

00523
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Síntesis de derivados del 3-fenilpropenoato de etilo y de la
cumarina para su evaluación como posibles agentes
inmunoactivadores**

TESIS

que para obtener el título de:

QUÍMICA

presenta

Claudia Hernández Ramírez



México D.F. a febrero de 2003
EXAMEN DE CALIFICACIÓN PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

A



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	PROFESORES
Vocal	JOSÉ MANUEL MENDEZ STIVALET
Secretario	FERNANDO LEÓN CEDEÑO
1er. suplente	BLAS FLORES PÉREZ
2do suplente	MARTHA MENES ARZATE
	DANIEL MÉNDEZ ITURBIDE

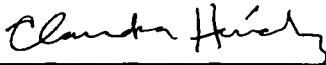
Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 203 del Departamento de Química Orgánica de la División de estudios de Posgrado, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor:



Profesor Fernando León Cedeño

Sustentante:



Claudia Hernández Ramírez

AGRADECIMIENTOS

Al maestro Fernando León Cedeño por su ayuda invaluable al permitirme aprender en su laboratorio y por su dedicación al dirigir esta tesis.

A Alejandro, Nadia, Poncho y Cris por su apoyo incondicional.

A Marisela Gutiérrez Franco y a Oscar Salvador Yáñez Muñoz por la elaboración de los espectros de IR y RMN-H.

A los maestros José Manuel Méndez Stivalet, Blas Flores Pérez y Margarita Ávila Romero por su interés en este proyecto.

Esta tesis contó con el apoyo económico del proyecto PAPIIT IN206599

C

**Dedicada a Mamá y Papá,
con todo mi cariño.**

D

ÍNDICE

I. Introducción	1
II. Antecedentes	
1. El cáncer	2
2. Antecedentes sobre las reacciones químicas usadas para la obtención de los productos	11
III. Resultados y Discusión	
1. 3-Hidroxycumarina	18
2. 3-Metoxicarbonil-7-hidroxycumarina	26
3. 3-Etoxicarbonil-7-hidroxycumarina	29
4. 2-Etoxicarbonil-3 (3'-hidroxi-4'-metoxifenil) propenoato de etilo	31
5. Ácido 2-carboxi-3-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-2-propenóico	33
IV. Parte experimental	
1. Síntesis del clorhidrato del glicinato de etilo	38
2. Síntesis de la 3-Salicilidenaminocumarina	38
3. Síntesis de la 3-Hidroxycumarina	38
4. Síntesis de la 3-Metoxicarbonil-7-hidroxycumarina	39
5. Síntesis de la 3-Etoxicarbonil-7-hidroxycumarina	39
6. Síntesis del 2-Etoxicarbonil-3 (3'-hidroxi-4'-metoxifenil) propenoato de Etilo	40
7. Síntesis del Ácido 2-carboxi-3-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-2 propenóico	40
V. Conclusiones	42
VI. Bibliografía	44
VII. Anexo A Espectroscopia	46

INTRODUCCIÓN

Desde hace varios años se creó un proyecto interdisciplinario entre el Departamento de Química Orgánica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México y el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la misma universidad.

Este proyecto consiste en llevar a cabo la síntesis de los compuestos en el Departamento de Química Orgánica, para que en el Departamento de Farmacología se pruebe su posible actividad inmunoactivadora contra melanomas.

A lo largo de estos años se han sintetizado numerosos compuestos, algunos de los cuales han dado excelentes resultados como compuestos con actividad inmunoactivadora. Por esto, es necesario continuar estudiando las rutas sintéticas de los productos que ya han sido entregados para lograr su optimización. Con base en los resultados obtenidos hasta el momento, se ha propuesto la síntesis de nuevos compuestos para probar su posible actividad inmunoactivadora.

Esta tesis se realizó con el objetivo de proporcionar al Departamento de Farmacología 1g de cada uno de los productos siguientes: 3-metoxicarbonil-7-hidroxicumarina, 3-etoxicarbonil-7-hidroxicumarina, 2-etoxicarbonil-3 (3'-hidroxi-4'-metoxifenil)propenoato de etilo, y ácido 2-carboxi-3-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-2-propenónico así como el de hacer un estudio para optimizar la ruta sintética para obtener la 3-hidroxicumarina.

ANTECEDENTES

EL CÁNCER

La palabra cáncer se utiliza para nombrar un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento anormal de las células. Se manifiesta por la reducción o pérdida de control en el crecimiento y función celular. En términos moleculares y biológicos, todos los tipos de cáncer tienen defectos parecidos en la regulación de la proliferación y de la muerte celular¹.

Las células cancerosas pueden distinguirse de las células normales por medio de un examen microscópico, ya que las primeras se observan con una menor diferenciación. Las células malignas presentan una alta relación núcleo-citoplasma, un nucleolo prominente, varias mitosis y estructuras relativamente poco diferenciadas. La presencia de células con capacidad invasiva es un diagnóstico suficiente para indicar malignidad².

La carcinogénesis es un proceso de varias etapas que desemboca en el cambio de una célula normal en una célula cancerosa. La conversión de una célula normal en una neoplásica requiere de múltiples mutaciones, principalmente en los genes que codifican a las proteínas que participan en el control de la proliferación. Las mutaciones que inducen la formación de cáncer pueden ocurrir en células en división y pasar a la progenie. Los factores que promueven la carcinogénesis pueden ser externos (productos químicos ambientales, tabaquismo, radiación o infecciones virales) o internos (defectos en el sistema inmune y predisposición genética).

¹ Tannock, I. y Hill, R. 1999. *The basics science of oncology*. 3ª. Ed. Mc-Graw-Hill. EEUU. Cap. 1,2.

² Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D. Y Darnell J. 2000. *Molecular Biology*. 4ª ed. Scientific American Books. EE.UU. 1033-1174

Dado que existen diferentes mecanismos que promueven la carcinogénesis, las neoplasias generadas son diferentes, varían en tiempo de crecimiento, grado de diferenciación celular, detectabilidad, invasividad, potencial metastásico, respuesta a tratamientos y pronóstico³.

La formación de tumores requiere de tres estadios conocidos que son: iniciación, promoción y progresión. La iniciación que se origina por alguna causa procarcinógena, resulta en la alteración específica de genes susceptibles. La célula mutada incrementa su capacidad de proliferación, lo cual le permite entrar al ciclo celular para proliferar. Este fenómeno es irreversible y los cambios moleculares pueden permanecer latentes hasta que otro estímulo induzca la proliferación⁴.

El segundo estadio conocido como promoción, se caracteriza por un estado de hiperfloración o hiperplasia. Esta proliferación es selectiva y puede dar origen a lesiones premalignas o tumores benignos. Los promotores pueden ser, en general, sustancias químicas exógenas, estímulos físicos o bien agentes endógenos como las hormonas. Adicionalmente a la proliferación excesiva, la descendencia de estas células presenta una apariencia anormal en su estructura y orientación, condición que se denomina displasia.

Existe un tipo de tumor que se genera "*in situ*", éstos normalmente derivan de epitelios y son tumores benignos pues la mayoría de las veces son de tamaño pequeño, se encuentran encapsulados y no invaden el tejido que los rodea. Causan daño al ejercer presión local u obstrucción en órganos vitales, por lo que el tratamiento quirúrgico constituye una opción efectiva⁵.

³Ruddon,W.R. 1995. Cancer Biology. 3ª ed. N.Y. Oxford University Press. 520pp

⁴ Ibidem.

⁵ Andrés J.P. 1999 *Patología molecular de la progresión tumoral*. Fox Chase Cancer Center 9: 138-143

La tercera etapa se refiere a la conversión de lesiones premalignas en tumores malignos y su progresión. Durante esta etapa las células neoplásicas adquieren gradualmente características cada vez más agresivas, es decir: un fenotipo invasivo y metastásico. Si los cambios genéticos permiten que el tumor comience a invadir la membrana basal y a diseminarse a través del flujo sanguíneo o linfático, se considera que el tumor ha llegado a ser maligno⁶.

El melanoma es un tumor maligno que se puede llegar a formar en los melanocitos, los cuales son un tipo de células encargadas de dar la coloración a la piel. La mayoría de los melanomas se localizan en la piel pero pueden localizarse también en otros lugares como en las mucosas y la retina. La piel está constituida por dos capas principales: la epidermis (exterior) y dermis (interior); los melanocitos se encuentran en la epidermis. El factor etiopatogénico más importante en el desarrollo del melanoma maligno es la radiación solar. La radiación ultravioleta tiene mayores consecuencias en personas con fenotipos de piel clara⁷.

El proceso de metástasis se refiere a la diseminación de células cancerosas desde su sitio original a otras partes del cuerpo. Las células cancerosas pueden invadir el tejido adyacente por extensión del tumor. También pueden romper el contacto con otras células del tejido de origen, atravesar la barrera de la lámina basal y entrar a la circulación sanguínea para formar tumores secundarios en sitios lejanos al del origen. Las células con esta capacidad se llaman células metastáticas. Sólo los tumores malignos tienen la capacidad de producir metástasis, invadir al tejido adyacente y destruirlo.

El sitio anatómico del tumor proporciona datos sobre el curso clínico del mismo. Además, indica la probabilidad y ruta de producir metástasis, los efectos del tumor sobre las funciones del cuerpo y el tratamiento que puede aplicarse. Se ha demostrado que cada tipo de célula cancerosa tiene afinidad para metastatizar a ciertos órganos. Los sitios secundarios más comunes para la proliferación de

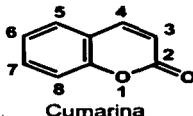
⁶ Andrés, J.P. *op. cit.* pp 138-143.

metástasis de cualquier tipo de cáncer son los pulmones, el hígado, los nódulos linfáticos, la médula ósea y el cerebro. En general, el sitio inicial de formación de tumores secundarios tiende a ser el órgano que contiene la primera red capilar encontrada por las células después de ser liberadas del tumor⁸. Cuando las células tumorales entran en el sistema linfático, pasan por los nodos linfáticos regionales donde pueden ser retenidas y ahí es donde se puede provocar un crecimiento metastásico. Una vez que las células cancerosas alcanzan los vasos sanguíneos, pueden llegar a tejidos distantes a través del torrente sanguíneo; pero sólo el 0.01% de las células que entran en la circulación tiene la capacidad de formar un tumor metastásico secundario⁹.

CUMARINA

La cumarina es un producto natural que se encuentra en diversas plantas como en haba de Tonka, el clavo, el trébol dulce y algunos aceites esenciales como el de lavanda¹⁰.

Químicamente es una lactona llamada 1,2-benzopirona del ácido o-hidroxifenilpropenóico; tiene un peso molecular de 146.5g/mol, p.f. de 68-70°C y un p.e. de 303°C. Es soluble en etanol, cloroformo y aceites.



Cumarina

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se ha encontrado que posee actividad antipirética y antiinflamatoria por lo que se ha utilizado en el tratamiento de enfermedades reumáticas. Dado que estimula la actividad fagocitaria en macrófagos y otras células del sistema inmune, ha sido utilizada en el tratamiento de infecciones crónicas (brucelosis, micoplasmosis, toxoplasmosis).

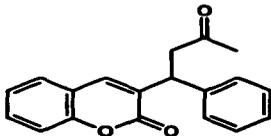
⁷ Lodish *op. cit.*

⁸ Liotta, L. 1986 *Tumor invasion and metastases role ... Cancer Res.* 46: 1-7.

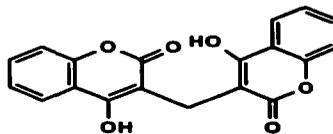
⁹ Lodish *op. cit.*

¹⁰ Nair, R. V. *Et al.* 1991. *Novel coumarins as potential anticarcinogenic agents. Carcinogenesis.* 12: 65-69.

Actualmente algunos derivados cumarínicos como la warfarina y el dicumarol son utilizados como anticoagulantes. Estos derivados comenzaron a utilizarse en el tratamiento de neoplasias para prevenir la formación de estroma de fibrina alrededor del tumor. A mediados del siglo pasado se describió la asociación de la fibrina con los tumores y se postuló que ésta pudiera tener importancia en la producción de metástasis. Se ha demostrado que la warfarina en combinación con otros tratamientos, alarga al doble la sobrevivida de pacientes con carcinoma pulmonar.



Warfarina



Dicumarol

El efecto antineoplásico de los derivados cumarínicos, no se debe a sus propiedades anticoagulantes. La administración de vitamina K, antagoniza la acción anticoagulante de derivados cumarínicos como la warfarina, pero no antagoniza el efecto antineoplásico.

La cumarina tiene actividad antineoplásica e inhibe la activación metabólica de carcinógenos potenciales, aún cuando carece de efecto anticoagulante. Se ha comprobado que la cumarina tiene actividad antineoplásica *in vivo* en melanomas malignos¹¹, carcinoma renal metastásico¹² y en carcinoma prostático¹³. En un estudio realizado *in vitro* se observó que la cumarina inhibe el crecimiento de 14 diferentes líneas tumorales humanas¹⁴. La cumarina es considerablemente menos tóxica que la warfarina por lo que puede ser administrada a dosis mayores sin

¹¹ Zanker, K.S. et al. 1984. *Coumarin in melanoma patients...* Drugs Exptl. Clin. Res. 11:767-774

¹² Dexeus, F. 1990. *Phase II study of coumarin and cimetidine in patients with metastatic renal carcinoma.* Journal of clinical Oncol. 8: 325-329

¹³ Mohler, J.L. et al.. 1994. *Coumarin (1,2-benzopyrone) for the treatment of prostatic carcinoma.* J.Cancer Res. Clin. Oncol. 120 suppl: S35-S38

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

efectos teratogénos¹⁵. Estudios en humanos han demostrado la tolerancia de hasta 7g diarios con efectos adversos de poca importancia y reversibles al suspender el tratamiento¹⁶.

Se desconocen los mecanismos exactos involucrados en los efectos antineoplásico y antimetastásico de la cumarina. Para explicar sus acciones se han propuesto dos mecanismos principales: 1) la inhibición del crecimiento de algunas células tumorales; 2) la estimulación de ciertos componentes del sistema inmune que participan en la reacción contra el tumor.

La vida media biológica de la cumarina es de 1.2h si se administra por vía oral y de 0.8h cuando es administrada por vía intravenosa. Se oxida tanto *in vivo* como *in vitro* en todas las posiciones de la molécula generando monohidroxycumarinas¹⁷ además de la posible hidrólisis del anillo lactónico y se han descrito como productos de excreción del ácido o-hidroxifenilacético y del ácido o-hidroxifeniláctico. Estos productos pueden estar acetilados, metoxilados, conjugados o sufrir otro tipo de transformación. Las principales vías metabólicas de la cumarina se muestran en la figura 1

La cumarina es metabolizada por el sistema del citocromo p50 (isoforme CYP2A6 en humanos), produciendo varios derivados monohidroxilados. Los productos de biotransformación varían cuantitativamente dependiendo de la especie¹⁸. El principal producto de biotransformación en el humano es la 7-hidroxycumarina, mientras que en el ratón es la 3-hidroxycumarina. El metabolismo del ratón es semejante al del ser humano ya que posee hidroxilasas hepáticas y los productos metabólicos son derivados hidroxilados, a diferencia de la rata en la que los derivados son ácidos hidroxifenilcarboxílicos mucho más tóxicos. Se ha propuesto que algunos de los productos de biotransformación de la cumarina

¹⁴ Marshall, M.E. 1994. *An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hidroxycoumarin*. J. Cancer Res. Clin. Oncol. **120** (suppl): S14-S16.

¹⁵ Cox, D. et 1989. *The rarity of liver toxicity in patients treated with coumarin (1,2-Benzopyrone)*. Human Toxicol. **8**: 501-506

¹⁶ Marshall *op. cit.*

¹⁷ Ritschel W.A. 1984. Therapeutic concentration of coumarone.... Drug Res. **34**: 907-910

¹⁸ Cohen, A. J. 1979. *Critical review of the toxicology of coumarin* Fd. Cosmet. Toxicol. **17** 277-289

puedan tener actividad inmunoestimulante, antineoplásica y antimetastásica mayor que la cumarina^{19,20}.

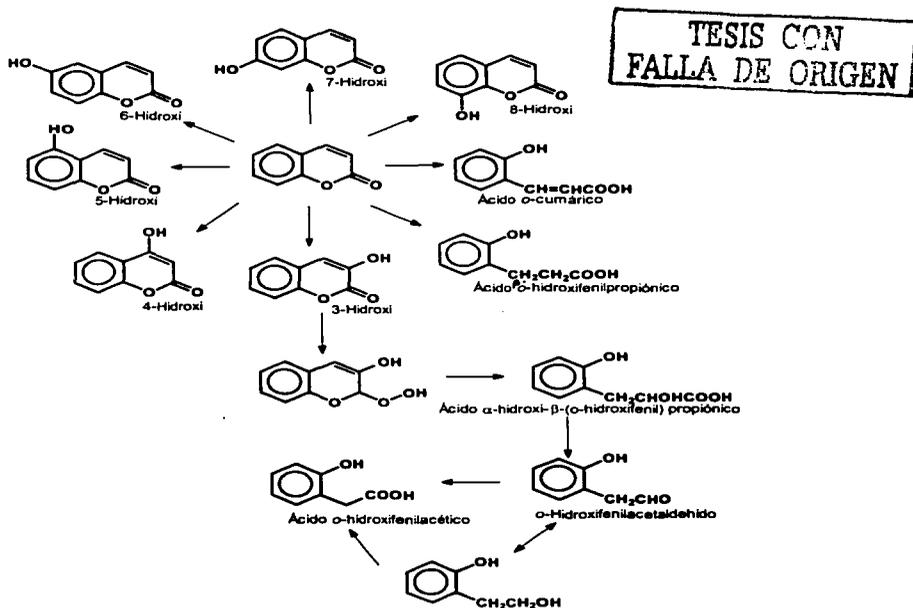


Fig 1 Vías metabólicas de la cumarina. Esta figura muestra los metabolitos de la cumarina, producidos por diferentes vías metabólicas. (Tomado de Thomes R.D. 1997).

¹⁹ Jiménez, O.A.; et al.. 1999 *Cytostatic activity of coumarin metabolites...* Melanoma Research. **9**. 243-247

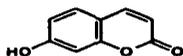
²⁰ Moran, E.O.; et al.. 1987. *Analysis of coumarin and its urinary metabolites by high-performance liquid chromatography.* Journal of Chromatography. **418**: 165-169

Por ejemplo, la 7-hidroxycumarina, a concentraciones 2mM, inhibe el crecimiento *in vitro* de células del adenocarcinoma pulmonar humano línea a549. Este mismo compuesto es un inhibidor más potente del crecimiento *in vitro* de líneas tumorales que la cumarina misma. En estos ensayos se ha observado que en las células expuestas al fármaco se disminuye la incorporación de análogos de timidina, aunque se desconocen los mecanismos moleculares que modulan estos efectos. Se ha propuesto que la cumarina y la 7-hidroxycumarina pueden controlar el crecimiento de ciertos tumores a través de la regulación de la expresión de oncogenes.

