

Análisis de la estereoquímica relativa y absoluta de peroxisomicinas

Luis Alejandro Pérez López**, Verónica Rivas Galindo**, Rosalba Ramírez Durón*, Alfredo Piñeyro López*, Noemí Waksman de Torres**

En el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la UANL se ha trabajado en los últimos años en el aislamiento, identificación y acción biológica de hidroxiantracetonas aisladas de plantas del género *Karwinskia*. Estas plantas son reportadas como tóxicas, de las que ya se describieron 15 especies, once de las cuales existen en México.¹

Las hidroxiantracetonas tienen una distribución especial en sus anillos (en algunas especies se les considera como preantraquinonas); en particular las hidroxiantracetonas diméricas que aparecen en esta familia pertenecen a una intrigante clase de compuestos biarílicos naturales. Estas sustancias son quirales, debido tanto a la presencia de centros quirales como a la rotación restringida alrededor del enlace biarílico, que da lugar a otro elemento de quiralidad y a la posibilidad de existencia de atropoisomerismo.² De acuerdo a la naturaleza del esqueleto de estos compuestos, se han aislado hasta ahora principalmente derivados de la peroxisomicina, isoperoxisomicina y tullidinoles (figura 1). Una revisión de la química y biología de estos compuestos ha sido publicada recientemente.³

La peroxisomicina A1, en particular, ha despertado mayor interés por su posible aplicación clínica como potencial agente antineoplásico.^{4,5,6} Las peroxisomicinas se llamaron así por su efecto selectivo sobre la membrana peroxisomal. Esto se observó tanto en levaduras como en ratas y macacos.^{7,8,9} Se aislaron cuatro peroxisomicinas de los frutos de *K. Parvifolia*.^{10,11} Es posible la existencia de ocho estereoisómeros, debido a la rotación restringida alrededor del enlace naftílico de estas sustancias.

En otro estudio se probó el efecto de estas antracetonas sobre células de Chang y células de

Hepatoma G2, y se encontró que PA1 y PA3 tienen efecto citotóxico selectivo, mientras que PA2 e Iso-PA1, aunque citotóxicas, no muestran efecto selectivo.¹²

Las peroxisomicinas A1 (PA1) y A2 (PA2) se pudieron cristalizar y con ello se determinó la estereoquímica relativa en cada una de ellas. Los datos cristalográficos demostraron que en PA1 la configuración de C-3 y C-3' debe ser la misma, mientras que en PA2 es opuesta. Por otro lado, si se considera que de acuerdo con el resultado de las curvas de dicroísmo circular ambas deben tener el mismo sentido de rotación alrededor del eje, resulta que PA1 y PA2 son epímeros en C-3.¹³

Respecto de PA3 y PA4, éstas se obtuvieron en muy poca cantidad, por lo que no fue posible lograr cristales de las mismas.

Dada la importancia biológica de la peroxisomicina A1 como posible agente antineoplásico, y al observar diferencias en el comportamiento de este compuesto y de sus estereoisómeros en cuanto a su actividad biológica, se diseñó este trabajo experimental con el objeto de conocer algunos datos estereoquímicos de PA3 y PA4, para establecer la estereoquímica absoluta de la PA1. De esta manera, por correlación se podría obtener la estereoquímica de los otros isómeros y posteriormente aplicar el mismo método para resolver el problema en otras antracetonas aisladas de plantas tóxicas. Finalmente, se pretende además con este estudio colaborar en los estudios encaminados a dilucidar el mecanismo de acción de la peroxisomicina A1.

* Departamento de Farmacología y Toxicología.

