



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“OBTENCIÓN DE DERIVADOS SEMISINTÉTICOS DE LA
SINROTÓLIDA”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
FRANCISCO JAVIER JUÁREZ GONZÁLEZ



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente Profa. María Isabel Aguilar Laurents
Vocal Prof. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Secretario Profa. Mabel Clara Fragoso Serrano
1er sup. Profa. Georgina Artemisa Duarte Lisci
2do sup. Prof. José Fausto Rivero Cruz

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor de tema.

Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

Sustentante.

Francisco Javier Juárez González

AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el periodo Septiembre 2006 – Febrero 2007 (proyecto: 45861-Q).
- Al Dr. Carlos Martín Cerda García-Rojas del Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por la asistencia brindada en la determinación de los espectros de RMN.
- A la Q. Georgina Duarte y Q.F.B. Margarita Guzmán de la USAI, Facultad de Química por el registro de los espectros de masas.
- A los miembros del jurado por sus observaciones que me permitieron la corrección del presente manuscrito.
- Gracias a todos los compañeros del laboratorio 123 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química por su apoyo.
- Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, por mi formación profesional.
- Al Dr. Rogelio Pereda Miranda por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación.
- De manera especial a la Dra. Mabel Clara Frago Serrano, por su gran apoyo, paciencia, disposición y dedicación en la dirección de la presente tesis.

A mis padres:

María González Arévalo y Francisco Juárez Dolores.

A mis hermanas:

Patricia, Susana y Liliana.

Mis abuelos:

Ignacio, Fortuna y a mi tía Elisa.

A mis amigos:

Cristina, Morquecho y Karolina.

Liliana, Claudia, Susana, Mayda, Belem y Erasto.

“Demasiados progresos mecánicos, una vida agitada, una sociedad que solo tiene un ideal: nuevas invenciones mecánicas, una vida cada vez más fácil y mejor. Saborear los descubrimientos de la ciencia, como se lame un helado, engendra la sed de una comodidad mayor y la lucha constante para llegar a ella. Todo eso mata el alma, la conmiseración, la comprensión, la nobleza. No hay tiempo para ocuparse de los demás. Pero aun a pesar de eso siempre existirá quien piense que vale la pena arriesgarse un poco para ayudar a un hombre. Y eso..., eso es magnífico”

Henri Charrière

A ti María que aunque ya no estas aquí el recuerdo de quien fuiste siempre estará conmigo.

ÍNDICE.

	Página
1. RESUMEN.	1
2. INTRODUCCIÓN	2
• 2.1. La importancia de los productos naturales.	2
• 2.2. Medicamentos anticancerígenos.	4
• 2.3. 5,6-dihidro- α -pironas.	7
○ 2.3.1. 6-Alquenil-5,6-dihidro- α -pironas encontradas en plantas.	7
○ 2.3.2. Biosíntesis de las 5,6-dihidro- α -pironas.	11
• 2.4. Propiedades espectroscópicas y espectrometrías de las 5,6-dihidro- α -pironas	14
○ 2.4.1. Espectroscopia de infrarrojo y ultravioleta.	14
○ 2.4.2. Espectroscopias de RMN ^1H	14
○ 2.4.3. Espectroscopias de RMN ^{13}C .	17
3. HIPOTESIS.	18
4. OBJETIVO GENERAL.	19
• 4.1. Objetivos específicos.	19
5. PARTE EXPERIMENTAL.	20
• 5.1. Procedimientos generales.	20
○ 5.1.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución.	20
○ 5.1.2. Instrumental analítico.	20
• 5.2. Obtención de compuestos semisintéticos a partir de sinrotólida	21
○ 5.2.1. Acetilación parcial de la sinrotólida	21
○ 5.2.2. Oxidación del compuesto 4'-acetilsinrotolida	22
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	24
• 6.1. Epimerización de la sinrotólida.	24

• 6.1.1. Acetilación de la sinrotólida.	24
• 6.1.2. Resonancia Magnética Nuclear de los compuestos sintetizados.	24
• 6.1.3. Oxidación de la sinrotólida.	32
• 6.1.4. Resonancia Magnética Nuclear del compuesto sintetizado en la oxidación.	32
7. CONCLUSIONES.	38
• 7.1 Expectativas.	39
8. BIBLIOGRAFÍA.	40

ÍNDICE DE FIGURAS.

	No. Figura.	Pagina
Vinblastina.	1	4
Vincristina.	2	5
Etopósido.	3	5
Tenopósido.	4	6
Paclitaxel.	5	6
Anillo de δ -lactona $-\alpha,\beta$ -insaturado.	6	7
Umuravumbólida y desacetilumuravumbólida	7	8
Hiptólida.	8	9
Espicigerólida.	9	10
Anamarina.	10	10
Sinrotólida.	11	11
Ácido parasórbico.	12	11
Aspirina.	13	12
La incorporación de ^{13}C -acetato en la biosíntesis de la aspirina.	14	12
Psitolina.	15	13
Biosíntesis de psitolina a partir de fenilalanina.	16	13
5,6-dihidro- α -pironas sustituidas en C_6	17	15
Desplazamientos químicos y multiplicidad característica para el protón olefínico conjugado del núcleo de la 5,6-dihidro- α -pirona.	18	16
Multiplicidad observada para el núcleo H_6 de la 5,6-dihidro- α -pirona.	19	17
Secuencia sintética para obtener los derivados 2-5 de la sinrotólida.	20	23
Cromatograma generado mediante CLAR de la mezcla de la reacción obtenida durante la acetilación parcial de la sinrotólida.	21	24
Espectro de RMN ^1H de la 4'-acetilsinrotólida (500 MHz, CDCl_3).	22	25
Espectro de RMN ^1H de la 5'-acetilsinrotólida (500 MHz, CDCl_3).	23	26
Espectro de RMN ^1H de la peracetilsinrotólida (500 MHz, CDCl_3).	24	26
Espectro de RMN ^{13}C de la 4'-acetilsinrotólida.	25	27
Espectro de RMN ^{13}C de la 5'-acetilsinrotólida.	26	28
Espectro de RMN ^{13}C de la peracetilsinrotólida.	27	28
Espectro bidimensional ^1H - ^1H COSY de la 4'-acetilsinrotólida.	28	29
Espectro bidimensional ^1H - ^1H COSY de la 5'-acetilsinrotólida.	29	30
Espectro bidimensional ^1H - ^1H COSY de la peracetilsinrotólida.	30	31
Cromatograma generado mediante CLAR de la mezcla de la reacción obtenida de la oxidación de 4'-acetilsinrotólida.	31	32
Espectro de RMN ^1H de la 4'-acetil-5'-oxosinrotólida (500 MHz, CDCl_3).	32	33
Espectro bidimensional ^1H - ^1H COSY de la 4'-acetil-5'-oxosinrotólida.	33	34
Espectro de RMN ^{13}C de la 4'-acetil-5'-oxosinrotólida.	34	35
Secuencia sintética para epimerizar los centros estereogénicos C_4' y C_5' de la sinrotólida.	35	39

ÍNDICE DE CUADROS.

	No. Cuadro.	Pagina
Desplazamientos químicos en la RMN ^1H para los compuestos 2-5 . ^a	1	36
Desplazamientos químicos en la RMN ^{13}C para los compuestos 2-5 . ^a	2	37

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

COSY	Correlación homonuclear.
AC ₂ O	Anhídrido acético.
AcOH	Ácido acético.
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución.
CoA	Coenzima A.
d	Doblete.
dc	Cuarteto dobleteado.
dd	Doble de doblete.
ddd	Doble de doble de doble.
dddd	Doble de doble de doble de doble
DOR	Dispersión óptica rotatoria.
eV	Electrón volt.
EM	Espectro de masas.
FAB ⁺	Bombardero rápido de átomos modalidad positiva.
Hz	Hertz.
IR	Infrarrojo.
<i>J</i>	Constante de acoplamiento.
m	Multiplete.
MHz	Mega hertz.
m/z	Relación masa-carga.
ppm	Partes por millón.
RMN	Resonancia magnética nuclear.
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear carbono 13.
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protónica.
s	Singulete.
t _R	Tiempo de retención.
UV	Ultravioleta.
δ	Desplazamientos químicos.
λ	Longitud de onda.

1. RESUMEN.

Desde los albores de la humanidad se ha practicado la medicina tradicional a través de tentativas y desaciertos. La cual comprende conocimientos y prácticas empleadas en la prevención, diagnóstico y eliminación de afecciones físicas o mentales, obtenidas exclusivamente sobre la experiencia práctica y observación transmitida de generación en generación de forma oral o escrita.

Así, a través de los tiempos los productos naturales han tenido un gran éxito en nuestra sociedad pues han reducido el dolor, el sufrimiento y la enfermedad, revolucionado también a la medicina actual. Los productos naturales en primer lugar proporcionan un número elevado de fármacos extremadamente útiles que son difíciles, si no imposible, de producir comercialmente por síntesis y, en segundo lugar, pueden proporcionar compuestos susceptibles de modificación para convertirse en fármacos más efectivos o menos tóxicos.

Las 5,6-dihidro- α -pironas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, particularmente en plantas, hongos y bacterias. Muchos de estos compuestos son biológicamente activos, exhibiendo fototoxicidad y citotoxicidad contra diferentes líneas de células tumorales, o actividad antimicrobiana.

Tomando como antecedente la actividad biológica de las 5,6-dihidro- α -pironas C_6 sustituidas, resulta de interés el aislamiento, la caracterización y la síntesis de estos compuestos. Por lo tanto el objetivo de este proyecto consistió en la obtención de derivados semisintéticos a través de una secuencia de reacciones utilizando como materia prima una 5,6-dihidro- α -pirona, la sinrotólida (fig. 11). Así como también la purificación por cromatografía de líquidos y la caracterización de la estructura molecular de los compuestos obtenidos, mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas contemporáneas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. La importancia de los productos naturales.

El uso de plantas para tratar enfermedades y dolencias, ha sido una característica del ser humano que es tan antigua como la existencia del mismo. El estudio adecuado y conocimiento de las drogas vegetales es seguramente una de las más antiguas de las “ciencias”. El conocimiento adecuado de las plantas fue uno de los primeros en que, por necesidad, el hombre desarrolló un interés organizado. Este interés práctico abarcó tanto las plantas comestibles, como a las tóxicas y medicinales, y es fácil pensar en las ventajas que podía tener para una sociedad primitiva el conocer adecuadamente las propiedades de las plantas que crecían cerca de su lugar de vivienda.

El estudio comienza con el uso de drogas por el hombre primitivo para protegerse de enfermedades, esto forma un enorme bagaje de información, que en parte ha sido clasificada de forma más oficial, pero que coexiste con la sabiduría popular que aun se transmite de forma oral (Zhang y Arnol, 2005).

Así, a través de los tiempos los productos naturales han tenido un gran éxito en nuestra sociedad pues han reducido el dolor, el sufrimiento y la enfermedad, revolucionado así también a la medicina actual. Dentro de los productos naturales encontramos a los agentes antibióticos y anticancerígenos de mayor importancia. Más del 60% de los medicamentos en proceso de ser aprobados y los ya aprobados, contienen principios activos provenientes de productos naturales o relacionados con ellos (Cragg, *et al.*, 1997).

Muchos productos naturales han alcanzado su comercialización sin la necesidad de hacer modificaciones químicas en su estructura, tal es el caso de muchos antibióticos así como esteroides. De hecho, el potencial para comercializar un compuesto sin modificaciones químicas distingue a los productos naturales como una gran fuente de compuestos con diversidad química, muchos ya conocidos y muchos más aun por ser descubiertos. En otros casos, la molécula extraída del producto natural no llega a utilizarse como tal, pero sirve como molécula modelo para su manipulación, por métodos químicos o

genéticos (cefalosporinas y rifampicina). En estos casos, el producto natural presenta la estructura química base o farmacóforo, que pueden ser modificados vía “semisíntesis” para producir fármacos con propiedades mejoradas (Verdine, 1996).

El metabolismo secundario está involucrado con la naturaleza de las respuestas a las necesidades y retos del ambiente que rodea al organismo. La naturaleza ha llevado a cabo constantemente su propia combinación química desde hace 3 billones de años cuando las bacterias aparecieron sobre la tierra. Desde esos tiempos, ha existido un proceso de evolución con respecto a la producción de metabolitos secundarios. Si los metabolitos producidos son de utilidad para el organismo, los genes responsables de su biosíntesis se conservan. La recombinación química practicada por la naturaleza es mucho más compleja que la realizada en cualquier laboratorio moderno, creando exóticas estructuras de estereoquímica compleja, y grupos funcionales reactivos (Verdine, 1996). Como resultado, una gran cantidad y variedad de productos han sido encontrados en la naturaleza. El número total de productos naturales encontrados en plantas ha sido estimado en 500,000 (Mendelson y Balick, 1995). De los cuales 160,000 productos naturales han sido identificados (Henkel, *et al.*, 1999), la cifra aumenta alrededor de 10,000 productos naturales identificados por año (Henkel, *et al.*, 1999). Alrededor de 100,000 metabolitos secundarios de pesos moleculares menores a 2500 g/mol han sido caracterizados, la mitad de ellos obtenidos de microorganismos y la otra mitad de plantas (Berdy, 1995).

En la última década, las grandes compañías farmacéuticas enfatizan la química combinatoria, dejando a un lado los productos naturales y minimizando su importancia, al producir grandes cantidades de compuestos sintéticos. Desafortunadamente, la química empleada actualmente no llega a crear la diversidad suficiente de moléculas farmacológicamente activas. Pero por fortuna, algunas compañías están consientes de este hecho y han retomado y revitalizado el interés en los productos naturales.

Los productos naturales desempeñan un papel significativo en la medicina moderna. En primer lugar proporcionan un número elevado de fármacos extremadamente útiles que son difíciles, si no imposible, de producir comercialmente por síntesis. En segundo lugar, pueden proporcionar compuestos susceptibles de modificación para convertirse en

fármacos más efectivos o menos tóxicos. El tercer papel consiste en que algunos productos naturales, que poseen escasa o nula actividad, son susceptibles de ser modificados por métodos químicos o biológicos para producir fármacos potentes que no se obtienen fácilmente por otros medios (Zhang y Arnol 2005).

2.2. Medicamentos anticancerígenos.

En el año 2000, 57% de todos los medicamentos utilizados en estudios clínicos para el cáncer eran productos naturales o compuestos relacionados con ellos (Parkin, 2000).

En cuanto a los compuestos anticancerígenos obtenidos del reino vegetal cabe mencionar a los primeros agentes en avanzar al uso clínico, los alcaloides de la vinca, vinblastina (fig. 1) y vincristina (Oncovin®) (fig. 2), aisladas de la pervinca de Madagascar, *Catharanthus roseus* (Sinkora K, *et al.*, 1999). Lo que es interesante es que ambos agentes anticancerígenos son de hecho dímeros heterólogos de dos alcaloides que por separado no tienen actividad citotóxica, pero químicamente combinados, interactúan con la tubulina, impidiendo la formación de los microtubulos en la fase M del ciclo celular (Figg y McLeod, 2004).

