

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

**Centro Interdisciplinario de Investigación para el
Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca**

**SÍNTESIS Y ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA SOBRE LA LÍNEA
CELULAR MCF-7 DE NUEVOS DERIVADOS TRIAZOLICOS DE
DIOSGENINA**

Tesis que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias

Presenta:

I.Q. Bethsabe Belem Villagómez González

Directo de tesis:

Dra. Delia Soto Castro



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca siendo las 10:00 horas del día 25 del mes de mayo del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR OAXACA para examinar la tesis titulada:

Síntesis y actividad antiproliferativa sobre la línea celular MCF-7 de nuevos derivados triazólicos de diosgenina

Presentada por el alumno:

Villagómez González
Apellido paterno Apellido materno
Nombre(s) Bethsabe Belem

Con registro:

A	1	6	0	2	4	6
---	---	---	---	---	---	---

Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISOR

Director(a) de tesis

Dra. Delia Soto Castro

Dra. Lucila Lagunéz Rivera

Dr. Prisciliano Felipe de Jesús
Cano Barrita

Dr. Francisco Castellanos León

M. en C. Frank Manuel León
Martínez

Dr. Miguel Chávez Gutiérrez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE
PROFESORES

Dr. Salvador Isidro Belmonte
Jiménez



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
IPN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca el día 14 del mes junio del año 2018, el (la) que suscribe Bethsabe Belem Villagómez González alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales con número de registro A160246, adscrito a Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Delia Soto Castro y cede los derechos del trabajo intitulado Síntesis y actividad antiproliferativa sobre la línea celular MCF-7 de nuevos derivados triazólicos de diosgenina, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección belem.villagomez@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Bethsabe Belem Villagómez González
Nombre y firma


CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.

AGRADECIMIENTOS

A la Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de los Recursos Naturales del CIIDIR Unidad Oaxaca del Instituto Politécnico Nacional por la formación académica y el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría con No. de becario: 502017.

Al programa de Apoyo complementario a mujeres indígenas becarias CONACyT 2016-1, 2017-02.

A la Secretaria de Investigación y Posgrado del IPN por la beca otorgada en el periodo Agosto-Diciembre de 2017 en el proyecto con clave 20170670.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por los proyectos 251504 y 264110, por los apoyos para el equipamiento y construcción del laboratorio de Biomacromoléculas.

Agradezco a:

Dra. Rosa Luisa Santillan Baca

Por dejarme realizar la síntesis de los fragmentos en el laboratorio 20 de Química Orgánica en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.

M.C. María Eugenia Ochoa Becerra

Por el apoyo en la adquisición de los espectros de RMN e FT-IR en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N de todas las muestras enviadas.

Cuéllar Rivera Geiser

Por el apoyo en la adquisición de las muestras de masas de alta resolución en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.

Dra. Delia Soto Castro

Por la dirección de la tesis.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biomacromoléculas de IPN Ciudad Oaxaca y en el laboratorio de Química Orgánica en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.

Dedicatoria

A mis padres y a mis hermanos que me apoyan y aman incondicionalmente.

A mis amigos que estuvieron en los momentos difíciles

A Franco que juntos podemos lograrlo todo.

CONTENIDO

RESUMEN	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCION	13
JUSTIFICACIÓN	14
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS	15
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos	15
MARCO TEÓRICO.....	16
5.1 Modelado de estructuras químicas	16
5.1.1 Reglas de Lipinski	16
5.2 Cáncer	17
5.2.1 Actividad tumoral	18
5.2.2 Cáncer de mama	18
5.2.4. Líneas celulares cancerígenas.....	20
5.3 Diosgenina	20
5.3.1 Fuentes	21
5.3.2 Estructura química.....	22
5.3.3 Beneficios a la salud	23
5.3.2.1 Efecto de la diosgenina sobre el Cáncer.....	25
5.3.3.1 Modificaciones estructurales en la diosgenina y su efecto en la citotoxicidad.....	26
5.3.3. Relación estructura actividad	28
MATERIALES Y MÉTODO	30
6.1 Instrumentación y Equipo	30
6.1.1 Espectrometría de Masas	30
6.1.2 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear	30
6.1.3 Espectroscopia de Infrarrojo.....	30
6.1.4 Purificación de Productos.....	30
6.1.5 Punto de Fusión.....	31
6.2 Reactivos y Disolventes.....	31
6.4 Metodología	31
6.4.1 Síntesis de la diosgenina modificada	31

6.4.2 Procedimiento de síntesis y caracterización espectroscópica	33
6.4.2.1 Metodología general de alquilación o adición de Michael	33
6.4.2.1.1 (metil 3-[(2-met-butoxicarbonil-ethyl)-(3-hidroxi-propil)-amino]- propionato) 2	33
6.4.2.1.2 ter-butil 3-[(2-tert-butoxicarbonil-etil)-(3-hidroxi-propil)-amino-propionato) 3	33
6.4.2.2 Metodología general de Yodación de grupo hidroxilo	34
6.4.2.2.1 (metil 3-[(2-met-butoxicarbonil-etil)-(3-iodo-propil)-amino]- propionato 4	34
6.4.2.2.2 (tert-Butil 3-[(2-tert-butoxicarbonil-etil)-(3-iodo-propil)-amino]- propionato) 5	35
6.4.2.3 Azidación de los fragmentos yodados	35
6.4.2.3.1 (metil 3-[(2-met-butoxicarbonil-etil)-(3-azido-propil)-amino]- propionato 6	36
6.4.2.3.2 (tert-Butil 3-[(2-tert-butoxicarbonil-etil)-(3-azido-propil)-amino]- propionato) 7	36
6.4.2.4 Ácido 4-oxo-4-(prop-2-in-1-iloxi) butanoico 8	37
6.4.2.5 Compuesto 9	38
6.4.2.6 Metodología general de formación de anillos triazolicos (reacción click)	39
6.4.2.6.1 Compuesto 10	39
6.4.2.6.2 Compuesto 11	40
6.4.2.7 <i>Compuesto 12</i>	41
6.4.2.8 <i>Compuesto 13</i>	42
6.4.3 Evaluación de la actividad biológica.....	42
6.4.3.1 Líneas celulares, cultivo y mantenimiento.	42
6.4.3.2 Preparación de stocks de compuestos.....	43
6.4.3.3 Tratamiento de las células con los compuestos.	43
6.4.3.4 Determinación de concentración celular respecto al control por Cristal Violeta.	
44	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
7.1 Análisis	45
7.1.1 COMPUESTO HIDROXILADOS.....	48
7.1.2 Compuestos iodados	50
7.1.5 Compuesto 9	54
7.1.6 Derivados triazolicos.....	56
7.1.7 Hidrólisis de 11	59

7.2 Pruebas de solubilidad.....	61
7.3 Evaluación de la actividad biológica	62
CONCLUSIONES	68
REFERENCIAS.....	69
ANEXOS	73

Abreviaturas usadas

TFA	Ácido tricloroacético
FT-IR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
HRMS ESI TOF	Masas de alta resolución - ionización por electrospray - tiempo de vuelo (High Resolution Mass Spectroscopy-Elctrospray Ionization-Time Of Flight)
NaN ₃	Azida de sodio
hFB	Fibroblastos humanos
ADMET	Absorción, distribución, metabolismo, excreción y Toxicidad
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RMN	Resonancia magnética nuclear
AcOET	Acetato de etilo
CaH ₂	Hidruro de Calcio
DMF	N, N-Dimetilformamida
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de metileno
TLC	Cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography)
CV	Cristal violeta
Ph ₃ P	Trifenilfosfina
NH ₄ OH	Hidróxido de amonio
Hex	Hexano
Na ₂ SO ₄	Sulfato de Sodio
KOH	Hidróxido de potasio
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
HCl	Ácido clorhídrico
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
MeOH	Metanol
AsNa	Ascorbato de Sodio
PhCO ₂ H	Ácido benzoico
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
Pf	Punto de fusión
DMSO	Dimetilsulfóxido
IC ₅₀	Índice de inhibición media
Log P	Coeficiente de partición
CaCo2	Adenocarcinoma de colón caucásico

RESUMEN

La diosgenina es una saponina esteroideal proveniente de leguminosas y tubérculos, la cual ha mostrado efectos anticancerígenos en varias líneas celulares cancerígenas, como es el caso de la MCF-7 (cáncer de mama). En este trabajo se establece una ruta de síntesis para la modificación estructural de la diosgenina con la incorporación de un fragmento hidrofílico, que modula su solubilidad y mejora su actividad citotóxica. La síntesis partió del 3-aminopropan-1-ol, sobre éste se realizó una adición de Michael con metilacrilato y con terbutilacrilato, para obtener los derivados **2** y **3**. El grupo focal OH se sustituyó por iodo (I) (compuestos **4**, **5**) y posteriormente a azida (N₃) (compuestos **6**, **7**). Por otro lado, se sintetizó el ácido 4-oxo-4-(prop-2-in-1-ilo) butanoico **8** mediante una reacción mecanoquímica, éste compuesto fue unido a la diosgenina mediante una esterificación de Steglich **9**. Una vez obtenidos los fragmentos **6**, **7** (grupo focal azida) y el compuesto **9** con alquino terminal, se realizó una reacción click para obtener derivados de diosgenina con un anillo triazólico (**10**, **11**). El derivado **11** (grupo terbutilo) fue hidrolizado en TFA para obtener un compuesto con terminales de ácido carboxílico **12**. Todos los compuestos fueron caracterizados por RMN de ¹H y ¹³C, así como por FT-IR, punto de fusión y masas de alta resolución HRMS ESI TOF. Con los derivados **10** y **12**, y la diosgenina, se realizaron ensayos de viabilidad celular mediante la técnica de CV a 48 horas de incubación en la línea celular cancerígena MCF-7 y en fibroblastos humanos hFB, como modelo de línea celular sana. Los resultados mostraron que el derivado **12** es dos veces más activo sobre MCF-7 que la diosgenina, con valores de IC₅₀ de 202.41±3.82 µM y 401.27±62.30µM, respectivamente. Con base a las propiedades ADMET el compuesto **12** podría ser un buen candidato para una administración vía intravenosa.

ABSTRACT

Diosgenin is a steroidal saponin from legumes and tubers, which has shown anticancer effects in several cancer cell lines, as is the case of MCF-7 (breast cancer). In this work, a synthesis route for the structural modification of diosgenin was established with the incorporation of a hydrophilic fragment, which modulates its solubility and improves its cytotoxic activity. The synthesis was started on 3-aminepropan-1-ol, over which Michael addition was carried out with methylacrylate and with tertbutylacrylate, to obtain derivatives **2** and **3**. The OH focal group was replaced by iodine (I) (compounds **4**, **5**) and subsequently to azide (N₃) (compounds **6**, **7**). On the other hand, 4-oxo-4-(prop-2-yn-1-yloxy) butanoic acid **8** was synthesized by means of a mechanochemical reaction, this compound was coupled to diosgenin by Steglich esterification **9**. A click reaction was performed between fragments **6**, **7** (azide focal group) and compound **9** with alkyne end group, to obtain diosgenin derivatives with a triazole ring (**10**, **11**). Derivative **11** (tertbutyl group) was hydrolyzed in TFA to obtain a compound with carboxylic acid terminals **12**. All compounds were characterized by ¹H and ¹³C NMR, as well as by FT-IR, high resolution mass spectrometry HRMS-ESI TOF and melting point. From derivatives **10** and **12**, and diosgenin, cell viability assays were performed using the CV assay at 48 hours of incubation in the MCF-7 cancer cell line and in human fibroblasts hFB, as a healthy cell line model. The results showed that derivative **12** is twice active on MCF-7 as diosgenin, with IC₅₀ values of 202.41 ± 3.82 μM and 401.27 ± 62.30 μM, respectively. Based on the ADMET properties, compound **12** could be a good candidate for intravenous administration.

INTRODUCCION

La herbolaría ha trascendido hasta hoy en día y numerosas plantas e infusiones sirven como base para la medicina moderna. En la actualidad las plantas han adquirido un gran interés científico debido a la medicina natural. Por ello se han realizado diversos estudios sobre éstas para conocer los compuestos que las constituyen, su estructura y propiedades; ya que, son la base para múltiples fármacos, entre los que destacan los de tipo: hormonal, sedantes, antiinflamatorios, diuréticos, entre otros.

Trabajos recientes indican que los productos naturales junto con otros compuestos derivados o inspirados en ellos forman parte de aproximadamente el 35-40% del total de medicamentos que se comercializan en la actualidad. En campos como el de los antibióticos y los agentes anticancerígenos, más del 75% de los fármacos son derivados de sustancias de origen natural (Labrada, 2012).

Dentro de los productos naturales, la diosgenina juega un papel muy importante ya que se ha demostrado su potencial en el tratamiento de enfermedades como cáncer, diabetes o cardiovasculares. Lo que representa una alternativa para los pacientes con algún tipo de enfermedad crónico-degenerativa; pudiendo tener acceso a un fármaco de origen natural capaz de disminuir los efectos secundarios que se presentan al suministrar algún medicamento alópata. Sin embargo, la diosgenina es prácticamente insoluble en medios fisiológicos, presenta baja absorción y un alto porcentaje que se absorbe es rápidamente metabolizado. (Manda et al., 2013)

En este estudio elucidamos a la diosgenina para mejorar la solubilidad y por ende sus propiedades de la diosgenina; en este trabajo se realizó un análisis teórico (Log P, permeabilidad en CaCo2, toxicidad oral aguda y toxicidad en ratas y peces) con el programa admetSAR de modelos de diosgenina modificada con fragmentos con diferentes grupos terminales. Las moléculas que resultaron con un menor Log P, mayor permeabilidad y menor citotoxicidad fueron seleccionados para llevar a cabo su síntesis. Después se realizaron pruebas de citotoxicidad con CV. Nuestros resultados demuestran que la solubilidad es importante ya que el compuesto 12 resulto tener mejor resultados que la Diosgenina.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer es la principal causa de muerte por enfermedad a escala mundial, se le atribuyen 8.2 millones de defunciones ocurridas en el 2012 (OMS, 2015) y se prevé que el número aumente en un 70% en las próximas 2 décadas (OMS, 2015). Más del 70% de las defunciones por cáncer se registraron en países de ingresos bajos y medianos, como México.

Ante estos números alarmantes existe una gran diversidad en tratamientos químicos contra el cáncer, muchos de éstos no son específicos en células cancerígenas y afectan otros órganos. Por lo que se ha desarrollado una intensa búsqueda tratando de encontrar alternativas con menores efectos secundarios, dando como resultado un alto número de nuevas propuestas, tal es el caso de la diosgenina (Raju & Rao, 2011), la cual ha mostrado tener efectos contra cáncer en varios órganos (Patel et al., 2012) e *in vitro* en líneas celulares como: cáncer de mama (Li et al., 2005), células mieloides en leucemia (Jiang et al., 2016) cáncer de colón (Raju et al., 2004); sin embargo, la Diosgenina, muestra un bajo nivel de absorción vía oral y una rápida metabolización vía intravenosa, lo cual la hace un producto de bajo rendimiento terapéutico. Por ello, se requiere modificar su estructura química para tener una alternativa que permita aumentar su solubilidad y mejorar sus propiedades.

HIPÓTESIS

El aumento en la hidrosolubilidad de la diosgenina mejorará su absorción y biodisponibilidad, por ende, potencializará su actividad biológica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Modificar la estructura de la diosgenina con la incorporación de un fragmento hidrofílico para modular su solubilidad y potenciar su actividad biológica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar fragmentos hidrofílicos con diferentes grupos funcionales.
2. Evaluar teóricamente la viabilidad de los fragmentos acoplados a la Diosgenina de acuerdo con las Reglas de Lipinsky y las propiedades ADMET (Administración, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad) mediante los programas MOLINSPIRATION y admetSAR.
3. Sintetizar los fragmentos que de acuerdo con sus características (Log P, permeabilidad y citotoxicidad) mejoren las propiedades de la diosgenina.
4. Acoplar el fragmento hidrofílico a la diosgenina a través de una reacción click.
5. Corroborar la obtención de los nuevos derivados de Diosgenina mediante técnicas espectroscópicas (FT-IR, MASAS, RMN).
6. Evaluar la actividad citotóxica *in vitro* en líneas celulares cancerígenas MCF-7 y fibroblastos humanos (hFB) como modelo de células sanas.

MARCO TEÓRICO

5.1 MODELADO DE ESTRUCTURAS QUÍMICAS

La simulación por computadora es una herramienta que nos permite hacer una predicción rápida de las propiedades físicas y químicas de las moléculas. Los diferentes paquetes que existen pueden estar fundamentadas en las leyes de la química clásica, la química cuántica o bien una mezcla de ambas. Además, específicamente hablando de las propiedades de moléculas con aplicaciones como fármacos, los softwares existentes suelen estar basados en el estudio de la relación estructura-actividad de miles de fármacos y compuestos bioactivos cuyo estudio se ha publicado en revistas de alto impacto, generándose así, mediante comparación la predicción de propiedades con un alto número de confiabilidad.

Las propiedades de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad juegan un papel muy importante en el descubrimiento y desarrollo de medicamentos, pesticidas, aditivos de comida y productos químicos. En la década pasada, muy pocos medicamentos entre cientos de candidatos salían al mercado debido a la cantidad de fallas que se tenía en la etapa clínica debido a que las propiedades ADMET no eran las adecuadas (Cheng et al., 2012), es aquí donde comienza la búsqueda de programas que pudieran predecir con facilidad dichas propiedades de los compuestos.

El programa admetSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar1/predict/>), nos permite determinar propiedades tales como solubilidad del agua, absorción intestinal humana, viabilidad oral, transporte, toxicidad..., etc. La forma en que funciona el programa es introducir la estructura deseada, que dará como resultado las propiedades ADMET de ésta, todo esto se logra gracias a la comparación que se realiza de dicha estructura con la base de datos del programa.

5.1.1 REGLAS DE LIPINSKI

Son usadas como primer paso para realizar una exploración virtual y eliminar rápidamente candidatos que no tienen las propiedades fisicoquímicas adecuadas para una buena viabilidad oral. Han sido adoptadas en los últimos años por la industria farmacéutica para determinar un rápido perfil de los productos terapéuticos

administrados oralmente que se transportan lentamente al sitio de acción (Bhal, Kassam, Peirson, & Pearl, 2007); Usualmente nos ofrece una buena estimación con respecto a la permeabilidad y solubilidad *in vivo* (Lipinski, Lombardo, Dominy, & Feeney, 1997), las cuales son propiedades muy importantes para la absorción.

Las reglas son:

1. No más de 5 enlaces de hidrógenos donadores (átomos de oxígeno o nitrógeno con uno o más átomos de hidrógeno).
2. No más de 10 enlaces de hidrógeno aceptores (átomos de oxígeno o nitrógeno).
3. Masa molecular menor a 500 Da.
4. Un coeficiente de partición de octanol-agua de log P no mayor a 5.
5. No más de una violación.

La violación de más de 1 de estas reglas ha mostrado pobres propiedades farmacológicas para la administración oral (Bhal et al., 2007) (<http://www.molinspiration.com/>).

5.2 CÁNCER

El cáncer es un término genérico para un gran grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del cuerpo. Se caracteriza por un crecimiento rápido de células anormales que crecen más allá de su límite usual, el cual puede invadir partes adyacentes del cuerpo y esparcirse a otros órganos, este proceso se denomina metástasis. La metástasis es la mayor causa de muerte por cáncer (OMS, 2015).

Desde el siglo pasado, el cáncer es considerado una enfermedad común que paulatinamente se convirtió en un problema importante de salud pública a nivel mundial. Además de ocasionar una gran pérdida de vidas humanas cada año, es responsable de enormes cargas económicas, sociales y emocionales. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) refieren al cáncer como la primera causa de muerte en el mundo (Ríos, Rivera, Cervantes, & Martínez, 2012), se le atribuyen 8.2 millones de defunciones ocurridas en 2012 (OMS, 2015). Entre los principales

tipos de cáncer se encuentran: pulmonar (1.59 millones de defunciones); hepático (745 000 defunciones); gástrico (723 000 defunciones); colón rectal (694 000 defunciones); mama (521 000 defunciones); esofágico (400 000 defunciones), cervicouterino (266 000 defunciones).

5.2.1 ACTIVIDAD TUMORAL

El cáncer se forma a partir de una sola célula. La transformación de una célula normal a células tumorales, es un proceso de varias etapas, suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estos cambios son el resultado de interacciones entre los factores genéticos de una persona y 3 categorías (OMS, 2015) de agentes externos:

- Carcinógenos físicos: como las radiaciones ultravioletas e ionizantes.
- Carcinógenos químicos: como los asbestos, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) o el arsénico (contaminante del agua de bebida).
- Carcinógenos biológicos: como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos.

Entre los factores que determinan el desarrollo del cáncer se encuentran:

1. La edad ya que el mecanismo de reparación celular es menos efectivo en una persona adulta (OMS, 2015).
2. Uso de tabaco, alcohol, dieta no saludable e inactividad física.
3. Infecciones crónicas teniendo más relevancia en países tercermundistas. Como: virus de hepatitis B (HBV), virus de hepatitis C (HCV) y algunos tipos del virus del papiloma humano (HPV) incrementan el riesgo de cáncer en hígado y cervical respectivamente. Infecciones con VIH incrementan el riesgo de cáncer cervical.

5.2.2 CÁNCER DE MAMA

Existen al menos 200 tipos de cáncer que los humanos pueden padecer. El cáncer puede surgir en cualquiera de los 60 órganos que tiene el cuerpo humano, pero cada tipo de cáncer es único, ya que no necesariamente es definido por el órgano que afecta, sino más bien por el tipo de célula del tejido en cuestión.

El cáncer de mama es un crecimiento anormal de los tejidos del pecho. El tipo de tumor más frecuente se da en las glándulas productoras de leche. El cáncer de mama tiene una etiología compleja que incluye factores genéticos, biológicos, conductuales, ambientales y sociales. Se clasifica en 3 categorías: *histopatológico*, se extienden a tejidos circundantes de la mama, *biológico*, se encuentran localizados únicamente en el tejido mamario, y *molecular*. La clasificación histopatológica se subdivide a su vez en cáncer invasivo y no invasivo. La clasificación biológica es la expresión de los receptores hormonales (tales como estrógeno y progesterona). Los subtipos moleculares principales son tipo luminal (el subtipo A y B), HER2 amplificado y basal, todos éstos tienen un distintivo biológico y fisiológico (McLaren & Ng, 2014).

Las lesiones de la mama tienen un marcado predominio femenino. La estructura más compleja de la mama femenina, el volumen y la extrema sensibilidad a las influencias endócrinas predisponen a este órgano a cierto número de enfermedades. Los tumores constituyen la lesión más importante, aunque no la más común de la mama femenina. En la mama femenina pueden aparecer una gran variedad de tumores. Estos tumores pueden abarcar todo el espectro de las neoplasias que pueden brotar del epitelio escamoso estratificado, estructuras glandulares y tejido conectivo mesenquimal. Algunos de los tumores son los papilomas cutáneos, carcinomas epidermoides de la piel, adenomas, papilomas de los conductos, carcinomas de origen en los conductos glandulares, y prácticamente cualquier variedad de tumor mesenquimatoso benigno o maligno como fibroma y fibrosarcoma, tumor de células granulares, condrosarcoma, lipoma y liposarcoma, sarcoma osteogénico, angioma y angiosarcoma. (SSA, 2011). Así, al no haber una causa única, se hace fundamental la prevención mediante conductas y hábitos que han mostrado tener un efecto protector como dar leche materna, realizar ejercicio, llevar una dieta baja en grasas y alta en frutas y verduras y no consumir tabaco ni alcohol, acciones que deben realizarse junto con otras que promuevan la detección temprana de tumores en las mamas como son la autoexploración y el cribado (INEGI, 2015).

5.2.4. LÍNEAS CELULARES CANCERÍGENAS

Las líneas celulares son un grupo de células individuales que son idénticas genéticamente a una sola célula progenitora como resultado de divisiones mitóticas, existe dos tipos principales:

1. Continua, las que son de un solo tipo de célula, diploide de aproximadamente 50 generaciones.
2. Continua establecida, es un tipo celular, aneuploide teóricamente de infinitas generaciones (Pina & López, 2015)

Estas líneas celulares surgen de un cultivo primario el cual proviene de un órgano o tejido que presente células cancerígenas, conservando con ello el cariotipo característico del organismo que dio origen (Pina & López, 2015).

La línea celular de cáncer de mama MCF-7 fue derivada de una corte preural tomado de una paciente con metástasis de cáncer de mama de 69 años de edad; 2 años después la muestra fue estudiada en un laboratorio la cual mostraba tener diferente línea celular, la cual marcaba 88 cromosomas presentando receptores en los estrógenos y por ende tiene una respuesta proliferativa a los estrógenos. A partir de este punto mostro tener un gran potencial, dando como resultado ser un buen modelo *in vitro* para el estudio de los mecanismos tumorales.

5.3 DIOSGENINA

La diosgenina es una saponina esteroideal encontrada generalmente en las plantas, de las familias: *Dioscorea*, *Costus* y *Trigonella*. Es un compuesto esteroideal proveniente del metabolismo secundario, mostrando importancia en funciones biológicas de plantas y animales, actuando como regulador en el desarrollo y procesos fisiológicos en animales. También es utilizada en la síntesis de nuevas drogas hormonales (Li et al., 2005) con poder antiinflamatorio, entre las que destacan la prednisolona, la hidrocortisona, la cortisona y al prednisona (figura 1).

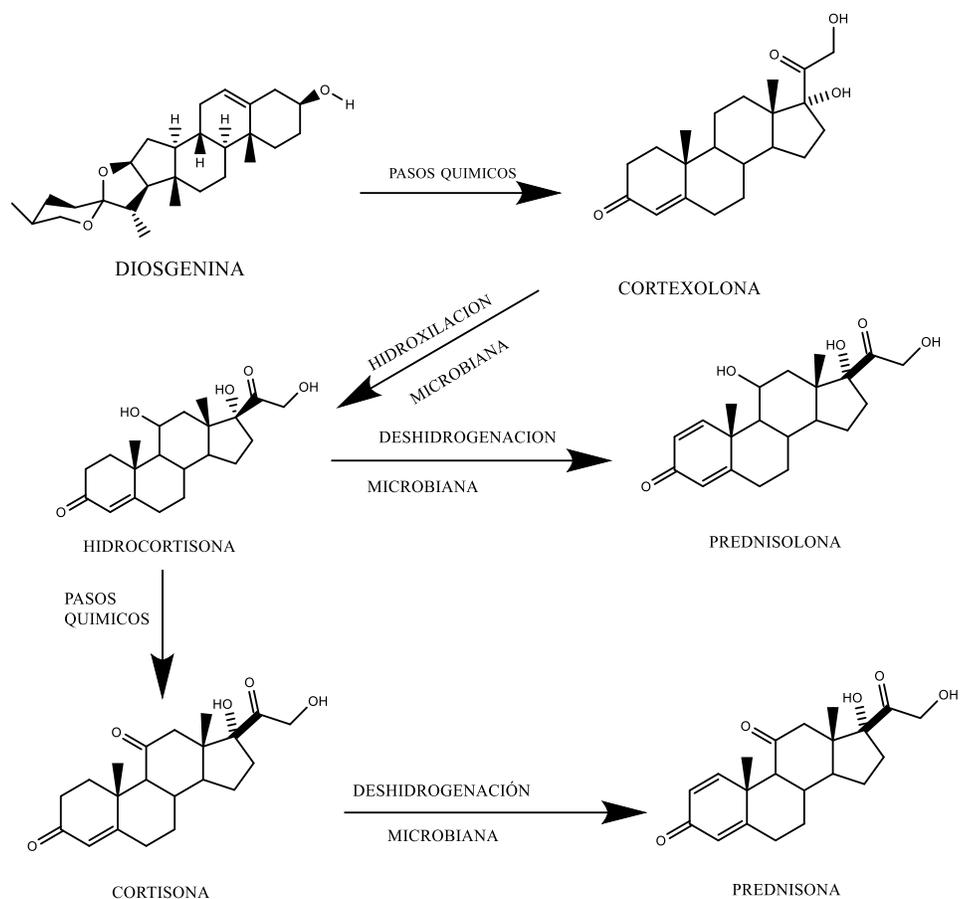


Figura 1. Obtención de hormonas a partir de diosgenina

5.3.1 FUENTES

La diosgenina se encuentra en forma natural en una gran variedad de plantas entre las que se puede mencionar magueyes (género agave), izotes (género yuca), samandoca (*samuke carnerosana*), en muchas plantas de la familia *Costus speciosus*, 1-3% peso (Bajaj, 1999), *Trigonella* de 1-2 % peso (Nagata & Ebizuca, 2002) y muchas especies de *Dioscorea*, 13% peso (Bajaj, 1999), las especies primordiales son *D. floribunda*, *D. composita* y *D. spiculifera*, *D. deltoidea*, *D. nipponica* y *D. zingiberensis* (Tomlinson & Akerele, 2015, S. Mirunalini, 2011). Sin embargo, su principal fuente de obtención es el barbasco mexicano (*dioscórrea composita hemsf*) (Bonilla, 1985).

