



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

Obtención de sulfuros C-3 de  
menadiona, evaluación de su  
actividad antimicrobiana y de su  
efecto coagulante en sangre.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**DARIO JIMÉNEZ CÁRDENAS**

ASESORES:

DR. RENÉ MIRANDA RUVALCABA

M. en C. MARTHA BEATRIZ VILCHIS ARGUETA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **AGRADECIMIENTOS**

*Gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el período de estudio.*

*A mi madre, por que gracias a su amor, paciencia y comprensión he llegado a realizar uno de los anhelos mas grandes de la vida, gracias por compartir y dedicar gran parte de tu vida conmigo y por darme aliento, por que sin ti y sin tus enseñanzas no estaría aquí, ni sería quien soy ahora, a tí te dedico esta tesis.*

*Al Dr. Rene, por permitirme ser parte del grupo de trabajo, por asesorarme a lo largo de la tesis, por su generosidad y compañía en este camino que hoy culmina en el presente proyecto, por compartir su conocimiento conmigo e inspirar en mí mucha admiración y estímulo para seguir creciendo intelectualmente.*

*Sin lugar a duda este trabajo no pudo haberse realizado sin la formación y soporte institucional que recibí durante cuatro años en la FES-Cuautitlán. Se agradece al Técnico Académico Draucin Jiménez Celi, del taller de soplado de vidrio, por el apoyo proporcionado en la elaboración del equipo de vidrio empleado durante la experimentación.*

*Quiero agradecer especialmente a Joel por su valiosa colaboración, apoyo y consejos para mi formación. Agradezco profundamente a la sección de orgánica y a todo su personal por las facilidades brindadas para la realización de esta Tesis.*

*Gracias a todos los maestros que contribuyeron realmente en mi formación, por todos sus conocimientos, orientación y tiempo. Gracias a mis sinodales que revisaron con paciencia este trabajo, a la amistad brindada, las sugerencias y contribuciones que resultaron de gran utilidad para este trabajo.*

*A Miki, Liz, Vane, Pao, Den, Jair y Beto por ser unos amigos increíbles y con quienes he compartido muchos momentos que siempre llevaré en mi corazón. Ustedes han enriquecido mi vida con su cariño y su alegría. Gracias por recordarme que hay personas valiosas en el mundo y gracias por estar en el mío.*

*Gracias a mis hermanos Arturo, Bruno y Edgar, por confiar en mí, por su ayuda, afecto e interés, son la mejor compañía para compartir el mismo techo.*

*A mis abuelitas Esperanza y Mercedes, sé que me ves y estas orgullosa de mí.*

*Gracias Emmanuel por hacer de esos momentos un verdadero vivir, por ser quien eres y formar parte de mí; por haber aparecido y cambiado mi vida.*

|   |    |
|---|----|
| • ÍNDICE .....  | 2  |
| • GLOSARIO .....  | 3  |
| • INTRODUCCIÓN .....  | 5  |
| • ANTECEDENTES  |    |
| ○ Vitamina K .....  | 7  |
| ○ Filoquinonas y menaquinonas .....   | 10 |
| ○ Farmacocinética de la vitamina K .....  | 12 |
| ○ Evaluación de la actividad antimicrobiana de la vitamina K .....                    | 15 |
| ○ Métodos biológicos de diagnóstico .....   | 16 |
| ○ Efecto coagulatorio de la vitamina K .....  | 17 |
| ○ Recomendaciones .....   | 18 |
| ○ Toxicidad .....   | 18 |
| ○ Sulfuros .....  | 20 |
| • HIPÓTESIS .....   | 21 |
| • OBJETIVOS.....  | 22 |
| ○ Objetivo general  |    |
| ○ Objetivos particulares  |    |
| • PARTE EXPERIMENTAL  |    |
| ○ Reactivos .....   | 23 |
| ○ Equipos .....   | 23 |
| ○ Procedimiento experimental .....  | 24 |
| • RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....  | 25 |
| • CONCLUSIONES .....  | 36 |
| • REFERENCIAS .....   | 37 |
| • ANEXOS  |    |
| ○ Espectros de resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ ). ..... | 44 |
| ○ Espectros de espectrometría de masas por impacto electrónico .....                  | 55 |

## INTRODUCCIÓN

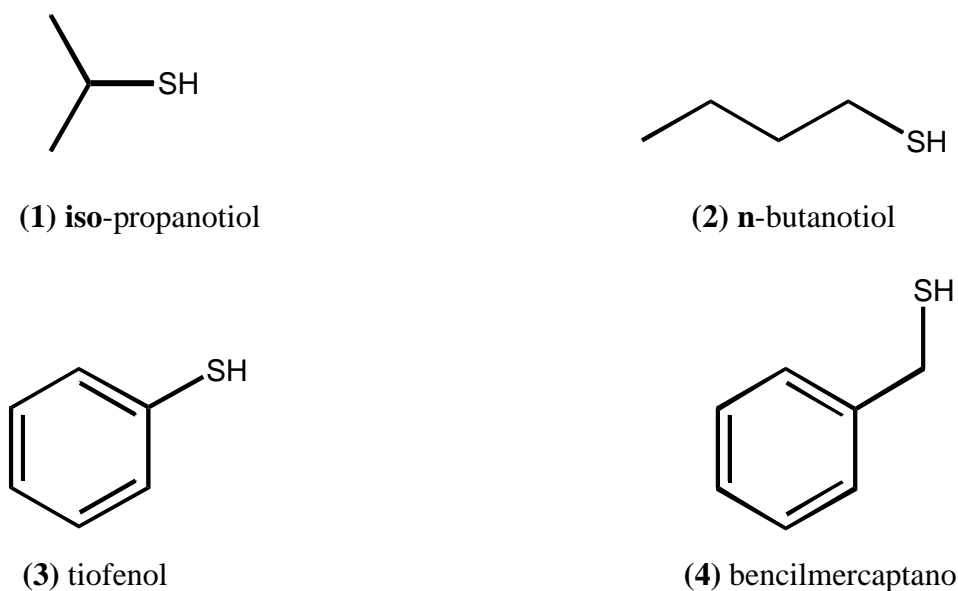
Las vitaminas son componentes orgánicos presentes en cantidades mínimas, en los alimentos naturales, indispensables para el metabolismo energético y sintético, además la falta de ellas en la dieta es causa de diversas enfermedades; algunas de éstas, causadas por deficiencia de vitaminas, se han descrito desde hace muchos siglos por las culturas, china (2600 AC) y la egipcia (1500 AC): V.g. beriberi del escorbuto, la ceguera nocturna y la xeroftalmia. Como consecuencia de lo antes mencionado, diversas sustancias ricas en vitamina A se usaron como remedios para la ceguera nocturna por los chinos, y los hígados de aves y mamíferos comestibles se recomendaron como agente curativo para la ceguera nocturna y la xeroftalmia por Hipócrates, alrededor de 400 A.C.<sup>1</sup>; también se conocía desde algún tiempo que el raquitismo podía curarse tomando aceite de hígado de bacalao.<sup>2</sup>

En consecuencia, en situaciones como las anteriores, se dedujo que los alimentos naturales contenían sustancias indispensables para la salud que no eran proteínas, grasas ni carbohidratos.<sup>2</sup> Algunos eventos particulares y relacionados con lo antes expuesto son los siguientes: en 1906 Frederick Hopkins en Inglaterra sugirió que los nutrientes desconocidos eran esenciales para la vida animal y uso el término “factores alimenticios accesorios”.<sup>1</sup> En 1912, el bioquímico Casimir Funk propuso denominarlas con el término Vitaminas; el cual proviene de *vita* que significa vida en latín y la palabra amina. Aunque en realidad, pocas de ellas son aminas. Como consecuencia de lo antes mencionado, hoy se conocen muy bien las trece vitaminas, indispensables en la dieta, con las cuales mediante su empleo apropiado se han podido erradicar enfermedades que durante largo tiempo fueron un problema para la humanidad.<sup>3</sup>

Las vitaminas se clasifican de acuerdo a su solubilidad, asimismo se organizan en dos grandes categorías, las solubles en grasa y las que lo hacen en agua. En lo particular la vitamina K es un término genérico para un homólogo de vitaminas liposolubles, el cual consiste en varios derivados de la 2-metil-1,4-naftoquinona, comúnmente llamada menadiona.

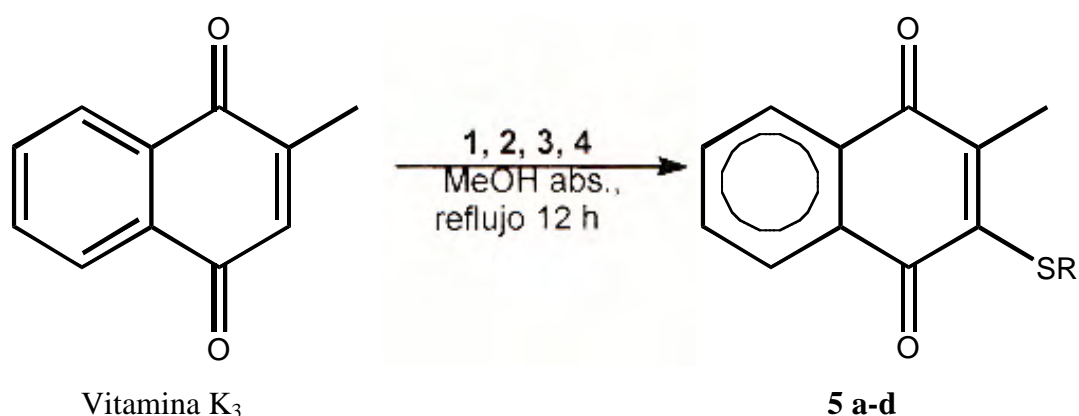
Teniendo como marco de referencia los comentarios vertidos en los párrafos anteriores, en este trabajo de tesis se consideró importante, llevar a cabo la reacción entre los tioles (1), (2), (3) y (4) (ver Figura 1) y la menadiona con el objetivo de generar los sulfuros

correspondientes en C-3 (**5 a-d**) de acuerdo a la Figura 2 y potencializar el efecto biológico, estudiando la condición de activación térmica. Y en consecuencia generar derivados sulfurados de vitamina K<sub>3</sub> para posteriormente realizar con ellos un estudio comparativo contra la menadiona, como antihemorrágicos y antimicrobianos.



**Figura 1.** Tioles utilizados.

De la reacción de menadiona (vitamina K<sub>3</sub>) con los diferentes mercaptanos, se obtuvieron los sulfuros correspondientes (**5 a-d**), en condiciones de reflujo con metanol, esto implica en cierta forma una sustitución en C-3.



**5a**, R= C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>; **5b**, R=C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>; **5c**, R= C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; **5d**, R= C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>

**Figura 2.** Reacción de la menadiona con diferentes tioles.

## ANTECEDENTES

- **Vitamina K**

La vitamina K es una familia de compuestos liposolubles estructuralmente similares con la 2-metil-1,4-naftoquinona, incluyendo la filoquinona ( $K_1$ ), menaquinonas ( $K_2$ ) y menadiona ( $K_3$ ).<sup>4</sup> En lo general, las 1,4-naftoquinonas forman una familia de compuestos caracterizados por un sistema de naftaleno el cual contienen dos grupos carbonilo en posiciones relativas 1 y 4; dicho de otra manera, todos los miembros de la familia de la vitamina K poseen como esqueleto común el de la naftoquinona, pero con cadenas diversas que los distinguen (Figura 3).<sup>5</sup>

La vitamina K está asociada con un número de funciones biológicas importantes, debido a sus características químicas particulares. Desde su descubrimiento por el profesor Henrik Dam en 1935, se despertó el interés en su estudio, tanto para establecer su estructura como para conocer su reactividad y propiedades farmacológicas; de esta manera, su aislamiento y caracterización fueron publicados en 1939 por E. A. Doisy y colaboradores.<sup>6</sup>

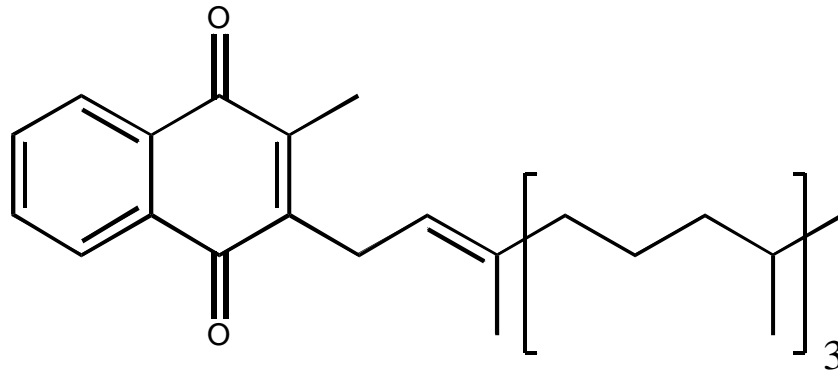
Al respecto de dicha investigación, se informó sobre: el aislamiento de vitamina K de la alfalfa ( $K_1$ ) y de la harina de sardina podrida ( $K_2$ ), los correspondientes análisis elementales, su comportamiento hacia la hidrogenación y oxidación.

El mismo grupo de trabajo logró establecer la estructura de la vitamina  $K_1$  por métodos de degradación, verificándose la estructura mediante la correspondiente síntesis, mismos métodos que posteriormente serían empleados para establecer la estructura de la vitamina  $K_2$ .<sup>7</sup>

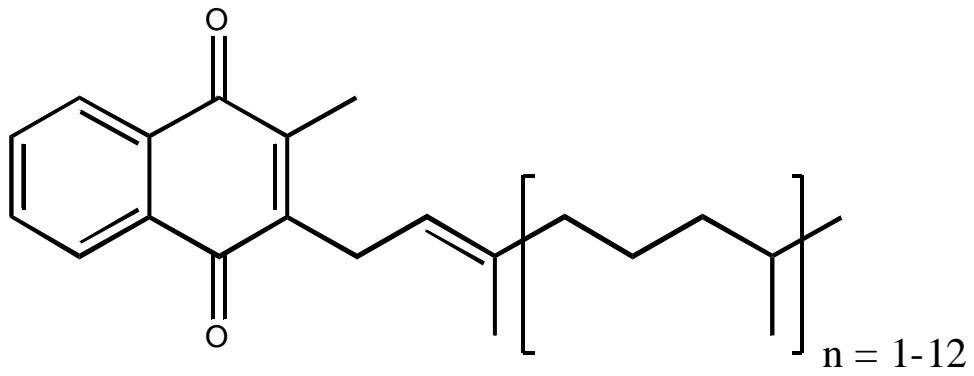
La menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona o vitamina  $K_3$ ) no es considerada una vitamina natural, ésta es un análogo sintético que actúa como provitamina. Su única estructura, es muy simple ya que no contiene la cadena alifática como grupo prostético en posición 3.<sup>7</sup> Es conveniente tener presente que la metilnaftoquinona (MNQ) es contemplada producto de síntesis, también se ha aislado de los tejidos de frutos de algunas plantas aunque con rendimientos bajos.<sup>8</sup>



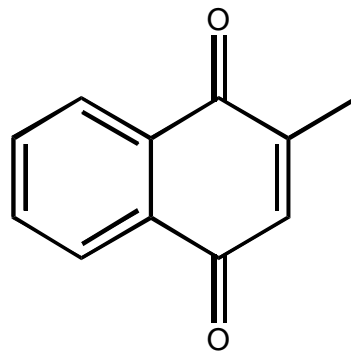
Fitonadiona (Vitamina K<sub>1</sub>, filoquinona)



Serie Menaquinona (Vitamina K<sub>2</sub>)



Menadiona (Vitamina K<sub>3</sub>)



**Figura 3.** Familia de la Vitamina K.

En relación a la síntesis de la MNQ, en 1940, Louis F. Fieser presentó un método por demás sencillo para preparar 2-metil-1,4-naftoquinona oxidando el 2-metilnaftaleno (MN) con anhídrido crómico en solución acética, obteniéndola con un rendimiento promedio del 40%. Décadas más tarde, con el desarrollo de métodos catalíticos, con carácter ecológico, se han publicado varios procedimientos basados en la oxidación de 2-metilnaftaleno:

1) El empleo de Mn o Fe 3,5-octanitroftalocianinas en condiciones medias (acetonitrilo, 20°C) con ácido peracético (AcCOOH) dando la correspondiente naftoquinona con rendimientos del 55-62%.<sup>9</sup>

2) La oxidación de 2-metilnaftaleno con monopersulfato de potasio como oxidante primario en presencia de varias metaloporfirinas (M.Por) hidrosolubles en condiciones ácidas (pH = 3,5 o 6), en diferentes tiempos de reacción<sup>19</sup>, obteniéndose 2-metil-1,4-naftoquinona en un 46%.<sup>10</sup>

Recientemente O. A. Kholdeeva<sup>11</sup> presentó un nuevo método, limpio y eficiente para la producción de MNQ basado en la oxidación de 2-metil-1-naftol permitiendo un incremento en la selectividad y por ende evitando la formación de subproductos.

La mencionada transformación se realizó con oxidantes económicos en un medio ambientalmente benigno, como: peróxido de hidrógeno acuoso, peróxido de *ter*-butilo y oxígeno molecular usando tres tipos diferentes de catalizadores heterogéneos tales, como, el titanio-silicato Ti-MMM-2 (hidrotérmicamente estable y mesoporoso), así como la ftalocianina de hierro soportado en sílica (FePeS/SiO<sub>2</sub>) y, nanopartículas de oro soportadas con oxígeno (O<sub>2</sub>).