Las cumarinas constituyen un grupo importante de compuestos naturales; se les considera derivados de la lactona del ácido o-hidroxicinámico. La cumarina está constituida químicamente por la fusión de un anillo de benceno y un anillo de 1,2-pirano .

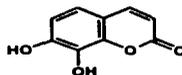
Las cumarinas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza como constituyentes de diversos órganos vegetales y pueden ser aisladas de raíces, tallos, hojas o frutos. Frecuentemente se encuentran juntas varias de ellas, haciendo difícil su aislamiento.

La mayoría de las cumarinas que se encuentran en forma libre en la naturaleza, contienen oxígeno en el átomo de carbono-7 (ya sea en forma de hidroxilo o alcoxilo). Otras posiciones pueden estar también oxigenadas, como en los siguientes compuestos:



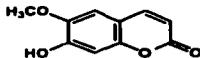
Umbeliferona

13



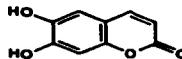
Dafnetina

14



Escopoletina

15



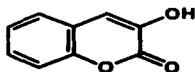
Esculetina

16

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

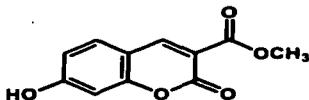
Estos antecedentes sugieren que los productos de biotransformación de la cumarina pueden tener actividades que contribuyen en el efecto antineoplásico de la cumarina.

La presente tesis se realiza con el fin de sintetizar productos de la biotransformación de la cumarina y análogos a éstos: 3-Hidroxicumarina, 3-Metoxicarbonil-7-hidroxicumarina (2), 3-Etoxicarbonil-7-hidroxicumarina (3), y 2-Etoxicarbonil-3 (3'-hidroxi-4'-metoxifenil) propenoato de etilo (4)

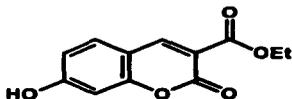


3-Hidroxicumarina (1)

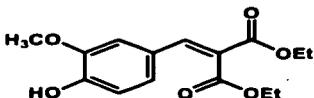
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



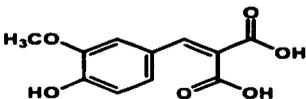
3-Metoxicarbonil-7-hidroxicumarina (2)



3-Etoxicarbonil-7-hidroxicumarina (3)



2-Etoxicarbonil-3 (3'-hidroxi-4'-metoxifenil)
propenoato de etilo (4)



Ácido 2-carboxi-3-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-
2-propenoico (5)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANTECEDENTES SOBRE LAS REACCIONES QUÍMICAS USADAS PARA LA OBTENCIÓN DE LOS PRODUCTOS

Reacción de Esterificación

Los ácidos carboxílicos reaccionan con alcoholes para formar ésteres a través de una reacción de condensación conocida como esterificación:



Las reacciones de esterificación son catalizadas por ácido. Proceden muy lentamente en ausencia de ácidos fuertes²¹, pero alcanzan el equilibrio (con el problema de que toma algunas horas) cuando un ácido y un alcohol son

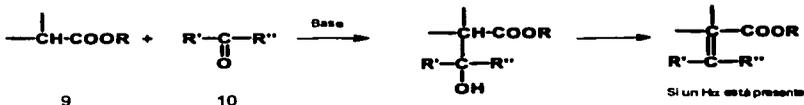
calentados a reflujo con una pequeña cantidad de ácido sulfúrico concentrado, cloruro de hidrógeno o ácido p-toluensulfónico. Como la posición del equilibrio determina la cantidad de éster formado, el uso de un exceso de ácido carboxílico o de alcohol, incrementa el rendimiento basado en el reactivo limitante. El componente que se use en exceso dependerá de su disponibilidad y costo. El rendimiento de una reacción de esterificación puede ser también incrementado removiendo el agua o el éster de la mezcla de reacción conforme se vaya formando. El agua puede ser removida de tres maneras: 1. Por destilación simple , 2. Por destilación azeotrópica y 3. Haciendo uso de un agente deshidratante o malla molecular.

Cuando R' es un grupo metilo, la manera más común de llevar el equilibrio hacia la formación de los productos es adicionando un exceso de metanol; cuando R' es etilo, es preferible remover el agua por destilación azeotrópica. Los catalizadores más comunes son el ácido sulfúrico (H₂SO₄) y el ácido p-toluensulfónico (TsOH)²².

Algunos derivados ácidos no requieren catalizador. R' puede ser cualquier grupo alquilo primario o secundario. Los alcoholes terciarios forman con facilidad un carbocatión como intermediario, obteniéndose el producto de eliminación. Los fenoles pueden ser usados para preparar ésteres fenólicos, pero los rendimientos son muy bajos.

Reacciones tipo aldólicas [adición-O-Hidroxo-C- (α-alcoxicarbonilalquílica)]

En presencia de una base fuerte, el carbón α de un éster carboxílico puede condensarse con el carbonilo de un aldehído o de una cetona para dar un β-hidroxiéster, el cual puede (o no) deshidratarse al éster α,β-insaturado.



²¹ Solomons, *Fundamentals of organic chemistry* 4a ed. 200. John Wiley & Sons p.779

²² March, J. *Advanced organic chemistry. Reactions, Mechanism and structure.* 4^o ed. 1992 Edit. John Wiley and Sons. New York, N.Y. p 393

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

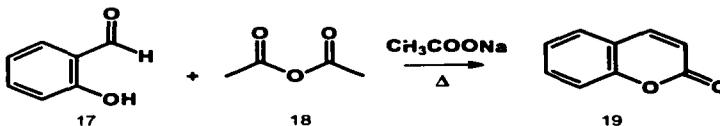
La base remueve el protón del carbono α al carbonilo para dar un carbanión, el cual se adiciona al $C=O$ del aldehído o cetona. El oxígeno toma un protón y el alcohol resultante puede (o no) deshidratarse, dependiendo de si hay un hidrógeno α presente y si el nuevo enlace que se forma estaría conjugado con dobles enlaces ya existentes en la molécula.

Métodos de síntesis de las cumarinas

Las síntesis más importantes de cumarinas utilizan como materia prima a los fenoles y a los salicilaldehídos, los cuales se transforman en cumarinas al hacerlos reaccionar a través de métodos bien conocidos como los de Perkin, Knoevenagel y von Pechmann

Reacción de Perkin

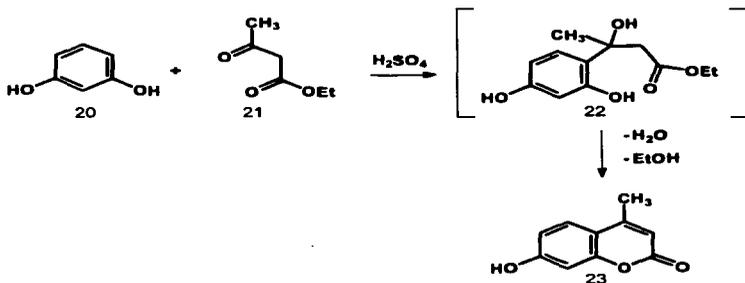
Esta síntesis consiste en la condensación entre un aldehído aromático y un anhídrido de ácido carboxílico, en presencia de la sal alcalina de un ácido que generalmente es la correspondiente al mismo ácido.



Reacción de Von Pechmann

Los fenoles reaccionan con los β -cetoésteres bajo condiciones ácidas (incluidos los cetoésteres cíclicos) para dar una cumarina. Como catalizador se usa el ácido sulfúrico concentrado, también se puede usar el fluoruro de hidrógeno o una resina de intercambio catiónico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Reacción de Knoevenagel

La reacción de Knoevenagel se lleva a cabo entre un aldehído (sin hidrógenos en el carbono α) y un compuesto que tenga un grupo metileno activo, en presencia de una amina. Para obtener la cumarina, un sustituyente 2-hidroxi debe estar presente en el aldehído aromático.

Las condiciones de la reacción de Knoevenagel son mucho menos severas que las asociadas a la reacción de Perkin y a la de Pechmann. De todas maneras, es necesario descarboxilar el producto para obtener una cumarina no sustituida en la posición 3, esta es otra de las razones por las que se prefiere la reacción de Knoevenagel a la de Perkin.

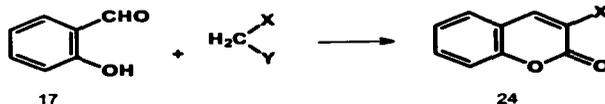


Fig. 2 Reacción de Knoevenagel para la obtención de cumarinas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dos mecanismos han sido propuestos para la reacción de Knoevenagel²³. En uno de ellos, la amina puede formar una imina o sal de iminio (**25**) (Fig. 3). Una vez formada, esta sal reacciona subsecuentemente con el enolato del compuesto con el metileno activo. Bajo circunstancias normales, la eliminación de la amina daría el derivado del ácido cinámico (**27**). Cuando un grupo *o*-hidroxi está presente en el aldehído aromático, puede ocurrir el cierre del anillo para dar la cumarina²⁴ (reacción de transesterificación intramolecular).

En el segundo mecanismo propuesto, el carbanión derivado del compuesto con el metileno activo por la desprotonación de la amina, ataca al carbonilo sin la posterior intervención de la base. (Fig. 4)

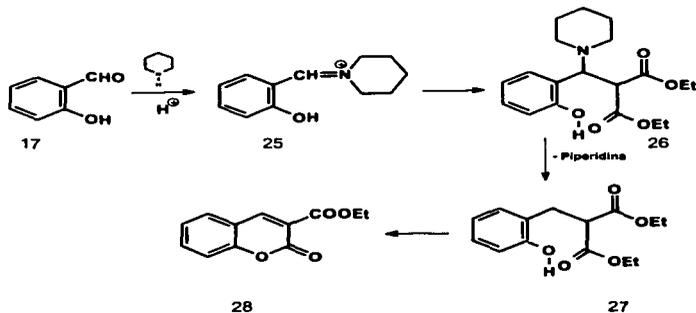


Fig. 3

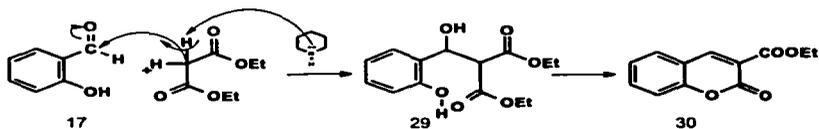


Fig. 4

²³ *idem* p.804

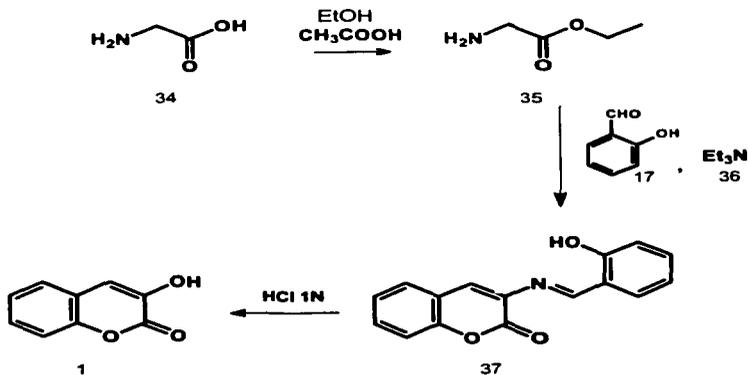
²⁴ *idem* p.804

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Obtención de la 3-Hidroxicumarina

En 1986 Kokotos y Tzougraki reportaron una ruta sintética para obtener la 3-Hidroxicumarina a partir de la glicina. En esta ruta el aminoácido se hace reaccionar con etanol en presencia de ácido acético, con calentamiento a reflujo para obtener el éster etílico de la glicina. La salicilidénaminocumarina (**37**) se obtiene a partir de dicho éster cuando una solución acuosa del mismo se trata a temperatura ambiente con salicilaldehído en presencia de trietilamina como catalizador.

La 3-hidroxicumarina se obtiene después de calentar a reflujo (**37**) con ácido clorhídrico 1N.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Condiciones experimentales.

De la totalidad de los experimentos realizados, sólo se incluyen en las tablas los que aportaron los datos más relevantes en el estudio de las reacciones.

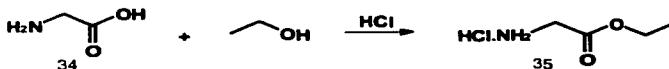
1. Síntesis de la 3-hidroxycumarina (1)

La obtención de la 3-hidroxycumarina se llevó a cabo por medio de una condensación de Knoevenagel.

La ruta sintética seguida para obtener la 3-hidroxycumarina fue la reportada por Kokotos y Tzougraki, usando ácido clorhídrico en lugar de ácido acético (ver página 17).

a) Síntesis del Clorhidrato del glicinato de etilo (35)

El Clorhidrato del glicinato de etilo (39) fue preparado a través de una reacción de esterificación de la glicina con etanol, haciendo pasar por la solución una corriente de ácido clorhídrico gaseoso, HCl(g).



Se realizaron experimentos variando la temperatura y el tiempo de la reacción, y los mejores resultados se obtuvieron cuando la cantidad de ácido clorhídrico gaseoso que se hizo circular fue alta.

Para obtener el clorhidrato del glicinato de etilo, inicialmente se pensó en estudiar dos variables independientes: el tiempo y la temperatura de reacción.

La primera variable independiente que se estudió fue el tiempo de reacción, para lo cual se propusieron experimentos a 1,2,4 y 6h. La segunda variable que se estudió fue la temperatura, para lo cual la reacción se llevo a cabo en baño de

hielo (4°C), temperatura ambiente (25°C) y con calentamiento a reflujo (96°C) usando 100mL de ácido clorhídrico. Los mejores resultados se obtuvieron calentando a reflujo durante 6h (Fig.5, tabla 1).

En general cuando se pasa a través de la solución un exceso de ácido clorhídrico gaseoso (48.84g) se incrementa el rendimiento

Se repitió el experimento con 112g de ácido clorhídrico a 2, 4 y 6h de reacción pero se observó que el rendimiento no varía demasiado (Fig..5, tabla 1).

Las condiciones con las que se obtuvo mayor rendimiento del producto fueron las siguientes:

Tabla 1

Temperatura	Tiempo/h	Cantidad de ácido/g	% de rendimiento
Calentamiento a reflujo	6	44.84	90.20
Ambiente	1	112.1	88.5

Sin embargo, si observamos los resultados de la tabla 1, nos damos cuenta que usando 112.1g de ácido, temperatura ambiente y 1 hora de reacción el rendimiento es del 88.5%. Se decidió continuar con estas condiciones para sintetizar el éster (39) porque el rendimiento no varía demasiado y además es más económico realizar una reacción a temperatura ambiente durante una hora que calentar a reflujo por 6 horas.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A continuación se muestran las gráficas de los experimentos realizados:

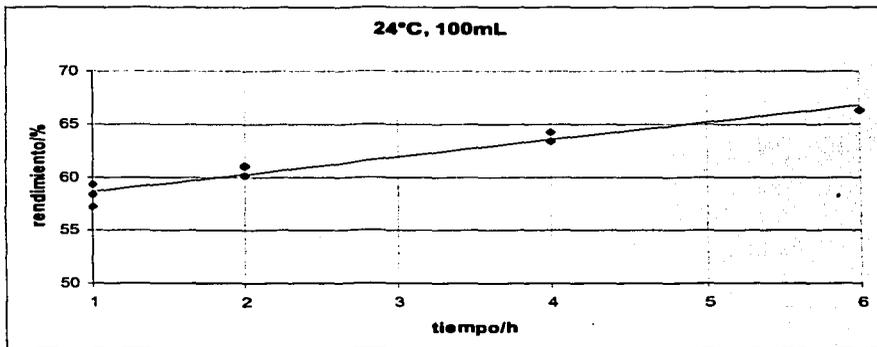


Fig. 5. Obtención de (34) a temperatura ambiente con 100mL de ácido clorhídrico.

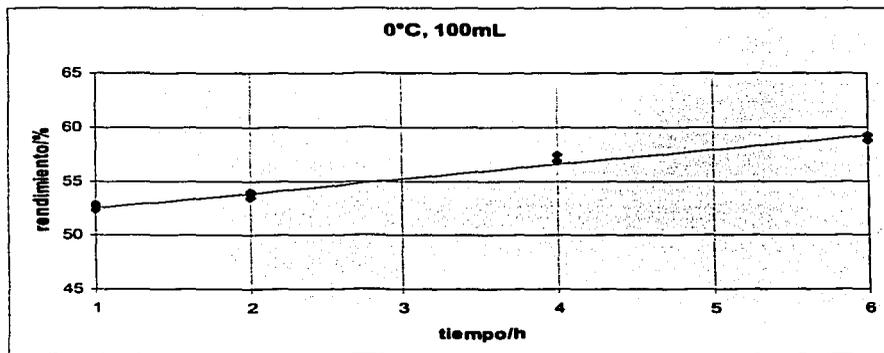


Fig. 6. Obtención de (34) a 0°C con 100mL de ácido clorhídrico

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

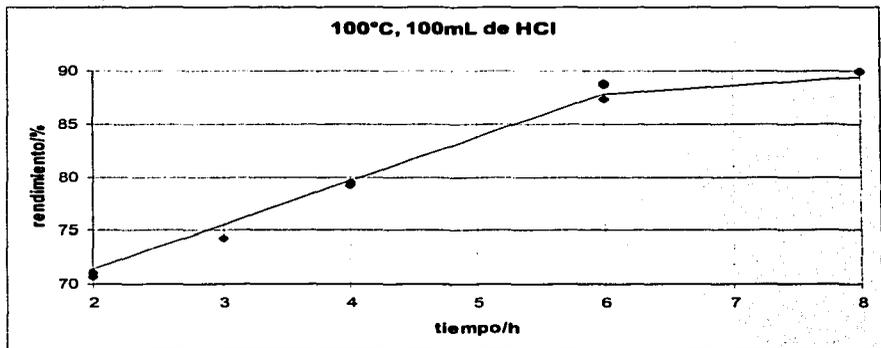


Fig. 7. Obtención de (34) a 100°C con 100mL de ácido clorhídrico

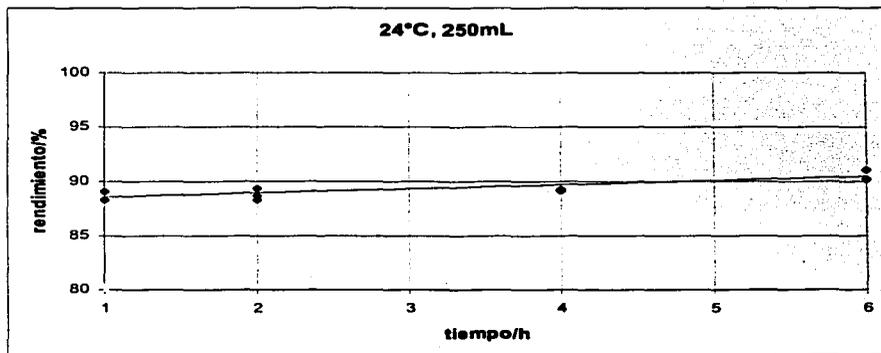
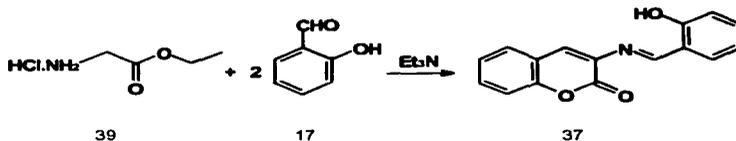


Fig. 8. Obtención de (34) a temperatura ambiente con 250mL de ácido clorhídrico

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

b) Síntesis de la 3-Salicilidénaminocumarina (37).

