



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**Síntesis de ácidos dimetil, dihidroxi, formil, benzoicos  
como antioxidantes naturales**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. EMMANUEL BARUCH BAUTISTA REDONDA



TUTOR: Dr. GUSTAVO A GARCIA DE LA MORA

AÑO: 2012



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: Dr. Eugene A. Bratoeff Titeff

Vocal: Dr. Cecilio Álvarez Toledano

Vocal: Dr. Joaquín Tamariz Mascarúa

Vocal: Dr. José Gustavo Ávila Zárraga

Secretario: Dra. Virginia Maricela Mastranzo Corona

### **Lugar donde se realizó la tesis**

Laboratorio 205-206, Departamento de Química Orgánica,  
Laboratorio 206, Departamento Bioquímica,  
Facultad de Química UNAM

---

Q. Emmanuel Baruch Bautista Redonda

Sustentante

---

Dr. Gustavo A. García de la Mora

Asesor

## Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Químicas de la Universidad Nacional Autónoma de México que por medio de su programa de Maestría he podido extender mi formación profesional y académica dentro del área de la Química.

Al CONACyT por el apoyo económico otorgado durante los estudios de Maestría (becario: 240008).

Muy en especial al Dr. Gustavo A. García de la Mora por haberme brindado la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo así como por todas las observaciones realizadas para el fortalecimiento de mi formación.

Al Dr. Carlos Rius Alonso por haberme dado la oportunidad de realizar experimentos con el aparato Discover-Explorer Hybrid® para las reacciones en microondas.

A las maestras Yvonne Grillasca, Alejandrina Acosta, Irene Audelo por el apoyo proporcionado para la obtención de los espectros de RMN y por las observaciones realizadas durante mi estancia en el laboratorio que me ayudaron en mi formación.

Al personal de la USAI: Q. Georgina Duarte Lisci en la colaboración de la espectrometría de masas y a la Q. Marisela Gutiérrez Franco en la colaboración de la espectroscopía de IR.

Al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes y al M. en C. Ignacio González Sánchez por la realización de las pruebas biológicas del presente trabajo.

A los miembros del jurado por las observaciones y comentarios realizados al presente trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 205 y 206 por compartir no sólo el gusto por la Química sino por los momentos de convivencia y felicidad.

Parte de este trabajo se presentó:

- 46° Congreso Mexicano de Química. Ciudad de Querétaro, Querétaro.
- QuimiUNAM 2011. Ciudad Universitaria, UNAM.

*No hay que confundir nunca el conocimiento con la sabiduría.  
El primero nos sirve para ganarnos la vida; la sabiduría nos ayuda a  
vivir.*

*Sorcha Carey*

*A mi esposa Yanet Gabriela Rojas Martínez.  
A mis hermanos Elihú, Eligio y Oswaldo, mis abuelos Eligio y  
Herlinda, a mis padres Juan y Mariana*

## CONTENIDO

	Página
<b>Lista de esquemas</b>	<b>i</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>i</b>
<b>Lista de gráficos</b>	<b>ii</b>
<b>Lista de tablas</b>	<b>ii</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>iii</b>
<b>1 Resumen</b>	<b>1</b>
<b>2 Introducción.</b>	<b>2</b>
<b>3 Antecedentes.</b>	<b>3</b>
3.1 El estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas.	3
3.2 Antioxidantes.	3
3.3 Resveratrol.	5
3.4 Aromatización de cetonas cíclicas.	6
3.5 Orto-formilación de compuestos fenólicos.	7
3.6 Pseudocifelarina A.	9
<b>4 Objetivos</b>	<b>11</b>
<b>5 Resultados y análisis de resultados.</b>	<b>12</b>
5.1 Resultados de 3,5-dihidroxibenzoato de metilo (12).	13
5.2 Resultados de 3,5-dimetoxibenzoato de metilo (13).	13
5.3 Resultados de 2-formil-3,5-dimetoxibenzoato de metilo (14).	14
5.4 Resultados de (3,5-dimetoxi-1,2-fenilen) dimetanol	15

(15).	
<b>5.5 Resultados de 2,2-dimetil-4,6-dioxo-ciclohexan-carboxilato de metilo (20).</b>	<b>16</b>
<b>5.6 Resultados de 2,4-dihidroxi-5,6-dimetilbenzoato de metilo (8).</b>	<b>18</b>
<b>5.7 Resultados del ácido 2,4-dihidroxi-5,6-dimetilbenzoico (21).</b>	<b>21</b>
<b>5.8 Resultados de 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetil benzoato de metilo (9).</b>	<b>22</b>
<b>5.9 Resultados del ácido 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetilbenzoico (10).</b>	<b>23</b>
<b>5.10 Resultados de 5,5- dimetil, 1,3-ciclohexanodiona (2).</b>	<b>24</b>
<b>5.11 Resultados del 3-hidroxi-5,6-dimetilfenol (22).</b>	<b>24</b>
<b>5.12 Resultados de 2,4-dihidroxi-3-formil-5,6-dimetil-benzaldehido (23).</b>	<b>25</b>
<b>5.13 Resultados de las pruebas biológicas (citoprotección).</b>	<b>25</b>
<b>6 Conclusiones.</b>	<b>28</b>
<b>7 Procedimiento experimental.</b>	<b>29</b>
<b>7.1 Síntesis de 3,5-dihidroxibenzoato de metilo (12).</b>	<b>30</b>
<b>7.2 Síntesis de 3,5-dimetoxibenzoato de metilo (13).</b>	<b>31</b>
<b>7.3 Síntesis de 2-formil-3,5-dimetoxibenzoato de metilo (14).</b>	<b>31</b>
<b>7.4 Síntesis de (3,5-dimetoxi-1,2-fenilen) dimetanol (15).</b>	<b>31</b>
<b>7.5 Síntesis de 2,2-dimetil-4,6-dioxo-ciclo-hexan-carboxilato de metilo (20).</b>	<b>32</b>
<b>7.6 Síntesis de 2,4-dihidroxi-5,6-dimetilbenzoato de metilo (8).</b>	<b>33</b>

<b>7.7 Síntesis de 4,6-dimetoxi-2,3-dimetilbenzoato de metilo (8a).</b>	<b>34</b>
<b>7.8 Síntesis del ácido 2,4-dihidroxi-5,6-dimetilbenzoico (21).</b>	<b>35</b>
<b>7.9 Síntesis de 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetilbenzoato de metilo (9).</b>	<b>35</b>
<b>7.10 Síntesis del ácido 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetilbenzoico (10).</b>	<b>36</b>
<b>7.11 Síntesis de 5,5- dimetil, 1,3-ciclohexanodiona (2).</b>	<b>37</b>
<b>7.12 Síntesis del 3-hidroxi-5,6-dimetilfenol (22).</b>	<b>37</b>
<b>7.13 Síntesis de 2,4-dihidroxi-3-formil-5,6-dimetilbenzaldehido (23).</b>	<b>38</b>
<b>7.14 Pruebas biológicas (citoprotección).</b>	<b>39</b>
<b>6.14.1 Líneas Celulares</b>	<b>39</b>
<b>6.14.2 Compuesto analizado</b>	<b>39</b>
<b>6.14.3 Medio de cultivo: DMEM</b>	<b>39</b>
<b>8 Bibliografía.</b>	<b>41</b>

## Lista de esquemas

Esquema		Página
1	Mecanismo oxidativo de los fenoles	5
2	Mecanismo de oxidación para resveratrol en etanol a Temperatura ambiente	6
3	Formación de especies sulfonantes	7
4	Mecanismo de aromatización de 5,5-dimetilciclohexan-1,3-diona	7
5	Mecanismo para la formilación de Gross	9
6	Estrategia sintética desarrollada por Elix (1984)	10
7	Primer estrategia sintética de este trabajo	12
8	Segunda estrategia sintética de este trabajo	16
9	Secuencia de reacciones para obtener <b>21</b>	16
10	Mecanismo de la anillación de Robinson	17
11	Equilibrio tautomérico	18
12	Mecanismo de aromatización del compuesto <b>8</b>	20
13	Reacción de metilación de los fenoles	21
14	Reacción de hidrólisis de <b>8</b> para generar <b>21</b>	22
15	Secuencia de reacciones para obtener <b>10</b>	22
16	Secuencia de reacciones para obtener <b>23</b>	23
17	Ecuación de Boltzmann	25

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Tomografía de: A) Cerebro normal, B) Cerebro con Alzheimer.	3
2	Antioxidantes naturales: a) ácido gálico, b) ácido rosmarínico y c) ácido ferúlico.	4
3	Resveratrol	5
4	Estructura del naftolenoide	8
5	Pseudocifelarina A	9
6	Estructura de 2- hidroxí-6,6-dimetil-4-oxo-ciclohexa-2-ene-1-carboxilato de metilo ( <b>20a</b> )	18
7	3,5-dihidroxibenzoato de metilo ( <b>12</b> ).	30
8	3,5-dimetoxibenzoato de metilo ( <b>13</b> ).	30
9	2-formil-3,5-dimetoxibenzoato de metilo ( <b>14</b> ).	31
10	(3,5-dimetoxi-1,2-fenilen) dimetanol ( <b>15</b> ).	32
11	2,2-dimetil-4,6-dioxo-ciclohexan-carboxilato de metilo ( <b>20</b> ).	32
12	6,6-dimetil-4-oxo-2-[(trifluoroacetil)oxi]-2-ciclohexen-1-carboxilato de metilo ( <b>20b</b> ).	33
13	4,6-dihidroxí-2,3-dimetilbenzoato de metilo ( <b>8</b> ).	34
14	4,6-dimetoxi-2,3-dimetilbenzoato de metilo ( <b>8a</b> ).	34
15	Ácido 2,4-dihidroxí-5,6-dimetilbenzoico ( <b>21</b> ).	35
16	3-formil-2,4-dihidroxí-5,6-dimetilbenzoato de metilo ( <b>9</b> ).	36

<b>17</b>	Ácido 2,4-dihidroxi-3-formil-5,6-dimetilbenzoico ( <b>10</b> ).	36
<b>18</b>	5,5- dimetil, 1,3-ciclohexanodiona ( <b>2</b> ).	37
<b>19</b>	3-hidroxi-5,6-dimetilfenol ( <b>22</b> ).	38
<b>20</b>	2,4-dihidroxi-3-formil-5,6-dimetil-benzaldehido ( <b>23</b> ).	38

### Lista de gráficos

<b>Gráfico</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	Porcentaje de viabilidad de células tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> durante 48 horas.	26
<b>2</b>	Resultados de citoprotección en células D54 y U373 MG.	27

### Lista de tablas

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	Condiciones de reacción para aromatización 1.	19
<b>2</b>	Condiciones de reacción para aromatización 2.	24
<b>3</b>	Determinación de IC <sub>50</sub> por el modelo de Boltzmann	25
<b>4</b>	IC <sub>50</sub> de las líneas celulares.	26
<b>5</b>	Resultados de citoprotección en células D54 y U373 MG	26
<b>6</b>	Medio de cultivo DMEM	40

## Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
%	Porcentaje
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de dimetilo
° C	Grados celsius
α	Alfa
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATFA	Anhídrido trifluoroacético
β	Beta
c.c.f.	Cromatografía en capa fina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
Cl <sub>2</sub> CHOCH <sub>3</sub>	Dicloro-metil, metil éter
cm <sup>-1</sup>	Número de onda
δ	Desplazamiento químico (delta)
d	Doblete
D54	Línea celular de astrocitoma grado IV
DMEM	Medio de cultivo (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMF	<i>N,N</i> -dimetil-formamida
EM	Espectrometría de masas
FT	Transformada de Fourier
GO <sup>·</sup>	Radical Galvinoxil; 2,6-Di-tert-butil-α-(3,5di-tert-butil-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-iliden)-p-toliloxi).
g/mol	Gramos por cada mol
H	Hidrógeno
H <sub>2</sub> O	Óxido de hidrógeno
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogeno
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
Hex	Hexano
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de potasio
λ	Longitud de onda (lambda)
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LiAlH <sub>4</sub>	Hidruro doble de litio y aluminio
M	Concentración molar
μ	Prefijo micro-
m/z	Relación masa-carga
M <sup>+</sup>	Ion molecular

M <sup>+1</sup>	Ion molecular más una unidad
MeOH	Metanol
MeO <sup>-</sup> Na <sup>+</sup>	Metóxido de sodio
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
mL	mililitro
mmol	milimol
mW	Micro-onda
N	Concentración normal
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
nm	Nanómetro
OH	Hidroxilo
pH	Potencial de hidrógeno
POCl <sub>3</sub>	Oxicloruro de fosforo
ppm	Parte por millón
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética de Carbono 13
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética de Hidrógeno
s	Singlete
<i>t</i> -BuOH	<i>tert</i> -butanol
THF	Tetrahidrofurano
TiCl <sub>4</sub>	Tetracloruro de Titanio
TMS	Tetrametilsilano
U.V.	Ultravioleta
U373 MG	Línea celular de astrocitoma grado III

## 1 Resumen.

El consumo de alimentos con propiedades antioxidantes ha aumentado a nivel mundial y se ha popularizado en las últimas décadas, ello se debe en parte a los múltiples estudios que señalan que la explicación a la *paradoja francesa* radica en el consumo moderado de vino tinto. Al resveratrol, polifenol antioxidante que se encuentra en proporciones significativas en las uvas rojas y por tanto en el vino tinto, se le atribuyen propiedades de inhibición de la agregación plaquetaria y disminución en la incidencia de enfermedades cardiovasculares, por mencionar algunos beneficios para la salud.

En este contexto se realizó la síntesis de algunas entidades químicas derivadas de la Pseudocifelarina A, las cuales fueron caracterizadas por métodos espectroscópicos y espectrométricos convencionales y cuyas propiedades antioxidantes fueron evaluadas *in vitro*.

Además de contribuir a la generación nuevos compuestos químicos y de la modificación de rutas sintéticas ya existentes, los resultados de las evaluaciones biológicas de los compuestos sintetizados en el presente trabajo de investigación indican de forma preliminar mayor eficacia que el resveratrol en protección frente a radicales libres.

### **Abstract**

In the last decades, popularity of antioxidant foods has increased worldwide due several investigations pointing out that moderate consumption of red wine seems to be the responsible of the French paradox. Antioxidant properties, platelet aggregation inhibition and decreased in risk factors of cardiovascular diseases, are some of the validated activities of resveratrol, the main polyphenolic compound in grape skin and therefore in wine.

In this context, several pseudocycphellarin A derivatives were synthesized and characterized by conventional spectrometric and spectroscopic techniques. Also, their antioxidant activities were established *in vitro*.

Besides the contribution to chemical knowledge, preliminary results obtained in the biological evaluation for the tested compounds showed better protection against free radicals than resveratrol.

## 2 Introducción.

Los antioxidantes son sustancias que pueden proteger las células de los efectos de los radicales libres, siendo estos, moléculas producidas cuando el cuerpo degrada los alimentos o por la exposición ambiental y la radiación. Algunas de las sustancias antioxidantes son:  $\beta$ -carotenos, luteína, polifenoles, vitamina A, C y E. Los antioxidantes se encuentran en muchos alimentos, entre éstos, las frutas y los vegetales, las nueces, los granos, algunas carnes, aves y pescados.

El término antioxidante fue utilizado originalmente para referirse específicamente a un producto químico que previniera el consumo de oxitocina. A finales del siglo XIX y a principios de siglo XX, extensos estudios fueron dedicados a las aplicaciones de antioxidantes en procesos industriales importantes, tales como la prevención de la corrosión del metal, la vulcanización del caucho, y la polimerización de combustibles en la formación de escoria en motores de combustión interna.<sup>1</sup>

Las primeras investigaciones sobre el que juegan los antioxidantes en biología se centraron en su uso en la prevención de la oxidación de grasas insaturadas, que es la causa del envejecimiento.<sup>2</sup> La actividad antioxidante podía ser medida simplemente colocando la grasa en un contenedor cerrado con oxígeno y midiendo la tasa de consumo de éste. Sin embargo fue la identificación de las vitaminas A, C, y E como antioxidantes la que revolucionó el campo y condujo a dilucidar la importancia de los antioxidantes en la bioquímica de los organismos vivos.<sup>3,4</sup> La investigación de cómo la vitamina E previene el proceso de peroxidación de lípidos condujo a la identificación de antioxidantes como agentes reductores que evitan reacciones oxidativas, a menudo depurando especies reactivas del oxígeno antes de que puedan dañar a las células.<sup>5</sup>

Se piensa que el estrés oxidativo contribuye al desarrollo de una amplia gama de enfermedades incluyendo la enfermedad de Alzheimer,<sup>6,7</sup> la enfermedad de Parkinson<sup>8</sup> y las patologías causadas por la diabetes.<sup>9,10</sup> Un caso en el cual esto encaja es el papel que juega el estrés oxidativo en las enfermedades cardiovasculares. Aquí, la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) parecen accionar el proceso de aterogénesis, que da lugar a la aterosclerosis y finalmente a la enfermedad cardiovascular.<sup>11,12</sup> La diabetes tipo 2, por su parte, es la forma más común dentro de las diabetes mellitus, se caracteriza por una destrucción autoinmune de las células secretoras de insulina, obligando a los pacientes a depender de la administración exógena de insulina para su supervivencia.<sup>13</sup>

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el 2006 en México las enfermedades no-transmisibles se incrementaron; representando el 73.3% de la mortalidad proporcional en el año 2000 (vs 49.8% en 1980). La prevalencia de hipertensión arterial (30%), diabetes (10.1%) e hipercolesterolemia (43%) son altas y la diabetes representa la primera causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres. Los hábitos y comportamientos de riesgo como sobrepeso y obesidad aumentaron en todos los grupos sociales principalmente en zonas urbanas, afectando el 51.8% de mujeres entre 12 y 49 años (60% en el norte del país) y el 5.5% de niños menores de 5 años.<sup>14</sup>

Es por ello la importancia de tener como objetivos generales de este trabajo, diseñar y desarrollar una ruta de síntesis que permita la obtención de compuestos derivados de la pseudocifelarina A (figura 5) sustentado en la capacidad de los compuestos fenólicos para eliminar los radicales libres y de esta manera ser evaluados como posibles protectores del estrés oxidativo en líneas de células U373 MG y D54 de astrocitoma humano.

