

PRÁCTICA I.6

DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS DE DERIVADOS DE 6,7-DIARIL PTERIDINAS CON ACTIVIDAD NEMATOCIDA

DETERMINATION OF PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF 6,7-DIARYL PTERIDINE DERIVATIVES WITH NEMATOCIDE ACTIVITY

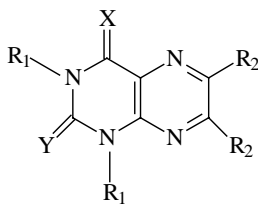
Juana Silber, Liliana Giacomelli, y Rosa Cattana

*Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-
Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Agencia
Postal Nro. 3. 5800 Río Cuarto, Argentina*

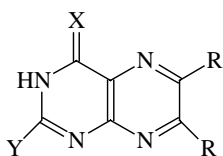
E-mail: rcattana@exa.unrc.edu.ar

Teniendo en cuenta que la absorción, distribución, biotransformación y excreción de un fármaco implican su pasaje a través de membranas celulares, es esencial tener en cuenta los mecanismos mediante los cuales las drogas cruzan las membranas y las propiedades físicoquímicas de las moléculas y de las membranas que afectan esta transferencia. El tamaño y la forma molecular, la solubilidad en el sitio de absorción, el grado de ionización y la solubilidad relativa en lípidos de sus formas ionizada y no ionizada son características importantes de un fármaco.

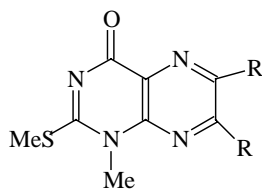
Se realizaron diversos estudios sobre una serie de compuestos derivados de 6,7 diaril pteridina (Esquema 1) que poseen actividad antihelmíntica in vitro [1].



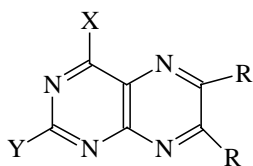
- 1: R₁ = methyl, R₂ = *p*-Br-phenyl X = Y = O
- 2: R₁ = methyl, R₂ = *p*-F-phenyl, X = Y = O
- 3: R₁ = methyl, R₂ = *p*-Cl-phenyl, X = Y = O
- 4: R₁ = H, R₂ = *p*-methoxyphenyl, X = O , Y = S
- 5: R₁ = H, R₂ = *p*-F-phenyl, X = O, Y = S
- 6: R₁ = H, R₂ = *p*-Cl-phenyl, X = O, Y = S
- 7: R₁ = H, R₂ = *p*-Br-phenyl, X = Y = S



- 8: R = 2-thienyl, X = S, Y = H



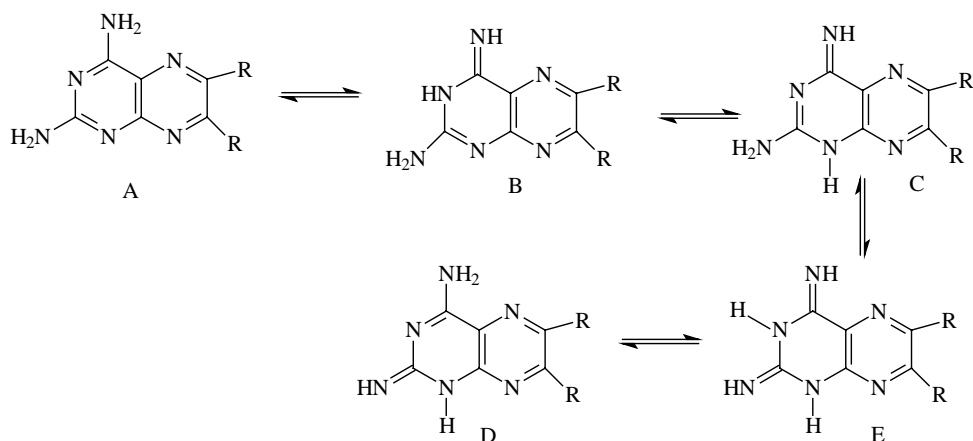
- 9: R = *p*-F-phenyl
- 10: R = *p*-Cl-phenyl
- 11: R = *p*-Br-phenyl



- 12: R = 2-thienyl, X = Y = NH₂
- 13: R = 2-thienyl, X = NH₂, Y = H
- 14: R = phenyl, X = Y = NH₂
- 15: R = phenyl, X = NH₂, Y = H

Esquema 1

En algunos de los compuestos estudiados puede existir tautomerismo funcional en el cual estaría involucrado el grupo NH₂ como se muestra en el Esquema 2.