Por otro lado, es necesario mencionar que, tan pronto como las investigaciones sobre la vitamina K indicaron una estructura quinoide, S.A Thayer<sup>12</sup> y colaboradores comenzaron a examinar la potencia antihemorrágica de un grupo de quinonas entre ellas la 2-metil-1,4-naftoquinona, la cual mostró la más alta actividad del grupo; en forma complementaria, en otros estudios se comparó a la 2-metil-1,4-naftoquinona con la vitamina K natural obtenida de la alfalfa, encontrando que la primera fue prácticamente tan activa como la última en cuanto a su actividad antihemorrágica.<sup>13,14</sup>

Asimismo, en 1946, se estudio otra posible actividad de 2-metil-1,4-naftoquinona, como bactericida y fungicida. La experimentación consistió en aplicar diferentes concentraciones de la MNQ en los medios de cultivo, así como en algunos casos se colocó también sustancias antagonistas como compuestos conteniendo radical -SH para observar su influencia en MNQ y su actividad. Se encontró que la menadiona resultó efectiva para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos.<sup>15</sup>

Sin embargo, también se constató que la presencia de los mercaptanos en el medio de cultivo potencializa la actividad de la menadiona. Lo anterior se debe que la menadiona reacciona con los mercaptanos al considerarse la primera como un sistema cetona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado y que la adición de mercaptanos toma lugar en la posición 3 en el anillo quinoide.<sup>15</sup>

#### • **Filoquinonas y menaquinonas**

La filoquinona ( $K_1$ ) o fitonadiona (así llamada por estar íntimamente relacionada con la fotosíntesis en plantas superiores), es la 2-metil-3-fetil-1,4-naftoquinona la cual se encuentra en plantas de hojas verdes como la alfalfa, es la única vitamina K natural disponible para uso terapéutico. La vitamina  $K_2$  representa una serie de compuestos (las menaquinonas), en los cuales la cadena lateral (fiilo) de la fitonadiona ha quedado sustituida por una cadena lateral que consta de dos a trece unidades de prenilo. Las bacterias grampositivas sintetizan cantidades considerables de menaquinonas, y las grandes cantidades de vitamina K contenidas en las heces de seres humanos y de animales son generadas por las bacterias en el tubo digestivo.<sup>16</sup>

La vitamina K es un principio esencial en la dieta para la biosíntesis normal de varios factores necesarios en la coagulación de la sangre.<sup>17</sup> En 1929, Dam observó que los pollos alimentados con dietas inadecuadas presentaron una enfermedad por deficiencia, en la cual el síntoma notorio fue hemorragia espontánea, al parecer debido a un contenido bajo de protrombina en la sangre.<sup>18</sup>

En 1931 Mc Farlane y colaboradores, establecieron con mayor claridad la existencia del factor antihemorrágico, al comprobar que los pollos alimentados, con harina de pescados extraída con éter manifestaban clara tendencia sufrir hemorragias y, que esta tendencia se eliminaba alimentado a las aves con harina de pescado no extraída.<sup>19</sup>

En forma complementaria por esa época, se demostró que esta enfermedad no podía ser curada con ninguna de las vitaminas liposolubles conocidas (A, E y D) u otros lípidos fisiológicamente activos.

Como consecuencia de los estudios anteriores, la vitamina antihemorrágica de los pollos fue definida como liposoluble en 1935, Dam y colaboradores (1935, 1936) encontraron que el padecimiento podía aliviarse con rapidez mediante alimentación con una sustancia liposoluble no identificada. Dam denominó a esta sustancia vitamina K (vitamina de la Koagulation). Asimismo, Alquist y Stokstad (1935) describieron la misma enfermedad hemorrágica en pollos, y el método para su prevención. Dichas investigaciones se informaron en un momento en el cual la atención de varios grupos de investigadores estaba centrada en la causa de la tendencia hemorrágica en sujetos con ictericia obstructiva y enfermedades del hígado.<sup>20</sup> Por ejemplo, Quick y cols., (1935) detectaron que el defecto de coagulación en individuos con ictericia se debió a un decremento de la concentración sanguínea de protrombina. Durante el mismo año, Hawkins y Whipple informaron que los animales con fístulas biliares tuvieron probabilidades de presentar hemorragia excesiva. Hawkins y Brinkhous (1936) mostraron después que esto se debió a deficiencia de protrombina, y que el padecimiento podía aliviarse al suministrar sales biliares como alimentos.<sup>21</sup>

Esos estudios experimentales culminaron con la demostración por parte de Butt (1938), así como por Warner (1938) que el tratamiento combinado con vitamina K y sales biliares era eficaz para la diátesis hemorrágica en pacientes con ictericia. De este modo, se estableció la relación entre vitamina K, función hepática adecuada y los mecanismos fisiológicos que operan la coagulación normal de la sangre.<sup>22</sup>

A su vez, en Mayo de 1939 el grupo de investigación de Doisy informó sobre el aislamiento de las vitaminas K<sub>1</sub> y K<sub>2</sub>, siendo la primera una sustancia aceitosa aislada de la alfalfa, la última como una sustancia cristalina aislada de la harina de pescado podrido.<sup>23</sup>

En este contexto los análisis elementales correspondientes mostraron que estas sustancias contienen 41 y 31 átomos de carbono respectivamente y teniendo ambas dos átomos de oxígeno. El color amarillo puro de estas vitaminas indicó su correspondencia con la serie de *p*-quinona.

Como conclusión se estableció que, de la considerable variedad de quinonas sólo la 1,4-naftoquinona y sus derivados poseen actividad de vitamina K, no así las 1,2-naftoquinonas. Posteriormente identificaron la vitamina K<sub>1</sub>, como 2-metil-3-fetil-1,4-naftoquinona mediante métodos de degradación, los cuales después fueron aplicados a esclarecer la estructura de la vitamina K<sub>2</sub>; en este estudio las estructuras correspondientes se basaron principalmente en haber caracterizado los productos de degradación obtenidos mediante la ozonólisis del diacetato de la hidroquinona respectiva.<sup>24, 25</sup> Finalmente, en 1939 se efectuó por síntesis la estructura de la vitamina K<sub>1</sub>; mientras que la síntesis correspondiente a la estructura de la vitamina K<sub>2</sub> fue publicada en 1940.<sup>26</sup>

Los animales pueden sintetizar menaquinona a partir del precursor de la menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona), o vitamina K<sub>3</sub>. Dependiendo del sistema de biovaloración utilizado, la menadiona es al menos igual de activa desde un punto de vista molar que la fitonadiona.<sup>27</sup>

#### • **Farmacocinética de la vitamina K**

El mecanismo de absorción intestinal de compuestos con actividad de vitamina K, varía con su solubilidad. La fitonadiona y las menaquinonas sólo se absorben de manera adecuada a partir del tubo digestivo en presencia de sales biliares. No obstante, la menadiona y sus derivados hidrosolubles se absorben incluso en ausencia de bilis. La fitonadiona y las menaquinonas se absorben casi por completo por medio de la linfa; la menadiona y sus derivados hidrosolubles entran de manera directa en el torrente sanguíneo. La fitonadiona se absorbe mediante un proceso dependiente de energía y sensible de saturación, en las proyecciones proximales del intestino delgado, y en el colon. Después de inyección por vía intramuscular, las preparaciones de vitamina K tanto natural como sintética se absorben con facilidad.<sup>28</sup>

Luego de la absorción, la fitonadiona se concentra inicialmente en el hígado, pero la concentración declina con rapidez. Muy poca vitamina K se acumula en otros tejidos. La fitonadiona se metaboliza con rapidez hacia metabolitos más polares, que se excretan en la bilis y la orina. Los principales metabolitos urinarios se originan por acortamiento de la cadena lateral a cinco o siete átomos de carbono, lo cual produce ácidos carboxílicos que se conjugan con glucuronato antes de la excreción.<sup>29</sup>

Aparentemente, hay poco almacenamiento de vitamina K en el organismo. Las reservas limitadas de vitamina presentes en los tejidos se destruyen con lentitud. Bajo circunstancias en las cuales la falta de bilis interfiere en la absorción de vitamina K, aparece hipoprotrombinemia con lentitud durante un periodo de varias semanas. Los fármacos con actividad de vitamina K pueden evaluarse químicamente y no requieren biovaloración. Para cuantificar el contenido de la vitamina K en los alimentos, se emplea una valoración basada en la capacidad de la preparación para aumentar las concentraciones de protrombina en pollos con deficiencia.<sup>30</sup>

Después de la lactancia, la hipoprotrombinemia dependiente de una deficiencia de vitamina K en la dieta es en extremo infrecuente, porque la vitamina no sólo se encuentra en muchos alimentos, sino que también la sintetizan las bacterias intestinales. Con todo, la combinación de una dieta inadecuada y el uso prolongado de fármacos que inhiben el crecimiento de las bacterias intestinales pueden conducir a deficiencia de vitamina K. En ocasiones, el uso de un antibiótico de amplio espectro puede producir por sí mismo una hipoprotrombinemia que desaparece con facilidad a dosis pequeñas de vitamina K y restablecimiento de la flora intestinal normal. El uso de ese tipo de antibióticos en pacientes que tienen otras causas de hipoprotrombinemia o una deficiencia de vitamina K puede tener profundas consecuencias. Es posible que sobrevenga hipoprotrombinemia en quienes reciben alimentación por vía intravenosa durante periodos prolongados.<sup>31</sup>

La terapia con un anticoagulante cumarínico da por resultado gran aumento de la cantidad de fitonadiona-2,3-epóxido en el hígado y la sangre. Ese tipo de tratamiento también aumenta la excreción urinaria de metabolitos de fitonadiona, principalmente productos de la desintegración de fitonadiona-2,3-epóxido. La menadiona al parecer se reduce a la forma diol (hidroquinona), y se excreta como conjugados glucurónido y sulfato.<sup>32</sup>

Las vitaminas K son resistentes al calor, humedad y al contacto con el aire, son inestables a la luz. Al ser liposolubles no se pierden por ebullición en agua, y no se destruyen por los métodos usuales de cocinado. Sin embargo, son fácilmente destruidas por los ácidos, los álcalis, los agentes oxidantes y la luz ultravioleta, es una familia estructural de grasas solubles de 2-metil-1,4-naftoquinonas que incluyen la filoquinona ( $K_1$ ), menaquinonas ( $K_2$ ) y menadiona ( $K_3$ ). Toda la familia de la vitamina K posee el esqueleto idéntico de naftoquinona con varias cadenas laterales que los distinguen.<sup>33</sup>

Las filoquinonas son absorbidas en el intestino delgado, y transportadas a través de la vía linfática junto a los quilomicrones y lipoproteínas. Una vez absorbida a través de la porta llega al hígado, donde en el hepatocito se convierte en forma éóxido, su forma activa. Llega al hígado y se distribuye a los tejidos corporales asociada a las distintas lipoproteínas, aunque se desconoce la existencia de una proteína transportadora específica de vitamina K. Las menaquinonas son producidas en la flora intestinal, y constituyen mayoritariamente las reservas hepáticas, son absorbidas en los últimos tramos del íleon y colon por difusión pasiva, y almacenadas de manera similar a las filoquinonas.<sup>33</sup>

La menadiona es transformada en menaquinona por el reestablecimiento de su cadena en el intestino, su transporte es realizado de la misma forma que las menaquinonas. El derivado soluble de la vitamina  $K_3$  se absorbe muy bien en el tracto digestivo. Y su distribución es muy amplia. Se metaboliza en el hígado con formación de dihidroxinaftaleno, y se elimina por vía renal y fecal a través de conjugados glucuronados y sulfatados de manera similar a las vitaminas  $K_1$  y  $K_2$ . Tejidos ricos en vitamina K son, además del hígado, las glándulas suprarrenales, los ganglios linfáticos, el pulmón, el riñón y la médula ósea.<sup>33</sup>

Se ha señalado que el riñón es más sensible a la menadiona que otros órganos, incluyendo el corazón y el hígado. La vitamina  $K_3$  es un nutriente esencial asociado a la cascada de coagulación, también ha sido el centro de considerables investigaciones para demostrar su potencial antihemorrágico, antifúngico y antibacterial.<sup>34</sup>

- **Evaluación de la actividad antimicrobiana de la vitamina K**

En trabajos recientes, la evaluación de los extractos se realizó frente a los microorganismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* CCCHCQF<sup>2</sup>, *Trichophyton mentagrophytes* CCCHCQF6 y *Fusarium oxysporum* CCCHCQF5.<sup>35</sup>

Para bacterias, la evaluación de la actividad antibacteriana se llevó a cabo mediante el método de inoculación directa en placas de agar. El extracto se valoró a diferentes concentraciones (100, 500 y 1 000 µg), para el control positivo se emplearon 10 µg de ampicilina contra la bacteria grampositivo y 30 µg de amikacina para gramnegativo.<sup>35</sup>

Para levaduras, la evaluación de la actividad antimicótica se llevó a cabo mediante el método de inoculación directa en placas de agar. El extracto se valoró a una concentración de 10 µg, para el ensayo de la actividad antifúngica se utilizaron tubos con 5 mL de caldo Dextrosa- Sabouraud inoculados con 5 µL de suspensión de levaduras. Para el control positivo se utilizaron 8 µg de nistatina. Utilizando como disolvente etanol.<sup>35</sup>

Asimismo en otro trabajo, se ha informado de la actividad antimicrobiana de cinco quinonas contra dos cepas bacterianas y tres hongos, fueron investigadas mediante dilución en caldo. Todas las quinonas, excepto coenzyme Q<sub>10</sub>, expusieron su actividad más alta contra *Trichophyton mentagrophytes*. Thymoquinona mostró la actividad más potente, la actividad antibacteriana fue relacionada con la estructura de orthoquinona (1,2-naftoquinona) y la actividad antifúngica fue relacionada con la estructura de paraquinona (ubiquinona, thymoquinona y menadiona).<sup>36</sup>

En anteriores investigaciones se ha estudiado la actividad antifúngica de las 1,4-naftoquinonas, 1,2-naftoquinonas, 1,4-benzoquinonas, y antraquinonas, para identificar productos naturales y usarlos en el área agrícola como antifúngicos. Se evaluó la actividad antifúngica de las quinonas contra *Colletotrichum spp.*<sup>37</sup>

Actualmente un estudio fue emprendido para evaluar el efecto antifúngico de las quinonas sobre *Mycobacterium*. Las especies de *Mycobacterium* se encuentran ampliamente en el ambiente, y naturalmente resistentes a muchos procedimientos de desinfección.



Las opciones de tratamiento son limitadas, y no se han desarrollado nuevos antibióticos desde los años 1970. Compuestos activos tienen concentraciones mínimas inhibitorias desde 12.51 g/mL, siendo el componente activo una quinona. La actividad bactericida observada representa un mecanismo único de acción. Nuestros compuestos pueden tener la utilidad significativa como biocidas contra micobacterias y otros patógenos.<sup>38</sup>

Por otro lado, el resurgimiento de la tuberculosis por resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a las drogas utilizadas avala el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para su control. Una serie de derivados de quinolonas de funcionalidad variada fue sintetizada por métodos convencionales en un actual estudio. Esta serie fue evaluada *in vitro* en cuanto a su actividad antiparasitaria (OMS, Suiza) y demostró poseer actividad antimalárica de leve a moderada.<sup>39</sup>

La mayor parte de los compuestos que se han examinado son quinonas, a menudo involucradas en el transporte de electrones de ubiquinona. Extensamente han sido empleadas como agentes antifúngicos, y son productos naturales defensivos en plantas. También han sido utilizadas como antibacteriales de amplio espectro, y están siendo investigadas como agentes anticancerígenos, el mecanismo de toxicidad está todavía en investigación, pero existen dos teorías en la literatura.

El ciclo de redox es el concepto de los compuestos que tienen un ciclo catalítico y generan radicales oxidados, como el peróxido de hidrógeno y el superóxido, que dañan la célula. La alquilación es cuando las quinonas son activadas dentro de las células y estas atacan a las proteínas, ADN u otros objetivos.<sup>40</sup>

- **Métodos biológicos de diagnóstico**

La medición de tiempo de protombina (TP) ha sido una técnica muy empleada para el diagnóstico de la deficiencia de vitamina K, pero la misma resulta de baja sensibilidad y es poco precisa. Lo anterior es debido, a que la TP se altera sólo cuando es marcada la disminución de la síntesis de los factores de la coagulación sanguínea dependiente de vitamina K.<sup>41</sup>

Los métodos recientes de análisis de la coagulación con mayor sensibilidad, de la separación de las filoquinona y menaquinona del extracto lipídico por medio de HPLC y de la detección de protrombina carboxilasa plasmática mediante inmunoquímica, han permitido determinar estados deficitarios más leves de esta vitamina.<sup>42</sup>

- **Efecto coagulatorio de la vitamina K**

Las vitaminas K naturales y la menadiona son liposolubles. Es posible elaborar derivados hidrosolubles activos de la menadiona al formar la sal bisulfito de sodio o la sal tetrasodio del éster del ácido difosfórico. Esos compuestos se convierten en menadiona en el organismo. En animales y seres humanos normales, la fitonadiona y las menaquinonas están desprovistas virtualmente de actividad farmacodinámica.<sup>43</sup>

En animales y seres humanos con deficiencia de vitamina K, el efecto farmacológico de esta última es idéntico al de su función fisiológica normal, es decir, favorece la biosíntesis de factores II (protrombina), VII, IX y X en hígado.<sup>43</sup>

Los factores de la coagulación dependientes de vitamina K, en ausencia de esta última (o en presencia del anticoagulante tipo cumarina), son proteínas precursoras biológicamente inactivas en el hígado. La vitamina K funciona como un cofactor esencial para un sistema de enzimas microsómico que activa a esos precursores mediante la conversión de múltiples residuos de ácido glutámico cerca del aminoterminal de cada precursor en residuos g-carboxiglutamil en la proteína completada. La formación de este nuevo aminoácido, el ácido g-carboxiglutámico, permite que la proteína una al  $\text{Ca}^{2+}$ , y que a su vez quede unida a una superficie de fosfolípidos; esos dos sucesos son necesarios en la cascada de fenómenos que conducen a la formación de coágulos (ver Figura 4).<sup>43</sup>

La forma activa de la vitamina K parece ser la vitamina K hidroquinona reducida, que, en presencia de  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , y la enzima carboxilasa microsómica, se convierte en su 2,3-epóxido al mismo tiempo que ocurre la g-carboxilación. La forma hidroquinona de la vitamina K se regenera a partir del 2,3-epóxido mediante una epoxidorreductasa sensible a cumarina. El carboxiglutamato se encuentra en diversas proteínas además de los factores de la coagulación dependientes de vitamina K.<sup>44</sup>

Una de esas es la osteocalcina en los huesos, que es un productor secretor de los osteoblastos. Su síntesis está regulada por el calcitriol, la forma activa de la vitamina D, y su concentración plasmática se correlaciona con la velocidad de recambio óseo. En la sangre, las proteínas tanto S como C también contienen carboxiglutamato; esas proteínas poseen una función anticoagulante al inactivar a los factores VIII y V.<sup>44</sup>

Esas estimaciones se han basado en la conservación del tiempo de protrombina o la restitución del mismo, que puede no ser suficientemente sensible como para detectar deficiencia subclínica de vitamina K. En lactantes, 10 mg/kg de peso corporal de fitonadiona bastan para prevenir hipoprotrombinemia. Las necesidades se satisfacen mediante la dieta promedio; además, la vitamina sintetizada por las bacterias intestinales también está disponible para el huésped.<sup>45</sup>