### 3 Antecedentes.

#### 2.1 El estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas.

El estrés oxidativo se refiere a las consecuencias citopatológicas de un equilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad de la célula para defenderse en este término. Datos a partir de modelos experimentales y estudios en células de cerebro humano sugieren que el estrés oxidativo puede jugar un papel importante en la degeneración neuronal en enfermedades como el Parkinson, Alzheimer (En la figura 1 se observa un cerebro normal **A** y con daño celular por el Alzheimer **B**) y esclerosis amiotrófica lateral. El metabolismo oxidativo mitocondrial, óxido nítrico y el metabolismo de los fosfolípidos son un recurso potencial de producción intracelular de radicales libres. La alteración en los sistemas de defensa de los radicales libres contribuye al estrés oxidativo.<sup>15</sup>

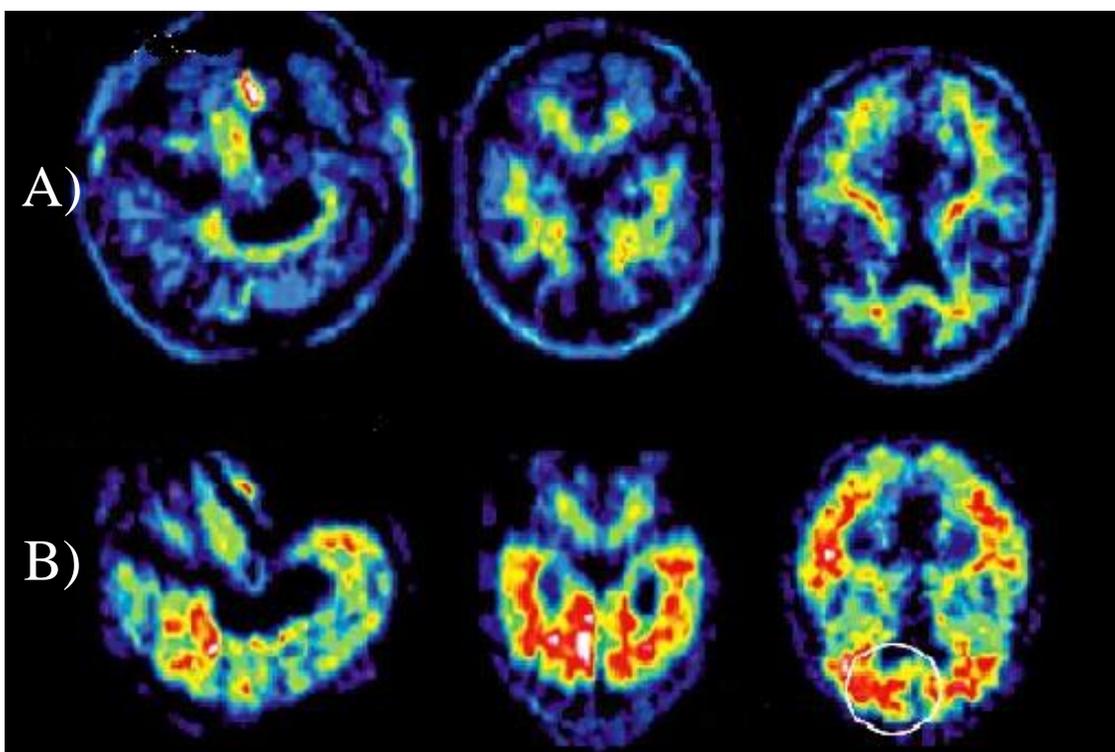
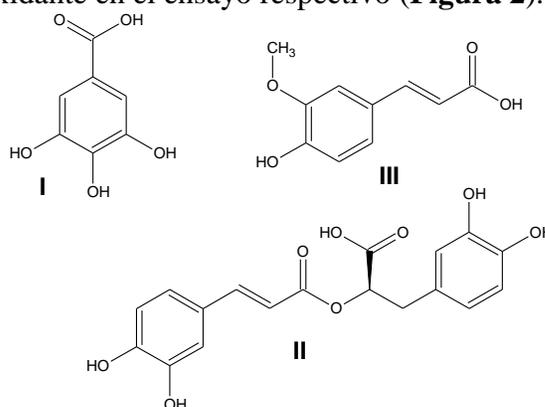


Figura 1. Tomografía de: A) Cerebro normal, B) Cerebro con Alzheimer.

#### 2.2 Antioxidantes.

Los aceptores de electrones, como el oxígeno molecular, reaccionan rápidamente con los radicales libres para formar nuevos radicales, refiriéndose así, como especies con oxígeno reactivo (EOR). Las EOR incluyen aniones superóxido ( $O_2^-$ ), hidróperóxido ( $H_2O_2$ ) y radicales hidroxilo ( $\cdot OH$ ). La peroxidación lipídica involucra una serie de radicales libres mediados por procesos de reacción en cadena, asociada a diferentes tipos de daño biológico severo. Es por ello que la atención se ha enfocado al uso de antioxidantes, especialmente naturales que puedan inhibir sus efectos y proteger de los daños causados por los radicales libres.<sup>16</sup>

La acumulación de evidencia química, bioquímica, clínica y epidemiológica sustenta los efectos quimio-protectores de los antioxidantes fenólicos contra los desordenes mediados por el estrés oxidativo. La acción farmacológica de los antioxidantes fenólicos deriva principalmente de su capacidad para eliminar los radicales libres, de sus propiedades quelatantes de metales, así como de sus efectos en las vías de señalización celular y la expresión de los genes. La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos, que son extensamente distribuidos en dietas a base de plantas, se evalúan por el equivalente de capacidad antioxidante (TEAC, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), el poder reductor antioxidante férrico (FRAP, Ferric Reducing Antioxidant Power), la capacidad eliminadora de hipoclorito y el método desoxirribosa. Éstos son algunos ensayos para la medición de la oxidación. Entre los flavonoides, las propiedades antioxidantes disminuyen en el orden de la quercitina, miricetina y kaempferol. El ácido gálico (**I**) y el ácido rosmarínico (**II**) fueron los antioxidantes más potentes entre los fenoles simples y los ácidos hidroxi-cinámicos respectivamente. El ácido ferúlico (**III**) muestra una actividad inhibitoria alta contra la degradación de la desoxirribosa. La eficacia de los fenoles difiere dependiendo sobre el mecanismo de acción antioxidante en el ensayo respectivo (**Figura 2**).<sup>17</sup>



**Figura 2. Antioxidantes naturales: a) ácido gálico, b) ácido rosmarínico y c) ácido ferúlico.**

Los tejidos de las plantas son sistemas biológicos que sintetizan compuestos, funcionan como antioxidantes, tal es el caso del  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico y carotenoides; además, son ricos en una gran variedad de compuestos fenólicos. Comúnmente, los alimentos derivados de las plantas contienen variedades de flavonoides hidroxilados y fenólicos, en cantidades que van desde trazas hasta gramos por kilogramo de planta fresca. Las uvas, vinos y productos de las uvas contienen grandes cantidades de compuestos fenólicos en su mayoría flavonoides en alta concentración (1000-1800 mg/mL) que pueden actuar como antioxidantes.<sup>18</sup> El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras del daño oxidativo, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos ya que representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana.<sup>19</sup> La capacidad de los poli-fenoles vegetales para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos fue reconocida desde los años treinta;<sup>20</sup> sin embargo, el mecanismo antioxidante fue ignorado en gran medida hasta hace poco tiempo. Los polifenoles se unen a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelatar iones de metales de transición, tales como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ; catalizar el transporte de electrones; y depurar radicales libres. Debido a este hecho, se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus,

enfermedades neurodegenerativas, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal e inflamaciones.<sup>21</sup>

### 2.3 Resveratrol.

El resveratrol es una fitoalexina con una estructura de estilbeno, aislada de más de 70 especies de plantas tales como uvas, cacahuates y bayas. Su actividad biológica está documentada en años recientes por un gran número de estudios fisiológicos y farmacológicos que indican que el resveratrol juega un papel importante en la prevención del cáncer, enfermedades del corazón, neurodegenerativas, antivirales e inflamaciones que por otra parte, su reactividad con los radicales libres le otorga propiedades como antioxidante así como en la inhibición de la agregación plaquetaria.<sup>22</sup>

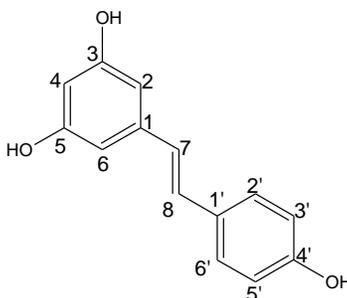
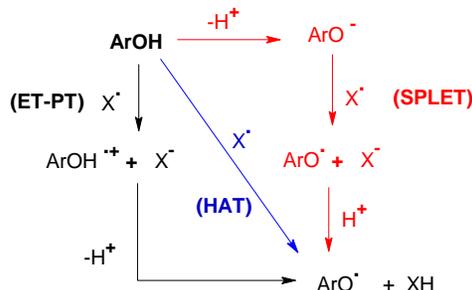


Figura 3. Resveratrol

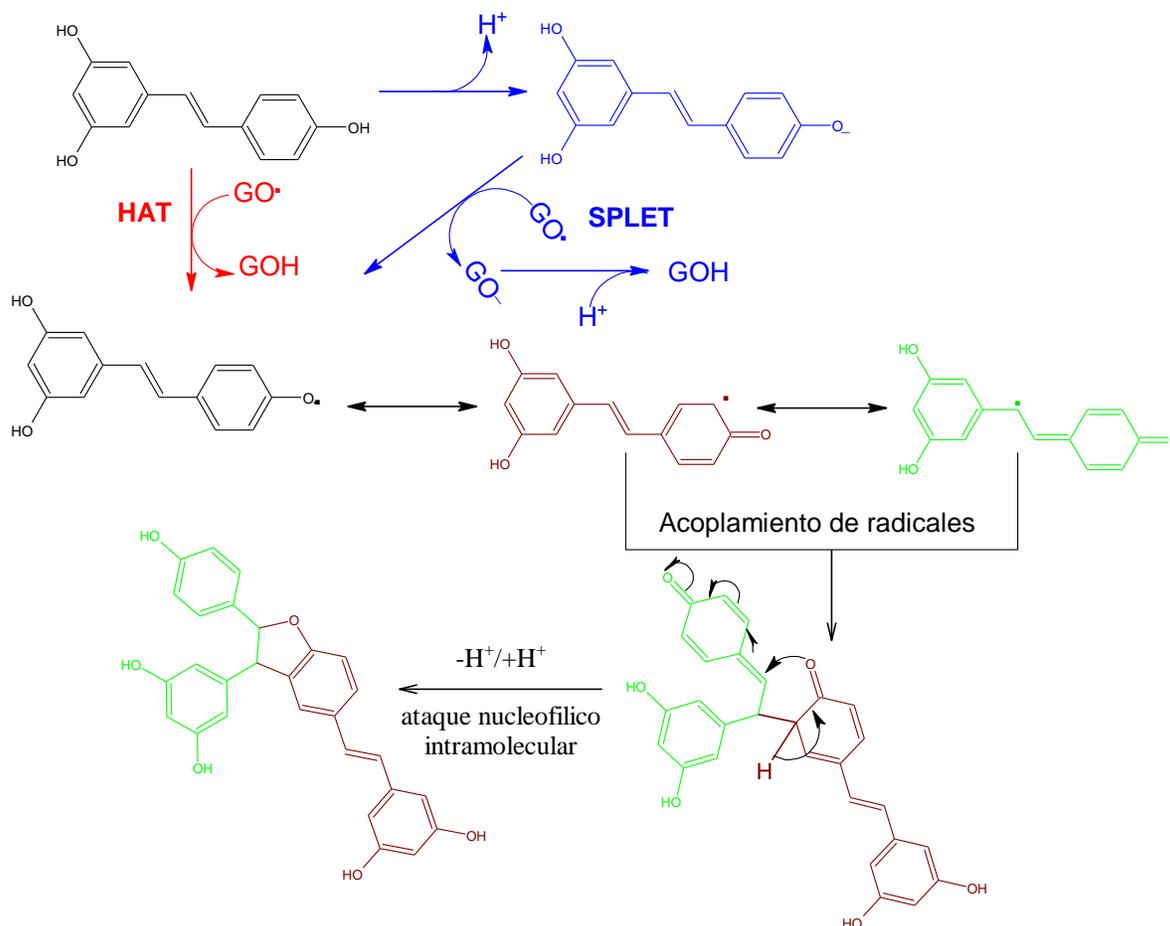
Su concentración relativa es alta en vino tinto (0.1-14.3 mg/L) por lo que ha llegado a ser propuesto como el principal protagonista para la llamada *paradoja francesa*. En la reacción antioxidante del resveratrol, la sustracción del protón de 4'-OH es más favorable que los protones 3-OH o 5-OH, como lo demuestran los experimentos de radiólisis-y estacionaria y radiólisis de pulso,<sup>23,24</sup> el análisis de los productos de oxidación<sup>25</sup> y los cálculos teóricos<sup>26</sup>. Es por ello el interés en las investigaciones y el estudio de las relaciones estructura-actividad de los análogos del resveratrol, al introducir grupos electro-donadores y electro-atractores en la posición *orto*- ó *para*- de 4-OH. Por otro lado, los antioxidantes fenólicos reaccionan con los radicales localizados en oxígeno o nitrógeno ( $X^\cdot$ ), vía tres mecanismos diferentes (**Esquema 1**):



Esquema 1. Mecanismo oxidativo de los fenoles.

- HAT:** Es un proceso en un solo paso, que consiste en la transferencia del átomo de hidrogeno del fenol (ArOH) a X<sup>•</sup>.
- SPLET:** Es un proceso de transferencia secuencial del anión fenóxido a X<sup>•</sup>
- ET-PT:** Es un proceso de transferencia del electrón del fenol (ArOH) a X<sup>•</sup> seguido por la transferencia del protón.

Los principales productos que se forman cuando se hace reaccionar resveratrol con radicales libres como Galvinoxil (GO<sup>•</sup>), que es un análogo de fenoles, son dímeros de dihidrofurano, sugiriendo que a partir de los productos de oxidación, el grupo hidroxilo de la posición 4' es mas fácil de someterse a oxidación que los otros grupos hidroxilo y el dímero es formado vía un intermediario *orto*-quinona (**Esquema 2**).<sup>27</sup>

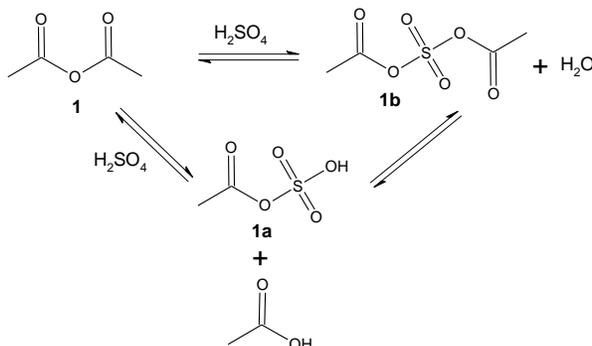


**Esquema 2. Mecanismo de oxidación para resveratrol en etanol a temperatura ambiente.**

#### 2.4 Aromatización de cetonas cíclicas.

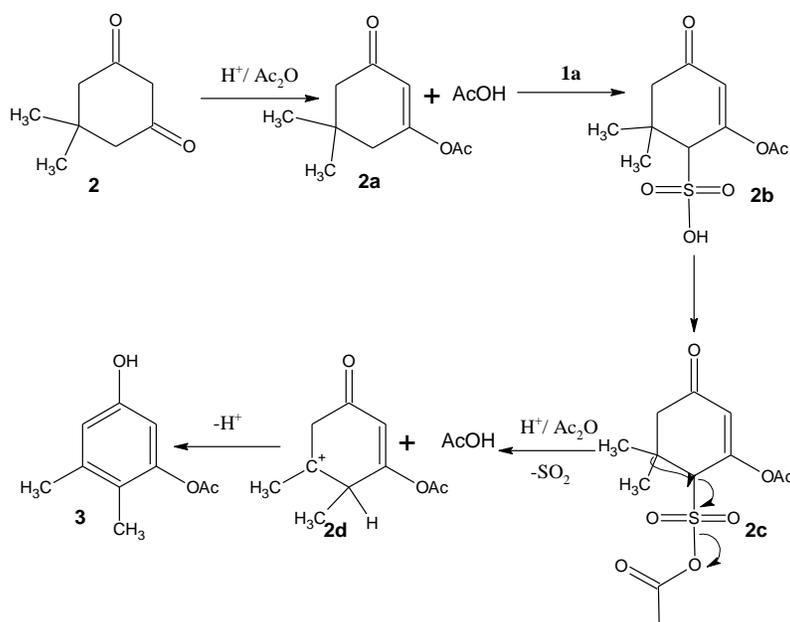
Los primeros datos de síntesis de dihidroxicetonas a partir de la correspondiente ciclohexanodiona involucran dos etapas: el tratamiento inicial con óleum al 30% para formar el correspondiente ácido sulfónico y, posteriormente, poner a reflujo el sulfonato con anhídrido acético para obtener el compuesto aromático en un rendimiento promedio del 18%.<sup>28</sup>

Otro método para la obtención de compuestos aromáticos partiendo de ciclohexanonas es utilizando como reactivos el ácido sulfúrico concentrado y el anhídrido acético, los cuales reaccionan a baja temperatura para producir especies sulfonantes como se muestra en el **Esquema 3**.



