



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**SÍNTESIS DE ANÁLOGOS Y HOMÓLOGO DEL GIGANTOL  
COMO ANTIESPASMÓDICOS POTENCIALES**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

**MARIA TRINIDAD SERRANO ALVA**

DIRECTOR DE TESIS: DR. ADELFO N. REYES RAMÍREZ



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

---

---

## CONTENIDO

Abreviaturas .....	i
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. ANTECEDENTES TEÓRICOS</b> .....	3
1.1. La familia Orchidaceae .....	3
1.2. Antecedentes de <i>Scaphyglottis livida</i> .....	6
1.3. Agentes antiespasmódicos naturales.....	8
1.4. Músculo liso. Contracción y relajación .....	11
1.4.1. El mecanismo de contracción del músculo liso .....	12
1.4.2. Relajación del músculo liso.....	14
1.4.3. La CaM en la regulación de la contracción muscular .....	15
1.5. Características de los estilbenoides.....	16
1.5.1. Condensación de Perkin.....	19
1.5.2. Reacción de Wittig.....	19
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	21
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	22
3.1. Objetivo general .....	22
3.2. Objetivos particulares .....	22
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	25
<b>5. DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS</b> .....	26
5.1. Procedimiento general de síntesis .....	26
5.2. Síntesis de los intermediarios para la sal de fosfónio [6].....	27
5.2.1. 3,5-Dihidroxibenzoato de metilo [1].....	27
5.2.2. 3-Hidroxi-5-metoxibenzoato de metilo [2].....	27
5.2.3. 3-(Benciloxi)-5-metoxibenzoato de metilo [3] .....	28
5.2.4. [3-(Benciloxi)-5-metoxifenil]metanol [4].....	29
5.2.5. 1-(Benciloxi)-3-(bromometil)-5-metoxibenceno [5] .....	29
5.2.6. Bromuro de {[3-(benciloxi)-5-metoxifenil]metil}trifenilfosfonio [6] .....	30
5.3. Síntesis de los bibencilos <b>7b-10b</b> .....	30
5.3.1. ( <i>E</i> )- y ( <i>Z</i> )-1-(Benciloxi)-3-[2-(4-etoxi-3-metoxifenil)etenil]-5-metoxibenceno [7a].....	30
5.3.2. 3-[2-(4-Etoxi-3-metoxifenil)etil]-5-metoxifenol [7b] .....	31

5.3.3.	( <i>E</i> )- y ( <i>Z</i> )-1-(Benciloxi)-3-metoxi-5-[2-(4-metoxifenil)etenil] benceno [ <b>8a</b> ]....	32
5.3.4.	3-[2-(4-Metoxifenil)etil]-5-metoxifenol [ <b>8b</b> ] .....	33
5.3.5.	( <i>E</i> )- y ( <i>Z</i> )-1-(Benciloxi)-3-{2-[4-(benciloxi)-3-bromofenil]etenil}- 5-metoxi-benceno [ <b>9a</b> ] .....	33
5.3.6.	3-[2-(3-Bromo-4-hidroxifenil)etil]-5-metoxifenol [ <b>9b</b> ].....	34
5.3.7.	( <i>E</i> )- y ( <i>Z</i> )-4-{2-[3-(Benciloxi)-5-metoxifenil]etenil}benzoato de metilo [ <b>10a</b> ]	35
5.3.8.	4-[2-(3-Hidroxi-5-metoxifenil)etil]benzoato de metilo [ <b>10b</b> ].....	36
5.4.	Síntesis del bibencilo [ <b>12</b> ] .....	36
5.4.1.	( <i>E</i> )- y ( <i>Z</i> )-3-[2-(4-Metoxifenil)etenil]fenol [ <b>11</b> ] .....	36
5.4.2.	3-[2-(4-Metoxifenil)etil]fenol [ <b>12</b> ] .....	37
5.5.	Síntesis del difenilmetano [ <b>15</b> ] .....	38
5.5.1.	Bromuro de 3,5-dimetoxibencilo [ <b>13</b> ] .....	38
5.5.2.	1,3-Dimetoxi-5-(2-metoxifenoximetil)benceno [ <b>14</b> ].....	38
5.5.3.	2-[(3,5-Dimetoxifenil)metil]-6-metoxifenol [ <b>15</b> ].....	39
5.6.	Efecto de los análogos y homólogo del gigantol sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa dependiente de calmodulina (PDE1) .....	41
6.	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	43
6.1.	Síntesis de la sal de fosfónio para la reacción de Wittig .....	43
6.1.1.	3,5-Dihidroxibenzoato de metilo [ <b>1</b> ].....	43
6.1.2.	3-Hidroxi-5-metoxibenzoato de metilo [ <b>2</b> ].....	45
6.1.3.	3-(Benciloxi)-5-metoxibenzoato de metilo [ <b>3</b> ] .....	45
6.1.4.	[3-(Benciloxi)-5-metoxifenil]metanol [ <b>4</b> ].....	46
6.1.5.	1-(Benciloxi)-3-(bromometil)-5-metoxibenceno [ <b>5</b> ] .....	47
6.1.6.	Bromuro de {[3-(benciloxi)-5-metoxifenil]metil}trifenilfosfonio [ <b>6</b> ].....	48
6.2.	Reacción de Wittig.....	49
6.2.1.	3-[2-(4-Etoxi-3-metoxifenil)etil]-5-metoxifenol [ <b>7b</b> ] .....	50
6.2.2.	3-[2-(4-Metoxifenil)etil]-5-metoxifenol [ <b>8b</b> ].....	52
6.2.3.	3-[2-(4-Metoxifenil)etil]fenol [ <b>12</b> ].....	53
6.3.	Síntesis del difenilmetano [ <b>15</b> ] .....	56
6.3.1.	Bromuro de 3,5-dimetoxibencilo [ <b>13</b> ] y 1,3-dimetoxi-5-(2-metoxi-fenoximetil)benceno [ <b>14</b> ] .....	56
6.3.2.	2-[(3,5-Dimetoxifenil)metil]-6-metoxifenol [ <b>15</b> ].....	56
6.4.	Efecto de los análogos y homólogo sobre el complejo PDE1-CaM.....	59

---

7. <b>CONCLUSIONES</b> .....	60
8. <b>PERSPECTIVAS</b> .....	61
9. <b>REFERENCIAS</b> .....	62
10. <b>ANEXO</b> .....	66
Espectro 1. Espectrometría de masas de 3-[2-(4-Etoxi-3-metoxifenil)etil]-5-metoxifenol [ <b>7b</b> ]. .....	66
Espectro 2. RMN <sup>1</sup> H del 3-[2-(4-Etoxi-3-metoxifenil)etil]-5-metoxifenol [ <b>7b</b> ]. .....	66
Espectro 3. IR de 3-[2-(4-Metoxifenil)etil]-5-metoxifenol [ <b>8b</b> ]. .....	67
Espectro 4. RMN <sup>13</sup> C de 3-[2-(4-Metoxifenil)etil]-5-metoxifenol [ <b>8b</b> ]. .....	67
Espectro 5. RMN <sup>1</sup> H de 3-[2-(4-Metoxifenil)etil]fenol [ <b>12</b> ]. .....	68
Espectro 6. RMN <sup>13</sup> C de 2-[(3,5-Dimetoxifenil)metil]-6-metoxifenol [ <b>15a</b> ]. .....	68
Espectro 7. RMN <sup>1</sup> H de 5-[(3,5-Dimetoxifenil)metil]-2-metoxifenol [ <b>15b</b> ]. .....	69

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Estilbenoides espasmolíticos de <i>Scaphyglottis livida</i> .....	8
<b>Esquema 2.</b> Ejemplos estructurales de antiespasmódicos naturales. ....	9
<b>Esquema 3.</b> Rutas biogénicas propuestas para la formación de estilbenoides.....	17
<b>Esquema 4.</b> Reacción de condensación de Perkin para la síntesis de la batatasina I.....	19
<b>Esquema 5.</b> Reacción de condensación de Wittig para la formación de la batatasina III.	20
<b>Esquema 6.</b> Estrategia de síntesis de la sal de Wittig, compuesto <b>6</b> .....	23
<b>Esquema 7.</b> Estrategia de síntesis de los bibencilos <b>7b-10b</b> .....	23
<b>Esquema 8.</b> Estrategia de síntesis del bibencilo <b>12</b> .....	24
<b>Esquema 9.</b> Estrategia de síntesis del difenilmetano <b>15</b> . ....	24
<b>Esquema 10.</b> 3,5-Dihidroxibenzoato de metilo [ <b>1</b> ]. ....	44
<b>Esquema 11.</b> Mecanismo de reacción de la sustitución nucleofílica de ácido para ácidos carboxílicos .....	44
<b>Esquema 12.</b> 3-Hidroxi-5-metoxibenzoato de metilo [ <b>2</b> ]. ....	45
<b>Esquema 13.</b> 3-(Benciloxi-5-metoxibenzoato de metilo [ <b>3</b> ]). ....	46
<b>Esquema 14.</b> [3-(Benciloxi)-5-metoxifenil]metano [ <b>4</b> ]. ....	46
<b>Esquema 15.</b> Mecanismo de reacción de la reducción de un éster con $\text{LiAlH}_4$ .....	47
<b>Esquema 16.</b> 1-(Benciloxi)-3-bromometil)5-metoxibenceno [ <b>5</b> ]. ....	47
<b>Esquema 17.</b> Mecanismo de reacción $\text{S}_{\text{N}}2$ del alcohol con $\text{PBr}_3$ . ....	48
<b>Esquema 18.</b> Bromuro de {[3-(benciloxi)-5-metoxifenil]metil}trifenilfosfonio [ <b>6</b> ]. ....	48
<b>Esquema 19.</b> Mecanismo de reacción de la sal de fósforo. ....	48
<b>Esquema 20.</b> Mecanismo de reacción de Wittig .....	49
<b>Esquema 21.</b> 3-[2-(4-Etoxi-3-metoxifenil)etil]-5-metoxifenol [ <b>7b</b> ]. ....	50
<b>Esquema 22.</b> 3-[2-(4-Metoxifenil)etil]-5-metoxifeno [ <b>8b</b> ]. ....	52
<b>Esquema 23.</b> 3-[2-(4-Metoxifenil)etil]fenol [ <b>12</b> ]. ....	54
<b>Esquema 24.</b> 1,3-Dimetoxi-5-(2-metoxifenoximetil)benceno [ <b>14</b> ]. ....	56
<b>Esquema 25.</b> 2-[(3,5-Dimetoxifenil)metil]-6-metoxifenol [ <b>15</b> ]. ....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Scaphyglottis livida</i> .....	7
<b>Figura 2.</b> Regulación de la contracción del músculo liso.....	13
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de acción de NO en la relajación del músculo liso. ....	15
<b>Figura 4.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C de 3-[2-(4-etoxi-3-metoxifenil)etil]-5-metoxi- fenol <b>7b</b> . ....	51
<b>Figura 5.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de 3-[2-(4-metoxifenil)etil]-5-metoxifenol <b>8b</b> .....	53
<b>Figura 6.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C de 3-[2-(4-metoxifenil)etil]fenol <b>12</b> .....	54
<b>Figura 7.</b> Espectrometría de masas para el compuesto <b>12</b> . ....	55
<b>Figura 8.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto <b>15a</b> . ....	57
<b>Figura 9.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C para el compuesto <b>15b</b> . ....	58

## ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
AMPc	3',5'-Monofosfato cíclico de adenosina
C	Carbono
Ca <sup>2+</sup>	Ion Calcio
CaM	Calmodulina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
cm	Centímetros
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
FeCl <sub>3</sub>	Cloruro férrico
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
H	Hidrógeno
H <sub>2</sub>	Hidrógeno molecular
HCl	Ácido clorhídrico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
K	Potasio
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de potasio
KI	Yoduro de potasio
KOH	Hidróxido de potasio
LiAlH <sub>4</sub>	Tetrahidruro de litio y aluminio
L-NAME	Éster metílico de <i>N</i> -nitro-L-arginina
m	Metro
Me <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de dimetilo
MeOH	Metanol
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de miosina
MLCK-(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Fosfatasa de la cadena ligera de miosina
MLCK*	Cinasa de la cadena ligera de miosina activa

mm	Milímetros
N <sub>2</sub>	Nitrógeno molecular
Na	Sodio
NaH	Hidruro de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NaNH <sub>2</sub>	Amiduro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sodio
NO	“Óxido nítrico”
NOS	Óxido nítrico sintasa
ODQ	1 <i>H</i> -[1,2,4]oxadiazolo-[4,3a]quinoxalin-1-ona
PBr <sub>3</sub>	Tribromuro de fósforo
Pd	Paladio
PDE ó PDE1	Fosfodiesterasa del AMPc
PPh <sub>3</sub>	Trifenilfosfina
<i>S. livida</i>	<i>Scaphyglottis livida</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
THF	Tetrahidrofurano
µm	Micrómetros

## INTRODUCCIÓN

Por la importancia que tiene la calmodulina (CaM) en la regulación de numerosas funciones celulares, entre ellas la contracción del músculo liso, el hallazgo de nuevos inhibidores sería de gran utilidad para el tratamiento farmacológico de enfermedades gastrointestinales, asma y alergias, entre otras.

En estudios recientes, se ha comprobado que los bibencilos gigantol y batatasina III así como una serie de fenantrenos, obtenidos de los extractos metanólicos de las orquídeas *Scaphyglottis livida* y *Nidema boothi*, provocan una disminución significativa del tono y la amplitud de las contracciones espontáneas del íleon de rata y de cobayo. El efecto farmacológico de estos compuestos fue mejor que el de la papaverina, un relajante inespecífico utilizado como control positivo. Mediante experimentos farmacológicos, fue posible descartar que el mecanismo de acción *in vitro* de estos estilbenoides sea de tipo antihistaminérgico, anticolinérgico, o una interferencia directa con el flujo de calcio a la célula muscular.<sup>1-3</sup> La aplicación de un radioinmunoensayo permitió establecer que los bibencilos incrementan los niveles del segundo mensajero monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) de manera adicional, el efecto de estos productos disminuyó significativamente en presencia de ODQ (1*H*-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3*a*]quinoxalin-1-ona) y L-NAME (éster metílico de *N*-nitro-L-arginina), inhibidores de las enzimas guanilciclase y óxido nítrico sintasa (NOS), respectivamente. Los resultados de estos dos conjuntos de experimentos, sugieren que los bibencilos ejercen parcialmente su efecto relajante por un mecanismo de acción nitrérgico.<sup>4,5</sup>

Un estudio de electroforesis, indicó que estos estilbenoides modifican la movilidad electroforética de la proteína calmodulina de cerebro bovino. Este último resultado, aunque preliminar, sugiere que el gigantol y la batatasina podrían interactuar con la CaM y desencadenar así su efecto relajante sobre el músculo liso.<sup>2</sup> Esta afirmación se apoya en el hecho de que la fenotiazina y otros antagonistas de CaM relajan el músculo liso.

Por lo antes mencionado, en este trabajo se llevó a cabo la síntesis de una serie de análogos del gigantol lo cual permitirá continuar con los estudios de relación estructura química-actividad biológica. Estos análogos diferían de la molécula líder en el patrón de sustitución de los anillos aromáticos, los bibencilos (**7b-10b** y **12**) se sintetizaron a partir de la reacción de Wittig seguida de una reducción catalítica, además de la síntesis de un derivado homólogo mediante una reacción de transposición bencílica, el difenilmetano (**15**). Adicionalmente se encontró que los compuestos **8b**, **15a** y **15b** tienen un efecto inhibitor del complejo CaM-PDE1, lo que indicaría que posiblemente puedan tener función antiespasmódica.

## 1. ANTECEDENTES TEÓRICOS

### 1.1. La familia Orchidaceae

La familia Orchidaceae con más de 15,000 especies se encuentran agrupadas en cinco subgrupos, nueve tribus y 800 géneros,<sup>6,7</sup> por lo cual la familia Orchidaceae es probablemente la más abundante del reino vegetal. Sin embargo, la mayoría de las especies se encuentran localizadas con una mayor abundancia y diversidad en los trópicos, especialmente en las zonas montañosas entre los 1,000 y los 2,000 m de altura sobre el nivel del mar.<sup>8,9</sup>

Las orquídeas se pueden clasificar en terrestres, epífitas, litofíticas o semiacuáticas dependiendo del lugar donde se desarrollan.<sup>6,10</sup>

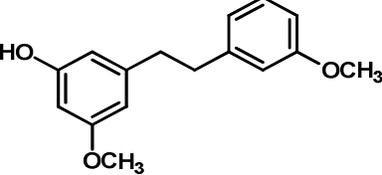
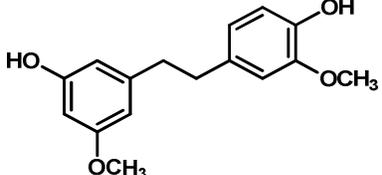
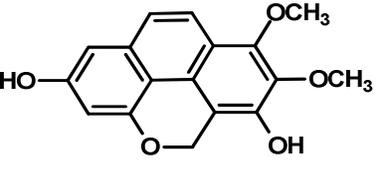
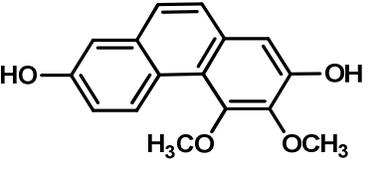
De esta clasificación se estima que el 73% de las orquídeas son epífitas. Las epífitas son plantas que crecen sobre otras plantas hospederas, por lo general árboles pero sin tener un contacto directo con los haces vasculares de los mismos. Por lo tanto, las epífitas no extraen agua ni nutrientes del hospedero. Aunque algunos habitantes de la región de Tuxtla y Veracruz las llaman erróneamente “parásitas”.<sup>11</sup>

Muchas especies de orquídeas son de gran importancia económica, debido principalmente a la belleza de sus flores, que son utilizadas con fines ornamentales. Algunas otras contienen aceites esenciales que le confieren propiedades aromáticas, tal es el caso de la vainilla (*Vainilla planifolia*), se utiliza ampliamente en la industria cosmética y de alimentos. Otras, se utilizan en las prácticas médicas tradicionales con fines curativos atribuyéndoseles diversas propiedades medicinales, tales como analgésicas, antidiarréicas, vermífugas, tónicas, antipiréticas, antiinflamatorias, antibacterianas y anticancerígenas.<sup>8,10</sup>

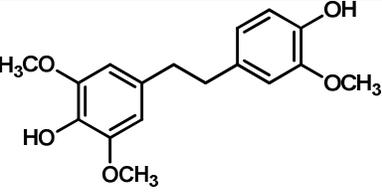
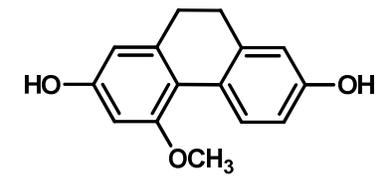
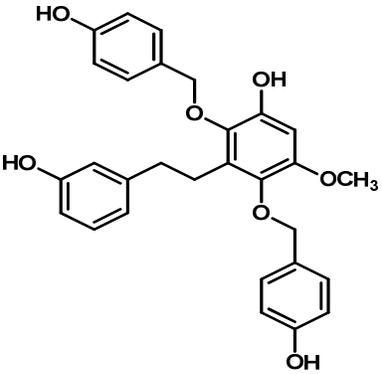
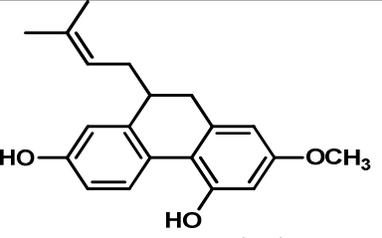
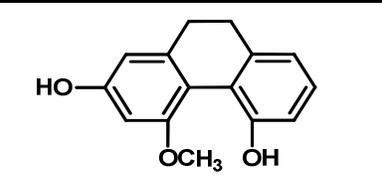
Desde el punto de vista fitoquímico, las orquídeas han sido objeto de numerosos estudios, los cuales han resultado en el aislamiento de metabolitos con diferentes estructuras entre los que destacan alcaloides de los tipos picrotoxano,

pirrolizidínico y fenilalquilamina, triterpenoides de los tipos cicloartano y lostano, flavonoides, cumarinas, compuestos aromáticos simples y estilbenoides, siendo este último grupo el más característico. Muchos de estos estilbenoides aislados de estas orquídeas han presentado importantes actividades biológicas.<sup>8</sup> En el siguiente cuadro se presentan algunos ejemplos.

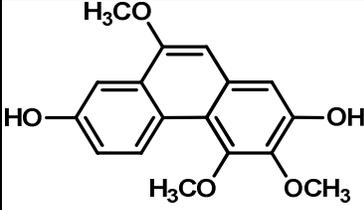
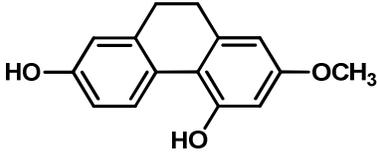
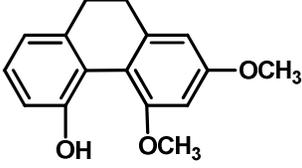
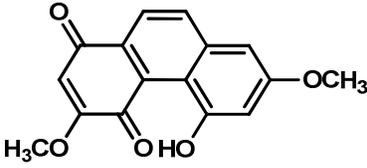
**Cuadro 1.** Ejemplos de estilbenoides bioactivos aislados de la familia Orchidaceae.<sup>8,9</sup>

Especie	Metabolito	Propiedades
<p><i>Bletilla striata</i></p>	 <p>3'-O-metilbatatasina III (i)</p>	<p>Antibacteriano contra <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Staphylococcus aureus</i><sup>12</sup></p>
<p><i>Bulbophyllum vaginatum</i> <i>Lusia volucris</i> <i>Catasetum barbatum</i> <i>Dendrobium nobile</i></p>	 <p>Gigantol (ii)</p>	<p>Antiinflamatorio<sup>13</sup> Antimutagénico<sup>14</sup> Fitotóxico<sup>2</sup></p>
<p><i>Coelogyne ovalis</i> <i>Coelogyne cristata</i></p>	 <p>Coelogina (iii)</p>	<p>Espasmolítico, bloqueador de canales de Ca<sup>2+</sup> en íleon de cobayo<sup>15</sup></p>
<p><i>Eria convallarioides</i> <i>Eulophia nuda</i> <i>Oncidium cebolleta</i></p>	 <p>Nudol (iv)</p>	<p>Antiinflamatorio, inhibidor específico no competitivo de las contracciones inducidas por histamina.<sup>13</sup></p>

**Cuadro 1.** Ejemplos de estilbenoides bioactivos aislados de la familia Orchidaceae. (Cont.)

Especie	Metabolito	Propiedades
<p><i>Dendrobium loddigessi</i> <i>Dendrobium nobile</i></p>	 <p>Aloifol (Moscetilina) (v)</p>	<p>Inhibidor de la agregación plaquetaria<sup>16</sup> Antimutagénico<sup>17</sup> Fitotóxico<sup>2</sup></p>
<p><i>Orchis militaris</i> <i>Agrostophyllum callosum</i> <i>Spiranthes sinensis</i></p>	 <p>Orcinol (vi)</p>	<p>Antifúngico contra el moho <i>Candida lipolytica</i> <i>Phytophthora infestans</i> y <i>Monilinia fructicola</i><sup>18</sup></p>
<p><i>Bletilla striata</i></p>	 <p>3,3'-dihidroxi-5-metoxi-2,6-bis-(p-hidroxibencil) bibencilo (vii)</p>	<p>Antibacteriano contra <i>Bacillus subtilis</i>, <i>B. cereus</i>, <i>Nocardia gardneri</i> y <i>Staphylococcus aureus</i><sup>19</sup></p>
<p><i>Spiranthes sinensis</i></p>	 <p>Espirantol-A (viii)</p>	<p>Antibacteriano contra <i>Bacillus subtilis</i>, <i>B. cereus</i>, <i>N. gardneri</i> y <i>S. aureus</i> Antifúngico contra <i>Candida albicans</i> y <i>Trichophyton mentagrophytes</i><sup>20</sup></p>
<p><i>Loroglossum hircinum</i></p>	 <p>Hircinol (ix)</p>	<p>Antifúngico contra <i>Aspergillus niger</i><sup>18</sup></p>

