

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



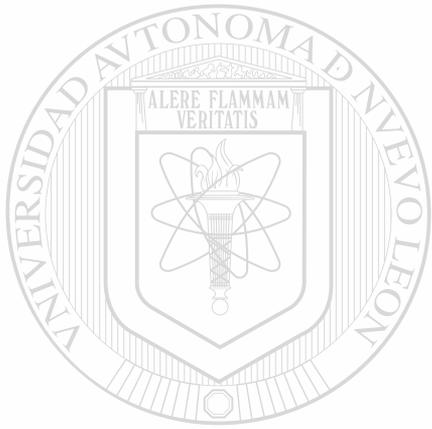
ESTUDIO FITOQUIMICO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA
DE LOS MELAMPOLIDOS AISLADOS DE
Tetragonotheca repanda y *Tetragonotheca ludoviciana*
(ASTERACEAE)

Por

M. C. GLORIA ALEJANDRA BENAVIDES CORTEZ

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

Marzo, 2004



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

M. C. GLORIA ALEJANDRA BENAVIDES CORTEZ

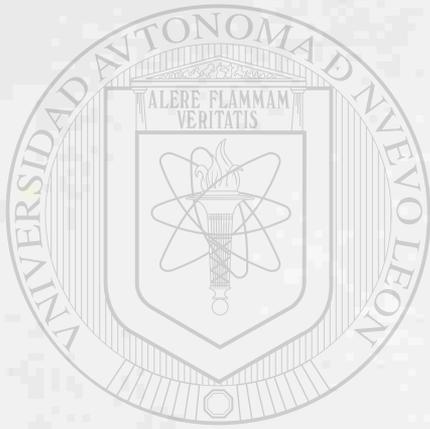
UNL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
BIBLIOTECAS

TD
QP981
.S4
B4
2004
c.1



1080123882



UANL

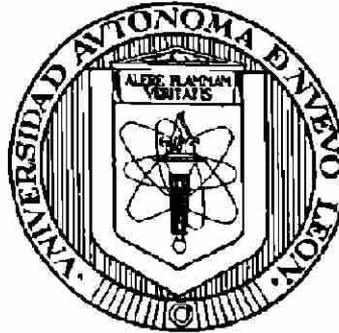
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIO FITOQUIMICO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS
MELAMPOLIDOS AISLADOS DE *Tetragonotheca repanda* y
Tetragonotheca ludoviciana (ASTERACEAE)**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por

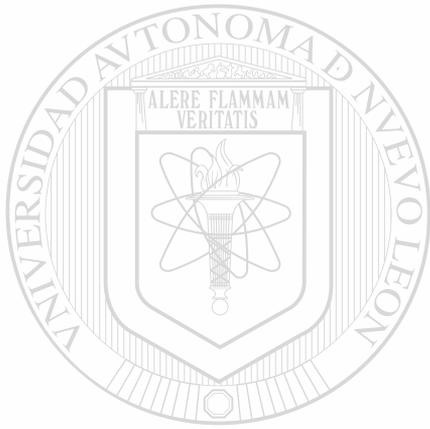
M. C. GLORIA ALEJANDRA BENAVIDES CORTEZ

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

Marzo de 2004

TD
QP981
.54
B4
2004



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

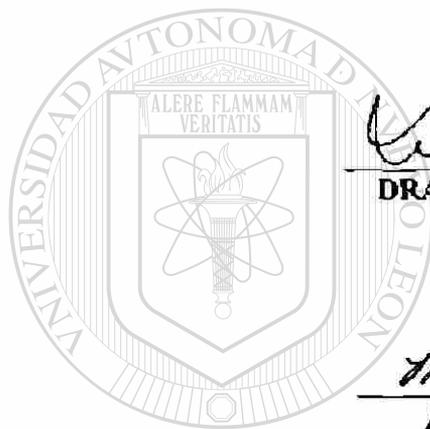


**ESTUDIO FITOQUIMICO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS
MELAMPOLIDOS AISLADOS DE *Tetragonotheca repanda* y
Tetragonotheca ludoviciana (ASTERACEAE)**

Aprobación de la Tesis:



DR. NIKOLAUS H. FISCHER
Director de Tesis



DRA. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES
Co-Director de Tesis



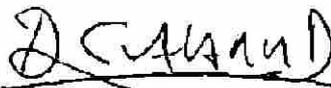
DRA. MA. JULIA VERDE STAR



DRA. ROSALBA RAMÍREZ DURÓN



DR. LUCIO VERA CABRERA



DR. DIONICIO GALARZA DELGADO
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

**“ESTUDIO FITOQUIMICO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS
MELAMPOLIDOS AISLADOS DE *Tetragonotheca repanda* y
Tetragonotheca ludoviciana (ASTERACEAE)”**

Presentado por:

M. C. GLORIA ALEJANDRA BENAVIDES CORTEZ



Este trabajo se realizó en el Departamento de Farmacognosia de la Escuela de Farmacia, University of Mississippi, bajo la asesoría del Doctor Nikolaus H. Fischer y la coasesoría de la Doctora Noemí Waksman de Torres.

U A N L

FIRMAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Director

Co-Director

Dr. Nikolaus H. Fischer

Dra. Noemí Waksman de Torres

RESUMEN

Gloria Alejandra Benavides Cortez

Fecha de Graduación: Marzo de 2004

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del estudio: ESTUDIO FITOQUIMICO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS MELAMPOLIDOS AISLADOS DE *Tetragonotheca repanda* y *Tetragonotheca ludoviciana* (ASTERACEAE).

Número de páginas: 102

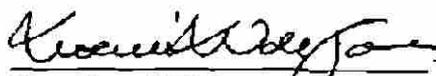
Candidata para el grado de Doctora en Ciencias con especialidad en Química Biomédica.

Area de Estudio: Química Biomédica.

Propósito y Método de Estudio: Las sesquiterpen lactonas (SLs) son compuestos terpenoides con un amplio espectro de actividades biológicas. Se han reportado SLs de tipo melampólido en *Tetragonotheca spp*; sin embargo, algunos de los compuestos no han sido aislados en forma pura y sus actividades biológicas no han sido estudiadas. En el presente trabajo se purificaron SLs de tipo melampólido de *T. repanda* y *T. ludoviciana* mediante CLV y CLAR. Se establecieron sus estructuras por métodos espectroscópicos y difracción de rayos X. Se estudió la actividad antimalaria, antimicrobiana, antiinflamatoria, antitumor y apoptótica en la mayoría de los compuestos aislados. Se realizó el ensayo antimalaria-parásito LDH. Se investigó la actividad antimicrobiana en seis microorganismos. Se estudió el efecto antiinflamatorio utilizando como molécula blanco el NF- κ B, así como también se estudiaron los efectos en la actividad enzimática de COX-2, el crecimiento celular en 4 líneas de tumor humano, la progresión del ciclo celular mediante citometría de flujo y tinción con DAPI para identificar apoptosis.

Conclusiones y Contribuciones: Se aislaron seis melampolidos, repandines A al F, a partir de *T. repanda*. Se aislaron el tetraludín A, tetraludín G y la mezcla de tetraludín Ha-Hb (C-2' epímeros) de *T. ludoviciana*. Los repandines (A, B, y C) y el tetraludín A no mostraron actividad antimicrobiana. Sin embargo, mostraron actividad antimalaria en concentraciones de 2.2-3.6 μ g/mL. Los repandines (A, B, D y E) y el tetraludín A inhibieron la activación de NF- κ B y el crecimiento celular, además, los repandines A y E inhibieron la actividad enzimática de COX-2. El repandín D y tetraludín A indujeron el arresto del ciclo celular en la fase G₂/M y apoptosis. Las SLs estudiadas interfieren con el mecanismo de transcripción del NF- κ B y COX-2, por lo tanto, estas SLs pueden ser útiles en el desarrollo de nuevos fármacos antiinflamatorios y antitumorales.


Dr. Nikolaus H. Fischer
Director


Dra. Noemí Waksmann de Torres
Co-Director

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincero agradecimiento al **Dr. Nikolaus H. Fischer** por su paciencia, apoyo, dirección y amistad, que hicieron posible llegar al término de esta Tesis.

Quiero expresar mi agradecimiento con cariño y respeto a la **Dra. Noemi Waksman de Torres** por su guía magistral ejemplar y la amistad brindada.

Mi agradecimiento al **Dr. Frank Wiggers** y **Dr. Wolfgang Schubly** por su paciencia en el entrenamiento para la operación de espectrómetros de RMN. Mi apreciación a la **Dr. Melissa Jacob** que realizó los ensayos anti-microbianos, a la **Dr. Shabana I. Khan** quien realizó los ensayos anti-maláricos y anti-inflamatorios, y al **Dr. Guoyi Ma** que realizó los ensayos de ciclo celular y apoptosis en *The National Center for Natural Products Research* en *The University of Mississippi*. También quiero expresar mi agradecimiento al **Dr. Frank Fronczek** quien realizó la estructura de rayos-X en el Departamento de Química en *Louisiana State University*.

Mi sincero agradecimiento a mi **Comité de Tesis** por sus sugerencias y tiempo, a la **Dra. María de la Luz Salazar** por su invaluable ayuda. Gracias a **CONACYT** y la **UANL** por el apoyo económico para la realización de esta Tesis.

Gracias a mis padres, hermanos, a mis compañeros y amigos de la Facultad de Medicina, UANL, así como también a mis amigos de *LSU* y *OleMiss* por su apoyo y ayuda incondicional.

Por último, mi agradecimiento a mi esposo, **Giuseppe**, por su paciencia, apoyo y por su asesoramiento en la realización de esta Tesis, y a mi hijo **Marcello**.

TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO

1. INTRODUCCION	1
Hipótesis	15
Objetivos específicos	15
2. MATERIAL Y METODOS	16
2.1. Material biológico	16
2.2. Material y equipo en general	16
2.3. Aislamiento	17
2.3.1. Aislamiento de los compuestos de <i>T. repanda</i>	18
2.3.2. Aislamiento de los compuestos de <i>T. ludoviciana</i>	22
2.4. Elucidación de la estructura	25
2.5. Evaluación de la actividad biológica	25
2.5.1. Ensayo antimalaria-parásito deshidrogenasa láctica	25
2.5.2. Bioensayo anti-microbiano	26
2.5.3. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria, tumorigénica y apoptótica	28
2.5.3.1. Material	28
2.5.3.2. Cultivo celular	28
2.5.3.3. Plásmidos	28
2.5.3.4. Ensayo de transfección celular	29
2.5.3.5. Determinación de la actividad enzimática de COX-2	30
2.5.3.6. Ensayo de inhibición del crecimiento celular	30
2.5.3.7. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	31
2.5.3.8. Ensayo de tinción DAPI	31

3. RESULTADOS	32
3.1. <i>Compuestos aislados del extracto de DCM de T. repandu</i>	32
3.2. <i>Compuestos aislados del extracto de DCM de T. ludoviciana</i>	51
3.3. Evaluación de la actividad biológica	63
3.3.1. Ensayo antimalaria-parásito deshidrogenasa láctica	63
3.3.2. Bioensayo anti-microbiano	64
3.3.3. Efectos en inflamación, crecimiento tumoral y apoptosis	65
3.3.3.1. Efecto en la transcripción inducida por PMA y TNF-α	65
3.3.3.2. Efecto en la actividad enzimática de COX-2	66
3.3.3.3. Efecto en el crecimiento de células tumorales humanas	67
3.3.3.4. Efecto en el ciclo celular	68
3.3.3.5. Inducción de la apoptosis	68
4. DISCUSION	70
4.1. <i>Compuestos aislados de Tetragonotheca repanda</i>	70
4.2. <i>Compuestos aislados de Tetragonotheca ludoviciana</i>	74
4.3. Evaluación de la actividad biológica	77
4.3.1. Actividad anti-malaria	77
4.3.2. Actividad anti-microbiana	77
4.3.3. Efectos en inflamación, crecimiento tumoral y apoptosis	78
5. CONCLUSIONES	82
RECOMENDACIONES	84
REFERENCIAS	85
APENDICE	87
RESUMEN AUTOBIOGRAFICO	88

LISTA DE FIGURAS

1. Clasificación de las sesquiterpenlactonas por Picman en 1986	2
2. Actividad anti-micobacteriana del costunólido, partenólido y sus derivados semisintéticos	4
3. Ciclización transanular del partenólido	5
4. Actividad citotóxica de los melampólidos aislados de <i>Mikania minima</i> .	6
5. Ilustración esquemática de la activación del factor de transcripción NF- κ B por LPS y citocinas.	7
6. Estructura química de algunos sesquiterpenos y su inhibición en la expresión de COX-2 en macrófagos estimulados por LPS	9
7. Actividad anti-inflamatoria de algunas sesquiterpenlactonas	11
8. Melampólidos reportados en <i>Tetragonotheca repanda</i>	12
9. Melampólidos reportados en <i>Tetragonotheca ludoviciana</i>	13
10. Melampólidos reportados en <i>Tetragonotheca heliantoides</i>	14
11. Cromatograma que muestra el t_R de los repandines C, D, E y F en CLAR semipreparativo	36
12. Espectro ^1H -RMN del repandin C (400 MHz)	37
13. Espectros del repandin C. c).- ^{13}C -RMN y d).- DEPT 135 (0-160 ppm)	38
14. Espectro ^1H -RMN del repandin D (400 MHz)	39
15. Espectros del repandin D. c).- ^{13}C -RMN y d).- DEPT 135 (0-160 ppm)	40
16. Espectro ^1H - ^1H COSY en 400 MHz del repandin D	41
17. Espectro de correlación ^1H - ^{13}C (HMQC) en 400 MHz del repandin D	42

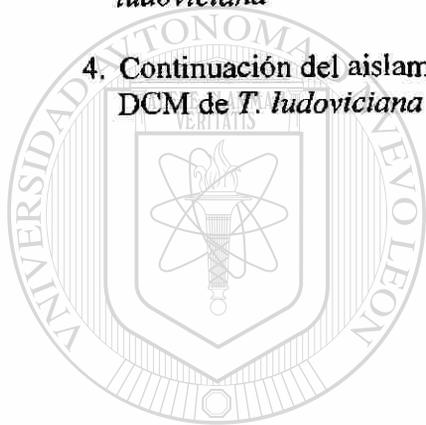
18. Espectro ^1H -RMN del repandin E (400 MHz)	43
19. Espectro ^1H -RMN del repandin F (400 MHz)	44
20. Cromatograma que muestra el t_R de los repandines A y B en CLAR semipreparativo	45
21. Espectro ^1H -RMN del repandin A (400 MHz)	46
22. Espectro ^1H -RMN del repandin B (400 MHz)	47
23. Estructuras de los repandines C al F aislados de <i>T. repanda</i>	49
24. Estructuras de los repandines A y B aislados de <i>T. repanda</i>	50
25. Cromatograma del tetraludín H en CLAR semipreparativo	53
26. Espectro ^1H -RMN del tetraludín H (400 MHz)	54
27. Espectros del tetraludín H. c).- ^{13}C -RMN y d).- DEPT 135 (0-160 ppm)	55
28. Espectro ^1H - ^1H COSY en 500 MHz de los tetraludines Ha y Hb (C-2' epímeros)	56
29. Difracción de rayos-X de los tetraludines Ha y Hb (C-2' epímeros)	57
<hr/>	
30. Cromatograma que muestra el t_R de los tetraludines A y G en CLAR semipreparativo	58
31. Espectro ^1H -RMN del tetraludín A (400 MHz)	59
32. Espectro ^1H -RMN del tetraludín G (400 MHz)	60
33. Estructuras de los tetraludines aislados de <i>T. ludoviciana</i>	62
34. Apoptosis inducida por repandin D o tetraludín A (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en células HL 60 (24 h de exposición)	69

LISTA DE TABLAS

1. Condiciones estándar de CLV	18
2. Datos espectrales de ^{13}C -RMN y DEPT 135 de los repandines A, B y E (CDCl_3)	48
3. Datos espectrales de ^{13}C -RMN y DEPT 135 de los tetraludines A y G (CDCl_3)	61
4. Resultados del ensayo de DHL	63
5. Resultados del bioensayo anti-microbiano	64
6. Resultados del bioensayo anti-microbiano	65
7. Valores de IC_{50} de la inhibición de la transcripción mediada por PMA y $\text{TNF-}\alpha$ por los repandines (A, B, D y E) y el tetraludín A en células SW1353	66
8. Efecto de los repandines (A, B, D y E) y el tetraludín A en la actividad enzimática de COX-2 en macrófagos de ratón	67
9. Efectos inhibitorios de los repandines (A, B, D y E) y el tetraludín A contra diferentes líneas celulares de tumor humano <i>in vitro</i> (48 h de exposición)	68

LISTA DE DIAGRAMAS

- | | |
|--|----|
| 1. Aislamiento de compuestos del extracto de DCM de <i>T. repanda</i> | 20 |
| 2. Continuación del aislamiento de compuestos del extracto de DCM de <i>T. Repanda</i> | 21 |
| 3. Aislamiento de compuestos del extracto de DCM de <i>T. ludoviciana</i> | 23 |
| 4. Continuación del aislamiento de compuestos del extracto de DCM de <i>T. ludoviciana</i> | 24 |



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

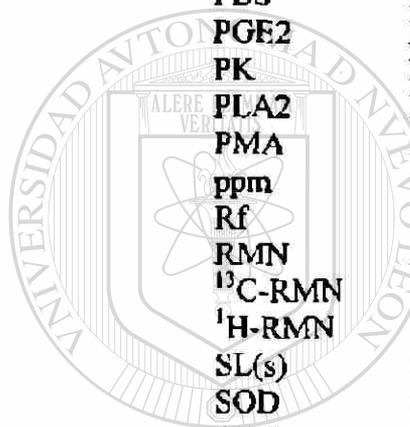
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

Å	Angstrom
Ac	Acetato
AcOEt	Acetato de Etilo
ATCC	American Type Culture Collection
C	Carbono
°C	Grados Celsius
C-18	Columna Fase Reversa de Octadecilsilano
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CDCl ₃	Cloroformo Deuterado
CFU	Unidad Formadora de Colonias
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CLV	Cromatografía de Líquidos al vacío
cm	Centímetros
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
cols.	Colaboradores
COSY	Correlation Spectroscopy
COX-2	Ciclooxigenasa-2
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenil-indole dihidrocloruro
DCM	Diclorometano
DEPT-135	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer $\theta_3=135^\circ$
DHL	Deshidrogenasa Láctica
FBS	Suero Fetal Bovino
Fig.	Figura
g	Gramos
H	Hidrógeno
h	Horas
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria 50%
I-κB	Proteína inhibidora del NF-κB
IL-1	Interleucina I
iNOS	Oxido Nitrico Sintasa inmunológica
J	Constante de acoplamiento
L	Litro
LPS	Lipopolisacárido
LSU	Louisiana State University
M	Molar
MetOH	Metanol
mg	Miligramos
MHz	Mega Hertz
min	Minuto(s)
mL	Mililitro(s)

mm	Milímetro(s)
MPC	Complejo Proteasa Multicatalítico
MRS	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a Meticilina
ms	Milisegundos
μ	Micrones
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μM	Micromolar
:Nu ⁺	Nucleófilo
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NF-κB	Factor Nuclear-κB
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
O	Oxígeno
PBS	Phosphate buffered saline
PGE2	Prostaglandina E 2
PK	Protein cinasa
PLA2	Fosfolipasa citosólica A 2
PMA	Forbol 12-Miristato 1-Acetato
ppm	Partes por millón (unidad de medición en ¹ HRMN)
Rf	Factor de retardo (cociente de frentes)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
¹³ C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
¹ H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
SL(s)	Sesquiterpenolactona(s)
SOD	Superóxido Dismutasa
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral-Alfa
t _R	Tiempo de Retención
V	Volts
Vol	Volumen
δ	Desplazamiento químico relativo al estándar (TMS)
λ	Longitud de onda



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

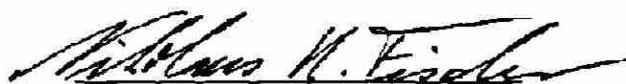
®

**PHYTOCHEMICAL STUDY AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF
MELAMPOLIDES FROM *Tetragonotheca repanda* AND
Tetragonotheca ludoviciana (ASTERACEAE).**

ABSTRACT

Sesquiterpene lactones are terpenoid compounds characteristic of the Asteraceae (Compositae). The functional group common to the majority of sesquiterpene lactones is the α -methylene- γ -lactone group. Many sesquiterpene lactones also contain additional α , β -unsaturated carbonyls as well as epoxides. These functional groups represent reactive receptor sites for biological nucleophiles, in particular, thiol and amino groups. Nucleophilic addition to epoxides and α -, β -unsaturated carbonyl compounds lead to irreversible adduct formation. Therefore, sesquiterpene lactones can cause irreversible alkylations of essential thiol and amino functions of certain enzymes. The numerous biological activities that have been reported for sesquiterpene lactones, including antimicrobial, antiviral, antiinflammatory, and antitumor activities, are usually rationalized in terms of the irreversible formation of covalent adducts. Melampolide-type sesquiterpene lactones had been reported in *Tetragonotheca* spp.; however, few of these compounds have been isolated from these plants in pure form. Furthermore, their biological activities were not studied. In this study, we present melampolide-type compounds isolated from *T. repanda* and *T. ludoviciana* and their biological activities. Six pure melampolides, repandins A-F, were isolated by VLC and HPLC from crude extracts of *T. repanda*. Two pure melampolides and epimeric mixture, tetraludin A, tetradulin G, and tetraludin Ha-Hb, were isolated from *T. ludoviciana*. Their structures were established by spectroscopic methods and single-crystal X-ray diffraction. Most of the isolated melampolides were studied for their antimalarial, antimicrobial, antiinflammatory, antitumor, and apoptotic activities. Repandin A, repandin B, repandin C, and tetraludin A did not exhibit antimicrobial activities at 50, 10 and 2 μ g/mL against *S. aureus*, MRS, *P. aureoginosa*, *C. albicans*, *C. neoformans*, *A. fumigatus* and *M. intracellulare*. Repandin A, repandin B, repandin C, and tetraludin A showed activity against *P. falciparum* at concentrations between 2.2-3.6 μ g/mL in the Antimalarial/Parasite Lactate

Dehydrogenase assay. The antiinflammatory bioactivities of the isolated melampolides were also studied using NF- κ B as a target molecule. The transcription factor NF- κ B is one of the key regulators of genes involved in the immune and inflammatory response. Repandin A, repandin B, repandin D, repandin E, and tetraludin A inhibited the activation of NF- κ B in SW 1353 cell induced by phorbol-12-myristate 13-acetate (PMA) and TNF- α . COX-2 enzyme activity was inhibited by repandin A and repandin E, but not by repandin B, repandin D, and tetraludin A. It is noteworthy that repandins A and E are structurally similar and may fulfill the spatial requirements to fit in the COX-2 active site. However, all these melampolides effectively inhibited cell growth of tumor cells. Cell cycle analysis and DAPI staining assay showed that repandin D and tetraludin A induced cell cycle arrest in G₂/M phase and apoptosis in HL 60 cells. These activities are likely mediated by inhibition of NF- κ B activation. Studies on structure-activity relationships revealed that bifunctional sesquiterpene lactones inhibit NF- κ B DNA binding at concentrations 10 times lower than their monofunctional analogs. Repandin A, repandin B, repandin D, repandin E, and tetraludin A contain the α -methylene γ -lactone group, as well as an α,β -unsaturated ester and/or an α,β -epoxy ester, that represent additional reactive centers for alkylation by biological nucleophiles. In this regard, it is known that Cysteine 38 and Cysteine 120 of the p65 subunit of NF- κ B are both sites of alkylation by sesquiterpene lactones, and since the distance between these cysteines is just 8 Å, it has been proposed that NF- κ B is locked into an inactive form by a single bifunctional sesquiterpene lactone, thereby preventing DNA binding by NF- κ B. The remarkable bioactivities we observed strongly suggest these compounds should be studied further.



Dr. Nikolaus H. Fischer
Adviser

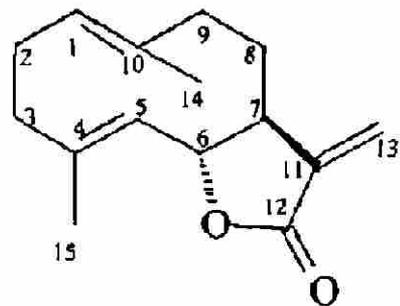
CAPITULO 1

INTRODUCCION

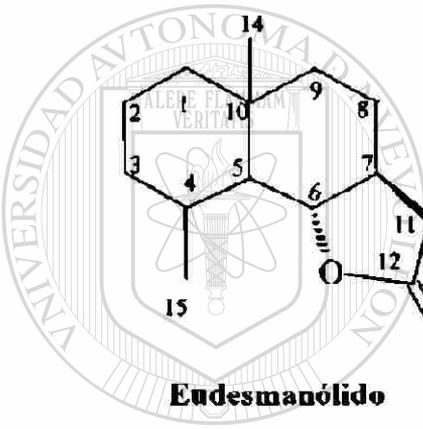
Las sesquiterpenlactonas son compuestos terpenoides característicos de la familia Asteraceae (Compositae). La clasificación de las sesquiterpenlactonas de acuerdo a su esqueleto carbocíclico nos indica que la mayoría de éstas se pueden colocar en uno de los cuatro grupos principales: germacranólidos (con un anillo de 10 miembros); eudesmanólidos (compuestos bicíclicos de 6/6); guaianólidos y pseudoguaianólidos (compuestos bicíclicos de 5/7) (Fig. 1).¹

Entre los diferentes tipos de esqueleto de las lactonas los germacranólidos representan el grupo mas grande. Dependiendo de la configuración de los dobles enlaces en el anillo, cuatro subgrupos de germacranólidos pueden ser formulados, de los cuales todos se encuentran como productos naturales.^{2,3} Los germacranólidos contienen un ciclodecadieno trans-trans; los heliangólidos tienen un anillo 1(10)-trans, 4-cis; los melampólidos presentan un ciclodecadieno 1(10)-cis, 4-trans y los cis, cis-germacranólidos que contienen un anillo 1(10)-cis, 4-cis.

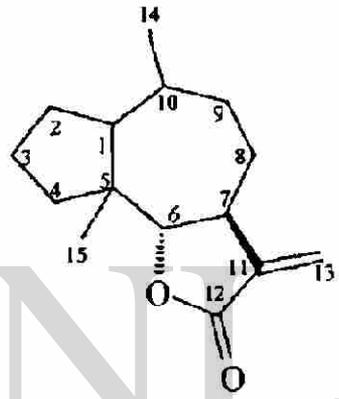
La mayoría de los tipos estructurales de las lactonas encontradas en la familia Asteraceae y en otras familias de plantas superiores contienen el grupo α -metileno- γ -lactona, en el cual el H-7 tiene la configuración α sin excepción.³



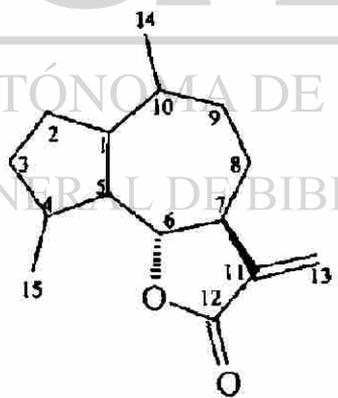
Germacranólido



Eudesmanólido



Pseudoguaianólido



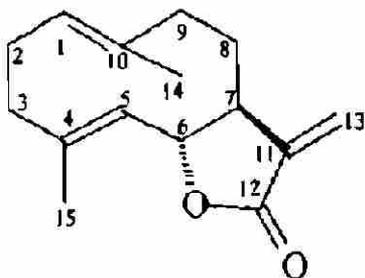
Guaianólido

Fig. 1: Clasificación de las sesquiterpenlactonas por Picman en 1986.¹

La característica funcional de la mayoría de las sesquiterpenlactonas está en el grupo α -metileno- γ -lactona. Muchas lactonas además contienen carbonilos α,β -insaturados así como también epóxidos. Estos grupos funcionales representan sitios receptores reactivos para nucleófilos biológicos, en particular, grupos tiol y amino. Por lo tanto, las sesquiterpenlactonas pueden causar alquilaciones irreversibles con los grupos tiol y amino que desempeñan funciones esenciales sobre ciertas enzimas. Consecuentemente, se ha reportado un amplio espectro de actividades biológicas en tales lactonas.

Se ha reportado en la literatura que muchas sesquiterpenlactonas presentan actividad anti-bacteriana, anti-tuberculosis, anti-micótica, anti-parasitaria, anti-tumoral y actividad citotóxica.