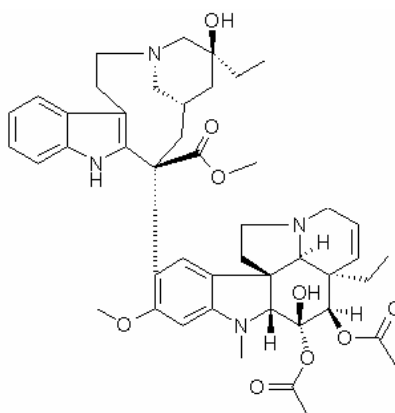


Figura 1. Vinblastina

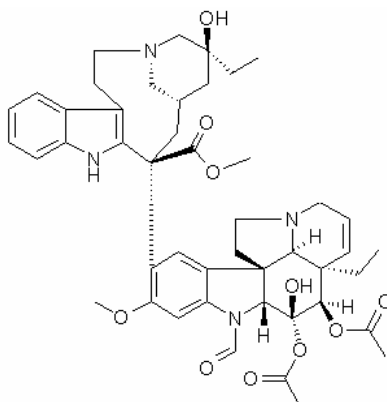


Figura 2. Vincristina

Podofilotoxina un agente antitumoral aislado de las raíces de varias especies del género *Podophyllum*. El compuesto resultó ser muy tóxico por lo que se recurrió a la semisíntesis para su modificación, dando como resultado dos agentes aprobados clínicamente, etoposido (Eposin®, Etopophos®, Vepesid®, VP-16®) (fig. 3) y tenopósido (Vumon®, VM-26) (fig. 4) (Sinkora, *et al.*, 1999). Estos Compuestos bloquean el ciclo celular en dos puntos en específico: bloquean la fase entre la última división y el comienzo de la replicación del ADN (la fase G1) y también bloquean la replicación del ADN (en la fase S) al interactuar este compuesto con la topoisomerasa tipo II (Figg y Mcleod, 2004).

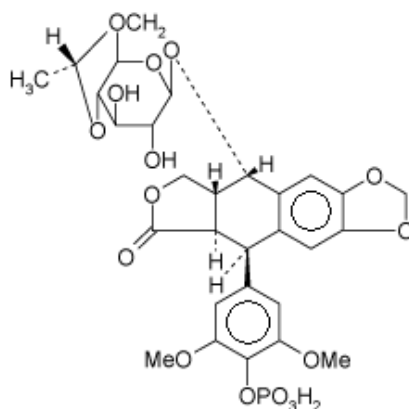


Figura 3. Etopósido

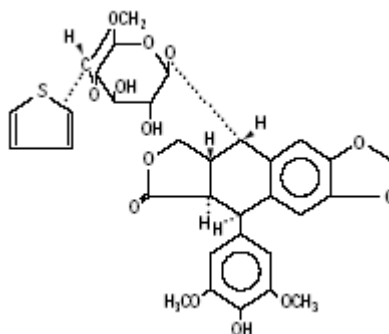


Figura 4. Tenopósido

Una molécula recientemente exitosa derivada del reino vegetal, utilizada como agente quimioterapéutico es el Taxol[®] (fig. 5) (nombre genérico paclitaxel) que fue aislado en un inicio de la corteza de *Taxus brevifolia* (Sinkora, *et al.*, 1999).

Paclitaxel fue un gran descubrimiento con respecto a su mecanismo de acción en el tratamiento contra el cáncer. Es el primer compuesto identificado que causa la estabilización de los microtúbulos de la célula en mitosis. Como resultado de tal estabilización la célula detiene la división celular y manda a la muerte celular programada (apoptosis) (Hanahan y Weinberg, 2000).

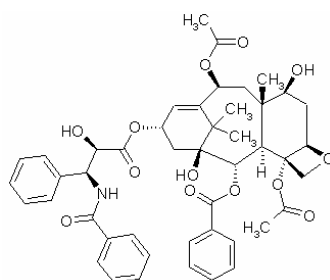


Figura 5. Paclitaxel

Un gran número de agentes obtenidos de plantas, siguen aún en diferentes niveles de ensayos clínicos. Algunos están siendo investigados como agentes citotóxicos directos. Mientras que otros están siendo estudiados desde el punto de vista de su potencial como inhibidores particulares de algunas enzimas, proteínas o vías del ciclo celular (Zhang y Arnol, 2005).

2.3. 5,6-dihidro- α -pironas.

Las 5,6-dihidro- α -pironas, se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, particularmente en plantas, hongos y bacterias. Poseen un anillo de δ -lactona- α,β -insaturado (fig. 6) con un grupo sustituyente alquilo, alquenilo o arilo en el C-6 y ocasionalmente sustituciones alrededor del anillo. Muchos de estos compuestos son biológicamente activos, exhibiendo fitotoxicidad, citotoxicidad contra diferentes líneas de células tumorales o actividad antimicrobiana (Mollet *et al.*, 1998). Las propiedades de estos compuestos se encuentran asociadas al poder alquilante del núcleo de la δ -lactona- α,β -insaturada (Pereda-Miranda, 1995).

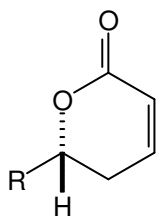


Figura 6. Anillo de δ -lactona - α,β -insaturado.

2.3.1. 6-alquenil-5,6- dihidro- α -pironas encontradas en plantas.

Las 5,6-dihidro- α -pironas C_6 substituidas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, pero se encuentran particularmente asociadas con las familias Annonaceae, Piperaceae, Lamiaceae y Lauraceae. Se han encontrado estos compuestos en todas las partes de la planta incluyendo hojas, tallos, flores y frutos. Las familias vegetales antes mencionadas no son las únicas fuentes para la obtención de las 6-alquenil-5,6-dihidro- α -pironas pues se han encontrado estos compuestos en otras familias vegetales y también están ampliamente distribuidas en hongos (Davies-Coleman y Rivett. 1989).

En los últimos años se han estado diseñando mecanismos de síntesis para producir estos compuestos con mejores rendimientos (Bluet, *et al.*, 2006).

De la familia Lamiaceae se han aislado 29 compuestos que tienen una cadena lateral con diferentes grados de oxigenación unida a la lactona insaturada. Los compuestos encontrados en esta familia han demostrado tener propiedades farmacológicas importantes como citotoxicidad en células tumorales humanas, así como actividad antimicrobiana y antifúngica. Algunos de los compuestos obtenidos de la familia que también se conocen como *serie de derivados- labiatae C12 enelactonas*, y se han estado estudiando en los últimos años son:

Umuravumbólida y desacetilmuravumbólida.

Estos compuestos (fig. 7) son los más simples de la serie, fueron aislados de *Tetradenia riparia*, (Lamiaceae) encontrada en el centro y sur de África. Aunque aun no se han estudiado sus efectos biológicos, se ha llegado a pensar que pudieran tener efectos similares a los demostrados por las α -pironas (Van Puyvelde *et al.*, 1979).

En 2001 se realizó la primera síntesis de enantiómeros puros de la umuravumbólida y la desacetilmuravumbólida. Confirmando así su estructura y configuración. Los pasos clave en la síntesis fueron: reducción asimétrica, alilboración y cierre de anillo metatésico (M. Venkat Ram Reddy *et al.*, 2001).

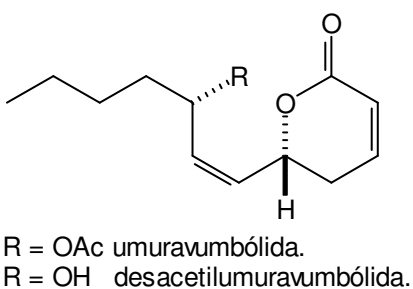


Figura 7.

Hiptólida.

Fue la primera 6-alquenil-5,6-dihidro- α -pirona aislada de la familia de las labiadas de *Hyptis pectinata*, aún cuando el compuesto (fig. 8) se había obtenido desde 1920, fue hasta los años sesenta que se describió su estructura correcta y sólo hasta el final de la década de los ochenta se estableció su configuración absoluta (Achmad *et al.*, 1987)

Recientemente se reportó la primera síntesis estereo selectiva de este compuesto y un epímero no natural en C-6. Mediante un análisis de retrosíntesis se pudieron establecer los pasos de la síntesis total de la hiptólida. Los pasos generales de esta síntesis fueron: una alilación asimétrica de Brown, una etinilación asimétrica de Carreira y un cierre de anillo metatésico (García-Fontanet, 2004).

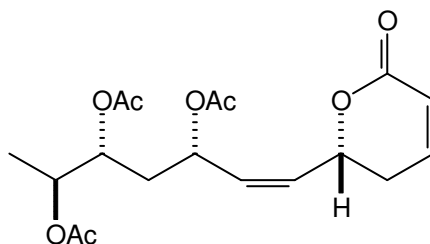


Figura 8. Hiptólida.

Espicigerólida.

Este compuesto (fig. 9) se aisló como el principio antimicrobiano y citotóxico de las partes aéreas de *Hyptis spicigera* que se encuentra extensamente distribuida a través de los trópicos de ambos hemisferios. Esta especie se conoce en México como la hierba del burro y es ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana de la cual se pudo aislar esta 5,6-dihidro- α -pirona (Fragoso-Serrano, 2000).

En 2003 se describió la síntesis estereoselectiva de esta lactona citotóxica y de tres isómeros, de los cuales dos resultaron tener actividad citotóxica en células de carcinoma cervicouterino y carcinoma nasofaríngeo. El análisis de retrosíntesis sugirió un azúcar como material de inicio, la L-ramnosa que coincide con la quiralidad de la cadena lateral de esta lactona. Los pasos importantes para la síntesis de los compuestos fueron: alilación asimétrica de Brown y un cierre de anillo metatésico (Falomir *et al.*, 2003).

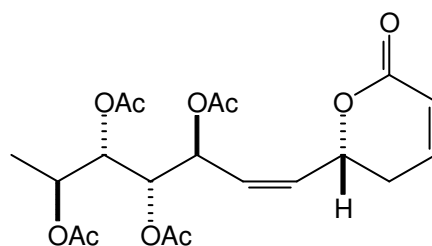


Figura 9. Espicigerólida.

Anamarina.

Fue aislada de las hojas y flores de una especie no identificada del género *Hyptis* (Alemany, *et al.*, 1979). Se han realizado diferentes investigaciones conducentes a la síntesis total y parcial de la anamarina (Fig. 10). En 2004 se describió una síntesis estereoselectiva de la 10-*epianamarina* y 5,10-*epianamarina*. La síntesis fue diseñada con base en un análisis de retrosíntesis, sugiriendo como material de inicio al etilsorbato. Finalmente, la síntesis de estos dos epímeros consta de 13 a 14 pasos (Gao y O'Doherty, 2005).

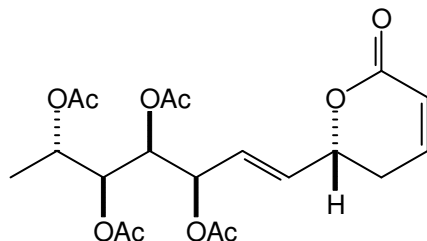


Figura 10. Anamarina.

Sinrotólida.

Aislada de la hojas de *Syncolostemon rotundifolius*, existe poca información con respecto a este compuesto (Fig. 11), hasta ahora se sabe que su estructura se estableció a través de experimentos de doble resonancia, mientras que la estereoquímica relativa de todos sus centros quirales y la conformación *cis* del doble enlace se basó en el análisis cristalográfico de rayos X (Davies-Coleman y Rivett, 1987).

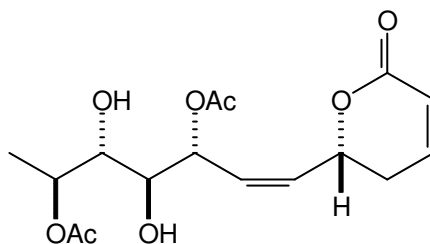


Figura 11. Sinrotólida.

2.3.2. Biosíntesis de las 5,6- dihidro- α - pironas.

Al momento sólo se tiene reporte de la biosíntesis de tres compuestos, ácido parasórbico, aspirona y psitolin. La primera investigación sobre la biosíntesis de una 5,6-dihidro- α -pironas C_6 substituida, fue estudiada en *Sorbus acuparia L.* en la formación del ácido parasórbico (fig. 12). La estructura de este compuesto muestra que la L-ramnosa es un posible precursor y se sugiere que la ruta biosintética principal es la vía del acetato malonato, ya que se observó que al utilizar (1- ^{14}C) y (2- ^{14}C)-acetato, así como (1- ^{14}C) malonato de sodio, hay una alta incorporación isotópica en C_1 , C_2 y C_6 .

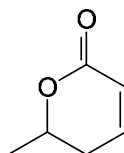


Figura 12. Ácido parasórbico.

Se han realizado investigaciones biosintéticas exhaustivas con la aspirona (fig. 13) aislada del hongo *Aspergillus melleus*, encontrándose que ésta ocurre a través de un rearrreglo de tipo Favorskii de una cadena lineal de policetona (fig. 14). Al utilizar como precursor acetato marcado doblemente con ^{13}C se logró establecer que la aspirona proviene de tres unidades intactas de acetato y tres carbonos provenientes del rompimiento de unidades de acetato, además de que el enlace entre los C_3 y C_7 se forma por dos unidades de acetato enlazadas cabeza-cabeza.

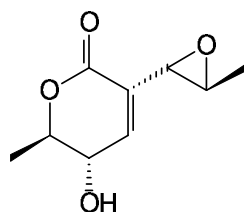


Figura 13. Aspirona

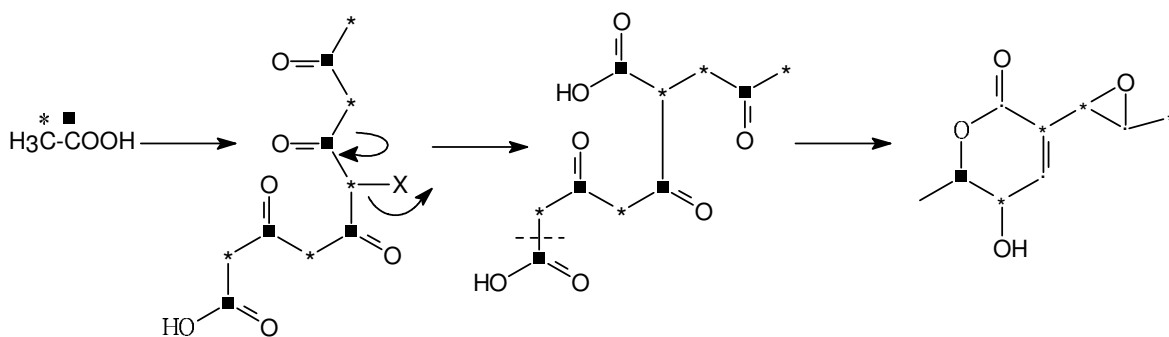


Figura 14. La incorporación de ^{13}C -acetato en la biosíntesis de la aspirona.

