



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

---

---

DETERMINACION DE UNA SERIE DE PROPIEDADES  
FISICOQUIMICAS ( $K_D$ ,  $\log P$ ,  $\Delta G$ ,  $\gamma$ ,  $\pi$ ), ASI COMO DEL  
EFECTO CITOTOXICO DE CINCO LACTONAS  
SESQUITERPENICAS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A**

**GABRIEL MARTINEZ RODRIGUEZ**

ASESORES:

M. EN C. BENJAMIN VELASCO BEJARANO

DR. RENE MIRANDA RUVALCABA

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

2005

m. 344928



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO  
AVENIDA DE LA UNAM  
MEXICO

**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO**  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Determinación de una serie de propiedades fisicoquímicas (KD, Log P, ΔG y π), así como del efecto citotóxico de cinco lactonas sesquiterpénicas.

que presenta el pasante: Gabriel Martínez Rodríguez  
con número de cuenta: 9714023 0 para obtener el título de :  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 4 de Marzo de 2005

PRESIDENTE MFC. Ma. Eugenia R. Posada Galarza

VOCAL Q. Mario Morales Delgado

SECRETARIO MC. Benjamín Velasco Bejarano

PRIMER SUPLENTE MFC. Beatriz de Jesús Maya Monroy

SEGUNDO SUPLENTE QFB. Juan Chiu Chan

La felicidad no esta en hacer siempre lo que se quiere, sino, en querer siempre lo que se hace.

León Tolstoy.



El presente trabajo de tesis se desarrolló en el Laboratorio de Investigación L-122, de la Sección de Química Orgánica, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM; y en el Laboratorio de Bioquímica Médica II de la Escuela Superior de Medicina, IPN.

---

## DEDICATORIA

A Francisca Rodríguez Santos, mi mamá...

Mamá este trabajo es tuyo, es para ti, para la persona más maravillosa, incansable, inteligente y amorosa, para ti que estuviste siempre a mi lado, confiando en mí, aun más de lo que yo podía, para ti, que me apoyaste en todo momento, pasara lo que pasara, para ti que eres mi razón de vida, que eres mi vida, para ti que viviste con tanta intensidad, como yo, cada momento de esta etapa, para ti que lo mereces todo, para ti...

---

## AGRADECIMIENTOS

...A mi amigo y asesor Benjamín, por compartirme sus conocimientos, guiarme, soportarme, y sobre todo por ofrecerme su amistad...

...Al Dr. Rene Miranda, por brindarme su afecto, instruirme y aconsejarme, por estar siempre dispuesto a compartir todo su saber y experiencia...

...Al Profesor Gabriel Arrollo; a Cecilia, Boris, Oli, Joel, Inesita, Ulme, Roberto, Eva, Berna, en fin a todo el maravilloso equipo de trabajo de la sección de Química Orgánica, dispuesto en todo momento a tenderle la mano a quien lo necesite; a todos ellos por ser excelentes compañeros y amigos...

...A mi familia: mis hermanos y padres, mis amigos de por vida...

...Y a todos mis amigos y compañeros de la mejor generación de QFB's, la generación 27...

¡GRACIAS!

---

## GLOSARIO

AcOEt	Acetato de etilo
<i>cf</i>	Cromatografía de capa fina
cm <sup>-1</sup>	Número de onda
s	Señal simple
d	Señal doble
sa	Señal ancha
dd	Señal doble de doble
m	Señal múltiple
t	Señal triple
δ	Desplazamiento químico
eV	Electrón volts
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
λ <sub>max</sub>	Longitud de onda máxima
m/z	Relación masa carga
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
nm	Nanómetro
pf	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
UV	Ultravioleta
TAFF	Tonsil Actisil FF
Et <sub>2</sub> O	Eter dietílico
ν <sub>max</sub>	Frecuencia máxima
M <sup>+</sup>	Ión molecular
ΔG	Energía libre de Gibbs
KD	Constante de partición
Log P	Logaritmo base 10 del KD
π	Constante hidrofóbica
PPI	Pirofosfato de isopentenilo
PPDMA	Pirofosfato de dimetilalilo
PPG	Pirofosfato de geranilo
PPF	Pirofosfato de farnesilo
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
DMSO	Dimetilsulfoxido
RPMI	Medio enriquecido
EM	Espectrometría de masas

---

## ÍNDICE

<b>GLOSARIO</b>	1
<b>ÍNDICE</b>	2
<b>INTRODUCCIÓN</b>	5
<b>GENERALIDADES</b>	7
◆ LA TRIBU VERNONEAE	8
◆ TERPENOIDES	9
◆ LACTONAS SESQUITERPÉNICAS	14
◆ Actividad Biológica de las Lactonas Sesquiterpénicas	19
◆ PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS	21
◆ Constante de Partición y Log P.	21
◆ Constante Hidrofóbica ( $\pi$ ).	25
◆ Energía Libre de Gibbs ( $\Delta G$ ).	26
<b>HIPÓTESIS</b>	31
<b>OBJETIVOS</b>	31
◆ OBJETIVO GENERAL	32
◆ OBJETIVOS PARTICULARES	33
<b>DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	34
◆ MATERIALES	35

◆ <b>METODOLOGÍA</b>	<b>36</b>
◆ <b>Aislamiento de las Glaucolidas A y D del Espécimen Vegetal</b> <i>Vernonia salicifolia.</i>	36
◆ <b>Aislamiento de la Glaucolida E, del espécimen vegetal</b> <i>Critoniopsis uniflora (S.H.BRP).</i>	37
◆ <b>Hidrogenación de la Glaucolida E.</b>	37
◆ <b>Reacción de Ciclación de la Glaucolida E.</b>	38
◆ <b>Determinación Experimental del Coeficiente de Partición.</b>	38
◆ <b>Determinación del Coeficiente de Partición (KD),</b> Log P, $\pi$ , y $\Delta G$ .	39
◆ <b>Coeficiente de Partición (KD).</b>	39
◆ <b>Log p</b>	39
◆ <b>Constante de Hidrofobicidad (<math>\pi</math>)</b>	40
◆ <b>Energía Libre de Gibbs (<math>\Delta G</math>)</b>	40
◆ <b>Procedimiento General <i>in vitro</i> para Evaluar la</b> <b>Citotoxicidad.</b>	40
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>42</b>
◆ <b>OBTENCIÓN DE LACTONAS</b>	43
◆ <b>HIDROGENACIÓN DE LA GLAUCÓLIDA E</b>	43
◆ <b>REACCIÓN DE CICLACIÓN DE LA GLAUCÓLIDA E</b>	44
◆ <b>DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN</b>	52
◆ <b>Longitudes Máximas, para cada Compuesto.</b>	52
◆ <b>Cinética de Extracción.</b>	53
◆ <b>Coeficiente de Partición (KD), Log P, <math>\pi</math>, <math>\Delta G</math>.</b>	54

---

◆ DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO Y CORRELACIÓN CON PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS	56
CONCLUSIONES	57
REFERENCIAS	57

---

## INTRODUCCIÓN

Los productos naturales han sido una fuente de compuestos bioactivos; algunos incluso han sido empleados como prototipos para el diseño de fármacos, por ejemplo, la quinina obtenida del árbol de quina, la salicina encontrada en sauces europeos, o bien el taxol componente de las especies de *Taxus*. De la misma forma, muchos de los especímenes de la familia Asteraceae (Compositae) han sido utilizados como antibióticos, antiinflamatorios e inclusive para el tratamiento exitoso de la migraña. Al interior de esta familia, se encuentra la tribu Vernoneae, que a su vez alberga al género *Vernonia*. Dicho género se caracteriza por la producción de lactonas sesquiterpénicas (LS) especialmente de los grupos de la clase de las germacranólidas e hirsutinólidas.

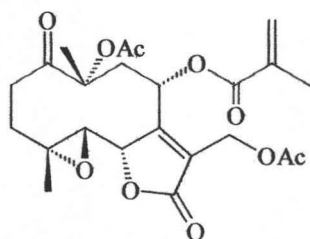
Las LS son un grupo de metabolitos secundarios, incoloros, generalmente de sabor amargo, relativamente estables e hidrofóbicos, de las que existen aproximadamente 4000 estructuras. Las LS poseen una amplia gama de efectos biológicos, que en general son atribuidos a su capacidad para establecer enlaces covalentes con los grupos sulfidrido de proteínas funcionales (generalmente enzimas), en una reacción de adición tipo Michael, debido a sus sistemas carbonílicos  $\alpha$ - $\beta$ -insaturados. Verbigracia, se sabe, que la cisteína y el glutatión, son blancos comunes.

Sin embargo, existen otros factores que pueden modificar la actividad biológica de las LS como el carácter lipofílico (Log P, KD), el tamaño de los sustituyentes, o bien, el número de sitios  $\alpha$ - $\beta$ -insaturados.

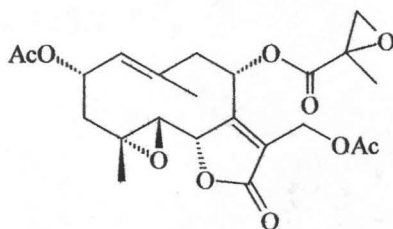
En especial el Log P (medida estándar de liposolubilidad) afecta de manera importante el comportamiento de las moléculas, ya que, influye directamente en el paso de estos a través de la membrana fosfolipídica. Es por ello, que el valor de KD o de Log P, ha sido correlacionado a la absorción de fármacos, toxicidad, carcinogenicidad, interacción fármaco receptor, al metabolismo de las moléculas, a la viabilidad y a varias propiedades moleculares.

Por lo anterior, en el presente trabajo de tesis, se determinaron experimentalmente los parámetros fisicoquímicos: KD, Log P,  $\Delta G$  y  $\pi$ , de una serie de cinco lactonas sesquiterpénicas, de las que, tres fueron aisladas de dos especímenes vegetales del género *Vernonia* (*Vernonia salicifolia* y *Vernonia uniflora*) (1, 2, 3) y dos más son productos de transformaciones químicas (4, 5).

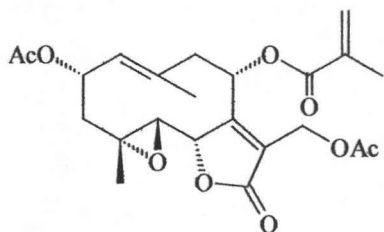




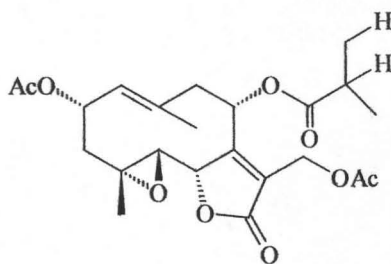
1



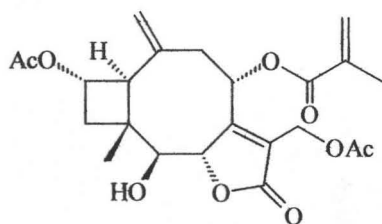
2



3



4



5

Asimismo, en forma complementaria se efectuó la evaluación de su actividad citotóxica, sobre células neoplásicas K562 y linfocitos T humanos (MT2), a efecto de correlacionar ambas propiedades. Al respecto, se determinó que existe una dependencia directa entre el Log P de cuatro de los compuestos estudiados y su actividad biológica sobre células MT2. Además, se evaluó el efecto que tiene la modificación de la estructura hidrocarbonada principal de las lactonas sesquiterpénicas 1-5 con respecto a la actividad biológica, resolviendo que esta última se ve modificada sustancialmente siempre a la baja, a pesar de existir una fluctuación del volumen estérico.

# **GENERALIDADES**

---

## ◆ LA TRIBU VERNONEAE

Desde hace años, los productos naturales han sido una fuente rica en compuestos bioactivos, de los que incluso algunos han sido empleados como prototipos para el diseño de fármacos con gran potencia y baja toxicidad. Sin embargo, del total de especies vegetales que se calcula existen en el planeta, tan sólo el diez por ciento, han sido estudiadas desde el punto de vista farmacológico.

Existe una gran cantidad de compuestos químicos de origen vegetal, que han ofrecido respuesta a problemas de salud por ejemplo: la quinina (obtenida del árbol de quina) que salvó miles de vidas en la primera mitad del siglo pasado y que ahora sintetizada, mantiene libre a la humanidad de la malaria; la salicina, base del compuesto activo de la Aspirina, aislada de los sauces europeos; o bien, el taxol, un alcaloide extraído de una especie de *Taxus* del noreste de Estados Unidos, que ha sido exitosamente empleado en el tratamiento de fases avanzadas de cáncer ovárico; particularmente, muchos de los especímenes de Asteraceae (Compositae) han sido utilizados como antibióticos, antiinflamatorios e inclusive para el tratamiento exitoso de la migraña; <sup>1</sup> entre otros muchos más.

La tribu Vernoneae, incluida en la familia Compositae, fue reconocida por Cassini y delimitada por Leissing <sup>2</sup>, está integrada por cerca 1450 especies y 70 géneros, siendo 37 monotípicos.. De estos, el género *Vernonia* es uno de los más abundantes, ya que, contiene cerca de 1000 especies, cuya distribución está repartida casi por partes iguales entre las especies nativas del continente americano (con alrededor de 300 en nuestro país) y las contenidas en África y el sudeste de Asia.

El género *Vernonia* presenta una gran variedad morfológica de hojas y tallos, lo que demuestra la gran diversificación que desarrolló este género durante su evolución.

Existen tanto especies anuales como perennes; algunos autores sugieren que es importante para su mejor caracterización, considerar el tipo de inflorescencia, la morfología del polen, el número de cromosomas, así como los metabolitos secundarios.<sup>3-6</sup>

Al respecto de las especies americanas se ha informado del aislamiento de metabolitos como germacranólidas e hirsutinólidas, en contraste con las especies del Viejo Mundo de donde se han aislado: eudesmanólidas, guayanólidas y elemanólidas.

Con base en estas consideraciones, el género *Vernonia* se dividió en dos subgéneros; uno de ellos, el *Orbivestus* comprende a las especies del Viejo Mundo, mientras que las especies americanas quedaron incluidas en el subgénero *Vernonia*.<sup>7</sup>

Esta clasificación se confirmó por la morfología del polen, estudios quimiosistemáticos y citotaxonómicos. Se sabe además que, las especies del Nuevo Mundo tienen siete cromosomas y las del Viejo Mundo entre nueve y diez.

Mabry<sup>8</sup> propuso que las lactonas sesquiterpénicas tienen un valor taxonómico especial dentro del género *Vernonia*. Tomando esta consideración Robinson delimitó la tribu Vernonie por la distribución de lactonas sesquiterpénicas. Posteriores estudios fitoquímicos de especies de este género, permitieron postular que tanto glaucólidas como hirsutinólidas eran los quimiomarcadores por excelencia para este tipo de especímenes.

Es importante señalar que para este trabajo de tesis se estudiaron dos especímenes pertenecientes a la familia Vernoneae, la *Vernonia salicifolia* (*Critoniopsis salicifolia*) y la *Vernonia uniflora* (*Critoniopsis uniflora*).

## ♣ TERPENOIDES

En general de las plantas se emplean los extractos, sin embargo, éstos presentan algunos inconvenientes, dado que, en general se trata de mezclas de muchos compuestos, como:

terpenoides, flavonoides, e inclusive alcaloides; y cada uno puede actuar por separado y en forma distinta, por lo que es importante describir de forma adecuada el caso que nos atañe.

Los terpenoides están correlacionados con el isopreno, una molécula hipotética de cinco átomos de carbono cuya nomenclatura sistematizada es, 2 metil-1,3-butadieno, (Figura 1).

