



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA Y ORGÁNICA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO

GONZALO ANDRES HASEMBER GIJÓN

**“ESTUDIO DE SÍNTESIS DE SALES DE FOSFONIO DERIVADAS DEL ÁCIDO
GÁLICO”**

DIRECTORES DE MEMORIA:

Dr. Ramiro Araya Maturana

Dr. Jorge Ferreira Parker

PROFESOR PATROCINANTE:

Dr. Ramiro Araya Maturana

Santiago, Chile

2012

A mi familia, mis padres, por su apoyo incondicional.

A mi abuelita Aida, muchas gracias por todo.

**Agradecimiento a FONDECYT por el apoyo económico brindado a través del
proyecto N° 1090075**

A mis padres, por su preocupación y su apoyo en cada una de las decisiones que he tomado. Todos mis logros son sus logros. A mis hermanos, Marcelo, Rodrigo y Christian, a mi tía Miriam, porque de una u otra forma siempre estuvieron y estarán ahí incondicionalmente.

A Natalia, por todo su amor y comprensión. Eres un gran soporte para mí.

A mis directores de memoria, Dr. Ramiro Araya, por su apoyo y por sobre todo su gran calidez humana, por enseñarme que lo más importante es ser consecuente en la vida. Al Dr. Jorge Ferreira, por toda su ayuda en la realización de esta memoria y por su infinita paciencia.

A mis profesores de la carrera de Química, en especial a los profesores Claudio Saitz, Hernán Pessoa y Jacqueline Pezoa, por todo su aporte en mi formación como profesional. También al profesor Mario Pavani, por toda su ayuda en esta memoria.

A mis compañeros de laboratorio, Oney, Paul, Christian, Max, Christopher, Claudia, José, Nelson, por todas esas conversaciones y buenos momentos vividos.

A mis amigos, de toda una vida y de la universidad, Giancarlo, Lela, Ana, Sergio, Carola, Lorena, Andrea Valdivia, Yasser, Pablo, Karina, Raúl, Pancha, Jorge, Alejandro, Caro, Catalina, Braulio, Renzo, Andrea Venegas, Daniel, Nico, Vivi, Silvana, Jesús, por toda su amistad y apoyo, porque de alguna forma cada uno de ustedes han contribuido a la realización de esta memoria.

Muchas gracias a todos.

RESUMEN

Se sintetizaron sales de fosfonio derivadas del ácido gálico con potencial actividad biológica, por medio de dos estrategias sintéticas.

La primera ruta está compuesta de 3 pasos, donde la esterificación se realizó a través de la formación del haluro de acilo correspondiente, obteniendo como producto final la sal de fosfonio derivada del ácido gálico con los hidroxilos fenólicos bencilados.

La segunda ruta consiste en una esterificación directa a partir del ácido gálico utilizando la esterificación de Steglich.

Se informan resultados de viabilidad y respiración del adenocarcinoma mamario de ratón TA3 por la acción de los productos finales, confirmando su capacidad citotóxica en células tumorales.

SUMMARY

STUDY OF SYNTHESIS OF DERIVATIVES PHOSPHONIUM SALTS FROM GALLIC ACID

Derivatives phosphonium salts from gallic acid with biological activity potential were synthesized by means of two synthetic strategies.

The first path consist of three steps where the esterification was performed through the formation of the acyl halide, obtaining as a final product the derivative phosphonium salt from gallic acid with the benzylated phenolic hydroxyl.

The second route involves a direct esterification from gallic acid using Steglich esterification.

Results on viability and respiration by these final products are reported, confirming their ability to inhibit the growth mouse mammary adenocarcinoma TA3 cell line.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Ácido gálico y actividad biológica.	1
1.2.- Sales de fosfonio y su acción en la mitocondria.-	5
1.3.- Reacción de esterificación de Steglich.-	8
1.4.- Ensayos biológicos.-	10
2. OBJETIVOS	11
2.1.- Objetivo General.-	11
2.1.- Objetivos Específicos.-	11
3. PARTE EXPERIMENTAL	11
3.1.- Síntesis.-	11
3.1.1.- <i>3,4,5-tris(benziloxi)benzoato de metilo</i> (1)	12
3.1.2.- <i>Ácido 3,4,5-tris(benziloxi)benzoico</i> (2)	13
3.1.3.- <i>Bromuro de (11-hidroxiundecil)trifenilfosfonio</i> (3)	14
3.1.4.- <i>Bromuro de (11-(3,4,5-tris(benziloxi)benzoiloxi)undecil)trifenilfosfonio</i> (4)	15
3.1.5.- <i>Bromuro de (11-(3,4,5-trihidroxibenzoiloxi)undecil)trifenilfosfonio</i> (5)	16
3.2.- Ensayos biológicos.-	17
3.2.1.- Material biológico.-	17
3.2.2.- Propagación de la línea tumoral.-	17
3.2.3.- Obtención de células tumorales.-	17
3.2.4.- Preparación de la fracción mitocondrial de células tumorales.-	18
3.2.5.- Medición de la concentración de proteínas.-	18
3.2.6.- Viabilidad en células de cultivo.-	19
3.2.7.- Medición del consumo de oxígeno.-	19
3.2.8.- Consumo de oxígeno en células tumorales.-	20

3.2.9.- Consumo de oxígeno mitocondrial.-	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1.- Bencilación de 3,4,5-trihidroxibenzoato de metilo.-	22
4.2.- Saponificación del 3,4,5-tris(benziloxi)benzoato de metilo (1).-	23
4.3.- Esterificación del Ácido 3,4,5-tris(benziloxi)benzoico (2).-	24
4.4.- Esterificación del ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico.	28
4.5.- Ensayo de viabilidad celular.-	30
4.6.- Determinación de la respiración celular.-	31
5. CONCLUSIONES.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Compuestos polifenólicos del té verde	1
Figura 2. Obtención del ácido gálico de los compuestos del té verde	2
Figura 3. Captación de cationes trifenilfosfonio de alquilo por la mitocondria	6
Figura 4. 3,4,5-tris(benziloxi)benzoato de metilo	12
Figura 5. Ácido 3,4,5-tris(benziloxi) benzoico	13
Figura 6. Bromuro de (11-hidroxiundecil)trifenilfosfonio	14
Figura 7. Bromuro de (11-(3,4,5-tris(benziloxi)benzoiloxi)undecil)trifenilfosfonio	15
Figura 8. Bromuro de (11-(3,4,5-trihidroxibenzoiloxi)undecil)trifenilfosfonio	16
Figura 9. Espectro HMQC del compuesto 4	26
Figura 10. Efecto del compuesto 4 sobre la velocidad de oxidación de duroquinol en células TA3	31
Figura 11. Consumo de oxígeno en mitocondrias de células TA3	32

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Esterificación de Steglich	8
Esquema 2. Mecanismo esterificación de Steglich	9
Esquema 3. Ruta de síntesis	21
Esquema 4. Reacción de bencilación del 3,4,5-trihidroxibenzoato de metilo	22
Esquema 5. Saponificación del 3,4,5-tris(benziloxi)benzoato de metilo	23
Esquema 6. Esterificación del Ácido 3,4,5-tris(benziloxi)benzoico	24
Esquema 7. Esterificación vía haluro de acilo	25
Esquema 8. Formación sal de fosfonio	27
Esquema 9. Esterificación del ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico	28
Esquema 10. Tabla de la concentración en la velocidad de respiración	30

1. INTRODUCCIÓN

1.1.- Ácido gálico y actividad biológica.

El té verde, una tradicional bebida asiática, ha mostrado en numerosos estudios actividad preventiva contra el cáncer en varios órganos humanos,¹ sin embargo, el mecanismo molecular de estas actividades aún sigue siendo desconocido. Diversos estudios han demostrado que el té verde contiene varios componentes polifenólicos, también llamados taninos, tales como catequina, (-)-epicatequina (EC), (-)-galato de epicatequina (ECG), (-)-epigalocatequina (EGC), y (-)-galato de epigalocatequina (EGCG)², a los cuales se les atribuye esta actividad. (Estos componentes se muestran en la Figura 1).