Continuando con la síntesis de la 3-Hidroxycumarina, se estudió la condensación del salicilaldehído con el clorhidrato del glicinato de etilo (39) en presencia de la trietilamina, a temperatura ambiente y bajo una atmósfera de nitrógeno, para obtener la 3-Salicilidénaminocumarina (37).

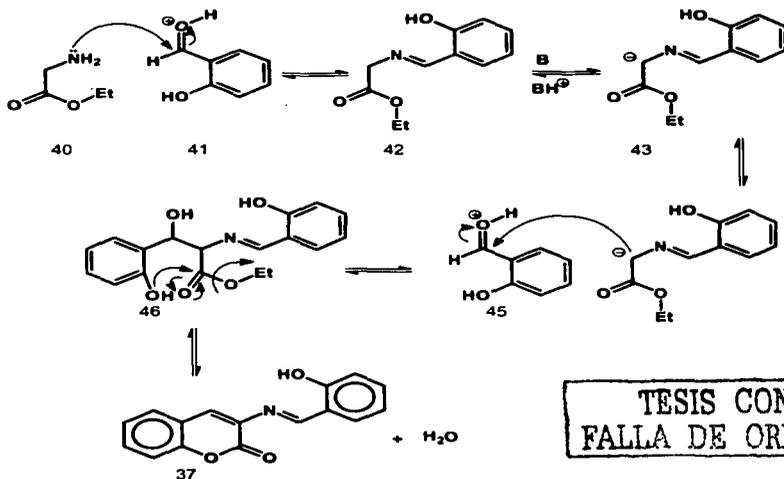


El problema principal que presentaba esta síntesis era que al usar agua como disolvente se formaba además de la cumarina (37) un producto polimérico que hacía extremadamente difícil la purificación de la cumarina.

En este sentido, al usar la trietilamina como disolvente en lugar de agua se determinó que el compuesto (37) se forma con un buen rendimiento cuando una solución de (39) se trata con un 10% de exceso de salicilaldehído bajo una agitación vigorosa con trietilamina como catalizador y disolvente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Un mecanismo razonable se muestra a continuación:

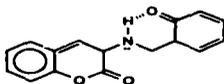


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Después de que se forma la base de Schiff (**42**), el grupo metileno está lo suficientemente activado por dos grupos electroattractores (carboxi e imino) para permitir la condensación con una molécula de salicilaldehído. Este intermediario tiene la geometría adecuada para que ocurra la reacción de ciclización intramolecular para dar el producto (**37**).

En la parte de los antecedentes se describe la reacción reportada por Kokotos y Tzougraki en la cual se indica que basta con hacer reaccionar a (**37**) con ácido clorhídrico 1N para obtener la 3-hidroxicumarina. No obstante que se realizaron varios intentos por reproducir los resultados con las condiciones indicadas por ellos, no se consiguió obtener el resultado esperado. Por esto se decidió probar la influencia de dos variables independientes en la reacción, siendo éstas el tiempo

de reacción y la concentración de ácido clorhídrico. Se encontró que calentando la reacción a reflujo durante 24h con ácido clorhídrico 4M el rendimiento de la reacción era muy bajo. Esta disminución en la reactividad del compuesto (37) frente a una hidrólisis, si se compara con la de otras bases de Schiff, probablemente es resultado de un incremento en la estabilidad de la estructura particular del sustrato sobre el que se va a llevar a cabo la reacción de hidrólisis propiciada por un puente de hidrógeno intramolecular entre el nitrógeno y el grupo hidroxilo.



Como resultado del estudio anterior se logró establecer que bajo condiciones más vigorosas (HCl 8M, 24h de reflujo), la hidrólisis de (37) produce el compuesto esperado: la 3-Hidroxycumarina (1).

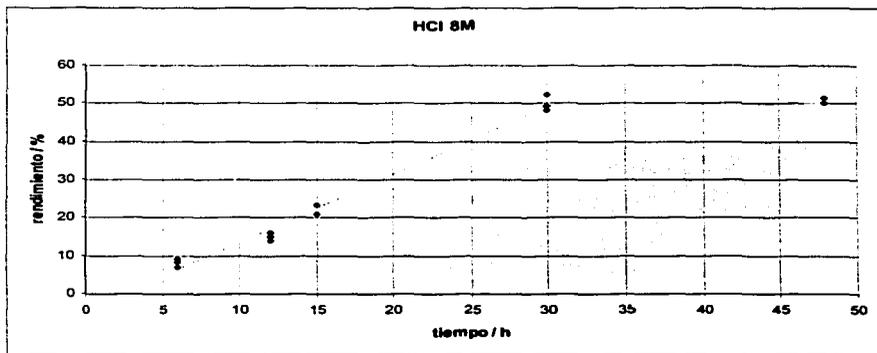


Fig. 9. Rendimiento de (1) en función del tiempo de reacción con HCl 8M

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la gráfica de la fig.9 se observan los experimentos que se realizaron para la obtención de la 3-hidroxicumarina con HCl 8M.

Caracterización del Clorhidrato del glicinato de etilo

Punto de fusión: 143-144°C

Espectro de Infrarrojo, pastilla de KBr (Espectro 1)

IR: (cm⁻¹): 2977.83 (NH₃⁺), 1746.02 (éster)

Caracterización de la 3-Salicilidénaminocumarina

Punto de fusión: 191-192°C

Espectro de Infrarrojo, pastilla de KBr (Espectro 2)

IR: (cm⁻¹): 3390.83 (OH), 1717.31 (C=O), 1624.73 (C=C), 1605.54 (C=N).

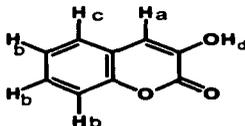
Caracterización de la 3-Hidroxicumarina

Punto de fusión: 151°C

Espectro de Infrarrojo, pastilla de KBr (Espectro 3)

IR: (cm⁻¹): 3370.78 (OH), 3029.51 (C-H aromático), 1690.83 (C=O), 1651.38, 1599.88 (C=C en el anillo de la pirona).

Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ¹H (300MHz, DMSO). (Espectros 4 y 5, intercambio con D₂O) **H_a** δ 7.11 (s, 1H), **H_b** δ 7.31 (m, 3H), **H_c** δ 7.53 (dd, 1H, *J* = 7.8Hz *J* = 1.5Hz), **H_d** δ 10.37 (s, 1H) -D₂O



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 10

A 7.11ppm se observa un singulete que integra para un hidrógeno: H_a. La siguiente señal es un multiplete que integra para tres hidrógenos, al ampliar la señal del multiplete se observan: un doblete dobleteado que corresponde a un hidrógeno acoplado con otro en posición *orto* y uno más en posición *meta* (*J*_{orto} = 7.2Hz, *J*_{meta} = 1.8Hz) y dos tripletes dobleteados que corresponden a los otros dos

hidrógenos que se acoplan con dos hidrógenos en posición *orto* y uno más en posición *meta* ($J= 7.5, 7.5, 1.5\text{Hz}$).

A 7.53ppm se encuentra una señal que corresponde a un doblete dobleteado que integra para un protón (H_c) acoplado con un hidrógeno en posición *orto* ($J= 7.8\text{Hz}$) y otro en posición *meta* ($J= 1.5\text{Hz}$). El protón H_d genera una señal que corresponde a un singulete que integra para un hidrógeno a 10.37ppm y que desaparece con agua deuterada. Fig 10

2. Síntesis de la 3-metoxicarbonil-7-hidroxicumarina (2)

Para la obtención de la 3-metoxicarbonil-7-hidroxicumarina (2) se hizo reaccionar el 2,4-dihidroxibenzaldehído con malonato de dimetilo en presencia de piperidina . Se hicieron varios experimentos para determinar la influencia que tendría en esta reacción el tiempo. Los experimentos realizados están resumidos en la gráfica de la fig. 11.

Se encontró que en los experimentos en los que se calentó a reflujo de 2 a 6h, se presentaban dificultades para que el producto precipitara. El producto quedaba disuelto en un aceite del que era muy difícil separarlo. Por esto se decidió probar más experimentos incrementando el tiempo de reacción.

Se decidió fijar el tiempo de reacción en 24h para experimentos posteriores porque aunque no es grande la diferencia entre rendimientos al efectuar la reacción durante 12 y 24h (la diferencia es de 7.33%), con 24h de reacción el producto precipita rápidamente y no se presentan problemas de aislamiento.

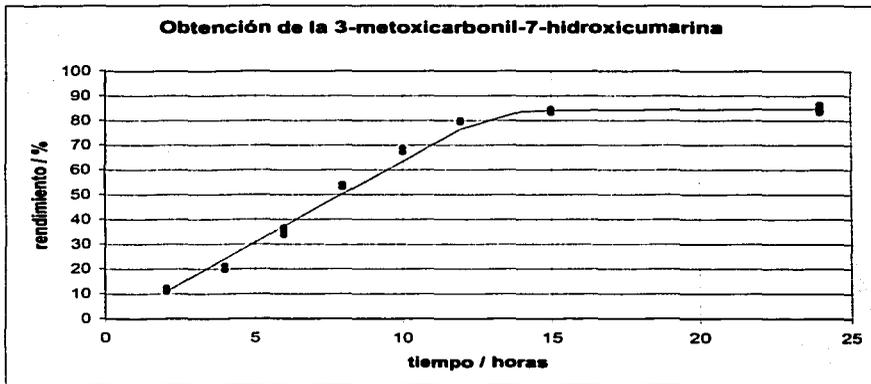
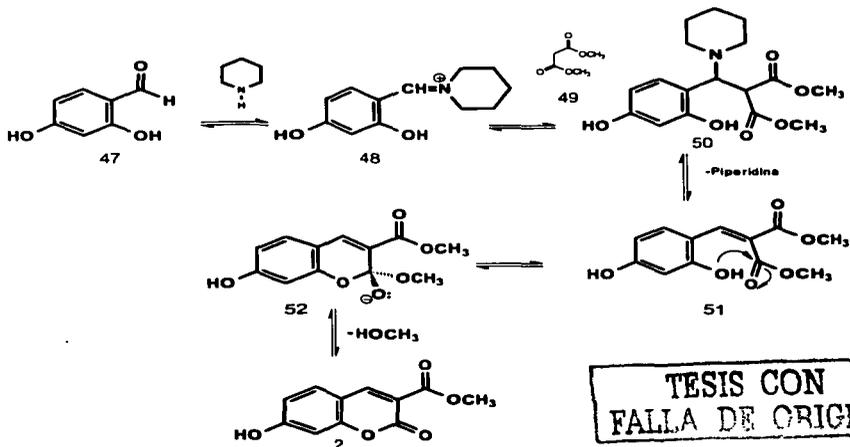


Fig. 11. Experimentos para la obtención de (2)

El 2,4-dihidroxi-benzaldehído (47) se mezcla con el malonato de dimetilo (49) y unas gotas de piperidina, esta mezcla se calienta a reflujo. Después de 24h de reacción la mezcla se vierte en un vaso de precipitados que contiene ácido clorhídrico al 10% y hielo. La 3-metoxicarbonil-7-hidroxicumarina (2) precipita rápidamente.

Un mecanismo que permite explicar la formación del producto, implica que reaccione el 2,4-dihidroxi-benzaldehído con la piperidina para que se obtenga la sal de iminio (48) que subsecuentemente reacciona con el ion enolato del malonato de dietilo para formar la estructura (59). Al existir la posibilidad de formarse un enlace conjugado a los dobles enlaces de los carbonilos del diéster, se elimina la piperidina de la molécula para dar paso a la formación de (51).

Ahora el oxígeno de uno de los hidroxilos del 2,4-dihidroxibenzaldehído y el átomo de carbono del carbonilo del diéster tienen la geometría ideal para reaccionar entre sí y para formar un anillo de seis miembros, aunque el carbonilo del que hablamos esté conjugado con un doble enlace, se ganará estabilidad al formarse un anillo de seis miembros, se forma un intermediario tetraédrico (52) y se elimina metóxido para obtener el compuesto (2).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Caracterización de la 3-metoxicarbonil-7-hidroxicumarina (2)

Punto de fusión: 269-270°C

Espectro de Infrarrojo, Pastilla de KBr (Espectro 6)

IR (cm^{-1}): 3292.25 (OH), 3059.63 (C-H aromático), 1720.51 (C=O éster), 1697.29 (C=O en el anillo de pirona), 1590.40 (C=C en el anillo de pirona).

Espectro de RMN-¹H (300 MHz, DMSO) (Espectros 7 y 8, intercambio con D₂O):

H_a δ 3.76 (s, 3H), H_b δ 6.71 (dd, 1H, $J = 2.7, 0.4\text{Hz}$), H_c δ 6.82 (dd, 1H, $J = 8.7$,

2.2Hz), H_d δ 7.72 (d, 1H, J = 8.4Hz), H_e δ 8.66 (d, 1H, J = 0.6Hz), H_f δ 11.09 (s, 1H)- D_2O .

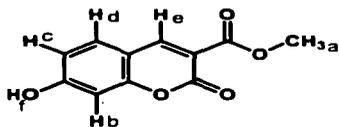
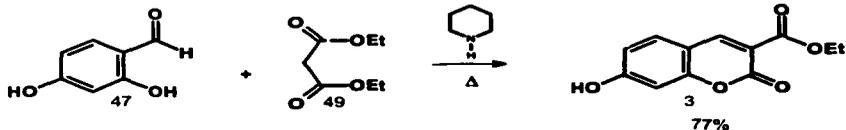


Fig. 12

La señal a campo más alto que se observa es la de 3.76ppm, esta señal es un singlete que integra para 3 protones y que corresponde a un metilo (H_a). La siguiente señal se encuentra a 6.71ppm y es un doblete dobleteado que corresponde al hidrógeno H_b acoplado con un hidrógeno en la posición *meta* (H_c , J = 2.7Hz) y uno más en la posición *para* (H_d , J = 0.4Hz). A 6.82ppm aparece un doblete dobleteado que integra para 1H y que corresponde a H_c , este hidrógeno se acopla con H_d en posición *orto* (J = 8.7Hz) y con H_b en posición *meta* (J = 2.2Hz). La penúltima señal, a 8.66ppm es un doblete que integra para 1H y que corresponde al hidrógeno H_e , se observa un doblete debido al acoplamiento con el H_d (J = 0.6Hz). A campo más bajo aparece una señal que corresponde con H_f , aparece como un singlete que integra para un protón y desaparece con agua deuterada, Fig 12.

3. Síntesis de la 3-Etoxicarbonil-7-hidroxicumarina (3)

Una vez que se establecieron las mejores condiciones para obtener el compuesto (2), se realizó la síntesis de la 3-Etoxicarbonil-7-hidroxicumarina (3), para lo cual se utilizó el 2,4-dihydroxibenzaldehído y el malonato de dietilo como materia prima.



La reacción se llevó a cabo con calentamiento a reflujo por 24h. Se obtuvo el compuesto (3) con un rendimiento del 77%

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Caracterización

Punto de fusión: 172-173°C

Espectro de Infrarrojo, Pastilla de KBr (Espectro 9)

IR (cm⁻¹): 3547.16 (OH), 3054.71 (CH aromático), 1736.83 (C=O éster), 1617.93 y 1604.93 (C=C en el anillo de la pirona).

Espectro de RMN-¹H (300 MHz, DMSO) (Espectros 10 y 11, intercambio con D₂O): H_a δ 1.24 (t, 3H, J= 7.2,7.2Hz), H_b δ 4.20 (m, 2H, J= 7.2,7.2,7.2Hz) H_c δ 6.71 (dd, 1H, J= 2.4,0.4Hz), H_d δ 6.83 (dd, 1H, J= 8.7,2.2Hz), H_e δ 7.74 (d, 1H, J= 8.7Hz), H_f δ 8.66 (d, 1H, J= 0.6Hz), H_g δ 11.03 (s, 1H) - D₂O

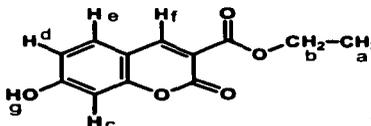


Fig. 13

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A campo más alto aparece la señal del metilo, Fig. 13 (H_a), es un triplete (ya que se acopla con los dos protones H_b) con constantes de acoplamiento $J = 7.2, 7.2\text{Hz}$ y que integra para tres protones. La siguiente señal es un cuadruplete que integra para 2 protones y que corresponde a los hidrógenos del metileno (H_b) acoplados con los 3 hidrógenos del metilo ($J = 7.2\text{Hz}$). En la región de los hidrógenos aromáticos, a 6.71ppm se observa un doblete dobleteado que integra para 1H que corresponde al hidrógeno H_c el cual está acoplado con H_d en posición *meta* ($J = 2.4\text{Hz}$), y con H_e en posición *para* ($J = 0.4\text{Hz}$). A 6.83ppm se observa un doblete dobleteado que integra para 1 protón y que corresponde a H_d acoplado en posición *orto* con H_e ($J = 8.7\text{Hz}$) y en posición *meta* con H_c ($J = 2.2\text{Hz}$). La señal de H_e se observa a 7.74ppm como un doblete que integra para un solo protón. H_e se acopla con el hidrógeno que tiene en posición *orto*, H_d. En 8.66 se encuentra

un doblete que integra para un protón, esta señal es la que produce el Hidrógeno H_r , éste se acopla con H_o ($J = 0.6\text{Hz}$).

Finalmente, la señal que desaparece con agua deuterada se encuentra a 11.03ppm, es un singulete que integra para 1 protón (H_g).

4. Síntesis del 2-Etoxicarbonil-3-(3'-hidroxi-4'-metoxifenil)propenoato de etilo (4)

El 2-etoxicarbonil-3-(3'-hidroxi-4'-metoxifenil)propenoato de etilo (4) se sintetizó utilizando como materia prima el 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (53) (vainillina) y el malonato de dietilo.

