



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Terpenos

Obtención de Algunos Derivados de las Budleinas A y B y Actividad Citotóxica de la Budleina A en Dos Líneas Celulares

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO
PRESENTA
Pablo Roche Vidal
MEXICO, D. F. 1978



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.

TESIS 1970

N.º M. C. ~~324~~ 368

FECHA _____

PROF. _____



JURADO ASIGNADO :

PRESIDENTE : Prof. ALFONSO ROMO DE VIVAR

VOCAL : Profa. YOLANDA CABALLERO ARROYO

SECRETARIO : Prof. CARLOS GUERRERO RUIZ

1º SUPLENTE: Prof. CECILIO ALVAREZ TOLEDANO

2º SUPLENTE: Prof. JOSE CALDERON PARDO

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :

INSTITUTO DE QUIMICA U.N.A.M.

SUSTENTANTE :

PAOLO ROCHE VIDAL

ASESOR DEL TEMA :

Dr. CARLOS GUERRERO RUIZ

A mis padres:

Rómulo Roche Guillén

María de la Luz Vidal De Roche

que me enseñaron un horizonte

nuevo a través del estudio.

A mis hermanos:

Nieves

Romana

Rómulo

Luz María

Francisco

Antonio

A mis cuñados:

Gustavo Priego Pérez

Jesús Escutia Flores

José Luis Uribe Camacho

A mis maestros

A mis amigos

Con agradecimiento ::

Al Dr. Carlos Guerrero Ruiz por su valiosa
dirección y ayuda para la realización del
presente trabajo.

El bien a la humanidad
está en la ciencia ,
compartámoslo dando
algo de nosotros mismo.

C O N T E N I D O

1.-INTRODUCCION

2.-PARTE TEORICA

3.-PARTE EXPERIMENTAL

4.-CONCLUSION

5.-BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

Los vegetales han desempeñado un papel muy importante en la evolución ecológica de nuestro planeta.

Suelen adaptarse a lugares completamente inhóspitos para otras especies, han modificado su morfología para elaborar las sustancias nutritivas para su crecimiento, adoptando a la vez una infinidad de formas en su lucha por la supervivencia.

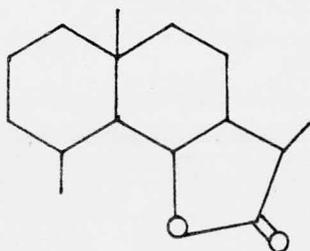
El hombre en su afán de descubrir nuevos horizontes en el campo de la investigación, encontró en los productos naturales un filón de recursos renovables de múltiples usos para la elaboración de sustancias útiles en la agricultura, en medicamentos, etc.

En los últimos años el estudio de los productos naturales ha — apertado un sin número de compuestos con diferentes tipos de esqueleto como los monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos triterpenos, canotencoides, etc.

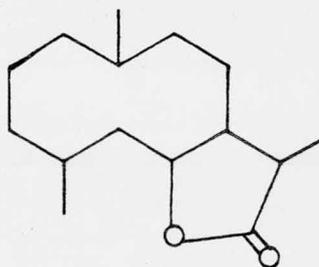
En la familia de las compuestas principalmente, se ha encontrado una variedad de sustancias que poseen ciertas características químicas como en el caso de los germacranos, eudesmanos, lactonas — sesquiterpénicas como las drimanólidas, guayanólidas, etc.

Debido a su comportamiento químico las lactonas sesquiterpénicas han sido objeto de minuciosos estudios. Poseen un esqueleto fundamental con 15 átomos de carbono, que teóricamente deriva de la — unión de tres fragmentos de isopreno.

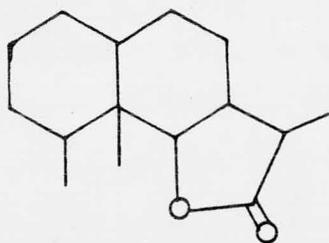
Por deshidrogenación pueden formar derivados del naftaleno como ocurre con las del tipo eudesmanólida (a), germacranólida (b), eremo_{filanólida} (c) y drimanólida (d).



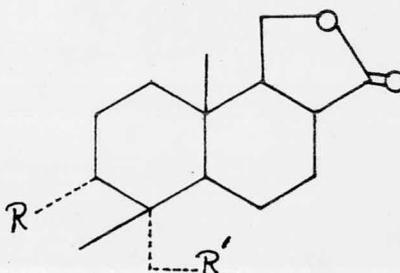
(a) eudesmanólida



(b) germacranólida

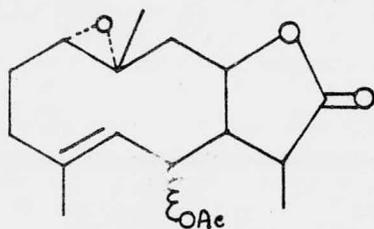


(c) eremofilanólida

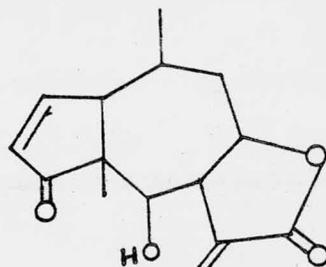


(d) drimanólida

Las lactonas sesquiterpénicas se han encontrado principalmente en extractos de flores o partes aéreas de las compuestas, siendo lo suficientemente típicas para tener valor quimiotaxonómico. En algunas lactonas sesquiterpénicas el oxígeno de la lactona se halla en el carbono 8 como la piretosina (g) y mexicanina I (h), con grupos epóxido, acetoxi ó carbonilo como partes de la molécula, contribuyendo a incrementar los miembros de este grupo.

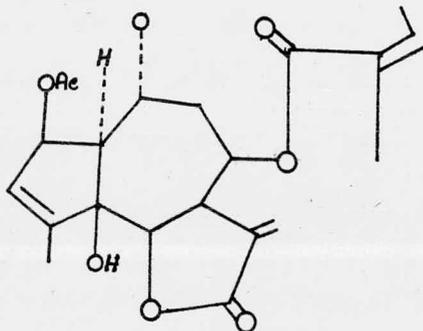


(g) piretrosina

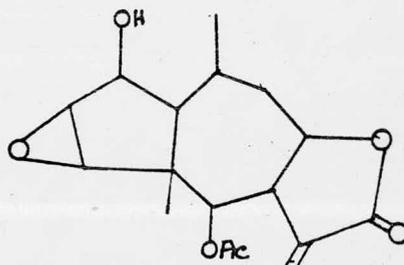


(h) mexicanina I

Algunas lactonas sesquiterpénicas poseen acción citotóxica, v. gr., el acetato de euparotina (i), las psilostachina como la galliardina (j).

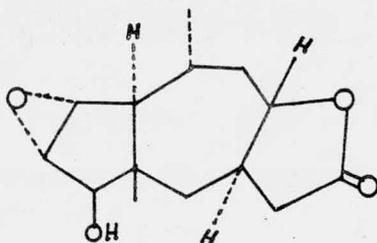


(i) acetato de euparotina

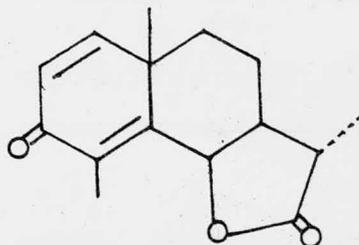


(j) galliardina

Otras son analgésicos como la amatalina (k) ó amibicidas como la santonina (m).



(k) amatalina

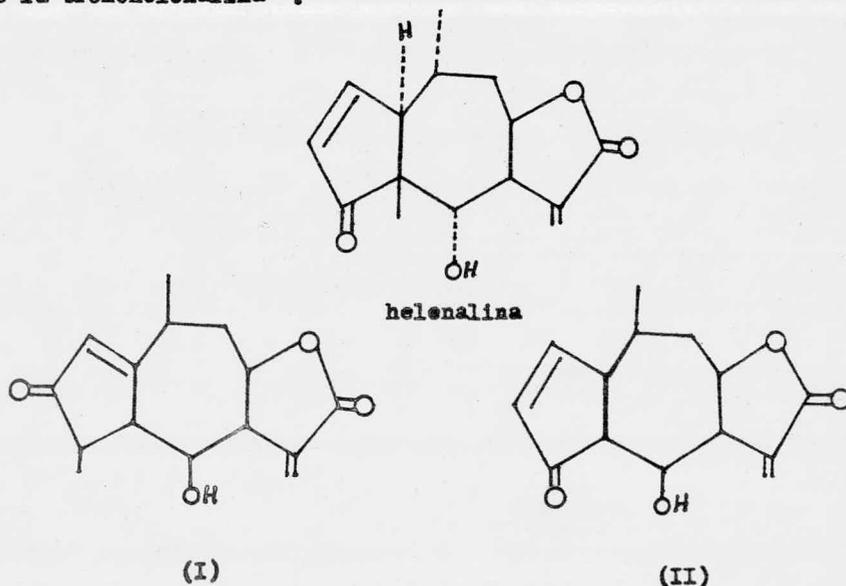


(m) santonina

Señ sustancias amargas, de farmacología estudiada, provenientes de plantas usualmente reportadas como medicinales, por lo que es probable que sean los agentes activos. Se ha sugerido que la actividad citotóxica encontrada en algunas lactonas sesquiterpénicas está relacionada con el grupo exometilenbutenólido y también que este grupo contribuye en la modificación del crecimiento de los vegetales ¹.

Desde 1910 en que se aisló por primera vez la helenalina aparecieron en la literatura química varios trabajos en los que se asignó la estructura (I) a esta sustancia, basándose en evidencias químicas como la obtención de azulenos en reacciones de deshidrogenación, en espectroscopia del IR y UV.

no fue sino hasta 1963, en que basándose en el estudio de los espectros de RMN de la helenalina y de varios de sus derivados, se pudo corregir la fórmula (I) y establecer como estructura correcta la fórmula (II) ², la cual fue confirmada por difracción de rayos X de la bromohelenalina ³.



Actividad Farmacológica:

Desde el punto de vista biológico el estudio de estos "principios amargos" de origen vegetal ha adquirido gran interés debido a las múltiples acciones farmacológicas de las lactonas sesquiterpénicas.

En la literatura se describen informes de efectos de lactonas insaturadas como ⁴ :

- 1.-Inhibidores selectivos de crecimiento de tejidos animales.
- 2.-Antibióticos.
- 3.-Inhibidores en la germinación de semillas y el crecimiento de plantas.
- 4.-Venenos de peces y actividad insecticida.
- 5.-Actividad cardíaca.
- 6.-Antihelmínticos, hemorrágicos, etc.

En los estudios de relación estructura-actividad se han postulado las siguientes premisas para un máximo de actividad citotóxica.⁵

- a).-La presencia de una α -metileno- γ -lactona.
- b).-La α -metileno- γ -lactona exocíclica presenta más actividad que la $\alpha\beta$ insaturada- γ -lactona endocíclica.
- c).-La actividad biológica es aumentada por la presencia de otros grupos C=O, α - β -no-saturados (tipo éster, enona, etc.)
- d).-La sustancia debe dar una reacción positiva tipo Michael con compuestos que contienen grupo SH (principalmente cisteína).
- e).-La actividad citotóxica aumenta proporcionalmente a la lipofili-
cidad.

Estos estudios se han llevado a cabo utilizando técnicas "in vitro", con líneas celulares de carcinoma humano de nasofaringe (KB) además de inhibición del crecimiento.

En la presente tesis se describe la obtención de algunos derivados de las budleínas A y B, y la actividad citotóxica de la budleína A que fue la que se obtuvo en mayor cantidad.

PARTE TEORICA

Las lactonas sesquiterpénicas se han encontrado principalmente en extractos de flores o paredes aéreas en la familia de las compuestas siendo útiles en la quimiotaxonomía.

Ultimamente se ha venido estudiando sistemáticamente la composición química de las especies del género "Viguiera (fam. compositae). En publicaciones anteriores se describió el aislamiento y de terminación de las estructuras de las budleínas A (1) y B (8), encontradas respectivamente en Viguiera angustifolia ⁶ y Viguiera budlei aefornis ⁷ esta última especie se recolectó en el Km. 40 de la carretera México-Toluca, obteniéndose 0.0365% de la budleína A y de la budleína B 0.004%.

El elevado contenido de las germacranólidas resultó ser de interés, ya que se había encontrado actividad citotóxica en la budleína A (1).

Nos pareció de interés estudiar la misma especie que crece en el Km. 30 de la carretera México-Puebla, con el propósito de ver si existía algún cambio en la composición química. De este lote se aislaron las mismas lactonas solo que en un rendimiento muy superior. La budleína A se obtuvo en un 0.3% y la budleína B en un 0.0468% , también se aisló la 5-Hidroxi-4,6,7-trimetoxi flavona ó Salvigenina.

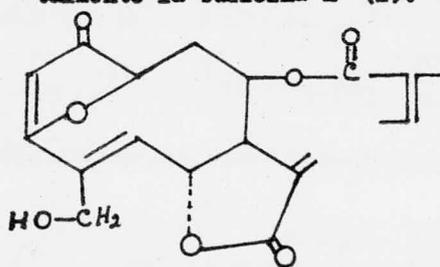
La budleína A $C_{20}H_{22}O_7$ fue identificada por medio de RMN ----- (espec. 1), en el cual se observan las siguientes señales: en 1.5 ppm la señal de un metilo terciario angular; en 4.4 ppm señal para los protones base del alcohol; en 5.7 ppm (1H, J=2Hz) y 6.4 ppm ---- (1H, J=2Hz) las señales de dobletes de metileno exocíclico; en IR (espec. 2), se observan las siguientes bandas: en 1760, 1650 cm^{-1}

bandas de carbonilo de una γ -lactona conjugada con un metileno exocíclico, en 3400 cm^{-1} banda de OH.