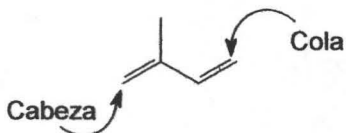


Figura 1

La condensación de varias unidades de isopreno pueden presentarse de manera regular cabeza-cola, o bien irregular cabeza-cabeza o cola-cola, (Figura 2).



Figura 2.- Unión regular de isopreno cabeza-cola.

Se conocen miles de terpenos, que en su mayoría, se encuentran en plantas; algunos son de cadena abierta, mientras que otros tienen una estructura cíclica. Por ejemplo el mirceno (i) aislado del laurel presenta una estructura acíclica, la carvona (ii) extraída de la hierbabuena puntiaguda tiene esqueleto monocíclico; y el  $\alpha$ -pineno (iii) obtenido de la trementina es un compuesto bicíclico.

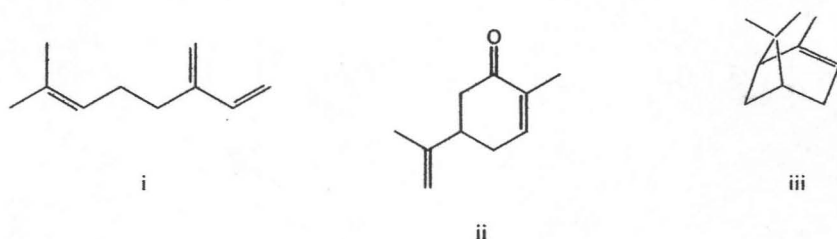


Figura 3. Terpenos con diferente estructura

Considerando que los terpenoides están formados por determinado número de unidades de isopreno, se ha establecido una clasificación<sup>9</sup> basada en la cantidad de éstas, (Tabla 1).

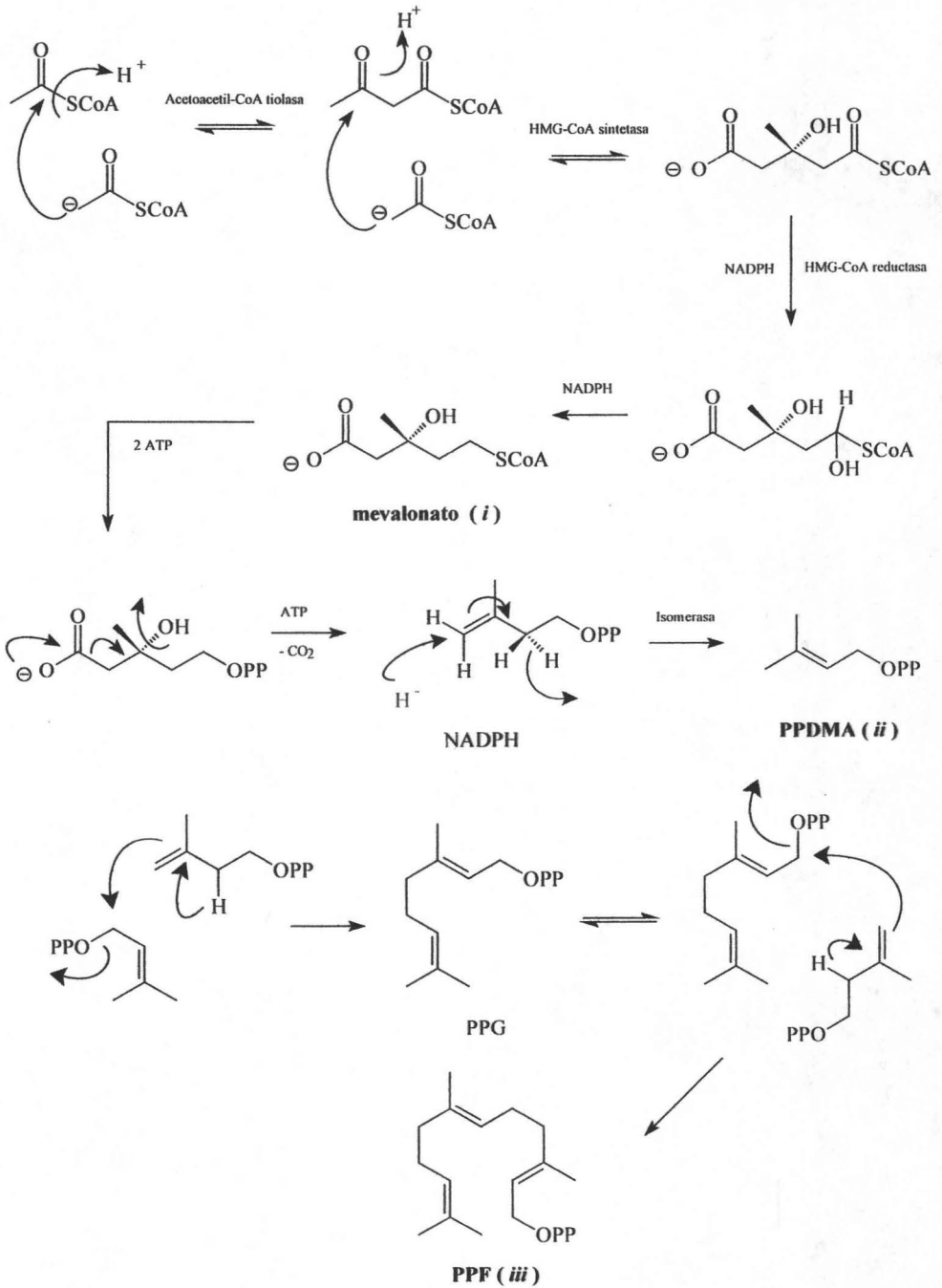
Tabla 1.- Clasificación de terpenoides de acuerdo al número de unidades de isopreno.

Unidades de isopreno	Número de carbonos	Nombre o Clase	Precursor	Ejemplos
1	C <sub>5</sub>	<b>Hemiterpenos</b>	PPI y PPDMA	Ácido angélico, ácido tiglico
2	C <sub>10</sub>	<b>Monoterpenos</b>	PPG	Mentol, citral, carbomentol.
3	C <sub>15</sub>	<b>Sesquiterpenos</b>	PPF	Tropolonas, germacranólidas.
4	C <sub>20</sub>	<b>Diterpenos</b>	PPGG	Ácido resínico, vitamina A.
5	C <sub>25</sub>	<b>Sesterterpenos</b>	PPGF	Ácido gascárdico, cerorubenol.
6	C <sub>30</sub>	<b>Triterpenos</b>	Escualeno	Argentatinas, lanosterol.
8	C <sub>40</sub>	<b>Tetraterpenos</b>	Fitoeno	Carotenoides vg. β-carotenos.
n	C <sub>n</sub>	<b>Politerpenos</b>	(PPF) <sub>n</sub>	Hule natural, solanesol

La biogénesis de los terpenoides sigue la ruta del ácido mevalónico, en la que, primeramente se condensan dos moléculas de acetil coenzima A (Acetil CoA), involucrando a la enzima acetil CoA tiolasa, generando una estructura con cuatro átomos de carbono, posteriormente esta estructura reacciona con una molécula más de acetil CoA interviniendo la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) sintetasa, produciendo una molécula con seis átomos de carbono. Ésta posteriormente es reducida vía tioacetal, lo que conduce a la formación del ácido (3R) mevalónico (3R-AMV), en forma de mevalonato (*i*).

Posteriormente el 3R-AMV es fosforilado, descarboxilado y deshidratado para generar el pirofosfato de isopentenilo (PPI), el cual se isomeriza por medio de la adición y eliminación de un protón del medio para generar el pirofosfato de dimetilalilo (PPDMA), (*ii*); estas moléculas están en relación de 7:93 respectivamente y son conocidas como isopreno activo.<sup>9,10</sup>

Finalmente, el PPI y el PPDMA reaccionan entre sí, generando el pirofosfato de geranilo (PPG), el cual es considerado como precursor biogénico de los monoterpenos. Por otro lado, la unión de otra molécula de PPI a una PPG da como resultado la formación de una nueva estructura (*iii*) formada por 15 átomos de carbono conocida como pirofosfato de farnesilo (PPF), la cual se ha propuesto como el precursor biogénico de los sesquiterpenos, (Esquema 1).



Esquema 1. Biogénesis del pirofostto de farnesilo (PPF)



### ◆ LACTONAS SESQUITERPÉNICAS

Las lactonas sesquiterpénicas, constituyen un amplio y diverso grupo de metabolitos secundarios, incoloros, generalmente con un sabor amargo, relativamente estables e hidrofóbicos; de éstos se conocen aproximadamente 4000 estructuras, que han sido aisladas de alrededor de catorce familias de angiospermas, y en menor grado de gimnospermas, de hígado y de algunos representantes del reino fungi. Sin embargo, un gran número de éstas, ha sido obtenido de plantas superiores e inferiores de Astereaceae (*Compositae*) con más de 3000 representantes<sup>1, 11-13</sup> (Tabla 2), solo ausente en el género *Tegeteae*. En general, una planta de una especie particular, solo contiene un único tipo de esqueleto, con algunas variaciones. Las lactonas se encuentran regularmente en las hojas y flores, y no en tallo o raíces, aunque se ha reportado la presencia de algunas de ellas en la raíz de *Liriodendro tulipifera* y en la corteza de ciertas especies brasileñas.

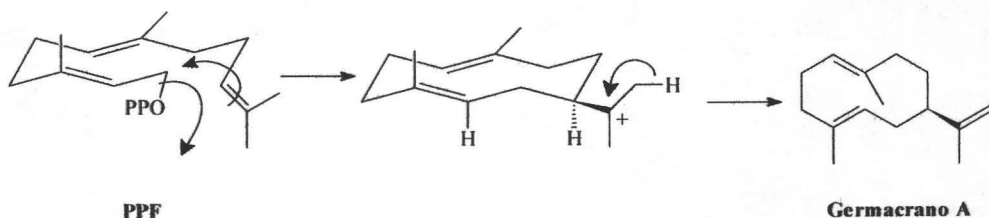
Tabla 2: Distribución de las estructuras de lactonas sesquiterpénicas en Astereaceae

Tribu (Nº de géneros)	Géneros con lactonas sesquiterpénicas	Tipo de lactona presente.
Anthemideae (50)	10	Cadinanólidas, Crimoranólidas, Eudesmanólidas, Germacranólidas, Guaianólidas y Helenanólidas
Arctoteae - Calenduleae (50)	1	Guaianólidas
Astereae (100)	1	Guaianólidas
Cichoreae (75)	6	Eudesmanólidas, Germacranólidas y Guaianólidas

Continuación Tabla 2

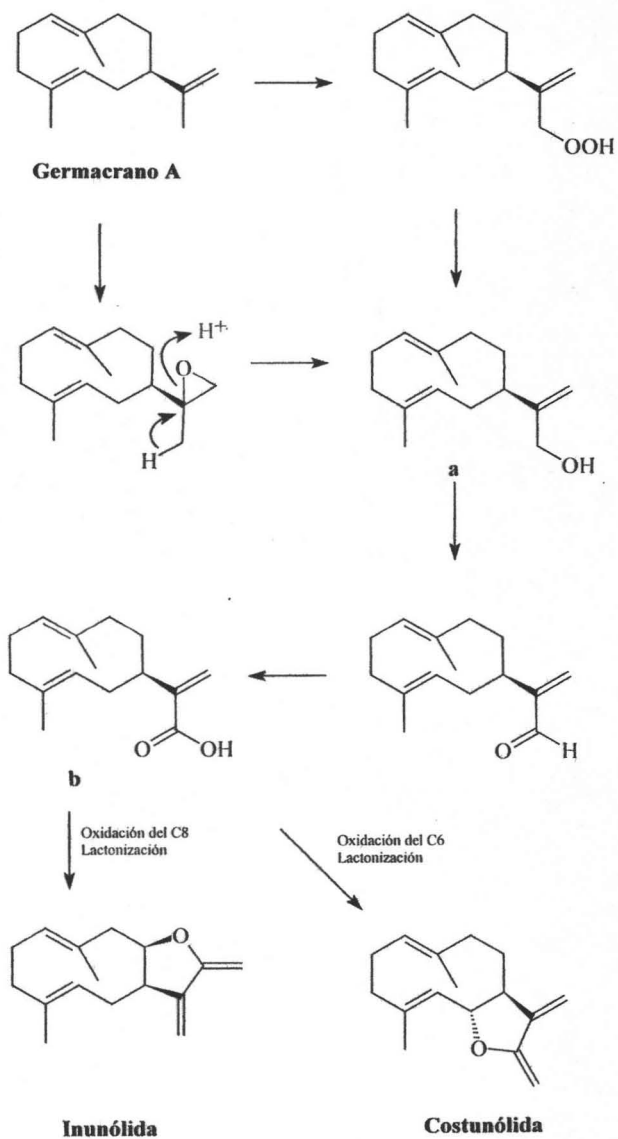
Tribu (Nº de géneros)	Géneros con lactonas sesquiterpénicas	Tipo de lactona.
Cynareae (50)	8	Elemanólidas, Eudesmanólidas, Germacranólidas y Guaianólidas
Eupatorieae (50)	4	Ambrosanólidas, Elemanólidas, Germacranólidas, Guaianólidas y <i>Seco</i> - Ambrosanólidas
Heleniae (60)	11	Elemanólidas, Eudesmanólidas, Germacranólidas, Guaianólidas y Helenanólidas
Heliantheae, que incluye la subtribu Ambrosiinae (250)	24	Ambrosanólidas, Elemanólidas, Eudesmanólidas, Germacranólidas, Guaianólidas, Helenanólidas, <i>Seco</i> - Ambrosanólidas, <i>Seco</i> -Eudesmanólidas, <i>Seco</i> - Helenanólidas y Xantanólidas
Inuleae (300)	5	Ambrosanólidas, Elemanólidas, Germacranólidas, Guaianólidas, Helenanólidas, <i>Seco</i> - Ambrosanólidas, <i>Seco</i> -Eudesmanólidas y Xantanólidas
Mutiseae (50)	1	Eudesmanólidas
Senecionae (50)	4	Baquenólidas, Eremofilanólidas, Germacranólidas, Helenanólidas y Xantanólidas
Tageteae (15)	0	Ninguno
Vernoniae (50)	4	Elemanólidas, Germacranólidas, Guaianólidas

Las lactonas sesquiterpénicas, proceden de las reacciones de ciclación del PPF, en particular sobre la molécula del *trans-trans*-pirofosfato de farnesilo, de la cual se originan los germacranos, (Esquema 2).<sup>11, 14-16</sup>



Esquema 2.- Transformación del PPF al germacrano A.