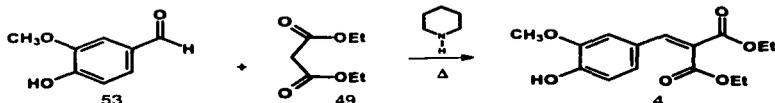
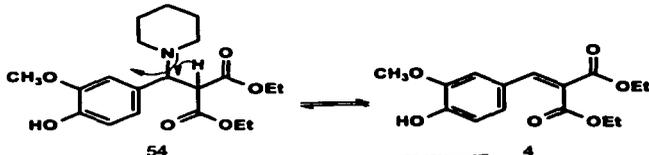


Fig. 3.10

La reacción procedió cuando se calentó la mezcla de reacción a reflujo con piperidina por 24 horas.

El mecanismo de reacción a través del cual se puede explicar la formación del producto (4), implica (como ya se estableció en el esquema de la página 28) la formación de la sal de iminio y la adición del carbanión del malonato de dietilo para formar el intermediario (54), la piperidina reacciona con el carbonilo de (53) para formar una sal de iminio, el cual posteriormente reacciona con el metileno activo del malonato de dietilo. el carbono del grupo aldehído de (53), el oxígeno se estabiliza tomando el protón que la piperidina había abstraído al malonato de dietilo. Por último se elimina el ion piperidinio (54) dando paso a la formación de (4).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

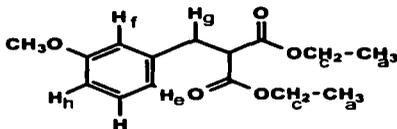
Caracterización del 3-etoxicarbonil-3-(3'-hidroxi-4'-metoxifenil) propenoato de etilo (4)

Punto de fusión: 101-102°C

Espectro de Infrarrojo, Pastilla de KBr (Espectro 12)

IR (cm⁻¹): 3479.16(OH), 3027.08 (CH aromático), 1732.11 (C=O éster), 1682.31 (alqueno trisustituido), 1603.79 y 1586.25 (enlace C=C del anillo aromático).

Espectro de RMN-¹H (300 MHz, DMSO) (Espectros 13 y14, intercambio con D₂O): H_a δ 1.23 (m, 6H, J= 7.2,7.2Hz), H_b δ 3.75 (s, 3H) H_c δ 4.25 (m, 4H, J= 7.0,7.0,7.0Hz J= 7.2,7.2,7.2Hz), H_d δ 6.83 (d, 1H, J= 8.1Hz), H_e δ 7.01 (dd, 1H, J= 8.4,2.1Hz), H_f δ 7.09 (d, 1H, J= 2.1Hz), H_g δ 7.59 (s, 1H), H_h δ 9.88 (s, 1H)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 14

Observando las señales ampliadas del espectro de RMN-¹H del 2-Etoxicarbonil-3 (3'-hidroxi-4'-metoxifenil) propenoato de etilo se puede apreciar que el multiplete que aparece a 1.23ppm son en realidad, dos tripletes traslapados correspondientes a las señales de los Hidrógenos H_a (Fig. 14). Cada uno de ellos integra para 3 hidrógenos, los hidrógenos de los metilos se acoplan con los dos hidrógenos del metileno produciendo los dos tripletes, el primero con constantes J= 7.2 y 7.2Hz, y el segundo con las mismas constantes de acoplamiento.

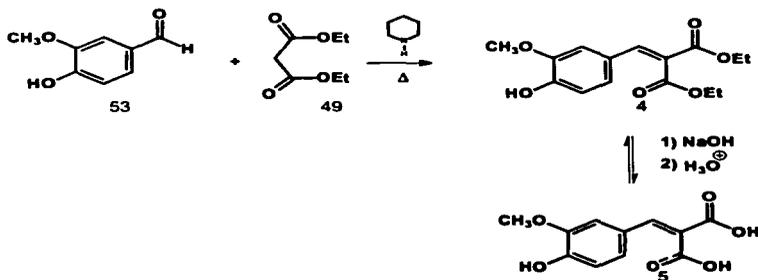
A continuación aparece un singulete que integra para 3 protones, esta señal (3.75ppm) pertenece al metoxilo (protones H_b). Al igual que la primera señal, al analizar la ampliación de la señal a 4.25ppm y que integra para 4H, se observan dos cuadrupletes pertenecientes a los metilenos (protones H_c). Los metilenos

acoplados con cada uno de los tres protones del grupo metilo producen un cuadruplete, el primero a 4.21ppm y el segundo a 4.29ppm con constantes de acoplamiento, $J = 7.2, 7.2$ y 7.2Hz en cada uno de los dos cuadrupletes.

El doblete que integra para 1 protón es originado por el hidrógeno H_a acoplado con el hidrógeno H_b en posición *orto* ($J = 8.1\text{Hz}$). La siguiente señal es un doblete doblete que integra para un protón, generado por el hidrógeno H_b acoplado con H_a en posición *orto* ($J = 8.4\text{Hz}$) y con H_c en posición *meta* ($J = 2.1\text{Hz}$). A 7.09ppm se observa un doblete que corresponde al hidrógeno H_c acoplado con H_b en posición *meta* ($J = 2.1\text{Hz}$). La señal producida por H_d es un singulete a 9.88ppm que integra para un protón y desaparece con agua deuterada.

5. Síntesis del ácido 2-carboxi-3-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-2-propenóico (5)

Para obtener el ácido 2-carboxi-3-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-2-propenóico, se partió del 2-Etoxicarbonil-3-(3'-hidroxi-4'-metoxifenil) propenoato de etilo (5) y éste fue sometido a una hidrólisis básica.



Dado que esta reacción no está descrita para este compuesto, se probaron diferentes concentraciones de NaOH.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Al realizar el estudio de la reacción se encontró que a bajas concentraciones de hidróxido de sodio, 2.5 a 6M, se obtiene el ácido deseado con un rendimiento muy bajo. Además del ácido se separaron otros dos subproductos, siendo uno de ellos el reactivo y otro que al ser caracterizado por sus datos espectroscópicos se identificó como 4-Hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vainillina), que había sido utilizado como materia prima en la obtención del sustrato (4). Una propuesta razonable para explicar estos resultados es que paralelo al paso lento de la hidrólisis se lleva a cabo el ataque de un grupo hidroxilo en el carbono (1) de la estructura (55) que seguido de los pasos que se muestran en la figura 15 permiten explicar la formación de la vainillina (53) (reacción de retroaldólica).

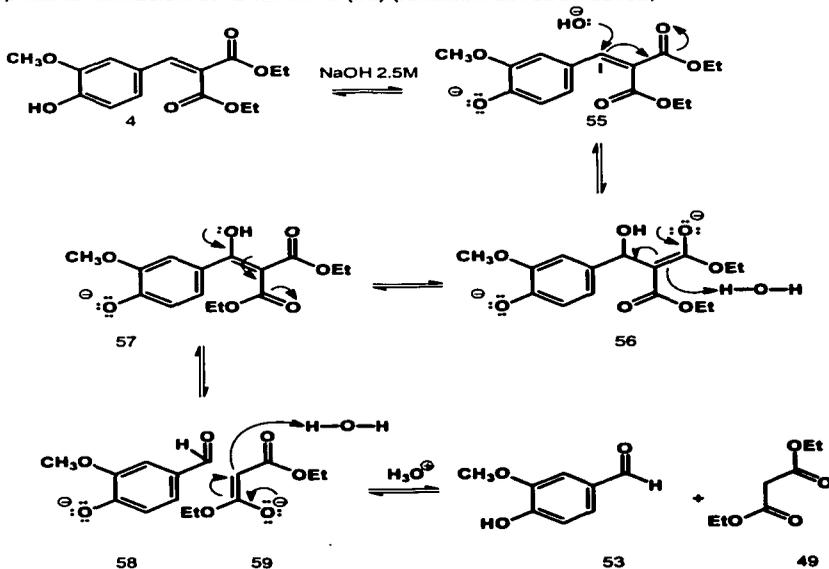


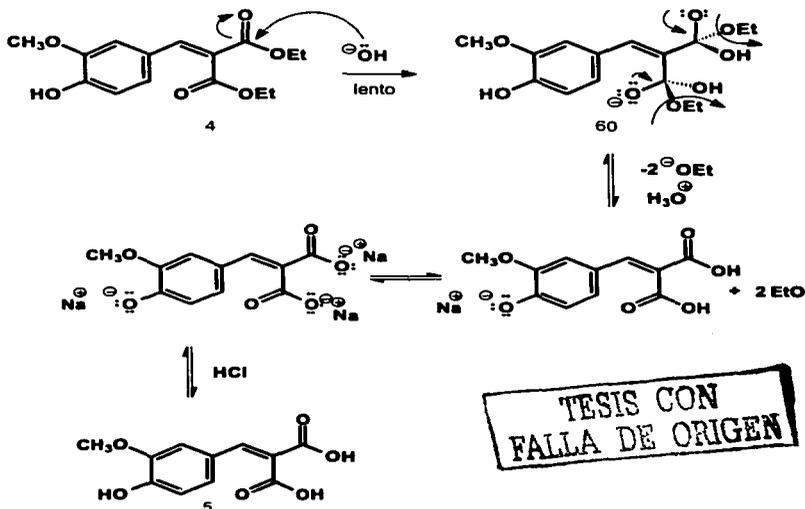
Fig. 15

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con base en el resultado anterior, se decidió efectuar la reacción incrementando la concentración del hidróxido de sodio.

Se realizaron experimentos con NaOH 8M manejando el tiempo como variable independiente. Dejando la reacción con calentamiento a reflujo durante 8h se obtuvo el mejor rendimiento. Se probó un experimento de 10h pero como se observa en la fig. 16 el rendimiento no varía demasiado.

La formación del ácido (5) se explica mediante el mecanismo típico de una hidrólisis de un grupo éster, el cual pasa por la formación de un intermediario tetraédrico. El hidroxilo ataca a los carbonilos del éster polarizando el enlace C=O, se forma un intermediario tetraédrico (43) y se expulsa al etóxido como mejor grupo saliente.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

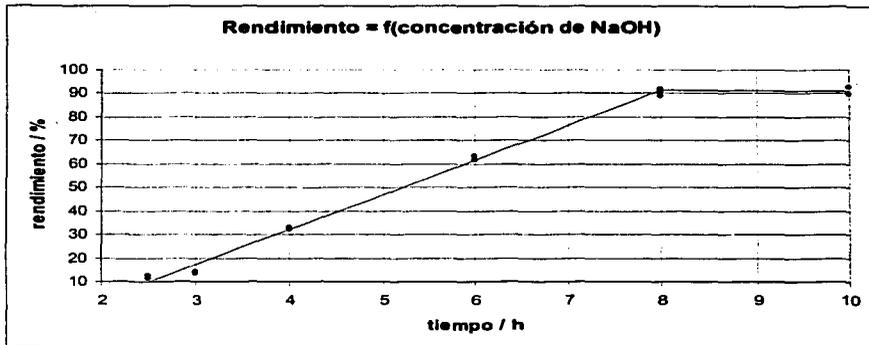


Fig. 16 Rendimiento de (5) en función del tiempo de reacción.

Caracterización del ácido 2-carboxi-3-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil) -2-propenóico

Punto de fusión: 193-194°C

Espectro de Infrarrojo, Pastilla de KBr (Espectro 15)

IR (cm⁻¹): 3487.49 (OH del ácido), de 2586.76 a 2945.65 pequeñas bandas (-COOH), 1709.17 (C=O ácido), 1412.61 (puentes de H [fig. 17]), 1610.28 y 1585.25 (C=C del anillo bencénico).

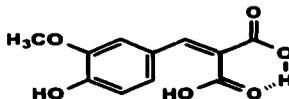


Fig. 17

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Espectro de RMN-¹H (300 MHz, DMSO) (Espectros 16 y 17, intercambio con D₂O): **H_a** δ 3.74 (s, 3H), **H_b** δ 6.80 (d, 1H, *J*= 8.4Hz), **H_c** δ 7.05 (dd, 1H, *J*= 8.4,2.1Hz), **H_d** δ 7.16 (d, 1H, *J*= 1.8Hz), **H_e** δ 7.41 (s, 1H), **H_f** δ 9.75 (s, 1H) –D₂O, **H_g** δ 13.07 (s, 2H) –D₂O.

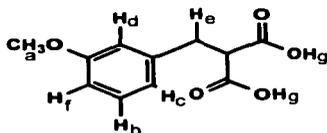


Fig. 18

A 3.74ppm se observa la primera señal, un singulete que integra para 3 protones y que corresponde a los hidrógenos H_a (Fig.18) del grupo metoxilo. La siguiente señal es un doblete que integra para un hidrógeno y es originado por el protón H_b acoplado con H_c en posición *orto* (*J*= 8.4Hz). El protón H_c se acopla con un protón en posición *meta* (*J*= 1.8Hz) y produce un doblete que integra para un protón a 7.16ppm.

En 7.41ppm se observa un singulete que integra para un protón y que corresponde a H_e. Entre las señales que desaparecen con agua deuterada se encuentra una a 9.75ppm, un singulete que integra para un protón (H_f) y otra a 13.07ppm que es un singulete que integra para dos protones (los que han sido identificados como H_g).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PARTE EXPERIMENTAL

Los disolventes usados para las recrystalizaciones fueron de grado técnico y se purificaron en el laboratorio.

En el desarrollo del trabajo experimental, el progreso de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina (cromatoplasas Merck de sílica gel 60 F₂₅₄; 0.25mm de espesor y aproximadamente 2.0 cm de ancho y 5.0cm de largo). Como reveladores se utilizaron luz ultravioleta o vapores de yodo.

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Síntesis del clorhidrato del glicinato de etilo (35)

En un matraz de tres bocas de fondo redondo de 500mL con junta esmerilada 24/40, se colocan 5g de glicina (6.66×10^{-2} moles) con 150mL de etanol (EtOH) absoluto. Se hace circular una corriente de ácido clorhídrico gaseoso HCl(g) durante media hora. La solución se deja enfriar a temperatura ambiente y se espera a que los cristales de clorhidrato de glicinato de etilo precipiten.

El producto se recrystaliza de agua obteniéndose cristales blancos con punto de fusión 143-144°C. Rendimiento 88.5%, 7.59g.

Síntesis de la 3-salicilidénaminocumarina (37)

En un matraz de fondo redondo de 100mL con una boca y junta esmerilada 14/20 se colocan 5g de (35). Se adicionan 8mL (9.34g, 1.01×10^{-1} g) de salicilaldehído previamente disueltos en 14mL de trietilamina. La reacción se efectúa bajo atmósfera de nitrógeno durante 18h.

Al finalizar la reacción el producto precipita, se filtra y se lava con agua. Se recrystaliza dos veces de dimetilformamida-agua. Se obtienen 7.31g (67% rendimiento) de producto, cristales amarillos con punto de fusión 191-192°C.

Síntesis de la 3-hidroxycumarina (1)

Una suspensión de 1g (3.77×10^{-3} moles) de (37) en 20mL (4.39g, 1.20×10^{-2} moles) de ácido clorhídrico 8M se calienta a reflujo durante 48h. Después de filtrar

la mezcla de reacción caliente, el filtrado se enfría hasta que aparezca un precipitado. El producto crudo se purifica por medio de una recrystalización de agua, utilizando carbón activado. Se obtienen cristales de color blanco con p.f. 150-151°C, el rendimiento es del 48% (0.29g). IR (cm^{-1}) 3370.78, 3029.51, 1690.83, 1651.38, 1599.88. RMN- ^1H (300MHz, DMSO) δ 7.11 (s, 1H), δ 7.31 (m, 3H), δ 7.53 (dd, 1H, $J= 7.8, 1.5\text{Hz}$), δ 10.37 (s, 1H) - D_2O

Síntesis de la 3-metoxicarbonil-7-hidroxicumarina (2)

En un matraz de fondo redondo, con junta esmerilada 14/20 de 50mL equipado con barra magnética, se adicionan 1 g (7.24×10^{-3} moles) de 2,4-dihidroxi-benzaldehído, 2mL (2.3g, 1.74×10^{-2} moles) de malonato de dimetilo y 1 gota de piperidina. Se coloca un refrigerante en posición de reflujo y se calienta a ebullición durante 24 horas. Una vez que ha finalizado el tiempo de calentamiento, la mezcla de reacción se enfría en baño de hielo, se adiciona ácido clorhídrico al 10% y se raspa con una varilla de vidrio hasta observar la aparición de un precipitado. Se filtra y se lava con agua, el producto se recrystaliza por par de disolventes (etanol-agua) tres veces. Se obtienen 0.88g cristales color blanco con p.f. 269-270°C. 85% de rendimiento. IR (cm^{-1}): 3292.25, 3059.63, 1720.51, 1697.29 y 1590.40. RMN- ^1H (300MHz, DMSO) δ 3.76 (s, 3H), δ 6.71 (dd, 1H, $J= 2.7, 0.4\text{Hz}$), δ 6.82 (dd, 1H, $J= 8.7, 2.2\text{Hz}$), δ 7.72 (d, 1H, $J= 8.4\text{Hz}$), δ 8.66 (d, 1H, $J= 0.6\text{Hz}$), δ 11.09 (s, 1H) - D_2O .

Síntesis de la 3-etoxicarbonil-7-hidroxicumarina (3)

En un matraz de fondo redondo, con junta esmerilada 14/20 de 50mL equipado con barra magnética, se adicionan 1 g (7.24×10^{-3} moles) de 2,4-dihidroxi-benzaldehído, 2mL (3.1g, 1.94×10^{-2} moles) de malonato de dietilo y 1 gota de piperidina. Se coloca un refrigerante en posición de reflujo y se mantiene a ebullición durante 24 horas. Una vez que ha finalizado el tiempo de calentamiento, la mezcla de reacción se enfría en baño de hielo, se adiciona ácido clorhídrico al 10% y se raspa con una varilla de vidrio hasta observar la aparición de un

precipitado. Se filtra y se lava con agua, el producto se recristaliza de acetato de etilo.

Se obtienen 1.407g de cristales color blanco con p.f. 172-173°C. 83% de rendimiento. IR: (cm⁻¹): 3479.16, 3027.08, 1732.11, 1682.31, 1603.79 y 1586.25. RMN-¹H (300MHz, DMSO) δ 1.24 (t, 3H, J= 7.2,7.2Hz), δ 4.20 (m, 2H, J= 7.2,7.2,7.2Hz), δ 6.71 (d, 1H, J= 2.4Hz), δ 6.83 (dd, 1H, J= 8.7,2.2Hz), δ 7.74 (d, 1H, J= 8.7Hz), δ 8.66 (d, 1H, J= 0.6Hz), δ 11.03 (s, 1H) -D₂O.