**Cuadro 1.** Ejemplos de estilbenoides bioactivos aislados de la familia Orchidaceae. (Cont.)

Especie	Metabolito	Propiedades
<i>Maxillaria densa</i>	 <p>Gimnopusina (x)</p>	Actividad fototóxica <sup>21</sup>
<i>Dendrobium plicatile</i> <i>Lusia indivisa</i> <i>Bletilla striata</i>	 <p>Lusiantridina (xi)</p>	Antitumoral en ratón, agente citotóxico in vitro (A-549, SK-DV-3 y HL-60 leucemia humana) <sup>22</sup> Fitotóxico <sup>2</sup>
<i>Loroglossum hircinum</i>	 <p>Loroglosol (xii)</p>	Antifúngico contra <i>Phytophthora infestans</i> <sup>18</sup>
<i>Dendrobium nobile</i>	 <p>Denbinobina (xiii)</p>	Antitumoral <sup>22</sup>

## 1.2. Antecedentes de *Scaphyglottis livida*

*Scaphyglottis livida* (*S. livida*) es una planta erecta, con un tallo de dos a tres veces ramificado, sus ramas poseen un pseudobulbo fusiforme, delgado, costado de hasta 10 cm de largo y 8 mm de diámetro y dos hojas. Las hojas son angostas, lineales de 4 a 12 cm de largo, 3 a 4 mm de ancho ápice retuso. Las flores son escasas en el pseudobulbo terminal, con pequeños ovarios cortos, verdoso-crema, con líneas violeta, pétalos y sépalos de aproximadamente 2 mm de largo (Figura 1). *Scaphyglottis livida* crece tanto en la selva alta como en los bosques secos premontañosos y mesófilos de montañas entre los 600 y 1,500 m de altura.<sup>8-10</sup>

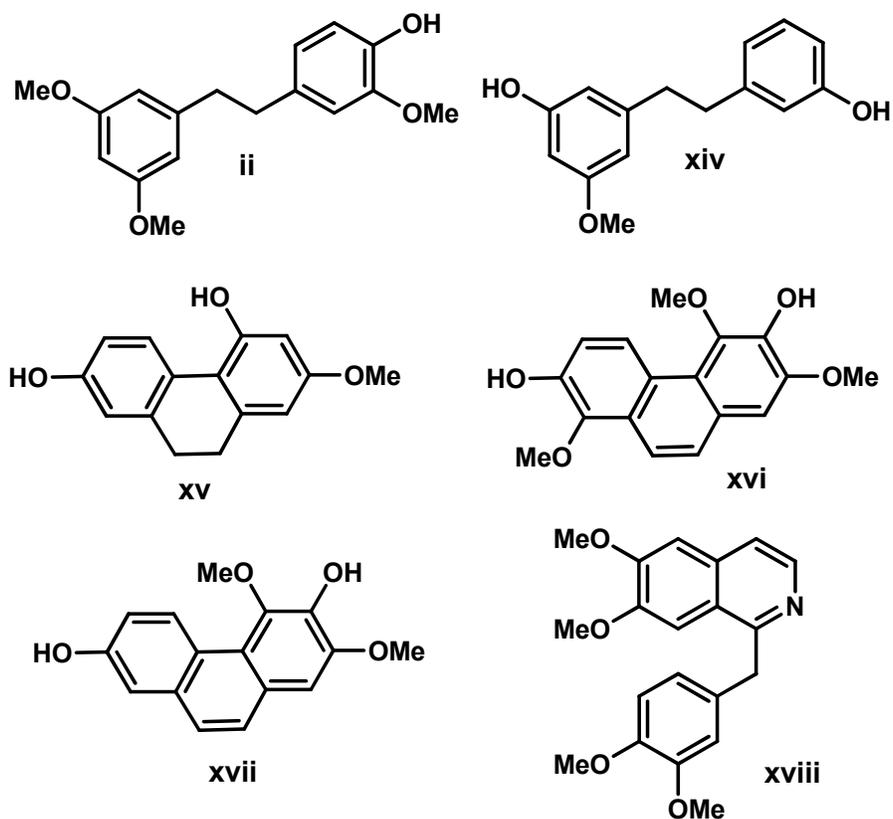


**Figura 1.** *Scaphyglottis livida*.

*Scaphyglottis livida* se distribuye ampliamente en México principalmente en las zonas tropicales de los estados de Veracruz, Chiapas, Oaxaca y Guerrero y de países como Guatemala y Honduras. Los habitantes de la región de Tuxtla y Veracruz emplean la planta entera para el tratamiento de heridas, para evitar el aborto, como repelente de insectos y para el tratamiento de cólicos estomacales.<sup>8</sup> Desde el punto de vista fitoquímico y farmacológico, esta especie ha sido objeto de varios estudios que han valido parcialmente su uso para el tratamiento de cólicos estomacales. Un estudio realizado por Estrada y colaboradores (1999), permitió comprobar que el extracto de *S. livida* obtenido con  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:1) provoca una disminución en el tono y la amplitud de las contracciones espontáneas del íleon de cobayo y rata; el estudio fitoquímico biodirigido de un extracto espasmolítico activo permitió el aislamiento de una serie de estilbenoides espasmolíticos [gigantol (ii), batatasina III (xiv), coelonina (xv), 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (xvi) y 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno (xvii)] con una

potencia mayor o igual a la papaverina (**xviii**), un relajante inespecífico utilizado como control positivo.<sup>4,9</sup> Las estructuras de estos compuestos se ilustran a continuación en el esquema 1.

**Esquema 1.** Estilbenoides espasmolíticos de *Scaphyglottis livida*.



Gigantol (**ii**), batatasina III (**xiv**), coelonina (**xv**), 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (**xvi**), 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno (**xvii**) y papaverina (**xviii**).

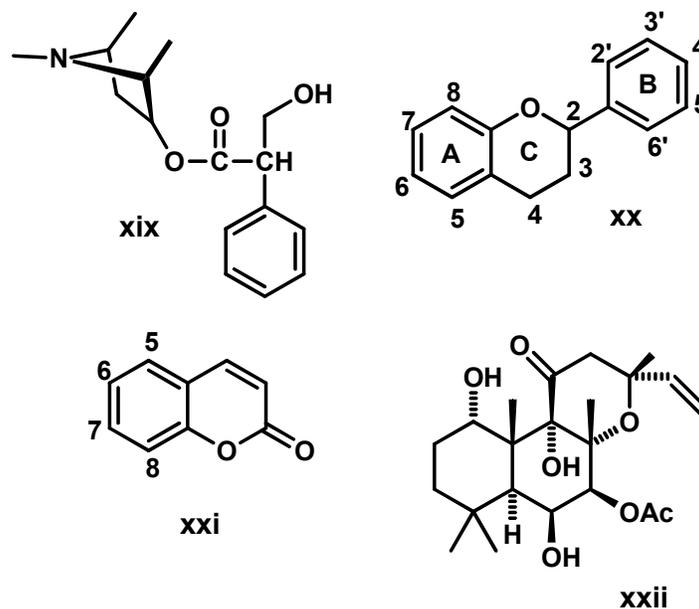
### 1.3. Agentes antiespasmódicos naturales

Se conoce como agente espasmolítico al compuesto que induce relajación e inhibe los espasmos musculares. Estos agentes son también conocidos como antiespasmódicos.

Los antiespasmódicos empleados para el tratamiento de los desórdenes gastrointestinales son sustancias que disminuyen la actividad motora del músculo

liso del tracto digestivo.<sup>23</sup> Muchos de estos medicamentos se utilizan en la terapéutica para el tratamiento de cólicos, dispepsia, ulceración y diarrea. Los antiespasmódicos naturales presentan una gran diversidad estructural y pertenecen principalmente a las siguientes categorías de compuestos: alcaloides, flavonoides, terpenoides y cumarinas.<sup>8</sup> Los alcaloides no poseen un esqueleto en común, un alcaloide con función antiespasmódica es la atropina (**xix**). Por lo contrario los flavonoides poseen un esqueleto común que está conformado de difenil-piranos, (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) (**xx**). De igual forma las cumarinas presentan una estructura en común de 2*H*-1-benzopiran-2-ona, denominada cumarina (**xxi**). Por último los terpenoides presentan una gran variedad estructural, derivan de la fusión repetitiva de unidades ramificadas de cinco carbonos basadas en la estructura del isopentenilo y se clasifican por el número de unidades de cinco carbonos que contienen, un ejemplo con propiedades antiespasmódicas es la forskolina (**xxii**).<sup>10,23</sup> (Esquema 2).

**Esquema 2.** Ejemplos de estructuras de antiespasmódicos naturales.



Atropina (**xix**), difenil-pirano (**xx**) esqueleto básico de los flavonoides, 2*H*-1-benzopiran-2-ona (**xxi**) y forskolina (**xxii**).

De acuerdo a su mecanismo de acción los antiespasmódicos naturales se pueden clasificar de la siguiente manera: antagonistas colinérgicos muscarínicos, agonistas de neuropéptidos opiodes, bloqueadores de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , inhibidores de la fosfodiesterasa del 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) y los activadores de adenililciclase.<sup>24,25</sup>

Los agonistas colinérgicos muscarínicos incluyen los alcaloides tropánicos atropina, escopolamina y hiosciamina, además de un gran número de derivados semisintéticos de este grupo, obtenidos a partir de especies vegetales de la familia Solanaceae. La atropina y escopolamina son bloqueadores competitivos de los receptores muscarínicos localizados en los órganos efectores inervados por el sistema nervioso autónomo parasimpático y de los receptores muscarínicos neuronales y ganglionales localizados en el sistema nervioso periférico (SNP) y el sistema nervioso central (SNC).<sup>8,24</sup>

El grupo de los agonistas opiodes incluye principalmente a los alcaloides del opio: morfina y codeína. Estos metabolitos secundarios son agonistas directos de neuropéptidos opiodes, cuya distribución celular y función se localiza principalmente en el SNC y en el tracto gastrointestinal. La morfina y la codeína, al igual que todos los agonistas opiodes actúan principalmente en los receptores  $\mu$ . Estos compuestos en el tracto gastrointestinal actúan disminuyendo la secreción gástrica, biliar, pancreática e intestinal y originan un aumento en el tono basal. Los agonistas opiodes constituyen los medicamentos básicos para el tratamiento farmacológico inespecífico de la diarrea, los cuales producen una disminución en la motilidad intestinal y contrarrestan la secreción excesiva que acompaña algunas formas de diarrea.<sup>24</sup>

Los bloqueadores de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  constituyen un grupo muy heterogéneo de compuestos químicos que actúan principalmente a través de interacciones con sitios específicos en la subunidad  $\alpha_1$  de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependiente tipo L. Estas sustancias bloqueadoras de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  inhiben el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células excitables de músculo liso, esquelético y

cardíaco. Los flavonoles y algunas flavonas constituyen otro grupo de metabolitos secundarios a los que se les ha demostrado una actividad relajante del músculo liso, asociado a un bloqueo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>8</sup>

Dentro del grupo de los inhibidores de la fosfodiesterasa del 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), se encuentra la papaverina, es un alcaloide del opio, pero carece de acción narcótica o analgésica de tipo morfínico. Suele considerarse el prototipo de los denominados relajantes musculares inespecíficos, esto implica que la papaverina no interactúa con ningún tipo específico de receptor de membrana. La papaverina además de ser un inhibidor de la fosfodiesterasa del AMPc; también estimula algunos receptores de dopamina; su molécula contiene una porción de tipo dopamínico, por lo que es posible que el efecto relajante de músculo liso sea consecuencia de estas acciones específicas.<sup>26</sup>

En el grupo de los activadores de adenililciclase el producto natural principal de este grupo es forskolina, diterpeno aislado de las raíces de *Coleus forskoli*. Esta sustancia produce relajación del músculo liso mediante la activación de la adenililciclase, posiblemente estimulando directamente el componente catalítico de la enzima. El efecto relajante por la forskolina se debe a la acumulación de AMPc en el sarcoplasma.<sup>8</sup>

#### **1.4. Músculo liso. Contracción y relajación**

En el cuerpo, el músculo liso se encuentra en las paredes de los órganos huecos de vísceras abdominales y pelvianas (sistema digestivo y urogenital), en las paredes estructurales vasculares (bazo y vasos sanguíneos no capilares), en las paredes de los bronquios, en las cápsulas y conductos de glándulas exocrinas, y en estructuras asociadas con el ojo.<sup>26</sup>

Las células musculares lisas son fusiformes, con un núcleo en posición central. Sus dimensiones varían mucho; en el intestino tiene de 5-6  $\mu\text{m}$  de

diámetro, 30-40  $\mu\text{m}$  de largo, mientras que en el útero pueden ser largas, hasta de 0.5 mm. Las células musculares lisas más pequeñas están en las paredes de los vasos sanguíneos, donde tienen 2-3  $\mu\text{m}$  de diámetro y 15-20  $\mu\text{m}$  de largo.<sup>26</sup>

El tono del músculo liso es expresión del grado de actividad basal que presenta. El tono puede ser como *neurógeno*, debido a una llegada constante de impulsos nerviosos autónomos, o puede ser *miógeno*, dependiente de actividad intrínseca. Cuando en el tejido preexiste cierto grado de contracción, el músculo liso puede responder con relajación.<sup>26</sup>

El músculo liso del mamífero se puede clasificar en dos tipos denominados de multiunidad y unitario (o de una sola unidad).<sup>27</sup>

#### **1.4.1. El mecanismo de contracción del músculo liso**

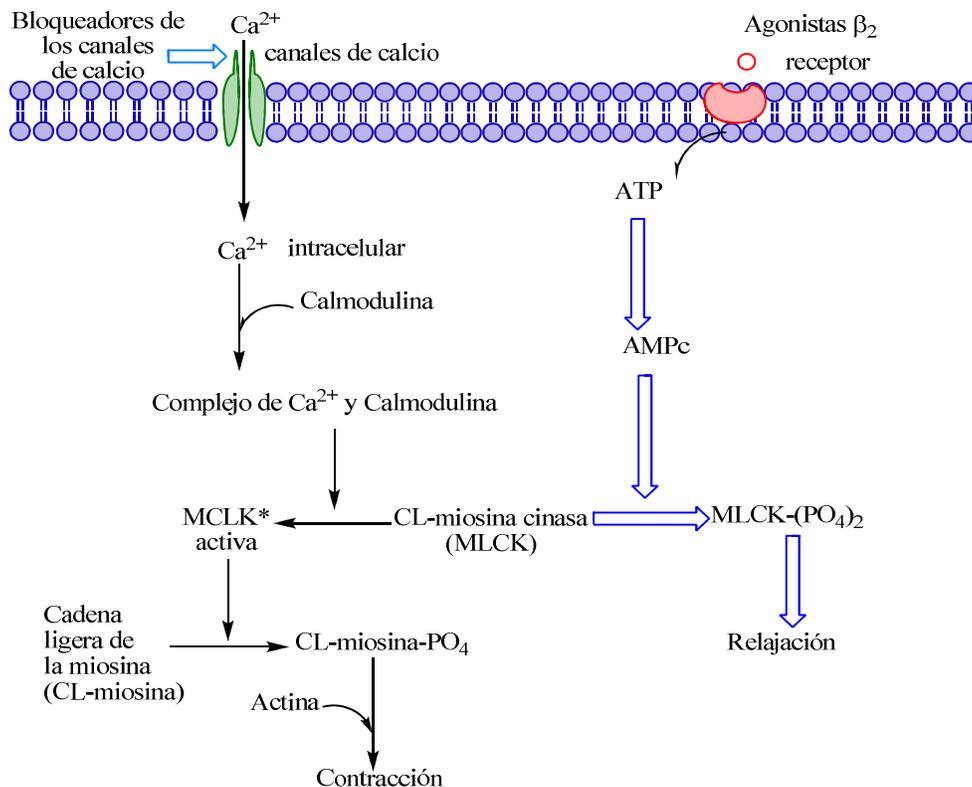
Al igual que en el caso del músculo esquelético, el estímulo que inicia la mayor parte de las contracciones del músculo liso es un aumento de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio intracelular. Este aumento puede ser producido en diferentes tipos de músculo liso, por la estimulación nerviosa del músculo liso, por estimulación hormonal, por distensión de la fibra o incluso por cambios del ambiente químico de la fibra.<sup>26.28</sup>

El músculo contiene filamentos tanto de actina como de miosina, que tienen características similares a los filamentos de actina y miosina del músculo esquelético. No contiene el complejo de troponina normal que es necesario para el control de la contracción del músculo esquelético. Sin embargo, en lugar de la troponina, las células musculares lisas contienen una gran cantidad de otra proteína reguladora denominada *calmodulina*.<sup>28</sup>

La calmodulina (CaM) es una proteína de naturaleza ácida ubicua que se enlaza al calcio y regula muchos procesos celulares a través de su interacción con una gran variedad de proteínas.<sup>29</sup> La proteína es de bajo peso molecular (16 a 18 kilodaltones) y está constituida en promedio por 148 aminoácidos arreglados en

dos dominios globulares que están conectados por una larga hélice flexible. Cada dominio globular contiene dos sitios funcionales que se unen al ion calcio.<sup>30</sup> Al enlazarse al calcio la CaM expone dos superficies hidrofóbicas rodeadas por una carga negativa, una en cada dominio globular y cuando todos los sitios están ocupados hay un marcado cambio conformacional que permite a la CaM activar enzimas y canales iónicos.<sup>10</sup> Entonces el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM puede enlazarse a las largas cadenas de las enzimas que modula a través de interacciones hidrofóbicas.<sup>27</sup>

Una vez que aumenta la concentración intracelular de los iones  $\text{Ca}^{2+}$ , el calcio se combina con la calmodulina para formar un complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM que convierte a la enzima cinasa de la cadena ligera de miosina en su forma activa (MLCK, del inglés *myosin light chain kinase*). Esta última fosforila las cadenas ligeras de la miosina, iniciando así la interacción de la miosina con la actina. Dando como resultado la contracción,<sup>25,31,32</sup> como se muestra en la figura 2.



**Figura 2.** Regulación de la contracción del músculo liso.

### 1.4.2. Relajación del músculo liso

La relajación del músculo liso ocurre cuando se elimina el estímulo contráctil en el momento que finaliza la disociación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, que a su vez se disocia de la MLCK, por lo que la cinasa se inactiva, también la relajación se da por la acción directa de una sustancia que estimula la inhibición del mecanismo contráctil. En cualquiera de estos casos el proceso de relajación requiere de una disminución de calcio y el aumento de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP).<sup>31</sup>

La relajación se puede dar por agentes bloqueadores de los canales de calcio, evitando así el ingreso de calcio y el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que da la contracción.<sup>25</sup>

Algunos otros agentes relajantes del músculo liso actúan promoviendo la formación de AMPc y GMPc, mediante la estimulación de receptores  $\beta_2$  adrenérgicos y/o la enzima guanililciclase, respectivamente, lo que trae como consecuencia la activación de la proteína cinasa dependiente de AMPc y/o de la proteína dependiente de GMPc. Ambas enzimas inducen la relajación del músculo liso debido, en primer lugar, a un decremento en la afinidad de unión de la MLCK por el complejo calcio-CaM, probablemente porque fosforila a la MLCK y una vez fosforilada muestra una afinidad mucho menor por el complejo y por lo tanto es mucho menos sensible a la activación (flechas gruesas figura 2), y en segundo lugar, por la disminución de calcio.<sup>25,31</sup>

Otros agentes relajantes del músculo liso son los nitratos, nitritos y otras sustancias que incrementan la concentración de óxido nítrico (NO).<sup>33</sup> El NO es un gas estable altamente difusible, se sintetiza mediante una familia de enzimas llamadas colectivamente óxido nítrico sintasa (NOS), de ubicación citosólica.<sup>25</sup> La forma endotelial y neuronal de la NOS son activadas por  $\text{Ca}^{2+}$ . El sustrato es la L-arginina y sus productos son citrulina y NO.<sup>28,34</sup> Una vez generado, el NO interactúa con la molécula del hem de la guanililciclase soluble, esto resulta en la activación de la enzima, lo cual permite la formación de GMPc, a partir de trifosfato

de guanosina (GTP).<sup>22</sup> El GMPc facilita la desfosforilación de las cadenas ligeras de miosina, impidiendo la interacción de esta con la actina.<sup>25</sup> (Figura 3).

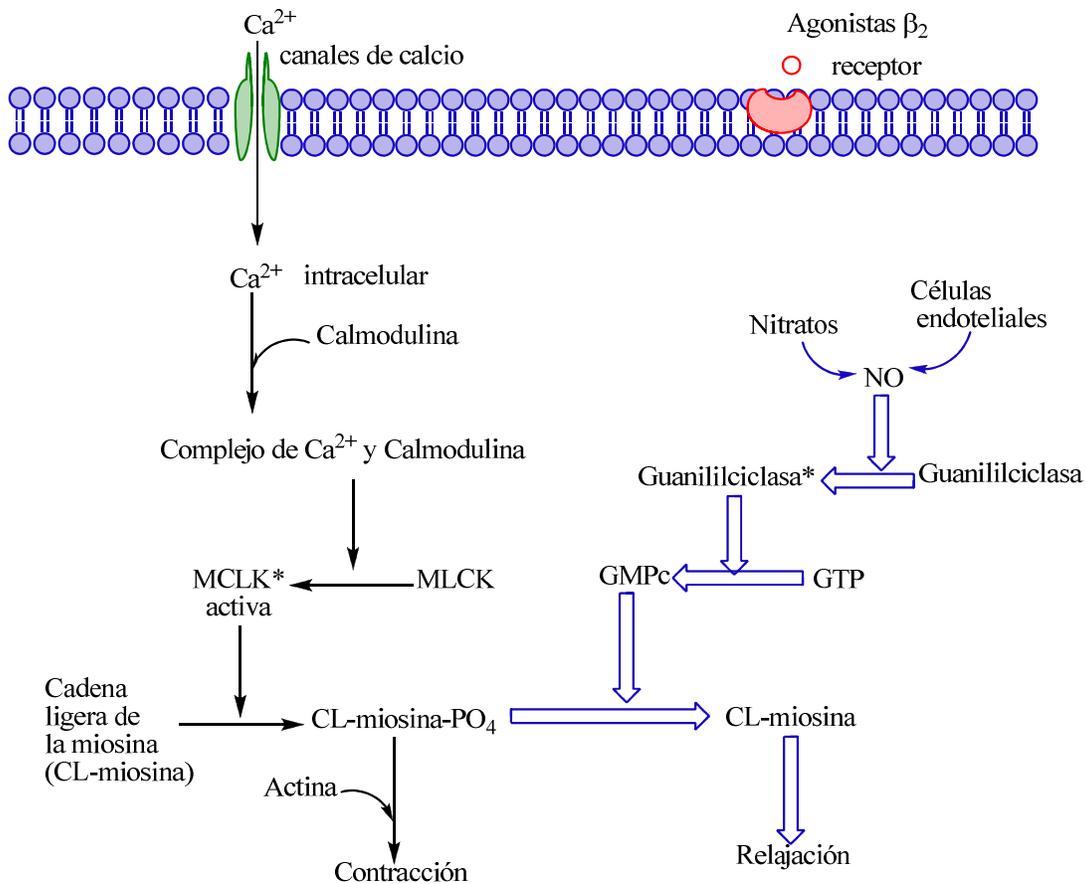


Figura 3. Mecanismo de acción de NO en la relajación del músculo liso.

