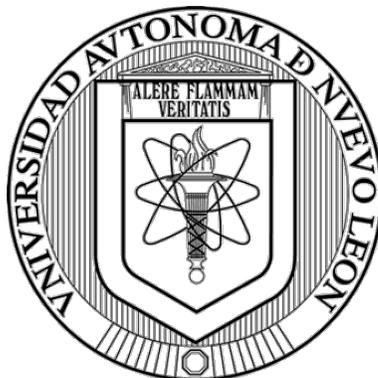


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**SEMISÍNTESIS Y EVALUACIÓN CITOTÓXICA DE ARILTETRALINAS C(4)-
FUNCIONALIZADAS A PARTIR DE 3'-DESMETOXI-6-O-DESMETIL
ISOGUAIACINA**

Por

QFB ERIKA LETICIA CASTILLO GONZÁLEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Orientación en Farmacia**

Septiembre 2020

SEMISÍNTESIS Y EVALUACIÓN CITOTÓXICA DE ARILTETRALINAS C(4)-
FUNCIONALIZADAS A PARTIR DE 3'-DESMETOXI-6-O-DESMETIL
ISOGUAIACINA

Aprobación de la Tesis:



Dr. Edgar Abraham García Zepeda
Presidente



Dra. María del Rayo Camacho Corona
Secretario



Dra. María del Rosario González González
Vocal



Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Subdirectora de Estudios de Posgrado

SEMISÍNTESIS Y EVALUACIÓN CITOTÓXICA DE ARILTETRALINAS C(4)-
FUNCIONALIZADAS A PARTIR DE 3'-DESMETOXI-6-O-
DESMETILISOGUAIACINA

Revisión de la Tesis:

Comité Tutorial



Dr. María del Rayo Camacho Corona



Dra. María del Rosario González González



Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera



Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Subdirectora de Estudios de Posgrado

RESUMEN

QFB Erika Leticia Castillo González

Fecha de graduación: 5 de
septiembre de 2020

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

**Título del Estudio: SEMISÍNTESIS Y EVALUACIÓN CITOTÓXICA DE
ARILTETRALINAS C(4)-FUNCIONALIZADAS A PARTIR
DE 3'-DESMETOXI-6-O-DESMETILISOGUAIACINA**

Número de páginas: 181

**Candidato para el Grado de Maestro
en Ciencias con Orientación en
Farmacia**

**Área de estudio: Estudio de Compuestos con Actividad Farmacológica y
Biotecnología Farmacéutica**

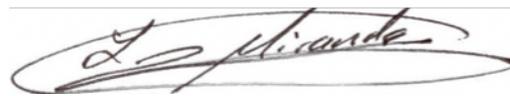
Propósito y Método de Estudio: Los datos publicados por el GLOBOCAN denotan una tendencia creciente en las estadísticas de incidencia y mortalidad del cáncer a nivel mundial, situándose actualmente como la segunda causa de muerte con 9.6 millones de defunciones. Esta problemática impulsó el desarrollo de diversas estrategias para abatirla, entre las que se encuentra el desarrollo de nuevos agentes citotóxicos a partir de productos naturales, destacándose podofilotoxina como fuente de obtención de sus derivados etopósido y tenipósido, útiles para el tratamiento de cáncer microcítico de pulmón. La similitud estructural del ciclolignano 3'-desmetoxi-6-O-desmetilisoguaiacina con podofilotoxina y su análogo citotóxico 3'-desmetoxi isoguaiacina, lo posiciona como un producto natural importante para desarrollar nuevos agentes citotóxicos. Es por ello que en el presente proyecto de investigación se planteó la semisíntesis de ariltetralinas C(4)-funcionalizadas y O-alquiladas a partir de 3'-desmetoxi-6-O-desmetilisoguaiacina mediante reacciones de eterificación, oxidación bencílica C-H y reducción, así como por adición nucleofílica de hidroxilamina y posterior acetilación. Las moléculas obtenidas se caracterizaron mediante el análisis de sus propiedades espectroscópicas (RMN ^1H y ^{13}C 1D y 2D) y espectrométricas para después evaluar la actividad citotóxica frente a diversas líneas celulares de cánceres humanos.

Contribuciones y Conclusiones: La estereoquímica relativa y absoluta 1*R*,2*R*,3*R*- de EC-01 y, por ende, la de **LT8** y sus derivados no naftalénicos, se confirmó con la conformación cristalina observada por rayos X, las constantes de

acoplamiento ($J_{1-2} = 5.6$ Hz, $J_{2-3} = 6.9$ Hz) en RMN ^1H y por el primer efecto Cotton observado en el espectro de dicroísmo circular para **EC-01**. En la etapa de semisíntesis se obtuvieron 14 derivados, reportándose 10 de estos por primera vez. Se caracterizaron 5 isómeros constitucionales de posición *mono-* y *di-O-*metilados obtenidos a partir de la reacción de **LT8** con yodometano y carbonato de potasio mediante las correlaciones entre los hidrógenos vecinos espacialmente observadas en el espectro del experimento NOESY. Se obtuvieron dos derivados 6,7-(1,3-dioxolano) a partir de la reacción de **LT8** con bromoclorometano, **EC-15** y su análogo naftalénico **EC-16** en un 40%. Mediante bromación bencílica con *N*-bromosuccinimida se sintetizaron dos derivados naftalénicos más, **EC-09** bromado en posición C4 y **EC-12**, análogo aromatizado de **EC-01**. Se logró funcionalizar la posición C4 mediante oxidación bencílica con Oxone[®] y KI irradiada con luz y se propuso un mecanismo de reacción en el que ocurren una sustitución nucleofílica unimolecular y una eliminación E1 de manera simultánea a partir del aislamiento de los subproductos **EC-12** y **EC-27**, éste último que se encuentra bromado en uno de los anillos aromáticos, probando así la predominancia de una sustitución electrofílica aromática sobre una oxidación C-H. A partir del derivado cetónico **EC-18** obtenido en un 40% de la oxidación bencílica, se sintetizó por reducción estereoselectiva del grupo carbonilo en presencia de LiAlH_4 el alcohol **EC-47** en posición β en un 54%. A su vez, se logró obtener el derivado oxima **EC-41** en un 78% a partir del producto cetónico **EC-18** por adición nucleofílica de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, a pesar del impedimento estérico; a partir de este producto, se obtuvo el derivado O-acetil oxima **EC-49** en un 12% en presencia de Ac_2O . Finalmente, se realizó un cribado de 6 derivados semisintéticos y **LT8** con etopósido como control positivo mediante el ensayo de sulforodamina B a 25 μM . Estadísticamente, se concluyó que no existen diferencias significativas en el % de actividad citotóxica de las 7 moléculas ensayadas. Sin embargo, las diferencias más notorias se observaron en las líneas celulares K-562 y SKLU-1. En la primera, los derivados **EC-04** y **EC-41** presentan un % de inhibición de crecimiento celular de 73.18 y 53.2%, respectivamente, superando al 44.54% observado para **LT8**. En la estirpe SKLU-1 también aparece el derivado **EC-01** como el compuesto semisintético más citotóxico (37.96%), seguido por **EC-18** (32.91%), ambos superando el porcentaje observado para **LT8** (13.86%). Finalmente, se destacan los derivados **EC-04** y **EC-41** al mostrar un 24.32% y 29.07% de inhibición de crecimiento celular, respectivamente en la línea normal COS-7, respecto al 73% y 53.2% observados para la línea K-562, en ese orden. Aun se requiere la evaluación biológica de las moléculas faltantes pero, actualmente, se reconocen a los derivados **EC-04** y **EC-41** como más activos que **LT8** contra la línea K-562 de leucemia mieloide crónica.



Dr. Edgar Abraham García Zepeda
Director de Tesis



Dr. Luis Demetrio Miranda Gutiérrez
Co-Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS



**Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas
Laboratorio de Química Farmacéutica**

Por proveer la infraestructura, equipos e insumos utilizados en el proyecto de tesis.



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Por la beca de manutención otorgada (CVU 932078) durante este proyecto de investigación.



Dr. Edgar Abraham García Zepeda

Por haber sido mi mentor desde el inicio de mi licenciatura y darme la oportunidad de desempeñarme en la química orgánica. Gracias por depositar su confianza en mí para la realización de este proyecto; sin su guía, apoyo, paciencia y atenciones no hubiera sido posible culminarlo.



Dr. Luis Demetrio Miranda Gutiérrez

Por su co-dirección, asesoramiento, instalaciones y reactivos provistos para la semisíntesis y adquisición de los espectros de las moléculas de esta investigación en el laboratorio 1-2 del Instituto de Química-UNAM.



Dra. María del Rayo Camacho Corona

Por proveer el producto natural 3'-desmetoxi-6-O-desmetilisoguaiacina para la semisíntesis de este proyecto.



Comité tutorial

Dra. María del Rayo Camacho Corona
Dra. María del Rosario González González
Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera

Por sus observaciones y sugerencias que, de forma interdisciplinaria, enriquecieron el desarrollo de la tesis.

Gracias a mis familiares que estuvieron apoyándome en cada etapa de la maestría; a mi madre Reyna, por estar siempre pendiente de mí durante mi estancia lejos de casa, a mis abuelos Luz María y José Mauro, por todos sus cuidados y atenciones durante mis padecimientos, y a mi tío Ángel, por ayudarme mientras estuve en Ciudad de México.

Bien es dicho que, si caminas solo irás más rápido, pero si caminas acompañado, llegarás más lejos y, en este sentido, agradezco a Saúl, por acompañarme en los buenos momentos y en las dificultades, por animarme siempre y por su apoyo moral y técnico. Es una serendipia el haber llegado a mi vida.

Del Laboratorio de Química Farmacéutica (anteriormente de Química de Productos Naturales), quiero agradecer a Saúl, Lolis, y Juan, quienes me recibieron y acogieron. Sin ustedes mi trabajo diario en el laboratorio no hubiera sido tan ameno.

Agradezco a mis compañeros del laboratorio 1-2 del Instituto de Química-UNAM: Cynthia, Ricardo, Davir, Norberto, Eduardo, Pedro, Mario, Enrique, Yoarhy, Gabriel, Ángel y Adriana Romo por cada uno de sus consejos experimentales en síntesis orgánica para el desarrollo de esta tesis.

DEDICATORIA

Para mi madre, Reyna Leticia.

Para mis abuelos, José Mauro y Luz María.

Para mi compañero de vida (S.A.A.R.)

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 CÁNCER.....	1
1.1.1 Generalidades	1
1.1.2 Epidemiología	2
1.2 BLANCOS TERAPÉUTICOS DE AGENTES CITOTÓXICOS	3
1.2.1 Microtúbulos.	5
1.2.2 Topoisomerasas	6
1.3 PRODUCTOS NATURALES MODULADORES DE MICROTÚBULOS	8
1.3.1 Sitio de Unión de la Colchicina	9
1.3.2 Podofilotoxina	11
1.4 DICROÍSMO CIRCULAR.....	13
1.4.1 Fundamento	13
1.4.2 Cromóforos	18
1.4.3 Efecto Cotton	19
1.4.4 Vectores de Polarización	20
1.4.5 Regla del Sector Benceno	21
1.4.6 Regla de Quiralidad del Benceno	23
1.4.7 Regla de la Quiralidad del Excitón	26
ANTECEDENTES	29
2.1 ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE DERIVADOS DE PODOFILOTOXINA.....	29
2.2 INTERACCIÓN DE PODOFILOTOXINA Y DERIVADOS CON BLANCOS TERAPÉUTICOS.....	30
2.2.1 Interacción de Podofilotoxina y Derivados con Tubulina	31
2.2.2 Interacción de Podofilotoxina y Derivados con Topoisomerasa II	37
2.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LIGNANOS NATURALES	40
2.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE 3'-DESMETOXI-6-O-DESMETILISOGUAIACINA.....	42
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
3.1 HIPÓTESIS.....	43
3.2 OBJETIVOS.....	43

3.2.1 Objetivo General	43
3.2.2 Objetivos Específicos	44
PARTE EXPERIMENTAL	45
4.1 UBICACIÓN DE INFRAESTRUCTURA Y EQUIPOS	45
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	46
4.2.1 Purificación de Compuestos	46
4.2.2 Semisíntesis de Ariltetralinas C(4)-funcionalizadas	46
4.2.3 Elucidación Estructural de los Compuestos Obtenidos	50
4.2.4 Determinación de la Actividad Citotóxica	51
4.2.4.1 Preparación de la Línea Celular.	51
4.2.4.2 Rastreo de Actividad Citotóxica a 25 μ M.	52
4.3 DISPOSICIÓN DE RESIDUOS	53
4.4 OBTENCIÓN DE 3'-DESMETOXI-6-O-DESMETILISOGUAIACINA	55
4.4.1 Datos Físicos y Espectroscópicos de 3'-desmetoxi-6-O-desmetil isoguaiacina (LT8)	56
4.5 OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS SEMISINTÉTICOS	57
4.5.1 Obtención de Subproductos Mono- y di- Metoxilados a Partir de 3'-desmetoxi-6-O-desmetil isoguaiacina (LT8)	57
4.5.1.1 Datos Físicos y Espectroscópicos del Subproducto EC-02	58
4.5.1.2 Datos Físicos y Espectroscópicos del Subproducto EC-03	58
4.5.1.3 Datos Físicos y Espectroscópicos del Subproducto EC-04	59
4.5.1.4 Datos Físicos y Espectroscópicos del Subproducto 3'-desmetoxi isoguaiacina (EC-06)	59
4.5.1.5 Datos Físicos y Espectroscópicos del Subproducto EC-28	60
4.5.2 Obtención del Derivado EC-01 por O-metilación	61
4.5.2.1 Datos Físicos y Espectroscópicos del Derivado EC-01	62
4.5.3 Obtención de los Derivados 6,7-(1,3-dioxolano)	63
4.5.3.1 Preparación del Derivado EC-15 por Metilación de Catecol... ..	63
4.5.3.1.1 Datos Físicos y Espectroscópicos del Derivado EC-15	64
4.5.3.2 Preparación del Subproducto EC-16 por Metilación de Catecol.	64
4.5.3.2.1 Datos Físicos y Espectroscópicos del Derivado EC-16	65
4.5.4 Obtención de Derivados Naftalénicos por Bromación Bencílica	66
4.5.4.1 Datos Físicos y Espectroscópicos del Subproducto EC-09	67
4.5.4.2 Datos Físicos y Espectroscópicos del Subproducto EC-12	67
4.5.5 Obtención del Derivado EC-18 por Oxidación Bencílica	68
4.5.5.1 Datos Físicos y Espectroscópicos del Derivado EC-18	69
4.5.6 Obtención del Derivado EC-47 por Reducción	70
4.5.6.1 Datos Físicos y Espectroscópicos del Derivado EC-47	71
4.5.7 Obtención de EC-41 por Adición Nucleofílica a Carbonilo	72
4.5.7.1 Datos Físicos y Espectroscópicos del Derivado EC-41	73
4.5.8 Obtención del Derivado EC-49 por Esterificación	74
4.5.8.1 Datos Físicos y Espectroscópicos del Derivado EC-49	75
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	76
5.1 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE 3'-DESMETOXI-6-O-DESMETIL ISOGUAIACINA	76

5.2 SÍNTESIS DE DERIVADOS METOXILADOS A PARTIR DE 3'-DESMETOXI-6-O-DESMETIL ISOGUIACINA	83
5.2.1 Elucidación Estructural de Derivados Metoxilados a Partir de 3'-desmetoxi-6-O-desmetil isoguaiacina	86
5.2.1.1 Elucidación Estructural del Subproducto EC-02	86
5.2.1.2 Elucidación Estructural del Subproducto EC-03	89
5.2.1.3 Elucidación Estructural del Subproducto EC-04	91
5.2.1.4 Elucidación Estructural del Subproducto 3'-desmetoxi isoguaiacina (EC-06)	93
5.2.1.5 Elucidación Estructural del Subproducto EC-28	96
5.2.1.6 Elucidación Estructural del Derivado EC-01	98
5.3 SÍNTESIS DE DERIVADOS 6,7-(1,3-DIOXOLANO)	104
5.3.1 Elucidación Estructural del Derivado EC-15	107
5.3.2 Elucidación Estructural del Subproducto EC-16	108
5.4 SÍNTESIS DE DERIVADOS NAFTALÉNICOS POR BROMACIÓN BENCÍLICA	110
5.4.1 Elucidación Estructural de Derivados Naftalénicos Obtenidos por Bromación Bencílica	112
5.4.1.1 Elucidación Estructural del Subproducto EC-09	112
5.4.1.2 Elucidación Estructural del Subproducto EC-12	114
5.5 SÍNTESIS DEL DERIVADO EC-18 POR OXIDACIÓN BENCÍLICA	116
5.5.1 Elucidación Estructural del Subproducto EC-27	125
5.5.2 Elucidación Estructural del Derivado EC-18	127
5.6 OBTENCIÓN DEL DERIVADO EC-47 POR REDUCCIÓN DE CARBONILO	129
5.6.1 Elucidación Estructural del Derivado EC-47	133
5.7 SÍNTESIS DEL DERIVADO OXIMA EC-41 POR ADICIÓN NUCLEOFÍLICA	142
5.7.1 Elucidación Estructural del Derivado EC-41	142
5.8 SÍNTESIS DEL DERIVADO EC-49 POR ACETILACIÓN	144
5.8.1 Elucidación Estructural del Derivado EC-49	144
5.9 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ARILTETRALINAS	146
5.9.1 Rastreo de Actividad Citotóxica	146
CONCLUSIONES	155
REFERENCIAS	158

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Número de Casos y Muertes Mundialmente, Ambos Sexos, Todas las Edades, 2018.	2
2. Número de Casos y Muertes en México, Ambos Sexos, Todas las Edades, 2018.	3
3. Clasificación de Agentes Citotóxicos de Acuerdo con su Mecanismo de Acción.....	4
4. Dianas Moleculares de Agentes Citotóxicos dentro del Ciclo Celular.	5
5. Estructura de Microtúbulos.	5
6. Acción de las Topoisomerasas.	7
7. Clasificación de Agentes Antimitóticos (Mecanismo de Acción y Sitios de Unión de Inhibidores de los Microtúbulos.	8
8. Sitio de Unión de la Colchicina en el Complejo Tubulina-Colchicina:RB3-SLD.....	10
9. Ligandos de Tubulina en el Sitio de Unión de la Colchicina.....	11
10. Estructuras Químicas de Podofilotoxina (1a y 1b) y Epipodofilotoxina (2a y 2b).	12
11. Vector Eléctrico de Luz Polarizada Linealmente.	14
12. Luz Polarizada Circularmente a la Derecha.	14
13. Superposición de Luz Polarizada Circularmente a la Derecha y a la Izquierda a a Misma Intensidad y Longitud de Onda.	15
14. Superposición de Luz Polarizada Circularmente a la Izquierda y a la Derecha a Diferente Velocidad de Propagación.	16
15. Luz Polarizada Elípticamente.	16
16. Diagramas de Polarización de Bandas de Absorción de Moléculas Representativas.....	21
17. Proyección de Cuadrantes de la Regla del Sector Benceno.....	22
18. Regla de la Quiralidad del Benceno.	24
19. (a) Separación de los Estados Excitados de dos Cromóforos Acoplados y (b) Parámetro Típico de Efectos Cotton por Acoplamiento de Excitación.	27

20. Derivados Semisintéticos de Podofilotoxina con Actividad Citotóxica.....	30
21. Mapeo de los Grupos Farmacofóricos del Sitio de Unión de la Colchicina.....	32
22. Estructuras Químicas de Lignanós 1-5 Aislados de <i>B. fagaroides</i>	33
23. Esquema del Experimento STD-NMR. El Intercambio entre Ligando Unido y Libre Permite la Transferencia de Magnetización de la Proteína al Ligando.....	35
24. Representación Esquemática de los Protones que Interactúan con Tubulina. En Rojo los Protones más Afectados en el Complejo y en el Recuadro Punteado la Región que Interactúa con la Proteína.....	37
25. Estructuras de Etopósido y Derivados con Sustituciones en C4 o Anillo E.....	38
26. Escisión de ADN por Etopósido y Derivados.....	39
27. Interacción de TOP-53 con Topoisomerasa II de Levadura Determinado por STD [¹ H]-NMR.....	40
28. Esquema General de Síntesis.....	49
29. Clasificación de Residuos para su Disposición, Emitido por el Departamento de Medio Ambiente y Seguridad.....	54
30. Esquema de Síntesis del Derivado EC-01	61
31. Esquema de Síntesis del Derivado EC-15 por Metilación de Catecol.....	63
32. Esquema de Síntesis del Derivado EC-16 por Metilación de Catecol.....	64
33. Esquema de Síntesis por Bromación Bencílica.....	66
34. Esquema de Síntesis por Oxidación Bencílica.....	68
35. Esquema de Síntesis del Derivado EC-47 por Reducción de Carbonilo.....	70
36. Esquema de Síntesis del Derivado EC-41 por Adición Nucleofílica a Carbonilo.....	72
37. Esquema de Síntesis del Derivado EC-49 por Esterificación.....	74
38. Estructura Cristalina de Triacetato de 3'-desmetoxi-6-O-desmetil isoguaiacina.....	77
39. Estructuras Químicas de LT8 y 6,3'-di-O-desmetil isoguaiacina.....	78
40. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de LT8	82
41. Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de LT8	83
42. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del Subproducto EC-02	88
43. Espectro NOESY (400 MHz, CDCl ₃) del Subproducto EC-02	88
44. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) del Subproducto EC-03	91
45. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) del Subproducto EC-04	92
46. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de 3'-desmetoxi isoguaiacina.....	94
47. Estructuras Químicas de 3,4-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano y 3'-desmetoxi isoguaiacina.....	95
48. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del Subproducto EC-28	98
49. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del Derivado EC-01	99
50. Estructura Cristalina del Derivado EC-01	100
51. Espectro de DC del Derivado EC-01	103
52. Aplicación del Método de la Quiralidad del Excitón al Derivado EC-01	104
53. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del Derivado EC-15	108
54. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del Subproducto EC-16	109
55. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del Subproducto EC-09	113

56. Espectro de Masas de Baja Resolución del Subproducto EC-09	114
57. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del Subproducto EC-12	115
58. Estructura Cristalina del Subproducto EC-12	116
59. Factores Estéricos y Electrónicos que Afectan la Reactividad del Derivado EC-01	123
60. Mecanismo de Reacción de Oxidación Bencílica con Oxone/KI.	124
61. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del Subproducto EC-27	126
62. Espectro de Masas de Alta Resolución del Subproducto EC-27	127
63. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del Derivado EC-18	129
64. Ángulo Bürgi-Dunitz en ataque nucleofílico a carbonilo de EC-18	132
65. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) del Derivado EC-47	134
66. Espectro NOESY (400 MHz, CDCl ₃) del Derivado EC-47	135
67. Espectro HSQC (400 MHz, CDCl ₃) del Derivado EC-47	136
68. Ampliación (45-60, 3.5-3.9 ppm) de Espectro HSQC (400 MHz, CDCl ₃) del Derivado EC-47	137
69. Ampliación (5-45, 0.6-2.4 ppm) de Espectro HSQC (400 MHz, CDCl ₃) del Derivado EC-47	138
70. Ampliación (130-165, 3.5-7.0 ppm) de Espectro HMBC (400 MHz, CDCl ₃) del Derivado EC-47	139
71. Ampliación (147-149, 3.5-3.9 ppm) de Espectro HMBC (400 MHz, CDCl ₃) del Derivado EC-47	140
72. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) del Derivado EC-47	141
73. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del Derivado EC-41	143
74. Espectro de RMN ¹ H (700 MHz, CDCl ₃) del Derivado EC-49	146
75. Prueba de Normalidad de Anderson-Darling.	149
76. Prueba de Friedman con Líneas Celulares como Bloques.	151
77. Prueba de Friedman sin Etopósido con Líneas Celulares como Bloques.	152
78. Prueba de Friedman con Moléculas como Bloques.	153

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1 Definición de la Quiralidad del Excitón.	28
2 Citotoxicidad de Compuestos 1-5 en Líneas Celulares A549 y A2780	33
3 Actividad Citotóxica de Podofilotoxina y Derivados Frente a Diversas Líneas Celulares Cancerosas Humanas	41
4 Disposición y Cuantificación de Residuos	54
5 Datos Espectroscópicos de RMN ¹ H y ¹³ C de Ciclolignanos.....	80
6 Optimización de Reacción de Metilación a Partir de 3'-desmetoxi-6-O- desmetil isoguaiacina	85
7 Desplazamientos Químicos (δ) de RMN ¹ H y Constantes de Acoplamiento (J, en Hz, en Paréntesis) de 3'-desmetoxi isoguaiacina	96
8 Comparativa Entre Ángulo Diedro y Constante de Acoplamiento Experimentales y Teóricas del Derivado EC-01	101
9 Datos de Dicroísmo Circular del Derivado EC-01	102
10 Optimización de Reacción de Metilación de Catecol.....	106
11 Experimentos de Bromación Bencílica a Partir del Derivado EC-01	111
12 Optimización de Reacción de Oxidación Bencílica	119
13 Optimización de Reacción de Reducción de Carbonilo.....	130
14 Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Celular a 25 μM.....	147

NOMENCLATURA

°C	Grado centígrado
% IC	Porcentaje de inhibición de crecimiento
Ac ₂ O	Anhídrido acético
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIBN	Azobisisobutironitrilo
BaO	Óxido de bario
BPO	Peróxido de benzoilo
BrCH ₂ Cl	Bromoclorometano
brs	Señal ancha
CC	Cromatografía en Columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Br ₂	Dibromometano
CHCl ₃	Cloroformo
CH ₃ I	Yodometano
cm	Centímetro

CO ₂	Dióxido de carbono
Cols	Colaboradores
Cs ₂ CO ₃	Carbonato de cesio
d	Doblete
DCM	Diclorometano
dd	Doblete de dobletes
DDQ	2,3-Dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
DIB	(Diacetoxiyodo)benceno
dm	Decímetro
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DO	Densidad óptica
dqd	Doblete de cuarteto de doblete
DTBP	Peróxido de di <i>terc</i> -butilo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM-AR	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
ESI ⁺	Ionización por Electrospray en modo positivo
Et ₂ O	Éter etílico
g	Gramo
h	Hora
HBrO	Ácido hipobromoso
HIO	Ácido hipoyodoso
H ₅ IO ₆	Ácido peryódico
HCl	Ácido clorhídrico

Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy
H ₂ O	Agua
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy
Hz	Hertz
IBX	Ácido 2-yodoxibenzoico
IC ₅₀	Concentración de inhibición media
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KBr	Bromuro de potasio
K ₂ CO ₃	Carbonato de potasio
kg	Kilogramo
KI	Yoduro de potasio
L	Litro
LiAlH ₄	Hidruro de litio y aluminio
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
m	Multiplete
mCPBA	Ácido 3-cloroperoxibenzoico
MeCN	Acetonitrilo
MeNO ₂	Nitrometano
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
min	Minuto
ml	Mililitro

mmol	Milimol
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MW	Microondas
m/z	Relación masa-carga
NaBH ₄	Borohidruro de sodio
NaH	Hidruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
NH ₂ OH•HCl	Clorhidrato de hidroxilamina
NHPI	<i>N</i> -hidroxiftalimida
nm	Nanómetro
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
pf	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
qd	Cuarteto de dobletes
R _f	Factor de retención
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
s	Singulete
SiO ₂	Óxido de silicio
SRB	Sulforodamina B
STD-NMR	Saturation Transfer Difference Nuclear Magnetic Resonance

t	Triplete
TBHP	Hidroperóxido de <i>terc</i> -butilo
TCA	Ácido tricloroacético
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
W	Watt
δ	Desplazamiento químico
θ	Ángulo diedro
λ	Longitud de onda
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
$\bar{\nu}$	Número de onda
Å	Ångstrom

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

1.1.1 Generalidades

El cáncer es definido por la Organización Mundial de la Salud como un crecimiento descontrolado de las células y su diseminación hacia tejido circundante en un proceso llamado metástasis [1]. Se desarrolla desde la transformación de una célula normal a célula cancerígena que deriva en un tumor maligno capaz de invadir otros tejidos del cuerpo.

Existen diversas causas tanto exógenas (tabaco, bebidas alcohólicas, exposición ocupacional a disolventes orgánicos y metales pesados, contaminantes ambientales y en alimentos como aflatoxinas, fármacos citotóxicos, radiación ionizante, infecciones crónicas por virus) como endógenas (herencia y mutaciones genéticas) que pueden iniciar una cascada de eventos dentro de las células que finalmente provocan la activación de genes que estimulan la división celular o la inactivación de genes involucrados en la regulación del ciclo celular y apoptosis, como lo es el gen p53 [2].

1.1.2 Epidemiología

En 2016 se estimó que 41 millones de defunciones fueron causadas por enfermedades no transmisibles y que el cáncer representaba la segunda causa de muerte con un 22% (9 millones de decesos) [3].

En 2018, GLOBOCAN (Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence) emitió un reporte que estima un total de 18.1 millones de nuevos casos y 9.6 millones de defunciones [4] [5], siendo el cáncer de pulmón, de mama y colorrectal aquellos con más casos reportados (Figura 1) [6]. Adicionalmente, esta organización estima un total de 29.5 millones de nuevos casos de cáncer proyectados a 2040 [7].

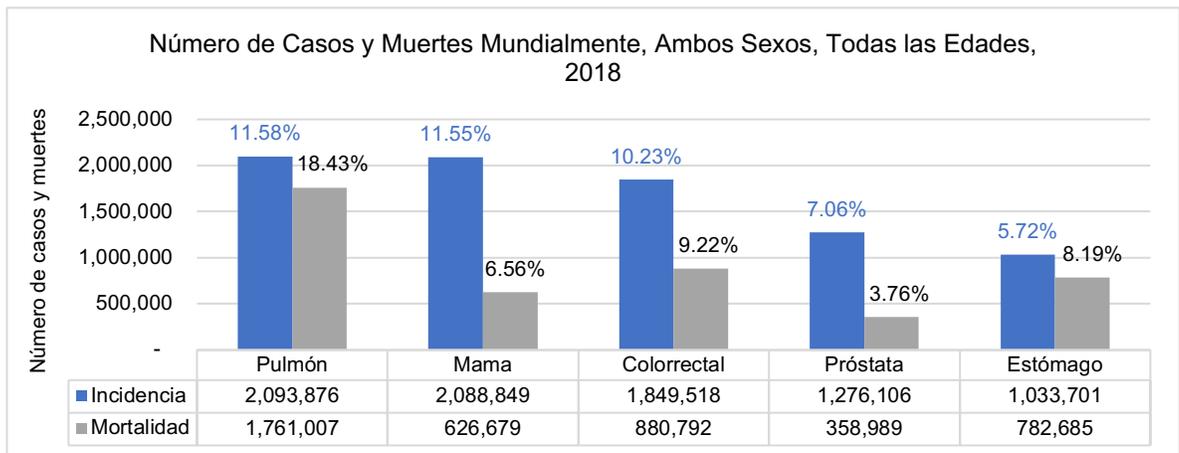


Figura 1. Número de Casos y Muertes Mundialmente, Ambos Sexos, Todas las Edades, 2018.

Gráfica reimpressa de: GLOBOCAN, “Estimated Number of Incident Cases and Deaths Worldwide, Both Sexes, All Ages, 2018” [8].

En 2016, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía reportó que el cáncer fue la tercera causa de muerte en México (precedido por enfermedades isquémicas del corazón y diabetes mellitus), registrándose 82,502 decesos, mientras que en Nuevo León fue la segunda causa de muerte (precedida igualmente por enfermedades del corazón) [9]. Por otro lado, en el reporte emitido por GLOBOCAN en septiembre de 2018 se registraron 83,476 defunciones y 190,667 nuevos casos en México [10]. Además, se reporta que los tipos de cáncer más prevalentes para ambos sexos en el país son de mama, de próstata y colorrectal, en ese orden de prioridad (Figura 2).

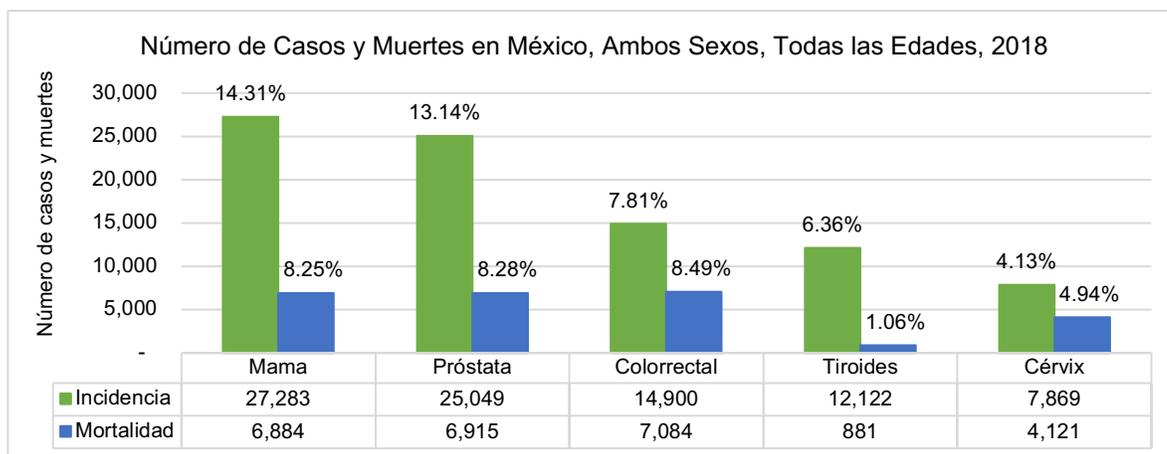


Figura 2. Número de Casos y Muertes en México, Ambos Sexos, Todas las Edades, 2018.

Gráfica reimpressa de: GLOBOCAN, “Estimated Number of Incident Cases and Deaths in Mexico, Both Sexes, All Ages, 2018” [11].

1.2 Blancos Terapéuticos de Agentes Citotóxicos

Los fármacos citotóxicos actúan a diferentes niveles del ciclo celular, especialmente en fase S (de síntesis) o M (mitótica) y, a su vez, en distintas

dianas terapéuticas: al interactuar directamente con el ADN (ácido desoxirribonucleico), al inhibir enzimas necesarias para su replicación, o interrumpiendo la mitosis. En la Figura 3 se resumen los blancos terapéuticos de los fármacos citotóxicos más usados para el tratamiento de distintos tipos de cáncer [12].

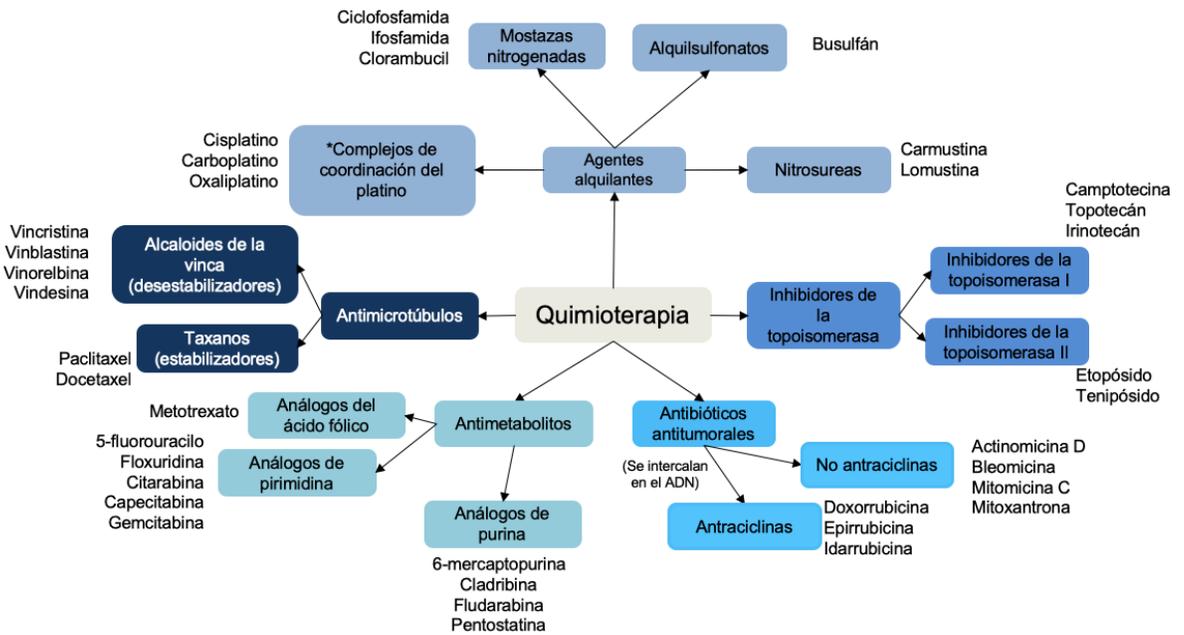


Figura 3. Clasificación de Agentes Citotóxicos de acuerdo con su Mecanismo de Acción.

Figura adaptada de: L. Brunton and J. Lazo, *Goodman & Gilman: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, 11a ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 2007.

Los agentes citotóxicos pueden actuar a nivel específico del ciclo celular, por lo que para que puedan llevar a cabo su actividad farmacológica, un buen porcentaje de las células deben estar en la misma fase del ciclo. Por otro lado, hay fármacos cuyo mecanismo de acción no involucra una fase de ciclo celular en específico, por ejemplo, los agentes alquilantes, pues sus especies reactivas

son atacadas por bases nitrógenadas (principalmente guanina) del ADN (Figura 4).

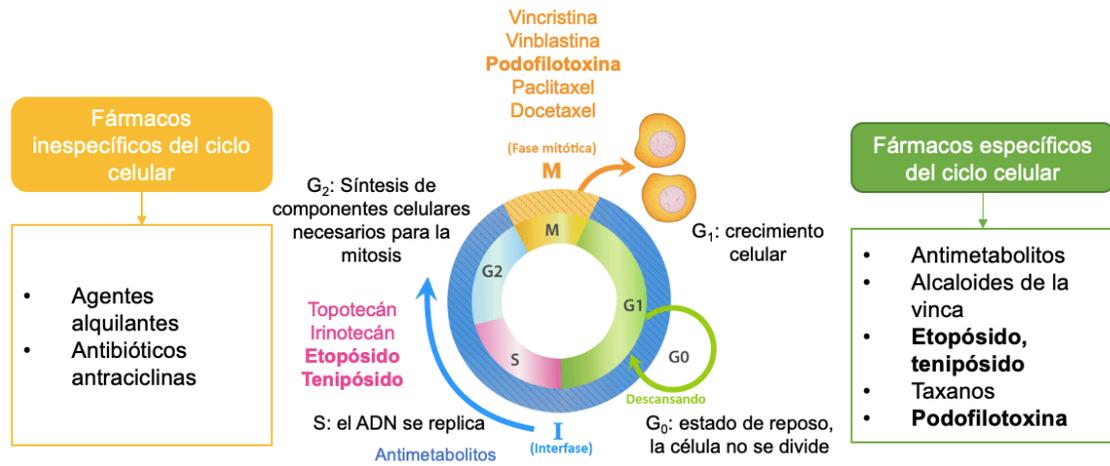


Figura 4. Dianas Moleculares de Agentes Citotóxicos dentro del Ciclo Celular.

Figura adaptada de Harwood, J. y Wilkin, D. "Ciclo celular" [sitio web]. Estados Unidos: CK-12, 2016. [Consultado 3 de junio de 2020] [13].

1.2.1 Microtúbulos.

Los microtúbulos son hélices cilíndricas que resultan de un acomodo paralelo de 13 protofilamentos, cada uno de ellos derivados de la polimerización de heterodímeros de subunidades α - y β -tubulina [14] [15] (Figura 5).

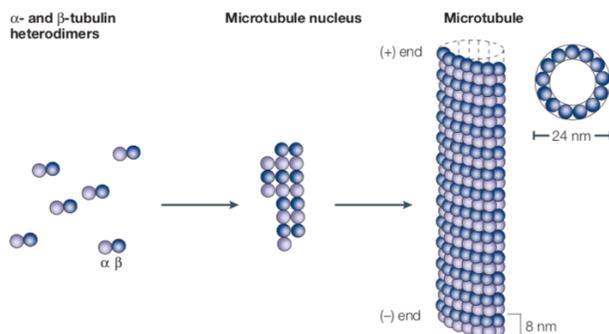


Figura 5. Estructura de Microtúbulos.

Figura reimpresa de *Nat. Rev. Cancer*, **2004**, 4: 253-265.

Estas estructuras celulares juegan un papel importante en muchas funciones biológicas, incluyendo transporte intracelular, señalización y división celular y, para cumplir con estas funciones, el ensamblaje de los microtúbulos se mantiene como un proceso dinámico [15].

Durante la mitosis forman el huso mitótico y separan los cromosomas hijos entre las células en división, haciendo a los microtúbulos una diana ideal para la terapia anticáncer. Los fármacos que interfieren con esta dinámica pueden inhibir la mitosis, previniendo la progresión del ciclo celular y dando lugar a apoptosis.

1.2.2 Topoisomerasas

Las topoisomerasas son enzimas encargadas de reducir el superenrollamiento de la doble hélice de ADN que se genera por delante de la horquilla de replicación. Existen dos tipos, y la diferencia entre la topoisomerasa I y II es que la primera rompe y vuelve a unir una cadena del ADN, mientras que la II rompe las dos cadenas del ADN para volver a unir las (Figura 6) [16].

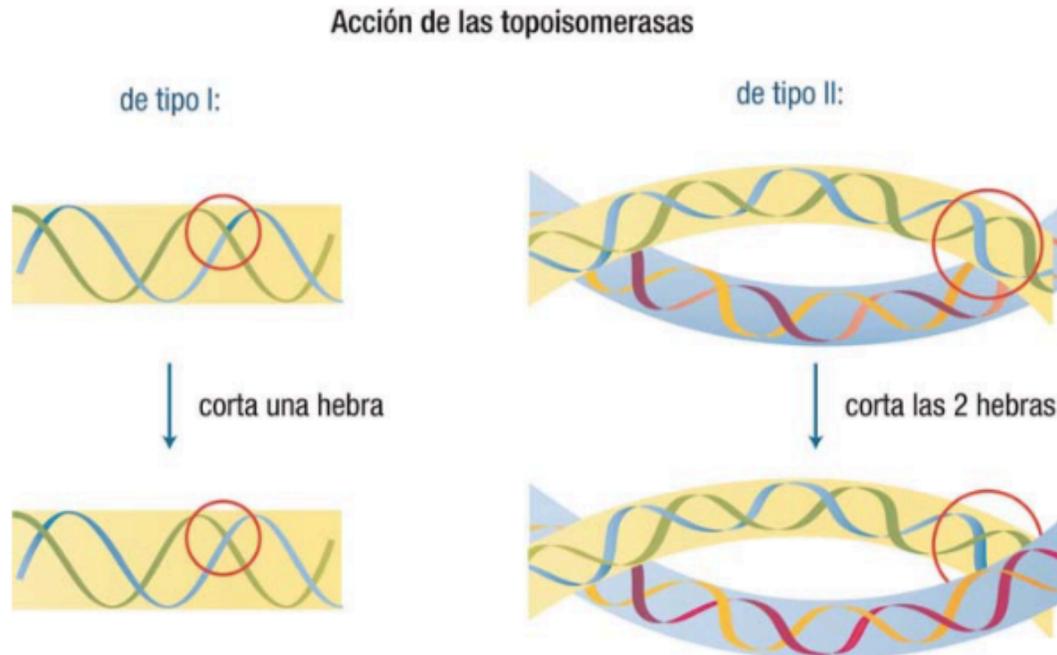


Figura 6. Acción de las Topoisomerasas.

Figura reimpressa de: Herráez A. *Texto Ilustrado e Interactivo de Biología Molecular e Ingeniería Genética*, 2a ed. España: Elsevier, 2012.

La apertura de la doble hélice ocasionada por la progresión de la helicasa a lo largo del ADN bicatenario conlleva la aparición de superenrollamientos positivos por delante de la horquilla. Para aliviar esa tensión de torsión se requiere algún tipo de mecanismo giratorio pues, de lo contrario, el superenrollamiento acumulado por delante de la horquilla llegaría a impedir el avance de la replicación. Este problema se resuelve gracias a la acción de las topoisomerasas, enzimas que alteran el estado de superenrollamiento del ADN sin modificar su estructura en otros aspectos. Es decir, interconvierten topoisómeros modificando el número de enlace del ADN (número de vueltas que da una hebra respecto a la otra).

1.3 Productos Naturales Moduladores de Microtúbulos

Las plantas son capaces de producir moléculas que interfieren con la regulación del ensamblaje de los microtúbulos. Estos agentes estabilizan o desestabilizan la polimerización de tubulina en diferentes sitios de unión [17] (Figura 7).

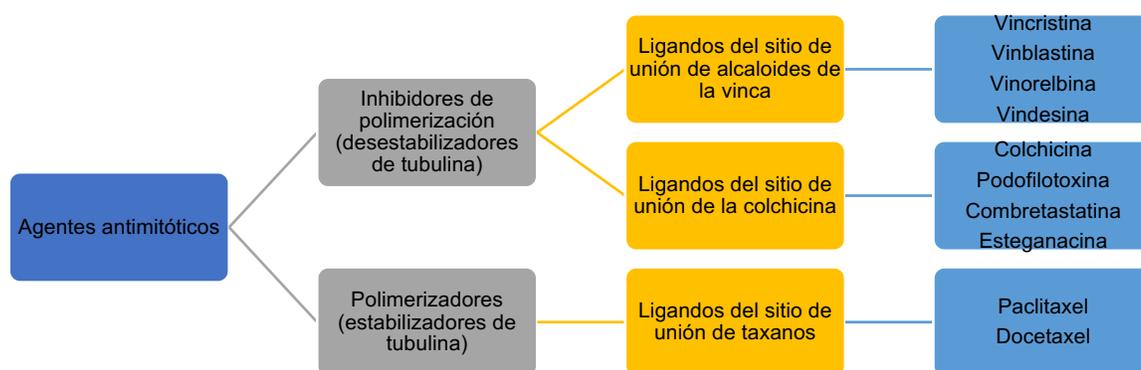


Figura 7. Clasificación de Agentes Antimitóticos (Mecanismo de Acción y Sitios de Unión de Inhibidores de los Microtúbulos).

Figura adaptada de *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2004**, 4(10): 1077–1104.

Los estabilizadores de microtúbulos son de tipo taxano (paclitaxel y su derivado semisintético docetaxel). Estos se unen a la β -tubulina en la superficie interior de los microtúbulos y antagonizan el desensamble de esta estructura citoesquelética fundamental, favoreciendo la polimerización de la tubulina en microtúbulos estables pero poco funcionales al carecer de flexibilidad necesaria en la mitosis, dejando a la célula en fase mitótica.

Los alcaloides de la vinca (vincristina y vinblastina, así como sus derivados semisintéticos vinorelbina y vindesina) son considerados desestabilizadores de

tubulina, se unen a la subunidad β en los extremos de los microtúbulos, causando despolimerización de estos y supresión de la estabilidad dinámica, lo que ocasiona que el huso mitótico no permanezca intacto y, por lo tanto, los cromosomas no se puedan alinear quedando dispersos en el citoplasma durante la mitosis.

1.3.1 Sitio de Unión de la Colchicina

Un producto natural que también tiene la capacidad de unirse a la tubulina es la colchicina. Tiene su propio sitio de unión con dicha proteína y se une de manera competitiva en el espacio interdimérico entre las subunidades α y β del heterodímero por puentes de hidrógeno (con el residuo Cys241 de β -tubulina). Su acción antiproliferativa involucra la formación de un complejo tubulina-colchicina que se une a las terminaciones de los microtúbulos previniendo la elongación del polímero, tal como se reportó por Ravelli y cols [18] al publicar por primera vez la estructura cristalina de la proteína de tubulina formando un complejo con el dominio similar a estamina (SLD) de la proteína RB3 (complejo TR2) (Figura 8). Como resultado de esta unión competitiva, la colchicina produce arresto celular en la fase G_2/M del ciclo celular.

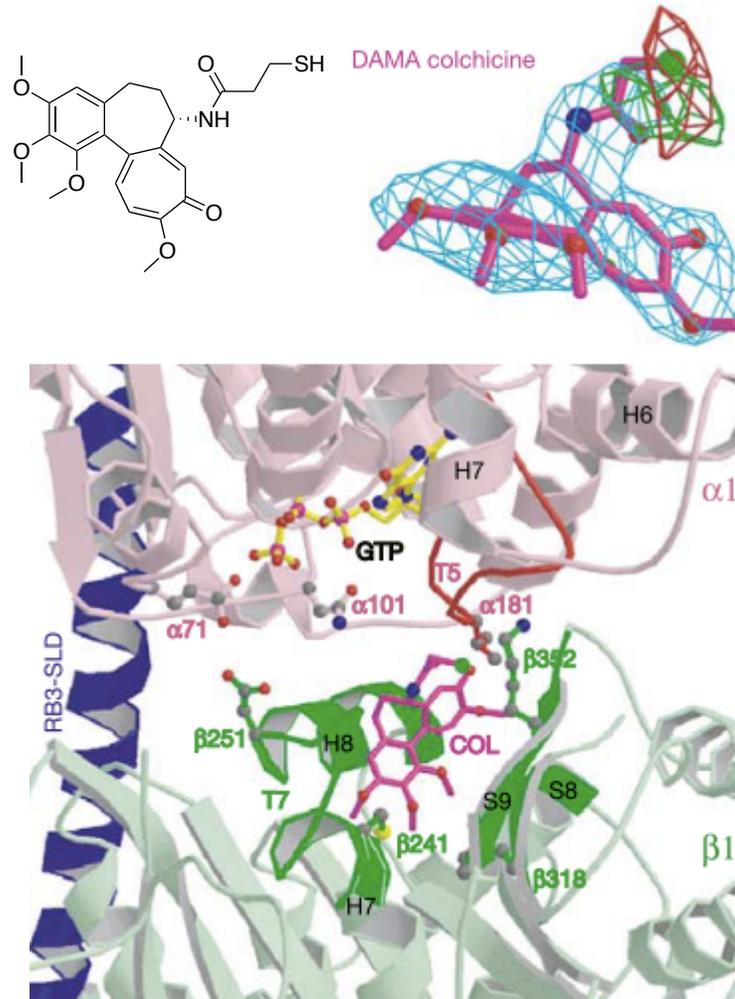


Figura 8. Sitio de Unión de la Colchicina en el Complejo Tubulina-Colchicina:RB3-SLD.

Figura adaptada de *Nature*, **2004**, 428, 198-202.

Con lo anterior se determinó el complejo ternario tubulina-podofilotoxina:RB3-SLD y se encontró que se unen en el mismo sitio. Además, se reemplazó la colchicina con *N*-desacetil-*N*-(2-mercaptoacetyl)-colchicina (DAMA-colchicina), lo que permitió establecer la ubicación del grupo *N*-acetilo y definir su orientación. Determinaron entonces que el sitio de unión a la colchicina está envuelto por las hebras S8 y S9, el bucle T7, las hélices H7 y H8 de la subunidad β y por el bucle

T5 de la subunidad α ; también encontraron una interacción importante entre los metoxilos del anillo trimetoxilado con Cys β 241 por puente de hidrógeno.

Dentro de las especies moleculares que también se unen a la tubulina en el mismo sitio que la colchicina, están los productos naturales esteganacina, podofilotoxina y combretastatina A-4, todas ellas comparten similitud estructural que las hacen moléculas líderes para su modificación semisintética con el objetivo de mejorar su actividad citotóxica *per se* (Figura 9).

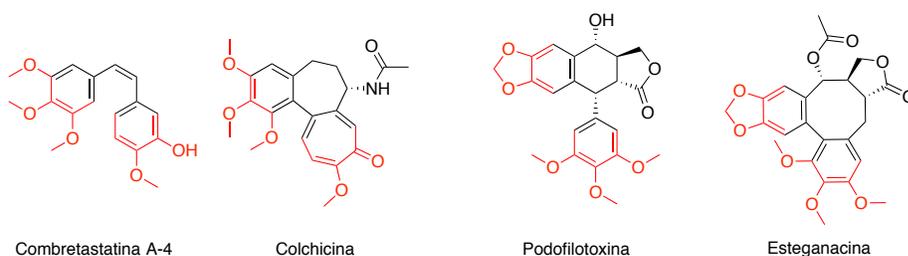


Figura 9. Ligandos de Tubulina en el Sitio de Unión de la Colchicina.

Figura adaptada de: G. M. Cragg, D. G. I. Kingston, and D. J. Newman, *Anticancer agents from natural products*. United States: CRC Press, 2012.

1.3.2 Podofilotoxina

La podofilotoxina (Figura 10) es un fenilpropanoide dimérico (anillo aromático de 6 carbonos con una cadena alifática de 3 carbonos) cuyos monómeros están unidos por uno de los carbonos de la cadena alifática. Esta estructura es característica de los lignanos.

Particularmente, es un lignano de tipo ariltetralina lactónica debido a que está compuesta por un núcleo tetrahidronaftaleno (tetralina) unido a un anillo de tipo dioximetileno (anillo A) y a un anillo lactónico (anillo D), formando una estructura pseudoplanar a lo largo de los anillos A-D; al anillo C está unido a través del C1 un trimetoxibenceno (anillo E) que gira libremente. Esto le confiere al -OH de la posición C4 una orientación ecuatorial y al anillo E una orientación axial [19].

La unión del anillo E da la prioridad a la numeración del núcleo tetrahidronaftaleno y es una convención establecida por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés) [20].

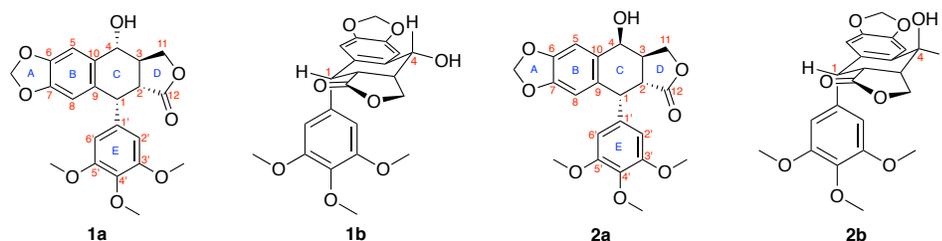


Figura 10. Estructuras Químicas de Podofilotoxina (**1a** y **1b**) y Epipodofilotoxina (**2a** y **2b**).

Figura adaptada de *Pharmacol. Ther.*, **1993**, 59(2): 163–228.

La podofilotoxina cuenta con 4 estereocentros (C1-C4) y presenta un isómero epimérico en C4 llamado epipodofilotoxina (que también tiene propiedades citotóxicas). Estas características estructurales le permiten a la podofilotoxina unirse a la tubulina al igual que la colchicina, combretastatina A-4 y esteganacina, así como a la topoisomerasa II.

1.4 Dicroísmo circular

La actividad óptica está presente en casi todos los productos naturales y juega un papel muy importante en la farmacodinamia, es por ello que, en el caso de moléculas obtenidas por síntesis total o por semisíntesis a partir de una molécula líder presente en los seres vivos, es necesario determinar su actividad óptica para establecer su configuración absoluta y, de esta manera, descartar aquellos efectos nocivos a la salud que algunos isómeros ópticos pueden ocasionar al llevar a cabo su interacción fármaco-receptor. Un experimento útil para determinar la configuración absoluta de una molécula es el Dicroísmo Circular (DC).

1.4.1 Fundamento

La luz polarizada linealmente (Figura 11) se caracteriza porque su vector es propagado en forma de onda coseno, por lo que si se observa de frente, el vector varía en longitud de acuerdo a su función coseno, pero la vibración es en la misma dirección [21].

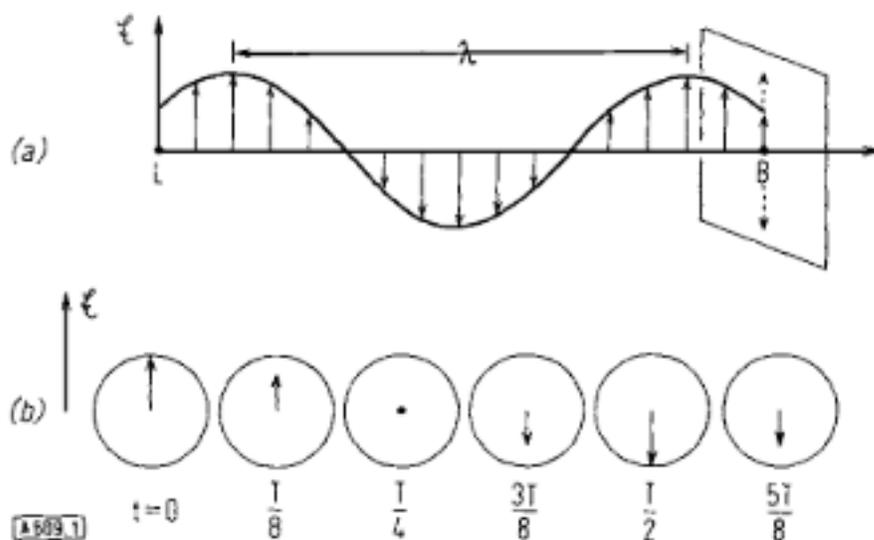


Figura 11. Vector Eléctrico de Luz Polarizada Linealmente.

