

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



OBTENCION DE DERIVADOS FUNCIONALES
DE LA PEROXISOMICINA A1

POR
ROSALBA RAMIREZ DURON

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR
EN CIENCIAS con Especialidad en Química Biomédica

Mayo de 1998



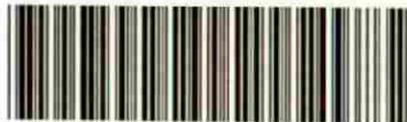
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

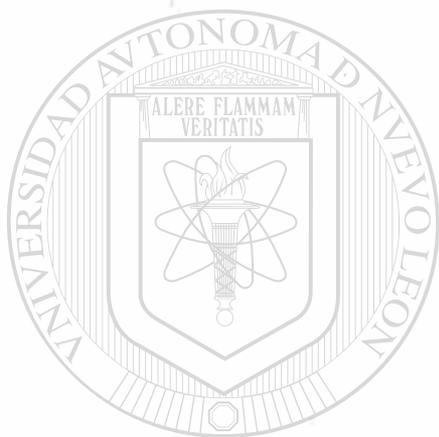
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD
QP981
.K37
R3
c.1



1080080879



UANL

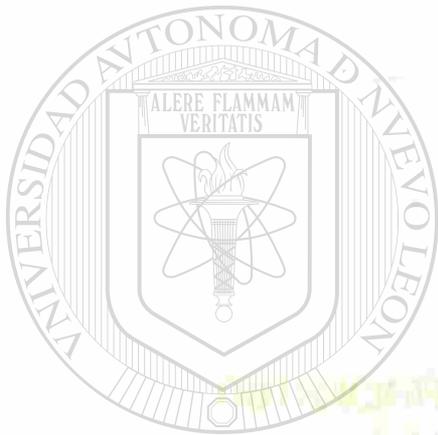
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA

Aprobación de la Tesis:



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ROSALBA RAMÍREZ DUCÓN

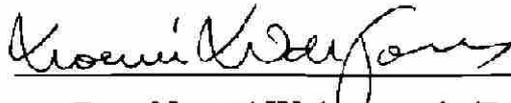
Centro de adquisición general para el área de Ciencias Exactas y Naturales
EN CIENCIAS Exactas y Naturales

Mayo de 2018

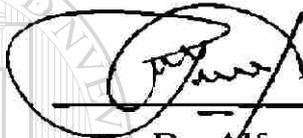
7

OBTENCION DE DERIVADOS FUNCIONALES DE LA PEROXISOMICINA A1

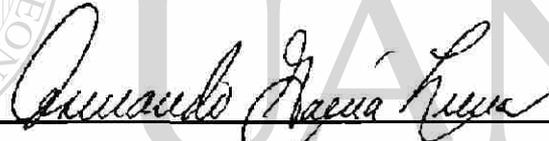
Aprobación de la Tesis:



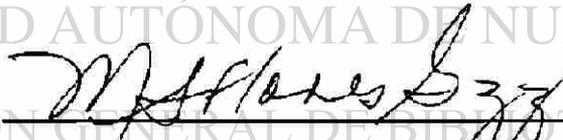
Dra. Noemí Waksman de Torres
Presidente



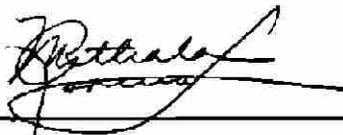
Dr. Alfredo Piñeyro López
1er. Vocal



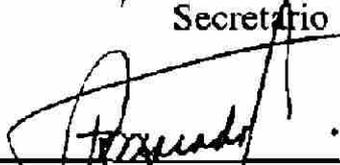
Dr. Armando García Luna
2do. Vocal



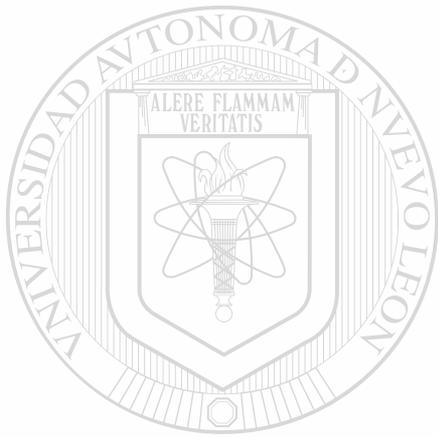
Dra. Socorro Flores de Castañeda
3er. Vocal



Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda
Secretario



Dr. Roberto Mercado Longoria
Subdirector de Investigación y Estudios de Posgrado



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



AGRADECIMIENTOS

A Dios, por llenarme de su presencia y permitirme vivir este momento.

A mis padres, por el apoyo que siempre me han brindado, gracias por aguantar mis malos ratos y desvelos y por tenerme presente en sus oraciones.

A mis hermanos, sobrinos y cuñados, mil gracias por su confianza, amor y comprensión. Agradezco a Dios el haberme elegido para formar parte de una familia como la nuestra.

A la Dra. Noemí Waksman, por la manera tan desinteresada de regalarme parte de sus conocimientos, experiencias y sobre todo por su invaluable amistad. Gracias por haber creído en mí.

Al Dr. Alfredo Piñeyro López, por su apoyo y por haberme dado la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis en el Depto. de Farmacología y Toxicología.

Al CONACYT por el apoyo financiero brindado a través de los Proyectos 3122-M9306, F512-N9306 y 565-0/PAD con los cuales se realizó esta tesis.

Al Dr. Armando García y a la Dra. Mirthala Moreno por su amistad, comentarios y consejos.

A la Dra. Socorro Flores por su colaboración y evaluación de este trabajo.

A la Dra. Lourdes Garza, por que me dió la oportunidad de aprender a su lado un poco de su amplia experiencia en cultivos celulares.

A Verónica Rivas, por que a su lado he encontrado el verdadero significado de la amistad. ¡1000 Gracias comadre! porque sin necesidad de buscarte siempre estás junto a mí cuando más te necesito.

A Gloria A. Benavides por su amistad y compañía. Gracias por tu apoyo "amiguilla".

A Ivonne, por hacer menos pesadas mis tareas. Gracias por tu sonrisa "bombón".

A Lucy, Adolfo, Amador, Ricardo, Yareli y en general a todos mis amigos por su amistad y compañerismo.

A mis Semejantes, por tomarse la molestia de fijarse en mí y en lo que realizo, ya que gracias a sus comentarios y acciones me fortalezo como ser humano día con día.

**OBTENCION DE DERIVADOS FUNCIONALES DE LA
PEROXISOMICINA A1**

Presentado por

Q. C. B. Rosalba Ramírez Durón

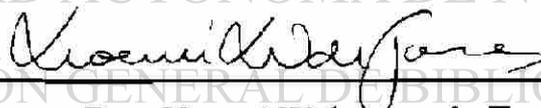


Este trabajo fue realizado en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. bajo la asesoría de la Dra. Noemí Waksman de Torres y la coasesoría del Dr. Armando García Luna.

UANL

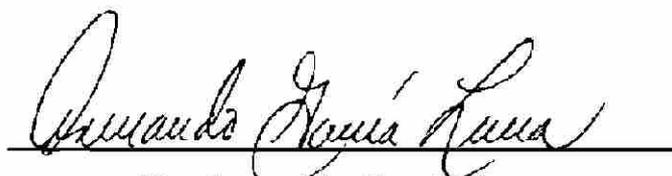
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Dra. Noemí Waksman de Torres

Asesor de Tesis



Dr. Armando García Luna

Co-asesor de Tesis

Rosalba Ramírez Durón

Fecha de graduación: Mayo, 1988

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio:

OBTENCION DE DERIVADOS
FUNCIONALES DE LA
PEROXISOMICINA A1

Número de páginas: 174

Candidato para la obtención del grado de
Doctor en Ciencias con Especialidad
en Química Biomédica

Area de Estudio: Química Biomédica

Propósito y Método de Estudio: La Peroxisomicina A1 es una antracenona dimérica que exhibe toxicidad selectiva en diversas líneas celulares humanas (benignas y malignas), razón por la cual se le ha considerado como un potencial agente antineoplásico. En este trabajo se describen los resultados de la manipulación química de este compuesto con la finalidad de obtener alguna posible relación entre la estructura y la actividad biológica. Se presenta el procedimiento de derivatización en los OH fenólicos (metilación con diazometano), anillos aromáticos (cloración con N-Cl-succinimida) y grupos carbonilos (reducción con borhidruro de litio). Se describe la purificación de los productos de las reacciones anteriores mediante diversas técnicas cromatográficas; se obtuvieron 6 nuevos compuestos puros, los cuales fueron identificados y caracterizados por UV-Visible, IR, EM, RMN de ^1H , ^{13}C y 2D. Se presentan los resultados de la valoración de la actividad biológica de los derivados en 2 ensayos *in vitro*: determinación del efecto que producen sobre la actividad de catalasa, así como la determinación del efecto citotóxico en dos líneas celulares humanas de origen hepático (benignas y malignas).

Contribuciones y Conclusiones:

En base a los resultados obtenidos se concluyó que la modificación química de los hidroxilos fenólicos y del grupo carbonilo en la Peroxisomicina A1 (compuesto 1, 2, 3, 4 y 6), ocasiona pérdida de la actividad biológica de este compuesto, lo cual sugiere que estos grupos funcionales están estrechamente ligados en el mecanismo de acción de la Peroxisomicina A1. Asimismo al observar que uno de los derivados obtenidos (compuesto 5) mostró selectividad semejante a la Peroxisomicina A1 en las líneas celulares estudiadas, se sugiere que el H-7', no esta involucrado en el mecanismo de acción de la Peroxisomicina A1.

FIRMA DEL ASESOR

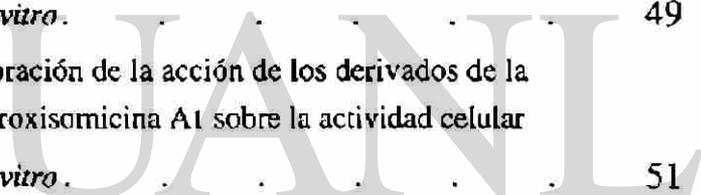
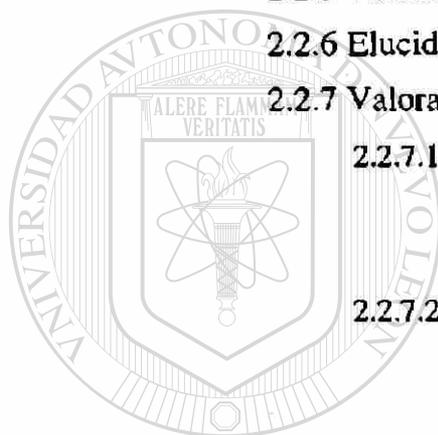


Dra. Noemí Waksman de Torres

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1 INTRODUCCION	1
2 MATERIAL Y METODOS	28
2.1 Material	28
2.1.1 Material Biológico.	28
2.1.1.1 Clasificación taxonómica de la <i>K. parvifolia</i>	28
2.1.2 Material y equipo general	29
2.1.2.1 Solventes	29
2.1.2.2 Reactivos	30
2.1.2.3 Técnicas Cromatográficas	31
2.1.2.4 Equipo general	34
2.2 Métodos.	36
2.2.1 Aislamiento y purificación de la Peroxisomicina A1	36
2.2.2 Verificación de la pureza de la Peroxisomicina A1	38
2.2.3 Obtención de los derivados de la Peroxisomicina A1	38
2.2.3.1 Bloqueo de los hidroxilos fenólicos	39
2.2.3.2 Sustitución electrofílica aromática	42
2.2.3.3 Bloqueo del grupo carbonilo	44
2.2.4 Aislamiento y purificación de los derivados de la Peroxisomicina A1	46

2.2.4.1 Aislamiento y purificación a partir del producto de la reacción de metilación	46
2.2.4.2 Aislamiento y purificación a partir del producto de la reacción de cloración	46
2.2.4.3 Aislamiento y purificación a partir del producto de la reacción de reducción del carbonilo	47
2.2.5 Verificación de la pureza de los compuestos 1 al 6.	48
2.2.6 Elucidación de la estructura de los compuestos 1 al 6	48
2.2.7 Valoración de la Actividad Biológica	49
2.2.7.1 Determinación del efecto de los derivados de la Peroxisomicina A1 sobre la actividad de catalasa <i>in vitro</i>	49
2.2.7.2 Valoración de la acción de los derivados de la Peroxisomicina A1 sobre la actividad celular <i>in vitro</i>	51



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



3 RESULTADOS 54

3.1 Aislamiento y purificación de la Peroxisomicina A1 54

3.2 Verificación de la pureza de la Peroxisomicina A1 54

3.3 Obtención de los derivados de la Peroxisomicina A1 55

3.3.1 Bloqueo de los hidroxilos fenólicos 55

3.3.2 Sustitución electrofílica aromática 55

3.3.3 Bloqueo del grupo carbonilo. 56

3.4 Aislamiento y purificación de los derivados de la
 Peroxisomicina A1 57

3.5 Verificación de la pureza de los derivados de la
 Peroxisomicina A1 57

3.6 Elucidación de la estructura 58

3.6.1 Elucidación de la estructura del compuesto 1 58

3.6.2 Elucidación de la estructura del compuesto 2 68

3.6.3 Elucidación de la estructura del compuesto 3 79

3.6.4 Elucidación de la estructura del compuesto 4 93

3.6.5 Elucidación de la estructura del compuesto 5 106

3.6.6 Elucidación de la estructura del compuesto 6 112

3.7 Valoración de la actividad biológica 125

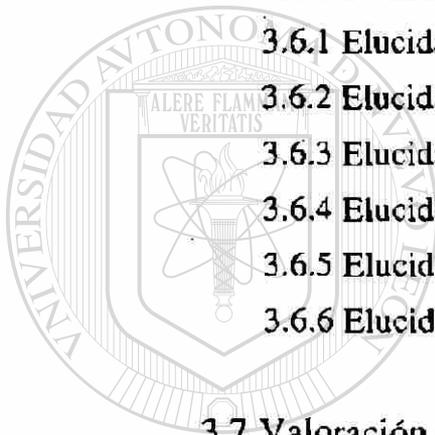
3.7.1 Determinación del efecto de los derivados de la
 Peroxisomicina A1 sobre la actividad de catalasa
 en ensayos *in vitro* 125

3.7.1.1 Determinación de la CI10 126

3.7.2 Valoración de la acción de los derivados de la
 Peroxisomicina A1 sobre la actividad celular
in vitro 127

4 DISCUSION 128

4.1 Bloqueo de los hidroxilos fenólicos 129



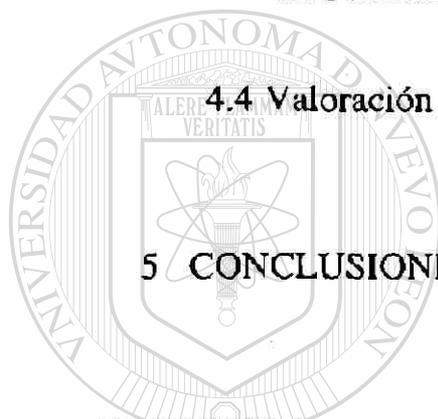
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Capítulo	Página
4.1.1 Elucidación de la estructura de los éteres metílicos.	132
4.2 Sustitución electrofílica aromática	145
4.2.1 Elucidación de la estructura del compuesto 5	146
4.3 Bloqueo del grupo carbonilo	147
4.3.1 Elucidación de la estructura del compuesto 6	149
4.4 Valoración de la actividad biológica	153
5 CONCLUSIONES.	159
APENDICE 1	161
<hr/>	
APENDICE 2	163
REFERENCIAS	167



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

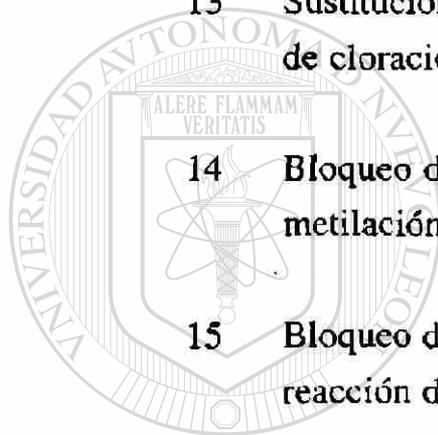
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución geográfica de las especies del género <i>Karwinskia</i> en México	6
2	Peroxisomicina A1 (geometría optimizada por medio de cálculos semiempíricos, nivel AM1)	8
3	Compuestos aislados del fruto de la <i>K. parvifolia</i>	16
4	Compuestos antracenónicos aislados del género <i>Cassia</i>	18
5	Compuestos antracenónicos aislados del género <i>Cortinarius</i>	18
6	Estructura química de la Doxorubicina y la Daunorrubicina	20
7	Estructura química de la Mitoxantrona	20
8	Estructura química del Paclitaxel y el Docetaxel	21
9	Relación estructura-actividad en la Tetraciclina	22
10	Diagrama de extracción y purificación de la	

Figura	Página
Peroxisomicina A1	37
11 Bloqueo de los hidroxilos fenólicos: reacción de metilación	39
12 Esquema de la reacción de metilación.	41
13 Sustitución electrofílica aromática: reacción de cloración.	42
14 Bloqueo del grupo carbonilo, primer paso: metilación del OH 9 y 9'.	44
15 Bloqueo del grupo carbonilo, segundo paso: reacción de reducción	44
<hr/>	
16 Espectro UV-Visible del compuesto 1	59
17 Espectro IR del compuesto 1	59
18 Espectro de masas del compuesto 1	60
19 Espectro de RMN de ^1H del compuesto 1	61
19a Espectro de RMN de ^1H del compuesto 1 (ampliación de la región aromática)	62
20 Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 1	63



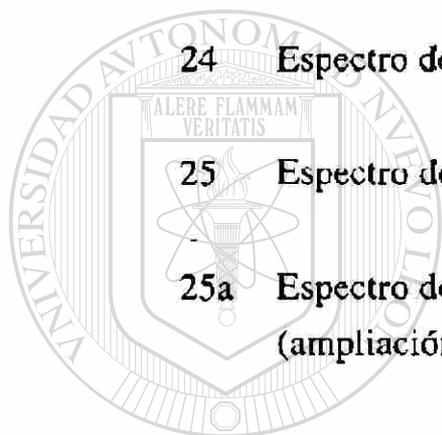
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

Figura	Página
21 Espectro HMQC del compuesto 1 (correlación de los metoxilos)	64
22 Espectro HMBC del compuesto 1 (correlación de los metoxilos)	65
23 Estructura propuesta para el compuesto 1	66
24 Espectro de masas del compuesto 2	69
25 Espectro de RMN de ^1H del compuesto 2	70
25a Espectro de RMN de ^1H del compuesto 2 (ampliación de la región aromática)	71
26 Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 2	72
<hr/>	
27 Espectro HMQC del compuesto 2	73
28 Espectro HMBC (7 Hz) del compuesto 2 (correlación de los fenoles)	74
29 Espectro nOe diferencial del compuesto 2 Señal irradiada δ 6.89 (H-5')	75
29a Espectro nOe diferencial del compuesto 2 Señal irradiada δ 6.85 (H-7')	76



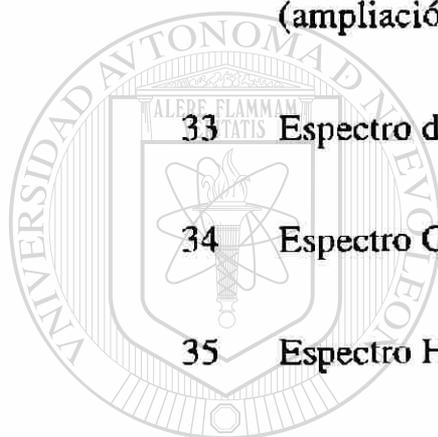
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Figura	Página
30 Estructura propuesta para el compuesto 2 . . .	77
31 Espectro de masas del compuesto 3 . . .	80
32 Espectro de RMN de ^1H del compuesto 3 . . .	81
32a Espectro de RMN de ^1H del compuesto 3 (ampliación de la región aromática) . . .	82
33 Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 3 . . .	83
34 Espectro COSY 45 del compuesto 3 . . .	84
35 Espectro HMQC del compuesto 3 . . .	85
36 Espectro HMBC (9 Hz) del compuesto 3 (correlación de H-5', H-7' y OH-8') . . .	86
36a Espectro HMBC (9 Hz) del compuesto 3 (correlación de los metoxilos) . . .	87
37 Espectro nOe diferencial del compuesto 3 Señal irradiada δ 10.18 (OH-8'). . .	88
37a Espectro nOe diferencial del compuesto 3 Señal irradiada δ 4.12 (OCH ₃ -9') . . .	89
37b Espectro nOe diferencial del compuesto 3	



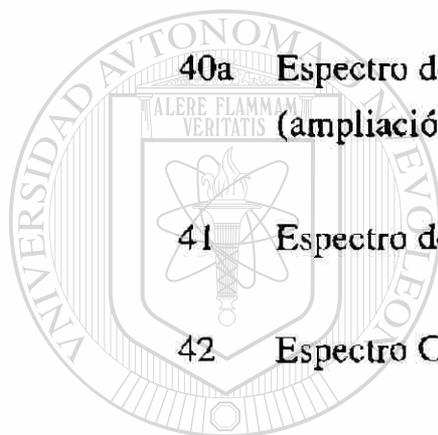
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Figura	Página
Señal irradiada δ 3.40 (OCH ₃ -8)	90
38 Estructura propuesta para el compuesto 3	91
39 Espectro de masas del compuesto 4	94
40 Espectro de RMN de ¹ H del compuesto 4	95
40a Espectro de RMN de ¹ H del compuesto 4 (ampliación de la región aromática)	96
41 Espectro de RMN de ¹³ C del compuesto 4	97
42 Espectro COSY 45 del compuesto 4	98
43 Espectro HMQC del compuesto 4	99
44 Espectro HMBC (7 Hz) del compuesto 4 (correlación del OH fenólico)	100
45 Espectro nOe diferencial del compuesto 4 Señal irradiada δ 6.85 (H-7')	101
45a Espectro nOe diferencial del compuesto 4 Señal irradiada δ 4.00 (OCH ₃ -8')	102
45b Espectro nOe diferencial del compuesto 4 Señal irradiada δ 10.22 (OH-8).	103



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

Figura	Página
46 Estructura propuesta para el compuesto 4 . . .	104
47 Espectro de RMN de ^1H del compuesto 5 . . .	107
47a Espectro de RMN de ^1H del compuesto 5 (ampliación de la región aromática) . . .	108
48 Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 5 . . .	109
49 Espectro COSY 45 del compuesto 5 (correlación de H-5' y H-6') . . .	110
50 Estructura propuesta para el compuesto 5 . . .	111
51 Espectro IR del compuesto 6 . . .	113
<hr/>	
52 Espectro de RMN de ^1H del compuesto 6 . . .	114
52a Espectro de RMN de ^1H del compuesto 6 (ampliación de la región alifática) . . .	115
53 Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 6 . . .	116
54 Espectro DEPT 135 del compuesto 6 . . .	117
55 Espectro COSY 45 del compuesto 6 (correlación de H-1 y H-1' con H-2 y H-2') . . .	118

56 Espectro HMQC del compuesto **6**
(correlación de H-1 y H-1') 119

57 Espectro nOe diferencial del compuesto **6**
Señal irradiada δ 3.05 (H-4ax) 120

57a Espectro nOe diferencial del compuesto **6**
Señal irradiada δ 3.20 (H-4ec) 121

57b Espectro nOe diferencial del compuesto **6**
Señal irradiada δ 1.30 (CH₃-3'). . . . 122

57c Espectro nOe diferencial del compuesto **6**
Señal irradiada δ 1.50 (CH₃-3) 123

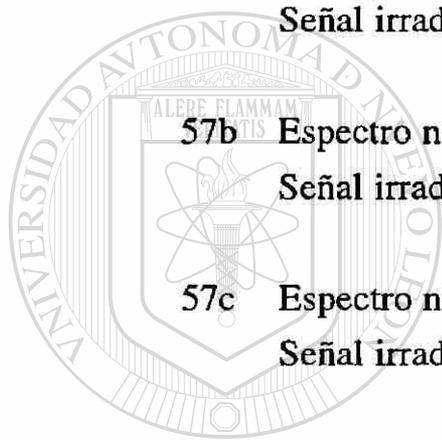
58 Estructura propuesta para el compuesto **6** 124

59 Isómeros probables para el compuesto **2** 135[®]

60 Acoplamiento dipolares y a larga distancia
observados en el compuesto **2** 139

61 Acoplamiento dipolares y a larga distancia
observados en el compuesto **3** 143

62 Acoplamiento dipolares y a larga distancia
observados en el compuesto **4** 144

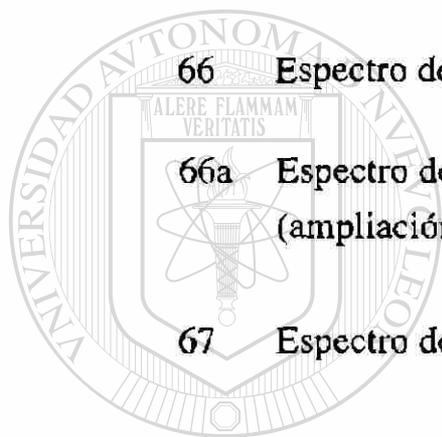


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura		Página
63	Estructura química de la Torosacrisona	148
64	Acoplamientos a larga distancia observados en el compuesto 6	153
65	Relación estructura-actividad en la Peroxisomicina A1	158
66	Espectro de RMN de ^1H de la Peroxisomicina A1	164
66a	Espectro de RMN de ^1H de la Peroxisomicina A1 (ampliación de la región aromática)	165
67	Espectro de RMN de ^{13}C de la Peroxisomicina A1	166



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

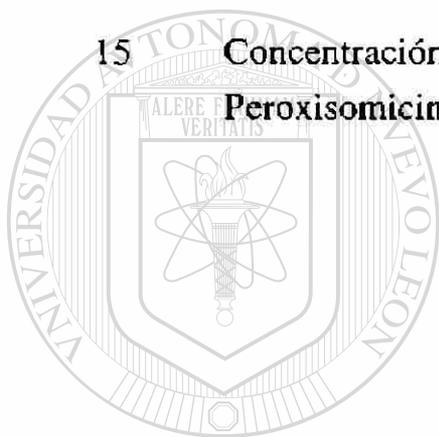
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Agentes antineoplásicos de origen natural	3
2	Cuantificación de toxinas en diferentes especies del género <i>Karwinskia</i>	13
3	Letalidad por vía oral en ratones cepa CD1 obtenida con el fruto de diferentes especies del género <i>Karwinskia</i>	14
4	Propiedades fisicoquímicas de la Peroxisomicina A1	25
5	Asignación del espectro de RMN de ^1H del compuesto 1	67
6	Asignación del espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 1	67
7	Asignación del espectro de RMN de ^1H del compuesto 2	78
8	Asignación del espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 2	78
9	Asignación del espectro de RMN de ^1H del compuesto 3	92
10	Asignación del espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 3	92
11	Asignación del espectro de RMN de ^1H del compuesto 4	105

Tabla		Página
12	Asignación del espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 4	105
13	Determinación del efecto de los derivados de la Peroxisomicina A1 sobre la actividad de catalasa	125
14	Efecto inhibitorio (CI_{10}) de los derivados de la Peroxisomicina A1 sobre la actividad de catalasa	126
15	Concentración citotóxica 50% de los derivados de la Peroxisomicina A1	127



UANL

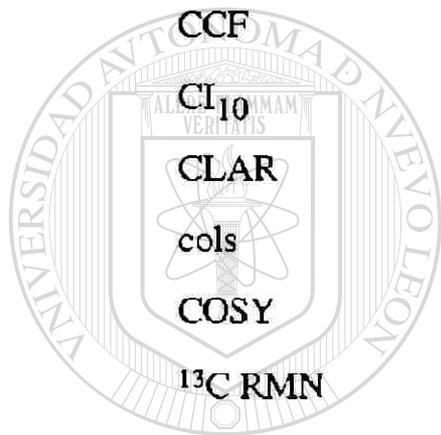
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



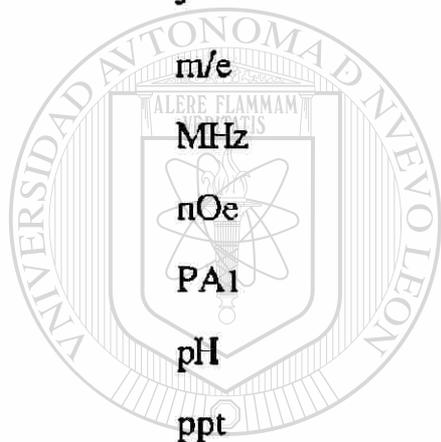
ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
ax	axial
C	Carbono
CC	Cromatografía en Columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CI ₁₀	Concentración Inhibitoria diez
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
cols	Colaboradores
COSY	Correlation Spectroscopy
¹³ C RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono Trece
CT ₅₀	Concentración citotóxica 50%
DEPT	Distorsionless Enhancement Polarization® Transfer
DL ₅₀	Dosis Letal Media
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMF	Dimetilformamida
ec	Ecuatorial
ENCB	Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
H	Hidrógeno



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
¹ H RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
Hz	Hertz
IPN	Instituto Politécnico Nacional
J	Constante de acoplamiento
m/e	Relación masa-carga
MHz	Megahertz
nOe	Nuclear Overhauser effect
PA1	Peroxisomicina A1
pH	-Log [H]
ppt	Precipitado
ppm	Partes por millón
R _f	Razón de la distancia que recorre la muestra con [®] respecto al eluyente
Sob	Sobrenadante
T	Toxina
t _R	Tiempo de retención
UV-Visible	Ultravioleta Visible



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO 1

INTRODUCCION

En la quimioterapia de las enfermedades neoplásicas continuamente se producen avances, ya que la investigación en este campo es de creciente interés e importancia práctica para la medicina en general.

En los últimos años, uno de los mayores progresos ha sido el descubrimiento de nuevos o mejores agentes quimioterapéuticos. Una gran variedad de compuestos han sido objeto de minuciosas investigaciones para evaluar su actividad. Sin embargo, sólo unos pocos han probado ser suficientemente útiles para el tratamiento de neoplasias humanas, con niveles aceptables de toxicidad, como para merecer la designación de agentes quimioterapéuticos.

En la actualidad un número importante de enfermedades neoplásicas pueden ser tratadas mediante una terapia que emplee únicamente agentes antineoplásicos, o estos agentes combinados con otros métodos. No obstante, y a pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento, esta clase de enfermedades continúa ocupando la segunda causa de mortalidad

general en los EUA así como en México, particularmente en Nuevo León⁽¹⁾. Esto se debe en gran parte, a que muchas de las formas de cáncer más frecuentes son todavía resistentes a una terapia efectiva.

Los agentes antineoplásicos se pueden clasificar de acuerdo a su origen, constituyendo una parte muy importante de esta clasificación los compuestos aislados a partir de productos naturales. En la Tabla 1 se enlistan algunos de los agentes de origen natural más conocidos y actualmente disponibles en el mercado⁽²⁾.

Las investigaciones encaminadas a descubrir nuevas drogas de origen natural se han intensificado muchísimo. En las últimas dos décadas se comenzó a desarrollar una búsqueda sistemática con programas como el del Laboratory of Drug Discovery Research and Development (LDDR) y el National Cooperative Drug Discovery Group (NCDDG), ambos como parte del National Cancer Institut (NCI).

Como ejemplo del resultado de estas investigaciones figura el descubrimiento del Taxol (Paclitaxel), dipertenoide aislado de la corteza del fresno *Taxus brevifolia*, en el cual se presenta como un componente minoritario.

TABLA 1

Agentes antineoplásicos de origen natural

Tipo de agente	Nombres genéricos
Alcaloides de la Vinca	Vinblastina Vincristina
Epipodofilotoxinas	Etopósido Tenipósido
Antibióticos	Dactinomicina Daunorrubicina Doxorrubicina Bleomicina Plicamicina Mitomicina
Enzimas	L-Asparaginasa
Modificadores de la respuesta biológica	Interferón alfa

Actualmente se le ha considerado como una de las drogas que mejor papel puede desempeñar en el futuro de la quimioterapia del cáncer. Después de más de una década de investigaciones, fue en 1992 cuando se aprobó su uso para el tratamiento del cáncer ovárico refractario a cisplatino; además ha tenido actividad promisorio contra cánceres del seno, pulmón, esófago, cabeza y cuello⁽³⁾.

Para el empleo apropiado de medicamentos dentro de la terapia contra el cáncer, resulta esencial considerar que potentes agentes citotóxicos actúan en fases específicas del ciclo celular. Como consecuencia de esto, tienen actividad sólo contra células que están en proceso de división. Asimismo, las neoplasias humanas que en la actualidad son más susceptibles al tratamiento quimioterapéutico, son aquellas que tienen un alto porcentaje de células en proceso de división. De la misma manera, existen tejidos normales que proliferan rápidamente, como lo son médula ósea, piel, epitelios y gónadas entre otros.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Considerando lo anterior, resulta que en forma muy frecuente, al emplear medicamentos contra el cáncer los tejidos normales resulten dañados, ocasionando con esto graves efectos colaterales⁽²⁾. Dichos efectos son el producto de una nula o moderada selectividad, que con frecuencia limita en mucho la utilidad de los medicamentos antineoplásicos.

En este aspecto, en los últimos años se ha investigado en los laboratorios del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina, de la U.A.N.L., una sustancia denominada Peroxisomicina A1. El interés en esta sustancia surgió al demostrar la toxicidad selectiva que este compuesto exhibe entre células de origen benigno y células neoplásicas malignas, ambas de origen humano.

La Peroxisomicina A1 originalmente fue aislada de la *Karwinskia humboldtiana*, planta perteneciente a la familia de las Rhamnaceas. Este género incluye diversas especies de árboles y arbustos⁽⁴⁾. El habitat natural para estas plantas, caracterizadas desde antaño como tóxicas, se extiende desde el sur de los EUA a México, Centroamérica, norte de Colombia, Cuba, Haití y República Dominicana. En México se han identificado hasta el momento 11 especies⁽⁵⁾ (Figura 1), siendo la *K. humboldtiana* la especie tóxica más conocida y abundante^(6,7,8,9,10,11).

Dreyer y cols.⁽¹²⁾, fueron los primeros en aislar la Peroxisomicina A1 del endocarpio de la *K. humboldtiana*; la llamaron T-514 por ser éste su peso molecular, caracterizándola como una antracenona dimérica. Posteriormente en este Depto. de Farmacología y Toxicología, se hicieron modificaciones a la técnica original de aislamiento y se logró purificar dicha sustancia^(13,14).

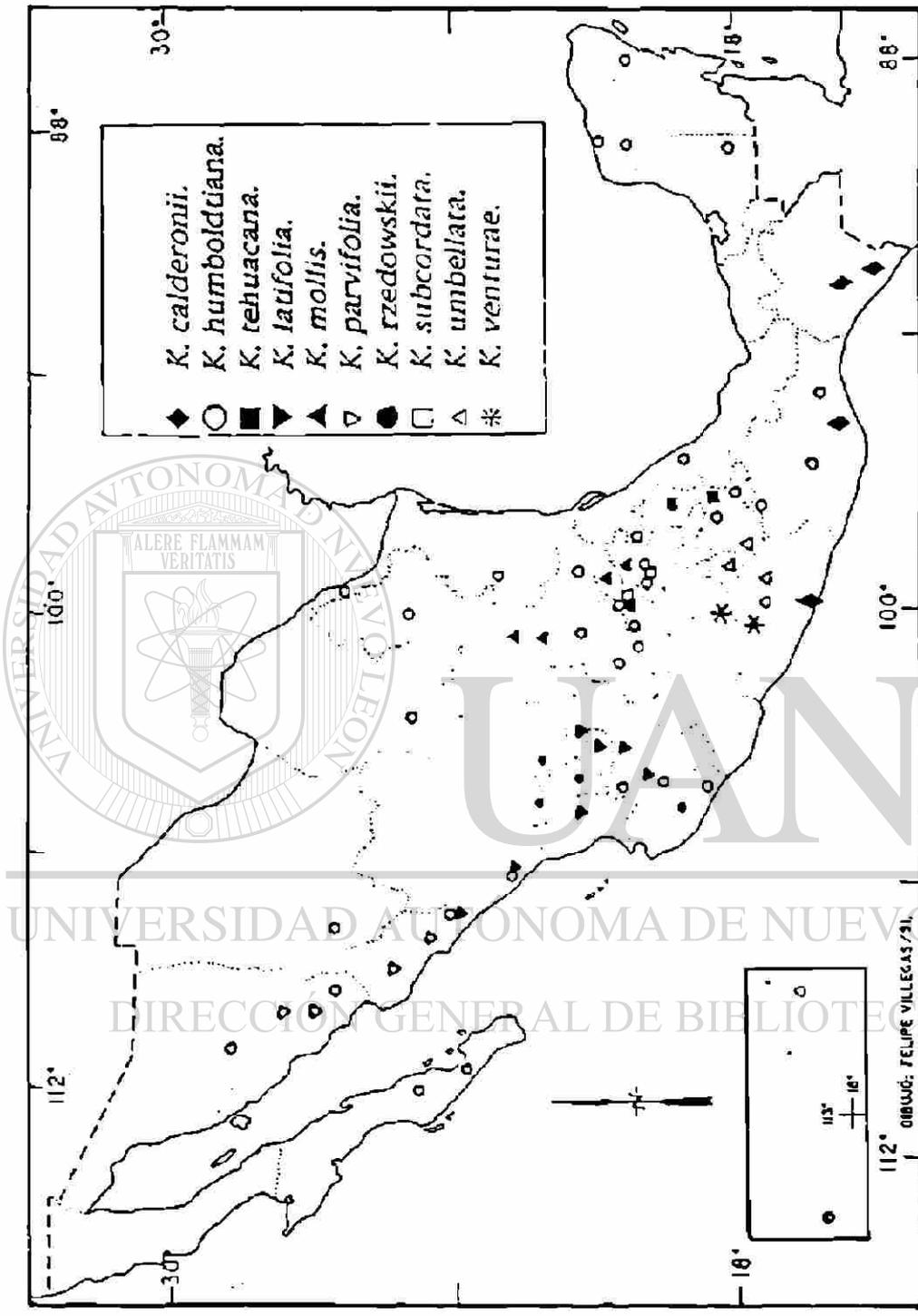


Figura 1. Distribución geográfica de las especies del género *Karwinskia* en México⁽⁵⁾.

Con ayuda de la difracción de Rayos X, actualmente se conoce la estructura cristalina de la Peroxisomicina A1⁽¹⁵⁾, información que ha sido corroborada con programas de modelaje molecular, al utilizar métodos semiempíricos para optimización de geometría, nivel AM1⁽¹⁶⁾ (Figura 2).

Dentro de las investigaciones encaminadas a demostrar la acción biológica de la Peroxisomicina A1, se logró probar su efecto tóxico en diversas especies de animales, con lo cual se encontró una marcada toxicidad hacia hígado, pulmón y riñón, con alteraciones caracterizadas por necrosis centrolobulillar y esteatosis hepática, lesión en capilares pulmonares y degeneración turbia en riñón⁽¹⁷⁾. La selectividad que este compuesto mostró en dichos órganos, fue el motivo de la determinación de la DL₅₀ en distintas especies de animales, además de otras pruebas de toxicidad aguda.⁽¹⁸⁾ Los resultados de estos estudios mostraron siempre una curva de pendiente abrupta en la distribución de la letalidad lo cual sugería una variación biológica estrecha.

Dicha característica hizo plantear la hipótesis de que si hubiera toxicidad selectiva de la Peroxisomicina A1 entre células de origen benigno y células neoplásicas malignas, podría esta sustancia tener un potencial uso terapéutico, y de esta forma ser una alternativa más en el tratamiento de algunas neoplasias⁽¹⁸⁾.

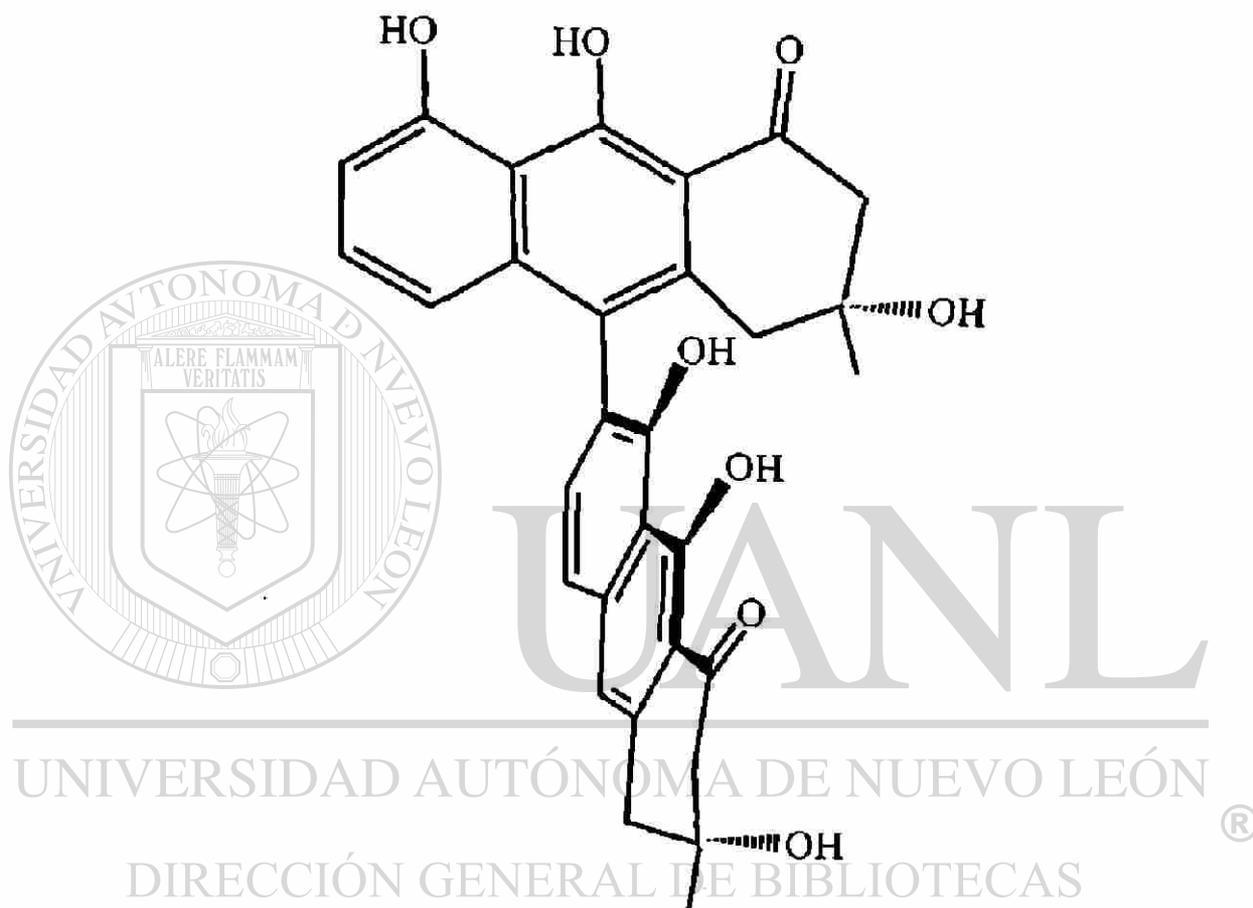


Figura 2

Peroxisomicina A1 (geometría optimizada por medio de cálculos semiempíricos, nivel AM1).

Para demostrar esto, se estudió *in vitro* el efecto citotóxico de la Peroxisomicina A1 sobre células de origen hepático, pulmonar y de colon tanto benignas como malignas y se comparó con el efecto producido por agentes antineoplásicos de uso actual, como son la Vincristina, 5-Fluoruracilo, Doxorubicina, Epidoxorrubicina, y la Mitomicina. Los resultados que arrojaron dichos estudios lograron confirmar la toxicidad selectiva de la Peroxisomicina A1, ya que siempre se mostró más tóxica para las células neoplásicas que para las células benignas. Además, mostró tener mejor "índice terapéutico" que los antineoplásicos de referencia⁽¹⁹⁾.

Estos resultados fueron corroborados y ampliados en las Universidades de Berlín y Freiburg en la República de Alemania: en ambos sitios los resultados obtenidos fueron similares a los anteriormente descritos. Además, se logró demostrar resultados satisfactorios para otras líneas de tumores malignos, para los cuales no existe tratamiento en la actualidad. Asimismo, se demostró que las células de médula ósea son particularmente resistentes a la Peroxisomicina A1 lo cual, como se mencionó anteriormente, es una característica deseable para muchos agentes antineoplásicos.

En base a los resultados anteriores, se consideró importante evaluar este compuesto en los laboratorios del NCI. Como primer paso, la Peroxisomicina A1 fue sometida a la evaluación de la actividad citotóxica

in vitro, en un panel de 60 líneas celulares malignas, etapa que superó satisfactoriamente. Actualmente está siendo evaluada en la segunda etapa, en ensayos *in vivo*. Esta etapa consiste en evaluar en animales de laboratorio, los efectos producidos por la Peroxisomicina A1, y comparar los resultados con los efectos que la misma sustancia mostró en los ensayos *in vitro*.

Por tales motivos se solicitó una patente para su uso y hoy en día este proyecto se encuentra en la fase de Farmacología Clínica I⁽²⁰⁾.

En lo concerniente al mecanismo de acción, éste aún no ha logrado dilucidarse, aunque cabe mencionar que se ha demostrado el efecto de la Peroxisomicina A1 sobre la lipoperoxidación microsomal hepática⁽²¹⁾.

Asímismo, en estudios realizados en levaduras metilotróficas, se demostró que la Peroxisomicina A1 tiene un marcado efecto sobre los peroxisomas. Destruye selectiva e irreversiblemente a estos organelos⁽²²⁾.

Fue precisamente este efecto selectivo el que originó que este compuesto inicialmente llamado T-514, ahora reciba el nombre de Peroxisomicina A1. La letra A y el número 1 que complementan el nombre de Peroxisomicina, provienen de la nomenclatura para estereoisómeros de esta naturaleza establecida por Steglich y Gill⁽²³⁾. De acuerdo a esta nomenclatura los atropoisómeros de tipo A, son aquellos que en las curvas de Dicroísmo Circular presentan efecto Cotton negativo a λ larga y efecto Cotton positivo a λ corta; asímismo los atropoisómeros de tipo B son

aquellos que presentan efectos Cotton de signo contrario al tipo A (el número corresponde al orden de purificación e identificación del compuesto).