### 1.4.3. La CaM en la regulación de la contracción muscular

La calmodulina al ser una proteína que regula la actividad de varias enzimas, incluye algunas fosfodiesterasas de los nucleótidos cíclicos, la sintasa de óxido nítrico, la adenililciclase, varias cinasas, incluyendo la que fosforila las cadenas ligeras de la miosina, por tan solo mencionar algunas, muchas de las cuales son relevantes en el proceso de contracción muscular, por lo cual se puede considerar que la CaM juega un papel central en la contracción muscular.<sup>35</sup>

La actividad reguladora de la CaM se inhibe en presencia de ciertos fármacos y numerosos metabolitos secundarios. Entre los fármacos más importantes se encuentran los antipsicóticos derivados de la fenotiazina como la clorpromazina y la trifluoroperazina. Otros fármacos que interactúan con la CaM son los antimicóticos derivados del miconazol, entre otros fármacos que son antagonistas de la CaM.<sup>36</sup>

Al inhibir la CaM por medio de un fármaco, se induce una disociación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-MLCK, resultando en un incremento de la actividad de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina activa, desfosforilando las cadenas ligeras de miosina y así de esta manera la relajación del músculo liso.<sup>37</sup>

Para determinar las propiedades inhibitorias del efecto modulador de CaM ejercido por diferentes compuestos, se han establecido a través de diferentes métodos como son espectroscópicos, electroforéticos y enzimáticos. En la mayoría de los casos se mide la inhibición de la actividad enzimática de la fosfodiesterasa del AMPc (PDE1) por electroforesis y cromatografía de afinidad.<sup>38</sup>

### **1.5. Características de los estilbenoides**

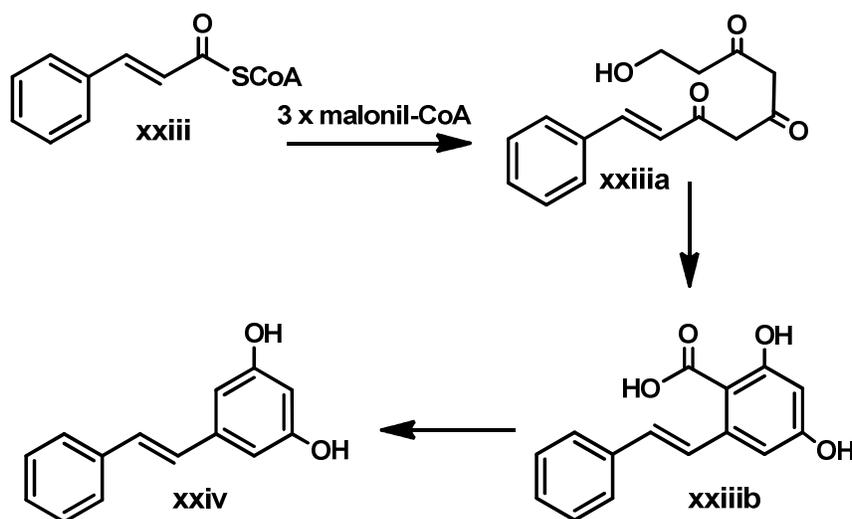
Los estilbenoides son un grupo de compuestos de tipo  $\text{C}_6\text{-C}_2\text{-C}_6$  generalmente de naturaleza fenólica. Su origen biogénico mixto involucra las rutas del ácido siquímico y acetato-malonato. Estos productos naturales son metabolitos característicos de algunas familias de plantas. Los productos se encuentran principalmente en especies de orquídeas y briofitas, aunque también se han descrito en moráceas, cannabináceas y polígonaes, por tan solo mencionar algunas familias de angiospermas que biosintetizan este tipo de productos. Desde el punto de vista bioquímico, se dividen en cuatro grandes grupos: estilbenos, bibencilos, fenantrenos y 9,10-dihidrofenantrenos, cada uno con sus subgrupos.<sup>39</sup>

Los estilbenoides de orquídeas se obtienen como sólidos amorfos o cristalinos y pueden ser coloridos o incoloros. La naturaleza fenólica de algunos de estos compuestos es fácil de determinar debido a las coloraciones violeta y azul características que presentan frente a reveladores químicos como cloruro férrico y ácido fosfomolibdico respectivamente en cromatogramas en capa delgada.<sup>8</sup>

En la literatura se han descrito tres posibles rutas biogénicas que conducen a la formación de los estilbenoides. La primera descrita por Birch y Donovan (1953) se considera que estos productos son de biogénesis mixta, generándose a través de las rutas acetato-malonato y ácido siquímico. Así una molécula de cinamoil-CoA (**xxiii**) (unidad iniciadora) y tres unidades de malonil-CoA se condensa para generar el estilbeno (**xxiv**). Posteriormente, Robinson y colaboradores (1955), propusieron una segunda hipótesis, según la cual estos compuestos se generan por la ruta acetato-malonato a partir de la condensación del policétido (**xxv**) y siete unidades de malonil-CoA. Por último, la tercera hipótesis propuesta Seshadri (1957), considera que los estilbenoides se generan a través de la condensación aldólica de una molécula análoga a un benzaldehído (**xxvii**) y otra del ácido fenilacético (**xxviii**).<sup>39</sup> (Esquema 3).

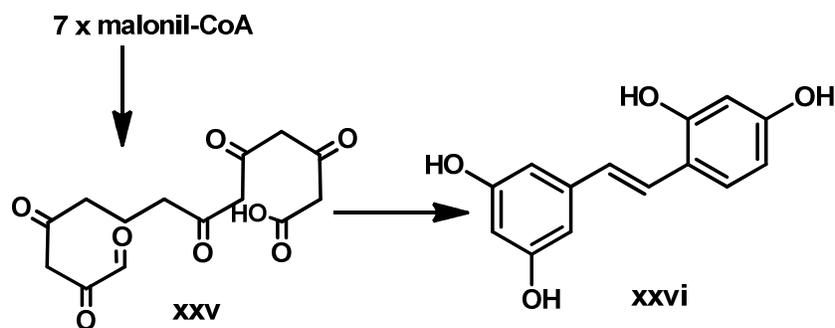
### Esquema 3. Rutas biogénicas propuestas para la formación de estilbenoides.

#### a) Hipótesis de Birch y Donovan



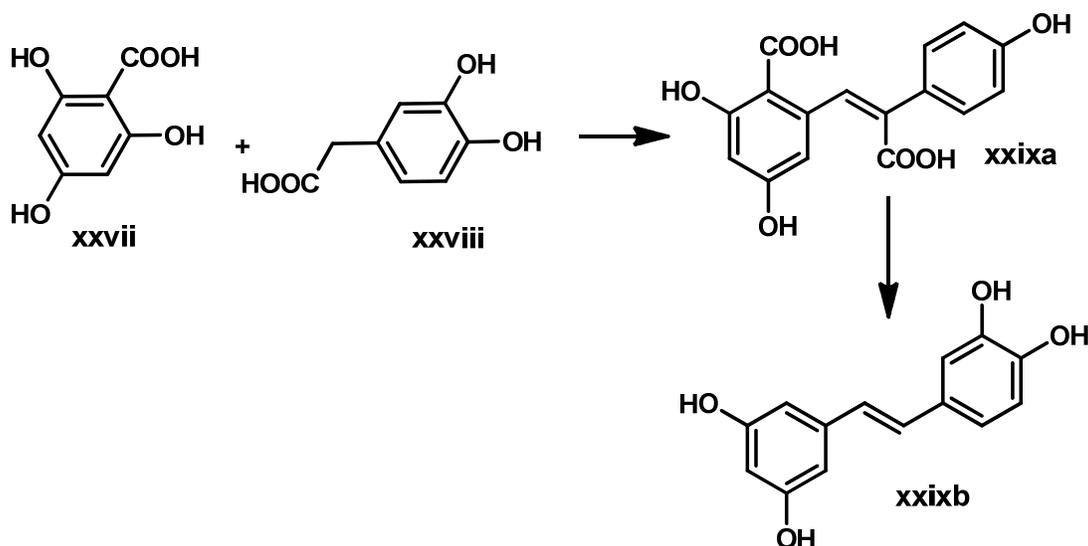
Cinamoil-CoA (**xxiii**), (1*E*)-9-hidroxi-1-fenilnon-1-ene-3,5,7-triona (**xxiiiia**), ácido 2,4-dihidroxi-6-[(*E*)-2-feniletetil]benzoico (**xxiiiib**) y 5-[(*E*)-2-feniletetil]benzeno-1,3-diol (**xxiv**).

## b) Hipótesis de Robinson



Ácido 3,5,7,11,13,14-hexaoxotetradecanoico (**xxv**) y 5-[(*E*)-2-(2,4-dihidroxifenil)etenil]benceno-1,3-diol (**xxvi**).

## c) Hipótesis de Seshadri



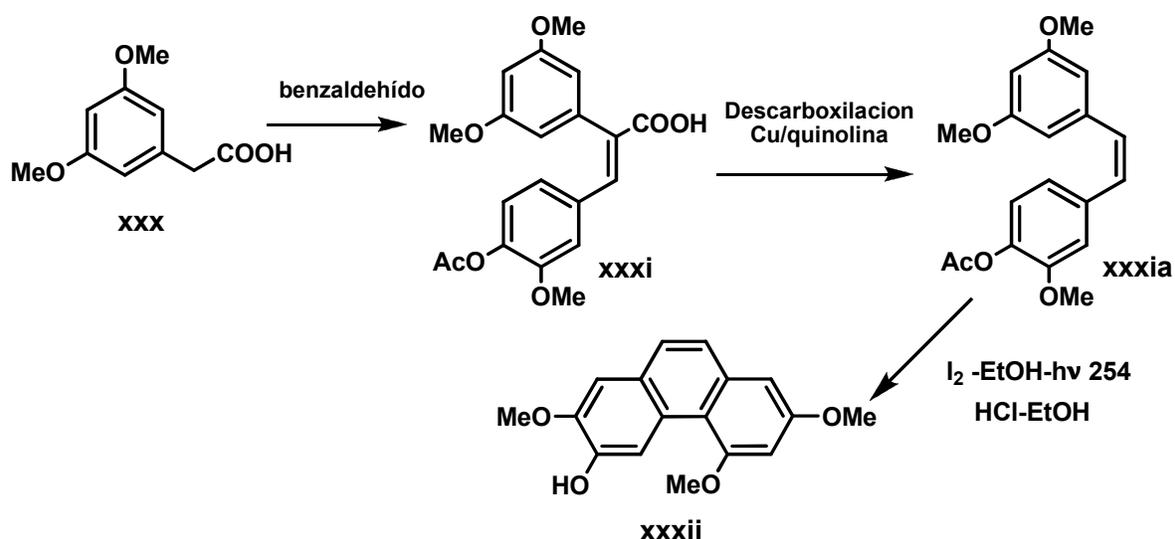
Ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico (**xxvii**), ácido 2-(3,4-dihidroxifenil)acético (**xxviii**), ácido 2-[2-carboxi-2-(4-hidroxifenil)etenil]-4,6-dihidroxibenzoico (**xxixa**) y 5-[(*E*)-2-(3,4-dihidroxifenil)etenil]benceno-1,3-diol (**xxixb**).

Para la síntesis de los estilbenoides se utilizan varias estrategias y las más importantes involucran la condensación de Perkin y la reacción de Wittig.

### 1.5.1. Condensación de Perkin

En la condensación de Perkin el estilbenoide se genera mediante la condensación de un análogo del ácido fenilacético (**xxx**) (bajo la forma de sal) con un análogo del benzaldehído. Esta reacción genera los isómeros *cis* y *trans* del estilbeno. La fotociclización posterior de esta mezcla permite la obtención de los fenantrenos correspondientes (**xxxii**), como se muestra en el esquema 4.<sup>8,40</sup>

**Esquema 4.** Reacción de condensación de Perkin para la síntesis de la batatasina I.



Ácido 2-(3,5-dimetoxifenil)acético (**xxx**), ácido (2E)-3-[4-(acetiloxi)-3-metoxifenil]-2-(3,5-dimetoxifenil)prop-2-enoico (**xxxi**), acetato de 4-[(Z)-2-(3,5-dimetoxifenil)etenil]-2-metoxifenil (**xxxia**) y 2,5,7-trimetoxifenantren-3-ol ó batatasina I (**xxxii**).

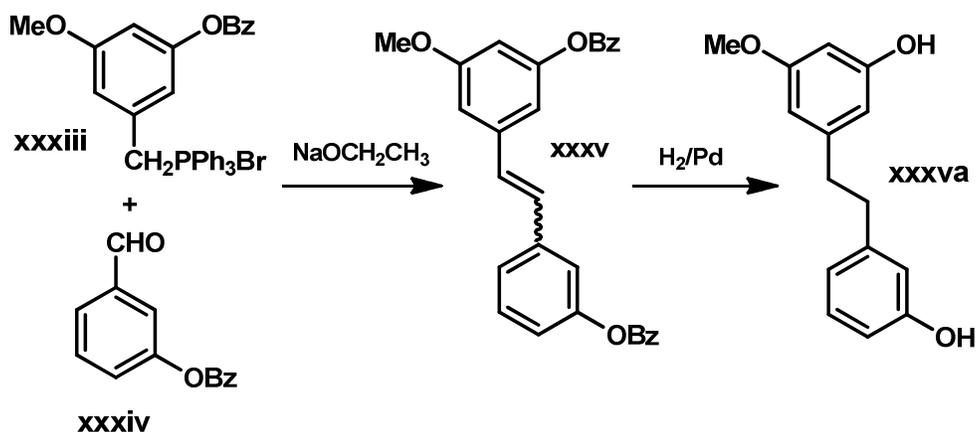
### 1.5.2. Reacción de Wittig

En 1954, George Wittig descubrió una forma de adicionar un carbanión, estabilizado por un átomo de fósforo, a una cetona o a un aldehído. Sin embargo, el producto obtenido no es un alcohol, ya que el intermedio experimenta una eliminación y se transforma en un alqueno.<sup>41</sup>

En esta estrategia un análogo del benzaldehído (**xxxiv**) reacciona con un íluro de benciltrifenilfosfonio (**xxxiii**), reactivo o sal de Wittig, para así generar los

isómeros *cis* y *trans* (**xxxv**) de los estilbenos.<sup>8</sup> La sal de Wittig se obtiene a partir de haloalcanos en dos etapas: la primera consiste en una sustitución nucleófila con trifenilfosfina, la segunda consiste en la desprotonación del carbono contiguo al fósforo mediante bases como *n*-butil litio (*n*-BuLi), hidruro de sodio (NaH), amiduro de sodio (NaNH<sub>2</sub>), entre otras.<sup>41</sup> Una vez obtenidos los isómeros por medio de una reducción con H<sub>2</sub>/Pd permite la obtención de los bibencilos (**xxxva**). (Esquema 5).

**Esquema 5.** Reacción de condensación de Wittig para la formación de la batatasina III.



Bromuro de {[3-(benzoiloxi)-5-metoxifenil]metil}trifenilfosfanio (**xxxiii**), benzoato de 3-formilfenilo (**xxxiv**), benzoato de 3-[(*E*)-2-[3-(benzoiloxi)-5-metoxifenil]etenil]fenilo (**xxxv**) y 3-[2-(3-hidroxfenil)etil]-5-metoxifenol ó batatasina III (**xxxva**).

Mediante la aplicación de estas estrategias generales se ha logrado la síntesis de una serie de estilbenoides, dentro de los cuales se puede mencionar la batatasina I y III, el gigantol, las combrestatinas B-3 y B-4, la gimpusina entre otros.

Los distintos estudios *in vitro* que se han realizado para establecer el mecanismo de acción mediante el cual los bibencilos gigantol (**i**) y batatasina III (**ii**) ejercen su efecto antiespasmódico permitieron concluir que estos compuestos son antagonistas de la proteína calmodulina y promueven la producción de óxido nítrico (NO).<sup>4</sup>

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dada la gran importancia que tiene la calmodulina (CaM) en la regulación de numerosas funciones, entre ellas la contracción muscular, el hallazgo de nuevos inhibidores puede ser de gran interés para el tratamiento farmacológico de enfermedades gastrointestinales, asma, hipertensión, entre otras.

Se han realizado estudios donde los resultados sugieren que los estilbenoides gigantol y batatasina, podrían interactuar con la CaM y desencadenar así un efecto relajante en el músculo liso.<sup>1</sup> A partir de estos resultados se sintetizaron una serie de análogos del gigantol para observar la relación estructura-actividad farmacológica, estos análogos diferían de la molécula líder en el patrón de sustitución de los anillos aromáticos y en la naturaleza de los sustituyentes, estableciéndose que para una máxima actividad espasmolítica es necesario que los anillos aromáticos del núcleo estilbenoide presenten sustituyentes oxigenados.<sup>2</sup>

Por tanto, con base en la información previamente establecida, se sugiere seguir con la preparación de análogos del gigantol para encontrar nuevos agentes con propiedades relajantes del músculo liso, lo cual permitirá obtener información valiosa sobre la relación estructura-actividad farmacológica al cambiar los sustituyentes y el tamaño de la cadena entre los fenilos.

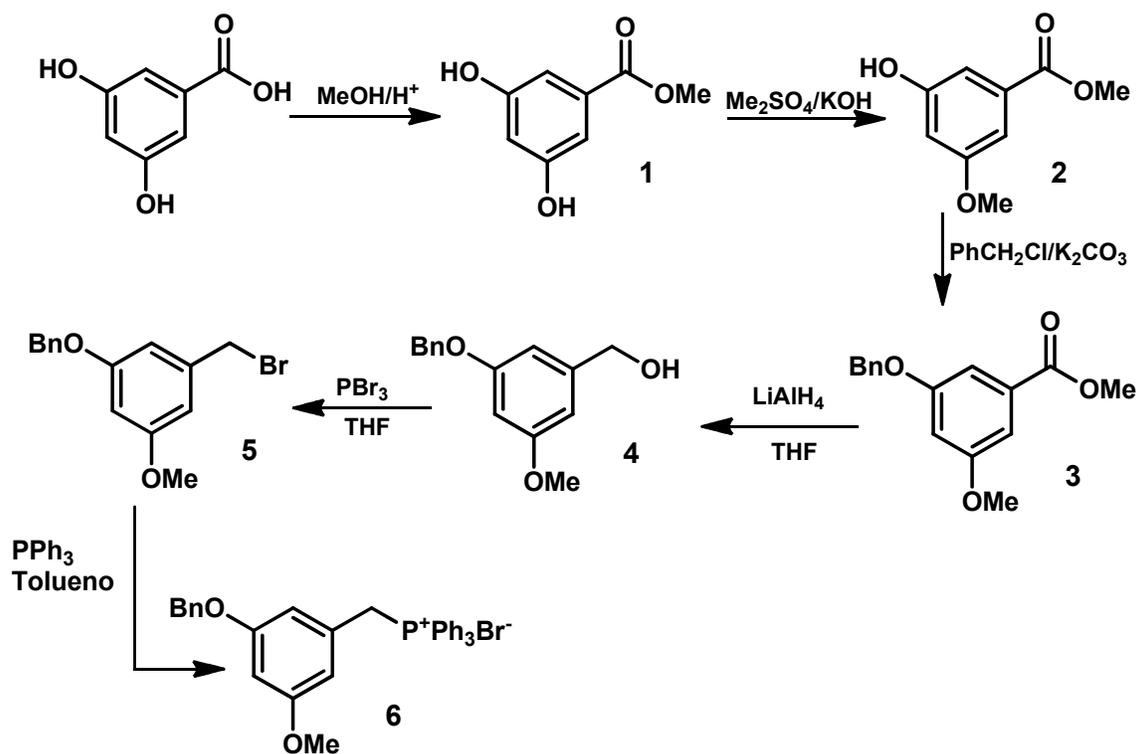
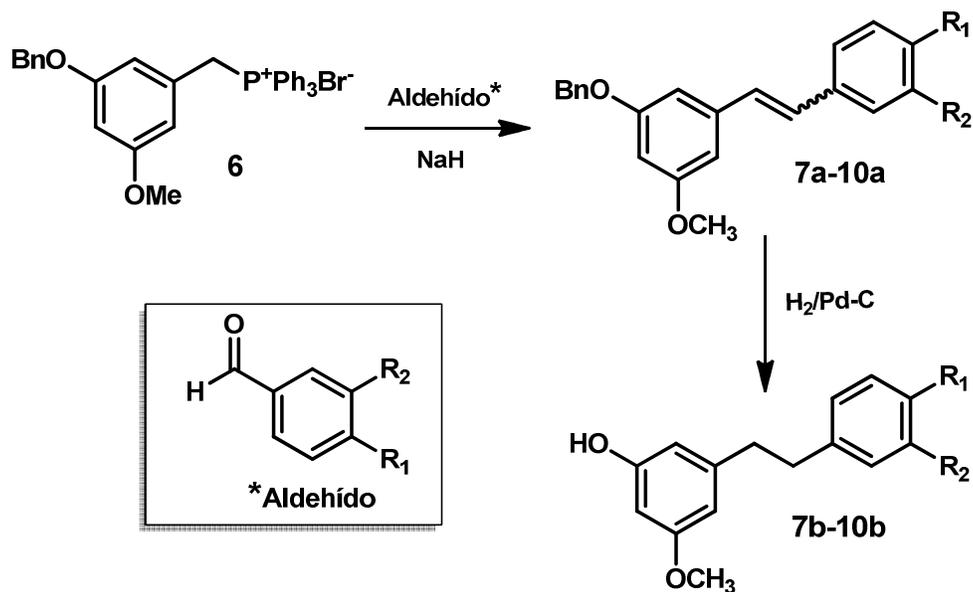
### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

Sintetizar los análogos del gigantol, modificando el patrón de sustitución, sustituyentes, así como el tamaño de la cadena alquílica que une ambos anillos aromáticos con el fin de obtener información sobre la relación estructura-actividad biológica.

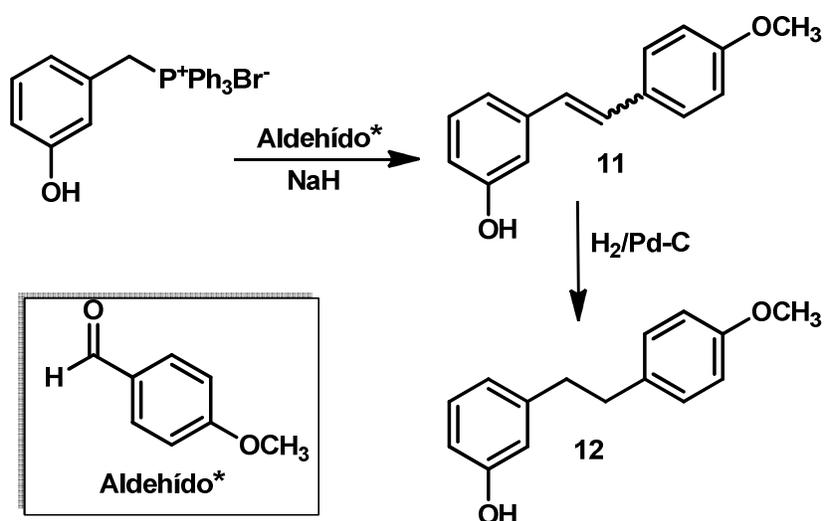
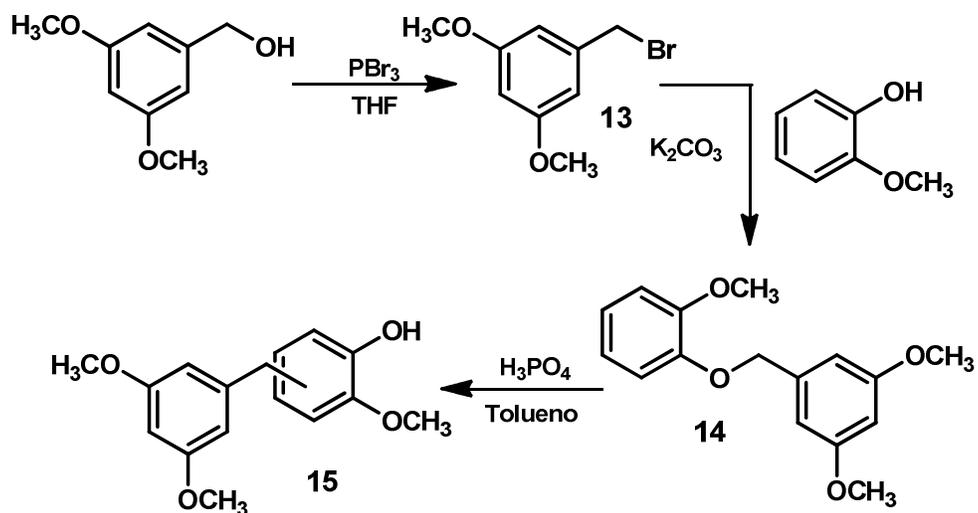
#### 3.2. Objetivos particulares

1. Obtener la sal de Wittig **6**, mediante la previa preparación de los intermediarios **1-5**, involucrados en una síntesis lineal que se presenta en el esquema 6.
2. Realizar la síntesis de los bibencilos **7b-10b** análogos del gigantol, iniciando por la condensación de la sal de Wittig **6** con diversos aldehídos seguido de una reducción catalítica como se ilustra en el esquema 7.
3. Realizar la síntesis del bibencilo **12** por medio de la condensación del bromuro de [(3-hidroxifenil)metil]trifenilfosfonio con 4-metoxibenzaldehído seguida de una reducción catalítica, ilustrada en el esquema 8.
4. Realizar la síntesis del homólogo del gigantol, el difenilmetano compuesto **15**, de acuerdo a la secuencia de síntesis descrita en el esquema 9.
5. Llevar a cabo la caracterización de los compuestos orgánicos sintetizados por medio de RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, IR y espectrometría de masas.
6. Obtener información sobre la relación estructura-actividad biológica.