**Esquema 3. Formación de especies sulfonantes**

Para el caso del compuesto 5,5-dimetilciclohexan-1,3-diona (**2**), el primer paso en la aromatización, es la formación del mono-acetato de enol **2a** para producir una cetona  $\alpha, \beta$ -insaturada e introducir en la posición vinílica especies sulfonantes, como el ácido sulfónico correspondiente **2b**, generando así el anhídrido mixto **2c** con un equivalente de anhídrido acético. La aromatización se efectúa por la descomposición del anhídrido mixto seguida por la migración de un grupo metilo y formación de un carbocation terciario **2d**, con una subsecuente eliminación para generar el producto **3** tal como se muestra en el **Esquema 4**.<sup>29</sup>



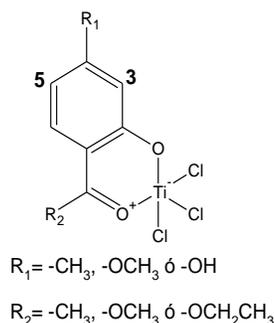
**Esquema 4. Mecanismo de aromatización de 5,5-dimetilciclohexan-1,3-diona.**

### 2.5 Orto-formilación de compuestos fenólicos.

La sustitución electrofílica aromática en compuestos aromáticos con 1,1-diclorometil metil éter (formilación de Gross) fue descrita en 1960 por A. Rieche, H. Gross and E.

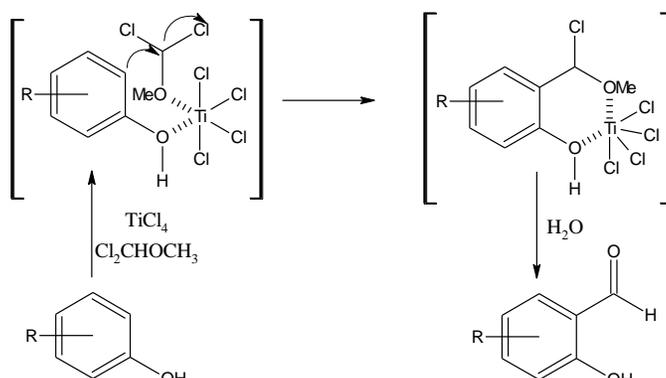
Hoft.<sup>30</sup> Ellos informaron que los compuestos aromáticos incluyendo benceno y tolueno reaccionan con  $\alpha$ -halo éteres en presencia de catalizadores de Friedel-Crafts ( $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{TiCl}_4$  y  $\text{SnCl}_4$ ) para generar isómeros aromáticos, como productos de la sustitución, describiendo que los éteres son inestables y descomponen cuando se calientan y/o hidrolizan en agua para formar los correspondientes aldehídos.<sup>30,31</sup>

La formilación de compuestos fenólicos con 1,1-diclorometil metil éter y  $\text{TiCl}_4$  en diclorometano difiere del método de Gatterman (ortoformiato y  $\text{AlCl}_3$ ) en que la formilación ocurre en posición *orto*- al grupo hidroxilo, incluso cuando la posición *para* está vacante. Para el caso en donde se tienen compuestos *orto*-hidroxi-carbonílicos, la formilación ocurre exclusivamente en la posición C-3 y cuando se tienen compuestos *orto*-metoxi-carbonílicos en la posición C-5, indicando así que el anillo de seis miembros formado por el complejo de titanio es la especie responsable de la dirección de la sustitución electrofílica. Para el caso de los compuestos *orto*-hidroxi-carbonílicos, el grado de fijación del anillo aromático en el complejo con el metal puede considerarse con carácter de naftaleno. Por lo tanto, el sistema del metal quelatado se comporta como un anillo aromático fusionado, de manera que la posición C-3 constituye la posición *alfa* mas reactiva del sistema naftolenoide tal como se muestra en la **Figura 4**.<sup>32</sup>



**Figura 4. Estructura del naftolenoide.**

La regioselectividad de esta reacción cuando no se cuenta con un grupo carbonilo puede interpretarse en términos de la coordinación del Ti con los átomos de oxígeno del fenol y del éter, ya que aumenta la electrofilia del 1,1-diclorometil metil éter favoreciendo la sustitución en el anillo aromático. De esta manera se ha planteado un mecanismo por el cual ocurre la reacción de formilación (**Esquema 5**).



Esquema 5. Mecanismo para la formilación de Gross.

## 2.6 Pseudocifelarina A.

La Pseudocifelarina A (**Figura 5**), fue aislada del líquen ártico *Pseudocyphellaria endochrysea* en 1984 por Huneck.<sup>33</sup> En ese mismo año, Elix<sup>34</sup> describió una ruta sintética teniendo como precursor al ácido 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetilbenzoico (**10**) el cual, describe Huneck, proviene de la degradación química por alcoholólisis (*t*-BuOH) de la Pseudocifelarina A.

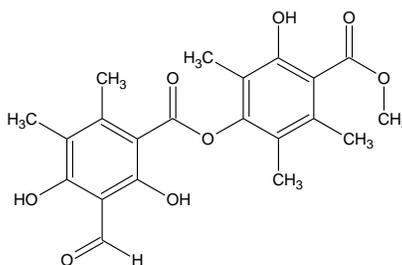


Figura 5. Pseudocifelarina A

La estrategia utilizada por Elix para preparar el compuesto **10** es partiendo del ácido orselínico (**4**), el cual es de suma importancia para la bioquímica de los líquenes,<sup>35</sup> de los cuales se puede extraer, sin embargo no está disponible comercialmente.

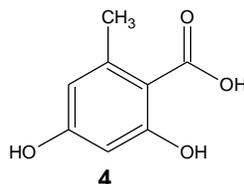
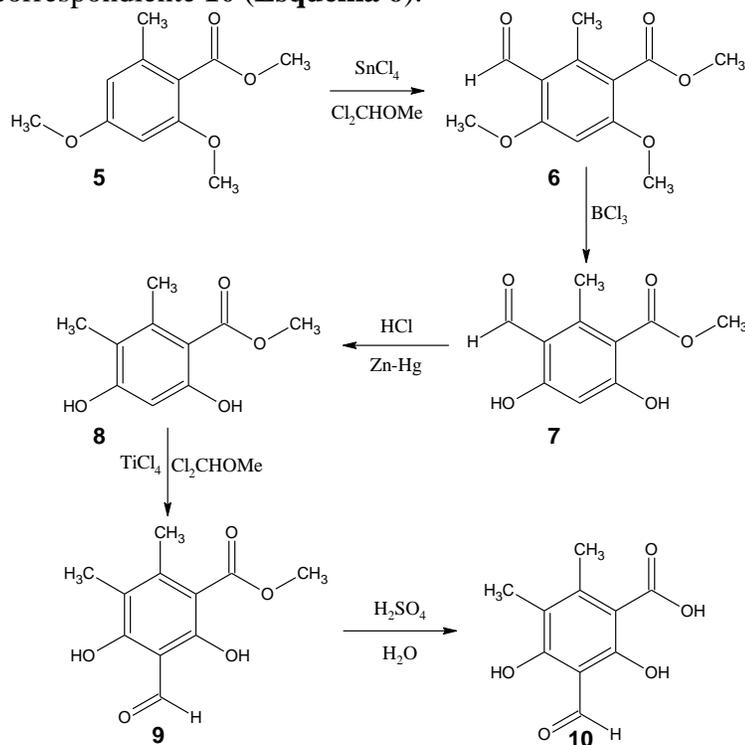


Figura 6. Ácido orselínico.

Primeramente, se realiza una esterificación y metilación de los grupos hidroxilo del ácido orselínico (**4**) para generar **5**, el paso posterior es una formilación para dar **6**, el cual sufre una subsecuente desmetilación con tricloruro de Boro para producir el 5-formil-2,4-dihidroxi-6-metilbenzoato de metilo (**7**). Por reducción de Clemmensen de este último se genera el 2,4-dihidroxi-5,6-dimetilbenzoato de metilo (**8**), el cual se formila con cloruro de titanio (IV) y dicloro-metil-metil éter, produciendo el 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-

dimetilbenzoato de metilo (**9**). Como último paso, la hidrólisis del éster de **9** conduce al ácido carboxílico correspondiente **10** (Esquema 6).



Esquema 6. Estrategia sintética desarrollada por Elix (1984).

## 4 Objetivos.

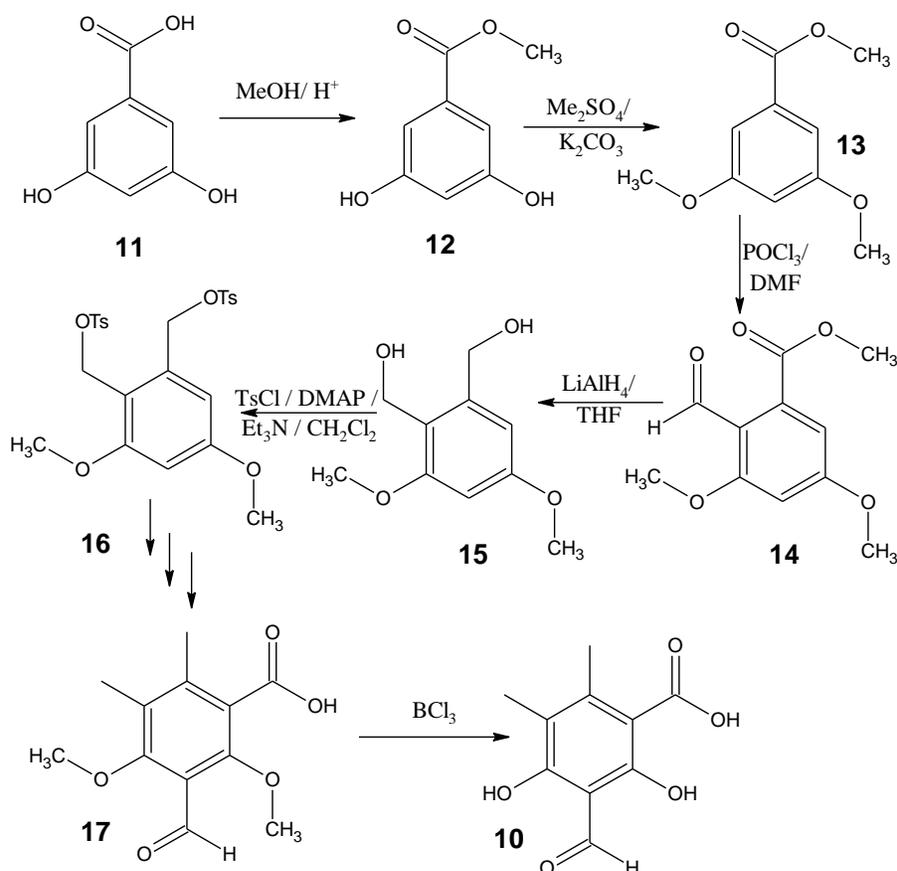
Tomando en consideración la capacidad de los compuestos poli-fenólicos para actuar como antioxidantes en sistemas biológicos, con efectos protectores a patologías como las enfermedades neurodegenerativas, la diabetes mellitus, el cáncer y las cardiopatías, se han planteado los siguientes objetivos principales de este trabajo:

- I. Desarrollar una metodología que permita la síntesis de compuestos polifenólicos derivados de la Pseudocifelarina A como es el caso del compuesto **10** (**Esquemas 7 y 8**).
- II. Obtener químicamente los precursores y productos.
- III. Caracterizar física y espectroscópicamente los precursores y productos.
- IV. Evaluar *in vitro* el efecto protector de los compuestos obtenidos en células D54 y U373 MG en medios oxidantes.

## 5 Resultados y discusión.

La primera estrategia planteada en este trabajo para la obtención del ácido **10** es aquella que parte del compuesto **11**, el cual se encuentra disponible comercialmente y así a través de diversas etapas obtener el producto **10** (**Esquema 7**).

Como primer paso se contempla una esterificación del ácido carboxílico **11** con MeOH en medio ácido generando **12**; el segundo paso consistirá en la protección de los grupos hidroxilos con  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$  y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  para obtener el precursor **13**; el paso siguiente consistirá en la formilación con el reactivo de Vilsmeier-Hack para obtener **14**, para posteriormente hacer una reducción de los grupos carbonilo con  $\text{LiAlH}_4$  y generar **15**; se continuará con la protección de los alcoholes con el grupo tosilo (**16**), para que de esta manera sea más fácil una reducción de éstos a grupos metilos, teniendo por ultimo reacciones consecutivas para la obtención del ácido **10**, tal como se muestra en el **esquema 7**.



#### 4.1 Preparación del 3,5-dihidroxibenzoato de metilo (12).

Los ésteres suelen prepararse directamente a partir de ácidos carboxílicos por una reacción  $S_N2$  de un ion carboxilato con un halogenuro de alquilo primario. Otro método utilizado consiste en la utilización de halogenuros de ácido con un alcohol en presencia de una base como piridina, o bien por la esterificación de Fisher de un ácido carboxílico con un alcohol en presencia de un catalizador como un ácido mineral siendo este último método el que se eligió para la obtención del compuesto **12** por lo práctico que implica la metodología además por ser la más viable y económica. La ruta sintética se inicia partiendo de un derivado del ácido benzoico **11** y MeOH utilizando como catalizador ácido sulfúrico, obteniéndose de **12** 83%.

La preparación de **12** se confirmó mediante RMN- $^1H$ , observándose los protones del éster metílico en 3.84 ppm con integración de 3H, para las señales de los desplazamientos de 6.58 (1H) y 6.98 (2H) ppm presentan una constante de acoplamiento de 2.4 Hz indicando que guardan una relación *-meta* entre ellos. La existencia del éster se corrobora en RMN- $^{13}C$  con la señal 51.71 ppm.

El espectro de IR muestra señales características en 3365 y 3229  $cm^{-1}$  asignados a los hidroxilos presentes en la molécula además de la vibración C=O en 1687  $cm^{-1}$  asignada al éster metílico.

#### 4.2 Preparación del 3,5-dimetoxibenzoato de metilo (13).

Durante la síntesis de algunas moléculas es frecuente que un grupo funcional interfiera con la reacción que se pretende realizar en un segundo grupo funcional, por lo que es necesaria la protección de dicho grupo. Para el caso de **12**, los fenoles presentes en la molécula deben ser protegidos y transformados a éteres para facilitar la etapa de formilación que se describe más adelante. Existen diferentes maneras de obtención de los éteres siendo la primera descrita en 1850 por Williamson, que consiste en la utilización de alcóxidos metálicos con halogenuros primarios por una vía  $S_N2$ , otro método consiste en partir de un alqueno que se trata con un alcohol en presencia de acetato de mercurio vía la alcoximercuración, para producir el éter se agrega  $NaBH_4$ . Para nuestro caso, se descarta el procedimiento de alcoximercuración utilizando el método de Williamson para generar un éter simétrico que es el producto **13**. Para esta etapa se utilizan como reactivos carbonato de potasio ( $K_2CO_3$ ) como base para generar el ion fenóxido, como agente alquilante sulfato de dimetilo ( $CH_3)_2SO_4$ ) y como disolvente acetona obteniéndose de **13** 81%.

La formación del producto principal depende del tiempo de reacción debido a que primeramente se forma el compuesto con un grupo metilo unido al grupo hidroxilo del fenol y es necesario hacer la purificación para separar los productos mono-metilados.

La disminución del punto de fusión es indicativo inicial de la desaparición de los puentes de hidrógeno en los hidroxilos, ya que fueron substituidos los protones por grupos metilo y por tanto el producto **13** es menos polar.

El producto **13** se caracterizó por espectroscopía de RMN- $^1H$  el protón aromático que aparece en 6.63 ppm se debe al efecto electro-donador que producen los grupos metoxilo en el anillo aromático. Para el caso de los dos protones aromáticos restantes (*orto* al grupo carbonilo) de 7.18 ppm, presentan un acoplamiento de 2.4 Hz con el protón en 6.63 ppm, indicando que son equivalentes dos de los tres protones y de esta manera aparecen con el

mismo desplazamiento. Las señales en 52.21 y 55.51 ppm en RMN-<sup>13</sup>C correspondientes a los metoxilos, corroboran la formación del producto **13**.

El espectro de IR demuestra la desaparición de la vibración O-H en 3365 y 3229 cm<sup>-1</sup> que presentaba el compuesto **12** y se mantienen las vibraciones asignadas al éster metílico, para este caso aparece en 1712 cm<sup>-1</sup>.

### 4.3 Preparación de 2-formil-3,5-dimetoxibenzoato de metilo (**14**).

Reimer y Tiemann fueron los primeros en describir en 1876 la producción de aldehídos hidroxi- aromáticos a partir de fenoles, cloroformo y una base. Aunque los rendimientos son aceptables y se encuentran alrededor del 60%, con la presencia en el anillo aromático de grupos desactivantes como nitro, nitrilo o carbonilo, los rendimientos son menores al 25%, por lo que se descarta la utilización de este método para la obtención del compuesto **14** ya que cuenta con un grupo carbonilo.<sup>36</sup> Gattermann y Koch describieron un método de preparación de aldehídos aromáticos por reacción del benceno con monóxido de carbono y cloruro de hidrógeno usando cloruro de aluminio anhidro como catalizador; esta reacción no es aplicable para fenoles o *alquil*-éteres.<sup>37</sup> La metodología utilizada para esta primer estrategia sintética consistió en el descrito por Vilsmeier y Haack en 1927 en donde utilizaron alcoxi o *N,N*-dimetil amino derivados aromáticos, oxiclорuro de fósforo y *N,N*-dimetil-formamida, si el anillo aromático contiene átomos de hidrógeno activados se obtienen rendimientos del 70-85%.<sup>38</sup> Para nuestro caso los reactivos corresponden al producto **13** que es un alcoxi- derivado aromático, oxiclорuro de fosforo y *N,N*-dimetil-formamida para obteniéndose de **14** 85%.