Además se demostró el efecto producido por la Peroxisomicina A1 sobre la actividad de la catalasa, la cual es considerada como una enzima marcadora de los peroxisomas, ya que se encuentra exclusivamente en este organelo. Los resultados de estudios *in vitro* demostraron que la Peroxisomicina A1 es un inhibidor no competitivo para la catalasa de tres fuentes animales: res, perro y ratón⁽²⁴⁾. Recientemente se investigó el efecto de la Peroxisomicina A1 sobre la actividad de la catalasa hepática del ratón albino por métodos histoquímicos, en cortes de tejido hepático incubados con toxina (*in situ*), así como en cortes de tejido y en fracciones hepáticas de ratones intoxicados con este compuesto (*in vivo*). En estos estudios se demostró que la Peroxisomicina A1 no afecta la actividad de la

catalasa bajo estas condiciones⁽²⁵⁾. Este hallazgo indica que la Peroxisomicina A1 inhibe la actividad de la catalasa únicamente en ensayos *in vitro* con enzima purificada, siendo incapaz de ejercer su poder inhibitorio en sistemas *in vivo*; lo anterior sugiere que la catalasa en forma directa, no está involucrada en el daño peroxisomal y por consiguiente tampoco en el mecanismo de acción de la Peroxisomicina A1.

A este respecto existe información en la literatura sobre la estrecha relación entre peroxisomas y cáncer. Se ha demostrado que los

peroxisomas se encuentran en número muy reducido en algunos tumores malignos^(26,27,28). Por tal motivo se pensó que a concentraciones iguales, las células malignas serían más sensibles a ser destruidas por acción de la Peroxisomicina A1. Esta acción se ha comparado con el efecto antineoplásico del llamado Factor de Necrosis Tumoral, del cual se sabe destruye a los peroxisomas en hígado, y genera una disminución de la actividad de la catalasa hepática⁽²⁹⁾.

En base a lo expuesto anteriormente y con el afán de obtener sustancias estructuralmente similares a la Peroxisomicina A1, se realizó un rastreo químico y toxicológico de otras especies del género *Karwinskia* que crecen en México y que no habían sido estudiadas anteriormente⁽³⁰⁾ (Tabla 2 y 3).

Una de las especies que resultó interesante fue la *K. parvifolia*. Un estudio químico del fruto de esta planta, estableció la presencia de la Peroxisomicina A1 en grandes cantidades. Se encontró, además otro compuesto no descrito anteriormente en la literatura, el cual se llegó a identificar como un diastereoisómero de la Peroxisomicina A1⁽³¹⁾. Los resultados de la difracción de rayos X en ambos compuestos, demostraron que la diferencia entre ellos radica en el tipo de quiralidad que presenta el carbono de la posición 3.

TABLA 2

Cuantificación de toxinas en diferentes especies del género *Karwinskia*

ESPECIES	PORCENTAJE		
	T 514	T 544	T 496
<i>K. humboldtiana</i>	0.70	1.60	0.80
<i>K. mollis</i>	0.95	1.33	1.08
<i>K. umbellata</i>	0.05	0.75	0.50
<i>K. subcordata</i>	1.07	1.51	0.98
<i>K. latifolia</i>	0.50	*	1.10
<i>K. parvifolia</i>	1.02	*	1.58
<i>K. calderonii</i>	0.70	0.75	2.00
<i>K. rzedowskii</i>	*	*	1.60
<i>K. venturensii</i>	*	*	0.11
<i>K. tehuacana</i>	0.33	0.83	0.40
<i>K. jhonstonii</i>	*	2.10	0.70

* No detectados.

N. Waksman y cols., *Rev. Latinoamer. Quím.*, (1989)⁽³⁰⁾.

TABLA 3

Letalidad por vía oral en ratones cepa CD1 obtenida con el fruto de diferentes especies del género *Karwinskia*

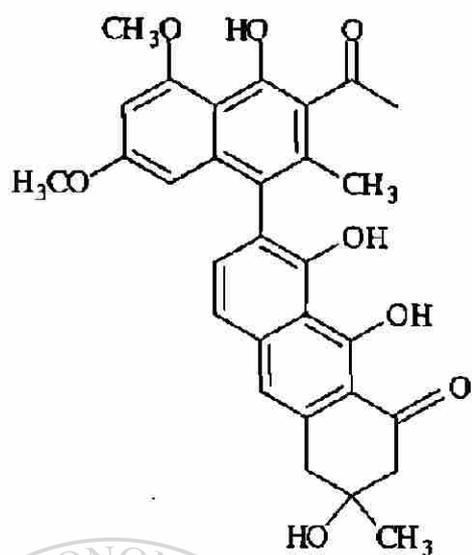
ESPECIES	DOSIS	
	1.5 gr/Kg % Letalidad	2.5 gr/Kg % Letalidad
<i>K. humboldtiana</i>	100.0	100.0
<i>K. mollis</i>	0.0	71.4
<i>K. umbellata</i>	14.3	85.7
<i>K. subcordata</i>	-	14.3
<i>K. latifolia</i>	-	0.0
<i>K. parvifolia</i>	71.4	100.0
<i>K. calderonii</i>	-	21.4
<i>K. rzedowskii</i>	-	28.5
<i>K. venturenzii</i>	-	0.0
<i>K. tehuacana</i>	-	28.5
<i>K. jhonstonii</i>	100.0	100.0

N. Waksman y cols., *Rev. Latinoamer. Quím.*, (1989)⁽³⁰⁾.

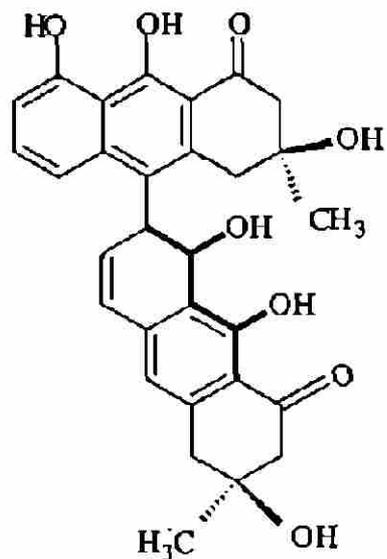
De esta forma se determinó que la Peroxisomicina A1 corresponde al isómero 3R3'R y el diastereoisómero corresponde al isómero 3S3'R⁽¹⁵⁾. De acuerdo a la nomenclatura establecida por Steglich y de acuerdo al resultado del Dicroísmo Circular, se decidió denominar a este diastereoisómero como Peroxisomicina A2.

En estudios posteriores con el fruto de esta misma planta, se llegaron a identificar otros compuestos, uno de ellos fue otra de las antracenonas diméricas que normalmente se encuentra en estas plantas, la llamada T516. Además se identificaron dos compuestos más, no reportados anteriormente en la literatura, de los cuales uno resultó ser, otro diastereoisómero de la Peroxisomicina A1 y el tercero se identificó como un isómero posicional, también de la Peroxisomicina A1⁽³²⁾. Acorde a la nomenclatura anterior, estos nuevos compuestos se denominaron como Peroxisomicina A3 e Isoperoxisomicina A1 respectivamente (Figura 3).

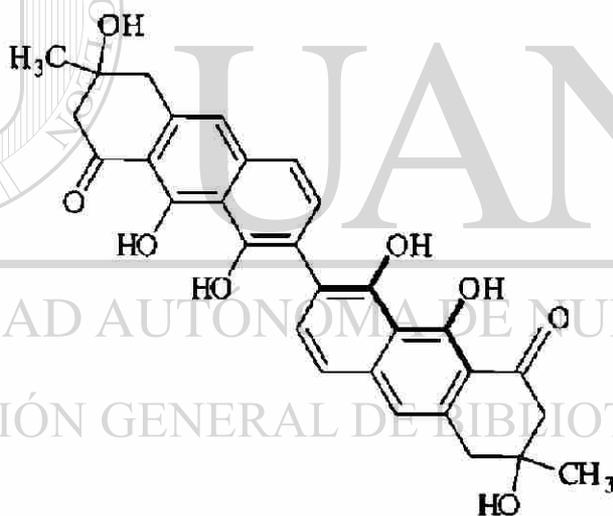
En consideración a la estrecha relación estructural entre la Peroxisomicina A2 y la Peroxisomicina A1, y por ser considerada esta última como un posible agente antineoplásico, ha resultado de gran interés continuar con los estudios químicos y toxicológicos con este nuevo compuesto y comparar la respuesta entre ambas sustancias.



T-516



Peroxisomicina A3



Isoperoxisomicina A1

Figura 3

Compuestos aislados del fruto de la *K. parvifolia*. Rivas, V. M. Tesis de Maestría (1995)⁽³²⁾.

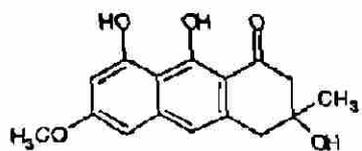
En lo que respecta a los estudios toxicológicos realizados en ratones cepa CD1, se demostró que la Peroxisomicina A2 ataca a los mismos órganos blanco que la Peroxisomicina A1, pero su toxicidad resultó aproximadamente de 3 a 5 veces menor que ésta⁽³³⁾.

Sin embargo, en estudios realizados *in vitro* con diferentes líneas celulares benignas y malignas, se comprobó que este compuesto no tiene la selectividad que caracteriza a la Peroxisomicina A1⁽³⁴⁾.

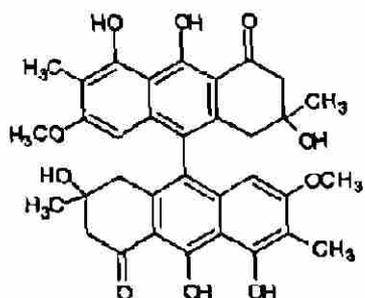
Otras plantas analizadas fueron la *Karwinskia umbellata* y la *Karwinskia tehuacana*, de las cuales se aislaron dos nuevas antracenonas diméricas. De la *K. umbellata* se aisló la Isoperoxisomicina A1 y de la *K. tehuacana* la T-510⁽³⁵⁾. Actualmente la acción biológica de estos nuevos compuestos es motivo de investigación.

Se han encontrado antracenonas de este tipo en otros productos naturales, por ejemplo en algunas especies del género *Cassia*^(36,37), y en hongos del género *Cortinarius*⁽³⁸⁾ (algunos ejemplos se muestran en la figura 4 y 5).

Uno de estos productos (Flegmacina) es estructuralmente similar a la Peroxisomicina A1, y también ha sido objeto de solicitud de patente como potencial agente antineoplásico.



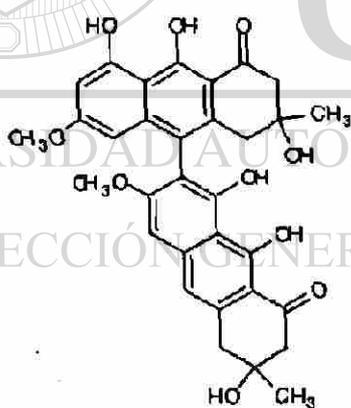
Torosacrisona



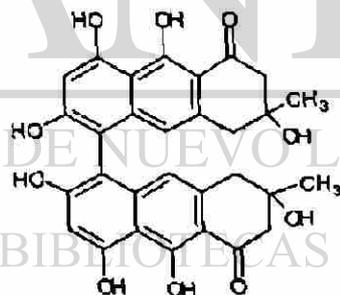
Singueanol I

Figura 4

Compuestos antracénicos aislados del género *Cassia*.



Flegmacina



Atrovirina

Figura 5

Compuestos antracénicos aislados del género *Cortinarius*.

En forma paralela al afán por descubrir nuevos antineoplásicos, ha surgido en años atrás una línea de investigación, adoptada por muchos laboratorios, que pretende entre otras cosas aportar nuevos fármacos en forma semisintética, realizando variaciones estructurales en los antineoplásicos de uso actual. Por esta vía los resultados han sido muy satisfactorios, ya que existen reportes de la creación de análogos altamente activos, que exhiben una excelente acción antitumoral. Muchos de ellos han reducido en gran parte los efectos colaterales tóxicos que la droga original mostraba, y tienen en la actualidad una mejor aceptación en la terapia contra el cáncer; en algunos casos llegaron a desplazar al medicamento original.

Un ejemplo de esto lo constituyen los estudios realizados con la familia de las Antraciclinas que representan una clase de agentes anticancerosos ampliamente prescritos⁽³⁹⁾. Esta familia de compuestos

datan del descubrimiento original de la Daunorrubicina y la Doxorrubicina (Figura 6) en los años 60's. A partir de esta fecha estas sustancias han sido sujetas a extensas investigaciones, entre las cuales se encuentran ingeniosas estrategias encaminadas a la modificación estructural de las mismas. De esta forma, se han llegado a sintetizar un gran número de derivados, muchos de los cuales han resultado mejores antineoplásicos que los compuestos originales. Algunos de ellos exhiben una toxicidad cardiaca menor que la del compuesto original, alteración que limitaba en mucho el valor clínico de estos medicamentos. Entre estos

derivados se puede mencionar la Epirrubicina y la Mitoxantrona. Esta última es una aminoantracenediona, que carece de capacidad para producir radicales libres del tipo de la quinona; esto origina que su toxicidad cardiaca sea menor que la de la Doxorubicina⁽²⁾. (Figura 7).

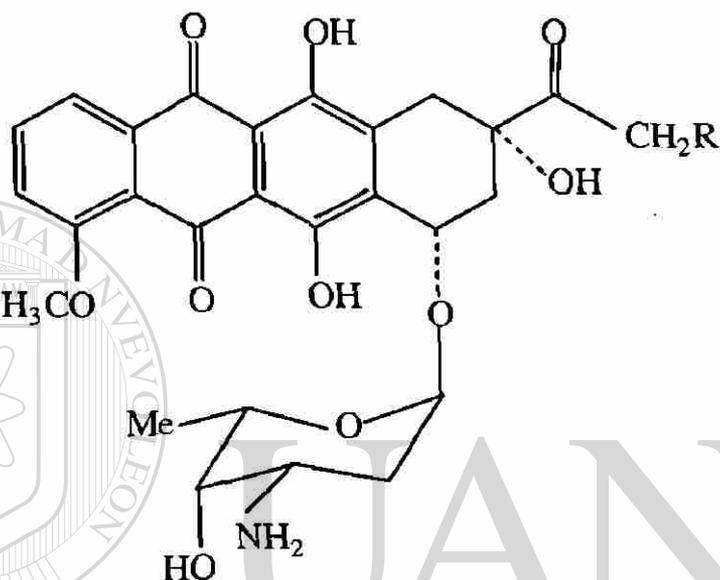


Figura 6

Estructura química de la Doxorubicina (R = OH) y la Daunorubicina (R = H), antibióticos antraciclínicos.

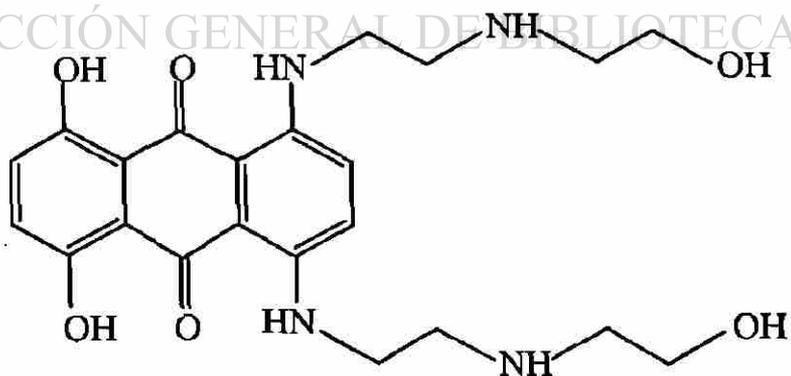


Figura 7

Estructura química de la Mitoxantrona.

Otro ejemplo que resulta interesante citar, lo constituye el Paclitaxel (Taxol); como se mencionó anteriormente, este compuesto entró al mercado a partir de 1992 y es considerado como una alternativa promisoría en la quimioterapia del cáncer.

El Paclitaxel es un compuesto dipertenóide que contiene un anillo taxano como núcleo (Figura 8) sustituido en el C-13 por una cadena lateral, la cual resulta esencial para su actividad antitumoral. La modificación química de la cadena lateral permitió sintetizar un análogo más potente, el Docetaxel (Taxotere) el cual ha demostrado actividad contra carcinomas de ovario y mama, al igual que el fármaco original.⁽²⁾

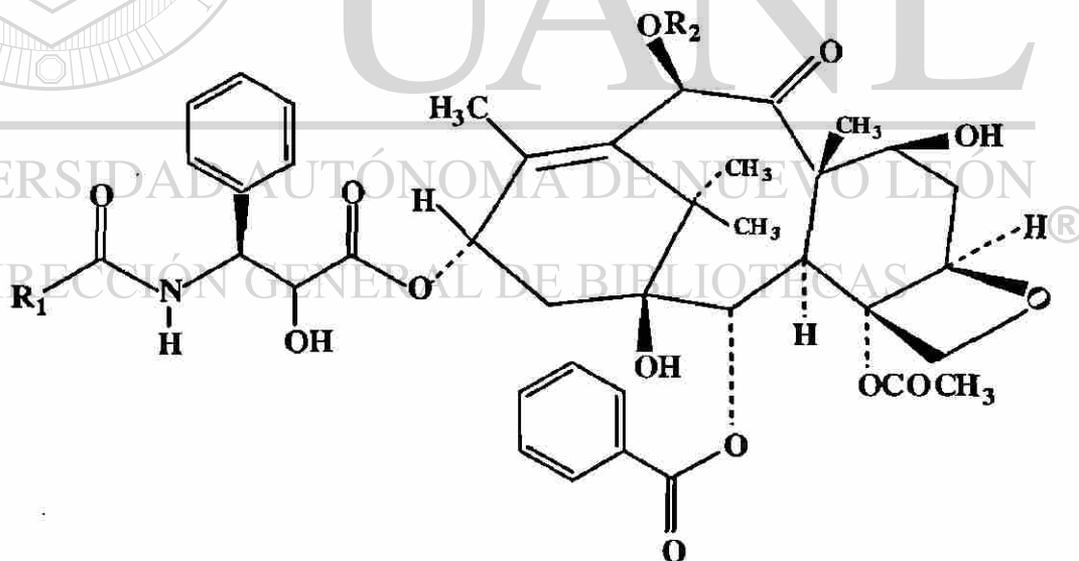


Figura 8
Estructuras químicas del Paclitaxel (R_1 : fenilo, R_2 : acetilo) y su análogo más potente, Docetaxel (R_1 : terbutoxy, R_2 : H).

De igual forma, la familia de las Tetraciclinas ha sido ampliamente estudiada⁽⁴⁰⁾; aunque estos compuestos no tienen actividad antineoplásica, ilustran claramente los resultados de la manipulación química, con la cual se llegó a establecer los grupos funcionales en la molécula que no deben ser modificados para que este tipo de compuestos no pierdan o disminuyan su actividad biológica (Figura 9).

En base a los resultados obtenidos al manipular químicamente la Tetraciclina, surgió el interés de sintetizar derivados funcionales de la Peroxisomicina A1.

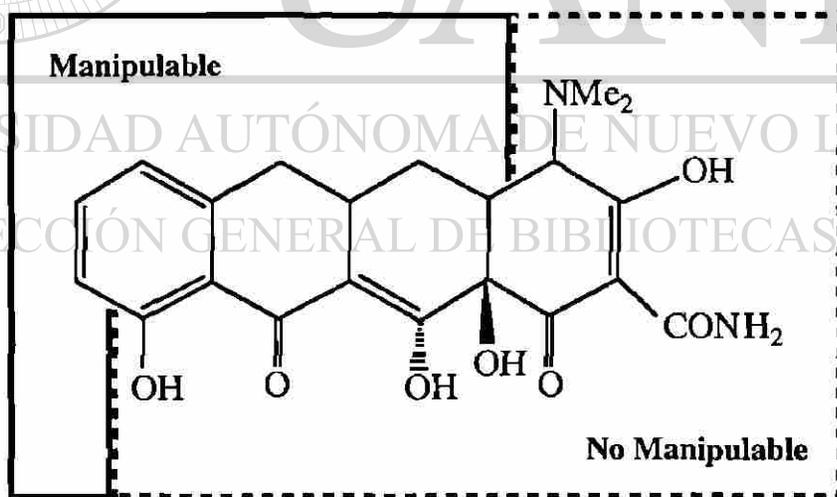


Figura 9

Relación estructura-actividad en la Tetraciclina.

Como ya se mencionó anteriormente, la Peroxisomicina A1 es un compuesto aislado de fuentes naturales, con una selectividad que muy pocos medicamentos de uso actual poseen, razón por la cual se contempla como un compuesto con gran posibilidad de convertirse en una alternativa más en la terapia contra el cáncer.

A través de los análogos sintetizados a partir de este compuesto, se podría llegar a establecer cuál o cuáles son los grupos funcionales responsables de la acción biológica que exhibe la Peroxisomicina A1; de esta manera se daría el primer paso para establecer alguna relación estructura-actividad en este compuesto. Además podrían resultar derivados que ayuden a mejorar la estabilidad y solubilidad de este compuesto en el organismo, tal y como sucedió en el caso de las Antraciclinas antes mencionadas.

Otra de las cosas importantes que pudieran surgir de este trabajo, es que alguno de los derivados obtenidos resultara inmunogénico a través de la unión con una proteína (ya que la Peroxisomicina A1 por su bajo peso molecular no es antigénica), con lo cual se obtendrían anticuerpos contra esa sustancia, lo que abriría otras áreas de estudio, que serían de suma importancia para la línea de investigación que se realiza en lo concerniente al género *Karwinskia*.

Para el desarrollo apropiado de las variaciones estructurales de cualquier droga, es un requisito el conocer las propiedades fisicoquímicas de las sustancias a modificar, por tal motivo para este estudio se tomaron como referencia estudios previos realizados con la Peroxisomicina A1, como son los estudios de solubilidad, constantes de partición lípido/agua realizadas con diferentes solventes orgánicos y a diferentes pH, así como la determinación de la constante de acidez.

Además, se tomó como referencia los resultados de la cinética de degradación de la Peroxisomicina A1 con variaciones de pH, temperatura y luz⁽⁴¹⁾.

Los resultados anteriores permitieron establecer que la Peroxisomicina A1 es termolábil con poca estabilidad a temperatura mayor de 40 °C, fotosensible, fácilmente oxidable con el oxígeno ambiental y degradable a pH básicos (Tabla 4).

Estas observaciones fueron consideradas como indispensables para elaborar adecuadamente la estrategia que se siguió en este trabajo de tesis.

TABLA 4

Propiedades fisicoquímicas de la Peroxisomicina A1.

Punto de fusión	179 - 181 °C
pKa	7.27 ± 0.09
Kpa	
Butanol/Agua	
pH 2.5	4.500 ± 0.900
pH 6	4.000 ± 0.900
pH 9	1.560 ± 0.300
pH 12	0.007 ± 0.002
t 1/2	
37 °C	horas
pH 2.5	148* 158**
pH 6	60* 70**
pH 9	25* 45**
Solubilidad	mg/mL
DMSO	50.00
CHCl ₃	20.00
Octanol	10.00
CH ₃ OH	1.00
Hexano	0.09
H ₂ O	0.01

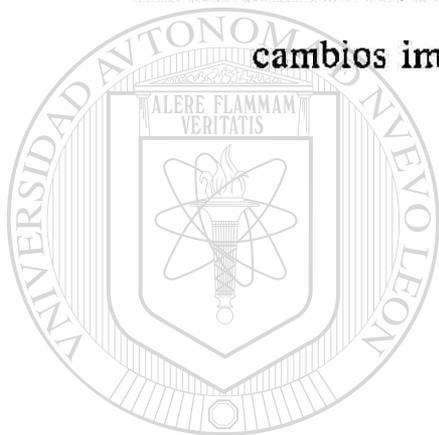
* Luz

** Oscuridad

Martínez, L. E., Tesis de Maestría U.A.N.L., (1990)⁽⁴¹⁾.

HIPOTESIS

La modificación estructural de la Peroxisomicina A1 provoca cambios importantes en su actividad biológica.



UANL

OBJETIVO GENERAL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



Realizar modificaciones moleculares en la Peroxisomicina A1 con el propósito de encontrar relaciones de estructura-actividad.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Aislamiento y Purificación de la Peroxisomicina A1.
- 2.- Verificación de la pureza de la Peroxisomicina A1.
- 3.- Obtención de derivados de la Peroxisomicina A1 que conduzcan al bloqueo de los hidroxilos fenólicos, sustitución en los anillos aromáticos y bloqueo del grupo carbonilo.
- 4.- Aislamiento y purificación de los productos de tales reacciones.
- 5.- Verificación de la pureza de los productos anteriores.
- 6.- Determinación de las constantes físicas y análisis espectroscópicos para la elucidación de la estructura de los productos que resulten de interés, obtenidos en el punto 4.
- 7.- Determinación de la acción biológica de los derivados (seleccionados en el punto 6) mediante los siguientes ensayos:
 - a) Determinación del efecto de los derivados de la Peroxisomicina A1 sobre la actividad de catalasa de origen bovino *in vitro*.
 - b) Valoración de la acción de los derivados de la Peroxisomicina A1 sobre la actividad celular *in vitro*.

CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Material biológico

Se trabajó con el fruto de *K. parvifolia* proveniente del municipio de Choix en Sinaloa, la cual fue recolectada en Diciembre de 1992. Esta planta fue identificada y clasificada por primera vez por Fernández Nava del I.P.N. Existe un ejemplar depositado en los herbarios E.N.C.B. y MEXU.

2.1.1.1 Clasificación taxonómica de la *K. parvifolia*

Familia: Rhamnáceas

Nombre común: Cacachila

Distribución geográfica: Sinaloa y Sonora

Usos: A este taxón no se le conoce uso alguno. En el Noroeste de México se le conoce como planta venenosa, ya que se ha visto que animales, principalmente ganado caprino, que consumen frutos de esta planta perecen generalmente por asfixia.

Descripción botánica:

Arbusto de 2-3 m de alto, ramas glabras. Hojas opuestas o subopuestas, láminas oblongo-lanceoladas, de 1.4-2.0 cm de largo, 1.0-1.2 cm de ancho, haz y envés glabros, margen crenado, con pequeñas manchas negras, ápice obtuso, base obtusa o redondeada; pecíolos delgados de 3-4 mm de largo, glabros; estípulas deltoides de aproximadamente 1 mm de largo, glabras, persistentes. Inflorescencias dispuestas en cimas axilares de 3 a 4 flores, pedúnculo floral ausente o de estar presente hasta de 2 mm de largo, con pequeñas motas negras sobre la superficie, glabro; pedicelos en la fructificación de 4-5 mm de largo; copa floral infundibuliforme, de 2 mm de largo, glabra; sépalos deltoides, de 0.5-1.0 mm de largo, carinados; glabros; pétalos blancos, unguiculados y cimbiformes, ligeramente más cortos que los estambres, persistentes, disco delgado, verde a café-oscuro, estigma 2-lobado, persistente en los frutos maduros.

Frutos axilares, frecuentemente solitarios, verdes en la juventud, café-claros en la madurez, de 4.5-5.0 mm de largo; 1 semilla por lóculo.

2.1.2 Material y equipo general

2.1.2.1 Solventes

Grado analítico:

De este tipo fueron los solventes utilizados para las extracciones,

CCF, CC Gravitacional, CC de baja presión, CLAR preparativo, así como aquellos utilizados en cada una de las reacciones efectuadas y en las técnicas empleadas para determinar la actividad biológica de los derivados.

Grado HPLC:

De este tipo fueron los solventes utilizados en el CLAR analítico, preparativo y semipreparativo.

Deuterados:

El cloroformo utilizado para la obtención de los espectros de RMN fue de este tipo.

2.1.2.2 Reactivos

Los reactivos utilizados en cada una de las reacciones efectuadas, así como aquellos utilizados para los ensayos biológicos se obtuvieron de las casas comerciales Sigma Chemical Co., Aldrich Chemical Company Inc. y de Merck.

Sigma:

N-cloro-succinimida, 95-98%.

N-N-Dimetilformamida.

Catalasa de hígado bovino (E.C.1.11.1.6.).

Peróxido de hidrógeno 30% (v/v).

Suero fetal bovino.

Medio nutritivo de MEM.

Tripsina.

Aldrich:

Diazald (N-metil-N-nitroso-p-toluensulfonamida).

Borhidruro de Litio, 95%.

Merck:

Etanol absoluto.

Sales de KH_2PO_4 y K_2HPO_4 .

Líneas celulares: Fueron obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA):

Células normales de Hígado humano: Chang CCL-13.

Células malignas de Hígado humano: Hepatoma G2, Hb-8065.

2.1.2.3 Técnicas Cromatográficas

CCF en sílica:

Cromatofolios AL de sílica gel 60 F254 Merck, espesor de 0.2 mm.

Eluentes: **1a** Benceno-acetona (1:1)

1b Benceno-acetona (3:1)

1c Acetato de etilo.

CCF en Fase Reversa:

Cromatoplasmas TLC de Sílica gel RP-18 F254, Merck.

Eluentes: **2a** Metanol-agua (65:35)

2b Metanol-agua (80:20)

Detección en CCF:

Lámpara UV: GELMAN SCIENCES, INC. Modelo No. 51438 de 253.7 y 375.0 nm. Revelador: Solución de KOH al 5% en etanol.

CC gravitacional:

Sílica gel 60 para cromatografía en columna, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, Merck.

Eluente: **3a** Acetato de etilo.

CC Flash:

Sílica gel 60 para cromatografía en columna, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, de Merck.

Eluente: **4a** Benceno-acetona (3:1) con 0.1% de ác. acético.

CC de baja presión:

1.- Columna Lobar Lichroprep Si 60 (40-63 μm), tamaño B (310-25 mm) para cromatografía de líquidos, Merck.

Eluentes: **5a** Acetato de etilo.

5b Acetato de etilo-acetona (15:1), (10:1), (5:1), (1:1)

Flujo: 1.5 mL/min.

2.- Columna Lobar Lichroprep RP-18 (40-63 μm), tamaño B (310-25 mm), para cromatografía de líquidos, Merck.

Eluentes: **6a** Metanol-H₂O-Ac. acético (75:25:1.6).

6b Acetonitrilo-H₂O-Ac. acético (50:50:1.6).

Flujo: 1.5 mL/min.

Temperatura: 25 °C.

CLAR Analítico:

Cromatógrafo de líquidos HEWLETT-PACKARD Modelo 1090 con arreglo de diodos. Columna FR ODS de 100 x 2.1 mm con tamaño de partícula de 5 μm .

Eluente **7a** Condiciones:

A=Metanol

B=Agua-acetonitrilo-ác. acético (80:20:1.6).

Tiempo (min.)	%A	%B
0-4	80	20
4-6	100	0
6-8	100	0
8-10	80	20

Eluente **7b** Condiciones:

A=Metanol

B=Agua-acetonitrilo-ác. acético (65:35:1.6).

Tiempo (min.)	%A	%B
0-4	65	35
4-6	100	0
6-8	100	0
8-10	65	35

Flujo: 0.4 mL/min.

Temperatura: 26.9 °C.

$\lambda = 410$ nm

CLAR semipreparativo:

Cromatógrafo Waters Prep LC 2000. Columna analítica de 8 mm X 100 mm Radial-Pak™ Liquid Chromatography cartridge, tipo 8MBC18 10 μ m.

Eluente: **8a** Condiciones:

A= Acetonitrilo

B= Agua-ác. acético al 1.6%

Flujo= 4 mL/min.

$\lambda = 440$ nm

Tiempo (min.)	%A	%B	Curva*
0-5	50	50	6
5-10	100	0	6
10-15	100	0	6

CLAR Preparativo:

Cromatógrafo Waters Prep LC 2000. Columna de 40 mm X 100 mm

Radial-Pak™ Liquid Chromatography cartridge, 8MBC18 10 µm.

Eluente: **9a** Condiciones:

A= Acetonitrilo

B= Agua-ác. acético al 1.6%

Flujo= 70 mL/min.

λ = 440 nm

Tiempo (min.)	%A	%B	Curva*
0-6.8	50	50	6
6.8-11.8	100	0	6
11.8-30	100	0	6

*Ver apéndice I.

2.1.2.4 Equipo general

Evaporaciones: Se realizaron en un rotavapor Buchi a temperatura

inferior a 40°C.

Desecación de muestras: Se utilizó una Pistola de Desaga.

Centrifugaciones: Se realizaron en una centrífuga refrigerada CPKP de Beckman.

Puntos de fusión: Se determinaron en un aparato Electrothermal.

Liofilización: Se utilizó una liofilizadora Freezemobile 12, Virtis.

Espectros UV-Visible: Se obtuvieron en un espectrofotómetro Beckman DU 7500 con arreglo de diodos y controlador de temperatura Peltier.

Espectros Infrarojos: Fueron realizados en pastilla de KBr en un aparato Perkin Elmer 1710 con TF y en un Bruker Vector 22 con aditamento ATR.

Espectros de Masas: Se obtuvieron por impacto electrónico, utilizando un espectrómetro HP 5985.

Espectros de RMN: Se obtuvieron en un aparato Bruker (400.13 MHz ^1H , 100.62 MHz ^{13}C).

Evaluación microscópica en los ensayos de citotoxicidad: Se realizó en un Invertoscopio Axiovert 100 de Carl Zeiss.

Incubación de las líneas celulares: Se utilizó una incubadora NAPCO, modelo 5410.

2.2 METODOS

2.2.1 Aislamiento y purificación de la Peroxisomicina A1

Figura 10.

Extracciones:

Se utilizó el fruto molido de *K. parvifolia*, el cual se extrajo varias veces con acetato de etilo. El extracto se evaporó y precipitó con éter de petróleo, con lo cual se obtuvo un precipitado (ppt. 1). El ppt.1 se sometió a extracciones con metanol de las cuales el sobrenadante (Sob.1) contenía principalmente Peroxisomicina A1, Peroxisomicina A2 y compuestos de t_R similares a la Peroxisomicina A1. El Sob. 1 se evaporó y precipitó con éter de petróleo obteniendo de esta forma un ppt. 2 y un Sob. 2.

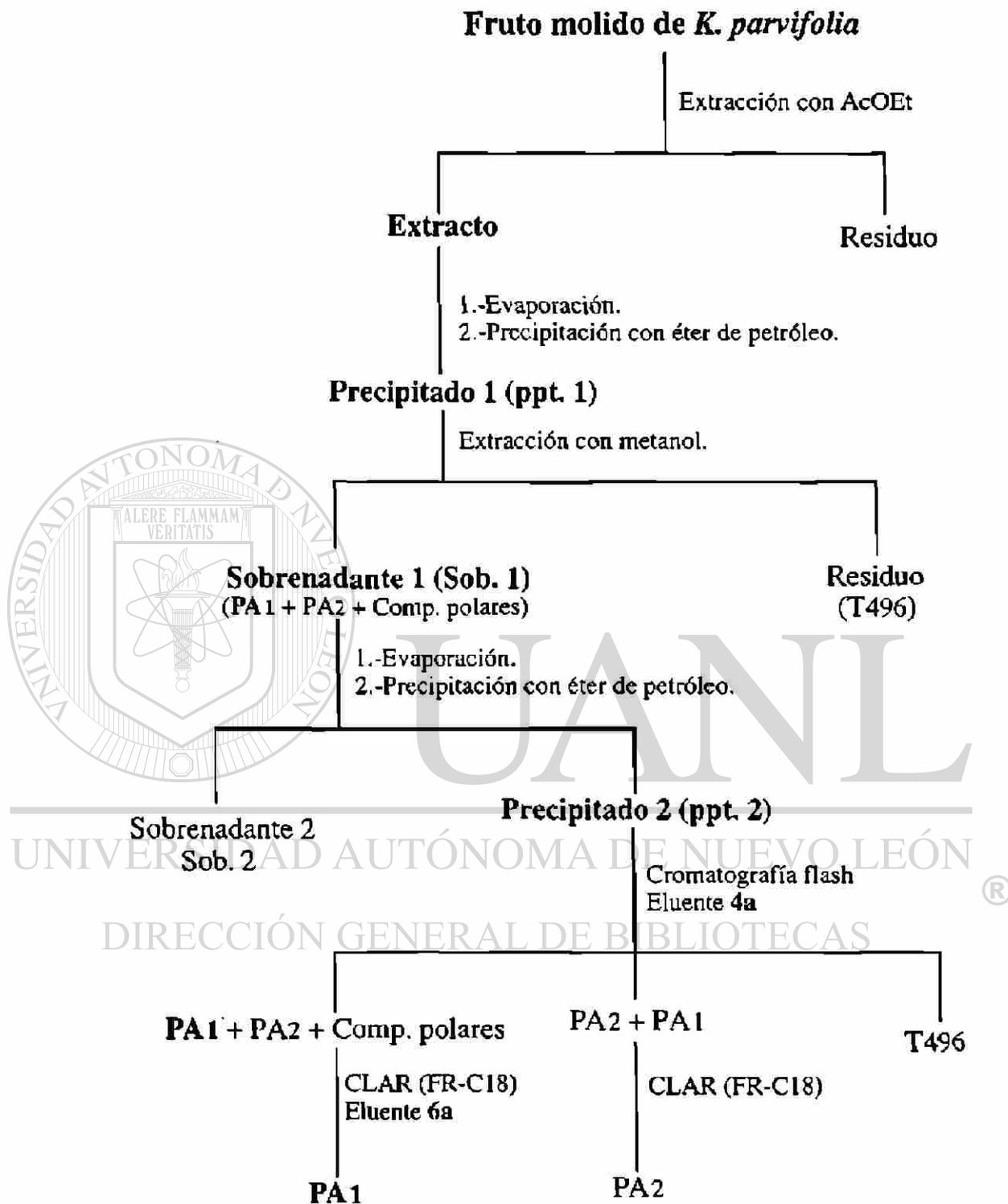
Todas las extracciones se realizaron a temperatura ambiente.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Purificación de la Peroxisomicina A1:

Figura 10 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El ppt. 2 se sometió a CC Flash utilizando el eluyente 4a. De esta forma se obtuvo una fracción enriquecida en Peroxisomicina A1, la cual fue sometida a CLAR (FR-C18) utilizando el eluyente 6a para así finalmente obtener Peroxisomicina A1 pura.



2.2.2 Verificación de la pureza de la Peroxisomicina A1

Se determinó basándose en dos parámetros:

Pureza química:

- a.- Determinación del punto de fusión.
- b.- CCF en sílica gel 60, con los eluentes **1a** y **1b**.
- c.- CLAR analítico RP-18, con el eluyente **7b**.

Pureza biológica:

- a.- Valoración del grado de inhibición de la catalasa *in vitro*.
- b.- Valoración de la actividad citotóxica *in vitro*.

2.2.3 Obtención de los derivados

Se realizaron ensayos preliminares para cada uno de los procedimientos seleccionados en cada reacción.

Para evitar la degradación de la Peroxisomicina A1 se adaptó cada uno de los procedimientos a las siguientes condiciones de reacción:

- Temperatura no mayor de 40°C.
- pH neutro o ligeramente ácido.
- Atmósfera libre de oxígeno (corriente de N₂ o Argón).
- Protección contra la luz.

Se monitoreó la formación de productos de degradación por medio de CCF en sílica gel (eluentes **1a** y **1b**), revelando las placas con KOH en etanol. Una vez establecidas las condiciones óptimas en cada reacción, se procedió a realizarlas en escala preparativa.

2.2.3.1 Bloqueo de los hidroxilos fenólicos

Se realizó mediante la síntesis de éteres metílicos con diazometano, el cual se obtuvo a partir del diazald.

La reacción teórica se muestra a continuación:

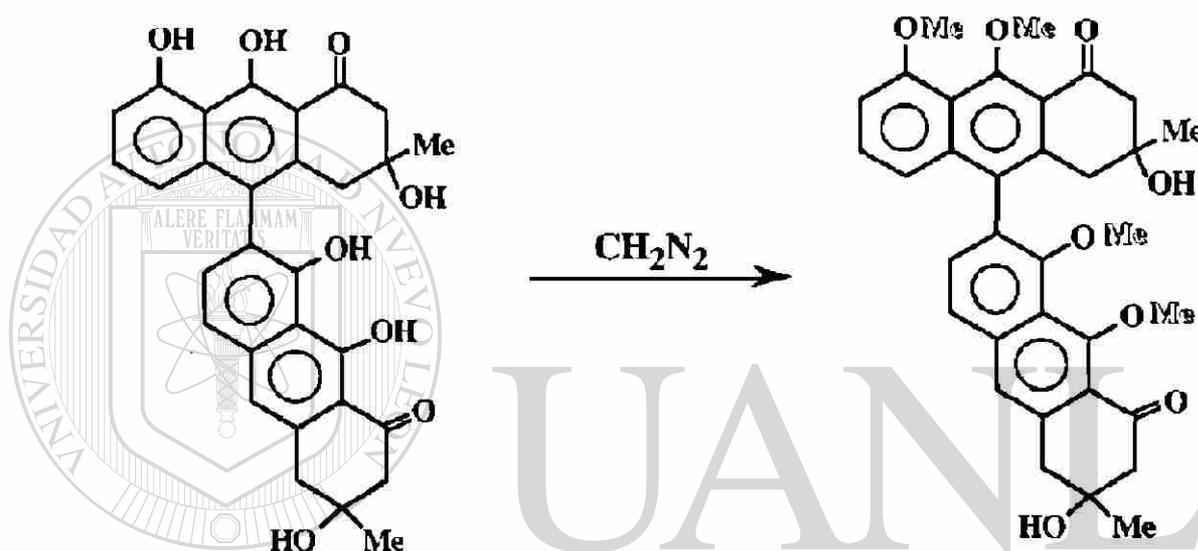


Figura 11

Bloqueo de los hidroxilos fenólicos: reacción de metilación.

Procedimiento:

Metilación de 250 mg de Peroxisomicina A1.

Se armó el equipo tal y como se muestra en la Figura 12, y se utilizaron los reactivos como se indica. Una vez que se alcanzó la temperatura del baño de agua a 65 °C se dió inicio a la reacción con el

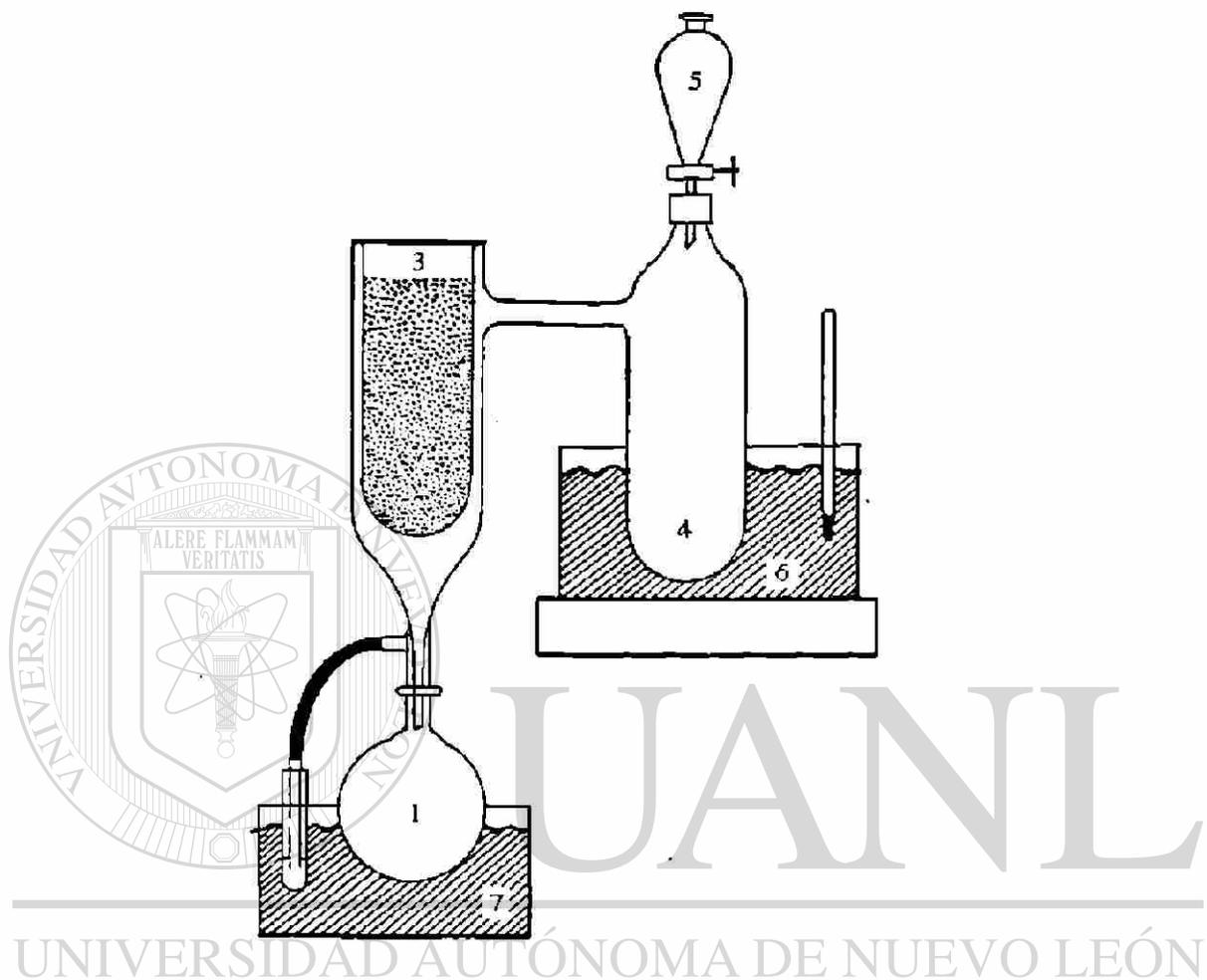
agregado gota a gota de la solución del diazald (2.5 g en 22.5 mL de éter etílico) al matraz 4 (ver Figura 12) el cual contenía 2.5 g de KOH disueltos en 5 mL de etanol y 4 mL de agua destilada bajo constante agitación magnética.

De esta forma se generó en el matraz 4 el diazometano gaseoso. Este gas junto con el éter etílico después de pasar por el dedo frío (enfriado con CO₂ sólido-acetona) condensaron directamente sobre el matraz que contenía la Peroxisomicina A1 disuelta en etanol. De esta forma ocurrió la metilación de la Peroxisomicina A1.

La reacción finalizó cuando se agotó la solución del diazald. Una vez finalizada la reacción se evaporó el solvente, se recuperó el producto con acetato de etilo y se precipitó con hexano.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Se corroboró la desaparición de la Peroxisomicina A1 realizando CCF en sílica gel utilizando el eluyente **1c**.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

- 1- Peroxisomicina A1 disuelta en etanol.
- 2- Trampa de éter etílico.
- 3- CO₂ sólido en acetona.
- 4- Solución de KOH (etanol al 95%-H₂O).
- 5- Solución de diazald en éter etílico.
- 6- Baño de agua a 65 °C.
- 7- Baño de hielo-NaCl a -21 °C.