Figura reimpressa de *Angew. Chem. Int. Ed.* **1968**, 7(1), 14-25.

Un haz de luz polarizada circularmente (Figura 12) se caracteriza porque su vector eléctrico describe una hélice, y el vector cambia su dirección respecto al tiempo.

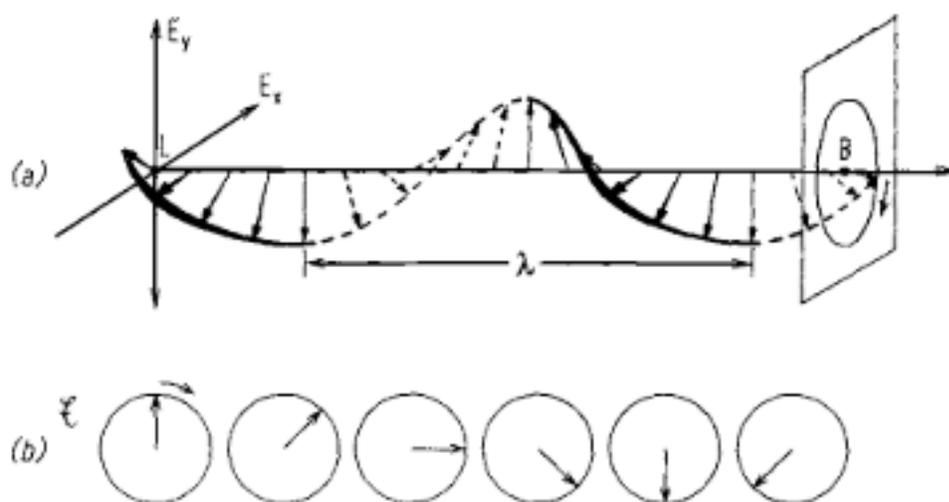


Figura 12. Luz Polarizada Circularmente a la Derecha.

Figura reimpressa de *Angew. Chem. Int. Ed.* **1968**, 7(1), 14-25.

Para la luz polarizada circularmente a la derecha la dirección del vector es a favor de las manecillas del reloj, mientras que en la luz polarizada circularmente a la izquierda el vector va en sentido contrario. Si una fuente de luz emite en una dirección luz polarizada circularmente tanto a la izquierda como a la derecha a la misma longitud de onda e intensidad, la superposición de ambas produce una vibración linealmente polarizada (Figura 13).

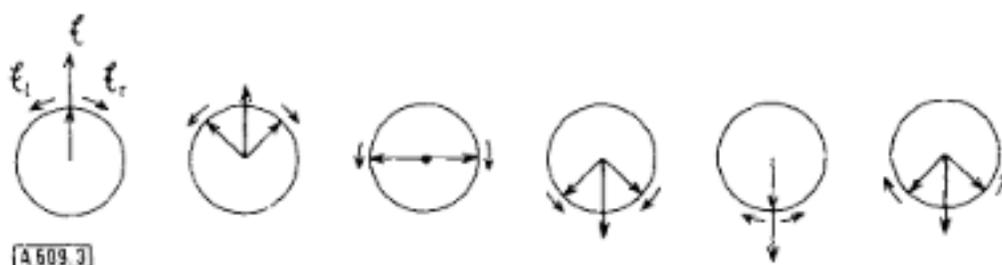


Figura 13. Superposición de Luz Polarizada Circularmente a la Derecha y a la Izquierda a Misma Intensidad y Longitud de Onda.

Figura reimpressa de *Angew. Chem. Int. Ed.* **1968**, 7(1), 14-25.

Si ambos haces de luz se propagan a diferentes velocidades a través de un medio quiral ($C_L \neq C_R$, lo que da lugar a $\lambda_L \neq \lambda_R$), el vector resultante no tendrá una dirección constante y generará un ángulo α (Figura 14) respecto a la dirección original de vibración de la luz incidente; la luz transmitida es ahora polarizada elipsoidalmente.

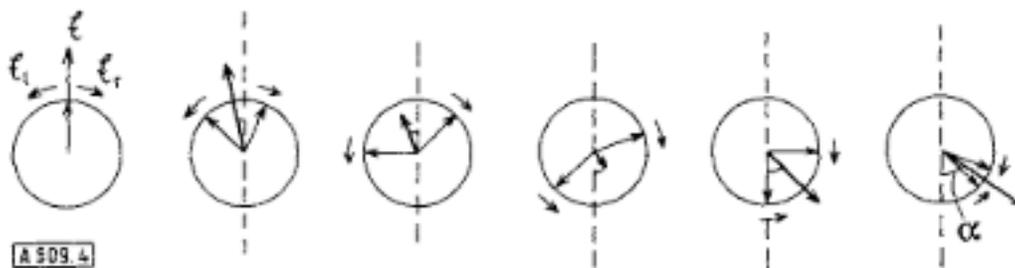


Figura 14. Superposición de Luz Polarizada Circularmente a la Izquierda y a la Derecha a Diferente Velocidad de Propagación.

Figura reimpressa de *Angew. Chem. Int. Ed.* **1968**, 7(1), 14-25.

El ángulo θ (Figura **15**) de la luz polarizada transmitida elipsoidalmente se define como ángulo de elipticidad [22]:

(1)

$$\text{arc tan} \theta = \frac{\text{eje menor de elipsoide}}{\text{eje mayor de elipsoide}}$$

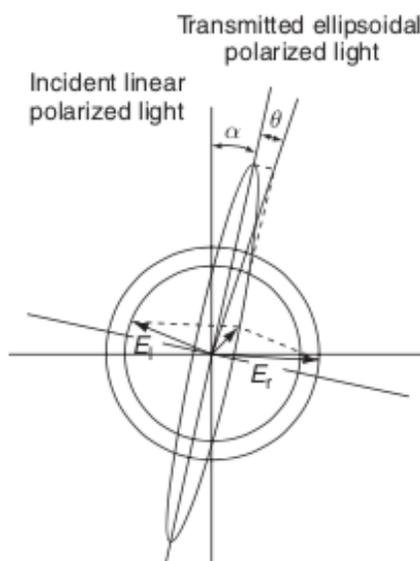


Figura 15. Luz Polarizada Elípticamente.

Figura reimpressa de Mander Lew. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*. Vol. 1, Reino Unido: Ed. Elsevier Ltd., **2010**.

El fenómeno de DC es causado por la diferencia de la intensidad de absorción para luz polarizada circularmente a la derecha y a la izquierda y se expresa como $[\theta]$ o elipticidad molar:

(2)

$$\theta = \frac{\theta M}{lc}$$

Donde θ es el ángulo de elipticidad observado, M es el peso molecular, l es la longitud de la celda y c es la concentración (g/100 ml de solución) [21].

Para una descripción estandarizada y cuantitativa del DC, se hace referencia a la Ley de Lambert-Beer. Si I_0 es la intensidad de la luz incidente y I es la intensidad de la luz transmitida, la absorbancia:

(3)

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon cl$$

La absorbancia A es proporcional a la concentración c y la longitud de la celda l . Si la concentración c está dada en mol/L y l en cm, entonces ϵ es la absorptividad molar [23].

En el caso de moléculas orgánicas, se prefiere utilizar la diferencia de extinción $\Delta\epsilon$ ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) sobre la elipticidad molar para describir el DC, pues la luz circularmente polarizada a la izquierda o a la derecha no solo se propaga a diferentes velocidades, sino también a diferentes extinciones, calculada como

la diferencia del coeficiente de absorción ϵ_L [24] para luz polarizada circularmente a la izquierda y ϵ_R para la luz polarizada circularmente a la derecha:

(4)

$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$$

La elipticidad molar $[\theta]$ se correlaciona con $\Delta\epsilon$ [22] como sigue:

(5)

$$[\theta] = 3300\Delta\epsilon$$

(6)

$$\frac{\theta}{33} = \Delta A = (\Delta\epsilon)(c)(l)$$

Donde ΔA es la diferencia de absorbancia de DC, c es concentración molar (mol/dm^3) y l la longitud de la celda (cm).

Como resultado de este fenómeno se genera un componente en forma de “S” sobrepuesto a la banda de absorción conocido como Efecto Cotton. El DC se caracteriza por cuatro cantidades: $\Delta\epsilon$, $\lambda_{\text{máx}}$, el signo y la forma de la curva.

1.4.2 Cromóforos

Un cromóforo es una estructura molecular responsable de una o más transiciones electrónicas asociadas a las bandas de absorción en el rango UV-Vis ya que posee grupos funcionales capaces de absorber esta radiación [23]. El

primer paso antes de analizar un espectro de DC es reconocer correctamente las unidades cromofóricas de la molécula en cuestión.

Es posible diferenciar entre dos tipos de cromóforos, por ejemplo “inherentemente disimétricos” (derivados de bifenilo, dienos conjugados no planares, enonas conjugadas no planares) y cromóforos que tienen una simetría local, pero son perturbados disimétricamente al incorporarse a un entorno quiral (-C=O, C=S, -S-S-, NO₂, COOR, C=N, N=N) [25].

1.4.3 Efecto Cotton

Un Efecto Cotton se asocia con la presencia de un cromóforo y, cuando la luz se absorbe, un electrón es excitado de un orbital ocupado a un orbital desocupado de antienlace y, si estos orbitales se encuentran en un centro asimétrico, se observará dicho efecto [21].

Existen muchas reglas que correlacionan los signos de los Efectos Cotton con la configuración absoluta de una molécula y, a pesar de que la mayoría de estas reglas se aplican para un solo cromóforo, las interacciones espaciales entre dos o más cromóforos también dan lugar a efectos Cotton (véase 1.4.7 Regla de la Quiralidad del Excitón).

Los efectos Cotton de compuestos orgánicos se clasifican en tres tipos considerando las propiedades simétricas y la naturaleza de los cromóforos y sus

transiciones: 1) efectos Cotton producidos por cromóforos inherentemente simétricos que son perturbados asimétricamente (cetonas, dobles enlaces, benzoatos, compuestos aromáticos); 2) efectos Cotton producidos por cromóforos inherentemente disimétricos (dienos conjugados, cetonas α,β -insaturadas); 3) efectos Cotton producidos por interacciones dipolo-dipolo entre más de dos cromóforos [26].

1.4.4 Vectores de Polarización

En 1949, Platt [27] utilizó un modelo para la interpretación de transiciones electrónicas de sistemas aromáticos “cata-condensados” (cuyos carbonos no pertenecen a más de dos anillos y cada carbono se encuentra en la periferia del sistema conjugado) en los cuales se genera un circuito o perímetro de electrones π . Los cuatro niveles electrónicos más bajos en estos sistemas aromáticos, de acuerdo a la nomenclatura de Platt (que establece letras como L y B para cada capa energética), son 1L_b , 1L_a , 1B_b y 1B_a . En esta nomenclatura, el subíndice a denota los vectores de polarización que tienen densidad de electrones en los átomos y puntos nodales (puntos de menor densidad electrónica) en los enlaces que conectan a dichos átomos; el subíndice b corresponde a los vectores de polarización que poseen la densidad electrónica de los electrones π en los enlaces (*bonds*, en inglés) y los puntos nodales en los átomos, como se muestra en la Figura 16.

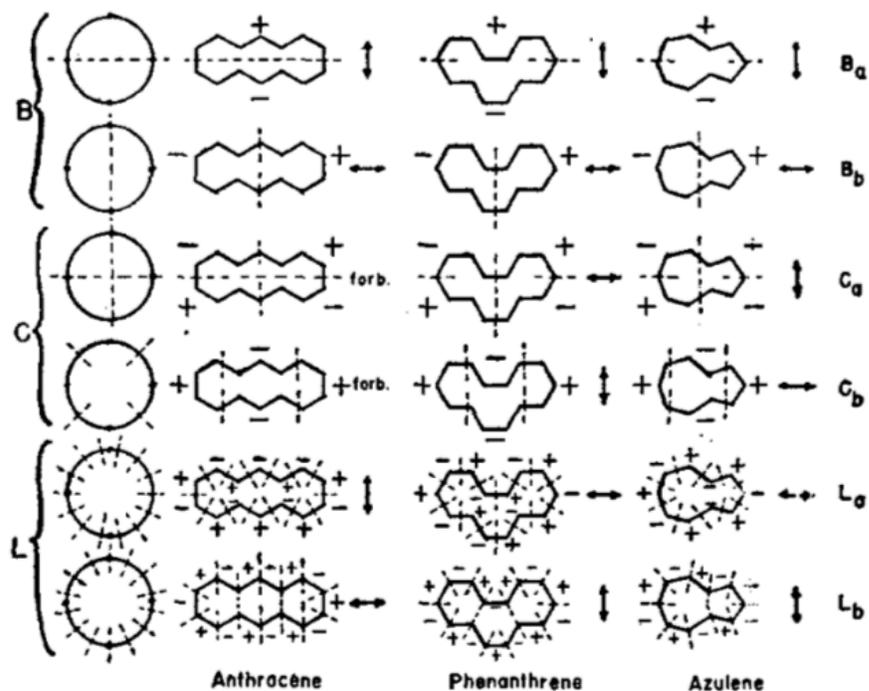


Figura 16. Diagramas de Polarización de Bandas de Absorción de Moléculas Representativas.

Figura reimpressa de *J. Chem. Phys.* **1949**, 17, 484.

1.4.5 Regla del Sector Benceno

En ausencia de sustituyentes adicionales en el anillo, el signo de la banda 1L_b en el espectro de DC de bencenos directamente unidos a un centro asimétrico está determinado por dicho estereocentro. El signo de la banda 1L_b puede, por lo tanto, ser predicho si se conoce la conformación preferida del grupo quiral en el enlace de unión [28]. Para bencenos sustituidos, la conformación preferida es aquella en la cual el hidrógeno contiguo al estereocentro eclipsa o casi eclipsa con el plano del anillo aromático. Lo mencionado anteriormente y los datos de DC de moléculas similares sugieren la proyección en cuadrantes de la Figura 17.

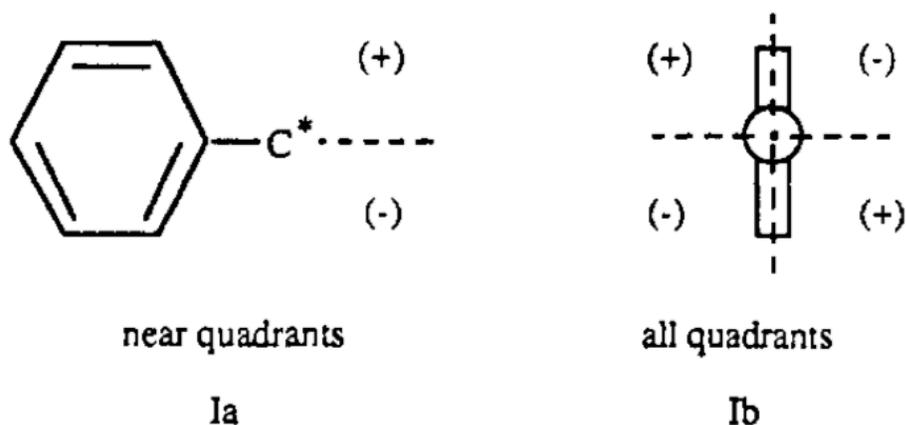


Figura 17. Proyección de Cuadrantes de la Regla del Sector Benceno.

Figura reimpressa de *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 432-435.

Los signos en la proyección expresan las contribuciones en DC a los Efectos Cotton de la banda 1L_b por los grupos ubicados en los cuatro cuadrantes. La suma de estas contribuciones proporciona el signo del Efecto Cotton de la banda 1L_b . En resumen, la regla de sector benceno permite obtener la sumatoria de las contribuciones a la fuerza rotatoria de la banda observada en DC que se dan por cada grupo unido al centro asimétrico.

Utilizando los datos de DC de diversos compuestos enantiopuros como fenilcarbinoles y bencilcarbinaminas, en los cuales un sustituyente del centro quiral contiguo al benceno es un hidrógeno y de los cuales se conoce la configuración absoluta, se estableció una secuencia para las aportaciones vibrónicas al efecto Cotton de la banda 1L_b : SH, CO_2^- , $\text{C}(\text{CH}_3)_3 > \text{CH}_3 > \text{NH}_2$, NH_3^+ , ${}^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$, OH, OCH_3 , Cl, I; y $\text{CH}_3 > \text{CO}_2\text{H} > {}^+\text{NH}_3$, OH, OCH_3 .

1.4.6 Regla de Quiralidad del Benceno

Para bencenos directamente unidos a un centro asimétrico y sin más sustituyentes, el efecto Cotton de la banda 1L_b es el resultado de la aportación vibrónica de transiciones a longitudes de onda más cortas, y su signo depende solo de la configuración del centro asimétrico contiguo al anillo de benceno.

En bencenos más sustituidos el signo del efecto Cotton de la banda 1L_b puede tener el mismo o distinto signo que el análogo monosustituido, y tal cambio se puede predecir con base a la regla de quiralidad del benceno y depende de la posición en el anillo, así como del momento espectroscópico del sustituyente adicional [29].

En un benceno sustituido y directamente unido a un centro asimétrico se inducen momentos de transición electrónicos en los enlaces del anillo y su magnitud se relaciona con el tipo de sustituyente en el anillo de benceno. Este momento se puede desglosar en momentos de transición de enlace mostrados en la Figura **18**.

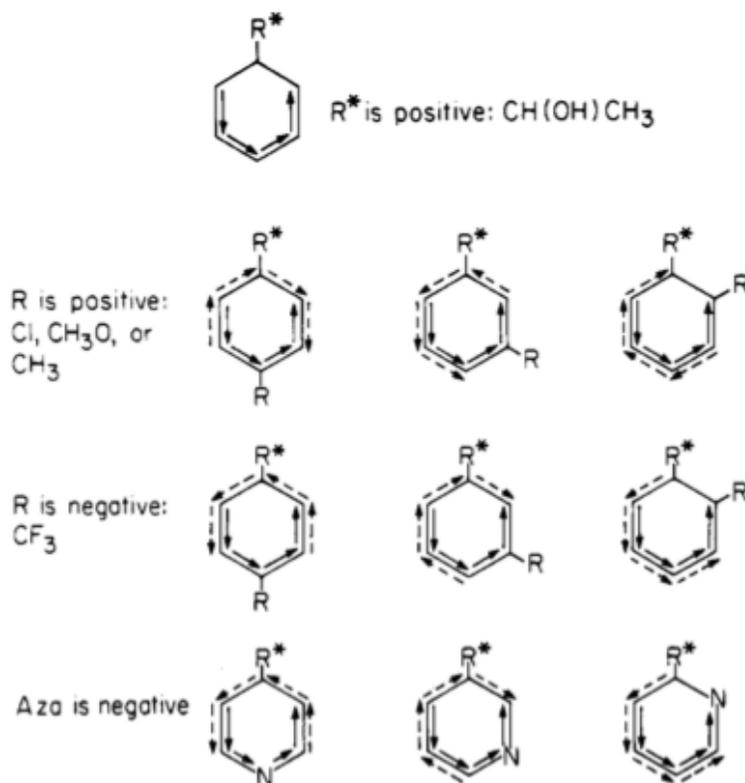


Figura 18. Regla de la Quiralidad del Benceno.

Figura reimpressa de *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 3386-3389.

En la figura anterior [29] se muestran las direcciones del momento de enlace inducido para bencenos sustituidos con grupos que tienen momentos espectroscópicos positivos y negativos. Las flechas sólidas indican la contribución vibrónica por un centro asimétrico y tienen un solo sentido en contra de las manecillas del reloj, mientras que las flechas punteadas representan aquellos momentos de enlace inducidos por sustituyentes adicionales en el anillo y varía el sentido de la flecha dependiendo de la posición de sustitución (*orto*, *meta* y *para*) y de la presencia de una carga parcial positiva o negativa en los sustituyentes.

Para un anillo aromático monosustituido con efecto Cotton de la banda 1L_b con signo negativo, al sustituirlo con un átomo de Cl en posición *orto-* o *para-*, que posee momentos espectroscópicos positivos, la alineación de los momentos de transición de enlace inducidos se oponen a aquellos del centro asimétrico (la contribución vibrónica o fuerza rotacional vibrónica negativa ha sido disminuida por una contribución inducida positiva), reduciendo la intensidad de la señal negativa para 1L_b y por lo tanto invirtiendo el signo del efecto en este caso. En contraste, cuando se introduce Cl en posición *meta-* ocurre una intensificación del efecto Cotton negativo. La introducción de grupos como CN o CF_3 con momentos espectroscópicos negativos da lugar a los efectos contrarios antes mencionados. Cuando las contribuciones vibrónicas e inducidas se alinean o tienen el mismo signo, se intensifica la señal de 1L_b y no hay ambigüedad en la predicción del signo del efecto Cotton pero, cuando tienen alineaciones contrarias, la predicción del signo del Efecto Cotton es más compleja [30].

En sustituciones *para-* con un átomo o grupo con momento espectroscópico negativo, se inducen momentos de enlace de sentido contrario, y la contribución inducida positiva para la fuerza rotacional tiene el mismo signo que la contribución vibracional. Sustitución *meta-* por un grupo en particular inducirá momentos de enlace en sentido opuesto de aquel inducido por el mismo grupo en posición *para-*. Sustituciones *orto-* revierte el sentido de los momentos de enlace inducidos de aquellos con el mismo sustituyente en *meta-*, y el signo del efecto Cotton se revertirá de aquel isómero *meta-*.

1.4.7 Regla de la Quiralidad del Excitón

Cuando interactúan dos cromóforos se generan dos efectos Cotton de misma amplitud pero signo opuesto, se produce lo que se conoce como acoplamiento de excitón. Esta división indica que los dos efectos se deben a interacciones dipolo-dipolo entre los momentos de transición electrónica de la banda de transferencia de carga molecular de dos cromóforos [24].

Como consecuencia del acoplamiento entre dos cromóforos unidos por un centro asimétrico, los dos estados excitados degeneran en dos niveles, separados por un valor llamado $2V_{1,2}$, llamado división de Davydov (Figura **19a**) [22]. La división de estados excitados se refleja en una banda de absorción más ancha o dividida, centrada en la longitud de onda de transición del cromóforo solo (Figura **19b**) [31].

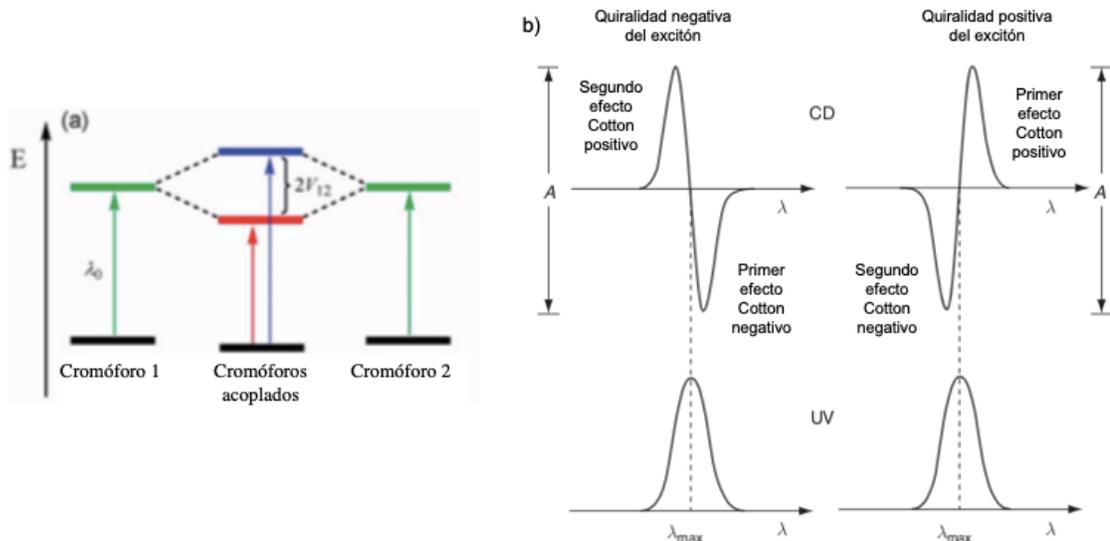


Figura 19. **(a)** Separación de los Estados Excitados de dos Cromóforos Acoplados y **(b)** Parámetro Típico de Efectos Cotton por Acoplamiento de Excitón.

Figura reimpressa de *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, 36, 914-931.

El signo de la quiralidad del excitón se puede evaluar de la siguiente manera: al considerar los dos vectores de polarización de interés (que pueden ser como alguno de los descritos en la Figura 16) y observarlos en un plano en el que un vector quede delante del otro, el signo negativo se define cuando hay un ángulo agudo en contra de las manecillas del reloj entre ambos vectores de polarización [32], como lo describe la simbología de la TABLA 1.

TABLA 1

Definición de la Quiralidad del Excitón.

Definición	Simbología	Efectos Cotton
<p>Quiralidad del excitón positiva</p>		<p>Primero Positivo (a λ más larga) y segundo negativo (a λ más corta)</p>
<p>Quiralidad del excitón negativa</p>		<p>Primero negativo (a λ más larga) y segundo positivo (a λ más corta)</p>

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Actividad Cytotóxica de Derivados de Podofilotoxina

El descubrimiento de compuestos líderes con actividad biológica ha sido parte esencial en la investigación farmacéutica y los productos naturales han sido fuente importante para el desarrollo de moléculas con actividades farmacológicas mejoradas para una gran variedad de enfermedades como lo es el cáncer [33].

Hasta 2016, el Centro de Evaluación e Investigación de Fármacos (CDER, por sus siglas en inglés) ha reportado estadísticas sobre la aprobación de “Nuevas Entidades Moleculares” (NME, por sus siglas en inglés), siendo los productos naturales los de mayor auge en los 90s. Del total de NME registradas hasta 2016, 5.3% correspondían a productos naturales que no han sido modificados y cuyos congéneres sintéticos o semisintéticos han sido predominantes, alcanzando un 28% de NME aprobados a partir de productos naturales modificados [34].

En el auge del desarrollo de nuevos fármacos a partir de productos naturales provenientes de plantas (90s), se aprobaron las epipodofilotoxinas etopósido y

tenipósido, y se introdujeron en estudios clínicos las 4β-anilinas NPF y GL-311 [35] (Figura 20).

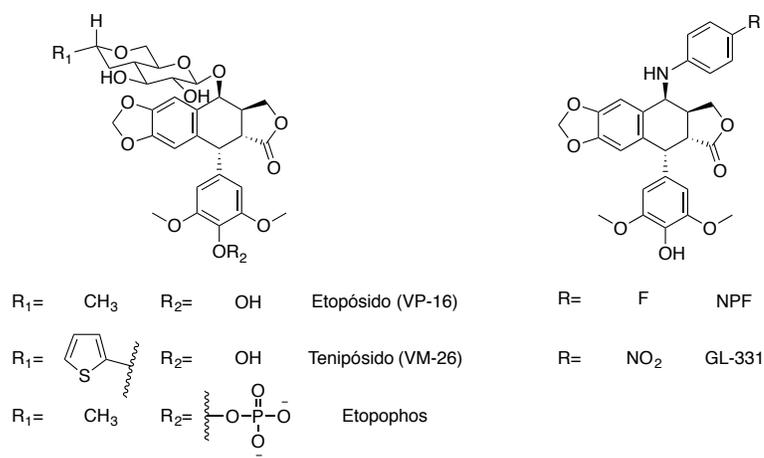


Figura 20. Derivados Semisintéticos de Podofilotoxina con Actividad Citotóxica.

Figura adaptada de *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44(46): 8457–8459.

La investigación del mecanismo de acción de estas moléculas ha permitido establecer que tienen dos blancos terapéuticos: etopósido y tenipósido forman un intermediario terciario ligando-ADN-topoisomerasa II que induce escisiones de ADN, y los derivados NPF y GL-331 tienen capacidad de unirse de forma reversible con la tubulina, evitando su polimerización, lo que conduce finalmente a un arresto celular en la metafase [36].

2.2 Interacción de Podofilotoxina y Derivados con Blancos Terapéuticos

A partir del desarrollo de los derivados 4β-sustituídos de podofilotoxina, etopósido y tenipósido, se siguió explorando la influencia en la actividad citotóxica de más grupos funcionales en esta posición con características químicas diversas (grupos electrodonadores o electroattractores, grupos polares,

hidrofóbicos, así como también voluminosos) con el objetivo de establecer una relación estructura-actividad de las moléculas sintetizadas a partir de podofilotoxina. Para ello, se han realizado investigaciones respecto a la interacción de podofilotoxina y sus derivados con tubulina y topoisomerasa II, dada su similitud con etopósido y tenipósido y otros derivados semisintéticos C(4)-sustituídos.

2.2.1 Interacción de Podofilotoxina y Derivados con Tubulina

Gussio y cols en 2005 [37] tomaron la estructura de rayos X del complejo tubulina:DAMA-colchicina reportada anteriormente por Ravelli y cols [18] como plantilla para un estudio por acoplamiento molecular y determinar los sitios de unión de una serie de inhibidores del sitio de unión de la colchicina. Estos modelos se utilizaron posteriormente para generar un farmacóforo común basado en dichas estructuras. Se propuso que las moléculas utilizadas para el estudio se pueden unir por siete grupos farmacofóricos, que consisten en tres aceptores de puentes de hidrógeno (A1, A2 y A3), un donador de puente de hidrógeno (D1), dos centros hidrofóbicos (H1 y H2), y un grupo plano (R1), observando que A2, H1, H2, y R1 son esenciales para la actividad, pues se presentaron en todos los casos; entre las 15 moléculas se repiten de cinco a seis de estos grupos.

En la Figura **21** se muestra que los puntos H2 y R1, que son hidrofóbicos y planares, fungen como la porción rígida de la plataforma molecular que satisface

todos los requerimientos geométricos y estéricos para la unión, mientras que los puntos A1, A2, A3, D1 y H1 poseen interacciones cruciales con la proteína. Además, se describen los residuos de aminoácidos de mayor interacción en el modelo.

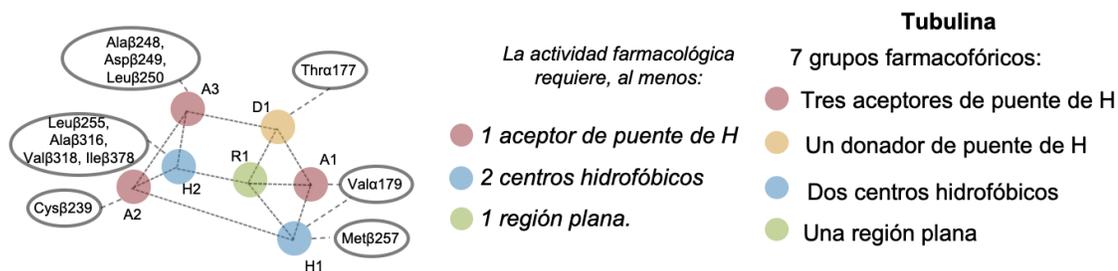


Figura 21. Mapeo de los Grupos Farmacofóricos del Sitio de Unión de la Colchicina.

Figura adaptada de *J Med Chem*, **2005**, 48(19): 6107-6116.

Unos años más tarde, un estudio importante que ayudó a determinar las interacciones moleculares entre podofilotoxina y derivados con tubulina fue el realizado por Antúñez-Mojica y cols. (2016) [33]. Se reportaron las interacciones estructurales y bioquímicas con tubulina de lignanos aislados de *Bursera fagaroides*: podofilotoxina (1), acetil podofilotoxina (2), 5'-desmetoxi-β-peltatina A metil éter (3), 7',8'-dehidro acetil podofilotoxna (4), y burseranina (5) (Figura 22).

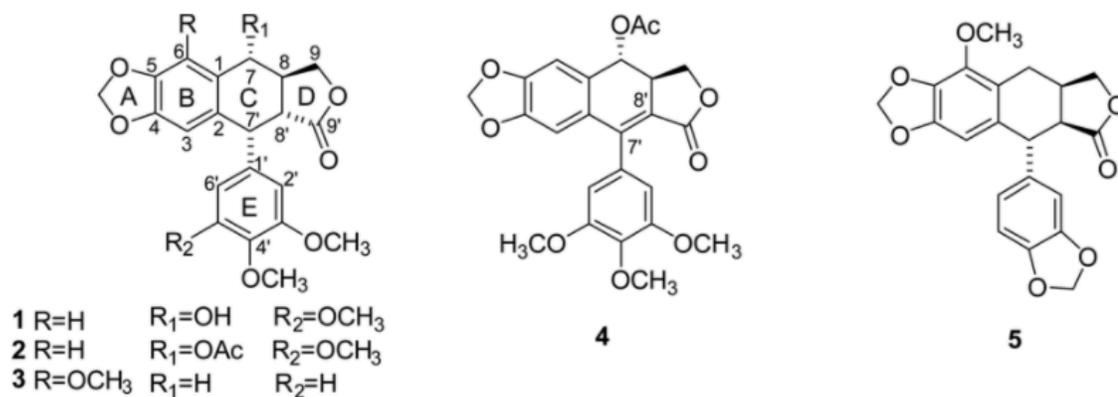


Figura 22. Estructuras Químicas de Lignanos 1-5 Aislados de *B. fagaroides*.

Figura reimpressa de *J. Nat. Prod.*, **2016**, 79, 2113-2121.

Se evaluaron los 5 productos naturales contra las líneas celulares cancerosas A549 y A2780, obteniendo los resultados de la TABLA 2.

TABLA 2
Citotoxicidad de Compuestos 1-5 en Líneas Celulares A549 y A2780

Compuesto	IC ₅₀ (nM) ^a	
	A549	A2780
1	15±1	18±1
2	25±2	34±5
3	33±7	84±10
4	263±75	587±58
5	8670±3000	12940±4000

A549: cáncer de pulmón; A2780: cáncer de ovario.

^aValores promedio ± error estándar de tres experimentos independientes a 48 h de exposición.

En la tabla anterior se demuestra que los compuestos fueron altamente citotóxicos contra ambas líneas, mostrando valores que van de 25 nM a 13 μ M.

Para comprobar el mecanismo de acción llevaron a cabo diversos experimentos. Observaron que los compuestos acumularon un mayor porcentaje de células en fase G₂/M de la línea 549 mediante citometría de flujo.

En el segundo experimento, confirmaron el sitio de unión a la colchicina como la diana molecular de estos compuestos al medir el grado de desplazamiento de MTC [2-metoxi-5-(2,3,4-trimetoxifenil)2,4,6-cicloheptatrien-1-ona], un análogo de colchicina que fluoresce a 350 nm cuando está unido a la tubulina. El compuesto (**2**) y podofilotoxina resultaron los más activos, con un 65 y 28% de fluorescencia, respectivamente (se midió la disminución de fluorescencia, directamente proporcional al grado de desplazamiento de MTC).

Para el estudio de reconocimiento de estructuras moleculares entre el dímero α/β tubulina, se llevó a cabo el estudio de Resonancia Magnética Nuclear de Diferencia de Transferencia de Saturación (STD-NMR, por sus siglas en inglés). El fundamento de este se describe a continuación.

Se basa en el efecto NOE (Nuclear Overhauser Effect) y en la observación de las señales de resonancia del ligando, así como en el hecho de que, para una unión débil de ligando (constante de disociación, K_D entre 10^{-8} mol/L a 10^{-3} mol/L), hay un intercambio entre el ligando unido y libre. Este experimento involucra la

sustracción del espectro en el cual la proteína fue selectivamente saturada (espectro “en resonancia” obtenido al irradiar a cierta región que contiene solo resonancias de la proteína, con señales I_{SAT}), de aquel espectro adquirido sin saturación de proteína (“fuera de resonancia” con señales I_0). En el espectro diferencial ($I_{STD} = I_0 - I_{SAT}$) solo permanecerán las señales del ligando que recibieron la transferencia de saturación de la proteína (por efecto NOE) (Figura 23).

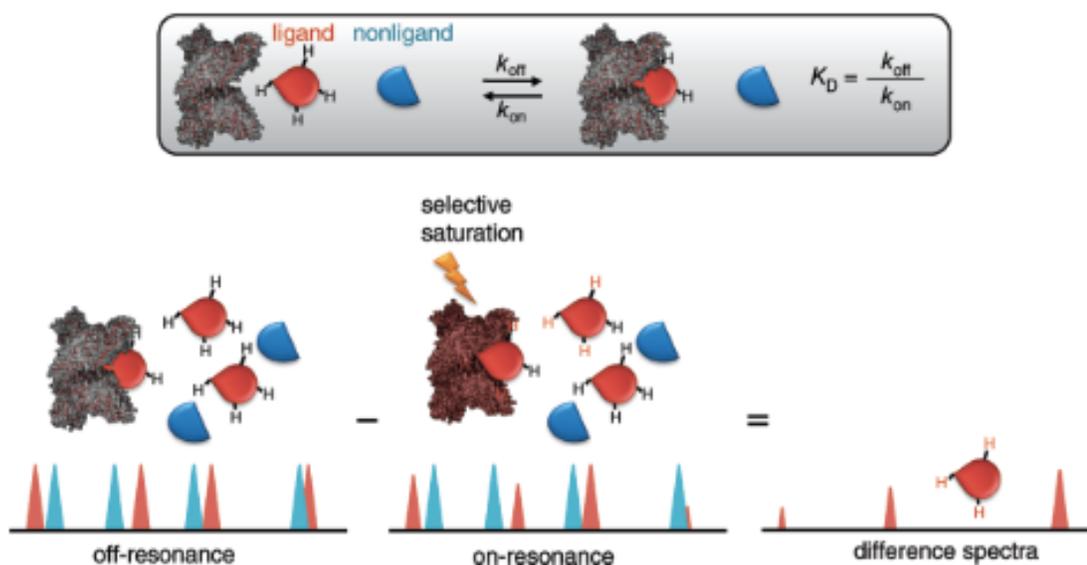


Figura 23. Esquema del Experimento STD-NMR. El Intercambio entre Ligando Unido y Libre Permite la Transferencia de Magnetización de la Proteína al Ligando.

Figura reimpressa de *J. Chem. Ed.* **2011**, 990-994.

Otros compuestos que puedan estar presentes pero que no se unen al receptor no recibirán ninguna transferencia de saturación; sus señales tendrán igual intensidad en los espectros “en resonancia” y “fuera de resonancia” y, como

consecuencia, tras la sustracción no se observarán señales en el espectro diferencial. La diferencia en intensidad a causa de la transferencia de saturación se puede cuantificar ($I_{STD}=I_0-I_{SAT}$) y es indicativo de la unión. Para una molécula que se une a la proteína, solo aquellas señales de los hidrógenos que están en estrecho contacto con la proteína ($\leq 5 \text{ \AA}$) y que reciban transferencia de magnetización aparecerán en el espectro diferencial y de éstos, los que estén más cerca a la proteína, tendrán señales más intensas a causa de una transferencia de saturación más eficiente.

Explicado el fundamento de esta técnica espectroscópica, se analizaron los lignanos 1-3 por STD-NMR. Los lignanos 1 y 2 mostraron efectos STD mayores para los hidrógenos H-3 y H-6 del anillo B, seguido de los protones en los anillos A y E. El compuesto 3 mostró efectos STD para H-3, H-5' y H-6' y de manera importante para el OMe en C40, lo que indica proximidad con la proteína. Con todo lo anterior se concluye que los anillos B y E presentan una interacción clave con la tubulina (Figura **24**).

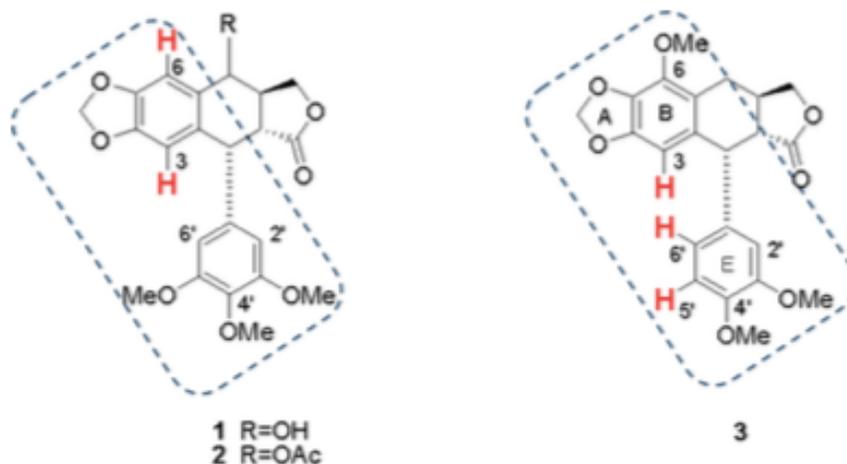


Figura 24. Representación Esquemática de los Protones que Interactúan con Tubulina. En Rojo los Protones más Afectados en el Complejo y en el Recuadro Punteado la Región que Interactúa con la Proteína.

Figura reimpressa de *J. Nat. Prod.*, **2016**, 79, 2113-2121.

2.2.2 Interacción de Podofilotoxina y Derivados con Topoisomerasa II

Existen al menos dos isoformas de topoisomerasa II que comparten un 70% de la secuencia de aminoácidos en vertebrados: II α y II β . La primera es esencial en la relajación de la cadena de ADN y es esencial para la supervivencia de células activas en crecimiento y su concentración se incrementa en periodos de proliferación; en contraste, la topoisomerasa II β es de carácter constitutiva, es decir, su concentración no se ve afectada por el ciclo celular, es por ello por lo que la isoforma α ha sido más estudiada que la β .

Como se ha descrito anteriormente, los derivados semisintéticos etopósido y tenipósido ejercen su efecto citotóxico al inhibir la función de topoisomerasa II, de ligar nuevamente el ADN que se escinde al formar complejos ternarios de

ligando-enzima-ADN. En un estudio realizado por Wilstermann y cols. [38] se utilizaron técnicas como STD-NMR y electroforesis para definir los grupos funcionales en etopósido y otras moléculas ensayadas (Figura 25) que se asocian con topoisomerasa II de levadura *Saccharomyces* y topoisomerasa IIa humana, así como para determinar la capacidad de los derivados estudiados para formar complejos ternarios.

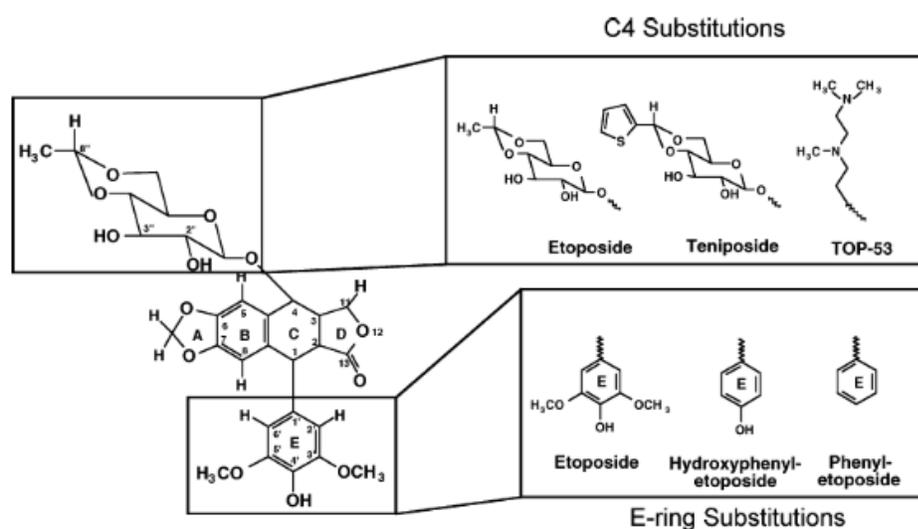


Figura 25. Estructuras de Etopósido y Derivados con Sustituciones en C4 o Anillo E.

Figura reimpressa de *Biochemistry*, **2007**; 46(28): 8217–25

Para el ensayo de electroforesis se utilizó plásmido pBR322 superenrollado negativamente, las moléculas a probar y después del tiempo de reacción (6 minutos) se digirió con proteinasa K y se añadió SDS para correr las muestras en el gel, mostrando los resultados de la Figura 26:

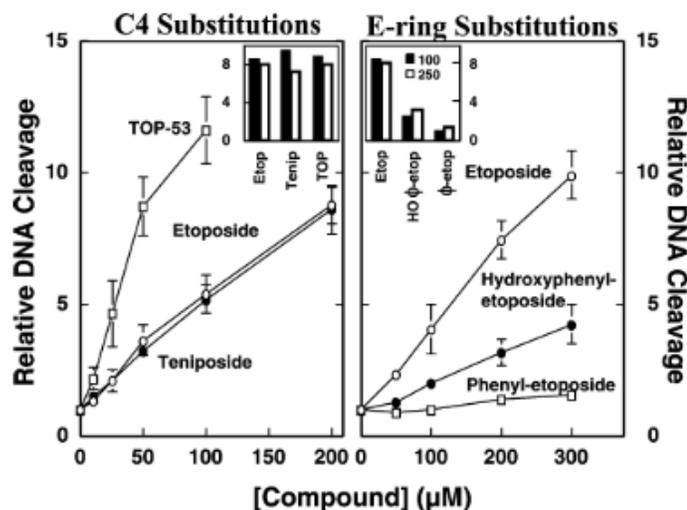


Figura 26. Escisión de ADN por Etopósido y Derivados.

Figura reimpressa de *Biochemistry*, **2007**; 46(28): 8217–25.

En el gráfico de la izquierda, se observa la influencia del sustituyente en C4 con la capacidad de generar fragmentos de ADN observables por electroforesis, siendo la molécula TOP-53 la que presentó mayor actividad respecto a etopósido. En contraste, en el gráfico de la derecha se estudió la dependencia entre la variación de sustituyentes en el anillo E, concluyendo que, al reducir las sustituciones en este anillo, también se reduce la actividad citotóxica sobre topoisomerasa II.

En el espectro diferencial de etopósido se observaron efectos NOE con los protones geminales del anillo A, H5 y H8 del anillo B, así como con H2', H6', con los metoxilos en 3' y 5' del anillo E y no se observó ninguna interacción con los hidrógenos de la porción glicosídica.

Se encontró que el derivado TOP-53 que había mostrado buena actividad en el ensayo de electroforesis, presenta señales en el espectro diferencial de STD-NMR ^1H (Figura 27) para los mismos hidrógenos que etopósido y, además, para los hidrógenos de la cadena aminoalquilo.

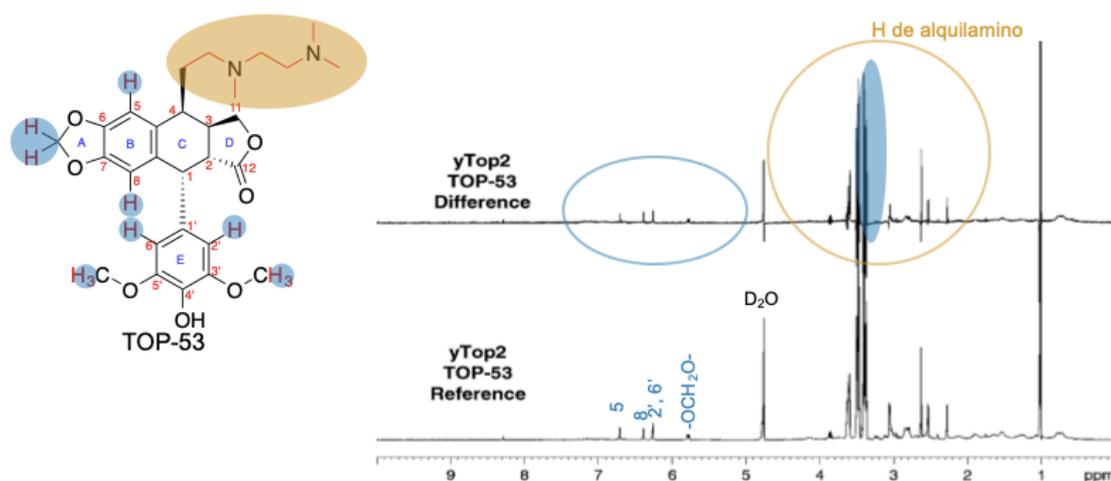


Figura 27. Interacción de TOP-53 con Topoisomerasa II de Levadura Determinado por STD [^1H]-NMR.

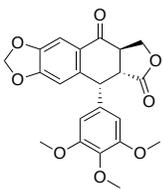
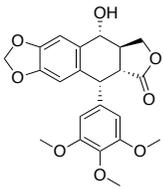
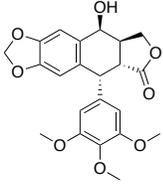
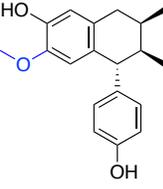
Figura adaptada de *Biochemistry*, 2007; 46(28): 8217–25.

2.3 Actividad Biológica de Lignanós Naturales

Actualmente se cuenta con estudios de actividad citotóxica de ariltetralinas naturales (TABLA 3): podofilotoxina, epipodofilotoxina (-OH en C4 β), podofilotoxona (análogo C4 cetónico), y 3'-desmetoxi isoguaiacina. Se reportan concentraciones que alcanzan el orden de nM para epipodofilotoxina y el resto de los análogos con concentraciones superiores a este mostrando una moderada actividad citotóxica.

TABLA 3

Actividad Citotóxica de Podofilotoxina y Derivados Frente a Diversas Líneas Celulares Cancerosas Humanas

Compuesto	Línea celular	Actividad citotóxica
 Podofilotoxona	DU145 (cáncer de próstata)	IC ₅₀ = 14.7±0.8 μM, MTT [39]
	PC-3 (cáncer de próstata)	IC ₅₀ = 20.6±3.2 μM, MTT [39]
	PC-3 (cáncer de próstata)	% Inhibición celular a 20 μM= 52.0±5.6, MTT [40]
	Bcap-37 (cáncer de mama)	% Inhibición celular a 20 μM= 42.1±6.3, MTT [40]
 Podofilotoxina	DU145 (cáncer de próstata)	IC ₅₀ = 0.08±0.02 μM, MTT [39]
	PC-3 (cáncer de próstata)	IC ₅₀ = 0.12±0.03 μM, MTT [39]
	HT-29 (cáncer de colon)	IG ₅₀ = 12 nM, SRB [41]
 Epipodofilotoxina	HT-29 (cáncer de colon)	IG ₅₀ = 60 nM, SRB [41]
 3'-desmetoxi isoguaiacina	ACC375 (melanoma)	
	MCF7 (cáncer de mama)	IC ₅₀ = 22 μM, SRB [42]
	SW480 (cáncer de colon)	IC ₅₀ = 9.6 μM, SRB [42]
		IC ₅₀ = 55.1 μM, SRB [42]

Ensayos de citotoxicidad realizado por el método de reducción del colorante de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (**MTT**) y unión del colorante sulforrodamina B (**SRB**) a proteínas.

Actividad citotóxica representada en porcentaje de inhibición celular (%IC), Concentración de Inhibición Media (IC₅₀) o Concentración Media de Inhibición de Crecimiento (GI₅₀).

Tabla adaptada de: *Chem. – A Eur J*, 2016, 23(19): 4467–4526.

2.4 Actividad Biológica de 3'-desmetoxi-6-O-desmetilisoguaiacina

Así como la podofilotoxina, los ciclolignanos son también productos naturales de tipo ariltetralina, por lo cual están estructuralmente relacionados. Recientemente, Favela-Hernández y cols. [43] aislaron, caracterizaron estructuralmente y evaluaron la actividad biológica de 3'-desmetoxi-6-O-desmetilisoguaiacina, reportada previamente por Konno y cols. [44] de la planta *Larrea tridentata*. Se encontró que este fue activo frente a aislados clínicos de *Enterococcus faecalis* (Concentración Mínima Inhibitoria, CMI=12.5-50 µg/ml), siendo igualmente o dos a cuatro veces más activo que el estándar levofloxacino (CMI=50 µg/ml). Además, fue activo contra dos cepas multifarmacorresistentes de *M. tuberculosis* (CMI=12.5 µg/ml) [43].

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Al menos una de las ariltetralinas C(4)-funcionalizadas exhibe mayor inhibición de crecimiento celular contra una o varias de las líneas celulares cancerosas humanas de glioblastoma (U251), adenocarcinoma de próstata (PC-3), leucemia mieloide crónica (K-562), adenocarcinoma colorrectal (HCT-15), adenocarcinoma mamario (MCF-7), adenocarcinoma de pulmón (SKLU-1) que 3'-desmetoxi-6-O-desmetilisoguaiacina y/o etopósido.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo General

Semisintetizar ariltetralinas C(4)-funcionalizadas a partir de 3'-desmetoxi-6-O-desmetilisoguaiacina y determinar su porcentaje de inhibición de crecimiento celular contra líneas celulares cancerosas.

3.2.2 Objetivos Específicos

1. Realizar análisis estructural y estereoquímico de 3-desmetoxi-6-O-desmetilisoguaiacina.
2. Incorporar diversos grupos funcionales en la posición C4 de los derivados O-alkilados obtenidos de 3'-desmetoxi-6-O-desmetilisoguaiacina.
3. Purificar los derivados semisintéticos.
4. Caracterizar estructuralmente las moléculas mediante técnicas espectrométricas y espectroscópicas.
5. Evaluar la inhibición de crecimiento celular de los derivados semisintéticos a 25 μM frente a líneas celulares cancerosas humanas y una línea celular normal (COS-7).

CAPÍTULO 4

PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Ubicación de Infraestructura y Equipos

La semisíntesis de los derivados obtenidos en este proyecto de tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Farmacéutica, ubicado en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), así como en el laboratorio 1-2 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Se realizó la espectroscopía y espectrometría de las moléculas de este proyecto en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La determinación de la actividad citotóxica de los compuestos se realizó en el Laboratorio de Ensayos Biológicos del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Purificación de Compuestos

La purificación se realizó por Cromatografía en Columna (CC) a gravedad y Cromatografía en Columna Flash utilizando sílica (SiO_2) con tamaño de partícula de 63-200 μm (70-230 mesh), y de 40-63 μm (230-400 mesh), respectivamente como fase estacionaria y disolventes como hexano (Hex), acetato de etilo (AcOEt), diclorometano (DCM), metanol (MeOH) y acetona como fase móvil.

Para el seguimiento de las columnas durante la purificación, y de las reacciones químicas durante la síntesis de los compuestos, se utilizó la técnica de Cromatografía en Capa Fina (CCF) con cromatofolios Merck Sílica gel 60 F₂₅₄. Como reveladores se utilizaron una lámpara de UV marca Spectroline ENF-260C (λ 254 y 365 nm), solución de sulfato de cerio (IV), solución de vainillina, solución de ninhidrina y vapores de yodo. Para eliminar el disolvente a presión reducida se utilizaron evaporadores rotativos marca Büchi.

4.2.2 Semisíntesis de Ariltetralinas C(4)-funcionalizadas

Todos los reactivos descritos a continuación fueron adquiridos de Sigma-Aldrich y utilizados sin posterior purificación, a menos de ser especificado.

El esquema general de síntesis se muestra en la Figura 28. Se protegieron los grupos fenólicos de 3'-desmetoxi-6-O-desmetil isoguaiacina por dos procedimientos: el primero fue la formación del grupo 1,3-dioxolano a partir del catecol, con dibromometano (CH_2Br_2) o bromoclorometano (BrCH_2Cl) carbonato de cesio (Cs_2CO_3) o carbonato de potasio (K_2CO_3), en acetonitrilo (MeCN) o *N,N*-Dimetilformamida (DMF) a reflujo; el segundo procedimiento fue por metilación de los tres grupos hidroxilo en la molécula.

Para la *O*-metilación del catecol y fenol se llevaron a cabo dos metodologías: para la metilación parcial se usó K_2CO_3 , yodometano (CH_3I) al 99.5% y acetona a reflujo; para la metilación total se utilizó, a 0 °C, hidruro de sodio (NaH) al 90%, CH_3I al 99.5% en DMF anhidra [por agitación en óxido de bario (BaO) y posterior destilación a presión reducida].

En la reacción de bromación bencílica se utilizó *N*-bromosuccinimida (NBS) al 99%, y peróxido de benzoilo (BPO) al 98% en tetracloruro de carbono (CCl_4) a reflujo.

La reacción de oxidación bencílica se llevó a cabo con Oxone[®], yoduro de potasio (KI), y una lámpara de luz blanca de 100 W (watt) en MeCN y agua a temperatura ambiente.

Para realizar la reacción de adición nucleofílica de hidroxilamina, se utilizó ésta en forma de clorhidrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) al 99% en MeOH y piridina a reflujo.

A partir del derivado oxima, se acetiló con anhídrido acético (Ac_2O) al 99%, 4-Dimetilaminopiridina (DMAP) al 99% en piridina.

En la reacción de reducción del derivado cetónico a alcohol se utilizó hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4) al 95% a 0 °C en atmósfera de argón en éter etílico (Et_2O) secado con sodio/benzofenona.

