

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



DETERMINACION DE LA CONFIGURACION ABSOLUTA  
DE LA PEROXISOMICINA A<sub>1</sub>

Por

LUIS ALEJANDRO PEREZ LOPEZ

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

Noviembre, 2000

TM  
QH603  
P47  
P47  
2000  
c.1

LUIS ALEJANDRO  
FERREZ

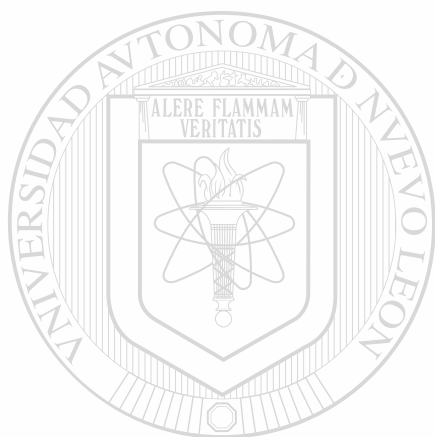
LOPEZ

2000  
NOV





1080111587



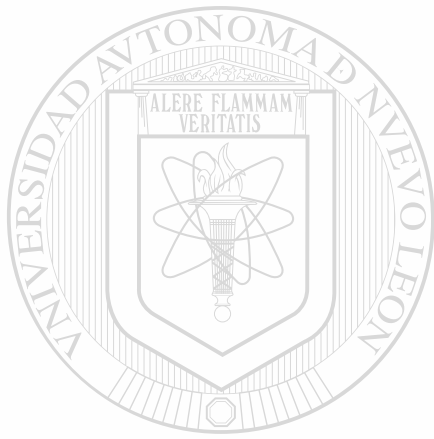
# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

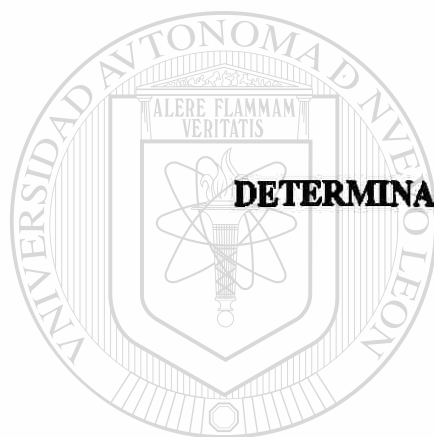
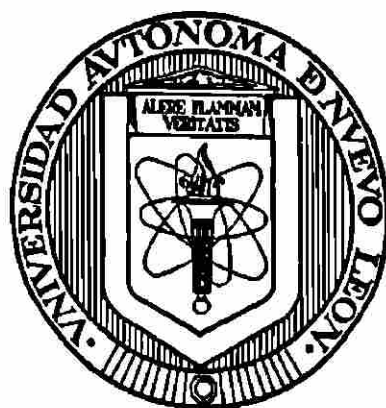


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**DETERMINACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA  
DE LA PEROXISOMICINA A<sub>1</sub>**

Por

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
**LUIS ALEJANDRO PÉREZ LÓPEZ**

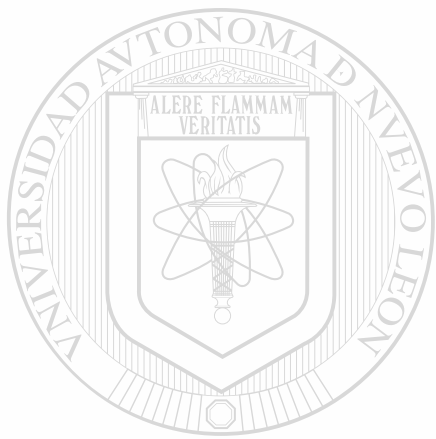
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad en  
Química Analítica Biomédica**

**Noviembre, 2000**

QH603  
P47  
P47  
2.1



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**DETERMINACION DE LA ESTEREOQUIMICA ABSOLUTA DE LA  
PEROXISOMICINA A1**

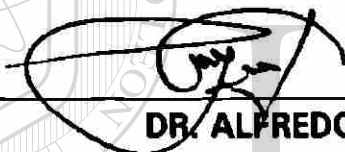
**Aprobación de la Tesis:**



**DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES**  
Director de Tesis



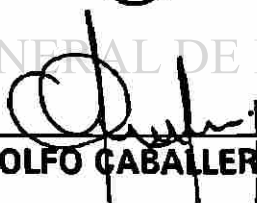
**DRA. ROSALBA RAMIREZ DURON**  
Co-Director de Tesis



**DR. ALFREDO PIÑEYRO LÓPEZ**



**DR. ARMANDO GARCIA LUNA**



**M.C. ADOLFO CABALLERO QUINTERO**



**DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA**  
Subdirector  
de Investigación y Estudios de Posgrado



**DETERMINACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA  
DE LA PEROXISOMICINA A<sub>1</sub>**

**Presentado por:**

**QBP LUIS ALEJANDRO PÉREZ LÓPEZ**

**Este trabajo se realizó en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. Noemi Waksman de Torres y la coasesoría de la Dra. Rosalba Ramírez Durón.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

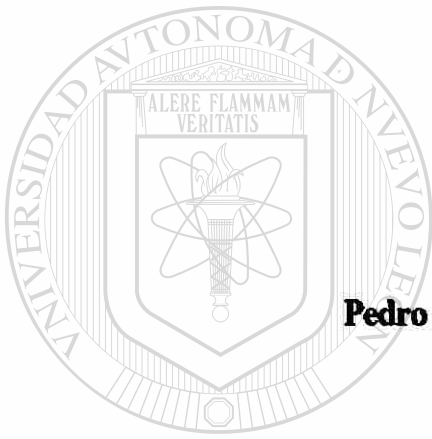
**ASESORA**

**COASESORA**

  
**DRA. NOEMI WAKSMAN  
DE TORRES**

  
**DRA. ROSALBA RAMÍREZ  
DURÓN**

## **DEDICATORIA**



**Dedico esta tesis con cariño**

**A mis padres**

**Pedro Pérez Gutiérrez y Alicia López Costilla**

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

*¿De que vientre salió el hielo?  
Y la escarcha del cielo,  
¿quién la engendró?  
Job 38:29*

*Los cielos cuentan la gloria de  
Dios y la expansión denuncia  
la obra de sus manos.  
Salmo 19:1*

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A Dios**

**Gracias Señor por que me has permitido llegar hasta este momento en tu especial compañía, porque has estado al pendiente en cada situación que he vivido, y porque sé que siempre puedo confiar en ti.**

**Agradezco a mis padres Pedro Pérez Gutiérrez y Alicia López Costilla por todo su apoyo y comprensión que me han brindado siempre, lo que me permite seguir adelante en mi desarrollo profesional y como persona.**

**Agradezco a mis hermanos y a sus familias por su comprensión, paciencia y tolerancia cosas que tienen un especial valor ¡Gracias!**

**Agradezco a la Dra. Noemi Waksman de Torres por aceptarme en el programa de posgrado en la especialidad de química biomédica que atinadamente coordina, por darme la oportunidad de trabajar en sus proyectos como parte de su equipo de trabajo, por su valiosa y profesional asesoría y por todo el apoyo brindado durante la realización de esta tesis.**

**Agradezco a la Dra. Rosalba Ramírez Durón por su experiencia y tiempo dedicado para el mejor desarrollo de este trabajo durante la fase experimental y por sus comentarios siempre detallados y favorables para la mejor edición de esta tesis.**

**Agradezco al MC. Adolfo Caballero Quintero por su incansable y especial apoyo en los trabajos de espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear, por el trabajo profesional realizado en la revisión de la escritura.**

**Agradezco al Dr. Alfredo Piñeyro López por el apoyo brindado y por sus valiosos comentarios en la realización de esta tesis.**

**Agradezco al Dr. Armando García Luna por su tiempo y sus sugerencias realizadas durante la revisión de esta tesis.**



**Agradezco a la MC. Verónica Rivas Galindo por su apoyo ofrecido en los trabajos de espectroscopía de RMN y durante la parte experimental en la realización de este trabajo.**

**Agradezco a la Técnica Laboratorista Ivonne Carrera Rodríguez y a la Q.B.P. Lucía Ceniceros Almaguer por su valiosa ayuda durante la realización de técnicas cromatográficas en la parte práctica de esta tesis, por compartir algunos “tips” técnicos que nos ayudan al rápido avance del trabajo experimental, por tolerarme durante mi estancia en su área de trabajo y por su sincera amistad.**

**Agradezco al MC. Amador Osorio Pérez por su colaboración en la realización de técnicas cromatográficas durante el desarrollo de la presente tesis y por su sincera amistad y apoyo durante mis estudios de maestría.**

**Agradezco a la Dra. Elsa Guajardo del I.T.E.S.M. por facilitarme el hidrogenador catalítico de Parr y al Dr. Bernard J. Micheli por su asesoría en el uso de este equipo y por permitirme trabajar en su laboratorio.**

**Agradezco a la MC. Lucía Yareli Colunga González por su grata compañía durante nuestros cursos de maestría, por su apoyo siempre presente y su sincera amistad.**

**A mis compañeros de generación en el posgrado Q.C.B. Alma Rosa Cruz Cabrera, Dr. Juan Carlos Segoviano Ramírez, Dr. Pablo Ruiz, Dr. Andrés Hernández por su amistad y por los momentos que pasamos juntos durante el curso de nuestros estudios.**

**Agradezco a todos los maestros del posgrado por sus enseñanzas y por su preocupación por mantener siempre un buen nivel, lo que nos impulsa a seguir adelante.**

**Agradezco a todo el personal del Departamento de Farmacología y Toxicología que de alguna u otra manera me apoyaron durante mis estudios de maestría.**

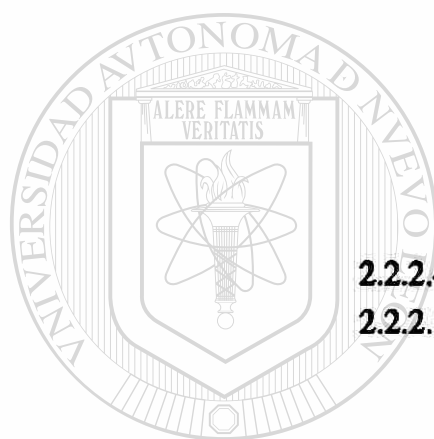
**Agradezco a mis amigos que siempre han estado al pendiente de mi crecimiento como profesionista y que han colaborado en mi crecimiento como persona.**

**Agradezco a CONACYT por la beca de manutención con registro 118603 otorgada para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias con especialidad en Química Analítica Biomédica.**

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Peroxisomicina A <sub>1</sub> .....	1
1.2 Configuración .....	9
1.2.1 Configuración relativa .....	10
1.2.2 Configuración absoluta .....	13
1.3 Importancia .....	17
1.4 Objetivos .....	18
1.4.1 Objetivo general .....	18
1.4.2 Objetivos específicos .....	18
2. MATERIAL Y METODOS .....	19
2.1 Material y equipo general .....	19
2.1.1 Compuestos principales .....	19
2.1.2 Equipo .....	20
2.1.3 Cromatogramas .....	20
2.1.4 Solventes .....	21
2.1.5 Reactivos .....	21
2.2 Métodos .....	22
2.2.1 Obtención de la configuración absoluta de la Peroxisomicina A <sub>1</sub> vía difracción de rayos X .....	22
2.2.1.1 Síntesis del derivado clorado en la posición 7' de la peroxisomicina A <sub>1</sub> .....	23
2.2.1.2 Aislamiento y purificación del derivado clorado de la peroxisomicina A <sub>1</sub> .....	24
2.2.1.3 Cristalización del derivado clorado de peroxisomicina A <sub>1</sub> .....	26
2.2.2 Determinación de la configuración absoluta de la peroxisomicina A <sub>1</sub> por medio de degradación	

química hasta la obtención del butanólido	
tetrahidro-2-metil-5-oxo-2-furanacetato de metilo .....	27
2.2.2.1 Bloqueo de los hidroxilos fenólicos en las	
posiciones 9 y 9' de la peroxisomicina A <sub>1</sub> .....	28
2.2.2.1.1 Aislamiento del derivado metilado	
en las posiciones 9 y 9' de la	
peroxisomicina A <sub>1</sub> .....	30
2.2.2.2 Reducción de los grupos carbonilos del	
producto 1 .....	30
2.2.2.3 Hidrogenólisis del producto 2 .....	33
2.2.2.3.1 Hidrogenólisis homogénea .....	33
2.2.2.3.1.1 Hidrogenólisis homogénea	
del alcohol bencílico .....	33
2.2.2.3.1.2 Hidrogenólisis homogénea de	
los alcoholes secundarios	
del producto 2 .....	35
2.2.2.3.2 Hidrogenólisis heterogénea de los	
alcoholes secundarios del producto 2 ....	36
2.2.2.4 Oxidación del producto 3 .....	38
2.2.2.5 Metilación del producto 4 .....	39
2.2.2.5.1 Aislamiento y purificación del	
producto 5 .....	41
2.2.2.6 Análisis por <sup>1</sup> H RMN del producto 5 .....	41
2.2.2.7 Análisis por <sup>1</sup> H RMN del producto 5	
con reactivo de desplazamiento quiral .....	41
2.2.2.8 Análisis por polarimetría del producto 5 .....	42
2.2.3 Obtención del butanólido tetrahidro-2-metil-5-oxo-	
2-furanacetato de metilo por degradación química de	
la peroxisomicina A <sub>2</sub> .....	43
2.2.3.1 Purificación de la peroxisomicina A <sub>2</sub> .....	44
2.2.3.2 Bloqueo de los hidroxilos fenólicos en las	
posiciones 9 y 9' de la peroxisomicina A <sub>2</sub> .....	45
2.2.3.2.1 Aislamiento del derivado metilado	
en las posiciones 9 y 9' de la	
peroxisomicina A <sub>2</sub> .....	45
2.2.3.3 Reducción del grupo carbonilo del producto 1B ...	46
2.2.3.4 Hidrogenólisis heterogénea de los alcoholes	
secundarios del producto 2B .....	46
2.2.3.5 Oxidación del producto 3B .....	46

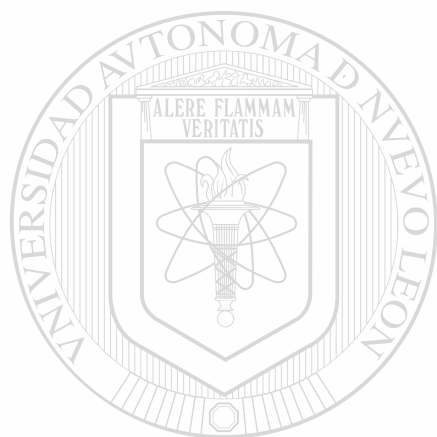




2.2.3.6 Metilación del producto 4B .....	47
2.2.3.6.1 Aislamiento y purificación del producto 5B .....	47
2.2.3.7 Análisis por <sup>1</sup> H RMN del producto 5B .....	48
2.2.3.8 Análisis por <sup>1</sup> H RMN del producto 5B con reactivo de desplazamiento quiral .....	48
2.2.3.9 Análisis por <sup>1</sup> H RMN de la mezcla de los productos 5 y 5B con reactivo de desplazamiento quiral .....	48
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
3.1 Obtención de la configuración absoluta de la peroxisomicina A <sub>1</sub> por la vía de difracción de rayos X .....	49
3.1.1 Síntesis del derivado clorado en la posición 7' de la peroxisomicina A <sub>1</sub> .....	49
3.1.1.1 Aislamiento y purificación del derivado clorado de la peroxisomicina A <sub>1</sub> .....	50
3.1.1.2 Cristalización del derivado clorado de la peroxisomicina A <sub>1</sub> .....	51
3.2 Determinación de la configuración absoluta de la peroxisomicina A <sub>1</sub> por la vía de degradación química hasta la obtención del butanólido tetrahydro-2-metil-5-oxo-2- furanacetato de metilo .....	52
3.2.1 Degradación química de la peroxisomicina A <sub>1</sub> .....	52
3.2.1.1 Bloqueo de los hidroxilos fenólicos en las posiciones 9 y 9' de la peroxisomicina A <sub>1</sub> .....	52
3.2.1.1.1 Aislamiento y purificación del derivado metilado en las posiciones 9 y 9' de la peroxisomicina A <sub>1</sub> .....	52
3.2.1.2 Reducción de los grupos carbonilos del producto 1 .....	53
3.2.1.3 Hidrogenólisis del producto 2 .....	55
3.2.1.3.1 Hidrogenólisis homogénea .....	55
3.2.1.3.1.1 Hidrogenólisis homogénea del alcohol bencílico .....	55
3.2.1.3.1.2 Hidrogenólisis homogénea de los alcoholes secundarios del producto 2 ..	55
3.2.1.3.2 Hidrogenólisis heterogénea de los	



<b>5.1 Conclusiones</b> .....	<b>82</b>
<b>5.2 Perspectivas</b> .....	<b>83</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>84</b>



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

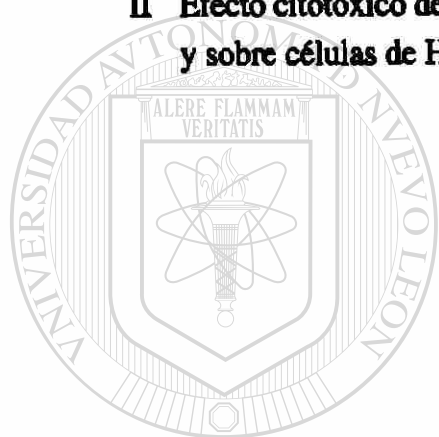
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<b>I Efecto de compuestos antracénicos sobre la actividad de la catalasa ...</b>	<b>8</b>
<b>II Efecto citotóxico de diversas antracenas sobre células CHANG-CLL y sobre células de HEPATOMA G2 .....</b>	<b>9</b>



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Distribución del género <i>Karwinskia</i> .....	3
2 Peroxisomicina A <sub>1</sub> .....	4
3 Compuestos aislados de <i>Karwinskia humboldtiana</i> .....	4
4 Curva de dicroísmo circular de PA <sub>1</sub> y PA <sub>2</sub> .....	5
5 Estructura de diastereoisómeros e isómeros de posición de la PA <sub>1</sub> aislados del fruto de <i>Karwinskia parvifolia</i> .....	7
6 Configuración relativa de la peroxisomicina A <sub>1</sub> y A <sub>2</sub> .....	12
7 Curvas de dicroísmo circular de PA <sub>1</sub> , PA <sub>2</sub> y PA <sub>3</sub> .....	12
8 Estructuras de flavomaninas 6,6'-di-O-metil éteres .....	15
9 Vía degradativa de las flavomaninas .....	16
10 Reacción de cloración de la peroxisomicina A <sub>1</sub> .....	23
11 Metilación en las posiciones 9 y 9' de la peroxisomicina A <sub>1</sub> .....	28
12 Equipo utilizado para la reacción de metilación de la PA <sub>1</sub> .....	29
13 Reacción de reducción de los grupos carbonilos en la PA <sub>1</sub> metilada en 9 y 9' .....	31
14 Equipo utilizado para la reacción de reducción de los grupos carbonilos del producto 2 .....	32
15 Hidrogenólisis homogénea de alcohol bencílico .....	33
16 Equipo para llevar a cabo la hidrogenólisis homogénea del alcohol bencílico y de los alcoholes secundarios del producto 2 .....	34
17 Hidrogenólisis homogénea de los alcobnoles secundarios en el Producto 2 .....	35
18 Hidrogenólisis heterogénea de los alcoholes secundarios del producto 2 .....	37
19 Esquema del aparato de Parr para la reacción de hidrogenólisis heterogénea del producto 2 .....	38
20 Reacción de oxidación del producto 3 .....	38
21 Reacción de metilación del ácido carboxílico del butanólido	

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Ac.	Ácido
ATR	Atenued Total Reflectance
cols.	Colaboradores
CL <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria 50%
CT <sub>50</sub>	Concentración Tóxica 50%
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CC	Cromatografía en Columna
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
C8	Columna fase reversa de octilsilano
DC	Dicroísmo circular
DMF	Dimetilformamida
ETOH	Etanol
Éter Et	Éter etílico
Fig.	Figura
FR ODS	Columna de Fase Reversa de Octadecilsilano
HPLC	High Performance Liquid Cromatography
<sup>1</sup> HMRN	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
IR	Infrarrojo
Iso-PA <sub>1</sub>	Isoperoxisomicina A <sub>1</sub>
Iso-PA <sub>2</sub>	Isoperoxisomicina A <sub>2</sub>
IUPAC	International Union Pure and Applied Chemical
NOE	Nuclear Overhauser Effect
pág.	Página
pH	Potencial de iones hidrógeno
PA <sub>1</sub>	Peroxisomicina A <sub>1</sub>
PA <sub>2</sub>	Peroxisomicina A <sub>2</sub>
PA <sub>3</sub>	Peroxisomicina A <sub>3</sub>
Rf	Factor de retardo (cociente de frentes)
T	Toxina

THF	Tetrahidrofurano
TLC	Thin Layer Chromatography
TR	Tiempo de Retención
c	Concentración en gr/mL
cm <sup>-1</sup>	Centímetros a la menos 1 (unidad de medición en IR)
dm	Decímetro
g	gramos
h	Horas
MHz	Megahertz
µg	Microgramos
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mg	Miligramos
mL	Militros
mM	Milimolar
min.	Minuto
M	Molar
nm	Nanómetros
psi	Libra por pulgada cuadrada
ppm	Partes por millón (unidad de medición en <sup>1</sup> HRMN)
α	Alfa (desviación del plano de la luz polarizada observada)
[α] <sub>D</sub> <sup>25</sup>	Desviación específica del plano de luz polarizada
δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda (unidad de medición en Ultravioleta-visible) ®
°C	Grados Celcius

## RESUMEN

**Luis Alejandro Pérez López**

**Fecha de graduación: Noviembre del 2000**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Medicina**

**Título del Estudio:**

**DETERMINACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA DE LA PEROXISOMICINA A<sub>1</sub>**

**Número de páginas: 88**


**Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Química Analítica Biomédica**

**Área de Estudio: Química Analítica Biomédica**

**Propósito y Método de Estudio.** La peroxisomicina A<sub>1</sub> (PA<sub>1</sub>) es una antracena dimérica derivada de plantas del género *Karwinskia* que ha sido estudiada como un posible agente antineoplásico. A fin de colaborar en el establecimiento del mecanismo de acción de este compuesto, en este trabajo se determinó la configuración absoluta de la PA<sub>1</sub> intentando por dos vías: A) Por difracción de rayos X; introduciendo un átomo pesado en la estructura de la molécula y utilizando una longitud de onda cercana a la absorción de dicho átomo. Se sintetizó el derivado 7'Cl de la PA<sub>1</sub>, pero no se logró obtener cristales adecuados para el análisis por rayos X. B) Por degradación química de la PA<sub>1</sub> en 5 etapas, se obtuvo el butanólido tetrahidro-2-metil-5-oxo-2-furanacetato de metilo que se analizó por <sup>1</sup>HRMN con reactivo de desplazamiento quiral y se comparó con la mezcla de butanólidos (R y S) obtenidos por la degradación química de la PA<sub>2</sub>. Se encontró que el butanólido derivado de PA<sub>1</sub> es de configuración R, resultado que se comprobó con el análisis por polarimetría. Se hizo el análisis retrospectivo con modelos moleculares de cada uno de los productos de las 5 etapas de la degradación química para llegar a la configuración absoluta de la PA<sub>1</sub>.

**Conclusiones y Contribuciones.** Se encontró que la PA<sub>1</sub> es de configuración S,S en sus carbonos quirales 3 y 3', mientras que la PA<sub>2</sub> presenta configuración R en el C-3 y S en el C-3'. Estos resultados contribuirán al establecimiento del mecanismo de acción de la PA<sub>1</sub> y a la determinación de la configuración absoluta de otras antracenas diméricas extraídas de plantas del mismo género.

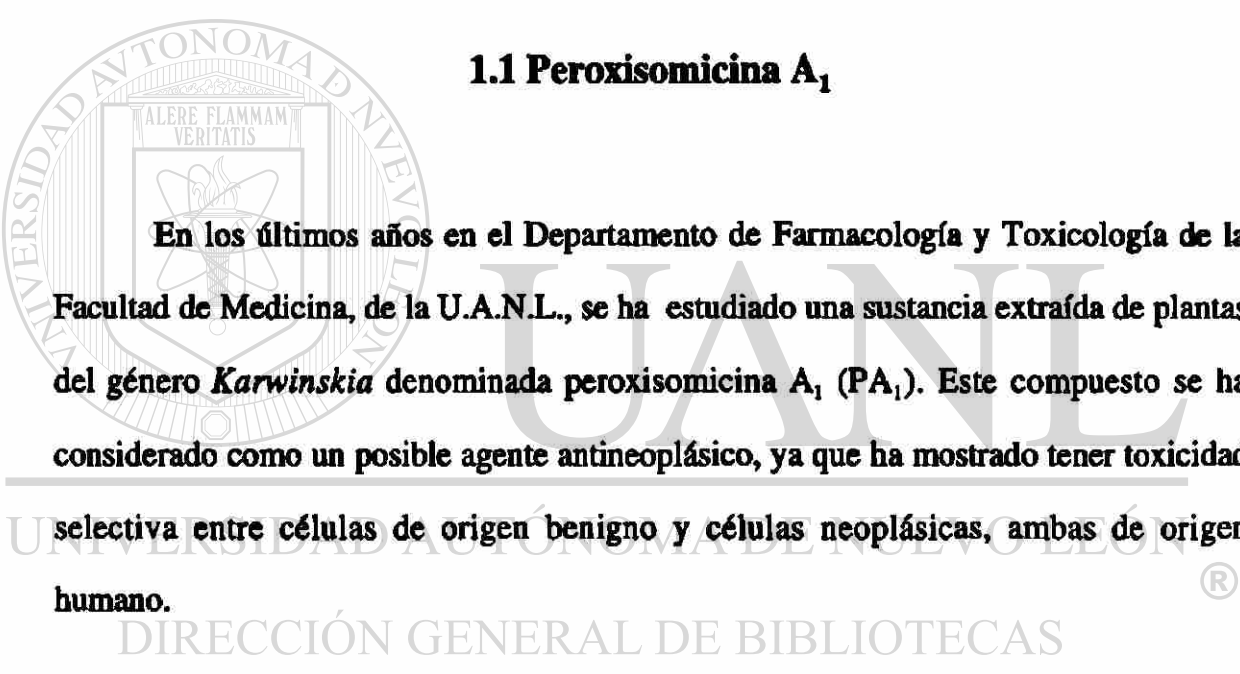
**FIRMA DEL ASESOR**

  
**Dra. Noemi Waksman de Torres**

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Peroxisomicina A<sub>1</sub>



En los últimos años en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina, de la U.A.N.L., se ha estudiado una sustancia extraída de plantas del género *Karwinskia* denominada peroxisomicina A<sub>1</sub> (PA<sub>1</sub>). Este compuesto se ha considerado como un posible agente antineoplásico, ya que ha mostrado tener toxicidad selectiva entre células de origen benigno y células neoplásicas, ambas de origen humano.

El género *Karwinskia* (Rhamnaceae) incluye alrededor de 15 especies de árboles y arbustos, cuyo hábitat natural se extiende del sur de Estados Unidos de América, norte de Colombia y el Caribe. En México se encuentran 11 de estas especies, que en su mayoría son consideradas como plantas tóxicas <sup>(1)</sup>, Fig. 1.

La Peroxisomicina A<sub>1</sub> fue aislada por primera vez por Dreyer y cols. en 1975 a partir del fruto de *Karwinskia humboldtiana*; la llamaron originalmente T-514, de acuerdo a su peso molecular. Este compuesto es una antracenona dimérica que se

encuentra sustituida en la posición 3 y 3' por un hidroxilo y un radical metilo, Fig. 2. También aislaron otras toxinas que denominaron en base a sus pesos moleculares como: T-544, T-496 y T-516, Fig. 3 <sup>(2)</sup>.

En estudios realizados para conocer algunas características fisicoquímicas de estos compuestos, se encontró que son estables en forma sólida, pero inestables cuando están en solución, además producen anhídridos y productos de oxidación principalmente en solución alcalina <sup>(3)</sup>. Por otro lado, estudios de estabilidad realizados con estos compuestos, demostraron que son termolábiles, descomponiéndose a temperaturas superiores a 40 °C, sensibles a la luz <sup>(4)</sup>.

Después de observar la selectividad en la toxicidad de PA<sub>1</sub> para hígado y pulmón sin daño neurológico periférico, Piñeyro y cols. supusieron que si hubiera toxicidad selectiva de PA<sub>1</sub> entre células benignas y células neoplásicas, podría haber un potencial uso terapéutico de este compuesto. Así evaluaron el efecto de PA<sub>1</sub> en 11 líneas celulares humanas, 3 benignas y 8 de origen maligno, las cuales incluían células hepáticas, pulmonares y de colon; con estos experimentos se demostró por primera vez la toxicidad selectiva "in vitro" de la PA<sub>1</sub> <sup>(5)</sup>.

En estudios encaminados a tratar de encontrar el mecanismo de acción de la peroxisomicina A<sub>1</sub>, se encontró un efecto específico e irreversible en la integridad de peroxisomas de levaduras metilotróficas, tratadas "in vivo" con dosis no letales de 2 µg/mL de este compuesto <sup>(6)</sup>.