Figura 12

Esquema de la reacción de metilación.

2.2.3.2 Sustitución electrofílica aromática

Para este fin se llevó a cabo una reacción de cloración:

La reacción teórica se muestra en la siguiente figura:

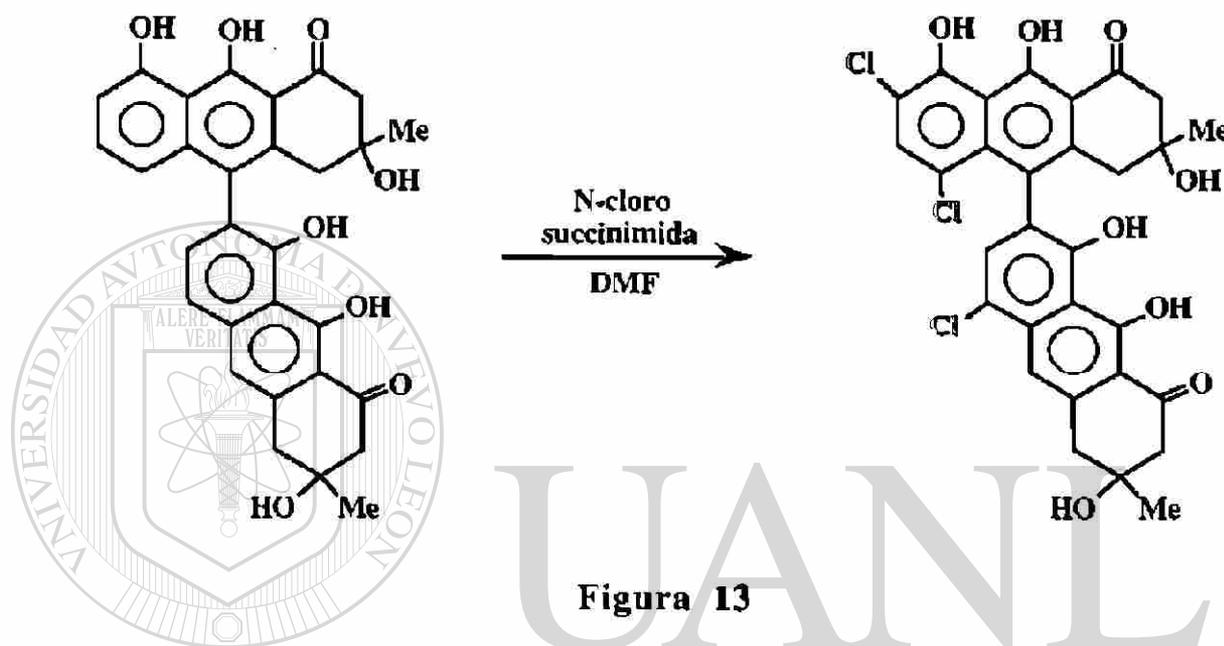


Figura 13

Sustitución electrofílica aromática: reacción de cloración.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Para precisar el producto termodinámicamente más estable, se realizó el cálculo de densidad electrónica de la Peroxisomicina A1, con la representación gráfica del orbital HOMO, se utilizó para ello el programa de cálculos semiempíricos de Mac Spartan plus.

Procedimiento:

Cloración de 250 mg de Peroxisomicina A1.

En un matraz de 3 bocas se dejó entrar y salir N_2 y se colocó la Peroxisomicina A1 disuelta en dimetilformamida (en cantidad suficiente hasta solución homogénea). A través de un embudo de adición se añadió gota a gota una solución de N-cloro-succinimida (143 mg disueltos en cantidad suficiente de DMF), bajo agitación magnética y baño de hielo.

Se llevó el control de la reacción con CCF fase reversa con los eluentes **2a** y **2b** así como por CLAR analítico con los eluentes **7a** y **7b**. Se dió por terminada la reacción cuando en los cromatogramas anteriores se observó la desaparición de la Peroxisomicina A1.

Se liofilizó el producto de la reacción, congelado previamente con nitrógeno líquido, (este paso se realizó para eliminar en forma rápida la DMF, ya que tiene un punto de ebullición de $153^{\circ}C$). El producto liofilizado se disolvió con la mínima cantidad de una mezcla $CHCl_3$ y $AcOEt$ (1:1) y finalmente se precipitó con hexano. Se analizó el precipitado así obtenido por medio de CCF fase reversa con los eluentes **2a** y **2b** y por CLAR analítico utilizando los eluentes **7a** y **7b**.

Para determinar la presencia del cloro se realizó fusión con sodio al producto obtenido, realizando posteriormente una prueba cualitativa para la determinación de halógenos ($AgNO_3$ en etanol).

2.2.3.3 Bloqueo del grupo carbonilo

Para lograr el bloqueo del grupo carbonilo se realizó un procedimiento en dos pasos:

1^{er} paso: metilación del OH 9 y 9'.

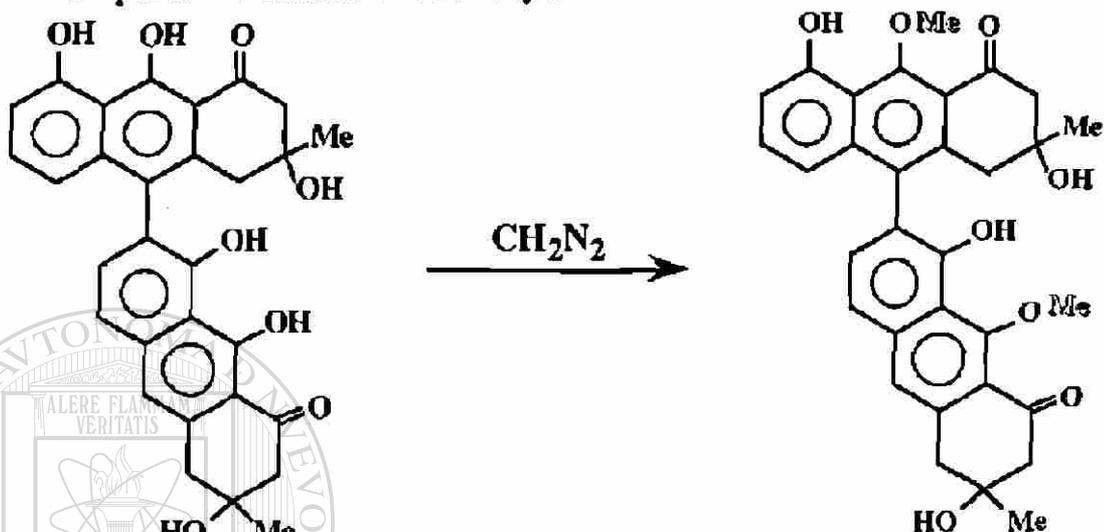


Figura 14

Bloqueo del grupo carbonilo, primer paso: metilación del OH 9 y 9'.

2^{do} paso: reducción.

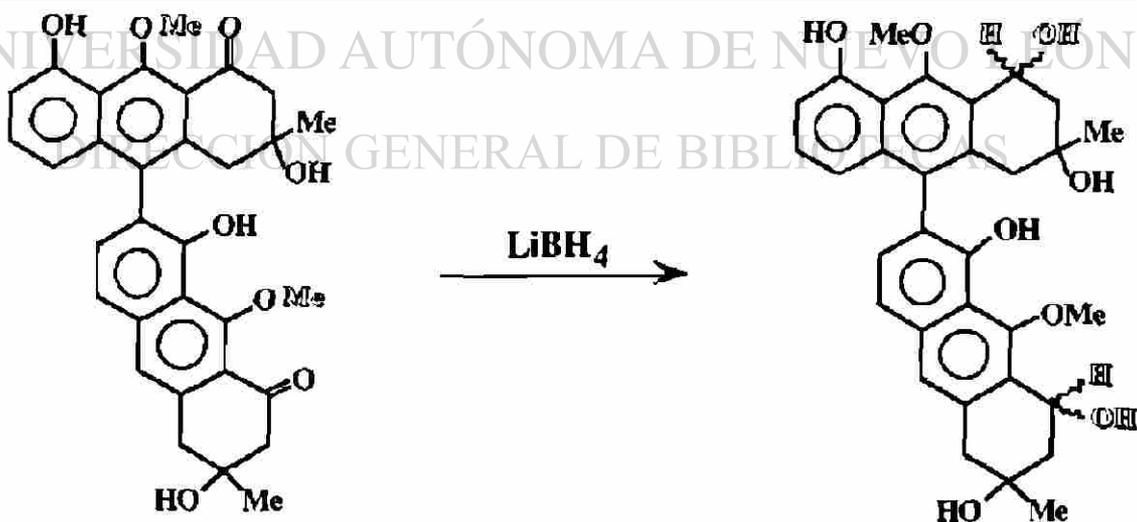


Figura 15

Bloqueo del grupo carbonilo, segundo paso: reacción de reducción.

Procedimiento:

Reducción de 250 mg de Peroxisomicina A1.

En un matraz de 3 bocas se dejó entrar y salir N_2 y se colocó la Peroxisomicina A1 (previamente metilada en las posiciones 9 y 9') disuelta en tetrahidrofurano (en cantidad suficiente hasta solución homogénea). A través de un embudo de adición se añadió gota a gota una solución de $LiBH_4$ (266.4 mg disueltos en cantidad suficiente de THF), bajo agitación magnética a temperatura ambiente.

Se llevó el control de la reacción con CCF en sílica gel usando el eluyente **1c**. Cuando en el cromatograma anterior se observó la desaparición del compuesto original se finalizó la reacción agregando metanol.

El solvente se evaporó y el producto se recuperó en AcOEt, el cual fue lavado varias veces con agua destilada. Se separaron las fases; la fase acuosa se extrajo repetidas veces con AcOEt. Las fases orgánicas se juntaron, evaporaron y recuperaron en la mínima cantidad posible de AcOEt, para finalmente precipitar con hexano.

El precipitado así obtenido se analizó por CCF en sílica gel, usando el eluyente **1c**, además de obtener su espectro IR.

2.2.4 Aislamiento y purificación de los derivados

2.2.4.1 Aislamiento y purificación a partir del producto de la reacción de metilación.

El producto de la reacción se sometió a CC gravitacional usando el eluyente **3a**. Las fracciones obtenidas se analizaron por CCF en sílica gel con el eluyente **1c**. Se juntaron fracciones similares las cuales se evaporaron, recuperándose en AcOEt para finalmente precipitar con hexano. Los precipitados de interés (aquellos que se obtuvieron en más cantidad y en los que se observaba algún compuesto mayoritario) se sometieron a CC de baja presión utilizando el eluyente **5a**. Después de analizar y procesar las fracciones de igual forma que en la cromatografía anterior, se lograron purificar 4 derivados designándose como compuestos **1, 2, 3, y 4**.

2.2.4.2 Aislamiento y purificación a partir del producto de la reacción de cloración.

El producto de la reacción se sometió a CC de baja presión en fase reversa, con el eluyente **6b**. Se analizaron las fracciones obtenidas utilizando CCF fase reversa usando el eluyente **2a y 2b**. Se separaron en fracciones similares, se evaporó el solvente, se precipitaron y se

recuperaron en la mínima cantidad de CHCl_3 , para finalmente precipitarlas con hexano. De estos precipitados se seleccionó el que se obtuvo en mayor cantidad y en el que se observó algún compuesto mayoritario. El precipitado así seleccionado se sometió a CLAR analítica fase reversa, con el eluyente **1a**, para establecer con ello las condiciones óptimas de purificación. Una vez establecidas las condiciones se sometió el mismo precipitado a CLAR preparativa, usando el eluyente **9a**. Se analizaron las fracciones así obtenidas utilizando CCF fase reversa con el eluyente **2a** y **2b**, así como por CLAR analítico (eluentes **7a** y **7b**). Se separaron fracciones similares y después de evaporar y precipitar con hexano se obtuvo un derivado puro, el cual se designó como compuesto **5**.

2.2.4.3 Aislamiento y purificación a partir del producto de la reacción de reducción del carbonilo.

El producto de la reacción se sometió a CC en sílica gel de baja presión, utilizando el eluyente **5b**. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por CCF en sílica gel, utilizando el eluyente **1c**. Se separaron en fracciones similares, se evaporaron y se recuperaron en la mínima cantidad de AcOEt, para finalmente precipitarlas con hexano. De esta forma se obtuvo un derivado puro el cual se designó como compuesto **6**.

2.2.5 Verificación de la pureza de los compuestos 1 al 6

A todos los derivados se les realizó RMN de ^1H .

Los derivados obtenidos en la reacción de metilación y en la reducción del carbonilo, se sometieron a CCF en sílica gel con el eluyente 1c. La pureza del derivado obtenido en la reacción de cloración, se constató por CLAR fase reversa (eluentes 7a y 7b).

2.2.6 Elucidación de la estructura de los compuestos 1 al 6

De cada uno de los derivados se obtuvieron los siguientes espectros:

- Espectro UV-Visible
- Espectro IR
- Espectro de RMN de ^1H
- Espectro de RMN de ^{13}C
- Espectros de RMN de doble dimensión
- Espectros nOe (en caso necesario)
- Espectro de Masas

2.2.7 Valoración de la Actividad Biológica

2.2.7.1 Determinación de la acción de los derivados sobre la actividad de catalasa *in vitro*.

Para este fin se utilizó un método espectrofotométrico basado en la medición de la disminución de la Absorbancia del peróxido de hidrógeno a 240 nm, pH 7.4 y 25 °C. Las tasas de reacción enzimática se midieron en un espectrómetro Beckman DU 7500 equipado con paquete de cinética enzimática.

a)- Determinación del 100% de actividad de la catalasa.

En una cubeta de cuarzo de 1 cm de trayecto óptico se agregaron las siguientes soluciones:

- 950 µL de solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM, pH de 7.4.

- 40 µL de la solución de catalasa: a partir de una solución patrón de la enzima de 10 mg/mL en solución amortiguadora de fosfato de potasio, se preparó una dilución 1:150.

- Se agitó y se tomó la lectura de Absorbancia a 240 nm (Lectura del blanco).

- Se disparó la reacción enzimática agregando 10 µL de H₂O₂ (dilución 1:5 de peróxido de hidrógeno al 30% en solución amortiguadora de fosfato de potasio).

- Se agitó y se tomó la lectura de Absorbancia a 240 nm cada minuto durante 6 minutos.

Lo anterior se realizó por triplicado para obtener el valor promedio.

La actividad enzimática de la catalasa se expresó como U/mL (μM de peróxido de hidrógeno utilizado/min/mL).

b)- Determinación del poder inhibitorio para cada uno de los derivados.

En una cubeta de cuarzo de 1 cm de trayecto óptico se agregaron las siguientes soluciones:

- 930 μL de solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM a pH de 7.4.

- 40 μL de la solución de catalasa (dilución 1:150).

- 20 μL del derivado a probar disuelto en etanol.

- Se agitó y se tomó la lectura de Absorbancia a 240 nm (lectura del blanco).

- Se disparó la reacción enzimática agregando 10 μL de H_2O_2 ® (dilución 1:5 de peróxido de hidrógeno al 30% en solución amortiguadora de fosfato de potasio).

- Se agitó y se tomó la lectura de Absorbancia a 240 nm durante 6 min.

Lo anterior se hizo por triplicado variando la concentración μM de cada derivado y, en base a ello, se calculó en cada caso el grado de inhibición de la catalasa causado por la adición del compuesto.

c)- Determinación de la CI_{10} .

Para realizar las curvas de inhibición de cada compuesto se utilizaron diferentes concentraciones y se graficó el logaritmo de la actividad restante versus la concentración.

Para cada concentración se hicieron tres determinaciones de la actividad enzimática. Se calculó con esto la actividad restante graficando el valor promedio de las mismas. Para el análisis estadístico se utilizó el método de mínimos cuadrados contenido en el programa Cricket Graph. Se obtuvo la ecuación de la curva y con ella se calculó la CI_{10} para cada derivado.

2.2.7.2 Valoración de la acción de los derivados sobre la actividad celular *in vitro*.

Las líneas celulares se obtuvieron de la American Type Culture Collection y fueron las siguientes:

Células de hígado de Chang (origen benigno).

Células de Hepatoma G2 (origen neoplásico).

a)- Obtención de monocapa celular en placas de 96 celdillas.

Se utilizó una variable del método descrito por Lickiss⁽⁴²⁾. Las células de ambas líneas fueron sembradas en frascos de cultivo, en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 9:1; se

mantuvieron en incubación a 37 °C durante 3 a 4 días hasta la formación de monocapa celular.

Transcurrido este tiempo, las monocapas celulares fueron expuestas a 1.5 mL de tripsina al 0.25 %, durante 5 a 15 min., con el propósito de desprenderlas del recipiente y separar las células entre sí; posteriormente las células fueron resuspendidas en medio MEM y se determinó la concentración celular en un hemocitómetro (cámara de Neubauer), ajustándose a 20×10^3 células por cada 0.1 mL.

Se agregó 0.1 mL de la suspensión celular (20,000 células) a cada celdilla de la placa de 96; se incubaron a 37 °C hasta la formación de la monocapa celular (24 - 48 hrs).

b)- Exposición celular a los derivados y determinación de la CT₅₀.

Las placas fueron revisadas microscópicamente (Invertoscopio IM-35 Carl-Zeiss) para evaluar la formación de la monocapa celular en todas las celdillas.

El medio de cultivo de las placas fue retirado y se agregaron 100 µL de medio MEM a las 96 celdillas; posteriormente se agregó el derivado de la Peroxisomicina A1 disuelto en etanol, en 12 concentraciones (160 µg/mL hasta 0.078 µg/mL).

Se utilizaron tres celdillas para cada concentración a evaluar, dejando celdillas control en las cuales sólo se agregó el solvente (etanol).

Las 12 concentraciones de cada derivado de la Peroxisomicina A1,

fueron evaluadas en tres ocasiones diferentes, en experimentos separados.

Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 72 horas. Una vez concluido el periodo de incubación, las células fueron revisadas microscópicamente con diferentes factores de amplificación (100x, 200x y 300x).

El criterio de citotoxicidad evaluado fue la adhesión celular a la placa de 96 celdillas; las celdillas donde todas las células estaban desprendidas, fueron consideradas como celdillas con concentración citotóxica total (CT₁₀₀), y las celdillas con adhesión celular igual a las células de las celdillas control, fueron consideradas como celdillas con concentración no citotóxica (CT₀).

La concentración citotóxica 50% (CT₅₀) fue calculada como el promedio geométrico entre la CT₁₀₀ (la cual dió el efecto máximo), y la CT₀ (la cual no produjo daño celular) de acuerdo a el criterio de Ekwall⁽⁴³⁾.

Se evaluó la selectividad de cada derivado, comparando las CT₅₀ establecidas para la Peroxisomicina A1 en cada línea celular.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LA PEROXISOMICINA A1

Se utilizó el fruto molido de la *K. parvifolia* como fuente para la obtención de la Peroxisomicina A1. La purificación de dicho compuesto se llevó a cabo según el método descrito en la figura 10.

Para fines de este trabajo, el método de purificación se realizó repetidas veces.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

3.2 VERIFICACION DE LA PUREZA DE LA PEROXISOMICINA A1

Pureza Química:

- a)- Punto de fusión: 179 - 182 °C.
- b)- R_f en CCF en sílica gel, eluente 1a: 0.33
- c)- R_f en CCF en sílica gel, eluente 1b: 0.20
- d)- t_R en CLAR, eluente 7b: 2.6

Pureza Biológica:

a)- % de inhibición de la catalasa en ensayos *in vitro*: 39.3%

b)- Actividad citotóxica *in vitro* después de 72 hrs de exposición.

Línea celular	CT50 μg/mL
Chang 13-CCL	1.25 - 2.50
Hepatoma G2	0.049 - 0.156

3.3 OBTENCION DE LOS DERIVADOS

3.3.1 Bloqueo de los hidroxilos fenólicos

Reacción de metilación.

Como producto de esta reacción se obtuvo un precipitado color amarillo claro (265 mg). Al analizar el producto anterior por CCF en sílica gel utilizando el eluente 1c, se observaron alrededor de 10 compuestos con R_f diferentes y fluorescencia blanco-verdosa a 375 nm. El cromatograma anterior se reveló con KOH en etanol resultando negativa la formación de hidroxiantraquinonas (coloración café).

3.3.2 Sustitución electrofílica aromática

Reacción de cloración.

Como producto de esta reacción se obtuvo un precipitado color verdoso (200 mg). El análisis del producto anterior arrojó los siguientes resultados:

- En la CCF fase reversa (eluentes 2a y 2b), se observaron alrededor de 7 compuestos con R_f diferentes. Los cromatogramas anteriores se revelaron con KOH en etanol, resultando negativa la formación de hidroxiantraquinonas (coloración café).

- Con el análisis por CLAR analítico utilizando los eluentes 7a y 7b, se constató lo observado en la CCF fase reversa.

- La prueba cualitativa de AgNO_3 en etanol resultó positiva para el cloro.

3.3.3 Bloqueo del grupo carbonilo

Reacción de reducción.

Como producto de esta reacción se obtuvo un precipitado color blanco-ostión (180 mg). Al analizar este producto por CCF en sílica gel (eluyente 1c), se observaron alrededor de 5 compuestos, los cuales presentaron fluorescencia blanca a 375 nm. El revelado de la CCF anterior con KOH en etanol resultó negativo (coloración café). El espectro IR del producto de esta reacción muestra la desaparición de la banda a 1675 cm^{-1} que corresponde al estiramiento del carbonilo en el compuesto de referencia.

3.4 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS DERIVADOS DE LA PEROXISOMICINA A1

Se aislaron y purificaron 6 derivados semisintéticos como productos mayoritarios en cada una de las reacciones anteriores.

Del bloqueo de los hidroxilos fenólicos se obtuvieron 4 éteres metílicos denominados para fines de este trabajo como compuestos 1, 2, 3 y 4.

De la sustitución electrofílica aromática se obtuvo un derivado clorado denominado como compuesto 5.

Del bloqueo de los grupos carbonilo se obtuvo un derivado denominado como compuesto 6.

3.5 VERIFICACION DE LA PUREZA DE LOS DERIVADOS DE LA PEROXISOMICINA A1

La pureza de cada uno de los derivados de la Peroxisomicina A1 se confirmó por RMN de ^1H .

Características cromatográficas:

Valores de R_f en CCF en sílica gel, eluente 1 c.

Peroxisomicina A1	0.14
Compuesto 1	0.21
Compuesto 2	0.27
Compuesto 3	0.22
Compuesto 4	0.16
Compuesto 6	0.23
Compuesto 5	t_R condiciones 7a: 1.4 y 7b: 3.9

3.6 ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA

3.6.1 Elucidación de la estructura del compuesto 1

Para cumplir con este objetivo, se analizaron los siguientes espectros:

Espectro UV-Visible (Figura 16).

Espectro IR (Figura 17).

Espectro de masas (Figura 18).

Espectro de RMN de ^1H (Figura 19 y 19a).

Espectro de RMN de ^{13}C (Figura 20).

Espectro HMQC (Figura 21).

Espectro HMBC a 7 Hz (Figura 22).

Como resultado del análisis de cada uno de los espectros anteriores la Figura 23 muestra la estructura propuesta para el compuesto 1. La asignación de cada una de las señales de ^1H y ^{13}C en la molécula se presenta en la Tabla 5 y 6.

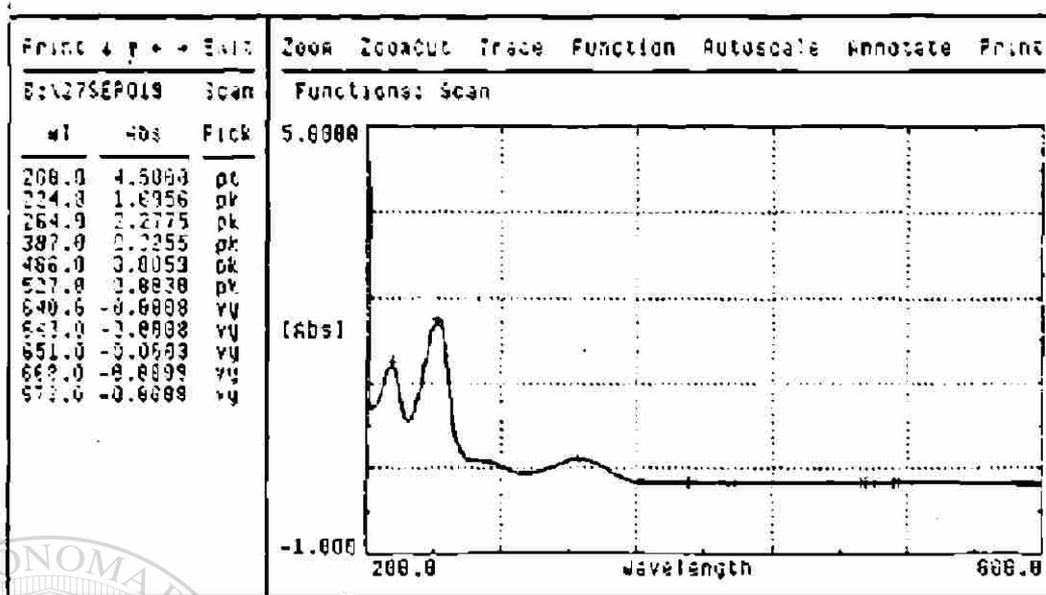


Figura 16. Espectro UV-Visible del compuesto 1.

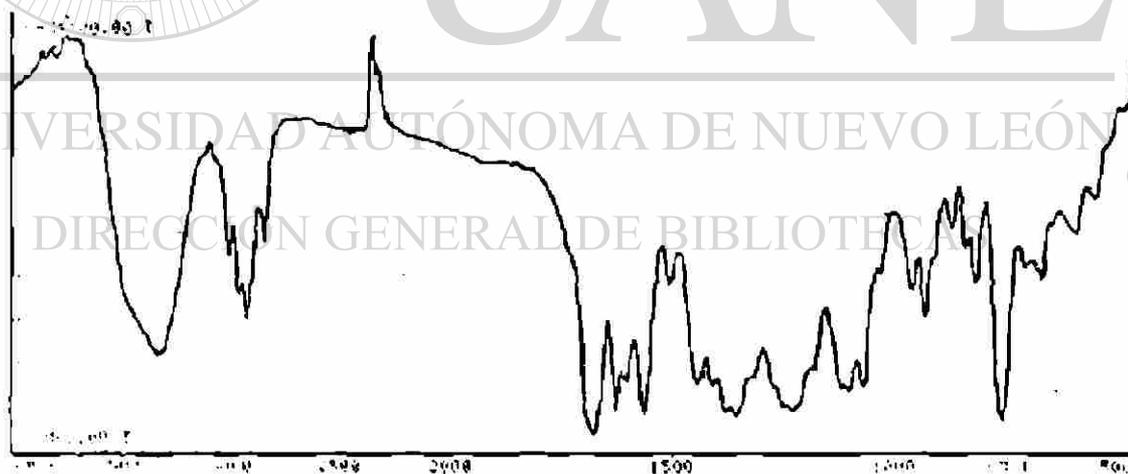
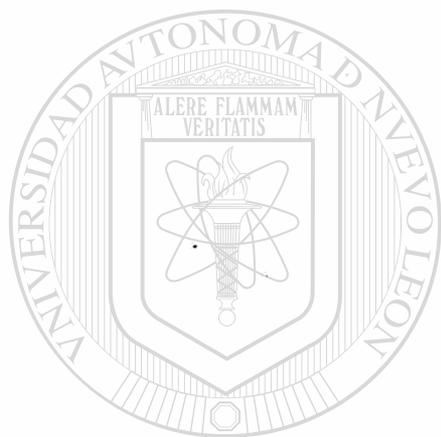


Figura 17. Espectro IR del compuesto 1.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Figura 18. Espectro de masas del compuesto 1.

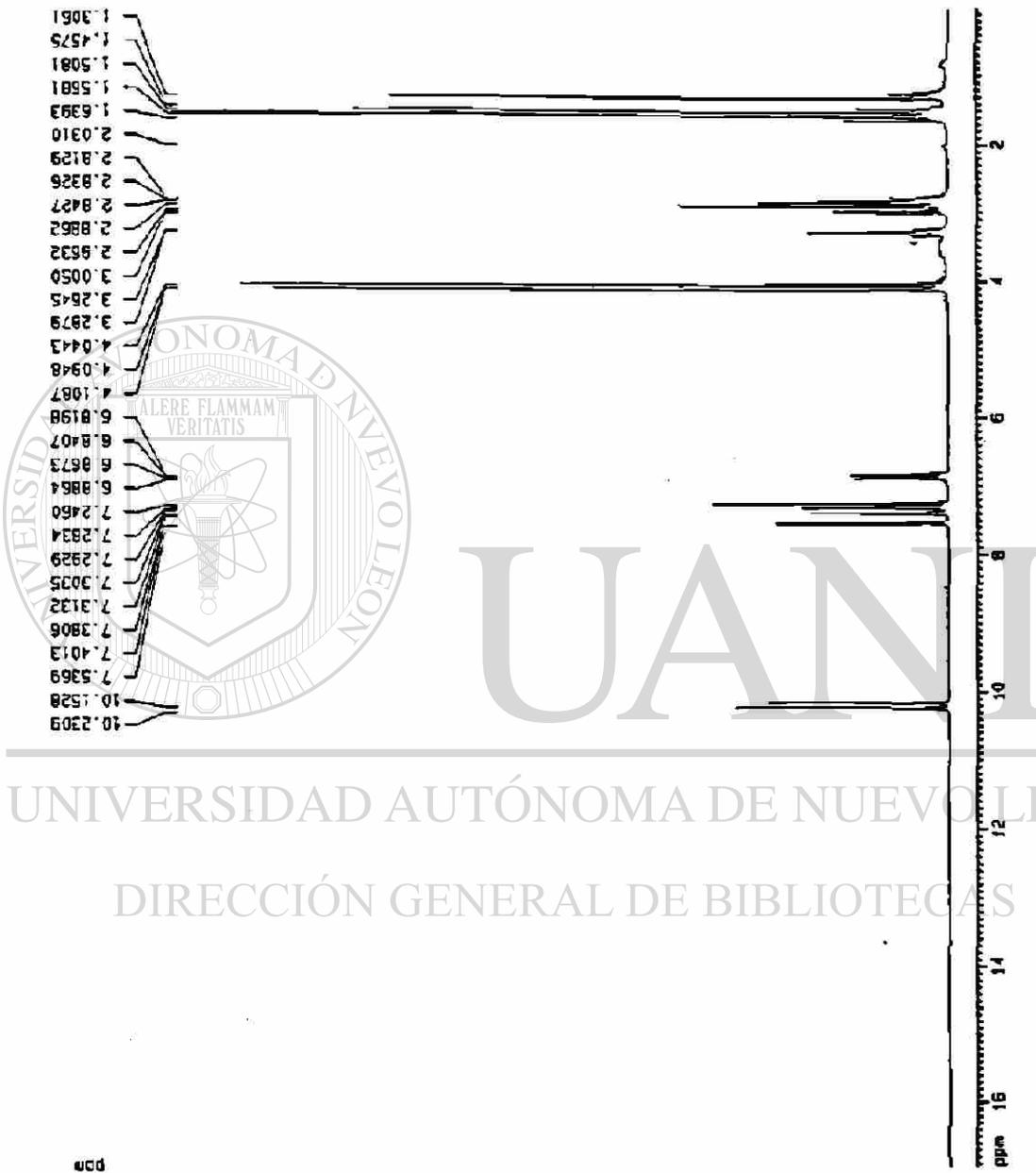


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 1.

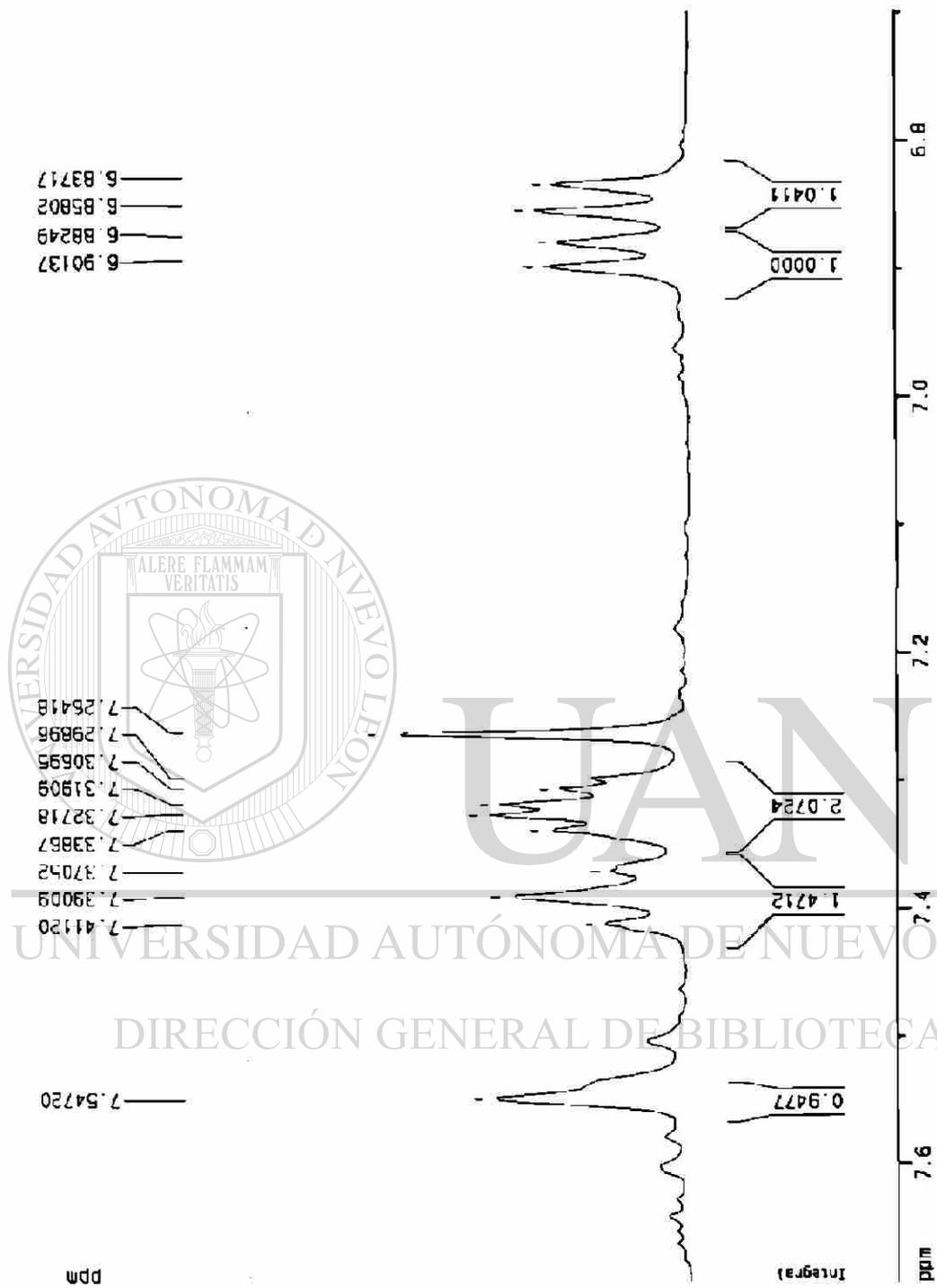


Figura 19a. Espectro de RMN de ¹H del compuesto 1. (ampliación de la región aromática).

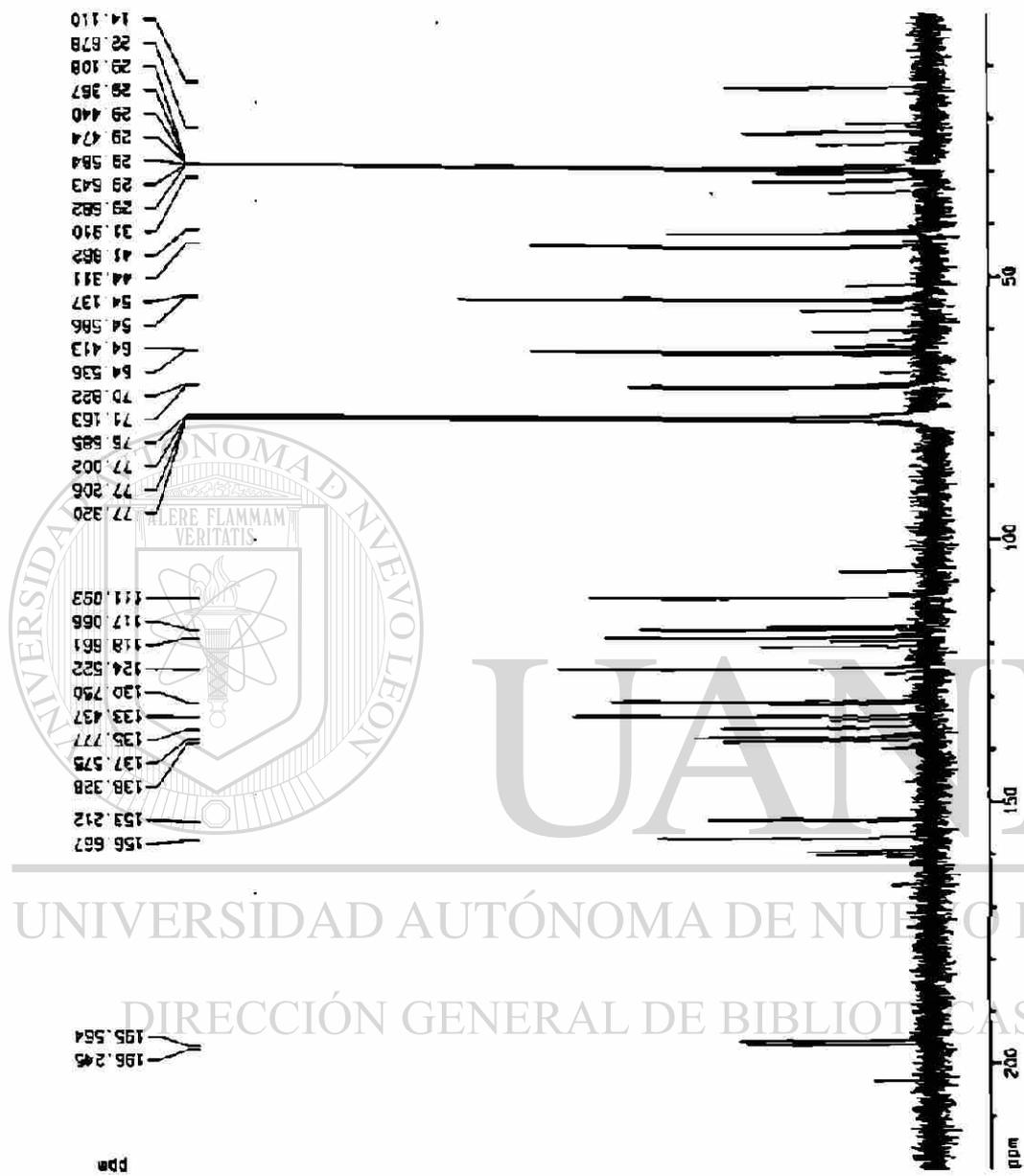


Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 1.

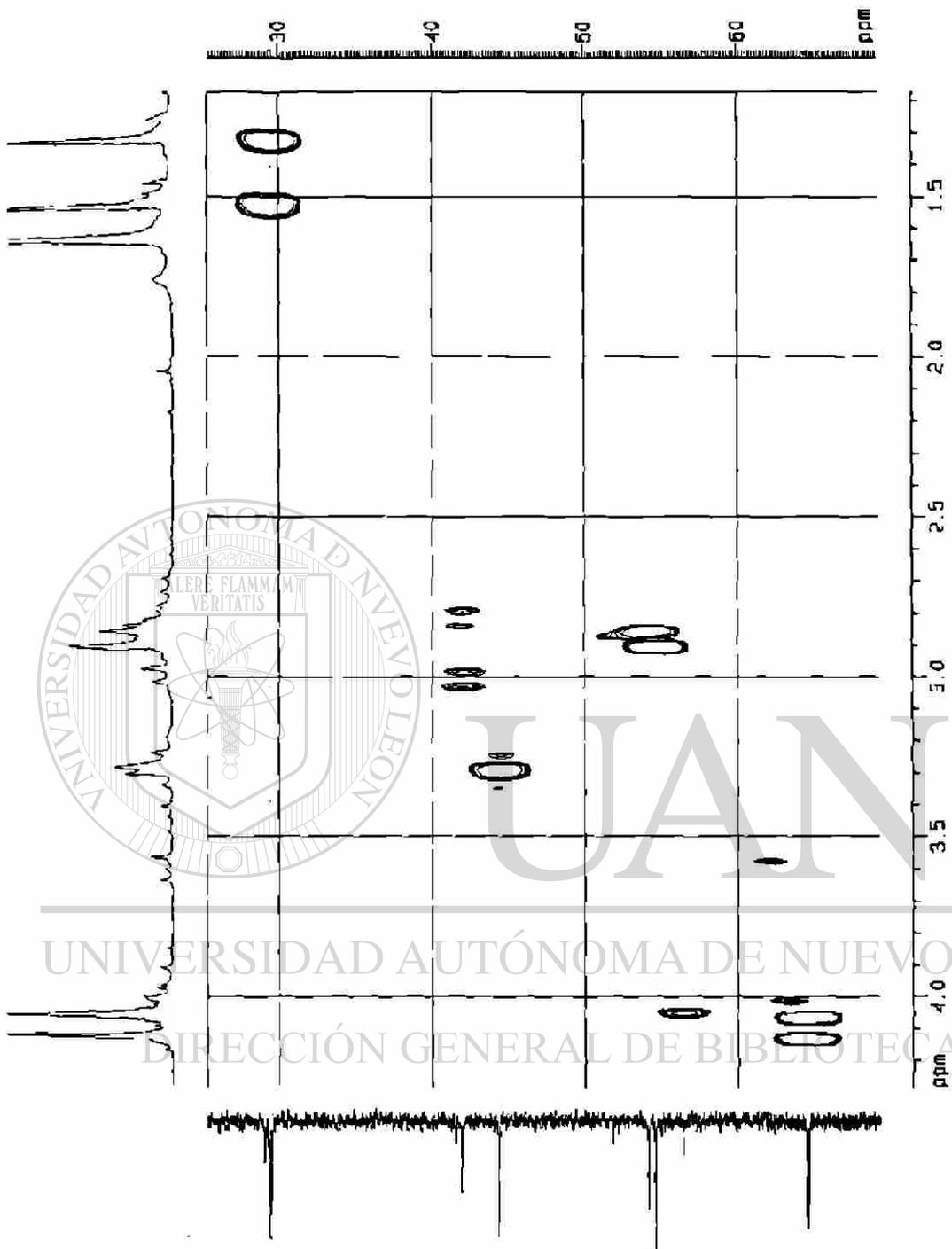


Figura 21. Espectro HMQC del compuesto I. (correlación de los metoxilos).

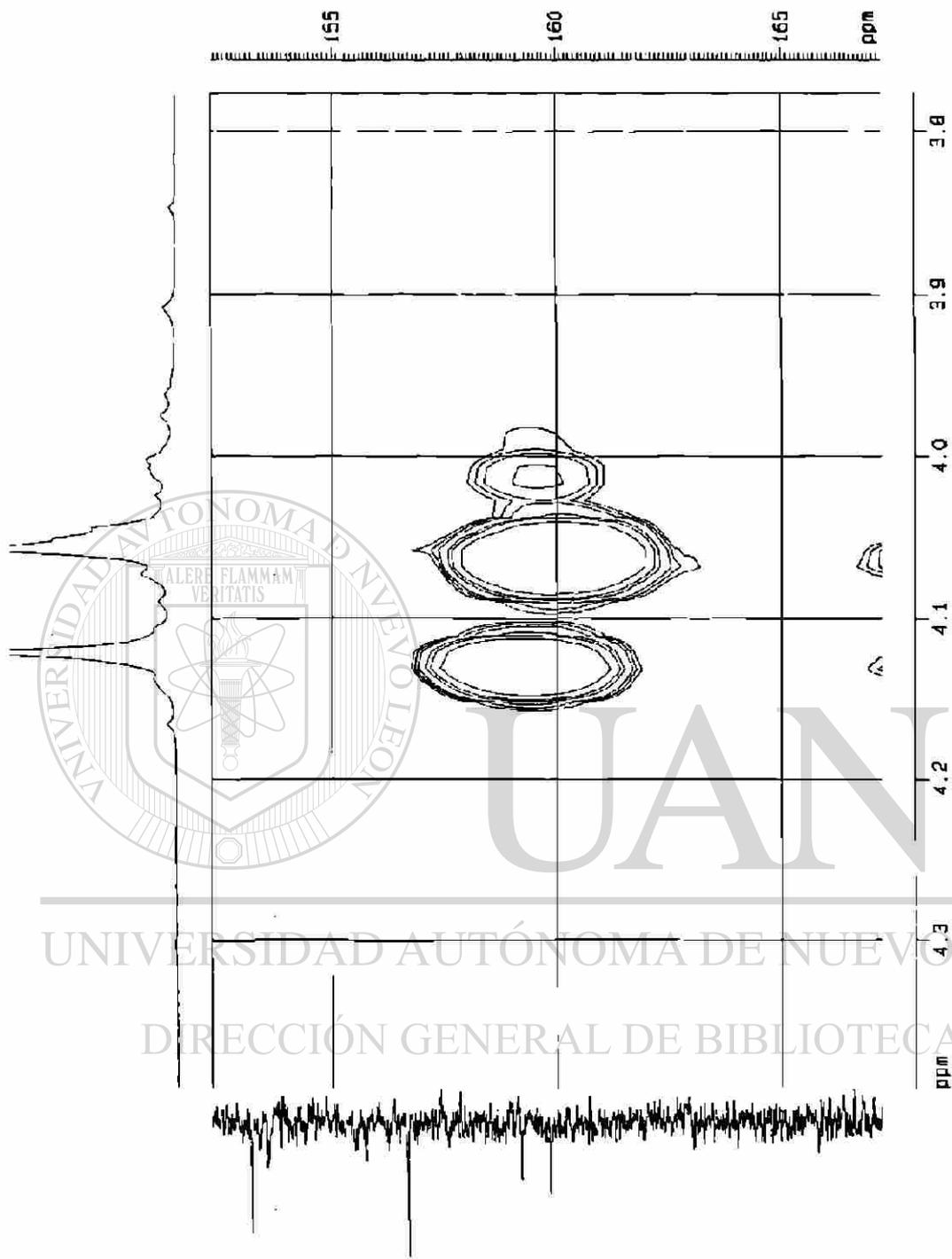
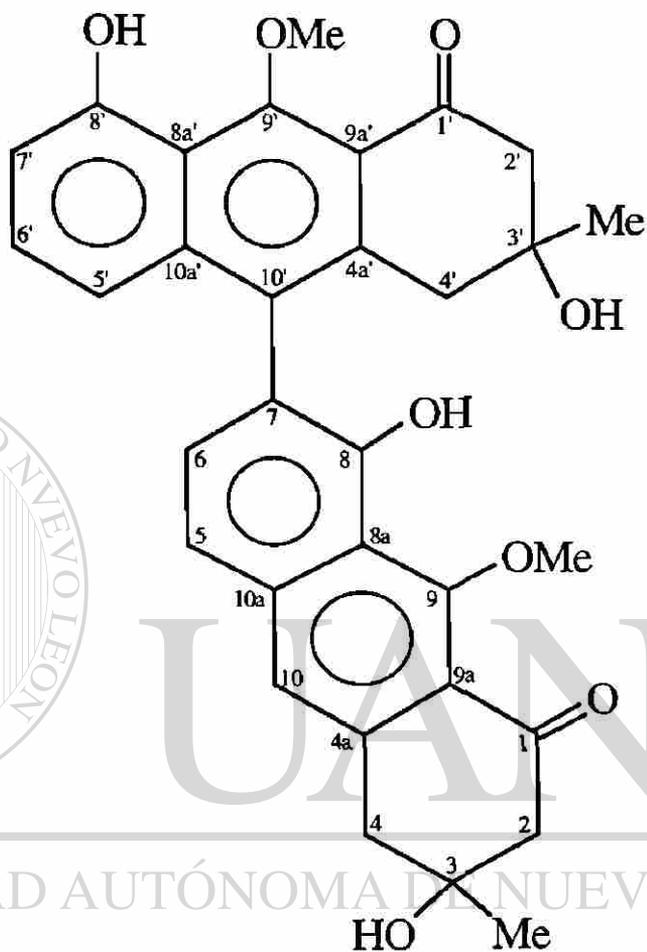
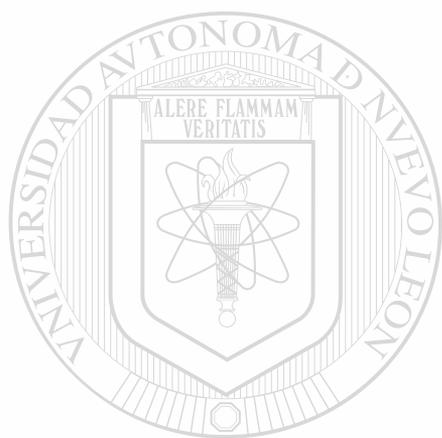


Figura 22. Espectro HMBC (7Hz) del compuesto **1**.
(correlación de los metoxilos).[®]



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FIGURA 23

Estructura propuesta para el compuesto 1.