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H muestra que la formilación se realizó en posición *orto*- al carbonilo de éster, debido a que se observa que el protón de la materia prima de 6.63 ppm a 6.51 ppm en el producto **14**. Para ambos casos es un protón que se encuentra afectado por los grupos electro-donadores, para el caso de los protones aromáticos desprotegidos de la materia prima de 7.18 ppm en donde la integración indica que hay dos protones, en el producto se observa que sólo existe uno en 6.56 ppm. Si la formilación se hubiese efectuado en la posición *para* al carbonilo, la molécula tendría un plano de simetría y los hidrógenos presentes en el anillo aromático serían equivalentes observándose en el mismo desplazamiento. La aparición de una señal en 10.29 ppm es indicativo de la presencia de un aldehído.

En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C se observa el metilo del éster en 52.8 ppm, los metilos de los éteres en 55.8 y 55.9 ppm así como los carbonos de carbonilo en 169.5 y 187.6 ppm siendo un desplazamiento adecuado para un éster y un aldehído, respectivamente.

El espectro de IR muestra la presencia de dos tipos de carbonilos, para la señal de 1718 cm<sup>-1</sup> se asigna a la vibración C=O de éster y de 1625 cm<sup>-1</sup> se asigna a la vibración C=O de aldehído.

#### 4.4 Preparación de (3,5-dimetoxi-1,2-fenilen) dimetanol (15).

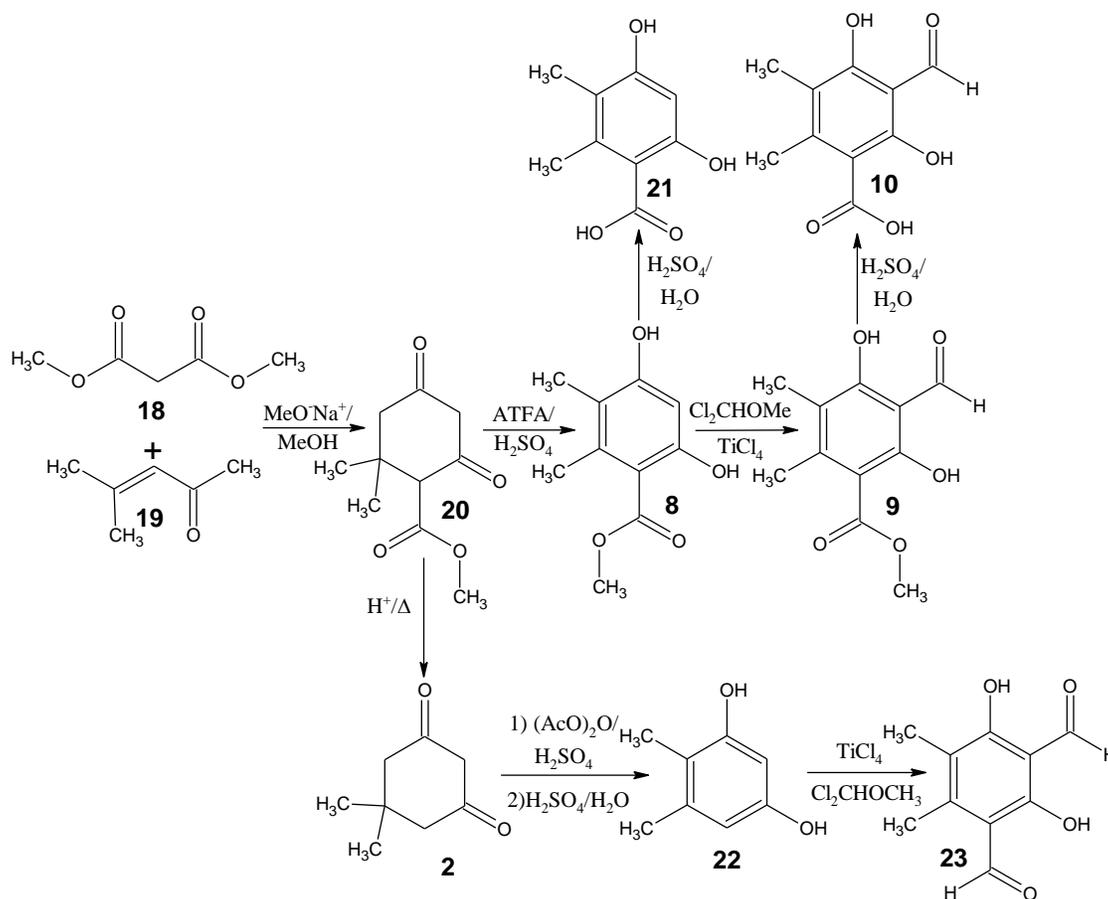
Para la reducción de **14** se utilizó como agente reductor  $\text{LiAlH}_4$  para asegurarnos de que la reacción de reducción se efectuó totalmente en ambos grupos carbonilo y no se efectuara de manera exclusiva sobre alguno de ellos. Se emplean 2.2 equivalente molares de  $\text{LiAlH}_4$  para obtener **15** en 76%.

En el espectro de RMN- $^1\text{H}$  se observan las señales asignadas a los metilos de éter en 3.81 y 3.82 ppm, los protones aromáticos en 6.43 y 6.52 ppm como dobletes ( $J=2.4$ ) los cuales guardan una relación en posición *meta* uno respecto al otro. Las modificaciones se demuestran con la aparición de dos metilenos bencílicos en 4.66 y 4.74 ppm.

Las señales del espectro de IR corroboraron la transformación observando la desaparición de las señales de los carbonilos en 1718 y 1625  $\text{cm}^{-1}$ .

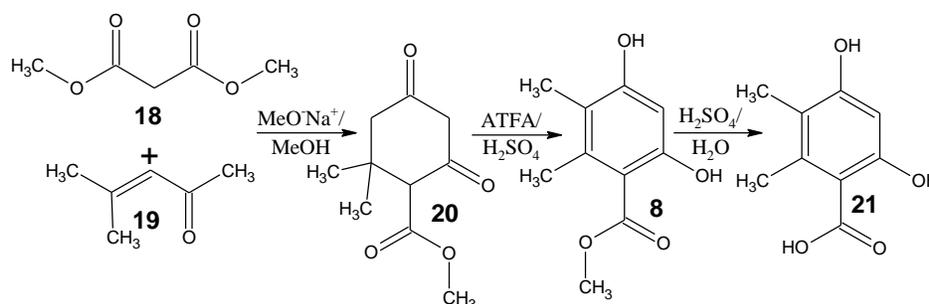
La estrategia sintética planteada hasta este momento tiene como materia de inicio el compuesto **11** el cual esta disponible comercialmente en contraste con la estrategia hecha por Elix (1984) que parte del ácido **4** el cual se obtiene de diferentes especies de líquenes por ser un metabolito secundario y además no está disponible comercialmente. En esta etapa se decide cambiar la estrategia sintética, aunque nuestros rendimientos fueron buenos, el número de pasos para llegar al compuesto **10** es superior al que desarrolla Elix (1984), por lo que se propone una ruta diferente (con menor número de pasos) que nos permita obtener los compuestos deseados y realizar las pruebas biológicas, que es uno de los principales objetivos de esta investigación.

En la segunda estrategia que se planteó para la síntesis del ácido **10**, se encuentra la anillación de Robinson entre el malonato de dimetilo (**18**) y el óxido de mesitilo (**19**) obteniéndose como producto principal el compuesto 2,2-dimetil-4,6-dioxo-ciclohexan-carboxilato de metilo (**20**) que es un compuesto no aromático pero que mediante una reacción de aromatización con anhídrido trifluoroacético (ATFA) y ácido sulfúrico concentrado generará el 2,4-dihidroxi-5,6-dimetilbenzoato de metilo (**8**) el cual será la base para la obtención de los compuestos **10** y **21**, además de que el compuesto **8**, fue uno de los intermediarios descrito por Elix en 1984. Este procedimiento nos ayudará a reducir significativamente los pasos y llegar al compuesto **10** con cuatro modificaciones a partir de las materias de inicio **18** y **19**. El compuesto **21** se obtendría por hidrólisis ácida del compuesto **8** tal como se muestra en el **Esquema 8**:



Esquema 8. Segunda estrategia sintética de este trabajo.

La primera etapa de esta ruta de síntesis consiste en la obtención del producto **21** a partir de las materias de inicio **18** y **19** de acuerdo a la siguiente secuencia de reacciones que se muestra en el **esquema 9**.



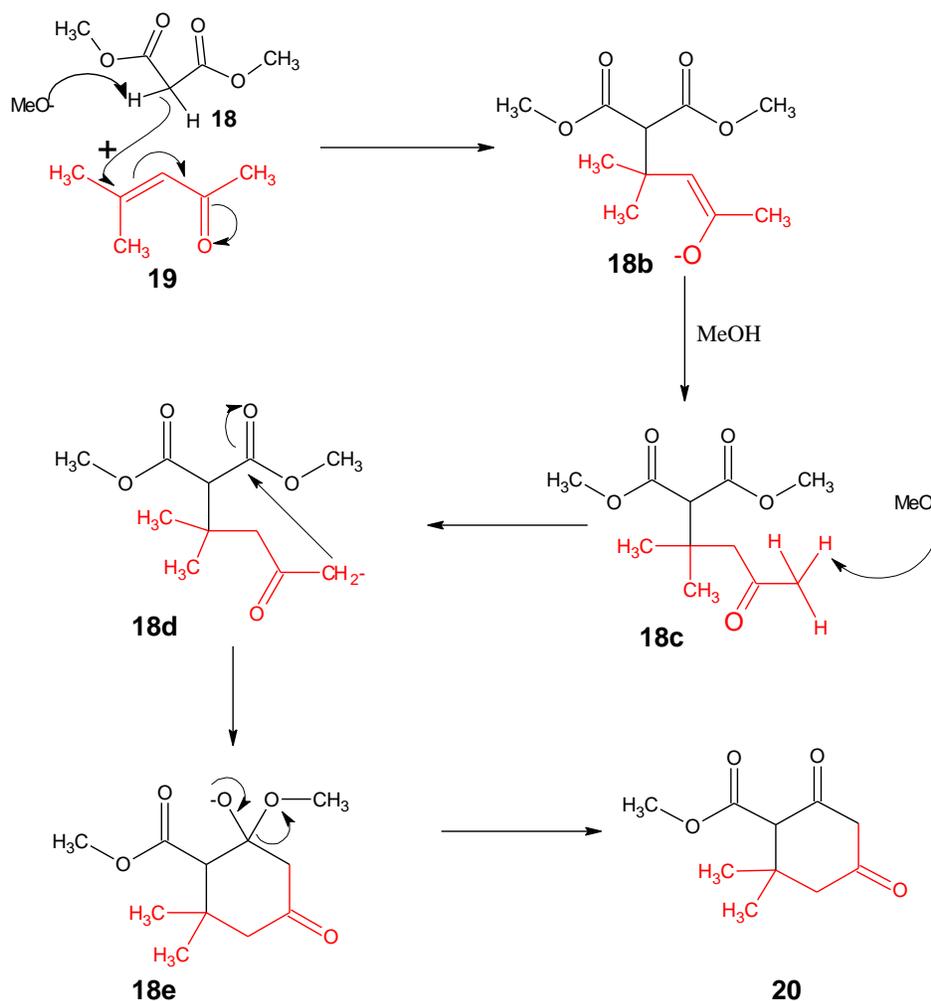
Esquema 9. Secuencia de reacciones para obtener 21.

#### 4.5 Preparación del 2,2-dimetil-4,6-dioxociclohexancarboxilato de metilo (**20**).

El primer método que describe la obtención de la 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona (**2**) y algunos derivados como **20** fue informado por Vorlander en 1897,<sup>39</sup> aunque en 1935 Robinson y Rapson generalizaron esta transformación<sup>40</sup> que fue utilizada en este trabajo por la practico ya que genera el producto deseado **20**, otro método para obtener compuestos

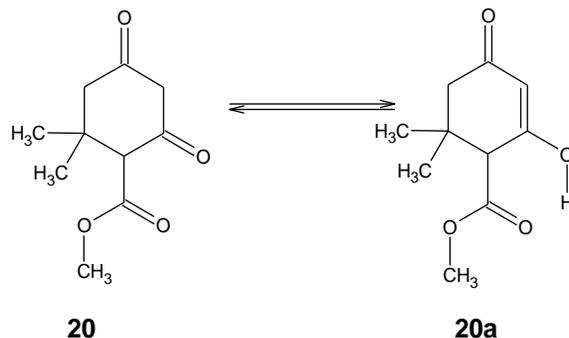
cíclicos puede ser por medio de reacciones de Diels-Alder, aunque no se utiliza debido a que la estructura base de los productos no corresponde al compuesto **20**.

Las materias de inicio utilizadas para esta transformación fueron malonato de dimetilo **18** que contiene hidrógenos  $\alpha$  a un carbonilo que se pueden abstraer con una base como el metóxido de sodio; el carbanion producto de esta reacción ácido base se puede adicionar a un compuesto  $\alpha$ - $\beta$  insaturado como el óxido de mesitilo (**19**) y formar el ciclo deseado **20** en 81%. La obtención del producto **20**, amarillo o anaranjado en algunos casos, depende del tiempo que se mantenga el  $\text{MeO}^-\text{Na}^+$  con el malonato de dimetilo (**18**) para formar el correspondiente carbanión y realizar una adición 1,4 tipo Michael sobre el compuesto (**19**), la ciclación ocurre cuando se extrae un protón *alfa* al carbonilo que proviene inicialmente del óxido de mesitilo (**19**), dicho mecanismo se ejemplifica en el **Esquema 10**:

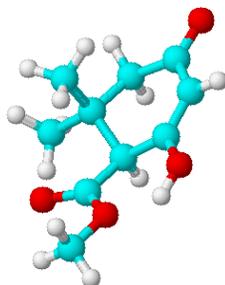


Esquema 10. Mecanismo de la anillación de Robinson

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H muestra que se tiene un equilibrio tautomérico entre la ciclohexanodiona **20** y uno de sus correspondientes enoles **20a** en una relación del 46.5% y 53.5% (**Esquema 11**), prevaleciendo la forma enólica, dicha afirmación se confirma con la presencia de 6 tipos de hidrógenos con acoplamiento geminal AB y constantes  $J = 15, 17.1$  y  $17.4$  Hz además de un protón vinílico en 5.53 ppm, un protón de O-H en 8.26 ppm, este último se encuentra en dicha posición debido a la formación de un puente de hidrógeno con los electrones  $sp^2$  del oxígeno del carbonilo del éster. Se descarta la presencia del enol generado por la migración del protón *alfa* al carbonilo del éster debido a que se encuentran las señales de 3.16 y 3.41 ppm asignadas a dicho protón en el compuesto **20** y **20a** respectivamente.



**Esquema 11. Equilibrio tautomérico.**



**Figura 7. Estructura de -2-hidroxi-6,6-dimetil-4-oxociclohexan-2-ene-1-carboxilato de metilo (20a).**

#### 4.6 Preparación de 2,4-dihidroxi-5,6-dimetil-benzoato de metilo (8).

Existen diferentes procedimientos para la obtención de compuestos aromáticos a partir de moléculas no aromáticas, pero la transformación de algún derivado de la ciclohexanona o ciclohexenona a compuestos derivados aromáticos en condiciones sulfonantes fue publicado primeramente por Doering en 1949.<sup>41</sup> Años posteriores Nelson (1992) describe el tratamiento de dimedona (**2**) y algunos de sus derivados con ácido sulfúrico y anhídrido trifluoroacético vía una sulfonación que involucra una posterior migración 1,2 de un grupo metilo para generar derivados del dimetilresorcinol.<sup>42</sup> Esta última metodología es muy útil debido a que produce la estructura base deseada para obtener el compuesto **10** en 40%.

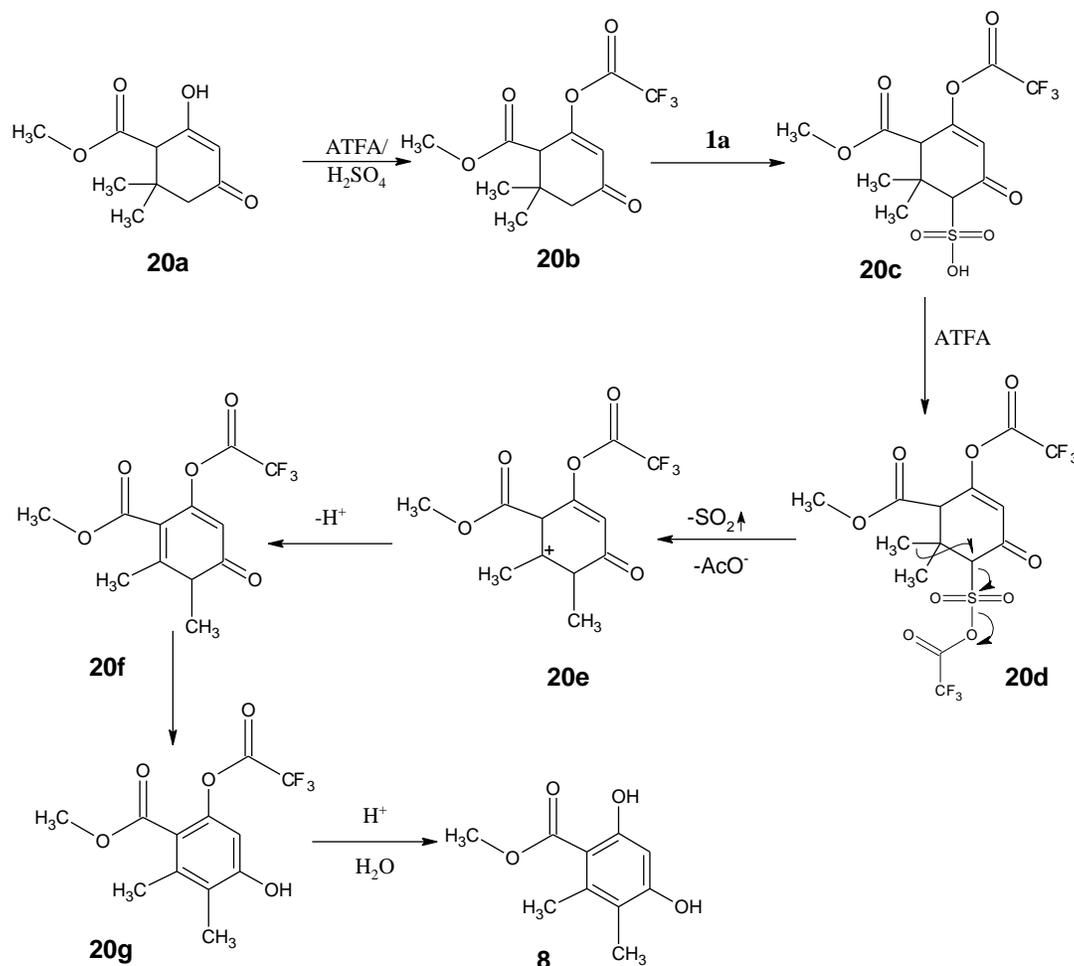
La aromatización con anhídrido acético y ácido sulfúrico no se efectúa debido a que las especies sulfonantes generadas no son tan reactivas en comparación a cuando se utiliza anhídrido trifluoroacético en la aromatización de **2** publicado por Kablaoui (1974).