Síntesis del 2-etoxicarbonil-3 (3'-hidroxi-4'-metoxifenil) propenoato de etilo (4)

En un matraz de fondo redondo, con junta esmerilada 14/20 de 50mL equipado con barra magnética, se adicionan 1 g (6.58x10⁻³ moles) de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído, 2mL (3.1g, 1.94x10⁻² moles) de malonato de dietilo y 1 gota de piperidina. Se coloca un refrigerante en posición de reflujo y se mantiene a ebullición durante 24 horas. Una vez que ha finalizado el tiempo de calentamiento, la mezcla de reacción se enfría en baño de hielo, se adiciona ácido clorhídrico al 10% y se raspa con una varilla de vidrio hasta observar la aparición de un precipitado. Se filtra y se lava con agua, el producto se recristaliza de etanol-agua. Se obtienen 1.49g de cristales blancos con pf 101-102°C el rendimiento de la reacción es del 77%. IR: (cm⁻¹): 3479.16, 3027.08, 1732.11, 1682.31, 1603.79 y 1586.25. RMN-¹H (300 MHz, DMSO): δ 1.23 (m, 6H, J= 7.2,7.2Hz), δ 3.75 (s, 3H) δ 4.25 (m, 4H, J= 7.0,7.0,7.0Hz J= 7.2,7.2,7.2Hz), δ 6.83 (d, 1H, J= 8.1Hz), δ 7.01 (dd, 1H, J= 8.4,2.1Hz), δ 7.09 (d, 1H, J= 2.1Hz), δ 7.59 (s, 1H), δ 9.88 (s, 1H)

Síntesis del ácido 2-carboxi-3-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-2-propenoico (5)

En un matraz redondo de 100mL con una boca esmerilada se coloca 1g de (4) y 50mL (16g 4 x10⁻¹ moles) de NaOH 8M. Se hace circular una corriente de gas N₂ durante diez minutos.

La reacción se calienta a reflujo durante cuatro horas y bajo atmósfera de nitrógeno, al término del calentamiento a reflujo, la solución se deja enfriar a

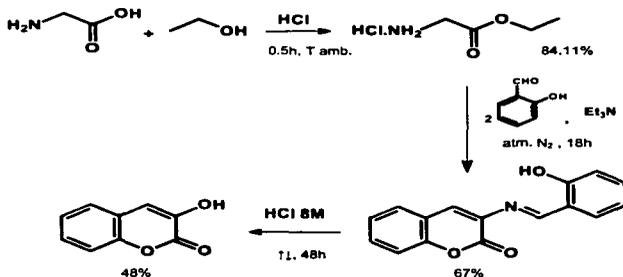
temperatura ambiente y se adiciona gota a gota HCl al 10 % hasta llegar a pH 7. En ese momento precipita un sólido rojo que se filtra y se desecha.

La solución se extrae 3 veces con fracciones de 40mL de éter etílico. Se evapora en el rotavapor y se lava cuidadosamente con agua helada (el ácido es soluble en agua). Se obtienen 0.720g de un polvo fino color amarillo pálido con pf 193-194°C. Rendimiento 89%. IR (cm^{-1}): 3487.49, de 2586.76 a 2945.65 pequeñas bandas, 1709.17, 1412.61, 1610.28 y 1585.25.

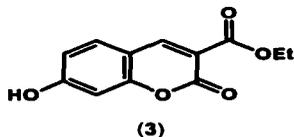
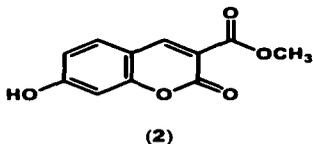
RMN- ^1H (300MHz, DMSO): δ 3.74 (s, 3H), δ 6.80 (d, 1H, $J= 8.4\text{Hz}$), δ 7.05 (dd, 1H, $J= 8.4, 2.1\text{Hz}$), δ 7.16 (d, 1H, $J_{\text{meta}}= 1.8\text{Hz}$), δ 7.41 (s, 1H), δ 9.75 (s, 1H) - D_2O , δ 13.07 (s, 2H) - D_2O .

CONCLUSIONES

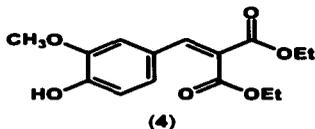
1. Se realizó un amplio estudio sobre la reacción de obtención de la 3-hidroxicumarina (1) a partir del clorhidrato del glicinato de etilo.



2. Se sintetizaron los siguientes derivados de la 7-hidroxicumarina: 3-metoxicarbonil-7-hidroxicumarina (2) y 3-etoxicarbonil-7-hidroxicumarina (3).

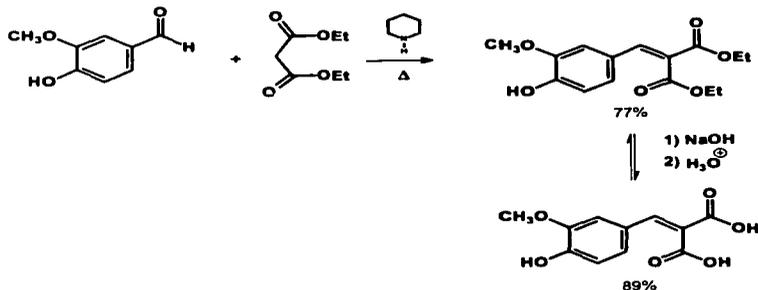


3. Se obtuvo el 2-etoxicarbonil-3 (3'-hidroxi-4'-metoxifenil) propenoato de etilo (4) con un rendimiento del 77%.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. Se sintetizó el ácido 2-carboxi-3-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-2-propenoico (5) a través de una ruta sintética que hace uso de la reacción de Knoevenagel, la cual no está descrita totalmente en la literatura con un rendimiento del 89%.



5. Se entregó un gramo de cada uno de los siguientes compuestos al departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, para su evaluación en líneas celulares:

- 3-Hidroxycumarina (1)
- 3-Metoxicarbonil-7-hidroxycumarina (2)
- 3-Etoxicarbonil-7-hidroxycumarina (3)
- 2-Etoxicarbonil-3 (3'-hidroxi-4'-metoxifenil) propenoato de etilo (4)
- Ácido 2-carboxi-3-(4'-hidroxi 3'-metoxifenil)-2-propenoico (5)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. LIBROS Y ARTÍCULOS CONSULTADOS

- ANDRÉS J.P. 1999 *Patología molecular de la progresión tumoral*. Fox Chase Cancer Center **9**: 138-143
- BALMER,C; y WELLS, A. 1998. *Basic principles of cancer treatment and cancer chemotherapy*. En: Tannock Y Hill R. The basics science of oncology. 3ª ed. Mc Graw-Hill, USA.
- COHEN, A. J. 1979. *Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic reponse and their significance to man*. Fd. Cosmet. Toxicol. **17** 277-289
- COX, D.; O'KENNEDY, R. Y THORNES, R.D. *The rarity of liver toxicity in patients treated with coumarin (1,2-benzopyrone)*. Human Toxicol. **8**: 501-506
- DEXEUS, F. 1990 *Phase II study of coumarin and cimetidine in patients with metastatic renal carcinoma*. Journal of clinical Oncol. **8**: 325-329
- JIMÉNEZ, O.A.; MOLINA, G.J.; MENDOZA, P.N.; LEÓN, C.F.; FLORES, P.B.; SANTOS, S.E. y MANDOKI J.J. 1999 *Cytostatic activity of coumarin metabolites and derivatives in the B16-F10 murine melanoma cell line*. Melanoma Research. **9**. 243-247
- KATRITZKY,R.A. y REES, W.C. *Comprehensive heterocyclic chemistry*. Vol 3.Edit Pergamon. pp 803
- KOKOTOS, G. et al *J. Heterocyclic Chem.* 1986 **23** :87-93
- LIOTTA, L. 1986 *Tumor invasion and metastasis role of the extracellular matrix*. Cancer Res. **46**: 1-7.
- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D. Y DARNELL J. 2000. *Molecular Biology*. 4ª ed. Scientific American Books. EE.UU. 1033-1174
- LU,C. Y KERBEL,R. 1994. *Cytokines, growth factors and the loss of negative growth controls in the progression of human cutaneous malignant melanoma*. Curr. Opin. Oncol. **6**: 212-220
- MARCH, J.N. 1992 *Advanced organic chemistry 4a* ed. Edit. John Wiley &

Sons. Pp 227-236, 342-343, 387

MARSHALL, M.E. 1994. *An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin*. J. Cancer Res. Clin. Oncol. **120** (suppl): S14-S16.

MOHLER J.L.; WILLIAMS, B.T.; THOMPSON, I.M. y MARSHALL; M.E. 1994. *Coumarin (1,2-benzopirone) for the treatment of prostatic carcinoma*. J.Cancer Res. Clin. Oncol. **120** suppl: S35-S38

MORAN, E.O.; O'KENNEDY, R. Y THORNES,R.D. 1987. *Analysis of coumarin and its urinary metabolites by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography. **416**: 165-169.

NAIR, R. V.; FISCHER,P.E.; SAFE,H.S.; CORTEZ, C.; HARVEY, G.R. y DIGIOVANNI, J. 1991. *Novel coumarins as potential anticarcinogenic agents*. Carcinogenesis. **12**: 65-69.

RITSCHHEL W.A. 1984. *Therapeutic concentration of cumarone and predicted dosage regimens*. Drug Res. **34**: 907-910

SHOENWAEELDER,M.S. y BURRIDGE,K. 1999. *Bi-directional signaling between the cytoskeleton and integrins*. Current opinion in Cell Biology. **11**: 274-286

SOLOMONS *Fundamentals of organic chemistry* 4a ed. 200. John Wiley & Sons p.779

TANNOCK, I. Y HILL,R. 1999. *The basics science of oncology*. 3ª. Ed. Mc-Graw-Hill. USA. Cap. 1,2.

THORNES,R.D. y O'KENNEDY. *Coumarins. Biology, applications and mode of action*. John Wiley and sons. Pp 67-142.

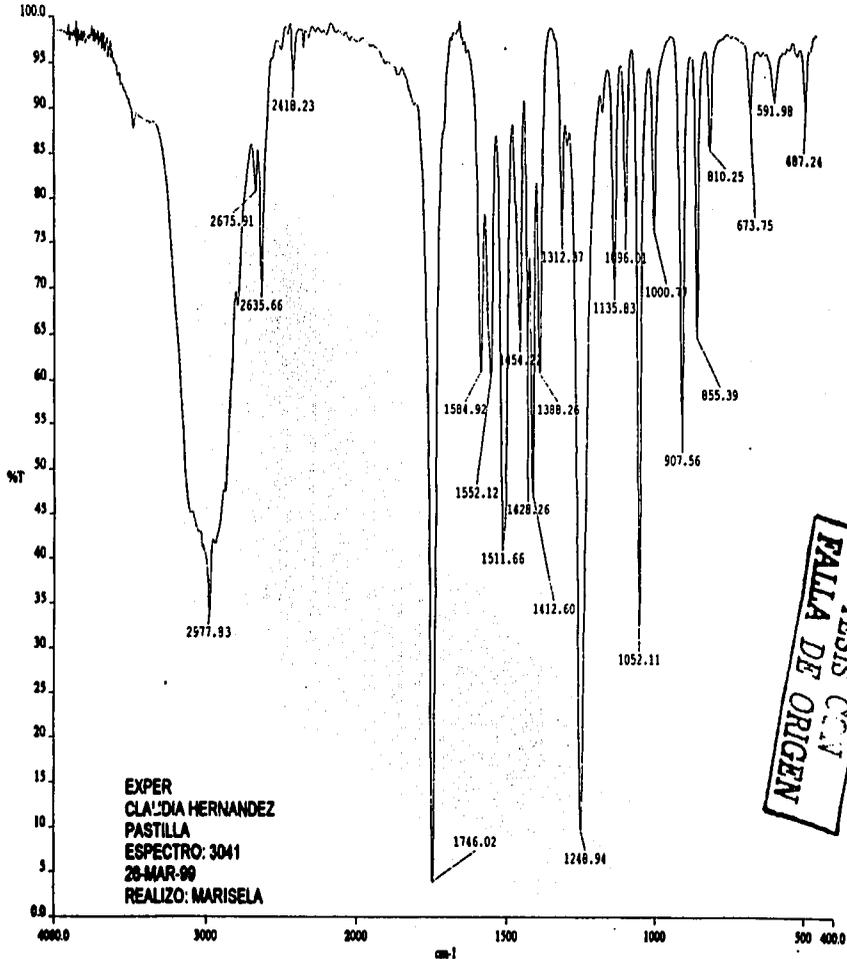
WEIDNER. 1993. *Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication*. *Semin. Diagn. Pathol.* **10**: 302-313

WEINBERG, A.R. 1996. *How cancer arises*. Scientific American Library. Special Issue: What you need to know about cancer? **275**; 3:32-40.

ZÄNKER,K.S.; BLÜMEL,G.; LANGE,S. y SIEWERT,J.R. 1984. *Coumarin in melanoma patients: an experimental and clinical study*. *Drugs Exptl. Clin. Res.* **11**:767-774.