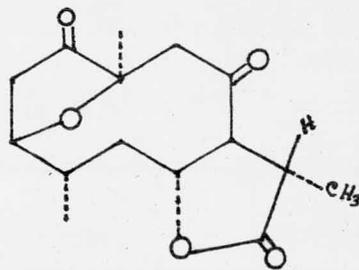
La budleina B $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$ fue identificada por medio de RMN ----- (espec. 3), en el cual se observan las siguientes señales: en 1.6 ppm la señal de un metilo vinflico; en 3.9 ppm aparece un doblete -- (J=11Hz) para protones base de alcohol; en 5.6 ppm (J=4Hz) y 6.3 ppm (J=5Hz) las señales de dobletes característicos para metileno exocíclico; en IR (espec. 4), muestra las siguientes bandas: en 1725, 1650 cm^{-1} bandas de carbonilo de una γ -lactona con un metileno exocíclico.

A continuación se describen la obtención de algunos derivados de las budleinas A y B, y los ensayos preliminares de la actividad citotóxica de la budleina A en dos líneas celulares.

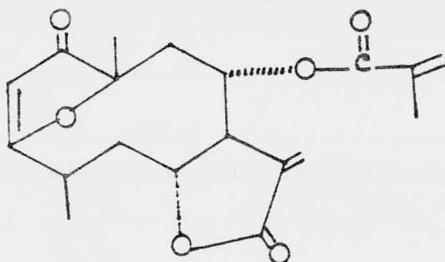
En ocasiones anteriores se ha intentado modificar la estructura de la budleina A (1), con el objeto de correlacionarla químicamente con la deshidro desmetacril hexahidro zexbrevina (2) ⁸. La diferencia con la zexbrevina (3), la constituye el oxidrilo primario alílico, la doble ligadura cis 4-5 y el éster en C-8. Para llegar al compuesto (2), se intentó saturar las dobles ligaduras por hidrogenación obteniéndose siempre resultados negativos con los catalizadores heterogéneos conocidos. La hidrogenación también se intentó usando como catalizador homogéneo al complejo de Ru (6) ⁹, recuperándose totalmente la budleina A (1).



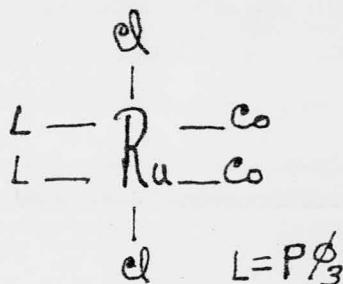
(1)



(2)



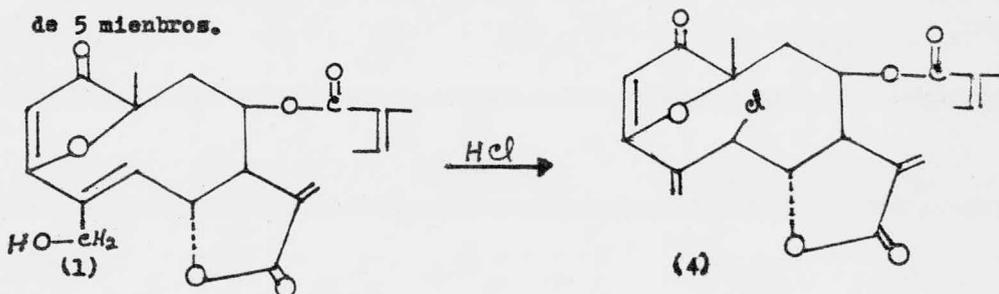
(3)

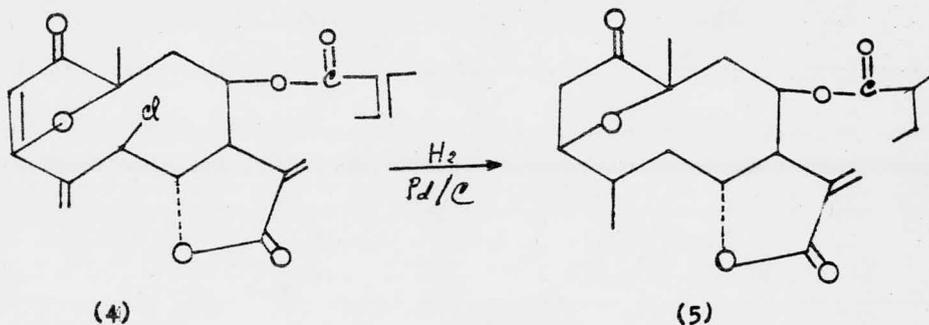


(6)

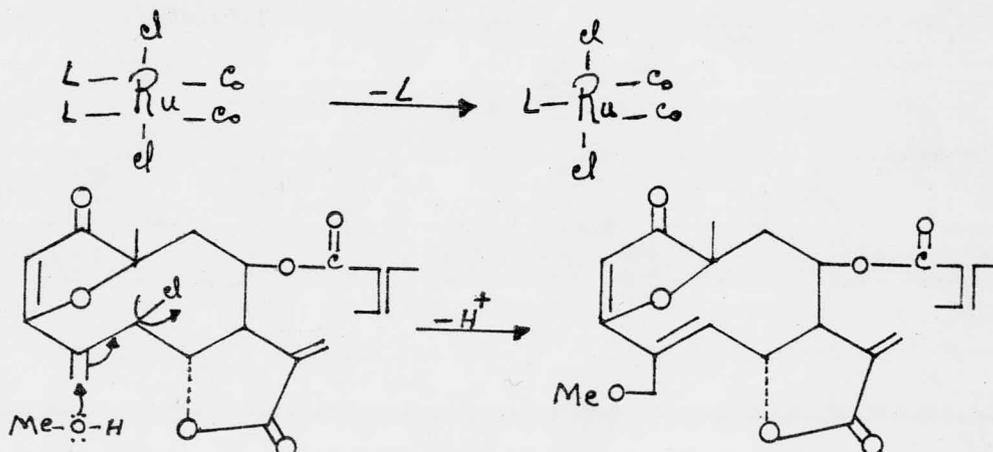
Se ha visto que el oxidrilo primario alílico a la doble ligadura cis de (1) sufre transposiciones alílicas en condiciones de acetilación ^{6,10} el tratamiento de (1) con HCl produce el derivado halogenado (4), también por transposición.

Se ha observado que el nucleófilo entra por el lado menos impedido obteniéndose el sustituyente en C-5, con orientación β , ya que mostró las siguientes señales en RMN (espec. 5), quedando H-5 en 5.05 ppm α formando χ de 90° con H-6, ya que la constante de acoplamiento es (J=0). Los protones del metileno de C-14 aparecieron como singletes en 5.85 y 5.9 ppm, H-6 en 4.7 ppm (d, J=9Hz). La hidrogenación de (4) con Pd/C da el producto (5) en rendimiento muy bajo, en RMN (espec. 6), mostró las siguientes señales: H-8 5.2 (m), H-6 ---- 4.5 (m), H-3 4.5 (m), y las señales de los metilos en 0.8 y 1.5 ppm. En IR (espec. 7), las siguientes bandas: 1732 cm^{-1} carbonilo del éster, 1770 cm^{-1} carbonilo de lactona- γ^{δ} -saturada y cetona en anillo de 5 miembros.

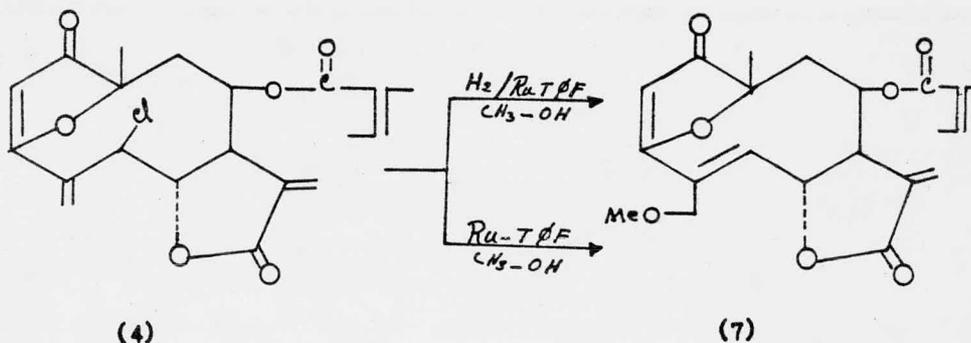




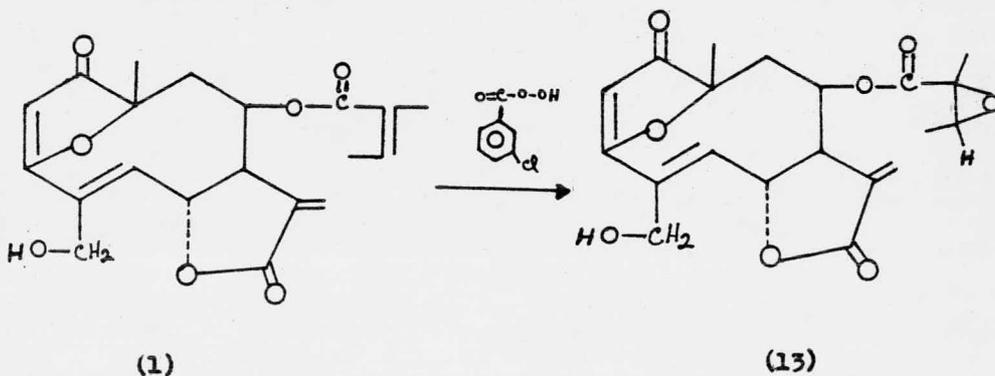
Se intentó hidrogenolizar el cloro alílico del compuesto (4) utilizando como catalizador $\text{NaCS}_2\text{Co}(\text{CN})_5$ con resultados negativos, probablemente debido a impedimentos estéricos. También se utilizó el complejo de Ru (6) en metanol obteniéndose el compuesto (7) que es un producto de adición-eliminación catalizado por el complejo en la que nada tuvo que ver el hidrógeno, ya que cuando la reacción se repitó sin hidrógeno se obtuvo el mismo producto, que se puede explicar por medio del siguiente mecanismo:



El producto (7), no muestra bandas de OH en IR (espec. 8), y en RMN (espec. 9), muestra las mismas señales que la budleina A (1), -- más el metoxilo que aparece en 3.4 ppm (s).



Cuando a la budleina A (1), se trató con ácido *m*-cloroperbenzoico nos dió el producto (13), el cual muestra las siguientes señales en RMN (espec. 10) : en 1.5 ppm la señal de dos metilos terciarios angulares, en 1.2 ppm aparece un doblete ($J=4\text{Hz}$) para metilo secundario también del éster.



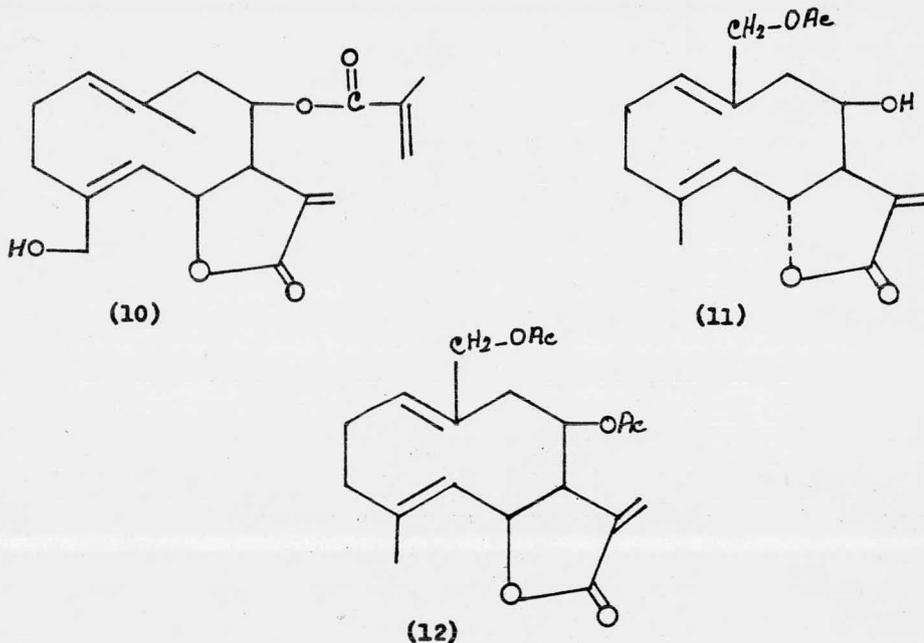
De la obtención de la transposición de Cope se puede deducir : que la estereoquímica de las dobles ligaduras en la budleina B es -- trans-trans como todos los ejemplos descritos en la literatura ¹³, -- cuando se intentó en varias ocasiones la transposición de Cope con la euparhombina (10) ¹⁴, una substancia con dobles ligaduras Δ ¹⁻¹⁰ trans ₄₋₅ Δ cis siempre falló. Se estableció definitivamente la presencia del alcohol primario en C-15 al observarse en RMN el sistema AB y un metilo vinílico. La constante de acoplamiento H-5, H-6 es de 12Hz, correspondiente a acoplamiento trans-diaxial ¹⁵, ésto solamente se logra si H-5 es α y H-6 es β .