	<b>Método 1 (anhídrido acético)</b>	<b>Método 2 (Temperatura ambiente)</b>	<b>Método 3 (Reflujo)</b>	<b>Método 4 (mW)</b>
<b>Condiciones</b>	Se manejan las mismas condiciones que los métodos 2, 3 y 4	Se mantiene en agitación en un matraz sellado durante 7 días.	Se mantiene en agitación por 24 horas.	Temperatura= 90°C, Presión= 45 psi, Potencia= 13 Watts, tiempo= 40 minutos
<b>Observaciones</b>	No se observa la formación del producto	El tiempo de reacción es largo	Se forman mas impurezas	El tiempo de reacción es menor que a temperatura ambiente y a reflujo.
<b>Rendimiento</b>	0%	37%	15%	40%

**Tabla 1. Condiciones de reacción para aromatización 1**

La diferencia en los resultados para el caso en donde la reacción se efectúa a temperatura ambiente, muestra rendimientos aceptables con el inconveniente del tiempo para que la materia prima **20** se transforme. En el caso donde se somete a reflujo, el rendimiento es bajo en comparación a las demás condiciones debido a que la temperatura, la acidez del sistema y el tiempo de 24 h promueven que la materia prima se fragmente formando mayor cantidad de impurezas con un bajo rendimiento. Cuando se utilizan microondas el tiempo es reducido, evitando un mayor contacto de la materia de inicio con la acidez, además de que se obtiene mayor rendimiento.

De acuerdo al mecanismo planteado por Kablaoui (1974) para la aromatización de la dimedona (5,5-dimetilciclohexan-1,3-diona) con anhídrido acético y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se plantea un mecanismo alternativo con anhídrido trifluoroacético para el caso del compuesto **20** (**Esquema 12**):

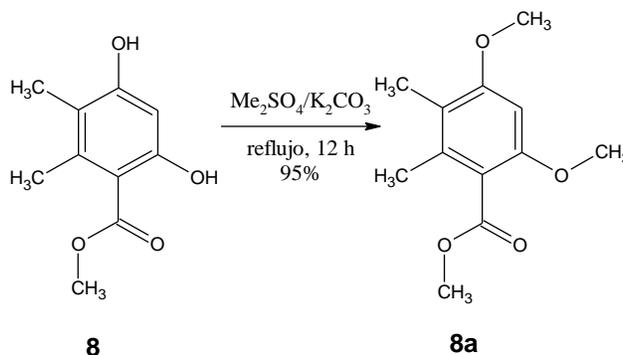
Esquema 12. Mecanismo de aromatización del compuesto **8**

La presencia de la especie **20a** se confirma cuando se genera el éster **20b** en las condiciones de reacción para la aromatización de **20**. Dicho intermediario se aisló y caracterizó con espectroscopía de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  en donde desaparecen las señales de la ciclohexanodiona (**20**): 8.26 ppm (s, 1H,  $\text{HC}=\text{C}-\text{OH}$ ) asignada al  $-\text{OH}$  del enol y las señales con acoplamiento AB de 17.1 y 15 Hz en 2.37, 3.03, 3.33 y 3.88 ppm de los metilenos de **20**. La presencia del intermediario **20b** es indicativa de que es la primera especie que se genera en estas condiciones apoyando la propuesta del mecanismo.

El espectro de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  de **8** muestra singuletes correspondientes a los metilos base de aromático en 2.10 y 2.43 ppm, en 3.92 ppm un singulete base de éster correspondiente a un metilo, un singulete en 6.28 ppm debido al protón aromático encontrándose en este desplazamiento por el efecto que causan los grupos sustituyentes, mostrando un efecto de electro-donación por parte de los mismos y para el caso del protón que aparece en 11.29 ppm y que corresponde al protón del grupo hidroxilo que se encuentra en posición *orto* al éster metílico. El desplazamiento de este protón se debe a la formación de un puente de hidrogeno con los electrones  $\text{sp}^2$  del oxígeno del carbonilo del éster.

Es importante resaltar que la señal del carbonilo del éster metílico que aparece en IR en  $1645\text{ cm}^{-1}$  con una intensidad baja. Suponemos que esta posición inusual se debe al puente de hidrogeno que se encuentra involucrado. Si se forma el éster metílico del fenol, el éster deberá recobrar sus características, apareciendo  $>1700\text{ cm}^{-1}$  con intensidad fuerte.

Cuando se obtiene el éter **8a** (Esquema 13), en la c.c.f. no se observa diferencia entre **8** y **8a**. Por lo cual fue necesario realizar eluciones consecutivas (Hex/AcOEt 9:1 x 5), revelando con  $\text{CoSO}_4$  donde la coloración de las muestras es diferente, indicando que se tratan de compuestos diferentes, de esta manera se puede decir que la similitud en polaridad de ambos compuestos se debe a que uno de los protones del fenol se encuentra comprometido formando un puente de hidrogeno tal como se menciona anteriormente.



Esquema 13. Reacción de metilación de los fenoles

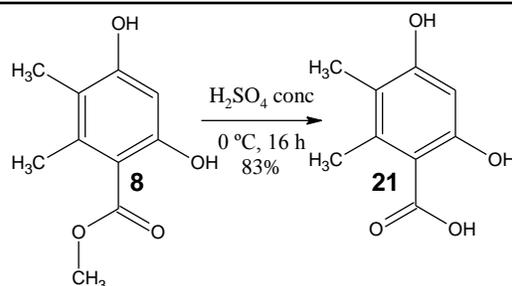
La aparición de la señal en IR del carbonilo en  $1725\text{ cm}^{-1}$  con intensidad fuerte en el compuesto **8a**, confirma la hipótesis de que la disminución en la frecuencia e intensidad del carbonilo en el compuesto **8**, es debido a la formación del puente de hidrogeno con un fenol.

En RMN- $^{13}\text{C}$  la señal del carbonilo del éster **8** aparece en 172.3 ppm, cuando se realiza la modificación y se genera el éter **8a**, dicha señal se modifica a 169.5 ppm observándose una ligera protección por parte de la densidad electrónica.

#### 4.7 Preparación del ácido 2,4-dihidroxi-5,6-dimetil-benzoico (**21**).

Los ésteres son hidrolizados, sea por una base acuosa (saponificación) o por un ácido acuoso para producir ácidos carboxílicos más el alcohol correspondiente. Para esta etapa se descarta la utilización de medio básico para obtener el producto **21** a partir de **8** debido a la presencia de los hidrógenos ácidos de los fenoles que generaría el ion fenóxido y sería fácilmente oxidado a la quinona correspondiente, dicho efecto es ilustrado por el mecanismo SPLET (Ya-Jing 2009). El medio ácido acuoso sería el indicado para proceder con la hidrólisis aunque después de realizar diferentes pruebas a temperatura ambiente o a reflujo por escalas de tiempo no fue posible obtener el producto **21**.

La reacción se realizó en ácido sulfúrico concentrado por la estabilidad del éster en **8**, esto debido a la formación de un puente de hidrogeno del oxígeno  $\text{sp}^2$  del ester con el hidroxilo que se encuentra en posición *-orto* dificultando que se realicen hidrólisis convencionales con medio ácido acuoso, Esquema 14.



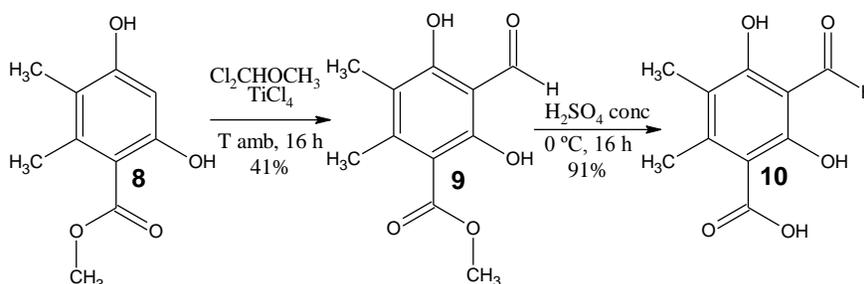
**Esquema 14. Reacción de hidrólisis de 8 para generar 21**

La reacción de hidrólisis se confirma primeramente con la espectroscopía de RMN-<sup>1</sup>H en donde se observan los protones de los metilos base de aromático que aparecen en 2.13 y 2.52 ppm y el protón base de aromático de 6.36 ppm.

En RMN-<sup>13</sup>C se observan señales características de los carbonos correspondientes a la estructura de **8**, dentro de los cuales son dos metilos base de aromático (11.5 y 18.9 ppm), seis carbonos con hibridación  $sp^2$  designados al anillo aromático (101.8, 107.5, 117.2, 142.4, 159.8 y 162.4 ppm) y un carbono del carbonilo del ácido carboxílico (172.3 ppm).

En IR se confirma la presencia de la vibración O-H del ácido carboxílico por la señal en  $3334\text{ cm}^{-1}$  y por la vibración del enlace C=O en  $1708\text{ cm}^{-1}$ . La espectrometría de masas corrobora el peso molecular del producto.

La segunda etapa en esta estrategia sintética consiste en la formilación de **8** con cloruro de titanio (IV) y dicloro-metil-metil éter obteniéndose 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetilbenzoato de metilo (**9**) y por otra parte una hidrólisis del éster **9** generó el ácido carboxílico correspondiente **10** de acuerdo al **Esquema 15**.



**Esquema 15. Secuencia de reacciones para obtener 10.**

#### 4.8 Preparación del 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetil-benzoato de metilo (**9**).

Existen diferentes métodos para generar aldehídos aromáticos dentro de los cuales se encuentra el descrito por Reimer-Tiemann (1876), el cual se descarta para utilizarse en esta transformación por que presenta el inconveniente de que la materia de inicio tiene un grupo desactivante, un carbonilo. Otro método es el publicado por Vilsmeier-Haack (1927) que de igual manera se descarta por que se utiliza como materias de inicio anillos aromáticos con sustituyentes como alcóxidos o *N,N*-alquil-aminas y el generar este tipo de grupos en los fenoles del compuesto **8** aumentaría en una transformación más la estrategia sintética. El método adecuado que no tiene algún inconveniente para la formilación de **8** es el descrito por Gross (1960) **Esquema 15**.

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H muestra como señal característica el protón de aldehído en 10.35 ppm, desapareciendo el protón base de aromático que se encontraba en 6.28 ppm corroborando la sustitución sobre el anillo aromático; los protones de los grupos –OH se encuentran a campo bajo, en 12.44 y 12.89 ppm por la formación de puentes de hidrogeno con los oxígenos de los carbonilos correspondientes.

La presencia de las señales de IR en 3226 cm<sup>-1</sup> es indicativa de la presencia de los grupos hidroxilo mostrando que no se realizaron modificaciones en ellos, la vibración C=O del aldehído y del éster aparecen en 1638 cm<sup>-1</sup> existiendo la posibilidad de que sea un solo carbonilo pero se confirma con RMN-<sup>13</sup>C con las señales de 172.1 ppm para el éster y de 194.0 ppm para el aldehído.

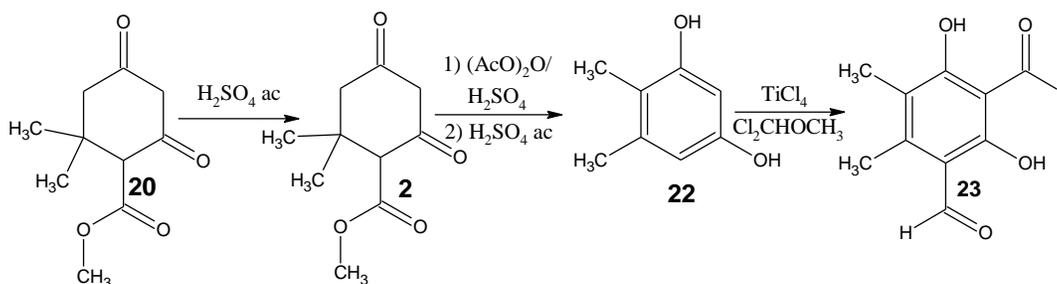
#### 4.9 Preparación del ácido 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetil-benzoico (10).

De manera similar al compuesto **21**, la reacción de hidrólisis se efectúa en ácido sulfúrico concentrado debido a la estabilidad que presenta el éster por la formación de un puente de hidrogeno del oxígeno sp<sup>2</sup> con el hidroxilo que se encuentra en posición *-orto* dificultando que se realicen hidrólisis convencionales con disoluciones acuosas y medios ácidos no tan fuertes. De esta forma la hidrólisis de **9** a **10**, se llevó a cabo empleando ácido sulfúrico concentrado a temperatura ambiente por 16 horas proporcionando **10** en 91 % **Esquema 15**.

En la espectroscopía de RMN-<sup>1</sup>H, la desaparición del metilo de éster que aparecía en un desplazamiento de 3.96 ppm en **9**, es el primer indicativo que se realizó la transformación de hidrólisis. Las señales de los metilos base de aromático se mantienen como singuletes en 2.13 y 2.58 ppm así como la señal de aldehído en 10.39 ppm. La señal en 12.44 ppm que se encontraba en **9** desapareció manteniéndose la señal de 12.89 ppm asignada al OH con puente de hidrógeno entre el oxígeno del aldehído y el hidroxilo *-orto*.

Para el caso de la espectroscopía de IR, la señal entre 3200-2600 es correspondiente a la vibración –O-H del ácido carboxílico. La espectrometría de masas confirma la obtención del compuesto **10**.

La última etapa en esta ruta de síntesis es obtener análogos del compuesto **10** que consta como primer paso realizar una descarboxilación en medio ácido para obtener el compuesto 5,5-dimetilciclohexan-1,3-diona (**2**), se realiza una aromatización con anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado con una subsecuente hidrólisis para formar el compuesto 3-hidroxy-5,6-dimetilfenol (**22**), el paso posterior consiste en la formilación de (**22**) con cloruro de titanio (IV) y dicloro-metil-metil éter obteniéndose el compuesto 2,4-dihydroxy-3-formil-5,6-dimetil-benzaldehido (**23**), **Esquema 16**.



Esquema 16. Secuencia de reacciones para obtener **23**.

#### 4.10 Preparación de 5,5- dimetil, 1,3-ciclohexanodiona (2).

Una reacción de descarboxilación del compuesto **20** para obtener **2** es adecuada ya que se tiene como materia de inicio un compuesto 1,3 di-carbonílico que facilita la reacción. El proceso se realiza con ácido sulfúrico al 10 % a reflujo por 12 h obteniéndose de **2** 95%.

En RMN-<sup>1</sup>H se observa un equilibrio tautomérico de la 1,3-dicetona **2** con su correspondiente enol en una proporción del 54.3:45.7% respectivamente, la presencia de dos protones: uno vinílico en 5.48 ppm y otro en 9.18 ppm del hidroxilo corroboran esta afirmación, las señales adicionales corresponden a metilos y metilenos presentes en la molécula. Para el caso **2**, los metilenos no presentan constantes de acoplamiento geminales como en el caso del compuesto **20**, debido a que el ambiente químico de los hidrógenos axiales y ecuatoriales es similar volviéndolos equivalentes.

El espectro de IR muestra una señal característica en 1611 cm<sup>-1</sup> que corresponde a una β-dicetona.

#### 4.11 Preparación del 3-hidroxi-5,6-dimetilfenol (22).

	Método 1 (Temperatura ambiente)	Método 2 (Reflujo)	Método 3 (mW)
<b>Condiciones</b>	Se mantiene en agitación en un matraz sellado	Se mantiene en agitación por 24 horas.	Temperatura= 115°C, Presión= 10 psi, Potencia= 6 Watts, tiempo= 20 minutos
<b>Observaciones</b>	El proceso de aromatización no se efectúa con buenos rendimientos	El tiempo de reacción provoca que se descomponga mayor cantidad de materia prima	La cantidad de impurezas generadas en estas condiciones es menor
<b>Rendimiento</b>	<10%	80%	85%

**Tabla 2. Condiciones de reacción para aromatización 2**

El proceso de aromatización se efectúa a diferentes condiciones aunque los rendimientos son diferentes para cada caso (**Tabla 2**). El mejor rendimiento para generar **2** es de 85% cuando se coloca en condiciones de microondas, no existiendo mucha diferencia cuando se somete a reflujo (80%), para ambos casos el desprendimiento del dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) se ve favorecido por la temperatura, es por que ello que la reacción a temperatura ambiente produce menos del 10% de producto. El procedimiento se puede realizar utilizando como reactivo anhídrido trifluoroacético pero resultaría mas costoso; sin embargo la reacción de aromatización para el compuesto **2** se efectúa con rendimientos aceptables con anhídrido acético. En comparación con la aromatización de **20**, para **2**, las especies sulfonantes resultan tener mayor acceso a los sitios reactivos tal como se describe en el **Esquema 4**.