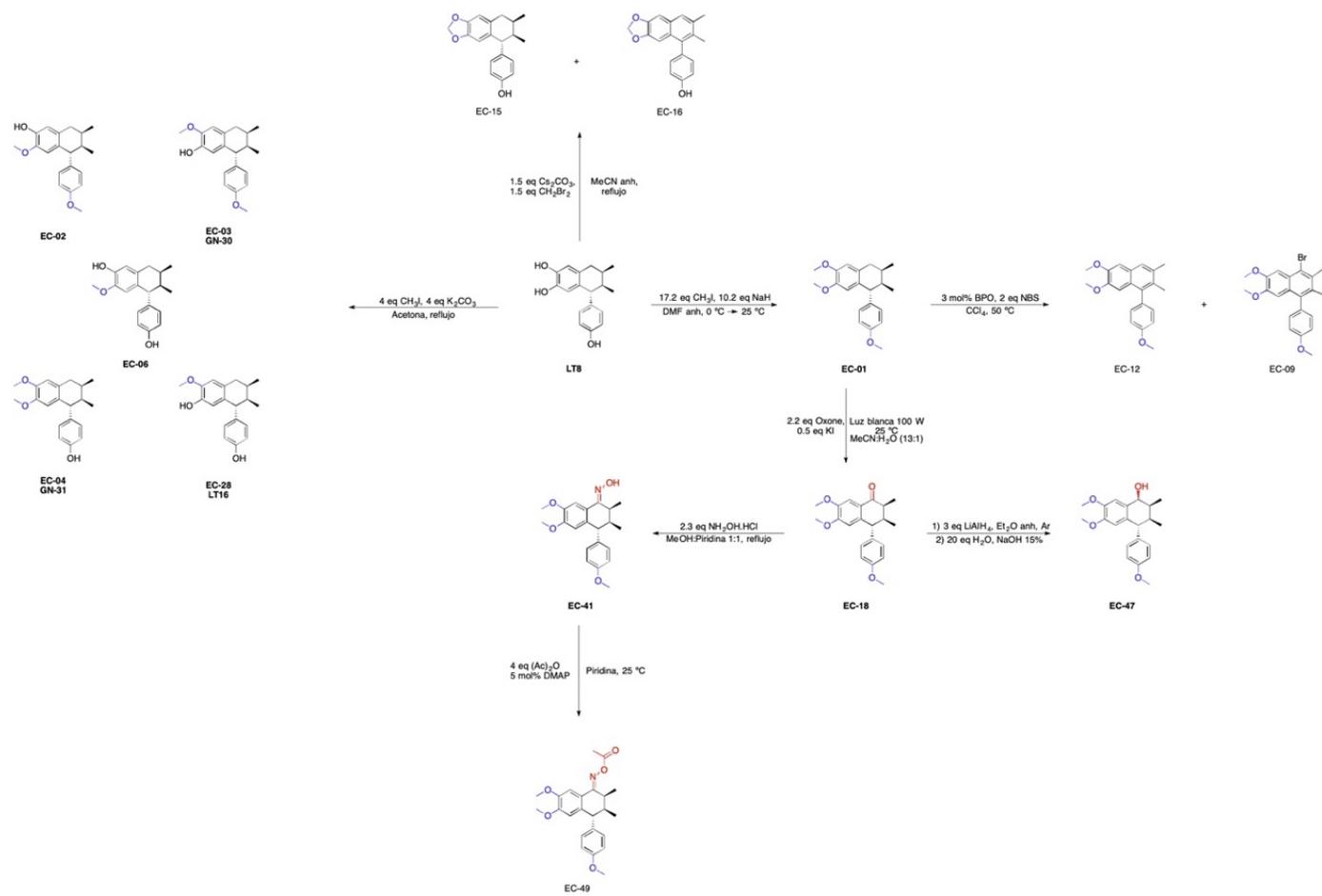


Figura 28. Esquema General de Síntesis.

4.2.3 Elucidación Estructural de los Compuestos Obtenidos

Se determinó la configuración absoluta del producto natural 3'-desmetoxi-6-O-desmetil isoguaiacina mediante DC con un espectropolarímetro JASCO J-1500. Los puntos de fusión de los compuestos se determinaron en un aparato Fisher-Johns. Las estructuras cristalinas fueron obtenidas en un Difractómetro de Monocristal Bruker, modelo D8 Venture.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H) de las moléculas se obtuvieron en los instrumentos JEOL Eclipse (300 MHz), Bruker (400 MHz) y Bruker AVANCE III HD (700 MHz) usando cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como estándar interno, reportando los desplazamientos químicos (δ) en partes por millón (ppm). Las constantes de acoplamiento (J) se mostraron en Hertz (Hz); se describieron las multiplicidades con las siguientes abreviaturas: singulete (s), doblete (d), triplete (t), doblete de dobletes (dd), cuarteto de dobletes (qd), doblete de cuarteto de doblete (dq), multiplete (m) y señal ancha (brs). Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C) se adquirieron a 75 (JEOL Eclipse 300 MHz), 125 (Bruker 400 MHz), y 175 (Bruker AVANCE III HD 700 MHz) MHz en CDCl_3 y los desplazamientos químicos se reportaron en ppm [mostrando una señal residual a 77 ppm de cloroformo (CHCl_3)]. También se adquirieron experimentos heteronucleares de HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) y HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) en el espectrómetro Bruker de 400 MHz.

Los espectros de Infrarrojo fueron adquiridos en un espectrofotómetro FT-IR Bruker Tensor 27, reportándose las absorciones en número de onda ($\bar{\nu}$, cm^{-1}). Los espectros de masas de baja y alta resolución se adquirieron en un espectrómetro JEOL The AccuTOF JMS-T100LC.

4.2.4 Determinación de la Actividad Citotóxica

4.2.4.1 Preparación de la Línea Celular.

Las líneas celulares que se utilizaron en este proyecto pertenecen al panel del NCI (National Cancer Institute), las cuales fueron adaptadas al medio de cultivo RPMI-1640 adicionado con suero fetal bovino (10%) y una mezcla de antibióticos-antimicóticos al 10% en cajas Petri.

Las líneas celulares fueron adheridas a las cajas Petri para su crecimiento y después de 24-48 horas de incubación, se adicionó 1 ml de 0.05% de tripsina-EDTA para desprenderlas de las caja Petri. Enseguida del desprendimiento de las células, se adicionaron de 5-10 ml de medio de cultivo para inactivar la tripsina. Las células en suspensión fueron depositadas en tubos cónicos y centrifugadas por 3 minutos (min) para obtener el paquete celular que sería resuspendido en medio de cultivo. A partir de esta suspensión, se tomó una alícuota y se agregó azul de tripano, para el conteo de la población de células viables y ajustar la densidad del inóculo. Determinando el número de células por

ml (5000-10000, dependiendo de la línea celular), se hicieron los ajustes necesarios para depositar el inóculo en un volumen de 100 µl/pozo a la densidad correspondiente a cada línea celular. Cada placa fue inoculada con la línea celular por triplicado y fue preincubada por 24 horas (h) a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa, para favorecer la estabilidad de las células antes de adicionar las sustancias a probar.

4.2.4.2 Rastreo de Actividad Citotóxica a 25 µM.

Para un rastreo primario de actividad citotóxica de un compuesto puro, se probó la concentración de 25 µM. Todas las muestras fueron solubilizadas en dimetilsulfóxido (DMSO) 100 veces más concentradas que la concentración a probar. Después de la preparación de las muestras en solución y en el caso de realizar curvas concentración-respuesta (5 diluciones se probaron) se agregaron 100 µL, siendo el volumen final del pozo de 200 µl. Nuevamente la microplaca fue incubada por 48 h bajo las condiciones antes mencionadas. Al finalizar el periodo de incubación de los compuestos con las células, éstas fueron precipitadas (o fijadas) *in situ* añadiendo 50 µl de una solución de ácido tricloroacético (TCA) frío al 50% e incubadas a 4 °C por 60 min. Se desechó el sobrenadante y las placas fueron lavadas 5 veces con agua desionizada y secadas al ambiente. El teñido de las células fijadas al sustrato del pozo se realizó con 100 µl de una solución al 0.4% de SRB y se incubó por 30 min. a temperatura ambiente. La SRB no unida se removió por 3 lavados con ácido

acético al 1% y se dejó secar al ambiente. A las placas teñidas se les agregaron 100 µl de un buffer de base tris y se agitaron por 10 minutos para favorecer la disolución del complejo; a continuación se midió la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas (Synergy/BioteK) a una longitud de onda de 515 nm. Los datos se procesaron obteniendo el promedio de la DO de los 3 pozos/línea tratados con el compuesto (DO_t), los 3 pozos tratados con DMSO (DO_c) y los 2 pozos testigos (aquellos que tienen compuesto y no tienen células, DO_b). El porcentaje de inhibición del crecimiento (%IC) se calculó con la siguiente fórmula:

(7)

$$\%IC = 100 - \left(\frac{DO_{muestra} - DO_{blanco}}{DO_{control\ negativo} - DO_{blanco}} \right) (100)$$

4.3 Disposición de Residuos

La disposición de los residuos generados en la etapa de semisíntesis orgánica y evaluación biológica se llevó a cabo bajo los lineamientos establecidos por el Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL (Figura 29), por el Reglamento de Higiene y Seguridad del Instituto de Química-UNAM y por la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002.



Figura 29. Clasificación de Residuos para su Disposición, Emitido por el Departamento de Medio Ambiente y Seguridad.

TABLA 4
Disposición y Cuantificación de Residuos

Residuos	Colector o recipiente	Cantidad
Soluciones de ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos, bases inorgánicas	Colector A	500 ml
Sólidos inorgánicos	Colector B	2 kg
Combinaciones orgánicas no halogenadas líquidas, bases orgánicas y aminas	Colector C	30 L

Combinaciones orgánicas halogenadas líquidas	Colector D	6 L
Cancerígeno, orgánico	Colector E	1 L
Combinaciones orgánicas sólidas	Colector G	1 kg
Guantes de látex o nitrilo, placas cromatográficas, papel aluminio o papel común impregnados con residuos peligrosos	Basura industrial	3 kg
Residuos sólidos de cultivos y cepas de agentes infecciosos	Bolsa roja de polietileno	2 kg
Residuos no anatómicos sólidos	Bolsa roja de polietileno	2 kg

4.4 Obtención de 3'-desmetoxi-6-O-desmetilisoguaiacina

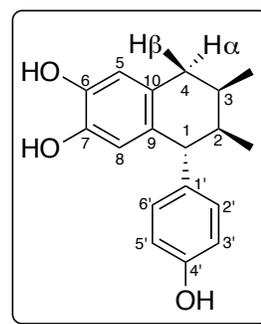
El ciclolignano 3'-desmetoxi-6-O-desmetilisoguaiacina fue extraído y purificado del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *Larrea tridentata* mediante cromatografía en columna previamente empacada con sílica gel y eluida con una mezcla de CH₃Cl:MeOH 97:3, de acuerdo con el procedimiento reportado por Favela-Hernández y cols. [43]. El compuesto de interés fue obtenido como un sólido de color beige claro, del cual, 1 g fue provisto por la Dra. Camacho-Corona. La estructura química se confirmó mediante el análisis de los espectros de RMN ¹H y RMN ¹³C y se estableció la configuración absoluta de

dicho producto natural mediante DC en la sección 5.2.1.6 Elucidación Estructural del Derivado **EC-01**.

4.4.1 Datos Físicos y Espectroscópicos de 3'-desmetoxi-6-O-desmetil isoguaiacina (**LT8**)

El producto natural es un sólido beige claro; pf: 182-185 °C, R_f: 0.17 (Hex:Acetona 70:30). **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.86 (brs, 1H, OH), 7.33 (brs, 1H, OH), 6.81 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.67 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.66 (brs, 1H, OH), 6.55 (s, 1H, H-5), 6.28 (s, 1H, H-8), 3.51 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-1), 2.78 (dd, *J* = 16.5, 5.7 Hz, 1H, H-4_α), 2.36 (dd, *J* = 16.5, 7.2 Hz, 1H, H-4_β), 2.00-1.94 (m, 1H, H-3), 1.88-1.79 (m, 1H, H-2), 0.83 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃-C3), 0.82 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃-C2). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 154.8 (C4'), 142.8 (C6), 142.3 (C7), 138.7 (C1'), 130.1 (C2', C6'), 130.1 (C9), 128.0 (C10), 116.9 (C8), 115.0 (C3', C5'), 114.8 (C5), 50.0 (C1), 40.8 (C2), 35.0 (C4), 29.2 (C3), 16.0 (CH₃-C3), 15.8 (CH₃-C2).

EM-AR (ESI⁺) *m/z* calculado para C₁₈H₂₁O₃ [M+H]⁺ 285.14907, encontrado 285.14933.



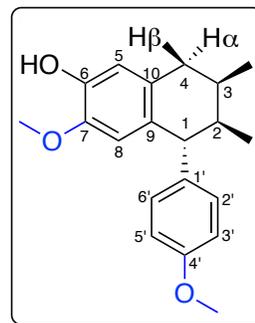
4.5 Obtención de los Compuestos Semisintéticos

4.5.1 Obtención de Subproductos Mono- y di- Metoxilados a Partir de 3'-desmetoxi-6-O-desmetil isoguaiacina (**LT8**)

En un matraz bola de 50 ml de dos cuellos se pesaron 200 mg (0.7033 mmol) de **LT8**, se colocó un agitador magnético y se disolvió en 20 ml de acetona (previamente secada con malla molecular). Se conectó el matraz a un refrigerante para iniciar un reflujo a 70 °C y se añadió 389 mg (2.8134 mmol) de K₂CO₃ (previamente secado en estufa) al 99.9% y 176 µl (2.8134 mmol) de CH₃I al 99.5%, en ese orden, y se dejó bajo esas condiciones. Se monitoreó el progreso de la reacción por CCF utilizando una mezcla de Hex/Acetona 7:3 como fase móvil. Tras 16 horas de reacción, se filtró a vacío el contenido del matraz a través de celita y el filtrado se evaporó a presión reducida para obtener un crudo de aspecto resinoso de color café-rojizo, el cual fue purificado posteriormente mediante CC de 45.2x2 cm con sílica gel como fase estacionaria y una mezcla de Hex/Acetona en gradiente de polaridad, iniciando con una proporción 99:1 y finalizando con 86:14.

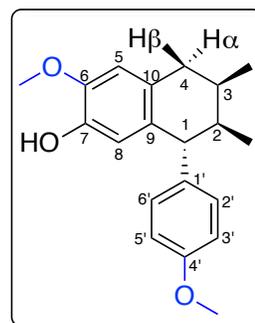
4.5.1.1 Datos Físicos y Espectroscópicos del Subproducto **EC-02**.

El producto es un sólido beige claro; pf: 103-105 °C; R_f: 0.5 (Hex:Acetona 70:30). **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.93 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.80 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.67 (s, 1H, H-5), 6.31 (s, 1H, H-8), 5.44 (s, 1H, OH), 3.78 (s, 3H, C4'-OCH₃), 3.69 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, H-1), 3.68 (s, 3H, C7-OCH₃), 2.81 (dd, *J* = 16.5, 5.4 Hz, 1H, H-4α), 2.42 (dd, *J* = 16.4, 8.2 Hz, 1H, H-4β), 2.04-1.95 (m, 1H, H-3), 1.94-1.85 (m, 1H, H-2), 0.90 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, C3-CH₃), 0.88 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, C2-CH₃). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 157.8 (C4'), 145.1 (C6), 143.9 (C7), 139.8 (C1'), 130.1 (C2', C6'), 129.5 (C9), 129.3 (C10), 114.2 (C5), 113.5 (C3', C5'), 112.7 (C8), 56.0 (C7-OCH₃), 55.4 (C4'-OCH₃), 50.8 (C1), 41.1 (C2), 34.5 (C4), 28.3 (C3), 16.9 (C3-CH₃), 15.4 (C2-CH₃). **EM-AR (ESI⁺)** m/z calculado para C₂₀H₂₅O₃ [M+H]⁺ 313.18037, encontrado 313.18005.



4.5.1.2 Datos Físicos y Espectroscópicos del Subproducto **EC-03**.

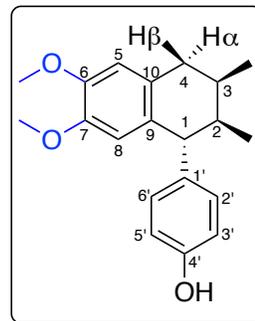
El producto es una resina beige claro; R_f: 0.47 (Hex:Acetona 70:30). **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H2', H-6'), 6.78 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.57 (s, 1H, H-5), 6.38 (s, 1H, H-8), 5.3 (s, 1H, OH), 3.86 (s, 3H, C6-OCH₃), 3.78 (s, 3H, C4'-OCH₃), 3.62 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, H-1), 2.88 (dd, *J* = 16.4, 5.2 Hz, 1H, H-4α), 2.46 (dd, *J* = 16.4,



7.2 Hz, 1H, H-4 β), 2.05-1.99 (m, 1H, H-3), 1.96-1.88 (m, 1H, H-2), 0.89 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, C3-CH $_3$), 0.88 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, C2-CH $_3$).

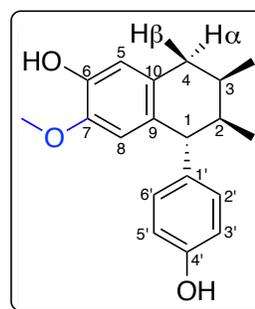
4.5.1.3 Datos Físicos y Espectroscópicos del Subproducto **EC-04**.

El producto es un sólido verde claro; pf: 140-142 °C; R $_f$: 0.4 (Hex:Acetona 70:30). **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl $_3$) δ (ppm): 6.87 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.71 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.59 (s, 1H, H-5), 6.32 (s, 1H, H-8), 3.86 (s, 3H, C6-OCH $_3$), 3.69 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H-1), 3.66 (s, 3H, C7-OCH $_3$), 2.84 (dd, $J = 16.5, 5.4$ Hz, 1H, H-4 α), 2.45 (dd, $J = 16.4, 8$ Hz, 1H, H-4 β), 2.04-1.97 (m, 1H, H-3), 1.94-1.86 (m, 1H, H-2), 0.91 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, C3-CH $_3$), 0.90 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, C2-CH $_3$).



4.5.1.4 Datos Físicos y Espectroscópicos del Subproducto 3'-desmetoxi isoguaiacina (**EC-06**).

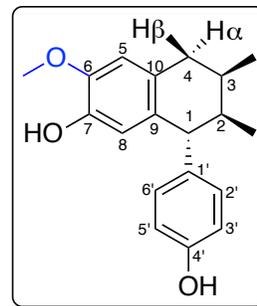
El producto es una resina amarilla; R $_f$: 0.33 (Hex:Acetona 70:30). **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl $_3$) δ (ppm): 6.87 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.71 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.66 (s, 1H, H-5), 6.3 (s, 1H, H-8), 5.42 (s, 1H, OH), 4.59 (s, 1H, OH), 3.68 (s, 3H, C7-OCH $_3$), 3.67 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H-1), 2.8 (dd, $J = 16.6, 5.4$ Hz, 1H, H-4 α), 2.42 (dd, $J = 16.4, 8$ Hz,



1H, H-4 β), 2.03-1.95 (m, 1H, H-3), 1.92-1.86 (m, 1H, H-2), 0.9 (d, $J = 6.4$, Hz, 3H, C3-CH₃), 0.88 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, C2-CH₃).

4.5.1.5 Datos Físicos y Espectroscópicos del Subproducto **EC-28**.

El producto es un sólido amarillo; pf: 63-64 °C; R_f: 0.34 (Hex:Acetona 70:30). **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.88 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.7 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.57 (s, 1H, H-5), 6.39 (s, 1H, H-8), 5.34 (s, 1H, OH), 4.73 (s, 1H, OH), 3.86 (s, 3H, C6-OCH₃), 3.61 (d, $J = 6$ Hz, 1H, H-1), 2.87 (dd, $J = 16.2, 5.4$ Hz, 1H, H-4 α), 2.46 (dd, $J = 16.3, 7.4$ Hz, 1H, H-4 β), 2.05-1.98 (m, 1H, H-3), 1.94-1.88 (m, 1H, H-2), 0.89 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, C3-CH₃), 0.88 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, C2-CH₃). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 153.7 (C4'), 145.1 (C6), 143.6 (C7), 139.5 (C1'), 131.0 (C9), 130.3 (C2', C6'), 127.9 (C10), 116.2 (C8), 115.0 (C3', C5'), 110.7 (C5), 55.9 (C6-OCH₃), 50.1 (C1), 40.8 (C2), 35.3 (C4), 29.1 (C3), 16.2 (C3-CH₃), 15.8 (C2-CH₃).



4.5.2 Obtención del Derivado **EC-01** por O-metilación

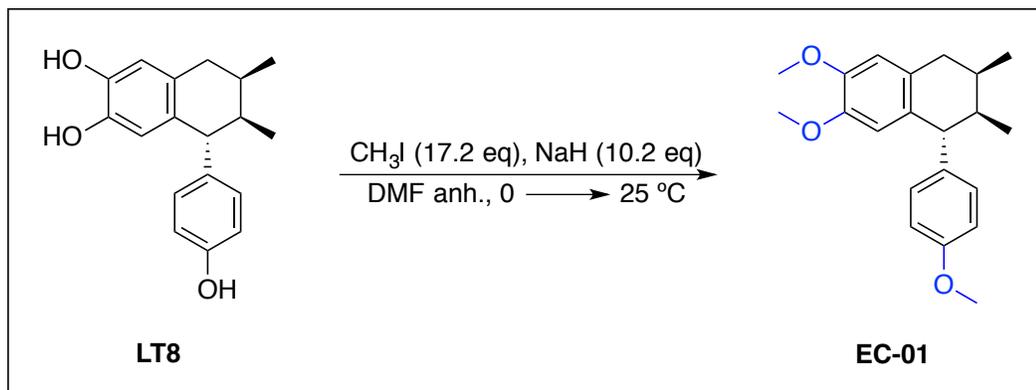


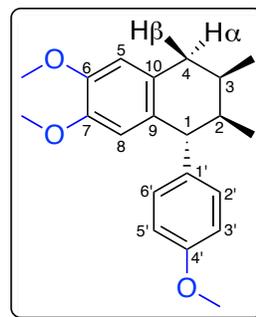
Figura 30. Esquema de Síntesis del Derivado **EC-01**.

En un matraz bola de 25 ml de un cuello se pesaron 1.0655 mmol de **LT8**, se colocó un agitador magnético y se purgó el matraz con Argón. Posteriormente se disolvió con 10 ml de DMF anhidra (previamente agitada en BaO y destilada a presión reducida), y se introdujo el matraz a un baño de hielo para entonces añadir 10.8090 mmol de NaH al 90% en dos porciones. Finalmente, se retiró el baño de hielo y se inyectó 18.3281 mmol de CH_3I gota a gota, dejando la reacción en agitación por 1 hora a 25°C hasta observar el consumo total de la materia prima por CCF. Una vez finalizada la reacción, se adicionó agua suficiente para remover el NaH en exceso y se transfirió el contenido del matraz a un embudo de separación, en el cual se extrajo la fase orgánica tres veces con AcOEt, para después secarla con Na_2SO_4 , filtrarla y evaporarla a presión reducida para obtener un aceite amarillo, el cual fue purificado posteriormente mediante CC de 20x2.5 cm con sílica gel como fase estacionaria y una mezcla de Hex/Acetona

en gradiente de polaridad, iniciando con una proporción 99:1 y finalizando con 97:3.

4.5.2.1 Datos Físicos y Espectroscópicos del Derivado **EC-01**.

El producto es un cristal incoloro rectangular; pf: 76 °C;
R_f: 0.57 (Hex:Acetona 70:30). **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.92 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.79 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.60 (s, 1H, H-5), 6.33 (s, 1H, H-8), 3.87 (s, 3H, C6-OCH₃), 3.78 (s, 3H, C4'-OCH₃), 3.70 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, H-1), 3.67 (s, 3H, C7-OCH₃), 2.84 (dd, *J* = 16.5, 5.4 Hz, 1H, H-4α), 2.45 (dd, *J* = 16.5, 8.1 Hz, 1H, H-4β), 2.07-1.96 (m, 1H, H-3), 1.96-1.86 (m, 1H, H-2), 0.91 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, C3-CH₃), 0.90 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, C2-CH₃). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 157.8 (C4'), 147.4 (C6), 147.3 (C7), 139.6 (C1'), 130.1 (C2', C6'), 129.7 (C9), 128.6 (C10), 113.4 (C3', C5'), 113.4 (C5), 111.3 (C8), 55.9 (C6-OCH₃), 55.9 (C7-OCH₃), 55.3 (C4'-OCH₃), 50.7 (C1), 41.1 (C2), 34.7 (C4), 28.4 (C3), 16.9 (C3-CH₃), 15.3 (C2-CH₃). **IR** (película) $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3005, 2958, 2870, 2838, 1608, 1584, 1510, 1457, 1454, 1441, 1358, 1354, 1302, 1264, 1246, 1230, 12011, 1205, 1175, 1116, 1019, 1018, 871, 839, 763. **EM-AR (ESI⁺)** m/z calculado para C₂₁H₂₇O₃ [M+H]⁺ 327.19602, encontrado 327.19637.



4.5.3 Obtención de los Derivados 6,7-(1,3-dioxolano)

4.5.3.1 Preparación del Derivado **EC-15** por Metilación de Catecol.

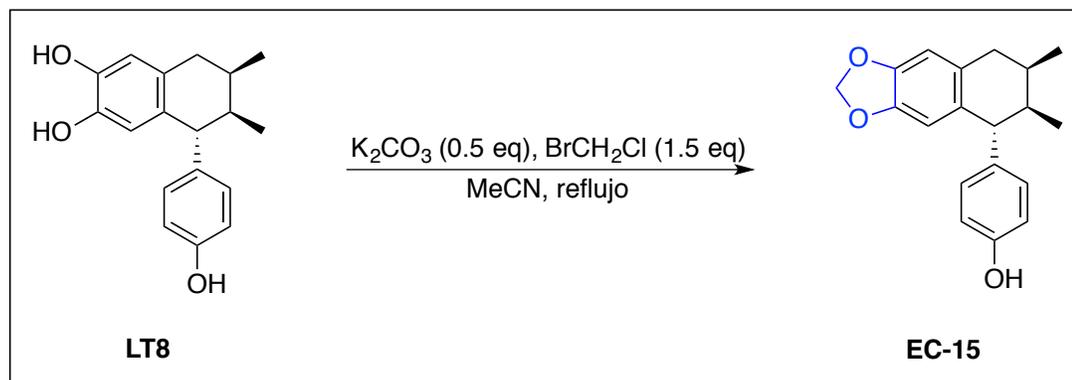
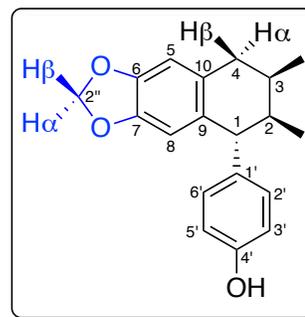


Figura 31. Esquema de Síntesis del Derivado **EC-15** por Metilación de Catecol.

En un matraz bola de 25 ml de dos cuellos se pesó 0.0176 mmol de **LT8**, se colocó un agitador magnético y se disolvió en 1 ml de MeCN (secado con malla molecular de 4 Å). Luego, se adicionó 0.0088 mmol de K_2CO_3 y 0.0263 mmol de $BrCH_2Cl$ para finalmente dejar la reacción agitando a reflujo. Una vez finalizada la reacción (por monitoreo por CCF) se evaporó el contenido del matraz a presión reducida para purificarse por CC de 11x0.5 cm con sílica gel como fase estacionaria y una mezcla de Hex/Acetona en gradiente de polaridad, iniciando con una proporción 99:1 y finalizando con 96:4.

4.5.3.1.1 Datos Físicos y Espectroscópicos del Derivado **EC-15**.

El producto es una resina incolora; R_f : 0.43 (Hex:Acetona 70:30). **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6.88 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.72 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.56 (s, 1H, H-5), 6.29 (s, 1H, H-8), 5.85 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-2'' α), 5.84 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-2'' β), 4.53 (s, 1H, OH), 3.63 (d, $J = 6$ Hz, 1H, H-1), 2.84 (dd, $J = 16.5, 5.1$ Hz, 1H, H-4 α), 2.44 (dd, $J = 16.3, 7.6$ Hz, 1H, H-4 β), 2.06-1.96 (m, 1H, H-3), 1.94-1.85 (m, 1H, H-2), 0.88 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, C3- CH_3 , C2- CH_3) **EM-AR (ESI $^+$)** m/z calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 297.14907, encontrado 297.14970.



4.5.3.2 Preparación del Subproducto **EC-16** por Metilación de Catecol.

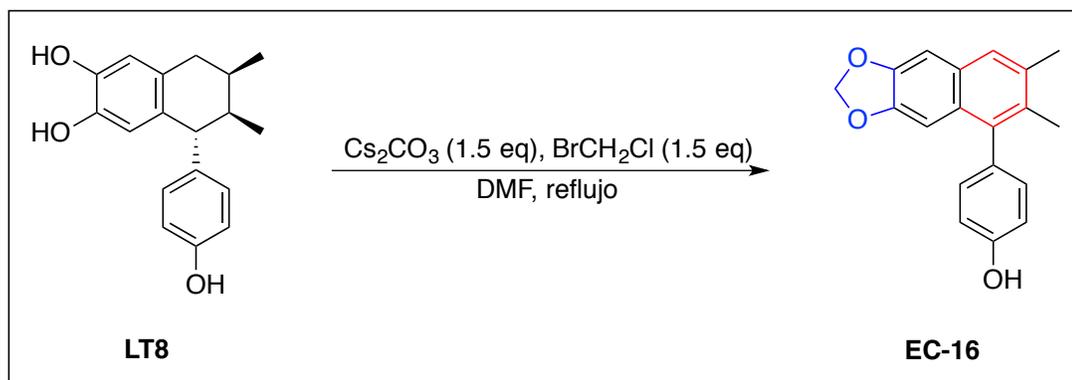


Figura 32. Esquema de Síntesis del Derivado **EC-16** por Metilación de Catecol.

En un matraz de 25 ml se pesaron 0.0352 mmol de **LT8**, se colocó un agitador magnético y se disolvió en 0.7 ml de DMF. Posteriormente, se adicionaron 0.0528

mmol de Cs_2CO_3 y después se inyectaron 0.0528 mmol de BrCH_2Cl para dejar la reacción a reflujo. Al finalizar la reacción (por observación por CCF), se filtró el contenido del matraz a vacío a través de celita y se extrajo la fase orgánica tres veces con AcOEt y agua, se secó la fase orgánica con Na_2SO_4 para finalmente evaporarla y obtener un sólido café oscuro, el cual se purificó por CC de 10.5x0.5 cm con sílica gel como fase estacionaria y una mezcla de Hex/Acetona en gradiente de polaridad, iniciando con una proporción 99:1 y finalizando con 96:4.

4.5.3.2.1 Datos Físicos y Espectroscópicos del Derivado **EC-16**.

El producto es un sólido blanco; pf: 154-156 °C; R_f : 0.4

(Hex:Acetona 70:30). **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm):

7.47 (s, 1H, H-4), 7.08 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.04

(s, 1H, H-5), 6.94 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.64 (s, 1H,

H-8), 5.94 (s, 2H, H-2''), 4.96 (s, 1H, OH), 2.42 (s, 3H, C3-

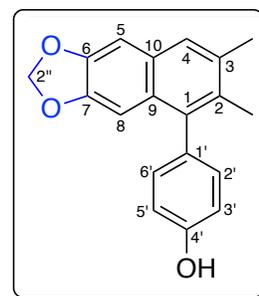
CH_3), 2.08 (s, 3H, C2- CH_3). **RMN ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 154.6 (C4'),

147.0 (C6), 146.7 (C7), 137.6 (C1), 133.8 (C3), 133.2 (C9), 132.0 (C2), 131.5

(C2', C6'), 129.0 (C1'), 128.9 (C10), 126.6 (C4), 115.5 (C3', C5'), 103.2 (C5),

103.1 (C2''), 100.9 (C8), 21.1 (C3- CH_3), 17.6 (C2- CH_3). **EM-AR (ESI+)** m/z

calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 293.11777, encontrado 293.11649.



4.5.4 Obtención de Derivados Naftalénicos por Bromación Bencílica

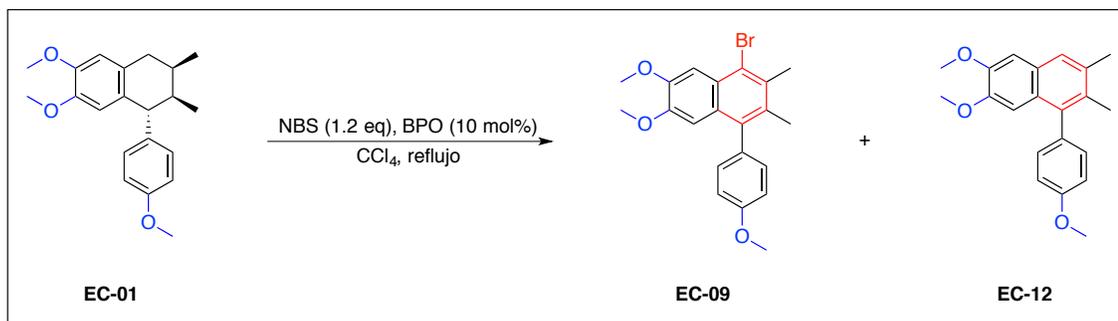
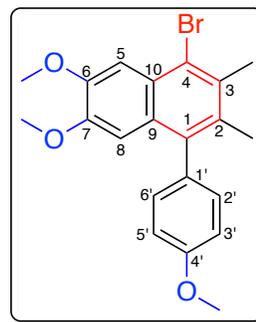


Figura 33. Esquema de Síntesis por Bromación Bencílica.

En un matraz bola de 25 ml de dos cuellos se pesaron 0.0306 mmol de **EC-01**, se colocó un agitador magnético y se disolvió en 0.5 ml de CCl₄. Posteriormente se adicionaron 0.0367 mmol de NBS y 0.0031 mmol de BPO para finalmente dejar el matraz a reflujo en agitación. Después de observar el patrón cromatográfico de la reacción por CCF, se enjuagó el matraz de reacción con CHCl₃ y se filtró a través de celita a vacío para después evaporar el disolvente a presión reducida y obtener un sólido café oscuro, que se purificó por CC de 12.5x0.5 cm con sílica gel como fase estacionaria y una mezcla de Hex/AcOEt en gradiente de polaridad, iniciando con una proporción 97:3 y finalizando con 95:5.

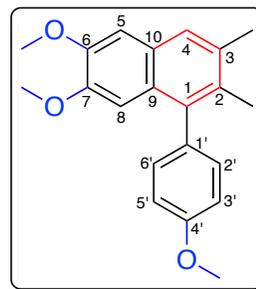
4.5.4.1 Datos Físicos y Espectroscópicos del Subproducto **EC-09**.

El producto es un sólido blanco; pf: 87 °C; R_f: 0.63 (Hex:Acetona 70:30). **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.96 (s, 1H, H-5), 7.14 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.04 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.66 (s, 1H, H-8), 3.91 (s, 6H, C6-OCH₃, C7-OCH₃), 3.67 (s, 3H, C4'-OCH₃), 2.49 (s, 3H, C3-CH₃), 2.11 (s, 3H, C2-CH₃). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 158.7 (C4'), 151.4 (C6), 146.4 (C7), 137.3 (C1), 135.0 (C2), 134.1 (C3), 132.7 (C9), 131.3 (C2', C6'), 130.1 (C1'), 126.3 (C10), 125.9 (C5), 115.7 (C4), 114.1 (C3', C5'), 106.4 (C8), 60.8 (C6-OCH₃), 55.8 (C7-OCH₃), 55.4 (C4'-OCH₃), 21.4 (C3-CH₃), 17.7 (C2-CH₃). **IR** (película) $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 2999, 2934, 2834, 1738, 1609, 1511, 1481, 1463, 1419, 1407, 1284, 1256, 1242, 1210, 1174, 1145, 1040, 1026, 835, 810, 692. **EM-AR (ESI⁺)** m/z calculado para C₂₁H₂₂BrO₃ [M+H]⁺ 401.07523, encontrado 401.07386.



4.5.4.2 Datos Físicos y Espectroscópicos del Subproducto **EC-12**.

El producto es un sólido beige claro; pf: 140-143 °C; R_f: 0.5 (Hexano:Acetona 70:30). **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.50 (s, 1H, H-4), 7.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.06 (s, 1H, H-5), 7.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.64 (s, 1H, H-8), 3.98 (s, 3H, C6-OCH₃), 3.91 (s, 3H, C4'-OCH₃), 3.69 (s, 3H, C7-OCH₃), 2.44 (s, 3H, C3-CH₃), 2.10 (s, 3H, C2-CH₃). **RMN ¹³C** (75



MHz, CDCl₃) δ (ppm): 158.6 (C4'), 148.8 (C6), 148.6 (C7), 137.1 (C1), 133.7 (C3), 133.1 (C2), 131.8 (C1'), 131.3 (C2', C6'), 127.7 (C9), 127.6 (C10), 125.9 (C4), 114.0 (C3', C5'), 105.8 (C8), 105.6 (C5), 60.0 (C6-OCH₃), 55.7 (C7-OCH₃), 55.4 (C4'-OCH₃), 21.2 (C3-CH₃) , 17.6 (C2-CH₃). **IR** (película) $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 2998, 2928, 2834, 1606, 1504, 1463, 1400, 1280, 1239, 1201, 1170, 1148, 1029, 1011, 915, 881, 850, 835, 766. **EM-AR (ESI⁺)** m/z calculado para C₂₁H₂₃O₃ [M+H]⁺ 323.16472, encontrado 323.16637.

4.5.5 Obtención del Derivado **EC-18** por Oxidación Bencílica

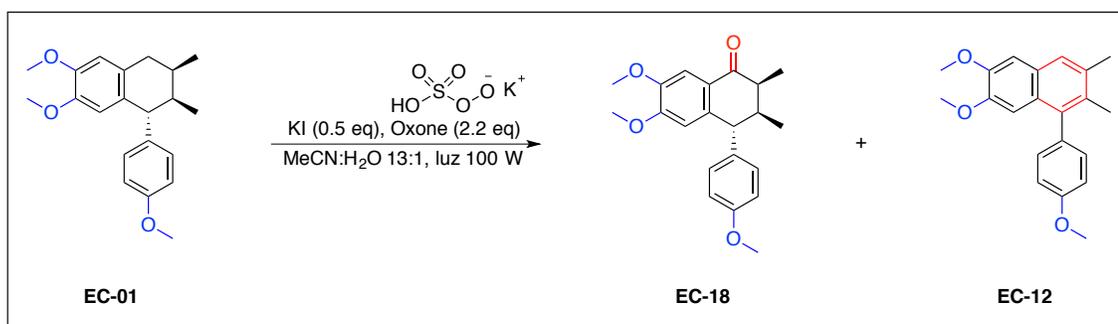


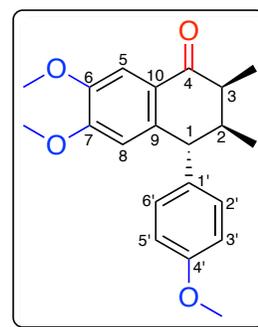
Figura 34. Esquema de Síntesis por Oxidación Bencílica.

En un matraz bola de 50 ml de un cuello se pesaron 0.5269 mmol de **EC-01**, se colocó un agitador magnético y se disolvió el contenido en 28 ml de una solución en proporción 1:1 de MeCN:H₂O. Después se encendió un foco de luz blanca de 100 W a 2 cm del matraz de reacción y se adicionaron simultáneamente 0.3634 mmol de KI y 1.1592 mmol de Oxone[®], para dejar la reacción en agitación a 25 °C, rodeando el matraz y el foco en aluminio. Posterior

a observar el patrón cromatográfico de la reacción por CCF, se enjuagó el matraz de reacción con AcOEt y se filtró a través de celita a vacío para después evaporar la mayor cantidad del disolvente a presión reducida y obtener un líquido amarillo oscuro, que se extrajo tres veces con AcOEt/H₂O. Se secó la fase orgánica con Na₂SO₄ para finalmente evaporarla a presión reducida hasta obtener un aceite amarillo oscuro que se purificó por CC de 30x2.5 cm con sílica gel como fase estacionaria y una mezcla de Hex/Acetona en gradiente de polaridad, iniciando con una proporción 99:1 y finalizando con 80:20.

4.5.5.1 Datos Físicos y Espectroscópicos del Derivado **EC-18**.

El producto es un sólido beige; pf: 53-55 °C; R_f: 0.45 (Hex:Acetona 70:30). **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.56 (s, 1H, H-5), 6.97 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.83 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.42 (s, 1H, H-8), 3.99 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H-1), 3.94 (s, 3H, C6-OCH₃), 3.79 (s, 3H, C4'-OCH₃), 3.77 (s, 3H, C7-OCH₃), 2.76 (qd, *J* = 7.2, 4.2 Hz, 1H, H-3), 2.44-2.32 (m, 1H, H-2), 1.12 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, C3-CH₃), 0.99 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, C2-CH₃). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 200.2 (C4), 158.4 (C4'), 153.8 (C7), 148.3 (C6), 138.9 (C9), 135.9 (C1'), 129.9 (C2', C6'), 125.7 (10), 114.0 (C3', C5'), 111.9 (C8), 108.2 (C5), 56.1 (C6-OCH₃), 56.1 (C7-OCH₃), 55.4 (C4'-OCH₃), 50.1 (C1), 42.8 (C2), 42.4 (C3), 16.0 (C3-CH₃), 12.2 (C2-CH₃). **IR** (película) $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3074, 2959, 2927, 2855, 1732, 1674, 1601, 1510, 1461, 1407, 1367, 1269, 1210, 1179, 1152,



1092, 1072, 1035, 830, 768. **EM-AR (ESI⁺)** m/z calculado para C₂₁H₂₅O₄ [M+H]⁺ 341.17528, encontrado 341.17463.

4.5.6 Obtención del Derivado **EC-47** por Reducción

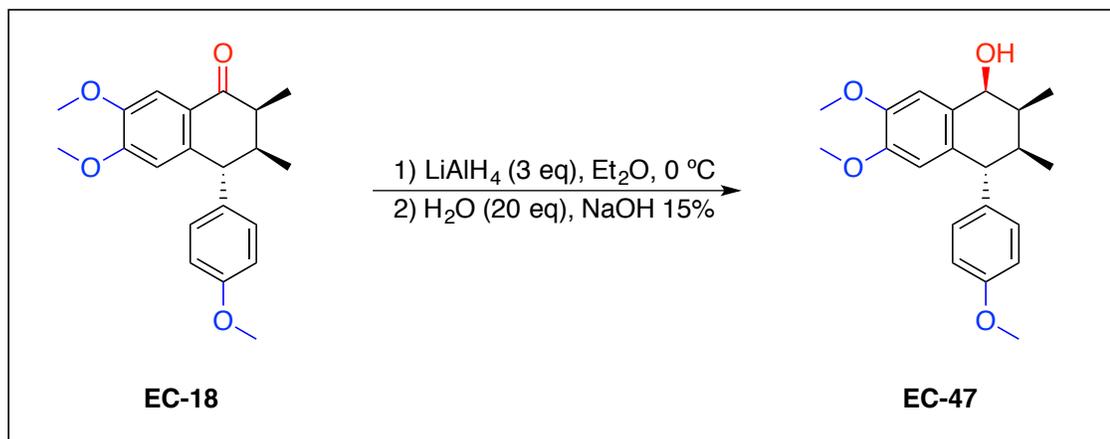


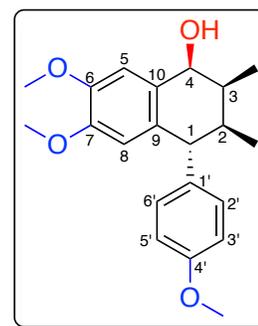
Figura 35. Esquema de Síntesis del Derivado **EC-47** por Reducción de Carbonilo.

En un matraz bola de 10 ml se pesaron 0.1446 mmol de LiAlH₄, se colocó un agitador magnético, se purgó con Argón y se disolvió en 4 ml de Et₂O (anhidro con sodio/benzofenona) para después colocarlo en baño de hielo; en otro matraz bola de 10 ml se pesaron 0.0482 mmol de **EC-18**, igualmente se purgó con argón y se disolvió en 2 ml de Et₂O anhidro para posteriormente canular su contenido al matraz en baño de hielo y dejar la reacción en agitación a 0 °C. Luego de observar por CCF el progreso y finalización del experimento, gota a gota y 0 °C se adicionó 0.9642 mmol de H₂O, luego 10 gotas de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 15% y nuevamente 0.9642 mmol de H₂O al matraz de reacción y 1 hora después se filtró el contenido del matraz a través de celita a vacío, se evaporó la mayor parte de disolvente a presión reducida y se extrajo la

reacción tres veces con AcOEt/H₂O; la fase orgánica se recuperó y se secó con Na₂SO₄ para finalmente evaporarla a presión reducida hasta obtener un sólido ligeramente amarillo que se purificó por CC de 12x0.5 cm con sílica gel como fase estacionaria y una mezcla de Hex/Acetona en gradiente de polaridad, iniciando con una proporción 99:1 y finalizando con 88:12.

4.5.6.1 Datos Físicos y Espectroscópicos del Derivado **EC-47**.

El producto es un cristal incoloro en forma de aguja; pf: 157-160; R_f: 0.27 (Hex:Acetona 70:30). **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.13 (s, 1H, H-5), 6.98 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.81 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.19 (s, 1H, H-8), 5.00 (s, 1H, H-4), 3.90 (s, 3H, C6-OCH₃), 3.8 (s, 3H, C4'-OCH₃), 3.60 (s, 3H, C7-OCH₃), 3.54 (d, *J* = 10 Hz, 1H, H-1), 2.24-2.18 (m, 1H, H-3), 2.06 (dq, *J* = 9.6, 6.8, 2.8 Hz, 1H, H-2), 0.92 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, C2-CH₃), 0.90 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, C3-CH₃). **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 158.1 (C4'), 148.0 (C7), 147.9 (C6), 138.0 (C1'), 131.7 (C10), 130.8 (C9), 130.3 (C2', C6'), 113.75 (C3', C5'), 112.5 (C8), 108.7 (C5), 72.7 (C4), 56.0 (C6-OCH₃), 55.9 (C7-OCH₃), 55.4 (C4'-OCH₃), 49.0 (C1), 40.2 (C2), 39.5 (C3), 17.8 (C2-CH₃), 6.9 (C3-CH₃). **EM-AR (ESI⁺)** m/z calculado para C₂₁H₂₅O₃ [M-H₂O+H]⁺ 325.18037, encontrado 325.17904.



4.5.7 Obtención de **EC-41** por Adición Nucleofílica a Carbonilo

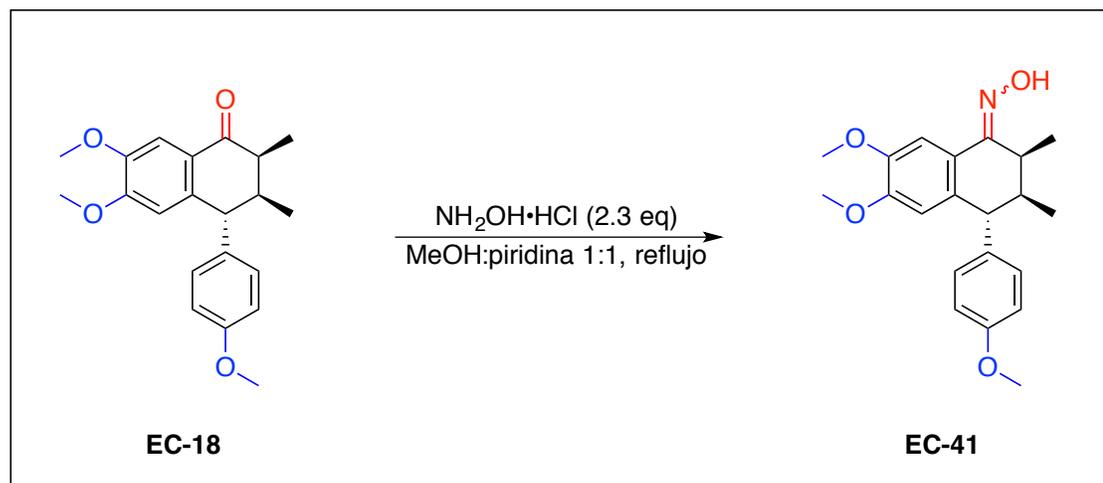
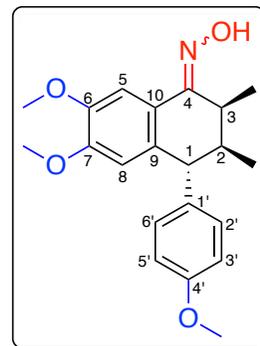


Figura 36. Esquema de Síntesis del Derivado **EC-41** por Adición Nucleofílica a Carbonilo.

En un matraz bola de 10 ml se pesaron 0.0306 mmol de **EC-18**, 0.0703 mmol de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ y se colocó un agitador magnético. Luego, se disolvió el contenido del matraz en 1 ml de una solución de MeOH:piridina en proporción 1:1 y se llevó la reacción a reflujo. Después de observar el progreso del experimento por CCF se enjuagó el matraz con AcOEt y el contenido se extrajo tres veces con AcOEt:HCl 1 M, se recuperó la fase orgánica y se secó con Na_2SO_4 para finalmente evaporar a presión reducida y obtener un sólido blanco ligeramente amarillo, que se purificó por CC de 12x0.5 cm con sílica gel como fase estacionaria y una mezcla de Hex/Acetona en gradiente de polaridad, iniciando con una proporción 99:1 y finalizando con 90:10.

4.5.7.1 Datos Físicos y Espectroscópicos del Derivado **EC-41**.

El producto es un cristal incoloro en forma de aguja; pf: 163-165 °C; R_f : 0.3 (Hex:Acetona 70:30). **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.42 (s, 1H, H-5), 7.03 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.14 (s, 1H, H-8), 3.90 (s, 3H, C6-OCH₃), 3.82 (s, 3H, C4'-OCH₃), 3.69-3.64 (m, 1H, H-1), 3.63-3.60 (m, 1H, H-3), 3.57 (s, C7-OCH₃), 2.25-2.1 (m, 1H, H-2), 1.1 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, C3-CH₃), 0.84 (d, $J = 6.9$ Hz, C2-CH₃). **RMN ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 160.6 (C4), 158.3 (C4'), 150.3 (C7), 147.8 (C6), 136.7 (C9), 135.9 (C1'), 130.4 (C2', C6'), 122.0 (C10), 114.0 (C3', C5'), 112.0 (C8), 105.8 (C5), 55.9 (C6-OCH₃), 55.7 (C7-OCH₃), 55.4 (C4'-OCH₃), 47.4 (C1), 39.0 (C2), 32.0 (C3), 17.1 (C3-CH₃), 9.8 (C2-CH₃). **EM-AR (ESI⁺)** m/z calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 356.18618, encontrado 356.18574.



4.5.8 Obtención del Derivado **EC-49** por Esterificación

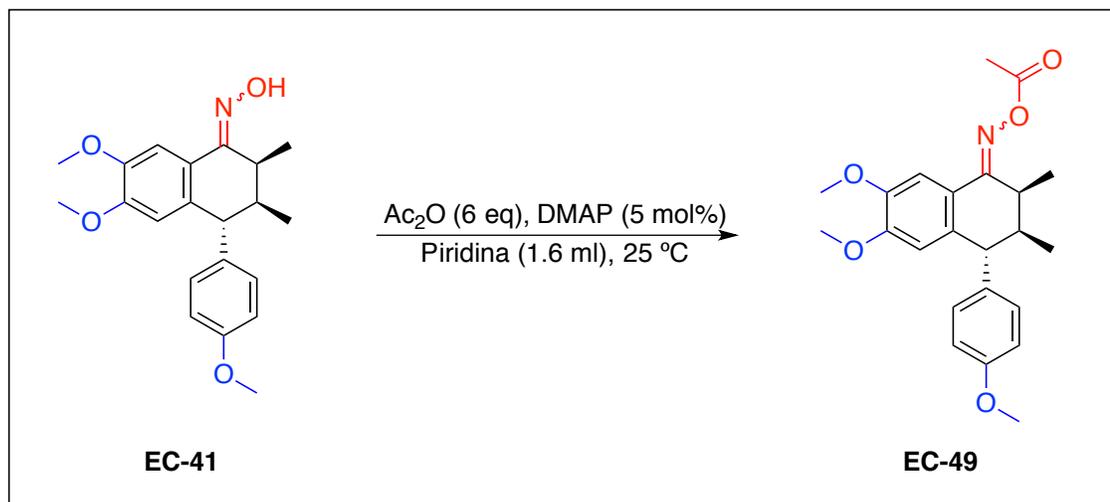
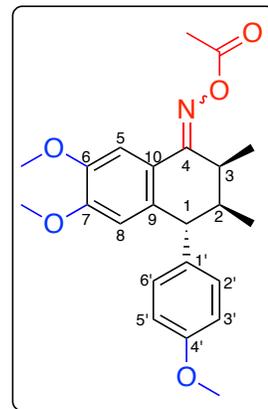


Figura 37. Esquema de Síntesis del Derivado **EC-49** por Esterificación.

En un matraz bola de 10 ml se pesaron 0.0422 mmol de **EC-41**, 0.0021 mmol de DMAP, y 0.2532 mmol de Ac_2O se colocó un agitador magnético y se disolvió el contenido en 1.6 ml de piridina, se tapó el matraz y se dejó en agitación a 25 °C. Al ya no observar progreso del experimento por CCF, se vació el contenido del matraz a un embudo de separación para extraerlo tres veces con AcOEt/HCl 1 M; se recuperó la fase orgánica y se secó con Na_2SO_4 para posteriormente evaporarla a presión reducida y finalmente purificar el residuo por CC de 12x0.5 cm con sílica gel como fase estacionaria y una mezcla de Hex/Acetona en gradiente de polaridad, iniciando con una proporción 99:1 y finalizando con 87:13.

4.5.8.1 Datos Físicos y Espectroscópicos del Derivado **EC-49**.

El producto es un sólido blanco; pf: 197-200 °C; R_f: 0.33 (Hex:Acetona 70:30). **RMN ¹H** (700 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.6 (s, 1H, H-5), 7.01 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.86 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.16 (s, 1H, H-8), 3.92 (s, 3H, C6-OCH₃), 3.82 (s, 3H, C4'-OCH₃), 3.63 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, H-1), 3.58 (s, 3H, C7-OCH₃), 3.53 (qd, *J* = 7, 4.2 Hz, 1H, H-3), 2.89 (s, 3H, CH₃-COO), 2.20-2.16 (m, 1H, H-2), 1.12 (d, *J* = 7 Hz, 3H, C3-CH₃), 0.85 (d, *J* = 7 Hz, 3H, C2-CH₃). **RMN ¹³C** (175 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 169.5 (CH₃-COO), 166.5 (C4), 158.5 (C4'), 151.6 (C7), 147.9 (C6), 137.6 (C1'), 136.2 (C9), 130.4 (C2', C6'), 120.3 (C10), 114.0 (C3', C5'), 111.9 (C8), 107.1 (C5), 56.2 (C7-OCH₃), 55.8 (C6-OCH₃), 47.4 (C4'-OCH₃), 47.4 (C1), 39.4 (C3), 34.3 (C2), 20.1 (CH₃-COO), 17.0 (C3-CH₃), 10.2 (C2-CH₃). **EM-AR (ESI⁺)** m/z calculado para C₂₃H₂₈NO₅ [M+H]⁺ 398.19675, encontrado 398.19836.



CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Análisis Estructural de 3'-desmetoxi-6-O-desmetil isoguaiacina

Se cotejaron los datos espectroscópicos reportados en al menos 4 referencias y se observaron algunas discrepancias (letra color rojo, TABLA 5) que han sido resueltas a continuación.

Fronczek y cols. reportaron en 1987 la estructura cristalina del análogo triacetilado de 3'-desmetoxi-6-O-desmetil isoguaiacina [45] determinando a partir de ella (sin datos espectroscópicos ni espectrométricos) la configuración relativa de los tres centros quirales de la molécula y estableciendo que los metilos unidos a C2 y C3 se encontraban *cis* entre ellos y *trans* respecto al anillo aromático sustituyente en C1 (Figura 38).

