



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

SÍNTESIS DE CROMONAS Y ACILCROMONAS.
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD VASORRELAJANTE EN
AORTA DE RATA E INHIBICIÓN DE FOSFODIESTERASAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JOSÉ ARTURO ACOSTA BASILIO

DIRECTOR DE TESIS:
Dr. ADELFO NATALIO REYES RAMÍREZ

ASESOR DE TESIS:
Dr. FERNANDO RODRÍGUEZ RAMOS

MÉXICO, D.F. 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México: abrevadero de mi filosofía positivista e idealista.

Agradezco a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por haber recibido de ella mi formación profesional, por los excelentes profesores de los que tuve la oportunidad de aprender, por haberme permitido seguir mi vocación científica.

Se agradece al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con clave **IN216312**, “Síntesis y estudio de la actividad biológica de nuevos flavonoides, como potenciales moléculas broncorrelajantes y vasorrelajantes.”

- Dr. Adelfo N. Reyes Ramírez

Por todo el apoyo durante todo el proceso de tesis y por los recursos para llevar a cabo la síntesis química, realizada en el laboratorio 4 planta alta de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), de la FES Zaragoza UNAM.

- Dr. Fernando Rodríguez Ramos

Por la invitación al proyecto de investigación y por ser asesor en el trabajo experimental.

- Dr. Andrés Navarrete Castro

Por los recursos y el apoyo para llevar a cabo el bioensayo en órgano aislado, que se llevó a cabo en el laboratorio 126 del conjunto E, Facultad de Química UNAM.

DEDICATORIA

A Dios Por haberme permitido concluir este trabajo. Porque cada día me muestra el camino a seguir.

A mis padres Elena y Daniel quienes me han apoyado en todo momento, gracias por estar en los momentos más importantes de mi vida. Siempre serán mi fortaleza y ejemplo de vida.

A mi hermano Sergio por su valiosa cooperación para todos los proyectos que hasta ahora hemos realizado.

A todos mis amigos con quienes compartí buenos y malos momentos, aprendí mucho de cada uno de ellos.

A todos mis profesores por compartir sus conocimientos y que han sido de gran utilidad en mi carrera profesional.

“La emoción de descubrir algo nuevo es el
corazón mismo de la investigación”

Gerardo Herrera Corral

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. HIPERTENSIÓN ARTERIAL (HTA)	3
2.1.1. DEFINICIÓN	3
2.1.2. EPIDEMIOLOGIA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL EN MÉXICO (HTA).....	4
2.1.3. TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN.....	4
2.2. FLAVONOIDES	7
2.3. MÚSCULO LISO VASCULAR (MLV)	8
2.3.1. MECANISMO GENERAL DE RELAJACIÓN	8
2.3.2. MECANISMO GENERAL DE CONTRACCIÓN	9
2.4. CROMONAS	11
2.4.1. SÍNTESIS DE CROMONAS	13
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVOS.....	20
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	20
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
6. MATERIAL Y METODOS	21
6.1. SÍNTESIS QUÍMICA	21
6.1.1. MÉTODO GENERAL DE SÍNTESIS:	24
6.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO VASORRELAJANTE EN AORTA DE RATA.....	27
6.2.1. SISTEMA DE REGISTRO	30
6.2.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
6.3. BIOENSAYO ENZIMÁTICO.....	30
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
7.1. CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DE LAS CROMONAS SINTETIZADAS.....	33
7.2. EVALUACIÓN BIOLÓGICA.....	36
7.3. BIOENSAYO ENZIMTICO	40
8. CONCLUSIONES.....	42
9. REFERENCIAS	43

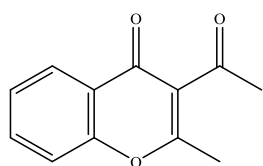
ANEXO.....	50
Espectros RMN ^1H	50
Espectros RMN ^{13}C	55
Espectros de Masas (EIMS).....	60

1. INTRODUCCIÓN

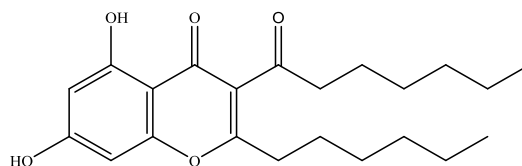
La Hipertensión Arterial (HTA), es una de las enfermedades crónicas más frecuentes en nuestro país, con una prevalencia del 33.3 % en hombres y 30.8 % en mujeres en una población adulta.¹⁻² Los problemas de salud a causa de la HTA son, por mencionar los más importantes, el infarto al miocardio, la hemorragia cerebral, la insuficiencia cardiaca y la insuficiencia renal.¹ La HTA involucra la contracción y pérdida de elasticidad del músculo liso vascular (MLV), provocando un aumento de la resistencia periférica a la circulación sanguínea y un aumento de la presión arterial,³⁻⁵ dicha contracción es reversible al aplicar diversos fármacos vasodilatadores.⁶⁻⁸ Por lo que una de las estrategias para tratar la HTA es el desarrollo de nuevos fármacos vasodilatadores, con menos efectos no deseados o con mayor eficiencia terapéutica en el tratamiento de la HTA.⁷⁻¹⁰ Las investigaciones acerca de nuevas sustancias con efectos relajantes en MLV aislado de aorta de rata destacan a las flavonas e isoflavonas como metabolitos relajantes del MLV,¹¹⁻¹⁶ su estructura química las relaciona directamente con las cromonas.¹⁷

Recientemente en nuestro grupo de trabajo se realizó un estudio de actividad vasorrelajante de cromonas sustituidas en la posición C-2 con grupos alquilo lineales y ramificados, demostrando que el anillo de cromona sin sustituyentes tiene un efecto vasodilatador, el cual puede ser aumentado con la sustitución de grupos alquilo en C-2,¹⁷ este es un descubrimiento novedoso porque establece el precedente de que los anillos de cromona son vasorrelajantes y que pueden ser funcionalizados para realizar estudios de relación estructura-actividad vasorrelajante de cromonas, con el fin de obtener compuestos más potentes y eficientes. Debido a que las flavonas e isoflavonas han demostrado tener actividad relajante en MLV aislado de aorta de rata, se decidió enfocar la presente

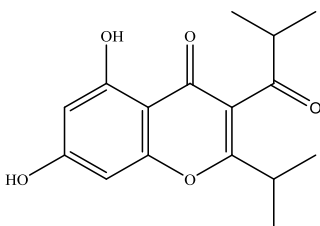
investigación como una contribución a los estudios de estructura-actividad de cromonas basándonos en el arreglo estructural de flavonas e isoflavonas, las cuales son productos naturales generalmente sustituidos con grupos hidroxilo y que se ha informado que este grupo funcional se relaciona con el efecto vasodilatador.¹¹⁻¹⁶ Por lo que en el presente trabajo se llevó a cabo la síntesis de cinco cromonas sustituidas con grupos hidroxilo, alquilo y acilo (A, B, C, D y E). La síntesis se planteó como una necesidad de obtener compuestos en buenos rendimientos ya que resulta complicado realizar estudios preclínicos de un producto natural debido a su bajo rendimiento en su aislamiento a partir de su fuente natural, con esto se contribuye también en la implementación de metodologías sintéticas fáciles y eficientes de las cuales se obtengan buenos rendimientos y de bajos costos. Además de que con las síntesis realizadas se deja abierta la posibilidad de obtener una gran cantidad de análogos.



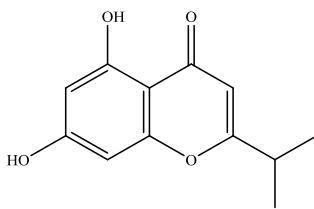
A



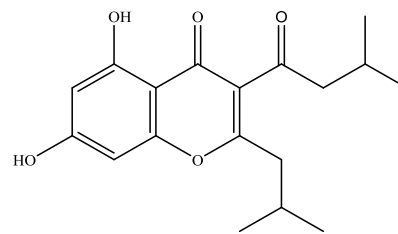
B



C



D



E

2. MARCO TEÓRICO

2.1. HIPERTENSIÓN ARTERIAL (HTA)

2.1.1. DEFINICIÓN

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad que consiste en la elevación sostenida de la presión arterial por arriba de 140 mmHg de presión sistólica y 90 mmHg de presión diastólica (Figura 1), es una enfermedad crónica que generalmente se encuentra asociada a otros trastornos en la salud como son: diabetes mellitus, dislipidemias, obesidad y arterioesclerosis.⁶

La HTA se clasifica según su causa (primaria o secundaria), edad de aparición o estadio de gravedad; de acuerdo a esta última se decide si debe o no tratarse.

I. Primaria: esencial o idiopática. No se identifica causa específica; 90-95% de los casos.

II. Secundaria: Enfermedades parenquimatosas renales y renovasculares, feocromocitoma, síndrome de Cushing, hiperaldosteronismo primario y coartación de la aorta.¹⁸

Categoría	Sistólica(mmHg)	Diastólica (mmHg)
Normal	<130	<85
Normal alta	130 – 139	85 – 89
Estadio 1 (leve)	140 – 159	90 – 99
Estadio 2 (moderada)	160 – 179	100 – 109
Estadio 3 (severa)	180 – 209	110 – 119
Estadio 4 (muy severa)	> 210	>120

Figura 1. Clasificación de la presión arterial en mayores de 18 años¹⁸

2.1.2. EPIDEMIOLOGIA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL EN MÉXICO (HTA)

La hipertensión arterial (HTA) es uno de los principales factores de riesgo para padecer enfermedad cardiovascular, cerebrovascular y falla renal, que son importantes causas de mortalidad en México. En tan solo seis años, entre los años 2000 y 2006, la prevalencia de HTA se incrementó 19.7 % hasta afectar a 1 de cada 3 adultos mexicanos (31.6 %).¹⁹ Los últimos datos de la Encuesta Nacional de Salud demuestran que el incremento de incidencia de HTA en México se ha detenido, manteniéndose prácticamente constantes del año 2006 al 2012.¹ Sin embargo, continúa afectando a más del 30 % de la población. Las complicaciones de la HTA se relacionan directamente con la magnitud del aumento de la tensión arterial y el tiempo de evolución. No hay duda de que, en general, el tratamiento temprano de la hipertensión arterial tiene importantes beneficios. Por esta razón la prevalencia de esta enfermedad en México adquiere mayor importancia si se considera que en el año 2012 el 43.7 % de los adultos con hipertensión no había sido diagnosticado y que únicamente del 73.6 % que reciben tratamiento menos de la mitad tiene la enfermedad controlada.²

2.1.3. TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN

Todos los antihipertensivos actúan en uno o más de los cuatro sitios de control anatómicos del cuerpo humano (Figura 2).

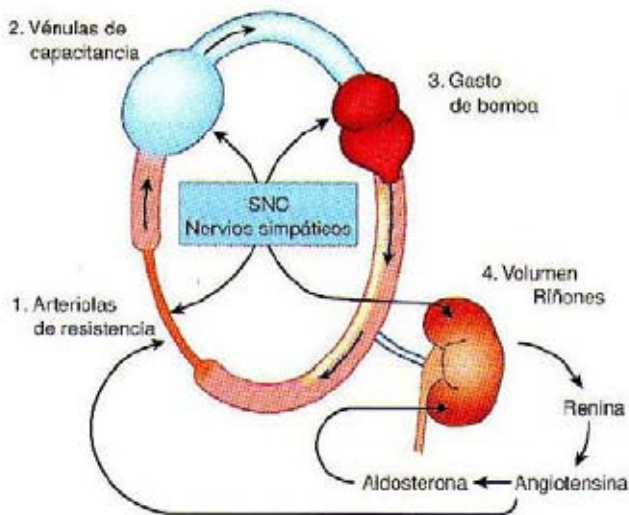
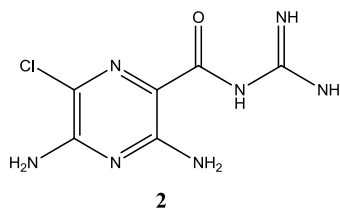
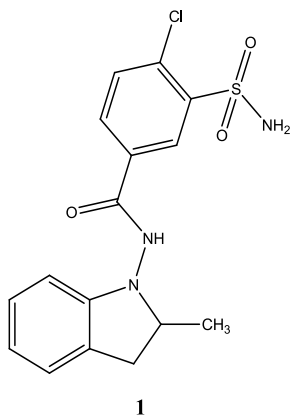


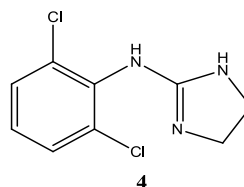
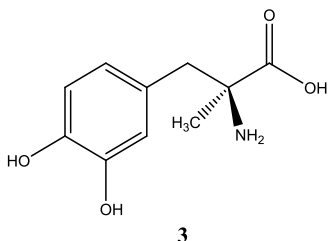
Figura 2: sitios anatómicos de control de presión arterial. (Katzung 2007).

Los antihipertensivos producen sus efectos al interferir en los mecanismos normales de regulación de presión arterial. Debido a sus mecanismos de acción comunes, los fármacos se pueden clasificar de la siguiente forma:

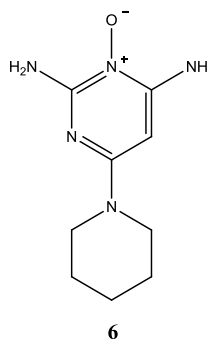
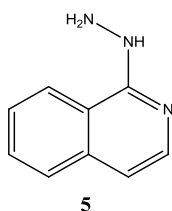
- 1) **Diuréticos**, reducen la presión arterial al disminuir el sodio del cuerpo y el volumen sanguíneo, como lo son la indapamida (**1**) y la amilorida (**2**)



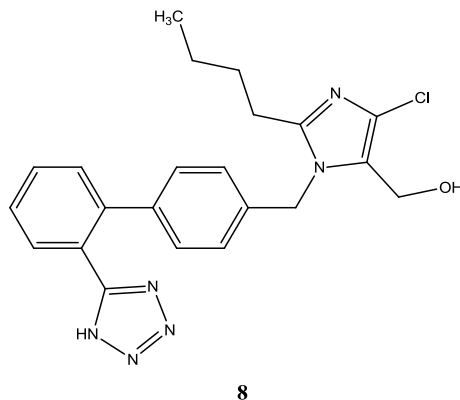
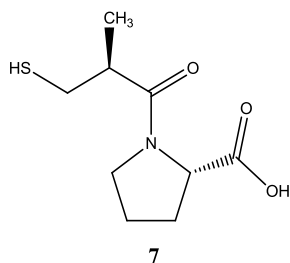
- 2) **Simpaticolíticos**, los fármacos metildopa (**3**) y clonidina (**4**) disminuyen la presión arterial al reducir la resistencia vascular periférica, inhiben el funcionamiento cardíaco e incrementan el estancamiento venoso en los vasos de capacitancia.



- 3) **Vasodilatadores directos**, reducen la presión arterial al relajar el músculo liso vascular, dilatando así la resistencia de los vasos y, en grados variables, aumentando también la capacidad. Dentro de esta clase de medicamentos se encuentran los vasodilatadores orales hidralazina (**5**) y minoxidil (**6**).



- 4) **Agentes que bloquean la producción o acción de la angiotensina II**. Producen la resistencia vascular periférica y potencialmente el volumen sanguíneo. Ejemplo de estos fármacos son el captopril (**7**) que inhibe la enzima convertidora de angiotensina (ECA) peptidil dipeptidasa que hidroliza la angiotensina I a angiotensina II, y el losartan (**8**) que es un bloqueador del receptor de la angiotensina II.⁸

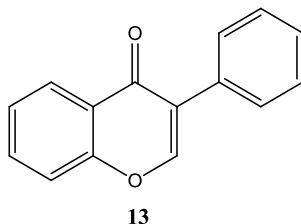
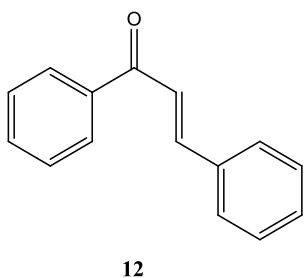
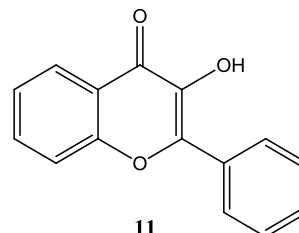
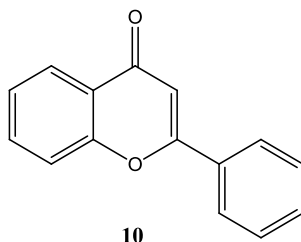
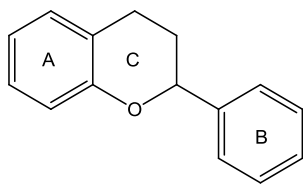


El hecho de que estos grupos de fármacos actúen por mecanismos distintos permite combinar fármacos de uno o más grupos, aumentando la eficacia y en algunos casos disminuyendo la toxicidad.⁸

Recientes estudios han demostrado que la combinación de inhibidores de enzimas fosfodiesterasas (PDE's) en conjunto con otros fármacos ha sido de utilidad para el tratamiento de la hipertensión arterial.²⁰⁻²¹

2.2. FLAVONOIDES

Los flavonoides (**9**) comprenden un gran número de compuestos, conocidos como metabolitos secundarios aislados de plantas de distintos géneros y especies, se clasifican de acuerdo a su estructura, entre las cuales se encuentran las flavonas (**10**), flavonoles (**11**), chalconas (**12**) e isoflavonas (**13**).²²



Los flavonoides tienen diversas actividades biológicas entre las cuales se destacan las antioxidantes²¹, antiinflamatorias²², antivirales²³ y algunos otros presentan actividades relajantes de músculo liso.¹¹

2.3. MÚSCULO LISO VASCULAR (MLV)

El músculo liso está constituido por células que tienen forma de huso, está contenido en las paredes de varios órganos y conductos del cuerpo, entre los que se encuentran: vasos sanguíneos, estómago, intestinos, vesícula, vías aéreas, útero, entre otros.²⁴

2.3.1. MECANISMO GENERAL DE RELAJACIÓN

En el proceso de relajación del MLV intervienen: hormonas, canales iónicos, péptidos y neurotransmisores, los cuales actúan incrementando la concentración de adenosinmonofosfato cíclico (AMPC), guanosinmonofosfato cíclico (GMPc) ó inhibiendo

la entrada de calcio extracelular,²⁴⁻²⁵ siendo estos los principales mecanismos por los cuales actúan los relajantes en el músculo liso vascular como se representa en la figura 3.