Los desplazamientos de RMN-<sup>1</sup>H muestran señales de metilos base de aromático en 2.07 y 2.21 ppm así como dos protones aromáticos con constantes de acoplamiento de 2.4 Hz indicando que guardan una posición *meta* entre ellos corroborando la transformación.

El espectro de IR muestra señales en 3288 y 3227  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a vibraciones – O-H.

#### 4.12 Preparación de 2,4-dihidroxy-3-formil-5,6-dimetil-benzaldehído (23).

De acuerdo a lo descrito anteriormente para la formilación de fenoles, el procedimiento de Reimer-Tiemann (1876) no genera el compuesto con la doble sustitución en comparación a la formilación de Gross (1960) que si puede generar el compuesto **23**, por lo que se procede a utilizar como reactivos diclorometil metil éter ( $\text{Cl}_2\text{CHOCH}_3$ ), tetracloruro de titanio ( $\text{TiCl}_4$ ) y el compuesto **22** obteniéndose de **23** 37%.

Los desplazamientos de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  muestran señales características de metilos base de aromático en 2.11 y 2.51 ppm, las señales de los protones de aldehído en 10.15 y 10.33 ppm. De manera similar a los compuestos anteriores en donde se mencionaba la formación de puentes de hidrógeno entre el oxígeno de grupos carbonilo y los hidroxilos en posición – *orto*, se repite tal efecto encontrándose así dos señales en 13.16 y 13.68 ppm asignadas a los protones de los hidroxilos.

La presencia de dos señales en 193.25 y 194.59 ppm en  $\text{RMN}^{-13}\text{C}$  demuestra la presencia de dos carbonilos de aldehído.

El espectro de IR muestra señales en 3416  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a vibraciones –O-H del fenol presente en la molécula y en 1711  $\text{cm}^{-1}$  una señal característica de carbonilo.

#### 4.13 Resultados de las pruebas biológicas (citoprotección).

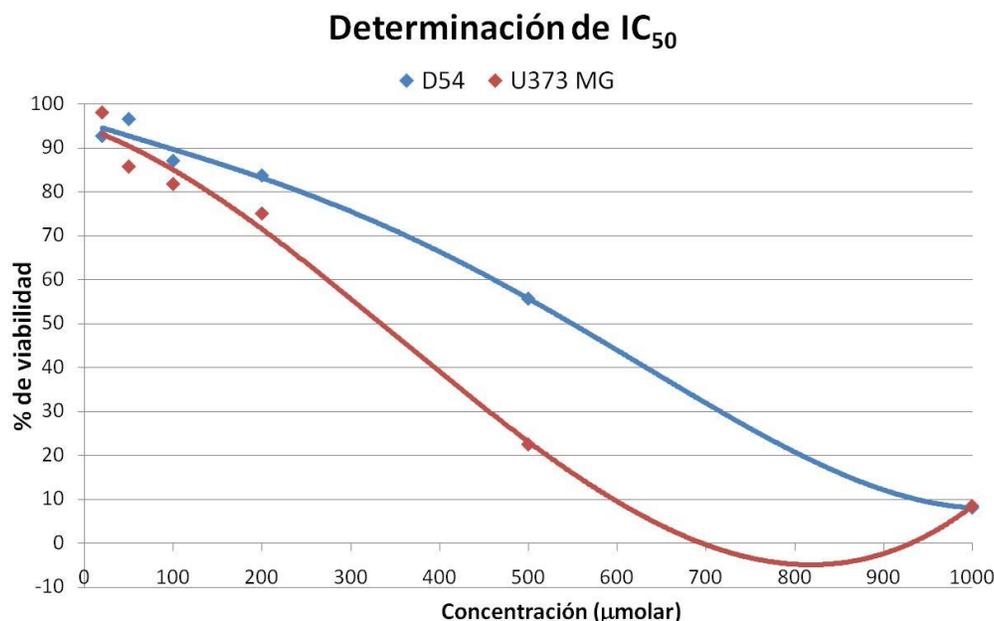
La primer etapa antes de evaluar la protección del compuesto **21a** las células frente a la oxidación, es determinar el  $\text{IC}_{50}$  del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (agente oxidante) que corresponde a la cantidad de una sustancia que se necesita para inhibir la función biológica siendo para este caso en células U373 MG y D54, de esta manera se conocer la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a la que se deben colocar las líneas celulares y determinar el grado de protección por parte de **21**, para cada uno de los casos se realizaron regresiones y con el modelo de Boltzmann (**Esquema 17**) se determinó el valor de dichas concentraciones, mencionando los resultados a continuación:

	D54	U373 MG
$A_1$	86.9430	99.8669
$A_2$	78.07111	8.5179
$X_0$	542.2436	296.9008
$dx$	139.3148	105.6240
$\text{IC}_{50}$	<b>564.47</b>	<b>296.76</b>
Desviación estándar	<b>78.19</b>	<b>128.92</b>

$$y = A_2 + \frac{(A_1 - A_2)}{\left(1 + \exp\left(\frac{(x - x_0)}{dx}\right)\right)}$$

Esquema 17. Ecuación de Boltzmann

Tabla 3. Determinación de  $\text{IC}_{50}$  por el modelo de Boltzmann



**Gráfico 1.** Porcentaje de viabilidad de células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 48 horas.

Los valores del IC<sub>50</sub> para las líneas celulares son diferentes entre ellas siendo así que para las células D54 se observa una mayor resistencia al medio oxidante en comparación a las células U373 MG.

	IC <sub>50</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μmolar)	Desviación estándar
<b>D54</b>	564.47	78.19
<b>U373 MG</b>	296.76	128.92

**Tabla 4.** IC<sub>50</sub> de las líneas celulares.

Tratamiento	<b>D54</b>	<b>U373 MG</b>
	% Viabilidad	% Viabilidad
1) DMEM	100.00	100
2) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	32.85	25.70
3) Compuesto 21	96.96	97.20
4) Resveratrol	87.01	94.23
5) Compuesto 21 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	70.05	19.74
6) Resveratrol + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	54.20	18.80
7) (3h+ compuesto 21) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	62.39	21.30
8) (3h+ resveratrol) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	44.11	19.10

**Tabla 5.** Resultados de citoprotección en células D54 y U373 MG.

Para el caso de las células D54, los resultados muestran una protección por parte del compuesto **21** a las células frente al medio oxidante en donde se cultivan, el compuesto **21** presenta mayor efecto con una viabilidad del 70% en comparación al resveratrol que es la sustancia antioxidante de referencia que presenta una viabilidad del 54.2%. Los resultados son similares al tratamiento previo con **21** y agregar posteriormente de 3 horas el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ya que **21** tiene un porcentaje de inhibición del 3.04%.

Los resultados indican una protección a las células U373 MG por parte de **21** respecto al resveratrol y la tendencia es similar para el caso en donde se trató previamente con **21** y posteriormente  $H_2O_2$ , para estas líneas celulares **21** tiene un porcentaje de inhibición del 2.8%. Dicho efecto se debe a que **21** no es tóxico para las células y además en medios oxidantes aporta un efecto protector.

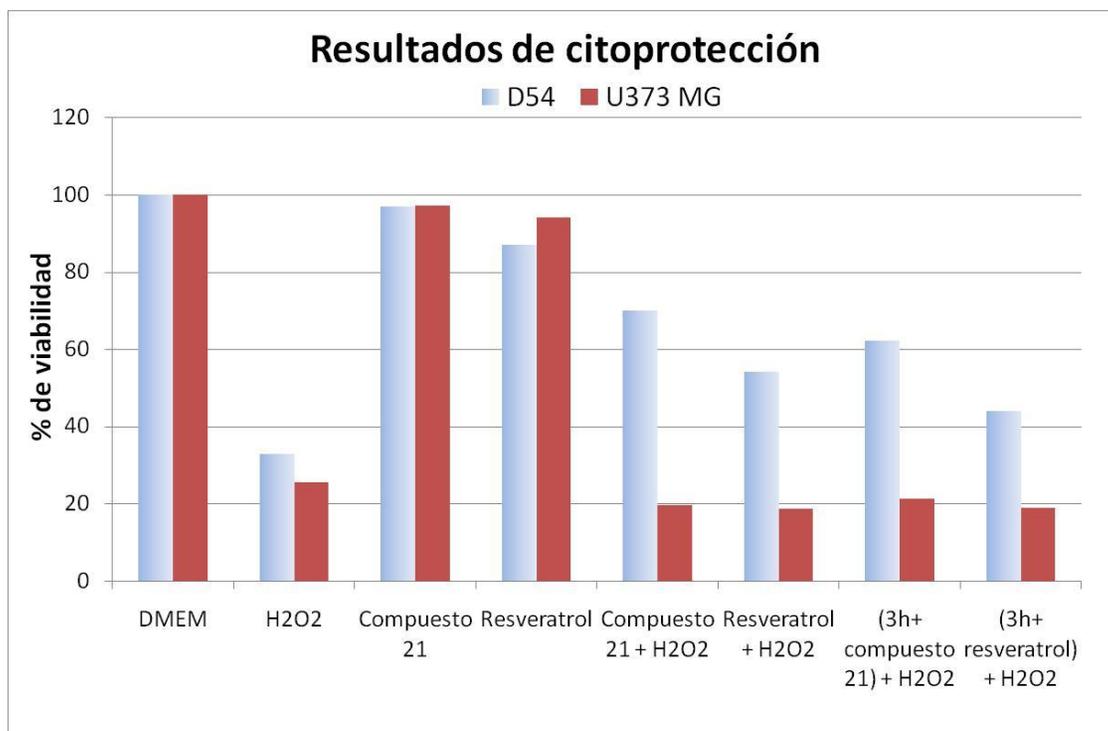


Gráfico 2. Resultados de citoprotección en células D54 y U373 MG.

Para ambas líneas celulares se observa un efecto protector del compuesto **21** respecto al resveratrol (grafico 2) sin embargo, para el caso de las células U373 MG es menor debido a que son más sensibles al medio oxidante correspondiendo con los resultados de la determinación del  $IC_{50}$ .

## 6 Conclusiones.

La síntesis de los compuestos polifenólicos **10** y **21** derivados de la Pseudocifelarina A se logró de manera satisfactoria con modificaciones importantes al procedimiento descrito en la literatura además de obtener un compuesto nuevo **23**.

Se lograron aislar y caracterizar las estructuras de los productos e intermediarios en la ruta de síntesis.

Se demostró que la frecuencia inusual de la vibración de un carbonilo de éster en IR en  $1645\text{ cm}^{-1}$  se debe a una fuerte formación de puente de hidrogeno con el fenol adyacente. Este es un dato que no se había descrito anteriormente.

El compuesto **21**, evaluado *in vitro* posee preliminarmente mayor efecto protector a medios oxidantes en comparación al resveratrol que se utilizó como referencia en líneas celulares D54 y U373 MG.

## 7 Procedimiento experimental.

La metodología experimental consta de dos partes: la primera es la síntesis química a partir de materia prima disponible comercialmente, caracterización de los intermediarios y productos por métodos físicos y espectroscópicos, la segunda parte corresponde a las pruebas biológicas evaluando la actividad antioxidante del compuesto **21**.

Los puntos de fusión de los compuestos se determinaron en un aparato Fisher-Johnes y no están corregidos. Su pureza y el avance de las reacciones se siguieron por cromatografía en capa fina (c.c.f.) utilizando cromatoplasmas de gel de sílice (60F<sub>254</sub>, Merck), en sistemas de elución que se mencionan para cada caso, para visualizar las placas se empleó una lámpara de U.V. ( $\lambda=254$  nm) y/o una solución de CoSO<sub>4</sub> al 2% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N.

Las reacciones se sometieron a radiaciones de micro-ondas (mW) se colocaron en un aparato **Discover-Explorer Hybrid®** de acuerdo a las especificaciones para cada caso.

Los equipos utilizados para la caracterización de los precursores y productos por métodos espectroscópicos fueron:

Para la técnica espectrofotometría de Absorción de Infra-Rojo (IR) se utilizó un espectrofotómetro FT-IR Spectrum 400.

Para la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno (RMN-H<sup>1</sup>) y de Carbono (RMN-C<sup>13</sup>) se utilizó el equipo Innova Varian de 300 MHz utilizando cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>) como disolvente, los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están dados en partes por millón (ppm) referidos al tetrametilsilano (TMS) para RMN-H<sup>1</sup> y CDCl<sub>3</sub> para RMN-<sup>13</sup>C, las constantes de acoplamiento J están dadas en Hz.

Para la espectrometría de masas (EM) se empleó un espectrofotómetro de masas Termo-electrón, modelo DFS (Double Focus Sector) con un analizador másico de doble sector (magnético y eléctrico con Geometría inversa), mediante la técnica de Impacto electrónico.

En las pruebas biológicas *in vitro*, se analizó el efecto protector del compuesto **21** en líneas celulares D54 y U373 MG de astrocitoma humano teniendo como agente oxidante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 5.1 Síntesis de 3,5-dihidroxi-benzoato de metilo (12).

Se preparó una disolución del ácido 3,5-dihidroxibenzoico **11** (1g, 6.48 mmol) en 20 mL de MeOH y se adicionaron 0.2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado colocando en agitación y a reflujo por 18 hrs monitoreando la reacción por c.c.f. (Hex/AcOEt 6:4). Una vez concluida la reacción, se neutralizó con NaHCO<sub>3</sub>, se realizaron extracciones con AcOEt-H<sub>2</sub>O, se secó la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evapora a sequedad, se purifica por cromatografía en columna (Hex/AcOEt 6:4) obteniéndose 0.9 g de **12** (83%).

La caracterización de **12** se efectuó por métodos físicos y espectroscópicos mostrándose los resultados a continuación:

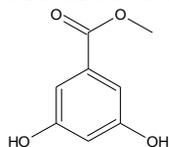


Figura 8. 3,5-dihidroxibenzoato de metilo (**12**)

Aspecto	Sólido blanco
Punto de fusión	167-170 °C
Fórmula Molecular	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
Peso Molecular	168 g/mol

**FTIR (por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>):** 3365 y 3229 (H-O-Ar), 3088 (C-H, Ar), 1687 (C=O, Ar-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1599 (-C=C-, Ar sustituido)

**RMN-<sup>1</sup>H (ppm) (CDCl<sub>3</sub>/TMS):** δ = 3.84 (s, 3H, -CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.58 (t, J = 2.4 Hz, 1H, Ph-H), 6.98 (d, J = 2.4 Hz, 2H, Ph-H).

**RMN-<sup>13</sup>C (ppm) (CDCl<sub>3</sub>/TMS):** δ = 51.71 (-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 107.47 (C=CH), 107.89 (2 C=CH), 131.34 (C=C), 157.89 (2 =C-OH), 166.91 (-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

### 5.2 Síntesis de 3,5-dimetoxi-benzoato de metilo (13).

Se preparó una disolución del compuesto **12** (1g, 6 mmol) con 15 mL de acetona agregando K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.58g, 25.92 mmol), posteriormente se adicionó (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.4 mL, 1.63g, 12.96 mmol) colocando a reflujo en agitación por 24 horas y monitoreando por c.c.f. Se agregó MeOH manteniendo en agitación por 30 minutos y se evaporó el disolvente orgánico, el sólido formado se purificó por cromatografía en columna con eluyente Hex/AcOEt 9:1, se obtuvieron 0.960g con un rendimiento del 81%.

La caracterización de **13** se efectuó por métodos físicos y espectroscópicos mostrándose los resultados a continuación:

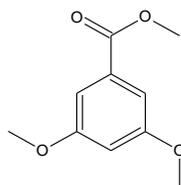


Figura 9. 3,5-dimetoxi-benzoato de metilo (**13**)

Aspecto	Sólido blanco
Punto de fusión	38-39 °C
Fórmula Molecular	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>
Peso Molecular	196 g/mol

**FTIR (por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>):** 3018 (C-H, Ar), 1712 (C=O, Ar-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1595(-C=C-, Ar sustituido), 1206 (Ar-O-CH<sub>3</sub>)

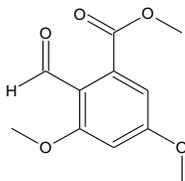
**RMN-<sup>1</sup>H (ppm)** (CDCl<sub>3</sub>/TMS):  $\delta$  = 3.81 (s, 6H, -OCH<sub>3</sub>), 3.90 (s, 3H, -CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.63 (t, J = 2.4 Hz, 1H, Ph-H), 7.18 (d, J = 2.4 Hz, 2H, Ph-H).

**RMN-<sup>13</sup>C (ppm)** (CDCl<sub>3</sub>/TMS):  $\delta$  = 52.21 (-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 55.51 (2 -OCH<sub>3</sub>), 105 (C=CH), 107.03 (2 C=CH), 131.92 (C=C), 160.56 (2 C=C), 166.81 (Ph-CO<sub>2</sub>-).

### 5.3 Síntesis de 2-formil-3,5-dimetoxibenzoato de metilo (14).

En un matraz bola (en baño de hielo) con DMF (0.8 mL, 0.745g, 10.2 mmol) se agregó lentamente POCl<sub>3</sub> (1 mL, 1.56g, 10.2 mmol) y una vez agregado se mantuvo en agitación por 30 minutos, posteriormente se agregó el compuesto **13** (1g, 5.1 mmol) utilizando como disolvente 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> manteniendo a reflujo por 24 horas, se monitorea por c.c.f. (Hex/AcOEt 9:1). Una vez concluida la reacción se enfrió la mezcla con baño de hielo y se agregó agua lentamente con agitación, neutralizando con NaHCO<sub>3</sub>, se realizaron extracciones con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> evaporando a sequedad obteniendo un rendimiento del 85%.