- **Recomendaciones**

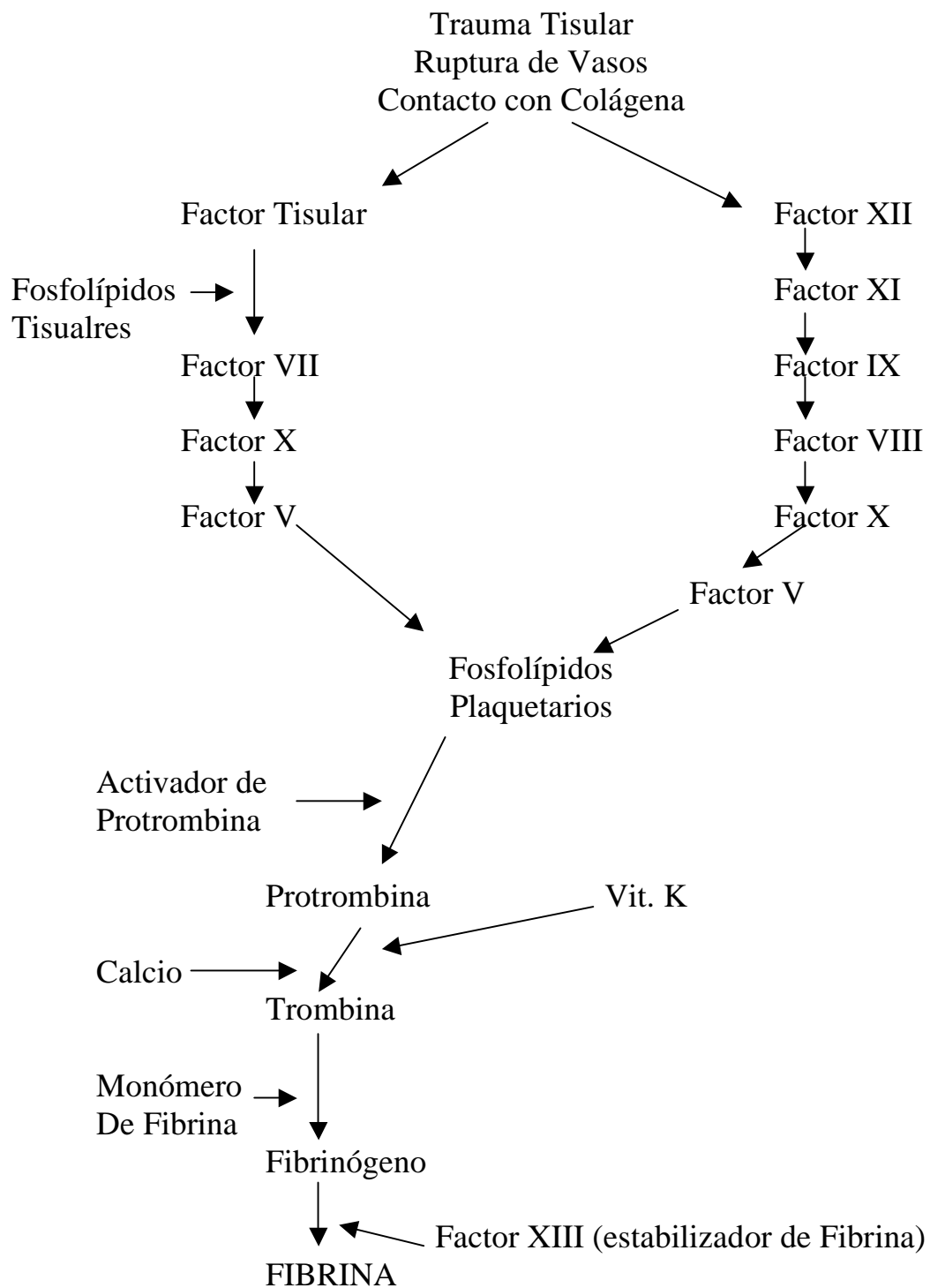
No se ha identificado con precisión el requerimiento de vitamina K en seres humanos; parece ser en extremo pequeño. Frick estimó que el requerimiento diario, en pacientes en quienes se produjo deficiencia de vitamina K por medio de una dieta de inanición y antibioticoterapia durante tres a cuatro semanas, es de un mínimo de 0.03 mg/kg de peso corporal; otros colocan el requerimiento diario en 0.5 a 1 mg/kg, y la dosis diaria recomendada por el *Food and Nutrition Board del National Research Council* se aproxima a 1 mg/kg de peso corporal. A los recién nacidos se les debe suministrar vitamina K inmediatamente después del nacimiento.<sup>46</sup> Esas estimaciones se han basado en la conservación del tiempo de protrombina o la restitución del mismo, que puede no ser suficientemente sensible como para detectar deficiencia subclínica de vitamina K.<sup>47</sup>

- **Toxicidad**

La fitonadiona y las menaquinonas no son tóxicas para los animales, incluso a dosis muy grandes. En seres humanos, la administración de fitonadiona por vía intravenosa ha producido rubor, disnea, dolor retrosternal, colapso cardiovascular y, rara vez, muerte. No está claro si esas reacciones se deben a la vitamina en sí o a los compuestos que se utilizan para dispersar y emulsificar la preparación.<sup>48</sup>

## Via Extrínseca

## Via Intrínseca



**Figura 4.** Cascada de coagulación.

La menadiona irrita la piel y las vías respiratorias. Sus soluciones tienen propiedades vesicantes. La menadiona y sus derivados han quedado comprendidos en la producción de anemia hemolítica, hiperbilirrubinemia y kernicterus en recién nacidos, en especial prematuros. La menadiona también puede inducir hemólisis en sujetos con deficiencia genética de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. En pacientes con hepatopatía grave, la administración de dosis grandes de menadiona o fitonadiona puede deprimir más la función del hígado.<sup>49</sup>

- **Sulfuros**

Las reacciones de adición sobre quinonas continúa siendo materia de estudio para los químicos que buscan desarrollar nuevos fármacos con actividad biológica, así como en la investigación para determinar aspectos de la interacción de quinonas con sistemas biológicos.

En 1946, Louis F. Fieser<sup>50</sup> llevó a cabo la síntesis de un sulfuro el cual fue obtenido por adición vía Michael con mercaptanos, con una posterior oxidación con  $\text{Ag}_2\text{O}$  con rendimientos moderados (14-70%), obteniéndose compuestos de gran importancia médica, específicamente con alguna actividad antihemorrágico o bacteriostática e incluso aplicaciones en quimioterapia. Dos años más tarde el mismo Louis F. Fieser<sup>51</sup> obtiene 2-metil-3-tioalquil(aril)-1,4-naftoquinonas, vía la adición de un número mayor de mercaptanos con posterior oxidación con una solución de dicromato. Lográndose rendimientos más altos de alrededor del 70%. M. O. Donald, en 1979, informó sobre la adición de mercaptanos a temperatura ambiente, a la 2-metil-1,4-naftoquinona utilizando etanol como disolvente, seguida por la posterior oxidación con aire. Estos compuestos presentaron actividad farmacológica, sobre todo para activar la coagulación de la sangre.<sup>52</sup>

En 1995, Nishikawa<sup>53</sup> logró un método para adición de mercaptanos a una solución etérea de vitamina  $\text{K}_3$ , utilizando como catalizador DBU (1,8-diazabicycloundeca-7-eno) dando el intermediario hidroquinona y oxidándose con aire a la quinona. Estos tioéteres se sintetizaron para ser utilizados como inhibidores de células cancerígenas. Conjuntamente en los últimos años (2002-2005) se han obtenido derivados sulfurados de la menadiona que presentan actividad anticancerígena; basada en la adición tipo Michael del mercaptano en solución alcohólica con posterior oxidación por medio del contacto con el aire.<sup>54</sup>

## **OBJETIVO GENERAL:**

Sintetizar derivados sulfurados de menadiona, mediante condiciones convencionales de reacción; con el fin de obtener moléculas con posibles efectos tanto antimicrobiano como coagulante en sangre.

## **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Llevar a cabo una serie de transformaciones de la menadiona con diferentes mercaptanos, obteniendo los respectivos sulfuros en C-3; lo anterior en presencia de disolvente, usando como fuente de activación a la energía térmica .
- Aislamiento y purificación de los productos obtenidos, por cromatografía preparativa; así como su posterior caracterización mediante técnicas espectroscópicas comunes, RMN y EMIE.
- Evaluar los derivados sulfurados de la menadiona, en cuanto a su actividad antimicrobiana *in vitro*; asimismo establecer de manera comparativa con la vitamina K<sub>3</sub> su efecto antihemorrágico.

## **HIPÓTESIS**

Se ha informado que los sustituyentes alquilo, en C-2 de las 1, 4-naftoquinonas, inhiben de manera considerable la adición de varios reactivos de tipo HA (ROH, RSH, NH<sub>3</sub>, RNH<sub>2</sub>, RNH, R<sub>2</sub>CuLi, etc.); así mismo, se sabe que los mercaptanos son buenos nucleófilos, en consecuencia, si se hace reaccionar a la menadiona con una serie de mercaptanos en condiciones convencionales de reacción, se podrá generar los correspondientes sulfuros en C-3, asimismo es de esperar que con estas nuevas moléculas se puedan realizar estudios tanto de efecto antihemorrágico como de actividad antimicrobiana.

## PARTE EXPERIMENTAL

### REACTIVOS

Los reactivos: Menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona), 2-propanotiol (**1**), *n*-butanotiol (**2**), tiofenol (**3**) y bencilmercaptano (**4**) fueron adquiridos de la compañía Aldrich; éstos fueron empleados sin tratamiento previo. Los disolventes, *n*-hexano, AcOEt, CHCl<sub>3</sub>, metanol absoluto y acetona, fueron grado analítico siendo utilizados sin tratamiento alguno. Las cromatografías en capa fina se efectuaron utilizando aluminofolios con gel de sílice 60 F<sub>254</sub>, utilizando como fase móvil el sistema *n*-hexano-AcOEt (85:15); el revelado de éstas se llevó a cabo por diferentes métodos: luz ultravioleta, con una lámpara UV (modelo UVLS-24) y con 2,4-dinitrofenilhidrazina. La purificación de la mayoría de los productos se realizó por cromatografía en columna usando gel de sílice, Merck 60 con tamaño de partícula de 0.063 mm (malla 230 ASTM) como fase estacionaria, y como eluyente el sistema *n*-hexano-AcOEt (85:15).

### EQUIPOS

Los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C fueron adquiridos en un espectrómetro Varian Unity 300, a 300 MHz para <sup>1</sup>H y a 75 MHz para <sup>13</sup>C, en disolución de CDCl<sub>3</sub> usando TMS como referencia interna. Los espectros de masas por impacto electrónico se obtuvieron utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Varian Saturn 4D GC/MS/MS (modelo 3300 GC/Star 3400C; con potencial de ionización de 70 eV). Para las reacciones con activación térmica se utilizó un sistema de reflujo.



## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 1.- Obtención de los derivados sulfurados de menadiona (5 a-d), en MeOH absoluto, mediante activación térmica.

Para la síntesis de la serie de derivados sulfurados de menadiona, se colocó en un matraz de bola una mezcla de 1 mmol de menadiona (vitamina K<sub>3</sub>) y 1 mmol de (1), (2), (3) o (4), en presencia de disolvente (30 mL de MeOH<sub>abs</sub>); ésta se sometió a reflujo durante 48 horas, el avance de las reacciones se realizó por medio de *ccf* en intervalos de 1 hora.<sup>9</sup> Para la obtención de los derivados azufrados se utilizaron mantillas con agitador magnético, matraces de 50 mL y refrigerantes unidos entre si con mangueras de hule, bajo las siguientes condiciones: tiempo de reflujo 48 horas, temperatura 70-90° C. Posteriormente el crudo de reacción se soportó en gel de sílice para su purificación mediante cromatografía en placa preparativa, eluyendo con el sistema n-hexano-AcOEt (85:15).

### 2.- Evaluación coagulatoria

Con los derivados sulfurados de la vitamina K<sub>3</sub> se realizó un estudio comparativo como antihemorrágicos con la prueba de coagulación. Se utilizó como referencia la vitamina K<sub>3</sub>. Tiempo de coagulación: se colocaron 2 mL de sangre en un tubo de ensaye y se le agregaron 100 µL de citrato de sodio (al 3.8 %), se centrifugo la mezcla a 4000 rpm por 5 minutos, una vez separado el plasma se colocó en un tubo de ensaye limpio y se incubó a 37° C durante un minuto, inmediatamente después se adiciono 100 µL de vitamina K<sub>3</sub> o de los derivados (5 a-d) al 5 % o 10 %, y finalmente se midió el tiempo de coagulación.<sup>6</sup>

### 3.- Evaluación antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se evaluó con la prueba de sensibilidad en discos, mediante el método de difusión en medio sólido, empleando diferentes concentraciones [50, 100, 200 y 1000 µg/mL] de los derivados sulfurados de la menadiona generados (5 a-d), utilizando tres hongos diferentes (*C. albicans* ATCC 14053, *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019).<sup>5</sup> Los productos obtenidos de la menadiona fueron disueltos en acetona.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

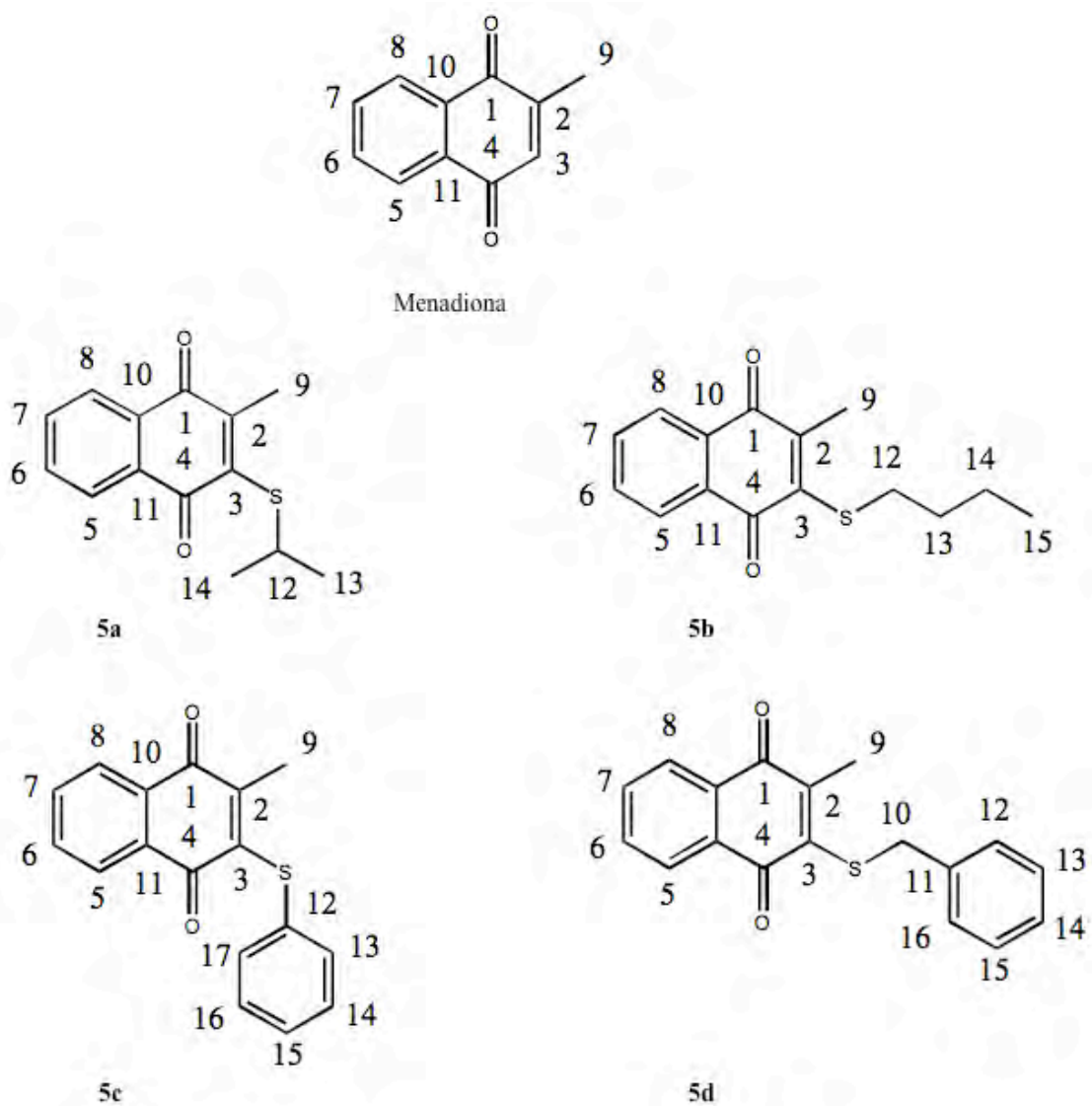
En las Figuras 6, 7 y en las Tablas 1-7, se presentan de manera resumida los resultados generados durante el presente estudio, como son: datos de obtención y caracterización, así como de ensayos biológicos.