5.3.2 ESTRUCTURA QUÍMICA

Recientemente se descubrió que muchos metabolitos secundarios tienen importantes funciones ecológicas en las plantas, dentro de las cuales destacan la protección vegetal, la atracción de agentes polinizadores y mimetizadores (Taiz & Zeiger, 2006).

Las saponinas son un grupo de metabolitos secundarios que tienen una amplia distribución en plantas y en algunos organismos marinos. El nombre saponina proviene de la palabra en Latín *sapo* (*soap* en inglés) y hace alusión a las propiedades detergentes de esta familia de compuestos y a su capacidad para formar espumas estables al agitar sus disoluciones acuosas. El comportamiento en agua se explica por su naturaleza anfifílica, resultado de la combinación de elementos hidrofóbicos e hidrofílicos en la misma estructura (Labrada, 2012). Son heterósidos que constan de una parte glucídica (con uno o más azúcares) hidrofílica y de una aglicona (parte no glucídica) hidrofóbica (figura 2). Las Saponinas se clasifican en 2 grupos según sea la naturaleza de la aglicona (figura 4); esteroides neutros (diosgenina) y triterpénicos ácidos (Ac. Oleanólico) (López Luengo, 2001)

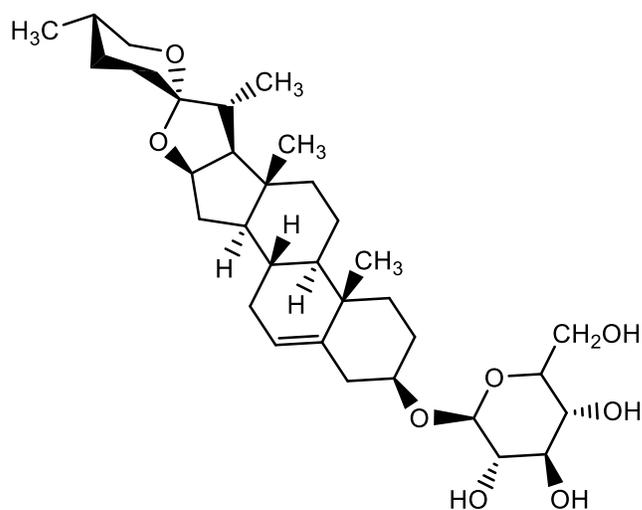


Figura 2 Estructura química de un diosgenina O-glucosídica

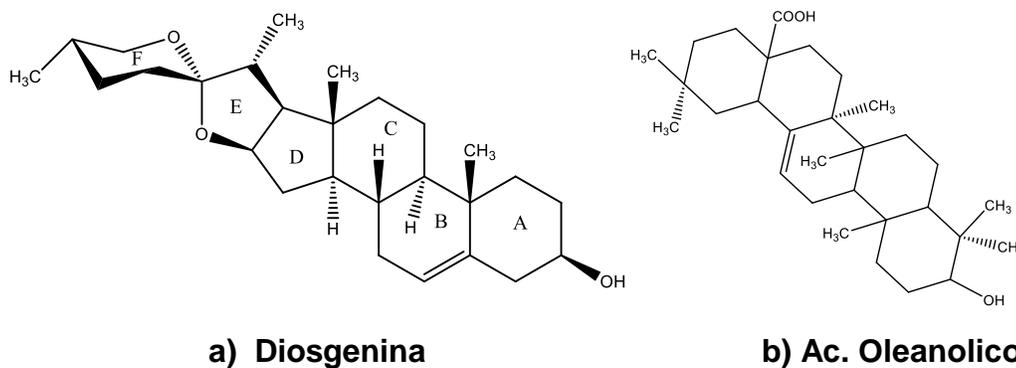


Figura 3 Estructura química de saponinas

La diosgenina es una saponina esteroidal que deriva de un esqueleto hexacíclico de 27 átomos de carbono, que es el núcleo espiroetano (López Luengo, 2001) con una cadena lateral espiroacetálica unida en los carbonos 16 y 17 del esteroide con un doble enlace entre los carbonos 5- 6 y con un grupo hidroxilo en la tercera posición (Deshpande & Bhalsing). La cadena espiroacetálica consiste en un anillo de cinco miembros (E) y otro de seis (F), ambos heterocíclicos. Los compuestos que presentan el anillo F (Figura 3) abierto se conocen como furostanos. (Bonilla, 1985)

5.3.3 BENEFICIOS A LA SALUD

La diosgenina actúa como un intermediario inicial para la síntesis de esteroides y anticonceptivos. Aunque, es también usada como un medicamento para el tratamiento de enfermedades como leucemia, hipercolesterol, síndrome de climaterio y cáncer de colon a nivel experimental; también ha sido probada para el uso en el mantenimiento de los niveles de colesterol en la sangre, con la producción de dehidroepiandrosterona (DHEA). El suministro sostenido de diosgenina ha mostrado capacidad de prevenir significativamente la pérdida de huesos. Se ha encontrado que tiene un perfil farmacológico muy impresionante y puede ser usado como un medicamento alternativo para tratar diversos desordenes (tabla 1) entre los que destacan: estrés oxidativo, reproducción y quimioterapia de cáncer; aunque sus efectos específicos nos dan un gran valor para futuros tratamientos e investigaciones (Patel, Gadewar, Tahilyani, & Patel, 2012). En la Figura 4, se resumen los efectos de la diosgenina en diferentes sistemas (Patel et al., 2012).

Tabla 1. Beneficios de la diosgenina

Beneficio	Resultados
Contra microorganismos	Se mostró una actividad débil antimicrobiana contra <i>Cándida albicans</i> , <i>C.albicans</i> , <i>C. glabrata</i> .
Virus	Virus de la hepatitis C, donde los niveles del RNA viral y las proteínas virales disminuyeron significativamente inflamaciones.
Enfermedades cardiovasculares	Se ha demostrado que pueden disminuir los niveles de colesterol total (CT) en plasma total, y LDL (lipoproteínas de baja densidad), incrementando el radio de HDL (lipoproteínas de alta densidad) suprimiendo el colesterol absorbido e incrementando el colesterol secretado.
Desordenes en la sangre	Se investigaron los efectos anti-tromboticos, donde se logró la inhibición de agregados plaquetarios, la trombosis y la activación prolongada de tiempo de tromboplastina parcial (ATPP), tiempo de protombina (PT) y tiempo de trombina (TT), de una manera dependiente. El tiempo de sangrado y de coagulación se prolongó lo que indica que tiene actividad anti-trombotica.
Glucosa en sangre	El suplemento de diosgenina disminuyo notablemente la actividad de la lactasa y maltasa comparada con un control de diabéticos. Así mismo decreció significativamente la actividad de la transaminasa comparada contra un control normal y diabético. Demostrando propiedades hipoglicemias las cuales son benéficas para la diabetes.
Sistema inmune	Efectos supresivos de la diosgenina sobre el alérgeno-inducido Th2 intestinal, respondió a un aumento en la regulación de las células T del sistema inmune en sitio inflamado.

Además de las actividades que se describen en la tabla 1, se pueden observar otras actividades citadas por (Kim & Park, 2018).

Un número limitado de experimentos nos han llevado al entendimiento de la eficacia preclínica de la diosgenina como un agente quimiopreventivo/terapéutico contra el cáncer de varios órganos. El estudio utilizando modelos *in vitro* sugieren que la diosgenina suprime el crecimiento de las células cancerígenas asociadas con la proliferación, diferenciación, apoptosis, inflamación y oncogénesis (Raju & Rao, 2011).

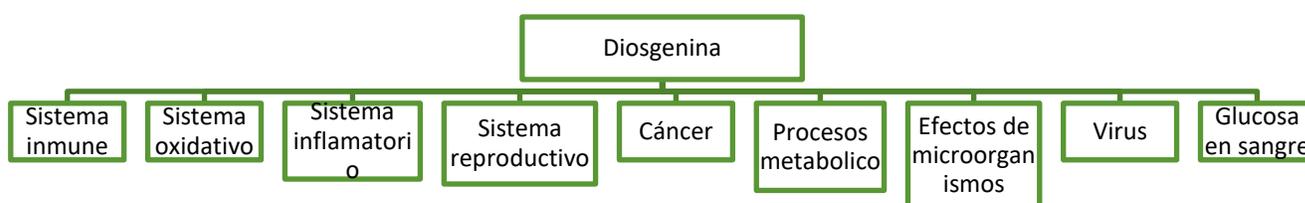


Figura 4. Efectos benéficos de la diosgenina

5.3.2.1 EFECTO DE LA DIOSGENINA SOBRE EL CÁNCER

El crecimiento de las células y el efecto de algunos medicamentos sobre éstas, pueden ser evaluadas por métodos tradicionales como la morfología, los métodos de observación o por tecnología biomédica. Al ser un metabolito secundario, esta, muestra muchas funciones biológicas en plantas y animales, actuando como un regulador en el desarrollo y procesos fisiológicos en el sistema de los animales (Li et al., 2005). Se han realizado algunos reportes sobre las acciones que tiene la diosgenina sobre el cáncer (tabla 2).

Tabla 2. Estudios de la diosgenina en cáncer

Autor	Estudio
(Corbiere, Liagre, Terro, & Beneytout, 2004)	Efecto anti proliferativo por diosgenina a través de la activación de p53, emitido mediante apoptosis inducida y modulación de la actividad de la caspasas-3 en diferentes células de cáncer en humanos.
(Li et al., 2005)	Estudio electroquímico de cáncer de mama, células MCF-7, y evaluación de los efectos de la diosgenina.
(Liu, Wang, Ju, Wong, & Wu, 2005)	Diosgenina induce el paro del ciclo de la célula y apoptosis en células K562 de leucemia, con la ruptura de la homeostasis del Ca ²⁺ .
(Raju, Patlolla, Swamy, & Rao, 2004)	Inhibición de la formación de focos inducidas por azoximetano en ratas F344 e induce apoptosis en células de cáncer de colón HT-29.
(Selim & Al Jaouni, 2015)	Efectos anticancerígenos y apoptoticos sobre la proliferación celular de diosgenina aislada de <i>Costus Speciosus</i> .

5.3.3.1 MODIFICACIONES ESTRUCTURALES EN LA DIOSGENINA Y SU EFECTO EN LA CITOTOXICIDAD

Debido a la alta actividad como anticancerígeno que presenta la diosgenina, se han realizado diferentes estudios para modificarla estructuralmente, con el objetivo de incrementar su actividad y/o modular su balance hidrófilo/hidrófobo y con ello mejorar sus propiedades ADMET. En la tabla 3 se muestran algunos de los estudios más recientes.

Tabla 3. Estudios sobre la modificación de la diosgenina

Autor	Modificación	Efecto
(Kaskiw et al., 2009)	Acoplamiento de diferentes grupos en el hidroxilo de la posición 3 de la diosgenina. 2-amino-2-deoxi-β-D-glucopiranosil y/o α-L-rhamno-piranosil-(1→4)-2-amino-2-deoxi-β-D-glucopiranosil.	Síntesis de análogos estructurales de diosgenina: para evaluar su actividad en células cancerígenas MCF-7 y HeLa. Como resultado los análogos con disacáridos son menos activos que los monosacáridos y en general la actividad decrece.
(Soto-castro et al., 2017)	Síntesis del (25R)-6β-penilami-nospirostan-3β, 5α-diol.	Síntesis de agente antiproliferativos en células cancerígenas MCF-7, mostrando como resultado actividad antiproliferativa utilizando los métodos de MTT y CV.
(Masood et al., 2017)	Acoplamiento de diferentes análogos triazólicos en la posición 3 del hidroxilo.	Síntesis de análogos de diosgenina para evaluar su actividad cancerígena en líneas celulares de mama, colon e hígado las cuales mostraron tener muy buena actividad utilizando MTT.
(Singh et al, 2014)	Síntesis de análogos mediante la apertura del anillo espiroacetálico.	Síntesis de análogos para examinar la respuesta inflamatoria, los cuales resultaron idóneos como candidatos para el tratamiento inflamatorio.
(Hamid et al, 2017)	Síntesis de análogos de diosgenina, modificada en el C-7.	6 de los análogos mostraron actividad citotóxica contra cáncer de próstata, siendo el compuesto 16 el que mejor resultados arrojó considerándose un buen candidato para posibles mejoras.

5.3.3. RELACIÓN ESTRUCTURA ACTIVIDAD

Las hormonas esteroidales afectan el metabolismo de las células blancas. Para poder ejercer su efecto, penetran la célula y se asocian en el citoplasma con un receptor específico, formando un complejo hormona-receptor que migra al núcleo celular, donde interacciona con el DNA de una manera específica e induce la transcripción de ciertos genes involucrados directamente en su acción en la célula blanca. De esta manera, el complejo hormona-receptor actúa como un inductor que se une a un represor de ciertos genes o a una región específica en el cromosoma adecuado (Bonilla, 1985).

En los últimos diez años se han publicado varios trabajos relacionados con el aislamiento de saponinas esteroidales de numerosas especies de plantas. Además, se reporta la evaluación de la actividad citotóxica de los nuevos compuestos frente a diversas líneas de células cancerígenas para poder comprobar su eficacia.

Usando modelado molecular para determinar la relación de las características estructurales necesarias en la diosgenina para la obtención de un efecto sobre la velocidad de proliferación, su distribución y apoptosis se encontró que la conformación espacial y la capacidad de transferir electrones son factores determinantes. Dichos estudios mostraron que la actividad anticancerígena está relacionada con el doble enlace en la posición 5-6 de la diosgenina. Aunque la conformación estructural de los carbonos 5 y 25 también mostró ser importante para su actividad biológica (Raju & Rao, 2011). La estructura espirostánica del aglicón es importante para la actividad citotóxica de las saponinas esteroidales comparada con la saponina furostánica (Labrada, 2012).

Muchas clases de esteroides exhiben propiedades antitumorales con uniones a receptores y al ADN. Las hormonas esteroidales han demostrado tener propiedades contra neoplasias de colon, mama y otras líneas celulares. Los dímeros esteroidales han sido utilizados para la catálisis de muchos tipos de reacciones, especialmente para el área de farmacología por ejemplo la cefalostatina es el dímero más poderoso anticancerígeno que ha sido probado, es por ello el interés en la síntesis de nuevos

compuestos y sus análogos como potenciales agentes antitumorales (Shawakfeh et al., 2008).

A finales del siglo pasado se reportaron algunos compuestos naturales glicosilados con 100 veces mayor actividad anticancerígena que el Taxol (Wang et al., 2012). En su mayoría las moléculas naturales y sus análogos muestran una actividad anti-inflamatoria, algunos de estos son establecidos como agentes clínicos para enfermedades crónicas. Los componentes de las plantas son un factor significativo en el desarrollo de antiinflamatorios en la industria farmacéutica, los cuales sirven como buenas fuentes para futuras modificaciones.

MATERIALES Y MÉTODO

6.1 INSTRUMENTACIÓN Y EQUIPO

6.1.1 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Los espectros de masas de alta resolución (HRMS, High Resolution Mass Spectroscopy) fueron adquiridos por la técnica de ESI-TOF (Electrospray Ionization Time-Of-Flight) en un espectrómetro Agilent Technologies MS TOF. Los datos se expresaron como relación m/z de los fragmentos correspondientes. El ión molecular se designó como $[M^+H]$.

6.1.2 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La adquisición de los espectros de 1H y ^{13}C se realizaron en un equipo JEOL ECA+ 500(MHz) y en un equipo BRUKER 400(MHz), respectivamente, utilizando el disolvente deuterado pertinente. Los desplazamientos químicos (δ) están dados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) están expresadas en Hertz (Hz). Para la asignación de las señales se utilizan las siguientes abreviaturas: s= señal simple, d= señal doble, dd= señal doble de dobles, t= señal triple, m= señal múltiple.

6.1.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

Los espectros de infrarrojo se determinaron en un equipo Varian 600-IR por medio de la técnica Reflectancia Total Atenuada (ATR) en un rango de 600- 3800 cm^{-1} . Los datos se expresan en números de onda ν (cm^{-1}) para los principales máximos de absorción.

6.1.4 PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS

En función del tipo de compuesto y el grado de impurezas, el método de purificación se desarrolló en etapas de cristalización simple, precipitación y/o columnas cromatográficas de sílice, las cuales, nos ayudaron a fraccionar el extracto obtenido. En las columnas el orden de elución empleado fue de polaridad creciente, iniciando con hexano (hex) e incrementando con proporciones de acetato de etilo (AcOEt) o metanol dependiendo de la polaridad de los fragmentos.

6.1.5 PUNTO DE FUSIÓN

El punto de fusión se determinó en un equipo Electrothermal 9100 y se reporta sin corrección.

6.2 REACTIVOS Y DISOLVENTES

Tanto los reactivos como los disolventes se obtuvieron de fuentes comerciales como Sigma-Aldrich Corporation y FERMONT. Los disolventes se usaron sin previa purificación, salvo que se indique lo contrario. La DMF se secó con CaH_2 (hidruro de calcio) (5% w/v) durante una noche, se filtró y se destiló a presión reducida para su uso. El CH_2Cl_2 fue secado mediante la destilación sobre CaH_2 . La diosgenina de grado puro fue donada por la Dra. Rosa Luisa Santillan Baca.

6.4 METODOLOGÍA

6.4.1 SÍNTESIS DE LA DIOSGENINA MODIFICADA

La metodología para realizar la modificación estructural de la diosgenina se resume en el diagrama de flujo presentado en la figura 5.

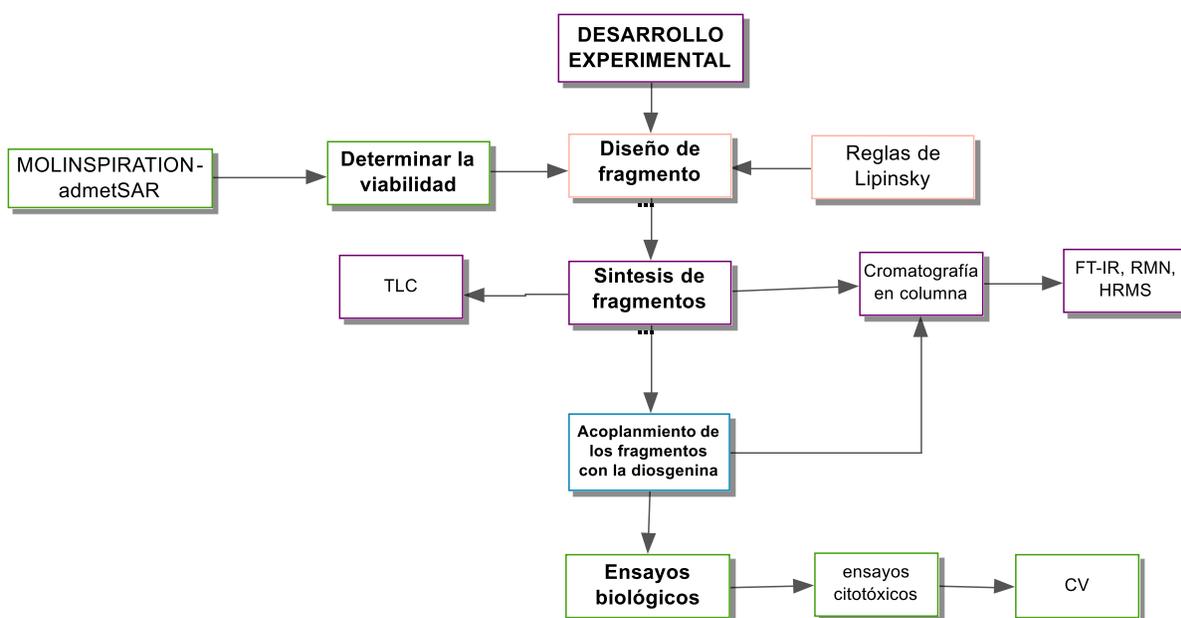
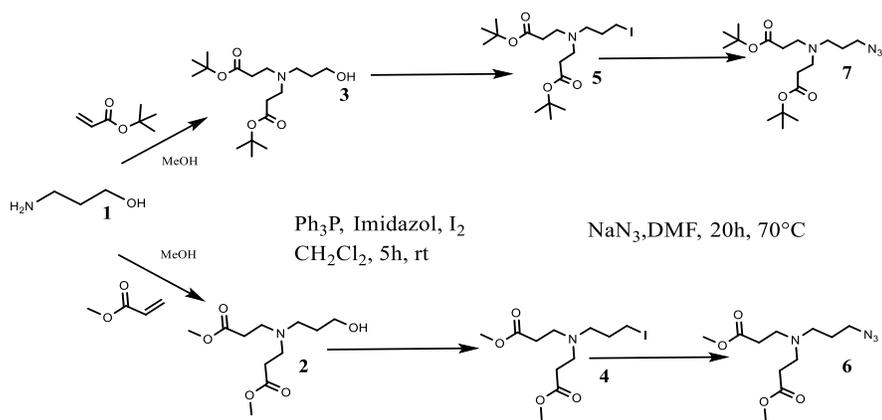


Figura 5. Diagrama de flujo del método empleado en la investigación

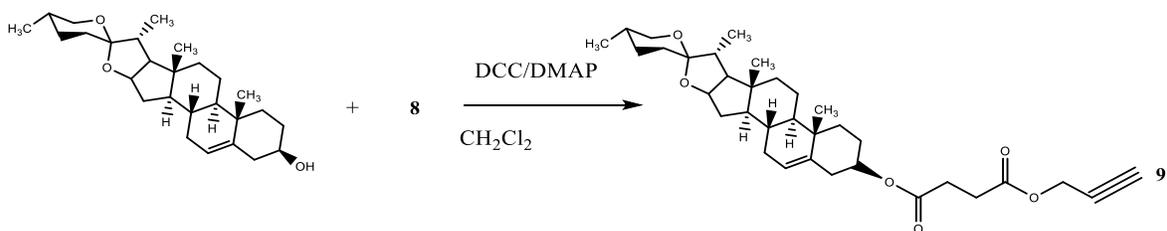
Síntesis fragmentos derivados del 3 amino propanol



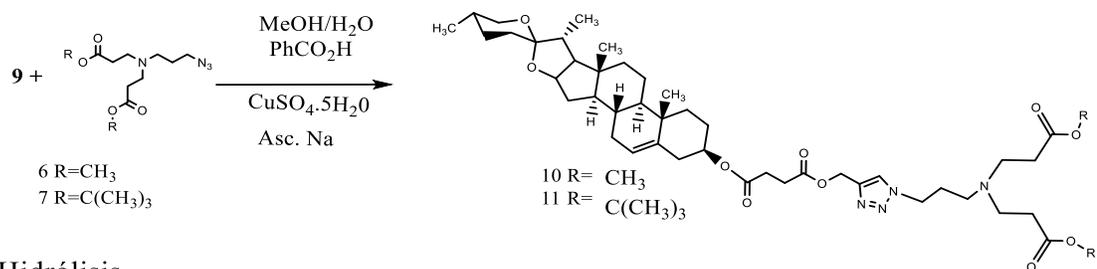
ácido 4-oxo-4-(prop-2-in-1-iloxy) butanoico



Esterificación de Diosgenina



Reacción click



Hidrólisis

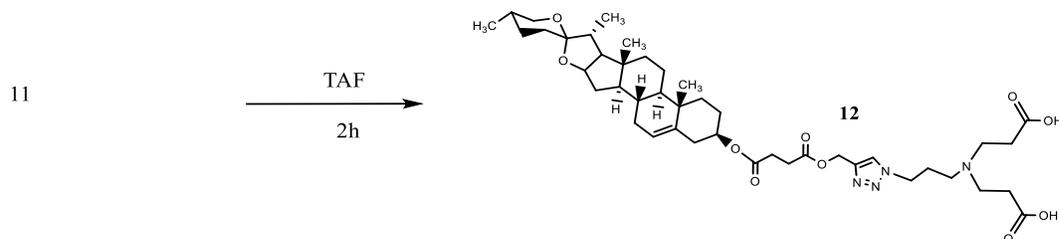


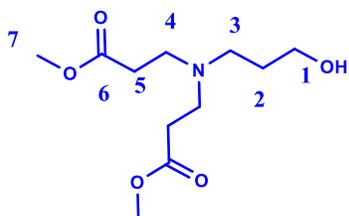
Figura 6. Ruta de síntesis de nuevos derivados de diosgenina

6.4.2 PROCEDIMIENTO DE SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCOPICA

6.4.2.1 METODOLOGÍA GENERAL DE ALQUILACIÓN O ADICIÓN DE MICHAEL

En un matraz de bola de 50 mL provisto con un agitador magnético, purgado con atmosfera de Argón (Ar) y manteniéndolo en oscuridad, se disolvieron 40 mmol de 3-aminopropan-1-ol **1** diluido en 30 mL de metanol. La disolución se dejó bajo agitación y se agregaron 80 mmol del acrilato correspondiente. La mezcla se mantuvo en agitación por 24h. Una vez concluida la reacción el disolvente y el acrilato remanente se removieron a vacío.

6.4.2.1.1 (METIL 3-[(2-MET-BUTOXICARBONIL-ETHIL)-(3-HIDROXI-PROPIL)-AMINO]-PROPIONATO) **2**



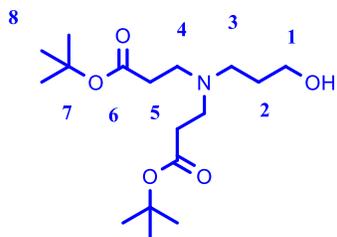
De acuerdo con el método general reaccionaron 5.010 g (66.6 mmol) de 3-aminopropan-1-ol disueltos en 50 mL de metanol y 14.5 mL (159.71 mmol) de acrilato de metilo durante 24 h. Obteniendo un 99% de rendimiento, 16.29

g.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.69 (t, 2H, *J* = 5.3 Hz, H-1), 3.66 (s, 6H, H-7) 2.76 (t, 4H, *J* = 7.1 Hz, H-4), 2.60 (t, 2H, *J* = 5.9 Hz, H-3), 2.48 (t, 4H, *J* = 7.1 Hz, H-5), 1.66 (td, 2H, *J* = 6.0, 5.0 Hz, H-2).

FT-IR (cm⁻¹): 3431(OH, st), 2952, 2940, 2830 (C-H aliph, st), 1734.16 (C=O, st).

6.4.2.1.2 TER-BUTIL 3-[(2-TERT-BUTOXICARBONIL-ETIL)-(3-HIDROXI-PROPIL)-AMINO]-PROPIONATO) **3**



De acuerdo con el método general reaccionaron 3.010 g (39.9mmol) de 3-aminopropan-1-ol en 30 mL de metanol y 12.3 mL (95.9 mmol) de acrilato de terbutilo durante 24 h. Obteniendo un 99% de rendimiento, 13.09 g.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 3.72 (t, 2H, *J*=5.6 Hz, H-1), 2.73 (t, 4H, *J*=7.3 Hz, H-4), 2.61 (t, 2H, *J*=5.6 Hz, H-3) 2.38 (t, 4H, *J*= 7.3 Hz, H-5), 1.67 (td, 2H, *J*=10.7, 5.6 Hz, H-2), 1.43 (s, 18H, H-8).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 171.8 (C6), 80.7 (C7) 63.2 (C1), 53.0 (C3), 49.4 (C4), 33.3 (C5), 28.4 (C2) y 28.1 (C8).

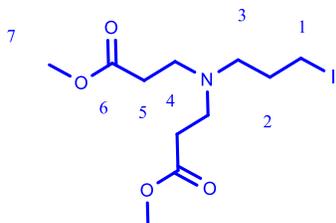
HR-ESI-TOF (m/z): Calculado para C₁₇H₃₃N₁O₅+H⁺ 332.2432; encontrado 332.2438.

FT-IR (cm⁻¹): 3442 (OH, st), 2976, 2933, 2825 (C-H, st), 1724 (C=O, st).

6.4.2.2 METODOLOGÍA GENERAL DE YODACIÓN DE GRUPO HIDROXILO

En un matraz de bola de 150 mL provisto con un agitador magnético, bajo atmosfera inerte, se agregaron en el siguiente orden: 4 mL de CH₂Cl₂ seco, trifenilfosfina (Ph₃P) (1.50 mmol), imidazol (1.50 mmol) y después de 5 min iodo (1.5 mmol). Finalmente, el fragmento con punto focal hidroxilo (1 mmol) se diluyó en 1 mL de CH₂Cl₂ seco y se agregó a la mezcla de reacción. La reacción se mantuvo en agitación por 1 h. El producto se purificó en una columna flash con polaridad ascendente, Hexano-AcOEt y 1% de NH₄⁺OH.