**Esquema 6.** Estrategia de síntesis de la sal de Wittig, compuesto 6.**Esquema 7.** Estrategia de síntesis de los bibencilos 7b-10b.

Cuadro 2. Gigantol y bibencilos análogos, compuestos **7b** a **10b**.

Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Gigantol	OH	OCH <sub>3</sub>
<b>7b</b>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<b>8b</b>	OCH <sub>3</sub>	H
<b>9b</b>	OH	Br
<b>10b</b>	COOCH <sub>3</sub>	H

Esquema 8. Estrategia de síntesis del bibencilo **12**.Esquema 9. Estrategia de síntesis del difenilmetano **15**.

#### **4. HIPÓTESIS**

La modificación de la molécula del gigantol tanto en los sustituyentes como en la cadena alquílica que une ambos anillos aromáticos proporcionará información sobre los requerimientos estructurales necesarios para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos con actividad antiespasmódica.

## 5. DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

### 5.1. Procedimiento general de síntesis

El curso de las reacciones fue seguido por cromatografía en capa fina (CCF), usando placas comerciales de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> de Merck. Se emplearon como reveladores: radiaciones UV, vapores de yodo y solución de cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>).

Los disolventes empleados en las reacciones se destilaron antes de ser utilizados. El tetrahidrofurano (THF) se secó con sodio y benzofenona como indicador.

Todo el material de vidrio utilizado en las reacciones se secó en la estufa por lo menos 24 horas a 150 °C antes de ser utilizados cuando se requerían condiciones controladas de humedad.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato *Fisher-Johns*, y no fueron corregidos. Los espectros de Infrarrojo se registraron en un espectrómetro Perkin Elmer modelo FT 1650. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) y de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz) se obtuvieron en un espectrómetro Varian VXR-3005 y Varian Unity Plus 500 en CDCl<sub>3</sub> utilizándose TMS como estándar interno. Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro Hewlitt-Packard modelo 5890 a 70 eV.

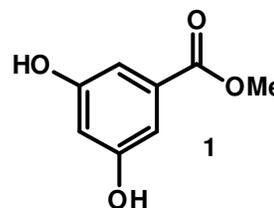
La evaluación biológica, fue realizada en el Laboratorio 124, Edificio E de la Facultad de Química, UNAM bajo la dirección de la Dra. Rachel Mata. La Dra. Mata proporcionó los resultados de la actividad sobre la CaM de los compuestos orgánicos sintetizados.

## 5.2. Síntesis de los intermediarios para la sal de fosfónio [6]

### 5.2.1. 3,5-Dihidroxi benzoato de metilo [1]

En un matraz se colocaron 15.0 g (97.3 mmol) de ácido 3,5-dihidroxi benzoico disueltos en 90 mL de metanol y 3 mL (55.1 mmol) de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) el cual fue añadido gota a gota. La solución resultante se calentó a temperatura de reflujo por 4.5 horas, el curso de la reacción fue seguido por cromatografía en capa delgada, empleando una fase móvil (7:3) de hexano-acetato de etilo (AcOEt). El matraz de reacción fue sumergido en un baño de hielo y en frío se llevó a cabo la adición lenta de 3.6 g (64.2 mmol) de hidróxido de potasio (KOH) en lentejas y finalmente con una solución de KOH al 10% se neutralizó hasta un pH de 7.

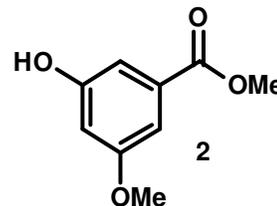
La mezcla se concentró hasta sequedad bajo presión reducida obteniéndose el crudo de reacción como una masa pastosa, la cual se trató con 40 mL de agua y 100 mL de AcOEt; la fase acuosa fue tratada nuevamente con 50 mL de AcOEt, las fases orgánicas se juntaron y se lavaron con 25 mL de agua, se secaron con sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) anhidro, se filtró y por último se concentró en el rotavapor. Se obtuvieron 14.9 g (91.0% de rendimiento) del compuesto **1** como un sólido amorfo de color rosa de p.f. 162-164 °C, [lit.<sup>42</sup>p.f. 164-167 °C].



### 5.2.2. 3-Hidroxi-5-metoxibenzoato de metilo [2]

En un matraz sumergido en un baño de hielo que contenía 5.4 g KOH disueltos en 70 mL de agua, se adicionaron 14.3 g (85 mmol) de **1**. A la solución resultante, se adicionó lentamente 8 mL (85.0 mmol) de sulfato de dimetilo y posteriormente, la reacción se dejó en agitación por 4.5 horas a temperatura ambiente siguiendo el curso de la reacción por cromatografía en capa delgada, empleando una mezcla de hexano-AcOEt (7:3) como fase móvil.

La mezcla de reacción se extrajo con AcOEt (2x40 mL), se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró en el rotavapor. Se obtuvieron 14.7 g de una mezcla de productos en crudo. Los productos obtenidos se separaron por cromatografía en columna (hexano-AcOEt, 6:1) para dar 5.5 g (35.5% de rendimiento) del compuesto **2**, como un sólido blanco cristalino de p.f. 90-92 °C [lit.<sup>43</sup> p.f. 94-95.5 °C].

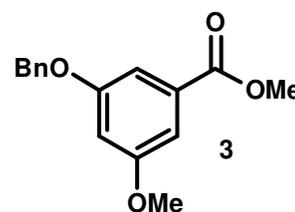


### 5.2.3. 3-(Benciloxi)-5-metoxibenzoato de metilo [3]

En un matraz se colocaron 5.4 g (29.6 mmol) de **2**, 6.6 g (47.8 mmol) de carbonato de potasio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), 5.3 mL (46 mmol) de cloruro de bencilo, 0.7 g (4.2 mmol) de yoduro de potasio (KI) y 80 mL de acetona, la mezcla de reacción se dejó en agitación por 15 horas a temperatura ambiente, después se calentó a temperatura de reflujo por 41 horas, el curso de la reacción se siguió por cromatografía en capa delgada (hexano-AcOEt, 8:2).

La solución color hueso se concentró a sequedad en el rotavapor y el residuo se trató con 30 mL de agua y 30 mL de AcOEt, la fase acuosa se neutralizó con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% y posteriormente se extrajo con AcOEt (2x30 mL), se juntaron las fases orgánicas y se lavaron con 25 mL de agua. Se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró en el rotavapor. Se obtuvieron 8.8 g del producto crudo.

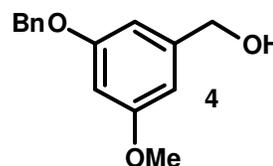
El producto se purificó empleando una columna cromatográfica, utilizando una mezcla de hexano-AcOEt (9:1) como fase móvil. De donde se obtuvieron 6.0 g (72.6% de rendimiento) del compuesto **3** como un líquido viscoso de color naranja que tarda en solidificar, el p.f. 46.5-47.0 °C y los datos espectrales fueron consistentes con los de la literatura.<sup>43</sup>



#### 5.2.4. [3-(Benciloxi)-5-metoxifenil]metanol [4]

A una solución de 5.4 g (19.8 mmol) de **3** en aproximadamente 50 mL de THF seco, en atmósfera de nitrógeno molecular ( $N_2$ ), se le adicionó en un intervalo de 30 minutos 1.3 g (34.2 mmol) de tetrahidruro de litio y aluminio ( $LiAlH_4$ ), se dejó en agitación por 7 horas y se monitoreó la reacción por cromatografía en capa delgada (hexano-AcOEt, 8:2). A la suspensión gris obtenida se le adicionó lentamente 40 mL de AcOEt, posteriormente se realizó la adición lenta de 25 mL de agua, formándose un sólido blanco que se filtró al vacío y se lavó con AcOEt (2x10 mL). Se separaron las fases del líquido filtrado y la fase orgánica se lavó con 15 mL de agua, se secó con  $Na_2SO_4$  anhidro, se filtró y concentró en el rotavapor.

El compuesto fue recuperado por cromatografía en columna, utilizando como mezcla de elución hexano-AcOEt (3:1). Se obtuvieron 3.4 g (70.4% de rendimiento) de **4** como un líquido viscoso de color amarillo. Los datos espectrales son consistentes con los de la literatura.<sup>43</sup>



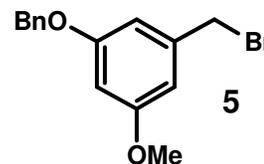
#### 5.2.5. 1-(Benciloxi)-3-(bromometil)-5-metoxibenceno [5]

En un matraz con 40 mL de THF seco, en atmósfera de  $N_2$ , se disolvieron 3.4 g (13.9 mmol) de **4**, la solución resultante se colocó en un baño de hielo-agua por 15 minutos con agitación y posteriormente en un intervalo de 7 minutos se le adicionó lentamente 1.6 mL (16.9 mmol) de tribromuro de fósforo ( $PBr_3$ ) y se dejó en agitación por 3 horas a temperatura ambiente.

A la mezcla de reacción enfriada en un baño de hielo, se añadieron lentamente 40 mL de agua y el producto fue recuperado de la fase acuosa por extracción con 30 mL y después con 15 mL de AcOEt, las fases orgánicas se juntaron y se lavaron con 15 mL de una solución saturada de bicarbonato de sodio

(NaHCO<sub>3</sub>) y por último se realizó un lavado con 10 mL de agua (a pH 7). La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró en el rotavapor.

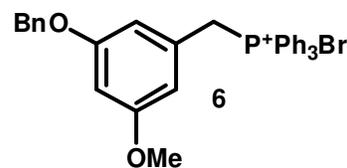
El compuesto se purificó por cromatografía en columna (hexano-AcOEt, 9:1). De donde se obtuvieron 3.8 g (88.6% de rendimiento) del compuesto **5** como cristales blancos de p.f. 52-54 °C.



### 5.2.6. Bromuro de {[3-(benciloxi)-5-metoxifenil]metil} trifenilfosfonio [6]

En un matraz protegido de la humedad atmosférica empleando una trampa con silica gel, se disolvieron 3.5 g (11.4 mmol) de **5** en 65 mL de tolueno. A la solución resultante se le adicionó 3.7 g (14.2 mmol) de trifenilfosfina (PPh<sub>3</sub>) y posteriormente se dejó en agitación a temperatura ambiente por 24 horas y para completar la reacción se calentó a temperatura de reflujo por 5 horas más.

La mezcla de reacción fue filtrada con vacío y el sólido blanco obtenido fue lavado con éter de petróleo. Se obtuvieron 3.9 g (59.2% de rendimiento) del compuesto **6**, el cual fue utilizado sin mayor purificación en la siguiente reacción.



## 5.3. Síntesis de los bibencilos 7b-10b

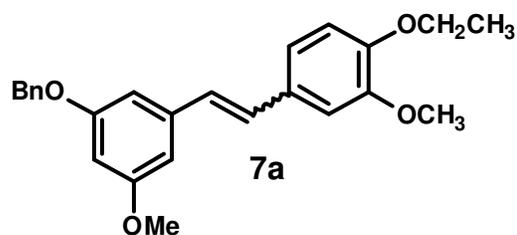
### 5.3.1. (E)- y (Z)-1-(Benciloxi)-3-[2-(4-etoxi-3-metoxifenil)etenil]-5-metoxibenzeno [7a]

En un matraz, se suspendieron 1.1 g (2 mmol) de la sal de Wittig **6**, 0.36 g (2.0 mmol) de 4-etoxi-3-metoxibenzaldehído en 20 mL de THF seco, en atmósfera de N<sub>2</sub>. A la suspensión resultante se adicionaron 160 mg (4 mmol) de hidruro de sodio (NaH) al 60% y la agitación se continuó por 2.5 horas a temperatura ambiente.

A la mezcla de reacción se le adicionó 4.5 mL de ácido clorhídrico (HCl) al 5%, se concentró a sequedad en el rotavapor y el residuo se lavó con 20 mL de salmuera. El producto fue recuperado por extracción con dos volúmenes de 15 mL de AcOEt; se juntaron las fases orgánicas, se lavaron con 10 mL de agua y se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y nuevamente se concentró en el rotavapor.

Para retirar las impurezas de la mezcla de reacción, se empleó una columna cromatográfica utilizando como medio de elución hexano-AcOEt (8:2). Se obtuvieron 400 mg (51.2% de rendimiento) de la mezcla (E) y (Z) de **7a** como un líquido de color amarillo.

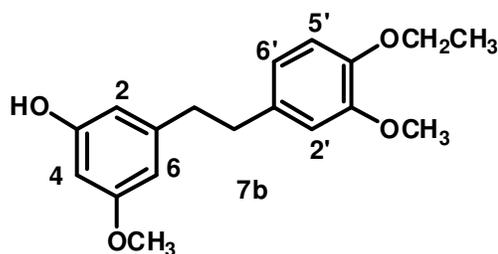
Los isómeros no fueron separados y la mezcla como tal fue utilizada en la siguiente reacción.



### 5.3.2. 3-[2-(4-Etoxi-3-metoxifenil)etil]-5-metoxifenol [**7b**]

En un frasco para hidrogenación se colocaron 400 mg (1.0 mmol) de **7a** y 52 mg de paladio/carbono (Pd/C) al 10% en 25 mL de AcOEt. Se colocó en el aparato de hidrogenación por 3 horas a 59 psi de presión y 55 °C de temperatura.

Se filtró para eliminar el catalizador y se concentró en el rotavapor. El producto se purificó por cromatografía en columna (hexano-AcOEt, 8:2). Recuperándose 133 mg (43.2%) del compuesto **7b** como un líquido viscoso anaranjado.



#### Caracterización:

**RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ<sub>H</sub>(ppm):** 1.45 (3H, t, J = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>-4), 2.82 (4H, m, H-7, H-7'), 3.75 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-5), 3.84 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-3'), 4.07 (2H, c, J = 7.0 Hz, CH<sub>2</sub>O-4'), 4.83 (1H, s, HO-3), 6.25 (2H, d, J = 1.8 Hz, H-4, H-6), 6.32 (1H, dd, J<sub>1</sub> =

$J_2 = 1.8$  Hz, H-2), 6.67 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2'), 6.69 (1H, dd,  $J = 8.1, 2.0$  Hz, H-6'), 6.79 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-5').

**RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta_c$ (ppm):** 15.1 (CH<sub>3</sub>), 37.4 (C-7'), 38.4 (C-7), 55.5 (CH<sub>3</sub>O-3'), 56.2 (CH<sub>3</sub>O-5), 64.7 (CH<sub>2</sub>O-4'), 99.3 (C-4), 107.1 (C-6), 108.2 (C-2), 112.6 (C-2'), 113.3 (C-5'), 120.6 (C-6'), 134.6 (C-1'), 144.8 (C-1), 146.8 (C-4'), 149.4 (C-3'), 156.8 (C-5), 161.2 (C-3).

**IR (KBr),  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>:** 3451, 2935, 1600, 1456, 1145.

**EM-IE ( $m/z$ ):** 302 [M<sup>+</sup> (37.7)]

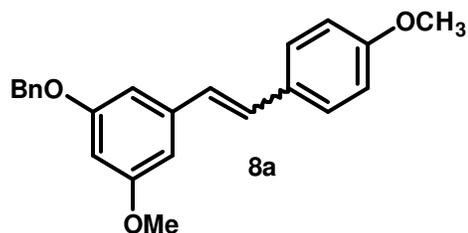
### 5.3.3. (E)- y (Z)-1-(Benciloxi)-3-metoxi-5-[2-(4-metoxifenil)etenil] benceno [8a]

En aproximadamente 20 mL de THF seco se suspendieron 1.14 g (2 mmol) de la sal de Wittig **6** y 0.25 mL (2.1 mmol) de 4-metoxibenzaldehído, a la suspensión se le adicionó 168 mg (4.1 mmol) de NaH al 60% y se dejó en agitación por 2.5 horas a temperatura ambiente.

A la mezcla de reacción se adicionaron 4.5 mL de HCl al 5%, se concentró en el rotavapor para eliminar el THF, se lavó con 20 mL de salmuera y se extrajo con AcOEt (2x15 mL), se juntaron las fases orgánicas y se lavó con 10 mL de agua, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró en el rotavapor.

La mezcla *cis-trans* se purificó por cromatografía en columna (hexano-AcOEt, 8:2), de donde se obtuvieron 220 mg (25.3% de rendimiento) de la mezcla **8a** como un líquido anaranjado.

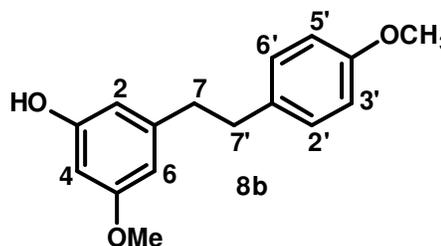
Los isómeros no fueron separados y la mezcla como tal fue utilizada en la siguiente reacción.



### 5.3.4. 3-[2-(4-Metoxifenil)etil]-5-metoxifenol [8b]

En un frasco para hidrogenación se colocó la mezcla de isómeros **8a** (0.6 mmol) y 19 mg de hidróxido de paladio ( $\text{Pd}(\text{OH})_2$ ) al 20% en 25 mL de AcOEt. La mezcla de reacción fue sometida a hidrogenación por 8 horas, empleando 59 psi de presión y 55 °C de temperatura.

El producto se purificó por cromatografía en columna utilizando como medio de elución hexano-AcOEt (8:2), de donde se obtuvieron 38.9 mg (41.3% de rendimiento) del compuesto **8b** como un líquido viscoso anaranjado.



#### Caracterización:

**RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta_{\text{H}}$ (ppm):** 2.83, (4H, m, C-7, C-7'), 3.75 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-4'), 3.79 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-5), 4.77 (1H, s, OH-3), 6.25 (2H, d, J = 1.8 Hz, H-4, H-6), 6.32 (1H, dd, J<sub>1</sub> = J<sub>2</sub> = 1.8 Hz, H-2), 6.82 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3', H-5'), 7.09 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2', H-6').

**RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta_{\text{C}}$ (ppm):** 36.8 (C-7'), 38.4 (C-7), 55.5 (OCH<sub>3</sub>-3, OCH<sub>3</sub>-4'), 99.2 (C-4), 107.0 (C-2), 108.0 (C-6), 113.9 (C-3', C-5'), 129.5 (C-2', C-6'), 133.9 (C-1'), 144.8 (C-1), 156.8 (C-4'), 158.1 (C-5), 161.1 (C-3).

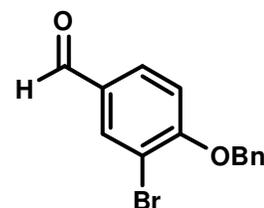
**IR (KBr),  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>:** 3401, 2933, 1597, 1453, 1244, 1148.

**EM-IE (m/z):** 258 [M<sup>+</sup> (65)]

### 5.3.5. (E)- Y (Z)-1-(Benciloxi)-3-{2-[4-(benciloxi)-3-bromofenil]etenil}-5-metoxibenceno [9a]

De acuerdo al procedimiento descrito para la obtención del compuesto **3**, a partir de 1.5 g (7.5 mmol) de 3-bromo-4-hidroxibenzaldehído, 1.3 g (9.4 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.2 g (1.3 mmol) de KI y 1.2 mL (10.4 mmol) de cloruro de bencilo en 22 mL de acetona y calentamiento a temperatura de reflujo por 3 horas. Después del

tratamiento de recobro y purificación, se obtuvieron 1.44 g (66.0% de rendimiento) de 4-(benciloxi)-3-bromobenzaldehído como cristales blancos, con p.f. de 94-95 °C.

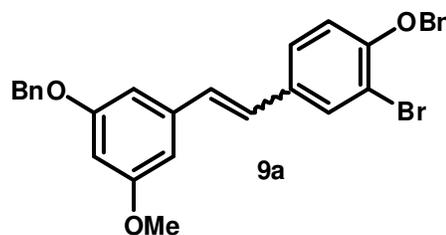


4-(benciloxi)-3-benzaldehído

Se suspendieron 1.5 g (2.7 mmol) de la sal de Wittig **6** y 310 mg (7.7 mmol) de NaH al 60% en aproximadamente 30 mL de THF seco bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. La suspensión resultante se dejó en agitación por 30 minutos a temperatura ambiente y en seguida se añadieron 0.78 g (2.7 mmol) de 4-(benciloxi)-3-bromobenzaldehído obtenido en el paso anterior y se dejó 1.5 horas más en agitación a la misma temperatura.

Al término de la reacción se añadieron 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%, se concentró en el rotavapor, el residuo se trató con 10 mL de agua y el producto fue recobrado de la fase acuosa por extracción con dos volúmenes de 15 mL de AcOEt. Se juntaron las fases orgánicas y se lavaron con 10 mL de agua. La fase orgánica obtenida se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y concentró en el rotavapor.

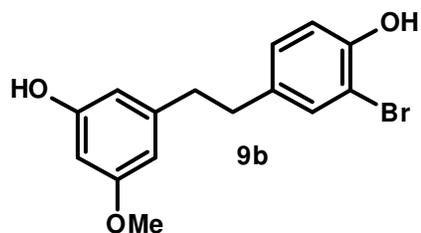
Se realizó una percolación para eliminar algunas impurezas utilizando una mezcla de elución de hexano-AcOEt (9:1), en donde se obtuvieron 1.1 g (80.0% de rendimiento) de la mezcla *cis-trans* de **9a** como un líquido amarillo viscoso. Los isómeros no fueron separados y la mezcla como tal fue utilizada en la siguiente reacción.



### 5.3.6. 3-[2-(3-Bromo-4-hidroxifenil)etil]-5-metoxifenol [9b]

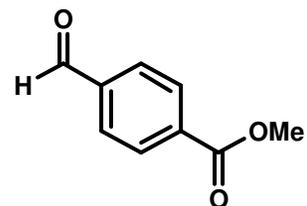
En un frasco para hidrogenación se colocó la mezcla de isómeros de **9a** (1.1 g, 2.1 mmol) y 100 mg de Pd/C al 10% en 30 mL de AcOEt. La mezcla de reacción fue sometida a hidrogenación por 13 horas, empleando 60 psi de presión y 57 °C de temperatura.

Se obtuvieron 806 mg de producto crudo, el cual se purificó por cromatografía en columna utilizando una fase móvil de hexano-AcOEt (9:1), de donde se obtuvieron dos productos principales de **9b**. De la mezcla, del compuesto menos polar se obtuvo 30 mg como un sólido amarillo y del más polar se obtuvieron 45 mg como una resina amarilla. Ambos compuestos están en proceso de caracterización.



### 5.3.7. (E)- y (Z)-4-{2-[3-(Benciloxi)-5-metoxifenil]etenil}benzoato de metilo [10a]

A partir de 755 mg (5 mmol) de 4-carboxibenzaldehído, 0.9 g (6.2 mmol) de  $K_2CO_3$ , 0.6 mL (6.3 mmol) de sulfato de dimetilo, 3 gotas de 1,8-diabencilo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) en 10 mL de tolueno, a temperatura de reflujo por 2 horas, se obtuvo una mezcla de reacción que se purificó por cromatografía en columna empleando como fase móvil hexano-AcOEt (95:5), se obtuvieron 702 mg (90.9% de rendimiento) de 3-formilbenzoato de metilo como cristales blancos con un p.f. de 58-60 °C.