**Tabla 1:** Propiedades de la vitamina K<sub>3</sub> y de la serie de derivados sulfurados de menadiona.

| NOMBRE   | CLAVE     | APARIENCIA   | SOLUBILIDAD   | PTO. DE FUSIÓN (°C) | P M (g/mol) |
|--|-----------|--|---|---------------------|-------------|
| Menadiona<br>(vitamina K <sub>3</sub> ,<br>2-metil-1,4-<br>naftoquinona) | <b>R</b>  | Polvo color<br>amarillo claro                                | DMSO, CHCl <sub>3</sub><br>acetona, AcOEt<br>benceno y acetonitrilo | 99-101              | 172         |
| 2-Metil-3-<br>propanotiol-<br>1,4-<br>naftoquinona                       | <b>5a</b> | Consistencia<br>aceitosa, color<br>naranja oscuro            | DMSO, CHCl <sub>3</sub><br>acetona, AcOEt<br>benceno y acetonitrilo | -----               | 216.16      |
| 2-Metil-3- <b>n</b> -<br>butiltiol-1,4-<br>naftoquinona                  | <b>5b</b> | Cristales<br>delgados y<br>cortos, color<br>naranja oscuro   | DMSO, CHCl <sub>3</sub><br>acetona, AcOEt<br>benceno y acetonitrilo | 42-44               | 260.18      |
| 2-Metil-3-<br>tiofenol-1,4-<br>naftoquinona                              | <b>5c</b> | Cristales de<br>forma alargada<br>de color<br>naranja-rojizo | DMSO, CHCl <sub>3</sub><br>acetona, AcOEt<br>benceno y acetonitrilo | 89-91               | 280.18      |
| 2-Metil-3-<br>bencilmer-<br>captano-1,4-<br>naftoquinona                 | <b>5d</b> | Cristales<br>delgados y<br>cortos, color<br>naranja oscuro   | DMSO, CHCl <sub>3</sub><br>acetona, AcOEt<br>benceno y acetonitrilo | 57-59               | 294.21      |

**Tabla 2.** Porcentajes de rendimientos de los productos obtenidos.

| <b>NOMBRE</b>                               | <b>CLAVE</b> | <b>PRODUCTO PURO OBTENIDO (mg)</b> | <b>RENDIMIENTO (%)</b> |
|---|--------------|------------------------------------|------------------------|
| 2-Metil-3-propanotiol-1,4-naftoquinona      | <b>5a</b>    | 50                                 | 61                     |
| 2-Metil-3-n-butiltiol-1,4-naftoquinona      | <b>5b</b>    | 10                                 | 34                     |
| 2-Metil-3-tiofenol-1,4-naftoquinona         | <b>5c</b>    | 100                                | 41                     |
| 2-Metil-3-bencilmercaptano-1,4-naftoquinona | <b>5d</b>    | 70                                 | 38                     |



**Figura 5.** Menadiona y productos obtenidos (**5 a-d**) con asignaciones correspondientes.

**Tabla 3.** Datos de RMN  $^1\text{H}$  para menadiona y los correspondientes sulfuros.

| COMPUESTO | MENADIONA      | 5a           | 5b           | 5c                | 5d                |
|-----------|----------------|--------------|--------------|-------------------|-------------------|
| Hidrógeno | $\delta$ (ppm) |              |              |                   |                   |
| 3         | 6.85(q, 1H)    | ————         | ————         | ————              | ————              |
| 5-8       | 8.08(m, 2H)*   | 8.08(m, 2H)* | 8.08(m, 2H)* | 8.04(m, 2H)*      | 8.04(m, 2H)*      |
| 6-7       | 7.73(m, 2H)*   | 7.70(m, 2H)* | 7.70(m, 2H)* | 7.68(m, 2H)*      | 7.67(m, 2H)*      |
| 9         | 2.20(d, 3H)    | 2.37(s, 3H)  | 2.36(s, 3H)  | 2.34(s, 3H)       | 2.21(s, 3H)       |
| 10        | ————           | ————         | ————         | ————              | ————              |
| 11        | ————           | ————         | ————         | ————              | ————              |
| 12        | ————           | 4.12(m, 1H)  | 3.21(t, 2H)  | ————              | 4.41(s, 2H)       |
| 13        | ————           | 1.30(d, 3H)  | 1.57(m, 2H)  | 7.38-7.23(m, 5H)* | ————              |
| 14        | ————           | 1.30(d, 3H)  | 1.43(m, 2H)  | ————              | 7.28-7.17(m, 5H)* |
| 15        | ————           | ————         | 0.91(t, 3H)  | ————              | ————              |

\*Ar

**Tabla 4.** Datos de RMN <sup>13</sup>C para menadiona y los correspondientes sulfuros \*

| COMPUESTO | MENADIONA | 5a    | 5b    | 5c    | 5d    |
|-----------|-----------|-------|-------|-------|-------|
| Carbono   | δ (ppm)   |       |       |       |       |
| 1         | 185.0     | 182.5 | 182.4 | 185.9 | 182.2 |
| 2         | 148.2     | 147.9 | 147.5 | 149.0 | 147.6 |
| 3         | 135.7     | 135.6 | 146.8 | 145.8 | 145.8 |
| 4         | 185.6     | 181.3 | 181.6 | 185.4 | 181.2 |
| 5         | 133.6     | 133.3 | 133.5 | 133.5 | 133.3 |
| 6         | 126.1     | 126.5 | 126.8 | 126.5 | 126.4 |
| 7         | 126.5     | 126.7 | 126.9 | 126.9 | 126.6 |
| 8         | 133.7     | 133.5 | 133.8 | 133.6 | 133.5 |
| 9         | 16.5      | 15.3  | 15.4  | 15.9  | 15.1  |
| 10        | 132.2     | 132.7 | 132.3 | 132.4 | 132.6 |
| 11        | 132.1     | 132.0 | 132.3 | 131.9 | 131.8 |
| 12        | _____     | 38.5  | 34.3  | 133.9 | 38.6  |
| 13        | _____     | 23.9  | 32.9  | 130.4 | 137.6 |
| 14        | _____     | 23.9  | 22.0  | 129.1 | 128.9 |
| 15        | _____     | _____ | 13.8  | 127.2 | 128.5 |
| 16        | _____     | _____ | _____ | 129.1 | 127.3 |
| 17        | _____     | _____ | _____ | 130.4 | 128.5 |
| 18        | _____     | _____ | _____ | _____ | 128.9 |

\*Desacoplados

**Tabla 5.** Datos de **EMIE** de menadiona y sus respectivos sulfuros.

| <b>COMPUESTO</b> | <b>M<sup>+</sup>·</b><br><i>m/z</i> (ar %) | <b>PICO BASE</b><br><i>m/z</i> (ar %) [*] | <b>OTROS FRAGMENTOS</b><br><i>m/z</i> (ar %)  |
|------------------|--|---|---|
| Menadiona        | 172(75)                                    | 173(100)[M+1] <sup>+</sup>                | 144 (13) [M-28] <sup>+</sup> ·, 116 (42) [M-56] <sup>+</sup> ·, 115 (73) [M-57] <sup>+</sup> , 104 (11.5) [M-68] <sup>+</sup> ·, 76 (2.5) [M-96] <sup>+</sup> · |
| <b>5a</b>        | 246(n.o.)                                  | 204 (100) [M-42] <sup>+</sup> ·           | 248 (1) [M+2] <sup>+</sup> ·, 143 (56) [M-103] <sup>+</sup> , 115 (82) [M-131] <sup>+</sup> , 104 (30) [M-142] <sup>+</sup> ·, 76 (50) [M-170] <sup>+</sup> ·   |
| <b>5b</b>        | 260(2)                                     | 115 (110) [M-145] <sup>+</sup>            | 204 (73) [M-56] <sup>+</sup> ·, 143 (46) [M-117] <sup>+</sup> , 105 (54) [M-155] <sup>+</sup> , 76 (76) [M-184] <sup>+</sup> ·                                  |
| <b>5c</b>        | 280(n.o.)                                  | 109 (100) [M-171] <sup>+</sup>            | 281 (1.5) [M+1] <sup>+</sup> , 143 (3) [M-137] <sup>+</sup> , 115 (5) [M-165] <sup>+</sup> , 104 (5) [M-176] <sup>+</sup> ·, 76 (6) [M-204] <sup>+</sup> ·      |
| <b>5d</b>        | 294(n.o.)                                  | 91 (100) [M-203] <sup>+</sup>             | 295 (1.25) [M+1] <sup>+</sup> , 143 (4) [M-151] <sup>+</sup> , 115 (5) [M-179] <sup>+</sup> , 105 (7.5) [M-189] <sup>+</sup> , 76 (11) [M-218] <sup>+</sup> ·   |

[\*] Asignaciones

n. o. = no observado

**Tabla 6.** Tiempo de coagulación para la vitamina K<sub>3</sub> y de los derivados sulfurados (**5 a-d**).

| <b>COAGULANTE</b>       | <b>TIEMPO DE COAGULACIÓN A CONC. DE 5 % P/V (seg)</b> | <b>TIEMPO DE COAGULACIÓN A CONC. DE 10 % P/V (seg)</b> |
|-------------------------|---|--|
| Vitamina K <sub>3</sub> | 16.36 (e)   | 13.28 (e)  |
| <b>5a</b>               | 13.19 (e)   | 15.60 (e)  |
| <b>5b</b>               | 20.44 (e)   | 15.71 (e)  |
| <b>5c</b>               | 15.03 (e)   | 11.25 (e)  |
| <b>5d</b>               | 16.35 (e)   | 18.40 (e)  |

Análisis de variancia unifactorial  $P > 0.05$ . Literales diferentes  $P < 0.05$ .

**Tabla 7.** Actividad antimicrobiana del compuesto **5c**.

| <b>COMPUESTO</b> | <b>CONCENTRACIÓN</b> |
|------------------|----------------------|
| <b>5c</b>        | 1000 µg/mL           |

Teniendo como antecedentes inmediatos los resultados mostrados con anterioridad, en las páginas siguientes se presenta de manera amplia la discusión de los mismos; ésta se realiza de la manera siguiente: datos de obtención; formación de los sulfuros de menadiona; caracterización de los productos; ensayos biológicos; un aspecto particular.

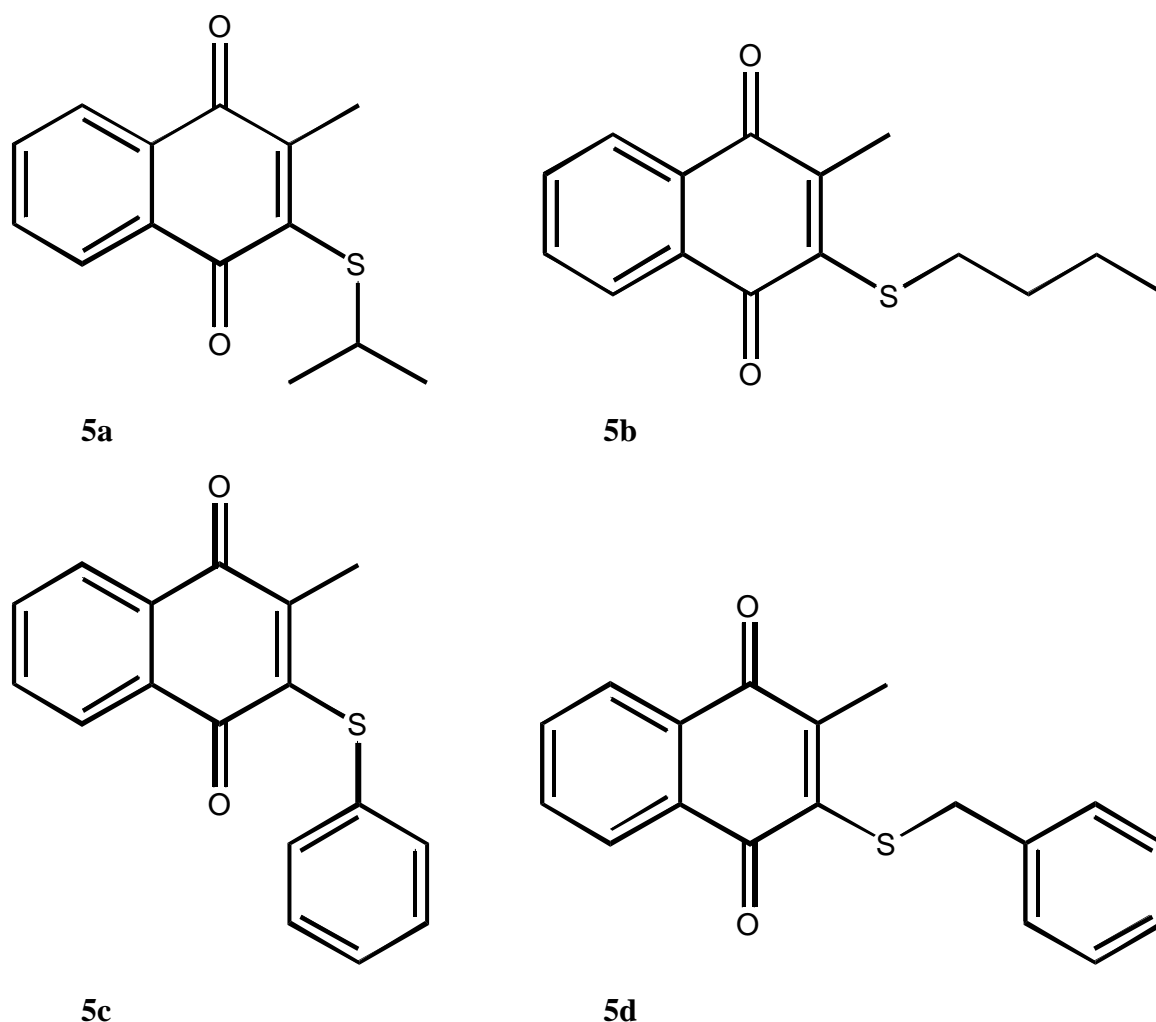
#### **Datos de obtención**

La proporción **n**-hexano:AcOEt se obtuvo por ensayo y error entre los disolventes antes mencionados, desde utilizar uno hasta diferentes proporciones de ellos, encontrando que en 85:15 **n**-hexano:AcOEt se eluye mejor las cuatro fracciones de la menadiona con el tiol. Se utilizó como revelador la luz UV. La placa se dejó secar y se observó en UV donde se marcaron los contornos visibles para después raspar y separar sucesivamente las fracciones. Se colocó el raspado en un embudo con papel filtro y se lavó con AcOEt para extraer los productos de la sílice. Se dejó secar el producto al vacío y se calculó el punto de fusión de cada producto. Se pesó y obtuvo rendimientos comparables de los productos purificados. Los rendimientos consignados en la Tabla 2 corresponden a los productos purificados.



### Formación de los sulfuros de menadiona

Los productos se obtuvieron de la reacción de la vitamina K<sub>3</sub> (menadiona) con los diversos tioles, como se muestran en la Figura 6, no se presentó la obtención del producto de isomerización o el proceso de adición tipo Michael, los productos finales obtenidos corresponden a reacciones de sustitución aparente sobre C-3 (**5 a-d**). Los porcentajes de rendimientos de las correspondientes reacciones se encuentran resumidos en la Tabla 2. Complementariamente las moléculas obtenidas: **5 a-d**, fueron caracterizadas por RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) y EMIE. (ver espectros de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y EMIE, de cada uno de los productos obtenidos así como sus asignaciones correspondientes en apéndice o en Figura 5).



**Figura 6.** Productos obtenidos de la reacción de la menadiona con tioles diferentes.

## Caracterización de los productos

**RMN <sup>1</sup>H:** En los espectros de RMN <sup>1</sup>H de los productos de la reacción de menadiona con los diferentes mercaptanos [(1), (2), (3) o (4)], se puede observar como en el espectro de menadiona (Espectro 1), la señal cuarteto del hidrógeno ubicado en 6.85 ppm (1H, H-3), desaparece en los espectros de los sulfuros obtenidos, así como la señal doble de H-9 (3H) cambia a una señal sencilla; mientras tanto, las demás señales en el anillo quinónico presentan cambios. En el espectro del sulfuro de isopropanotiol (Espectro 3) se observa una señal múltiple centrada en 4.12 ppm, que corresponde al H-12 (1H), asimismo se tiene una señal doble a campo alto para H-13 (3H) y H-14 (3H) a 1.30 ppm; para el sulfuro de *n*-butanotiol (Espectro 5), se tiene una señal triple en 3.21 ppm que corresponde al H-12 (2H), igualmente se ve otra señal triple centrada en 0.91 ppm asignada para H-15 (3H), un conjunto de señales múltiples en 1.57 y 1.43 ppm para H-13 y H-14 respectivamente; con respecto al derivado de tiofenol (Espectro 7), se presentan señales múltiples en la región de los aromáticos de 7.38 a 7.23 ppm que corresponden al fenilo unido al azufre (5H) y para el sulfuro de bencilmercaptano (Espectro 9), se da la aparición de una señal sencilla en 4.41 ppm que corresponde al metileno, (2H, H-12), así como una señal múltiple en la región aromática que va de 7.28 - 7.17 ppm, para los hidrógenos del anillo aromático.

**RMN <sup>13</sup>C:** En los espectros de RMN <sup>13</sup>C de los productos de la reacción de Menadiona con los diferentes mercaptanos [(1), (2), (3) o (4)], se puede observar como en el espectro de menadiona (Espectro 2), presenta cambios ligeros en el anillo quinónico. En el espectro del producto de *iso*-propanotiol (Espectro 4), aparece una señal a 38.5 ppm asignada a C-12 (1H) base de azufre, asimismo, la señal en 23.9 ppm es para C-13 (3H) y C-14 (3H); para el derivado de *n*-butanotiol (Espectro 6), se observan cuatro señales de tipo alifático a campo alto de 34.2 (2H, C-12), 32.9 (2H, C-13), 22.0 (2H, C-14) y 13.8 (3H, C-15) ppm que corresponde a la cadena alifática unida al átomo de azufre. Respecto al sulfuro de tiofenol (Espectro 8), se observa la señal de tres grupos metino de tipo aromático a 130.4, 129.1 y 127.2 ppm las cuales se asignaron a C-13 (1H) y C-17 (1H), C-14 (1H) y C-16 (1H) y C-15 (1H), respectivamente; finalmente, en el espectro del producto de bencilmercaptano (Espectro 10), se observan tres señales de grupo metino a 128.9, 128.5 y 127.3 ppm que corresponden a los carbonos del anillo aromático C-14 (1H) y C-18 (1H), C-15 (1H) y C-17 (1H) y C-16 (1H) respectivamente, así como un metileno a 38.6 ppm, que es asignado para C-12 (2H).

**EMIE:** La caracterización por medio de los espectros de EMIE, en acuerdo a lo reportado en la literatura, presenta una fragmentación para la menadiona (Espectro 11), con las asignaciones siguientes:  $m/z$  173 (100)  $[M+1]^+$ ,  $m/z$  172 (75)  $M^{+\bullet}$ ,  $m/z$  144 (13)  $[M-28]^{\bullet+}$ ,  $m/z$  116 (42)  $[M-56]^{\bullet+}$ ,  $m/z$  115 (73)  $[M-57]^+$ ,  $m/z$  104 (11.5)  $[M-68]^{\bullet+}$  y  $m/z$  76 (2.5)  $[M-96]^{\bullet+}$ . En relación a los sulfuros obtenidos, se observa un patrón de fragmentación consistente con la menadiona, tal como se muestra a continuación: para el producto de **iso**-propanotiol (Espectro 12),  $m/z$  248 (1)  $[M+2]^{\bullet+}$ ,  $m/z$  204 (100)  $[M-42]^{\bullet+}$ ,  $m/z$  143 (56)  $[M-103]^+$ ,  $m/z$  115 (82)  $[M-131]^+$ ,  $m/z$  104 (30)  $[M-142]^{\bullet+}$  y  $m/z$  76 (50)  $[M-170]^{\bullet+}$ ; en el producto de **n**-butanotiol (Espectro 13),  $m/z$  260 (2)  $M^{+\bullet}$ ,  $m/z$  204 (73)  $[M-56]^{\bullet+}$ ,  $m/z$  143 (46)  $[M-117]^+$ ,  $m/z$  115 (110)  $[M-145]^+$ ,  $m/z$  105 (54)  $[M-155]^+$  y  $m/z$  76 (76)  $[M-184]^{\bullet+}$ ; mientras que en el producto de tiofenol (Espectro 14),  $m/z$  281 (1.5)  $[M+1]^+$ ,  $m/z$  143 (3)  $[M-137]^+$ ,  $m/z$  115 (5)  $[M-165]^+$ ,  $m/z$  104 (5)  $[M-176]^{\bullet+}$ ,  $m/z$  109 (100)  $[M-171]^+$  y  $m/z$  76 (6)  $[M-204]^{\bullet+}$ ; y por último para el producto de bencilmercaptano (Espectro 15),  $m/z$  295 (1.25)  $[M+1]^+$ ,  $m/z$  143 (4)  $[M-151]^+$ ,  $m/z$  115 (5)  $[M-179]^+$ ,  $m/z$  105 (7.5)  $[M-189]^+$ ,  $m/z$  91 (100)  $[M-203]^+$  y  $m/z$  76 (11)  $[M-218]^{\bullet+}$ .