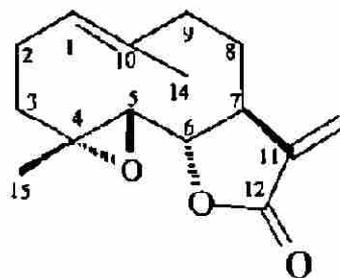
En 1998 Fischer y col. reportaron la actividad anti-micobacteriana de los componentes puros de *Magnolia glandiflora* y *M. virginiana*, costunólido y partenólido, así como algunos otros germacranólidos relacionados y derivados semisintéticos. El costunólido, el compuesto más lipofílico de las sesquiterpenlactonas probadas, mostró un CMI contra *Mycobacterium tuberculosis* y *M. avium* de 32 y 128 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Su derivado 4,5-epóxido, partenólido, fue el germacranólido más activo contra *M. tuberculosis* y *M. avium*, con CMI de 16 y 64 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. En contraste, sus 11 β H,13-dihidroderivados, así como los sesquiterpenos obtenidos por reducción del anillo en la lactona, no mostraron actividad a concentraciones menores de 128 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 2). Con los datos obtenidos ellos sugieren que el grupo α -metileno- γ -lactona es esencial pero no suficiente; aunado a esto los valores de lipofilicidad juegan un papel importante en la actividad anti-micobacteriana. Una posible explicación del incremento en la actividad del partenólido (menos lipofílico que el costunólido) y germacranólidos monoepóxidos relacionados, puede ser su única propiedad de sufrir fácilmente ciclización transanular (Fig. 3).⁴



Costunólido

M. tuberculosis CMI = 32 µg/mL

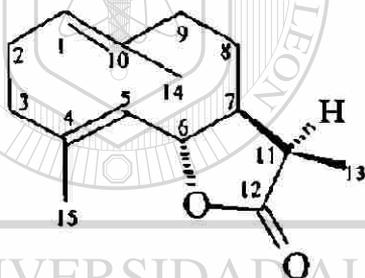
M. avium CMI = 128 µg/mL



Partenólido

M. tuberculosis CMI = 16 µg/mL

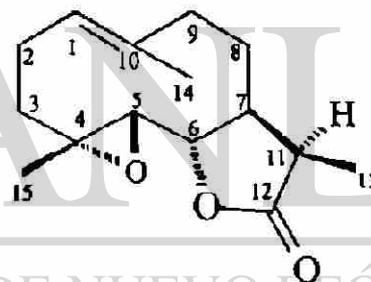
M. avium CMI = 64 µg/mL



11βH, 13-dihydrocostunólido

M. tuberculosis CMI > 128 µg/mL

M. avium CMI > 128 µg/mL



11βH, 13-dihidropartenólido

M. tuberculosis CMI > 128 µg/mL

M. avium CMI > 128 µg/mL

Figura 2. Actividad anti-micobacteriana del costunólido, partenólido y sus derivados semisintéticos.

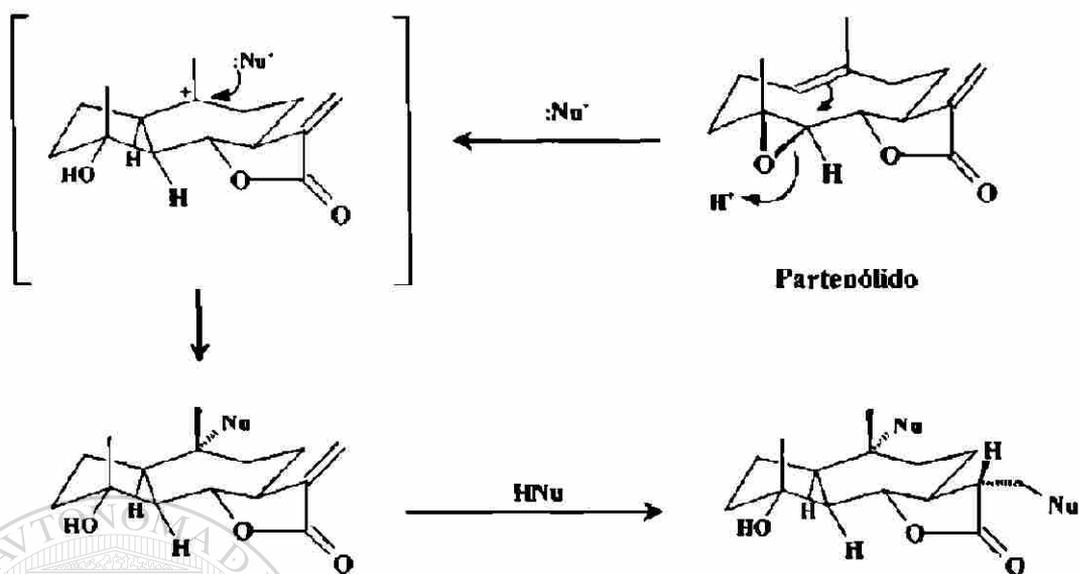
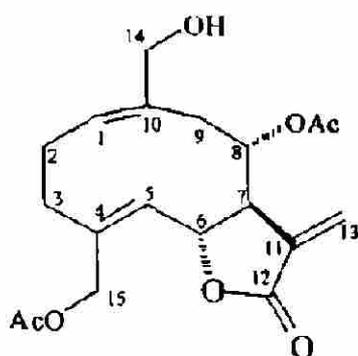


Figura 3. Ciclización transanular del partenólido.

Barrero y col., en el 2000, reportaron la actividad citotóxica de dos melampólidos, aislados de *Mikania minima*. Ellos evaluaron la actividad de ambos melampólidos en tres líneas celulares de tumor: P-388 linfoma de ratón (ML), contra la A-549 carcinoma de pulmón (LC) y HT-29 carcinoma de colon (CC) en líneas celulares humanas. El compuesto 1 mostró una $IC_{50}=2.7 \times 10^{-6}$ M, $IC_{50}=5.5 \times 10^{-6}$ M, y una $IC_{50}=5.5 \times 10^{-6}$ M, respectivamente. El compuesto 2 mostró una $IC_{50}=1.4 \times 10^{-6}$ M, $IC_{50}=2.8 \times 10^{-6}$ M y una $IC_{50}=2.8 \times 10^{-6}$ M, respectivamente (Figura 4). El aldehído 2 mostró una actividad mayor que el alcohol 1. Generalmente es aceptado que la actividad citotóxica de las sesquiterpenlactonas está básicamente en el grupo α -metileno- γ -lactona y que es aumentada por un segundo grupo aceptor de Michael. De acuerdo a esto, la mayor actividad del compuesto 2 puede ser atribuida al aldehído conjugado.⁵

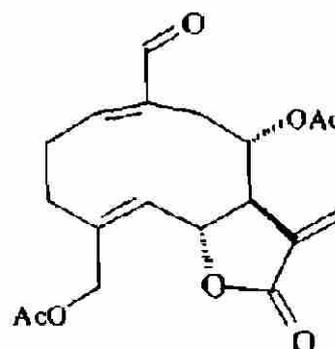


Melampólido 1

$$\text{ML IC}_{50} = 2.7 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$\text{LC IC}_{50} = 5.5 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$\text{CC IC}_{50} = 5.5 \times 10^{-6} \text{ M}$$



Melampólido 2

$$\text{ML IC}_{50} = 1.4 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$\text{LC IC}_{50} = 2.8 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$\text{CC IC}_{50} = 2.8 \times 10^{-6} \text{ M}$$

Figura 4: Actividad citotóxica de melampólidos aislados de *Mikania minima*.

El factor de transcripción NF- κ B es un importante regulador de los genes involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria. La figura 5 muestra esquemáticamente la activación del NF- κ B por lipopolisacáridos (LPS) y citocinas (IL-1 β y TNF- α). Los LPS, TNF- α y IL-1 β interactúan con distintos receptores en la superficie extracelular resultando en la generación intracelular de O $_2^{\cdot-}$, el cual sufre dismutación a H $_2$ O $_2$ catalizada por la superóxido dismutasa (SOD). Mediante un mecanismo desconocido, el H $_2$ O $_2$ activa la protein cinasa (PK) para fosforilar I- κ B, la subunidad inhibitoria. La fosforilación causa la ubiquitinación de I- κ B, la I- κ B ubiquitinada sirve como sustrato para el complejo proteasa multicatalítico (MPC), el cual degrada I- κ B liberando el NF- κ B, un heterodímero de p50 y p65. La degradación del inhibidor permite que el NF- κ B se traslade al núcleo, donde éste estimula la transcripción de genes que codifican varias citocinas inflamatorias (IL-1, TNF- α), quimiocinas, moléculas de adhesión y enzimas inflamatorias como la óxido nítrico sintasa

inmunológica (iNOS), ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la fosfolipasa citosólica A2. Estos mediadores están involucrados en la patogénesis de enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino o el síndrome de sepsis.^{6,7}

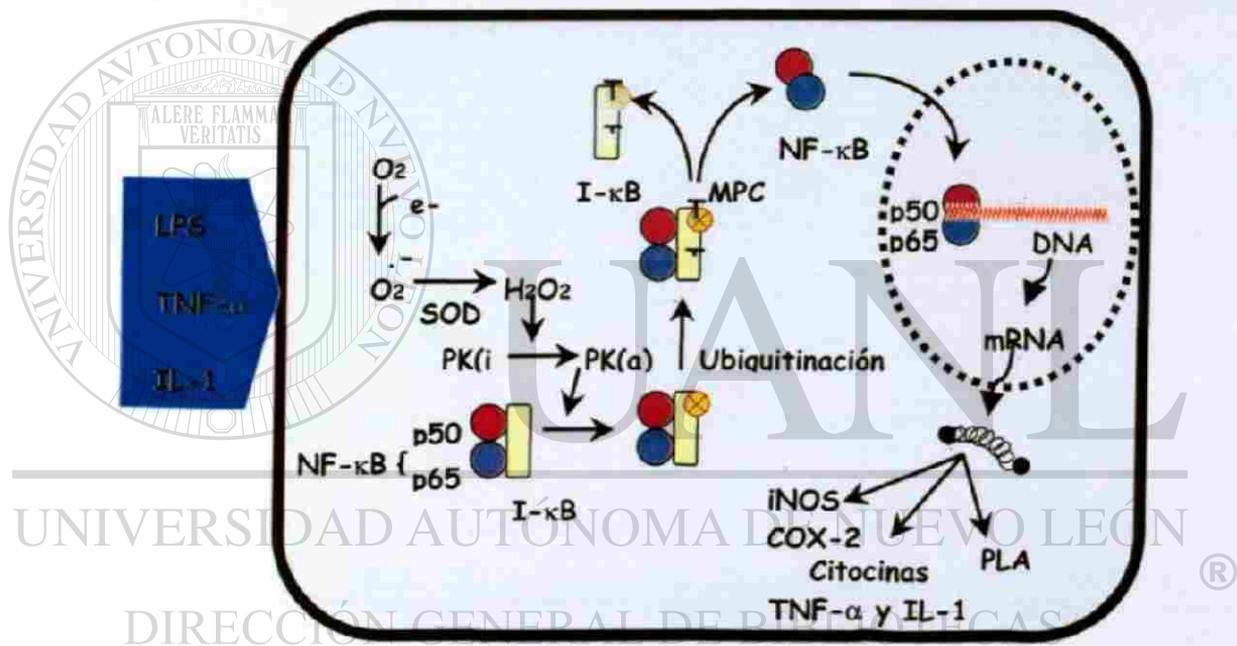
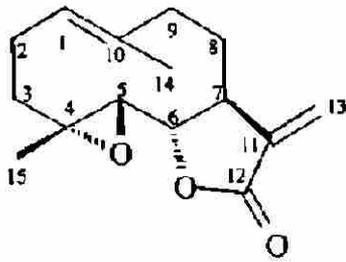


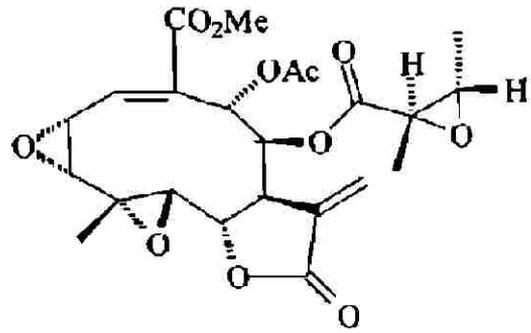
Figura 5: Ilustración esquemática de la activación del factor de transcripción NF-κB por LPS y citocinas.⁶

Recientemente, a aumentado el interés por el uso de agentes anti-inflamatorios para la prevención y tratamiento de una variedad de cánceres. Existe considerable evidencia que COX-2 es importante en tumorigénesis. La COX-2 puede favorecer el crecimiento de células tumorales mediante el incremento de la proliferación celular y estimulación de angiogénesis. Un aumento en la expresión de COX-2 inhibe apoptosis e incrementa la invasividad de células malignas. Por lo tanto, los compuestos que interfieren en el mecanismo de transcripción de COX-2 podrían disminuir la inflamación y la tumorigénesis.⁸

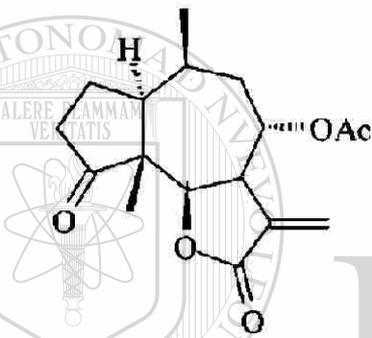
Hwang y col., en 1996, reportaron la inhibición de la expresión de la ciclooxigenasa mitógeno-inducible (COX-2) y de las citocinas proinflamatorias (TNF- α y IL-1) por sesquiterpenlactonas en macrófagos estimulados por lipopolisacáridos (LPS). Entre los sesquiterpenos probados están el partenólido y el leucanthín B, los cuales mostraron la actividad inhibitoria más alta (Figura 6); la característica común de estos compuestos es la presencia de los grupos α -metileno- γ -lactona y epóxido en su estructura. El confertiflorin y el psilostachyín A carecen de grupo epóxido en su estructura y su actividad inhibitoria está disminuida en comparación con el partenólido. La saturación del doble enlace 11-13 en el partenólido, da como resultado la pérdida de la actividad inhibitoria. La relación estructura-función indica que la cadena α -metileno- γ -lactona confiere el efecto de inhibición, y el grupo epóxido parece acentuar la actividad inhibitoria. Estos grupos pueden interactuar con nucleófilos biológicos como el grupo sulfhidrilo. El partenólido suprimió la fosforilación de la tirosina sobre proteínas estimulada por lipopolisacáridos en la línea celular de macrófagos en murinos (RAW 264.7). Esta supresión fue correlacionada con su efecto inhibitorio en la expresión de COX-2 y citocinas. Entre las proteínas activadas por fosforilación de tirosina, las cinasas proteicas activadas por mitógeno fueron las que exhibieron la mayor inhibición.⁹



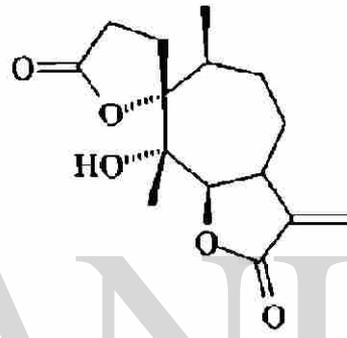
Partenólido
 $IC_{50} = 0.2 \mu\text{g/mL}$



Leucanthin B
 $IC_{50} = 0.2 \mu\text{g/mL}$



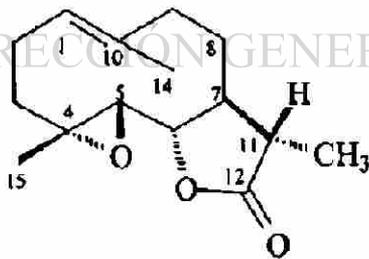
Confertiflorin
 $IC_{50} = 0.9 \mu\text{g/mL}$



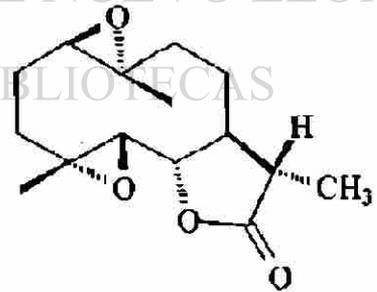
Psilostachyin A
 $IC_{50} = 1.3 \mu\text{g/mL}$

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



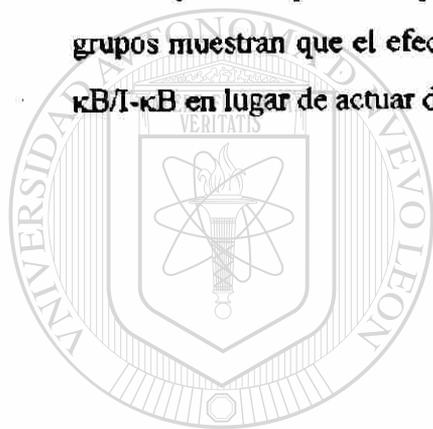
$IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$



$IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$

Figura 6: Estructura química de algunos sesquiterpenos y su inhibición en la expresión de COX-2 en macrófagos estimulados por LPS.

Algunos grupos de investigadores han estudiado la actividad anti-inflamatoria de las sesquiterpenlactonas en relación con el factor de transcripción NF- κ B.^{7,10,11,12} Algunas de las sesquiterpenlactonas estudiadas por Castro y col. son: costunólido ($IC_{50}=50 \mu M$), 3-acetoxicostunólido ($IC_{50}=50 \mu M$), 7-hidrocostunólido ($IC_{50}=10 \mu M$) y 3,4-epoxideshidroleucodín ($IC_{50}=5 \mu M$) (Fig. 7). Ellos muestran que estos compuestos naturales inhiben la cascada de señales del NF- κ B por actuar directamente en la subunidad p65, probablemente por reaccionar en una adición tipo Michael con residuos de cisteína en y cerca de la unión con el DNA.¹⁰ Kim y col.¹² reportan el 2 β ,5,10-deshidroxi-6 α -angeloiloxi-9 β -isobutiloxi-germacran-8 α ,12-olide ($IC_{50}= 2.16 \mu M$) y Helner y col.⁷ reportan el partenólido ($IC_{50}>10 \mu M$) e isohelenín ($IC_{50} >20 \mu M$). Ambos grupos muestran que el efecto inhibitorio es debido a la estabilización del complejo NF- κ B/I- κ B en lugar de actuar directamente en la subunidad p65 del NF- κ B.

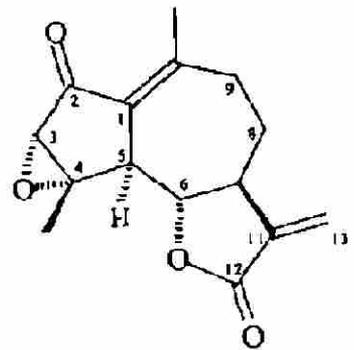
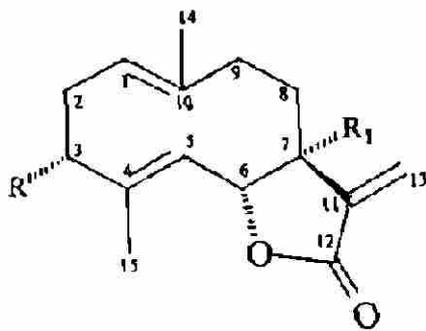


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

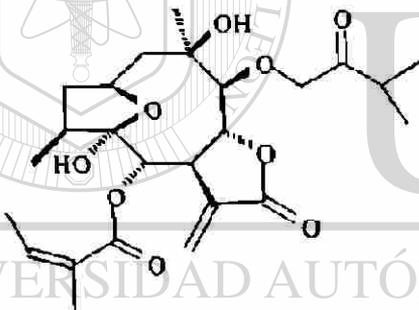


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

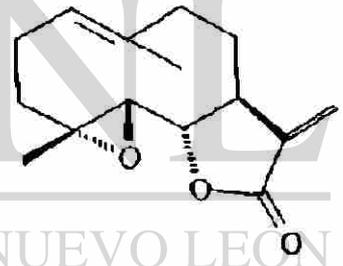


	R	R ₁	IC ₅₀
1) Costunólido	H	H	50 μM
2) 3-acetoxi costunólido	OAc	H	50 μM
3) 7-hidroxi costunólido	H	OH	10 μM

3,4-epoxidehidroleucodin
IC₅₀ = 5 μM



2β,5-epoxi-5,10-dihidroxi-6α-angeliloxi-
9β-isobutiloxi-germacran-8α,12-ólido
IC₅₀ = 2.16 μM



Partenólido
IC₅₀ = >10 μM

Figura 7: Actividad anti-inflamatoria de algunas sesquiterpenlactonas.

Tetragonotheca es un pequeño género constituido por cuatro especies *T. repanda*, *T. ludoviciana*, *T. helianthoides* y *T. texana*. Este género crece en el sur de Estados Unidos y México. *Tetragonotheca spp.* contiene sesquiterpenolactonas en la parte aérea.^{12,13,14,15} Los repandines A al G, que se muestran en la Figura 8, han sido reportados en *T. repanda*, todos ellos presentan el mismo esqueleto tipo melampólido con un doble enlace exocíclico 4 (15), la diferencia entre ellos está en las cadenas laterales de los C-8 y C-9. Los compuestos 9-isobutiriloxi-4b,15-epoxirepandanólido-8-O-[5-hidroxiangelato], 15-Hidroxi-4a,15-dihidroxirepandanólido-8-O-angelato y un éster cíclico, tetragonólido isobutirato, han sido también reportados en *T. repanda*.^{13, 14}

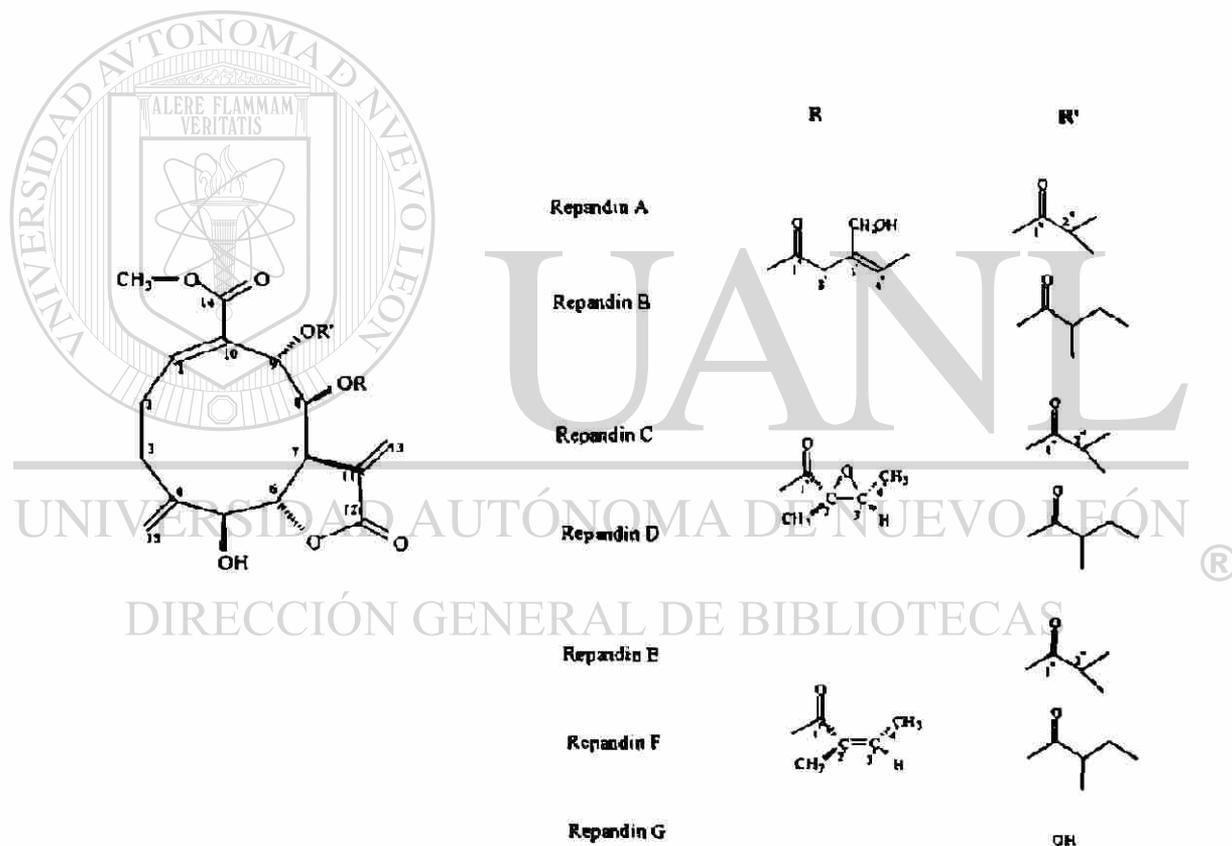


Figura 8: Melampólidos reportados en *Tetragonotheca repanda*.

Compuestos tipo melampólidos, tetraludín A al N (Figura 9), han sido reportados en *T. Ludoviciana*; como en el caso de los repandines, estos compuestos difieren en la naturaleza de la cadena lateral en los C-8 y C-9. Algunos tetraludines son pares epiméricos que difieren en un centro quiral en la cadena lateral del C-8.^{15, 16}

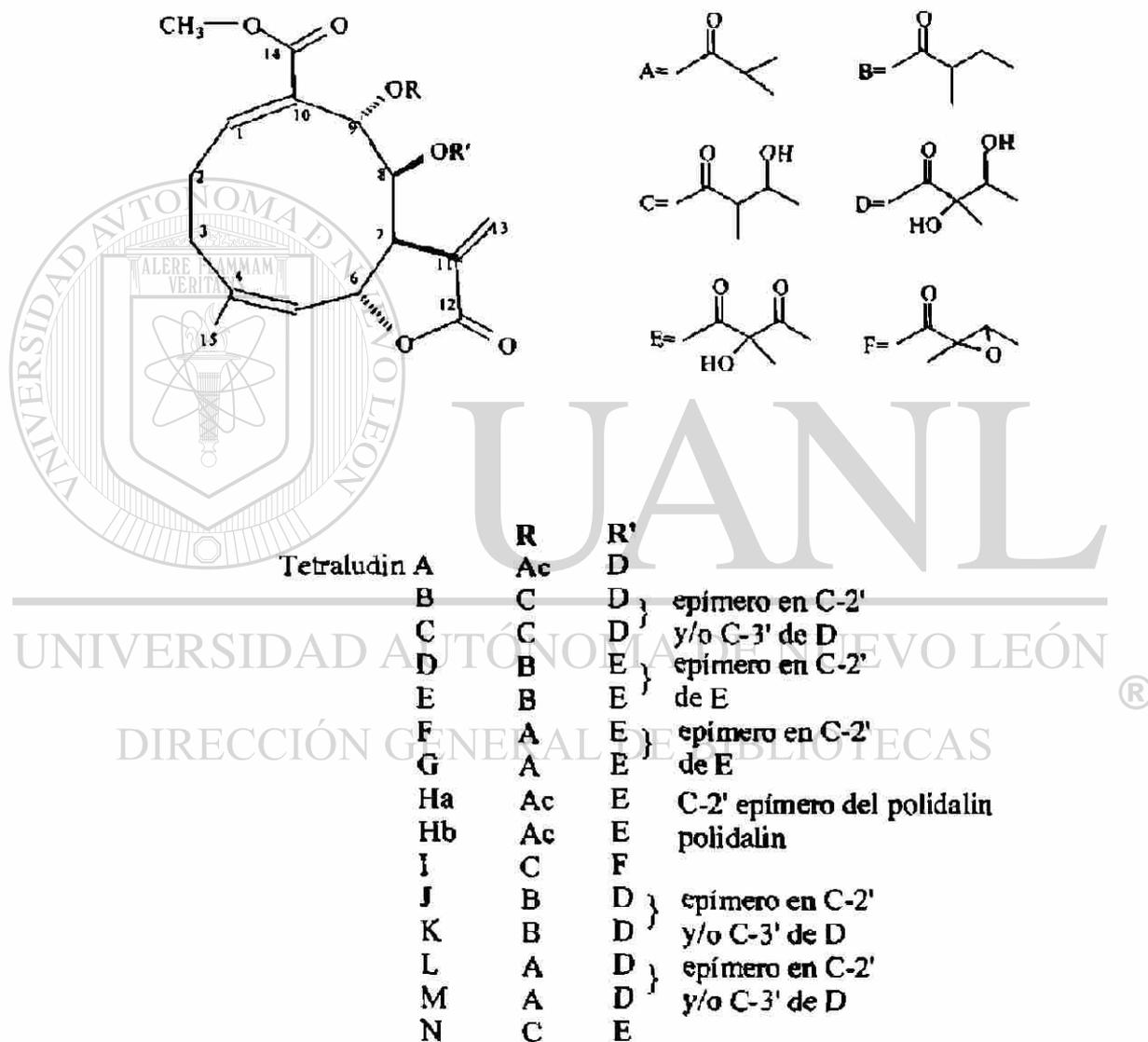


Figura 9: Melampólidos reportados en *Tetragonotheca ludoviciana*.

El análisis químico de *Tetragonotheca helianthoides* dió como resultado seis nuevas sesquiterpenlactonas tipo melampólido, tetrahelines A al F. Todos los compuestos nuevos tienen el mismo anillo medio y difieren en los grupos éster laterales de C-8 y C-9.¹⁷

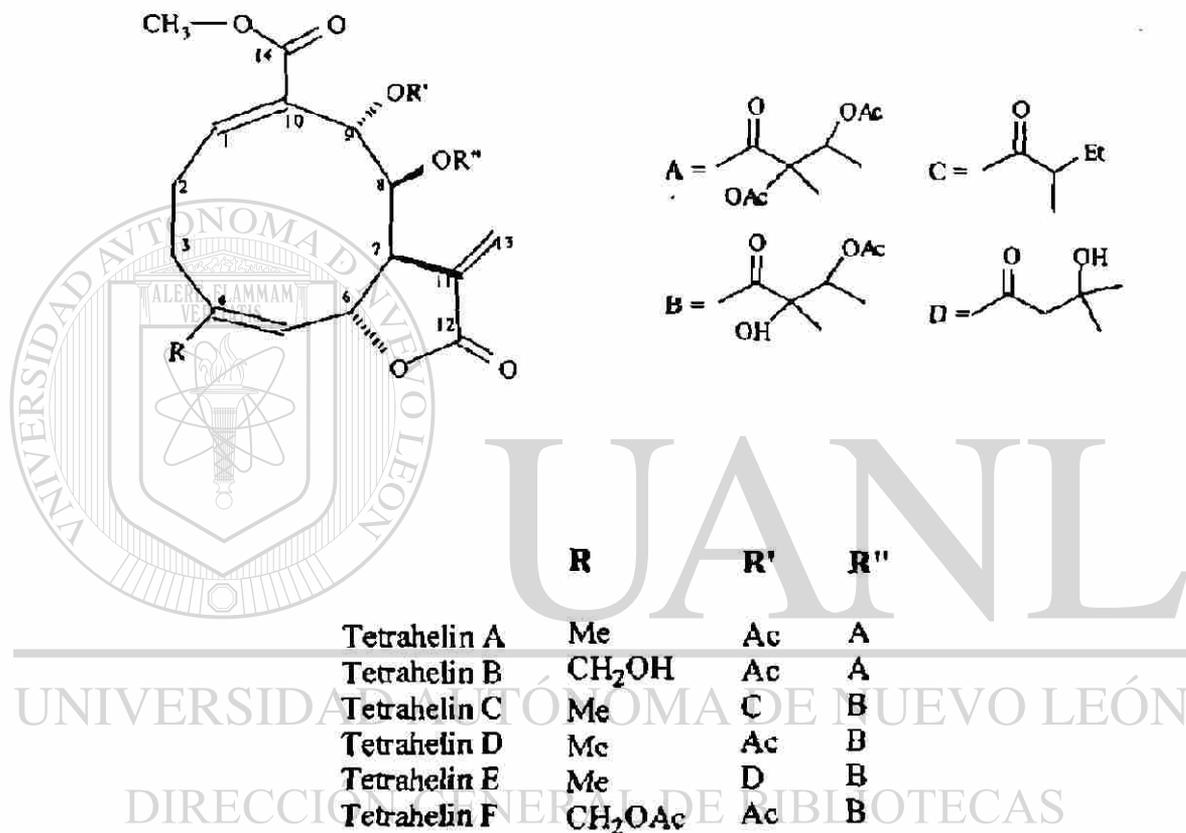


Figura 10: Melampólidos reportados en *Tetragonotheca helianthoides*.