APÉNDICE II

Espectroscopia

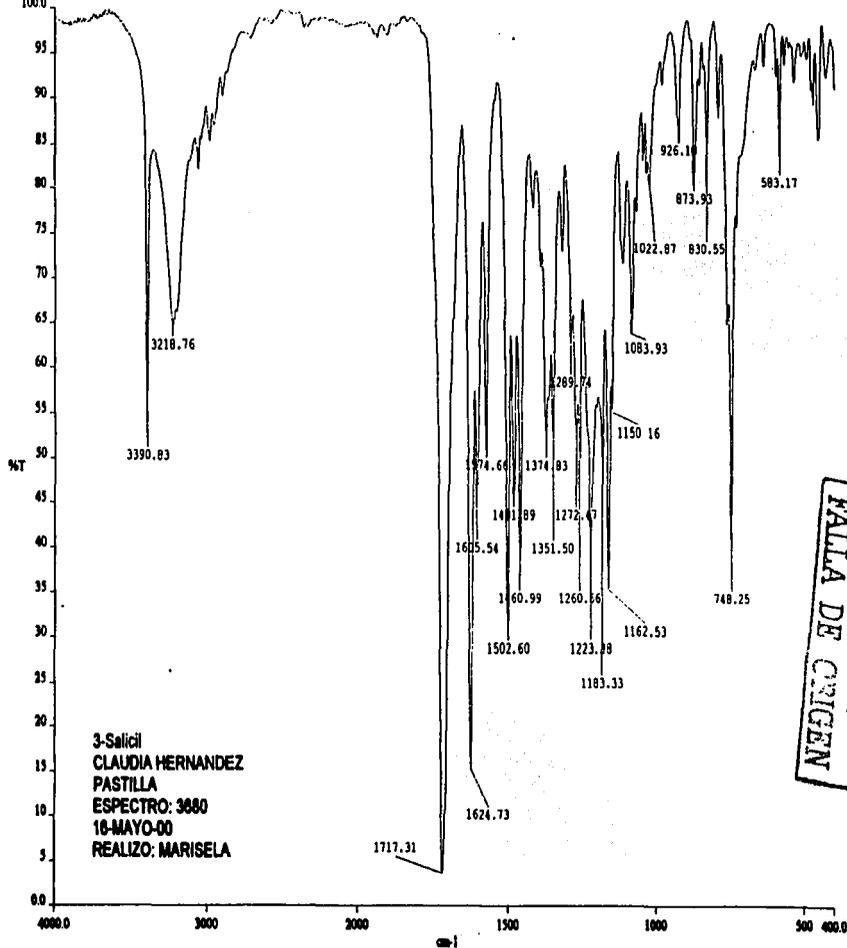


EXPER
 CLAUDIA HERNANDEZ
 PASTILLA
 ESPECTRO: 3041
 28-MAR-99
 REALIZO: MARISELA

TESIS CCA
 FALTA DE ORIGEN

Espectro 1

AT

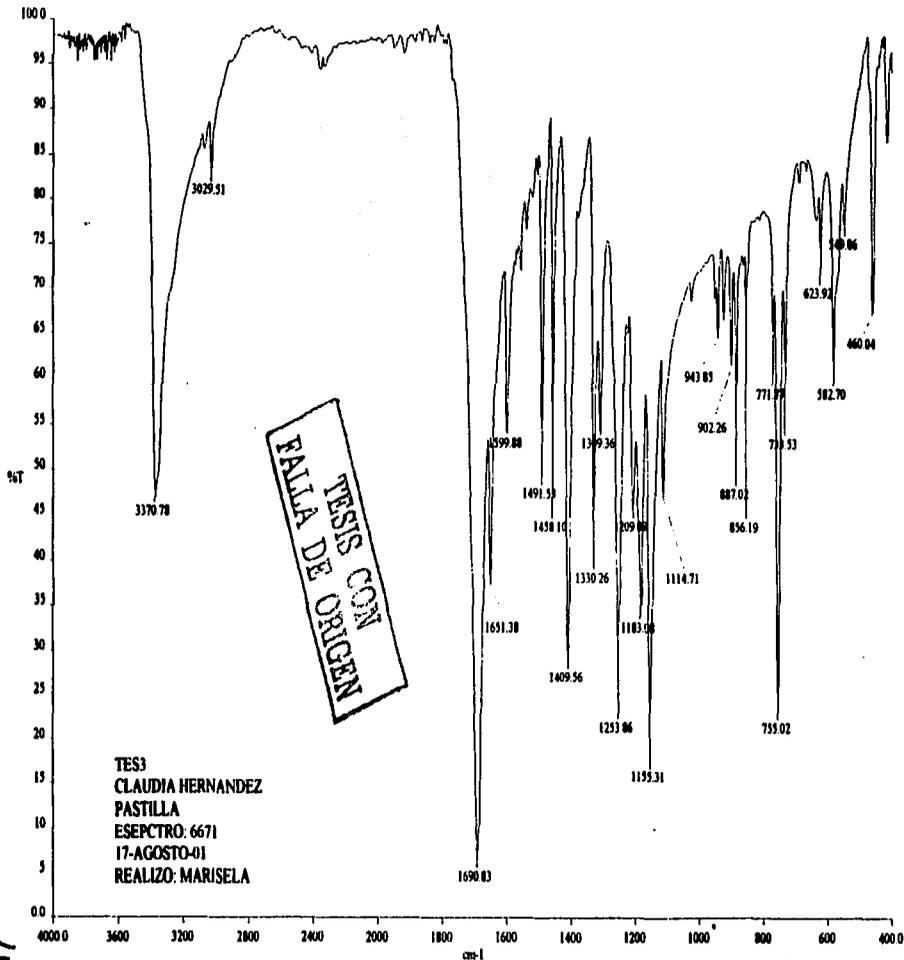


3-Salici
 CLAUDIA HERNANDEZ
 PASTILLA
 ESPECTRO: 3080
 18-MAYO-00
 REALIZO: MARISELA

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Espectro 2

48

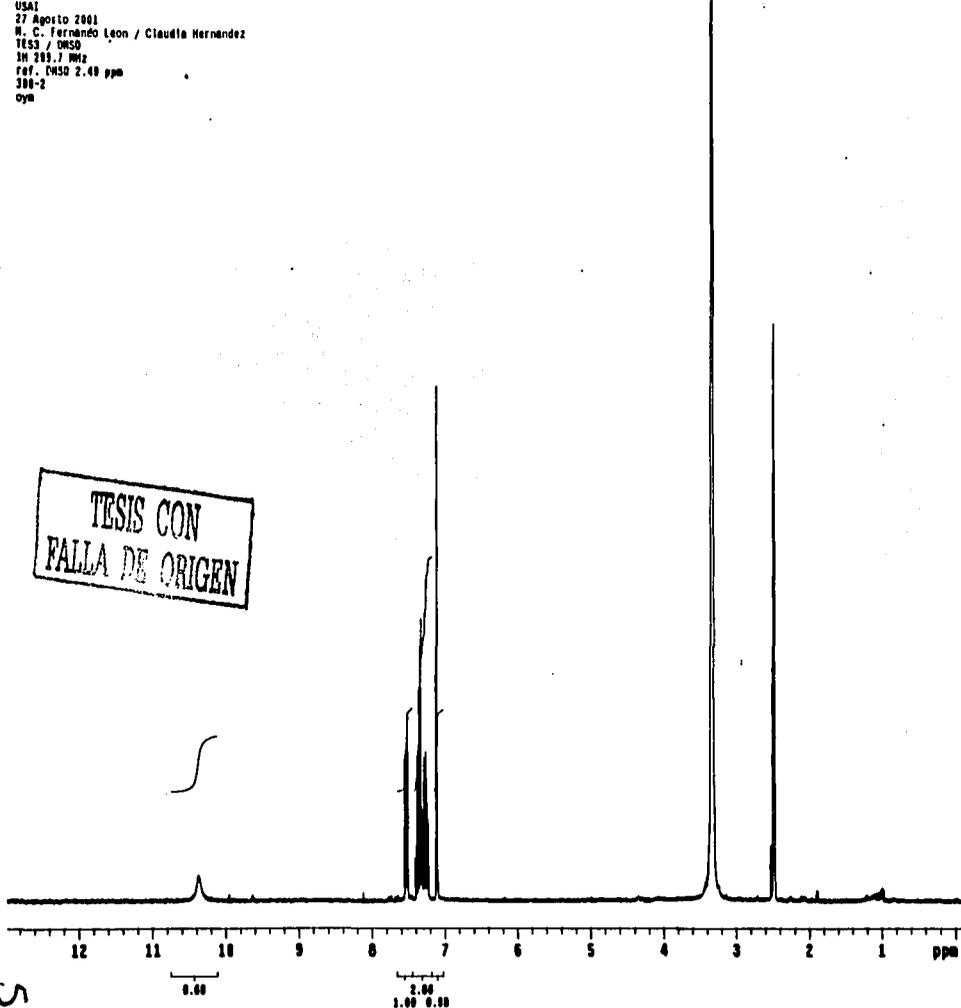


49

Espectro 3

USAI
27 Agosto 2001
W. C. Fernando Leon / Claudia Hernandez
TES3 / QMSO
IM 200.7 MHz
ref. DMSO 2.40 ppm
JBB-2
oym

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

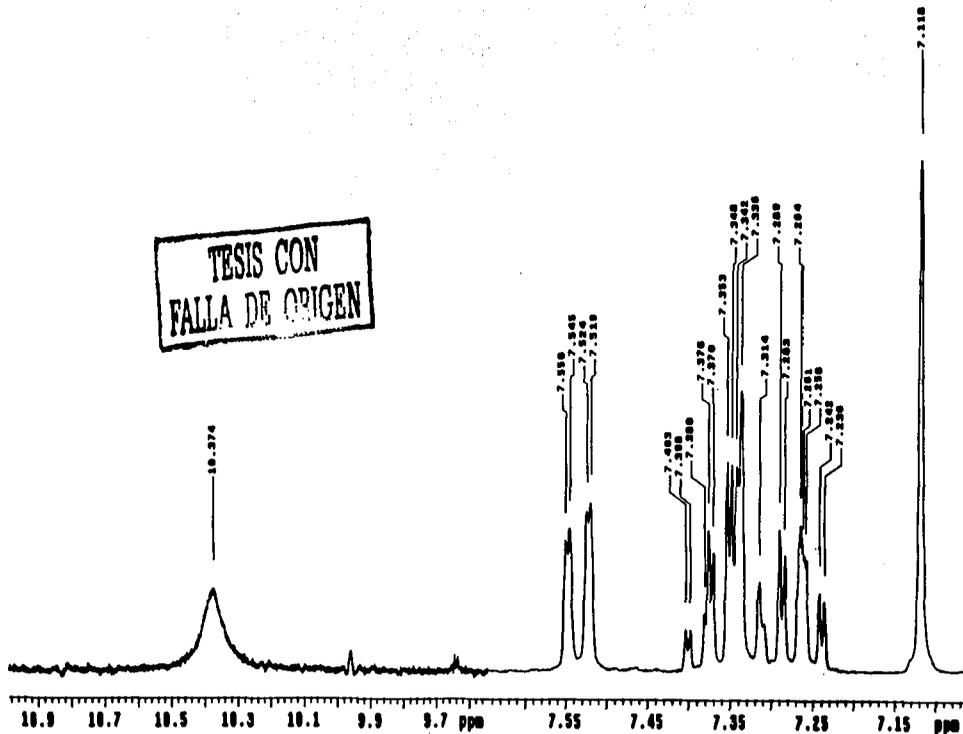


50

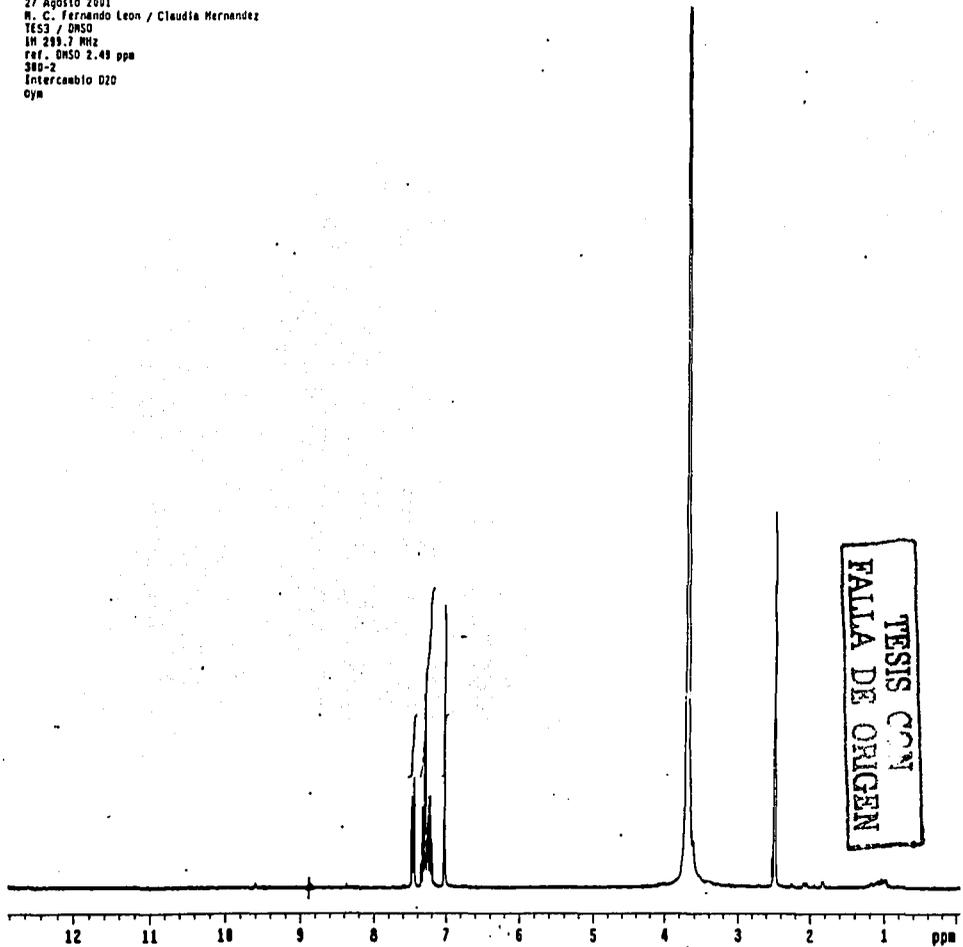
Espectro 4

USAI
27 Agosto 2001
M. C. Fernando Leon / Claudia Hernandez
TESS / DMSO
IN 200.7 MHz
ref. DMSO 2.40 ppm
000-2
oye

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



27 Agosto 2001
M. C. Fernando Leon / Claudia Hernandez
TES3 / DMSO
IH 299.7 MHz
ref. DMSO 2.49 ppm
SRO-2
Intercambio D2O
cym

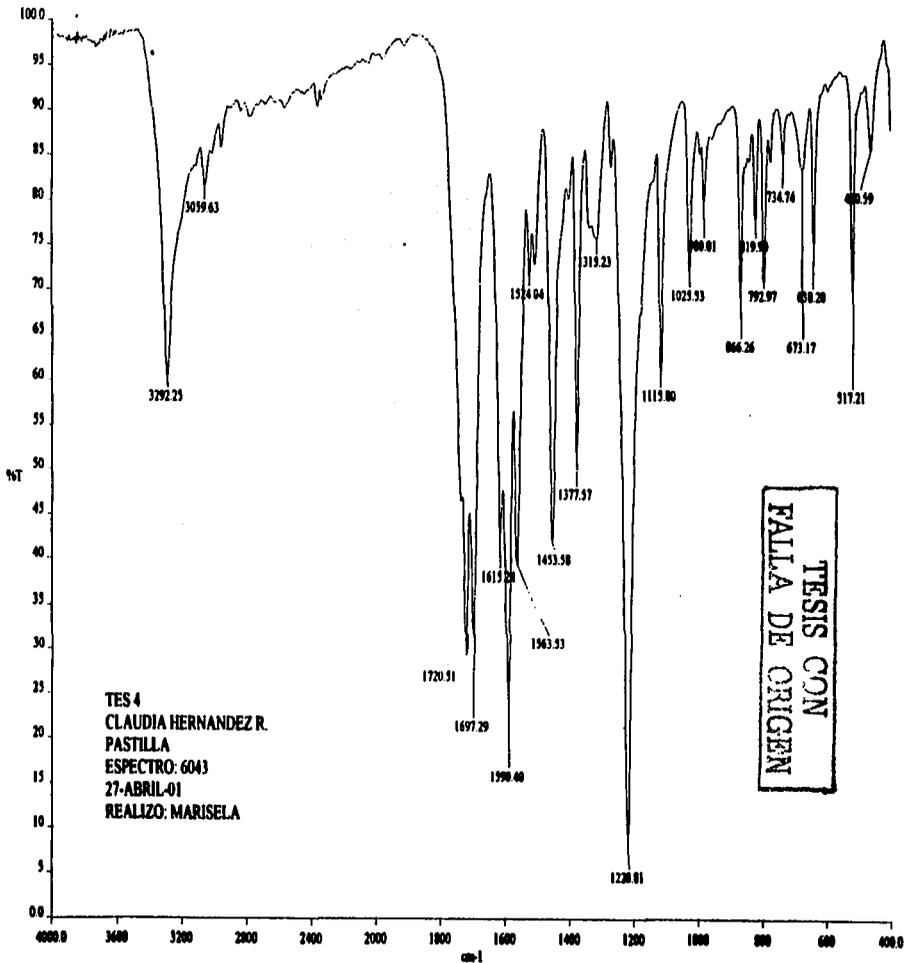


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.00 1.01
3.01

5.

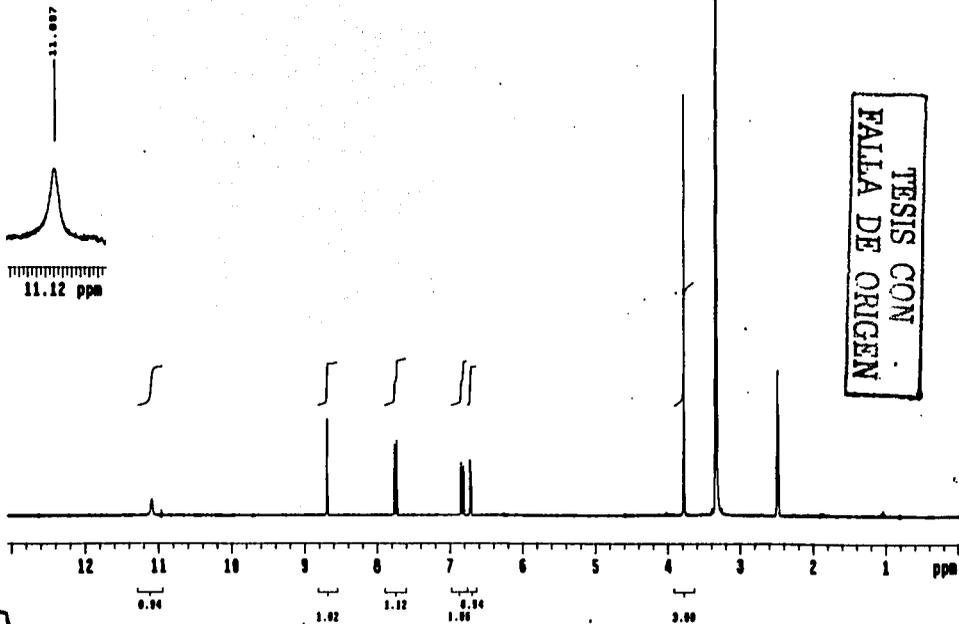
Espectro 5



TES 4
 CLAUDIA HERNANDEZ R.
 PASTILLA
 ESPECTRO: 6043
 27-ABRIL-01
 REALIZO: MARISELA

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

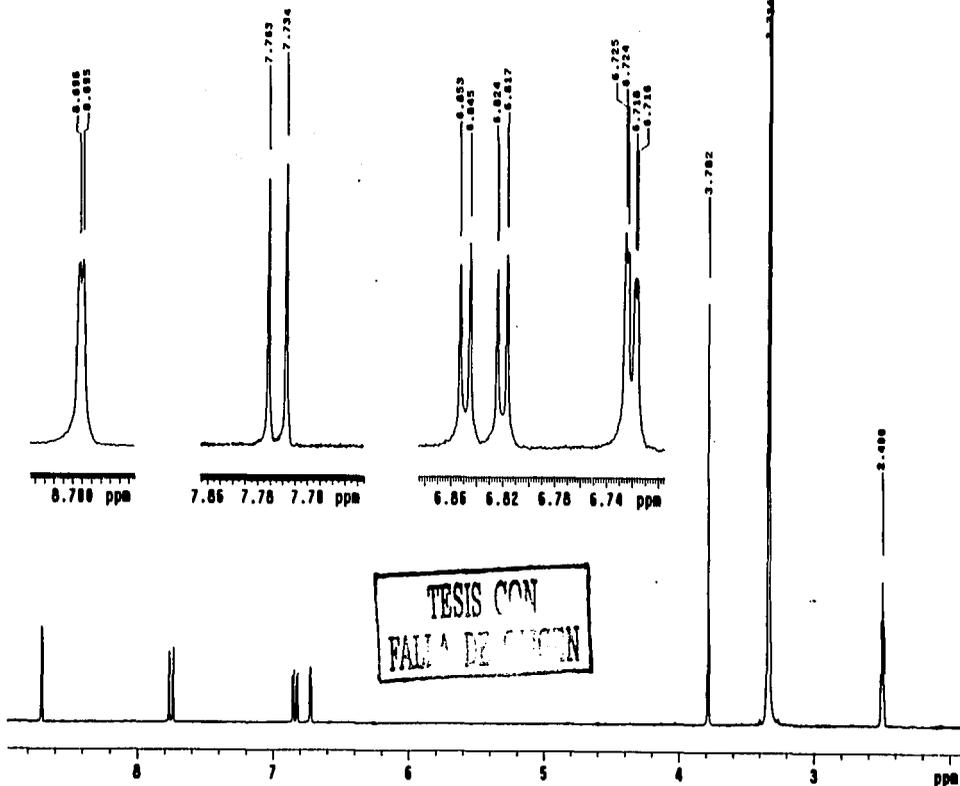
USAI
25 mayo 2001
W. C. Fernando Leon / Claudia Hernandez
TESA / DMSO
10 300.7 MHz
Ref. DMSO 2.49 ppm
300-1
oym



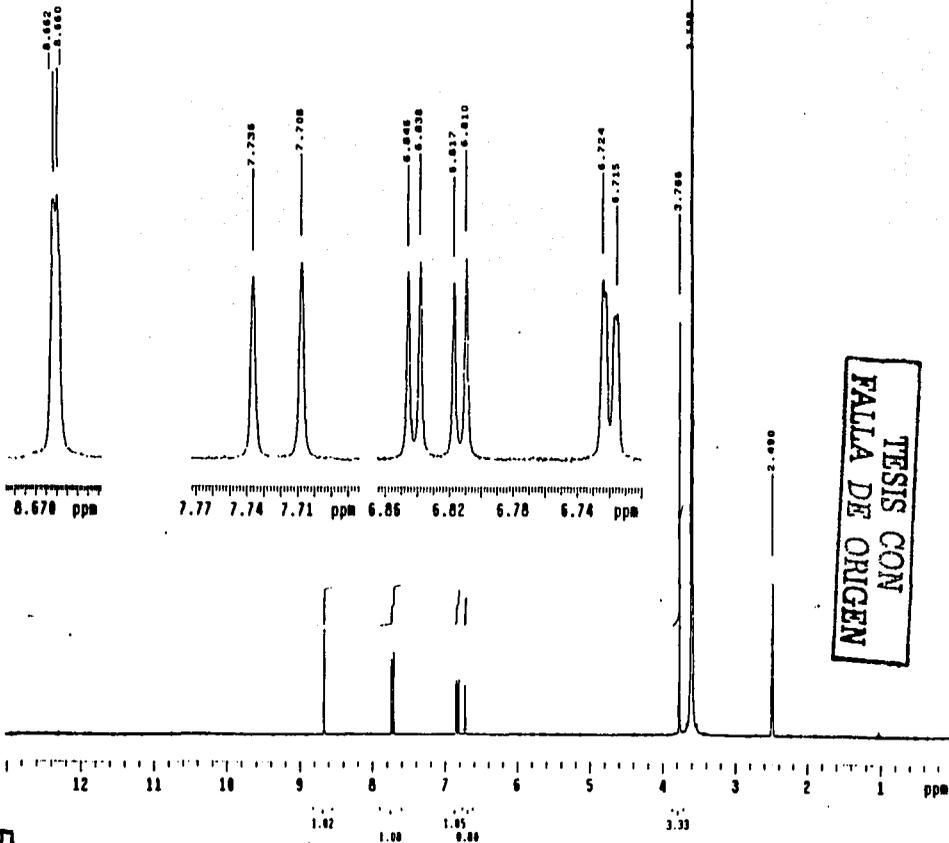
54

Espectro 7

USA1
25 mayo 2001
R. C. Fernando Leon / Claudia Hernandez
TESI / DMSO
1H 299.7 MHz
Ref. DMSO 2.49 ppm
300-1
oym