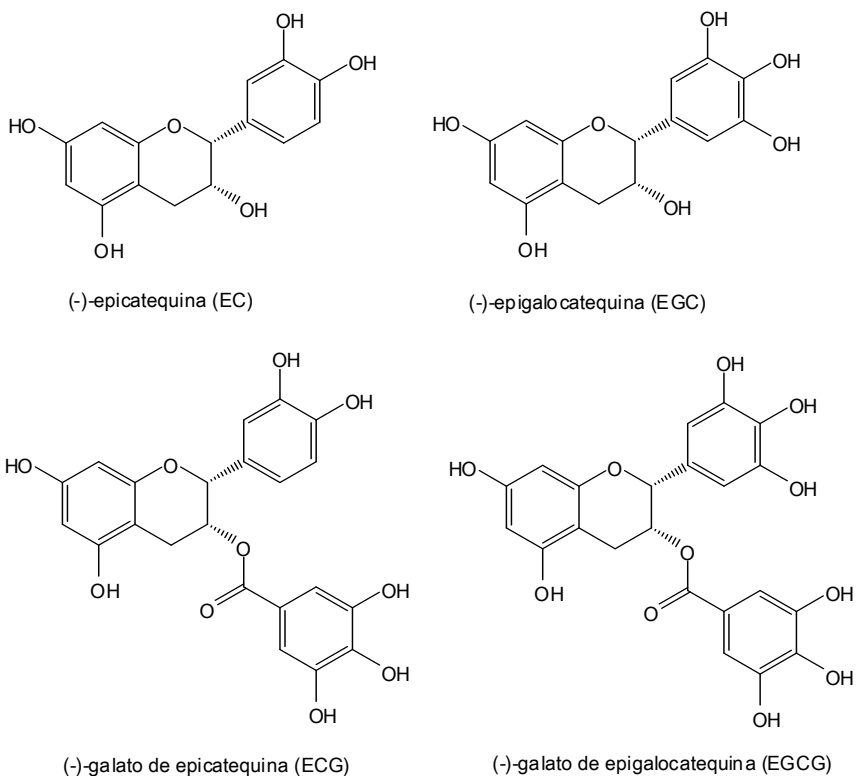


Figura 1. Compuestos polifenólicos del té verde

¹ (a) Nakachi, K.; Matsuyama, S.; Miyake, S.; Suganuma, M.; Imai, K. *Biofactors.*, **2000**, 13, 49.(b) Fujiki, H.; Suganuma, M.; Imai, K.; Nakachi, K. *Cancer Lett.*, **2002**, 188, 9.

² Okuda, T.; Mori, K.; Hatano, T. *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, 33, 1424.

EGCG, el principal constituyente del té verde, ha sido reportado como inhibidor del crecimiento y proliferación de varias líneas celulares de cáncer.³ Además, se han publicado estudios en donde los compuestos ECG y EGCG presentan una fuerte actividad inhibitoria del crecimiento en líneas celulares cancerosas de pulmón humano.⁴ Debido a que estos dos compuestos tienen en común el grupo galato en su estructura, se ha considerado que esta podría ser la razón de la actividad antiproliferativa.

El ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) es el compuesto fenólico que se obtiene de la hidrólisis de los constituyentes que se encuentran en el té verde.⁵ En la Figura 2 se observa la hidrólisis de ésteres del ácido gálico.

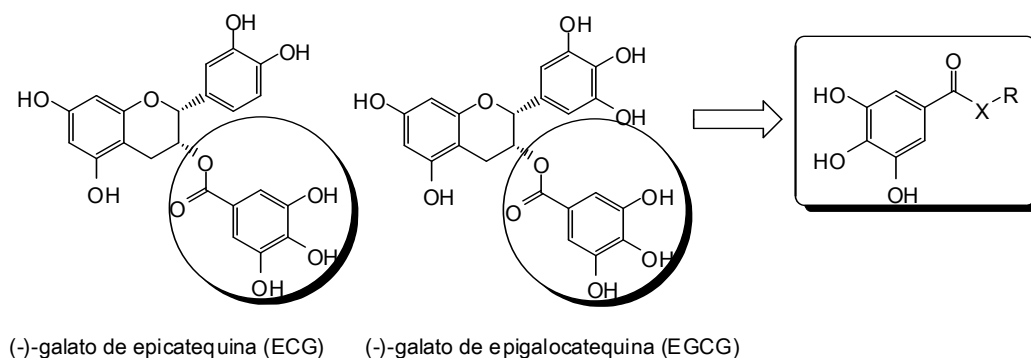


Figura 2. Obtención del ácido gálico de los compuestos del té verde

Algunos estudios han demostrado que el ácido gálico presenta actividades similares a las de sus precursores.⁶ Además, algunas investigaciones bioquímicas han reportado que el ácido gálico inhibe la actividad de la ornitina descarboxilasa,⁷ DNA polimerasa,⁸ ribonucleótido reductasa,⁹ etc. Sin embargo, estas inhibiciones son

³ Fujiki, H.; Okuda, T. *Drugs Future.*, **1992**, 17, 462.

⁴ Okabe, S.; Sukanuma, M.; Hayashi, M.; Sueoka, E.; Komori, A.; Fujiki, H. *Jpn. J. Cancer Res.*, **1997**, 88, 639.

⁵ Inoue, M., Suzuki, R., Sakaguchi, N., Li, Z., Takeda, T., Ogihara, Y., Jiang, B.Y., Chen, Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **1995**, 18, 1526–1530.

⁶ (a) Grichner T., Pospisil F., Veleminsky V., Volkeova V., Volke J., *Folia Microbiol.*, **1987**, 32, 55. (b) Mirvish S.S., Cardesa A., Wallcave L., Shubik P., *J. Natl. Cancer Inst.*, **1975**, 55, 633.

⁷ Gali H.U., Perchellet J.P., *Cancer Resp.*, **1991**, 51, 2820.

⁸ Parker W.B., Nishizawa M., Fisher M.H., Ye N., Lee K.H., Cheng Y.C., *Biochem. Pharmacol.*, **1989**, 38, 3759.

usualmente muchos menores que las provocadas por los taninos, ácido tánico o derivados del ácido gálico.¹⁰ Por ejemplo, para el caso de la actividad mutagénica, su eficacia fue comparable a la del ácido ascórbico, pero fue menos del 1 % de la actividad presentada por el ácido tánico.¹¹

Por otro lado, los ésteres derivados del ácido gálico, especialmente galato, octil y lauril galato son frecuentemente usados como aditivos antioxidantes para prevenir cambios en el sabor de la comida y en sus valores nutricionales, debido a la oxidación de grasas insaturadas.¹² Estos ésteres de alquilo también son usados como antioxidantes en la industria farmacéutica y cosmética. El carácter lipofílico de la cadena alquílica de los derivados del ácido gálico es importante en su potencia antioxidante.¹³ La estructura de la cadena alquílica es relevante para la antimutagenicidad y la inhibición de la expresión CYP1A,¹⁴ también para la inhibición genética del virus de tumor mamario de ratón,¹⁵ y para la inducción de apoptosis en células tumorales.¹⁶ El largo de la cadena alquílica lipofílica muestra tener un fuerte impacto en la afinidad a membranas por estos compuestos.^{14,17} Los ésteres de alquilo del ácido gálico presentan propiedades antivirales, antibacteriana y antifúngica,¹⁸ especialmente contra bacterias Gram-positivas.^{12,19} La actividad apoptótica también muestra dependencia de la parte hidrofóbica de la molécula.^{5,20} La citotoxicidad no es

⁹ Elford H.L., Wampler G.L., van't Riet B., *Cancer Res.*, **1979**, 39, 844.

¹⁰ (a) Sayer J. M., Yagi H., Wood A. W., Conney A. H., Jerina D. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 5562. (b) Okuda T., Kimura Y., Yoshida T., Hatano T., Okuda H., Arichi S., *Chem. Pharm. Bull.*, **1983**, 31, 1625.

¹¹ Huang M., Chang R.L., Wood A.W., Nwemark H.L., Sater J.M., Yagi H., Jerina D.M., Conney A.H., *Carcinogenesis*, **1985**, 6, 237.

¹² Kubo, I., Fujita, K., Nihei, K., *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 6692–6696

¹³ Nakayama, T., Hiramitsu, M., Osawa, T., Kawakishi, S., *Mutat. Res.* **1993**, 303, 29–34.

¹⁴ Feng, Q., Kumagai, T., Nakamura, Y., Uchida, K., Osawa, T., *Mutat. Res.*, **2003**, 537, 101–108.

¹⁵ Abe, I., Umehara, K., Morita, R., Nemoto, K., Degawa, M., Noguchi, H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2001**, 281, 122–125.

¹⁶ Roy, G., Lombardía, M., Palacios, C., Serrano, A., Cespón, C., Ortega, E., Eiras, P., Luján, S., Revilla, Y., González-Porqué, P., *Arch. Biochem. Biophys.*, **2000**, 383, 206–214.