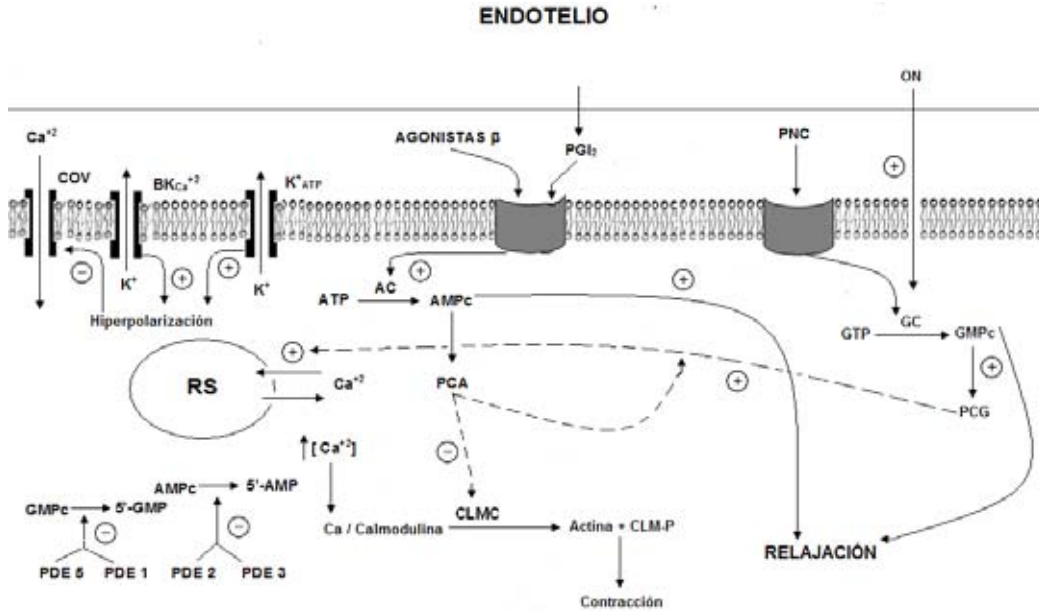


Figura 3. MECANISMO DE RELAJACIÓN DEL MÚSCULO LISO VASCULAR. COV= canal operado por voltaje, $BK_{Ca^{+2}}$ = canal de potasio activado por calcio de larga conductancia, K^{+}_{ATP} = canales de potasio sensibles a ATP de conductancia intermedia, RS= retículo sarcoplásmico, PGI_2 = prostaciclina, ATP= adenosíntrifosfato, AC= adenilatociclasa, AMPc= adenosinmonofosfato cíclico, PCA= proteína cinasa A, CLM= cadena ligera de miosina, CLMC= cadena ligera de miosinacinas, PNC= péptido natriurético C, GTP= guanosíntrifosfato, GC= guanilatociclasa, GMPc= guanosinmonofosfato cíclico, PCG= proteína cinasa G, PDE= fosfodiesterasa (Modificado de Sanders, K. 2001 pp. 1438)²⁵

2.3.2. MECANISMO GENERAL DE CONTRACCIÓN

En el proceso de contracción del MLV intervienen: hormonas, péptidos, enzimas, neurotransmisores y canales iónicos, los cuales actúan incrementando la entrada de calcio extracelular ó activando la salida de calcio del retículo sarcoplásmico, siendo estos los principales mecanismos por los cuales actúan los agentes contráctiles del músculo liso vascular como se puede ver en la figura 4.

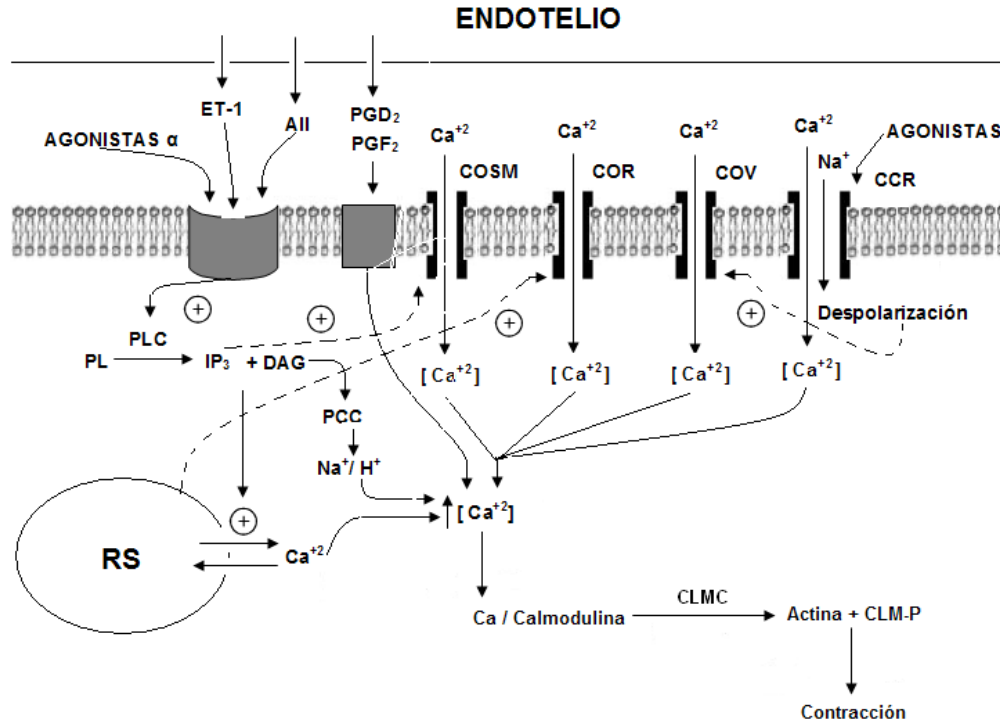
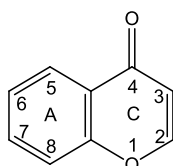


Figura 4. MECANISMO DE CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO VASCULAR. *ET-1*= endotelina uno, *AII*= angiotensina dos, *PL*= fosfatidilinositol, *PLC*= fosfolipasa C, *IP3*= inositoltrifosfato, *DAG*= diacilglicerol, *PCC*= proteína cinasa C, *RS*= retículo sarcoplásmico, *CLM*= cadena ligera de miosina, *CLMC*= cadena ligera de miosinacinas, *PG*= prostaglandina, *COSM*= canal de calcio operado por segundo mensajero, *COR*= canal de calcio operado por reservas, *COV*= canal de calcio operado por voltaje, *CCR*= canal de calcio controlado por receptores (Modificado de Sanders, K. 2001 pp. 1438).²⁵

El proceso contráctil del músculo liso vascular se puede revertir mediante el uso de vasodilatadores como las flavonas o sus derivados las cromonas, vía la inhibición de fosfodiesterasas, y además pueden usarse como una alternativa en el tratamiento de la hipertensión arterial.¹¹

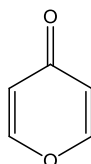
2.4. CROMONAS

Las cromonas se encuentran en una gran variedad de plantas a las cuales se le atribuyen diversos efectos terapéuticos, las cromonas están formadas por dos anillos que constituyen el núcleo conocido como *4H-1-benzopiran-4-ona* (**14**).²⁶



14

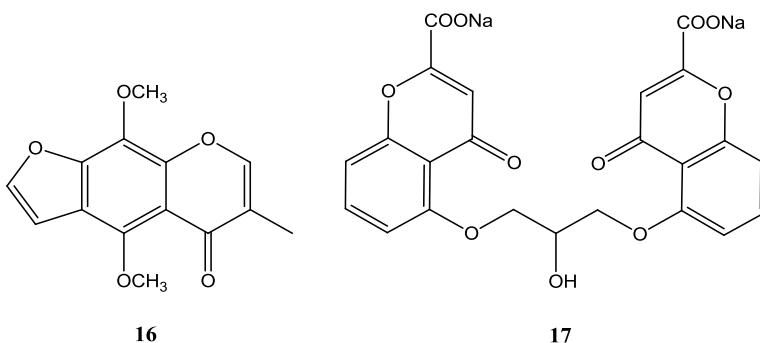
El anillo de cromona es la base estructural de varios flavonoides, como las flavonas (**10**), flavonoles (**11**) e isoflavonas (**13**). Además tienen una reactividad muy similar a la *4H-piran-4-ona* (**15**).²⁶

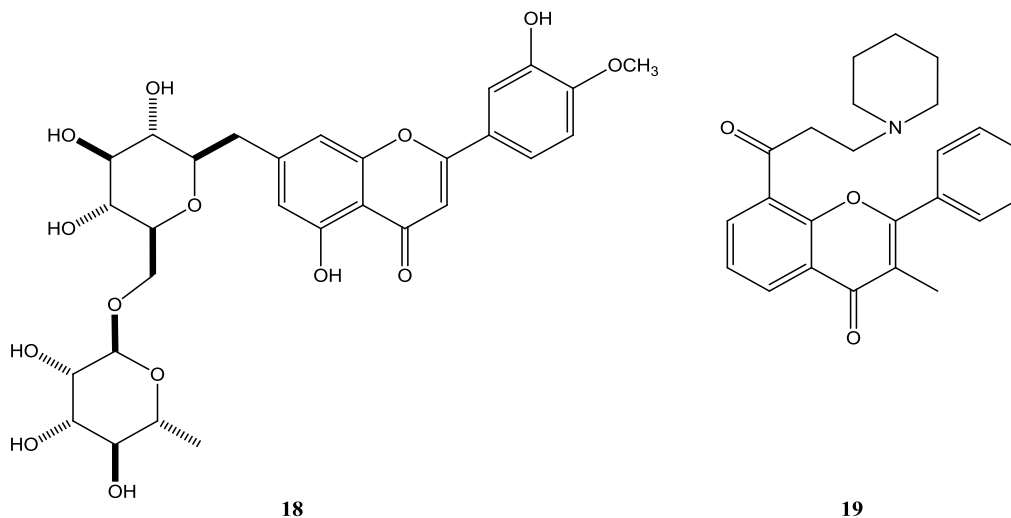


15

Se ha llegado a clasificar como una estructura que puede servir como base para el desarrollo de nuevos fármacos debido a que existe la posibilidad de modificar químicamente su estructura, lo que puede derivar en la obtención de variadas actividades biológicas, de hecho son múltiples los efectos farmacológicos que se han informado de varias cromonas, como citotóxicas,²⁷⁻²⁹ antivirales,³⁰⁻³¹ antibacterianos³²⁻³³ y relajantes del músculo liso de vías aéreas y también vascular.¹¹⁻¹⁷

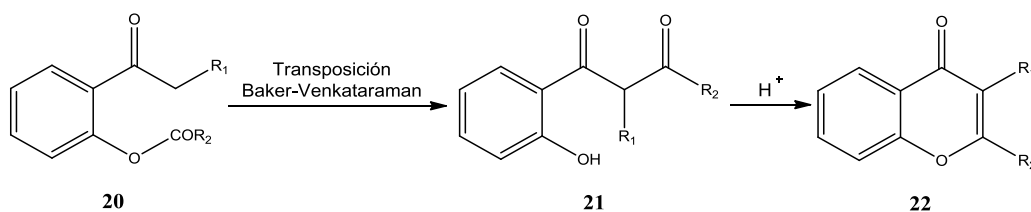
Aunque hay un gran número de derivados de cromonas, conocidos por sus propiedades farmacológicas sólo algunos se han llegado a utilizar como medicamentos. La Kelina (**16**) es una cromona extraída de las semillas de la planta *Ammivisnaga*, fue la primera cromona utilizada clínicamente y se ha utilizado durante siglos en la región del Mediterráneo como un diurético muy recomendado en el cólico renal.³⁴ Por otra parte, en 1950, la kelina (**16**) se utilizó como un relajante del músculo liso en el tratamiento de la angina de pecho y asma.³⁵ Sin embargo, el uso actual de kelina como un agente terapéutico se centra en el tratamiento del vitíligo, un desorden de pigmentación en la piel.³⁶ Actualmente se comercializan en nuestro país medicamentos que contienen cromonas como por ejemplo: el cromoglicato de sodio (**17**), Lomudal ®, utilizado como un estabilizador de los mastocitos en la rinitis alérgica, el asma y la conjuntivitis alérgica.³⁷ La diosmina (**18**), Daflon ® se usa para el tratamiento de enfermedades venosas³⁸ y flavoxato (**19**) un relajante del músculo liso para el tratamiento de la incontinencia urinaria.³⁹





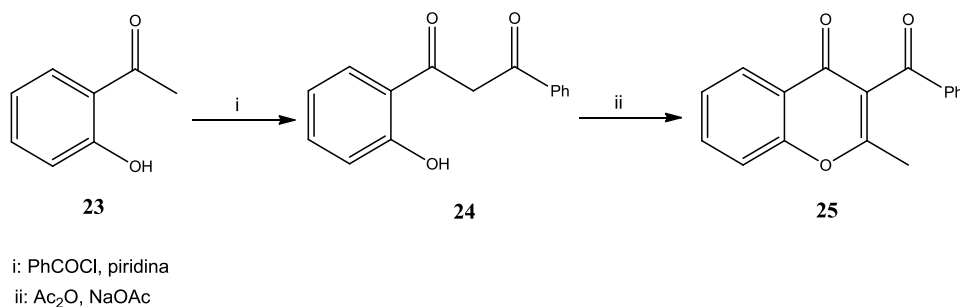
2.4.1. SÍNTESIS DE CROMONAS

Las cromonas se pueden sintetizar bajo condiciones ácidas o básicas.⁴⁰ El método más común es la síntesis de benzopiranoas sustituidas en la posición C-2 y C-3 a partir de la esterificación de de *o*-hidroxiacetofenona para obtener un éster (**20**) que por medio de la transposición de Baker–Venkataraman se obtiene un compuesto dicarbonílico (**21**). El cual es ciclado al anillo de cromona a reflujo con un ácido fuerte como: ácido yodhídrico, ácido polifosfórico (APP), ácido acético anhidro, ácido clorhídrico, ácido *p*-toluensulfónico (TsOH), ácido perclórico y ácido sulfúrico.⁴¹⁻⁴⁴

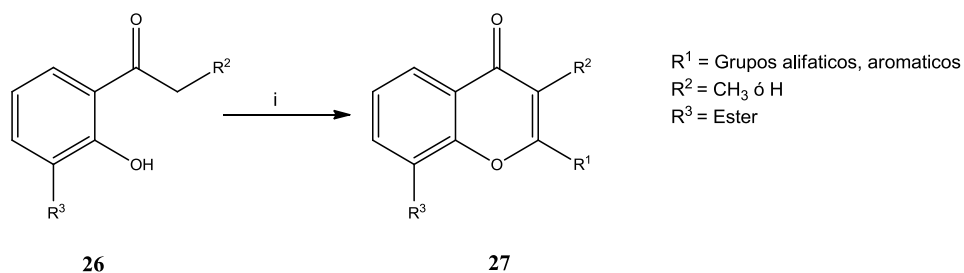


Aunque el uso de catalizadores básicos en el cierre de anillo para la formación de cromonas no es tan común en comparación con el uso de catalizadores ácidos, a veces puede tener resultados satisfactorios.⁴⁰

En el año 2005 Gabbit y colaboradores sintetizaron 3 acilcromonas por la acilación de 2-hidroxiacetofenona con anhídridos de ácido en presencia de acetato de sodio.⁴⁵ Para ello se empleó 2-hidroxiacetofenona (**23**) que se obtenía fácilmente por la *O*-acilación de *o*-hidroxiacetofenona (**23**) seguido por la trasposición de Baker–Venkataraman (BV). Con la acilación de las 1,3 dicetonas (**24**) con anhídrido acético se obtienen las 2-alkil-3-aroylcromonas (**25**) con rendimientos altos. Esta reacción de condensación no solo es aplicable con anhídrido acético, también se puede utilizar otros anhídridos como lo son: anhídrido propiónico y anhídrido butírico.⁴⁶

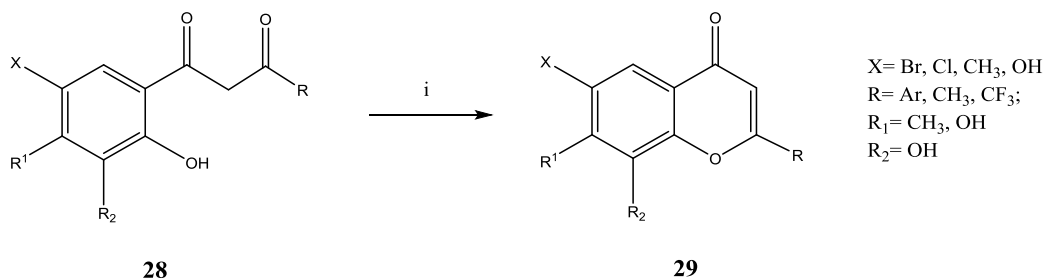


Otra alternativa para la síntesis de cromonas es la reportada en el año 2005 por Ganguly y colaboradores, donde las cromonas se obtienen en un solo paso mediante una modificación a la reacción de Baker-Venkataraman. Un cloruro de acilo (**26**) es añadido a una solución de hidroxiacetofenona en piridina anhidra en una atmósfera inerte (N₂), finalmente se añade diazobiscicloundeceno (DBU) lentamente y se calienta la reacción hasta 80° C para cerrar el anillo y formar la cromona (**27**).⁴⁷



i: $R^1\text{COCl}$, Piridina, DBU

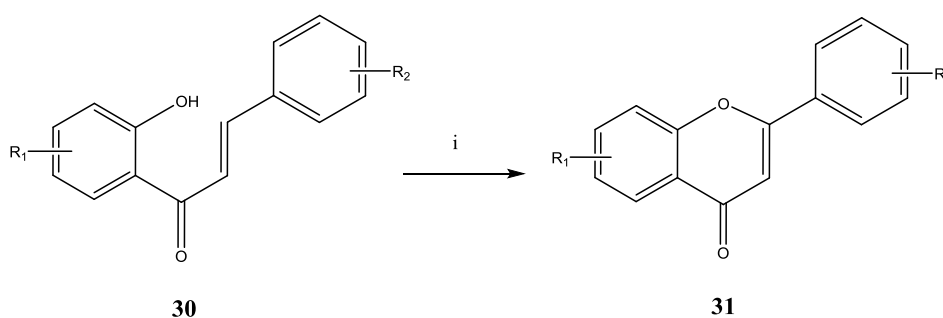
En el año 2005 se reportó una síntesis sencilla mediante el uso de microondas para flavonas y cromonas, a través de la ciclación de 1-(2-hidroxiaril)-3-aryl-1,3-propanodiona. En su estudio se sintetizaron en 5 minutos, a través de la deshidratación del intermediario 1,3-propanodiona (**28**) con su posterior ciclación hacia las flavonas y cromonas correspondientes (**29**), esto se llevó a cabo en etanol y presencia de cloruro cúprico (CuCl_2) bajo irradiación de microondas.⁴⁸



i: CuCl_2 , EtOH/ Microondas, 5min

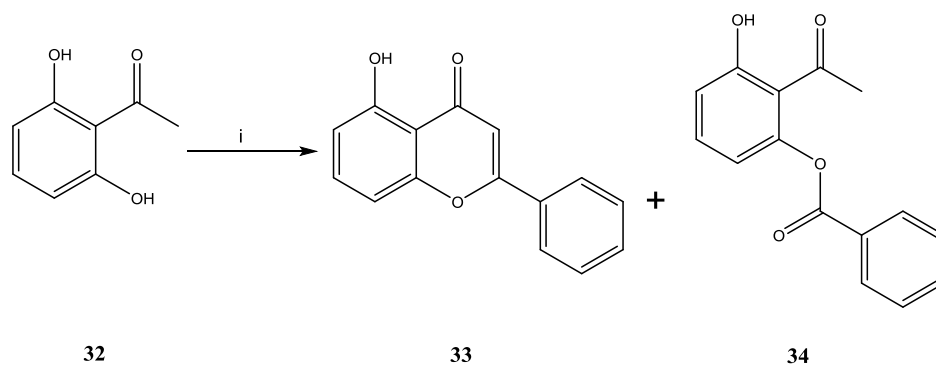
En los últimos años, las reacciones químicas en fase sólida tienen muchas ventajas incluyendo una buena selectividad, alto rendimiento, operación simple, y no hay contaminación. Muchos investigadores han aplicado este método en las síntesis de flavonas y cromonas.⁴⁹