Esquema 2

Por otro lado, también es posible la formación de agregados en solución, mediante enlaces puentes de hidrógeno.

A los fines de relacionar la actividad terapéutica de estos compuestos con propiedades fisicoquímicas determinadas experimentalmente es necesario conocer cual de los posibles tautómeros predomina y si se encuentran libres o formando agregados.

Para ello, se hicieron estudios de efectos de temperatura y de concentración mediante espectroscopia UV/vis [2] en condiciones de solvente y concentración similares a las utilizadas para determinar su bioactividad.

Problema 1

Describe qué se observaría en los estudios UV/vis en caso de (a) formación de agregados. (b) Existencia de equilibrio intramolecular por formación de tautómeros

Muchos estudios muestran que la actividad biológica de una sustancia es predominantemente, una función de su hidrofobicidad que es la tendencia a ser repelido por el agua y disolverse en solventes no polares (lipofilicidad).

La hidrofobicidad/lipofilicidad de un compuesto es una propiedad compleja que generalmente se mide disolviéndolo en una mezcla bifásica de agua y un líquido inmisible y determinando luego la concentración de equilibrio en cada fase. Se calcula así coeficiente de partición entre ambos solventes. El más usado como medida de hidrofobicidad es el coeficiente de partición octanol-agua ($P_{o/w}$) y para utilizarlo en relaciones lineales de energía libre se lo expresa como logaritmo ($\log P_{o/w}$) [3].

Una alternativa es usar la cromatografía líquida en fase inversa (RPLC) para determinar la lipofilicidad. Es creciente el uso de RPLC en la estimación de propiedades fisicoquímicas de compuestos orgánicos, lo cual se conoce como “relaciones cuantitativas estructura-retención” y esto se relaciona con las “relaciones cuantitativas estructura-actividad”. La lipofilicidad que obtiene experimentalmente a través del

logaritmo del factor de capacidad ($\log k'$)^{*} el que es directamente proporcional al logaritmo del coeficiente de partición. El uso de RPLC para determinar descriptores de lipofilidad presenta varias ventajas sobre los métodos tradicionales para determinar coeficiente de partición: son métodos más rápidos, no es necesario tener la muestra pura, se puede automatizar. Una de las aproximaciones más usadas para determinar factores de capacidad como descriptores de lipofilidad es el $\log k'_w$ (logaritmo del factor de capacidad en agua pura), este presenta como ventaja la independencia del modificador orgánico, refleja la partición entre medios polar-no polar de manera similar al coeficiente de partición y depende únicamente de la estructura del soluto.

El $\log k'_w$ puede ser estimado desde la ordenada al origen de la ecuación (1) [4]:

$$\text{Log } k'_w = S \% + \log k'_w \quad (1)$$

donde S es el valor fuerza de Snyder y % es el porcentaje en volumen de la fase móvil.

Por otro lado puede utilizarse la ecuación (2):

$$\text{Log } k' = a + b \cdot E_T(30) \quad (2)$$

donde k' es el factor de capacidad del soluto a una dada composición de la fase móvil, $E_T(30)$ es el parámetro de polaridad del solvente de Reichardt [5] y a y b son los coeficientes de la regresión, se podrá calcular el $\log k'_w$ en agua pura empleando el valor de $E_T(30)$ correspondiente a agua pura. Se ha demostrado [2,4] que mediante la ecuación anterior se obtienen valores de $\log k'_w$ más exactos que si se grafica $\log k'$ vs. % de solvente orgánico y se extrapola a concentración cero de éste.

Problema 2

En tabla 1, se muestran los valores de $\log k'$ medidos en columnas MAI (membrana artificialmente inmovilizada) y mezclas acetonitrilo (ACN)-agua a pH fisiológico como fase móvil, % y $E_T(30)$ para distintas composiciones de solvente para los compuestos 4, 9, y 15.

Utilizando cualquier programa estadístico calcule $\log k'_w$ mediante los dos métodos descriptos (ecuaciones 1 y 2). Compare la validez de los resultados obtenidos por ambos métodos.

PROBLEMA 3

En Tabla 2 se muestran los valores obtenidos de $\log k'_w$ para todos los compuestos estudiados Error! Bookmark not defined. (excepto los que debe calcular en problema 1) y valores de $-\log IC_{50}$ Error! Bookmark not defined..

*Factor de capacidad = $k' = (t - t_0)/t_0$; t = tiempo de retención del soluto, t_0 = tiempo de inyección del solvente.

Relacione los valores de $(-\log IC_{50})$ con los de $(\log k'_w)$. ¿Qué conclusiones podría obtener respecto a la relación estructura-actividad biológica?

