



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN**

---

---

**Síntesis y cálculo de las propiedades fisicoquímicas  
de una serie de moléculas con posible actividad  
de detergente lisosomotrópico**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN FARMACIA

PRESENTA:

MIGUEL ALEJANDRO TREJO RANGEL

ASESOR: DR. JOSÉ LUIS ARIAS TÉLLEZ

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Síntesis y cálculo de las propiedades fisicoquímicas de una serie de moléculas con posible actividad de detergente lisosomotrópico**

Que presenta el pasante: Miguel Alejandro Trejo Rangel  
Con número de cuenta: 311119978 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Farmacia.

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 05 de Agosto de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Juan Manuel Aceves Hernández	
VOCAL	Dr. José Luis Arias Téllez	
SECRETARIO	Dr. Benjamín Velasco Bejarano	
1er. SUPLENTE	M.F.C. Beatriz de Jesús Maya Monroy	
2do. SUPLENTE	M.C. Víctor Hugo Vázquez Valadez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



*“¿Qué más podría desear? Un pequeño jardín para pasear y la inmensidad para meditar. Algunas flores sobre la tierra y todas las estrellas del cielo.”*

*Víctor Hugo*



## Agradecimientos

---

Al Dr. José Luis Arias Téllez, por todo el apoyo y paciencia que me dio durante este tiempo, así como por haber confiado en mí y en este pequeño proyecto que me propuse hacer. Sin su ayuda no lo hubiera logrado, siempre le estaré agradecido por ello.

Al sínodo de este examen, por su tiempo y observaciones. Al Dr. Juan Manuel Aceves Hernández, por el interés y la oportunidad que me dio en la difusión de este trabajo.

A Claudia Patricia Villamizar Caballero, el Dr Abraham Méndez Albores y la Dr. Sandra Díaz Barriga Arceo, por su ayuda en la obtención de los espectros infrarrojos, ultravioleta y de resonancia magnética nuclear.

A mis amigos y compañeros Edson, Lulú, James, Marcos, Marbella, Queren y Mayra. Cada quien hizo a su manera mi camino un poco más apacible y menos difícil.

A Daniela, por haber sido parte de este proyecto, y sobre todo por el efímero pero hermoso tiempo que compartimos aquellas tardes en el laboratorio. Gracias por la compañía que me diste a pesar del futuro incierto, siempre atesoraré esos recuerdos en mi memoria.

A Yessica, por la inmarcesible y bella amistad que hemos construido, mi paso por la Universidad bien valió la pena por el solo hecho de haberte conocido. Gracias por la amistad que me has dado a pesar de ser quien soy, siempre tendrás un lugar en mi corazón.

A mis hermanos, por todos esos maravillosos momentos que hemos vivido juntos. Y a mis padres que han dado lo mejor de sí al darme cuanto han considerado valioso en mi crecimiento. Pese a que no lo diga, los admiro por quienes son, serán mi ejemplo de fortaleza y bondad. Los amo a todos.

## Índice general

---

Agradecimientos .....	I
Índice general .....	II
Índice de figuras .....	IV
Índice de tablas .....	V
Índice de gráficas .....	V
Tabla de abreviaturas .....	VI
1 Introducción .....	1
2 Antecedentes .....	2
2.1 Generalidades del cáncer .....	2
2.2 Terapia citotóxica del cáncer .....	4
2.2.1 Desarrollo de fármacos antineoplásicos .....	4
2.2.2 Fármacos antineoplásicos .....	5
2.2.3 Rol del lisosoma en la terapia del cáncer .....	9
2.3 Detergentes lisosomotrópicos .....	12
2.3.1 Origen y definición .....	12
2.3.2 Propiedades fisicoquímicas de los agentes lisosomotrópicos: pKa y logP ....	13
2.3.3 Permeabilidad de la membrana lisosomal: parámetro $\alpha$ .....	15
2.3.4 Propiedades fisicoquímicas de los detergentes: HLB y geometría .....	17
2.4 Funcionalización de los tocoferoles .....	20
2.4.1 Química de los tocoferoles .....	20
2.4.2 Oxidación de los tocoferoles .....	21
2.4.3 Aminación reductiva de aldehídos y cetonas .....	23
2.4.4 Condensación entre aminas y quinonas .....	24
3 Definición del proyecto .....	27
3.1 Objetivo general .....	27
3.2 Objetivos particulares .....	27
3.3 Hipótesis .....	27
3.4 Estrategia sintética .....	28
4 Sección experimental .....	30

4.1	Reactivos y materiales .....	30
4.2	Equipos .....	30
4.3	Metodología experimental .....	31
4.3.1	Hidrólisis del acetato de $\alpha$ -tocoferol.....	31
4.3.2	Oxidación del $\alpha$ -tocoferol.....	31
4.3.3	Síntesis de las bases de Schiff .....	32
4.3.4	Síntesis de las aminas .....	33
4.4	Metodología de los cálculos teóricos.....	33
5	Resultados y discusión .....	37
5.1	De la reacción de hidrólisis.....	37
5.2	De la reacción de oxidación.....	39
5.3	De la síntesis de las bases de Schiff.....	42
5.4	De la síntesis de las aminas.....	43
5.5	De los cálculos computacionales y las predicciones del modelo.....	45
6	Conclusiones .....	63
7	Bibliografía.....	64
8	Anexos.....	72
8.1	Espectros .....	72
8.2	Modelo matemático de la acumulación por protonación.....	91
8.3	Diagramas de distribución de microespecies y logD vs pH .....	103
8.4	Imágenes de los confórmeros y sus descriptores geométricos.....	106

## Índice de figuras

---

Figura 1. Estructuras químicas de algunos fármacos alquilantes .....	6
Figura 2. Estructuras químicas de algunos antimetabolitos .....	6
Figura 3. Estructuras químicas de algunos fármacos que dañan microtúbulos .....	7
Figura 4. Estructuras químicas de algunos fármacos inhibidores de cinasas .....	7
Figura 5. Estructuras químicas de algunos fármacos antagonistas de hormonas .....	8
Figura 6. Estructuras químicas de algunos fármacos inhibidores de la topoisomerasa.....	8
Figura 7. Rol dual de los lisosomas en la célula cancerosa.....	10
Figura 8. Estructuras químicas de algunos detergentes lisosomotrópicos .....	13
Figura 9. Acumulación lisosomal por protonación .....	13
Figura 10. Rompimiento de membranas por detergentes .....	18
Figura 11. Parámetro de empaquetamiento para tensioactivos .....	19
Figura 12. Formación de un poro en la membrana.....	20
Figura 13. Clasificación de los componentes de la vitamina E.....	21
Figura 14. Oxidación del tocoferol por acción del Fe(III) .....	23
Figura 15. Aminación reductiva de aldehídos y cetonas .....	23
Figura 16. Resumen de las reacciones entre quinonas y aminas .....	25
Figura 17. Ruta sintética original .....	28
Figura 18. Ruta sintética modificada.....	29
Figura 19. Secuencia que muestra el origen de las constantes del modelo matemático .....	36
Figura 20. Mecanismo de la reacción de hidrólisis .....	37
Figura 21. Numeración de los átomos del sustrato.....	37
Figura 22. Mecanismo de la reacción de oxidación .....	40
Figura 23. Apariencia de los productos de oxidación a diferentes condiciones de reacción	41
Figura 24. Mecanismo de la reacción de iminación .....	42
Figura 25. Mecanismo de la reacción de aminación de la cadena lateral.....	43
Figura 26. Producto de síntesis derivado de la morfolina .....	44
Figura 27. Acumulación lisosomal de bases lipófilas .....	91



## Índice de tablas

---

Tabla 1. Condiciones para la reacción de oxidación .....	32
Tabla 2. Condiciones para la síntesis de las iminas.....	32
Tabla 3. Condiciones para la síntesis de las aminas .....	33
Tabla 4. Valores de los parámetros del modelo de acumulación .....	34
Tabla 5. Valores de los parámetros para la formación de poros en la membrana .....	35
Tabla 6. Predicción del modelo por acumulación para diversas moléculas .....	48
Tabla 7. Predicción del modelo por acumulación para diversos detergentes .....	53
Tabla 8. Resumen de las formulas del modelo de acumulación por protonación .....	100

## Índice de gráficas

---

Gráfica 1. Influencia del parámetro $\alpha$ en la acumulación lisosomal .....	16
Gráfica 2. Espectros de absorción de la reacción de oxidación.....	40
Gráfica 3. Relación entre captación lisosomal experimental y la predicha.....	45
Gráfica 4. Acumulación lisosomal predicha para algunas moléculas lisosomotrópicas .....	50
Gráfica 5. Parámetro $\alpha$ para algunas moléculas lisosomotrópicas .....	51
Gráfica 6. Proporción $[L]/[E]$ vs pKa de los productos de síntesis .....	52
Gráfica 7. Acumulación lisosomal predicha para algunos detergentes lisosomotrópicos....	54
Gráfica 8. Porcentaje de detergente en la membrana necesario para formar poros.....	56
Gráfica 9. Relación entre la cantidad de detergente en la membrana y el radio de poro .....	57
Gráfica 10. Acumulación celular para el producto derivado de la morfolina .....	58
Gráfica 11. Acumulación celular para el producto derivado de la dietanolamina .....	59
Gráfica 12. Acumulación celular para el producto derivado de la etanolamina.....	60
Gráfica 13. Acumulación en los lisosomas para los tres productos de síntesis.....	61
Gráfica 14. Relación entre la lipofilicidad de la molécula y $t_{\text{máx}}$ .....	62

## Tabla de abreviaturas

---

CCF	Cromatografía en capa fina
CCP	Parámetro de embalaje crítico
DCM	Diclorometano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eq	Equivalente químico
Et <sub>3</sub> N	Trietilamina
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Etanol
HLB	Balance hidrófilo lipófilo
IR	Infrarrojo
LMP	Permeabilización de la membrana lisosomal
LogD	Logaritmo del coeficiente de distribución octanol/agua
LogP	Logaritmo del coeficiente de reparto octanol/agua
LogP <sub>c</sub>	Logaritmo del coeficiente de permeabilidad
MHz	Mega Hertz
mmol	Mili mol
nm	Nanómetro
pK <sub>a</sub>	Logaritmo de la constante de disociación ácida
ppm	Partes por millón
RCT	Reducción en la captación total lisosomal
RMN C <sup>13</sup>	Resonancia magnética nuclear de C <sup>13</sup>
RMN H <sup>1</sup>	Resonancia magnética nuclear de H <sup>1</sup>
ROS	Especies reactivas del oxígeno
TA	Temperatura ambiente
UV	Ultravioleta
v/v	Relación volumen/volumen

# 1 Introducción

---

En 2015 se atribuyeron al cáncer 8.8 millones de defunciones. A nivel global aproximadamente una de cada tres mujeres y uno de cada dos hombres desarrollarán un tipo de cáncer durante su vida. Alrededor del 15 por ciento de todos los fallecimientos en el mundo se atribuirán a él. En algunos países, el cáncer superará a las enfermedades cardíacas como la causa más habitual de muerte <sup>[1]</sup>. Pese a los grandes avances que se han hecho en el entendimiento bioquímico de esta enfermedad, sigue siendo necesaria la búsqueda de nuevos objetivos farmacológicos, que nos permitan superar los inconvenientes que presentan muchos de los fármacos antineoplásicos.

Los lisosomas han sido planteados como un novedoso objetivo farmacológico para el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos. Las formas en que los lisosomas contribuyen a la tumorigénesis y la progresión del cáncer aún se están descubriendo. Sin embargo, cada vez es más claro que la alteración farmacológica de los procesos lisosomales podría explotarse como una terapia contra el cáncer.

El ganador del premio nobel Christian de Duve junto con su equipo fueron los primeros en plantear las características fisicoquímicas que debería de tener una molécula para acumularse preferencialmente en estos orgánulos celulares <sup>[2]</sup>. A las moléculas que tienden a acumularse preferencialmente en los lisosomas se les denomina agentes lisosomotrópicos. Si además de su capacidad de acumularse en los lisosomas dichas moléculas causan el rompimiento de las membranas que lo componen, debido a sus propiedades tensioactivas, se les denomina detergentes lisosomotrópicos.

En el presente trabajo, se muestra la síntesis y el cálculo por métodos computacionales, de las propiedades fisicoquímicas de una serie de moléculas con potencial de ser detergentes lisosomotrópicos. Para ello se partió del  $\alpha$ -tocoferol ya que, dadas sus características químicas y estructurales, facilita la funcionalización del tocoferol para generar moléculas con características fisicoquímicas más adecuadas que puedan funcionar como detergentes lisosomotrópicos.

## 2 Antecedentes

---

### 2.1 Generalidades del cáncer

Existe un amplio consenso de que el cáncer es en esencia una enfermedad genética y que la acumulación de las alteraciones moleculares en el genoma de las células somáticas, es la base de la progresión del cáncer. Es importante enfatizar que el cáncer no consiste en una sola enfermedad, sino que se trata de muchos trastornos con alteraciones genéticas, una evolución natural y una respuesta terapéutica muy variada <sup>[3]</sup>.

La mayoría de los agentes que causan cáncer (carcinógenos) son agentes que originan alteraciones en la secuencia de DNA o mutaciones (mutágenos). Así, de manera similar a todas las enfermedades genéticas, el cáncer resulta de alteraciones en el DNA. Una gran cantidad de evidencia indica que el DNA de las células tumorales contiene muchas alteraciones que van desde mutaciones puntuales sutiles (cambios en un solo par de bases) hasta grandes aberraciones cromosómicas, como por ejemplo deleciones y translocaciones cromosómicas. La acumulación de mutaciones en las células a lo largo del tiempo representa un proceso de varios pasos que subyace a la carcinogénesis <sup>[4]</sup>.

A pesar de las diferencias en cada tipo de cáncer todos comparten ciertas características en común que nos permiten racionalizar la complejidad de las enfermedades neoplásicas. Las características distintivas del cáncer comprenden ocho capacidades adquiridas por células incipientes del cáncer durante el desarrollo en múltiples etapas de los tumores humanos <sup>[5]</sup>. Dichas características distintivas son:

- Adquisición de inmortalidad replicativa. Las células normales tienen un número finito de duplicaciones que pueden realizar, después de las cuales se vuelven senescentes. Esto se debe al acortamiento de los extremos cromosómicos, los telómeros, que se produce durante cada ronda de replicación del DNA. Las células cancerosas mantienen la longitud de sus telómeros debido a una regulación alterada, lo que les proporciona un potencial replicativo ilimitado.

- Señalización proliferativa sostenida. Las células normales necesitan señales externas de factores de crecimiento para dividirse mientras que las células cancerosas no dependen de ellos. Las mutaciones adquiridas alteran las vías del factor de crecimiento que conducen a un crecimiento no regulado.
- Evasión de los supresores del crecimiento. Las células normales responden a las señales inhibitorias para mantener la homeostasis (la mayoría de las células del cuerpo no se dividen activamente). Por otro lado, las células cancerosas no responden a señales inhibitorias del crecimiento, pues las mutaciones adquiridas o el silenciamiento génico interfieren con las vías inhibitorias.
- Elusión de la destrucción inmune. Las células cancerosas exitosas son aquellas que no estimulan una respuesta inmune o pueden interferir con la respuesta inmune para evitar ser eliminadas.
- Activación de invasión y metástasis. Las células normales mantienen su ubicación en el cuerpo y generalmente no migran. Las alteraciones del genoma pueden afectar la actividad y los niveles de enzimas involucradas en la invasión o las moléculas involucradas en la adhesión celular.
- Inducción de angiogénesis. Las células normales dependen de los vasos sanguíneos para suministrar oxígeno y nutrientes, pero la arquitectura vascular es más o menos constante en el adulto. Las células cancerosas inducen la angiogénesis, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, necesarios para la supervivencia y expansión del tumor.
- Resistencia a la muerte celular. Las células normales se eliminan mediante apoptosis (un proceso de muerte celular programada), a menudo en respuesta al daño del DNA. Las células cancerosas evaden las señales apoptóticas.
- Desregulación de la energética celular. La división celular no controlada exige aumentos en el combustible y precursores biosintéticos que se obtiene al ajustar el metabolismo energético. A diferencia de las células normales, las células cancerosas realizan la glucólisis, incluso en presencia de oxígeno.

Las bases moleculares y bioquímicas que subyacen en el proceso de transformación se están volviendo cada vez más claras y proporcionan información de importancia crítica para identificar nuevos objetivos de fármacos antineoplásicos.

## 2.2 Terapia citotóxica del cáncer

### 2.2.1 Desarrollo de fármacos antineoplásicos

Históricamente, los medicamentos para el tratamiento del cáncer se descubrieron mediante la prueba de los efectos citotóxicos de los compuestos en líneas celulares, órganos e incluso organismos completos. Se requirió un trabajo posterior para dilucidar el mecanismo de acción de los fármacos citotóxicos. En contraste, el descubrimiento moderno de fármacos contra el cáncer generalmente comienza con la identificación de un objetivo molecular. Este cambio ha sido posible gracias a una mejora dramática en nuestra comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a la patogénesis del cáncer.

La estrategia actual de la industria farmacéutica para controlar el crecimiento tumoral de manera selectiva es desarrollar medicamentos que interfieran con objetivos importantes en la angiogénesis tumoral, la invasión tumoral, la metástasis tumoral, el control del ciclo celular y la apoptosis <sup>[6]</sup>. La selección de objetivos individuales para el descubrimiento de medicamentos generalmente se basa en la información que se puede obtener de la literatura académica o en investigaciones originales no publicadas.

El descubrimiento de nuevos compuestos líderes, y posiblemente nuevos medicamentos, puede clasificarse esquemáticamente en los siguientes enfoques: la mejora de los medicamentos ya existentes, el cribado sistemático, la explotación retroactiva de la información biológica y los intentos de diseño basados en la información estructural de la proteína diana <sup>[7]</sup>.

En la síntesis de análogos de moléculas activas existentes, el objetivo es comenzar con los principios activos conocidos y, mediante diversas transformaciones químicas, preparar nuevas moléculas para los que se produce un aumento en potencia, se reivindica un mejor perfil de actividad específica, una mayor seguridad o una mejor formulación que sea más fácil de manejar por los médicos y enfermeras o más aceptable para el paciente.

El cribado sistemático de alto rendimiento involucra someter a prueba colecciones de cientos de miles de productos naturales o compuestos sintéticos contra un objetivo biológico mediante un bioensayo cuantitativo. Su propósito es identificar las moléculas que modulan

la actividad del objetivo biológico y que permitirán identificar compuestos líderes de entre los ensayos exitosos.

Una importante contribución al descubrimiento de nuevos principios activos proviene de la explotación de la información biológica. Esto significa información que se relaciona con un efecto biológico dado (fortuito o voluntario), provocado por algunas sustancias en humanos, en animales, o incluso en plantas o bacterias.

Los enfoques descritos hasta ahora se deben mucho al azar y carecen de originalidad. Un enfoque más científico se basa en el conocimiento de la diana molecular incriminada: enzima, receptor, canal iónico, proteína de señalización, proteína de transporte o DNA. Para ello se emplea el modelado por computadora para diseñar compuestos que se unen a regiones de la molécula diana que se sabe que son importantes para su función normal. Una estructura tridimensional de la molécula objetivo es un requisito previo para el diseño basado en la estructura <sup>[8]</sup>.

### 2.2.2 Fármacos antineoplásicos

Los compuestos utilizados en quimioterapia de enfermedades neoplásicas son muy variados en estructura y mecanismos de acción, lo que incluye fármacos alquilantes, antimetabolitos, agentes que dañan los microtúbulos, inhibidores de cinasas, hormonas y antagonistas de hormonas y fármacos inhibidores de la topoisomerasa <sup>[9]</sup>.

- Fármacos alquilantes

La base de las propiedades terapéuticas y tóxicas la constituye la capacidad de los fármacos alquilantes para interferir en la integridad y la función del DNA e inducir la muerte celular en los tejidos en proliferación rápida. Sus efectos antineoplásicos y citotóxicos guardan relación directa con la alquilación de aminas, oxígenos o fosfatos, así como en la formación de aductos con el DNA. Las mostazas nitrogenadas, alquilsulfonatos, nitrosoureas y complejos del platino pertenecen a esta categoría (figura 1).

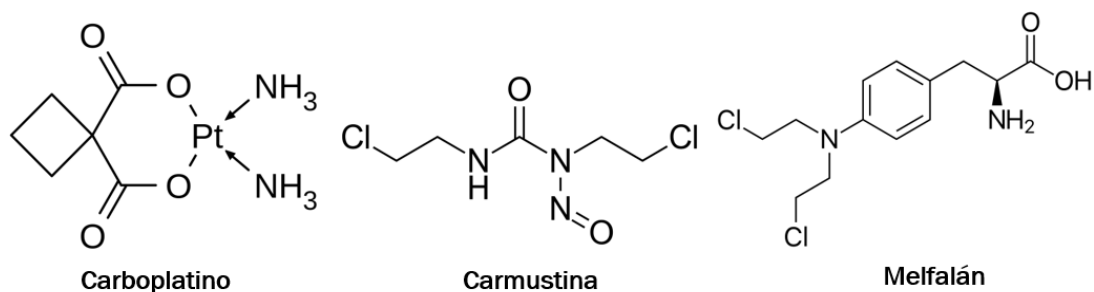


Figura 1. Estructuras químicas de algunos fármacos alquilantes.

- Antimetabolitos

Los antimetabolitos son sustancias que se parecen mucho a los metabolitos y, por lo tanto, interfieren con las reacciones fisiológicas que los afectan. Los antimetabolitos aplicados en la quimioterapia actúan interfiriendo con la síntesis de DNA. En resumen, los análogos del ácido fólico, como el metotrexato (figura 2), inhiben la dihidrofolato reductasa, necesaria para la síntesis de purina. Otros antimetabolitos son los análogos de purina o pirimidina, nucleótidos "fraudulentos" que se incorporan al DNA durante la síntesis del DNA y conducen a una replicación defectuosa del DNA.

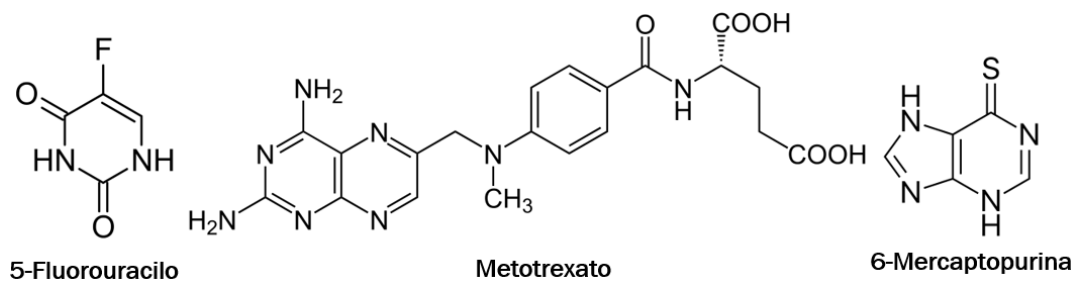


Figura 2. Estructuras químicas de algunos antimetabolitos.

- Agentes que dañan los microtúbulos

Algunos antineoplásicos actúan a través de los microtúbulos, ya sea al causar estabilización desorganizada de ellos en zonas alejadas del centriolo o al desestabilizar el huso mitótico, e interferir en la mitosis. Se conocen dos mecanismos principales para la interrupción de los microtúbulos mediada por interacción con tubulina: inhibición de la polimerización de tubulina y estabilización de la tubulina polimerizada. Este grupo lo conforman los alcaloides de la vinca, los taxanos y los epotilones (figura 3).



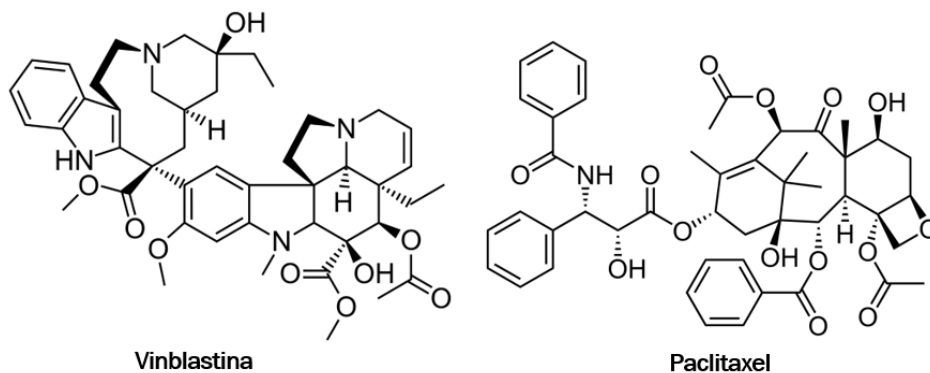


Figura 3. Estructuras químicas de algunos fármacos que dañan microtúbulos.

- Agentes inhibidores de las proteínas quinasas

Las proteínas quinasas son componentes fundamentales de las vías de transducción de señales que regulan el crecimiento y adaptación celulares al medio ambiente extracelular. Estas vías de señalización incluyen la transcripción génica, la síntesis de DNA y la regulación de eventos citoplásmicos. Ciertas quinasas son más activas en algunos tipos de células cancerosas y bloquearlas puede ayudar a evitar que las células cancerosas crezcan. Los inhibidores de la quinasa también pueden bloquear el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos que los tumores necesitan para crecer. El imatinib, erlotinib y sunitinib son ejemplos de moléculas pequeñas que son inhibidores de quinasas (figura 4).

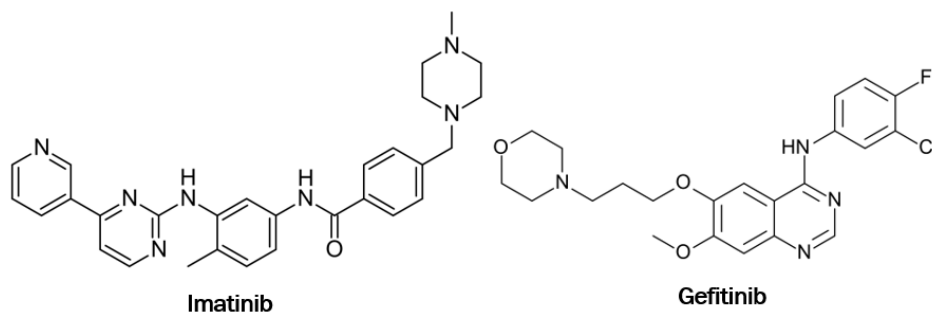


Figura 4. Estructuras químicas de algunos fármacos inhibidores de cinasas.

- Hormonas y antagonistas de hormonas

El crecimiento de varios cánceres depende de hormonas o es regulado por éstas. Estas moléculas interrumpen el eje estimulador creado por la reserva sistémica de andrógenos y estrógenos, inhiben la producción de hormonas o se unen a los receptores y por último bloquean por completo la expresión de genes que favorecen el crecimiento y supervivencia tumorales. El tamoxifeno y el letrozol pertenecen a este grupo de fármacos (figura 5).

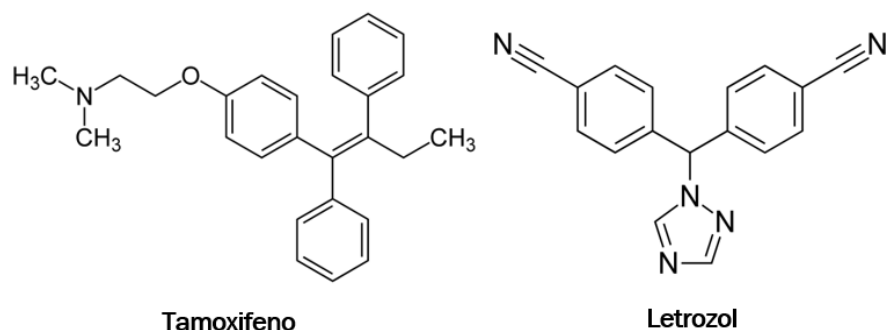


Figura 5. Estructuras químicas de algunos fármacos antagonistas de hormonas.

- Fármacos inhibidores de la topoisomerasa

Las topoisomerasas de DNA son enzimas nucleares que disminuyen la fuerza torsional en el DNA superhelicoidal con lo cual se permite que algunas regiones escogidas de DNA se conviertan en una zona suficientemente desenmarañada y relajada al grado de permitir la replicación, reparación y transcripción. Hay dos clases de topoisomerasas (I y II) que median la rotura y resellado de la cadena de DNA, y ambas se han convertido en el sitio de acción de los antineoplásicos. Los análogos de camptotecina inhiben la función de la topoisomerasa I, en tanto que otros compuestos químicos diferentes (como antraciclinas, epipodofilotoxinas y acridinas) inhiben la topoisomerasa II (figura 6).

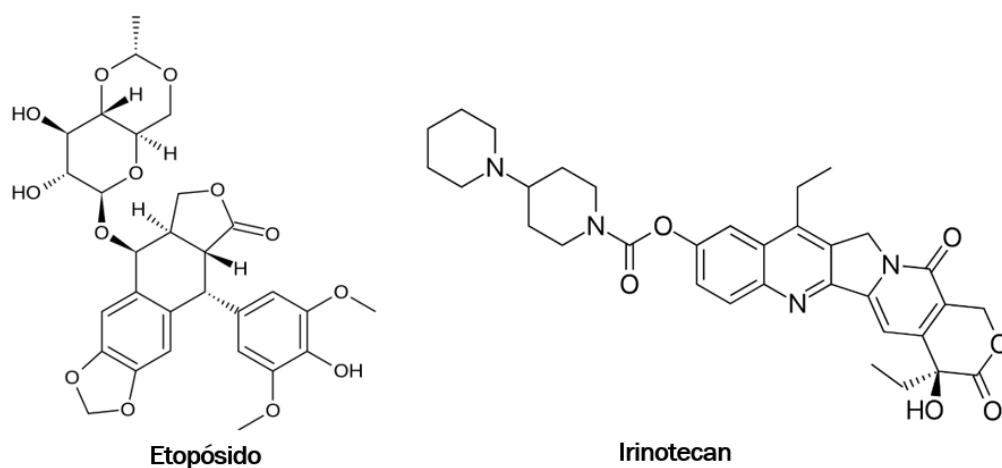


Figura 6. Estructuras químicas de algunos fármacos inhibidores de la topoisomerasa.

También hay estrategias novedosas, que aún se encuentran en fases tempranas de investigación, como los inhibidores de las proteínas inhibidoras de la apoptosis, los compuestos dirigidos contra las mitocondrias y los compuestos impulsores de la permeabilización de la membrana lisosomal (LMP) <sup>[10]</sup>.

### 2.2.3 Rol del lisosoma en la terapia del cáncer

Todas las células contienen lisosomas, son compartimentos delimitados por membrana que digieren a los materiales incorporados a la célula mediante endocitosis, además mediante un proceso denominado autofagia también digieren elementos de la propia célula, tales como orgánulos envejecidos que se han tornado obsoletos para la célula <sup>[11]</sup>.

Un lisosoma contiene cerca de 50 enzimas hidrolíticas diferentes que pueden hidrolizar todo tipo de macromoléculas biológicas (las catepsinas son las principales proteasas de este orgánulo). La membrana del lisosoma se halla protegida del efecto destructor de las enzimas hidrolíticas porque su cara luminal contiene una enorme cantidad de glicoproteínas <sup>[12]</sup>. Las enzimas del lisosoma alcanzan su actividad óptima en un pH ácido de 4.6, por lo que son hidrolasas ácidas. De esta manera si accidentalmente ocurriera una fuga de estas enzimas pueden hacer poco daño al citosol, ya que contiene unas condiciones de pH de 7.2 <sup>[13]</sup>.

Como se mencionó anteriormente, los lisosomas también participan en el proceso llamado autofagia. Este proceso se divide en cuatro pasos <sup>[14]</sup>:

- Nucleación y extensión de una membrana en una estructura en forma de U (fagóforo) que delimita una porción del citosol.
- Cierre del fagóforo en un compartimento cerrado y delimitado por doble membrana (autofagosoma).
- Fusión del nuevo compartimento con lisosomas para formar el autofagolisosoma.
- Digestión de la membrana interna del autofagolisosoma y de su contenido.

Como se observa en la figura 7 los lisosomas tienen un rol dual en la célula cancerosa. Por un lado, las proteasas lisosomales que se secretan extracelularmente pueden promover la tumorigénesis al favorecer la metástasis. Además, el secuestro lisosómico de múltiples agentes quimioterapéuticos reduce la accesibilidad de los fármacos a sus sitios objetivo, lo que resulta en un efecto citotóxico notablemente reducido y resistencia a los fármacos. Por otro lado, se ha demostrado que la liberación citosólica de enzimas lisosomales desencadena la muerte celular <sup>[15]</sup>.

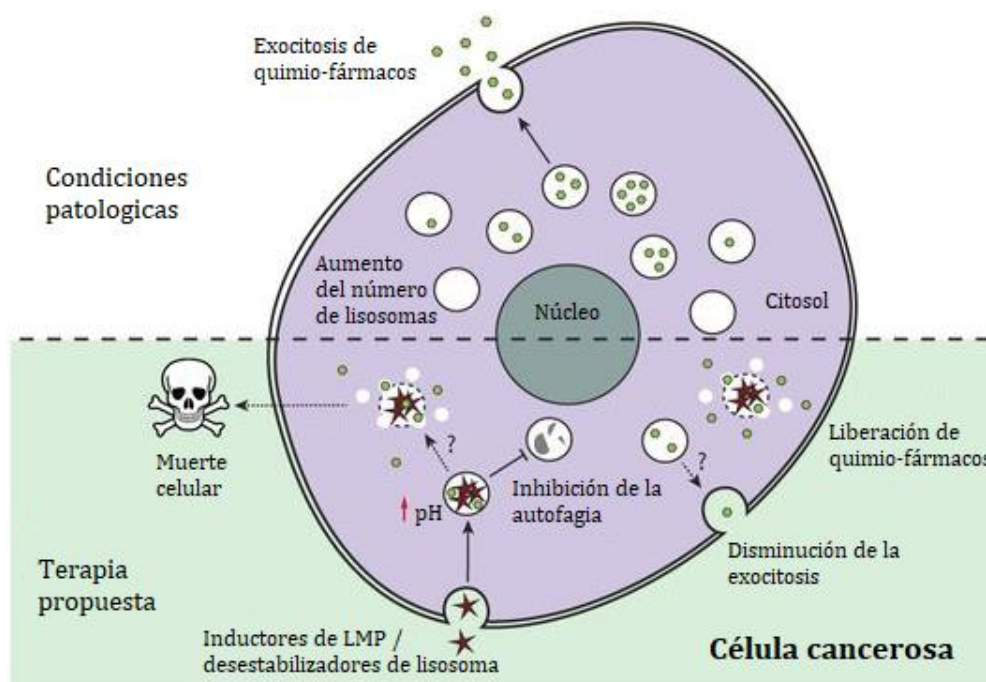


Figura 7. Rol dual de los lisosomas en la célula cancerosa (Modificado de [16]).

De manera más concreta, se sabe que la liberación de catepsinas contenidas en el lisosoma; si se liberan intracelularmente, pueden contribuir a la destrucción de la célula cancerosa; en cambio sí se liberan de forma extracelular, pueden actuar como enzimas pro-oncogénicas que, al descomponer la matriz extracelular, estimulan la angiogénesis, la migración y en último término la metástasis <sup>[17]</sup>.

Hace más de una década, se propuso que un daño limitado a los lisosomas desencadena la apoptosis y que uno extenso resulta en necrosis <sup>[18]</sup>. Con respecto a los criterios morfológicos la muerte celular puede clasificarse como apoptótica o necrótica. La apoptosis se caracteriza por fragmentaciones nucleares y de citosol en cuerpos apoptóticos, que requiere la activación de caspasas. La apoptosis está íntimamente relacionada con la integridad de la membrana mitocondrial y en este sentido los lisosomas no pueden competir en importancia con este otro orgánulo. Sin embargo, la célula no puede sobrevivir sin un sistema endocítico funcional y el arsenal de hidrolasas que alberga representa una amenaza si se libera en el citosol.

El evento crítico para la participación de los lisosomas en la muerte celular es la LMP. En la mayoría de los casos, la LMP amplifica la señalización de la muerte celular, pero también

puede iniciarla <sup>[19]</sup>. Los mecanismos efectores, que conducen a la muerte celular por la LMP, son poco conocidos, con la excepción de las catepsinas.

La liberación de catepsina B dirige a las células hacia la apoptosis, debido a su actividad proteolítica esta enzima induce a la proteína proapoptótica Bid y elimina a la proteína Bcl-xl que previene la apoptosis. Además, la catepsina B parece degradar una cisteína proteasa que de otro modo habría eliminado la Bax, otra proteína proapoptótica, manteniendo de manera indirecta los niveles celulares de la proteína Bax. El esfuerzo concertado de estos tres eventos tempranos aleja el equilibrio del destino celular de la necrosis hacia la apoptosis <sup>[20]</sup>. La catepsina D también ha sido asociada con la liberación de citocromo c mediada por Bax debido a la activación proteolítica de Bid. Por otra parte, la apoptosis se asoció con la acidificación citosólica, proporcionando así un entorno más favorable para la escisión de Bid mediada por la catepsina <sup>[21]</sup>.

Existen otras explicaciones de como la LMP induce la muerte celular. Una de ellas es que las células cancerosas exhiben tasas metabólicas más altas y una mayor acumulación lisosomal de hierro <sup>[22]</sup>. Esto provoca un tipo de muerte celular llamada ferroptosis, donde ocurre la sensibilización mediada por hierro a las especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por LMP <sup>[23,24]</sup>.

Un último mecanismo mediante el cual la LMP se ha asociado con la muerte celular ocurre al deshabilitar la eliminación de orgánulos dañados por autofagia <sup>[25]</sup>. Se ha demostrado que algunos cánceres tienen una clara dependencia de la autofagia <sup>[26]</sup>, en estos casos la inhibición farmacológica de la autofagia conduce, en última instancia, a una importante supresión del crecimiento de las células de cáncer <sup>[27]</sup>. Sin embargo aún no se conocen completamente las conexiones moleculares entre la autofagia y la muerte celular y, en diferentes contextos, la autofagia puede promover o inhibir la muerte celular <sup>[28]</sup>.

En términos teóricos, todos estos factores hacen que los lisosomas de las células cancerosas sean una potencial diana terapéutica de la muerte celular mediada por los lisosomas. Esto ha quedado demostrado por el uso de moléculas que han tenido éxito aprovechando este enfoque <sup>[29-31]</sup>.

## 2.3 Detergentes lisosomotrópicos

### 2.3.1 Origen y definición

El término lisosomotropismo fue propuesto en 1974 por Christian de Duve y colaboradores y se usa para designar a todas las sustancias que se incorporan selectivamente en los lisosomas <sup>[2]</sup>. Esta propiedad caracteriza a muchos agentes biológicamente activos, y en general tiene una relación íntima con sus efectos farmacológicos, terapéuticos, tóxicos o patógenos. Como se verá más adelante el lisosomotropismo puede conferirse artificialmente a casi cualquier sustancia mediante un acoplamiento adecuado con un portador apropiado.

Ya se conocen algunos agentes lisosomotrópicos lo que indica que este campo de investigación ofrece abundantes posibilidades para un nuevo tipo de diseño de fármacos, con aplicaciones para muchas enfermedades diferentes, incluidas, entre otras, infecciones microbianas, parasitosis y cáncer. Varios de ellos son fármacos que se usan en distintos tipos de enfermedades, algunos incluyen a la cloroquina, la amiodarona, el tamoxifeno, la amantadina, la imipramina y la leelamina <sup>[32-35]</sup>.

Posteriormente, surgió el término de detergente lisosomotrópico propuesto en 1979 por Firestone y colaboradores. El término se usa para designar a todas las sustancias que, además de acumularse en los lisosomas, pueden romper las membranas de estos orgánulos cuando alcanzan cierta concentración <sup>[36]</sup>. Se argumentó que las bases débiles con una larga cadena hidrocarbonada también se acumularían en los lisosomas. La forma catiónica intralisosómica además tendría propiedades de detergencia, y se podría esperar que rompa la membrana del lisosoma. También postularon que estas sustancias serían citotóxicas, como consecuencia de su acción sobre los lisosomas y que serían inocuas para células que no tienen lisosomas como los eritrocitos.

Desde entonces se han descrito varias sustancias con supuesta actividad de detergente lisosomotrópico, para las cuales se ha reportado su toxicidad en una gran variedad de tipos celulares <sup>[37-41]</sup>. En la figura 8 se muestran las estructuras de algunos detergentes lisosomotrópicos.

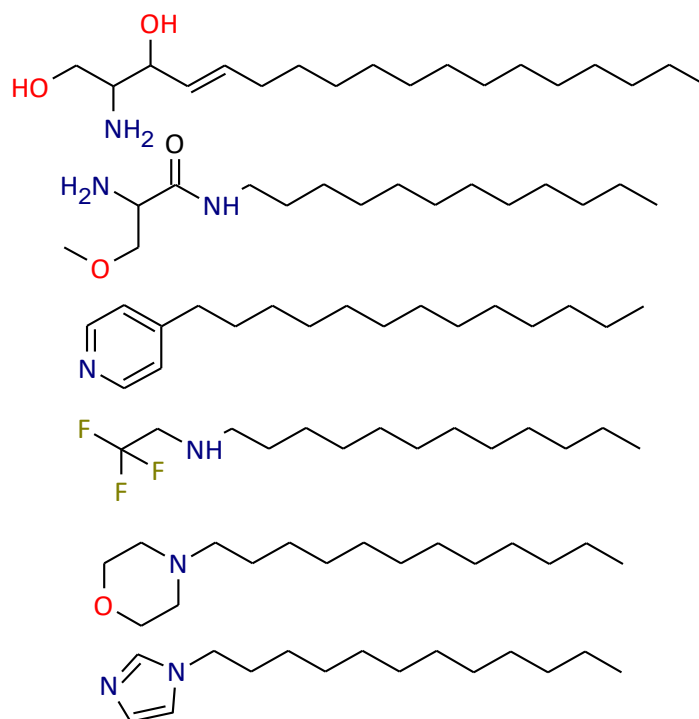


Figura 8. Estructuras químicas de algunos detergentes lisosomotrópicos.

### 2.3.2 Propiedades fisicoquímicas de los agentes lisosomotrópicos: pKa y logP

Se sabe que los fármacos catiónicos lisosomotrópicos se concentran en los compartimentos ácidos de las células debido a la baja retrodifusión de la molécula protonada, tal como se ilustra en la figura 9 <sup>[42]</sup>. Dicho fenómeno puede ser llamado acumulación por protonación y teóricamente depende de dos propiedades fisicoquímicas de la molécula: el pKa y el logP.