Cuando se irradió la señal correspondiente al metileno de C-9 - en 2.05 ppm la señal base del oxidrilo se simplificó manteniendo el acoplamiento con H-7 (J=2Hz), si tomamos en cuenta que H-7 es α bigénicamente en el producto de Cope adquiere una orientación axial. La constante de acoplamiento pequeña (J=2Hz) corresponde a una interacción axial-ecuatorial, quedando el oxidrilo con orientación β -axial, H-8 α -ecuatorial como lo indica la fórmula (9), a partir de éste producto se deduce la estereoquímica de la budleina B (8).

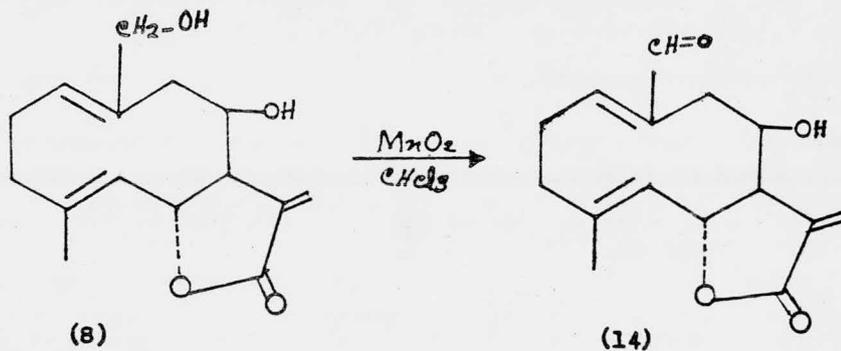
Las observaciones anteriores están de acuerdo con el estudio de rayos X efectuados con la ovatifolina (11) ¹⁶, que fue correlacionada por acetilación con la zexbrevina D (12) ^{17,18}, ésta a su vez se obtuvo por acetilación de la budleina B (8).

Como se ha observado en otras substancias del mismo tipo ¹⁹, la budleina B (8) y el producto de la transposición de Cope presentan la misma fragmentación en EM observándose solamente ligeras variantes en la intensidad de algunos picos, de ésto se puede concluir -- que un espectro de masas de un germacrano Δ ¹⁻¹⁰ trans, Δ ⁴⁻⁵ trans ---

6 de su elemeno no corresponde ni a una ni a otra substancia, más --
 bién debe atribuirse a la fragmentación de la mezcla del equilibrio
 signatrópico inducido por el impacto electrónico ²⁰

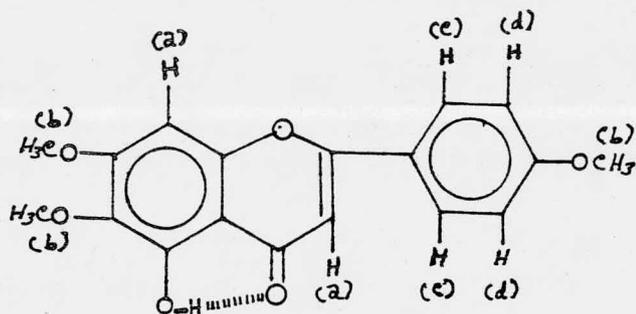


Cuando a la budleina B (8), se le hizo una reacción de oxida-
 ción con MnO_2 nos dió el producto (14), el cual muestra las siguien-
 tes señales en RMN (espec. 12) : en 1.5 ppm un singulete para metilo
 vínfilico, en 4.5 ppm la señal para el protón en C-8, centrada en
 5.00 ppm la señal de doblete de doblete ($J=6Hz$) para el protón en
 C-1, en IR (espec. 13), se observan las siguientes bandas : en 3500
 cm^{-1} banda de OH, en 1750,1650 cm^{-1} bandas para el carbonilo de una
 γ -lactona conjugada con un metileno exocíclico.



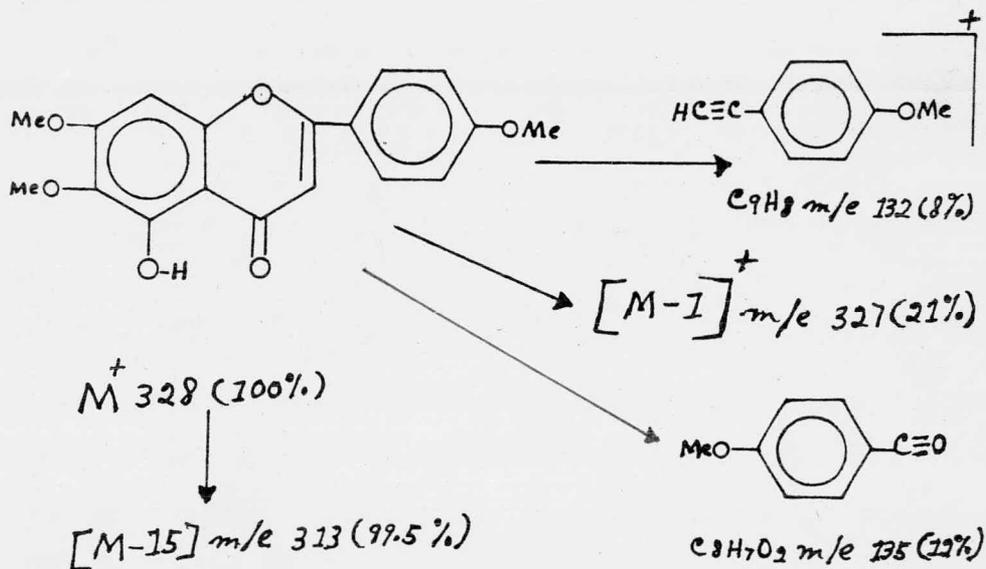
IDENTIFICACION DE LA FLAVONA:

La flavona se identificó como la 5-Hidroxi-4,6,7-trimetoxi flavona ó Salvigenina ²¹, ya que mostró las siguientes señales en RMN (espec. 14):



- a= 6.44
- b= 3.9
- c= 7.74 (J=9Hz)
- d= 6.92 (J=9Hz)

Y se observó la siguiente fragmentación en espectrometría de masas ²² :



La posición del oxidrilo queda bien definida en C-5, debido a que en IR (espec. 15), no aparece la banda de OH libre y el carbono quelatado ²³ aparece en 1650 cm^{-1} .

ACTIVIDAD CITOTOXICA DE LA BUDLEINA A EN DOS LINEAS CELULARES.

Para conocer la actividad biológica de la budleina A, se realizaron estudios en presencia de células en cultivo de tejidos, siguiendo la misma metodología empleada en un trabajo anterior ¹⁴. Estas -- pruebas biológicas nos dan un índice para interpretar el comportamiento de las líneas celulares la L-929 y la HEp-2 en presencia de diferentes dosis de la budleina A. Estudios similares a éste, han sido realizados por otros autores ²⁴ en los que se ha encontrado --- que sustancias del tipo de las lactonas sesquiterpénicas con uno o dos grupos alquilantes, poseen actividad citotóxica o anti-tumoral. El grupo funcional descrito por Kupchan et al ⁵, y Lee et al ²⁴, como el que confiere ésta actividad es el α -metileno de la γ -lactona. Este grupo se encuentra presente en la budleina A, razón por la ---- cual se pensó que ésta sustancia tuviera actividad citotóxica.*

*

Este trabajo fue llevado a cabo por J. Taboada, J. Tellez y M. González: en el laboratorio de Biología Celular, Subjefatura de Investigación Básica, Centro Médico Nacional, IMSS; como parte de las investigaciones que se están efectuando en colaboración con el Instituto de Química.

PARTE EXPERIMENTAL

EXTRACCION DE LA PLANTA:

La planta fue recolectada en el Km. 30 de la carretera México - Puebla en el mes de Septiembre de 1977. 4 Kg. de la planta seca se extrajeron con CHCl_3 , tres veces en frío., el extracto clorofórmico se concentró a seco en rotavapor obteniéndose (325 g) de extracto, éste se disolvió en 1 litro de agua y 1 litro de Et-OH, se extrajeron tres veces con hexano y tres veces con CHCl_3 , el extracto clorofórmico se secó y se concentró en rotavapor dejando (65 g) que se cromatografiaron en una columna con 1 Kg. de sílice, aislandose de las fracciones eluidas 1:1 CHCl_3 -acetona (14 g) de budleina A con P.F.=110-115°C, de las fracciones eluidas con 60% acetona-40% CHCl_3 se aisló budleina B (1875 g) con P.F.=168-170°C, y (130 mg) de Salvigénina con P.F.=190-193°C

OBTENCION DEL DERIVADO HALOGENADO (4):

A una solución de 200 mg de budleina A en 10 ml. de CHCl_3 se le agregaron 10 gotas de HCl conc. la mezcla se mantuvo con agitación, la reacción se controló por placas. Después de 2 Hrs el HCl se neutralizó con Na_2CO_3 , se separó la parte clorofórmica, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró. El producto cristalizó de éster isopropílico, obteniéndose 135 mg. con P.F.=127-130°C.

IR: 1700 cm^{-1} banda del carbonilo del éster, 1760 cm^{-1} banda de carbonilo de γ -lactona saturada y cetona de anillo de 5 miembros.

M_1^+ 392, M_2^+ 394 para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{Cl}$.

HIDROGENACION DEL DERIVADO HALOGENADO (4):

A una solución de 50 mg. de derivado halogenado en 15 ml. de Me-OH, se le agregaron 20 mg. de Pd/C, la mezcla se hidrogenó durante 8 Hrs. después de este tiempo se filtró el catalizador, se evaporó el disolvente, del aceite resultante se separa la mancha menos polar eluida en 90% CHCl₃-10% acetona en placas 20x20 de sílice. Obteniéndose 10 mg. del producto (5), que no cristalizó.

IR: 1732 cm⁻¹ banda de carbonilo del éster, 1770 cm⁻¹ banda de carbonilo de cetona y lactona γ -saturada. M^+ encontrada 366, calculada para C₂₀H₃₀O₆ 366.

OBTENCION DEL ETER (7)

A una solución de 100 mg. de derivado halogenado en 15 ml. de Me-OH, se le añadieron 15 mg. de catalizador homogéneo de Ru, después de 2 días de agitación a T.A. se concentró la solución, el producto se purificó en placas 20x20 de sílice, eluidas en 95% CHCl₃ - 5% acetona. Obteniéndose 50 mg. de producto (7), que no cristalizó.

IR: 1600 cm⁻¹ banda de doble ligadura enólica, 1650 cm⁻¹ banda de doble ligadura, 1715 cm⁻¹ banda de carbonilo del éster y cetona conjugada, 1760 cm⁻¹ banda de carbonilo de γ -lactona. M^+ encontrada 388, calculada para C₂₁H₂₄O₇ 388.

PRODUCTO DE LA TRANSPOSICION DE COPE (9):

200 mg. de budleina B se calentaron en un tubo de vidrio a 200°C durante 5 minutos, después de este tiempo la mezcla de reacción mostró dos manchas en cromatoplaça, se extrajo con acetona y se separó la mancha superior en placa de 20x20 de sílice, eluida en 80% CHCl₃-20% acetona, el compuesto aislado correspondió al producto (9), obteniéndose por cristalización con hexano (50 mg), con

P.F. = 158-160°C.

IR: 3350 cm^{-1} banda de OH, 1760 cm^{-1} banda de carbonilo de γ -lactona.
 \bar{M} encontrada 264, calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$ 264.

OBTENCION DEL EPOXIDO (13):

A una solución de 400 mg. de budleina A en 50 ml. de CHCl_3 , se le agregaron 500 mg. de ácido cloroperbenzoico, se puso a reaccionar a reflujo, después de 50 Hrs. se le añadió Na_2CO_3 para neutralizar - la mezcla que mostró dos manchas, se extrajo con 50% CHCl_3 -50% Me-OH, se separó la mancha inferior en placa 20x20 de sílice eluida en ---- 85% CHCl_3 -15% acetona, que correspondió al producto (13), obtenien dose por cristalización con hexano (50 mg), con P.F.=68-70°C.

IR: 1760 cm^{-1} banda de carbonilo de γ -lactona. \bar{M}^+ encontrada 390, cal culada para $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_8$ 390.

OBTENCION DEL ALDEHIDO (14):

A una solución de 300 mg. de budleina B en 50 ml. de CHCl_3 , se le agregaron 3 g. de MnO_2 . La mezcla se puso a reaccionar con agita ción a T.A. durante 45 minutos, se filtró sobre celita, se concen tró en rotavapor, cristalizando de éter isopropílico, obteniéndose 185 mg. de producto (14), el producto no funde.

IR: 3500 cm^{-1} banda de OH, 1750 cm^{-1} banda de carbonilo de γ -lactona.

Los puntos de fusión no estan corregidos. Los espectros de I.R. fueron obtenidos con un espectrómetro Perkin-Elmer 337 y estan dados en cm^{-1} . Los espectros de RMN fueron corridos en un espec trómetro Varian A-60-A y HA 100 en solución de deuterocloroformo, usando como referencia interna tetrametil silano, los desplaza mientos químicos estan dados en escala δ . Los espectros de Masas se determinaron en un aparato Hitachi-Perkin-Elmer RMUD.

MATERIAL Y METODOS:

Se utilizaron dos líneas celulares en la determinación de la actividad biológica de la budleina A, una derivada de tejido conectivo murino la L-929 y la otra derivada de carcinoma laríngeo humano llamada HEP-2, ambas cultivadas en tubos Leighton con un inoculo inicial de 60,000 células por ml. suspendidas en Medio Basal Eagle suplementado con 10% de suero de ternera y 100 U.I. de penicilina e incubadas a 37°C ¹, en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂.

Después de 24 Hrs. de crecimiento celular se agregó la budleina en dosis de 1, 5, 10 y 50 µg/ml, esta lactona se disolvió en propileno glicol y después medio de cultivo, quedando la concentración del propileno glicol a 0.001 ml/ml de medio.