Se realizaron experimentos con soportes de sílica gel con cloruro de indio o bromuro de indio (InCl_3 o InBr_3) al 15-20 %, como una nueva ruta para la oxidación superficial y eficiente de 2-hidroxichalconas (**30**) y producir las flavonas correspondientes (**31**), empleando catalizadores de apoyo sólido y condiciones libres de disolvente. Estos catalizadores se preparan de manera eficiente y fácil bajo condiciones de reacción suaves y permiten la obtención de productos con rendimientos del 98-80 %.⁵⁰



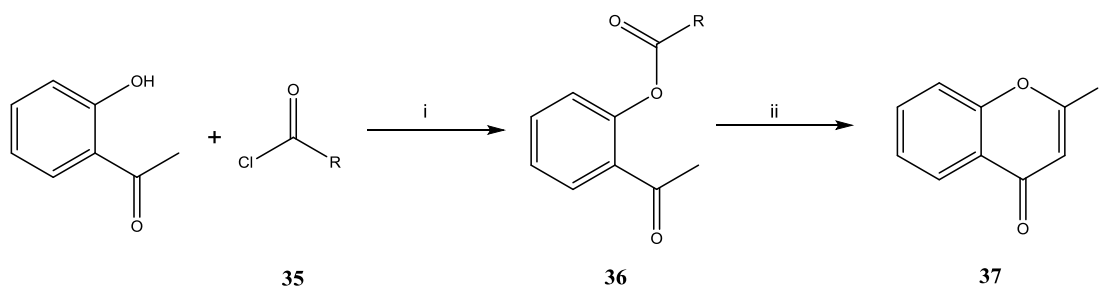
i: Soporte de gel de sílice InBr_3 o InCl_3
 $R_1, R_2 = \text{H, OH, O-Me, Ar}$

Por otra parte Chin Fei Chee y colaboradores llevaron a condiciones de reflujo una solución de 2',6'-dihidroacetofenona (**32**) en acetona anhidra con un equivalente de cloruro de benzoilo en presencia de carbonato de potasio (K_2CO_3) para producir la 5-hidroxiavona (**33**) con ligeras trazas de su éster correspondiente (**34**).⁵¹



i: PhCOCl, K₂CO₃, Acetona

En el estudio realizado por Rodriguez-Ramos y colaboradores sintetizaron cromonas sustituidas en la posición C-2 con una modificación a la metodología reportada en Ganguly. Después de obtener el éster fenólico (**36**) correspondiente al cloruro de acilo (**35**), se llevó a cabo como segundo paso la ciclación del anillo de cromona (**37**), para ello se utilizó piridina y DBU a una temperatura de reflujo.¹⁷



i: DBU, Piridina, CH₂Cl₂, 30°C, 6 h
ii: DBU, piridina, reflujo, 12 h

R: Cadenas alifaticas

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, la investigación científica relacionada al tratamiento de la HTA busca el desarrollo de fármacos que promuevan la relajación del MLV así como la inhibición de los procesos inflamatorios que provocan la contracción, enfatizando que un control correcto de la HTA implica la utilización combinada de ambos tipos de fármacos. En resumen las investigaciones en el tratamiento de la HTA se dirigen a la farmacología del músculo liso, las implicaciones del sistema inmunitario, la integración de la genética, y el medio ambiente.

Recientes estudios han demostrado propiedades vasorrelajantes de productos naturales como las flavonas, cuyo mecanismo de acción farmacológico se relaciona con la inhibición de fosfodiesterasas (PDE). Así mismo productos sintéticos han demostrado tener propiedades vasorrelajantes, como las cromonas y debido a que un fármaco ideal para el tratamiento de la HTA, sería aquel que tenga un efecto relajante directo sobre las paredes de la aorta, causando disminución selectiva de la presión arterial. Se propuso la obtención de nuevas cromonas que den nueva información acerca de la relación estructura actividad que sirva para desarrollar un prototipo seguro y eficaz en el tratamiento de esta enfermedad.

4. HIPÓTESIS

Utilizando K_2CO_3 y acetona a reflujo, en un solo paso se obtendrán 5 cromonas sustituidas en C-2 con grupos alquilo, en C-3 con grupos acilo, en C-5 y C-7 con grupos hidroxilo, dichas cromonas presentarán un efecto relajante en la aorta aislada de rata, la diferencia entre la potencia y la efectividad de las cromonas evaluadas será consecuencia de sus diferencias estructurales.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar cromonas sustituidas con grupos alquilo, acilo e hidroxilo y evaluar su efecto relajante en el modelo de aorta aislada de rata.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Llevar a cabo la síntesis de las cromonas **A-E** a partir de 2',4',6'-trihidroxiacetofenona y *o*-hidroxiacetofenona a reflujo con K₂CO₃ y acetona en presencia de cloruros de acilo.
- Purificar los compuestos obtenidos por métodos de separación cromatográficos y de cristalización.
- Llevar a cabo la caracterización estructural de los compuestos sintetizados por métodos físicos, espectroscópicos RMN ¹H y ¹³C y espectrométricos EM.
- Evaluar la actividad relajante de las cromonas sobre MLV en un modelo de aorta aislada de rata.
- Adicionalmente evaluar si las cromonas sintetizadas pueden inhibir la degradación de AMPc o GMPc a través de la inhibición de la actividad de la enzima fosfodiesterasa (PDE) como posible mecanismo de acción farmacológico.

6. MATERIAL Y METODOS

La metodología del presente trabajo se dividió en tres partes, la primera está enfocada en la síntesis química de las cromonas así como su caracterización estructural, la segunda parte describe como se llevó a cabo la evaluación biológica del efecto vasorrelajante en aorta de rata y por último el bioensayo enzimático donde los compuestos sintetizados y fármacos son comparados para medir la actividad de las enzimas fosfodiesterasas.

6.1. SÍNTESIS QUÍMICA

REACTIVOS

- *o*-hidroxiacetofenona (Sigma-Aldrich 98%)
- 2',4',6'-trihidroxiacetofenona (Sigma-Aldrich 97%)
- Cloruro de isovaleroilo (Sigma-Aldrich 98%)
- Cloruro de heptanoilo (Sigma-Aldrich 99%)
- Cloruro de acetilo (Sigma-Aldrich 98%)
- Cloruro de isobutirilo (Sigma-Aldrich 98%)
- Piridina (Sigma-Aldrich 99%)
- DBU (Sigma-Aldrich 98%)
- Carbonato de potasio K₂CO₃ (Sigma-Aldrich 99%)
- N₂ (Infra 99%)
- Ácido clorhídrico (FLUKA 30-35%)
- Sulfato de sodio anhidro (Sigma-Aldrich 99%)
- Silica gel para columna (Kieselgel 60; 0.063-0.200 mm)

- Silica gel para cromatografía en capa fina CCF (FLUKA alta pureza, sin sulfato de calcio)

DISOLVENTES

Todos los disolventes fueron grado reactivo, los cuales fueron destilados previamente antes de su uso y recuperándolos después de su uso por medio de un rotavapor.

- Hexano
- Acetato de etilo (AcOEt)
- Acetona
- Metanol
- Cloruro de metileno
- Etanol

MATERIALES

- Matraces balón de 50 mL
- Columnas de cromatografía con altura de 60 cm y diámetro de 4 cm.
- Pipetas
- Matraces Erlenmeyer de 125 mL
- Embudo de separación de 150 mL
- Cajas petri
- Embudos de tallo corto

OTROS

- Jeringas de 5 mL
- Tapones de hule
- Pinzas de tres dedos
- Soporte universal
- Anillo metálico
- Agitadores magnéticos
- Algodón
- Tapón septum

EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Balanza analítica (OHAUS Explorer)
- Rotavapor (BÜCHI R-114)
- Aparato capilar para determinar punto de fusión (Electro-thermal Mel-Temp)
- Bomba de vacío (BÜCHI V-700)
- Bomba de agua sumergible
- Placas de agitación y calentamiento (IKA CMAG HS 7)
- Espectrometro RMN (Varian VXR-3005 y Varian Unity Plus 500)
- Espectrometro EM (Hewlett-Packard 5890)

Los productos obtenidos fueron purificados mediante cromatografía en columna tipo “flash” (Hex:AcOEt 8:2).

El curso de la reacción se monitoreó mediante cromatografía en capa fina (TLC) sobre placas de aluminio (0.2 mm grosor) y empleando indicador fluorescente a 254 nm, usando una mezcla de hexano/acetato de etilo (8:2) como eluyente.

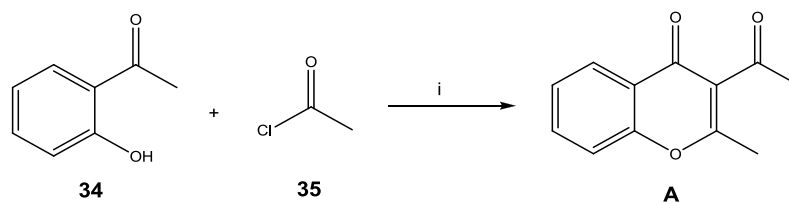
Para procesar los espectros de RMN, se empleó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se evaluaron en ppm. Las muestras fueron disueltas en CDCl_3 .

Los desplazamientos químicos (δ) se reportaron en partes por millón (ppm) a partir de la señal de TMS. Para indicar la multiplicidad de las señales en RMN ^1H , se utilizan las abreviaturas: (*s*) simple, (*d*) doble, (*t*) triple, (*c*) cuádruple y (*m*) múltiple. En los casos en que la multiplicidad de una señal no pudo determinarse se reporta el intervalo de δ en el cual se observa. Por último las constantes de acoplamiento (*J*) se reportaron en Hertz (Hz).

6.1.1. MÉTODO GENERAL DE SÍNTESIS:

Síntesis de: 3-acetil-2-metil-4*H*-cromen-4-ona (**A**)

Se llevó a cabo la síntesis de **A** según se informa en la metodología de Ganguly.⁴³ La cromona sustituida en C-2 por un metilo y acilada en C-3 fue sintetizada a partir de *o*-hidroxiacetofenona (**34**) haciéndola reaccionar con cloruro de acetilo (**35**), en presencia de DBU y piridina (Esquema 1).



i: DBU/Piridina; 80-90 °C

Esquema 1: Síntesis general de **A**

En un matraz balón de 50 mL seco y con tapón septum, se disolvió 1 equivalente de *o*-hidroxiacetofenona en piridina anhidra, en atmósfera de N₂ con 3 equivalentes del cloruro de acetilo (**35**). Posteriormente se añadieron 3 equivalentes de DBU gota a gota, mediante una jeringa a través del tapón. Se calentó de 90-110 °C con agitación constante por 24 horas, se siguió el curso de la reacción por CCF. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, a continuación en un baño de hielo se acidificó la reacción con HCl al 10 %, se extrajo con acetato de etilo, se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró sobre algodón y concentró a presión reducida.

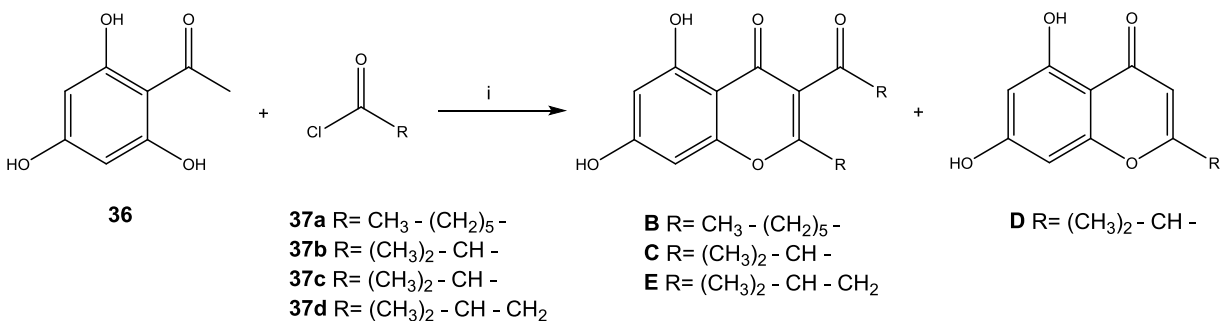
El producto crudo se purificó por cromatografía de adsorción en columna de vidrio abierta de 3 cm de diámetro y, 40 cm de altura empacada con gel de sílice malla 230-400, usando una mezcla de hexano-acetato de etilo 9:1 como eluyente. De cada fracción se obtuvo su placa de CCF, reuniendo aquellas con el mismo contenido químico.

El producto puro fue caracterizado por espectrometría de masas y RMN ¹H y ¹³C; se determinaron sus características físicas.

Síntesis de: *3-heptanoil-2-hexil-5,7-dihidroxi-4H-cromen-4-ona* (**B**), *5,7-dihidroxi-3-isobutiril-2-isopropil-4H-cromen-4-ona* (**C**), *5,7-dihidroxi-2-isopropil-4H-cromen-4-ona* (**D**), *5,7-dihidroxi-2-isobutil-3-(3-metilbutanoil)-4H-cromen-4-ona* (**E**).

Para la síntesis de las cromonas **B**, **C**, **D** y **E** se procedió según el método informado por Chin Fei Chee y colaboradores,⁵¹ las cromonas 5,7-dihidroxiadas, sustituidas en C-2 con grupos alquilo y aciladas en C-3 fueron sintetizadas a partir de 2',4',6'-trihidroxiacetofenona y cloruros de acilo, en presencia de carbonato de potasio K₂CO₃, utilizando acetona con 1 % de agua como disolvente. Donde se obtuvieron tres

acilcromonas (**B**, **C** y **E**) y una cromona C-2 sustituida con metilo (**D**) en un solo paso sin que se haya observado productos de transposición de Baker-Venkataraman. (Esquema 2).



i: K₂CO₃/acetona 1% H₂O; 60° C

Esquema 2: Síntesis general de **acilcromonas**

En un matraz balón de 50 mL se disolvió 1 equivalente de 2',4',6'-trihidroxiacetofenona en acetona (1 % p/p de agua) se adicionaron 10 equivalentes de carbonato de potasio K₂CO₃. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos hasta tener una mezcla homogénea y se agregaron 3 equivalentes de cloruro de acilo correspondiente. Posteriormente la mezcla de reacción se sometió a un sistema de reflujo con una temperatura de 60° C y agitación por 24 horas en una atmosfera abierta, la reacción se monitoreo mediante CCF.

La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, la acetona se evaporo en un rota evaporador, el producto crudo fue extraído con 20 mL de agua y 20 mL de AcOEt. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró sobre algodón y se concentró con ayuda del rota evaporador.

Los productos crudos se purificaron y se caracterizaron de la misma manera que la cromona

A.

6.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO VASORRELAJANTE EN AORTA DE RATA

REACTIVOS Y SUSTANCIAS:

- Solución de Krebs
 - NaCl (Merck, Darmstadt, Germany).
 - KCl (Merck, Darmstadt, Germany).
 - NaH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, Germany).
 - MgSO₄•7H₂O (Merck, Darmstadt, Germany).
 - CaCl₂•2H₂O (Merck, Darmstadt, Germany).
 - NaHCO₃ (Merck, Darmstadt, Germany).
 - Glucosa (Merck, Darmstadt, Germany).
- Metanol (MeOH) Mallinckrodt Baker S.A de C.V. (México).
- El agua para cromatografía de líquidos (CL) como fase móvil fue purificada en un purificador de agua Milli-Q System (Millipore S.A. de C.V. México).
- Tween 80

FÁRMACOS

- (-)-Norepinefrina (NE) Sigma-Aldrich.
- Acetilcolina (ACh) Sigma-Aldrich.
- Citrato de Sildenafil Sigma-Aldrich.
- Rolipram Sigma-Aldrich.
- Pentobarbital sódico (Anestesal Pfizer).

EQUIPO

- Polígrafo Biopack System MP100
- Transductores de fuerza marca Grass FT 03E acoplado a una computadora, utilizando el software Acknowledge 3.9.0.
- Purificador de agua Milli-Q system (Millipore S.A. de C.V., México).

Se utilizaron ratas macho (Wistar) con un peso entre 200-300 g, se obtuvieron del bioterio de la división de estudios de posgrado e investigación (FES-Zaragoza, México), mantenidos bajo condiciones convencionales de bioterio y alimentados con dieta estándar (Purina Pellets) y libre acceso al agua, los experimentos se realizaron siguiendo los lineamientos especificados en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio) y de acuerdo a las reglas internacionales de cuidado y uso de animales de laboratorio.⁵⁵

La contracción inducida con (-)-Norepinefrina (NE) 0.1 μ M en anillos de aorta de rata se determinó de acuerdo al modelo experimental reportado previamente por Rodríguez-Ramos y colaboradores.¹⁷

Los fármacos y las cromonas sintetizadas fueron suspendidos en una solución al 0.05 % de Tween 80 en agua destilada. La concentración final de Tween 80 fue menos del 0.0005 %, esta concentración no afecta la respuesta del músculo liso evaluado. Los fármacos en solución o suspensión se prepararon unos minutos antes de utilizarlos en los experimentos.