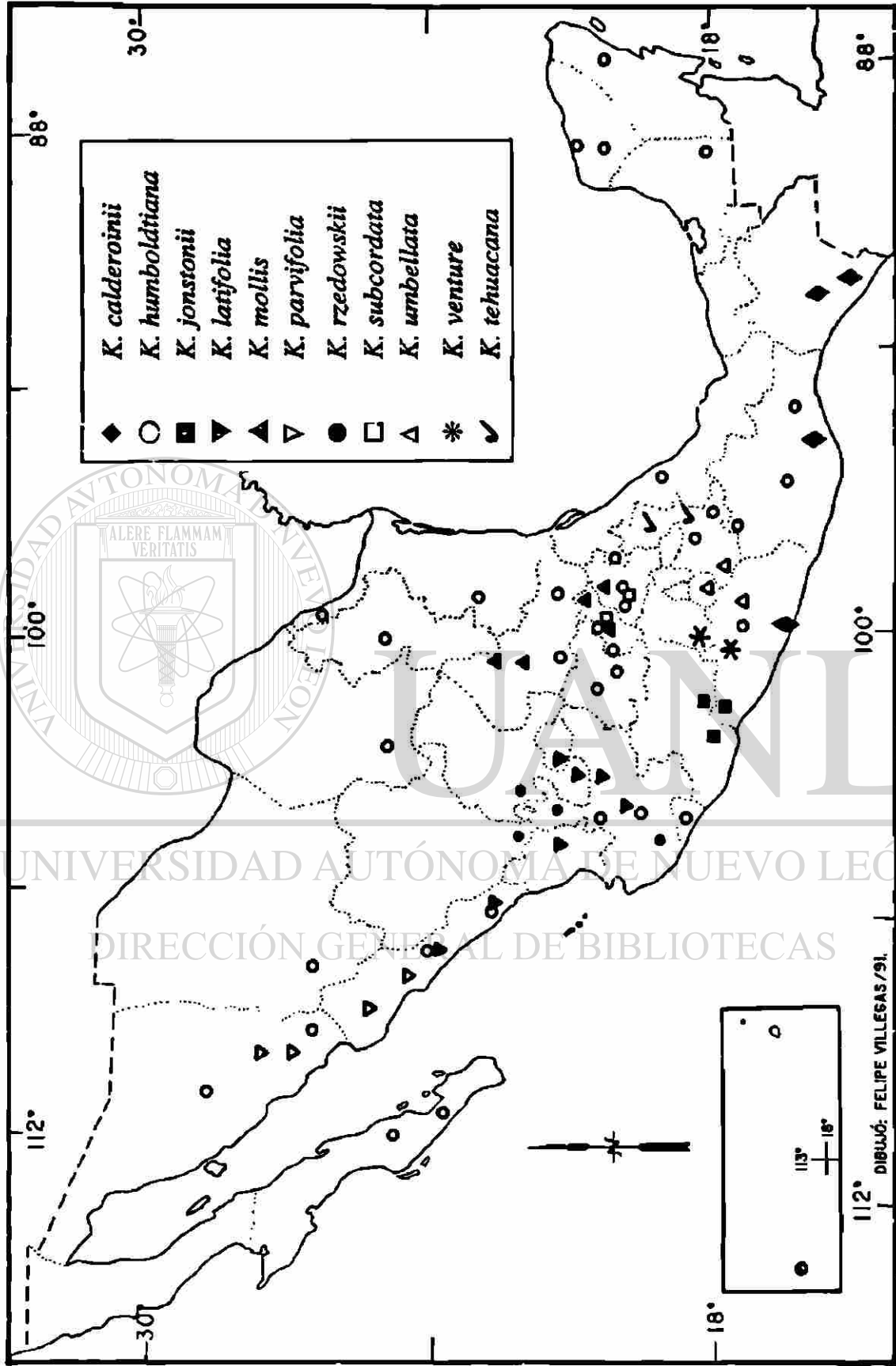


Figura 1. Distribución del género *Karwinskia*.<sup>®</sup>

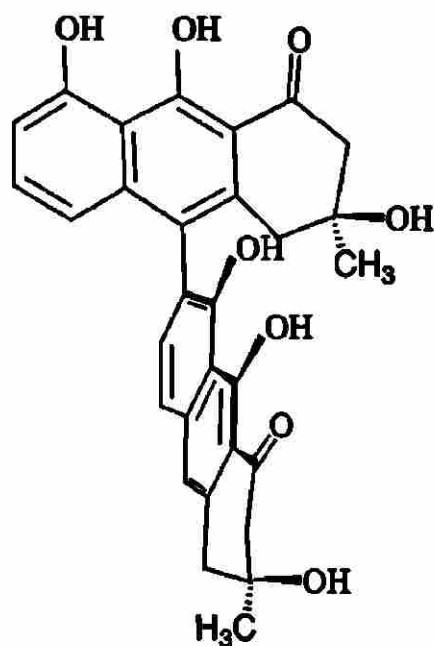


Figura 2. Peroxisomicina A<sub>1</sub>.

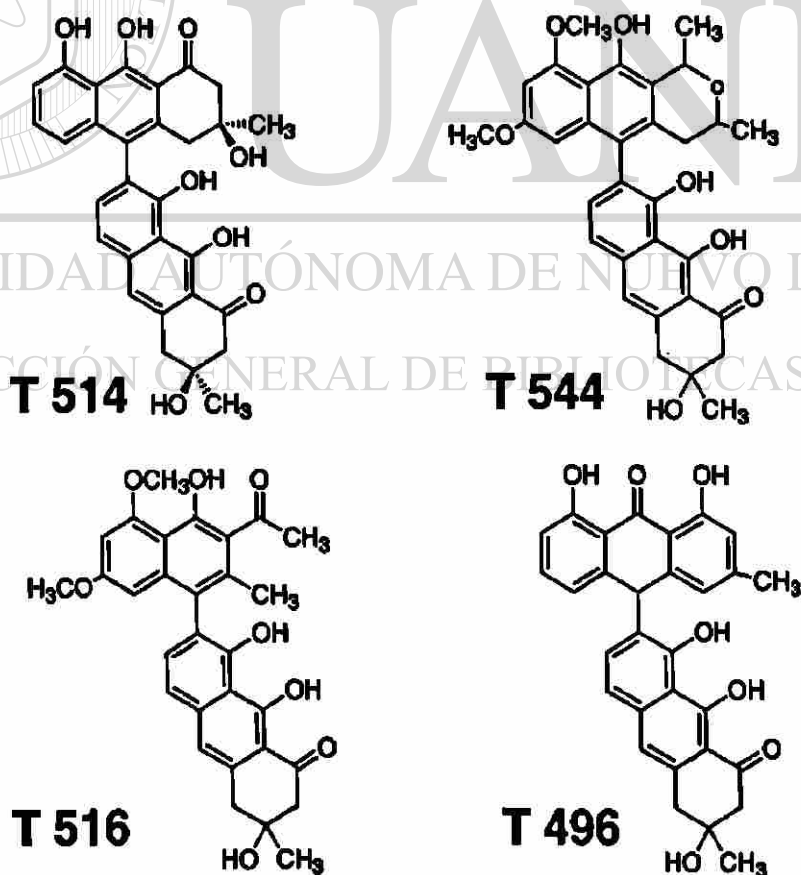


Figura 3. Compuestos aislados de *Karwinskia humboldtiana*.

El efecto de la  $PA_1$  sobre los peroxisomas dio lugar a que este compuesto que anteriormente se llamaba T-514, recibiera el nombre de Peroxisomicina  $A_1$  ( $PA_1$ ). La letra A y el número 1 provienen de la nomenclatura para estereoisómeros de esta naturaleza establecida por Steglich y Gill <sup>(7)</sup>, según la cual, compuestos que en el espectro de Dicroísmo Circular (DC), exhiben un efecto Cotton negativo a longitud de onda larga y efecto Cotton positivo a longitud de onda corta son designados tipo A; mientras que el espectro de DC de moléculas tipo B los signos del efecto Cotton son contrarios al tipo A, Fig. 4.

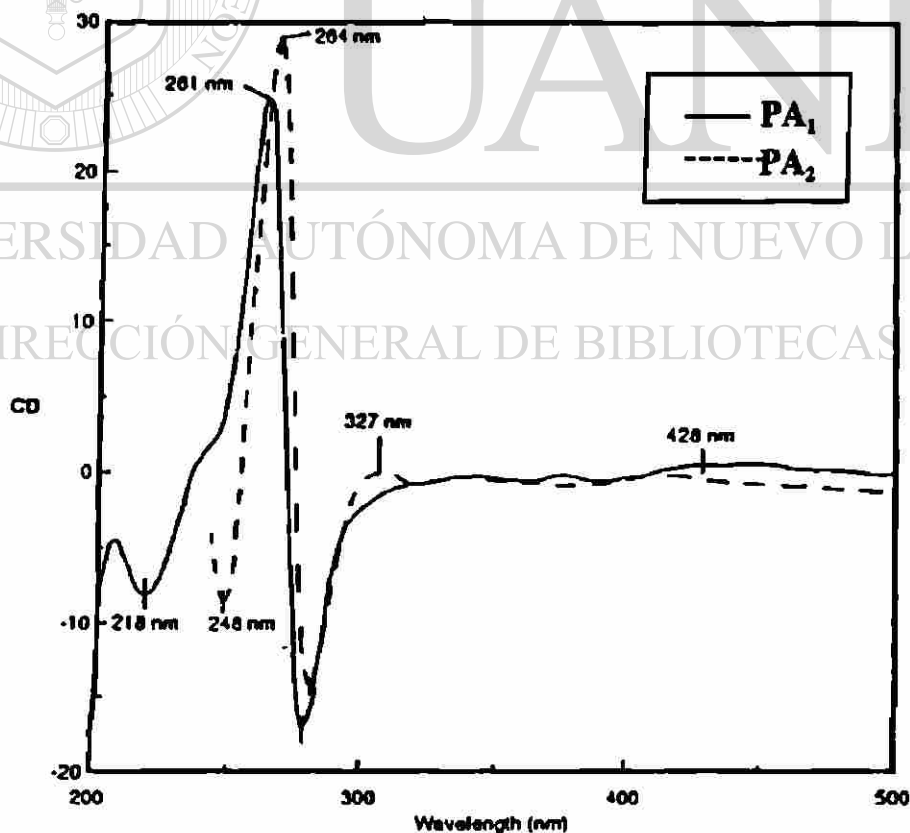


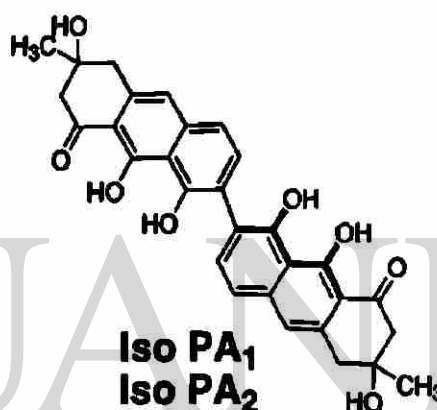
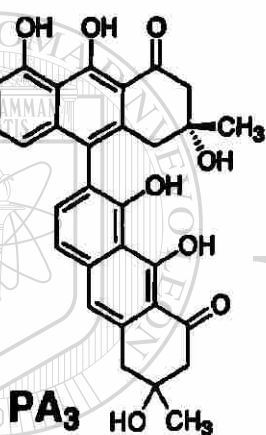
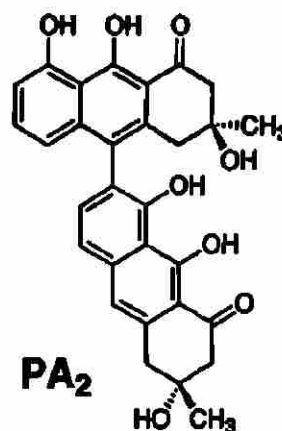
Figura 4. Curva de dicroísmo circular de  $PA_1$  y  $PA_2$ .

En estudios realizados “in vitro” se demostró que la PA<sub>1</sub> produce inhibición no competitiva de la catalasa hepática de tres fuentes animales: bovina, canina y murina <sup>(8)</sup>. También se investigó el efecto “in situ” de la PA<sub>1</sub> sobre la actividad de la catalasa hepática del ratón albino por métodos histoquímicos, en cortes de tejido hepático incubados con toxina, así como “in vivo” en ratones intoxicados con este compuesto, en cortes de tejido y fracciones hepáticas, donde se demostró que la PA<sub>1</sub> no afecta la actividad de la catalasa bajo estas condiciones <sup>(9)</sup>. Estos dos estudios indicaron que la PA<sub>1</sub> inhibe la actividad de la catalasa únicamente en ensayos “in vitro” pero no es capaz de ejercer esta acción en sistemas “in vivo”.

Paralelamente a los estudios de actividad biológica y mecanismo de acción, se realizó un rastreo químico y toxicológico de 11 especies del género *Karwinskia* existentes en México, a fin de obtener compuestos estructuralmente similares a PA<sub>1</sub> y/o fuentes alternas para obtener este compuesto. En este estudio se observó que todas las plantas examinadas fueron tóxicas, y además se caracterizaban por la presencia de al menos uno de los compuestos antracenónicos responsables de la toxicidad de *K. humboldtiana* <sup>(10)</sup>. De frutos de *K. parvifolia* se lograron aislar, además de la peroxisomicina A<sub>1</sub>, dos diastereoisómeros de PA<sub>1</sub> que llamaron peroxisomicina A<sub>2</sub> (PA<sub>2</sub>), peroxisomicina A<sub>3</sub> (PA<sub>3</sub>), el compuesto llamado T-516 y dos isómeros de posición de la PA<sub>1</sub> que llamaron isoperoxisomicina A<sub>1</sub> (Iso-PA<sub>1</sub>) e isoperoxisomicina A<sub>2</sub> (Iso-PA<sub>2</sub>), Fig. 5 <sup>(11,12)</sup>.

En estudios posteriores realizados “in vitro” con estos compuestos estructuralmente relacionados con la peroxisomicina A<sub>1</sub>, se encontró que también tienen efecto sobre la catalasa de hígado de origen bovino. Se encontró relación entre estructura y grado de inhibición de todos los compuestos que se analizaron, de los cuales la

peroxisomicinas A<sub>1</sub> y la peroxisomicina A<sub>2</sub> causaron el más alto grado de inhibición <sup>(8)</sup>,  
 tabla I.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Figura 5. Estructura de diastereoisómeros e isómeros de posición de la PA<sub>1</sub> aislados del  
 fruto de *Karwinskia parvifolia*.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Efecto Inhibitorio (CI<sub>50</sub>) de Compuestos Antracénicos  
Sobre la Actividad de la Catalasa**

<b>Compuestos</b>	<b>CI<sub>50</sub> (μM)</b>
Peroxisomicina A1	3.34 ± 0.99
Peroxisomicina A2	3.64 ± 1.10
Flegmacina A1	6.33 ± 2.79
FlelmacinaA2	8.54 ± 3.23
Peroxisomicina A3	9.07 ± 0.54
Isoperoxisomicina A1	17.59 ± 1.00
Isoperoxisomicina A2	22.69 ± 3.00
Tullidinol	22.69 ± 3.00
T-516	69.77 ± 1.99
T-496	99.50 ± 19.03
T-510	120.00 ± 10.44
Aminotriazol	4 X 10 <sup>5</sup>

Tabla.I. Efecto inhibitorio de compuestos antracénicos sobre la actividad de la catalasa <sup>(8)</sup>.

Por otra parte, en un estudio realizado para analizar el efecto de PA<sub>2</sub>, Iso-PA<sub>1</sub> y T-544 sobre los peroxisomas, se encontró que dichos compuestos a dosis no letales de 2 μg/mL producen daño sobre estos organelos celulares en cultivos de *Candida boidinii* en metanol; el daño más fuerte se presentó con la T 544. Además se observó que la PA<sub>1</sub>, PA<sub>2</sub> y la T-544 producen una disminución en la viabilidad celular de estas levaduras cultivadas en medios con metanol o con glucosa, siendo PA<sub>1</sub> e IsoPA<sub>2</sub> las que causaron el más bajo porcentaje de sobrevivencia <sup>(13, 14)</sup>.

En otro estudio donde se probó el efecto de estas antracenonas sobre células de CHANG y células de HEPATOMA G2, se encontró que PA<sub>1</sub> y PA<sub>3</sub> tienen efecto citotóxico selectivo, mientras que la PA<sub>2</sub> e Iso-PA<sub>1</sub>, aunque citotóxicas, no muestran efecto selectivo <sup>(15)</sup>, tabla II.

CT <sub>50</sub> (µg/mL) Obtenida después de 72 h		
Compuesto	CHANG – CCL	HEPATOMA G2
Peroxisomicina A1	2.5	0.16
Peroxisomicina A2	2.5	2.5
Peroxisomicina A3	5	1.24
Isoperoxisomicina A1	1.76	1.76
Tullidinol	5	2.5

Tabla II. Efecto citotóxico de diversas antracenonas sobre células de CHANG-CLL y sobre células de HEPATOMA G2 <sup>(15)</sup>.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 1.2 Configuración

Dada la diversidad de acción biológica de las antracenonas diméricas se considera de suma importancia la determinación y especificación de la configuración absoluta de cada una de ellas.

Configuración ha sido definida por la IUPAC en 1979 como el arreglo en el espacio de los átomos de una molécula de constitución definida sin tomar en cuenta el arreglo (ordenamiento) por la rotación no restringida de uno o más enlaces simples <sup>(16)</sup>.



Las peroxisomicinas presentan dos centros quirales, en la posición 3 y 3' y tienen también un eje de rotación restringido (unión entre los bifenilos), lo cual genera la posibilidad que existan ocho estereoisómeros de cada uno.

### 1.2.1 Configuración Relativa

La determinación de la configuración de una molécula puede ser relativa o absoluta. Algunos métodos utilizados para determinar la configuración relativa son: dicroísmo circular, dispersión óptica rotatoria y difracción de rayos X.

Uno de los métodos para establecer la configuración relativa (correlación configuracional) de moléculas que tienen más de un centro quiral, es por difracción de rayos X; sin embargo esta técnica no permite diferenciar entre enantiómeros si la molécula no presenta algún átomo pesado<sup>(16)</sup>. En la cristalografía ordinaria de rayos X,

las intensidades de los rayos difractados dependen de las distancias entre los átomos, pero no en la orientación espacial absoluta de la estructura, aquí el cambio de fase debido a dispersión de la radiación incidente es casi el mismo para todos los átomos; así, un cristal de un compuesto quiral y su enantiómero produce el mismo patrón de rayos X y no puede ser distinguido uno de otro, de manera que con este método sólo es posible obtener la configuración relativa de una molécula<sup>(16)</sup>.

La PA<sub>1</sub> pudo ser cristalizada de cloroformo produciendo cristales prismáticos amarillos, la PA<sub>2</sub> fue cristalizada de una mezcla de tolueno y mesitileno en la forma de pequeños cristales de forma irregular color amarillo. Se realizó el análisis de difracción de rayos X de estos compuestos. Se encontró que la configuración relativa de los carbonos 3 y 3' de la peroxisomicina A<sub>1</sub> es la misma, es decir los dos son R o S, mientras

que en la peroxisomicina  $A_2$  la configuración relativa de estos carbonos es diferente; es decir uno es R y el otro es S, Fig. 6. Ambas peroxisomicinas mostraron ángulos de torsión similares entre los grupos biarilos unidos:  $+63^\circ$  para  $PA_1$  y  $+72^\circ$  para  $PA_2$  <sup>(17)</sup>.

Esta información ha sido corroborada, ya que los resultados descritos coinciden con los cálculos teóricos obtenidos mediante métodos semiempíricos, con programas de modelaje molecular para optimización de la geometría, nivel AM 1.

Estos resultados junto con las curvas de dicroísmo circular, que muestran que ambos compuestos son del mismo signo, permitieron concluir que la  $PA_1$  y  $PA_2$  son epímeros en el C-3, Fig. 7 <sup>(17)</sup>.

Por otro lado, se utilizó RMN y por medio de experimentos NOE se corroboró esta información, y además se estableció que la configuración del C-3' en  $PA_3$  es inversa a la de  $PA_1$  y  $PA_2$ .

Los estudios anteriores ayudaron a establecer solamente la configuración relativa de las peroxisomicinas  $A_1$  y  $A_2$  pero no se logró establecer su configuración absoluta.

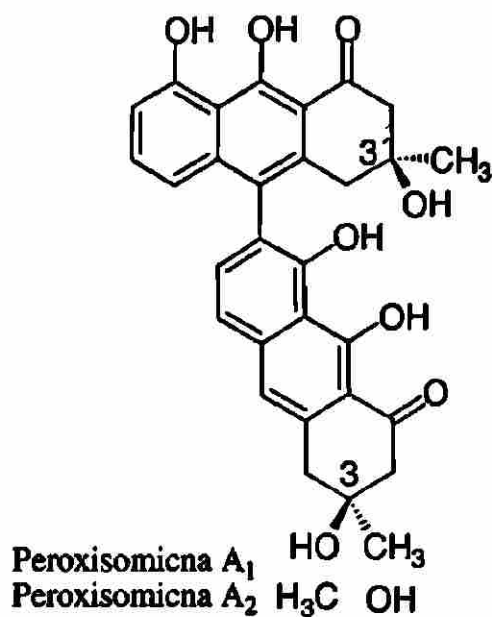


Figura 6. Configuración relativa de Peroxisomicinas A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>.

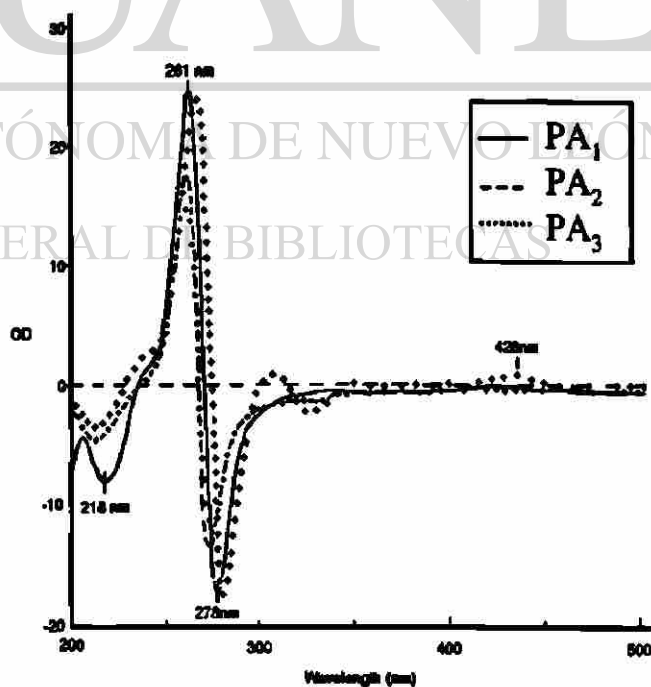
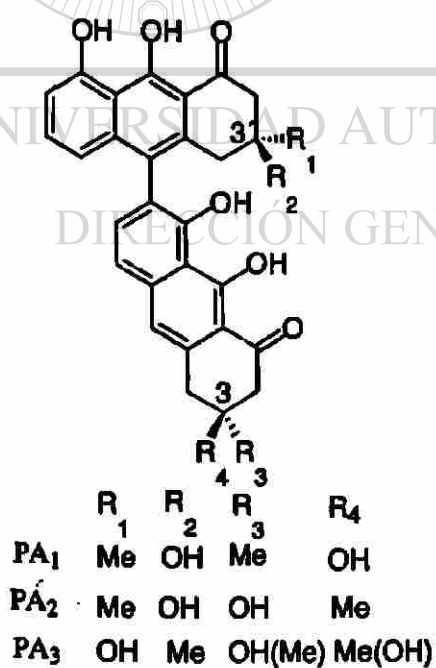


Figura 7. Curvas de dicroísmo circular de PA<sub>1</sub>, PA<sub>2</sub> y PA<sub>3</sub>.

## 1.2.2 Configuración Absoluta

Para determinar la configuración absoluta de una molécula existen varios métodos:

- A) Rayos X
  - a) Utilizando un átomo pesado en la molécula.
  - b) Modificación en la morfología de un cristal polar en presencia de aditivos
- B) Aproximación teórica
- C) Vía degradativa-Correlación química.

Por mucho tiempo, la configuración absoluta de compuestos que presentan estereoisomería fue determinada por correlación con la configuración del gliceraldehído (+) o (-), y fue hasta 1951 cuando la primera determinación experimental de configuración absoluta de una molécula quiral se llevó a cabo utilizando cristalografía de rayos X modificado. En el estudio de cristalografía de rayos X del tartrato de rubidio y sodio se encontró que el tartrato (+) tenía la configuración R, R <sup>(16)</sup>.

El método utilizado incluye el uso de rayos X de una longitud de onda cercana al límite de absorción de uno de los átomos del compuesto, generalmente un átomo pesado; esto ocasiona un cambio de fase de los rayos X dispersados por el átomo pesado en relación a los demás átomos, el cual origina un patrón de difracción que depende de la orientación espacial de los átomos <sup>(16)</sup>.

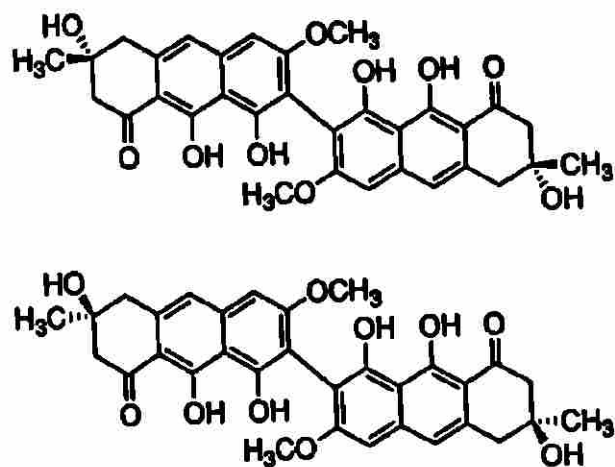
El método de modificación de la morfología de un cristal en presencia de aditivos, consiste en distinguir por análisis de rayos X, cambios generados entre dos extremos de un cristal polar por la adición de un compuesto, que es adsorbido en alguno

de dichos extremos, impidiendo el crecimiento de este extremo en el cristal. El compuesto añadido se adsorbe en una de las caras del cristal, puesto que el carácter polar de dicho cristal está dado por la disposición de los átomos en la molécula <sup>(16)</sup>.

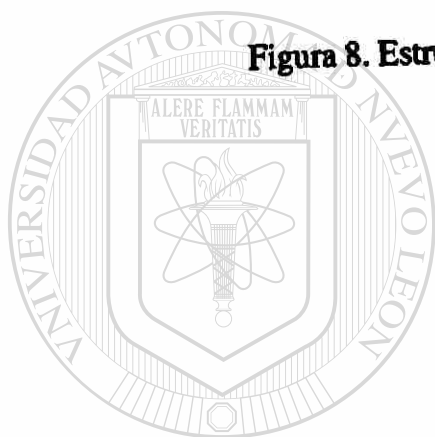
El método de aproximación teórica, se basa en la comparación de patrones computacionales teóricos con determinaciones experimentales de curvas de dicroísmo circular, análisis de dispersión óptica rotatoria y de rotación óptica <sup>(16)</sup>.

En el método de la vía degradativa y posterior correlación química, se utilizan reacciones de degradación del compuesto de interés hasta obtener un compuesto conocido, del cual ya se conoce su configuración y se comparan los datos espectroscópicos y/o de rotación óptica del producto obtenido, con los del ya conocido para establecer su configuración absoluta <sup>(16)</sup>.

Este método de la vía degradativa fue utilizado por Melvin Gill y cols. en la determinación de la estereoquímica absoluta en las flavomaninas 6-6'-di-O-metil éteres, Fig. 8. La molécula de la flavomanina se degradó hasta la obtención del butanólido tetrahidro-2-metil-5-oxo-2-furanacetato de metilo cuyos datos espectroscópicos y de rotación óptica se compararon con los datos reportados de cada uno de los butanólidos enantiómeros sintetizados previamente. El proceso degradativo lo realizaron en cinco etapas que incluyen: metilación de los hidroxilos fenólicos, reducción de los grupos carbonilo, hidrogenólisis de los alcoholes secundarios generados en la reducción, oxidación de los tetrahidroantracenos obtenidos y metilación del ácido carboxílico; sin procesos de purificación de los productos en cada etapa, Fig. 9 <sup>(18)</sup>.