Un medio similar sin substancia fue utilizado como control (dosis que no afecta el crecimiento celular). Después de 72 Hrs. de incubación en presencia de la budleina A, las células fueron cosechadas con tripsina al 0.25%, contadas en un contador electrónico de partículas modelo B (Hialeah, Florida), y simultáneamente se realizó prueba de viabilidad celular utilizando azul de tripan al 0.1% en solución buffer de fosfato a Ph=7.2²⁵. Además un cultivo de cada grupo fue fijado en May-Grunwald-Giemsa para estudios morfológicos.

RESULTADOS Y DISCUSION:

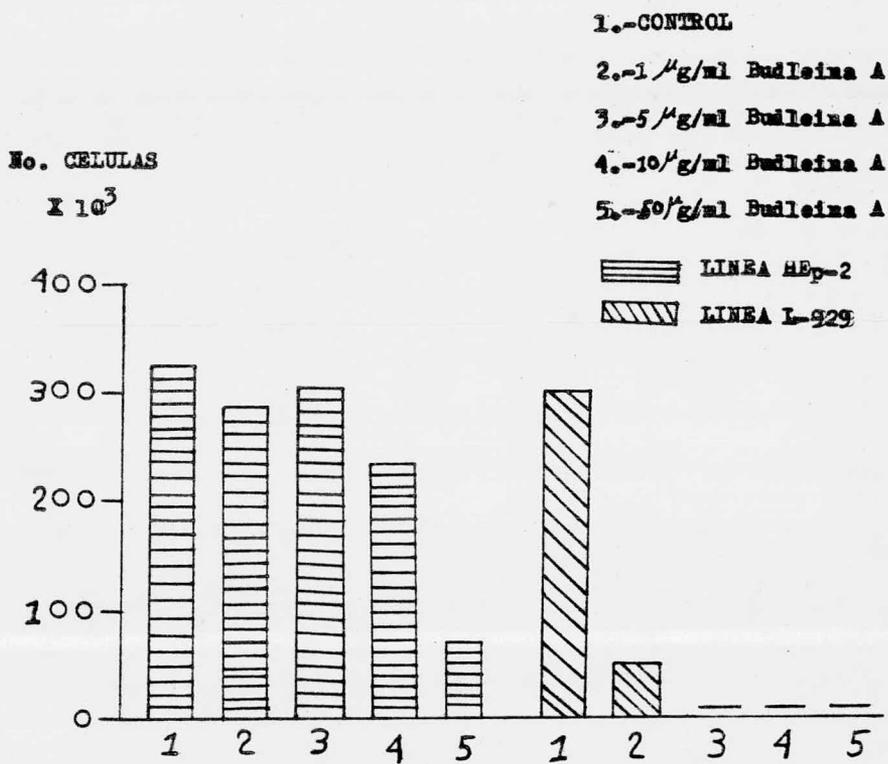
El efecto de la budleina A sobre las dos líneas celulares se puede apreciar en el histograma (I), en la línea HEP-2 encontramos que el crecimiento celular en presencia de budleina en dosis de 1, 5, 10 µg/ml no difiere significativamente del control, observándose solo que disminuye el porcentaje de mitosis, en cambio en dosis de 50 µg/ml el crecimiento celular muestra una inhibición del 79%

comparado con el control. Con esta dosis el porcentaje de células muertas contadas en el test de exclusión fue de 38% y en el análisis morfológico no se encontraron mitosis como se puede ver en el cuadro (II). La ED_{50} encontrada en esta línea celular es igual a 31 $\mu\text{g/ml}$ de budleina.

En la línea L-929 la budleina tiene actividad citotóxica a dosis de 1 $\mu\text{g/ml}$ en donde encontramos una inhibición en el crecimiento del 83% comparado con el control, por lo que la ED_{50} es menor --- 1 $\mu\text{g/ml}$. En el test de exclusión se detectó un 13% de células muertas. Esta lactona en presencia de la línea L-929 demostró ser altamente citotóxica, pero el comportamiento tan disímil en las dos líneas celulares estudiadas se debe probablemente a las diferencias de origen embriológico, morfológico y de especie de estas células, mientras que la línea L-929 crece en forma de fibroblastos aislados sin tener contacto unas células con otras, las células de la línea HEp-2 que son de origen epitelial crecen en forma laminar con sus bordes unidos uno al otro presentando por lo tanto menos superficie para la acción de la budleina, posiblemente todos éstos hechos sean los que protejan a la línea HEp-2 que es la que presenta mayor resistencia a la acción citotóxica de esta lactona. Sin embargo de acuerdo a los protocolos del Cancer Chemotherapy Reports ²⁶, en los que se pide como requisito que para aceptar extractos de plantas como posibles sustancias anti-tumorales, éstas tengan una $ED_{50} = 30 \mu\text{g}$ en el estadio I, nos encontramos que la budleina en el caso de la HEp-2 se encuentra justo en el límite requerido. Aquí puede verse también en el cuadro (II), que en presencia de budleina a la concen

tración de 1 μ g/ml hay aumento de células multinucleadas en la línea L-929, en el caso mencionado la proporción es mucho mayor.

No sabemos si el aumento en células multinucleadas se deba a la fusión de células o a que haya cariocinesis sin citocinesis.



(I)

PORCENTAJE DE MITOSIS EN LAS LINEAS L-929 Y HEP-2
CULTIVADAS EN PRESENCIA DE BUDLEINA DURANTE 72 HORAS

Dosis	L-929		HEP-2	
	Mitosis %	Multinucleadas %	Mitosis %	Multinucleadas %
Control				
P.G.	4.5	2.5	3.5	5.0
1 μ g	0	14	2.8	5.6
5 μ g	-	-	2.4	4.8
10 μ g	-	-	2.4	4.9
50 μ g	-	-	-	-
ED-50	1 μ g		31 μ g	

(II)

C O N C L U S I O N

El estudio llevado a cabo durante el desarrollo de este trabajo fue con el objeto de hacer una relación Quimiotaxonómica de las lactonas sesquiterpénicas budleínas A y B recolectadas en dos diferentes lugares, así como la obtención de algunos de sus derivados y comprobar la actividad citotóxica de la budleína A en dos líneas celulares.

Es necesario realizar estudios posteriores tanto "in vitro" con otro tipo de células, con "in vivo" para conocer mejor el comportamiento de esta lactona y las posibilidades de utilizarla en estudios citológicos o de otra índole.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Domínguez, A.X.
Métodos de Investigación Fitoquímica
Ed. Limusa, México (1973)
- 2.-Díaz, E., Nathan, J.P., Romo de Vivar, A., Romo, J.
Bol. Inst. Quím. U.N.A.M. 17 122 (1965).
- 3.-Emerson, M., Caughlan, C., Herz, W.
Tetrahedron Letters 621-625 (1964).
- 4.-Haynes, L.J.
Quarterly Reviews II 46-72 (1948).
- 5.-Kupchan, S.M., Eakin, M.A., And Thomas, A.M.
J. of. Med. Chem. 14 1147-1149 (1971)
- 6.-Guerrero, C., Santana, M., y Romo, J.
Rev. Latinamer. Quím. 7 41 (1976).
- 7.-Romo de Vivar, A., Guerrero, C., Díaz, E., Bratoeff, A.E.
And Jimenez, L.
Phytochem. 15 522 (1976).
- 8.-Romo de Vivar, A., Guerrero, C., Díaz, E., And Ortega, A.
Tetrahedron 26 1657 (1970).
- 9.-Mc. Quillin, F.J.
Homogeneous Hydrogenation in Organic Chemistry (1976).
- 10.-Vichnenski, W., Sarti, S.J., Gilbert, B., And Hertz, W.
Phytochem. 15 191 (1976).

- 11.-Horeau, A., et Kagan, H.
Tetrahedron 20 2431-2441 (1964).
- 12.-Hammond, G., And Deboer, Ch.
J. Of. The American Chem. Soc. 86 889-902 (1964)
- 13.-Bhacca, N., And Fischer, M.
Chem. Communications 68-69 (1969).
- 14.-Guerrero, C., Diaz, E., Martínez, M., Taboada, J., Miranda, S.,
Gonzalez, M., y Tellez, J.
Rev. Latinomer. Quim. 8 123 (1977).
- 15.-Silverstein And Barsler.
Spectrometric Identification of Organic Compounds 144 (1967).
- 16.-Watson, W.H.
Rev. Latinomer. Quim. 8 101 (1977).
- 17.-Gnecco, S., Poyser, J.P., And Silva, M.
Phytochem. 12 2469 (1973).
- 18.-Ortega, A., Guerrero, C., y Roma, J.
Rev. Latinoamer. Quim. 4 91 (1973).
- 19.-Kenichi, I., Isao, H., Hitoshi, M.
J. Chem. Soc. 8 1142-1147 (1970).
- 20.-Jain, T.C., Mc Closkey, J. E., And Banks, C.M.
Organic Masc. Spectrom 5 751 (1971).
- 21.-Harbone, J. B., Mabry, J.S., And Mabry, T. J.
The Flavonoids 272 Champan And Hall, London (1975).

22.-Mabry, T.J.

Rev. Latinamer. Quím. 6 105 (1975).

23.-Rosas, N.

(comunicación Personal).

24.-Lee, K.H., Huang, T.A., Piantadosi, C., Pagano, J.S.

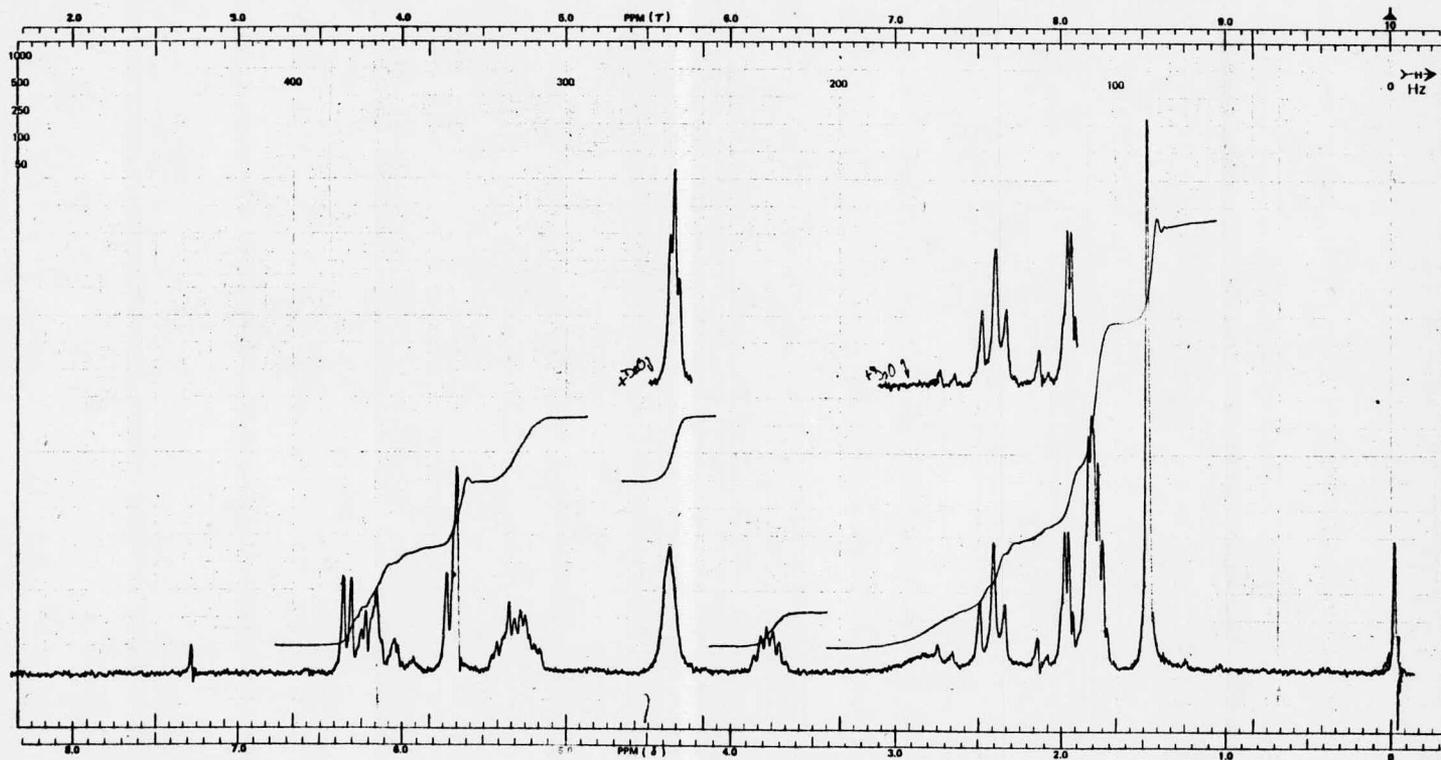
And Geissman, T.A.

Cancer Res. 31 1649-1654 (1971).