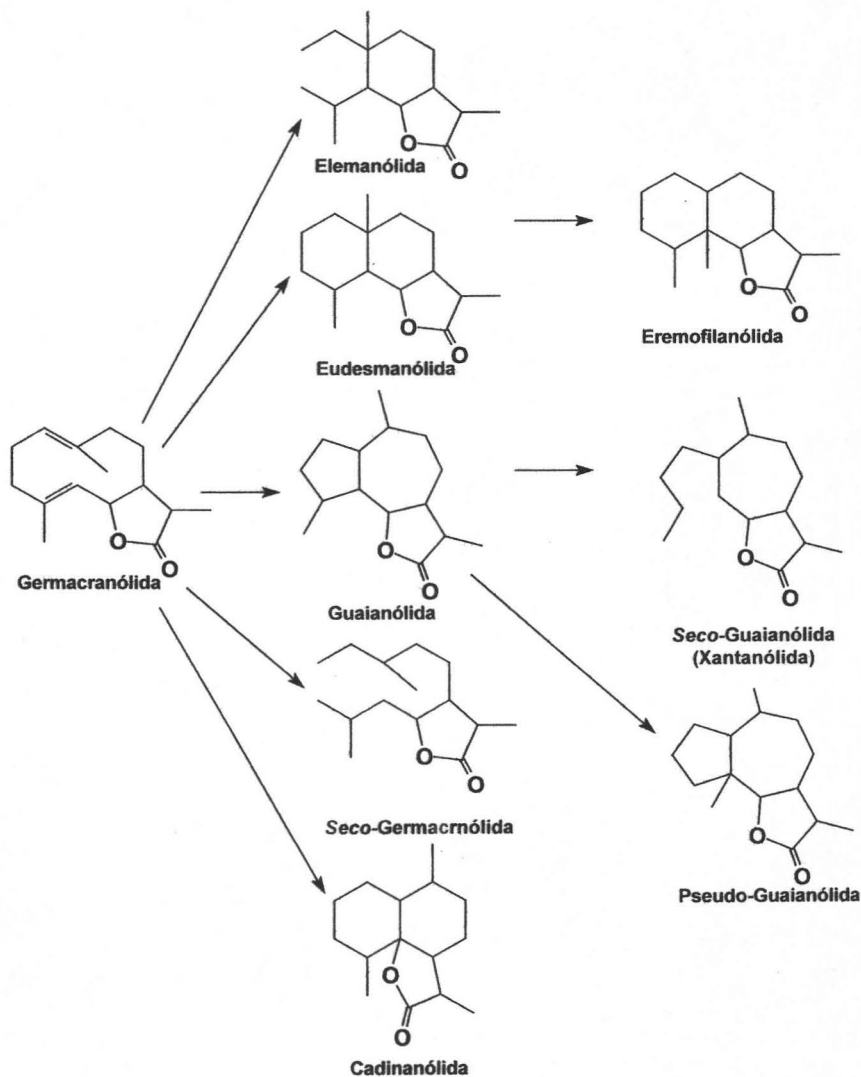
Se han sugerido dos posibles vías biogénicas para la formación del anillo lactónico, a partir del germacrano A, la biogénesis de la inunólida y costunólida, en éstas el sistema de germacrano constituye un intermediario hipotético entre el PPF y los anillos de los costunólidas e inunólidas; a su vez, la introducción de un oxígeno en el C-12 del germacrano A, da como resultado un alcohol (a), el cual, puede provenir de la apertura de un epóxido, o bien, por una reacción mediada enzimáticamente. Se sugiere que esta nueva estructura se oxida en etapas posteriores hasta la formación del ácido carboxílico (b) que puede generar una lactona 12, 6 ó 12, 8, (Esquema 3).



Esquema 3.- Biogénesis del anillo lactónico.

Se ha propuesto a través de reacciones biomiméticas que algunos terpenoides ya formados pueden presentar posteriores reacciones de ciclación intramoleculares y generar una

nueva serie de estructuras, tal es el caso del esqueleto de la germacranólida. Al respecto se ha demostrado que ésta, da origen a una serie estructuras sesquiterpénicas tales como: elemanólida, pseudoguayanólida, eudesmanólida, guayanólida, xantanólida, pseudoesmanólida, cadinanólida, *seco*-germacranólida, (Esquema 4).<sup>16</sup>



Esquema 4.- Relación estructural entre una germacranólida y otros sesquiterpenos.

Cabe mencionar que existen tres tipos de lactonas sesquiterpénicas, las cuales pueden ser endocíclicas  $\alpha$ ,  $\beta$ , insaturadas (a), exocíclicas  $\alpha$ ,  $\beta$ , insaturadas (b) o bien ciclopentanonas (c), (Figura 4).

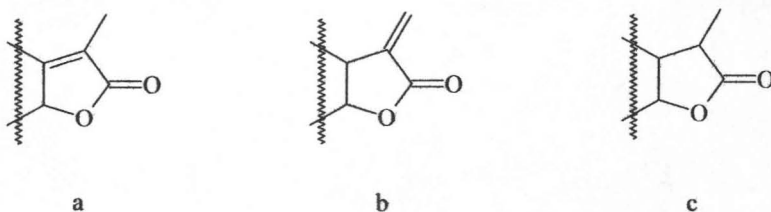


Figura 4.

◆ **Actividad Biológica de las Lactonas Sesquiterpénicas**

La bioactividad de estos compuestos ha sido revisada por una gran cantidad de autores, ya sea como un grupo, o bien estudiando algunos de sus representantes, actualmente se conoce una gama muy grande de actividades biológicas atribuidas a este tipo de compuestos, algunas de las cuales se enumeran en la Tabla 3. <sup>1, 11-13, 17-22</sup>

Tabla 3. Efectos de las lactonas sesquiterpénicas

Alelopático	Antitumoral	Hipotensivo
Alergeno	Antiulceroso	Insecticida
Analgésico	Antiprotozoarios	Moluscocida
Antelmintico	Cardiotóxico	Mutagénico
Anticolinérgico	Cardiotónico	Esquistosomicida
Antiartrítico	Colinérgico	Sedante
Antiasmático	Estimulante del SNC	Antiviral
Antibacterial	Citotóxico	Regulador genético
Antifúngico	Diurético	Clastogénico
Antihiperlipidémico	Genotóxico	Inmunosupresivos
Antiinflamatorio	Hipoglicémico	Anorexigénico

La citotoxicidad de las lactonas sesquiterpénicas y una amplia variedad de efectos biológicos de importancia, por ejemplo su actividad antiinflamatoria, se ha atribuido a que estos compuestos son capaces de establecer enlaces covalentes con los grupos sulfidrilo de proteínas funcionales (generalmente enzimas). Sus sistemas electrofílicos  $\alpha$ - $\beta$ -insaturados, pueden producir reacciones de adición tipo Michael, por lo que se sugiere tienen características alquilantes. Al respecto, se sabe que los restos de cisteína en los polipéptidos, son un blanco para la reacción antes mencionada, ya que este aminoácido, posee azufre en su estructura.<sup>11</sup>

19-21, 23-28

Dado que, el mecanismo de acción de las lactonas sesquiterpénicas ha sido investigado intensamente, es posible mencionar algunos de sus blancos moleculares como: la fosfatasa ácida, la aril sulfatasa, catepsinas, ciclooxigenasa, glucógeno sintetasa, 5-lipoxigenasa, fosfofructocinasa, fosfolipasa A<sub>2</sub>, glutatión reducido, timidilato sintasa, iosina monofosfato deshidrogenasa, el ADN y ARN y sus enzimas sintetetas.<sup>1, 11, 19, 24, 26</sup> Recientemente las investigaciones acerca de la actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas se han enfocado en la elucidaciones de los efectos antiinflamatorios, por lo que es posible mencionar algunas de ellas entre las que se encuentran, la actividad catalítica sobre elastasa de neutrófilos, la exocitosis de catepsina G y fosfatasa ácida de gránulos azurofílicos, así como también la liberación de histamina y serotonina de células sanguíneas.<sup>22, 27, 29-36</sup> Al respecto es necesario resaltar la importancia de la inhibición del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), que si bien ha sido intensamente estudiado por su participación en procesos inflamatorios e inmunológicos, también regula la proliferación y migración celular así como la apoptosis.<sup>20, 23-25, 36-38</sup>

La intervención de las lactonas sesquiterpénicas en algunos otros procesos está implicada también en la citotoxicidad vía apoptosis, acerca de ello, se menciona su interacción con el proceso energético de las mitocondrias; así como en la supresión de la proteína pro-

apoptótica Bcl-2 y expresión y activación de la caspasa 3, resultando el arresto del ciclo celular además de la fragmentación del ADN.<sup>20, 21, 24</sup>

Asimismo pueden afectar a la célula, induciendo un daño letal directo al material genético provocando la ruptura cromosomal, e incluso se sabe que afectan la organización y reorganización nuclear al alterar la arquitectura de los microtúbulos.<sup>17, 26</sup>

Existen factores, que incrementan o no la interacción de las lactonas con las moléculas biológicas como: el carácter lipofílico (Log P, KD), que generalmente las hace más o menos citotóxicas; el tamaño de los sustituyentes, que afecta la flexibilidad de la molécula; la dosis; la cantidad de cisteína, que es quizá la causa de una mayor o menor susceptibilidad por células de diferentes tejidos o líneas celulares; el número de sitios  $\alpha$ - $\beta$ -insaturados y de grupos sulfidrilo; el pH del medio, entre otros.<sup>17, 18, 20, 25-27, 39-45</sup>

## ◆ PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

### ◆ Constante de Partición y Log P

En la naturaleza una de las estructuras más importantes para la vida es la membrana plasmática, ya que, esta es una barrera de permeabilidad selectiva entre la célula y el medio extracelular. Sus propiedades de permeabilidad aseguran que las sustancias esenciales, como la glucosa, los aminoácidos y los lípidos, entren a la célula con facilidad, que los intermediarios metabólicos permanezcan en el interior y que los compuestos de desecho la abandonen. Es decir, la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática permite que la célula mantenga un medio interno constante.<sup>46</sup>

La bicapa fosfolipídica es esencialmente impermeable a la mayor parte de las sustancias hidrosolubles, como la glucosa, los aminoácidos y a los iones. El transporte de estas moléculas a través de las membranas celulares es mediado por proteínas transportadoras asociadas



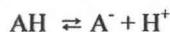
con la biocapa. Sin embargo, existen moléculas pequeñas que pueden atravesar las membranas celulares por difusión pasiva, sin la ayuda de proteínas; a favor de la concentración. Esto es, son capaces de acceder al interior de la célula por gradiente de concentración.<sup>47</sup>

El primer paso en el transporte por difusión pasiva es el movimiento de un compuesto, desde la solución acuosa, hacia el interior hidrófobo de la biocapa fosfolipídica. Este proceso, del flujo total de una molécula en la interfase de dos medios inmiscibles es gobernado por su liposolubilidad. Cuanto más lipofílica una molécula es, más soluble será en una fase orgánica. Por lo tanto, en estas condiciones, la penetración de cualquier sustancia, a una membrana biológica, es influenciada por su carácter lipofílico; ya que, prácticamente no hay especificidad en este proceso, una molécula hidrófoba pequeña cualesquiera, puede ser transportada. La hidrofobicidad de una sustancia se mide por su Coeficiente de Partición (KD), que es la constante de equilibrio para su partición entre el agua y el octanol, relación que se ha adoptado como la medida estándar de liposolubilidad;<sup>47-50</sup> debido a que la composición del interior de la capa fosfolipídica es no polar al igual que el octanol. El Coeficiente de Partición de una sustancia que atraviesa la biocapa es igual a la proporción entre su concentración justo dentro del centro hidrófobo ( $C^m$ ) y la concentración en la fase acuosa ( $C^a$ ):

$$K = \frac{C^m}{C^a}$$

El Coeficiente de Partición, por lo tanto, se calcula como el cociente de la concentración del compuesto en octanol sobre la concentración del compuesto en agua. Y es diferente al coeficiente de distribución que es el cociente de la suma de las concentraciones de todas las especies del compuesto en octanol, sobre la suma de las concentraciones de todas las especies del compuesto en agua, referido obviamente a moléculas ionizables que a diferentes

valores de pH presentan un comportamiento lipofílico diferente.<sup>49</sup> De acuerdo con reacciones ácidas de disociación, se puede introducir el concepto de un coeficiente de partición para la especie catiónica; la aniónica y para la especie neutral. Lo que da la definición de los coeficientes de partición y de distribución para especies ionizadas y no ionizadas.



$$P_0 = \frac{[AH]_{\text{octanol}}}{[AH]_{\text{agua}}} \quad P_i = \frac{[A^-]_{\text{octanol}}}{[A^-]_{\text{agua}}} \quad D = \frac{[AH]_{\text{octanol}} + [A^-]_{\text{octanol}}}{[AH]_{\text{agua}} + [A^-]_{\text{agua}}}$$



$$P_0 = \frac{[RNH_2]_{\text{octanol}}}{[RNH_2]_{\text{agua}}} \quad P_i = \frac{[RNH_3^+]_{\text{octanol}}}{[RNH_3^+]_{\text{agua}}} \quad D = \frac{[RNH_2]_{\text{octanol}} + [RNH_3^+]_{\text{octanol}}}{[RNH_2]_{\text{agua}} + [RNH_3^+]_{\text{agua}}}$$

Los coeficientes de partición y de distribución para los compuestos multipróticos se definen en mucho de la misma manera que para los compuestos monopróticos, de la siguiente forma.<sup>49</sup>

$$P_0 = \frac{[\text{La suma de las concentraciones de las especies neutrales}]_{\text{octanol}}}{[\text{La suma de las concentraciones de las especies neutrales}]_{\text{agua}}}$$

$$P_i = \frac{[\text{La suma de las concentraciones de las microespecies con carga}]_{\text{octanol}}}{[\text{La suma de las concentraciones de las microespecies con carga}]_{\text{agua}}}$$

$$D = \frac{[\text{La suma de las concentraciones de todas las microespecies}]_{\text{octanol}}}{[\text{La suma de las concentraciones de todas microespecies}]_{\text{agua}}}$$

Para los casos previos  $P_0$  se refiere al KD de las especies no ionizadas,  $P_i$  al de las especies ionizadas y D al coeficiente de distribución.

El Coeficiente de Partición, es entonces, la medida de la afinidad relativa de una sustancia por los lípidos, versus el agua: cuanto más grande es el valor de KD la liposolubilidad es mayor. Se dice que un compuesto con un KD bajo ( $< 10$ ) puede ser considerado como hidrofílico, mientras que un KD alto ( $> 10^4$ ) será muy hidrofóbico.<sup>51</sup> En general se sabe que el intervalo del Coeficiente de partición va de  $10^{-3}$  hasta  $10^7$ , o bien en términos del logaritmo del Coeficiente de Partición (Log P) de -3 a 7.<sup>44, 49-53</sup>

Durante la determinación del KD, deben ser tomadas algunas consideraciones como, la pureza de las fases, o bien, que es preferible una concentración menor de 0.01 mol/L del soluto; en general la medición del KD se hace a condiciones estándar de temperatura (25 °C), aunque, este es un parámetro que realmente no afecta su medición, ya que la variación se da en tan solo, 0.001 - 0.01 unidades de Log P por grado. Es necesario mencionar, que el coeficiente de partición octanol/agua, es diferente al cociente de la solubilidad de un compuesto en agua sobre la de octanol, debido a que, para el KD la medición se hace a un sistema de fases de gran interacción, ya que, en el equilibrio la fase orgánica contienen 2.3 mol/L de agua, y la fase acuosa contiene  $4.5 \times 10^{-8}$  mol/L de octanol. Es importante mencionar que, comúnmente el KD esta en función de la concentración del soluto.<sup>52</sup>

El valor del Coeficiente de Partición o del Log P, ha sido correlacionado a la absorción de fármacos, toxicidad, carcinogenicidad, interacción fármaco receptor, al metabolismo de las moléculas, a la viabilidad y a varias propiedades moleculares.<sup>50</sup> Este parámetro se encuentra definido experimentalmente para muchas moléculas, pero aun existe una gran cantidad de compuestos en los que tales valores son desconocidos, como los nuevos productos de síntesis y/o cuando la determinación experimental resulta bastante difícil o está sujeta a grandes

incertidumbres. Cabe mencionar, sin embargo, que a la fecha no existe ningún método teórico matemático que pueda resolver las incertidumbres con precisión, por lo que si bien los sofisticados programas computacionales cada día alcanzan un mayor perfeccionamiento, la determinación experimental, sigue aportando los resultados más confiables.