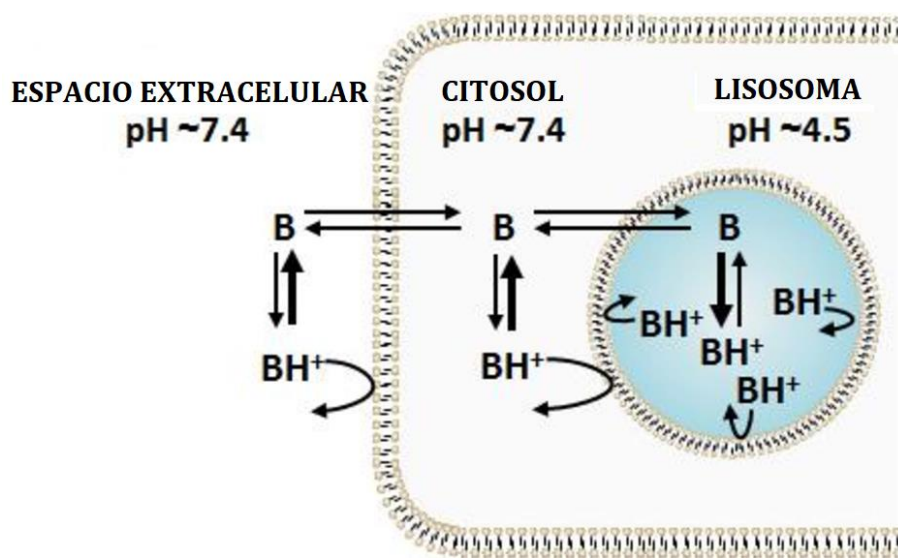


Figura 9. Acumulación lisosomal por protonación (Modificado de [38]).

El pKa es la medida logarítmica, en base diez, de la constante de disociación ácida (Ka). Esta constante de disociación es una medida cuantitativa de la fuerza de un ácido en solución, determinada por la siguiente ecuación:

$$pKa = -\log(Ka)$$

De esta manera para las bases, el grado de disociación de una molécula está relacionada con el pKa y el pH del medio de acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbach <sup>[43]</sup>:

$$pH = pKa + \log \frac{[B]}{[BH^+]}$$

El coeficiente de reparto es una medida de la afinidad de una sustancia disuelta en agua hacia los lípidos y es útil para estimar cómo se distribuye, entre las biomembranas lipófilas y el citosol acuoso dentro de una célula <sup>[44]</sup>. Este coeficiente es una relación de las concentraciones en equilibrio de un compuesto no ionizado en las dos fases de disolventes inmiscibles (agua y n-octanol). Se ha elegido el n-octanol por ser un compuesto orgánico que simula bien el material lipídico de las membranas celulares. Por otro lado, el logP es el logaritmo en base 10 de dicho coeficiente. Matemáticamente se expresa de la siguiente manera:

$$\log P = \log \left( \frac{[soluta]_{octanol}}{[soluta]_{agua}} \right)$$

Los compuestos que tienen grupos ionizables existen en solución como una mezcla de diferentes formas iónicas. La ionización de esos grupos, y por lo tanto la relación de las concentraciones de las formas iónicas, depende del pH. El logaritmo del coeficiente de distribución octanol/agua, logD, representa dicha relación a cualquier valor de pH y suele ser más conveniente su uso para moléculas con grupos ionizables. Matemáticamente se expresa de la siguiente manera:

$$\log D = \log \left( \frac{[soluta]_{octanol}}{[soluta]_{agua}^{ionizado} + [soluta]_{agua}^{neutral}} \right)$$



De esta manera, las moléculas que poseen una forma catiónica en equilibrio (principalmente aminas) y que además son capaces de atravesar las membranas celulares mediante difusión simple, tienen más probabilidades de acumularse en los lisosomas <sup>[45]</sup>.

Recientemente, se realizó un cribado con cuarenta fármacos incluyendo antidepresivos, antipsicóticos, antiarrítmicos y anticancerígenos para determinar sus efectos lisosomotrópicos <sup>[46]</sup>. El ensayo reveló que, aunque estructuralmente y farmacológicamente diversos, los fármacos que eran lisosomotrópicos compartían ciertas propiedades fisicoquímicas. En general se observó que poseían un valor de  $\log P > 2$  y un pKa básico entre 6.5 y 11. En contraste, los fármacos que no se encontraban en estos intervalos no eran lisosomotrópicos.

### 2.3.3 Permeabilidad de la membrana lisosomal: parámetro $\alpha$

Conocer los rangos óptimos de las propiedades fisicoquímicas que permiten la acumulación en los lisosomas es útil, pero resulta mejor contar con modelos matemáticos que predigan y cuantifiquen el grado de acumulación.

Se han construido modelos para tal fin, algunos son más complejos que otros. Uno de ellos predice la acumulación de moléculas en el citosol, lisosoma y mitocondria, usando para ello la ecuación de Fick-Nernst-Planck <sup>[47]</sup>. Dicho modelo celular considera la difusión de moléculas iónicas y neutras a través de biomembranas, la disociación a iones mono o bivalentes, adsorción a lípidos y atracción o repulsión eléctrica.

Un modelo más sencillo es el que fue planteado por Christian de Duve, expresado en términos de un equilibrio de difusión pasiva y un equilibrio de disociación <sup>[2]</sup>. Dicho modelo parte de un sistema de dos ecuaciones diferenciales de las cuales es posible deducir la siguiente ecuación que describe al sistema en el estado estacionario:

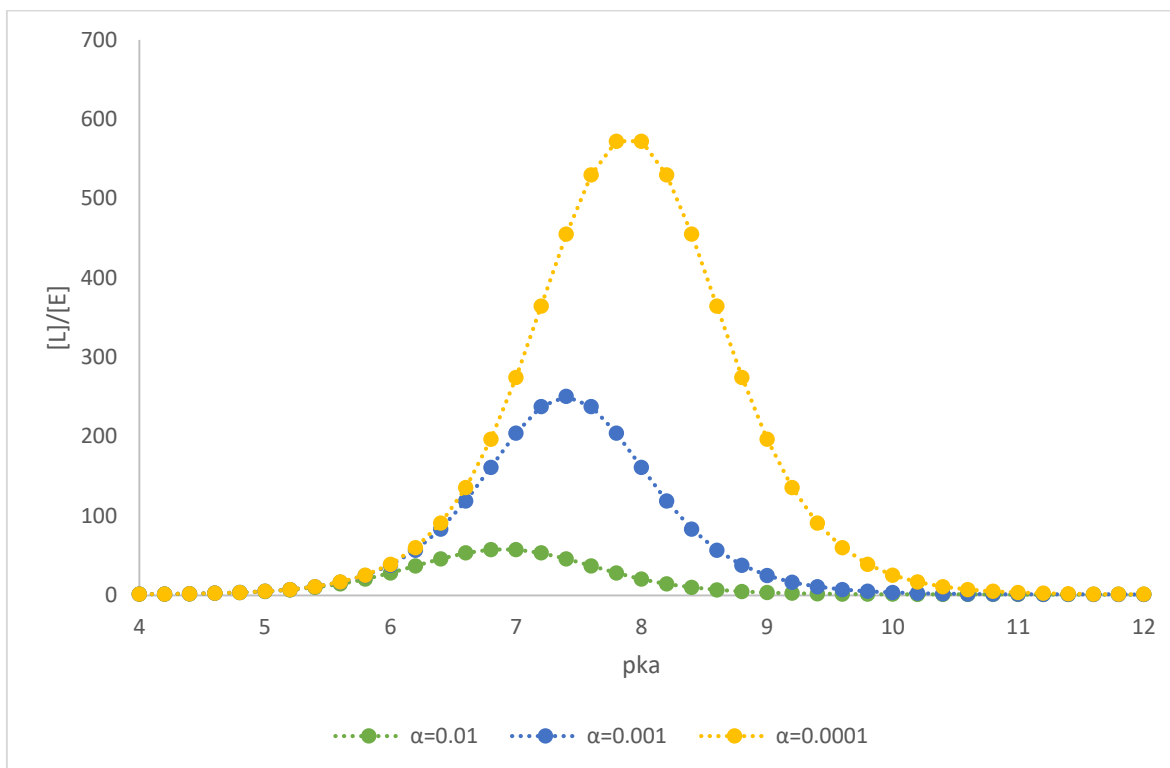
$$\frac{[Lisosoma]}{[Extracelular]} = \frac{(\alpha[H^+]_E + Ka)([H^+]_L + Ka)}{([H^+]_E + Ka)(\alpha[H^+]_L + Ka)}$$

Donde Ka representa la constante de disociación ácida de la molécula y  $[H^+]$  representa la concentración de protones en espacio extracelular o el lisosoma según corresponda.

Además, la ecuación contiene el parámetro  $\alpha$  que se refiere a la relación del coeficiente de permeabilidad de la membrana lisosómica para la molécula en sus formas ionizada ( $P_1$ ) y no ionizada ( $P_0$ ):

$$\alpha = \frac{P_1}{P_0}$$

Según dicha ecuación, en el estado estacionario las concentraciones de soluto en el espacio lisosomal dependen fundamentalmente del pKa y de la permeabilidad para la forma ionizada y no ionizada de la molécula. En la gráfica 1 se muestra el cociente de la concentración lisosomal y extracelular contra pKa, lo que da una curva en forma de campana. El grado máximo de secuestro lisosomal y el pKa al cual esto ocurre es sensible a la magnitud del parámetro  $\alpha$  [48]. Teóricamente mientras más se aproxime a cero el valor de  $\alpha$  mayor será su acumulación en los lisosomas. Esta influencia ha sido confirmada experimentalmente, demostrando que el valor de  $\alpha$  tiene un gran impacto sobre la capacidad de acumulación lisosomal [49].



Gráfica 1. Influencia del parámetro  $\alpha$  en la acumulación lisosomal.

La solución explícita de las ecuaciones diferenciales planteadas por Christian de Duve no se había realizado anteriormente por considerarse que el sistema sería muy complicado de resolver por métodos analíticos. En consecuencia, solo se habían discutido las propiedades generales de la solución en el estado estacionario por métodos numéricos. En el anexo 8.2 se muestra, por primera vez, la resolución analítica de dicho sistema de ecuaciones diferenciales.

#### 2.3.4 Propiedades fisicoquímicas de los detergentes: HLB y geometría

Los tensioactivos son generalmente compuestos orgánicos anfifílicos, lo que significa que contienen grupos hidrófobos (colas hidrocarbonadas) y grupos hidrófilos (sus cabezas). Por lo tanto, un tensioactivo contiene un componente insoluble en agua y un componente soluble en agua.

El balance o equilibrio hidrófilo-lipofílico (HLB) permite clasificar a los tensioactivos, ya que es una medida del grado en el que estos son hidrófilos o lipófilos. Puede ser determinado mediante el cálculo de los valores para las diferentes regiones de la molécula, tal como lo describe Griffin o Davies <sup>[50,51]</sup>.

Los tensioactivos se clasifican en lipófilos con valores de HLB menores de 10, e hidrófilos con valores de HLB mayores de 10. Dentro de estos grupos se encuentran otros subgrupos de acuerdo al valor de HLB: antiespumante (1.5 a 3), emulsionante agua en aceite (3 a 6), humectante (7 a 9), detergente (13 a 15), emulsionante aceite en agua (12 a 16) y solubilizante (15 a 18).

Los detergentes tienen la capacidad de destruir la bicapa lipídica, solubilizando proteínas de la membrana o estabilizando fragmentos de membrana. Cuando se mezclan con membranas, los detergentes rompen la barrera lipídica interrumpiendo la interacción lípido-lípido, lípido-proteína y proteína-proteína. Los detergentes, al igual que los lípidos, se asocian entre ellos y se unen a superficies hidrofóbicas tal como se observa en la figura 10.

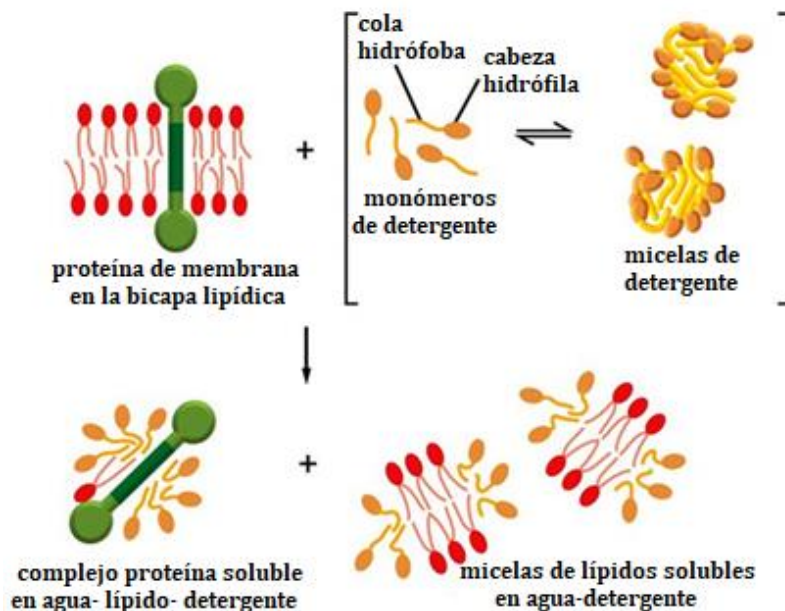


Figura 10. Rompimiento de membranas por detergentes (Tomado de [14]).

A baja concentración los detergentes son monoméricos en solución, pero cuando su concentración aumenta hasta valores superiores a un límite se agregan formando micelas. La forma y el tamaño de una micela está en función de la geometría molecular de las moléculas de agente tensioactivo. Esto se debe a las consideraciones geométricas simples expresadas por la relación del parámetro de empaquetado crítico de tensioactivo (CPP):

$$CPP = \frac{v}{a_0 l_c}$$

Donde  $v$  es el volumen de la cola,  $a_0$  es el área del grupo de cabeza efectiva y  $l_c$  es la longitud de la cadena. Cuando  $0 < CPP \leq \frac{1}{3}$  solo existen micelas esféricas en solución. Si en cambio  $\frac{1}{3} < CPP \leq \frac{1}{2}$  las agregaciones con una forma hexagonal son más probables. Mientras que, para el valor  $\frac{1}{2} < CPP \leq 1$ , hay un equilibrio entre los tamaños del grupo de la cabeza y la cola, lo que causa que la molécula de tensioactivo forme agregados más planos con una estructura similar a la bicapa lipídica <sup>[52]</sup>. Como se muestra en la figura 11 los tensioactivos en forma de cono con una sola cola hidrocarbonada ( $CPP \leq \frac{1}{3}$ ) son más propensos a formar micelas y por lo tanto a destruir membranas.

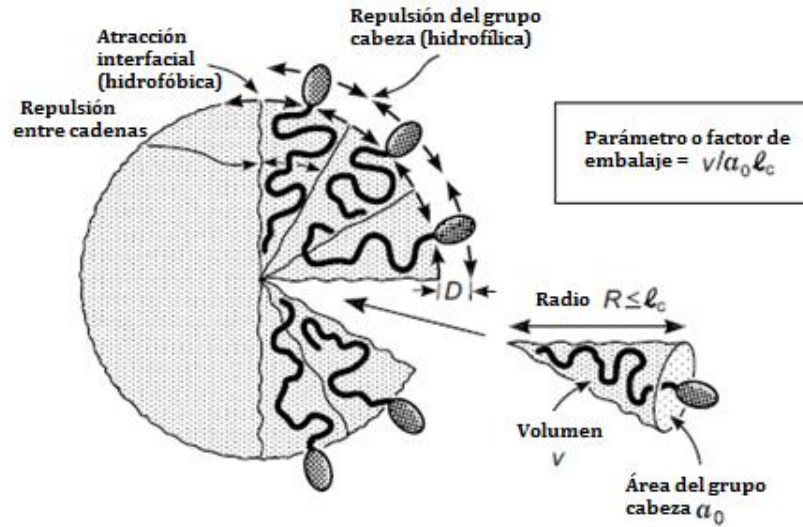


Figura 11. Parámetro de empaquetamiento para tensioactivos (Modificado de [52]).

La figura 12 muestra que las membranas pueden contener poros que proporcionan una ruta de baja energía para que diversas sustancias atraviesen las membranas. Dichos orificios pueden ser poros transitorios de corta duración, que involucran solo moléculas de lípidos, o canales de mayor duración, generalmente asociados a la presencia de detergentes.

Estos poros se formarán de manera bastante abrupta cuando la fracción molar de detergente alcance un cierto valor crítico,  $C_{crit}$ , que puede ser calculado con la siguiente ecuación [52]:

$$C_{crit} = e^{-2\gamma a_0 D / RkT}$$

Donde  $\gamma$  es la energía interfacial de la membrana,  $D$  es la distancia entre la interfaz hidrocarburo-agua donde ocurren las fuerzas de repulsión laterales entre los grupos cabeza,  $k$  la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura y  $R$  el radio del poro.

Si se considera un poro en una bicapa cuya geometría es como la de la superficie interna de una dona, o también llamada toroidal, puede calcularse el número de moléculas necesarias para formar un poro según la ecuación [52]:

$$N = \frac{A}{a_0} = \frac{2\pi^2 l_c (R + l_c) - 4\pi l_c^2}{a_0}$$

Donde  $R$  es el radio del poro y  $A$  el área interna del poro.

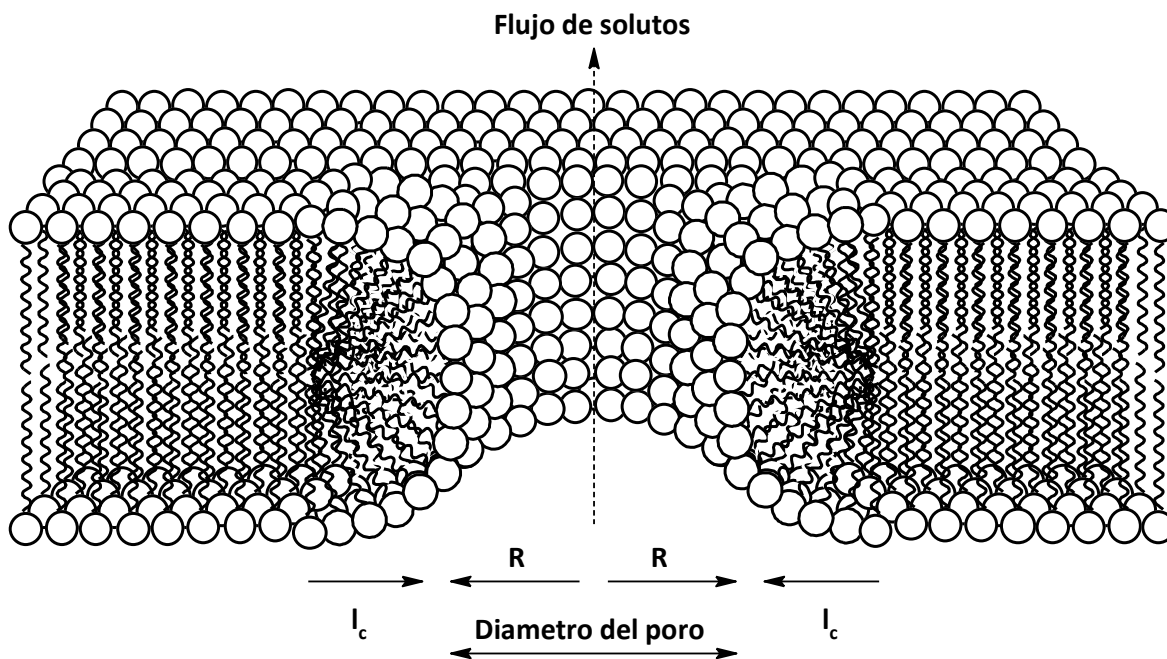


Figura 12. Formación de un poro en la membrana.

## 2.4 Funcionalización de los tocoferoles

### 2.4.1 Química de los tocoferoles

Los tocoferoles son derivados prenilados del benzodihidropirano y constituyen lo que habitualmente se denomina vitamina E. Después del descubrimiento de esta vitamina se propuso que su función bioquímica es la de ser un antioxidante soluble en grasa <sup>[53]</sup>.

La vitamina fue aislada por primera vez en 1935 a partir del aceite de germen de trigo como concentrado oleoso <sup>[54]</sup>. Los intentos de investigar la estructura de la vitamina revelaron dos compuestos estructuralmente similares de la vitamina:  $C_{29}H_{50}O_2$  y  $C_{28}H_{48}O_2$ . El compuesto  $C_{29}H_{50}O_2$  recibió el nombre de  $\alpha$ -tocoferol, mientras que el otro recibió el nombre de  $\beta$ -tocoferol <sup>[55]</sup>. La estructura del  $\alpha$ -tocoferol fue aclarada mediante análisis elemental de su descomposición térmica y oxidativa, que también expuso a cuatro miembros de la familia de la vitamina E, incluidos:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  tocoferol <sup>[56]</sup>. Algunas décadas más tarde, se descubrieron cuatro miembros adicionales de la familia del tocoferol en el aceite de palma:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  tocotrienol <sup>[57]</sup>.

De esta manera, si la cadena lateral se encuentra o no saturada, se distinguirán los tocoferoles de los tocotrienoles; en cada una de estas dos series la posición y la naturaleza de los sustituyentes determinan la existencia de cuatro compuestos diferentes <sup>[58]</sup>, tal como se puede ver en la figura 13.

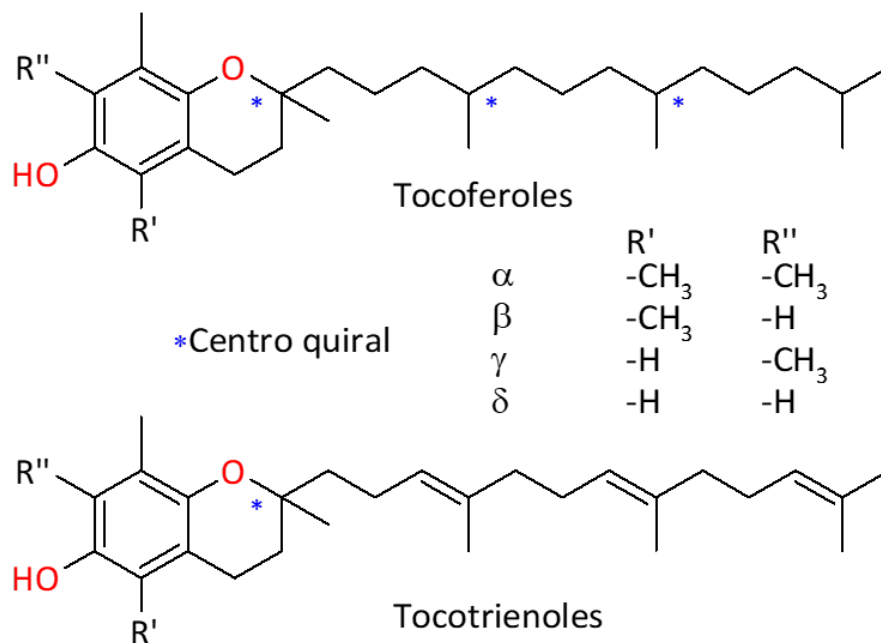


Figura 13. Clasificación de los componentes de la vitamina E.

En suplementos comerciales, el acetato de  $\alpha$ -tocoferol completamente sintético es más usado por ser más barato y menos propenso a oxidarse <sup>[59]</sup>. Los tocoferoles sintéticos se fabrican como una mezcla de ocho estereoisómeros. Esto se debe a que la molécula posee tres estereocentros y de acuerdo a la fórmula el número total de estereoisómeros hipotéticamente posibles no excederá de  $2^n$ , donde  $n$  es el número de estereocentros tetraédricos. El alfa-tocoferol natural está en la forma RRR, de modo que en la mezcla sintética éste representa el 12.5% del total.

#### 2.4.2 Oxidación de los tocoferoles

Como se dijo anteriormente los tocoferoles son antioxidantes liposolubles que se oponen a fenómenos oxidativos, sobre todo a la oxidación de ácidos grasos, para ello en primer lugar se convierte en un radical inerte y posteriormente, por hidratación, genera una p-quinona. La palabra quinona alude a toda la clase de ciclohexanodionas totalmente conjugadas.

Hay varias estrategias empleadas para la síntesis de tocoferol quinonas. El uso de complejos de metales de transición de alto potencial de oxidación, presenta una herramienta potencialmente útil para la oxidación de los tocoferoles a sus respectivas quinonas.

En casos sencillos las quinonas pueden producirse en un alto rendimiento a través de la exposición de fenoles con dicromato de sodio  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  en  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , llamado reactivo de Jones <sup>[60]</sup>. En casos más difíciles el nitrosodisulfonato de dipotasio  $\text{K}_2(\text{SO}_3)_2\text{NO}$ , también llamado sal de Fremy, puede ser una opción <sup>[61]</sup>.

Se ha informado que diversos aromáticos oxigenados, incluidos los tocoferoles, podrían oxidarse a la correspondiente quinona utilizando una oxidación con soporte de sílice con nitrato de amonio cérico  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$  (CAN) con buen rendimiento <sup>[62]</sup>. El cerio (IV) se prepara generalmente como sal de nitrato de amonio cérico porque es relativamente no tóxico, fácil de manejar y estable <sup>[63]</sup>. También se ha reportado la síntesis eficiente de quinonas a partir de tocoferoles utilizando un sistema catalítico de metiltrioxorenio y peróxido de hidrógeno (MTO/  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) <sup>[64]</sup>.

Un último método para la oxidación de los tocoferoles a sus respectivas quinonas involucra el cloruro férrico  $\text{FeCl}_3$  <sup>[65]</sup>. El hierro (III) es un oxidante eficiente debido a su relativamente alto potencial redox de  $\sim 0.771$  V. Tras la oxidación de compuestos aromáticos ricos en electrones, el hierro (III) se reduce a hierro (II) en una transferencia de un electrón, por lo tanto, se requieren dos equivalentes de  $\text{FeCl}_3$  para la completa oxidación de los tocoferoles a las quinonas <sup>[66]</sup>. La figura 14 muestra el esquema general para la síntesis de tocoferol quinonas a partir de sus tocoferoles progenitores.



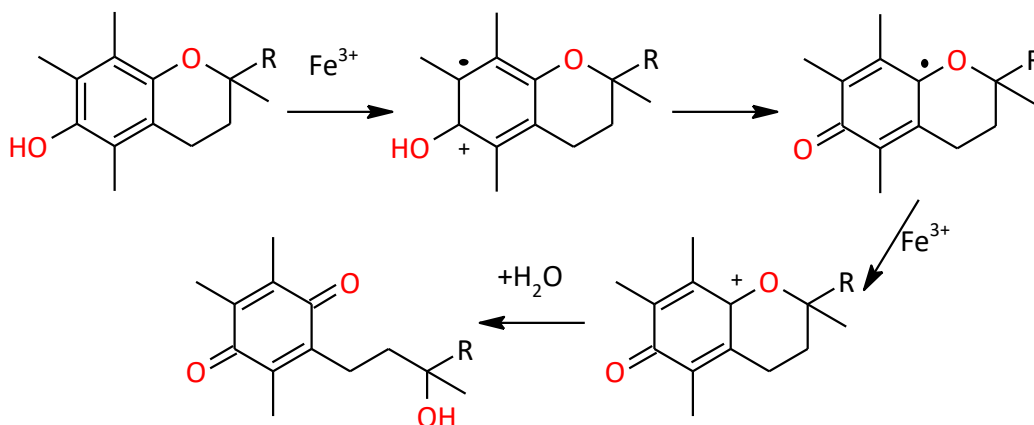


Figura 14. Oxidación del tocoferol por acción de Fe(III).

### 2.4.3 Aminación reductiva de aldehídos y cetonas

La aminación reductiva es el método más generalizado de síntesis de aminas. Primero se forma un derivado de imina o de oxima, utilizando una cetona o un aldehído y, a continuación, se reduce la imina u oxima a amina. La aminación reductiva permite obtener una amina primaria, secundaria o terciaria, dependiendo si se parte de amoniaco, de una amina primaria o de una amina secundaria, como se puede ver en la figura 15 <sup>[67]</sup>.

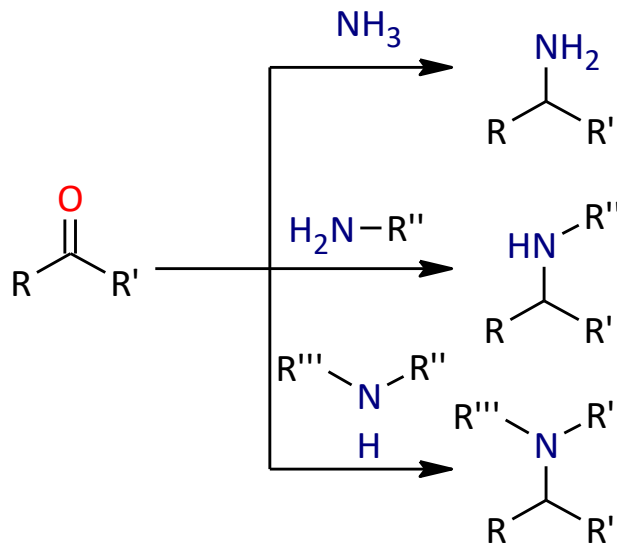


Figura 15. Aminación reductiva de aldehídos y cetonas.

La reducción de iminas a aminas puede realizarse por hidrogenación catalítica, ácido fórmico o hidruros (como hidruro de litio aluminio  $\text{LiAlH}_4$  o borohidruro de sodio  $\text{NaBH}_4$ ) <sup>[68]</sup>. Sin embargo, la elección del agente reductor dependerá de si la aminación reductiva se llevará a

cabo en un procedimiento de una o dos etapas, es decir, si la imina se reducirá al mismo tiempo que se va generando o si se hará en un paso posterior.

Las iminas se pueden reducir selectivamente en presencia de sus precursores carbonilo si se elige el agente reductor adecuado. Reactivos como el cianoborohidruro de sodio  $\text{NaCNBH}_3$  y el triacetoxiborohidruro de sodio  $\text{Na}(\text{OAc})_3\text{BH}$  reaccionan selectivamente con los iones de iminio y se usan frecuentemente para aminaciones reductoras en un solo paso <sup>[69,70]</sup>.

Una alternativa consistiría en aislar la imina intermedia y reducirla posteriormente con cualquier agente reductor. Generalmente se prefiere el uso de hidruros o ácido fórmico sobre la hidrogenación catalítica en reacciones a pequeña escala. Es posible realizar la reducción mediante hidrogenación catalítica (que involucra la adición directa de hidrógeno diatómico bajo presión y en presencia de un catalizador) pero hay muchos factores involucrados en la reacción haciéndola más complicada con respecto a otros agentes reductores <sup>[71]</sup>.

Cuando se realiza la aminación reductiva en dos pasos es importante maximizar las condiciones de reacción que generarán la imina también llamada base de Schiff. El pH adecuado es crucial para favorecer la reacción y se ha encontrado que de manera general esta reacción es más rápida para un pH de alrededor de 4.5 <sup>[72]</sup>. Para alcanzar este pH es común usar ácidos minerales, como  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o  $\text{HCl}$ , o ácidos orgánicos como el ácido p-toluensulfónico o incluso ácidos de Lewis como  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{TiCl}_4$ ,  $\text{SnCl}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  y  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ . También hay que considerar que la formación de las iminas implica un proceso reversible (generalmente las provenientes de aminas aromáticas son más estables que las derivadas de aminas alifáticas) por lo que estas pueden hidrolizarse para obtener la amina y la cetona o aldehído iniciales. Para evitar la reversibilidad de la reacción eliminar el agua puede ser útil. El aparato de Dean Stark, los agentes deshidratantes, incluidos el sulfato de sodio  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y los tamices moleculares pueden ser de ayuda <sup>[73]</sup>.

#### 2.4.4 Condensación entre aminas y quinonas

Al igual que los aldehídos y cetonas las quinonas también poseen grupos carbonilos, sin embargo su reactividad frente a las aminas no se limita solamente a una reacción entre la amina y el grupo carbonilo.

Existen al menos tres tipos de reacciones de adición que pueden experimentar las p-quinonas con las aminas, estas son: la adición 1,2, la adición 1,4 sin tautomerismo y la adición 1,4 con tautomerismo. La figura 16 resume estos tres tipos de reacciones entre aminas y quinonas, más adelante se describen a detalle las características que deben de tener la amina y el sustrato para que la reacción ocurra preferentemente por una de las tres vías.

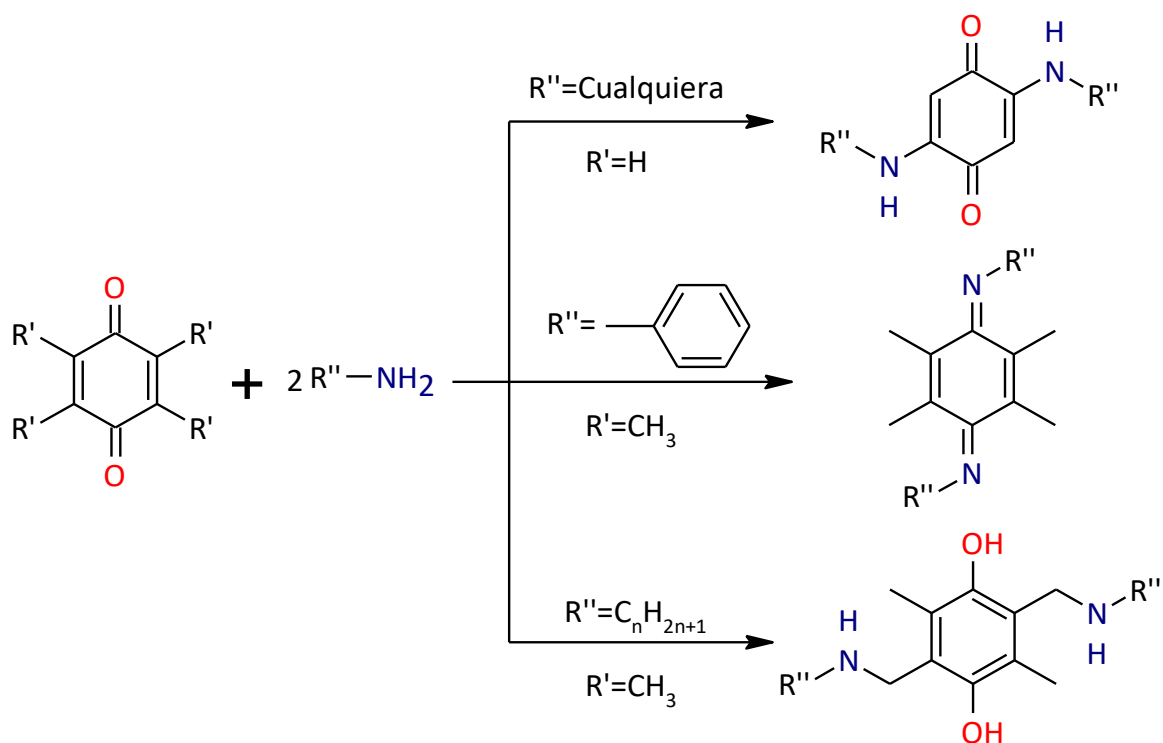


Figura 16. Resumen de las reacciones entre quinonas y aminas.

La adición 1,2 es en esencia igual que el primer paso de la aminación reductiva donde se forma el grupo imina. No todas las quinonas reaccionan de esta forma, solo las quinonas en las cuales se sustituyen con grupos alquilo todas las posibles posiciones para evitar una reacción tipo Michael se han utilizado con éxito en la formación de iminas<sup>[74]</sup>. Estas quinonas incluyen a las que están sustituidas con grupos metilo en las posiciones 2, 3, 5 y 6, así como las antraquinonas y las quinonas heterocíclicas<sup>[75]</sup>. También parece ser que principalmente las arilaminas son capaces de formar iminas, probablemente porque las iminas formadas son más estables que las derivadas de aminas alifáticas<sup>[76]</sup>.

La adición 1,4 sin tautomerismo ocurre cuando las posiciones susceptibles a una reacción tipo Michael no están sustituidas por grupos alquilo o bien cuando los grupos sustituidos

pueden ser fácilmente desplazados (por ejemplo, halógeno, alcóxido). En estos casos las quinonas se comportan como una cetona  $\alpha, \beta$  insaturada en la cual la amina puede adicionarse hasta dos veces para el caso de la p-benzoquinona <sup>[77]</sup>. Las aminas alifáticas primarias, secundarias e incluso las arilaminas pueden reaccionar de esta forma <sup>[78,79]</sup>.

La adición 1,4 con tautomerismo es la menos estudiada de las tres reacciones, pero se sabe que involucra una tautomerización previa antes de la reacción con la amina <sup>[80]</sup>. Para ello una quinona sustituida con grupos metilo se interconvierte en un metiluro de quinona en presencia de una base <sup>[81]</sup>. Un metiluro de quinona es un tipo de compuesto orgánico conjugado que contiene un ciclohexadieno con un carbonilo y un grupo metileno exocíclico. El carbonilo y el metileno están generalmente orientados orto o para entre sí.

Una vez formado el metileno exocíclico de la quinona reacciona con una amina a través de una reacción tipo Michael lo que conlleva a la aminación de la cadena lateral y a la regeneración de la aromaticidad del anillo para formar una hidroquinona. Principalmente las aminas alifáticas primarias y secundarias se adicionan de esta manera, además puede haber sucesivas adiciones si la hidroquinona se vuelve a oxidar en presencia de aire y existen más sustituyentes alquilo que permitan la tautomerización <sup>[82]</sup>. Si la quinona no está completamente sustituida entonces puede haber una competencia entre la adición 1,4 con tautomerismo y sin tautomerismo <sup>[83]</sup>. Recientemente esta reacción ha sido optimizada y se encontró que el proceso es promovido por aminas terciarias, en solventes próticos, en condiciones suaves y bajo atmósfera inerte <sup>[84]</sup>.

## 3 Definición del proyecto

---

### 3.1 Objetivo general

Sintetizar una serie de compuestos derivados del  $\alpha$ -tocoferol con posible actividad de detergente lisosomotrópico y predecir mediante modelos matemáticos su acumulación y sus efectos en la membrana lisosomal.

### 3.2 Objetivos particulares

- Realizar la síntesis de una serie de aminas derivadas del  $\alpha$ -tocoferol mediante tres reacciones consecutivas: hidrólisis del acetato de  $\alpha$ -tocoferol, oxidación del  $\alpha$ -tocoferol y condensación del  $\alpha$ -tocoferol quinona con una amina.
- Caracterizar los compuestos sintetizados de las tres reacciones consecutivas mediante espectroscopia IR, RMN  $C^{13}$  y RMN  $H^1$ .
- Calcular el valor teórico de algunas propiedades fisicoquímicas relevantes de los productos de síntesis mediante herramientas computacionales.
- Construir y resolver las ecuaciones de un modelo matemático simplificado que describa la acumulación lisosomal de bases monopróticas.
- Predecir mediante el modelo matemático desarrollado la acumulación lisosomal de cada uno de los productos finales de síntesis.
- Comparar las propiedades lisosomotrópicas de los productos finales de síntesis con otros compuestos que reporten actividad lisosomotrópica haciendo uso del modelo matemático desarrollado.
- Predecir mediante diversas ecuaciones el efecto de las propiedades tensioactivas de los productos finales de síntesis sobre la membrana.

### 3.3 Hipótesis

Si se somete al acetato de  $\alpha$ -tocoferol a una serie de reacciones consecutivas con el fin provocar la funcionalización de la molécula con diferentes grupos amino, entonces el sustrato adquirirá las propiedades fisicoquímicas adecuadas que, de acuerdo a reportes previos, caracterizan a los detergentes lisosomotrópicos.

### 3.4 Estrategia sintética

Se seleccionó el acetato de  $\alpha$ -tocoferol como sustrato de la serie de reacciones realizadas en este trabajo. La razón que llevaron a elegir dicho compuesto como punto de partida es porque cumple con la geometría deseada. Su estructura consiste en una larga cadena hidrocarbonada y en un extremo contiene un grupo polar capaz de transformarse en otros grupos funcionales. En este sentido el sustrato ofrece la base para realizar las reacciones químicas necesarias para introducir grupos amino en su estructura. Además, se trata de una sustancia comercialmente disponible, de fácil obtención y barato. Inicialmente se propuso la ruta sintética que se observa en la figura 17.

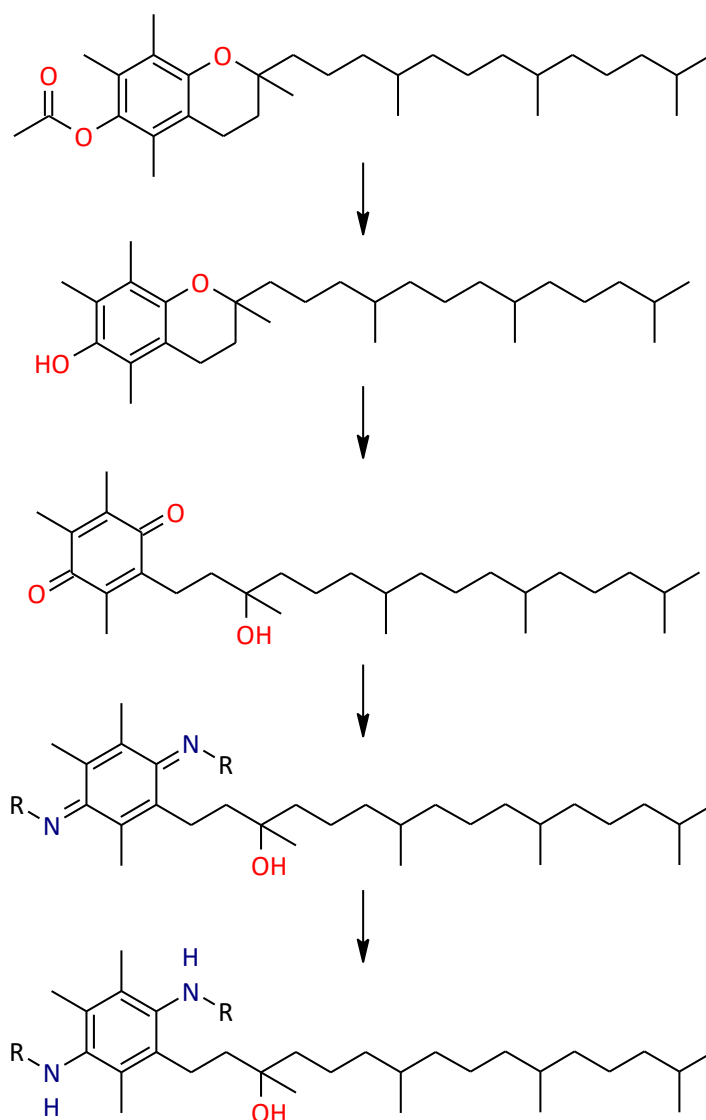


Figura 17. Ruta sintética original.

La propuesta consistía en una serie de reacciones consecutivas que involucraban la hidrólisis del acetato de  $\alpha$ -tocoferol, la oxidación del  $\alpha$ -tocoferol, la formación de iminas y su reducción para formar aminas. Esta propuesta se planteó teniendo en mente que la quinona proveniente de la reacción de oxidación sufriría la condensación clásica entre aminas y grupos carbonilo para formar iminas.

Sin embargo, como se menciona en la discusión de los resultados, fue necesario cambiar las últimas dos reacciones para seguir una ruta como la que se observa en la figura 18.

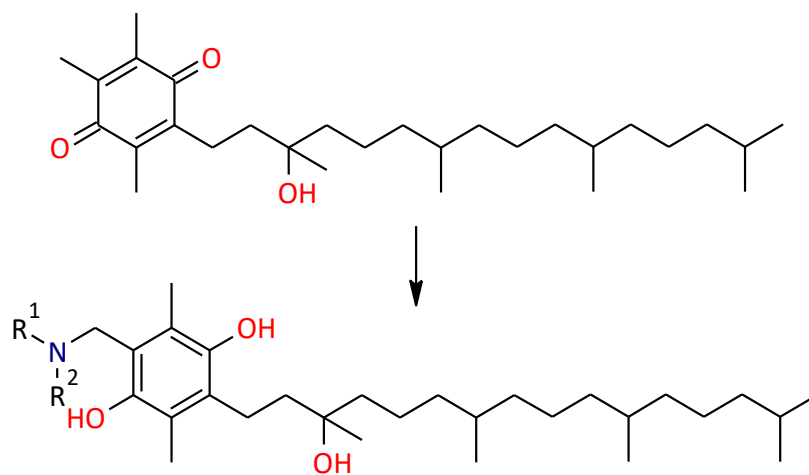


Figura 18. Ruta sintética modificada.