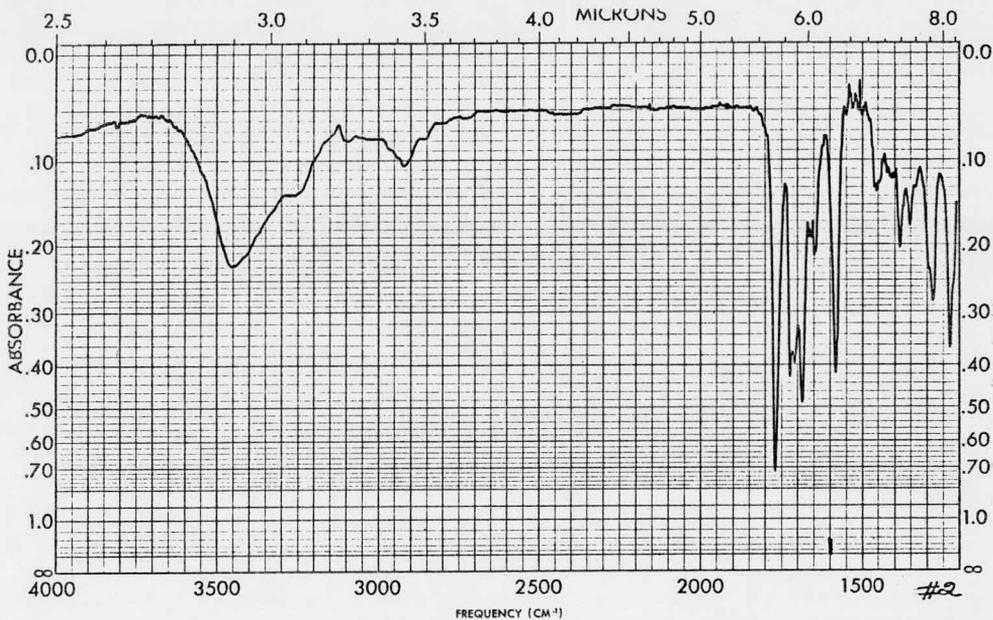
25.-González, M. y Trujillo, J.M.

Bol. de la Asoc. Mex. de Patología VII 2 113-120 (1969).

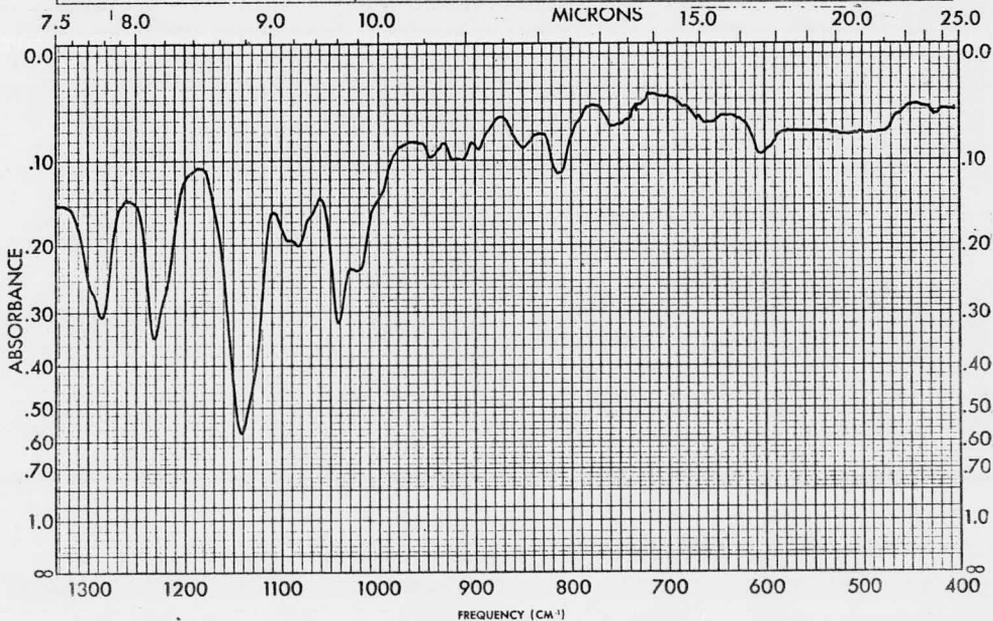
26.-Cancer Chemotherapy Reports 25 22 (1962).



ESPECTRO #1



SAMPLE <i>BUDLEINA "A"</i>	CURVE NO. <i>12970</i>	SCAN SPEED <i>F</i>	OPERATOR <i>ALFREDO</i>
ORIGIN <i>Dr. GUERRERO</i>	CONC. <i>—</i>	SLIT <i>N</i>	DATE <i>26-JUN-78</i>
SOLVENT <i>KBr</i>	CELL PATH <i>—</i>	REMARKS <i>BANDA DE POLIESTIRENO</i>	
	REFERENCE <i>AIRE</i>		

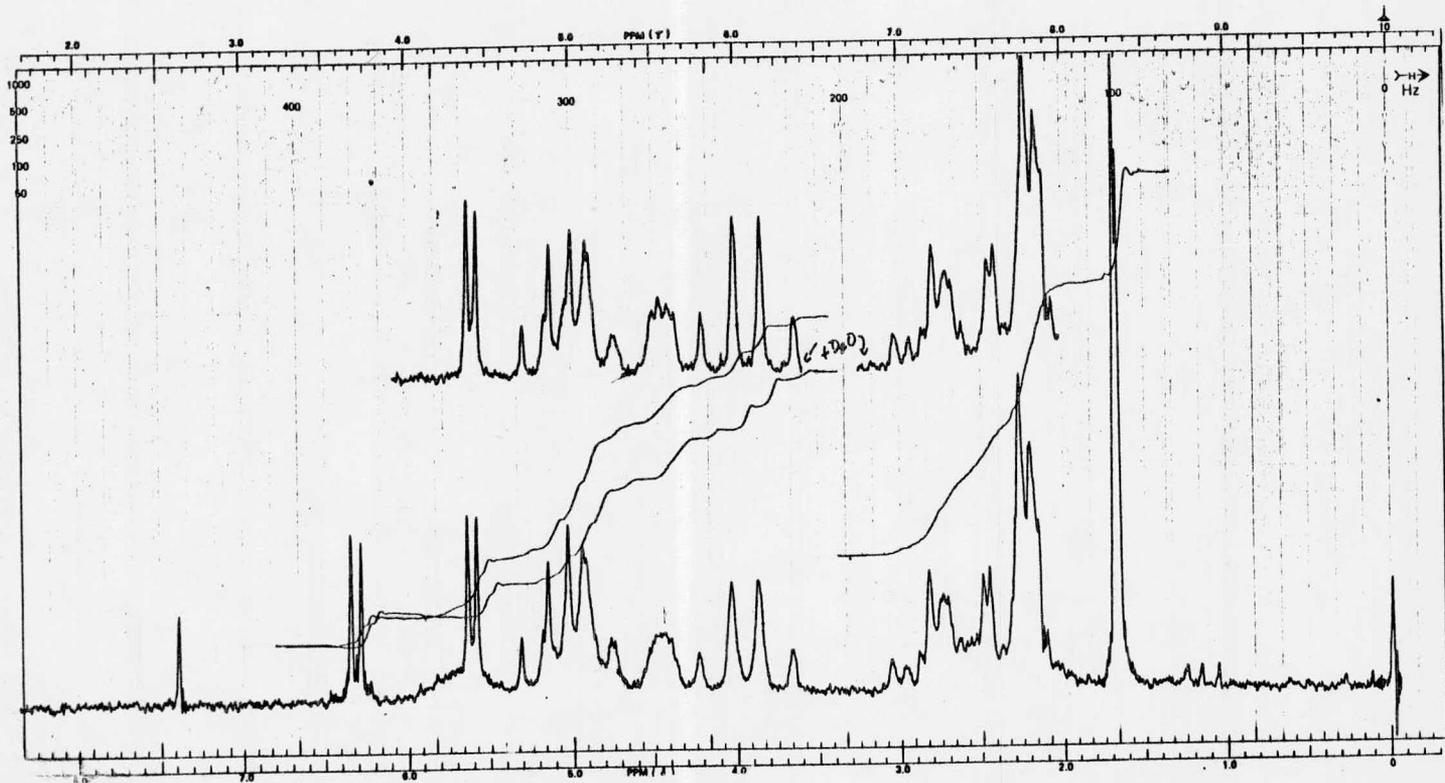


SAMPLE <i>BUDLEINA "A"</i>	CURVE NO. <i>12970</i>	SCAN SPEED <i>F</i>	OPERATOR <i>ALFREDO</i>
ORIGIN <i>Dr. GUERRERO</i>	CONC. <i>—</i>	SLIT <i>N</i>	DATE <i>26-JUN-78</i>
SOLVENT <i>KBr</i>	CELL PATH <i>—</i>	REMARKS <i>BANDA DE POLIESTIRENO</i>	
	REFERENCE <i>AIRE</i>		

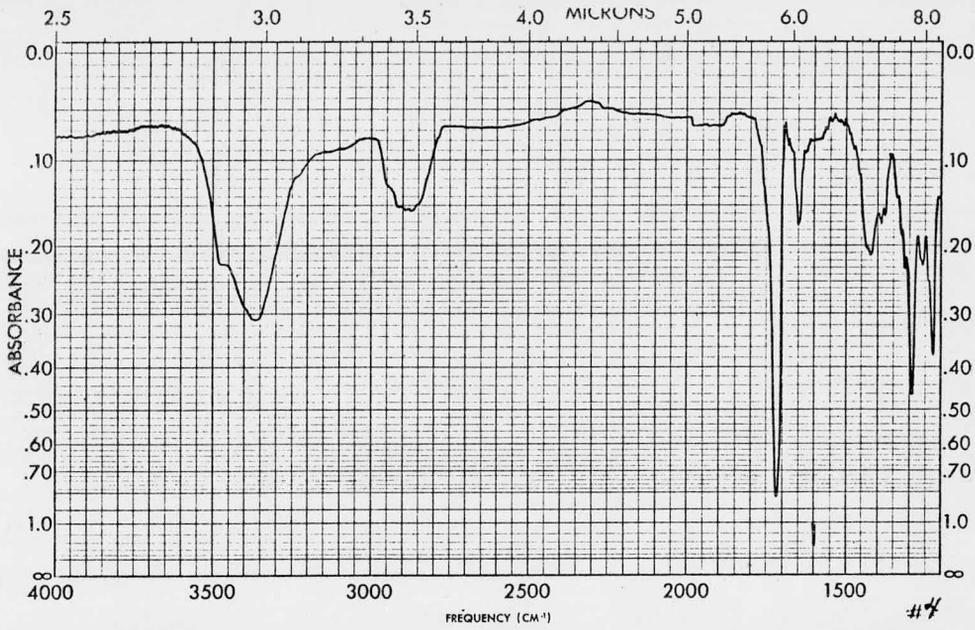
PART NO. 337-1208

ESPECTRO #2

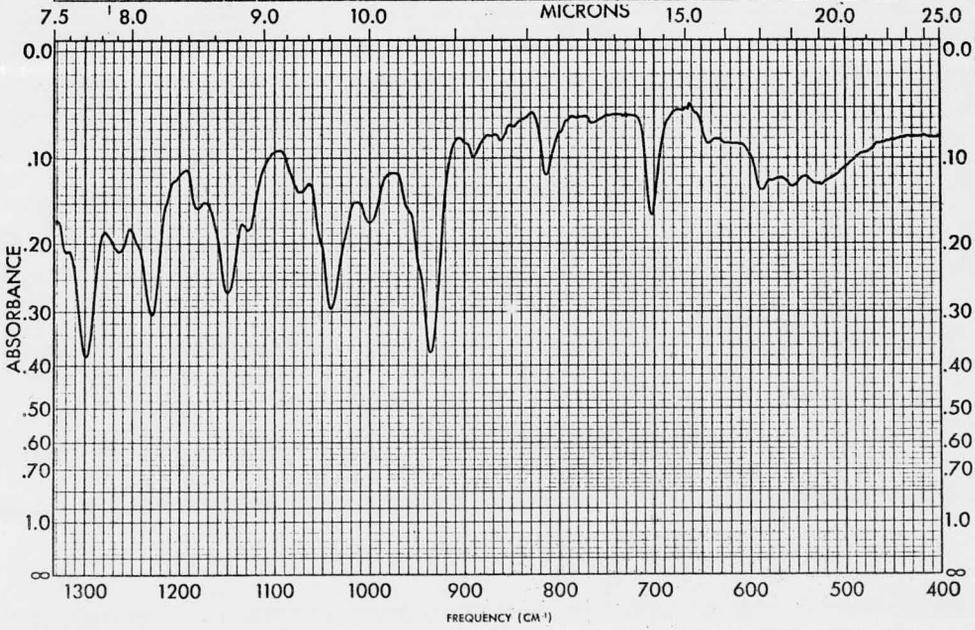
PERKIN-ELMER®



ESPECTRO #3



SAMPLE <u>GUDLEINA B</u>	CURVE NO. <u>12930</u>	SCAN SPEED <u>F</u>	OPERATOR <u>ALFREDO</u>
ORIGIN <u>Dr. GUERRERO</u>	CONC. <u> </u>	SLIT <u>N</u>	DATE <u>19-JUN-78</u>
SOLVENT <u>KBr</u>	CELL PATH <u> </u>	REMARKS <u>BANDA DE ALIESTIREM</u>	
	REFERENCE <u>AIRE</u>		