**Figura 8. Estructura de flavomaninas 6,6'-di-O-Metil éteres.**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

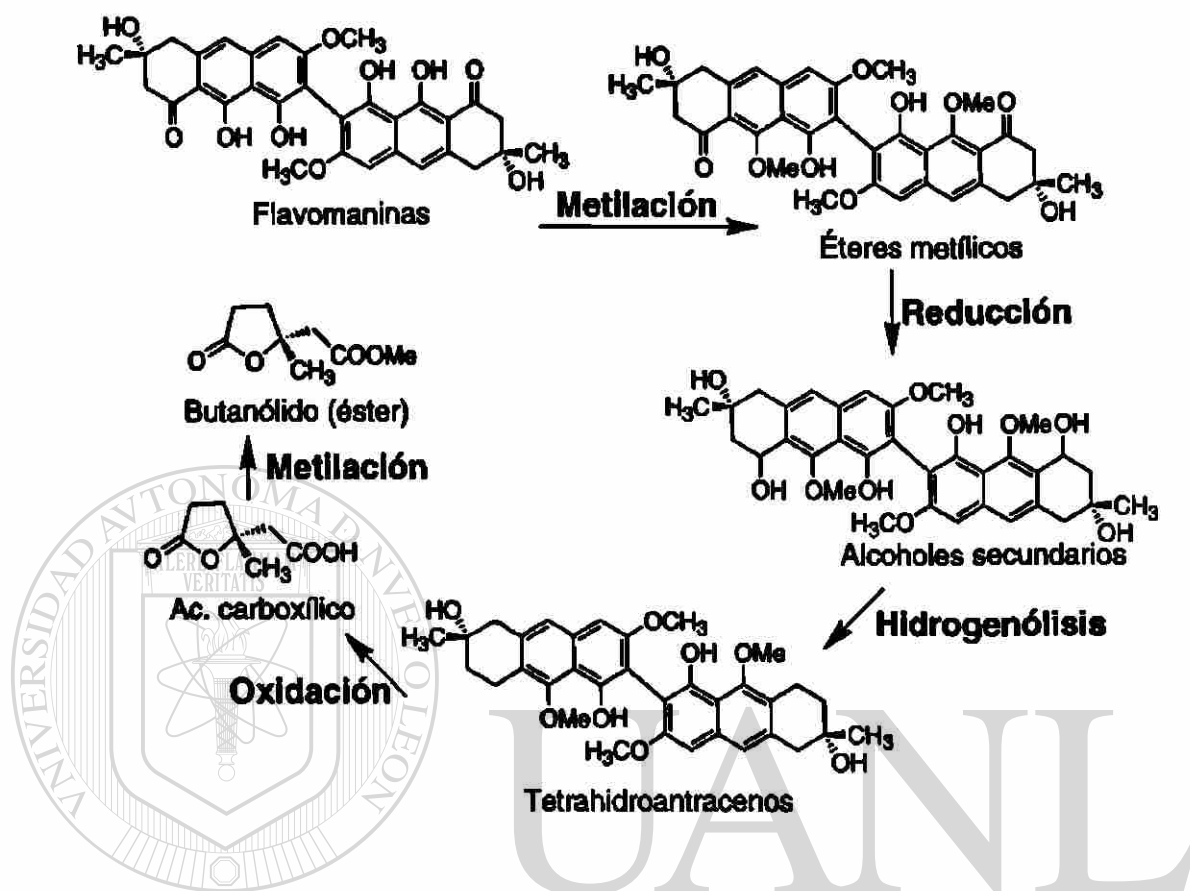


Figura 9. Vía degradativa de las flavomaninas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En contraste con métodos ópticos que son limitados en su aplicabilidad para pre-antraquinonas monoméricas, la degradación química y posterior correlación con ésteres quirales del tipo butanólidos, ofrece una solución práctica para la determinación de la quiralidad central en diantracenos acopladas y puede por tanto, ser utilizado para determinar la configuración absoluta de la peroxisomicina A<sub>1</sub><sup>(18)</sup>.



### 1.3 Importancia

**Dada la importancia biológica de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> como posible agente antineoplásico, y al observar diferencias en el comportamiento de este compuesto y sus estereoisómeros en cuanto a su actividad biológica, se pretende con este estudio — establecer la configuración absoluta de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> a fin de colaborar en los estudios encaminados a dilucidar el mecanismo de acción de esta antracenona.**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo General

Establecer la configuración absoluta de la Peroxisomicina  $A_1$ .

### 1.4.2 Objetivos Específicos

1. Determinación de la configuración absoluta de la peroxisomicina  $A_1$ , vía difracción de rayos X.

1a. Sintetizar y cristalizar el derivado clorado en la posición 7' de la peroxisomicina  $A_1$ .

1b. Si se obtuvieran cristales en el punto anterior, analizar el derivado 7'-Cl de la peroxisomicina  $A_1$  por difracción de rayos X.

y/6

2. Determinación de la configuración absoluta de la peroxisomicina  $A_1$ , vía de degradación química

2a. Obtener el butanólido tetrahidro-2-metil-5-oxo-2-furanacetato de metilo de configuración específica, por degradación química de la peroxisomicina  $A_1$ .

2b. Analizar el butanólido obtenido por espectroscopía de  $^1\text{HRMN}$  con reactivos de desplazamiento quiral y correlacionar con los resultados reportados en la literatura.

3. De acuerdo a los resultados obtenidos en el objetivo 1 y/o 2 establecer la estereoquímica absoluta de la peroxisomicina  $A_1$ .

## CAPÍTULO 2

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### 2.1 Material y Equipo General

##### 2.1.1 Peroxisomicinas

Peroxisomicina A<sub>1</sub> con un grado de pureza aceptable, fue proporcionada por el Laboratorio de Producción del Departamento de Farmacología de la U.A.N.L. y Peroxisomicina A<sub>2</sub> impura, ambas se obtuvieron del fruto de *K. parvifolia* proveniente del municipio de Choix en Sinaloa, recolectadas en Diciembre de 1992.

### 2.1.2 Equipo

**CLAR Analítico:** Cromatógrafo Hewlett-Packard Modelo 1090 con arreglo de diodos.

Columna FR ODS de 100 x 2.1 mm con tamaño de partícula de 5 µm.

**CLAR semipreparativo:** Cromatógrafo Waters Prep. LC 2000. Columna analítica de 8

mm X 100 mm Radial-Pak™ tipo 8MBC18 10 µm. Columna

de 40 mm X 100 mm Radial-Pak™ tipo 8MBC18 10 µm.

**Espectros de IR:** Espectrofotómetro Bruker Vector 22 con ATR.

**Espectros de RMN:** Espectrofotómetro Bruker (400.13 MHz <sup>1</sup>H, 100.62 MHz <sup>13</sup>C, 9.4

Teslas).

**Polarimetría:** Polarímetro Perkin Elmer modelo 341 automático.

**Rotavapor:** Büchi RE 121 Brinkman.

**Centrífuga:** IEC Micro-MB. Beckman GPKR.

**Bomba:** BIO-RAD Econo Pump EP1.

**Colector de Fracciones** BIO-RAD Model 2128.

**Balanza :** Granataria Sout OHAUS. Analítica Sartorius Basic BA110S.

**Hidrogenador Catalítico de Parr:** Parr Instrument Company, inc.

### 2.1.3 Cromatografías

**CCF en sílica:** Cromatofolios AL de sílica gel 60 F<sub>254</sub> Merck, espesor de 0.2 mm.

**CCF –FR:** Cromatoplasmas TLC de sílica gel RP-18 F<sub>254</sub>, Merck.

**CC gravitacional:** Sílica gel 60 para cromatografía en columna, 0.063-0.200 mm, Merck.

CC de baja presión: Columna Lobar Lichroprep Si 60 (40-43  $\mu\text{m}$ ) y columna Lobar Lichroprep RP-18 (40-63  $\mu\text{m}$ ) para cromatografía de líquidos, Merck.

#### 2.1.4 Solventes

Grado analítico: para extracciones y cromatografías en placa.

Grado HPLC: para CLAR analítico y semipreparativo.

Deuterados: para los espectros de  $^1\text{HRMN}$ .

#### 2.1.5 Reactivos

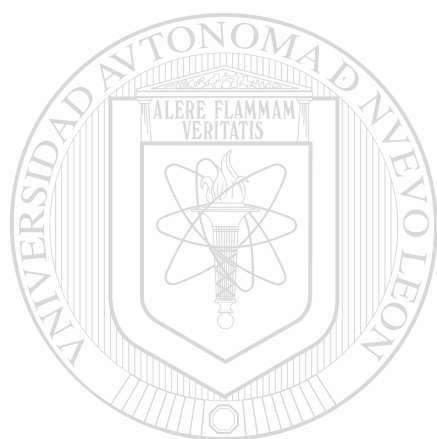
- N-Metil-N-nitroso-p-toluensulfonamida (Diazald). Aldrich Chemical Company.
- Borohidruro de litio. Aldrich Chemical Company.
- Paladio en carbón activado al 10 %. Aldrich Chemical Company.
- Metaperiodato de sodio. Control Técnico y Representaciones.
- Cloruro de rutenio hidrato. Sigma Chemical Company.
- Reactivo de desplazamiento quiral tris [3-heptafluoropropilhidroximetilen-(+)-camforato de europio de Europio III] Sigma Chemical Company.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Obtención de la Configuración Absoluta de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> por la Vía de Difracción de Rayos X

Estrategia General:

#### Vía Rayos X



Peroxisomicina A<sub>1</sub>



Derivado 7'Cl de PA<sub>1</sub>



Cristalización



Análisis por Difracción de Rayos X

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

### 2.2.1.1 Síntesis del Derivado Clorado en la Posición 7' de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>

La reacción teórica se muestra en la siguiente figura:

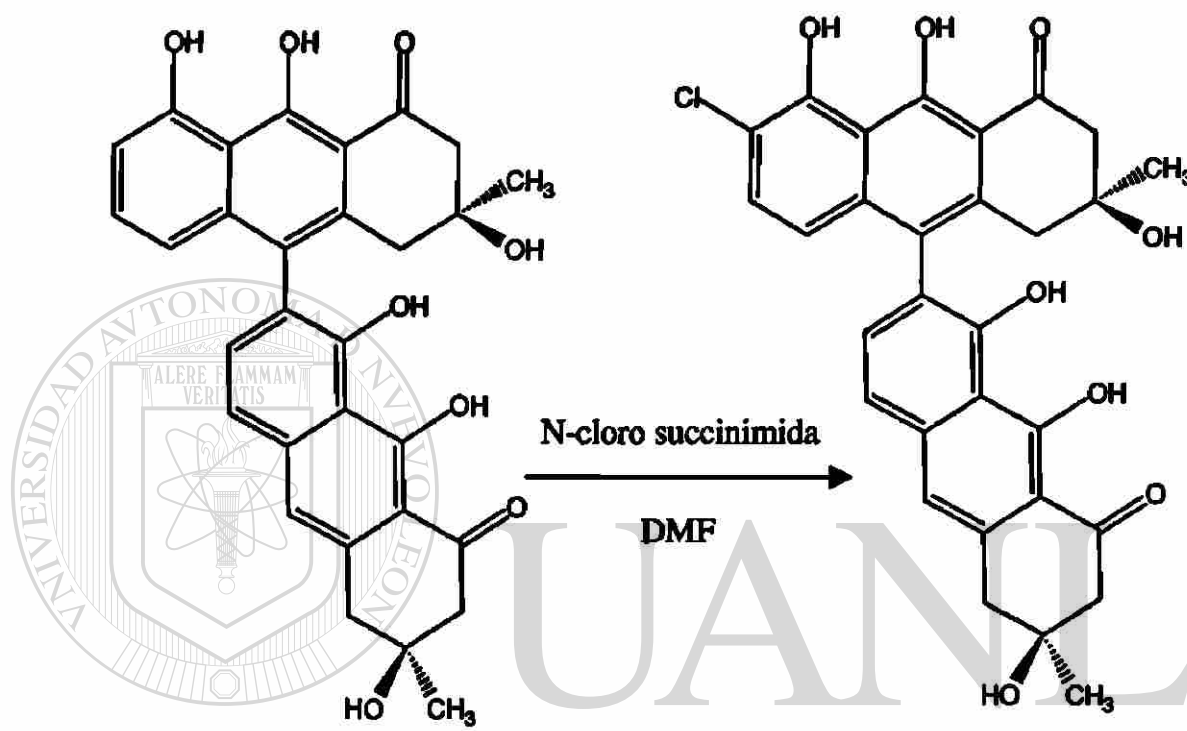


Figura 10. Reacción de Cloración de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>.

#### Procedimiento

##### Cloración de 250 mg de PA<sub>1</sub>

En un matraz de 3 bocas se dejó entrar y salir N<sub>2</sub> y se colocó en él la PA<sub>1</sub> disuelta en dimetilformamida (hasta solución homogénea). Se añadió una solución de N-cloro-succinimida (143 mg disueltos en cantidad suficiente de DMF), bajo agitación magnética y baño de hielo.



Para seguir el curso de la reacción se efectuó CCF fase reversa con el eluente metanol-agua (80:20) y CLAR analítico con la siguiente mezcla de eluentes:

A : B (65:35)

A=Metanol

B=Agua-Acetonitrilo-Ac. acético (70:30:1.6).

Flujo = 0.4 mL/min. Temperatura = 26.9 °C.  $\lambda = 410$  nm

La reacción finalizó cuando en los cromatogramas realizados desapareció la PA<sub>1</sub> y apareció la PA<sub>1</sub> clorada.

El producto de la reacción se evaporó en rotavapor a 38 °C, se disolvió con una cantidad mínima de cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) y se precipitó con éter de petróleo.

#### 2.2.1.2 Aislamiento y Purificación del Derivado Clorado de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>

El producto de la reacción anterior se sometió a CC de baja presión en fase reversa, con metanol-agua (90:10); se analizaron las fracciones obtenidas utilizando CCF fase reversa usando metanol-agua (80:20). Se juntaron las fracciones similares, se evaporó el solvente en rotavapor y se recuperaron en la mínima cantidad de CHCl<sub>3</sub> para finalmente precipitarlas con éter de petróleo. De estos precipitados, se seleccionó el que presentó el compuesto de interés de acuerdo a los resultados del CLAR analítico con el siguiente sistema de eluentes:

A : B (65:35).

A=Metanol, B=Agua-Acetonitrilo-Ac. acético (70:30:1.6)

Flujo = 0.4 mL/min. Temperatura = 26.9 °C.  $\lambda = 410$  nm

El precipitado así seleccionado se sometió a CLAR preparativo, se usaron las siguientes condiciones:

A=Acetonitrilo, B= Ac. acético en agua al 1.6%

Flujo de 70 mL/min.  $\lambda = 440$  nm

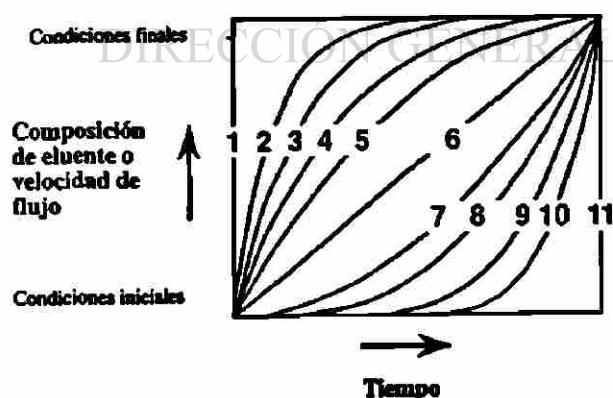
Columna fase reversa C8

Volumen de inyección de 3 mL

Solvente de la muestra: acetonitrilo

Gradiente:	Tiempo (min.)	%A	%B	Curva(*)
	0 – 6.8	50	50	6
	6.8 – 11.8	100	0	6
	11.8 - 30.0	100	0	6

### PERFILES DE CURVA DE GRADIENTE



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.

(\*) Curva 6 de las condiciones de elución en el aislamiento y purificación del derivado clorado de la PA<sub>1</sub>.

Se analizaron las fracciones así obtenidas utilizando CLAR analítico con el sistema de eluentes A : B (65:35)

**A=Metanol, B=Agua-Acetonitrilo-Ac. acético (70:30:1.6)**

**Flujo = 0.4 mL/min. Temperatura = 26.9 °C.  $\lambda$  = 410 nm**

**Se juntaron fracciones similares, se evaporaron, se recuperaron con la mínima cantidad de cloroformo y después se precipitaron con éter de petróleo.**

### **2.2.1.3 Cristalización del Derivado Clorado de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>**

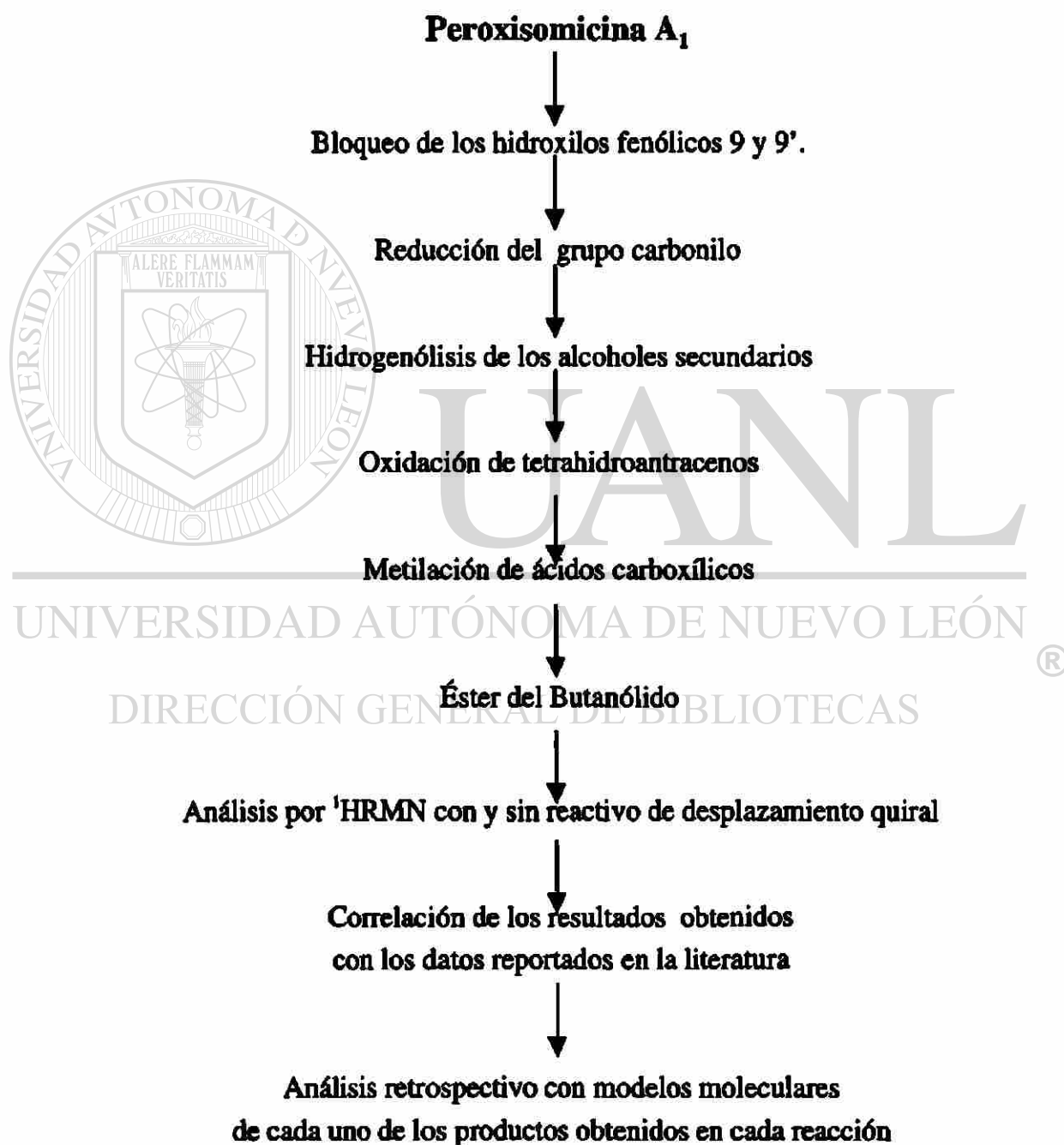
**El método utilizado para la cristalización fue la difusión líquido-líquido. En este método un pequeño volumen de disolución saturada en un tubo de ensayo se cubre con una segunda fase de precipitante que se agrega muy lentamente por las paredes del tubo; posteriormente se cierra herméticamente y se deja en reposo hasta la formación de cristales. Las condiciones que se establecen para el par disolvente-precipitante a usar son las siguientes:**

- 1) El producto a cristalizar debe ser insoluble en el precipitante.**
- 2) El precipitante debe ser de menor densidad que el disolvente.**
- 3) El disolvente y precipitante deben ser miscibles.**

**Se utilizaron 20 mg del derivado clorado de la peroxisomicina A<sub>1</sub> los cuales fueron disueltos en una mínima cantidad de cloroformo; hasta disolución saturada, se agregaron 2 mL de éter etílico como precipitante, y se dejó reposar por 20 días a temperatura ambiente.**

## 2.2.2 Determinación de la Configuración Absoluta de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> por Medio de Degradación Química Hasta la Obtención del Butanólido Tetrahidro-2-metil-5-oxo-2-furanacetato de metilo

Estrategia general:



### 2.2.2.1 Bloqueo de los Hidroxilos Fenólicos en las Posiciones 9 y 9' de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>

Se realizó la síntesis de éteres metílicos en las posiciones 9 y 9' de la PA<sub>1</sub> para bloquear los hidroxilos fenólicos. Para ello se utilizó diazometano, el cual fue generado a partir del diazald.

La reacción teórica se muestra en la siguiente figura:

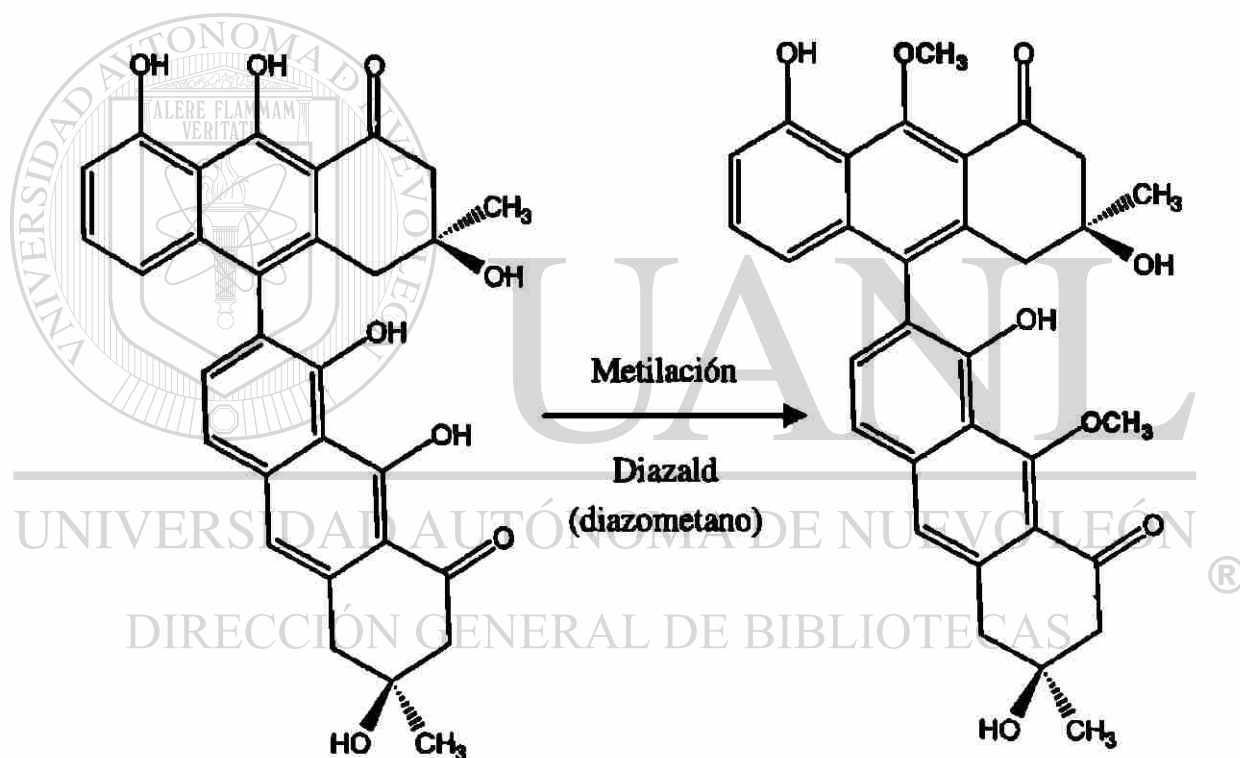


Figura 11. Metilación en las posiciones 9 y 9' de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>.

#### Procedimiento

Se armó el equipo como lo muestra la Fig.12, colocando los reactivos como se indica.

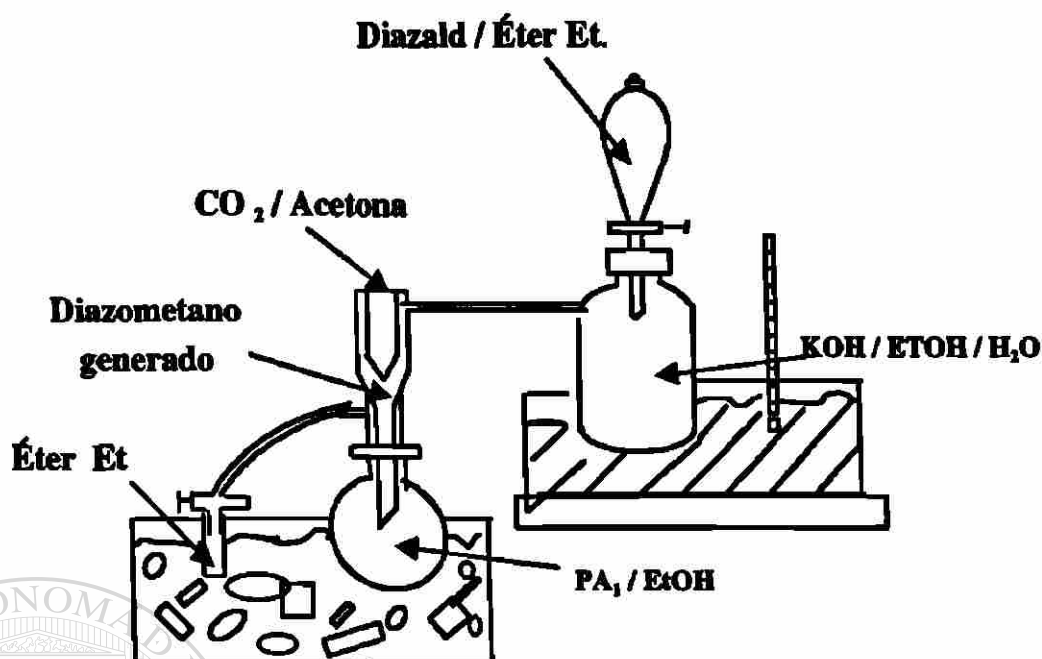


Figura 12. Equipo utilizado para la reacción de metilación de la PA<sub>1</sub>.

La temperatura en el baño de agua fue de 65 °C; se inició la reacción al agregar gota a gota la solución de diazald, contenida en el embudo (2.5 g en 22.5 mL de éter etílico) al recipiente generador del diazometano (el cual contenía 2.8 g de hidróxido de potasio (KOH) disueltos en 5 mL de etanol y 4 mL de agua destilada). Dicho recipiente generador se mantuvo en agitación (con magneto) y de esta manera se generó el diazometano gaseoso, el cual después de pasar por el dedo frío [enfriado con dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) sólido – acetona] condensó directamente sobre el matraz de reacción que contenía 500 mg de PA<sub>1</sub> disuelta en etanol, el cual se encontraba en baño de hielo con sal.

El monitoreo de la reacción se llevó a cabo con CCF en sílica gel, utilizando como eluyente acetato de etilo; se dio por terminada la reacción cuando desapareció la PA<sub>1</sub> y aparecieron los productos de la metilación (1.5 h de reacción). Posteriormente se

evaporó el solvente y se recuperó el producto con una mínima cantidad de acetato de etilo, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró, se evaporó a sequedad y se recuperó con la mínima cantidad de acetato de etilo; finalmente se precipitó con éter de petróleo.

#### **2.2.2.1.1 Aislamiento del Derivado Metilado en las Posiciones 9 y 9' de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>**

El producto de la reacción anterior se sometió a cromatografía en columna gravitacional en sílica gel 60 con elución isocrática con acetato de etilo como eluyente. Las fracciones obtenidas se analizaron por cromatografía en capa fina en sílica gel (eluyente acetato de etilo). Se juntaron fracciones similares, las cuales se evaporaron, se recuperaron en acetato de etilo, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se evaporaron a sequedad, se recuperaron con una mínima cantidad de acetato de etilo y finalmente se precipitaron con éter de petróleo. Los precipitados que contenían como producto mayoritario el compuesto metilado en las posiciones 9 y 9' de la PA<sub>1</sub>, identificados por <sup>1</sup>HRMN y por comparación de R<sub>f</sub> con los reportados por Ramírez <sup>(19)</sup> (compuestos denominados en la presente tesis como producto 1), fueron utilizados para la reacción de reducción.

#### **2.2.2.2 Reducción de los Grupos Carbonilos del Producto 1**

Para ello se realizó la reducción de los grupos carbonilos del producto 1 hasta obtener alcoholes secundarios. La reacción teórica se muestra en la siguiente figura:

evaporó el solvente y se recuperó el producto con una mínima cantidad de acetato de etilo, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró, se evaporó a sequedad y se recuperó con la mínima cantidad de acetato de etilo; finalmente se precipitó con éter de petróleo.

#### **2.2.2.1.1 Aislamiento del Derivado Metilado en las Posiciones 9 y 9' de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>**

El producto de la reacción anterior se sometió a cromatografía en columna gravitacional en sílica gel 60 con elución isocrática con acetato de etilo como eluente. Las fracciones obtenidas se analizaron por cromatografía en capa fina en sílica gel (eluente acetato de etilo). Se juntaron fracciones similares, las cuales se evaporaron, se recuperaron en acetato de etilo, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se evaporaron a sequedad, se recuperaron con una mínima cantidad de acetato de etilo y finalmente se precipitaron con éter de petróleo. Los precipitados que contenían como producto mayoritario el compuesto metilado en las posiciones 9 y 9' de la PA<sub>1</sub>, identificados por <sup>1</sup>H RMN y por comparación de R<sub>f</sub> con los reportados por Ramírez <sup>(19)</sup> (compuestos denominados en la presente tesis como producto **1**), fueron utilizados para la reacción de reducción.