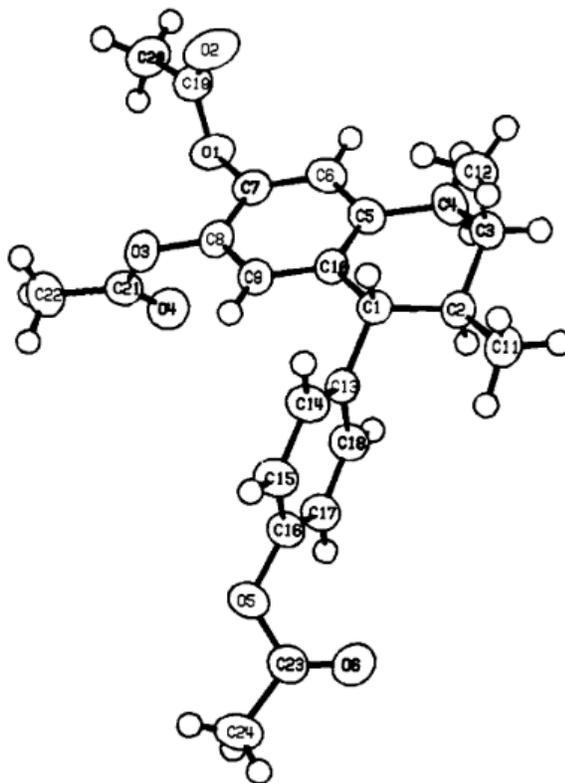


Figura 38. Estructura Cristalina de Triacetato de 3'-desmetoxi-6-O-desmetil isoguaiacina.

Figura reimpressa de *J. Nat. Prod.*, **1987**, 50(3), 497–499.

Tiempo después de los hallazgos de Franczek, Konno y cols. en 1989 [44] reportaron datos espectroscópicos para 6,3'-di-O-desmetil isoguaiacina (Figura **39**), observando una J entre H-1 y H-2 de 6.3 Hz, similar a la observada para **LT8**, (TABLA 5) lo que les permitió sugerir que el anillo aromático unido a C1 y los metilos unidos a C2 y C3 se encontraban *trans* entre sí en ambas moléculas. Las señales de estos metilos fueron similares a los observados en **LT8** (que no describen), por lo que dedujeron una estereoquímica igual para este último. Los desplazamientos de RMN ^{13}C también fueron muy parecidos y, aunado a los efectos Cotton negativos a 217 y 270 nm y el efecto Cotton positivo a 290 nm en

6,3'-di-O-desmetil isoguaiacina dedujeron que H-1 se encontraba en β y los metinos en α , estableciendo la estructura absoluta de 6,3'-di-O-desmetil isoguaiacina y, por lo tanto, la de **LT8**.

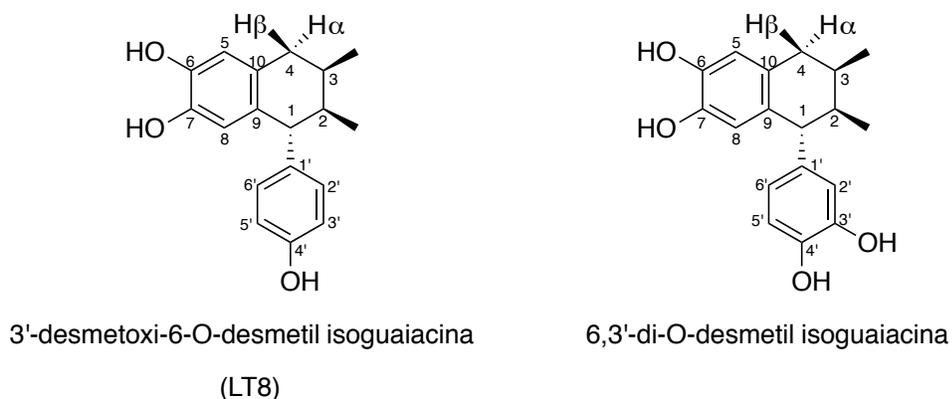


Figura 39. Estructuras Químicas de **LT8** y 6,3'-di-O-desmetil isoguaiacina.

Siguiendo su lógica para determinar la estructura absoluta de ambos ciclolignanos por similitudes espectroscópicas, hay que mencionar que asignaron de manera incorrecta los hidrógenos diastereotópicos en C4 para 6,3'-di-O-desmetil isoguaiacina pues, al cotejar los desplazamientos que otras tres investigaciones reportan y la configuración absoluta ya establecida para análogos de este ciclolignano, H-4 α es en realidad la señal que se desplaza a δ 2.8 ppm con $J = 16.5, 5.4$ Hz (TABLA 5).

Más tarde, Favela-Hernández y cols. [46] reportaron en 2012 datos espectroscópicos a partir de RMN ^1H y ^{13}C , COSY, HMQC y DEPT 90 y 135 de **LT8**. A causa de una confusión en transcripción de datos, aunque reportaron correctamente los desplazamientos químicos para H-2 y H-3, se asignaron al

revés en los espectros, llevando el error a la asignación de sus respectivos carbonos en HMQC. Corrigiendo esto, C2 aparece a δ 40.68 ppm y C3 a δ 28.98 ppm, tal como se reporta después por Núñez-Mojica y cols [47].

Otro error detectado en la investigación de Favela y cols. es la asignación inversa tanto en desplazamientos químicos como en asignación en los espectros de los hidrógenos aromáticos H-5 y H-8, que tampoco se corrigió en la investigación de Núñez-Mojica y cols., sin embargo, resultó intrigante que pese a dicho error se asignaran correctamente los carbonos C5 y C8 mediante HMQC, ignorando que estaban observando correlaciones incorrectas. Dicho error se detectó debido a que estos hidrógenos son asignados inversamente para **LT8** en la investigación realizada por Gnabre y cols. [48] en 1995 y para otros ciclolignanicos análogos del presente proyecto de los cuales sí se cuenta con experimentos NOESY y, en todos ellos, se asigna a H-5 como aquel singulete aromático que aparece a campo más bajo por sus efectos NOE observados con los protones diastereoméricos en C4. Con apoyo del espectro de HMQC proporcionado por Favela y cols. se determina que C8 aparece a δ 116.73 ppm y C5 se desplaza a δ 114.79 ppm. Otra inconsistencia observada en los datos espectroscópicos de la investigación de Favela y cols es la ausencia de 2 carbonos cuaternarios aromáticos, detallados en la TABLA 5.

TABLA 5

Datos Espectroscópicos de RMN ¹H y ¹³C de Ciclolignanos

Posición	^a Konno y cols, 1989	^b Gnabre y cols, 1995	^b Favela-Hernández y cols, 2012		^b Núñez-Mojica y cols, 2017	
	δ ¹ H (J=Hz)	δ ¹ H (J=Hz)	δ ¹ H (J=Hz)	δ ¹³ C	δ ¹ H (J=Hz)	δ ¹³ C
1	1H, 3.51, d (6.3)	1H, 3.59, d (6.3)	1H, 3.53, d (6.4)	49.93	1H, 3.61, d (6.4)	49.93
2	1H, 1.88, m	1H, 1.9, m	1H, 1.8, m	28.98	1H, 1.92, m	40.67
3	1H, 2.02, m	1H, 2.01, m	1H, 1.9, m	40.68	1H, 2.02, m	28.98
4		-	-	34.82	-	34.84
4α	1H, 2.37, dd (16.5, 7.7)	1H, 2.84, dd (16.3, 5.3)	1H, 2.69, dd (16.4, 5.2)	-	1H, 2.86, dd (16.42, 5.38)	-
4β	1H, 2.8, dd (16.5, 5.4)	1H, 2.42, dd (16.3, 7.2)	1H, 2.28, dd (16.4, 7.6)	-	1H, 2.44, dd (16.42, 7.34)	-
5	1H, 6.56, s	1H, 6.62, s	1H, 6.24, s	114.79	1H, 6.33, s	115.14
6	-	-	-	142.48	-	141.9

7	-	-	-	141.99	-	141.3
8	1H, 6.26, s	1H, 6.31, s	1H, 6.55, s	116.73	1H, 6.64, s	116.99
9		-	-	NR	-	130.72
10		-	-	128.35	-	129.23
C3-CH ₃	6H, 0.87, d (6.8)	6H, 0.87, 0.88, d (6.9)	3H, 0.84, d (2.8)	15.94	3H, 0.9, d (6.88)	15.91
C2-CH ₃			3H, 0.83, d (2.4)	15.64	3H, 0.89, d (6.88)	15.67
1'		-		NR	-	139.51
2'	1H, 6.44, s					
2', 6'		2H, 6.89, d (8.5)	2H, 6.82, d (8.3)	130.10	2H, 6.9, d (8.48)	130.17
3', 5'		2H, 6.72, d (8.5)	2H, 6.66, d (8.4)	114.71	2H, 6.74, d (8.56)	114.85
5'	1H, 6.71, d (8.7)					
6'	1H, 6.43, dd (8.7, 2.1)					
4'		-		154.20	-	153.58

^aDesplazamientos reportados para 6,3'-di-O-desmetil isoguaiacina.

^bDesplazamientos reportados para 3'-desmetoxi-6-O-desmetil isoguaiacina.

NR: No Reportado.

De esta manera, las asignaciones de RMN de ^1H y ^{13}C se muestran en la Figura 40 y Figura 41, respectivamente.

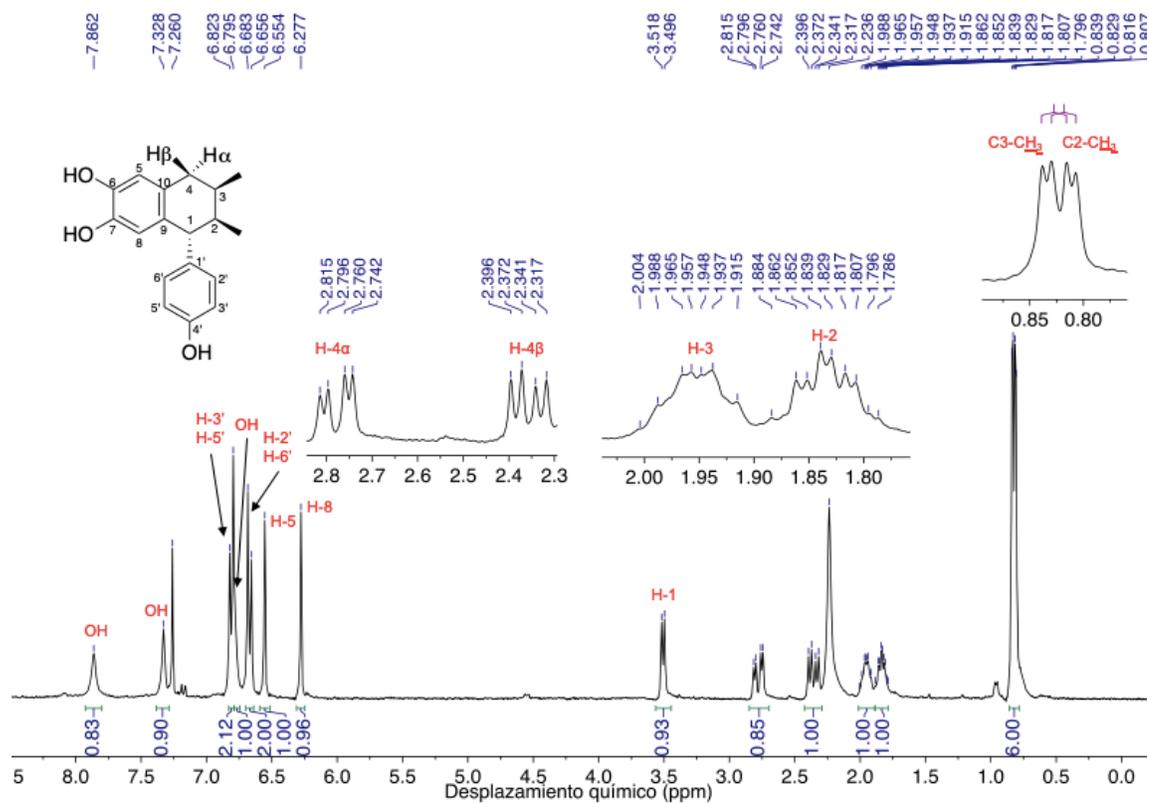


Figura 40. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **LT8**.

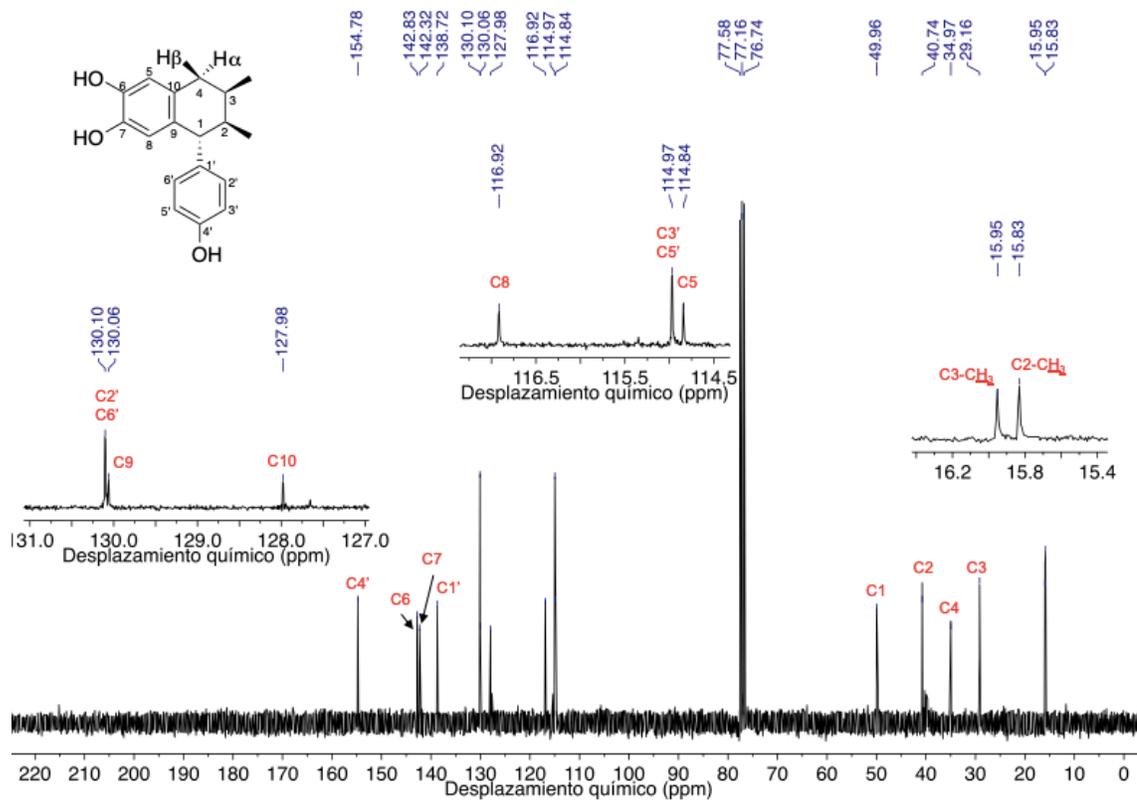


Figura 41. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **LT8**.

La configuración absoluta de LT8 se estableció mediante el análisis quiróptico de su derivado EC-01 en la sección: 5.2.1.6 Elucidación Estructural del Derivado **EC-01**.

5.2 Síntesis de Derivados Metoxilados a Partir de 3'-desmetoxi-6-O-desmetil isoguaiacina

Tras cotejar los datos espectroscópicos reportados para el producto natural **LT8** y establecer su configuración absoluta, se procedió a proteger los grupos catecol y fenol presentes en la molécula.

Inicialmente se propuso obtener el derivado **EC-01** por metilación directa con CH_3I de los tres grupos fenólicos siguiendo el procedimiento reportado por Konno y cols. [44] y, en los experimentos iniciales (experimentos 1 y 2, TABLA 6), se utilizó K_2CO_3 como base y acetona como disolvente a reflujo, sin embargo, en la CCF se observó la formación de al menos 4 productos menos polares que el producto natural de partida; tras haber purificado los compuestos y analizado sus espectros de RMN de ^1H y NOESY, se confirmó que se trataban de isómeros constitucionales de posición mono y dimetilados, por lo que se requería modificar el experimento, ya sea aumentando el número de equivalentes de base y halogenuro de alquilo, cambiando la base y/o el disolvente.

Primero se modificó la temperatura de la siguiente prueba (experimento 3, TABLA 6) a $50\text{ }^\circ\text{C}$, pero al disminuirla ya no se observó ningún producto formado. Entonces, se optó por cambiar a una base más fuerte, el NaH, ya que en el mecanismo de esta reacción es crucial la formación de los iones fenóxido que atacarán al halogenuro de alquilo, por lo que esta base más fuerte sería capaz de reducir la proporción de productos mono y dimetilados y favorecer la formación del producto deseado trimetilado al abstraer los hidrógenos de los fenoles con mayor facilidad. Siendo así, en el siguiente experimento (4, TABLA 6) se utilizó NaH en THF (Tetrahidrofurano), obteniendo el mismo resultado (el producto

trimetilado deseado además de otros dos subproductos dimetilados) que en la siguiente prueba en DMF (experimento 5, TABLA 6).

A partir de aquí, se estableció que la mejor base para esta reacción es NaH, pero aún se obtenía el derivado **EC-01** en trazas, por lo que se prosiguió aumentando los equivalentes tanto de base como de halogenuro de alquilo y, al hacer incrementos de 2 eq en cada monitoreo por CCF, se alcanzó un máximo de 56% de rendimiento del producto **EC-01** y la desaparición de subproductos con 17.2 eq de CH₃I y 10.2 eq de NaH en DMF sin previo tratamiento (experimento 6, TABLA 6).

Considerando el mecanismo de sustitución nucleofílica bimolecular que sigue esta reacción, también era necesario tomar en cuenta la presencia de agua en los disolventes como THF o DMF, que son muy higroscópicos, ya que el agua es capaz de solvatar los iones fenóxidos formados por el NaH, disminuyendo el rendimiento; por ello, en el último experimento (7, TABLA 6) se utilizó DMF anhidra (previamente agitada en BaO y destilada a presión reducida), aumentando el rendimiento hasta un 92% y reduciendo el tiempo de reacción.

TABLA 6
Optimización de Reacción de Metilación a Partir de 3'-desmetoxi-6-O-desmetil isoguaiacina

Exp	Halogenuro de alquilo (eq)	Base (eq)	Disolvente	Temp. (°C)	Tiempo (h)	Resultado
-----	----------------------------	-----------	------------	------------	------------	-----------

1	CH ₃ I (3)	K ₂ CO ₃ (3)	Acetona	70	20	EC-02, 03, 04 y 06
2	CH ₃ I (4)	K ₂ CO ₃ (4)	Acetona	70	24	EC-02, 03, 04 y 06
3	CH ₃ I (3.2)	K ₂ CO ₃ (3.2)	Acetona	50	6	NA
4	CH ₃ I (3.2)	NaH (3.2) ^a	THF	0 a 25	4	NA
5	CH ₃ I (3.2)	NaH (3.2) ^a	DMF	0 a 25	20	EC-01, 02 y 03
6	CH ₃ I (17.2)	NaH (10.2) ^a	DMF	0 a 25	2	EC-01 56%
7	CH ₃ I (17.2)	NaH (10.2) ^a	DMF ^b	0 a 25	2	EC-01 92%

^aLa reacción se llevó a cabo en atmósfera de argón.

^bEl disolvente fue secado previamente por destilación a presión reducida.

NA: No Aislado.

5.2.1 Elucidación Estructural de Derivados Metoxilados a Partir de 3'-desmetoxi-6-O-desmetil isoguaiacina

5.2.1.1 Elucidación Estructural del Subproducto **EC-02**.

Este compuesto se reporta por primera vez en este proyecto. El espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, Figura 42) muestra a campo bajo dos señales dobles de los 4 hidrógenos de un sistema AA'BB' del anillo *para*-disustituido, siendo la señal a δ 6.93 ppm para los hidrógenos H-2' y H-6' por el efecto NOE observado en el experimento NOESY (Figura 43) con el multiplete de H-2 a δ 1.94-1.85 ppm; por consiguiente, el doblete a δ 6.8 ppm es asignado a los hidrógenos H-3' y H-5'. En esta misma región aromática resuenan a δ 6.67 y 6.31 ppm dos singuletes que integran cada uno para un hidrógeno que corresponden a H-5 y H-8,

respectivamente, por la interacción NOE observada de H-5 con las señales dobles de dobles de los hidrógenos en C4. A campo más alto se encuentra una señal simple a δ 5.44 ppm del OH de la molécula. A continuación, se observa un singulete a δ 3.78 ppm que integra para tres hidrógenos del metoxilo unido al C4' por su interacción NOE con el doblete aromático de H-3' y H-5'. Posteriormente aparece, integrando para un hidrógeno, una señal doble a δ 3.69 ppm correspondiente a H-1 con una *J* vecinal de 5.7 Hz y enseguida un singulete que integra para tres hidrógenos del segundo metoxilo en la molécula, estando unido a C7 por el efecto NOE observado con el singulete aromático de H-8. A campo más alto resuenan dos señales dobles de dobles que corresponden a los hidrógenos H-4 α y H-4 β , observando el primero a δ 2.81 ppm por su interacción NOE con los dos dobletes de los metilos del ciclohexeno, y el segundo apareciendo a δ 2.42 por su efecto NOE con el multiplete a δ 2.04-1.95 ppm del metino H-2. Finalmente se observan dos señales dobles que integran para 3 hidrógenos cada una y que convergen formando una señal con apariencia de triplete, siendo la señal a δ 0.9 ppm aquella del metilo unido a C3 y a δ 0.88 ppm la que corresponde al metilo unido a C2.

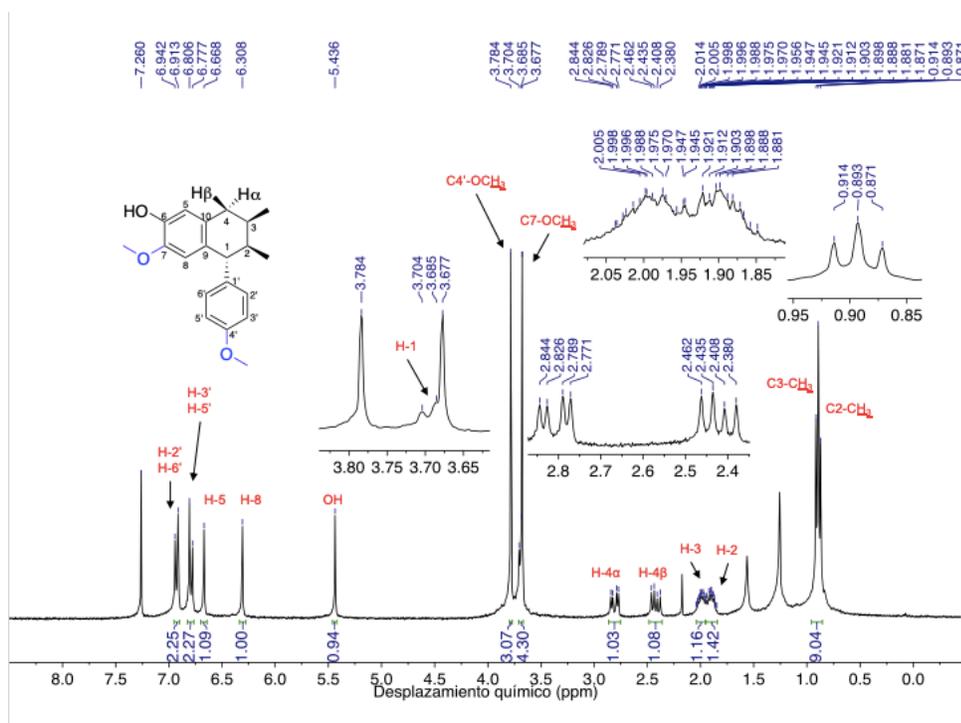


Figura 42. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del Subproducto **EC-02**.

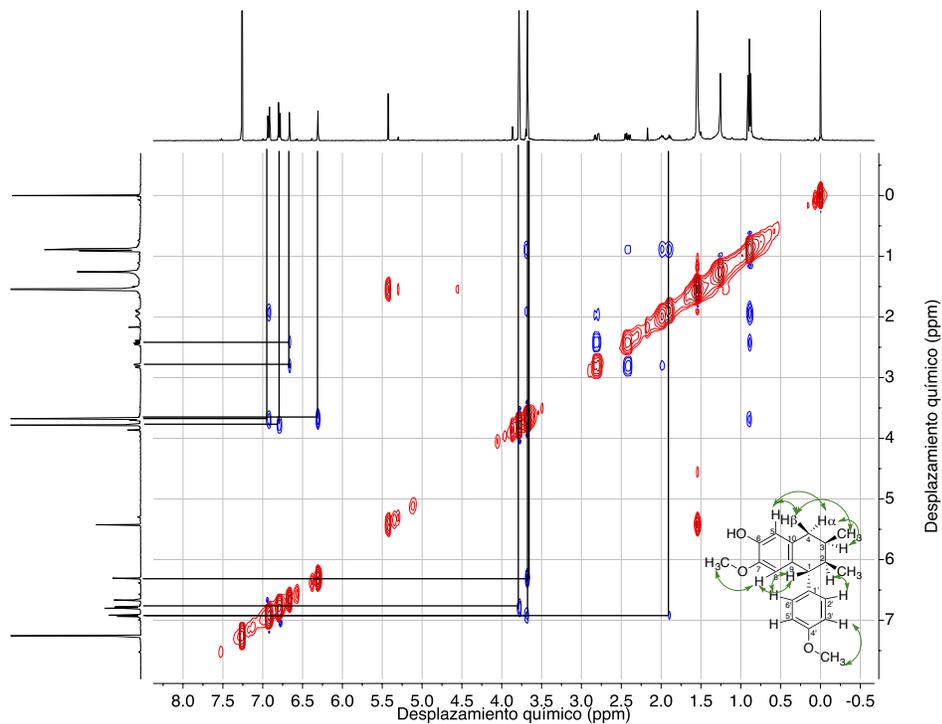


Figura 43. Espectro NOESY (400 MHz, CDCl_3) del Subproducto **EC-02**.

En el espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) se observan 10 señales de carbonos aromáticos: seis señales de carbonos cuaternarios a δ 157.8, 145.1, 143.9, 139.8, 129.5 y 129.3 ppm, dos señales a δ 130.1 y 113.5 ppm de los carbonos aromáticos del anillo *para*-disustituido C3', C5', y C2', C6, y dos señales de carbonos terciarios a δ 114.2 y 112.7 ppm correspondientes a los carbonos C5 y C8. A campo más alto aparecen a δ 56.0 y 55.4 ppm los carbonos de los metoxilos de la molécula, y posteriormente 6 señales en la región de 50.8-15.4 ppm correspondientes a los carbonos del ciclohexeno y metilos de la molécula.

5.2.1.2 Elucidación Estructural del Subproducto **EC-03**.

Se observa en el espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , Figura 44) dos dobletes que integran cada uno para dos hidrógenos a campo bajo que corresponden al sistema AA'BB' del anillo aromático *para*-disustituido, siendo aquel que aparece a δ 6.93 ppm correspondiente a H-2' y H-6' debido a su correlación espacial observada en el experimento NOESY con el multiplete a δ 1.96-1.88 del metino H-2 y con el doblete que resuena a δ 3.62 ppm que corresponde a H-1; éste último también muestra una interacción NOE con los dobletes de los metilos del ciclohexeno. En consecuencia, el siguiente doblete aromático corresponde a H-3' y H-5', con el que también se aprecia una correlación espacial con el singulete a δ 3.78 del metoxilo unido a C4'. A continuación, se observa un singulete en la región aromática a δ 6.57 ppm de H-

5 debido a su correlación espacial con las señales dobles de dobles de los hidrógenos del metileno en C4 y, en consecuencia, la señal simple a δ 3.86 ppm con la que también muestra interacción NOE corresponde a los hidrógenos del metoxilo unido a C6. El siguiente singulete aromático a δ 6.38 ppm es asignado a H-8, que además muestra una correlación NOE con la señal doble de H-1. A campo más alto se observa una señal doble de doble a δ 2.88 ppm de H-4 α debido a su correlación espacial con el multiplete que aparece a δ 2.05-1.99 ppm del metino H-3; por lo que la siguiente señal doble de doble corresponde al hidrógeno H-4 β , el cual tiene una interacción NOE con los dobletes de los metilos unidos a C3 y C2 que aparecen a δ 0.89 y 0.88, respectivamente. Esta información observada en los espectros de RMN fue cotejada con la reportada por Núñez-Mojica y cols. [47], confirmando las asignaciones propuestas.

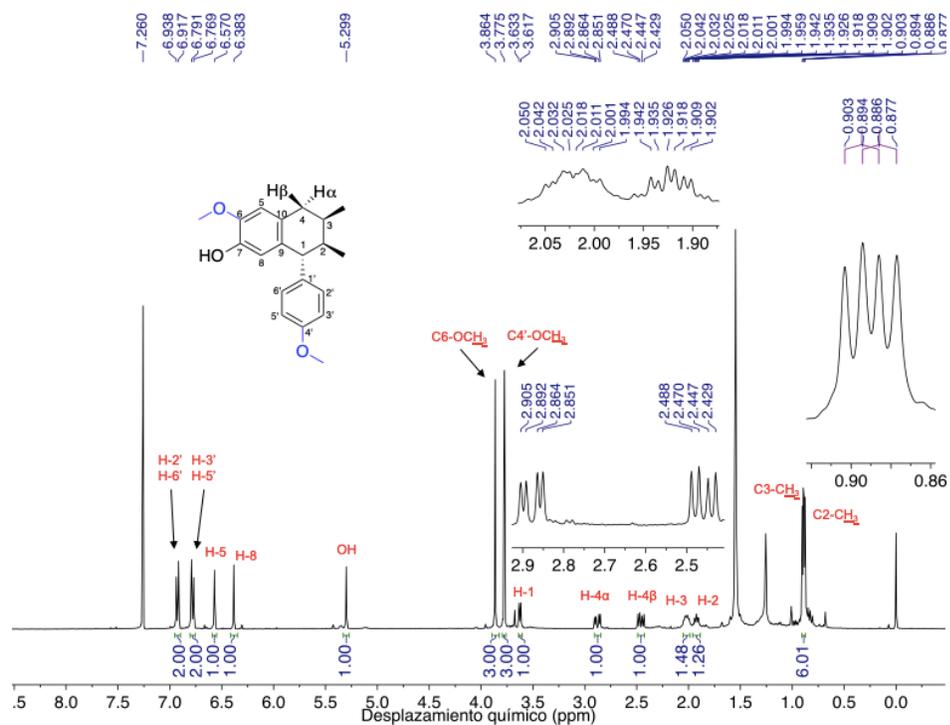


Figura 44. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del Subproducto **EC-03**.

5.2.1.3 Elucidación Estructural del Subproducto **EC-04**.

En el espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Figura 45) aparecen dos señales dobles a campo bajo correspondientes a los cuatro hidrógenos del sistema AA'BB' del anillo *para*-disustituido, aquella observada a δ 6.87 ppm corresponde a H-2' y H-6' debido a las interacciones NOE que presenta con el doblete a δ 3.69 ppm de H-1 y con el multiplete desplazado a δ 1.94-1.86 ppm del metino H-2; el doblete aromático restante que aparece a δ 6.71 ppm corresponde a H-3' y H-5'. En esta misma región de protones aromáticos se observa un singulete a δ 6.59 ppm de H-5 por las correlaciones espaciales que tiene con los dobletes de doblete de los hidrógenos diastereotópicos en C4. La asignación de H-5 permitió identificar al singulete en δ 3.86 ppm como aquel

unido a C6 por la interacción espacial observada entre ellos y, por otro lado, el singlete aromático desplazado a δ 6.32 ppm corresponde a H-8, el cual presenta una interacción NOE con el singlete a δ 3.66 ppm, ubicando entonces al metoxilo en C7. La señal doble de doble que aparece a δ 2.84 ppm se asignó a H-4 α ya que presenta una correlación espacial con el multiplete desplazado a δ 2.04-1.97 ppm de H-3, mientras que la siguiente señal doble de doble observada a δ 2.45 ppm es asignada a H-4 β , que además presenta un efecto NOE con los dobletes a δ 0.91 y 0.90 ppm que cruzan entre sí y que corresponden a los hidrógenos de los metilos unidos a C3 y C2, respectivamente. Esta información fue corroborada con los datos espectroscópicos reportados por Núñez-Mojica y cols.[47], confirmando las asignaciones propuestas.

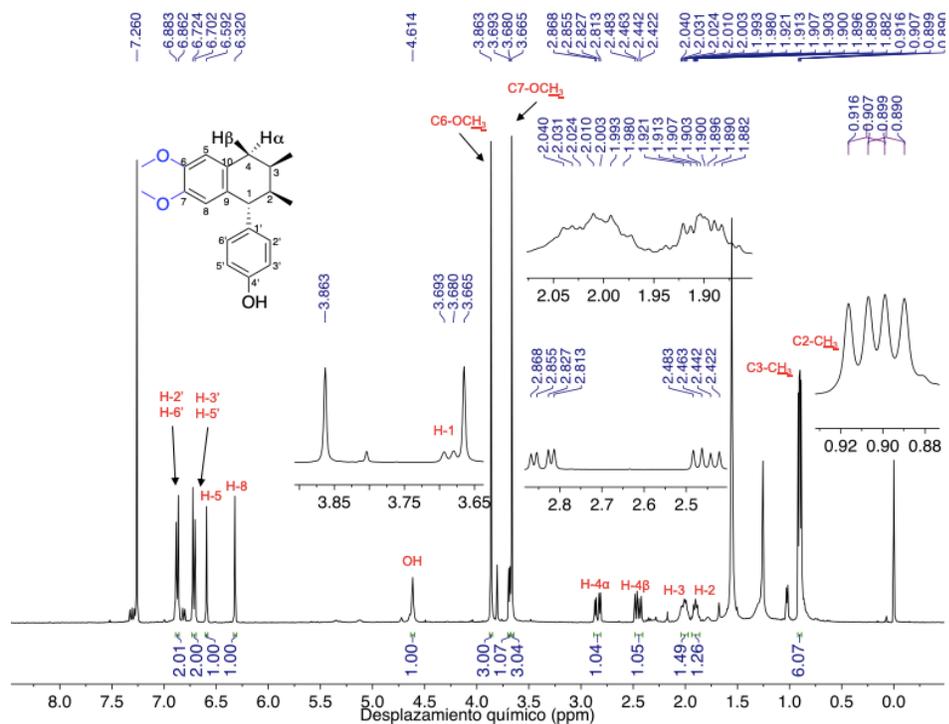


Figura 45. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del Subproducto **EC-04**.

5.2.1.4 Elucidación Estructural del Subproducto 3'-desmetoxi isoguaiacina (EC-06).

En el espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Figura 46) se observan dos señales dobles en la región aromática que corresponden a los cuatro hidrógenos del anillo *para*-disustituido de la molécula, el doblete a δ 6.87 ppm corresponde a los hidrógenos H-2' y H-6' debido a los efectos NOE observados con el multiplete que se desplaza a δ 1.92-1.86 ppm correspondiente del metino H-2 y, por lo tanto, la siguiente señal doble en la región de hidrógenos aromáticos que resuena a δ 6.71 ppm corresponde a H-3' y H-5'. A continuación, a δ 6.66 ppm aparece el singulete de H-5 debido a las interacciones espaciales que se observan con los dos dobletes de doblete de los hidrógenos diastereotópicos en C4 en δ 2.8 y 2.42 ppm, siendo el primero aquel asignado a H-4 α por su efecto NOE observado con el multiplete desplazado a δ 2.03-1.95 ppm del metino H-3, y el segundo a H-4 β al presentar una interacción espacial con los dobletes a δ 0.9 y 0.88 ppm que son de los hidrógenos de los metilos unidos a C3 y C2, respectivamente. Por último, el singulete aromático que aparece en δ 6.3 ppm se asignó a H-8, que a su vez presenta un efecto NOE con el singulete desplazado a δ 3.68 ppm que corresponde a los hidrógenos del único metoxilo en la molécula, por lo cual se define su unión a C7.

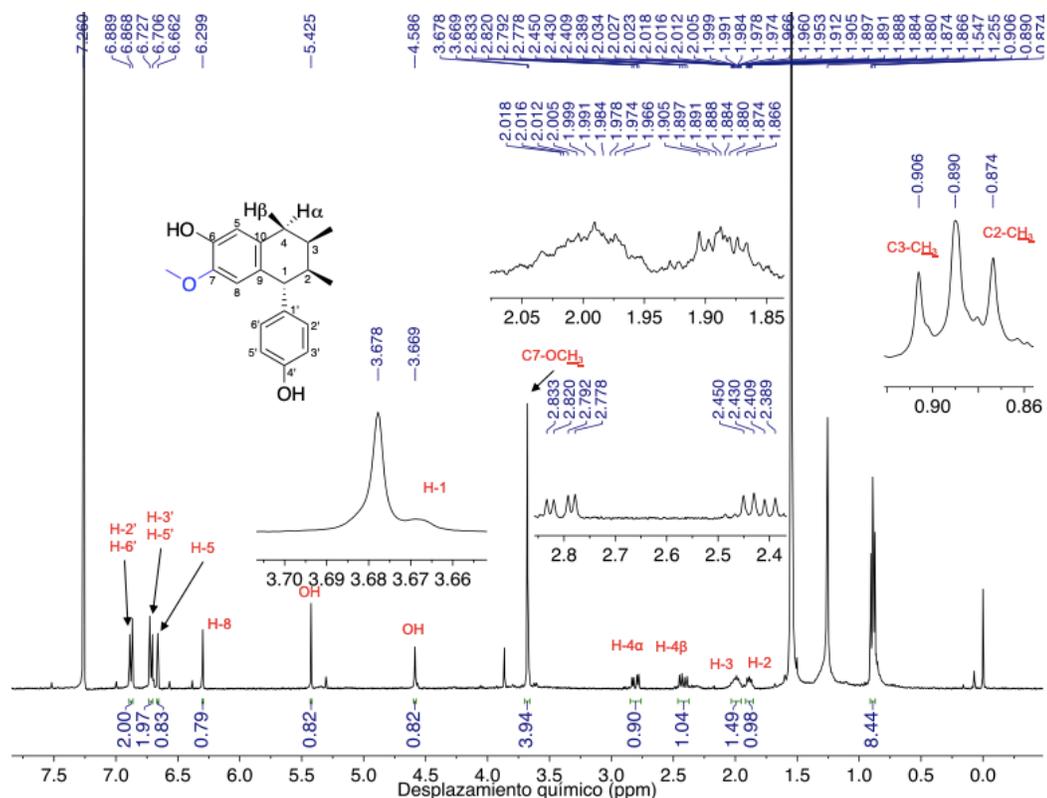


Figura 46. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 3'-desmetoxi isoguaiacina.

Después de cotejar estos datos espectroscópicos con los reportados por Núñez-Mojica y cols. [47] para la molécula 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano (Figura 47), se determina que se trata de la misma molécula. En la investigación anteriormente citada, se asignó la configuración (S) a C1, orientando al anillo aromático *para*-disustituido en el mismo plano que los metilos, justificando dicha orientación por la $J = 12.6$ Hz observada para este hidrógeno, sin embargo, esta señal está solapada con el singulete a δ 3.68 ppm del metoxilo unido a C7, aunado a que se observan señales de una impureza (quizás un lignano análogo), lo que hace ambiguo este dato. Además, al observar que todos los datos espectroscópicos en RMN ^1H (TABLA 7) son muy similares tanto en la

investigación mencionada, por Gnabre y cols. [48] como en el presente proyecto y, que la molécula propuesta en la presente investigación proviene de una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular en la cual no se involucra la conversión estereoquímica del C1 de la cual se obtuvo también el derivado **EC-01** cuyo espectro de dicroísmo circular demuestra la configuración relativa de C1 como (*R*) por el primer efecto Cotton positivo a 289 nm reportado para ariltetralinas 1(*R*), se concluye que la estructura en cuestión posee una configuración relativa 1(*R*), refutando la estereoquímica propuesta por Núñez-Mojica.

Es pertinente destacar además que gracias al espectro de DC obtenido del derivado **EC-01** (5.2.1.6 Elucidación Estructural del Derivado **EC-01**.) que se purificó a partir de la misma reacción de la que se obtuvo 3'-desmetoxi isoguaiacina, se confirma la orientación α o 1(*R*).

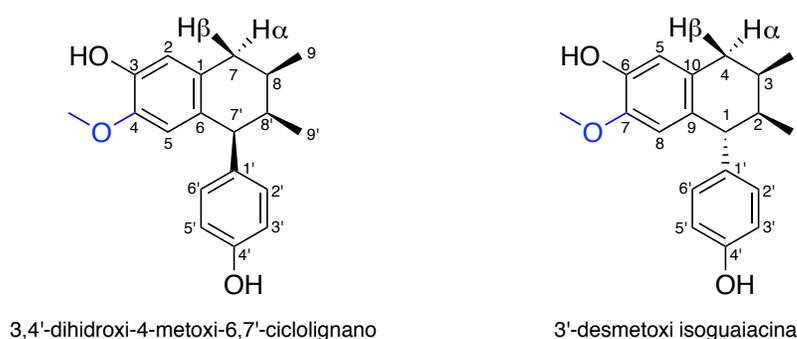


Figura 47. Estructuras Químicas de 3,4'-dihidroxi-4-metoxi-6,7'-ciclolignano y 3'-desmetoxi isoguaiacina.

TABLA 7

Desplazamientos Químicos (δ) de RMN ^1H y Constantes de Acoplamiento (J , en Hz, en Paréntesis) de 3'-desmetoxi isoguaiacina

Posición	Gnabre, 1995*	Núñez-Mojica, 2017*	Presente proyecto*
C2-CH ₃	0.88, d, (6.9)	0.9, d, (6.6)	0.88, d, (6.4)
C3-CH ₃	0.89, d, (6.9)	0.92, d, (6.7)	0.9, d, (6.4)
H-1	3.61, d, (6.2)	3.68, d, (12.6)	3.67, d, (3.6)
H-2	1.9, m	1.9, m	1.89, m
H-3	2.02, m	2.0, m	1.99, m
H-4 α	2.87, dd (16.2, 4.7)	2.82, dd, (16.4, 5.3)	2.8, dd, (16.6, 5.4)
H-4 β	2.45, dd (16.2, 7.2)	2.44, dd, (16.6, 8.3)	2.42, dd, (16.4, 8)
C7-OCH ₃	3.86, s	3.7, s	3.68, s
H-5	6.57, s	6.68, s	6.66, s
H-8	6.39, s	6.32, s	6.3, s
H-2', H-6'	6.87, d (8.5)	6.9, d, (8.5)	6.87, d, (8.4)
H-3', H-5'	6.7, d, (8.5)	6.74, d, (8.6)	6.71, d, (8.4)
OH	4.78, 5.35, s	4.73, 5.47, s	4.59, 5.42, s

*En CDCl₃.

5.2.1.5 Elucidación Estructural del Subproducto **EC-28**.

Se observa en el espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl₃) (Figura 48) a campo bajo dos señales dobles a δ 6.88 y 6.7 ppm que integran para dos hidrógenos

cada una, correspondientes a los cuatro hidrógenos del sistema AA'BB' del anillo *para*-disustituido, siendo el primero de H-2' y H-6' y el segundo de H-3' y H-5'. En la misma región aromática se observan dos señales simples a δ 6.57 y 6.39 ppm, correspondiendo la primera de H-5 y la segunda a H-8 por el efecto NOE observado de la segunda con la señal doble en δ 3.61 ppm que corresponde a H-1; esta asignación permitió identificar el carbono C6 al cual está unido el metoxilo en la molécula, pues su señal simple a δ 3.86 presenta una interacción espacial con H-8. A campo más alto se observan dos dobletes de dobletes de los hidrógenos diastereotópicos en C4 a δ 2.87 y 2.46 ppm, siendo el primero de H-4 α debido al efecto NOE observado con la señal de multiplete que se desplaza a δ 2.05-1.98 ppm del metino H-3; por lo tanto el segundo doblete de doblete se asignó a H-4 β y el multiplete desplazado a δ 1.94-1.88 al metino H-2. Por último, se observan dos señales dobles a δ 0.89 y 0.88 ppm que convergen y que integra cada una para tres hidrógenos, que corresponden a los metilos unidos a C3 y C2, respectivamente. Los datos espectroscópicos y asignaciones de RMN ^1H y ^{13}C reportados por Núñez-Mojica [47] coinciden con la molécula propuesta.

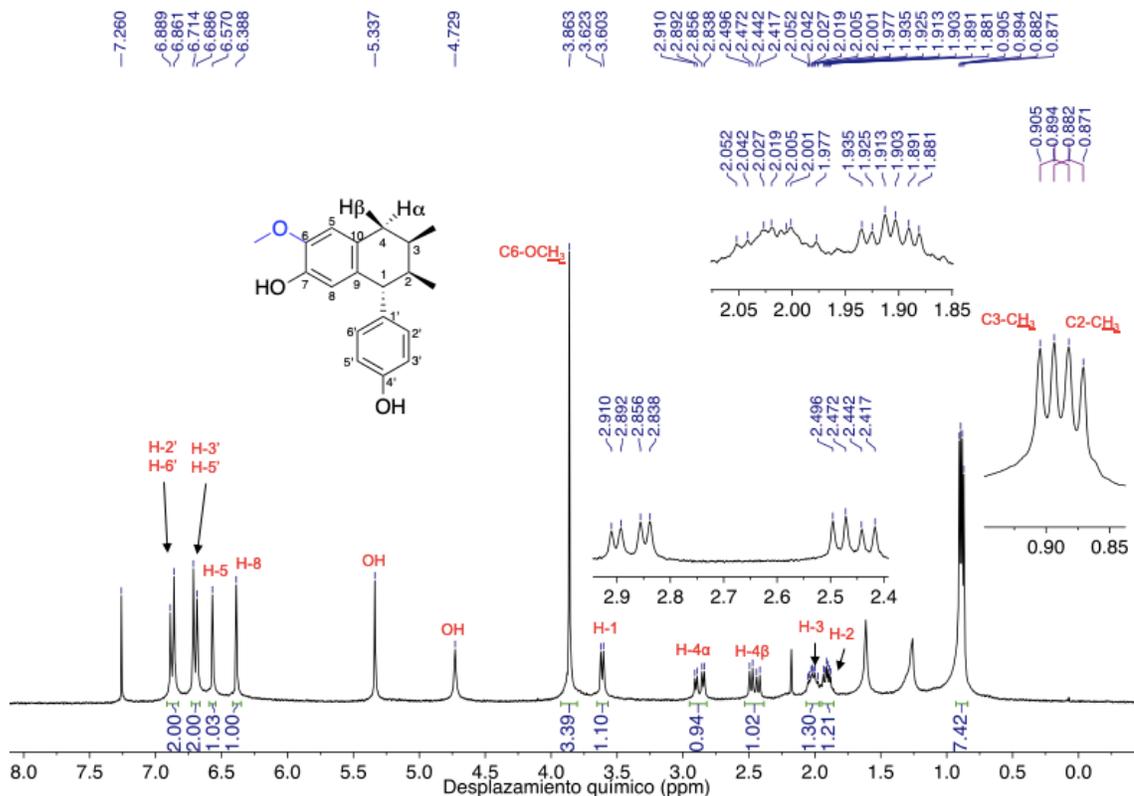


Figura 48. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del Subproducto **EC-28**.

5.2.1.6 Elucidación Estructural del Derivado **EC-01**.

Este compuesto se reporta por primera vez en este proyecto. En el espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) (Figura 49) aparecen a campo bajo dos señales dobles que integran cada una para dos hidrógenos a δ 6.92 y 6.79 ppm correspondientes a los hidrógenos H-2', H-6' y H-3', H-5', respectivamente, que conforman el sistema AA'BB' del anillo aromático *para*-disustituido. A continuación, resuenan dos singuletes en la misma región aromática a δ 6.60 y 6.33 ppm de los hidrógenos H-5 y H-8, respectivamente, seguidos de tres

singuletes que integran cada uno para tres hidrógenos en la región de δ 3.87-3.67 ppm correspondientes a los hidrógenos de los tres metoxilos de la molécula.

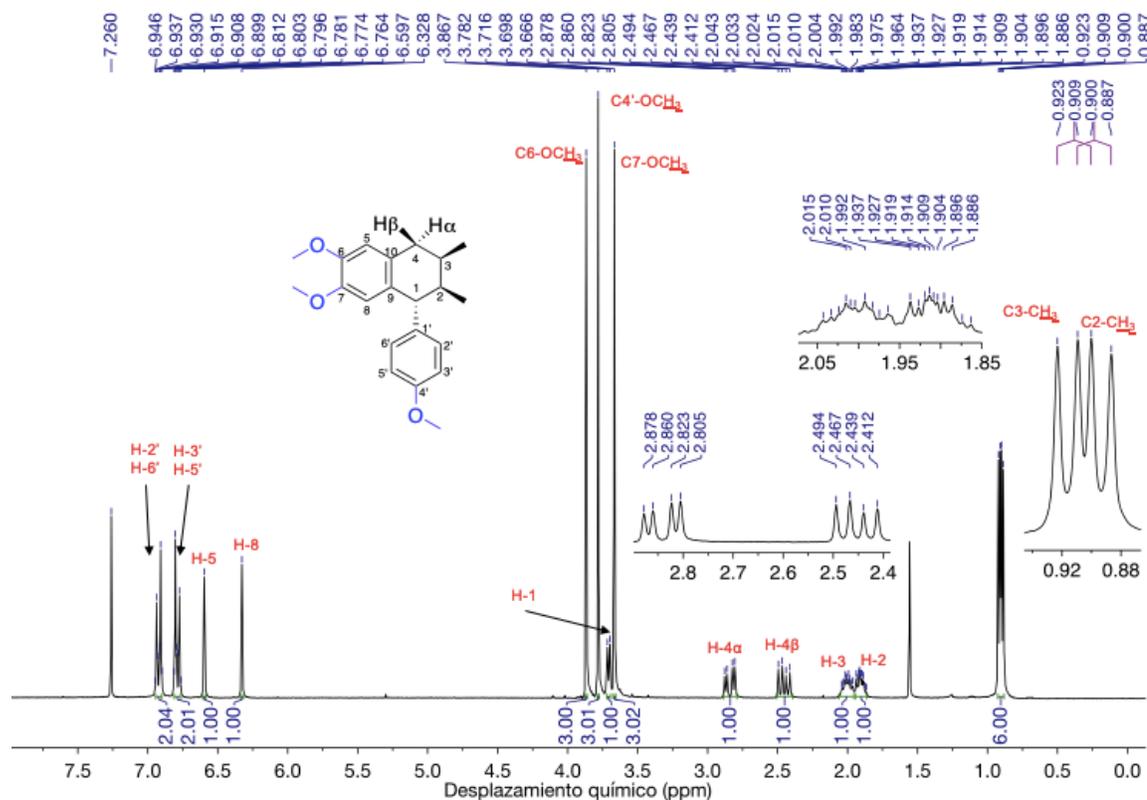


Figura 49. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del Derivado **EC-01**.

Los cristales obtenidos de **EC-01** fueron favorables para obtener la estructura cristalina (Figura **50**) de la molécula mediante difracción de rayos X de monocristal. A partir de ella se calcularon teóricamente las constantes de acoplamiento para el metino H-1 y para los hidrógenos diastereotópicos H-4 α y H-4 β (magnéticamente distintos al no tener eje de simetría y pertenecer a un metileno dentro de una molécula quiral) sustituyendo los ángulos diedro (θ) entre

ellos y sus hidrógenos acoplados en la ecuación de Karplus (8) [49], que describe la correlación entre las J y el ángulo diedro entre hidrógenos vecinales.

(8)

$$J = (9.5) \cos^2 \theta - (1.60) \cos \theta + 1.80$$

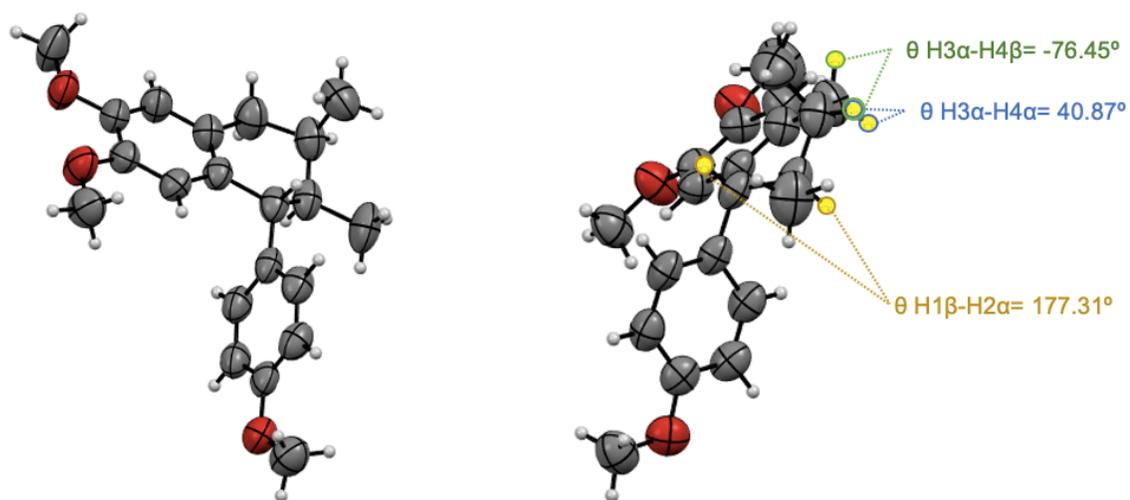


Figura 50. Estructura Cristalina del Derivado **EC-01**.

Como se describe en la TABLA 8, la J experimental obtenida por RMN ^1H para cada protón difiere en la forma cristalina principalmente para los hidrógenos H-1 y H-4 β .

TABLA 8
Comparativa Entre Ángulo Diedro y Constante de Acoplamiento
Experimentales y Teóricas del Derivado EC-01

Átomos	Estado sólido (cristal)		En solución (CDCl ₃)	
	Ángulo diedro experimental (θ)	J (Hz) teórica por difracción de rayos X	Ángulo diedro (θ) teórico por RMN ¹ H	J (Hz) experimental por RMN ¹ H
H1β-C1-C2-H2α	177.31	J _{H1-H2} = 12.9	123	J _{H1-H2} = 5.3
H3α-C3-C4-H4α	40.87	J _{H3-H4α} = 6.0	45	J _{H3-H4α} = 5.4
H3α-C3-C4-H4β	-76.45	J _{H3-H4β} = 1.9	138	J _{H3-H4β} = 8.2

Con lo anterior se plantea la existencia de diversos confórmeros en solución para el anillo de ciclohexeno y, por lo tanto, las constantes de acoplamiento observadas en solución por RMN de ¹H son entonces el resultado de un promedio de todos los confórmeros que puede tomar la molécula.

Para determinar la configuración absoluta de la molécula (y diferenciarlo de su respectivo enantiómetro), se utilizó el experimento de dicroísmo circular. En ariltetralinas, los cromóforos dominantes son los grupos aromáticos y los demás son secundarios.

Todas las 1-ariltetralinas muestran dos efectos Cotton; el primero entre 290 y 297 nm y el segundo entre 250 y 230 nm. El signo del efecto Cotton depende de la configuración de C1; todos los compuestos 4β dan un primer efecto Cotton negativo, y todos los 4α muestran un primer efecto Cotton positivo [50]. El primer

efecto Cotton provee la mayor información estereoquímica porque su amplitud depende de la configuración del carbono quiral. Todos los lignanos muestran un patrón de absorción típica para compuestos aromáticos con tres bandas en las regiones de 210, 230 y 280 nm que corresponden a los singuletes de estados excitados $^1B_{a,b}$; 1L_a y 1L_b , respectivamente [51], esto porque las ariltetralinas contienen dos cromóforos principales a los que se les atribuye estas bandas de absorción (tetrahidronaftaleno y anillo aromático unido a C1).

La estructura obtenida por difracción X permite visualizar una aproximación del conformero promedio en solución al llevar a cabo el experimento de DC. Estableciendo los vectores de polarización para los cromóforos de este derivado, el vector 1L_b (eje longitudinal) corresponde al anillo *para*-disustituido y el vector 1L_a (eje transversal) corresponde al núcleo de ariltetralina (Figura 52), que dan lugar a las absorciones electrónicas a continuación:

TABLA 9

Datos de Dicroísmo Circular del Derivado EC-01

λ (nm)	$[\theta]$
289	+3.74699
273	-2.26916
255	-0.416411
236	-14.4331
218	+4.49711
212	+3.05954

205**+11.2725**

$\Delta\epsilon$: diferencia de extinción molar. $\Delta\epsilon = [\theta]/3300$, donde $[\theta]$ es elipticidad molar

Como se observa en el espectro de DC del Derivado **EC-01**, (Figura 51) hay dos efectos Cotton por acoplamiento de excitón de cromóforos, siendo primero positivo a λ más larga (289 nm) y después negativo a λ más corta (273 nm), lo que concuerda con lo reportado por Ayres y cols. [50] para 1α -ariltetralinas, que muestran dos efectos Cotton; el primero positivo entre 290 y 297 nm y el segundo negativo entre 250 y 230 nm.