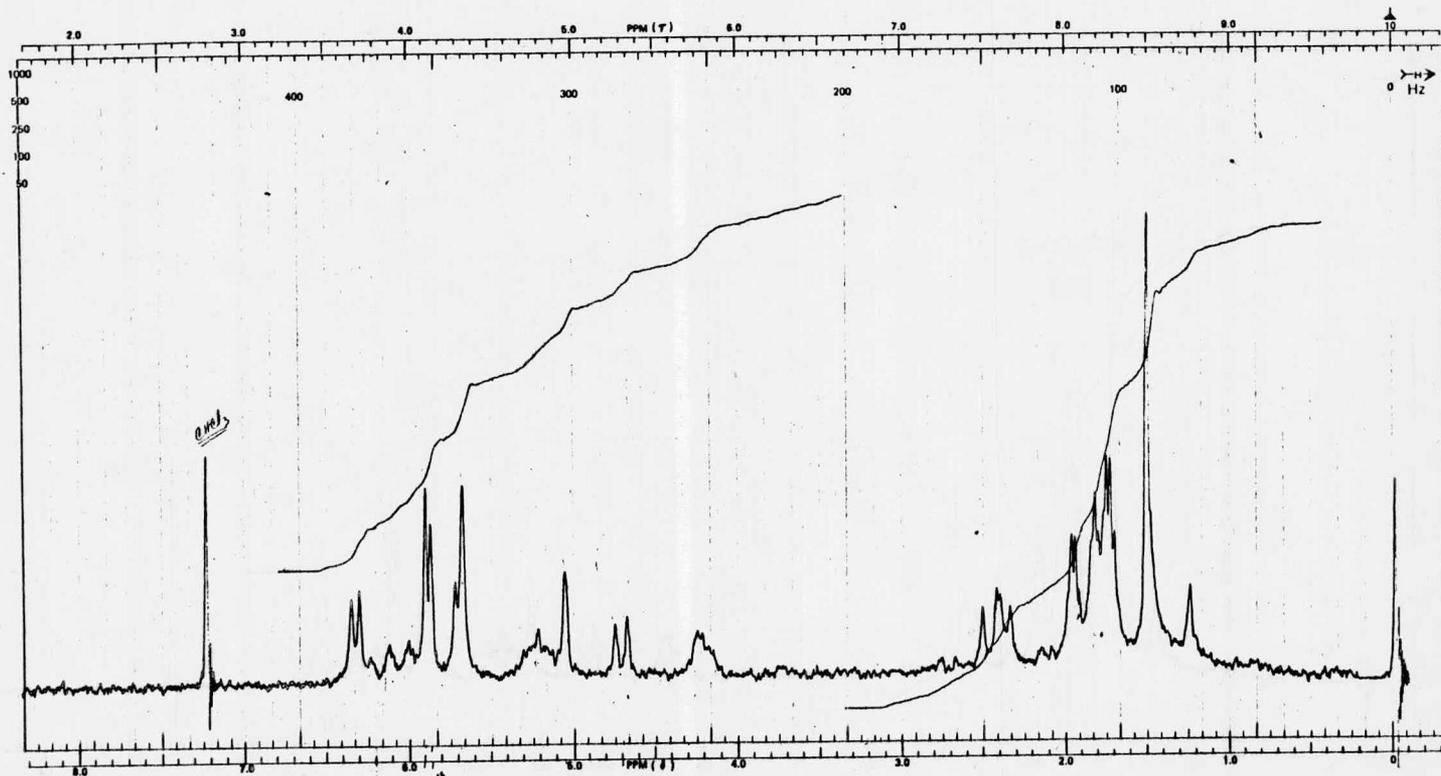


SAMPLE <u>GUDLEINA B</u>	CURVE NO. <u>12930</u>	SCAN SPEED <u>F</u>	OPERATOR <u>ALFREDO</u>
ORIGIN <u>Dr. GUERRERO</u>	CONC. <u> </u>	SLIT <u>N</u>	DATE <u>19-JUN-78</u>
SOLVENT <u>KBr</u>	CELL PATH <u> </u>	REMARKS <u> </u>	
	REFERENCE <u>AIRE</u>		

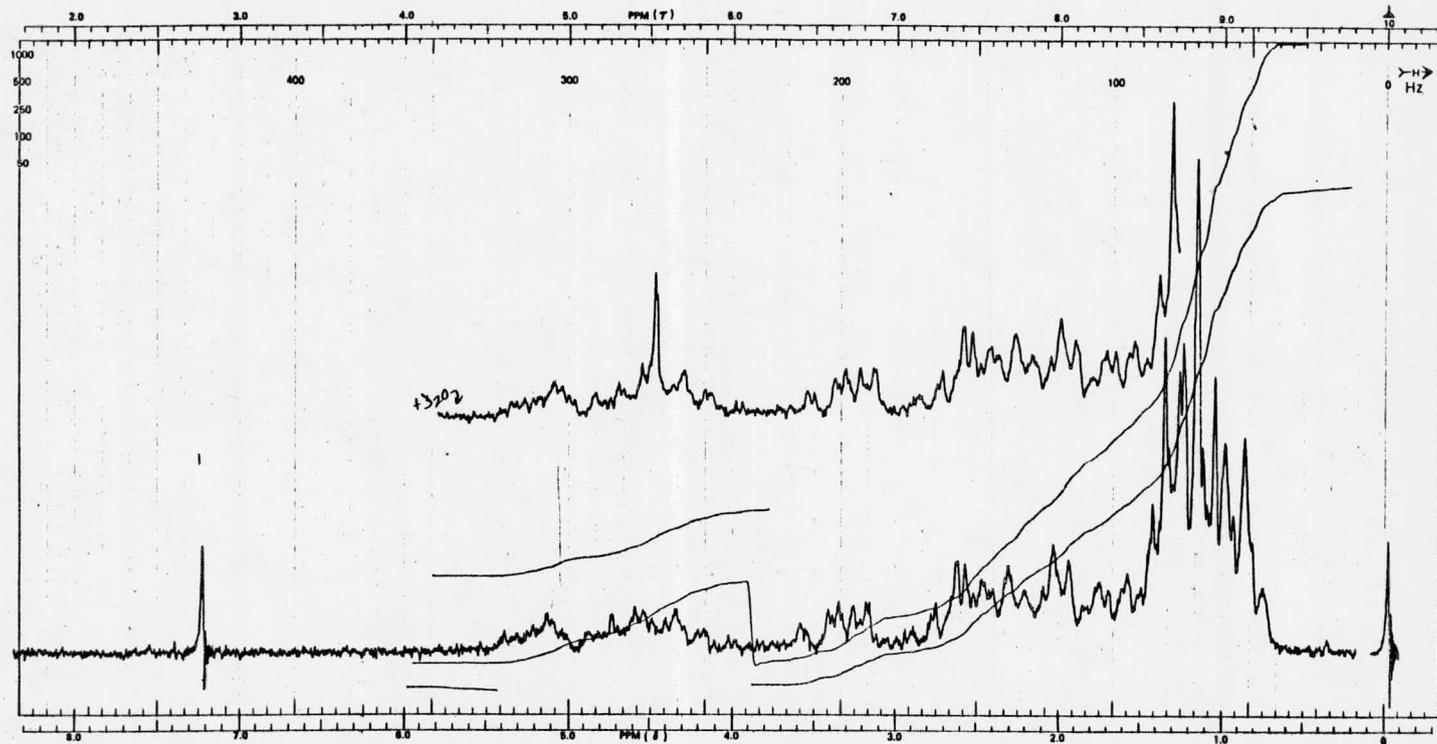
PART NO. 337 1208

ESPECTRO # 4

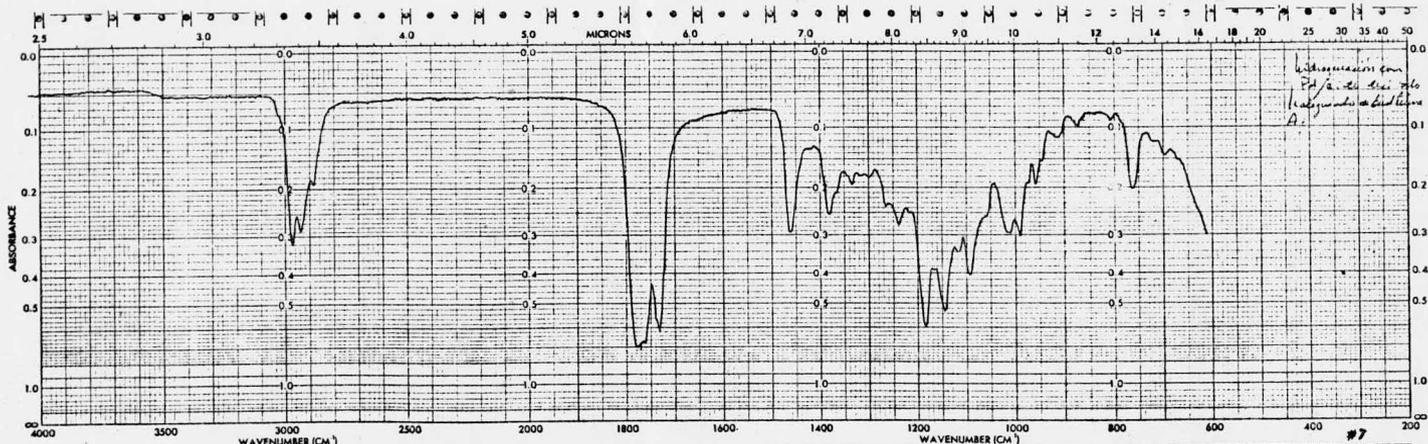
PERKIN ELMER



ESPECTRO #5



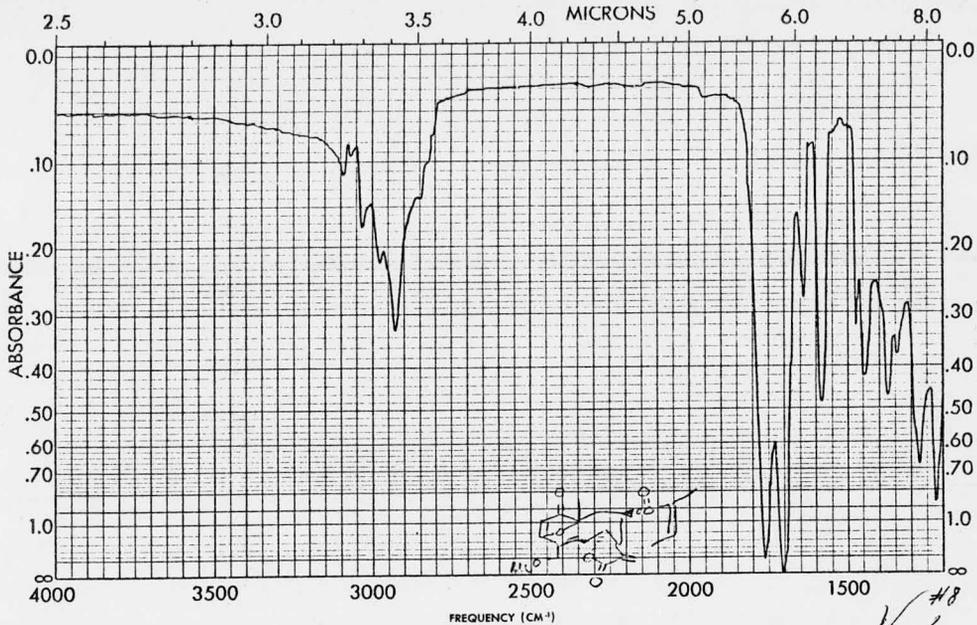
ESPECTRO #6



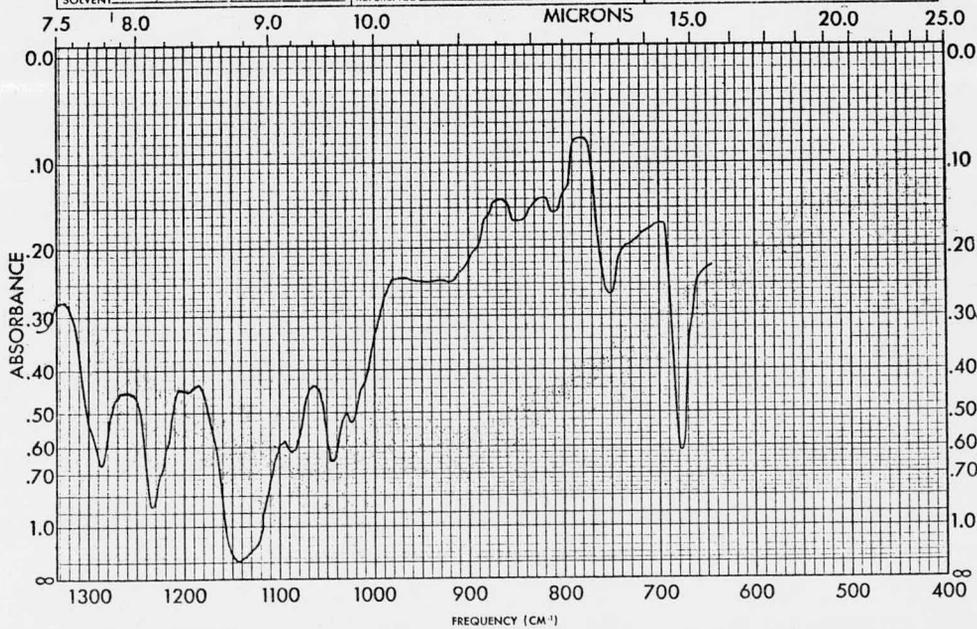
hidrogenados con
 P₂O₅ de 100 g
 (hidrogenados a 100°C)
 A.