## 4 Sección experimental

---

### 4.1 Reactivos y materiales

Los reactivos empleados tiourea (99.5%), morfolina (99%) y trietilamina (99%) corresponden a la marca Merck. El ácido clorhídrico (37%), acetato de etilo (99%) y etanol (99%) fueron marca Fermont. El hidróxido de sodio (99%), dietanolamina (98.5%) y monoetanolamina (99.5%) se adquirieron con J.T. Baker. El sulfato de sodio anhidro (99%), diclorometano (99%) isopropilamina (99.5%) y propilamina (98%) fueron marca Sigma-Aldrich. El cloruro férrico hexahidratado (98%) se adquirió con Productos Químicos Monterrey. El acetato de  $\alpha$ -tocoferol (mezcla racémica) se obtuvo de capsulas de 400 mg marca Medimart. El agua utilizada fue previamente destilada en destilados de la FES Cuautitlán.

El seguimiento de las reacciones se realizó por cromatografía de capa fina (CCF), sobre cromatofolios marca Macherey-Nagel ALUGRAM SIL G/UV<sub>254</sub>. Los compuestos se purificaron por cromatografía en columna, usando silica gel marca MN Kieselger 60 (malla 70:230).

### 4.2 Equipos

Los rendimientos se obtuvieron a partir de la medición de las masas de los productos obtenidos (peso seco) utilizando una balanza analítica OHAUS PA214.

Parrilla con mantilla de calentamiento-agitación marca SEVE, modelo MCA 302-3 de 100 mL. Parrilla con placa de calentamiento-agitación marca Cimarec Barnstead/Thermolyne.

La revelación de los cromatofolios se hizo bajo irradiación UV a longitudes de onda de 254 nm con una lámpara de UV Spectroline modelo ENF-280C, 115 volt, 60 Hz. Short wave 254 nm, long wave 356nm. Para las reacciones en atmosfera inerte se ocupó una línea mixta de vacío-nitrógeno.



Los espectros UV se realizaron en un espectrofotómetro UNICO UV-2100 en la FES Cuautitlán, como disolvente se empleó etanol al 99% marca Fermont. Los espectros IR se obtuvieron con un espectrofotómetro FTIR SP 8000 Frontier Perkin Elmer en la FES Cuautitlán. Rango de frecuencia 4000-50  $\text{cm}^{-1}$ .

Los espectros de RMN  $\text{C}^{13}$  y RMN  $\text{H}^1$  se realizaron en un espectrómetro VARIAN +300 MHz en la FES Cuautitlán, otro equipo JEOL, modelo JNGSX-270 en el CICATA Legaria del IPN y otro equipo Bruker Advance en el Instituto de Química de la UNAM, 300 MHz  $\text{H}^1$ , 75 MHz  $\text{C}^{13}$ . Como disolvente se empleó cloroformo deuterado al 99.8% marca Merck. Los valores de desplazamiento químico delta se expresan en ppm y son relativos al tetrametilsilano TMS.

### 4.3 Metodología experimental

#### 4.3.1 Hidrólisis del acetato de $\alpha$ -tocoferol

En un matraz se pesaron aproximadamente 0.4 g (10 mmol, 2.4 eq.) de NaOH y se disolvieron en 20 mL de EtOH. Una vez disuelto el NaOH se adicionaron 2.0 g (4.23 mmol) de acetato de  $\alpha$ -tocoferol y se calentó a 70°C durante 1 hora bajo agitación constante. Al terminar la reacción se midió el pH y se neutralizó hasta alcanzar un pH=7.0 con HCl concentrado. Se guardó la mezcla de reacción para realizar la reacción de oxidación.

Para analizar el producto de hidrólisis por espectroscopia IR, RMN  $\text{C}^{13}$  y RMN  $\text{H}^1$  se trasvasó 1 mL de la mezcla de reacción anterior a un tubo de ensayo con aproximadamente 10 mL de agua destilada. Posteriormente se agregaron 2 mL de DCM, se agitó el tubo y con ayuda de una pipeta se transfirió la fase orgánica a un vial. Se agregó un poco de sulfato de sodio anhidro hasta eliminar el agua remanente y se decantó la solución a otro vial. Finalmente se permitió la evaporación del DCM.

#### 4.3.2 Oxidación del $\alpha$ -tocoferol

La mezcla de reacción de hidrólisis se repartió en cuatro matraces en porciones iguales (~1.05 mmol de  $\alpha$ -tocoferol por matraz). Para cada uno de ellos se preparó la solución oxidante como se muestra en la tabla 1.

Matraz	Temperatura (°C)	Solución oxidante	
		FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Disolvente
1	70	0.71 g (2.64 mmol, 2.5 eq.)	2.5 mL de EtOH
2	70		2.5 mL de agua
3	TA		2.5 mL de EtOH
4	TA		2.5 mL de agua

Tabla 1. Condiciones para la reacción de oxidación.

Las soluciones del agente oxidante se agregaron a la mezcla de reacción en 4 porciones de aproximadamente 0.6 mL a intervalos de media hora entre cada una. Las reacciones se mantuvieron bajo agitación constante a las temperaturas señaladas en la tabla 1. Cuando se hizo la última adición se esperó una hora y media más para completar la reacción. Una vez terminada la reacción se agregó un poco de tiourea a cada matraz para provocar la precipitación del hierro.

El tratamiento de cada una de las mezclas de reacción resultantes se hizo como se señala a continuación. Al día siguiente se decantó la mezcla de reacción a un embudo de separación y se adicionaron 15 mL de agua destilada y 4 mL de EtOAc. Se agitó suavemente para evitar formar una emulsión, se desechó la fase acuosa y se recibió la fase orgánica en un vial. Se agregó un poco de sulfato de sodio anhidro hasta eliminar el agua remanente de la extracción y se decantó a un nuevo vial. Finalmente se permitió la evaporación del EtOAc. Todos los productos de oxidación fueron analizados por espectroscopia UV, mientras que solo el producto del matraz 1 fue analizado por espectroscopia IR, RMN C<sup>13</sup> y RMN H<sup>1</sup>.

#### 4.3.3 Síntesis de las bases de Schiff

Se utilizaron tres aminas diferentes: propilamina, isopropilamina y monoetanolamina. Para ello en tres tubos se agregaron los reactivos que se muestran en la tabla 2.

Tubo	Tocoferol quinona	Amina	HCL
1	100 mg (0.22 mmol)	27 mg Propilamina (0.44 mmol, 2 eq.)	2 gotas al 10%
2		27 mg Isopropilamina (0.44 mmol, 2 eq.)	
3		28 mg Monoetanolamina (0.44 mmol, 2 eq.)	

Tabla 2. Condiciones para la síntesis de las iminas.

En todos los tubos se usó 0.5 mL de EtOH como disolvente. La mezcla se agitó a una temperatura de 70°C por 24 h. Las mezclas de reacción fueron analizadas por espectroscopia IR sin purificación previa.

#### 4.3.4 Síntesis de las aminas

Se utilizaron tres aminas diferentes: morfolina, dietanolamina y monoetanolamina. Para ello en tres tubos de Schlenk se agregaron los reactivos que se muestran en la tabla 3.

Tubo	Tocoferol quinona	Amina	Et <sub>3</sub> N
1	100 mg	20 mg Morfolina (0.22 mmol, 1 eq.)	23 mg
2	(0.22 mmol)	24 mg Dietanolamina (0.22 mmol, 1 eq.)	(0.22 mmol,
3		14 mg Monoetanolamina (0.22 mmol, 1 eq.)	1 eq.)

Tabla 3. Condiciones para la síntesis de las aminas.

En todos los tubos se usó 1 mL de EtOH como disolvente. Los tubos se taparon, se evacuaron y rellenaron con nitrógeno (2 ciclos). La mezcla se agitó a una temperatura de 70°C por 24 h. Las mezclas de reacción se sometieron a cromatografía en columna utilizando gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil una mezcla de EtOAc/DCM (3:1 v/v). Hacia el final de la cromatografía se aumentó gradualmente la polaridad usando EtOH. Los productos fueron analizados por espectroscopia IR, RMN C<sup>13</sup> y RMN H<sup>1</sup>.

#### 4.4 Metodología de los cálculos teóricos

A partir del modelo que se desarrolla en el anexo 8.2 se realizó una hoja de cálculo en Excel para predecir la concentración dentro de los lisosomas a lo largo del tiempo. Es importante señalar que para los cálculos matemáticos solo se consideraron bases monopróticas. La hoja de cálculo en Excel requiere que se introduzcan únicamente tres valores para predecir la distribución de las moléculas en la célula, estos valores son el pKa, el logP (cuando la molécula no está protonada) y el logD[BH<sup>+</sup>] (cuando la molécula está completamente protonada). El valor del pKa fue predicho usando el software MarvinSketch v.17.2.27. Para predecir los valores de logP y logD[BH<sup>+</sup>] se usó la herramienta en línea Chemicalize, su uso es gratuito pero requiere registro previo <sup>[85]</sup> (para corroborar estos valores se pueden ver los diagramas del anexo 8.3). El valor de logD[BH<sup>+</sup>] puede aproximarse tomando el logD del pH donde la microespecie ionizada alcanza su máxima concentración.

El modelo además necesita el coeficiente de permeabilidad ( $P_c$ ) para cada una de las microespecies, este fue calculado a partir del  $\log D$  o  $\log P$  correspondiente con la siguiente fórmula <sup>[86]</sup>:

$$\log P_c = -5.102 + 0.566 \log D$$

El modelo requiere de unos parámetros bien definidos que fueron seleccionados sin representar un escenario especial. El volumen, el área de la superficie y el pH describen cada compartimento. El citosol es neutro (valor predeterminado 7.2), el pH lisosomal es ácido (valor predeterminado pH 4.4) y el pH externo es 7.4, que es el pH normal de la sangre y también el pH de muchos medios de nutrición utilizados en el trabajo experimental. Para el caso de los volúmenes y las áreas de las superficies de los compartimentos se tomaron los valores reportados para un hepatocito <sup>[14]</sup>. La tabla 4 resume los parámetros del modelo.

Parámetro	Símbolo	Valor	Unidad
Volumen citosol	$V_2$	$2.70 \times 10^{-15}$	$m^3$
Volumen lisosoma	$V_3$	$5 \times 10^{-17}$	$m^3$
Área citosol	$A_2$	$2.2 \times 10^{-9}$	$m^2$
Área lisosoma	$A_3$	$4.4 \times 10^{-10}$	$m^2$
pH extracelular	$pH_1$	7.4	-
pH citosol	$pH_2$	7.2	-
pH lisosoma	$pH_3$	4.4	-

Tabla 4. Valores de los parámetros del modelo de acumulación.

Además, se seleccionó un valor de 1 con unidades arbitrarias para la concentración extracelular ( $C_1$ ) del soluto.

Una vez proporcionada esta información pueden calcularse los valores de las constantes  $\alpha$ ,  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$ ,  $\lambda_3$ ,  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ,  $k_4$ ,  $k_5$ ,  $k_6$ ,  $k_7$ ,  $a$  y  $b$ , para ser finalmente sustituidas en las siguientes fórmulas (ver la figura 19 y los detalles del modelo matemático en el anexo 8.2):

$$[Lisosomas] = \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} - \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} e^{-at} \left( \cos bt + \frac{a}{b} \sin bt \right)$$

$$[Citosol] = \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_2} + \frac{k_3 C_1}{b} e^{-at} \sin bt - \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_2} e^{-at} \left( \cos bt + \frac{a}{b} \sin bt \right)$$

$$\frac{[Lisomas]}{[Extracelular]} = \frac{(\alpha[H^+]_1 + Ka_1)([H^+]_3 + Ka_1)}{([H^+]_1 + Ka_1)(\alpha[H^+]_3 + Ka_1)}$$

$$t_{m\acute{a}x} = \frac{\pi}{b}$$

$$[Lisomas]_{m\acute{a}x} = \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} + \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} e^{-a\pi/b}$$

Además de las fórmulas del modelo de acumulación por protonación se utilizaron las siguientes fórmulas, expuestas anteriormente, para describir el comportamiento de los detergentes en la membrana:

$$CPP = \frac{v}{a_0 l_c}$$

$$N = \frac{2\pi^2 l_c (R + l_c) - 4\pi l_c^2}{a_0}$$

$$C_{crit} = e^{-2\gamma a_0 D / RkT}$$

La tabla 5 resume los parámetros de las fórmulas anteriores <sup>[52]</sup> (a excepción del radio de poro en la membrana que puede ser variable, los demás parámetros son constantes).

Parámetro	Símbolo	Valor	Unidad
Energía interfacial	$\gamma$	0.05	Jm <sup>-2</sup>
Distancia interfacial	D	4×10 <sup>-10</sup>	M
Constante de Boltzmann	k	1.381×10 <sup>-23</sup>	JK <sup>-1</sup>
Temperatura	T	298.15	K
Radio del poro	R	1-6	nm

Tabla 5. Valores de los parámetros para la formación de poros en la membrana.

Mientras que los parámetros  $a_0$ ,  $v$  y  $l_c$ , se estimaron mediante el cálculo de los descriptores geométricos proporcionados por el software MarvinSketch v.17.2.27. Se consideró que el área de proyección mínima, la longitud perpendicular al área mínima (de la cadena hidrocarbonada) y el volumen de Van der Waals son aproximadamente iguales a  $a_0$ ,  $l_c$  y  $v$  respectivamente (para corroborar estos valores se puede ver la información del anexo 8.4). También se calculó el valor de HLB para cada uno de los detergentes usando el mismo software.

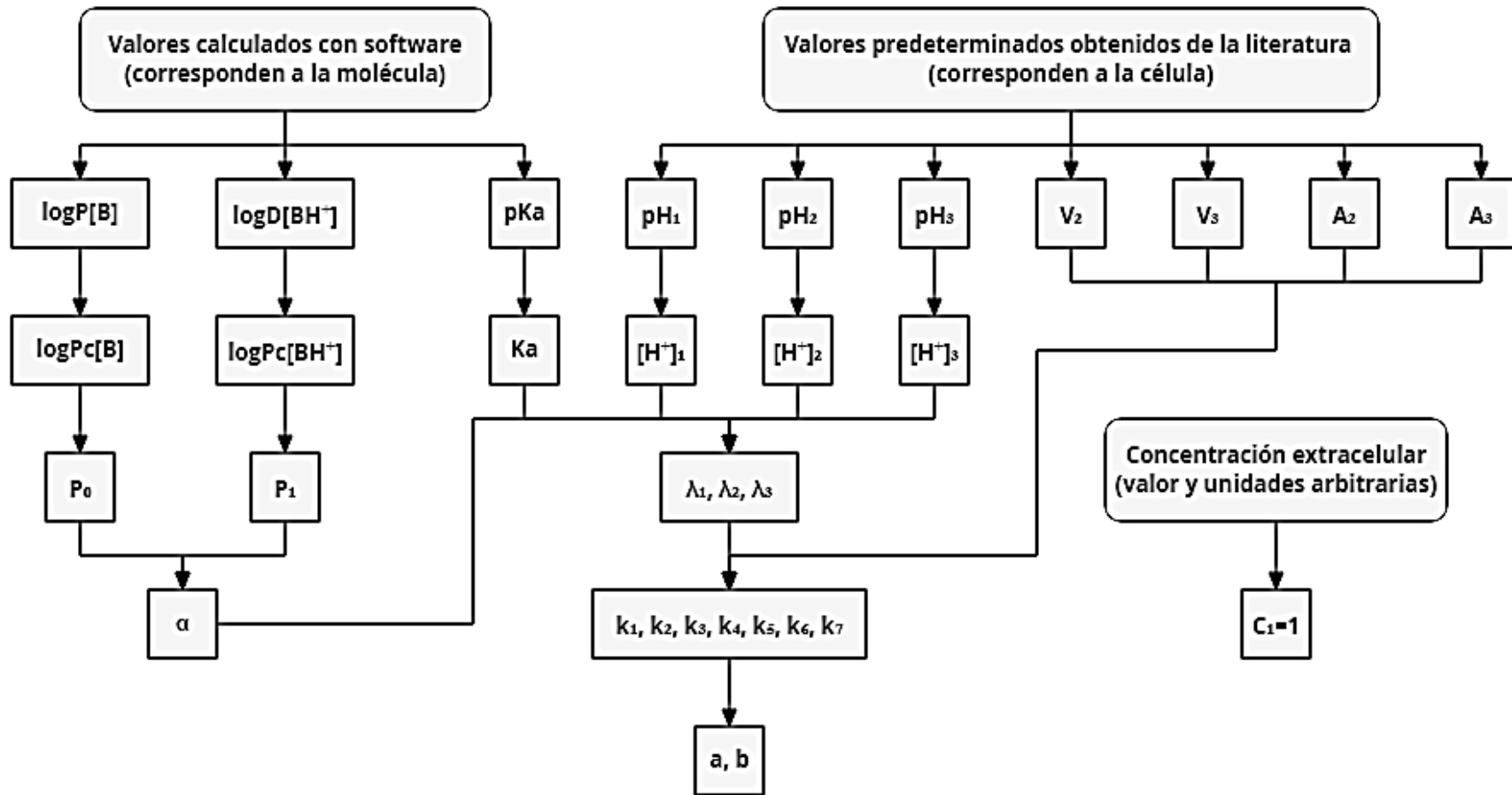


Figura 19. Secuencia que muestra el origen de las constantes del modelo matemático.

## 5 Resultados y discusión

### 5.1 De la reacción de hidrólisis

Mecanismo de Reacción. Durante la reacción ocurre el ataque del anión hidroxilo al grupo carbonilo del éster, produciendo la deslocalización de la carga hacia el átomo de oxígeno, conduciendo a un intermediario tetraédrico en el que el regreso de la carga negativa produce la eliminación del grupo etóxido. Bajo condiciones básicas los productos iniciales son las sales sódicas correspondientes, la adición de HCl conduce a la formación de los productos finales a través de una reacción ácido-base <sup>[61,87]</sup>.

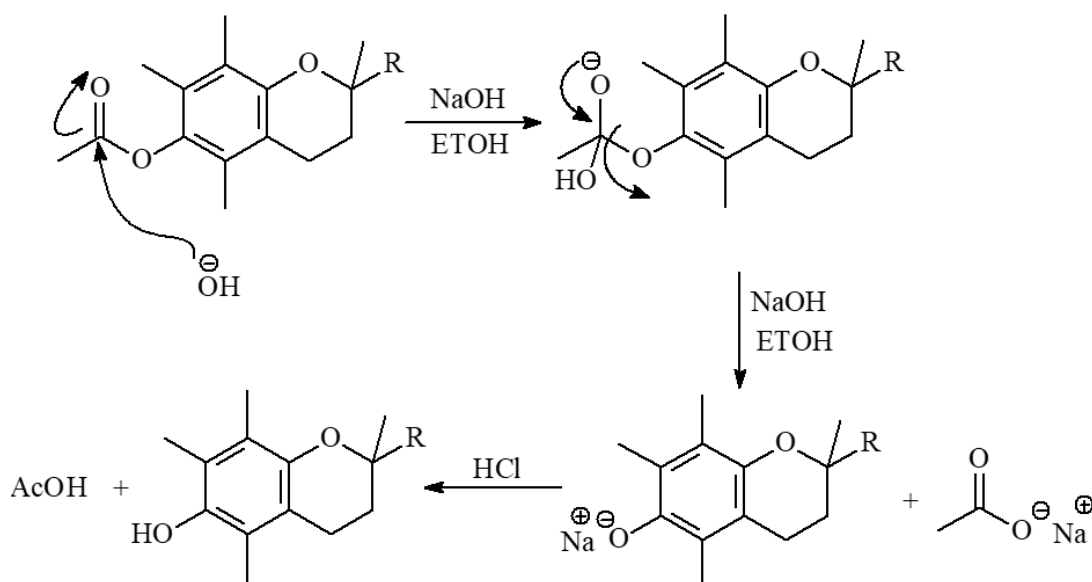


Figura 20. Mecanismo de la reacción de hidrólisis.

Caracterización del producto (sustrato: líquido oleoso transparente, producto: líquido oleoso amarillo, 98% de rendimiento).

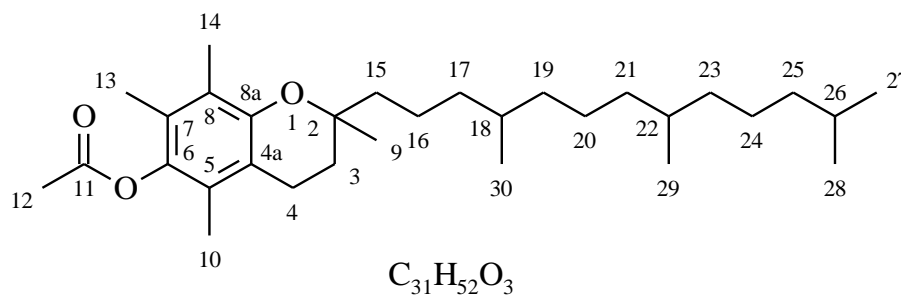


Figura 21. Numeración de los átomos del sustrato.

En el espectro No. 1 de referencia, que muestra tanto el espectro de RMN de  $H^1$  como de  $C^{13}$  el cual fue obtenido de la página electrónica comercial de Aldrich <sup>[88]</sup>, se observan las siguientes características estructurales.

En el espectro de RMN- $H^1$ , se observa a campo alto entre 0.7-0.9 ppm, 3 señales singlete que corresponden a los metilos alifáticos C27, C28, C29, C30. También se localizan entre 1.9-2.1 ppm 3 señales singlete que pertenecen a los tres metilos aromáticos C10, C13 y C14. En tanto que la señal metílica más desplazada a campo bajo ubicada en 2.3 ppm se asigna al metilo del grupo acetilo. La otra señal fina tipo singlete se observa en aproximadamente 1.3 ppm y se asigna al metilo C9. Entre 1.0 y 1.7 ppm se ubican varias señales múltiples que corresponden a los grupos metilenos  $CH_2$  y metinos (CH) de la cadena lateral hidrocarbonada incluyendo al metileno C3. Finalmente, la señal triplete ubicada en 2.6 ppm se debe al grupo metileno C4 debido a su posición vecina al sistema aromático el cual le produce desprotección <sup>[89,90]</sup>.

En el espectro de RMN- $C^{13}$ , parte superior del espectro No. 1 se observa una señal en 170 ppm que corresponde al C11 del grupo funcional éster, entre 117 y 150 ppm se detectan 6 señales que se asignan a los carbonos aromáticos C4a, C5, C6, C7, C8 y C8a, junto a la señal del disolvente  $CDCl_3$  señal múltiple en 78 ppm, se observa una señal localizada en 76 ppm que debe corresponder al C2, carbono vecino al átomo de oxígeno. Posteriormente se observan tres señales a campo alto entre 12-14 ppm que deben pertenecer a los carbonos metílicos C27, C28, C29 y C30, siendo los dos primeros equivalentes. Finalmente se detectan varias señales entre 19 y 40 ppm que se asignan a los carbonos alifáticos de tipo metilo, metileno y metino, C3, C4, C9, C10 y C12, y C13 a C30 <sup>[91-93]</sup>.

Los espectros No. 2 y No. 3 corresponden a los espectros de hidrólisis de RMN- $H^1$  y RMN- $C^{13}$  del alfa- tocoferol utilizado como sustrato en las reacciones y las características espectrales que muestran son exactamente similares a las analizadas en los espectros de referencia para este compuesto.

En el espectro de IR (espectro No. 4) se observa una banda ubicada en  $1750\text{ cm}^{-1}$  que se asigna al grupo carbonilo del éster. Así como una banda entre  $1250\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  debida a la tensión simétrica del enlace C-O-C <sup>[94]</sup>.



En el espectro No. 5 obtenido a partir de una muestra de la reacción de hidrólisis se observa la pérdida de la señal singulete del metilo del grupo acetilo ubicado en 2.3 ppm, al mismo tiempo se determina la aparición de una señal pequeña ancha ubicada en 4.3 ppm que se debe al grupo OH fenólico. Adicionalmente estos cambios fueron corroborados por un espectro de referencia (espectro No. 6). Las demás señales no sufren cambio alguno ya que no se realiza ningún otro cambio en la estructura del compuesto.

En tanto que en el espectro No 7 de RMN-C<sup>13</sup>, la modificación que se observa es la pérdida de la señal a campo bajo antes localizada en 169 ppm y que correspondía a C11. Así como la pérdida de una señal metílica C12 del grupo acetilo en la región 19-40 ppm, probablemente ubicado a 23.7 ppm de acuerdo a la comparación de espectros ampliados en dicha región. Espectros No. 8 y No. 9. Esta modificación también es corroborada por el espectro No. 6 de referencia.

En el espectro de IR (espectro 10) se observa la ausencia de la banda en aproximadamente 1750 cm<sup>-1</sup> debida al grupo éster. Adicionalmente se detectan una banda en 1080 cm<sup>-1</sup> debida a la vibración de tensión del enlace C-O y bandas localizadas en 1500 y 1350 cm<sup>-1</sup> ocasionadas por vibraciones de flexión del enlace O-H.

## 5.2 De la reacción de oxidación

Mecanismo de reacción. El mecanismo que se propone implica la unión del tocoferol a la molécula de FeCl<sub>3</sub> con desprendimiento de una molécula de HCl, para generar un intermediario en el que probablemente debido al efecto electronegativo de los átomos de cloro, se promueve una reacción vía radicales libres en la que el FeCl<sub>3</sub> se reduce a FeCl<sub>2</sub> desprendiendo un radical centrado en el carbono terciario del tocoferol, el cual a su vez puede reaccionar con una molécula de H<sub>2</sub>O para dar el alcohol terciario que es el producto que se observa a través de la RMN. Lo anterior también forma un radical libre centrado en hidrógeno el cual puede reaccionar con otra molécula de FeCl<sub>3</sub> liberando HCl y generando otra molécula de FeCl<sub>2</sub>.

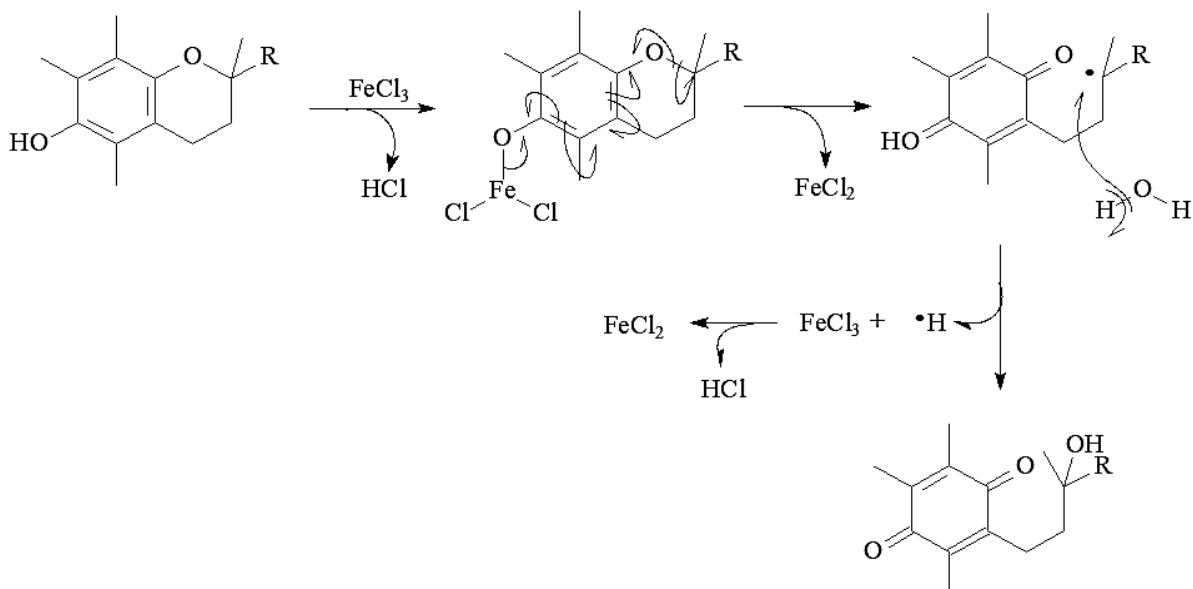
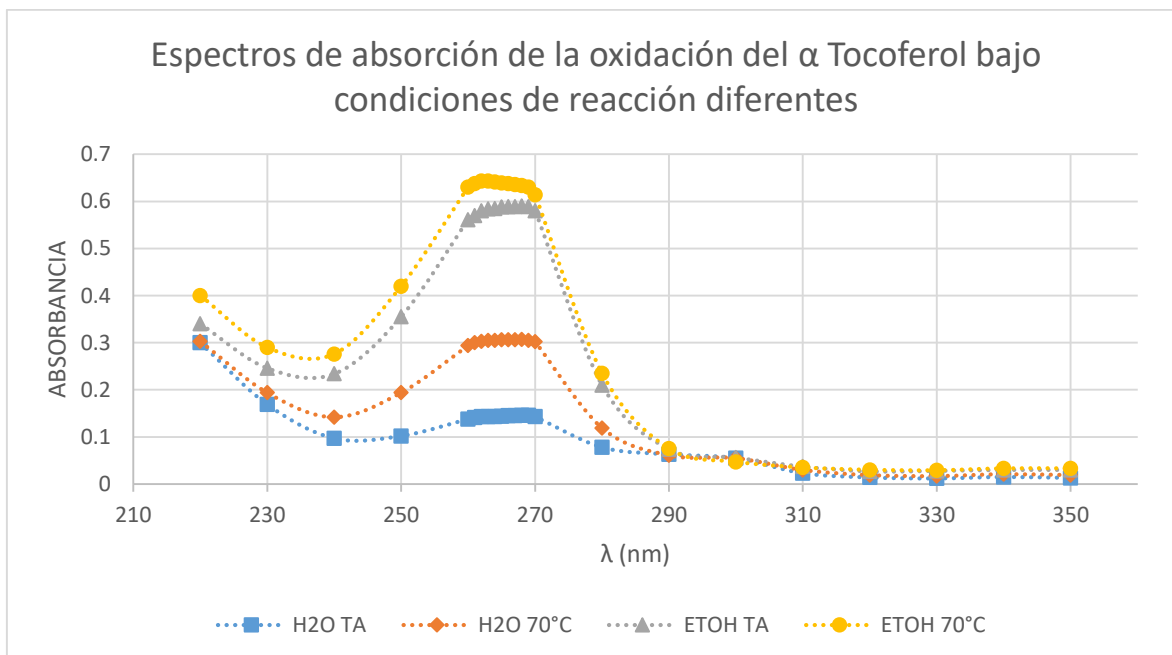


Figura 22. Mecanismo de la reacción de oxidación.

En la gráfica 2 se observa que los sistemas con más producto de oxidación son aquellos que fueron sometidos a temperaturas más elevadas, pero sobre todo aquellos donde la solución del agente oxidante se encuentra disuelta en etanol.



Gráfica 2. Espectros de absorción de la reacción de oxidación.

Probablemente se deba a que estas condiciones favorecen que el sustrato y el agente oxidante entren en contacto, esto se observa con más facilidad en la figura 23. Aquellos matraces que

son sometidos a temperaturas más altas o con etanol muestran una solución más homogénea, mientras que en aquellos que no fueron sometidos a dichas condiciones se observa una separación de fases al finalizar la reacción.

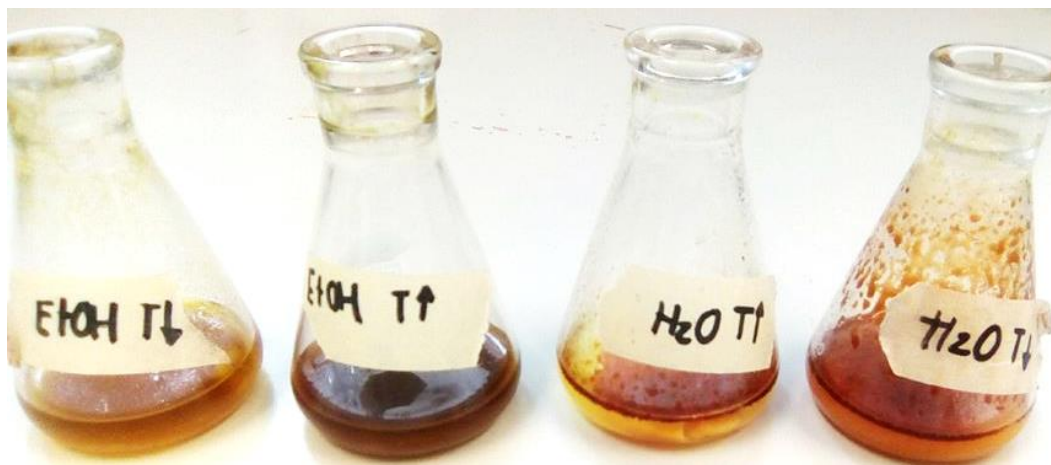


Figura 23. Apariencia de los productos de oxidación a diferentes condiciones de reacción.

Caracterización del producto (líquido oleoso naranja, 88% de rendimiento).

En el espectro No 11 de RMN- $C^{13}$ , se observan dos señales ubicadas a campo bajo con desplazamientos de 188 ppm y 186 ppm que corresponden a los grupos carbonilos provenientes de la reacción de oxidación, así como cuatro señales localizadas entre 140-150 ppm que se asignan a los carbonos de doble enlace dentro del ciclo, C5, C6, C8 y C8a. Las señales anteriores indican la presencia de un sistema tipo quinona. Además, se detecta aproximadamente en 72 ppm una señal desplazada a campo bajo con respecto a los carbonos de un alcano los cuales se localizan entre 12 y 42 ppm, dicha señal pertenece al carbono base de alcohol C2 unido a oxígeno. El espectro No. 12 corresponde a una ampliación de la zona a campo alto y en la que se observa una señal con doble intensidad con respecto a todas las demás señales, la cual debe ser originada por los metilos del grupo isopropilo terminal de la cadena hidrocarbonada.

En el espectro, No. 13, de RMN- $H^1$ , se observan tres señales singulete entre 2.0 y 2.6 ppm que se asignan a los metilos vinílicos C10, C13 y C14. A campo más bajo aproximadamente en 3.25 ppm se encuentra una señal triple que corresponde a C4, por estar en el campo de desprotección que origina el doble enlace y su multiplicidad debida al acoplamiento con C3, también se observa una señal pequeña amplia debida a un grupo OH que está localizada en

2.15 ppm. Adicionalmente se determina una señal triple ubicada en 1.85 ppm que se asigna a C3 debido a que es vecino al oxígeno y su multiplicidad ocasionada por el acoplamiento con C4, posteriormente se observa una señal múltiple en aproximadamente 1.78 ppm que se debe a C26 cuya multiplicidad se debe al acoplamiento con los hidrógenos de los carbonos C27, C28 (dos metilos) y C25 (un metileno CH<sub>2</sub>), así como una señal doble que se observa en 0.78 ppm que se debe a los metilos C27 y C28, ambas señales, la múltiple y la doble son indicativas de la presencia del grupo isopropilo terminal de la cadena. El triplete que se observa en 1.6 ppm se asigna a C15 ya que solo es vecino a los hidrógenos de C16. El resto de las señales localizadas entre 0.83 y 1.4 ppm corresponden al resto de los carbonos de la cadena hidrocarbonada, de C17 a C30.

### 5.3 De la síntesis de las bases de Schiff

Mecanismo de reacción. En la reacción ocurre el ataque nucleofílico de la amina al grupo carbonilo, seguida de un equilibrio ácido-base interno para dar el aminol correspondiente que posteriormente sufre una reacción de deshidratación para dar lugar a la aparición del primer grupo funcional imino. Esta reacción ocurre nuevamente para formar el di-imino del alfa-tocoferol

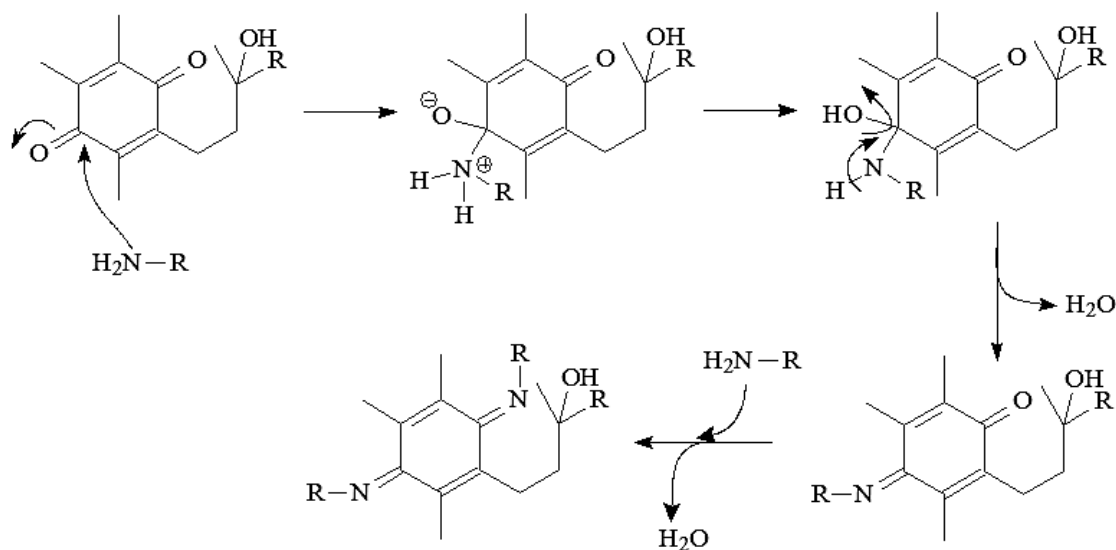


Figura 24. Mecanismo de la reacción de iminación.

Caracterización de productos. A través de los espectros de IR de las tres reacciones de iminación efectuadas entre la quinona del alfa-tocoferol y las tres aminas (propilamina,

isopropilamina y monoetanolamina ) durante 24 horas de exposición a 70°C se observa que los espectros presentan dos bandas importantes una aproximadamente en 1640  $\text{cm}^{-1}$  debida a la vibración de tensión del grupo carbonilo y otra que se ubica en aproximadamente 1550  $\text{cm}^{-1}$  y que se asigna a la vibración de tensión del doble enlace C=N, característico del grupo funcional imino. En los tres espectros se observa la predominancia de la señal del grupo carbonilo lo cual indica que la conversión del grupo carbonilo al imino correspondiente no es eficiente. Estas condiciones de reacción se prolongaron durante 48 horas, sin embargo, los espectros que se obtenían bajo estas condiciones eran muy similares a los descritos. Por tal razón no se intentó separar el producto sino investigar una nueva metodología [84].

#### 5.4 De la síntesis de las aminas

Mecanismo de reacción. La función de la trietilamina en la reacción es la de actuar como una base, promoviendo una deslocalización electrónica extendida hasta el grupo carbonilo conduciendo a un sistema tipo enolato que a continuación se protona para formar un sistema tipo enol. A continuación, la amina reactiva (morfolina, dietanolamina o monoetanolamina) realiza una adición conjugada tipo Michael re-aromatizando el sistema cíclico dando lugar a una especie fenolato-amina cuaternaria que finalmente sufre un equilibrio acido-base interno para dar el producto final.

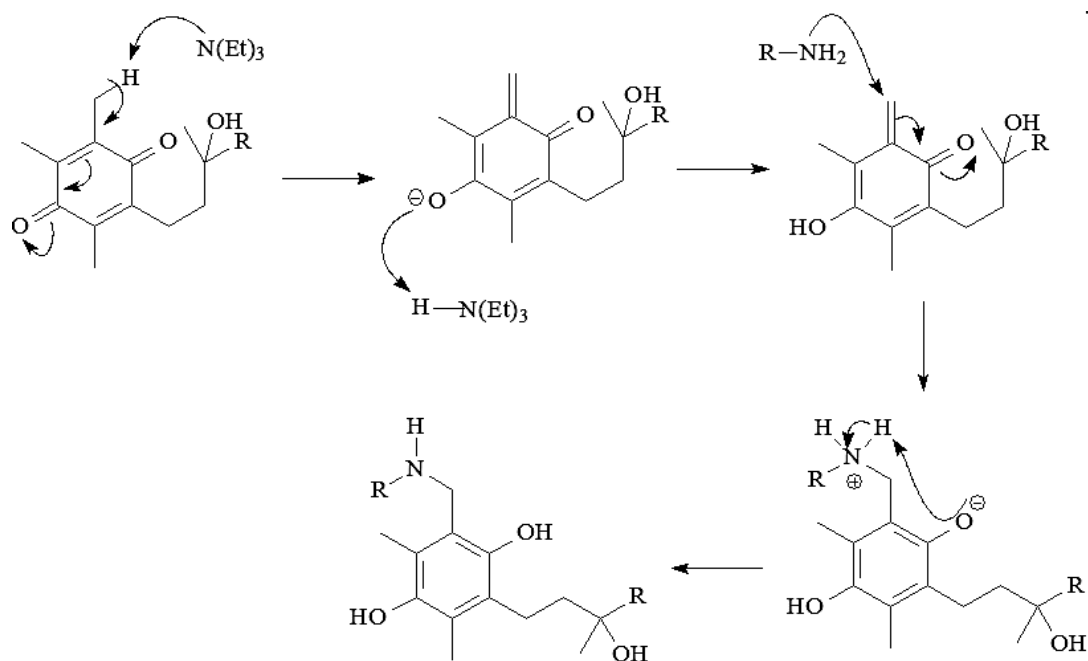


Figura 25. Mecanismo de la reacción de aminación de la cadena lateral.

Caracterización del producto cuando la amina utilizada como reactivo fue morfolina (líquido oleoso rojo oscuro, 31% de rendimiento). La estructura del compuesto es la siguiente:

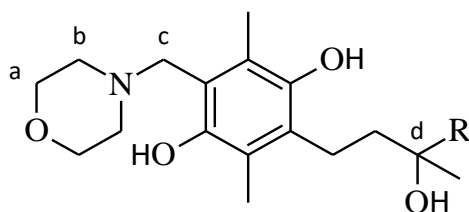


Figura 26. Producto de síntesis derivado de la morfolina.

En el espectro No. 19 de RMN  $C^{13}$ , se observan a campo alto entre 50 y 75 ppm cuatro señales que se asignan de la manera siguiente: las señales de mayor magnitud ubicadas en 66 y 53 ppm corresponden respectivamente a los carbonos etiquetados como  $C_a$  y  $C_b$ , magnitud debida a que la señal es generada en cada caso por dos carbonos equivalentes. En tanto que las señales de menor magnitud localizadas en 56 y 72 ppm se asignan a los carbonos etiquetados como  $C_c$  y  $C_d$ , en este caso la menor magnitud es ocasionada por un solo carbono de cada tipo. Por otro lado en la región aromática entre 116 y 148 se observan seis señales que corresponden al sistema aromático el cual es indicativo de que ésta ocurriendo una reacción de re-aromatización de la quinona del alfa-tocoferol.

En el espectro No. 20 de RMN  $H^1$  se observa una señal en 10.6 ppm debida al OH fenólico, además se determinan en aproximadamente 3.7 y 2.7 ppm señales que de acuerdo con la literatura se deben respectivamente a los grupos  $CH_2O$  y  $CH_2N$  de la morfolina.