Por último, la fenilalanina es el precursor biosintético de la psitolina (fig. 15), aislada de *Psitlotum nudum*. La ruta fue propuesta mediante los estudios de incorporación isotópica con R,S -[2',3'- $^{14}\text{C}_2$] y S -[1'- ^{14}C]- fenilalanina (fig. 16), la extensión de la cadena lateral se lleva a cabo por la adición de una unidad de acetato como malonil CoA (Davies-Coleman y Rivett, 1989). Sin embargo, no se han realizado estudios sobre la biosíntesis de las 5,6-dihidro- α -pironas de las labiadas, pero dejan ver en su mayoría que la cadena lateral proviene de carbohidratos (Davies-Coleman y Rivett, 1989).

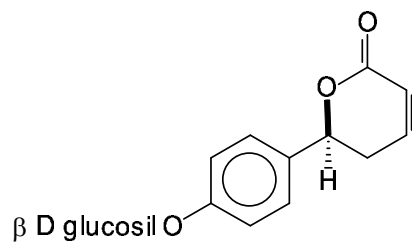


Figura 15. Psitolina.

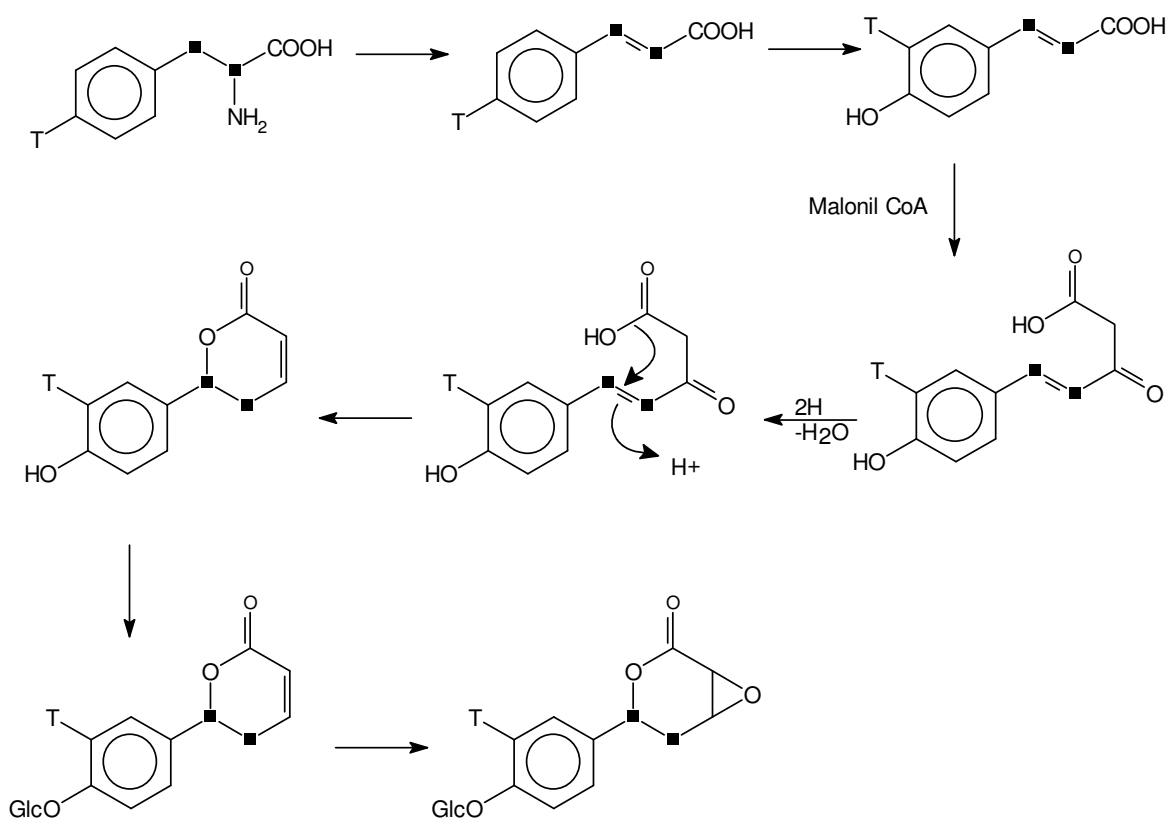


Figura 16. Biosíntesis de psitolina a partir de fenilalanina.

2.4. Propiedades espectroscópicas y espectrometrías de las 5,6-dihidro- α -pironas

2.4.1. Espectroscopía de infrarrojo y ultravioleta.

Los espectros de infrarrojo (IR) de las 5,6-dihidro- α -pironas C_6 sustituidas presentan una fuerte banda de absorción en 1710-1740 cm^{-1} debido al grupo carbonilo α,β -insaturado. El doble enlace de la lactona absorbe a 1590-1640 cm^{-1} y aunque su intensidad es mas débil que la del grupo carbonilo, se intensifica por la oxigenación de la posición C_4 o C_5 (Davies-Coleman y Rivett, 1989). Los sustituyentes en C_6 , en especial los 6-alquenos generalmente se encuentran sustituidos por hidroxilos o acetatos dando origen a bandas de absorción a 3200-3600 cm^{-1} , 1710-1730 cm^{-1} y 1240-1250 cm^{-1} (Davies-Coleman *et al*, 1987).

La longitud de onda (λ) de máxima absorción en el espectro de UV de una C_6 -alquil y C_6 -alquenal-5,6-dihidro- α -pironas monosustituida aparece normalmente entre 200-215 nm ($\epsilon = 8\ 000$ -12 000) (Davies-Coleman y Rivett, 1989).

2.4.2. Espectroscopías de RMN 1H

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) ha desempeñado un papel importante en la elucidación estructural de más de las dos terceras partes de este tipo de compuestos. El desacoplamiento de espín y experimentos de doble resonancia se han estado utilizando ampliamente para determinar la estructura química. Las señales características presentan un patrón de espín de primer orden, con desplazamientos químicos (δ) y constantes de acoplamiento (J) definidas. Estas constantes se determinan a través del análisis de los espectros de RMN unidimensionales (protónica, 1H y carbono-13, ^{13}C) y bidimensionales (1H - 1H y 1H - ^{13}C), permitiendo obtener la información necesaria para la caracterización de este tipo de compuestos (Davies-Coleman y Rivett, 1989).

En el espectro de RMN 1H las señales correspondientes al anillo de la 5,6-dihidro- α -pirona (fig. 17) se caracteriza como sigue: el protón en C_3 (δ 5.9-6.1) se acopla con el protón de C_4 ($J = 9.7$ -10.0 Hz), indicando un grupo olefinico *cis* adyacente a un grupo

carbonilo que también se acopla a larga distancia con los dos protones en C₅ ($J_{3-5} = 1\text{Hz}$, $J_{3,5\text{ax}} = 2-3\text{ Hz}$). La desprotección de H₄ (δ 6.78-7.05) respecto a H₃ es típica para un carbono β enlazado a un cromóforo de carbonilo α,β -insaturado. La multiplicidad de la señal para H₄ aparece como un doblete de dobletes por su acoplamiento con H₃ y con H_{5ax} ($J_{4,5\text{ax}} = 2-4\text{ Hz}$) y H_{5ec} ($J_{4,5\text{ec}} = 4-6\text{ Hz}$) (fig 18). Estos valores de J se han utilizado para determinar la estereoquímica relativa de los sustituyentes en C₅; además, este conjunto de señales es sumamente característico en los espectros de RMN ¹H de las 5,6-dihidro- α -pironas sustituidas en C₆ y puede utilizarse para identificar la presencia de este tipo de compuestos en extractos o fracciones (Davies-Coleman y Rivett, 1989; Pereda-Miranda, 1995).

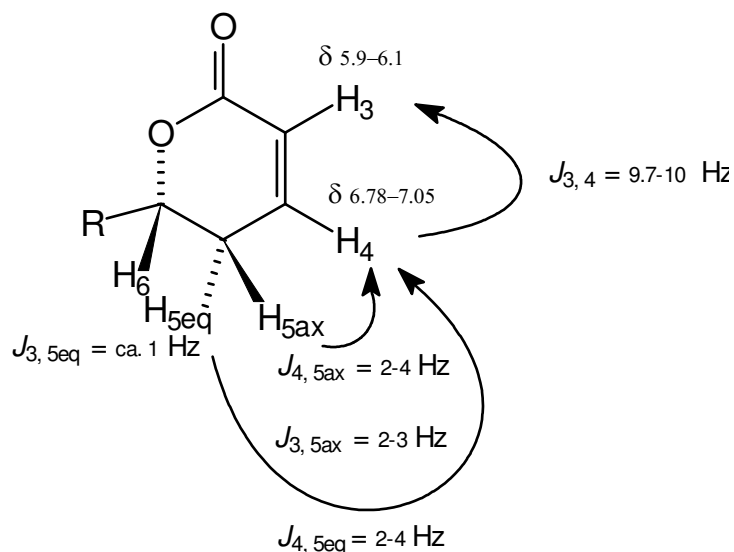


Figura 17. 5,6-dihidro- α -pironas sustituidas en C₆

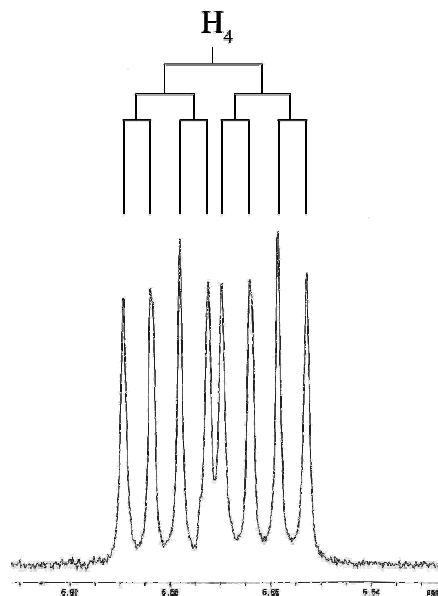


Figura 18. Desplazamientos químicos y multiplicidad característica para el protón olefínico conjugado del núcleo de la 5,6-dihidro- α -pirona.

Los dos protones alílicos en C_5 son no equivalentes y presentan un acoplamiento geminal típico ($J_{5ec,5ax} = 15-19$ Hz) y un acoplamiento con H_4 y H_6 ($J_{5ec,6} = 3-6$ Hz). Estos dos protones aparecen como un multiplete complejo en la mayoría de los casos entre δ 2.3-2.8. La hidroxilación o la acetilación de C_5 provoca un desplazamiento a campo bajo del protón H_5 germinal a esta sustitución (δ 4.2-5.4). El desplazamiento químico de H_6 (δ 4.2-5.1) depende de la naturaleza de la cadena olefinica que sustituye al núcleo C_6 . En el caso de la hiptólida (fig. 8), los protones metilénicos en C_5 presentan un acoplamiento con el protón geminal a la función etérea de la lactona (H_6), cuyo desplazamiento químico se observa en δ 5.29. El valor observado de 9.9 Hz sugiere una interacción *trans-diaxial* para los protones $H_{5\beta}$ y H_6 , de esta manera, se establece la configuración relativa pseudoecuatorial para la cadena lateral (Davies –Coleman y Rivett, 1989; Frago Serrano, 2000) (fig.19).

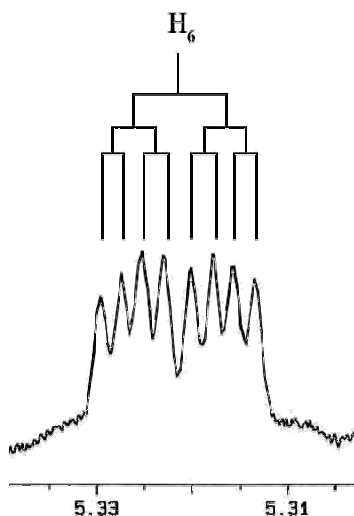


Figura 19. Multiplicidad observada para el núcleo H_6 de la 5,6-dihidro- α -pirona.

2.4.3. Espectroscopias de RMN ^{13}C .

En el espectro de RMN ^{13}C , la información de mayor importancia que se obtiene es la siguiente: el desplazamiento químico del átomo del carbonilo C_2 aparece usualmente centrado en δ 160-169, el C_3 entre δ 120-122 y la señal de C_4 en δ 144-148. El átomo de C_5 aparece a δ 25-30 y la oxigenación de este núcleo causa un desplazamiento paramagnético de casi 40 ppm y provoca un efecto menor sobre el desplazamiento químico de C_4 . Así, C_6 que normalmente aparece en δ 72-78, se desplaza paramagnéticamente por aproximadamente 35 ppm (Davies-Coleman y Rivett 1989). Las señales correspondientes a la cadena lateral son las siguientes: la señal en el espectro a campo alto corresponde al grupo metilo terminal (δ 12.9-16.6). Los metinos enlazados a oxígeno aparecen centrados en δ 66-81, los protones olefínicos en δ 121.1-126.3 y δ 132.9-144.9. Las señales correspondientes a los anillos de oxirano aparecen centradas en δ 56.5 y 58.9 ppm (Davies-Coleman y Rivett, 1989; Fragoso Serrano, 2000).

3. HIPOTESIS.

Tomando como antecedente la actividad biológica de las 5,6-dihidro- α -pironas C₆ substituidas aisladas de la familia Lamiaceae y específicamente la espicigerólida, un diastereoisómero de la sinrotólida, que mostró actividad citotóxica selectiva para el carcinoma nasofaríngeo en dos de sus isómeros obtenidos durante su síntesis, hace de interés la obtención de algunos otros diastereoisómeros de estas moléculas, para el estudio de su análisis conformacional y citotóxico que permitirá establecer la selectividad y la actividad sobre otras líneas celulares derivadas de carcinomas humanos.

4. OBJETIVO GENERAL.

El objetivo general del presente proyecto consistió en la obtención de derivados semisintéticos utilizando la sinrotólida como materia prima.

4.1. Objetivos específicos.

Para el cumplimiento del objetivo general se propusieron los siguientes objetivos específicos.

- Realizar la secuencia de reacciones químicas necesarias para la obtención de los derivados semisintéticos.
- Purificar los crudos de reacción por cromatografía de líquidos de alta resolución.
- Establecer la estructura molecular de los derivados generados, mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas contemporáneas.

5. PARTE EXPERIMENTAL.

5.1. Procedimientos generales.

5.1.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución.

Se utilizó un cromatógrafo marca Waters (Millipore Corporation, Waters Chromatography Division Milford, MA, EE.UU.) equipado con una bomba (modelo 600E) y detector de arreglo de diodos (modelo 996), adaptado a una computadora (Optiflex 466/LE, DELL). El control del equipo, la adquisición de datos, así como, el procesamiento y el manejo de la información cromatográfica se realizaron con el programa Empower 2 (Waters). La resolución de los crudos de reacción, así como la purificación de los compuestos, se efectuaron empleando una columna preparativa Symmetry C₁₈ (7 µm 19 x 300 mm) y columna analítica Symmetry C₁₈ (5 µm 4.6 x 250 mm) ambas de la marca Waters.