Las relaciones estructura/propiedad, han sido ampliamente reportadas en los últimos años. Éstas son indiscutiblemente de gran importancia en la química moderna, bioquímica y la química medicinal (actividades biológicas). Sin embargo el principal objetivo de estos estudios de relación estructura-propiedad, es encontrar una relación matemática entre la propiedad bajo investigación (por ejemplo Pka, el coeficiente de la partición, etc.), y uno o más parámetros descriptivos relacionados con la estructura de la molécula. <sup>48</sup>

◆ **Constante Hidrofóbica ( $\pi$ )**

Se han desarrollado varios métodos de evaluación teóricos, basados en la relación cuantitativa estructura-propiedad, ampliamente reportados en años recientes. El primer método para evaluar de Log P se propuso por Fujita, Iwasa, y Hansch (1964). Bajo su perspectiva, consideran que el log P es un aditivo-constitutivo, propiedad relacionada con la energía libre que es numéricamente igual a la suma del log P del compuesto padre más " $\pi$ ", un término que representa la diferencia entre el log P de un sustituyente particular y el átomo de hidrógeno que está siendo reemplazado. La forma general de la ecuación se da a continuación:

$$\pi X = \log P(PX) - \log P(PH)$$

Donde P (PX) es el coeficiente de partición de un derivado aromático y P (PH) indica que proviene del compuesto padre. <sup>48</sup>

◆ **Energía Libre de Gibbs ( $\Delta G$ ).**

La producción, almacenamiento y uso de la energía son fundamentales para la economía de la célula (unidad funcional biológica); al respecto, se conocen dos formas principales de energía: cinética y potencial. La primera se refiere al movimiento, por ejemplo, el de las moléculas. La segunda forma, es la energía potencial o almacenada, que es la más importante para el estudio de los sistemas biológicos o químicos.

Varias formas de energía potencial tienen importancia biológica; por ejemplo, para la biología es fundamental la energía almacenada en los enlaces de los átomos que forman las moléculas; de hecho, en la mayoría de las reacciones bioquímicas interviene la formación o ruptura de por lo menos un enlace químico covalente. Se reconoce esta energía cuando los enlaces químicos forman parte de reacciones que liberan energía. Por ejemplo, las células degradan constantemente la glucosa y la energía liberada durante su metabolismo, es aprovechada para realizar diferentes tipos de trabajo.

Una segunda forma de energía potencial con importancia biológica, es la energía de gradiente de concentración. Por ejemplo, cuando la concentración de una sustancia a un lado de una barrera permeable, como una membrana, es diferente a la del otro lado, se obtiene como resultado un gradiente. Todas las células crean gradiente de concentración, entre su interior y los líquidos externos, mediante el intercambio selectivo con el medio circundante de nutrientes, productos de desecho, iones y fármacos. Además, a menudo los compartimentos intracelulares contienen diferentes concentraciones de iones y otras moléculas; la concentración de protones dentro de los lisosomas es aproximadamente 500 veces la del citosol.

La tercer forma de energía potencial en las células es el potencial eléctrico, la energía de separación de cargas. Por ejemplo, hay un gradiente de carga eléctrica de aproximadamente 200,000 volts/cm a través de la membrana plasmática, de casi todas las células. <sup>46, 47, 54-56</sup>

Debido a que los sistemas biológicos, por lo general, operan a temperatura y presión constantes, es posible, retomar un concepto termodinámico, determinado por el químico norteamericano Josiah W. Gibbs, quien demostró que en condiciones de temperatura y presión constantes “todos los sistemas cambian de modo tal que la energía libre se reduce a un mínimo”. El cambio en la energía libre ( $\Delta G$ ), corresponde entonces, a la parte del cambio en la energía total de un sistema, disponible para realizar trabajo; es decir, constituye la energía útil.<sup>54</sup>

A temperatura y presión constantes, dos factores determinan la  $\Delta G$  de una reacción y en consecuencia, la tendencia a producirse: la entalpía (la variación de la energía de los enlaces), y la entropía (la variación de la aleatoriedad del sistema). Gibbs demostró, que la energía libre se puede definir de la siguiente forma

$$G = H - TS$$

donde H es la entalpía, S la entropía, y T la temperatura en grados kelvin.

En condiciones de temperatura constante una reacción es espontánea, solo si la variación de la energía libre ( $\Delta G$ ) es negativa en la siguiente ecuación:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Es posible entender mejor, el término entalpía si la aplicamos al desarrollo de las reacciones químicas; en una reacción exotérmica (exergónica para procesos biológicos), los productos contienen menos energía de enlace que los reactantes, la energía liberada por lo general se convierte en calor (la energía de la movilidad molecular) y  $\Delta H$  es negativa. En una reacción endérgica (endotérmica), los productos contienen más energía de enlace que

los reactantes, se absorbe calor y  $\Delta H$  es positiva. Las reacciones son espontáneas solo si  $\Delta H$  es menor a 0, es decir, si es negativa; de la misma forma que ocurre con  $\Delta G$ . Por otro lado, para esclarecer el concepto entropía es posible referirse a un sistema con gradiente de concentración, donde la entropía será menor antes de que se de la difusión, y alcanzará su punto mas alto, cuando el sistema alcance el equilibrio, ya que en tal situación las moléculas se encontrarán en un volumen mayor, y por tanto el desorden se incrementará. Por lo que, cuando la entalpía decrece la entropía aumenta.

A menudo una célula necesita acumular compuestos químicos, como la glucosa o iones  $K^+$ , en concentraciones mayores a las que existen en el medio. En consecuencia, deberá trasportar estos compuestos químicos contra un gradiente de concentración. Para calcular la cantidad de energía requerida para transferir 1 mol de una sustancia desde el exterior de la célula hacia su interior, se utiliza la ecuación: <sup>47</sup>

$$\Delta G = RT \ln K_{eq} = RT \ln C_2/C_1$$

ó en términos de logaritmo base 10:

$$\Delta G = 2.303 RT \log K_{eq}$$

Donde  $R$  es la constante de los gases, 1.987 cal/(K mol),  $T$  es la temperatura en grados Kelvin, mientras que,  $C_2$  es la concentración final de una sustancia dentro de la célula y  $C_1$  es la concentración afuera. Si en lugar del valor de 1.987 cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> para la constante  $R$  se utiliza el equivalente de 8.314 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>, el valor de la energía esta dada en J mol<sup>-1</sup> en lugar de cal mol<sup>-1</sup>.

Dado que el transporte de las moléculas en contra del gradiente de concentración ( $C_2 < C_1$ ), tiene una  $\Delta G$  positiva, no es espontáneo, y por lo tanto, éste solo se llevará a cabo si

existe energía química celular, a menudo provista por la hidrólisis de ATP. Por el contrario, cuando una sustancia se desplaza a favor de su gradiente de concentración ( $C_2 > C_1$ ), es decir, cuando el movimiento va desde donde hay mayor cantidad de la moléculas, hacia donde hay menor cantidad, este compuesto puede atravesar la membrana por difusión pasiva (no se consume energía), por lo que,  $\Delta G$  tiene un valor negativo. La velocidad de difusión relativa de una sustancia a través de la bicapa es proporcional a su gradiente de concentración a través de ésta y a su hidrofobicidad.

En teoría la magnitud del Coeficiente de Partición es determinada por el cambio en la energía libre de Gibbs, en un sistema experimental octanol/agua, para el desplazamiento del compuesto del agua al disolvente no polar. El equilibrio del Coeficiente de Partición (KD) se relaciona con la energía libre de Gibbs <sup>48</sup>, con la siguiente relación (asumiendo que los volúmenes molares de los dos sistemas de disolventes son similares):

$$\ln KD = -\Delta G / (RT)$$

Vale la pena mencionar, que la energía libre de Gibbs para transferir una molécula del agua a un disolvente orgánico depende de la compatibilidad de dicho compuesto con las dos fases inmiscibles.

Es importante resaltar, que tanto la entalpía como la energía de Gibbs de transferencia son alteradas significativamente por la presencia del otro disolvente (agua en octanol o viceversa) aun en pequeñas cantidades; ya que, las propiedades termodinámicas de cualquier sustancia pura son determinadas por fuerzas intermoleculares que operan entre las moléculas de esta. <sup>48</sup>



Particularmente en este trabajo de Tesis, se presentan los resultados de pruebas biológicas realizadas a un conjunto de moléculas conocidas como lactonas sesquiterpénicas (C15), de las que, tres fueron aisladas de 2 especímenes vegetales del género *Vernonia* y dos más son productos de transformaciones químicas; Así como también, algunas de sus propiedades fisicoquímicas ( $K_D$ ,  $\text{Log } P$ ,  $\Delta G$ ,  $\pi$ ) determinadas experimentalmente, a fin de establecer, una posible correlación entre estos aspectos.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---

### ◆ HIPÓTESIS

El carácter hidrofílico/hidrofóbico de una molécula es una propiedad que determina en menor o mayor grado su actividad biológica; por ende, si se determinan las propiedades fisicoquímicas  $KD$ ,  $\text{Log } P$ ,  $\Delta G$  y  $\pi$ , de una serie de lactonas sesquiterpénicas, éstas se podrán correlacionar convenientemente con el efecto citotóxico de las moléculas objetivo.

### ◆ OBJETIVO GENERAL

Determinar experimentalmente los parámetros fisicoquímicos:  $KD$ ,  $\text{Log } P$ ,  $\Delta G$  y  $\pi$ , de una serie de lactonas sesquiterpénicas mediante espectrofotometría de absorción UV-visible; así como, su actividad citotóxica, sobre células neoplásicas K562 y linfocitos T humanos (MT2), a efecto de determinar la correlación entre ambas propiedades.

## ◆ OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ Aislar del espécimen vegetal *Vernonia salicifolia* las glaucólidas A y D, y de *Critoniopsis uniflora*, la glaucólida E.
- ◆ Llevar a cabo dos transformaciones químicas de la glaucólida E, a fin de generar un producto de hidrogenación y uno más de ciclación.
- ◆ Caracterizar e identificar, las moléculas aisladas por medio de métodos espectroscópicos comunes como son: resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ; espectrometría de masas, espectrofotometría de absorción infrarroja; así como por comparación con muestras auténticas.
- ◆ Determinar experimentalmente los valores del coeficiente de partición, de cada una de las moléculas en estudio y en consecuencia calcular los parámetros fisicoquímicos:  $\text{Log P}$ ,  $\pi$ , y  $\Delta G$ .
- ◆ Evaluar el efecto citotóxico de cada uno de los compuestos obtenidos, sobre células neoplásicas K562 y linfocitos T humanos (MT2), mediante el método colorimétrico de Mosmann.
- ◆ Analizar si existe o no una correlación entre la actividad citotóxica y el  $\text{Log P}$ .

# **DESARROLLO EXPERIMENTAL**

---

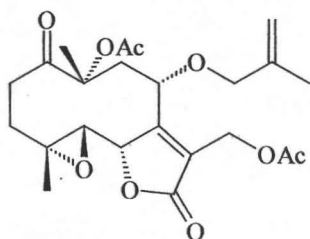
## ◆ MATERIALES

Los disolventes empleados (AcOEt, *n*-Hexano y metanol), fueron destilados antes de ser usados. El Tonsil Actisil FF se activó a 100 °C. En las determinaciones biológicas, fueron utilizados reactivos de distinta índole, los cuales son descritos a continuación, suero fetal bovino calificado y descomplementado; Buffer HEPES 1M (Gibco Cell Culture); Mezcla de antibioticos y antimicóticos 100x (Gibco Cell Culture); Mezcla de aminoácidos no esenciales 10mM (Gibco Cell Culture); Medio RPMI 1640, con L-Glutamina y rojo de fenol. Las células de experimentación son células neoplásicas K562 y los linfocitos sanos T. Se empleo 1-octanol marca Sigma grado espectrofotométrico, y agua desionizada para la formación de los sistemas octanol/agua. Para seguir el desarrollo de las diferentes reacciones se realizaron muestreos, con cromatografía en placa fina, con cromatofolios de sílice gel 60F<sub>254</sub> marca MERCK; asimismo para la cromatografía en columna, se utilizó gel de sílice 60, con un tamaño de partícula de 0.063-200 mm marca MERCK. La reacción de hidrogenación se llevó a cabo en un hidrogenador sencillo. Para la reacción con microondas se empleo un reactor modelo: MW1235WB; con una salida de frecuencia de 2450 MHz. Los espectros de RMN<sup>1</sup>H se obtuvieron en un aparato Varian XR-300 a 300 MHz, utilizando disolventes deuterados y como referencia interna al tetrametilsilano. Los espectros de RMN<sup>13</sup>C se obtuvieron en un aparato Varian, modelo Geminis 300, a 75 MHz y TMS como referencia interna. Los espectros de masa fueron determinados en un aparato JEOL JMS-SX102A mediante la técnica de impacto electrónico a 70 eV. Para la agitación de los sistemas octanol/agua, se utilizó un rotador de placas de ELISA giratorio, modelo: 3-D ROTATOR, marca LAB-LINE. La determinación de las absorbancias se obtuvo mediante un espectrofotómetro de luz visible, Perkin Elmer Instruments, modelo Lambda 25.

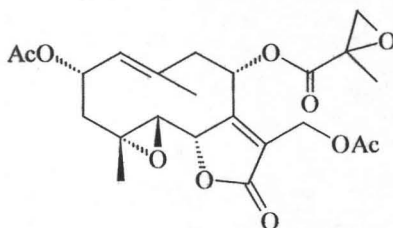
## ◆ METODOLOGIA

### ◆ Aislamiento de las Glaucolidas A y D del Espécimen Vegetal *Vernonia salicifolia*.

El espécimen vegetal fue recolectado en Valsequillo Puebla, México, en Octubre de 1995. La parte aérea, se seco y molió (256 g), acto seguido se extrajo sucesivamente con *n*-hexano, acetato de etilo y metanol. El extracto de acetato de etilo se concentró a presión reducida, obteniéndose 8.85 g de un polvo verdoso amorfo; éste, posteriormente se fraccionó, utilizando para ello una columna cromatográfica. Como fase móvil, se uso una mezcla de *n*-hexano-AcOEt (3:1). De esta columna se aislaron las Glaucolidas A (**1**) (0.8 g) y D (**2**) (2.95 g). La identificación de estos compuestos se logró mediante la comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con aquellos publicados, así como por la comparación con muestras auténticas mediante cromatografía en capa fina.



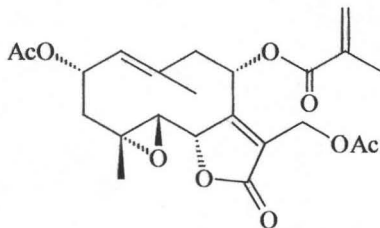
1



2

◆ **Aislamiento de la Glaucólida E, del Espécimen Vegetal *Critoniopsis uniflora* (S.H.BRP).**

El espécimen vegetal fue recolectado en Huajuapán de León, Oaxaca, México, en agosto de 2001. La parte aérea, seca y molida de la planta (1.2 kg) se extrajo sucesivamente con *n*-hexano, acetato de etilo y metanol. El extracto de acetato de etilo se concentró a presión reducida, obteniéndose 250 g de una sustancia amorfa, de la que luego de recristalizarse con una mezcla de *n*-Hexano y AcOEt, se aisló, un producto blanco amorfo. Éste se comparó con muestras auténticas, determinando que se trata de la Glaucólida E (3); Complementariamente se confirmó la estructura, por medio de los datos de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , comparados con los reportados en la literatura.<sup>9</sup>



3

◆ **Hidrogenación de la Glaucólida E.**

Se disolvieron 700 mg de la Glaucólida E, en presencia de 103 mg de Pt/C, en 50 mL de AcOEt anhidro. La mezcla se colocó en el hidrogenador por espacio de 72 h a temperatura ambiente y a 1 atmósfera de presión; la mezcla posteriormente se filtró, evaporándose el disolvente a presión reducida. El compuesto (4), resultó en un polvo blanco que se recristalizó, caracterizándose posteriormente por medio de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , IR y EM.



