



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Síntesis y Actividad Biológica de
5-Carboxi-3-pirrolin-2-onas y 5-Hidroxi-3-pirrolin-2-onas**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
OSCAR ARTURO MANZANO YESCAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. NOÉ ROSAS ESPINOSA

MÉXICO, D.F.,

AGOSTO 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

MANZANO YESCAS OSCAR ARTURO

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: **Síntesis y Actividad Biológica de 5-Carboxi-3-pirrolin-2-onas y 5-Hidroxi-3-pirrolin-2-onas.**

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE* Dr. NOÉ ROSAS ESPINOSA
VOCAL Mtra. LEONOR AGUILAR SANTELISES
SECRETARIO Q.F.B. IDALIA LETICIA FLORES GÓMEZ
SUPLENTE Dr. ADELFO N. REYES RAMÍREZ
SUPLENTE Q. MARTHA TRINIDAD J. OLIVEROS GARCÍA

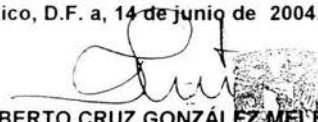








ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a 14 de junio de 2004.


Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ
JEFE DE LA CARRERA

c c p Departamento de Control de Egresados
c c p Interesado

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Química Inorgánica del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Noé Rosas Espinosa y la asesoría técnica del Dr. Pankaj Sharma.

El trabajo de investigación que se presenta para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo, fue realizado gracias a los apoyos financieros otorgados por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA, Proyecto N° IN-218901) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Proyecto N° 38761-E).

TABLA DE CONTENIDO

I. ANTECEDENTES	1
A. Síntesis	1
B. Actividad Biológica	1
C. γ-Lactamas (3-pirrolin-2-onas)	2
D. Radicales Libres	9
E. Antioxidantes	12
F. Cáncer	13
H. Inflamación	15
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
III. OBJETIVOS	26
IV. HIPÓTESIS	27
V: DESARROLLO EXPERIMENTAL	28
A. Síntesis de lactamas	28
B. Pruebas de actividad antioxidante	32
C. Prueba de Inflamación. (Edema en la oreja de ratón)	36
VI. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	39
A. α-Alquinilcetonas	39
B. γ-Lactamas	46
C. Pruebas de Actividad Biológica	57
VII CONCLUSIONES	65
A. α-Alquinilcetonas	65
B. γ-Lactamas	66
C. Pruebas de Actividad Biológica	67
VIII. REFERENCIAS	68
Anexo	72

ABREVIATURAS

AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
ANOVA	Análisis de varianza de una vía
ATP	Trifosfato de adenosina
c	Cuádruple
¹³ C	Isótopo de carbono
CCF	Cromatografía en capa fina
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
(CH ₃) ₄ Si	Tetrametil silano
d	Doble
DAG	Diacilglicerol
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidracilo
DO	Densidad óptica
EM	Espectrometría de masas
FCN	Factor de crecimiento neural
FNT _α	Factor de crecimiento tumoral alfa
HBT	Butil Hidroxitolueno
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria al 50%
IE	Impacto electrónico
IL-1 _β	Interleucina 1 _β
IN _γ	Interferon γ
IP3	1,4,5-Trifosfato de inositol
IR	Espectroscopia en el infrarrojo
¹ H	Protón
LOs	Lipoxigenasas
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
m	Múltiple
NADH	Forma reducida del dinucleotido de nicotinamida adenina

NMDA	N-Metil-D-aspartato
NO	Oxido nítrico
SONi	Oxido nítrico sintaza inducible
ppm	Partes por millón
PM	Peso molecular
PCK	Proteincinasa C
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PGS	Prostaglandinas
PKA	Proteincinasa A
q	Quíntuple
RMN	Resonancia magnética nuclear
Rx	Rayos X
s	Simple
SNC	Sistema Nervioso Central
t	Triple
TBA	Ácido tiobarbiturico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico
TMP	Tetrametoxipropanol
TPA	Acetato de 12-O-tetradecanoilforbol
TRQA	Tirosincinasa

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue la síntesis de γ -lactamas y la evaluación de su actividad biológica. Por lo tanto, el proyecto de tesis fue dividido en tres etapas.

En la primera etapa se sintetizaron cuatro α -alquilcetonas que constituyen la materia prima para la síntesis de la segunda etapa.

En la segunda etapa se desarrolló un procedimiento para la síntesis de heterociclos nitrogenados de cinco miembros.

En la última etapa se evaluó la actividad biológica de los compuestos sintetizados en animales de experimentación y otros modelos.

El método utilizado en la síntesis de γ -lactamas resulta de una modificación a un trabajo con anterioridad²⁶; en la última etapa se desarrolló una nueva técnica de síntesis, diferente a las reportadas en la literatura química.

Los productos obtenidos: fueron identificados y caracterizados haciendo uso de las técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear (^1H y ^{13}C), Espectroscopia en el Infrarrojo, Espectrometría de Masas y Difracción de Rayos X.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevos fármacos es una de las principales metas que tiene como objetivo la química actual. Es por ello que los investigadores están dedicados a la búsqueda de nuevas rutas de síntesis de compuestos químicos con actividad biológica y su posterior uso terapéutico para el desarrollo de nuevos medicamentos.

La síntesis de heterociclos de cinco miembros despertaron el interés de los químicos desde hace muchos años. Los anillos de lactamas son usados exitosamente en la ruta de síntesis de varios alcaloides. Asimismo, son precursores convenientes para la síntesis de γ -aminoácidos semejantes a la estatina y otros análogos.

Las 3-pirrolin-2-onas nombre con el cual son conocidas también las γ -lactamas son intermediarios sintéticos importantes y su unidad fundamental en productos naturales muestra actividad farmacológica (antitumoral, inhibición de la agregación plaquetaria y propiedades psicotrópicas), un ejemplo típico es el alcaloide antitumoral conocido como Jetropham. Estas características farmacológicas las hace interesantes como objetivo para el desarrollo de nuevas vías de síntesis.

Muchas rutas de síntesis de estos compuestos introducen el heteroátomo de nitrógeno en la estructura de carbono vía azida, cianida o amonía en reacciones de sustitución con derivados de iminas vía reducción.

En este proyecto se realizó la síntesis de γ -lactamas mediante una reacción de ciclocondensación de alquililcetonas en un sistema monofásico catalizado con Hierro, el cual permite obtener estos compuestos en un sólo paso y en corto tiempo. Utilizando para ello, altas presiones y temperatura constante. Asimismo, los compuestos sintetizados se ensayaron en diversos modelos (antiinflamación, radicales libres y líneas celulares) para poder determinar su actividad biológica.

I. ANTECEDENTES

A. Síntesis.

La síntesis química consiste en obtener compuestos químicos a partir de sustancias simples. El objetivo principal de la síntesis es la de crear nuevas sustancias químicas, así como el desarrollo de métodos más baratos y eficaces para sintetizar sustancias de interés farmacológico. Para llevar a cabo la síntesis, basta con la purificación de sustratos para obtener un producto químico deseado y aprovechar el uso de ese producto como materia prima para otra síntesis.

Gran parte de los progresos conseguidos en el campo de la síntesis se debe a la capacidad de los científicos para determinar la estructura detallada de una serie de sustancias, para ello es necesario hacer una correlación entre la estructura de una molécula y sus propiedades (relaciones estructura-actividad).

B. Actividad Biológica.

La investigación básica previa está constituida por el estudio preclínico, que comprende los estudios de laboratorio y los ensayos en animales, con la finalidad de predecir el efecto de algún fármaco en los humanos.

De igual manera se determina la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto farmacológico, se determinan sus rutas metabólicas, efectos en diferentes especies animales, se evalúa la DE_{50} , la DL_{50} , se realizan pruebas de toxicidad aguda y crónica, pruebas de teratogenicidad y la ventana terapéutica del fármaco.

Los resultados de los estudios preclínicos forman parte de la documentación que se utiliza para determinar si se continúa o no con el proyecto de investigación. Sin embargo, no se debe olvidar que muchos medicamentos se comportan de manera diferente en el hombre con respecto al animal.

Es por ello, que los ensayos clínicos en la actualidad se consideran indispensables para determinar la eficacia y seguridad de los medicamentos en el hombre.

Una vez identificado un compuesto con potencial terapéutico mediante estudios preclínico, se inicia en la denominada Fase 1 (Evaluación clínica) que comprende los estudios necesarios para proceder a realizar los primeros estudios en humanos.

C. γ -Lactamas (3-pirrolin-2-onas)

1. Definición.

Los compuestos que contienen un grupo carbonilo adyacente al grupo amino, se conocen como amidas, pueden ser cíclicos o lineales, las amidas lineales dependiendo de su grado de saturación se denominan (figura 1)

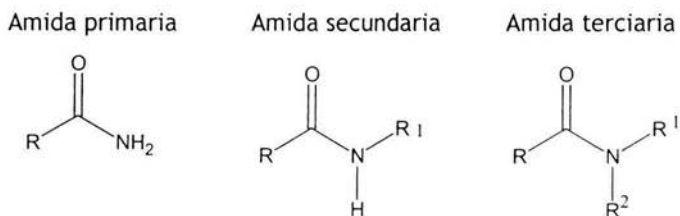


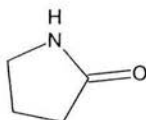
Figura 1. Tipos de amidas

Las amidas cíclicas se conocen como lactamas. Las lactamas son homólogas a las lactonas. Las lactonas se consideran como derivadas de ácidos carboxílicos por la pérdida de agua intramolecular. Y las lactamas como derivadas de aminoácidos carboxílicos, también por la pérdida de agua intramolecular. La forma tautomérica de una lactama se llama “lactima”¹

Butano -4-lactona



Butano-4-lactama



Butano-4-lactima

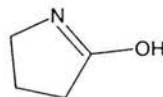


Figura 2. Forma tautomérica de la lactama.

2. Nomenclatura.

Los nombres IUPAC para las lactamas se derivan de añadir el término lactama al final de la raíz del nombre del ácido correspondiente. Los nombres comunes de las lactamas, (usados más frecuentemente que los nombres de la IUPAC), se forman cambiando la terminación -oico del aminoácido por- lactama.

Una letra griega designa al átomo de carbono siguiente al grupo carboxílico que cierra el anillo. Los sustituyentes se nombran tal y como aparecen en el ácido correspondiente² (figura 3).

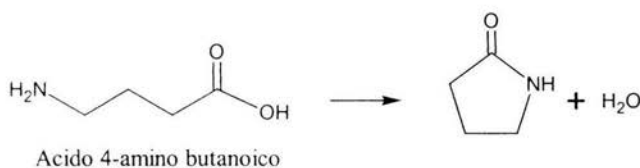
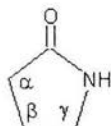


Figura3. Deshidratación de un aminoácido carboxílico.

La lactama se nombra (figura 4.)



IUPAC

Butano-4-lactama

COMÚN

 γ -Butirolactama

Figura 4. Nomenclatura de la lactama

Las lactamas son un grupo de compuestos ampliamente utilizados como antibióticos, principalmente las β -lactamas. La penicilina, antibiótico por todos conocida, es una β -lactama de cuatro miembros cuya estructura se presenta en la figura 5.

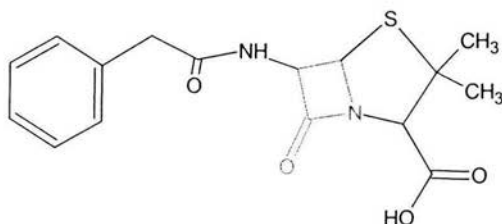


Figura5. Estructura de la penicilina una β -lactama.

3. Rutas de Síntesis.

Kang y cols., 2001 reportaron el uso de un catalizador carbonílico de rutenio en la cicloadición de α,β -iminas insaturadas con monóxido de carbono para formar γ -lactamas α,β insaturadas.

Para la reacción de ciclización se usa $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$ o $[\text{RuCl}_2(\text{CO})_3]$, Et_3N como base, y dioxano como disolvente bajo una presión de 20 atm con monóxido de carbono. Así, se obtiene la γ -lactama insaturada con un rendimiento aproximado del 85% (figura 6).



Figura 6. Carbonilación de sulfonamida α -alénica catalizada por rutenio.³

Nabuyuki y cols., 1999 reportaron la síntesis del (R)-(-)-5-Hidroxi-3-pirrollin-2-ona a partir de anhídrido citracónico en dos etapas (figura 7).

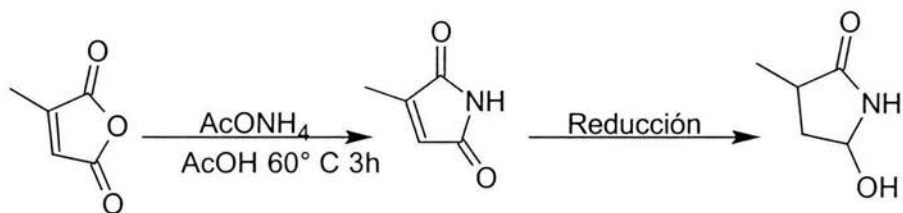


Figura 7. Síntesis de lactama a partir de anhídrido citraconico.⁴

Beltaief y cols., 1999 reportaron la síntesis de γ -lactamas utilizando para ello itaconatos como intermediarios.

La reacción se lleva a cabo utilizando una amina primaria (2 equivalentes) con ester itaconico alquilado en la posición tres en una mezcla de metanol agua (9:1) a temperatura ambiente, el proceso final da como resultado la formación de α -alquil- β -carboxi γ -lactama con buenos rendimientos (figura8).

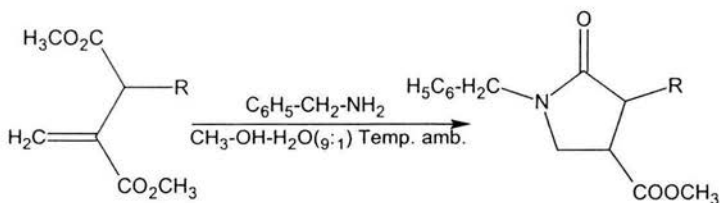


Figura 8. Síntesis de lactamas a partir de itaconatos⁵

Franco y cols., 2003 reportaron la síntesis de lactamas a partir de N-alil- α -percloroamidas (figura9).

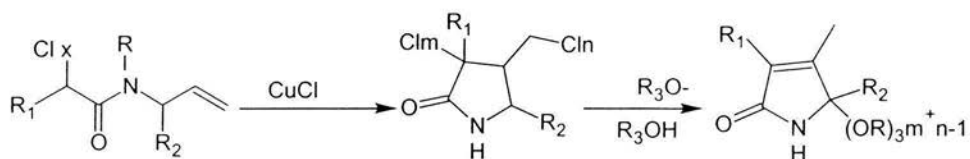


Figura 9. Síntesis de lactamas a partir de N-alil- α -percloroamidas.⁶

Parsons y cols., 2003 comenta que una amplia variedad de anillos de cinco miembros pueden ser preparados bajo suaves condiciones de reacción, utilizando una gama de métodos de ciclización, incluyendo la utilización de hidruro tributilo.

Una ciclización eficiente es usando una N-alil halo-amida para obtener una γ -lactama trisustituida. A continuación se muestra la reacción (figura10).

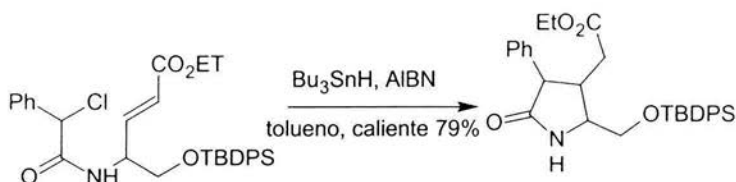


Figura 10. Reacción de ciclización utilizando una N-alil halo-amida para la síntesis de γ -lactama.⁷

Rosas y cols.,2000 reportaron la síntesis de las 5-Hidroxi-3-pirrolin-2-onas, utilizando para ello la hidrocianación de α -alquínilcetonas, con catalizador de níquel en un sistema monofásico acuoso.

Este método describe la reacción de α -alquínilcetonas en un sistema acuoso formado por KCN / NaOH / CO, catalizado por la formación de un complejo a partir de Ni(CN)₂. La reacción produce hidroxilactamas insaturadas. Donde la especie catalíticamente activa [Ni(CN)₄]⁴⁻ se forma *in situ* en condiciones de reacción suaves (presión atmosférica y temperatura ambiente)(figura11).

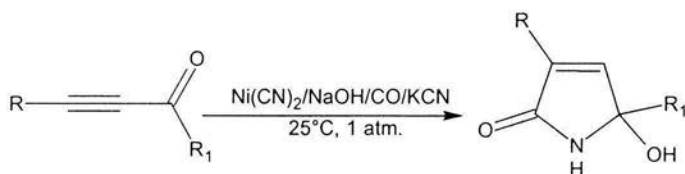


Figura 11. Síntesis de γ -lactamas a partir de α -alquínilcetonas.⁸

La formación de la especie aniónica activa, que es un ión complejo, se describe a continuación (figura 12).

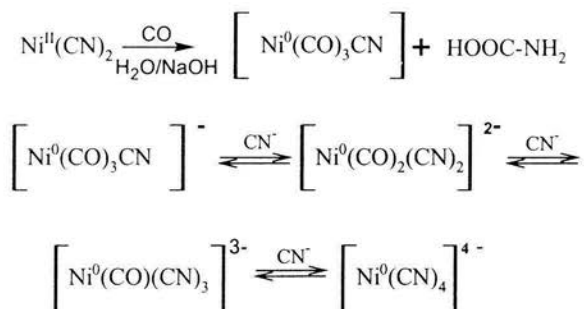


Figura 12. Formación de la especie aniónica activa.

Las condiciones reductoras de la reacción favorecen el cambio de Ni^{2+} a Ni^0 .

El complejo de níquel interacciona con la α -alquinilcetona para producir la lactama de la siguiente forma (figura 13).

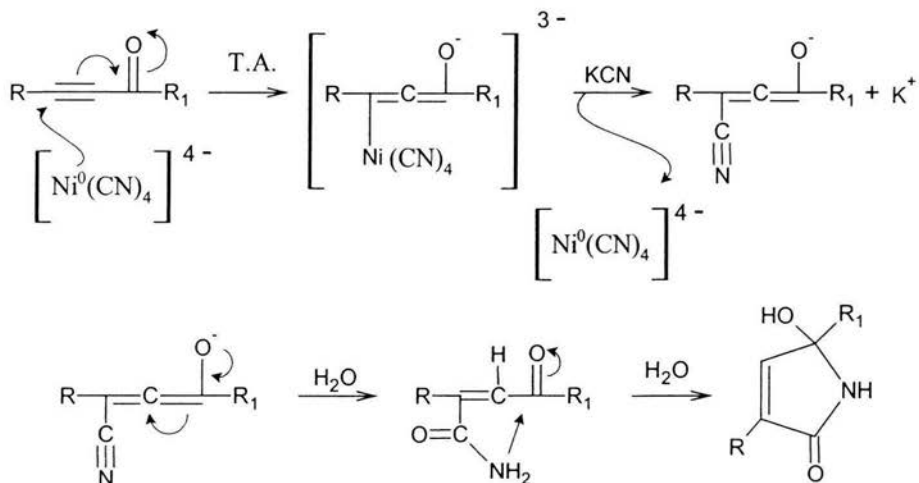


Figura 13. Reacción de la α -alquinilcetona con el complejo de níquel.

D. Radicales Libres

1. Definición.

La estabilidad de un compuesto químico se relaciona con la distribución de sus electrones en sus órbitas externas. Un radical libre se define como un átomo, grupo de átomos o molécula que poseen un electrón no apareado en su órbita externa. En ciertas condiciones metabólicas, la reducción del oxígeno es incompleta y conduce a la formación de radicales libres.

Estos productos atacan los fosfolípidos de las membranas celulares e intracelulares, a nivel de los ácidos grasos poliinsaturados en la peroxidación lipídica. De ella resultan productos de la peroxidación que pueden ser citotóxicos, quimiotácticos y patógenos. Otras veces actúan por la acción directa del oxígeno molecular.

Hay mediadores análogos a los radicales libres, que proceden del metabolismo de las membranas celulares por vía enzimática en la inflamación: los eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina, leucotrienes y otros).

En los sistemas biológicos la oxidación puede tener lugar mediante la adición enzimática de oxígeno o por deshidrogenación.

Los mecanismos mediante los cuales los oxidantes lesionan son muy complejos y variados. Dada su avidez por aceptar electrones de las células diana, los oxidantes pueden modificar la estructura y función de dicho órgano.⁹

Cuando existe un desbalance entre los sistemas oxidativos y antioxidantes, a favor de los primeros, hablamos de estrés oxidativo.