#### **2.2.2.2 Reducción de los Grupos Carbonilos del Producto 1**

Para ello se realizó la reducción de los grupos carbonilos del producto **1** hasta obtener alcoholes secundarios. La reacción teórica se muestra en la siguiente figura:



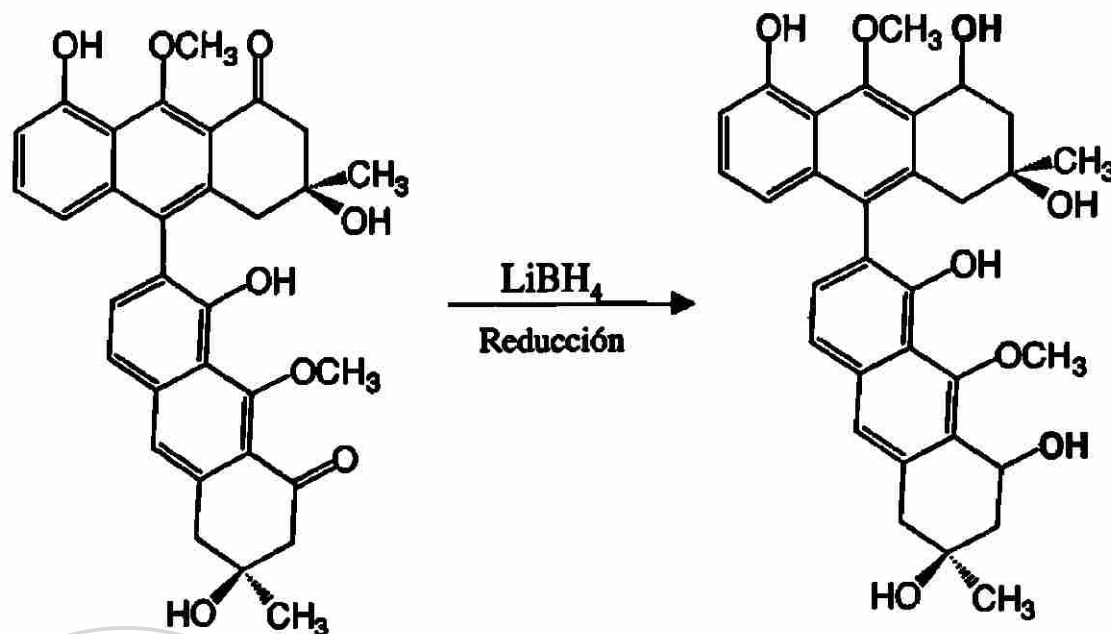


Figura 13. Reacción de reducción de los grupos carbonilos en la PA<sub>1</sub> metilada en 9,9'.

### Procedimiento

El equipo para la reacción de reducción se muestra en la figura 14.

Reducción de 370 mg del producto 1.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En un matraz de 3 bocas se dejó entrar y salir N<sub>2</sub> y se colocó el producto 1 en tetrahidrofurano (THF) en cantidad suficiente hasta solución homogénea. A través de un embudo de adición se añadió gota a gota una solución de borohidruro de litio (LiBH<sub>4</sub>), 304 mg disueltos en cantidad suficiente de THF. La reacción se llevó a cabo bajo agitación con magneto y a temperatura ambiente.

El curso de la reacción se siguió por medio de cromatografía en capa fina en sílica gel con acetato de etilo como eluente y se finalizó con el agregado de metanol al

matraz de reacción; esto cuando desapareció el compuesto original y se formó el producto reducido.

El solvente se evaporó y el producto se recuperó en acetato de etilo, se lavó con agua destilada, separándose las fases en un embudo de separación; la fase acuosa se extrajo repetidas veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas se secaron con sulfato de sodio anhidro, se juntaron, filtraron, evaporaron a sequedad y recuperaron en la mínima cantidad de acetato de etilo para finalmente precipitar con éter de petróleo. A la mezcla de alcoholes secundarios obtenidos con esta reacción se le llamó producto 2.

El precipitado obtenido se analizó por cromatografía en capa fina en sílica gel con el eluyente acetato de etilo; se obtuvo además el espectro IR del producto 2 disuelto en cloroformo, para ver la desaparición de la señal del grupo carbonilo.

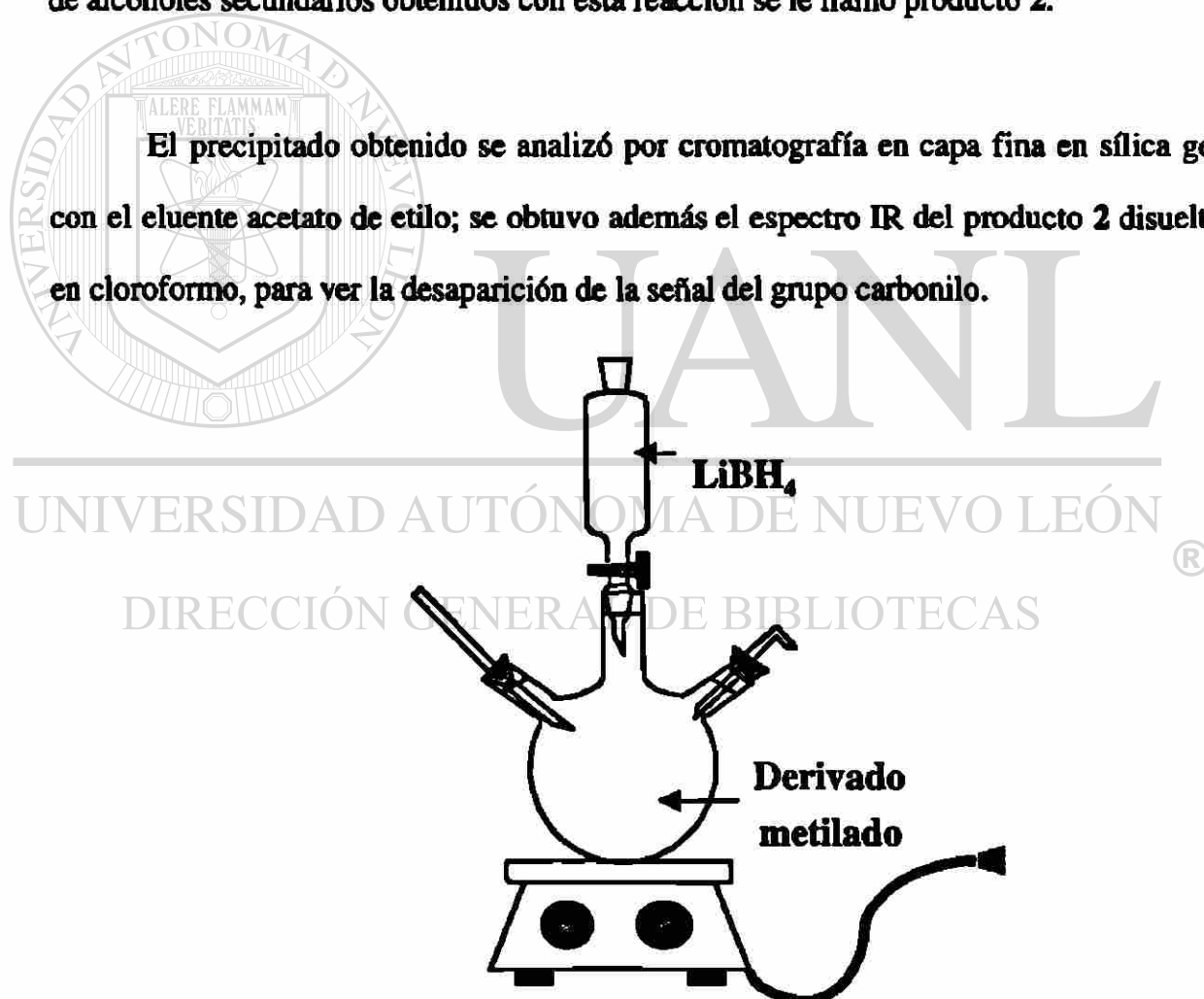


Figura 14. Equipo utilizado para la reacción de reducción de los grupos carbonilos del producto 1.

### 2.2.2.3 Hidrogenólisis del Producto 2.

Los alcoholes secundarios generados como producto de la reducción de los grupos carbonilos en el producto 1 se intentaron hidrogenolizar por dos vías para obtener tetrahidroantracenos:

A) Hidrogenación homogénea, en donde se genera el  $H_2$  y el catalizador “in situ”<sup>(20)</sup>.

B) Hidrogenación heterogénea con  $H_2$  y Pd en un hidrogenador catalítico de Parr<sup>(18)</sup>.

#### 2.2.2.3.1 Hidrogenólisis Homogénea

##### 2.2.2.3.1.1 Hidrogenólisis Homogénea de Alcohol Bencílico

Se realizó un ensayo preliminar de la hidrogenólisis homogénea con alcohol bencílico para obtener tolueno a fin de probar la reacción. La reacción teórica se muestra en la figura 15.

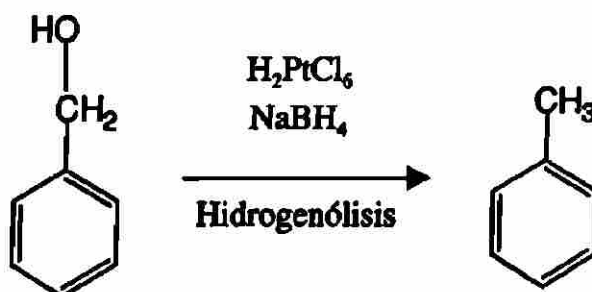


Figura 15. Hidrogenólisis homogénea de alcohol bencílico.

## Procedimiento

Se preparó el equipo como lo muestra la figura 16.

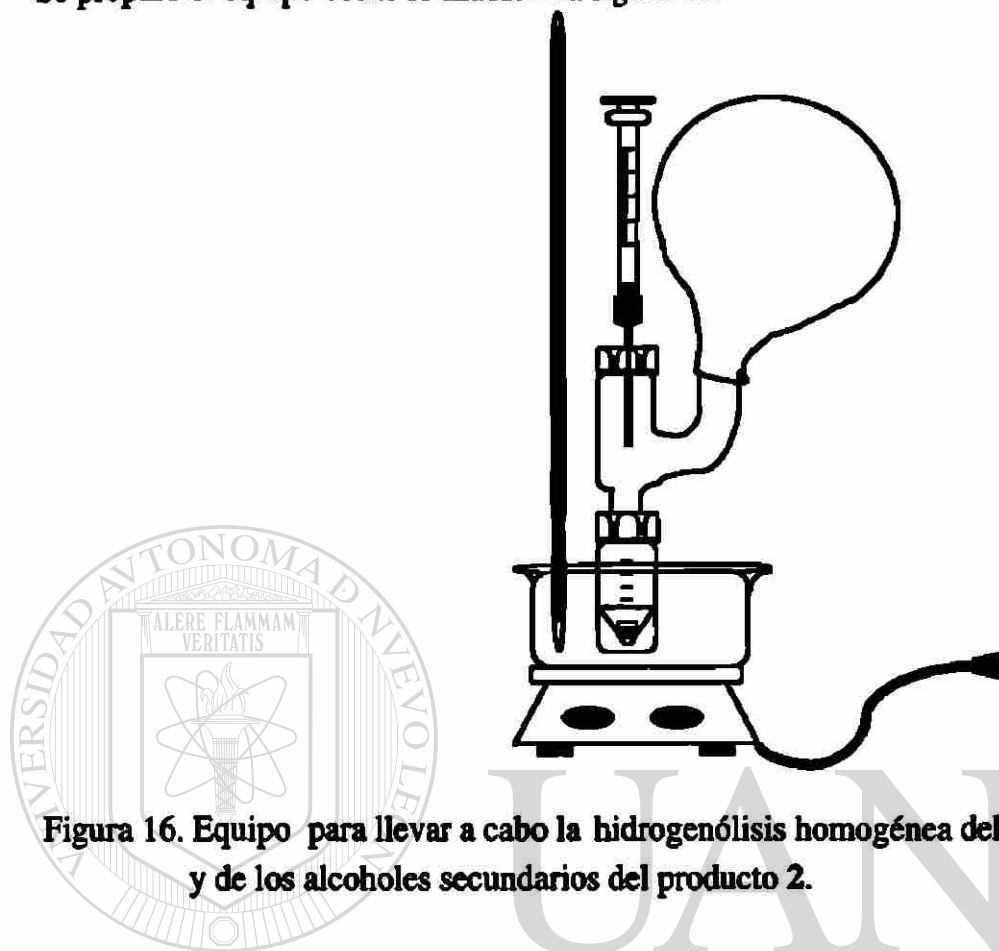


Figura 16. Equipo para llevar a cabo la hidrogenólisis homogénea del alcohol bencílico y de los alcoholes secundarios del producto 2.

Se agregó al matraz de reacción 50  $\mu\text{L}$  de una solución 0.2 M de ácido cloroplatínico, 1 mL de etanol absoluto y 125  $\mu\text{L}$  de una solución de borohidruro de sodio; después de 1 minuto se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de una solución 6 M de ácido clorhídrico a través del septum, inmediatamente después del ácido clorhídrico se añadieron 80  $\mu\text{L}$  de alcohol bencílico 0.76 mM disuelto en 250 mL de etanol absoluto. Se añadió gota a gota 1 mL de solución de borohidruro de sodio en un intervalo de 2 minutos. (0.38 g de borohidruro de sodio en 0.5 mL de hidróxido de sodio acuoso 2 M con 9.5 mL de etanol). La reacción se llevó a cabo con agitación vigorosa en baño de arena a 50 °C por 45 minutos. Después de agregar el último reactivo, (borohidruro de sodio) el globo conectado al aparato se infló y se mantuvo así por 30 minutos aproximadamente, lo que indicó que la reacción se estaba llevando a cabo. El producto

de la reacción se extrajo con hexano, se secó con sulfato de sodio anhidro, se realizó CCF en sílica gel con acetato de etilo como eluente; se evaporó hasta tener un volumen de 1 mL y se analizó por  $^1\text{HRMN}$  para detectar la presencia de tolueno como producto de la reacción.

### 2.2.2.3.1.2 Hidrogenólisis Homogénea de los Alcoholes Secundarios del Producto 2

La reacción teórica se muestra en la figura 17.

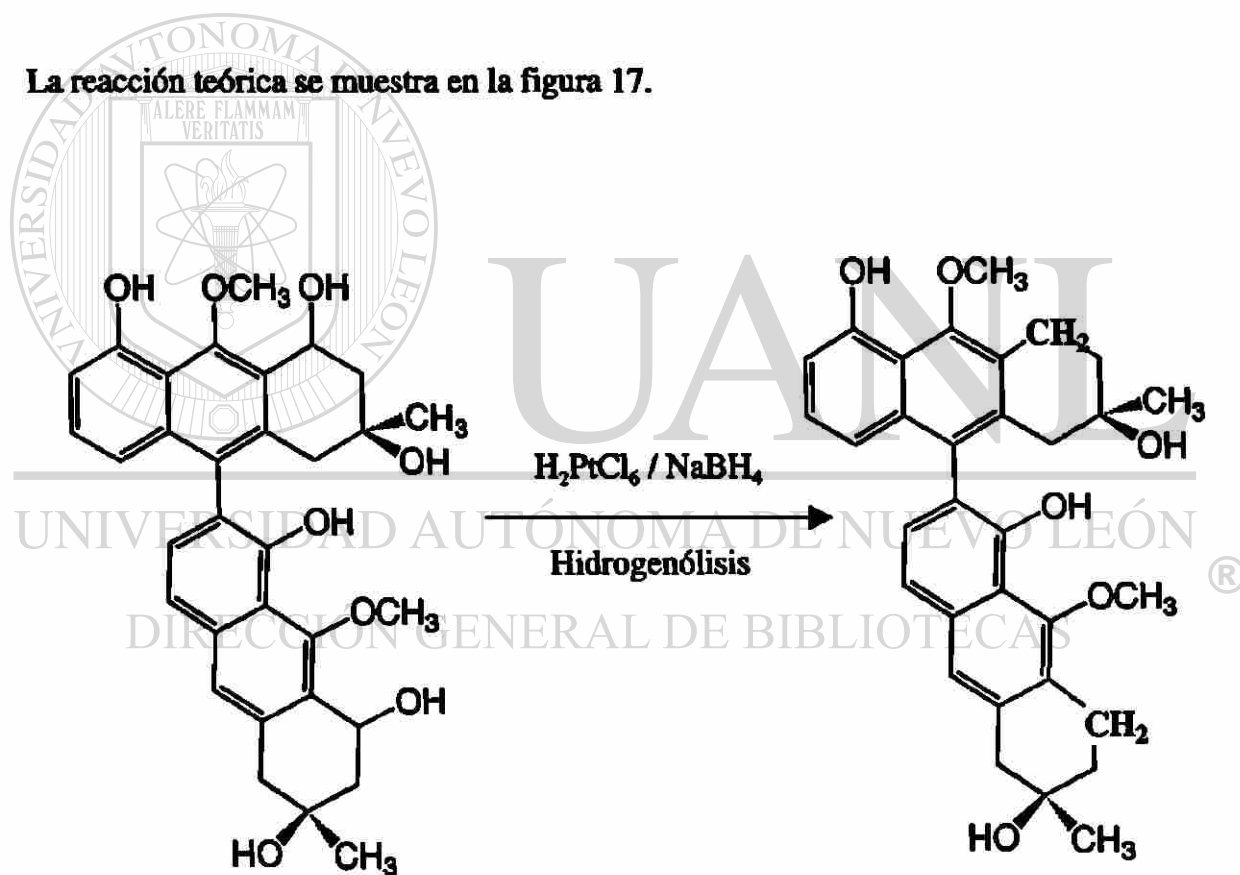


Figura 17. Hidrogenólisis homogénea de los alcoholes secundarios en el producto 2.

## Procedimiento

El equipo para la reacción se muestra en la figura 16.

Se agregó al matraz de reacción 50  $\mu\text{L}$  de una solución 0.2 M de ácido cloroplatínico, 1 mL de etanol absoluto y 125  $\mu\text{L}$  de una solución de borohidruro de sodio; después de 1 minuto se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de una solución 6 M de ácido clorhídrico a través del septum; inmediatamente después del ácido clorhídrico se añadieron 20 mg del producto 2 disuelto en 250  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto. Se añadió gota a gota 1 mL de solución de borohidruro de sodio en un intervalo de 2 minutos, (0.38 g de borohidruro de sodio en 0.5 mL de hidróxido de sodio acuoso 2 M con 9.5 mL de etanol). La reacción se llevó a cabo con agitación vigorosa en baño de arena a 50 °C por 45 minutos. Después de agregar el último reactivo (borohidruro de sodio) el globo conectado al aparato de la reacción permaneció inflado por 30 minutos aproximadamente, lo que indicó que la reacción se estaba llevando a cabo. El producto de la reacción se extrajo con cloroformo, se evaporó a sequedad, finalmente se analizó por  $^1\text{HRMN}$ .

### 2.2.2.3.2 Hidrogenólisis Heterogénea de los Alcoholes Secundarios del Producto 2

La reacción teórica de hidrogenólisis heterogénea de los alcoholes secundarios del producto 2 para obtener tetrahidroantracenos se muestra en la siguiente figura:

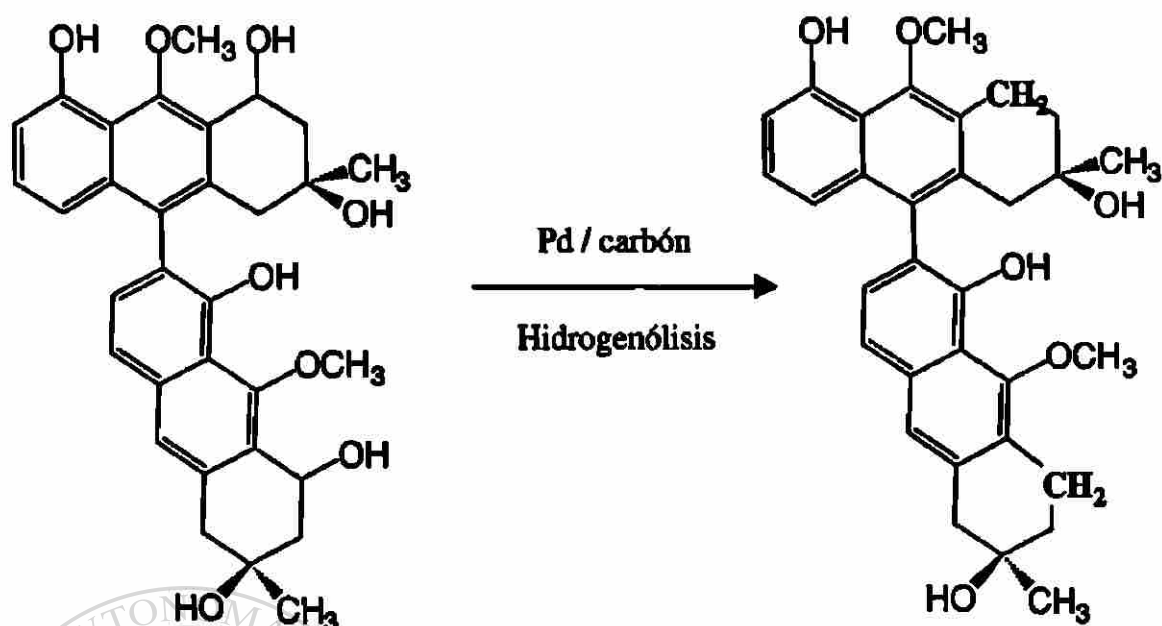


Figura 18. Hidrogenólisis heterogénea de los alcoholes secundarios del producto 2.

### Procedimiento

El aparato de Parr utilizado en ésta reacción se muestra en la figura 19.

200 mg del producto 2 en 10 mL de metanol se colocaron en el recipiente de reacción del aparato de Parr, se agregó como catalizador 40 mg de Paladio en carbón al 10% suspendidos en 5 mL de metanol; se selló dicho recipiente. Se purgó el aparato haciendo pasar  $H_2$  varias veces a 10 y 20 psi, finalmente se colocó a una atmósfera de  $H_2$  a 50 psi con agitación constante durante 15 h a temperatura ambiente.

El contenido del recipiente del aparato de Parr se filtró, se enjuagó el residuo varias veces con metanol, se evaporó a sequedad, se recuperó con cloroformo y finalmente se precipitó con éter de petróleo. Al producto obtenido en esta reacción se le llamó producto 3.

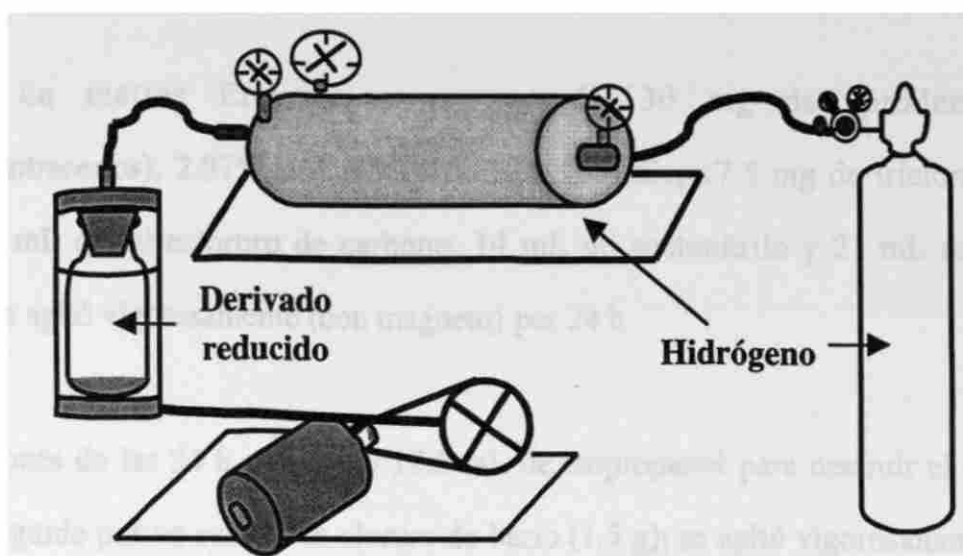


Figura 19. Esquema del aparato de Parr para la reacción de hidrogenólisis heterogénea del producto 2.

#### 2.2.2.4 Oxidación del Producto 3

La reacción teórica de oxidación del producto 3 (tetrahidroantracenos) se

muestra en la figura 20.

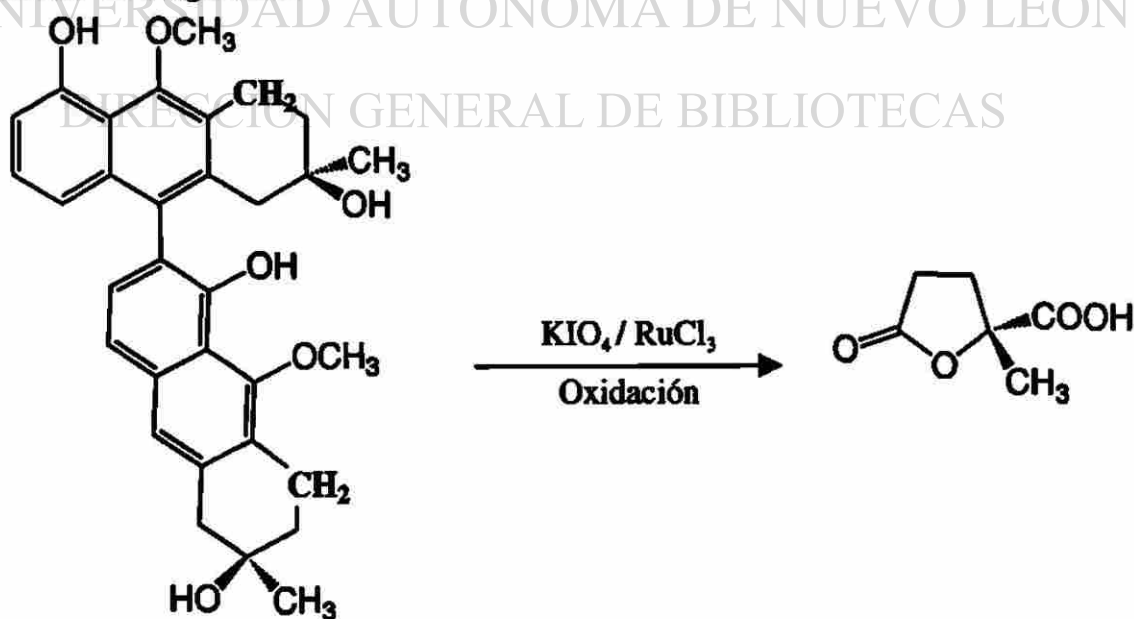


Figura 20. Reacción de oxidación del producto 3.



## Procedimiento

En un matraz Erlenmeyer se agregó 130 mg del producto 3 (tetrahydroantracenos), 2.975 g de metaperiodato de sodio, 17.5 mg de tricloruro de rutenio, 14 mL de tetracloruro de carbono, 14 mL de acetonitrilo y 21 mL de agua destilada. Se agitó vigorosamente (con magneto) por 24 h.

Después de las 24 h se agregó 17.5 mL de isopropanol para destruir el agente oxidante, seguido por un exceso de cloruro de bario (1.5 g); se agitó vigorosamente por 30 minutos, se filtró, y el residuo se lavó con cloruro de metileno. El filtrado se extrajo con cloruro de metileno 3 veces. La fase acuosa se acidificó (pH entre 3 y 4) y se extrajo con agitación continua con éter etílico durante 24 h a temperatura ambiente. Finalmente se juntaron el extracto de cloruro de metileno y el extracto étereo y se evaporaron a sequedad. Se formó una capa aceitosa, este producto fue llamado producto 4 que inmediatamente fue sometido a la reacción de metilación.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

### 2.2.2.5 Metilación del Producto 4

Se realizó la metilación del ácido carboxílico (producto de la reacción anterior), para obtener el éster metílico del butanólido.

La reacción teórica se muestra en la siguiente figura:



Figura 21. Reacción de metilación del ácido carboxílico del butanólido (producto 4).

### Procedimiento

Se armó el equipo como lo muestra la Fig.12, (página 29), los reactivos se colocaron como se indica.

La temperatura en el baño de agua era de 65 °C y se inició la reacción agregando gota a gota la solución de diazald, contenida en el embudo (2.5 g en 22.5 mL de éter etílico) al recipiente generador del diazometano (el cual contenía 2.5 g de KOH disueltos en 5 mL de etanol y 4 mL de agua destilada). Dicho recipiente generador se mantuvo en agitación (con magneto) y de esta manera se generó el diazometano gaseoso, el cual después de pasar por el dedo frío (enfriado con CO<sub>2</sub> sólido – acetona) condensó directamente sobre el matraz de reacción que contenía el producto 4 disuelto en etanol y la cantidad de éter etílico suficiente para disolver el compuesto, el cual se encontraba en baño de hielo con sal. Para finalizar la reacción se agregó 3 - 4 gotas de ácido acético, la reacción se llevó a cabo por 1 h. Posteriormente se evaporó el solvente y se recuperó el producto con una mínima cantidad de acetato de etilo, se secó con sulfato de sodio anhidro, se evaporó a sequedad; el producto obtenido fue identificado como producto 5.

### **2.2.2.5.1 Aislamiento y Purificación del Producto 5**

El producto **5** se sometió a cromatografía en columna de baja presión fase reversa, isocrática, se usó como eluyente acetato de etilo:hexano (3 : 2) a un flujo de 3 mL/min.

Las fracciones obtenidas se analizaron por cromatografía en capa fina en sílica gel con el mismo eluyente. Se juntaron las fracciones similares, se evaporó el solvente a sequedad, se recuperó en una pequeña cantidad de cloroformo y se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró, se evaporó el solvente y se llevó a sequedad con argón y en pistola de desecación.