** Departamento de Química Analítica. Facultad de Medicina, UANL.

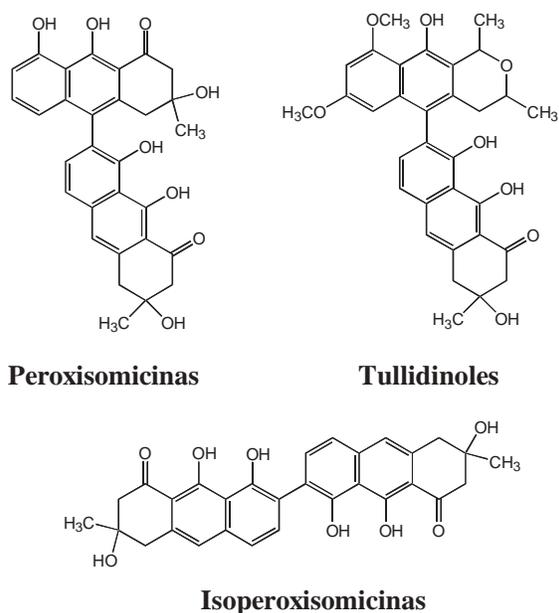
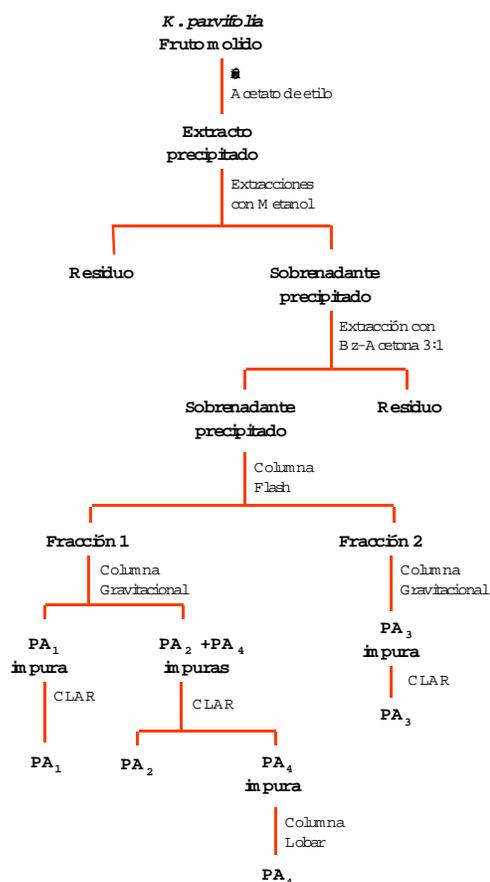


Fig. 1. Antracenas diméricas del género *Karwinskia*



Objetivo general

Establecer la configuración absoluta de la peroxisomicina A1.

Objetivos específicos

1. Aislar y purificar las peroxisomicinas A₁, A₂, A₃ y A₄.
2. Establecer la estereoquímica relativa de las cuatro peroxisomicinas.
3. Establecer la estereoquímica absoluta de PA₁ y PA₂ mediante una vía degradativa.

Material y métodos

Purificación de las peroxisomicinas

Para cumplir este objetivo se utilizó el siguiente esquema de purificación:

Estereoquímica relativa de las cuatro peroxisomicinas

Para lograr este objetivo fue necesario obtener los espectros de DC de cada peroxisomicina, así como

Purificación de las peroxisomicinas A1, A2, A3 y A4

los espectros de RMN para calcular efectos NOE y realizar los cálculos teóricos de modelos moleculares.

Estereoquímica absoluta de PA₁ y PA₂ mediante una vía degradativa

Se determinó la configuración absoluta de la PA₁ y PA₂ por medio de degradación química de ambos compuestos hasta la obtención del butanólido tetrahidro-2-metil-5-oxo-2-furanacetato de metilo. Para ello se llevó a cabo la siguiente estrategia de trabajo:

1° Bloqueo de los hidroxilos fenólicos 9 y 9'

Para ello se utilizó diazometano, el cual fue generado a partir del diazald. El producto se purificó mediante CC gravitacional en silica gel, se identificó por ¹H RMN y fue utilizado en la siguiente reacción.

2° Reducción de los grupos carbonilo

Se utilizó LiBH_4 en THF para obtener una mezcla de alcoholes secundarios. El producto se purificó por CC en sílica gel de baja presión. Se obtuvo el espectro IR para ver la desaparición de la señal del grupo carbonilo.

3° Hidrogenólisis de los alcoholes secundarios

Se realizó una hidrogenólisis heterogénea para obtener tetrahydroantracenos. Se utilizó un aparato de Parr, paladio en carbón al 10%; e H_2 a 10, 20 y 50 psi.