¹⁷ Tammela, P., Laitinen, L., Galkin, A., Weennberg, T., Heczko, R., Vuorela, H., Slotte, J.P., Vuorela, P., *Arch. Biochem. Biophys.*, **2004**, 425, 193–199.

¹⁸ (a) Fujita, K., Kubo, I., *Int. J. Food Microbiol.*, **2002**, 79, 193–201. (b) Savi, L.A., Leal, P.C., Vieira, T.O., Rosso, R., Nunes, R.J., Yunes, R.A., Creczynski-Pasa, T.B., Barardi, C.R., Simoes, C.M., *Arzneimittelforschung* ., **2005**, 55, 66–75.

¹⁹ (a) Kubo, I., Fujita, K., Nihei, K., Masuoka, N., *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, 11, 573–580. (b) Kubo, I., Fujita, K., Nihei, K., Nihei, A., *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 1072–1076.

²⁰ (a) Sakagami, H., Satoh, K., Hatano, T., Yoshida, T., Okuda, T., *Anticancer Res.*, **1997**, 17, 377–380. (b) Sakaguchi, N., Inoue, M., Ogihara, Y., *Biochem. Pharmacol.*, **1998**, 55, 1973–1981. (c) Serrano, A., Palacios, C., Roy, G., Cespón, C., Villar, M.L., Nocito, M., González-Porqué, P., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1998**, 350, 49–54.

una característica común en los compuestos fenólicos, pero es una característica bastante específica del ácido gálico, donde los tres grupos hidroxilo fenólicos son responsables de la citotoxicidad, y el grupo carboxilo está presumiblemente implicado en la distinción entre células normales o cancerígenas.⁵ Por otro lado, aquellos galatos que tienen una cadena alquílica larga enlazada al grupo carboxilo son tóxicos para hepatocitos de rata, pero en concentraciones mayores a las que se encuentran en células tumorales. Al parecer la respiración mitocondrial es un blanco común de estos compuestos. En mitocondrias aisladas de hígado de rata, causan un incremento del consumo de oxígeno que es dependiente de la concentración, lo que indica un desacoplamiento parcial de la respiración celular.²¹ Además, se ha descrito que los galatos alquílicos inhiben la respiración de células tumorales TA3 y su variable resistente, en forma más efectiva que el ácido gálico.²²

Por lo tanto, los ésteres alquílicos del ácido gálico son muy interesantes debido a la actividad biológica que presentan, donde pueden llegar a ser una opción viable en la síntesis de compuestos de interés terapéutico.

²¹ (a) Nakagawa, Y., Tayama, S., *Arch. Toxicol.*, **1995**, 69, 204–208. (b) Nakagawa, Y., Nakajima, K., Tayama, S., Moldéus, P., *Mol. Pharmacol.*, **1995**, 47, 1021–1027. (c) Nakagawa, Y., Moldéus, P., Moore, G.A., *Toxicology.*, **1996**, 114, 135–145.

²² C.Frey., M. Pavanni., G. Cordano., S. Muñoz., E. Rivera., J. Medina., A. Morello., J. Diego Malla., J. Ferreira. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A.*, **2007**, 146, 520.

1.2.- Sales de fosfonio y su acción en la mitocondria.-

La mitocondria tiene muchos roles que son esenciales para la función y supervivencia celular.²³ La disfunción mitocondrial interrumpe la actividad de células, tejidos y órganos,^{23b,24} por lo tanto, no es de extrañar que el daño mitocondrial contribuya a una amplia gama de enfermedades incluyendo ataxia de Friedreich,²⁵ enfermedad de Parkinson,²⁶ diabetes,²⁷ enfermedad de Huntington,²⁸ desórdenes asociados con las mutaciones del DNA mitocondrial,²⁹ apoptosis deficiente en cáncer y enfermedades degenerativas,³⁰ y la fisiopatología del envejecimiento.³¹ A pesar de la prevalencia de la disfunción mitocondrial, no se han desarrollado terapias mitocondriales específicas, en parte debido a la dificultad para transportar moléculas terapéuticas a la mitocondria *in vivo*. Como un primer paso hacia este tipo de terapias, se desarrolló una estrategia para transportar moléculas bioactivas por medio de un enlace covalente con el catión trifenilfosfonio a través de una cadena alquílica.³² En la Figura 3 se muestra la captación de cationes en la mitocondria celular.

²³ (a) Scheffler, I.E., *Mitochondria*. Wiley-Liss, New York., **1999**. (b) Murphy, M.P., Smith, R.A.J *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2000**, 41, 235–250. (c) Nicholls, D.G., Ferguson, S.J., *Bioenergetics 3*. Academic Press, London., **2002**.

²⁴ (a) Wallace, D.C., *Science*, **1999**, 283, 1482–1488. (b) Leonard, J.V., Schapira, A.H., *Lancet*, **2000**, 355, 299–304. (c) Leonard, J.V., Schapira, A.H., *Lancet*, **2000**, 355, 389–394. (d) Smeitink, J., van den Heuvel, L., DiMauro, S., *Nat. Rev. Genet.*, **2001**, 2, 342–352.

²⁵ (a) Puccio, H., Simon, D., Cossee, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P. & Koenig, M., *Nat. Genet.*, **2001**, 27, 181–186. (b) Kaplan, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1999**, 96, 10948–10949.

²⁶ Schapira, A. H., Mann, V. M., Cooper, J. M., Krige, D., Jenner, P. J. & Marsden, C. D., *Ann. Neurol.*, **1992**, 32, S116–S124.

²⁷ Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S.-I., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M. A., Beebe, D., Oates, P. J., Hammes, H.-P., *et al.*, *Nature*, **2000**, 404, 787–790.

²⁸ Tabrizi, S. J., Workman, J., Hart, P. E., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G., Cooper, J. M. & Schapira, A. H., *Ann. Neurol.*, **2000**, 47, 80–86.

²⁹ (a) Pitkanen, S. & Robinson, B. H. (1996) *J. Clin. Invest.*, **1998**, 345–351. (b) Wallace, D. C., *Science*, **1999**, 283, 1482–1488.

³⁰ Kroemer, G., Dallaporta, B. & Resche-Rignon, M., *Annu. Rev. Physiol.*, **1998**, 60, 619–642.

³¹ (a) Beckman, K. B. & Ames, B. N., *Physiol. Rev.*, **1998**, 78, 547–581. (b) Raha, S. & Robinson, B. H., *Trends Biochem. Sci.*, **2000**, 25, 502–508. (c) Ames, B. N., Shigenaga, M. K. & Hagen, T. M., *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, 1271, 165–170.

³² (a) Murphy, M. P., *Trends Biotechnol.*, **1997**, 15, 326–330. (b) Murphy, M. P. & Smith, R. A. J., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2000**, 41, 235–250. (c) Kelso, G. F., Porteous, C. M., Coulter, C. V., Hughes, G., Porteous, W. K., Ledgerwood, E. C., Smith, R. A. J. & Murphy, M. P., *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 4588–4596.

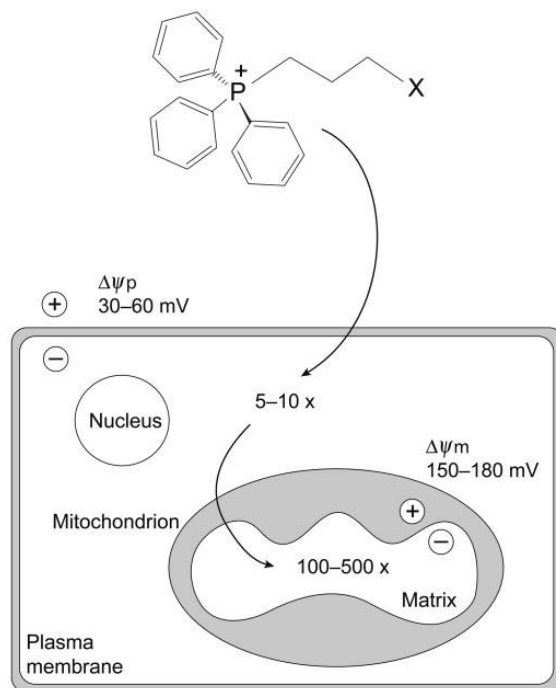


Figura 3. Captación de cationes trifenílfosfonio de alquilo por la mitocondria

La carga positiva deslocalizada en estos cationes lipofílicos les permite penetrar fácilmente las bicapas lipídicas y acumularse dentro de la mitocondria, debido al gran potencial de membrana (-150 a -170 mV, negativo en el interior).^{32a,33} Además, el potencial de membrana plasmática (-30 a -60 mV, negativo en el interior) también conduce a la acumulación de estas moléculas desde el medio extracelular en células aisladas, produciendo que se concentren aún mas dentro de la mitocondria, donde los cationes lipofílicos intracelulares están presentes en porcentajes mayores al 90%.³⁴ Esta captación selectiva debería incrementar favorablemente la eficacia y especificidad de moléculas diseñadas para interactuar con la mitocondria, mientras que también deberían disminuir las reacciones laterales dañinas.^{32b}

³³ Liberman, E. A., Topali, V. P., Tsofina, L. M., Jasaitis, A. A. & Skulachev, V. P., *Nature.*, **1969**, 222, 1076–1078.