TABLA 5

Asignación del espectro de RMN de ^1H del compuesto **1**
(400.13 MHz, valores de δ en CDCl_3)

H	δ ppm	J Hz	H	δ ppm	J Hz
2'	2.84		2	2.89 (d)	12.4
CH ₃ -3'	1.32 (s)		CH ₃ -3	1.52 (s)	
4'	2.83 (d)	16.76	4	3.29 (d)	16.1
	3.02 (d)	16.72			
5'	6.85 (d)	8.39	5	7.39 (d)	8.5
6'	7.33 (t)		6	7.30 (d)	8.1
7'	6.89 (d)	7.67	OH-8	10.25 (s)	
OCH ₃ -9'	4.12 (s)		OCH ₃ -9	4.06 (s)	
OH-8'	10.17 (s)		10	7.55 (s)	

TABLA 6

Asignación del espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **1**
(100.62 MHz, valores de δ en CDCl_3)

C	δ ppm	C	δ ppm
1'	196.24	1	195.57
2'	54.13	2	54.58
3'	70.82	3	71.16
CH ₃ -3'	29.47	CH ₃ -3	29.37
4'	41.88	4	44.31
4a'	135.77	4a	137.57
5'	117.06	5	118.66
6'	133.44	6	130.75
7'	111.09	7	120.35
8'	156.67	8	153.21
8a'	116.51	8a	116.61
9'	159.20	9	159.84
9a'	106.10	9a	107.53
10'	131.33	10	124.52
10a'	137.57	10a	138.33
OCH ₃ -9'	64.41	OCH ₃ -9	64.53

3.6.2 Elucidación de la estructura del compuesto 2

Para cumplir con este objetivo, se analizaron los siguientes espectros:

Espectro de masas (Figura 24).

Espectro de RMN de ^1H (Figura 25 y 25a).

Espectro de RMN de ^{13}C (Figura 26).

Espectro HMQC (Figura 27).

Espectro HMBC a 7 Hz (Figura 28).

Espectros nOe diferenciales (Figura 29 y 29a).

Como resultado del análisis de cada uno de los espectros anteriores la Figura 30 muestra la estructura propuesta para el compuesto 2. La asignación de cada una de las señales de ^1H y ^{13}C en la molécula se presenta en la Tabla 7 y 8.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

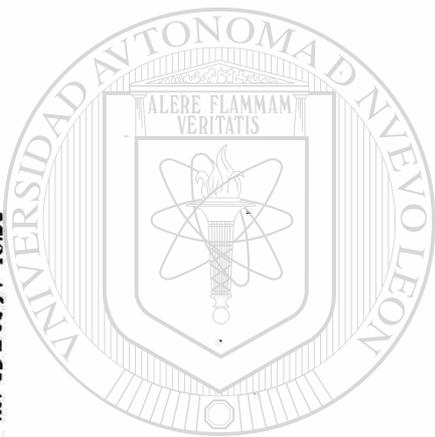
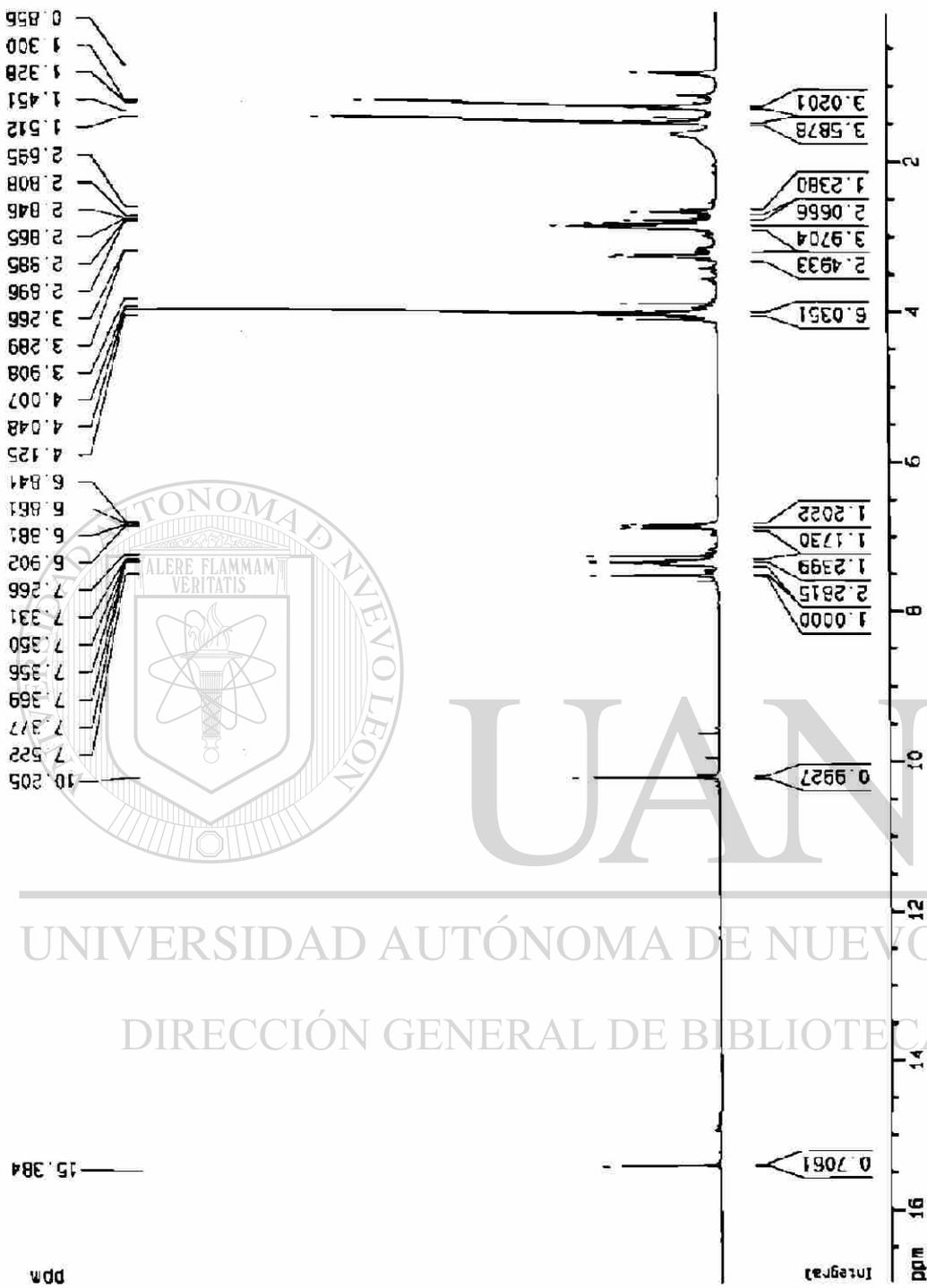


Figura 24. Espectro de masas del compuesto 2.



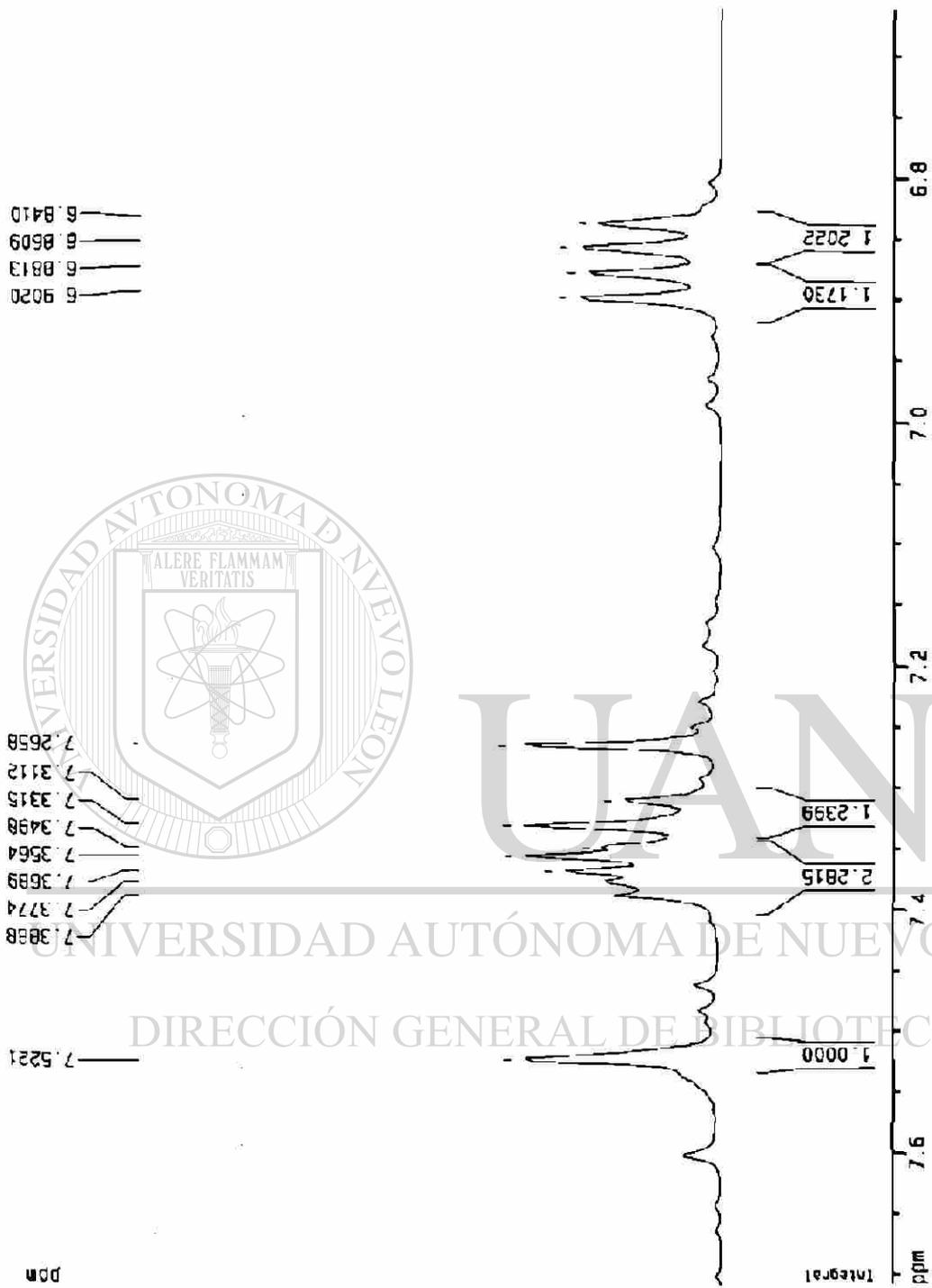


Figura 25a. Espectro de RMN de ¹H del compuesto 2. (ampliación de la región aromática).

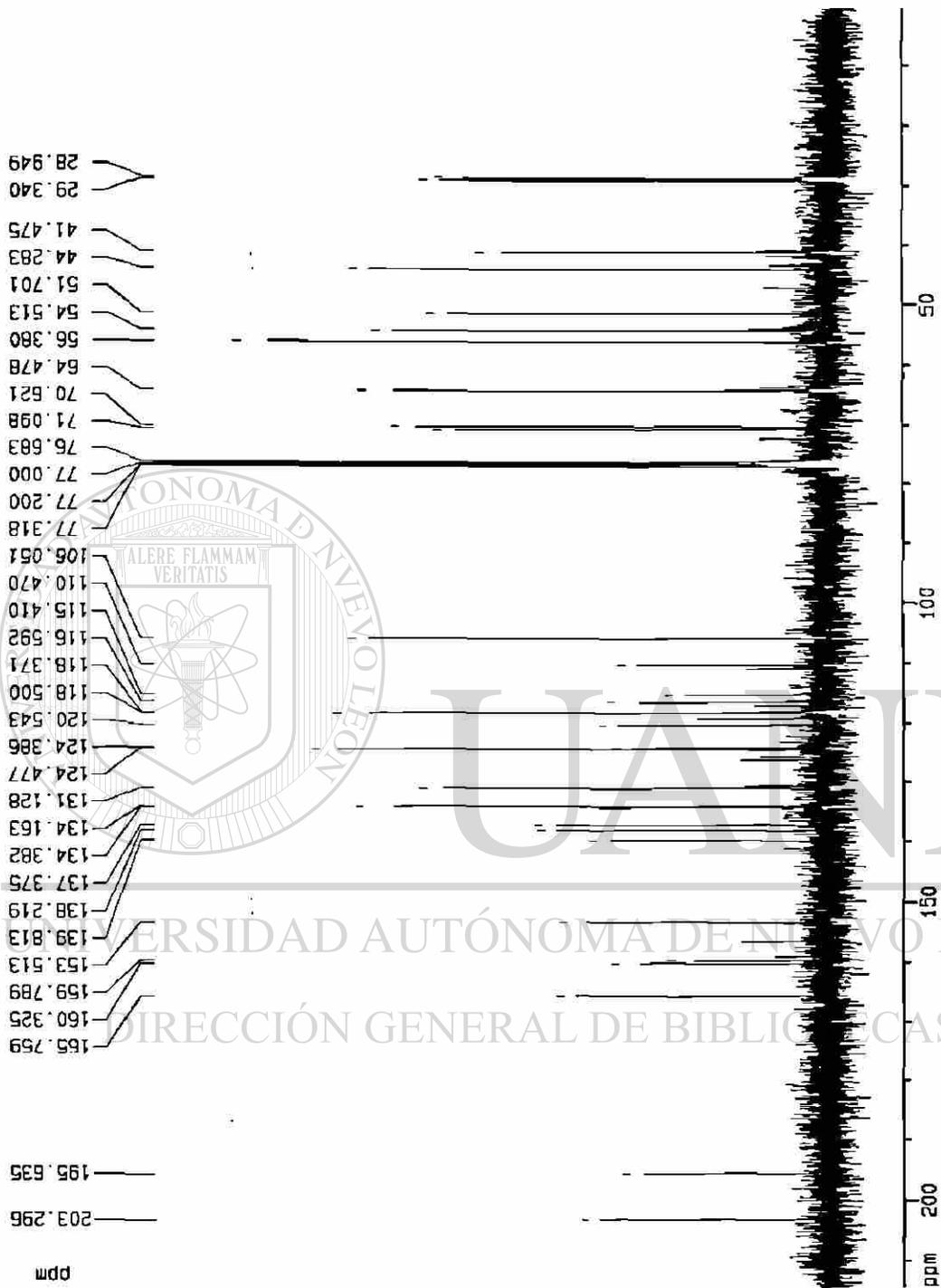


Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 2.

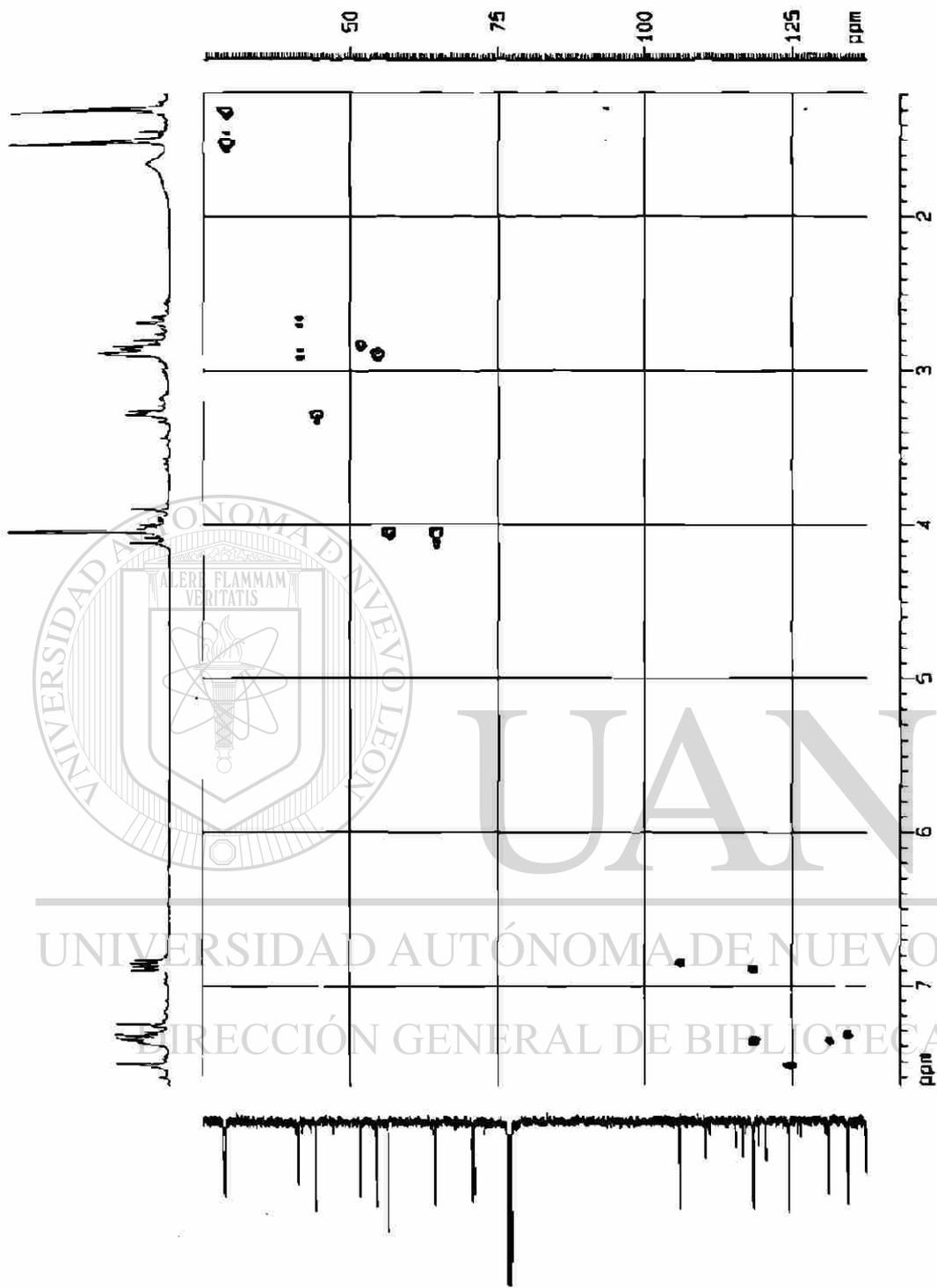


Figura 27. Espectro HMQC del compuesto 2.

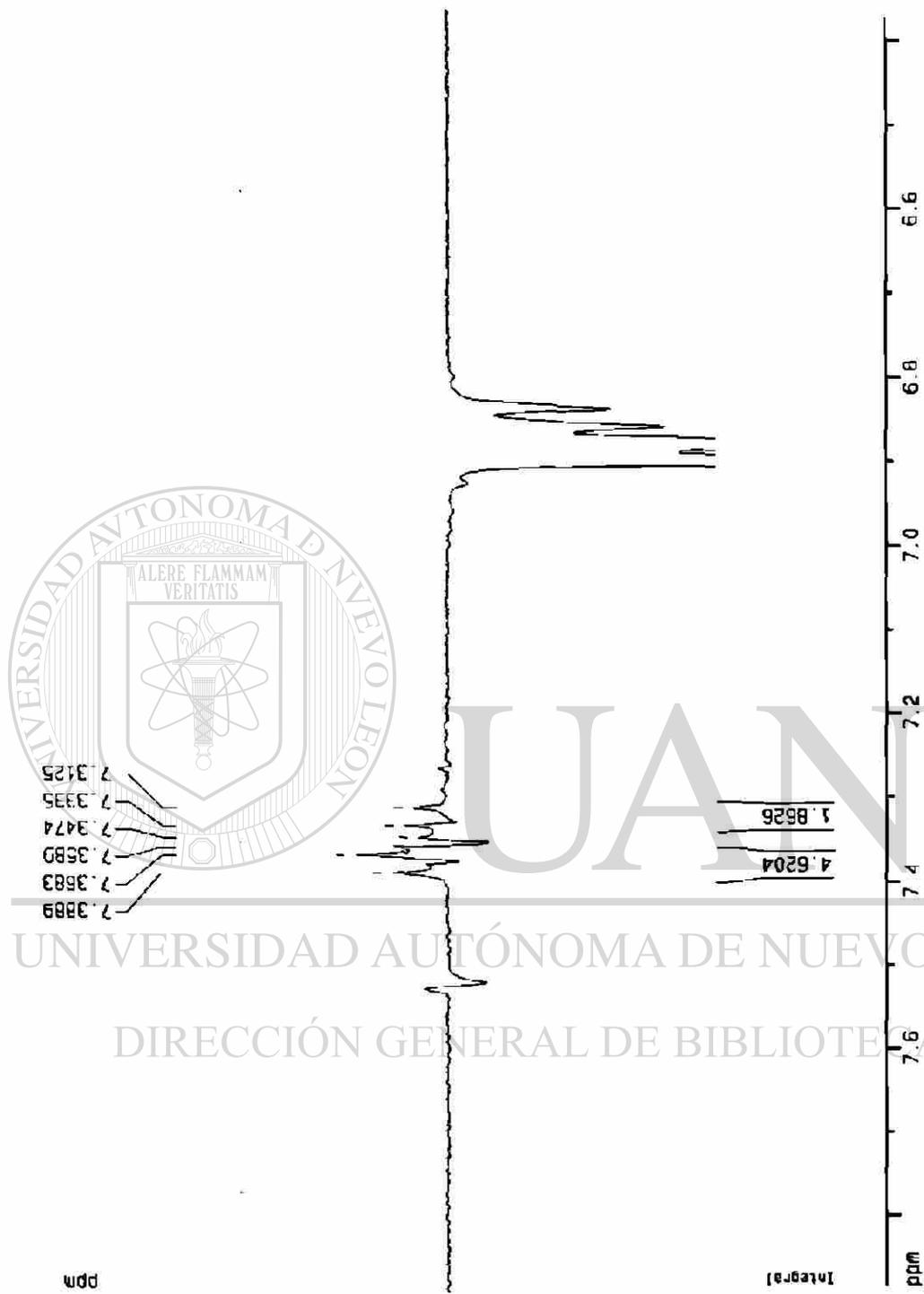
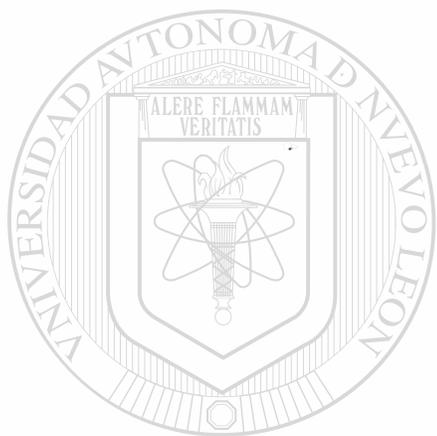


Figura 29. Espectro ^1H diferencial del compuesto **2**. Señal irradiada: δ 6.89 (H-5').

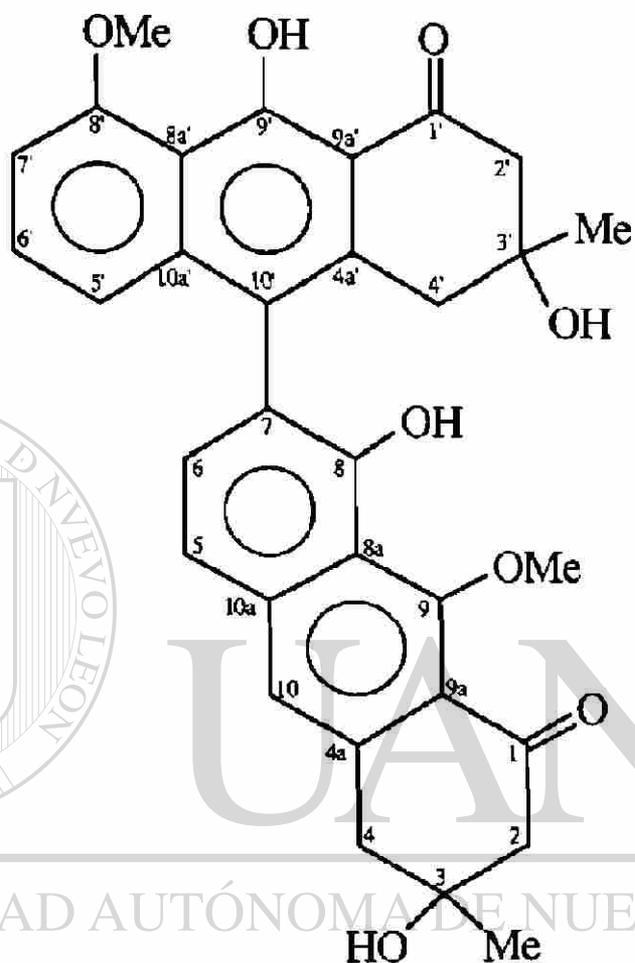
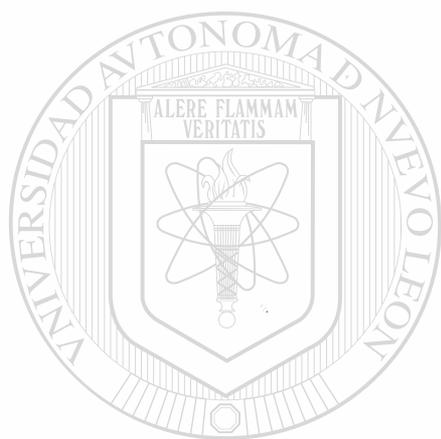


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Figura 29a. Espectro nOe diferencial del compuesto **2**.
Señal irradiada: δ 6.85 (H-7').



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FIGURA 30

Estructura propuesta para el compuesto 2

TABLA 7
Asignación del espectro de RMN de ^1H del compuesto **2**
(400.13 MHz, valores de δ en CDCl_3)

H	δ ppm	J Hz	H	δ ppm	J Hz
2'	2.83 (d)	15	2	2.88 (d)	12.4
CH ₃ -3'	1.30 (s)		CH ₃ -3	1.51 (s)	
4'	2.68 (d)	16.1	4	3.31 (d)	16.1
	2.87 (d)	15.4			
5'	6.89 (d)	8.3	5	7.37 (d)	8.5
6'	7.37 (t)		6	7.32 (d)	8.1
7'	6.85 (d)	7.9	OH-8	10.21 (s)	
OCH ₃ -8'	4.05 (s)		OCH ₃ -9	4.05 (s)	
OH-9'	15.38 (s)		10	7.52 (s)	

TABLA 8
Asignación del espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **2**
(100.62 MHz, valores de δ en CDCl_3)

C	δ ppm	C	δ ppm
1'	195.64	1	203.30
2'	51.70	2	54.51
3'	70.62	3	71.10
CH ₃ -3'	28.95	CH ₃ -3	29.34
4'	41.48	4	44.28
4a'	134.38	4a	137.38
5'	118.37	5	131.13
6'	118.50	6	134.16
7'	106.05	7	120.54
8'	160.33	8	153.51
8a'	115.41	8a	116.59
9'	165.76	9	159.79
9a'	110.47	9a	119.39
10'	124.39	10	124.48
10a'	139.81	10a	138.22
OCH ₃ -8'	56.38	OCH ₃ -9	64.48

3.6.3 Elucidación de la estructura del compuesto 3

Para cumplir con este objetivo, se analizaron los siguientes espectros:

Espectro de masas (Figura 31).

Espectro de RMN de ^1H (Figura 32 y 32a).

Espectro de RMN de ^{13}C (Figura 33).

Espectro COSY 45 (Figura 34).

Espectro HMQC (Figura 35).

Espectro HMBC a 9 Hz (Figura 36 y 36a).

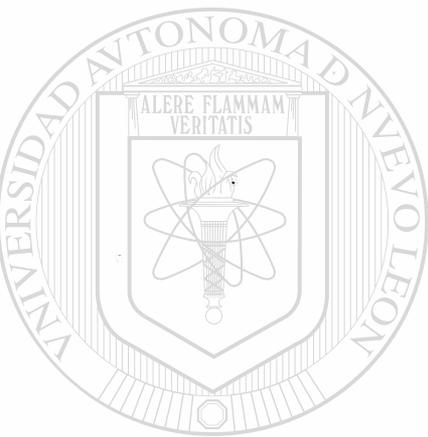
Espectros nOe diferenciales (Figura 37, 37a y 37b).

Como resultado del análisis de cada uno de los espectros anteriores la Figura 38 muestra la estructura propuesta para el compuesto 3. La asignación de cada una de las señales de ^1H y ^{13}C en la molécula se presenta en la Tabla 9 y 10.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

(Av [05-115 Acq] 100%=1230 av 13 Dec 94 16:21



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Figura 31. Espectro de masas del compuesto 3.

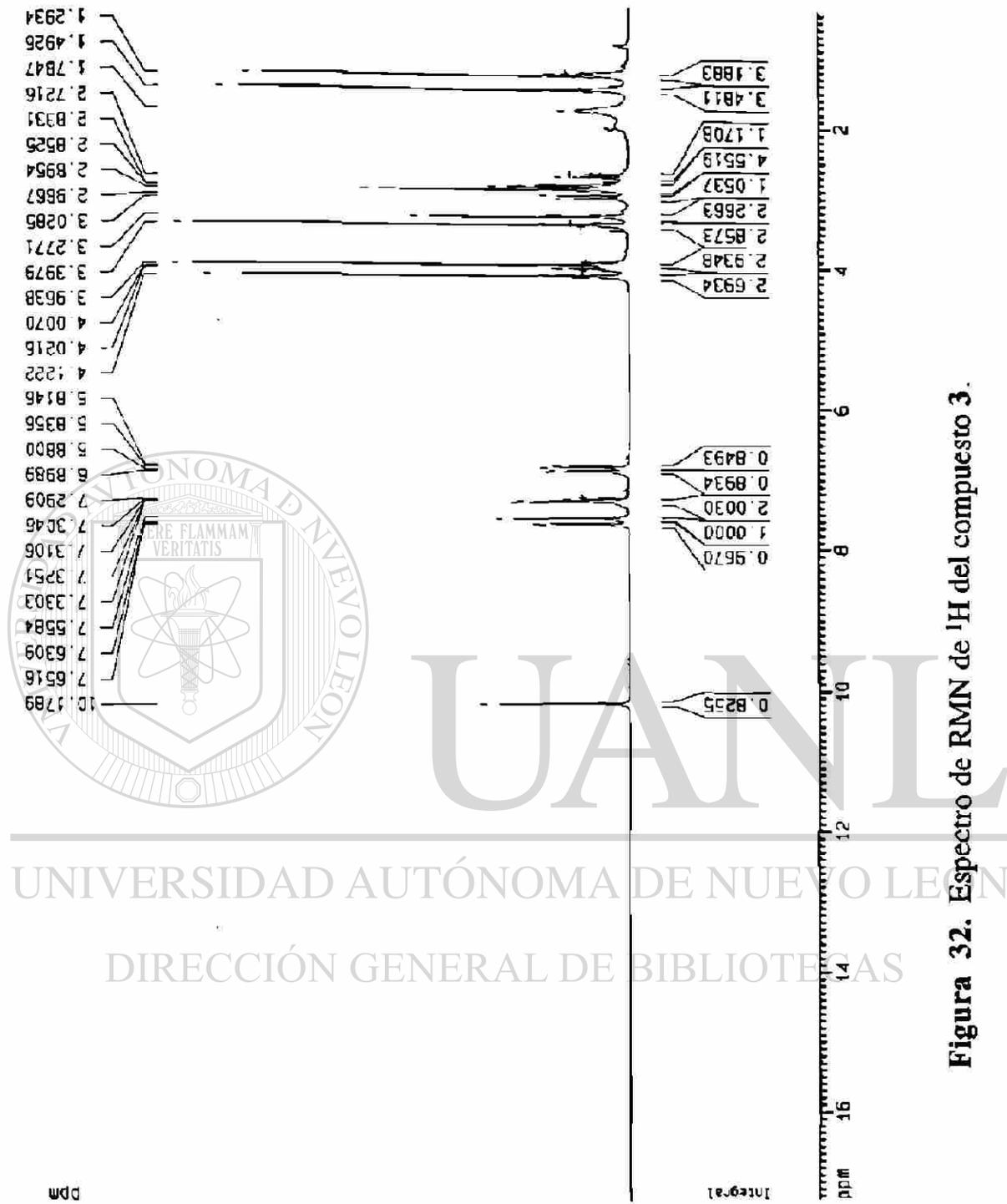


Figura 32. Espectro de RMN de ¹H del compuesto 3.

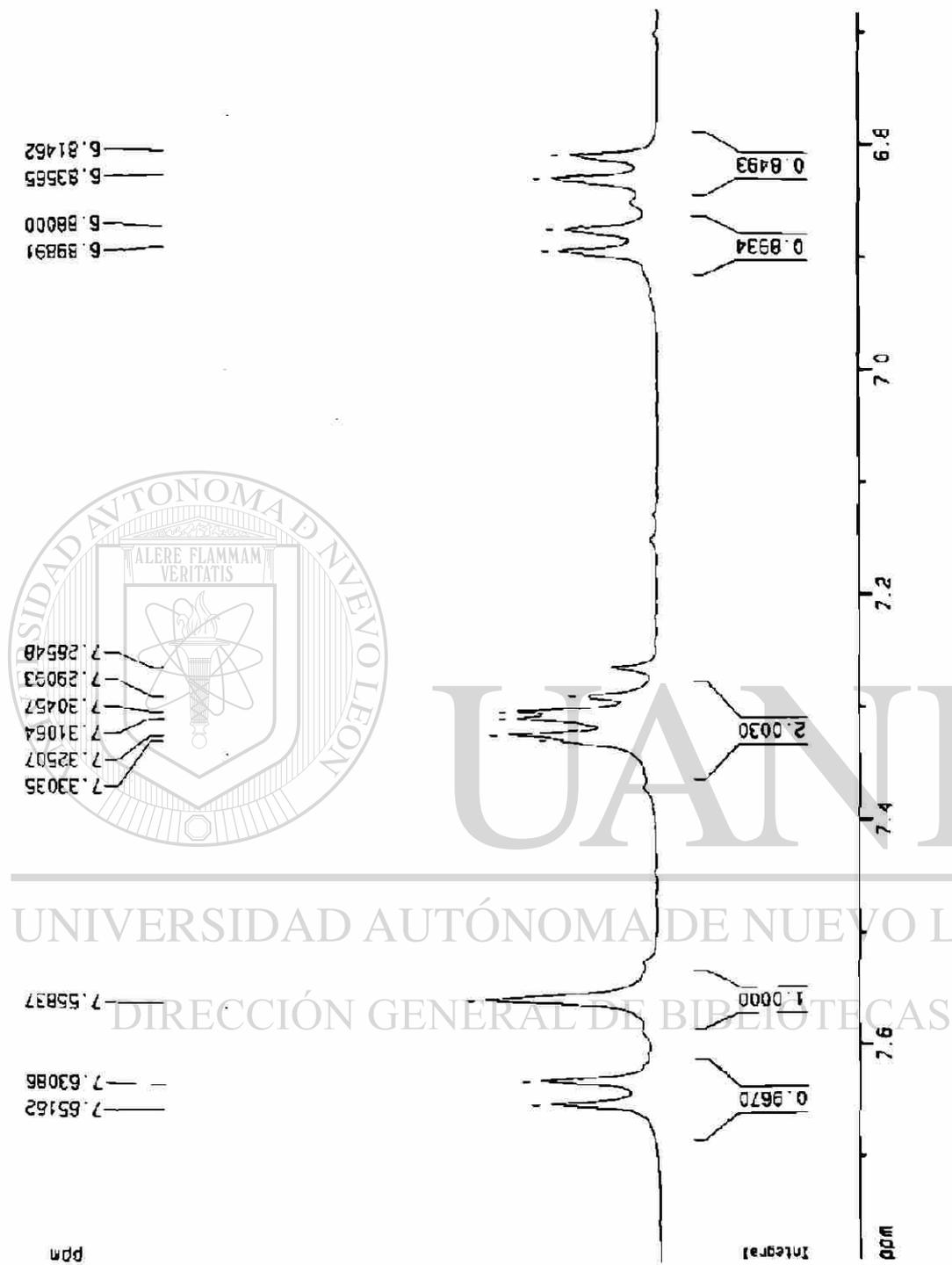


Figura 32a. Espectro de RMN de ¹H del compuesto **3**.
(ampliación de la región aromática).

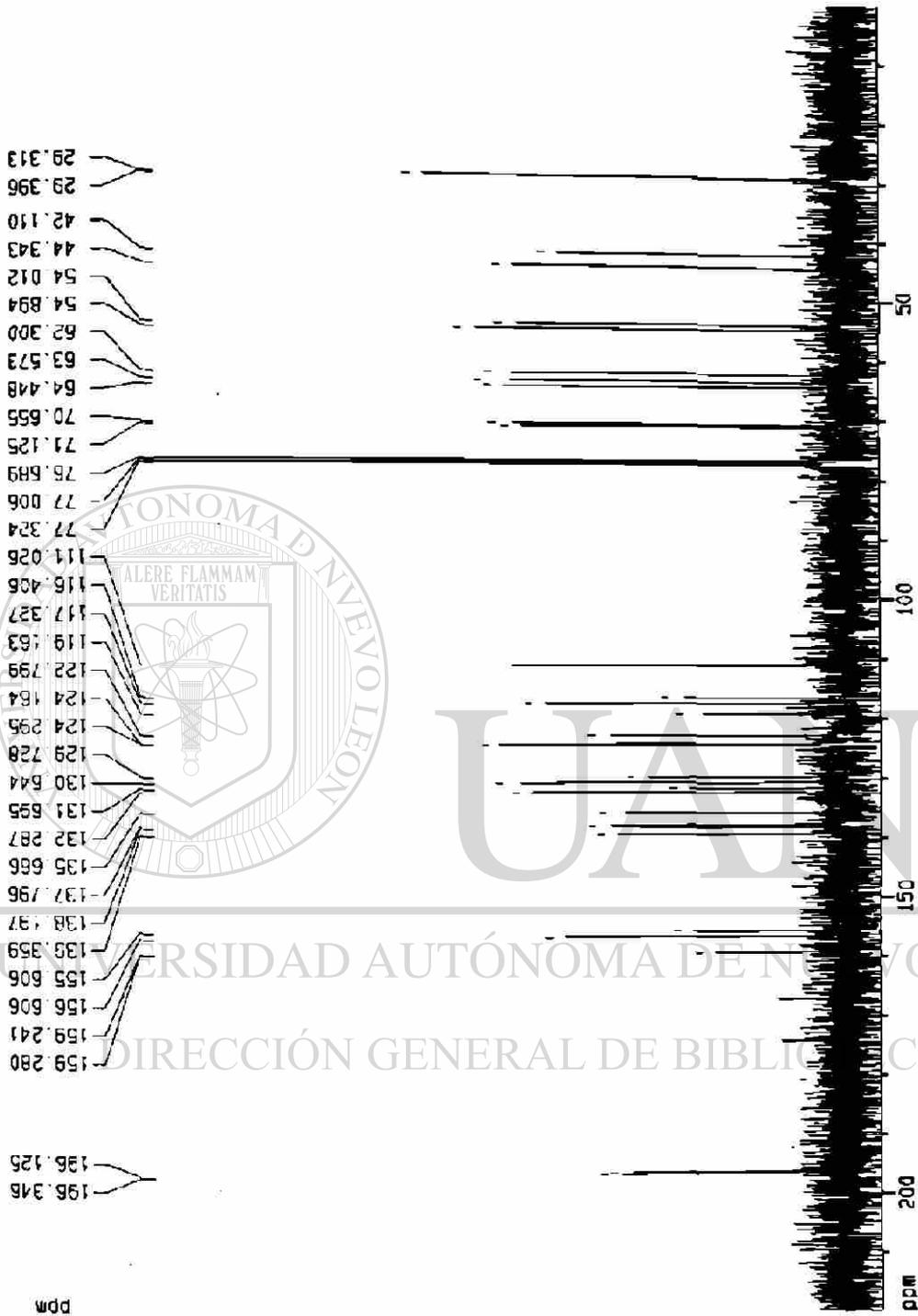


Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 3.

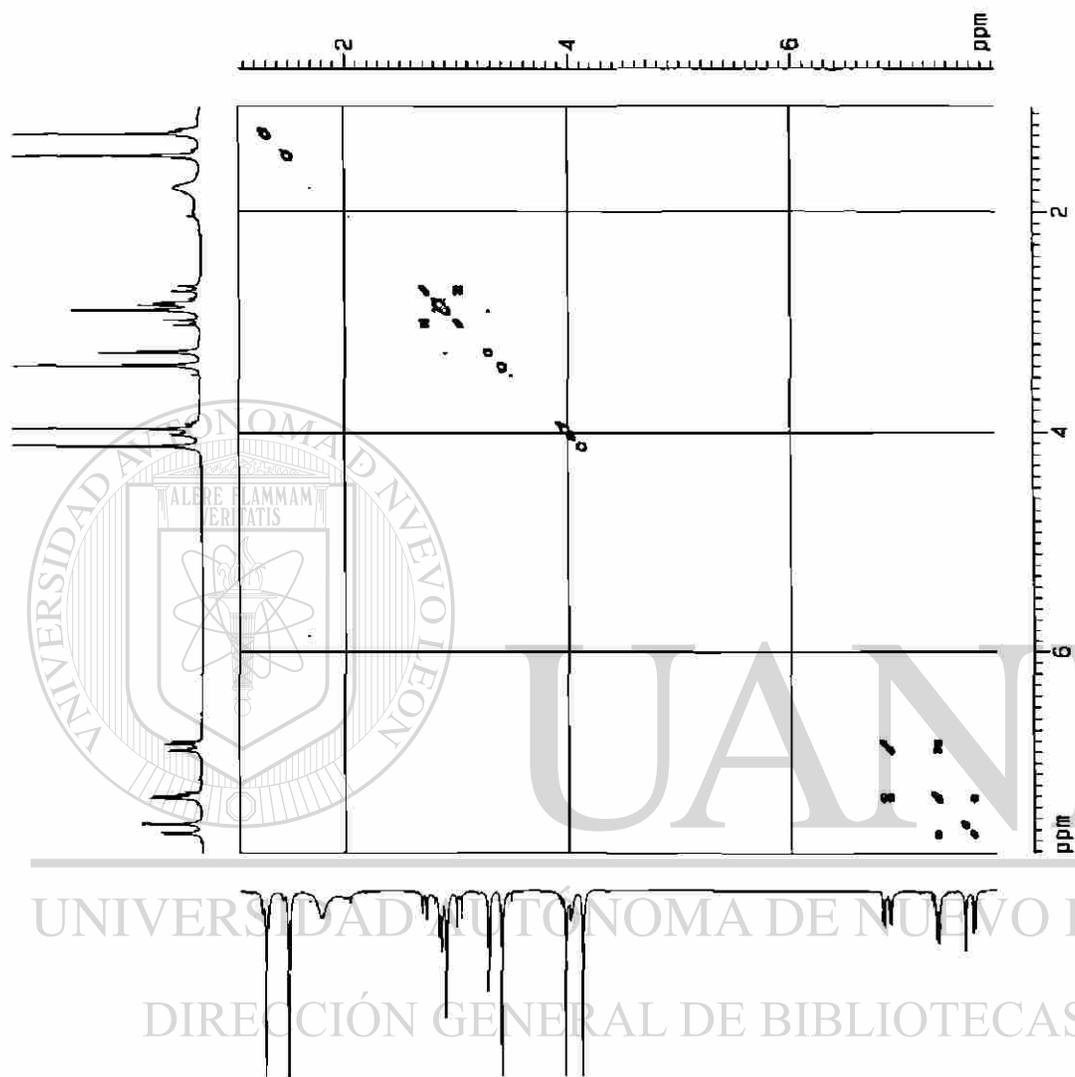


Figura 34. Espectro COSY 45 del compuesto 3.