4° Oxidación de tetrahydroantracenos

Para ello se utilizó NaIO_4 y RuCl_3 . Se formó una capa aceitosa que fue sometida a la reacción de metilación.

5° Metilación de ácidos carboxílicos

Para la obtención del éster del butanólido se utilizó diazometano, generado a partir del diazald; se purificó por CC de baja presión fase reversa.

6° Análisis por $^1\text{HRMN}$ con y sin reactivo de desplazamiento quiral

Se analizaron los ésteres metílicos del butanólido derivado de PA_1 , así como de PA_2 , por $^1\text{HRMN}$ con y sin el reactivo de desplazamiento quiral: tris [3-heptafluoropropilhidroximetileno-(+)-camforato de europio III]. Finalmente, se analizó una mezcla de los dos butanólidos.

7° Correlación de los resultados obtenidos con los datos reportados en la literatura

8° Análisis retrospectivo con modelos moleculares de cada uno de los productos obtenidos en cada reacción

Resultados y discusión

Como resultado del proceso exhaustivo de purificación, con varios métodos cromatográficos, se pudieron aislar e identificar cuatro estereoisómeros, 1-4, de los cuales 1 (PA_1) y 2 (PA_2) ya habían sido previamente aislados e identificados.¹¹ El EM de los nuevos compuestos mostraron un M^+ a m/e 514. El espectro UV era idéntico al mostrado por PA_1 y PA_2 , indicando la presencia del mismo cromóforo. Los datos de IR de los compuestos mostraban ban-

das de absorción a 3390 cm^{-1} , debido a grupos hidroxilos y un carbonilo quelado a 1626 cm^{-1} . Los espectros ^1H y ^{13}C NMR de 3 y 4 fueron muy similares a los de 1 y 2, con dos dobles dobletes (acoplamiento en orto y meta) a campos altos y un triplete en la región aromática que corresponde a los H-5', H-7' y H-6'. El singulete y los dos dobletes restantes encontrados en la región aromática mostraban la unión C7-C10'. Luego del análisis de los datos espectrales se concluyó que la estructura planar de 3 y 4 era la misma que la de 1 y 2. Las asignaciones de todos los C en el espectro de ^{13}C se hizo a través de los espectros de doble dimensión HMQC y HMBC.

Las curvas de dicroísmo circular de los cuatro compuestos exhibían el mismo efecto Cotton (figura 2), debido al acoplamiento de las transiciones de los cromóforos naftalénicos. Considerando que las dihidroxiantracenos dimericas que tienen la misma estereoquímica axial muestran espectros de DC del mismo tipo,² la estereoquímica alrededor del eje binaftílico en los cuatro compuesto debe ser la misma.

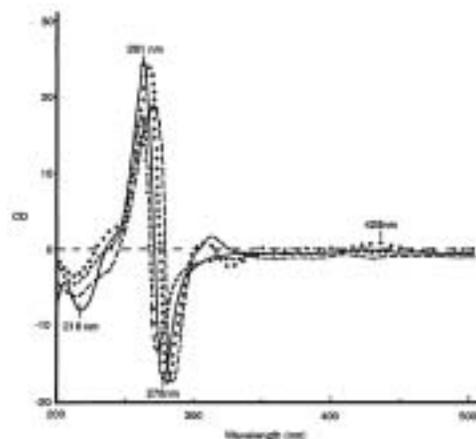


Fig 2. Dicroísmo circular de las cuatro peroxisomicinas.

Se construyeron modelos moleculares usando el método semiempírico (nivel AM1), y las conformaciones con mínima energía generadas por la computadora se usaron para calcular las constantes de partición vecinales y para correlacionar las distancias internucleares en cada estructura con los resultados del NOE diferencial. De esta manera se pudieron corroborar los resultados experimentales de rayos X, respecto a que 1 y 2 tienen la misma estereoquímica en C-3' y además se definió que 3 y 4

tienen la estereoquímica opuesta a 1 y 2; los esteroisómeros 3 y 4 también son epímeros en C-3.