5.1.2. Instrumental analítico.

Los puntos de fusión fueron determinados con el aparato Fisher-Johns. Los espectros de masas (EM) registrados mediante bombardeo rápido de átomos bajo la modalidad positiva (FAB⁺) utilizaron una matriz de glicerol en un espectrómetro Jeol SX (modelo 102-A). Los espectros por impacto electrónico se registraron a 20 eV en un espectrómetro Hewlett-Packard (modelo 5989-A). Los valores de dispersión óptica rotatoria (DOR) se determinaron en un polarímetro Perkin-Elmer 241. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de alta resolución protónica (¹H; 500 MHz) y de carbono 13 (¹³C; 125.7 MHz), así como los experimentos COSY, se registraron en un aparato Varian Unity Plus 500 o en un Broker AMX-500.

5.2. Obtención de compuestos semisintéticos a partir de sinrotólida.

Con el fin de epimerizar las posiciones C_{4'} y C_{5'} y de obtener derivados semisintéticos a partir de la sinrotólida (**1**). Se realizaron las reacciones indicadas en la figura 20, para generar la sinrotólida peracetilada (**3**), sinrotólida acetilada en las posiciones C_{4'} y C_{5'} (**2** y **4**) y el producto de oxidación de la 4'-acetilsinrotólida (**5**)

5.2.1. Acetilación parcial de la sinrotólida.

La sinrotólida (**1**, 20 mg) se disolvió con 103 µL de una mezcla de Ac₂O (6 µL) y piridina (200 µL) se mantuvo en agitación magnética a -10 °C durante 30 minutos. Al cabo de ese tiempo, se adicionó una cantidad igual de Ac₂O-piridina, dejando la mezcla de reacción con agitación continua y a temperatura ambiente hasta completar 2 horas. La mezcla de reacción se llevó a sequedad con N₂ para eliminar los residuos volátiles.

Posteriormente, se procedió a resolver el crudo de reacción (20.5 mg) por CLAR a una escala preparativa, utilizando una mezcla de acetonitrilo- agua (1:1) como fase móvil y una velocidad de flujo de 5 mL/min, recuperando 9.8 mg (48.54 %) de sinrotólida (**1**, t_R = 11.4 min), además de obtener los siguientes productos de reacción: 3.1 mg (15.35 %) de peracetato de la sinrotólida (**3**, t_R = 31.1 min), 5.8 mg (29 %) de la 4'-acetilsinrotólida (**2**, t_R = 17.4 min), 1.2 mg (6 %) de 5'-acetilsinrotólida (**4**, t_R 13.5 min).

Compuesto 2. Sólido blanco, pf 101–102 °C; DOR (*c* 1.26, CHCl₃) [α]₅₈₉ 0, [α]₅₇₈ 0, [α]₅₄₆ 0, [α]₄₃₆ +17.5, [α]₃₆₅ +77.1; RMN ¹H ver cuadro 1, fig.22; RMN ¹³C, ver cuadro 2. fig.25; EM-IE (20 eV) *m/z* (% de int. rel.) [M]⁺ 384 (0.7), [M – H₂O]⁺ 366 (3.5), [M – C₂H₄O₂]⁺ 324 (5.7), [M – C₄H₇O₂]⁺ 297 (1.6), [M – C₄H₇O₂ – C₂H₄O₂]⁺ 236 (18.0), 204 (27.5), 178 (38.8), 177 (23.7), 165 (18.2), 154 (22.7), 153 (37.8), 149 (21.5), 148 (23.2), 137 (18.8), 136 (75.8), 135 (57.2), 129 (27.9), 118 (21.4), 108 (25.1), 107 (50.6), [M – C₁₃H₁₉O₇]⁺ 97 (7.3), 81 (42.1), 79 (11.1), [C₄H₄O]⁺ 68 (39.5), [C₂H₃O]⁺ 43 (100.0); EM-FAB⁺ alta resolución *m/z* [M + H]⁺ 385.1495 (calculado para C₁₈H₂₄O₉ 384.1420).

Compuesto 3. Sólido blanco, pf 101-102 °C; DOR (*c* 1.62, CHCl₃) [α]₅₈₉ -8.6, [α]₅₇₈ -8.6, [α]₅₄₆ -9.8, [α]₄₃₆ -7.3, [α]₃₆₅ +19.0; RMN ¹H, ver cuadro 1, fig. 24; RMN ¹³C, ver cuadro 2, fig. 27; EM-IM (20 eV) *m/z* (% de int. rel.) [M]⁺ 426 (18.5), 367 (12.0), [M – C₂H₄O₂]⁺ 366 (59.8), [M – C₂H₄O₂ – C₂H₂O]⁺ 324 (6.5), [M – 2C₂H₄O₂]⁺ 264 (8.5), 230 (23.2), [M – 3 C₂H₄O₂ – C₂H₂O]⁺ 204 (50.4), [M – C₁₀H₁₅O₆]⁺ 196 (9.6), 195 (88.0), 179 (18.1), 178 (71.4), 165 (26.8), 154 (19.2), 153 (57.7), 149 (19.3), 137 (23.6), 136 (100.0), [M – C₁₀H₁₅O₆ – C₂H₄O₂]⁺ 135 (81.0), 130 (22.2), 129 (53.8), 118 (24.1), 108 (25.5), 107 (44.2), [M – C₁₅H₂₁O₈]⁺ 97 (12.7), 81 (21.1), [C₄H₄O]⁺ 68 (37.4), [C₂H₃O]⁺ 43 (61.5).

Compuesto 4. DOR (*c* 0.59, CHCl₃) [α]₅₈₉ 0, [α]₅₇₈ 0, [α]₅₄₆ +2, [α]₄₃₅ +15, [α]₃₆₅ +64; RMN ¹H ver cuadro 1, fig 23; RMN ¹³C, ver cuadro 2, fig 26; EM-IE (20 eV) *m/z* (% de int. rel.) [M]⁺ 384 (0.3), [M – H₂O]⁺ 366 (0.9), [M – C₂H₄O₂]⁺ 324 (2.2), [M – 2 C₂H₄O₂]⁺ 264 (1.0), 236 (8.1), [M – 3C₂H₄O₂]⁺ 204 (20.6), [M – C₈H₁₃O₅]⁺ 195 (18.1), [M – C₈H₁₃O₅ – H₂O]⁺ 177 (26.6), 165 (20.4), 154 (38.4), 153 (38.6), 148 (19.8), 137 (17.8) 136 (66.8), [M – C₈H₁₃O₅ – C₂H₄O₂]⁺ 135 (62.1), 129 (40.7), 118 (20.2), 108 (28.3), 107 (47.1), [M – C₁₃H₁₉O₇]⁺ 97 (16.4), 81 (28.2), [C₄H₄O]⁺ 68 (33.1), [C₂H₃O]⁺ 43 (100); EM-FAB⁺ alta resolución *m/z* [M + H]⁺ 385.1496 (calculado para C₁₈H₂₄O₉ 384.1420).

5.2.2. Oxidación del compuesto 4'-acetilsinrotólida

Se disolvieron 18 mg en 800 µl de AcOH y se adicionó una solución acuosa de CrO₃ (18. mg / 1600 µL) a 0°C. Se adicionaron 2 porciones de 800 µL de la solución oxidante, dejando reposar una hora entre cada adición, completando un total de 3 horas con agitación continua a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con CH₂Cl₂, Posteriormente se lavó la fase orgánica con solución saturada de NaHCO₃ hasta pH neutro, se secó con Na₂SO₄ y se concentró a sequedad. El crudo de la reacción (14.6 mg) se purificó por CLAR utilizando las siguientes condiciones cromatográficas: escala preparativa, utilizando una mezcla de acetonitrilo-agua (1:1) como fase móvil y una velocidad de flujo de 5 mL/min, recuperando 6 mg (33.5 %) de 4'-acetil-5'-oxosinrotólida (**5**, t_R = 21.5 min).

Compuesto 5. RMN ^1H ver cuadro 1, fig. 32; RMN ^{13}C , ver cuadro 2, fig. 34; EM-IE (20 eV) m/z (% de int. rel.) $[\text{M}]^+$ 382 (0.2), $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$ 322 (0.7), 167 (17.3) 166 (17.1), 165 (39.5), 153 (23.9), 149 (40.1), 148 (52.8) 147 (31.4), 137 (18.4), 136 (20.0), 135 (35.5), 115 (23.1), $[\text{M} - \text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_7]^+$ 97 (29.3), 95 (15.0), 87 (18.2), 85 (19.4), 81 (100.0), 73 (14.9), 71 (35.7), 70 (13.7), 69 (29.0), $[\text{C}_4\text{H}_4\text{O}]^+$ 68 (35.6), 60 (12.8), 57 (43.5), 55 (11.5), $[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^+$ 43 (84.7).

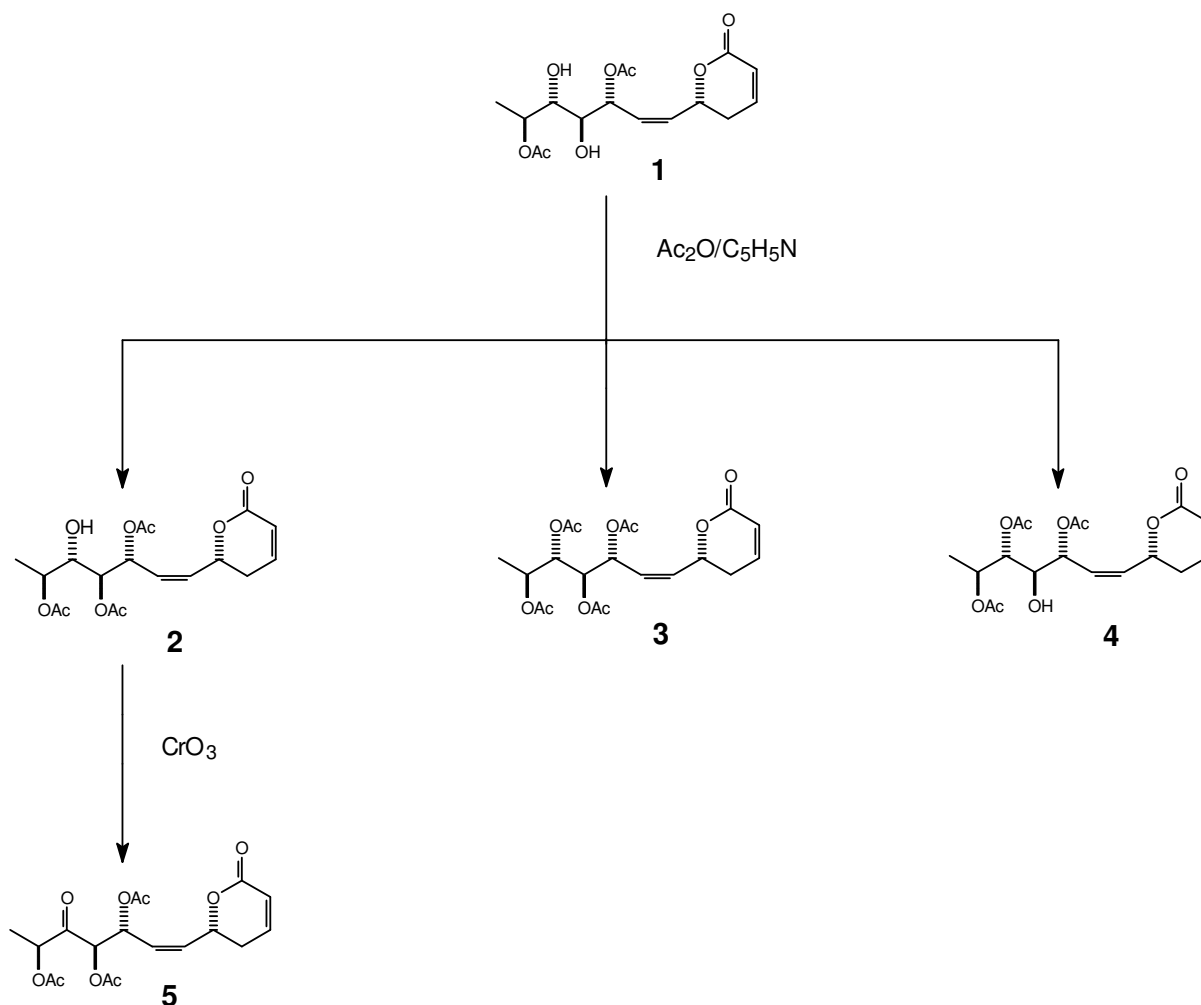


Figura 20. Secuencia sintética para obtener los derivados **2-5** de la sinrotólida.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1. Epimerización de la sinrotólida.

6.1.1. Acetilación (paso1).

La sinrotólida (**1**) se acetiló parcialmente utilizando cantidades equimolares de anhídrido acético-piridina, la resolución de la mezcla de reacción mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (fig. 21) proporcionó 4 constituyentes principales: la materia prima recuperada (**1**), la 4'-acetilsinrotólida (**2**), la 5'-acetilsinrotólida (**4**) y la sinrotólida peracetilada (**3**)

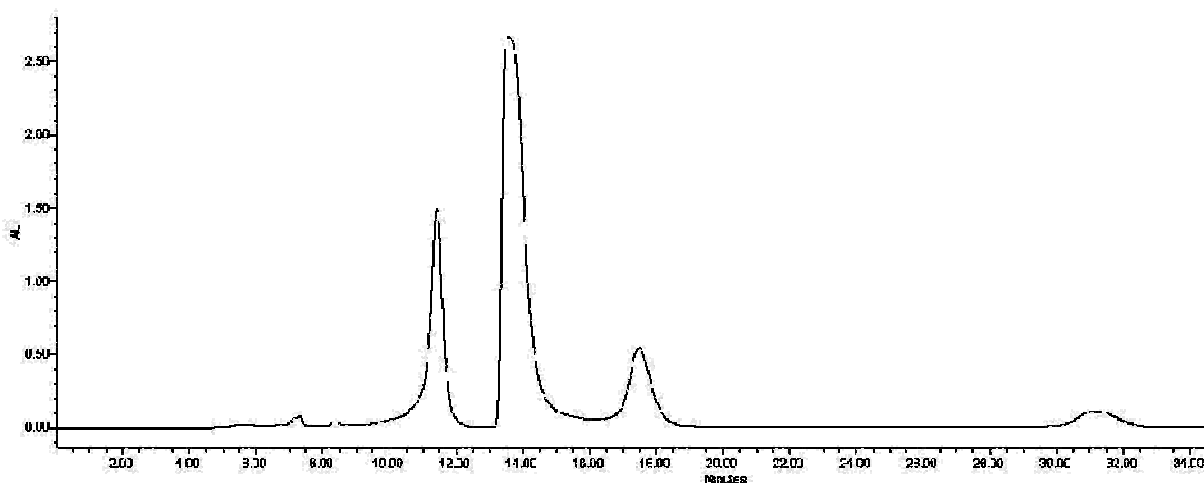


Figura 21 Cromatograma generado mediante CLAR de la mezcla de la reacción obtenida durante la acetilación parcial de la sinrotólida (**1**). Condiciones cromatográficas: columna preparativa Symmetry C₁₈ 7 μ m 19x300 mm, fase móvil: acetonitrilo-agua 1:1, velocidad de flujo = 5 mL/min. Asignación de los picos: t_R = 11.4 min, sinrotólida (**1**); t_R = 13.5 min, 5'-acetilsinrotólida (**4**); t_R = 17.4 min, 4'-acetilsinrotólida (**2**); t_R = 31.1 min, peracetilsinrotólida (**3**).