### **2.2.2.6 Análisis por <sup>1</sup>HRMN del Producto 5**

Las fracciones obtenidas en la purificación del producto **5** fueron evaporadas a sequedad, disueltas en cloroformo deuterado y analizadas por espectroscopía de <sup>1</sup>HRMN.

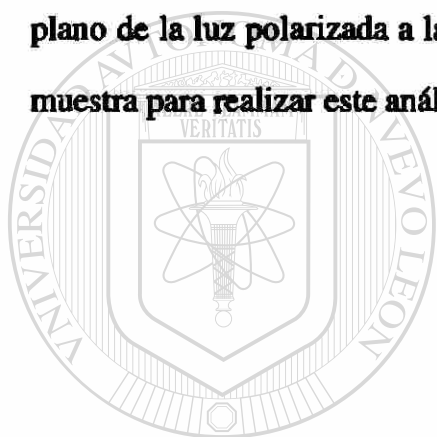
### **2.2.2.7 Análisis por <sup>1</sup>HRMN del Producto 5 con Reactivo de Desplazamiento Quiral**

Una de las fracciones del producto **5** que contenía el éster metílico del butanólido derivado de PA, según el análisis por <sup>1</sup>HRMN <sup>(18)</sup>, se analizó por espectroscopía de <sup>1</sup>HRMN con el reactivo de desplazamiento quiral: tris [3-heptafluoropihidroximetilen-

(+)-camforato de europio III] disuelto en cloroformo deuterado; se le agregaron sucesivamente 35, 70 y 105  $\mu\text{L}$  de este reactivo a una concentración de 100 mg/mL.

### 2.2.2.8 Análisis por Polarimetría del Producto 5

La fracción del producto 5 que contenía el éster metílico del butanólido derivado de PA<sub>1</sub>, se disolvió en cloroformo y se realizó el análisis cuantitativo de desviación del plano de la luz polarizada a la longitud de onda del sodio (589 nm). Se pesó 1.5 mg de muestra para realizar este análisis.



# UANL

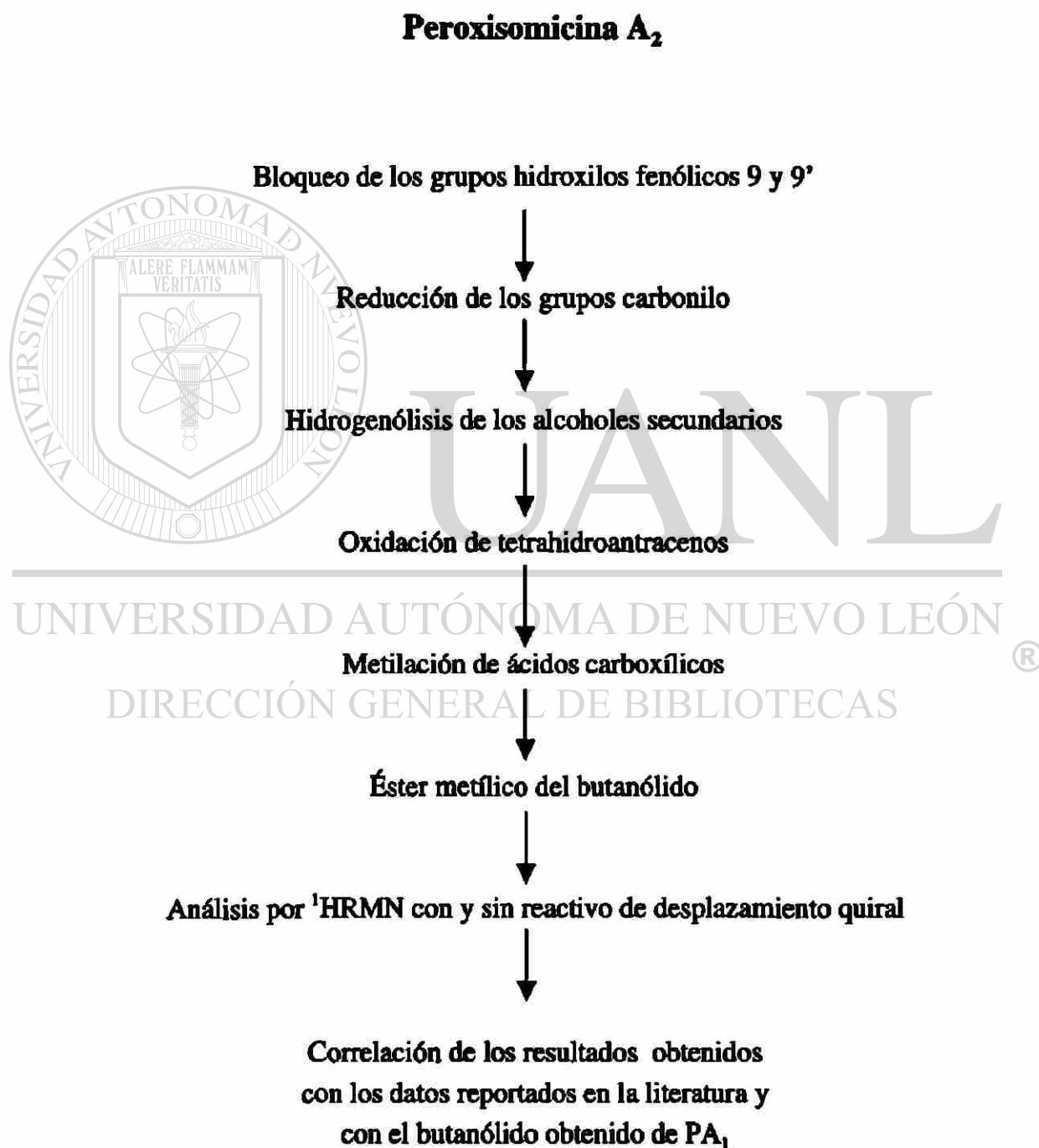
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 2.2.3 Obtención del Butanólido Tetrahidro-2-metil-5-oxo-2-furanacetato de metilo por Degradación Química de la Peroxisomicina A<sub>2</sub>

Esquema general:



### 2.2.3.1. Purificación de la Peroxisomicina A<sub>2</sub>

Se usó una muestra de PA<sub>2</sub> que contenían como principal impureza PA<sub>1</sub>; fue sometida a CLAR semipreparativo fase reversa, cuyas condiciones fueron las siguientes:

#### Isocrático

Eluente	Metanol-agua (55:45)
Flujo	70 mL/min.
Columna	C8
Longitud de Onda	440 nm
Solvente de muestra	Metanol
Volumen de inyección	3 mL

Las fracciones obtenidas de la columna semipreparativa fueron analizadas por CLAR analítico con las siguientes condiciones:

#### Isocrático

Eluente	A-B (65:35)
	A: metanol.
	B: agua-acetonitrilo-ác. acético (70:30:1.6)
Flujo	70 mL/min.
Columna	C18, tamaño de partícula 5 μ
Longitud de Onda	440 nm
Solvente de muestra	Metanol
Volumen de inyección	5 μL

Las fracciones que contenían la PA<sub>2</sub> pura se juntaron, se evaporó el metanol, se agregó cloruro de sodio a la solución acuosa y se extrajo con cloroformo. El extracto clorofórmico se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad, se recuperó con la mínima cantidad de cloroformo y se precipitó con éter de petróleo. Las fracciones obtenidas se analizaron por CLAR analítico.

### **2.2.3.2 Bloqueo de los Hidroxilos Fenólicos en las Posiciones 9 y 9' de la Peroxisomicina A<sub>2</sub>**

Se realizó la síntesis de éteres metílicos en las posiciones 9 y 9' de la PA<sub>2</sub> con diazometano, el cual fue generado a partir del diazald tal y como se realizó para la PA<sub>1</sub>, (pág. 28); se inició la reacción con 420 mg de PA<sub>2</sub>.

#### **2.2.3.2.1. Aislamiento del Derivado Metilado en las Posiciones 9 y 9' de la Peroxisomicina A<sub>2</sub>**

Se realizó el aislamiento del producto de la reacción anterior (éteres metílicos en las posiciones 9 y 9' de la PA<sub>2</sub>) como se realizó para la PA<sub>1</sub> en columna de sílica gel gravitacional con las mismas condiciones (pág. 30). Las fracciones similares se juntaron y se precipitaron, se analizaron por <sup>1</sup>HRMN para ver la desaparición de los grupos hidroxilo fenólicos. Los precipitados que contenían el compuesto de interés se llamaron producto 1B.

### 2.2.3.3 Reducción del Grupo Carbonilo del Producto 1B

La reacción de reducción de los grupos carbonilos del producto 1B (éteres metílicos 9,9' de la PA<sub>2</sub>), se realizó de la misma manera que se llevó a cabo con la PA<sub>1</sub>, (pág. 30); la reacción se inició con 300 mg, hasta obtener alcoholes secundarios; el producto obtenido fue identificado como producto 2B.

El precipitado obtenido se analizó por cromatografía en capa fina en sílica gel utilizando como eluente acetato de etilo y por <sup>1</sup>H RMN usando cloroformo deuterado como solvente.

### 2.2.3.4 Hidrogenólisis Heterogénea de los Alcoholes Secundarios del Producto 2B

La reacción de hidrogenólisis heterogénea de los alcoholes secundarios del producto 2B se realizó de la misma manera que con la PA<sub>1</sub>, (pág. 36). La reacción se inició con 214 mg, hasta obtener la mezcla de tetrahydroantracenos. El producto obtenido se identificó como producto 3B y se analizó por <sup>1</sup>H RMN.

### 2.2.3.5 Oxidación del Producto 3B

La oxidación del producto 3B (tetrahydroantracenos) hasta la obtención del ácido carboxílico del butanólido se llevó a cabo como con la PA<sub>1</sub>, (pág. 38); se usaron 145 mg de este producto. El producto obtenido en esta reacción se identificó como producto 4B.



La capa aceitosa obtenida de esta reacción fue sometida inmediatamente a la reacción de metilación.

### **2.2.3.6 Metilación del Producto 4B**

El producto **4B** (ácido carboxílico del butanólido de  $PA_2$ ) se disolvió en éter etílico y fue metilado con diazometano generado a partir de diazald como en la primera reacción en esta vía degradativa para generar el éster metílico del butanólido, (pág. 39); se agregaron unas gotas (3-4) de ácido acético al finalizar la reacción. El producto obtenido fue llamado producto **5B**.

#### **2.2.3.6.1 Aislamiento y Purificación del Producto 5B**

El producto **5B** (éster metílico del butanólido de  $PA_2$ ) se sometió a cromatografía en columna de baja presión en fase reversa isocrática, usando las mismas condiciones indicadas para el butanólido derivado de la  $PA_1$ , (pág. 41).

#### **2.2.3.7 Análisis por $^1H$ RMN del Producto 5B**

Las fracciones obtenidas en la purificación del producto **5B** fueron evaporadas a sequedad, disueltas en cloroformo deuterado y analizadas por espectroscopía de  $^1H$ RMN.

### **2.2.3.8 Análisis por $^1\text{HRMN}$ del Producto 5B con Reactivo de Desplazamiento Quiral**

Una de las fracciones que contenían al éster metílico del butanólido derivado de  $\text{PA}_2$  según el análisis de  $^1\text{HRMN}$ , se analizó por espectroscopía de  $^1\text{HRMN}$  con el reactivo de desplazamiento quiral: tris [3-heptafluoropihidroximetilen-(+)-camforato de europio III] disuelto en cloroformo deuterado; se le agregó sucesivamente 35, 70 y 105  $\mu\text{L}$  de este reactivo a una concentración de 100 mg/mL, igual que se realizó para el butanólido derivado de la  $\text{PA}_1$ .

### **2.2.3.9 Análisis por $^1\text{HRMN}$ de la Mezcla de los Productos 5 y 5B con Reactivo de Desplazamiento Quiral**

A una muestra del Producto 5 (butanólido derivado de  $\text{PA}_1$ ) disuelto en cloroformo deuterado que contenía 105  $\mu\text{l}$  de reactivo de desplazamiento quiral disuelto en cloroformo, se le realizó el análisis de  $^1\text{HRMN}$ ; posteriormente se agregaron 10  $\mu\text{l}$  producto 5B (butanólido derivado de  $\text{PA}_2$ ) disuelto en cloroformo deuterado y se realizó nuevamente el análisis por  $^1\text{HRMN}$ .

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Obtención de la Configuración Absoluta de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> por la Vía de Difracción de Rayos X

##### 3.1.1 Síntesis del Derivado Clorado en la Posición 7' de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>

Como producto de esta reacción se obtuvo un precipitado color verdoso. Por medio de CCF en fase reversa se observaron alrededor de 4 a 5 compuestos algunos de los cuales presentaron fluorescencia verde a 375 nm; se observó además el producto clorado con fluorescencia color naranja a esta misma longitud de onda y apareció una mancha con R<sub>f</sub> similar al de la PA<sub>1</sub>.

En el análisis por CLAR analítico fase reversa, con la mezcla de elutes 65:35 (A = Metanol, B = Agua-Acetonitrilo- Ac. Acético, 70:30:1.6) se observó la presencia entre otros, del compuesto 7'-Cl de PA<sub>1</sub>, el cual presentó un tiempo de retención de 6.4 minutos bajo las condiciones indicadas en la página 24.

### 3.1.1.1 Aislamiento y Purificación del Derivado Clorado de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>

Se obtuvieron seis fracciones de la cromatografía en columna de baja presión; el análisis de éstas por CCF en fase reversa (metanol-agua 80:20) reveló que la fracción V contenía el derivado clorado con un R<sub>f</sub> de 0.125 coincidente con el estándar. En el análisis por CLAR fase reversa de las mismas fracciones, (con las condiciones indicadas en la página 25), se observó en la fracción V el mismo TR (6.4 minutos) que el estándar, además se observó otro compuesto (TR 6.8 minutos) aproximadamente en la misma proporción, Fig. 22. Esta fracción V fue sometida a CLAR fase reversa semipreparativa, donde se observó que una de las fracciones (F3) contenía el compuesto de interés puro; ésta fue la fracción sometida al proceso de cristalización, Fig. 23.

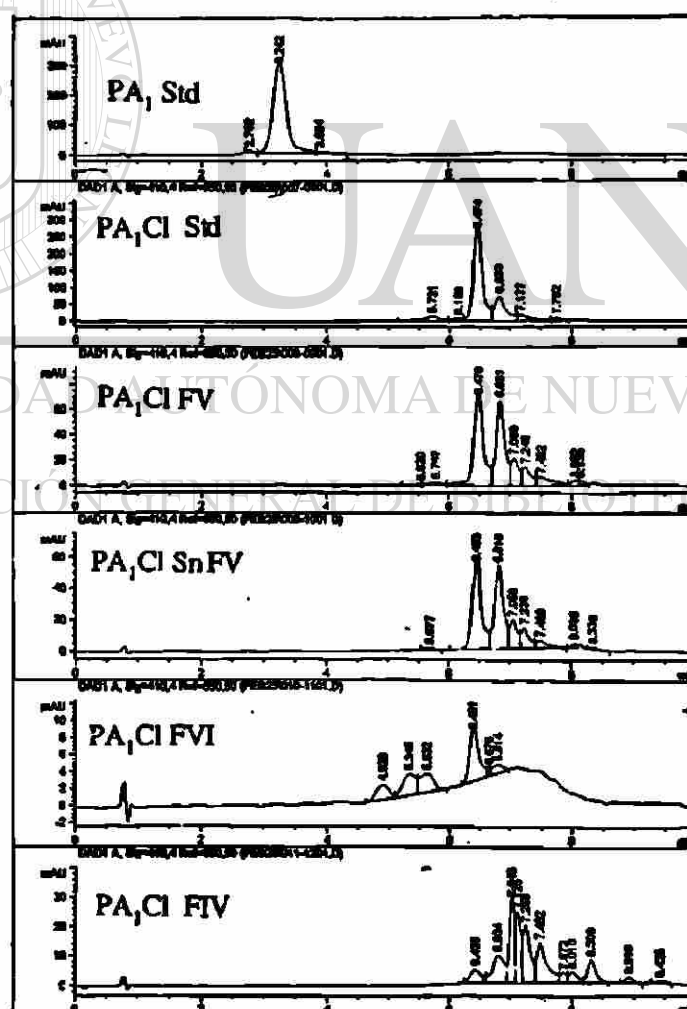


Figura 22. Cromatogramas CLAR analítico de las fracciones obtenidas en la purificación del producto de la reacción de cloración de la PA<sub>1</sub> por columna de baja presión

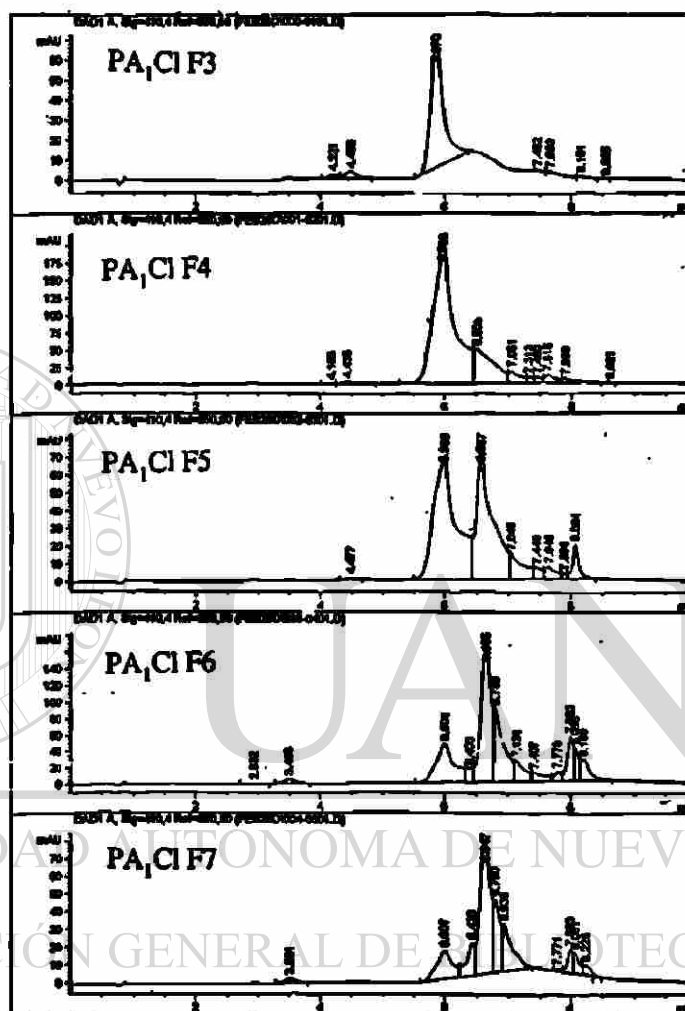


Figura 23. Cromatogramas CLAR analítico de las fracciones obtenidas de la purificación por CLAR semipreparativo del producto de la reacción de cloración de la PA<sub>1</sub>.

### 3.1.1.2 Cristalización del Derivado Clorado de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>

No se logró obtener los cristales del derivado clorado de la PA<sub>1</sub> por el método de difusión líquido-líquido.

## **3.2 Determinación de la Configuración Absoluta de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> por la Vía de Degradación Química Hasta la Obtención del Butanólido Tetrahidro-2-metil-5-oxo-2-furanacetato de metilo**

### **3.2.1 Degradación Química de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>**

#### **3.2.1.1 Bloqueo de los Hidroxilos Fenólicos en las Posiciones 9 y 9' de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>**

El producto de esta reacción fue un precipitado color amarillo; después de analizarlo en CCF en sílica gel se detectaron alrededor de 9 compuestos que mostraron fluorescencia blanco-verdosa a la luz ultravioleta a 375 nm.

##### **3.2.1.1.1 Aislamiento y Purificación del Derivado Metilado en las Posiciones 9 y 9' de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>**

Después de separar la mezcla de los compuestos obtenidos en la reacción anterior por medio de cromatografía en columna gravitacional en sílica gel, se obtuvieron varias fracciones que contenían el compuesto de interés (376 mg), que fue identificado como el derivado 9-9' dimetilado de la PA<sub>1</sub> por comparación del R<sub>f</sub> (0.40) con el estándar. (CCF en sílica gel con acetato de etilo) y además por comparación del espectro de <sup>1</sup>HRMN en donde se observa disminución de las señales a  $\delta$  16.06 y  $\delta$  16.40 que correspondían a los OH fenólicos de las posiciones 9 y 9' en la PA<sub>1</sub> y la aparición de señales a  $\delta$  4 que no aparecían en el espectro de la PA<sub>1</sub> <sup>(19)</sup>, Fig. 24. Dicho compuesto fue llamado en esta tesis producto 1,

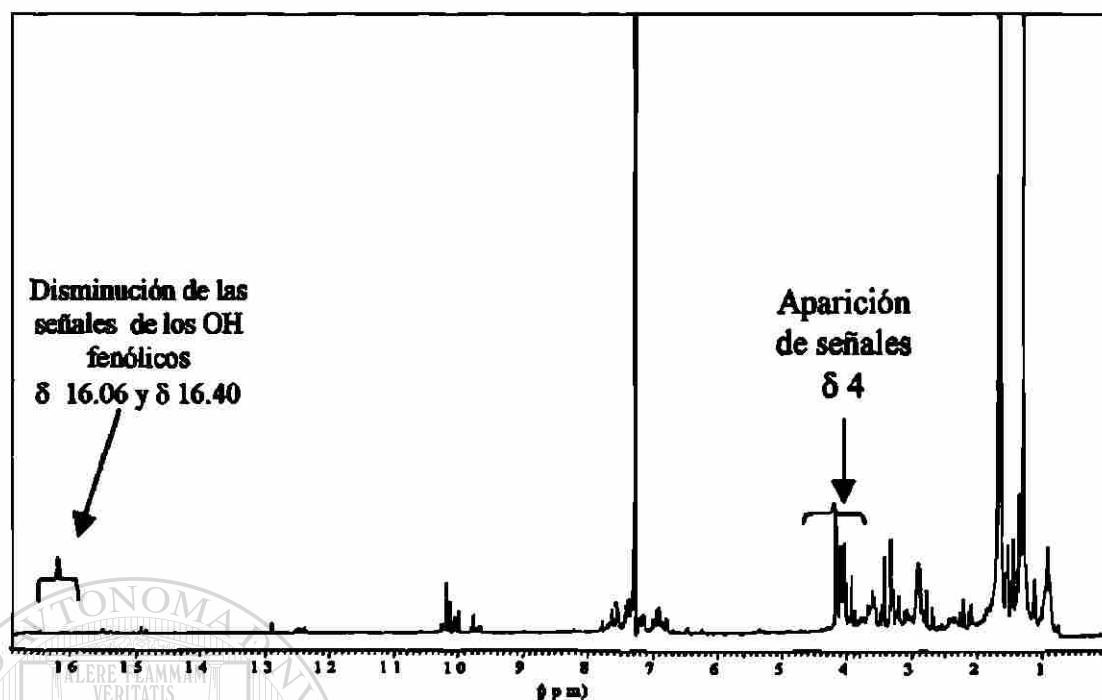


Figura 24. Espectro de  $^1\text{HRMN}$  del producto 1 (compuesto 9,9' dimetilado de  $\text{PA}_1$  impuro).

### 3.2.1.2 Reducción de los Grupos Carbonilos del Producto 1

De esta reacción se obtuvo un precipitado color blanco opaco (323 mg), que corresponde a una mezcla de alcoholes secundarios<sup>(18)</sup> al que se le llamó en esta tesis producto 2, el cual era una mezcla de varios compuestos que por CCF en sílica gel presentaron fluorescencia verde a 375 nm. En el espectro IR de este producto se observó la disminución de la banda a  $1675\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al estiramiento del grupo carbonilo, Fig. 25, En el espectro de  $^1\text{HRMN}$  se observa la aparición de señales a  $\delta 5.5$ , que no se observaban en el espectro del metilado de la  $\text{PA}_1$  y que corresponden a los hidrógenos de las posiciones 1 y 1', Fig. 26. Estos resultados son similares a los reportados por Ramírez<sup>(19)</sup> quien llegó hasta la purificación del metilado 9,9' y del compuesto reducido derivado de  $\text{PA}_1$ .

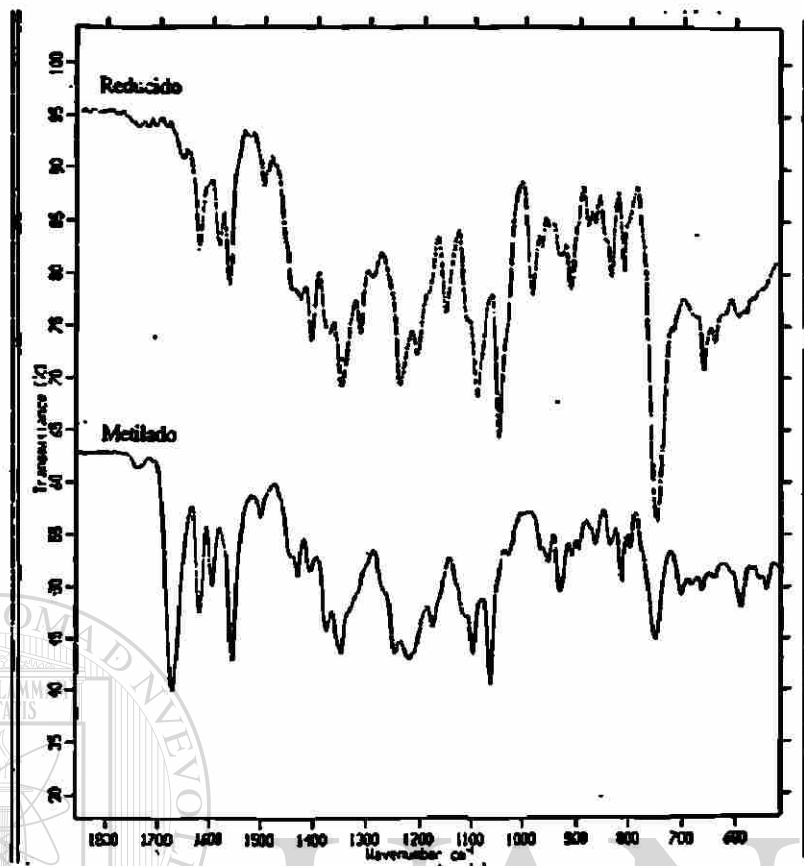


Figura 25. Espectro IR del producto 2 (producto de la reducción de los carbonilos en la PA<sub>1</sub> metilada en 9,9').

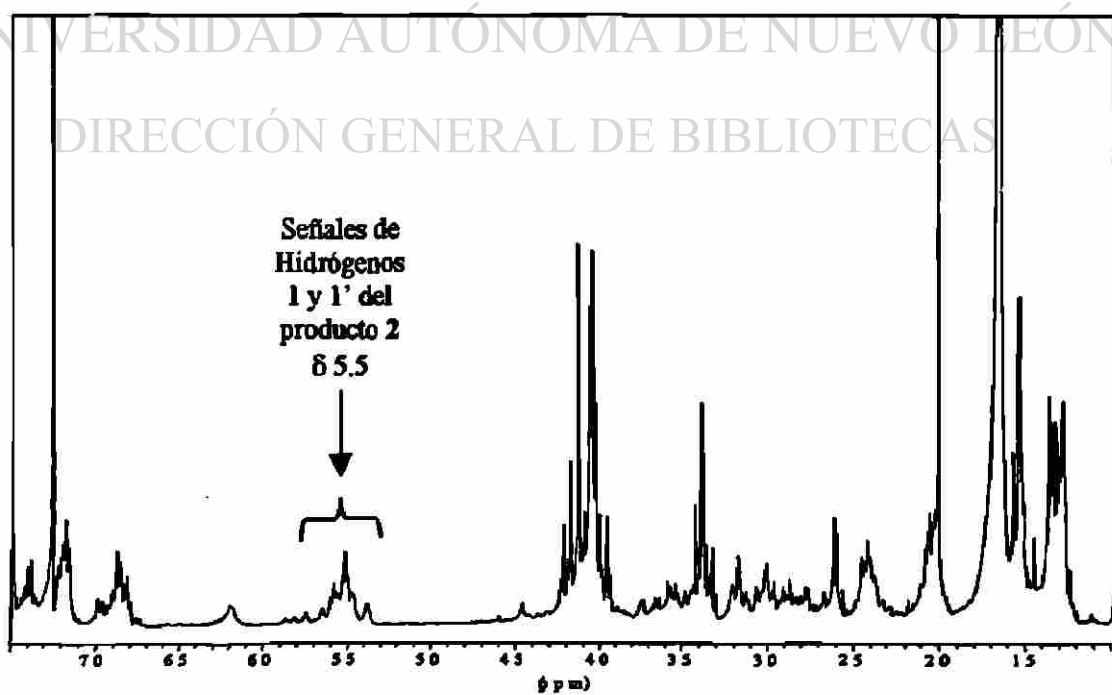


Figura 26. Espectro de <sup>1</sup>HRMN del producto 2.



### 3.2.1.3 Hidrogenólisis del Producto 2

#### 3.2.1.3.1 Hidrogenólisis Homogénea

##### 3.2.1.3.1.1 Hidrogenólisis Homogénea del Alcohol Bencílico

En el espectro de  $^1\text{HRMN}$  del producto de la hidrogenólisis del alcohol bencílico se observó la señal del metilo del tolueno a  $\delta$  2.4 y la señal metileno del alcohol bencílico a  $\delta$  4.7, lo que indicó que la reacción se llevó a cabo, aunque en forma incompleta, Fig. 27.