2. Origen

Existen varias fuentes de radicales libres, estos pueden ser procedentes de reacciones metabólicas esenciales (origen interno) o de fuentes exógenas (xenobióticos)

- a. *Subcelulares*: retículo endoplasmático, peroxisomas, mitocondrias (15% de producción de ATP), citosol.
- b. *Celulares*: Cadena respiratoria mitocondrial, fotosistema de cloroplasto leucocitos y macrófagos en la fagocitosis.
- c. *Reacciones de autoxidación de laspavinas*: quinonas, compuestos aromáticos nitrados, melanina, grupos tioles, tetrahidropteridinas.
- d. *Reacciones enzimáticas y proteínas*: aldehído oxidasa, citocromo p-450, ferredoxina, hemoglobina, indolamina deshidrogenasa, NADH-citocromo-b-5-reductasa, NADH-citocromo, P-450-reductasa, peroxidasa, triptófano dioxigenasa xantinoxidasa.
- e. *Ambientales*: rayos ultravioleta, ultrasonidos, rayos X y rayos gamma, iones metálicos, medicamentos, humo de tabaco, pesticidas, disolventes industriales, ozono, anestésicos.

3. Protección

Estas acciones agresivas normales en cualquier proceso biológico se ven contrarrestadas por un sistema de defensa intra y extracelular:⁹

- a. Enzimas citoplasmáticas, mitocondriales y extracelulares de superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa.
- b. Macromoléculas (ceruloplasmina, transferrina).
- c. Glutatión, metionina, Vitaminas (E y C).
- d. Agentes externos (superóxido dismutasa, catalasa, selenioglutatión, peroxidasa, selenio, zinc, N-acetil-cisteína), penicilamina, probucol, coenzima 2-10.

4. Componentes que pueden lesionar.

Los radicales libres pueden lesionar algunos componentes celulares:

- a. Lípidos: por oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados en membranas y organelos y su relación con la formación de lipofucsina.
- b. Carbohidratos: depolimerización de los polisacáridos.
- c. Proteínas: oxidación de los puentes sulfhídricos de las enzimas.
- d. Ácidos nucleicos: hidroxilación de sus bases, excitación de los tramos de DNA, mutaciones.

La formación de radicales libres pueden provocar la acumulación de reacciones oxidativas en las moléculas de vida larga como el colágeno y la elastina, pueden despolimerizar los mucopolisacáridos, favorecer el acúmulo de materiales como el pigmento de envejecimiento o lipofuscinas, alterar las membranas de las mitocondrias y lisosomas, provocar una fibrosis arteriolocapilar y disminuir la actividad de algunas enzimas y en general pueden ocasionar algunas disfunciones de órganos internos importantes.

E. Antioxidantes.

1. Definición.

Se define como cualquier sustancia que a bajas concentraciones en comparación con el sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente la oxidación de dicho sustrato.

2. Importancia.

La importancia de un antioxidante depende de su concentración, del medio donde actúa y de su habilidad para interactuar con sistemas regeneradores.

Actualmente se cree que ciertas enfermedades como la arteriosclerosis, degeneraciones ligadas al envejecimiento y al cáncer, podrían estar unidas al fenómeno de la oxidación celular mediada por radicales libres.

La importancia del estrés oxidativo y la defensa antioxidante de los constituyentes de la dieta es motivo constante de revisión.¹⁰ Las vitaminas se han introducido últimamente en patología humana, no por su carencia o avitaminosis sino como antioxidantes en ciertas afecciones ligadas al estrés oxidativo.

F. Cáncer

1. Definición.

El cáncer representa un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento indiscriminado y anárquico de ciertas células en el organismo. Estas células “malignas” son muy a menudo diferentes de las células normales que presentan anomalías diversas según el tipo de células afectadas, que pueden variar con la evolución de la enfermedad: el núcleo de la hipertrofia, la célula entera puede agrandarse, las divisiones celulares tienen un desarrollo rápido y anormal.

2. Tipos.

Se distinguen tres tipos de cáncer: los denominados sólidos, las leucemias y los hematosarcomas:

- a. En los cánceres sólidos, las células cancerosas se desarrollan en un órgano (riñón, hígado, cerebro, etc.), constituyendo un tumor que comprime, invade y destruye los tejidos, incluso los que los rodean. En algunos casos las células cancerosas pueden pasar a la sangre o a los vasos linfáticos para formar colonias de células cancerosas en otros órganos lejos del tumor de origen. Se habla de metástasis. Estas últimas son a su vez capaces de comprimir, invadir y destruir los tejidos en donde se desarrollan.
- b. En las leucemias, las células cancerosas no forman al principio un tumor localizado, pero invaden uniformemente la sangre y todos los órganos hematopoyéticos (los órganos que producen las células de la sangre, como la médula ósea, los ganglios linfáticos, etc). Sin embargo, ocurre también, que en las leucemias las células malignas pueden producir secundariamente tumores que comprimen e invaden otros órganos,

diferentes de los que producen los glóbulos de la sangre, común en el hígado y en el cerebro. En las leucemias la invasión importante de la medula ósea provoca a menudo perturbaciones responsables de anemias, infecciones y hemorragias.

- c. Los hematossarcomas. En el torrente sanguíneo existe un sistema cuyo cometido es también alimentar y eliminar los desechos celulares: el sistema linfático. Se presenta como finas canículas repartidas por casi todo el organismo, las cuales tienen por misión recuperar la linfa, líquido incoloro donde se bañan las células del cuerpo. El recorrido de los vasos linfáticos es interrumpido por abultamientos en forma de frijol, que llamados ganglios linfáticos y que actúan como filtros para impedir el paso de ciertas partículas o células voluminosas (como las células cancerosas). Los ganglios están situados en diferentes partes del cuerpo; hay en la ingle, en la axila, a nivel del cuello, etc. (los ganglios del cuello pueden inflamarse y hacerse sensibles en el curso de ciertas anginas). Los ganglios pueden dar lugar al desarrollo de cáncer a partir de sus propias células. Estos son los hematossarcomas. En el momento del diagnóstico están algunas veces localizados en un grupo en particular de ganglios (ejemplo: ganglio de la ingle, del cuello...) o localizados inicialmente, de forma difusa, sobre el conjunto del sistema ganglionar. Se desarrollan como tumores sólidos y pueden invadir los tejidos de alrededor. Pueden también complicarse a leucemias sin infiltrar la medula ósea.¹¹

H. Inflamación

1. Reacción Inflamatoria

La inflamación se produce cuando las células competentes en procesos inmunológicos se activan en respuesta a microorganismos o proteínas antigénicas extrañas para el huésped. El resultado de esta respuesta puede ser benéfico, como ocurre cuando los microorganismos invasores son fagocitados o neutralizados.

En general, la respuesta es iniciada por traumatismo o por antígenos. Por infecciones por ejemplo de virus, bacterias, protozoarios y hongos. La lesión celular que acompaña a la inflamación afecta a las membranas celulares estimulando a los leucocitos a secretar enzimas lisosómicas; más adelante se libera el ácido araquidónico de la membrana celular por activación de la PLA2 se sintetizan varios eicosanoides. Los leucotrienos tienen un efecto quimiotáctico poderoso sobre eosinófilos, neutrófilos y macrófagos, y promueven la broncoconstricción y alteraciones en la permeabilidad vascular. En el sitio de la lesión tisular, también se liberan cininas, neuropéptidos e histamina, así como, componentes del complemento y otros productos de leucocitos y plaquetas. La estimulación de las membranas de neutrófilos produce radicales libres derivados del oxígeno.

El anión superóxido se forma por reducción de oxígeno molecular, y puede estimular la producción de otras moléculas reactivas, como agua oxigenada y radicales oxidrilo. La interacción de estas sustancias con ácido araquidónico genera factores quimiotácticos, lo que perpetua el proceso inflamatorio.¹²

2. Mediadores Inflamatorios

a. Cininas

Las cininas son una familia de péptidos producidos en fluidos corporales y tejidos durante la inflamación. Las dos más estudiadas, son un nonapéptido y un decapeptido, denominadas respectivamente bradicinina y calidina, las cuales se sintetizan a partir de moléculas precursoras denominadas cininógenos (α_2 globulinas), por acción de la enzima calicreina. Todas las cininas poseen las mismas propiedades fisiológicas básicas, incluyendo el control de la relajación de músculo liso, participan en respuestas inflamatorias (vasodilatación, incremento de la permeabilidad vascular y estimulación de células inmunes) y se han considerado los más potentes mediadores algogénicos endógenos, por la capacidad que tienen de activar las fibras sensoriales primarias tipo C y A.¹³

En su síntesis intervienen tres vías diferentes: la vía plasmática, la tisular y la plasma / tejido independiente. Esta última se observa en las células inmunes (matositos y basófilos), en donde es posible producir cininas de una manera independiente de la enzima calicreina, a través de la liberación de proteasas celulares.

La mayor parte de los efectos de las cininas son mediados por la activación de al menos dos receptores, los cuales se han denominado B_1 y B_2 ; este último ha sido el más estudiado, se encuentra constitutivamente presente en un amplio rango de tejidos entre los que se incluyen neuronas nociceptivas periféricas y centrales, neuronas simpáticas, músculo liso vascular y células del sistema inmune. El receptor B_1 tiene una distribución más limitada y es expresado casi exclusivamente en tejidos inflamados. Este receptor parece mediar los efectos de las cininas durante la lesión tisular y la inflamación, y participa en la hiperalgesia, más que en la nocicepción aguda.

En la inducción de su expresión influyen diferentes factores, entre los cuales se menciona, principalmente, a la interleucina 1B (IL-1B) y otros como la IL-2, IL-8 factor de necrosis tumoral α (FNT α), factores de crecimiento y metabolitos activos de la bradicinina.¹⁴

El mecanismo de activación de las neuronas sensoriales se ha descrito asociado al receptor B₂. Este se encuentra acoplado a una proteína G que induce la activación de la fosfolipasa C, la cual aumenta los niveles de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3) y del diacilglicerol (DAG); éste último, activa una proteín-cinasa C (PCK), con la consecuente fosforilación de proteínas celulares incluyendo proteínas de membrana como de los canales iónicos. La modificación de las corrientes iónicas de Na⁺ y Ca⁺⁺ interviene en la liberación de neuropéptidos y en la activación de las enzimas sintetasa de óxido nítrico (SON) neuronal y endotelial.

El aumento en la síntesis de bradicinina se asocia además con un aumento en la producción de prostaglandinas (PGs) y leucotrienos, mediante dos posibles mecanismos: por un lado, durante el metabolismo del DAG se puede producir ácido araquidónico y aumentar directamente los niveles de prostaglandinas E₂ (PGE₂) y prostaciclina (PGI₂) y por otra parte la bradicinina parece intervenir también en la activación directa de una fosfolipasa A₂. El aumento en el AMPc intracelular, el cual, puede ser mediado por las PGs, potencia a su vez la acción de la bradicinina, aumenta la frecuencia de disparo de los nociceptores y facilita la liberación de neuropéptidos.¹⁵

Evidencia adicional ha demostrado que la estimulación de receptores B₂ también produce la activación de vías alternas de señalización, en las que se fosforilan algunos tipos de cinasas, entre las cuales se encuentra la proteín-cinasa S6 ribosomal, la cual induce la producción de algunas citocinas proinflamatorias como la IL-6 e IL-8, y la potenciación de la síntesis de IL-1B mediada por FNT- α .

El SNC también sintetiza cininas y es probable que en esta ubicación, estas sustancias inicien una cascada de eventos similares a los observados en la periferia, incluyendo un incremento en el flujo sanguíneo, extravasación de plasma y participación en la señalización del dolor.

Estos mecanismos aún no están bien dilucidados, pero es claro que la administración central de bradicinina causa hiperalgesia.

b. Prostaglandinas y otros derivados del ácido araquidónico.

Durante los procesos inflamatorios, diversas citocinas como la IL-1 β y el TNF- α , entre otros, inducen la producción de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2), con una subsecuente liberación de eicosanoides entre los que se encuentran las PGE₂, la PGI₂ y el leucotrieno B₄ (LTB₄), los cuales participan de manera importante en la sensibilización de las terminaciones nociceptivas ante estímulos dolorosos.¹⁶

La PGE₂ ha sido señalada como el eicosanoide más importante en la hiperalgesia mecánica, tanto en animales como en humanos. Su acción está mediada por la familia de receptores EP(1 a 4), de los cuales el EP1 ha sido catalogado como fundamental en las respuestas dolorosas agudas. La PGI₂, con importancia similar a la de la PGE₂ en la señalización de los estímulos de dolor, es rápidamente producida en situaciones de lesión tisular e interactúa con receptores IP ubicados en las membranas de las neuronas sensoriales.

El mecanismo de acción de estas sustancias está mediado por una proteína G y utiliza como segundo mensajero al AMPc, para activar una proteínquinasa A (PKA), la cual lleva a la fosforilación de un canal iónico o modulación de estructuras citosólicas que controlan los niveles de Ca⁺⁺ intracelular. Además, estos receptores pueden mediar la activación de la fosfolipasa C, con igual resultado. Algunos estudios han planteado que el óxido nítrico (NO) a bajas dosis,

puede intervenir en la vía anteriormente descrita actuando en un paso previo a la acción de la PKA.

Por otra parte, algunos leucotrienos, como el LTB₄, se han relacionado con el fenómeno de hiperalgesia. A su vez, el LTD₄ puede sensibilizar a las neuronas sensoriales de manera indirecta, estimulando en células como macrófagos y basófilos, la síntesis y liberación de eicosanoides, así como la producción de DAG e IP₃. El mecanismo que media el efecto de los leucotrienos en los nociceptores no es claro, pero parece involucrar la activación de la proteínasa C (PCK).

Además, algunas investigaciones señalan que los productos de las lipoxigenasas (LOs) como 15-(S)-HPETE, 5-(S)-HETE, LBT₄ y 12-(S)-HPETE, pueden actuar como agonistas endógenos de los receptores de capsaicina, logrando excitar de esta manera a las neuronas sensoriales.¹⁷

c. Serotonina

Esta sustancia es liberada por las plaquetas y células mastoides durante la inflamación. Uno de los estímulos para su liberación es la producción de FCN. Los efectos fisiológicos de esta sustancia en los tejidos son mediados por una familia de receptores, los cuales están divididos en tres grandes grupos designados como: 5HT₁, 5HT₂ y 5HT₃. Varios tipos de receptores se ubican en las terminaciones nerviosas libres y median los efectos de la serotonina sobre estas neuronas.¹⁸

Su unión al receptor 5HT₃ activa un canal catiónico selectivo para el Na⁺ y causa una excitación directa de los nociceptores. La serotonina puede también sensibilizar a los receptores y disminuir su umbral de respuesta a estímulos térmicos y mecánicos; este efecto para estar mediado principalmente por los receptores 5HT₁ particularmente la subclase 5HT_{1A} y por el receptor 5HT₂ a través de los cuales se eleva el AMPc y se altera la permeabilidad al ión potasio.¹⁹

d. Mediadores inflamatorios de las células inmunes.

El mayor reservorio de esta sustancia se encuentra en las células mastoides, de donde puede ser liberada por estímulos como la sustancia P, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, la IL-1 y el FCN, los cuales inducen la degranulación de estas células.

Se conoce poco acerca de la manera como la histamina ejerce sus efectos. Algunas neuronas sensoriales ubicadas en ganglios de la raíz dorsal y trigeminal expresan en su membrana receptores H1, a través de los cuales esta sustancia incrementa la permeabilidad para el Ca^{++} y estimula la liberación de tacininas y péptido relacionado con el gen de la calcitonina. Modelos animales en los cuales este receptor está ausente han demostrado una disminución en la respuesta dolorosa al aplicar estímulos químicos, mecánicos y térmicos.²⁰

e. Factor de crecimiento neural

Esta neurotropina es producida por los tejidos periféricos inervados y por células de soporte, incluyendo fibroblastos, células de Schwann y queratinocitos; controla la supervivencia, el crecimiento y el fenotipo de las neuronas inmaduras. Su aporte constante desde la periferia es necesario para el mantenimiento del fenotipo normal de las neuronas nociceptivas primarias adultas.

La inflamación provoca una temprana y mantenida elevación de FCN. Este factor, producido endógenamente o aplicado exógenamente se asocia con la activación y sensibilización de fibras sensoriales de pequeño calibre. Ejerce sus acciones a través de su unión a un receptor de alta afinidad, del tipo tirosinasa (TRQ A), el cual se encuentra ubicado en las células inflamatorias, neuronas simpáticas, y neuronas sensoriales primarias.

En estas últimas el FCN puede directamente alterar su excitabilidad y sensibilizarlas, pero además, el complejo FCN-receptor es internalizado y transportado hasta el cuerpo celular; en esta localización, interviene en la regulación de la expresión de genes como el de la sustancia P, del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y el de la proteína 43 (asociada al crecimiento neuronal).²¹

El aumento en la síntesis de estos neuropéptidos incrementa a su vez como efectos, tanto a nivel periférico en la inflamación neurogénica y en las astas posteriores de la médula, en la sensibilización central. Mediante estas acciones en el soma, el FCN contribuye también a regular la expresión de otras proteínas, como el receptor de la capsaicina y de los canales de sodio resistentes a la tetrodotoxina (TTX). Igualmente, promueve la ramificación axonal hacia la periferia aumentando de esta manera el campo receptivo de las neuronas sensoriales.

Los efectos en la transcripción genética parecen ser mediados por otras cascadas de señalización como la de las MAP cinasas y afectar no sólo a las neuronas de bajo umbral, las cuales adquieren un fenotipo químico semejante al de las fibras C; se ha demostrado que el número de células mielinizadas gruesas de los ganglios de la raíz dorsal inmunorreactivas a sustancia P, aumenta después de una inflamación.

El FCN puede alterar la excitabilidad de los nociceptores de manera indirecta, actuando sobre sus receptores en células inflamatorias y neuronas simpáticas postganglionares, a través de las cuales estimula la liberación de otros mediadores sensibilizadores, como neuropéptidos y citocinas. Se establece así un circuito de retroalimentación entre los neuropéptidos, citocinas y el FCN que pudiera estar activado en procesos inflamatorios crónicos.²²

f. Oxido nítrico (NO)

Múltiples sustancias liberadas durante procesos inflamatorios, tales como la IL1, IL6, FNT α y el interferón γ (ING γ), tienen la capacidad de aumentar la actividad de la enzima sintetasa de oxido nítrico inducible (SONi), ubicada en los macrófagos y por ende, elevar los niveles locales de NO. No obstante las otras dos isoformas de esta enzima, expresadas constitutivamente en las neuronas y en el endotelio (ONS n y ONS e) también son activadas en estos estados. Una evidencia de esto se observó al utilizar un antagonista de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) ubicados en neuronas periféricas, lo cual impidió la síntesis de NO, disminuyendo los niveles propios de esta sustancia en los estados de lesión tisular. Así el NO producido a partir de las ONS constitutivas parece intervenir en el desarrollo de la inflamación durante las primeras 4 horas, y el producido a partir de la ONS inducible se relaciona con el mantenimiento de la respuesta inflamatoria después de 5 horas de aplicado el estímulo.²³

El papel que cumple el NO en la señalización del dolor en las neuronas periféricas no ha sido completamente dilucidado ya que algunos modelos experimentales le han atribuido un papel pronociceptivo mientras que otros evidencian acciones antinociceptivas. Un factor que parece modificar los efectos de este gas, es su concentración en el sitio de inflamación. Algunos autores sugieren que participa como analgésico cuando es producido en bajas cantidades y como hiperalgésico cuando sus niveles son altos.

Se ha demostrado que el NO puede facilitar la hiperalgesia inducida por mediadores como PGE $_2$ o serotonina, actuando como intermediario de la vía AMPc - PKA cuando se encuentra en altas concentraciones.²² Por otra parte, diversos estudios le han atribuido acciones antinociceptivas, como mediador de la actividad analgésica de algunos fármacos como la dipirona, el diclofenaco y opiáceos, los cuales periféricamente pueden activar la vía L-arginina-ON-GMPc, logrando desensibilizar los nociceptores. Así, la acción del NO parece depender del sitio y mecanismos que aumentan su producción.

g. Sustancias Neurogénicas.