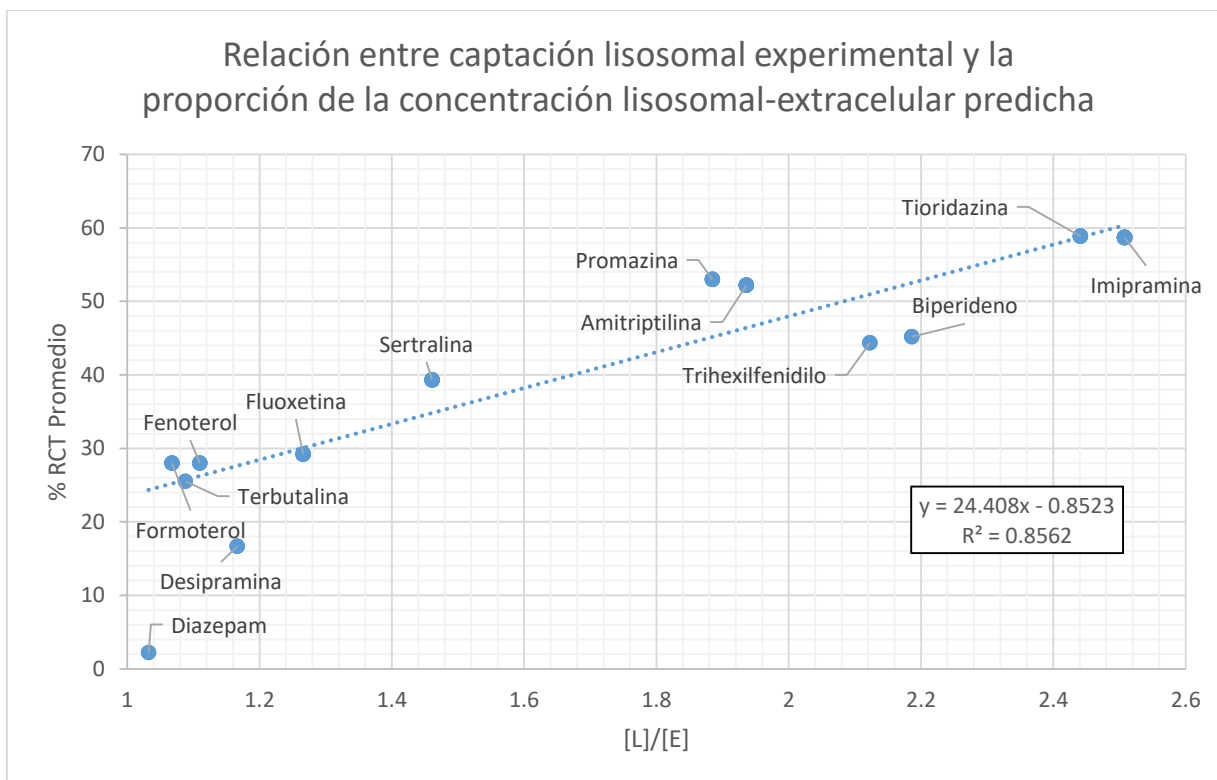
En el espectro No. 21 de IR las bandas características detectadas son:  $3500\text{ cm}^{-1}$  asignadas a las vibraciones de tensión O-H de los grupos alcohol y fenol, así como la vibración de tensión  $C=C$  en aproximadamente  $1600\text{ cm}^{-1}$ , dichas señales corroboran la presencia de un sistema aromático. Adicionalmente en aproximadamente  $1100\text{ cm}^{-1}$  se presenta la banda de tensión del enlace C-O de la función éter y el enlace C-O del alcohol, finalmente otra señal importante se observa en  $1250\text{ cm}^{-1}$  debida a la vibración de tensión C-N.

Resultados espectroscópicos similares se obtuvieron cuando se emplearon dietanolamina y monoetanolamina como reactivos en la reacción de aminación.

## 5.5 De los cálculos computacionales y las predicciones del modelo

Para demostrar de alguna forma la validez del modelo se compararon las predicciones del modelo con información experimental sobre la acumulación lisosomal de varias moléculas. Se realizó una recopilación de los estudios reportados en la literatura que investigan la distribución lisosomal de fármacos en diferentes sistemas in vitro utilizando cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), monensina y nigericina. Este consiste en un método indirecto para medir el secuestro lisosomal basado en el uso de agentes químicos para abolir el gradiente de pH lisosoma-citosol. La reducción en la acumulación de fármaco en presencia de estos agentes proporciona el grado de acumulación lisosomal.

Se eligió el porcentaje de la reducción en la captación total (%RCT) en el lisosoma como una medida cuantitativa del secuestro lisosomal experimental. Esta información fue recopilada anteriormente en un artículo <sup>[95]</sup> que incluye los valores del %RCT de diversos estudios <sup>[96-107]</sup>. Posteriormente se calculó el promedio del %RCT reportado para cada uno de los fármacos en los diferentes estudios y se graficó contra la proporción  $[L]/[E]$  predicha, tal como se observa en la gráfica 3.



Gráfica 3. Relación entre captación lisosomal experimental y la predicha.

Hay que recordar que la proporción  $[L]/[E]$  es una medida de cuantas veces es mayor la concentración en los lisosomas con respecto al medio extracelular cuando el sistema ha alcanzado el equilibrio. Por ejemplo, para la imipramina tiene un valor de 2.5 lo que significa que después de transcurrido un tiempo razonable su concentración en el lisosoma se estabiliza en un valor que es 2.5 veces mayor que la del espacio extracelular.

Retomando la gráfica 3 puede observarse que hay una relación aproximadamente lineal entre el %RCT y la proporción  $[L]/[E]$ . La curva proveniente del análisis de regresión lineal tiene una pendiente positiva, lo que no es nada sorprendente pues se esperaría que a proporciones  $[L]/[E]$  más grandes el valor del %RCT sea mayor. De manera ideal la ordenada al origen de la recta debería ser aproximadamente cero sin embargo aquí es bastante mayor. A pesar de eso es innegable que el modelo predice de alguna manera los resultados experimentales. Si bien el valor de  $r^2$  no está tan cercano a 1, resulta razonablemente bueno para tratarse de un modelo que describe un sistema biológico y claramente implica una correlación entre la predicción y la realidad.

Podría pensarse que los valores del %RTC no son comparables entre los diversos estudios puesto que las condiciones de los ensayos son diferentes (tiempo de exposición al fármaco, concentración del fármaco, sistema in vitro utilizado, etc.), y que por lo tanto no tiene sentido calcular el %RTC promedio para compararlo con las predicciones del modelo. Sin embargo, según el modelo desarrollado en este trabajo, las concentraciones de fármaco en el lisosoma en el estado estacionario solamente dependen de propiedades de la molécula ( $pK_a$ ,  $\log P$  y  $\log D$ ), por lo que en teoría los valores del %RCT deberían ser similares incluso entre los diferentes estudios.

Una vez establecido el poder predictivo del modelo se aplicó en diversas moléculas con supuesta actividad lisosomotrópica para comparar las predicciones con la de los productos de síntesis. Estas moléculas incluyen antidepresivos, antipsicóticos, antiarrítmicos, anticancerígenos, colorantes, entre otros. La tabla 6 recoge las propiedades fisicoquímicas de estas moléculas y algunos indicadores importantes relacionados con la acumulación lisosomal predichos por el modelo.



<b>Molécula</b>	<b>pka</b>	<b>LogP</b>	<b>LogD[BH+]</b>	<b>[L]/[E]</b>	<b><math>\alpha</math></b>	<b>t máx (s)</b>	<b>[L] máx</b>
<b>Azitromicina</b>	9.57	2.41	-4.57	57.4704342	0.00011203	684.558419	59.5448724
<b>Morfolina</b>	7.03	9.05	5.552	55.0570835	0.01047447	0.00089789	57.1016494
<b>Aripiprazol</b>	7.52	3.57	0.07	39.0540466	0.0104472	1.91378045	40.4274283
<b>Perazina</b>	8	3.78	0.39	17.0975532	0.01205758	2.49816959	17.6487566
<b>Lysotracker Red</b>	8.5	-3.75	-7.5	10.5726448	0.00754223	95463.2519	10.9125947
<b>Claritromicina</b>	8.38	3.23	-0.26	9.76515139	0.01058425	7.8504475	10.080064
<b>Amiodarona</b>	8.46	7.64	4.13	8.61733506	0.01031193	0.02703342	8.89720546
<b>Dietanolamina</b>	8.34	7.702	4.39	8.54047828	0.01334775	0.01926984	8.81787412
<b>Rojo neutro</b>	6.7	2.85	1.19	7.14547365	0.11493174	1.16291082	7.37613015
<b>Tamoxifeno</b>	8.76	6.35	2.85	4.94128726	0.0104472	0.16933178	5.10994879
<b>Prometazina</b>	9.13	3.69	0.19	2.72670641	0.0104472	6.02361117	2.82572989
<b>Clomipramina</b>	9.19	4.88	1.38	2.50780043	0.0104472	1.29083029	2.59960821
<b>Imipramina</b>	9.19	4.28	0.78	2.50780043	0.0104472	2.82142914	2.59960821
<b>Monoetanolamina</b>	8.84	7.835	4.956	2.45413788	0.02346854	0.01223885	2.54412729
<b>Tioridazina</b>	9.21	4.87	1.37	2.44107379	0.0104472	1.31195157	2.53066485
<b>Biperideno</b>	9.29	3.53	0.04	2.18630666	0.01058425	7.51626273	2.26735343
<b>Trihexilfenidilo</b>	9.32	4.23	0.73	2.12283187	0.0104472	3.06751162	2.20172915
<b>Clorpromazina</b>	9.39	3.94	0.44	1.95754184	0.0104472	4.51202654	2.03079895
<b>Amitriptilina</b>	9.4	4.33	0.83	1.93598218	0.0104472	2.71694689	2.00849895

<b>Molécula</b>	<b>pka</b>	<b>LogP</b>	<b>LogD[BH<sup>+</sup>]</b>	<b>[L]/[E]</b>	<b><math>\alpha</math></b>	<b>t máx (s)</b>	<b>[L] máx</b>
<b>Promazina</b>	9.39	3.32	-0.12	1.88482349	0.01129692	9.39382379	1.95557828
<b>Propranolol</b>	9.4	2.58	-0.66	1.66431447	0.01466088	19.1898313	1.72740181
<b>Sumatripan</b>	9.53	0.74	-2.61	1.57102145	0.01270282	244.751925	1.63082804
<b>Clorfenamina</b>	9.47	3.58	0.4	1.52310807	0.01585331	4.85354714	1.58121895
<b>Sertralina</b>	9.56	5.15	1.91	1.46109678	0.01466088	0.68029503	1.5170049
<b>Pentazocina</b>	9.57	3.89	0.78	1.37942088	0.01736761	2.97837691	1.43240962
<b>Paroxetina</b>	9.77	3.15	-0.09	1.28511246	0.01466088	9.2976114	1.33470584
<b>Fluoxetina</b>	9.8	4.17	0.93	1.26616306	0.01466088	2.46290014	1.31507078
<b>Desipramina</b>	10.01	3.9	0.65	1.16656987	0.01447105	3.5645467	1.21185495
<b>Leelamina</b>	9.9	5.17	2.14	1.16019531	0.01927614	0.51144179	1.2052473
<b>Fenoterol</b>	9.63	1.47	-0.82	1.10979178	0.05056616	24.2775213	1.15299655
<b>Terbutalina</b>	9.75	0.44	-1.89	1.08810641	0.04799765	98.0116814	1.13051407
<b>Formoterol</b>	9.81	1.06	-1.18	1.06785664	0.05397094	38.8902298	1.10951844
<b>Nortriptilina</b>	10.47	4.43	1.18	1.05785486	0.01447105	1.79593447	1.09914786
<b>Diazepam</b>	2.92	3.08	0.27	1.03220217	0.02567675	0.15589559	1.07250802
<b>Amantadina</b>	10.71	1.47	-1.57	1.02521384	0.01902655	64.7844142	1.06530031

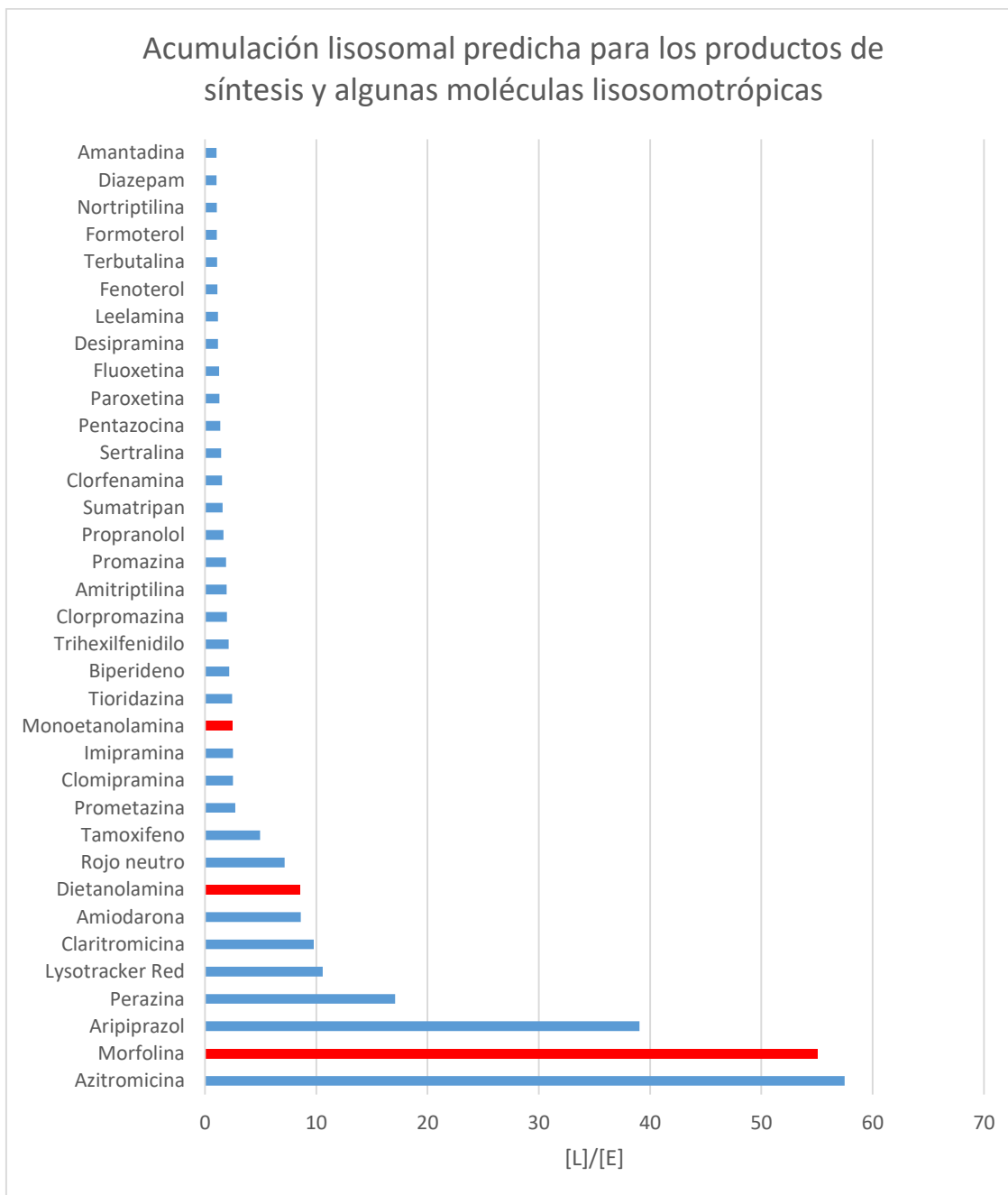
Tabla 6. Predicción del modelo por acumulación para diversas moléculas.

La gráfica 4 muestra la acumulación lisosomal para todas las sustancias de la tabla 6, se observa que los valores de  $[L]/[E]$  varían desde 1.025 para la amantadina hasta 57.47 para la azitromicina. Se resaltan en otra tonalidad las predicciones para los productos de síntesis. Inesperadamente, pese a la gran similitud estructural los productos de síntesis poseen acumulaciones lisosomales muy diferentes, más adelante se explica la razón.

La mayoría de las sustancias evaluadas poseen de nula a pobre acumulación lisosomal, con valores de  $[L]/[E]$  entre uno y tres. Uno de los productos de síntesis proveniente de la reacción con monoetanolamina cae en esta categoría. Luego están las sustancias de moderada acumulación lisosomal con valores de  $[L]/[E]$  entre tres y veinte. En este conjunto se encuentra la perazina (un antipsicótico), lysotracker red (un colorante usado para teñir lisosomas), la claritromicina (un antibiótico), la amiodarona (un antiarrítmico), el rojo neutro (otro colorante también usado para teñir lisosomas), el tamoxifeno (un antineoplásico) y uno de los productos de síntesis obtenido de la reacción con dietanolamina. Finalmente, hay un grupo de sustancias de alta acumulación lisosomal con valores de  $[L]/[E]$  mayores a veinte. Este grupo incluye la azitromicina (un antibiótico), el aripiprazol (un antipsicótico) y el producto de síntesis derivado de la morfolina. Resumiendo, los tres productos de síntesis caen en una de las tres categorías ya sea con una acumulación lisosomal baja, media o alta.

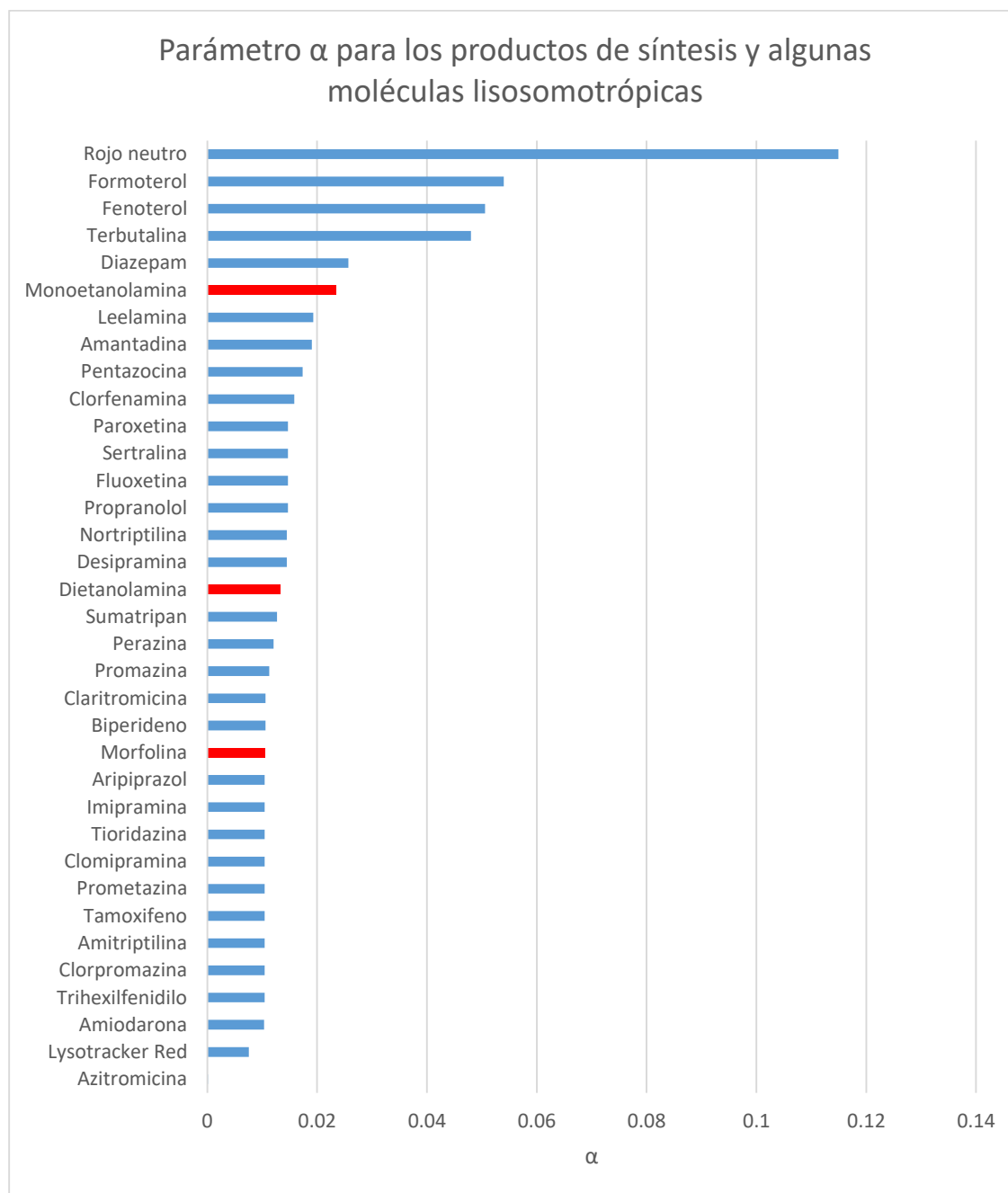
Una manera de analizar porque estas moléculas se acumulan de diferente manera en la célula, es comparando el parámetro  $\alpha$  de cada una de ellas. El parámetro  $\alpha$  es de gran importancia pues influye en el grado con el cual una sustancia puede acumularse en los lisosomas. Hay que recordar que el parámetro  $\alpha$  se refiere a la relación del coeficiente de permeabilidad de la membrana lisosómica para la molécula en sus formas ionizada y no ionizada. Teóricamente mientras más se aproxime a cero el valor de  $\alpha$ , mayor será la acumulación de una molécula en los lisosomas.

Se pueden clasificar las sustancias de acuerdo al valor de  $\alpha$  de la siguiente manera: valores menores a 0.01 son bajos, valores entre 0.01 y 0.04 son intermedios y valores mayores a 0.04 son altos. La mayoría de las moléculas tienen valores intermedios de  $\alpha$  muy similares, pero si se presta atención al orden en cual las moléculas están dispuestas en la gráfica 5 se observa que hay relación inversa entre  $\alpha$  y  $[L]/[E]$ .



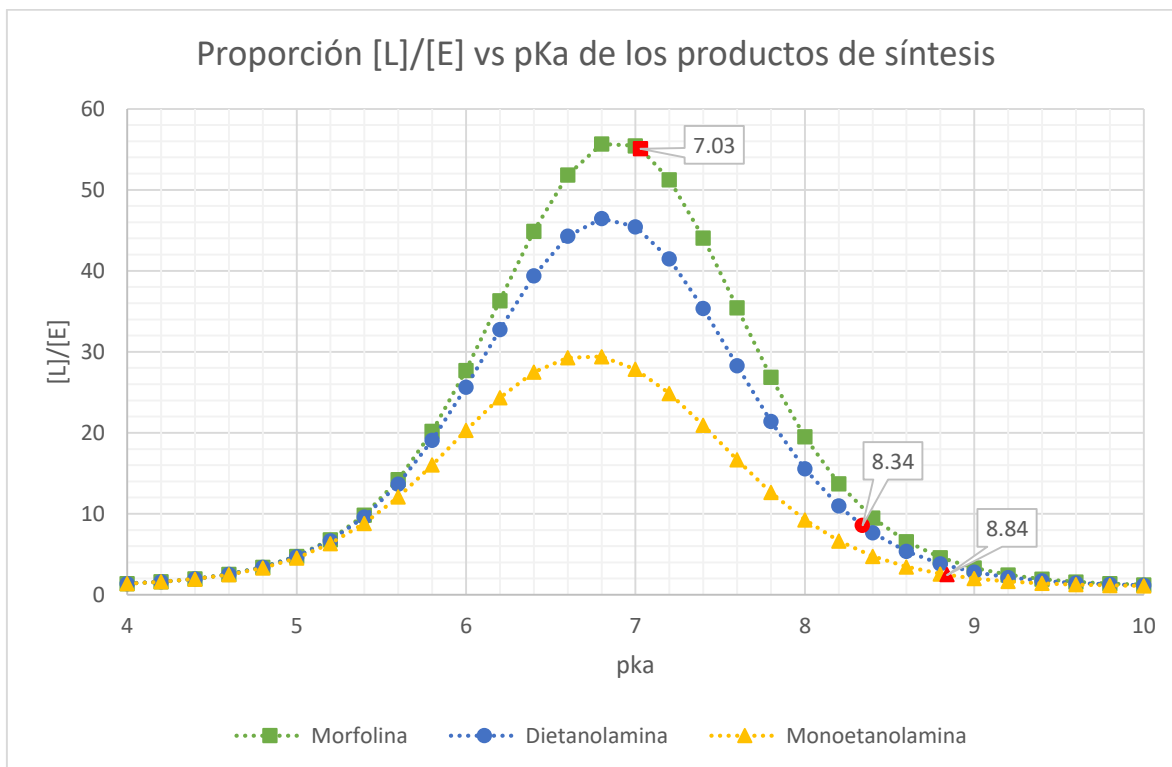
Gráfica 4. Acumulación lisosomal predicha para algunas moléculas lisosomotrópicas.

Basta con comparar los valores de  $\alpha$  y  $[L]/[E]$  para notar esta relación. Para  $\alpha$  el orden es monoetanolamina > dietanolamina > morfolina, pero para  $[L]/[E]$  el orden es inverso. Sin embargo hay algunas excepciones, por ejemplo el rojo neutro tiene el valor de  $\alpha$  más grande de las sustancias evaluadas pero se acumula de manera moderada en los lisosomas. Si bien el valor de  $\alpha$  es importante no es el único que influye en la acumulación lisosomal tal como se verá a continuación.



Gráfica 5. Parámetro  $\alpha$  para algunas moléculas lisosomotrópicas.

Como se mencionó anteriormente los productos de síntesis tienen una acumulación en el lisosoma muy diferente pese a ser estructuralmente similares. Incluso se podría decir que los valores de  $\alpha$  son similares para los tres compuestos. La explicación de por qué el modelo predice una acumulación en el lisosoma tan diferente se debe al valor del pKa. La gráfica 6 ejemplifica este efecto de una manera muy clara. Esta gráfica describe como sería la acumulación de cada uno de los compuestos sintetizados si su pKa fuera diferente.



Gráfica 6. Proporción [L]/[E] vs pKa de los productos de síntesis.

Por ejemplo, el compuesto derivado de la morfolina tiene un valor de  $\alpha$  de 0.01047 lo que le permite tener el “potencial” de acumularse en los lisosomas hasta un máximo de 55 veces la concentración extracelular. Esto depende fundamentalmente del pKa y para el caso de la morfolina su pKa calculado esta aproximadamente en la región óptima de máxima acumulación. Desafortunadamente para los compuestos obtenidos de la dietanolamina y la monoetanolamina los pKa correspondientes están lejos de esta región optima por lo que se acumulan de manera más pobre en los lisosomas pese a tener un “potencial” similar al de la morfolina. De esta manera queda demostrado que la acumulación lisosomal no solamente es sensible al valor de  $\alpha$ , sino que también el pKa puede ser sumamente importante.

El modelo también se aplicó a algunas moléculas con supuesta actividad de detergente lisosomotrópico para comparar sus predicciones con la de los productos de síntesis que se espera también actúen como detergentes. La tabla 7 recoge las propiedades fisicoquímicas de estas moléculas, algunos indicadores importantes relacionados con la acumulación lisosomal predichos por el modelo y otras propiedades relacionadas con su actividad como detergentes.

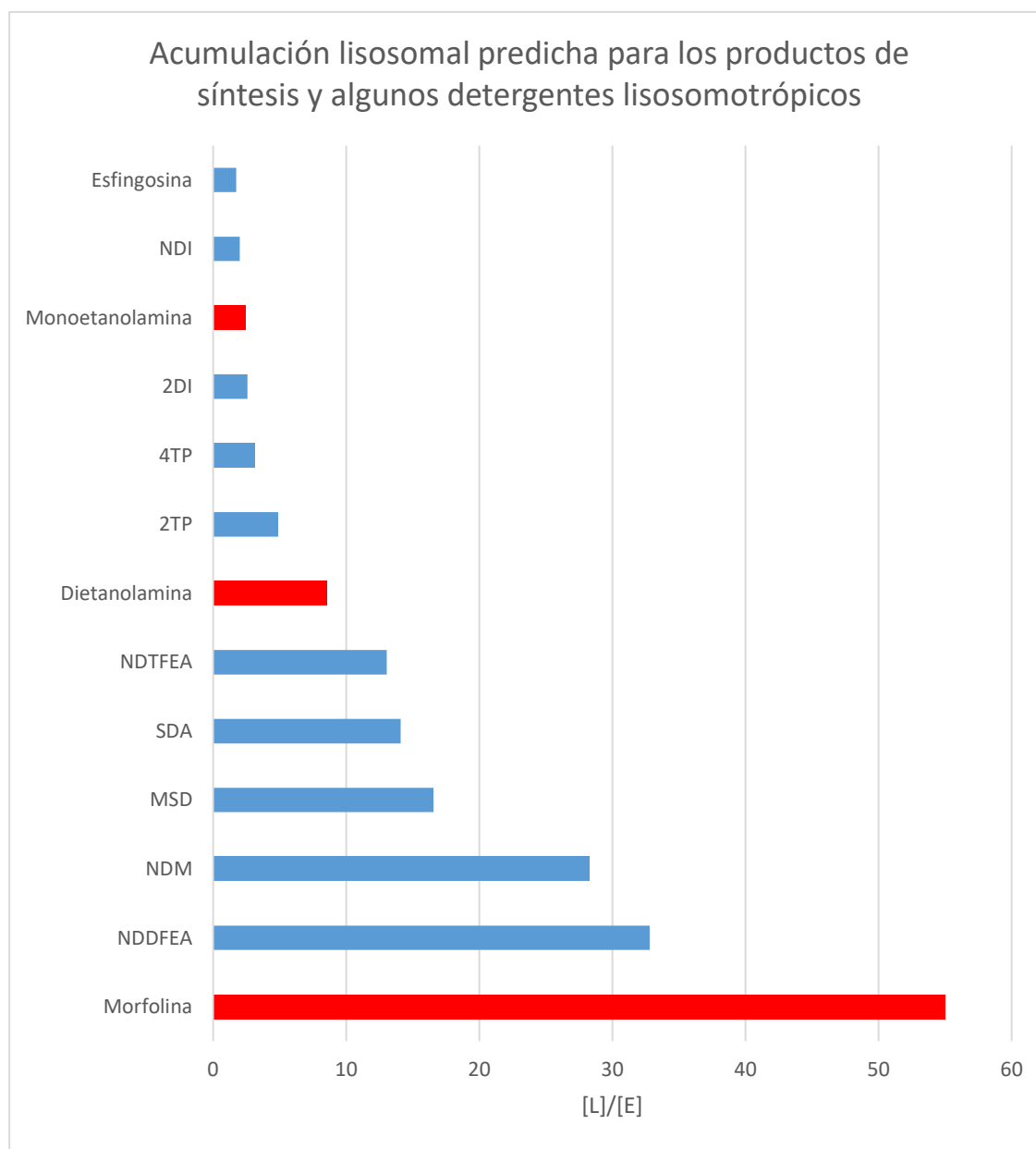
Molécula	pka	LogP	LogD [BH+]	[L]/[E]	$\alpha$	t máx (s)	[L] máx	HLB	ao (nm <sup>2</sup> )	v (nm <sup>3</sup> )	lc (nm)	CPP	N	Ccrit (%)
<b>Morfolina</b>	7.0	9.05	5.55	55.05	0.0104	0.0008	57.10	6.9	0.75	0.3492	1.941	0.23	187	8
<b>NDDFEA</b>	7.3	5.15	1.91	32.80	0.0146	0.1948	33.93	7.6	0.26	0.2150	1.792	0.45	492	42
<b>NDM</b>	7.7	4.85	1.35	28.30	0.0104	0.4941	29.26	9.2	0.37	0.2150	1.792	0.31	344	29
<b>MSD</b>	7.7	3.31	0.28	16.55	0.0192	2.8584	17.08	11.2	0.42	0.2150	1.792	0.28	305	25
<b>SDA</b>	7.8	2.67	-0.36	14.09	0.0192	7.3011	14.54	11.2	0.44	0.2150	1.792	0.26	288	23
<b>NDTFEA</b>	5.5	5.64	2.4	13.05	0.0146	0.0344	13.47	7.5	0.28	0.2150	1.792	0.41	451	39
<b>Dietanolamina</b>	8.3	7.70	4.39	8.540	0.0133	0.0192	8.81	8.1	0.84	0.3492	1.941	0.21	167	6
<b>2TP</b>	5.5	6.48	5.03	4.887	0.1511	0.0067	5.04	1.8	0.31	0.2314	2.005	0.36	468	36
<b>4TP</b>	5.7	6.6	5.62	3.162	0.2788	0.0042	3.27	1.8	0.31	0.2314	2.005	0.36	468	36
<b>2DI</b>	7.3	5.12	4.05	2.572	0.2479	0.0389	2.66	2.8	0.30	0.2150	1.792	0.38	419	36
<b>Monoetanolamina</b>	8.8	7.83	4.95	2.454	0.0234	0.0122	2.54	7.3	0.82	0.3492	1.941	0.21	171	6
<b>NDI</b>	6.5	4.96	4.37	2.001	0.4635	0.0260	2.07	3.3	0.26	0.2150	1.792	0.44	483	42
<b>Esfingosina</b>	9.2	4.56	1.53	1.733	0.0192	1.1016	1.79	8.6	0.37	0.2585	2.092	0.33	418	30

Tabla 7. Predicción del modelo por acumulación para diversos detergentes.

Abreviaturas. NDDFEA: N-dodecil difluoroetilamina, NDM: N-dodecil morfolina, MSD: O-metil serina dodecilamida, SDA: serina dodecilamida, NDTFEA: N-dodecil trifluoroetilamina, 2TP: 2-tridecil piridina, 4TP: 4-tridecil piridina, 2DI: 2-dodecil imidazol, NDI: N-dodecil imidazol. Véase la figura 8 para la estructura de algunos de estos compuestos.

En la gráfica 7 se muestra la acumulación lisosomal para varios detergentes lisosomotrópicos. Retomando la clasificación dada anteriormente se puede decir que hay cuatro detergentes que se acumulan en el lisosoma de manera pobre, seis que lo hacen de forma moderada y tres con alta acumulación.

Esto indicaría que al menos los compuestos sintetizados a partir de la morfolina y la dietanolamina pueden ser tan buenos o incluso mejores para acumularse de manera considerable en los lisosomas que los detergentes lisosomotrópicos descritos hasta ahora.



Gráfica 7. Acumulación lisosomal predicha para algunos detergentes lisosomotrópicos.



Sin embargo, el éxito de los compuestos sintetizados no depende únicamente de su capacidad de acumularse en los lisosomas, también son muy importantes sus propiedades de detergencia para ser capaces de romper la membrana lisosomal.

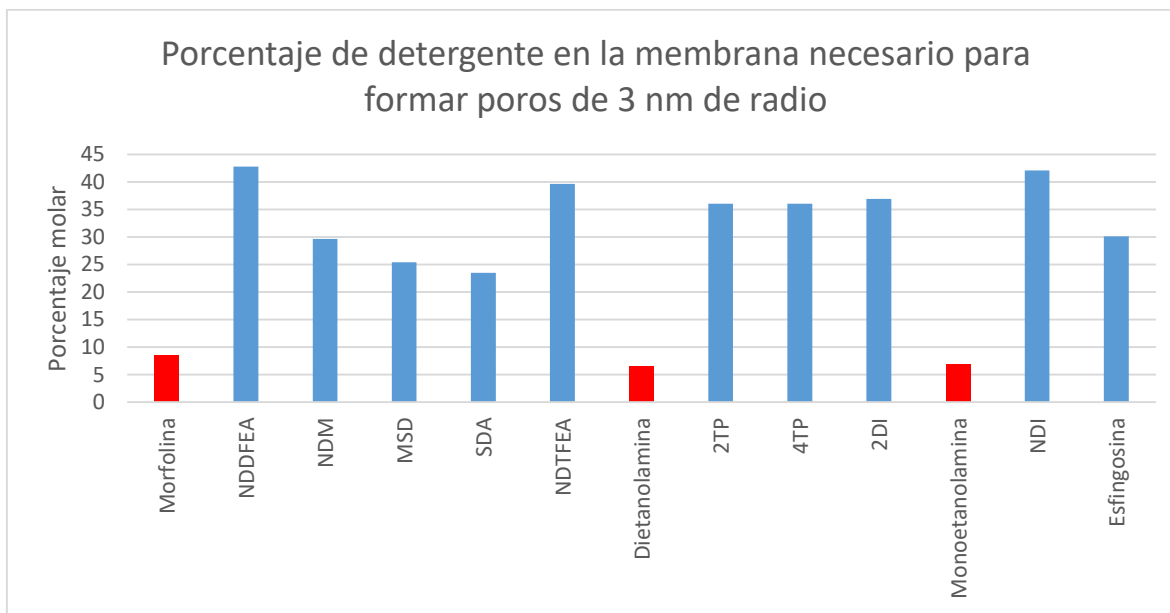
Una forma de medir sus propiedades como detergente es calculando sus valores de HLB. Como ya se mencionó anteriormente, el HLB permite clasificar a los tensioactivos de acuerdo a su grado en el que estos son hidrófilos o lipófilos. Idealmente los detergentes tienen un valor entre 12-15.

En este sentido los compuestos sintetizados no cuentan con el valor de HLB óptimo por lo que podrían no tener actividad como detergente. Como se puede ver en la tabla 7, el HLB para los compuestos derivados de la morfolina, la dietanolamina y la monoetanolamina son 6.9, 8.1 y 7.3 respectivamente. Si bien dichos valores son más altos que los de otras moléculas que supuestamente son detergentes lisosomotrópicos, tampoco tienen los valores más altos de todo el conjunto.

Otra manera de medir sus propiedades como detergente es estimando sus valores del CPP. Hay que recordar que el valor del CPP determina la geometría con la que se agregan las sustancias anfífilas, si el valor del CPP  $\leq \frac{1}{3}$  son más propensos a formar micelas y por lo tanto a destruir membranas.

Si se considera este parámetro entonces los compuestos sintetizados si tendrían la posibilidad de romper membranas pues sus valores son menores a  $\frac{1}{3}$ . Como se puede ver en la tabla 7 el CPP para los compuestos derivados de la morfolina, la dietanolamina y la monoetanolamina son 0.23, 0.21 y 0.21 respectivamente. Incluso son los valores más bajos de todo el conjunto.

Tomando en cuenta ambos parámetros (CPP y HLB) resulta incierto afirmar si los compuestos sintetizados actuaran como detergentes pues cumplen con los requerimientos de uno pero no del otro. De cualquier forma, asumiendo que los productos de síntesis actuarían como detergentes se realizaron los cálculos necesarios para describir su comportamiento en la membrana del lisosoma. Para ello se describe el rompimiento de la membrana como un proceso que involucra la formación de poros. En la gráfica 8 se muestra el porcentaje de detergente en la membrana necesario para formar poros de 3 nm de radio.

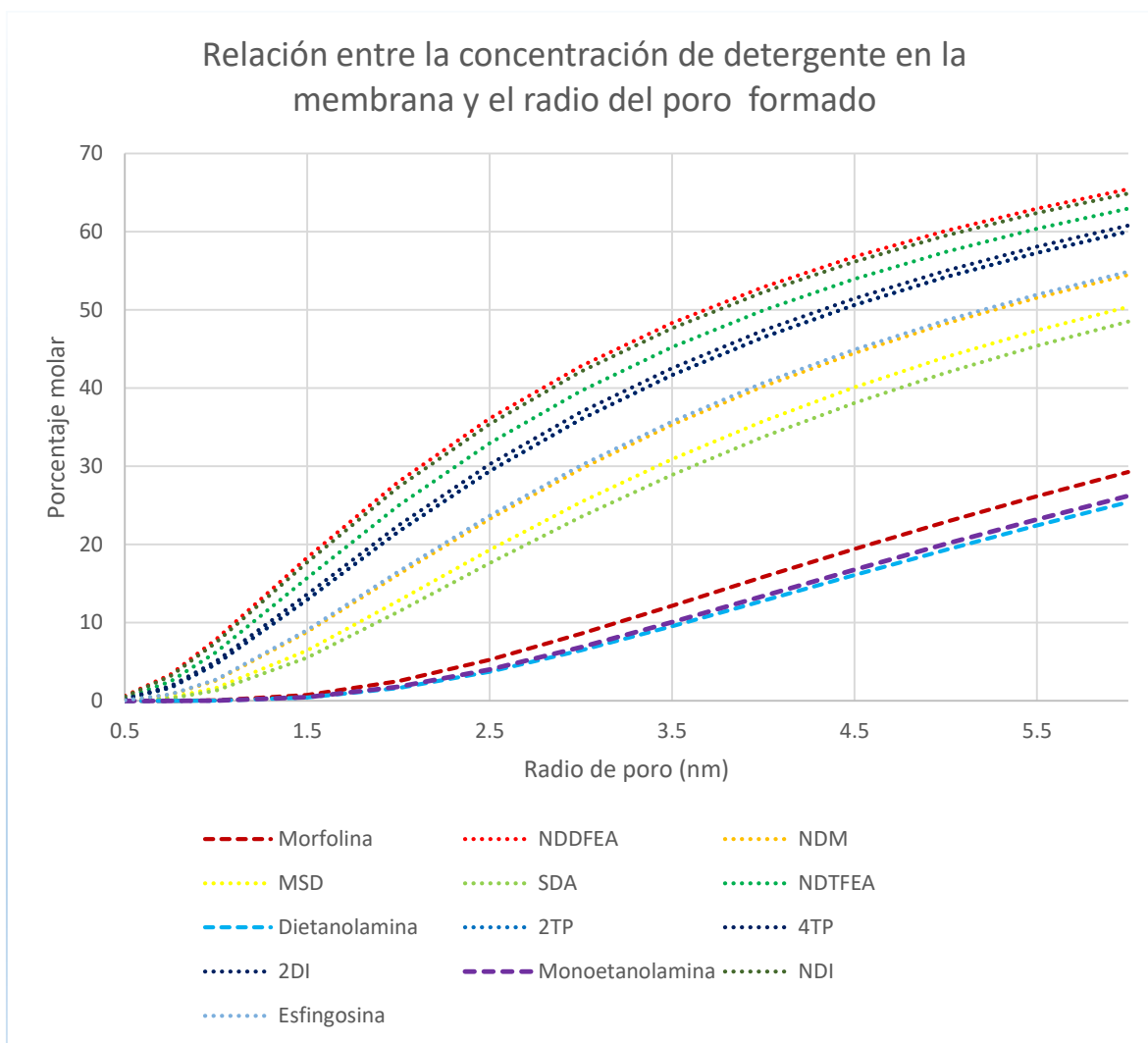


Gráfica 8. Porcentaje de detergente en la membrana necesario para formar poros.

Se observa que el porcentaje molar necesario para formar poros de 3 nm de radio es mucho menor para los compuestos sintetizados que para los otros detergentes lisosomotrópicos. Esto tiene una explicación sencilla y es que se necesitarían menos moléculas para formar un poro con los productos de síntesis. En la tabla 7 se muestra el número de moléculas necesarias (denotado con la letra N) para formar un poro de 3 nm. Los compuestos derivados de la morfolina, la dietanolamina y la monoetanolamina requieren de un número de moléculas de 187, 167 y 171 respectivamente. Mientras que por ejemplo la esfingosina requeriría de 418 para formar un poro del mismo tamaño.