6.4.2.2.1 (METIL 3-[(2-MET-BUTOXICARBONIL-ETIL)-(3-IODO-PROPIL)-AMINO]-PROPIONATO 4



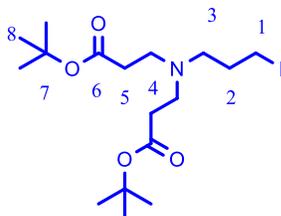
De acuerdo con el método general reaccionaron en 20 mL de CH₂Cl₂ seco: 1.572 g (6 mmol) de Ph₃P, 0.408 g (6 mmol) de imidazol y 1.524 g (6 mmol) de iodo hasta su completa disolución. Se agregó 0.988 g (4 mmol) del compuesto **2** previamente disuelto en 4 mL de CH₂Cl₂ seco. Se mantuvo en agitación por 3 h. Se filtró para quitar el sólido precipitado (óxido de trifenilfosfina) y se purificó por columna hasta una polaridad de 40Hex:60AcOEt. Obteniendo un 70% de rendimiento, 1.0 g.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 3.66 (s, 6H, H-7); 3.18 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz, H-1); 2.73 (t, 4H, *J* = 6.9 Hz, H-4), 2.48 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz, H-3), 2.44 (t, 4H, *J* = 6.9 Hz, H-5), 1.90 (m, 2H, *J* = 6.5 Hz, H-2),

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 173.0 (C6) 53.6 (C3), 51.6 (C7), 49.4 (C4), 32.7 (C5), 31.0 (C2) y 5.1 (C1),

HR-ESI-TOF (m/z): Calculado para C₁₁H₂₁N₁O₄I₁+H⁺ 358.0509; encontrado 358.0510.

6.4.2.2 (TERT-BUTIL 3-[(2-TERT-BUTOXICARBONIL-ETIL)-(3-IODO-PROPIL)-AMINO]- PROPIONATO) 5



De acuerdo con el método general reaccionaron en 52 mL de CH₂Cl₂ seco: 4.716 g (18 mmol) de Ph₃P, 1.224 g (18 mmol) de imidazol y 4.572 g (18 mmol) de iodo hasta su completa disolución. Se agregó 3.972 g (12 mmol) del compuesto **3** disuelto en 10 mL de CH₂Cl₂ seco. Se agitó por 3 horas. Se filtró para quitar el sólido precipitado (óxido de trifenilfosfina) y se purificó por columna hasta una polaridad de 80Hex:20AcOEt. Obteniendo un 70% de rendimiento, 3.70 g.

FT-IR (cm⁻¹): 2975, 2930, 2817 (C-H aliph, st), 1724 (C=O, st);

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 3.20 (t, 2H, J= 6.7 Hz, H-1), 2.68 (t, 4H, J=7.1 Hz, H-4), 2.47 (t, 2H, J= 6.4 Hz, H-3), 2.34 (t, 4H, J=7.1 Hz, H-5), 1.91 (m, 2H, H-2), 1.42 (s, 18H, H-8).

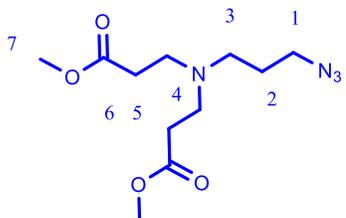
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 172.1 (C6), 80.4 (C7), 53.6 (C3), 49.5 (C4), 33.9 (C5), 31.3 (C2), 28.2 (C8) y 5.3 (C1),

HR-ESI-TOF (m/z): Calculado para C₁₇H₃₂N₁O₄I₁+H⁺, 442.1448; encontrado 442.1454.

6.4.2.3 AZIDACIÓN DE LOS FRAGMENTOS YODADOS

En un matraz de bola de 50 mL provisto con un agitador magnético se agregaron 6 mmol del fragmento yodado, 4 mL de DMF seca y 12 mmol de azida de sodio bajo atmosfera inerte, la mezcla se mantuvo en agitación a 70 °C por 20 h. El producto final se filtró y se lavó con agua, posteriormente se secó con Na₂SO₄ anhidro, se concentró y pasó por una columna flash con polaridad ascendente, Hexano-AcOEt y 1% de NH₄⁺OH, para quitar la DMF remanente.

6.4.2.3.1 (METIL 3-[(2-MET-BUTOXICARBONIL-ETIL)-(3-AZIDO-PROPIL)-AMINO]-PROPIONATO **6**



De acuerdo con el método general reaccionaron 2.380 g (6.66 mmol) del compuesto **4** con 0.867 g (13.3 mmol) de azida de sodio en 5 mL de DMF. Obteniendo un 92% de rendimiento, 1.67 g.

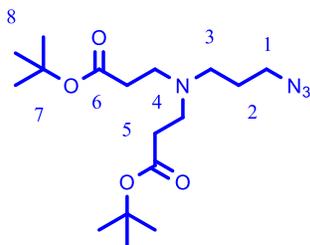
FT-IR (cm⁻¹): 2953, 2829 (C-H, st), 2096 (N₃, st), 1735.91 (C=O, st).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 3.66 (s, 6H, H-7), 3.30 (t, 2H, J=6.6 Hz, H-1), 2.73 (t, 4H, J= 6.9 Hz, H-4), 2.46 (t, 2H, J= 6.6 Hz, H-3), 2.42 (t, 4H, J= 6.9 Hz, H-5), 1.68 (m, 2H, H-2).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 172.9 (C6), 51.7 (C7), 50.7 (C3), 49.3 (C4), 49.2 (C1), 32.5 (C5) y 26.4 (C2).

HR-ESI-TOF (m/z): Calculado para C₁₇H₃₂N₄O₄+H⁺, 273.1485, encontrado 273.1557

6.4.2.3.2 (TERT-BUTIL 3-[(2-TERT-BUTOXICARBONIL-ETIL)-(3-AZIDO-PROPIL)-AMINO]-PROPIONATO) **7**



De acuerdo con el método general reaccionaron 3.580 g (8.10 mmol) del compuesto **5** con 1.060 g (16.0 mmol) de azida de sodio en 9 mL de DMF. Obteniendo un 82% de rendimiento, 2.34 g.

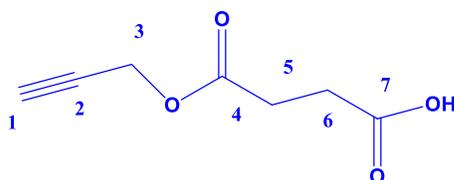
FT-IR (cm⁻¹): 2976, 2932, 2819 (C-H, st), 2094 (N₃, st), 1725 (C=O, st).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 3.30 (t, 2H, J=6.7 Hz, H-1), 2.68 (t, 4H, J=7.1 Hz, H-4), 2.44 (t, 2H, J=6.7 Hz, H-3), 2.32 (t, 4H, J=7.1 Hz, H-5), 1.68 (m, 2H, J=6.7 Hz, H-2), 1.42 (s, 18H, H-8).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 172.0 (C6), 80.4 (C7), 50.6 (C3), 49.4 (C4), 49.4 (C1), 33.8 (C5), 28.2 (C8) y 26.9 (C2).

HR-ESI-TOF (m/z): Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_4^+\text{H}^+$, 357.2496, encontrado 357.2497.

6.4.2.4 ÁCIDO 4-OXO-4-(PROP-2-INOXI) BUTANOICO **8**



Se trituró 1.50 g (2.6 mmol) de KOH en un mortero, se agregó 1 mL de alcohol propargílico hasta la formación de una pasta, posteriormente se adicionaron 1.960 g (1.96 mmol) de anhídrido

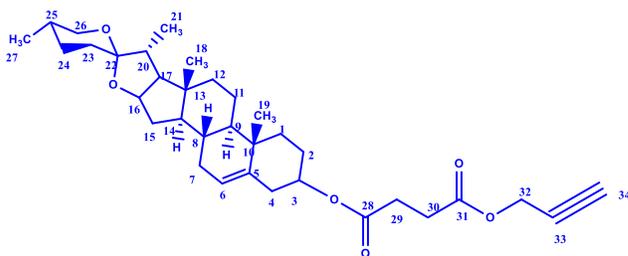
succínico, y se trituró hasta que ya no se apreciaba el alcohol propargílico por TLC. Posteriormente se agregó H_2O acidulada con HCl (1:1) hasta llegar a pH de 2; una vez alcanzado el pH deseado se realizaron extracciones con CH_2Cl_2 3 x 20 mL, se concentró y recristalizó con Hexano, obteniendo un 30% de rendimiento, 0.8121 g. Una vez realizada la reacción, se escaló 2 veces: se trituró 3.00 g (5.3 mmol) de KOH en un mortero, se retiró del mortero; se agregó en el mortero 2 mL de alcohol propargílico, lentamente se incorporó el hidróxido de potasio (tres cuartas partes) hasta la formación de una pasta se retiró del mortero. En pequeñas proporciones se incorporó 3.92 g (3.92 mmol) de anhídrido succínico y el resto de alcóxido de propargilo, obteniendo un 30% de rendimiento, 1.62 g. NOTA: El cambio en el orden de adición se debe a que la reacción es altamente exotérmica y al escalar, el calor liberado es suficiente para quemar tanto reactivos como productos.

FT-IR (cm^{-1}): 3400-2500 (COOH, st), 3288 (C-H alquino, st), 2917, 2849 (C-H aliph, st), 1729 (C=O ester, st), 1691 (C=O ácido, st).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 11.41(br s, 1H, COOH), 4.72 (s, 2H, H-3), 2.70 (m, 4H, H-5, H-6), 2.51 (d, 1H $J = 1.8$ Hz, H-1).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): 178.5 (C-7); 171.4 (C-4); 77.3 (C-2); 75.12 (C-1); 52.33 (C-3); 28.81 (C*-5); 28.59 (C*-6).

6.4.2.5 COMPUESTO 9



Se utilizó la esterificación de Steglich: en un matraz de bola de 50 mL provisto con un agitador magnético en un baño a 0°C se adiciono diosgenina 0.100 g (0.24 mmol), compuesto **8** 0.075 g (0.48

mmol) y DMAP (4-Dimetilaminopiridina) 0.018 g (0.15 mmol) bajo atmosfera inerte, junto con 5 mL de CH₂Cl₂ seco. La DCC (N,N'- dicitclohexilcarbodiimida), 0.118 g (0.55 mmol), se agregó previamente disuelta en 2 mL de CH₂Cl₂ seco en atmosfera inerte. Se agitó por 12 h, posteriormente la urea precipitada se filtró. Al crudo en CH₂Cl₂, se realizaron lavados con 0.5N HCl (ácido clorhídrico) 5 mL X 3 y con solución saturada de NaHCO₃ (bicarbonato de sodio) 5 mL X 3, posteriormente se secó con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se removió a vacío y se purificó por columna hasta una polaridad de 95Hex:05AcOEt. Obteniendo un 90% de rendimiento, 0.121 g. Pf: 101-102 °C.

FT-IR (cm⁻¹): 3287 (C-H alquino, st) 2984, 2849 (C-H alifatico, st), 2128 (C-C alquino, st), 1731 (C=O, st).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.36 (t, 1H, H-6), 4.70 (br s, 2H, H-32), 4.61 (m, 1H, H-3), 3.44 (d, 1H, J=9.1 Hz, H-16α), 3.34 (t, 1H, J=10.9 Hz, H-16β), 2.64 (d, 2H J = 5.8 Hz, H*-29), 2.60 (d, 2H, J=5.8Hz, H*30), 2.47 (t, 1H J= 2.47 Hz, H-34) 1.00 (s, 3H, H-19), 0.96 (d, 3H, J=6.7Hz, H-21), 0.78 (s, 6H, H-18, H-27).

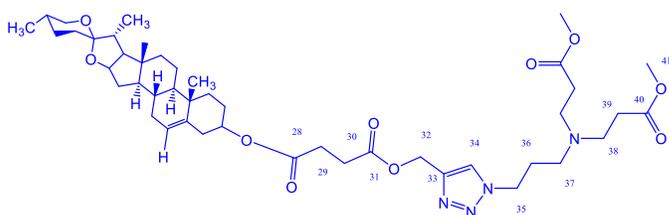
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): 171.6 (C*-31), 171.4 (C*-28), 139.6 (C-5), 122.4 (C-6), 109.3 (C-22), 80.8 (C-16), 77.5 (C-34), 75.1 (C-33), 74.4 (C-3), 66.8 (C-26), 62.3 (C-17), 56.4 (C-14), 52.2 (C-32), 49.9 (C-9), 41.7 (C-4), 40.3 (C-20), 39.9 (C-13), 38.1 (C-12), 37.0 (C-1), 36.8 (C-10), 32.1 (C*-7), 31.9 (C*-15), 31.45 (C*-2, C*-8), 30.36 (C-25), 29.37 (C*-23), 29.0 (C*-29), 28.9 (C-24), 27.8 (C*-30), 20.9 (C-11), 19.4 (C-19), 17.2 (C-27), 16.4 (C-18), 14.6 (C-21).

HR-ESI-TOF (m/z): Calculado para C₃₅H₄₅N₄O₂⁺H₁, 553.3537, encontrado 553.3527.

6.4.2.6 METODOLOGÍA GENERAL DE FORMACIÓN DE ANILLOS TRIAZOLICOS (REACCIÓN CLICK)

En un matraz de bola de 50 mL provisto con un agitador magnético se disolvieron en una mezcla de MeOH/H₂O (2:1) CuSO₄·5H₂O (0.20 equivalente), ascorbato de sodio (AsNa), (0.41 equivalente), y ácido benzoico (PhCO₂H) (2.0 equivalente), (se observó una coloración naranja que indica la reducción de cobre). Posteriormente se agregó el alquino (compuesto **9**) (0.9 equivalentes) y la azida correspondiente (1 equivalente). Se dejó en agitación a 40°C y se monitoreó por TLC hasta que se completó la reacción. Finalmente se agregaron 5 mL de CH₂Cl₂ y se realizaron lavados con NH₄Cl (cloruro de amonio) 5 mL X 3, solución saturada de NaHCO₃ 5mL X 3 y H₂O 5mL X 2. Posteriormente se secó con Na₂SO₄ anhidro, se concentró a vacío y se purificó por columna hasta una polaridad de 50Hex:50AcOEt

6.4.2.6.1 COMPUESTO **10**



De acuerdo al método general reaccionaron 0.672 g (5.50 mmol) de PhCO₂H, 0.227 g (1.15 mmol) de AsNa y 0.092 g (0.57 mmol) de CuSO₄·5H₂O en 20 mL de MeOH:

H₂O (2:1). Se agregaron el compuesto **9** 1.370 g (2.48 mmol) y el compuesto **6** 0.749 g (2.75 mmol) junto con 5 mL de DMF y 7 mL de CH₂Cl₂, para su completa disolución. Se dejó en agitación por 24 horas dando por terminada la reacción cuando no se observó materia prima por TLC. Por TLC se observó una conversión al 100%, ya que no se aprecia materia prima, sin embargo, se obtuvo un 50% de rendimiento, 1.05 g después de la columna. Pf: 89-90°C.

FT-IR (cm⁻¹): 2947, 2902, 2847 (C-H aliph, st), 1729 (C=O, st).

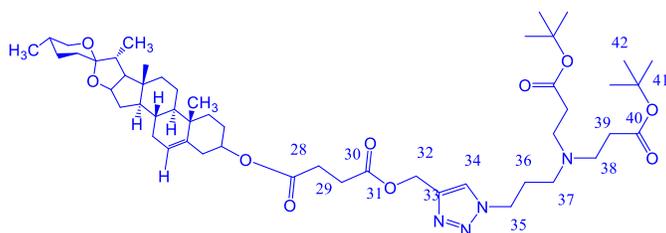
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.74 (s, 1H, H-34), 5.34 (t, 1H, H-6), 5.22 (br s, 2H, H-32), 4.57 (m, 1H, H-3), 4.39 (d, 1H, J=7.8 Hz, H-16α), 4.34 (t, 1H, J=7.1 Hz, 1H, H-16β), 3.66 (s, 4H, H-41), 3.35 (m, 1H, H-26), 2.72^a (t, 2H, H*-37), 2.71 (t, 4H, J=6.7Hz, H-38), 2.62 (d, 2H, J=5.3 Hz, H*-29), 2.59 (d, 2H, J=5.3 Hz, H*-30), 2.42^a (t, 2H, H*-35), 2.40 (t, 4H, J=6.7 Hz, H-39), 1.24 (s, 2H, H-27), 1.00 (s, 3H, H-19), 0.96 (d, 3H, J=6.7Hz, H-21), 0.77 (s, 6H, H-18).

^a: No se muestran las señales de J porque se encuentran traslapadas con H-38 y H-39.

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 173.0 (C40), 172.3 (C*-31), 171.6 (C*-28), 142.6 (C-33), 139.7 (C-5), 124.2 (C-34), 122.5 (C-6), 109.4 (C-22), 80.9 (C-16), 74.4 (C-3), 66.9 (C-26), 62.1 (C-17), 58.1 (C-32), 56.5 (C-14), 51.7 (C-41), 50.4 (C-37), 49.9 (C-9), 49.2 (C-38), 48.0 (C-35), 41.7 (C-4), 40.3 (C-20), 39.8 (C-13), 38.1 (C-12), 37.0 (C-1), 36.8 (C-10), 32.6 (C-39), 32.5 (C-7), 32.1 (C-15), 31.9 (C*-28), 31.5 (C-25), 30.4 (C*-29), 29.8 (C*-23), 29.4 (C*-30), 29.2 (C-24), 27.8 (C-36), 20.9 (C-11), 19.4 (C-19), 17.2 (C-27), 16.4 (C-18), 14.6 (C-21).

HR-ESI-TOF (m/z): Calculado para C₄₅H₆₈N₄O₁₀+H¹, 825.5021, encontrado 825.5007.

6.4.2.6.2 COMPUESTO 11



De acuerdo al método general reaccionaron 0.654 g (5.35 mmol) de PhCO₂H, 0.221 g (1.11 mmol) de AsNa y 0.088 g (0.55 mmol) de CuSO₄·5H₂O

en 20 mL de MeOH: H₂O (2:1). Se agregaron el compuesto **9** 1.318g (2.38 mmol) y el compuesto **7** 0.944 g (2.74 mmol) junto con 5 mL de DMF. Se dejó en agitación por 20 horas una vez terminada la reacción por TLC se pasó por una columna flash. Por TLC se observó una conversión al 100%, ya que no se apreciaba materia prima, sin embargo, se obtuvo un 52% de rendimiento, 0.75 g después de la columna. Pf: 80-81°C

FT-IR (cm⁻¹): 2927, 2902, 2849 (C-H aliph.), 1725 (C=O).

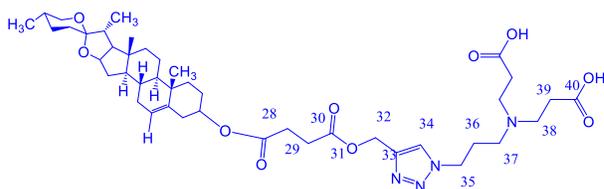
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.72 (s, 1H, H-34), 5.35 (t, 1H, H-6), 5.23 (br s, 2H, H-32), 4.57 (m, 1H, H-3), 4.39 (d, 1H, J=10 Hz, H-16α), 4.37 (t, J = 7.2 Hz, 1H, H-16β), 3.38 (m, 1H, H-26), 2.70, (t, 4H, J=6.8 Hz, H-38), 2.63 (d, 2H, J=5.6 Hz, H*-29), 2.59 (d, 2H, J=5.6 Hz, H*-30), 2.41 (t, 2H, J=6.1 Hz, H*-35), 2.32 (t, 4H, J=6.8

Hz, H-39), 2.04 (t, 2H, J=6.5 Hz, H*-37), 1.42 (s, 18H, H-42), 1.24 (s, 2H, H-27), 1.02 (s, 3H, H-19), 0.95 (d, 3H, J=6.7Hz, H-21), 0.78 (s, 6H, H-18).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 172.0 (C-31), 172.0 (C-40), 171.6 (C-28), 142.6 (C-33), 139.7 (C-5), 124.1 (C-34), 122.5 (C-6), 109.4 (C-22), 80.9 (C-41), 80.6 (C-16), 77.5 (C-3), 66.9 (C-26), 62.1 (C-17), 58.1 (C-32), 56.5 (C-14), 50.4 (C-37), 49.9 (C-9), 49.2 (C-38), 48.1 (C-35), 41.7 (C-4), 40.3 (C-20), 39.8 (C-13), 38.1 (C-12), 37.0 (C-1), 36.8 (C-10), 33.6 (C-39), 32.1 (C-7), 31.9 (C-15), 31.5 (C*-2, C*-8), 30.4 (C-25), 29.8 (C*-29), 29.5 (C-23), 29.2 (C*-30) 28.9 (C-24), 27.8 (C-36).

HR-ESI-TOF (m/z): calculado para C₅₁H₈₀N₄O₁₀+H¹, 909.5974, encontrado 909.5947.

6.4.2.7 COMPUESTO 12



En un matraz de bola de 50 mL provisto con un agitador magnético reaccionó el compuesto **10** 0.200 g (2.06 mmol) junto con 5 mL de ácido trifluoroacético

(TFA) y 2 gotas de agua por 2 h. Una vez concluida la reacción de acuerdo a la placa de TLC, se realizaron lavados con acetona 3 mL X 5 y CH₂Cl₂ 2 mL X 2 para retirar el ácido remanente mediante decantación y se dejó en la campana para su secado completo. Obteniendo un 90% de rendimiento, 0.2077 g. Para poder llegar al rendimiento obtenido se tuvieron que realizar pruebas a diferentes cantidades de TFA; se probaron 200 mg de compuesto **10** en las siguientes cantidades de TFA: 1.5 mL, 5 mL y 3 mL de ácido, obteniendo el mayor rendimiento en la proporción 200 mg del compuesto **10** en 5 mL de TFA. Pf: 159-160°C.

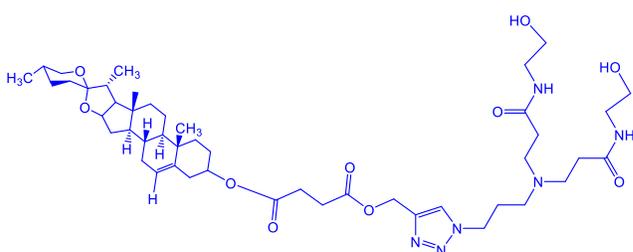
FT-IR (cm⁻¹): 3400- 2600 (OH, st), 1722 (C=O, ester st), 1667 (C=O, st).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 11.9 (br s, 1H, H-40), 8.13 (s, 1H, H-34), 5.32 (t, 1H, H-6), 5.13 (br s, 2H, H-32), 4.25 (m, 3H, 1H, H-3), 3.39 (m, 1H, H-26), 2.9 (m, 4H, H-29 H-30), 0.97 (s, 3H, H-19), 0.90 (d, 3H, J=6.7Hz, H-21), 0.72 (s, 6H, H-18, H-27).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 172.6 (C-40), 172.2 (C-31), 171.7 (C-28), 142.3 (C-33), 139.3 (C-5), 125.2 (C-34), 122.4 (C-6), 108.9 (C-22), 80.5 (C-16), 74.0 (C-3), 66.3 (C-26), 62.3 (C-17), 57.9 (C.32), 56.3 (C-14), 50.2 (C-37), 49.9 (C-9), 48.9 (C-38), 47.4 (C-35), 38.4 (C-13), 38.0 (C*-12), 36.7 (C-10), 31.4 (C-31), 30.3 (C*-27), 29.0 (C*-30), 27.8 (C-36).

HR-ESI-TOF (m/z): Calculado para C₄₃H₆₅N₄O₁₀+H¹, 797.4695, encontrado 797.4698.

6.4.2.8 COMPUESTO 13



Se hizo reaccionar 150 mg (0.18 mmol) del compuesto **10** con 0.44g (5.87 mmol) de etanolamina en 5 mL de metanol a 40°C por 48 h en atmosfera inerte.

Una vez dada por terminada la reacción se concentró a vacío y se purificó por columna hasta una polaridad de 50 hex:50 AcOET. Ya separadas las fracciones estas se mandaron a caracterizar y se obtuvo que el compuesto se separa en el enlace éster que une a la diosgenina con el compuesto **8**, resultando la obtención de diosgenina pura.

6.4.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

6.4.3.1 LÍNEAS CELULARES, CULTIVO Y MANTENIMIENTO.

Se emplearon células de cáncer de mama (MCF-7) y fibroblastos humanos (hFB). Los hFB fueron donados por la Dra. Sandra Telpalo Carpio del ITESM, Campus Monterrey y la línea MCF-7 fue donada por el Grupo Estratégico de Ingeniería Celular y de Biorreacción de la misma institución.

Las líneas celulares se cultivaron en el medio DMEM-F12 sin rojo fenol (cat. Sigma Aldrich, cat. D2906) adicionado con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF, cat. 35-010-CV, Mediatech). Las células crecieron en condiciones de humedad relativa a 5 % de CO₂ y 37 °C en una incubadora Nuair.

6.4.3.2 PREPARACIÓN DE STOCKS DE COMPUESTOS

El mismo día del ensayo se resuspendieron los compuestos y se hicieron las diluciones a probar:

1. Se pesó 0.005 g de compuesto en un microtubo y se adicionó en la cantidad respectiva de DMSO para obtener un stock a 100 mM.
2. Una vez preparado el stock se depositaron 2 μ L en 1998 μ L de medio. Se resuspendió y filtró para esterilizar. Esta cantidad fue para 3 pozos con 100 μ L para cada una placa de MCF-7 y una placa de hFB, se realizaron 3 réplicas de la primera concentración a probar y para iniciar las diluciones seriadas.
3. Se hicieron diluciones seriadas tomando 0.700 mL de la primera dilución y depositando en 0.700 mL de medio.
4. Se repitió de forma seriada hasta obtener 6 diluciones, contando desde la primera (2 μ L en 1998 μ L de medio).
5. Se prepararon 2 mL de control con la máxima concentración de DMSO. Es decir, se colocó 2 μ L de DMSO en 1998 μ L de medio. Éste fue el control de células sin compuesto, pero con el disolvente.
6. A 3 pozos de cada placa se colocaron 100 μ L de DMSO puro como control de efecto tóxico.

6.4.3.3 TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS CON LOS COMPUESTOS.

Las células fueron alimentadas en placas de 96 pozos, con 2×10^4 células por pozo con 100 μ L de medio de cultivo. En los bordes de las placas se colocó 200 μ L de PBS para controlar la evaporación. A las 24 horas de cultivo, se retiró el medio y se adicionaron 100 μ L de medio con el compuesto respectivo, a las siguientes concentraciones: 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 μ M. Como controles se adicionarán medio, medio con DMSO y DMSO al 100%. Se hicieron 3 réplicas de cada tratamiento y se corrieron 3 ensayos independientes.

Posteriormente las concentraciones se incrementaron para poder determinar la IC₅₀. Las concentraciones fueron: 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 μ M. La primera concentración se obtuvo al diluir 10 μ L del stock en 1990 μ L de medio.

6.4.3.4 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN CELULAR RESPECTO AL CONTROL POR CRISTAL VIOLETA.

A las 48 horas, después del registro fotográfico, se eliminó el medio y se lavó 4 veces con agua corriente de la llave. Al término, se eliminó el exceso de agua colocando la placa hacia abajo sobre una toalla de papel por 5 min. Luego, a los pozos se les adicionó 50 μ L cristal violeta al 5% (en metanol). Se dejó actuar por 25 min y al término se retiró el CV. Se hicieron 4 lavados con agua corriente. El exceso de agua se retiró colocando las placas hacia abajo sobre una toalla de papel. Por último, se adicionaron 200 μ L de metanol a cada pozo de la placa. Se homogenizaron y la placa fue leída en un espectrofotómetro de placas. La lectura se hizo a 541 nm en el Tecnológico de Mérida).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 ANÁLISIS

Con los fragmentos propuestos (figura 7) y con base en las reglas de Lipinsky incluidas en el programa MOLINSPIRATION (tabla 5) (<http://www.molinspiration.com/>) se determinaron: los enlaces de hidrógeno donadores, los aceptores, la masa molecular, el LogP y las violaciones para las reglas de Lipinsky. Las propiedades ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad) se determinaron mediante el programa admetSAR (mmd.ecust.edu.cn/admetSar1) con la finalidad de evaluar su actividad biológica. En la tabla 4 se resumen algunas de estas propiedades que consideramos más importantes ya que estas nos indican como actuaría teóricamente el profármaco en el organismo.