Normalmente los neuropéptidos, liberados de las terminaciones nerviosas sensoriales, ejercen un efecto eferente y trófico en los tejidos diana. Durante la inflamación. Sin embargo, las neurocininas, sustancia P, neurocinina A y el péptido relacionado con el gen de la CGRP, contribuyen directamente a la inflamación neurogénica y a la hiperalgesia del sitio lesionado.²⁴

La sustancia P, estimula la síntesis de NO en el endotelio vascular, causando vasodilatación y estimula la contracción de las células endoteliales produciendo extravasación de plasma, lo cual facilita el paso de mediadores inflamatorios y células del sistema inmune al sitio de lesión. Este neuropéptido induce además la degranulación de células mastoides permitiendo la liberación de otros mediadores inflamatorios principalmente histamina y enzimas proteolíticas, las cuales catalizan la producción de bradicinina.

A su vez, la estimulación de la producción de citocinas lleva a la activación de moléculas de adhesión necesarias para la interacción de los leucocitos con el endotelio vascular. Estos mecanismos se han involucrado en patologías como artritis, asma, enfermedad inflamatoria intestinal o migraña etc, en las cuales el uso de los antagonistas de las neurocininas podrían ser de utilidad clínica.

Por su parte, el CGRP es un potente vasodilatador arteriolar y actúa sinérgicamente con la sustancia P, incrementando el flujo sanguíneo. Algunos estudios indican que este péptido juega un papel importante en los cambios de plasticidad neuronal que ocurren en respuesta a eventos inflamatorios periféricos, incluyendo el desarrollo de respuestas nociceptivas.

Las terminales simpáticas también intervienen en la hiperalgesia e inflamación que sigue al trauma tisular sin lesión nerviosa.

Este efecto parece ser mediado por la liberación de otros mediadores químicos como prostanoïdes o posiblemente sustancia P de las fibras simpáticas activas.²⁵

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los nuevos fármacos nacen de la necesidad de tratar las enfermedades o los síntomas, para los cuales, no existe un tratamiento eficaz o de mejorar los ya existentes.

Sin lugar a dudas, la investigación básica es un requisito fundamental para cualquier descubrimiento. A menudo son las universidades y otras instituciones académicas las que, a través de la investigación básica, abren nuevas fronteras.

Existen reportes que sugieren que compuestos en cuyas estructuras se encuentran γ -lactamas poseen una importante actividad biológica como: antitumorales, inhibidores de la agregación plaquetaria, herbicidas y psicotropicos.

Por otra parte, la síntesis de γ -lactamas puede realizarse por varios métodos. Sin embargo las condiciones para su síntesis son drásticas y sus precursores difíciles de sintetizar.

En este trabajo se propone un método sencillo y directo para la síntesis de γ -lactamas a partir de α -alquilcetonas en un medio catalizado por Hierro (Fe^{+2}) en un sistema monofásico acuoso.

Los compuestos obtenidos en la síntesis fueron evaluados en diferentes modelos para determinar su posible actividad como son: antioxidantes, citotóxica y antiinflamación.

III. OBJETIVOS

Objetivo General: Síntesis y Actividad Biológica de 5-Carboxi-3-pirrolin-2-onas y 5-Hidroxi-3-pirrolin-2-onas

- Desarrollar una nueva ruta de síntesis de γ -lactamas a partir de α -alquilcetonas catalizadas por hierro en un sistema monofásico acuoso.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria, antioxidante y citotóxica de los compuestos sintetizados.

Objetivos Particulares

- Purificar los productos obtenidos.
- Caracterizar los productos obtenidos por Espectroscopía en el Infrarrojo, Resonancia Magnética Nuclear, Espectrometría de Masas y Rayos X. (IR, RMN, EM y Rx)
- Determinar la IC_{50} de los compuestos que hayan presentado actividad antiinflamatoria, antioxidante y citotóxica.

IV. HIPÓTESIS

La utilización de un sistema de reacción, empleando α -alquilcetonas catalizadas con hierro, será óptimo para la formación de γ -lactamas que poseerán actividad como antioxidantes, antitumorales y antiinflamatorios.

V: DESARROLLO EXPERIMENTAL

A. Síntesis de lactamas

Se modificaron algunas condiciones de reacción de las descritas en los antecedentes. Por razones de seguridad y económicas se decidió sustituir el cianuro de níquel II, $\text{Ni}(\text{CN})_2$ por hexacianoferrato II de potasio, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, sin usar hidróxido de sodio (figura 14).

De forma que se planteó la siguiente reacción:

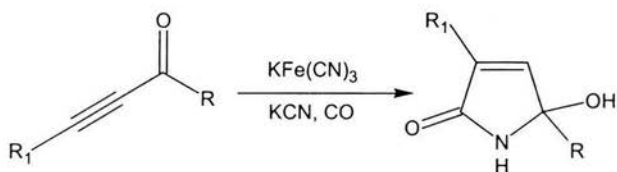


Figura 14. Reacción general para la síntesis de γ -lactamas

La relación estequiométrica establecida es la siguiente:

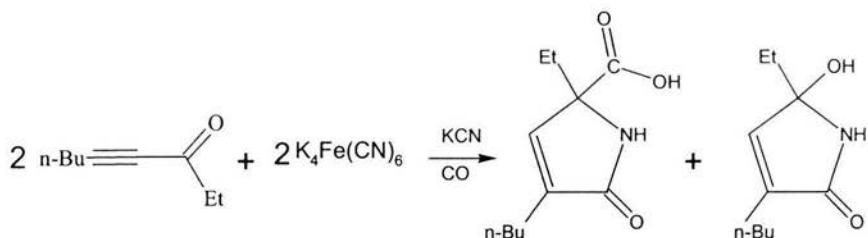


Figura 15. Relación estequiométrica.

La relación de α -alquinilcetona y ferricianuro de potasio es equimolar. El monóxido de carbono y el cianuro de potasio se agregan en exceso. Se debe agregar 15 milimoles de KCN por cada 2 milimoles de α -alquinilcetona y el exceso de CO está dado por la presión aplicada.

En la tabla 1 se muestran las relaciones de los reactivos y sustancias involucrados en el proceso, considerando que se desea utilizar 10 milimoles de alquinilcetona.

Tabla 1. Reactivos utilizados para la síntesis de γ -lactamas.

REACTIVO	MILIMOLES DE REACTIVO
α -alquinilcetona	10
Ferrocianuro de potasio $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$	10
Cianuro de Potasio KCN	75

1. Material y equipo

Material

Vasos de precipitado de 250 mL y 50 mL
 Agitador
 Trampa (embudo de adición modificado)
 Embudo
 Embudo buchner
 Matraz erlenmeyer 10, 50, 100 y 250 mL
 Matraz kitazato 100, 250 y 500 mL

Equipo

Estufa
 Rotavapor
 Lámpara de rayos UV
 Balanza analítica
 Aparato Fisher Johns para punto de fusión
 Reactor Parr

Otros

Silica gel 60.
 Placas comerciales para CCF de silica gel 60.

2. Procedimiento

La α -alquinilcetona a utilizar se elabora según el método descrito por Méndez y cols²⁶. Los demás reactivos utilizados en la síntesis de las lactamas son adquiridos comercialmente y utilizados sin purificación.

La síntesis se efectúa en un reactor Parr de 500 mL con agitación, manómetro y temperatura constante. El esquema se presenta en la figura 16.

- En un vaso de precipitados de 250 mL, se agregan 10 mmols de ferrocianuro de potasio, $K_4Fe(CN)_6$ a 50 mL de agua destilada, se agita manualmente hasta que se disuelva.
- Una vez disuelto el ferrocianuro de potasio, se adicionan 75 mmols de cianuro de potasio KCN, y se agita de nuevo hasta formar una sola fase.
- Por separado, se disuelven 10 mmols de α -alquinilcetona en un vaso de precipitados de 50 mL.
- Se agrega al reactor, la solución de ferrocianuro de potasio y cianuro de potasio, y la solución de α -alquinilcetona y se lleva a un volumen de 100 mL con agua destilada.
- Se cierra y se asegura el reactor.
- Por la válvula 4 del reactor, se introduce monóxido de carbono (CO) hasta una presión de 500 psi.
- Se cierra la válvula 4. El reactor y se monta en un soporte especial que consiste en una manta de calentamiento y un eje de agitación mecánica.
- Después de transcurrido el tiempo de reacción se deja enfriar el reactor hasta temperatura ambiente. Se despresuriza y posteriormente se extrae y se purifica el producto.

a. Extracción y purificación.

El producto de la reacción se extrae con acetato de etilo y se coloca en un embudo de separación

Se elimina la fase acuosa. La fase orgánica se lava tres veces con agua destilada.

La fase orgánica se pasa a un matraz erlenmeyer donde se pone en contacto con sulfato de sodio anhidro para secar. Ya seco el producto, se filtra para separar el sulfato de sodio y se concentra por destilación en un rotaevaporador.

Una primera purificación de la lactama se hace mediante placas cromatográficas preparativas en un sistema de elución 60:40 (acetato de etilo-hexano).

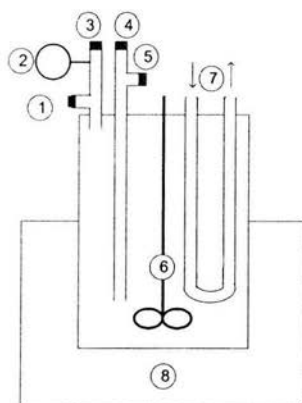


Figura 16. Reactor utilizado para llevar a cabo la reacción. 1. Válvula para introducir reactivos, 2. Manómetro, 3. Válvula de desfogaje, 4. Válvula para presurizar el sistema, 5. Válvula para tomar muestra, 6. Agitación mecánica de aspas inclinadas situada en el centro, con velocidad media, 7. Circulación para enfriamiento, 8. Manta de calentamiento.

B. Pruebas de actividad antioxidante

1.Reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)

a. Material y Equipo.

Material

Placas de ELISA
Micropipetas
Reservorios
Puntas para Micropipetas

Equipo

Lector de ELISA (ELx808)

b. Procedimiento.

La actividad antioxidante de los compuestos puros, extractos o fracciones se realiza siguiendo la metodología descrita en Cotelle y cols (1996). Midiendo de manera indirecta la reducción del radical libre DPPH mediante una técnica espectrofotométrica.

Se toman 50 μL de la solución problema a diferentes concentraciones y se depositan por cuatriplicado en placas de ELISA de 96 pozos. Posteriormente se agregan 150 μL de solución etanólica de DPPH 133.33 μM . (concentración final 100 μM), la mezcla se protege de la luz y se agita durante 30 minutos a 37°C. Finalmente se lee su densidad óptica (DO) a 515 nm en un lector de ELISA.

La actividad sobre el DPPH se expresa como porcentaje de reducción y se calcula con la fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = \frac{C - E}{C} * 100$$

En donde

C= Densidad óptica del control (DPPH 100 μM)

E= Densidad óptica del experimental (mezcla de DPPH 100 μM + compuesto problema)

2. Lipoperoxidación

a. Material y Equipo

Material

Tijeras de disección.

Pinzas.

Bisturí.

Micropipetas.

Puntas para micropipetas.

Tubos ependor.

Equipo

Incubadora.

Balanza analítica.

Centrífuga.

Homogenizador.

Baño térmico.

Espectrofotómetro Spectronic Génesis 5

Reactivos

Buffer de fosfatos.

Sulfato de hierro.

Ácido tricloroacético.

Hidróxido de sodio.

Ácido tiobarbitúrico (TBA).

Otros

Rata Wistar Macho (200-250gr)

b. Procedimiento.

Animal

Rata wistar macho (200-250 g) se mantiene a 25°C en un fotoperíodo de 12/12 horas luz/oscuridad con libre acceso a agua y alimento.

Homogenizado de cerebro de rata

- El animal se sacrifica con éter,
- Rápidamente se extrae el tejido cerebral y se deposita en buffer de fosfato
- El cerebro se homogeniza utilizando para ello un homogenizador
- El homogenizado es centrifugado por 10 minutos a 3400 rpm
- Se mide el contenido de proteínas y ajustando el contenido a 2.5 mg de proteína/mL.

Lipoperoxidación

- El sobrenadante (400 µL, 1mg de proteína) se incuba a 37 °C por 30 minutos en presencia de 50 µL de la muestra a ensayar
- La lipoperoxidación se inicia adicionando 50 µL de una solución fresca de sulfato de hierro (100 µM) e incubando a 37 °C por 60 minutos.
- Las sustancias reactivas al ácido Tiobarbitúrico (TBARS) son determinadas adicionando 0.5 mL de reactivo de TBA (1% TBA en solución de NaOH 0.05 N y 30 % de ácido tricloroacético en proporción de 1:1
- La solución final se enfría en un baño de hielo por 10 minutos y se centrifuga a 10000 rpm por 5 minutos y finalmente se calienta en un baño maría por 30 minutos, posteriormente se enfría en baño de hielo.

- La absorbancia del sobrenadante es medida en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 532 nm

El butil hidroxitolueno (HTB) y la quercetina se emplean como controles positivos. La concentración de TBARS se calcula por interpolación de la curva estándar del tetrametoxipropano(TMP). El resultado final es expresado en nmoles de TBARS por mg de proteína. El rango de inhibición (%) es calculado usando la siguiente fórmula.

$$\text{Rango de Inhibición (\%)} = \frac{A - A_1}{A} * 100$$

Donde A es la absorbancia del control y A₁ la absorbancia de la muestra.

Los resultados obtenidos se someten a un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguida de una prueba de Dunnet de comparación con el control. Los resultados con una ($p \leq 0.05$) ó ($p \leq 0.01$) se consideran con una diferencia estadísticamente significativa.

C. Prueba de Inflamación. (Edema en la oreja de ratón).

1. Material y Equipo.

Material

Frascos de 3 mL

Cajas de acrílico transparente

Jeringa de insulina

Microjeringas

Frasco grande

Sacabocados

Tubos ependor

Equipo

Balanza analítica

Balanza granataria

Reactivos

Etanol

Acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA)

γ -lactama a ensayar

Otros

4 Ratones machos CD-1 con un peso de 25 a 30 g.

2. Procedimiento

El ensayo de edema inducido con TPA se realiza siguiendo la metodología descrita en Rao y cols²⁸, 1993

Se emplean ratones macho CD1 25 a 30 g.

- Los animales (n=3) se colocan en cajas de acrílico transparente a temperatura constante, con un fotoperíodo de 12/12 horas luz /oscuridad con agua y alimento.
- Después del período se les anestesia en forma general con pentobarbital sódico (3.5 mg/kg) por vía intraperitoneal.
- En la oreja derecha se aplica 10 μ L de una solución etanólica de TPA (0.25 mg/mL).
- En la misma oreja y diez minutos después se aplica 0.31 mg o μ moles de la γ -lactama a aprobar disueltos en 20 μ L
- La oreja izquierda (control) recibe solamente 10 μ L de etanol y 20 μ L del vehículo del compuesto.

Cuatro horas después a la aplicación del TPA, los animales son anestesiados con éter y sacrificados por dislocación cervical para toma de muestra de 7 mm de diámetro de ambas orejas. El edema representa el incremento del peso de la muestra derecha con respecto a la izquierda.

La inhibición del edema se calcula con la fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{C - E}{C} * 100$$

En donde:

C= Edema del grupo control (Tratado con TPA)

E= Edema del grupo experimental (TPA más compuesto)


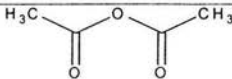
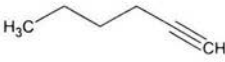
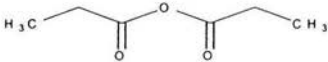
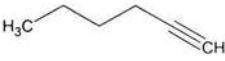


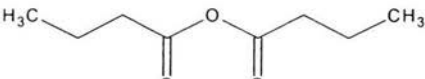
Los resultados obtenidos se someten a un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguida de una prueba de Dunnet de comparación múltiple para aislar los grupos con diferencia significativa (p 0.05).

VI. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

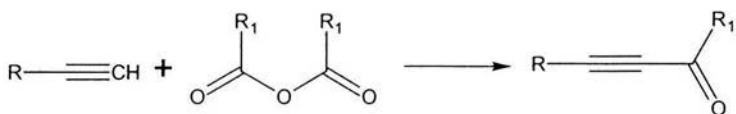
A. α -Alquinilcetonas.

La tabla 2 se resumen los alquinos y anhídridos utilizados para sintetizar distintos tipos de alquinilcetonas y así probar el efecto de los sustituyentes R y R₁ en la reacción de heterociclización.

Tabla 1. Reactivos utilizados para la síntesis de α -alquinilcetonas

1-ALQUINO	ANHIDRIDO	ALQUINILCETONA No.
 1-hexino	 Acético	I
 1-hexino	 Propiónico	II
 1-hexino	 Butírico	III
 1-pentino	 Butírico	IV

La reacción general para la síntesis de α -alquinilcetonas se muestra en la figura 17.



R= propilo o butilo

R₁= metilo, etilo o propilo

Figura 17. Reacción general para la síntesis de α -alquinilcetonas

En la tabla 3 se muestran las α -alquinilcetonas obtenidas con los reactivos anteriores, así como los rendimientos estequiométricos obtenidos después de la purificación. Los rendimientos fueron obtenidos considerando que los 30 milimoles de alquino reaccionan completamente.

Tabla 3. α -Alquinilcetonas obtenidas.

ALQUINILCETONA	ESTRUCTURA	RENDIMIENTO
I Oct-3-in-2-ona		60%
II Non-4-in-3-ona		80%
III Dec-5-in-4-ona		75%
IV Non-5-in-4-ona		70%

1. Análisis espectroscópico de α -alquinilcetonas

El análisis espectroscópico de las α -alquinilcetonas se realizó a partir de los espectros incluidos en el anexo y fueron obtenidos con los siguientes equipos:

Los espectros de IR se realizaron en un espectrofotómetro de infrarrojo Nicolet FT 5SX o Nicolet Magna FX 750 por medio de técnicas de solución en CHCl_3 , en celdas de bromuro de potasio (KBr) y película.

La espectrometría de masas se efectuó en un espectrómetro Jeol JMS-AX505 HA mediante la técnica de impacto electrónico.

Los espectros RMN se obtuvieron en un espectrómetro Jeol Eclipse LA300 (a 300 MHz para ^1H y 75 para ^{13}C). Se empleó $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ como referencia interna y CDCl_3 como disolvente a 25°C . Los desplazamientos químicos δ de las señales se dan en ppm y la multiplicidad se indica por las abreviaturas: s, d, t, q y m; que corresponden a: simple, doble, triple, cuádruple, quintuple, y múltiple respectivamente.

(I). Oct-3-in-2-ona

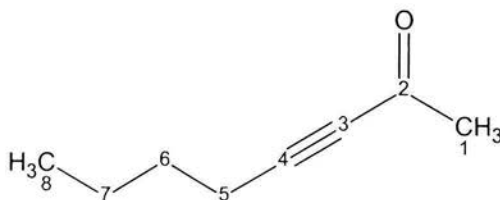


Figura 18. oct-3-in-2-ona

Aceite ámbar, PM 124, $C_8H_{12}O$.

EM (IE), m/z (%): 124(\ddagger , 10), 109 (100) (ver figura A5).

IRv (cm⁻¹): 3335.2 \equiv C-H , 2211.2 C=C , 1677.8 C=O (ver figura A1).

RMN ¹H δ (ppm): 2.31 (2H, t, H₅), 2.27 (3H, s, H₁), 1.48 (2H, q, H₆), 1.35 (2H, q, H₇), 0.86 (3H, t, H₈) (ver figura A9).

RMN ¹³C δ (ppm): 185.2 (C₂), 94.0 (C₃), 81.4 (C₄), 32.7 (C₁), 29.7 (C₅), 21.9 (C₆), 18.6 (C₇), 13.4 (C₈) (ver figura A10).

(II). Non-4-in-3-ona

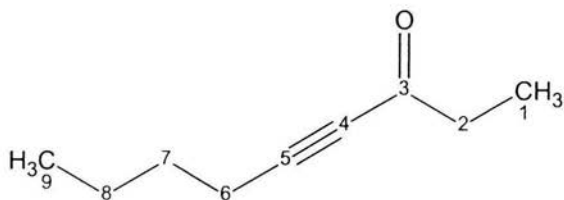


Figura 19. non-4-in-3-ona

Aceite ámbar, PM 138, C₉H₁₄O.

EM (IE), m/z (%): 138 (†, 30), 129 (100) (ver figura A6).

IRv (cm⁻¹): 3333.6 ≡ C-H, 2211.5 C=C, 1677.3 C=O (ver figura A2).