La caracterización de **14** se efectuó por métodos físicos y espectroscópicos mostrándose los resultados a continuación:



**Figura 10. 2-formil-3,5-dimetoxibenzoato de metilo (14)**

Aspecto	Sólido café
Punto de fusión	107-110 °C
Fórmula Molecular	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
Peso Molecular	224 g/mol

**FTIR (por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>):** 3069 (C-H, Ar), 1718 (C=O, Ar-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1625 (C=O, Ar-CH=O), 1602 (-C=C-, Ar sustituido), 1204 (Ar-O-CH<sub>3</sub>)

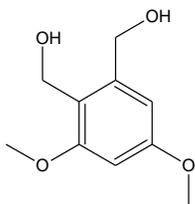
**RMN-<sup>1</sup>H (ppm)** (CDCl<sub>3</sub>/TMS):  $\delta$  = 3.87 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.90 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.91 (s, 3H, -CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.51 (d, J = 2.1 Hz, 1H, Ph-H), 6.56 (d, J = 2.1 Hz, 1H, Ph-H), 10.29 (s, 1H, CH=O).

**RMN-<sup>13</sup>C (ppm)** (CDCl<sub>3</sub>/TMS):  $\delta$  = 52.79 (-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 55.77 (-OCH<sub>3</sub>), 55.94 (-OCH<sub>3</sub>), 93.37 (C=CH), 105.13 (C=CH), 116.41 (C=C), 136.44 (C=C), 163.13 (C=C), 164.98 (C=C), 169.45 (Ph-CO<sub>2</sub>-), 187.57 (-CH=O).

### 5.4 Síntesis de (3,5-dimetoxi-1,2-fenileno) dimetanol (15).

Se preparó una disolución del compuesto **14** (0.2g, 0.89 mmol) con 20 mL de THF, se agregó lentamente LiAlH<sub>4</sub> (0.3g, 7.9 mmol), la mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 6 horas a temperatura ambiente. Para el tratamiento de la reacción a la mezcla se le agregó en baño de hielo 3 mL de H<sub>2</sub>O, el sólido formado se filtró a vacío y se lavó con H<sub>2</sub>O, se realizaron extracciones con AcOEt evaporando la fase orgánica, el rendimiento obtenido es del 76%.

La caracterización de **15** se efectuó por métodos físicos y espectroscópicos mostrándose los resultados a continuación:



**Figura 11. (3,5-dimetoxi-1,2-fenilen) dimetanol (15)**

Aspecto	Sólido amarillento
Punto de fusión	98-99 °C
Fórmula Molecular	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
Peso Molecular	198 g/mol

**FTIR (por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>):** 3296 y 3204 (H-O-CH<sub>2</sub>-Ar), 3010 (C-H, Ar), 1602 (-C=C-, Ar sustituido), 1201 (Ar-O-CH<sub>3</sub>)

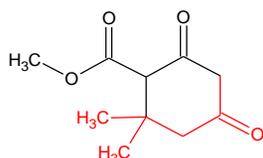
**RMN-<sup>1</sup>H (ppm)** (CDCl<sub>3</sub>/TMS): δ = 3.81 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.82 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 4.66 (s, 2H, -PhCH<sub>2</sub>-OH), 4.74 (s, 2H, PhCH<sub>2</sub>-OH), 6.43 (d, J = 2.4 Hz, 1H, Ph-H), 6.52 (d, J = 2.4 Hz, 1H, Ph-H).

**RMN-<sup>13</sup>C (ppm)** (CDCl<sub>3</sub>/TMS): δ = 55.32 (-OCH<sub>3</sub>), 55.68 (-OCH<sub>3</sub>), 55.75 (PhCH<sub>2</sub>-OH), 64.14 (-PhCH<sub>2</sub>-OH), 98.09 (C=CH), 105.67 (C=CH), 119.94 (C=C), 142.18 (C=C), 158.93 (C=C), 160.30 (C=C).

### 5.5 Síntesis de 2,2-dimetil-4,6-dioxociclohexan-carboxilato de metilo (20).

Se preparó una disolución en baño de hielo de 60 mL de MeOH y Na metálico (4.6 g, 0.2 mol) manteniendo en agitación hasta que el desprendimiento de H<sub>2</sub> termine, posteriormente se adicionó malonato de dimetilo (**18**) (12mL, 13.2 g, 0.1 mol) agitando por 1 hora formándose un sólido blanco, se agregó gota a gota a temperatura ambiente el óxido de mesitilo (**19**) (11.5mL, 9.8 g, 0.1 mol) y se mantuvo a reflujo por 24 horas monitoreando por c.c.f. la aparición del producto (Hex/AcOEt 6:4), una vez concluida la reacción se evaporó la fase orgánica, quedando un sólido amarillo al cual se le agregó una cantidad mínima de agua fría llevando a pH≈4 agitando por 2 horas, el sólido amarillo se filtró a vacío y se purificó por cromatografía en columna (Hex/AcOEt 6:4) obteniéndose 16g de producto con un rendimiento del 81 %.

La caracterización de **20** se efectuó por métodos físicos y espectroscópicos mostrándose los resultados a continuación:



**Figura 12. 2,2-dimetil-4,6-dioxo-ciclohexan-carboxilato de metilo (20)**

Aspecto	Sólido blanco
Punto de fusión	100-102 °C
Fórmula Molecular	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
Peso Molecular	198 g/mol

**FTIR (por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 2952 (C-H, alifático), 1732 (C=O,  $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 1577 (C=O,  $\beta$  dicetona, enol).

**EMIE (m/z, %):** pico base: (83, 100),  $\text{M}^+$ : (198, 4),  $\text{M}^{+1}$ : (199, 1)

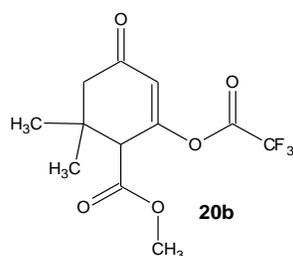
**RMN- $^1\text{H}$  (ppm)( $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):**  $\delta$  = 0.99 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 1.12 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 1.14 (s, 6H, 2- $\text{CH}_3$ ), 2.17(d, 1H,  $J=17.4$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.37 (d, 1H,  $J=15$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.70 (d, 1H,  $J=17.4$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.03 (d, 1H,  $J=15$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.16 (s, 1H,  $\text{CH}-\text{CO}-\text{OCH}_3$ ), 3.33 (d, 1H,  $J=17.1\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ ), 3.41 (s, 1H,  $\text{CH}-\text{CO}-\text{OCH}_3$ ), 3.72 (s, 3H,  $\text{CO}-\text{CH}_3$ ), 3.78 (s, 3H,  $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 3.88 (d, 1H,  $J = 17.1\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ ), 5.53 (s, 1H,  $\text{C}=\text{CH}$ ), 8.26 (s, 1H,  $\text{C}=\text{C}-\text{OH}$ ).

**RMN- $^{13}\text{C}$  (ppm)( $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):**  $\delta$  = 25.90 ( $-\text{CH}_3$ ), 25.98 ( $-\text{CH}_3$ ), 27.86 ( $-\text{CH}_3$ ), 28.48 ( $-\text{CH}_3$ ), 33.92 (C), 35.01 (C), 42.97 ( $-\text{CH}_2$ ), 50.88 ( $-\text{CH}_2$ ), 52.17 ( $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 52.44 ( $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 56.28 ( $-\text{CH}_2$ ), 60.61 ( $-\text{CHCO}_2^-$ ), 60.27 ( $-\text{CHCO}_2^-$ ), 103.29 ( $-\text{C}=\text{CH}$ ), 168.64 ( $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 169.89 ( $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 187.57 ( $-\text{C}=\text{O}$ ), 188.43 ( $-\text{C}=\text{O}$ ), 199.27 ( $-\text{C}=\text{O}$ ), 202.87 ( $-\text{C}=\text{O}$ ).

### 5.6 Síntesis de 2,4-dihidroxi-5,6-dimetilbenzoato de metilo (8).

Se preparó una disolución en baño de hielo del compuesto **20** (1g, 5.05 mmol) con 2.9 mL de ATFA (4.24g, 0.0202 mol) y se adicionó lentamente 0.3 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (0.49g, 5.05mmol), la mezcla de reacción se colocó bajo las condiciones siguientes: temperatura de 90 °C, 45 psi, potencia de 13 watts y un tiempo de 40 minutos con radiación de microondas obteniendo el mejor rendimiento de 40%, el avance de la reacción se monitoreó por c.c.f. (Hex/AcOEt 8:2). El tratamiento de la reacción se realizó agregando 50 mL de éter dietílico y en agitación de adicionó  $\text{NaHCO}_3$  hasta un pH~5, se realizaron extracciones sucesivas con éter dietílico (3X50 mL) evaporando la fase orgánica y purificando por cromatografía en columna (Hex/AcOEt 8:2).

Uno de los intermediarios aislados corresponde al compuesto **20b**.

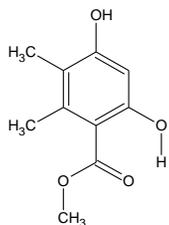


**Figura 13. 6,6-dimetil-4-oxo-2-[(trifluoroacetyl)oxi]-2-ciclohexen-1-carboxilato de metilo (20b)**

Aspecto	Líquido amarillo
Fórmula Molecular	$\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{O}_5$
Peso Molecular	294 g/mol

**RMN- $^1\text{H}$  (ppm)( $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):**  $\delta$  = 1.12 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 1.14 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 2.17 (d, 1H,  $J = 17.4$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.71 (d, 1H,  $J = 17.4$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.16 (s, 1H,  $\text{CH}-\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 3.71 (s, 3H,  $\text{CO}_2-\text{CH}_3$ ), 5.41 (s, 1H,  $\text{C}=\text{CH}$ ).

La caracterización de **8** se efectuó por métodos físicos y espectroscópicos mostrándose los resultados a continuación:



**Figura 14. 4,6-dihidroxi-2,3-dimetilbenzoato de metilo (8)**

Aspecto	Sólido blanco cristalino
Punto de fusión	118-120 °C
Fórmula Molecular	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>
Peso Molecular	196 g/mol

**FTIR (por reflectancia ATR, cm<sup>-1</sup>):** 3312 (O-H, fenol), 1645 (C=O, Ar-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1584 (-C=C-, Ar sustituido)

**EMIE (m/z, %):** pico base: (164, 100), M<sup>+</sup>: (196, 28), M<sup>+1</sup>: (197, 3)

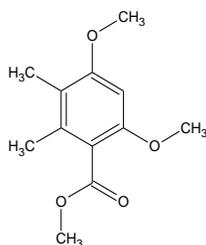
**RMN-<sup>1</sup>H (ppm)** (CDCl<sub>3</sub>/TMS): δ = 2.10 (s, 3H, Ph-CH<sub>3</sub>), 2.43 (s, 3H, Ph-CH<sub>3</sub>), 3.92 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.28 (s, 1H, Ph-H), 11.29 (s, 1H, Ph-OH).

**RMN-<sup>13</sup>C (ppm)** (CDCl<sub>3</sub>/TMS): δ = 11.48 (-CH<sub>3</sub>), 18.94 (-CH<sub>3</sub>), 51.93 (-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 100.74 (C=CH), 106.44 (-C=C-), 116.18 (-C=C-), 141.39 (-C=C-), 158.78 (-C=C-), 161.53 (-C=C-), 172.25 (-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

### 5.7 Síntesis de 4,6-dimetoxi-2,3-dimetil-benzoato de metilo (8a).

Se preparó una disolución de **8** (1g, 5.1 mmol) en acetona con (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.4 mL, 1.63g, 12.96 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, se mantuvo la mezcla de reacción en agitación y reflujo por 12 horas. Para el tratamiento se adicionó MeOH con agitación y reflujo durante una hora. Se evaporó el disolvente y se filtró a vacío el sólido formado lavando con agua fría.

La caracterización de **8a** se efectuó por métodos físicos y espectroscópicos mostrándose los resultados a continuación:



**Figura 15. 4,6-dimetoxi-2,3-dimetilbenzoato de metilo (8a)**

Aspecto	Sólido blanco cristalino
Punto de fusión	64-65 °C
Fórmula Molecular	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>
Peso Molecular	224 g/mol

**FTIR (por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 2993 (C-H, alifático), 1725 (C=O, Ar-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1590 (-C=C-, Ar sustituido)

**EMIE (m/z, %):** pico base: (193, 100), M<sup>+</sup>: (224, 37), M<sup>+1</sup>: (225, 5)

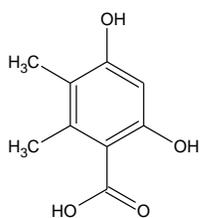
**RMN-<sup>1</sup>H (ppm)** (CDCl<sub>3</sub>/TMS):  $\delta$  = 2.06 (s, 3H, Ph-CH<sub>3</sub>), 2.16 (s, 3H, Ph-CH<sub>3</sub>), 3.81 (s, 3H, Ar-O-CH<sub>3</sub>), 3.82 (s, 3H, Ar-O-CH<sub>3</sub>), 3.88 (s, 3H, -CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.33 (s, 1H, Ph-H).

**RMN-<sup>13</sup>C (ppm)**(CDCl<sub>3</sub>/TMS):  $\delta$  = 10.98 (-CH<sub>3</sub>), 16.88 (-CH<sub>3</sub>), 52.05 (-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 55.56 (Ar-O-CH<sub>3</sub>), 55.98 (Ar-O-CH<sub>3</sub>), 92.87 (-C=CH), 116.63 (-C=C-), 117.41 (-C=C-), 135.38 (-C=C-), 155.18 (-C=C-), 158.83 (-C=C-), 169.45 (-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

### 5.8 Síntesis del ácido 2,4-dihidroxi-5,6-dimetil-benzoico (21).

El éster **8** (1g, 5.1 mmol) se disolvió en 40 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado a 0 °C durante una hora y posteriormente se agitó a temperatura ambiente por 16 horas. La mezcla de reacción se diluyó por adición de hielo y se extrajo con AcOEt lavando la fase orgánica con H<sub>2</sub>O y salmuera, el disolvente se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó para obtener un rendimiento del 83%.

La caracterización de **21** se efectuó por métodos físicos y espectroscópicos mostrando los resultados a continuación:



**Figura 16.** ácido 2,4-dihidroxi-5,6-dimetil-benzoico (21)

Aspecto	Sólido anaranjado
Punto de fusión	160-162 °C
Fórmula Molecular	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>
Peso Molecular	182 g/mol

**FTIR (por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3334 (-OH, ácido), 1708 (C=O, Ar-CO<sub>2</sub>H).

**EMIE (m/z, %):** pico base: (98, 100), M<sup>+</sup>:(182, 47), M<sup>+1</sup>: (183, 4.5)

**RMN-<sup>1</sup>H (ppm)** (CDCl<sub>3</sub>/TMS):  $\delta$ = 2.13 (s, 3H, Ph-CH<sub>3</sub>), 2.52 (s, 3H, Ph-CH<sub>3</sub>), 6.36 (s, 1H, Ph-H).

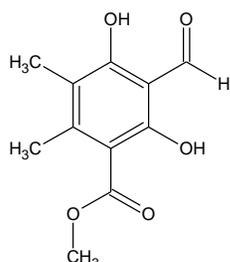
**RMN-<sup>13</sup>C (ppm)** (CDCl<sub>3</sub>/TMS):  $\delta$ = 10.14 (-CH<sub>3</sub>), 18.85 (-CH<sub>3</sub>), 101.74 (-C=CH), 107.51 (-C=C-), 117.22 (-C=C-), 142.40 (-C=C-), 159.81 (-C=C-), 162.36 (-C=C-), 170.25 (-CO<sub>2</sub>H).

### 5.9 Síntesis de 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetilbenzoato de metilo (9).

Se preparó una disolución de **8** (1g, 5.1 mmol) con Cl<sub>2</sub>CHOCH<sub>3</sub> (1 mL, 1.271g, 11.05mmol) y 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro, se enfrió a -7 °C agregando lentamente una solución de TiCl<sub>4</sub> 1M (2 mL, 0.378g, 2mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro manteniendo la agitación a 0 °C por 1 hora y a temperatura ambiente por 16 horas. Una vez concluida la reacción, se vertió en una mezcla de agua-hielo y se realizaron extracciones con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 X 10 mL), la

fase orgánica se lavó con una disolución diluida de ácido clorhídrico, salmuera y se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro la fase orgánica, el rendimiento obtenido fue del 41%.

La caracterización de **9** se efectuó por métodos físicos y espectroscópicos mostrándose los resultados a continuación:



**Figura 17. 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetilbenzoato de metilo (9)**

Aspecto	Sólido anaranjado
Punto de fusión	78-80 °C
Fórmula Molecular	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$
Peso Molecular	224 g/mol

**FTIR (por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3226 (-OH, fenol), 1638 (C=O, Ar-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**EMIE (m/z, %):** pico base: (164, 100),  $\text{M}^+$ : (224, 46),  $\text{M}^{+1}$ : (225, 6).

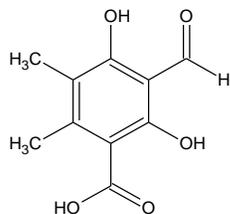
**RMN-<sup>1</sup>H (ppm) (CDCl<sub>3</sub>/TMS):**  $\delta$  = 2.10 (s, 3H, Ph-CH<sub>3</sub>), 2.48 (s, 3H, Ph-CH<sub>3</sub>), 3.96 (s, 3H, -CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 10.35 (s, 1H, -CHO), 12.44 (s, 1H, Ph-OH), 12.89 (s, 1H, Ph-OH).