³⁴ (a) Berry, M. N., Edwards, A. M., Barrit, G. J., Grivell, M. B., Halls, H. J., Gannon, B. J. & Friend, D. S., in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, eds. Burdon, R. H. & van Knippenberg, P. H. (Elsevier, Amsterdam), **1991**, Vol. 21, pp. 386–390. (b) Burns, R. J. & Murphy, M. P., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1997**, 339, 33–39.

Si estas moléculas dirigidas a la mitocondria han de tener potencial terapéutico, deberían ser captadas selectivamente por la mitocondria *in vivo*. En particular, estos compuestos deberían acumularse en concentraciones terapéuticamente efectivas en los órganos más afectados por disfunciones mitocondriales, como son; el corazón, músculo esquelético y el cerebro.^{29b,35} Debido a que los cationes alquiltrifenilfosfonio pasan fácilmente a través de la bicapa lipídica sin necesidad de un transportador, estos deberían ser captados por la mitocondria en todos los tejidos, a diferencia de los compuestos hidrofílicos que se basan en la expresión específica de tejidos de transportadores para la captación. Confirmando esto, el catión metil trifenilfosfonio (TPMP) es captado por la mitocondria dentro del corazón perfundido,³⁶ hígado,³⁷ y músculo esquelético.³⁸ En consecuencia, una vez que estas moléculas entran al torrente sanguíneo deberían acumularse dentro de las mitocondrias de todos los tejidos. Además, es de particular relevancia para enfermedades neurodegenerativas, que el paso directo de cationes lipofílicos a través de bicapas lipídicas les permita a estas moléculas atravesar la barrera hematoencefálica y acumularse en las mitocondrias del cerebro. Sin embargo, se conoce muy poco acerca de la captación, distribución en los tejidos, y del metabolismo de los cationes trifenilfosfonio *in vivo*, o si estos pueden atravesar la barrera hematoencefálica.

Un estudio ha demostrado que compuestos dirigidos a la mitocondria, por medio de la incorporación de los cationes trifenilfosfonio, pueden ser captados en los tejidos de cerebro, corazón, hígado, y músculo en ratones por simple administración oral.³⁹ Esto viene a corroborar lo anteriormente expuesto y puede ayudar en el desarrollo de nuevos compuestos como posibles terapias para las enfermedades asociadas con la disfunción mitocondrial. Por último, puede ser una herramienta para revelar como el daño mitocondrial contribuye a las enfermedades humanas.

³⁵ Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. & Ames, B. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1994**, 91, 19771–19778.

³⁶ (a) Kauppinen, R., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1983**, 725, 131–137. (b) Fukuda, H., Syrota, A., Charbonneau, P., Vallois, J., Crouzel, M., Prenant, C., Sastre, J. & Crouzel, C., *Eur. J. Nucl. Med.*, **1986**, 11, 478–483. (c) Wan, B., Doumen, C., Duszynski, J., Salama, G. & LaNoue, K. F., *Am. J. Physiol.*, **1993**, 265, H445–H452.

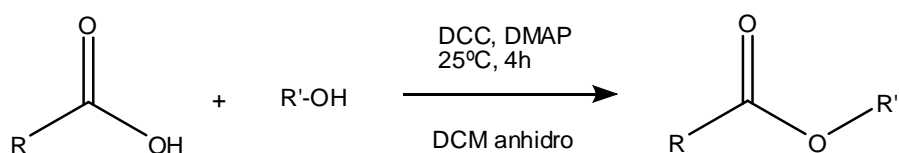
³⁷ Steen, H., Maring, J. G. & Meijer, D. K., *Biochem. Pharmacol.*, **1993**, 45, 809–818.

³⁸ (a) Rolfe, D. F. S., Newman, J. M., Buckingham, J. A., Clark, M. G. & Brand, M. D., *Am. J. Physiol.*, **1999**, 276, C692–C699. (b) Rolfe, D. F. S. & Brand, M. D., *Am. J. Physiol.*, **1996**, 271, C1380–C1389. (c) Rolfe, D. F. S. & Brand, M. D., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1996**, 1276, 45–50.

³⁹ Smith, R.A.J., Porteous, C.M., Gane, A.M., Murphy, M.P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2003**, 100, 5407–5412.

1.3.- Reacción de esterificación de Steglich.-⁴⁰

Esta reacción es un método conveniente para la esterificación de ácidos carboxílicos con alcoholes⁴¹ y tioles^{41a} bajo condiciones suaves. En el siguiente esquema se muestran las condiciones de reacción.



Esquema 1. Esterificación de Steglich

Este procedimiento depende de la alta eficiencia de la 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizador nucleofílico en reacciones de transferencia de grupo.⁴² La esterificación procede sin la necesidad de un derivado de ácido carboxílico activado presintetizado, a temperatura ambiente, bajo condiciones levemente básicas. Además del diclorometano (DCM) pueden ser usados otros solventes apróticos de polaridad comparable como el dietiléter, tetrahydrofurano, y acetonitrilo. La reacción puede ser aplicada a una amplia variedad de ácidos y alcoholes, incluyendo poli alcoholes,^{41a,41c,43} ésteres ácidos α -hidroxicarboxílicos,⁴⁴ e incluso alcoholes lábiles muy ácidos como la vitamina A.⁴⁵ También el método dicitclohexilcarbodiimida (DCC)/4-dimetilaminopiridina (DMAP) es muy conveniente para la síntesis de una amplia variedad de ésteres tioólicos.^{41a,46} En este caso se libera dicitclohexilurea (DCU). A continuación se presenta el mecanismo propuesto.^{41a}

⁴⁰ *Organic Syntheses*, Coll., **1990**, 7, 93.

⁴¹ (a) Neises, B.; Steglich, W. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1978**, 17, 522; *Angew. Chem.*, **1978**, 90, 556 (b) Hassner, A.; Alexanian, V. *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 4475. (c) Ziegler, F. E.; Berger, G. D. *Synth. Commun.*, **1979**, 9, 539

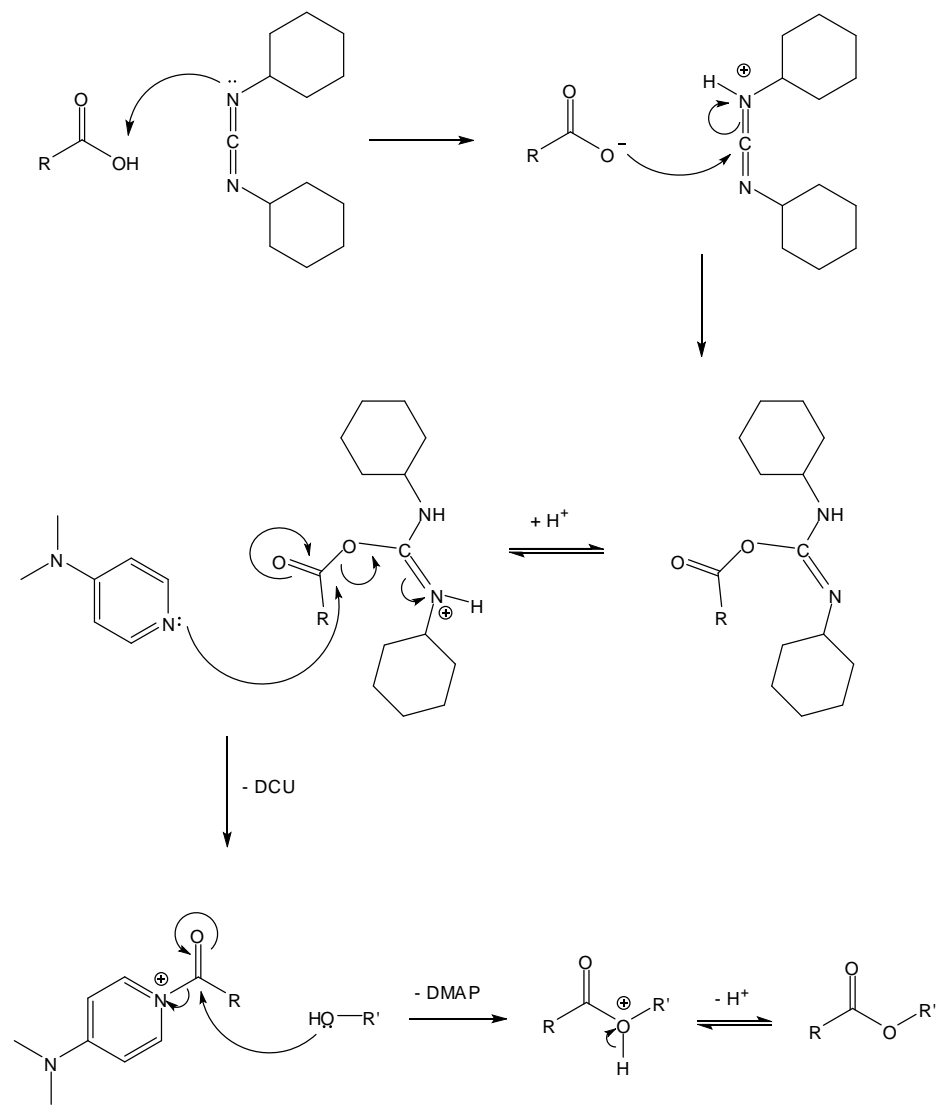
⁴² Steglich, W.; Höfle, G. *Angew. Chem., Inter. Ed. Engl.*, **1969**, 8, 981; *Angew. Chem.*, **1969**, 81, 1001; Höfle, G.; Steglich, W. *Synthesis.*, **1972**, 619; Höfle, G.; Steglich, W.; Vorbrüggen, H. *Angew. Chem., Inter. Ed. Engl.*, **1978**, 17, 569; *Angew. Chem.*, **1978**, 90, 602; Hassner, A.; Krepski, L. R.; Alexanian, V. *Tetrahedron.*, **1978**, 34, 2069.