Con los datos mencionados anteriormente se puede concluir que hay un fragmento en común a partir del sustrato, hay consistencia con los picos base en el fragmento 115.

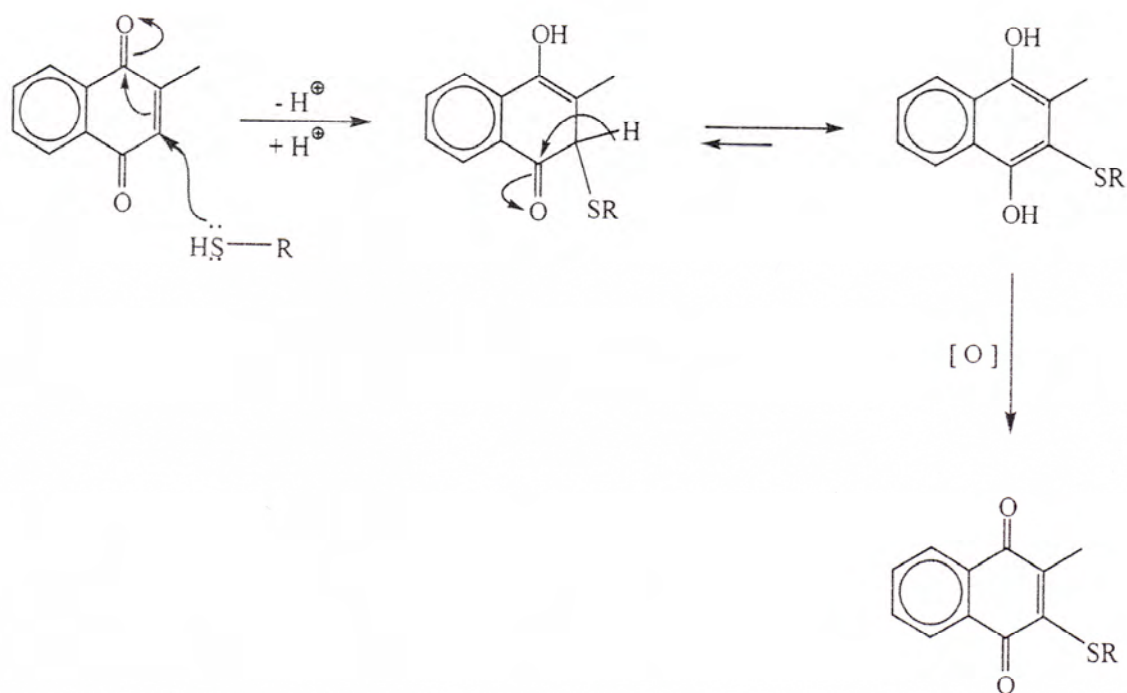
### **Ensayos biológicos**

En relación a la prueba estadística, a pesar de que los productos **5a** (5%) y **5c** (10%) tienen un tiempo de coagulación 1.2 veces menor que la vitamina K, no fué significativamente diferente  $P > 0.05$ .

Se realizó un “screening” primario *in vitro* de los productos finales, utilizando tres hongos diferentes (*C. albicans* ATCC 14053, *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019). El compuesto obtenido **5c** provocó halos de inhibición de 7 mm sobre *C. albicans* ATCC 14053.

### Un aspecto particular

Mediante el presente estudio se apreció que la reactividad de la menadiona frente a los diferentes mercaptanos empleados bajo las condiciones de trabajo, se dio en la posición 3 del anillo quinónico. Cabe destacar que esto fue posible debido a la deficiencia electrónica causada por el efecto electroattractor del grupo carbonílico, que en consecuencia hace a la posición ya mencionada, susceptible a una adición nucleofílica tipo Michael por parte de los mercaptanos, dando origen a un intermediario<sup>29,32</sup>, seguido por un proceso de oxidación que permite adquirir nuevamente el núcleo de naftoquinona. Dicho proceso de oxidación se considera que es provocado por la interacción con el oxígeno del aire. El mecanismo propuesto para explicar la formación de los productos, es exhibido en la Figura 7.



**Figura 7.** Mecanismo de reacción propuesto.

## CONCLUSIONES

- La menadiona produce los correspondientes sulfuros en C-3, en presencia de diferentes tioles en condiciones de reflujo, en presencia de disolvente (MeOH); éstas moléculas fueron obtenidas en lugar de los productos tipo Michael, lo que implica una “sustitución” en dicha posición C-3. Como consecuencia de lo anterior, se lograron cubrir los objetivos e hipótesis originalmente propuestos.
- Se presume que en la reacción expuesta en el punto anterior se realiza mediante una adición nucleofílica tipo Michael seguida de un proceso de oxidación, desarrollo que es propuesto en la Figura 7. Cabe hacer énfasis en que ésta sólo es una representación teórica e hipotética, que podría ser objeto de un estudio posterior, para su correspondiente validación.
- Al efectuar la reacción de la menadiona con **(1)**, **(2)**, **(3)** o **(4)**, mediante activación térmica, en presencia de disolvente se obtuvieron los sulfuros respectivos, con rendimientos moderados (34-61%).
- En relación a los derivados **5a** y **5c**, éstos muestran un comportamiento antihemorrágico similar que la vitamina K<sub>3</sub>.
- En relación a la posible actividad antimicrobiana, el único derivado sulfurado de menadiona que presentó efecto fue el **5c**, ya que inhibió el crecimiento del hongo *C. albicans* ATCC 14053.
- Por último es necesario mencionar que, las cuatro moléculas obtenidas con los diferentes mercaptanos, fueron caracterizadas mediante los correspondientes datos de RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C y EMIE.

## REFERENCIAS

1. Russell Mc Dowell L. “**Vitamins in animal nutrition. Comparative aspects to human nutrition**”. Editorial Academia Press. 1989.
2. Lloyd L. E. Y Mc Donald B. E. “**Fundamentos de nutrición**”. 2ª edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 1892.
3. [www.um.es/~molecula/vita.htm](http://www.um.es/~molecula/vita.htm)
4. S. Harris R. y G. Wool I. “**Vitamins and Hormones. Advances in research and applications**”. Academic Press Inc. New Cork, USA. **24**, 1966.
5. Lamson Davis W. MS., ND, Steven M., ND, LAc. “**Alternative Medicine Review**”. **8**, 303, 2003.
6. Doisy E. A., Tishler M., Binkley S. B., Mac Corquodale D. W., Emmett A. D., Brown R. A. y Bird O. D. “**Vitamin K potencies of synthetic compounds**”. *Journal of the American Chemical Society*. **74**, 2563, 1939.
7. Fieser Louis. F. y Fieser M. “**Química Orgánica**”. 2ª edición. Editorial Grijalbo S. A. D. F., México. 1960.
8. Binder Ronald G., Benson Mary E. y Flash Robert A. “**The constitution and synthesis of vitamin k<sub>1</sub>**”. *Phytochemistry*. **28**, 2799, 1989.
9. Fieser Louis. F. “**Diene synthesis of 2,3-dialkyl-1,4-naphthoquinones related to vitamin K**”. *The Journal of Biological Chemistry*, **133**, 391, 1940.
10. Fieser Louis F. y Brown Russell H. “**Synthesis of 2-methyl-3-phytyl-1,4-naphthoquinone**”. *Journal of the American Chemical Society*. **71**, 3609, 1947.
11. Kholdeeva Oxana A., Zalomaeva Olga V., Sorokin Alexander B., Ivanchikova Irina D., Della Pina C. y Rossi M. “**New routes to vitamin K<sub>3</sub>**”. *Catalysis Today*. **121**,

58, 2007.

12. Thayer S. A., Cheney L. C., Binkley S. B., Mac Corquodale D. W. y Doisy E. A. **“Diseases of metabolism and nutrition: review of certain recent contributions”**. *Journal of the American Chemical Society*. **61**, 1932, 1939.
13. Binkley S. B., Cheney L. C., Holcome W. F., Mc Kee R. W., Thayer S. A., Mac Corquodale D. W. y Doisy E. A. **“Synthetic and natural antihemorrhagic compounds”**. *Journal of the American Chemical Society*. **61**, 2558, 1939.
14. Anunziata Oscar A., Pinarella Liliana B. y Beltramone Andrea R. **“Assay procedure for vitamin K (anti-hemorrhagic vitamin)”**. *Journal of Molecular Catalysis. A.: Chemical*. **149**, 255, 1999.
15. Colwell Charlotte A. y Mc Call M. **“The mechanism of bacterial and fungus growth inhibition by 2-methyl-1, 4-naphthoquinone”**. *Journal of Bacteriology*. **51**, 659, 1946.
16. [http://www.biopsicologia.net/fichas/page\\_1097.html](http://www.biopsicologia.net/fichas/page_1097.html)
17. Schurgesrs L.J., Shearer M. J., Hamulyák K y Stöcklin, **“Blood”**. *Blood Journal*. **104**, 2682, 2004.
18. Shearer MJ. **“Vitamin K and Vitamin K dependent proteins”**. *British Journal of Pharmacology*. **156-62**, 1990.
19. Mc Farlane W. D., Gram. W. R. y Richardson F. **“Oxidation-reduction potentials in bacteriology and biochemistry”**. *Journal of Biochemistry*. **25**, 358, 1931.
20. Wasserstein M. **“Enzimología Clínica en la Patología Hepática”**. Editorial Puma. **21-28**, 1973.
21. Alarcón OM, Vásquez R. y Acosta F. **“Alteraciones hematológicas en ratas tratadas con dosis elevadas de vitaminaK<sub>3</sub>”**. *Archivos Latinoamericanos de*

*Nutrición*. **41**, 363-374, 1991.

22. Mijares M., Nagy E., Guerrero B. y Arocha-Piñango CL. **“Vitamin K”**. Banco de Sangre, Hospital Miguel Pérez Carreño, Instituto Venezolano de los Seguros Sociales, IVSS, Caracas, Venezuela, 2002.
23. Doisy E. A., Mc Kee R. W., Binkley S. B., Mac Corquodale D. W. y Thayer S.A. **“The isolation of vitamin K<sub>1</sub>”**. *Journal of the American Chemical Society*. **61**, 1295, 1939.
24. Brun Marie P., Braud E., Angotti D., Mondésert O., Quaranta M., Montes M., Miteva M., Grez N., Ducommun B. y Garbay C. **“Natural vitamin K and synthetic vitamin K”**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **13**, 4871, 2005.
25. Barknova V. S., Derkacheva Valentina M., Dolotova Olga V., Li Vladimir D., Negrimovsky Vladimir M. y Kaliya Oleg L. **“Vitamins K”**. *Tetrahedron Letters*. **37**, 1637, 1996.
26. Bruynzeel I., Hebeda C., Folkers E. y Bruynzeel D. **“Cutaneous hypersensitivity reactions to vitamin K: 2 cases reports and a review of the literature.”** *Archives of Internal Medicine*. **78-82**, 1992.
27. Mijares M.E., Nagy E., Guerrero B. y Arocha-Pinango C.L. **“La vitamina K: bioquímica, función y deficiencias”**. *Revista de Investigación Clínica*. **213-229**, 1998.
28. Chen Chinpiao, Liu Yi-Zhong, Shia Kak-Shan y Tseng Huan-Yi. **“Synthesis and anticancer evaluation of vitamin K<sub>3</sub> analogues”**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **12**, 2729, 2002.
29. Karr S., Lefterov Hililla M., Wang M., Lazo John S., Scout Collen N., Wilcox Craig S. y Carr Brian I. **“Vitamin K-active derivatives of 2-methyl-1, 4 naphthohydroquinone”**. *Journal of Biochemistry*. **42**, 10490, 2003.



30. Song, R., Sorokin A., Bernadou J. y Meunier B. **“Purification of the antihemorrhagic vitamin”**. *Journal of Organic Chemistry*. **62**, 673, 1997.
31. Taylor D. K., Avery T. D., Greatrex B. W., Tiekink E. R., Macreadie I. G., Macreadie P. I., Humphries A. D., Kalkanidis M., Fox E. N., Klonis N. y Tilley L. **“Novel Endoperoxide Antimalarials: Synthesis, Heme Binding, and Antimalarial Activity”**. *Journal of Medical Chemistry*. **47**, 1833-1839, 2004.
32. Binkley S. B., Mc Kee R. W., Thayer Sidney A. y Doisy Edgard A. **“The alkylation of hydroxynaphthoquinone”**. *The Journal of Biological Chemistry*. **133**, 721, 1940.
33. Mac Corquodale D. W., Binkley S. B., Thayer Sidney A. y Doisy Edgard A. **“Naphtoquinone antimalarials. III. Diene síntesis of 1,4-naphthoquinones”**. *Journal of the American Chemical Society*. **61**, 1928, 1939.
34. Mac Corquodale D. W., Cheney L. C., Binkley S. B., Holcomb W. F., Mc Kee R. W., Thayer Sydney A. y Doisy E. A. **“Naphthoquinone antimalarials. XVI. Water-soluble derivatives of alcoholic and unsaturated compounds”**. *The Journal of Biological Chemistry*. **231**, 357, 1939.
35. Shigeharu Inouye, Katsuhisa Uchida, Toshio Takizawa, Hideyo Yamaguchi y Shigeru Abe. **“Evaluation of the effect of terpenoid quinones on Trichophyton mentagrophytes by solution and vapor contact”**. *Journal of Medical Chemical*. **12**,100, 2006.
36. Jones D., Pell PA., Sneath, Kirsoy BE. y Snell JJS. **“Rapid screening of the antimicrobial activity of extracts and natural products”**. Academic Press. **35-40**, 1984.
37. Isagro Ricerca Srl, G. Fauser, Giovanni Meazza, Franck E. Dayan y David E. Wedge. **“Activity of Quinones on Colletotrichum Species”**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**, 3824, 2003.

38. Thuyanh Tran, Ekta Saheba, Ariana V. Arcerio, Violeta Chavez, Qing-yi Li, Luis E. Martinezb y Todd P. Primma. **“Quinones as antimycobacterial agents”**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **12**, 4809, 2004.
39. Muscia Gisela Celeste. **“Síntesis por microondas de compuestos quinolínicos contra malaria y tuberculosis”**. *Journal of the Chilean Chemical Society*. **391**. 2007.
40. Perreux, L. y Loupy A. **“A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations”**. *Tetrahedron*. **57**, 9199-9223, 2001.
41. Nelsestven G., Zytkovicz T. y Howard J. **“The mode of action of vitamin K”**. *Journal of Biological Chemistry*. **249**, 6347-50, 1974.
42. Ansbacher S. y Fernholz E. **“Editorial review the bioassay of vitamin K”**. *Journal of the American Chemical Society*. **61**, 1924, 1939.
43. Arteaga-Vizcaino M., Torres-Espina M., Redondo L., Soto-Torres L., Diez-Ewald M., Vizcaino-Salazar G., Torres-Guerra E. y Fernandez N. **“Efecto de la administración de la vitamina K sobre la actividad de los factores II, VII y X en neonatos sanos”**. *Revista de Investigación Clínica*. **83-93**, 1995.
44. Arteaga-Vizcaino M., Espinoza H., Torres G., Diez-Ewald M., Quintero J., Vizcaino G., Estevez J. y Fernandez N. **“Efecto de la vitamina K oral e intramuscular sobre los factores II, VII, IX y PIVKA II en el recién nacido hasta los 60 días de edad. Relación con la alimentación”**. *Revista Médica de Chile*. **1121**, 2001.
45. Muscia G. C., Bollini M., Bruno A. M. y Asís, S. E. **“Evaluation of antiparasitic, antituberculosis and antiangiogenic activities of 3-aminoquinolin-2-onederivatives”**. *Journal of the Chilean Chemical Society*. **51**, 859-863, 2006.

46. O'Connor M. y Addiego J. **“Use of oral vitamin K1 to prevent hemorrhagic disease of the newborn infant.”** *Journal of Pediatrics*. **108**, 616, 1986.
47. Lane P. y Hathaway W. **“Vitamin K in infancy.”** *Journal of Pediatrics*. **351-9**, 1985.
48. Brown C., Dulik D. y Jones T. **“The toxicity of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone)”**. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **285**, 187-196, 1991.
49. Vásquez-Royett F. **“Hipervitaminosis K<sub>3</sub> aguda en ratas”**. Universidad de Carabobo. Facultad de Ciencias de la Salud. Valencia. **9-16**, 1993.
50. Fieser Louis F. **“Studies in the synthesis of the antirachitic vitamins. I. The synthesis of 3-[2'-methylenecyclohexylidene-1']-propene-1”**. *Journal of the American Chemical Society*. **61**, 2559, 1939.
51. Fieser Louis F. y Turner Richard B. **“Naphthoquinone antimalarials. XVII. Chromic anhydride”**. *Journal of the American Chemical Society*. **69**, 2335, 1947.
52. Mack Donald O., Wolfensberger M., Girardot J., Millar Julie A. y Connor Jonson B. **“Vitamin K: its properties, distribution and clinical importance”**. *The Journal of Biological Chemistry*. **254**, 2666, 1979.
53. Nishikawa Y., Carr Brian I., Wang M., Kar S., Finn F., Dowd P., Zheng Zhizhen B., Kerns J. y Naganathan S. **“Growth inhibition of hepatoma cells induced by vitamin K and its analogs”**. *The Journal of Biological Chemistry*. **270**, 28304, 1995.
54. Martínez J., Velasco B., Pozas R., Torres H., Trujillo J., Arroyo G. y Miranda R. **“Eco-contributions to the Chemistry of Perezone, a comparative study, using different modes of activation and solvent conditions”**. *Natural Product Communications*. Volumen III, **9**, 1465-1468, 2008.

## **Anexos**

En este apartado de la Tesis, se presentan las tres series de espectros (RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  y EMIE) para cada uno de los productos obtenidos. Aunque los correspondientes datos se mostraron de manera resumida en las Tablas 3, 4 y 5, los espectros respectivos se proporcionan para mayor objetividad.