Las ratas fueron sacrificadas con una dosis (95 mg/kg) de pentobarbital sódico vía intraperitoneal. Posteriormente se realizó la disección del animal para obtener la aorta, limpiándola de todo el tejido conjuntivo y grasa adheridos, después se depositó en un contenedor con solución de Krebs y con burbujeo constante de gas carbógeno [5 % CO₂ – 95 % O₂ (Infra S.A. de C.V.)], la aorta fue dividida en ocho anillos de aproximadamente 2 mm de longitud, cada anillo fue sumergido en una cámara para órgano aislado que contenía 10 mL de solución de Krebs a 37 °C y con burbujeo constante de gas carbógeno, sujetado en cada extremo por dos ganchos de alambre de nicromel. Cada uno de los anillos fue sometido a una tensión inicial de 4 g, dejando estabilizar el tejido por 60 minutos.

Después del periodo de estabilización, los anillos de aorta fueron contraídos con NE (0.1 μM) en dos ocasiones en intervalos de 30 minutos cada uno y lavados después de cada estimulación con solución de Krebs. La integridad del endotelio vascular se verificó adicionando ACh (10 μM) en la última contracción con NE, el resultado de la adición de ACh se interpretó de la siguiente forma: un endotelio intacto alcanza una relajación de más del 84 %, la ausencia de endotelio se observa por una falta de relajación después de la adición de ACh.

Treinta minutos después los anillos fueron contraídos con NE (0.1 μM) y cuando el tejido alcanzó su máximo efecto contráctil y se observó que la contracción era sostenida, se adicionaron concentraciones acumulativas (10⁻⁹-10⁻⁴ M) de los compuestos y fármacos de referencia.

6.2.1. *SISTEMA DE REGISTRO*

Los cambios de tensión del músculo liso se registraron en gramos de fuerza a través de un polígrafo y los datos fueron digitalizados y analizados utilizando el software Acknowledge 3.9.0.8

6.2.2. *ANÁLISIS ESTADÍSTICO*

Los valores de la concentración efectiva CE_{50} para el efecto relajante se calcularon por una regresión lineal. Utilizando sólo aquellos valores de la curva dosis-respuesta que describían mejor la recta con un coeficiente de correlación $r^2 = 0.9$. Todos los valores se registraron como el promedio \pm E.E.M. de al menos seis experimentos. La significancia estadística entre los valores obtenidos se determinó por un análisis de varianza de una vía, seguido de la prueba t de Dunnett. Una $P < 0.05$ será considerada una diferencia estadísticamente significativa.

6.3. *BIOENSAYO ENZIMÁTICO*

REACTIVOS Y SUSTANCIAS:

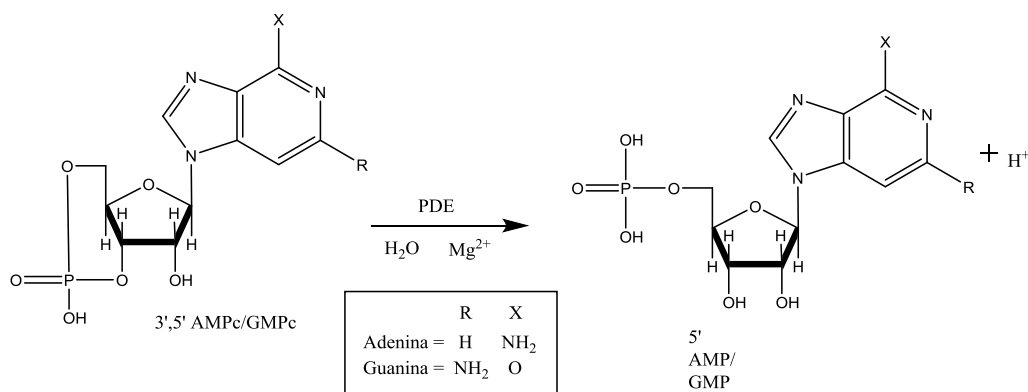
- Fosfodiesterasas de cerebro de bovino BIOMOL International, Inc.
- 5'-nucleotidasa de veneno de la víbora *Crotalus atrox* BIOMOL International, Inc.
- 3',5'-AMPc BIOMOL International, Inc.
- 3',5'-GMPc BIOMOL International, Inc.
- Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4) BIOMOL International, Inc.
- Reactivo de color BIOMOL GREENTM BIOMOL International, Inc.
- Acetonitrilo (CH_3CN) Mallinckrodt Baker S.A de C.V. (México).
- Metanol (MeOH) Mallinckrodt Baker S.A de C.V. (México).

EQUIPO

- Bio-tek ELx800 Lector de microplacas.

Para el ensayo de fosfodiesterasas, los fármacos y las cromonas fueron disueltos en una mezcla binaria de acetonitrilo y agua (1:1). El ensayo de inhibición enzimática se llevó a cabo como marca la metodología de screening de compuestos de prueba en el kit de ensayo de BIOMOL cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE). El método empleado para medir la actividad de las enzimas fosfodiesterasas es un método colorimétrico diseñado para llevarse a cabo en una microplaca de 96 pozos. La base del ensayo es la degradación del AMPc o GMPc por las enzimas fosfodiesterasas y posterior adición de la enzima 5'-nucleotidasa, la cual liberará al grupo fosfato del nucleótido cíclico. El fosfato inorgánico liberado se cuantificó a través de una reacción colorimétrica con verde de malaquita, contenido en el reactivo de color BIOMOL GREEN.

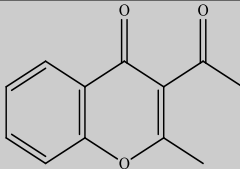
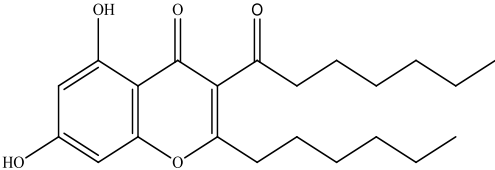
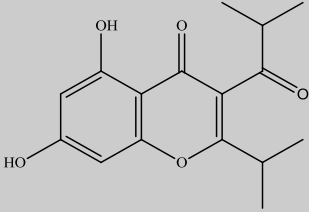
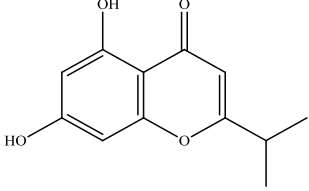
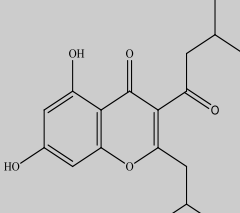
Los principios activos y fármacos fueron probados a diferentes concentraciones en experimentos independientes: cromonas (1.0-300 μM), Rolipram (3.0-300 μM), citrato de Sildenafil (0.001-300 μM).



Esquema 3: Hidrólisis de 3',5' AMPc/GMPc a través de fosfodiesterasas (PDE). (Lugnier C. 2006).⁵³

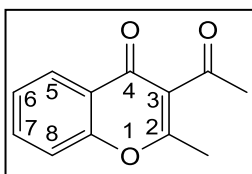
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez purificadas las cromonas se llevó a cabo la caracterización de las mismas, se realizaron las pruebas de aspecto físico y punto de fusión, además se calculó el rendimiento obtenido a partir de las hidroxiafetofenonas correspondientes. Los resultados se muestran en el cuadro 1.

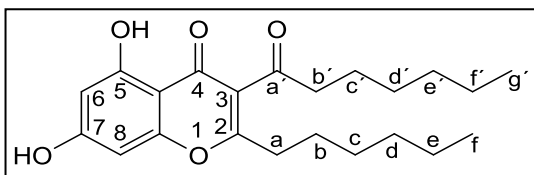
	Cromona	Aspecto	Rendimiento (%)	Punto de fusión (°C)
A		Cristales blancos en forma de agujas	53	88
B		Cristales ligeramente amarillos	50	80
C		Cristales amorfos rojizos	30	198
D		Cristales en forma de aguja ligeramente rojizos	30	178
E		Cristales en forma de aguja ligeramente amarillos	40	130

7.1. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS CROMONAS SINTETIZADAS

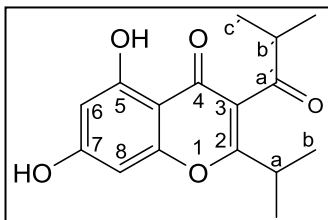
La caracterización estructural de las cromonas **A-E** se llevó a cabo mediante el uso de técnicas espectroscópicas RMN ^1H y ^{13}C y espectrométricas por EM.



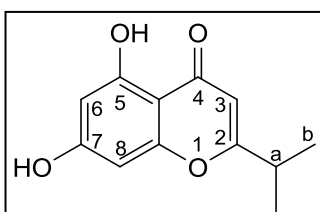
Cromona **A**: 3-acetil-2-metil-4*H*-cromen-4-ona RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.82 (1H, dd, H-5), 7.54 (1H, ddd, $J = 8.1, 7.5, 1.7$ Hz, H-7), 7.33 (1H, ddd, H-6), 7.12 (1H, dd, H-8), 2.56 (3H, s, CH_3CO), 2.35 (3H, s, CH_3). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 197.52 ($-\text{COCH}_3$), 169.47 (C-4), 149.07 (C-2), 133.42 (C-8a), 130.74 (C-7), 130.28 (C-5), 126.19 (C-3), 126.03 (C-4a), 123.84 (C-6), 99.99 (C-8), 29.33 ($-\text{COCH}_3$), 21.14 (CH_3). EIMS m/z (intensidad relativa %): 206 [M^+] (12), 121 (100), 178 (6).



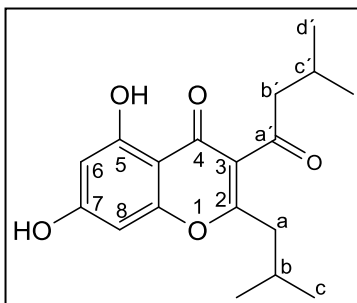
Cromona **B**: 3-heptanoil-2-hexil-5,7-dihidroxi-4*H*-cromen-4-ona RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 12.59 (1H, s, OH-5), 6.62 (1H, s, OH-7), 6.33 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.28 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 2.93 (2H, t, $J = 9.7, 5.2$ Hz, b'), 2.63 (2H, t, a), 1.78 – 1.59 (4H, m, $J = 14.8, 7.2$ Hz, c', b), 1.43 – 1.22 (12H, m, d', e', f', c, d, e), 0.93 – 0.82 (6H, m, $J = 6.3$ Hz, g', f). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 203.66 (a'), 180.14 (C-4), 170.84 (C-2), 162.59 (C-7), 162.47 (C-5), 157.22 (C-8a), 122.21 (C-3), 104.83 (C-4a), 100.02 (C-6), 99.77 (C-8), 94.19 (b'), 44.72 (d), 32.58 (e'), 31.59 (c), 31.37 (d'), 28.97 (a), 28.90 (b), 27.72 (c'), 23.93 (g'), 22.44 (f'), 13.97 (g', f). EIMS m/z (intensidad relativa %): 374 [M^+] (40), 289 (100), 178 (2).



Cromona **C**: 5,7-dihidroxi-3-isobutiril-2-isopropil-4H-cromen-4-ona ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 12.53 (1H, s, OH-5), 6.36 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 6.27 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.02 (1H, s, OH-7), 3.41 – 3.30 (1H, m, $J = 13.9, 7.0$ Hz, b'), 3.02 – 2.90 (1H, m, $J = 13.6, 6.8$ Hz, a), 1.31 (6H, d, $J = 6.8$ Hz, c'), 1.18 (6H, d, $J = 7.0$ Hz, b). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 207.30 (a'), 180.42 (C-2), 173.18 (C-4), 162.56 (C-7), 162.32 (C-5), 157.46 (C-8a), 120.65 (C-2), 104.96 (C-4a), 99.63 (C-6), 94.07 (C-8), 41.40 (b'), 31.51(a), 20.17 (b), 17.86 (c'). EIMS m/z (intensidad relativa): 290 [M^+] (24), 247 (100), 29 (4).



Cromona **D**: 5,7-dihidroxi-2-isopropil-4H-cromen-4-ona ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 12.69 (1H, s, OH-5), 9.81 (1H, s, OH-7), 6.34 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2), 6.29 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 5.99 (1H, s, H-6), 2.86 – 2.75 (1H, m, $J = 13.9, 6.9$ Hz, a), 1.29 (6H, d, $J = 6.9$ Hz, b). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 182.66 (C-4), 174.48 (C-2), 164.02 (C-7), 162.03 (C-5), 158.21 (C-8a), 105.45 (C-3), 104.52 (C-4a), 99.27 (C-6), 93.99 (C-8), 33.03 (a), 19.96 (b). EIMS m/z (intensidad relativa): 220 [M^+] (100), 247 (96), 360 (2).



Cromona **E**: 5,7-dihidroxi-2-isobutil-3-(3-metilbutanoil)-4H-cromen-4-ona ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 12.60 (1H, s, OH-5), 6.59 (1H, s, H-8), 6.33 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 6.28 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-7), 2.85 (2H, d, $J = 6.8$ Hz, b'), 2.55 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, a), 2.31-2.15 (2H, m, b y c'), 1.00 (d, $J = 2.3$ Hz, c), 0.98 (d, $J = 2.3$ Hz, d'). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 202.91(a'), 180.13 (C-4), 169.91(C-2), 162.62 (C-7), 162.48 (C-5), 157.14 (C-8a), 123.25 (C-3), 104.87 (C-4a), 101.87 (C-6), 99.79 (C-8), 53.63 (b'), 40.83 (a), 27.79 (c'), 24.42 (b), 22.66 (d'), 22.41 (c). EIMS m/z (intensidad relativa): 318 [M^+] (18), 153 (100), 109 (2).

Para el análisis RMN se buscaron en bases de datos pero no se encontraron reportados, para ello se utilizó un programa teórico Chem-Draw ultra 11.0 como apoyo en la caracterización de las cromonas.

Para la cromona **A** en el espectro RMN ^1H se observaron 6 señales que corresponden a los 10 hidrógenos presentes en la molécula. Las 4 señales que van de 7.12-7.82 ppm corresponden a hidrógenos aromáticos integrando para un hidrógeno en cada señal.

Las 2 señales que se encuentran en 2.35 ppm y 2.56 ppm corresponden a los hidrógenos de los grupos metilo que están unidos a C-2 y al grupo carbonilo adyacente a C-3, forman un singulete cada una, además integran un valor aproximado de 3 unidades.

En el espectro RMN ^{13}C se observaron 12 señales para los 12 carbonos presentes en la molécula, destacan las señales con un desplazamiento de 21.14 ppm que corresponde al

grupo metilo que está unido a C-2 y 29.33 ppm que está unido al grupo carbonilo adyacente en la posición C-3.

También se observan los grupos carbonilo de las posiciones C-4 y adyacente a C-3 con desplazamientos a campo bajo de 169.47 y 197.52 ppm respectivamente.

Para el análisis de las demás cromonas (**B-E**) se realizó de una forma similar, cabe destacar que en los espectros RMN ^1H presentan una señal muy peculiar en un desplazamiento químico cercano a 12.6 ppm, formando un singulete, que corresponden al grupo funcional OH en la posición C-5, se deduce que el grupo carbonilo en la posición C-4 afecta a este protón, protegiéndolo al establecer un puente de hidrogeno.

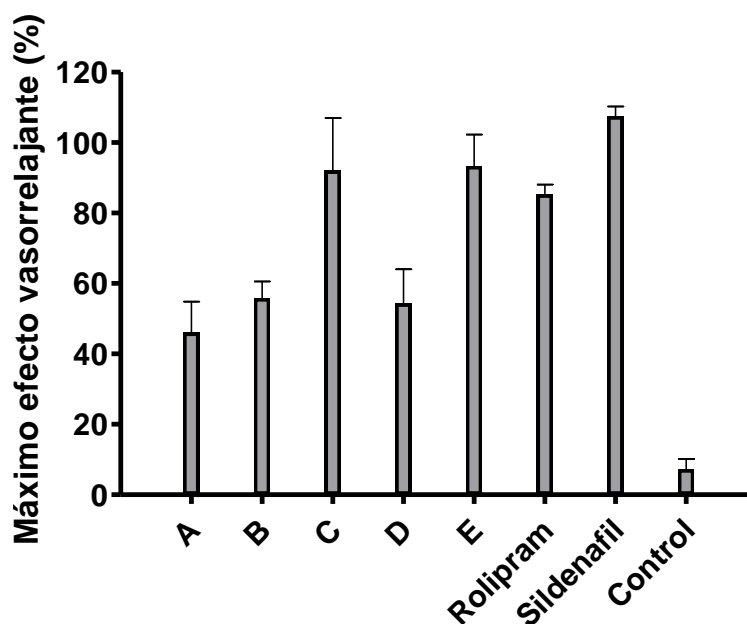
7.2. *EVALUACIÓN BIOLÓGICA*

Una vez caracterizadas las cromonas **A-E**, fueron evaluadas biológicamente sobre músculo liso aislado de aorta de rata.

El tejido de músculo liso se empleó de tal forma que se afectará en forma mínima sus condiciones fisiológicas normales, se indujo la contracción mediante el estímulo con una solución de norepinefrina 0.1 μM , posteriormente se observó la capacidad de relajación de los compuestos obtenidos al añadir una solución de concentración conocida directamente sobre el tejido. Para los controles positivos se utilizaron dos fármacos: Rolipram y Sildenafil, que son relajantes de músculo liso vía inhibición de enzimas fosfodiesterasas 4 y 5 respectivamente, cuya concentración final fue la misma que se utilizaron para las cromonas.

En la gráfica 1 se muestra el efecto máximo de relajación del músculo liso de aorta de rata contraído previamente con norepinefrina, con una concentración de 100 μ M cada compuesto de prueba así como las sustancias de referencia, tomando a 0 % el punto nulo de relajación (estado contraído con norepinefrina), y un estado de relajación de 100 % al estado basal (sin norepinefrina).

El efecto máximo de relajación de músculo liso que se registró fue la solución que contenía al fármaco sildenafil, sin embargo hubo dos cromonas que lograron una mayor relajación que el fármaco Rolipram, las cuales corresponden a los compuestos **C** y **E** cuya relajación superan el 85 %.