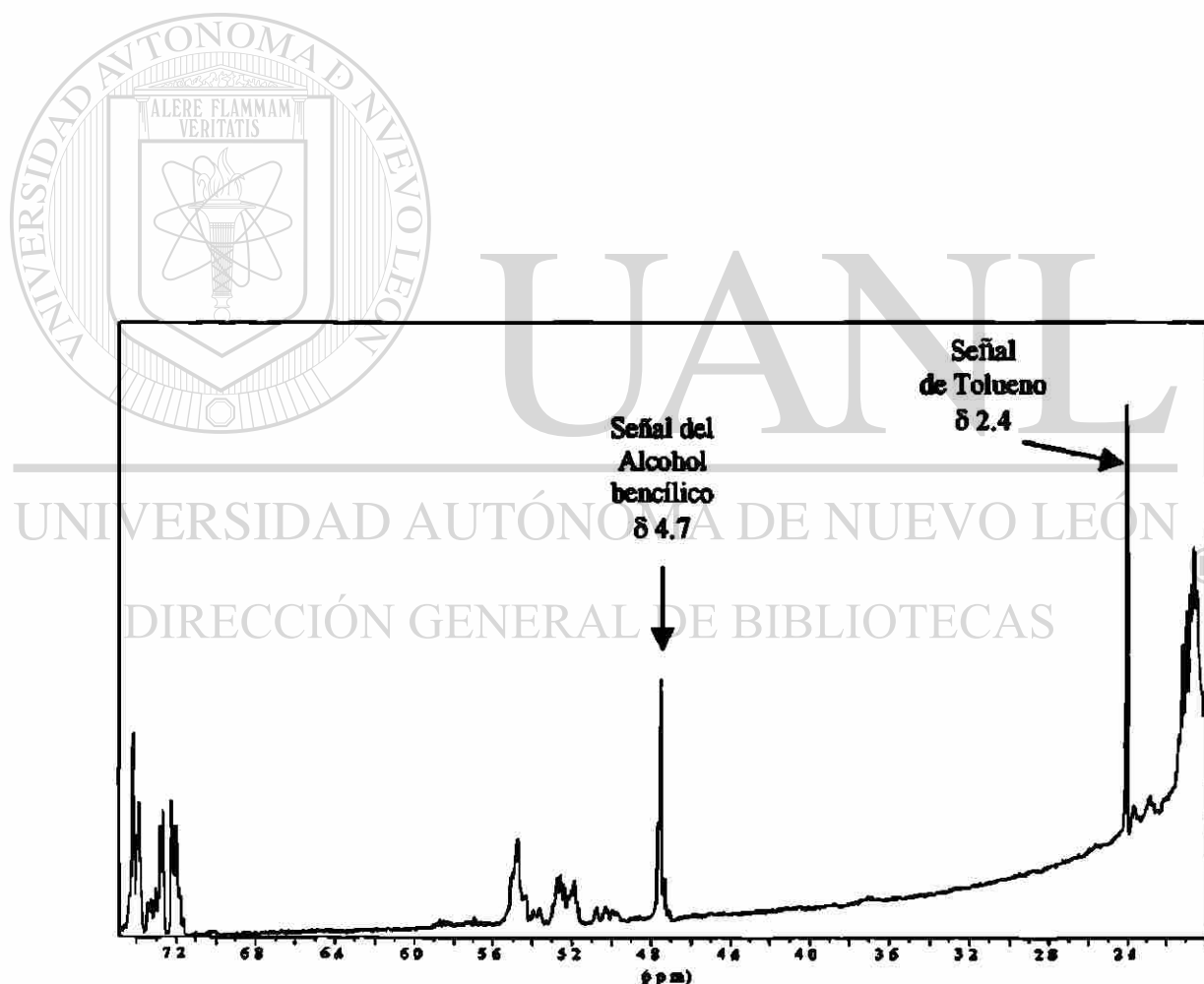


Figura 27. Espectro de  $^1\text{HRMN}$  del producto de la reacción de hidrogenólisis homogénea del alcohol bencílico.

### 3.2.1.3.1.2 Hidrogenólisis Homogénea de los Alcoholes Secundarios del Producto 2

Como producto de esta reacción se obtuvo un precipitado amarillo. En el espectro de  $^1\text{HRMN}$  se observó la aparición de una señal alrededor de  $\delta$  5, que podría ser un alqueno; producto no deseado. Fig. 28.

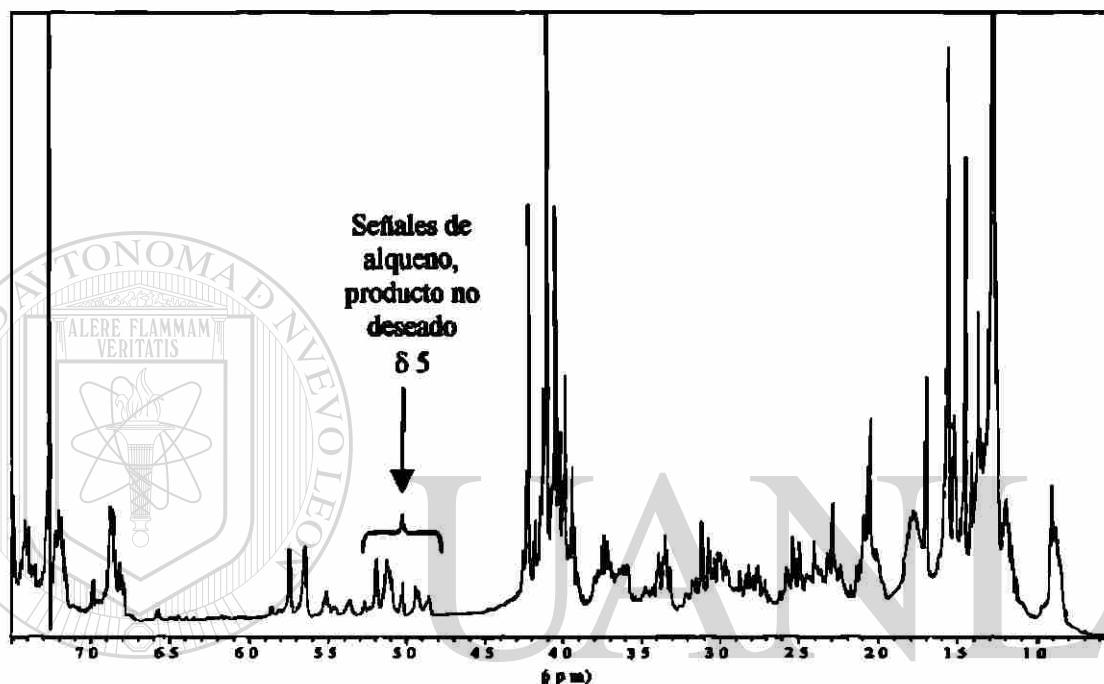


Figura 28. Espectro de  $^1\text{HRMN}$  del producto de la reacción de hidrogenólisis homogénea de los alcoholes secundarios del producto 2.

### 3.2.1.3.2 Hidrogenólisis Heterogénea de los Alcoholes Secundarios del Producto 2

Como producto de esta reacción se obtuvo un precipitado color blanco ostión (134 mg). A la mezcla de tetrahidroantracenos <sup>(18)</sup> obtenidos en esta reacción se le llamo producto 3. En el espectro de  $^1\text{HRMN}$  de este producto se observó la desaparición de las señales a  $\delta$  5.5 que aparecían en el espectro del producto de la reducción (producto 2). Fig. 29.

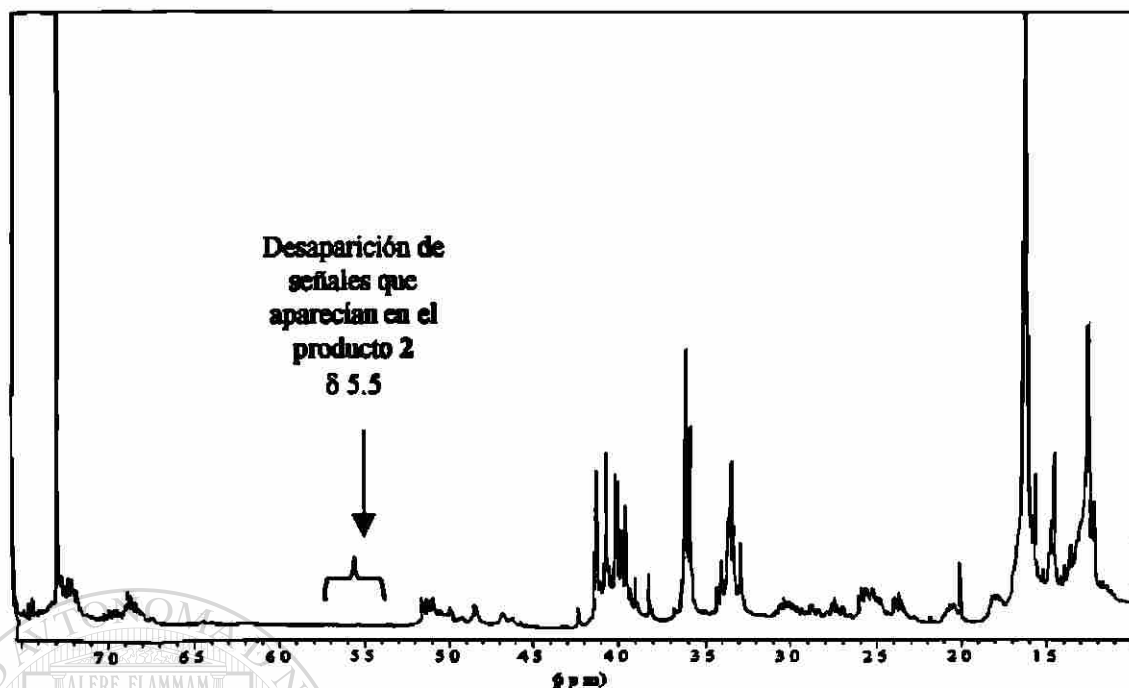


Figura 29. Espectro de  $^1\text{HRMN}$  del producto 3.

#### 3.2.1.4 Oxidación del Producto 3

El producto de la reacción de oxidación de los tetrahidroantracenos (producto 3), fue una capa oleosa, que fue llamado en esta tesis como producto 4.

#### 3.2.1.5 Metilación del Producto 4

De la reacción de metilación del ácido carboxílico (producto 4), se obtuvo una capa oleosa llamada en este trabajo como producto 5; al ser analizada por  $^1\text{HRMN}$  se observó la desaparición de las señales aromáticas y se observó la aparición de señales a  $\delta$  3.7 y a  $\delta$  1.52 que corresponden al éster metílico del butanólido que es el producto esperado <sup>(18)</sup>, Fig. 30.

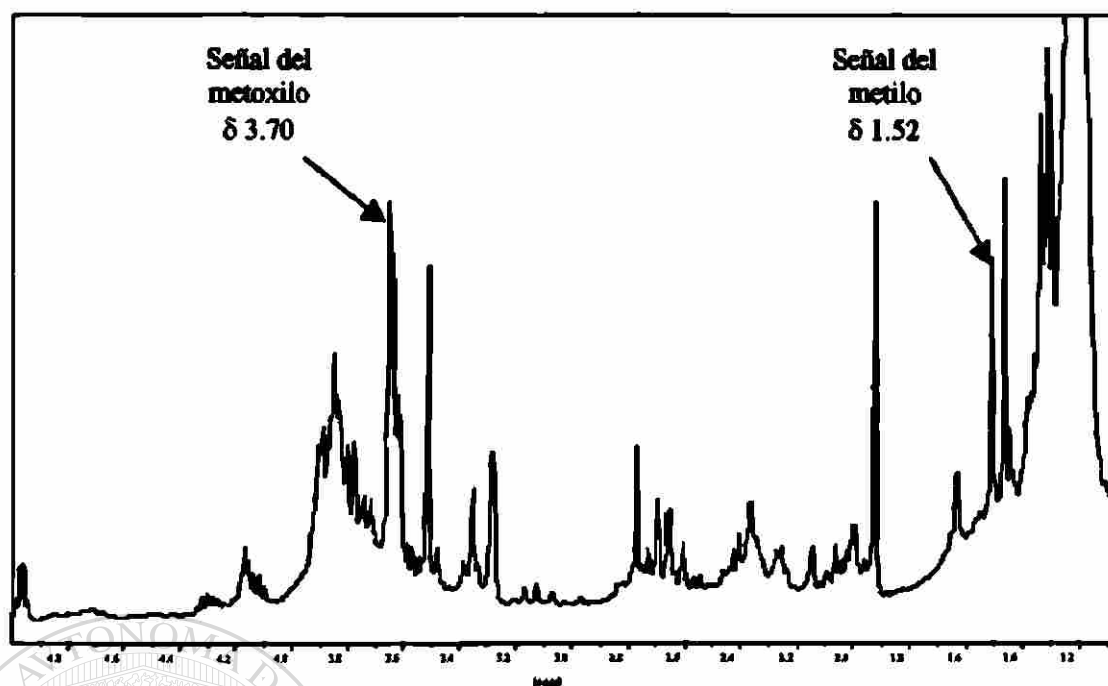


Figura 30. Espectro de  $^1\text{HRMN}$  del producto 5.

### 3.2.1.5.1 Aislamiento y Purificación del Producto 5

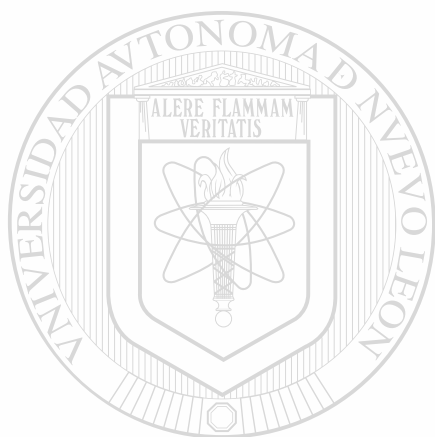
Las muestras obtenidas de la columna de purificación del producto 5 se analizaron por CCF en sílica gel, se observaron alrededor de 18 manchas con una fluorescencia naranja oscura a 254 nm, que finalmente fue el número de fracciones obtenidas.

### 3.2.1.6 Análisis por $^1\text{HRMN}$ del Producto 5

Las fracciones obtenidas en la purificación del producto 5 fueron analizadas por  $^1\text{HRMN}$ , y se observó que las fracciones 8 y 9 contenían las señales a  $\delta$  1.52 y  $\delta$  3.70 que corresponden al butanólido buscado <sup>(18)</sup>, Fig. 31A.

### 3.2.1.7 Análisis por $^1\text{HRMN}$ del Producto 5 con Reactivo de Desplazamiento Quiral

A la fracción 8 que mostró las señales de interés en  $^1\text{HRMN}$  se le agregó 105  $\mu\text{L}$  del reactivo de desplazamiento quiral tris (3-[heptafluoropilhidroximetilen]-d-camforato de europio III), a una concentración de 100 mg/mL y fue analizada por  $^1\text{HRMN}$  observándose desplazamiento de señales a campos menores: la señal de  $\delta$  1.52 se desplazó a  $\delta$  2.20 y la de  $\delta$  3.70 a  $\delta$  4.51, Fig. 31B.



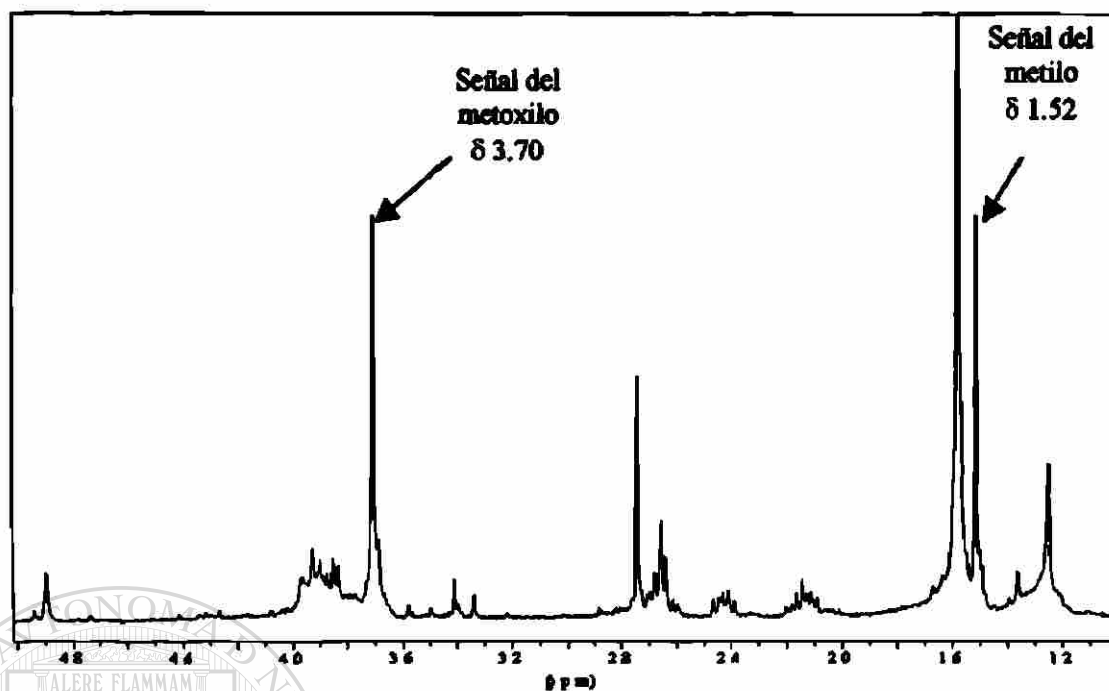
# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A



B

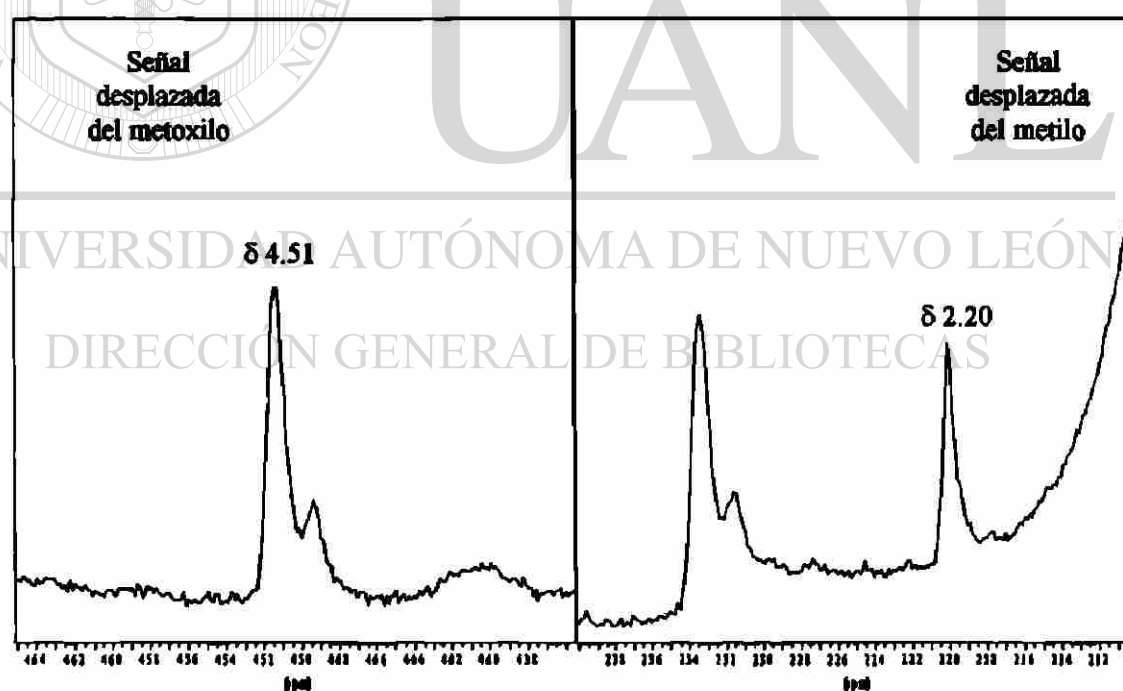


Figura 31. Espectro de  $^1\text{H}$ RMN del butanólido tetrahidro-2-metil-5-oxo-2-furanacetato de metilo derivado de  $\text{PA}_1$ . A sin reactivo de desplazamiento quiral. B con reactivo de desplazamiento quiral, donde se muestran los desplazamientos de las señales del metilo de  $\delta$  1.52 a  $\delta$  2.20 y del metoxilo de  $\delta$  3.70 a  $\delta$  4.51.

### 3.2.1.8 Análisis por Polarimetría del Producto 5

Se realizó el análisis cuantitativo de la desviación del plano de luz polarizada del éster metílico del butanólido derivado de PA<sub>1</sub> disuelta en cloroformo a la longitud de onda del sodio (589 nm) obteniéndose el siguiente resultado:

Long. de onda (nm)	$\alpha$ Observada	Desviación estándar
589	(+) 0.0070	0.0003

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{\alpha \text{ observada}}{c \times l}$$

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{+ 0.0070}{(0.00075 \text{ g/mL}) \times (1 \text{ dm})} = + 9.3^\circ$$

### 3.2.2 Obtención del Butanólido Tetrahidro-2-metil-5-oxo-2-furanacetato de metilo por Degradación Química de la Peroxisomicina A<sub>2</sub>

#### 3.2.2.1 Purificación de la Peroxisomicina A<sub>2</sub>

Cuando la muestra de PA<sub>2</sub> que contenía PA<sub>1</sub> como principal impureza fue sometida al CLAR semipreparativo en fase reversa, el cromatograma indicó la presencia de por lo menos dos compuestos diferentes, sin embargo de las fracciones obtenidas en esta separación se obtiene la PA<sub>2</sub> con un alto grado de pureza (TR de 1.79 minutos), según se observó en los cromatogramas de CLAR analítico; estas fracciones fueron usadas para la obtención del butanólido derivado de PA<sub>2</sub>, Fig.32.

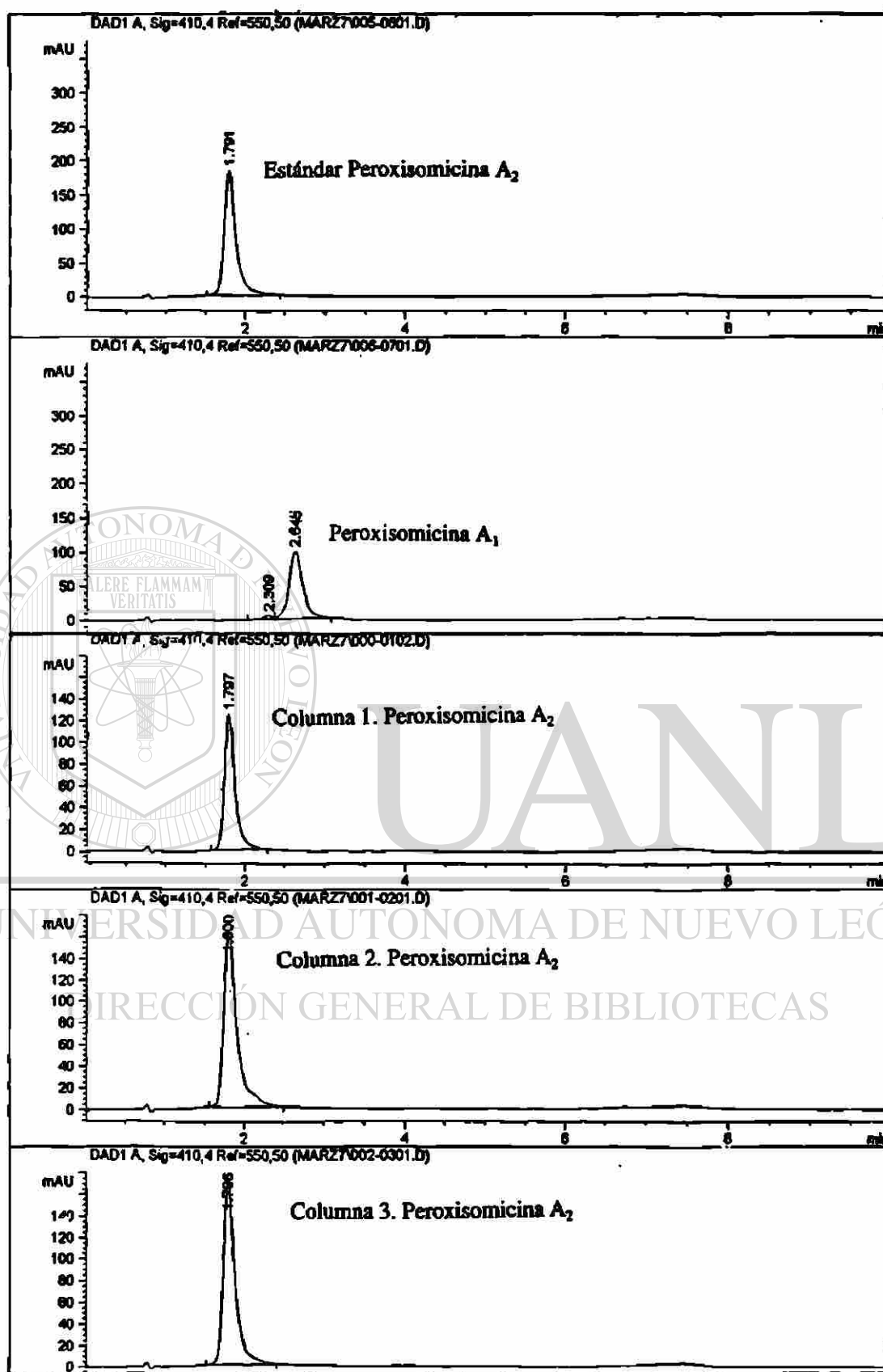


Figura 32. Cromatogramas CLAR analítico de la purificación de PA<sub>2</sub> por CLAR semipreparativo.



### 3.2.2.2 Bloqueo de los Hidroxilos Fenólicos en las Posiciones 9 y 9' de la Peroxisomicina A<sub>2</sub>

El producto de la reacción de metilación de los hidroxilos fenólicos de las posiciones 9 y 9' de la PA<sub>2</sub> fue un precipitado color amarillo en el cual en CCF en sílica gel se detectaron entre 7 y 9 compuestos que mostraron fluorescencia blanco-verdosa a la luz ultravioleta a 375 nm.

#### 3.2.2.2.1 Aislamiento y Purificación del Derivado Metilado en las Posiciones 9 y 9' de la Peroxisomicina A<sub>2</sub>

Después de separar la mezcla de estos compuestos por cromatografía en columna gravitacional en sílica gel se obtuvieron 9 fracciones; el producto de interés (314 mg) fue identificado como el derivado 9-9' dimetilado de la PA<sub>2</sub> por medio del espectro de <sup>1</sup>HRMN, donde se observó la desaparición o disminución de las señales a  $\delta$  16.06 y  $\delta$  16.41, Fig. 33, este producto fue identificado como producto 1B.

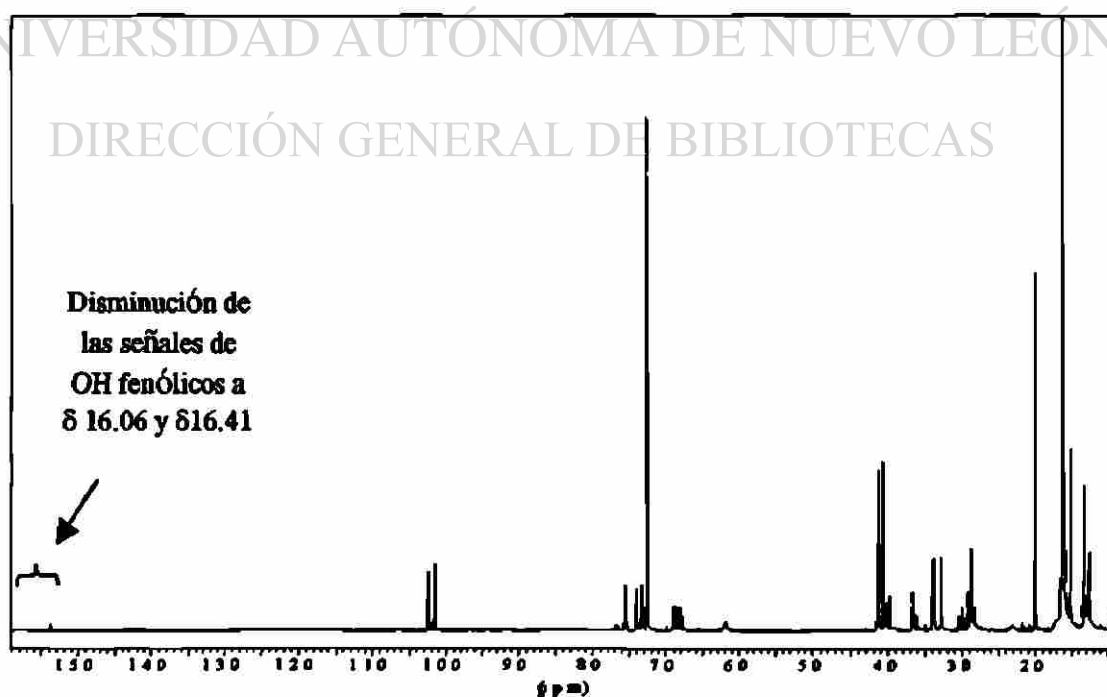


Figura 33. Espectro de <sup>1</sup>HRMN del producto 1B.

### 3.2.2.3 Reducción del Grupo Carbonilo del Producto 1B

Se obtuvo un precipitado color blanco ostión (212 mg) de la reacción de reducción del producto 1B; en CCF en sílica gel se observó la aparición de varios compuestos que presentaron fluorescencia verde a 375 nm y la desaparición del producto 1B; en el espectro de  $^1\text{HRMN}$  se observó la aparición de señales a  $\delta$  5.5, que no se observaban en el espectro del metilado, Fig. 34. La mezcla de alcoholes secundarios generados en esta reacción de reducción fue designado en el presente trabajo como producto 2B<sup>(18)</sup>.