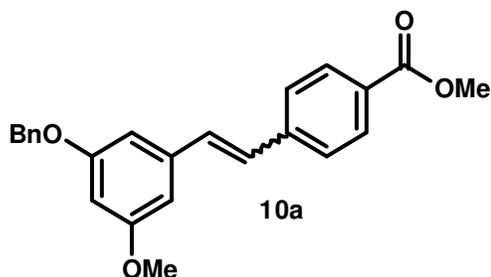


3-formilbenzoato de metilo

En un matraz se disolvieron 275 mg (1.8 mmol) de 3-formilbenzoato de metilo, 1.0 g (1.8 mmol) de la sal de Wittig **6**, 180 mg (4.5 mmol) de NaH al 60% en 20 mL de THF seco. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 6 horas.

A la mezcla de reacción se adicionaron 1.5 mL de  $H_2SO_4$  al 10%, se concentró en el rotavapor y el residuo se trató con 10 mL de agua. El producto fue recobrado por extracción con dos volúmenes de 15 mL de AcOEt, se juntaron las fases orgánicas y se lavaron con 10 mL de agua, se secaron con  $Na_2SO_4$  anhidro, se filtraron y concentraron en el rotavapor. Se obtuvieron 1.14 g del crudo.

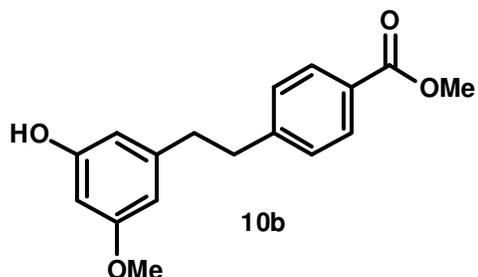
La mezcla se purificó por columna cromatográfica utilizando como fase móvil hexano-AcOEt (7:3). Se obtuvieron 200 mg (30.2% de rendimiento) de la mezcla *cis-trans* puro de **10a** como un sólido blanco. Los isómeros no fueron separados y la mezcla como tal fue utilizada en la siguiente reacción.



### 5.3.8. 4-[2-(3-Hidroxi-5-metoxifenil)etil]benzoato de metilo [10b]

En un frasco para hidrogenación se colocaron los 200 mg (0.3 mmol) de la mezcla (*cis-trans*) (**10a**), 33 mg del catalizador Pd/C al 10% en 30 mL de AcOEt. La mezcla de reacción se sometió a hidrogenación a 60 psi de presión y 60 °C de temperatura por 9 horas.

El producto se purificó por cromatografía en columna (hexano-AcOEt, 7:3), de donde se obtuvieron 53.9 mg (35.2% de rendimiento) del compuesto **10b** como un sólido blanco. Actualmente, este producto se encuentra en el proceso de caracterización.

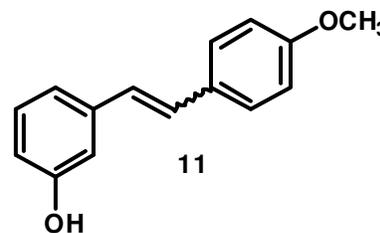


## 5.4. Síntesis del bibencilo [12]

### 5.4.1. (*E*)- y (*Z*)-3-[2-(4-Metoxifenil)etenil]fenol [11]

En un matraz se suspendieron 485 mg (1.5 mmol) de bromuro de [(3-hidroxifenil)metil]trifenilfosfonio (esta sal de fosfónio fue sintetizada previamente en el laboratorio de investigación con el mismo procedimiento empleado para obtener la sal de fosfónio **6**) y 0.2 mL (1.6 mmol) de 4-metoxibenzaldehído en aproximadamente 20 mL de THF seco bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. A la suspensión resultante se le adicionó 175 mg (4.4 mmol) de NaH al 60%, se dejó en agitación por 16 horas a temperatura ambiente.

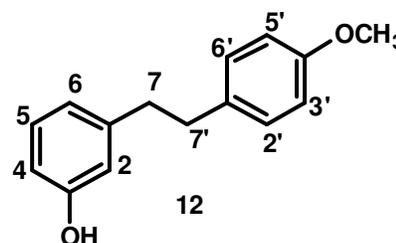
A la mezcla de reacción se adicionaron 5 mL de HCl al 5%, se lavó con 20 mL de salmuera y el producto fue recobrado de la fase acuosa por extracción con dos volúmenes de 15 mL de AcOEt, las fases orgánicas se mezclaron, lavaron con 10 mL de agua, secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y después de filtrar se concentró en el rotavapor. Se obtuvieron 600 mg del producto crudo como la mezcla (*cis-trans*). Los isómeros no fueron separados y la mezcla como tal fue utilizada en la siguiente reacción.



#### 5.4.2. 3-[2-(4-Metoxifenil)etil]fenol [12]

En un frasco para hidrogenación se disolvieron los 600 mg (2.81 mmol) de la mezcla de isómeros de **11**, 30 mg de Pd(OH)<sub>2</sub> al 20% en 25 mL de AcOEt. La mezcla de reacción fue sometida bajo condiciones de hidrogenación a 60 psi de presión y 58 °C de temperatura durante 3 horas.

Se filtró el catalizador y la solución se concentró en el rotavapor. El producto se purificó por cromatografía en columna usando como medio de elución hexano-AcOEt (9:1), de donde se obtuvieron 79.5 mg (13.1% de rendimiento) del bibencilo **12** como un líquido viscoso de color amarillo.



#### Caracterización:

**RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ<sub>H</sub>(ppm):** 2.84 (4H, s, H-7, H-7'), 3.79 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-4'), 6.64 (1H, d, J = 1.2 Hz, H-2), 6.66 (1H, ddd, J = 7.8, 2.7, 1.2 Hz, H-6), 6.75 (1H, ddd, J = 7.8, 1.6, 1.2 Hz, H-4), 6.83 (2H, d, J = 6.6 Hz, H-3', H-5'), 7.09 (2H, d, J = 6.6 Hz, H-2', H-6'), 7.14 (1H, dd, J = 7.8, 1.2 Hz, H-5).

**RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ<sub>C</sub>(ppm):** 36.7 (C-7'), 37.9 (C-7), 55.2 (OCH<sub>3</sub>-4'), 112.7 (C-4), 113.7 (C-3', C-5'), 115.4 (C-2), 120.9 (C-6), 129.3 (C-2', C-6'), 129.4 (C-5), 133.8 (C-1'), 143.8 (C-1), 155.5 (C-3), 157.8 (C-4').

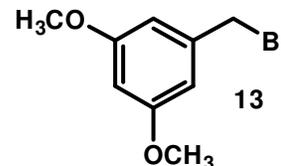
**IR (KBr), ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>:** 3452, 2935, 1598, 1452, 1236, 1017.

**EM-IE (m/z):** 228 [M<sup>+</sup> (100)]

## 5.5. Síntesis del difenilmetano [15]

### 5.5.1. Bromuro de 3,5-dimetoxibencilo [13]

Se disolvieron 7.0 g (41.6 mmol) de alcohol 3,5-dimetoxibencilico en aproximadamente 70 mL de THF seco bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. La solución resultante se colocó en un baño de hielo-agua por 15 minutos y con ayuda de una jeringa se le adicionó 4.8 mL (51 mmol) de PBr<sub>3</sub> (durante 10 minutos) y se dejó en agitación por 2.5 horas a temperatura ambiente. Una vez terminada la reacción se colocó en un baño de hielo y se le adicionaron lentamente 60 mL de agua, se realizaron extracciones con AcOEt (25 y 10 mL), se juntaron las fases orgánicas y se lavaron con una solución de NaHCO<sub>3</sub> y por último con 10 mL de agua. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y concentró en el rotavapor. Se obtuvieron 8.5 g (88.3% de rendimiento) de **13** como cristales blancos de p.f. 68-70 °C, [lit.<sup>44</sup> p.f. 71-72 °C].

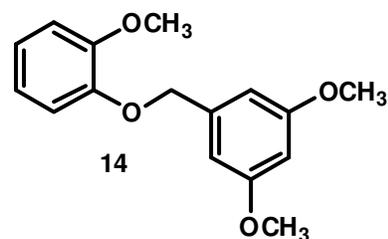


### 5.5.2. 1,3-Dimetoxi-5-(2-metoxifenoximetil)benceno [14]

Se pesaron 8.5 g (36.8 mmol) de **13**, 5.0 g (40.3 mmol) de guayaacol y 5.5 g (40.0 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, que se disolvieron en 65 mL de acetona. La mezcla de reacción fue calentada a temperatura de reflujo por 7.5 horas y el curso de la reacción fue monitoreada por cromatografía en capa delgada y una fase móvil de hexano-AcOEt (8:2). Para completar la reacción, fue necesario la adición de 1.0 g (6.1 mmol) de KI y calentamiento a temperatura de reflujo por 2.5 horas más.

A la mezcla de reacción se le adicionó 30 mL de agua y se eliminó el disolvente orgánico en el rotavapor. El producto fue recobrado de la fase acuosa por extracción con dos volúmenes de 15 mL de AcOEt, los extractos se mezclaron y la fase orgánica se lavó con 20 mL de una solución de NaOH al 10%, 15 mL de agua y secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Después de filtrar, se concentró en el rotavapor de donde se obtuvieron 18.2 g del producto crudo.

Una mezcla enriquecida del compuesto **14** (3.7 g), fue obtenida por percolación de la mezcla de reacción empleando como soporte gel de sílice y hexano-AcOEt (9:1) como fase móvil.

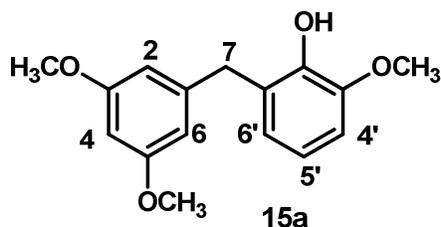


### 5.5.3. 2-[(3,5-Dimetoxifenil)metil]-6-metoxifenol [15]

1.5 g del compuesto enriquecido de **14** se hizo reaccionar con 1.7 mL (29.1 mmol) de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  en 18 mL de tolueno. Después de 6.5 horas de calentamiento a temperatura de reflujo, la mezcla de reacción se diluyó con 15 mL de agua y se neutralizó con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , el producto fue recobrado de la fase acuosa con dos volúmenes de 15 mL de AcOEt, las fases orgánicas se juntaron y se lavaron con 10 mL de agua, finalmente la fase orgánica obtenida se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y concentró en el rotavapor.

El compuesto se purificó por cromatografía en columna usando una fase móvil de hexano-AcOEt (9:1). Se obtuvieron tres compuestos principales, del compuesto menos polar **15a** se obtuvieron 400 mg (26.8% de rendimiento) como un sólido amorfo blanco.

El compuesto **15a** fue caracterizado como 2-[(3,5-dimetoxifenil)metil]-6-metoxifenol:



p.f.: 80 °C

**RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ<sub>H</sub>(ppm):** 3.74 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-3'), 3.75 (6H, s, OCH<sub>3</sub>-3, OCH<sub>3</sub>-5), 3.95 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 5.52 (1H, s, OH), 6.31 (1H, t, J = 2.3 Hz, H-4), 6.35 (2H, d, J = 2.3 Hz, H-2, H-6), 6.66, (1H, dd, J = 8.0, 1.7 Hz, H-6'), 6.84 (1H, dd, J = 8.0, 1.7 Hz, H-4'), 6.94 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-5').

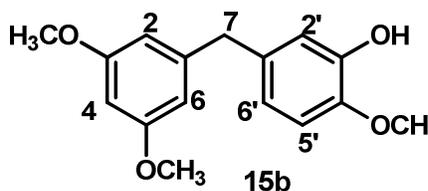
**RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ<sub>c</sub>(ppm):** 35.7 (C-7), 55.2 (OCH<sub>3</sub>-3, OCH<sub>3</sub>-5), 61.3 (OCH<sub>3</sub>-3'), 97.9 (C-4), 107.0 (C-2, C-6), 113.9 (C-2'), 122.4 (C-5'), 124.9 (C-6'), 133.5 (C-1'), 142.9 (C-1), 145.4 (C-4'), 148.9 (C-3'), 160.8 (C-3, C-5).

**IR (KBr), ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>:** 3406, 2957, 1590, 1468, 1208, 1159.

**EM-IE (m/z):** 274 [M<sup>+</sup> (100)].

Del segundo y tercer producto se obtuvieron 200 mg (13.8%), de los cuales se purificaron por placa preparativa, usando como soporte sílice gel y un sistema de elución de hexano-AcOEt (20:1), se eluyó 12 veces, de donde se obtuvieron 36.6 mg (2.4% de rendimiento) del compuesto **15b** como un líquido viscoso.

El compuesto **15b** fue caracterizado como 5-[(3,5-dimetoxifenil)metil]-2-metoxifenol.



**RMN<sup>1</sup>H ( MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ<sub>H</sub>(ppm):** 3.75 (s, 9H, OCH<sub>3</sub>-3, OCH<sub>3</sub>-4', OCH<sub>3</sub>-5), 3.86 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.53 (s, 1H, OH-3'), 6.31 (dd, J = 2.8 Hz, 1H, H-4), 6.34 (dd, J = 2.0 Hz, 2H, H-2, H-6), 6.67, (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-6'), 6.70 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-5'), 6.83 (d, J = 4.0 Hz, 1H, H-2').

**RMN<sup>13</sup>C ( MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ<sub>c</sub>(ppm):** 41.5 (C-7), 55.3 (OCH<sub>3</sub>-3, OCH<sub>3</sub>-5), 61.3 (OCH<sub>3</sub>-3'), 97.8 (C-4), 106.9 (C-2, C-6), 114.2 (C-5'), 115.1 (C-2'), 121.6 (C-6'), 133.9 (C-1'), 143.8 (C-1), 145.4 (C-3', C-4'), 160.8 (C-3, C-5).

**IR (KBr), ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>:** 3437, 2935, 1594, 1511, 1460, 1152.

**EM-IE (m/z):** 274 [M<sup>+</sup> (29)].

Del tercer compuesto, el más polar **15c** se obtuvieron 18.4 mg (1.2% de rendimiento) como una resina, no se tiene una cantidad de producto suficiente para completar la espectroscopia.

## 5.6. Efecto de los análogos y homólogo del gigantol sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa dependiente de calmodulina (PDE1)

Como se había mencionando con anterioridad la parte de la evaluación biológica fue realizada por parte de la Dra. Rachel Mata en la Facultad de Química, UNAM, por lo cual se indicará de manera concisa el proceso experimental que se llevó a cabo.

La actividad de la enzima fosfodiesterasa dependiente de calmodulina (PDE1) en presencia de calmodulina (CaM) se determinó a través de la cuantificación de la cantidad de fósforo producido, como resultado de la reacción de hidrólisis de AMPc.

El ensayo se hizo mediante la preparación de una mezcla de reacción [0.015 unidades de fosfodiesterasa de cerebro de bovino (PDE1, Sigma), 0.08 µg de calmodulina (CaM Humana), 0.063 unidades de 5'-nucleotidasa de veneno de *Crotalus atrox* (Sigma) y 10 µM de la proteína albúmina sérica bovina (ASB, Boehringer Mannheim), en 1 mL de buffer TRIS-HCl constituido por TRIS-HCl 45 mM, acetato de magnesio 5.6 mM, imidazol 45 mM y CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, a pH de 7]. Una vez preparado lo anterior se incubó durante 30 min a 30 °C. En una placa de ELISA de 96 pozos (cada uno con una capacidad de 250 µL) se adicionaron 10 µL del compuesto a evaluar [disuelto en una mezcla binaria de acetonitrilo-agua (1:1)] para obtener concentraciones finales de 0.5, 1, 2, 3, 4, 7, 13, 20, 32, 50 y 60 µM y 40 µL de la mezcla de reacción. La placa se incubó durante 30 min a 30 °C. Al término de este período, a cada pozo se adicionaron cada 10 segundos, a temperatura ambiente y durante 15 minutos 10 µL de AMP cíclico 10.8 mM. Por último, se adicionaron a cada pozo 190 µL de una solución de verde de malaquita y molibdato de amonio, con el fin de estimar el contenido de fósforo inorgánico espectrofotocolorimétricamente. Como control positivo se utilizó a la clorpromazina, un inhibidor de la CaM. Cada muestra se ensayó por sextuplicado.

Los valores de absorbancia obtenidos fueron interpolados a una curva estándar de fosfato monobásico de potasio (Sigma) que fue preparada tomando las alícuotas necesarias para obtener once concentraciones diferentes en un intervalo de 0.1 a 3 nM. La absorbancia de las muestras se determinó a 700 nm utilizando un lector de placa ELISA, marca BIO-RAD modelo 680.

## 6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

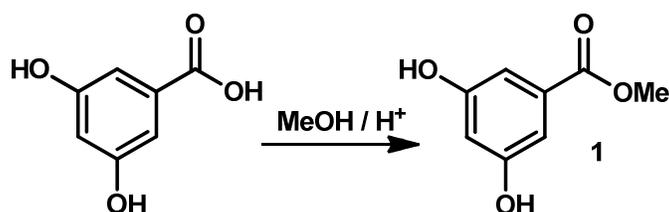
Los bibencilos considerados en el presente trabajo, fueron preparados mediante una secuencia de reacciones (ver esquema 6) en donde se utilizó la reacción de condensación de Wittig. En esta reacción, se emplearon sales de benciltrifenilfosfónio, las cuales se prepararon por reacción de cantidades equimoleculares de trifenilfosfina y los haluros bencílicos apropiados bajo agitación y reflujo en tolueno o algún disolvente similar. Al cabo de la reacción las sales se separaron y purificaron, para posteriormente hacerlas reaccionar con el correspondiente aldehído en presencia de una base, como NaH, en suspensión en THF anhidro; la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta completar la reacción con el aldehído. Al término de la reacción los productos fueron recobrados de la mezcla de reacción con un disolvente orgánico y se purificaron por métodos cromatográficos, obteniéndose una mezcla de alquenos-isómeros *cis-trans*, (estilbenos). Finalmente a los estilbenos así obtenidos, se sometieron a condiciones de hidrogenación catalítica empleando Pd/C como catalizador para así formar los bibencilos. Hubo bibencilos que contenían grupos hidroxilos fenólicos libres; para lograr obtenerlos, se empleó el fragmento benciléter como grupo protector el cual es eliminado durante la reacción de hidrogenación catalítica de los estilbenos para regenerar los hidroxilos fenólicos libres.

### 6.1. Síntesis de la sal de fosfónio para la reacción de Wittig

#### 6.1.1. 3,5-Dihidroxibenzoato de metilo [1]

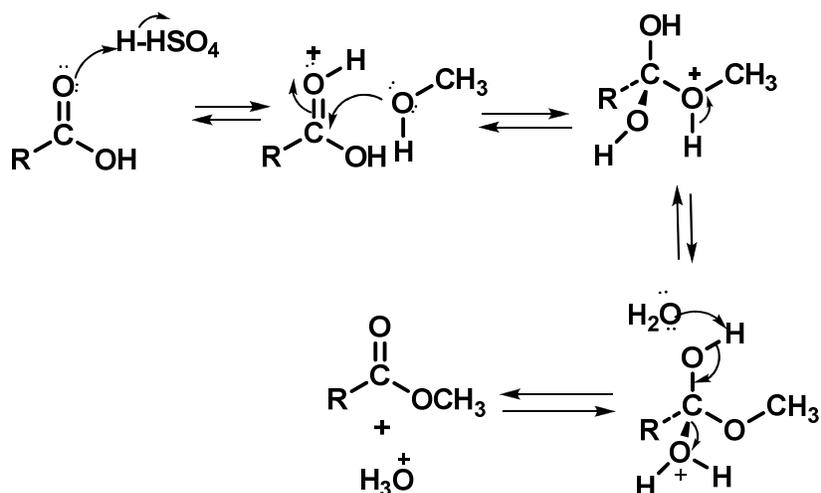
Para sintetizar los bibencilos propuestos, el ácido 3,5-dihidroxibenzoico fue transformado en el compuesto bromuro de {[3-(benciloxi)-5-metoxifenil] metil}trifenilfosfonio [6], mediante una serie de reacciones consecutivas.

Esquema 10.



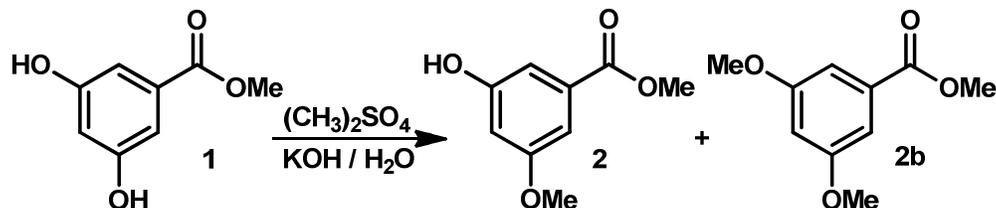
De acuerdo con el esquema 10, el compuesto **1** se obtuvo como un sólido amorfo de color rosa (91.1% de rendimiento), el p. f. 162-164 °C, el cual corresponde con el de la literatura.<sup>42</sup> Este éster se obtuvo a partir del ácido 3,5-dihidroxibenzoico por calentamiento en metanol y en presencia de ácido sulfúrico mediante un proceso ampliamente utilizado y conocido como esterificación de Fischer. Esta reacción de esterificación, es una reacción de sustitución nucleofílica sobre el grupo carboxilo en condiciones ácidas, en donde el ácido sulfúrico tiene la función de catalizar mediante la protonación del átomo de oxígeno del grupo carbonilo generando una especie cargada positivamente transformándolo en un grupo más susceptible al ataque nucleofílico por parte del oxígeno del alcohol. El mecanismo de reacción propuesto se describe en el esquema 11.

**Esquema 11.** Mecanismo de reacción de la sustitución nucleofílica de acilo para ácidos carboxílicos.



### 6.1.2. 3-Hidroxi-5-metoxibenzoato de metilo [2]

Esquema 12.

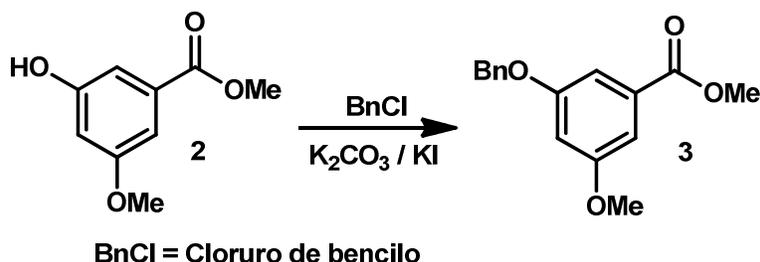


La síntesis de éteres de Williamson son de las reacciones más sencillas y versátiles utilizadas para la preparación de éteres. Este método implica un ataque S<sub>N</sub>2 de un ion alcóxido a un halogenuro de alquilo primario no impedido, sulfato o tosilato. El alcóxido generalmente se obtiene añadiendo Na, K, NaOH, KOH al alcohol en solución. En nuestro caso (esquema 12), el compuesto **1** posee dos grupos hidroxilo de tipo fenólico, los cuales presentan un carácter más ácido que los correspondientes grupos hidroxilo de tipo alcohol, por esta razón fue posible utilizar KOH como base en medio acuoso para la metilación de **1**. Bajo las condiciones estudiadas en el presente trabajo de tesis, de la mezcla de reacción se recobró el compuesto monometilado **2** como un sólido blanco cristalino, con p.f. de 90-92 °C, con un rendimiento relativamente bajo de 35.5% y el producto dimetilado **2a**, como un sólido blanco con rendimiento del 20.1%. El punto de fusión y los datos espectrales fueron consistentes con los informados en la literatura.

### 6.1.3. 3-(Benciloxi)-5-metoxibenzoato de metilo [3]

Después de haber obtenido el compuesto **2**, en éste se realizó la protección del segundo hidroxilo fenólico haciéndolo reaccionar con cloruro de bencilo (BnCl) bajo condiciones básicas, empleando yoduro de potasio como catalizador, (esquema 13).