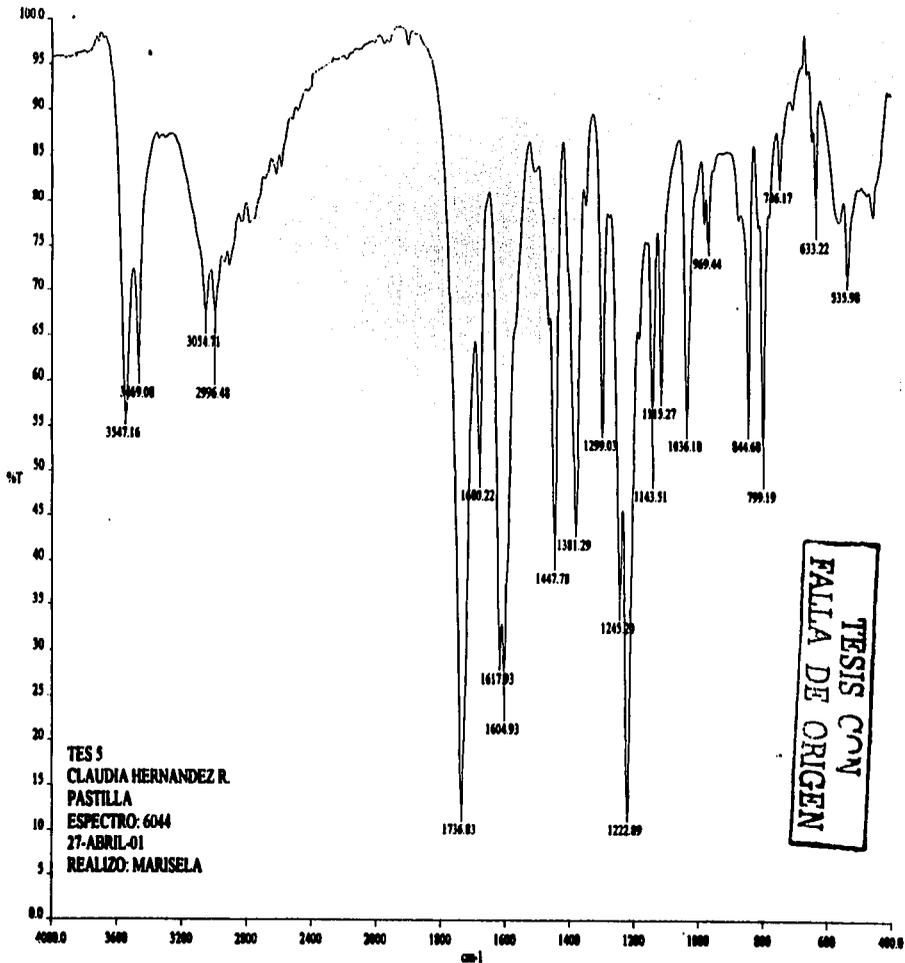


USA1
29 mayo 2001
W. C. Fernando Iqon / Claudia Hernandez
TES4 / DMSO
In 299.7 MHz
Ref. DMSO 2.49 ppm
300-
Intercambio U20
0ym



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

56

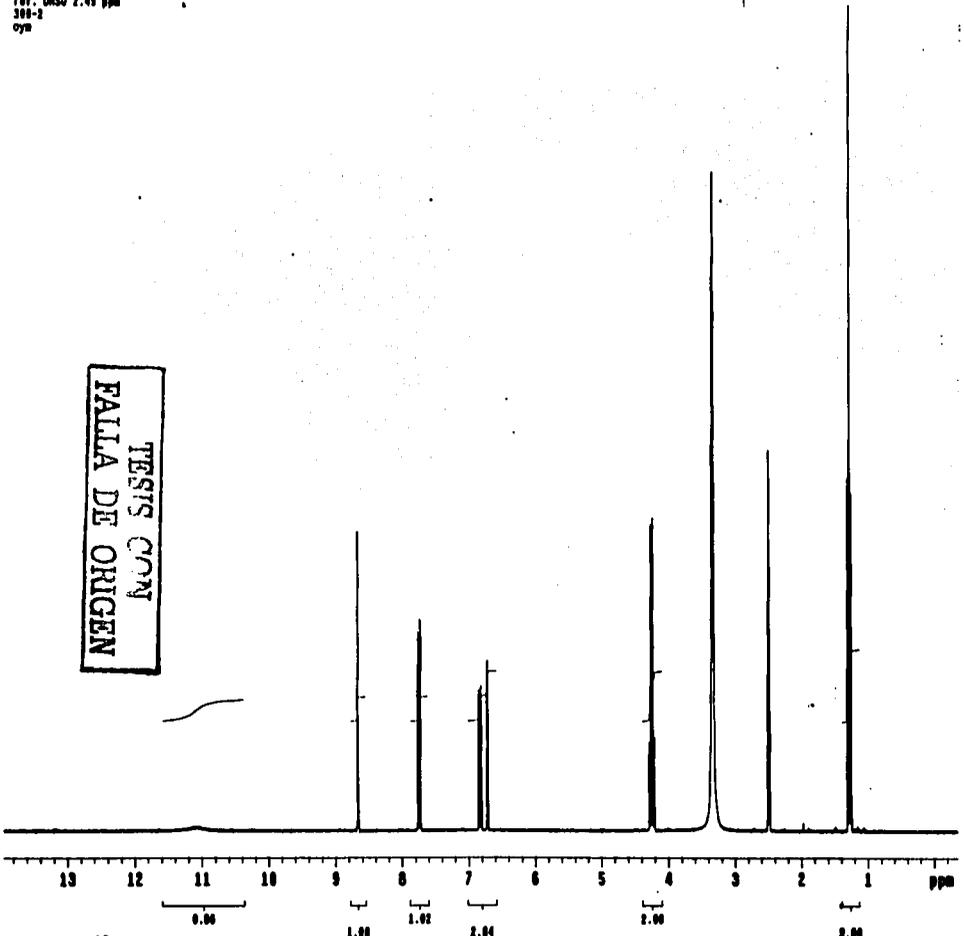


- Espectro 9

57

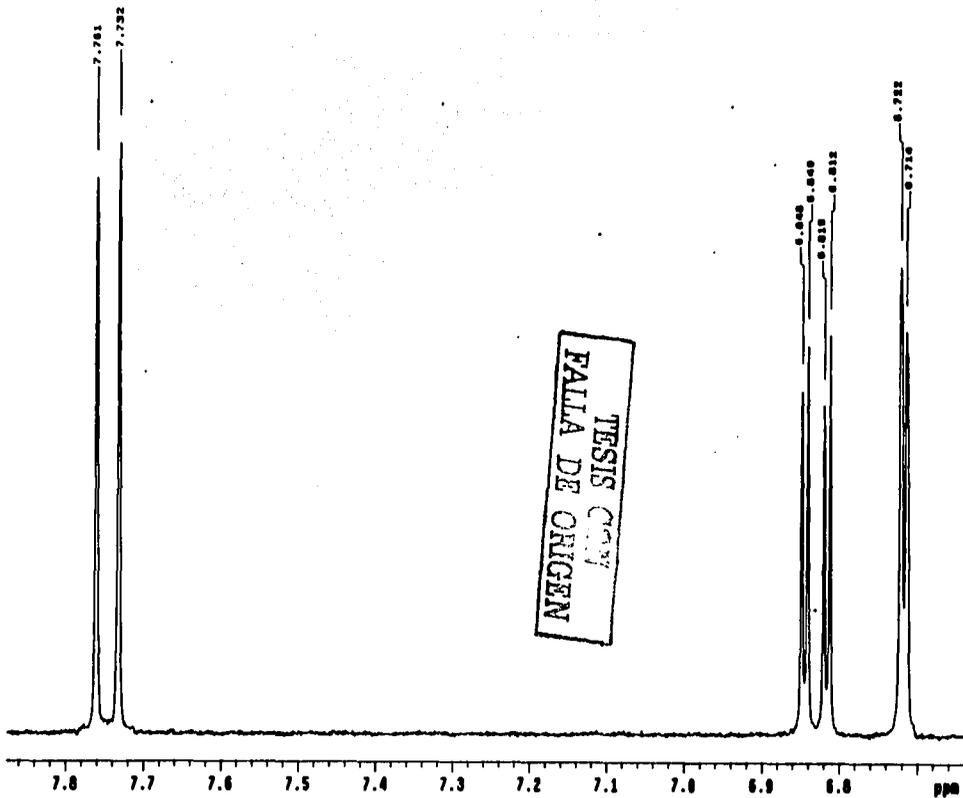
24 Agosto 2001
M. C. Fernando Leon / Claudia Martinez
TESS / SMO
16 200.7 MHz
ref. DMSO 2.49 ppm
300-2
cya

TESTS CON
FALLA DE ORIGEN



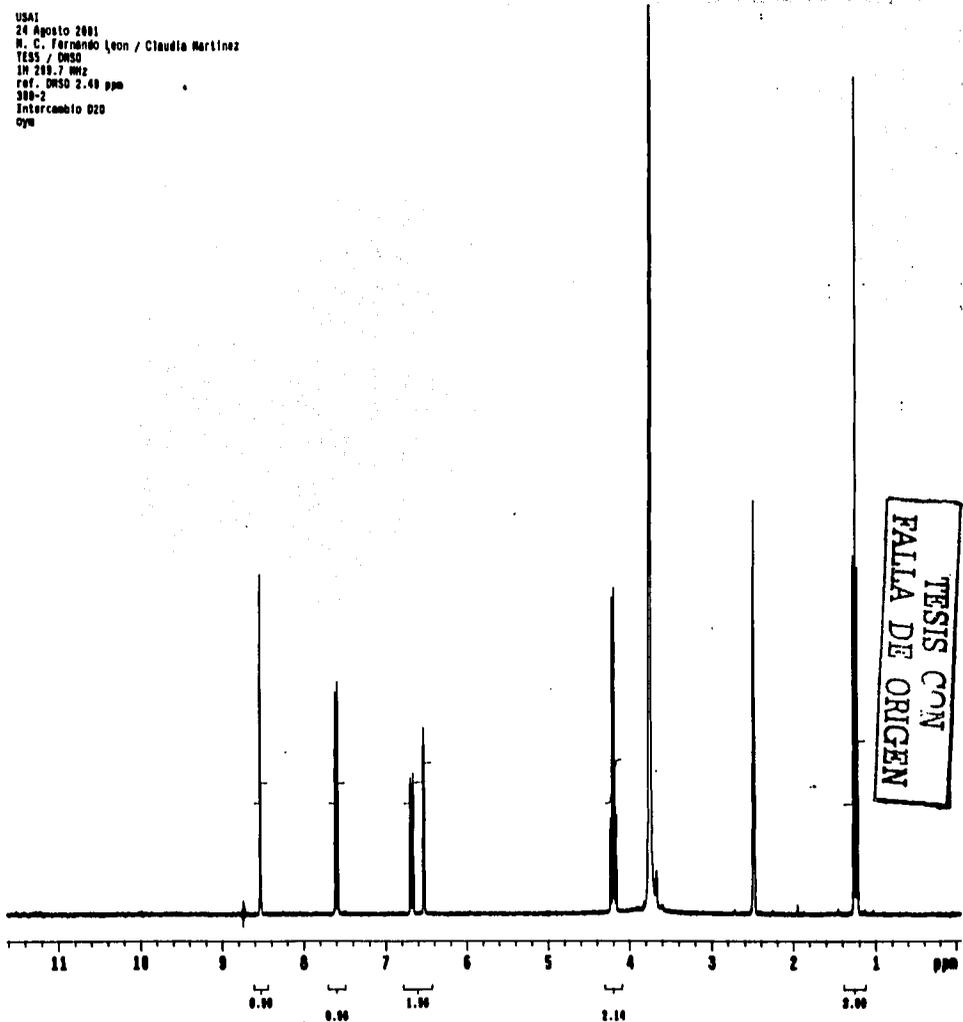
58 Espectro 10

24 Agosto 2001
M. C. Fernando Leon / Claudia Martinez
YES / DMSO
IH 200.7 MHz
ref. DMSO 2.49 ppm
300-2
cym

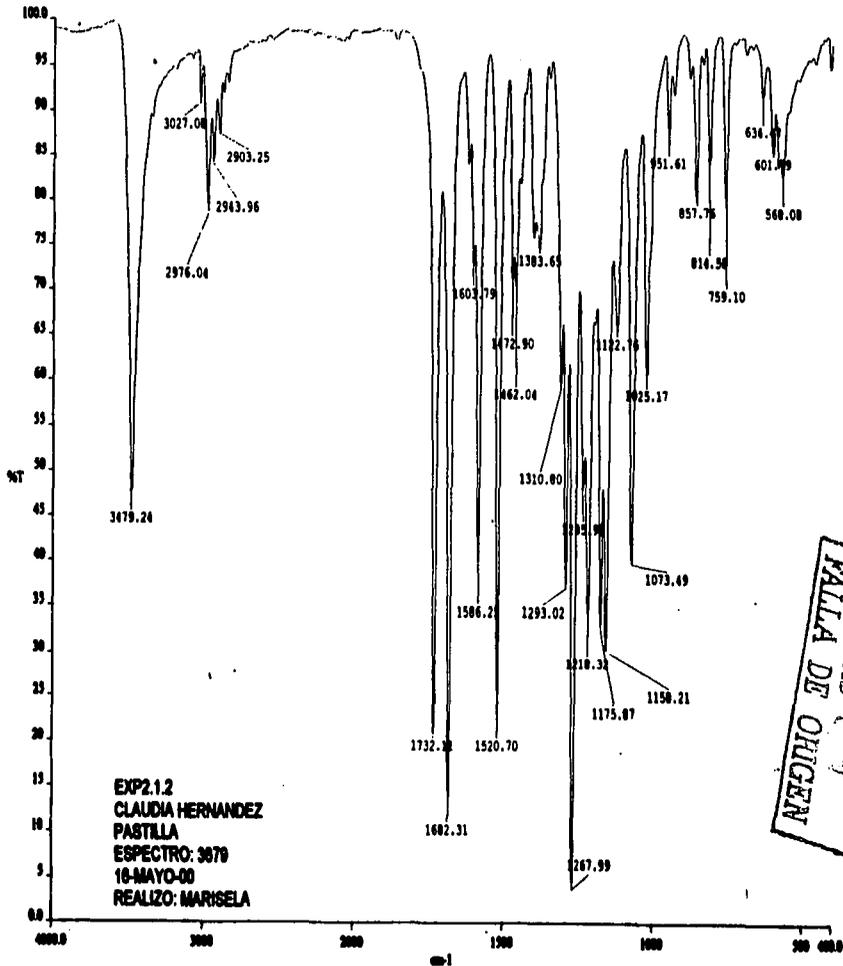


TESIS COM
FALTA DE ORIGEN

USA1
24 Agosto 2001
M. C. Fernando Leon / Claudia Martinez
TESS / OMSO
1H 200.7 MHz
ref. OMSO 2.48 ppm
300-2
Intercambio D2O
oym



69
Espectro 11



TESIS 2007
 PALLA DE ORIGEN

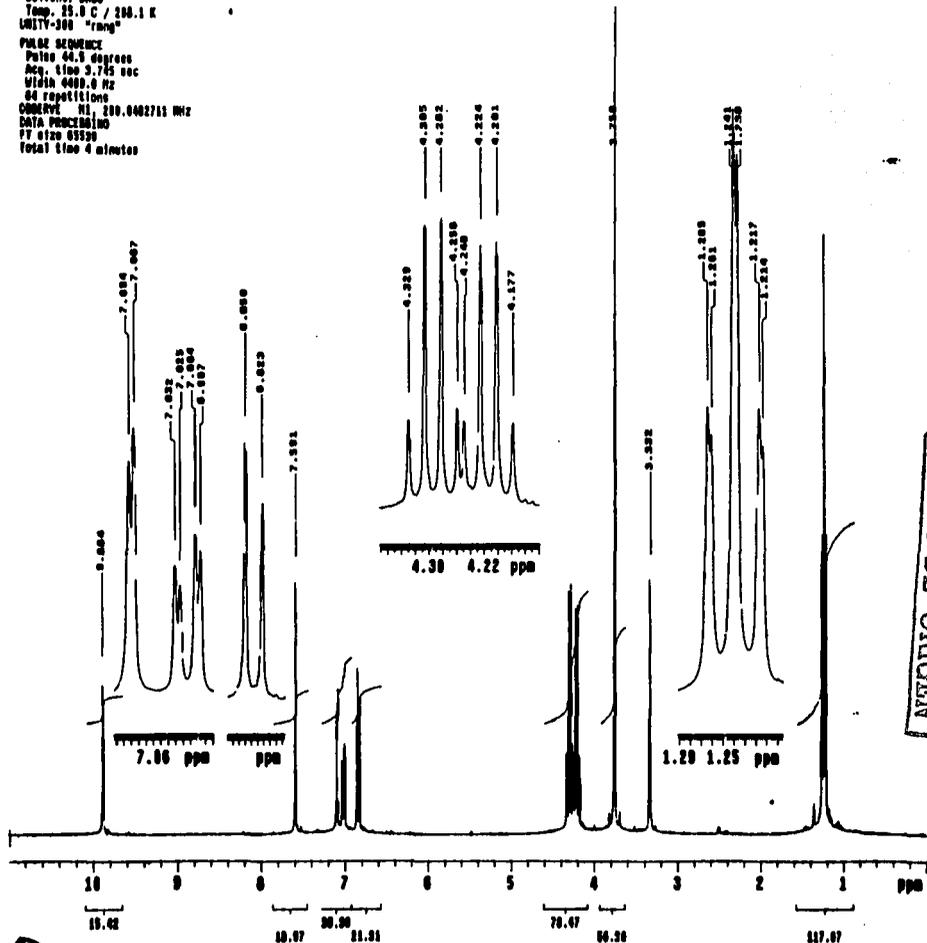
Espectro 12

61

Exp-2.1.2
F. Leon-C. Manz
24-9-89
800

Solvent: DMSO
Temp: 25.0 C / 298.1 K
UNITY-300 "nm"