RMN 1H δ (ppm): 2.49 (2H, c, H₂), 2.31 (2H, t, H₆), 1.49 (2H, q, H₇), 1.36 (2H, m, H₈), 1.05 (3H, t, H₁), 0.87 (3H, t, H₉) (ver figura A11).

RMN 13C δ (ppm): 188.8 (C₃), 94.3 (C₄), 80.7 (C₅), 38.8 (C₂), 29.7 (C₆), 21.9 (C₇), 18.6 (C₈), 13.5 (C₉), 8.1 (C₁) (ver figura A12).

(III). Dec-5-in-4-ona

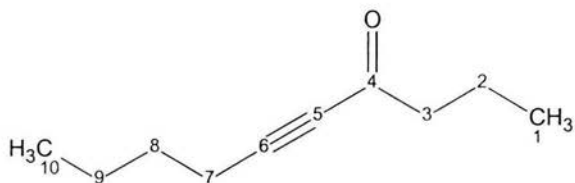


Figura 20. dec-5-in-4-ona

Aceite ámbar, PM 152, C₁₀H₁₆O.

EM (IE), m/z (%): 152 (⁺, 7), 109 (100) (ver figura A7).

IR_v (cm⁻¹): 3316.8 \equiv C-H , 2211.9 C=C , 1675.6 C=O (ver figura A3).

RMN ¹H δ (ppm): 2.44 (2H, t, H₃), 2.31 (2H, t, H₇), 1.63 (2H, m, H₂), 1.50 (2H, q, H₈), 1.37 (2H, m, H₉), 0.89 (3H, t, H₁), 0.86 (3H, t, H₁₀) (ver figura A13).

RMN ¹³C δ (ppm): 188.9 (C₄), 94.2 (C₅), 80.9 (C₆), 47.4 (C₃), 37.3 (C₂), 29.7 (C₇), 21.9 (C₈), 18.6 (C₉), 17.7 (C₁), 13.5 (C₁₀) (ver figura A14).

(IV). Non-5-in-4-ona

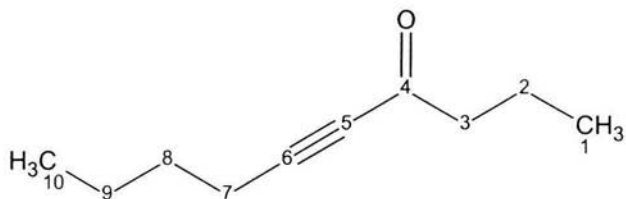


Figura 21. Non-5-in-4-ona

Aceite ámbar, PM 152, C₁₀H₁₆O.

EM (IE), m/z (%): 152 (†, 100), 152 (100) (ver figura A8).

IRv (cm⁻¹): 3329.3 ≡ C-H, 2212.6 C≡C, 1675.7 C=O (ver figura A4).

RMN 1H δ (ppm): 2.43 (2H, t, H₃), 2.26 (2H, t, H₇), 1.61 (2H, q, H₂), 1.52 (2H, q, H₈), 0.93 (3H, t, H₁), 0.86 (3H, t, H₉) (ver figura A15)

RMN 13C δ (ppm): 188.0 (C₄), 94.0 (C₅), 81.0 (C₆), 47.4 (C₃), 37.0 (C₂), 21.3 (C₇), 20.8 (C₈), 17.6 (C₁), 13.5 (C₉). (ver figura A16)

B. γ -Lactamas

Después de realizar la reacción, la extracción y la purificación; de las placas cromatográficas se obtuvieron dos fracciones principales cuyos valores de R_f son:

Fracción A 0.08109

Fracción B 0.48648

De acuerdo a los resultados de los estudios espectroscópicos, se obtuvieron dos diferentes γ -lactamas cabe mencionar que la fracción A corresponde a las carboxilactamas y la fracción B a las hidroxilactamas, las estructuras de los compuestos se muestran en la figura 22.

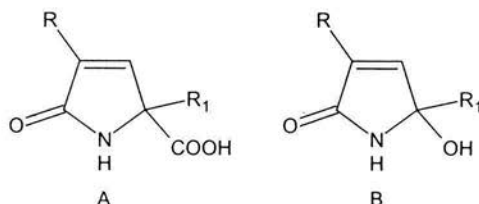


Figura 22. γ -lactamas obtenidas.

Tabla 4 . Reacción de α -Alquinilcetona con $K_4Fe(CN)_6$, KCN y CO en agua a 90 °C por dos horas a 500psi.

α - Alquinilcetona	Carboxilactama Fracción A	Rendimiento (%)	Hidroxilactama Fracción B	Rendimiento (%)
I	V	8	IX	28
II	VI	8	X	31
III	VII	8	XI	39
IV	VIII	9	XII	26

El porcentaje es expresado en % de conversión de la α -Alquinilcetona.

1. Análisis espectroscópico de γ lactamas

El análisis espectroscópico de las γ lactamas se realizó a partir de los espectros incluidos en el anexo y fueron obtenidos en los mismos equipos que se utilizaron para las α -alquilcetonas.

(V) Ácido-4-Butil-2-metil-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-carboxílico

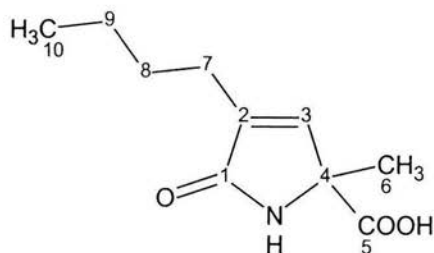


Figura 23. Ácido- 4-Butil-2-metil-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-carboxílico

Este producto se obtuvo como un sólido blanco, punto de fusión 95°C., PM 197.23, C₁₀H₁₅NO₃.

EM (IE), m/z (%): 197 (†, 10), 180(100) (ver figura A25).

IRv (cm⁻¹): 3284.3 N—H, 2958.8 O—H, 1684.6 C=O (ver figura A17).

RMN ¹H δ (ppm): 8.28 (1H,s,-NH), 6.68(1H,s,=C-H), 2.12(1H,s,-CH₂), 1.51(1H,d,-CH₃), 1.28(1H,m,-CH₂), 0.83 (1H,t,-CH₃) (ver figura A32).

RMN ¹³C δ (ppm): 175.03(C₅), 174.08(C₁), 144.66(C₂), 138.37(C₃), 66.44(C₄), 29.42(C₈), 24.72(C₇) 22.74(C₆), 22.37(C₉), 13.85(C₁₀) (ver figura A33).

(VI) Ácido-4-Butil-2-etil-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-carboxílico

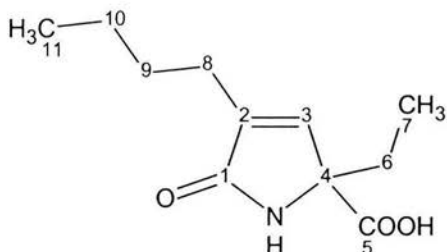


Figura 24. Ácido-4-Butil-2-etil-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-carboxílico

Este producto se obtuvo como un sólido blanco cuyo punto de fusión es de 85-86° C. PM 211.26, C₁₁H₁₇NO₃.

EM (IE), m/z (%): 211 (\dagger , 18), 166 (100) (ver figura A26).

IRv (cm⁻¹): 3520.7 N—H, 3405.5 O—H, 1691.2 C=O (ver figura A18).

RMN ¹H δ (ppm): 8.28 (1H,s,-NH), 6.66(1H,s,=C-H), 2.19(1H,s,-CH₂), 1.47(1H,s,-CH₂), 1.30(2H,m,-CH₂), 0.87 (2H,m,-CH₃) (ver figura A34).

RMN ¹³C δ (ppm): 175.55(C₅), 173.39(C₁), 143.79(C₂), 138.84(C₃), 70.84(C₄), 29.57(C₈), 28.90(C₆) 24.78(C₉), 22.37(C₁₀), 13.86(C₁₁), 8.47(C₇) (ver figura A35).

Difracción de Rayos X (ver figura A46).

(VII) Ácido-4-Butil-5-oxo-2-propil-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-carboxílico

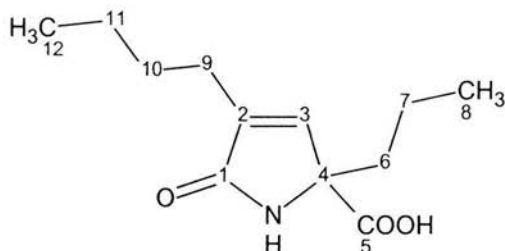


Figura 25. Ácido-4-Butil-5-oxo-2-propil-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-carboxílico

Este producto se obtuvo como un sólido blanco cuyo punto de fusión es de 55° C. PM 211.26, C₁₁H₁₇NO₃.

EM (IE), m/z (%): 225 (†, 5), 180 (100) (ver figura A27).

IRv (cm⁻¹): 3293.1 N—H, 2960.7 O—H, 1685.9 C=O (ver figura A19).

RMN ¹H δ (ppm): 8.26 (1H,s,-NH), 6.68(1H,s,=C-H), 2.17(2H,m,-CH₂), 1.29(3H,m,-CH₂), 0.88 (2H,m,-CH₃) (ver figura 36).

RMN ¹³C δ (ppm): 175.44(C₅), 173.45(C₁), 144.00(C₂), 138.51(C₃), 70.25(C₄), 37.86(C₆), 29.56(C₁₀), 24.76(C₉) 22.37(C₁₁), 17.68(C₇), 14.12(C₈), 13.84(C₁₂) (ver figura A37).

(VIII) Ácido-5-Oxo-2,4-dipropil-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-carboxílico

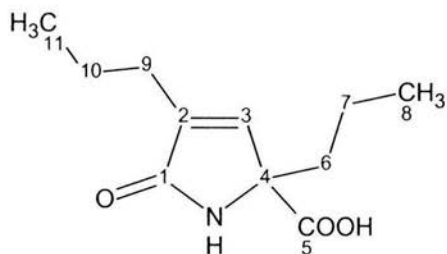


Figura 26. Ácido-5-Oxo-2,4-dipropil-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-carboxílico

Este producto se obtuvo como un sólido blanco, punto de fusión 75°C., PM 169.22, C₁₁H₁₇NO₃.

EM (IE), m/z (%): 211 (±, 2), 166 (100) (ver figura A28).

IRv (cm⁻¹): 3262.8 N—H, 2961.7 O—H, 1685.6 C=O (ver figura A20).

RMN ¹H δ (ppm): 7.84 (1H,s,-NH), 6.70(1H,s,=C-H), 2.18(1H,t,-CH₂), 1.57(1H,m,-CH₂), 1.24(2H,m,-CH₂), 0.91 (2H,t,-CH₃) (ver figura A38).

RMN ¹³C δ (ppm): 175.83(C₅), 173.18(C₁), 144.28(C₃), 138.31(C₂), 70.15(C₄), 37.83(C₆), 27.09(C₉), 20.75(C₁₀), 17.74(C₇), 14.11(C₈). 13.77(C₁₁) (ver figura A39).

(IX) 3-Butil-5-hidroxi-5-metil-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona

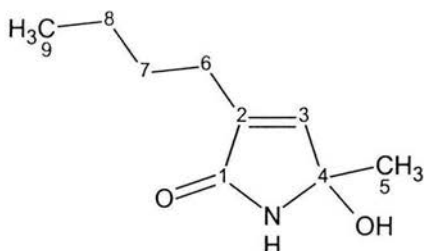


Figura 27. 3-Butil-5-hidroxi-5-metil-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona

Este producto se obtuvo como un sólido blanco, punto de fusión 105°C., PM 169.22, C₉H₁₅NO₂.

EM (IE), m/z (%): 169 (\dagger , 2), 166 (100).

IRv (cm⁻¹): 3443.1.8 O—H, 1707.6 C=O (ver figura A21).

RMN ¹H δ (ppm): 7.35 (1H,s,-NH), 6.46(1H,s,=C-H), 2.12(1H,t,-OH), 2.12(1H,t,-CH₂), 1.53(1H,m,-CH₂), 1.44(2H,m,-CH₂), 0.88 (2H,t,-CH₃) (ver figura A40).

RMN ¹³C δ (ppm): 172.95(C₁),144.52(C₂),138.11(C₃), 85.82(C₄), 29.45(C₆), 24.78(C₅), 24.47(C₇), 22.41(C₈), 13.89(C₉) (ver figura A41)

(X) 3-Butil-5-etil-5-hidroxi-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona

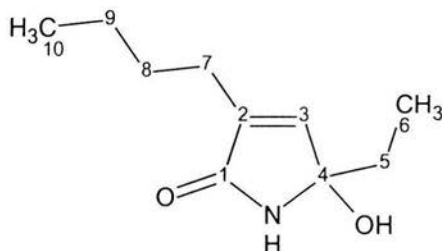


Figura 28. 3-Butil-5-etil-5-hidroxi-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona

Este producto se obtuvo como un sólido blanco, punto de fusión 65°C., PM 183.25, C₁₀H₁₇NO₂.

EM (IE), m/z (%): 183 (†, 18), 154 (100) (ver figura A29).

IRv (cm⁻¹): 3297.9 O—H, 1698.7 C=O (ver figura A22).

RMN ¹H δ (ppm): 7.18(1H,s,-NH), 6.43(1H,s,=C-H), 2.15(1H,m,-OH), 2.13(2H,m,-CH₂), 1.84(1H,c,-CH₂), 1.36(2H,m,-CH₂), 0.91 (2H,t,-CH₃) (ver figura A42).

RMN ¹³C δ (ppm): 173.12(C₁), 143.24(C₂), 139.06(C₃), 88.49(C₄), 30.75(C₅), 29.57(C₇), 24.58(C₈), 22.43(C₉), 13.83(C₁₀), 8.31(C₆) (ver figura A43).

(XI) 3-Butil-5-hidroxi-5-propil-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona

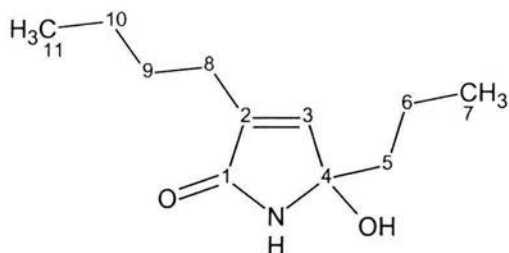


Figura 29. 3-Butil-5-hidroxi-5-propil-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona

Este producto se obtuvo como un sólido blanco, punto de fusión 68°C., PM 197.27, C₁₁H₁₉NO₂.

EM (IE), m/z (%): 197 (⁺, 2), 152 (100) (ver figura A30).

IRv (cm⁻¹): 3296.3 O—H, 1698.4 C=O (ver figura A23).

RMN ¹H δ (ppm): 7.36(1H,s,-NH), 6.44(1H,s,=C-H), 2.12(1H,m,-OH), 2.11(1H,m,-CH₂), 1.75(1H,t,-CH₂), 1.35(3H,m,-CH₂), 0.96 (2H,t,-CH₃) (ver figura A44).

(XII) 5-Hidroxi-3,5-dipropil-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona

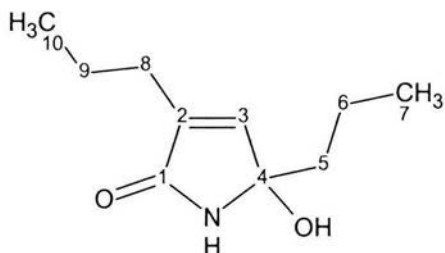


Figura 30. 5-Hidroxi-3,5-dipropil-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona

Este producto se obtuvo como un sólido blanco, punto de fusión 65°C., PM 183.25, C₁₀H₁₇NO₂.

EM (IE), m/z (%): 183 (†, 18), 154 (100) (ver figura A31).

IRv (cm⁻¹): 3444.2 O—H, 1708.1 C=O, (ver figura A24).

RMN ¹H δ (ppm): 7.24(1H,s,-NH), 6.44(1H,s,=C-H), 2.12(1H,c,-OH), 2.00(1H,c,-CH₂), 1.75(1H,t,-CH₂), 1.50(1H,c,-CH₂), 1.45 (1H,m,-CH₂) 0.88(2H,c,-CH₃) (ver figura A45).

RMN ¹³C δ (ppm): 173.06(C₁), 143.74(C₃), 138.51(C₂), 88.03(C₄), 40.00(C₅), 26.87(C₈), 26.87(C₈), 20.72(C₉), 17.41(C₆), 14.23(C₇), 13.82(C₁₀) (ver figura A46).

2. Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de γ -lactamas

Por analogía con las especies catalíticas formadas a partir de níquel, se propone un mecanismo de reacción para la síntesis de γ -lactamas.

Formación del complejo a partir de:

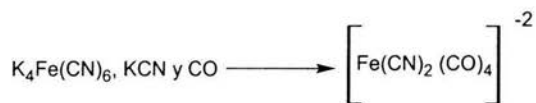


Figura 31. Formación del complejo

Es necesario realizar un estudio completo que escapa a los alcances de este trabajo de tesis para determinar cuál ión complejo de hierro es el que toma parte en la ciclización de la α -alquinilcetona.

Una vez formado el anión complejo, este podría interactuar con la α -alquinilcetona de la siguiente forma:

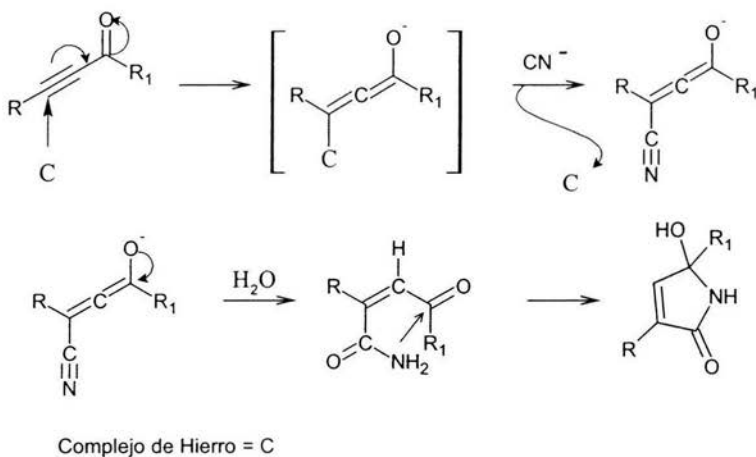


Figura 32. Interacción del anión complejo con la α -alquinilcetona

El exceso de CO favorece una segunda etapa de reacción:

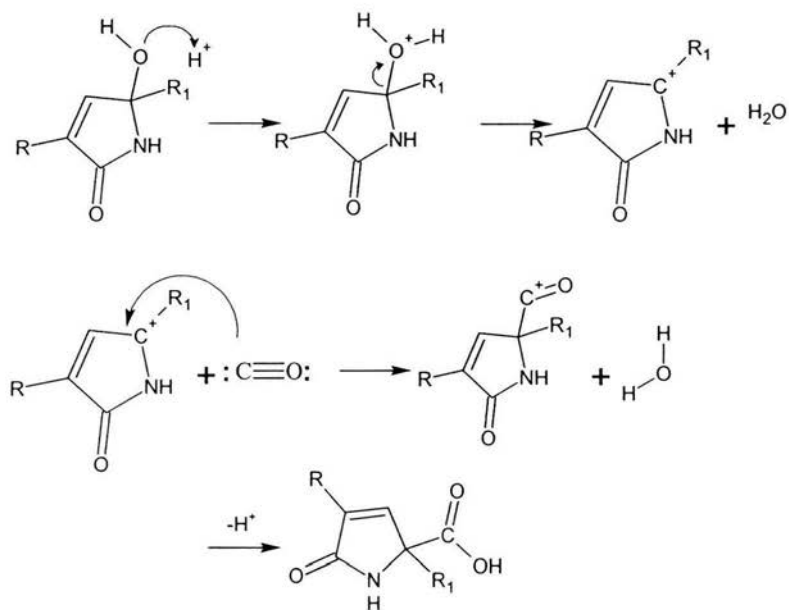


Figura 32. Formación de la carboxilactama.

C. Pruebas de Actividad Biológica

En la tabla 5 se sugiere una serie de abreviaturas para hacer más fácil la identificación de los compuestos para la realización de las pruebas de actividad biológica.

Tabla 5. Abreviaturas sugeridas para los nombre de las γ -Lactamas sintetizadas.

Nombre del compuesto	Abreviatura sugerida
Ácido-4-Butil-2-metil-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-carboxílico	CL-B-M
Ácido-4-Butil-2-etil-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-carboxílico	CL-B-E
Ácido-4-Butil-5-oxo-2-propil-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-carboxílico	CL-B-P
Ácido-5-Oxo-2,4-dipropil-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-carboxílico	CL-P-P
3-Butil-5-hidroxi-5-metil-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	L-B-M
3-Butil-5-etil-5-hidroxi-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	L-B-E
3-Butil-5-hidroxi-5-propil-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	L-B-P
5-Hidroxi-3,5-dipropil-1,5-dihidro-2H-pirrol-2-ona	L-P-P

Tabla 6. Pruebas de actividad biológica (antiinflamación y antioxidante).