Para conocer la estereoquímica absoluta de estos compuestos no tenemos ningún modelo que nos permita inferir el tipo de rotámero que se presenta a partir de las curvas de DC, como se ha hecho con otros compuestos de este tipo. Además, la configuración del C-3 no es posible obtenerla tampoco con ninguno de estos datos experimentales; por esta razón se diseñó un procedimiento degradativo (reportado anteriormente para flavomaninas)¹⁴ que nos permitiría, a través de la comparación de la estereoquímica del butanólido final obtenido, conocer la estereoquímica del compuesto original.

Por las características degradativas del proceso y la inestabilidad de estos compuestos, esto sólo fue posible con los compuestos que se aislaron en cantidad suficiente, como PA₁ y PA₂; sin embargo, pensamos que teniendo los resultados para estas sustancias se podría tener más inferencia de la estereoquímica de las otras por comparación de datos.

El primer paso de la vía degradativa fue el bloqueo de los grupos OH fenólicos de las posiciones 9 y 9' por medio de diazometano, generado a partir de diazald. Se seleccionó este reactivo a partir de los buenos resultados reportados por Ramírez,¹⁵ después de probar diferentes maneras de bloquear dichos hidroxilos. Es necesario el bloqueo de los grupos OH fenólicos antes de reducir el grupo carbonilo, puesto que así se evita la formación de puentes de hidrógeno entre los hidroxilos fenólicos y este grupo; está reportado que estos puentes de hidrógeno son la causa de que el grupo carbonilo no se pueda reducir.¹⁴ Melvin Gill y cols. reportaron que durante el proceso de degradación química de hidroxiantracetonas como la flavomanina no fue necesario purificar los productos en cada una de las etapas. Sin embargo, por lo señalado anteriormente (nula reactividad del carbonilo), se debía asegurar que los hidroxilos fenólicos de la PA₁ estuvieran metilados en las posiciones 9 y 9' para poder continuar con las siguientes reacciones, razón por la cual se decidió llevar a cabo el aislamiento de los derivados metilados. El derivado de PA₁ metilado en las posiciones 9, 9' (5), una vez aislado se analizó por ¹HRMN y se observó la desaparición de los dos hidroxilos fenólicos 9 y 9' que en la PA₁ aparecen alrededor de 16 ppm.

Una vez que se logró metilar los hidroxilos fenó-

licos en la PA₁, se continuó con la reducción de los carbonilos; ésta se realizó con LiBH₄ reportada también por Ramírez.¹⁵ La disminución de la señal del carbonilo a 1675 cm⁻¹ observada en el espectro de infrarrojo y la aparición de señales a 5.5 ppm en el espectro de ¹HRMN del producto de esta reacción son evidencias de que la reducción de los grupos carbonilos se llevó a cabo. Después de obtener los alcoholes secundarios en esta reacción, producto 6, se prosiguió con la hidrogenólisis de los mismos.

En el siguiente paso los alcoholes secundarios de las posiciones 1 y 1' del producto 6 se transformaron en grupos metilenos por medio de una hidrogenólisis, producto 7. Se analizaron los resultados de esta reacción por ¹HRMN y se observó la desaparición de las señales a δ5.5 que aparecían en el espectro de 6. Estos cambios indican que la reacción se llevó a cabo adecuadamente, es decir, se realizó la hidrogenólisis de los OH de los alcoholes secundarios formados en la reacción anterior en la posición 1 y 1' de 6, formándose un metileno.

La siguiente reacción en la vía degradativa de la PA₁ fue la oxidación de 7, con la que se esperaba como resultado el ácido carboxílico del butanólido producto 8, que no fue analizado por ¹HRMN, ya que se procedió inmediatamente a la reacción de metilación de este ácido carboxílico; ésta se llevó a cabo con diazometano, como en la primera reacción de metilación, para obtener finalmente el éster metílico del butanólido. El producto obtenido (9) fue purificado y las fracciones obtenidas se analizaron por ¹HRMN; se observó la desaparición de las señales aromáticas (δ7.5) y se observaron las señales de interés (a δ1.52 para el metilo y δ3.70 para el metoxilo), ya que estas señales pertenecen a los H unidos a carbonos que están a su vez unidos con el carbono quiral (figura 3).