Las actividades biológicas de *Tetragonotheca repanda* y *T. ludoviciana* no han sido estudiadas; además, algunos de los compuestos no han sido totalmente purificados. En el presente trabajo, se presenta un estudio de la actividad biológica de los melampólidos aislados de *T. repanda* y *T. ludoviciana*.

HIPOTESIS

Los germacranólidos aislados de los extractos semipolares de *Tetragonotheca repanda* y *Tetragonotheca ludoviciana* presentan actividad anti-microbiana, anti-malárica, anti-inflamatoria, anti-tumor y apoptótica.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Aislar los compuestos a partir del extracto semipolar de *Tetragonotheca repanda* y *Tetragonotheca ludoviciana*.
2. Elucidar la estructura de los compuestos aislados mediante técnicas espectroscópicas.
3. Evaluar la actividad biológica de los compuestos aislados (anti-microbiana, anti-malárica, anti-inflamatoria, anti-tumor y apoptótica).

CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Tetragonotheca repanda (Asteraceae): Se utilizó 15 g del extracto de DCM, parte aérea. Recolectada el 30 de abril de 1976 a 14 millas al sur de Falfurrias, Brooks Co., Texas, a lo largo de la autopista 281 (Se encuentra un ejemplar en LSU, Urbatch and Fischer 2460).

Tetragonotheca ludoviciana (Asteraceae): Se utilizó 15 g del extracto de DCM, parte aérea. Recolectada en agosto de 1977 en Tarrant Co., Texas, (Se encuentra un ejemplar en la Universidad de Texas en Arlington, Bacon and Bragg 1652).

2.2. MATERIAL Y EQUIPO EN GENERAL.

Solventes: Hexano, acetato de etilo, etanol, metanol, acetona y diclorometano grado analítico. Metanol, agua, acetonitrilo grado CLAR.

CCF: Cromatofolios AL TLC 20X20 cm Sílica gel 60 F₂₅₄, espesor de capa de 0.25 mm, Merck.

CLV: Sílica gel grado TLC MN Kieselgel G.

CLAR Semipreparativo: Cromatógrafo de líquidos Waters 996 con detector de arreglo de diodos. Precolumna Phenomenex Luna 10 μ C18(2) 60x21.20 mm 5 micrones. Columna Phenomenex Luna C18(2) 250X21.20 mm 5 micrones. Condiciones isocráticas con metanol-agua-acetonitrilo (60:30:10). Flujo de 15 mL/min.

Evaporaciones: Rotavapor Büchi a temperatura inferior a los 40 °C.

Revelador: Reactivo de Godin.

Cartucho: C-18 Alltech de 1 y 3 g. Se acondiciona y/o lava con metanol antes y después de su uso. La muestra se disuelve en metanol-agua (50:50). Se eluye y recolectan 3 fracciones: C-18F1= Metanol-agua (50:50)

C-18F2 = Metanol-agua (60:40)

C-18F3 = Metanol-agua (80:20)

Espectros de RMN: BRUKER de 400 MHz y 500 MHz, usando CDCl_3 como solvente.

Análisis cristalográfico de rayos X: Realizado en un difractor Kappa CCD con Oxford cryostream equipado con radiación $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). Datos cristalográficos experimentales en apéndice.

2.3. AISLAMIENTO.

Se utilizó un procedimiento estándar de Cromatografía de Líquidos al Vacío[®] (CLV)¹⁸ para separar los extractos crudos (DCM) de *Tetragonotheca repanda* y *T. ludoviciana*. El extracto (15 g) se adsorbe en sílica gel (15 g) y se coloca en una columna de CLV (8 cm de diámetro y 30 cm de longitud, empacada con 150 g de sílica gel). Por medio de un incremento en la polaridad del solvente el extracto se separó en ocho fracciones. La Tabla 1 muestra la cantidad y proporciones de los solventes utilizados en el fraccionamiento.

Tabla 1: Condiciones estándar de CLV.

Fracción	Vol (mL)	Hexano (% v/v)	AcOEt (% v/v)	MeOH (% v/v)
1	300	100	0	0
2	300	95	5	0
3	300	80	20	0
4	300	50	50	0
5	300	20	80	0
6	300	0	100	0
7	300	0	50	50
8	300	0	0	100

2.3.1. Aislamiento de los compuestos de *T. repanda*:

Se continuó con la separación de las fracciones V1F4 y V1F5 obtenidas del extracto de DCM de *T. repanda* debido a que mostraron señales de interés en ¹H-NMR.

La fracción V1F4 mostró más de 4 componentes en CCF en sílica gel utilizando como eluyente hexano-AcOEt (3:2). La fracción V1F4 (2.65 g) se cromatografió por CLV (CLV 3), utilizando 20 g de sílica gel e incrementando la polaridad del eluyente; se recolectaron 13 fracciones. Las fracciones V3F10 y V3F11 obtenidas en hexano-AcOEt (50:50), que en ¹H-RMN mostraron señales de interés, se juntaron y se extrajeron en un cartucho de C-18 (condiciones en 2.2) obteniendo 160 mg de la fracción que denominamos V3F10F11(C-18F2). Esta fracción fue disuelta en 600 µL de metanol; después de filtrarla se inyectaron alícuotas de 100 µL en CLAR semipreparativo con las condiciones dadas en 2.2. En el cromatograma se observaron 4 picos principales, los cuales fueron identificados como las fracciones R1F2, R1F4, R1F7 y R1F10; estas fracciones fueron secadas en un rotavapor a una temperatura menor de 40 °C, recuperadas en DCM y secadas al vacío (Diagrama 1).

La fracción V1F5 obtenida en hexano-AcOEt (20:80) mostró una mancha alargada de R_f intermedio en CCF en sílica gel utilizando como eluente AcOEt. Se cromatografió la fracción V1F5 (4.41 g) por CLV (CLV 4) utilizando 40 g de sílica gel e incrementando la polaridad del eluente; se recolectaron 9 fracciones. La fracción V4F5 (1.14 g) obtenida en hexano-AcOEt (70:30) fue recromatografiada por CLV (CLV 5) utilizando 20 g de sílica gel e incrementando la polaridad del eluente; se recolectaron 10 fracciones. La fracción V5F4 (126 mg) obtenida en una proporción de hexano-AcOEt (77:23), mostró picos de interés en el espectro de $^1\text{H-RMN}$, se pasó a través de un cartucho C-18 obteniéndose 90 mg de la fracción que denominamos V5F4(C-18F2). Esta fracción fue disuelta en 450 μL de metanol, se filtró y se inyectaron alícuotas de 100 μL en CLAR semipreparativo con las condiciones dadas en 2.2. En el cromatograma se observaron 2 picos los cuales fueron identificados como las fracciones R2F4 y R2F6. Las dos fracciones obtenidas fueron secadas en un rotavapor a una temperatura menor de 40 $^\circ\text{C}$, recuperadas en DCM y secadas al vacío (Diagrama 2).

Se juntaron las fracciones V4F4, V4F6 y V4F7 para dar 1.39 g de muestra. Se cromatografió por CLV (CLV 6) utilizando 20 g de sílica gel e incrementando la polaridad del eluente; se recolectaron 18 fracciones. Las fracciones obtenidas se juntaron de acuerdo a su R_f en CCF en sílica gel utilizando AcOEt como eluente, además fueron obtenidos los espectros de $^1\text{H-RMN}$ de algunas de las fracciones para monitorear la separación de los compuestos. Las fracciones que se juntaron fueron: V6F5-F8, V6F10F11 y V6F12-14 para darnos 144 mg, 251 mg y 469 mg de muestra, respectivamente. Cada una de las fracciones fueron pasadas a través de un cartucho de C-18 con las condiciones dadas en 2.2. Se disolvieron en la cantidad adecuada de metanol, después de filtrarlas se inyectaron alícuotas de 100 μL en CLAR semipreparativo con las condiciones mencionadas en 2.2. Las fracciones obtenidas fueron secadas en un rotavapor, recuperadas en DCM y secadas al vacío (Diagrama 2).

DIAGRAMA 1

AISLAMIENTO DE COMPUESTOS DEL EXTRACTO DE DCM DE *T. repanda*

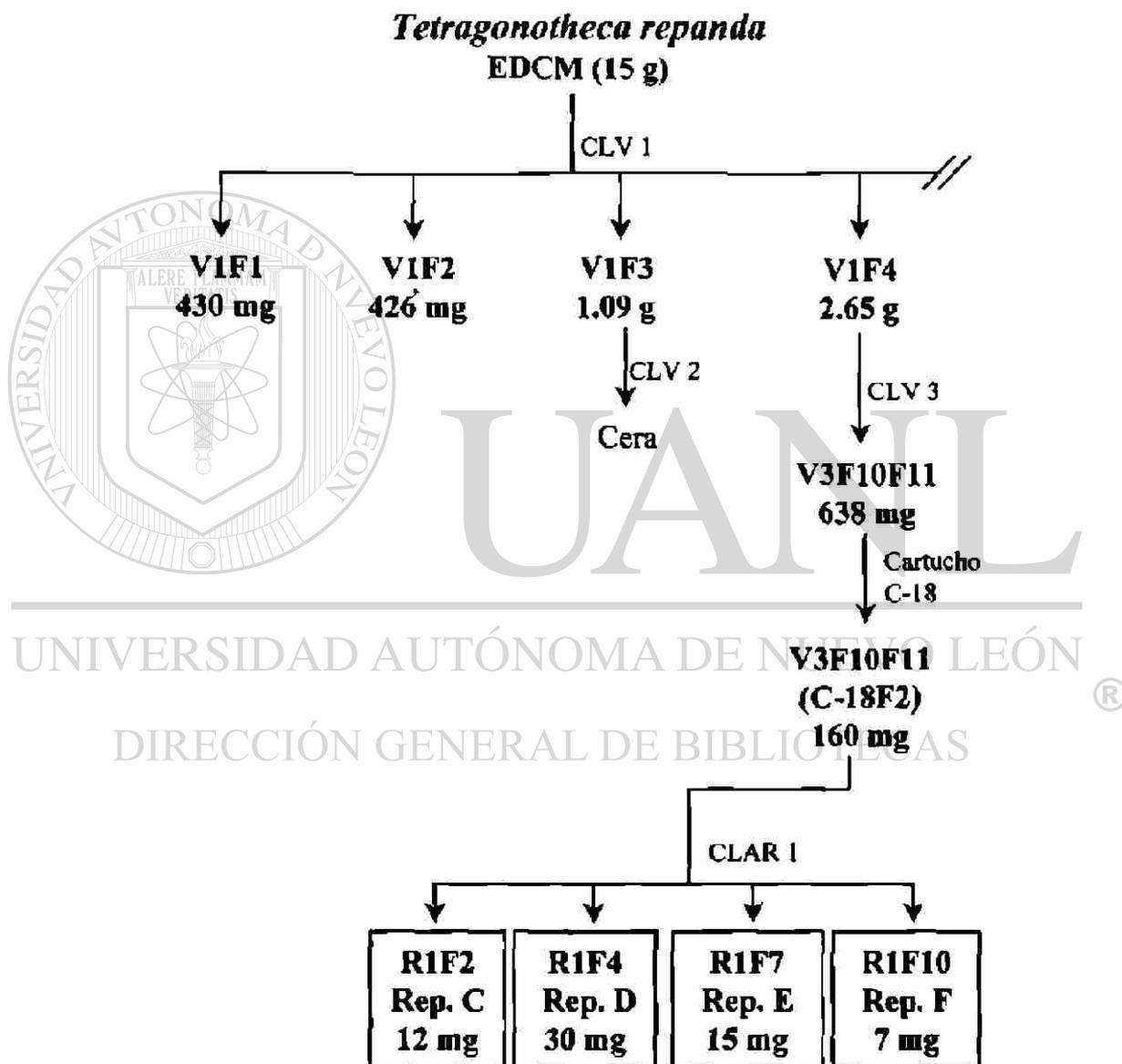
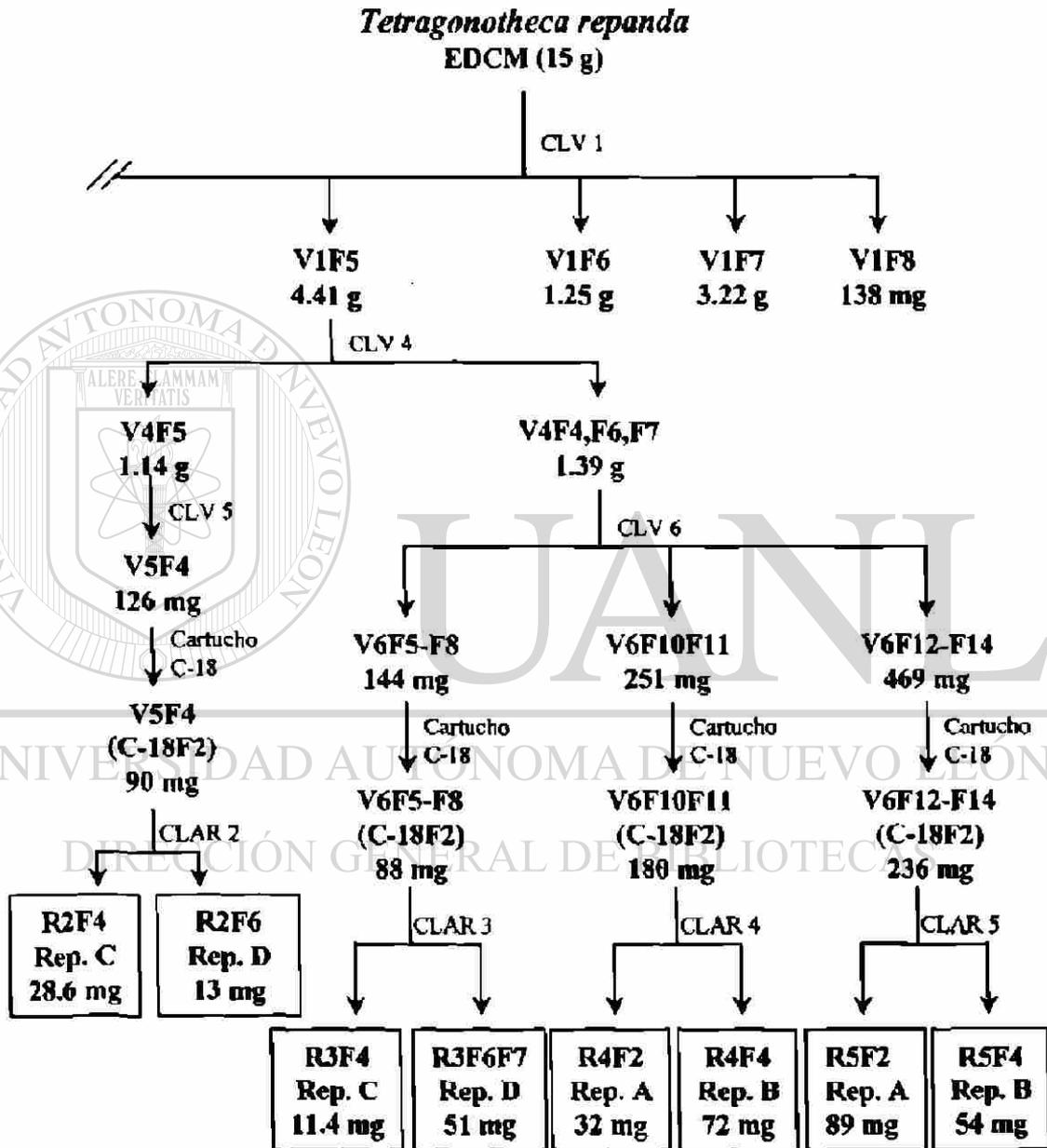


DIAGRAMA 2

**CONTINUACION DEL AISLAMIENTO DE COMPUESTOS
DEL EXTRACTO DE DCM DE *T. repanda***



2.3.2. Aislamiento de los compuestos de *T. ludoviciana*:

Se continuó con la separación de las fracciones semipolares V7F4 y V7F5 obtenidas del extracto de DCM de *T. ludoviciana*. La fracción V7F4 mostró al menos seis compuestos en CCF en sílica gel utilizando como eluente hexano-AcOEt (3:2). V7F4 (2.44 g) se cromatografió por CLV (CLV 9) utilizando 40 g de sílica gel e incrementando la polaridad del eluente; se recolectaron 13 fracciones. La fracción V9F10 (535 mg) obtenida en hexano-AcOEt (75:25), la cual mostró señales de interés en ¹H-RMN, fue pasada a través de un cartucho C-18 obteniéndose 88 mg de la fracción que denominamos V9F10(C-18F2). Dos compuestos fueron purificados (25 mg de R8F2 y 5 mg de R8F4) mediante CLAR semipreparativo con las condiciones dadas en 2.2 (Diagrama 3).

La fracción V7F5 (3.43 g) se cromatografió por CLV (CLV10) utilizando 40 g de sílica gel e incrementando la polaridad del eluente; se recolectaron 11 fracciones. Se juntaron las fracciones V10F5 y F6 por mostrar señales similares en el espectro de ¹H-RMN, se pasaron a través del cartucho C-18 obteniéndose 78 mg de la fracción que denominamos V10F5F6(C-18F2). Mediante CLAR semipreparativo (condiciones dadas en 2.2) se purificaron 16 mg de la fracción R8F2. Las fracciones V10F8 y F9 obtenidas en hexano-AcOEt (50:50 y 20:80) mostraron más de 2 compuestos de R_f intermedio en CCF en sílica gel utilizando como eluente AcOEt. Estas fracciones fueron juntadas (V10F8F9) para darnos 1.97 g. Se recromatografió por CLV (CLV 11) utilizando 22 g de sílica gel e incrementando la polaridad del eluente; se recolectaron 8 fracciones. Las fracciones V11F3 (643 mg) y V11F4 (263 mg) fueron pasadas a través del cartucho C-18 obteniéndose 190 mg de la fracción V11F3(C-18F1) y 225 mg de V11F4(C-18F1F2). Cada una de las fracciones se disolvió en la cantidad adecuada de metanol; después de filtrarlas se inyectaron alícuotas de 100 µL en CLAR semipreparativo con las condiciones mencionadas en 2.2. Las fracciones recolectadas fueron secadas en un rotavapor, recuperadas en la mínima cantidad de DCM y secadas al vacío (Diagrama 4).

DIAGRAMA 3

**AISLAMIENTO DE COMPUESTOS DEL
EXTRACTO DE DCM DE *T. ludoviciana***

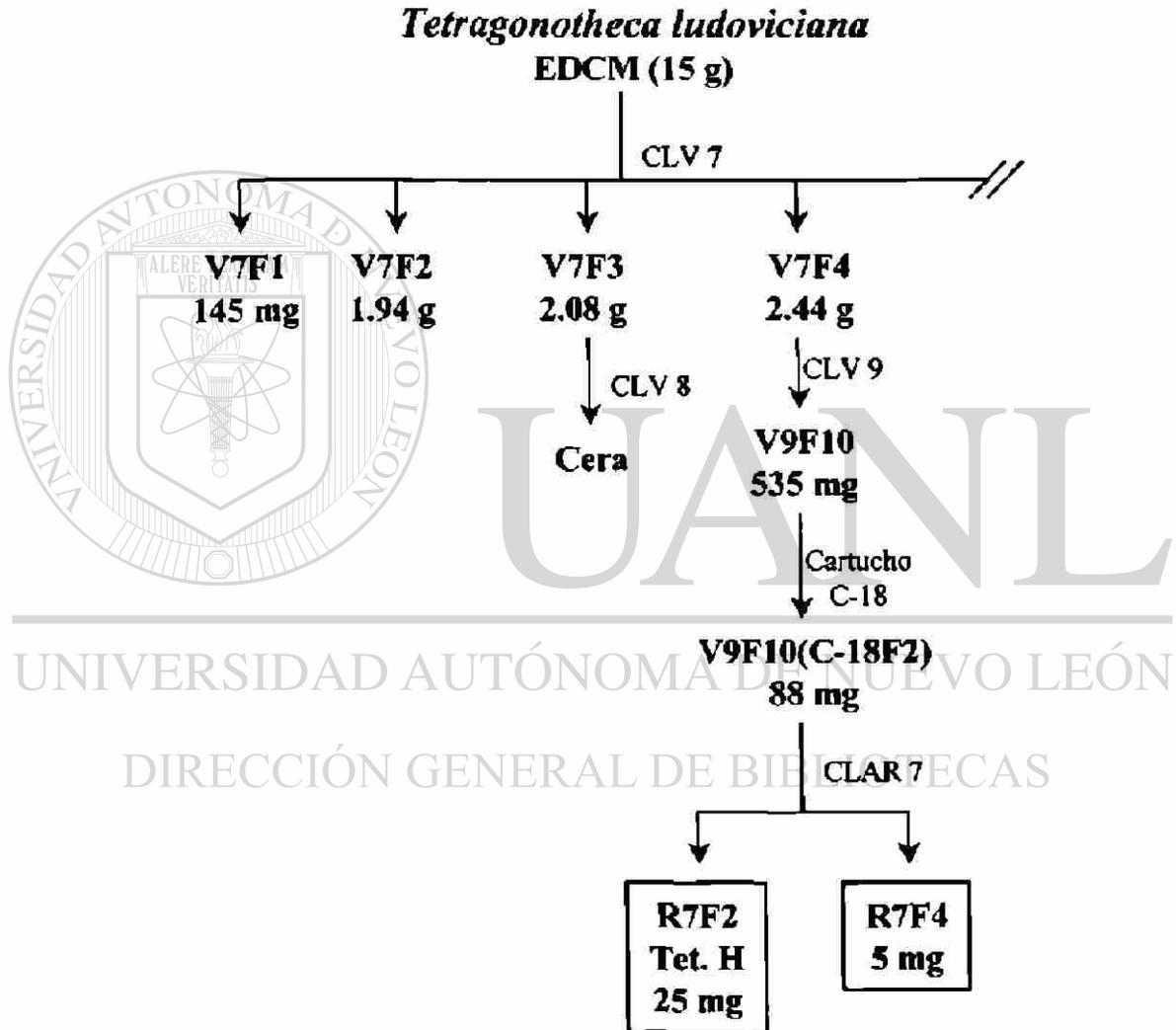
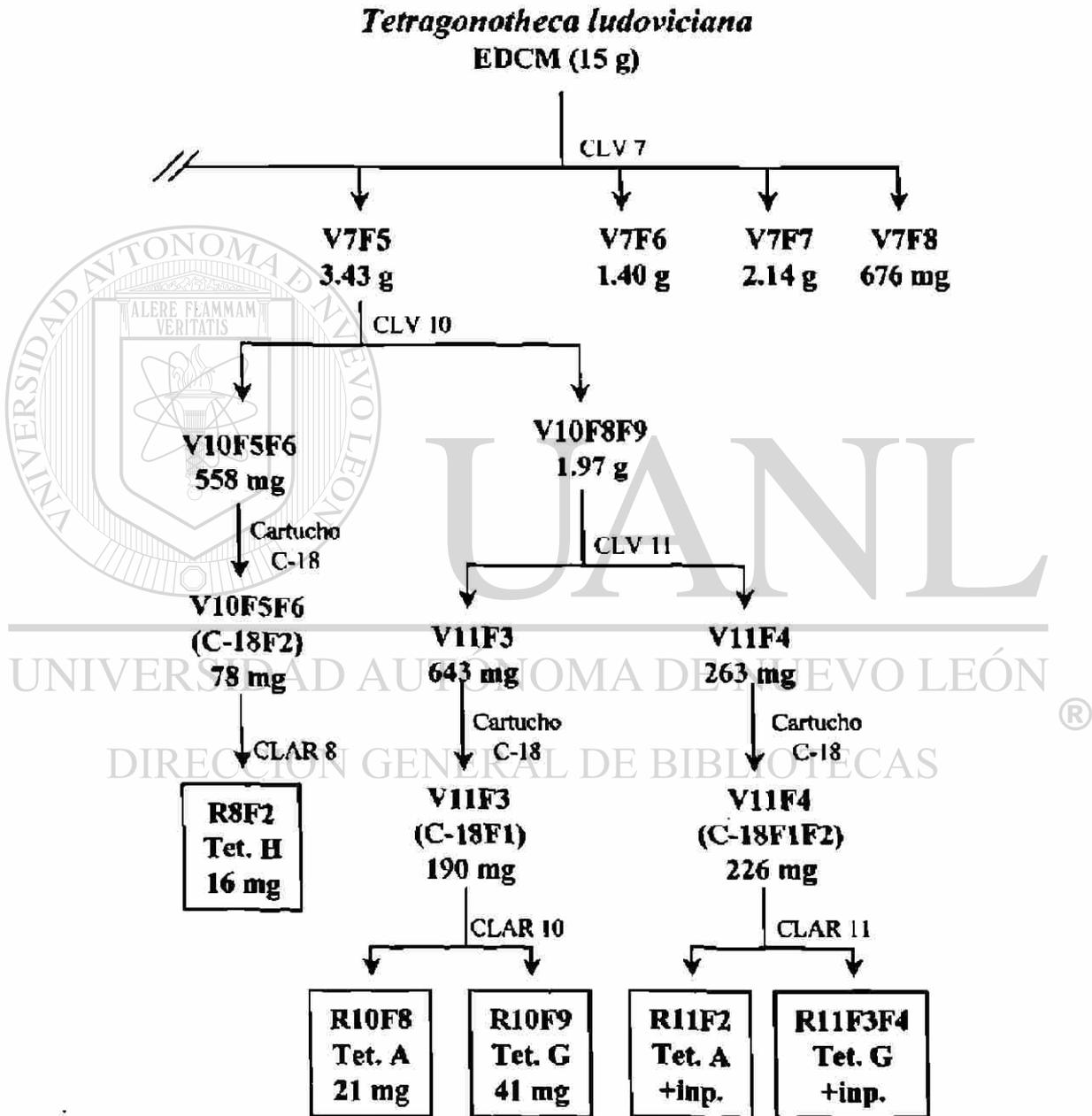


DIAGRAMA 4

CONTINUACION DEL AISLAMIENTO DE COMPUESTOS
DEL EXTRACTO DE DCM DE *T. ludoviciana*.



2.4. ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA.

- a). Espectro de ^1H -RMN
- b). Espectro de ^{13}C -RMN
- c). Espectro RMN de doble dimensión.
- d). Difracción de rayos X.

2.5. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

2.5.1. Ensayo antimalaria-parásito deshidrogenasa láctica (DHL).

Se preparó una suspensión de células rojas con un 2% de parasitemia y 2% hematocrito en medio completo de malaria. Se dispensaron alícuotas de 200 μL de esta suspensión en cada celda de un plato microtitulador de fondo plano con 96 celdas. Se añadieron volúmenes de 10 μL del compuesto a probar por duplicado en la celda apropiada. Se colocaron los platos en la cámara húmeda con una mezcla de gas de 90% N_2 , 5% O_2 y 5% CO_2 y se incubaron a 37 °C por 48 horas. Después de 48 horas, se añadieron alícuotas de 100 μL del reactivo Malstat a cada celda de un nuevo plato microtitulador de 96 celdas. Se resuspendieron los cultivos del primer plato, mezclando varias veces cada celda. Se removieron 20 μL de cada celda del cultivo resuspendido y se añadieron al plato que contenía el reactivo de Malstat. Se incubaron los platos a temperatura de laboratorio por 30 min. Después se añadieron a cada celda 20 μL de la mezcla 1:1 de la solución de NBT/PES (2 mg/mL y 0.1 mg/mL, respectivamente). Se incubaron los platos en la oscuridad por 1 hora. La reacción fue detenida con 100 μL de una solución de ácido acético al 5%. El plato se lee a 650 nm. Los datos fueron trasladados a Excel donde fueron generadas las curvas de dosis respuesta.