Tabla 1 Valores de % de ACN, $E_T(30)$ y $\log k'$.

% ACN	$\log k' (4)$	$\log k' (9)$	$\log k' (15)$	$E_T (30)$
0				63.4
20	1.19	1.57	1.30	59.60
30	0.32	0.81	0.39	58.36
35	-0.017	0.48	0.057	57.74
40	-0.37	0.15	-0.35	57.29
45	-0.68	-0.04	-0.71	56.87

Tabla 2 Valores de actividad antihelmíntica $(-\log IC_{50})$, de ref. 1)^a y logaritmo de factor de capacidad en agua pura en columnas MAI ($\log k'_w$) para los compuestos de Ssquema 1.

Compound	$-\log IC_{50}$	$\log k'_w$
1	2.52	4.84
2	2.10	3.63
3	3.00	5.04
4	1.19	
5	0.72	3.68
6	2.12	4.72
7	3.00	5.68
8	1.08	3.60
9	1.52	
10	2.46	5.26
11	2.71	5.25
12	1.11	3.42
13	0.60	3.62
14	1.22	3.85
15	0.97	

^a IC_{50} es la concentración requerida para obtener un 50 % de reducción en el crecimiento de población de un nemátodo.

REFERENCIAS

1. C. Ochoa, J. Rodríguez, M. L. Lopez García, A. R. Martínez, M. M. Martínez. *Arzneim. Forsch. Drug. Res.* **46**, 643 (1996).
2. M. Reta, L. Giacomelli, M. Santo, R. Cattana, J. J. Silber, C. Ochoa, M. Rodríguez, A. Chana. *Biomed. Chromatogr.* **17**, 365 (2003).
3. R. Kalizan, A. Nasal, A. Bucinski. *Chem. Rev.* 91 (1993).
4. J. J. Michels, J. G. Dorsey. *J. Chromatogr.* **499**, 435 (1990)
5. C. Reichardt. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, 2nd ed., VCH, New York (1990).

Rosa Cattana

rcattana@exa.unrc.edu.ar

El trabajo en los laboratorios de Medicinal Chemistry debe mantener altos estándares de precaución y buen uso.

El manejo de instrumental eléctrico, la utilización de calor, el material de cristal y los disolventes no presentan un especial problema, si se siguen las instrucciones del supervisor.

Este documento ha sido supervisado por el Prof. Dra. Rosa Cattana (rcattana@exa.unrc.edu.ar) quien informa que no existen problemas específicos de seguridad en la realización de este ejercicio, incluyendo toxicidad, inflamabilidad y explosión, ni cualquier otro destacable, dentro de lo usual en un laboratorio de Medicinal Chemistry.

Se agradecerá comunicar al Editor cualquier posible incidencia.

EXERCISE I.6

DETERMINATION OF PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF 6,7-DIARYL PTERIDINE DERIVATIVES WITH NEMATOCIDE ACTIVITY

Juana Silber, Liliana Giacomelli, and Rosa Cattana

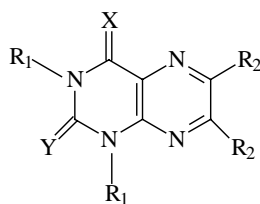
Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Agencia Postal No. 3, 5800 Río Cuarto, Argentina

E-mail: rcattana@exa.unrc.edu.ar

Absorption, distribution, biotransformation, and excretion of a medicinal drug imply its penetration of a cellular membrane. Thus, it is essential to know the mechanism by which drugs pass through the membranes as well as the physicochemical properties of these molecules and the membranes that affect such transference.

The size and molecular shape, the solubility at the absorption site, the degree of ionization, and the relative solubility in lipids of the ionized and nonionized forms are important properties to determine in these drugs.

Several physicochemical properties of a series of compound derivatives of 6,7-diaryl pteridines (Scheme 1), which have been shown to have in vitro antihelmintic properties [1], have been studied.



1: $R_1 = \text{methyl}$, $R_2 = p\text{-Br-phenyl}$ $X = Y = \text{O}$

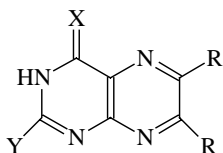
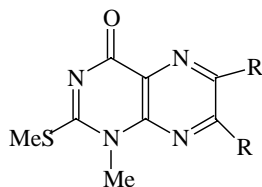
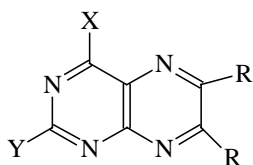
2: $R_1 = \text{methyl}$, $R_2 = p\text{-F-phenyl}$, $X = Y = \text{O}$