PULSE SEQUENCE:
Puls 44.5 degrees
Acq. time 3.745 sec
Width 4089.0 Hz
84 repetitions
CONV P1 200.0002761 MHz
DATA PROCESSING
FT size 85520
Total time 4 minutes



TESIS 2007
FALLA DE ORIGEN

Exp-2.1.2 + 72.0
F. Leon-C. Hdez
22-9-99
ADM

Solvent: DMSO
Temp. 35.0 C / 299.1 K
UNITY-200 "rang"

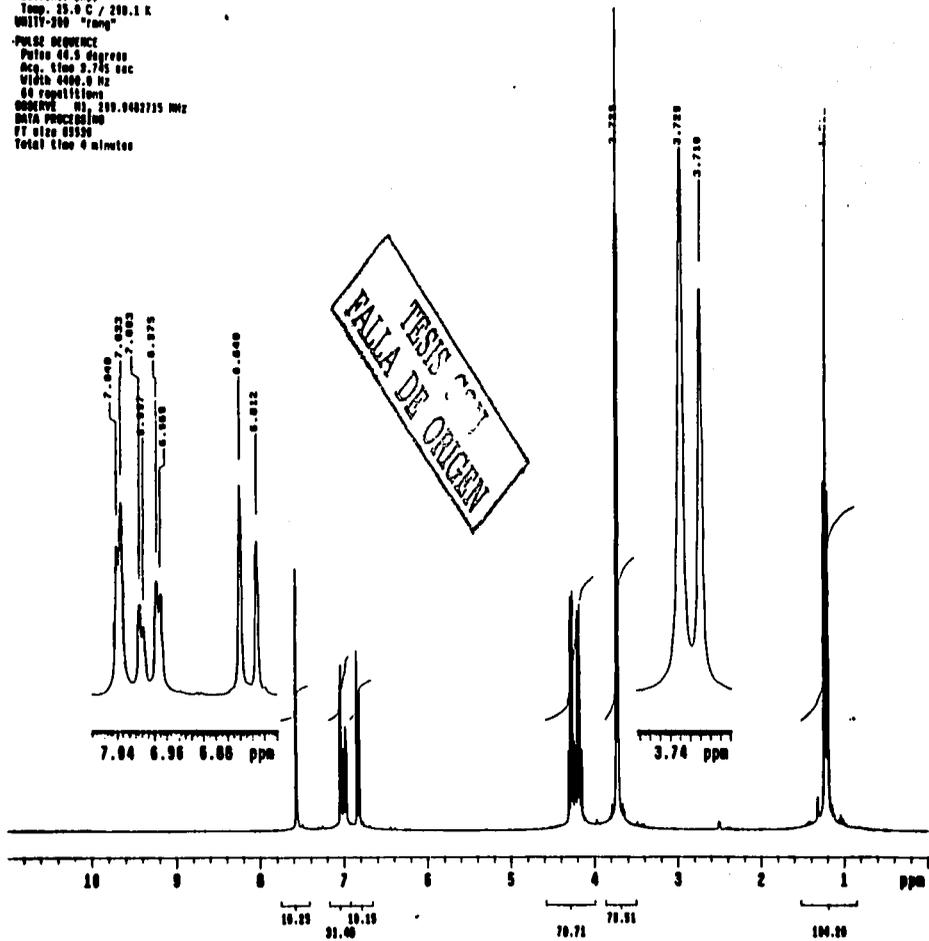
PULSE SEQUENCE

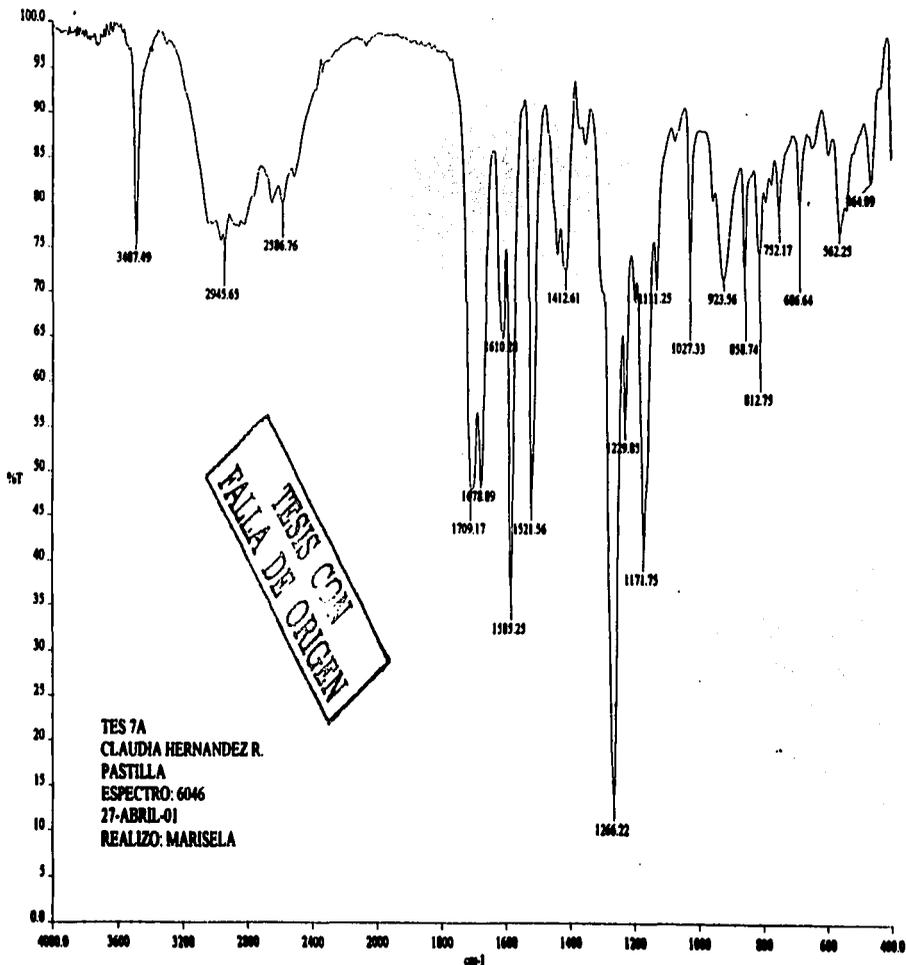
Pulse 46.5 degrees
Acq. time 9.745 sec
Width 6400.0 Hz
60 repetitions

ORIGEN 01 119.0402715 MHz

FT size 83530
Total time 9 minutes

TESIS
FALLA DE ORIGEN



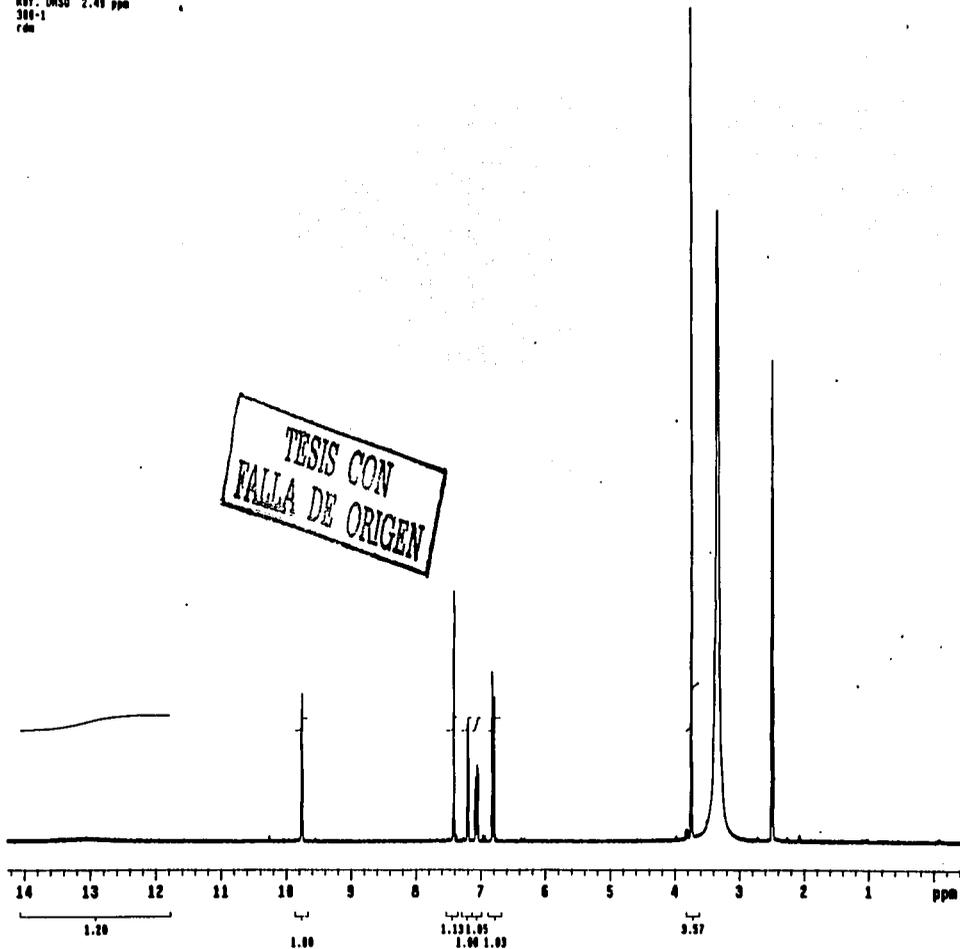


Espectro 15

64

02/MAYO/2001
W.C. Fernando Leon/Claudia Hernandez
TESIS/OMRO
IN 300.2 MHz
Ref. DMSO 2.40 ppm
300-1
rdm

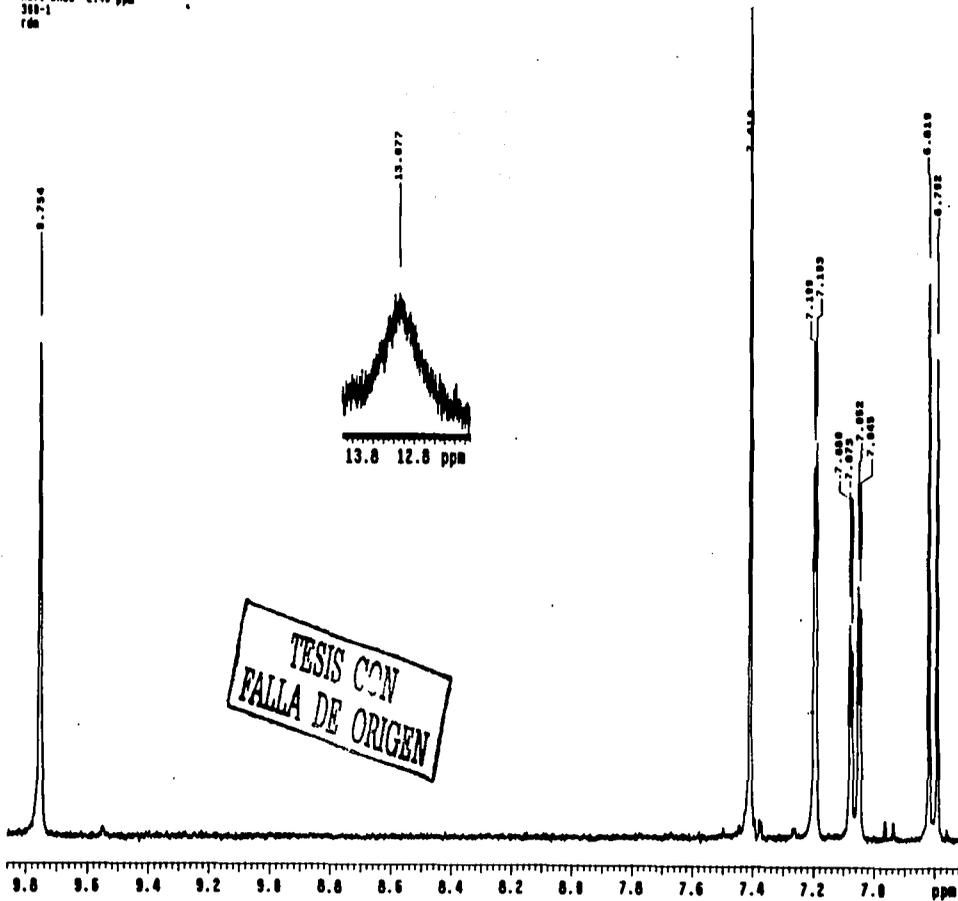
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Espectro 16

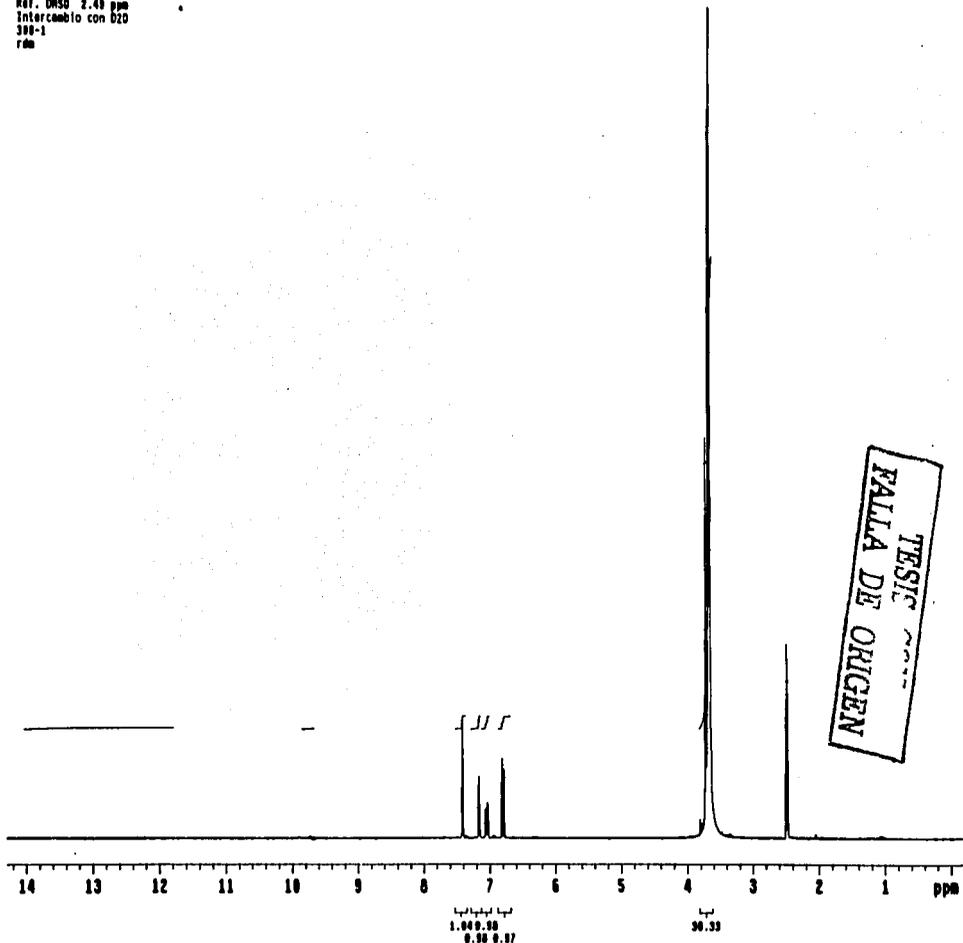
65

02/MAYO/2001
W.C. Fernando Leon/Claudia Hernandez
TESIS/OMSO
IH 300.2 MHz
Ref. DMSO 2.49 ppm
300-1
f6m



68

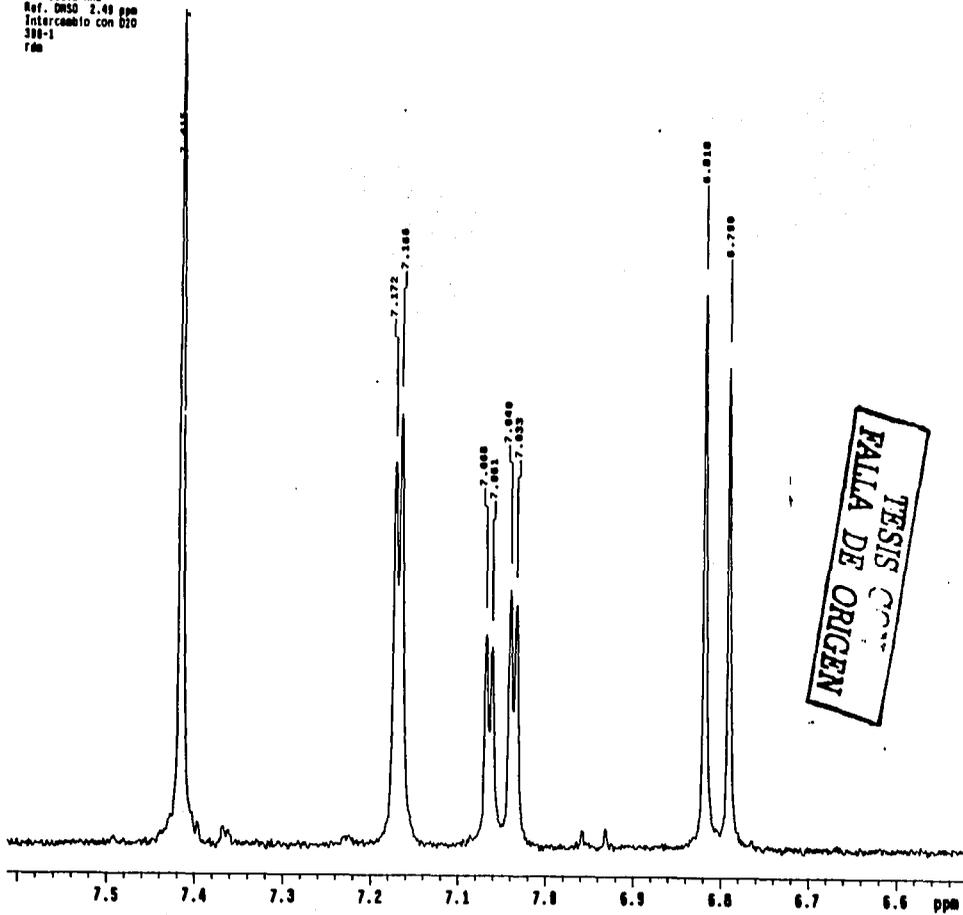
USA1
02/MAYO/2001
N.C. Fernando Leon/Claudia Hernandez
TESTA/DMSO
IN 300.2 MHz
Ref. DMSO 2.49 ppm
Intercambio con D2O
300-1
fda



67

Spectro 17

02/MAYO/2001
M.C. Fernando Leon/Claudia Hernandez
TE37A/DMSO
3H 300.2 MHz
Ref. DMSO 2.48 ppm
Intercambio con D2O
300-1
fde



TESIS COMPLETA
FALLA DE ORIGEN

68