2.5.2. Bioensayo anti-microbiano.

Los organismos usados en este ensayo incluyeron: *Candida albicans* ATCC 90028, *Cryptococcus neoformans* ATCC 90113, *Aspergillus fumigatus* ATCC 90906, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* resistente a meticilina ATCC 4330 (MRS), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Mycobacterium intracellulare* ATCC 23068. Excepto por *C. neoformans*, el cual es almacenado a -70 °C, todos los organismos fueron almacenados a 4 °C en agar en tubo inclinado hasta su uso [*C. albicans* en agar Sabouraud Dextrosa (Difco, Detroit), *S. aureus*, MRS y *P. aeruginosa* en agar Eugon (Difco, Detroit), *M. intracellulare* en agar Lowenstein-Jensen (BBL, Maryland), y *A. fumigatus* en agar YM (Difco, Detroit)]. Los agares frescos en tubo inclinado se prepararon cada dos semanas a partir de cultivos congelados. Las pruebas de susceptibilidad se realizaron utilizando una versión modificada de los métodos NCCLS.^{19, 20} Excluyendo a *A. fumigatus* (el cual es preparado el día del ensayo), todos los microorganismos se subcultivaron antes del ensayo por suspensión de las células a partir del agar en tubo inclinado o del cultivo congelado en el caldo apropiado e incubando a varias temperaturas y tiempos: *C. albicans* en caldo Dextrosa Sabouraud (Difco, Detroit) por 24 hrs a 37 °C; *C. neoformans* en caldo Dextrosa Sabouraud por 72 hrs a 30 °C; *S. aureus* y MRS en caldo Eugon (BBL, Maryland) por 24 hrs a 37 °C; *M. intracellulare* en caldo Middlebrook enriquecido con OADC (BBL, Maryland) por 72 hrs a 37 °C; *P. aeruginosa* en caldo Eugon por 6 hrs a 37 °C.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los inóculos de *C. albicans*, *C. neoformans*, *S. aureus*, MRS y *P. aeruginosa*, fueron preparados diluyendo el organismo subcultivado en su caldo de incubación. La dilución fue estandarizada a 0.5 del estándar de McFarland (suspensión de BaSO₄), la cual se preparó cada semana. Los rangos del inóculo final fueron: *C. albicans*: 1.0 - 4.0X10³, *C. neoformans*: 0.7 - 2.0X10⁵, *S. aureus*: 1.0 - 5.0X10⁵, MRS: 0.2 - 6.0X10⁵ y *P. aeruginosa*: 1.0 - 6.0X10⁵ CFU/mL. *M. intracellulare* se preparó haciendo una dilución 1 a 30 del subcultivo en caldo Middlebrook. El día del ensayo, se preparó el inóculo de *A. fumigatus* removiendo cuidadosamente el crecimiento del agar en tubo

inclinado y transfiriéndolo a 3 mL de solución salina estéril. Esta suspensión se filtró por Miracloth estéril (Calbiochem, La Joya, CA) y fue diluida (por determinación turbidimétrica a 630 nm) en caldo YM a $3.0 - 6.0 \times 10^4$ CFU/mL. Los compuestos o extractos a probar fueron diluidos en DMSO, mediante dilución seriada usando solución salina normal y se transfirieron por duplicado a platos microtituladores de 96 celdas (platos de fondo plano para *C. albicans*, *C. neoformans*, *S. aureus*, MRS y *P. aeruginosa* y platos de fondo redondo para *M. intracellulare* y *A. fumigatus*). Los inóculos microbianos fueron añadidos para llegar a un volumen final de 200 μ L y empezando en una concentración final de 500 μ g/mL para los extractos crudos y de 50 μ g/mL para compuestos puros. Los medicamentos [Ciprofloxacina (ICN Biomedicals, Ohio) para bacterias y Anfotericina B (ICN Biomedicals, Ohio) para hongos] así como controles de crecimiento y blanco (solamente el medio) fueron añadidos a cada plato. Excepto para *M. intracellulare* y *A. fumigatus*, los cuales fueron inspeccionados visualmente, los organismos restantes fueron leídos turbidimétricamente a 630 nm usando el EL-340 Biokinetics Reader (Bio-Tek Instruments, Vermont) antes y después de la incubación: *C. albicans*, *S. aureus*, MRS y *P. aeruginosa* a 37 °C por 24 hrs, *C. neoformans* y *A. fumigatus* a 30 °C por 72 hrs. Para los organismos leídos turbidimétricamente, el porcentaje de crecimiento se calculó y graficó versus concentración para obtener la IC₅₀ y para compuestos puros solamente, se calculó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración fungicida o bactericida mínima (CMF/CMBs). Excepto por *M. intracellulare*, la CMI se define como la menor concentración con la que no se detecta crecimiento visual. Para *M. intracellulare*, la CMI se define como la menor concentración probada que inhibe significativamente el crecimiento. Las concentraciones fungicida o bactericida mínimas fueron determinadas por remoción de 5 mL de cada duplicado, transferidas al agar e incubadas a las temperaturas y tiempos previamente mencionados. La CMF/CMB se define como la menor concentración probada de la muestra que elimina el 100% de los organismos.

2.5.3. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria, tumorigénica y apoptótica.

2.5.3.1. Material:

Medio de Eagle modificado Dulbecco/ mezcla de nutrientes Ham F12 (DMEM/F12) de JRH Biosciences (Lenexa, KS). El suero fetal bovino (FBS) de Atlanta Biologicals (Norcross, GA). El medio RPMI 1640 de Gibco. El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) recombinante humano, forbol 12-miristato 1-acetato (PMA), DAPI, MTT, yoduro de propidio (PI) y ribonucleasa-tipo 1A de Sigma Chemical Co. Reactivos para el ensayo de luciferasa de Analytical Luminescence (San Diego, CA). Isoton II, fluido acarreador usado en la citometría de flujo de Becton Dickson. PGE2 EIA kit de Cayman Chemical.

2.5.3.2. Cultivo celular:

Todas las líneas celulares utilizadas en este estudio fueron obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). La línea celular de condrosarcoma humano SW1353 fue cultivada en una mezcla 1:1 de DMEM/F12, suplementado con 10 % de FBS, y 10,000 U/mL de penicilina G de sodio o 10,000 μ g/mL de estreptomycin y fungizona. Las células de MCF-7 (carcinoma humano de seno), BT 549 (carcinoma humano ductal de seno), SK-OV3 (carcinoma humano de ovario) y HL 60 (leucemia humano) fueron crecidas como monocapas en DMEM con 10 % de FBS. Todas las células fueron cultivadas en un frasco tratado para cultivo de tejidos a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % de humedad.

2.5.3.3. Plásmidos:

El cDNA COX-2 humano fue generosamente donado por el Dr. Stephen M. Prescott (University of Utah, Salt Lake City, UT). Para crear la proteína activadora-1 4 (4-AP-1) utilizada, cuatro copias de un sitio de unión de AP-1 sintético (TGAGTCA)

fueron insertadas en el sitio *Bell II* de *pIAP1-LUC*. El plásmido de luciferasa *IAP1-LUC* utilizado fue construido insertando un promotor mínimo de rata sintético *CYP1A1* (bases -1 a -44) 5' a el gen *luc*^r en una versión modificada del vector pGL3-Basic (Promega). El factor nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) construido contiene dos copias de este elemento provenientes del promotor de inmunoglobulina K. (*pBIIXLUC*) y fue donado por el Dr. Ricardo Dalla-Favera. El plásmido *Sp-1* (pGL3-promotor) fue obtenido de Promega.

2.5.3.4. Ensayo de transfección celular:

Después de tripsinización de las células SW1353, el plato con 1.2×10^7 células/celda fue lavado, primero con antibiótico y FBS-libre de DMEM/F12, y después resuspendido en 500 μg de antibiótico-libre de DMEM/F12 conteniendo 2.5 % de FBS. El plásmido de luciferasa construido fue añadido a la suspensión celular a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de medio e incubado por 5 min a temperatura ambiente. Las células fueron electroporadas en 500 μL de medio a 160 V y un pulso de 70 ms usando cubetas desechables BIX modelo 640 (4 mm) en un BIX Electro Square Porator T820 (BIX, Inc., San Diego, CA). Después de la electroporación e incubación a temperatura ambiente por 10 min, 1.25×10^5 células fueron transferidas a un plato con 200 $\mu\text{L}/\text{celda}$ de DMEM/F12 conteniendo 10 % FBS y antibióticos. Después de 24 h de transfección, las células fueron expuestas a diferentes concentraciones del compuesto a probar por 30 min, después fueron incubadas con medio en presencia de 70 ng/mL de PMA o 50 ng/mL de TNF- α por 8 h adicionales. El medio fue aspirado y las células fueron lisadas por la adición de 40 μL de una mezcla de reactivo LucLite^R y PBS conteniendo calcio y magnesio al 1 mM (Packard Instrument Company, Meriden, CT). La cantidad de luz producida fue detectada en un TopCount^R microplate scintillation en modo de conteo simple-fotón (Packard).

2.5.3.5. Determinación de la actividad enzimática de COX-2:

Los macrófagos de ratón (RAW 264.7) fueron sembrados en un plato con 96 celdas (50,000 células/celda) e incubados a 37 °C por 24 h. El lipopolisacárido (LPS, 5 µg/mL) fue añadido a cada celda e incubado por 16 h para inducir la producción de COX-2. El compuesto a probar fue añadido a la más alta concentración (25 µg/mL) y fue incubado por 2 h. Después las células fueron incubadas con ácido araquidónico (300 mM) por 30 min. La actividad de COX-2 fue determinada midiendo el nivel de PGE2 en el medio usando el inmunoensayo enzimático (PGE2 kit).

2.5.3.6. Ensayo de inhibición del crecimiento celular:

La inhibición del crecimiento celular de MCF-7, BT 549 y SK-OV3 fue llevado a cabo mediante el ensayo de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio). Las células en crecimiento logarítmico fueron sembradas a una densidad de 25,000 células/celda en un placa con 96 celdas y se cultivaron por 24 h. Después, éstas se incubaron en presencia o ausencia del compuesto a probar por 48 h a 37 °C. Se adicionaron 50 µL de MTT de 1 mg/mL a cada celda y los placas se incubaron a 37 °C en 5 % de CO₂ por 4 h. Los cristales azules formados en cada celda fueron disueltos en 150 µL de DMSO. La absorbancia fue medida a 540 nm usando un lector de microplacas Bio-Kinetics (CEL 312e, Bio-Teck, Instruments). Las células de leucemia HL 60 fueron sembradas a una concentración de 100,000 células/celda en una placa de 24 celdas y se permitió el crecimiento de las mismas por 24 h antes de la adición de los compuestos a probar. Después de 48 h de incubación con los compuesto a 37 °C, el conteo celular fue llevado a cabo mediante el método de exclusión del azul de tripano para determinar viabilidad celular. La actividad inhibitoria de crecimiento celular de los compuestos fue expresada como IC₅₀, la concentración que causa el 50 % de inhibición de crecimiento comparada contra el control.

3.5.3.7. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo:

Las células (1×10^5 /mL) fueron sembradas en frascos tratados para cultivo de tejido de 25 cm^2 (7 mL/frasco) y fueron cultivadas por 24 h antes de la adición del compuesto. Después de 6, 12, 24 y 48 h de incubación con $3 \mu\text{g/mL}$ de tetraludina A o repandina D a 37°C , aproximadamente 2×10^5 células fueron colectadas por centrifugación a 1000 rpm por 5 min. El paquete celular fue fijado en 1 mL de etanol al 70 % a 4°C y almacenado a -20°C . Las muestras fueron lavadas con PBS dos veces antes del ensayo de ciclo celular. La tinción de DNA fue realizada por adición de $200 \mu\text{L}$ de ioduro de propidio ($50 \mu\text{g/mL}$ en PBS) y $50 \mu\text{L}$ de RNAasa (concentración final de $40 \mu\text{g/mL}$) a cada muestra. El contenido de DNA celular fue medido por un citómetro de flujo Facscan. Aproximadamente 10^4 células fueron analizadas por cada histograma. Las muestras fueron excitadas a 380-410 nm y la fluorescencia resultante fue medida a longitudes de onda mayores a 550 nm. El análisis del porcentaje de células en fase G1, S y G2+M del ciclo celular fue hecho en el programa Cellquest (Dickinson, CA).

3.5.3.8. Ensayo de tinción DAPI:

El ensayo de tinción DAPI fue usado para determinar si el mecanismo de inhibición del crecimiento estaba relacionado con la inducción de la apoptosis. Después del tratamiento de las células con el compuesto ($3 \mu\text{g/mL}$) por 48 h, las células fueron colectadas por centrifugación a $2000 \times g$ por 15 min. Se lavaron con buffer de PBS helado y se fijaron en una solución de formaldehído al 3.7 % por 10 min. Las células fijadas fueron teñidas con $4 \mu\text{g/mL}$ de DAPI por 15 min. La morfología nuclear de las células fue observada en un microscopio de fluorescencia.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1. COMPUESTOS AISLADOS DEL EXTRACTO DE DCM DE *T. repanda*.

Se aislaron seis compuestos a partir del extracto semipolar de *Tetragonotheca repanda*. El extracto fue fraccionado de acuerdo a los diagramas 1 y 2.

Fracciones R1F2, R2F4 y R3F4:

a). Cromatograma (CLAR semipreparativo): t_R de 6.98 min. (Fig. 11-C).

b). Espectro de ^1H -RMN (Fig. 12).

c). Espectro de ^{13}C -RMN (Fig. 13c).

d). Espectro DEPT-135 (Fig. 13d).

Mediante espectroscopía y los datos reportados en la literatura¹³ se determinó que las fracciones R1F2, R2F4 y R3F4, con un peso aproximado de 52 mg, corresponden al melampólido llamado Repandin C o 9 α -isobutiriloxirepandanólido-8-O-epoxiangelato ($\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_{10}$) el cual se muestra en la Figura 23.

Fracciones R1F4, R2F6 y R3F6:

- a). Cromatograma (CLAR semipreparativo): t_R de 8.08 min. (Fig. 11-D).
- b). Espectro de ^1H -RMN (Fig. 14).
- c). Espectro de ^{13}C -RMN (Fig. 15c).
- d). Espectro DEPT-135 (Fig. 15d).
- e). Espectro COSY (Fig. 16).
- f). Espectro HMQC (Fig. 17).

Mediante espectroscopía y los datos reportados en la literatura¹³ se determinó que las fracciones R1F4, R2F6 y R3F6, con un peso aproximado de 94 mg, corresponden al melampólido llamado **Repandin D** o 9α -[2-metilbutiriloxi]-repandanolide-8-*O*-epoxiangelato ($\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_{10}$), el cual se muestra en la Figura 23.

Fracción R1F7:

- a). Cromatograma (CLAR semipreparativo): t_R de 9.70 min. (Fig. 11-E).
- b). Espectro de ^1H -RMN (Fig. 18).
- c). Espectro de ^{13}C -RMN (Tabla 2).
- d). Espectro DEPT 135 (Tabla 2).

Mediante espectroscopía y los datos reportados en la literatura¹⁴ se determinó que la fracción R1F7, con un peso aproximado de 15 mg, corresponde al melampólido llamado **Repandin E** o 9α -isobutiriloxirepandanolide-8-*O*-angelato ($\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{O}_9$). Su estructura se muestra en la Figura 23.

Fracción R1F10:

- a). Cromatograma (CLAR semipreparativo): t_R de 11.98 min. (Fig.11-F).
- b). Espectro de ^1H -RMN (Fig. 19).

Mediante espectroscopía y los datos reportados en la literatura¹⁴ se determinó que la fracción R1F10, con un peso aproximado de 7 mg, corresponden al melampólido llamado **Repandin F** o 9α -[2-metilbutiriloxi]-repandanolide-8-*O*-angelato ($\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_9$). Su estructura se muestra en la Figura 23.

Fracciones R4F2 y R5F2:

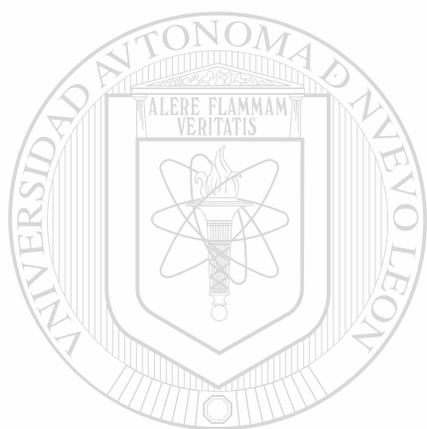
- a). Cromatograma (CLAR semipreparativo): t_R de 6.38 min. (Fig. 20-A).
- b). Espectro de ^1H -RMN (Fig. 21).
- c). Espectro de ^{13}C -RMN (Tabla 2).
- d). Espectro DEPT 135 (Tabla 2).

Mediante espectroscopía y los datos reportados en la literatura¹³ se determinó que las fracciones R4F2 y R5F2, con un peso aproximado de 121 mg, corresponden al melampólido llamado **Repandin A** o 9α -isobutiriloxirepandanolide-8-*O*-sarracinato ($\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_{10}$), el cual se muestra en la Figura 24.

Fracciones R4F4 y R5F4:

- a). Cromatograma (CLAR semipreparativo): t_R de 7.35 min. (Fig. 20-B).
- b). Espectro de ^1H -RMN (Fig. 22).
- c). Espectro de ^{13}C -RMN (Tabla 2).
- d). Espectro DEPT 135 (Tabla 2).

Mediante espectroscopía y los datos reportados en la literatura,¹³ se determinó que las fracciones R4F4 y R5F4, con un peso aproximado de 126 mg, corresponden al melampólido llamado **Repandin B** o 9 α -[2-metilbutiriloxi]-repandanolide-8-*O*-sarracinato (C₂₆H₃₄O₁₀), el cual se muestra en la Figura 24.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

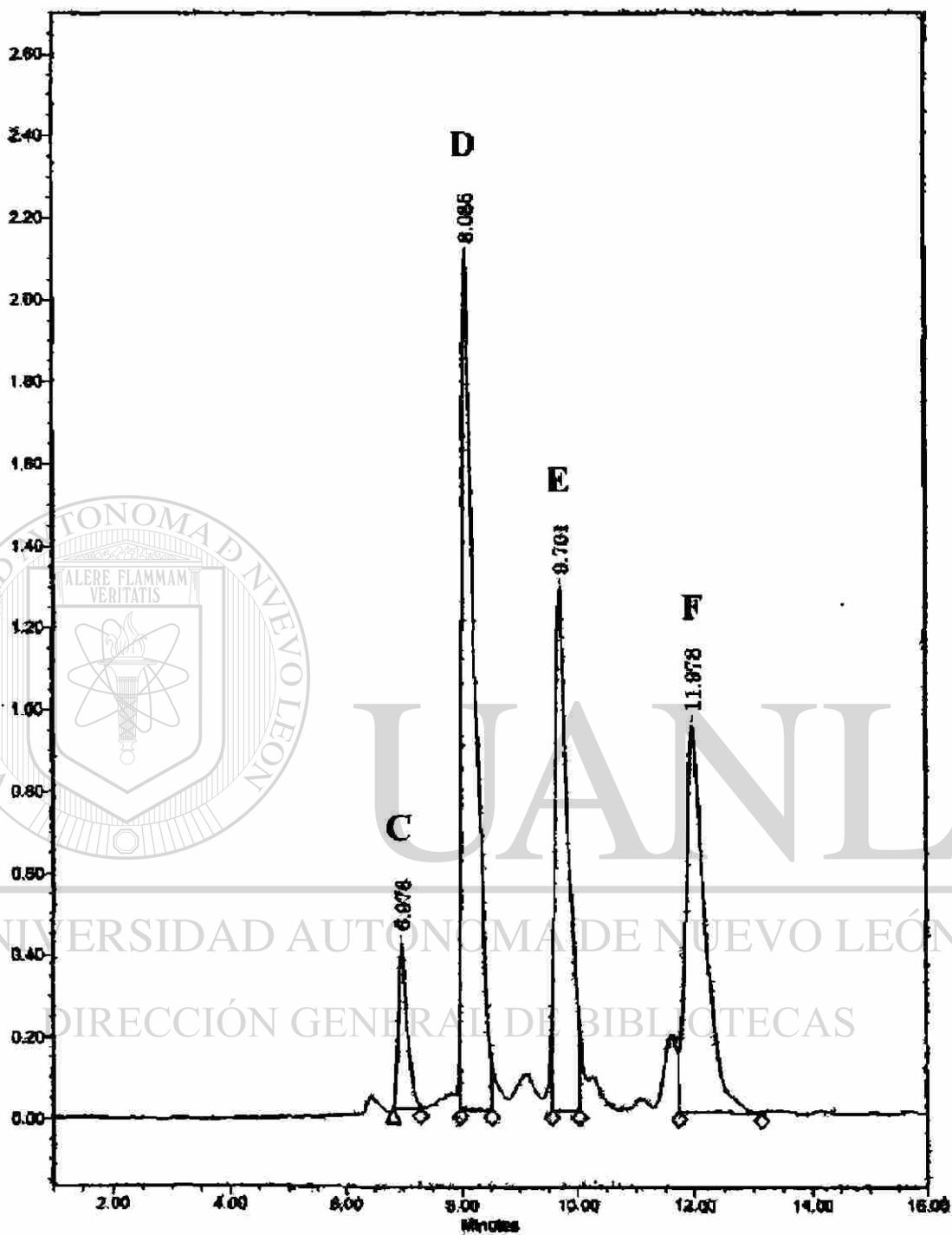


Fig. 11. Cromatograma que muestra el t_R de los repandines C, D, E y F en CLAR semipreparativo.

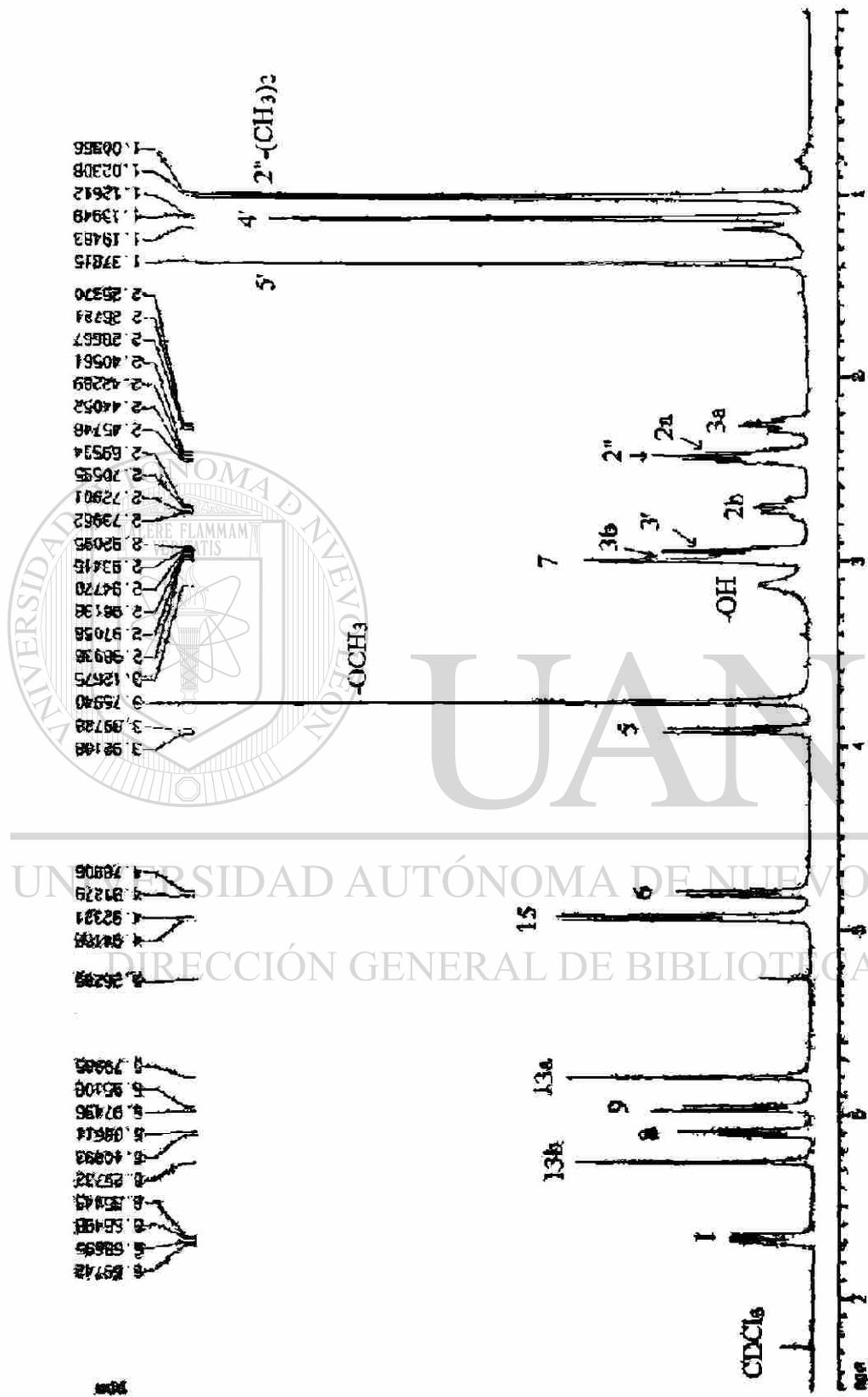


Fig. I.2. Espectro 1H -RMN del repandin C (400 MHz).

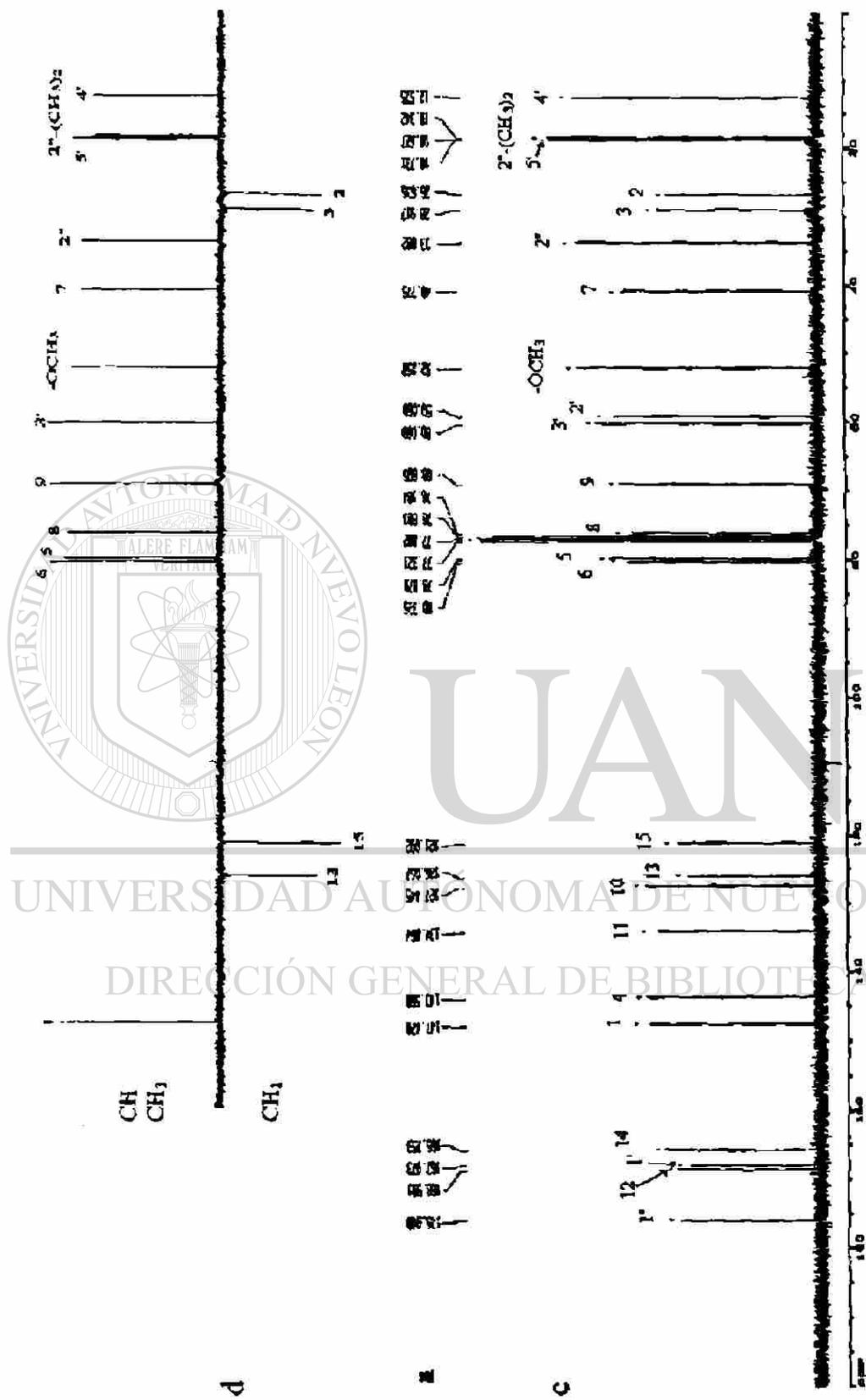


Fig. 13. Espectros del repandin C. c). ^{13}C -RMN y d). -DEPT 135 (0-160 ppm).