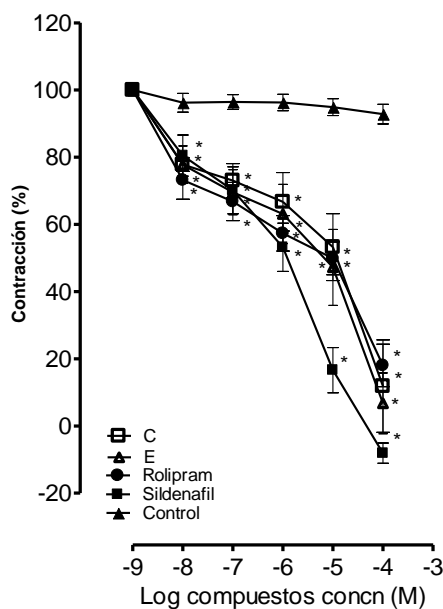


Grafica 1 .Máximo efecto relajante en músculo liso aislado de aorta de rata. Cada barra representa el promedio \pm E.E.M, $n = 6$. La concentración final de los compuestos evaluados fue de 100 μ M.

Los compuestos que presentaron un mayor efecto fueron las cromonas **C** y **E**, que se sintetizaron a partir del cloruro de isobutilo y cloruro de isovaleroilo respectivamente.

Una vez identificados los compuestos (cromonas **C** y **E**) se llevó a cabo el estudio en función de su concentración, siendo la mínima utilizada 10^{-9} M y 10^{-4} M. La contracción máxima se representó como 100 % (estímulo dado por la norepinefrina $0.1 \mu\text{M}$), tras lo cual se añadieron las soluciones de prueba y referencia de concentraciones conocidas. Para el relajamiento total del tejido se tomó en cuenta el estado basal sin norepinefrina.

La gráfica 2, para este estudio es dependiente de la concentración, indica que la mínima concentración con la que se observó un efecto de relajación fue de 10^{-8} M para ambos compuestos de prueba, 77 % para la cromona **C** y 77.5 % para **E**.



Gráfica 2. Efecto vasorrelajante en aorta de rata: de la cromona **C** (\square), cromona **E** (Δ), rolipram (\bullet), sildenafil (\blacksquare), control (\blacktriangle). Cada punto representa el promedio \pm E.E.M. ($n = 6$). $*p < 0.05$ respecto al grupo control, prueba de Dunnett después de una prueba de ANOVA.

En la concentración 10^{-5} M se hace más evidente la diferencia entre los compuestos de prueba cromona **C** (53 %) y cromona **E** (47 %) contra el sildenafil, ya que este presenta un mayor efecto de relajación, llegando así a 17% de contracción.

En la concentración más alta (10^{-4} M) se observó que los compuestos de prueba alcanzaron un máximo de relajación dado que alcanzo un 11.8 % de contracción para la cromona **C** y 6.7 % para la cromona **E**, superando al fármaco Rolipram (18 % en contracción).

SILDENAFIL

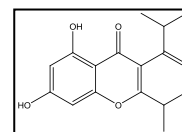
(Inhibidor de la PDE-5, sustrato GMPc) $CE_{50} = 0.60 \pm 0.14 \mu\text{m}$ ($r^2 = 0.889$)

ROLIPRAM

(Inhibidor de la PDE-4, sustrato AMPc) $CE_{50} = 2.95 \pm 0.78 \mu\text{M}$ ($r^2 = 0.816$)

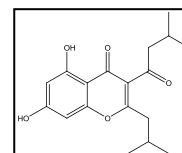
CROMONA C (8 EXPERIMENTOS)

(Relaja la aorta de rata) $CE_{50} = 12.55 \pm 3.94 \mu\text{M}$ ($r^2 = 0.830$)



CROMONA E (9 EXPERIMENTOS)

(Relaja la aorta de rata) $CE_{50} = 1.62 \pm 0.42 \mu\text{M}$ ($r^2 = 0.842$)



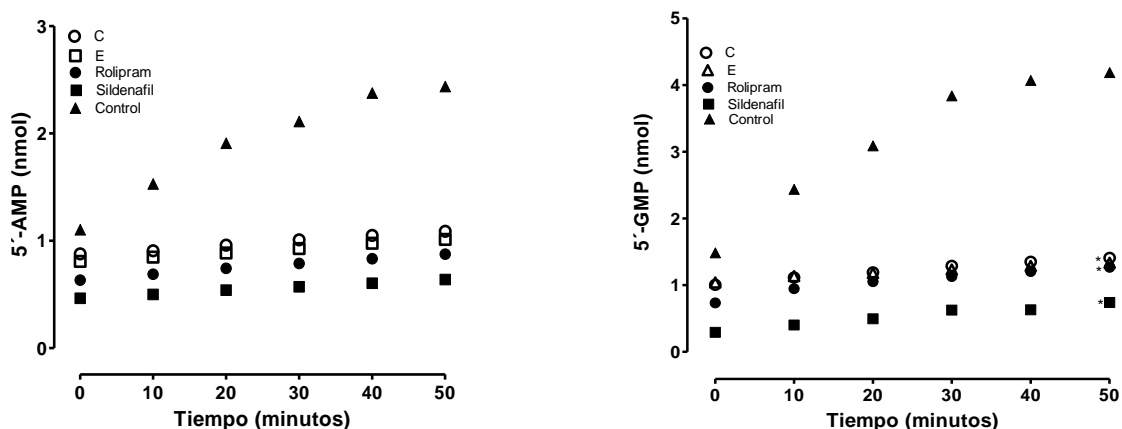
7.3. BIOENSAYO ENZIMÁTICO

Se observó que el Sildenafil fue el compuesto más potente, pues evitó la acción de las fosfodiesterasas y por consecuencia el rompimiento de los enlaces PO_3 , logrando así una mayor permanencia en los niveles de AMPc y GMPc.

En el caso del Rolipram se observó que el efecto fue ligeramente menor que el Sildenafil, con una diferencia de 0.237 unidades en la concentración de 5'-AMP, y 0.529 de 5'-GMP, lo cual sugiere que el Sildenafil tiene afinidad por la inhibición de la PDE-5, que es la encargada de actuar sobre el GMPc.

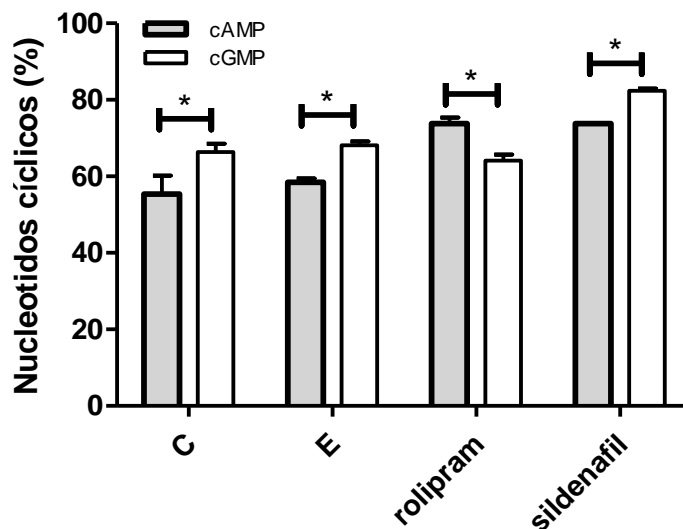
Las cromonas **C** y **E** también presentan un efecto inhibitor para ambas fosfodiesterasas, ligeramente muestran una selectividad hacia la PDE-5 al igual que el Sildenafil.

En las gráficas 3 y 4 se muestra la formación de 5'-AMP y 5'-GMP a partir de la hidrólisis del AMPc y GMPc respectivamente durante un lapso de 50 minutos.



Gráfica 3 y 4. Curso temporal de la hidrólisis de AMPc y GMPc por fosfodiesteras (PDEs), en presencia de las cromonas **C** y **E**, rolipram, sildenafil y en ausencia de compuesto inhibitor (control). Cada punto representa el promedio \pm E.E.M. ($n = 3$). * $p < 0.05$ respecto al grupo control, prueba de Dunnett después de una prueba de ANOVA, al tiempo 50.

En la gráfica 5 se relaciona el porcentaje de inhibición de la actividad de PDE's para cada uno de los compuestos, en la cual se aprecia con claridad la afinidad de cada molécula hacia determinado tipo de fosfodiesterasa.



Gráfica 5. Porcentaje de inhibición de la actividad de PDEs. Cada barra representa la media de inhibición de la degradación de AMPc o GMPc \pm SEM, $n = 3$. La concentración de los compuestos evaluados fue de 40 μ M, a excepción de sildenafil, que se ensayó a 0.1 μ M.

En esta grafica se aprecia con mayor claridad la selectividad del Sildenafil hacia la inhibición de la hidrolisis de GMPc con un 82% y 73% para la inhibición de la hidrólisis de AMPc.

Con un comportamiento similar pero de menor intensidad las cromonas **C** y **E** alcanzaron un 66 y 68% para la inhibición de la hidrólisis de GMPc y 55 y 58% para la inhibición de la hidrólisis del AMPc respectivamente.

Para el caso del Rolipram se observó que tiene más afinidad para inhibir la hidrólisis de AMPc alcanzando un 73% mientras que para la inhibición del GMPc alcanzo un 64%.

8. CONCLUSIONES

- Se lograron sintetizar las cromonas **A-E** en un solo paso, se purificaron por cromatografía en columna y se caracterizaron por sus propiedades físicas, espectroscópicas RMN ^1H y de ^{13}C , y espectros de masas.
- La evaluación biológica se llevó a cabo con todos los compuestos sintetizados para determinar su actividad relajante sobre músculo liso en aorta de rata, siendo las cromonas C y E las que presentan el mayor efecto vasodilatador.
- Los resultados obtenidos del ensayo enzimático *in vitro* refieren que uno de los mecanismos de acción vasorrelajante de las cromonas **C** y **E** podría ser vía inhibición de fosfodiesterasas cuyo sustrato sea GMPc.

9. REFERENCIAS

1. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, México **2012**. [consultado en Mayo 2014], disponible en:
<http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>
2. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA (INEGI) en línea, México **2013**. [consultado en Mayo 2014]disponible en:
<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2013/salud0.pdf>
3. Safar M, London G, Plante G. Arterial stiffness and kidney function. *Hypertension*. **2004**. 43, 163-168.
4. Touyz R. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Experimental Physiology* **2005**. 90, 449-455.
5. Callera G, Tostes R, Savoia C, Muscara M & Touyz R. Vasoactive peptides in cardiovascular (patho)physiology. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*. **2007**. 5, 531-552.
6. Rodríguez-Carranza R, Guía de Farmacología y Terapéutica, 2ª Ed. McGrawHill. **2009**.
7. García B. Hipertensión arterial. Colección La Ciencia Para Todos. México D.F: Ed. Secretaría de Educación Pública, Fondo de Cultura Económica, CONACYT; **2000**. p. 19-20.

8. Katzung B. Farmacología básica y clínica. Mexico DF. Manual moderno. 10^a ed. **2007**.
9. Franklin S. Aging and hypertension: the assessment of blood pressure indices in predicting coronary heart disease. *Journal of Hypertension*. **1999**, 17, S29-S36.
10. Colandrea M, Friedmen G, Nichaman M, Lynd C. Systolic hypertension in the elderly. *An epidemiological assessment. Circulation*. **1970**. 41, 239-245.
11. Rodríguez F, Gonzáles A, Navarrete, A. Gnaphaliin A and B relax smooth muscle of guinea-pig tracheal and rat aorta via phosphodiesterase inhibition. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **2011**. 63, 926-935.
12. Herrera M, Zarzuelo A, Jiménez J, Marhuenda E, Duarte J. Effects of flavonoids on rat aortic smooth muscle contractility: Structure-Activity relationships. *General Pharmacology*. **1996** 27, 273-277.
13. Ajay M, Gilani A, Mustafa M. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sciences*. **2003** 74, 603-612.
14. Ko W, Wan H, Lei C, Shih C, Chun M, Lin C. Mechanims of relaxant action of 3-O-methylquercetin in isolated guinea pig. Trachea. *Planta Medica*. **2002** 68, 30-35.
15. Ko W, Liu P, Leu I, Shin C. Relaxant effect of flavonoids in isolated guinea pig trachea and their structure–activity relationships. *Planta Medica*. **2003** 69, 1086-1090.
16. Ko W, Shih C, Lai Y, Chen J, Huang H. Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships. *Biochemical Pharmacology*. **2004** 68, 2087-2094.

17. Rodriguez F, Navarrete A, González M, Alarcón C, Aguilera A, Reyes A. Synthesis, docking study and relaxant effect of 2-alkyl and 2-naphthylchromones on rat aorta and guinea-pig trachea through phosphodiesterase inhibition. *Bioorganic Chemistry*, **2013** 50,17-25
18. Hospital General de México. Guías diagnósticas de consulta externa 6. Hipertensión arterial sistémica. **2013** [consultado en Mayo 2014] disponible en:
http://www.hospitalgeneral.salud.gob.mx/descargas/pdf/area_medica/consul_exter/guia_hipertension.pdf
19. Barquera S, Campos I, Hernández L, Villalpando S, Rodríguez C, Durazo R, Aguilar C. Hypertension in Mexican adults: results from the National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Publica* **2010** 52, S63-S71.
20. Tousoulis D, Androulakis E, Papageorgiou E, Stefanadis C. Novel therapeutic strategies in the management of arterial hypertension. *Pharmacol Ther.* **2012** 135, 168-175.
21. Kılıçkesmez K, Serdar M. Phosphodiesterase type 5 inhibitors in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Özel Sayı.* **2010** 10:2, 16.
22. Jing-chun X, Wei-jun W. Extraction of total flavone from *Solanum photeinocarpum* and its antioxidation activity. *Guangxi Zhiwu.* **2012** 32:4, 567-570.
23. Gomes A, Couto D. Trihydroxyflavones with antioxidant and anti-inflammatory efficacy. *BioFactors* **2012** 38:5, 378-386.
24. Webb R. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education.* **2003** 27, 201–206.

25. Sanders K. Signal Transduction in Smooth Muscle Invited Review: Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *Journal of Applied Physiology*. **2001** 91, 1438–1449.
26. Joule J, Mills K. Heterocyclic Chemistry. United Kingdom, 5th edition; Chichester, **2010**.
27. Bhatnagar S, Sahi S. Synthesis and docking studies on styryl chromones exhibiting cytotoxicity in human breast cancer cell line. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2010** 20, 4945-4950.
28. Chirattikarm M, Narumol P. Doking study on anti-cancer activity of chromone derivatives. *Med. Chem Res*. **2013** 22, 45-56.
29. Dong-Hyuk N, Ki-Yong L. Synthesis and anticancer activity of chromone-based analogs of lavendustin A. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2010** 45, 4288-4292
30. Ungwitayatorn H, Samee W, Pimthon J. 3D-QSAR studies on chromone derivatives as HIV-1 protease inhibitors. *J. Mol. Struct*. **2004** 689:99-106.
31. Yu D, Chen C. Anti-AIDS agents. 60. (dagger) substituted 3 ' R,4 ' R-Di-O(-)-camphanoyl-2 ' ,2 ' -dimethyldihydropyrano[2,3-f]chromone (DCP) analogues as potent anti-HIV agents. *J. Med. Chem*. 47. **2004** 4072-4082.
32. Somnath S. Synthesis and antibacterial screening of some pyrazole and chromone derivatives. *Heterocyclic Letters Vol. 2*: **2012** 4, 461-466
33. Kavitha P, Saritha M. Synthesis, structural characterization, fluorescence, antimicrobial, antioxidant and DNA cleavage studies of Cu(II) complexes of formyl chromone Schiff bases, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **2013** 102:159–168.

34. Edwards A, Howell J. The chromones: history, chemistry and clinical development. A tribute to the work of Dr R. E. C. Altounyan. *Clin. Exp. Allergy*. **2000** 30, 756-774.
35. Nordlund J. The pigmentary system: physiology and pathophysiology, USA Malden, Massachusetts, 2th ed.; Blackwell Publishing, Inc. **2006**.
36. de Leeuw J, Assen Y, Van der Beek N, Bjerring P, Neumann H. Treatment of vitiligo with khellin liposomes, ultraviolet light and blister roof transplantation. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2011**, 25, 74-81.
37. Holgate S, Polosao R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, 8, 218-230.
38. Frick R. Three treatments for chronic venous insufficiency: Escin, hydroxyethylrutoside and Daflon. *Angiology* **2000**, 51, 197-205.
39. Ruffmann, R., A Review of Flavoxate Hydrochloride in the Treatment of Urge Incontinence. *J. Int. Med. Res.* **1988**, 16, 317-330.
40. Nian-Guang Li, Zhi-Hao S, Yu-Ping T. Synthetic Strategies in the Construction of Chromones. *Journal of Heterocyclic Chemistry.* **2010** 10, 1002
41. Harikrishnan L, Showalter H. A Novel Synthesis of 2,3-Disubstituted Benzopyran-4-ones and Application to the Solid Phase. *Tetrahedron.* **2000** 56, 515.
42. Appleton R, Bantick, J, Chamberlain T, Hardern D, Lee T, Pratt A. Antagonists of slow reacting substance of anaphylaxis. Synthesis of a series of chromone-2-carboxylic acids. *J Med Chem.* **1977** 20, 371.
43. Hadjeri M, Barbier M, Ronot X, Mariotte A, Boumendjel A, Boutonnat J. Modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by flavonoid derivatives and analogues. *J Med Chem.* **2003** 46, 2125.