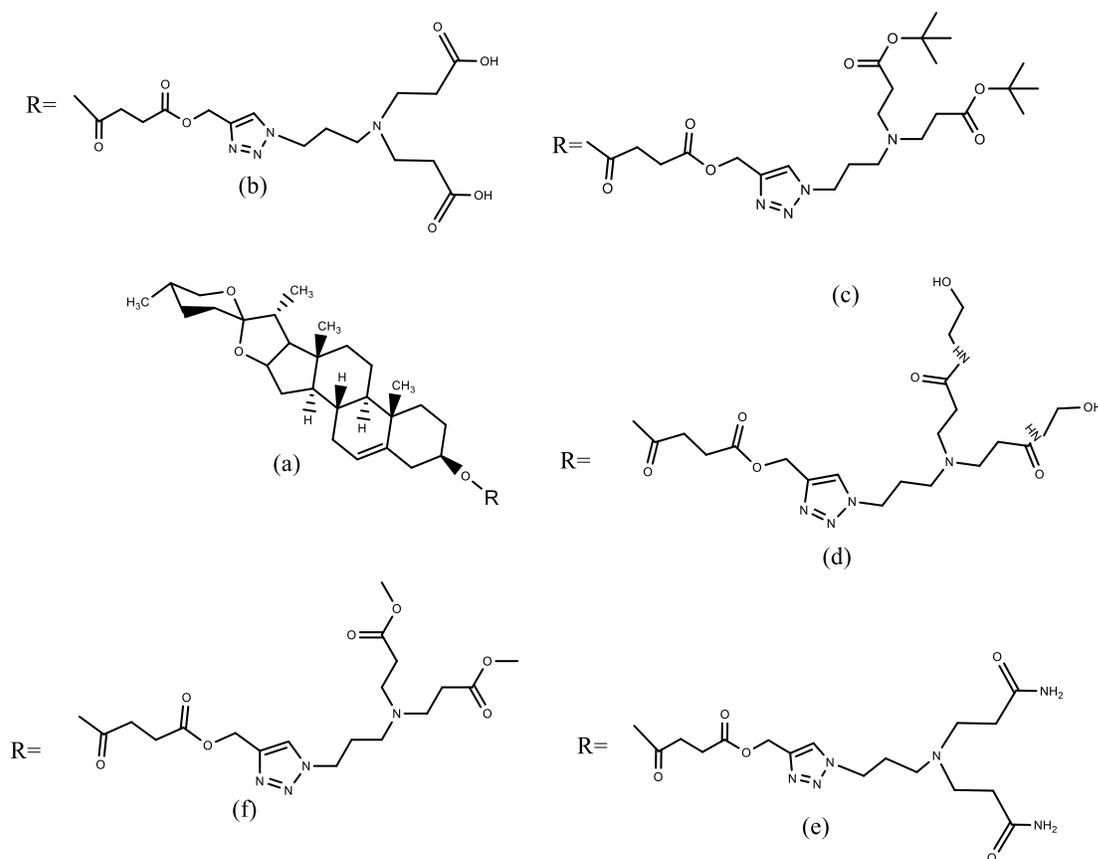


Figura 7. Fragmentos propuestos

Los resultados obtenidos para Log P en las 5 estructuras propuestas nos indican que los compuestos que presentan un índice mayor a cinco poseen mayor solubilidad lipofílica mientras los que se tienen un índice menor a uno serían más hidrofílicos, los compuestos mayoritariamente fueron lipofílicos $c > a > f > b > e > d$, tal como reporta delgado *et al.*, (2003).

Respecto al peso molecular de los compuestos propuestos, ninguno rebasó el orden de las 1000 umas, con lo cual no se condiciona el paso de estos a través de la membrana biológica.

Otros dos parámetros importantes dentro de las reglas de Lipinsky son los hidrógenos donadores y aceptores de cada una de las moléculas. Los compuestos propuestos presentaron un bajo número de hidrógenos donadores, en el caso del compuesto c y f hubo ausencia de esta propiedad. En lo que respecta al número de hidrógenos aceptores solo la diosgenina presentó un índice bajo con tan solo 3, las demás moléculas presentaron números ≥ 11 , estos parámetros cumplen con lo establecido por Lipinsky por ello las moléculas pueden ser administradas vía oral ya que al tener hidrógenos donadores y aceptores se forman enlaces con la membrana plasmática.

Tabla 4. Cálculo teórico de los fragmentos propuestos basados en las Leyes de Lipinsky

Leyes de Lipinsky						
R. Lipinsky/ fragmentos	a	b	c	d	e	f
Hidrógenos donadores	1	2	0	4	2	0
Hidrógenos aceptores	3	12	14	12	12	14
Peso molecular	414.63	797	909.22	883.14	795.03	825.06
Log. p	5.93	5.30	8.25	3.75	4.27	5.91
Violaciones	1	3	3	2	2	3

Con el programa admetSAR se determinó la permeabilidad en células CaCo-2 y toxicidad de cada una de las moléculas propuestas, siendo las más tóxicas d y e. Con relación a la permeabilidad el d es el que posee mayor permeabilidad, sin embargo, al ser muy tóxica, se decidió que el compuesto idóneo es el b por las características mostradas tanto en su permeabilidad como en su toxicidad.

Tabla 5. Propiedades ADMET de los compuestos propuestos

Propiedades ADMET de MOLINSPIRATION/admetSAR						
	a	b	c	d	e	f
Permeabilidad Caco-2 cm/s	0.587	0.646	0.586	0.714	0.683	0.5629
Toxicidad oral aguda mg/kg	0.615	0.610	0.657	0.596	0.590	0.6334
Toxicidad aguda en ratas mol/kg	1.746	2.780	2.681	2.777	2.814	2.780
Toxicidad en peces mg/L	0.905	1.104	0.850	1.214	1.139	0.896

La toxicidad oral aguda indica que mientras más alto el valor se considera más tóxica, siendo éste caso similar en los 6 compuestos propuestos; así mismo podemos distinguir claramente entre toxicidad de ratas y en peces.

Con base en los resultados obtenidos por los programas molinspiration y admetSAR se eligieron 3 fragmentos para su respectiva síntesis (figura 8), los compuestos b, d y f, a los cuales se les diseñó una ruta de síntesis, usando 3-aminopropan-1-ol como punto de partida.

Se establecieron reacciones de adición de Michael sobre el 3-aminopropan-1-ol con diferentes acrilatos (metil acrilato, terbutilacrilato) para tener diferentes grupos funcionales y el mismo punto focal (OH) (compuestos hidroxilados); el punto focal es completamente susceptible de modificación, lo que permitió pasar de hidroxilo a iodo

(compuestos iodados) y posteriormente a azida (compuestos azidados), siendo este último el grupo adecuado para formar triazoles vía click.

Por otro lado, la diosgenina fue esterificada con el ácido 4-oxo-4-(prop-2-in-1-iloxi) butanoico en el hidroxilo de la posición 3, para adicionar un alquino terminal que permita ser acoplado con la azida de los fragmentos (Figura 8).

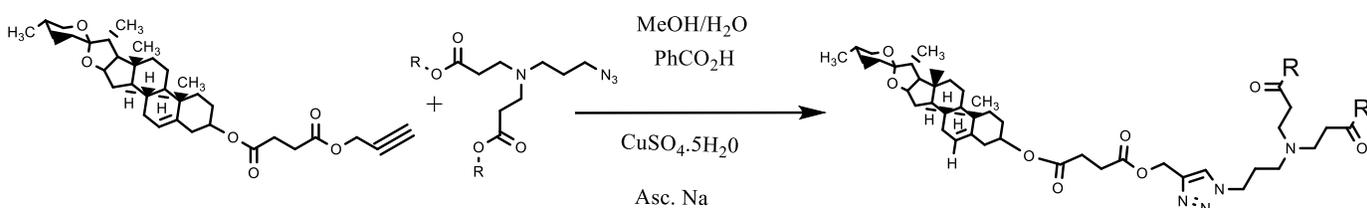


Figura 8. Esquema de reacción click

Con base en la metodología descrita se evaluaron tanto tiempo de reacción como rendimientos en la síntesis de los compuestos previamente seleccionados.

7.1.1 COMPUESTO HIDROXILADOS

Los compuestos **2** y **3** se obtuvieron mediante la adición de Michael del metil acrilato y terbutil acrilato sobre el 3-amino-1-ol, respectivamente, quedando un grupo hidroxilo (OH) como punto focal. Después de remover el disolvente se obtuvo un rendimiento del 99%.

Los compuestos **2** y **3**, puros, son oleosos y amarillentos, éstos se caracterizaron mediante espectroscopía de RMN de ^1H y ^{13}C ; apoyando a ésta con FT-IR y HRMS ESI-TOF, compuesto **3**, las cuales ayudaron a confirmar las estructuras.

Tabla 6. Señales características de RMN de ^1H y ^{13}C para los compuestos **2** y **3** con OH focal

Posición	Compuesto 2		Compuesto 3	
	δ_{H} (ppm) (multiplicidad)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) (multiplicidad)	δ_{C} (ppm)
1	3.69 (t)	62.6	3.72 (t)	63.2
2	1.66 (td)	28.5	1.67 (td)	28.4
3	2.60 (t)	52.7	2.61 (t)	53.0
4	2.76 (t)	49.3	2.73 (t)	49.4
5	2.48 (t)	32.1	2.38 (t)	33.3
6	--	172.9	--	171.8
7	3.66 (t)	51.7	--	80.7
8	--	--	1.43 (s)	28.1

En la tabla 6, se presentan los desplazamientos de los compuestos **2** y **3** donde se puede resaltar para RMN de ^1H que los grupos funcionales hidroxilo (OH) en la posición C-1 desplazan las señales de H-1 hasta 3.7 ppm, a diferencia del grupo funcional éster en la posición C-6 que desplaza H-5 a 2.4 ppm. Los desplazamientos de RMN ^{13}C para carbonilo del grupo éster se encuentran en 172.9 ppm y 171.8 ppm para **2** y **3**, respectivamente. La principal diferencia entre **2** y **3** está en el carbono en 51.7 ppm asociado al metil éster y en 28.1 ppm asociado a los metilenos del terbutilo. Para complementar la caracterización de los compuestos **2** y **3**, se empleó la técnica espectroscópica de FT-IR y la técnica HRMS ESI-TOF para el compuesto **3**, los datos se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Datos de FT-IR para los compuestos **2** y **3**

Compuesto	FT-IR (cm^{-1})
2	1734(C=O); 3431(OH); 952, 2940, 2830 (C-H)
3	1724 (C=O); 3442 (OH); 2976, 2933, 2825 (C-H)

En la tabla 7 se muestran los datos espectroscópicos de FT-IR que muestran las principales señales de los compuestos **2** y **3** donde se puede observar en 1734 cm^{-1} y 1724 cm^{-1} la vibración de tensión del grupo C=O del éster, y en 3431 cm^{-1} y 3442 cm^{-1} la vibración del OH.

Para el compuesto **3** se calculó un valor de m/z correspondiente a 332.2432, mismo que se corroboró con el obtenido mediante HRMS-ESI-TOF, de 332.2438.

7.1.2 COMPUESTOS IODADOS

Una vez que la obtención de los compuestos **2** y **3** con un grupo focal OH, fue corroborada, el hidroxilo fue sustituido por yodo en presencia de yodo metálico, imidazol y trifetilfosfina, formando los compuestos **4** y **5** con rendimientos del 70%. Los compuestos **4** y **5**, puros son oleoso y amarillentos. Éstos se caracterizaron mediante RMN de ^1H y ^{13}C , apoyando con FT-IR y HRMS ESI-TOF para corroborar la estructura.

Tabla. 8. Señales características de RMN de ^1H y ^{13}C para compuesto iodo focal

Posición	Compuesto 4		Compuesto 5	
	δ_{H} (multiplicidad)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (multiplicidad)	δ_{C} (ppm)
1	3.18 (t)	5.1	3.20 (t)	5.3
2	1.90 (m)	31.0	1.91 (m)	31.3
3	2.48 (t)	53.6	2.47 (t)	53.6
4	2.73 (t)	49.4	2.68 (t)	49.5
5	2.44 (t)	32.7	2.34 (t)	33.9
6	--	173.0	--	172.1
7	3.66 (s)	51.6	--	80.4
8	--	--	1.42 (s)	28.2

En la tabla 8 se muestran los desplazamientos para los compuestos **4** y **5**. La obtención del compuesto **4** se corroboró mediante RMN de ^1H por el desplazamiento de H-1 de 3.69 ppm a 3.18 ppm. Para el compuesto **5** el H-1 pasó de 3.72 ppm a 3.20 ppm. En RMN de ^{13}C el corrimiento más característico fue el de C-1 de 62.6

ppm a 5.1 ppm para **4**, y de 63.2 ppm a 5.3 ppm en el caso de **5**. Además, en FT-IR (tabla 9) se nota la clara ausencia de la banda de los hidroxilos. Con la técnica HRMS ESI-TOF (tabla 9) se determina el valor de m/z correspondiente al del compuesto, corroborándose la estructura de los compuestos.

Tabla 9. Datos de FT-IR y HRMS para los compuestos **4** y **5**

Compuesto	FT-IR (cm^{-1})	HRMS (m/z) [M+H]
4	--	Calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{N}_1\text{O}_4 + \text{H}$ 358.0509, encontrado 358.0510
5	1724 (C=O); 2959-2854 (C-H).	Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{N}_1\text{O}_4 + \text{H}$ 442.1448, encontrado 442.1454

7.1.3 COMPUESTOS AZIDADOS

Una vez que la obtención de los compuestos **4** y **5** fue corroborada, el grupo focal iodo, fue transformado a azida con NaN_3 en DMF a $70\text{ }^\circ\text{C}$, formando los compuestos **6** y **7**.

Los resultados muestran que los compuestos **6** y **7**, puros son oleosos y amarillentos éstos se caracterizaron obteniendo un rendimiento del 92% y 82% para **6** y **7**, respectivamente. Ambos compuestos se caracterizaron por técnicas espectroscópicas.

Tabla. 10. Señales características de RMN de ^1H y ^{13}C para compuestos con azida focal

Posición	Compuesto 6		Compuesto 7	
	δ_{H} (multiplicidad)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (multiplicidad)	δ_{C} (ppm)
1	3.30 (t)	49.3	3.30(t)	49.4
2	1.68(m)	26.4	1.68(m)	26.9
3	2.46(t)	50.7	2.44(t)	50.6
4	2.73(t)	77.0	2.68 (t)	49.4
5	2.42(t)	32.5	2.32(t)	33.8
6	--	172.8	--	172.0
7	3.66(s)	51.7	--	80.4
8	--	--	1.42(s)	28.2

En la tabla 10 se muestran los desplazamientos de ^1H para los compuestos **6** y **7**. La obtención de estos compuestos se corroboró por el desplazamiento de H-1 de 3.18 ppm a 3.30 ppm para **6**, y de 3.20 ppm a 3.30 ppm en el caso de **7**. ^{13}C se observa un desplazamiento del C-1 de 5.10 ppm a 49.3 ppm, para **6**, y 5.3 ppm a 49.4 ppm, en el caso de **7**. Además, en FT-IR (tabla 11) muestra claramente presencia de N_3 en 2095 cm^{-1} . Con la técnica HRMS ESI-TOF (tabla 11) se determinó el valor de m/z correspondiente al peso molecular.

Tabla 11. Datos de FT-IR y HRMS para los compuestos **6** y **7**

Compuesto	FT-IR (cm^{-1})	HRMS (m/z) [$\text{M}+\text{H}$]
4	2953, 2829 (C-H)	Calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_4 + \text{H}$ 273.1557, encontrado 273.1553
	2096 (N_3)	
	1725 (C=O)	
5	2976, 2932, 2819 (C-H)	Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_4 + \text{H}$ 357.2497, encontrado 357.2497
	2094 (N_3)	
	1725 (C=O)	

7.1.4 ÁCIDO 4-OXO-4-(PROP-2-IN-1-ILOXI) BUTANOICO **8**

El compuesto **8** fue sintetizado mediante molienda en mortero, como se describe en la metodología, primero se formó el alcoxido del alcohol propargilico al triturar éste con KOH. Posteriormente se adiciona el anhídrido succínico y se trituro para llevar a cabo la esterificación por apertura del anillo. A diferencia de la metodología de síntesis reportado por (Ni et al., 2014), el nuevo método de síntesis es más económico y “verde” ya que se dejan atrás compuestos como el DMAP y la trietilamina y el uso de disolventes anhidros.

El compuesto **8** puro es un sólido blanco cristalino, obteniendo un rendimiento del 30% tras una cristalización en Hexano. Los datos espectroscópicos se detallan en las tablas 12 y 13.

Tabla. 12. Señales características de RMN de ^1H y ^{13}C para compuesto **8**

Compuesto 8		
Posición	δ_{H} (multiplicidad)	δ_{C} (ppm)
1	2.51 (t)	75.1
2	--	77.3
3	4.72 (s)	52.3
4	--	171.4
5*	2.70 (dd)	28.8
6*	2.70(dd)	28.6
7	11.41 (brs)	178.5

En la tabla 12, se presentan los desplazamientos de RMN ^1H del ácido 4-oxo-4-(prop-2-in-1-iloxi) butanoico en donde se puede resaltar las señales asociadas al alquino en 2.51 ppm y debido al éster, el H-3 es el más desplazado. En RMN de ^{13}C se tienen dos señales asociadas a carbonilos, 178.5 ppm y 171.4 ppm además del desplazamiento característico de los carbonos de grupos alquinos de C-1 y C-2 en 77.3 ppm y 75.1 ppm, respectivamente. Mediante espectroscopia FT-IR (tabla 13) se

evidencia la presencia de COOH en 3300-2600 cm^{-1} , del alquino en 2944.65 cm^{-1} , el (C=O éster) en 1691.48 cm^{-1} y el (COOH) en 1729.64 cm^{-1} .

Tabla 13. Datos de FT-IR para el compuesto **8**

Compuesto	FT-IR (cm^{-1})
11	1691.48 (C=O éster); 1729.64 (C=O OH) 2944.65 (CH alquino), 3300-2600(COOH)

7.1.5 COMPUESTO **9**

Una vez sintetizado el compuesto **8** se esterificó con la diosgenina a través de una esterificación de Steglich, ya que nos permite trabajar con ácidos lábiles y compuestos estéricamente demandantes, se necesita menos cantidad de alcohol e impide la formación de carbocationes como en el caso de la esterificación de Fisher.

El compuesto **9** puro es un sólido blanco, se obtuvo con un rendimiento del 90%. La caracterización se condensa en las tablas 14 y 15, para RMN y FTIR respectivamente.

Tabla 14. Señales de ^1H y ^{13}C de diosgenina y el compuesto **9**

Posición	Diosgenina		Compuesto 9	
	δ_{H} (multiplicidad)	(ppm) δ_{C} (ppm)	δ_{H} (multiplicidad)	(ppm) δ_{C} (ppm)
3	3.51	71.9	4.61	74.4
5	--	141.0	--	139.6
6	5.30	121.6	5.36	122.4
9	0.94	50.3	0.94	49.9
14	1.08	56.7	--	56.4
16	4.38	81.0	3.40	80.8
17	1.78	62.3	--	62.3
19	1.04	19.6	1.00	19.4
21	0.92	14.7	0.96	14.6
22	--	109.5	--	109.3
26	3.37	67.0	3.40	66.8
27	0.76	17.35	0.78	17.2
28	--	--	--	171.4
29*	--	--	2.64	29.0
30*	--	--	2.60	27.8
31	--	--	--	171.6
32	--	--	4.70	52.2
33	--	--	--	75.1
34	--	--	2.47	77.5

De acuerdo con los datos de la tabla 14 se corroboró que la reacción de esterificación se llevó a cabo. Existen diferencias marcadas entre las señales de la diosgenina y el compuesto **9**. Es muy notorio el desplazamiento que tiene el H-3 en donde se encuentra posicionado el grupo OH y como éste es desplazado al momento de realizarse la esterificación de 3.51 ppm a 4.61 ppm. Además de las señales correspondientes a los metilenos del fragmento del succínico, H-32 en 4.70 ppm y el

singulete en 2.47 ppm designado al alquino terminal. En RMN ^{13}C observamos los desplazamientos que ocurren en C-3 y se observa la aparición de los carbonos C-28, C-31- C-32, C-33, C-34. En FT-IR (tabla 15) el grupo éster está caracterizado por la ubicación del carbonilo en 1731 cm^{-1} y el alquino en 3287 cm^{-1} . Finalmente, con HRMS ESI-TOF (tabla 15) el ion molecular obtenido de 553.3577 correspondiente al esperado para M+H.

Tabla 15. Datos de FT-IR y HRMS para el compuesto **9**

Compuesto	FT-IR (cm ⁻¹)	HRMS (m/z) [M+H]
9	3287 (C-H alquino)	calculado para C ₃₄ H ₄₉ O ₆
	2984, 2849 (C-H)	+H 553.3537, encontrado
	1731 (C=O)	553.3527

7.1.6 DERIVADOS TRIAZOLICOS

Una vez que los compuestos **6** y **7** fueron sintetizados con un grupo focal N₃ y que se derivatizó la diosgenina con el ácido 4-oxo-4-(prop-2-in-1-iloxi) butanoico **9**, se realizó la reacción click entre éstos, formando los compuestos **10** y **11** en presencia de CuSO₄.5H₂O, PhCO₂H y ascorbato de sodio.

Los compuestos **10** y **11** fueron obtenidos con rendimientos del 50% y 53% respectivamente.

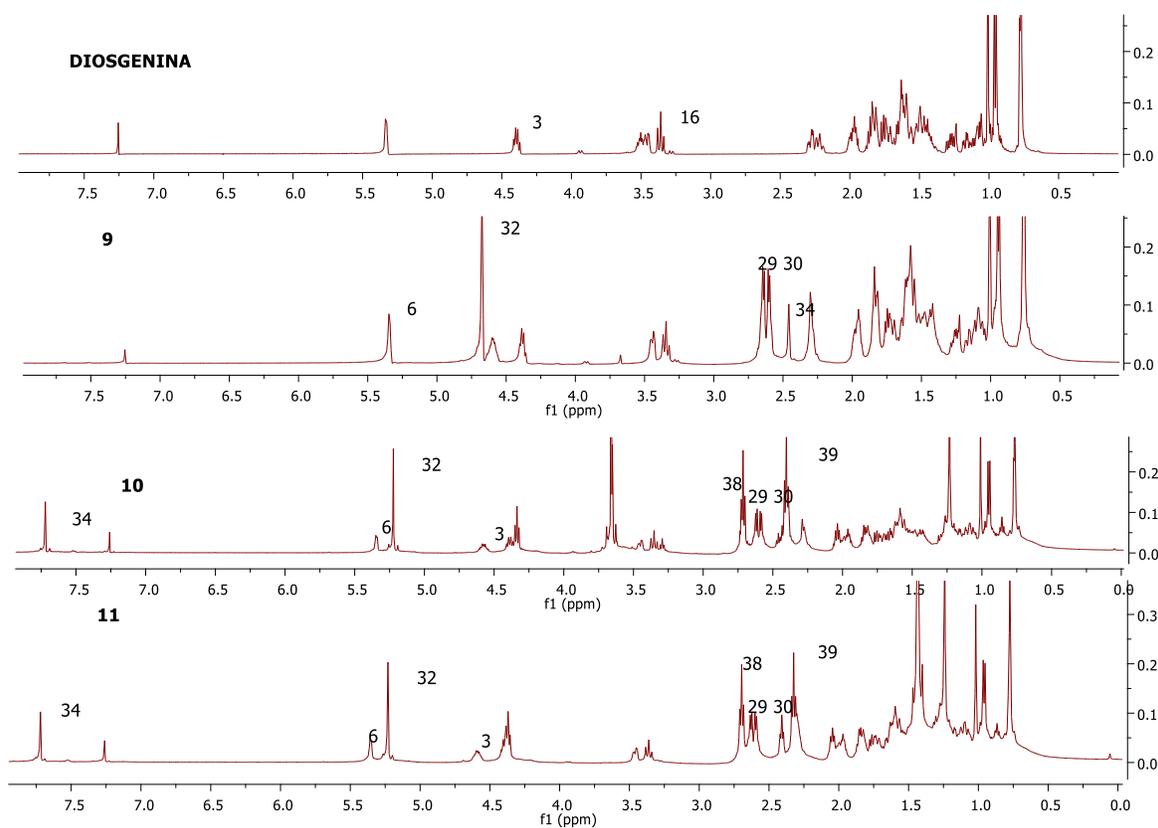


Figura 9. Señales características de RMN de ¹H para la diosgenina, compuesto 9, compuesto 10 y compuesto 11.

En la figura 9 se pueden observar las señales características de la diosgenina, compuesto **9** y **10**, en donde podemos corroborar la formación del anillo triazólico debido a la señal en 7.74 ppm, asociada en éste. Además, la señal en 3.66 ppm asociada a los metilenos del metil éster, aunado a la ausencia de la señal en 2.47 ppm, asignada al alquilo en el compuesto 9. De manera similar para el **11**, la señal asignada al anillo triazólico se encuentra en 7.72 ppm acompañada de la señal en 1.42 ppm asociada a los metilos del terbutilo, evidencia la obtención de los compuestos esperados.

Tabla 16. Señales de ^{13}C del compuesto 10 y 11

Posición	Compuesto 10	Compuesto 11
	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)
3	74.4	77.5
5	139.7	139.7
6	122.5	122.5
14	56.5	56.5
16	80.9	80.6
17	62.1	62.1
22	109.4	109.4
26	66.9	66.9
28*	171.6	171.6
31*	172.3	172.0
32	58.1	58.1
33	142.6	142.6
34	124.2	124.1
40	173.0	172.0
41	51.7	80.9
42	--	28.9

En la resonancia de ^{13}C (tabla 16), la formación del anillo triazólico se evidencia por el corrimiento de las señales correspondientes al alquino (C 34) de 77.3 ppm a 124.2 ppm para **10**, y de 77.5 ppm y 124.1 ppm, para **11**

Tabla 17. Datos de FT-IR y HRMS para el compuesto **10** y **11**

Compuesto	FT-IR (cm ⁻¹)	HRMS ESI-TOF (m/z) [M+H]
10	1729 (C=O); 2947, 2902, 2847 (C-H)	Calculado para C ₄₆ H ₆₅ N ₈ O ₆ +H 825.5021, encontrado 825.5007
11	1725 (C=O); 2927,2902, 2849 (C-H)	Calculado para C ₅₂ H ₇₇ N ₈ O ₆ +H 909.5974, encontrado 909.5947

Los datos de FT-IR se resumen en la tabla 17 y es posible ver que los 3 diferentes carbonilos de éster dan una sola banda en 1729 cm⁻¹ y 1725 cm⁻¹ para **10** y **11**, respectivamente. Finalmente, la obtención de los compuestos se corrobora por masas de alta resolución donde los datos del ion molecular correspondiente no varían en más de 3 ppm con el técnico.

7.1.7 HIDRÓLISIS DE **11**

Una vez sintetizado el compuesto **11** con grupo terminal terbutilo, este se hidrolizó con ácido trifluoroacético, y dos gotas de agua en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de los lavados para remover el TFA se obtuvo un rendimiento del 90%.

Tabla 18. Señales de ^1H y ^{13}C del compuesto 12

Posición Compuesto 12		
	δ_{H} (multiplicidad)	δ_{C} (ppm)
3	4.25 (m)	74.0
6	5.32(t)	122.4
19	0.97 (s)	
21	0.90 (d)	
22	--	108.9
26	3.39 (m)	66.3
27	0.72 (s)	30.3
28	--	171.7
30	2.9 (m)	29.0
31	--	172.2
32	5.13 (s)	57.9
33	--	142.3
34	8.13 (s)	125.2
35	4.4 (m)	47.4
40	11.9 (brs)	172.6

Como puede verse en la tabla 18, las señales de ^1H asociados a los metilos del grupo terbutilo en 1.42 ppm desaparecen dando lugar a una nueva señal en 11.9 ppm asociado al protón del ácido y generando un desplazamiento en la señal del anillo triazólico a 8.13 ppm probablemente debido a interacciones entre los nitrógenos de anillo y las terminales del ácido. Con la hidrolisis las señales en ^{13}C asociadas al carbono cuaternario del grupo terbutilo en 28.9 ppm desaparece, sin que el resto de las señales se modifiquen significativamente. Los datos de FT-IR se condensan en la tabla 19 y es posible ver el carbonilo de éster en 1724 cm^{-1} para **12**. Finalmente, la obtención de los compuestos se corroboró por espectrometría de masas de alta

resolución donde los datos del ión molecular correspondiente no varían en más de 3 ppm con el teórico.

Tabla 19. de FT-IR y HRMS para el compuesto **12**

Compuesto	FT-IR (cm-1)	HRMS (m/z) [M+H]
12	3400-2600 (COOH) 1724 (C=O)	Calculado para C ₄₃ H ₆₅ N ₄ O ₁₀ +H 797.4695, encontrado 797.4698

7.2 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Con el objetivo de determinar la viabilidad de proponer diferentes vías de administración de los compuestos, se realizaron pruebas de solubilidad (tabla 19) para los compuestos **10**, **12** y la diosgenina utilizando la relación 2 µg/40 µL en las cuales se hicieron pruebas con DMSO, agua a pH 7.0, etanol/agua pH 7.0 y DMSO/Acetona.

Se eligieron DMSO, solución de fosfatos a pH 7.0, etanol, acetona y mezcla de etanol/agua y DMSO/ Acetona. Por un lado, el DMSO es uno de los disolventes más empleados para pruebas biológicas *in vitro*. La solución de fosfatos es el medio en que se diluyen las disoluciones de DMSO para pruebas biológicas *in vitro*. Por otro lado, el etanol y acetona son disolventes que suelen emplearse para pruebas antiinflamatorias *in vivo* en piel de animales, en la tabla 20 se muestran los resultados.

Tabla 20. Pruebas de solubilidad en diferentes medios de los compuestos **10,12** y diosgenina

Compuesto	DMSO	pH 7.0	Etanol/pH 7.0	DMSO/Acetona
10	+++	-	+	+++
12	+++	+++	+++	+++
Diosgenina	+	-	-	-

(- nada soluble, + poco soluble, ++medianamente soluble, +++ muy soluble)

Se puede observar claramente como la diosgenina es muy poco o nada soluble en los diferentes medios, mientras que el compuesto **12** al tener terminaciones COOH presenta una mejor solubilidad en todos los medios, por lo que potencialmente puede ser un profármaco de aplicación tópica, oral (con base en las reglas de Lipinsky) e intravenosa, debido a su solubilidad en agua pH 7.