3: $R_1 = \text{methyl}$, $R_2 = p\text{-Cl-phenyl}$, $X = Y = \text{O}$

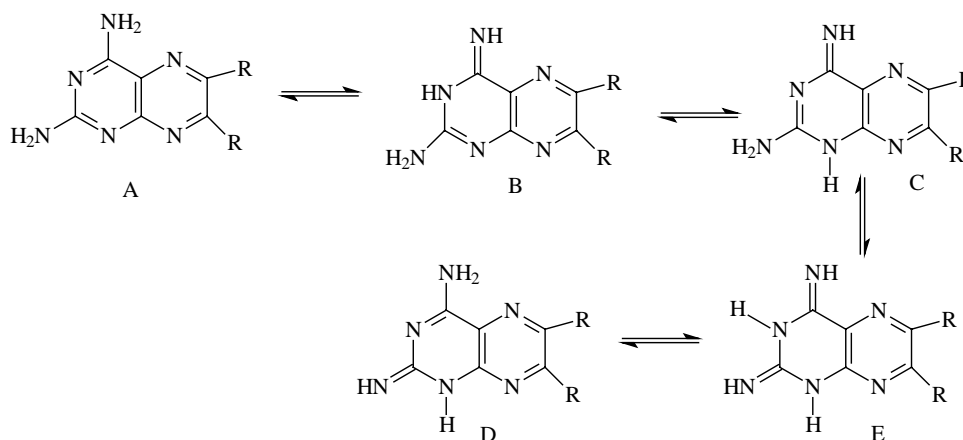
4: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = p\text{-methoxyphenyl}$, $X = \text{O}$, $Y = \text{S}$

5: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = p\text{-F-phenyl}$, $X = \text{O}$, $Y = \text{S}$

6: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = p\text{-Cl-phenyl}$, $X = \text{O}$, $Y = \text{S}$

7: $R_1 = H, R_2 = p\text{-Br-phenyl}, X = Y = S$ 8: $R = 2\text{-thienyl}, X = S, Y = H$ 9: $R = p\text{-F-phenyl}$ 10: $R = p\text{-Cl-phenyl}$ 11: $R = p\text{-Br-phenyl}$ 12: $R = 2\text{-thienyl}, X = Y = \text{NH}_2$ 13: $R = 2\text{-thienyl}, X = \text{NH}_2, Y = H$ 14: $R = \text{phenyl}, X = Y = \text{NH}_2$ 15: $R = \text{phenyl}, X = \text{NH}_2, Y = H$ **Scheme 1**

Some of the studied compounds can show functional tautomerism in which the NH_2 group is involved, such as is shown in Scheme 2.

**Scheme 2**

On the other hand, it is also possible that these compounds in solution form aggregates through hydrogen bonding.

In order to relate the therapeutic activity of these compounds with the experimentally measured physicochemical properties, it is necessary to know which is the predominant tautomeric form and which are free or aggregated in solution.

Consequently, studies were performed to determine the effects of temperature and concentration in the UV/vis spectra [2] in the solvents and concentrations similar to the ones used for the determination of its bioactivity.

Problem 1

Describe what you expect to observe in the UV/vis spectra by changing temperature and/or concentration in the case of (a) aggregates formation and (b) different forms in equilibrium due to intramolecular formation of tautomers.

Many studies have shown that the biological activity of the substances is predominantly a function of their hydrophobic nature, which is the tendency to repel water and be miscible in nonpolar solvents (lipophilicity).

The hydrophobic/lipophilic nature of a compound is a complex physicochemical property that can be determined by dissolving it in a two-phase mixture of water and an immiscible liquid and then measuring its equilibrium concentration in each phase. Thus, the partition coefficient of the compound between water and the solvent is calculated

The most useful parameter as a measure of hydrophobicity is the partition coefficient between water and octanol ($P_{o/w}$) or to use it in free energy lineal relationships as its logarithm ($\log P_{o/w}$) [3].

Alternatives, particularly chromatographic methods, have been evaluated and used successfully to assess the lipophilicity of organic compounds. Reverse phase liquid chromatography (RPLC) is particularly useful for estimating the physicochemical properties of organic compounds and is known as “structure–retention quantitative relationships”, which are also related to “structure–activity quantitative relationships”. The lipophilicity parameter is obtained experimentally as the logarithm of the capacity factor ($\log k'$)[†] which is proportional to the logarithm of partition coefficient. The use of RPLC to determine lipophilicity descriptor has several advantages over the traditional methods of obtaining partition coefficients because it is faster, no purification of the sample is needed, and it can be performed automatically. One of the most used approximations to determine capacity factors as lipophilicity descriptors is the $\log k'_w$ (logarithm of the capacity factor in pure water). The advantage of using this descriptor is the fact that it is independent of the organic solvent used in its determination, and reflects the partition between the polar and nonpolar media in a way similar to a partition coefficient but is independent of the solute structure.