⁴³ Zinic, M.; Bosnic-Kasnar, B.; Kolbah, D. *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 1365.

⁴⁴ Gilon, Ch.; Klausner, Y.; Hassner, A. *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 3811.

⁴⁵ Niewöhner, U.; Steglich, W., unpublished results.

⁴⁶ Neises, B.; Steglich, W.; van Ree, T. S. *Afr. J. Chem.*, **1981**, 34, 58.



Esquema 2. Mecanismo esterificación de Steglich

1.4.- Ensayos biológicos.-

Para medir la actividad biológica de los compuestos de interés, generalmente se realizan dos tipos de pruebas: viabilidad y respiración celular.

La viabilidad celular; se realiza principalmente por el ensayo de reducción enzimática de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).⁴⁷ El MTT es captado por las células y reducido enzimáticamente a su forma insoluble, produciendo cristales de formazán. Estos cristales quedan retenidos en las células y pueden ser liberados mediante la solubilización de las mismas. De esta forma, es cuantificada la cantidad de MTT reducido utilizando métodos colorimétricos, ya que como consecuencia de la reacción se produce un cambio en la coloración del amarillo al azul.⁴⁸

La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazán después de su exposición a un compuesto de interés, permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se está evaluando.⁴⁹ Por lo tanto, la cantidad de células vivas será proporcional a la cantidad de formazán producido.

Los resultados de este test dan cuenta de la toxicidad y se expresa como la concentración del compuesto evaluado a la que se inhibe el 50% del crecimiento celular (IC₅₀), que se obtiene de la curva dosis versus respuesta.

Por otro lado, la respiración celular se determina cuantificando el consumo de oxígeno en preparados de células o mitocondrias. Esta cuantificación se realiza principalmente utilizando métodos polarográficos con un electrodo de oxígeno. De esta forma se determina la inhibición de la respiración celular al adicionar el compuesto de

⁴⁷ Fentem J.H. The use of human tissues in vitro toxicology, Summary of general discussions. *Human Experimental Toxicology.*, **1994**, 13 (2),445-449.

⁴⁸ Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer B.J, Boobis A., *Food Chem Toxicol .*, **2002**; 40(2),193-236.

⁴⁹ Jiménez N, González M, Fernández C, López J., *Biomecánica.*, **2007**, 15 (1), 63-71.

interés a la mezcla de reacción. De la curva dosis versus respuesta se obtiene el IC₅₀, que en este caso corresponderá a la concentración del compuesto a la que se inhibe el 50 % del consumo de oxígeno.

2. OBJETIVOS

2.1.- Objetivo General.-

Sintetizar sales de fosfonio derivadas del ácido gálico

2.1.- Objetivos Específicos.-

- Sintetizar compuestos derivados del ácido gálico portadores de cationes trifenilfosfonio para la obtención de productos biológicamente activos.
- Proponer diferentes rutas de síntesis de los compuestos anteriormente descritos y determinar la mejor estrategia de reacción.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1.- Síntesis.-

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H fueron realizados a 300 MHz en un espectrómetro Bruker AVANCE DRX 300, usando CDCl₃ o DMSO-d₆ como solvente. Los desplazamientos químicos están reportados en ppm con respecto al tetrametilsilano (TMS) usado como estándar interno, para ¹H RMN. Todos los solventes usados fueron tratados de acuerdo con los procedimientos estándares. Se utilizaron columnas cromatográficas con gel de sílice para cromatografía flash como fase estacionaria. Los espectros de los productos nuevos se encuentran al final en anexos.

3.1.1- 3,4,5-tris(benziloxi)benzoato de metilo (**1**)

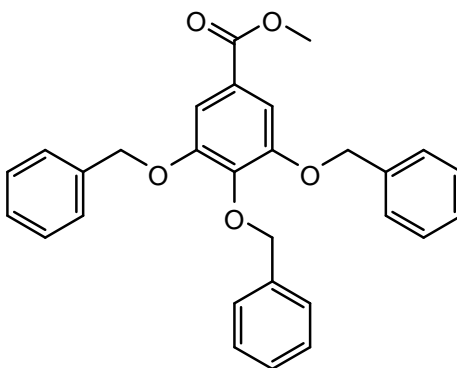


Figura 4. 3,4,5-tris(benziloxi)benzoato de metilo

A una solución de 3,4,5-trihidroxibenzoato de metilo (1 g; 5,43 mmol) y K_2CO_3 (2,49 g; 18,1 mmol) en DMF, se le adicionó bromuro de bencilo (2,78 g; 16,29 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 24 hrs. Posteriormente, se agregó agua y se extrajo 3 veces con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera, fue secada sobre $MgSO_4$, y filtrada. Se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando una mezcla de hexano y acetato de etilo (5:1) como eluyente. Posteriormente se eliminó el solvente a presión reducida obteniendo 1.2 g del compuesto **1**, con un 48 % de rendimiento.

1H NMR: (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.43-7.25 (m, 17H, Ar-H); 5.28 (s, 2H, CH_2 -Ar); 5.13 (s, 4H, CH_2 -Ar); 4.63 (s, 3H, O- CH_3)

3.1.2.- Ácido 3,4,5-tris(benziloxi)benzoico (2)

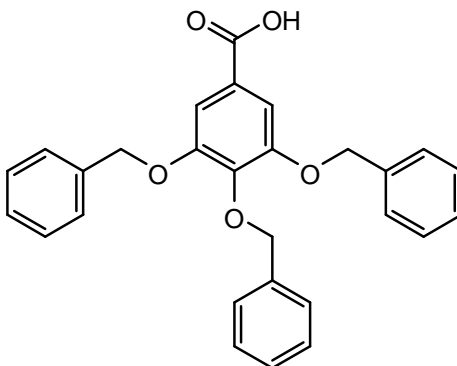


Figura 5. Ácido 3,4,5-tris(benziloxi) benzoico

A una solución del compuesto 1 (1 g; 2,20 mmol) en MeOH (10 mL), dioxano (20 mL) y H₂O (4 mL), se le agregó NaOH (0,2 g; 5 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a ebullición durante 6 hrs a 120 °C y luego se evaporó el solvente. Al residuo se le adicionó agua y se extrajo 3 veces con acetato de etilo. La fase orgánica fue lavada con salmuera, y se secó sobre MgSO₄. Posteriormente se filtró y se eliminó el solvente a presión reducida obteniendo 0.9 g del compuesto 2, con un 92,8 % de rendimiento.

¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 7.43-7.25 (m, 17H, Ar-H); 5.28 (s, 2H, CH₂-Ar); 5.13 (s, 4H, CH₂-Ar)

3.1.3.- Bromuro de (11-hidroxiundecil)trifenilfosfonio (3)

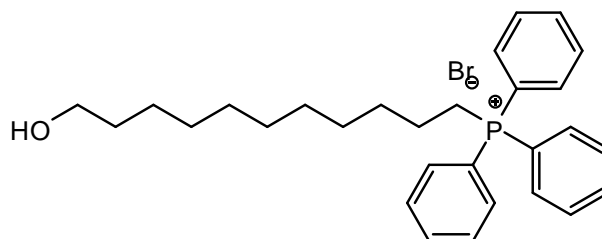


Figura 6. Bromuro de (11-hidroxiundecil)trifenilfosfonio

A una solución de 11-bromoundecan-1-ol (3 g; 11,9 mmol) en benceno se le adicionó trifenilfosfina (3,1 g; 11,9 mmol) y se reflujo a 100 °C por aproximadamente 24 hrs. Se observó la aparición de una segunda fase más densa. Posteriormente se evaporó el solvente a presión reducida, y el residuo denso se lavó con éter de petróleo frío agitando continuamente con una bagueta hasta la solidificación. El sólido se filtró al vacío obteniendo 2.1 g del compuesto 3. Rendimiento de un 34,2 %.

$^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ 7.91-7.67 (m, 15H, Ar-H); 3.87 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{Ph})_3$); 3.62 (t, 2H, CH_2-OH); δ 1.63-1.22 (m, 18H, $-\text{CH}_2-$)

3.1.4.- Bromuro de (11-(3,4,5-tris(benziloxi)benzoiloxi)undecil)trifenilfosfonio (**4**)

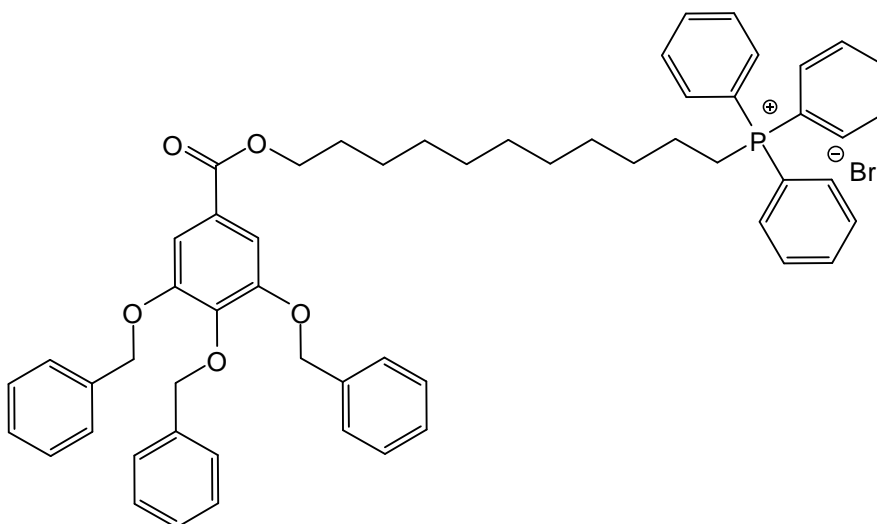


Figura 7. Bromuro de (11-(3,4,5-tris(benziloxi)benzoiloxi)undecil)trifenilfosfonio

Se tomó 1 g (2,27 mmol) del compuesto **2** y se refluxó en un exceso de cloruro de tionilo durante 4 hrs aproximadamente. Posteriormente se eliminó el exceso de cloruro de tionilo a presión reducida y el sólido obtenido se mantuvo en atmósfera inerte de N₂. Se le agregó K₂CO₃ (0,31 g; 2,27 mmol) y 1,16 g (2,27 mmol) de bromuro de (11-hidroxiundecil)trifenilfosfonio (**3**) en acetonitrilo anhidro suficiente bajo atmósfera inerte de N₂. La mezcla de reacción se agitó durante 24 hrs a temperatura ambiente. Luego se eliminó el solvente a presión reducida, al residuo se le añadió agua destilada y se extrajo 3 veces con diclorometano. La fase orgánica fue lavada con salmuera, y se secó sobre MgSO₄. El producto de la reacción se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando una mezcla de acetato de etilo y metanol (4:1) obteniendo 0.8 g del compuesto **4**. Rendimiento de un 37.2 %.

¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 7.89-7.66 (m, 20H, Ar-H); δ 7.46-7.32 (m, 12H, Ar-H); δ 5.17 (s, 2H, CH₂-Ar); 5.13 (s, 2H, CH₂-Ar); 5.11 (s, 2H, CH₂-Ar); 4.26 (t, 2H, O-CH₂-); 3.83 (m, 2H, -CH₂-P(Ph)₃); δ 1.77-1.14 (m, 18H, -CH₂-)

3.1.5.- Bromuro de (11-(3,4,5-trihidroxibenzoiloxi)undecil)trifenilfosfonio (**5**)

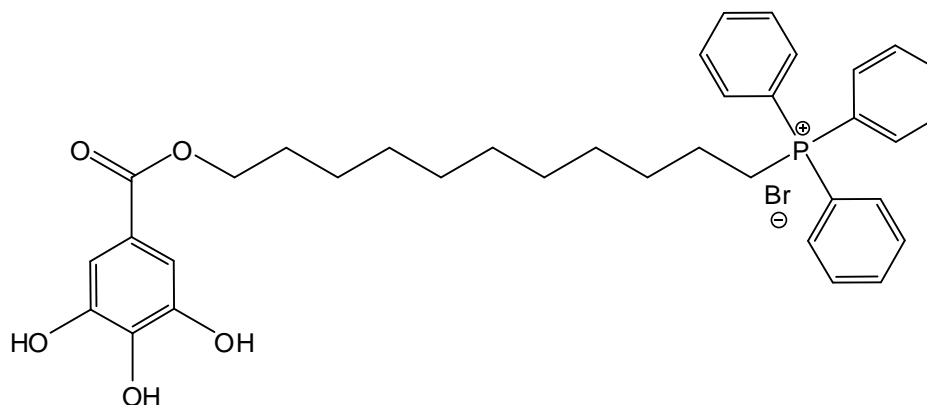


Figura 8. Bromuro de (11-(3,4,5-trihidroxibenzoiloxi)undecil)trifenilfosfonio

A una solución del ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (0,16 g; 0,97 mmol) en DMF anhidro, atmósfera inerte de N_2 , y a 0 °C, se le adicionó en primer lugar dicitclohexilcarbodiimida (0,61 g; 0,97 mmol), luego se le agregó 4-dimetilaminopiridina (0,37 g; 0,97 mmol), y por último se agregó 0,5 g (0,97 mmol) de bromuro de (11-hidroxiundecil)trifenilfosfonio (**3**). La reacción se mantuvo a 0 °C durante 5 minutos y luego a temperatura ambiente durante 7 hrs. Se observó la aparición de un precipitado que corresponde a la dicitclohexilurea (DCU). La solución es filtrada al vacío y luego el solvente es removido a presión reducida. Se adicionó diclorometano (20 mL), la fase orgánica se lava primero con 10 mL de una solución 0,5 N de HCl y luego con solución saturada de carbonato de sodio. Durante este proceso podría precipitar más DCU la cual es removida por filtración al vacío. El producto de reacción se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando una mezcla de acetato de etilo y metanol (2:1) obteniendo 0,03 g del compuesto **5**. Rendimiento de un 4.7 %.

1H NMR: (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.90-7.64 (m, 17H, Ar-H); 3.74 (m, 2H, $-CH_2-P(Ph)_3$); 3.61 (t, 2H, O- CH_2 -); δ 1.69-1.13 (m, 18H, $-CH_2$ -)

3.2.- Ensayos biológicos.-

3.2.1.- Material biológico.-

Línea celular tumoral TA3 (adenocarcinoma mamario de ratón) se obtuvo de ratones machos jóvenes de la cepa CAF-1 JAX.

3.2.2.- Propagación de la línea tumoral.-

Las células tumorales se propagaron en forma de tumor ascítico semanalmente en ratones machos, mediante la inoculación por vía intraperitoneal de $1 \times 10^6/0,1$ mL suero fisiológico de células del carcinoma TA3. Por otro lado, se inocularon $2 \times 10^6/0,1$ mL suero fisiológico de células de la sublínea TA3-MTX-R.