La razón de esto es porque el área que conforma la cabeza polar de los detergentes ( $a_0$ ) es mucho más grande para los productos de síntesis que para los demás detergentes lisosomotrópicos. Si se imagina al poro como la parte interior de una dona se comprendería fácilmente que un  $a_0$  grande permitiría cubrir una cantidad mayor de área con un menor número de moléculas.

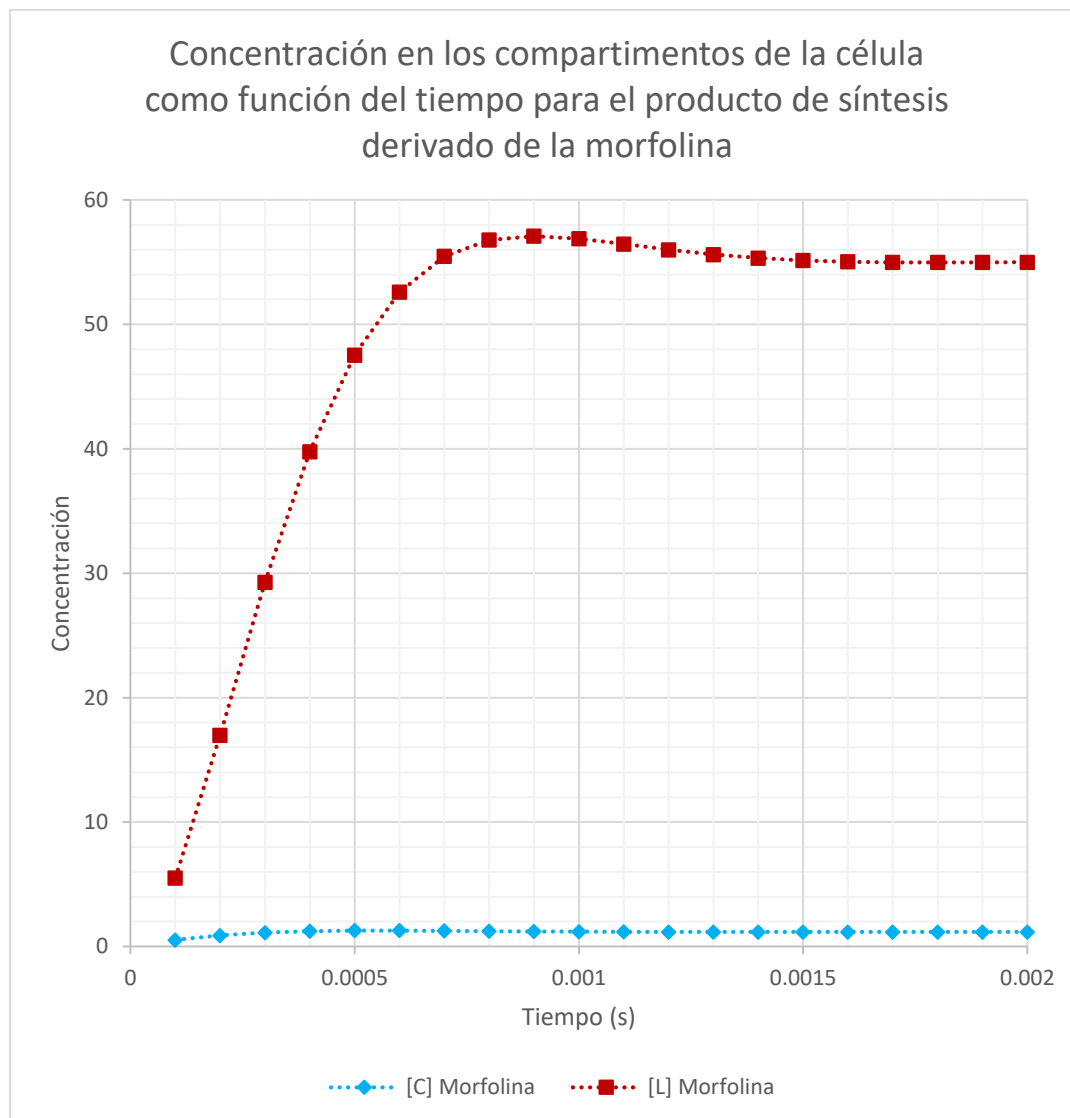
En la gráfica 9 se muestra la relación entre la concentración de detergente necesario para formar poros de diferentes radios. Se observa que el porcentaje molar necesario para formar poros más grandes crece más lentamente para los compuestos sintetizados que para los otros detergentes lisosomotrópicos. Teóricamente esto les conferiría una ventaja importante sobre los demás detergentes lisosomotrópicos.



Gráfica 9. Relación entre la cantidad de detergente en la membrana y el radio de poro.

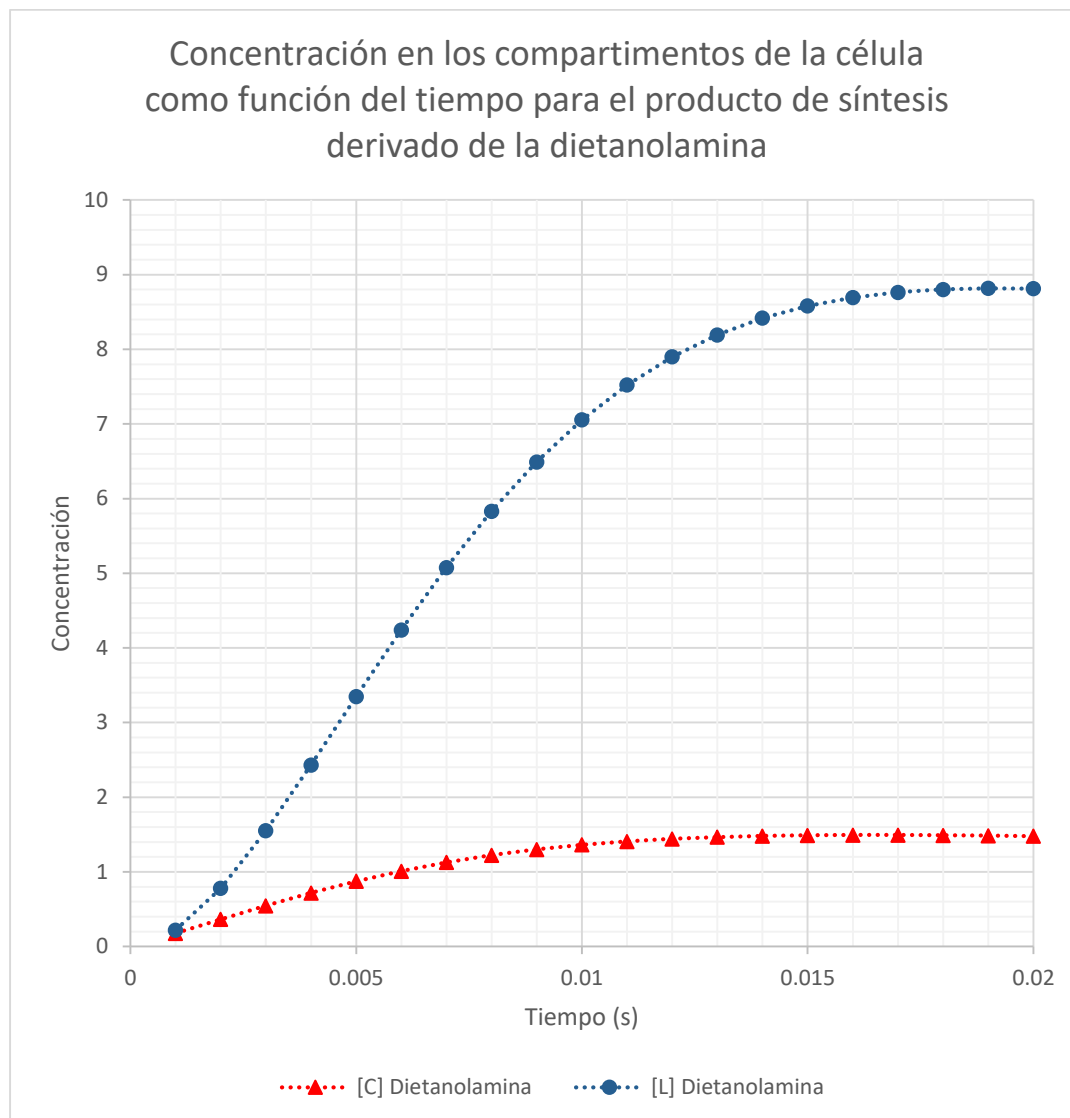
Retomando de nuevo el modelo de acumulación por protonación se discutirá brevemente el aspecto relativo a la velocidad con la que se alcanza el estado estacionario ( $[L]/[E]$ ). En las gráficas 10, 11 y 12 se muestra como es la evolución de los sistemas para cada uno de los compuestos sintetizados.

Se puede comenzar por observar que, obviamente, en el tiempo cero las concentraciones dentro del citosol  $[C]$  y el lisosoma  $[L]$  son cero. Estas son las condiciones iniciales del modelo que son planteadas en el anexo 8.2, el modelo solo es aplicable cuando dichas concentraciones son igual a cero en el tiempo cero, que desde luego suele ser la situación más común y útil. Luego conforme va transcurriendo el tiempo las concentraciones en el lisosoma y el citosol comienzan a aumentar.



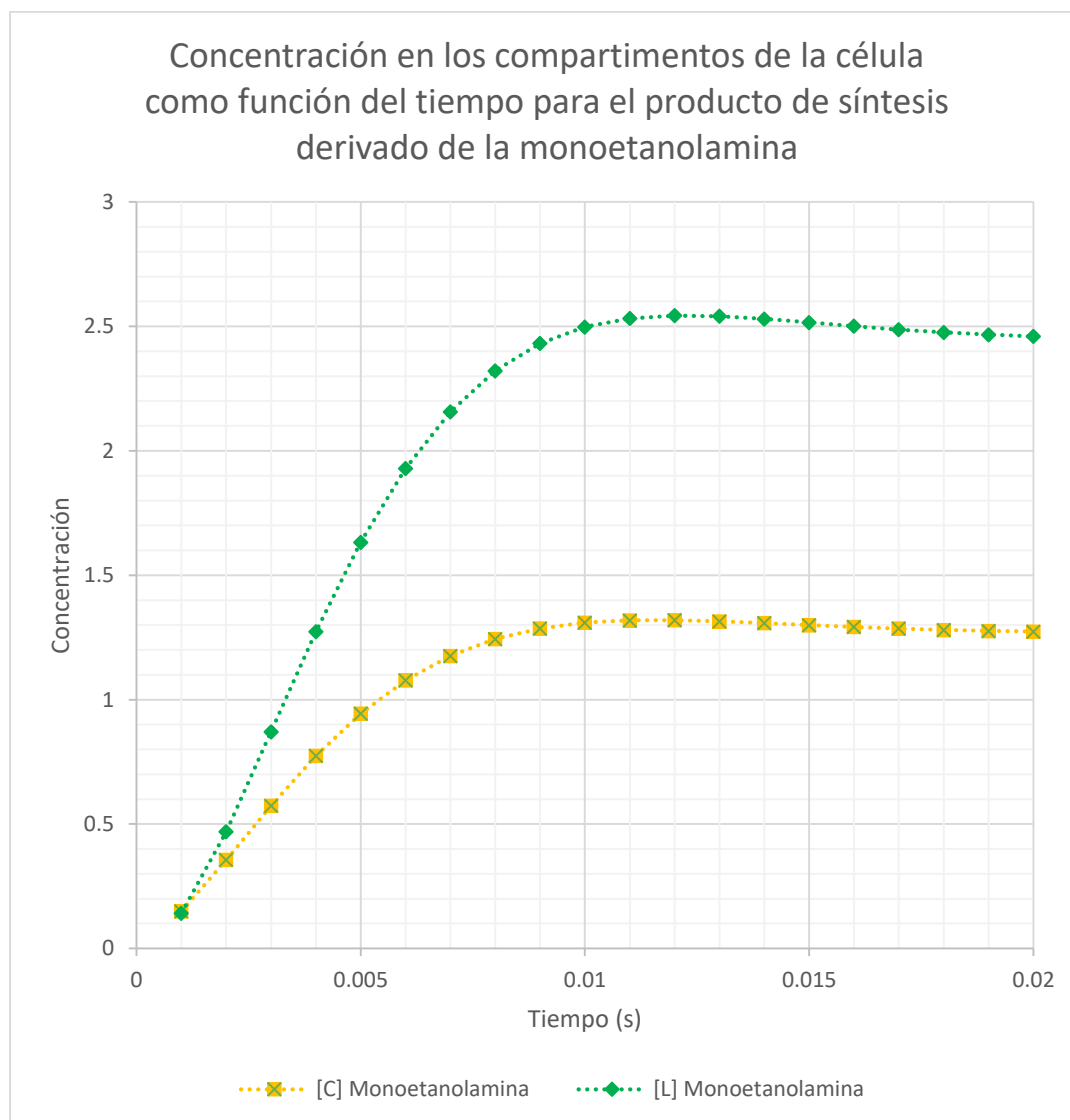
Gráfica 10. Acumulación celular para el producto derivado de la morfolina.

Luego tiene lugar el primer fenómeno interesante, que ocurre cuando la concentración en el citosol alcanza un máximo para después disminuir ligeramente y estabilizarse. Algo similar ocurre con la concentración dentro del lisosoma la cual aumenta hasta llegar a un máximo para poco después disminuir y estabilizarse. El máximo en la concentración del lisosoma, representada como  $[L]_{\text{máx}}$  en las tablas 6 y 7, ocurre poco después de que el citosol alcanza su concentración máxima y de hecho puede ser calculado con una fórmula deducida en el anexo 8.2. Evidentemente la  $[L]_{\text{máx}}$  tiene asociado un momento al cual esta concentración es alcanzada, representado como  $t_{\text{máx}}$  en las tablas 6 y 7, y que también puede ser calculado con una fórmula deducida en el anexo 8.2.



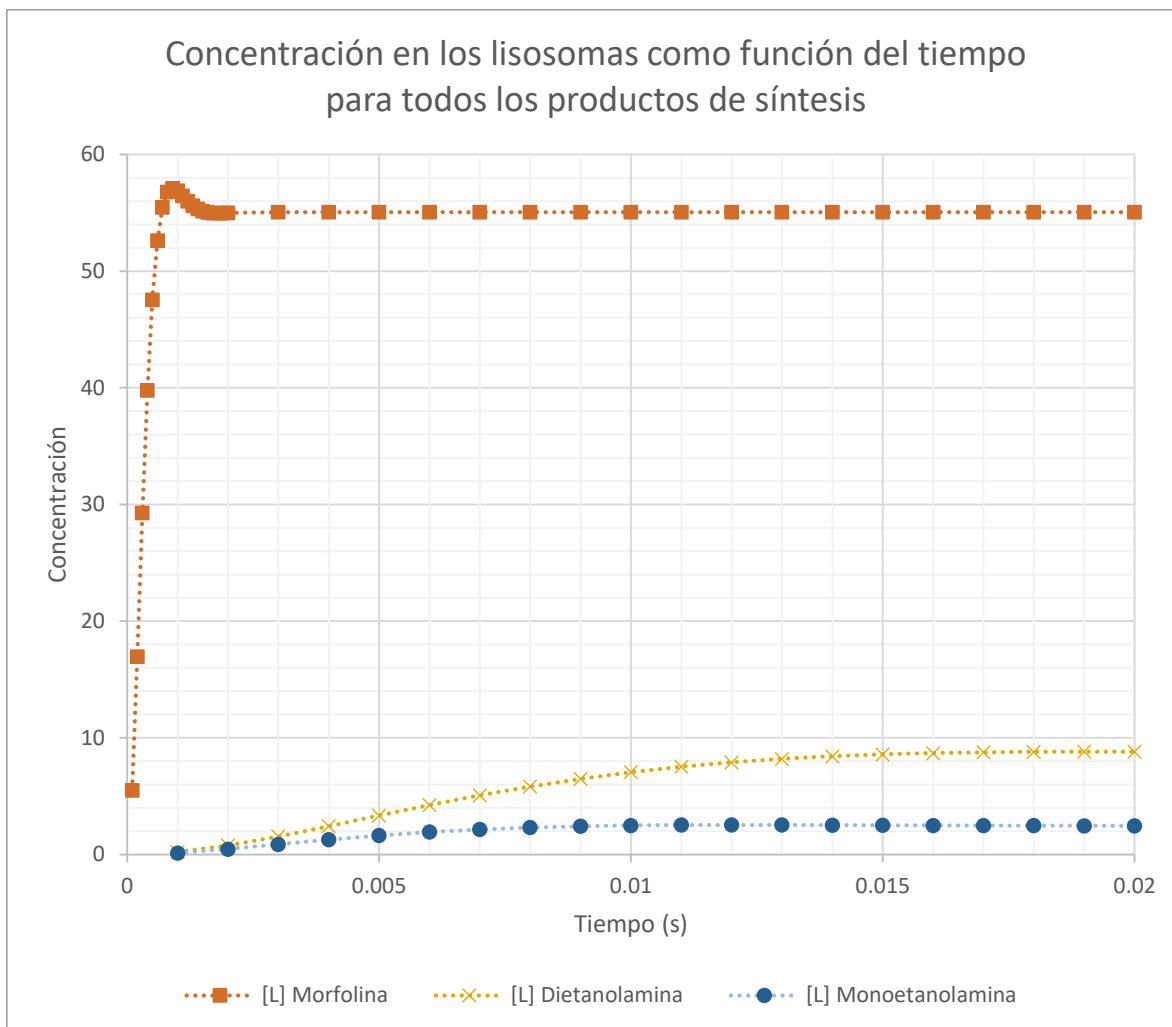
Gráfica 11. Acumulación celular para el producto derivado de la dietanolamina.

Ahora si se miran con detalle las gráficas 10, 11 y 12 pareciera haber algo mal con el  $t_{\text{máx}}$  pues según los cálculos la  $[L]_{\text{máx}}$  se alcanzaría a una velocidad increíblemente rápida para los tres compuestos sintetizados. De las tablas 6 y 7 se observa que el  $t_{\text{máx}}$  para los compuestos sintetizados a partir de la morfolina, la dietanolamina y la monoetanolamina son 0.00089, 0.01926 y 0.01223 segundos respectivamente. Sin embargo para otros compuestos parece haber valores más razonables, por ejemplo, el valor de  $t_{\text{máx}}$  para el sumatripan es de 244 segundos y para la azitromicina es de 684 segundos. Incluso el compuesto Lysotracker Red tiene un  $t_{\text{máx}}$  de 95463 segundos, lo que equivale a poco más de un día para alcanzar la concentración máxima dentro del lisosoma.



Gráfica 12. Acumulación celular para el producto derivado de la etanolamina.

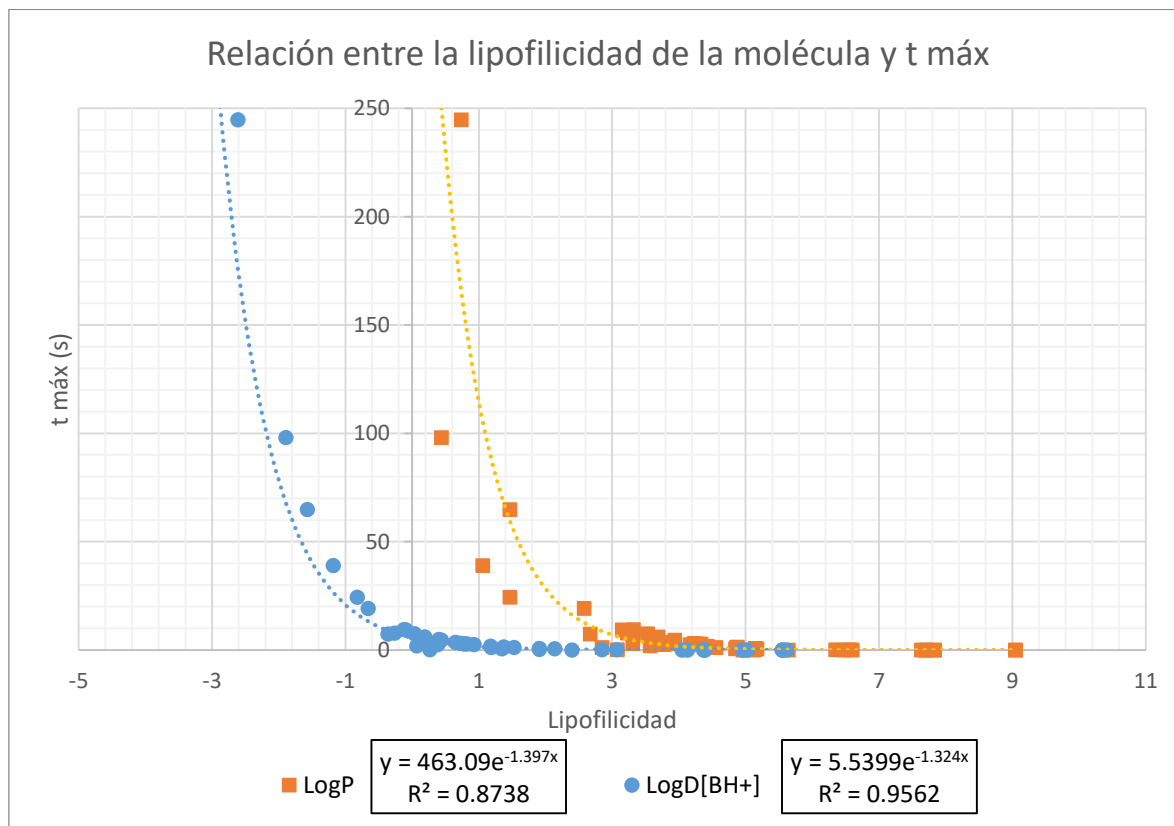
Si bien se espera que el modelo se aproxime de alguna manera a la realidad hay algunos aspectos de ésta que son omitidas con el fin de poder abordar las ecuaciones diferenciales del anexo 8.2 con más facilidad. Hay en particular un aspecto que fue omitido y que podría explicar porque algunos valores de  $t_{\text{máx}}$  son inverosímilmente pequeños. El modelo supone que las velocidades de difusión en el citoplasma y en los lisosomas son lo suficientemente rápidas, de modo que únicamente la permeabilidad de la membrana limita la velocidad. Es decir, considera que cuando las moléculas terminan de atravesar una membrana estas difunden instantáneamente hasta la membrana siguiente.



Gráfica 13. Acumulación en los lisosomas para los tres productos de síntesis.

Las predicciones de los modelos deben de interpretarse con cautela e incluso si estas no representan de manera precisa la realidad esto no significa que no puedan usarse dichas predicciones. Por ejemplo, en la gráfica 13 se agrupan las curvas que describen la concentración en los lisosomas como función del tiempo para todos los productos de síntesis. Puede que las predicciones del valor de  $t_{m\acute{a}x}$  no sean las reales, pero eso no impediría suponer de una manera confiable que la concentración máxima del compuesto sintetizado de la morfolina se alcanzaría mucho antes que para los compuestos sintetizados de la dietanolamina y monoetanolamina. Es decir, aún es posible hacer comparaciones entre los valores de  $t_{m\acute{a}x}$  de diferentes compuestos, porque todos están sujetos al mismo modelo matemático. Siguiendo este razonamiento se hizo una última comparación entre el valor de  $t_{m\acute{a}x}$  y la lipofiliidad de los compuestos usados hasta ahora.

En la gráfica 14 se muestra la relación entre  $t_{\text{máx}}$  y la lipofilidad de la molécula, expresada como  $\text{LogP}$  y  $\text{LogD}[\text{BH}^+]$ . Es claro que existe una relación exponencial entre estas variables de manera que se puede decir que para valores de  $\text{LogP} < 2$  y  $\text{LogD}[\text{BH}^+] < -2$  la difusión de un lado de la membrana al otro se hace tan lenta que el  $t_{\text{máx}}$  aumenta considerablemente de una manera exponencial. Según las ecuaciones de la línea de tendencia parece ser que hay una mejor correlación entre  $t_{\text{máx}}$  y  $\text{LogD}[\text{BH}^+]$ , que entre  $t_{\text{máx}}$  y  $\text{LogP}$ .



Gráfica 14. Relación entre la lipofilidad de la molécula y  $t_{\text{máx}}$ .



## 6 Conclusiones

---

Se realizó la síntesis de una serie de aminas derivadas del  $\alpha$ -tocoferol mediante tres reacciones consecutivas: hidrólisis del acetato de  $\alpha$ -tocoferol, oxidación del  $\alpha$ -tocoferol y condensación del  $\alpha$ -tocoferol quinona con una amina.

Se determinaron las mejores condiciones para la reacción de oxidación de  $\alpha$ -tocoferol y se exploraron nuevas rutas sintéticas para la funcionalización de los tocoferoles con aminas alifáticas primarias y secundarias. Se caracterizaron los compuestos sintetizados mediante espectroscopia IR, RMN  $C^{13}$  y RMN  $H^1$ .

Se calcularon los valores teóricos de algunas propiedades fisicoquímicas relevantes de los productos de síntesis mediante herramientas computacionales. Estas propiedades fueron usadas para tratar de predecir sus efectos sobre las membranas lisosomales.

Se construyeron y resolvieron las ecuaciones diferenciales de un modelo matemático simplificado que describe la acumulación lisosomal de bases monopróticas. Dichas ecuaciones habían sido planteadas anteriormente por Christian de Duve pero no habían sido proporcionadas las soluciones analíticas hasta este momento.

Se predijo la acumulación lisosomal, usando el modelo matemático desarrollado, de cada uno de los productos finales de síntesis, así como de otros compuestos con el fin de comparar sus propiedades lisosomotrópicas. Se demostró de manera contundente que los productos de síntesis podrían presentar una acumulación lisosomal apreciable y en algunos casos mejor que la de otros compuestos con una actividad lisosomotrópica reportada.

Finalmente se predijo mediante diversas ecuaciones el efecto de las propiedades tensioactivas de los productos finales de síntesis sobre la membrana. Dicha predicción evidenció que, en el supuesto de que los compuestos sintetizados tengan actividad de detergente, tendrían una potencia mayor con respecto a otros detergentes lisosomotrópicos para romper membranas.

En resumen, se demostró el potencial que tienen los compuestos sintetizados como detergentes lisosomotrópicos y como fármacos antineoplásicos, lo que abre la posibilidad a sintetizar análogos de estas sustancias que puedan ser evaluadas en sistemas biológicos.

## 7 Bibliografía

---

1. Organización Mundial de la Salud. (12 de Septiembre de 2018). *Cáncer*. Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. De Duve, C., De Barsey, T., Poole, B., Trouet, A., Tulkens, P., y Van Hoof, F. (1974). Lysosomotropic agents. *Biochemical Pharmacology*, 23(18), 2495-2531.
3. DeVita, V. T., Lawrence, T. S., y Rosenberg, S. A. (Edits.). (2015). *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology* (10 ed.). Philadelphia: Wolters Kluwer.
4. Mendelsohn, J., Howley, P. M., Israel, M. A., Gray, J. W., y Thompson, C. B. (2015). *The Molecular Basis of Cancer* (4 ed.). Philadelphia: Elsevier Saunders.
5. Pecorino, L. (2012). *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics* (3 ed.). Oxford: Oxford University Press.
6. Teicher, B. A., y Andrews, P. A. (Edits.). (2004). *Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval* (2 ed.). Totowa, New Jersey: Human Press.
7. Wermuth, C. G., Aldous, D., Raboisson, P., y Rognan, D. (Edits.). (2015). *The Practice of Medicinal Chemistry* (4 ed.). Amsterdam: Academic Press.
8. Lemke, T. L., Williams, D. A., Roche, V. F., y Zito, S. W. (Edits.). (2008). *Foye's Principles of Medicinal Chemistry* (6 ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
9. Brunton, L. L., Chabner, B. A., y Knollmann, B. C. (Edits.). (2012). *Goodman & Gilman's Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica* (12 ed.). México: McGraw-Hill.
10. Apraiz, A., Boyano, M. D., y Asumendi, A. (2011). Cell-centric view of apoptosis and apoptotic cell death-inducing antitumoral strategies. *Cancers*, 3(1), 1042–1080.
11. Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., . . . Darnell, J. (2005). *Biología Celular y Molecular* (5 ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
12. De Robertis, E. M., y Hib, J. (2004). *Fundamentos de Biología Celular y Molecular De Robertis* (4 ed.). Buenos Aires: Editorial El Ateneo.
13. Karp, G. C. (2013). *Biología Celular y Molecular, Conceptos y Experimentos* (7 ed.). México: McGraw-Hill.
14. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. (2010). *Biología Molecular de la Célula* (5 ed.). Barcelona: Ediciones Omega.
15. Halaby, R. (2015). Role of lysosomes in cancer therapy. *Research and Reports in Biology*, 6, 147-155.

16. Marques, A., y Saftig, P. (2019). Lysosomal storage disorders – challenges, concepts and avenues for therapy: beyond rare diseases. *Journal of Cell Science*, 132(2).
17. Kirkegaard, T., y Jäättelä, M. (2010). Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793(4), 746-754.
18. Kågedal, K., Zhao, M., Svensson, I., y Brunk, U. T. (2001). Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *The Biochemical Journal*, 359(2), 335-343.
19. Repnik, U., Česen, M. H., y Turk, B. (2014). Lysosomal membrane permeabilization in cell death: Concepts and challenges. *Mitochondrion*, 19(Part A), 49-57.
20. Castro, M., Bunt, G., y Wouters, F. (2016). Cathepsin B launches an apoptotic exit effort upon cell death-associated disruption of lysosomes. *Cell Death Discovery*, 4, 1-8.
21. Appelqvist, H., Johansson, A.-C., Linderöth, E., Johansson, U., Antonsson, B., Steinfeld, R., . . . Öllinger, K. (2012). Lysosome-mediated apoptosis is associated with cathepsin D-specific processing of Bid at Phe24, Trp48, and Phe183. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 42(3), 231-242.
22. Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., . . . Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149(5), 1060-1072.
23. Terman, A., Kurz, B., Gustafsson, B., y Brunk, U. T. (2006). Lysosomal labilization. *IUBMB Life*, 58(9), 531-539.
24. Denamur, S., Tyteca, D., Marchand-Brynaert, J., Van Bambeke, F., Tulkens, P. M., Courtoy, P. J., y Mingeot-Leclercq, M.-P. (2011). Role of oxidative stress in lysosomal membrane permeabilization and apoptosis induced by gentamicin, an aminoglycoside antibiotic. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(9), 1656-1665.
25. Karch, J., Schips, T. G., Maliken, B. D., Brody, M. J., Sargent, M. A., Kanisicak, O., y Molkentin, J. D. (2017). Autophagic cell death is dependent on lysosomal membrane permeability through Bax and Bak. *eLife*, 6. doi:10.7554/eLife.30543
26. Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., . . . Kimmelman, A. C. (2011). Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes and Development*, 25(7), 717-729.
27. Amaravadi, R. K., Yu, D., Lum, J. J., Bui, T., Christophorou, M. A., Evan, G. I., . . . Thompson, C. B. (2007). Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(2), 326-336.
28. Wang, Y., Singh, R., Massey, A. C., Kane, S. S., Kaushik, S., Grant, T., . . . Czaja, M. J. (2007). Loss of macroautophagy promotes or prevents fibroblast apoptosis depending on the death stimulus. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(8), 4766-4777.

29. Boya, P., Gonzalez-Polo, R.-A., Poncet, D., Andreau, K., Vieira, H. L., Roumier, T., . . . Kroemer, G. (2003). Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene*, 3927–3936.
30. McAfee, Q., Zhang, Z., Samanta, A., Levi, S. M., Ma, X.-H., Piao, S., . . . Amaravadi, R. K. (2012). Autophagy inhibitor Lys05 has single-agent antitumor activity and reproduces the phenotype of a genetic autophagy deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(21), 8253-8258.
31. Chen, Q.-Y., Shi, J.-G., Yao, Q.-H., Jiao, D.-M., Wang, Y.-Y., Hu, H.-Z., . . . Wu, L.-J. (2012). Lysosomal membrane permeabilization is involved in curcumin-induced apoptosis of A549 lung carcinoma cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 359(1-2), 389-398.
32. Lu, S., Sung, T., Lin, N., Abraham, R. T., y Jessen, B. A. (2017). Lysosomal adaptation: How cells respond to lysosomotropic compounds. *PloS One*, 12(3).
33. Kuzu, O. F., Gowda, R., Sharma, A., y Robertson, G. P. (2014). Leelamine mediates cancer cell death through inhibition of intracellular cholesterol transport. *Molecular cancer therapeutics*, 13(7), 1690-1703.
34. Ohkuma, S., y Poole, B. (1981). Cytoplasmic vacuolation of mouse peritoneal macrophages and the uptake into lysosomes of weakly basic substances. *The Journal of Cell Biology*, 90(3), 656-664.
35. Parks, A., y Marceau, F. (2016). Lysosomotropic cationic drugs induce cytostatic and cytotoxic effects: Role of liposolubility and autophagic flux and antagonism by cholesterol ablation. *Toxicology and applied pharmacology*, 305, 55-65.
36. Firestone, R. A., Pisano, J. M., y Bonney, R. J. (1979). Lysosomotropic agents. 1. Synthesis and cytotoxic action of lysosomotropic detergents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 22(9), 1130-1133.
37. Forster, S., Scarlett, L., y Lloyd, J. B. (1987). The effect of lysosomotropic detergents on the permeability properties of the lysosome membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, 924(3), 452-457.
38. Villamil Giraldo, A. M., Appelqvist, H., Ederth, T., y Öllinger, K. (2014). Lysosomotropic agents: impact on lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Biochemical Society Transactions*, 42(5), 1460-1464.
39. Li, W., Yuan, X., Nordgren, G., Dalen, H., Dubowchik, G. M., Firestone, R. A., y Brunk, U. T. (2000). Induction of cell death by the lysosomotropic detergent MSDH. *FEBS Letters*, 470(1), 35-39.
40. Dubowchik, G. M., Gawlak, S. L., y Firestone, R. A. (1995). The in vitro effects of three lysosomotropic detergents against three human tumor cell lines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 5(8), 893-898.

41. Ostenfeld, M. S., Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Fehrenbacher, N., Olsen, O., Groth-Pedersen, L., . . . Jäättelä, M. (2008). Anti-cancer agent siramesine is a lysosomotropic detergent that induces cytoprotective autophagosome accumulation. *Autophagy*, 4(4), 487-499.
42. Marceau, F., Bawolak, M.-T., Lodge, R., Bouthillier, J., Gagné-Henley, A., C.-Gaudreault, R., y Morissette, G. (2012). Cation trapping by cellular acidic compartments: Beyond the concept of lysosomotropic drugs. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 259(1), 1-12.
43. Delgado Cirilo, A., Minguillón Llombart, C., y Joglar Tamargo, J. (2000). *Introducción a la Química Terapéutica* (2 ed.). España: Diaz De Santos.
44. Kerns, E. H., y Di, L. (2008). *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization*. Amsterdam: Elsevier.
45. Lloyd, J. B. (2000). Lysosome membrane permeability: implications for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 41(2), 189-200.
46. Nadamaciva, S., Lu, S., Gebhard, D. F., Jessen, B. A., Pennie, W. D., y Will, Y. (2011). A high content screening assay for identifying lysosomotropic compounds. *Toxicology in Vitro*, 25(3), 715-723.
47. Trapp, S., Rosania, G. R., Horobin, R. W., y Kornhuber, J. (2008). Quantitative modeling of selective lysosomal targeting for drug. *European Biophysics Journal: EBJ*, 37(8), 1317-1328.
48. Ndolo, R. A., Luan, Y., S., D., L., F. M., y Krise, J. P. (2012). Lysosomotropic properties of weakly basic anticancer agents promote cancer cell selectivity in vitro. *PLoS One*, 7(11).
49. Duvvuri, M., Gong, Y., Chatterji, D., y Krise, J. P. (2004). Weak base permeability characteristics influence the intracellular sequestration site in the multidrug-resistant human leukemic cell line HL-60. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32367-32372.
50. Davies, J. (1957). A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent. *Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interface (Proceedings of the International Congress of Surface Activity)*, 426-438.
51. Griffin, W. C. (1954). Calculation of HLB values of non-ionic surfactants. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 5(4), 249-256.
52. Israelachvili, J. N. (2011). *Intermolecular and Surface Forces* (3 ed.). Amsterdam: Elsevier.
53. Wolf, G. (2005). The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill. *Journal of Nutrition*, 135(3), 363-366.
54. Evans, H. M., Emerson, O. H., y Emerson, G. A. (1936). The isolation from wheat germ oil of an alcohol,  $\alpha$ -tocopherol, having the properties of vitamin E. *Journal of Biological Chemistry*, 113(1), 319-332.

55. Emerson, O. H., Emerson, G. A., Mohammad, A., y Evans, H. M. (1937). The chemistry of vitamin E: Tocopherols from various sources. *Journal of Biological Chemistry*, 122(1), 99-107.
56. Fernholz, E. (1938). On the constitution of  $\alpha$ -tocopherol. *Journal of the American Chemical Society*, 60(3), 700-705.
57. Pennock, J. F., Hemming, F. W., y Kerr, J. D. (1964). A reassessment of tocopherol chemistry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 17(5), 542-548.
58. Kuklinski, C. (2003). *Farmacognosia*. Barcelona: Ediciones Omega.
59. Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales* (2 ed.). Zaragoza: Acriba.
60. Liotta, D., Arbiser, J., Short, J. W., y Saindane, M. (1983). Simple, inexpensive procedure for the large-scale production of alkyl quinones. *The Journal of Organic Chemistry*, 48(17), 2932-2933.
61. McMurry, J. (2012). *Química Orgánica* (8 ed.). Australia: Cengage Learning.
62. Ali, M. H., Niedbalski, M., Bohnert, G., y Bryant, D. (2006). Silica-gel-supported ceric ammonium nitrate (CAN): a simple and efficient solid-supported reagent for oxidation of oxygenated aromatic compounds to quinones. *Synthetic Communications*, 36(12), 1751-1759.
63. Sridharan, V., y Menendez, J. C. (2010). Cerium ( IV ) ammonium nitrate as a catalyst in organic synthesis. *Chemical Reviews*, 110(6), 3805-3849.
64. Saladino, R., Neri, V., Farina, A., Crestini, C., Nencioni, L., y Palamara, A. T. (2008). A novel and efficient synthesis of tocopheryl quinones by homogeneous and heterogeneous methyltrioxorhenium/hydrogen peroxide catalytic systems. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 350(2), 321-331.
65. Cohen, N., y Lopresti, R. J. (1981). Studies on the total synthesis of (2R,4'R,8'R)- $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) stereospecific cyclizations leading to optically active chromans. *Journal of Organic Chemistry*, 46(12), 2445-2450.
66. Kreps, F., Kyselka, J., Burčová, Z., Schmidt, Š., Filip, V., Dubaj, T., . . . Čertík, M. (2016). Synthesis and analysis of tocopheryl quinone and tocopherol esters with fatty acids in heated sunflower oil. *European Journal Lipid Science Technology*, 118(5), 788-802.
67. Wade, L. G. (2004). *Química Orgánica* (5 ed.). Madrid: Pearson educación.
68. Camps García, P., Vázquez Cruz, S., y Escolano Mirón, C. (2010). *Química Farmacéutica I Tomo 2 Preparación de los Grupos Funcionales más Usuales en Fármacos. Problemas Resueltos de Síntesis de Fármacos*. Barcelona: Universitat de Barcelona.
69. Abdel-Magid, A. F., Carson, K. G., Harris, B. D., Maryanoff, C. A., y Shah, R. D. (1996). Reductive amination of aldehydes and ketones with sodium triacetoxyborohydride.

- Studies on direct and indirect reductive amination procedures. *The Journal of Organic Chemistry*, 61(11), 3849-3862.
70. Borch, R. F., Bernstein, M. D., y Durst, H. D. (1971). Cyanohidridoborate anion as a selective reducing agent. *Journal of the American Chemical Society*, 93(12), 2897-2904.
  71. Gomez, S., Peters, J. A., y Maschmeyer, T. (2002). The reductive amination of aldehydes and ketones. *Advanced Synthesis And Catalysis*, 344(10), 1037-1057.
  72. Yurkanis Bruice, P. (2016). *Fundamentos de Química Orgánica* (3 ed.). México: Pearson.
  73. Qin, W., Long, S., Panunzio, M., y Biondi, S. (2013). Schiff Bases: a short survey on an evergreen chemistry tool. *Molecules*, 18(10), 12264-12289.
  74. Hall, H. K., Padias, A. B., Williams, P. A., Gosau, J.-M., Boone, H. W., y Park, D.-K. (1995). Novel polyaromatic quinone imines. *Macromolecules*, 28(1), 1-8.
  75. Boone, H. W., Bryce, J., Lindgren, T., Padias, A. B., y Hall, H. K. (1997). Stereoregular poly (benzoquinone imines) from methyl-substituted benzoquinones. *Macromolecules*, 30(9), 2797-2799.
  76. Hall, H. K., Padias, A. B., y Boone, H. W. (2007). Condensation routes to polyaniline and its analogs. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 45(21), 4751-4763.
  77. Almeida Barbosa, L. C., Alves Pereira, U., Alvares Maltha, C. R., Teixeira, R. R., Moreira Valente, V. M., Oliveira Ferreira, J. R., . . . Pessoa, C. (2010). Synthesis and biological evaluation of 2,5-bis(alkylamino)-1,4-benzoquinones. *Molecules*, 15(8), 5629-5643.
  78. David, C. C., Campos, J. F., Silva, T. M., y Camara, C. A. (2015). Synthesis of new 2-N,N'-dialkylamino-1,4-naphthoquinone Derivatives: concerning the reactivity of lapachol with secondary amines. *Revista Virtual de Química*, 7(2), 752-764.
  79. Singh, M. W., Karmakar, A., Barooah, N., y Baruah, J. B. (2007). Variations in product in reactions of naphthoquinone with primary amines. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 3(10).
  80. Cameron, D. W., Scott, P. M., y Todd, L. (1964). Side-chain amination: a new reaction of nuclear-alkylated quinones. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 42-48.
  81. Lapidot, A., Silver, B. L., y Samuel, D. (1966). The tautomerism of quinones and the question of quinone methide intermediates in oxidative phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 241(23), 5537-5541.
  82. Dean, F. M., Houghton, L. E., y Morton, R. B. (1968). Adducts from quinones and diazoalkanes. Part VII. The function of quinone methides in the side-chain amination of alkylquinones and in dimerisations giving ethylenediquinones. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 2065-2069.