**◆ Reacción de Ciclación de la Glaucólida E.**

Se mezclaron 1 g de Glaucólida E con 3 g de Tonsil Actisil FF (TAFF) activado en un matraz Erlenmeyer; la mezcla se colocó en un reactor de microondas y se irradió durante 2:50 minutos, con el 100 % de la potencia. Luego se adicionaron 10 mL de acetato de etilo y la mezcla se filtró a través de una cama de celita. Posteriormente el disolvente se evaporó a presión reducida; finalmente se obtuvo un polvo blanco que se caracterizó mediante RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , IR; (Compuesto 5)

**◆ Determinación Experimental del Coeficiente de Partición.**

Para determinar el coeficiente de reparto experimental de las cinco lactonas sesquiterpénicas estudiadas, se procedió de la siguiente manera: Se obtuvieron los máximos de absorbancia que presenta cada una de las moléculas objetivo, por medio de un barrido en un intervalo entre 1100 y 190 nm, para lo cual se usaron concentraciones de entre 0.006 mg/mL y 0.22 mg/mL del compuesto en octanol, cuidando que la absorbancia se encontrara entre 0.2 y 0.8. Por otro lado, se llevo a cabo una cinética de extracción, para determinar el tiempo adecuado de agitación, usando la siguiente metodología: Se preparó un total de 15 tubos de ensaye con cinco mililitros de agua y un mL de una disolución de Glaucólida E en 1-octanol (0.012 mg/mL). Se dividieron en cinco grupos de 3 tubos cada uno, cada conjunto, se agitó por separado a diferentes tiempos: 6, 12, 15, 18 y 24 minutos respectivamente, en un rotador, después se dejaron reposar por 24 h. Posteriormente se cuantificó la concentración presente en el 1-octanol, por medio de espectrometría UV-visible.

Para la determinación del Coeficiente de Partición de la Glaucólida E, se prepararon 9 tubos de ensaye de 10 mL, en ocho de ellos se colocaron 5 mL de agua desionizada y 1 mL de una disolución de la Glaucólida E en 1-octanol; en un tubo más se colocó 1-octanol puro. Todos los tubos perfectamente tapados fueron agitados por 15 minutos, dejándose reposar durante 24 h. Posteriormente se separaron las fases y se tomaron 250  $\mu$ L de la fase orgánica, que se aforaron a un volumen final de 4 mL con etanol al 96 %. La concentración de la glaucólida en la fase orgánica se determinó espectrofotométricamente a 217 nm. Este proceso se realizó por triplicado para obtener un total de 24 datos que fueron analizados estadísticamente para obtener el coeficiente de variación, que no debe ser mayor a 4 %.

◆ **Determinación del Coeficiente de Partición (KD), Log P,  $\pi$ , y  $\Delta G$ .**

♣ **Coeficiente de Partición (KD).**

El coeficiente de partición, se determino a partir de los valores de absorbancia y concentración calculados experimentalmente utilizando la siguiente ecuación.

$$KD = \frac{[\text{mg/mL}]_{\text{octanol}}}{[\text{mg/mL}]_{\text{agua}}}$$

♣ **Log p**

El Log P se obtuvo al calcular el Logaritmo base 10 del Coeficiente de Partición .

$$\text{Log KD} = \text{Log P}$$

### ♣ Constante de hidrofobicidad ( $\pi$ )

Para la determinación del valor numérico de la constante hidrofóbica, se empleó la siguiente fórmula:

$$\pi X = \text{Log } P(PX) - \text{Log } P \text{ (compuesto padre)}$$

Donde P(PX) es el Coeficiente de Partición de un derivado y P (compuesto padre) se refiere al KD del compuesto 3 que en este caso se consideró como el compuesto padre.

### ♣ Energía Libre de Gibbs ( $\Delta G$ )

Para el cálculo de la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ), se consideró la formula siguiente:

$$\Delta G = - 2.303 RT \text{ Log } KD$$

Donde T es la temperatura en grados Kelvin y R es la constante de los gases, 1.987 cal/(K mol), o bien, 8.314 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> y Log KD, al logaritmo de la constante de partición correspondiente a cada caso.

### ◆ Procedimiento general *in vitro* para evaluar la citotoxicidad.

Para el ensayo de citotoxicidad (viabilidad celular) se prepararon suspensiones de células de las cepas K562 y MT2 (5 x 10<sup>4</sup> células/mL) en ambos casos en medio RPMI adicionado con 10% de suero fetal bovino, L-glutamina, antibiótico, antimicótico, Buffer HEPES y aminoácidos no esenciales; por otro lado, se prepararon placas de ELISA donde se colocaron 100  $\mu$ L de las suspensiones de células previamente preparadas y se dejaron en acondicionamiento por 24 horas en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37 °C.

Posteriormente se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de una disolución del compuesto a evaluar necesarios para alcanzar concentraciones de 30, 15, 7.5 y 3  $\mu\text{M}$  en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . El efecto citotóxico se evaluó a las 48 h de la adición del compuesto, para lo cual, se usó una disolución al 0.5% de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio, y se dejó actuar por 4 h; posteriormente se retiró el sobrenadante y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de DMSO. A continuación, se determinó la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas UV visible, la absorbancia obtenida es directamente proporcional al número de células viables. Con los datos obtenidos se determinaron los  $\text{CI}_{50}$  de cada compuesto.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

### ◆ OBTENCIÓN DE LACTONAS

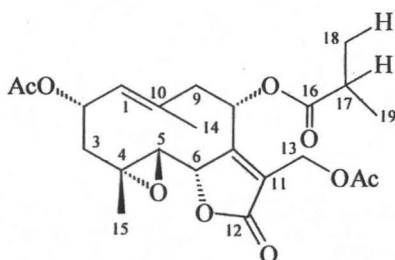
Las Glaucolidas A (1) y D (2), presentaron puntos de fusión de 153-154 °C y 182-185 °C respectivamente, éstas fueron aisladas del espécimen vegetal *Vernonia salicifolia* con un rendimiento de 0.31% (0.8 g) y 1.15% (2.95 g). Asimismo, de *Critoniopsis uniflora* (S.H.BRP), se aisló 83.5 g de la Glaucolida E (3), de p.f. 140-145, con un rendimiento del 7%. Los datos espectroscópicos de RMN<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, así como, los puntos de fusión de los compuestos 1, 2 y 3 se compararon con los reportados en la literatura<sup>9</sup>, determinándose que se trata de las moléculas esperadas.

### ◆ HIDROGENACIÓN DE LA GLAUCÓLIDA E

De la reacción de hidrogenación de la Glaucolida E se aislaron 486 mg de un compuesto blanco, con un intervalo de fusión de 167-170 °C.

Mediante el ión molecular 450 *m/z*, obtenido por espectrometría de masas, por medio de la técnica de impacto electrónico, se determinó que el producto de hidrogenación de la Glaucolida E presenta un incremento en la masa molecular en dos unidades, con respecto al peso original, debido a la adición de dos átomos de hidrógeno.

De la comparación de los espectros de RMN<sup>1</sup>H de la Glaucolida E y del producto de hidrogenación, se estableció que el metileno del metacrilato de la posición 8 se hidrogenó, ya que, el par de señales dobles en aproximadamente 5.6 y 6.1 ppm que corresponden a los dos protones metilénicos del metacrilato (en la Glaucolida 3), no se encuentran en el producto de hidrogenación. Cabe señalar que el resto de las señales en ambos espectros permanecen constantes; por lo anterior se sugiere como estructura a 4 para el producto de esta reacción.



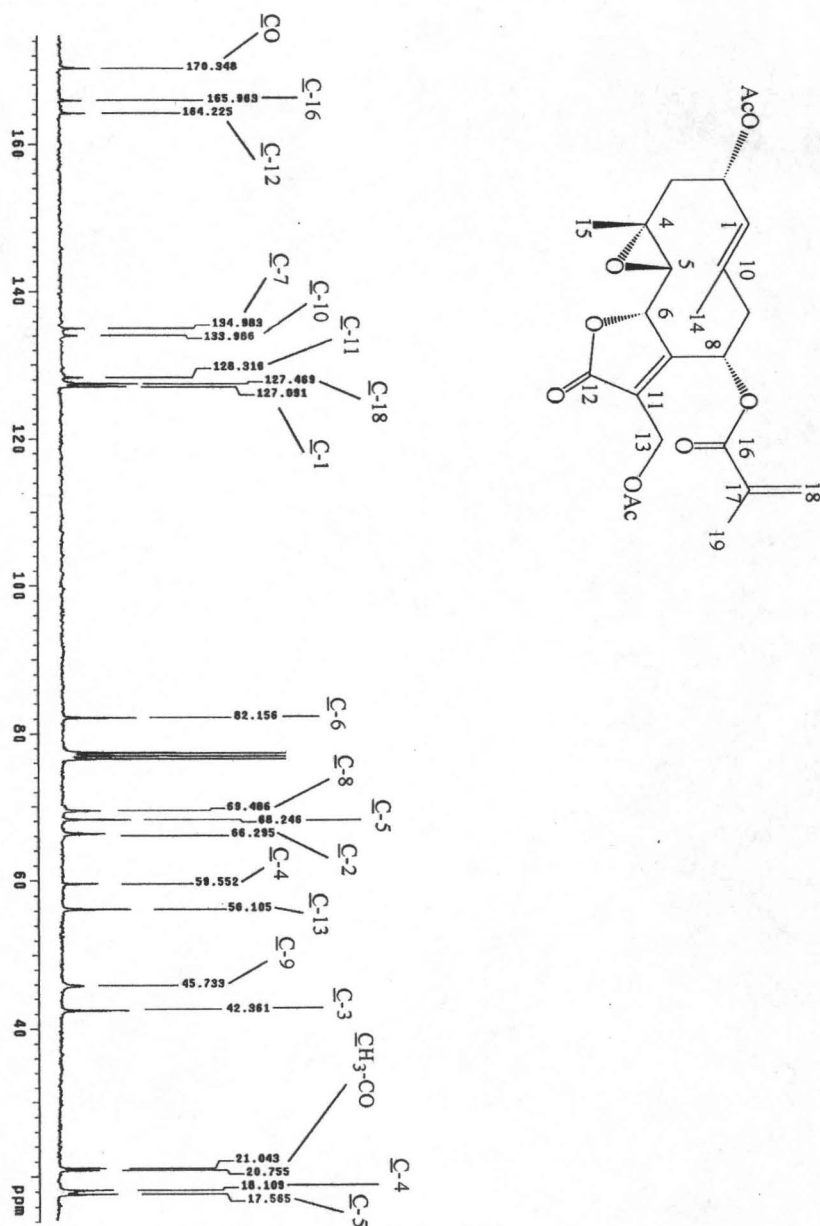
4

RMN<sup>1</sup>H (300 MHz) CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 1.36 (s, 3H, H-15), 2.01 (s, 1H, H-14), 2.45 (d, *J*=9 Hz, 1H, H-5), 2.58 (dd, *J*=7, 10 Hz, 2H, H-3), 2.60 (d, *J*=13 Hz, 1H, H-9), 2.93 (dd, *J*=11, 13, Hz, 1H, H-9), 4.75 (d, *J*=9 Hz, 1H, H-6), 5.15 (*J*=10 Hz, 1H, H-1), 5.02 (d, *J*=13 Hz, 1H, H-13), 5.56 (ddd, *J*=7, 10, 12 Hz, H-2); EM IE (70 eV) *m/z* (%ar): 450 (3.52) M<sup>+</sup>, 390 (9.15), 331 (3.5), 260 (7.7), 43 (100). IR (CHCl<sub>3</sub>) ν max cm<sup>-1</sup>: 3594 (γ-lactona), 1738 (carbonilo éster).

#### ◆ REACCIÓN DE CICLACIÓN DE LA GLAUCÓLIDA E

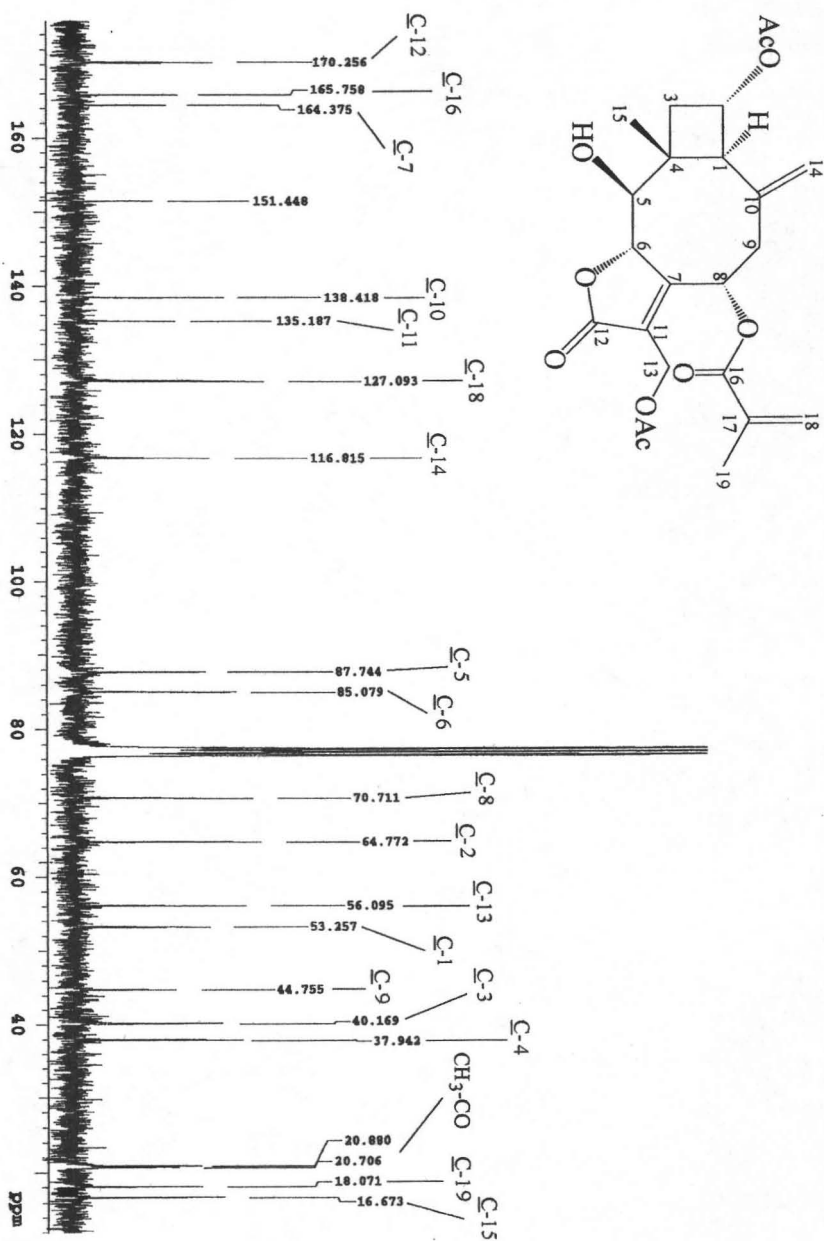
La reacción de la Glaucólida E, bajo condiciones energéticas de microondas produjo el compuesto 5, del que se obtuvieron 723 mg en forma de polvo color blanco, con un rendimiento de 72.3% y un punto de fusión de 159-161 °C.