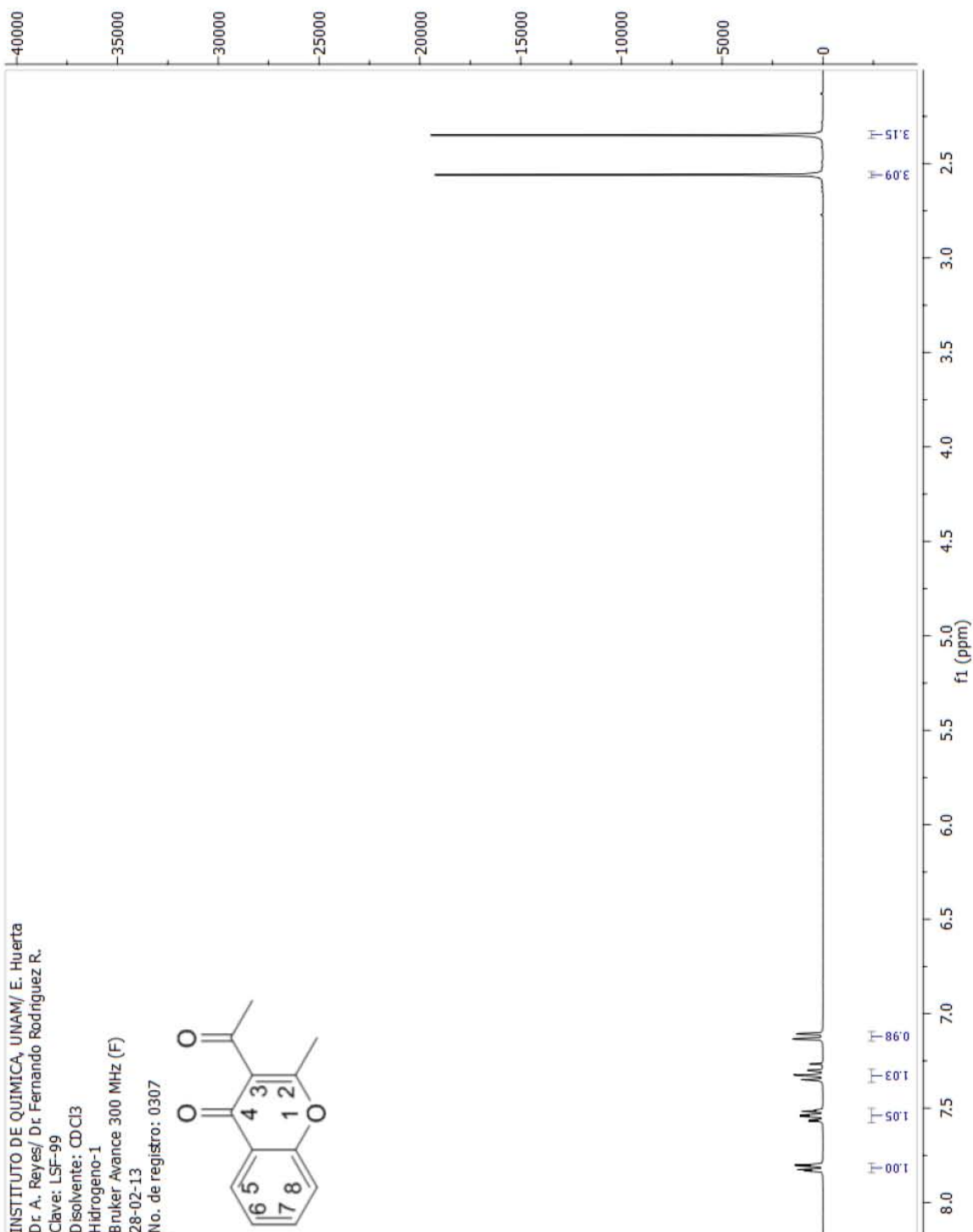
44. Sabui S, Venkateswaran R. Synthesis of O-methyl epi-heliannuol E. *Tetrahedron*. **2003** 59, 8375-8381.
45. Clarke D, Gabbutt C, Hepworth J, Heron B. Synthesis of 3-alkenyl-2-arylchromones and 2,3-dialkenylchromones via acid-catalysed retro-Michael ring opening of 3-acylchroman-4-ones. *Tetrahedron Letters*. **2005** 46, 5515-5519.
46. Huffman K, Burger M, Henderson W, Loy M, Ullman E. New photochromic cyclohexadienes. *J Org Chem* **1969** 34, 2407-2414.
47. Ganguly A, Kaur S, Mahata P, Biswas D, Pramanik B, Chan T. Synthesis and Properties of 3-acyl- γ -pyrones, a novel class of flavones and Chromones. *Tetrahedron Lett*. **2005** 46, 4119-4121.
48. Kabalka G, Meredd R. Microwave-assisted synthesis of functionalized flavones and chromones. *Tetrahedron Lett*. **2005** 46, 6315-6317.
49. Nian-Guang Li, Zhi-Hao Shi. Synthetic Strategies in the Construction of Chromones. *J. Heterocyclic Chem*. **2010** 47, 785.
50. Ahmed N, Ali H, Van Lier J. Silica gel supported InBr₃ and InCl₃: new catalysts for the facile and rapid oxidation of 2'-hydroxychalcones and flavanones to their corresponding flavones under solvent free conditions. *Tetrahedron Lett*. **2005** 46, 253.
51. Chin-Fei C, Michael J. An efficient one-pot synthesis of flavones. *Tetrahedron Letters* **2011** 52, 3120–3123.
52. Diario Oficial de la Federación [DOF]. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y usos de los animales de laboratorio. México **2001** consultado en 14 de agosto de **2014**, disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>.

53. Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacology & Therapeutics*. **2006** 109, 366-398.

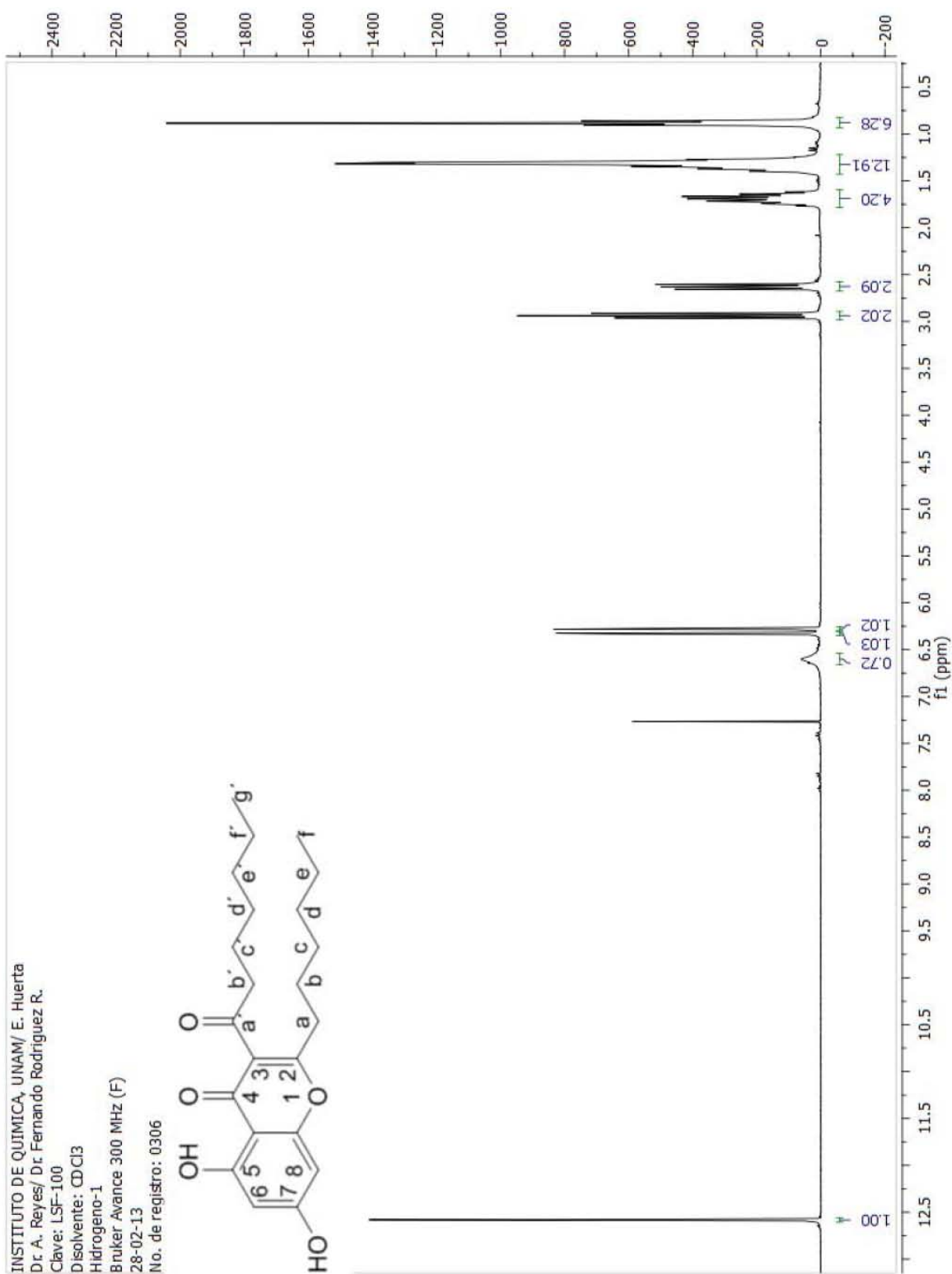
ANEXO

Espectros RMN ^1H

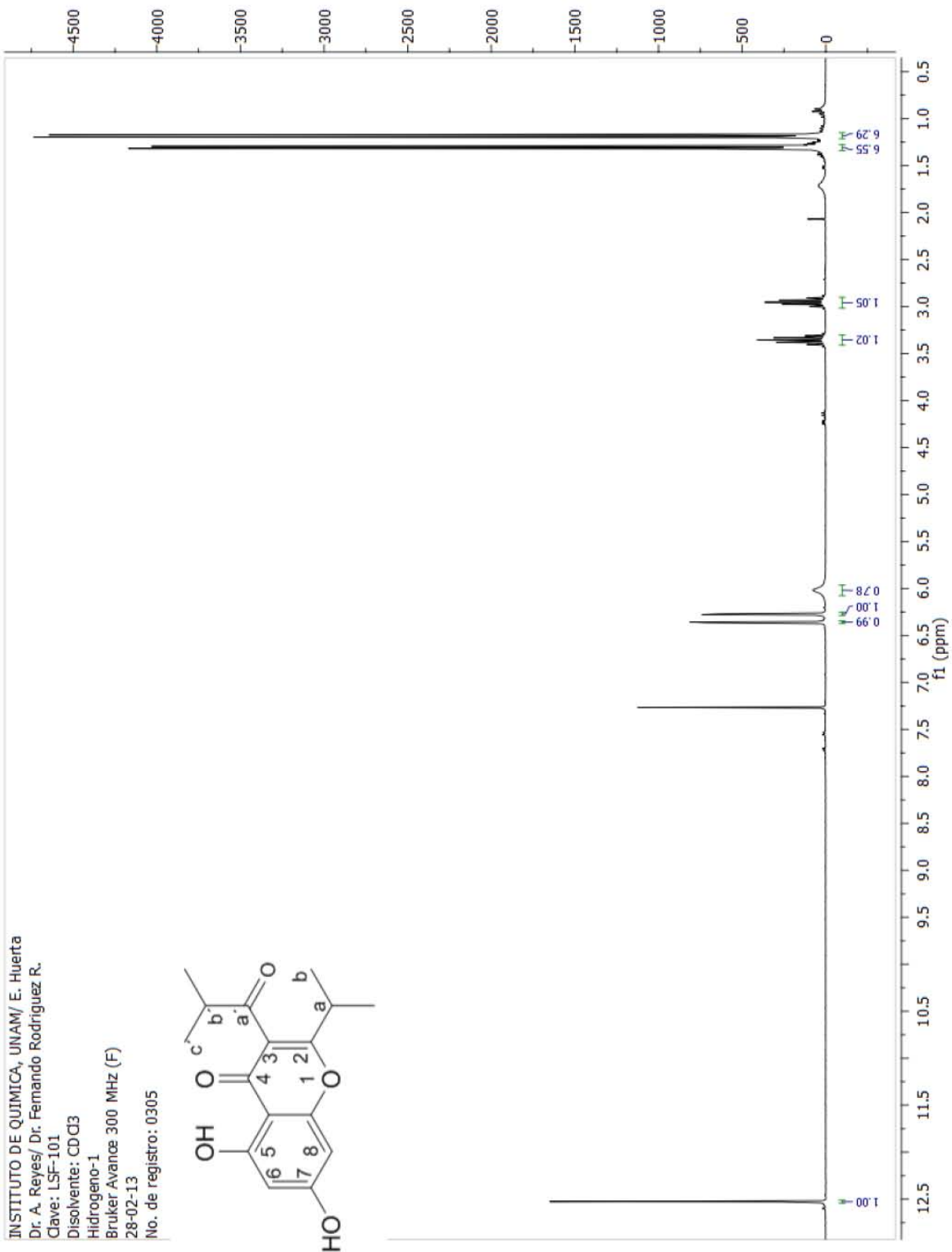
Cromona A: 3-Acetil-2 metil cromona



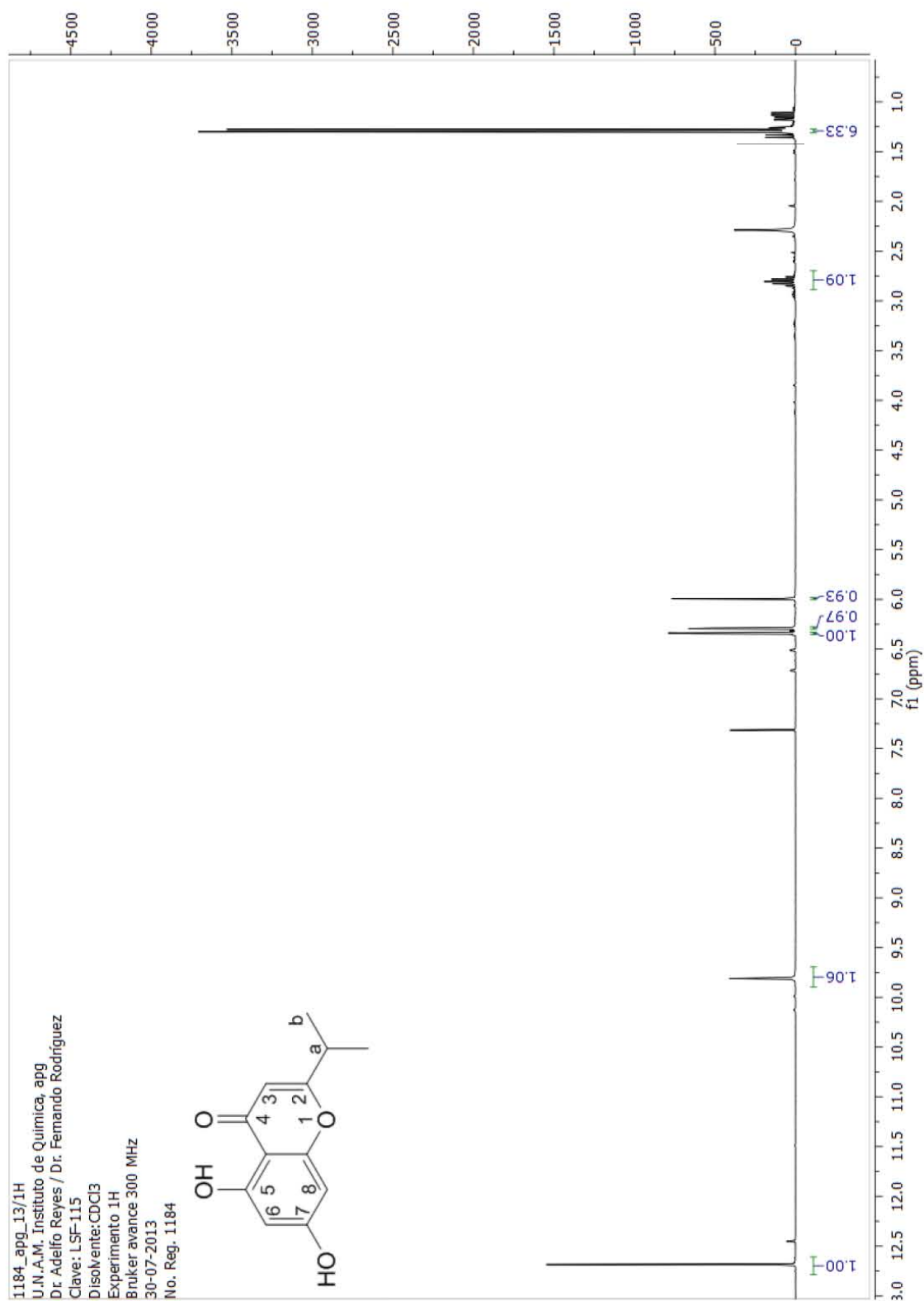
Cromona B: *5,7-Dihidroxi-3-heptanoil-2 hexil cromona*



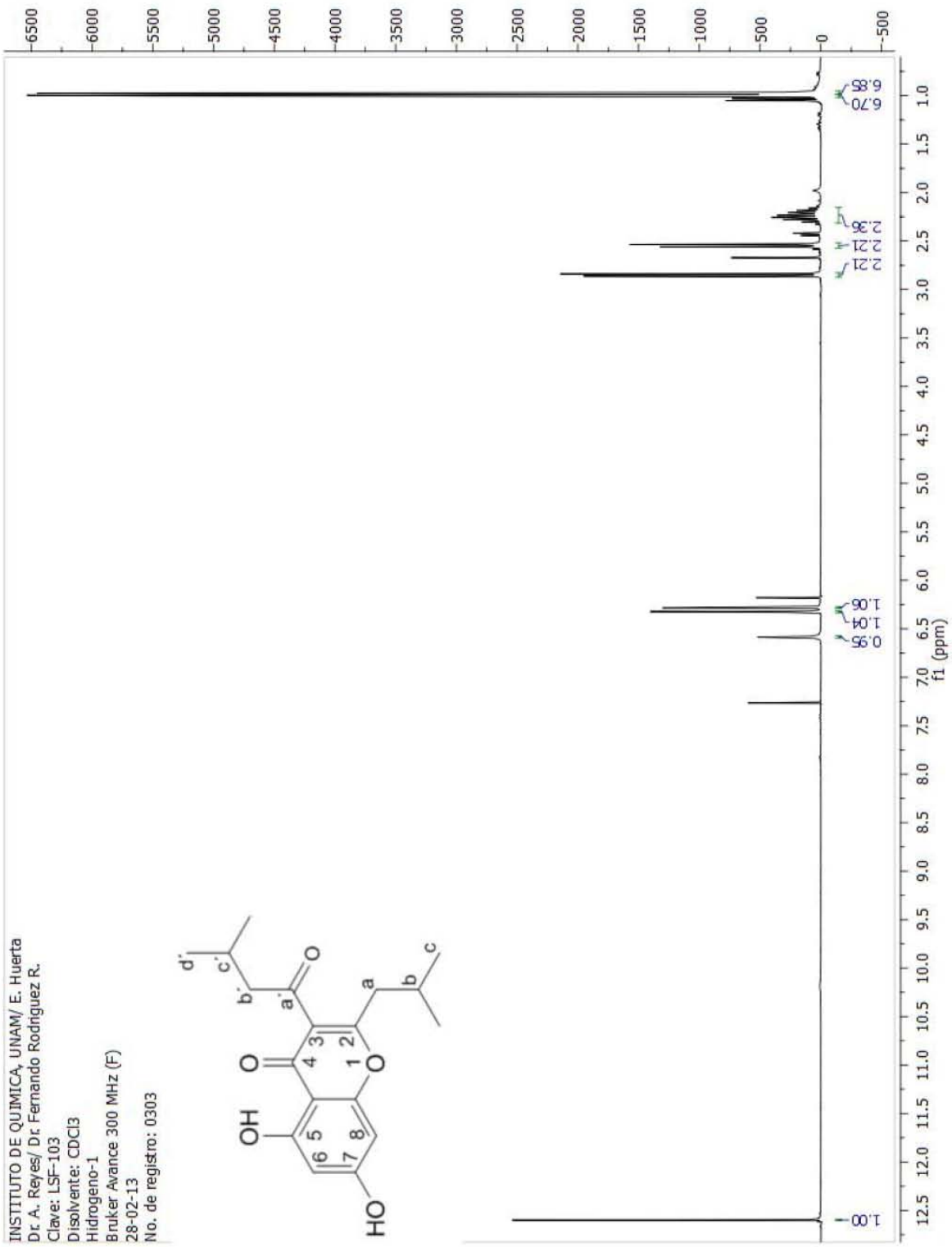
Cromona C: 5,7-Dihidroxi-3 isobutiril -2 isopropil cromona