7.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Con la finalidad de evaluar el efecto de las modificaciones esteroidales en la diosgenina sobre la actividad biológica, se llevó a cabo un estudio de viabilidad celular mediante CV (cristal violeta) en la línea celular cancerígena MCF-7 y en hFB, como modelo de células sanas. Para estas pruebas se utilizaron los compuestos **10**, **12** y la diosgenina.

a)

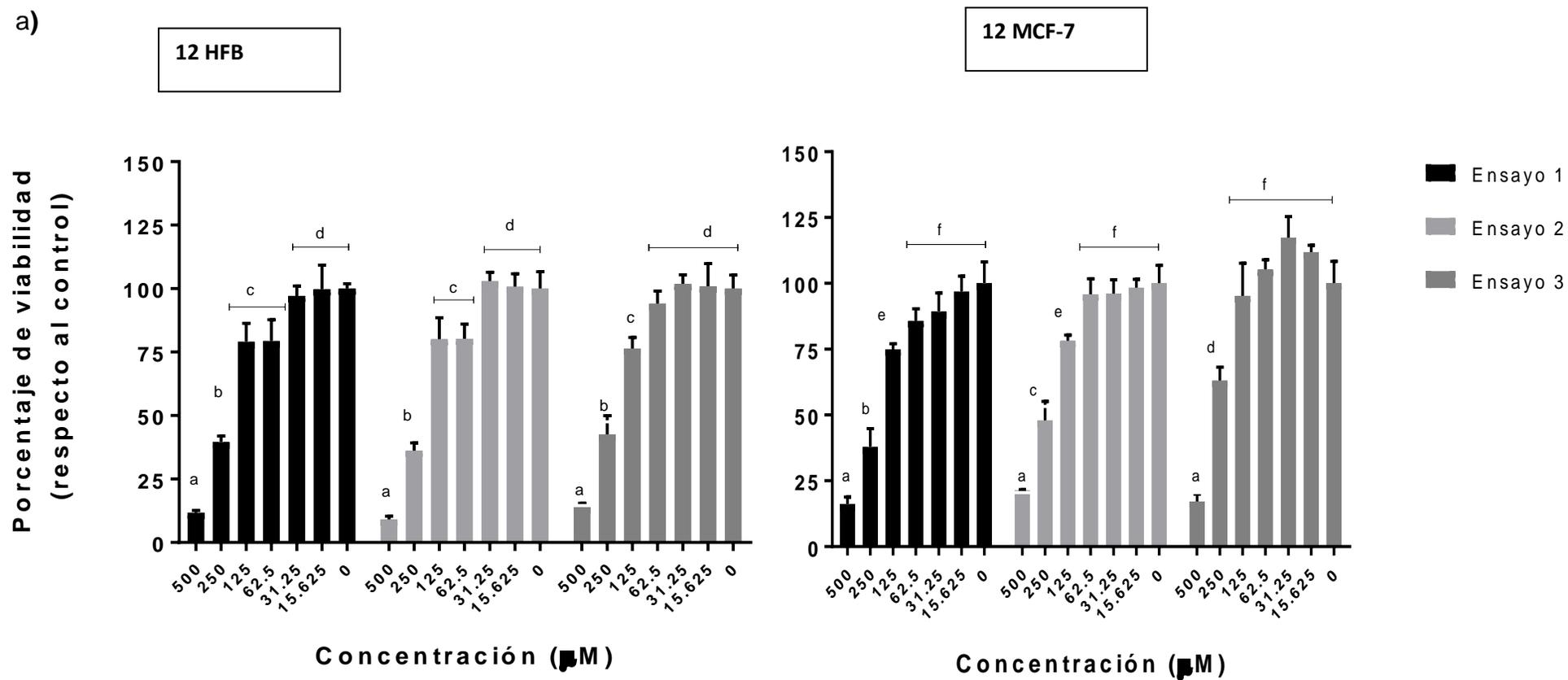


Figura 10. Gráficos de actividad antiproliferativa mediante CV de tres ensayos independientes sobre MCF-7 y hFB a 48 h de incubación con el compuesto 12

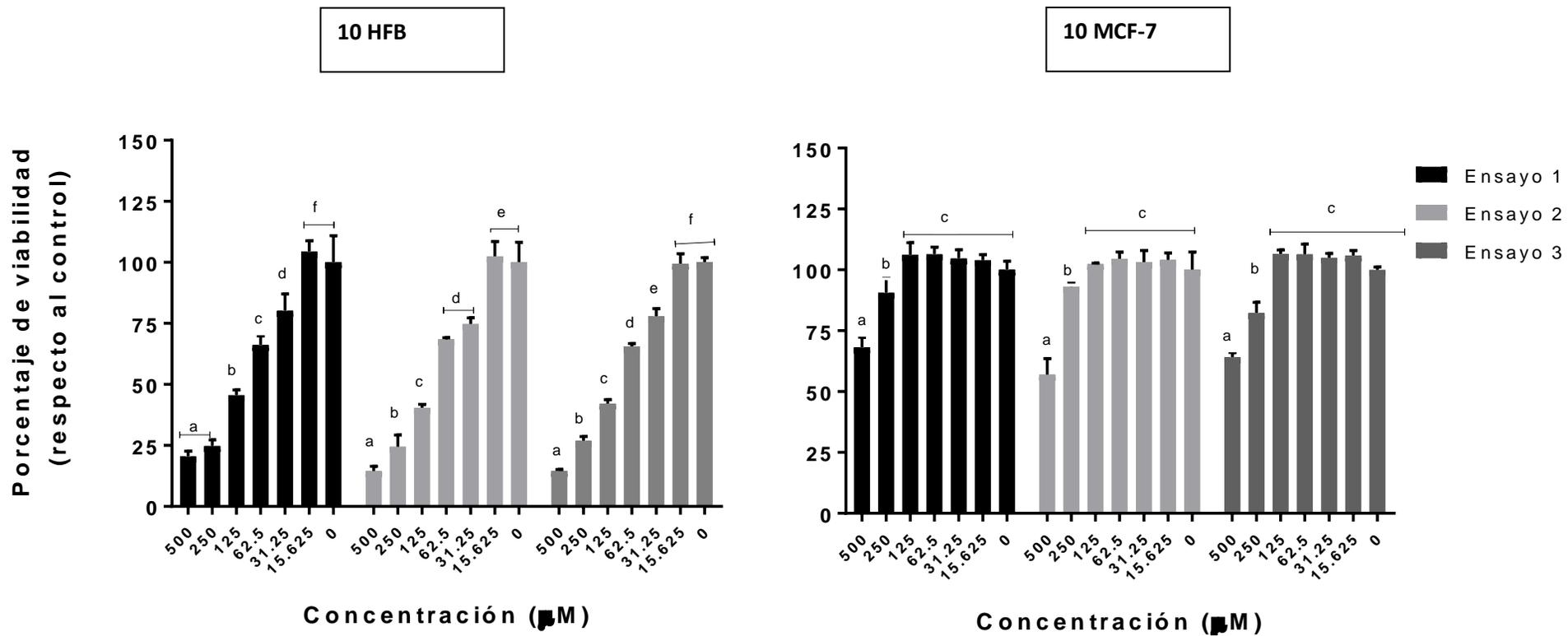


Figura 11. Gráficos de actividad antiproliferativa mediante CV de tres ensayos independientes sobre MCF-7 y hFB a 48 h de incubación con el compuesto 10

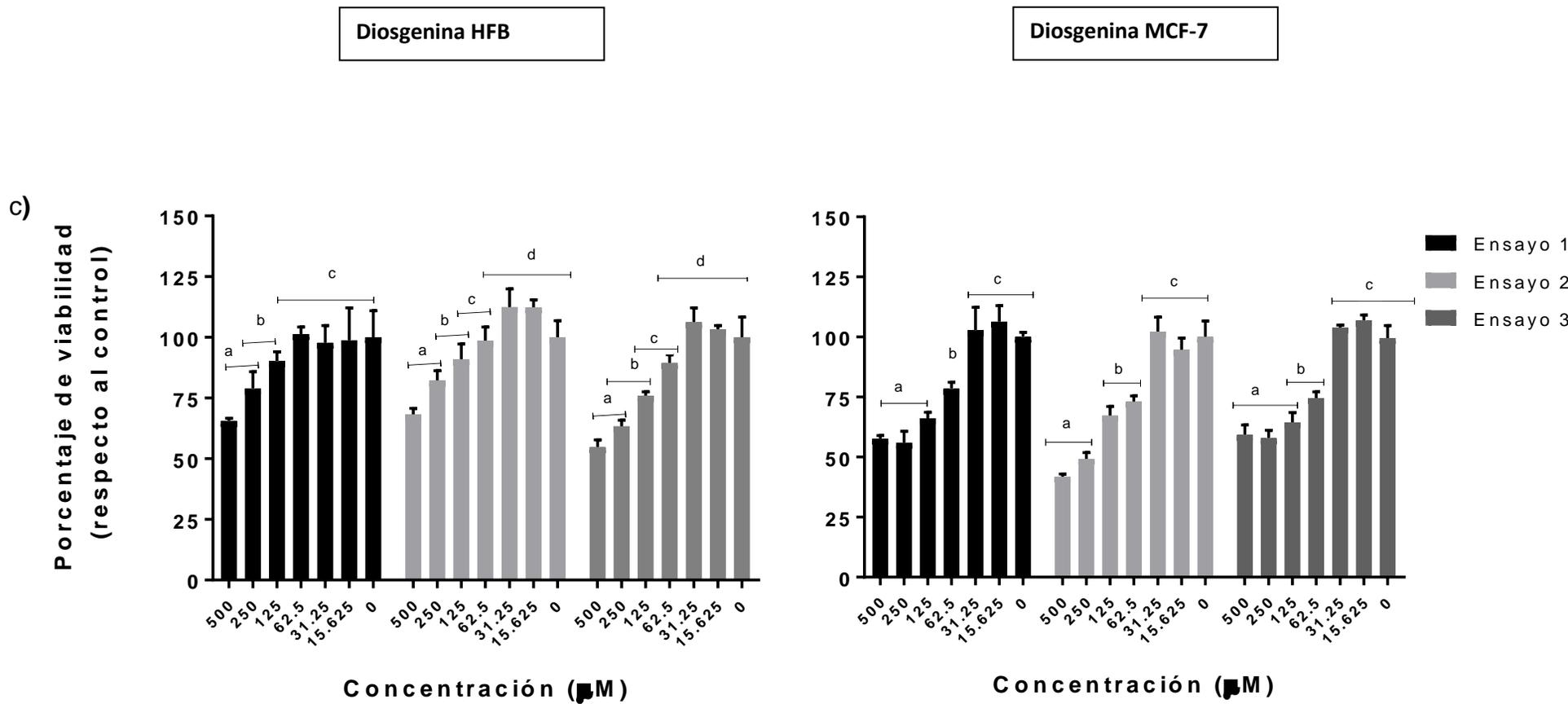


Figura 12. Gráficos de actividad antiproliferativa mediante CV de tres ensayos independientes sobre MCF-7 y hFB a 48 h de incubación con la diosgenina

En las figuras 10, 11 y 12 se muestran los resultados, de los tres ensayos independientes por triplicado, de la actividad sobre los fibroblastos y las células MCF-7 de los compuestos **10**, **12** y diosgenina. Como puede observarse el compuesto **12** presenta mayor actividad sobre ambas líneas celulares, mientras que el compuesto **10** resulta ser más tóxico para los hFB, pero inactivo en la línea celular MCF-7. También se puede ver que la modificación realizada sobre la diosgenina la hace más hidrófila, por lo que tiene un efecto positivo en cuanto a actividad, ya que la actividad del derivado **12** es casi 2 veces mayor que la de la diosgenina. En la figura 13, se muestra una foto de las células tras la exposición con el compuesto **12**.

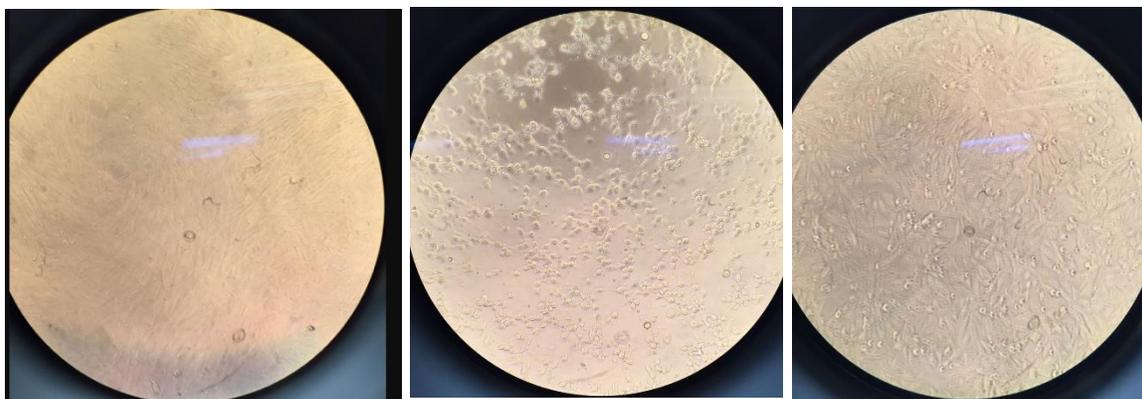


Figura 13. Fotos de las células tras la exposición del compuesto 12 a) Control hFB b) hFB + 500 μM (398.22 $\mu\text{g}/\text{m}$) c) MCF-7+500 μM (398.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Por otro lado, para el compuesto **10** el efecto del compuesto depende de la línea celular y de la concentración, observándose efectos sobre la línea de hFB a concentraciones mayores a 15.625 μM . En la línea MCF-7 el efecto antiproliferativo se da a concentraciones mayores de 125 μM . En cuanto a la diosgenina se observa un efecto dependiente de la línea celular y la concentración, si bien en los hFB se observa un incremento en la toxicidad dependiente de la concentración, en la línea MCF-7 se obtuvo diferencia significativa, con respecto al control en el rango de 500 a 62.5 μM .

Tabla 21. Valores de concentración inhibitoria media IC₅₀ para los diferentes compuestos en células MCF-7 y hFB

Compuesto	Línea celular	IC ₅₀ promedio (µM)	Std Des (µM)
12	hFB	251.77	50.61
	MCF-7	202.41	3.82
10	hFB	96.95	37.38
	MCF-7	> 500	-
Diosgenina	hFB	> 500	-
	MCF-7	401.27	62.30

En la tabla 21 se pueden observar los valores de concentración para alcanzar una inhibición de la proliferación del 50 % en las líneas celulares MCF-7 y hFB cuando interactúan con la diosgenina y los compuestos **10** y **12**. Como puede verse el compuesto **12** tuvo una mejor actividad con respecto a la diosgenina sobre la línea celular cancerígena MCF-7; la concentración necesaria para inhibir en 50% el crecimiento de las células es prácticamente la mitad de lo requerido de diosgenina. También puede verse que el compuesto **10** no presenta actividad sobre las células cancerígenas, lo que pudiera estar asociado a la falta de solubilidad, sin embargo, ocurre lo contrario con las células sanas hFB, por lo que para explicar su comportamiento son necesarios estudios del mecanismo de acción sobre ambas líneas celulares.

CONCLUSIONES

De acuerdo a las Reglas de Lipinsky y con ayuda del programa de simulación admetSAR se logró seleccionar los fragmentos idóneos con base en sus propiedades de solubilidad, permeabilidad en CaCo_2 y toxicidad oral aguda, a partir de lo cual se estableció la ruta de síntesis adecuada para obtener los compuestos planteados **12**. Cada uno de estos compuestos y sus intermediarios se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas de FT-IR, RMN y HRMS.

La obtención del compuesto **13**, uno de los más favorables de acuerdo a las simulaciones, no fue obtenido debido a que en el último paso de reacción se favorece la hidrólisis en el hidroxilo de la diosgenina.

Se estableció una nueva ruta de síntesis a través de mecanoquímica para el compuesto **8** (ácido 4-oxo-4-(prop-2-in-1-iloxi) butanoico), impactando en una disminución del tiempo de reacción y disminuyendo el uso de disolventes.

La incorporación del fragmento hidrófilo en la diosgenina permitió modular la hidrosolubilidad de ésta, con lo cual se mejoraron las propiedades de la actividad citotóxica de la diosgenina, ya que de acuerdo con la evaluación de la actividad citotóxica de los compuestos **10** y **12** en la línea cancerígena MCF-7, mostró que el derivado **12** es dos veces más activo sobre MCF-7 que la diosgenina, con valores de IC_{50} de $202.41 \pm 3.82 \mu\text{M}$ y $401.27 \pm 62.30 \mu\text{M}$, respectivamente, mientras que el compuesto **10** no muestra mejora ya que su IC_{50} es $>500 \mu\text{M}$.

La mayor actividad obtenida del compuesto **12**, es decir, el más hidrófilo, corroboro que los programas admetSAR y molinspiration son herramientas adecuadas para predecir la viabilidad de modificaciones estructurales en compuestos bioactivos.

REFERENCIAS

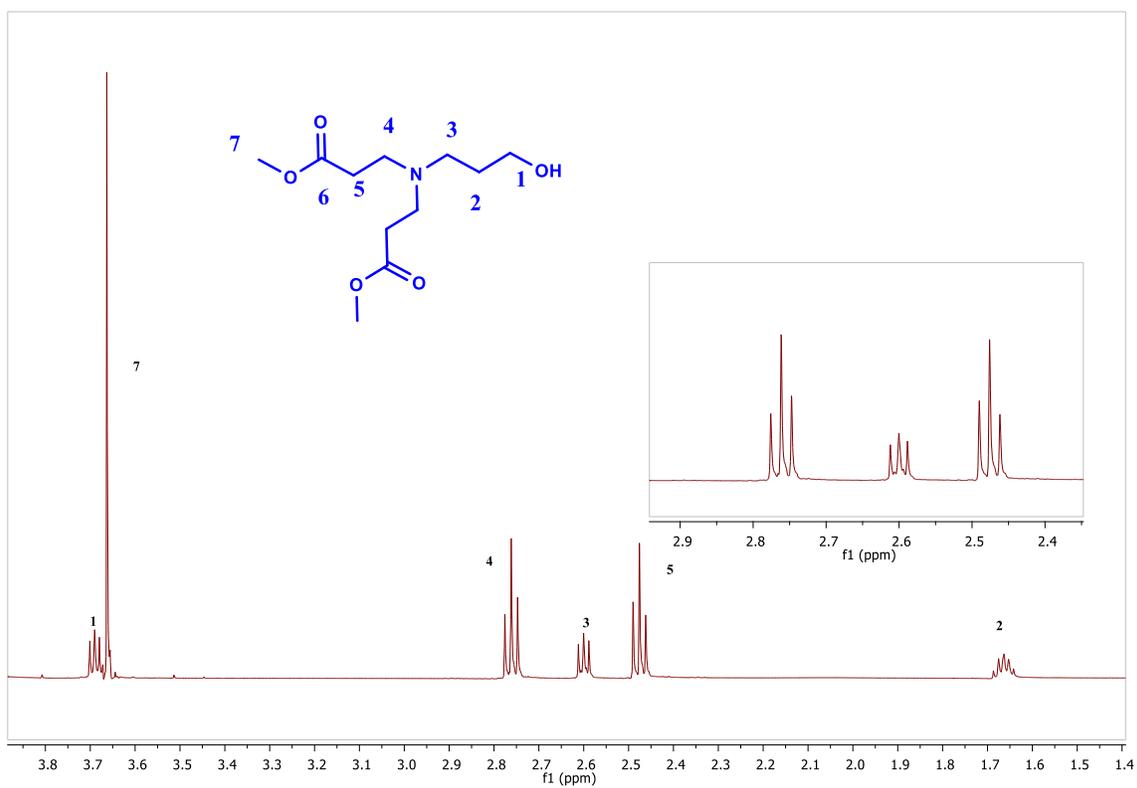
- Bajaj, Y. (1999). Biotechnology in agriculture and forestry 43. Medicinal and aromatic plants XI. *Biotechnology in agriculture and forestry 43. Medicinal and aromatic plants XI*.
- Bhal, S. K., Kassam, K., Peirson, I. G., & Pearl, G. M. (2007). The Rule of Five revisited: applying log D in place of log P in drug-likeness filters. *Molecular pharmaceutics*, 4(4), 556-560.
- Bonilla, A. C. (1985). Biotecnología de Esteroides. 1.
- Cheng, F., Li, W., Zhou, Y., Shen, J., Wu, Z., Liu, G., . . . Tang, Y. (2012). admetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. In: ACS Publications.
- Corbiere, C., Liagre, B., Terro, F., & BENEYTOU, J.-L. (2004). Induction of antiproliferative effect by diosgenin through activation of p53, release of apoptosis-inducing factor (AIF) and modulation of caspase-3 activity in different human cancer cells. *Cell research*, 14(3), 188-196.
- Deshpande, H., & Bhalsing, S. Plant Derived Novel Biomedicinal: Diosgenin.
- Hamid, A. A., Kaushal, T., Ashraf, R., Singh, A., Gupta, A. C., Prakash, O., ... & Shanker, K. (2017). (22 β , 25R)-3 β -Hydroxy-spirost-5-en-7-iminoxy-heptanoic acid exhibits anti-prostate cancer activity through caspase pathway. *Steroids*, 119, 43-52.
- INEGI. (2015). ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL... DÍA MUNDIAL DE LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA (19 DE OCTUBRE). Retrieved from <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>
- Jiang, S., Fan, J., Wang, Q., Ju, D., Feng, M., Li, J., . . . Ye, L. (2016). Diosgenin induces ROS-dependent autophagy and cytotoxicity via mTOR signaling pathway in chronic myeloid leukemia cells. *Phytomedicine*, 23(3), 243-252.
- Kaskiw, M. J., Tassotto, M. L., Mok, M., Tokar, S. L., Pycko, R., Th'ng, J., & Jiang, Z.-H. (2009). Structural analogues of diosgenyl saponins: synthesis and anticancer activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(22), 7670-7679.

- Kim, J. K., & Park, S. U. (2018). An update on the biological and pharmacological activities of diosgenin. *EXCLI journal*, 17, 24.
- Labrada, K. R. P. (2012). *Síntesis y caracterización de análogos y miméticos de saponinas espirostánicas*. (Doctor en Ciencias Químicas Investigación), Universidad de la Habana, La Habana Cuba.
- Li, J., Liu, X., Guo, M., LIU, Y., LIU, S., & YAO, S. (2005). Electrochemical study of breast cancer cells MCF-7 and its application in evaluating the effect of diosgenin. *Analytical sciences*, 21(5), 561-564.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 23(1-3), 3-25.
- Liu, M.-J., Wang, Z., Ju, Y., Wong, R. N.-S., & Wu, Q.-Y. (2005). Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with the disruption of Ca²⁺ homeostasis. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 55(1), 79-90.
- López Luengo, M. T. (2001). Saponósidos. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 20(6), 124-128.
- Manda, V. K., Avula, B., Ali, Z., Wong, Y.-H., Smillie, T. J., Khan, I. A., & Khan, S. I. (2013). Characterization of in vitro ADME properties of diosgenin and dioscin from *Dioscorea villosa*. *Planta Med*, 79(15), 1421-1428.
- McLaren, A., & Ng, V. V. (2014). Education: Clinical Review - Breast cancer. GP, 61. Retrieved from <http://go.galegroup.com.etechnology.idm.oclc.org/ps/i.do?action=interpret&iid=GALE%7CA240864067&v=2.1&u=pu&it=r&p=AONE&sw=w&authCount=1>
- Mohammad, Y., Fazili, K. M., Bhat, K. A., & Ara, T. (2017). Synthesis and biological evaluation of novel 3-O-tethered triazoles of diosgenin as potent antiproliferative agents. *Steroids*, 118, 1-8.
- Nagata, T., & Ebizuka, Y. (2002). *Medicinal and aromatic plants XII* (Vol. 12): Springer Science & Business Media.

- Ni, B., Dong, X.-H., Chen, Z., Lin, Z., Li, Y., Huang, M., . . . Zhang, W.-B. (2014). "Clicking" fluorinated polyhedral oligomeric silsesquioxane onto polymers: a modular approach toward shape amphiphiles with fluorous molecular clusters. *Polymer Chemistry*, 5(11), 3588-3597.
- OMS. (2015). Cáncer. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Patel, K., Gadewar, M., Tahilyani, V., & Patel, D. K. (2012). A review on pharmacological and analytical aspects of diosgenin: a concise report. *Natural products and bioprospecting*, 2(2), 46-52.
- Pina, S., & López, R. (2015). *Introducción al cultivo celular. Manual de técnicas.* .
- Raju, J., Patlolla, J. M., Swamy, M. V., & Rao, C. V. (2004). Diosgenin, a steroid saponin of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 13(8), 1392-1398.
- Raju, J., & Rao, C. V. (2011). Diosgenin, a steroid saponin constituent of yams and fenugreek: emerging evidence for applications in medicine. *Bioactive Compounds in Phytomedicine. Croatia: InTech*, 125.
- Ríos, P. R., Rivera, A. G., Cervantes, F. S., & Martínez, P. M. (2012). Tendencia de la mortalidad por cáncer en México: 1990-2012.
- S. Mirunalini, S. (2011). NOVEL EFFECTS OF DIOSGENIN –A PLANT DERIVED STEROID; A REVIEW. *Pharmacology online Newsletter*, 1, 726-736.
- Selim, S., & Al Jaouni, S. (2015). Anticancer and apoptotic effects on cell proliferation of diosgenin isolated from *Costus speciosus* (Koen.) Sm. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 301.
- Shawakfeh, K. Q., Al-Said, N. H., & Al-Zoubi, R. M. (2008). Synthesis of bis-diosgenin pyrazine dimers: New cephalostatin analogs. *Steroids*, 73(6), 579-584.
- Singh, M., Hamid, A., Maurya, A. K., Prakash, O., Khan, F., Kumar, A., . . . Bawankule, D. U. (2014). Synthesis of diosgenin analogues as potential anti-inflammatory agents. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 143, 323-333.

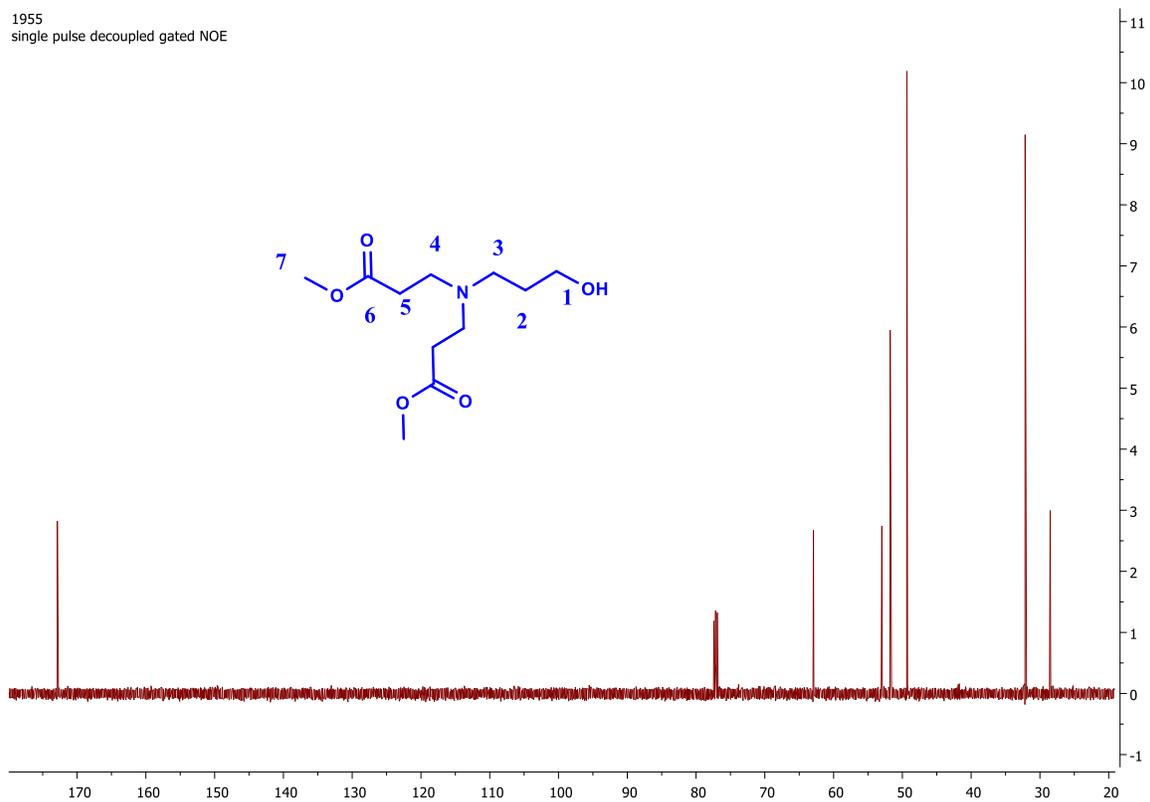
- Soto-Castro, D., Contreras, R. C. L., del Socorro Pina-Canseco, M., Santillán, R., Hernández-Huerta, M. T., Silva, G. E. N., ... & Rincón, S. (2017). solvent-free synthesis of 6 β -phenylamino-cholestan-3 β , 5 α -diol and (25r)-6 β -phenylaminospirostan-3 β , 5 α -diol as potential antiproliferative agents. *Steroids*, 126, 92-100.
- SSA. (2011). Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. Retrieved from http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2011/monografias/P_EPI_DE_LOS_TUMORES_MALIGNOS_M%C3%A9xico.pdf
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (Vol. 10): Universitat Jaume I.
- Tomlinson, T. R., & Akerele, O. (2015). *Medicinal plants: their role in health and biodiversity*. University of Pennsylvania press.
- Wang, B., Chun, J., Liu, Y., Han, L., Wang, Y.-s., Joo, E.-J., . . . Cheng, M.-s. (2012). Synthesis of novel diosgenyl saponin analogues and apoptosis-inducing activity on A549 human lung adenocarcinoma. *Organic & biomolecular chemistry*, 10(44), 8822-8834.