**Anexo 1. Espectros de RMN  $H^1$  y  $C^{13}$**   
**correspondientes a la menadiona y a los**  
**productos 5 a-d.**

Dario-Dr Rene-Menadiona

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CDCl3

Ambient temperature

Mercury-200 "Mercury200"

Relax delay 1.000 sec

Pulse 40.0 degrees

Acq. time 1.992 sec

Width 3411.8 Hz

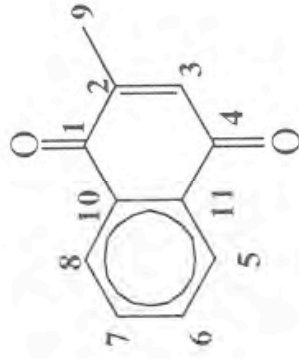
64 repetitions

OBSERVE HL, 199.9750831 MHz

DATA PROCESSING

FT size 16384

Total time 0 min, 49 sec

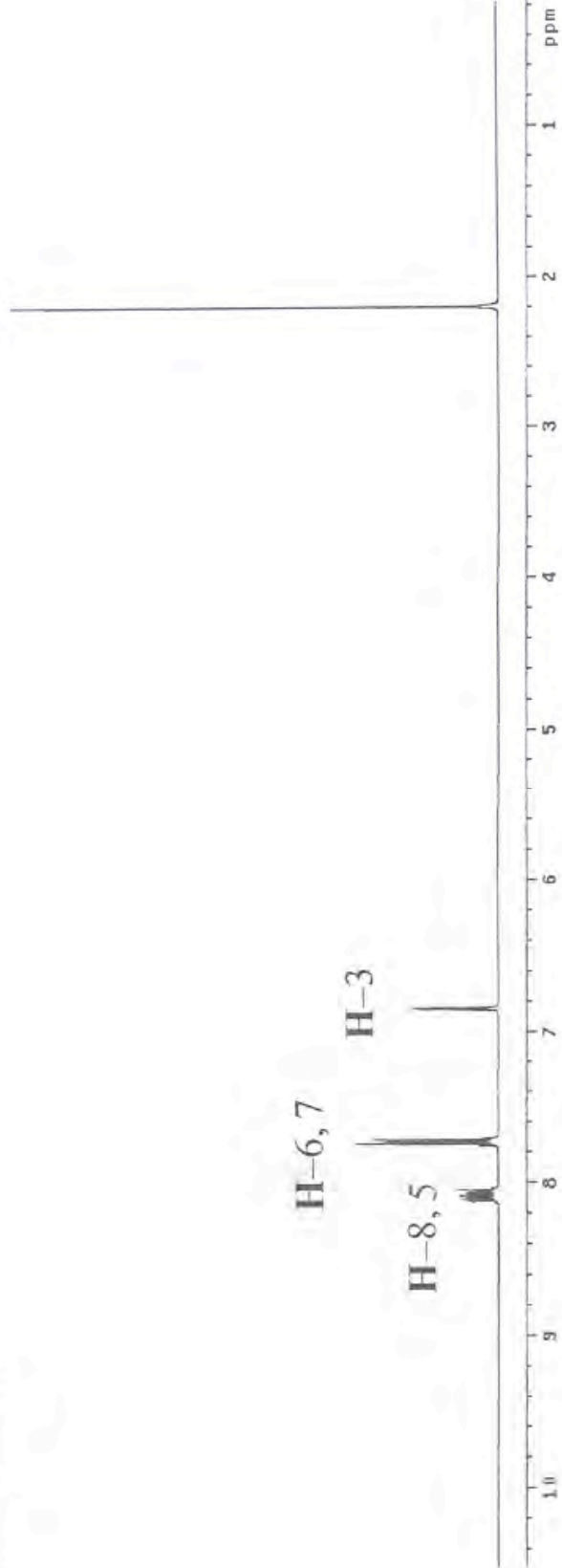


H-9

H-6,7

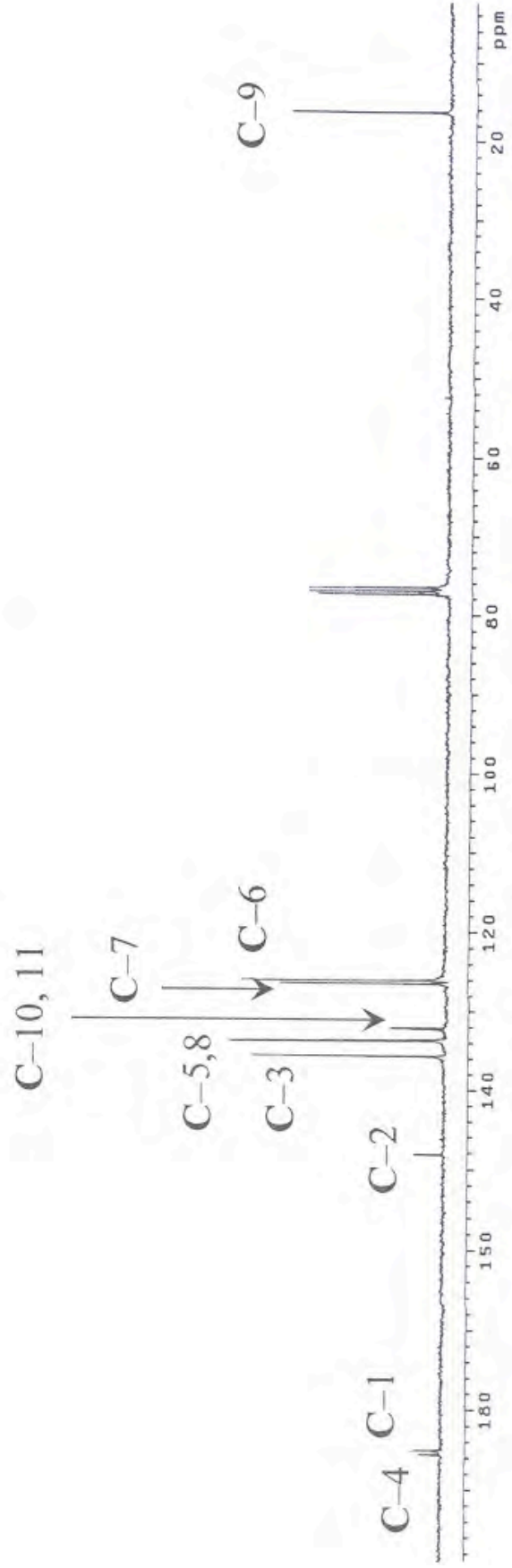
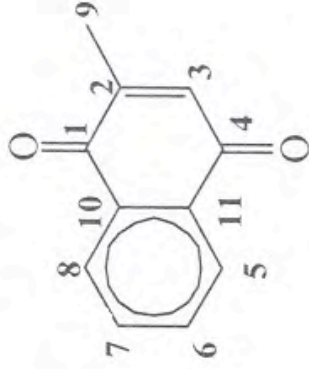
H-3

H-8,5



Espectro 1. RMN H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>/TMS) de menadiona, determinado a 300 MHz.

Dario-Dr Rene-Menadiona  
Pulse Sequence: s2pul  
Solvent: CDCl3  
Ambient temperature  
Mercury-200 "Mercury200"



Espectro 2. RMN  $\text{C}^{13}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) de menadiona, determinado a 75 MHz.

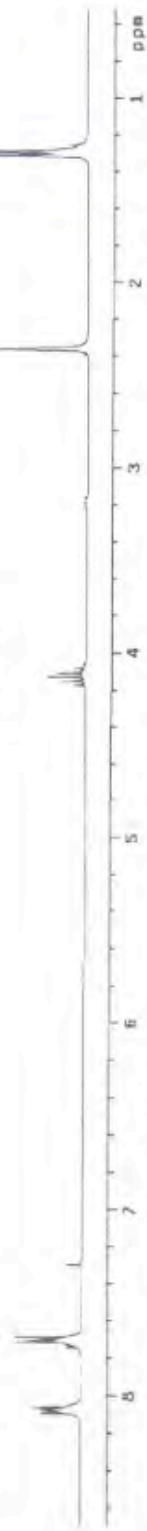
HMBT Dario-Dr Rene menadiona-isopropanotiol  
Pulse Sequence: s2pul  
Solvent: CDCl<sub>3</sub>  
Ambient temperature  
Mercury-200 "Mercury 200"



H-9  
H-13, 14

H-6, 7  
H-5, 8

H-12



Espectro 3. RMN H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>/TMS) del compuesto **5a**, determinado a 300 MHz.



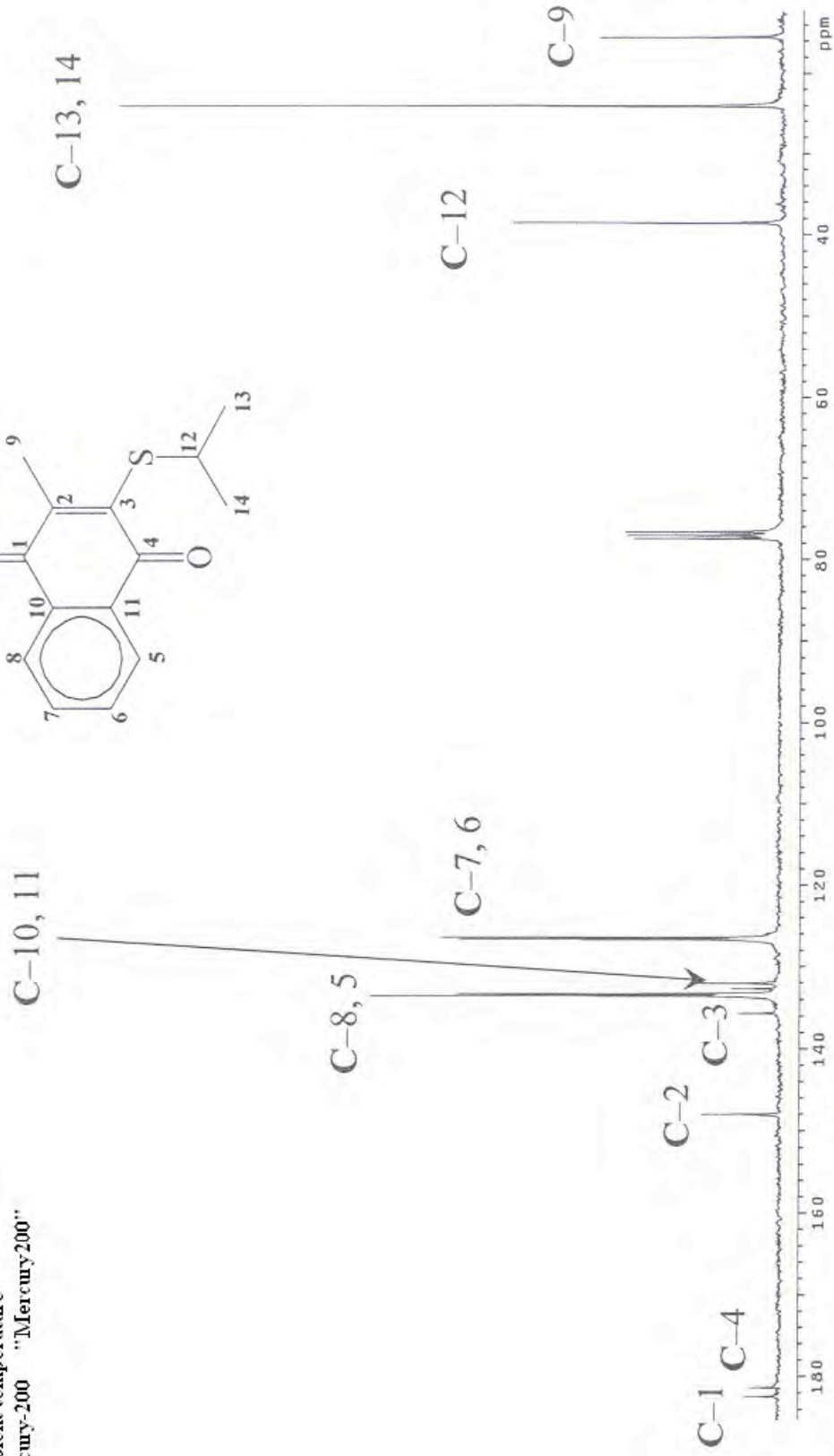
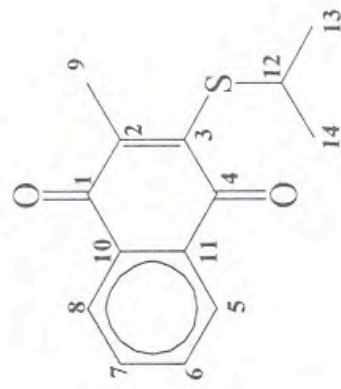
CMBT Dario-Dr Rene menadiona-isopropanotiol

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CDCl<sub>3</sub>

Ambient temperature

Mercury-200 "Mercury200"



Espectro 4. RMN C<sup>13</sup> (CDCl<sub>3</sub>/TMS) del compuesto 5a , determinado a 75 MHz.

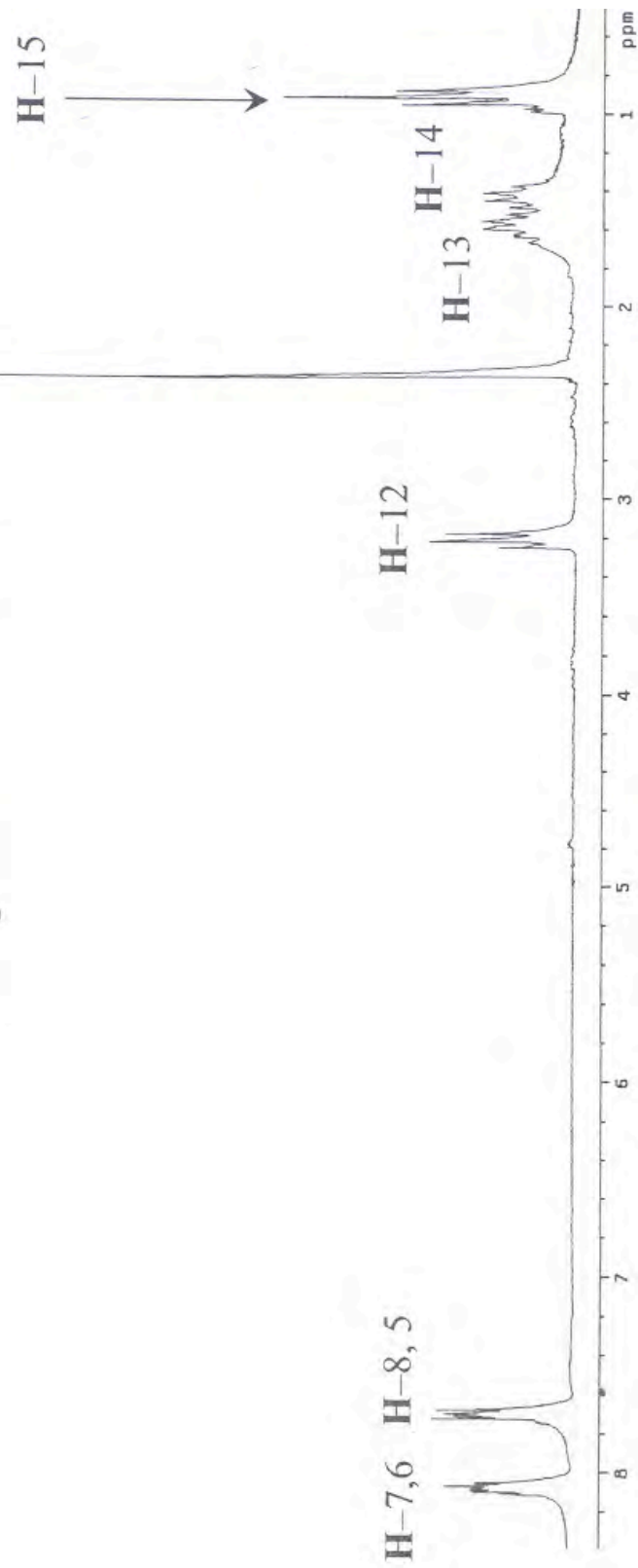
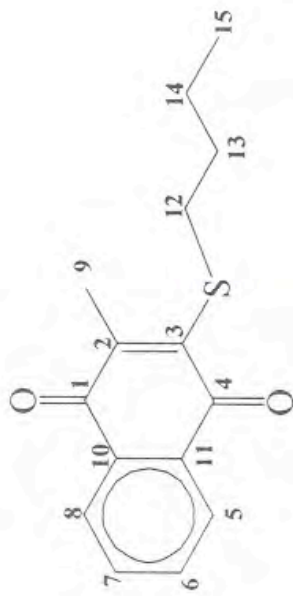
HMBT Dario-Dr Rene menadiona-butanolol

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CDCl3

Ambient temperature

Mercury-200 "Mercury200"



Espectro 5. RMN H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>/TMS) del compuesto **5b**, determinado a 300 MHz.