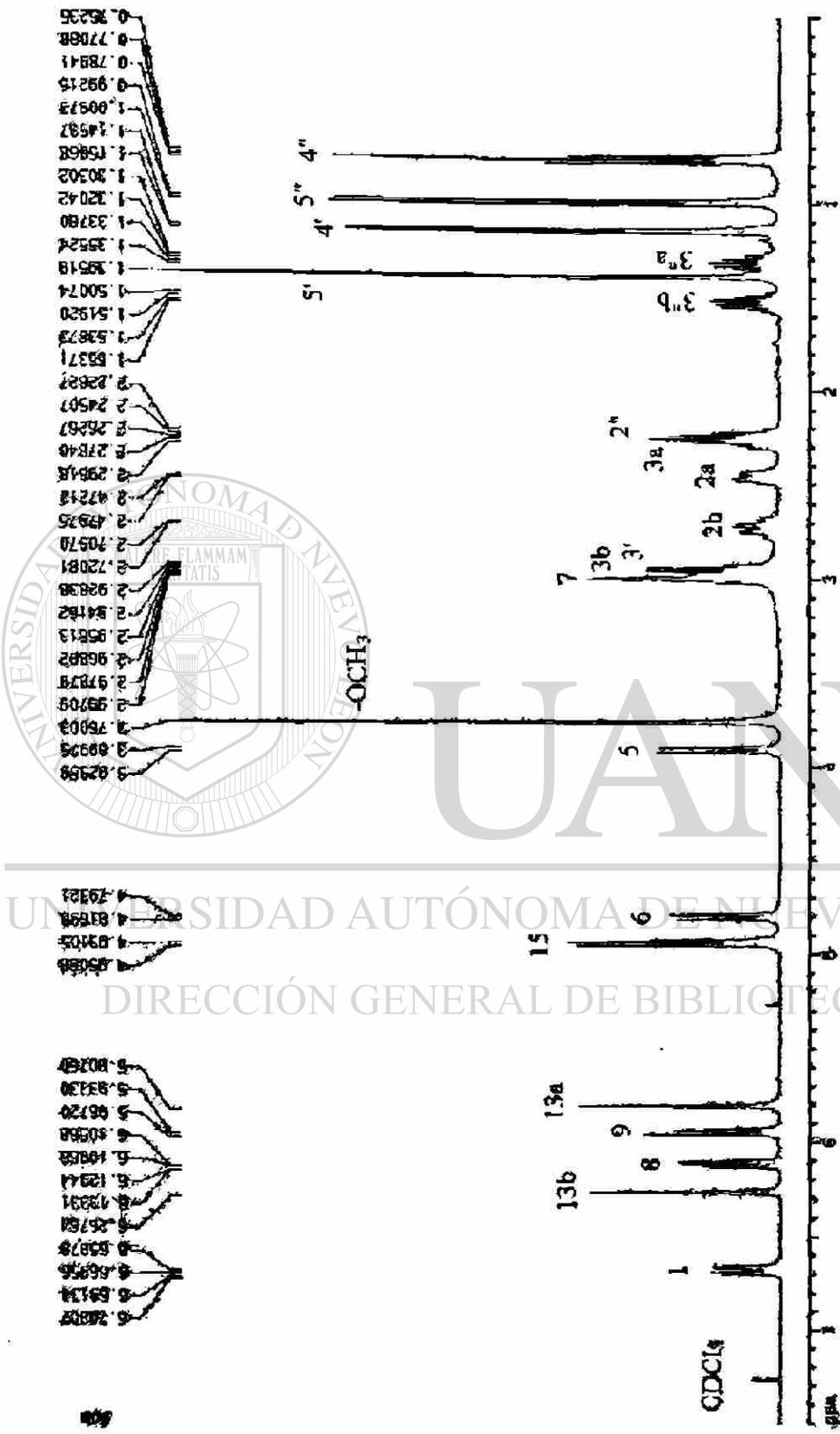


Fig. 14. Espectro ¹H-RMN del repandin D (400 MHz).

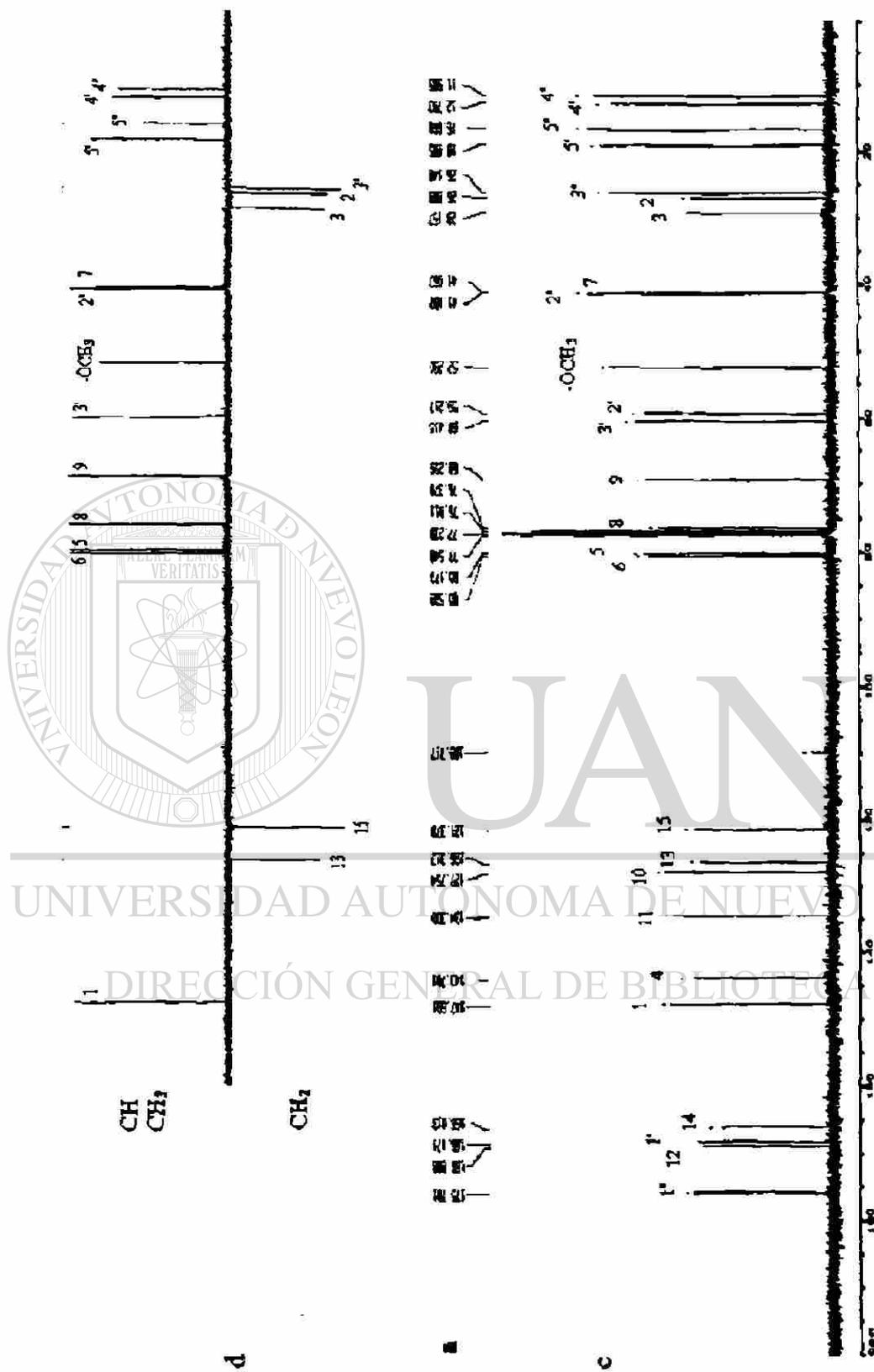


Fig. 15. Espectros del repandin D. c). ^{13}C -RMN y d).- DEPT 135 (0-160 ppm).

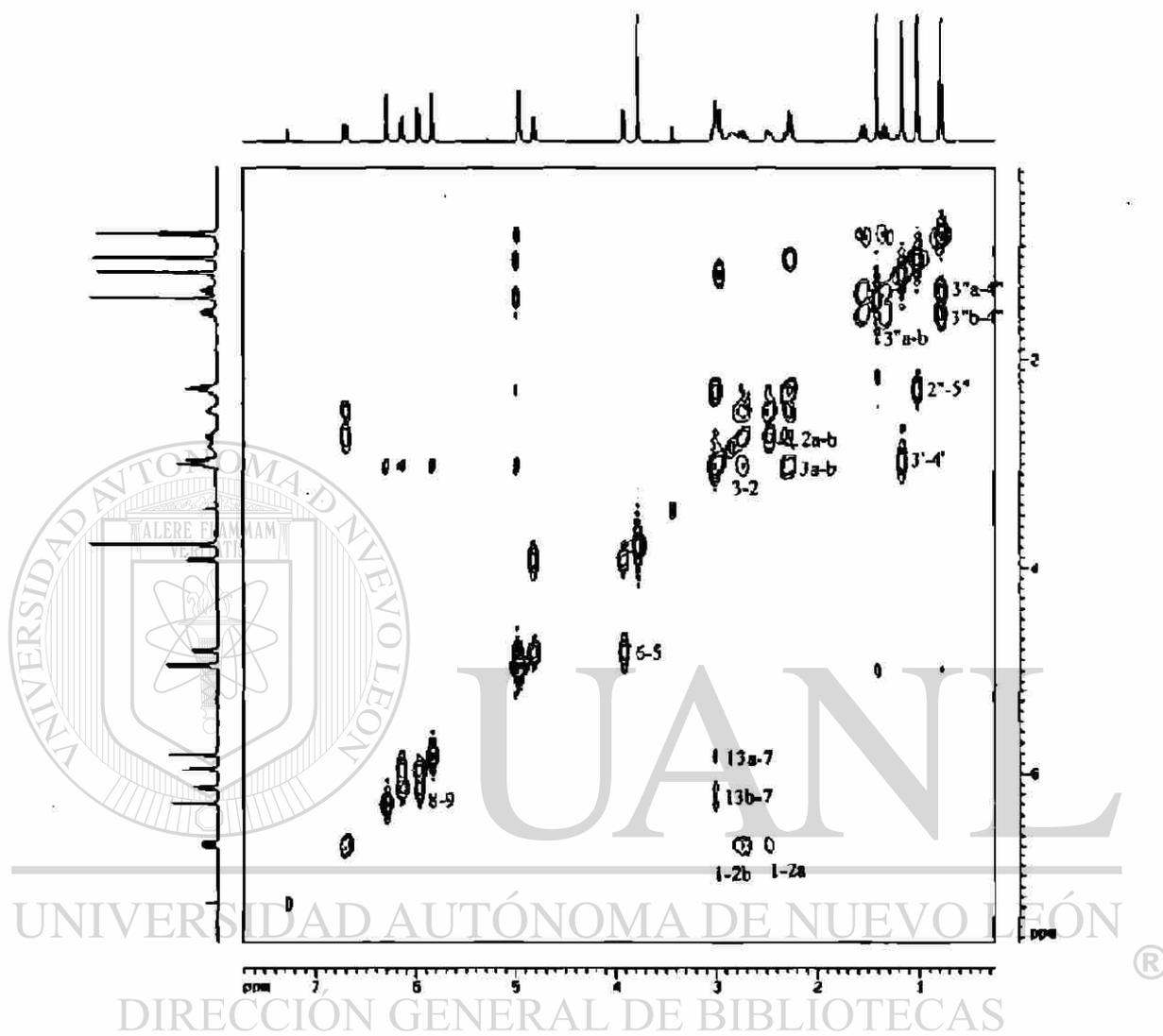


Fig. 16. Espectro ^1H - ^1H COSY en 400 MHz del repandin D.

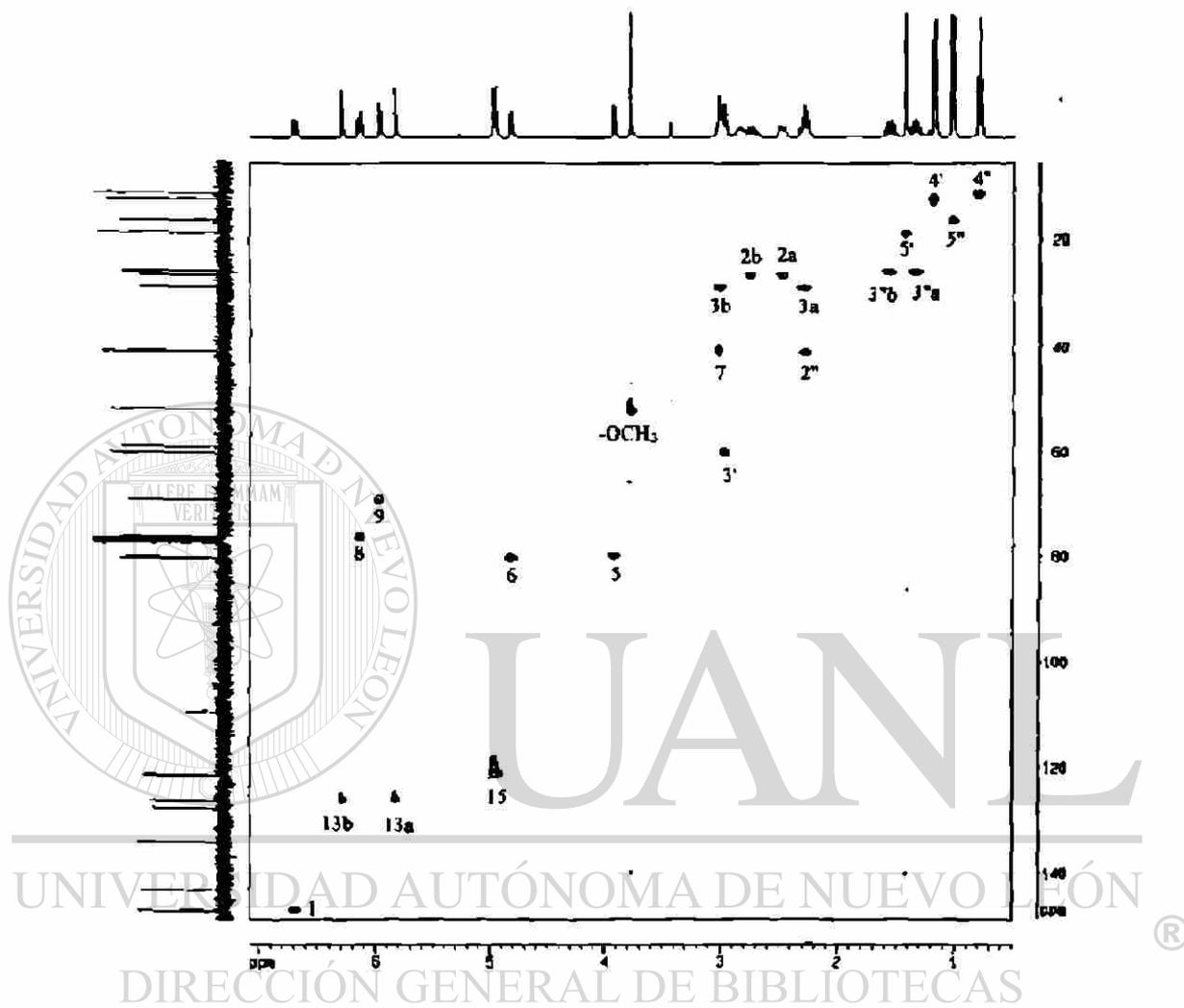


Fig. 17. Espectro de correlación ^1H - ^{13}C (HMOC) en 400 MHz del repandin D.

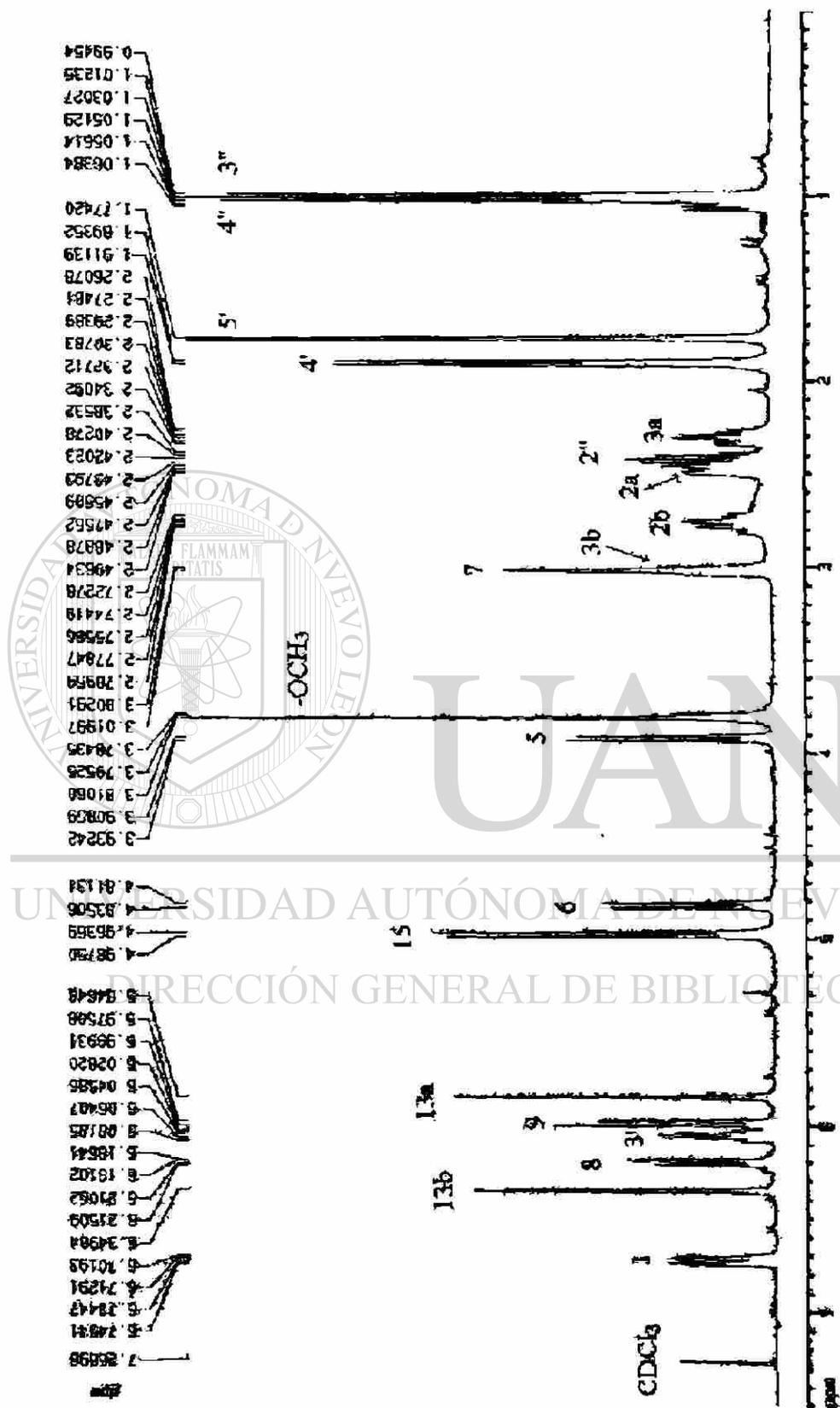


Fig. 18. Espectro ¹H-RMN del repandin E (400 MHz).

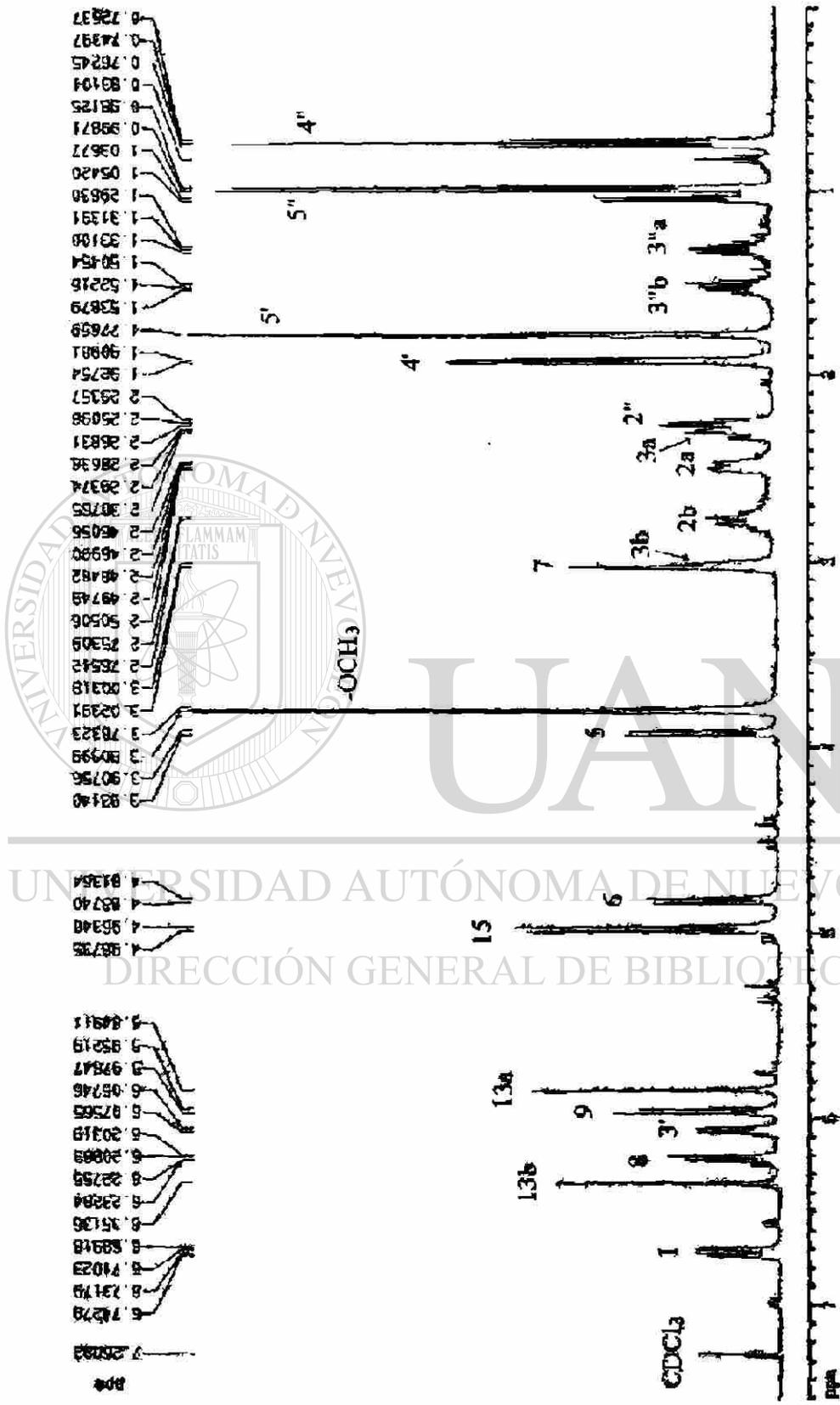


Fig. 19. Espectro ¹H-RMN del repandin F (400 MHz).

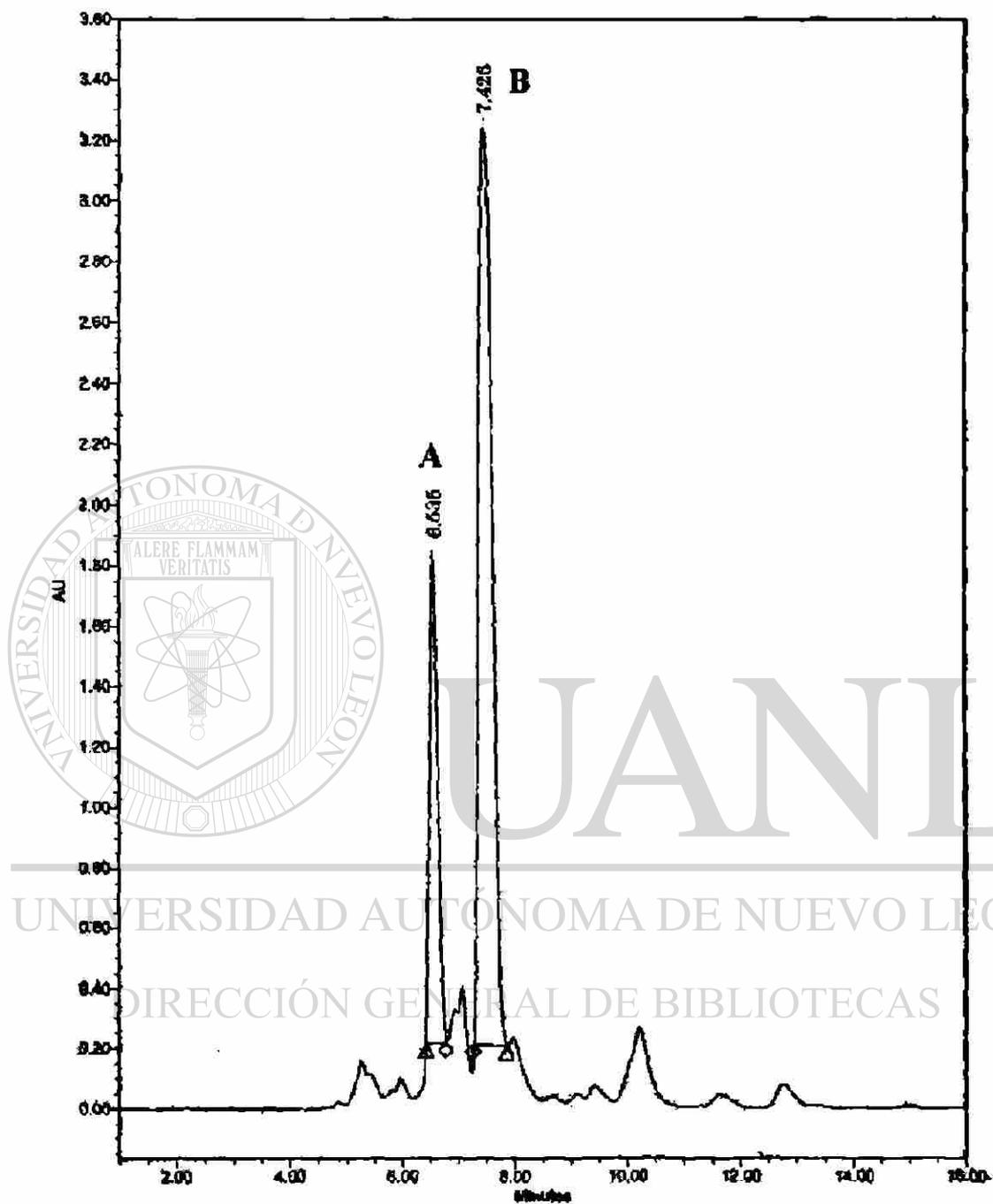


Fig. 20. Cromatograma que muestra el t_R de los repandines A y B en CLAR semipreparativo.

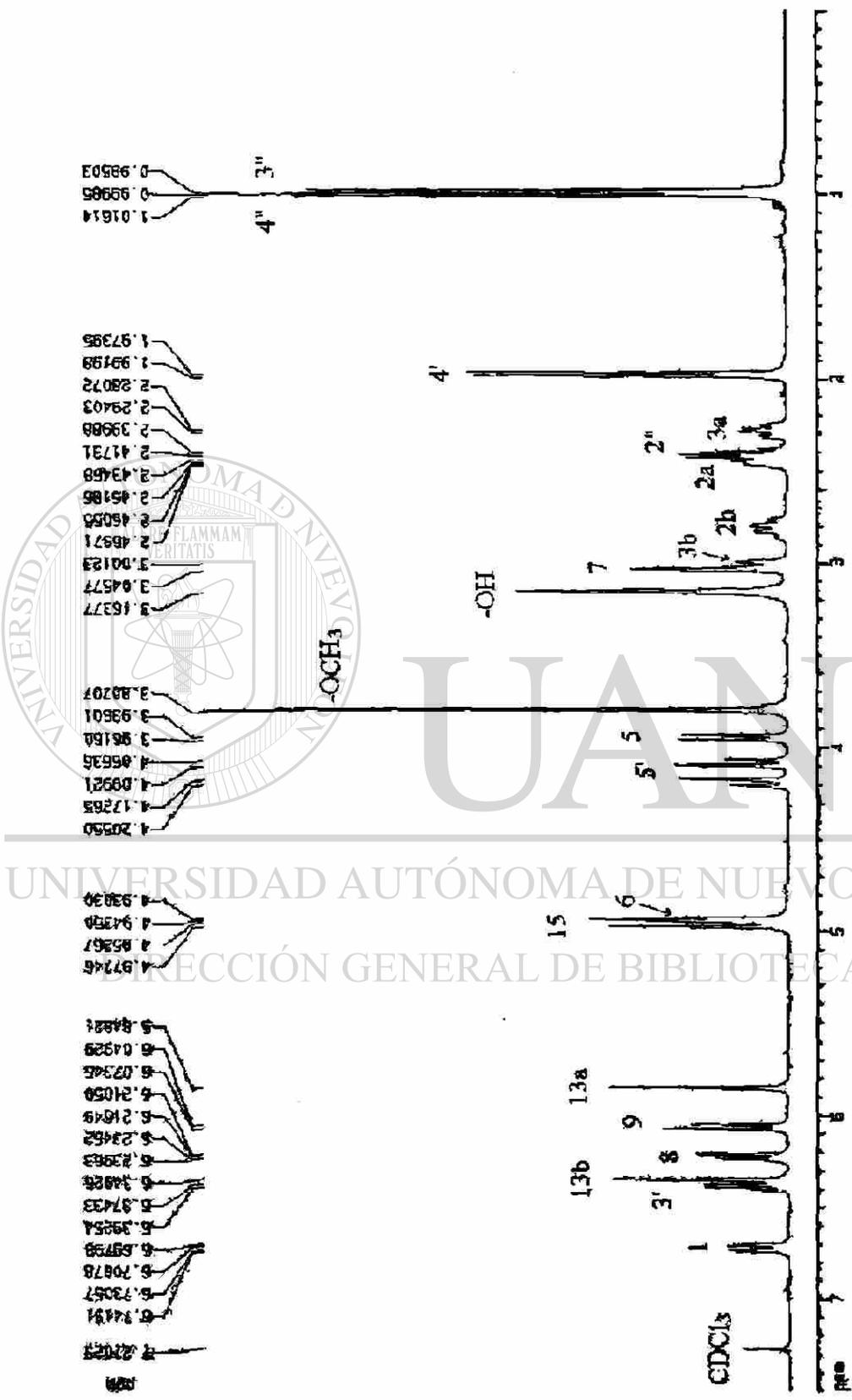
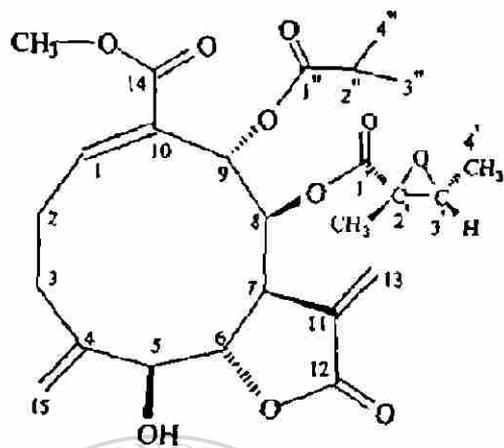


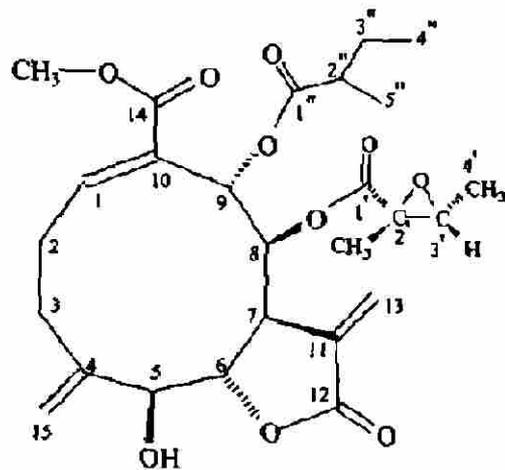
Fig. 21. Espectro ¹H-RMN del repandin A (400 MHz).