3.2.3.- Obtención de células tumorales.-

Después de 5-6 días de haber inoculado la suspensión celular en el espacio peritoneal (1×10^6 células), los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y luego de una incisión abdominal se extrae el fluido ascítico. Los fluidos ascíticos son filtrados a través de una gasa. La cavidad peritoneal fue lavada con medio Tris el que contenía: NaCl 150 mM, KCl 5 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 a una temperatura entre 0 - 4 °C. Los lavados realizados anteriormente fueron agregados al fluido ascítico filtrado. La separación de las células se realizó por centrifugación a 270 x g por 5 minutos a una temperatura de 0 – 4 °C y el sobrenadante se descartó por aspiración, según el método de Moreadith y Fiskum.⁵⁰ Las células se resuspendieron nuevamente en el mismo medio y se centrifugaron bajo las mismas condiciones, este proceso se realizó dos o tres veces, hasta remover la contaminación por eritrocitos. Cuando las células se encontraron aptas para su uso, se resuspendieron y diluyeron en un volumen adecuado, del medio anteriormente mencionado, para obtener una concentración entre 30-35 mg de proteína/mL.

⁵⁰ Moreadith, R.W. and Fiskum, G., *Analytical Biochemistry.*, 1984, 137, 360-367.

3.2.4.- Preparación de la fracción mitocondrial de células tumorales.-

Las mitocondrias de las células tumorales se prepararon de acuerdo al método descrito por Moreadith y Fiskum.⁵⁰ La suspensión celular obtenida en el paso anterior se resuspendió en medio H1; el que contenía: manitol 0,21 M, sacarosa 0,07 M, Hepes 0,005 M, albúmina 0,5 % p/v, EGTA 0,001 M, a pH 7.4 y a una temperatura de 0–4 °C hasta un volumen aproximado de 30 mL. Se adicionó 0,3 mL de una disolución de digitonina 10% (p/v) en DMSO y se agitó suavemente con la ayuda de una bagueta de vidrio, luego el volumen obtenido de suspensión celular se aumentó al doble adicionando medio H1. Posteriormente se centrifugó a 3000 x g durante 3 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el centrifugado para procesarlo en un homogenizador de vidrio teflón a 1,500 rpm con un máximo de 15 pasos. Las células no rotas y los núcleos resultantes se removieron por centrifugación a 500 x g por 10 minutos. El sobrenadante se almacenó en un tubo de centrifugación inserto en hielo, mientras que el centrifugado se resuspendió, homogeneizó y centrifugó nuevamente en las mismas condiciones descritas, para luego reunir ambos sobrenadantes y ser sometidos a centrifugación a 270 x g durante 10 minutos. El centrifugado obtenido se descartó mientras que el sobrenadante se sometió nuevamente a centrifugación, pero esta vez a 10500 x g durante 10 minutos para obtener la fracción mitocondrial. El centrifugado obtenido de esta centrifugación es resuspendido en Medio H1 sin EGTA y sin albúmina (medio H1 de suspensión) y es centrifugado a 9750 x g por 12 minutos. Se vuelve a realizar el proceso anterior y finalmente el centrifugado se resuspende en 1 mL de Medio H1 de suspensión. Se realizó determinación de proteínas por medio del método biuret a la suspensión mitocondrial obtenida.

3.2.5.- Medición de la concentración de proteínas.-

Se determinó la concentración de proteínas mediante el método del Biuret.⁵¹ El medio de reacción consistió en un volumen determinado de células o mitocondrias

⁵¹ Gornall, A.G., Bardawill, Ch.J., y David, M.M., *J . Biol . Chem.*, **1949.**, 177, 751-766.

(50 μ L), 0,2 mL de colato de sodio al 4 %, 2,5 mL de NaOH al 10 %, 0,3 mL de CuSO_4 al 1 %. Luego de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente se midió en un espectrofotómetro la absorbancia del complejo de color azul a 540 nm. La concentración de proteínas se calculó en base de una curva patrón de albúmina.

3.2.6.- Viabilidad en células de cultivo.-

Las líneas celular utilizada fue TA3, la cual se cultivó en medio líquido, de acuerdo al método descrito por Fones y col.⁵² El medio empleado fue DMEM, complementado con glucosa 4,5 g/L, Hepes 5,96 g/L, bicarbonato de sodio 2 g/L, penicilina 100 UI/mL, estreptomycin 100 μ g/mL y 10 % de SBF a 37 °C, pH 7.0 y 5 % CO_2 . Las células se llevaron a una concentración de 1×10^5 células/ml y se sembraron 100 μ L por pocillo. Se adicionó la droga a 6 diferentes concentraciones y se midió la viabilidad cada 24 hrs (24, 48 y 72 hrs) mediante la reacción colorimétrica de MTT (color verde) a formazán (color violeta). La lectura de las placas se realizó a 570 nm, determinando el porcentaje de sobrevivencia en base al crecimiento celular control.

3.2.7.- Medición del consumo de oxígeno.-

El consumo de oxígeno se midió polarográficamente con un electrodo de Clark conectado a un oxígrafo o monitor de oxígeno YSI 5300, instalado en una celda de 600 μ L termorregulada a 25 °C. La señal fue amplificada y se registró las variaciones de la concentración de oxígeno en un inscriptor modelo 6012 B-1 Linseis. Para calibrar el electrodo a 95 %, se utilizó una solución saturada con aire como patrón. En el medio de respiración la solubilidad del oxígeno del aire a 25 °C y a 718 mmHg de presión atmosférica en 600 μ L es 287.4 nmoles de O.

⁵² Fones, E., Amigo, H., Gallegos, K., Guerrero, A., Ferreira, J., *Biochem. Pharmacol.*, **1989**, 38, 3443–3451.

3.2.8.- Consumo de oxígeno en células tumorales.-

Como medio de respiración se uso la misma solución de lavado descrita para la obtención de células tumorales. Como sustrato se utilizó glutamina 5 mM. El consumo de oxígeno se empezó a registrar al agregar una alícuota de 1,5 mg de proteína celular, y se registró hasta que se consumió todo el oxígeno del medio. Esta medición corresponde al control o 0 % inhibición sobre el consumo de oxígeno.

Para determinar el efecto sobre el consumo de oxígeno de las diferentes drogas se adicionó una alícuota de proteínas similar al control y la misma concentración de glutamina. Cuando se consumió alrededor de un 20 % del oxígeno se agregaron las drogas a diferentes concentraciones, determinándose el grado de inhibición por comparación a la medición control.

Los registros se realizaron en ausencia y presencia de CCCP 0,14 μ M (TA3) y 0,28 μ M (TA3 MTX R) para lograr el máximo efecto desacoplante. Este fue agregado cuando se consumió aproximadamente un 15 % del oxígeno.

3.2.9.- Consumo de oxígeno mitocondrial.-

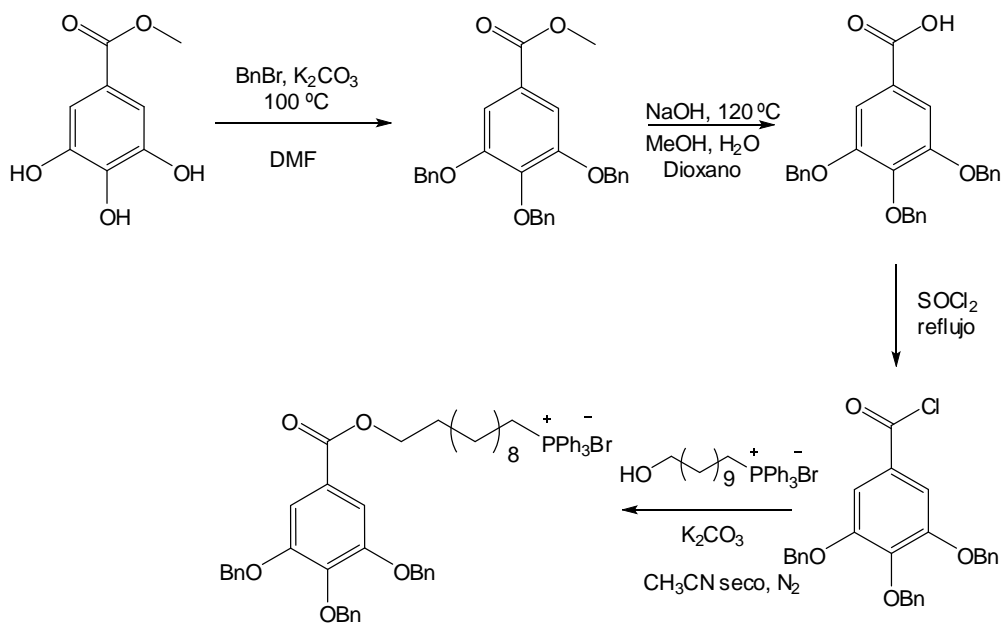
El medio de respiración mitocondrial contenía sacarosa 200 mM, KCl 50 mM, KH_2PO_4 3 mM, MgCl_2 2 mM, EGTA 0,5 mM y HEPES 3 mM a pH 7,4 a 25 °C.