SAMPLE _____	SOLVENT: <u>petrola</u>	REMARKS <u>el apéndice tiene un desplazamiento de 4 cm² hacia mayor número de onda</u>	SCAN MODE <u>H</u>	OPERATOR <u>W. B. H.</u>
ORIGIN <u>Dr. Humero</u>	CONCENTRATION _____	PRINTED IN U.S.A.	SLIT <u>N</u> TIME CONSTANT <u>1</u>	DATE <u>11-18-55</u>
CELL PATH _____	REFERENCE <u>air</u>	PERKIN-ELMER *	PART NO. 510-4366	REF. NO. <u>1747</u>

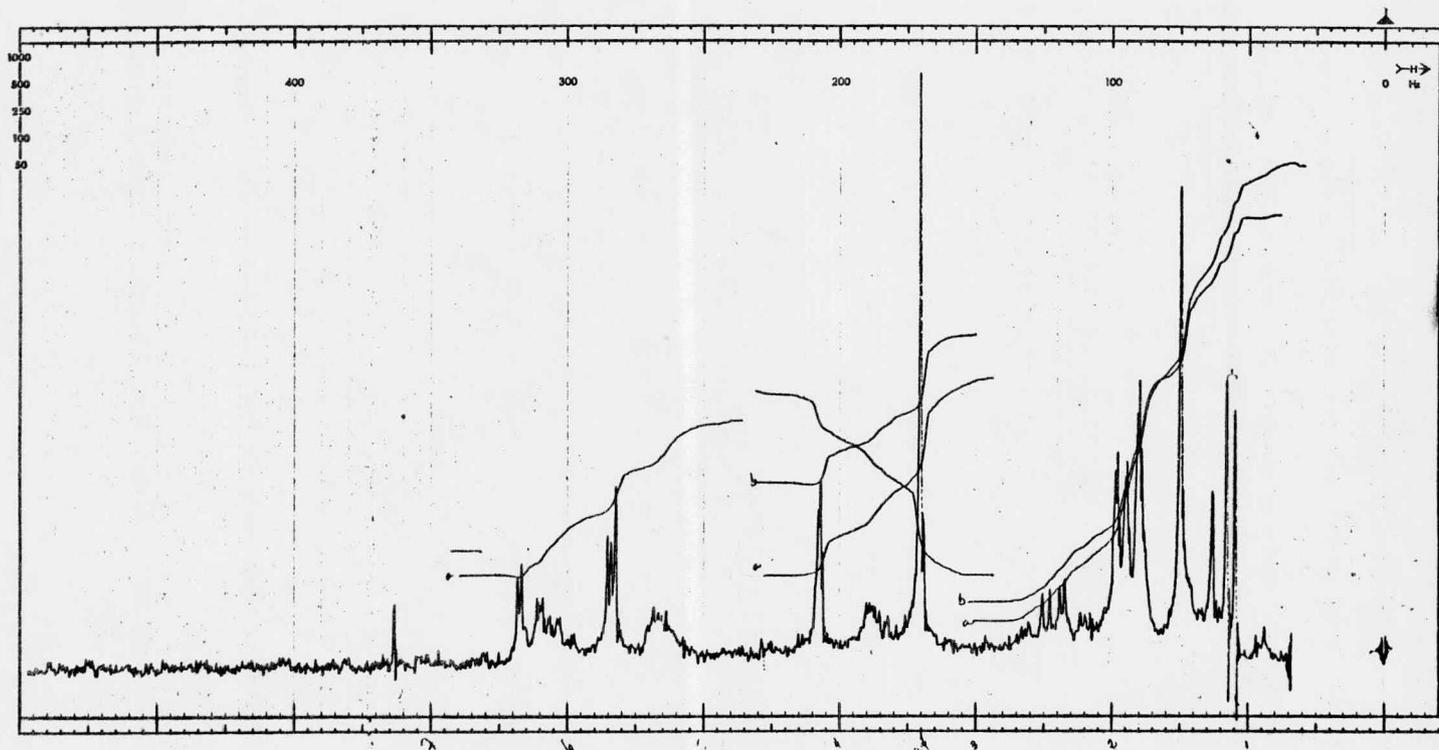
ESPECTRO # 7



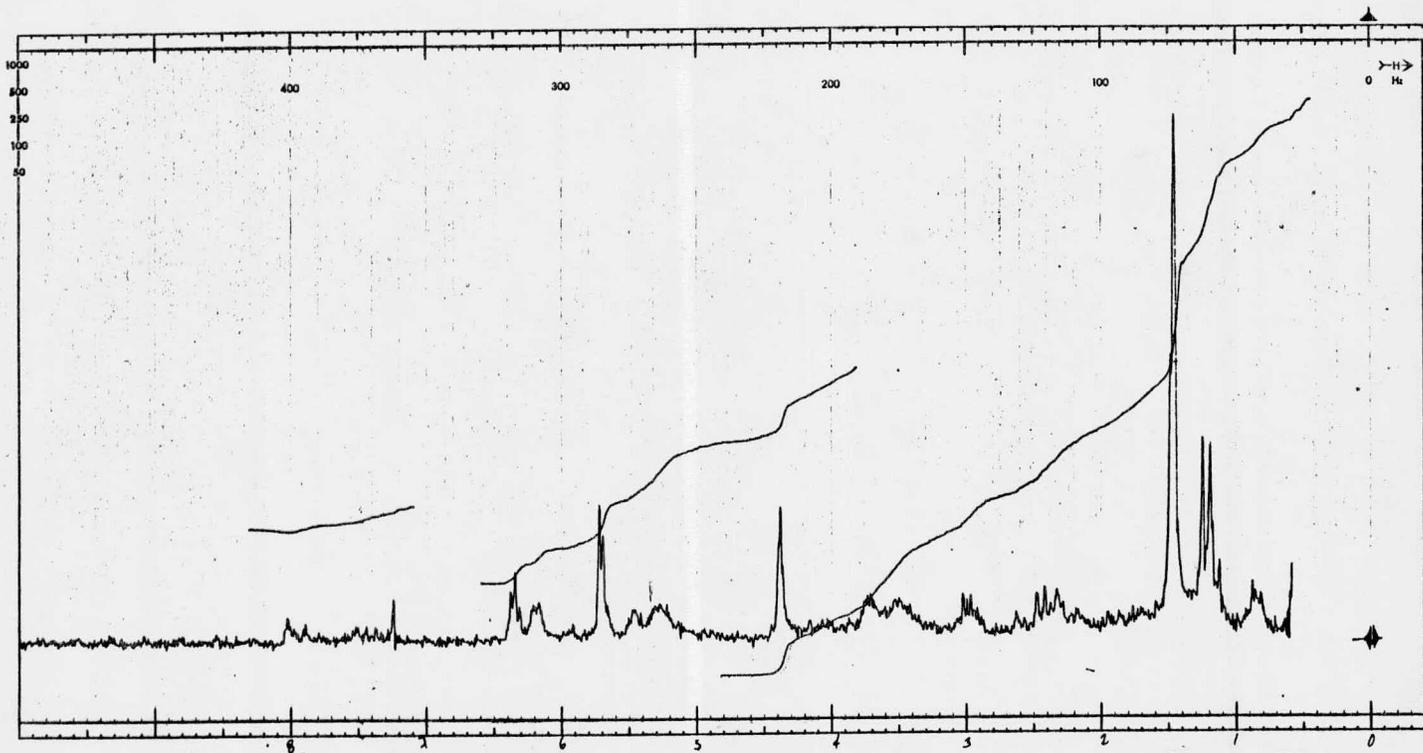
SAMPLE _____	CURVE NO. <u>12527</u>	SCAN SPEED <u>Quick</u>	OPERATOR <u>W.C.</u>
ORIGIN <u>Dr. C. Guergo</u>	CONC. _____	SLIT <u>N</u>	DATE <u>3-7-72</u>
SOLVENT <u>Petroleum</u>	CELL PATH _____	REMARKS _____	
	REFERENCE <u>A.S.C.</u>		



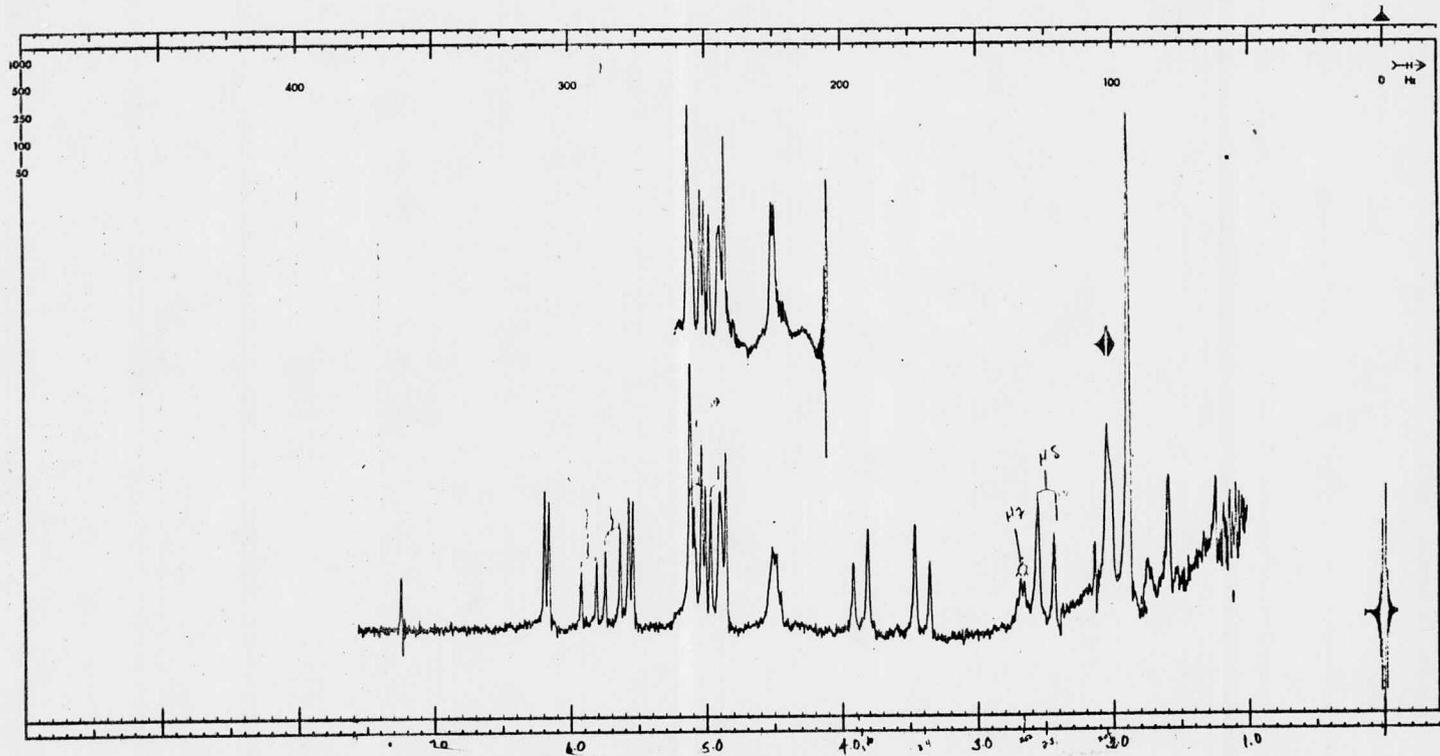
SAMPLE _____	CURVE NO. <u>12527</u>	SCAN SPEED _____	OPERATOR _____
ORIGIN _____	CONC. _____	SLIT _____	DATE _____
SOLVENT _____	CELL PATH _____	REMARKS _____	
	REFERENCE _____		