Compuesto	DPPH	Lipoperoxidación	Antiinflamación
L-P-P	0.85	1.97	35.95
L-B-M	0.96	2.00	33.94
L-B-E	0.85	3.56	27.77
L-B-P	0.95	2.36	23.65
CL-P-P	12.52	3.42	21.60
CL-B-M	0.05	14.24	43.76
CL-B-E	0.11	2.21	57.68
CL-B-P	0.16	3.54	61.43

Los valores de DPPH son expresados en porcentaje, los de lipoperoxidación en nmol TBARS/mg de proteína y los de actividad antiinflamatoria en porcentaje de inhibición de edema.

La concentración de los compuestos utilizada para realizar la prueba de TPA (Actividad Antiinflamatoria) fue de 1 μ mol/oreja

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Tabla 7. Pruebas de citotoxicidad en líneas celulares

COMPUESTO	LINEAS CELULARES					LINFOCITOS NORMALES
	U251	PS-3	HCT-15	CHOW	K562	
L-P-P	11.36	21.36	6.40	18.97	39.7	14.60
L-B-M	25.13	23.20	6.93	9.86	38.97	8.98
L-B-E	13.24	20.13	5.95	10.31	42.61	4.60
L-B-P	13.26	15.98	12.40	9.80	15.20	16.80
CL-P-P	26.22	28.59	3.94	1.24	30.97	31.18
CL-B-M	22.45	29.80	9.43	0.44	41.45	7.39
CL-B-E	17.46	12.61	4.79	0.69	22.81	14.66
CL-B-P	22.61	61.26	14.62	1.75	38.5	25.38

Tipos de cáncer. U25 Sistema Nervioso Central (SNC), PS-3 Próstata, HCT-15 Colón, CHOW ovario y K562 Leucemia. NOTA: La concentración de los compuestos para las pruebas de citotoxicidad fue de 50 μM y para macrófagos murinos (% Inh NO_2) fue de 100 μM .

Tabla 8. Reporte de actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA de la CL-B-M

Muestra	Dosis ($\mu\text{mol}/\text{oreja}$)	Edema (mg) (promedio \pm ES)	% de Inhibición	CI ₅₀ ($\mu\text{mol}/\text{oreja}$)
	0	14.51 \pm 0.09	-	
	0.1	12.95 \pm 0.71	10.78 \pm 4.94	
	0.31	10.85 \pm 1.35 [*]	25.24 \pm 9.3	1.72
CL-B-M	1	8.41 \pm 1.08 ^{**}	42.01 \pm 7.5	
	3.1	6.02 \pm 1.44 ^{**}	58.48 \pm 9.95	
	5.62	6.62 \pm 1.44 ^{**}	54.35 \pm 9.21	

Los datos representan el promedio de 4-6 ratones \pm el error estándar de la media (e.e). Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett para aislar los grupos significativos. Los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \geq 0.01$ (**) se consideraron con diferencia estadísticamente significativa con respecto al control.

Tabla 9. Reporte de actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA de la CL-B-E

Muestra	Dosis ($\mu\text{mol}/\text{oreja}$)	Edema (mg) (promedio \pm ES)	% de Inhibición	CI ₅₀ ($\mu\text{mol}/\text{oreja}$)
	0	14.95 \pm 0.38	-	
	0.1	14.68 \pm 0.95*	1.84 \pm 6.32	
	0.2	11.31 \pm 1.78*	25.29 \pm 11.92	
CL-B-E	0.31	8.05 \pm 0.94**	46.15 \pm 6.28	0.417
	1.0	3.93 \pm 0.81**	73.74 \pm 5.42	
	3.1	5.30 \pm 1.09**	64.54 \pm 7.47	
	5.62	5.88 \pm 1.07**	60.7 \pm 7.00	

Los datos representan el promedio de 4-12 ratones \pm el error estándar de la media (ERM). Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett para aislar los grupos significativos. Los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \geq 0.01$ (**) se consideraron con diferencia estadísticamente significativa con respecto al control.

Tabla 10. Reporte de actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA de la CL-B-P

Muestra	Dosis ($\mu\text{mol/oreja}$)	Edema (mg) (promedio \pm ES)	% de Inhibición	CI ₅₀ ($\mu\text{mol/oreja}$)
	0	14.10 \pm 0.19	-	
	0.1	10.50 \pm 0.61	25.53 \pm 6.80	
	0.2	8.85 \pm 1.32 [*]	37.23 \pm 7.23	
CL-B-P	0.31	6.53 \pm 1.28 ^{**}	53.68 \pm 7.9	0.298
	1.0	4.23 \pm 0.10 ^{**}	70.00 \pm 5.4	
	3.1	4.35 \pm 1.44 ^{**}	69.14 \pm 9.65	

Los datos representan el promedio de 4-10 ratones \pm el error estándar de la media (ERM). Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett para aislar los grupos significativos. Los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \geq 0.01$ (**) se consideraron con diferencia estadísticamente significativa con respecto al control.

1. Análisis de las Pruebas de Actividad Biológica.

Los resultados en el estudio de antioxidantes (DPPH y Lipoperoxidación) no muestran valores de importancia significativa por lo cual, se descarta que estos compuestos puedan llegar a tener un uso como captadores de radicales libres.

En lo que respecta al estudio realizado sobre líneas celulares sólo dos compuestos presentan valores cercanos al cincuenta por ciento que son la L-B-E con un porcentaje de inhibición cercano al 42.61% y la CL-B-M con 41.45 %, ambas en la línea celular de cáncer de leucemia. Además de que al ensayar estos compuestos con linfocitos normales no afectan su crecimiento celular.

La prueba de actividad antiinflamatoria que presenta mejores resultados.

La aplicación tópica de TPA en la orejas del ratón induce una prolongada respuesta inflamatoria, asociada con un incremento transitorio en la producción de prostanoïdes.

La inflamación cutánea es producida y mantenida por la interacción de varias poblaciones de células (macrófagos residentes, queratinocitos, fibroblastos, plaquetas y células endoteliales), células que alcanzan el foco inflamatorio por quimotaxis (neutrófilos, monocitos y linfocitos) y mediadores proinflamatorios liberados por estas células (citocinas, prostaglandinas y leucotrienos etc).

Los resultados obtenidos en el estudio indican que las γ -lactamas que en su estructura presentan un grupo carboxilo (COOH), poseen una actividad mayor que aquellas que tienen un grupo hidroxilo (OH). Además analizando los resultados obtenidos en un estudio de tipo estructura-actividad, es claramente observable que al aumentar el tamaño de la cadena lineal en el carbono cuaternario, aumenta la actividad antiinflamatoria, resultado que es corroborado en el cálculo de la concentración inhibitoria al cincuenta por ciento (IC₅₀).

De igual manera al comparar los resultados de la CL-P-P y la Cl-B-P se observa que aumenta la actividad antiinflamatoria al aumentar en un carbono la cadena lineal alfa al grupo carbonilo. Estos resultados abren una posibilidad en el uso de este tipo de compuestos en la terapéutica de inflamación.

Se recomienda realizar un estudio con otros tipos de sustituyentes, tanto en el carbono alfa como en el carbono cuaternario, para poder determinar como se ve afectada la actividad.

El modelo de inflamación TPA es inespecífico, ya que sólo nos permite ver si un compuesto posee actividad antiinflamatoria, pero no permite, determinar acerca del mecanismo por el cual actúa la molécula; por lo que es muy recomendable realizar estudios, que están fuera de alcance de este proyecto de tesis, para conocer que tipo de mecanismo involucrado en el proceso inflamatorio es el que se inhibe.

VII CONCLUSIONES

A. α -Alquinilcetonas

En RMN ^1H , las señales de los hidrógenos y las cadenas alifáticas aparecen desplazadas en un intervalo de 0.6 a 2.7 ppm dependiendo del tamaño de la cadena y de su cercanía a los grupos electroattractores $\text{C}=\text{O}$ y $\text{C}=\text{C}$.

Para ^{13}C , el número de señales en el espectro, correspondió en cada caso al número de carbonos presentes en la molécula, ubicados de acuerdo a los corrimientos químicos.

Los espectros de IR mostraron las bandas de los principales grupos funcionales en todas las α -alquinilcetonas sintetizadas. Los grupos observados son:

El triple enlace ($\text{C}\equiv\text{C}$) alrededor de 2200 cm^{-1} el enlace ($\equiv\text{C}-\text{H}$) alrededor de 3000 cm^{-1} y el grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) entre 1670 y 1700 cm^{-1} .

De manera interesante los espectros de masas de dos compuestos mostraron valores con el doble del peso molecular esperado. Esto puede deberse a que las condiciones con las cuales es realizada la técnica las alquinilcetonas tienden a dimerizarse.

El análisis espectroscópico permite concluir de forma satisfactoria que se obtienen 4 productos necesarios para la síntesis de γ -lactamas.

B. γ -Lactamas

Los estudios en el IR muestran los grupos funcionales carbonilo e hidroxilo de las moléculas. En la espectroscopia de RMN se evidencian las señales de protón y carbón correspondientes a los dobles enlaces, grupos carbonilo y cadenas alifáticas en concordancia con su corrimiento químico característico. Asimismo, fue posible la obtención de monocristales de la especie A, lo que permitió aplicar la técnica de difracción de rayos X y obtener un difractograma que confirma que, efectivamente la estructura de la γ -lactama es la mostrada en la figura A.

Al observar la formación de α -lactamas se concluye que el hierro II forma una especie catalíticamente activa en este tipo de reacciones de heterociclización.

Dicha especie es un complejo análogo al formado por el níquel cero. Sin embargo, la formación del complejo de hierro requiere de más energía por lo que la reacción se lleva a cabo bajo condiciones de presión y temperatura superiores a las normales.

La identificación del complejo de hierro está fuera de los alcances de este trabajo de tesis, por lo que es necesario realizar todo un estudio de investigación enfocado exclusivamente a la determinación de la estructura de dicha especie. Sin embargo, en concordancia con los resultados obtenidos se puede afirmar los siguientes puntos:

- El complejo contendrá ligantes CN⁻ dentro de la esfera de coordinación
- El monóxido de carbono interviene en la formación del complejo hierro.
- El monóxido de carbono es fundamental para la carbonilación.

Además de obtener las hidroxilactamas esperadas, también se pudieron obtener las carboxilactamas.

Del procedimiento desarrollado resulta una heterociclización seguida de una carbonilación en un solo paso de trabajo experimental.

Esto sin lugar a dudas convierte a las carboxilactamas en productos de mayor interés, por lo que se recomienda desarrollar una línea de investigación para la optimización del proceso, para conseguir un mayor rendimiento. Al ensayar el método con alquilacetonas diferentes se pudo generalizar el método, al obtenerse ocho productos diferentes.

C. Pruebas de Actividad Biológica

Las pruebas de actividad antiinflamatoria se presentan resultados satisfactorios, destacando la actividad de las carboxilactamas sobre las hidroxilactamas, así como la tendencia de inhibición de la actividad antiinflamatoria cuando se aumenta el número de carbonos en las cadenas alifáticas. De acuerdo a la estructura de las γ -lactamas, estas serían clasificadas como Antiinflamatorios no esteroideos (AINES) ya que no se parecen a las estructuras presentadas en los antiinflamatorios esteroideos (derivados de la cortisona) .

Los resultados sugieren que las lactamas no son buenas captadoras de radicales libres y que no poseen una fuerte actividad citotóxica. Sin embargo, hay que ensayar con otro tipo de sustituyentes.

VIII. REFERENCIAS

1. www.acdlabs.com/iupac/nomenclature/
2. Roberts J., Caserio M., (1999). Basic Principles of Organic Chemistry, W. A. Benjamin Inc. New York Amsterdam., USA ., p.c. 546-547, 712-713.
3. Suk-ku, K., Kwang-Jin, K; Chan-Mo, Y. (2001). Ru-Catalyzed Cyclocarbonylation of α - and β -Allenic Sulfonamides: Synthesis of γ - and δ -Unsaturated Lactams. Organic Letters, 3(18), 2851-2853.
4. Nabuyuki, M.; Toshiki, N.; Yasuaki T. (1999). First synthesis of (R)-(-)-5-hydroxy-3-pyrrolin-2-one (jatropham) by lipase-catalyzed kinetic resolution. Tetrahedron Asymmetry. 10, 4469-4471.
5. Beltaief, R.; Besbes, F.; Ben, A. (1999). (Z)- Dimethyl α -(Bromomethyl) fumarate, an Efficient Intermediate for the Selective Synthesis of Dimethyl 3-Alkyl Itaconates and 2-Alkyl 3- Carbomethoxy - γ -Lactams. Tetrahedron. 55, 3949-3958.
6. Franco, G.; Christian, V.; Inge, L. (2003). Synthesis of 5-methoxylated 3-pyrrolin-2-ones via the rearrangement of chlorinated pyrrolidin-2-ones. Tetrahedron. 59, 1147-1157.
7. Parsons, A. (2001). Free radical cyclisation of enamides leading to biologically important γ -lactams. Acad. Sci. Paris, Chimie/Chemistry. 4, 391-400.

8. Rosas, N.; Cabrera, A.; Sharma, P.; Arias, J.; García, J.; Arzoumanian, H. (2000). Catalytic hydrocyanation of α -ketoalkynes by $\text{Ni}(\text{CN})_2/\text{CO}/\text{KCN}$ system alkaline aqueous media: Identification of the active species. *Journal of Molecular Catalysis*. 156, 103-112.
9. Southom, P.; Powis, G.; (1988) Free radicals in Medicine (I and II) *Mayo Clin Proc.* 63, 389-408.
10. Thomas, J. (1994) Oxidative stress, oxidant defence and dietary constituents. En: Shils, M.; Olson, J.; Shike, M. (eds). *Modern nutrition in health and diseases*. Vol. 1 8th ed Lea & Febiger. Philadelphia (1994).
11. Khoury, S. Jazmín C. (1991) *Cáncer los grandes especialistas responden*, 1ª Ed. Aguilar, España.
12. Katzung, B. (1991). *Farmacología Básica y Clínica*. 4ª Edición, Ed. El Manual Moderno, México.
13. Calixto, J.; Cabrini, D.; Ferreira. (2000). Kinins in pain and inflammation. *J. Pain*. 87, 1-5.
14. Hall, J. (1997). Bradykinin receptors. *Gen Pharmacol*. 28, 1-6.
15. Bolyard, L.; Van Looy, J.; Vasko, M. (2000). Sensitization of rat sensory neurons by chronic exposure to forskolin or "inflammatory cocktail". *Pain* 88, 277-285.
16. Murata, T.; Ushikubi, F.; Toshiyuki, M. (1997) Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature*. 388, 678-682.

17. Wook, H.; Cho, H. (2000). Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97, 155-160.
18. Garabedian, B.; Kanaan, J. Haddad, J. (1997). Involvement of interleukin 1bb, nerve growth factor and prostaglandin E2 in endotoxin-induced localized inflammatory hiperalgesia. *Br. J. Pharmacol* . 121, 1619-1626.
19. Dray, A. (1995). Inflammatory mediators of pain. *J. Br J Anaest*. 75, 125-131.
20. Mobarakeh, J.; Sakurada, S.; Katsuyama, S. (2000). Role of histamine H (1) receptor in pain perception. *Eur J Pharmacol*. 391, 81-89.
21. Woolf, C.; Allchorne, A. (1996) Peripheral cell types contributing to the hyperalgesic action of nerve growth factor in inflammation. *J Neuroscience*. 27, 16-23.
22. Janig, W.; Levine, J.; Michaelis, M. (1996) Interaction of Sympathetic and primary afferent neurons following nerve injury and tissue trauma. *Prog Brain Res*, 113, 161-184.
23. Nakamura, A.; Fujita, M.; Shiomi, H. (1996). Involvement of endogenous nitric oxide in the mechanism of bradykinin induced peripheral hiperalgesia. *Br J Pharmacol*. 117, 407-412.
24. Dray, A. (1994). Tasting the inflammatory soup: The role of peripheral neurons. *Pain Rev*. 1:153-171.

25. Janig, W.; Levine, JD; Michaelis, M. (1996). Interactions of Sympathetic and primary afferent neurons following nerve injury and tissue trauma. *Prog Brain Res.* 89: 265-273.
26. Méndez, M. ; Gutiérrez, Y. Síntesis de Heterociclos a partir de α -Alquilcetonas. Universidad Nacional Autónoma de México, México 2003.
27. Cotelle, N. et al. (1996). Antioxidant Properties of Hidroxy- Flavones. *Free Radical and Medicine.* 20, No1, 35-43 .
28. Rao, T. S., Curie, J. L., Shaffer, A. (1993). Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) and tetradecanoylphobol acetate (TPA) - induced dermal inflammation. *Inflammation*, 10, 723-741.