**RMN-<sup>13</sup>C (ppm) (CDCl<sub>3</sub>/TMS):**  $\delta$  = 10.62 (-CH<sub>3</sub>), 20.06 (-CH<sub>3</sub>), 52.30 (-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 104.22 (-C=C-), 107.71 (-C=C-), 117.37 (-C=C-), 149.99 (-C=C-), 165.03 (-C=C-), 165.53 (-C=C-), 172.11 (-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 193.99 (-CHO).

### 5.10 Síntesis del ácido 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetil-benzoico (10).

El éster **9** (1g, 4.46mmol) se disolvió en 40 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado a 0 °C durante una hora y posteriormente se agitó a temperatura ambiente por 16 horas. La mezcla de reacción se diluye por adición de hielo y se extrae con AcOEt lavando la fase orgánica agua y salmuera, el disolvente se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se evaporó obteniéndose un rendimiento del 91%.

La caracterización de **10** se efectuó por métodos físicos y espectroscópicos mostrándose los resultados a continuación:



**Figura 18. ácido 2,4-dihidroxi-3-formil-5,6-dimetil-benzoico (10)**

Aspecto	Sólido amarillo claro
Punto de fusión	176-178 °C
Fórmula Molecular	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_5$
Peso Molecular	210 g/mol

**FTIR (por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3200-2600 (-OH, ácido), 1626 (C=O, Ar-CO<sub>2</sub>H).

**EMIE (m/z, %):** pico base: (166, 100), M<sup>+</sup>: (210, 20), M<sup>+1</sup>: (211, 2).

**RMN-<sup>1</sup>H (ppm)** (CDCl<sub>3</sub>/TMS):  $\delta$ = 2.13 (s, 3H, Ph-CH<sub>3</sub>), 2.58 (s, 3H, Ph-CH<sub>3</sub>), 10.33 (s, 1H, -CHO), 12.89 (s, 1H, Ph-OH).

**RMN-<sup>13</sup>C (ppm)** (CDCl<sub>3</sub>/TMS):  $\delta$ = 10.41 (-CH<sub>3</sub>), 19.63 (-CH<sub>3</sub>), 106.45 (-C=C-), 114.70 (-C=C-), 149.17 (-C=C-), 151.97 (-C=C-), 159.13 (-C=C-), 164.12 (-C=C-), 167.05 (-CO<sub>2</sub>H), 194.20 (-CHO).

### 5.11 Síntesis de 5,5- dimetil, 1,3-ciclohexanodiona (2).

El compuesto **20** (1g, 5.05 mmol) se disolvió en 40 mL de agua agregando 5 mL de HCl al 10 % manteniendo en agitación y a reflujo por 12 horas hasta que desapareció la materia de inicio monitoreando por c.c.f. Para el tratamiento de la reacción se realizaron extracciones sucesivas con AcOEt lavando la fase orgánica con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y salmuera, se evaporó la fase orgánica obteniendo un rendimiento del 95%.

La caracterización de **2** se efectuó por métodos físicos y espectroscópicos mostrándose los resultados a continuación:

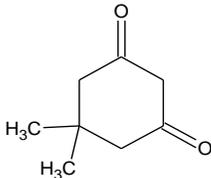
	Aspecto	Sólido amarillento
	Punto de fusión	146-147 °C
	Fórmula Molecular	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>
	Peso Molecular	140 g/mol

Figura 19. 5,5-dimetil, 1,3-ciclohexanodiona (2)

**FTIR (por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 2954 (C-H, alifático), 1611 (C=O,  $\beta$  dicetona, enol).

**EMIE (m/z, %):** pico base: (83, 100), M<sup>+</sup>: (140, 21), M<sup>+1</sup>: (141, 3)

**RMN-<sup>1</sup>H (ppm)**(CDCl<sub>3</sub>/TMS):  $\delta$  = 1.04 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 1.09 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 2.26 (s, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 2.53 (s, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 3.34 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.48 (s, 1H, C=CH), 9.18 (s, 1H, C=C-OH).

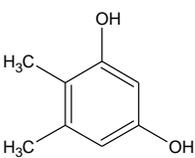
**RMN-<sup>13</sup>C (ppm)**(CDCl<sub>3</sub>/TMS):  $\delta$  = 28.20 (2-CH<sub>3</sub>), 30.91 (C), 32.73 (C), 28.28(2-CH<sub>3</sub>), 46.22 (2-CH<sub>2</sub>), 54.07(2-CH<sub>2</sub>), 57.26 (-CH<sub>2</sub>), 103.06 (-C=CH), 191.27 (-C=O), 203.72 (-C=O).

### 5.12 Síntesis del 3-hidroxi-5,6-dimetil-fenol (22).

Se preparó una disolución en baño de hielo del compuesto **2** (1 g, 7.14 mmol) con 2.7 mL de anhídrido acético (2.85 g, 28 mmol) adicionando lentamente 0.4 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (0.735 g, 7.5mmol), la mezcla de reacción se colocó en las condiciones siguientes: temperatura de 115 °C, presión de 10 psi, potencia de 6 watts y un tiempo de 20 minutos obteniendo un rendimiento del 85%, el avance de la reacción se monitoreó por

c.c.f. (Hex/AcOEt 8:2). Una vez concluida la reacción se agregó 50 mL de agua fría y se realizaron extracciones sucesivas con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3X50 mL) evaporando la fase orgánica y purificando por cromatografía en columna (Hex/AcOEt 8:2). El producto obtenido corresponde al acetato el cual es hidrolizado en medio ácido para obtener el compuesto (**22**).

La caracterización de **22** se efectuó por métodos físicos y espectroscópicos mostrándose los resultados a continuación:

 <p><b>Figura 20. 3-hidroxi-5,6-dimetil-fenol (22)</b></p>	Aspecto	Sólido rojizo
	Punto de fusión	135-136 °C
	Fórmula Molecular	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2$
	Peso Molecular	138 g/mol

**FTIR (por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3288 y 3227 (O-H, fenol), 1606 (-C=C-, Ar sustituido)

**EMIE (m/z, %):** pico base: (123, 100),  $\text{M}^+$ : (138, 96),  $\text{M}^{+1}$ : (139, 8).

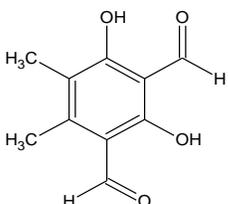
**RMN- $^1\text{H}$  (ppm)** ( $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):  $\delta$  = 2.07 (s, 3H, Ph- $\text{CH}_3$ ), 2.21 (s, 3H, Ph- $\text{CH}_3$ ), 6.19 (d, 1H, J = 2.4Hz, Ph-H), 6.26 (d, 1H, J = 2.4Hz, Ph-H).

**RMN- $^{13}\text{C}$  (ppm)** ( $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ):  $\delta$  = 10.39 (- $\text{CH}_3$ ), 19.73 (- $\text{CH}_3$ ), 99.85 (-C=CH), 108.20 (-C=CH), 113.61 (-C=C-), 138.05 (-C=C-), 154.33 (-C=C-), 154.89 (-C=C-).

### 5.13 Síntesis de 2,4-dihidroxi-3-formil-5,6-dimetil-benzaldehido (**23**).

Se preparó una disolución del compuesto **22** (1g, 7.2 mmol) con  $\text{Cl}_2\text{CHOCH}_3$  (1 mL, 1.271g, 11.05mmol) y 10 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro, se enfrió a -7 °C agregando lentamente una solución de  $\text{TiCl}_4$  1M (2 mL, 0.378g, 2 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro, manteniendo la agitación a 0 °C por 1 hora y a temperatura ambiente por 16 horas. Una vez concluida la reacción, se vertió en una mezcla de agua-hielo y se realizaron extracciones con éter dietílico (3 X 10 mL), la fase orgánica se lavó con una disolución diluida de ácido clorhídrico, salmuera y se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro evaporando la fase orgánica, el rendimiento obtenido fue del 37%.

La caracterización de **23** se efectuó por métodos físicos y espectroscópicos mostrándose los resultados a continuación:

 <p><b>Figura 21. 2,4-dihidroxi-3-formil-5,6-dimetil-benzaldehido (23)</b></p>	Aspecto	Sólido blanco
	Punto de fusión	80-82 °C
	Fórmula Molecular	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$
	Peso Molecular	194 g/mol

**FTIR (por reflectancia ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3416 (O-H, fenol), 1711 (C=O, Ar-CHO), 1602 (C=O, Ar-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**EMIE (m/z, %):** Pico base: (91, 100), M<sup>+</sup>: (194, 76), M<sup>+</sup>: (195, 9).

**RMN-<sup>1</sup>H (ppm)(CDCl<sub>3</sub>/TMS):**  $\delta$  = 2.11 (s, 3H, Ph-CH<sub>3</sub>), 2.51 (s, 3H, Ph-CH<sub>3</sub>), 10.15 (s, 1H, -CHO), 10.33 (s, 1H, -CHO), 13.16 (s, 1H, Ph-OH), 13.68 (s, 1H, Ph-OH).

**RMN-<sup>13</sup>C (ppm) (CDCl<sub>3</sub>/TMS):**  $\delta$  = 15.48 (-CH<sub>3</sub>), 19.94 (-CH<sub>3</sub>), 109.74 (-C=C-), 115.44 (-C=C-), 119.18 (-C=C-), 151.39 (-C=C-), 168.78 (-C=C-), 171.53 (-C=C-), 193.25 (-CHO), 194.59 (-CHO).

## 5.14 Pruebas biológicas (citoprotección).

### 5.14.1 Líneas Celulares

Se emplearon células U373 MG de humano de origen tumoral correspondientes a un astrocitoma grado III. Estas células se caracterizan por ser difusas, infiltrantes, caracterizándose por anaplasia dispersa y elevado potencial proliferativo.<sup>43</sup>

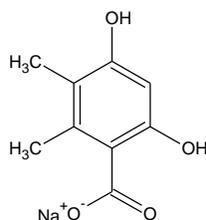
Se emplearon células D54 de humano de origen tumoral correspondientes a un astrocitoma grado IV. Estas células se caracterizan por ser el más incidente, creciendo principalmente en los hemisferios cerebrales tendiendo a ser un tumor agresivo clínicamente.<sup>44</sup>

### 5.14.2 Compuesto analizado

*Nombre* 2,4-dihidroxi-5,6-dimetilbenzoato de sodio

*Peso molecular* 204 g/mol

*Estructura*



### 5.14.3 Medio de cultivo: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium).

<i>Aminoácidos</i>	<i>mg/dL</i>	<i>Sales inorgánicas</i>	<i>mg/dL</i>	<i>Suplementos</i>	<i>mg/dL</i>	<i>Otros</i>	<i>mg/dL</i>
L - Glutamina	584	NaCl	6400	i - Inositol	7.2	D- Glucosa	4500

L - Lisina	146	NaHCO <sub>3</sub>	3700	Pantotenato de calcio	4	Rojo fenol	15
L - Isoleucina	105	KCl	400	Cloruro de colina	4		
L - Leucina	105	CaCl <sub>2</sub>	200	Ácido fólico	4		
L - Tirosina	104.2	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	125	Nicotinamida	4		
L - Treonina	95	MgSO <sub>4</sub>	97.6	Piridoxal	4		
L - Valina	94	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	0.1	Tiamina	4		
L - Arginina	84			Riboflavina	0.4		
L - Fenilalanina	66						
L - Cisteína	62.7						

**Tabla 6. Medio de cultivo DMEM**

Para la determinación del IC<sub>50</sub> de las líneas celulares se realizaron cultivos con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre 20 y 1000  $\mu$ molar y de esta manera obtener los valores del porcentaje de viabilidad.

Para la evaluación de citoprotección en las líneas celulares se cultivaron en diferentes condiciones: 1) En el medio de cultivo (DMEM) sin algún otra sustancia, siendo este el control, 2) en un ambiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con una concentración indicada por el IC<sub>50</sub> para cada línea celular, 3) en presencia del compuesto **21**, 4) en presencia de resveratrol, 5) en presencia del compuesto **21** y un ambiente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el mismo medio, 6) en presencia de resveratrol y un ambiente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el mismo medio, 7) en presencia del compuesto **21** 3 horas antes del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 8) en presencia de resveratrol 3 horas antes del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 8 Bibliografía.

- [1] Matill, H. A. *Annu. Rev. Biochem*, **1947**, *16*, 177–192.
- [2] German, J. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1999**, *459*, 23–50.
- [3] Jacob, R. *Subcell Biochem.*, **1996**, *25*, 1–16.
- [4] Knight, J. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **1998**, *28* (6) 331-46.
- [5] Wolf, G. *J. Nutr.*, **2005**, *135* (3), 363-6.
- [6] Christen Y. *Am J Clin Nutr*, **2000**, *71* (2), 621S-629S.
- [7] Nunomura A.; Castellani R.; Zhu X.; Moreira P.; Perry G. y Smith M.; *J. Neuropathol Exp. Neurol*, **2006**, *65* (7), 631-41.
- [8] Wood-Kaczmar A.; Gandhi S. y Wood N.: *Trends Mol Med*, **2006**, *12* (11), 521-8.
- [9] Davì G.; Falco A. y Patrono C.: *Antioxid Redox Signal*, **2005**, *7* (1–2) 256-68.
- [10] Giugliano D.; Ceriello A. y Paolisso G.: *Diabetes Care*, **1996**, *19* (3), 257-67.
- [11] Van Gaal L.; Mertens I, y De Block C.: *Nature*, **2006**, *444* (7121), 875-80.
- [12] Aviram M.: *Free Radic Res*, **2000**, *33*, S85–97.
- [13] Katzung Bertram G.: *Pancreatic Hormones & Antidiabetic Drugs.: Basic & Clinical Pharmacology*, 9 edición. **2007**, McGraw-Hill Capítulo 41.
- [14] <http://www.who.int/countries/mex/es/> revisado 15/Noviembre/2011, 17:00 horas.
- [15] Simonian N. A. y Coyle J.T.: *Annu. Rev. Pharm. and Tox.*, **1996**, *36*, 83-106.
- [16] Mathew S. y Abraham T. E.: *Food and Chem. Tox.*, **2006**, *44*, 198–206.
- [17] Soobrattee M.A.; Neergheen V. S.; Luximon-Ramma A.; Aruomab O. I. y Bahorun T.: *Mutation Research*, **2005**, *579*, 200–213
- [18] Kanner J.; Frankel J. E.; Granit R.; German B. y Kinsellat J. E.: *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, *42*, 64-69.
- [19] Aherne S. A. y O'Brien N. M.: *Nutrition*, **2002**, *18*, 75-81.

- [20] Benthath A.; Rusznyak S. y Szent-György A.: *Nature*; 798. En: *Flavonoids in Health and Disease*. Ed Marcel Dekker, INC. New York, **1936**, 5, 137-161.
- [21] Saskia A.; van Accker y Bast A.: *Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids*. En: *Flavonoids in health and Disease*. Ed Marcel Dekker, INC. New York, **1998**, 9:221-251
- [22] Sun Hong-Yi; Xiao Chun-Fen; Cai Yu-Chen; Chen Yu; Wei Wen; Liu Xian-Ke; Lvze-Liang; y Zou Yong,: *Chem. Pharm. Bull.*, **2010**, 58(11), 1492-1496.
- [23] Stojanović S.; Brede O.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, 4, 757–764.
- [24] Stojanović S.; Sprinz H. y Brede, O. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, 391, 79–89.
- [25] Wang M.; Jin Y.; Ho C.T. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 3974–3977
- [26] Fukuhara K.; Nagakawa M.; Nakanishi I.; Ohkubo K.; Imai K.; Urano S.; Fukuzumi S.; Ozawa T.; Ikota N.; Mochizuki M.; Miyata N. y Okuda H. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 1437–1443.
- [27] Ya-Jing S.; Yi-Ping Q.; Xiao-Da L.; Fang D.; Xian-Ling S.; Wen-Qiang J.; Qiang L.; Jian-Guo F.; Bo Z.; *J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 5025.
- [28] W. von E Doering y Beringer F. M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1949**, 71, 2221.
- [29] Kablaoui, Mahmoud S. *J. Org. Chem.* **1974**, 25, 3696-3698
- [30] Gross H.; Rieche A.; y Holt E.: *Chem. Ber.* **1960**, 93, 88-94.
- [31] DeHaan F. P. y Delker G. L. *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 3963-3966
- [32] Cresp T. M.; Sargent M. V.; Elix J. A. y Murphy D. P. H.: *J. Chem. Soc. Perkin Transaction 1*, **1973**, 340.
- [33] Huneck S. *Phytochemistry*. **1984**, 23 (2), 431-434.
- [34] Elix J. A. y Lajide L.: *Aust. J. Chem.* **1984**, 37, 2153-2157.
- [35] Nolan T. J.; Keane, J. y Davidson V. E. *Scientific Proceedings of the Royal Dublin Society, Series A*, **1940**, 22, 237–239.
- [36] Reimer K. y Tiemann F.: *Ber.* **1876**, 9, 824.
- [37] Gattermann L. y Koch J.: *Ber.* **1897**, 30, 1622.

- [38] Vilsmeier A. y Haack A.: *Ber.* **1927**, 60, 119.
- [39] Vorlander D.: *Liebigs Ann. Chem.* **1897**, 294, 253.
- [40] Rapson W. S. y Robsinson R.: *J. Chem. Soc.* **1935**, 1285-1288.
- [41] E. Doering W. y Beringer F. M.: *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 2221.
- [42] Nelson P. H. y Nelson J. T.: *Synthesis*, **1992**, 1287.
- [43] Pérez O. L.; Rodríguez R. E. y Figueredo R. R. *Rev Cubana Cir.* **2001**, 40 (2), 87-91.
- [44] Buckner J. C.; Brown P. D.; O'Neill B. P.; Meyer F. B.; Wetmore C. J.; y Uhm J. H.: *Clinic Proceedings*, **2007**, 82, 1271–86.