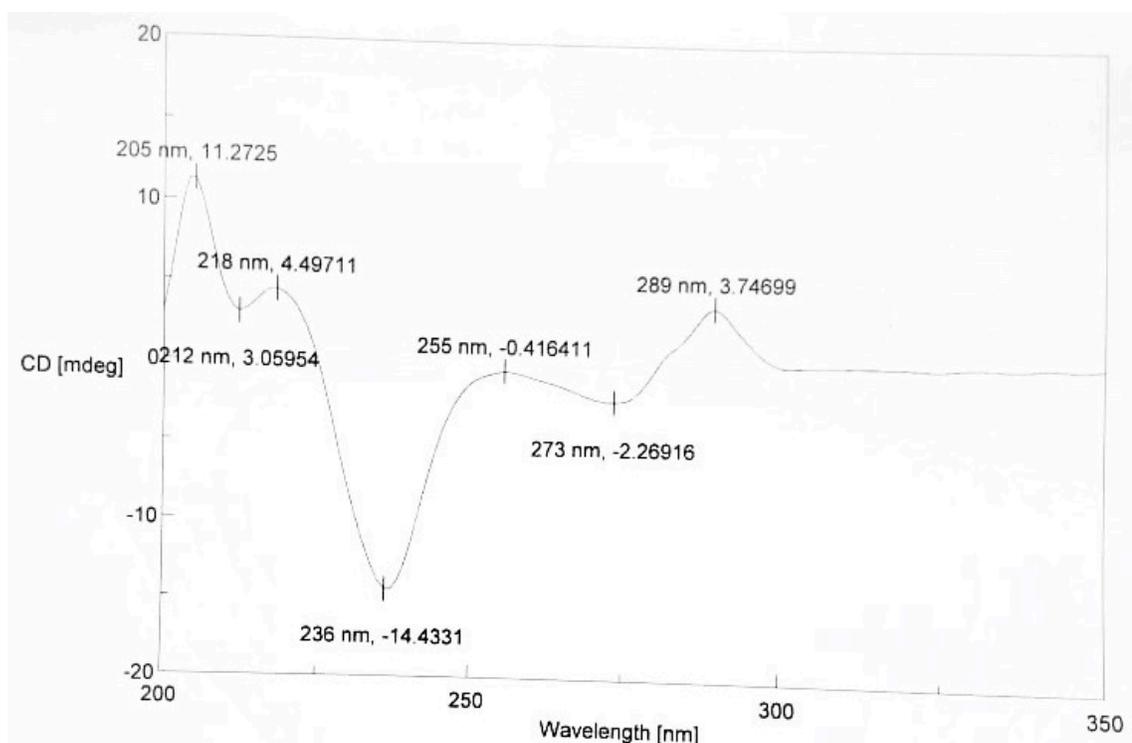


Figura 51. Espectro de DC del Derivado **EC-01**.

Tras establecer los vectores de polarización del derivado **EC-01** (Figura 52), es posible aplicar la regla de la quiralidad del excitón para confirmar lo anteriormente reportado por Ayres y cols. Situando al cromóforo de tetralina frente al cromóforo del anillo de benceno *para*-disustituido, se observa un ángulo agudo entre estos dos en sentido de las manecillas del reloj, determinando de esta manera la configuración absoluta de la molécula al confirmar la quiralidad positiva del carbono estereogénico C1.

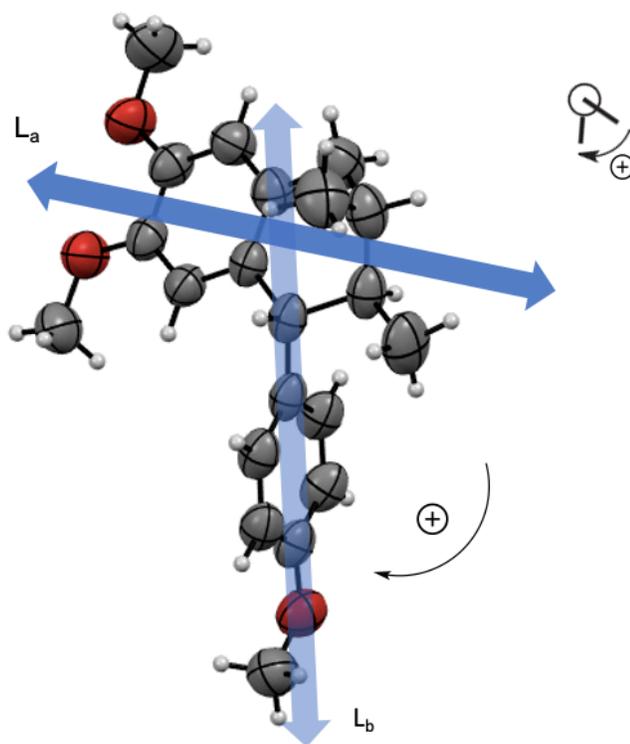


Figura 52. Aplicación del Método de la Quiralidad del Excitón al Derivado **EC-01**.

5.3 Síntesis de Derivados 6,7-(1,3-dioxolano)

Además de proteger los tres grupos fenólicos presentes en 3'-desmetoxi-6-O-desmetil isoguaiacina por metilación de los tres en un solo paso, también se

planteó proteger primero el catecol formando un anillo dioximetileno para posteriormente metilar el C4'-OH libre. En este sentido, se siguió el procedimiento reportado por Zelle y cols. [52] para llevar a cabo esta reacción en el experimento 1 (TABLA 10). Se formó el anillo dioximetileno pero, además ocurrió una oxidación del núcleo de tetralina a naftaleno, obteniéndose el subproducto **EC-16**. Por ello, se probó secar y desgasificar el disolvente previamente para excluir al oxígeno ambiental y al agua como catalizadores de la oxidación (experimentos 9 y 10, TABLA 10), pero se observó el mismo resultado. Posteriormente se cambió el halogenuro por CH₂Cl₂ pero la reacción fue nula, por lo que se utilizó también CH₂Br₂, no obstante se seguía formando el producto naftalénico en mayor proporción (experimentos 7-9, TABLA 10). Se decidió modificar la base a K₂CO₃ (experimentos 3-6, TABLA 10) y como mejor resultado fue el obtenido en el experimento 6 (TABLA 10), siendo el producto deseado **EC-15** como el único formado, sin embargo se obtuvo en trazas, lo que sugiere que cantidades que superan 1 eq de base, en combinación con DMF como disolvente, favorecen la oxidación de la tetralina a naftaleno.

Como reporta Zelle y cols [52], el uso de DMF sobre MeCN favorece el progreso de la reacción a causa de que al utilizar el primer disolvente se logra alcanzar una mayor temperatura de reflujo (punto de ebullición de 153 °C) y a que los fenóxidos de cesio son más solubles en DMF que en MeCN. Además, se observó en los experimentos realizados en DMF en el presente proyecto y en el de la referencia citada la formación del subproducto naftalénico **EC-16**, lo que

sugiere que el aumento de temperatura también promueve la aromatización del producto natural.

TABLA 10
Optimización de Reacción de Metilación de Catecol

Exp	Disolvente	Base (eq)	Halogenuro de alquilo (eq)	Temp (°C)	Tiempo (h)	Resultado
1	DMF	Cs ₂ CO ₃ (1.5)	BrCH ₂ Cl (1.5)	110	4	40 % EC-16
2	MeCN	Cs ₂ CO ₃ (1.5)	BrCH ₂ Cl (1.5)	82	25	Trazas EC-15
3	MeCN	K ₂ CO ₃ (1.5)	BrCH ₂ Cl (2.5)	82	4	EC-16
4	DMF	K ₂ CO ₃ (1.5)	BrCH ₂ Cl (3)	82	2	Trazas EC-15 + EC-16
5	MeCN	K ₂ CO ₃ (7)	CH ₂ Cl ₂ (7)	65	3	N. A.
6	MeCN	K ₂ CO ₃ (0.5)	BrCH ₂ Cl (2)	110	151	Trazas EC-15
7	DMF	Cs ₂ CO ₃ (1.5)	CH ₂ Br ₂ (1.5)	60	1	EC16
8	MeCN anhidro	Cs ₂ CO ₃ (1.5)	CH ₂ Br ₂ (1.5)	80	54	Trazas EC-15 + EC-16
9	DMF ^{a,c}	Cs ₂ CO ₃ (1.5)	CH ₂ Br ₂ (1.5)	40 ^b	16	EC-16
10	DMF ^{a,c}	Cs ₂ CO ₃ (1.5)	CH ₂ Br ₂ (1.5)	25	144	N. A.

^aDisolvente anhidro.

^bLa reacción procedió en atmósfera de argón.

^cDisolvente desgasificado.

N. A. No aislado

5.3.1 Elucidación Estructural del Derivado **EC-15**.

Este compuesto se reporta por primera vez en este proyecto. En el espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) (Figura **53**) aparecen a campo bajo dos señales dobles integrando cada una para dos hidrógenos que corresponden al sistema AA'BB' del anillo *para*-disustituido a δ 6.88 y 6.72 ppm correspondientes a H-2', H-6' y H-3', H-5', respectivamente. A continuación, se aprecian dos señales simples en la misma región aromática, una desplazándose a δ 6.56 ppm de H-5 y la otra a δ 6.29 ppm de H-8. Posteriormente resuenan dos dobletes a δ 5.84-5.85 ppm con una J geminal de 1.2 y 1.5 Hz que se asignaron a los hidrógenos diastereotópicos H-2'' del grupo funcional 1,3-dioxolano. A δ 3.63 ppm aparece el doblete del metino H-1 y posteriormente dos señales dobles de dobles a δ 2.84 y 2.44 ppm que corresponden a los hidrógenos diastereotópicos unidos a C4. Estas señales y los multipletes que se observan en la región de δ 2.06-1.85 ppm de los metinos H-2 y H-3 confirman que la molécula no se encuentra aromatizada. Finalmente aparece a δ 0.88 ppm una señal doble que integra para seis hidrógenos que corresponde a los dos metilos unidos al ciclohexeno en C2 y C3.

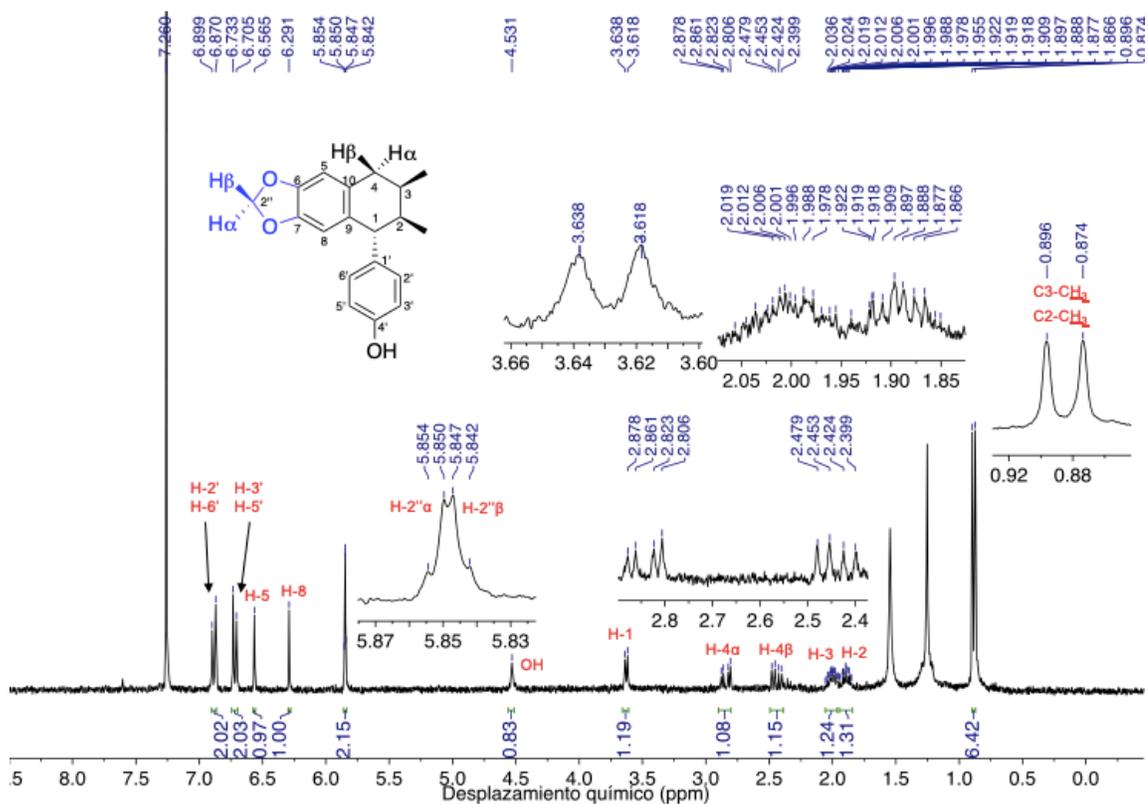


Figura 53. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del Derivado **EC-15**.

5.3.2 Elucidación Estructural del Subproducto **EC-16**.

El derivado **EC-16** se reporta por primera vez en esta investigación. En la región aromática del espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) (Figura 54) aparece, a comparación de los 6 hidrógenos presentes en los derivados de tipo tetralina, 7 hidrógenos aromáticos en total, siendo aquella señal simple a δ 7.47 ppm la correspondiente a H-4. Enseguida a δ 7.08 ppm resuena una señal doble de H-2' y H-6', a δ 7.04 ppm un singulete de H-5, a δ 6.94 ppm un doblete de H-3' y H-5', así como un singulete a δ 6.64 ppm de H-8. A campo más alto, resuena a δ 5.94 un singulete que integra para dos hidrógenos correspondientes a H-2'' del grupo funcional 1,3-dioxolano. A continuación, se corrobora también la

aromatización del núcleo de tetralina por la simplificación en la multiplicidad de las señales correspondientes a los metilos de la molécula, siendo ahora singuletes a δ 2.42 y 2.08 ppm que integran para tres hidrógenos cada uno.

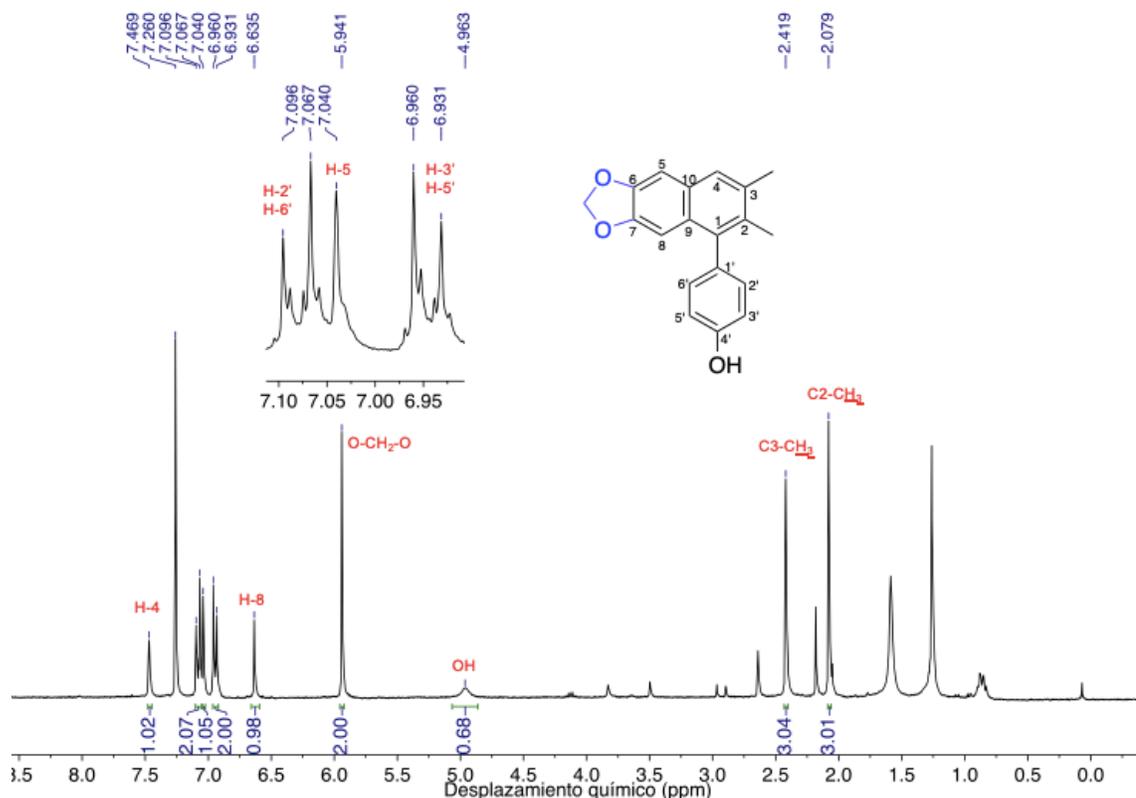


Figura 54. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del Subproducto **EC-16**.

La aromatización del producto obtenido se confirma en el espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) al observar nueve carbonos cuaternarios, dos carbonos terciarios, y uno secundario en el rango de δ 154.6-100.9 ppm y solo dos carbonos primarios en la región alifática de δ 21.1 1 17.6 ppm correspondientes a los metilos de la molécula.

5.4 Síntesis de Derivados Naftalénicos por Bromación Bencílica

El objetivo de llevar a cabo esta reacción en el proyecto fue obtener una tetralina bromada en la posición C4 para posteriormente realizar reacciones de sustitución nucleofílica. Todos los experimentos se realizaron en CCl₄, y se inició probando 10 mol% de BPO como iniciador de radicales (experimento 1, TABLA 11) y, tras caracterizar los dos productos obtenidos, se confirmó que se trataba del derivado naftalénico bromado en C4 **EC-09** y del producto naftalénico sin sustituyente **EC-12**. Estos resultados sugieren que prevalecen las condiciones oxidativas favorecidas por el BPO, promoviendo el paso de propagación de la reacción, aunado a que el radical bencílico en C1 es mucho más estable que aquel formado en C4 debido a la mayor densidad electrónica proporcionada por los dos anillos aromáticos cercanos, propiciando aún más el paso de propagación. Esta reacción se describe en la sección 5.5 Síntesis del Derivado EC-18 por Oxidación Bencílica.

Por ello, se redujo la cantidad de BPO (experimento 2, TABLA 11) a 10 mol% obteniendo el mismo resultado y, al reducir a 3 mol% ya no prosiguió la reacción (experimento 3, TABLA 11). Al utilizar luz en lugar de altas temperaturas para iniciar la formación de radicales (experimento 4, TABLA 11) se seguía obteniendo el mismo resultado que en las pruebas anteriores, por lo que se optó por cambiar el agente oxidante a azobisisobutironitrilo (AIBN) y, sin embargo, se obtenía solamente el producto naftalénico (experimentos 5 y 6, TABLA 11).

TABLA 11

Experimentos de Bromación Bencílica a Partir del Derivado EC-01

Exp	NBS (eq)	Iniciador de radicales (mol%)	Temp (°C)	Tiempo	Resultado
1 ^a	2	BPO (15)	77	39	EC-01, 09 y 12
2 ^a	2	BPO (10)	77	29	EC-01, 09 y 12
3	2	BPO (3)	50	2	NR
4 ^b	2	BPO (3)	25	25	EC-01, 09 y 12
5	1.2	AIBN (3)	120	21	EC-12
6	1.2	AIBN (3)	70	22	EC-12

^aEl experimento se llevó a cabo en atmósfera de argón.

^bEl experimento se irradió con un foco de 100 W.

NR: No Reacción.

Los experimentos anteriores demostraron que, en presencia de un agente oxidante que catalice la reacción, se favorecerá el paso de propagación de radicales, llegando a oxidar inclusive el núcleo de tetralina a naftaleno, a causa de la gran estabilidad que poseen los radicales bencílicos generados durante la reacción.

5.4.1 Elucidación Estructural de Derivados Naftalénicos Obtenidos por Bromación Bencílica

5.4.1.1 Elucidación Estructural del Subproducto **EC-09**.

Este es el primer reporte de esta molécula. Se obtuvo el subproducto naftalénico bromado en un 14%. En el espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) (Figura 55) aparecen dos señales dobles en la región aromática a δ 7.14 y 7.04 ppm que integran cada una para dos hidrógenos, correspondientes a H-2', H-6' y H-3', H-5' del anillo aromático *para*-disustituido, respectivamente. También a δ 7.96 y 6.66 ppm aparecen los hidrógenos H-5 y H-8 como singuletes. Posteriormente a δ 3.91 ppm resuena una señal simple que integra para seis hidrógenos de los metoxilos unidos a los carbonos C6 y C7 y a δ 3.67 ppm el singulete de los hidrógenos del tercer metoxilo de la molécula unido a C4'. La aromaticidad del producto se confirma con los singuletes a δ 2.49 y 2.11 ppm que integran cada una para tres hidrógenos, correspondiendo a los metilos del derivado y a la ausencia de señales para los hidrógenos diastereotópicos en C4, así como para los metinos unidos a C1, C2 y C3 observados en los derivados ariltetralinas.

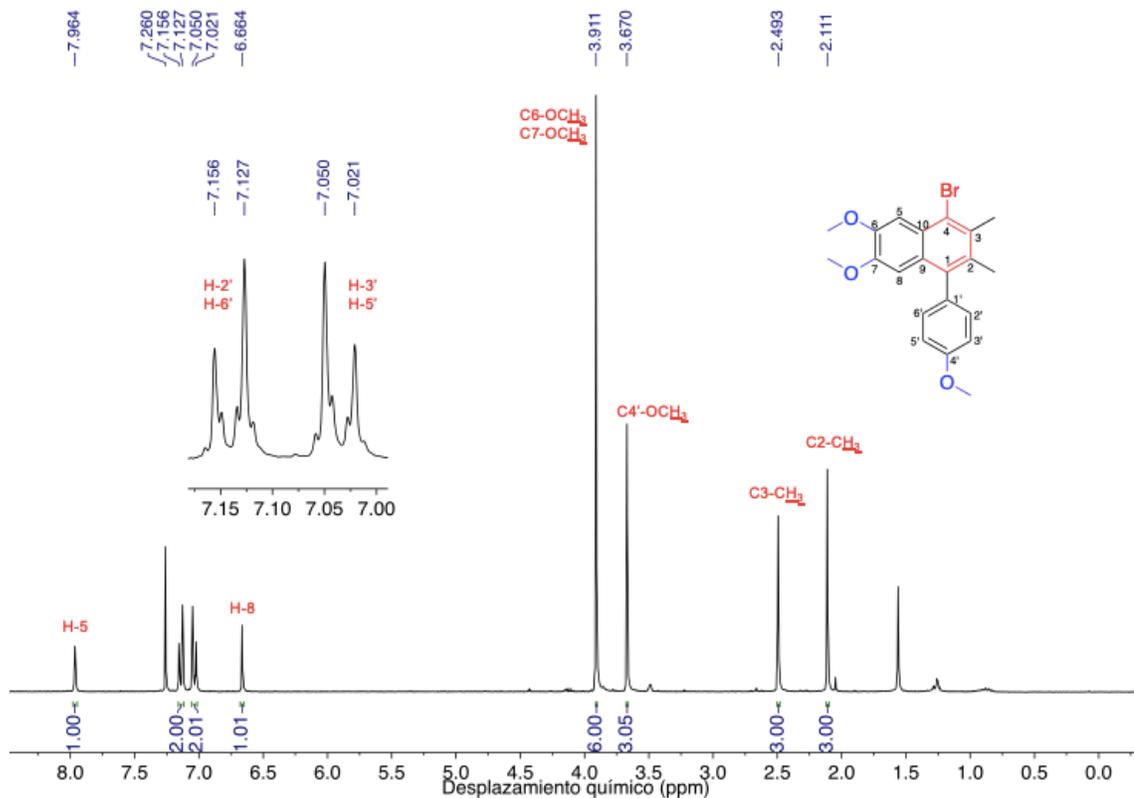


Figura 55. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del Subproducto **EC-09**.

Aunado a esto, en el espectro de RMN ^{13}C aparecen un total de 14 señales de carbonos aromáticos distintos, de los cuales 10 corresponden a carbonos cuaternarios, lo que confirma una sustitución en C4, misma que ha sido corroborada en el espectro de masas de baja resolución (Figura 56), mostrando un pico M+2 con una relación 1:1 de intensidad respecto a la observada para el pico del ion molecular a m/z 401, demostrando la sustitución en C4 por un átomo de bromo.

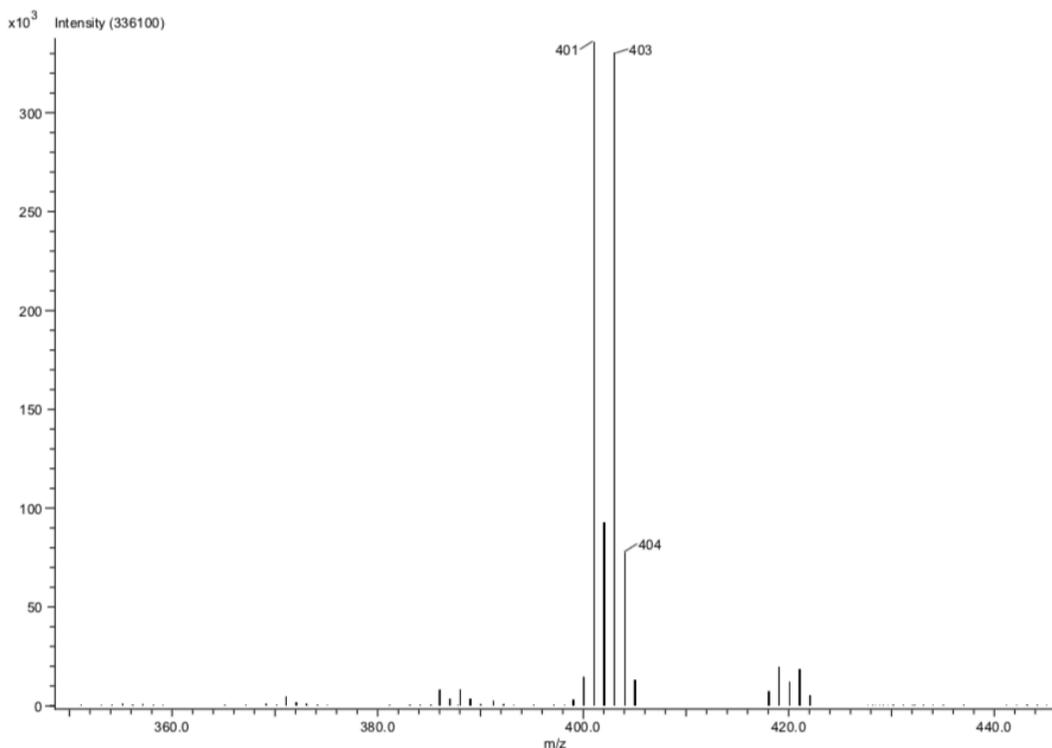


Figura 56. Espectro de Masas de Baja Resolución del Subproducto **EC-09**.

5.4.1.2 Elucidación Estructural del Subproducto **EC-12**.

Se obtuvo el subproducto naftalénico **EC-12** en un 22% y se reporta por primera vez en este proyecto. En el espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) (Figura 57) se observa en la región aromática un total de siete hidrógenos, siendo 4 de ellos los que conforman el sistema AA'BB' del anillo *para*-disustituido. Los dobletes que aparecen a δ 7.18 y 7.03 ppm corresponden a los hidrógenos H-2', H-6' y H-3', H-5', respectivamente. En esta misma región resuenan dos singuletes a δ 7.06 y 6.64 ppm de los hidrógenos H-5 y H-8 de la molécula y, adicionalmente, se desplaza a δ 7.5 ppm el singulete de H-4. A campo más alto aparecen tres singuletes en la región de δ 3.98-3.69 ppm cada uno integrando para tres

hidrógenos atribuibles a los tres metoxilos de la molécula y, en seguida, otros dos singuletes que también integran para tres hidrógenos a δ 2.44 y 2.1 ppm de los metilos unidos a C3 y C2 del naftaleno, respectivamente.

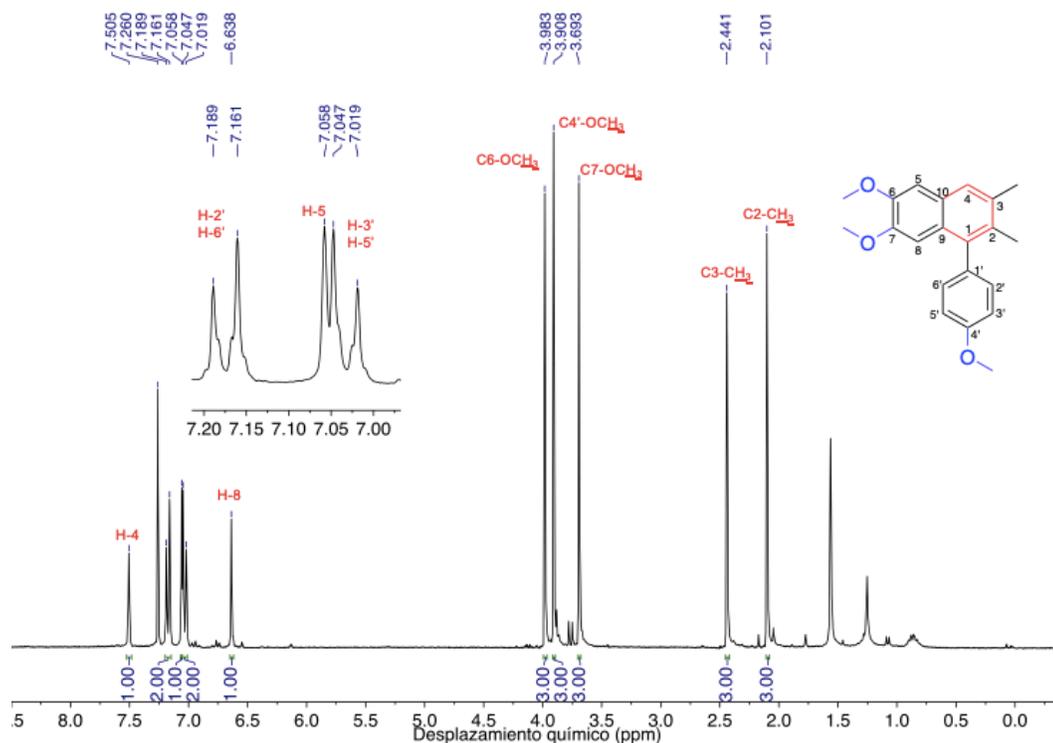


Figura 57. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del Subproducto **EC-12**.

El núcleo de naftaleno se corrobora con el espectro de RMN de ^{13}C al observar un total de catorce señales de carbonos aromáticos en la región de δ 158.6-105.6 ppm y solo 5 señales en el rango de δ 60.0-17.6 ppm correspondientes a los carbonos de los tres metoxilos y los dos metilos en la estructura así como con los datos cristalográficos obtenidos por difracción de rayos X de monocristal (Figura 58).

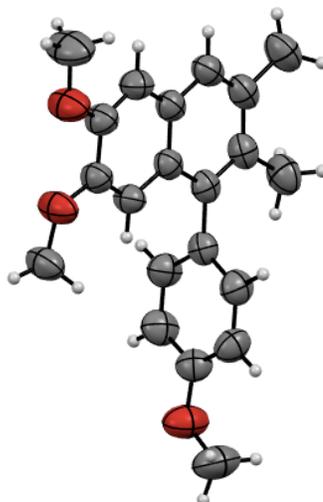


Figura 58. Estructura Cristalina del Subproducto **EC-12**.

5.5 Síntesis del Derivado **EC-18** por Oxidación Bencílica

Para optimizar la oxidación selectiva de la posición C4, se realizaron un total de 43 experimentos y en la TABLA **12** se describen aquellos más representativos de entre las modificaciones realizadas en cuanto a equivalentes de reactivos y diferentes disolventes. Para aquellas reacciones que reportan cantidades traza o nula de producto deseado se observó un patrón cromatográfico de más de 10 subproductos, que no pudieron purificarse debido a la poca cantidad de materia prima utilizada para cada reacción.

Se inició utilizando un solo agente oxidante por prueba, por ejemplo ácido 2-yodoxibenzoico (IBX) (experimento 5, TABLA **12**) en microondas (MW) e hidroperóxido de *terc*-butilo (TBHP) (experimento 9, TABLA **12**), observando en muy poca cantidad al producto deseado en el primer experimento. Después se

probó con un agente oxidante y un catalizador por reacción, por ejemplo peróxido de di *terc*-butilo (DTBP) con cloruro ferroso (FeCl_2) (experimento 6, TABLA **12**), (diacetoxi)yodobenceno (DIB) con azida de sodio (NaN_3) (experimento 10, TABLA **12**), ácido peryódico (H_5IO_6) con óxido de cromo (VI) (CrO_3) (experimento 12, TABLA **12**), TBHP con KI, FeCl_3 (cloruro férrico) y acetato de cobre (II) [$\text{Cu}(\text{OAc})_2$] (experimento 13, 15 y 17, respectivamente), obteniendo los mismos resultados desfavorables en todos los casos.

Al observar la formación de muchos subproductos en todas las pruebas, se optó por probar el oxígeno ambiental acompañado de otros oxidantes en cantidades catalíticas como 2,3-Dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) o *N*-hidroxiftalimida (NHPI), sin embargo, la oxidación tampoco resultó selectiva, generando una gran cantidad de subproductos. (experimentos 16 y 18, TABLA **12**).

Tras estos hallazgos se exploraron combinaciones entre los oxidantes ya mencionados junto con el ácido 3-cloroperoxibenzoico (mCPBA) (experimentos 3, 4, TABLA **12**) y clorito de sodio (NaClO_2) (experimento 11, TABLA **12**) esperando reducir el número de subproductos formados, pero los resultados también fueron infructuosos.

Fue hasta que se utilizó como agente oxidante el monopersulfato de potasio ($2\text{KSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$), conocido como Oxone[®] comercialmente, que se obtuvieron resultados que permitieron proponer el mecanismo radicalario de la

reacción. Primero, como catalizador se utilizó el bromuro de potasio (KBr) siguiendo la reacción reportada por Moriyama y cols. [53] (experimento 7, TABLA 12) y se obtuvo un único producto en un 92% de rendimiento, **EC-27**, una ariltetralina bromada en C8 del anillo aromático.

A continuación, se hicieron otras pruebas sustituyendo el KBr por KI, en primer lugar, utilizando nitrometano (MeNO_2) como disolvente (experimento 1, TABLA 12), recuperando la materia prima en su totalidad. Posteriormente se probó una mezcla de $\text{DCM:H}_2\text{O}$ (experimento 2, TABLA 12) observando la formación del derivado cetónico esperado en un rendimiento muy bajo (7%), lo que sugiere que el agua está involucrada en el mecanismo de la reacción. Finalmente, al cambiar solamente el disolvente por DMF sin secar y manteniendo iguales el resto de las variables del experimento anterior, se obtuvo un aumento moderado en el rendimiento, alcanzando un 34% del producto esperado y únicamente el derivado **EC-12** como subproducto (experimento 8, TABLA 12). Al comprobar que el agua tenía un papel importante en la reacción, en el último experimento se utilizó $\text{MeCN:H}_2\text{O}$ en proporción 13:1 (experimento 18, TABLA 12), como reporta Yin y cols. [54] confirmando el mecanismo propuesto por ellos, aumentando ligeramente el rendimiento a 40% y obteniendo nuevamente el subproducto **EC-12**.

TABLA 12

Optimización de Reacción de Oxidación Bencílica

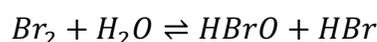
Exp	Disolvente	Oxidante (eq)	Catalizador (eq)	Temperatura (°C)	Condición especial	Tiempo (h)	Rendimiento (%)
1	MeNO ₂	Oxone (4)	KI (1.5)	95	-	141	N. A.
2	CH ₂ Cl ₂ :H ₂ O (9:1)	Oxone (2.7)	KI (2.7)	60	-	141	EC-18 (7)
3	MeCN	DIB (3), TBHP (3), mCPBA (2)	-	25	-	43	Trazas
4	DMSO	IBX (3), TBHP (3), mCPBA (2)	-	25	-	2	Trazas
5	DMSO	IBX (3)	-	60	-	28	Trazas
6	CICH ₂ CH ₂ Cl	DTBP (1.2)	FeCl ₂ (0.1)	120	-	102	N. A.
7	CH ₂ Cl ₂ :H ₂ O (9:1)	Oxone (3,2)	KBr (2.7)	120	Luz blanca 100 W	54	EC-27 (92)
8	DMF	Oxone (2.7)	KI (2.7)	60	Luz blanca 100 W 2 h	22	EC-18 (34)
9	-	TBHP 70% (10)	-	170))) 90-247 W	0.5	N.A.
10	MeCN:H ₂ O (1:1)	DIB (2)	NaN ₃ (0.1)	25	-	30	N. A.

11	MeCN:H ₂ O (3:1)	TBHP (5) NaClO ₂ (1.2)	-	60	-	29	Trazas
12	MeCN anhidro	H ₅ IO ₆ (7)	CrO ₃ (0.05)	25	-	3	Trazas
13	MeCN anhidro	TBHP (3)	KI (0.2)	25	-	3	Trazas
14	DMSO	O ₂	t-BuONa (2)	50	-	2	N. A.
15	Piridina	TBHP (3)	FeCl ₃ (0.02)	115	Reflujo	24	N. A.
16	MeCN anhidro	O ₂	DDQ (0.0125), NHPI (0.05)	82	Reflujo	20	N. A.
17	Dioxano	TBHP (6)	Cu(OAc) ₂ (0.2)	110	Reflujo	19	Trazas
18	MeCN:H ₂ O (13:1)	Oxone (2.2)	KI (0.5)	25	Luz blanca 100 W	4	EC-18 (40)

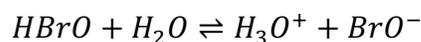
N. A.: No Aislado.

Para explicar la reacción de sustitución electrofílica aromática que sufre el derivado **EC-01** para formar el subproducto **EC-27** se propone el mecanismo a continuación (Figura **60**). Inicialmente Oxone[®] y KBr reaccionan entre sí para generar Br₂ el cual, al reaccionar con el agua presente en el medio, genera ácido hipobromoso (HBrO), un ácido débil cuyo pKa es de 8.55 [55], por lo que a pH neutro en solución se encuentra parcialmente ionizado:

(9)



(10)



La especie BrO⁻ es finalmente la fuente de bromo electrofílico que será atacado por el anillo aromático del derivado **EC-01** utilizado como materia prima para la oxidación bencílica, generando entonces el subproducto **EC-27**. Este compuesto es favorecido por los dos metoxilos unidos al anillo que funcionan como grupos activadores, proporcionando una mayor densidad electrónica sobre el sistema anular por efecto resonante, aumentando su reactividad para llevar a cabo la sustitución electrofílica aromática (Figura **59**). Este tipo de subproductos también fueron observados por Yin y cols [54] y Khan y cols. [56] cuando probaron esta reacción en anillos aromáticos sustituidos con grupos como metoxilos o hidroxilos, prevaleciendo la sustitución electrofílica aromática sobre la oxidación C-H bencílica.

En contraste con lo propuesto, al utilizar KI como catalizador no se genera el subproducto yodado en el anillo aromático, esto debido a que el pKa del ácido hipoyodoso (HIO) es de 10.5 [55], haciéndolo un ácido todavía más débil que HBrO, por lo que la cantidad formada de la especie IO⁻ en el medio de reacción es muy escasa.

Moriyama y cols. [53] obtuvieron los subproductos bromados en posición bencílica principalmente en moléculas con cadenas alquílicas largas y con sustitución de grupos electroattractores en el anillo aromático, lo que confirma el intermediario (2) propuesto. Por su parte, Yin y cols [54] también realizaron experimentos para determinar la fuente del oxígeno en el producto cetónico deseado. Realizaron pruebas en atmósfera de argón obteniendo el producto oxidado esperado y utilizaron H₂O¹⁸, recuperando el producto también marcado en una proporción 2:1 respecto al no marcado. Por lo tanto, la caracterización de subproductos bromados en posición bencílica y la obtención del producto final marcado a partir de H₂O permite proponer una sustitución nucleofílica unimolecular del intermediario yodado y posterior oxidación del intermediario alcohol **4** formado para generar el producto cetónico final en un 40% de rendimiento.

Inicialmente, KI reacciona con Oxone para generar I₂. Después sucede una escisión homolítica bajo irradiación con luz para formar el I[•], el cual genera el radical bencílico **1** que después será yodado a partir de I₂ para generar de nuevo I[•]. Después el intermediario yodado en posición bencílica **2** sufre una sustitución

nucleofílica unimolecular por el agua formando posteriormente otro intermediario de tipo alcohol **4** que por último se oxida por una segunda molécula de Oxone para formar la cetona final [54].

Tal como ocurre la reacción de sustitución nucleofílica unimolecular sobre el intermediario catiónico bencílico, a su vez sucede una eliminación de tipo E1 en presencia de un disolvente prótico y nucleófilo no básico como el agua, lo que explica la generación del subproducto naftalénico **EC-12** en un 10%. Es importante mencionar que la reacción de eliminación es igualmente favorecida a causa de que el carbocatión generado en C1 es incluso más estable que aquel formado en C4 (**3**) a consecuencia de que el primero es un carbocatión en posición bencílica a dos anillos aromáticos, a comparación de uno en el caso del carbocatión en C1 (Figura **59**).

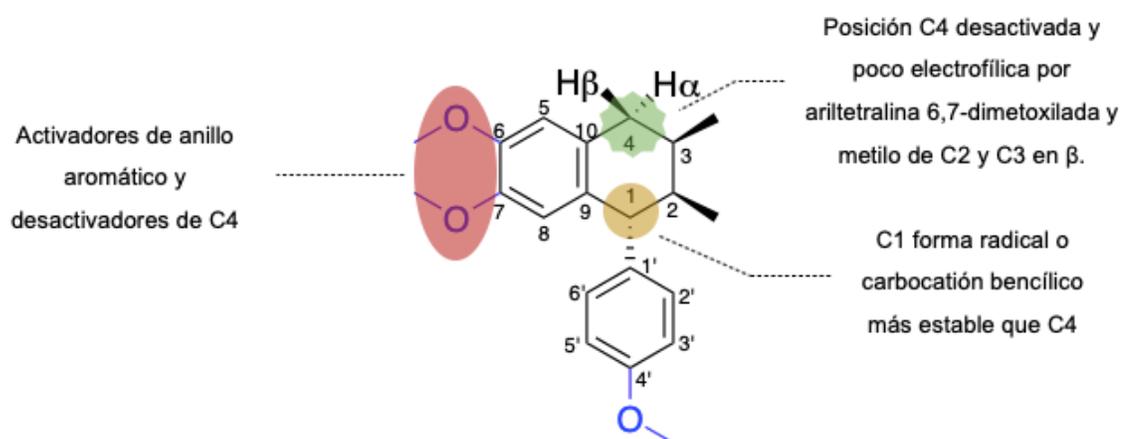


Figura 59. Factores Estéricos y Electrónicos que Afectan la Reactividad del Derivado **EC-01**.

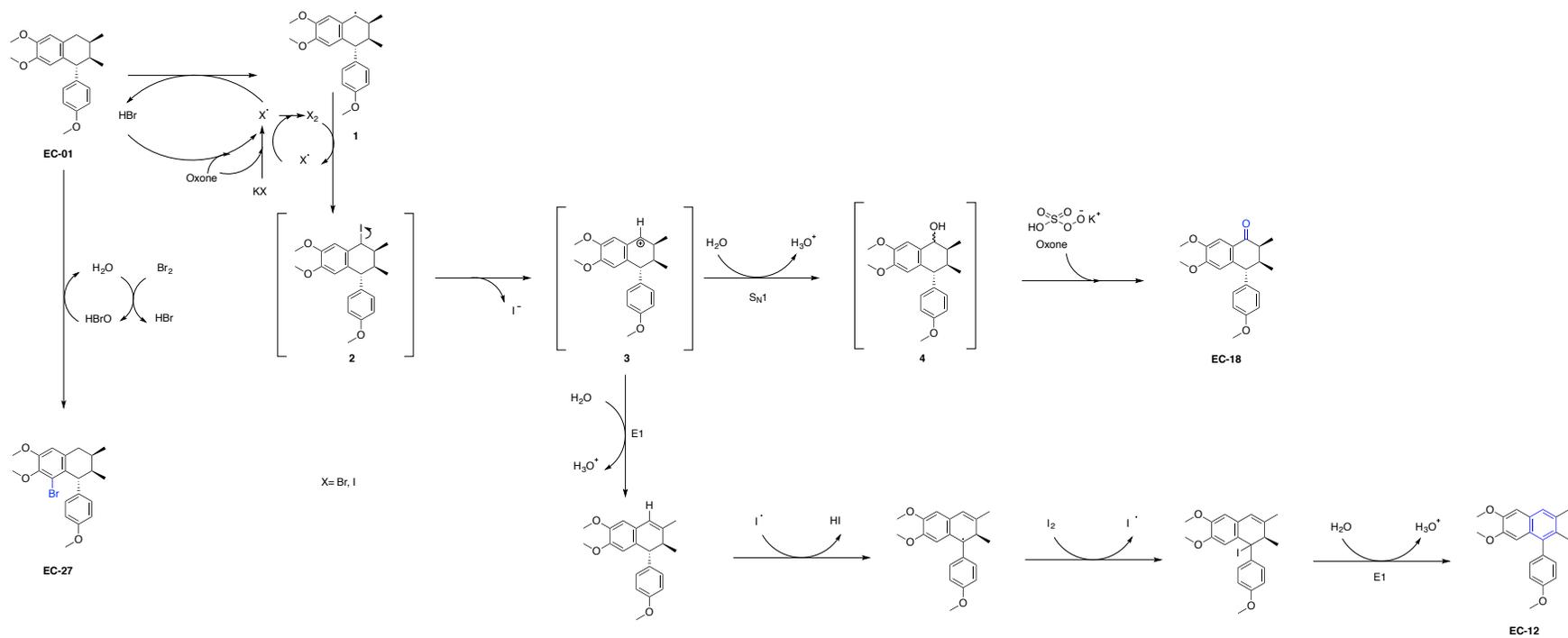


Figura 60. Mecanismo de Reacción de Oxidación Benzclica con Oxone/KI.

5.5.1 Elucidación Estructural del Subproducto **EC-27**

En la región aromática del espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) (Figura 61) aparecen solamente 5 hidrógenos, siendo cuatro de ellos los correspondientes al sistema AA'BB' del anillo *para*-disustituido, desplazándose a δ 6.89 y 6.79 ppm y ambos con $J = 8.7$ Hz, dos dobletes asignados a los hidrógenos H-2', H-6' y H-3', H-5, respectivamente. En esta misma zona, a 6.41 resuena un singulete correspondiente a H-5. En la región de 3.85-3.68 ppm aparecen tres singuletes, dos de ellos integrando para tres hidrógenos de los metoxilos unidos a C6 y C7 y aquel desplazado a δ 3.78 ppm integra para cuatro hidrógenos, debido a los protones del metoxilo unido a C4' y al solapamiento de la señal que del metino H-1.

A campo más alto se aprecian dos dobletes de los hidrógenos diastereotópicos del metileno en C4, uno a δ 2.82 ppm con J geminal de 17.4 Hz y J vecinal de 5.7 Hz, correspondiente a H-4 α y otro a δ 2.36 ppm con una J geminal de 17.4 Hz y J vecinal de 8.3 Hz correspondiente H-4 β . A continuación, aparecen dos singuletes en el rango de δ 2.05-1.84 ppm de los metinos H-3 y H-2, respectivamente. Por último, resuenan a δ 0.93 y 0.89 ppm dos señales dobles con J vecinal de 6.9 Hz para ambos que corresponden a los hidrógenos de los metilos unidos a C3 y C2, respectivamente.

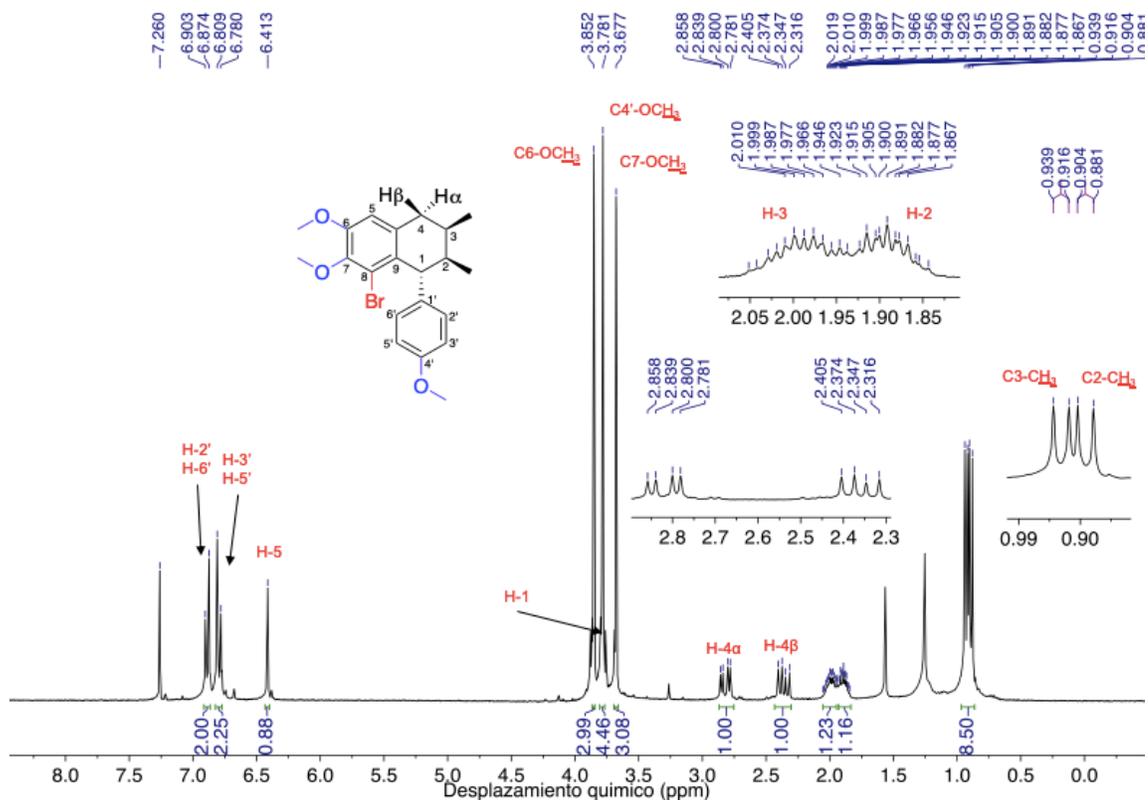
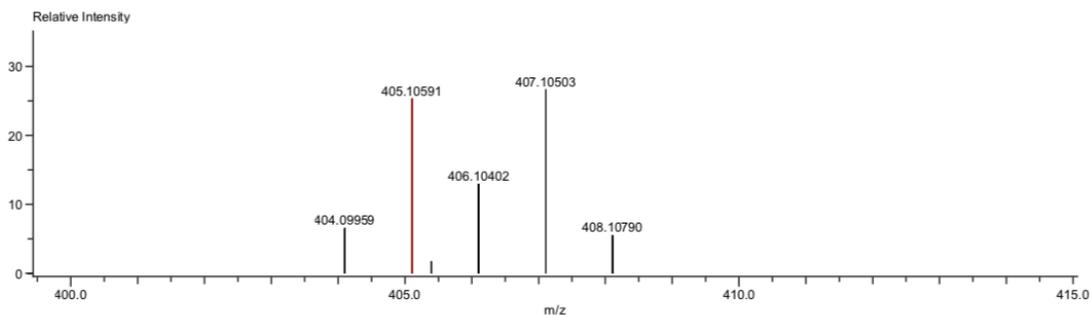


Figura 61. Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) del Subproducto **EC-27**.

La ausencia de otro singulete en la región aromática con integración para un hidrógeno presume una sustitución en el anillo aromático dimetoxilado, la cual se confirma que se trata de un átomo de bromo en el espectro de masas de alta resolución (Figura 62), mostrando un pico [M+H]⁺ de m/z 405.10591 y otro con una intensidad en proporción casi 1:1 correspondiente a [M+H]⁺+2 de m/z 407.10503. Esto corresponde al primer reporte de esta molécula.

Data:U-3525-EC27
 Sample Name:Dr. Luis D. Miranda - Erika Castillo
 Description:
 Ionization Mode:ESI+
 History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5]];Correct Base[5.0%];Average[MS[...
 Acquired:9/19/2019 2:08:23 PM
 Operator:AccuTOF
 Mass Calibration data:Cal Peg 600
 Created:9/27/2019 11:34:28 AM
 Created by:
 Charge number:1
 Tolerance:100.00(mmu)
 Unsaturation Number:0.0 .. 12.0 (Fraction:Both)
 Element:¹²C:1 .. 21, ¹H:1 .. 26, ⁷⁹Br:1 .. 1, ¹⁶O:1 .. 3



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
405.10591	56093.01	405.10653	-0.62	-1.53	¹² C ₂₁ ¹ H ₂₆ ⁷⁹ Br ₁ ¹⁶ O ₃	8.5

Figura 62. Espectro de Masas de Alta Resolución del Subproducto **EC-27**.

5.5.2 Elucidación Estructural del Derivado **EC-18**

Como primer reporte de este compuesto, en el espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) (Figura **63**) aparece a δ 7.56 ppm un singlete aromático de H-5 que, a comparación del desplazamiento químico de ese mismo hidrógeno en el derivado **EC-01** de partida (δ 6.6 ppm), aparece a campo más bajo a causa del efecto de desapantallamiento ejercido por el carbonilo formado en C4. Después a δ 6.97 y 6.83 ppm resuenan dos dobletes que integran cada uno para dos hidrógenos, asignados a H-2', H-6' y H-3', H-5' del anillo *para*-disustituido, respectivamente. A continuación, se observa un singlete a δ 6.42 del hidrógeno aromático H-8. A δ 3.99 ppm se desplaza un doblete con *J* vecinal de 5.1 Hz que del metino H-1, que está acoplado con el metino H-2 que aparece como multiplete a δ 2.44-2.32 ppm.

En el rango de δ 3.94-3.77 resuenan tres singuletes que integran cada una para tres hidrógenos, correspondientes a los tres metoxilos de la molécula; a campo más alto se observa un cuarteto de doblete a δ 2.76 ppm que corresponde al metino H-3 con una $J_{H_3-CH_3}$ vecinal de 7.2 Hz al acoplarse con los hidrógenos del metilo unido al mismo carbono y una $J_{H_3-H_2}$ también vecinal de 4.2 Hz por su acoplamiento con el metino en el C2. La simplificación de esta multiplicidad respecto a la observada para dicho hidrógeno en **EC-01** comprueba que C4 ya no está saturado de hidrógenos, sino unido a un oxígeno por doble ligadura, que se confirma también por su desplazamiento químico en RMN ^{13}C , siendo de δ 200 ppm, típico de un carbono de carbonilo cetónico, y por la banda de absorción a 1674 cm^{-1} observada en el espectro de Infrarrojo correspondiente a un estiramiento del doble enlace C=O. Por último, a campo alto se observan dos dobletes que integran cada una para tres hidrógenos a δ 1.12 y 0.99 ppm de los metilos unidos al ciclohexeno, cuyos desplazamientos químicos están más separados respecto a los observados para los mismos hidrógenos en **EC-01**.

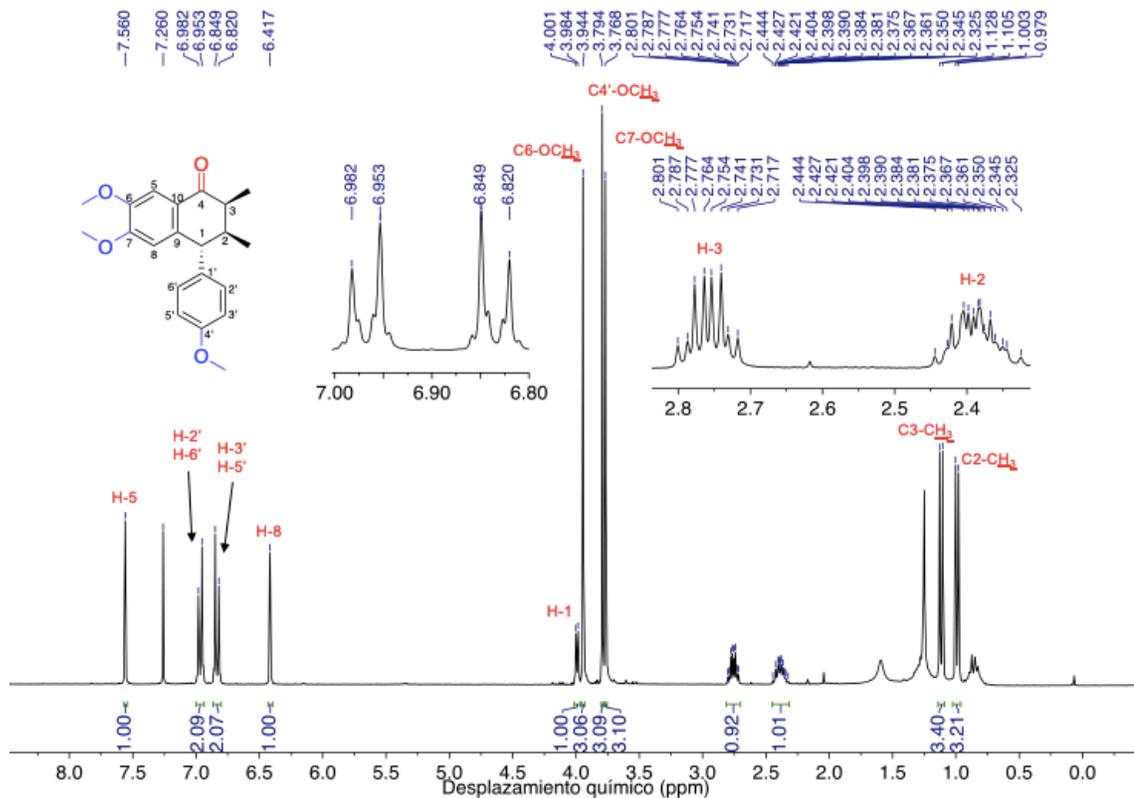


Figura 63. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del Derivado **EC-18**.