ANEXOS

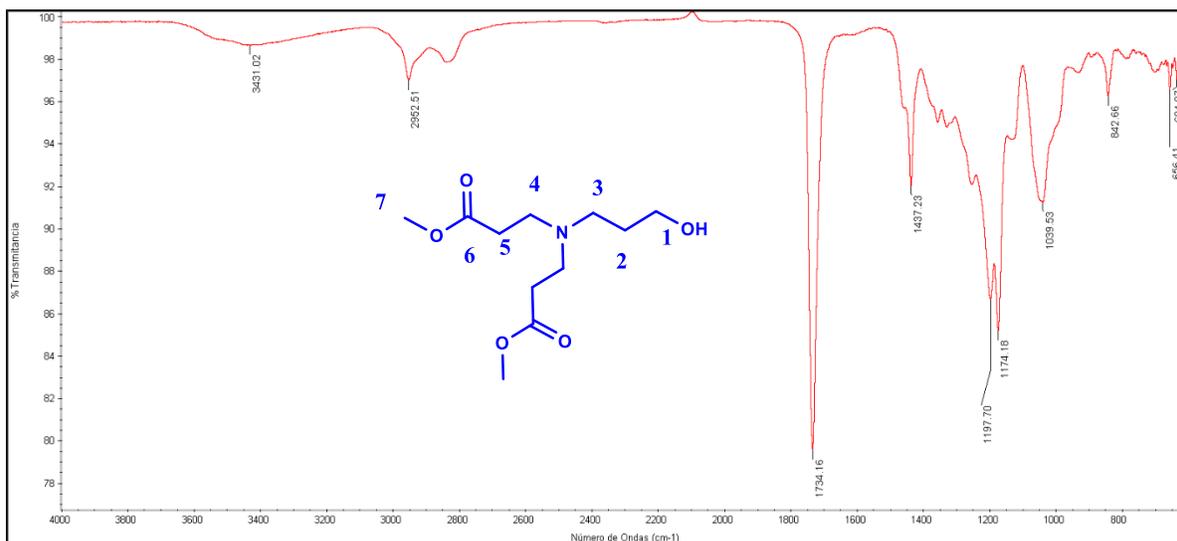


Anexo 1. RMN ¹H Compuesto 2

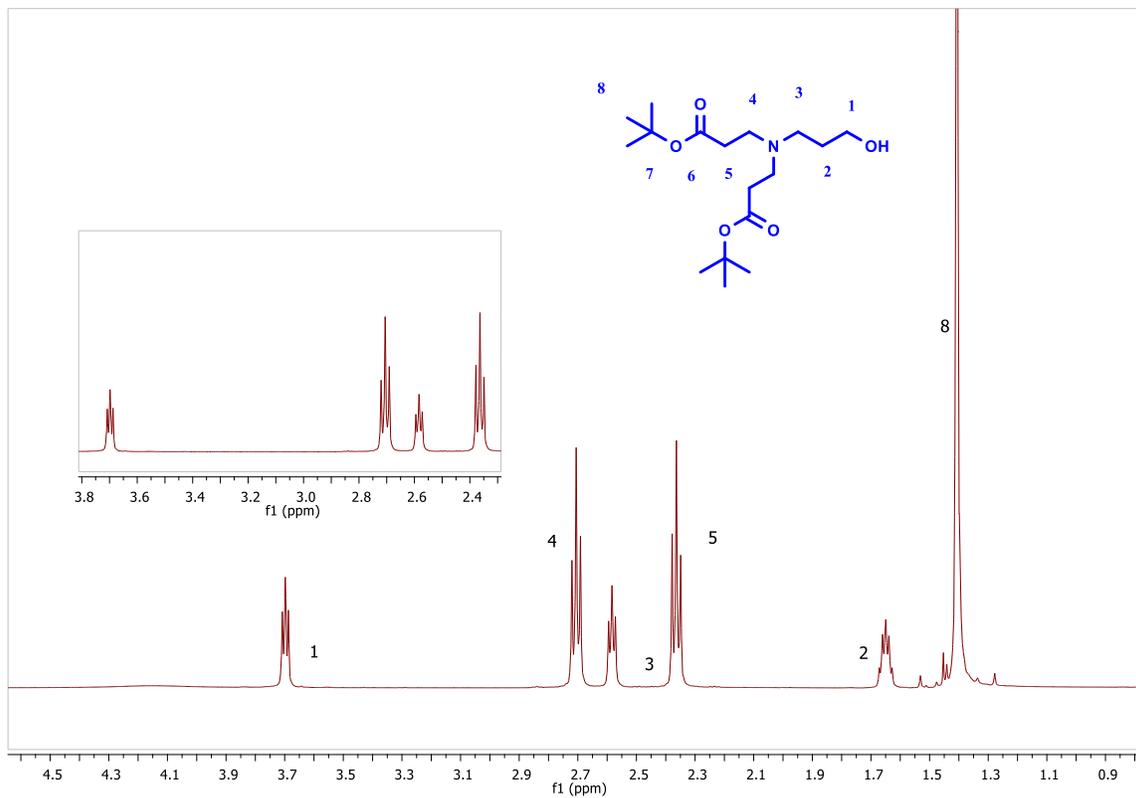
1955
single pulse decoupled gated NOE



Anexo 2. RMN ¹³C Compuesto 2

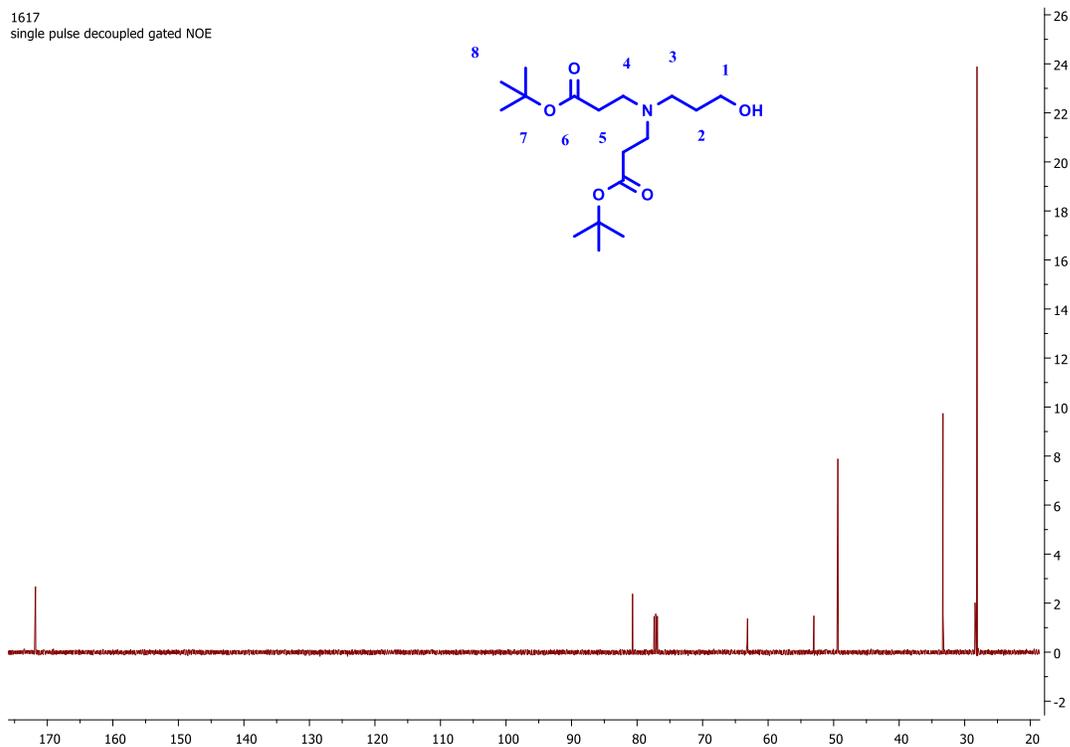


Anexo 3. FT-IR Compuesto 2

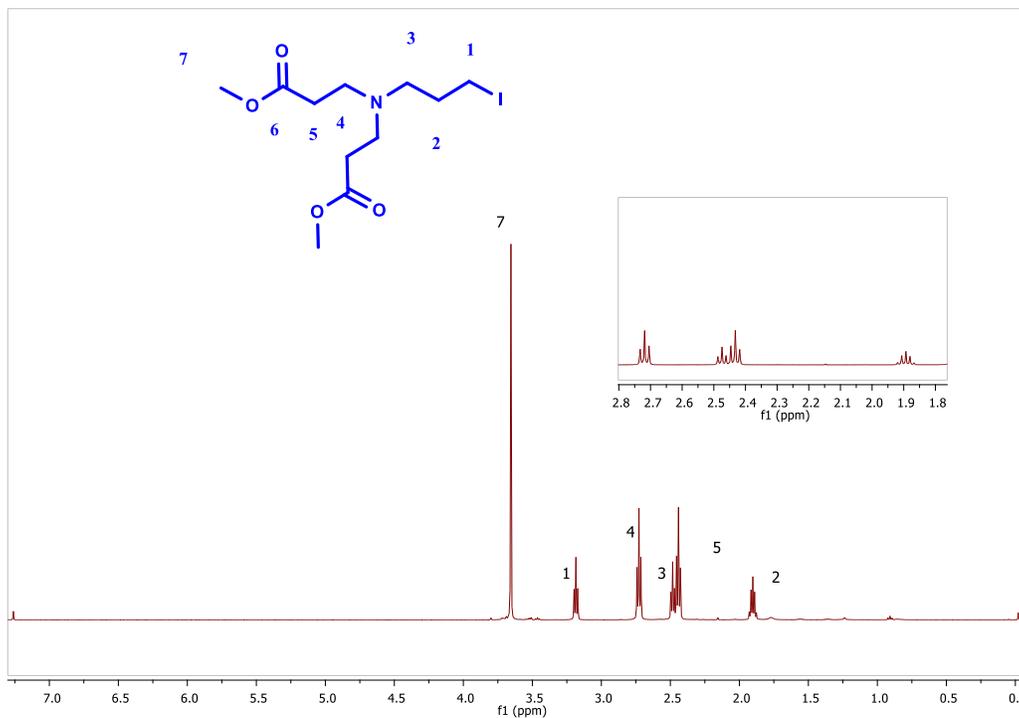


Anexo 4. RMN ¹H Compuesto 3

1617
single pulse decoupled gated NOE

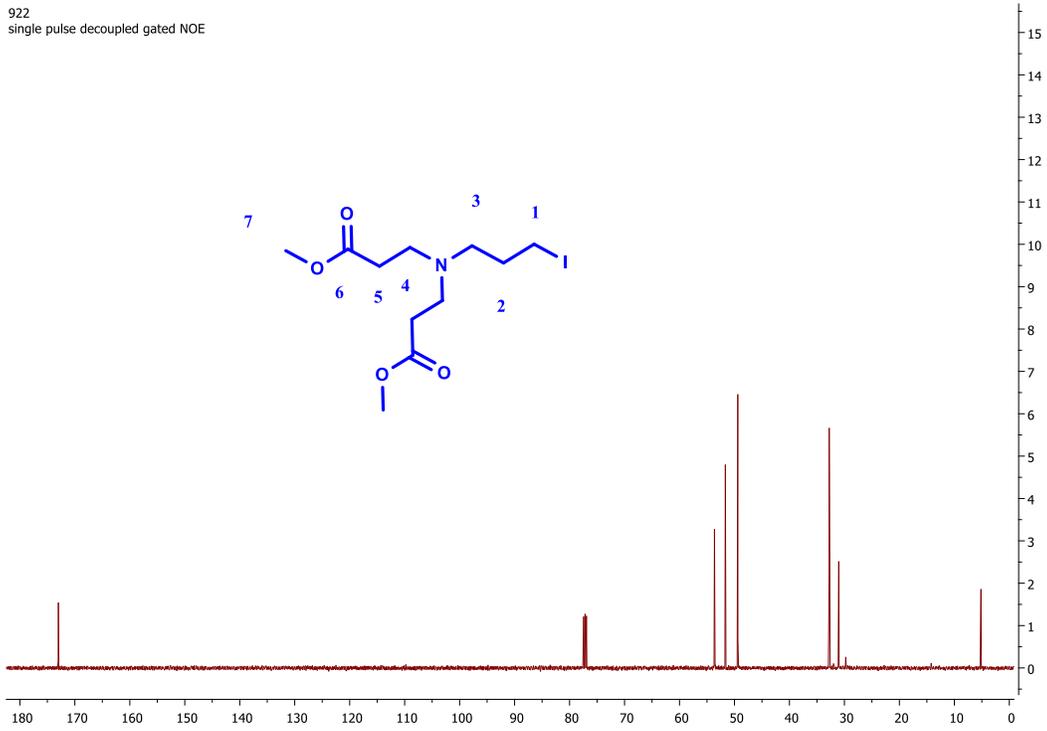


Anexo 5. RMN ¹³C Compuesto 3

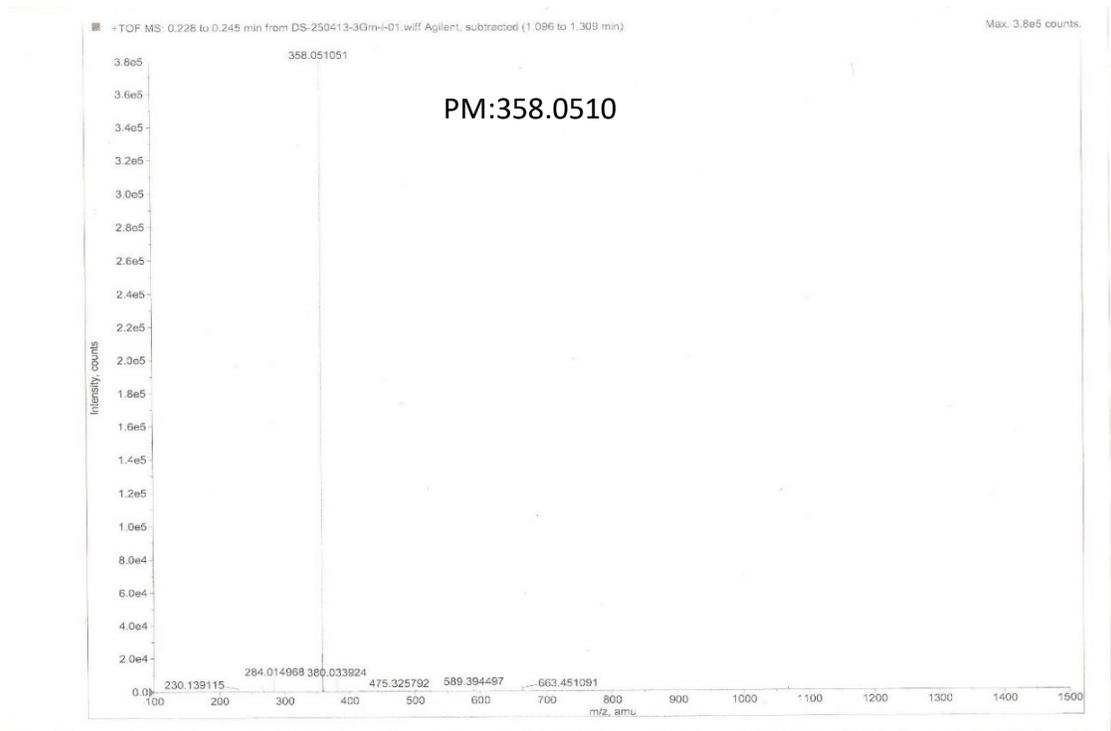


Anexo 6. RMN ¹H Compuesto 4

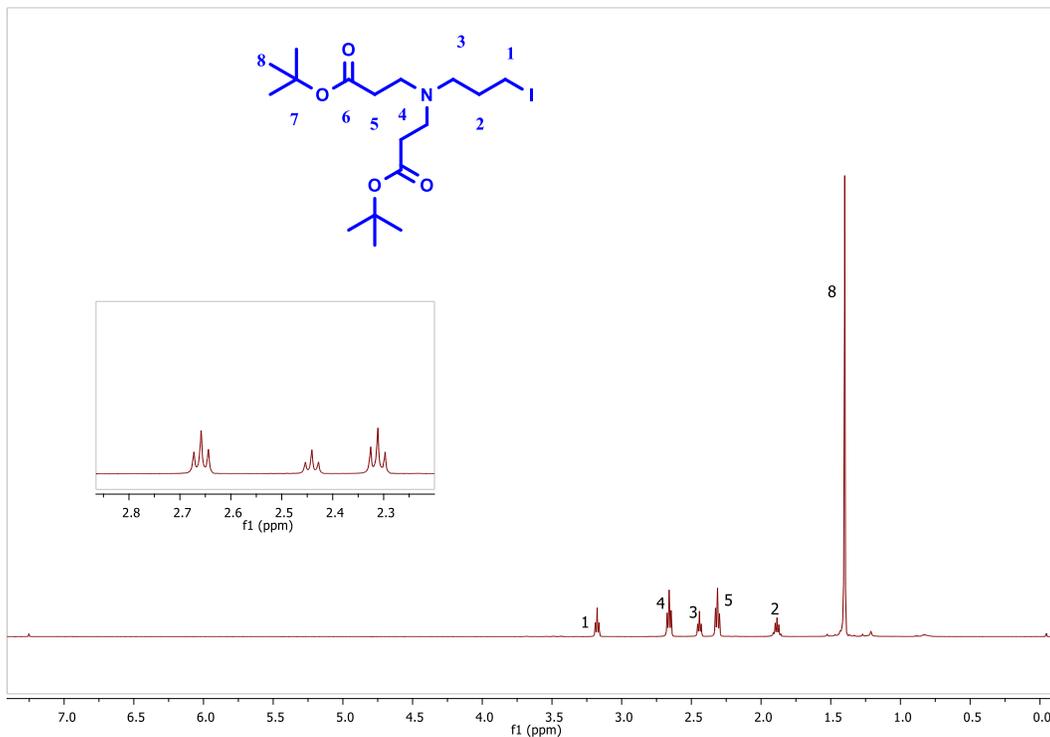
922
single pulse decoupled gated NOE



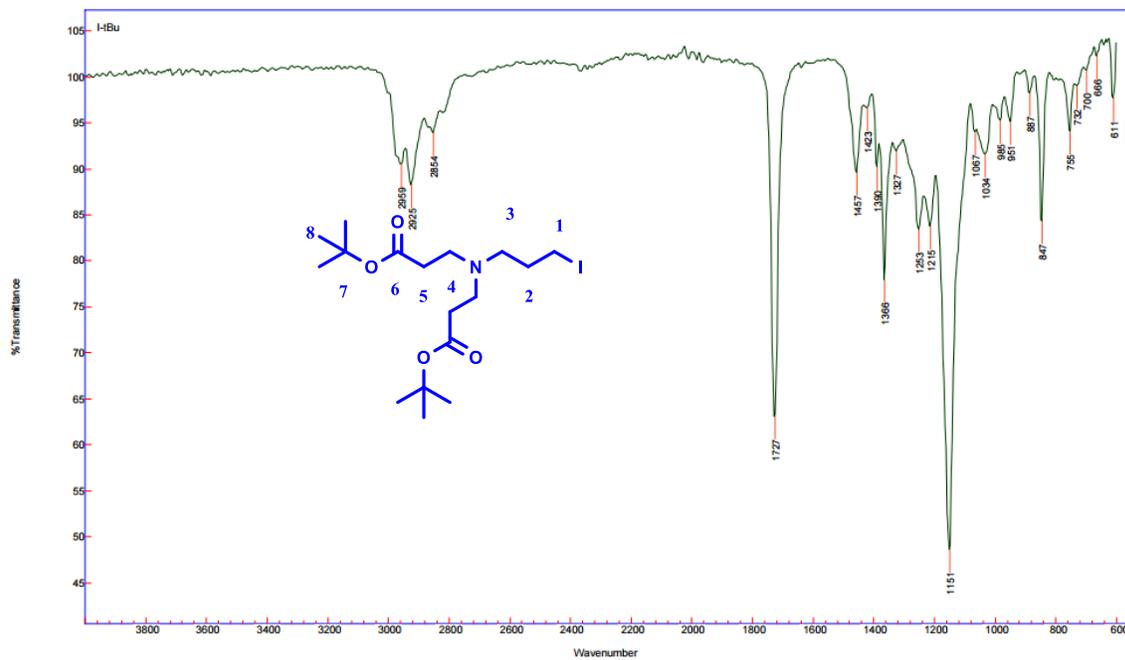
Anexo 7. RMN ¹³C Compuesto 4



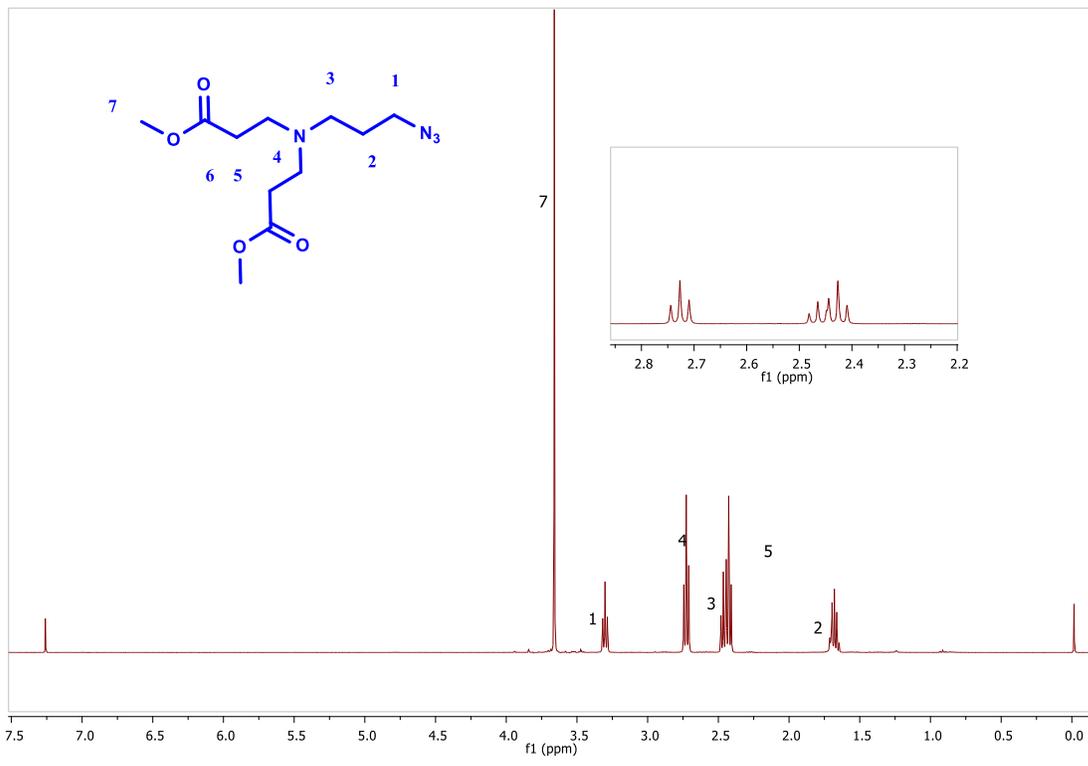
Anexo 8. HRMS ESI TOF Compuesto 4



Anexo 9. RMN ¹H Compuesto 5

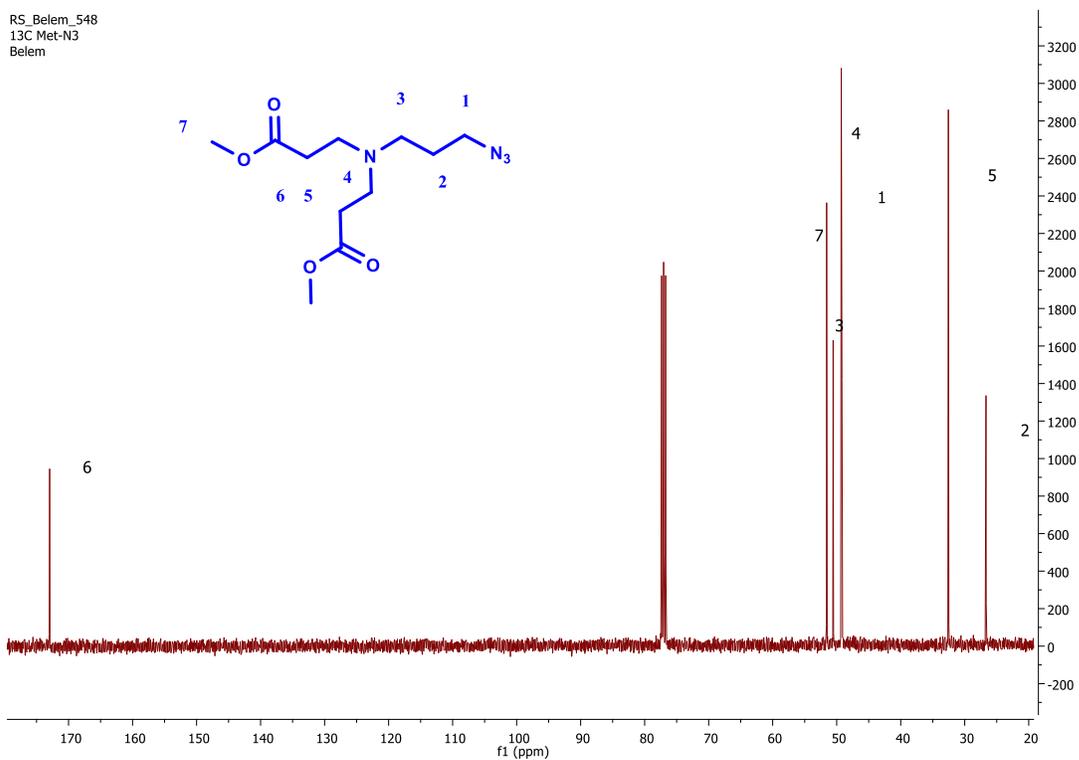


Anexo 10. FT-IR Compuesto 5

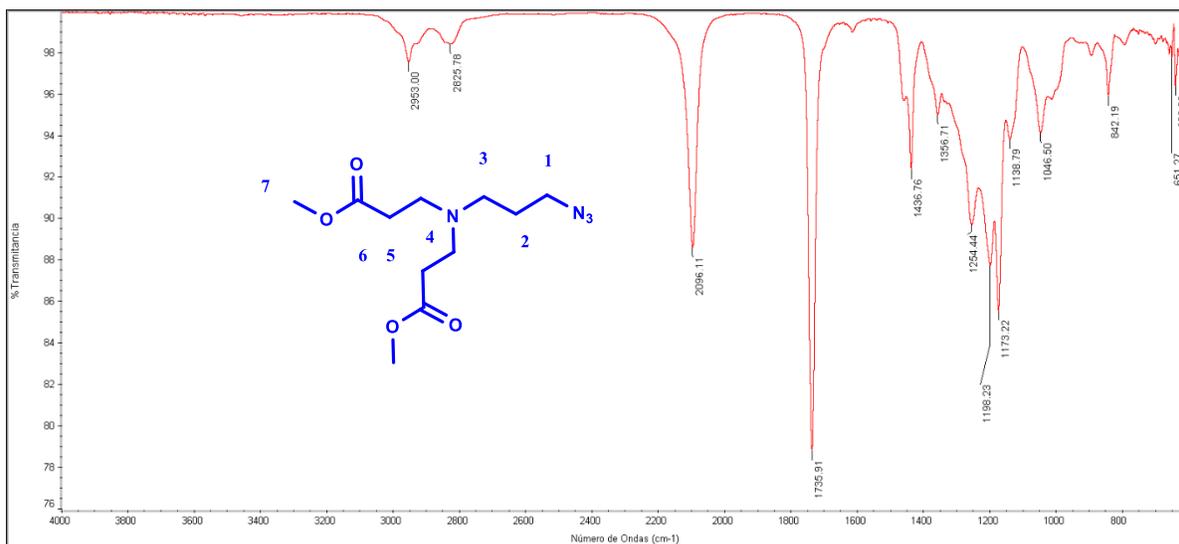


Anexo 11. RMN ¹H Compuesto 6

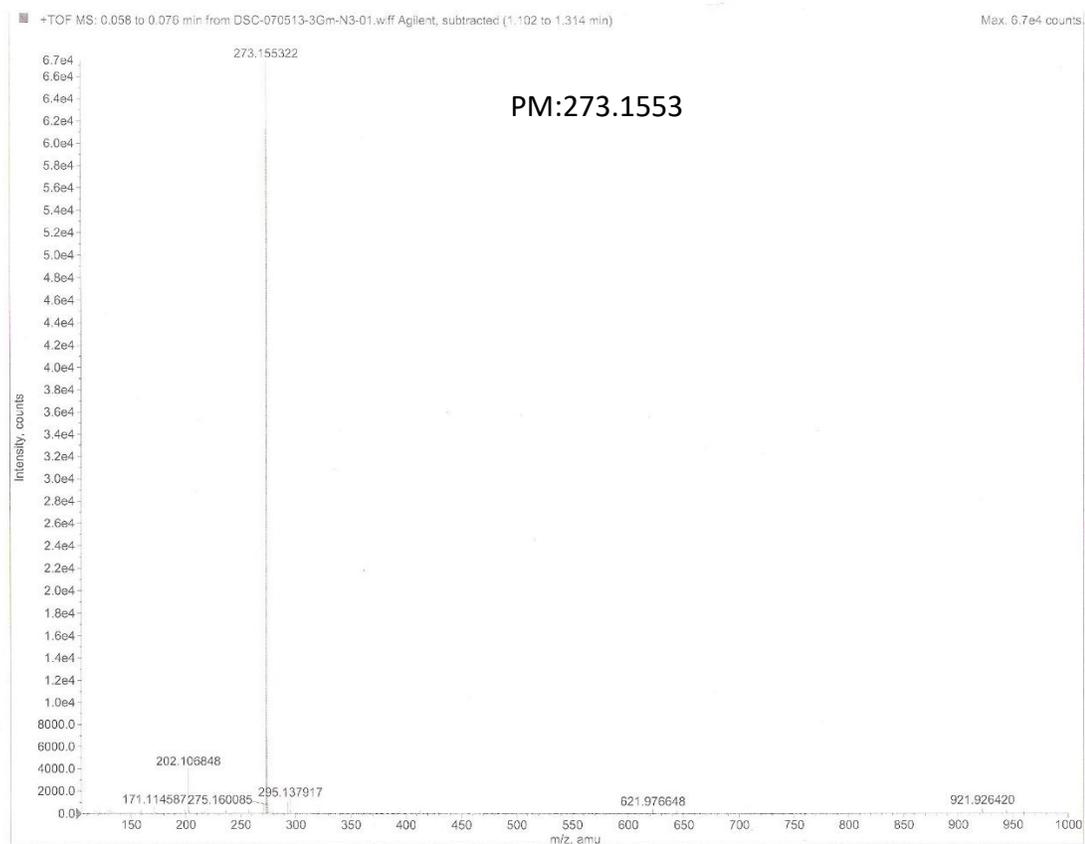