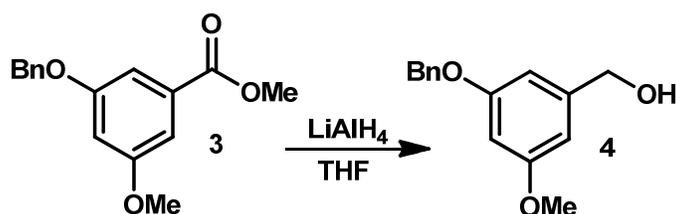
Esquema 13.



El compuesto **3** se obtuvo como un líquido amarillo-naranja, con un rendimiento del 72.6% y sus datos espectrales fueron consistentes con los de la literatura.<sup>43</sup>

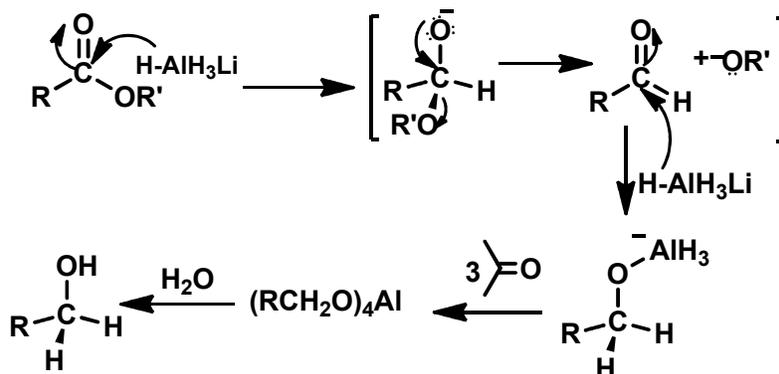
#### 6.1.4. [3-(Benciloxi)-5-metoxifenil]metanol [4]

Esquema 14.



Una vez obtenido el compuesto **3** se prosiguió a realizar la reducción del grupo éster utilizando como agente reductor al tetrahidruro de aluminio y litio, mediante una reacción de adición nucleofílica. En donde el ion complejo hidruro de aluminio es la especie que proporciona un hidrógeno en forma de ion hidruro al átomo de carbono del éster, seguida por la eliminación del metóxido para dar así, al aldehído correspondiente como un intermediario, dado que este compuesto es reducido al alcohol bajo las mismas condiciones. Como se muestra en el siguiente mecanismo de reacción.

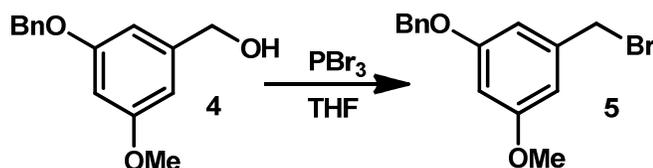
**Esquema 15.** Mecanismo de reacción de la reducción de un éster con  $\text{LiAlH}_4$ .



Finalmente se obtuvo el 70.4% de rendimiento del compuesto **4**, obtenido como un líquido amarillo y sus datos espectrales fueron consistentes con los informados en la literatura.<sup>43</sup>

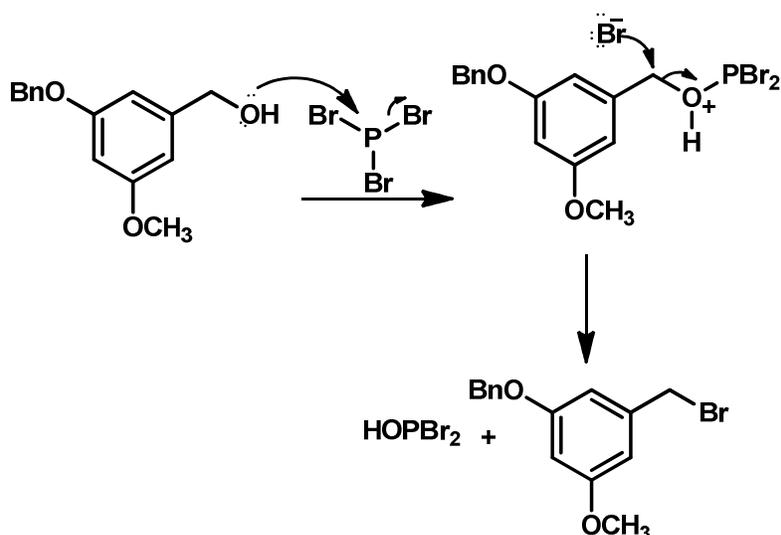
#### 6.1.5. 1-(Benciloxi)-3-(bromometil)-5-metoxibenceno [5]

**Esquema 16.**



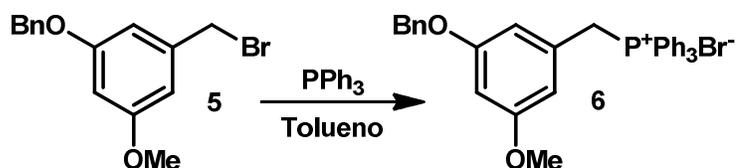
Después de obtener el alcohol bencílico **4**, el siguiente paso para la obtención de la sal de fosfónio es convertir el alcohol en el bromuro de bencilo **5** por medio de una reacción de sustitución nucleofílica del tipo  $\text{S}_{\text{N}}2$  en donde el tribromuro de fósforo convierte al alcohol en un mejor grupo saliente como se muestra en el esquema 17. Del compuesto **5** se obtuvo un rendimiento de 88.6% como cristales blancos con un p.f. de 52-54 °C, sus datos espectrales corresponden con los reportados en la literatura.

**Esquema 17.** Mecanismo de reacción S<sub>N</sub>2 del alcohol con PBr<sub>3</sub>.



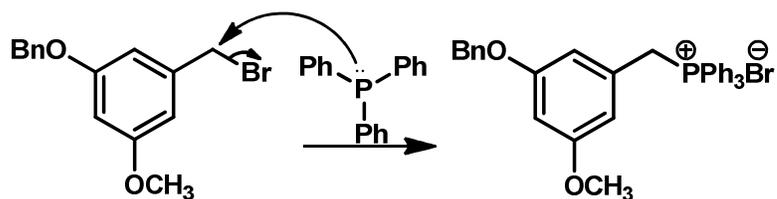
#### 6.1.6. Bromuro de {[3-(benciloxi)-5-metoxifenil]metil}trifenilfosfonio [6]

**Esquema 18.**



Finalmente en la última síntesis para obtener la sal de fosfónio, se hizo reaccionar el bromuro de bencilo con trifenilfosfina, esta reacción procede por un mecanismo de sustitución nucleofílica S<sub>N</sub>2 (ver esquema 19), de donde se obtuvo el compuesto **6** como un sólido blanco, con un rendimiento del 59.2%.

**Esquema 19.** Mecanismo de reacción de la sal de fosfónio.

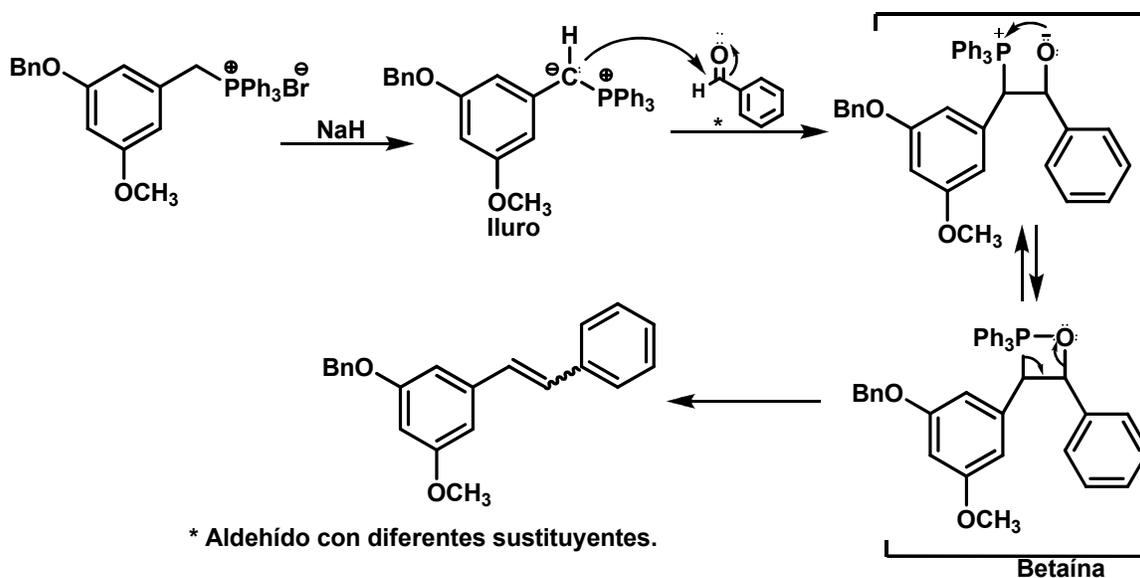


## 6.2. Reacción de Wittig

Una vez obtenida la sal de fosfónio **6**, está se hizo reaccionar con una base fuerte, en este caso hidruro de sodio para obtener el íluro de fósforo, este intermediario así generado, es una especie que no posee una carga global pero tiene un átomo de carbono cargado negativamente enlazado a un átomo de fósforo cargado positivamente. Una vez obtenido el íluro de fósforo, se hace reaccionar con el aldehído correspondiente para la obtención del estilbena formando un doble enlace que une a ambos anillos aromáticos.

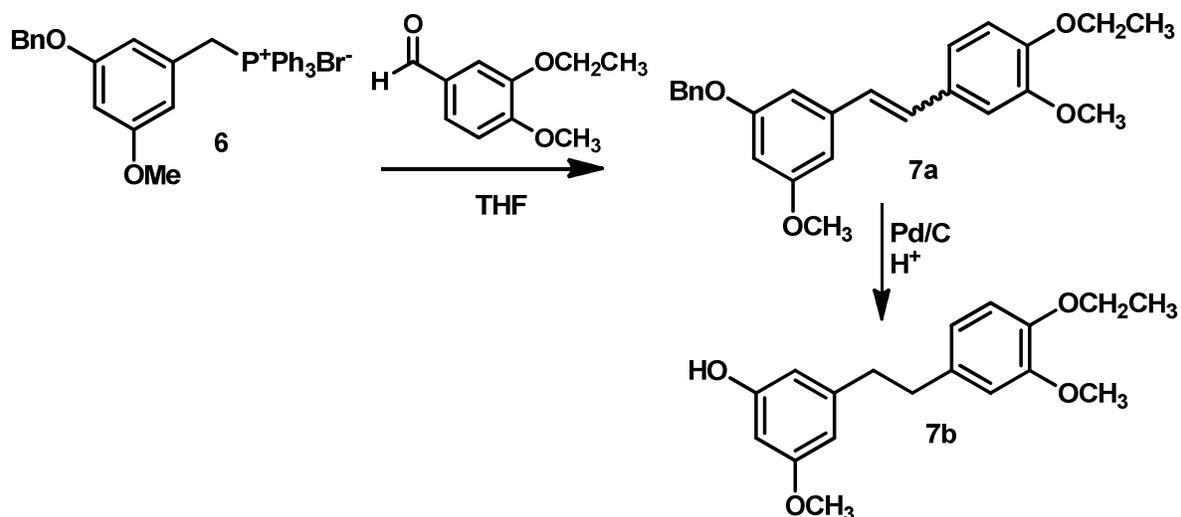
La reacción consiste en un proceso de adición nucleofílica del íluro de fósforo, donde el carbono con carga negativa, ataca el carbonilo del aldehído produciendo un intermediario reactivo conocido como betaína, la cual experimenta una formación intramolecular de un enlace P-O para producir un anillo de cuatro, y que posteriormente por un "rearrreglo" da lugar al doble enlace del estilbena y al óxido de trifenilfosfina. Como se muestra en el esquema 20.

**Esquema 20.** Mecanismo de la reacción de Wittig.



## 6.2.1. 3-[2-(4-Etoxi-3-metoxifenil)etil]-5-metoxifenol [7b]

Esquema 21.

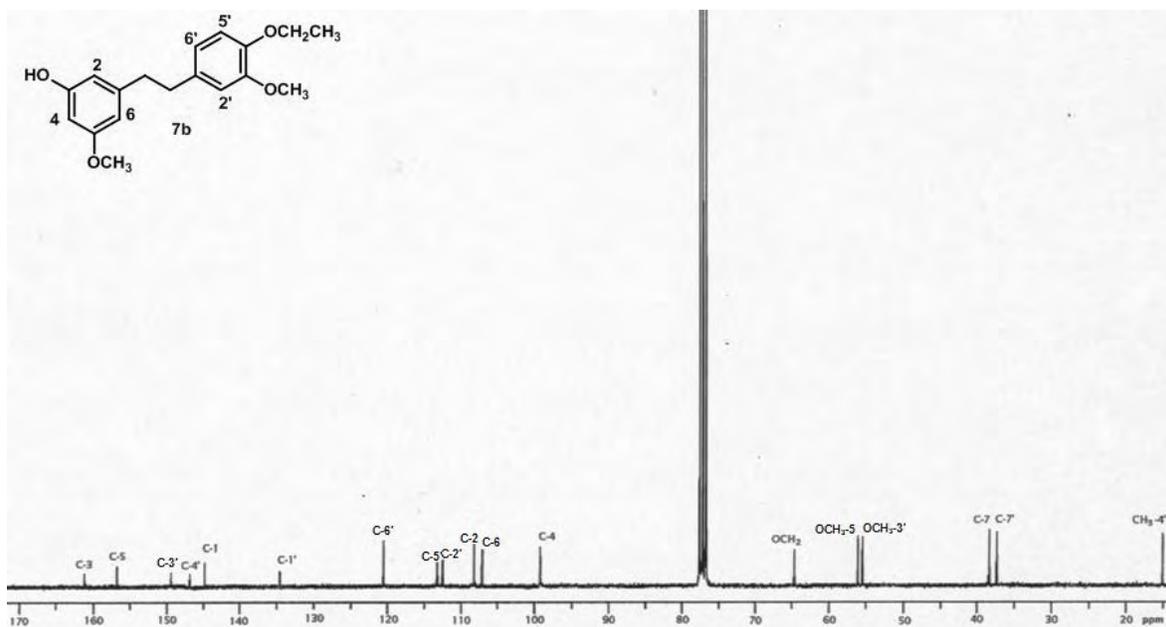


El primer bibencilo que se sintetizó fue el 3-[2-(4-etoxi-3-metoxifenil)etil]-5-metoxifenol, en donde el 4-etoxi-3-metoxibenzaldehído se hizo reaccionar con la sal de trifenilfosfonio en cantidades equimolares y una vez obtenido el estilbena **7a** como una mezcla de isómeros *cis-trans*, estos isómeros fueron convertidos en el bibencilo **7b** con un rendimiento del 43.2% al ser sometidos bajo condiciones de hidrogenación empleando Pd-Carbono como catalizador, en donde se reduce el doble enlace y con el mismo tratamiento se hidrogenoliza el grupo protector, O-benciloxi, para regenerar el hidroxilo fenólico. El bibencilo **7b** fue caracterizado por métodos espectroscópicos y espectrométricos; el espectro de masas (anexo, espectro 1), registra una ruptura con un  $m/z$  de 137 una que es un fragmento característico para este bibencilo. En el espectro de IR se observan bandas características para el hidroxilo fenólico en  $\nu_{\max} \sim 3451 \text{ cm}^{-1}$ , además de presentar bandas características de carácter aromático en  $\nu_{\max} 2935, 1600, 1456 \text{ cm}^{-1}$ .

La RMN fue útil como herramienta complementaria para la asignación de la posición y tipo de sustituyentes presentes. Así, en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  para **7b** (anexo, espectro 2) se observa en 1.45 ppm un triplete para los tres hidrógenos

del CH<sub>3</sub> del etoxilo, después se puede observar un multiplete en 2.82 ppm que integra para los 4 hidrógenos de la cadena alifática que une a ambos anillos, en 3.75 y 3.84 ppm se observan dos singuletes que integran para los hidrógenos de los grupos CH<sub>3</sub>-O de ambos anillos, en 4.07 ppm se observa un cuatruplete que integra para los dos hidrógenos del -OCH<sub>2</sub> del etoxilo, el hidroxilo fenólico se observa como un singulete a 4.83 ppm, finalmente se observan varias señales en un rango de 6.25 a 6.79 ppm que integran para los hidrógenos de los anillos aromáticos.

En la figura 4 se muestra el espectro de RMN <sup>13</sup>C, donde se puede observar una señal en 15.1 ppm que corresponde al CH<sub>3</sub> del etoxilo, en 37.4 y 38.4 ppm señales que corresponde a los carbonos de la cadena alifática, en 55.5 y 56.2 ppm correspondientes a los carbonos de los grupos -OCH<sub>3</sub> de ambos anillos, en 64.7 ppm que corresponde al carbono del OCH<sub>2</sub> del etoxilo y finalmente una serie de señales de 99.4 a 161.6 ppm correspondientes a los carbonos de los anillos aromáticos.

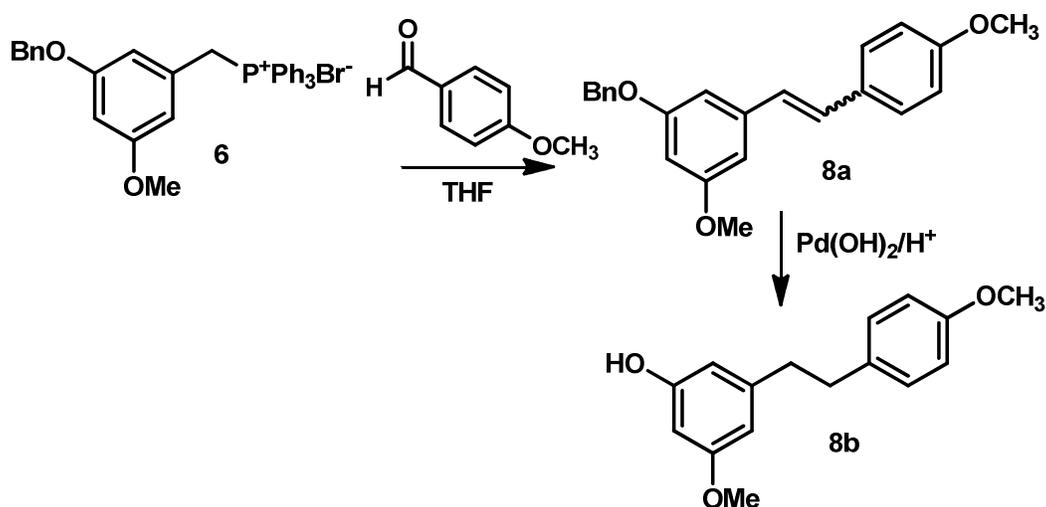


**Figura 4.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C de 3-[2-(4-etoxi-3-metoxifenil)etil]-5-metoxifenol **7b**.

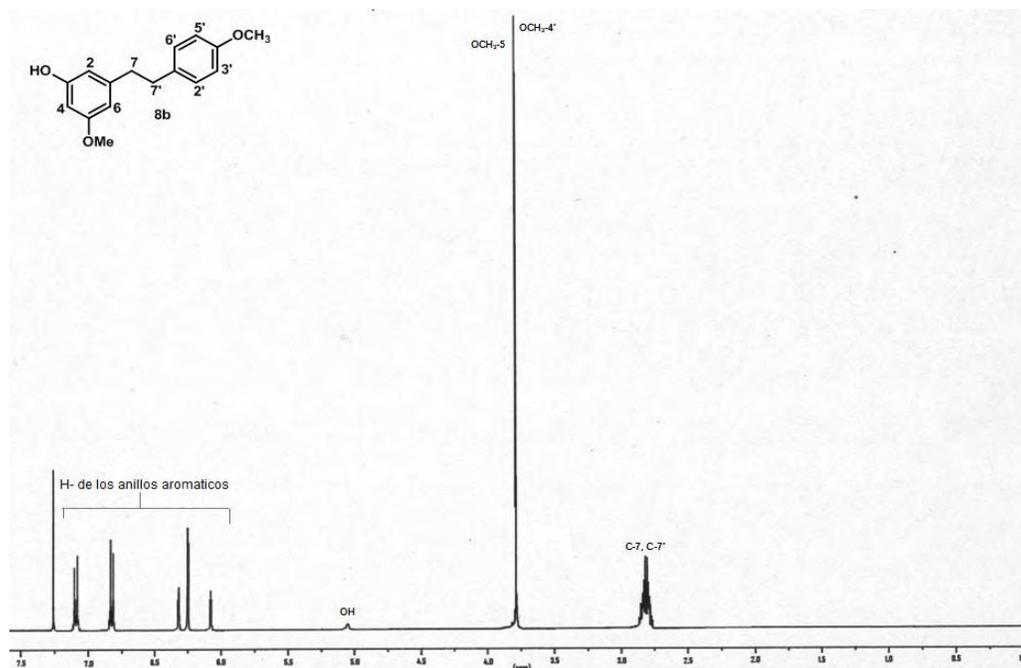
### 6.2.2. 3-[2-(4-Metoxifenil)etil]-5-metoxifenol **8b**

Para la obtención del 3-[2-(4-metoxifenil)etil]-5-metoxifenol **8b**, se hizo reaccionar la sal de trifenilfosfonio **6** con 4-metoxibenzaldehído en cantidades equimoleculares en THF, una vez obtenida la mezcla *cis-trans* después fue sometida bajo condiciones de hidrogenación catalítica empleando hidróxido de paladio como catalizador y acetato de etilo (esquema 22). El compuesto **8b** fue obtenido con un rendimiento del 41.3% como un líquido anaranjado, el bajo rendimiento se debe a la generación de subproductos los cuales dificultaron la recuperación del producto en forma pura.

#### Esquema 22.



En la figura 5 se muestra el espectro de RMN  $^1\text{H}$  para el compuesto **8b**. En él se puede observar un multiplete en 2.83 ppm que integran para los cuatro hidrógenos de la cadena alifática, en 3.75 y 3.79 ppm se observan dos singuletes que integran para seis hidrógenos que corresponden a los grupos metoxilos de ambos anillos, en 4.77 ppm un singulete que integra para el hidrógeno del hidroxilo fenólico, posteriormente se encuentran diferentes señales entre 6.25 y 7.09 ppm que integran para los diferentes hidrógenos de los anillos aromáticos.



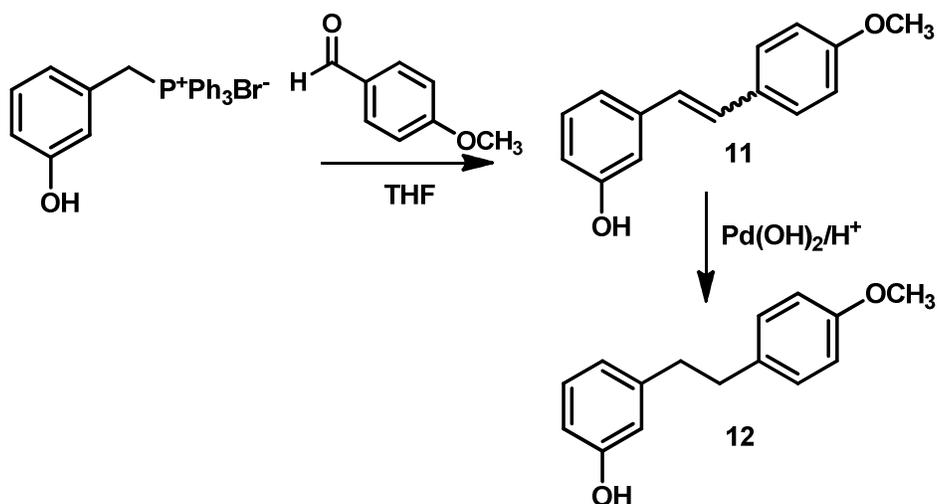
**Figura 5.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 3-[2-(4-metoxifenil)etil]-5-metoxifenol **8b**.