Cromona D: 5,7 dihidroxi-2isopropil cromona



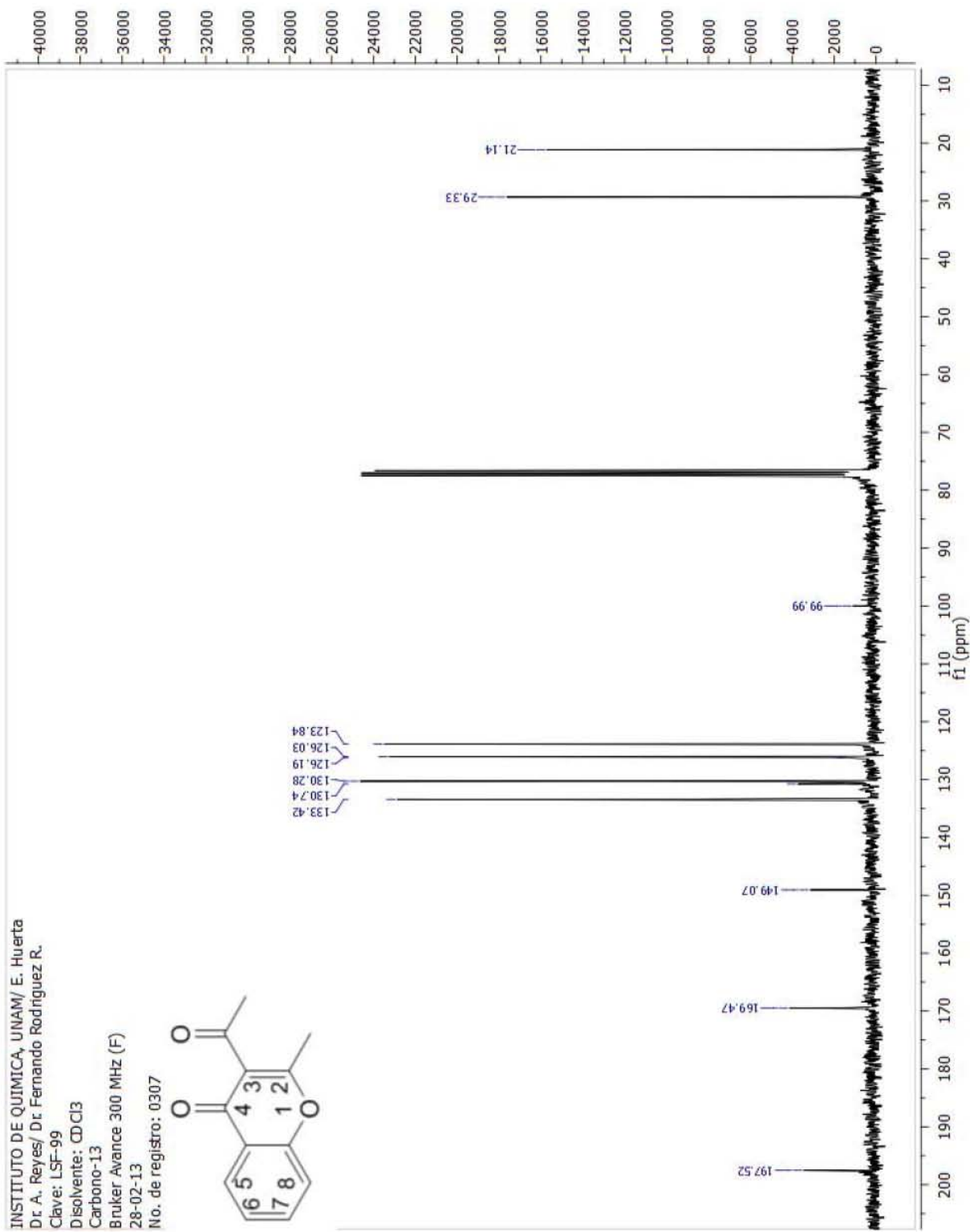
Cromona E: 5,7 dihidroxi-2 isobutil-3-(3-metil butanoil) cromona



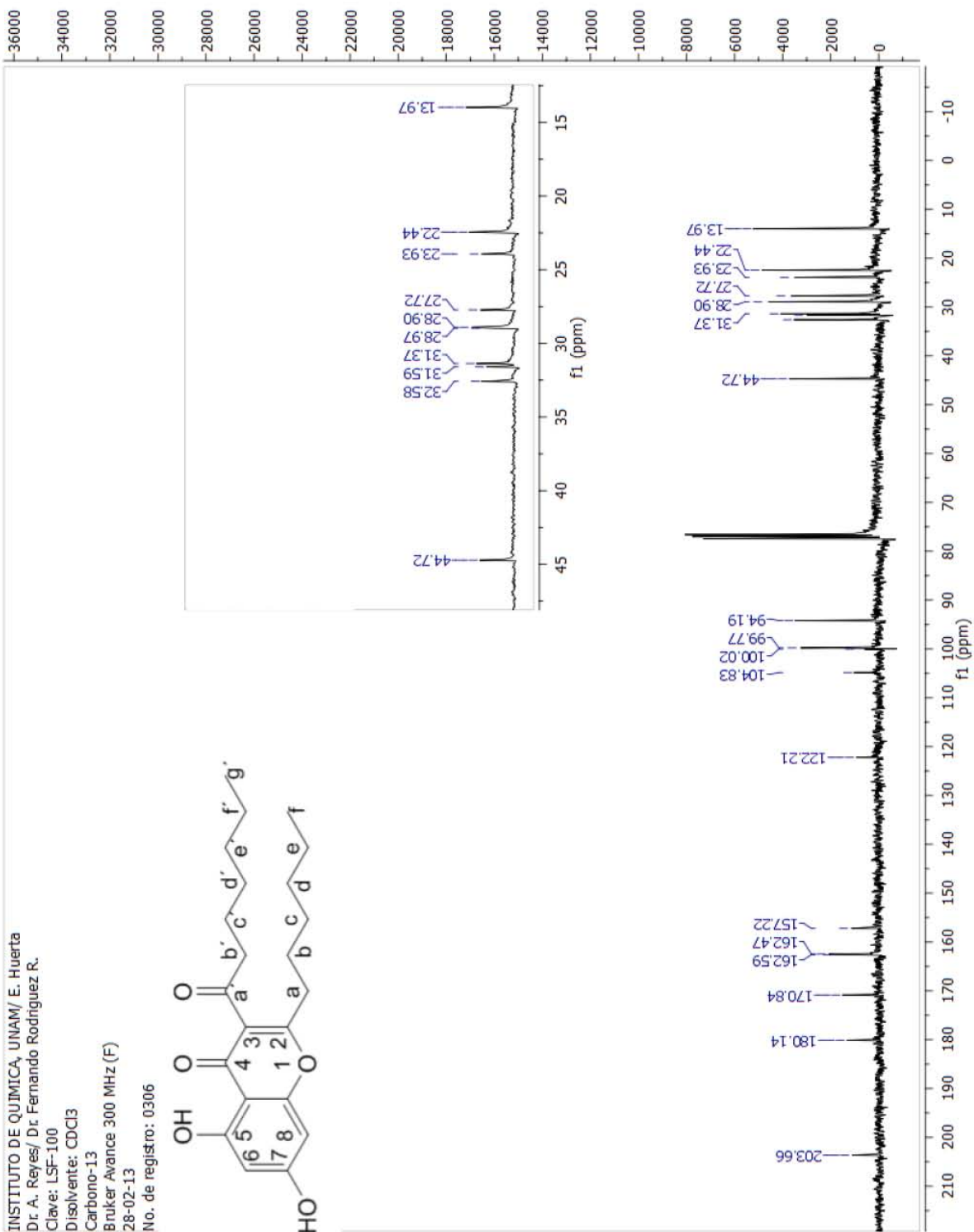
INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/ E. Huerta
Dr. A. Reyes/ Dr. Fernando Rodriguez R.
Clave: LSF-103
Disolvente: CDCl₃
Hidrogeno-1
Bruker Avance 300 MHz (F)
28-02-13
No. de registro: 0303

Espectros RMN 13C

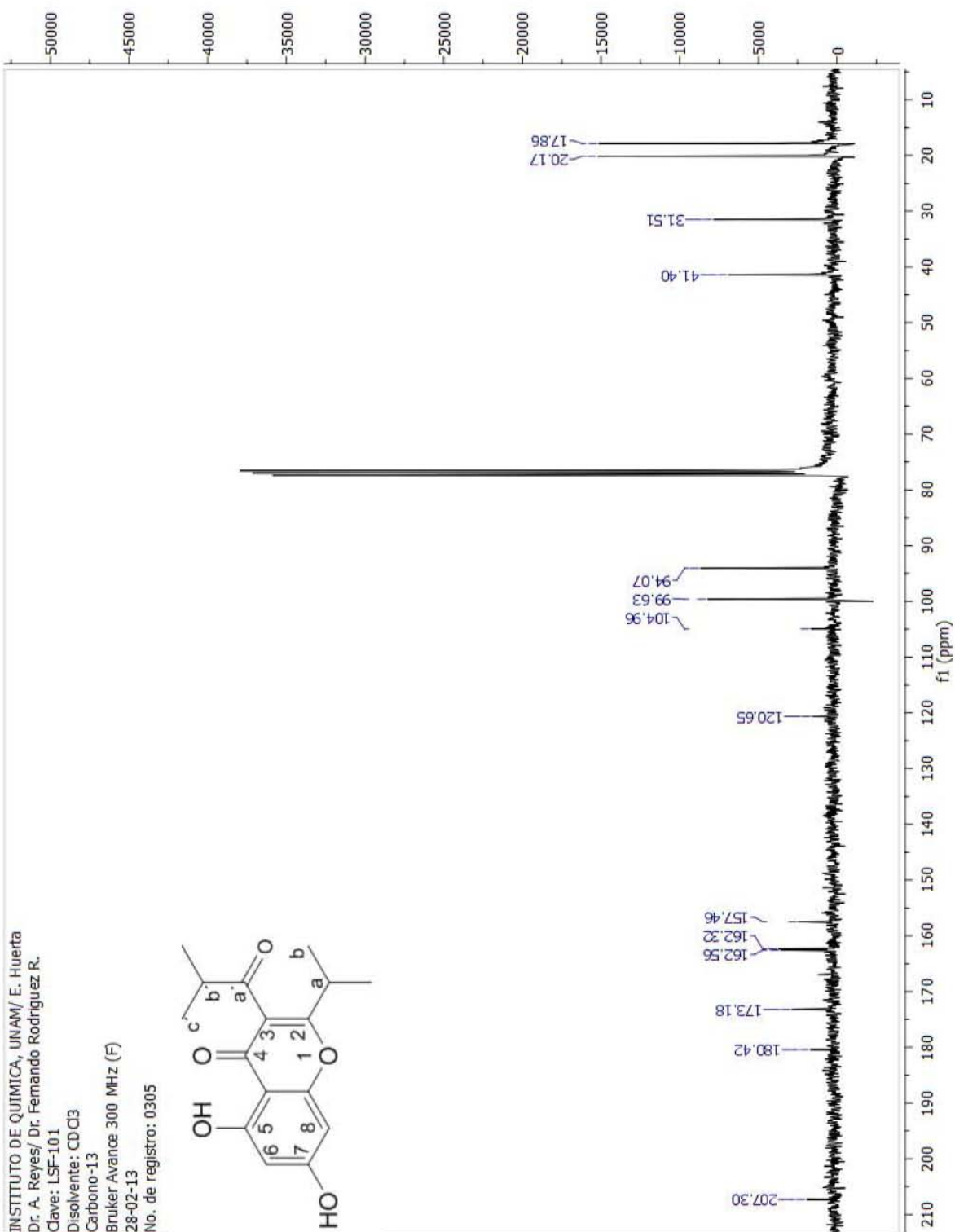
Cromona A: *3-Acetil-2 metil cromona*



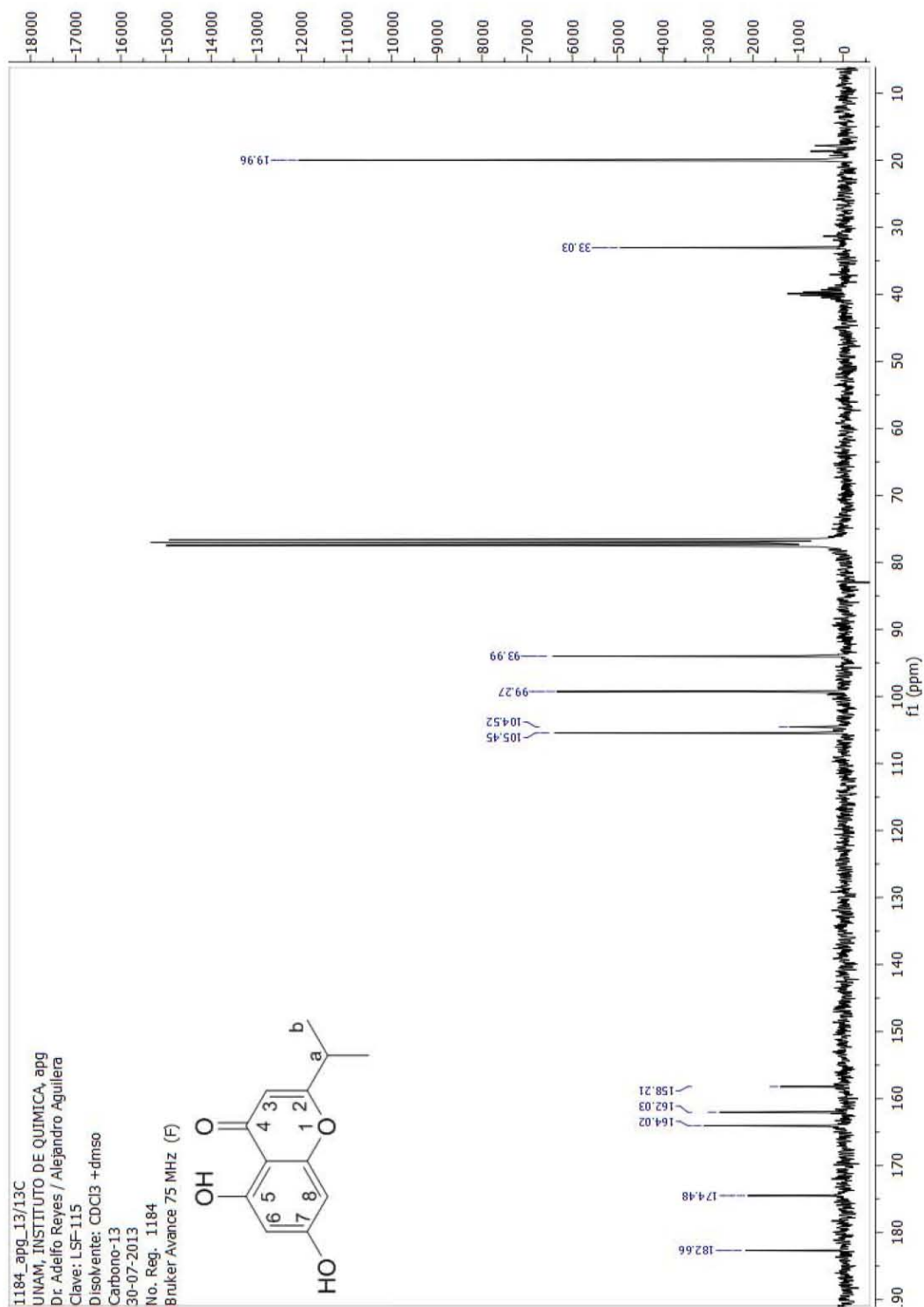
Cromona B: 5,7-Dihidroxi-heptanoil-2 hexil cromona