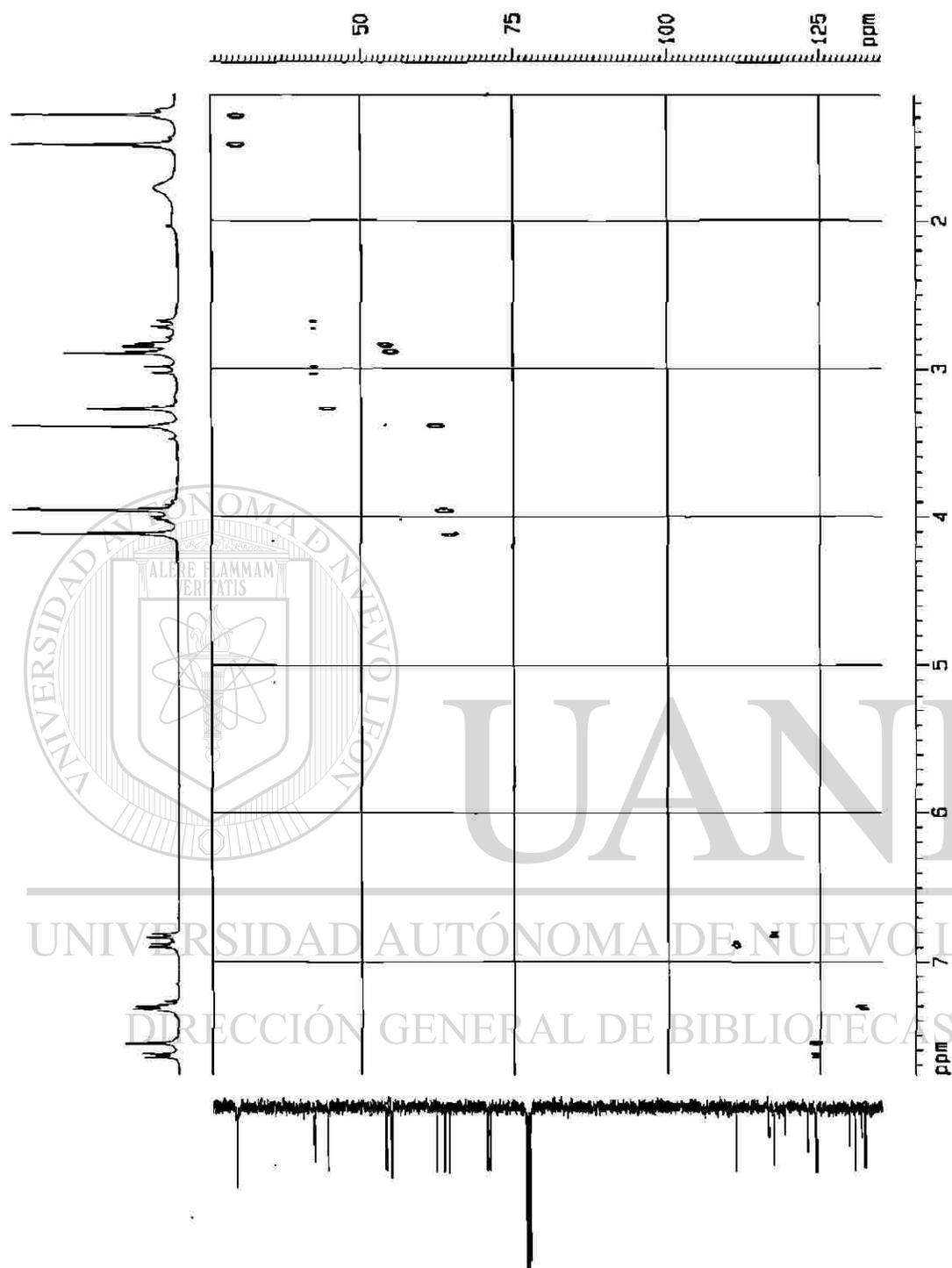


Figura 35. Espectro HMQC del compuesto 3.

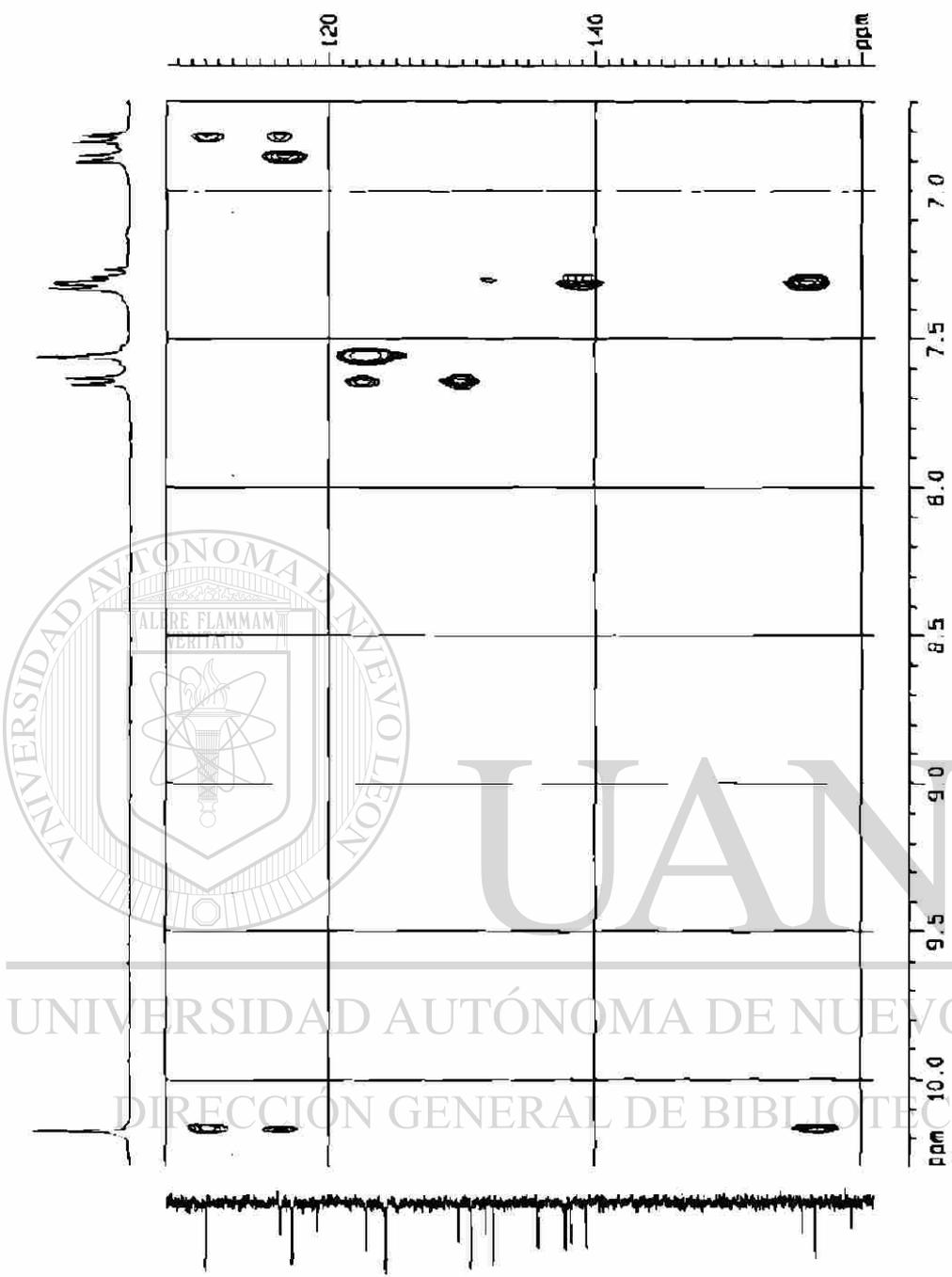


Figura 36. Espectro HMBC (9 Hz) del compuesto **3**.
(correlación de H-5', H-7' y OH-8').

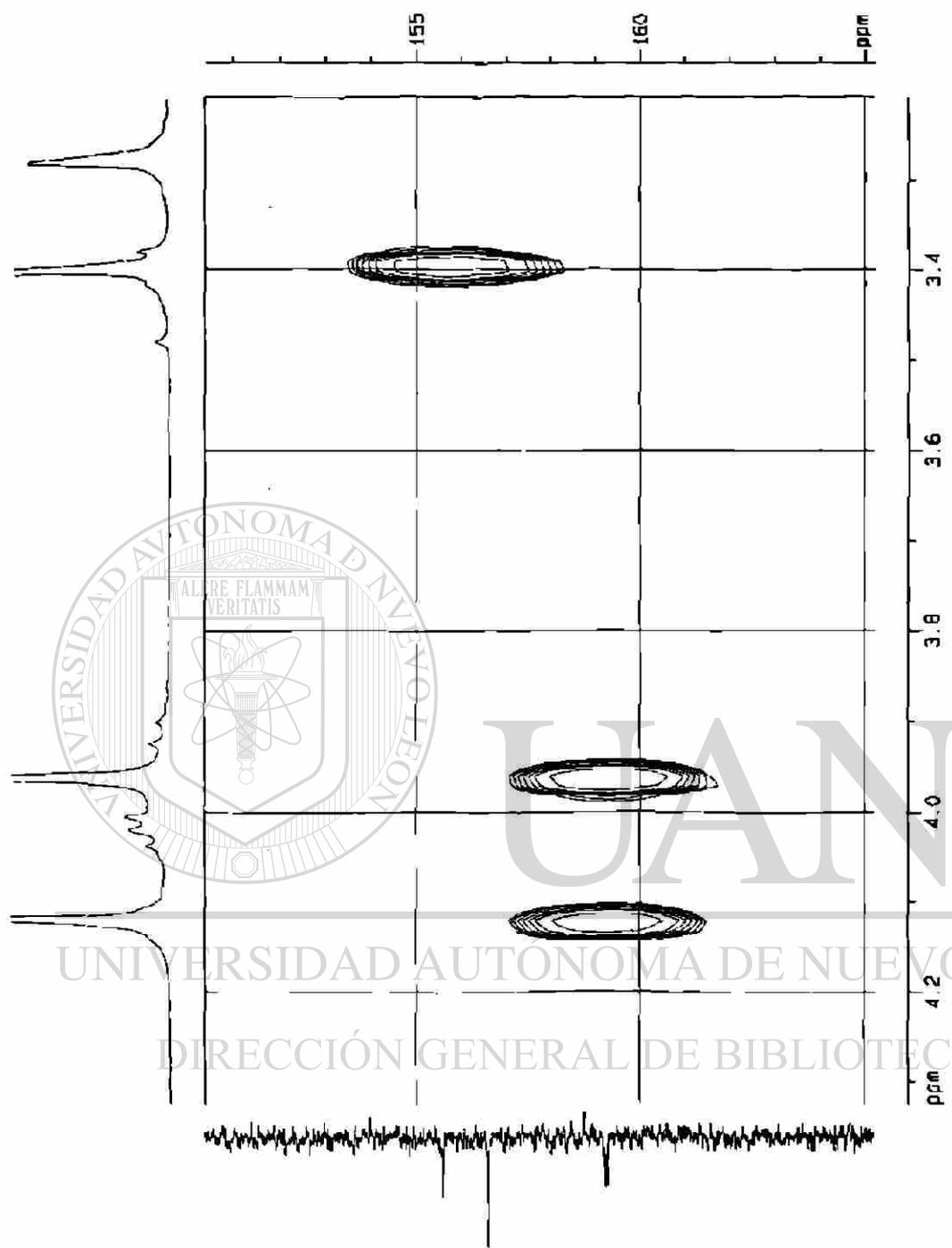
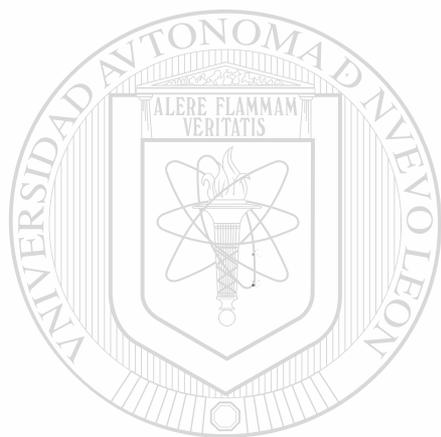


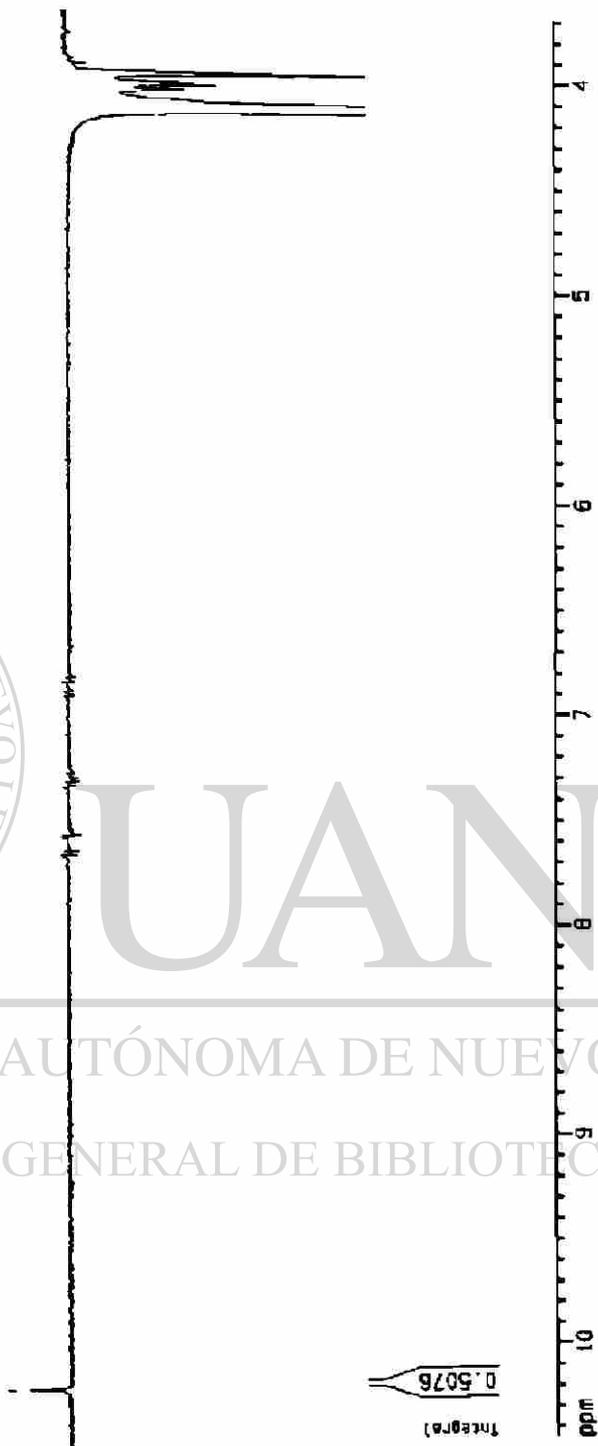
Figura 36a. Espectro HMBC (9 Hz) del compuesto **3**.
(correlación de los metoxilos).



Figura 37. Espectro ^1H de diferencial del compuesto **3**.
Señal irradiada: δ 10.18 (OH-8).

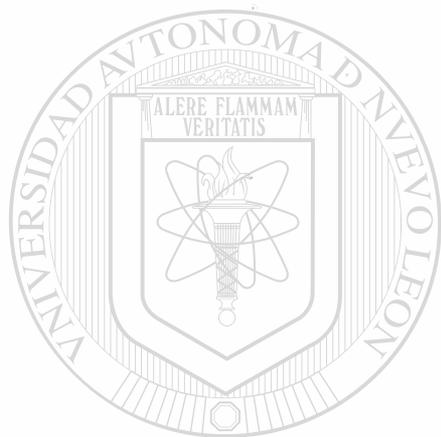


10.1782
ppm



0.5076
Integral

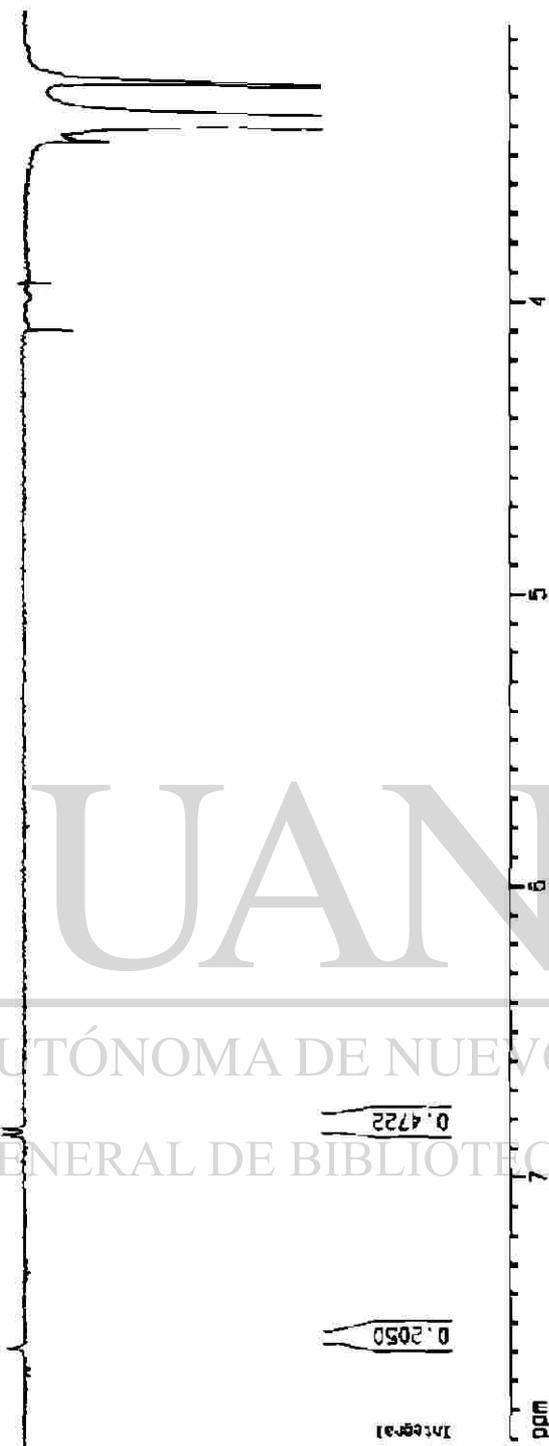
Figura 37a. Espectro nOe diferencial del compuesto **3**.
Señal irradiada: δ 4.12 (OCH_2-9').



6.83753
6.81668

7.58020

ppm



0.2050

0.4722

Integral

ppm

Figura 37b. Espectro ^1H diferencial del compuesto **3**.
Señal irradiada: δ 3.40 (OCH_3 -8).

®

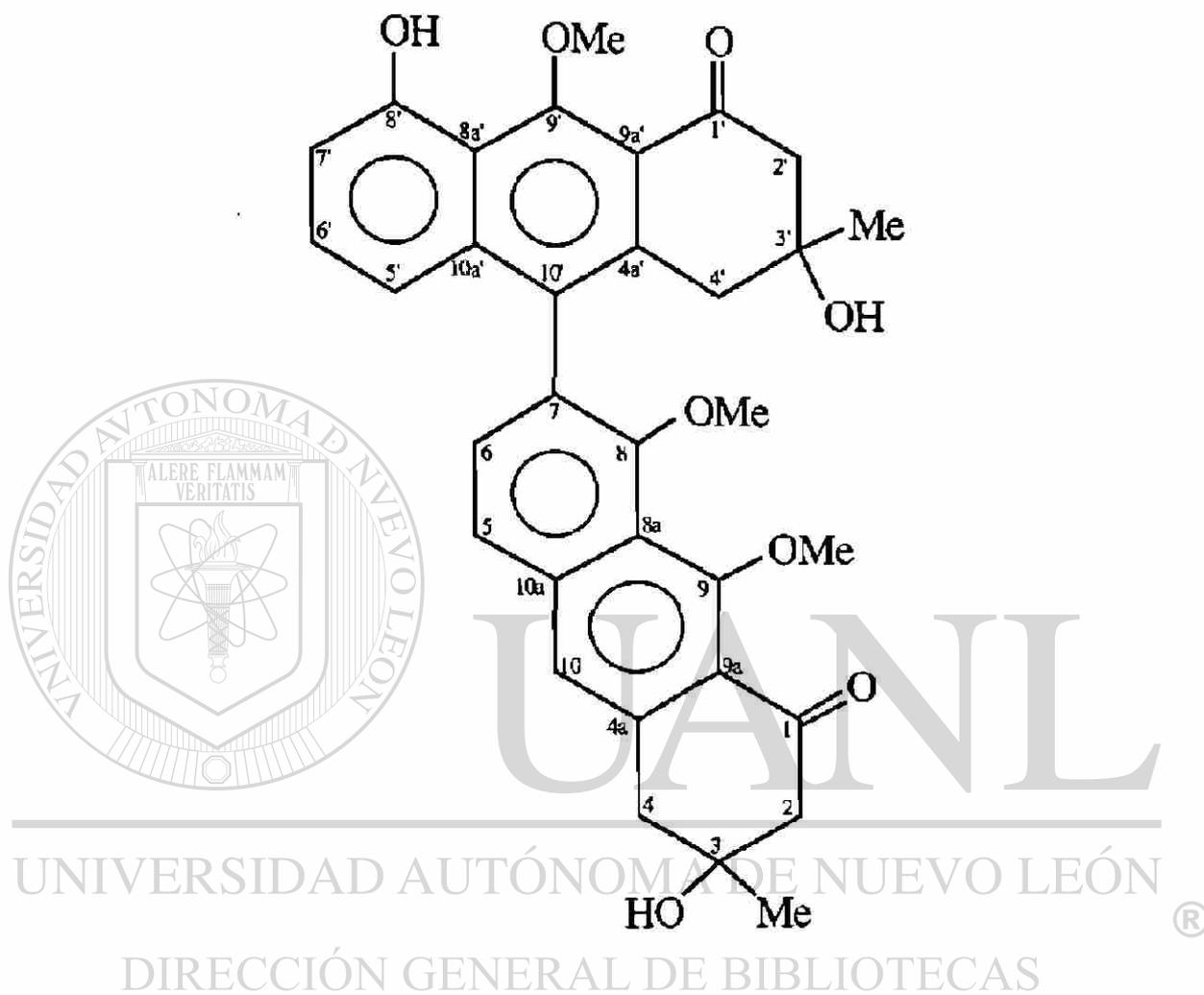


FIGURA 38

Estructura propuesta para el compuesto 3

TABLA 9
Asignación del espectro de RMN de ^1H del compuesto **3**
(400.13 MHz, valores de δ en CDCl_3)

H	δ ppm	J Hz	H	δ ppm	J Hz
2'	2.84 (m)		2	2.90 (d)	
CH ₃ -3'	1.29 (s)		CH ₃ -3	1.49 (s)	
4'	2.70 (d)	16.76	4	3.28 (s)	
	3.01 (d)	16.72			
5'	6.83 (d)	8.39	5	7.64 (d)	8.4
6'	7.33 (t)		6	7.30 (d)	
7'	6.89 (d)	7.67	OCH ₃ -8	3.40 (s)	
OCH ₃ -9'	4.12 (s)		OCH ₃ -9	3.96 (s)	
OH-8'	10.18 (s)		10	7.56 (s)	

TABLA 10
Asignación del espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **3**
(100.62 MHz, valores de δ en CDCl_3)

C	δ ppm	C	δ ppm
1'	196.35	1	196.13
2'	54.01	2	54.89
3'	70.65	3	71.13
CH ₃ -3'	29.40	CH ₃ -3	29.39
4'	42.11	4	44.34
4a'	135.67	4a	137.80
5'	117.33	5	124.16
6'	131.70	6	132.29
7'	111.03	7	120.54
8'	156.61	8	155.61
8a'	116.41	8a	122.80
9'	159.24	OCH ₃ -8	62.30
OCH ₃ -9'	64.45	OCH ₃ -9	63.57
9a'	130.64	9	159.28
10'	139.36	9a	119.16
10a'	138.20	10	124.30
		10a	129.73

3.6.4 Elucidación de la estructura del compuesto 4

Para cumplir con este objetivo, se analizaron los siguientes espectros:

Espectro de masas (Figura 39).

Espectro de RMN de ^1H (Figura 40 y 40a).

Espectro de RMN de ^{13}C (Figura 41).

Espectro COSY 45 (Figura 42).

Espectro HMQC (Figura 43).

Espectros HMBC a 7 Hz (Figura 44).

Espectros nOe diferenciales (Figura 45, 45a y 45b).

Como resultado del análisis de cada uno de los espectros anteriores la Figura 46 muestra la estructura propuesta para el compuesto 4. La asignación total de las señales de ^1H y ^{13}C en la molécula se presenta en la Tabla 11 y 12.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

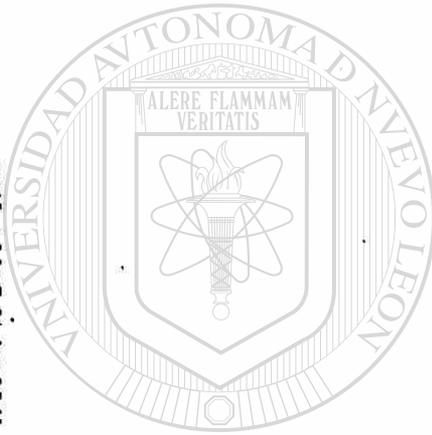


Figura 39. Espectro de masas del compuesto 4.

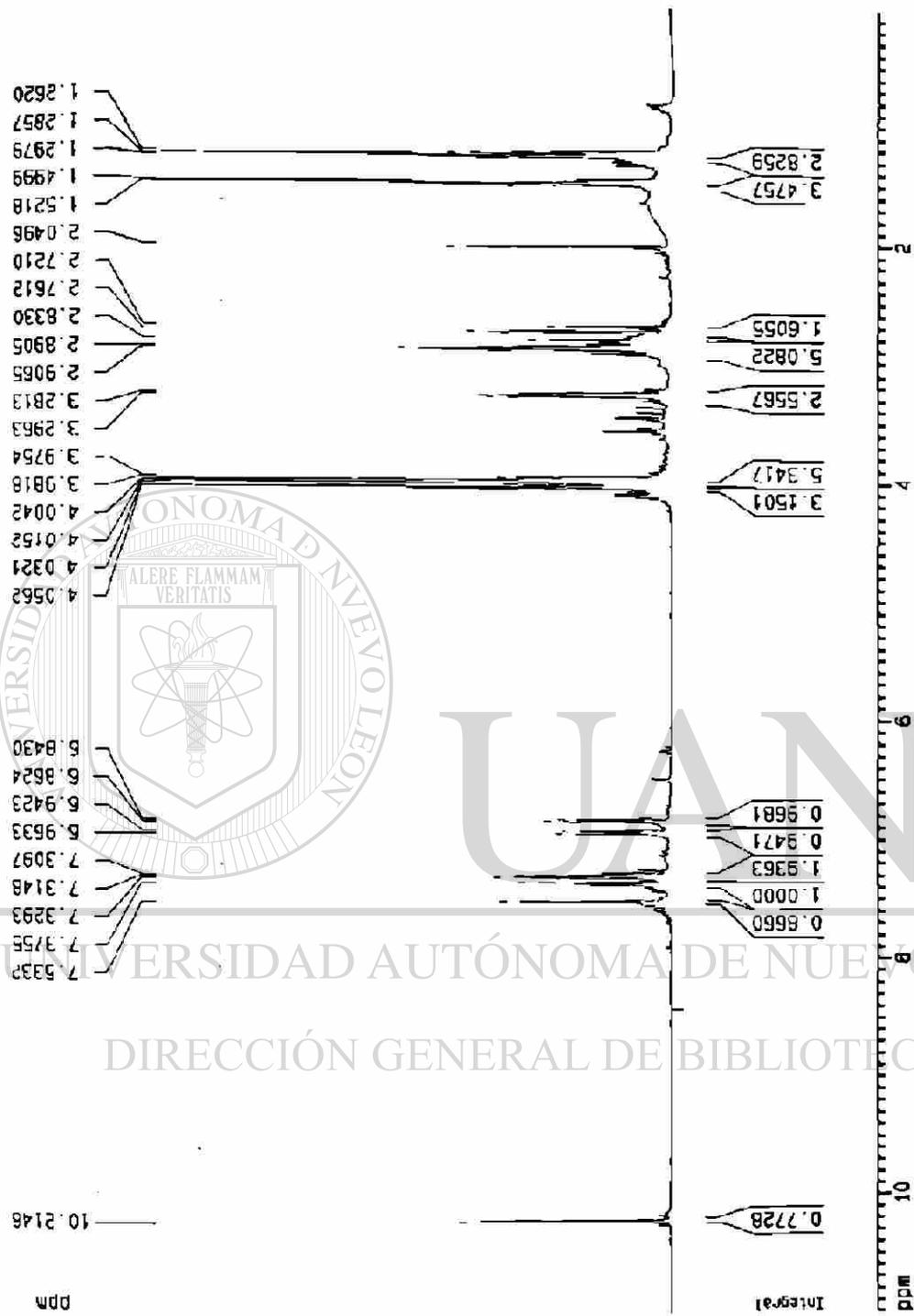


Figura 40. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 4.

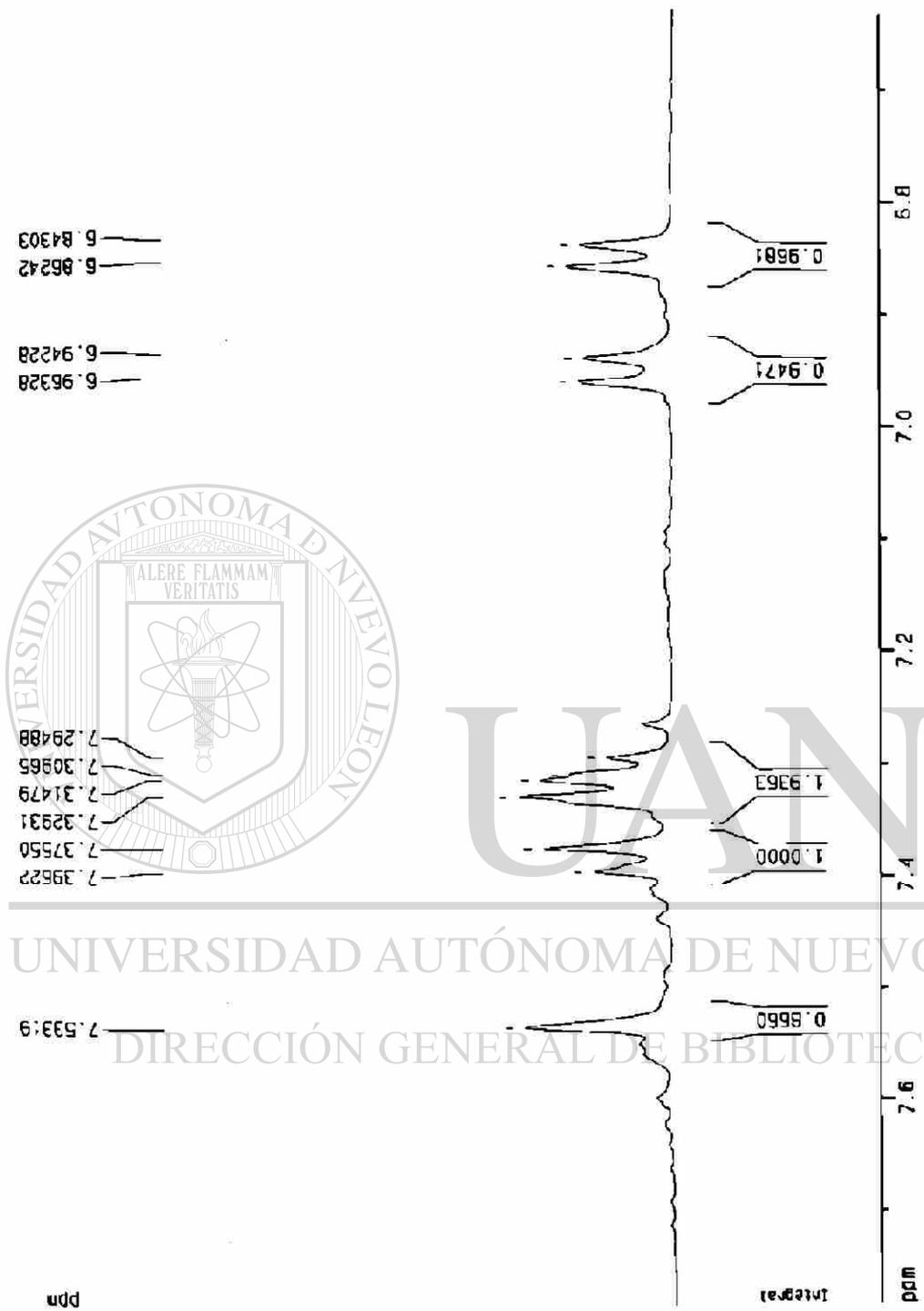
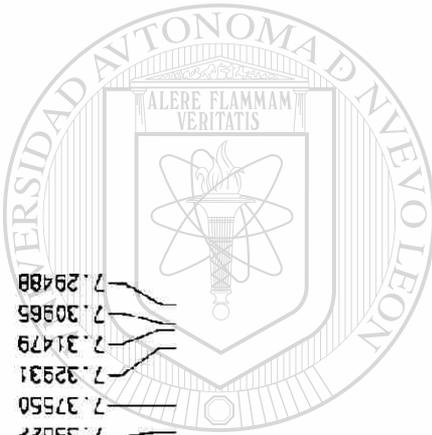


Figura 40a. Espectro de RMN de ¹H del compuesto 4. (ampliación de la región aromática).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Figura 41. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 4.

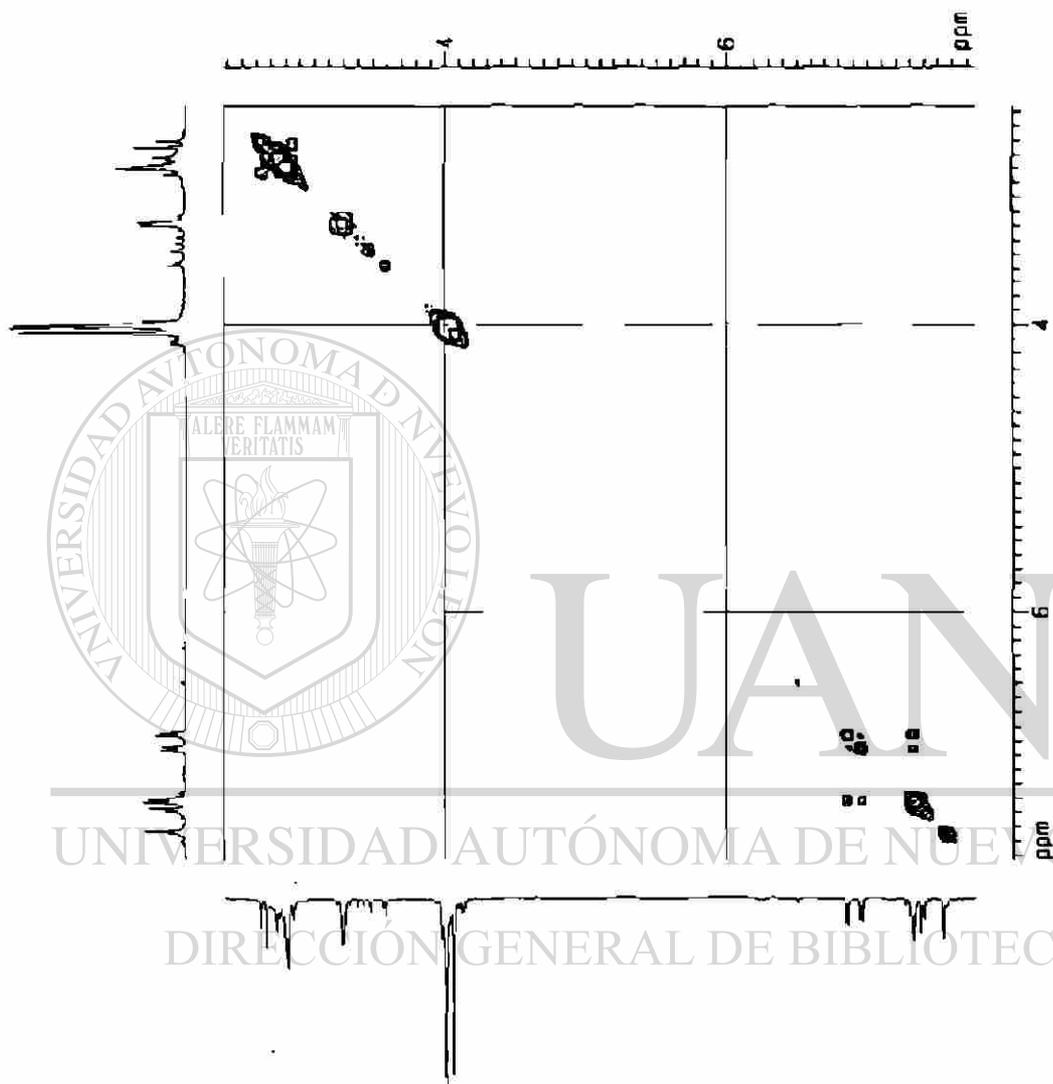


Figura 42. Espectro COSY 45 del compuesto 4.

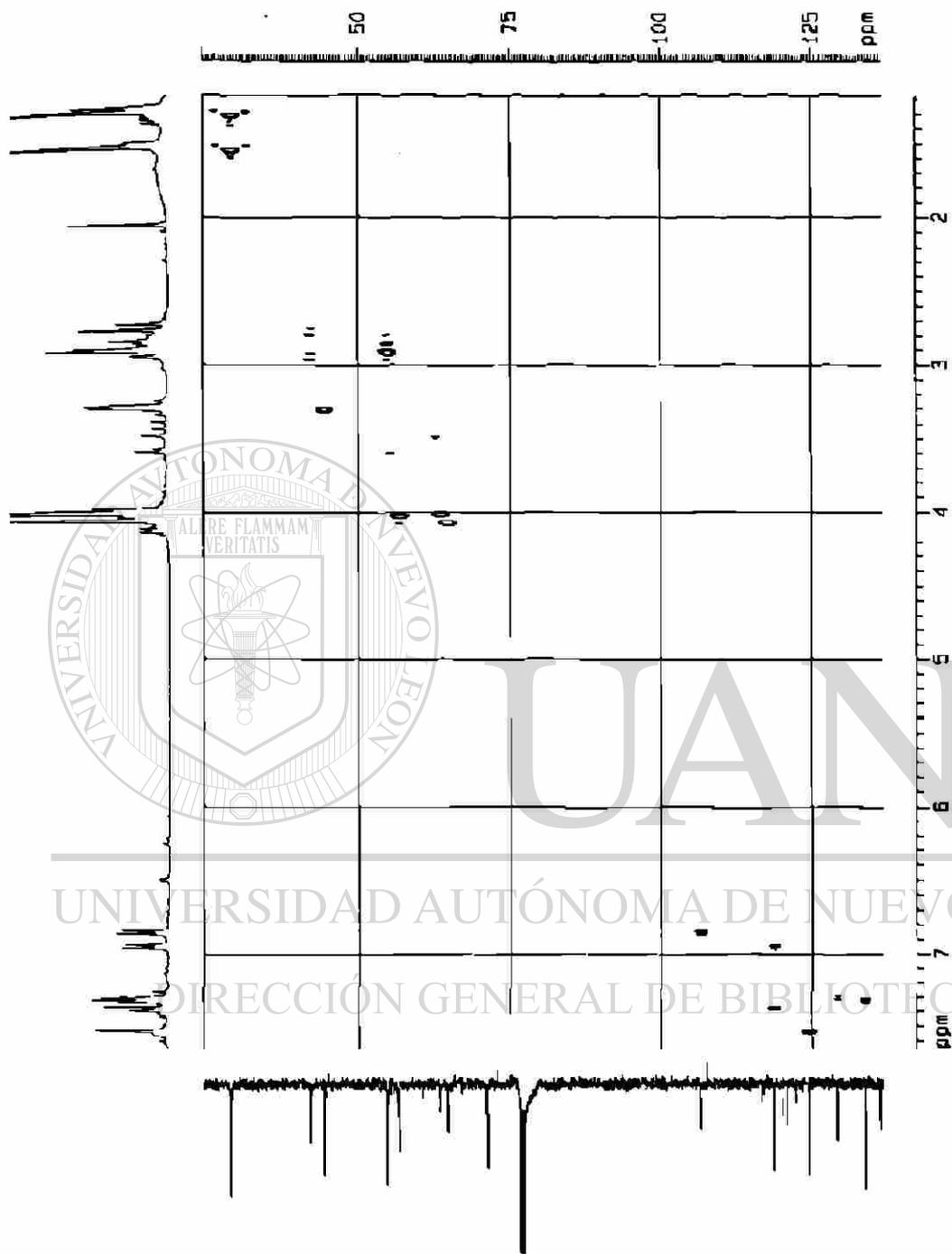


Figura 43. Espectro HMQC del compuesto 4.

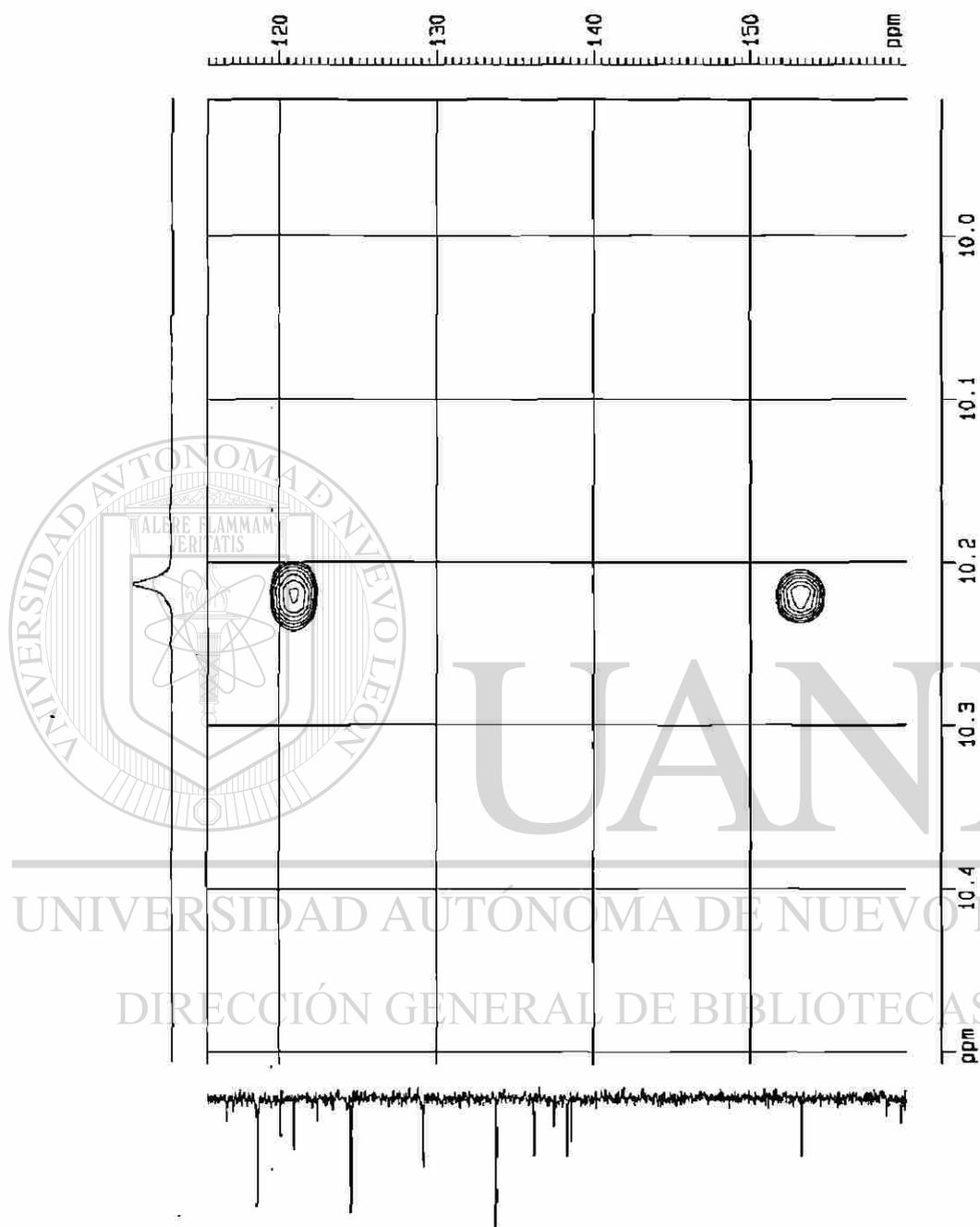
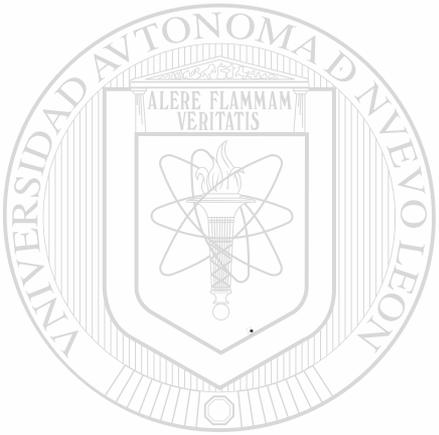
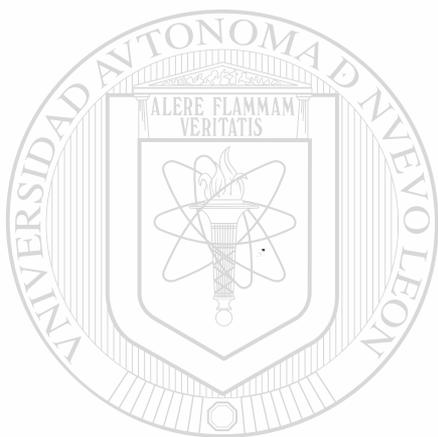


Figura 44. Espectro HMBC (7 Hz) del compuesto **4**.
® (correlación del OH fenólico).