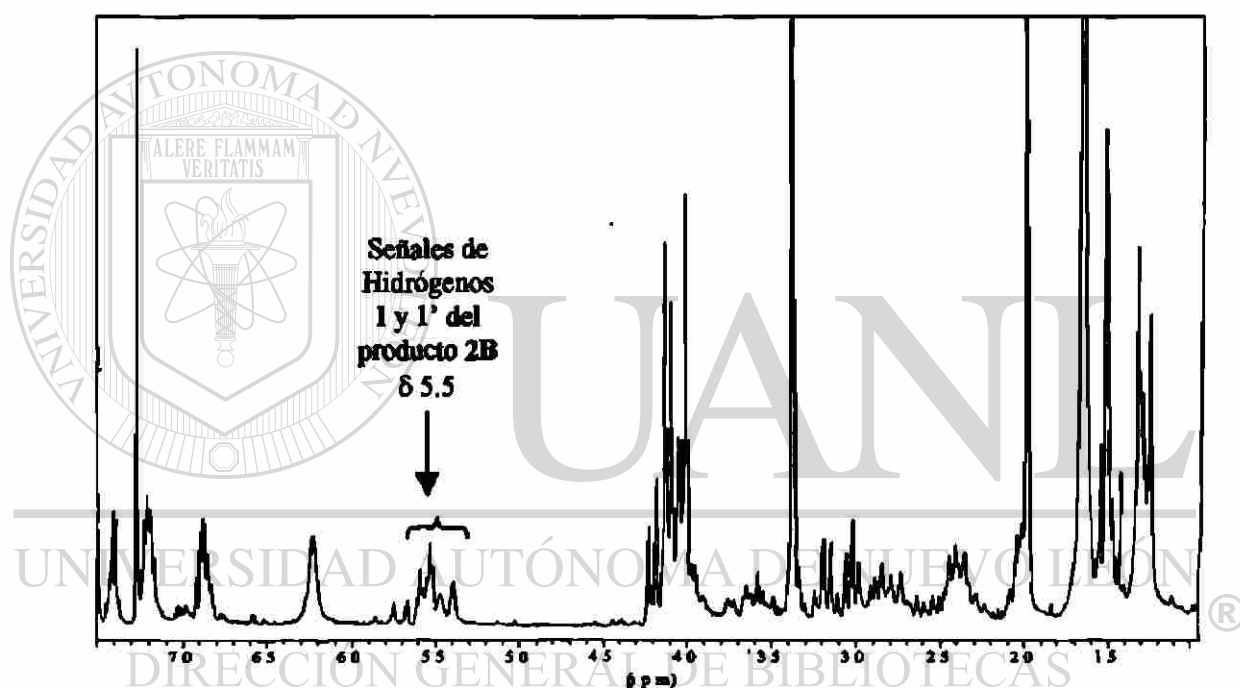


Figura 34. Espectro de  $^1\text{HRMN}$  del producto 2B.

### 3.2.2.4 Hidrogenólisis Heterogénea de los Alcoholes Secundarios del Producto 2B

Como producto de la reacción de hidrogenólisis de los alcoholes secundarios del producto 2B se obtuvo un precipitado color blanco ostión (150 mg) que corresponde a una mezcla de tetrahidroantracenos<sup>(18)</sup>. En el espectro  $^1\text{HRMN}$  se observó la

desaparición de las señales a  $\delta$  5.5 que aparecían en el espectro del producto de la reducción, Fig. 35. El producto obtenido en esta reacción fue llamado producto 3B.

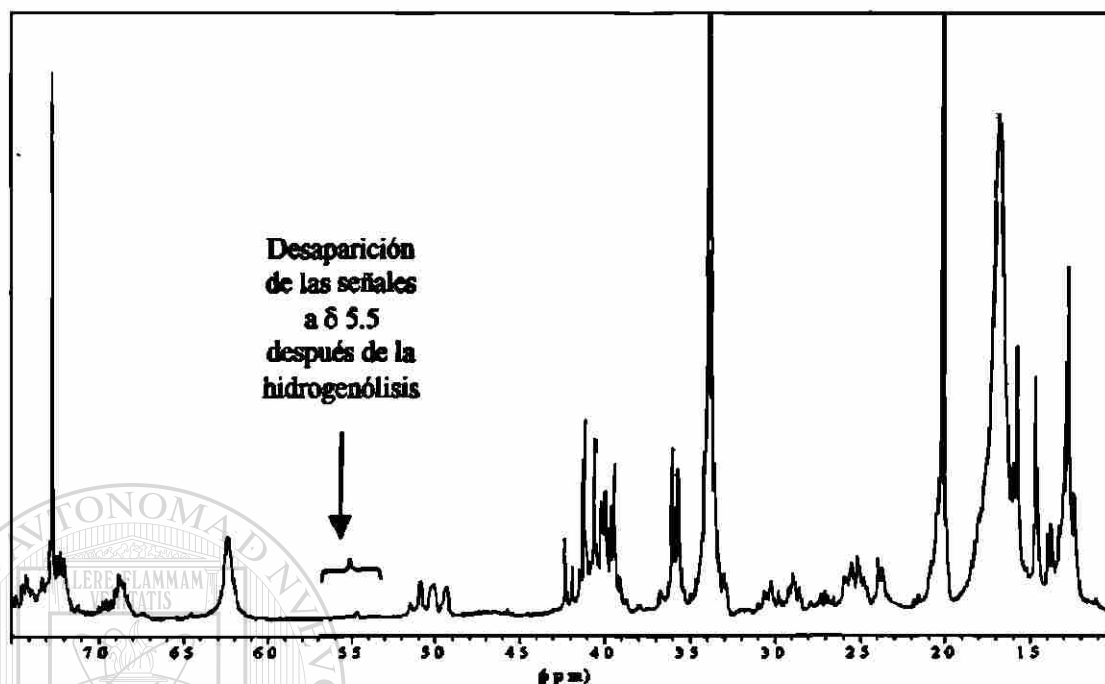


Figura 35. Espectro de  $^1\text{HRMN}$  del producto 3B.

### 3.2.2.5 Oxidación del Producto 3B

De la reacción de oxidación del producto 3B (mezcla de tetrahidroantracenos) hasta la obtención del ácido carboxílico, se obtuvo una capa oleosa. El producto de esta reacción fue designado como producto 4B.

### 3.2.2.6 Metilación del Producto 4B

Como producto de la reacción de metilación del ácido carboxílico obtenido en la reacción anterior (producto 4B), se obtuvo una capa oleosa a la que designó en este trabajo como producto 5B y que no fue analizada por  $^1\text{HRMN}$  sino que inmediatamente se sometió a la purificación.

### 3.2.2.7 Aislamiento y Purificación del Producto 5B

Las muestras obtenidas de la columna de purificación del producto 5B (página 47) se analizaron por CCF en sílica gel, se observaron alrededor de 19 manchas con diferente Rf que presentaron fluorescencia naranja oscura a 254 nm; finalmente éste fue el número de fracciones obtenidas.

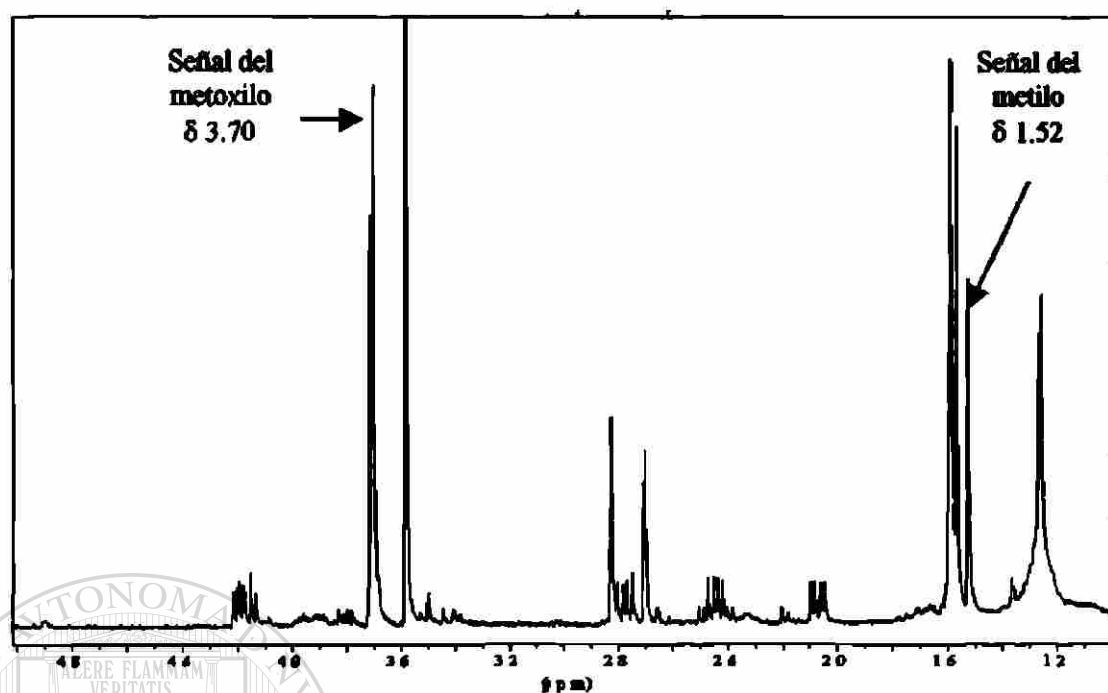
### 3.2.2.8 Análisis por $^1\text{HRMN}$ del Producto 5B

Las fracciones obtenidas en la purificación del producto 5B fueron analizadas por  $^1\text{HRMN}$ ; se observó que las fracciones 7, 8 y 9 contenían las señales a  $\delta$  1.52 y  $\delta$  3.70 que corresponden al butanólido buscado <sup>(18)</sup>, Fig. 36A.

### 3.2.2.9 Análisis por $^1\text{HRMN}$ del Producto 5B con Reactivo de Desplazamiento Quiral

A una de las fracciones que mostró las señales de interés en  $^1\text{HRMN}$  se les agregó el reactivo de desplazamiento quiral tris (3-[heptafluoropilhidroximetilen]-d-camforato de europio III), y se observó el desplazamiento de señales a campos menores, además de observarse la partición en dos de cada una de éstas, desplazándose la señal de  $\delta$  1.52 a  $\delta$  2.17 y  $\delta$  2.20 y la de  $\delta$  3.70 a  $\delta$  4.48 y  $\delta$  4.51, Fig. 36B.

A



B

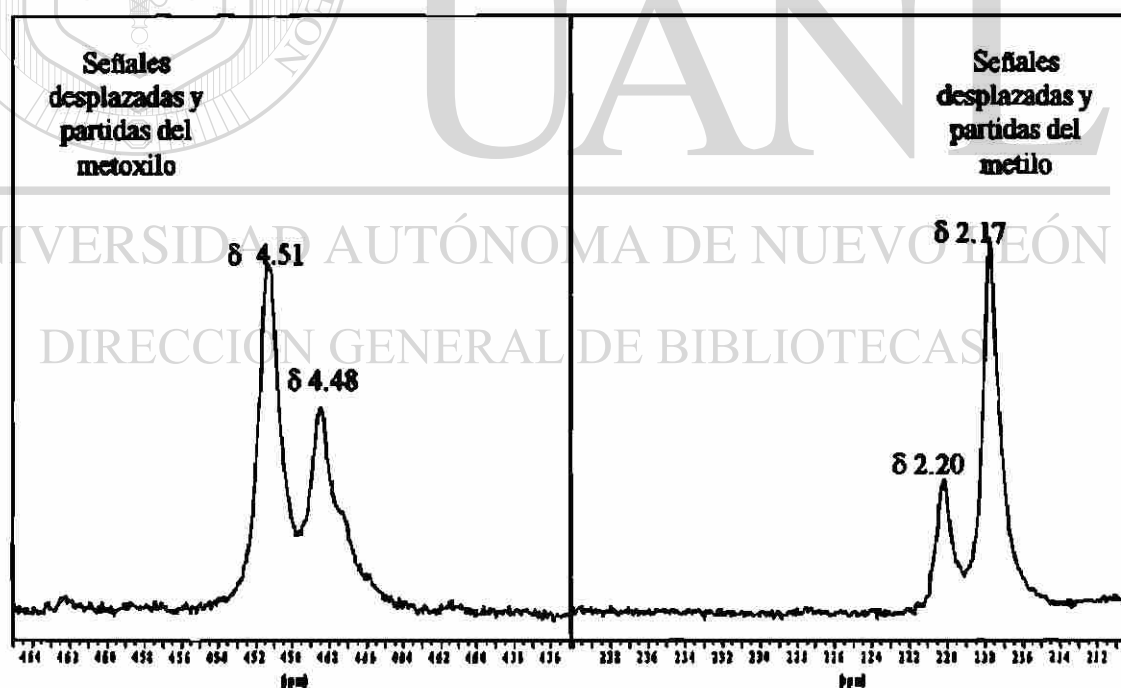
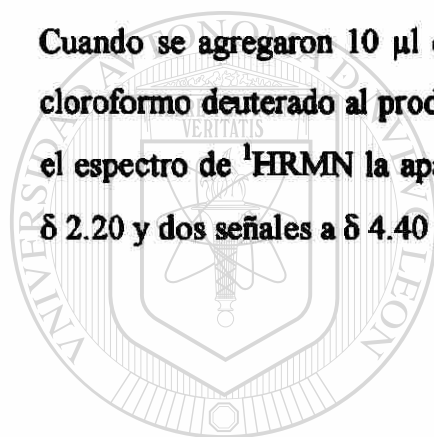


Figura 36. Espectros de  $^1\text{H}$ RMN del butanólido tetrahidro-2-metil-5-oxo-2-furanacetato de metilo derivado de  $\text{PA}_2$ . A sin reactivo de desplazamiento quiral. B Con reactivo de desplazamiento quiral, donde se muestran los desplazamientos y las particiones de las señales del metilo de  $\delta$  1.52 a  $\delta$  2.17 y  $\delta$  2.20 y la del metoxilo de  $\delta$  3.70 a  $\delta$  4.48 y  $\delta$  4.51).

### 3.2.2.10 Análisis por $^1\text{HRMN}$ de la Mezcla de los Producto 5 y 5B con Reactivo de Desplazamiento Quiral

Del análisis por  $^1\text{HRMN}$  del butanólido obtenido de  $\text{PA}_1$  (producto 5) se obtuvo un espectro en el que aparecían las señales del metilo ( $\delta$  1.52) y del metoxilo ( $\delta$  3.70), Fig. 37A.

A través del análisis por  $^1\text{HRMN}$  del butanólido derivado de  $\text{PA}_1$  (producto 5) que contenía 105  $\mu\text{l}$  de reactivo de desplazamiento, se observaron las señales del metilo de  $\delta$  1.52 desplazada a  $\delta$  2.20 y la del metoxilo de  $\delta$  3.70 desplazada a  $\delta$  4.51, Fig. 37B. Cuando se agregaron 10  $\mu\text{l}$  del butanólido derivado de  $\text{PA}_2$  (producto 5B) disuelto en cloroformo deuterado al producto 5 que tenía reactivo de desplazamiento, se observó en el espectro de  $^1\text{HRMN}$  la aparición de una señal a  $\delta$  2.19 adicional a la ya existente de  $\delta$  2.20 y dos señales a  $\delta$  4.40 y  $\delta$  4.44, Fig. 37C.

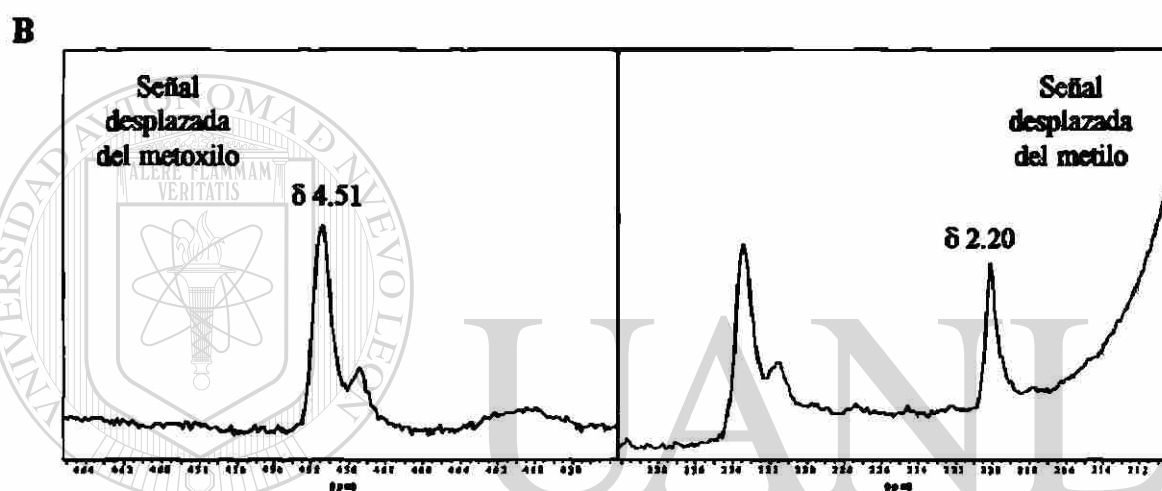
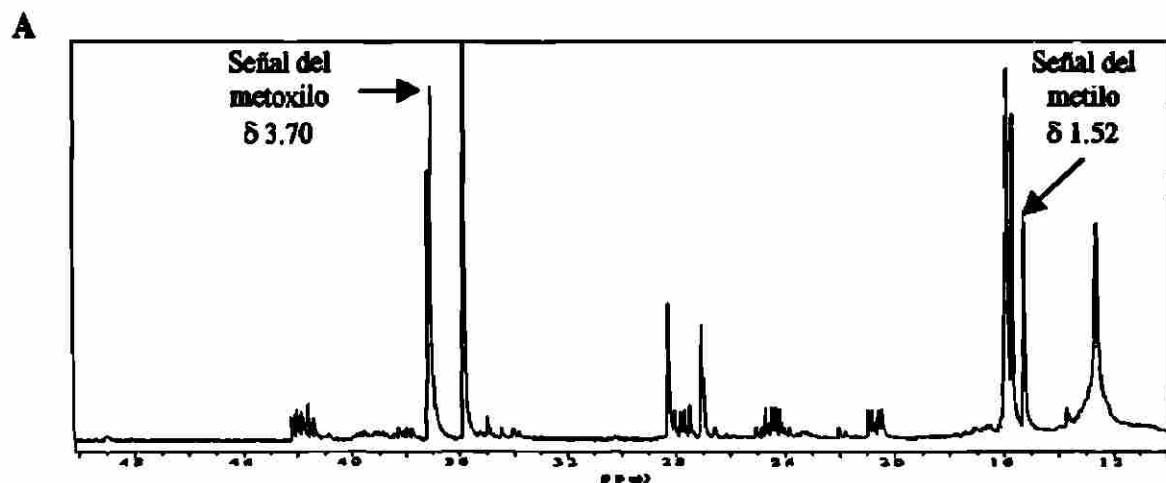


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

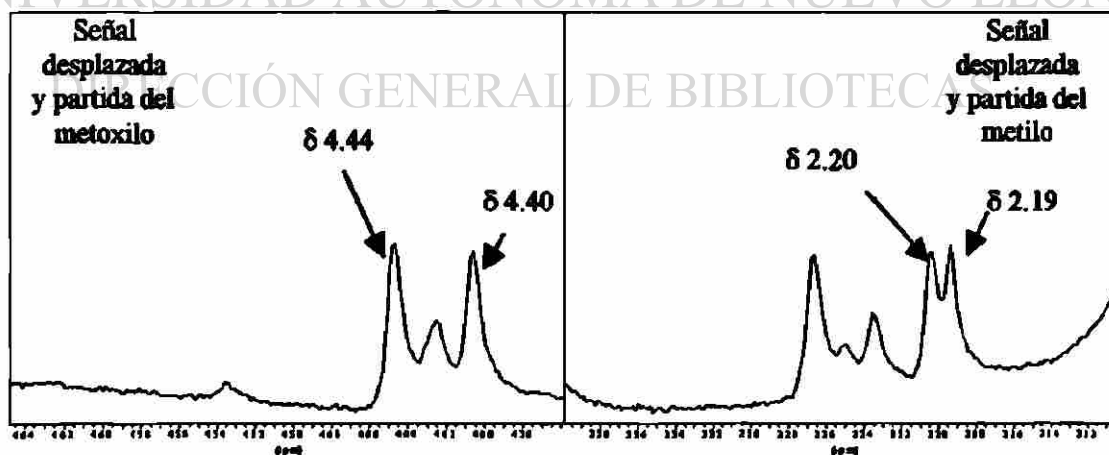


Figura 37. Espectros de  $^1\text{HRMN}$ . **A** butanólido derivado de  $\text{PA}_1$  sin reactivo de desplazamiento quiral. **B** butanólido derivado de  $\text{PA}_1$  con reactivo de desplazamiento quiral. **C** mezcla de los butanólidos derivados de  $\text{PA}_1$  y  $\text{PA}_2$  con reactivo de desplazamiento quiral.

## **CAPÍTULO 4**

### **DISCUSIÓN**

**En el presente trabajo se estableció como objetivo general obtener la configuración absoluta de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> y para lograrlo se utilizaron dos vías, planteadas como objetivos específicos. La primera vía consistía en obtener la configuración absoluta de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> por difracción de rayos X de un derivado de este compuesto que tuviera en su estructura un átomo pesado. La segunda vía se basaba en la degradación química de la PA<sub>1</sub> hasta obtener un butanólido y posterior comparación de los datos espectroscópicos de éste con los datos publicados en la literatura y finalmente correlacionar estos resultados con modelos moleculares para finalmente obtener la configuración absoluta.**



#### **4.1 Obención de la Configuración Absoluta de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> por la Vía de Difracción de Rayos X**

Para obtener la configuración de la PA<sub>1</sub> por esta vía, se llevó a cabo la síntesis del derivado 7'-cloro de este compuesto. Se tomó como referencia el trabajo realizado por Ramírez y cols. en el cual, mediante la modificación química de la PA<sub>1</sub>, se sintetizó una serie de derivados, con los cuales se llegó a establecer relaciones de estructura-actividad biológica en este compuesto <sup>(19)</sup>. Uno de estos derivados, el producto clorado en la posición 7' de la PA<sub>1</sub>, resultó de interés para nuestro objetivo, ya que el Cloro constituye un átomo pesado y podría ser utilizado para determinar la configuración absoluta de la PA<sub>1</sub>, usando una longitud de onda cercana al límite de absorción del cloro para generar un patrón de rayos X diferente al de la técnica normal de difracción de rayos X <sup>(16)</sup>.

Una vez obtenido el compuesto de interés del cual se obtuvo un bajo rendimiento, el siguiente paso era obtener cristales del mismo. Para esto se utilizó la difusión líquido-líquido y la difusión líquido-vapor; sin embargo no se logró obtener los cristales adecuados del derivado 7' cloro de la PA<sub>1</sub> por ninguno de los métodos probados. Por esta razón se propone que en un futuro se trate de cristalizar el derivado 7'-Cl de la PA<sub>1</sub> por medio de otros métodos. Considerando que la mayoría de las técnicas de cristalización necesitan soluciones saturadas y debido al bajo rendimiento obtenido en esta reacción, se propone realizar modificaciones a la técnica original y con ello asegurar la producción del compuesto puro en mayor cantidad. Además, algunas técnicas de cristalización requieren pasos de calentamiento y enfriamiento, y considerando la inestabilidad de este compuesto esto originaría la degradación del

derivado clorado <sup>(22)</sup>. Por este motivo, se propone realizar la reacción de cloración en algún derivado metilado de la PA<sub>1</sub>, ya que está descrito que estos derivados metilados son más estables por el bloqueo de los grupos hidroxilos que poseen <sup>(18)</sup>.

#### 4.2 Obtención de la Configuración Absoluta de Peroxisomicina A<sub>1</sub> por la Vía de Degradación Química.

Esta vía degradativa fue utilizada por Melvin Gill y cols. en antracenas monoméricas y diméricas para determinar su configuración absoluta, obteniendo de ellas el butanólido tetrahidro-2-metil-5-oxo-furanacetato de metilo y comparando la configuración absoluta de éste con los butanólidos enantiómeros (R y S) sintetizados previamente <sup>(18, 20)</sup>.

Melvin Gill menciona que en contraste con métodos ópticos que son limitados en su aplicabilidad para pre-antraquinonas monoméricas tales como torosacrisona, la degradación química y posterior correlación con ésteres quirales del tipo butanólidos, ofrece una solución práctica para la determinación de la quiralidad central en diantracenas acopladas y puede por tanto, ser utilizado para determinar la configuración absoluta de la peroxisomicina A<sub>1</sub> obtenida de plantas del género *Karwinskia* <sup>(18, 20)</sup>.

El primer paso de la vía degradativa fue el bloqueo de los grupos OH fenólicos de las posiciones 9 y 9' por medio de diazometano, generado a partir de diazald. Se

seleccionó este reactivo por los buenos resultados reportados por Ramírez<sup>(19)</sup> después de probar diferentes maneras de bloquear dichos hidroxilos, Fig. 11. El bloqueo de los grupos OH fenólicos es necesario antes de reducir el grupo carbonilo puesto que así se evita la formación de puentes de hidrógeno entre los hidroxilos fenólicos y este grupo; está reportado que estos puentes de hidrógeno son la causa de que el grupo carbonilo no se pueda reducir <sup>(18)</sup>.

Melvin Gill y cols. reportaron que durante el proceso de degradación química de hidroxiantracenas como la flavomanina no es necesario purificar los productos en cada una de las etapas. Sin embargo por lo señalado anteriormente (nula reactividad del carbonilo) nosotros debíamos asegurar que los hidroxilos fenólicos de la PA<sub>1</sub> estuvieran metilados en las posiciones 9 y 9' para poder continuar con las siguientes reacciones <sup>(18)</sup>, razón por la cual se decidió llevar a cabo el aislamiento de los derivados metilados. El derivado de PA<sub>1</sub> metilado en las posiciones 9, 9' (llamado en este trabajo producto 1) una vez aislado, se analizó por <sup>1</sup>HRMN en donde se observó la desaparición de los dos hidroxilos fenólicos 9 y 9' que en la PA<sub>1</sub> aparecen alrededor de 16 ppm, Fig.24.

Una vez que se logró metilar los hidroxilos fenólicos en la PA<sub>1</sub>, se continuó con la siguiente reacción de la vía degradativa, que consistió en la reducción de los carbonilos; ésta se realizó con borohidruro de litio reportada también por Ramírez y cols. en el estudio antes mencionado <sup>(19)</sup>. La disminución de la señal del carbonilo a 1675 cm<sup>-1</sup> observada en el espectro de infrarrojo y la aparición de señales a 5.5 ppm en el espectro de <sup>1</sup>HRMN del producto de esta reacción evidencia que la reducción de los grupos carbonilos se llevó a cabo. Después de obtener los alcoholes secundarios en esta reacción, denominados como producto 2, (Fig.25 y 26), se prosiguió con la hidrogenólisis de los mismos.

En el siguiente paso los alcoholes secundarios de las posiciones 1 y 1' del producto 2 tenían que transformarse en grupos metilenos por medio de una hidrogenólisis. Inicialmente se planteó la posibilidad de llevar a cabo la hidrogenólisis por vía homogénea y heterogénea para seleccionar la más adecuada:

a) Hidrogenación homogénea donde el  $H_2$  y el catalizador se generan "in situ" a través de la reacción del ácido cloroplátnico y borohidruro de sodio en medio ácido <sup>(21)</sup>.

b) Hidrogenación heterogénea con  $H_2$  y Pd como catalizador en un hidrogenador catalítico de Parr.

Debido a que la reacción de hidrogenólisis homogénea no estaba reportada para alcoholes, se probó previamente con alcohol bencílico donde se esperaba como producto de la reacción el tolueno. Por medio del espectro de  $^1H$ RMN del producto de la reacción se pudo encontrar la señal del metilo del tolueno a  $\delta$  2.4, aunque también apareció la señal del metileno del alcohol bencílico a  $\delta$  4.5; por esto, podemos decir que la reacción se llevó a cabo, aunque no completamente, Fig. 27. Sin embargo al probar esta misma reacción con el producto 2 no se observaron buenos resultados, ya que en el espectro de  $^1H$ RMN se observó la aparición de una señal a  $\delta$  5 (Fig. 28), lo que indica la posible formación de un alqueno durante la reacción, el cual no es el producto esperado. Por este resultado y al no obtener hidrogenación apreciable, se decidió llevar a cabo la hidrogenólisis por la vía de hidrogenación heterogénea con el hidrogenador catalítico de Parr. En los primeros intentos de esta reacción la muestra se disolvió en 10 mL de metanol y la reacción se llevó a cabo durante 10 h, pero no hubo buenos resultados; por

ello, en reacciones posteriores se ajustó el volumen del solvente a 15 mL y el tiempo de reacción a 15 h como describe Gill <sup>(18)</sup>.

Se analizaron los resultados de esta reacción por <sup>1</sup>H RMN y se observó la desaparición de las señales a  $\delta$ 5.5 que aparecían en el espectro del producto 2, Fig. 29. Estos cambios indican que la reacción se llevó a cabo adecuadamente; es decir se realizó la hidrogenólisis de los OH de los alcoholes secundarios formados en la reacción anterior en la posición 1 y 1' del producto 2, formándose un metileno (señales que no se aprecian claramente en el espectro de <sup>1</sup>H RMN porque el producto no está puro). El producto obtenido en esta reacción fue llamado en este trabajo producto 3.