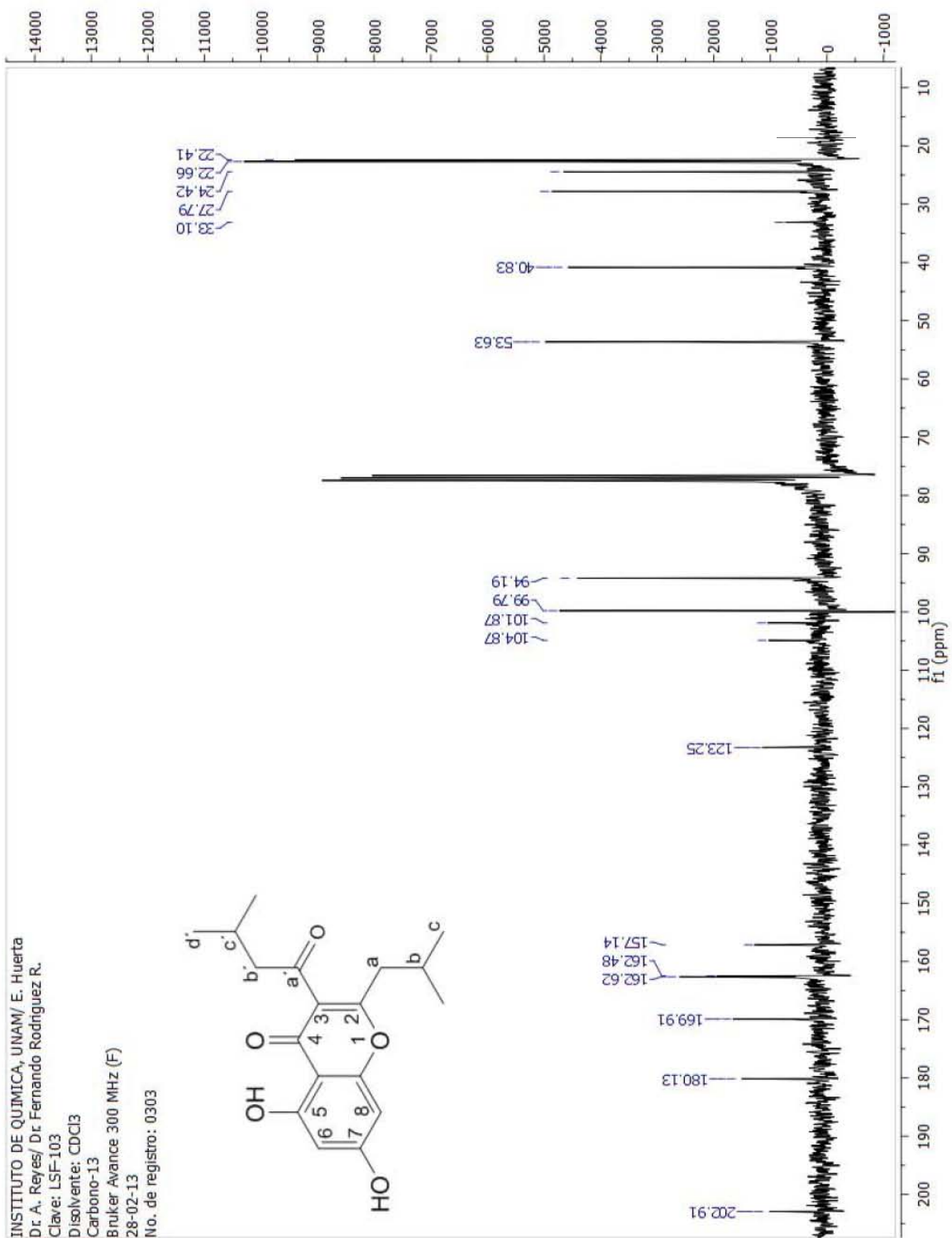
Cromona C: 5,7-Dihidroxi-3 isobutiril -2 isopropil cromona



Cromona D: 5,7 dihidroxi-2-isopropil cromona

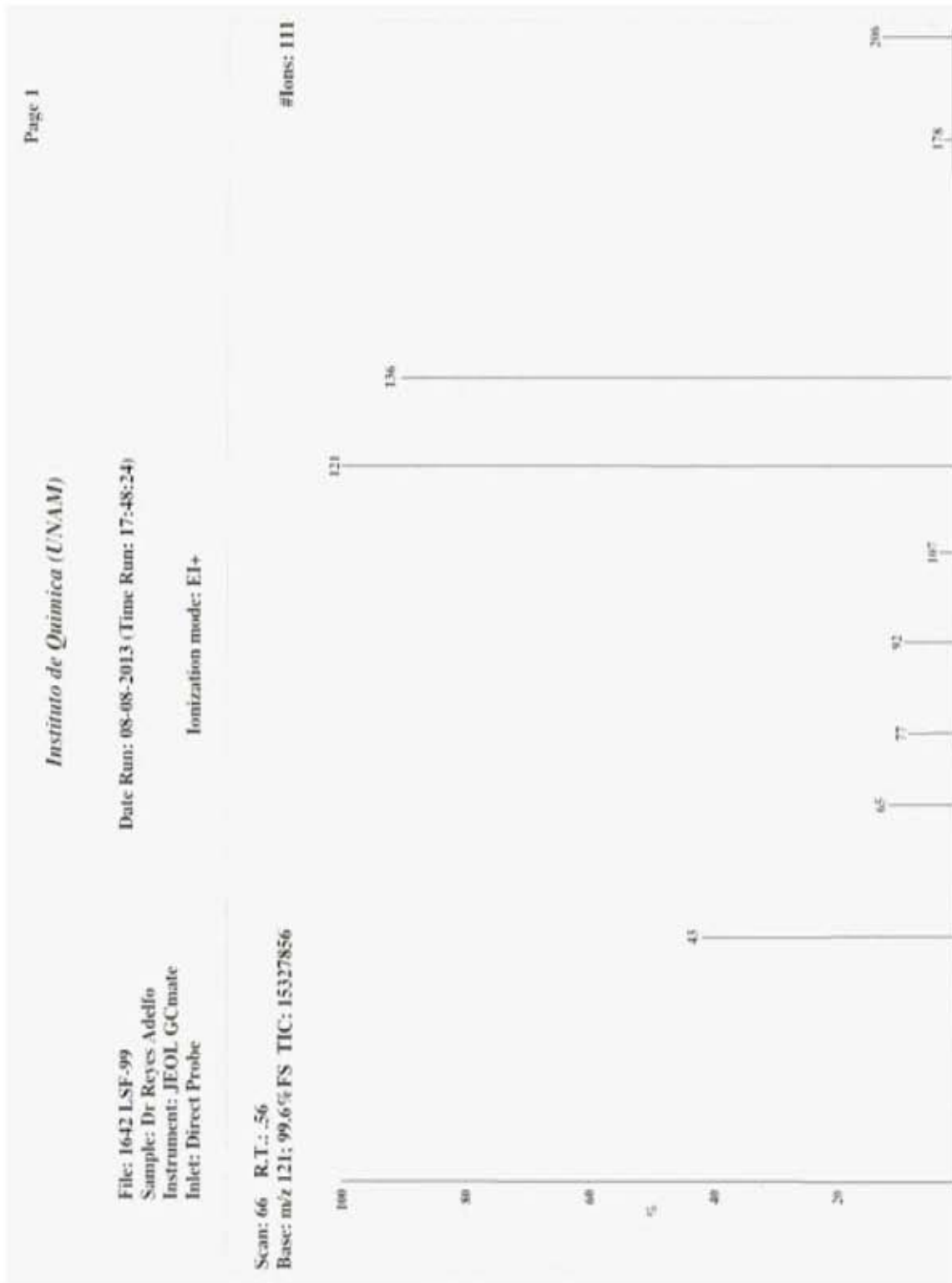


Cromona E: 5,7 dihidroxi-2 isobutil-3-(3-metil butanoil) cromona



Espectros de Masas (EIMS)

Cromona A: 3-Acetil-2 metil cromona



Cromona B: 5,7-Dihidroxi-3-heptanoil-2 hexil cromona

Page 1

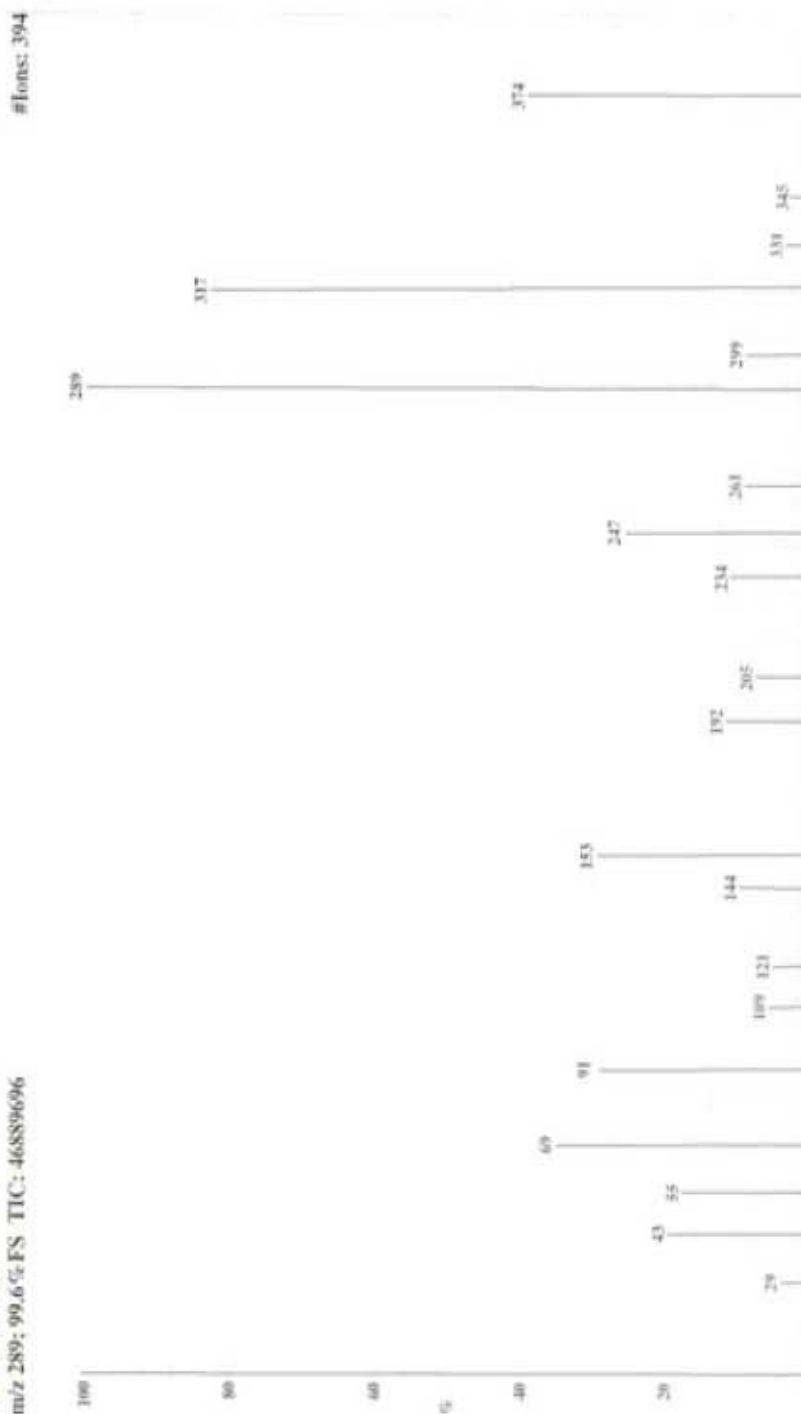
Instituto de Química (UNAM)

Date Run: 08-08-2013 (Time Run: 17:53:31)

Ionization mode: EI+

File: 1643 LSF-100
Sample: Dr Reyes Adelfo
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: Direct Probe

Scan: 105 R.T.: 89
Base: m/z 289; 99.6% FS TIC: 46889696



Cromona C: 5,7-Dihidroxi-3 isobutiril -2 isopropil cromona

Page 1

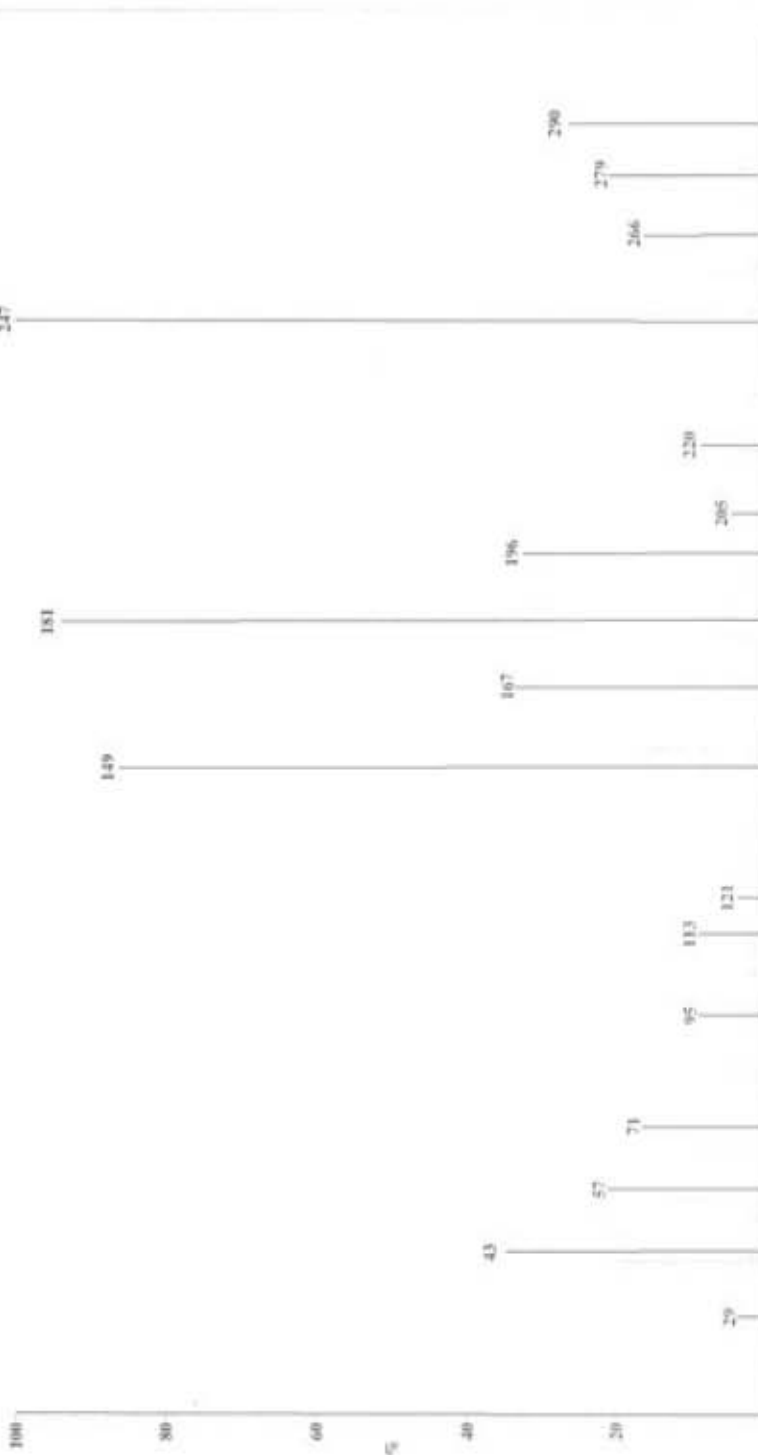
Instituto de Química (UNAM)

Date Run: 08-08-2013 (Time Run: 17:59:50)

Ionization mode: EI+

File: 16684 LSF-101
Sample: Dr Reyes Adolfo
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: Direct Probe

Scan: 54 R.T.: .45
Base: m/z 247; 99.6%FS TIC: 38937040



Cromona D: 5,7 dihidroxi-2isopropil cromona

Page 1

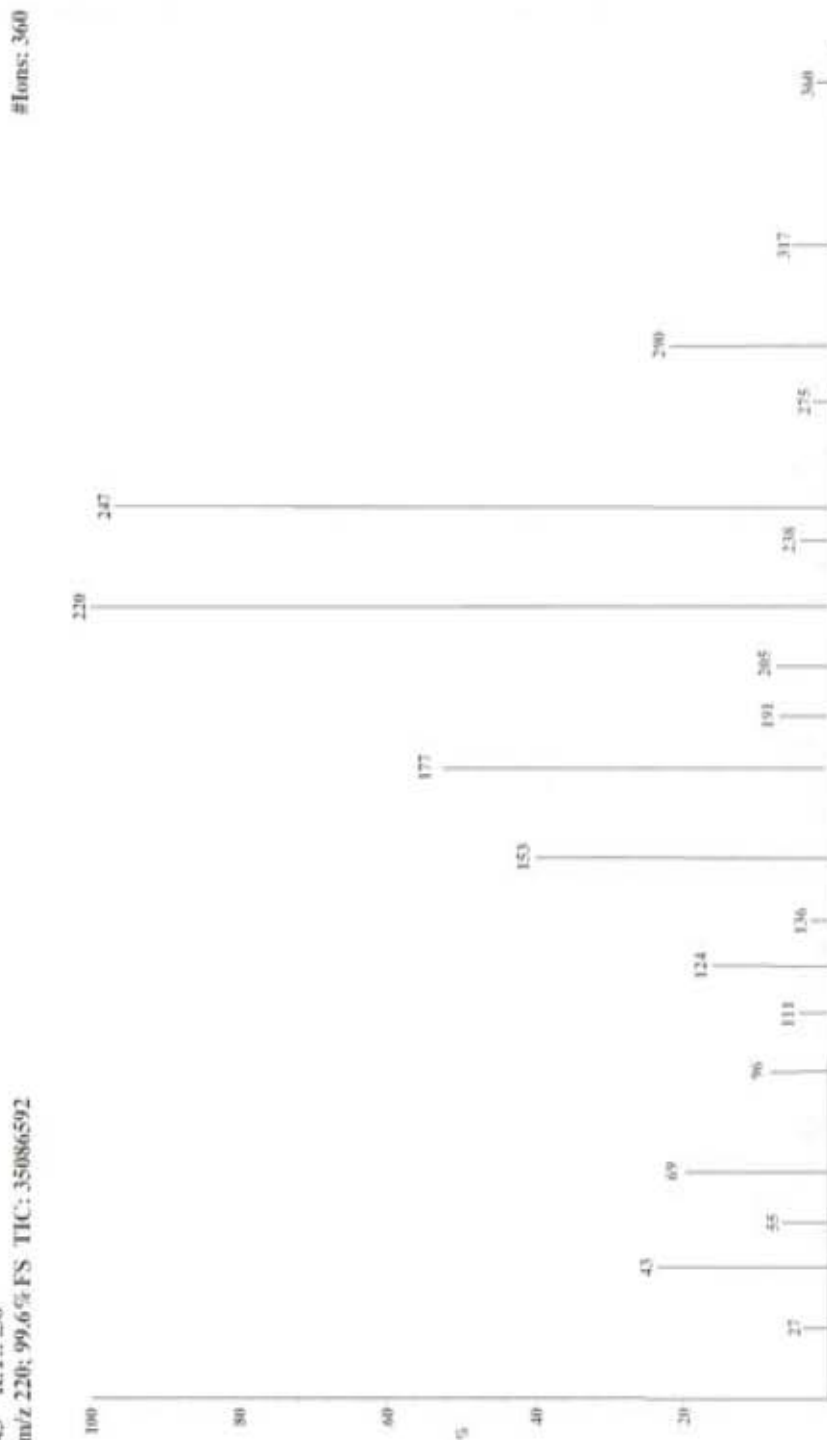
Instituto de Quimica (UNAM)

Date Run: 08-08-2013 (Time Run: 18:03:25)

Ionization mode: EI+

File: 1645 LSF-102
Sample: Dr Reyes Adelfo
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: Direct Probe

Scan: 43 R.T.: .36
Base: m/z 220; 99.6% FS TIC: 35086592



Cromona E: 5,7 dihidroxi-2 isobutil-3-(3-metil butanoil) cromona