La comparación de los espectros de RMN<sup>1</sup>H de la Glaucólida E (Espectro 3) y del compuesto 5 (Espectro 4) indica que éste último presenta, una modificación estructural apreciable. También es importante mencionar que algunos de los sustituyentes presentes en la Glaucólida E permanecen intactos durante la transformación, como lo demuestran un par de señales simples en 2.01 y 2.10 ppm que integran para 3 protones cada una y que corresponden a los hidrógenos de los acetatos de las posiciones dos y trece; esto se confirma con dos señales a campo bajo, 170.32 y 169.85 ppm, en el correspondiente espectro de RMN<sup>13</sup>C (Espectro 2).

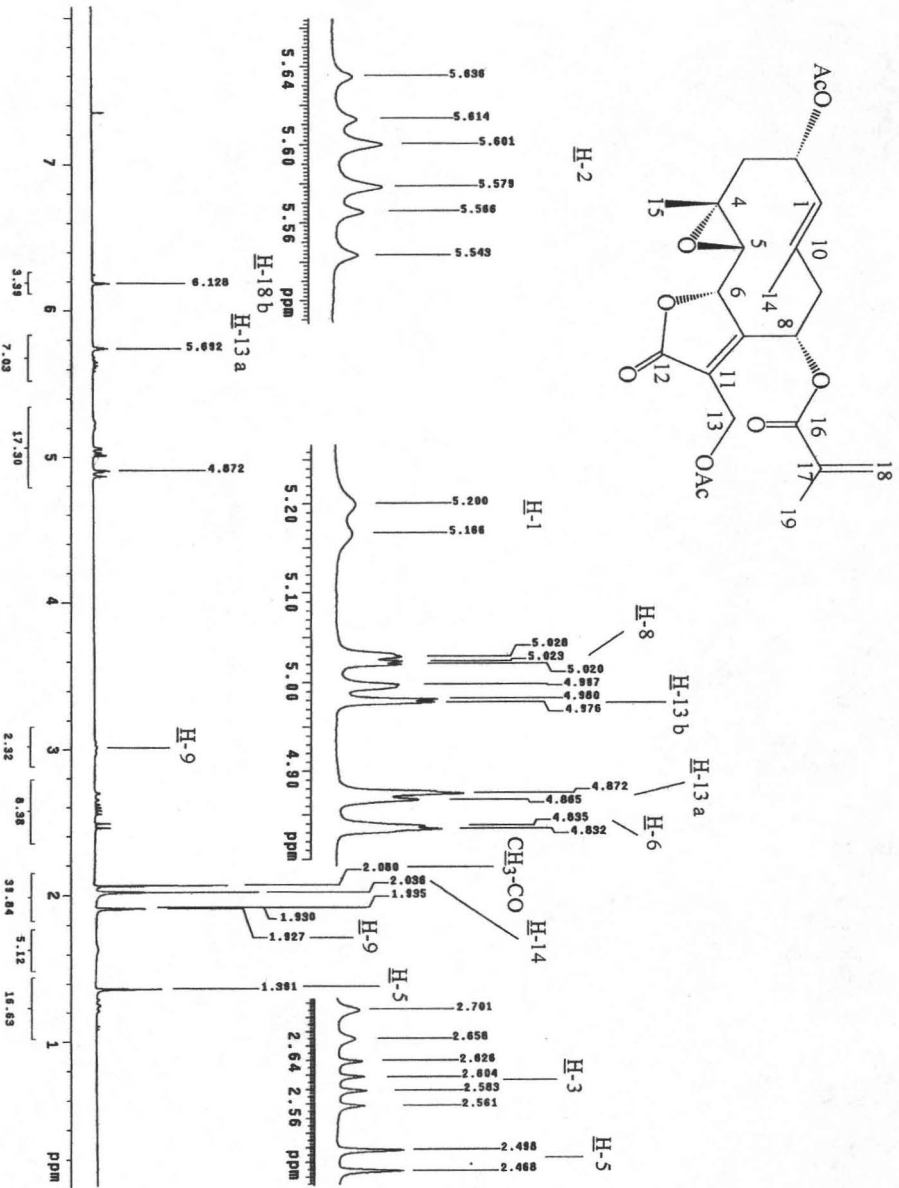


Espectro 1. Resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  de 3

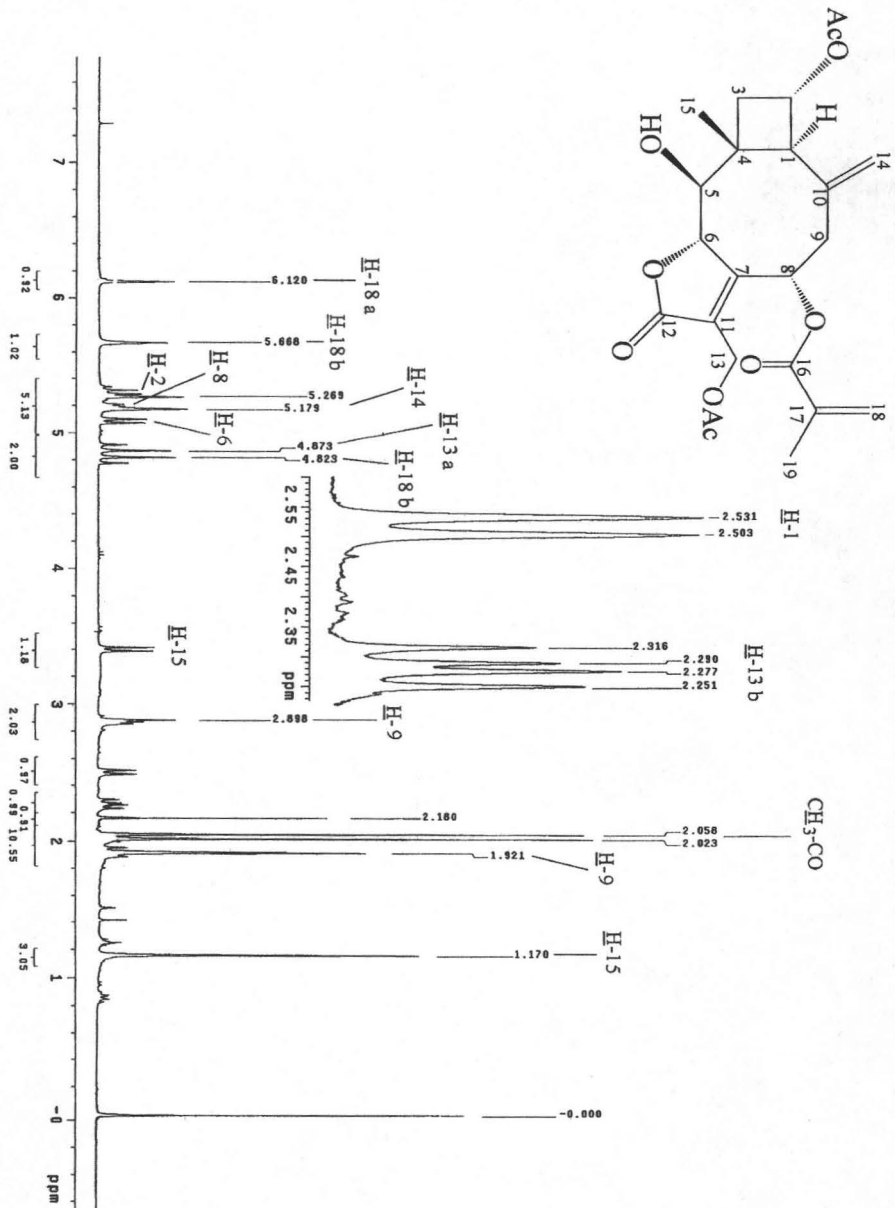




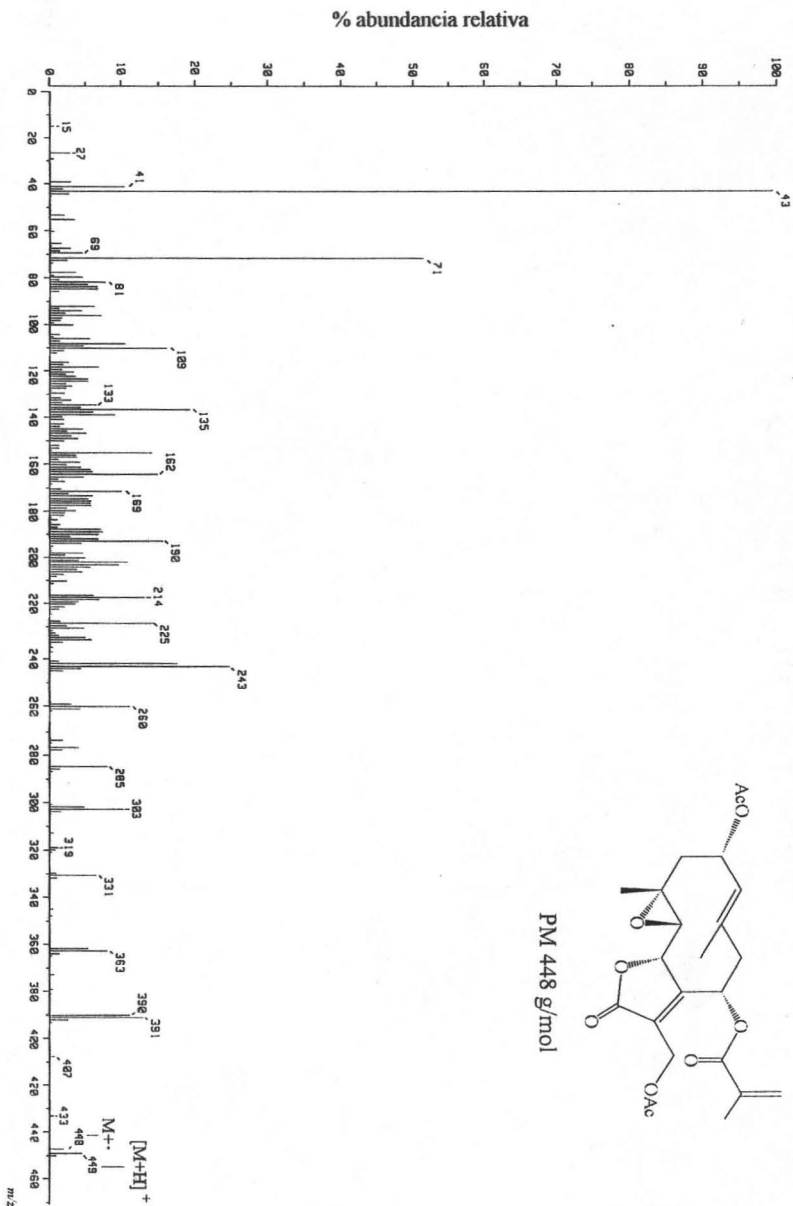
Espectro 2. Resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  de 5



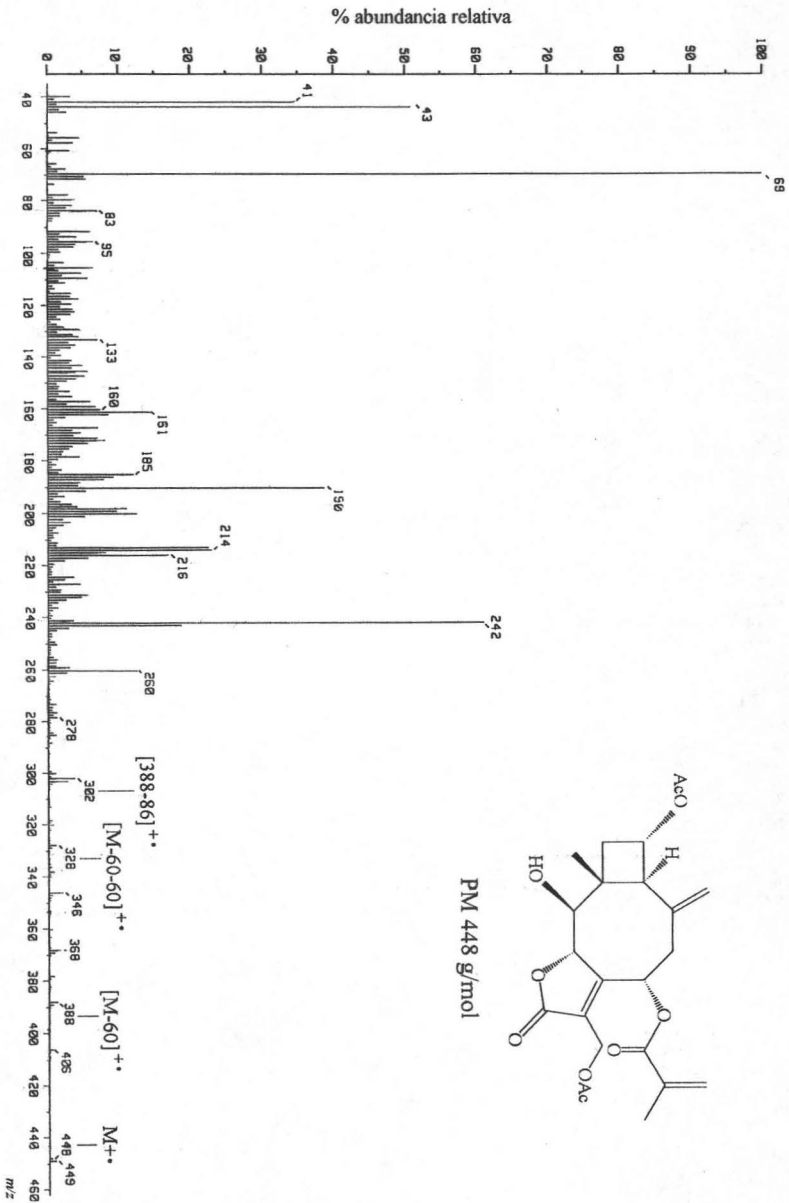
Espectro 3. Resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  de 3



Espectro 4. Resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup>H de 5



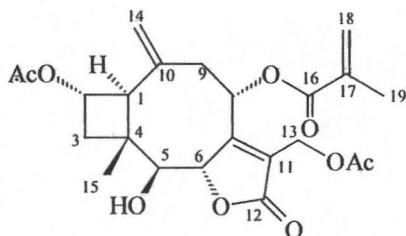
Espectro 5. Espectrometría de masas por IE de 3



Espectro 6. Espectrometría de masas por IE de 5

Asimismo se observa en el espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  de **5** un par de señales, una de ellas doble de doble centrada en 2.28 ppm con constantes de acoplamiento  $J=7.8$  y 11.7 Hz, y otra doble en 2.53 ppm con una  $J=8.4$  Hz asignadas a los protones no equivalentes de la posición nueve. Adicionalmente se observa una señal simple en 1.17 ppm asignada a un metilo unido a un carbono tetrasustituido correspondiente al metilo quince.

En el espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  de la Glaucólida E, aparece una señal simple en 2.1 ppm, ésta integra para tres protones asignados al metilo de la posición catorce; es necesario mencionar, que tal señal en el espectro de protones de **5** desaparece, y en cambio exhibe un par de señales dobles en 5.17 y 5.26 que integran para un protón y que fueron asignadas al sistema metilénico de la posición catorce. Por otro lado en el espectro de masas de **5** (Espectro 6) se observa un fragmento  $m/z$  448, que corresponde al ión molecular esperado, consistente con el respectivo peso molecular de esta molécula; igualmente se observa un fragmento  $m/z$  328 que corresponde al ión  $[\text{M}-60-60]^+$  debido a la pérdida de los dos acetatos presentes en la estructura de **5**. También se muestra un fragmento  $m/z$  302 el cual corresponde a la pérdida de 86 uma a partir de 388, y que esta de acuerdo con la pérdida del metacrilato de la posición ocho. Lo anterior, confirma que estos sustituyentes no se modificaron durante la reacción.