ANEXO

ESPECTROS DE
 Δ .ALQUINILCETONAS

ESPECTROSCOPIA EN EL INFRARROJO

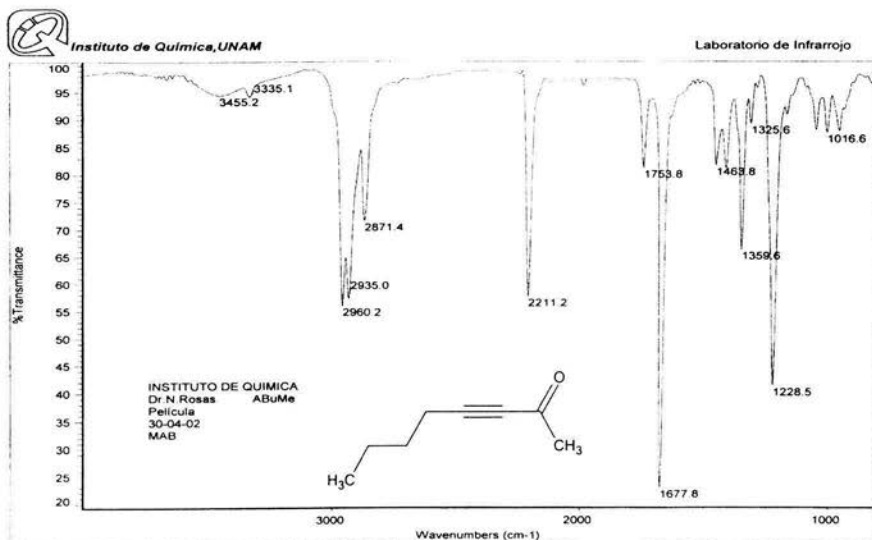


Figura A1. Espectro de IR de oct-3-in-2-ona

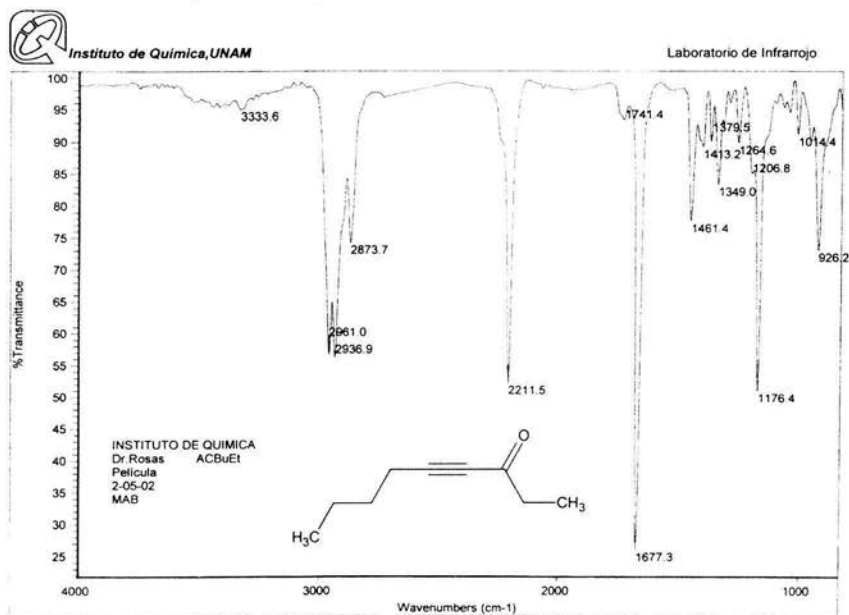


Figura A2. Espectro de IR de non-4-in-3-ona

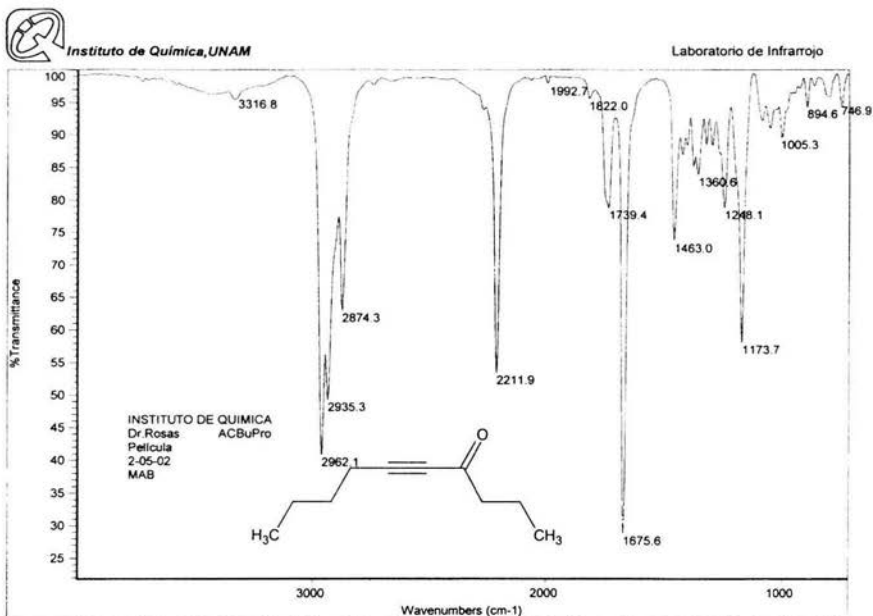


Figura A3. dec-5-in-4-ona

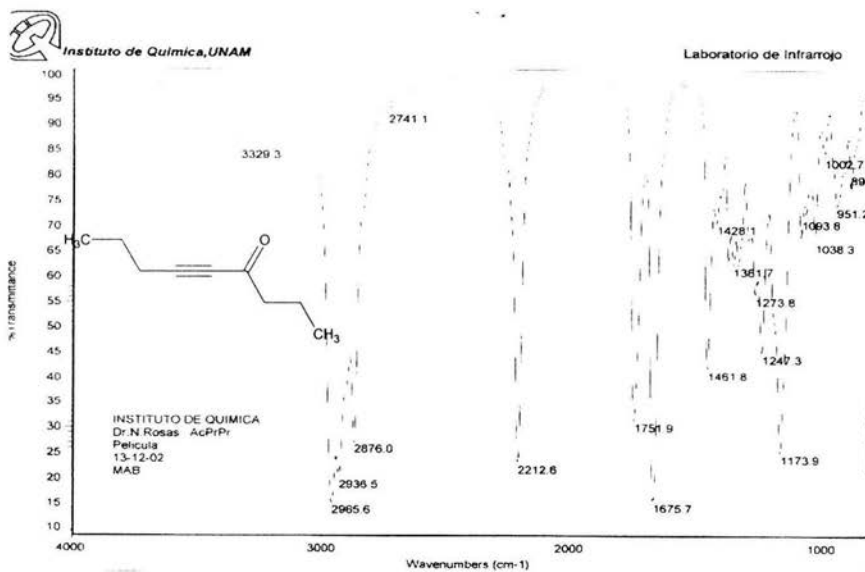


Figura A4. non-5-in-4-ona

ESPECTROMETRÍA DE MASAS

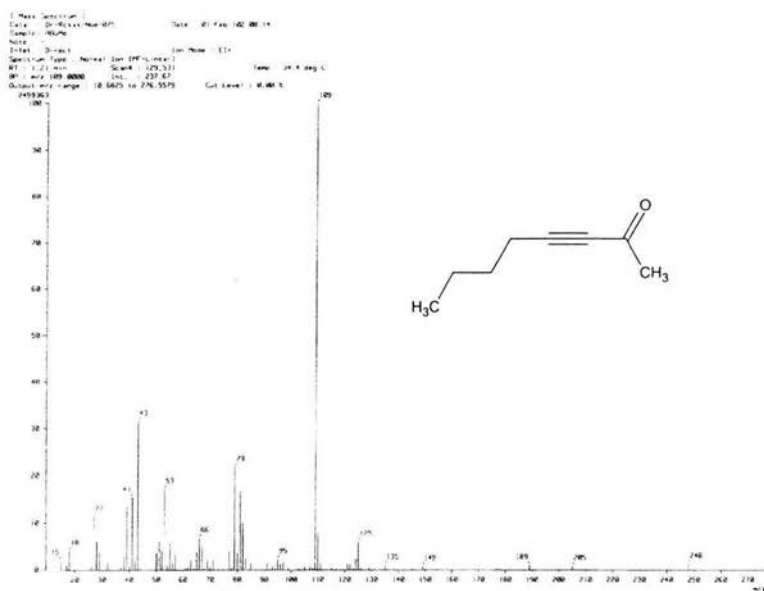
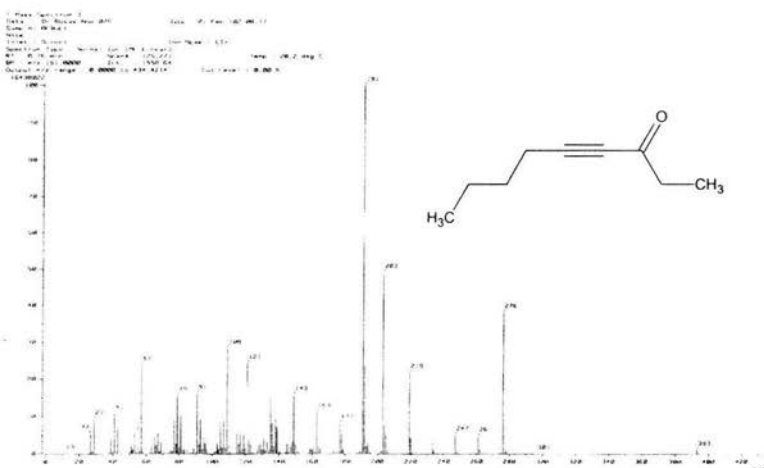