The $\log k'_w$ can be estimated by the intercept of the plot of eq. 1 [4]

$$\text{Log } k' = S \% + \log k'_w \quad (1)$$

where S is the Snyder force and % is the percentage of the mobile phase.

Equation 2 can also be calculated

$$\text{Log } k' = a + b \cdot E_T \quad (2)$$

[†]Capacity factor = $k' = \frac{C_{\text{stationary}}}{C_{\text{mobile}}}$ (www.tjupac.org/publications/ed/medjinal/chemis/tye/)

where k' is the capacity factor of a given composition in the mobile phase and $E_T(30)$ is the Reichardt's solvent polarity parameter [5] while a and b are the regression coefficients. The value of $\log k'_w$ in pure water can be calculated as the value of $E_T(30)$ corresponding to pure water. It has been demonstrated [2,4] that the values of $\log k'_w$ obtained by means of eq. 2 are more exact than the ones obtained by plotting $\log k'$ vs. % of the organic solvent (eq. 1) and extrapolating to zero concentration of this solvent.

Problem 1

Table 1 shows the values of $\log k'$ measured in MAI columns (artificially immobilized membranes) in mixtures of water-acetonitrile at physiological pH as mobile phase, % and $E_T(30)$ for different solvent compositions of compounds 4, 9, and 15.

Using any statistics software calculates $\log k'_w$ using the described methods (equations 1 and 2). Compare the validity of the values obtained by both methods.

Problem 3

Table 2 shows the values of $\log k'_w$ obtained for all the studied compounds (except those that should be calculated in problem 2) together with the values of $-\log IC_{50}$ (Error! Bookmark not defined. Error! Bookmark not defined.).

Relate the values of $(-\log IC_{50})$ with those of $(\log k'_w)$. What conclusions can be drawn regarding the structure–activity relationship?

Table 1 Values of % of acetonitrile (ACN), E_T (30), and $\log k'$.

% ACN	Log k' (4)	Log k' (9)	Log k' (15)	E_T (30)
0				63.4
20	1.19	1.57	1.30	59.60
30	0.32	0.81	0.39	58.36
35	-0.017	0.48	0.057	57.74
40	-0.37	0.15	-0.35	57.29
45	-0.68	-0.04	-0.71	56.87

Table 2 Values of antihelmintic activity ($-\log IC_{50}$, ref. 1)^a and logarithm of the capacity factor in pure water in columns MAI ($\log k'_w$) for the compounds in Scheme 1.

Compound	$-\log IC_{50}$	Log k'_w
1	2.52	4.84
2	2.10	3.63
3	3.00	5.04
4	1.19	
5	0.72	3.68
6	2.12	4.72
7	3.00	5.68
8	1.08	3.60
9	1.52	
10	2.46	5.26
11	2.71	5.25
12	1.11	3.42
13	0.60	3.62
14	1.22	3.85
15	0.97	

^a IC_{50} is the inhibitory concentration required to obtain up 50 % in the reduction of population growth of nematode.

REFERENCES

1. C. Ochoa, J. Rodríguez, M. L. Lopez García, A. R. Martínez, M. M. Martínez. *Arzneim. Forsch. Drug. Res.* **46**, 643 (1996).
2. M. Reta, L. Giacomelli, M. Santo, R. Cattana, J. J. Silber, C. Ochoa, M. Rodríguez, A. Chana. *Biomed. Chromatogr.* **17**, 365 (2003).
3. R. Kalizan, A. Nasal, A. Bucinski. *Chem. Rev.* 91 (1993).
4. J. J. Michels, J. G. Dorsey. *J. Chromatogr.* **499**, 435 (1990)
5. C. Reichardt. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, 2nd ed., VCH, New York (1990).

Rosa Cattana

rcattana@exa.unrc.edu.ar

High standards in safety measures should be maintained in all work carried out in Medicinal Chemistry Laboratories. The handling of electrical instruments, heating elements, glass materials, dissolvents and other inflammable materials does not present a problem if the supervisor's instructions are carefully followed.

This document has been supervised by Prof. Dr. Rosa Cattana (rcattana@exa.unrc.edu.ar) who has informed that no special risk (regarding toxicity, inflammability, explosions), outside of the standard risks pertaining to a Medicinal Chemistry laboratory exist when performing this exercise.

If your exercise involves any "special" risks, please inform the editor.