5.6 Obtención del Derivado **EC-47** por Reducción de Carbonilo

A partir del derivado cetónico se obtuvo el producto **EC-47** de tipo alcohol mediante una reducción en atmósfera inerte (argón) a 0 °C en Et_2O anhidro y LiAlH_4 como agente reductor. Se realizaron solamente tres pruebas, siendo la primera de ellas (TABLA 13) con borohidruro de sodio (NaBH_4) y aún cuando se utilizaron 4 eq no se observó el producto deseado tras 6 horas de reacción. Después se experimentó con 1.6 eq de LiAlH_4 (2, TABLA 13) y sí se formó el derivado **EC-47**, pero en bajo rendimiento. Finalmente, al aumentar los eq de

este reductor (3, TABLA 13) se logró también mejorar el rendimiento, alcanzando un 54%.

TABLA 13
Optimización de Reacción de Reducción de Carbonilo

Exp	Reductor (eq)	Disolvente	Temp (°C)	Tiempo (h)	Resultado
1	NaBH ₄ (4)	MeOH anh	0 a 25	6	N. A.
2	LiAlH ₄ (1.6)	Et ₂ O anh	0	5	22%
3	LiAlH ₄ (3)	Et ₂ O anh	0	2	54%

N. A.: No Aislado.

Los aldehídos son generalmente más reactivos que las cetonas en adiciones nucleofílicas por efectos estéricos y electrónicos. Estéricamente, la presencia de sustituyentes largos o voluminosos en un carbonilo cetónico significa que el nucleófilo se aproximará con mayor dificultad a comparación de un aldehído. Este factor también explica por qué solo se obtuvo el diastéromero 4(S) con el grupo -OH en β; al considerar que esta reacción es una adición nucleofílica a carbonilo, el ataque del nucleófilo se lleva a cabo a un ángulo de 105±5 °, conocido como ángulo Bürgi-Dunitz [57]. Este ángulo describe la geometría de ataque (aproximación) de un nucleófilo en un centro trigonal plano insaturado, como lo es un grupo C=O, siendo óptimo para el solapamiento entre el orbital molecular más alto ocupado (HOMO) del nucleófilo y el orbital molecular más bajo vacío (LUMO) del centro trigonal plano insaturado, en este caso el orbital s del H⁻ y el

orbital π^* de C=O perpendicular al plano, respectivamente. En esta aproximación el nucleófilo evita solaparse con los orbitales de los grupos a los cuales el grupo electrofílico está unido.

Al observar un modelado *in silico* del derivado cetónico **EC-18** (Figura **64**) se aprecia un mayor impedimento estérico en la cara diastereotópica *Si* de la molécula por los dos metilos en β unidos a C2 y C3 y, considerando que la reacción química se produce en solución, también se toman en cuenta las ligeras torsiones que esos dos carbonos puedan tener, dificultando aún más el ataque nucleofílico por dicha cara. En contraste, al observar la cara diastereotópica *Re* de la molécula se aprecia un menor impedimento estérico pues el anillo aromático unido a C1 está en posición *pseudo* ecuatorial, dejando menos impedida esta cara promoviendo el ataque nucleofílico de H^- “por detrás del plano”. Lo anterior justifica una reacción estereoselectiva que dio lugar únicamente al diasterómero 4S.

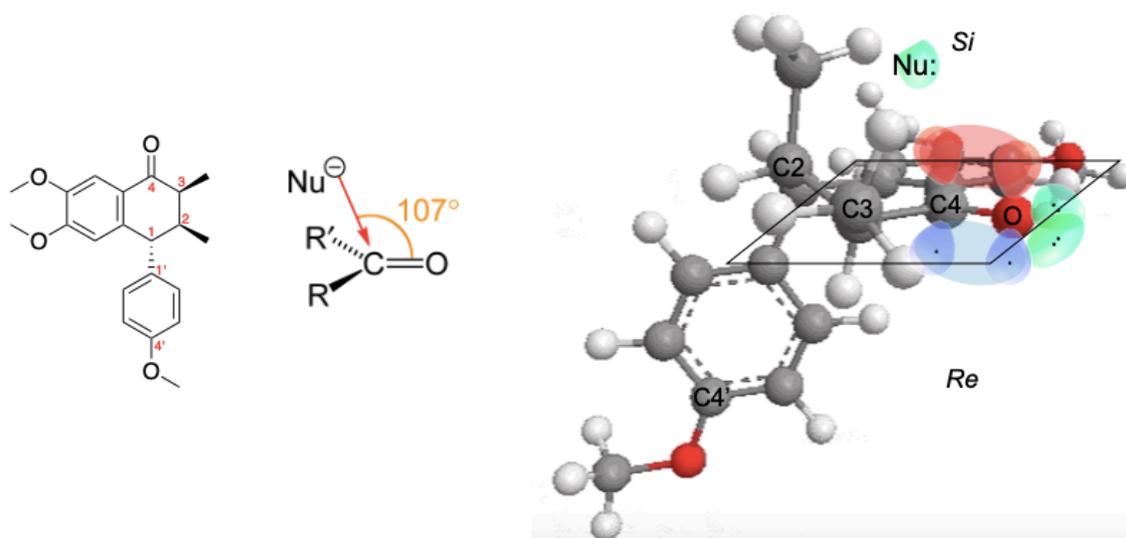


Figura 64. Ángulo Bürgi-Dunitz en ataque nucleofílico a carbonilo de **EC-18**.

Además de tomar en cuenta los factores estéricos anteriores, electrónicamente las cetonas son menos reactivas que los aldehídos por su menor polarización del grupo carbonilo, es decir, al poseer dos sustituyentes en lugar de uno como en los aldehídos, se estabiliza mejor la carga parcial positiva del carbono, haciéndolo menos electrofílico; añadiendo que las cetonas bencílicas son todavía menos reactivas a causa del efecto electrodonador resonante del anillo aromático. Es por ello que cuando se probó NaBH_4 como agente reductor, no fue posible la reducción. Sin embargo, el LiAlH_4 sí fue lo suficientemente reactivo para reducir el carbonilo estéricamente impedido y poco electrofílico de **EC-18**, pues es un agente reductor más fuerte que NaBH_4 porque el enlace Al-H se encuentra más polarizado que el enlace Na-H [58].

5.6.1 Elucidación Estructural del Derivado **EC-47**

En el espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Figura **65**) aparece a δ 7.13 ppm un singulete aromático correspondiente a H-5, que presenta efectos NOE en el experimento NOESY (Figura **66**) con el singulete ancho a δ 5.0 ppm que integra para un hidrógeno que corresponde a H-4 y con el singulete a δ 3.9 ppm que integra para tres hidrógenos que corresponde entonces al metoxilo unido a C6.; por lo tanto el siguiente singulete aromático a δ 6.19 ppm corresponde a H-8, que a su vez presenta un efecto NOE con la señal simple que resuena a δ 3.60 ppm y que integra para tres hidrógenos que se asignó entonces al metoxilo unido a C7.

A δ 6.98 y 6.81 ppm aparecen dos dobletes correspondientes a los cuatro hidrógenos del sistema AA'BB' del anillo *para*-disustituido, asignándose el primero a H-2' y H-6' por las interacciones espaciales observadas con el dqd a δ 2.06 ppm correspondiente a H-2 ($J_{\text{H1-H2}} = 9.6$ Hz, $J_{\text{H2-CH3}} = 6.8$ Hz y $J_{\text{H2-H3}} = 2.8$ Hz), con el doblete desplazado a δ 0.92 ppm que integra para tres hidrógenos y que del metilo unido a C2, y con la señal doble a δ 3.54 ppm del metino H-1; por lo tanto, el doblete a δ 0.90 ppm que integra para tres hidrógenos es del metilo unido a C3 y el doblete aromático a δ 6.81 ppm corresponde a H-3', H-5', que presenta interacción espacial con el singulete a δ 3.8 ppm que integra para tres hidrógenos del metilo unido a C4'. El singulete ancho a δ 5.0 ppm asignado a H-4 también presenta un efecto NOE con el dqd de H-2 y la señal de multiplete desplazada a δ 2.24-2.18 ppm del metino H-3, lo que confirma que el grupo OH

en C4 del producto está en posición β , adquiriendo este carbono una configuración 4S. Lo anterior representa el primer reporte de esta molécula.

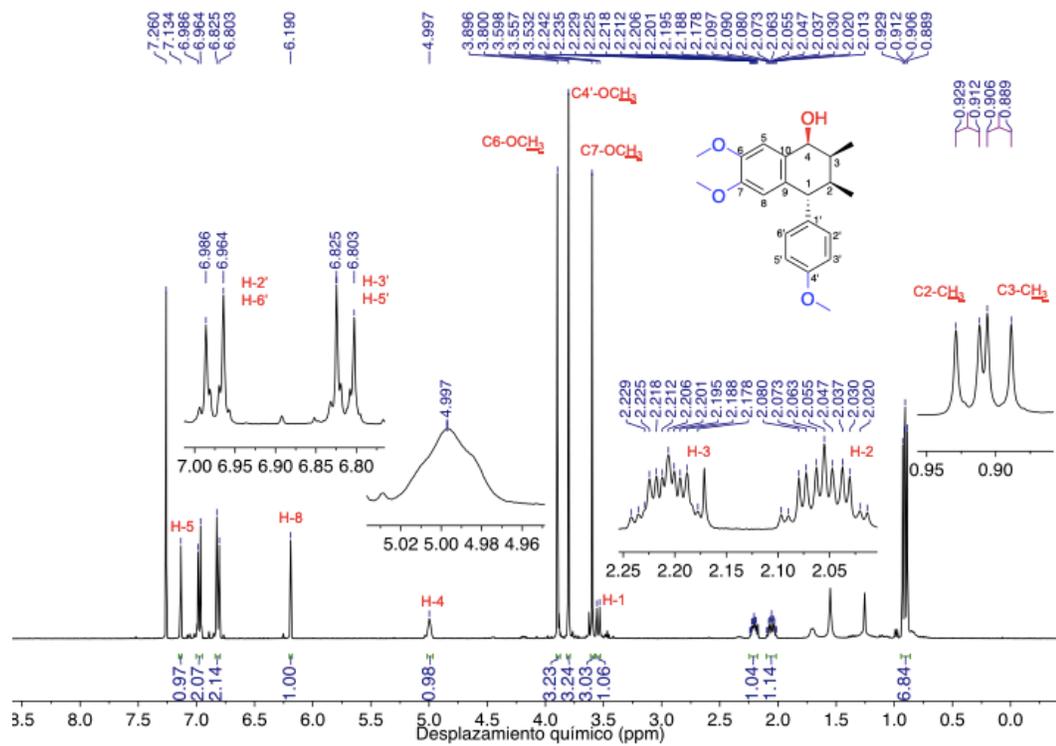


Figura 65. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del Derivado **EC-47**.

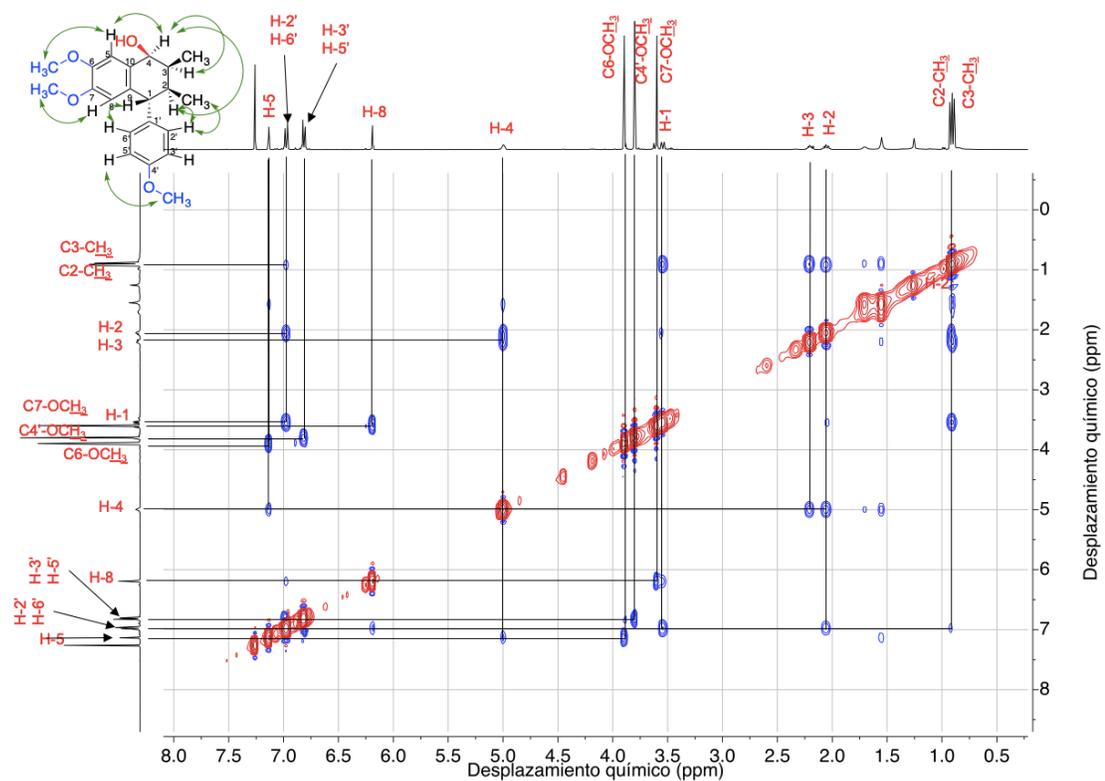


Figura 66. Espectro NOESY (400 MHz, CDCl_3) del Derivado **EC-47**.

Tras asignar los hidrógenos con ayuda de los experimentos de RMN ^1H y NOESY, es posible asignar también los carbonos primarios, secundarios y terciarios de la molécula a partir del experimento HSQC (Figura 67). A δ 108.7 y 112.5 ppm se desplazan los carbonos terciarios aromáticos C5 y C8, respectivamente, y a δ 130.3 y 113.75 ppm aparecen las señales de los carbonos aromáticos equivalentes C2', C6' y C3', C5', en ese orden. A campo más alto el hidrógeno H-4 correlaciona con la señal a δ 72.7 ppm.

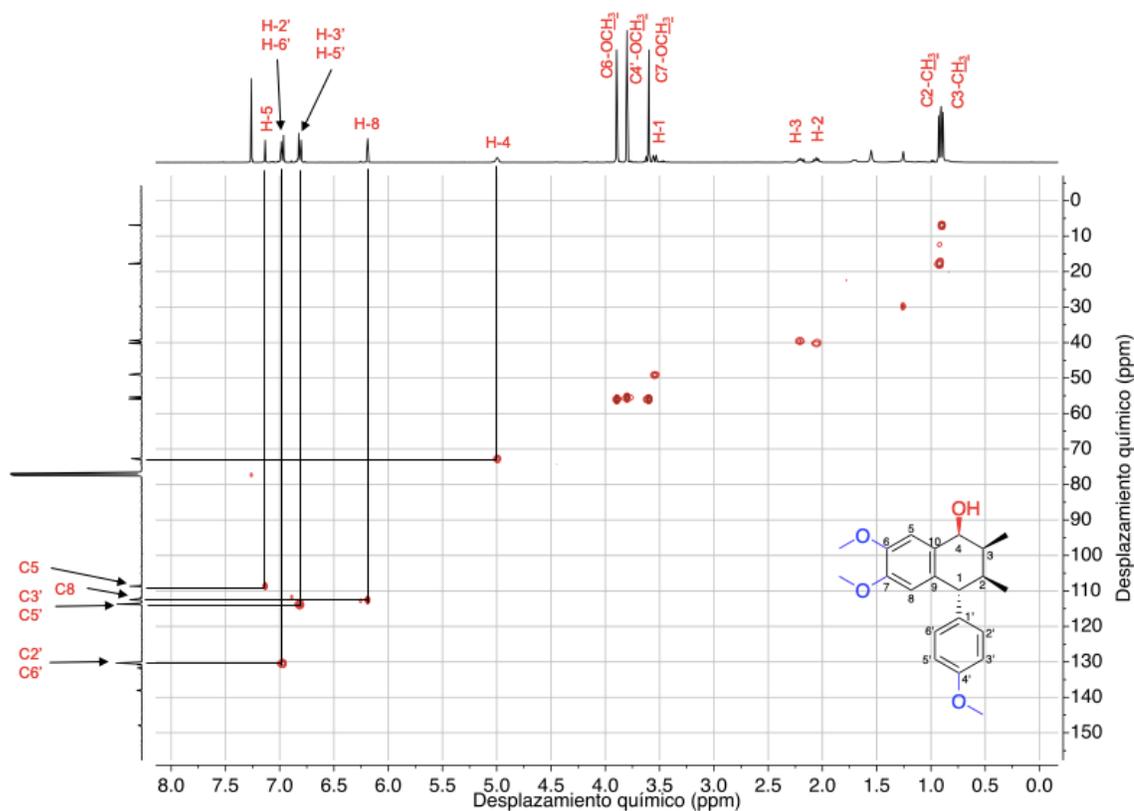


Figura 67. Espectro HSQC (400 MHz, CDCl_3) del Derivado **EC-47**.

En la ampliación de la Figura **68** se observa con mayor detalle las correlaciones de los tres singuletes de metoxilos; la señal asignada para C6-OCH_3 a δ 3.9 ppm corresponde al carbono en δ 56.0 ppm, la señal que se desplaza a δ 3.80 ppm de C4'-OCH_3 correlaciona con la señal de carbono a δ 55.4 ppm, y el singulete a δ 3.6 ppm asignada para C7-OCH_3 presenta una correlación con el carbono a δ 55.9 ppm. A campo más alto el doblete de H-1 correlaciona con el carbono a δ 49.0 ppm.

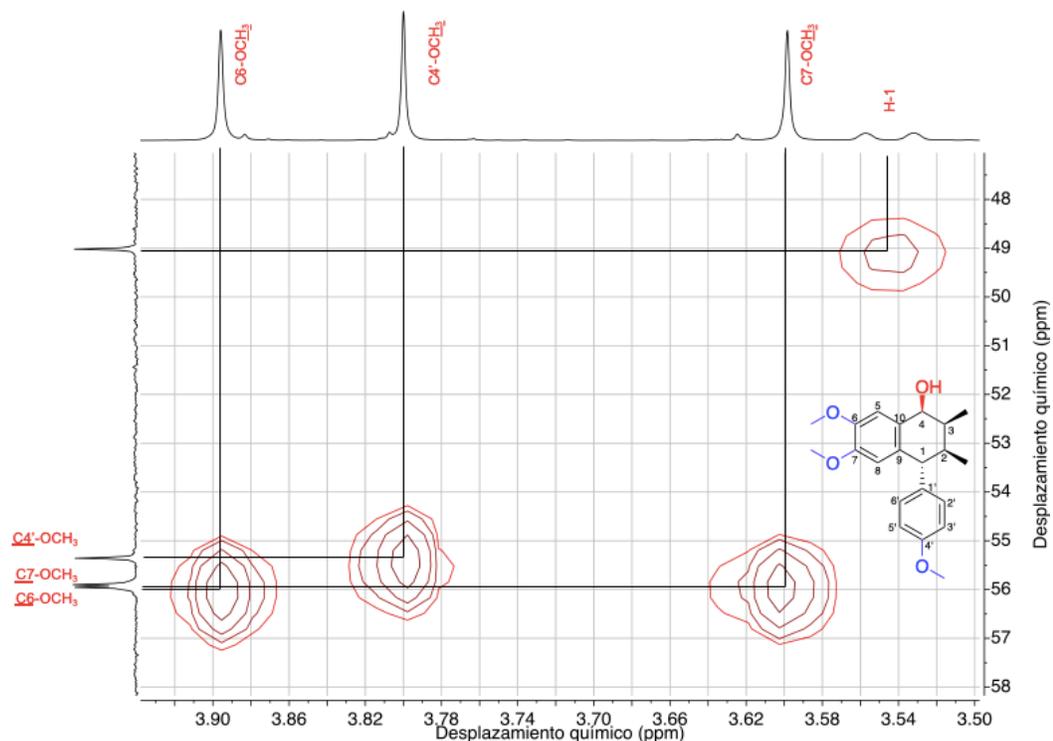


Figura 68. Ampliación (45-60, 3.5-3.9 ppm) de Espectro HSQC (400 MHz, CDCl_3) del Derivado **EC-47**.

En la región alifática también se hizo una expansión (Figura 69) para mostrar con claridad las correlaciones. La señal dqd asignada para H-2 correlaciona con el carbono a δ 40.2 ppm, mientras que el multiplete de H-3 correlaciona con la señal de carbono a δ 39.5 ppm. A campo más alto los dobletes a δ 0.92 y 0.90 ppm de los dos metilos de la molécula unidos a C2 y C3 correlacionan con los carbonos desplazados a δ 17.8 y 6.9 ppm, en ese orden.

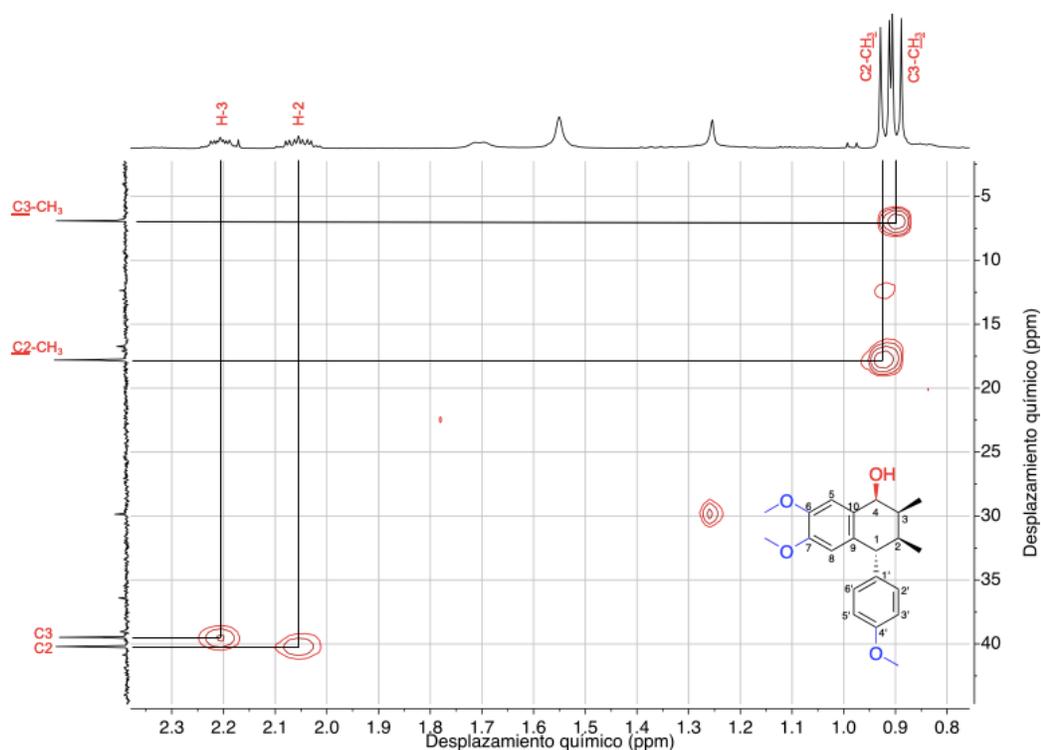


Figura 69. Ampliación (5-45, 0.6-2.4 ppm) de Espectro HSQC (400 MHz, CDCl_3) del Derivado **EC-47**.

Para asignar las señales de RMN ^{13}C de los carbonos cuaternarios se analizó el espectro de HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) que correlaciona hidrógenos y carbonos a dos o más enlaces. En la ampliación de la región aromática del eje de ^{13}C (Figura 70) aparece una señal de carbono cuaternario a δ 158.1 ppm que ha sido asignada a $\text{C4}'$ ya que presenta una correlación a tres enlaces con el doblete a δ 6.98 ppm correspondiente a $\text{H-2}'$, $\text{H-6}'$, a dos enlaces con el doblete asignado a $\text{H-3}'$, $\text{H-5}'$ y a tres enlaces con el singulete correspondiente a los hidrógenos del metoxilo anteriormente asignado para aquel unido a $\text{C4}'$. La señal de carbono cuaternario desplazada a δ 138.0 ppm corresponde a $\text{C1}'$ ya que presenta una correlación a tres enlaces con el doblete

asignado a los hidrógenos H3', H-5'. El carbono cuaternario que resuena a δ 131.7 ppm se asigna a C10 por su única correlación observada a dos enlaces con H-5, mientras que el carbono cuaternario que aparece a δ 130.8 corresponde a C9 por sus correlaciones a dos enlaces con H-1 y H-8.

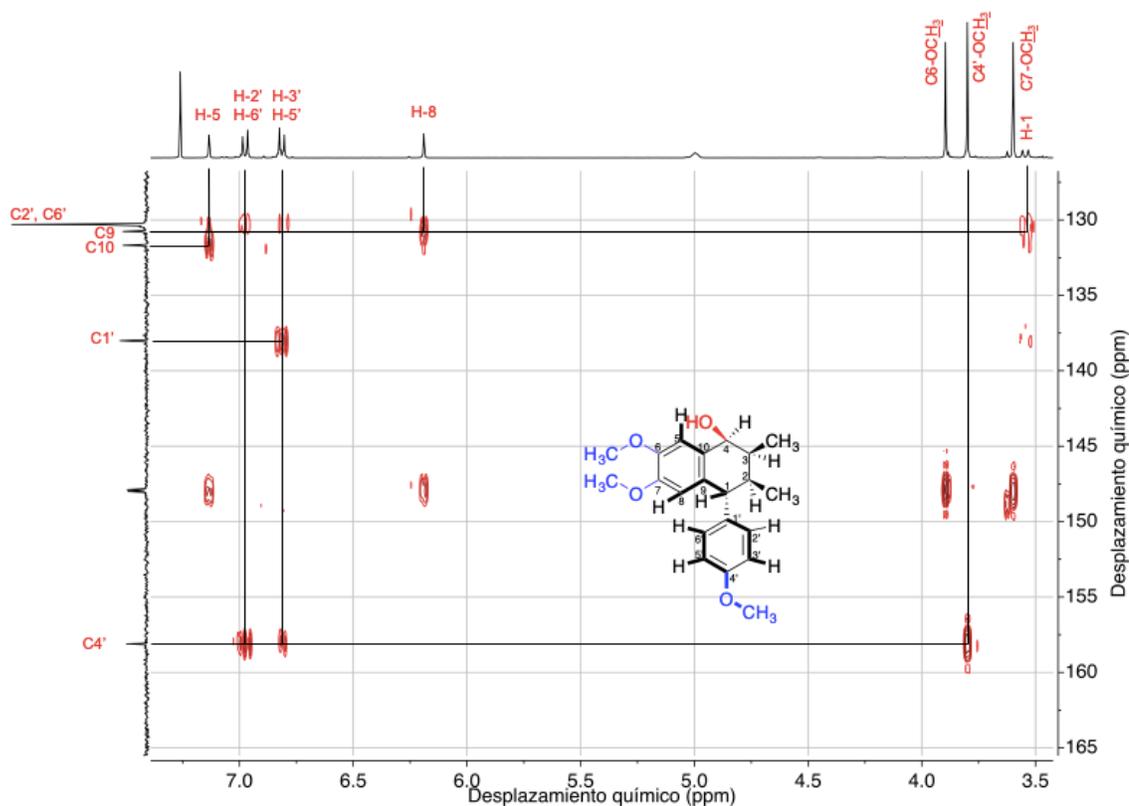


Figura 70. Ampliación (130-165, 3.5-7.0 ppm) de Espectro HMBC (400 MHz, CDCl_3) del Derivado **EC-47**.

Con ayuda de otra ampliación se han asignado los carbonos cuaternarios aromáticos del núcleo de tetralina unidos a oxígeno (Figura 71). El carbono cuaternario a δ 148.0 ppm se asigna a C7 pues correlaciona a tres enlaces con los hidrógenos del metoxilo unido a C7 y a tres enlaces con H-5, mientras que la

señal cercana a δ 147.9 se asigna a C6 pues correlaciona a tres enlaces con los hidrógenos del metoxilo unido a C6 y a tres enlaces con H-8.

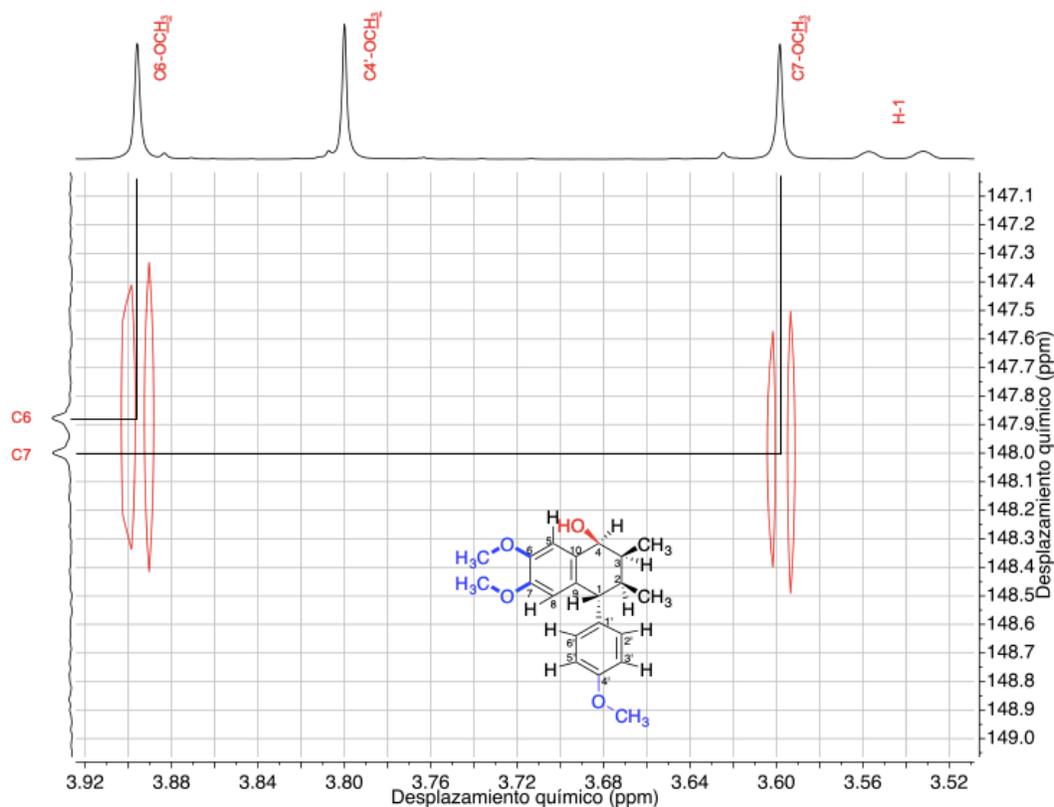


Figura 71. Ampliación (147-149, 3.5-3.9 ppm) de Espectro HMBC (400 MHz, CDCl₃) del Derivado **EC-47**.

Tras este análisis se logró asignar inequívocamente todas las señales observadas en el espectro de RMN ¹³C (Figura 72).

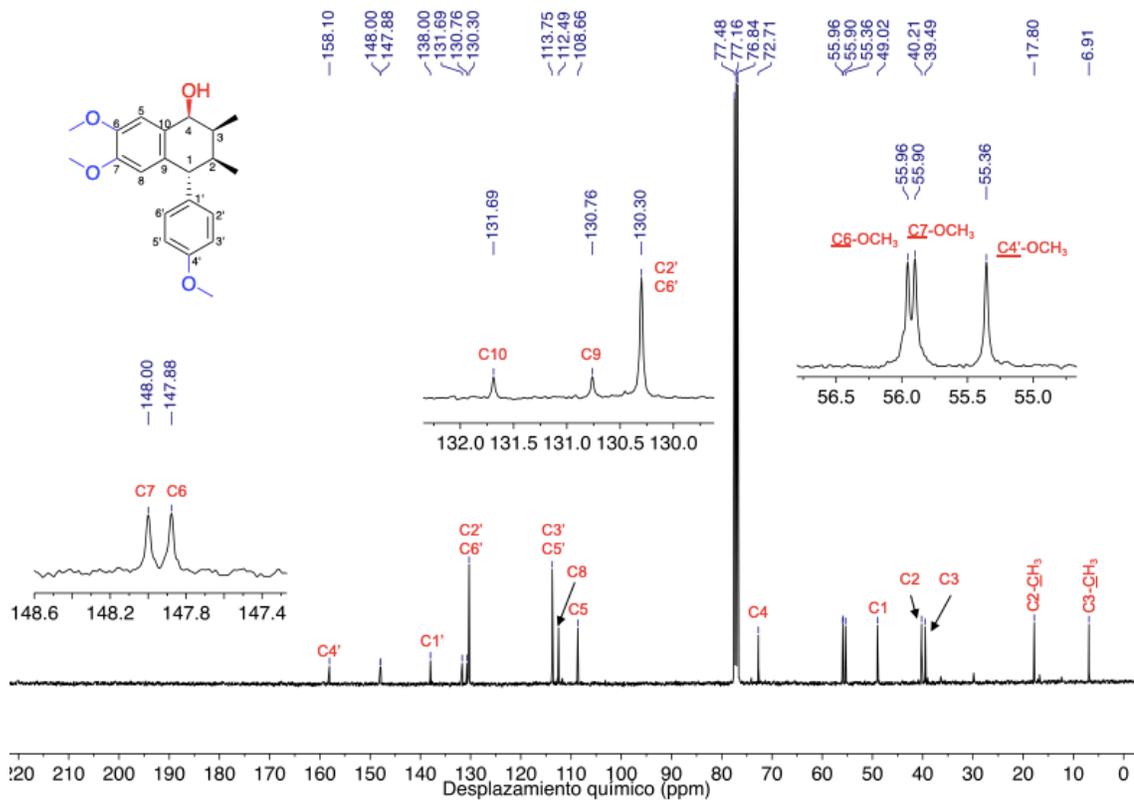


Figura 72. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del Derivado **EC-47**.

Por último, al adquirir el cromatograma del espectro de masas de alta resolución de este derivado, se observó un pico base a m/z 325 y no el ion molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ a 343 esperado, aun aumentando gradualmente la temperatura de ionización de 50 a 300 °C, lo que confirma que con esta técnica la molécula fue fácilmente deshidratada para obtener el pico base a m/z $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ 325.17904 en el espectro de masas de alta resolución.

5.7 Síntesis del Derivado Oxima EC-41 por Adición Nucleofílica

Para obtener el producto imina de hidroxilamina (oxima) se probó primero con 2.15 eq de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, en MeOH:piridina en proporción 1:1 a reflujo (110 °C) por 3 h, lo que permitió obtener el derivado oxima **EC-41** en un 78% de rendimiento. En un segundo y último experimento, se aumentó a 2.3 eq de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ y se dejó progresando la reacción hasta 4.5 h, obteniendo un aumento de reacción casi cuantitativo de 93%.

5.7.1 Elucidación Estructural del Derivado **EC-41**

En el espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) (Figura **73**) se observan dos singuletes en la región aromática a δ 7.42 y 6.14 ppm de los hidrógenos H-5 y H-8, respectivamente. En esta misma región también aparecen dos señales dobles a δ 7.03 y 6.85 ppm con constantes de acoplamiento *orto*- $J = 8.7$ y 8.7 Hz correspondientes a los hidrógenos H-2', H-6' y H-3', H-5' del sistema AA'BB' del anillo aromático *para*-disustituido, respectivamente. A continuación, en la región de δ 3.9-3.57 ppm se desplazan tres singuletes cada uno integrando para tres hidrógenos de los metoxilos unidos a C6, C4' y C7 y, en esta misma zona a δ 3.69-3.64 y 3.63-3.60 ppm, se observan dos multipletes que integran para un hidrógeno cada uno de los metinos H-1 y H-3 del ciclohexeno, en ese orden. Posteriormente a δ 2.18 ppm aparece otro multiplete que integra para un hidrógeno del metino H-2, luego se observan dos señales dobles a δ 1.1 y 0.84

ppm integrando cada uno para tres hidrógenos de los metilos unidos a los carbonos C3 y C2 del ciclohexeno, respectivamente.

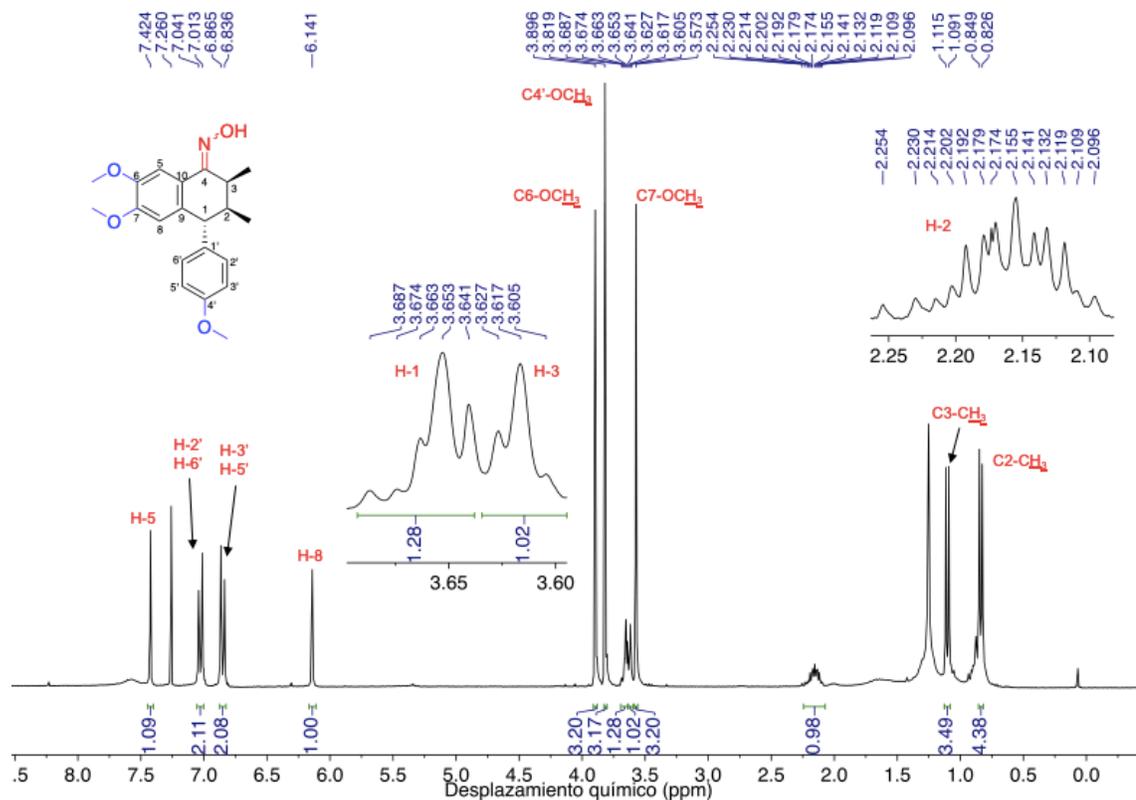


Figura 73. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del Derivado **EC-41**.

En el espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) ya no se observa el carbono a δ 200 ppm del carbonilo de la materia prima EC-18, sino que ahora aparece desplazado a δ 160.6 ppm, confirmando la formación del grupo funcional imina $\text{C}=\text{N}$. En la región aromática aparecen también un total de 6 carbonos cuaternarios, también las señales de los carbonos equivalentes C2', C6' y C3', C5' del anillo aromático *para*-disustituido a δ 130.4 y 114.0 ppm, respectivamente y además las señales de los carbonos terciarios C8 y C5 a δ 112.0 y 105.8 ppm, en ese orden. En la región alifática aparecen en el rango de δ 55.9-55.4 ppm las

señales correspondientes a los carbonos de los tres metoxilos de la molécula, posteriormente a δ 47.4, 39.0 y 32.0 ppm se observan las señales correspondientes a los carbonos C1, C2 y C3 del ciclohexeno, en ese orden y, finalmente, se desplazan a δ 17.1 y 9.8 ppm las señales correspondientes a los metilos unidos a C3 y C2, respectivamente. Estos datos espectroscópicos apoyan la estructura propuesta, siendo la primera vez que se reporta.

5.8 Síntesis del Derivado **EC-49** por Acetilación

Para optimizar esta reacción solo se llevó a cabo un experimento, en el cual se utilizaron inicialmente 4 eq de Ac_2O y 5 mol% de DMAP en piridina a 25 °C. Tras 3 horas de reacción se observó en CCF tanto la materia prima **EC-41** (derivado oxima) como el producto *O*-acetilado EC-49, por lo que se adicionaron 2 eq más de Ac_2O , sin observar progreso 6 horas de haber iniciado la reacción, obteniendo al final un 12% de rendimiento y recuperando un 70% de materia prima.

5.8.1 Elucidación Estructural del Derivado **EC-49**

Como primer reporte de **EC-49**, en el espectro de RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3) (Figura 74) se observan a campo bajo dos señales simples a δ 7.6 y 6.16 ppm de los hidrógenos aromáticos H-5 y H-8, respectivamente y, en esta misma zona, resuenan a δ 7.01 y 6.86 ppm ambos con J_{orto} 8.4 Hz, dos dobletes de los hidrógenos H-3', H-5' y H-2', H-6' del sistema AA'BB' del anillo aromático *para*-

disustituidos. A continuación, en la región de δ 3.92-3.58 ppm aparecen tres singuletes que integran para tres hidrógenos cada uno, asignados a los hidrógenos de los tres metoxilos de la molécula unidos a C6, C4' y C7; en esta misma zona resuena a δ 3.63 ppm un doblete atribuido al metino H-1. A δ 3.53 ppm se observa una señal de cuarteto de doblete del metino H-3 con $J_{H3-CH3} = 7.4$ y $J_{H3-H2} = 4.2$ Hz. Posteriormente, se aprecia un singulete a δ 2.89 ppm que integra para tres hidrógenos del metilo del grupo acetilo incorporado a la molécula; enseguida resuena un multiplete a δ 2.20-2.16 ppm atribuido al metino H-2 y, a campo más alto, se desplazan a δ 1.12 y 0.85 ppm dos dobletes que integran para tres hidrógenos cada uno de los metilos unidos a los carbonos C3 y C2 del ciclohexeno.

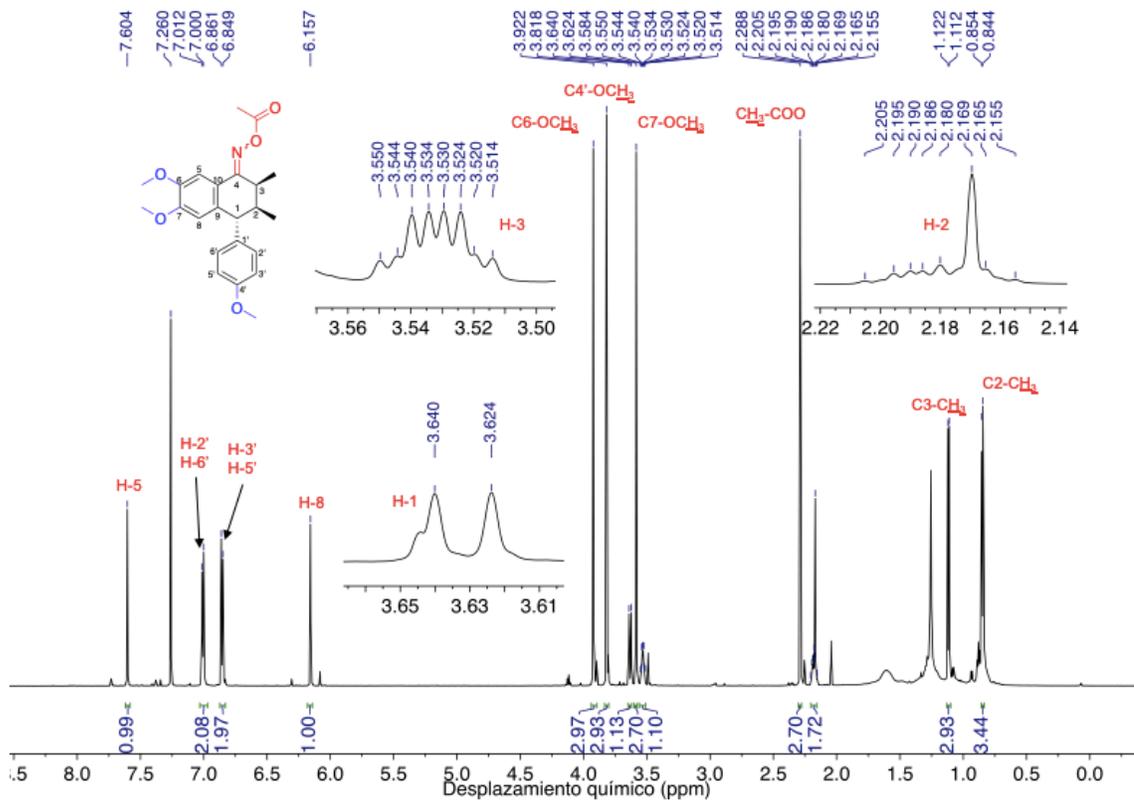


Figura 74. Espectro de RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3) del Derivado **EC-49**.

En el espectro de RMN ^{13}C aparecen, a diferencia del espectro para la materia prima EC-41, dos carbonos extra que se desplazan a δ 169.5 y 20.1 ppm, que corresponden al carbonilo y metilo del grupo acetilo incorporado a la molécula.

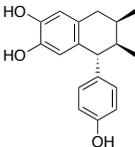
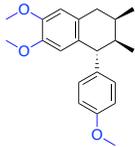
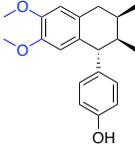
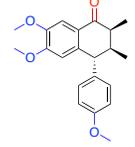
5.9 Determinación de la Actividad Biológica de Ariltetralinas

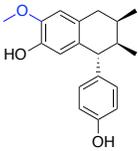
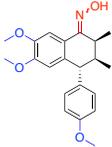
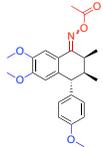
5.9.1 Rastreo de Actividad Citotóxica

Algunas de las ariltetralinas de este proyecto se sometieron a un rastreo de actividad citotóxica a 25 μM mediante el ensayo de SRB (TABLA 14).

TABLA 14

Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Celular a 25 μ M

% de inhibición del crecimiento por línea celular							
Muestra	U-251	PC-3	K-562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS-7
 LT8	5.09	49.0	44.54	4.15	NC	13.86	12.12
 EC-01	13.51	23.49	31.96	NC	2.4	37.96	7.29
 EC-04	16.6	11.3	73.18	22.47	NC	20.99	24.32
 EC-18	7.74	11.9	8.99	NC	12.3	32.91	18.52

 EC-28	5.0	19.16	25.0	NC	NC	13.39	11.18
 EC-41	1.4	18.11	53.2	11.0	7.3	22.29	29.07
 EC-47	8.9	16.56	27.45	NC	12.4	19.25	4.34
Etopósido	92.17	29.28	93.71	74.19	68.2	96.4	82.39

U251: glioblastoma humano; PC-3: adenocarcinoma de próstata humano; K-562: leucemia mieloide crónica humana; HCT-15: adenocarcinoma colorrectal humano en estadio C de Dukes; MCF-7: adenocarcinoma mamario humano; SKLU-1: adenocarcinoma de pulmón humano; COS-7: células de riñón de mono verde africano transformadas con SV40.

Se aplicó la prueba de Anderson-Darling para determinar si los valores obtenidos siguen una distribución normal debido a que, para realizar posteriormente pruebas paramétricas como ANOVA o *t*-student, se requiere una distribución normal de datos. Se utilizó el software Minitab para llevar a cabo la prueba de normalidad de Anderson-Darling con una significancia estadística de 0.05, que plantea las siguientes hipótesis:

H_0 = la distribución de los datos no es distinta a la distribución normal.

H_a = la distribución de los datos es distinta a la distribución normal.

Se obtuvo el siguiente gráfico:

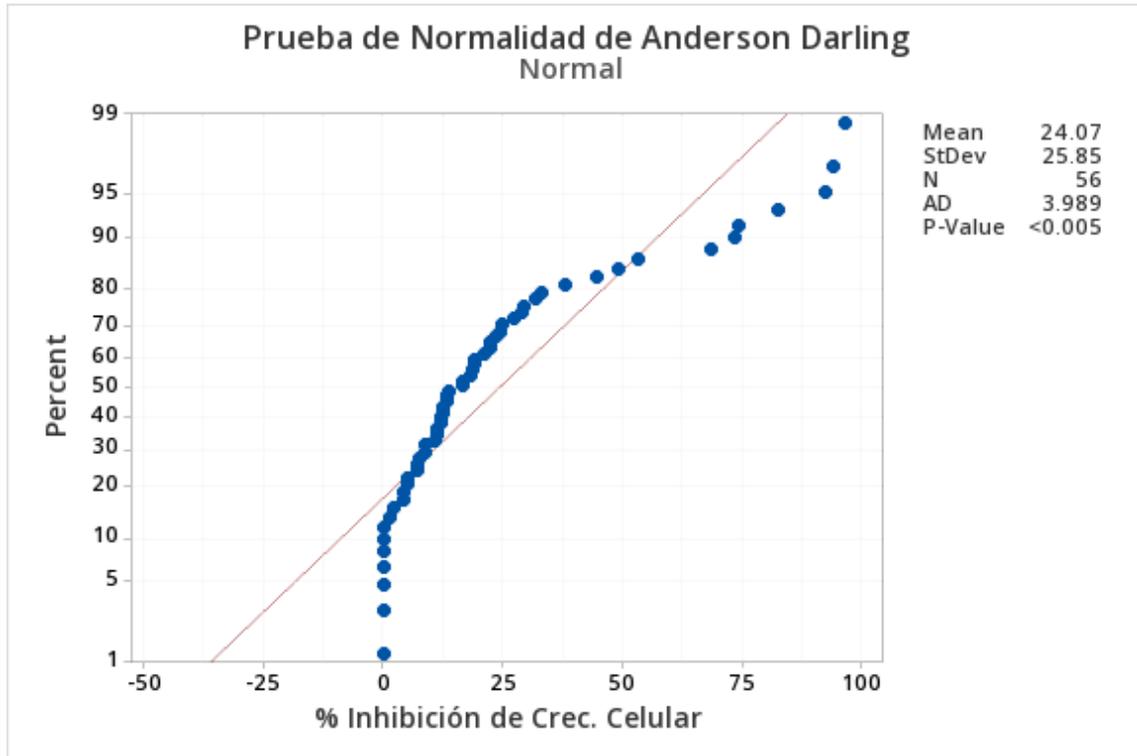


Figura 75. Prueba de Normalidad de Anderson-Darling.

Como el valor de p es menor al 0.05 de significancia estadística, se rechaza la H_0 y se concluye que los datos no siguen una distribución normal. Por lo tanto, no se pueden usar pruebas paramétricas para el análisis de dichos datos.

A continuación, se realizó una prueba de Friedman, que es una alternativa no paramétrica de la prueba ANOVA de dos factores, pues la TABLA 14 contiene datos dependientes de dos factores: la línea celular y la molécula ensayada. Esta

prueba se utiliza para determinar si la mediana del efecto del tratamiento difiere en un diseño de bloques aleatorizado (no se comparan medias porque la distribución de datos no es normal). En este proyecto, se desea evaluar la mediana del efecto citotóxico de las 8 moléculas en 7 líneas celulares. Los bloques entonces son un grupo de ensayos que se llevan a cabo en condiciones constantes, cuando se representan los efectos de la variable de bloque, el efecto del tratamiento se puede evaluar con mayor precisión.

Como las moléculas son la variable de tratamiento que constituye el principal interés de estudio y se desea analizar si existen diferencias entre ellas, se ingresaron los datos en el software Minitab de la siguiente manera: en “tratamiento” se introdujeron las moléculas ensayadas, en “respuesta” la columna de los valores de % de inhibición de crecimiento celular, y en “bloques” la columna de líneas celulares, arrojando la siguiente información:

Method

Treatment = Molécula

Block = Línea celular

Descriptive Statistics

Molécula	N	Median	Sum of Ranks
EC-01	7	16.1594	31.5
EC-04	7	21.7069	34.0
EC-18	7	14.7106	26.5
EC-28	7	11.3944	17.5
EC-41	7	20.5094	34.0
EC-47	7	12.7856	24.5
Etopósido	7	82.1756	55.0
LT8	7	13.8831	29.0
Overall	56	24.1656	

Test

Null hypothesis H_0 : All treatment effects are zero

Alternative hypothesis H_1 : Not all treatment effects are zero

Method	DF	Chi-Square	P-Value
Not adjusted for ties	7	20.02	0.006
Adjusted for ties	7	20.51	0.005

Figura 76. Prueba de Friedman con Líneas Celulares como Bloques.

Para determinar si cualquiera de las diferencias entre las medianas de las moléculas es estadísticamente significativa, se compara el valor p con el nivel de significancia para evaluar la hipótesis nula (0.05). La hipótesis nula indica que las medias de población son todas iguales. Un nivel de significancia de 0.05 indica un riesgo de 5% de concluir que existe una diferencia cuando no hay una diferencia real.

Si el valor p es menor que o igual al nivel de significancia, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que no todas las medianas de las moléculas son

iguales. En este caso, al ser p menor que 0.05, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que algunas medianas de las moléculas son distintas.

Es importante mencionar que esta diferencia en las medianas es atribuida principalmente al etopósido y, para comparar los derivados semisintéticos respecto a **LT8**, se prescinde de etopósido para hacer la nueva comparativa, que se muestra en la siguiente figura:

Method

Treatment = Molécula
Block = Línea celular

Descriptive Statistics

Molécula	N	Median	Sum of Ranks
EC-01	7	15.8529	31.5
EC-04	7	21.0886	34.0
EC-18	7	13.9214	26.5
EC-28	7	11.1800	17.5
EC-41	7	20.1243	34.0
EC-47	7	13.1957	24.5
LT8	7	13.8571	28.0
Overall	49	15.6029	

Test

Null hypothesis H_0 : All treatment effects are zero
Alternative hypothesis H_1 : Not all treatment effects are zero

Method	DF	Chi-Square	P-Value
Not adjusted for ties	6	6.40	0.380
Adjusted for ties	6	6.63	0.356

Figura 77. Prueba de Friedman sin Etopósido con Líneas Celulares como Bloques.

Ahora la p calculada es mayor a la significancia de 0.05, no hay evidencia suficiente que permita rechazar la H_0 y se concluye que las medianas de las

moléculas son iguales, es decir, no se puede afirmar que alguna de ellas sea distinta a **LT8**. No es conveniente realizar pruebas pareadas no paramétricas de comparación porque en principio no se encontraron diferencias significativas en la prueba de Friedman con líneas celulares como bloques.

Para conocer la diferencia de respuesta de las líneas celulares, se realiza de nuevo la prueba de Friedman, ahora tomando a las moléculas como bloques y comparar las medianas entre líneas celulares. Utilizando Minitab para esto, se obtuvieron los siguientes resultados:

Method

Treatment = Línea celular
Block = Molécula

Descriptive Statistics

Línea celular	N	Median	Sum of Ranks
COS-7	8	13.0550	35.0
HCT-15	8	3.5136	17.5
K-562	8	31.0250	49.0
MCF-7	8	3.2171	18.5
PC-3	8	16.5179	34.0
SKLU-1	8	20.8964	46.0
U-251	8	9.2300	24.0
Overall	56	13.9221	

Test

Null hypothesis H_0 : All treatment effects are zero
Alternative hypothesis H_1 : Not all treatment effects are zero

Method	DF	Chi-Square	P-Value
Not adjusted for ties	6	25.57	0.000
Adjusted for ties	6	25.62	0.000

Figura 78. Prueba de Friedman con Moléculas como Bloques.

Como la p calculada es menor al nivel de significancia de 0.05, se rechaza la H_0 , por lo que se concluye que algunas de las líneas celulares son significativamente distintas entre sí.

Globalmente, ningún compuesto evaluado mostró mayor actividad citotóxica que etopósido que se utilizó como control positivo. Además, se observa poca o nula actividad citotóxica en la línea celular HCT-15 para todos los compuestos evaluados, excepto para **EC-04** con un 22.47% de inhibición de crecimiento celular, el cual es más alto que el 4.15% observado para **LT8**. Respecto a los efectos sobre las estirpes de MCF-7 y U-251, tampoco se observó una actividad citotóxica considerable para ninguna de las moléculas evaluadas y, para la línea celular de PC-3, ningún derivado semisintético fue más citotóxico que el producto natural **LT8**.