Tabla 2. Datos espectrales de ^{13}C -RMN y DEPT 135 de los repandines A, B y E (CDCl_3).

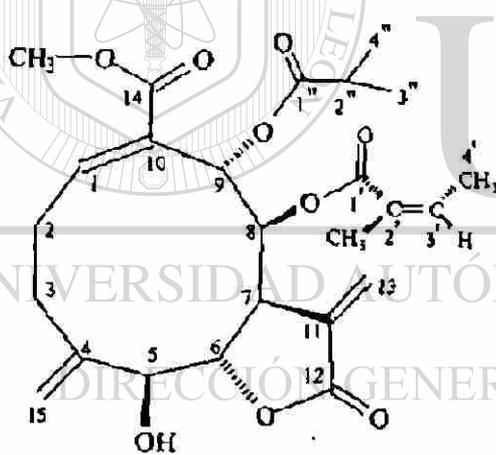
Carbono	A δ ppm (DEPT 135)	B δ ppm (DEPT 135)	E δ ppm (DEPT 135)
C-1	147.78 (CH)	147.58 (CH)	147.45 (CH)
C-2	26.95 (CH_2)	26.11 (CH_2)	26.74 (CH_2)
C-3	29.44 (CH_2)	26.67 (CH_2)	29.02 (CH_2)
C-4	144.07 (C)	143.88 (C)	143.47 (C)
C-5	80.31 (CH)	80.01 (CH)	80.26 (CH)
C-6	80.90 (CH)	80.67 (CH)	80.45 (CH)
C-7	41.25 (CH)	40.99 (CH)	40.95 (CH)
C-8	74.81 (CH)	74.40 (CH)	74.11 (CH)
C-9	69.31 (CH)	69.17 (CH)	69.15 (CH)
C-10	126.53 (C)	126.30 (C)	126.66 (C)
C-11	134.30 (C)	134.07 (C)	134.05 (C)
C-12	169.39 (C)	169.24 (C)	168.69 (C)
C-13	126.53 (CH_2)	126.30 (CH_2)	126.14 (CH_2)
C-14	165.01 (C)	164.68 (C)	165.79 (C)
C-15	121.23 (CH_2)	120.90 (CH_2)	121.32 (CH_2)
-OCH ₃	52.34	52.63	52.11
C-1'	166.13 (C)	165.89 (C)	165.92 (C)
C-2'	130.77 (C)	130.41 (C)	127.78 (C)
C-3'	142.94 (C)	142.79 (C)	140.10 (C)
C-4'	15.68 (CH_3)	15.48 (CH_3)	15.60 (CH_3)
C-5'	63.91 (CH_2)	63.50 (CH_2)	20.16 (CH_3)
C-1''	176.72 (C)	175.93 (C)	176.12 (C)
C-2''	34.05 (CH)	40.99 (CH)	33.81 (CH)
C-3''	18.67 (CH_3)	26.11 (CH_2)	18.48 (CH_3)
C-4''	18.69 (CH_3)	11.23 (CH_3)	18.49 (CH_3)
C-5''		16.12 (CH_3)	



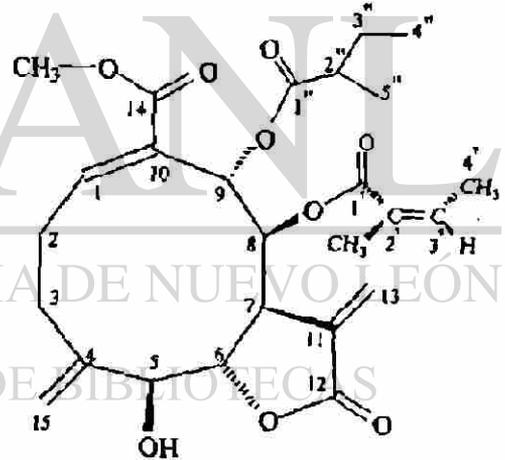
Repandin C



Repandin D

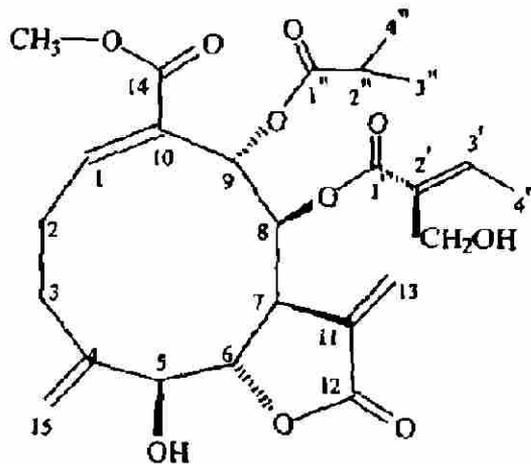


Repandin E

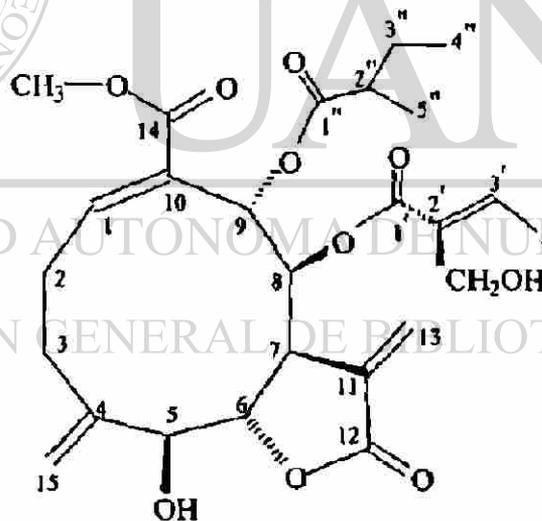


Repandin F

Fig. 23. Estructuras de los repandines C al F aislados de *T. repanda*.



Repandin A



Repandin B

Fig. 24. Estructuras de los repandines A y B aislados de *T. repanda*.

3.2. COMPUESTOS AISLADOS DEL EXTRACTO DE DCM DE *T. ludoviciana*.

Se aislaron tres compuestos a partir del extracto semipolar de *Tetragonotheca ludoviciana*. El extracto fue fraccionado de acuerdo a los diagramas 3 y 4.

Fracciones R7F2, R8F2:

- Cromatograma (CLAR semipreparativo): t_R de 7.11 min. (Fig. 25).
- Espectro de ^1H -RMN (Fig. 26).
- Espectro de ^{13}C -RMN (Fig. 27c).
- Espectro DEPT-135 (Fig. 27d).
- Espectro COSY (Fig. 28).
- Difracción de rayos-X (Fig. 29).

Mediante espectroscopia y los datos reportados en la literatura¹⁶ se determinó que las fracciones R7F2 y R8F2, con un peso aproximado de 41 mg, corresponden al melampólido llamado **Tetraludín H** (C2'-epímeros) ($\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{10}$) el cual se muestra en la Figura 33.

Fracciones R10F8 y R11F2:

- Cromatograma (CLAR semipreparativo): t_R de 6.75 min. (Fig. 30-A).
- Espectro de ^1H -RMN (Fig. 31).
- Espectro de ^{13}C -RMN (Tabla 3).
- Espectro DEPT-135 (Tabla 3).

Mediante espectroscopia y los datos reportados en la literatura¹⁵ se determinó que las fracciones R10F8 y R11F2, con un peso aproximado de 21 mg, corresponden al melampólido llamado **Tetraludín A** ($\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_{10}$), el cual se muestra en la Figura 33.

Fracciones R10F9 y R11F3F4:

- a). Cromatograma (CLAR semipreparativo): t_R de 7.17 min. (Fig. 30-G).
- b). Espectro de ^1H -RMN (Fig. 32).
- c). Espectro de ^{13}C -RMN (Tabla 3).
- d). Espectro DEPT-135 (Tabla 3).

Mediante espectroscopia y los datos reportados en la literatura¹⁶ se determinó que las fracciones R10F9 y R11F3F4, con un peso aproximado de 41 mg, corresponden al melampólido llamado **Tetraludin G** ($\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_{10}$), el cual se muestra en la figura 33.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

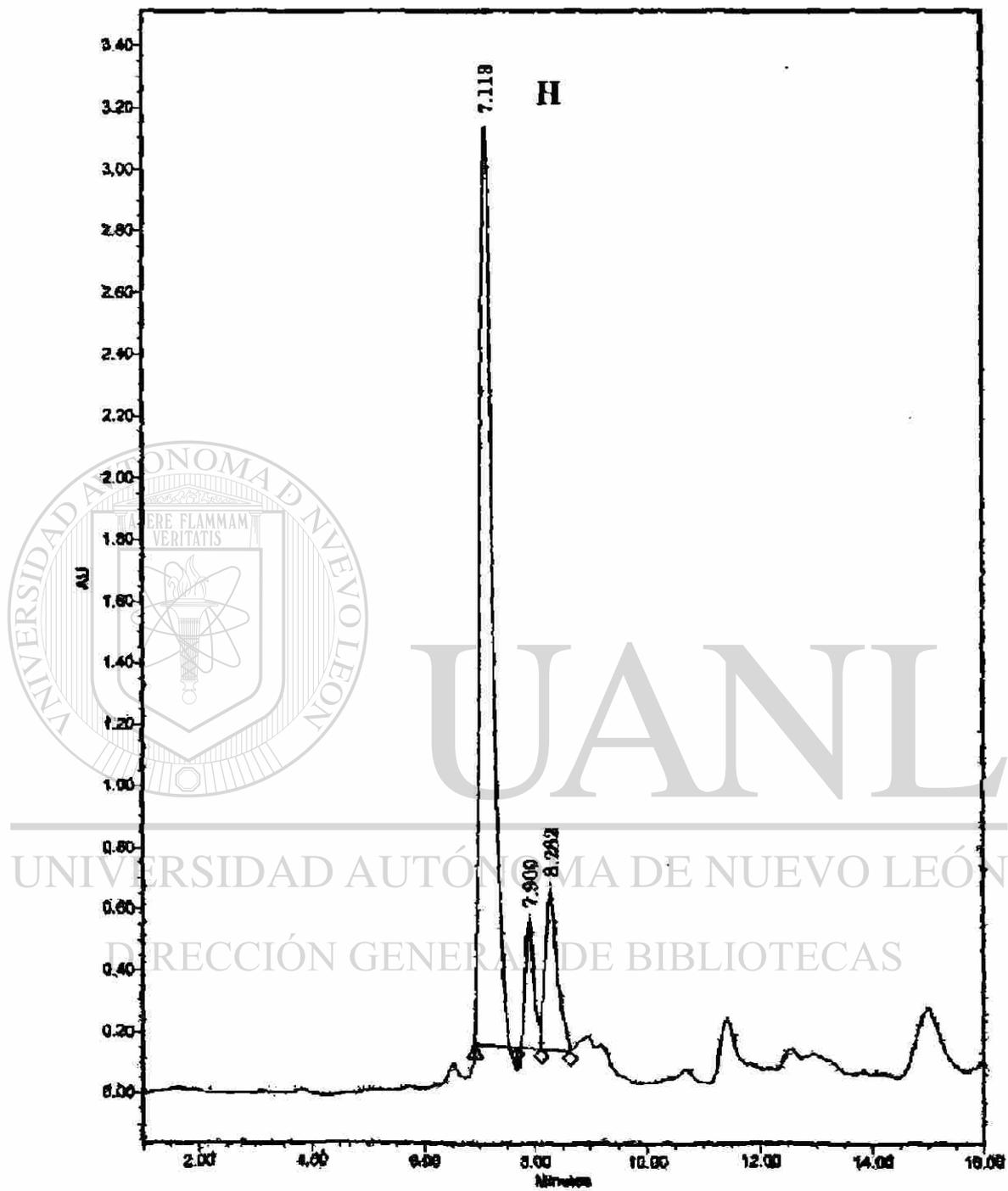


Fig. 25. Cromatograma del tetraludin H en CLAR semipreparativo.

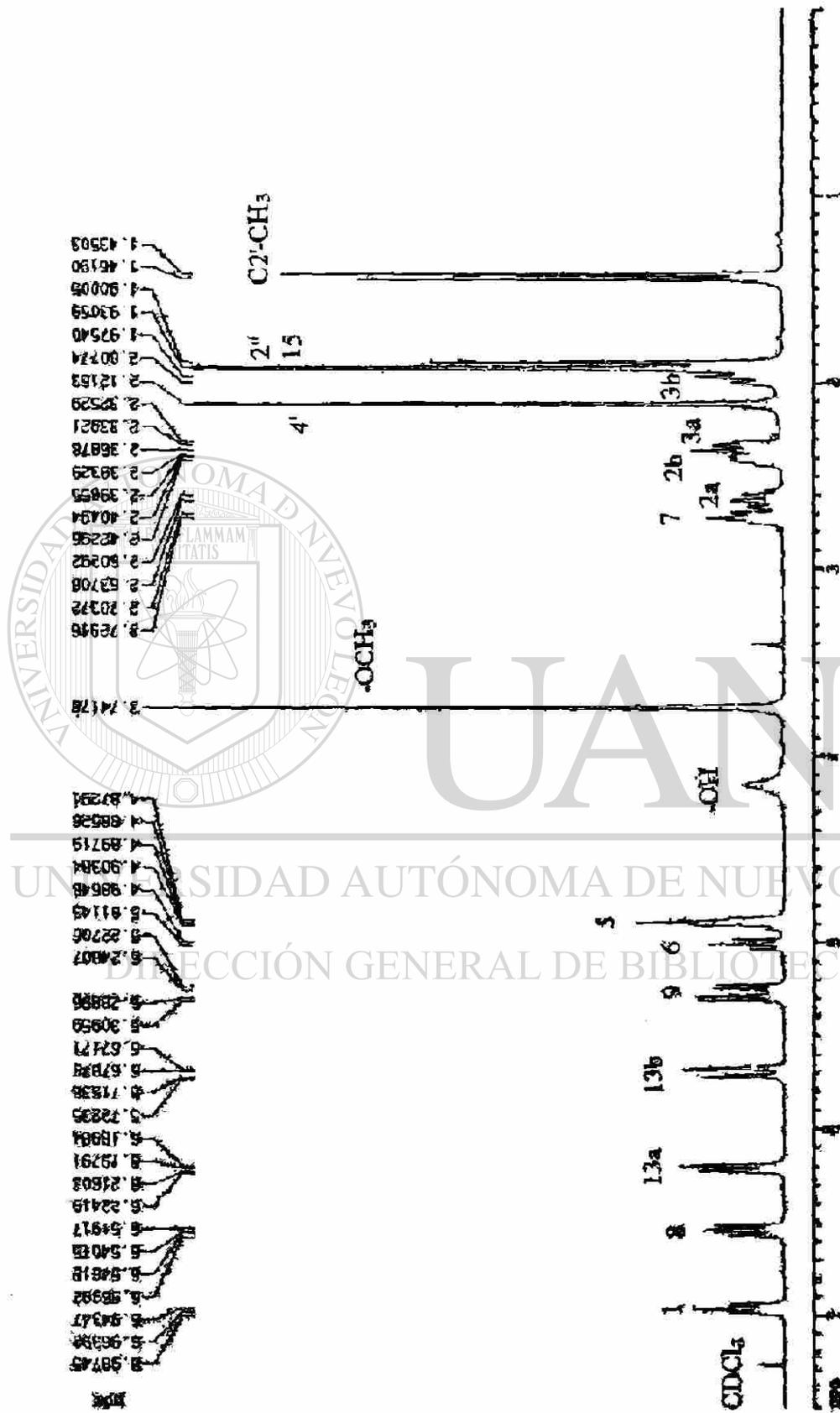


Fig. 26. Espectro ¹H-RMN del tetraludin H (400 MHz).

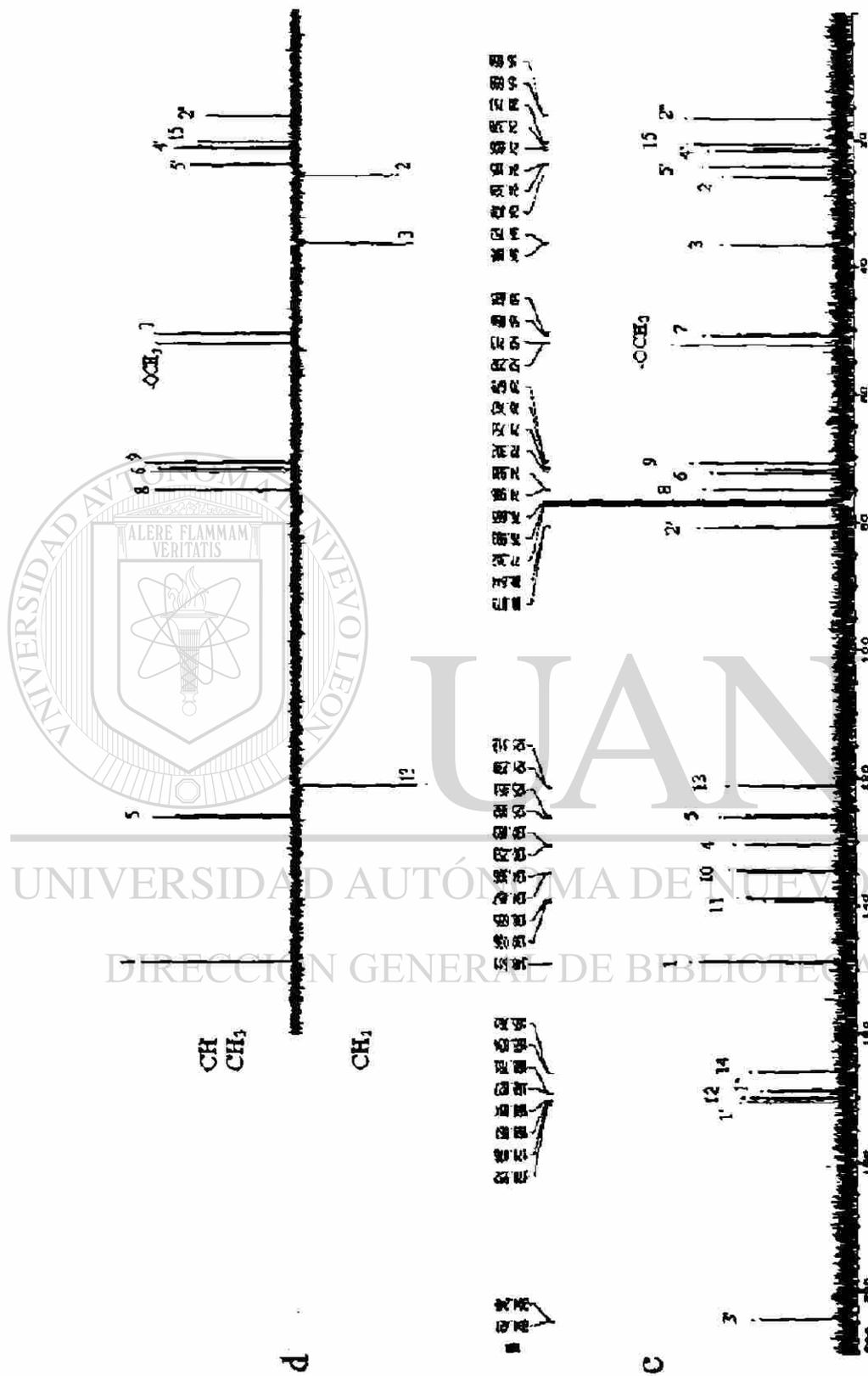


Fig. 27. Espectros del tetraludín H. c).- ¹³C-RMN y d).- DEPT 135 (0-160 ppm).

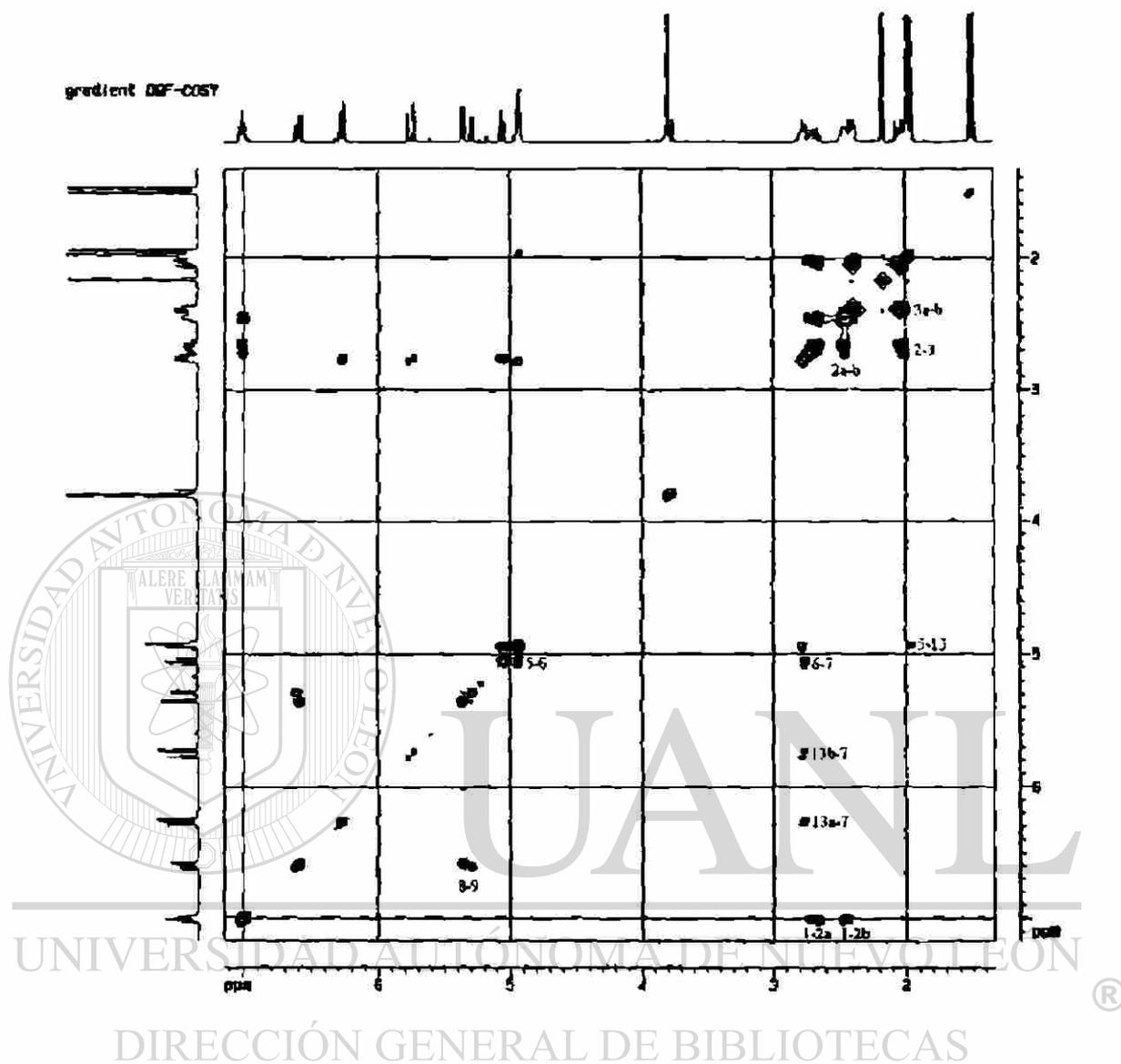
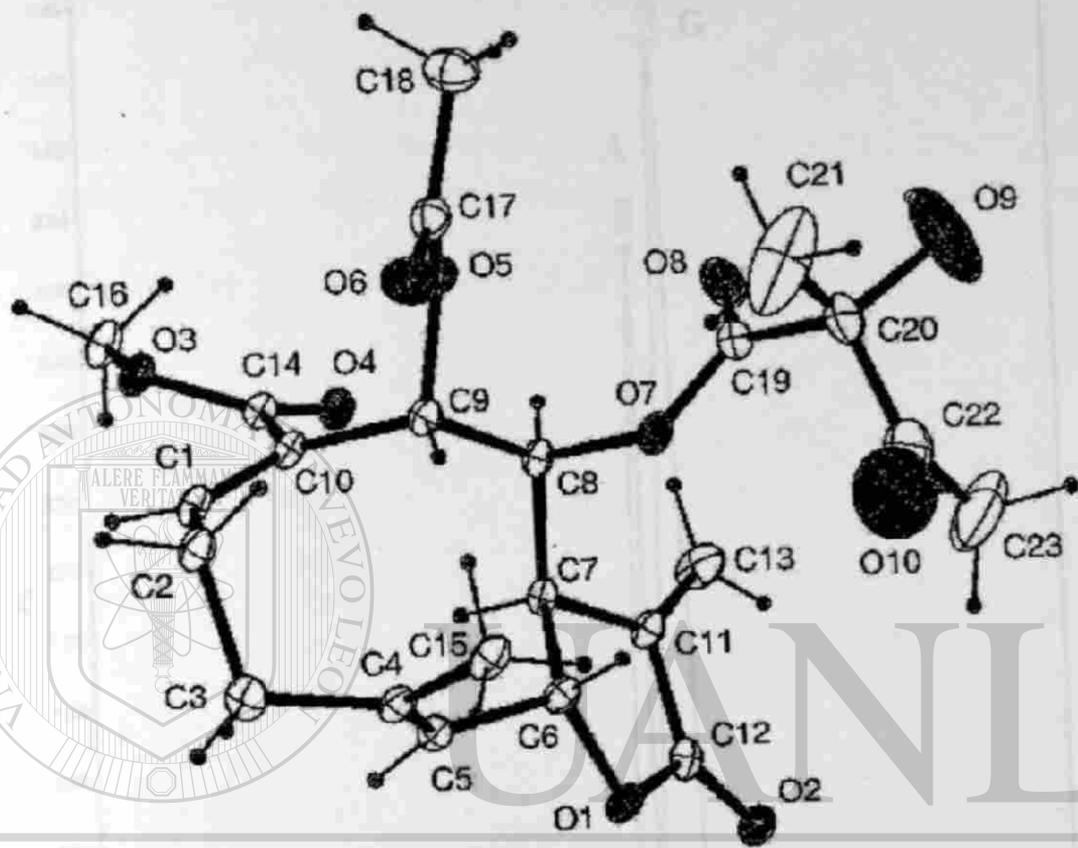


Fig. 28. Espectro ^1H - ^1H COSY en 500 MHz de los tetraludines Ha y Hb (C2'-epímeros).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

Fig. 29. Difracción de rayos-X de los tetraludines
Ha y Hb (C2'-epímeros).

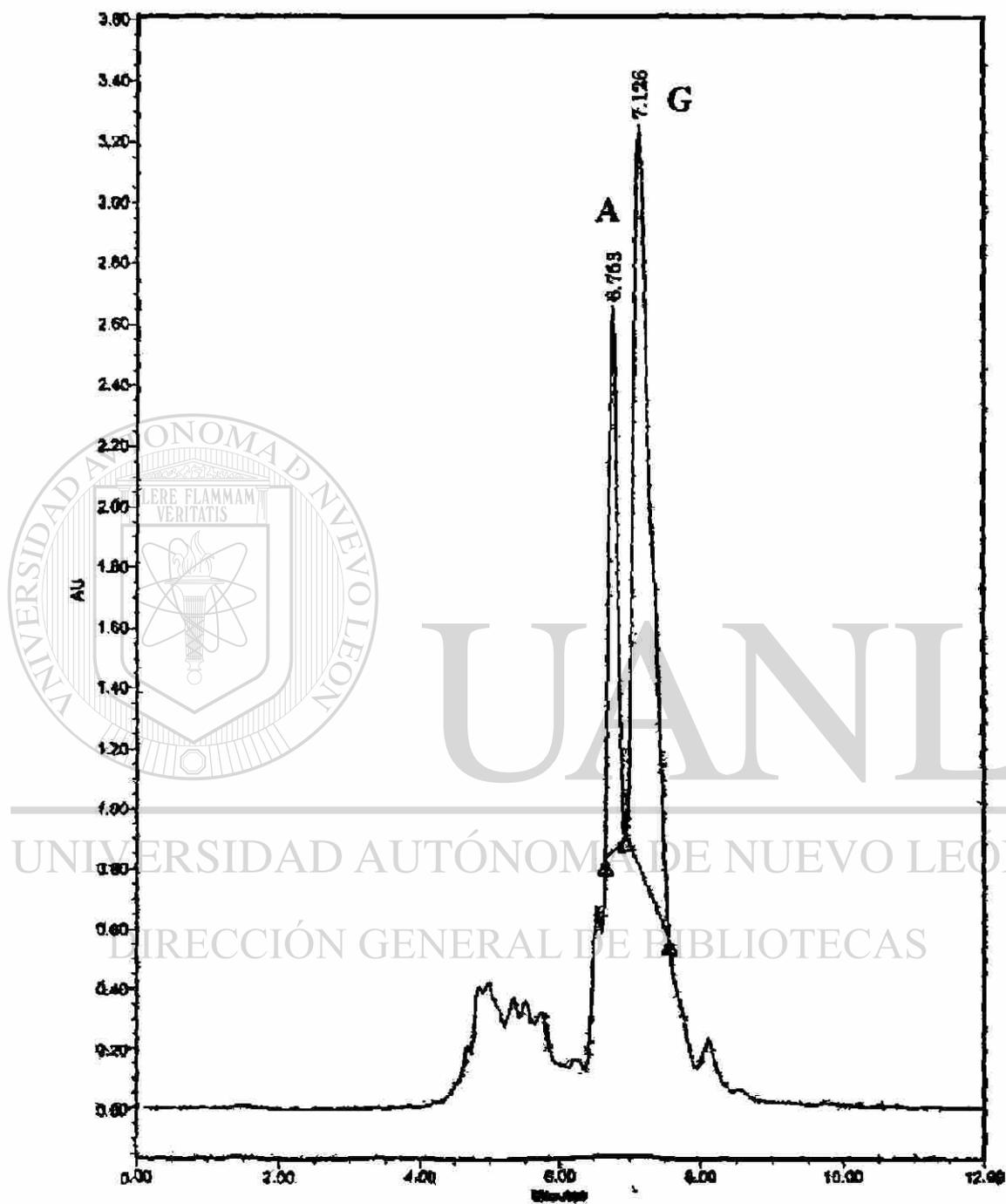


Fig. 30. Cromatograma que muestra el t_R de los tetraludines A y G en CLAR semipreparativo.