Se realizó la purificación del éster metílico del butanólido en una columna de baja presión de sílica gel con el sistema de eluentes AcOEt-Heexano 3:2. De esta purificación se obtuvieron 18 fracciones que fueron analizadas por ¹HRMN; en las fracciones 8 y 9 se observaron las señales a δ1.52, δ2.13, δ2.42, δ2.63, δ2.68, δ2.74 y 3.70, que corresponden al butanólido esperado;¹⁶ las señales de δ1.52 y δ3.70 son las que interesan para el análisis de ¹HRMN con reactivos de desplazamiento quiral.

Una vez que se obtuvo el producto 9, el siguiente paso consistió en realizar su análisis por ¹HRMN con reactivo de desplazamiento quiral para la asig-

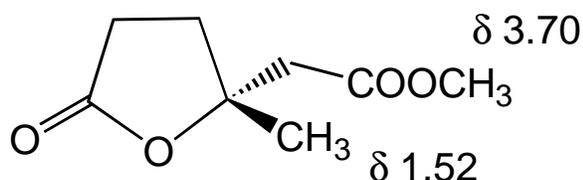


Fig. 3. Estructura del butanólido tetrahidro-2-metil-5-oxo-2-furanacetato de metilo.

nación estereoquímica. Para este análisis se tomó como referencia lo reportado por Melvin Gill y cols., quienes señalan que en ambos butanólidos (R y S) la señal del metilo (δ 1.52) y el metoxilo (δ 3.70) se desplazan a δ mayores después de agregar el reactivo de desplazamiento quiral; sin embargo, el butanólido R presenta las señales más desplazadas (mayor delta, menor campo) que el butanólido S.¹⁶ Como ya se mencionó en la introducción, de acuerdo a los análisis de rayos X se encontró que la PA₁ tiene el mismo tipo de configuración en C-3 y C-3',¹³ lo que nos indica que en la degradación química de la PA₁ se debe obtener un solo tipo de butanólido (R o S) y, por tanto, mostrar una sola señal (desplazada) al agregar el reactivo de desplazamiento quiral, tanto para la señal del metilo de δ 1.52 como para la del metoxilo de δ 3.70. Después de agregar 105 μ l del reactivo, se observaron en el espectro de ¹HRMN desplazamientos de la señal del metilo de δ 1.52 a δ 2.20 y del metoxilo de δ 3.70 a δ 4.51. Estas señales desplazadas no se parten en dos, lo cual confirma que el C-3 y C-3' de la PA₁ tienen la misma configuración y por tanto al realizar la degradación química sólo se genera un solo tipo de butanólido.

Para saber si el producto 9 es R o S, el paso siguiente en la estrategia original era agregar a una solución de éste en cloroformo deuterado, el reactivo de desplazamiento quiral y comparar los desplazamientos presentados en ¹HRMN con los desplazamientos que presentan los estándares de los butanólidos R y S bajo las mismas condiciones. Sin embargo, estos butanólidos no están disponibles comercialmente y los investigadores que los sintetizaron ya no están trabajando con este tipo de compuestos y no fue posible contactarlos. Por esta razón, se decidió desarrollar otra estrategia: dado que los estudios de difracción de rayos X demuestran que los C-3 y C-3' en la peroxisomicina PA₂ tienen configuración distinta¹³, se pensó que después de realizar

el mismo proceso de degradación química a la PA₂, se obtendría una mezcla de butanólidos R y S. El espectro de ¹HRMN de esta mezcla de butanólidos obtenidos de la PA₂ sería diferente al del butanólido obtenido de la PA₁, ya que se esperarían dos señales desplazadas para el metilo y dos señales desplazadas para el metoxilo en la mezcla proveniente de la PA₂ al agregar el reactivo de desplazamiento quiral, correspondiendo la más desplazada al butanólido R.¹⁶