RS_Belem_548
 13C Met-N3
 Belem



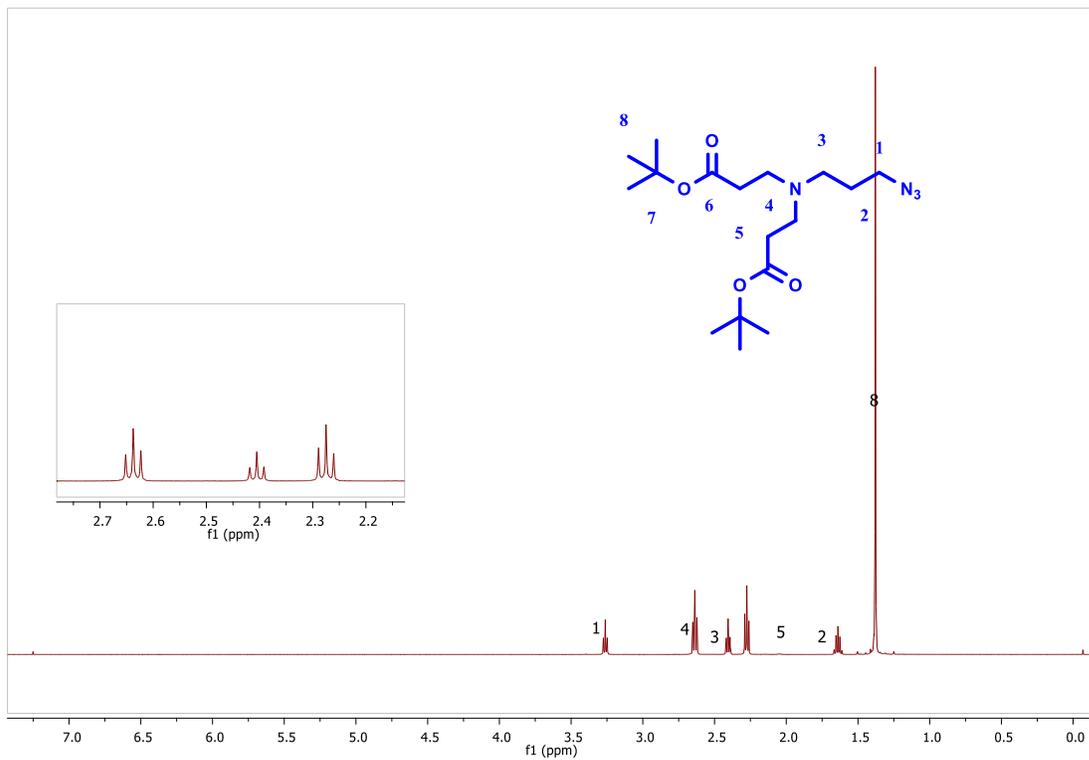
Anexo 12. RMN ¹³C Compuesto 6



Anexo 13. FT-IR Compuesto 6

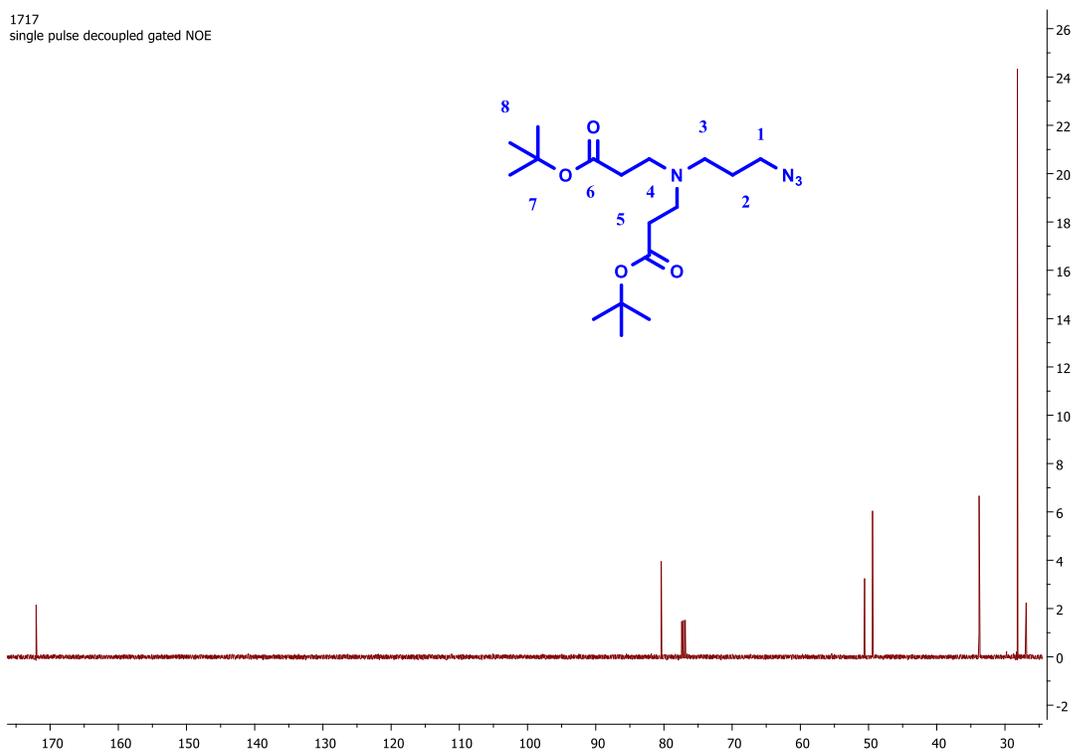


Anexo 14. HRMS ESI TOF Compuesto 6

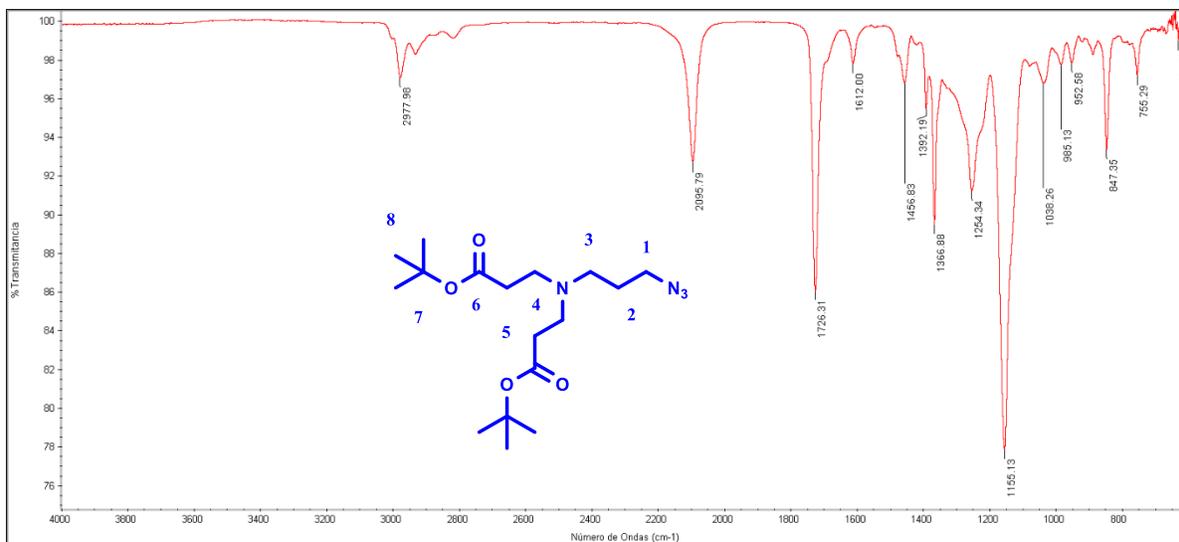


Anexo 16. RMN ¹H Compuesto 7

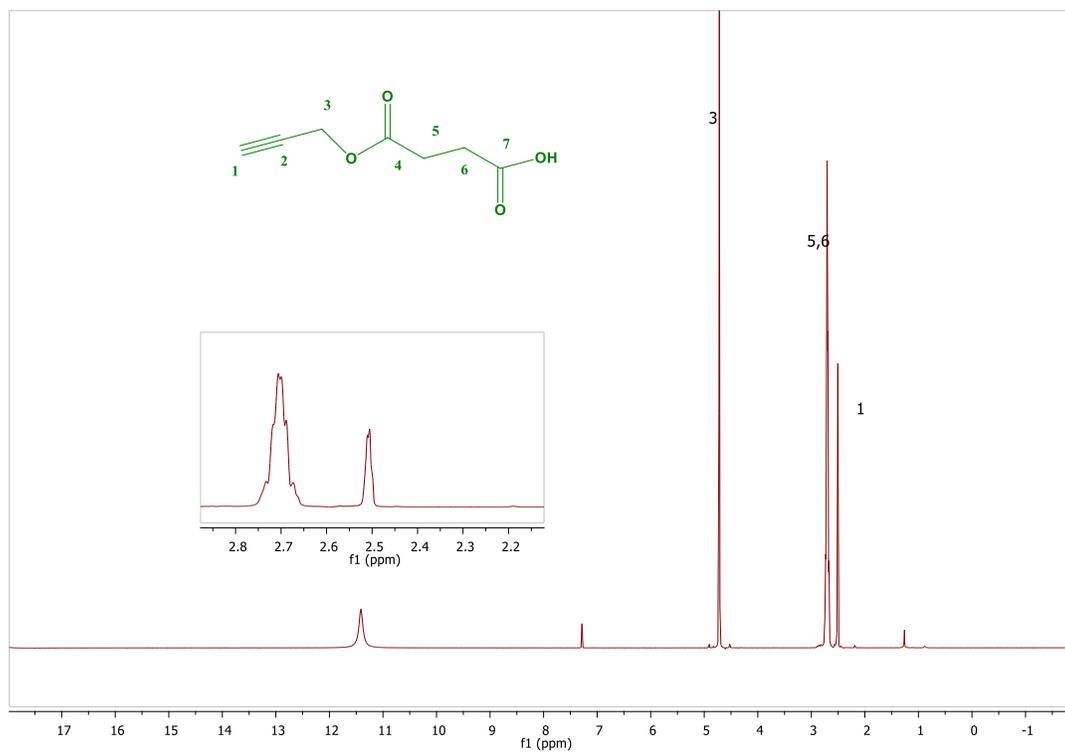
1717
single pulse decoupled gated NOE



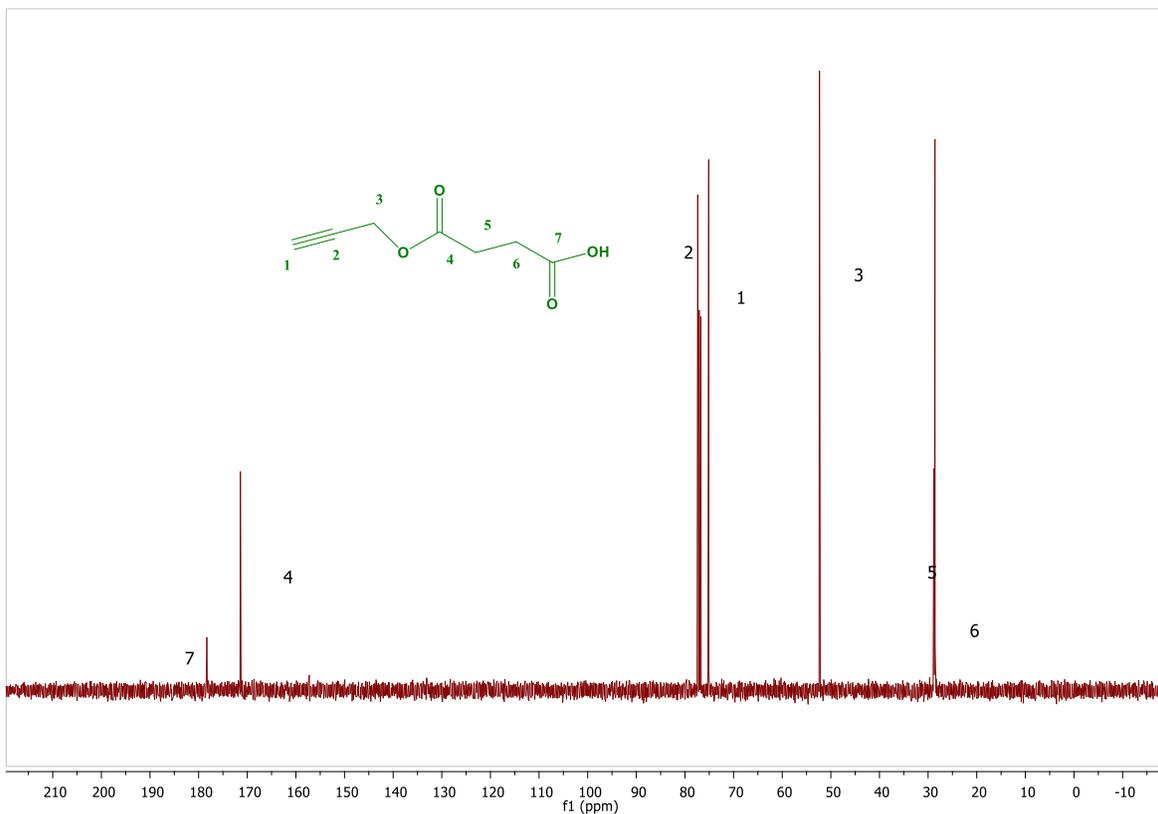
Anexo 17. RMN ¹³C Compuesto 7



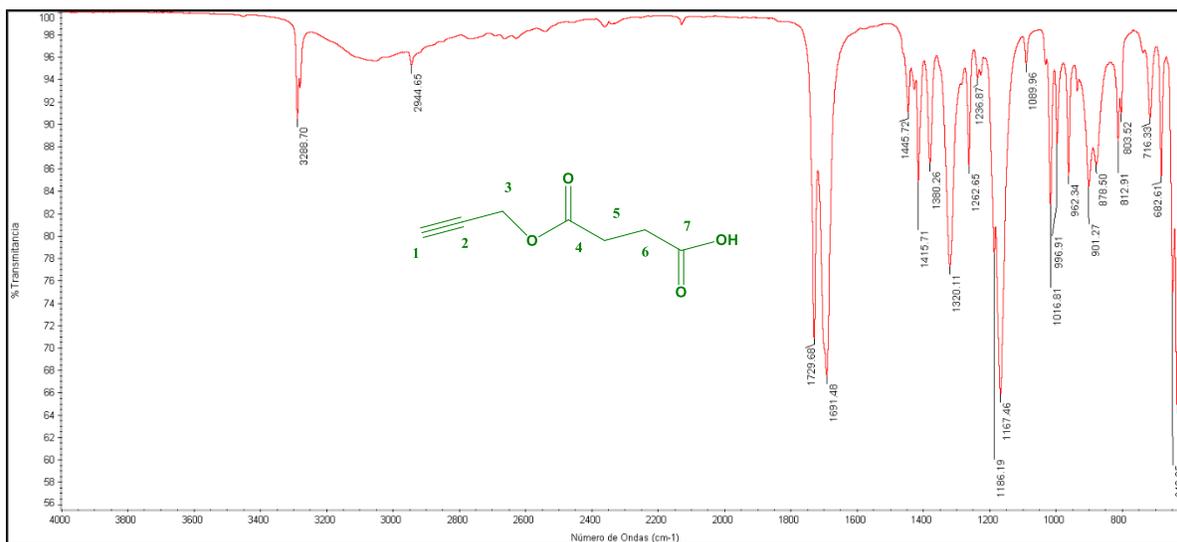
Anexo 18. FT-IR Compuesto 7



Anexo 19. RMN ¹H Compuesto 8

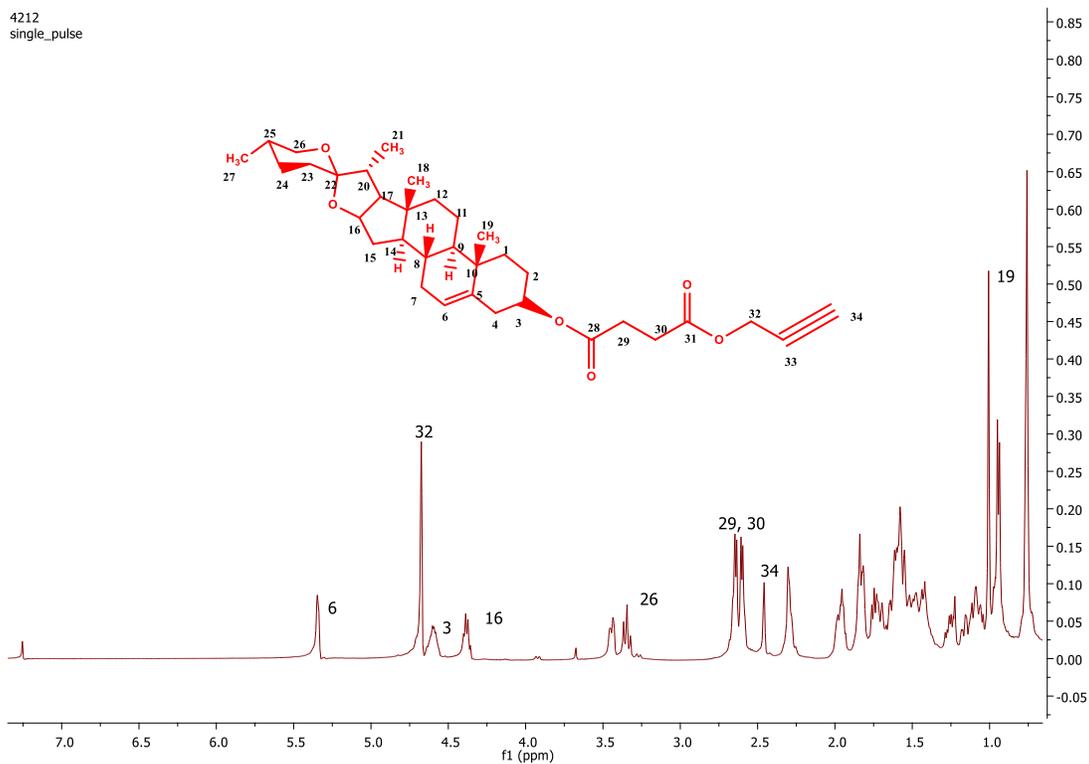


Anexo 20. RMN ¹³C Compuesto 8



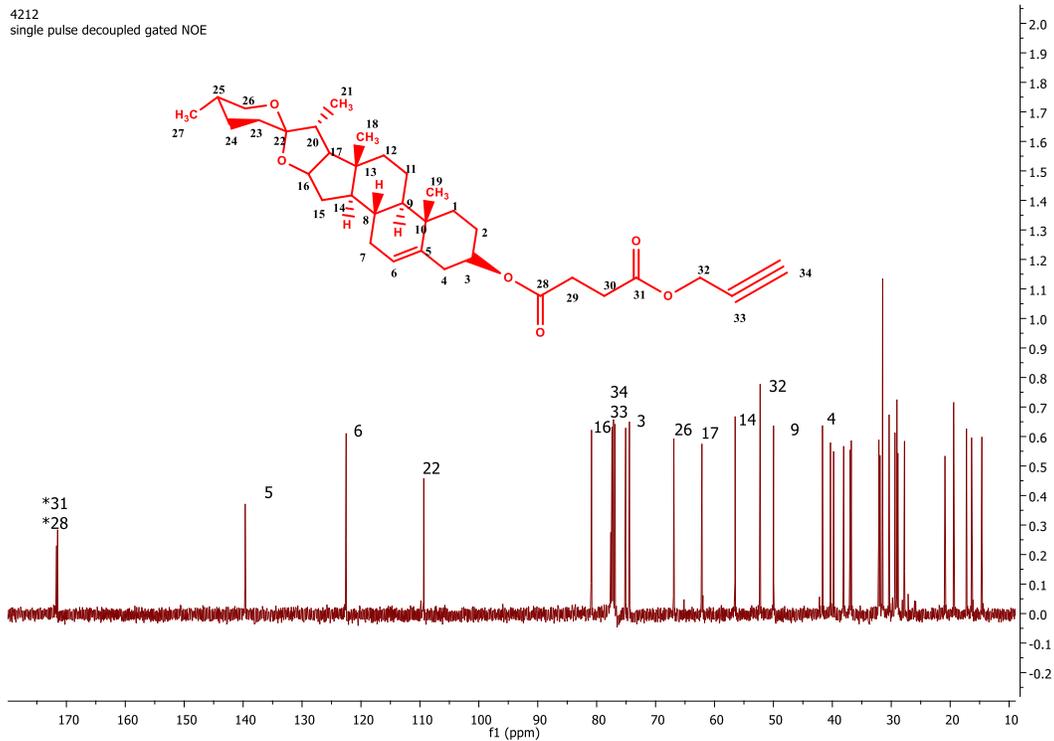
Anexo 21. FT-IR Compuesto 8

4212
single_pulse

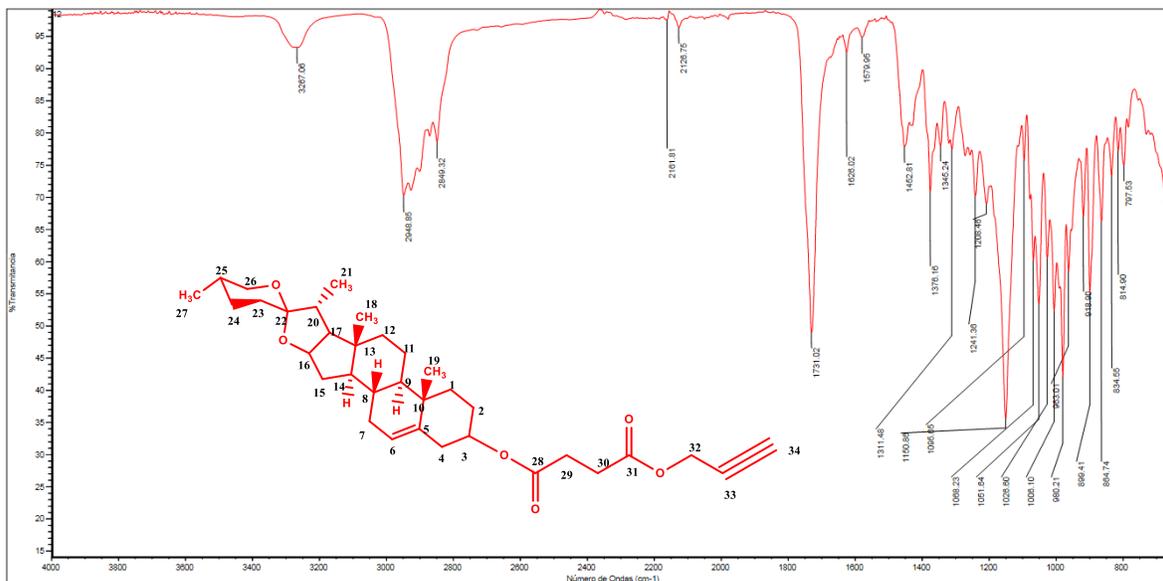


Anexo 22. RMN ¹H Compuesto 9

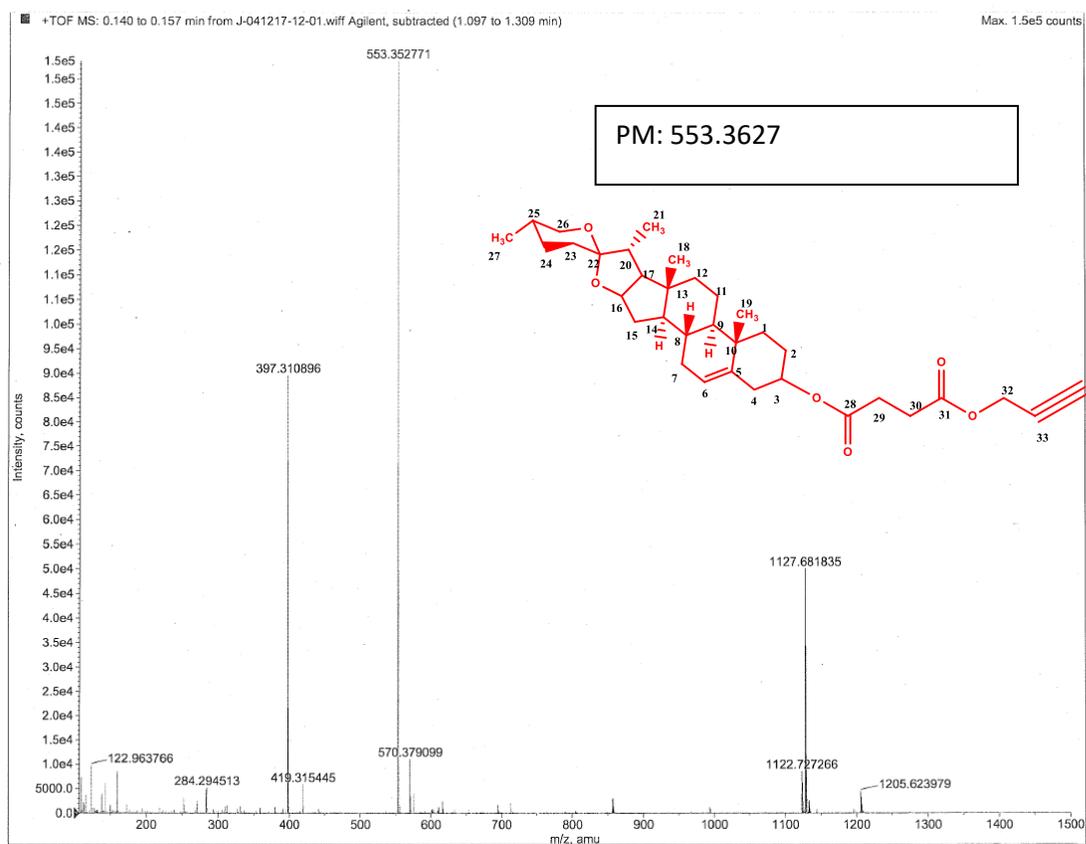
4212
single pulse decoupled gated NOE



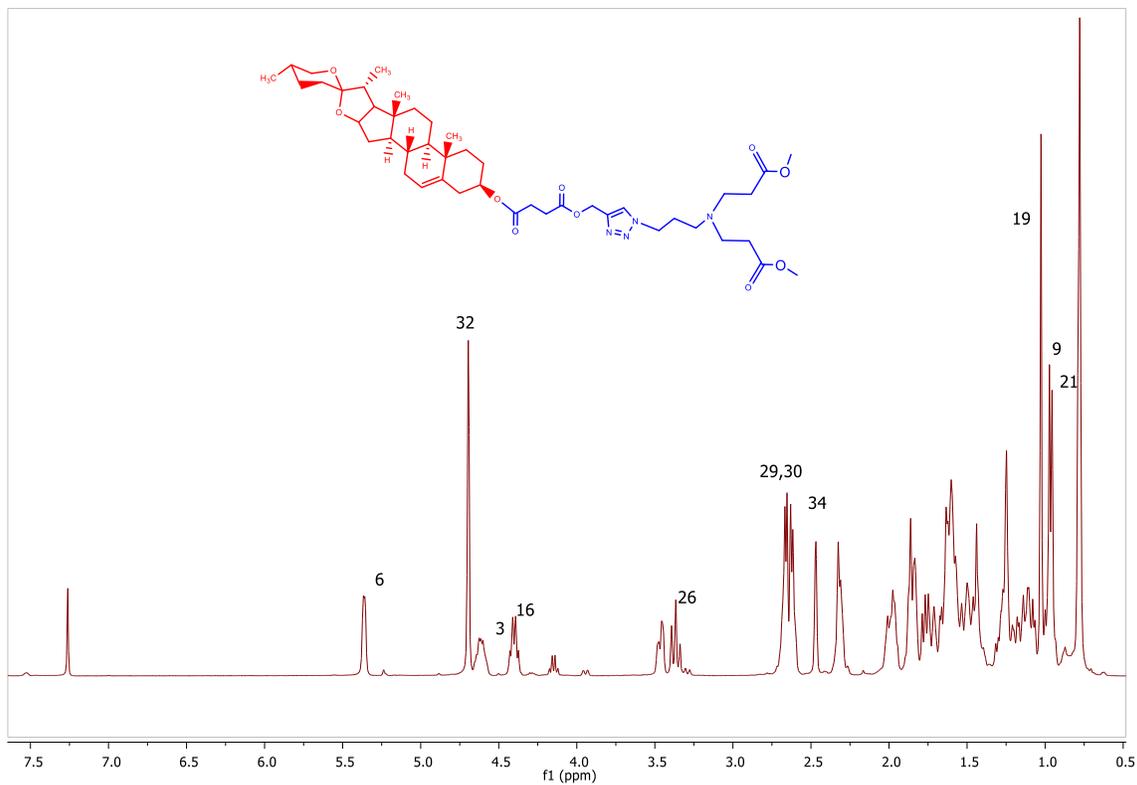
Anexo 23. RMN ¹³C Compuesto 9



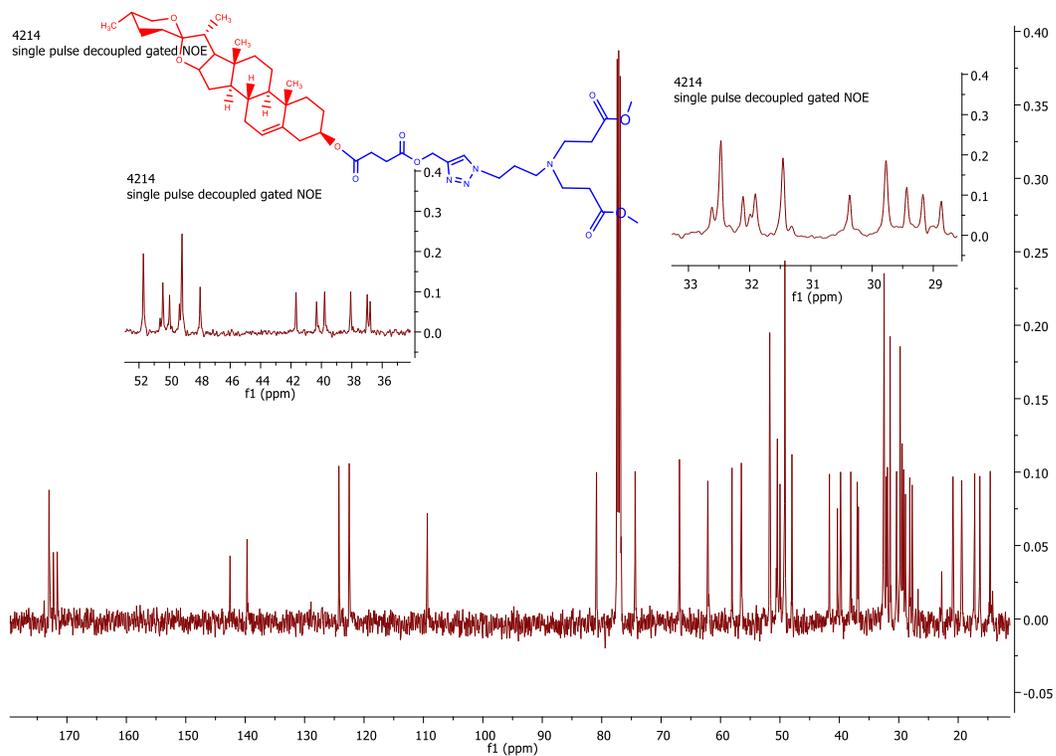