RMN<sup>1</sup>H (300 MHz) CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 1.17 (s, 3H, H-15), 1.88 (m, 2H, H-3), 1.92 (s, 3H, H-19), 1.98 (s, 3H, AcO), 2.02 (s, 3H, AcO), 2.28 (d, *J*=7.8 Hz, 3H H-3), 2.52 (d, *J*=8.4 Hz, 1H H-1) 2.87 (m, 2H, H-9), 3.29 (d, *J*=8.1 Hz, 1H H-5), 4.8 (d, *J*=12.9 Hz, 2H H-13), 4.90 (d, *J*=2.9 Hz, 2H H-13) 5.17 (sa, 2H, H-14), 5.20 (m, 1H, H-8), 5.23 (d, *J*=8.1 Hz, 1H H-6), 5.25 (d, *J*=8.1 Hz, 1H H-2), 5.26 (sa, 1H, H-14), 5.66 (sa, 2H H-18); RMN<sup>13</sup>C (75 MHz) CDCl<sub>3</sub> δ (ppm): 16.6 (C15), 18 (C19), 37.9 (C4), 40.1 (C3), 44.7 (C9), 52.18 (C1), 56.0 (C13), 64.7 (C2), 70.7 (C8), 85.0 (C5), 87.6 (C5), 116.8 (C14), 127.1 (C11), 127.1 (C8), 138.3 (C10), 164.4 (C7), 169.3 (C16), 170.2 (C2); EM IE (70 eV) *m/z* (%ar): 448(1.1) M<sup>+</sup>, 190(39), 69(100), 43(55); IR (CHCl<sub>3</sub>) ν max cm<sup>-1</sup>: 3594 (hidroxilo), 1763 (γ-lactona), 1738 (carbonilo éster).

#### ◆ DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN

##### ◆ Longitudes máximas, para cada compuesto.

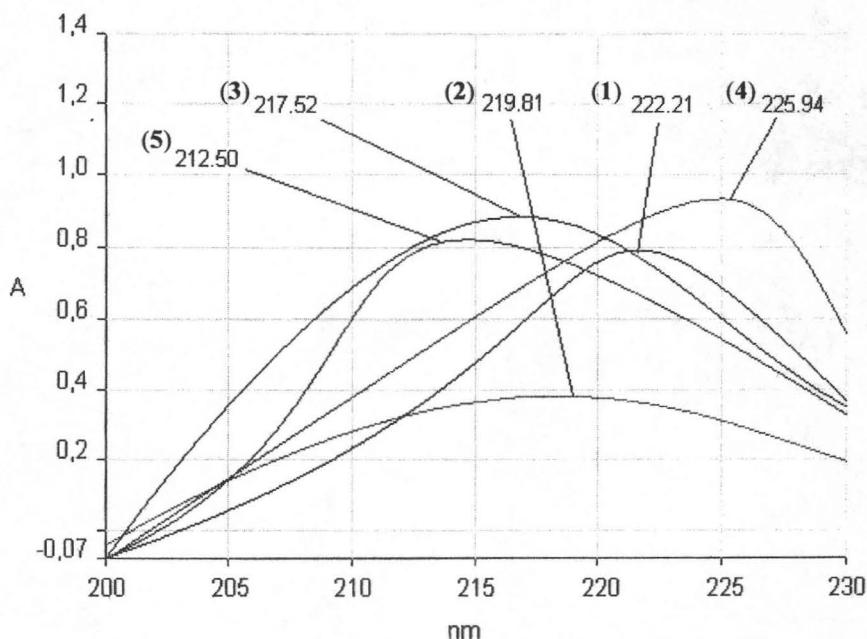
En la Tabla 4 se presenta en forma resumida la serie de valores de longitud de onda máxima determinada experimentalmente para cada una de las cinco lactonas sesquiterpénicas, a partir de la cual se determinó el KD correspondiente.

Tabla 4. Valores de longitud de onda máxima de los compuestos 1-5.

Compuesto	Longitud de onda Máxima (nm)
1	222.21
2	219.81
3	217.52
4	225.94
5	212.50

Así mismo, en la gráfica 1 se muestran, los picos de longitud de onda máxima

obtenidos para los compuestos 1-5.

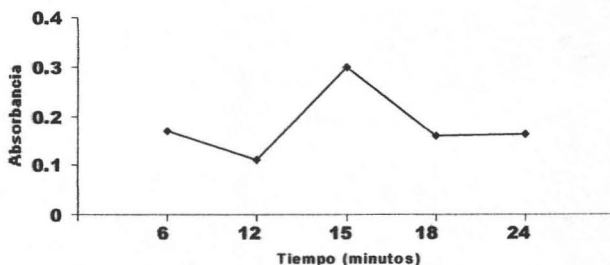


Gráfica 1. Longitud de onda máxima de los compuestos 1, 2, 3, 4 y 5

#### ◆ Cinética de extracción.

En la gráfica 2 se presenta la cinética de extracción determinada para la Glaucolida E en donde se observa que a los 15 minutos de agitación se obtienen la mayor absorbancia, lo que corresponde directamente a una mayor concentración del compuesto en la fase orgánica, también se observa que a tiempos mayores ésta decae. Por lo que, se consideró a este tiempo como el óptimo para realizar las extracciones. Cabe mencionar que esta cinética sólo se realizó para el compuesto padre (Glaucolida E) y el resultado obtenido se empleó para el resto de los compuestos evaluados.





Gráfica 2. Cinética de extracción

◆ **Coefficiente de Partición (KD), Log P,  $\pi$ ,  $\Delta G$ .**

En la Tabla 5 se resume la serie de datos obtenidos experimentalmente para determinar el KD, en ésta se pueden encontrar las concentraciones iniciales de las cuales se partió para hacer las posteriores extracciones; es necesario comentar que los valores obtenidos corresponden a tres determinaciones distintas usando en cada caso ocho muestras. El coeficiente de variación que se manejó en las extracciones no fue mayor a 4; se utilizó la prueba estadística  $\chi^2$  para determinar, si los resultados de los experimentos son semejantes obteniéndose una  $P \leq 0.05$ .

Tabla 5. Valores de referencia para la determinación de KD.

Compuesto	Concentración Inicial mg/mL	Absorbancia de la muestra inicial	Absorbancia media de las muestra	Coefficiente de Variación
1	0.006250	0.2545	0.2060	3.600
2	0.014250	0.3049	0.2148	2.236
3	0.006625	0.3331	0.2953	2.013
4	0.008250	0.2062	0.1780	2.403
5	0.022080	0.6019	0.4428	1.732

Todos los datos obtenidos fueron tratados en Microsoft Excel de Windows XP.

A partir del valor de KD experimental se calcularon los parámetros fisicoquímicos de interés, los cuales se muestran en la Tabla 6 para cada una de las moléculas objetivo. Particularmente los valores de  $\Delta G$  se encuentran expresados de forma conveniente en unidades de kcal y kJ. Es importante recordar que el KD indica el número de veces que la molécula es más soluble en la fase orgánica, de lo que es en la acuosa, esto es, ofrece una medida de su carácter hidrofílico/hidrofóbico. En este caso se observa que el compuesto 3 es 16.78 veces más soluble en octanol que en agua y el compuesto 2 es el que presenta el menor carácter lipofílico. Por otro lado, se enlistan también los parámetros Log P,  $\pi$  y  $\Delta G$ , obtenidos a partir de KD. El valor de la constante hidrofóbica  $\pi$ , mide la contribución hidrofóbica que tiene cada sustituyente o modificación presente respecto a la molécula padre o fundamental. Dicha constante es de gran utilidad ya que permite predecir que modificación es la mejor para cambiar de forma favorable la lipofilidad de un compuesto objetivo, por ejemplo, en el diseño de fármacos.

De lo anterior se desprende que la molécula 3 se desplaza con mayor facilidad de la fase acuosa a la orgánica, aunado a que esta molécula presenta también el valor de  $\Delta G$  más negativo, se deduce que ésta podrá atravesar la membrana celular con menor dificultad.

Tabla 6. Valores de los parámetros fisicoquímicos de 1-5

Compuesto	KD	Log P	$\pi$	$\Delta G^a$	$\Delta G^b$
1	13.49	$1.13 \pm 0.042$	0.09	-1.54	-6.45
2	5.44	$0.73 \pm 0.024$	0.49	-0.995	-4.17
3	16.67	$1.22 \pm 0.025$	0.00	-1.66	-6.96
4	13.16	$1.12 \pm 0.0275$	0.10	-1.53	-6.39
5	10.35	$1.02 \pm 0.0176$	0.20	-1.39	-5.82

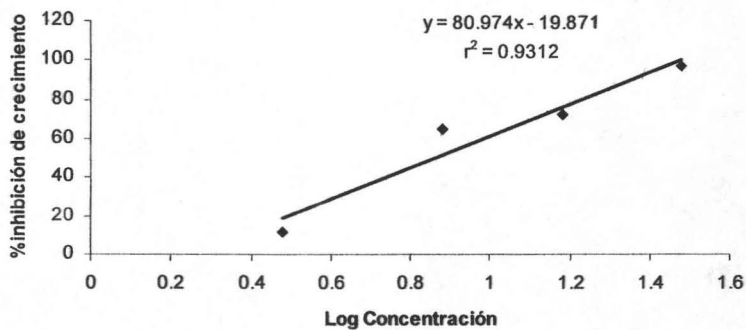
<sup>a</sup> = kcal mol<sup>-1</sup>; <sup>b</sup> = kJ mol<sup>-1</sup>

#### ◆ DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO Y CORRELACIÓN CON PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

La concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) se determinó a partir de los porcentajes de viabilidad celular expresados en inhibición del crecimiento celular. Los datos obtenidos fueron graficados respecto a la concentración.

Tabla 7. Valores de porcentaje de inhibición de crecimiento del compuesto 1

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Log Concentración	Porcentaje de inhibición del crecimiento celular
30	1.48	96.6
15	1.18	71.8
7.5	0.88	65.2
3	0.48	11.6



Gráfica 3. Log Concentración vs % de inhibición del crecimiento celular.

Con la fórmula descrita para la curva, es posible calcular la dosis al 50%, despejando a "x" y sustituyendo a "y" por 50. Finalmente para obtener el valor de la concentración inhibitoria 50 se obtiene el antilogaritmo.

$$x = (19.871 + 50) / 80.974$$

$$x = 0.86$$

$$10^{0.86} = 7.3$$

Por lo que para el caso específico  $CI_{50} = 7.3 \mu\text{M}$ .

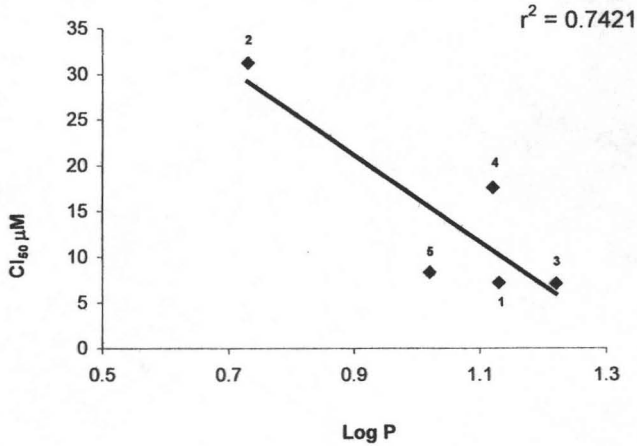
Los resultados biológicos generales obtenidos de la prueba de citotoxicidad llevada a cabo sobre las células neoplásicas (K562) y linfocitos T sanos, se presentan en la Tabla 8, los valores de  $CI_{50}$  están expresados en concentración  $\mu M$ , para ambas líneas celulares. Es importante mencionar que cada valor se generó a partir de tres experimentos independientes. De los valores obtenidos, se determinó que el compuesto 3 es el más citotóxico, mientras que, el compuesto 2 es el menos citotóxico en el caso de las células MT2, y para las células K562 el compuesto 5 resultó ser el de mayor efecto citotóxico. Cabe mencionar, que el método utilizado para medir la citotoxicidad de las moléculas, es el de Mosmann y éste evalúa la viabilidad de las células, por medio de la reacción con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio, posteriormente al tratamiento, en un tiempo determinado.

Tabla 8. Citotoxicidad de los compuestos 1-5 sobre células MT2 y K562

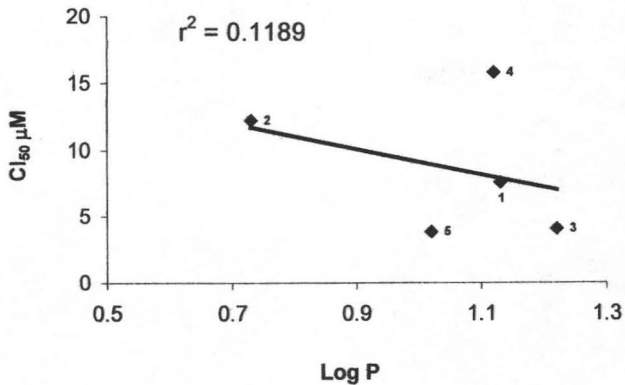
Compuesto	MT2 $CI_{50}$	K562 $CI_{50}$
1	$7.23 \pm 1.0$	$7.59 \pm 0.36$
2	$31.6 \pm 6.53$	$12.22 \pm 0.24$
3	$7.14 \pm 0.07$	$4.065 \pm 1.905$
4	$17.6 \pm 0.027$	$15.78 \pm 0.65$
5	$8.38 \pm 1.19$	$3.85 \pm 0.73$

Para establecer una posible correlación entre los valores de Log P experimentales y la actividad biológica evaluada, se graficaron ambos parámetros, obteniéndose un coeficiente de determinación de 0.7421 y una correlación de 0.8614 entre el Log P y los datos de  $CI_{50}$  en MT2 (Gráfica 4) y un valor de 0.1189 para el coeficiente de

determinación y una correlación de 0.345 entre el Log P y los datos de  $CI_{50}$  en K562 (Gráfica 5), lo que significa una correlación baja especialmente en el segundo caso.