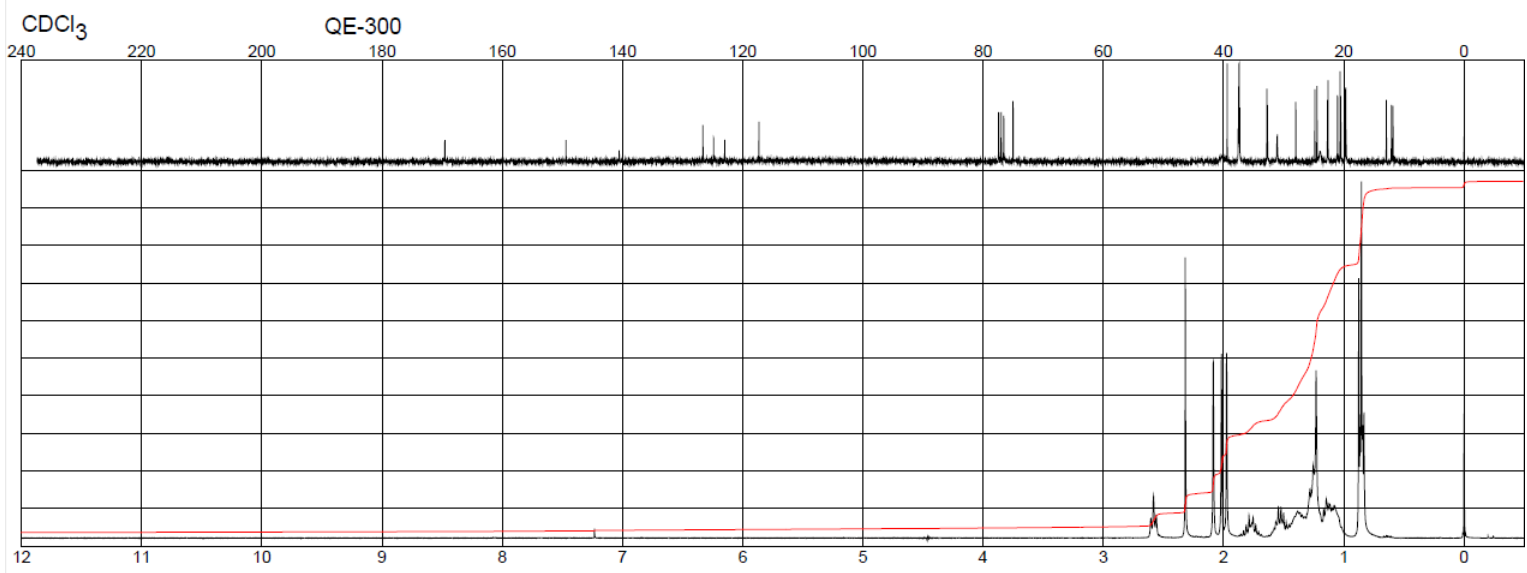


83. Cameron, D. W., Giles, R. G., y Titman, R. B. (1969). Side-chain versus nuclear amination of methyl-substituted benzo- and naphtho-quinones. *Journal of the Chemical Society C: Organic*(9), 1245-1251.
84. Mori-Quiroz, L. M., y Clift, M. D. (2016). Exploiting alkylquinone tautomerization: amine benzylation. *Organic Letters*, 18(14), 3446-3449.
85. *Chemicalize: Instant cheminformatics solutions*. (3 de Mayo de 2019). Obtenido de <https://chemicalize.com/>
86. Bodor, N., y Buchwald, P. (1999). Recent advances in the brain targeting of neuropharmaceuticals by chemical delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36(2-3), 229-254.
87. Carey, F. A. (2006). *Química Orgánica* (6 ed.). México: Mc-Graw-Hill.
88. *Catálogo en línea de Sigma-Aldrich*. (12 de Septiembre de 2018). Obtenido de <https://www.sigmaaldrich.com/united-states.html>
89. Pretsch, E., P., B., y Affolter, C. (2000). *Structure Determination of Organic Compounds. Tables of Spectral Data* (3 ed.). Springer-Verlag Berlín Heidelberg.
90. Silverstein, R. M., Webster, F. X., y Kiemle, D. J. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (7 ed.). John Wiley & Sons.
91. Hesse, M., Meier, H., y Zeeh, B. (2005). *Métodos espectroscópicos en Química Orgánica* (2 ed.). Vallehermoso, Madrid: Editorial Síntesis.
92. Requena, A., y Zuñiga, J. (2003). *Espectroscopía*. Madrid: Pearson Prentice Hall.
93. Breitmaier, E. (2002). *Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry: A Practical Guide* (3 ed.). John Wiley & Sons.
94. Conley, R. T. (1979). *Espectroscopía Infrarroja*. Madrid: Alhambra.
95. Ufuk, A., Somers, G., Houston, J., y Galetin, A. (2015). In vitro assessment of uptake and lysosomal sequestration of respiratory drugs in alveolar macrophage cell line NR8383. *Pharmaceutical Research*, 32(12), 3937–3951.
96. Daniel, W., y Wójcikowski, J. (1997). Contribution of lysosomal trapping to the total tissue uptake of psychotropic drugs. *Pharmacology and Toxicology*, 80(2), 62-68.
97. Daniel, W., y Wójcikowski, J. (1999). Lysosomal trapping as an important mechanism involved in the cellular distribution of perazine and in pharmacokinetic interaction with antidepressants. *European Neuropsychopharmacology*, 9(6), 483-491.
98. Daniel, W., y Wójcikowski, J. (1999). The role of lysosomes in the cellular distribution of thioridazine and potential drug interactions. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 158(2), 115-124.



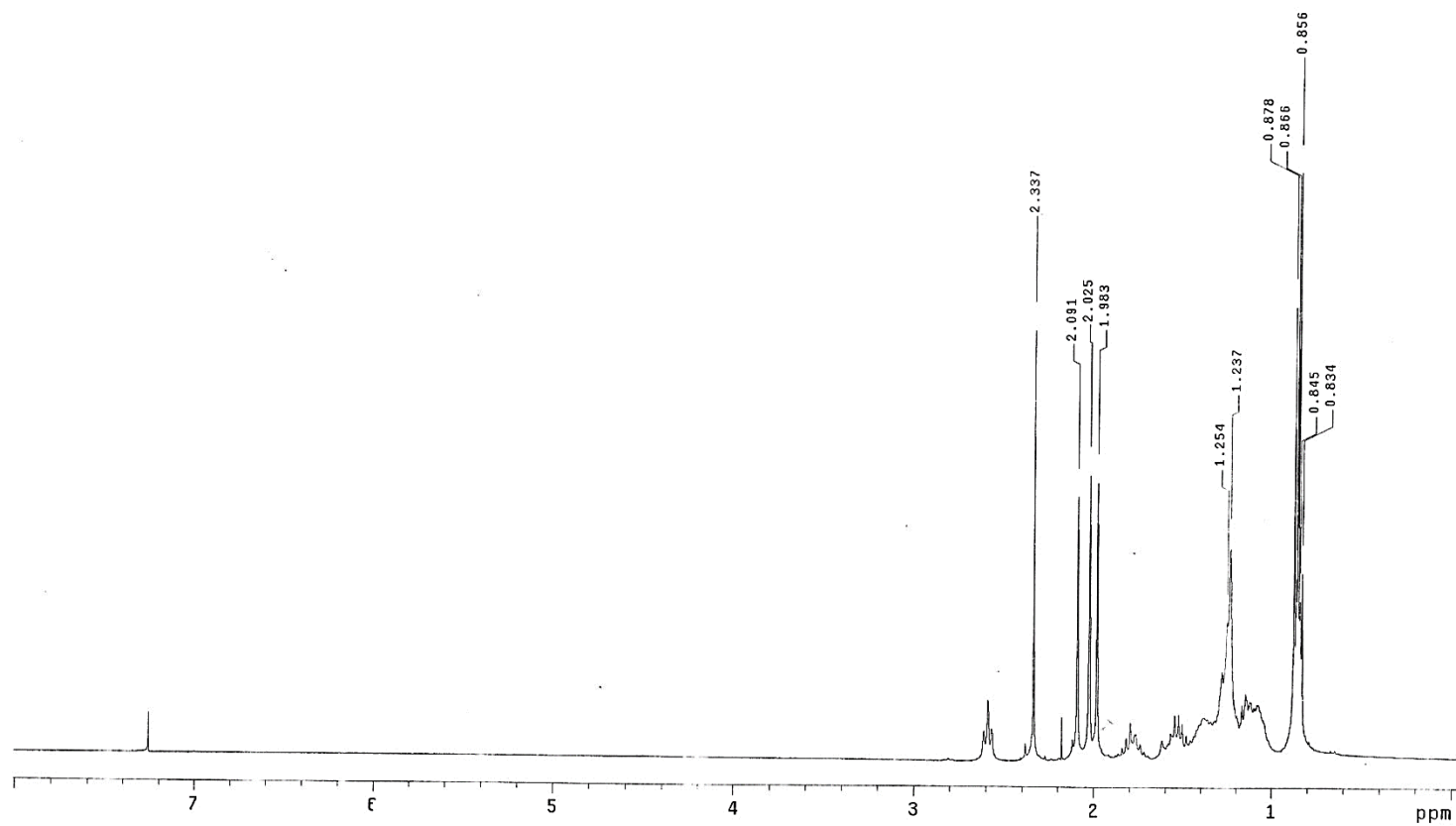
99. Daniel, W., Bickel, M., y Honegger, U. (1995). The contribution of lysosomal trapping in the uptake of desipramine and chloroquine by different tissues. *Pharmacology and Toxicology*, 77(6), 402-406.
100. Daniel, W., Wójcikowski, J., y Pałucha, A. (2001). Intracellular distribution of psychotropic drugs in the grey and white matter of the brain: the role of lysosomal trapping. *British Journal of Pharmacology*, 134(4), 807-814.
101. Ishizaki, J., Yokogawa, K., Hirano, M., Nakashima, E., Sai, Y., Ohkuma, S., . . . Ichimura, F. (1996). Contribution of lysosomes to the subcellular distribution of basic drugs in the rat liver. *Pharmaceutical research*, 13(6), 902-906.
102. Ishizaki, J., Yokogawa, K., Ichimura, F., y Ohkuma, S. (2000). Uptake of imipramine in rat liver lysosomes in vitro and its inhibition by basic drugs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 294(3), 1088-1098.
103. Ishizaki, J., Yokogawa, K., Nakashima, E., y Ichimura, F. (1997). Relationships between the hepatic intrinsic clearance or blood cell-plasma partition coefficient in the rabbit and the lipophilicity of basic drugs. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49(8), 768-772.
104. Ishizaki, J., Yokogawa, K., Nakashima, E., Ohkuma, S., y Ichimura, F. (1998). Influence of ammonium chloride on the tissue distribution of anticholinergic drugs in rats. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50(7), 761-766.
105. Ishizaki, J., Yokogawa, K., Nakashima, E., Ohkuma, S., y Ichimura, F. (1998). Uptake of basic drugs into rat lung granule fraction in vitro. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21(8), 858-861.
106. Kazmi, F., Hensley, T., Pope, C., Funk, R., Loewen, G., Buckley, D., y Parkinson, A. (2013). Lysosomal sequestration (trapping) of lipophilic amine (cationic amphiphilic) drugs in immortalized human hepatocytes (Fa2N-4 cells). *Drug Metabolism and Disposition*, 41(4), 897-905.
107. Novelli, A., Lysko, P., y Henneberry, R. (1987). Uptake of imipramine in neurons cultured from rat cerebellum. *Brain Research*, 411(2), 291-297.

## 8.1 Espectros

Espectro 1. Referencia de RMN  $\text{H}^1$  y  $\text{C}^{13}$  de acetato de alfa tocoferol.

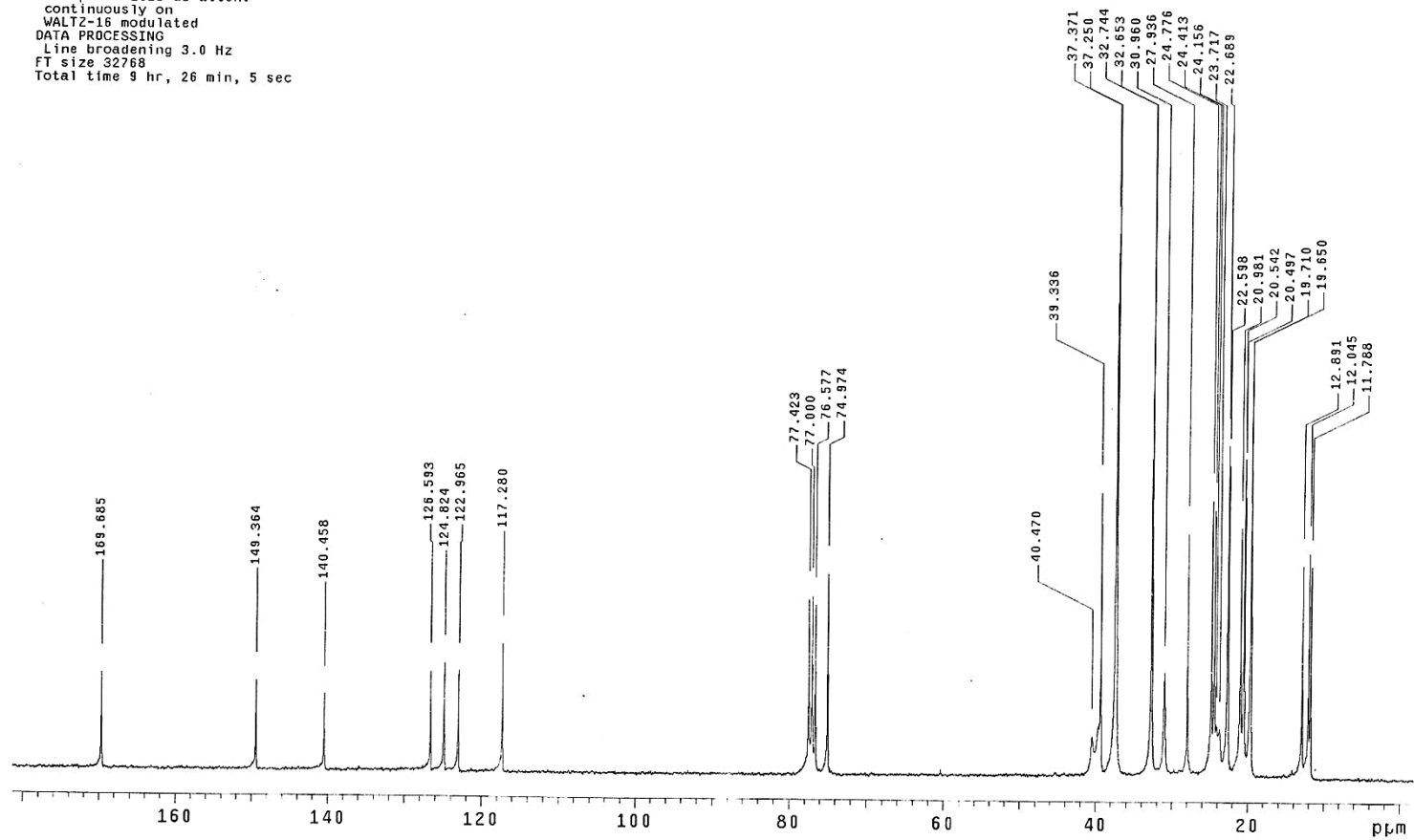
Dr. Arias  
a-Tocoferol  
Pulse Sequence: s2pu1  
Solvent: CDC13  
Ambient temperature  
Mercury-30088 "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec  
Pulse 47.4 degrees  
Acq. time 1.998 sec  
Width 4506.5 Hz  
16 repetitions  
OBSERVE H1, 300.0706244 MHz  
DATA PROCESSING  
FT size 32768  
Total time 0 min, 49 sec

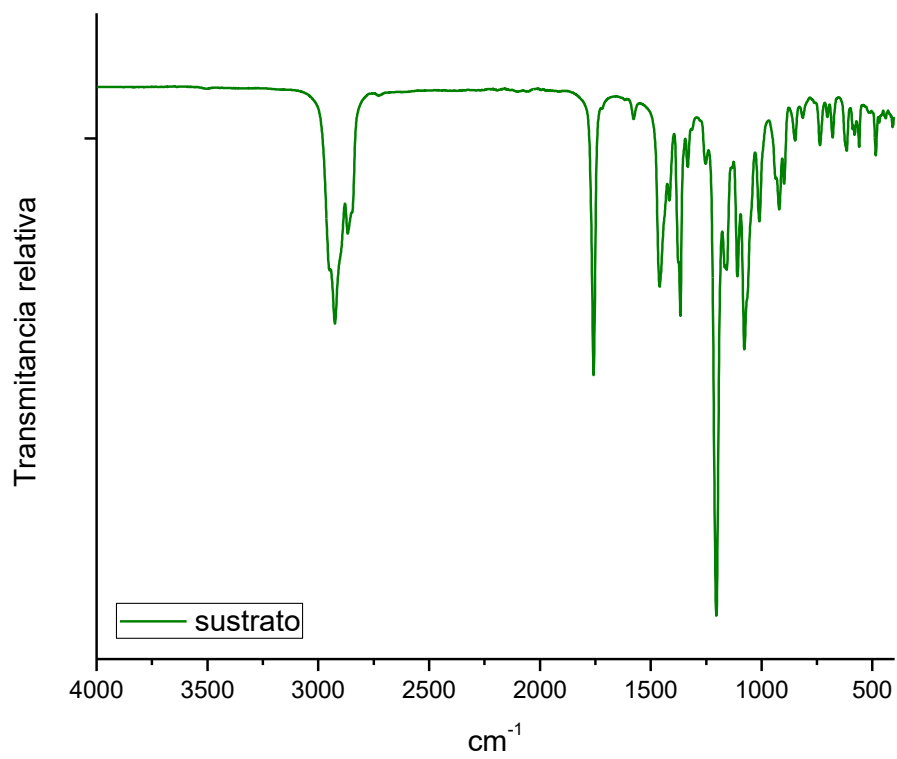


Espectro 2. RMN H<sup>1</sup> acetato de alfa tocoferol, sustrato.

Dr.Arias  
R3-HIDR  
Pulse Sequence: s2pu1  
Solvent: CDC13  
Ambient temperature  
Mercury-300BB "mercury300"  
Relax. delay 0.800 sec  
Pulse 32.6 degrees  
Acq. time 0.301 sec  
Width 18691.6 Hz  
30000 repetitions  
OBSERVE C13, 75.4528238 MHz  
DECOUPLE H1, 300.0720883 MHz  
Low power 1023 dB atten.  
continuously on  
WALTZ-16 modulated  
DATA PROCESSING  
Line broadening 3.0 Hz  
FT size 32768  
Total time 9 hr, 26 min, 5 sec

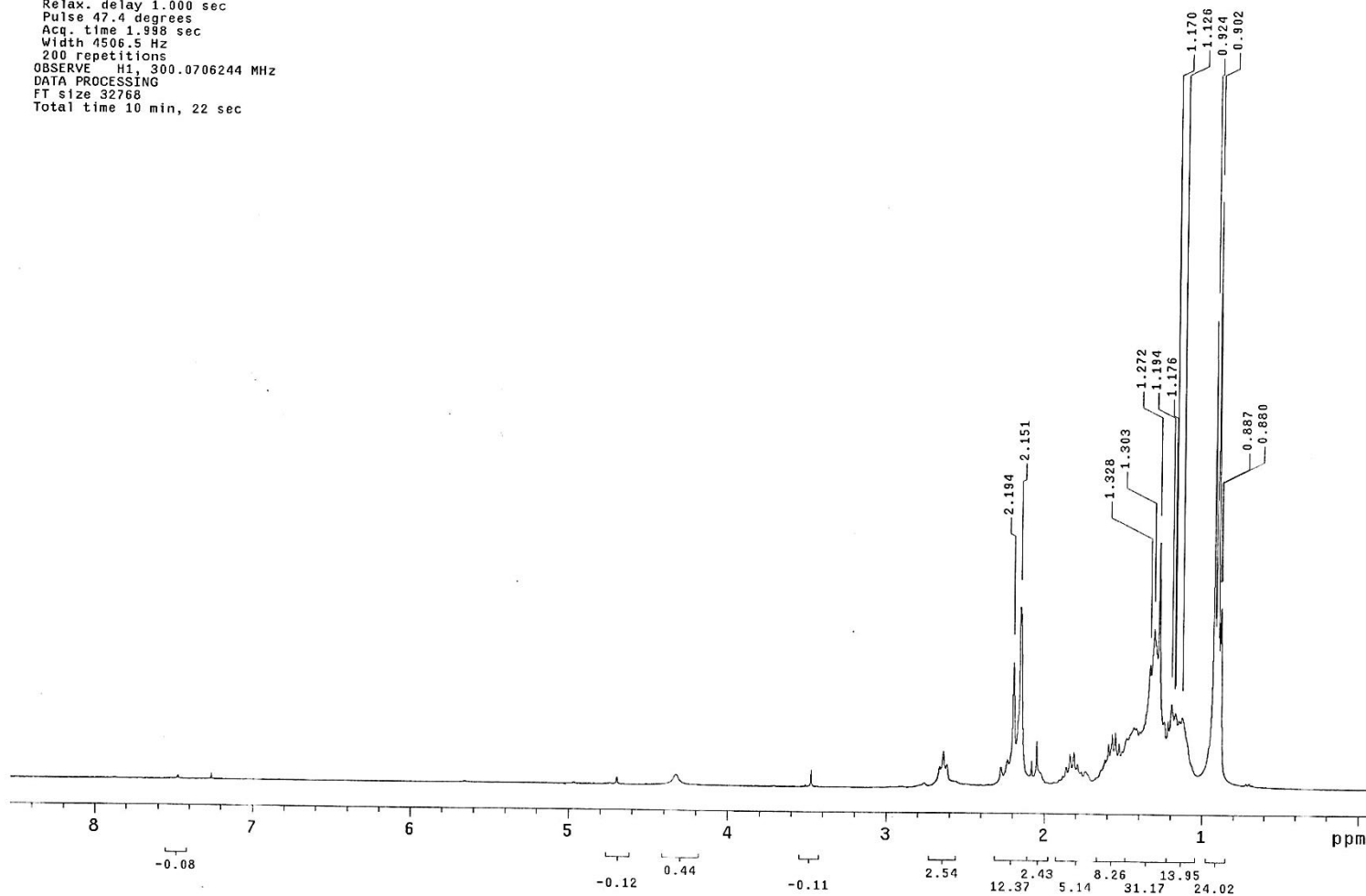


Espectro 3. RMN  $C^{13}$  acetato de alfa tocoferol, sustrato.

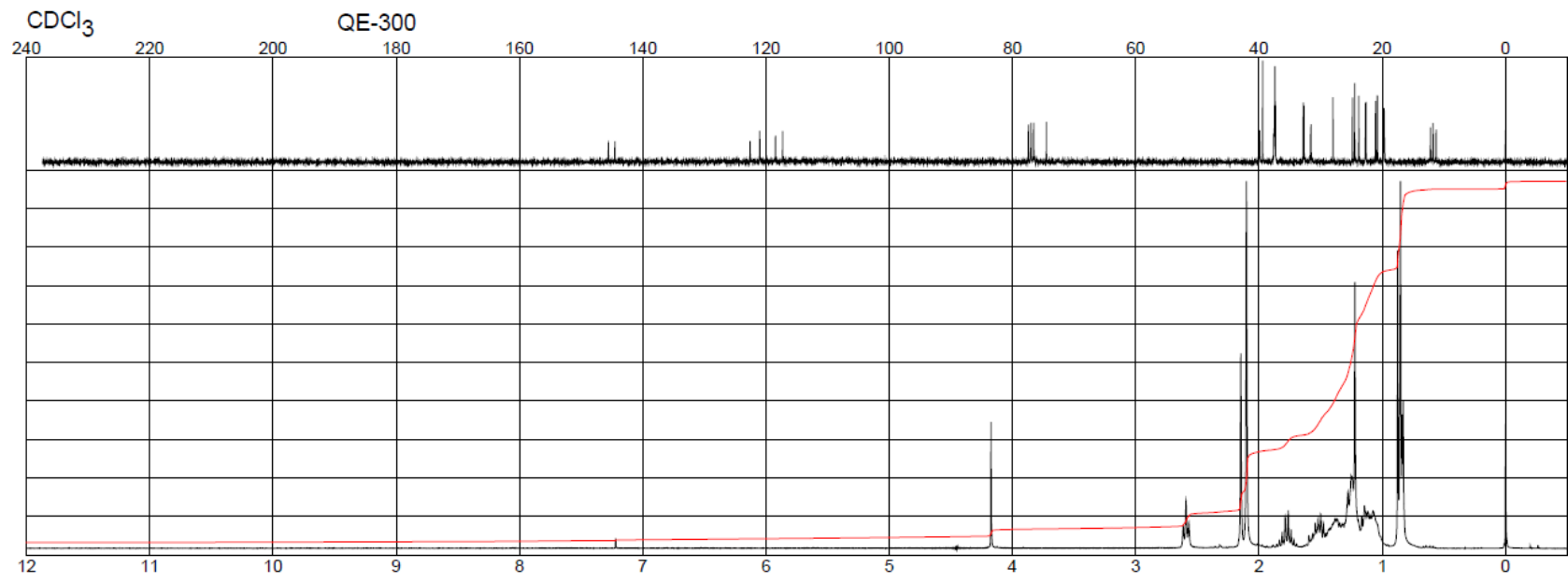


Espectro 4. IR de acetato de alfa tocoferol.

Dr. Arias  
TOC 3  
Pulse Sequence: s2pu1  
Solvent: CDC13  
Ambient temperature  
Mercury-300BB "mercury300"  
Relax. delay 1.000 sec  
Pulse 47.4 degrees  
Acq. time 1.998 sec  
Width 4506.5 Hz  
200 repetitions  
OBSERVE H1, 300.0706244 MHz  
DATA PROCESSING  
FT size 32768  
Total time 10 min, 22 sec



Espectro 5. RMN H<sup>1</sup> de alfa tocoferol proveniente de la reacción de hidrólisis.

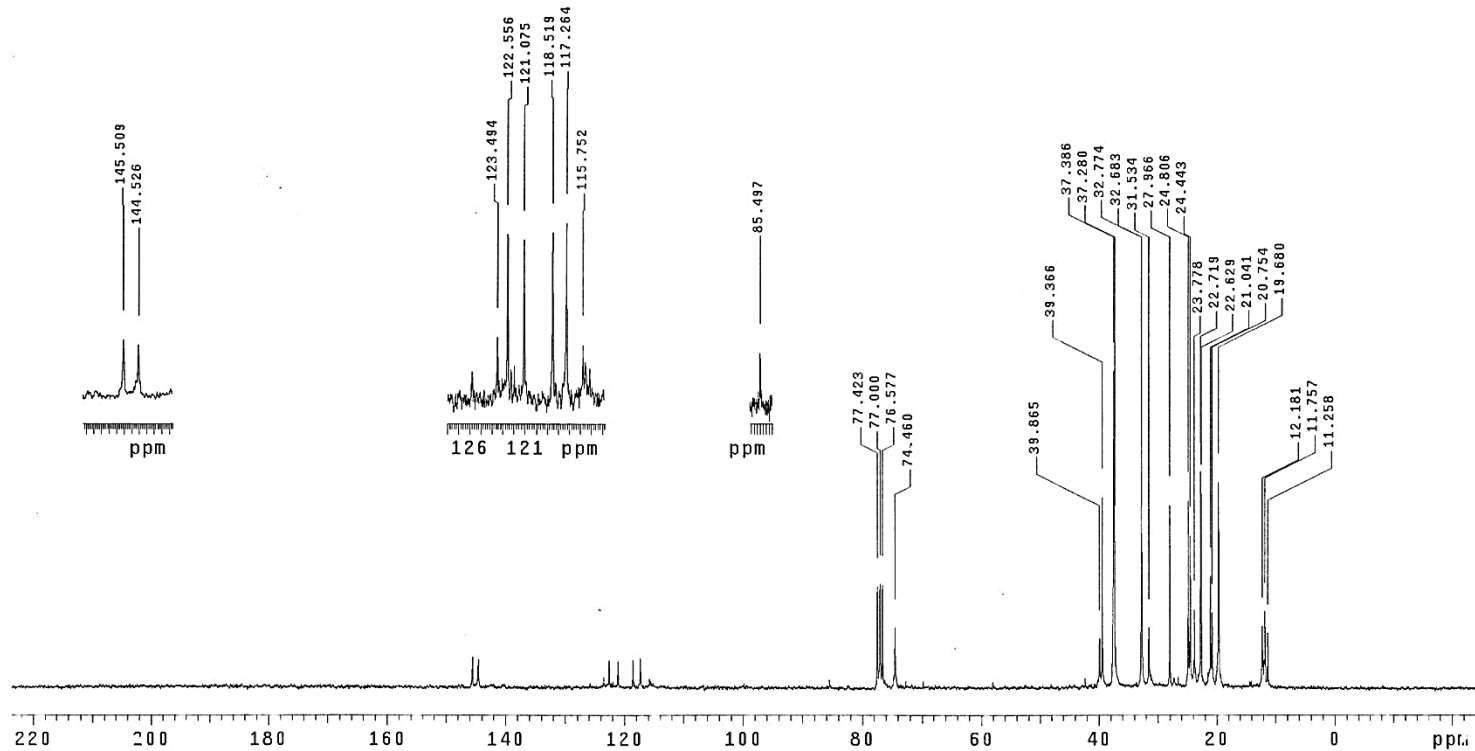


Espectro 6. Referencia de RMN  $\text{H}^1$  y  $\text{C}^{13}$  de alfa tocoferol.

Dr. Arias  
TOC 3

Pulse Sequence: s2pu1  
Solvent: CDC13  
Ambient temperature  
Mercury-300BB "mercury300"

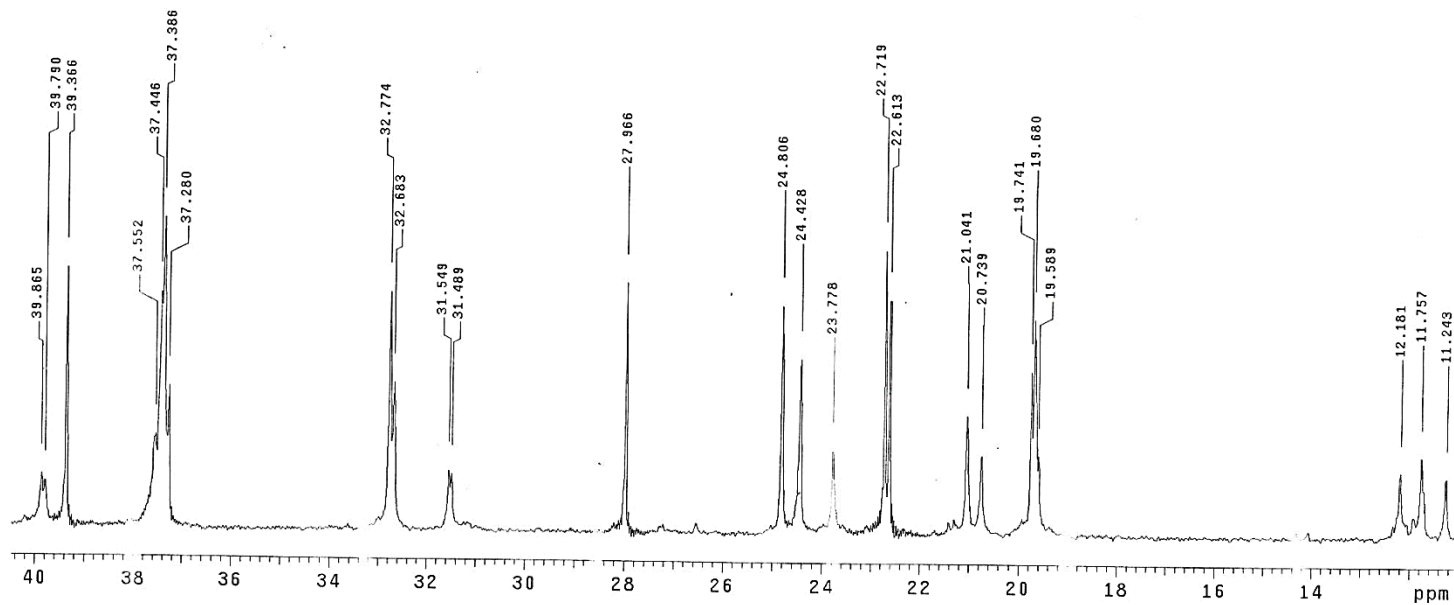
Relax. delay 0.800 sec  
Pulse 32.6 degrees  
Acq. time 0.301 sec  
Width 18691.6 Hz  
1000 repetitions  
OBSERVE C13, 75.4528227 MHz  
DECOUPLE H1, 300.0720883 MHz  
Low power 1023 dB atten.  
continuously on  
WALTZ-16 modulated  
DATA PROCESSING  
Line broadening 3.0 Hz  
FT size 32768  
Total time 12 hr, 35 min, 51 sec



Espectro 7. RMN C<sup>13</sup> de alfa tocoferol proveniente de la reacción de hidrólisis.

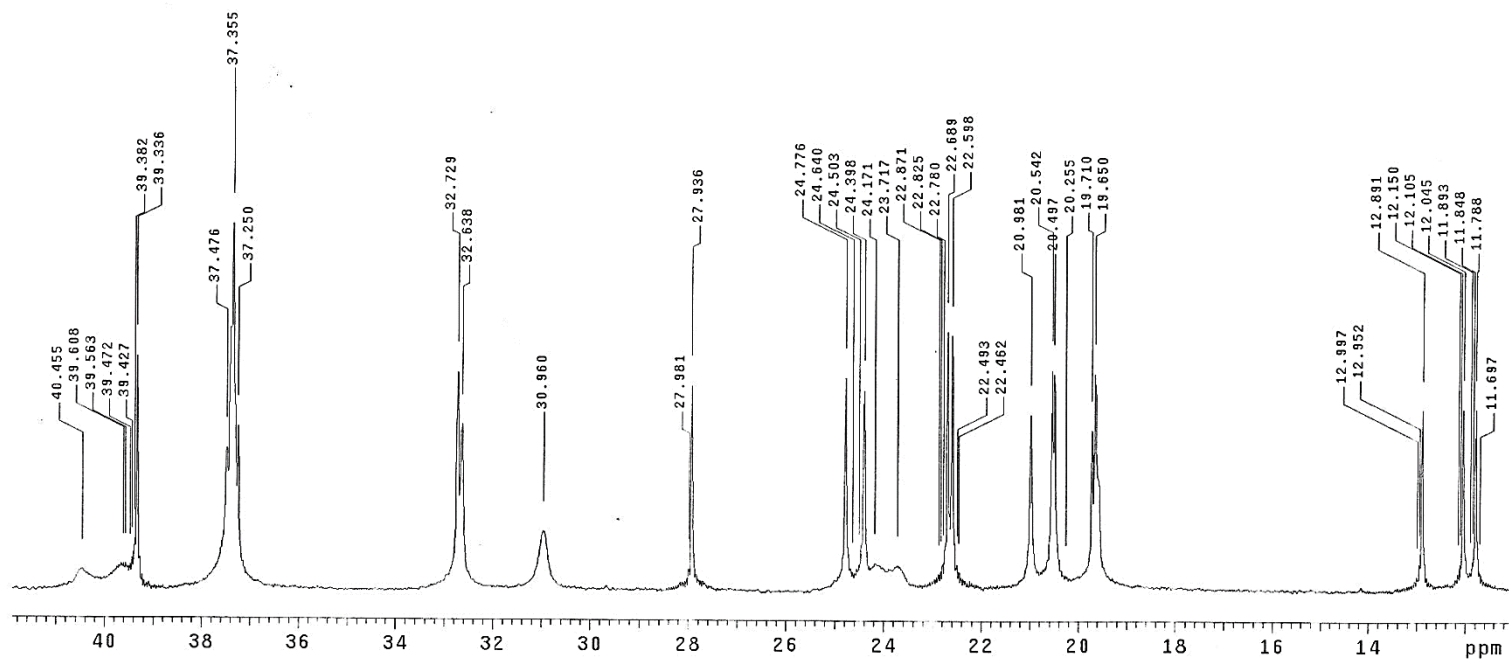


Dr. Arias  
TOC 3  
Pulse Sequence: s2pu1  
Solvent: CDCl3  
Ambient temperature  
Mercury-30088 "mercury300"  
  
Relax. delay 0.800 sec  
Pulse 32.6 degrees  
Acq. time 0.301 sec  
Width 18691.6 Hz  
1000 repetitions  
OBSERVE C13, 75.4528227 MHz  
DECOUPLE H1, 300.0720883 MHz  
Low power 1023 dB atten.  
continuously on  
WALTZ-16 modulated  
DATA PROCESSING  
Line broadening 1.0 Hz  
FT size 32768  
Total time 12 hr, 35 min, 51 sec

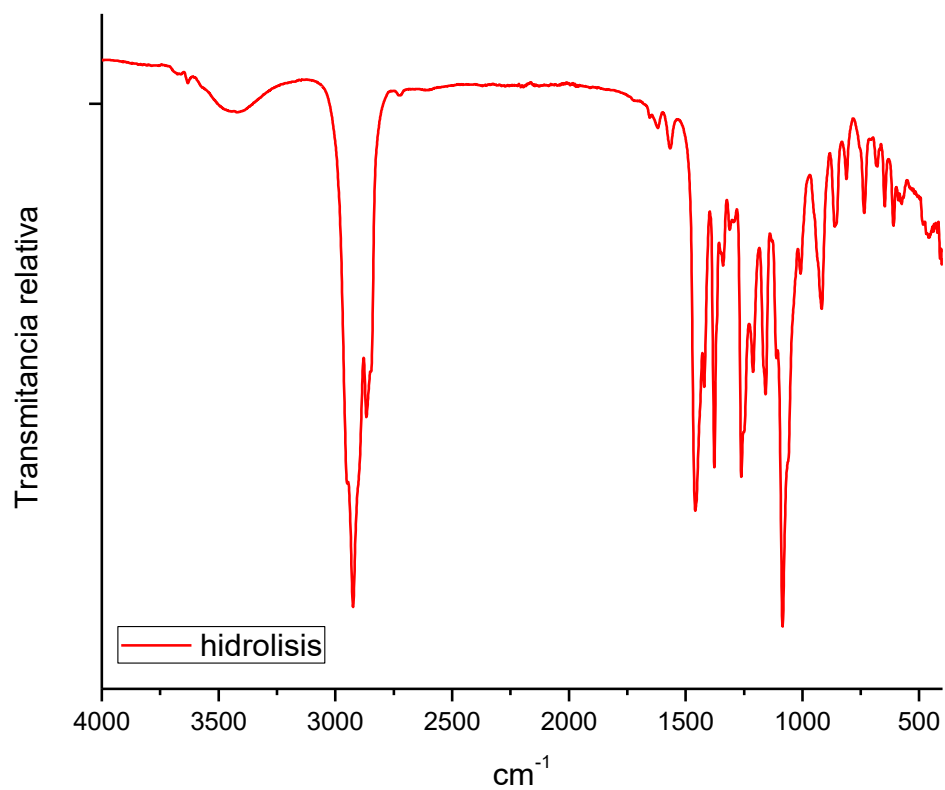


Espectro 8. Ampliación de RMN C<sup>13</sup>, del espectro 3, a campo alto.

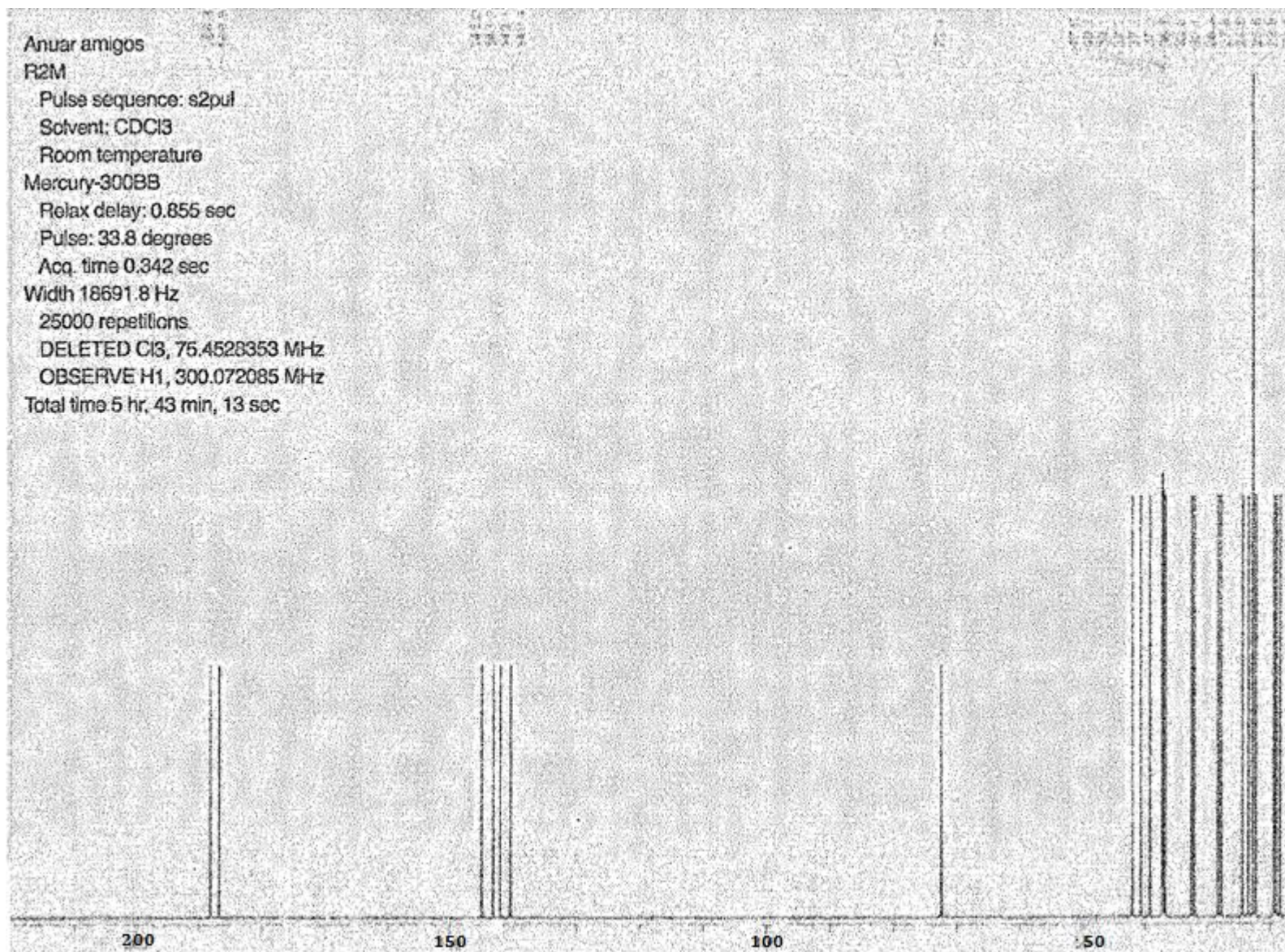
Dr. Arias  
R3-HIDR  
Pulse Sequence: s2pu1  
Solvent: CDC13  
Ambient temperature  
Mercury-30068 "mercury300"  
Relax. delay 0.800 sec  
Pulse 32.6 degrees  
Acq. time 0.361 sec  
Width 18691.6 Hz  
30000 repetitions  
OBSERVE C13, 75.4528238 MHz  
DECOUPLE H1, 300.0720883 MHz  
Low power 1023 dB atten.  
continuously on  
WALTZ-16 modulated  
DATA PROCESSING  
Line broadening 1.0 Hz  
FT size 32768  
Total time 9 hr, 26 min, 5 sec



Espectro 9. Ampliación de RMN  $C^{13}$ , del espectro 7, a campo alto.