Figura A5 . Espectro de masas de oct-3-in-2-ona



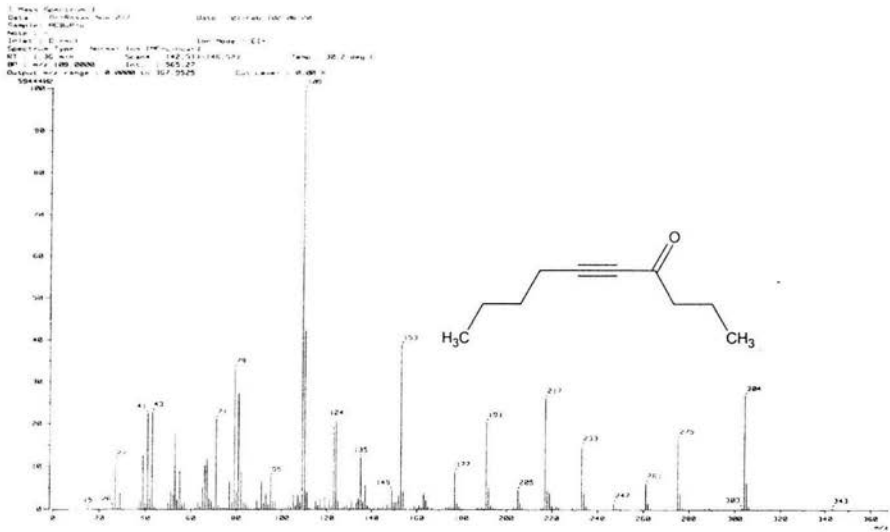


Figura A7. Espectro de masas de dec-5-in-4-ona

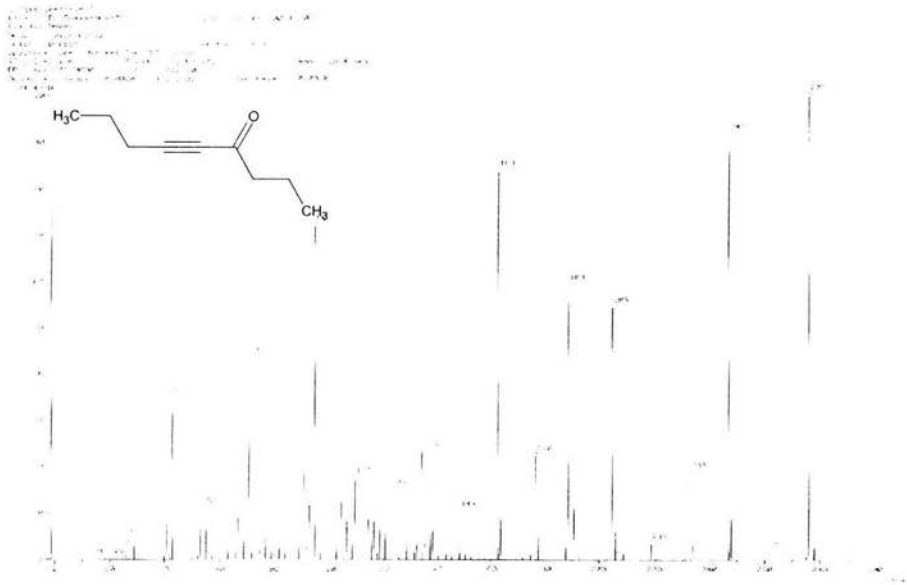


Figura A8. Espectro de masas non-5-in-4-ona

ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR, H¹ Y C¹³

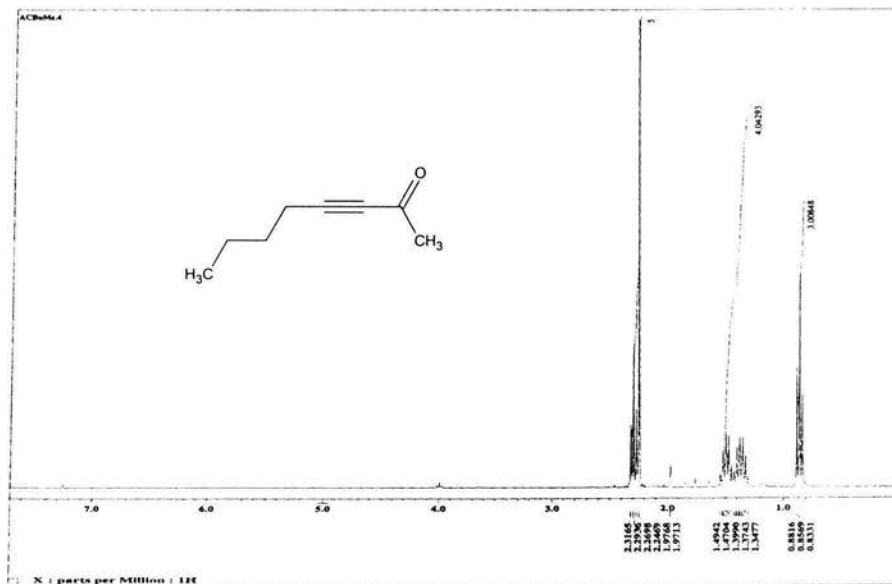


Figura A9. Espectro de RMN ¹H de oct-3-in-2-ona

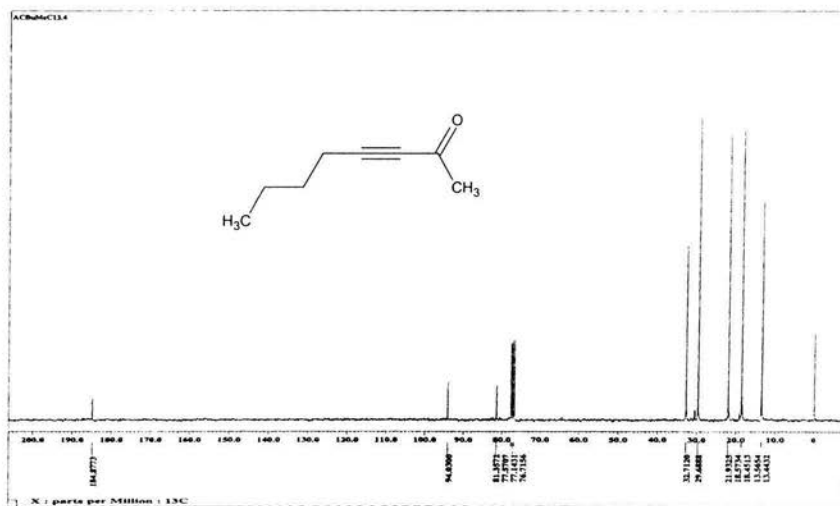


Figura A10. Espectro de RMN ¹³C de oct-3-in-2-ona

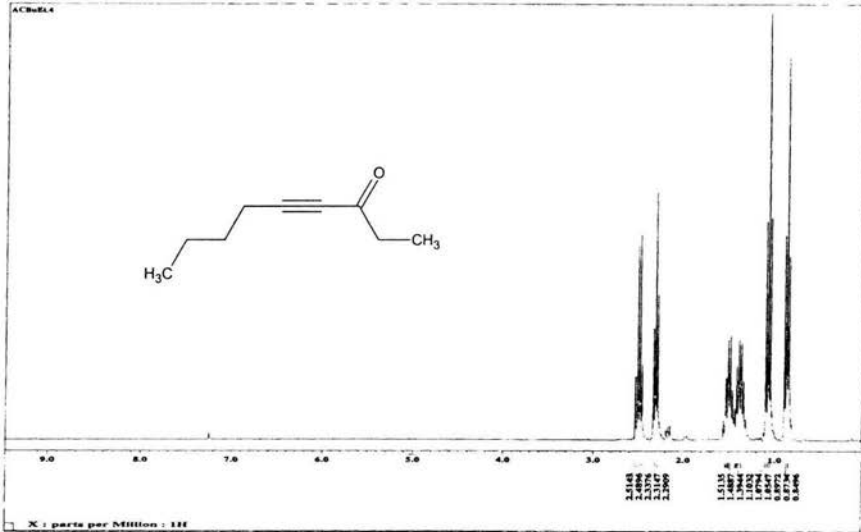


Figura A11. Espectro de RMN ^1H de non-4-in-3-ona

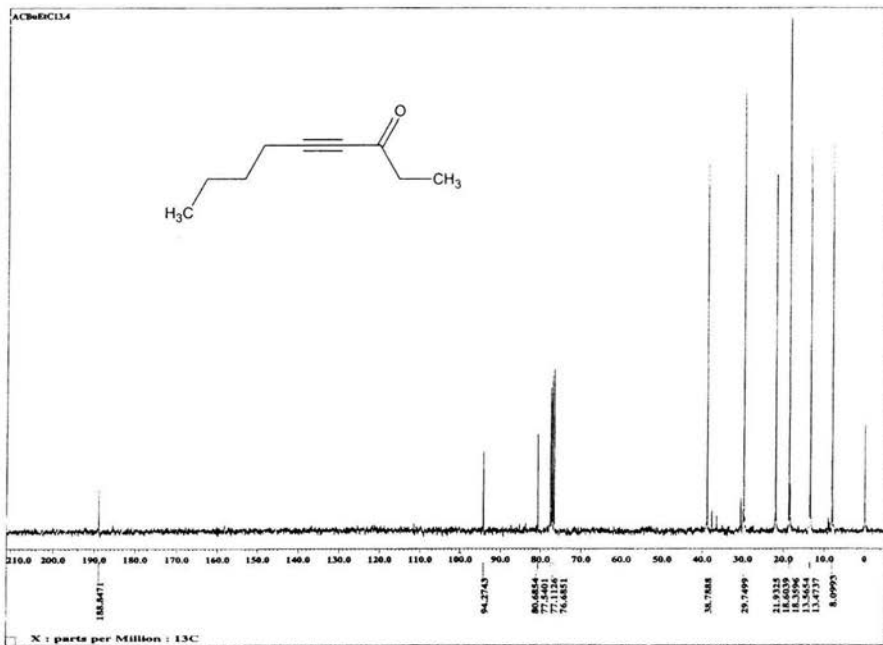


Figura A12. Espectro de RMN ^{13}C de non-4-in-3-ona

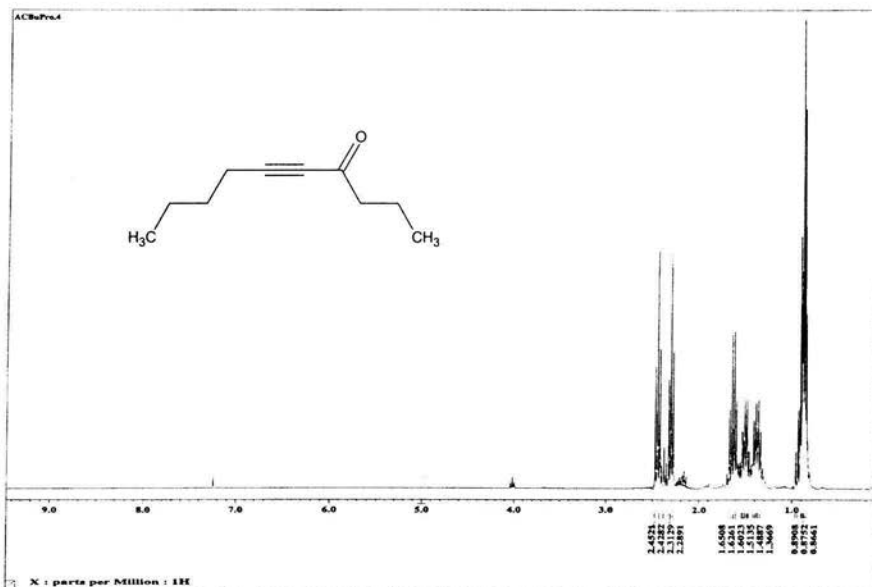


Figura A13. Espectro de RMN ^1H de dec-5-in-4-ona

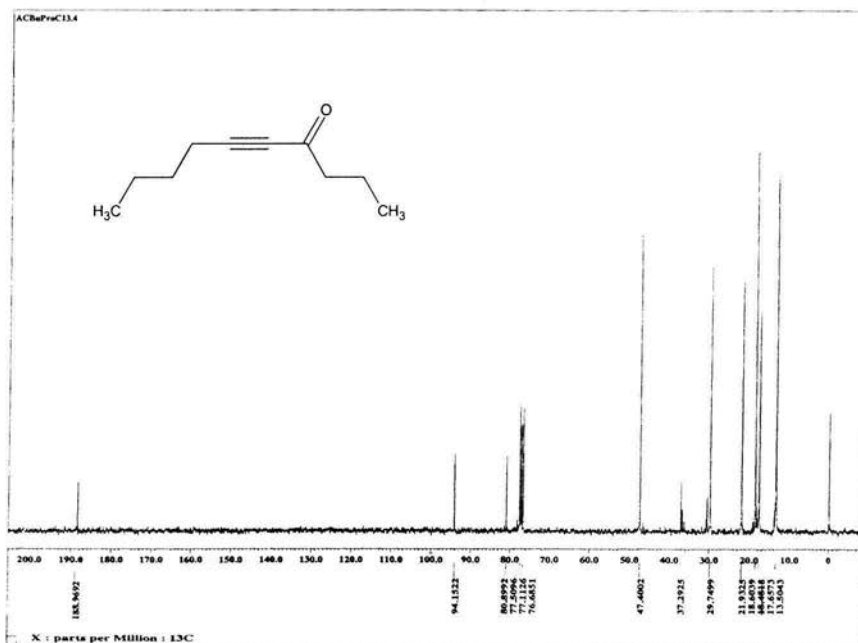


Figura A14. Espectro de RMN ^{13}C de dec-5-in-4-ona

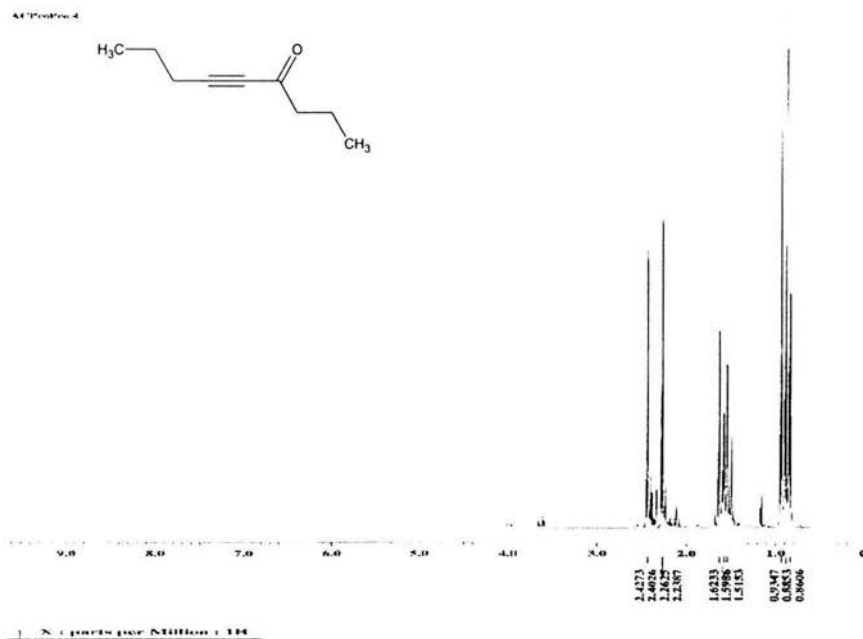


Figura A15. Espectro de RMN ^1H de non-5-in-4-ona

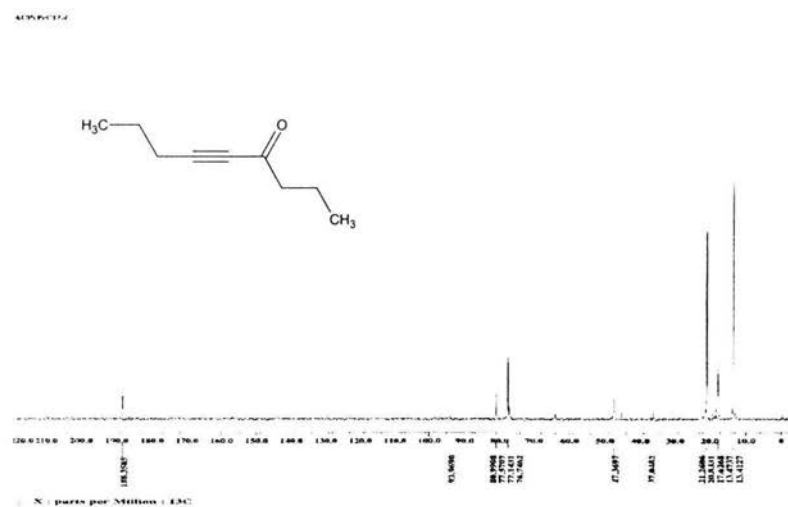


Figura A16. Espectro de RMN ^{13}C de non-5-in-4-ona

ESPECTROS DE γ -
LACTAMAS

ESPECTROSCOPÍA EN EL INFRARROJO

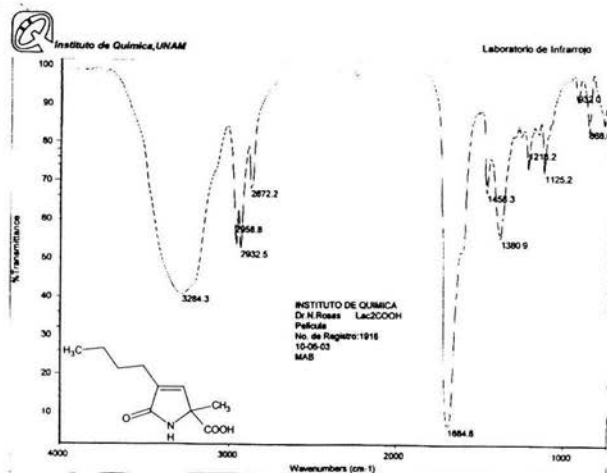


Figura A17. Espectro de IR de 4-Butil-2-metil-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-ácido carboxílico

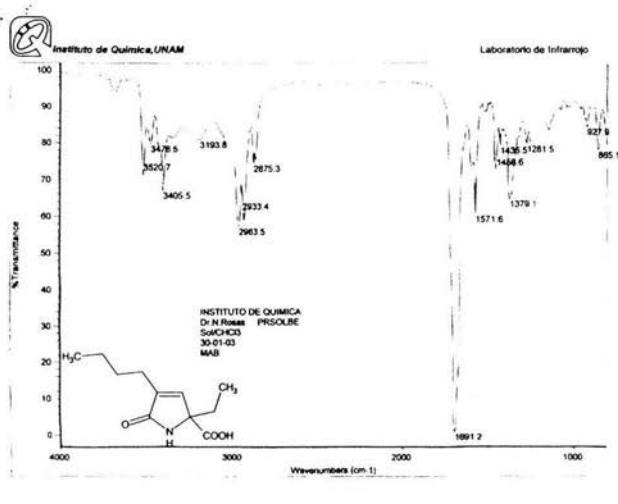


Figura A18. Espectro de IR de 4-Butil-2-etil-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-ácido carboxílico

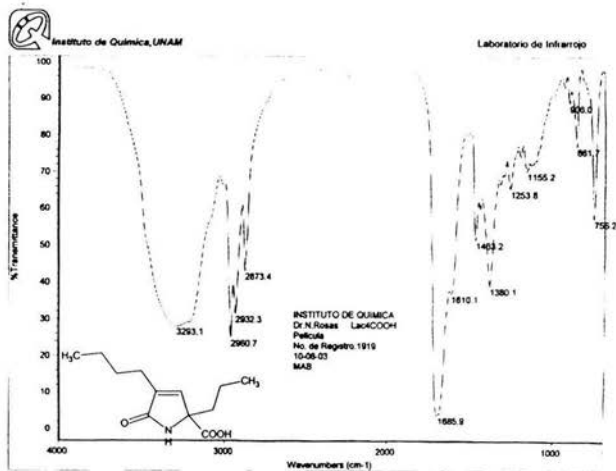


Figura A19. Espectro de IR de 4-Butil-5-oxo-2-propil-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-ácido carboxílico

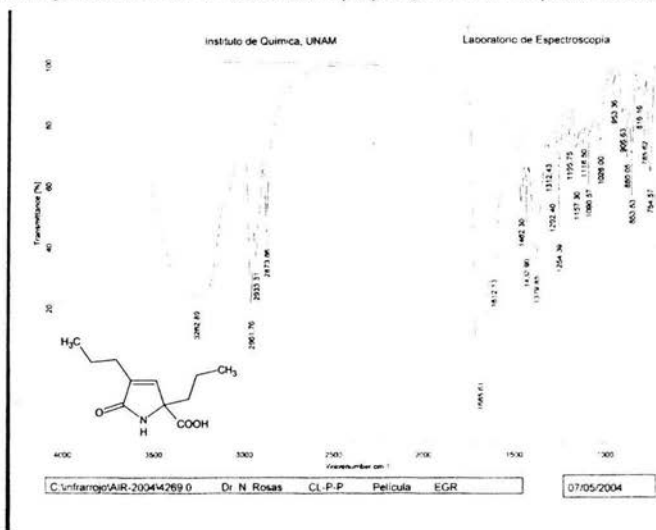


Figura A20. Espectro de IR de 5-Oxo-2,4-dipropil-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-ácido carboxílico

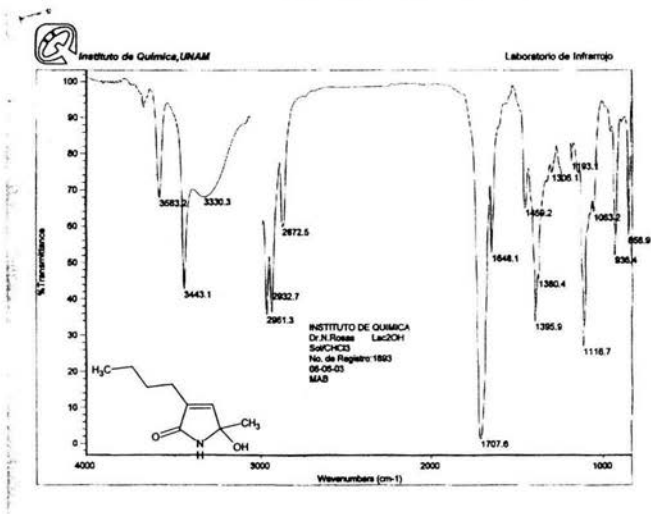


Figura A21. Espectro de IR de 3-Butil-5-hidroxi-5-metil-1,5-dihidro-pirrol-2-ona

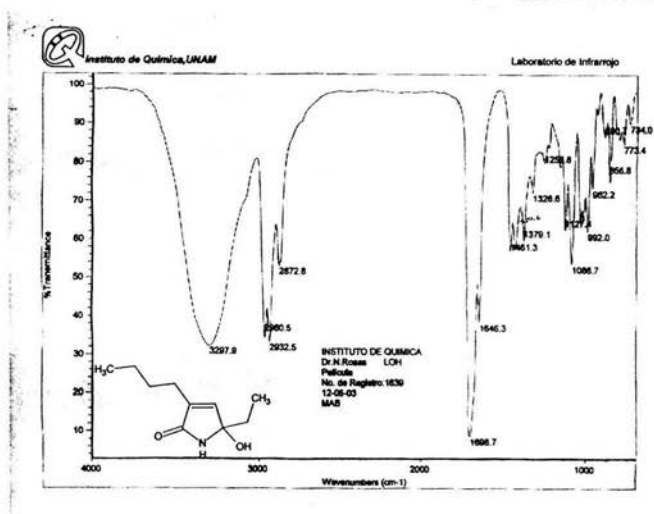


Figura A22. Espectro de IR de 3-Butil-5-etil-5-hidroxi-1,5-dihidro-pirrol-2-ona

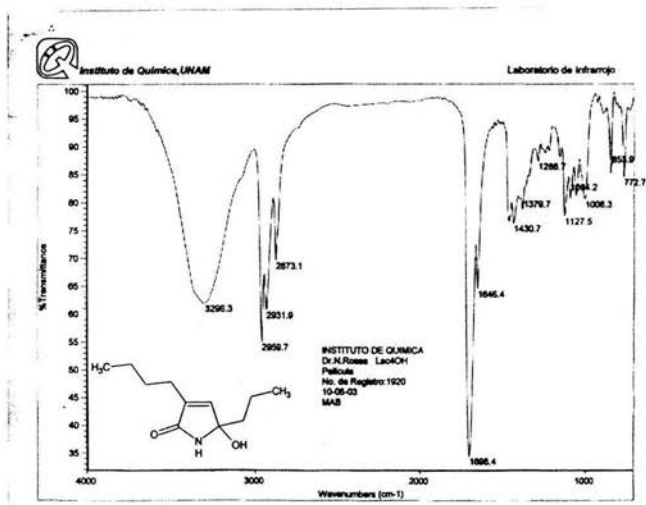


Figura A23. Espectro de IR de 3-Butil-5-hidroxi-5-propil-1,5-dihidro-pirrol2-ona

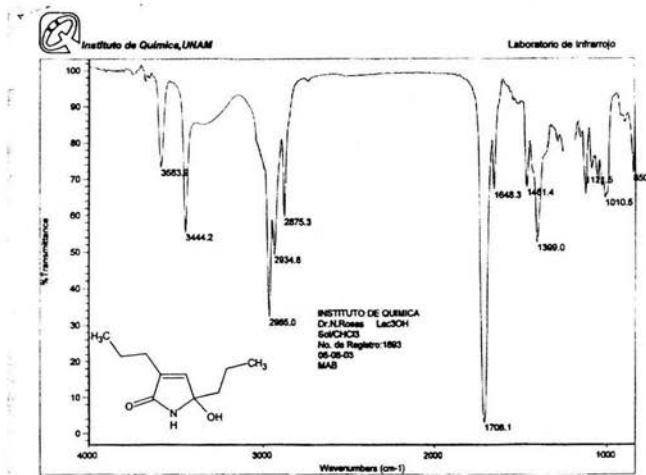


Figura A24. Espectro de IR de 5-Hidroxi-3,5-dipropil-1,5-dihidro-pirrol-2-ona

Espectrometría de Masas

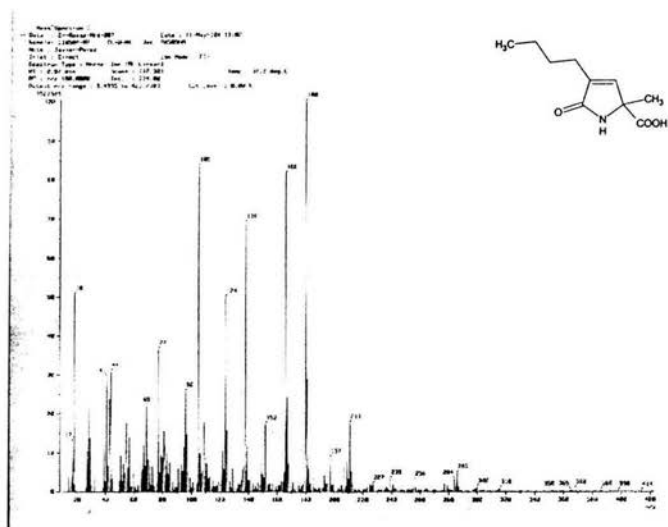


Figura A25. Espectro de Masas de 4-Butil-2-metil-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-ácido carboxílico

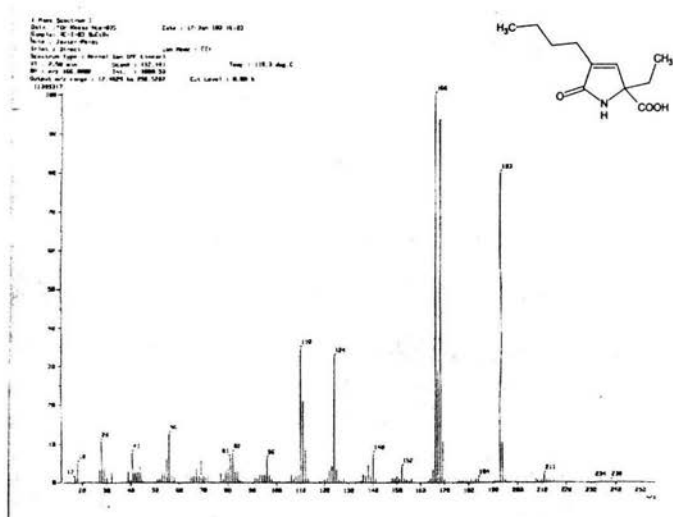


Figura A26. Espectro de Masas de 4-Butil-2-etil-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-ácido carboxílico

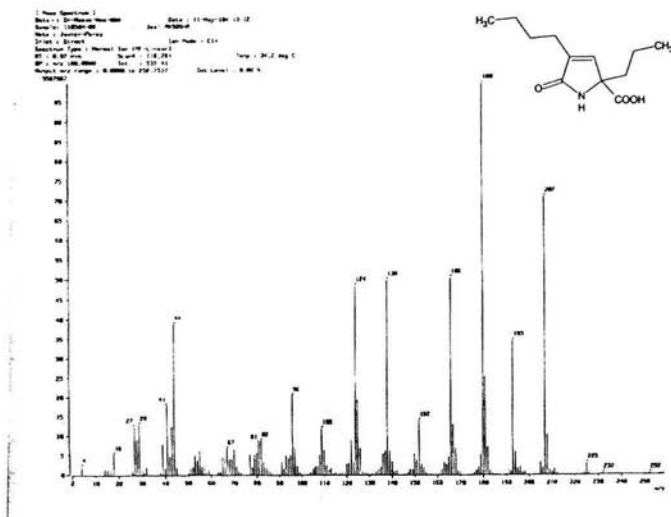


Figura A27. Espectro de Masas de 4-Butil-5-oxo-2-propil-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-ácido carboxílico

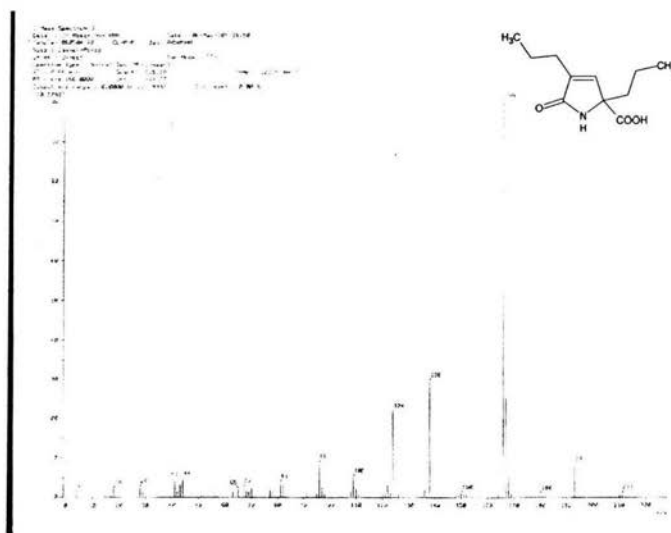


Figura A28. Espectro de Masas de 5-Oxo-2,4-dipropil-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-ácido carboxílico

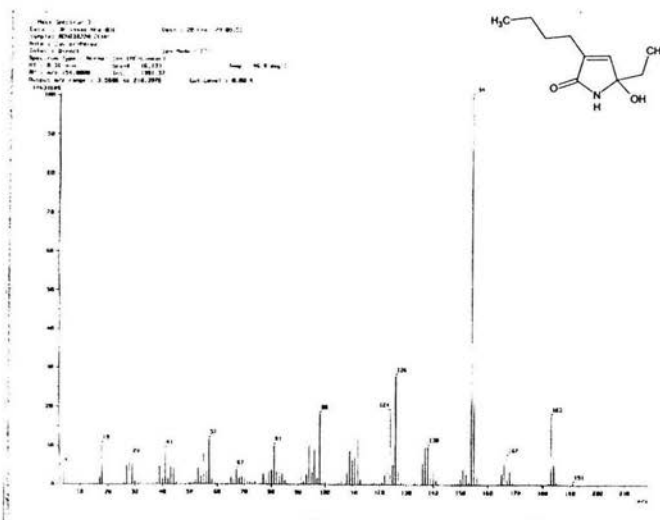
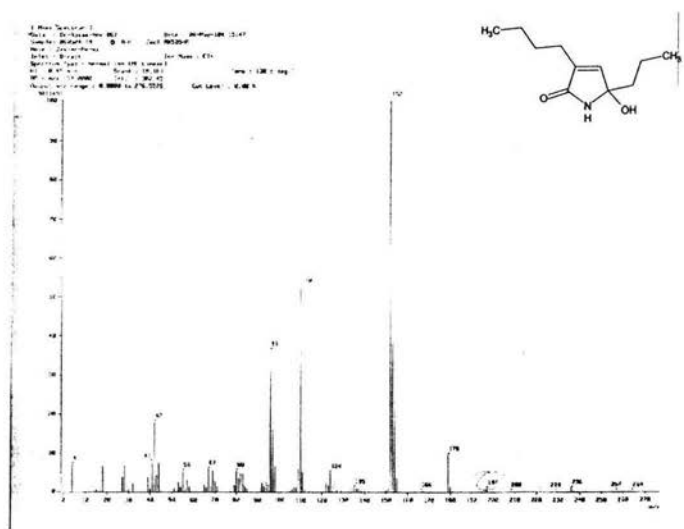


Figura A29. Espectro de Masas de 3-Butil-5-etil-5-hidroxi-1,5-dihidro-pirrol-2-ona



Espectro A30. Espectro de Masas de 5-Hidroxi-3,5-dipropil-1,5-dihidro-pirrol-2-ona