Figura 45. Espectro ^1H diferencial del compuesto **4**. Señal irradiada: δ 6.85 (H-7').





ppm
5.8520
5.8428

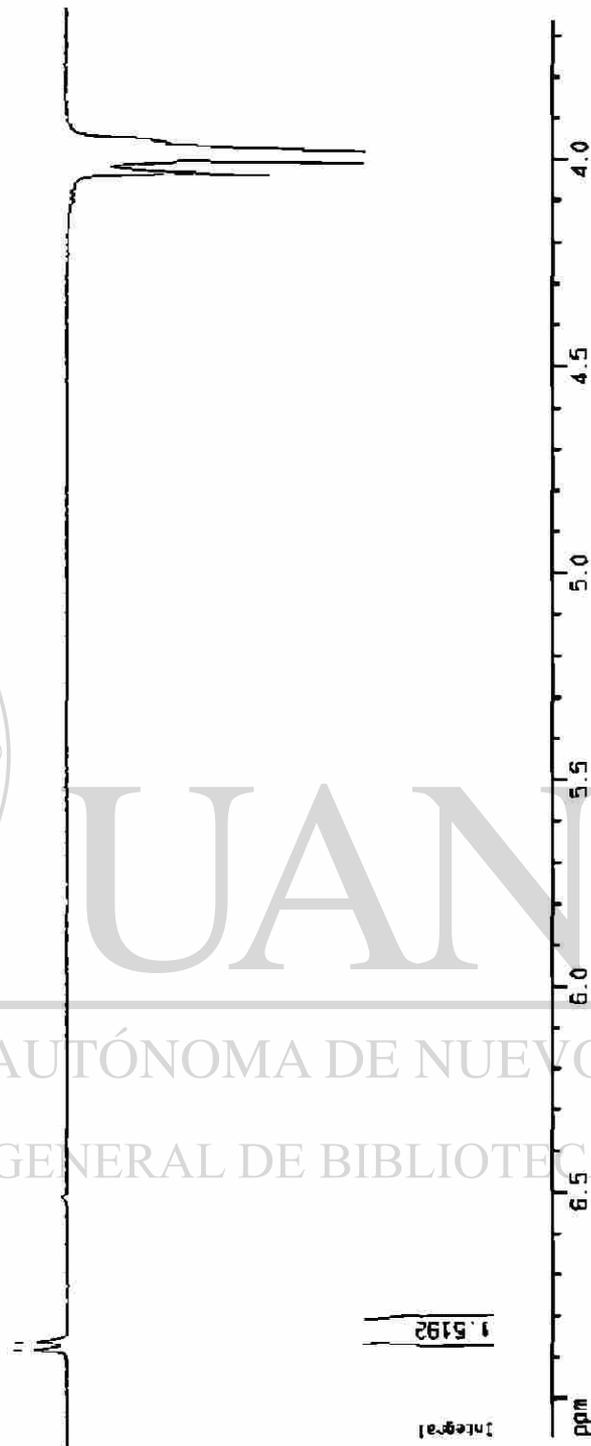


Figura 45a. Espectro nOe diferencial del compuesto **4**.
Señal irradiada: δ 4.00 (OCH₃-8').

®



Figura 45b. Espectro ^1H diferencial del compuesto 4.
Señal irradiada: δ 10.22 (OH-8).

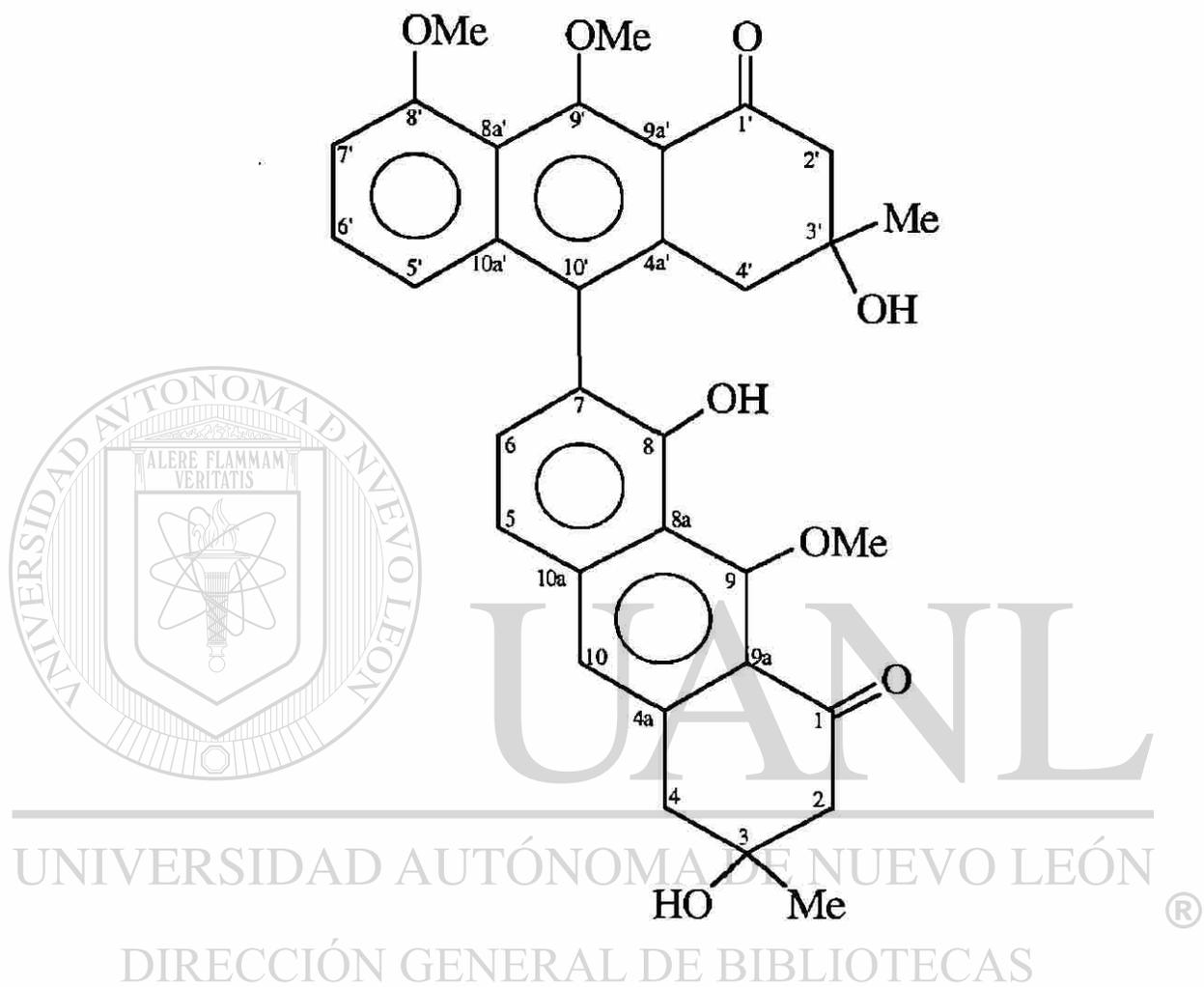


FIGURA 46

Estructura propuesta para el compuesto 4

TABLA 11

Asignación del espectro de RMN de ^1H del compuesto **4** (400.13 MHz, valores de δ en CDCl_3)

H	δ ppm	H	δ ppm
2'	2.74 (m)	2	2.88 (m)
CH ₃ -3'	1.29 (s)	CH ₃ -3	1.52 (s)
4'	2.84 (d)	4	3.29 (d)
	2.93 (d)	5	7.39 (m)
5'	6.95 (d)	6	7.32 (m)
6'	7.30 (m)	OCH ₃ -9	4.06 (s)
7'	6.85 (d)	10	7.53 (s)
OCH ₃ -8'	4.00 (s)	OH-8	10.22 (s)
OCH ₃ -9'	4.02 (s)		

TABLA 12

Asignación del espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **4** (100.62 MHz, valores de δ en CDCl_3)

C	δ ppm	C	δ ppm
1'	196.39	1	195.55
2'	54.55	2	54.55
3'	70.83	3	71.09
CH ₃ -3'	29.28	CH ₃ -3	29.33
4'	42.09	4	44.34
4a'	136.17	4a	137.46
5'	118.61	5	133.77
6'	118.61	6	129.14
7'	106.49	7	122.39
8'	158.72	8	153.22
OCH ₃ -8'	63.30	8a	120.90
8a'	120.07	9	159.63
9'	159.24	OCH ₃ -9	64.53
OCH ₃ -9'	56.55	9a	116.64
9a'	116.83	10	124.51
10'	123.41	10a	138.29
10a'	138.58		

3.6.5 Elucidación de la estructura del compuesto 5

Predicción teórica del producto termodinámicamente más estable:

Con el cálculo de densidad electrónica en la Peroxisomicina A1 con la representación gráfica del orbital HOMO, se observó que las zonas con mayor densidad electrónica resultaron ser las posiciones 7' y 5'.

Para elucidar la estructura del compuesto 5, se analizaron los siguientes espectros:

Espectro de RMN de ^1H (Figura 47 y 47a).

Espectro de RMN de ^{13}C (Figura 48).

Espectro COSY 45 (Figura 49).

Como resultado del análisis de cada uno de los espectros anteriores la

Figura 50 muestra la estructura propuesta para el compuesto 5.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

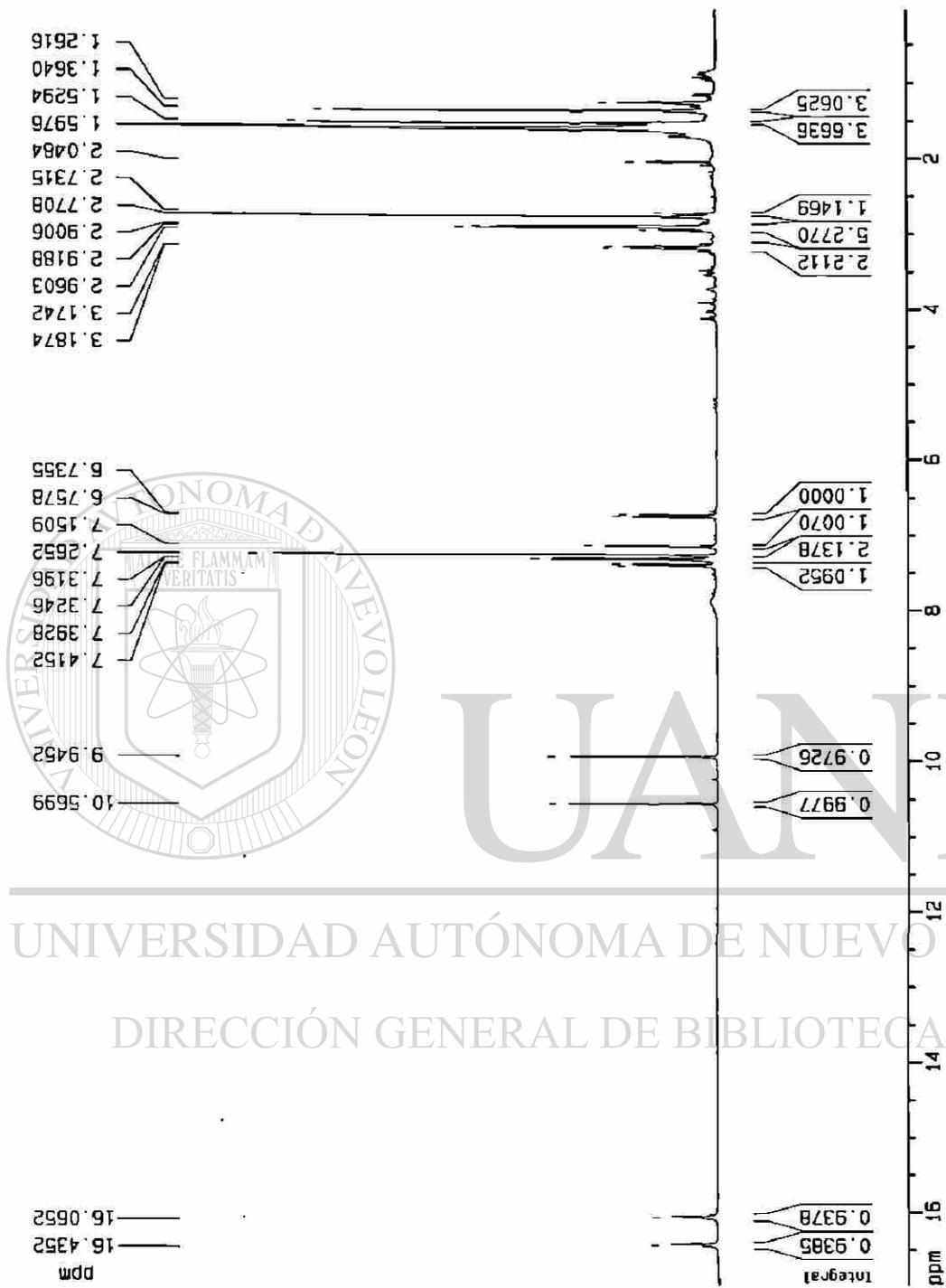


Figura 47. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 5.

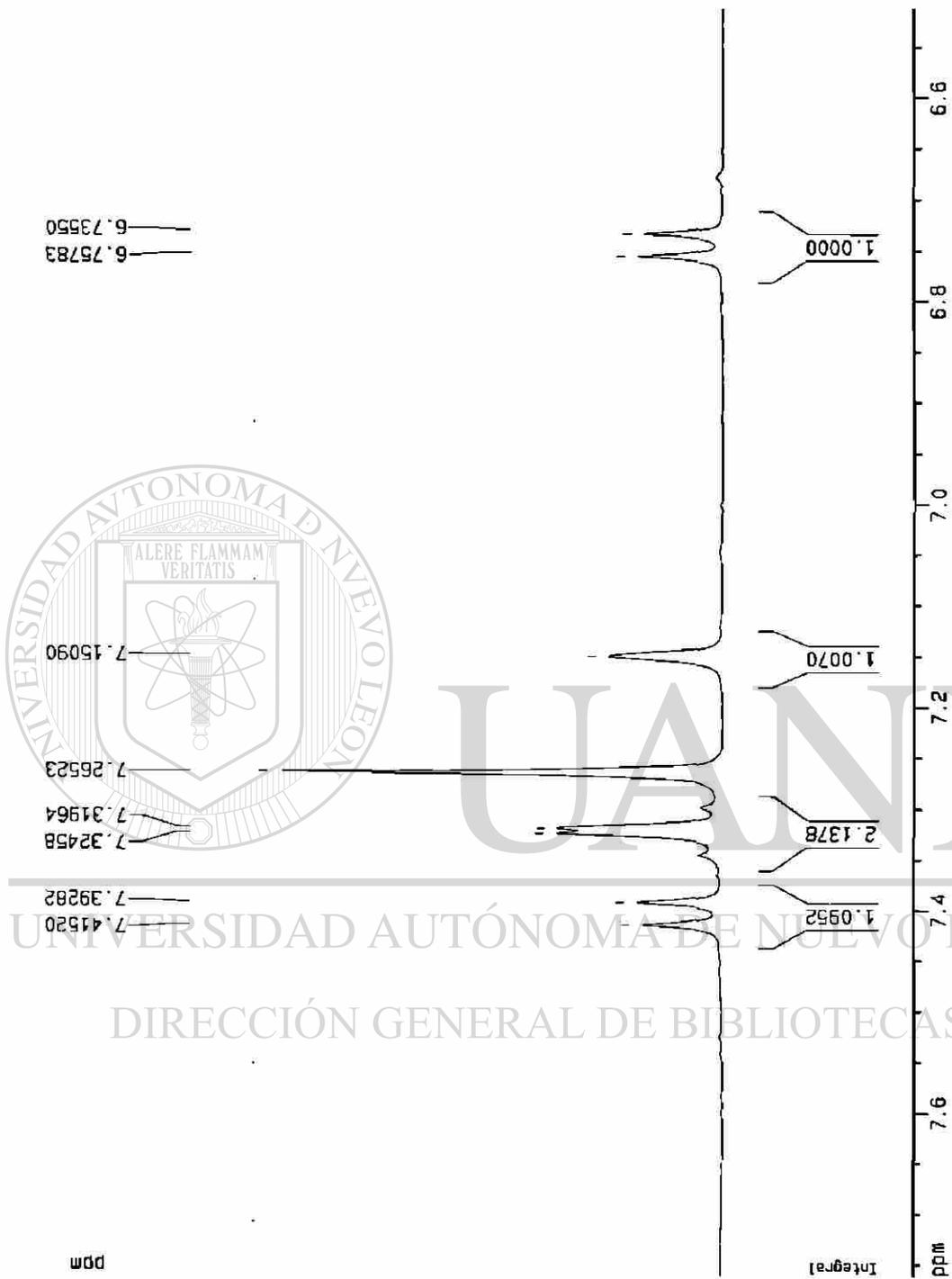


Figura 47a. Espectro de RMN de ¹H del compuesto 5. (ampliación de la región aromática).

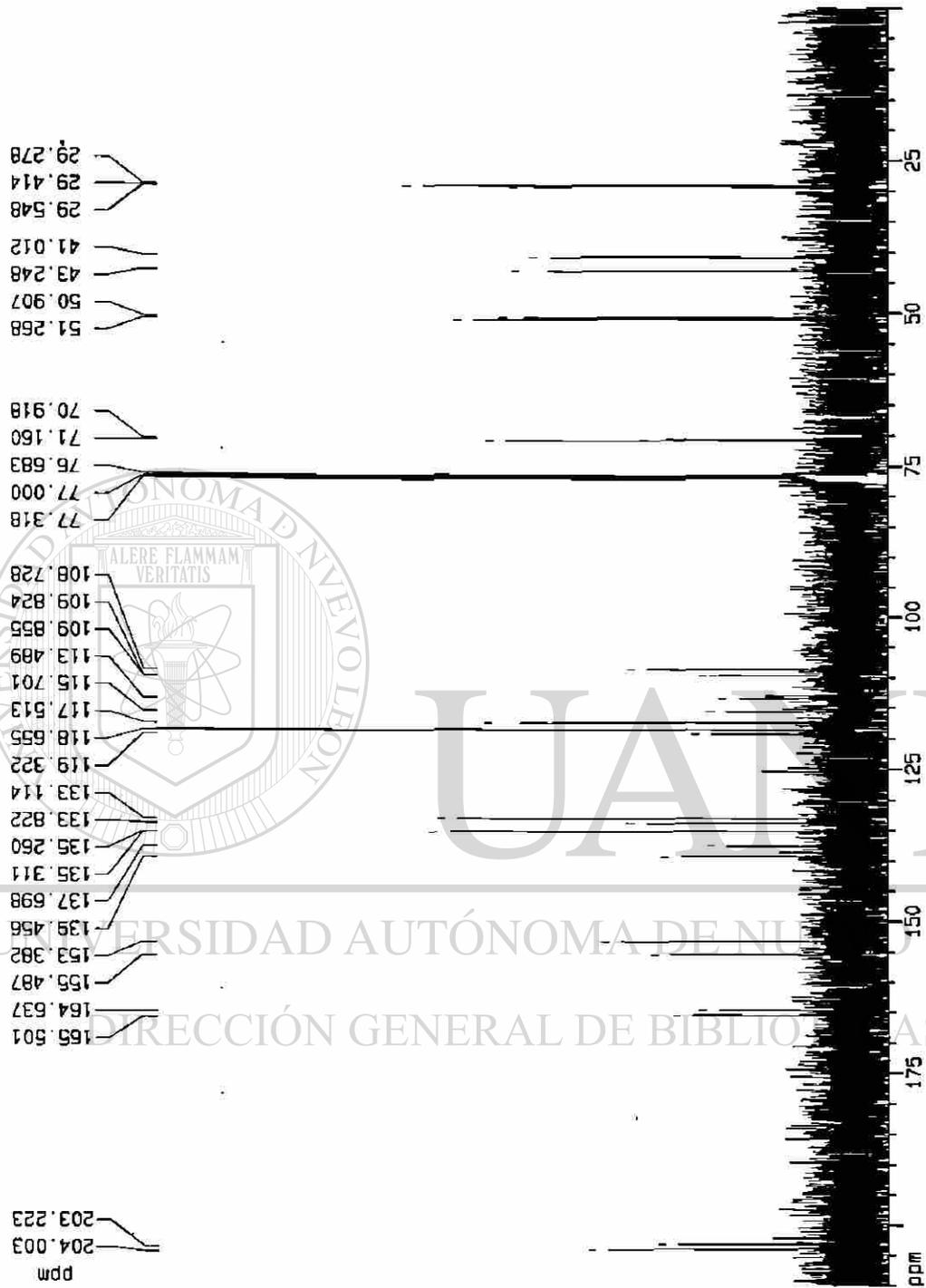


Figura 48. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 5.

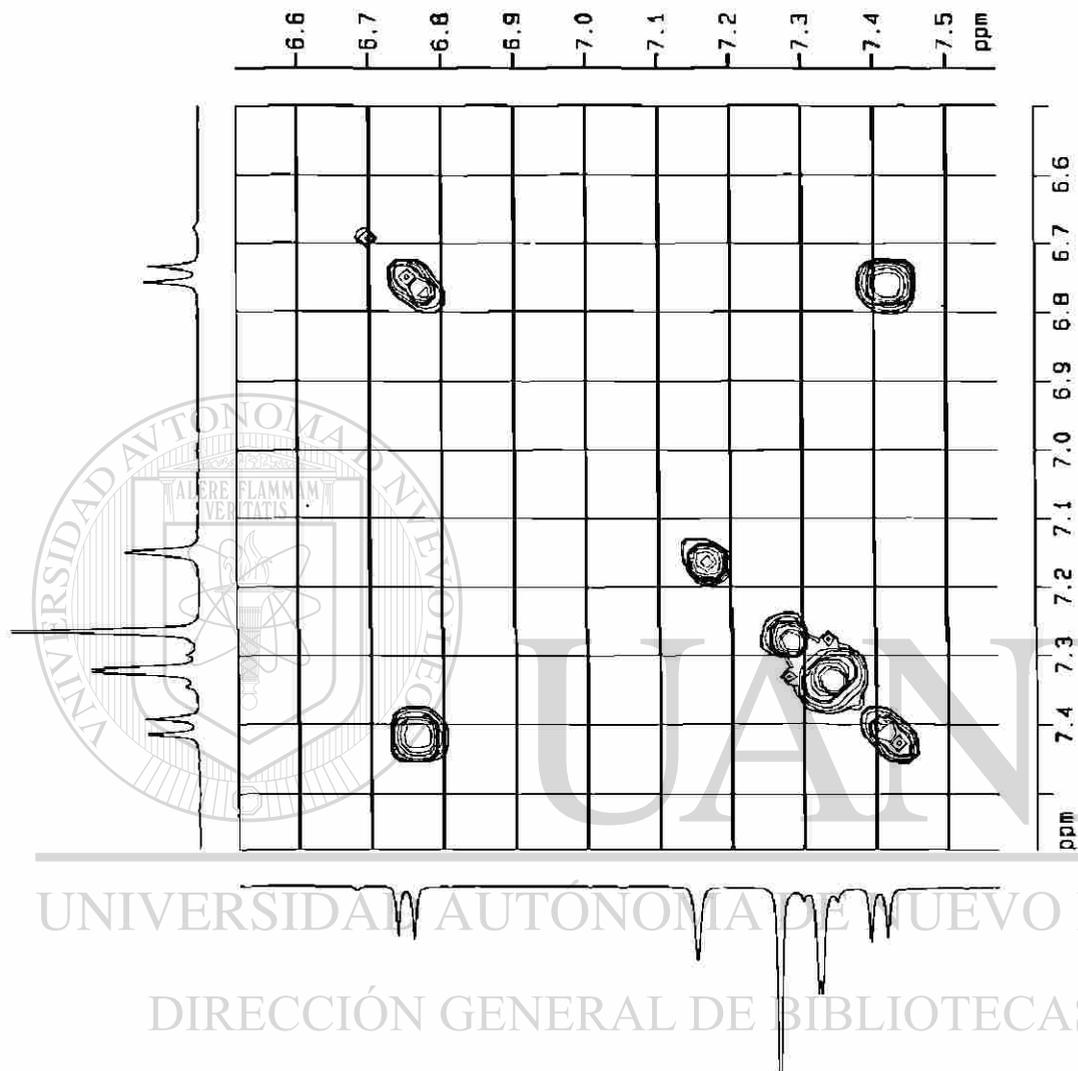


Figura 49. Espectro COSY 45 del compuesto 5.
 (correlación de H-5' y H-6').
 ®

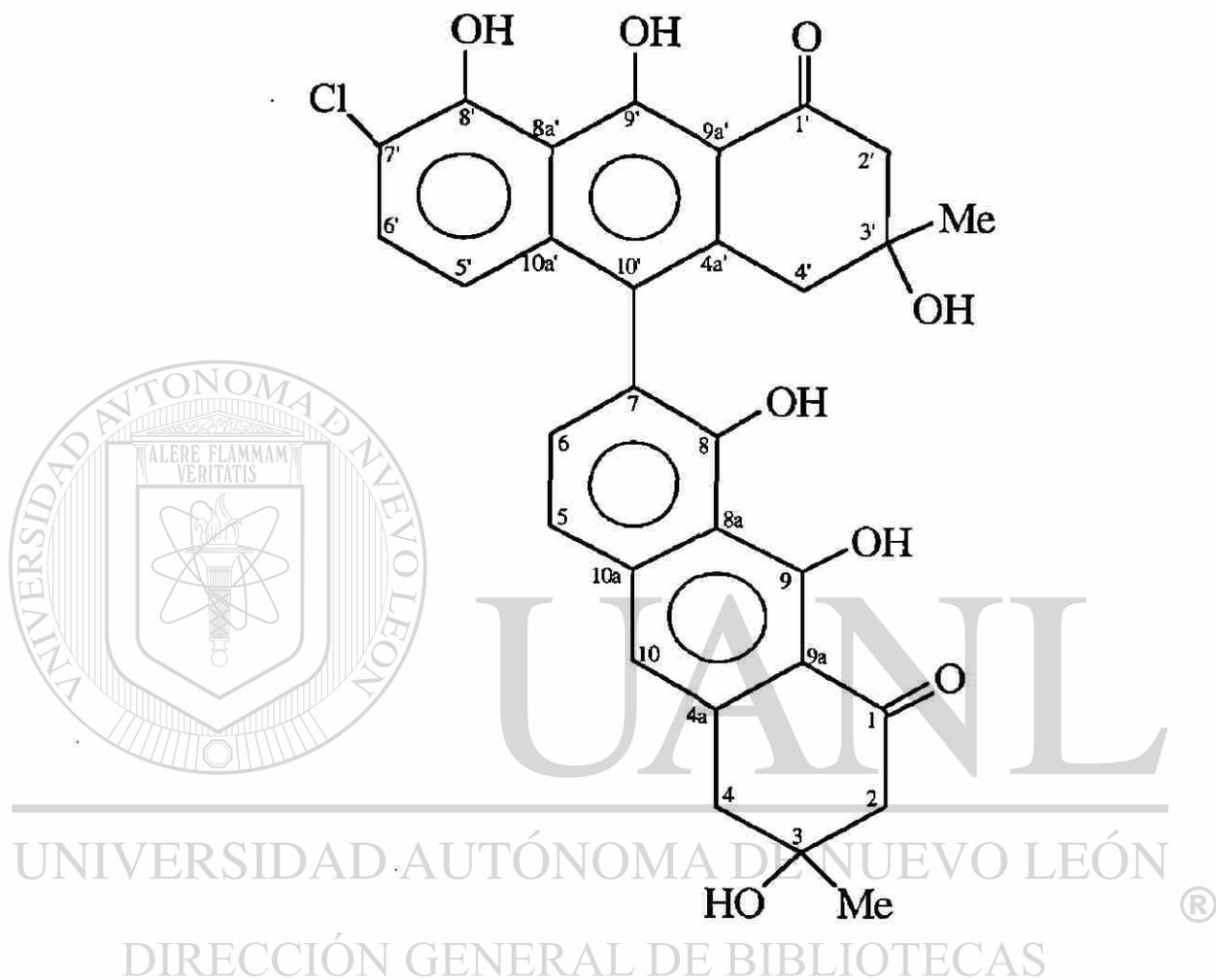


FIGURA 50

Estructura propuesta para el compuesto 5

3.6.6 Elucidación de la estructura del compuesto 6

Para cumplir con este objetivo, se analizaron los siguientes espectros:

Espectro IR (Figura 51).

Espectro de RMN de ^1H (Figura 52 y 52a).

Espectro de RMN de ^{13}C (Figura 53).

Espectro DEPT 135 (Figura 54).

Espectro COSY 45 (Figura 55).

Espectro HMQC (Figura 56).

Espectros nOe diferenciales (Figura 57, 57a, 57b y 57c).

Como resultado del análisis de cada uno de los espectros anteriores la Figura 58 muestra la estructura propuesta para el compuesto 6.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

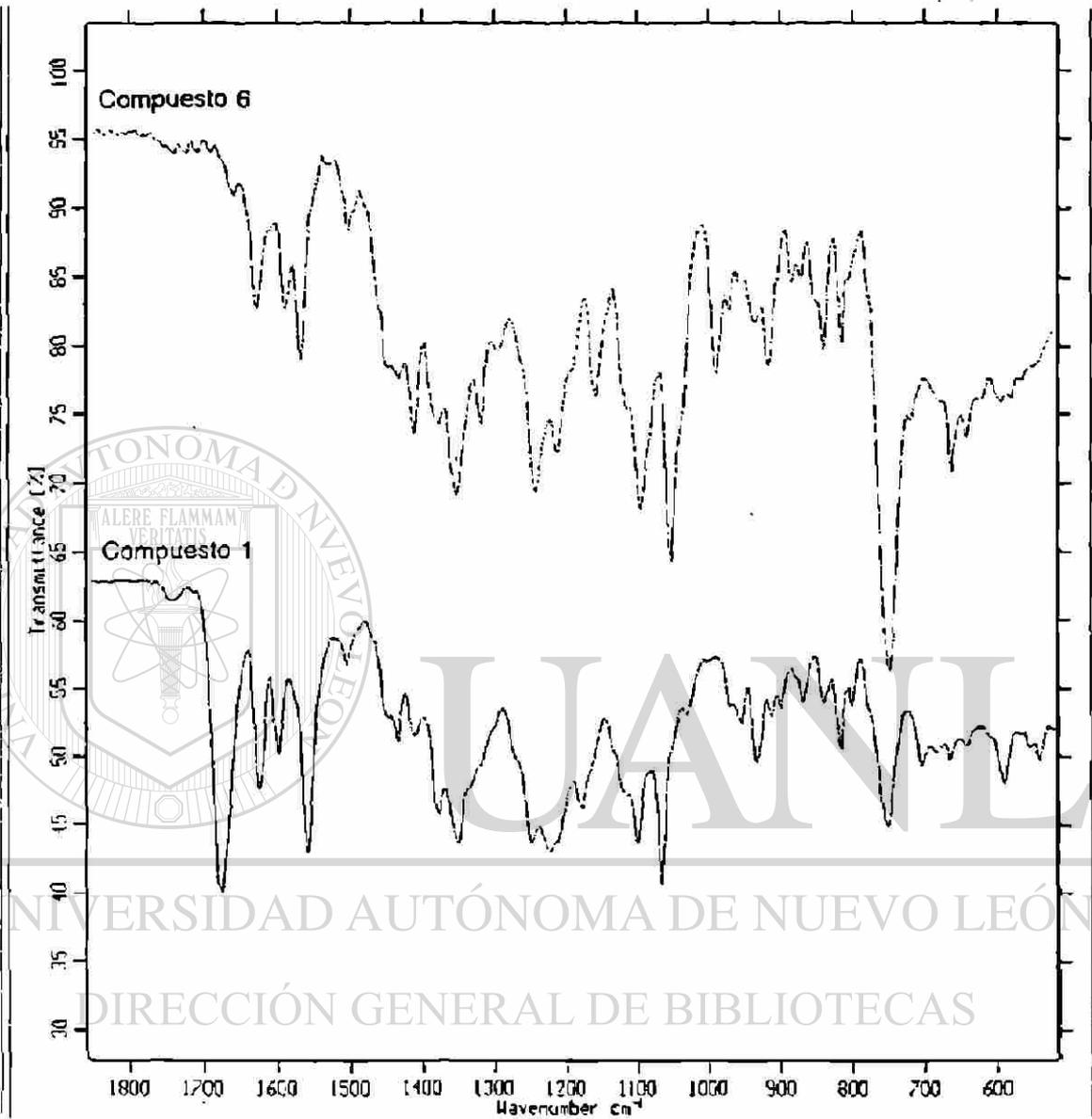


Figura 51. Espectro IR del compuesto 6.

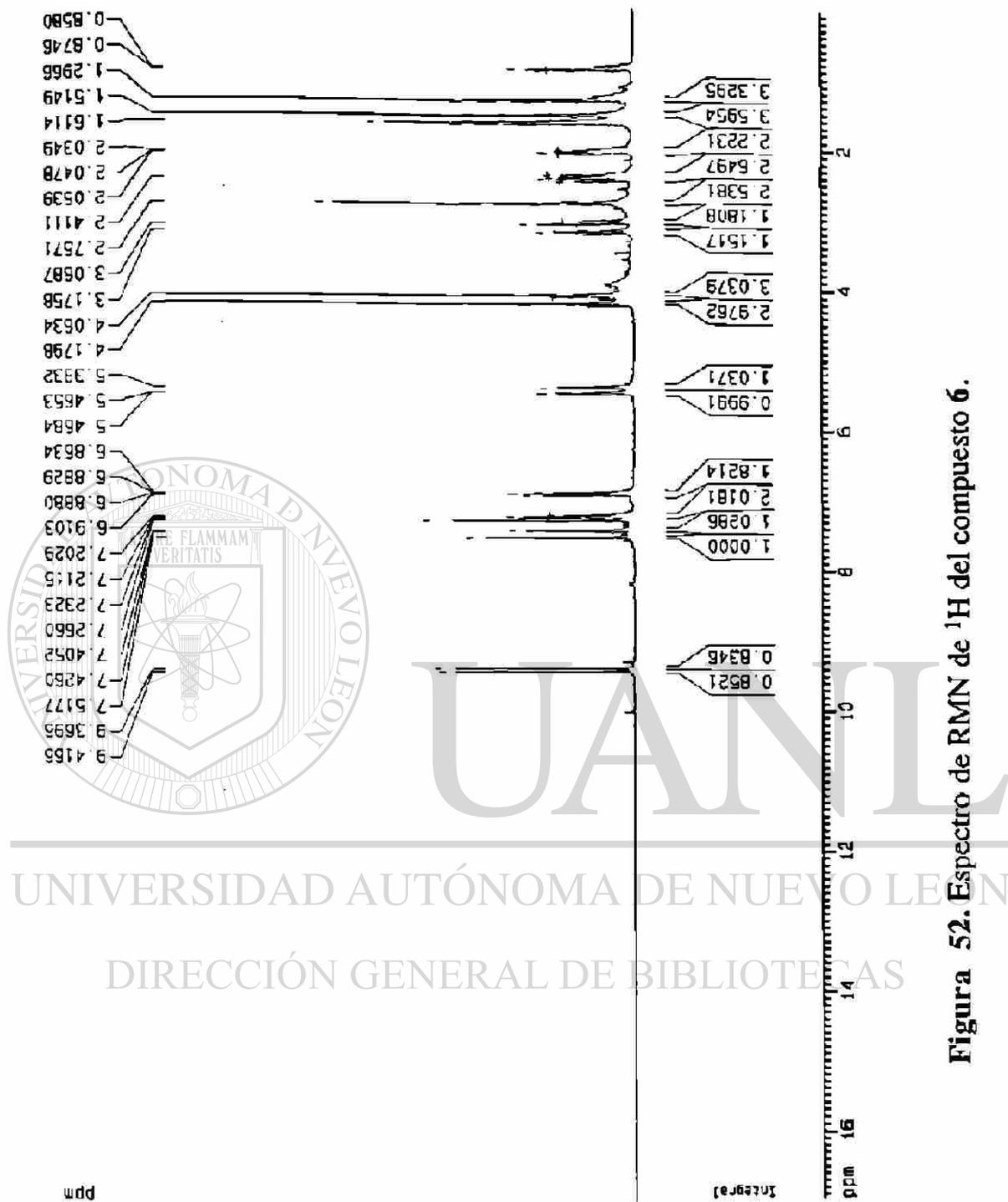


Figura 52. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **6**.

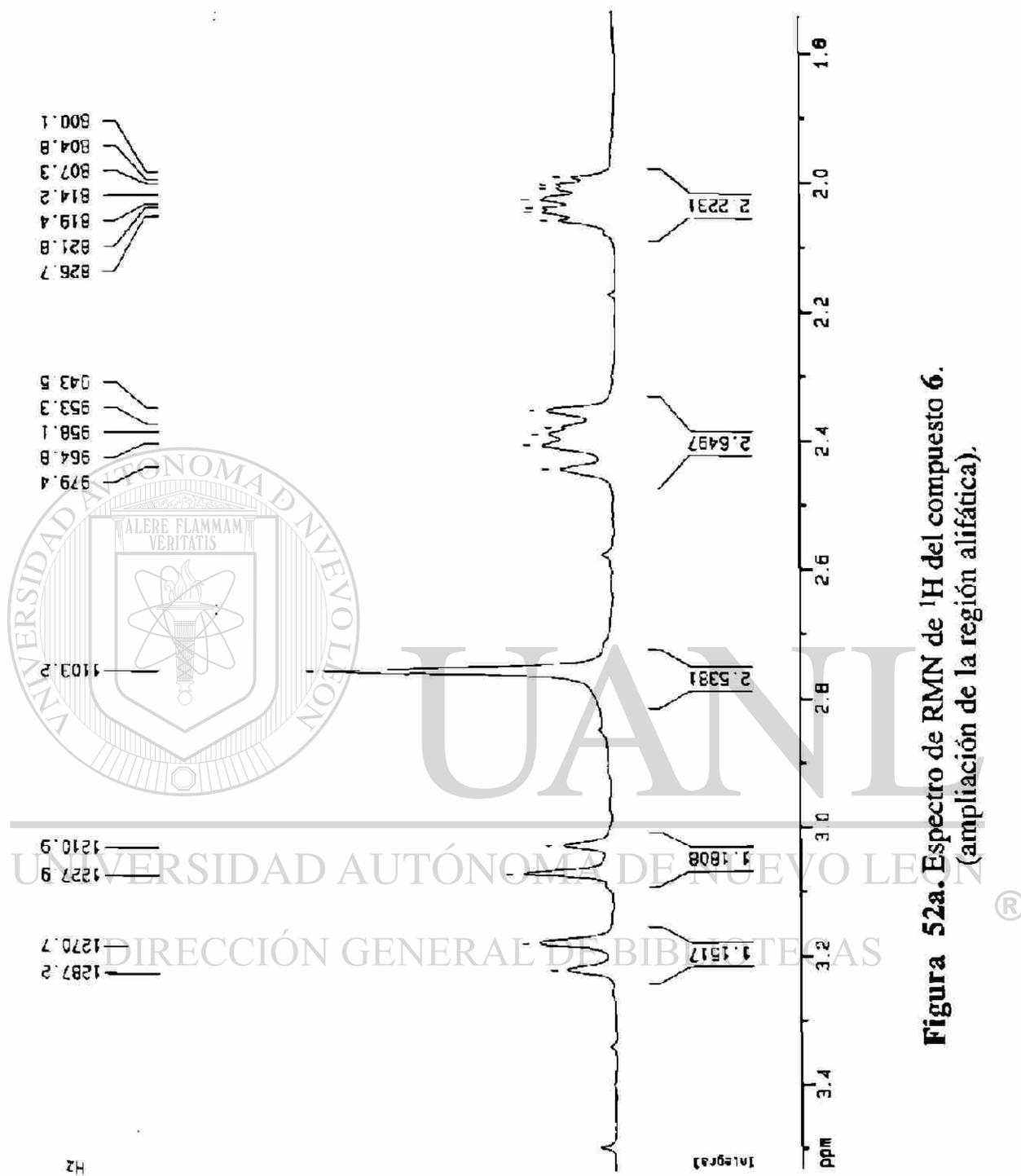
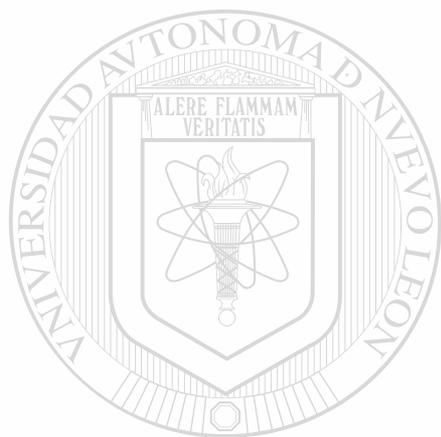


Figura 52a. Espectro de RMN de ¹H del compuesto 6. (ampliación de la región alifática).



Figura 53. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 6.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Figura 54. Espectro DEPT 135 del compuesto 6.

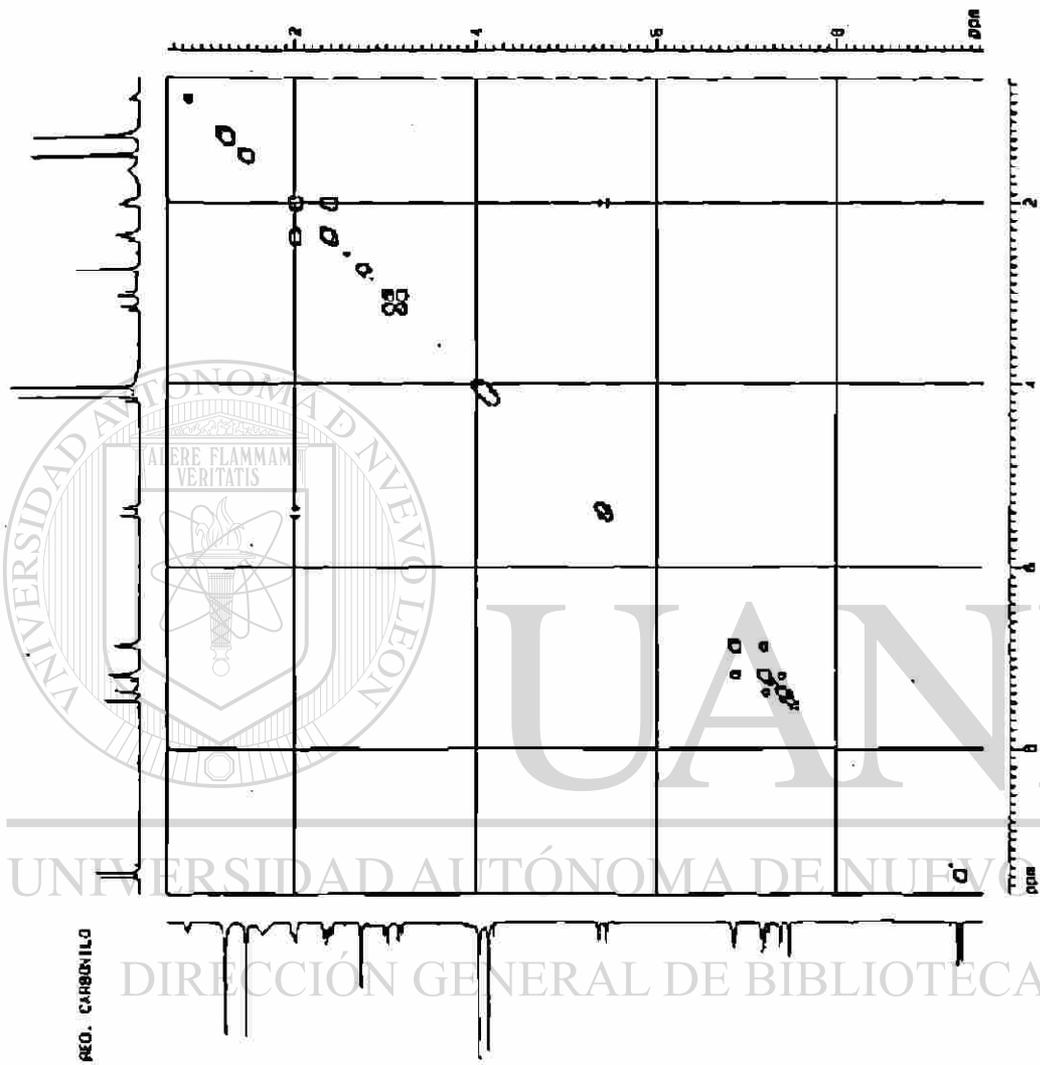


Figura 55. Espectro COSY 45 del compuesto **6**.
(correlación de H-1 y H-1' con H-2 y H-2').

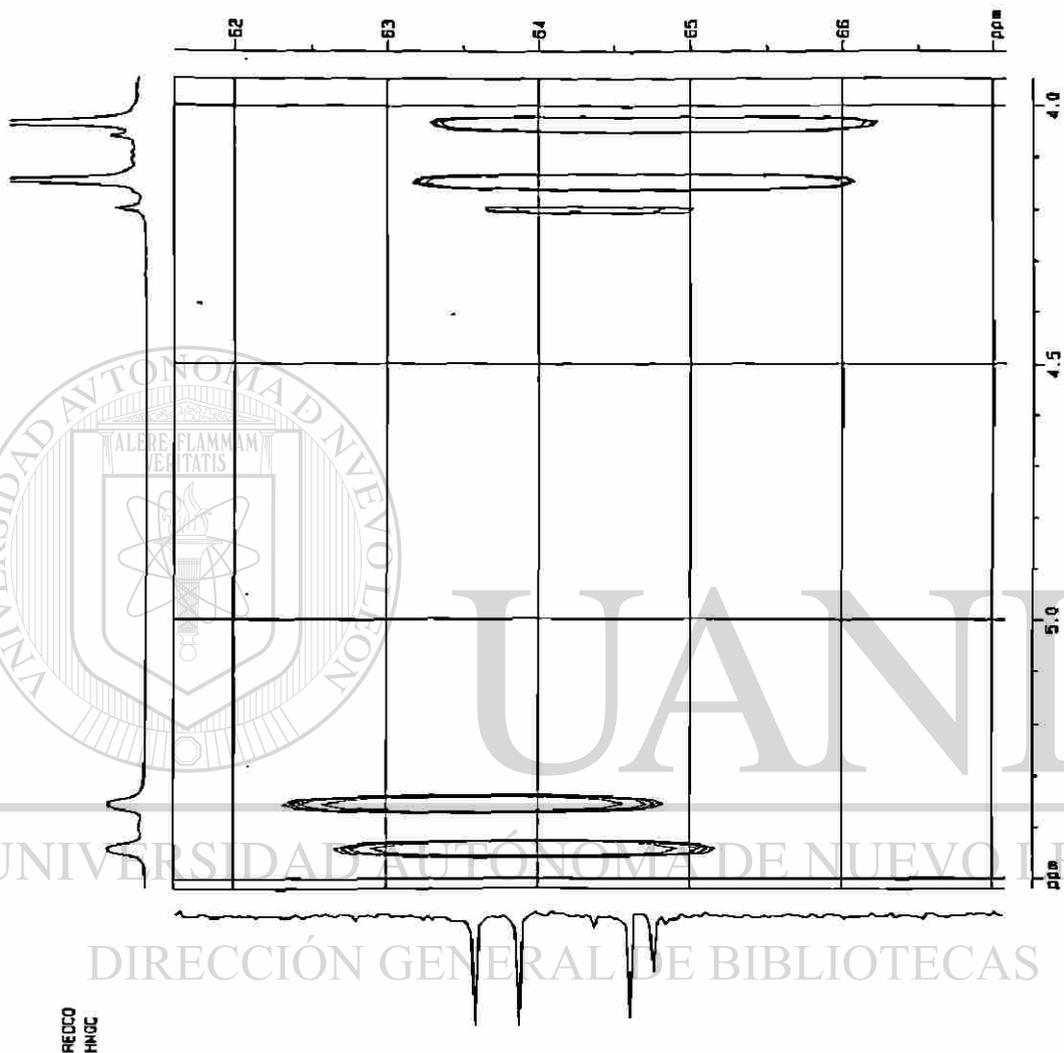


Figura 56. Espectro HMQC del compuesto **6**.
 (correlación de H-1 y H-1').