La formación del compuesto **8b** fue confirmada con espectrometría de masas, en donde se observó en ion molecular a 258  $m/z$  correspondiente a la masa del compuesto **8b**. En la espectroscopia de IR (anexo, espectro 3) se observa una banda ancha en  $3401.48\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la vibración del grupo hidroxilo del compuesto. En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (anexo, espectro 4) se observa una señal correspondiente a los carbonos de los grupos metoxilos en 55.5 ppm.

### 6.2.3. 3-[2-(4-Metoxifenil)etil]fenol [12]

El 3-[2-(4-metoxifenil)etil]fenol se obtuvo a partir del bromuro de [(3-hidroxifenil)metil]trifenilfosfonio, preparado con anterioridad en el laboratorio de investigación con el mismo procedimiento empleado para obtener la sal de fosfónio **6**, se hizo reaccionar con *p*-metoxibenzaldehído, para así obtener los isómeros *cis-trans* correspondientes, posteriormente los isómeros se sometieron a una reacción de hidrogenación catalítica, en donde el doble enlace de la cadena alquímica que une a los anillos es reducido (esquema 23). Se obtuvo un rendimiento bajo de 13.1% del bibencilo **12**, como un líquido amarillo.

## Esquema 23.



El producto fue caracterizado por métodos espectroscópicos; en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  que se muestra en la figura 6 se observan dos señales correspondientes a los carbonos de la cadena alifática en 36.7 y 37.9 ppm, en 55.2 ppm correspondiente al carbono del  $\text{OCH}_3$  y finalmente se encuentran las señales correspondientes a los carbonos de los anillos aromáticos entre 112.7 y 155.5 ppm.

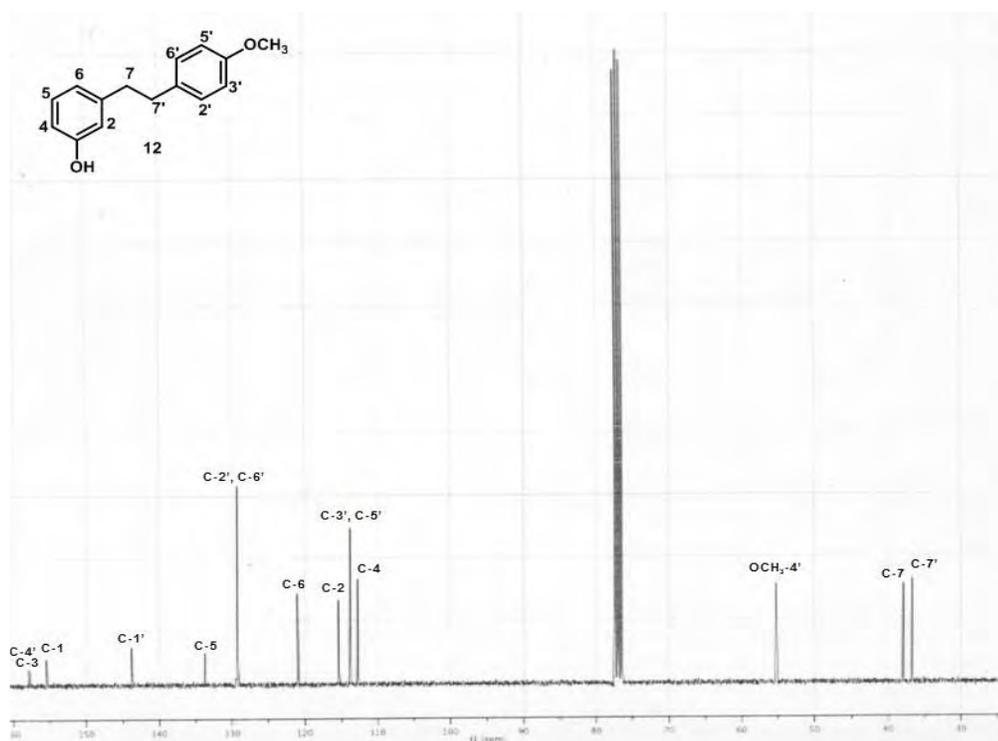
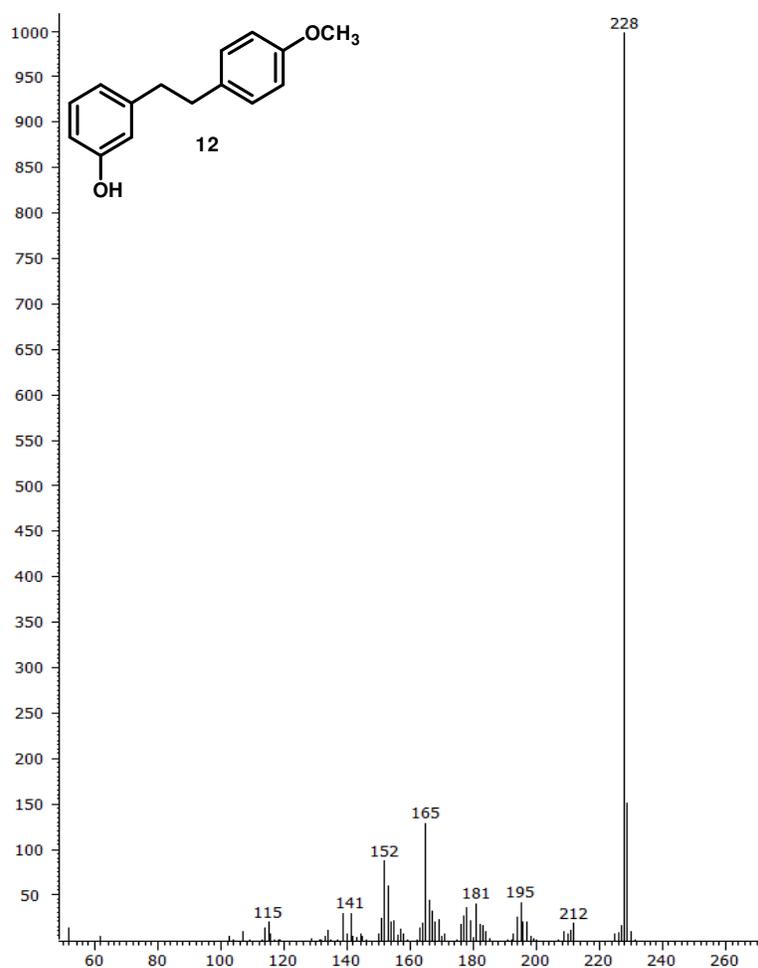


Figura 6. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 3-[2-(4-metoxifenil)etil]fenol 12.

En el caso de la RMN  $^1\text{H}$ , en el espectro se observa en 2.84 ppm un singulete que integra para cuatro hidrógenos correspondientes a la cadena alifática, en 3.79 ppm una señal que integra para tres hidrógenos del grupo  $\text{OCH}_3$  y finalmente señales entre 6.55 y 7.1 ppm correspondientes a las integraciones de los hidrógenos de los anillos aromáticos.

En espectroscopia de IR se observa una banda ancha en  $3452\text{ cm}^{-1}$  característica para la vibración del grupo hidroxilo.

Adicionalmente, en el espectro de masas se puede observar el ion molecular en  $228\text{ m/z}$  correspondiente a la masa molecular del compuesto **12**. (Figura 7).

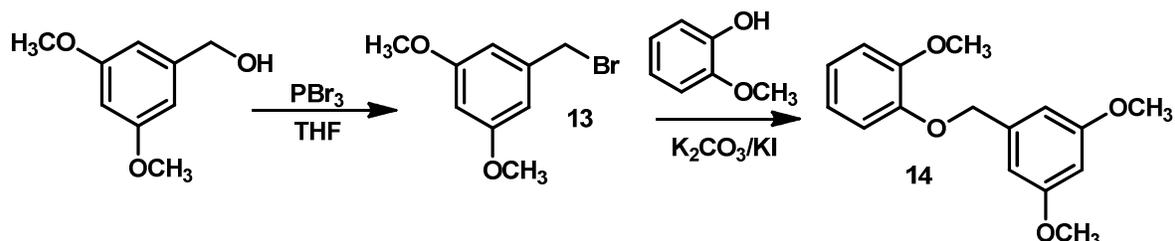


**Figura 7.** Espectrometría de masas para el compuesto **12**.

### 6.3. Síntesis del difenilmetano [15]

#### 6.3.1. Bromuro de 3,5-dimetoxibencilo [13] y 1,3-dimetoxi-5-(2-metoxifenoximetil)benceno [14]

##### Esquema 24.

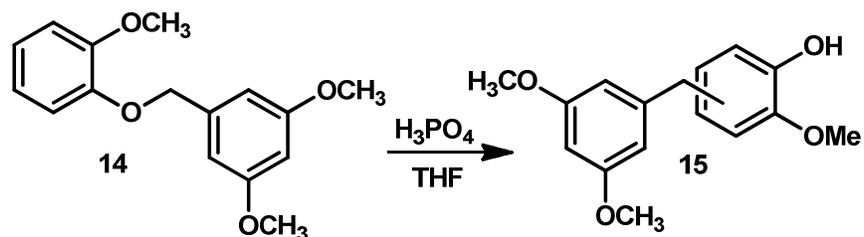


El último compuesto de interés a sintetizar fue el difenilmetano compuesto **15**, para obtenerlo, se utilizó el alcohol 3,5-dimetoxibencílico que por tratamiento con tribromuro de fósforo, se obtuvo el compuesto **13** (8.5 g, 88.3%) como cristales blancos.

Mediante la síntesis de éteres de Williamson, método que implica un mecanismo  $S_N2$  al reaccionar un ion alcóxido con un halogenuro de alquilo primario no impedido. En nuestro caso particular, el alcóxido se obtuvo *in situ* por reacción entre guayacol y  $K_2CO_3$ , que al hacerlo reaccionar con el bromuro **13**, se obtuvo una mezcla enriquecida del compuesto **14** con guayacol como impureza; a pesar de que se realizó una percolación para su purificación, hasta el momento no ha sido posible obtener el producto **14** en forma pura.

#### 6.3.2. 2-[(3,5-Dimetoxifenil)metil]-6-metoxifenol [15]

##### Esquema 25.



Después de sintetizar el compuesto **14** mediante una transposición bencílica por catálisis ácida se esperaba obtener el correspondiente difenilmetano.

Así, el tratamiento de **14** con ácido fosfórico a temperatura de reflujo en THF genera a **15** como una mezcla de tres productos de transposición principales, de los cuales solamente los dos más abundantes han sido caracterizados, el compuesto **15a** se obtuvo como un sólido blanco, con un 13.8% de rendimiento y el compuesto **15b** como un líquido viscoso amarillo, con rendimientos del 2.4% respectivamente.

La figura 8 muestra el espectro de RMN  $^1\text{H}$  para el compuesto **15a**, en el cual se observan señales en 3.74 y 3.75 ppm que integra para tres y seis hidrógenos que corresponden a los grupos metoxilo, posteriormente se observa una señal en 3.95 ppm que integra para dos hidrógenos que corresponde al metileno que une a los anillos, una señal en 5.52 ppm que integra un solo hidrógeno para el hidroxilo fenólico, finalmente se tienen una serie de señales de 6.31 a 6.94 ppm que integran para los hidrógenos de los anillos aromáticos. En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observa en 35.7 ppm una señal que corresponde al metilo que une a los anillos, en 55.2 ppm una señal que corresponde a dos carbonos de grupos metoxilo ( $\text{OCH}_3$ -3,5) y en 61.3 para el otro metoxilo ( $\text{OCH}_3$ -3'), después se observan de 97.9 a 160.8 ppm una serie de señales correspondientes a los carbonos de los anillos aromáticos. Con respecto a su espectrometría de masas presenta su ion molecular en 274  $m/z$  que concuerda con la masa molecular.

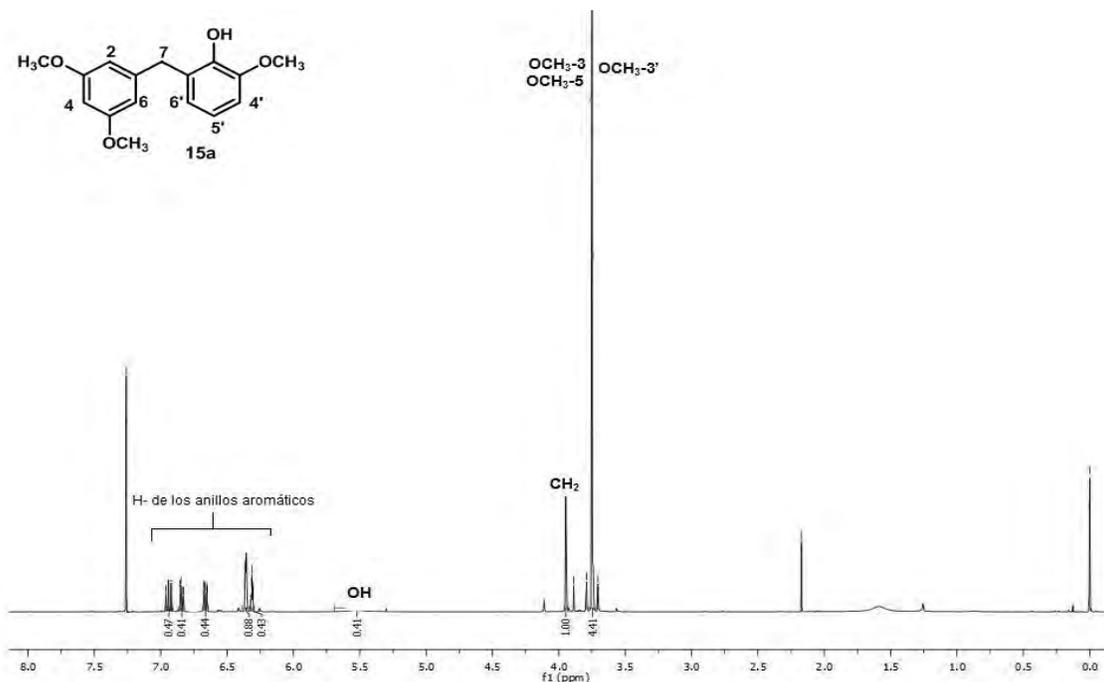


Figura 8. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **15a**.

En la figura 9 se muestra el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para el compuesto **15b**, en el cual se observan una señal en 41.5 ppm que corresponde al carbono del metilo que une a los anillos, en 55.3 ppm señal correspondiente a dos carbonos de los grupos metoxilo ( $\text{OCH}_3$ -3',5) y en 61.3 una señal que corresponde al carbono del otro metoxilo ( $\text{OCH}_3$ -3), finalmente varias señales que corresponden a los carbonos de los anillos aromáticos éstas en 97.8 a 160.8 ppm. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  para el compuesto **15b** se observan señales en 3.75 ppm que integra para nueve carbonos correspondientes a los grupos metoxilo del compuesto, en 3.86 ppm que integra para dos hidrógenos correspondientes al metileno, en 5.53 ppm que integra para el hidrógeno del fenol, y por último una serie de señales que integran para los diferentes hidrógenos de los anillos aromáticos en 6.31 a 6.83 ppm. En espectroscopia de IR se observa una banda ancha en  $3437\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del alcohol fenólico. Por medio de la espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  y la RMN  $^{13}\text{C}$  se propusieron las estructuras para los productos **15a** y **15b**.

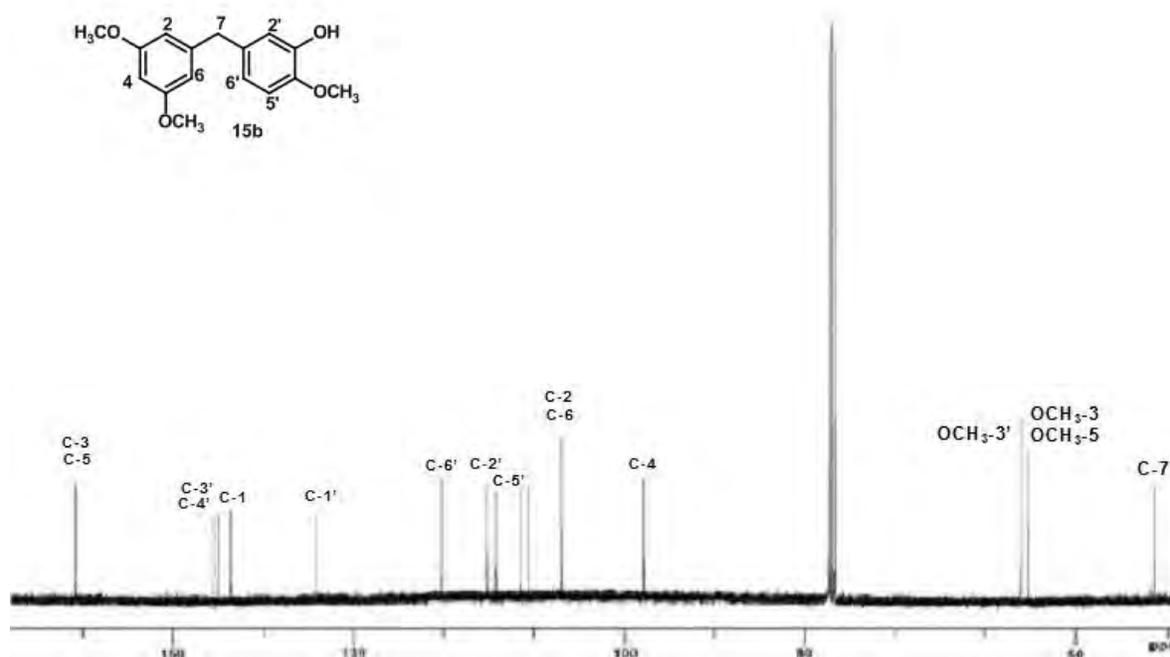


Figura 9. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para el compuesto **15b**.

#### 6.4. Efecto de los análogos y homólogo sobre el complejo PDE1-CaM

El efecto de los compuestos **7b**, **8b**, **12**, **15a** y **15b** sobre la actividad moduladora de la CaM se determinó utilizando un método enzimático, el cual se basa en la cuantificación del fósforo inorgánico espectrofotocolorimétricamente generado a partir de la hidrólisis de AMPc por la acción de la PDE1 en presencia de una 5'-nucleotidasa. La cantidad de fósforo cuantificada correlaciona directamente con la actividad de la PDE1 dependiente de CaM.

Los resultados muestran que los compuestos **8b**, **15a** y **15b** inhibieron la actividad del complejo PDE1-CaM con valores de IC<sub>50</sub> de 9.38, 56.15, 54.73 μM respectivamente. En la siguiente tabla se muestran los resultados.

**Tabla 1.** Resultados de los productos sobre el complejo PDE1-CaM.

Compuesto	IC <sub>50</sub>	Potencia	Actividad
<b>7b</b>	54.69	0.23	Inactivo
<b>8b</b>	9.38	1.88	Muy potente
<b>12</b>	43.45	0.27	Inactivo
<b>15a</b>	56.15	0.48	Moderadamente
<b>15b</b>	54.73	0.49	Moderadamente

#### Criterios de actividad

0.0-0.30	Inactivos
0.30-0.70	moderadamente
0.70-1.0	Equipotentes
>1.0	Muy potentes

## 7. CONCLUSIONES

- Se realizó la síntesis lineal de la sal de fosfónio **6** que se usó como intermediario en común para la obtención de los bibencilos **7b-10b**.
- Se realizó la síntesis de los bibencilos análogos del gigantol **7b-10b** y **12** modificando los sustituyentes de los anillos por medio de una secuencia de reacciones que involucran la reacción de Wittig.
- Mediante la transposición bencílica del compuesto **14** se obtuvieron los homólogos difenilmetano **15a** y **15b**.
- Los compuestos obtenidos fueron caracterizados por medio de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , IR y espectrometría de masas.
- A los análogos **7b**, **8b**, **12** y los homólogos **15a** y **15b** se les evaluó el efecto que tienen sobre la actividad de la enzima PDE1, en donde se observó que los compuestos **8b**, **15a** y **15b** tienen un efecto inhibitor del complejo CaM-PDE1, lo que indicaría que posiblemente puedan tener función antiespasmódica.
- Con los datos obtenidos hasta el momento no se ha podido recabar la suficiente información para realizar el estudio sobre la relación estructura química-actividad biológica, ya que no son suficientes los compuestos evaluados.

## 8. PERSPECTIVAS

- Se sugiere realizar la evaluación de los compuestos **9b** y **10b** además de seguir con la síntesis y evaluación farmacológica de otra serie de análogos del gigantol, con otros sustituyentes para así obtener la mayor información posible para realizar el estudio sobre la relación estructura química-actividad biológica.

---

## 9. REFERENCIAS

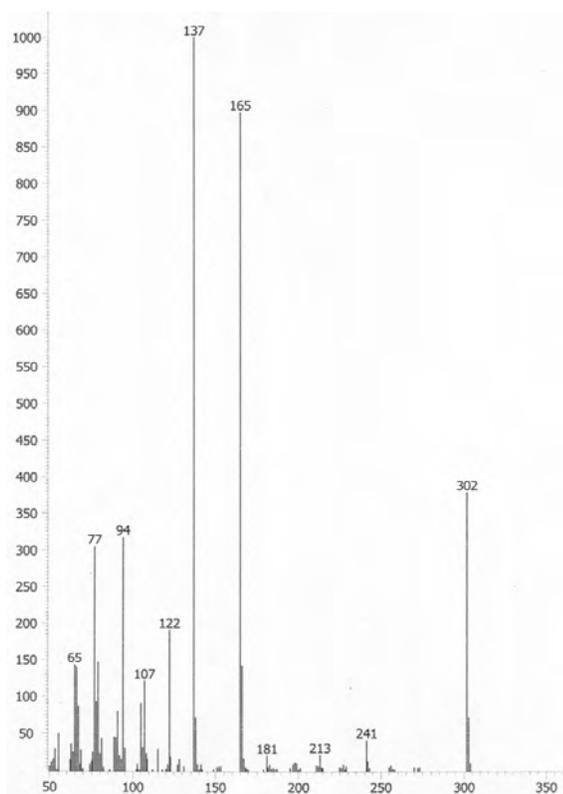
1. Estrada, S. S., López, G. J., Villalobos, M. R. y Mata, R. Endothelium-independent relaxation of aorta rings by two stilbenoids from the orchids *Scaphyglottis livida*. *Fitoterapia*. **2006**, *77*, 236-239.
2. Hernández, R. Y., Isela, R. J., Castillo, R., Rojas, A. y Mata, R. Spasmolytic effects, mode of action, and structure-activity relationships of stilbenoids from *Nidema boothii*. *Journal Natural Products*. **2004**, *67*, 160-167.
3. Estrada, S. S., López, G. J., Villalobos, M. R. y Mata, R. Spasmolytic stilbenoids from *Maxillaria densa*. *Fitoterapia*. **2004**, *75*, 690-695.
4. Estrada, S. S., Rojas, A., Mathison, Y., y Mata, R. Nitric oxide/cGMP mediates the spasmolytic action of 3,4'-Dihidroxi-3',5-dimetoxibibenzyl from *Scaphyglottis livida*. *Planta Medica*. **1999**, *65*, 109-114.
5. Mata, R., Rivero-Cruz, J.F. y Chávez, D. Bioactive secondary metabolites from selected mexican medicinal plants: Recent progress. *In Bioactive Compounds from Natural Sources*. (C. Tringalli, Ed.), Taylor & Francis, London. **2002**, 130-137.
6. Dresler, L.R. Phylogeny and classification of the Orchid family. *Discorides Press*. **1993**, 13-57.
7. Dresler, L.R. The Orchid. Natural history and classification. *Harvard University press*. London. **1981**, 50-159.
8. Estrada, S. E. [Tesis Doctoral] Estilbenoides Espasmolíticos de *Scaphyglottis livida* Lindley Schltr (Orchidaceae) y *Maxillaria densa* Lindley (Orchidaceae). Efecto 3,4'-dihidroxi-3',5-dimetoxibibencilo sobre el sistema óxido nítrico/GMP cíclico. Facultad de Química, UNAM, México. **2000**, 1-15.
9. Palacios, J. F. [Tesis Maestria] Compuestos analgésicos y antiinflamatorios de *Scaphyglottis livida* Lindley Schltr (Orchidaceae), Facultad de Química, UNAM, México. **2006**, 1-13.
10. Rodríguez, M. Triterpenoides de las especies *Maxillaria densa* Lindley (Orchidaceae) y *Scaphyglottis livida* Lindley Schltr (Orchidaceae). Facultad de Química, UNAM, México. **1998**, 1-11.
11. Hietz, P. y Hietz-Seifert, V. Epífitas de Veracruz. Guía ilustrada para las regiones de Xalapa y los Tuxtla, Veracruz. *Instituto de Ecología A.C.* **1994**.
12. Yamaki, M., Bai, L., Inoue K. y Takagi, S. Biphenantrenes from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*. **1989**, *28*, 3503-3505.
13. Shimizu, M., Shogawa, H., Hayashi, T., Arisawa, M., Suzuki, S., Yoshizaki, M., et. al. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs III. Constituents and anti-inflammatory effect of paraguayan crude "Tamandá cuná" (*Catasetum barbatum* Lindley). *Chemistry Pharmaceutical Bulletin*. **1988**, *36*, 4447-4452.