6.1.2. Resonancia Magnética Nuclear de los compuestos sintetizados.

La monoacetilación de los compuestos **2** y **4** se estableció a través del análisis de sus espectros de RMN ¹H (figuras 22 y 23). En primer lugar, se observaron señales sólo para tres protones base de grupos acetoxilo (δ 2.12, 2.08 y 2.02) y una señal que integraba para un protón, cuyo desplazamiento químico correspondía a un metino geminal a un grupo

hidroxilo centradas en δ 3.80 (**2**) y 3.92 (**4**), además de la señales para los hidroxilos (δ 2.82 y 2.62, respectivamente). La posición del grupo acetato en C_{4'} ó C_{5'} se estableció con el registro de los espectros ¹H-¹H COSY; en el compuesto **2**, la señal centrada en δ 3.80 (ddd, $J = 9.3, 5.5$ y 2.6 , H_{5'}) presentó cuadros de conectividad con la señal para H_{6'} (δ 4.90, dc, $J = 6.6$ y 2.6) y con la señal centrada en δ 5.08 (dd, $J = 9.3$ y 2.8 H₂, H_{4'}). Por lo tanto, el compuesto **2** corresponde a la 4'-acetilsinrotólida. En el compuesto **4**, que debería corresponder a la 5'-acetilsinrotólida, el hidroximetano (δ 3.92, ddd, $J = 9.4, 4.5$ H₂, y 1.0) presentó interacciones con las señales centradas en δ 5.53 (ddd, $J = 9.4, 4.5, 1.0$ H₂, H_{3'}) y δ 5.06 (dd, $J = 7.2$ y 3.9 H₂, H_{5'}). La interacción de esta última señal centrada en δ 5.23 (dc, $J = 6.5$ y 3.9 H₂) permitió asignar el desplazamiento químico del protón H_{6'}. Así, se ratificó la posición del acetoxilo adicional en C_{5'}. Con respecto al compuesto peracetilado (**3**) en su espectro de RMN ¹H (fig. 24) se observaron señales para cuatro grupos acetoxilo (δ 2.11, 2.11, 2.06 y 2.03) y la desaparición de la señal que correspondía al el protón del grupo hidroxilo.

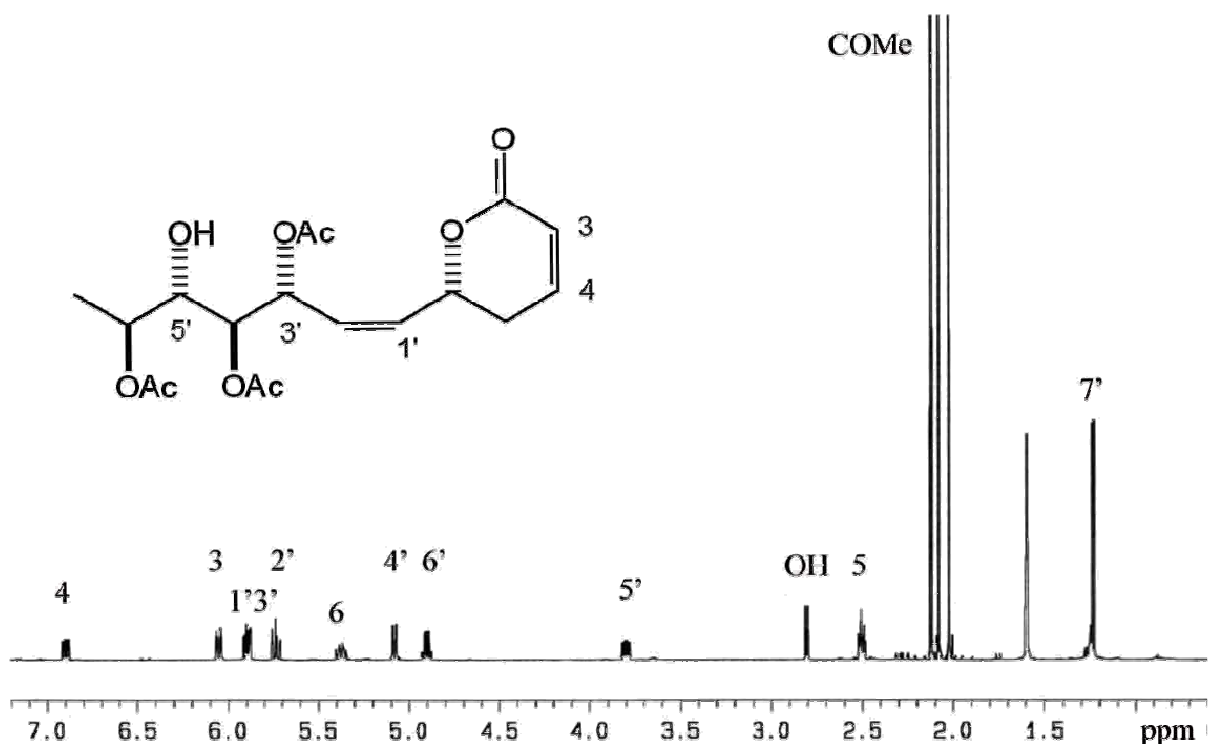


Figura 22. Espectro de RMN ¹H de la 4'-acetilsinrotólida (**2**) (500 MHz, CDCl₃).

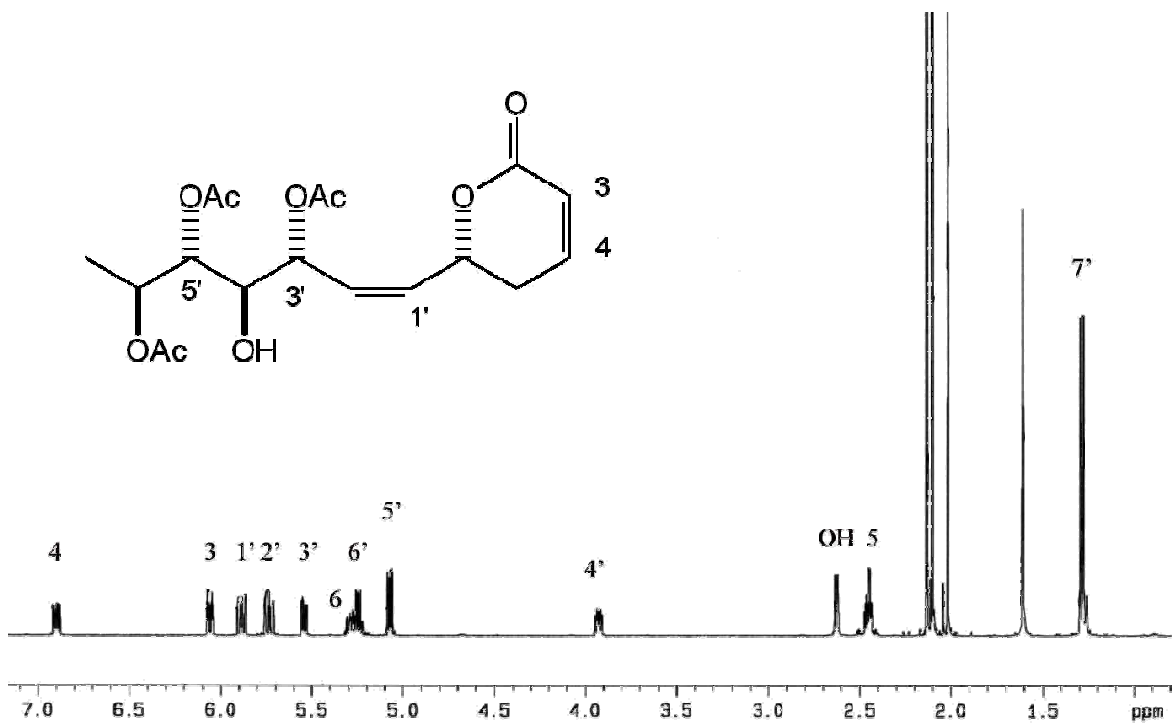


Figura 23. Espectro de RMN ^1H de la 5'-acetilsinrotólida (**4**) (500 MHz, CDCl_3).

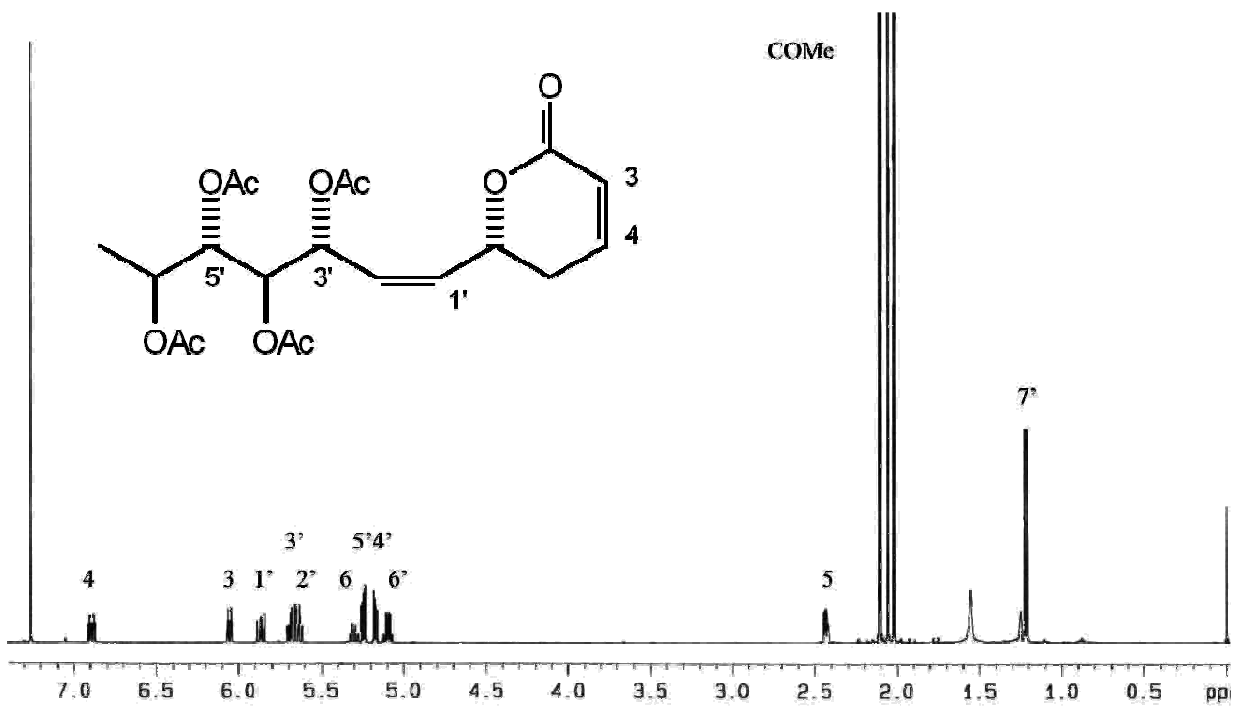


Figura 24. Espectro de RMN ^1H de la peracetilsinrotólida (**3**) (500 MHz, CDCl_3).

Los espectros de RMN ^{13}C confirmaron la presencia del núcleo de la 5,6- dihidro- α -pirona sustituida, mostrando señales prácticamente con los mismos desplazamientos en todos los compuestos (figuras 25, 26 y 27), las resonancias fueron: el carbonilo C_2 observado entre δ 163.1 - 163.6; las señales para los carbonos olefínicos conjugados C_3 y C_4 se observaron entre δ 121.3-121.5 y 144.3-144.9; el metileno alílico C_5 asignado a la señal centrada entre δ 29.5 y 29.7, respectivamente; por último, la señal del metino centrado entre δ 73.7-74.2 se asignó al centro estereogénico C_6 , evidenciando una cadena lateral en la posición C_6 del núcleo de la 5,6- dihidro- α -pirona (cuadro 2). De esta forma también fueron asignadas las señales correspondientes a tres carbonos geminales a las funciones acetoxilo para los compuestos monoacetilados (**2** y **4**) (figuras 25 y 26) y 4 señales de grupo acetoxilo para la peracetilsinrotólida (**3**) (fig. 27) (ver cuadro 2). Así, se muestran las asignaciones de los núcleos de ^{13}C que satisfacen los requisitos para la fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_9$ que corresponde a los compuestos **2** y **4**. De la misma forma, se presenta la asignación de los núcleos de ^{13}C que satisfacen los requisitos para $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$ (**3**) (fig. 27).

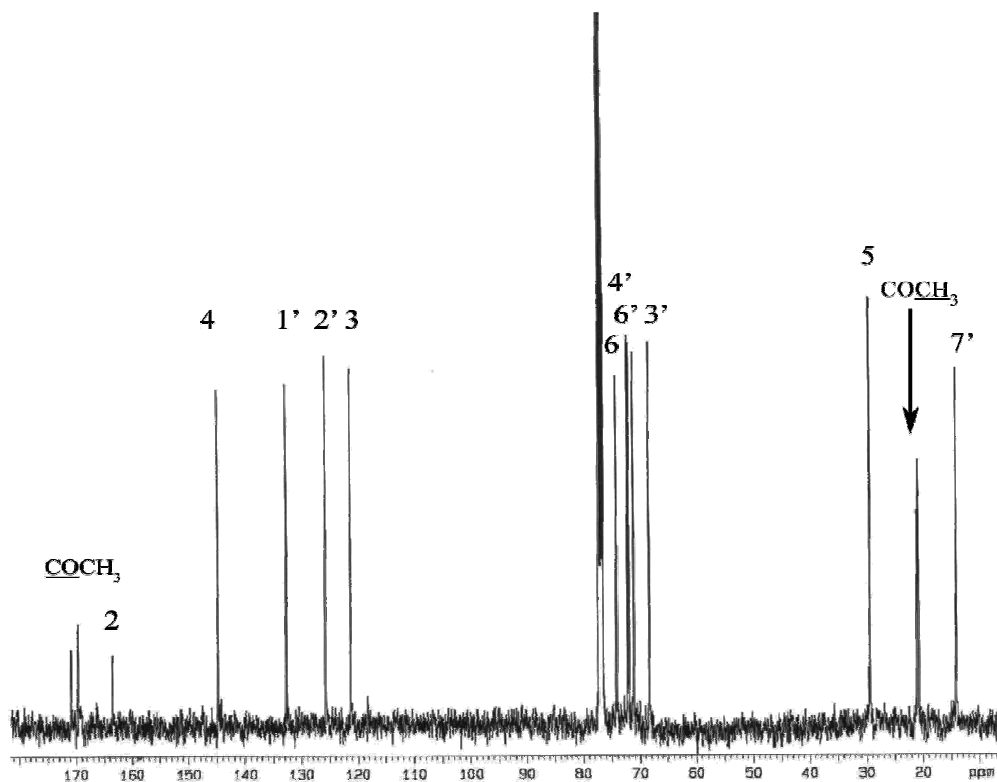


Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C de la 4'-acetilsinrotólida (**2**).