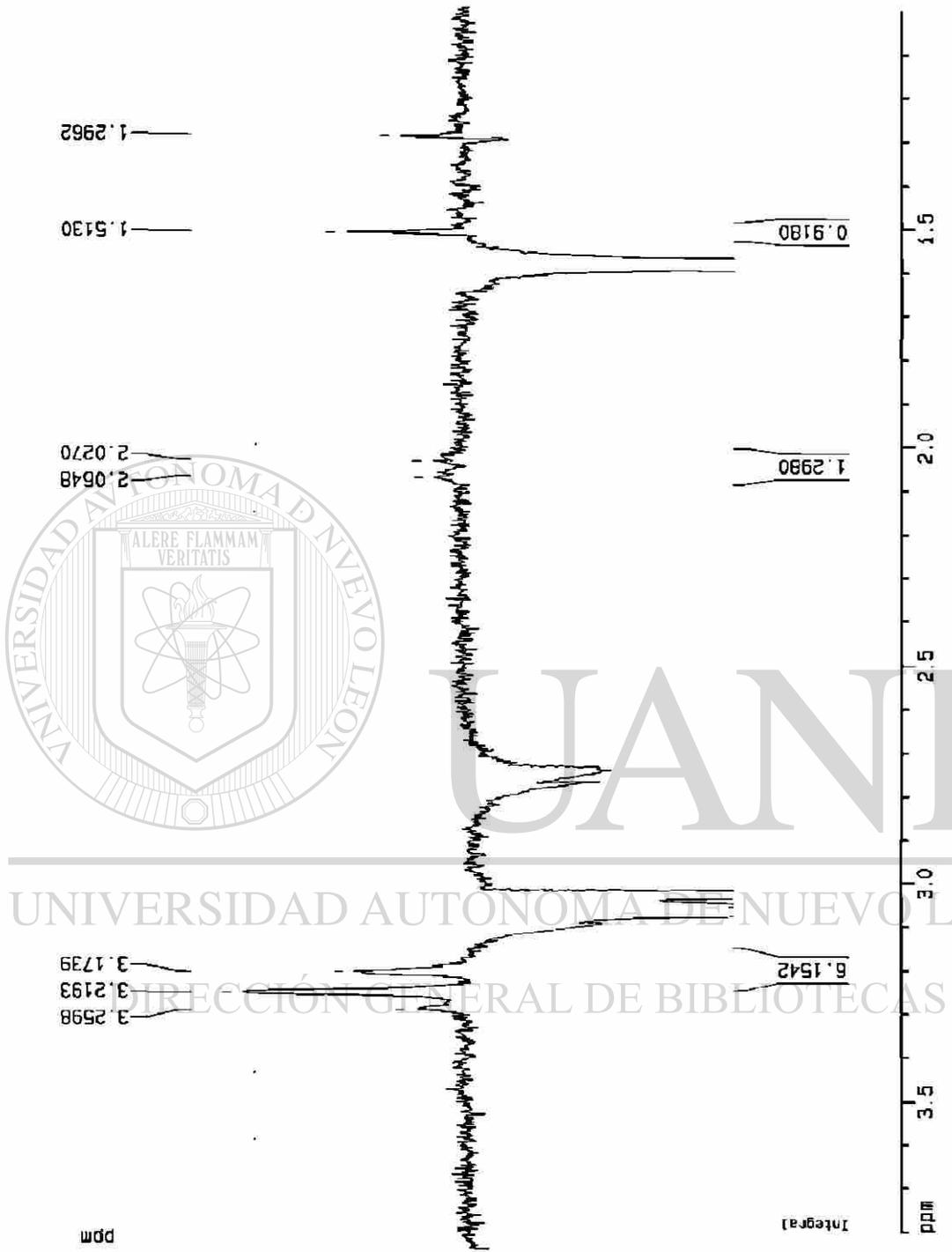


Figura 57. Espectro nOe diferencial del compuesto 6. Señal irradiada: δ 3.05 (H-4 ax).

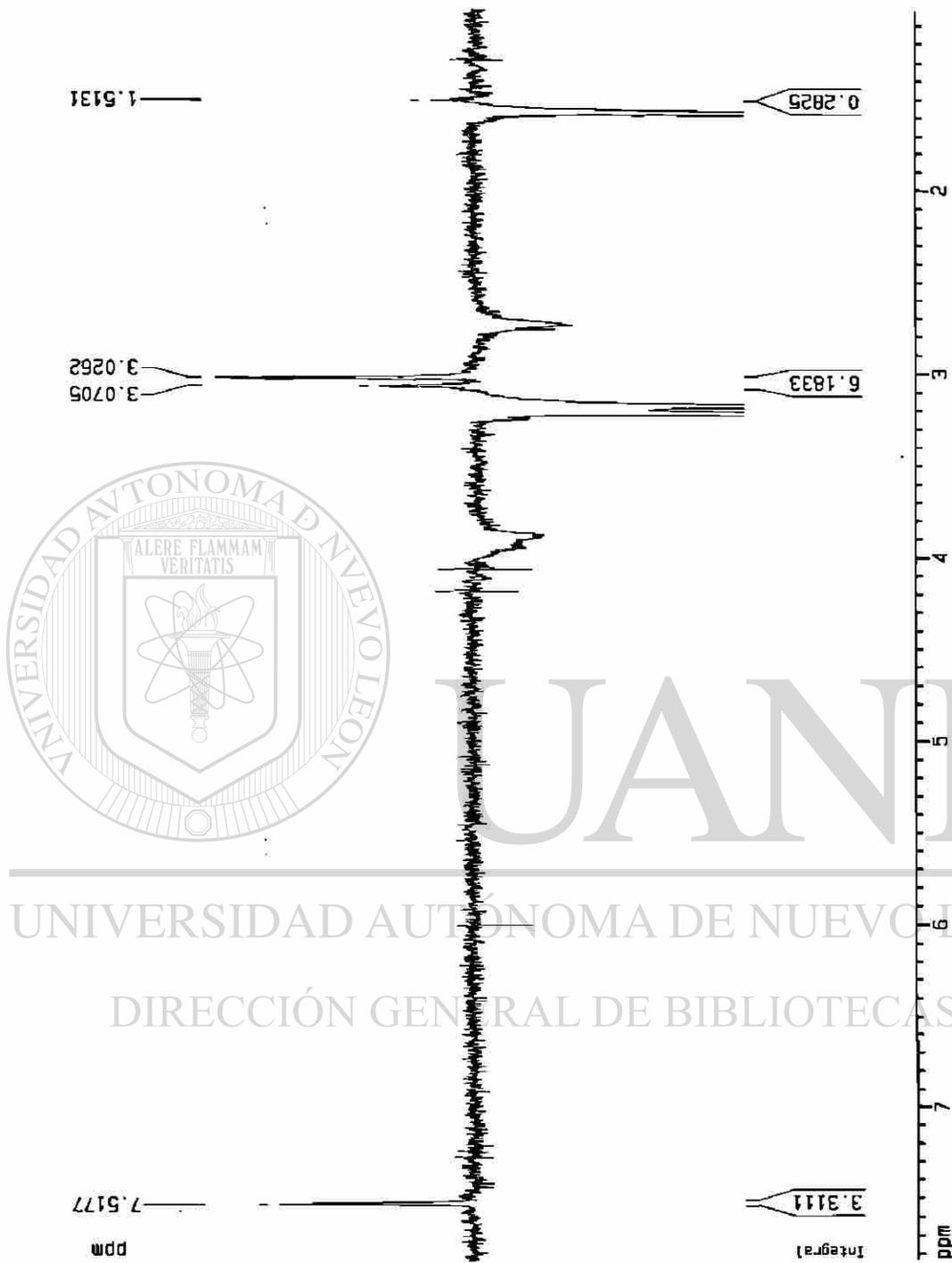
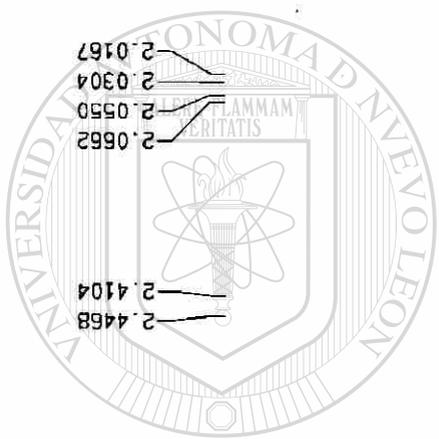


Figura 57a. Espectro ¹H de diferencial del compuesto 6. Señal irradiada: δ 3.20 (H-4 ec).



Figura 57b. Espectro nOe diferencial del compuesto **6**.
 ® Señal irradiada: δ 1.30 ($\text{CH}_3\text{-3}'$).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.2218
3.1781
3.0702
3.0272

2.4468
2.4104
2.0662
2.0550
2.0304
2.0167

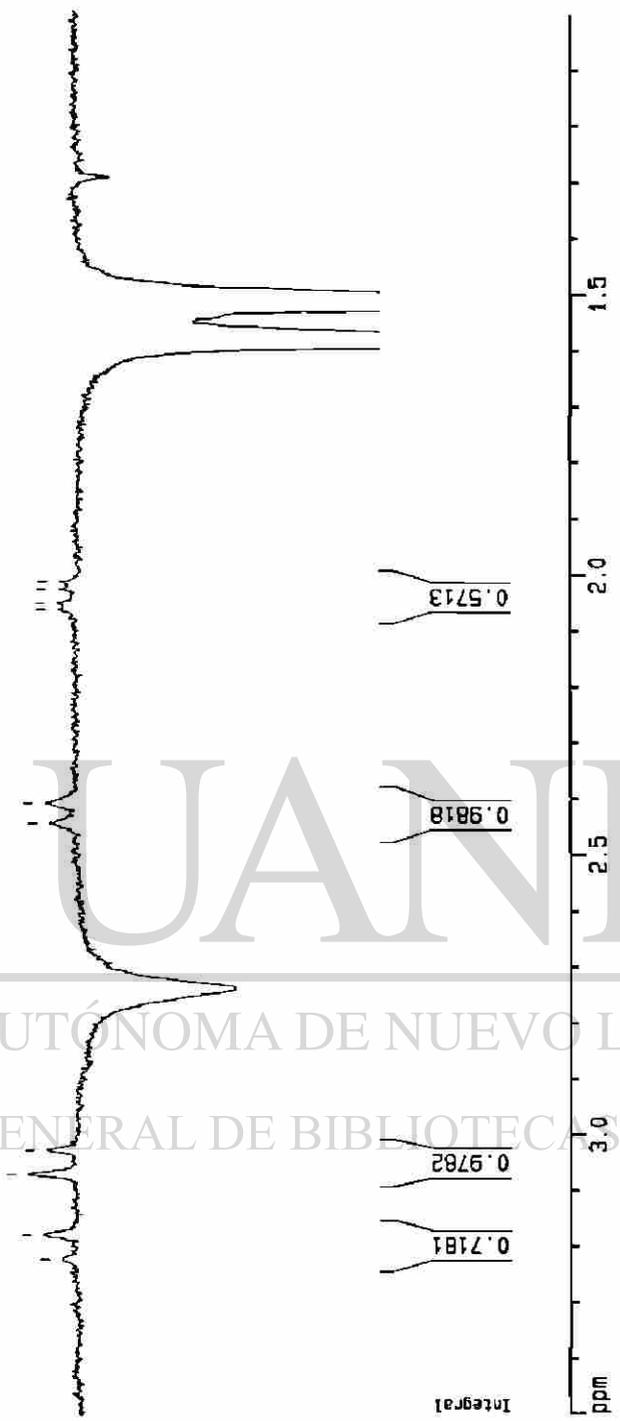
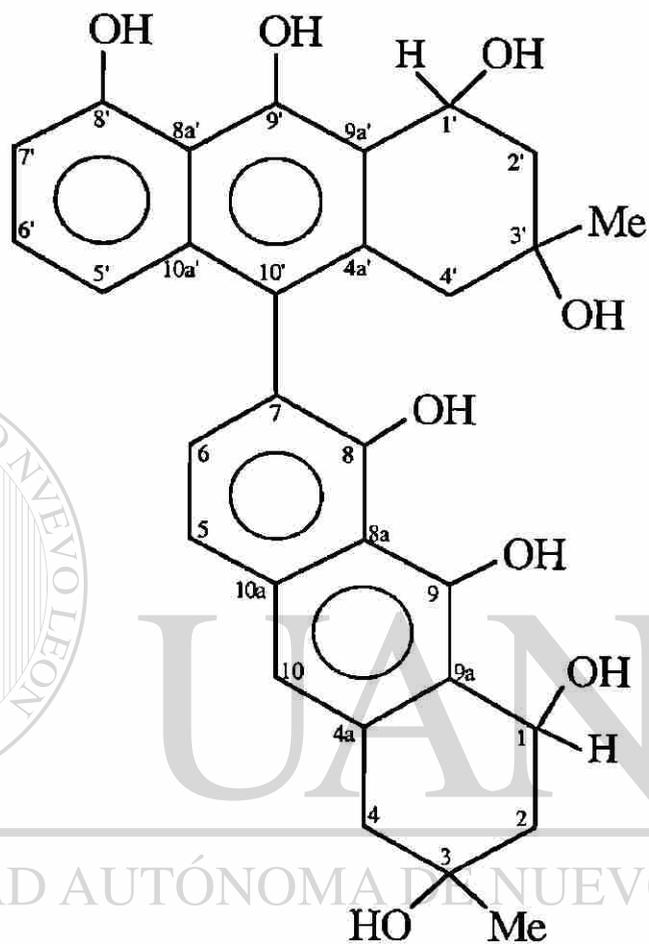
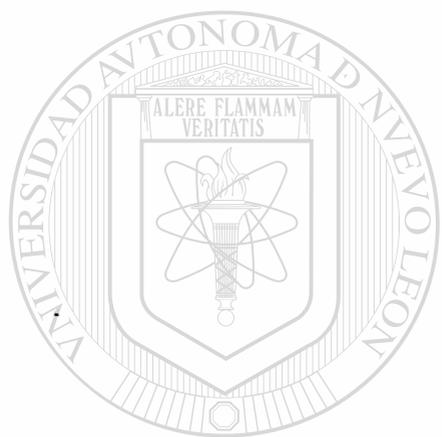


Figura 57c. Espectro ^1H de diferencial del compuesto **6**.
Señal irradiada: δ 1.50 (CH_3 -3).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FIGURA 58

Estructura propuesta para el compuesto 6

3.7 VALORACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

3.7.1 Determinación del efecto de los derivados de la Peroxisomicina A1 sobre la actividad de catalasa en ensayos *in vitro*.

La Tabla 13 muestra el % de inhibición sobre la actividad de la catalasa a la máxima concentración utilizada para cada compuesto.

TABLA 13
Determinación del efecto de los derivados de la Peroxisomicina A1 sobre la actividad de la catalasa.

Compuesto	Concentración μM	% de inhibición
PA1	3.9	50.0
1	29.5	11.9
2	36.6	15.7
3	28.8	22.4
4	54.0	18.5
5	36.5	37.3
6	18.4	26.8

3.7.1.1 Determinación de la CI_{10} .

Se determinó la CI_{10} después de graficar el logaritmo de la actividad restante de catalasa versus las diferentes concentraciones para cada compuesto analizado. Se obtuvo en cada caso la curva de regresión correspondiente; por medio de la ecuación de cada recta, se calculó la CI_{10} para cada compuesto.

TABLA 14
Efecto inhibitorio (CI_{10}) de los derivados de la Peroxisomicina A1 sobre la actividad de la catalasa.

Compuesto	Ecuación	CI_{10} μM
PA1	$\text{Log Act.} = 1.9387 - 7.2763 e^{-2} \text{ Conc.}$	0.21
1	$\text{Log Act.} = 2.0045 - 2.0136 e^{-3} \text{ Conc.}$	24.95
2	$\text{Log Act.} = 2.0388 - 2.6682 e^{-3} \text{ Conc.}$	23.05
3	$\text{Log Act.} = 2.0492 - 1.9340 e^{-3} \text{ Conc.}$	49.10
4	$\text{Log Act.} = 2.0405 - 2.1150 e^{-3} \text{ Conc.}$	40.78
5	$\text{Log Act.} = 1.9269 - 3.8837 e^{-3} \text{ Conc.}$	7.04
6	$\text{Log Act.} = 2.0297 - 9.0245 e^{-3} \text{ Conc.}$	8.36

3.7.2 Valoración de la acción de los derivados de la Peroxisomicina A1 sobre la actividad celular *in vitro*.

Se determinó la CT₅₀ para cada derivado después de 72 hrs de exposición con las dos líneas celulares utilizadas. Se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA 15
Concentración citotóxica 50% de los derivados de la Peroxisomicina A1.

Compuesto	CT ₅₀ μg/mL	
	Chang 13-CCL	Hepatoma G2
PA1	1.25 - 2.50	0.049 - 0.156
1	3.50 - 5.00	2.500 - 3.500
2	5.00	2.500 - 3.500
3	5.00	3.500
4	2.50 - 5.00	2.500
5	1.80 - 2.50	0.110 - 0.440
6	3.50 - 5.00	3.500 - 7.070

CAPITULO 4

DISCUSION

Para la obtención de cantidad suficiente de Peroxisomicina A1 y de esta forma dar cumplimiento a los objetivos planteados en este trabajo, fue necesario repetir el método de purificación varias veces.

Actualmente la Peroxisomicina A1 se está utilizando en ensayos clínicos con seres humanos; debido a esto, una vez purificada, se somete a un estricto control de calidad, el cual consiste en tomar como parámetros tanto la pureza química como la pureza biológica. Los valores de dichos parámetros se tienen establecidos en nuestro laboratorio y son los que se tomaron como referencia para establecer la pureza de la Peroxisomicina A1 utilizada en este trabajo.

Para fines de esta tesis, se utilizó Peroxisomicina A1 de dos calidades diferentes: una químicamente pura y otra química y biológicamente pura. Fue necesario hacer esta distinción considerando el costo que implica obtener este compuesto con la pureza biológica adecuada.

De esta forma se utilizó Peroxisomicina A1 de pureza química, para realizar los ensayos preliminares de cada uno de los procedimientos seleccionados en cada reacción.

Como el objetivo en estos ensayos preliminares era el adaptar las condiciones de reacción a las de estabilidad de la Peroxisomicina A1, el utilizar este compuesto con la calidad antes mencionada permitió realizar variaciones de pH, temperatura y concentración de reactivos, en los casos en los que no había evidencia de reacción aparente.

Una vez establecidas las condiciones de reacción, se utilizó Peroxisomicina A1 químicamente pura y biológicamente activa, para con ella realizar cada procedimiento a mayor escala y tener de esta forma cantidad suficiente de los derivados puros y caracterizados; esto permitió finalmente valorar la actividad biológica de cada uno ellos.

Con la finalidad de simplificar la comprensión de los resultados de este trabajo, se dividió la discusión de cada una de las modificaciones químicas realizadas en la Peroxisomicina A1; al final se discute en forma global los resultados obtenidos de la valoración de la actividad biológica de los derivados sintetizados en cada reacción.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.1 BLOQUEO DE LOS HIDROXILOS FENOLICOS

Para el bloqueo de los hidroxilos fenólicos se intentó sintetizar diferentes derivados que nos condujeran al mismo fin. Para esto se manipuló químicamente los hidroxilos fenólicos mediante la síntesis de éteres, ésteres y un glicósido.

Para la síntesis de éteres se probó la reacción de metilación utilizando diferentes reactivos. Al realizar un rastreo en la literatura encontramos reportes que señalan al diazometano como el reactivo de selección para sintetizar éteres metílicos en sustratos muy parecidos al nuestro y obtener productos con diferente grado de metilación^(44,45). A este respecto se probó como fuente generadora de diazometano el hidrato de hidrazina, con el cual se obtuvo un bajo rendimiento. De la misma forma, se probó la N-metil-N-nitroso-para-toluensulfonamida (diazald), como reactivo generador de diazometano, mejorando en mucho el rendimiento de la reacción^(46,47).

Asimismo, encontramos que el Me_2SO_4 ⁽⁴⁵⁾ es uno de los reactivos indicados cuando se quiere metilar totalmente un compuesto y ante la posibilidad de obtener un derivado tetrametilado decidimos probar esta reacción. Sin embargo, los ensayos realizados con este procedimiento no

fueron satisfactorios, ya que la especie metilante se genera en un medio de reacción básico proporcionado por el K_2CO_3 , lo cual ocasionó la degradación de la Peroxisomicina A1 a antraquinona (reacción positiva con KOH/etanol). Este mismo resultado lo obtuvimos al intentar la síntesis de ésteres mediante la formación de acetatos con anhídrido acético en piridina, siendo en este caso la piridina la que ocasiona la degradación de la Peroxisomicina A1⁽⁴⁸⁾.

Para la síntesis de benzoatos se utilizó el fluoruro de benzoilo⁽⁴⁹⁾ y la

obtención del glicósido se probó mediante una reacción de glucuronidación, con UDP glucurónico y la glucuronil transferasa^(50,51); con estos procedimientos no se encontró evidencia de reacción aparente.

Al evaluar los resultados de los ensayos preliminares en cada una de las reacciones anteriores y considerando el rendimiento, selectividad y estabilidad de los productos formados, se seleccionó la reacción de metilación con diazometano, como el procedimiento ideal para el bloqueo de los hidroxilos fenólicos. Como fuente generadora del diazometano se seleccionó el diazald con el cual obtuvimos rapidez de reacción y la seguridad necesaria para la obtención de un gas de este tipo. Otras ventajas observadas al utilizar diazald fueron: condiciones de reacción suaves y selectividad ante la presencia de otros grupos funcionales. Este último hecho fue determinante ya que la Peroxisomicina A1 posee alcoholes terciarios en su estructura, los cuales resultan inertes frente al diazometano en ausencia de catálisis con un ácido de Lewis, siendo en nuestro caso los grupos fenólicos de la Peroxisomicina A1 los que tienen la acidez suficiente para catalizar la reacción con este gas.

No obstante, consideramos deseable el obtener para un trabajo futuro, los ésteres y el glicósido, ya que ellos representan diferentes grupos funcionales mediante los cuales ampliaríamos los horizontes de esta tesis.

4.1.1 Elucidación de la estructura de los éteres metílicos.

Los espectros UV-Visible de los éteres metílicos sintetizados (compuestos **1**, **2**, **3** y **4**) muestran las bandas características para los cromóforos presentes en este tipo de moléculas (Figura 16).

En el espectro IR de estos compuestos (Figura 17) se observan las bandas de estiramiento simétrico y asimétrico del grupo éter a 1250 y 1050 cm^{-1} respectivamente, así como la disminución en la intensidad de la banda del estiramiento O-H, respecto de la intensidad que presenta esta banda en la Peroxisomicina A1; el resto del espectro IR de cada uno de los derivados muestra las bandas que caracterizan a estos compuestos.

Los espectros de masas de los compuestos **1** y **2** (Figura 18 y 24) muestran un ion molecular a 542, lo cual indica la presencia de dos metoxilos en cada derivado, siendo en ambos casos el pico base del espectro el ion a m/e 524, el cual corresponde a la pérdida de agua, fragmentación característica en este tipo de compuestos debido a la presencia de los alcoholes terciarios de las posiciones 3 y 3'. Otro fragmento observado, es el ion 506 que corresponde a la pérdida de dos moléculas de agua, así como el ion 491 que representa la pérdida de metilo a partir del ion 506. La fórmula molecular propuesta para estos derivados dimetilados es $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{O}_8$.

Los espectros de masas de los compuestos **3** y **4** (Figura 31 y 39) muestran un ion molecular a m/e 556, lo cual indica que se trata de dos derivados trimetilados con fórmula molecular $C_{33}H_{32}O_8$. En ambos casos el pico base del espectro corresponde a la pérdida de una molécula de agua, ion que aparece a m/e 538; se observa también el fragmento a m/e 520 el cual representa la pérdida de dos moléculas de agua.

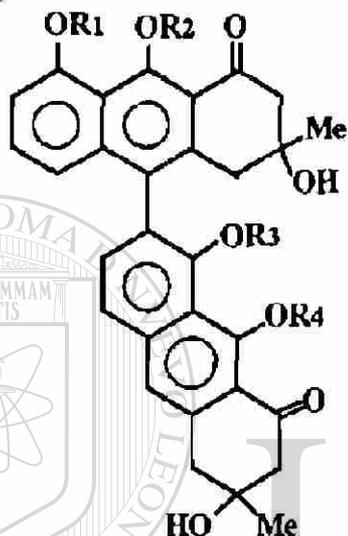
Al tomar como referencia el espectro de RMN de 1H de la Peroxisomicina A1 (Figura 66 y 66a), y al considerar el tipo de modificación realizada, esto es, síntesis de éteres metílicos, esperábamos en el espectro de RMN de 1H de los derivados la desaparición de alguna de las señales de los hidroxilos fenólicos de la Peroxisomicina A1 que aparecen alrededor de 16 ppm, asignados a los OH fenólicos de las posiciones 9 y 9', o los singuletes que están cerca de 10 ppm, asignados a los OH fenólicos de las posiciones 8 y 8'. Otra zona del espectro de RMN de 1H donde esperábamos cambio, es donde aparecen los hidrógenos unidos a oxígeno, alrededor de 4 ppm, zona que en el espectro de la Peroxisomicina A1 se encuentra libre de señales. Asimismo, en el espectro de RMN de ^{13}C esperábamos que el número de señales aumentara en forma correspondiente al número de metoxilos incorporados en cada derivado, los que deberían aparecer entre 55 y 65 ppm, zona que corresponde a carbonos de éteres aril alquílicos.

Al analizar los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C de los compuestos dimetilados **1** y **2**, se observaron francas diferencias entre ellos, lo cual indica la formación de éteres metílicos en diferentes posiciones.

En el espectro de RMN de ^1H del compuesto **1** (Figura 19 y 19a) se observa la desaparición de los singuletes de los hidroxilos 9 y 9', apareciendo únicamente como señales de hidroxilos fenólicos dos singuletes a 10.25 y a 10.17 ppm; a su vez aparecen dos singuletes a 4.11 y 4.04 ppm que integran cada uno para 3 hidrógenos. Por otro lado, en el espectro de RMN de ^1H del compuesto **2** (Figura 25) aparece 1 señal de hidroxilo fenólico a 15.38 ppm y otra a 10.21 ppm; asimismo en la zona de 4.05 ppm se observa un singulete que integra para 6 hidrógenos, lo cual sugiere la presencia de los dos grupos metoxilo.

Los espectros de RMN de ^{13}C en ambos dimetilados muestran dos señales más, respecto del número de señales que presenta la Peroxisomicina A1 (Figura 67), esto debido a la formación de los dos metoxilos en cada compuesto. Para el compuesto **1** (Figura 20) dichas señales aparecen a 64.41 y 64.54 ppm, mientras que en el compuesto **2** (Figura 26) aparecen a 56.38 y 64.47 ppm; en ambos compuestos, estas señales corresponden a carbonos de metilos de los éteres aril alquílicos formados. Lo anterior permitió proponer que el compuesto **1** corresponde al derivado dimetilado en las posiciones 9 y 9', sin embargo

la posición de los éteres metílicos en el compuesto **2** no quedó clara al analizar únicamente los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C , dado que para este compuesto existen diferentes posibilidades de metilación, como se observa en la siguiente figura:



- 1.- R1, R2 = OCH₃
- 2.- R3, R4 = OCH₃
- 3.- R1, R4 = OCH₃
- 4.- R2, R3 = OCH₃

Figura 59

Isómeros probables para el compuesto **2**

En el caso del compuesto **1**, y con la intención de corroborar la estructura propuesta, se recurrió a los espectros de doble dimensión HMQC y HMBC. En el espectro de HMQC (Figura 21), se observa la correlación de los singuletes de 4.04 y 4.11 ppm con las correspondientes señales en ^{13}C a 64.41 y 64.54 ppm.

En el caso del espectro HMBC el cual establece correlaciones C-H a 2 o 3 enlaces, se determinó previamente en base a la estructura química de

estos compuestos, que una J de 7 o 9 Hz es el valor adecuado para ver dichos acoplamientos. En este espectro (Figura 22) se observa la correlación de los hidrógenos de los metoxilos con las señales de los carbonos de las posiciones 9 y 9'. De esta forma, la estructura del compuesto 1 corresponde con la estructura propuesta (Figura 23).

En el caso del compuesto 2 para llegar a establecer la estructura correcta fue necesario recurrir a otros experimentos de RMN para asignar todas las señales de ^1H y de ^{13}C . Con el análisis del espectro HMQC (Figura 27) se asignaron la mayoría de las señales; para lograr la asignación total en la molécula y de esta forma justificar la estructura propuesta, se recurrió a los espectros nOe y HMBC.

La posición exacta de metilación se estableció con el espectro HMBC (Figura 28) en el cual se observaron las siguientes correlaciones:

La señal de 10.21 ppm que corresponde a un hidroxilo fenólico, correlaciona con las señales en ^{13}C a 120.54 y 153.51 ppm, las cuales corresponden a C-7 y C-8 respectivamente. Ambas correlaciones establecen que la señal de hidrógeno a 10.21 ppm corresponde al OH fenólico de la posición 8. Asimismo la señal de 15.38 ppm que corresponde al otro hidroxilo fenólico de la molécula, correlaciona con las señales en ^{13}C a 110.47, 115.41 y 165.76 ppm, las cuales fueron asignadas a C-9a', C-8a' y C-9' respectivamente. De esta forma se establece que el singulete, que en el espectro de hidrógeno aparece a 15.38

ppm, corresponde al OH fenólico de la posición 9'.

Con la información anterior se llegó a establecer que los sitios de metilación en el compuesto **2** fueron las posiciones 8' y 9, tal y como se muestra en la estructura propuesta (Figura 30).

Además de la información anterior se observaron otros datos en los espectros de RMN de ^1H en ambos derivados dimetilados que resulta interesante discutir: al observar la región aromática se observa que el singulete que corresponde al H-10, se desplazó mucho en ambos compuestos, respecto de la posición en que aparece en la Peroxisomicina A1, que es de 7.14 ppm (Figura 66a). En el compuesto **1** el H-10 aparece a 7.54 ppm (Figura 19a), y en el compuesto **2** a 7.52 ppm (Figura 25a), siendo ambas las señales de hidrógenos aromáticos que aparecen a campos más bajos. Este mismo desplazamiento se observa en el doblete del H-5' en el compuesto **2**, que aparece a 6.89 ppm, siendo que en la Peroxisomicina A1 aparece a 6.77 ppm. La característica común es que estos H tienen en *para* un OCH₃, mientras que en la Peroxisomicina A1 tienen un OH en esa misma posición.

No se encontró en la literatura justificación para este efecto; sin embargo se observó un desplazamiento similar en un compuesto natural estructuralmente relacionado con los derivados aquí descritos, el llamado

desmetoxitullidinol⁽⁵²⁾, en el cual el H-6' (que tiene un metoxilo en *para*) aparece a 6.98 ppm.

De esto podemos concluir que el hidrógeno en posición *para* a un grupo metoxilo, aparece a menor campo que el hidrógeno en *para* a un grupo hidroxilo.

Cabe mencionar que los dobletes que aparecen en el espectro de hidrógeno del compuesto **2** a 6.89 y 6.85 ppm, se asignaron al H-5' y H-7' respectivamente al observar los siguientes efectos nOe:

Al irradiar la señal de 6.89 ppm se observó efecto nOe positivo con las señales a 7.32 y 7.37 ppm, asignadas al H-6 y H-6' respectivamente, por lo cual se deduce que el doblete a 6.89 ppm corresponde al H-5' (Figura 29).

Al irradiar el doblete a 6.85 ppm se observó efecto nOe positivo con la señal a 7.37 ppm (H-6') y con la señal del metoxilo a 4.05 ppm, con lo cual se deduce que el doblete irradiado corresponde al H-7' (Figura 29a).

Los efectos nOe y correlaciones HMBC observados en el compuesto **2** se esquematizan en la siguiente figura:

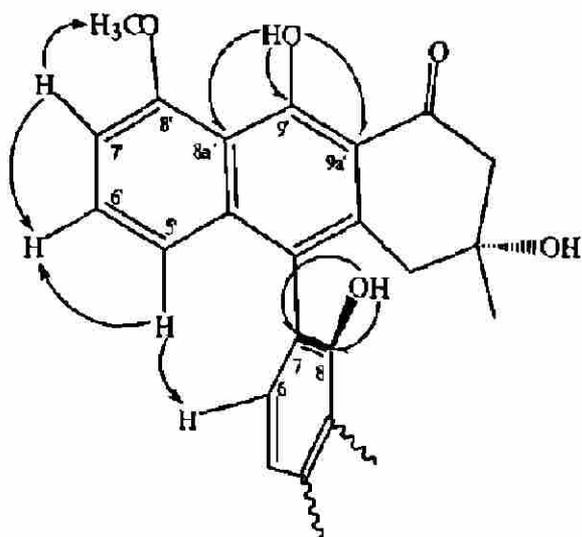


Figura 60

Acoplamiento dipolares (\curvearrowright) y a larga distancia (\longrightarrow) observados en el compuesto 2.

Los espectros de RMN de ^1H (Figura 32 y 40) de los compuestos 3 y 4 presentan sólo una señal de OH fenólico alrededor de 10 ppm y a su

vez aparecen 3 singletes en la zona que corresponde a hidrógenos de metoxilos aromáticos; asimismo el espectro de ^{13}C (Figura 33 y 41) muestra tres señales a un δ en el que aparecen los carbonos de aril alquil éteres, información que corrobora la presencia de tres metoxilos en cada compuesto, tal y como se había establecido por el PM de 556 encontrado en el espectro de masas. La desaparición de las señales de 16 ppm indica la presencia de metoxilos en las posiciones 9 y 9' en los dos compuestos; a su vez las diferencias observadas en la zona de los hidrógenos aromáticos confirmaron que se trataba de dos derivados trimetilados en los cuales el

tercer metoxilo debería estar uno en la posición 8 y en el otro en la posición 8'.

Al tomar en cuenta el desplazamiento a campos bajos para los hidrógenos en *para* respecto a un grupo metoxilo señalado anteriormente, se corroboró la presencia del OCH₃ en posición 9, ya que en el compuesto **3** el H-10 aparece a 7.56 ppm (Figura 32a) y en el compuesto **4** a 7.53 ppm (Figura 40a), δ mayor que el reportado para la Peroxisomicina A1 (Figura 65a).

Además en el compuesto **3** la señal del H-5 (de fácil asignación porque es un doblete muy bien resuelto del resto de las señales aromáticas) también aparece desplazada a δ mayor; si tomamos en cuenta nuestra propuesta (pág 138) esto sugiere que el OH-8 está metoxilado, dejando entonces como única posibilidad para la estructura el hidroxilo fenólico en la posición 8'.

De aquí se desprende que en el compuesto **4**, el tercer OCH₃ debería estar en la posición 8'.

Las observaciones anteriores indican que el compuesto **3** corresponde al derivado trimetoxilado en las posiciones 8, 9 y 9', y el compuesto **4** corresponde al derivado metoxilado en las posiciones 8', 9' y 9.

Para comprobar esto se procedió a analizar el espectro RMN de ¹H

del compuesto **4** (Figura 40a), en el cual se observa lo siguiente:

- La señal del H-5 aunque no muy bien resuelta, no parece estar desplazada respecto de la Peroxisomicina A1.

- En la zona en la que aparece H-5' y H-7' en la Peroxisomicina A1 (6.77 y 6.87 ppm respectivamente) aparecen dos dobletes a 6.85 y 6.95 ppm, desplazados respecto de la Peroxisomicina A1. Sin embargo con este análisis no quedaba claro cual señal correspondía al H-5' y cual al H-7'.

Para conocer este dato fue necesario recurrir a otras técnicas de RMN para asignar las señales de hidrógeno y de carbono en ambos compuestos; se obtuvieron los espectros COSY (Figura 34 y 42), y HMQC (Figura 35 y 43) de ambos derivados para asignar la mayoría de las señales.

Para poder asignar las señales de los carbonos unidos a OH y a OCH₃, por ser cuaternarios, fue necesario recurrir a los espectros de correlación a larga distancia (espectros nOe y HMBC).

Se recurrió además, a un programa de modelaje molecular (Mac Spartan plus) el cual a través de una serie de cálculos semiempíricos (nivel AM1) estableció la geometría óptima de las estructuras propuestas para los compuestos **3** y **4**. De esta forma se llegaron a conocer las distancias internucleares, información que se utilizó para correlacionar los experimentos de RMN que establecen acoplamientos de átomos a través del espacio (efectos nOe) con distancias internucleares menores a 3 Å°.

En el compuesto **3** se logró situar el OH fenólico en la posición 8' como se había predicho, al observar las siguientes correlaciones en el espectro HMBC a 9 Hz (Figura 36):

La señal del OH fenólico que aparece a 10.18 ppm, correlaciona con las señales a 111.03, 116.41 y 156.61 ppm asignadas a C-7', C-8a' y C-8' respectivamente. Por otro lado la señal de hidrógeno a 6.83 ppm (asignada a H-5') correlaciona con las señales a 111.03 y 116.41 ppm asignadas a C-7' y C-8a'; a su vez la señal a 6.89 ppm (H-7') correlaciona con la señal a 116.41 ppm asignada a C-8a', lo cual confirmó las asignaciones previas.

La posición de los metoxilos quedó establecida al observar las siguientes correlaciones (Figura 36a):

La señal a 3.40 ppm con la señal a 155.61 ppm asignada a C-8; la señal a 3.96 ppm con la señal a 159.28 ppm asignada a C-9 y la señal a

4.12 ppm correlaciona con el carbono a 159.24 ppm asignado a C-9'. Con esto se establece que las señales a δ 3.40, 3.96 y 4.12 corresponden a los metoxilos en las posiciones 8, 9 y 9' respectivamente.

Los espectros nOe, corroboraron la información proporcionada por los espectros HMBC, observándose para el compuesto **3** los siguientes efectos: Al irradiar la señal del OH fenólico a 10.18 ppm se observa efecto nOe con las señales a δ 6.89 (H-7') y 4.12 (OCH₃-9') (Figura 37). A su vez la irradiación del OCH₃ a 4.12 ppm, ocasiona efecto nOe positivo con el OH fenólico a δ 10.18 (Figura 37a); y al irradiar el OCH₃

a 3.40 ppm se observa efecto en la señal a δ 6.83 (H-5') (Figura 37b). Los efectos nOe y correlaciones HMBC observados en el compuesto **3** se representan en la siguiente figura:

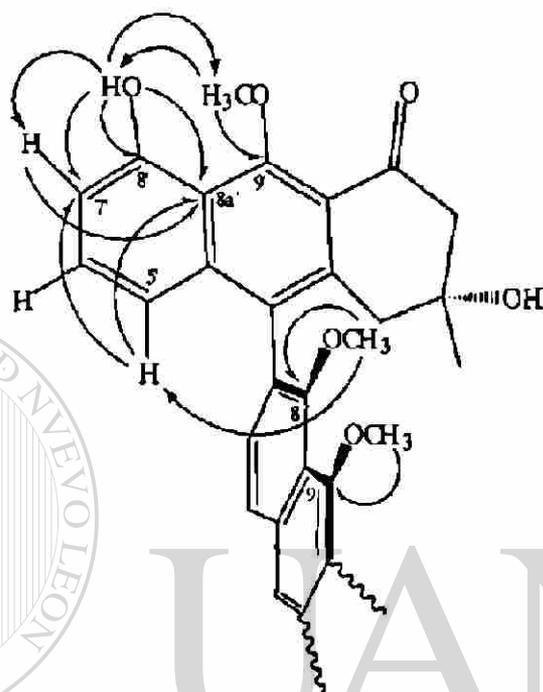


Figura 61

Acoplamiento dipolares (→) y a larga distancia (→) observados en el compuesto **3**.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En el compuesto **4** se asignó el hidroxilo fenólico en la posición 8 al observar correlación de la señal a 10.22 ppm con las señales a 122.18 ppm (C-8a) y 153.08 ppm (C-8) en el espectro HMBC (Figura 44).

De esta forma se confirmó que el OH fenólico está en la posición 8.

Para confirmar las asignaciones de H-5' y H-7' en este compuesto, se

debió recurrir a los espectros nOe diferenciales. Se observaron los siguientes efectos:

Al irradiar la señal a 6.85 ppm asignada al H-7', se observó efecto nOe positivo con la señal a 4.00 ppm (OCH₃-8') (Figura 45).

La cercanía espacial entre el H-7' y el OCH₃-8' se corroboró al irradiar la señal de los metoxilos, lo que ocasionó efecto nOe positivo con la señal a 6.85 ppm, asignada al H-7' (Figura 45a).

A su vez, al irradiar el OH fenólico se observó efecto con el OCH₃ de 4.06 ppm, lo cual establece que el OH fenólico se encuentra en la posición 8 y el OCH₃ en la posición 9 (Figura 45b).

Los efectos nOe y HMBC observados en el compuesto **4** se presentan en la siguiente figura:

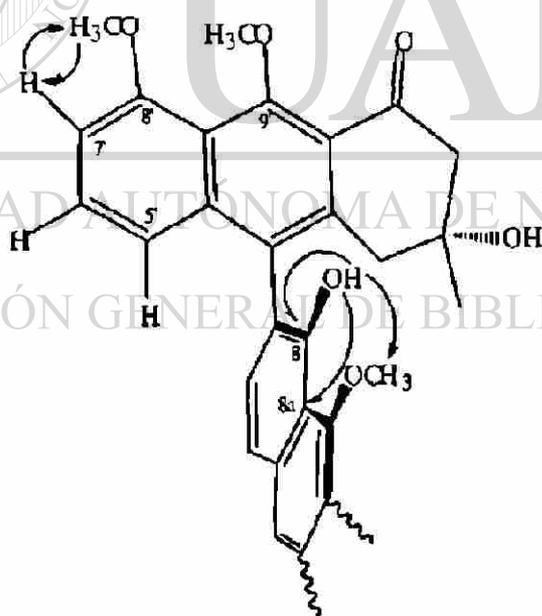


Figura 62

Acoplamiento dipolares (\curvearrowright) y a larga distancia (\longrightarrow) observados en el compuesto **4**.

Los efectos nOe observados en los compuestos 3 y 4 corroboraron la predicción teórica establecida con el programa Mac Spartan plus, ya que los núcleos que presentan efecto nOe positivo son hidrógenos espacialmente cercanos (distancias menores a 3 Å).

4.2 SUSTITUCION ELECTROFILICA AROMATICA

Como primer intento para realizar una sustitución electrofílica en la Peroxisomicina A1, se decidió introducir un átomo pesado en la molécula; este compuesto podría servir en un futuro para establecer la estereoquímica absoluta de la Peroxisomicina A1, a través del análisis de difracción de rayos X del derivado sintetizado. Para esto, se seleccionó la reacción de bromación. Existen reportes en la literatura donde se señala que fenoles como los presentes en la Peroxisomicina A1 son susceptibles a esta reacción al utilizar agua de bromo a temperatura ambiente, no es necesario utilizar catalizadores, ya que los anillos aromáticos se activan por los grupos dadores de electrones, los cuales estabilizan al intermediario de carga positiva formado durante esta reacción⁽⁵³⁾.

Los intentos por obtener un derivado de este tipo fracasaron, aún y cuando se intentaron diferentes procedimientos de bromación como el bromo en CS₂⁽⁵⁴⁾ y bromo en CH₂Cl₂⁽⁵⁵⁾. La fusión con sodio de los productos obtenidos en estas reacciones dió positiva la prueba cualitativa

para halógenos (fuschina básica en etanol), lo cual indicaba que la bromación se había llevado a cabo; sin embargo, las pruebas cualitativas para detección de antraquinonas, productos de degradación de la Peroxisomicina A1, también fueron positivas. Lo anterior señalaba la formación de antraquinonas, las cuales posteriormente se bromaron.

Como segunda opción, se intentó introducir cloro en la molécula de la Peroxisomicina A1, se utilizó para ello N-cloro-succinimida⁽⁵⁶⁾, a -5 °C, reacción a partir de la cual se obtuvo el compuesto 5, aún y cuando también se formaron algunos productos de degradación.

4.2.1 Elucidación de la estructura del compuesto 5.

Al tomar como referencia el espectro de RMN de ^1H de la Peroxisomicina A1 y considerando el tipo de modificación realizada, se esperaba que en el espectro de RMN de ^1H del derivado, se presentaran cambios en la región en la que aparecen los protones aromáticos.

El cálculo de densidad electrónica en la Peroxisomicina A1 con la representación gráfica del orbital HOMO (orbital molecular ocupado de mayor energía), mostró que las zonas con mayor densidad electrónica son las posiciones 5' y 7', por lo tanto, las más susceptibles a sufrir un ataque electrofílico. Lo anterior sugería la desaparición de las señales de

hidrógeno en esas posiciones o bien la desaparición de sólo una de ellas.

Al analizar el espectro de RMN de ^1H (Figura 47) del compuesto **5**, se observa en la zona alifática las señales características que aparecen en la Peroxisomicina A1, así como las señales de los cuatro hidroxilos fenólicos de este compuesto. En la región aromática se observa la desaparición del doblete que corresponde al H-7'; a su vez apareció un doblete a 7.40 ppm, asignado al H-6'. La multiplicidad del H-6' indicó el acoplamiento con un sólo hidrógeno, en este caso con el H-5', lo cual corrobora la sustitución del H- 7' por el cloro (Figura 47a).

Se realizó el espectro COSY, (Figura 49) en el cual se observa el acoplamiento entre H-5' y H-6', corroborando de esta forma la estructura propuesta (Figura 50).

Cabe mencionar que si bien el programa Mac Spartan plus se basa en predicciones teóricas, en este caso se correlacionó estrechamente con los resultados obtenidos en forma experimental.

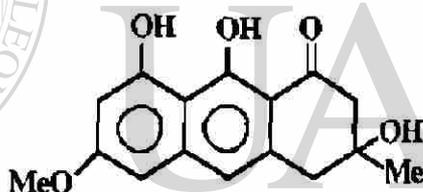
4.3 BLOQUEO DEL GRUPO CARBONILO

Para bloquear el grupo carbonilo en la Peroxisomicina A1, se

probaron reacciones de adición y reducción.