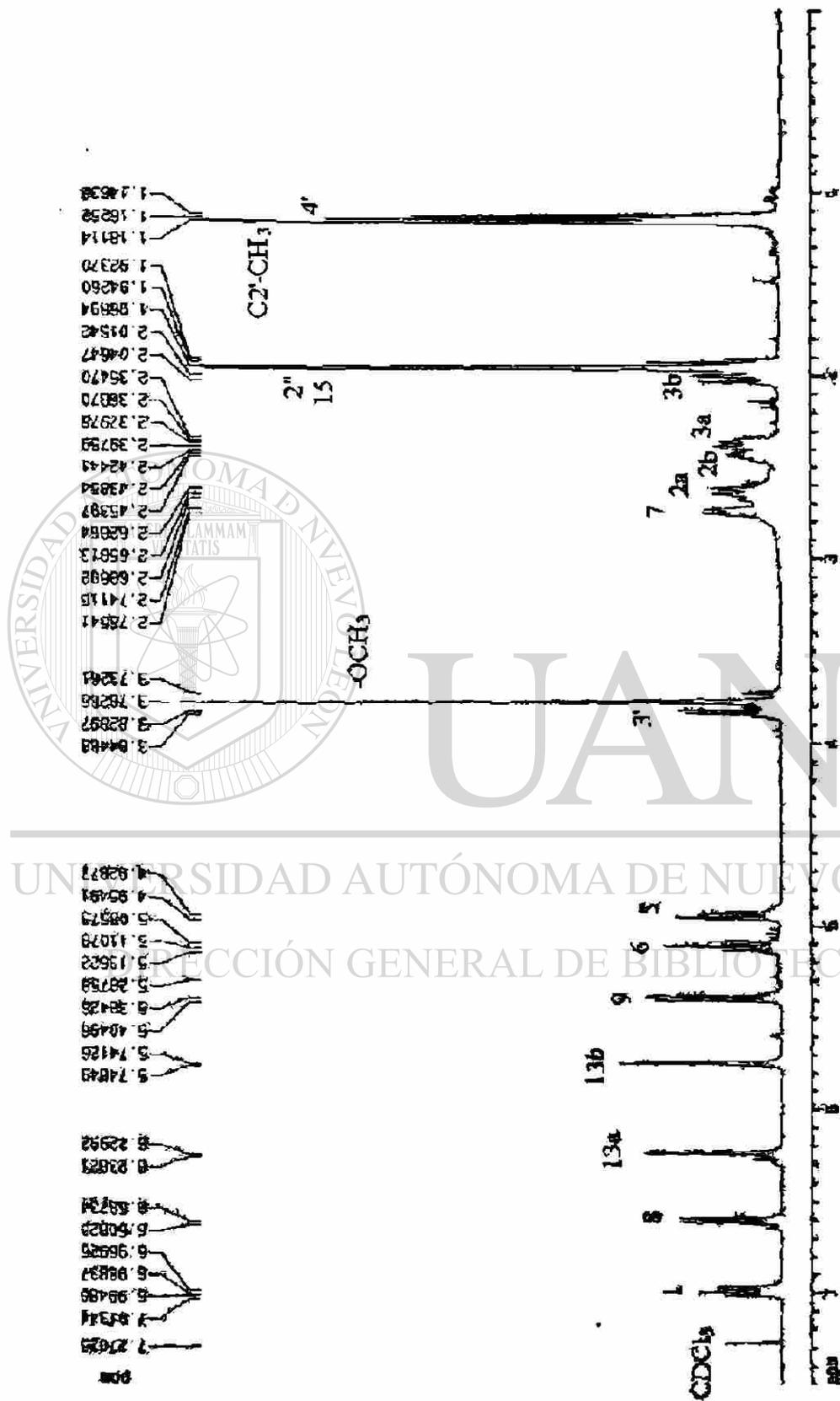


Fig. 31. Espectro ¹H-RMN del tetraludin A (400 MHz).

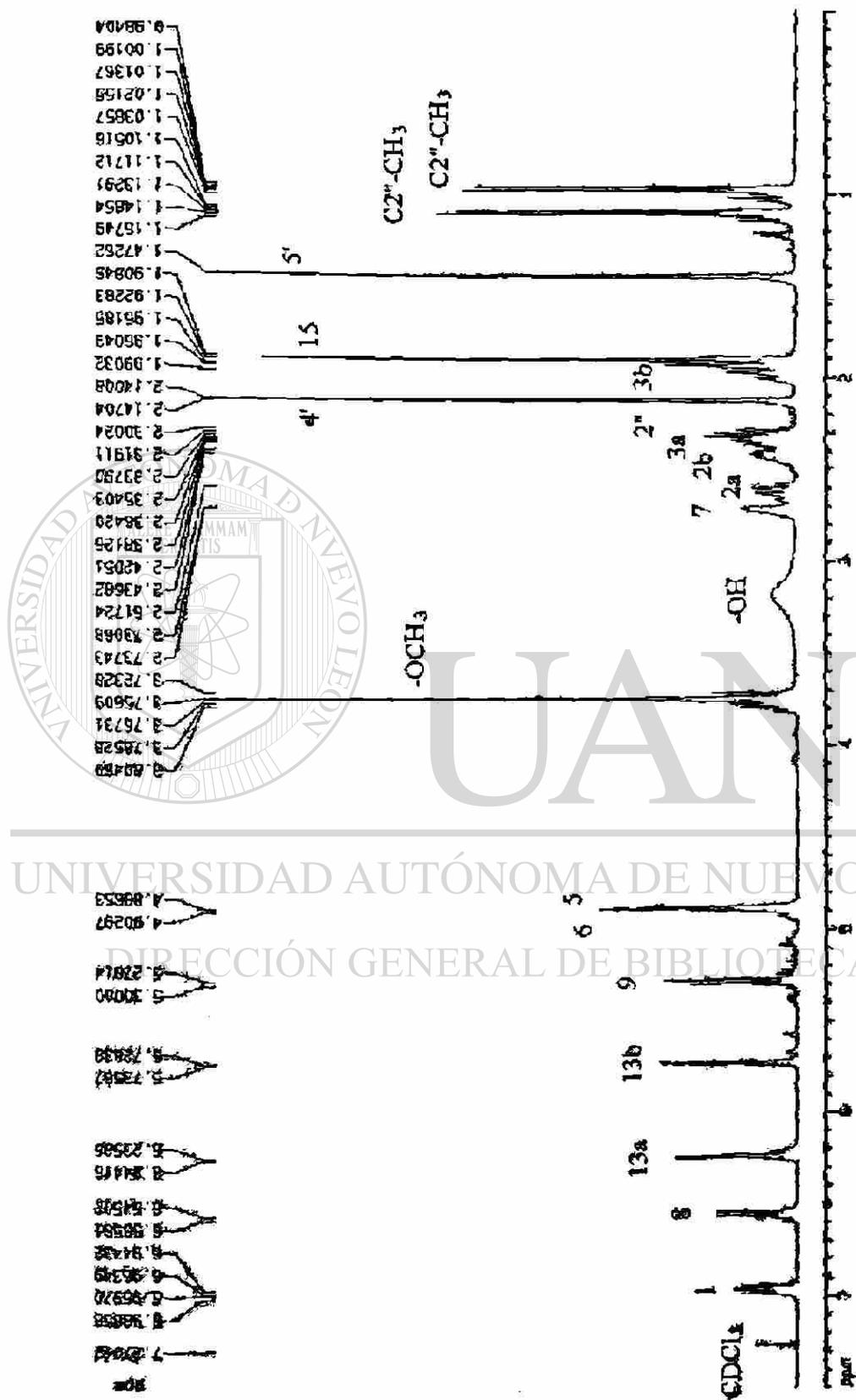
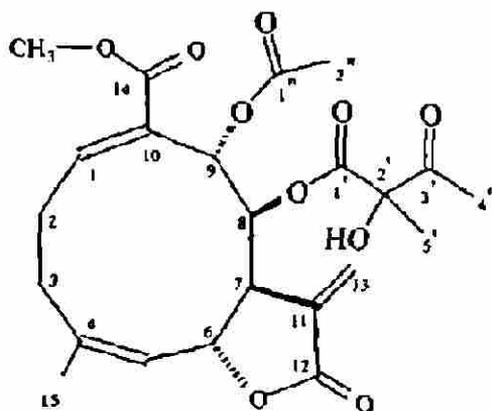


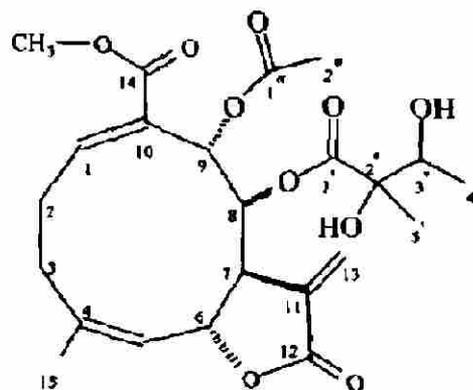
Fig. 32. Espectro ¹H-RMN del tetrahidin G (400 MHz).

Tabla 3. Datos espectrales de ^{13}C -RMN y DEPT 135 de los tetraludines A y G (CDCl_3).

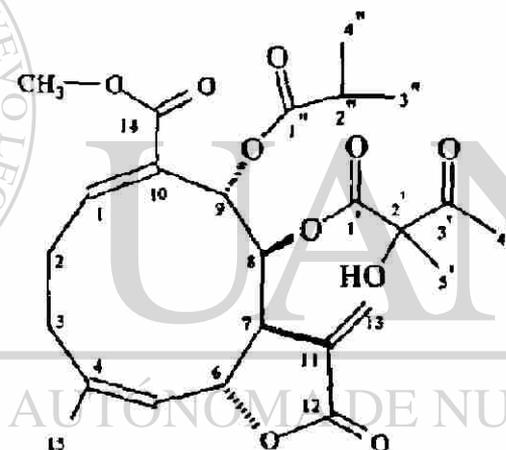
Carbono	A	G
	δ ppm (DEPT 135)	δ ppm (DEPT 135)
C-1	148.32 (CH)	148.57 (CH)
C-2	26.00 (CH_2)	26.03 (CH_2)
C-3	36.79 (CH_2)	36.73 (CH_2)
C-4	130.53 (C)	130.06 (C)
C-5	126.23 (CH)	125.72 (CH)
C-6	71.34 (CH)	71.31 (CH)
C-7	50.82 (CH)	50.80 (CH)
C-8	75.14 (CH)	74.98 (CH)
C-9	70.83 (CH)	69.12 (CH)
C-10	133.63 (C)	134.40 (C)
C-11	138.33 (C)	138.79 (C)
C-12	170.24 (C)	169.59 (C)
C-13	122.16 (CH_2)	121.26 (CH_2)
C-14	165.80 (C)	165.80 (C)
C-15	20.84 (CH_3)	20.32 (CH_3)
-OCH ₃	52.24 (CH_3)	52.25 (CH_3)
C-1'	174.93 (C)	174.46 (C)
C-2'	71.34 (C)	80.75 (C)
C-3'	75.24 (CH)	204.80 (C)
C-4'	16.51 (CH_3)	21.60 (CH_3)
C-5'	21.59 (CH_3)	24.24 (CH_3)
C-1''	169.43 (C)	168.73 (C)
C-2''	16.79 (CH_3)	47.69 (CH)
C-3''		14.01 (CH_3)
C-4''		13.72 (CH_3)



Tetraludín Ha y Hb



Tetraludín A



Tetraludín G

Fig. 33. Estructuras de los tetraludines aislados de *T. ludoviciana*.

3.3 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

3.3.1. Ensayo Antimalaria-Parásito Deshidrogenasa Láctica(DHL):

El ensayo de DHL se realizó con los compuestos puros repandin A, repandin B, repandin C y tetraludín A. La Tabla 4 muestra los resultados de estos compuestos contra *Plasmodium falciparum* clon D6 y clon W2. El ensayo se realizó a tres concentraciones: 4760, 1587 y 528.8 ng/mL, utilizando cloroquina y artemisinina como controles positivos.

Tabla 4. Resultados del ensayo de DHL.

Compuesto	IC ₅₀ (ng/mL)		
	<i>P. falciparum</i> (clon D6)	<i>P. falciparum</i> (clon W2)	Citotoxicidad (celulas Vero)
Repandin A	2300	2800	NC
Repandin B	2400	2700	NC
Repandin C	3600	2800	NC
Tetraludín A	2800	2200	NC
Cloroquina	15.5	140	
Artemisinina	9.5	3.7	

NC = No citotóxico

3.3.2. Bioensayo anti-microbiano:

Este bioensayo se realizó con los compuestos puros: repandin A, repandin B, repandin C y tetraludín A. Las tablas 5 y 6 muestran los resultados de estos compuestos contra diferentes microorganismos utilizando anfotericina B, ciprofloxacina y rifampicina como controles positivos.

Tabla 5. Resultados del bioensayo anti-microbiano.

Compuesto	IC ₅₀ (µg/mL)*				
	<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	<i>C. neoformans</i> (ATCC 90113)	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	MRS (ATCC 43300)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)
Repandin A	NA	NA	NA	NA	NA
Repandin B	NA	NA	NA	NA	NA
Repandin C	NA	NA	NA	NA	NA
Tetraludín A	NA	NA	NA	NA	NA
Anfotericina B	0.04	0.30			
Ciprofloxacina			0.20	0.15	0.09

* IC₅₀ = Concentración (µg/mL) que inhibe el 50 % de crecimiento.

Compuestos puros se consideran activos con IC₅₀ ≤ 15 µg/mL.

NA = No activo a concentraciones de 50, 10, 2 µg/mL

Tabla 6. Resultados del bioensayo anti-microbiano.

Compuest	CMI ($\mu\text{g/mL}$)*	
	<i>A. fumigatus</i> (ATCC 90906)	<i>M. intracellulare</i> (ATCC 23068)
Repandin A	NA	NA
Repandin B	NA	NA
Repandin C	NA	NA
Tetraludin A	NA	NA
Anfotericina B	1.25	
Rifampicina		3.13

*CMI = (Concentración Mínima Inhibitoria) la menor concentración con la que no se detecta crecimiento.

NA = No activo a concentraciones de 50, 10, 2 $\mu\text{g/mL}$.

3.3.3. Efectos en inflamación, crecimiento tumoral y apoptosis.

3.3.3.1. Efecto en la transcripción inducida por PMA y TNF- α :

Se estudió el efecto del repandin A, repandin B, repandin D, repandin E y tetraludin A, en la activación de NF- κ B y COX-2 en células SW 1353 (Condrosarcoma humano). Estos inhibieron la activación mediada por PMA y TNF- α del NF- κ B de un modo dependiente de la concentración. La tabla 7 muestra los valores de IC₅₀ en $\mu\text{g/mL}$. El repandin D mostró la mayor actividad seguido por el repandin E y el tetraludin A. Un plásmido de luciferasa construido con sitios de unión para Sp-1 fue usado como control, ya que este factor de transcripción no responde a mediadores de la inflamación. Los repandin A, repandin B, repandin D, repandin E y tetraludin A no inhibieron la activación del promotor Sp-1 mediada por PMA y TNF- α .

Tabla 7. Valores de IC₅₀ de la inhibición de la transcripción mediada por PMA y TNF- α por los repandines (A, B, D y E) y el tetraludín A en células SW 1353.

COMPUESTO	NF- κ B		COX-2		Sp-1	
	PMA (μ g/mL)	TNF- α (μ g/mL)	PMA (μ g/mL)	TNF- α (μ g/mL)	PMA (μ g/mL)	TNF- α (μ g/mL)
Repandín A	1.1	1.6	2.7	2.5	NA*	NA
Repandín B	1.1	3.5	1.7	3.7	NA	NA
Repandín D	0.6	1.3	1.4	2.3	NA	NA
Repandín E	0.6	1.5	1.3	2.1	NA	NA
Tetraludín A	0.7	1.1	1.4	2.2	NA	NA

* NA= No Activo

3.3.3.2. Efectos en la actividad enzimática de COX-2:

Se estudió el efecto del repandín A, repandín B, repandín D, repandín E y tetraludín A en la actividad enzimática de COX-2 en macrófagos de ratón (RAW 264.7) inducidos por LPS. La actividad de COX-2 fue determinada midiendo el nivel de PGE₂ en el medio. El repandín B, repandín D y tetraludín A no mostraron inhibición de la actividad de COX-2. Los valores de IC₅₀ de los repandines A y E fueron de 6.0 μ g/mL y 2.0 μ g/mL respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto de los repandines (A, B, D y E) y el tetraludín A en la actividad enzimática de COX-2 en macrófagos de ratón.

COMPUESTO	IC₅₀ (µg/mL)
Repandin A	6.0
Repandin B	NA
Repandin D	NA
Repandin E	2.0
Tetraludín A	NA

NA= No Activo

3.3.3.3. Efecto en el crecimiento de células tumorales humanas:

Se evaluó la actividad del repandin A, repandin B, repandin D, repandin E y tetraludín A contra diferentes líneas celulares para determinar si la inhibición de la activación de NF-κB estaba relacionada con la inhibición de crecimiento celular. Los valores de IC₅₀ se muestran en la Tabla 9. Las células de leucemia HL 60 fueron las más sensibles a estos compuestos.

Tabla 9. Efecto inhibitorio de los repandines (A, B, D, y E) y tetraludín A contra diferentes líneas celulares de tumor humano *in vitro* (48 h de exposición).

Línea celular	IC ₅₀ (µg/mL) estimado				
	Repandin A	Repandin B	Repandin D	Repandin E	Tetraludín A
HL 60	0.8	0.16	0.2	0.22	0.61
MCF-7	3.3	1.9	1.1	1.8	3.2
BT 549	3.5	2.0	1.4	1.8	2.4
SK-OV-3	3.7	1.6	1.2	1.7	1.9

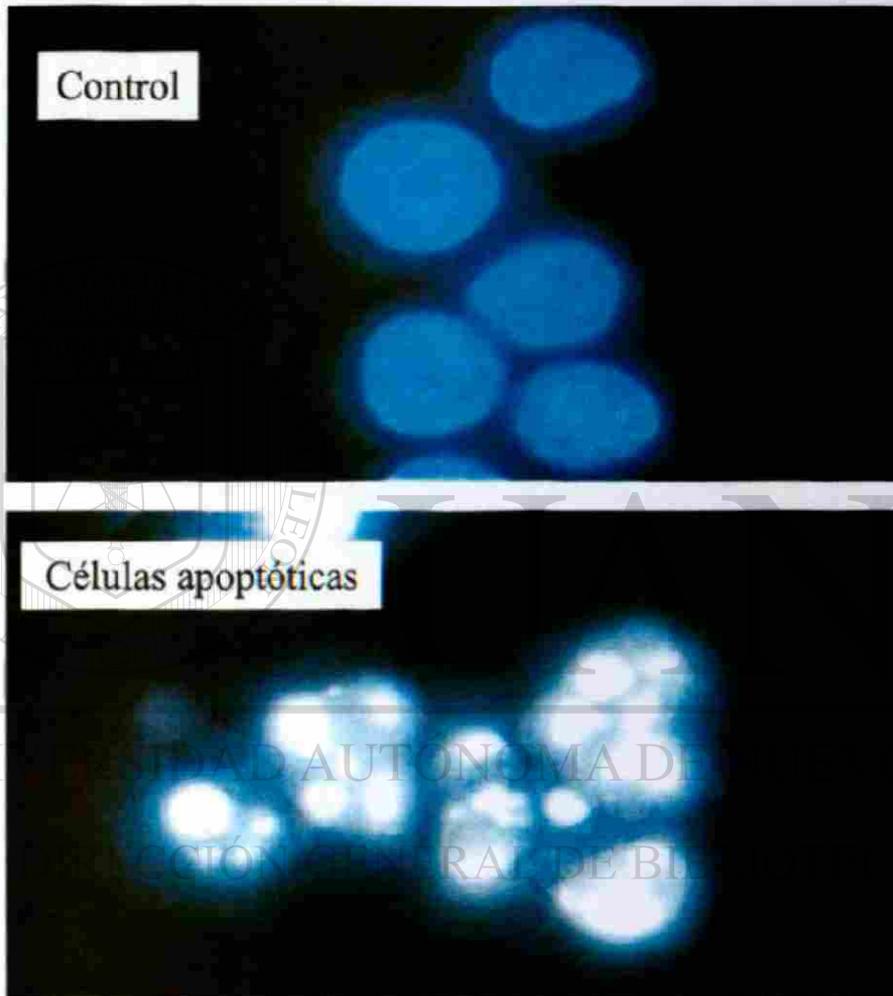
3.3.3.4. Efecto en el ciclo celular:

El repandin D y tetraludín A fueron seleccionados para los estudios siguientes de ciclo celular y apoptosis. La habilidad del repandin D y tetraludín A para inhibir la progresión en el ciclo celular fue determinada por citometría de flujo. El tratamiento de las células HL 60 con estos compuestos (3 µg/mL) por 12 h resultó en la acumulación de células en la fase G₂/M, con una disminución correspondiente en el número de células en G₁.

3.3.3.5. Inducción de la apoptosis:

El ensayo de ciclo celular indicó que las células mueren a la 24 h de exposición con el compuesto. Sin embargo, el ensayo no determinó si las células mueren por apoptosis o necrosis. Las células HL 60 fueron tratadas con 3 µg/mL del repandin D o tetraludín A por 24 h. Después, se realizó la tinción de DAPI para identificar las características de las células muertas. Las células expuestas al repandin D y tetraludín A mostraron núcleos condensados y fragmentados (Fig. 34), lo cual fue indicativo de apoptosis.

Fig. 34. Apoptosis inducida por repandin D o tetraludín A (3 $\mu\text{g/mL}$) en células HL 60 (24 h de exposición).



CAPITULO 4

DISCUSION

4.1. COMPUESTOS AISLADOS DE *Tetragonotheca repanda*.

A partir del extracto crudo de DCM de *Tetragonotheca repanda* se obtuvieron 6 compuestos mediante las técnicas cromatograficas CLV y CLAR. Los compuestos denominados repandines A al F, previamente reportados en la literatura^{13,14} como mezclas de dos o más compuestos (comunicación personal), fueron purificados e identificados mediante técnicas espectroscópicas y los datos en la literatura. Los compuestos predominantes de este extracto son el repandin A y el repandin B con 121 y 126 mg, respectivamente. El compuesto F se obtuvo en una pequeña cantidad (7 mg), lo que sólo nos permitió su identificación por el espectro RMN de protón.

Repandin D (C₂₆H₃₄O₁₀): Las fracciones R1F4, R2F6 y R3F6 obtenidas en CLAR semipreparativo con un t_R de 8.08 min (Fig. 11-D) y un peso total aproximado de 94 mg, consisten en un único compuesto, para el cual se propone el esqueleto tipo melampólido con un doble enlace exocíclico 4 (15), el cual ha sido reportado en compuestos obtenidos de *T. repanda*.^{13,14}

En el espectro de protón a 400 MHz (Fig. 14) se observan a *grosso modo* 19 señales. En la zona de los protones olefinicos se observan dos dobletes que integran para un protón cada uno a 6.26 ($J=1.14$ Hz, H-13b) y 5.80 ppm ($J=1.2$ Hz, H-13a), y un multiplete ancho a 2.99 ppm (H-7), corroborando las señales características del grupo α,β -insaturado γ -lactona. Se observan dos singuletes que integran para un protón a 4.95 y 4.93 ppm (H-15) los cuales son asignados a los protones del metileno exocíclico 4 (15). A campo bajo un doble doblete en 6.98 ppm ($J_{1,2b}=4.4$, $J_{1,2a}=13.0$ Hz) asignado a H-1 nos indica que se encuentra en posición *cis* con el grupo carbometoxi en el C-14, típico de la mayoría de los melampólidos. Un doble doblete que integra para un protón a 6.11 ppm ($J_{3,7}=2.2$ Hz, $J_{3,9}=9.5$ Hz) asignado a H-8 y un doblete a 5.94 ppm ($J_{9,8}=9.5$ Hz) asignado a H-9 nos indica la presencia de grupos éster en los C-8 y C-9, siendo el C-8 el grupo éster insaturado. Un doblete que integra para un protón a 6.83 ppm ($J_{6,5}=9.5$ Hz, H-6) se acopla con el doblete a 3.92 ppm ($J_{5,6}=9.5$ Hz, H-5), el desplazamiento químico sugiere la presencia de un hidroxilo en el C-5. Un singulete a 3.76 ppm nos indica la presencia de un grupo metoxilo. A campo alto se observa un singulete que integra para tres protones a 1.39 ppm (H-5'), un doblete que integra para tres protones a 1.2 ppm ($J_{4,3'}=5.4$ Hz, H-4') que se acopla con un cuarteto a 3.0 ppm ($J_{3,4}=5.4$ Hz, H-3') confirmándonos la presencia de la cadena 2,3-epoxi-2-metilbutanoil unida al C-8. Las señales que confirman la presencia de la cadena lateral 2-metilbutirato unida a C-9 son el triplete que integra para tres protones a 0.81 ppm ($J=7.4$ Hz, H-4''), un doblete a 1.04 ppm ($J=7$ Hz, H-5''), un multiplete a 2.28 ppm (H-2'') y dos multipletes que integran para un protón a 1.36 (H-3''a) y 1.58 ppm (H-3''b).

En el espectro de ^{13}C -RMN (Fig. 15c) se observan 26 señales. Las de campo más bajo a 175.7, 168.8, 168.1 y 166.0 ppm corresponden a los cuatro grupos éster presentes en la molécula. En la siguiente zona se observan 6 señales que corresponden a los dobles enlaces de las posiciones 1, 4, 11, 10, 13 y 15. El análisis del DEPT 135 (Fig. 15d) nos indica que los carbonos de las posiciones 13 y 15 son metilenos (señales negativas), así como también se observa una señal positiva a 147.7 ppm del CH en la posición 1. En la zona alifática de 85 a 0 ppm se observan 16 señales: los metilos a campo alto, la señal

característica del grupo metoxilo a 52.28 ppm y los metinos. En el análisis del DEPT 135 se establece que las señales a 29.15, 26.88 y 26.14 ppm son los metilenos de las posiciones 3, 2 y 3" respectivamente, además la señal a 59.21 ppm (C-2') no aparece, indicando que es un carbono cuaternario.

En el espectro ^1H - ^1H COSY en 400 MHz (Fig. 16) se observan las siguientes correlaciones: 3"a- 4", 3"b-4", 3"a-b, 2"-5", 2a-b, 3a-b, 2-3, 3'-4', 5-6, 13a-7, 13b-7, 1-2b, 1-2a y 8-9, las cuales nos ayudaron a establecer la estructura propuesta.

En el espectro ^1H - ^{13}C HMQC en 400 MHz (Fig. 17) se observan las siguientes correlaciones: 4"-CH₃, 4'-CH₃, 5"-CH₃, 5'-CH₃, 3"b- y 3"a-CH₂, 2b- y 2a-CH₂, 3b- y 3a-CH₂, 7-CH, 2"-CH, 14-OCH₃, 3'-CH, 9-CH, 8-CH, 5-CH, 6-CH, 15-CH₂, 13b- y 13a-CH₂ y 1-CH, las cuales nos ayudaron a corroborar la estructura propuesta.

Repandin C (C₂₅H₃₂O₁₀): Las fracciones R1F2, R2F4 y R3F4 obtenidas en CLAR semipreparativo mostraron un t_R de 6.98 min (Fig. 11-C) y un peso total aproximado de 54 mg. El espectro de ^1H -RMN en 400 MHz (Fig. 12) es muy semejante al obtenido para el repandin D, la diferencia está en la cadena lateral unida al C-9: en el espectro del repandin C se observa a campo alto un doblete que integra para seis protones a 1.01 ppm [J=7 Hz, 2"-(CH₃)₂] y un pequeño desplazamiento hacia campo bajo del multiplete (2.43 ppm, J=7 Hz) asignado al H-2", lo que nos indica la presencia de un grupo isobutirato. En el espectro de ^{13}C -RMN (Fig. 13c) se observan 25 señales y en el DEPT 135 (Fig. 13d) se observan los 4 grupos metileno (13, 15, 3 y 2) presentes en la molécula.

Repandin E (C₂₅H₃₃O₉): La fracción R1F7 obtenida en CLAR semipreparativo mostró un t_R de 9.70 min (Fig. 11-E) y un peso aproximado de 15 mg. En el espectro de ^1H -RMN (Fig. 18) se observan las mismas señales del esqueleto tipo melampólido con un doble enlace exocíclico 4 (15) que en los repandines anteriores, y al igual que el repandin C el espectro nos indica la presencia del grupo isobutirato en C-9. En la zona de los

protones olefinicos a 6.05 ppm se observa un cuarteto que integra para un protón ($J_{3,4}=7.1$ Hz, H-3') y que se acopla con un doblete a 1.9 ppm ($J_{4,3}=7.1$ Hz, H-4'), además de un singulete que integra para tres protones a 1.77 ppm que nos indica la presencia del grupo angelato unido al C-8. En el espectro de ^{13}C -RMN (Tabla 2) se observan 25 señales y en el DEPT 135 (Tabla 2) se observan los 4 grupos metileno (13, 15, 3 y 2) presentes en la molécula.