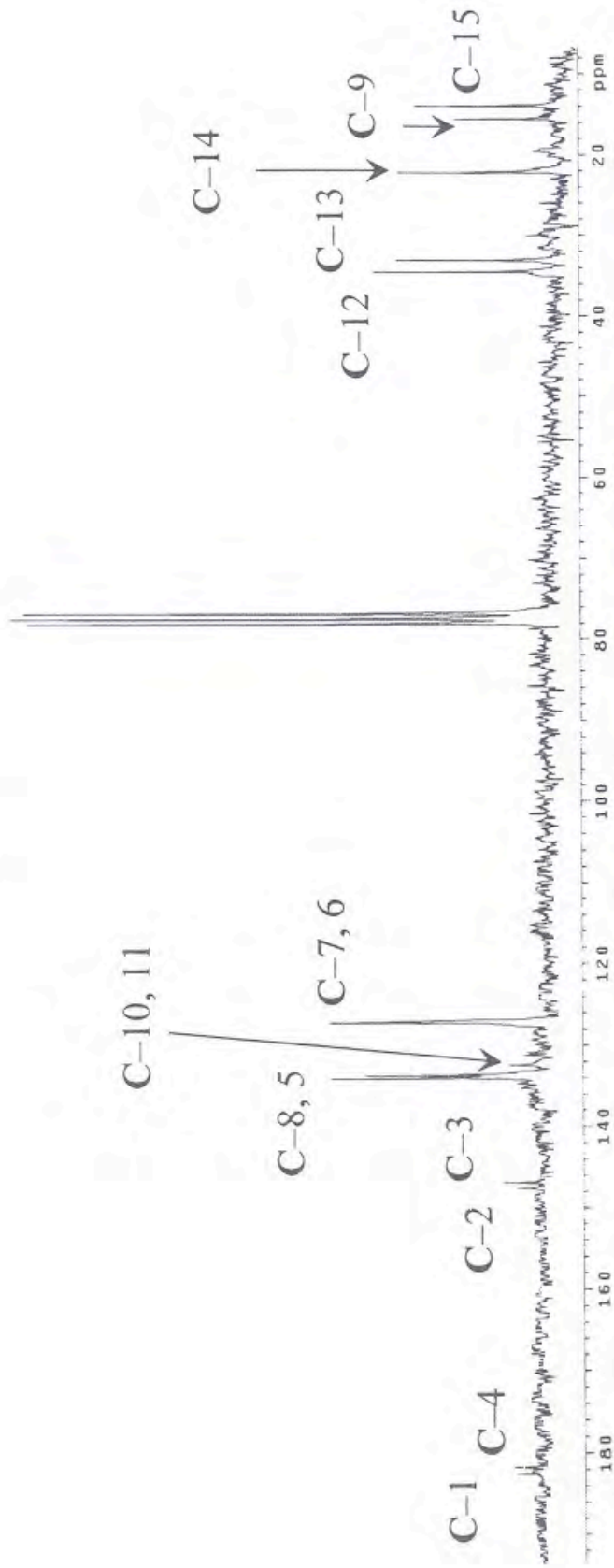
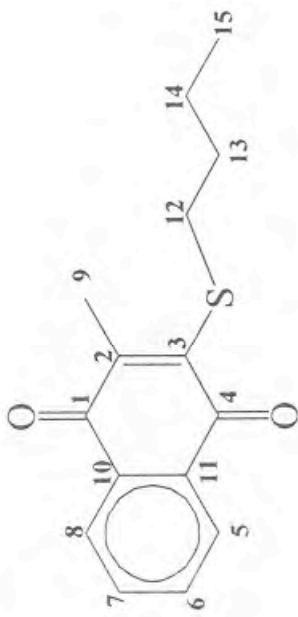
CMBT Dario-Dr Rene menadiona-butanolol

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CDCl<sub>3</sub>

Ambient temperature

Mercury-200 "Mercury200"



Espectro 6. RMN C<sup>13</sup> (CDCl<sub>3</sub>/TMS) del compuesto **5b**, determinado a 75 MHz.

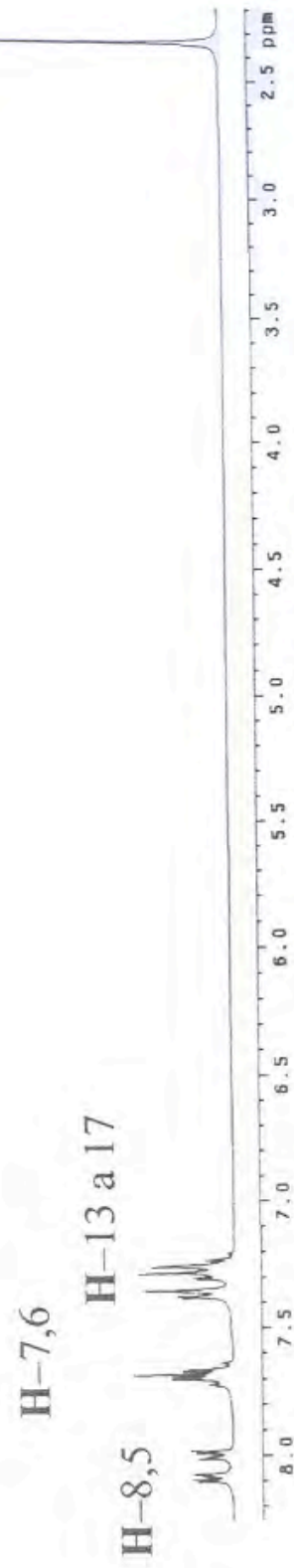
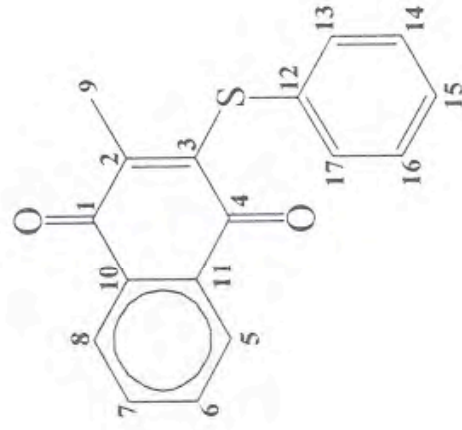
HMTF Dario-Dr Rene menadiona-tiofenol

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CDCl3

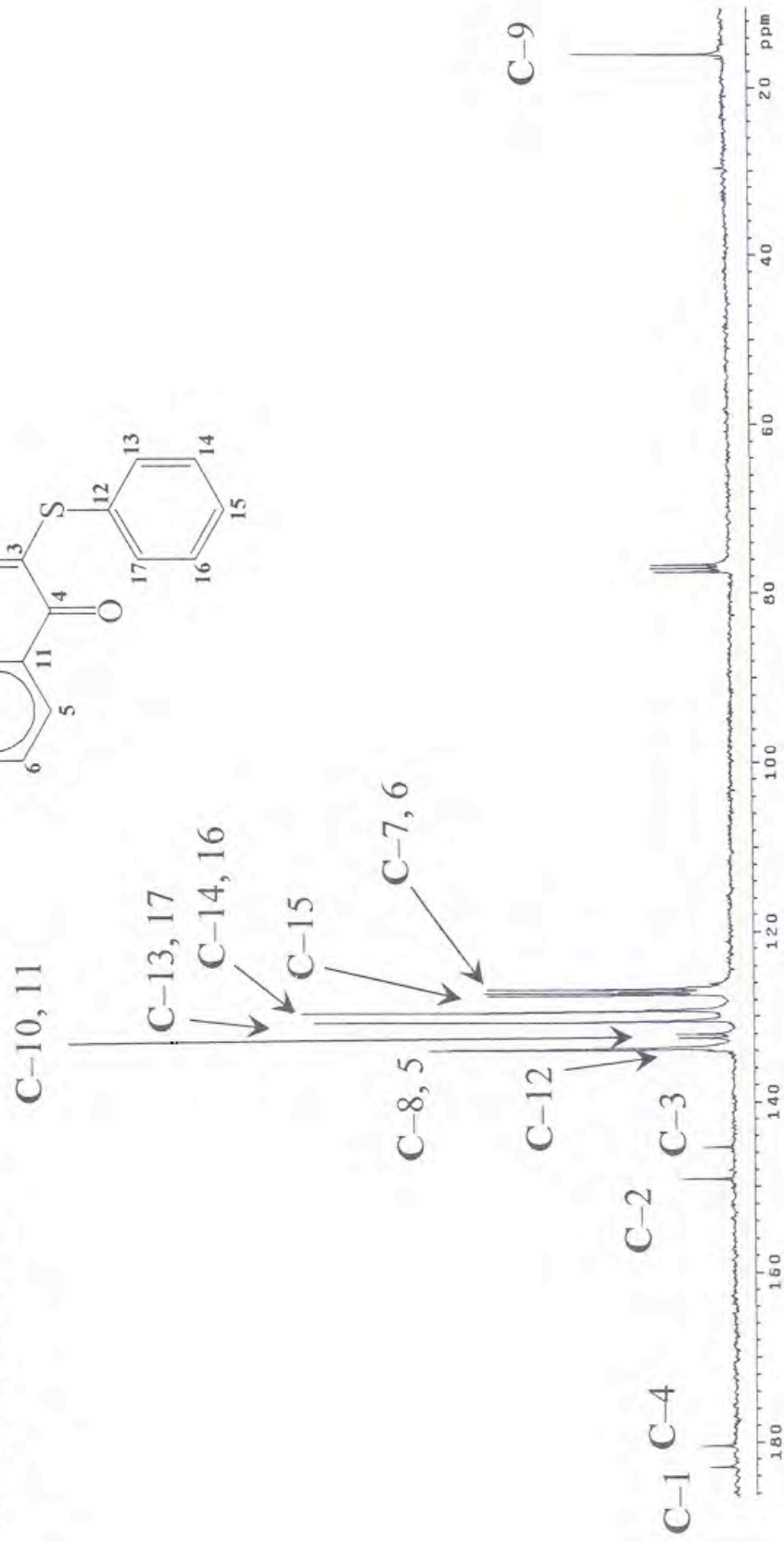
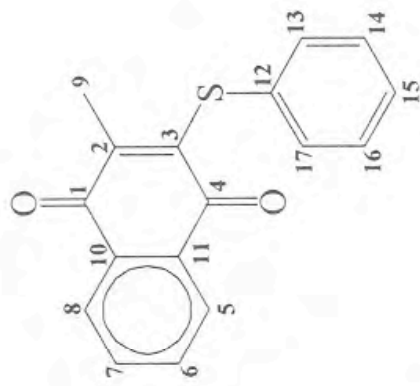
Ambient temperature

Moercury-200 "Mercury200"



Espectro 7. RMN H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>/TMS) del compuesto **5c**, determinado a 300 MHz.

CMTF Dario-Dr Rene menadiona-tiofenol  
Pulse Sequence: s2pul  
Solvent: CDCl<sub>3</sub>  
Ambient temperature  
Mercury-200 "Mercury200"



Espectro 8. RMN C<sup>13</sup> (CDCl<sub>3</sub>/TMS) del compuesto **5c**, determinado a 75 MHz.

HMBM Dario-Dr Rene menadiona-bencilmercaptano

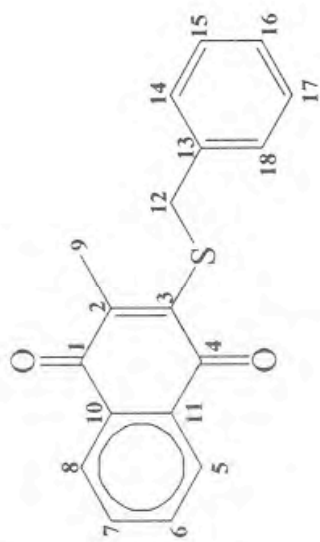
Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CDCl<sub>3</sub>

Ambient temperature

Mercury-200 "Mercury200"

H-9



H-12

H-14 a 18

H-7, 6

H-8, 5

ppm

Espectro 9. RMN H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>/TMS) del compuesto **5d**, determinado a 300 MHz.

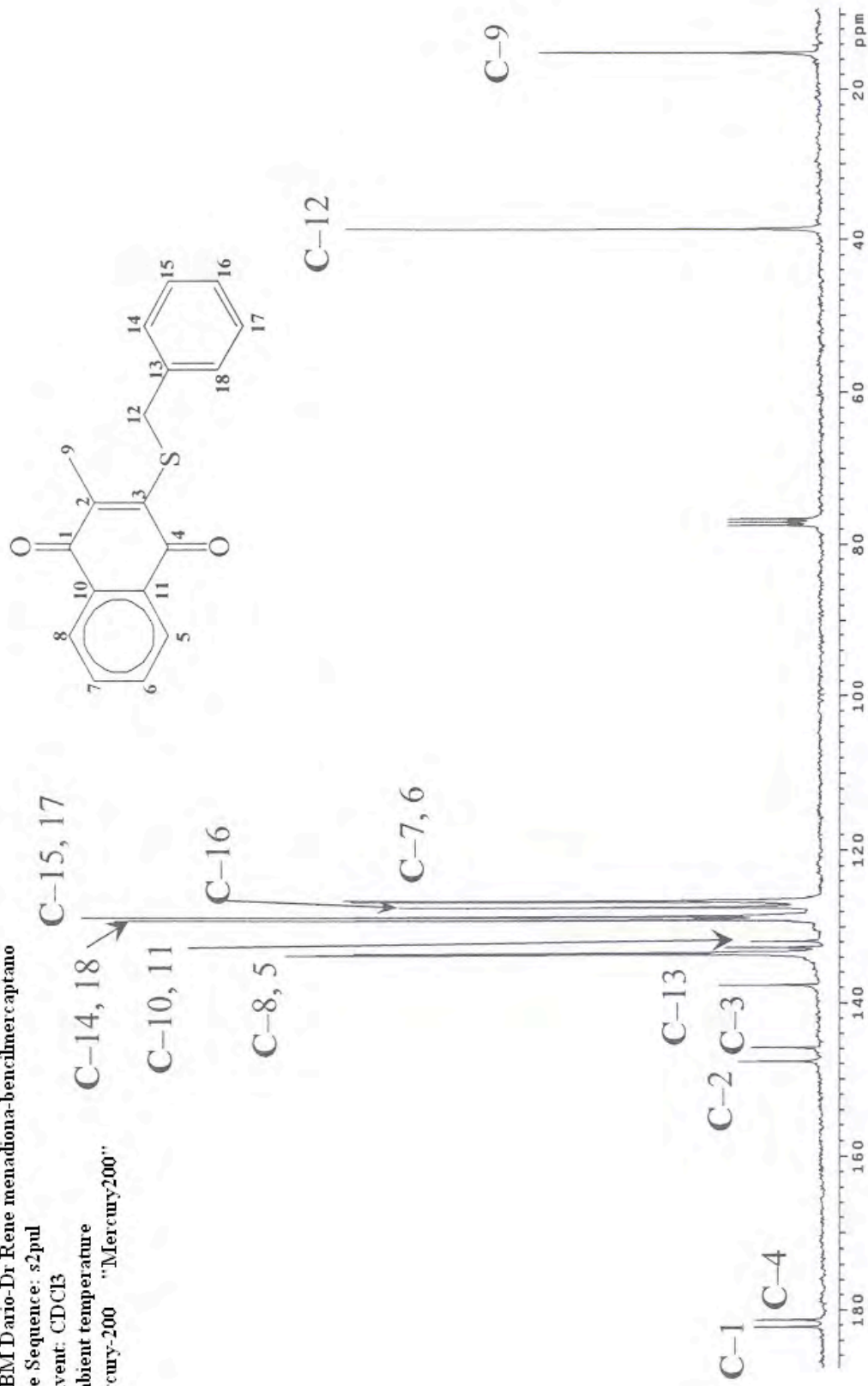
CMEM Dario-Dr. Rene menadiona-bencilmercaptano

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CDCl<sub>3</sub>

Ambient temperature

Mercury-200 "Mercury200"



Espectro 10. RMN C<sup>13</sup> (CDCl<sub>3</sub>/TMS) del compuesto **5d**, determinado a 75 MHz.

## **Anexo 2. Espectros de masas por impacto**

**electrónico correspondientes a la**

**menadiona y a los productos 5 a-d.**



Spectrum Plot

C:\SATURN\DATA\MENA

Comment: MENADIONA PURA

Scan: 550

Seg: 1

Retention: 9.16

RIC: 25447083

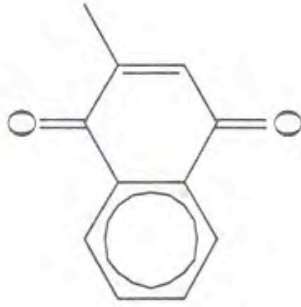
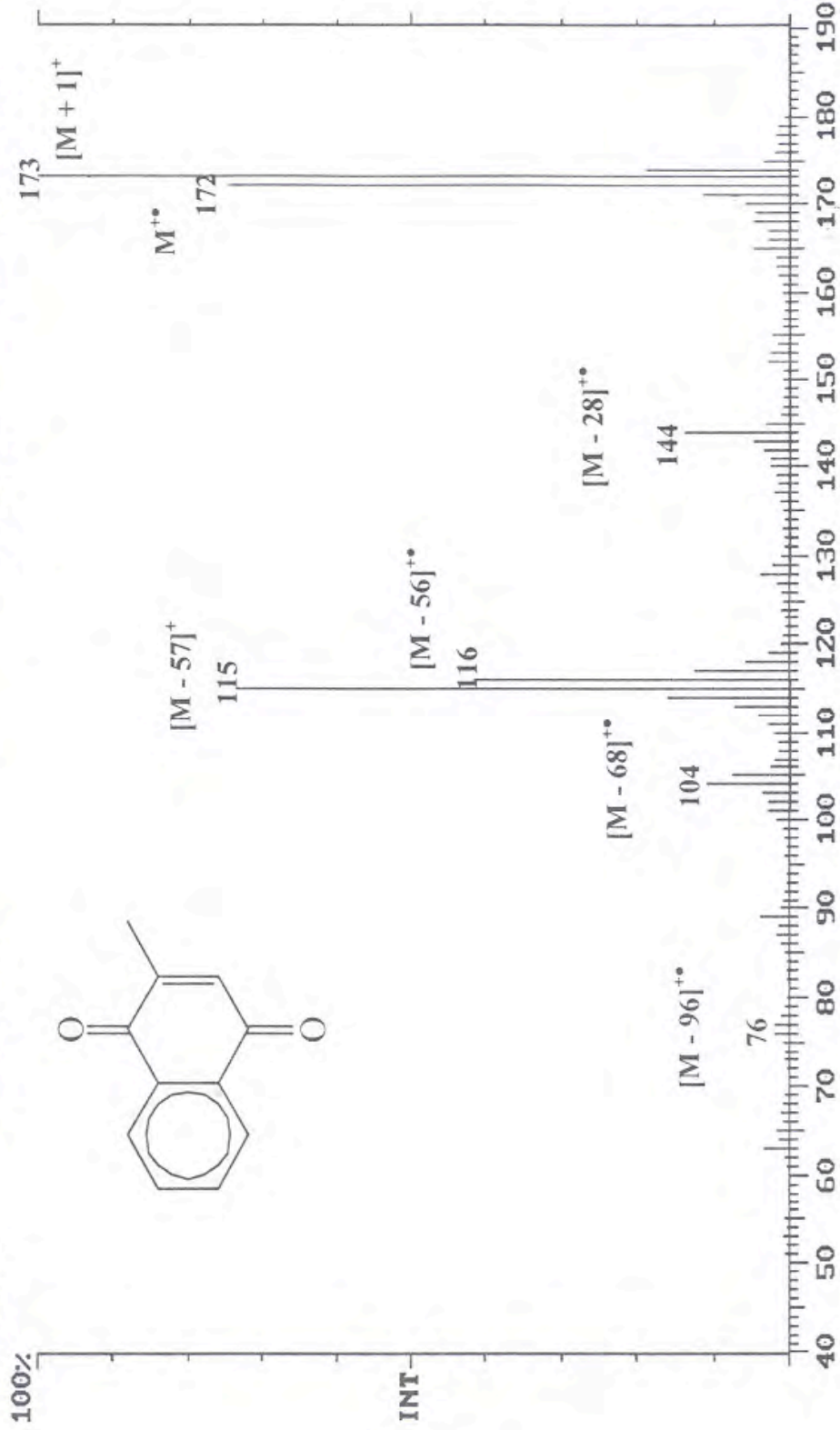
Masses: 51 - 180