Las diferencias más notorias se observaron en las líneas celulares K-562 y SKLU-1. En la primera los derivados **EC-04** y **EC-41** presentan un % de inhibición de crecimiento celular de 73.18 y 53.2%, respectivamente, superando al 44.54% observado para **LT8**. En la estirpe SKLU-1 también aparece el derivado **EC-01** como el compuesto semisintético más citotóxico (37.96%), seguido de **EC-18** (32.91%), ambos superando el porcentaje observado para **LT8** (13.86%). Finalmente, se destacan los derivados **EC-04** y **EC-41** al mostrar un 24.32% y 29.07% de inhibición de crecimiento celular, respectivamente en la línea normal COS-7, respecto al 73% y 53.2% observados para K-562, en ese orden.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

1. Se determinó la configuración absoluta de (1*R*,2*R*,3*R*)-3'-desmetoxi-6-*O*-desmetil isoguaiacina a partir de los datos cristalográficos por difracción de rayos X y del espectro de dicroísmo circular obtenidos del derivado **EC-01**.
2. Se obtuvieron 5 isómeros constitucionales de posición *mono*- y *di*-metilados por metilación parcial de **LT8** y el derivado **EC-01** trimetilado en un 92%.
3. Se semisintetizaron 14 moléculas a partir de **LT8**, 4 de ellas C(4)-funcionalizadas.
4. De las 14 moléculas obtenidas, 10 son reportadas por primera vez en esta investigación.

5. La obtención de los derivados naftalénicos **EC-09**, **EC-12** y **EC-16** permitió confirmar la mayor estabilidad del intermediario carbocatión o radical dibencílico a altas temperaturas o radiación con luz blanca.
6. Se propuso el mecanismo de reacción que sigue la oxidación bencílica de **EC-01** con Oxone/KI irradiada con luz blanca a partir de la purificación de los subproductos **EC-27** y **EC-12**, ocurriendo simultáneamente una sustitución nucleofílica unimolecular y eliminación E1.
7. Se llevó a cabo la reducción estereoselectiva del grupo carbonilo del derivado **EC-18** con LiAlH_4 con un rendimiento de 54%, comprobando los factores estéricos involucrados en ambas caras del carbonilo.
8. Se logró la adición nucleofílica al carbonilo **EC-18** con $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, siendo un nucleófilo pequeño, a pesar del impedimento estérico atribuible a los metilos unidos a C2 y C3 en β , para sintetizar la imina **EC-41**.
9. Se llevó a cabo la acetilación del derivado oxima **EC-41** con Ac_2O y DMAP para obtener el derivado **EC-49** en un 12% y recuperando un 70% de materia prima, por lo que se proponen nuevos experimentos utilizando cloruro de acetilo que, al ser más reactivo que el anhídrido, favorecería la esterificación.

10. Estadísticamente, se rechaza la hipótesis alternativa de este proyecto que establece que al menos uno de los derivados semisintéticos presentará mayor actividad citotóxica respecto a etopósido y/o **LT8** frente a alguna de las líneas celulares evaluadas.
11. Los derivados **EC-04** y **EC-41** presentan un % de inhibición de crecimiento celular de 73.18 y 53.2%, respectivamente, superando al 44.54% observado para **LT8**, y exhiben un 24.32% y 29.07% de inhibición de crecimiento celular, respectivamente en la línea normal COS-7, lo que demuestra cierta selectividad de estas moléculas frente a líneas celulares cancerosas, posicionándolas como los compuestos más promisorios de esta investigación.

CAPÍTULO 7

REFERENCIAS

- [1] WHO, “Cancer,” 2018. [Online]. Available: <http://www.who.int/topics/cancer/en/>. [Accessed: 26-Sep-2018].
- [2] J. L. Schwartz, “Physical Causes of Cancer,” in *The Cancer Handbook*, 2nd ed., M. R. Alison, Ed. Wiley, 2007, p. 1616.
- [3] World Health Organization, *World Health Statistics 2018- Monitoring Health for the SDG’s (Sustainable development goals)*. Luxembourg, 2018.
- [4] GLOBOCAN, “All Cancers Fact Sheet,” 2018.
- [5] International Agency for Research on Cancer, “Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9 .6 million cancer deaths in 2018,” 2018.
- [6] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, “Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 1, pp. 7–30, Jan. 2018.
- [7] GLOBOCAN, “Cancer Tomorrow,” 2018. [Online]. Available: <http://gco.iarc.fr/tomorrow/home>. [Accessed: 26-Sep-2016].
- [8] GLOBOCAN, “Estimated number of incident cases and deaths worldwide, both sexes, all ages.”
- [9] Instituto Nacional de Estadística y Geografía, “Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupo de edad y sexo del fallecido,” 2016.
- [10] GLOBOCAN, “Mexico Cancer Fact sheet,” 2018.
- [11] GLOBOCAN, “Estimated number of incident cases and deaths Mexico, both sexes, all ages,” 2018.
- [12] L. Brunton and J. Lazo, *Goodman & Gilman: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, 11a ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 2007.
- [13] J. Harwood and D. Wilkin, “Ciclo Celular,” 2016. [Online]. Available: <https://www.ck12.org/book/ck-12-conceptos-de-ciencias-de-la-vida-grados-6-8-en-español/section/2.18/>. [Accessed: 03-Jun-2020].

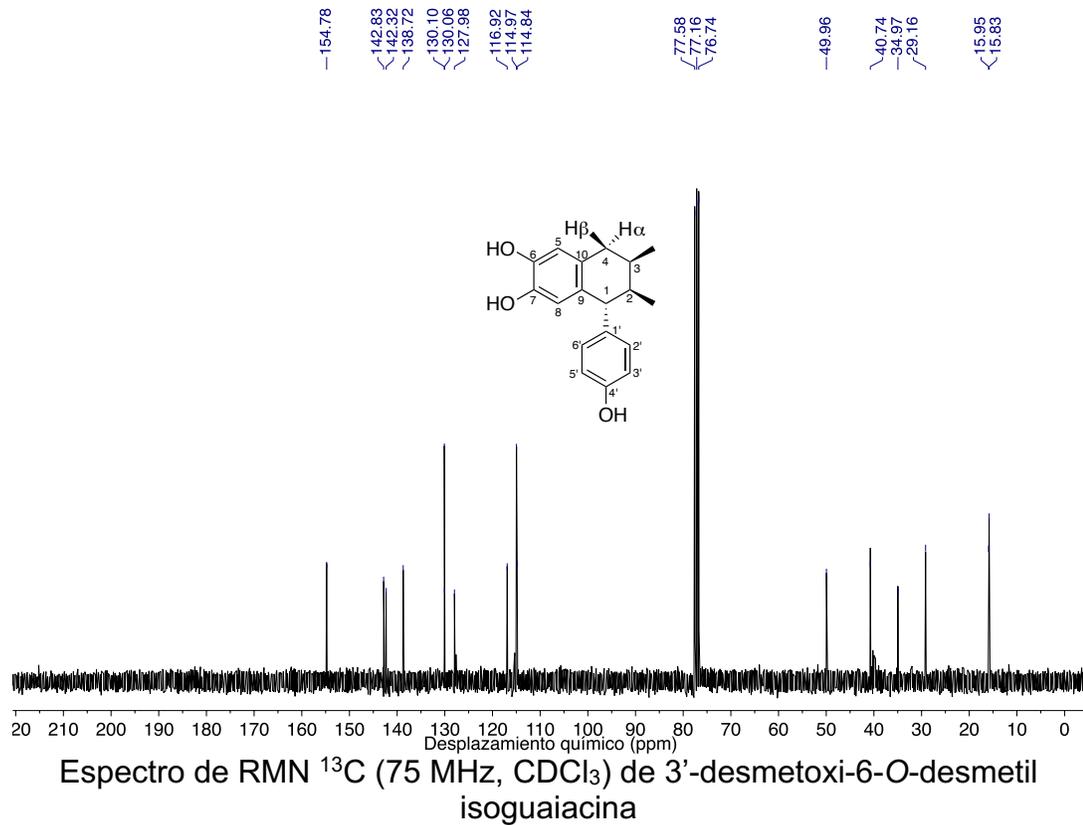
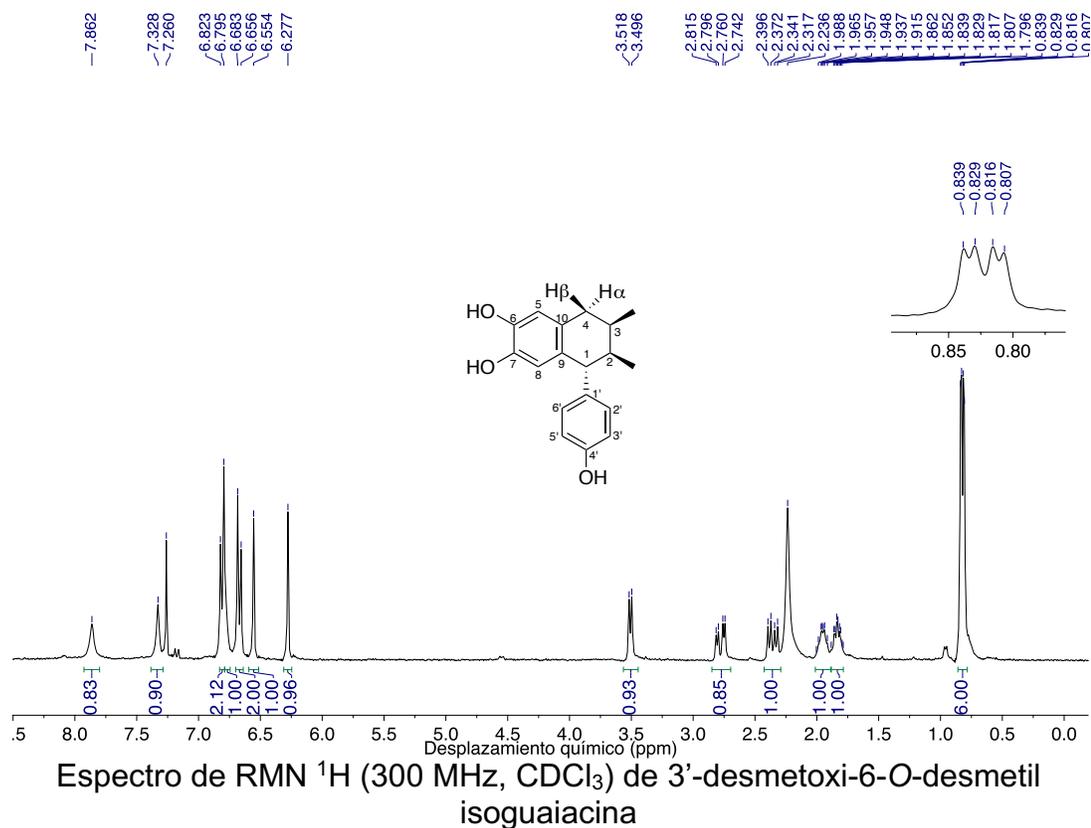
- [14] P. G. Morris and M. N. Fornier, "Microtubule Active Agents: Beyond the Taxane Frontier," *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 22, pp. 7167 LP – 7172, 2008.
- [15] M. A. Jordan and L. Wilson, "Microtubules as a target for anticancer drugs," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, pp. 253–265, Apr. 2004.
- [16] A. Herráez, *Texto Ilustrado e Interactivo de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud.*, 2nd ed. España: Elsevier, 2012.
- [17] M. N. Islam and M. N. Iskander, "Microtubulin Binding Sites as Target for Developing Anticancer Agents," *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 4, no. 10, pp. 1077–1104, 2004.
- [18] R. B. G. Ravelli *et al.*, "Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain," *Nature*, vol. 428, pp. 198–202, Mar. 2004.
- [19] D. L. Sackett, "Podophyllotoxin, steganacin and combretastatin: Natural products that bind at the colchicine site of tubulin," *Pharmacol. Ther.*, vol. 59, no. 2, pp. 163–228, 1993.
- [20] International Union of Pure and Applied Chemistry, "Nomenclature of Lignans and Neolignans (IUPAC Recommendations 2000)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 72, no. 8, pp. 1493–1523, 2000.
- [21] G. Sneath, "Circular Dichroism and Optical Rotatory Dispersion — Principles and Application to the Investigation of the Stereochemistry of Natural Products," *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 7, no. 1, pp. 14–25, Jan. 1968.
- [22] H.-W. Liu and L. Mander, Eds., *Comprehensive Natural Products II. Chemistry and Biology*. Elsevier Ltd, 2010.
- [23] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principios de Análisis instrumental*, 6th ed. Cengage Learning, 2008.
- [24] K. Kakanishi, N. Berova, and R. Woody, Eds., *Circular Dichroism: Principles and Applications*. VCH Publishers, 1994.
- [25] E. L. Eliel and S. H. Wilen, *Stereochemistry of Organic Compounds*. United States: John Wiley & Sons, Inc, 1994.
- [26] N. Harada and K. Nakanishi, "The Exciton Chirality Method and Its Application to Configurational and Conformational Studies of Natural Products," *Acc. Chem. Res.*, vol. 5, no. 8, pp. 257–263, Aug. 1972.
- [27] J. R. Platt, "Classification of Spectra of Cata-Condensed Hydrocarbons," *J. Chem. Phys.*, vol. 17, no. 5, pp. 484–495, May 1949.
- [28] H. E. Smith and L. P. Fontana, "Optically active amines. 35. A sector rule for the circular dichroism of the benzene chromophore," *J. Org. Chem.*, vol. 56, no. 1, pp. 432–435, Jan. 1991.
- [29] L. P. Fontana and H. E. Smith, "Optically active amines. 33. Circular dichroism of substituted phenylcarbinols," *J. Org. Chem.*, vol. 52, no. 15, pp. 3386–3389, Jul. 1987.
- [30] N. Kobayashi, A. Muranaka, and J. Mack, *Circular Dichroism and Magnetic Circular Dichroism Spectroscopy for Organic Chemists*. Royal Society of Chemistry, 2011.
- [31] N. Berova, L. Di Bari, and G. Pescitelli, "Application of electronic circular

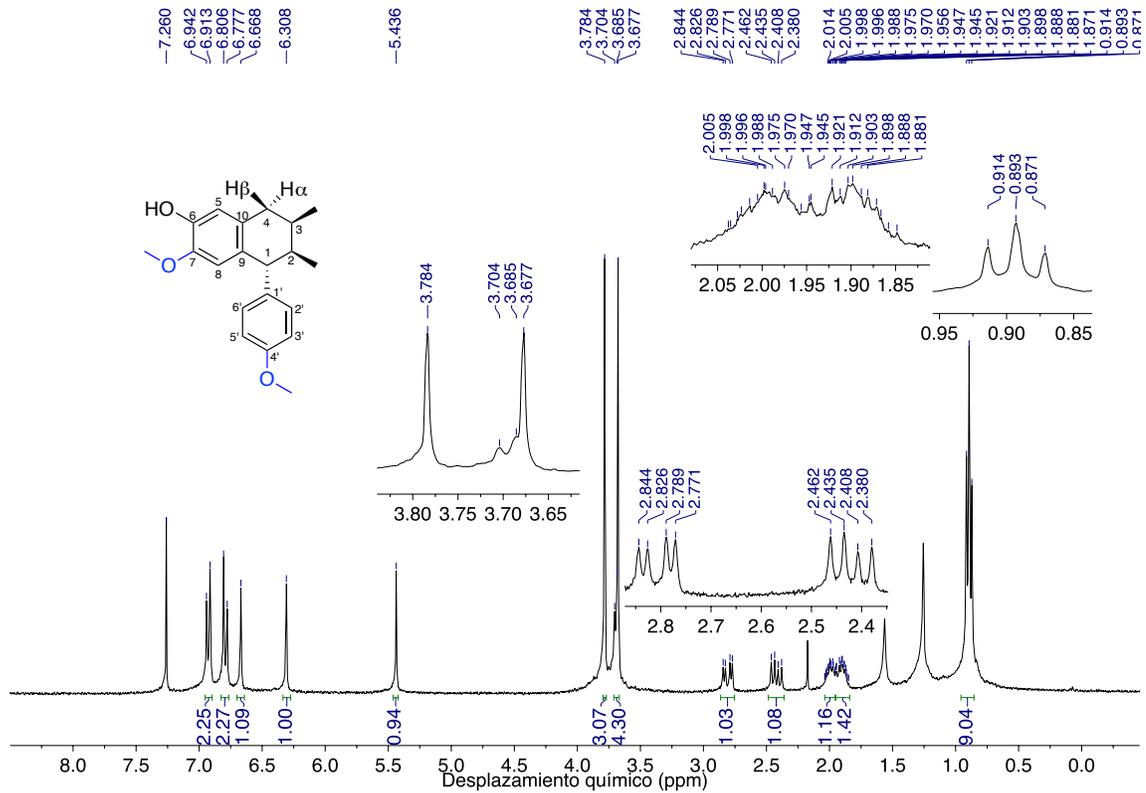
- dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 36, no. 6, pp. 914–931, 2007.
- [32] J. C. Lindon, G. E. Tranter, and J. L. Holmes, Eds., *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 1st ed. Academic Press, 2000.
- [33] M. Antúnez-Mojica *et al.*, "Structural and Biochemical Characterization of the Interaction of Tubulin with Potent Natural Analogues of Podophyllotoxin," *J. Nat. Prod.*, vol. 79, no. 8, pp. 2113–2121, 2016.
- [34] E. Patridge, P. Gareiss, M. S. Kinch, and D. Hoyer, "An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives," *Drug Discov. Today*, vol. 21, no. 2, pp. 204–207, 2016.
- [35] A. Kamal, B. A. Kumar, and M. Arifuddin, "A one-pot, efficient and facile synthesis of 4 β -arylaminopodophyllotoxins: synthesis of NPF and GL-331 as DNA topoisomerase II inhibitors," *Tetrahedron Lett.*, vol. 44, no. 46, pp. 8457–8459, 2003.
- [36] G. M. Cragg, D. G. I. Kingston, and D. J. Newman, *Anticancer agents from natural products*. United States: CRC Press, 2012.
- [37] T. L. Nguyen *et al.*, "A Common Pharmacophore for a Diverse Set of Colchicine Site Inhibitors Using a Structure-Based Approach," *J. Med. Chem.*, vol. 48, no. 19, pp. 6107–6116, Sep. 2005.
- [38] A. M. Wilstermann *et al.*, "Topoisomerase II–Drug Interaction Domains: Identification of Substituents on Etoposide That Interact with the Enzyme," *Biochemistry*, vol. 46, no. 28, pp. 8217–8225, Jul. 2007.
- [39] J. Li, J. Feng, C. Luo, H.-Y. S. Herman, and R.-W. Jiang, "Absolute configuration of podophyllotoxone and its inhibitory activity against human prostate cancer cells," *Chin. J. Nat. Med.*, vol. 13, no. 1, pp. 59–64, 2015.
- [40] X. Xu *et al.*, "Antiproliferation and cell apoptosis inducing bioactivities of constituents from *Dyosma versipellis* in PC3 and Bcap-37 cell lines," *Cell Div.*, vol. 6, no. 1, p. 14, 2011.
- [41] A. Abad *et al.*, "Synthesis and Antimitotic and Tubulin Interaction Profiles of Novel Pinacol Derivatives of Podophyllotoxins," *J. Med. Chem.*, vol. 55, no. 15, pp. 6724–6737, Aug. 2012.
- [42] J. D. Lambert *et al.*, "Cytotoxic lignans from *Larrea tridentata*," *Phytochemistry*, vol. 66, no. 7, pp. 811–815, Apr. 2005.
- [43] J. M. J. Favela-Hernández, A. García, E. Garza-González, V. M. Rivas-Galindo, and M. R. Camacho-Corona, "Antibacterial and Antimycobacterial Lignans and Flavonoids from *Larrea tridentata*," *Phyther. Res.*, vol. 26, no. 12, pp. 1957–1960, Mar. 2012.
- [44] C. Konno *et al.*, "1-Aryl tetralin lignans from *Larrea tridentata*," *J. Nat. Prod.*, vol. 52, no. 5, pp. 1113–1117, 1989.
- [45] F. R. Fronczek, P. Caballero, N. H. Fischer, S. Fernandez, E. Hernandez, and L. M. Hurtado, "The Molecular Structure of 3'-Demethoxynorisoguaiacin Triacetate from Creosote Bush (*Larrea tridentata*)," *J. Nat. Prod.*, vol. 50, no. 3, pp. 497–499, May 1987.
- [46] J. M. D. J. Favela-Hernández, "Aislamiento y Caracterización de los Compuestos Antibacterianos y Antituberculosos de *Larrea tridentata*, Determinación de su Toxicidad y Mecanismo de Acción del Compuesto más Activo," Universidad Autónoma de Nuevo León, 2012.

- [47] G. Núñez Mojica, "Nuevas Aportaciones a la Composición Química y Farmacológica de *Larrea tridentata*," Universidad Autónoma de Nuevo León, 2017.
- [48] J. Gnabre *et al.*, "Characterization of Anti — HIV Lignans," *Tetrahedron*, vol. 51, no. 45, pp. 12203–12210, 1995.
- [49] G. Balacco, "A Desktop Calculator for the Karplus Equation," *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, vol. 36, no. 4, pp. 885–887, Jan. 1996.
- [50] W. Klyne, R. Stevenson, and R. J. Swan, "Optical rotatory dispersion. Part XXVIII. The absolute configuration of otobain and derivatives," *J. Chem. Soc. C Org.*, no. 0, pp. 893–896, 1966.
- [51] D. C. Ayres and J. D. Loike, *Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties*. Cambridge University Press, 1990.
- [52] R. E. Zelle and W. J. McClellan, "A simple, high-yielding method for the methylenation of catechols," *Tetrahedron Lett.*, vol. 32, no. 22, pp. 2461–2464, Nov. 1991.
- [53] K. Moriyama, M. Takemura, and H. Togo, "Direct and selective benzylic oxidation of alkylarenes via C-H abstraction using alkali metal bromides," *Organic Letters*, vol. 14, no. 9, pp. 2414–2417, 2012.
- [54] L. Yin, J. Wu, J. Xiao, and S. Cao, "Oxidation of benzylic methylenes to ketones with Oxone-KBr in aqueous acetonitrile under transition metal free conditions," *Tetrahedron Lett.*, vol. 53, no. 33, pp. 4418–4421, 2012.
- [55] D. R. Lide, Ed., *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 84th ed. CRC Press, 2004.
- [56] A. T. Khan, T. Parvin, L. H. Choudhury, and S. Ghosh, "A simple synthetic protocol for oxidation of alkyl-arenes into ketones using a combination of HBr-H₂O₂," *Tetrahedron Lett.*, vol. 48, no. 13, pp. 2271–2274, 2007.
- [57] H. B. Bürgi, J. D. Dunitz, and E. Shefter, "Geometrical Reaction Coordinates. II. Nucleophilic Addition to a Carbonyl Group," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 95, no. 15, pp. 5065–5067, 1973.
- [58] P. Yurkanis Bruice, *Organic Chemistry*, 4th ed. Prentice Hall, 2003.

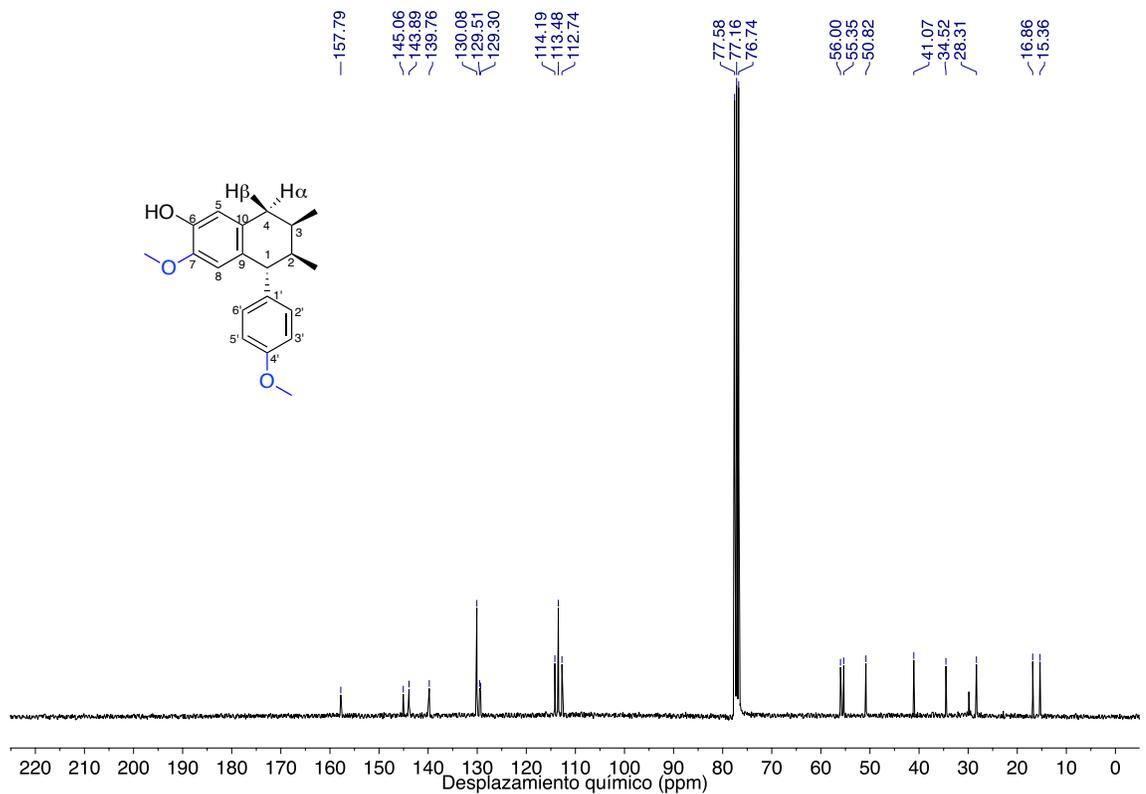
APÉNDICE

Espectroscopía de Infrarrojo, RMN ^1H y ^{13}C , y Dicroísmo Circular.

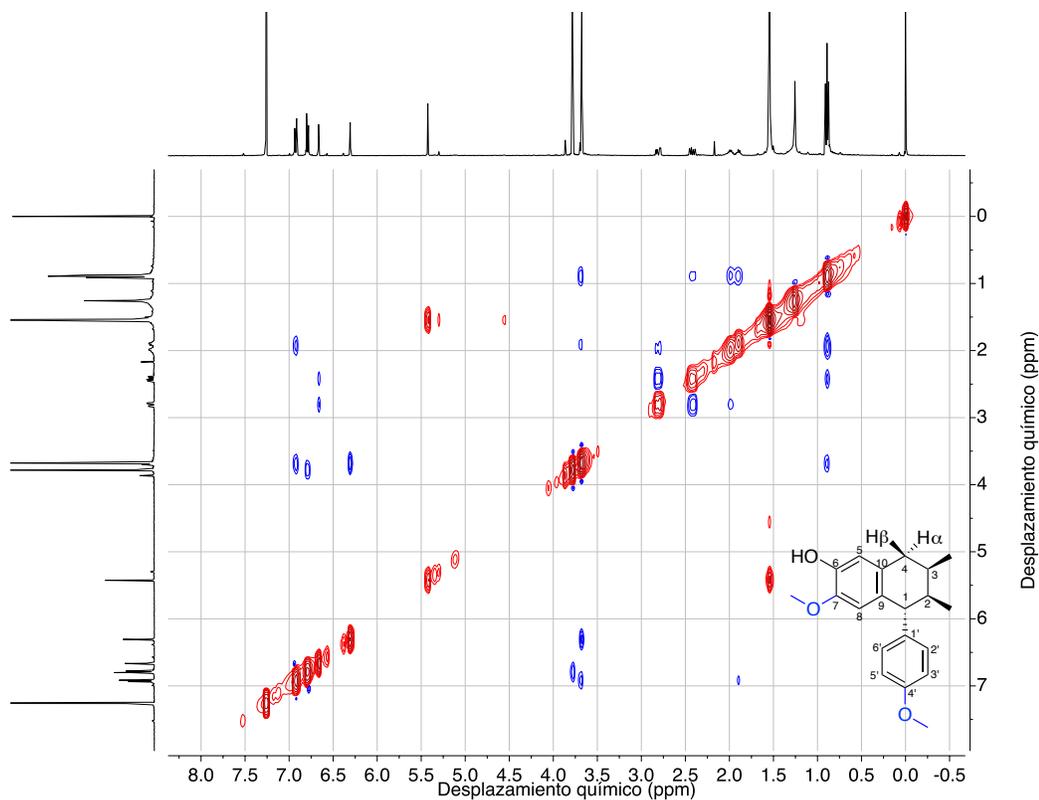




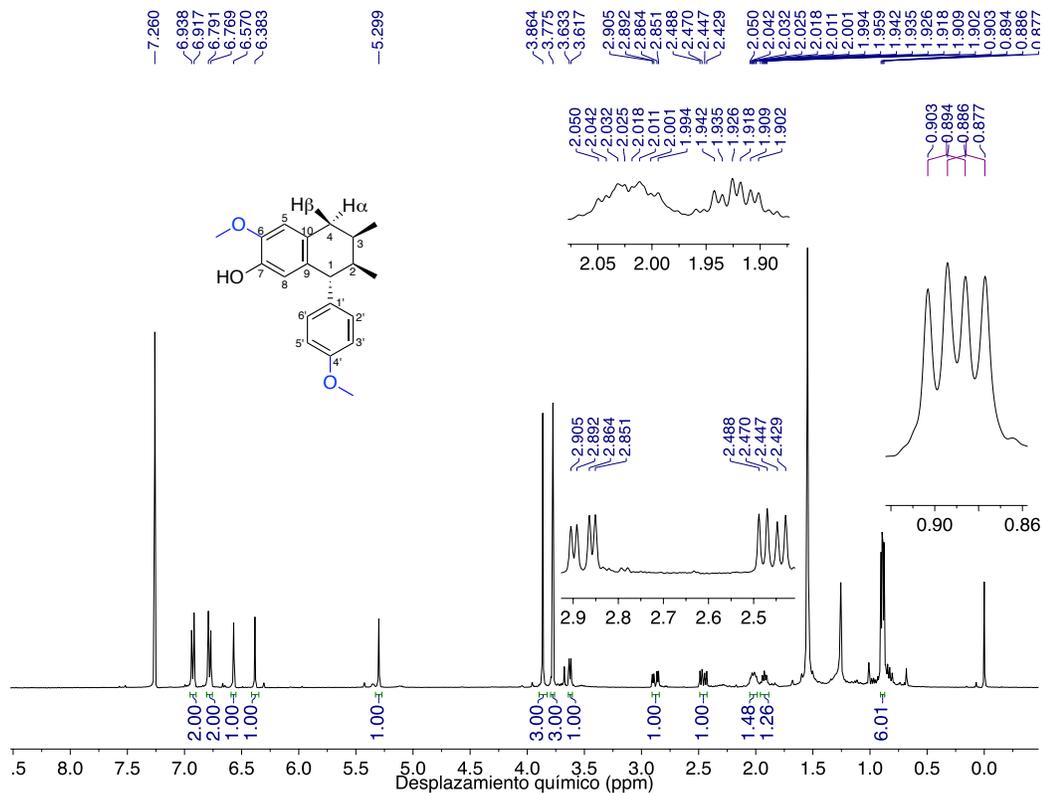
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de EC-02.



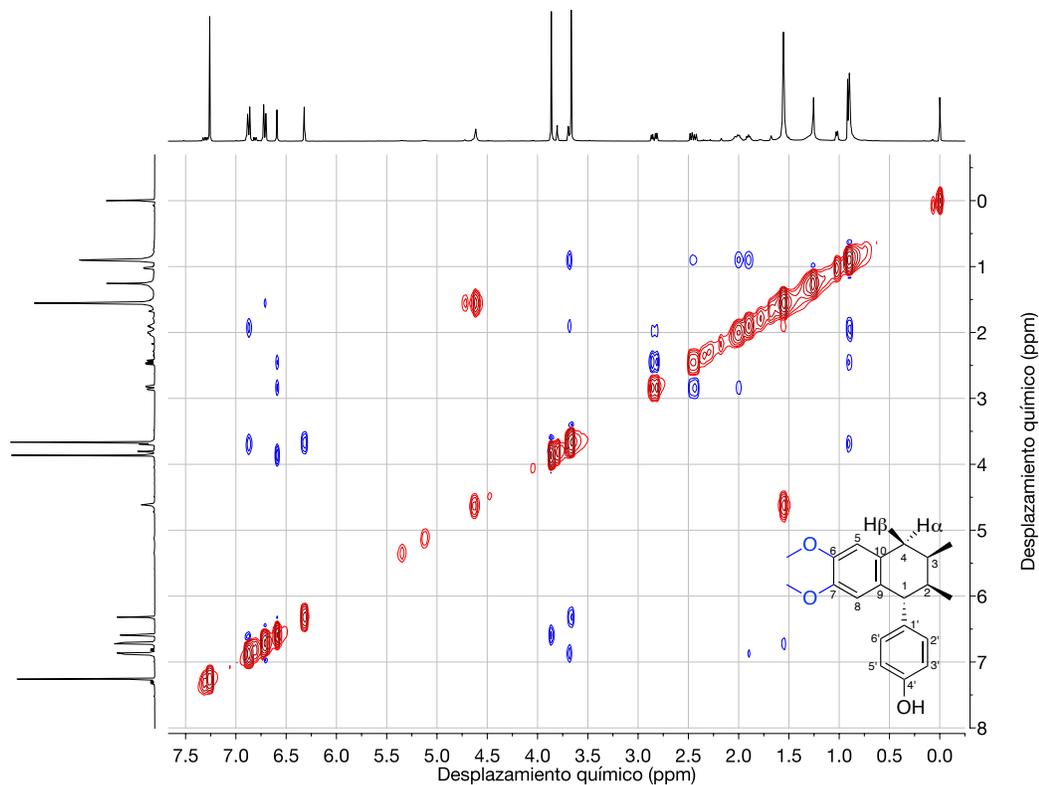
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de EC-02.



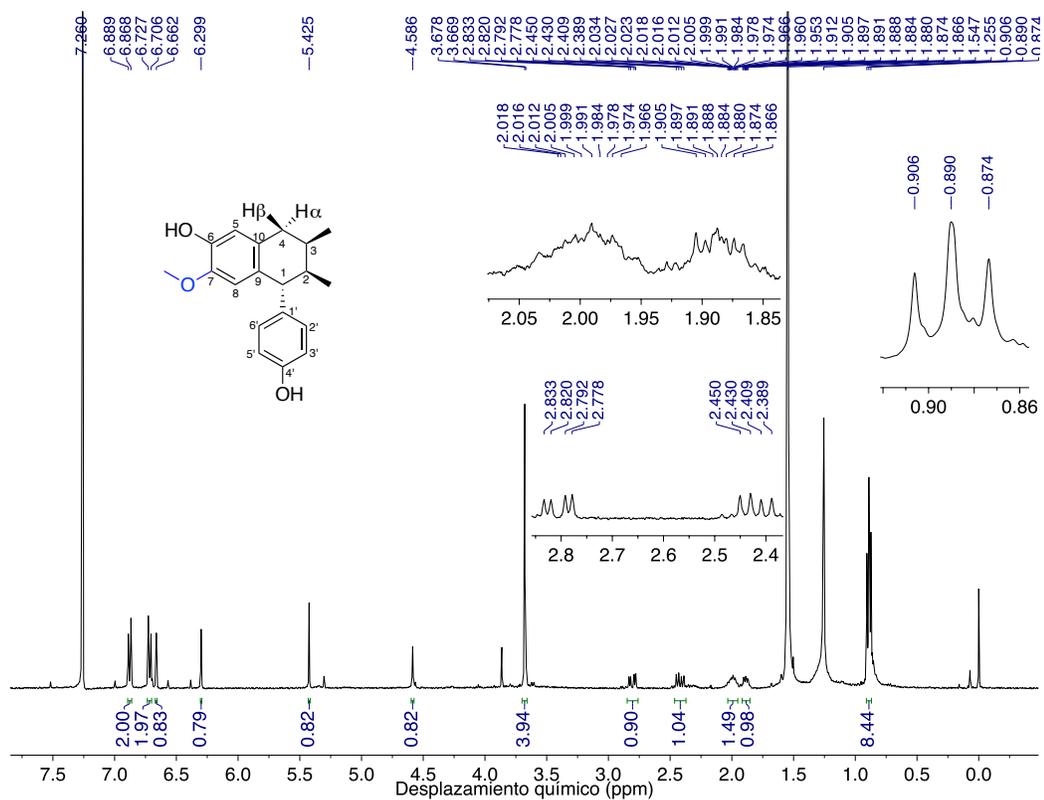
Espectro NOESY (400 MHz, CDCl_3) de EC-02.



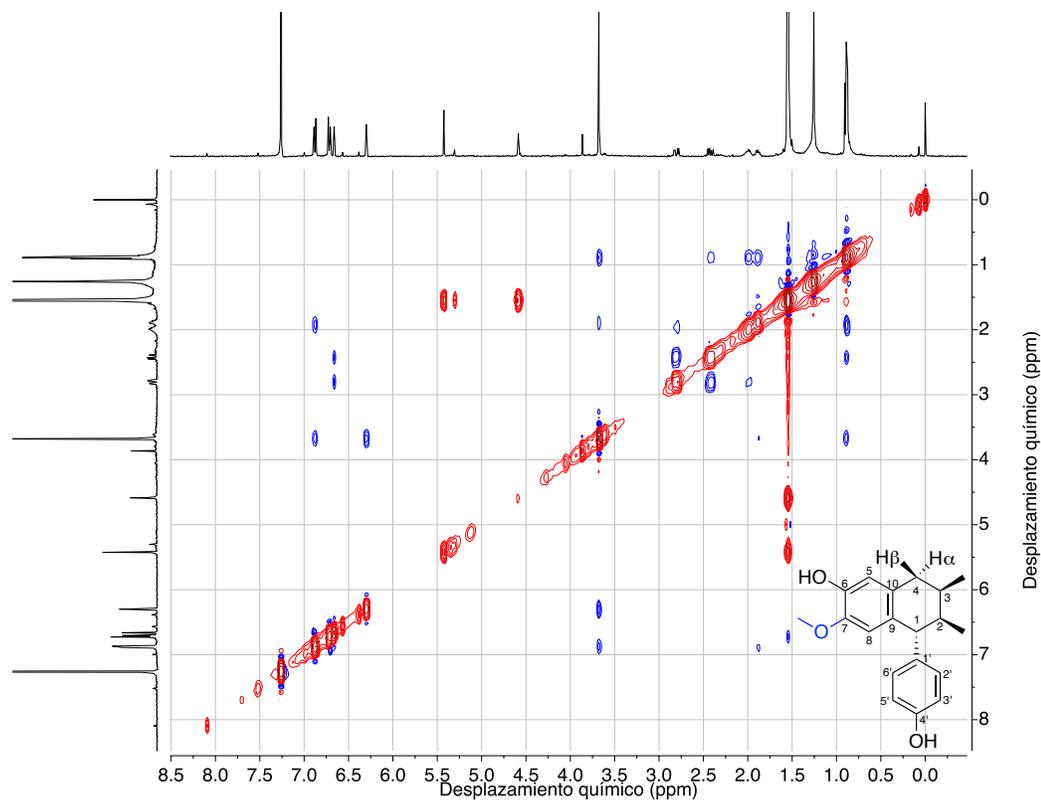
Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de EC-03.



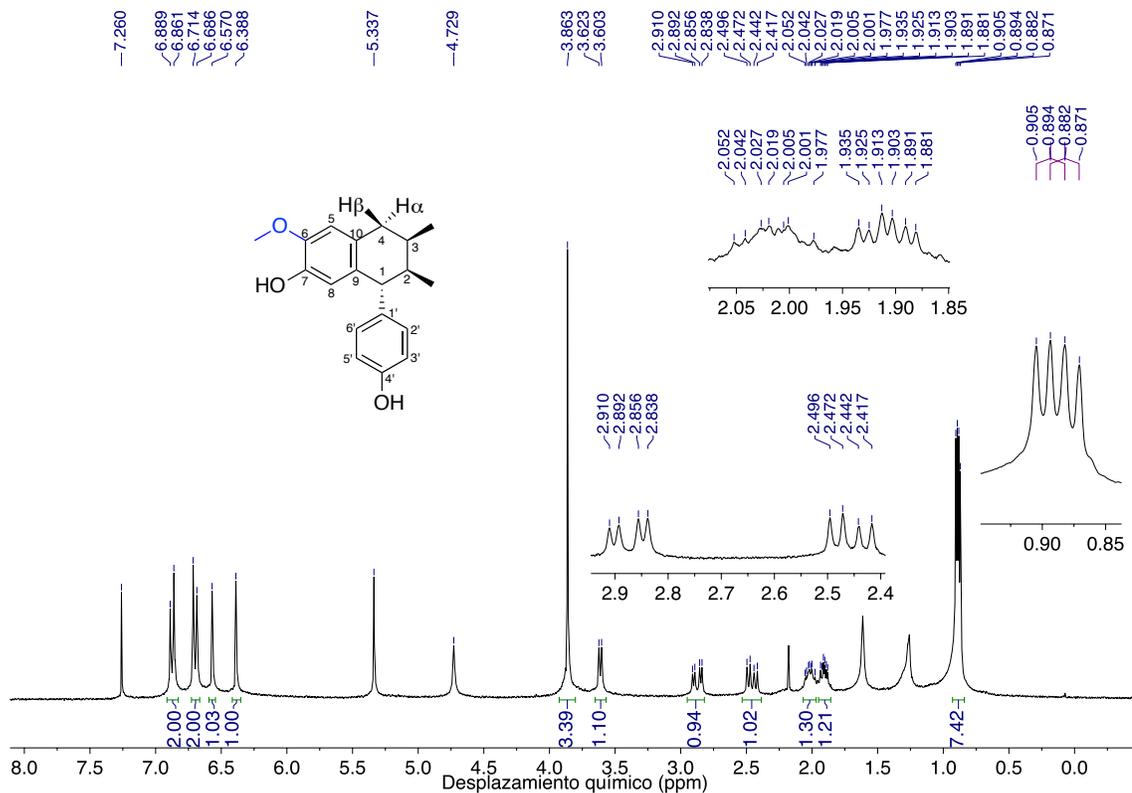
Espectro NOESY (400 MHz, CDCl₃) de EC-04.



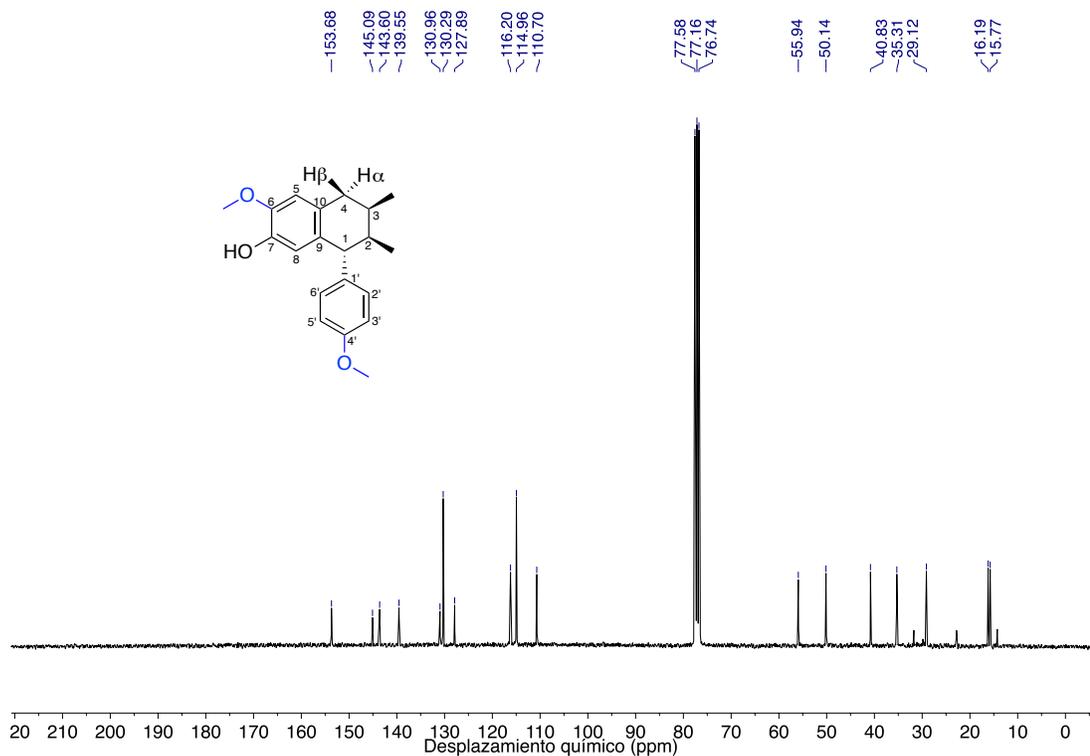
Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de 3'-desmetoxi isoguaiacina.



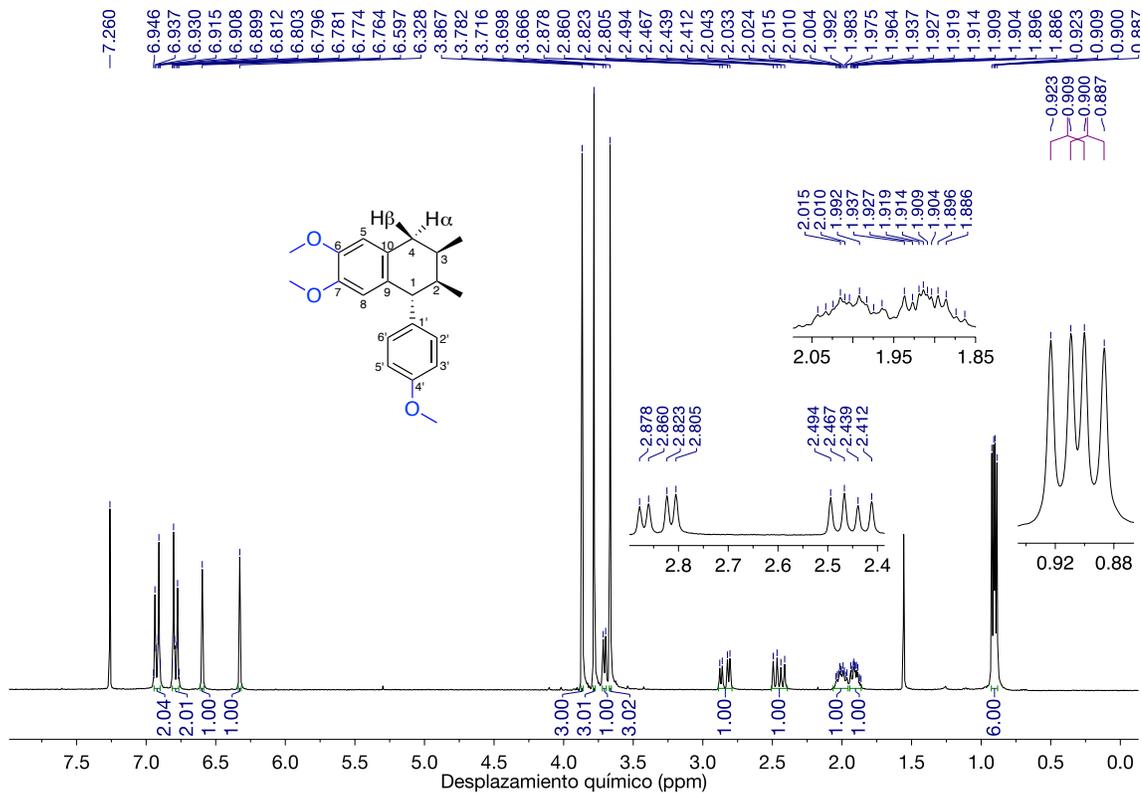
Espectro NOESY (400 MHz, CDCl₃) de 3'-desmetoxi isoguaiacina.



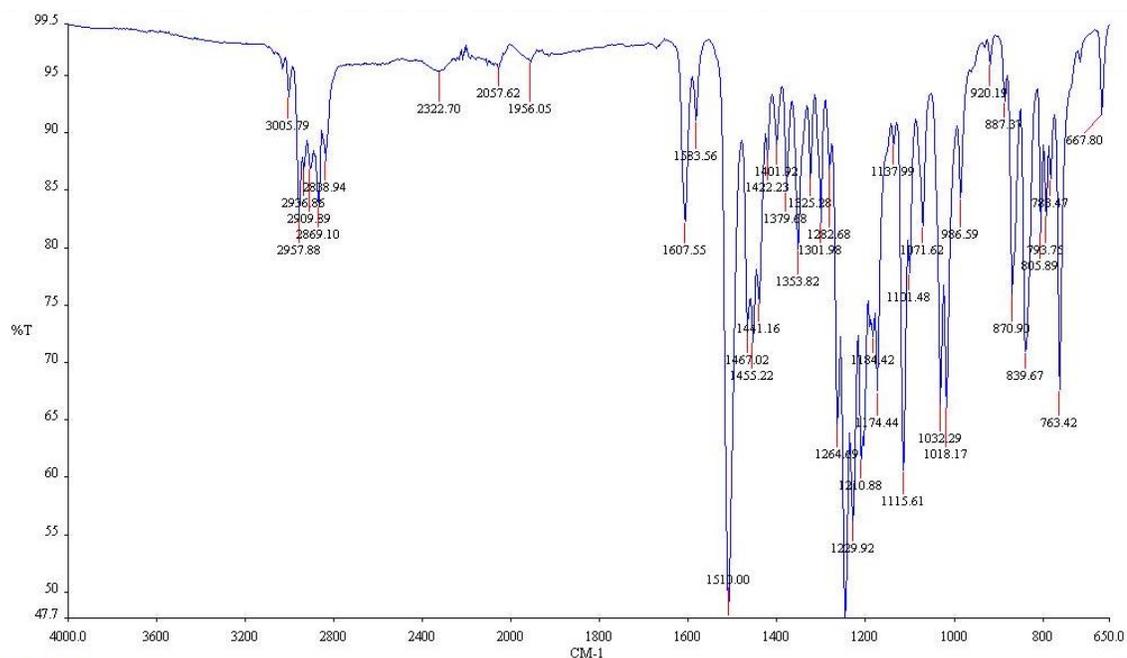
Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) del Subproducto EC-28.



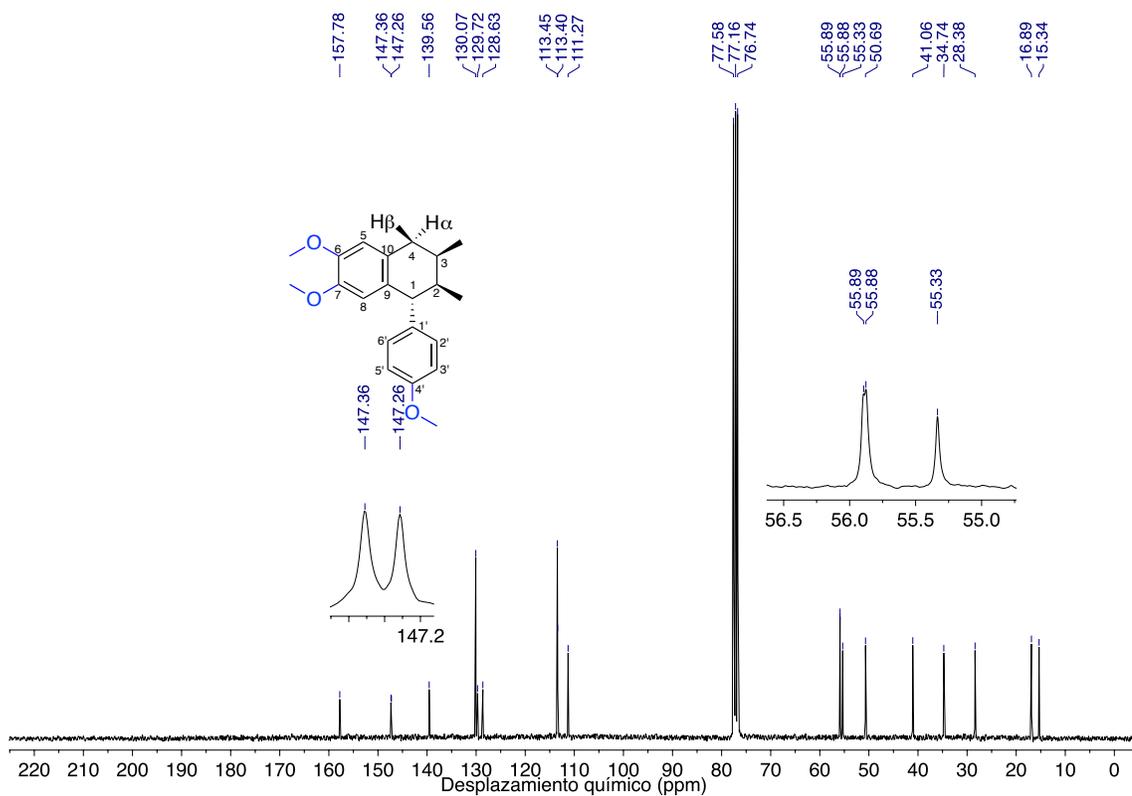
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del Subproducto EC-28.



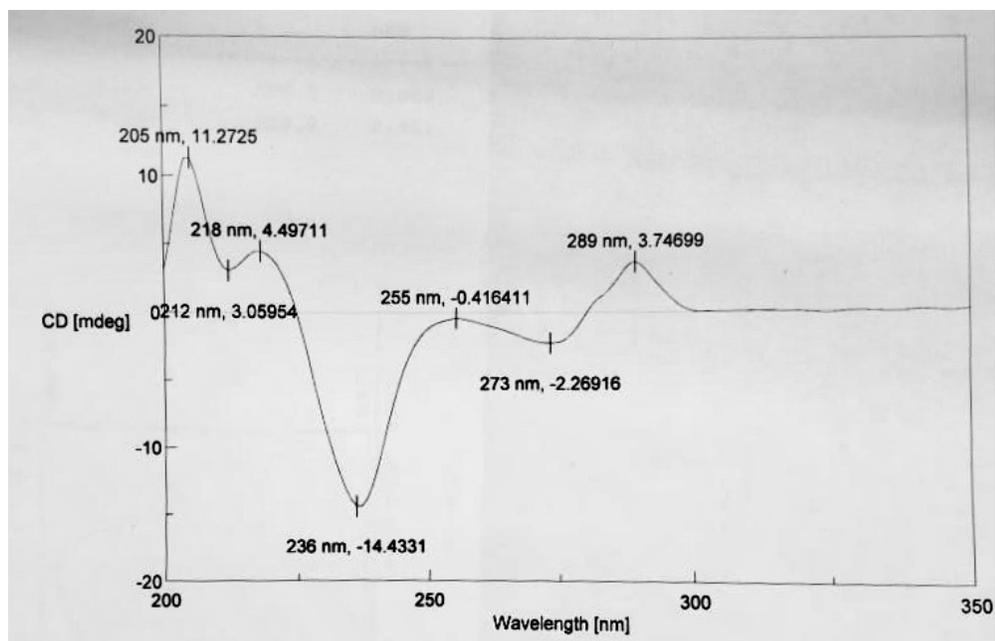
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del Derivado EC-01.



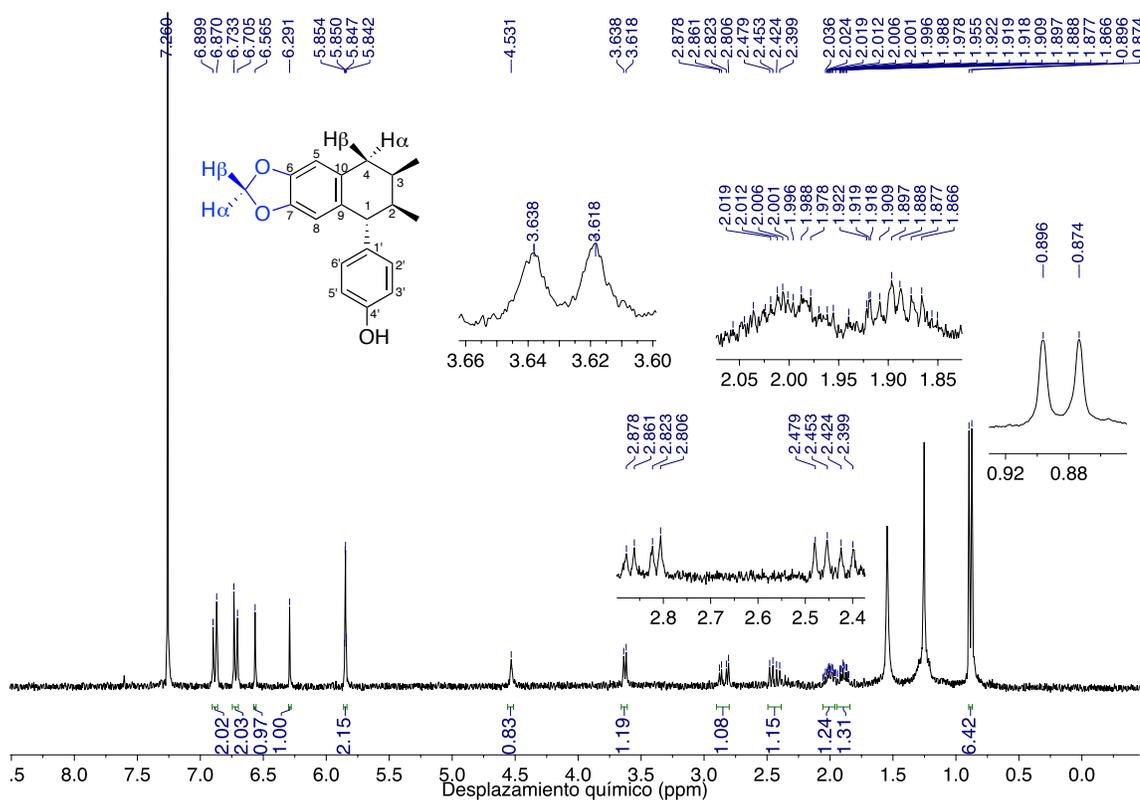
Espectro de Infrarrojo del Derivado **EC-01**.