La siguiente reacción en la vía degradativa de la PA<sub>1</sub> fue la oxidación del producto 3 (tetrahidroantracenos derivados de la PA<sub>1</sub>) donde se esperaba como resultado el ácido carboxílico del butanólido (producto 4) Fig. 20, que no fue analizado por <sup>1</sup>H RMN ya que se procedió inmediatamente a la reacción de metilación de éste ácido carboxílico.

La reacción de metilación del producto 4 es la última reacción de ésta vía degradativa y se llevó a cabo con diazometano como en la primera reacción de metilación para obtener finalmente el éster metílico del butanólido, Fig. 21. El producto obtenido (designado como producto 5) fue purificado y las fracciones obtenidas se analizaron por <sup>1</sup>H RMN.

En el primer intento al realizar todo el proceso degradativo de la PA<sub>1</sub>, se observó la presencia de señales aromáticas en el espectro de <sup>1</sup>H RMN del producto final, lo cual indicaba que la reacción de oxidación no se había llevado a cabo completamente ya que

en esta reacción se debería de perder la aromaticidad al formarse un ácido carboxílico del butanólido. Por esta razón, para tener material suficiente y optimizar las condiciones de la reacción de oxidación, fue necesario repetir todo el procedimiento de la vía degradativa. Las primeras tres reacciones (metilación, reducción e hidrogenólisis) fueron satisfactorias, tal y como sucedió en el primer intento. Cuando se realizó la reacción de oxidación se hicieron algunos cambios: se agregó un exceso de acetonitrilo en la mezcla en la cual se disuelve el producto 3, además se aumentó la velocidad de agitación; el metaperiodato de sodio (oxidante) y el tricloruro de rutenio (catalizador), se agregaron en las mismas cantidades.

Las modificaciones mencionadas se consideraron convenientes para que la reacción se llevara a cabo satisfactoriamente según describe Ashby <sup>(23)</sup>. Este autor señala que la oxidación incompleta se debe a la baja actividad catalítica del rutenio, que forma el complejo carboxilato de rutenio con el ácido carboxílico producto de la reacción; dicho complejo es de baja valencia, lo que lo hace inactivo, por lo cual para romper el complejo carboxilato y retornar el rutenio al ciclo, se usa el acetonitrilo que es un buen ligando para el rutenio (III/II) de baja valencia, y además no se ve afectado por el fuerte ambiente oxidante del sistema.

Una vez optimizadas las condiciones de la reacción de oxidación, se analizó el producto obtenido por <sup>1</sup>H RMN, se observó la desaparición de las señales aromáticas ( $\delta$  7.5) y se observaron las señales de interés (a  $\delta$  1.52 para el metilo y  $\delta$  3.70 para el metoxilo), (Fig. 30), ya que estas señales pertenecen a los H unidos a carbonos que están a su vez unidos con el carbono quiral, Fig. 38.

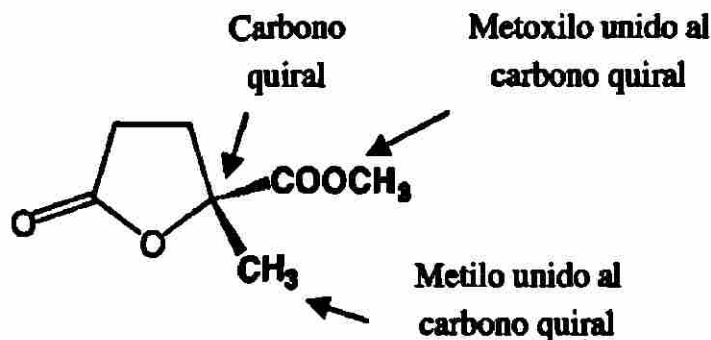


Figura 38. Estructura del butanólido tetrahidro-2-metil-5-oxo-2-furanacetato de metilo.

Gill y cols. reportaron la purificación del éster metílico del butanólido a partir del residuo de la última reacción por medio de CLAR (Ultraesfera de Si, 5  $\mu$  1 x 25 cm), y como eluente acetato de etilo:hexano 3:2<sup>(18)</sup>. En el presente trabajo se realizó la purificación del éster metílico del butanólido en una columna de baja presión de sílica gel con el mismo sistema de eluentes. De esta purificación se obtuvieron 18 fracciones que fueron analizadas por <sup>1</sup>HRMN; se observó en las fracciones 8 y 9 las señales a  $\delta$  1.52, 2.13, 2.42, 2.63, 2.68, 2.74 y 3.70, que corresponden al butanólido esperado<sup>(20)</sup>; las señales de  $\delta$  1.52 y  $\delta$  3.70 son las que principalmente interesan para el análisis de <sup>1</sup>HRMN con reactivos de desplazamiento quiral, Fig. 31A.

Una vez que se obtuvo el producto **5** (éster metílico del butanólido derivado de PA<sub>1</sub>), el siguiente paso consistió en su análisis por <sup>1</sup>HRMN con reactivo de desplazamiento quiral para la asignación estereoquímica. Para realizar este análisis, se tomó como referencia lo reportado por Melvin Gill y cols., en donde señalan los desplazamientos en <sup>1</sup>HRMN observados para los butanólidos R y S; ellos reportan que en ambos compuestos la señal del metilo ( $\delta$  1.52) y el metoxilo ( $\delta$  3.70) se desplazan a  $\delta$  mayores después de agregar el reactivo de desplazamiento quiral; sin embargo el



butanólido R presenta las señales más desplazadas (mayor delta, menor campo) que el butanólido S <sup>(18, 20)</sup>.

Como se mencionó en la introducción, de acuerdo a los análisis de rayos X <sup>(17)</sup> se encontró que la PA<sub>1</sub> tiene el mismo tipo de configuración en C-3 y C-3', lo que nos indica que en la degradación química de la PA<sub>1</sub>, se debe obtener un solo tipo de butanólido (R o S) y por lo tanto, mostrar una sola señal (desplazada) al agregar el reactivo de desplazamiento quiral, tanto para la señal del metilo de  $\delta$  1.52 como para la del metoxilo de  $\delta$  3.70.

En este experimento cuando a una de las fracciones que contenía el éster metílico del butanólido derivado de PA<sub>1</sub> se le agregó alícuotas de 30 y 70  $\mu$ L de reactivo de desplazamiento quiral: tris [3-heptafluoropropilhidroximetileno-(+)-camforato de europio III] en cloroformo deuterado (100 mg/mL); se observó en el espectro de <sup>1</sup>HRMN un ligero desplazamiento a mayor  $\delta$  para las señales del metilo  $\delta$  1.52 y del metoxilo  $\delta$  3.70; finalmente después de agregar 105  $\mu$ l del reactivo, los desplazamientos fueron más notorios observándose en el espectro de <sup>1</sup>HRMN desplazamientos de la señal del metilo de  $\delta$  1.52 a  $\delta$  2.20 y del metoxilo de  $\delta$  3.70 a  $\delta$  4.51. Estas señales desplazadas no parten en dos, lo cual confirma los estudios de rayos X, que indican que el C-3 y C-3' de la PA<sub>1</sub> tienen la misma configuración, y por tanto al realizar la degradación química sólo se genera un tipo de butanólido, Fig. 31B.

Para saber si el producto 5 (éster metílico del butanólido de la PA<sub>1</sub>) es R o S, el paso siguiente en la estrategia original era agregar a una solución de éste en cloroformo deuterado, el reactivo de desplazamiento quiral y comparar los desplazamientos



presentados en  $^1\text{HRMN}$  con los desplazamientos que presentan los estándares de los butanóidos R y S bajo las mismas condiciones. Sin embargo, estos butanóidos no están disponibles comercialmente y el grupo de investigadores que los sintetizaron ya no están trabajando con este tipo de compuestos y no fue posible contactarlos. Por esta razón, al no tener estándares para comparación, se decidió desarrollar otra estrategia: dado que los estudios de difracción de rayos X demuestran que los C-3 y C-3' en la Peroxisomicna  $A_2$  tienen configuración distinta <sup>(17)</sup>, se pensó que después de realizar el mismo proceso de degradación química a la  $PA_2$  esperaríamos obtener una mezcla de butanóidos R y S. El espectro de  $^1\text{HRMN}$  de esta mezcla de butanóidos obtenidos de la  $PA_2$  sería diferente al del butanóido obtenido de la  $PA_1$ , ya que se esperarían dos señales desplazadas para el metilo y dos señales desplazadas para el metoxilo en la mezcla proveniente de la  $PA_2$  al agregar el reactivo de desplazamiento quiral, correspondiendo como ya se mencionó la más desplazada al butanóido R <sup>(18)</sup>. De esta manera podríamos correlacionarlo con los resultados obtenidos a partir de la  $PA_1$ .

Para obtener el butanóido derivado de  $PA_2$ , fue necesario realizar la purificación de ésta, ya que no se contaba con una muestra con un grado de pureza aceptable. La muestra elegida contenía la  $PA_1$  como principal contaminante y fue separada con el método desarrollado recientemente por Rivas <sup>(24)</sup>, Fig.32.

Se sometió la  $PA_2$  al mismo proceso degradativo que la  $PA_1$ , hasta la obtención del butanóido, Fig. 33 – 36A; éste en el análisis de  $^1\text{HRMN}$  presentó las señales de  $\delta 1.52$  para el metilo y de  $\delta 3.70$  para el metoxilo. Después de agregar la misma cantidad de reactivo de desplazamiento quiral que se agregó al butanóido derivado de la  $PA_1$ , se encontró que tanto la señal de  $\delta 1.52$  del metilo como la de  $\delta 3.70$  del metoxilo se desplazaron a mayores  $\delta$  y que cada una de ellas se partió en dos, encontrándose para el

metilo señales a  $\delta$  2.17 y 2.20 y para el metoxilo señales a  $\delta$  4.48 y 4.51, Fig. 36B. Esto significa que en el proceso degradativo del PA<sub>2</sub> se formaron los butanólidos de las dos configuraciones, R y S, lo cual corrobora la configuración opuesta ya reportada de C-3 y C-3' en la PA<sub>2</sub> <sup>(17)</sup>.

Finalmente, para conocer la configuración absoluta de PA<sub>1</sub> se realizó lo siguiente: al butanólido derivado de PA<sub>1</sub> que contenía 105  $\mu$ l de reactivo de desplazamiento (y que presentó las señales desplazadas para el metilo a  $\delta$  2.20 y para el metoxilo a  $\delta$  4.51, Fig. 37B), se le agregaron 10  $\mu$ l del butanólido derivado de PA<sub>2</sub> disuelto en cloroformo deuterado; se pudo observar en el espectro de <sup>1</sup>H RMN la aparición de una señal a  $\delta$  2.19 adicional a la ya existente de  $\delta$  2.20 del metilo. Se observaron además dos señales desplazadas correspondientes al metoxilo a  $\delta$  4.40 y  $\delta$  4.42, Fig. 37C. En este caso fueron de más utilidad las señales obtenidas a partir del metilo ya que después de agregar el butanólido derivado de PA<sub>2</sub> (producto 5B), se puede deducir que la señal correspondiente al butanólido derivado de PA<sub>1</sub> es la que se desplaza a mayor  $\delta$  (2.20) y que corresponde, según la literatura, al butanólido R, ya que la señal menos desplazada ( $\delta$  2.19) se observó después de agregar el butanólido producto de la degradación de la PA<sub>2</sub>.

Para corroborar este resultado, una de las fracciones que contenían el éster metílico del butanólido derivado de PA<sub>1</sub> (compuesto 5) se analizó cuantitativamente por polarimetría, usando cloroformo como solvente; se observó desviación positiva del ángulo de rotación del plano de la luz polarizada, tal y como está reportado en la literatura para el butanólido R; se obtuvo un valor de + 9.3°. En la literatura se reportan

valores de  $+7.7^\circ$  y  $+10.3^\circ$  <sup>(18,20)</sup>, lo cual indica que el resultado encontrado por nosotros está dentro del error experimental.

En base a estos resultados y analizando la estereoquímica de las reacciones de la degradación de PA<sub>1</sub> en forma retrospectiva con modelos moleculares, se pudo deducir a partir del éster metílico del butanólido obtenido de configuración R (producto 5), que el ácido carboxílico del butanólido (producto 4) y los tetrahydroantracenos (producto 3) presentan la misma configuración R; pero tanto el producto de la reducción (producto 2), el producto de metilación (producto 1) y el original (Peroxisomicina A<sub>1</sub>), presentan configuración S. El cambio de configuración surge porque la regla de Cahn-Ingold-Prelog <sup>(24)</sup> para la nomenclatura de compuestos quirales (R y S) se basa en la prioridad de los sustituyentes unidos al C quiral; es precisamente cuando ocurre la reacción de hidrogenólisis que se pasa del producto 2 al producto 3 donde cambia la prioridad de los sustituyentes de los carbonos 3 y 3', de manera que el éster metílico del butanólido (producto 5) queda con configuración R, Fig.39.

La correlación de estos resultados con los resultados de difracción de rayos X nos permite establecer que la PA<sub>1</sub> tiene configuración 3S y 3'S. y que la PA<sub>2</sub> tiene una configuración R en el C-3 y S en el C-3' <sup>(17,18, 20)</sup>. Finalmente el nombre IUPAC para la Peroxisomicina A<sub>1</sub> es (3S,3'S)-3,3'-dimetil-3,3',8,8',9,9'-hexahidroxi-3,3',4,4'-tetrahydro (7,10'-biantraceno)-1,1'(2H,2'H)-diona y el nombre IUPAC para la Peroxisomicina A<sub>2</sub> es (3R,3'S)-3,3'-dimetil-3,3',8,8',9,9'-hexahidroxi-3,3',4,4'-tetrahydro (7,10'-biantraceno)-1,1'(2H,2'H)-diona, Fig. 40.

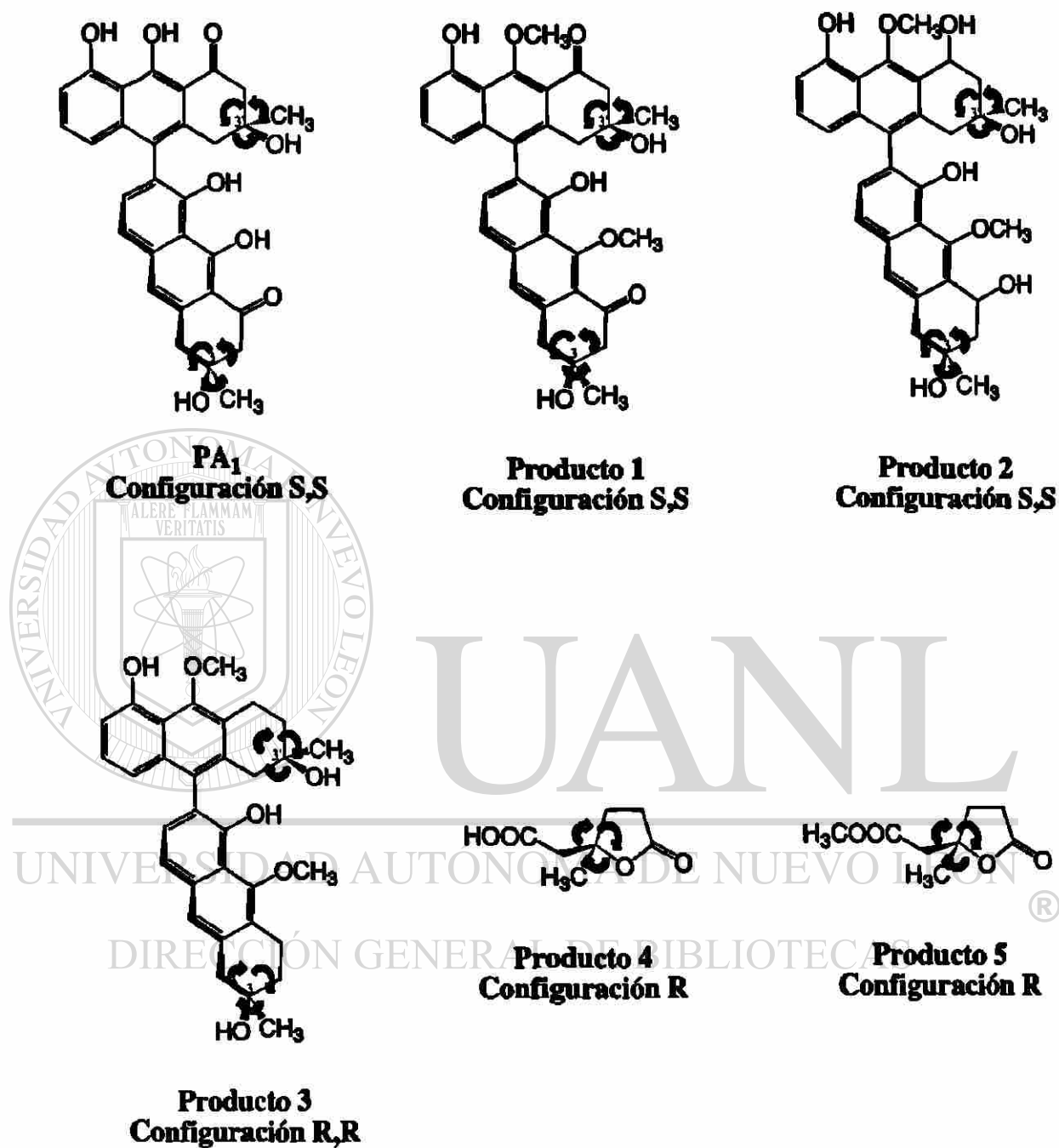
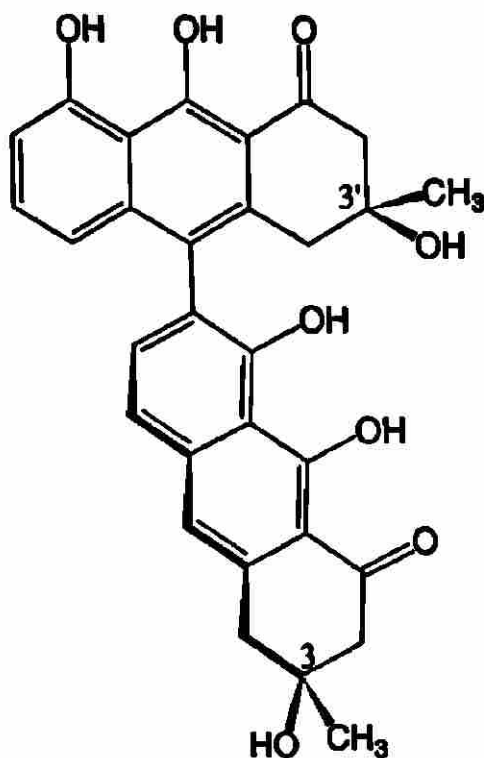
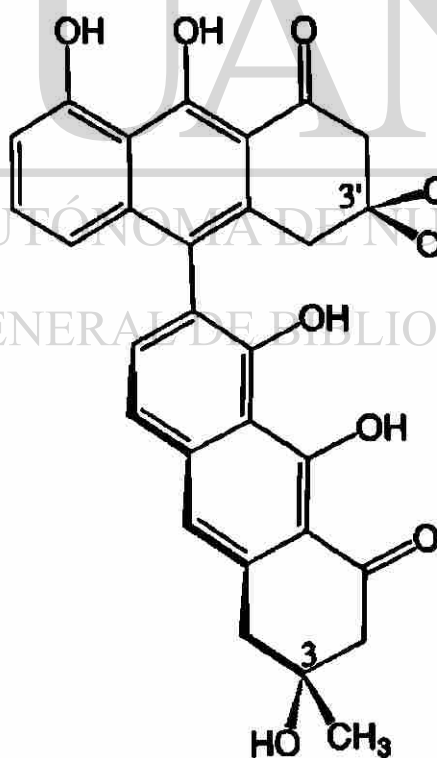


Figura. 39. Estructuras de los productos de cada reacción en la vía degradativa de la PA<sub>1</sub>.



**Peroxisomicina A<sub>1</sub>**

**(3S,3'S)-3,3'-dimetil-3,3',8,8',9,9'-hexahidroxi-3,3',4,4'-tetrahidro (7,10'-biantraceno)-1,1'(2H,2'H)-diona.**



**Peroxisomicina A<sub>2</sub>**

**(3R,3'S)-3,3'-dimetil-3,3',8,8',9,9'-hexahidroxi-3,3',4,4'-tetrahidro (7,10'-biantraceno)-1,1'(2H,2'H)-diona.**

**Figura 40. Configuración absoluta de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> y Peroxisomicina A<sub>2</sub>.**

## CAPÍTULO 5

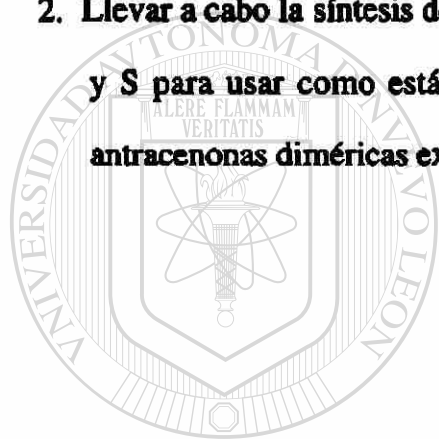
### CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

#### 5.1 Conclusiones

1. De acuerdo a los análisis de  $^1\text{HRMN}$  con reactivo de desplazamiento quiral de los butanólidos derivados de  $\text{PA}_1$  y  $\text{PA}_2$ , se pudo corroborar el resultado del análisis de rayos X ya que la configuración relativa en los C-3 y C-3' es la misma en la  $\text{PA}_1$  e inversa en el C-3 en la  $\text{PA}_2$ .
2. La correlación del butanólido R obtenido de la  $\text{PA}_1$  con modelos moleculares de cada uno de los productos formados en las diferentes etapas de degradación, nos permite decir que la  $\text{PA}_1$  presenta una configuración S para cada uno de los carbonos quirales 3 y 3'.
3. La correlación de los resultados del análisis de  $^1\text{HRMN}$  con reactivos de desplazamiento quiral del butanólido de la  $\text{PA}_2$ , con la configuración absoluta de  $\text{PA}_1$  y los resultados de difracción de rayos X, nos permite decir que la  $\text{PA}_2$  tiene una configuración R en el C-3 y S en el C-3'.

## 5.2 Perspectivas

1. Obtener la configuración absoluta de la peroxisomicina A<sub>1</sub> por medio de difracción de rayos X a una longitud de onda cercana a la absorción del cloro, y así corroborar los resultados de esta tesis. Se propone realizar la reacción de cloración en un derivado metilado de la PA<sub>1</sub>, ya que estos son más estables y pueden soportar el calentamiento requerido en muchos procesos de cristalización.
2. Llevar a cabo la síntesis de los butanóidos 2-metil-5-oxo-2-furanacetato de metilo R y S para usar como estándares en la determinación de la configuración de otras antracenas diméricas extraídas de plantas del género *Karwinskia*.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## BIBLIOGRAFÍA

1. Fenández, Nava R., "Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (Rhamnaceas) en México". *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser. Bot.* 63 (1): 1 – 23. (1992).
2. Dreyer, D., Arai, I., Bachman, C., Anderson, W., Smith, R. and Daves, D. "Toxins causing noninflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation". *J. Am. Chem. Soc.* 97: 4985 – 4990. (1975).
3. Arai, I., Dreyer, D., Anderson, W., Daves, G. "Neurotoxins of *Karwinskia humboldtiana*. Atropisomerism and diastereomeric oxidative products". *J. Chem. Soc.* 97: 163 – 164. (1978).
4. Martínez, Laura. Estudio de las propiedades fisicoquímicas de toxinas aisladas de *Karwinskia humboldtiana*. Tesis de Maestría. U.A.N.L., (1990).
5. Piñeyro, A., Martínez, L and González, R. "In vitro selective toxicity of T-514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines". *Toxicology.* 92: 217 – 227. (1994).
6. Sepúlveda, J., Vander Klei, I., Keizer, I; Piñeyro, A., Harder, W and Veenhuis, "Studies on the effect of toxin T 514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeast". *FEMS Microbiology Letters.* 91: 207 - 212. (1992).
7. Gill, M., Steglich, W. Pigments of fungi. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 511 – 317. (1987).



8. Moreno, M., Vargas, R., Esquivel, D., Waksman, N and Piñeyro, A. "Effect of peroxisomicine and related anthracenones on catalase activity". *Planta Médica*. 61: 337 – 340. (1995).
9. Moreno, M., Vargas, R., Ballesteros, R., Piñeyro, A. y Sepúlveda, J. "Studies on the peroxisomicine on catalase activity in albino mice". *Toxicon*. 35: 777 – 783. (1997).
10. Waskman, N; Martínez, L y Fernández, R. "Screening químico y toxicológico de otras especies del género *Karwinskia*". *Rev. Latinoam. Quím.* 20: 27 - 29. (1989).
11. Waskman, N y Ramírez, R. "Isolation of a new dimeric anthracenones from *Karwinskia parvifolia*". *Rev. Latinoam. Quím.* 23 (1) y 22 (4): 25 – 27. (1992).
12. Rivas G. Verónica. Estudio químico de los extractos semipolares de frutos de *K. parvifolia* y *K Johnstonii*. Tesis de Maestría. U.A.N.L. (1991).
13. Salazar, R., Sepúlveda, J., Waksman, N., Piñeyro, A. y Moreno, M. "Effect of peroxisomicine A<sub>2</sub> and T-544 of the genus *Karwinskia* on peroxisomes of *Candida boidinii*". *FEMS Microbiology Letters*. 158: 255 – 260. (1998).
14. Salazar Aranda Ricardo. Efecto "in vivo" de diversas antracenas diméricas sobre peroxisomas de *Candida boidinii*, Tesis de Maestría. U.A.N.L. (1998).
15. Garza L. "Efecto de diversas antracenas diméricas sobre células CHANG y células de hepatoma". Comunicación personal.
16. Eliel, E., Wilen S. Stereochemistry of Organic Compounds. John Wiley and Sons. 101 - 147. (1994).
17. Rodríguez, C., Bailey, N., Ramírez, R., Martínez, L., Piñeyro, A y Waksman, N. "Análisis estereoquímico de dos hidróxiantracenas diméricas". *Revista Ciencia*. U.A.N.L. 37 – 41. (1998).

18. Gill, M., Giménez, A., Jhingran, A.G., Palfreyman, A.R. *Tetrahedron Asymmetry.*, 1 (9): 1203 –1206. (1990).
19. Ramírez Durón Rosalba. *Obtención de derivados funcionales de la peroxisomicina A<sub>1</sub>*. Tesis de Doctorado. U.A.N.L. (1998).
20. Gill, M., Smrdel, A.F. "Pigments of Fungi, Part 16. Synthesis of Methyl (R)-(+)-Tetrahydro-2-methyl-5-oxo-2-furanacetato and its (S)-(-)-Antipode, Chiroptical References for Determination of the Absolute Stereochemistry of Fungal Pre-anthraquinones". *Tetrahedron Asymmetry.* 1 (7): 453 – 464. (1990).
21. Mayo Dana.W, R.M.Pike, P.K.Tromper. *Microscale Organic Laboratory. Third Edition.* John Wiley & Sons, Inc. 247-252. (1994).
22. Torrens, H. "Cristalización". *Rev. Soc. Quím. Méx.* 34 (1): 35 – 39. (1990).
23. Ashby, E. C., Goel, A. B. "A Greatly Improved Procedure for Ruthenium Tetraoxide Catalyzed Oxidations of Organic Compounds". *J. Org. Chem.* 46: 3936 – 3938. (1981).
24. Rivas V. "Purificación de Peroxisomicina A<sub>2</sub>". Comunicación personal.
25. Wade, L.G Jr. *Química Orgánica. Segunda Edición.* Editorial Prentice-Hall Hispanoamérica. 249 – 253. (1993).

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

**Luis Alejandro Pérez López**

**Candidato para el Grado de**

**Maestría en Ciencias con Especialidad de Química Analítica Biomédica**

**Título de Tesis: DETERMINACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA DE LA PEROXISOMICINA A<sub>1</sub>**

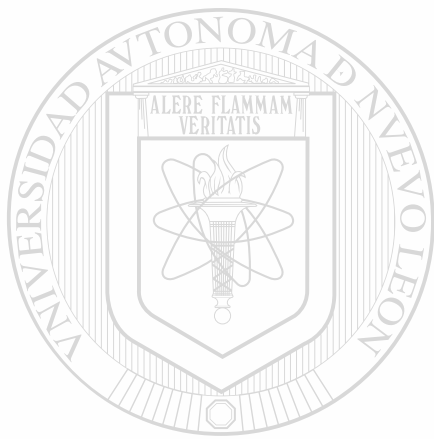
**Área de Estudio: Química Analítica**

**Biografía:**

**Datos Personales:** Nacido en Monterrey, Nuevo León, México, el 13 de Agosto de 1968, hijo del Sr. Pedro Pérez Gutiérrez y la Sra. Ma. Alicia López Costilla.

**Escolaridad:** Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo.

**Experiencia Profesional:** Profesor de Análisis Cualitativo en la Facultad de Biología U.A.N.L. en 1992. Químico en el Depto. de diagnóstico de cólera en el Laboratorio Estatal de Salud, N.L. 1992 – 1993. Químico en el laboratorio de análisis clínicos, Hospital el Buen Pastor, San Quintín BC, de 1993 – 1994. Químico en Servicios de Agua y Control Ambiental, Mty, N.L. de 1994 – 1995. Profesor de Química y Biología, preparatoria en Universitario de las Américas en 1995. Personal profesional no docente en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia U.A.N.L. de 1996 – 1997.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