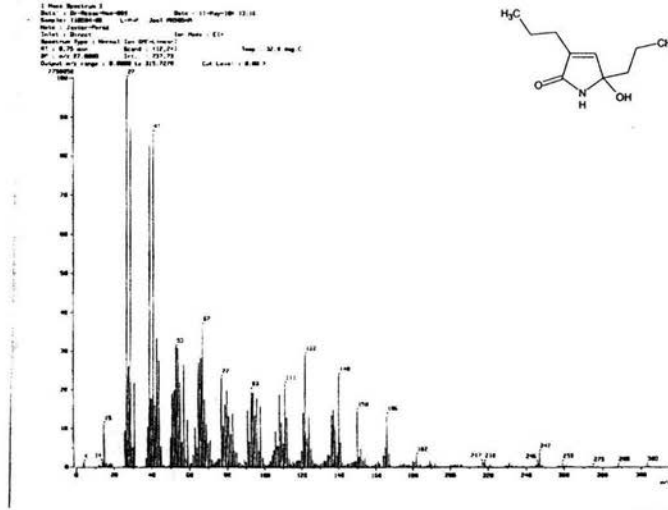


Figura A31. Espectro de Masas de 5-Hidroxi-3,5-dipropil-1,5-dihidro-pirrol-2-ona

ESPECTROSCOPÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR, H¹ Y C¹³

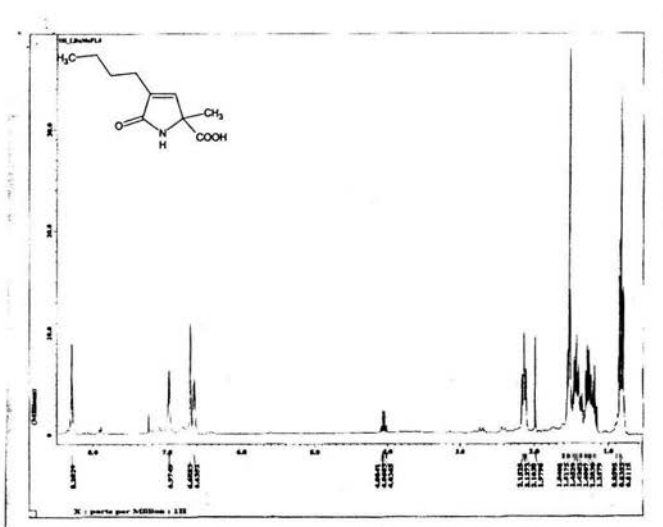


Figura A32. Espectro de RMN ¹H de 4-Butil-2-metil-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-ácido carboxílico

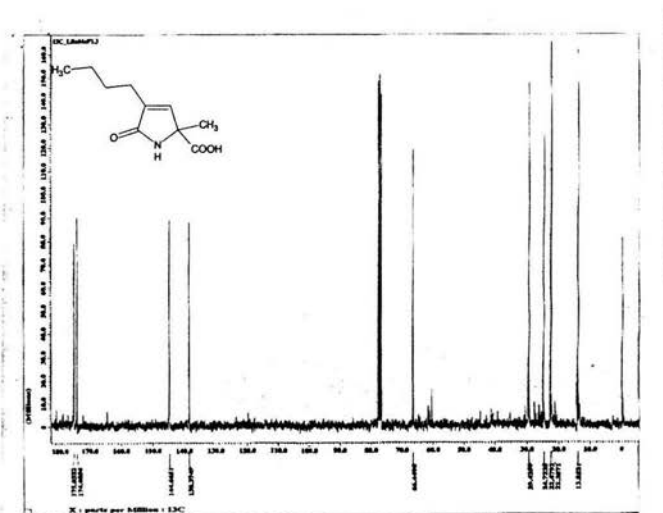


Figura A33. Espectro de RMN ¹³C de 4-Butil-2-metil-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-ácido carboxílico

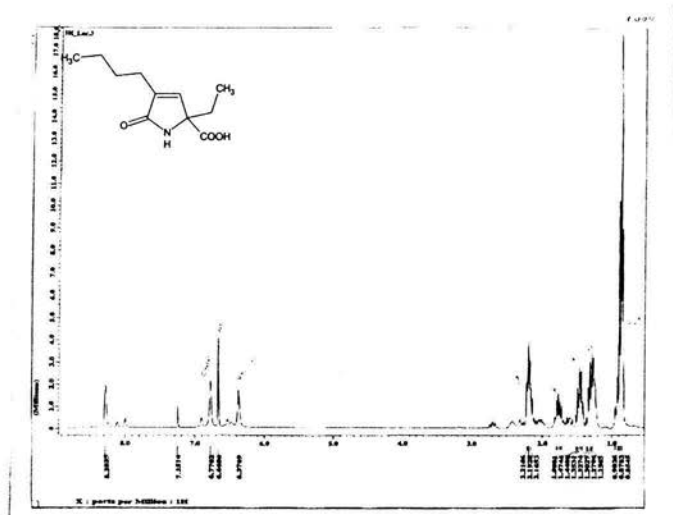


Figura A34. Espectro de RMN ^1H de 4-Butil-2-etil-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-ácido carboxílico

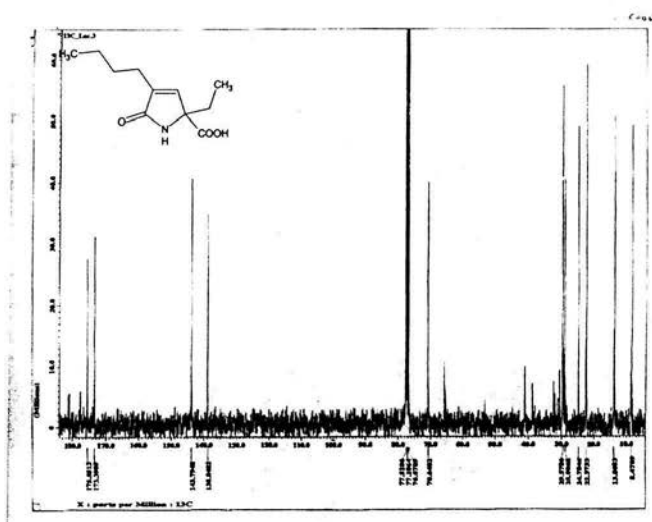


Figura A35. Espectro de RMN ^{13}C de 4-Butil-2-etil-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-ácido carboxílico

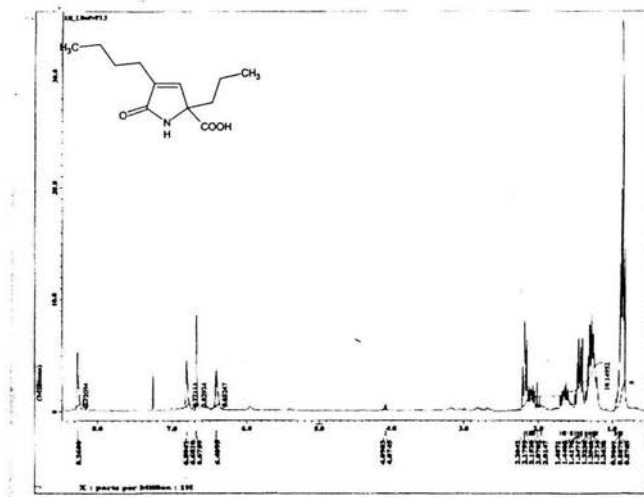


Figura A36. Espectro de RMN ^1H de 4-Butil-5-oxo-2-propil-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-ácido carboxílico

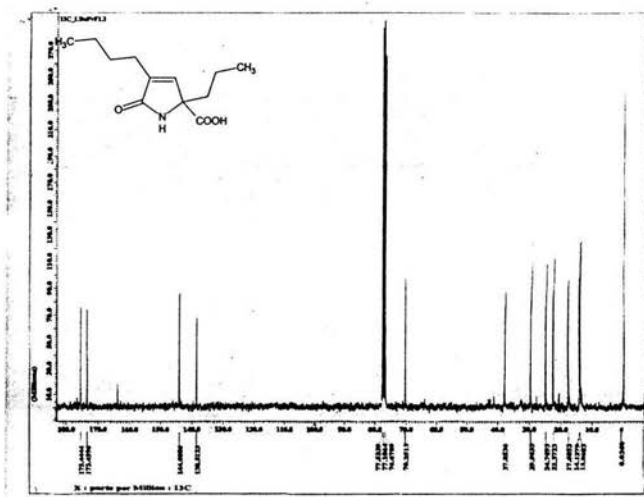


Figura A37. Espectro de RMN ^{13}C de 4-Butil-5-oxo-2-propil-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-ácido carboxílico

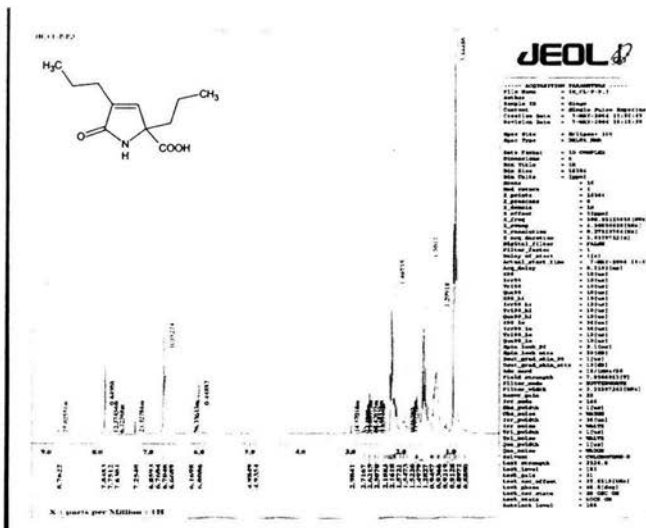


Figura A38. Espectro de RMN ¹H de 5-Oxo-2,4-dipropil-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-ácido carboxílico

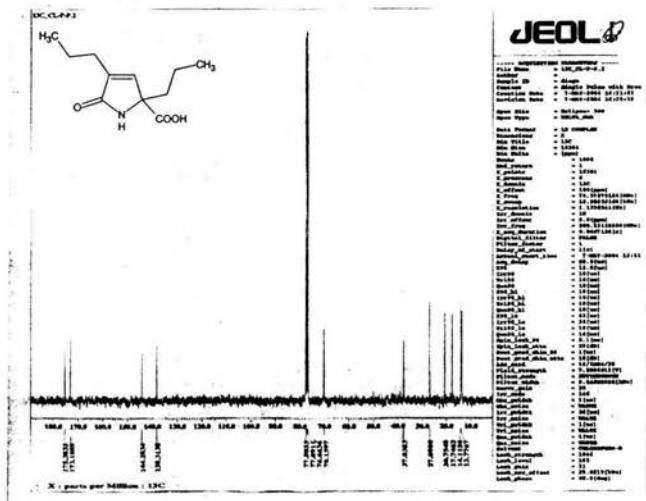


Figura A39. Espectro de RMN ¹³C de 5-Oxo-2,4-dipropil-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-ácido carboxílico

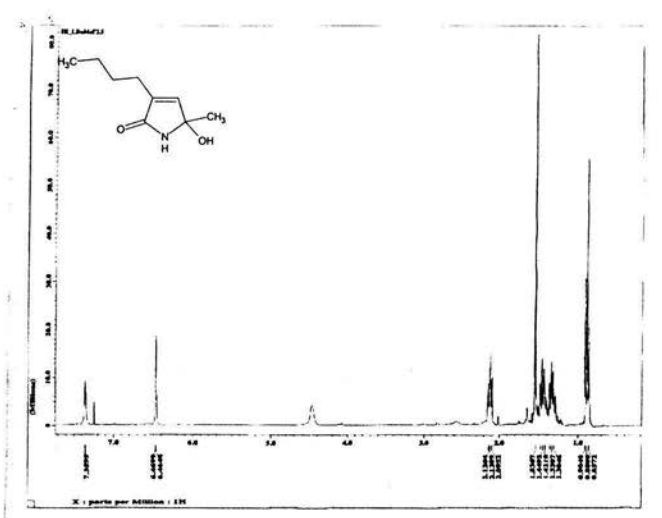


Figura A40. Espectro de RMN ¹H de 3-Butil-5-hidroxi-5-metil-1,5-dihidro-pirrol-2-ona

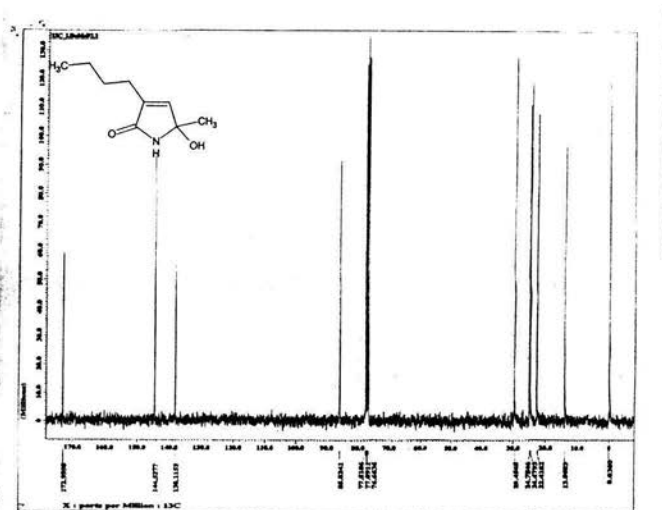


Figura A41. Espectro de RMN ¹³C de 3-Butil-5-hidroxi-5-metil-1,5-dihidro-pirrol-2-ona

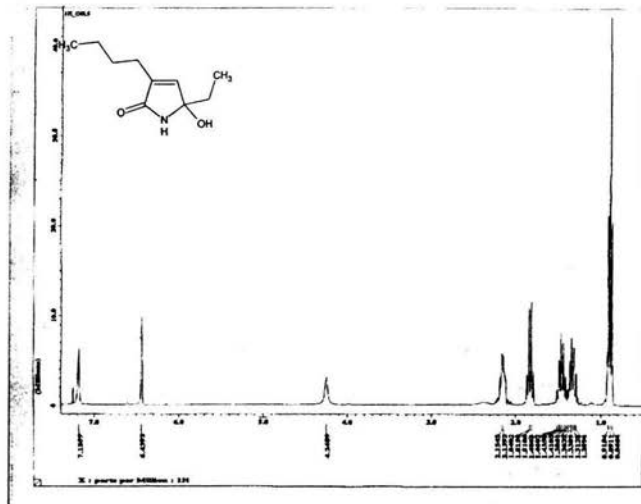


Figura A42. Espectro de RMN ^1H de 3-Butil-5-etil-5-hidroxi-1,5-dihidro-pirrol-2-ona

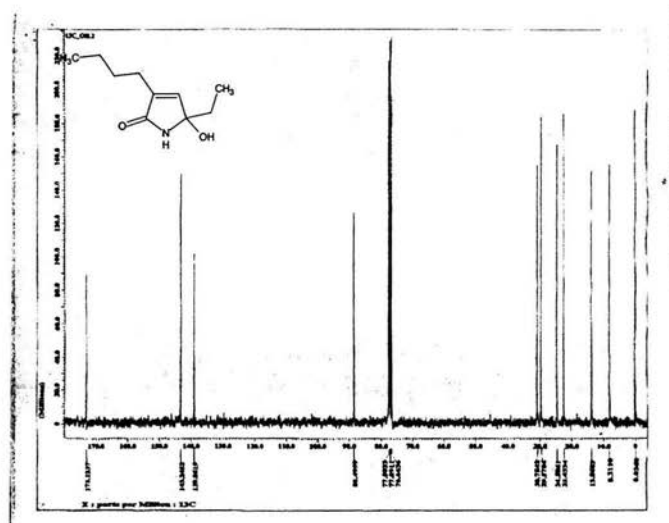


Figura A43. Espectro de RMN ^{13}C de 3-Butil-5-etil-5-hidroxi-1,5-dihidro-pirrol-2-ona

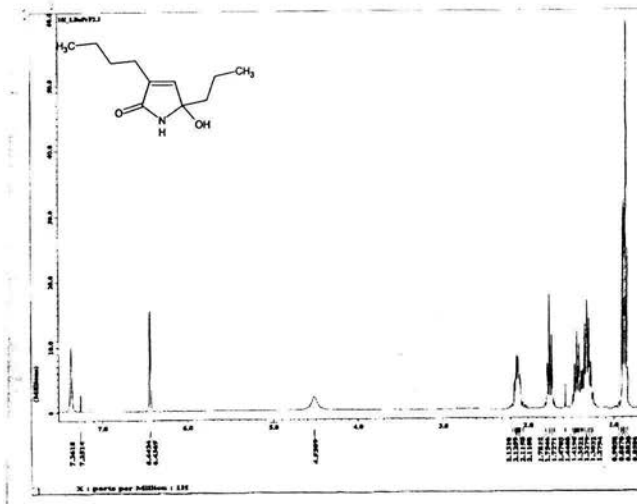


Figura A44. Espectro de RMN ¹H de 3-Butil-5-hidroxi-5-propil-1,5-dihidro-pirrol-2-ona

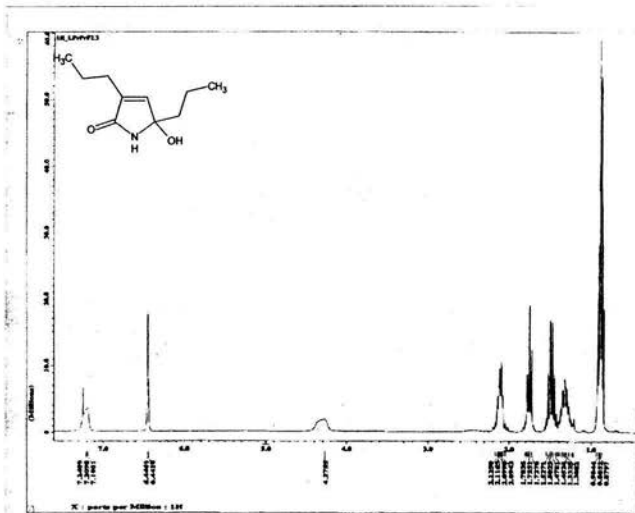


Figura A45. Espectro de RMN ¹H de 5-Hidroxi-3,5-dipropil-1,5-dihidro-pirrol-2-ona

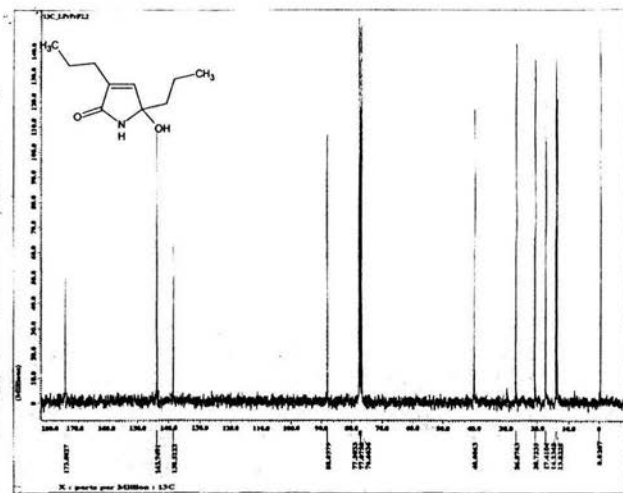


Figura A46. Espectro de RMN ^{13}C 5-Hidroxi-3,5-dipropil-1,5-dihidro-pirrol-2-ona

DIFRACCIÓN DE RAYOS X

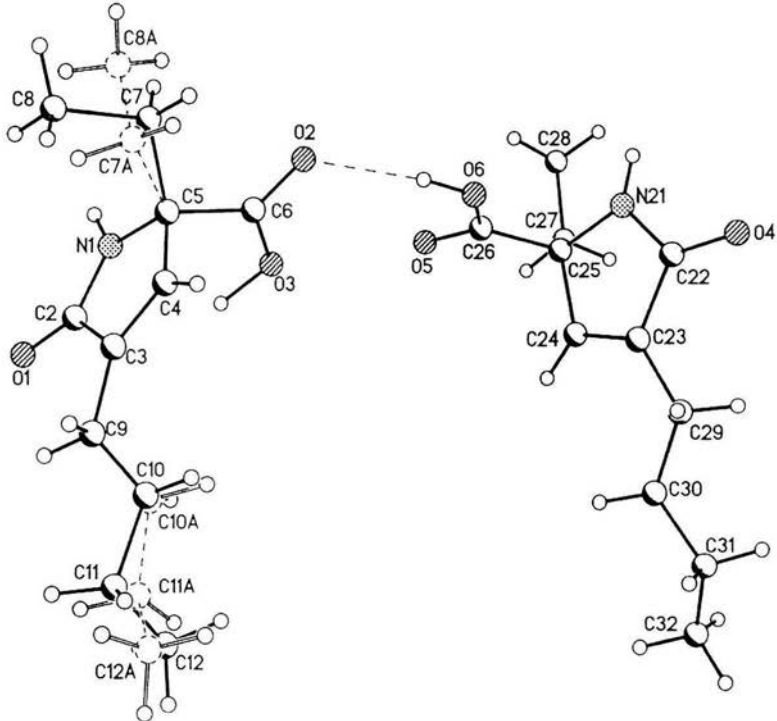


Figura A47. 4-Butil-2-etil-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-ácido carboxílico

“Cuando emprendas tu viaje a Itaca, ruega que el viaje sea largo, lleno de aventuras, lleno de conocimientos...Mantén a Itaca en tu mente. Llegar allá es tu destino final, más no apresures tu viaje. Es mejor dejar que dure muchos años y anclar en la isla cuando seas viejo, rico con lo que habrás ganado en el camino, sin esperar que Itaca te ofrezca riquezas. Itaca te ha regalado la hermosa travesía. Sin ella nunca habrías emprendido el viaje”.

Homero La Odisea.