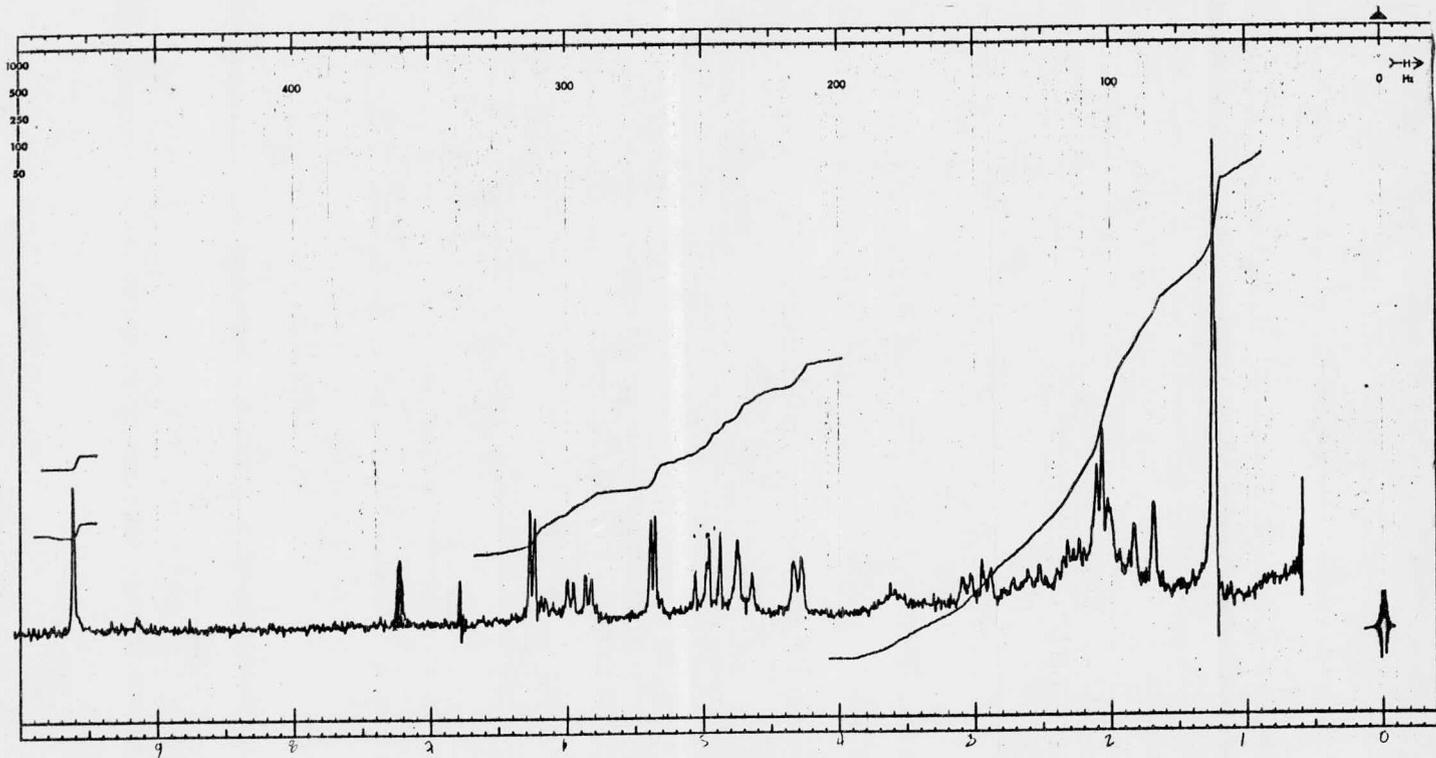
ESPECTRO # 9



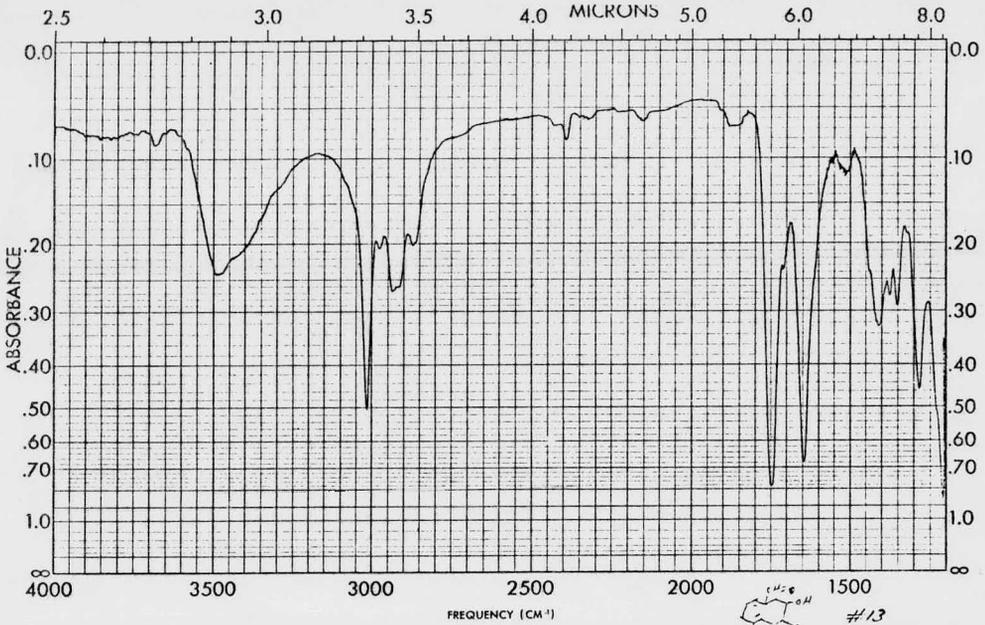
ESPECTRO # 10



ESPECTRO # 11

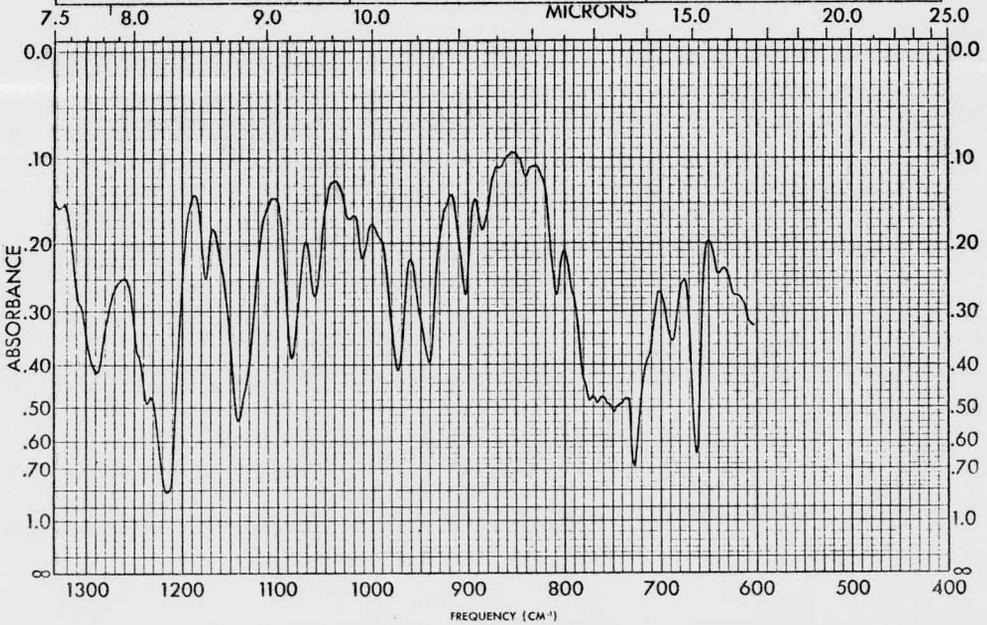


ESPECTRO #12

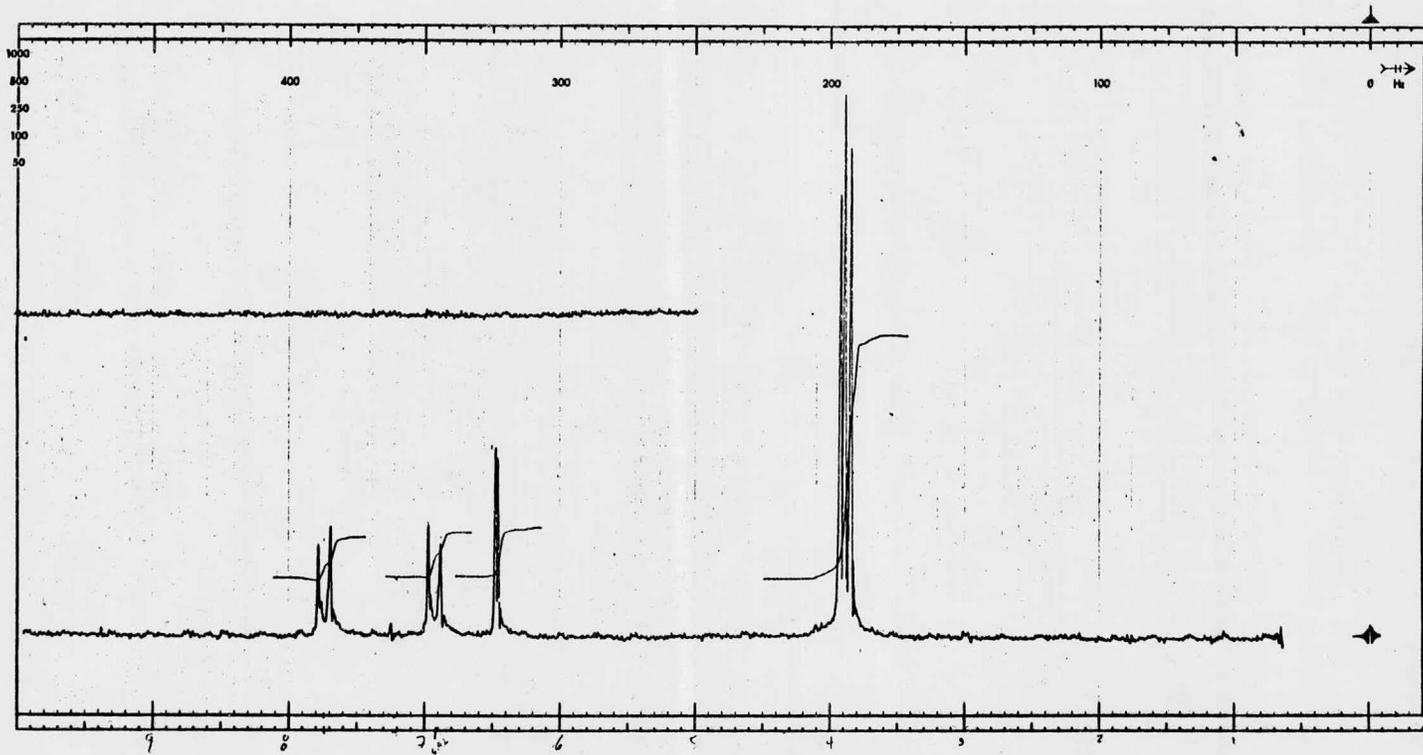


SAMPLE	CURVE NO.	SCAN SPEED	OPERATOR
ORIGIN	CONC.	SLIT	DATE
SOLVENT	CELL PATH	REMARKS	
	REFERENCE		

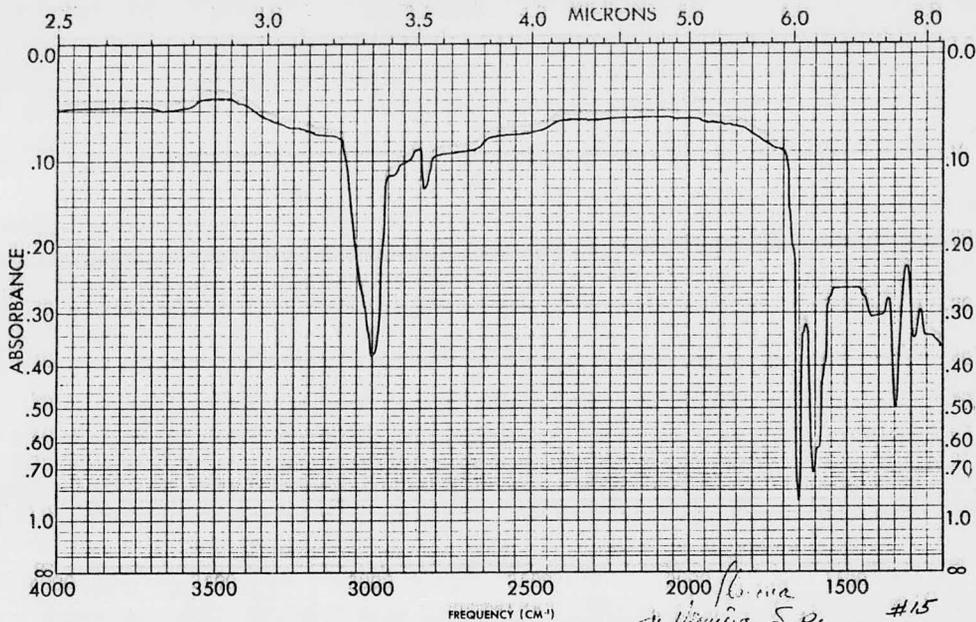
#13



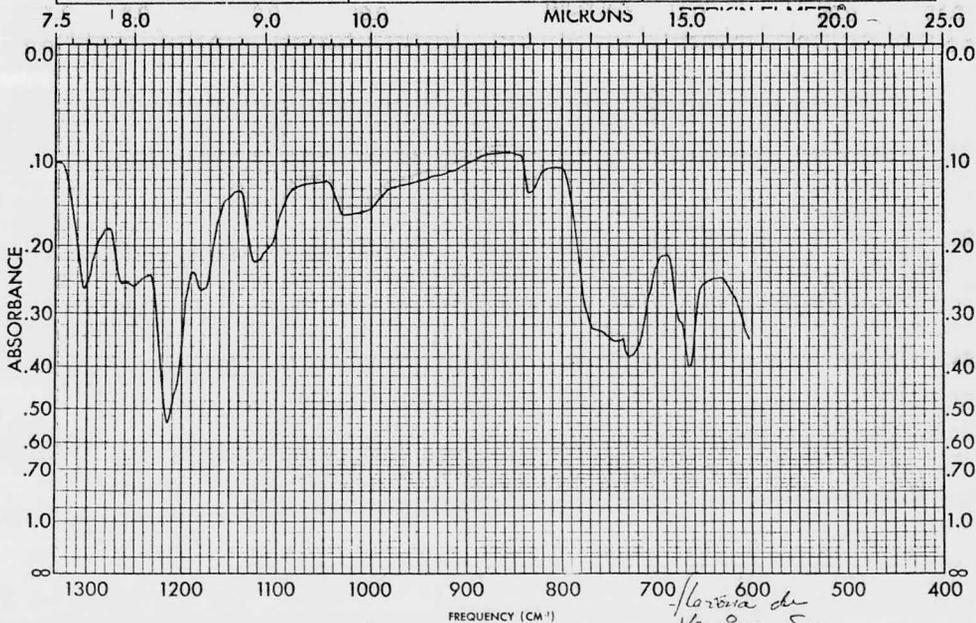
SAMPLE	CURVE NO.	SCAN SPEED	OPERATOR
ORIGIN	CONC.	SLIT	DATE
SOLVENT	CELL PATH	REMARKS	
	REFERENCE		



ESPECTRO #14



SAMPLE <i>la Viquera</i>	CURVE NO. <i>1502</i>	SCAN SPEED <i>F</i>	OPERATOR <i>...</i>
ORIGIN <i>...</i>	CONC. <i>...</i>	SLIT <i>L</i>	DATE <i>...</i>
SOLVENT <i>...</i>	CELL PATH <i>...</i>	REMARKS	
	REFERENCE <i>...</i>		



SAMPLE <i>la Viquera</i>	CURVE NO. <i>1502</i>	SCAN SPEED <i>F</i>	OPERATOR <i>...</i>
ORIGIN <i>...</i>	CONC. <i>...</i>	SLIT <i>L</i>	DATE <i>...</i>
SOLVENT <i>...</i>	CELL PATH <i>...</i>	REMARKS	
	REFERENCE <i>...</i>		