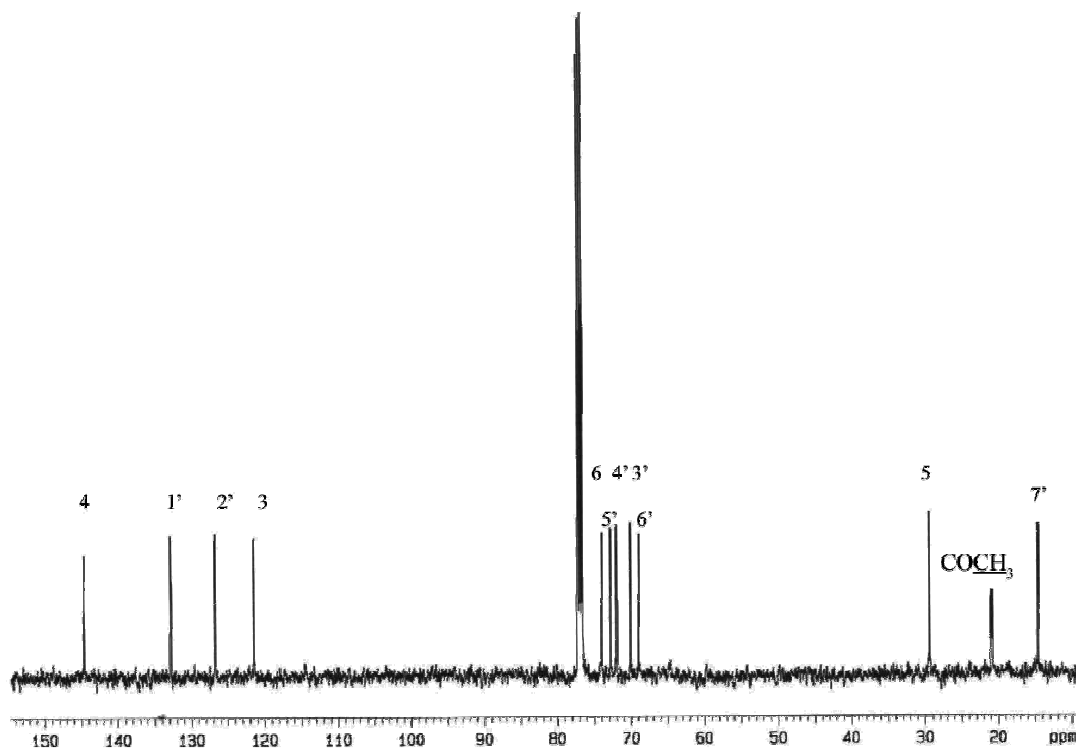


Figura 26. Espectro de RMN ^{13}C de la 5'-acetilsinrotólida (4).

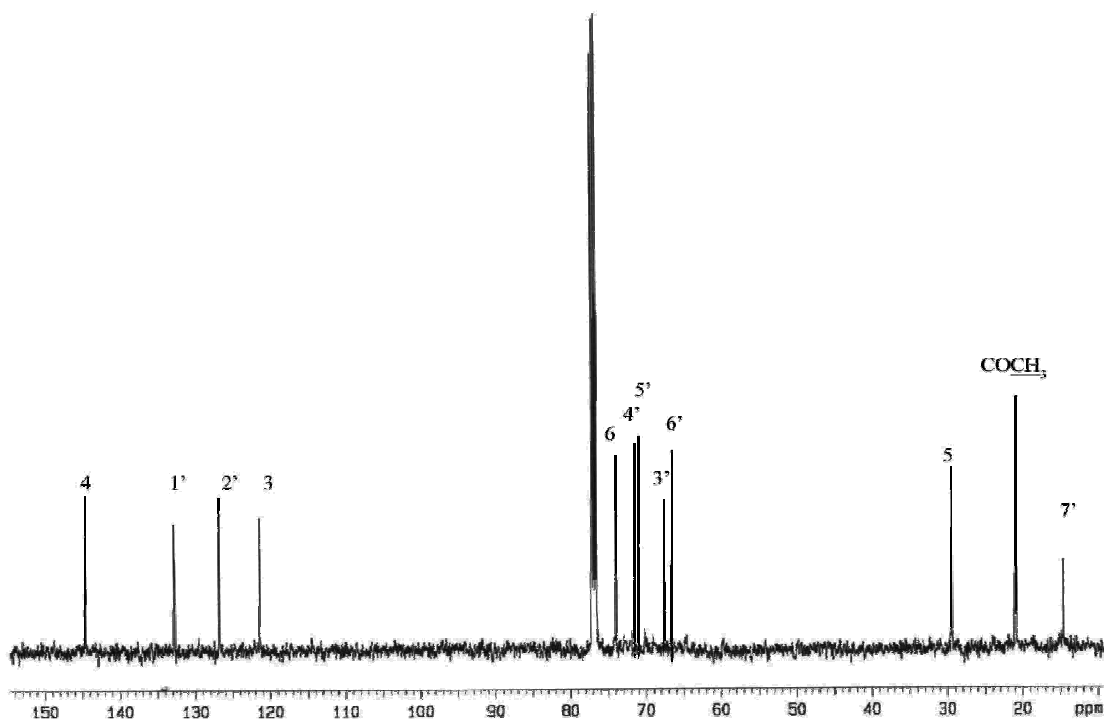


Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C de la paracetilsinrotólida (3).

El empleo de RMN- ^1H bidimensional (2D-COSY) permitió verificar la conectividad entre los protones vecinos; es de importancia mencionar los cuadros de conectividad de $\text{H}_6 - \text{H}_1'$ para todos los compuestos (**2-5**) que relacionan al núcleo de la 5,6- dihidro- α -pirona con su cadena lateral (figuras 28-30 y 33), así como también la localización del grupo hidroxilo en la cadena lateral, ubicado en el carbono 5' para la 4'-acetilsinrotólida (**2**) (fig. 28) y en el carbono 4' para la 5'-acetilsinrotólida (**4**) (fig. 29). Verificando también la ausencia del grupo hidroxilo en la peracetilsinrotólida (**3**) (fig. 30).

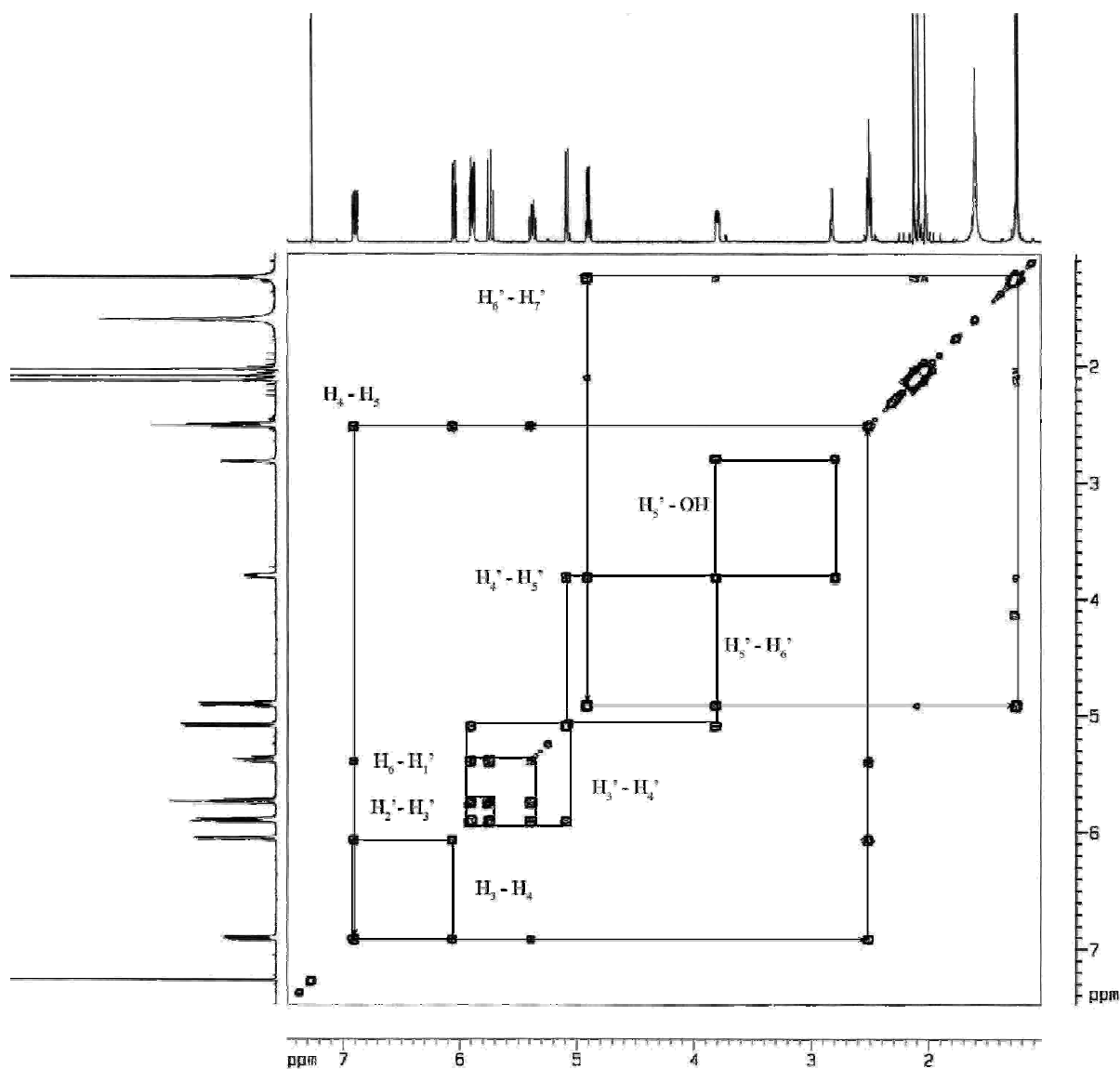


Figura 28. Espectro bidimensional $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY de la 4'-acetilsinrotólida (**2**).

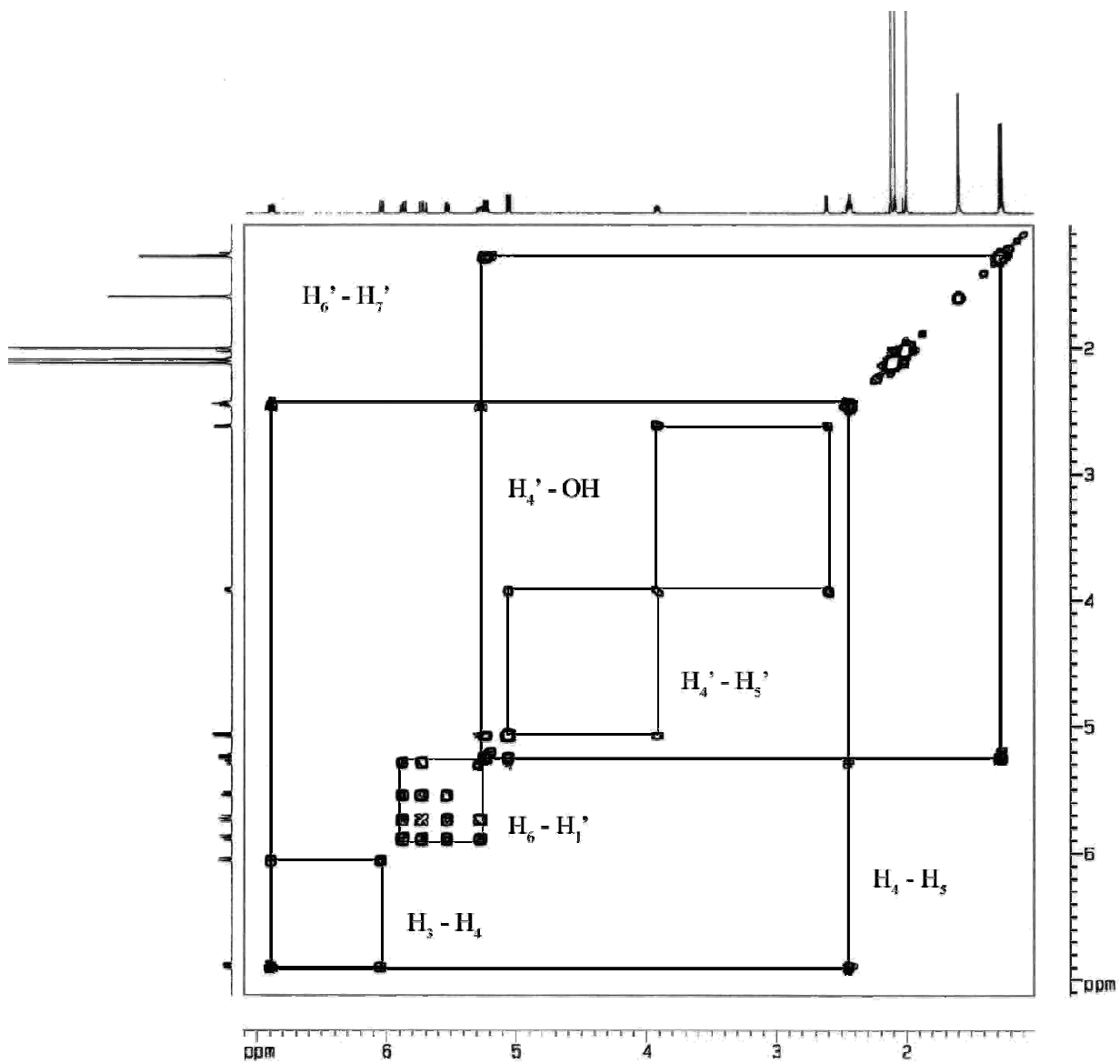


Figura 29. Espectro bidimensional $^1H - ^1H$ COSY de la 5'-acetilsinrotólida (4).