# Pks: 121

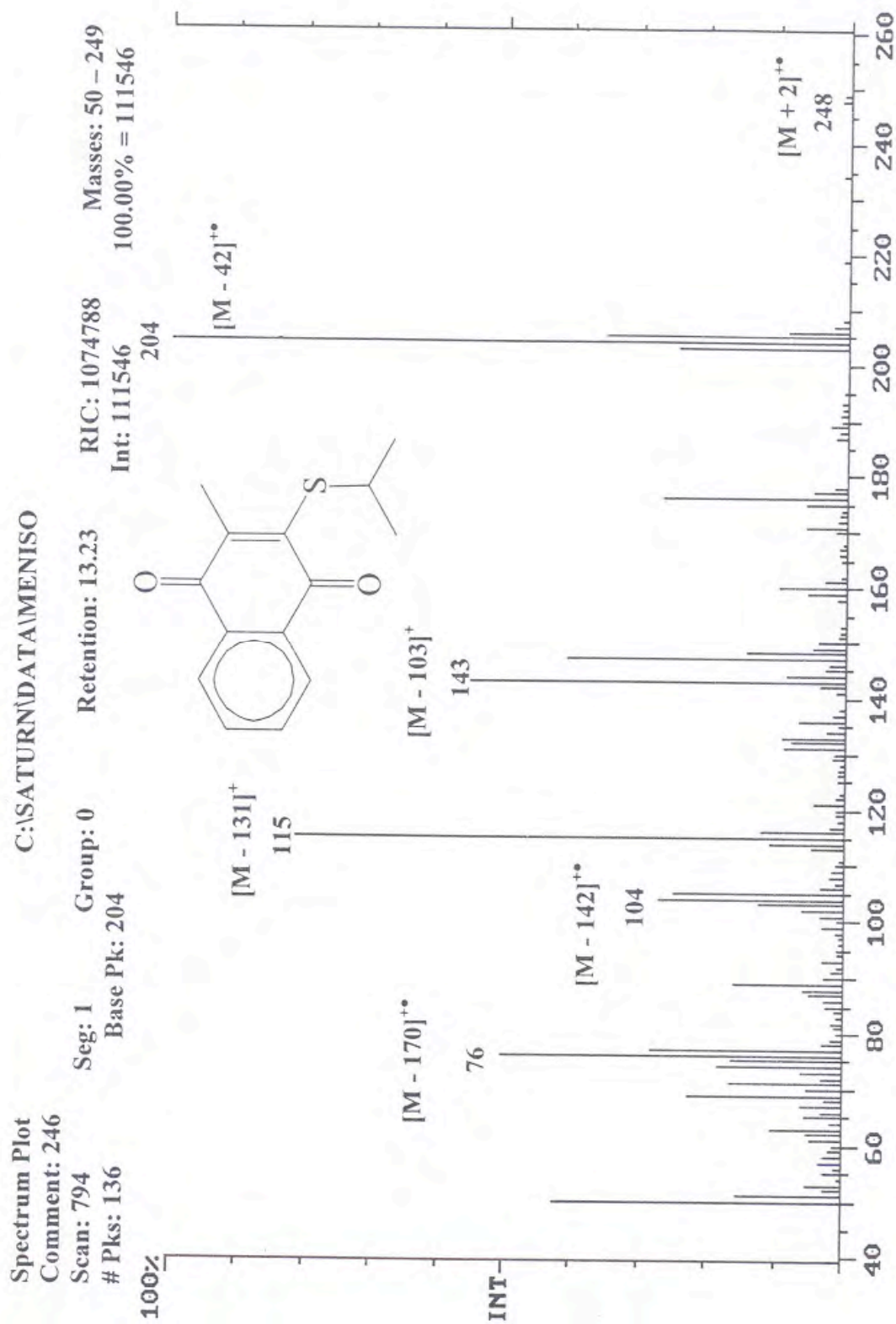
Base Pk: 173

Int: 4712644

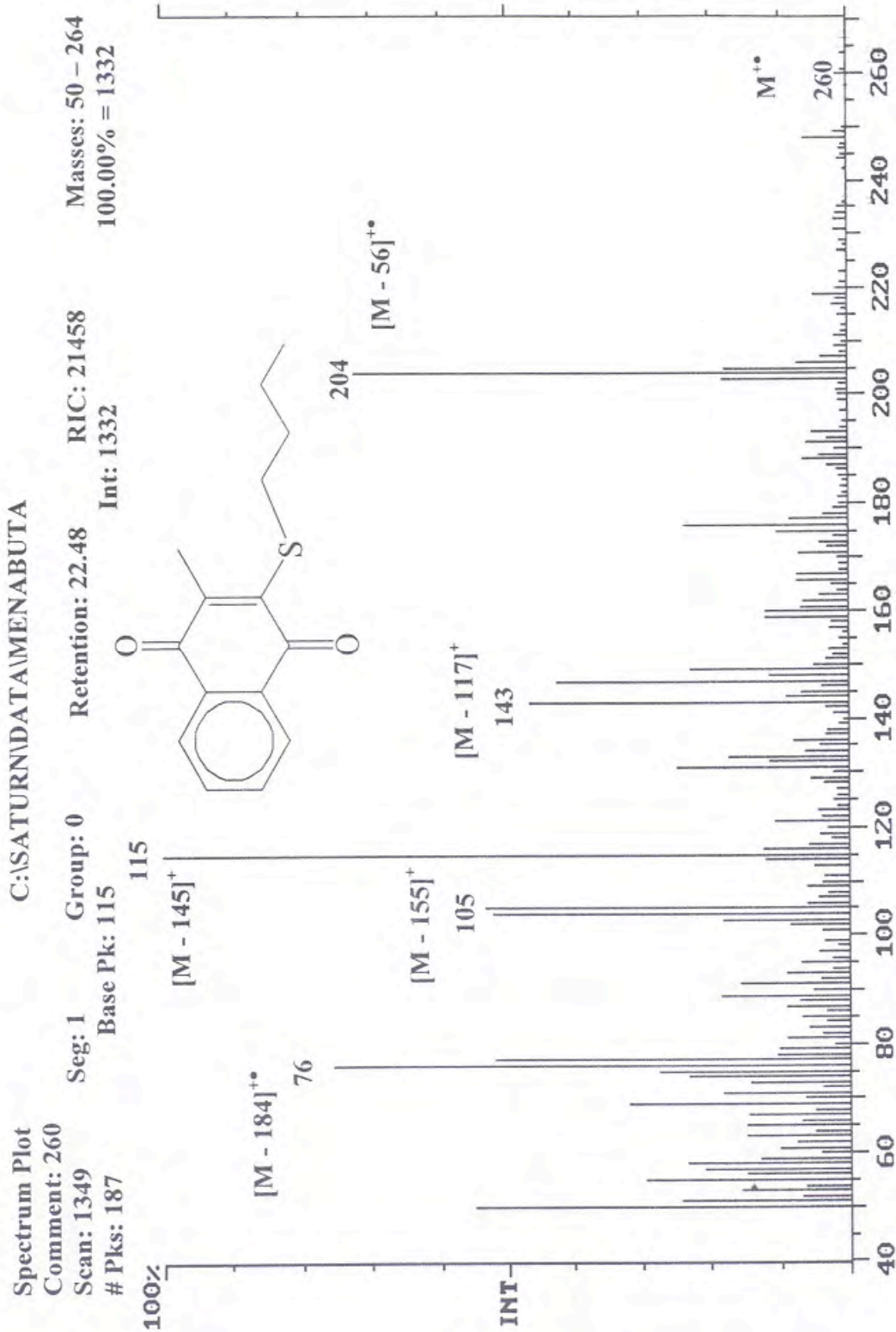
100.00% = 4712644



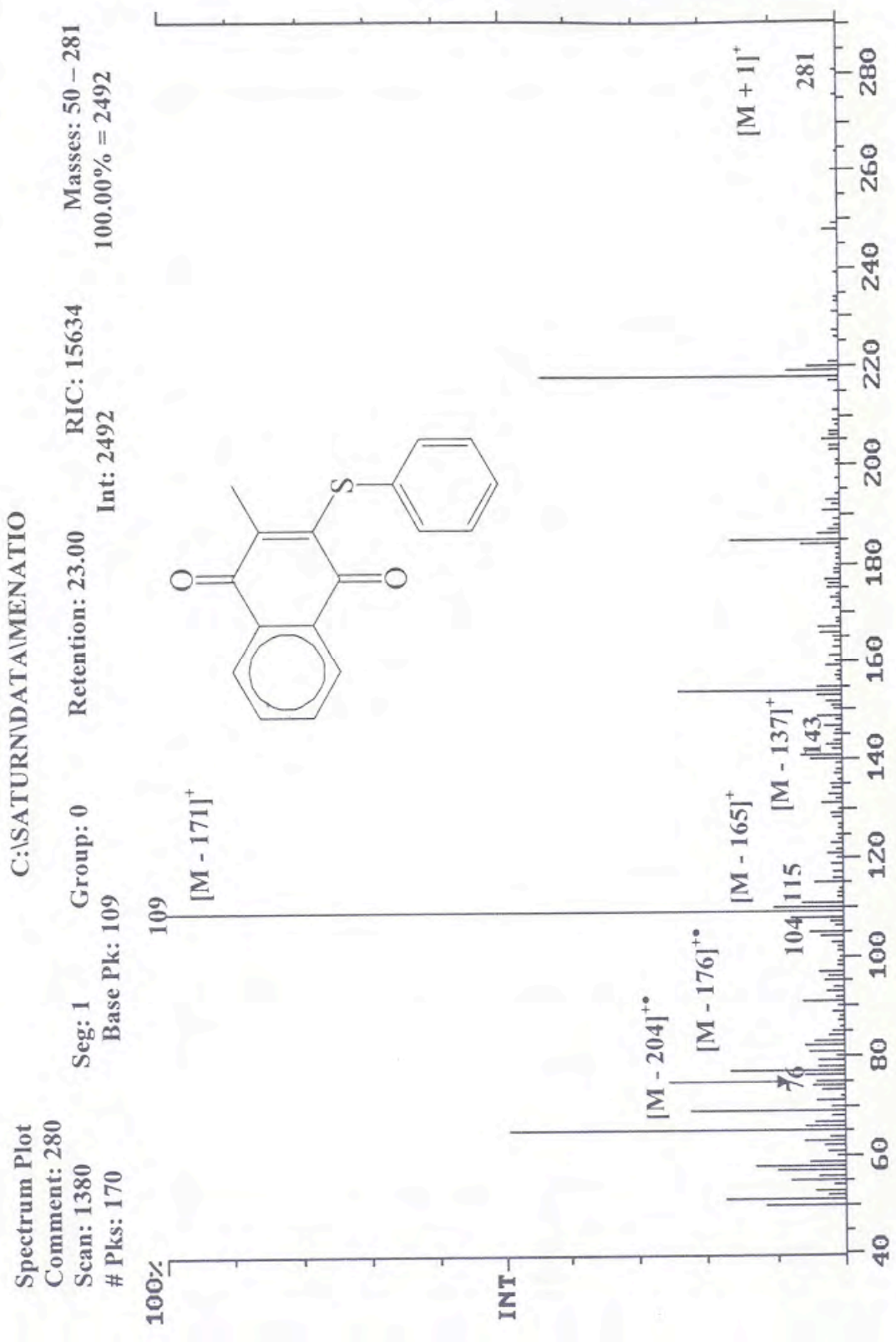
Espectro 11. Espectro correspondiente a la menadiona obtenido mediante EMIE, potencial de ionización 70 eV.



**Espectro 12.** Espectro correspondiente a **5a** obtenido mediante EME, potencial de ionización 70 eV.



Espectro 13. Espectro correspondiente a **5b** obtenido mediante EMIE, potencial de ionización 70 eV.



**Espectro 14.** Espectro correspondiente a **5c** obtenido mediante EMIE, potencial de ionización 70 eV.

Spectrum Plot  
Comment: 294

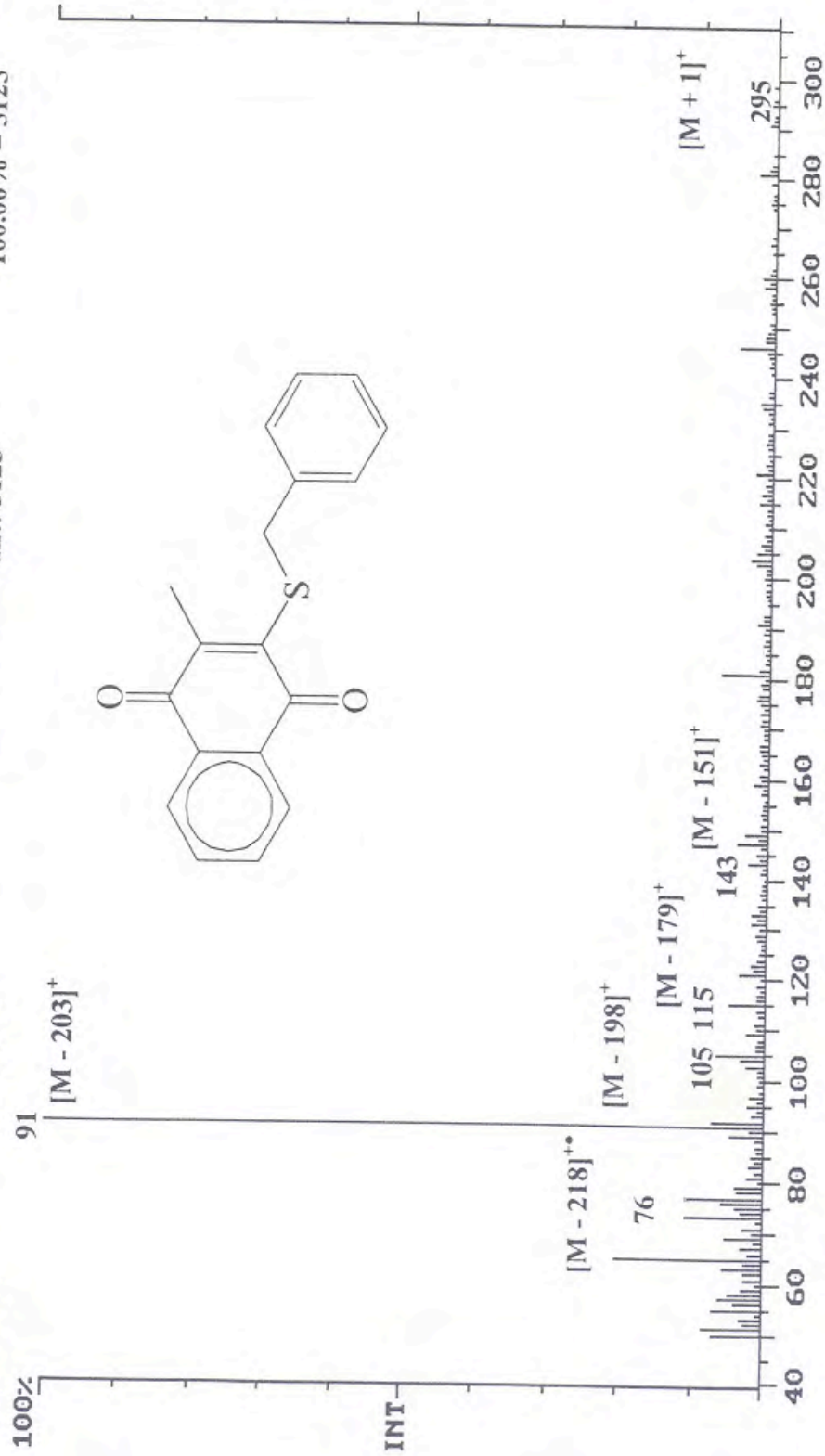
Scan: 1770  
# Pks: 224

Seg: 1  
Group: 0  
Base Pk: 91

Retention: 29.49  
Int: 5125  
RIC: 21370

Masses: 50 - 299  
100.00% = 5125

C:\SATURN\DATA\MENBEN



Espectro 15. Espectro correspondiente a **5d** obtenido mediante EMIE, potencial de ionización 70 eV.

## GLOSARIO

|                            |   |
|----------------------------|---|
| %                          | Por ciento                                      |
| $\alpha$                   | Alfa  |
| abs.                       | Absoluto  |
| AcOEt                      | Acetato de etilo                                |
| ATCC                       | The American Type Culture Collection            |
| $\beta$                    | Beta  |
| $^{\circ}\text{C}$         | Grados Celcius                                  |
| <i>C.</i>                  | <i>Candida</i>                                  |
| Ca                         | Calcio  |
| <i>ccf</i>                 | Cromatografía en capa fina                      |
| $\text{CDCl}_3$            | Cloroformo deuterado                            |
| $\text{CHCl}_3$            | Cloroformo                                      |
| $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ | Acetona   |
| $\text{CO}_2$              | Dióxido de carbono                              |
| cols.                      | Colaboradores                                   |
| Conc.                      | Concentración                                   |
| EMIE                       | Espectrometría de masas por impacto electrónico |
| g                          | Gramo   |
| $\text{K}_1$               | Filoquinona                                     |
| $\text{K}_2$               | Menaquinona                                     |
| $\text{K}_3$               | Menadiona                                       |
| Kg                         | Kilogramo                                       |
| LDH                        | Deshidrogenasa láctica                          |
| $\mu\text{g}$              | Microgramo                                      |
| $\mu\text{L}$              | Microlitro                                      |
| MeOH                       | Metanol   |
| mg                         | Miligramo                                       |
| MHz                        | Mega Hertz (Hertzios)                           |
| mL                         | Mililitro                                       |
| mm                         | Milimetro                                       |

|                     |   |
|---------------------|---|
| mmol                | Milimol                                       |
| MNQ                 | Metilnaftoquinona                             |
| O                   | Oxígeno                                       |
| p/v                 | Peso volumen                                  |
| ppm                 | Partes por millón                             |
| Pto.                | Punto   |
| R                   | Referencia (menadiona)                        |
| RMN                 | Resonancia magnética nuclear                  |
| RMN <sup>13</sup> C | Resonancia magnética nuclear de carbono trece |
| RMN <sup>1</sup> H  | Resonancia magnética nuclear de hidrógeno     |
| rpm                 | Revolución por minuto                         |
| RTO.                | Rendimiento                                   |
| seg                 | Segundo                                       |
| TGO                 | Transaminasa glutámico-oxaloacética           |
| TGP                 | Transaminasa glutámico-pirúvica               |
| TMS                 | Tetrametilsilano                              |
| TP                  | Protrombina                                   |
| UV                  | Ultravioleta                                  |