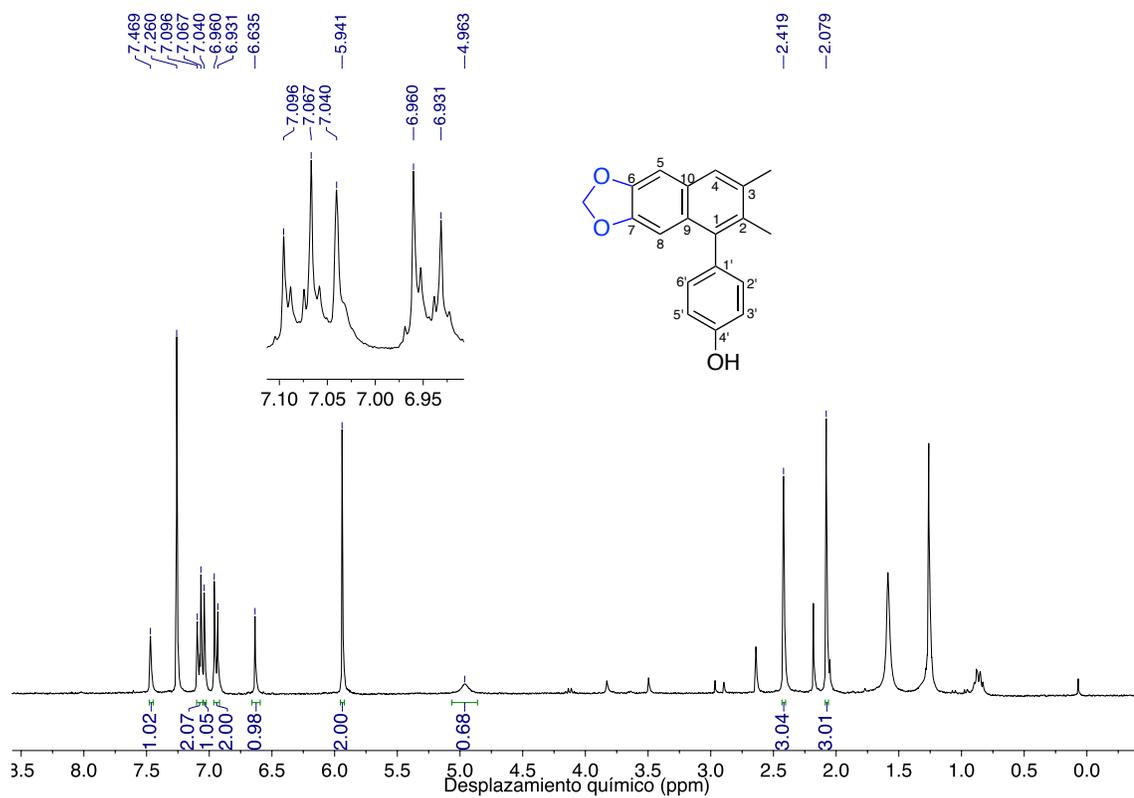
Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) del Derivado **EC-01**.



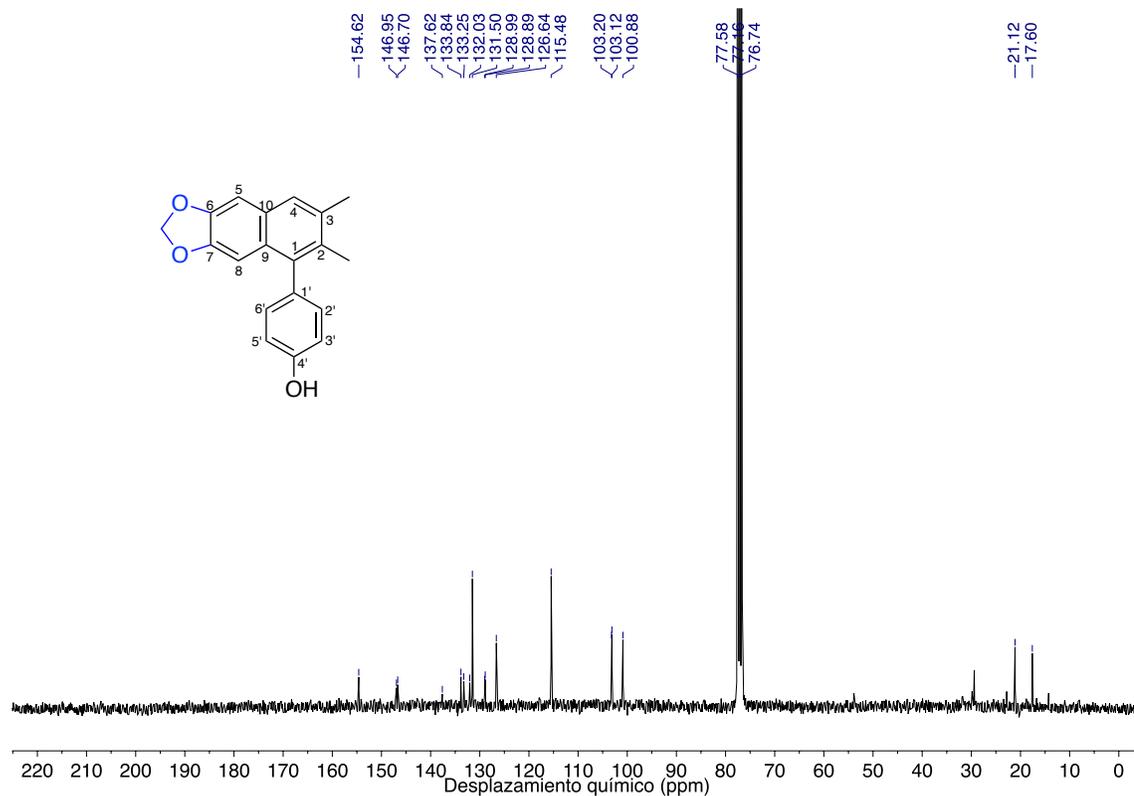
Espectro de Dicroísmo Circular del Derivado **EC-01**.



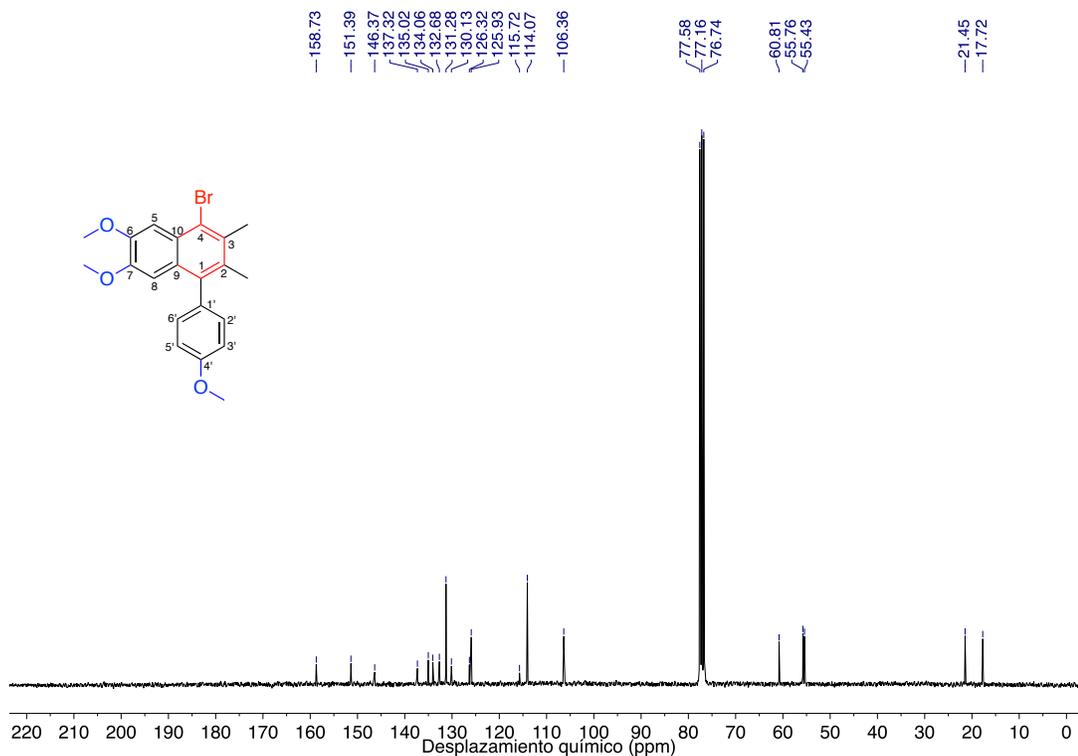
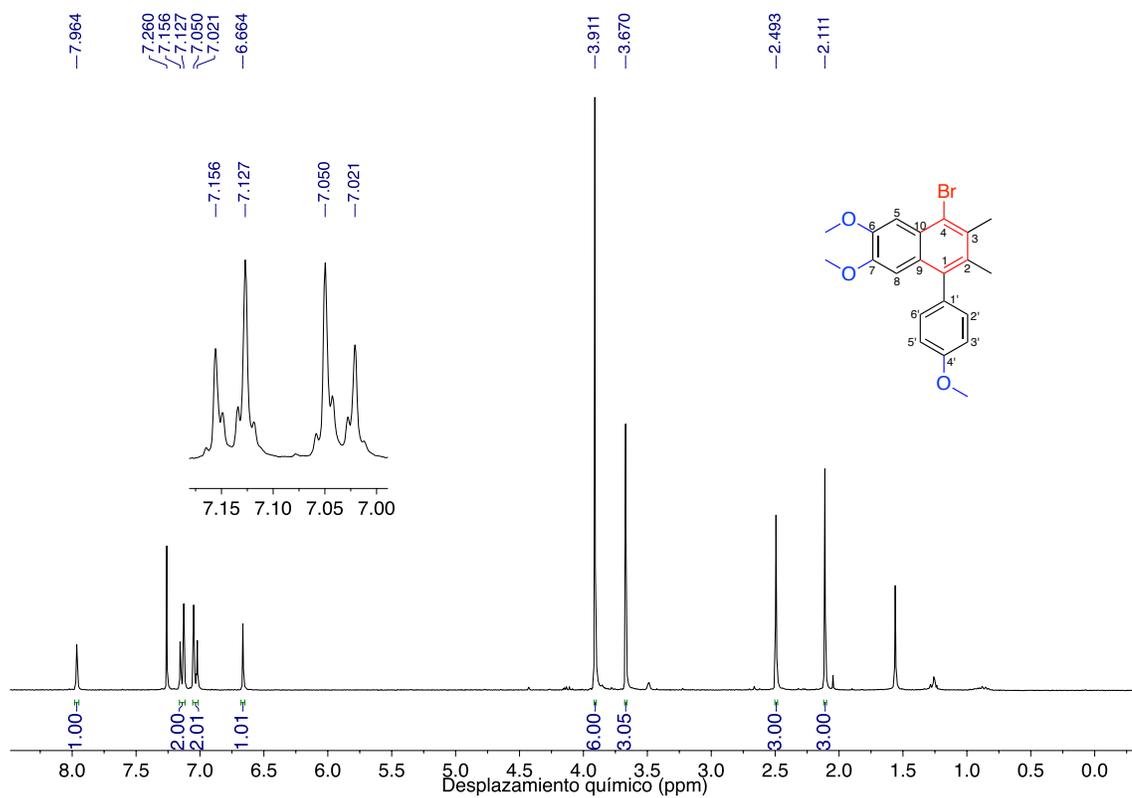
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **EC-15**.

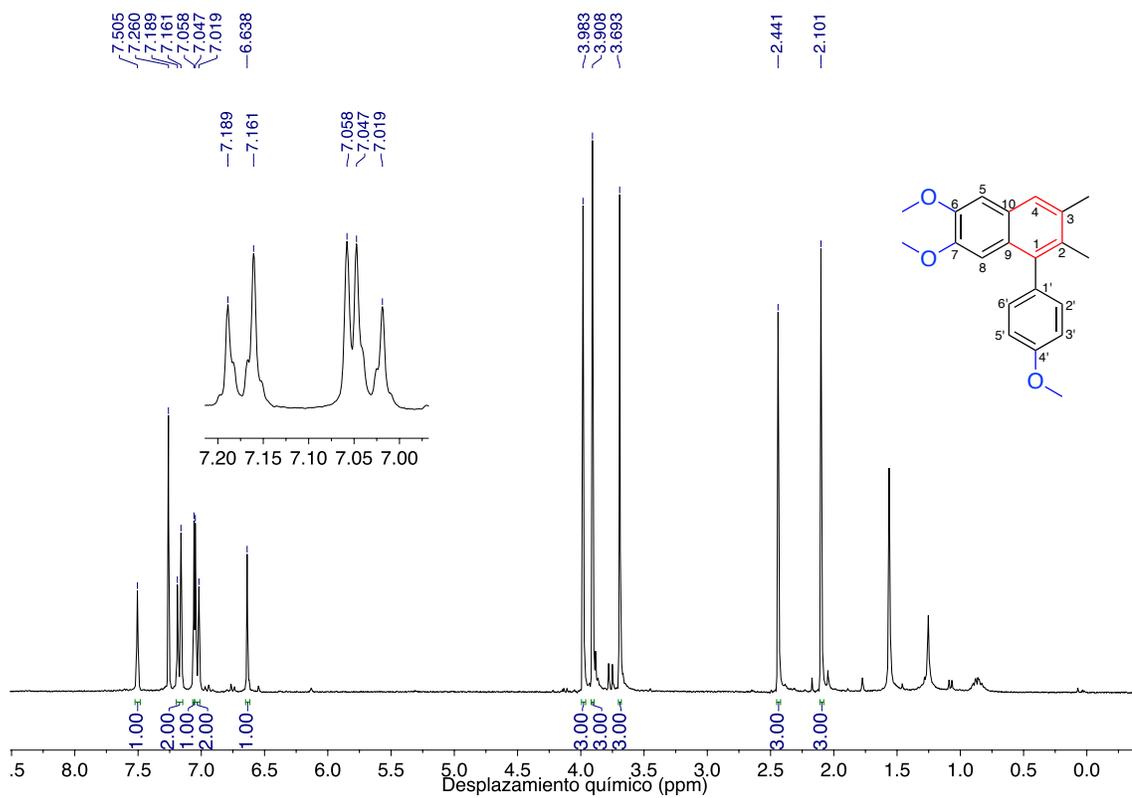
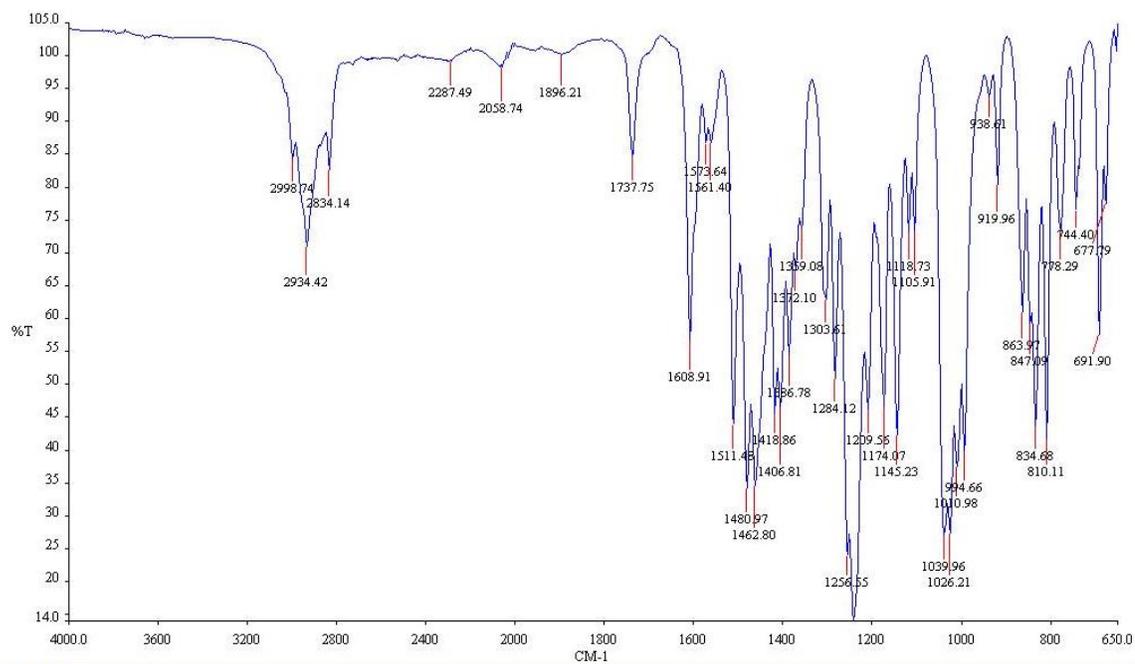


Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de EC-16.

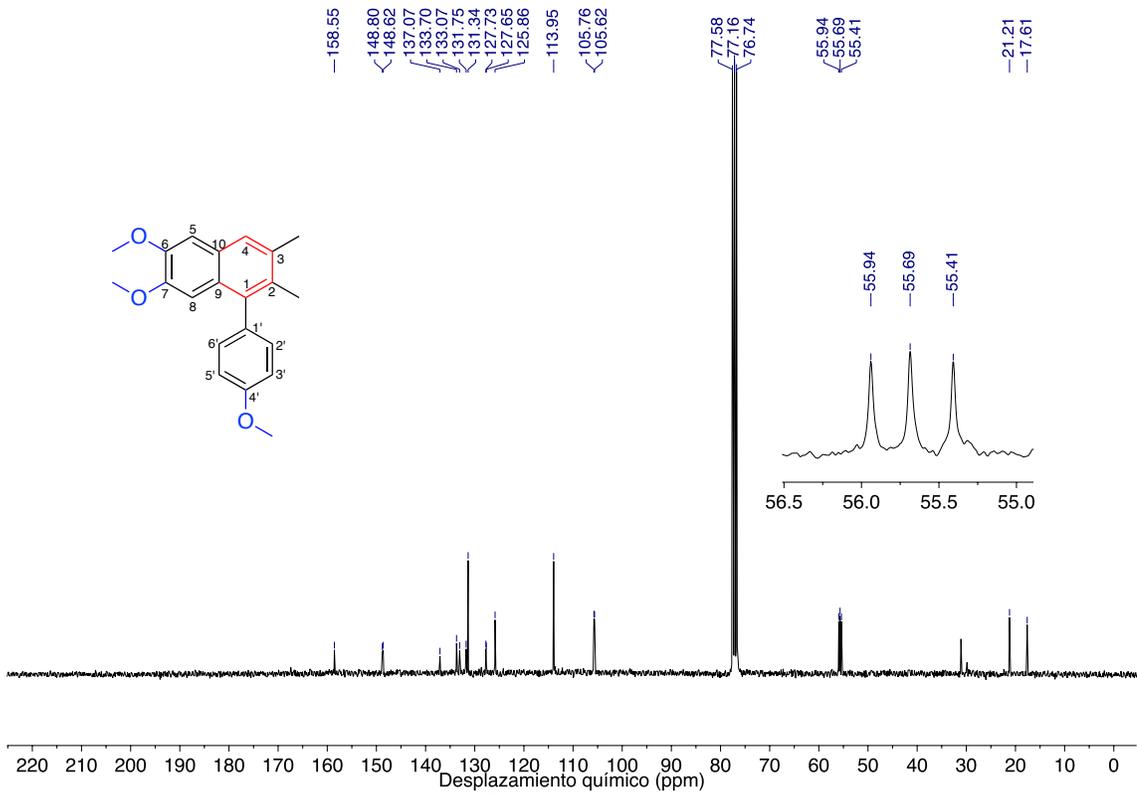


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de EC-16.

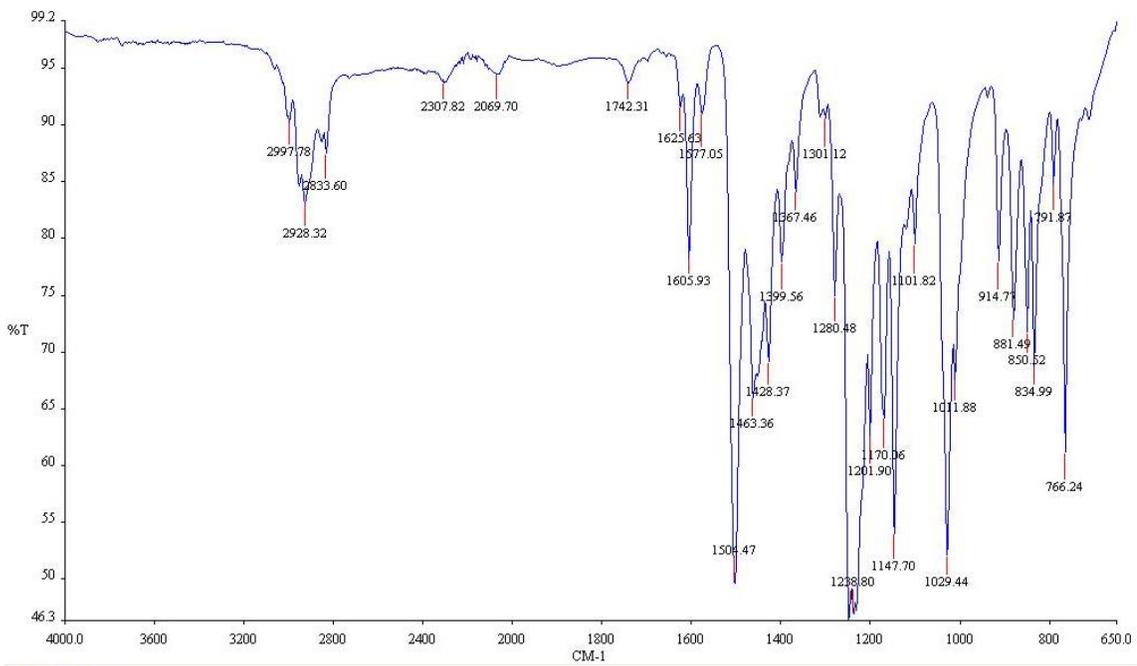




Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de EC-12.

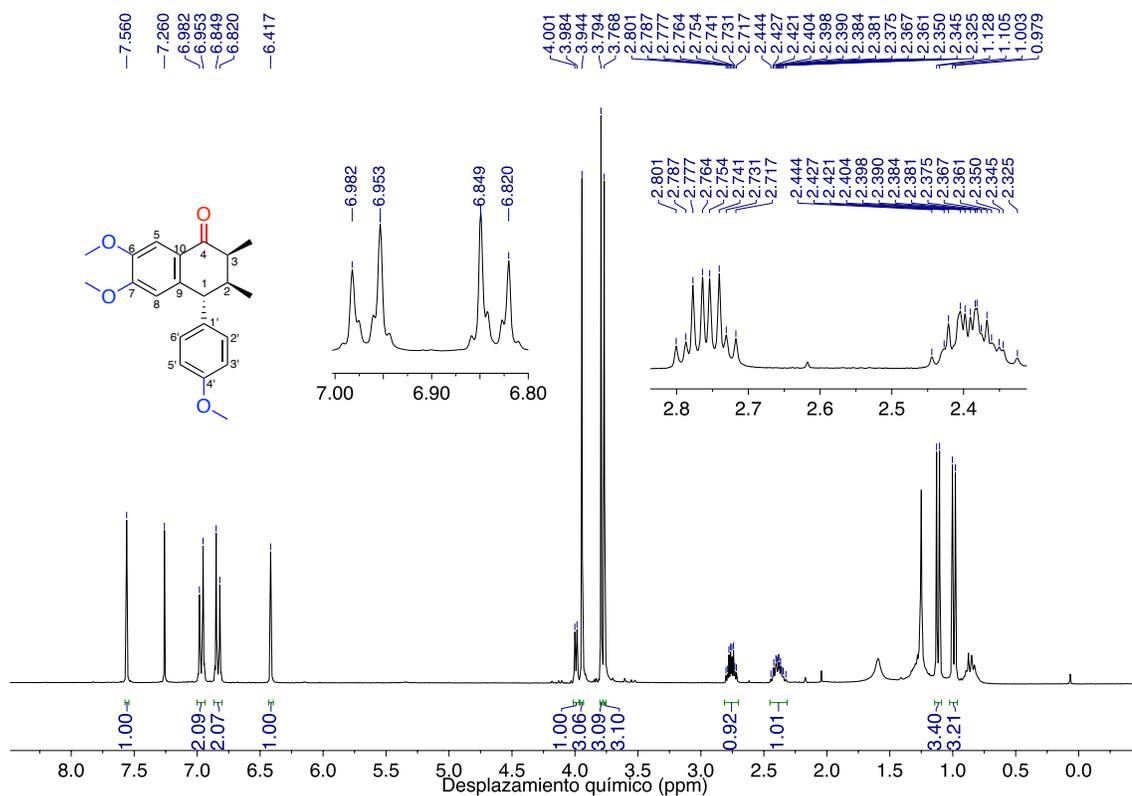


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de EC-12.

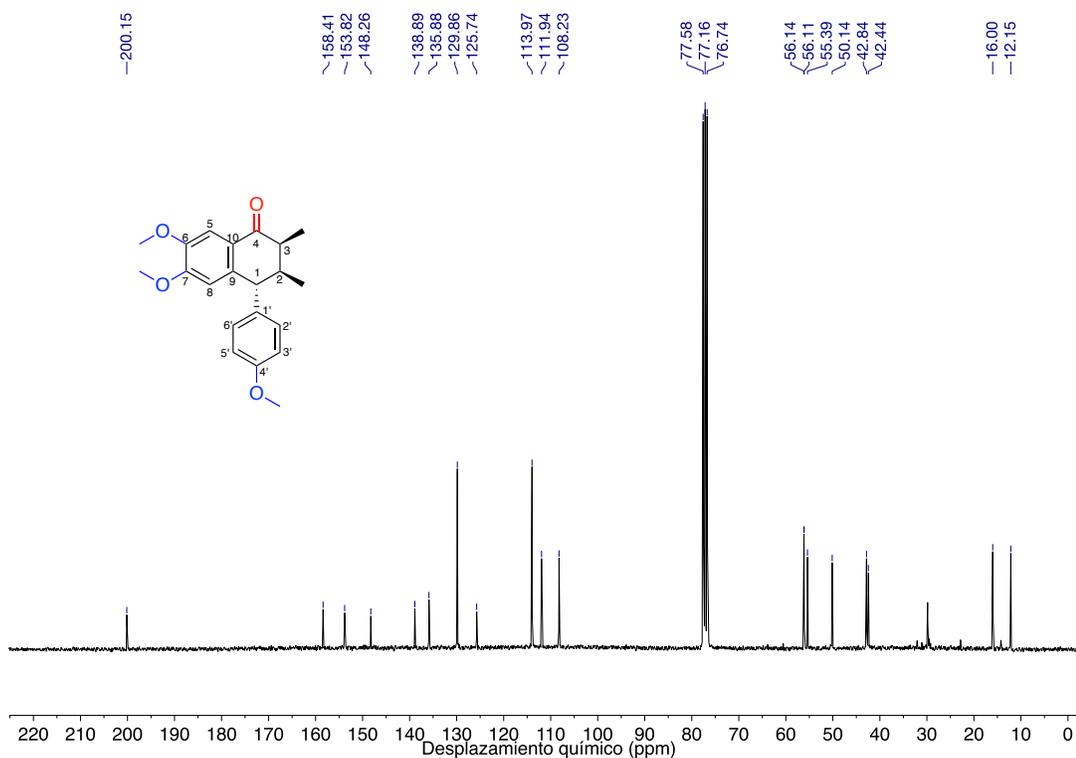


EC-12.M.asc

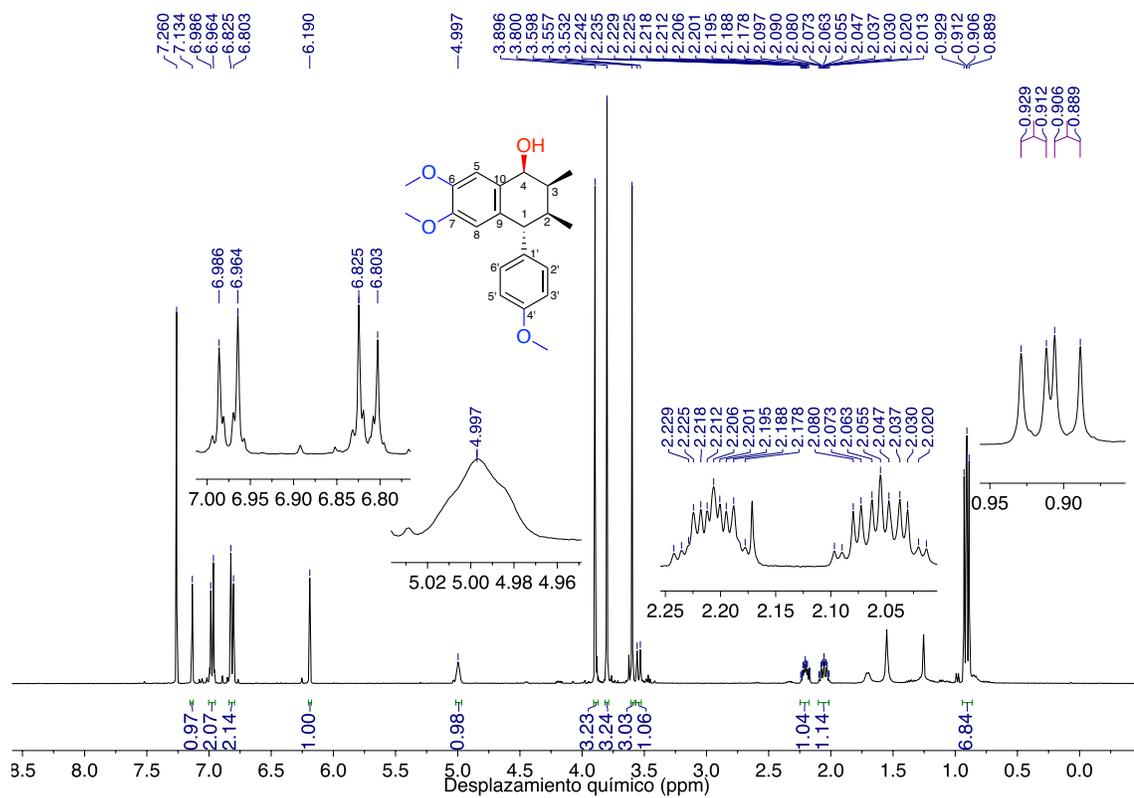
Espectro de Infrarrojo de EC-12.



Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de EC-18.



Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) de EC-18.

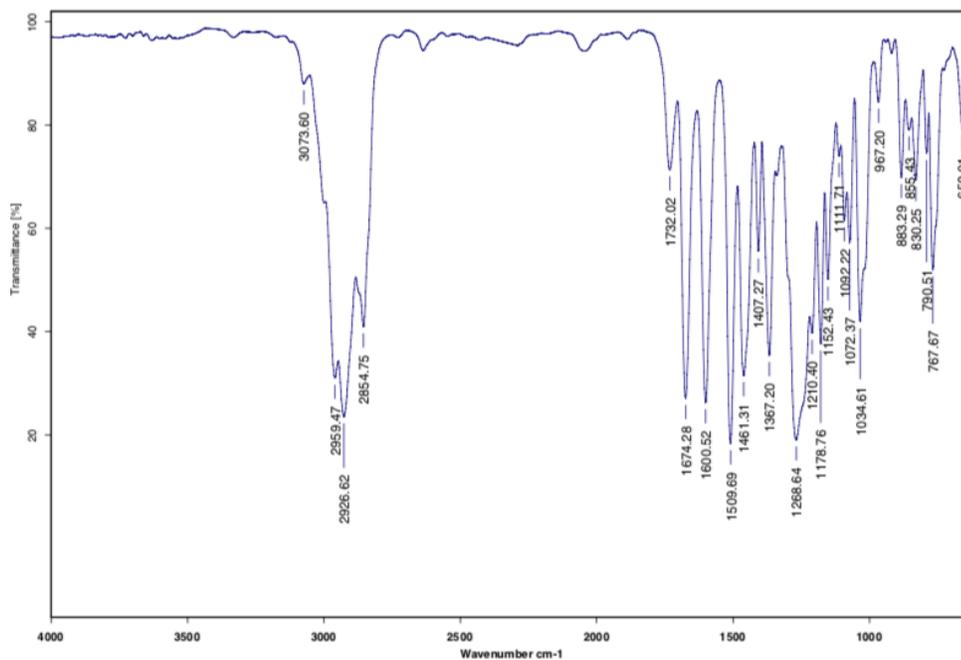


Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de EC-47.



Instituto de Química, UNAM

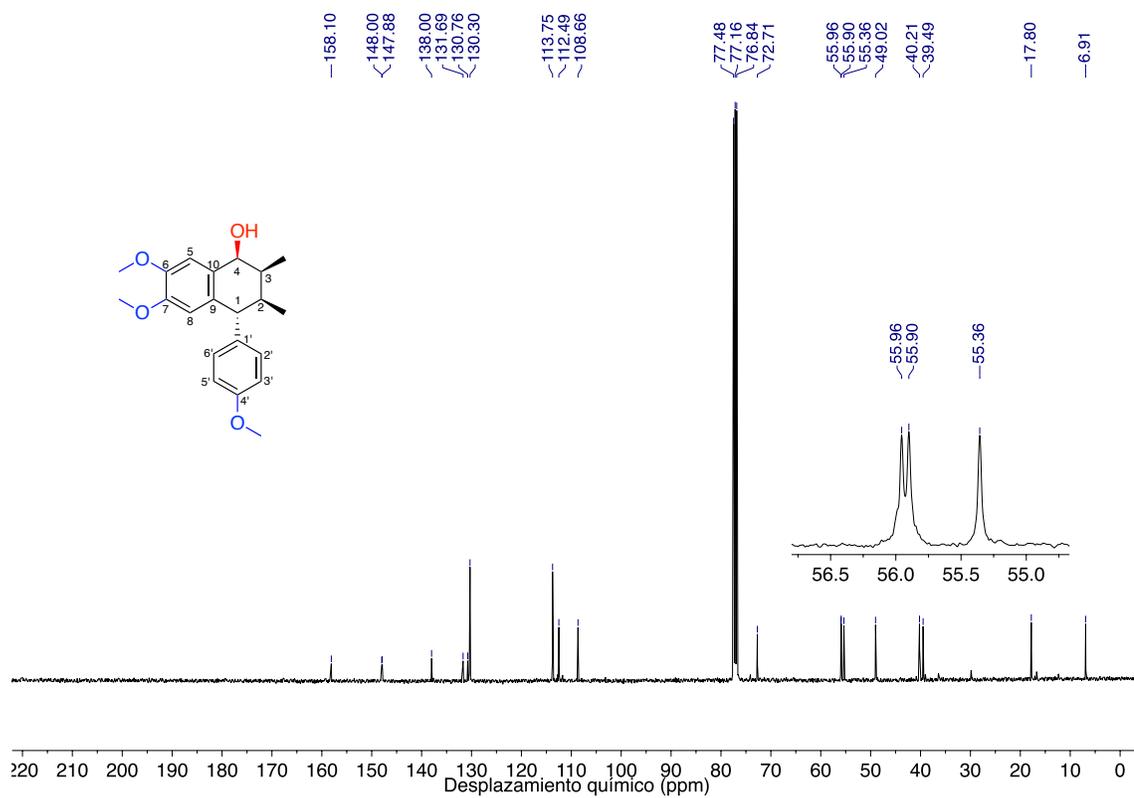
Laboratorio de Espectroscopia



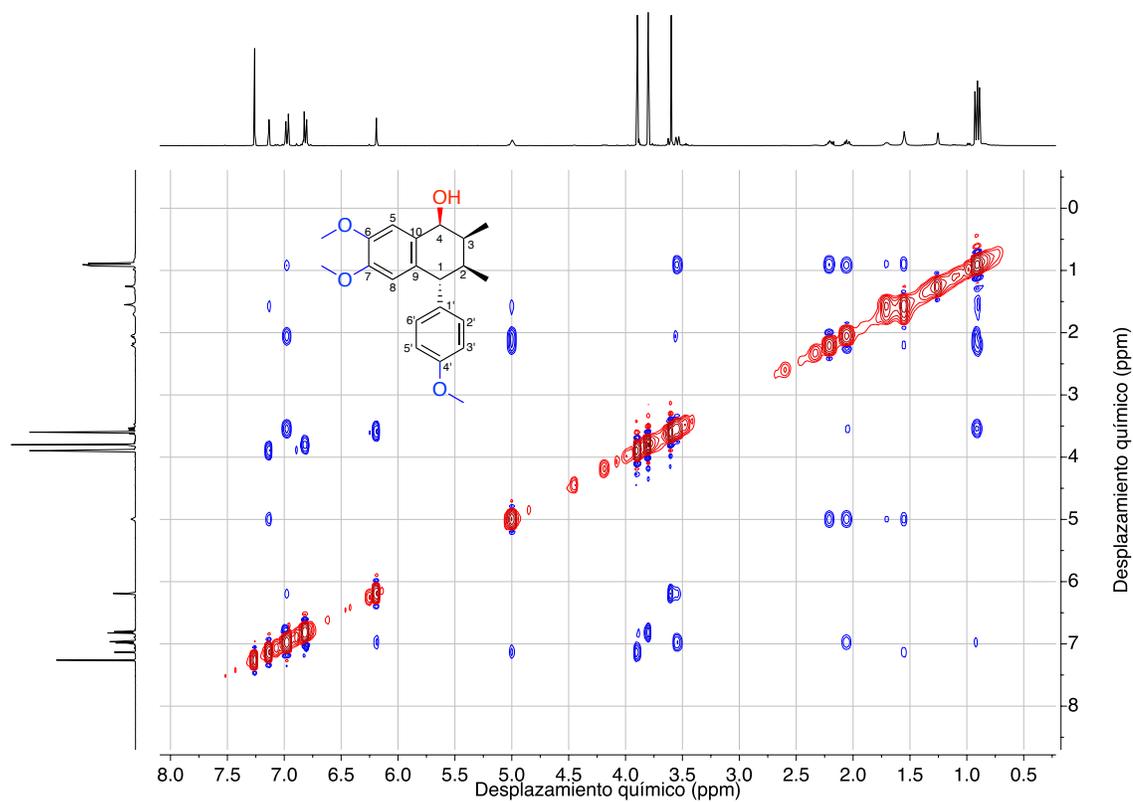
C:\Vnfarrojo\AIR-LEP-IQUI-007_19\Practicas\150819b.0 Dr. L. Miranda Ec-18 película Erika

15/08/2019

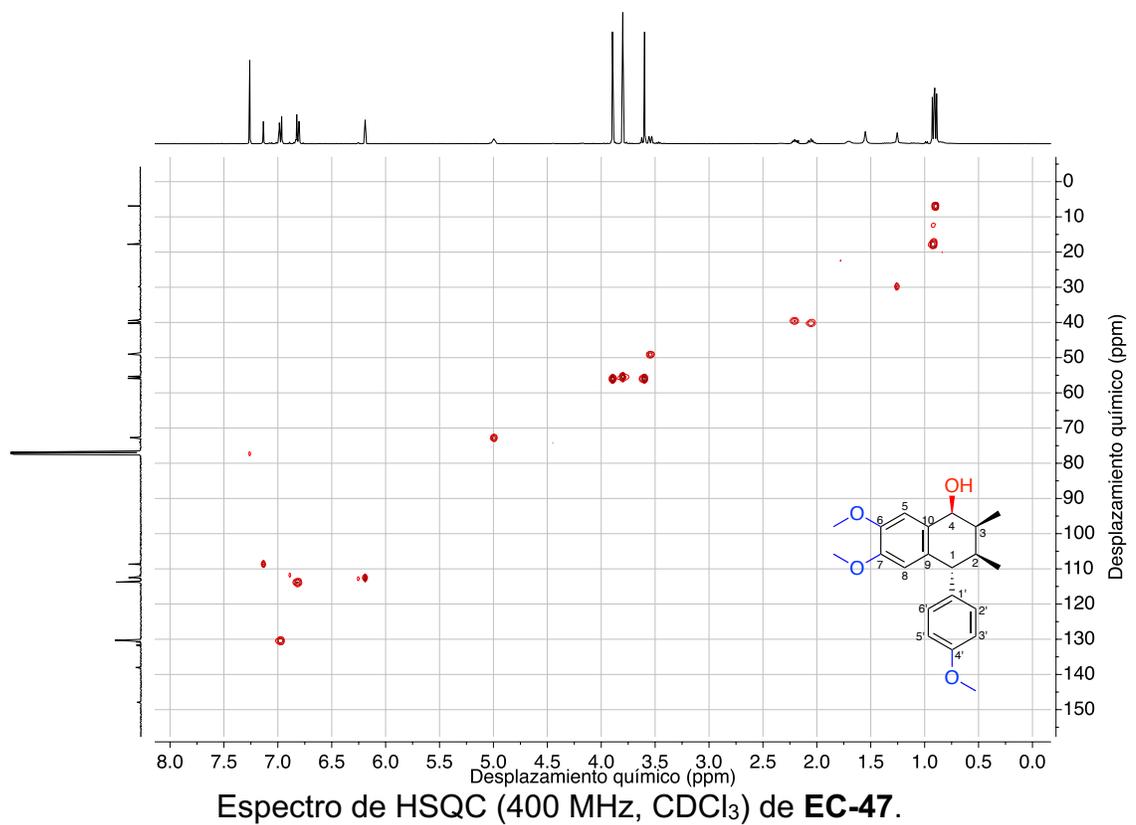
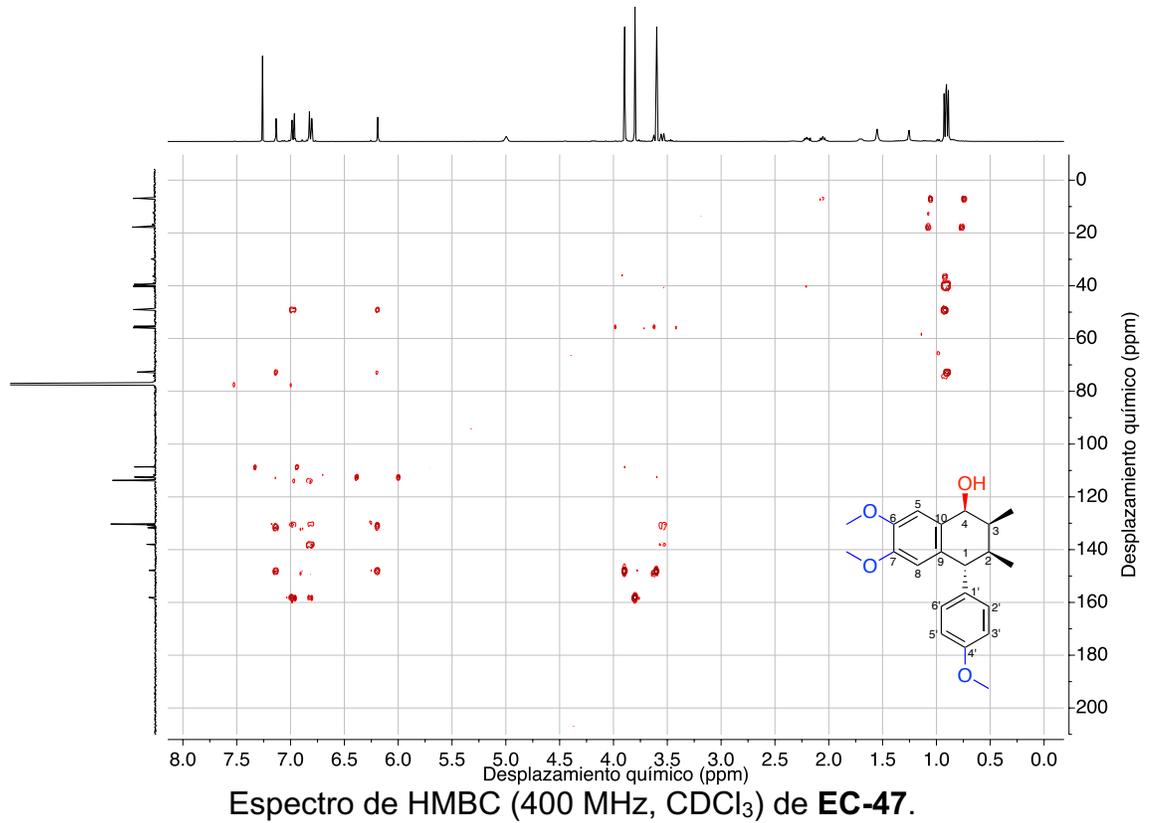
Espectro de Infrarrojo de EC-18.

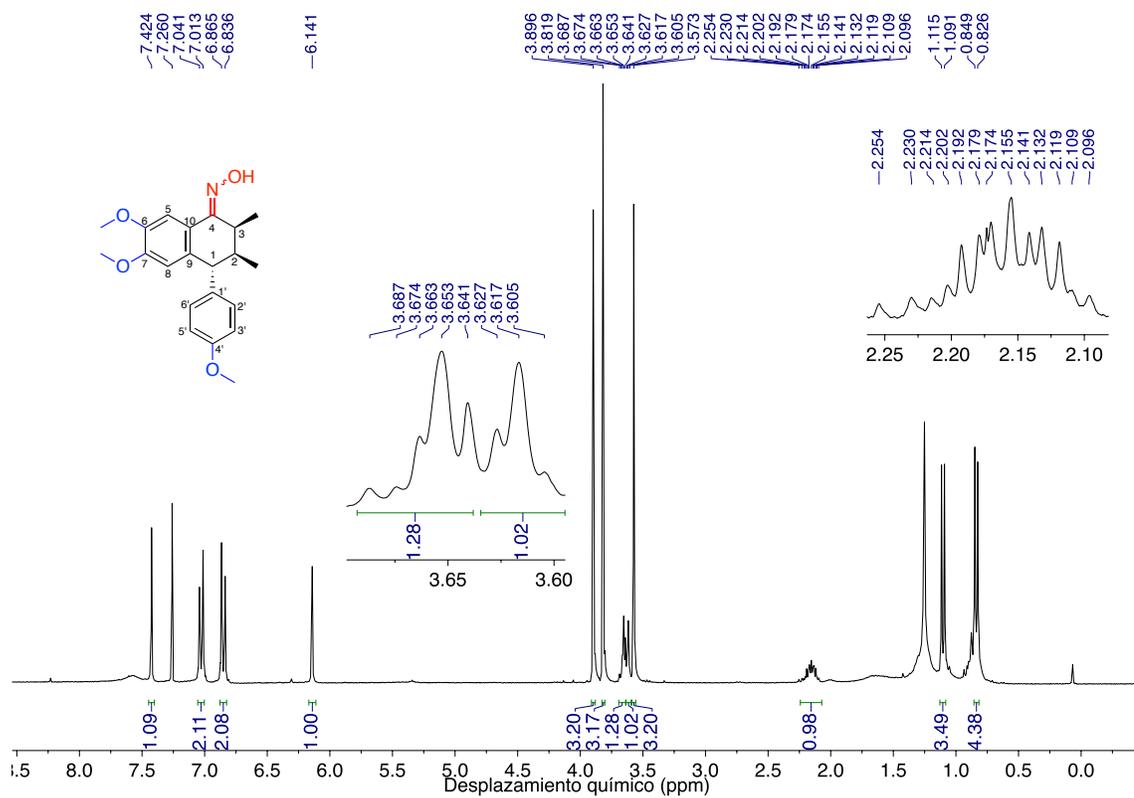


Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de EC-47.

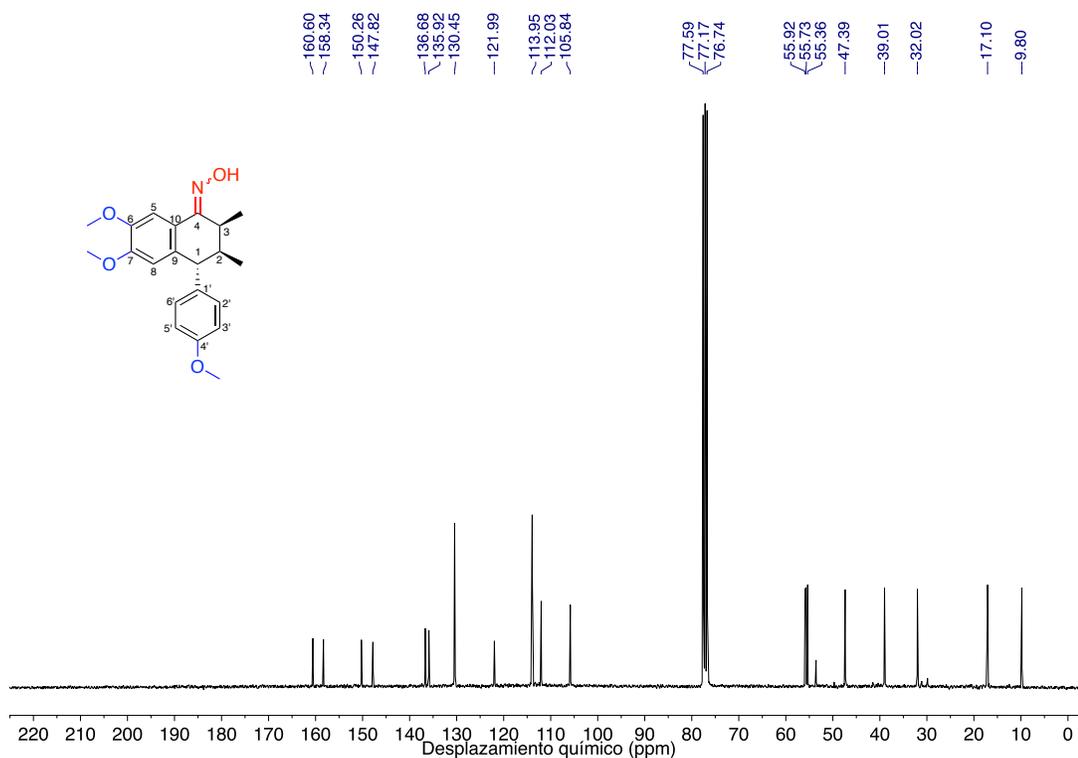


Espectro NOESY (400 MHz, CDCl_3) de EC-47.

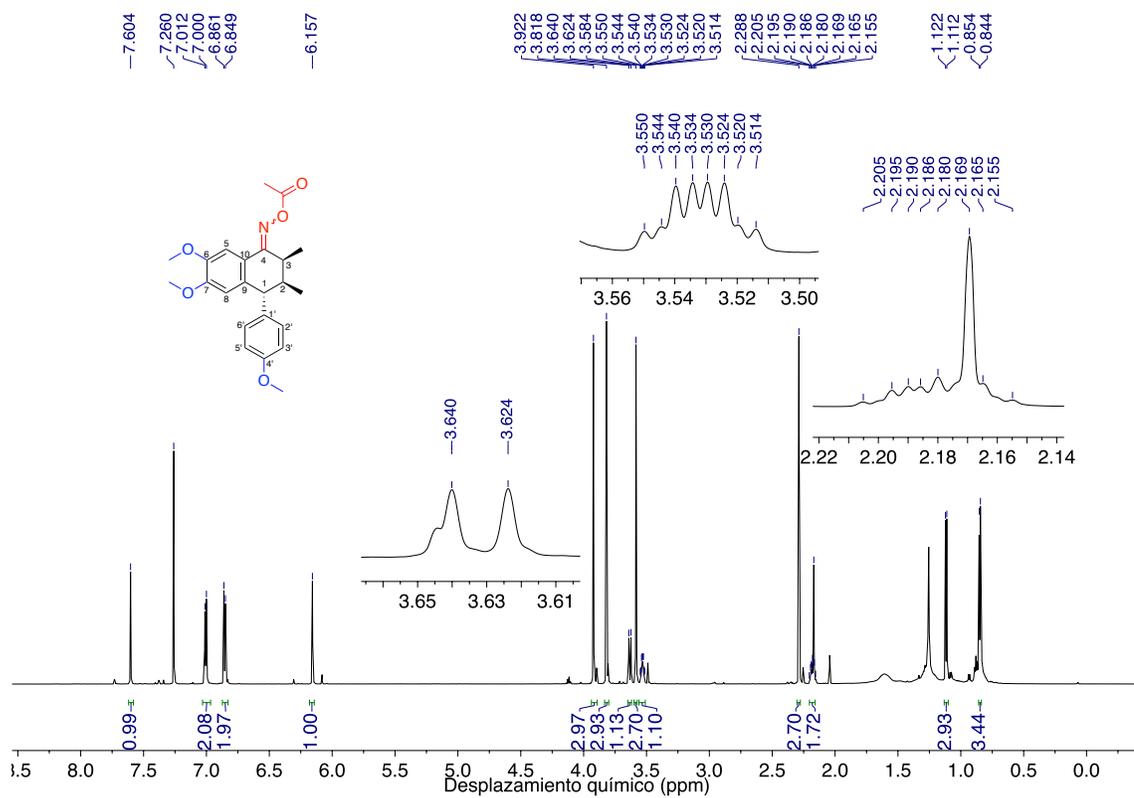




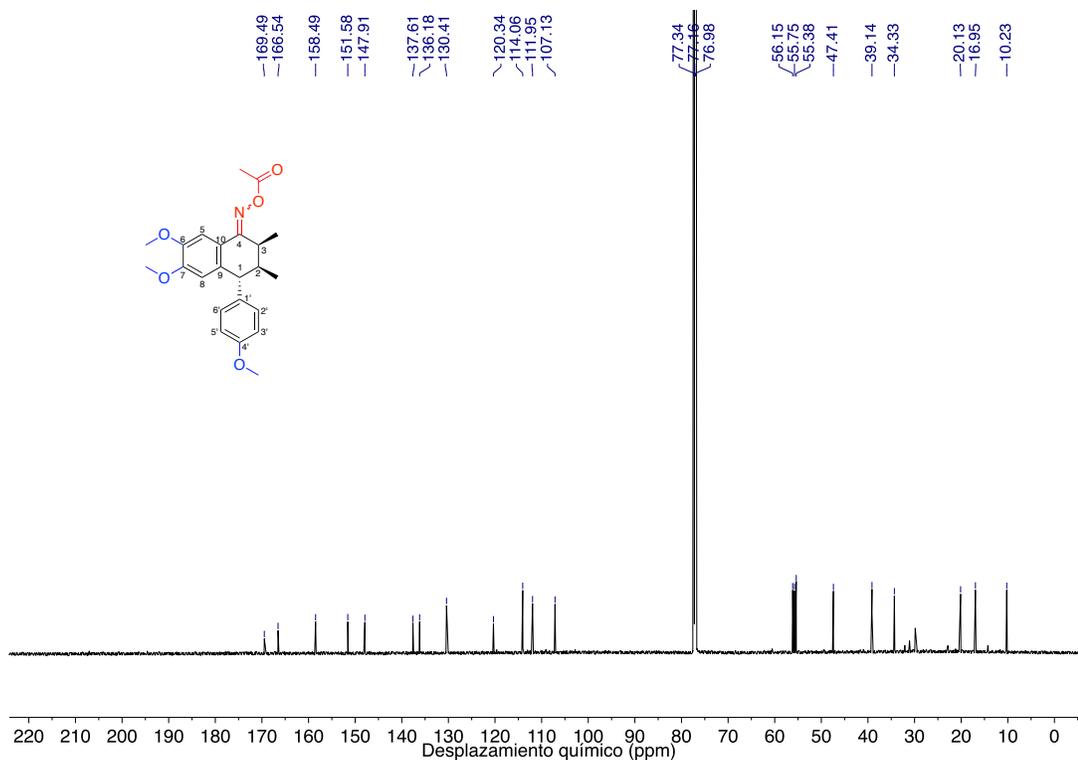
Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de EC-41.



Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) de EC-41.



Espectro de RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3) de EC-49.



Espectro de RMN ^{13}C (175 MHz, CDCl_3) de EC-49.