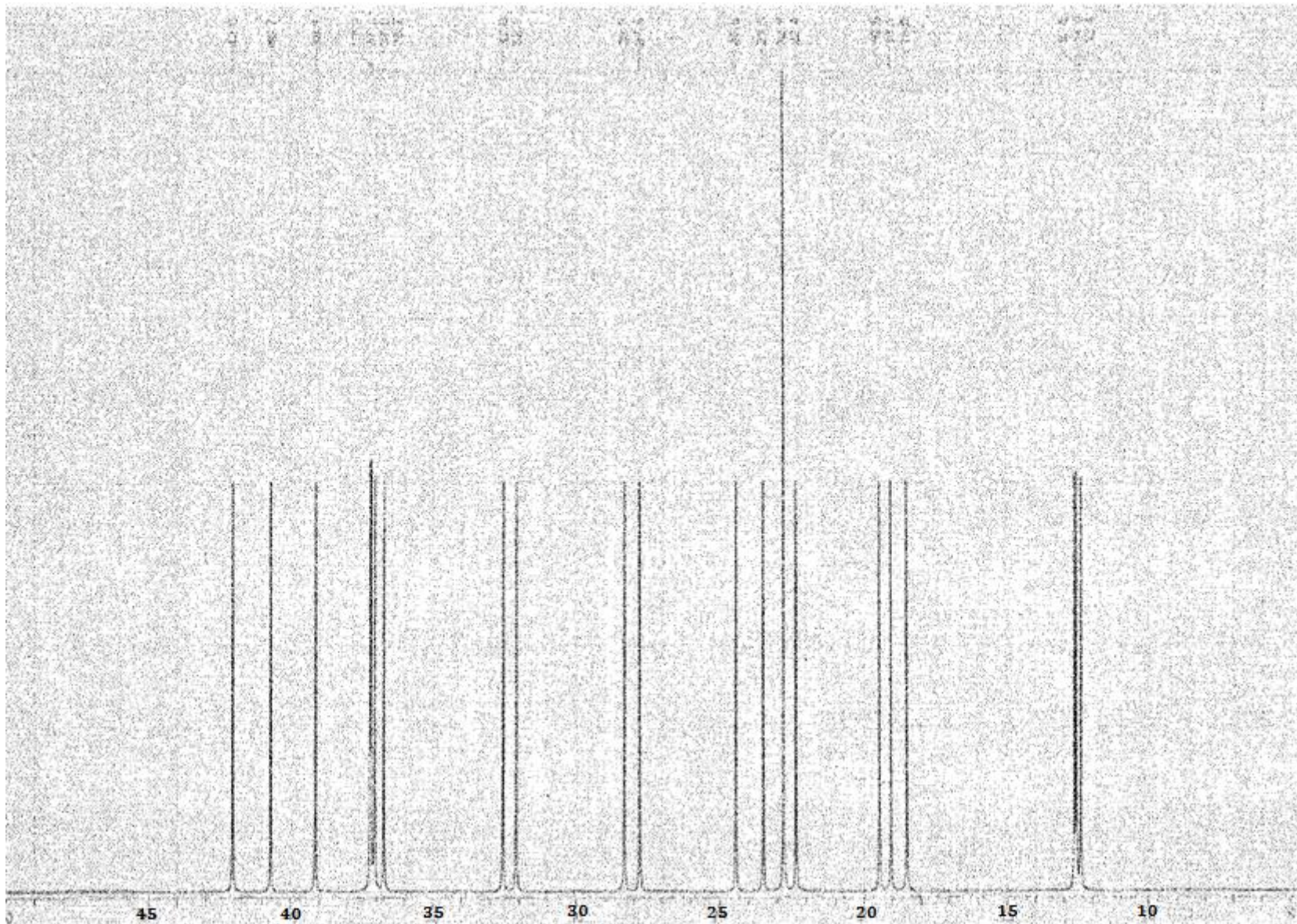


Espectro 10. IR de alfa tocoferol. Proveniente de la reacción de hidrólisis.



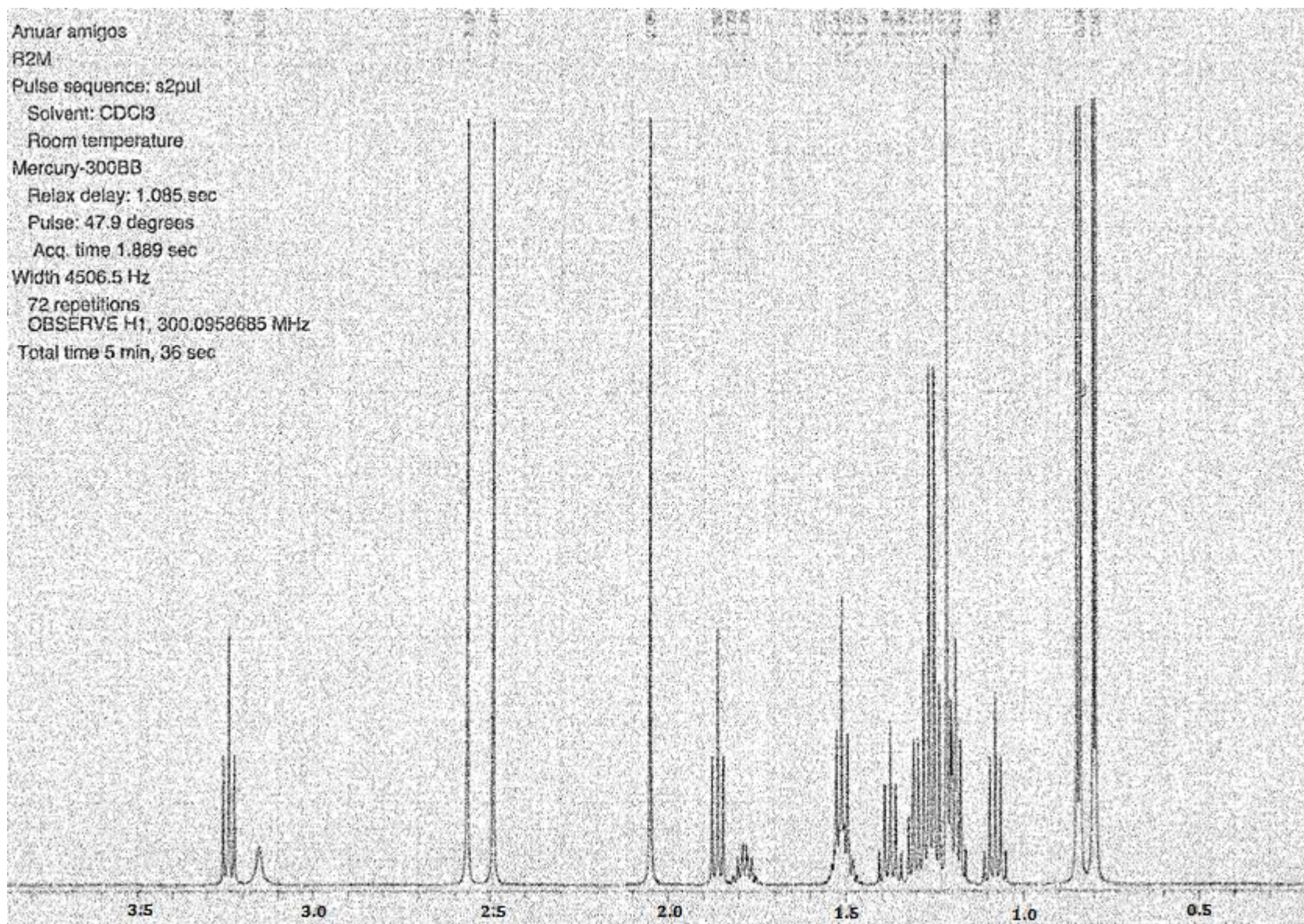
Espectro 11. RMN  $C^{13}$  de la quinona del alfa tocoferol. Producto de oxidación.





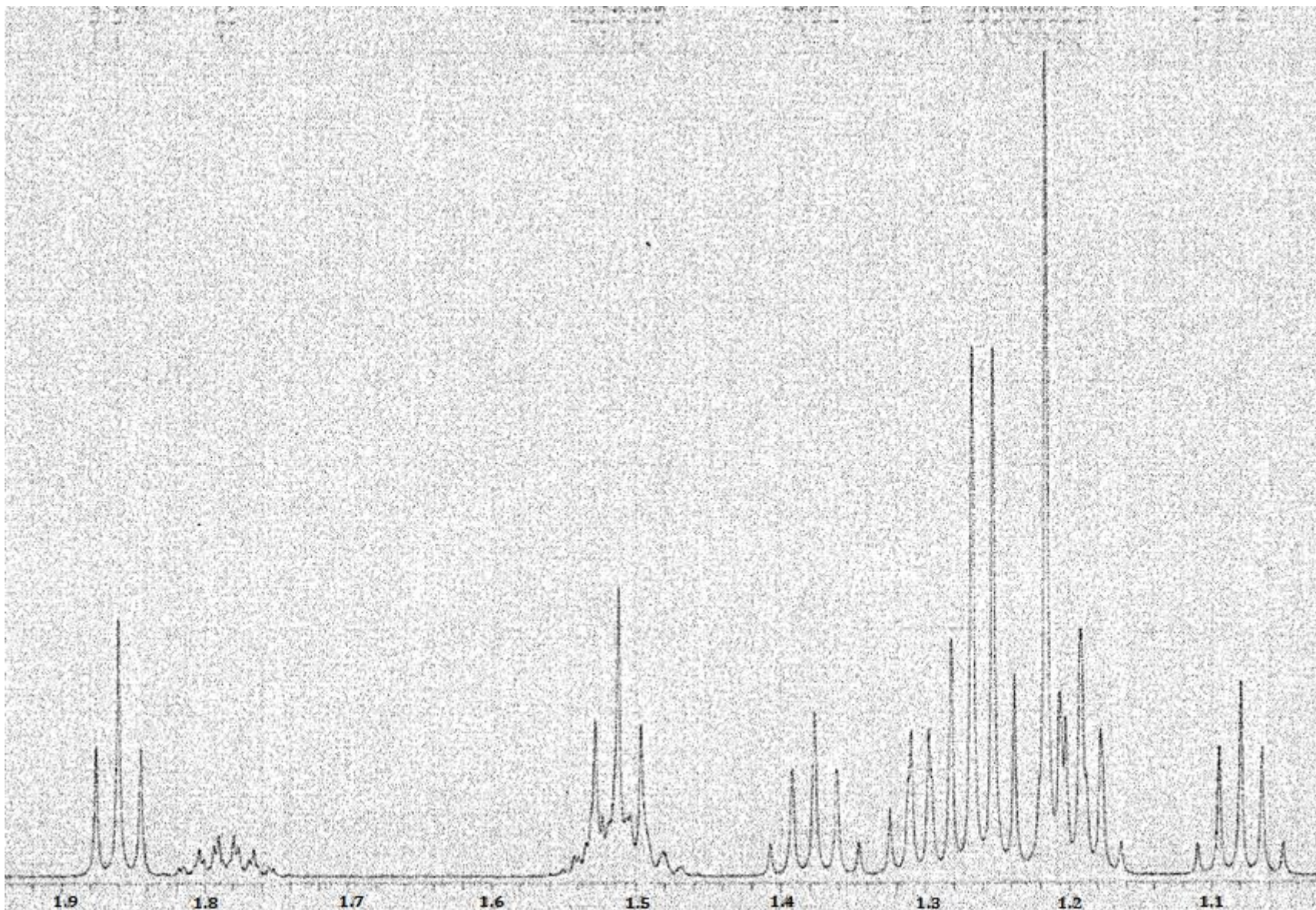
Espectro 12. RMN  $\text{C}^{13}$  ampliación a campo alto de la quinona del alfa tocoferol.



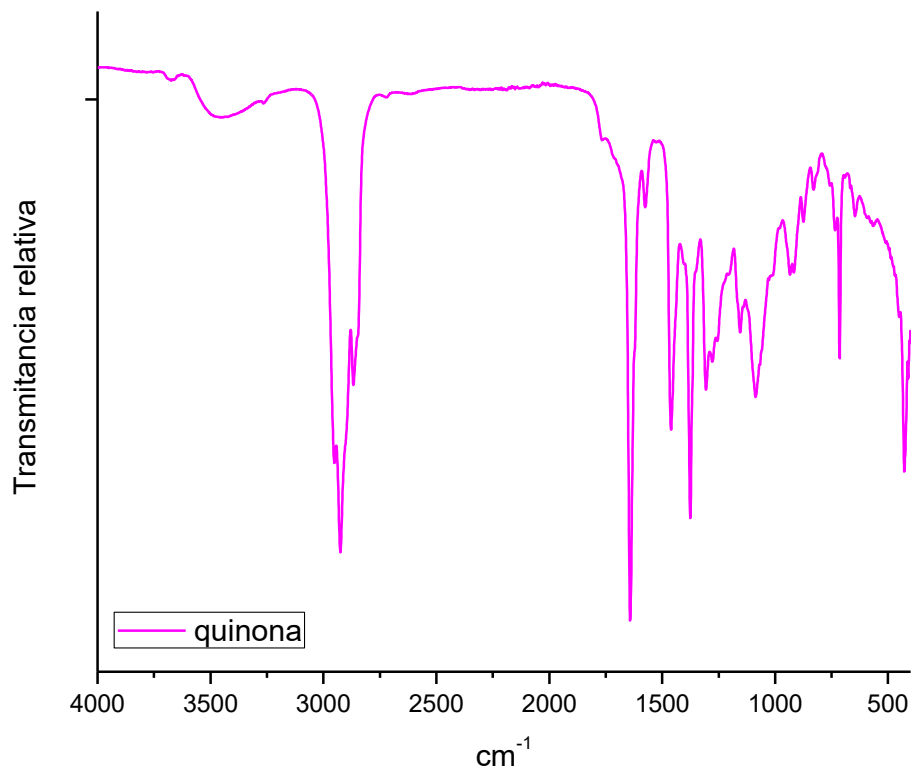


Espectro 13. RMN H<sup>1</sup> de la quinona del alfa tocoferol. Producto de oxidación.

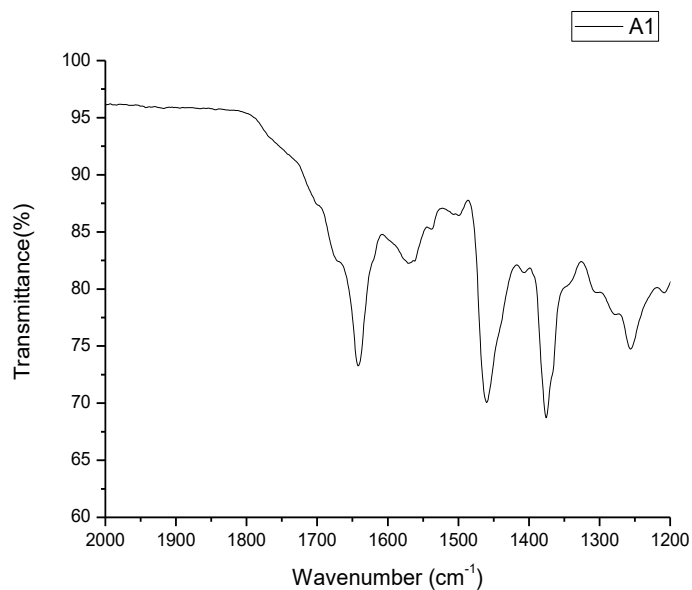




Espectro 14. RMN  $\text{H}^1$  ampliación a campo alto de la quinona del alfa tocoferol.

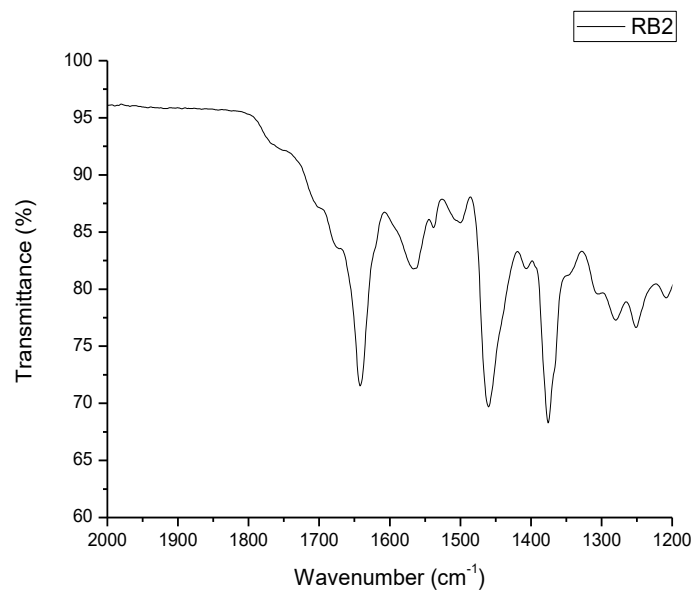


Espectro 15. IR de la quinona de alfa tocoferol.

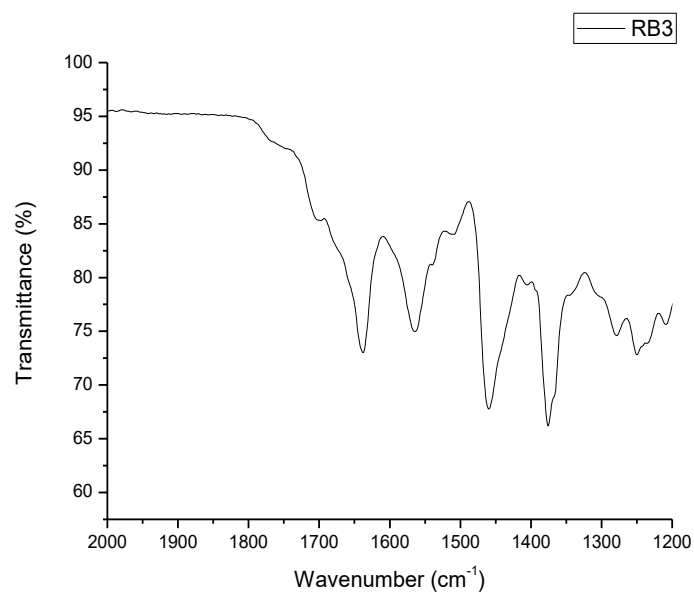


Espectro 16. IR de la reacción de iminación entre propilamina y la quinona de alfa tocoferol.

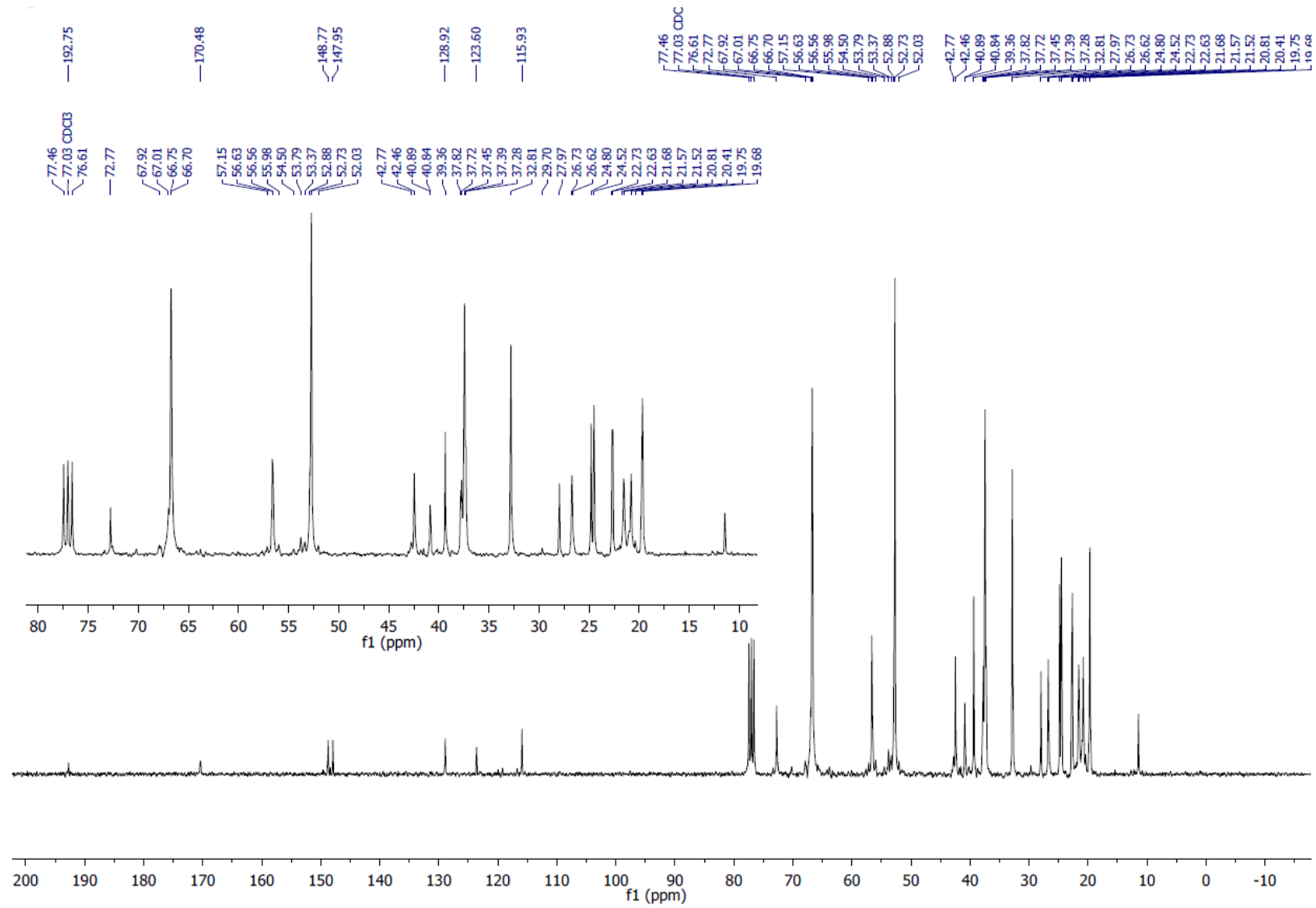




Espectro 17. IR de la reacción de iminación entre isopropilamina y la quinona de alfa tocoferol.



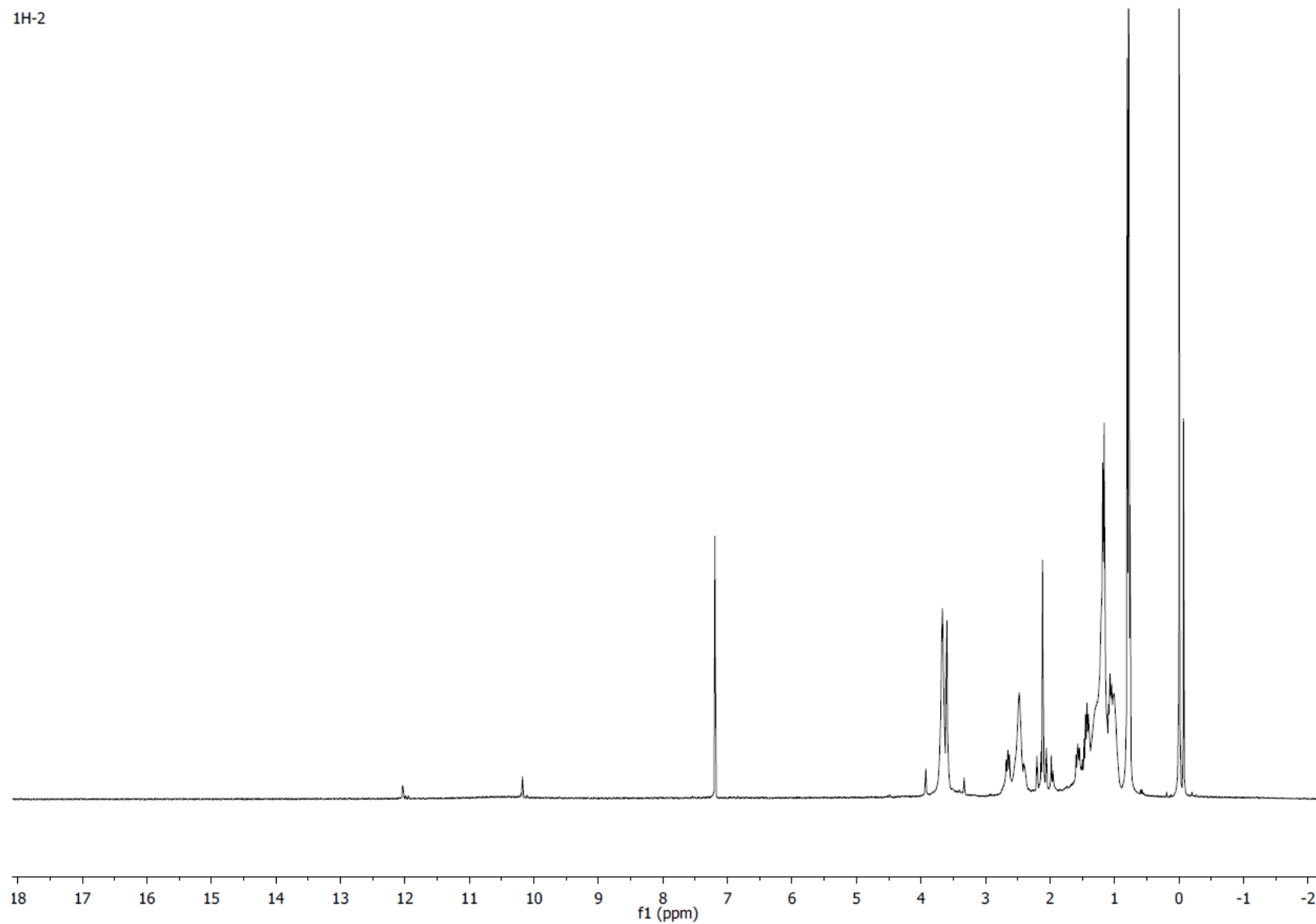
Espectro 18. IR de la reacción de iminación entre monoetanolamina y la quinona de alfa tocoferol.



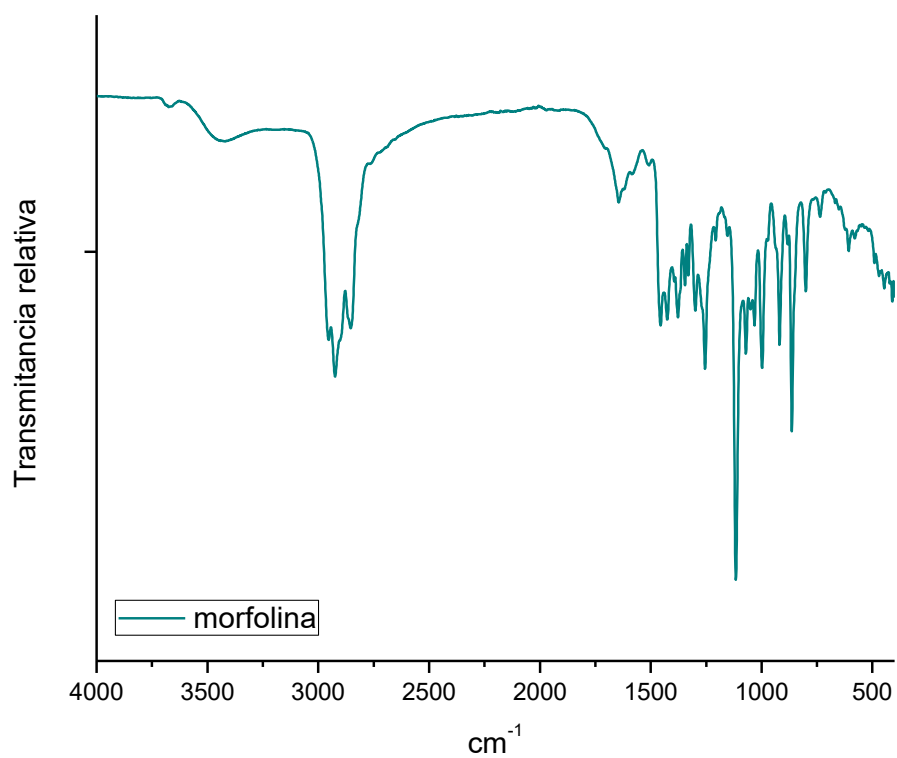
Espectro 19. RMN C<sup>13</sup> de la reacción de aminación del alfa-tocoferol empleando morfolina como reactivo.

1H-2

89



Espectro 20. RMN  $\text{H}^1$  de la reacción de aminación del alfa-tocoferol empleando morfolina como reactivo.



Espectro 21. IR de la reacción de aminación del alfa-tocoferol empleando morfolina como reactivo.

## 8.2 Modelo matemático de la acumulación por protonación

A partir de la figura 27 delimitamos el modelo que consta de tres compartimentos y en el que se hacen los siguientes supuestos:

1. El área  $A$  de las membranas que delimitan los compartimentos y sus volúmenes  $V$  permanecen constantes.
2. Las características de la permeabilidad de la membrana plasmática y de la membrana lisosomal son las mismas.

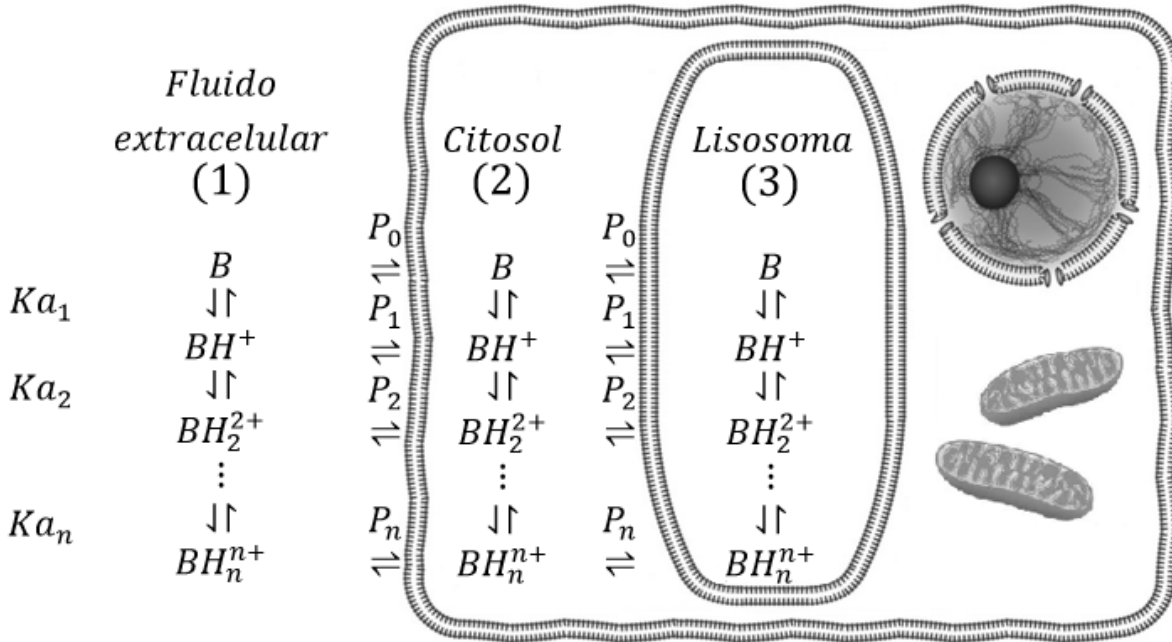


Figura 27. Acumulación lisosomal de bases lipófilas.

Las flechas " $\rightleftharpoons$ " representan un equilibrio de difusión pasiva y las flechas " $\Downarrow$ " un equilibrio de disociación, ambos equilibrios tienen asociados las constantes  $Ka$  y  $P$ .

Antes de desarrollar las ecuaciones diferenciales del modelo es necesario establecer algunas definiciones. De aquí en adelante el subíndice  $i$  denotará el compartimento al que se hace referencia y podrá tomar los valores 1, 2 o 3 para el fluido extracelular, citosol y lisosoma respectivamente.

De la figura 27 se hace evidente que la concentración total de las moléculas en el compartimento  $i$  ( $C_i$ ) está dado por la siguiente ecuación, en donde la microespecie entre corchetes representa su concentración en el compartimento  $i$ :

$$C_i = [B]_i + [BH^+]_i + [BH_2^{2+}]_i + \dots + [BH_n^{n+}]_i = \sum_{k=0}^n [BH_k^{k+}]_i$$

También será de ayuda establecer las siguientes constantes, en donde  $P$  representa el coeficiente de permeabilidad para las diferentes microespecies:

$$\alpha = \frac{P_1}{P_0}, \quad \beta = \frac{P_2}{P_1}, \quad \gamma = \frac{P_3}{P_2}, \quad \dots$$

Cabe recordar que la constante de disociación ácida está definida de la siguiente manera para las bases:

$$Ka_1 = \frac{[B]_i[H^+]_i}{[BH^+]_i}, \quad Ka_2 = \frac{[BH^+]_i[H^+]_i}{[BH_2^{2+}]_i}, \quad Ka_3 = \frac{[BH_2^{2+}]_i[H^+]_i}{[BH_3^{3+}]_i}, \quad \dots$$

Para plantear las ecuaciones diferenciales se parte de la ley de difusión de Fick donde  $J$  representa el flujo a través de la membrana,  $K$  el coeficiente de reparto,  $D$  el coeficiente de difusión,  $l$  el grosor de la membrana,  $P$  el coeficiente de permeabilidad y  $C$  la concentración (los subíndices  $r$  y  $d$  hacen referencia al compartimento receptor y donador respectivamente):

$$J = -\frac{KD(C_r - C_d)}{l} = -P(C_r - C_d) = P(C_d - C_r), \quad P = \frac{KD}{l}$$

El cambio del flujo  $J$  por unidad de tiempo viene dado por la siguiente ecuación, donde  $N$  es el número total de partículas y  $A$  el área de la membrana:

$$\frac{dN}{dt} = AJ$$

Dando que la concentración  $C$  viene dada por la siguiente ecuación, donde  $V$  es el volumen del compartimento, es posible escribir el cambio de  $C$  por unidad de tiempo como:

$$C_i = \frac{N_i}{V_i} \therefore \frac{dC_i}{dt} = \frac{A}{V_i} J$$

Puesto que en éste modelo los tres compartimentos se encuentran sucesivamente uno dentro del otro se tiene la siguiente ecuación:

$$\frac{dC_i}{dt} = \frac{1}{V_i} \sum_{j=i}^{i+1} A_j J = \frac{1}{V_i} (A_i J + A_{i+1} J)$$

Además, puesto que la ley de Fick hace referencia a la diferencia de las concentraciones totales de las moléculas en los compartimentos, la ley se puede reescribir como una suma de todas las microespecies presentes en el compartimento donador y receptor de la siguiente forma:

$$J = \sum_{k=0}^n P_k ([BH_k^{k+}]_d - [BH_k^{k+}]_r) = - \sum_{k=0}^n P_k ([BH_k^{k+}]_r - [BH_k^{k+}]_d)$$

El compartimento receptor será  $i$  mientras que los compartimentos donadores serán los que estén fuera o dentro del compartimento  $i$ , es decir  $i+1$  e  $i-1$ . Sabiendo esto y combinando las ecuaciones anteriores se tiene:

$$\frac{dC_i}{dt} = \frac{1}{V_i} \left\{ A_i \sum_{k=0}^n P_k \left( [BH_k^{k+}]_{i-1} - [BH_k^{k+}]_i \right) - A_{i+1} \sum_{k=0}^n P_k \left( [BH_k^{k+}]_i - [BH_k^{k+}]_{i+1} \right) \right\}$$

Si se considera el caso más sencillo donde la molécula tiene un solo grupo funcional ionizable, se pueden escribir las siguientes ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dC_3}{dt} = \frac{A_3}{V_3} \{ P_0([B]_2 - [B]_3) + P_1([BH^+]_2 - [BH^+]_3) \}$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_2}{dt} = \frac{1}{V_2} [A_2 \{ P_0([B]_1 - [B]_2) + P_1([BH^+]_1 - [BH^+]_2) \} \\ - A_3 \{ P_0([B]_2 - [B]_3) + P_1([BH^+]_2 - [BH^+]_3) \}] \end{aligned}$$

Antes de poder resolver dichas ecuaciones deben de reescribirse para que en ellas aparezcan las funciones desconocidas  $C_2$  y  $C_3$ . Para ello será necesario usar algo de algebra y las definiciones dadas anteriormente. Aplicando la definición de la constante  $\alpha$  para la primera ecuación diferencial tenemos:

$$\frac{dC_3}{dt} = \frac{A_3 P_0}{V_3} \{ ([B]_2 - [B]_3) + \alpha([BH^+]_2 - [BH^+]_3) \}$$

$$\frac{dC_3}{dt} = \frac{A_3 P_0}{V_3} \{ [B]_2 + \alpha[BH^+]_2 - [B]_3 - \alpha[BH^+]_3 \}$$

Aplicando la definición de la constante de disociación podemos escribir:

$$\begin{aligned} \frac{dC_3}{dt} &= \frac{A_3 P_0}{V_3} \left\{ \left( \frac{K a_1 [BH^+]_2 + \alpha [B]_2 [H^+]_2}{[H^+]_2} \right) - \left( \frac{K a_1 [BH^+]_3 + \alpha [B]_3 [H^+]_3}{[H^+]_3} \right) \right\} \\ &= \frac{A_3 P_0}{V_3} \left\{ \frac{K a_1^2 [BH^+]_2 + \alpha [B]_2 [H^+]_2^2}{K a_1 [H^+]_2} - \frac{K a_1^2 [BH^+]_3 + \alpha [B]_3 [H^+]_3^2}{K a_1 [H^+]_3} \right\} \end{aligned}$$

Multiplicando ambos términos por fracciones iguales a la unidad:

$$\begin{aligned} \frac{dC_3}{dt} &= \frac{A_3 P_0}{V_3} \left\{ \frac{K a_1^2 [BH^+]_2 + \alpha [B]_2 [H^+]_2^2}{K a_1 [H^+]_2} \left( \frac{[B]_2 + [BH^+]_2}{[B]_2 + [BH^+]_2} \right) \right. \\ &\quad \left. - \frac{K a_1^2 [BH^+]_3 + \alpha [B]_3 [H^+]_3^2}{K a_1 [H^+]_3} \left( \frac{[B]_3 + [BH^+]_3}{[B]_3 + [BH^+]_3} \right) \right\} \\ &= \frac{A_3 P_0}{V_3} \left\{ \frac{K a_1^2 [BH^+]_2 + \alpha [B]_2 [H^+]_2^2}{K a_1 [B]_2 [H^+]_2 + K a_1 [BH^+]_2 [H^+]_2} ([B]_2 + [BH^+]_2) \right. \\ &\quad \left. - \frac{K a_1^2 [BH^+]_3 + \alpha [B]_3 [H^+]_3^2}{K a_1 [B]_3 [H^+]_3 + K a_1 [BH^+]_3 [H^+]_3} ([B]_3 + [BH^+]_3) \right\} \end{aligned}$$

Aplicando la definición de  $C_i$ :

$$\frac{dC_3}{dt} = \frac{A_3 P_0}{V_3} \left\{ \frac{K a_1^2 [BH^+]_2 + \alpha [B]_2 [H^+]_2^2}{K a_1 [B]_2 [H^+]_2 + K a_1 [BH^+]_2 [H^+]_2} C_2 - \frac{K a_1^2 [BH^+]_3 + \alpha [B]_3 [H^+]_3^2}{K a_1 [B]_3 [H^+]_3 + K a_1 [BH^+]_3 [H^+]_3} C_3 \right\}$$

Aplicando de nuevo la definición de la constante de disociación:

$$\begin{aligned} \frac{dC_3}{dt} &= \frac{A_3P_0}{V_3} \left\{ \frac{Ka_1[B]_2[H^+]_2 + \alpha[B]_2[H^+]_2^2}{Ka_1[B]_2[H^+]_2 + [B]_2[H^+]_2^2} C_2 - \frac{Ka_1[B]_3[H^+]_3 + \alpha[B]_3[H^+]_3^2}{Ka_1[B]_3[H^+]_3 + [B]_3[H^+]_3^2} C_3 \right\} \\ &= \frac{A_3P_0}{V_3} \left\{ \frac{[B]_2[H^+]_2(Ka_1 + \alpha[H^+]_2)}{[B]_2[H^+]_2(Ka_1 + [H^+]_2)} C_2 - \frac{[B]_3[H^+]_3(Ka_1 + \alpha[H^+]_3)}{[B]_3[H^+]_3(Ka_1 + [H^+]_3)} C_3 \right\} \\ &= \frac{A_3P_0}{V_3} \left\{ \frac{Ka_1 + \alpha[H^+]_2}{Ka_1 + [H^+]_2} C_2 - \frac{Ka_1 + \alpha[H^+]_3}{Ka_1 + [H^+]_3} C_3 \right\} \end{aligned}$$

Remplazando los complicados coeficientes de las concentraciones por:

$$\lambda_i = \frac{Ka_1 + \alpha[H^+]_i}{Ka_1 + [H^+]_i}$$

Se obtienen las siguientes ecuaciones diferenciales (se puede obtener la segunda ecuación de manera similar al procedimiento realizado anteriormente):

$$\begin{aligned} \frac{dC_3}{dt} &= \frac{A_3P_0}{V_3} (\lambda_2 C_2 - \lambda_3 C_3) \\ \frac{dC_2}{dt} &= \frac{P_0}{V_2} \{A_2(\lambda_1 C_1 - \lambda_2 C_2) - A_3(\lambda_2 C_2 - \lambda_3 C_3)\} \end{aligned}$$

Para facilitar aún más la escritura se definen las siguientes constantes:

$$\begin{aligned} k_1 &= \frac{A_3P_0\lambda_2}{V_3}, \quad k_2 = \frac{A_3P_0\lambda_3}{V_3}, \quad k_3 = \frac{A_2P_0\lambda_1}{V_2}, \quad k_4 = k_6 + k_7, \\ k_5 &= \frac{A_3P_0\lambda_3}{V_2}, \quad k_6 = \frac{A_2P_0\lambda_2}{V_2}, \quad k_7 = \frac{A_3P_0\lambda_2}{V_2} \end{aligned}$$

Reescribimos el sistema de ecuaciones diferenciales reemplazándola con dichas constantes y cambiando de la notación de Leibniz para las derivadas a la notación prima. Nótese que el sistema está sujeto a las condiciones iniciales  $C_2(0) = 0$  y  $C_3(0) = 0$  lo que significa que en el tiempo cero las concentraciones dentro del compartimentos dos y tres son iguales a cero. Además, se hace el supuesto de que la concentración de soluto en el fluido extracelular ( $C_1$ ) permanece constante.

$$\begin{aligned} C_3' &= k_1 C_2 - k_2 C_3 \quad o \quad C_3' - k_1 C_2 + k_2 C_3 = 0 \\ C_2' &= k_3 C_1 - k_4 C_2 + k_5 C_3 \quad o \quad C_2' + k_4 C_2 - k_5 C_3 = k_3 C_1 \\ C_2(0) &= 0 \quad y \quad C_3(0) = 0 \end{aligned}$$

Puesto que se trata de un sistema de ecuaciones diferenciales las dos funciones incógnitas  $C_2$  y  $C_3$  deben de satisfacer ambas ecuaciones, adicionalmente la resolución del sistema no resulta trivial por métodos comunes de integración. Esta complejidad creciente puede ser resuelta por la herramienta denominada transformada de Laplace. La idea consiste en convertir el sistema de ecuaciones diferenciales en un sistema de ecuaciones algebraicas más sencillo de resolver y luego invertir el proceso de forma que obtengamos la solución buscada.

La transformada de Laplace ( $\mathcal{L}$ ) de la función  $f(t)$  se define de la siguiente forma, donde  $s$  es el operador de Laplace y la función de una variable real  $t$  se convierte en una función de dicho operador complejo  $s$ :



$$F(s) = \mathcal{L}\{f(t)\} = \int_0^{\infty} e^{-st} f(t) dt$$

Para invertir el proceso, se debe de obtener la transformada inversa de Laplace ( $\mathcal{L}^{-1}$ ) lo que daría la función buscada, para realizar este último paso generalmente se recurre a tablas de transformadas de Laplace en vez de recurrir a la definición anterior.