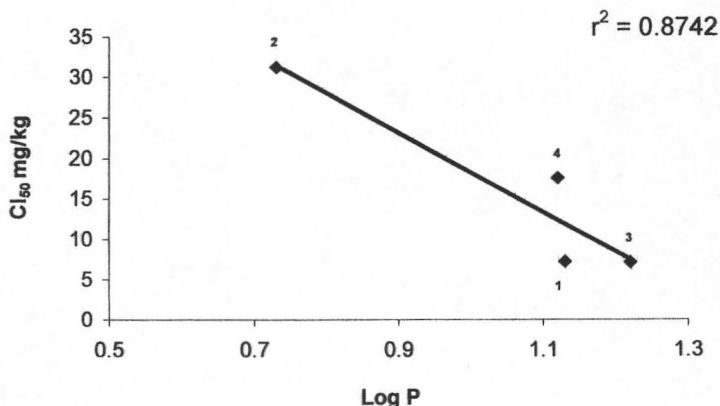


Gráfica 4. Log P vs  $CI_{50}$  de 1 - 5 sobre MT2



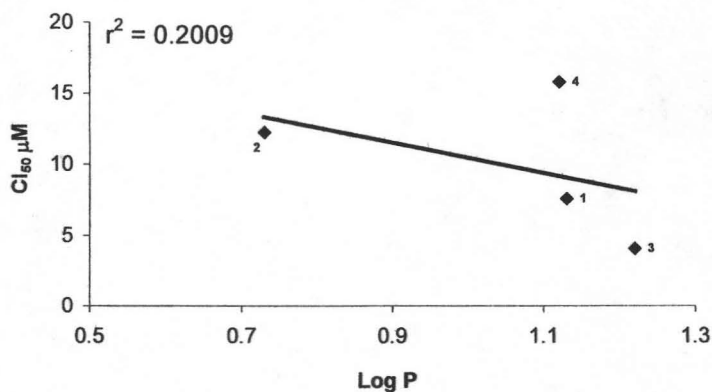
Gráfica 5. Log P vs  $CI_{50}$  de 1 - 5 sobre K562

Ya que, los compuestos 1, 2, 3 y 4 comparten una estructura hidrocarbonada monocíclica, diferente a la de la molécula 5 (bicíclica); ésta se retiró del estudio, obteniéndose así una correlación de 0.93 y un coeficiente de determinación de 0.87 (Gráfica 6). Lo anterior ofrece un indicio acerca de la relación existente entre el efecto biológico y la estructura principal de las moléculas estudiadas, incluso a pesar de tener diferentes sustituyentes como lo son el epoximetacrilato, metacrilato y dihidrometacrilato presentes en la posición ocho de los compuestos 2, 3 y 4 respectivamente.



Gráfica 6. Log P vs CI<sub>50</sub> de 1 - 4 sobre MT2

Por otro lado, un tratamiento similar al anterior, se siguió para las células tumorales K562, sin lograr establecer correlación alguna entre el efecto citotóxico y el carácter lipofílico ( $r = 0.45$   $r^2 = 0.2009$ ), a pesar de haber empleado la misma consideración hecha para el caso de las células MT2 (Gráfica 7). Esto denota, que no existe la misma sensibilidad en estas células a los compuestos en estudio, lo cual posiblemente está relacionado a una selectividad sobre la línea celular.



Gráfica 7. Log P vs CI<sub>50</sub> de 1 - 4 sobre K562

Resulta importante señalar que aun, a pesar de las diferencias encontradas al analizar la acción de los compuestos sobre los diferentes tipos celulares, el compuesto padre (Glaucólida E) que presenta el valor más grande de Log P, es también el de mayor efecto citotóxico.

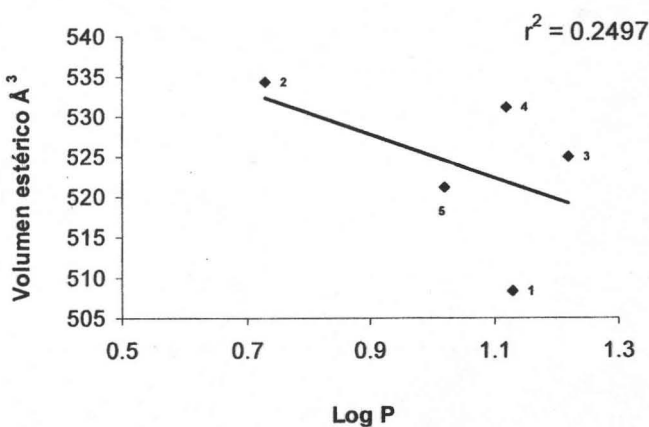
Por otra lado, con el fin de enriquecer el presente trabajo y establecer una probable correlación entre los resultados hasta ahora expuestos y el volumen estérico calculado, se generaron las estructuras tridimensionales de más baja energía para los cinco compuestos mediante el programa teórico Spartan. La optimización correspondiente se realizó empleando el método semiempírico PM3. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 9.



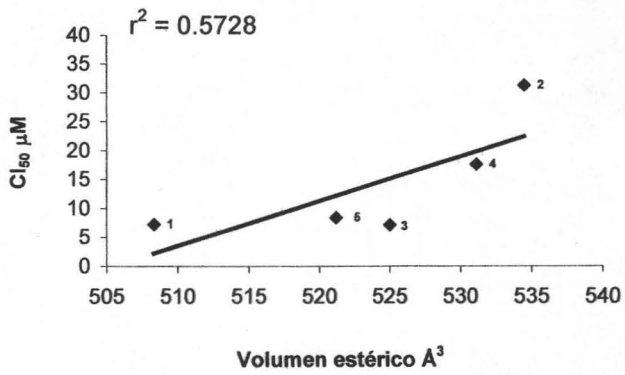
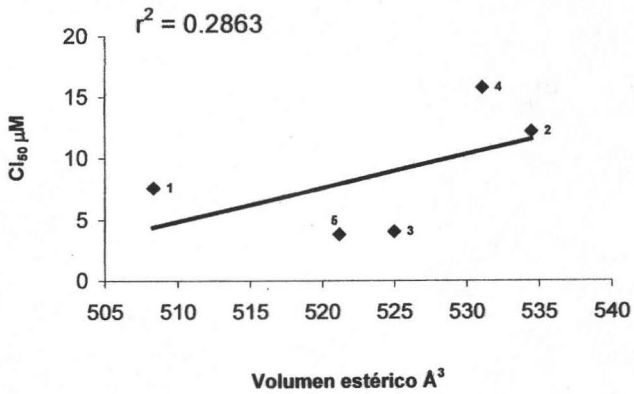
Tabla 9. Volumen estérico de los compuestos 1-5

Compuesto	Volumen Å <sup>3</sup>
1	508.32
2	534.47
3	524.99
4	531.11
5	521.18

Al Gráficarse los valores de Log P vs volumen no se encontró una buena correlación, Gráfica 8; así como tampoco, al Gráficar el volumen estérico contra el CI<sub>50</sub> para ambas líneas celulares, Gráfica 9 y 10.



Gráfica 8. Log P vs Volumen estérico de los compuestos 1 - 5

Gráfica 9. Volumen vs  $CI_{50}$  de los compuestos 1 - 5 sobre MT2Gráfica 10. Volumen vs  $CI_{50}$  de los compuestos 1 - 5 sobre K562

## **CONCLUSIONES**

---

## ◆ CONCLUSIONES

- ◆ Se aislaron las glaucólidas A, D y E de especímenes vegetales del género *Vernonia*
- ◆ Se modificó convenientemente la glaucólida E, por medio de una reacción de hidrogenación y otra de ciclación, para generar los compuestos 4 y 5 respectivamente.
- ◆ Se encontró una dependencia directa entre el Log P de las lactonas sesquiterpénicas 1, 2, 3 y 4 y su actividad biológica sobre Linfocitos T, esto es, a mayor Log P mayor actividad citotóxica, siendo el compuesto 3 el de mayor efecto; mientras que sobre las células K562, no se halló correlación entre la actividad citotóxica y el Log P de las moléculas objetivo.
- ◆ A pesar de existir una fluctuación en el volumen estérico, de las moléculas bajo estudio, se encontró que la actividad biológica, se ve modificada sustancialmente siempre a la baja respecto al compuesto padre.

## **REFERENCIAS**

---

## ◆ REFERENCIAS

1. J. T. Arnason, R. Mata y J. T. Romeo; *Recent Advances in Phytochemistry*, **29**, 332, (1995).
2. M. Martínez, M. Pineda; *Secondary Metabolites from Mexican Plants: Chemistry and Biological Properties*, **45** (1996).
3. A. L. Cabrera; *Darwiniana*, **64**, 578, (1944).
4. F. Bohlmann, J. Jakupovic; *Pl Syst. Evol.*, (suppl 4) **3**, (1990).
5. H. A. Gleason; *Amer. J. Bot.*, **10**, 187, (1923).
6. B. Jones, in Heywood V. H.; *The Biology and Chemistry of the Compositae*, Academic Press, N. Y., (1977).
7. S. B. Jones; *Rhodora*, **83**, 59, (1981).
8. T. J. Mabry, Z. Adbel-Beset W. G., Pandolina S. B., *Biochem. System. Ecol.*, **2**, 185, (1975).
9. B. Velasco; *Reacciones de Ciclización in vitro, en Medio Ácido, de las Glaucólidas D y E*, Tesis de Maestría. FESC, UNAM, (2002).
10. A. Castillo; *Monografía sobre Sesquiterpenos, Diterpenos y Sesterterpenos*, Tesis, Químico, FESC, UNAM, (2001).
11. E. Rodríguez, G. H. N. Towers y J. C. Mitchell; *Phytochemistry*, **15**, 1573, (1976).
12. M. Robles, M. Aregullin, J. West y E. Rodríguez; *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **59**, 11, 2064, (1995).

13. M. Robles, M. Aregullin, J. West y E. Rodríguez; *Planta Med.*, **61**, 199, (1995).
14. A. González, G. A. Galindo, H. Mansilla y A. Gutiérrez; *Rev. Latinoamer. Quim.*, **12**, 32, (1981).
15. F. C. Seaman, A. J. Malcolm y N. H. Fischer; *Phytochemistry*, **23**, 5, 1063, (1984).
16. N. H. Fischer, E. J. Oliver, H. D. Fischer; *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, Springer-Verlag, New York, **38**, (1979).
17. C. Bocca, L. Gabriel, F. Bozzo y A. Miglietta; *Chemico-Biological Interactions*, **147**, 1, 79, (2004).
18. H. Skaltsa, D. Lazari, C. Panagouleas, E. Georgiadou, B. Garcia y M. Sokovic; *Phytochemistry*, **55**, 8, 903, (2000).
19. J. Y. Cho, A. R. Kim, H. G. Joo, B. H. Kim, M. H. Rhee, E. S. Yoo, D. R. Katz, B. M. Chain and J. H. Jung; *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **313**, 4, 954, (2004).
20. J. Y. Cho, A. R. Kim, J. H. Jung, T. Chun, M. H. Rhee y E. S. Yoo; *Eur. J. Pharmacol.*, **492**, 2-3, 85, (2004).
21. V. R. Burim, R. Canalle, J. L. Callegari Lopes y C. S. Takahashi; *Genetics and Molecular Biology*, **22**, 3, (1999).
22. Y. Tambe, H. Tsujiuchi, G. Honda, Y. Ikeshiro y S. Tanaca; *Planta Med.*, **62**, 469, (1996).
23. J. Y. Cho, J. Park, E. S. Yoo, K. U. Baik, J. H. Jung, J. Lee, y M. H. Park; *Eur. J. Pharmacol.*, **492**, 3, 94, (2004).
24. A. Rivero, J. Quintana, J. L. Eiroa, M. López, J. Triana, J. Bermejo y F. Estévez; *Eur. J. Pharmacol.*, **482**, 1-3, 77, (2003).

25. F. Hilmi, J. Gertsch, P. Bremner, S. Valovic, M. Heinrich, O. Sticher y J. Heilmann; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **11**, 17, 3659, (2003).
26. J. D. Page, S. G. Chaney, I. H. Hall, K. H. Lee y D. J. Holbrook; *Eur. J. Pharmacol.*, **492**, 2-3, 85, (2004).
27. J. Heilmann, M. R. Wasescha y T. J. Schmidt; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **9**, 8, 2189, (2001).
28. T. W. Solomons, Grahan; *Química Orgánica*, 2ª Ed., Limusa Wiley, México, (1999).
29. A. N. García- Argaes, T. O. Ramirez Apan, H. Parra Delgado, G. Velásquez y M. Martínez- Vázquez; *Planta Med.*, **66**, 1, (2000).
30. B. Siedle, L. Gustavsson, S. Johansson, R. Murillo, V. Castro, L. Bohlin y I. Merfort; *Biochemical Pharmacology*, **65**, 5, 897, (2003).
31. D. Hawang, N. H. Fischer, B. C. Jang. H. Tak, J. K. Kin y W. Lee; *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **226**, 810, (1996).
32. I. H. Hall, C. O. Starnes Jr., K. H. Lee y T. G. Waddell; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **69**, 5, 537, (1980).
33. I. H. May, K. H. Lee, C. O. Starnes, Y. Sumida, R. Y. Wu, T. G. Waddell, J. W. Cochran y K. G. Gerhart; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **68**, 4, 735, (1979).
34. M. Li-Weber, M. Giaisi, S. Baumann, M. K. Treiber y P. H. Krammer; *Cell Death Differ*, **9**, 76, (2002).
35. M. Taniguchi, T. Kataoka, H. Suzuki, M. Uramoto, M. Ando, K. Arao, J. Magae, T. Nishimura, N. Otake, y K. Nagai; *Planta Med.*, **64**, 7, 594, (1998).
36. S. H. Kim, H. J. Kim y T. S. Kim; *Eur. J. Pharmacol.*, **482**, 3, 84, (2003).
37. J. H. Choi, K. M. Shin, N. Y. Kim, J. P. Hong, Y. S. Lee, H. J. Kim, H. J. Park, K. T. Lee; *Biol. Pharm. Bull.*, **11**, 1446, (2002).



38. L. Cowall, J. M. Cassady, C. J. Chang, J. F. Kozlowski; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 926, 2, 186, (1987).
39. S. Fujisawa, T. Atsumi, Y. Kadoma y H. Sakagami; *Toxicology*, 177, 1, 39, (2002).
40. S. Y. Kim y J. Lee; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12, 10, 2639, (2004).
41. H. Saito, J. Koyasu, T. Shigeoka y I. Tomita; *Toxicology in Vitro*, 8, 5, 1107, (1994).
42. W. Halle, I. Baeger, B. Ekwall y H. Spielmann; *ATLA*, 19, 3, 338, (1991).
43. Y. Issa, D. C. Watts, P. A. Brunton, C. M. Waters y A. J. Duxbury; *Dental Materials*, 20, 1, 12, (2004).
44. [http://www.amershamhealth.com/medcyclopaedia/medical/volume%20I/PARTITIO N%20COEFFICIENT.ASP](http://www.amershamhealth.com/medcyclopaedia/medical/volume%20I/PARTITIO%20N%20COEFFICIENT.ASP) (Septiembre 2004).
45. G. T. Fieldson y N. K. Mize; *Accelrys' Solutions Magazine*, Enero, (1998).
46. R. K. Murray, A. P. Mayes; *Bioquímica de Harper*, 15ª Ed., Manual Moderno, México, (2000).
47. H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore y J. Darnell; *Biología celular y molecular*, 4ª Ed., Editorial Medica Panamericana, España, (2003).
48. E. A. Tehrany, F. Fournier and S. Desobry; *Journal of Food Engineering*, 64, 3, 315, (2004).
49. [www.chemaxon.com/marvin/chemaxon/marvin/help/logPlogD](http://www.chemaxon.com/marvin/chemaxon/marvin/help/logPlogD) (Septiembre 2004).
50. <http://www.molinspiration.com/services/logp.html> (Septiembre 2004).

51. <http://static.highbeam.com/p/pharmaceuticaltechnology/november012002/estimationofdistributioncoefficientsfromthepartiti/> (Septiembre 2004).
52. <http://www.pirika.com/chem/TCPEE/LOGKOW/ourlogKow.html> (Septiembre 2004).
53. <http://static.highbeam.com/p/pharmaceuticaltechnology/november012002/estimationofdistributioncoefficientsfromthepartiti/> (Septiembre 2004).
54. A. L. Lehninger; Bioquímica. *Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular*, 2ª Ed., Ediciones Omega, S.A, España, (1995).
55. D. L. Nelson; *Lehninger. Principles of Biochemistry*, 3ª Ed., Worth Publishers, USA, (2000).
56. C. K. Mathews; *Biochemistry*, 3ª Ed., An Imprint of Addison Wesley Longman, inc., USA, (2000).