Se sometió la PA₂ al mismo proceso degradativo que la PA₁ hasta la obtención del butanólido; éste presentó en el análisis de ¹HRMN las señales de δ 1.52 para el metilo y de δ 3.70 para el metoxilo. Después de agregar la misma cantidad de reactivo de desplazamiento quiral que se agregó al butanólido derivado de la PA₁, se encontró que tanto la señal de δ 1.52 del metilo como la de δ 3.70 del metoxilo se desplazaron a mayores δ y que cada una de ellas se partió en dos, encontrándose para el metilo señales a δ 2.17 y δ 2.20 y para el metoxilo señales a δ 4.48 y δ 4.51. Esto significa que en el proceso degradativo del PA₂ se formaron los butanólidos de las dos configuraciones R y S, lo cual corrobora la configuración opuesta de C-3 y C-3' en la PA₂.¹³

Finalmente, para conocer la configuración absoluta de PA₁ se realizó lo siguiente: al butanólido derivado de PA₁ que contenía 105 μ l de reactivo de desplazamiento (y que presentó las señales desplazadas para el metilo a δ 2.20 y para el metoxilo a δ 4.51), se le agregaron 10 μ l del butanólido derivado de PA₂ disuelto en CDCl₃; se pudo observar en el espectro de ¹HRMN la aparición de una señal a δ 2.19 adicional a la ya existente de δ 2.20 del metilo, debido a que la señal menos desplazada se observó, después de agregar el butanólido producto de la degradación de la PA₂, la señal a δ 2.20 corresponde, según la literatura, al butanólido R.¹⁶

Para corroborar este resultado, el éster metílico del butanólido derivado de PA₁ (compuesto 9) se analizó por polarimetría en cloroformo y se obtuvo un valor de + 9.3°. En la literatura se reportan para el butanólido R valores de + 7.7° y + 10.3°.¹⁶

Con base en estos resultados y analizando la estereoquímica de las reacciones de la degradación de PA₁ en forma retrospectiva con modelos moleculares, se pudo deducir que los C quirales de la peroxisomicina A₁ presentan configuración S.

Conclusiones

La correlación de estos resultados con los obtenidos por difracción de rayos X nos permite establecer que la PA₁ tiene configuración 3S y 3'S, y que la PA₂ tiene una configuración R en el C-3 y S en el C-3'. Estos resultados contribuirán al establecimiento del mecanismo de acción de la PA₁ y ayudarán a la determinación de la configuración absoluta de otras antracenas diméricas extraídas de plantas del mismo género.

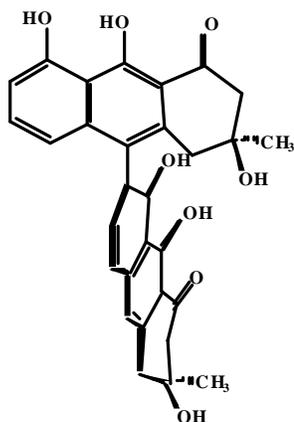


Fig. 4. Estereoquímica absoluta de PA1

Resumen

La peroxisomicina A₁ (PA₁) es una hidroxiantracena dimérica derivada de plantas del género *Karwinskia* que ha sido estudiada como un posible agente antineoplásico. De los extractos de *K. parvifolia* se aislaron e identificaron otros tres estereoisómeros que se denominaron peroxisomicinas A₂, A₃ y A₄ (PA₂, PA₃, PA₄). En este trabajo se determinó además la estereoquímica relativa de las cuatro peroxisomicinas naturales, por medio de estudios de DC y RMN (NOE diferencial). Asimismo, se pudo establecer la estereoquímica absoluta de PA₁ y PA₂ por medio de una degradación química en cinco etapas y posterior análisis del butanolido formado por medio de polarimetría y RMN, usando un reactivo de desplazamiento quiral. Se encontró que los C-3 y C-3' en PA₁ tienen configuración S, lo cual conlleva que el eje de quiralidad sea P.

Palabras clave: *Karwinskia*, *Rhamnaceae*, Peroxisomicina A1, Antracenas diméricas, Estereoquímica.