Se comienza aplicando la transformada de Laplace a cada término del sistema de ecuaciones diferenciales (las constantes pueden sacarse de la transformada):

$$\begin{aligned} \mathcal{L}\{C_3'\} - k_1\mathcal{L}\{C_2\} + k_2\mathcal{L}\{C_3\} &= 0 \\ \mathcal{L}\{C_2'\} + k_4\mathcal{L}\{C_2\} - k_5\mathcal{L}\{C_3\} &= k_3C_1\mathcal{L}\{1\} \end{aligned}$$

La transformada de una derivada viene dada por la siguiente regla, donde  $x_0$  es el valor de la función  $x$  a tiempo 0:

$$\mathcal{L}\{x'\} = s\mathcal{L}\{x\} - x_0$$

Por lo tanto, para las transformadas de las derivadas se tiene (recordar las condiciones iniciales  $C_2(0)=0$  y  $C_3(0)=0$ ):

$$\begin{aligned} \mathcal{L}\{C_3'\} &= s\mathcal{L}\{C_3\} - C_3(0) = s\mathcal{L}\{C_3\} \\ \mathcal{L}\{C_2'\} &= s\mathcal{L}\{C_2\} - C_2(0) = s\mathcal{L}\{C_2\} \end{aligned}$$

Sustituyendo en el sistema de ecuaciones diferenciales queda lo siguiente:

$$\begin{aligned} s\mathcal{L}\{C_3\} - k_1\mathcal{L}\{C_2\} + k_2\mathcal{L}\{C_3\} &= 0 \\ s\mathcal{L}\{C_2\} + k_4\mathcal{L}\{C_2\} - k_5\mathcal{L}\{C_3\} &= k_3C_1\mathcal{L}\{1\} \end{aligned}$$

Para simplificar la notación se realizan las siguientes sustituciones:

$$\mathcal{L}\{C_3\} = L, \quad \mathcal{L}\{C_2\} = M, \quad \mathcal{L}\{1\} = \frac{1}{s}$$

De manera que se obtiene:

$$\begin{aligned} sL + k_2L - k_1M &= 0 \\ -k_5L + sM + k_4M &= k_3C_1 \frac{1}{s} \end{aligned}$$

Sacando factor común en ambas ecuaciones se tiene:

$$\begin{aligned} (s + k_2)L - k_1M &= 0 \\ -k_5L + (s + k_4)M &= \frac{k_3C_1}{s} \end{aligned}$$

Se llega a un sistema de ecuaciones algebraicas donde  $L$  y  $M$  son las incógnitas y el resto son los coeficientes. Resolviendo el sistema para  $L$  con la regla de Cramer:

$$L = \frac{\begin{vmatrix} 0 & -k_1 \\ \frac{k_3 C_1}{s} & s + k_4 \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} s + k_2 & -k_1 \\ -k_5 & s + k_4 \end{vmatrix}} = \frac{-\left(-\frac{k_1 k_3 C_1}{s}\right)}{(s + k_2)(s + k_4) - k_1 k_5} = \frac{\frac{k_1 k_3 C_1}{s}}{s^2 + k_2 s + k_4 s + k_2 k_4 - k_1 k_5}$$

Si se realiza la resta de los dos términos constantes del denominador, retomando sus factores originales, se obtiene la siguiente igualdad:

$$k_2 k_4 - k_1 k_5 = k_2 k_6$$

Que puede sustituirse en el denominador. Sacando factor común del término lineal del denominador y completando el cuadrado se obtiene:

$$\begin{aligned} L = \mathcal{L}\{C_3\} &= \frac{k_1 k_3 C_1}{s\{s^2 + k_2 s + k_4 s + k_2 k_6\}} = \frac{k_1 k_3 C_1}{s\{s^2 + (k_2 + k_4)s + k_2 k_6\}} \\ &= \frac{k_1 k_3 C_1}{s\left\{s^2 + (k_2 + k_4)s + \left(\frac{k_2 + k_4}{2}\right)^2 - \left(\frac{k_2 + k_4}{2}\right)^2 + k_2 k_6\right\}} \\ &= \frac{k_1 k_3 C_1}{s\left\{\left(s + \frac{k_2 + k_4}{2}\right)^2 - \frac{(k_2 + k_4)^2}{4} + k_2 k_6\right\}} \\ &= \frac{k_1 k_3 C_1}{s\left\{\left(s + \frac{k_2 + k_4}{2}\right)^2 + \frac{4k_2 k_6 - (k_2 + k_4)^2}{4}\right\}} \end{aligned}$$

A continuación, se realiza la siguiente sustitución para escribir la fracción en términos de  $x$ :

$$x = s + \frac{k_2 + k_4}{2}$$

Lo que da como resultado:

$$\frac{k_1 k_3 C_1}{\left\{x - \frac{k_2 + k_4}{2}\right\}\left\{x^2 + \frac{4k_2 k_6 - (k_2 + k_4)^2}{4}\right\}} = \frac{k_1 k_3 C_1}{\left\{x - \frac{k_2 + k_4}{2}\right\}\left\{x^2 + \left(\frac{\sqrt{4k_2 k_6 - (k_2 + k_4)^2}}{2}\right)^2\right\}}$$

Se realiza otra sustitución para simplificar la notación de los términos constantes:

$$a = \frac{k_2 + k_4}{2}, \quad b = \frac{\sqrt{4k_2 k_6 - (k_2 + k_4)^2}}{2}$$

Al realizar la sustitución se hace evidente que el denominador contiene dos factores irreducibles, uno lineal y otro cuadrático (este último al ser una suma de cuadrados se sabe que es irreducible). Por lo que puede descomponerse en las fracciones parciales siguientes:

$$\frac{k_1 k_3 C_1}{(x - a)(x^2 + b^2)} = \frac{A}{x - a} + \frac{Bx + C}{x^2 + b^2}$$

Multiplicando ambos lados de esta ecuación por el producto de los denominadores del miembro del lado izquierdo se obtiene:

$$k_1 k_3 C_1 = A(x^2 + b^2) + (Bx + C)(x - a)$$

Sustituyendo  $x=a$  puede obtenerse el valor de  $A$ :

$$k_1 k_3 C_1 = A(a^2 + b^2) \therefore A = \frac{k_1 k_3 C_1}{a^2 + b^2}$$

No es posible asignar nuevos valores a  $x$  para obtener los valores de  $B$  y  $C$ . Por lo tanto, se regresa a la expresión original y se realizan las multiplicaciones entre los factores lo que da:

$$k_1 k_3 C_1 = Ax^2 + Ab^2 + Bx^2 - Bax + Cx - Ca$$

Igualando únicamente los coeficientes de  $x^2$  de ambos lados de la ecuación, permite obtener el valor de  $B$ :

$$0 = A + B \therefore B = -A = -\frac{k_1 k_3 C_1}{a^2 + b^2}$$

Igualando únicamente los coeficientes de  $x$  de ambos lados de la ecuación, permite obtener el valor de  $C$ :

$$0 = -Ba + C \therefore C = Ba = \frac{k_1 k_3 C_1 a}{a^2 + b^2}$$

Sustituyendo en  $A$  los términos y factores originales de  $a$ ,  $b$ ,  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  y  $k_6$ :

$$\begin{aligned} A &= \frac{k_1 k_3 C_1}{\left(\frac{k_2 + k_4}{2}\right)^2 + \left(\frac{\sqrt{4k_2 k_6 - (k_2 + k_4)^2}}{2}\right)^2} = \frac{k_1 k_3 C_1}{\frac{(k_2 + k_4)^2}{4} + \frac{4k_2 k_6 - (k_2 + k_4)^2}{4}} \\ &= \frac{k_1 k_3 C_1}{\frac{4k_2 k_6 + (k_2 + k_4)^2 - (k_2 + k_4)^2}{4}} = \frac{k_1 k_3 C_1}{k_2 k_6} = \frac{A_2 A_3 V_2 V_3 P_0^2 \lambda_2 \lambda_1 C_1}{A_2 A_3 V_2 V_3 P_0^2 \lambda_2 \lambda_3} = \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} \end{aligned}$$

De manera similar para  $B$  y  $C$ :

$$B = -\frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3}, \quad C = -\frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} a$$

Sustituyendo los valores de  $A$ ,  $B$  y  $C$  las fracciones parciales quedan de la siguiente forma:

$$\frac{k_1 k_3 C_1}{(x - a)(x^2 + b^2)} = \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} + \frac{-\frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} x + \left(-\frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} a\right)}{x^2 + b^2}$$

Reescribiendo en términos de  $s$ :

$$\begin{aligned}\mathcal{L}\{C_3\} &= \frac{k_1 k_3 C_1}{(x-a)(x^2+b^2)} = \frac{\frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3}}{s} + \frac{-\frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} \left(s + \frac{k_2 + k_4}{2}\right) - \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} a}{\left(s + \frac{k_2 + k_4}{2}\right)^2 + b^2} \\ &= \frac{\frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3}}{s} + \frac{-\frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} (s+a) - \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} a}{(s+a)^2 + b^2} = \frac{\frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3}}{s} - \frac{\frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} (s+a)}{(s+a)^2 + b^2} - \frac{\frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} a}{(s+a)^2 + b^2}\end{aligned}$$

Aplicando transformada inversa de Laplace ( $\mathcal{L}^{-1}$ ):

$$\begin{aligned}C_3 &= \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{\frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3}}{s} \right\} - \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{\frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} (s+a)}{(s+a)^2 + b^2} \right\} - \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{\frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} a}{(s+a)^2 + b^2} \right\} \\ &= \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{1}{s} \right\} - \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{s+a}{(s+a)^2 + b^2} \right\} - \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} a \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{1}{(s+a)^2 + b^2} \right\}\end{aligned}$$

Ahora será necesario aplicar el siguiente teorema de traslación en el eje  $s$ :

$$\mathcal{L}^{-1}\{F(s-a)\} = \mathcal{L}^{-1}\{F(s)|_{s \rightarrow s-a}\} = e^{at} \mathcal{L}^{-1}\{F(s)\}$$

De esta manera los dos últimos términos pueden reescribirse como:

$$\begin{aligned}\mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{s+a}{(s+a)^2 + b^2} \right\} &= \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{s+a}{(s+a)^2 + b^2} \Big|_{s \rightarrow s+a} \right\} = e^{-at} \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{s}{s^2 + b^2} \right\} \\ \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{1}{(s+a)^2 + b^2} \right\} &= \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{1}{(s+a)^2 + b^2} \Big|_{s \rightarrow s+a} \right\} = \frac{e^{-at}}{b} \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{b}{s^2 + b^2} \right\}\end{aligned}$$

Sustituyendo se tienen las siguientes transformadas inversas:

$$C_3 = \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{1}{s} \right\} - \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} e^{-at} \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{s}{s^2 + b^2} \right\} - \frac{\lambda_1 C_1 a e^{-at}}{\lambda_3 b} \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{b}{s^2 + b^2} \right\}$$

Las tres transformadas inversas restantes son directas y pueden obtenerse de tablas de transformadas de Laplace. Las formulas son las siguientes:

$$\mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{1}{s} \right\} = 1, \quad \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{s}{s^2 + k^2} \right\} = \cos kt, \quad \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{k}{s^2 + k^2} \right\} = \sin kt$$

Finalmente se obtiene la función incógnita  $C_3$ :

$$\begin{aligned}C_3 &= \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} - \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} e^{-at} \cos bt - \frac{\lambda_1 a C_1}{\lambda_3 b} e^{-at} \sin bt \\ C_3 &= \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} - \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} e^{-at} \left( \cos bt + \frac{a}{b} \sin bt \right)\end{aligned}$$

Realizando un proceso similar se obtiene la función incógnita  $C_2$ :

$$C_2 = \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_2} + \frac{k_3 C_1}{b} e^{-at} \sin bt - \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_2} e^{-at} \left( \cos bt + \frac{a}{b} \sin bt \right)$$

Es posible comprobar que las funciones  $C_2$  y  $C_3$  son soluciones del sistema de ecuaciones diferenciales, pero hacerlo aquí resultaría excesivo. En vez de eso se concentrará la atención en dos momentos que son particularmente interesantes de la función  $C_3$ : el punto máximo y el estado estacionario.

Para conocer los puntos máximos de la función es necesario obtener la derivada de  $C_3$ , con lo que se obtiene la siguiente función:

$$C_3' = \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} e^{-at} \sin bt \left( b + \frac{a^2}{b} \right)$$

Es importante saber los ceros de  $C_3'$  porque permiten conocer los máximos y mínimos de  $C_3$ . Resulta evidente que los ceros de  $C_3'$  vienen dados por:

$$t = \frac{n\pi}{b}, \quad n \in \mathbb{Z}$$

Si  $n = 1$  puede obtenerse el primer punto máximo para valores de  $t > 0$ . Dicho punto es el único que realmente tiene utilidad práctica pues además es el máximo absoluto para valores positivos de  $t$ . De manera que se define  $t_{m\acute{a}x}$  como el tiempo al que tiene lugar la concentración máxima dentro de lisosoma y que puede sustituirse en  $C_3$  para obtener:

$$t_{m\acute{a}x} = \frac{\pi}{b}, \quad C_{3m\acute{a}x} = \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} - \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} e^{-\frac{a\pi}{b}} \left( \cos \pi + \frac{a}{b} \sin \pi \right) = \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} + \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} e^{-\frac{a\pi}{b}}$$

El estado estacionario se refiere al momento en el cual la concentración del lisosoma ya no cambia con el transcurso del tiempo. Para describir matemáticamente este estado se debe obtener el límite de la función  $C_3$  cuando el tiempo tiende a  $\infty$ . Ya que la función exponencial tiende a 0 cuando el exponente adquiere valores negativos muy grandes se tiene:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \left\{ \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} - \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} e^{-at} \left( \cos bt + \frac{a}{b} \sin bt \right) \right\} = \frac{\lambda_1 C_1}{\lambda_3} = \frac{(\alpha[H^+]_1 + Ka_1)([H^+]_3 + Ka_1)}{([H^+]_1 + Ka_1)(\alpha[H^+]_3 + Ka_1)} C_1$$

Finalmente, el cociente entre  $C_3$  y  $C_1$  en el estado estacionario, que describe cuantas veces es mayor la concentración en los lisosomas con respecto al medio extracelular, viene dada por:

$$\frac{[Lisosomas]}{[Extracelular]} = \frac{C_3}{C_1} = \frac{(\alpha[H^+]_1 + Ka_1)([H^+]_3 + Ka_1)}{([H^+]_1 + Ka_1)(\alpha[H^+]_3 + Ka_1)} \frac{C_1}{C_1} = \frac{(\alpha[H^+]_1 + Ka_1)([H^+]_3 + Ka_1)}{([H^+]_1 + Ka_1)(\alpha[H^+]_3 + Ka_1)}$$

Esta es justamente la expresión descrita con anterioridad por Christian de Duve y es importante porque permite hacer comparaciones entre la acumulación de diferentes compuestos sin importar la concentración del medio extracelular.

En la tabla 8 se muestran las fórmulas más importantes del modelo de acumulación por protonación para bases monopróticas. Además se muestran las fórmulas que deberían utilizarse para el caso de bases dipróticas y tripróticas, las cuales se obtienen de manera muy similar usando el método descrito anteriormente.

Tabla 8. Resumen de las formulas del modelo de acumulación por protonación.

**Bases monopróticas**

- Constantes expresadas con letras griegas y latinas

$$\lambda_i = \frac{Ka_1 + \alpha[H^+]_i}{Ka_1 + [H^+]_i}, \quad \alpha = \frac{P_1}{P_0}$$

$$a = \frac{k_2 + k_4}{2}, \quad b = \frac{\sqrt{4k_2k_6 - (k_2 + k_4)^2}}{2}$$

$$k_1 = \frac{A_3P_0\lambda_2}{V_3}, \quad k_2 = \frac{A_3P_0\lambda_3}{V_3}, \quad k_3 = \frac{A_2P_0\lambda_1}{V_2}, \quad k_4 = k_6 + k_7, \quad k_5 = \frac{A_3P_0\lambda_3}{V_2}, \quad k_6 = \frac{A_2P_0\lambda_2}{V_2}, \quad k_7 = \frac{A_3P_0\lambda_2}{V_2}$$

- Sistema de ecuaciones diferenciales

$$\frac{dC_3}{dt} = \frac{A_3P_0}{V_3}(\lambda_2C_2 - \lambda_3C_3) = k_1C_2 - k_2C_3$$

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{P_0}{V_2}\{A_2(\lambda_1C_1 - \lambda_2C_2) - A_3(\lambda_2C_2 - \lambda_3C_3)\} = k_3C_1 - k_4C_2 + k_5C_3$$

- Funciones que describen las concentraciones lisosómicas y citosólicas

$$C_3 = \frac{\lambda_1C_1}{\lambda_3} - \frac{\lambda_1C_1}{\lambda_3}e^{-at} \cos bt - \frac{\lambda_1aC_1}{\lambda_3b}e^{-at} \sin bt$$

$$C_2 = \frac{\lambda_1C_1}{\lambda_2} + \frac{k_3C_1}{b}e^{-at} \sin bt - \frac{\lambda_1C_1}{\lambda_2}e^{-at} \cos bt - \frac{\lambda_1aC_1}{\lambda_2b}e^{-at} \sin bt$$

- Ecuación de la concentración lisosomal en el estado estacionario

$$\frac{\lambda_1C_1}{\lambda_3} = \frac{(Ka_1 + \alpha[H^+]_1)(Ka_1 + [H^+]_3)}{(Ka_1 + [H^+]_1)(Ka_1 + \alpha[H^+]_3)}C_1$$

- Ecuación de la concentración lisosomal máxima y el tiempo máximo

$$C_{3\text{máx}} = \frac{\lambda_1C_1}{\lambda_3} + \frac{\lambda_1C_1}{\lambda_3}e^{-\frac{a\pi}{b}}, \quad t_{\text{máx}} = \frac{\pi}{b}$$

**Bases dipróticas**

- Constantes expresadas con letras griegas y latinas

$$\mu_i = \frac{Ka_1Ka_2 + \alpha Ka_2[H^+]_i + \alpha\beta[H^+]_i^2}{Ka_1Ka_2 + Ka_2[H^+]_i + [H^+]_i^2}, \quad \alpha = \frac{P_1}{P_0}, \quad \beta = \frac{P_2}{P_1}$$

$$a = \frac{k_2 + k_4}{2}, \quad b = \frac{\sqrt{4k_2k_6 - (k_2 + k_4)^2}}{2}$$

$$k_1 = \frac{A_3P_0\mu_2}{V_3}, \quad k_2 = \frac{A_3P_0\mu_3}{V_3}, \quad k_3 = \frac{A_2P_0\mu_1}{V_2}, \quad k_4 = k_6 + k_7, \quad k_5 = \frac{A_3P_0\mu_3}{V_2}, \quad k_6 = \frac{A_2P_0\mu_2}{V_2}, \quad k_7 = \frac{A_3P_0\mu_2}{V_2}$$

- Sistema de ecuaciones diferenciales

$$\frac{dC_3}{dt} = \frac{A_3P_0}{V_3}(\mu_2C_2 - \mu_3C_3) = k_1C_2 - k_2C_3$$

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{P_0}{V_2}\{A_2(\mu_1C_1 - \mu_2C_2) - A_3(\mu_2C_2 - \mu_3C_3)\} = k_3C_1 - k_4C_2 + k_5C_3$$

- Funciones que describen las concentraciones lisosómicas y citosólicas

$$C_3 = \frac{\mu_1C_1}{\mu_3} - \frac{\mu_1C_1}{\mu_3}e^{-at} \cos bt - \frac{\mu_1aC_1}{\mu_3b}e^{-at} \sin bt$$

$$C_2 = \frac{\mu_1C_1}{\mu_2} + \frac{k_3C_1}{b}e^{-at} \sin bt - \frac{\mu_1C_1}{\mu_2}e^{-at} \cos bt - \frac{\mu_1aC_1}{\mu_2b}e^{-at} \sin bt$$

- Ecuación de la concentración lisosomal en el estado estacionario

$$\frac{\mu_1C_1}{\mu_3} = \frac{(Ka_1Ka_2 + \alpha Ka_2[H^+]_1 + \alpha\beta[H^+]_1^2)(Ka_1Ka_2 + Ka_2[H^+]_3 + [H^+]_3^2)}{(Ka_1Ka_2 + Ka_2[H^+]_1 + [H^+]_1^2)(Ka_1Ka_2 + \alpha Ka_2[H^+]_3 + \alpha\beta[H^+]_3^2)} C_1$$

- Ecuación de la concentración lisosomal máxima y el tiempo máximo

$$C_{3\text{máx}} = \frac{\mu_1C_1}{\mu_3} + \frac{\mu_1C_1}{\mu_3}e^{-\frac{a\pi}{b}}, \quad t_{\text{máx}} = \frac{\pi}{b}$$

**Bases tripróticas**

- Constantes expresadas con letras griegas y latinas

$$v_i = \frac{Ka_1Ka_2Ka_3 + \alpha Ka_2Ka_3[H^+]_i + \alpha\beta Ka_3[H^+]_i^2 + \alpha\beta\gamma[H^+]_i^3}{Ka_1Ka_2Ka_3 + Ka_2Ka_3[H^+]_i + Ka_3[H^+]_i^2 + [H^+]_i^3}, \quad \alpha = \frac{P_1}{P_0}, \quad \beta = \frac{P_2}{P_1}, \quad \gamma = \frac{P_3}{P_2}$$

$$a = \frac{k_2 + k_4}{2}, \quad b = \frac{\sqrt{4k_2k_6 - (k_2 + k_4)^2}}{2}$$

$$k_1 = \frac{A_3P_0v_2}{V_3}, \quad k_2 = \frac{A_3P_0v_3}{V_3}, \quad k_3 = \frac{A_2P_0v_1}{V_2}, \quad k_4 = k_6 + k_7, \quad k_5 = \frac{A_3P_0v_3}{V_2}, \quad k_6 = \frac{A_2P_0v_2}{V_2}, \quad k_7 = \frac{A_3P_0v_2}{V_2}$$

- Sistema de ecuaciones diferenciales

$$\frac{dC_3}{dt} = \frac{A_3P_0}{V_3}(v_2C_2 - v_3C_3) = k_1C_2 - k_2C_3$$

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{P_0}{V_2}\{A_2(v_1C_1 - v_2C_2) - A_3(v_2C_2 - v_3C_3)\} = k_3C_1 - k_4C_2 + k_5C_3$$

- Funciones que describen las concentraciones lisosómicas y citosólicas

$$C_3 = \frac{v_1C_1}{v_3} - \frac{v_1C_1}{v_3}e^{-at} \cos bt - \frac{v_1aC_1}{v_3b}e^{-at} \sin bt$$

$$C_2 = \frac{v_1C_1}{v_2} + \frac{k_3C_1}{b}e^{-at} \sin bt - \frac{v_1C_1}{v_2}e^{-at} \cos bt - \frac{v_1aC_1}{v_2b}e^{-at} \sin bt$$

- Ecuación de la concentración lisosomal en el estado estacionario

$$\frac{v_1C_1}{v_3} = \frac{(Ka_1Ka_2Ka_3 + \alpha Ka_2Ka_3[H^+]_1 + \alpha\beta Ka_3[H^+]_1^2 + \alpha\beta\gamma[H^+]_1^3)(Ka_1Ka_2Ka_3 + Ka_2Ka_3[H^+]_3 + Ka_3[H^+]_3^2 + [H^+]_3^3)}{(Ka_1Ka_2Ka_3 + Ka_2Ka_3[H^+]_1 + Ka_3[H^+]_1^2 + [H^+]_1^3)(Ka_1Ka_2Ka_3 + \alpha Ka_2Ka_3[H^+]_3 + \alpha\beta Ka_3[H^+]_3^2 + \alpha\beta\gamma[H^+]_3^3)} C_1$$

- Ecuación de la concentración lisosomal máxima y el tiempo máximo

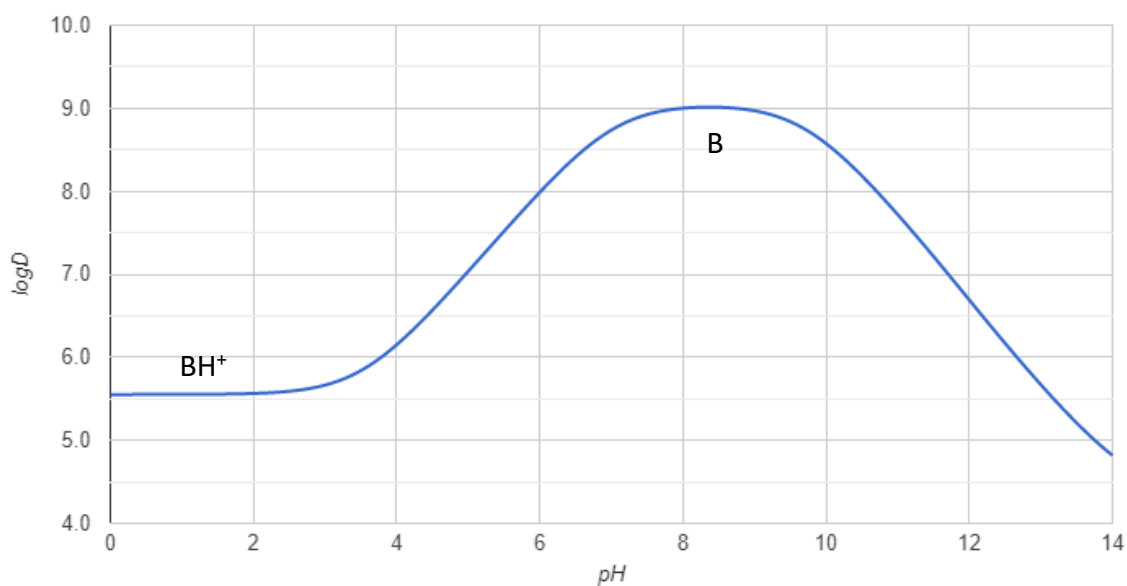
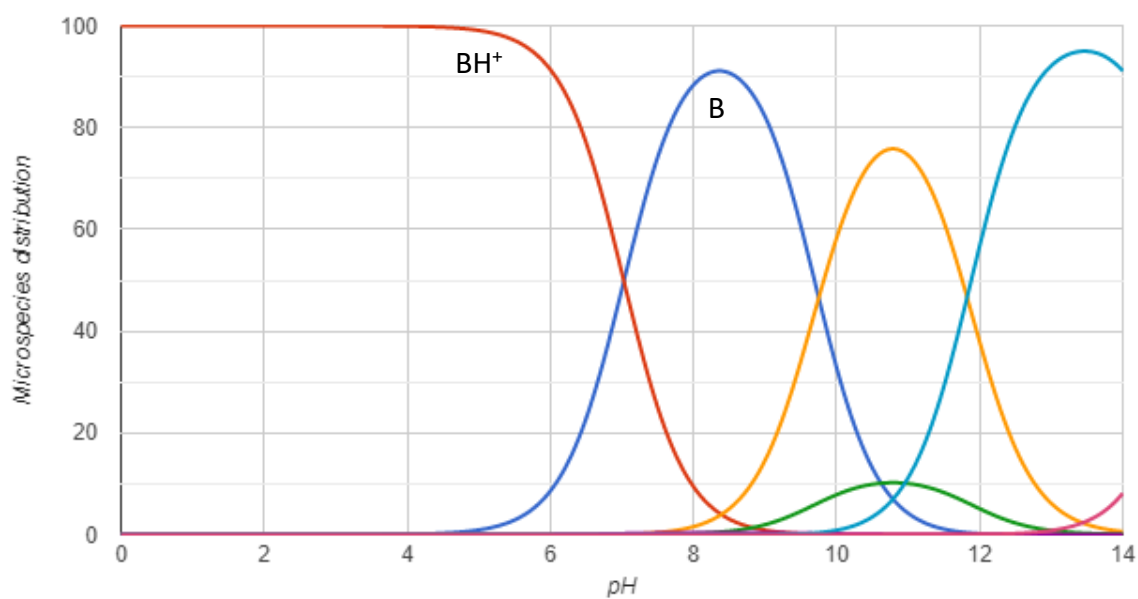
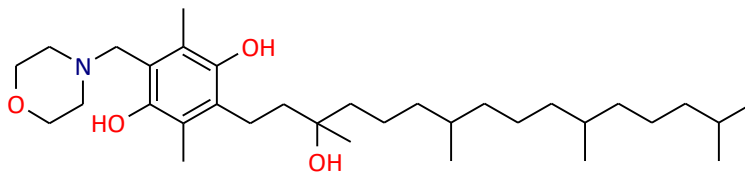
$$C_{3\text{máx}} = \frac{v_1C_1}{v_3} + \frac{v_1C_1}{v_3}e^{-\frac{a\pi}{b}}, \quad t_{\text{máx}} = \frac{\pi}{b}$$



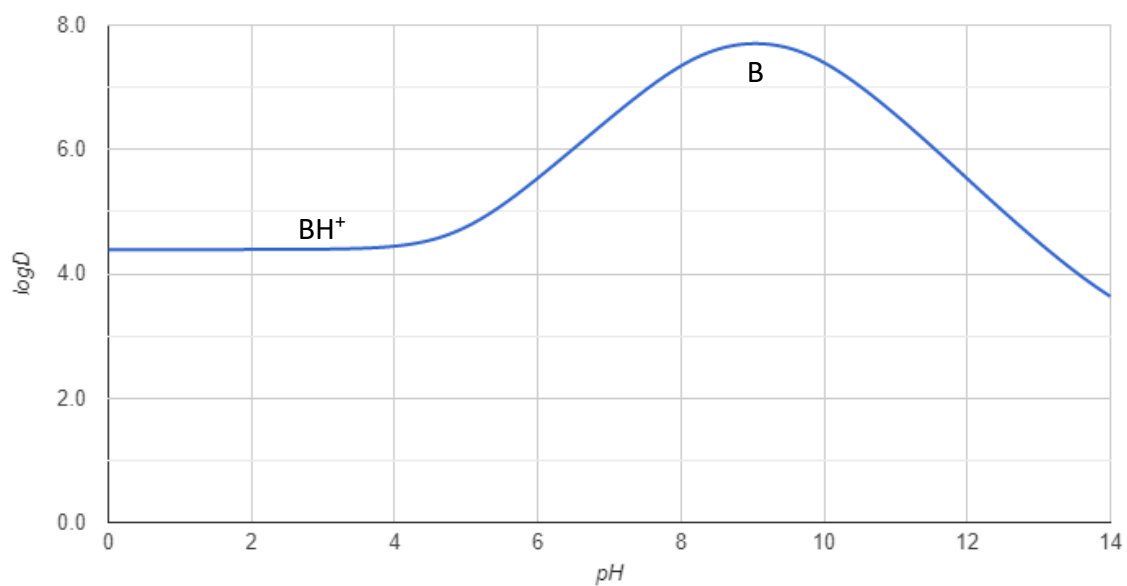
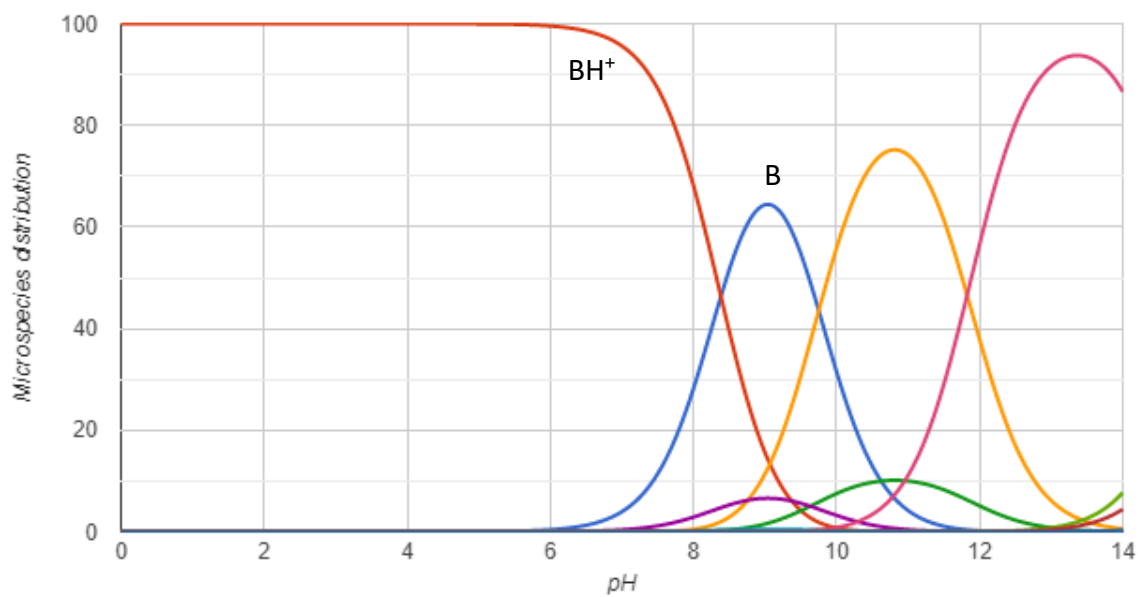
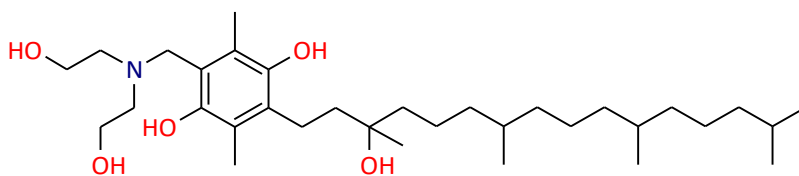
### 8.3 Diagramas de distribución de microespecies y logD vs pH

Nota: El símbolo B corresponde a la microespecie neutra, mientras que  $BH^+$  a la microespecie de la molécula completamente protonada. Las microespecies a la derecha de B corresponden a la ionización del grupo OH tipo fenólico y no se consideraron en el modelo matemático.

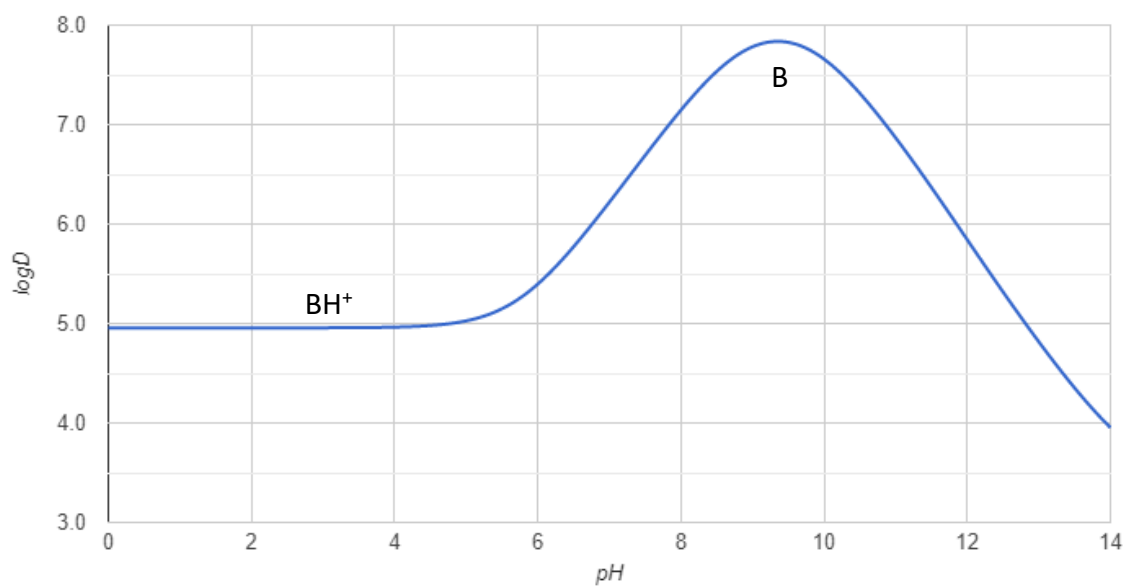
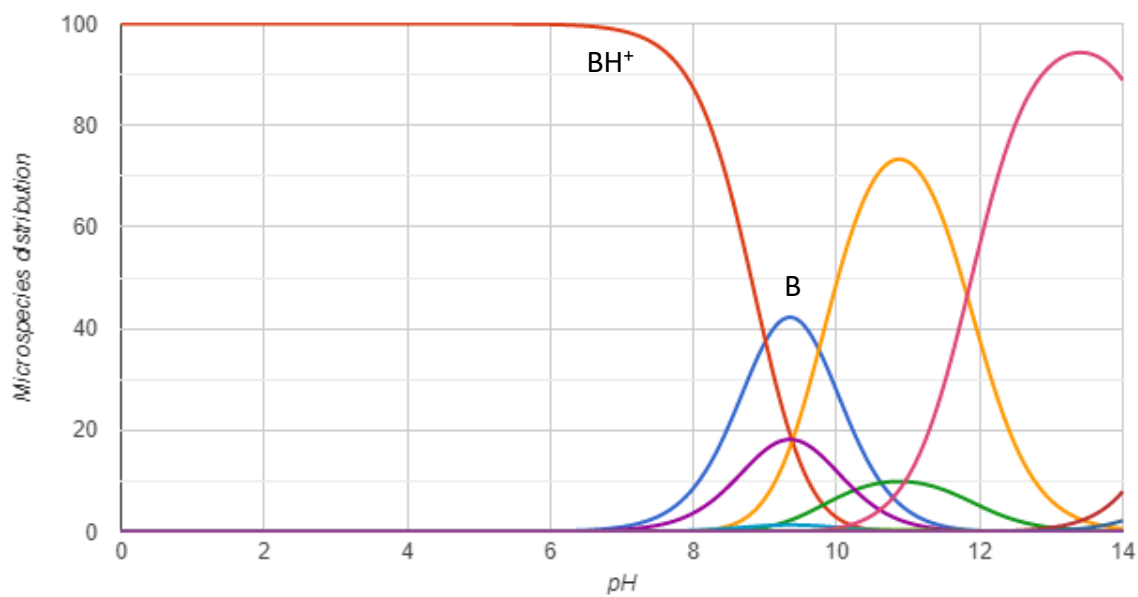
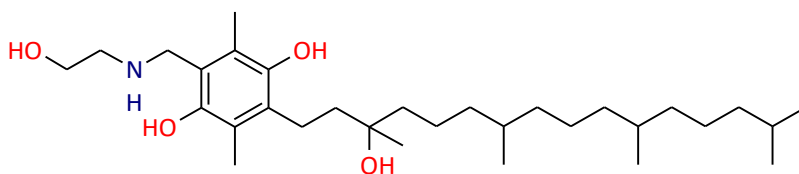
- Producto derivado de la morfolina.



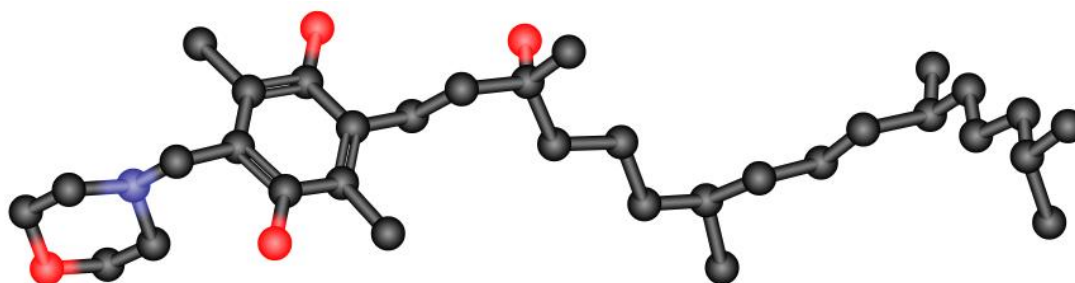
- Producto derivado de la dietanolamina.



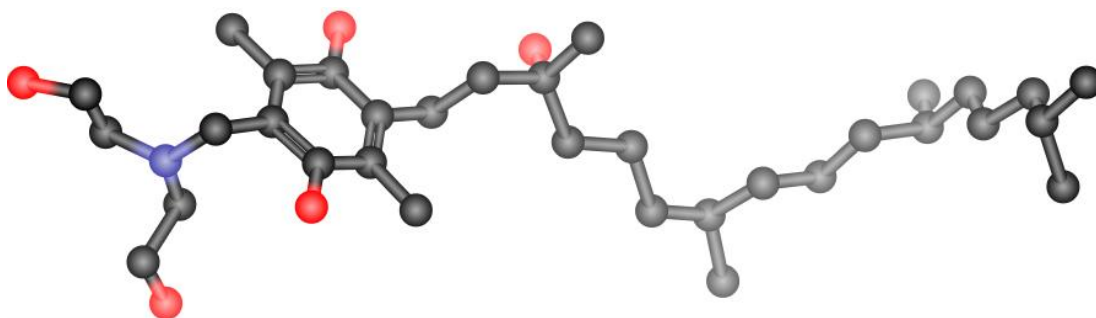
- Producto derivado de la monoetanolamina.



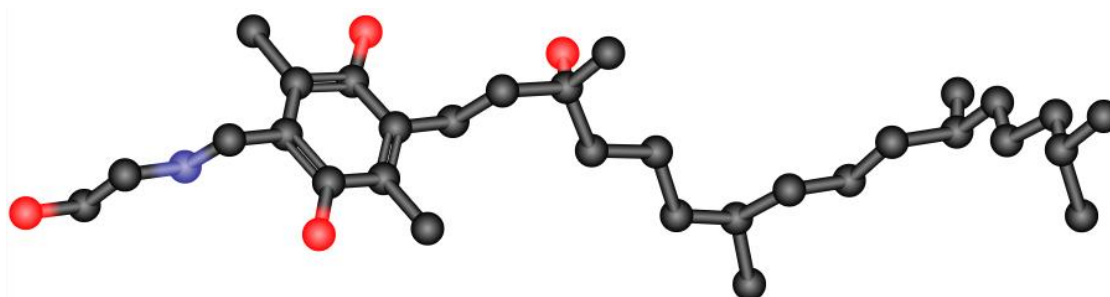
## 8.4 Imágenes de los conforméromos y sus descriptores geométricos



Van der Waals volume	579.20 Å <sup>3</sup>	Minimum projection area	75.88 Å <sup>2</sup>
Van der Waals surface area	1010.57 Å <sup>2</sup>	Maximum projection area	159.77 Å <sup>2</sup>
Solvent accessible surface area	1000.09 Å <sup>2</sup>	Minimum projection radius	5.81 Å
Topological polar surface area	73.16 Å <sup>2</sup>	Maximum projection radius	13.75 Å



Van der Waals volume	598.00 Å <sup>3</sup>	Minimum projection area	84.66 Å <sup>2</sup>
Van der Waals surface area	1041.57 Å <sup>2</sup>	Maximum projection area	168.93 Å <sup>2</sup>
Solvent accessible surface area	1031.09 Å <sup>2</sup>	Minimum projection radius	5.76 Å
Topological polar surface area	104.39 Å <sup>2</sup>	Maximum projection radius	13.89 Å



Van der Waals volume	555.10 Å <sup>3</sup>	Minimum projection area	82.72 Å <sup>2</sup>
Van der Waals surface area	967.32 Å <sup>2</sup>	Maximum projection area	157.08 Å <sup>2</sup>
Solvent accessible surface area	984.39 Å <sup>2</sup>	Minimum projection radius	6.57 Å
Topological polar surface area	92.95 Å <sup>2</sup>	Maximum projection radius	13.91 Å