Repandin F ($\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_9$): La fracción R1F10 obtenida en CLAR semipreparativo presentó un t_R de 11.98 min (Fig. 11-F) y un peso aproximado 7 mg. En el espectro de ^1H -RMN (Fig. 19) se observan las mismas señales del esqueleto tipo melampólido con un doble enlace exocíclico 4 (15) al igual que en los repandines anteriores, y al igual que el repandin E, el espectro nos indica la presencia del grupo angelato unido al C-8. Unido al C-9 se observan las señales características del grupo 2-metilbutirato.

Repandin A ($\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_{10}$): Las fracciones R4F2 y R5F2 obtenidas en CLAR semipreparativo mostraron un t_R de 6.38 min (Fig. 20) y un peso aproximado de 121 mg. En el espectro de ^1H -RMN (Fig. 21) se observan las mismas señales del esqueleto tipo melampólido con un doble enlace exocíclico 4 (15) que en los repandines anteriores, y al igual que los repandines C y E el espectro nos indica la presencia del grupo isobutirato en C-9. A campo alto se observa un cuarteto que integra para un protón a 6.38 ppm ($J_{3,4}=7.2$ Hz, H-3') y que se acopla con un doblete que integra para tres protones a 1.98 ppm ($J_{4,3}=7.2$ Hz, H-4'), además de dos dobletes a 4.06 y 4.2 ppm ($J_{5,6}=13.14$ Hz, H-5') lo cual confirma la presencia de la cadena sarracínol unida al C-8. En el espectro de ^{13}C -RMN (Tabla 2) se observan 25 señales y en el DEPT 135 (Tabla 2) se observan los 5 grupos metileno (13, 15, 5', 3 y 2) presentes en la molécula.

Repandin B ($\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_{10}$): Las fracciones R4F4 y R5F4 obtenidas en CLAR semipreparativo mostraron un t_R de 7.35 min (Fig. 20) y un peso aproximado de 126 mg. En el espectro de ^1H -RMN (Fig. 22) se observan las mismas señales del esqueleto tipo melampólido con un doble enlace exocíclico 4 (15) que en los repandines anteriores, y al

igual que los repandines D y F, el espectro nos indica la presencia del grupo isobutirato en C-9. Unido al C-8, al igual que el repandin A, se observan las señales características del grupo sarracínol. En el espectro de ^{13}C -RMN (Tabla 2) se observan 26 señales y en el DEPT 135 (Tabla 2) se observan los 6 grupos metileno (13, 15, 5', 3", 3 y 2) presentes en la molécula.

4.2. COMPUESTOS AISLADOS DE *Tetragonotheca ludoviciana*.

A partir del extracto crudo de DCM de *Tetragonotheca ludoviciana* se obtuvieron mediante diferentes técnicas cromatográficas 2 compuestos y una mezcla epimérica. El tetraludín A, tetraludín G y la mezcla de tetraludines Ha y Hb previamente reportados en la literatura como mezclas de dos o más compuestos,^{14,15,16} fueron purificados por primera vez e identificados mediante técnicas espectroscópicas y los datos reportados en la literatura.

Tetraludín Ha y Hb ($\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{10}$): Las fracciones R7F2 y R8F2 obtenidas en CLAR semipreparativo mostraron un t_R de 7.13 min (Fig. 26) y un peso aproximado de 41 mg. Se propone una sesquiterpenlactona de tipo melampólido con un anillo medio cis-1(10), trans-4,5-germacradieno para este compuesto, el cual ha sido reportado en la literatura.^{13,14,15} En el espectro de protón a 400 MHz (Fig. 27) se observa a campo bajo el desplazamiento químico del H-1 a 6.98 ppm ($J_{1-2a}=7.5$ Hz, $J_{1-2b}=10$ Hz), el cual nos indica la relación en posición cis con el grupo carbometoxi del C14, típica de los melampólidos. En la zona siguiente observamos pares de señales (H-8, H-13a, H-13b, H-9) que nos indican que no es un compuesto puro sino una mezcla. Mediante el espectro COSY a 500 MHz (Fig. 29) se determinó que la señal a 6.54 ppm ($J_{8-9}=8.4$ Hz, H-8) se correlaciona con los dobletes a 5.29 y 5.23 ppm ($J_{9-8}=8.4$ Hz, H-9), también se observa la correlación del par de dobletes a 6.2 ppm ($J=3$ Hz, H-13a) y a 5.7 ppm ($J=2.9$ Hz, H-13b) con la señal a 2.72 ppm, asignada a H-7, señales características del grupo α,β -

insaturado γ -lactona. El singulete a 3.74 ppm nos indica la presencia del grupo metoxilo. Se observa un singulete que integra para seis protones a 1.9 ppm lo que nos indica la presencia del grupo acetato unido a C-9 y que presenta el mismo desplazamiento químico del metilo en la posición 15. Se observan señales características del grupo 2-metil-2-hidroxi-3-cetobutirato: un singulete que integra para tres protones a 2.1 ppm se asigna al metilo en la posición C-4', también la señal a 1.4 ppm del metilo unido al C-2' que pareciera un doblete, pero se determinó por COSY que eran dos singuletes.

En el espectro de ^{13}C -MRN (Fig. 28c) se observa 23 señales, algunas aparecen dobles con un mínimo desplazamiento químico, lo que nos hace pensar que no es un compuesto puro, sino una mezcla de dos compuestos muy similares, posiblemente epímeros. Se observa a campo bajo con un δ 204.42 la señal del grupo cetona del C-3'. En la siguiente zona se observan las señales de los cuatro grupos éster (1', 12, 1" y 14) presentes en la molécula, le siguen los carbonos olefinicos (1, 11, 10, 4, 5 y 13) con un δ entre 120 y 150 ppm. En la misma zona en el espectro DEPT 135 (Fig. 28d), se observan como señales positivas los metinos de las posiciones 1 y 5, además la señal negativa a 121.11 ppm del metileno de la posición 13. El desplazamiento químico a 80.87 ppm, no aparece en el espectro DEPT, lo que nos indica que es el carbono cuaternario de la posición C2'.

El espectro ^1H - ^1H COSY a 500 MHz (Fig. 29) muestra las siguientes correlaciones: 3a-b, 2a-b, 2-3, 5-15, 5-6, 6-7, 13b-7, 13a-7, 8-9, 1-2a y 1-2b.

En la difracción de rayos X de este compuesto se observa que el cristal no está muy bien definido en el C-20, como se muestra en la Figura 30: los elipsoides de las posiciones C-21 y O-9 son grandes, lo cual nos indica un desarreglo en estos átomos con lo cual podemos concluir, en base a este modelo y lo que se ha reportado en la literatura, que es la mezcla de epímeros denominados tetraludín Ha y Hb. Es la primera vez que se obtiene un cristal de estos compuestos y mediante la difracción de rayos X se verificó la conformación que adoptan estas sustancias.

Tetraludin A (C₂₁H₃₀O₁₀): Las fracciones R10F8 y R11F2 obtenidas en CLAR semipreparativo mostraron un t_R de 6.75 min. (Fig. 31-A) y un peso aproximado de 21 mg. El espectro de ¹H-RMN (Fig. 32) muestra las señales características del melampólido con el anillo medio cis-1(10), trans-4,5-germacradieno. Al igual que el tetraludin H este compuesto presenta la señal a 1.96 ppm del grupo acetato unido al C-9. Un doblete que integra para tres protones a 1.15 ppm (J=6.4 Hz) acoplado con un cuarteto que integra para un protón a 3.83 ppm (J=6.4 Hz) y el singulete a 1.18 ppm (C-2'CH₃), nos indican la presencia del grupo 2-metil-2,3-dihidroxitirato en C-8.

El espectro de ¹³C-RMN (Tabla 3) muestra 23 señales y en el espectro DEPT 135 (Tabla 3) se observan los 3 grupos metileno (13, 3 y 2) presentes en la molécula.

Tetraludin G (C₂₅H₃₂O₁₀): Las fracciones R10F9 y R11F3F4 obtenidas en CLAR semipreparativo mostraron un t_R de 7.17 min. (Fig. 31-G) y un peso aproximado de 41 mg. El espectro de ¹H-RMN (Fig. 33) muestra las señales características del melampólido con el anillo medio cis-1(10), trans-4,5-germacradieno. Se observan las señales del grupo 2-metil-2-hidroxi-3-cetobutirato en C-8 al igual que en tetraludin H. A campo alto se observan dos dobletes que integran para tres protones a 1.0 (J=7.2 Hz) y 1.12 ppm (J=6.3 Hz), y un multiplete que integra para un protón a 2.31 ppm (J=7.5 y 6.4 Hz) lo que nos indica la presencia del grupo isobutirato en C-9.

El espectro de ¹³C-RMN (Tabla 3) muestra 23 señales y en el espectro DEPT 135 (Tabla 3) se observan los 3 grupos metileno (13, 3 y 2) presentes en la molécula.

4.3. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Muchas plantas y compuestos derivados de éstas han sido estudiados para evaluar su toxicidad y potencial de acción terapéutico. Tales estudios han llevado al descubrimiento de nuevos fármacos que pueden ser usados en medicina. Las sesquiterpenlactonas (SLs) son un grupo de productos naturales obtenidos de plantas superiores, principalmente de la familia Asteraceae, los cuales han demostrado una gran variedad de efectos biológicos. En el presente trabajo se evaluaron los efectos anti-malaria, anti-microbiana, anti-inflamatoria, anti-tumor y apoptótica de las SLs de tipo melampólido aisladas de *T. repanda* y *T. ludoviciana*.

4.3.1. Actividad anti-malaria.

Se realizó el ensayo de la deshidrogenasa láctica en *Plasmodium falciparum* clon D6 y clon W2, en el repandin A, repandin B, repandin C y tetraludín A. Los resultados de este ensayo nos indican que estos melampólidos son activos contra *P. falciparum* a concentraciones entre 2.2 a 3.6 $\mu\text{g/mL}$, como se muestra en la Tabla 4, además, no resultaron citotóxicos en las células Vero; sin embargo la actividad de estos melampólidos no está en el orden de los nanogramos por mililitro que muestran los controles positivos. La cloroquina reportó 15.5 ng/mL en el clon D6 y 140 ng/mL en el clon W2, y la artemisinina 9.5 ng/mL en el clon D6 y 3.7 ng/mL en el clon W2. La artemisinina es una SL con un grupo peróxido en su estructura obtenida de la hierba medicinal de China "qinghao" (*Artemisia annua*).^{1,3} Recientemente se ha reportado que el mecanismo de acción de la artemisinina incluye la ruptura oxidoreductiva de su grupo peróxido, generando radicales libres que inducen daño en el parásito.²¹

4.3.2. Actividad anti-microbiana.

Existen numerosos reportes de actividad anti-microbiana en varias SLs tales como partenólido, cnicin, mikanólido, heliangoides, etc. Estudios con diferentes bacterias

mostraron que hay una mayor actividad contra bacterias gram-positivas tales como *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*.^{1,3,4} Estudios antifúngicos de diversas SLs contra *Candida albicans* mostraron un número pequeño de compuestos activos.¹

Se realizó el bioensayo anti-microbiano de los melampólidos, repandin A, repandin B, repandin C y tetraludín A, contra los hongos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus* y las bacterias *Staphylococcus aureus* (gram-positivo), MRS (*S. aureus* resistente a meticilina), *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativo) y *Mycobacterium intracellulare*. Aunque existen estudios de actividad anti-microbiana de SLs puras o extractos de plantas conteniendo SLs donde se muestra que la mayoría de las preparaciones dan resultados positivos,^{1,3} las SLs de tipo melampólido que nosotros estudiamos no reportaron actividad anti-microbiana a concentraciones de 50, 10 y 2 µg/mL (Tablas 5 y 6).

4.3.3. Efectos en inflamación, crecimiento tumoral y apoptosis.

Existen numerosos estudios donde se demuestra que los extractos de plantas conteniendo SLs, así como también las SLs puras exhiben actividad anti-inflamatoria. La activación del NF-κB involucra muchos procesos celulares que conllevan a inflamación y desarrollo de cáncer. Como ya se sabe, el NF-κB se encuentra inactivo en el citoplasma unido a la proteína I-κB. El NF-κB puede ser activado por varios factores como citocinas pro-inflamatorias, infecciones bacterianas, señales de daño celular e intermediarios reactivos de oxígeno, los cuales incrementan fosforilación de proteínas y la proteólisis del I-κB. Una vez libre y activo el NF-κB puede translocarse al núcleo y unirse al sitio promotor del DNA para iniciar la transcripción del gen blanco.

En el presente trabajo se estudió el efecto del repandin A, repandin B, repandin D, repandin E y tetraludín A en la activación de NF-κB y COX-2 mediada por PMA y TNF-α. Pasco y col. desarrollaron y realizaron el ensayo para identificar compuestos que inhiben la activación de la expresión de COX-2, éste se basa en la construcción de un

“gen reportero” que utiliza una región del promotor de COX-2 humano para conducir la expresión de luciferasa.⁸ Los resultados de este ensayo mostraron que estos compuestos son inhibidores potentes de la activación del NF- κ B y COX-2 inducida por PMA y TNF- α en células SW 1353. El repandin D exhibió la mayor actividad de inhibición del NF- κ B, seguido por repandin E y tetraludín A.

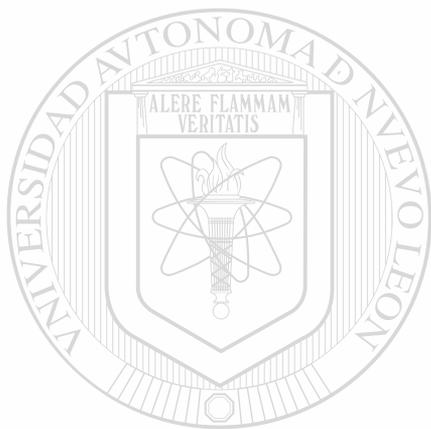
En macrófagos de ratón inducidos por LPS, el repandin A y repandin E inhibieron la actividad enzimática de COX-2 con una IC₅₀ de 6.0 μ g/mL y 2.0 μ g/mL, respectivamente. El repandin B, repandin D y tetraludín A no mostraron inhibición en la actividad enzimática de COX-2. Esto sugiere que el repandin A y repandin E tienen efectos farmacológicos en la inhibición de la activación del NF- κ B y COX-2, además de inhibición de la actividad enzimática del COX-2, lo que nos hace suponer que el mecanismo de acción es diferente al del repandin B, repandin D y tetraludín A, que sólo mostraron inhibición en la activación del NF- κ B y COX-2. El repandin A y repandin E presentan similitudes estructurales, además del esqueleto tipo melampólido con un doble enlace exocíclico 4 (15), ambos presentan un éster α,β -insaturado unido a C-8 y un grupo isobutirato unido a C-9. El repandin B y repandin D además del grupo éster α,β -insaturado y α,β -epoxi unido a C-8 respectivamente, ambos presentan el grupo 2-metilbutirato unido a C-9. Esto sugiere que la inhibición de la actividad enzimática de COX-2 por los repandines A y E puede ser debida a que se acoplan en un sitio activo en COX-2, mientras que los otros compuestos están impedidos estéricamente. Cabe mencionar que no se determinó la inhibición de la actividad enzimática del COX-2 en el repandin C, el cual presenta el grupo éster α,β -epoxi unido al C-8 y el grupo isobutirato unido a C-9, lo cual nos ayudaría a establecer mejor la relación estructura-función de estos melampólidos.

El repandin A, repandin B, repandin D, repandin E y tetraludín A inhibieron efectivamente el crecimiento celular en líneas de tumor humano, resultando las células de leucemia HL 60 las más sensibles a estos compuestos. Para observar los efectos en el ciclo celular y apoptosis se seleccionaron el repandin D y tetraludín A. Se encontró que

estos compuestos bloquean el progreso de células en la fase G₂/M, con una disminución en el número de células en fase G₁. El ensayo de tinción DAPI mostró que el repandin D y tetraludín A inducen apoptosis en células HL 60. En conclusión, el repandin A, repandin B, repandin D, repandin E y tetraludín A suprimen el crecimiento celular e inducen arresto del ciclo celular en fase G₂/M y apoptosis. Estas actividades son comúnmente mediadas por inhibición de la activación de NF- κ B y son consistentes con la actividad anti-inflamatoria que han mostrado otras SLs.^{7, 10-12, 22-24}

El mecanismo por el cual las SLs inhiben inflamación es tema de debate. Hwang y col. en 1996 reportan que el partenólido inhibe la fosforilación de la protein cinasa en macrófagos murinos estimulados con LPS.⁹ Hehner y col. reportan que la SL costunólido inhibe la activación de NF- κ B por prevenir la degradación del I- κ B.⁷ Sin embargo, Lyss y col. publican que la SL helenalina no inhibe la degradación de I- κ B o previene la translocación del NF- κ B al núcleo, sino que actúa selectivamente alquilando la subunidad p65 del NF- κ B.²² Recientemente, otro estudio demostró que el partenólido y otras SLs actúan directamente en el NF- κ B alquilando la cisteína (Cis 38) en la subunidad p65.²³ Existe evidencia de que el mecanismo general de las SLs que contienen el grupo α -metileno γ -lactona, así como carbonilos α,β -insaturados y epóxidos, reaccionan con nucleófilos biológicos, especialmente con el grupo sulfhidrilo en la cisteína, en una adición tipo Michaelis.¹³ Por otra parte, estudios en la relación estructura-actividad revelan que SLs bifuncionales inhiben la unión NF- κ B/DNA a concentraciones 10 veces menores que sus análogos monofuncionales.²⁴ Los repandines (A, B, D y E) y el tetraludín A contienen el grupo α -metileno γ -lactona en su estructura, además de esteres α,β -insaturados y/o α,β -epóxido, que representan centros de alquilación adicionales para nucleófilos biológicos. Al respecto, se conoce que la Cis 38 y Cis 120 en la subunidad p65 del NF- κ B son sitios de alquilación para SLs, y que la distancia entre estas cisteínas es de 8 Å solamente, por lo que se ha propuesto que una sola SL bifuncional bloquea el NF- κ B previniendo la unión con el DNA. Por inhibir la activación del NF- κ B, las SLs interfieren en la producción de citocinas proinflamatorias, moléculas de adhesión,

enzimas inflamatorias como COX-2, iNOS y PLA2. Estos mediadores están involucrados en la patogénesis de diversas enfermedades como artritis reumatoide, parkinson, alzheimer, esclerosis múltiple, cáncer y septicemia. Por lo tanto, las SLs pueden ser compuestos modelo para el desarrollo de nuevos fármacos anti-inflamatorios y anti-tumorales.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron seis compuestos puros de tipo melampólido a partir del extracto semipolar de *Tetragonotheca repanda*: repandin A, repandin B, repandin C, repandin D, repandin E y repandin F, los cuales ya habían sido descritos en la literatura.
2. Se obtuvieron 2 compuestos puros y una mezcla de epímeros de tipo melampólido, a partir del extracto semipolar de la *Tetragonotheca ludoviciana*: tetraludín A, tetraludín G y la mezcla epimérica de tetraludín Ha y Hb, los cuales ya habían sido descritos en la literatura.
3. El repandin A, repandin B, repandin C y tetraludín A presentaron actividad antimalaria a concentraciones entre 2.2 a 3.6 $\mu\text{g/mL}$. Resultaron no citotóxicos en las células Vero.
4. El repandin A, repandin B, repandin C y tetraludín A no presentaron actividad antimicrobiana a concentraciones de 50, 10 y 2 $\mu\text{g/mL}$ contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Staphylococcus aureus*, MSR, *Pseudomona aeruginosa* y *Mycobacterium intracellulare*.

5. El repandin A, repandin B, repandin D, repandin E y tetraludin A inhibieron la activación de NF- κ B y COX-2 mediada por PMA y TNF- α en células SW 1353.
6. En macrófagos de ratón inducidos por LPS, el repandin A y repandin E inhibieron la actividad enzimática de COX-2. El repandin B, repandin D y tetraludin A no mostraron inhibición en la actividad enzimática de COX-2.
7. El repandin A, repandin B, repandin D, repandin E y tetraludin A, inhibieron efectivamente el crecimiento celular en líneas de tumor humano.
8. El repandin D y tetraludin A indujeron el arresto del ciclo celular en fase G₂/M y apoptosis.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

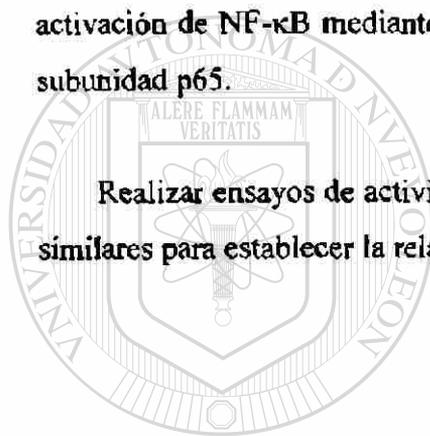
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RECOMENDACIONES

Realizar estudios para confirmar que este tipo de melampólidos inhiben la activación de NF- κ B mediante la alquilación de las cisteínas 38 y 120 localizadas en la subunidad p65.

Realizar ensayos de actividad enzimática de COX-2 con el repandin C y compuestos similares para establecer la relación estructura-función de este tipo de SLs.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

REFERENCIAS

1. Picman, A. K. (1986) *Biochem. System. Ecol.* 14, 255-281.
2. Rogers, D., Moss, G. P. and Neidle, S. (1972). *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 142-143.
3. Fischer, N. H. (1991) *Methods in Plant Biochemistry.* 7, 187-211.
4. Fischer, N. H., Lu, T., Cantrell, C. L., Castañeda-Acosta, J., Quijano, L. and Franzblau, S. G. (1998) *Phytochemistry*, 49, 559-564.
5. Barrero, A. F., Oltra, Rodríguez-García, I., Barragan, A. and Alvarez M. (2000). *J. Nat. Prod.* 63, 305-307
6. "Activation and Regulation of the Nitric Oxide" by Ignarro, L. J. *Oxidative Stress and Signal Transduction/ Edited by Forman, H. J. and Cadenas, E.* Chapman & Hall (1997) pag 14.
7. Hehner, S. P., Heinrich, M., Bork, P. M., Vogt, M., Ratter, F., Lehmann, V., Schulze-Osthoff, K., Dröge, W., and Schmitz, M. L. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 1288-1297.
8. Subbaramaiah, K., Bulic, P., Lin, Y., Dannenberg, A. and Pasco, D. S. (2001). *J. of Biomolecular Screening.* Vol. 6, No. 2, 101-110.
9. Hwang, D., Fischer, N. H., Jang, B. C., Tak, H., Kim, J. K. and Lee, W. (1996) *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 226, 810-818.
10. Castro, V., Murillo, R., Klaas, C. A., Meunier, C., Mora, G., Pahl, H. L., Merfort, I. (2000) *Planta Médica.* 66, 591-595.
11. Castro, V., Rungeler, P., Murillo, Hernandez, E., Mora, G., Pahl, H. L., Merfort, I. (2000) *Phytochemistry.* 53, 257-263.
12. Kim, E. J., Jin, H. K., Kim, Y. K., Lee, H. Y., Lee, S. Y., Lee, K. R., Zee, O. P., Han, J. W., Lee, H. W. (2001) *Biochemical Pharmacology.* 61, 903-910.
13. Seaman, F. C., Juneau, G. P., DiFeo, D. R., Jungk, S. and Fischer, N. H. (1979). *J. Org. Chem.*, Vol. 44, 3400-3404.

14. Jakupovic, J., Hafez, S., Bohlmann, F. and Dominguez, A. (1988). **Phytochemistry**, Vol. 27, 3881-3885.
15. Quijano, L., Bloemenstiel, D. and Fischer, N. H. (1979). **Phytochemistry**, Vol. 18, 1529-1532.
16. Quijano L., Olivier, E. J. and Fischer, N. H. (1980). **Phytochemistry**, Vol. 19, 1485-1489.
17. Seaman, F. C. and Fischer, N. H. (1980). **Phytochemistry**, Vol. 19, 583-586.
18. Cantrell, C. I., Lu, T., Fronczek, F. R., Fischer, N. H., Adams, L. B. and Franzblau, S. G. (1996). **J. Nat. Prod.** Vol. 59, 1131-1136.
19. "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically," M7-A4, Vol. 17, No. 2, NCCLS. (1997).
20. "Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standar," M27-A, Vol. 17, No. 9, NCCLS, (1997).
21. Ridley, R. G. (2002). **Nature**, Vol. 415, 686-693.
22. Lyss, G., Knorre, A., Schmidt, T. J., Pahl, H. L. and Merfort, I. (1998). **J. Biol. Chem.** Vol. 273, 33508-33516.
23. García-Piñeres, A. J., Castro, V., Mora, G., S., Schmidt, T. J., Strunck, E., Pahl, H. L. and Merfort, I. (2001). **J. Biol. Chem.** Vol. 276, No. 43, 39713-39720.

24. Rüngeler, P., Castro, V., Mora, G., S., Gören, N., Vichnewski, W., Pahl, H. L., Merfort, I. and Schmidt, T. J. (1999). **Bioorg. Med. Chem.** 7, 2343-2352.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APENDICE

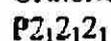
Crystal Data and X-ray Collection Parameters of Tetraludio Ha-Hb

Crystal data:



$$M_r = 464.45$$

Orthorhombic



$$a = 8.8389 (3) \text{ \AA}$$

$$b = 10.0179 (4) \text{ \AA}$$

$$c = 26.2334 (12) \text{ \AA}$$

$$V = 2322.90 (16) \text{ \AA}^3$$

$$Z = 4$$

$$D_x = 1.328 \text{ Mg m}^{-3}$$

Mo K α radiation

$$\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$$

Cell parameters from 2201 reflections

$$\theta = 2.5 - 25.0^\circ$$

$$\mu = 0.105 \text{ mm}^{-1}$$

$$T = 120 \text{ K}$$

colorless

$$0.40 \times 0.10 \times 0.02 \text{ mm}$$

Data collection:

Kappa CCD (with Oxford
Cryostream) diffractometer

ω scans with κ offsets

9630 measured reflections

2337 independent reflections

1746 reflections with $I > 2\sigma(I)$

$$R_{int} = 0.040$$

$$\theta_{max} = 25.0^\circ$$

$$h = -10 \rightarrow 10$$

$$k = -11 \rightarrow 11$$

$$l = -30 \rightarrow 30$$

intensity decay: < 1%

Refinement:

Refinement on F^2

$$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.059$$

$$\omega R(F^2) = 0.134$$

$$S = 1.106$$

2337 reflections

303 parameters

H-atom parameters constrained

$$\omega = 1/[s^2(F\sigma^2) + (0.0371 P)^2 + 2.0891 P]$$

$$\text{where } P = (F\sigma^2 + 2F\sigma^2)/3$$

$$(\Delta/\sigma)_{max} = 0.002$$

$$\Delta\rho_{max} = 0.24 \text{ e \AA}^{-3}$$

$$\Delta\rho_{min} = -0.28 \text{ e \AA}^{-3}$$

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Gloria Alejandra Benavides Cortez

**Candidata para el Grado de
Doctora en Ciencias con Especialidad en Química Biomédica**

**Título de la Tesis: ESTUDIO FITOQUIMICO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE
LOS MELAMPOLIDOS AISLADOS DE *Tetragonotheca
repanda* y *Tetragonotheca ludoviciana* (ASTERACEAE)**

Área de Estudio: Química Biomédica

Biografía:

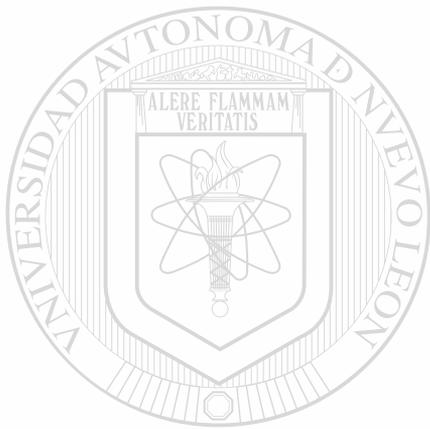
Datos Personales: Nacida el 13 de Abril de 1969 en Monterrey, Nuevo León, hija del Sr. Orfelio Benavides Sanchez y de la Sra. Blanca Laura Cortez Sepúlveda. Casada con Dr. Giuseppe L. Squadrito Goyzueta, con un hijo: Marcello L.

Escolaridad: Egresada de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. con el Título de Químico Clínico Biólogo, 1987-1992. Obtención del grado de Maestra en Ciencias con especialidad en Química Analítica Biomédica, en la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., 1993-1996.

Experiencia Profesional: Personal profesional no docente en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., bajo la supervisión de la Dra. Noemí Waksman, de Enero de 1993 a Dic. de 1999. Profesor visitante en el Departamento de Química de la Universidad Estatal de Louisiana, bajo la supervisión del Dr. Nikolaus H. Fischer, de Junio 1998 a Dic. 1999. Profesor visitante en el Departamento de Farmacognosia de la Universidad de Mississippi, bajo la supervisión del Dr. Nikolaus H. Fischer, de Enero del 2001 a Mayo del 2001. Investigador Asociado en el Departamento de Patología de plantas y Fisiología de cultivos de la Universidad Estatal de Louisiana, bajo la supervisión del Dr. Rodrigo Valverde, de Julio del 2001 a Abril del 2002.

Numero de Publicaciones: 3

- Billodeaux, D.R., Benavides, G.A., Fischer, N.H. and Fronczek, F.R. *Acta Cryst.* C55, 2129-2131 (1999).
- Waksman, N., Benavides-Cortez, G. and Rivas-Galindo, V. *Phytochemistry* 50: (6) 1041-1046 (1999).
- Benavides, G., Fronczek, F. R. and Fischer, N. H. *Acta Cryst.* C58, o131-o132 (2002).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