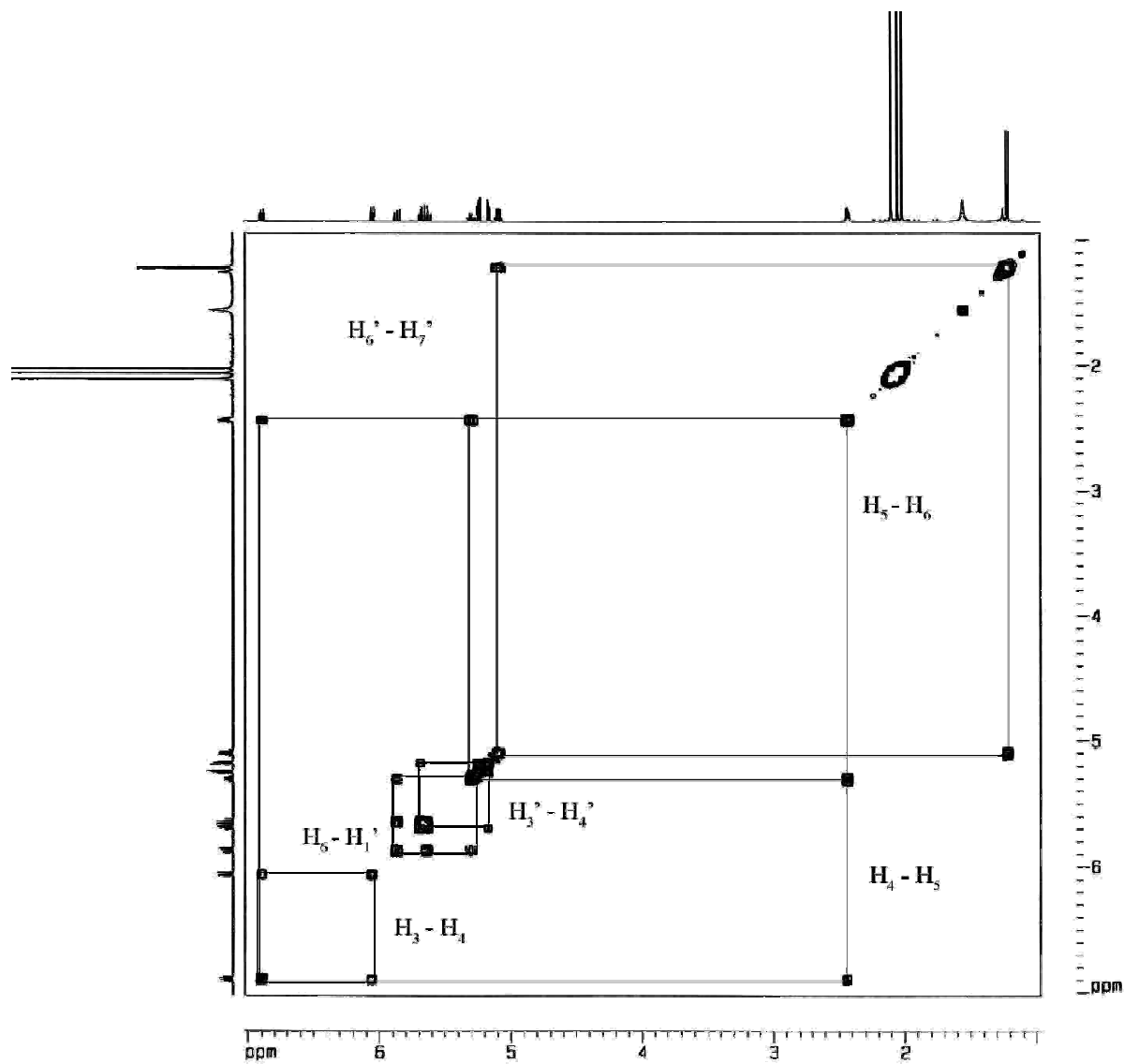


Figura 30. Espectro bidimensional ¹H - ¹H COSY de la peracetilsinrotólida (3).

6.1.3. Oxidación

Se realizó la oxidación del compuesto **2** (4'-acetilsinrotólida) utilizando trióxido de cromo, la resolución de la mezcla de reacción mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (fig. 31) proporcionó dos constituyentes principales: la materia prima recuperada (**2**) y el derivado 4'-acetil-5'-oxosinrotólida (**5**).

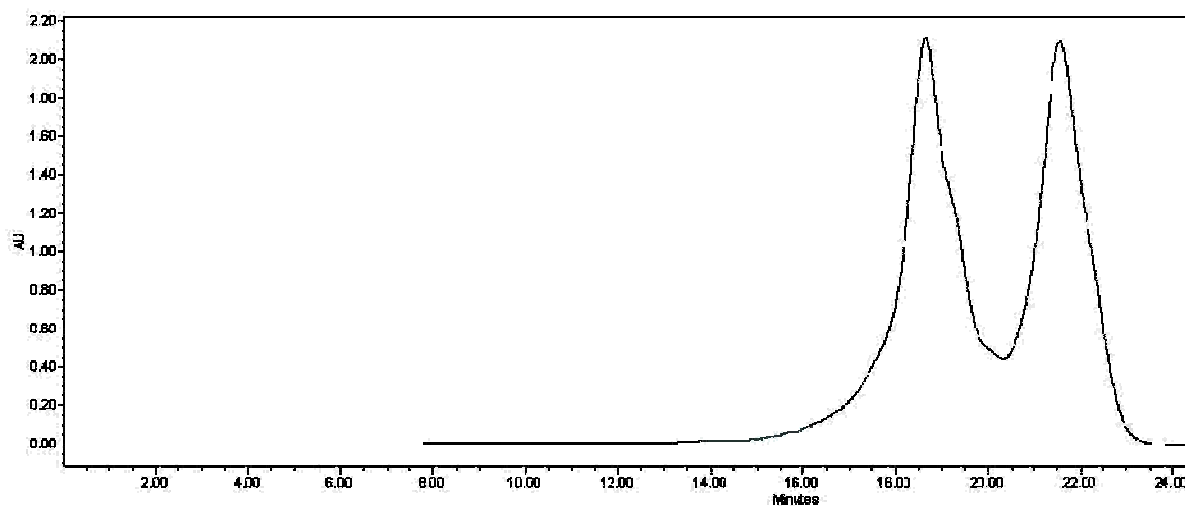


Figura 31. Cromatograma generado mediante CLAR de la mezcla de la reacción obtenida de la oxidación de 4'-acetilsinrotólida (**2**). Condiciones cromatográficas: columna preparativa Symmetry C₁₈ 7 μ m 19 x 300 mm, fase móvil: acetonitrilo-agua 1:1, velocidad de flujo = 5 ml/min. Asignación de los picos: t_R = 18.6 min, materia prima (**2**); t_R = 21.5 min, 4'-acetil-5'-oxosinrotólida (**5**).

6.1.4. Resonancia Magnética Nuclear del compuesto sintetizado en la oxidación.

En el espectro de RMN ¹H (fig. 32) se observan las mismas señales características del núcleo de la 5,6-dihidro- α -pirona sustituida (ver sección 6.1.2). Lo que es importante destacar en este espectro es la ausencia de la señal H₅ por la oxidación de este carbono y la desprotección de H₄ (δ 5.70) como consecuencia del grupo carbonilo, además de observar señales para tres protones base de grupos acetoxilo (δ 2.18, 2.13 y 2.01) (cuadro 1).

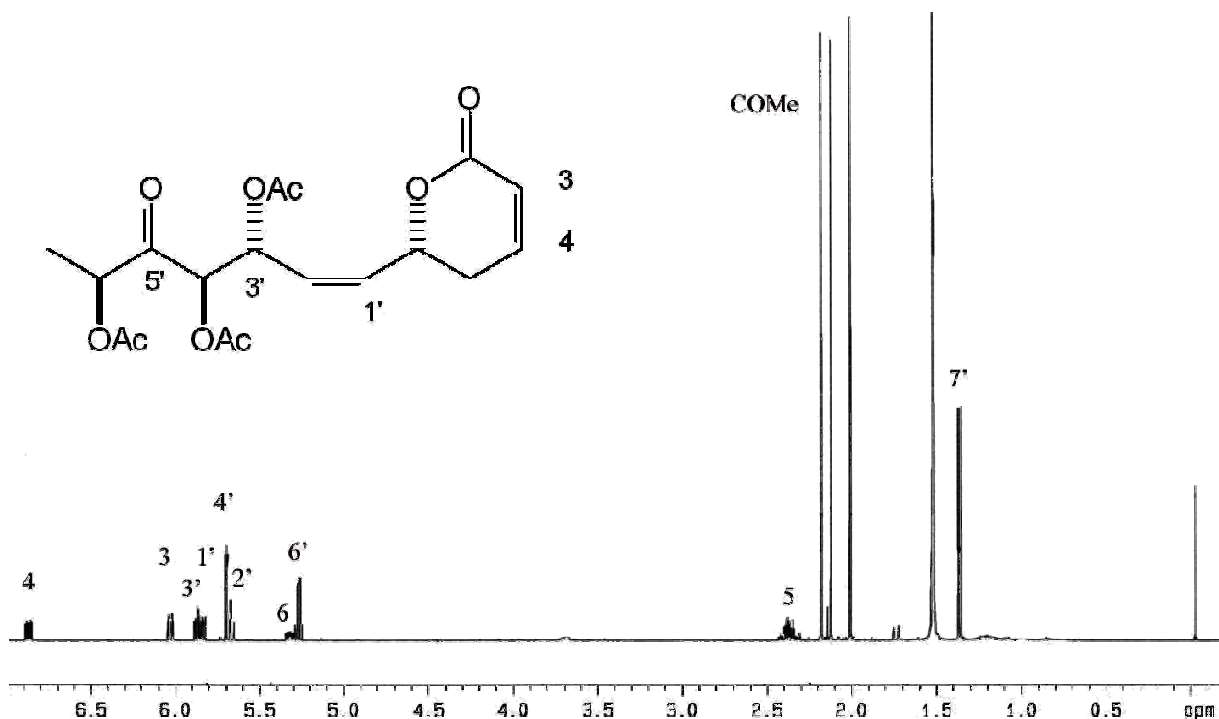


Figura 32. Espectro de RMN ^1H de la 4'-acetil-5'-oxosinrotólida (**5**) (500 MHz, CDCl_3).

El espectro de RMN- ^1H bidimensional (2D-COSY) resalta la ausencia de los cuadros de conectividad entre $\text{H}_5 - \text{H}_4'$ y $\text{H}_5 - \text{H}_6'$ (fig. 33).

Los espectros de RMN ^{13}C confirmaron la presencia del núcleo de la 5,6- dihidro- α -pirona sustituida, mostrando señales prácticamente con los mismos desplazamientos en todos los compuestos (ver sección 6.1.2). También, resulta importante en este espectro (fig. 34) la señal que aparece en δ 205.3 (cuadro 2), característica del grupo carbonilo correspondiente al C_5' , confirmando así la oxidación del compuesto 4'-acetilsinrotólida en dicha posición. Al mismo tiempo fueron asignadas las señales correspondientes a tres carbonos geminales a las funciones acetoxilo (δ 170.5, 170.0 y 169.8). Así, se muestran las asignaciones de los núcleos de ^{13}C que satisfacen los requisitos para la fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_9$ (**5**).

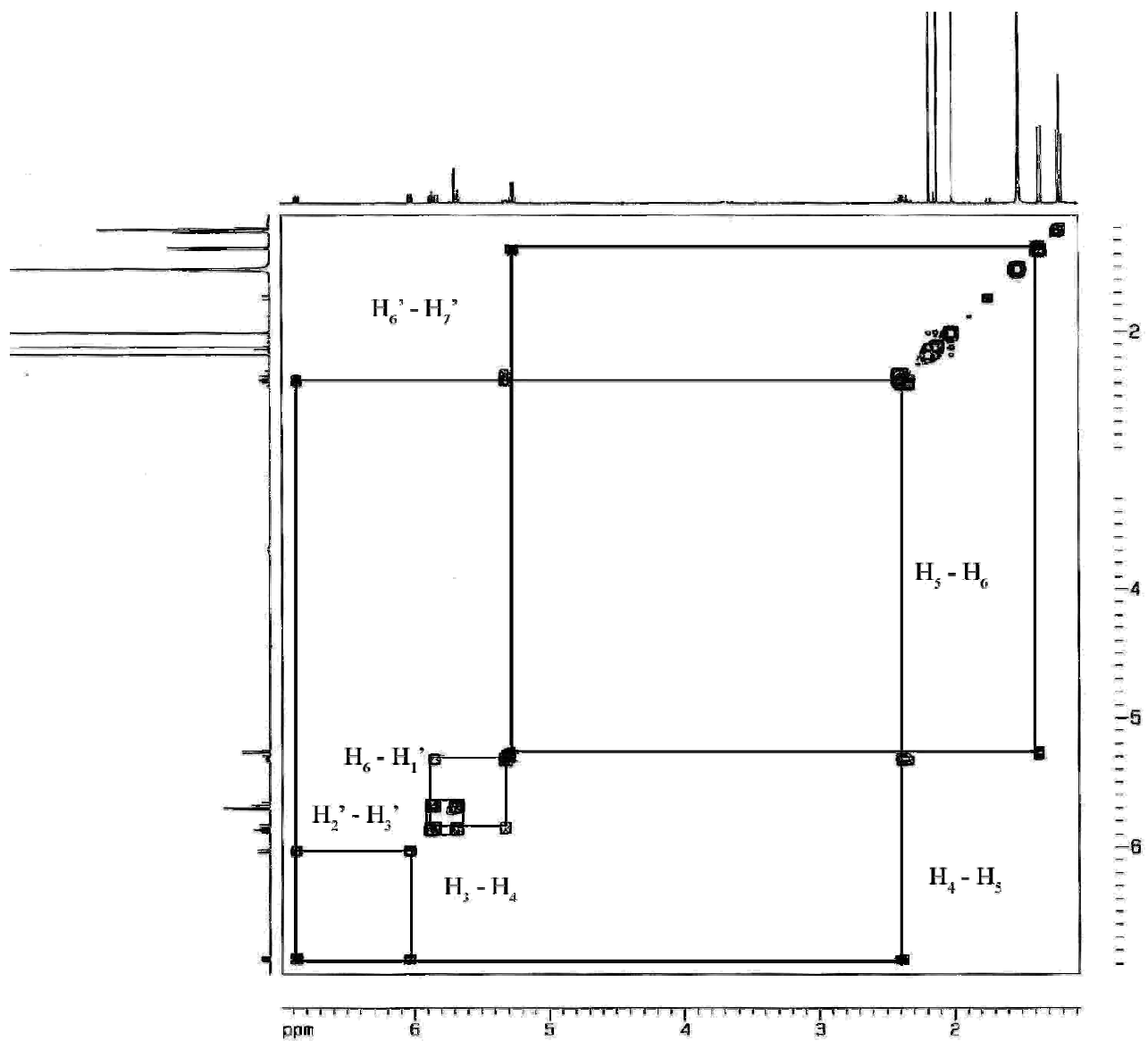


Figura 33. Espectro bidimensional ¹H - ¹H COSY de la 4'-acetil-5'-oxosinrotólida (5).