Anexo 24. FT-IR Compuesto 9



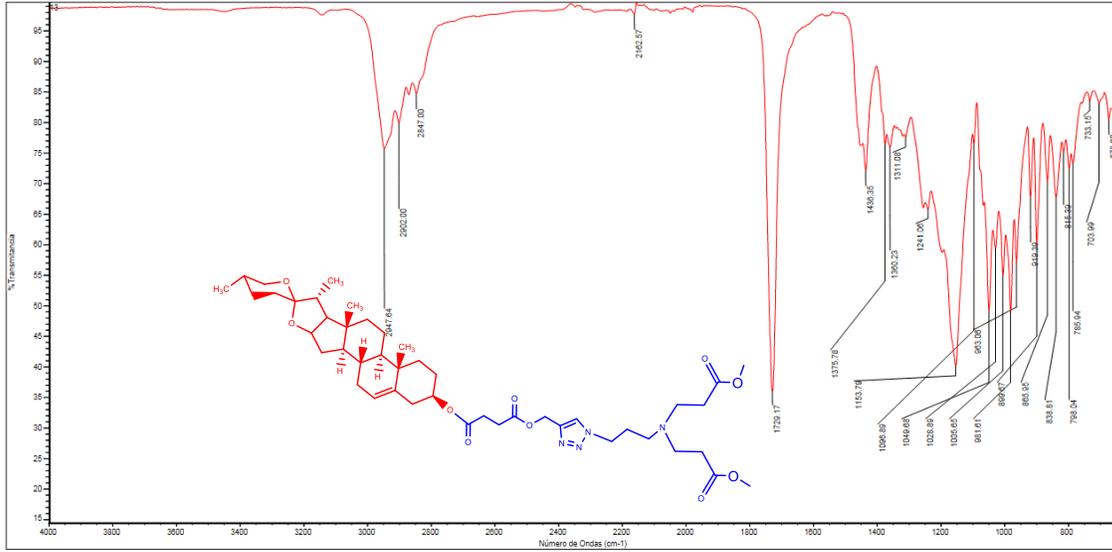
Anexo 25. HRMS ESI TOF Compuesto 9



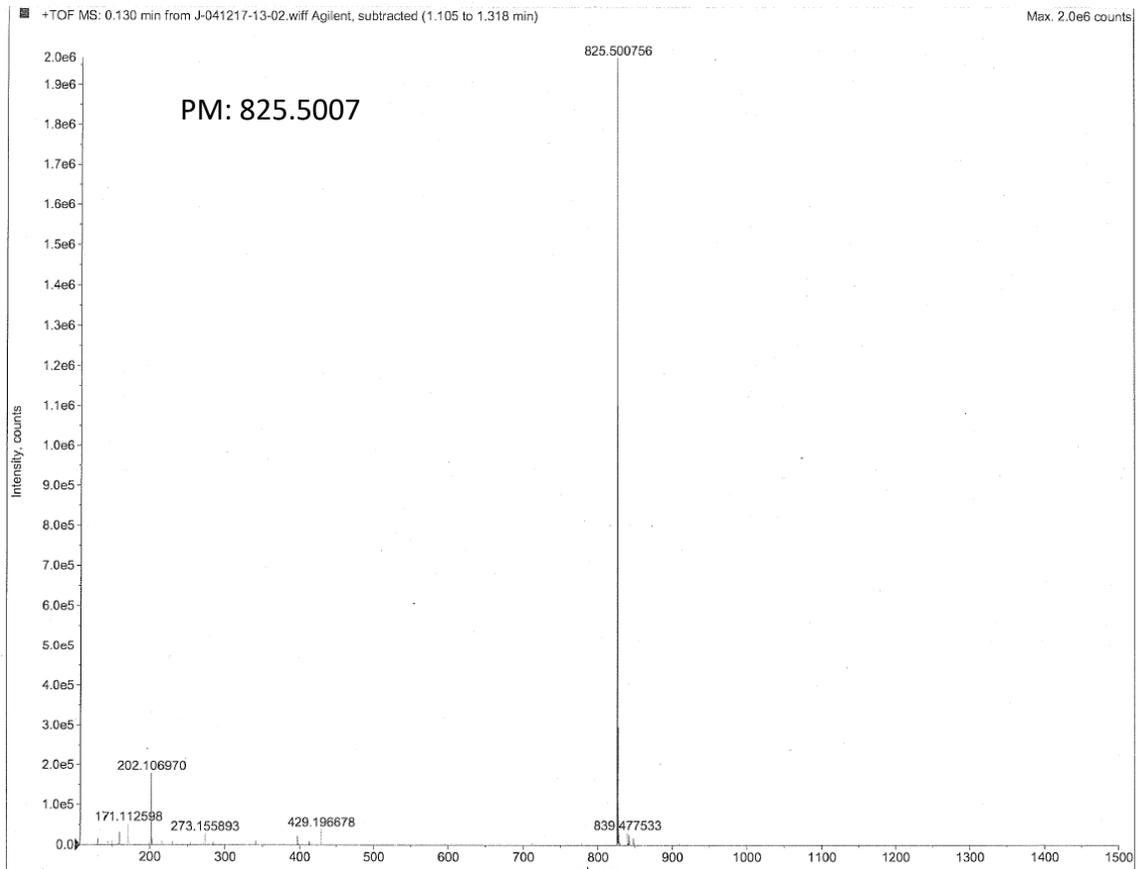
Anexo 26. RMN ¹H Compuesto 10



Anexo 27. RMN ¹³C Compuesto 10

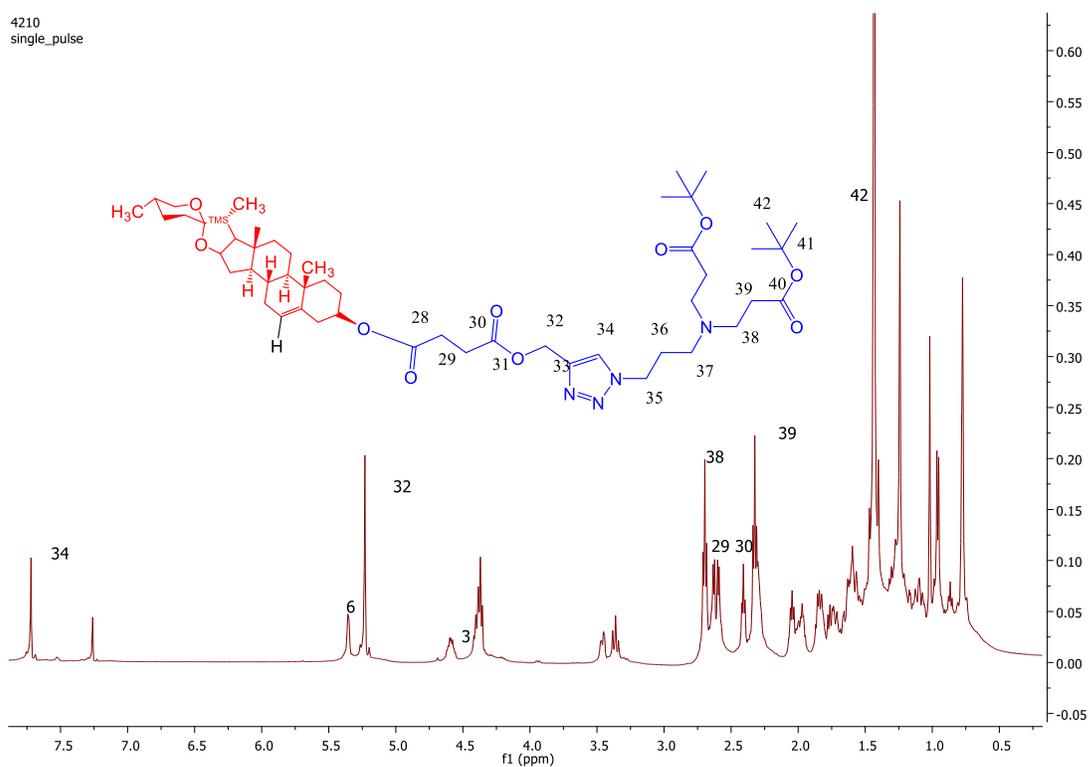


Anexo 28. FT-IR Compuesto 10



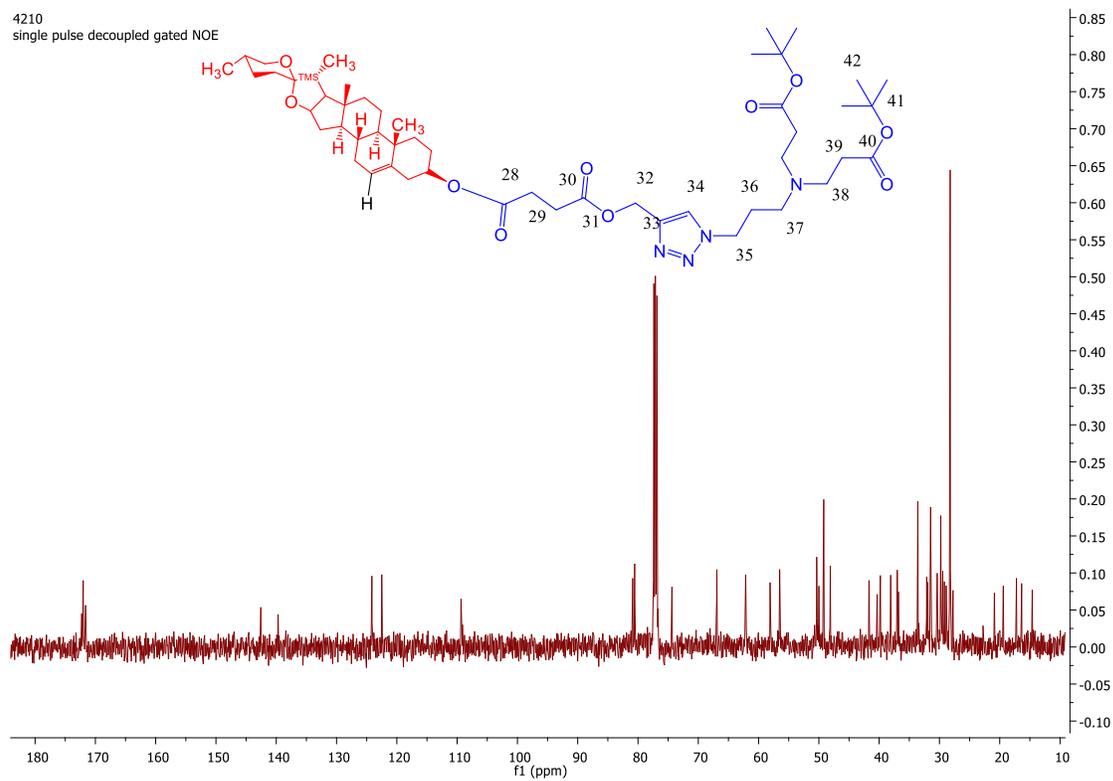
Anexo 29. HRMS ESI TOF Compuesto 10

4210
single_pulse

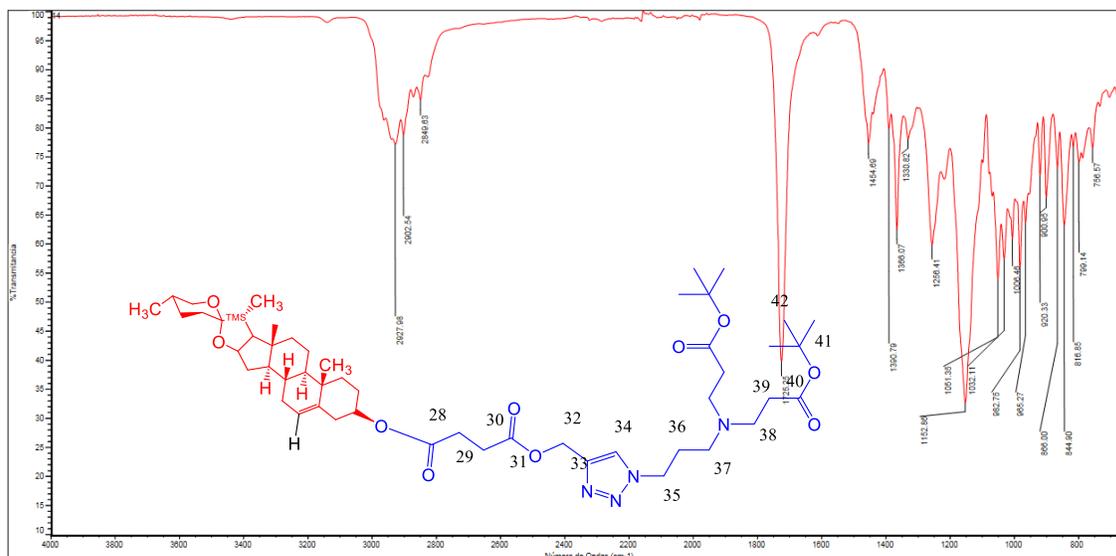


Anexo 30. RMN ¹H Compuesto 11

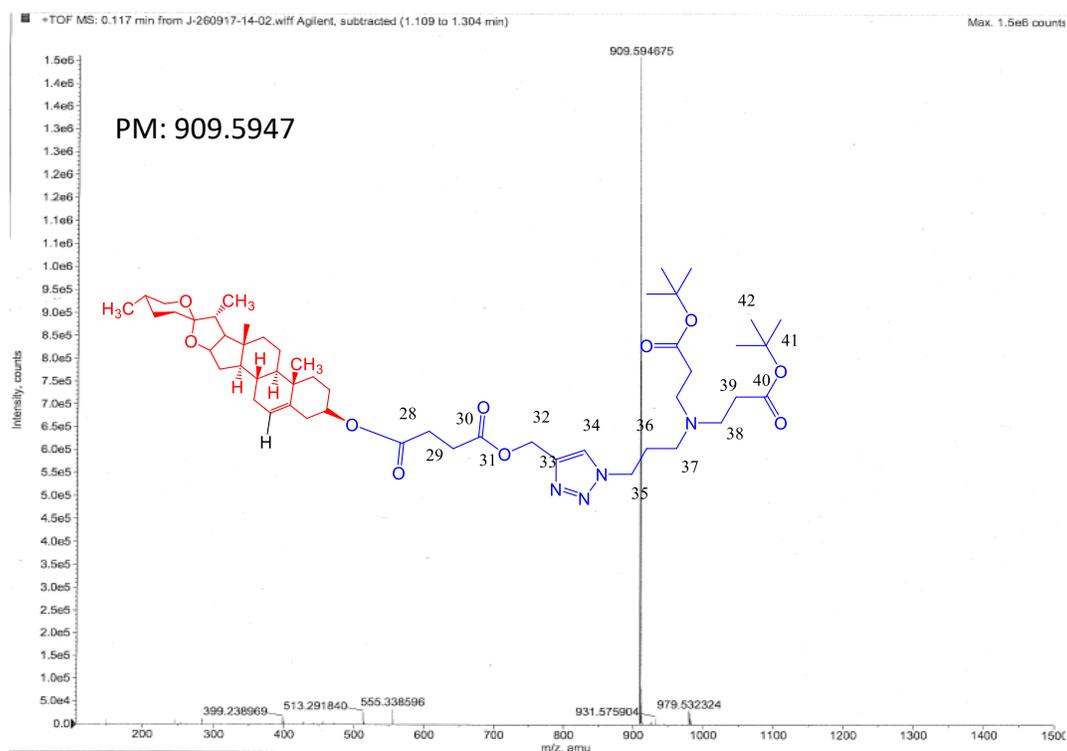
4210
single pulse decoupled gated NOE



Anexo 31. RMN ¹³C Compuesto 11

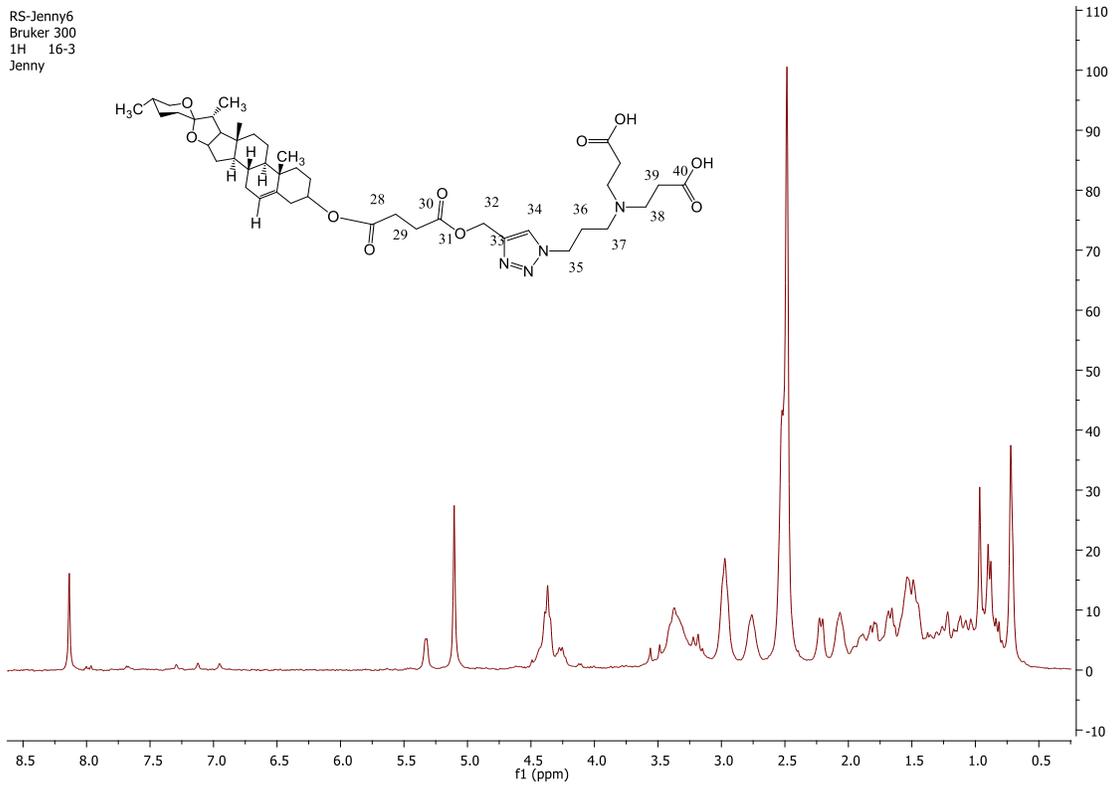


Anexo 32. FT-IR Compuesto 11



Anexo 33. HRMS ESI TOF Compuesto 11

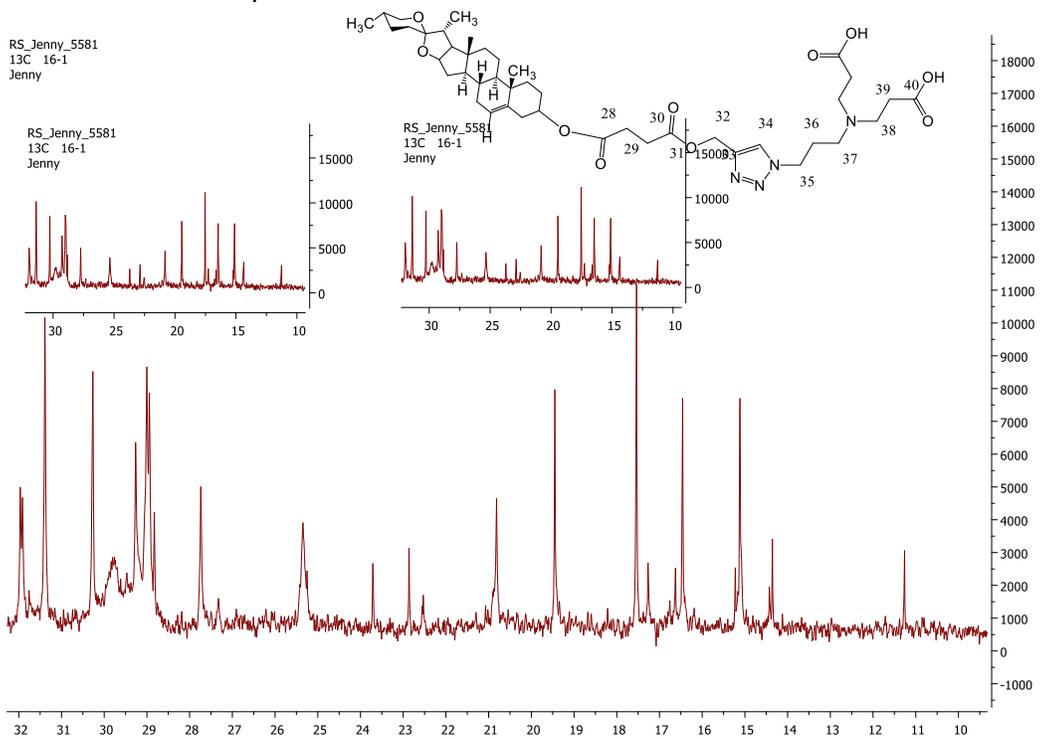
RS-Jenny6
Bruker 300
1H 16-3
Jenny



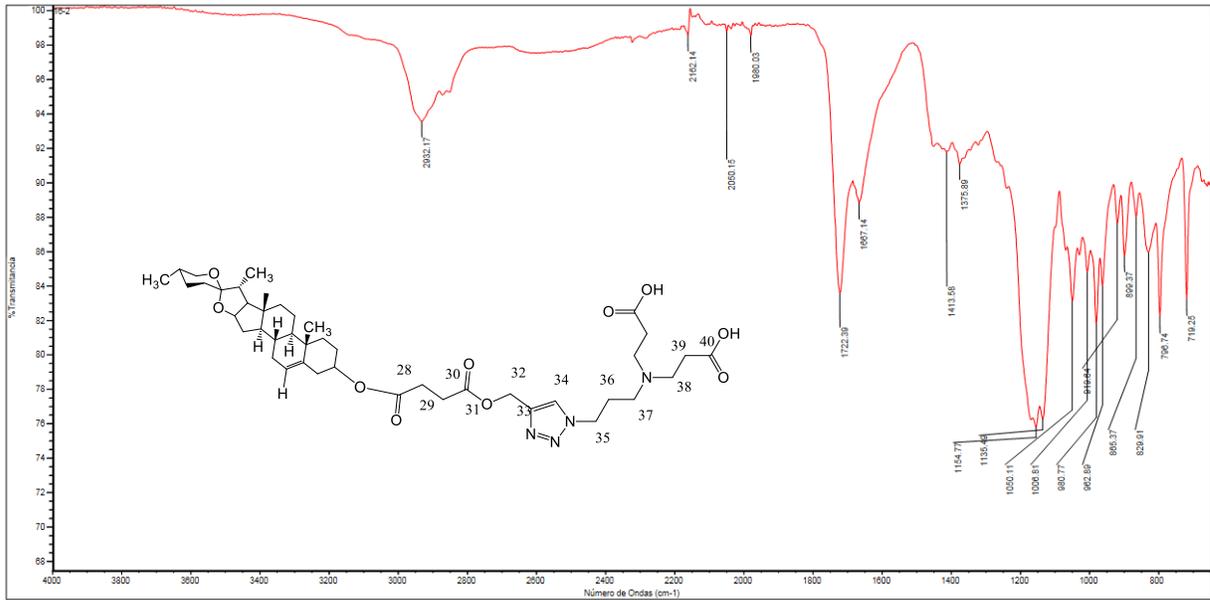
Anexo 34. RMN ¹H Compuesto 12

RS_Jenny_5581
13C 16-1
Jenny

RS_Jenny_5581
13C 16-1
Jenny



Anexo 35. RMN ¹³C Compuesto 12



Anexo 36. FT-IR Compuesto 12