14. Miyazawa, M., Shimamura, H., Nakamura, S. I. y Kameoka, H. Antimutagenic activity of gigantol from *Dendrobium nobile*. *Journal Agricultural Food Chemistry*. **1997**, *45*, 2849-2853.
15. Sachdev, K., Kulshreshtha, K. Phenolic constituents of *Coelogyne ovalis*. *Phytochemistry*. **1986**, *25*, 499-502.
16. Kong, J. M., Goh, N. K., Chia, L. S. y Chia T.F. Recents advances in traditional plants drugs and orchids. *Acta Pharmacologica sinica*. **2003**, *24*, 7-21.
17. Miyazawa, M., Shimamura, H., Nakamura, S. I., Sugiura, W., Kosaka, H. y Kameoka, H. Moscatilin from *Dendrobium nobile*, a naturally occurring bibenzyl compound with potential antimutagenic activity. *Journal Agricultural Food Chemistry*. **1999**, *47*, 2163-2167.
18. Baxter, H. Stilbenoids. En *Phytochemical dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants*. Ed. Taylor and Francis. London, 509-518.
19. Takagi, S., Yamaki, M. y Inoue, K. Antimicrobial agents from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*. **1983**, *22*, 1011-1015.
20. Tezuka, Y., Ueda, M. y Kikuchi, T. Studies on the constituents of Orchidaceous plants VIII. Constituents of *Spiranthes sinensis* (PERS.) AMES var. *Amoena* (M. BIEBERSON) HARA. (1). Isolation and structure elucidation of spiranthol-A, spiranthol-B and spirasienol-A, new isopentendihydrophenanthrenes. *Chemistry Pharmaceutical Bulletin*. **1989**, *37*, 3195-3199.
21. Valencias-Islas, N. A., Paul, R. N., Shier, W. T., Mata R. y Abbas, H. K. Phytotoxicity and ultrastructural effects of gymnopusim from the orchid *Maxillaria densa* on duckweed (*Lemna paucicostata*) frond and root tissues. *Phytochemistry*, **2002**, *61*, 141-148.
22. Lee, Y. H., Park, J. D., Baek, N. I. y Ahn, B. Z. *In vitro* and *in vivo* antitumoral, phenanthrenes from the aerial parts of *Dendrobium nobile*. *Planta Medica*. **1995**, *13*, 2273-2286.
23. López, M. T., Flavonoides. *Fitoterapia*. **2002**, *21(4)*, 108-113.
24. Gilman, A. G., Rall, T. W., Niles, A. S. y Taylor, P. Las bases Farmacológicas de la terapéutica 11<sup>a</sup>. Ed. Editada por Panamericana, México, D.F. **1996**.
25. Katzung, B. G. Farmacología básica y Clínica. Editorial El Manual Moderno. México, D.F. **2002**, 211-216, 373-376.
26. Bowman, W. C., Rand M. J. Farmacología bases bioquímicas y Patológicas. Aplicaciones clínicas. 2<sup>da</sup> Ed. Interamericana S.A. de C.V. México. **1984**, 9.21-9.31, 25.24-25.25.
27. Guyton, A. C., Hall, J. E. Tratado de fisiología médica. 11<sup>a</sup>. Ed. Elsevier España. **2007**, 92-99.

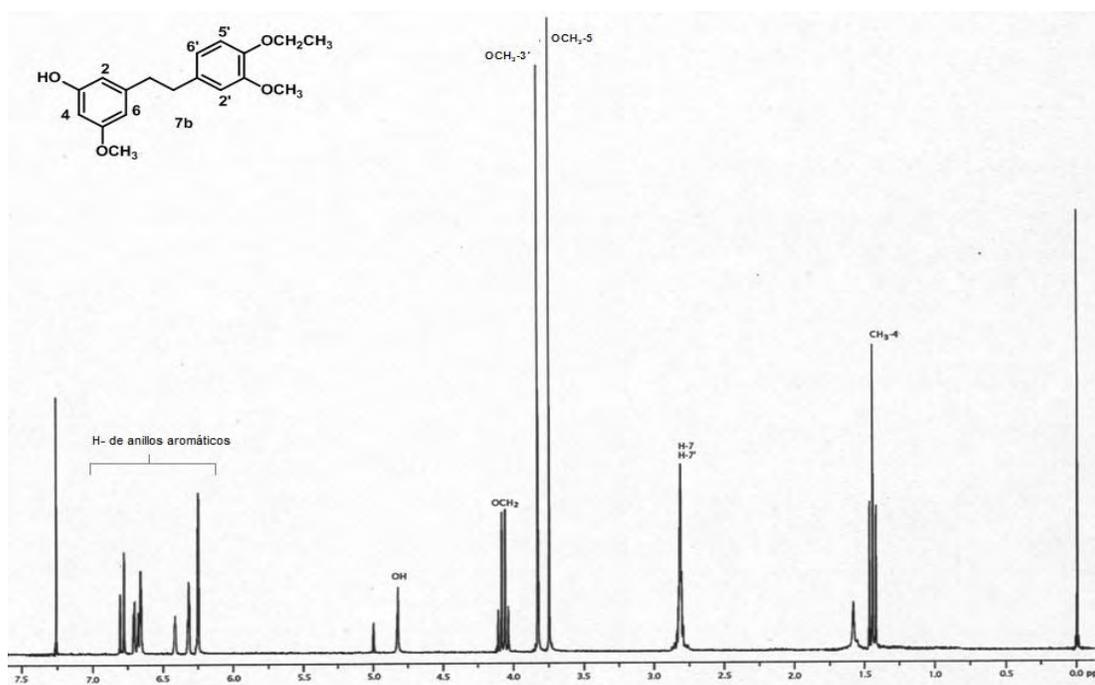
28. Murray, R. K., Daryl, K. G., Mayes, P. A. y Rodwell, V. W. Harper Bioquímica ilustrada. 16 ed. Manual Moderno S.A. de C.V. México, D.F. **2004**, 634-636.
29. Hook, S. S., Means, A. R. Ca<sup>2+</sup>/CaM Dependent Kinases: from activation to function. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. **2001**, *41*, 471-505.
30. Harmat, V., Böcskei, Z., Náray-Szabo, G., Bata, I., Csutor, A., Hermeicz, I., Arányi, P., et. al. A New Potent Calmodulin Antagonist with Arylalkylamine Structure: Crystallographic, Spectroscopic and Functional Studies. *Journal Moleculy Biology*. **2000**, *297*, 747-755.
31. Clinton R. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances Physiology Education*. **2003**, *27*, 201-206.
32. Fujimoto, S. y Takeo, I. Role of nitric oxide and nitric oxide-independent relaxing factor in contraction and relaxation of rabbit blood vessels. *European Journal of Pharmacology*. **1997**, *330*, 177-184.
33. Horowitz, A., Constance, B. M., Regent, L. y Kathleen, G. M., Mechanisms of Smoth muscle Contraction. *Physiological reviews*. **2006**, *76(4)*, 976-1003.
34. Hideaki, K., Hiroshi, O., Masatoshi, H., Minori, M., Ken-ichi, A., Ken-ichi, H., Shigeki, M., Hiroshi N., Kyung-jong W. y Koichi, S. Calcium Movements, Distribution and Functions in Smooth Muscle. *Pharmacological Reviews*. **1997**, *49(2)*, 207-210.
35. Chin, D. y Means, A. R. Calmodulin: A Prototypical Calcium Sensor. *Trends in Cell Biology*, **2000**, *10*, 322-328.
36. Bitar, K. N. Function of Gastrointestinal Smooth Muscle: From Signaling to Contractil Proteins. *American Journal of Medicine*. **2003**, *115*, 155-235.
37. Rivero-Cruz, B., Rivero-Cruz, I., Rodríguez-Sotres, R. y Mata, R. Effect of natural and synthetic benzyl benzoates on calmodulin. *Phytochemistry*. **2007**, *68*, 1147-1155.
38. Rybalkin, S. D, Yan, C., Bornfeldt, K. E. y Beavo, J. A. Cyclic GMP Phosphodiesterases and Regulation of Smooth Muscle Function. *Journal of American Heart Association*. **2003**, *9*, 280-291.
39. Gorham, J. The biochemistry of stilbenoids. Chapman and Hall. London. **1995**.
40. Thornton, M. R., Neilson, B. R. Química Orgánica. 2<sup>da</sup>. Ed. Sistemas Técnicos de Edición S. A. de C.V. México **1986**, 903-905.
41. Wade, L. G. Química Orgánica. 5ta. Ed. Pearson Prentice Hall. Madrid **2004**, 800-804.
42. Aldrich, Manual de productos químicos finos y equipo de laboratorio. 2000-2001, 627, 1107, 1108.

43. Cannon, J. R., Chow, P. W., Fuller, M. W., Hamilton, B. H., Metcalf, B. W. y Power, A. J. Phenolic constituents of grevillea robusta (proteaceae). The structure of robustol, a novel macrocyclic phenol. *Australia Journal Chemistry*. **1973**, *26*, 2257-75.
44. Wang, L. y Zunyuan, Y. *Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi*. 2003, *34(9)*, 428-429.

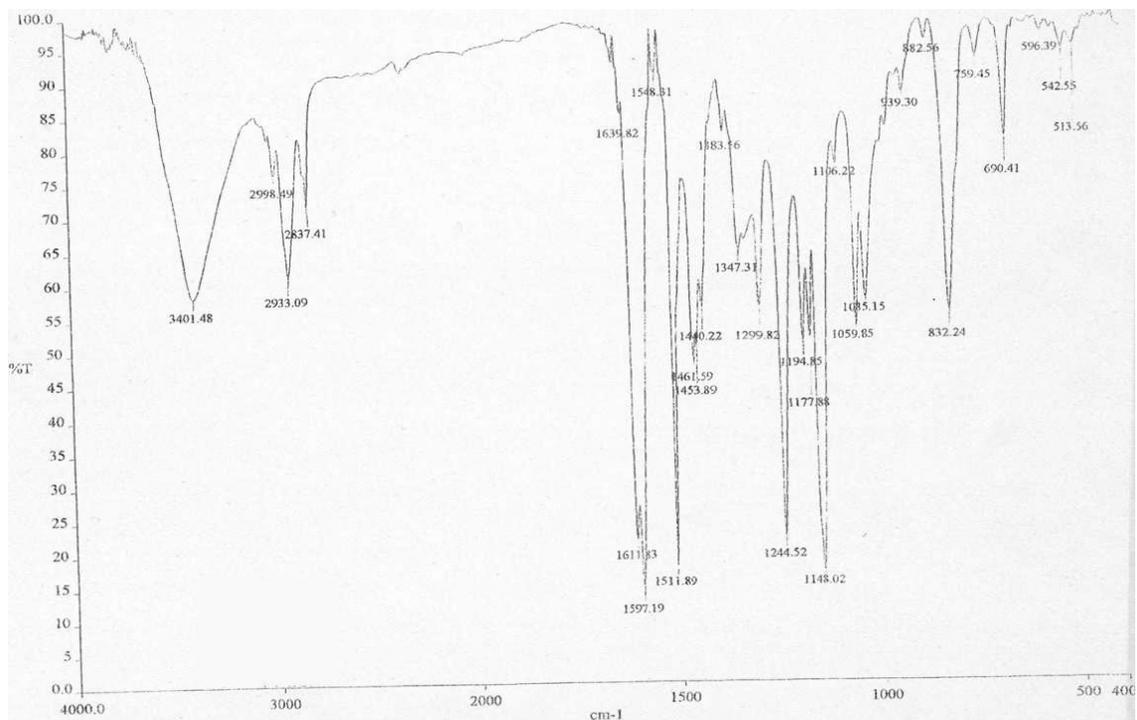
## 10. ANEXO



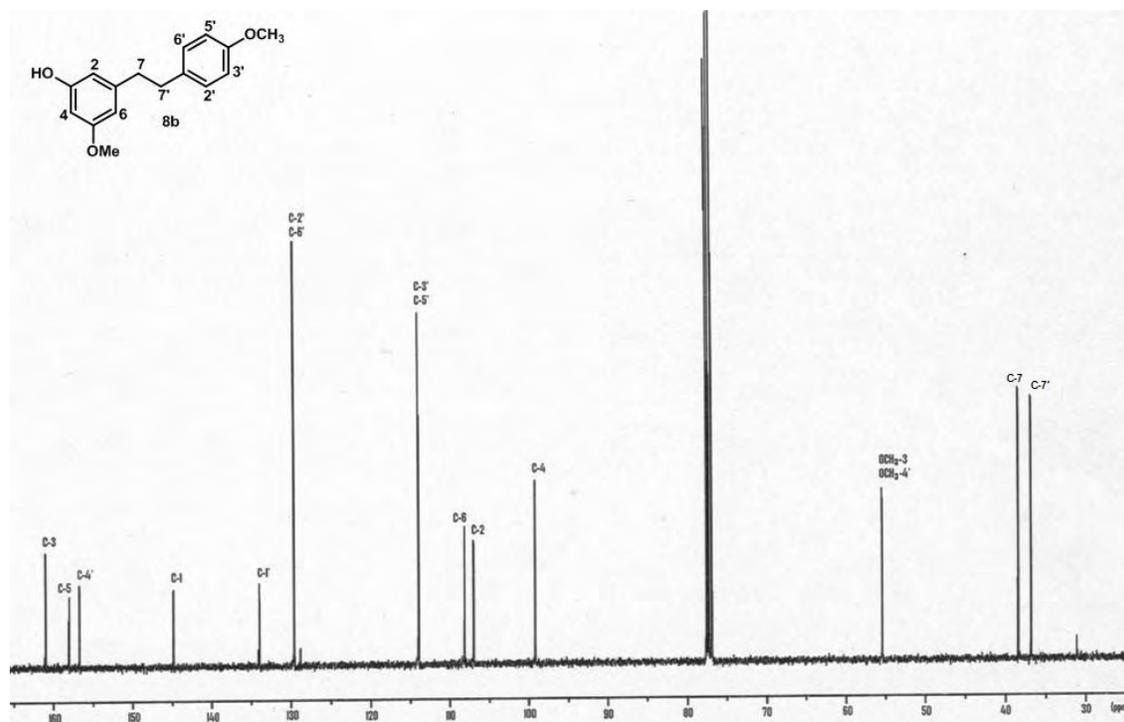
**Espectro 1.** Espectrometría de masas de 3-[2-(4-Etoxi-3-metoxifenil)etil]-5-metoxifenol [7b].



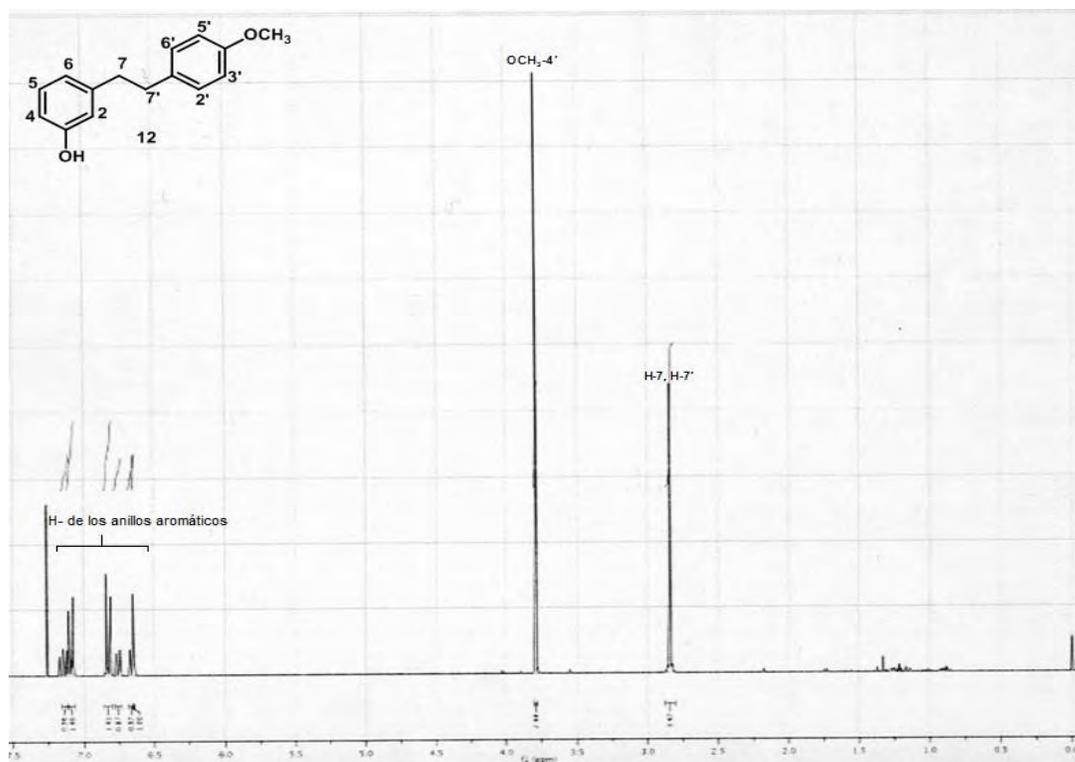
**Espectro 2.** RMN <sup>1</sup>H del 3-[2-(4-Etoxi-3-metoxifenil)etil]-5-metoxifenol [7b].



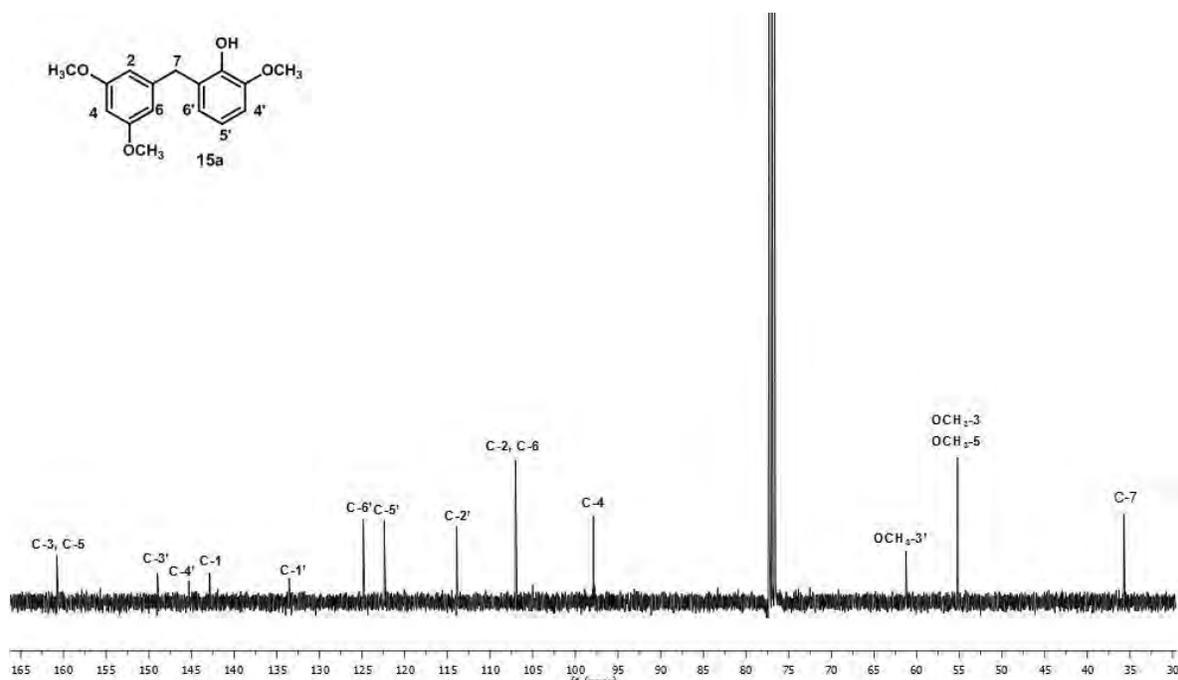
**Espectro 3.** IR de 3-[2-(4-Metoxifenil)etil]-5-metoxifenol [8b].



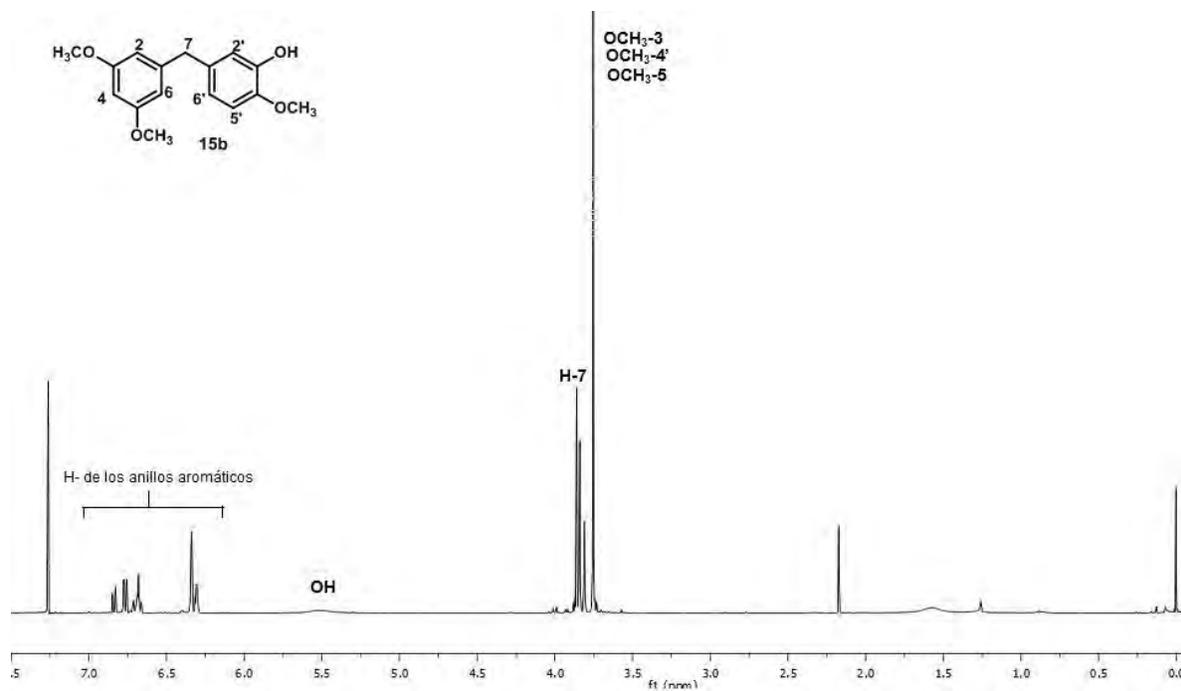
**Espectro 4.** RMN  $^{13}\text{C}$  de 3-[2-(4-Metoxifenil)etil]-5-metoxifenol [8b].



**Espectro 5.** RMN  $^1\text{H}$  de 3-[2-(4-Metoxifenil)etil]fenol [12].



**Espectro 6.** RMN  $^{13}\text{C}$  de 2-[(3,5-Dimetoxifenil)metil]-6-metoxifenol [15a].



**Espectro 7.** RMN <sup>1</sup>H de 5-[(3,5-Dimetoxifenil)metil]-2-metoxifenol [**15b**].