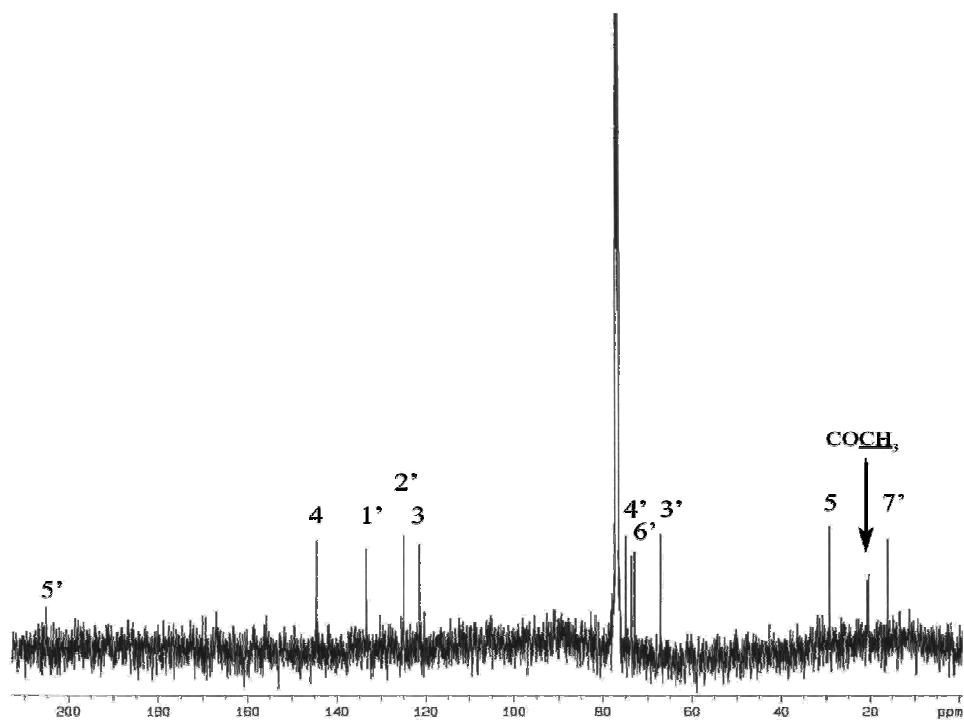


Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C de la 4'-acetil-5'-oxosinrotólida (**5**).

Cuadro 1. Desplazamientos químicos en la RMN ^1H para los compuestos **2-5**.^a

Posición	2	3	4	5
3	6.04 ddd (9.7, 1.8, 1.8,)	6.06 ddd (10.0, 2.0, 2.0)	6.04 ddd (9.8, 2.2, 1.4)	6.03 ddd (9.5, 2.5, 1.0)
4	6.9 ddd (9.7, 4.8, 3.5)	6.06 ddd (10.0, 4.5, 4.0)	6.89 ddd (9.8, 5.2, 3.2)	6.87 ddd (9.5, 5.5, 2.5)
5ax	2.49 – 2.40 m	2.45 -2.42 m	2.48 – 2.42 m	2.34 dddd (18.5, 11.0, 2.5, 2.5)
5ec	2.49 – 2.40 m	2.45 -2.42 m	2.48 – 2.42 m	2.41 dddd (18.5, 5.5, 5.0, 1.0)
6	5.38 dddd (9.5, 8.1, 7.1, 1.1)	5.30 dddd (8.5, 8.5, 7.5, 1.0)	5.27 dddd (9.0, 8.1, 7.5, 1.0)	5.32 dddd (11.0, 8.5, 5.0, 1.0)
1'	5.90 ddd (11.3, 8.1, 0.7)	5.87 ddd (10.5, 8.5, 0.5)	5.88 ddd (11.3, 8.1, 1.0)	5.85 ddd (11.0, 8.5, 0.5)
2'	5.73 ddd (11.3, 10.0, 1.1)	5.64 ddd (10.5, 9.5, 1.0)	5.72 ddd (11.3, 9.4, 1.0)	5.68 ddd (11.0, 10.0, 1.0)
3'	5.80 ddd (10.0, 2.8, 0.7)	5.69 ddd (9.5, 4.0, 0.5)	5.53 ddd (9.4, 4.5, 1.0)	5.87 ddd (10.0, 3.5, 0.5)
4'	5.08 dd (9.3, 2.8)	5.25 dd (7.0, 4.0)	3.92 ddd (7.2, 5.5, 4.5)	5.70 d (3.5)
5'	3.80 ddd (9.3, 5.5, 2.6)	5.18 dd (7.0, 4.0)	5.06 dd (7.2, 3.9)	----
6'	4.90 dc (6.6, 2.6)	5.10 dc (6.5, 4.0)	5.23 dc (6.5, 3.9)	5.27 c (7.0)
7'	1.24 d (6.6)	1.22 d (6.5)	1.28 d (6.5)	1.36 d (7.0)
OAc	2.12 s 2.08 s 2.03 s	2.11 s 2.11 s 2.06 s 2.03 s	2.12 s 2.09 s 2.01 s	2.18 s 2.13 s 2.01 s
OH	2.82 d (5.5)	----	2.62 d (5.5)	----

^a CDCl_3 , 500 MHz (*J* en Hz). Las asignaciones se realizaron mediante $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY, δ en ppm.

Cuadro 2. Desplazamientos químicos en la RMN ^{13}C para los compuestos **2-5**.^a

Posición	2	3	4	5
2	163.6	163.1	163.6	163.6
3	121.3	121.5	121.5	121.5
4	144.9	144.3	144.6	144.6
5	29.5	29.7	29.5	29.2
6	74.2	73.7	74.1	73.7
1'	132.8	133.0	132.9	133.4
2'	124.8	126.3	126.9	125.0
3'	68.5	67.7	70.2	67.3
4'	72.3	71.6	72.0	75.0
5'	71.2	71.1	72.9	205.3
6'	72.0	66.6	69.0	73.0
7'	14.2	15.0	14.6	16.1
<u>COCH₃</u>	21.2	21.1	21.1	20.8
	20.9	21.0	21.0	20.7
	20.9	20.9	20.9	20.5
	20.9	20.9	20.9	20.5
<u>COCH₃</u>	170.9	170.0	170.2	170.5
	169.7	169.5	170.2	170.0
	169.7	169.5	169.9	169.8
	169.7	169.4	169.9	169.8

^a ^{13}C (125.7 MHz). Las asignaciones se realizaron mediante ^1H - ^{13}C HMQC y HMBC, δ en ppm.

7. CONCLUSIONES

- Se lograron sintetizar cuatro derivados semisintéticos a partir de la sinrótolida, dos de los derivados se obtuvieron mediante acetilación selectiva bajo condiciones equimolares de anhídrido acético-piridina.
- Los compuestos obtenidos fueron purificados por cromatografía de líquidos de alta resolución empleando fase reversa.
- Se logró establecer la estructura molecular de los derivados obtenidos, mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas contemporáneas.

7.1 Expectativas.

Se pretende realizar una serie de reacciones (fig. 35), con el fin de epimerizar las posiciones 4' y 5' de la sinrotólida, purificar y establecer la estructura molecular de cada uno de los compuestos y precursores, para así finalmente monitorear su actividad citotóxica sobre líneas celulares derivadas de tumores humanos.

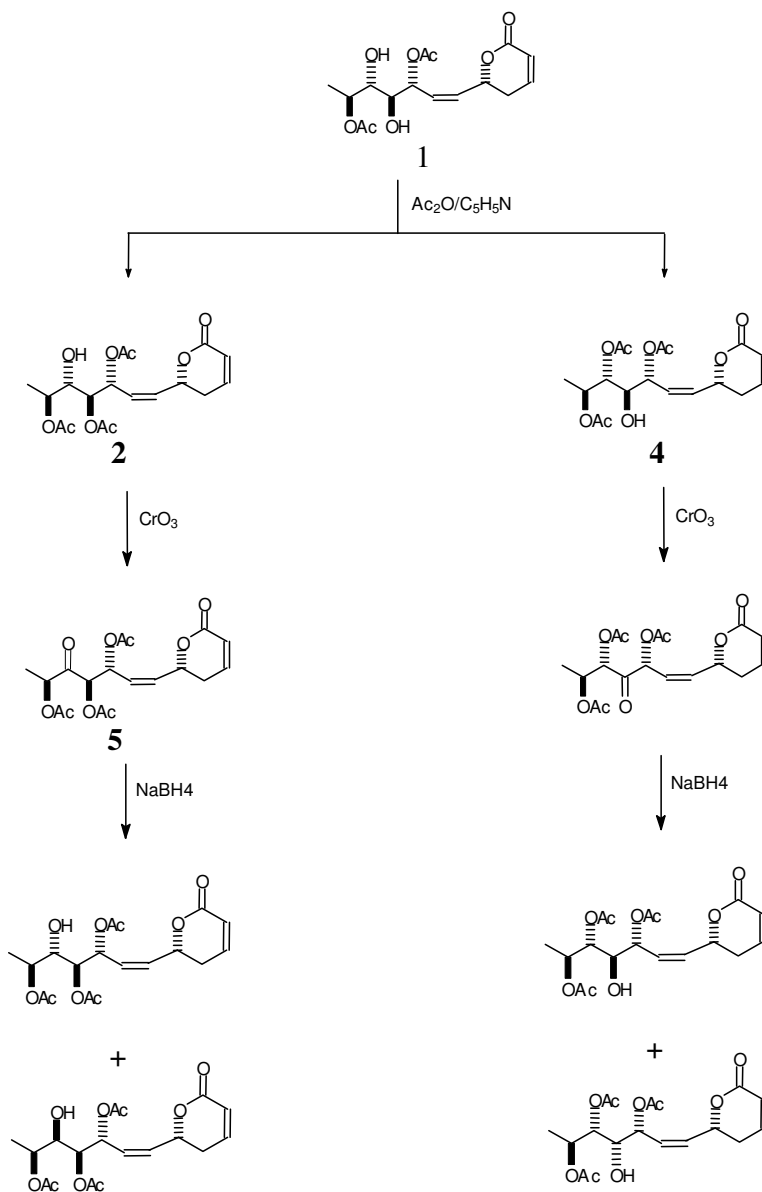


Figura 35. Secuencia sintética para epimerizar los centros estereogénicos C_{4'} y C_{5'} de la sinrotólida.

8. BIBLIOGRAFÍA.

- Achmad, S.; Hoyer, T.; Kjaer, S.; Makmur, L. y Norrestam, R. (1987) Molecular and crystal structure of Hyptolide, a naturally occurring α,β -unsaturated γ -lactona. *Acta Chemical Scandinavica* B41, 599-609.
- Alemany, A.; Márquez, C.; Pascual, C.; Valverde, S.; Martínez-Ripoll, M.; Fayos, J. y Perales, A. (1979) New compounds from *Hyptis*. X-ray crystal and molecular structures of anamarine. *Tetrahedron Letters* 37, 3583-3586.
- Berdy J. (1995) Secondary metabolites. Proc. 9th Internat Symp Biol; Part1, Allerton, New york:3-23.
- Bluet G, Bazan-Tejada B, Campagne JM. (2006) Catalytic asymmetric access to alpha,beta unsaturated delta-lactones through a vinylogous aldol reaction: application to the total synthesis of the Prelog-Djerassi lactone. *Organic Letters* 3, 3807-3810.
- Cragg GM, Newman DJ, Sander KM. (1997) Natural prducts in drug discovery and development. *J Nat Prods*; 60: 52-60.
- Davies-Coleman, T. M. Y Rivett D.E.A. (1987) Synrotolide, an α -pyrone from *Syncolostemon rotundifolius*. *Phytochemistry* 26, 1447-1497
- Davies-Coleman, T. M. Y Rivett, D.E.A. (1987) Stereochemical studies on Boronolide, an α -pyrone from *Tetradenia barcerae*. *Phytochemistry* 26, 3047-3050.
- Davies-Coleman, T. M. Y Rivett, D.E.A. (1989) Naturally occurring 6-substituted 5,6-dihydro- α -pyrones. En: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*.
- Dictionary of Natural Products; London: Chapman and Hall/CRC Press 2001.
- Falomir E, Murga J, Carda M, Marco J.A. (2003) Stereoselective síntesis of spicigerolide. *Tetrahedron Letters* 44, 539-541
- Figg WD, Mcleod HL. (2004) Hand Book of Anticancer Pharmacokinetics and Pharmacodynamic. Humana press:1-7.
- Fragoso- Serrano MC. (2000) Elucidación estructural y establecimiento de la configuración absoluta de metabolitos secundarios biodinámicos aislados de la planta medicinal *Hyptis spicigera*. Aplicación de la mecánica molecular en la

elucidación estereoquímica de la espicigerólida, una 5,6-dihidro- α -pirona citotóxica. Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 270p.

- Gao D, O'Doherty GA. (2005) De novo asymmetric synthesis of anamarine and its analogues. *Journal of Organic Chemistry* 70, 9932-9939.
- Garcia-Fontanet J, Murga J, Carda M, Marco J.A. (2004) Stereoselective synthesis of Hyptolide and 6-epi-hyptolide. *Tetrahedron* 60, 12261-12267.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*; 100: 57-70.
- Henkel T, Brunne RM, Müller H, Reichel F. (1999) Statistical investigation in to the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. *Angew Chem Int Ed Engl*;38: 643-647.
- Mendelson R, Balick M.J. The value of undiscovered pharmaceuticals in tropical forest. *Ercon Bot*;49:223-228.
- Parkin MD. (2001) Global cancer statistics in the year. *Lancet Oncol*; 2:533-543
- Pereda-Miranda, R. (1995) Bioactive natural products from traditionally used mexican plants. En: *Phytochemistry of Medicinal Plants* 29, J.T. Arnason, R. Mata, J.T. Romeo (editores), Plenum Press, New York, pp. 83-112.
- Roessner CA. Scott AI. (1996) Genetically synthesis of natural products: from alkaloids to corrins. *Annual Review of Microbiology*; 50:467-490.
- Sinkora K, Advani S, Kroltchouk V, Magrath I, Levy L, Pinedo H, Schawartsman G, Tattersall M, Yan S. (1999) Essential drugs for cancer therapy: a world health organization consultation. *Annals Oncology*; 10:385-390.
- Van Puyvelde, L.; Dube, S.; Uwimana, E.; Uwera, C.; Dommissie, A. R.; Esmans, L. D.; Schoor, V. O. y Vletinck, J. A. (1979) New α -pyrones from *Iboza riparia*. *Phytochemistry* 18, 1215-1218.
- Venkat Ram Reddy, John P. Rearick, Nyssa Hoch, and P. Veeraraghavan Ramachandran. (2001) Asymmetric Synthesis of Umuravumbolide. *Organic letters* 3, 19-20.
- Verdine GL. (1996) The combinatorial chemistry of nature. *Nature*; 384 supl: 11-13.

- Zhang L, Arnol DL. (2005) Drug Discovery and therapeutic Medicine. Humana Press: 4-13,129-141.