Abstract

Peroxisomicine A₁ (PA₁) is a dimeric hydroxyanthracenone isolated from plants of the genus *Karwinskia*; it is now under clinic evaluation as a possible antineoplastic agent. From *K. Parvifolia* extracts three new stereoisomers were isolated, purified and identified; namely: peroxisomicines A₂, A₃ and A₄ (PA₂, PA₃ and PA₄). In this work the relative stereochemistry of peroxisomicines was established by means of CD and NMR (NOE diff). Absolute stereochemistry of PA₁ and PA₂ also could be established by means of a five steps degradative process; the stereochemistry of the butanolide thus obtained was analyzed by means of polarimetry and NMR using a chiral shift reagent. C3 and C-3' PA₁ resulted to be S and the chirality axis P.

Keywords: *Karwinskia*, *Rhamnaceae*, Peroxisomicine A1, dimeric hydroxyanthracenones, stereochemistry.

Referencias

1. Fenández, Nava R. Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (Rhamnaceae) en México. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser. Bot.* 63 (1): 1–23, (1992).
2. Eliel, E., Wilen S. *Stereochemistry of Organic Compounds*. John Wiley and Sons. 101–147, (1994).
3. Noemí Waksman and A. Piñeyro-López. *Studies in Natural Products Chemistry Volume 22, Bioactive Natural Products (Part C)*, 555-606. First edition, Elsevier (2000).
4. Piñeyro, A. *Europaischen Patentblatt* 95/48 (29.11.95) Patent number: 0467407, (1995).
5. Piñeyro, A. *Bioscience patent* «Pharmaceutically acceptable anthracene compounds» Number: 5578646, (1996).
6. Patente Japonesa No. 2651758.
7. Sepúlveda, J., Vander Klei, I., Keizer, I; Piñeyro, A., Harder, W and Veenhuis, «Studies on the effect of toxin T 514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeast». *FEMS*

- Microbiology Letters. 91: pp. 207-212, (1992).
8. Sepúlveda, J., Bermúdez, M. V., Tamez, V. A., Ballesteros, R. G., Moreno, M., and Piñeyro, A. «Quantitative analysis of liver peroxisomes in rats intoxicated with peroxisomicine A1». *Toxicol. Lett.* 98, pp. 71-75 (1998).
 9. Tamez, V. A., Sepúlveda, J., Bermúdez, M. V., and Piñeyro, A. Autofagia de peroxisomas en hígado de macaco *Fascicularis* intoxicado con peroxisomicina A1. Memorias del IX Encuentro de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina, UANL, (1991).
 10. Waksman, N. y Ramírez, R. «Isolation of a new dimeric anthracenones from *Karwinskia parvifolia*». *Rev. Latinoam. Quím.* 23 (1) y 22 (4): 25-27, (1992).
 11. Rivas-Galindo, V. and N. Waksman, N. «Cytotoxic hydroxyanthracenones from fruits of *Karwinskia parvifolia*». *Natural Products Letters*, 15 (4), pp. 243-251, (2001).
 12. Garza L. Efecto de diversas antracénonas diméricas sobre células Chang y células de hepatoma. Comunicación personal.
 13. Rodríguez, C., Bailey, N., Ramírez, R., Martínez, L., Piñeyro, A y Waksman, N. «Análisis estereoquímico de dos hidróxiantracénonas diméricas». *Revista CiENCIAUANL* pp. 37-41, (1998).
 14. Gill, M., Giménez, A., Jhingran, A.G., Palfreyman, A.R. *Tetrahedron Asym.*, 1 (9): 1203-1206. (1990).
 15. R. Durón Rosalba, A. García Luna, L. Garza Ocañas, A. Piñeyro López and N. Waksman de Torres. "New synthetic derivatives from peroxisomicine A1 and their biological activity". *Pharmaceutical Biology*, 40 (6), pp. 440-447, (2002).
 16. Gill, M., Smrdel, A.F. «Pigments of Fungi, Part 16. Synthesis of Methyl (R)-(+)-Tetrahydro-2-methyl-5-oxo-2-furanacetato and (S)-(-)-Antipode, Chiroptical References for Determination of the Absolute Stereochemistry of Fungal Pre-anthraquinones». *Tetrahedron Asym.* 1 (7): pp. 453-464, (1990).