Con la adición se intentó sintetizar una oxima, al utilizar $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ y $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ ⁽⁵⁷⁾; la reducción se probó con NaBH_4 y LiBH_4 ⁽⁵⁸⁾ para sintetizar los alcoholes correspondientes. Sin embargo, aún y cuando se variaron las condiciones de reacción en ambos procedimientos, no se observó alguna evidencia de reacción aparente.

Melvyn Gill y cols.⁽⁴⁵⁾ describen un comportamiento similar al intentar reducir el grupo carbonilo en la torosacrisona, compuesto estructuralmente relacionado con la Peroxisomicina A1:



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 63
Estructura química de la Torosacrisona.

La finalidad de los autores fue establecer la estereoquímica absoluta del centro quiral de la torosacrisona, mediante la degradación química de ese compuesto, proponiendo como primer paso la reducción del grupo carbonilo. En los hallazgos descritos por los autores se señala el comportamiento inerte del grupo carbonilo, ya que reportan resultados

infructuosos en la reducción de este grupo funcional. Describen además, que la metilación de los hidroxilos fenólicos en la torosacrisona le confiere estabilidad a la molécula y a partir del producto de esta reacción logran la reducción del grupo carbonilo, utilizando LiBH_4 .

Por lo anterior, se decidió seguir la misma estrategia para reducir el carbonilo en la Peroxisomicina A1, es decir, primero se metilaron las posiciones 9 y 9' (compuesto 1 sintetizado en esta tesis) y posteriormente se redujo el grupo carbonilo de este compuesto. La reducción se realizó con NaBH_4 y LiBH_4 ; se obtuvieron resultados satisfactorios y similares con ambos procedimientos.

La explicación de la inercia del grupo carbonilo podría atribuirse a la cercanía espacial entre este grupo y el hidroxilo fenólico, lo que provoca

la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares, comprometiendo de esta forma al carbonilo; al bloquear los hidroxilos fenólicos mediante la formación de éteres, se rompen los puentes de hidrógeno dejando al carbonilo libre para reaccionar.

4.3.1 Elucidación de la estructura del compuesto 6.

En el espectro IR (Figura 51), se observa la desaparición de la banda del estiramiento del carbonilo del compuesto 1, la cual aparece a 1675

cm^{-1} , con lo cual se demuestra la reducción de este grupo funcional.

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 53), desaparecen las señales a 195.56 y 196.25 ppm, las cuales corresponden a los carbonilos del compuesto de referencia; a su vez aparecen dos señales a 63.59 y 63.87 ppm, las cuales corresponden a metinos, según se observa en el espectro DEPT 135 (Figura 54).

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 52 y 52a) aparecen dos singuletes ensanchados a 5.36 y 5.44 ppm, señales que integran para un hidrógeno cada una; el espectro HMQC (Figura 56) muestra la correlación de estos hidrógenos con los carbonos metínicos a 63.87 y 63.59 ppm.

El espectro COSY (Figura 55) muestra la correlación entre los hidrógenos a 5.36 y 5.44 ppm, con un multiplete en donde se encuentran señales de H-2 y H-2'.

La información anterior confirma la reducción de los dos carbonilos de la molécula, y por consiguiente, la formación de los alcoholes secundarios; de esta forma se establecía la estructura planar del compuesto 6.

Sin embargo, para establecer la estereoquímica de los dos nuevos

centros quirales en la molécula (posiciones 1 y 1'), fue necesario recurrir a los experimentos nOe diferenciales. Simultáneamente se utilizó el programa Mac Spartan plus, para optimizar la geometría de los posibles isómeros de este compuesto y calcular distancias internucleares (nivel AM1).

De esta forma teníamos 4 posibles estereoisómeros:

1'R3'R, 1R3R

1'R3'R, 1S3R

1'S3'R, 1S3R

1'S3'R, 1R3R

A su vez en cada uno de ellos el metilo podía estar en posición axial o ecuatorial, dando lugar a distintas conformaciones del anillo.

Para descartar algunas de las posibles estructuras se recurrió a las constantes de partición observadas en el compuesto **6** entre los H-2' y H-1' y entre H-2 y H-1; en ambos casos el valor de J fue menor a 5 Hz (Figura 52a).

De acuerdo a la ecuación de Karplus se calculó la J a partir del ángulo dihedro formado por H1'-C1'-C2'-H2' de cada geometría optimizada en los posibles estereoisómeros; asimismo se calcularon las distancias internucleares entre CH₃-3' con H-2' y H-4', así como CH₃-3 con H-2 y H-4.

Con el análisis de los cálculos anteriores se propone que la estereoquímica del compuesto **6** corresponde al isómero 1'R3'R, 1R3R (CH₃-3' y CH₃-3 ecuatorial), ya que esta estructura concuerda con los efectos nOe observados:

Al irradiar el doblete a δ 3.05 el cual corresponde a uno de los H-4 se observó entre otros, efecto nOe con la señal de H-2 a 2.05 ppm (Figura 57). En la estructura optimizada del isómero 1'R3'R, 1R3R, H-4 ax y H-2 ax están a menos de 3 Å entre sí, por lo anterior se pudo deducir que la señal a 3.05 ppm corresponde al H-4 ax y la señal a 2.05 ppm al H-2 ax.

Al irradiar la señal a 3.20 ppm (H-4 ec), no se observó efecto sobre la señal de H-2 lo cual corrobora los resultados anteriores (Figura 57a).

Por otro lado, por irradiación de la señal a 1.3 ppm (CH₃-3'), se observó efecto con las señales de H-2' (ax y ec), y con el singulete de H-4' a 2.76 ppm (Figura 57b). Asimismo al irradiar la señal a 1.5 ppm (CH₃-3), se observó efecto nOe positivo con H-2 (ax y ec) y con H-4 (ax y ec) (Figura 57c). Esto confirma la posición ecuatorial tanto del CH₃-3' como del CH₃-3.

Los efectos nOe observados en el compuesto **6** se muestran en la siguiente figura:

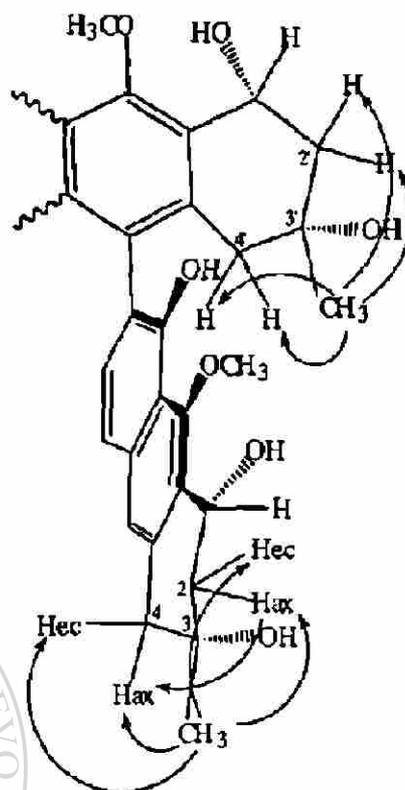


Figura 64
Acoplamientos a larga distancia observados en el compuesto 6.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

4.4 VALORACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Para comprobar si la modificación química de la Peroxisomicina A1 provoca cambios importantes en su acción biológica, hipótesis planteada en este trabajo, se valoró en ensayos *in vitro* la acción de los compuestos 1 al 6 sobre la actividad de la catalasa y sobre dos líneas celulares humanas; se compararon los resultados obtenidos con el efecto que provoca la

Peroxisomicina A1 en los mismos ensayos.

La actividad catalítica de una enzima puede ser afectada por acción de un determinado compuesto, ya sea por inhibición o activación; por lo cual, para ubicar el tipo de efecto que produciría cada derivado de la Peroxisomicina A1 sobre la actividad de la catalasa, se probó inicialmente la concentración de 3.9 μM , con la cual la Peroxisomicina A1 produce el 50 % de inhibición⁽²⁴⁾. A esta concentración prácticamente ninguno de los compuestos obtenidos modifican la actividad de la enzima.

Por lo anterior, cada compuesto se valoró a concentraciones mayores de 3.9 μM . La Tabla 13 muestra el grado de inhibición a la concentración máxima que se pudo utilizar para cada compuesto. A concentraciones mayores de las reportadas, los cambios observados en la absorbancia son atribuidos a la interacción entre los compuestos y el H_2O_2 ; lo anterior fue demostrado al observar interferencias en las lecturas al leer un blanco sin catalasa a esas concentraciones.

Con el fin de comparar el efecto que produce la Peroxisomicina A1 y los derivados sobre la catalasa, y al considerar el bajo poder inhibitorio que producen estos últimos, se determinó la CI_{10} de cada compuesto. Para esto se graficó el logaritmo de la actividad de la catalasa versus las concentraciones de cada compuesto. Se obtuvo la curva de regresión; a partir de la ecuación de la recta, y se calculó la CI_{10} de cada compuesto (Tabla 14).

La CI_{10} para los compuestos **1** y **2** (dimetilados) prácticamente es la misma; lo mismo sucede entre los compuestos **3** y **4** (trimetilados), lo anterior sugiere que el grado de inhibición de la enzima pudiera estar relacionado con la cantidad de metoxilos que posee la molécula. Además, los compuestos anteriores resultaron los menos activos; lo cual indica que los hidroxilos fenólicos en la Peroxisomicina A1 deben permanecer en la molécula, para que se conserve el poder inhibitorio sobre la enzima.

El poder inhibitorio de los compuestos **5** (CI_{10} : 7.04) y **6** (CI_{10} : 8.36) prácticamente es el mismo; no obstante, aunque estos compuestos resultaron los más activos, su poder inhibitorio es muy bajo, comparado con el efecto inhibitorio que la Peroxisomicina A1 produce en la catalasa.

Por otro lado, para valorar la actividad citotóxica de cada derivado, se analizó el efecto *in vitro* de los compuestos **1** al **6** sobre células

humanas de origen hepático tanto benignas como malignas, y se comparó con el efecto que la Peroxisomicina A1 produce en las mismas líneas celulares. Si bien se han utilizado diversas líneas celulares para demostrar la toxicidad selectiva de la Peroxisomicina A1⁽¹⁹⁾, se seleccionaron células humanas de origen hepático, por ser el hígado uno de los órganos blanco de este compuesto en ensayos *in vivo*⁽¹⁷⁾.

Como células benignas se utilizaron las células de hígado de Chang y como células neoplásicas las de Hepatoma G2, ya que son las líneas celulares que se utilizan en el control de calidad de la Peroxisomicina A1,

para evaluar la pureza biológica de este compuesto.

Cada compuesto se valoró a 12 concentraciones diferentes (0.078 $\mu\text{g/mL}$ a 160 $\mu\text{g/mL}$) en las líneas celulares antes mencionadas, utilizando 3 celdillas para cada concentración. Asimismo, se utilizó Peroxisomicina A1 como control positivo y se probaron controles carentes de las sustancias a evaluar, en las cuales sólo se adicionó el solvente (etanol); ambos controles se evaluaron a las mismas concentraciones que los compuestos. Este procedimiento se realizó en 3 ocasiones diferentes, en experimentos separados.

Después de 72 hrs de incubación, se evaluó la citotoxicidad potencial de los derivados de la Peroxisomicina A1. El criterio de citotoxicidad evaluado fue la adhesión celular a la placa de 96 celdillas; las celdillas donde todas las células estaban desprendidas, fueron consideradas como celdillas con concentración citotóxica total (CT_{100}), y las celdillas con adhesión celular igual a las células de las celdillas control, fueron consideradas como celdillas con concentración no citotóxica (CT_0). La concentración citotóxica 50% (CT_{50}) fue calculada como el promedio geométrico entre la CT_{100} (la cual dió el efecto máximo), y la CT_0 (la cual no produjo daño celular) de acuerdo a el criterio de Ekwall⁽⁴³⁾.

Se evaluó la selectividad de cada derivado, al comparar la concentración citotóxica 50% de ellos, con la CT_{50} encontrada para la Peroxisomicina A1 en ambas líneas celulares.

Con los resultados que se observan en la Tabla 15 se comprueba que los 4 derivados producto del bloqueo de los hidroxilos fenólicos en la Peroxisomicina A1 (compuestos 1, 2, 3 y 4), así como el compuesto 6, producto de la reducción del carbonilo, si bien son citotóxicos, no presentan toxicidad selectiva, ya que la respuesta tóxica de estos compuestos es prácticamente idéntica para las células de origen benigno y las de origen maligno.

El compuesto 5 es el único derivado que presenta diferencia en la respuesta tóxica en ambas líneas celulares, y de acuerdo con los valores de CT_{50} observados, se puede considerar que presenta selectividad semejante a la Peroxisomicina A1, en las líneas celulares probadas.

En base a los hallazgos antes mencionados se concluye que la modificación química de los hidroxilos fenólicos y del grupo carbonilo en la Peroxisomicina A1, ocasiona pérdida de la actividad biológica de este compuesto; lo cual sugiere que estos grupos funcionales están estrechamente ligados en la interacción Peroxisomicina A1-Receptor celular. Asimismo, al observar que el compuesto 5 exhibe selectividad semejante a la Peroxisomicina A1 en las líneas celulares estudiadas, sugiere que el H-7', no está involucrado en dicha interacción.

Lo anterior plantea la posibilidad de obtener nuevos derivados, productos de la sustitución electrofílica del H-7', los cuales ayuden a conocer las bases moleculares del mecanismo de acción de la

Peroxisomicina A1, hasta la fecha desconocido.

La relación estructura-actividad de la Peroxisomicina A1, objetivo general del presente trabajo, se esquematiza en la siguiente figura:

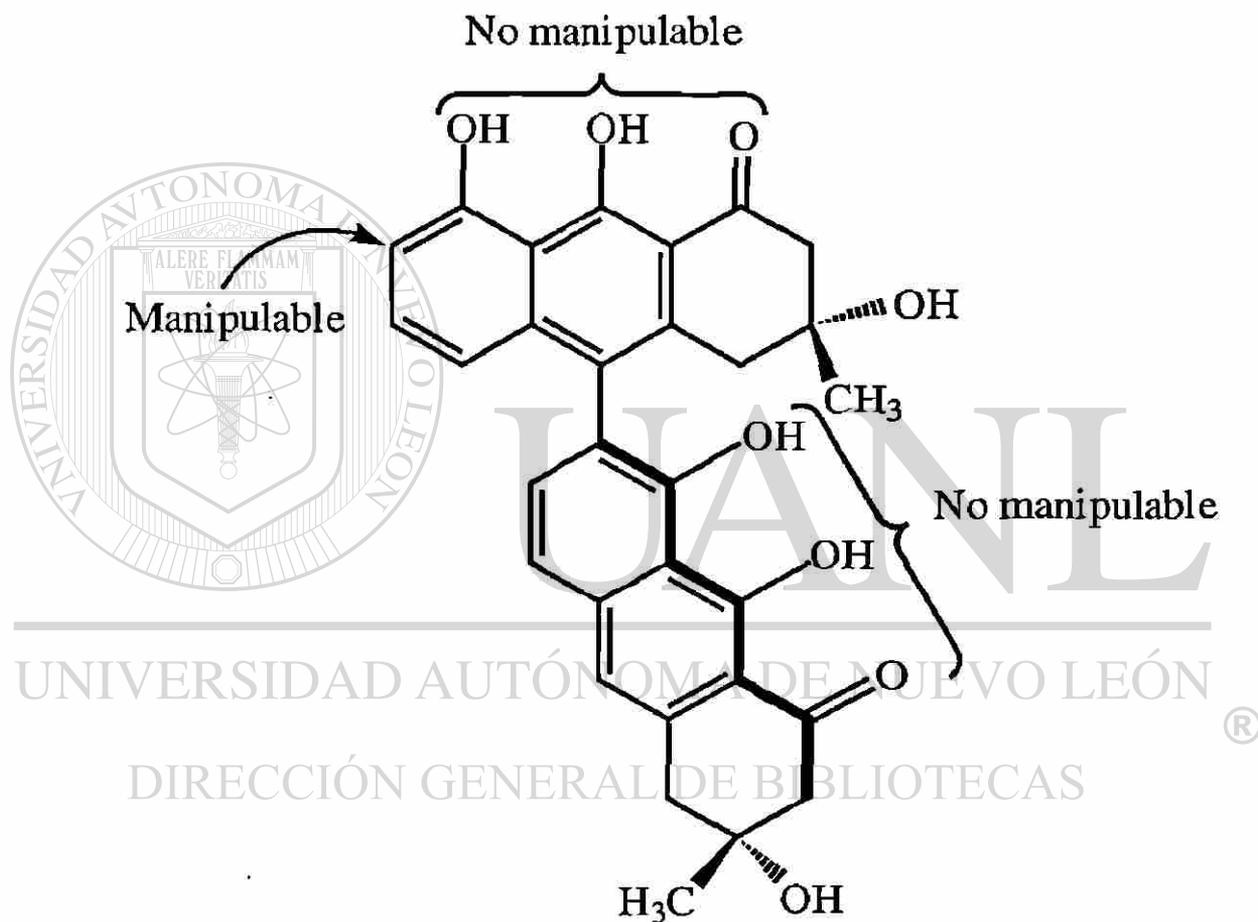


Figura 65

Relación estructura-actividad en la Peroxisomicina A1

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

- Se rechaza la hipótesis planteada en este trabajo:

“La modificación estructural de la Peroxisomicina A1 provoca cambios importantes en su función biológica”.

Esto debido a que uno de los derivados obtenidos demostró (en las líneas celulares probadas) citotoxicidad selectiva semejante a la observada en la Peroxisomicina A1.

- Se obtuvieron 6 productos nuevos no reportados previamente en la

literatura:

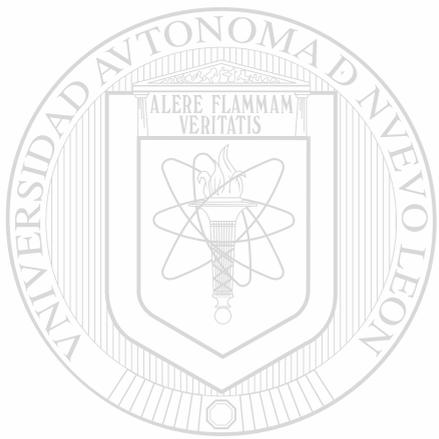
- Cuatro éteres metílicos, productos de la sustitución en los hidroxilos fenólicos (compuestos **1**, **2**, **3** y **4**).
- Un derivado clorado, producto de la sustitución electrofílica aromática (compuesto **5**).
- Un derivado metilado y reducido, producto de la reducción en el grupo carbonilo (compuesto **6**).

- Los métodos semiempíricos de cálculo (Mac Spartan plus), resultaron ser una herramienta muy útil para predecir el producto mayoritario en ciertas reacciones, así como para planear la estrategia a seguir en los experimentos de RMN como son los nOe diferenciales.
- Tanto los cuatro productos de sustitución en los hidroxilos fenólicos como el de reducción en el grupo carbonilo, no mostraron selectividad en las líneas celulares probadas, y prácticamente no inhibieron la actividad de la catalasa.
- El derivado obtenido en la sustitución electrofílica aromática, mostró menor poder inhibitorio que la Peroxisomicina A1 en la actividad de la catalasa, pero presentó selectividad semejante a la Peroxisomicina A1 en las líneas celulares probadas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



APENDICE 1

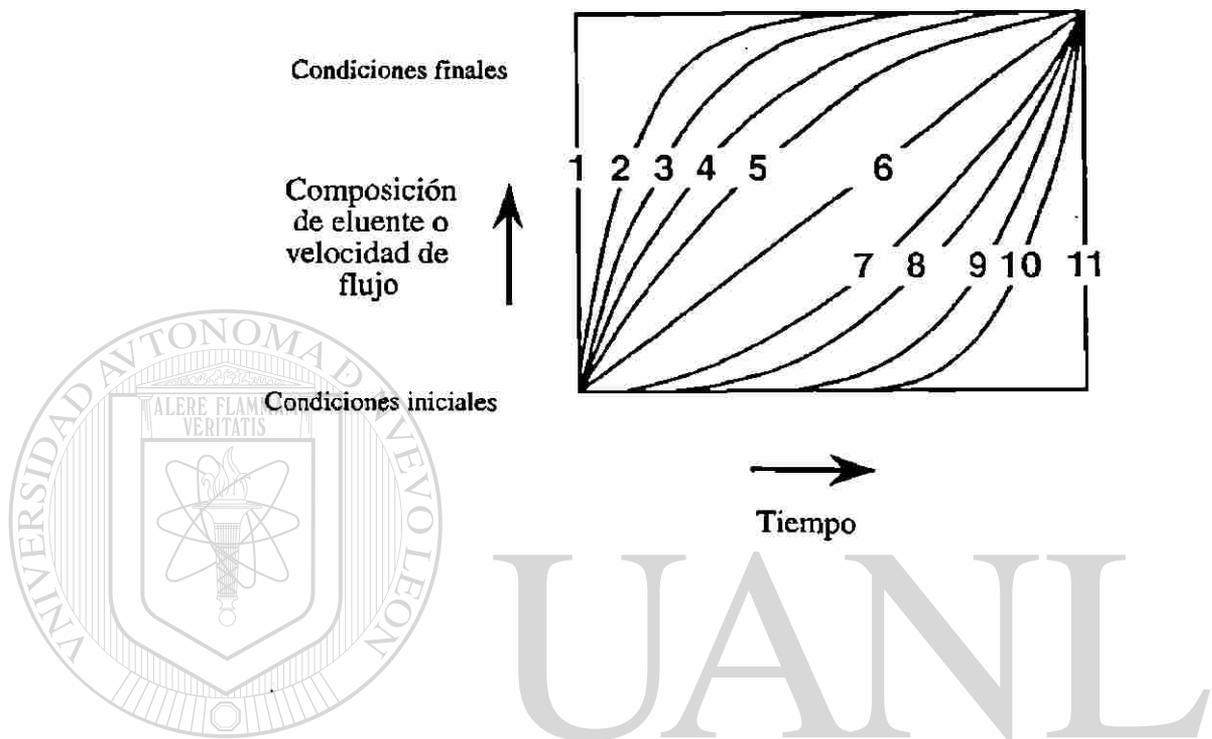
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



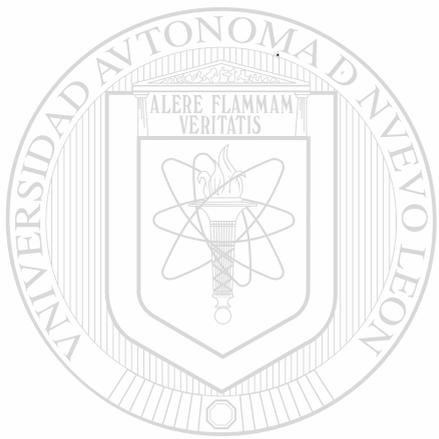
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PERFILES DE CURVA DE GRADIENTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Número de curva	Efecto
1	Inmediatamente toma las condiciones especificadas.
2 a 5	Curva de gradiente convexa.
6	Curva de gradiente lineal.
7 a 10	Curva de gradiente cóncava.
11	Mantiene las condiciones iniciales hasta la siguiente etapa.



APENDICE 2

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

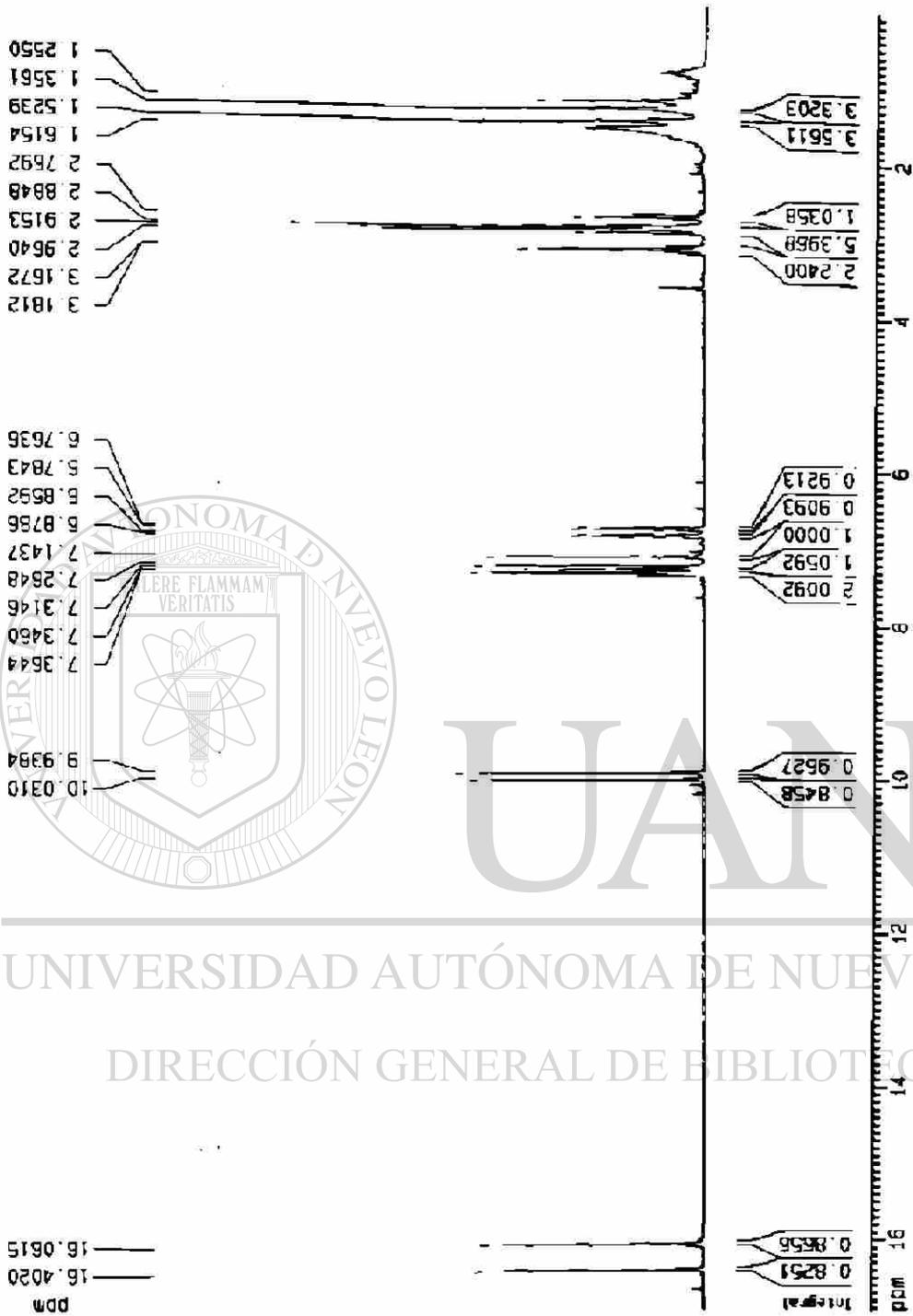


Figura 66. Espectro de RMN de ¹H de la Peroxisomicina A1.

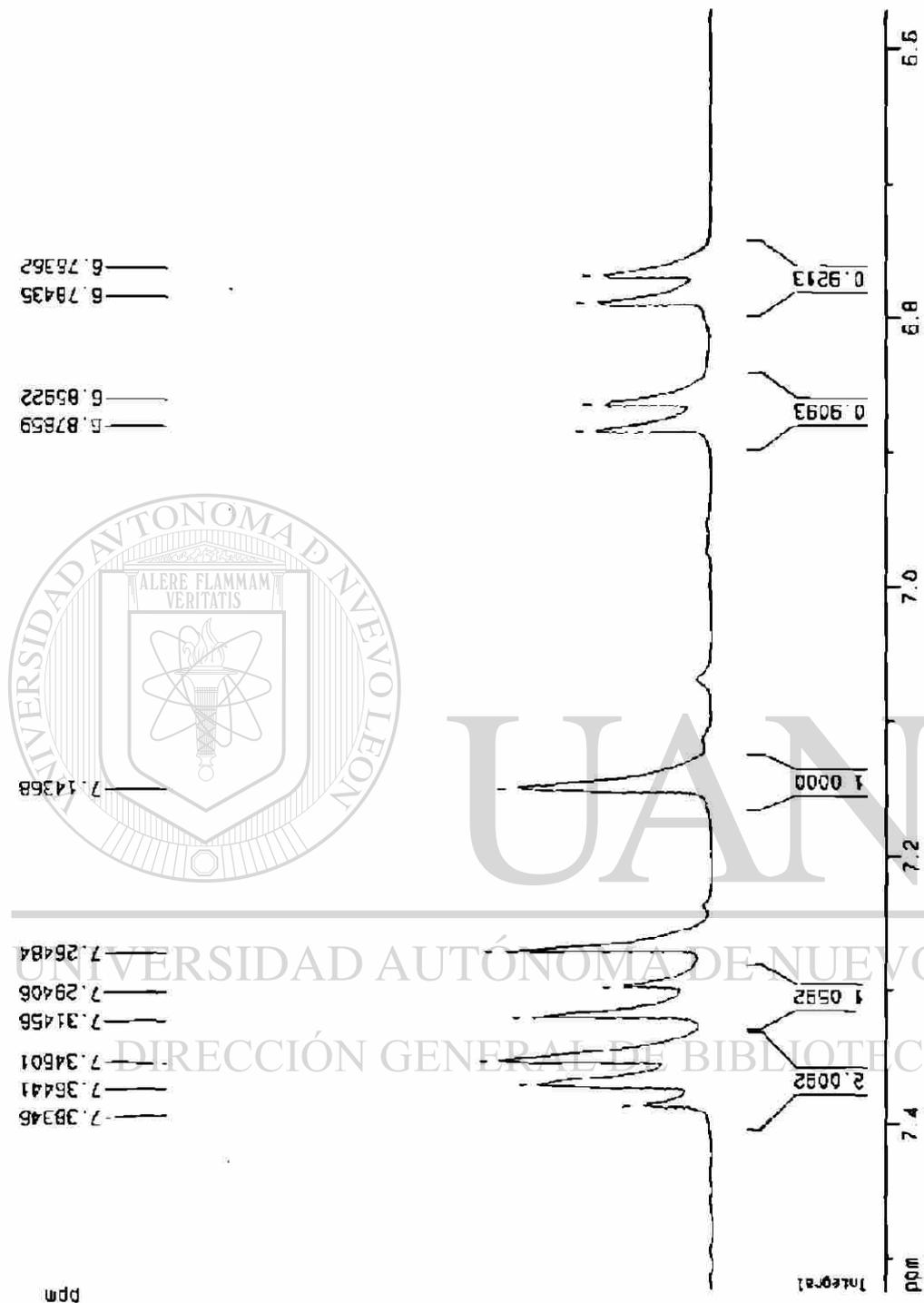


Figura 66a. Espectro de RMN de ¹H de la Peroxisomicina A1. (ampliación de la región aromática).

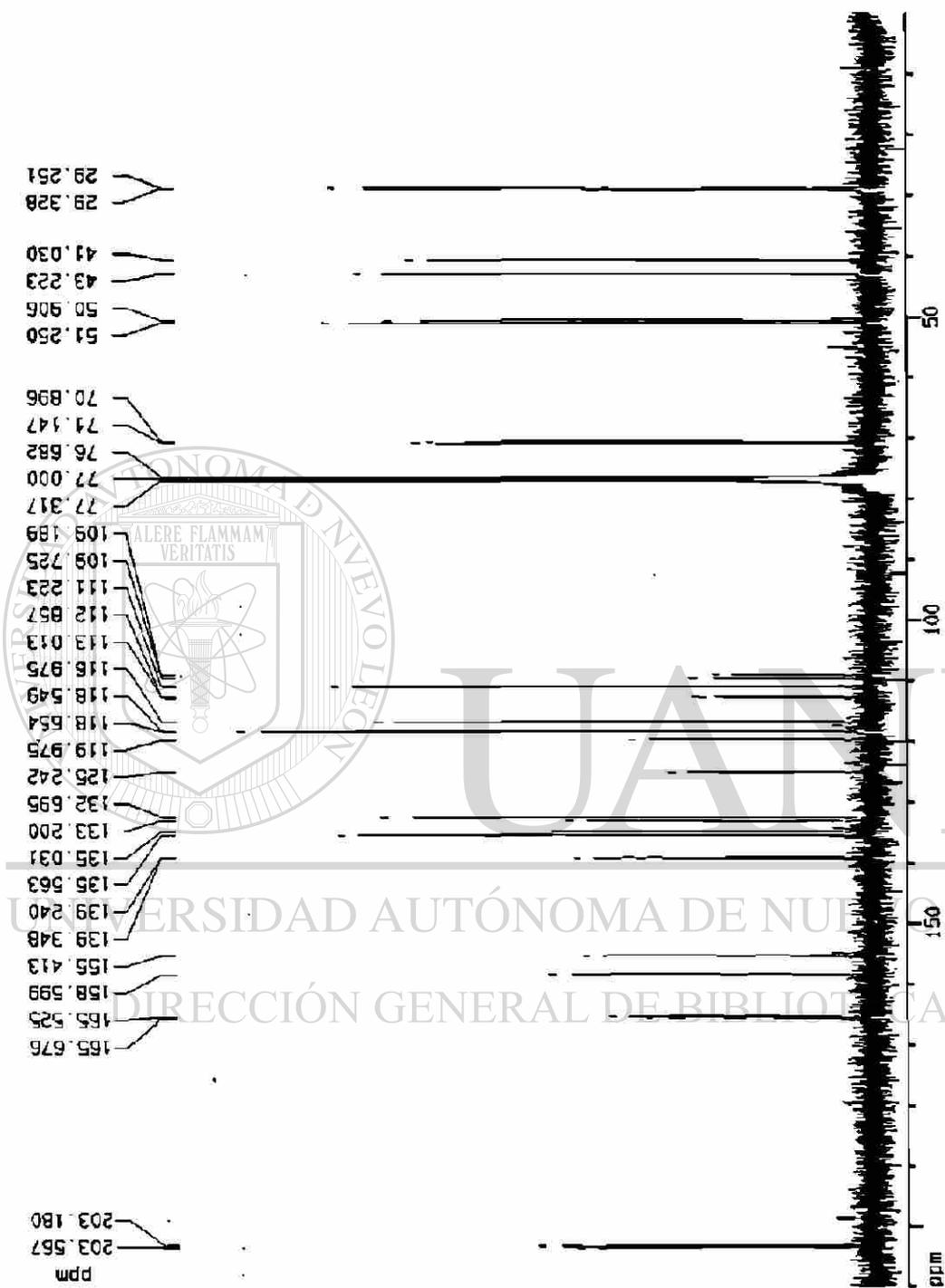


Figura 67. Espectro de RMN de ^{13}C de la Peroxisomicina A1.

REFERENCIAS

- 1- Cáncer como la segunda causa de muerte en E.U.A. y N.L. Boletín Médico, S.S.A. (1997).
- 2- Goodman Guilman, Alfred. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Mc Graw-Hill. Interamericana, 2, pp 1301-1359 (1996).
- 3- Rowinsky, E.K., Gilbert, M., Mcguire, W.P., Noe, D.A., Grochow, L.B., Forastiere, A.A., Ettinger, D.S., Lubejko, B.G., Clark, B., Sartorius, S.E., Cornblath, D.R., Hendricks, C.B. and Donehower, R.C. Sequences of taxol and cisplatin: phase I and pharmacologic study. *J.Clin. Oncol.*, 9, pp 1672-1703 (1991).
- 4- Standley, P. C. Rhamnaceae in trees and shrubs of México. *Contr. U.S. Nat. Her.*, 23, pp 715 (1923).
- 5- Fernández Nava, R. Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (Rhamnaceae) en México. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser. Bot.*, 63, pp 1-23 (1992).
- 6- Castillo Nájera, F. Contribución al estudio de la parálisis tóxica. Un envenenamiento colectivo con *Tullidora*. *Memorias del V Congreso Médico Mexicano, Dirección de Talleres Gráficos*, 1, pp 240 (1920).
- 7- Padron Puyou, F., Estudio clínico experimental de la parálisis por *Karwinskia humboldtiana*. (*tullidora*) en niños. *Gaceta Médica de México*, 81, pp 299-310 (1951).

- 8- Del Pozo, E. Los efectos paralizantes de la Tullidora. Estudios clínicos y experimentales. *Gaceta Médica de México*, 95, pp 179 (1965).
- 9- Escobar, A., Nieto, D. Aspectos neuropatológicos de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio Experimental. *Gaceta Médica de México*, 95, pp 163 (1965).
- 10- Charlton, K. and Pierce, K. A neuropathy in goats caused by experimental coyotillo (*K. humboldtiana*) poisoning (III). *Phathology Veterinary*, 7 pp 408 (1970).
- 11- Bustamante Sarabia, J., Olvera Rabiela, J. y Nieto Cañedo, L. Intoxicación fatal por tullidora (*Karwinskia humboldtiana*), comunicación de un caso. *Gaceta méd. México*, 114, pp 241 (1978).
- 12- Dreyer, D., Arai, I., Bashman, C., Anderson, W., Smith, R. and Daves, D. Toxins causing non inflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation. *J. Am. Chem. Soc.*, 97, pp 4985 (1975).
- 13- Guerrero, M., Piñeyro, A. and Waksman, N. Extraction and quantification of toxins from *Karwinskia humboldtiana* (tullidora). *Toxicon*, 25, pp 565-568 (1987).
- 14- Waksman, N., Torres, R., Salazar, M. L., Cenicerros, L. y Piñeyro, A., Peroxisomicina: un producto de interés farmacológico. Avances en los métodos de producción. XIX Simposium de Química de Productos Naturales. ITESM, Abril (1992).

- 15- Rodríguez de Barbarín Cecilia, Bailey Neil A, Ramírez-Durón Rosalba, Martínez-Villarreal Laura, Piñeyro-López Alfredo and Waksman Noemí. Análisis estereoquímico de dos hidroxiantracenas diméricas. *Revista Ciencia U.A.N.L.*, En Prensa.
- 16- MacSpartan Plus., Wavefunction, Inc.(1996).
- 17- Bermúdez, M.V., González Spencer, D., Guerrero, M., Waksman, N. and Piñeyro, A., Experimental intoxication with fruit and purified toxins of Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). *Toxicon*, 24, pp 1091 (1986).
- 18- Piñeyro López, Alfredo. Toxicidad selectiva *in vitro* de la toxina T 514 de la *Karwinskia humboldtiana* . Tesis Doctoral. Facultad de Medicina UANL, Monterrey N.L., (1990).
- 19- Piñeyro, A., Mtz de Villarreal, L. and González, R. *in vitro* selective toxicity of toxin T514 from *K. humboldtiana* (Buckthorn) plant on various human tumor cell lines. *Toxicology*, 92, pp 217-227 (1994).
- 20- Piñeyro-López, A., Pharmazeutisch brauchbare Naphthalin und Anthracenderivate Pharmaceutically applicable naphthaline and anthracene dervatives. Derivés de naphthaline et d'anthracene utiles comme medicamenta Europäisches Patenblatt, 48/1995, 29.11.(1995).
- 21- Garza Ocañas, L., Torres Alanis, O., Piñeyro-López, A. Effect of toxin 514 of *Karwinskia humboldtiana* on liver microsomal lipid peroxidation stimulated by Fe⁺²-ADP complexes and NADPH *in vitro*. *European Journal of Pharmacology*, 183, pp 1550-1551 (1990).

- 22- Sepúlveda, J., Van der Klei, I., Keizer, I., Piñeyro, A., Harder, W. and Veenuis. Studies on the effect of toxin T514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *M. FEMS Microbiology Letters*, 91, pp 207-212 (1992).
- 23- Gill, M., Steglich, W. Pigments of fungi. *Prog.Chem Org. Nat. Prod.*, pp 151-163 (1987).
- 24- Moreno, M., Vargas, R., Esquivel, D., Waksman, N., Piñeyro, A., Effect of peroxisomicine and related anthracenones on catalase activity. *Planta Médica*, 61, pp 337-340 (1995).
- 25- Moreno-Sepúlveda, M., Vargas-Zapata, R., Ballesteros-Elizondo, R., Piñeyro-López, A. and Sepúlveda-Saavedra, J. Studies on the effect of peroxisomicine on catalase activity in albino mice. *Toxicol*, 35, pp 777-783 (1997).
- 26- Greenstein, J.P. Biochemistry of Cancer. *Academic Press*, New York. (1947).
-
- 27- Kampschmidt, R.F. Mechanism of liver catalase depression in tumor-bearing animals. A review. *Cancer Res.*, 25, pp 34-45 (1965).
- 28- Ohnuma, T., Maldia, G., and Holland, J. F. Hepatic catalase activity in advanced human cancer. *Cancer Res.*, 26, pp 1806-1818 (1991).
- 29- Yasmineh Walid G., Parkin Janet L., Caspers Janelle I. and Theologides Athanasios. Tumor necrosis factor/cachectin decreases catalase activity of rat liver. *Cancer Research*, 51, pp 3990-3995 (1991).

- 30- Waksman, N., Martínez, L. y Fernández, R., Screening químico y toxicológico de otras especies del género *Karwinskia*. *Rev. Latinoam. Quím.*, 20, pp 27 (1989).
- 31- Waksman, N. y Ramírez, R. Isolation of a new dymeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*. *Rev. Latinoam. Quím.*, 23 and 22, pp 25-27 (1992).
- 32- Rivas G., Verónica, Estudio químico de los extractos semipolares de frutos de *K. parvifolia* y *K. johnstonii*. Tesis de Maestría. Fac. de Medicina, UANL, Monterrey N.L., (1995).
- 33- Martínez, J. Francisco., Ramírez, Durón, Rosalba., Waksman de Torres, Noemí and Piñeyro-López, Alfredo. Experimental evidence for toxic damage induced by a dymeric anthracenone: diast T-514 (peroxisomicine A2). *Toxicology Letters*, 90, pp 155-162 (1997).
- 34- Garza Ocañas Lourdes, Dra. Comunicación personal.
-
- 35- Rivas, V., Torres, Rosario and Waksman. Dymeric anthracenones from *Karwinskia* species. *Planta Médica*, 56, pp 562 (1990).
- 36- Takahashi, S., Kitanaka, S., Takido, M., Sankawa, U. and Shubata, S., Phlegmacins and anhydrophlegmacinquinones: Dymeric hydroanthracenes from seedlings of *Cassia torosa*. *Phytochemistry*, 16, pp 999-1002 (1980).
- 37- Endo M. Y Naoki H. Antimicrobial and antispasmodic tetrahydroanthracenes from *Cassia singueana*. *Tetrahedron*, 36, pp 2449-2452 (1980).

- 38- Steglich W., Töpfer-Petersen, E.Z. *Nat. Forsch.*, 27b, pp 1286-1287 (1992).
- 39- William Lown, J. Anthracycline and anthracenedione-based anticancer agents. Edited by J. William Lown, Amsterdam. *Elsevier* (1988).
- 40- Mitscher Lester, A. The chemistry of the tetracycline antibiotics. New York, Marcel Dekker. *Medicinal Research Series*, No 9 (1978).
- 41- Martínez Laura. Estudio de las propiedades fisicoquímicas de toxinas aisladas de *Karwinskia humboldtiana*. Tesis de maestría, UANL (1990).
- 42- Lickiss, J.N., Cane, K.A. Baikie, A.G. In vitro Drug selection in antineoplastic chemotherapy. *Europ. J. Cancer*, 10, pp 809-814 (1974).
-
- 43- Ekwall, B. and Johanson, A. Preliminary studies on the validity of *in vitro* measurement of drug toxicity using hela cells. I. Comparative *in vitro* cytotoxicity of 27 drugs. *Toxicology Letters*, 5, pp 199-210 (1980).
- 44- Melvyn Gill, A.G., Akhil G. Jhingran and Anna R. Palfreyman. A Degradative Method for the Determination of central chirality in natural occurring 3-Hidroxy-3-methyl-3,4-dihidroanthracen-1(2H)ones. *Tetrahedron Letters*, 31, pp 1203-1206 (1990).
- 45- Melvyn Gill, A.G., Akhil G. Jhingran and Anna R. Palfreyman. Pigments of Fungi, Part 19. A Degradative method for the

determination of central chirality in natural occurring 3-Hidroxy-3-methyl-3-4 dihydroanthracen-1(2H)ones. Application to pigments of the flavomannin type. *Tetrahedron Letters*, **1**, pp 621-634 (1990).

46- Howard Black, T. The preparation and reactions of diazomethane. *Aldrich Chemical Acta*, **16**, (1983).

47- Diazald, MNNG and Diazomethane Generators. Technical Information Bulletin, Number AL-180.

48- Domínguez A. Xorge, Rombold Carlos, Verde Star Julia, Achenbach Hans and Grob Johann. Hermosillo, an 8,3-neolignan from *Kramelia sonorae*. *Phytochemistry*, **26**, pp 1821-1823 (1987).

49- Furniss, Hannaford, Rogers, Smith and Tatchel. Vogel's. Benzoylation of phenols. Textbook of practical organic chemistry, pp 1103 Fourth Edition (1987).

50- Dutton, G. J. Uridine diphosphate glucuronic acid as glucuronyl donor in the synthesis of ester, aliphatic and steroid glucuronides. *Biochem.*, **64**, pp 693-701 (1956).

51- Lucier, George W., Sonawane, B. R. and McDaniel O. S. Glucuronidation and deglucuronidation reactions in hepatic and extrahepatic tissues during perinatal development. *Drug Metabolism and Disposition*, **5**, pp 279-287 (1977).

52- Yussim, L.F., Lara O., Benavides, A., Hernández, B., Fernández, R., Joaquín, T. and Zepeda, G. Anthracenones and anthraquinones from roots of five species of the genus *Karwinskia*. *phytochemistry*, pp

1429 (1995).

53- Furniss, Hannaford, Rogers, Smith and Tatchel. Vogel's. Bromination of phenols ($\text{Br}_2/\text{H}_2\text{O}$). Textbook of practical organic chemistry, pp 1105-1106, Fourth Edition (1987).

54- Furniss, Hannaford, Rogers, Smith and Tatchel. Vogel's. Bromination of phenols (Br_2/CS_2). Textbook of practical organic chemistry, pp 748-749, Fourth Edition (1987).

55- Coffen David L. Bromination of 2,6-ditertbutylphenol with $\text{Br}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$. *Organic Syntheses*, 72, pp 95 (1984).

56- Cohen Peter A. and Neil Towers G. H. Anthraquinones and phenanthroperylenequinones from *Nephroma laevigatum*. *Journal of Natural Products*, 58, pp 520-526 (1995).

57- Shriner R. L., Fuson R.C., Curtin D.Y. y Morrill T.C. The systematic identification of organic compounds. A laboratory manual, pp 181-182, Sixth edition (1980).

58- Furniss, Hannaford, Rogers, Smith and Tatchel. Vogel's. Reduction of aldehydes and ketones. Textbook of practical organic chemistry, pp 352-353, Fourth Edition (1987).