Como sustrato se utilizó una mezcla de Glutamato 0,5 mM + Malato 0,5 mM. Se realiza una medición control sobre el consumo de oxígeno con alícuota de 1 mg de proteína mitocondrial a la cual se le añadió ADP 0,5 μ M y se registró hasta que se consumió todo el oxígeno del medio. A través de esta medición control podemos verificar que las mitocondrias no se encuentran dañadas o desacopladas.

Para determinar el efecto sobre el consumo de oxígeno de las diferentes drogas se adiciona una alícuota de proteínas similar al control. Cuando se consumió alrededor de un 20 % del oxígeno se agregaron las drogas a diferentes concentraciones.

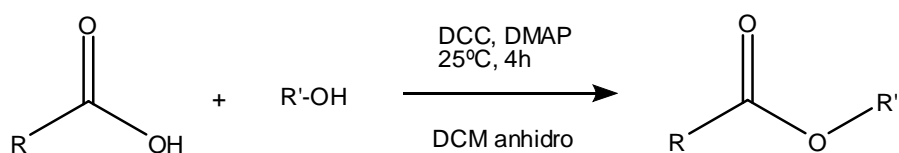
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la síntesis de sales de fosfonio derivadas del ácido gálico propuestas en esta Memoria se utilizaron dos posibles rutas de síntesis. La primera correspondió a la esterificación del ácido gálico con un bromo alcohol, para posteriormente formar la sal de fosfonio respectiva. La segunda ruta, consistió en formar la sal de fosfonio a partir del bromo alcohol, y finalmente esterificar con el ácido gálico. Sin embargo, para la primera ruta propuesta, se tenía información de que la reacción de formación de la sal de fosfonio con el bromo éster derivado del ácido gálico no daba los resultados esperados, lo que más adelante se corroboró en el laboratorio. Por otro lado, en ambas rutas, en la reacción de esterificación del ácido gálico los grupos hidroxilos podrían interferir en la síntesis, en ambas rutas, ya sea por esterificación de Steglich o por la vía de la formación del haluro de acilo correspondiente. Finalmente se decidió seguir la siguiente ruta de síntesis (Esquema 3):



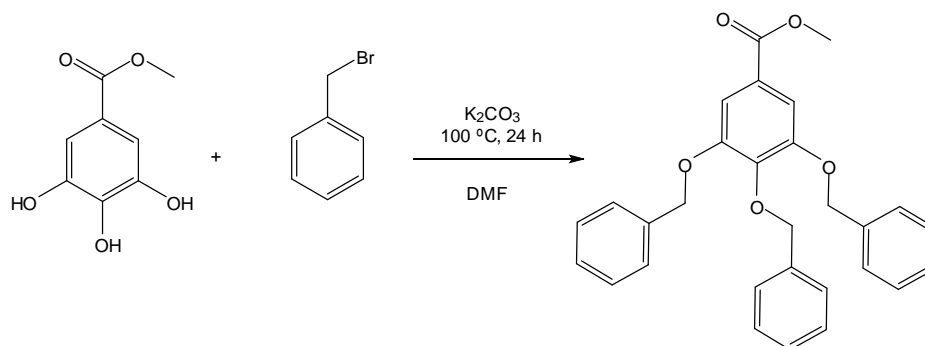
Esquema 3. Ruta de síntesis

Para obtener el compuesto final, el bromuro de (11-(3,4,5-trihidroxibenzoiloxi)undecil)trifenilfosfonio (**5**), se utilizó una hidrogenación catalizada por paladio-carbono. Sin embargo esta reacción no dio el resultado esperado, en donde a pesar de incrementar la presión hasta 30 bar, no hubo producto en absoluto. Por ende se realizó la esterificación a través del método de Steglich utilizando el ácido gálico como reactivo de partida. En el siguiente esquema se muestra la reacción general de Steglich.



Esquema 1. Esterificación de Steglich

4.1.- Bencilación de 3,4,5-trihidroxibenzoato de metilo.-



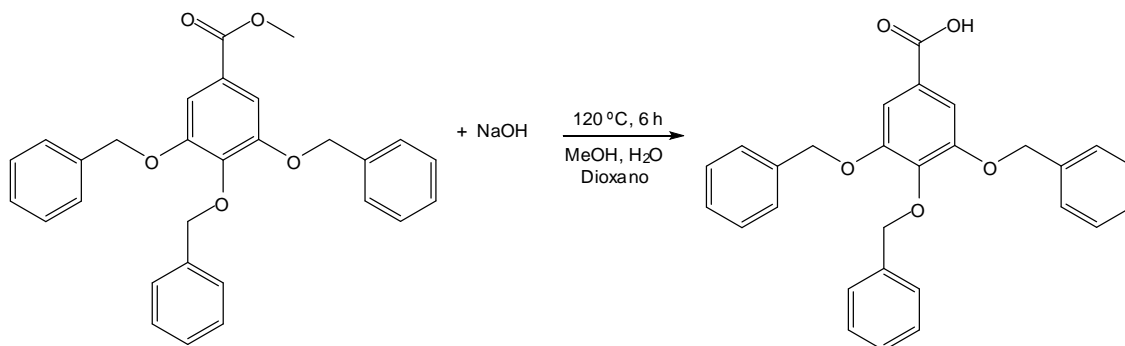
Esquema 4. Reacción de bencilación del 3,4,5-trihidroxibenzoato de metilo

La protección de los hidroxilos fenólicos se realizó utilizando bromuro de bencilo en presencia de carbonato de potasio, a 100 °C por 24 hrs, y utilizando como solvente dimetilformamida (DMF). Esta reacción de protección se realizó debido a que los grupos OH presentes en el anillo aromático podrían competir en la esterificación del

ácido gálico con el alcohol correspondiente, produciendo una doble esterificación para formar un compuesto cíclico entre dos moléculas de ácido gálico.

La reacción se siguió por cromatografía en placa fina donde se observó que después de 24 horas no se formó más producto. Se obtuvieron dos productos principales de polaridad similar, que se lograron separar, aunque no completamente, por cromatografía en columna flash con gel de sílice utilizando una mezcla de hexano y acetato de etilo (6:1). El producto deseado correspondió al de mayor *rf*. El rendimiento de la reacción, un 48 %, fue más bajo de lo esperado. Esto se puede explicar por la formación de dos productos principales de reacción y también debido a que la separación no fue completamente eficiente.

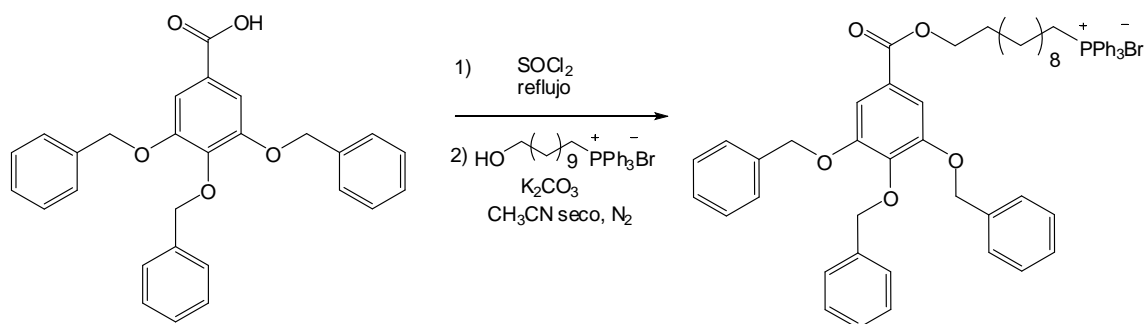
4.2.- Saponificación del 3,4,5-tris(benziloxi)benzoato de metilo (1).-



Esquema 5. Saponificación del 3,4,5-tris(benziloxi)benzoato de metilo

La reacción de saponificación se realizó utilizando hidróxido de sodio en una mezcla de metanol, dioxano y agua destilada. Se calentó a reflujo a 120 °C durante 6 horas y por seguimiento en cromatografía en placa fina se observó un solo producto de reacción correspondiente al ácido carboxílico deseado, obteniendo un rendimiento bastante bueno de un 93 %. El utilizar dioxano en la mezcla de solventes de reacción permitió que ésta se realizara en una fase homogénea.

4.3.- Esterificación del Ácido 3,4,5-tris(benziloxi)benzoico (2)-



Esquema 6. Esterificación del Ácido 3,4,5-tris(benziloxi)benzoico

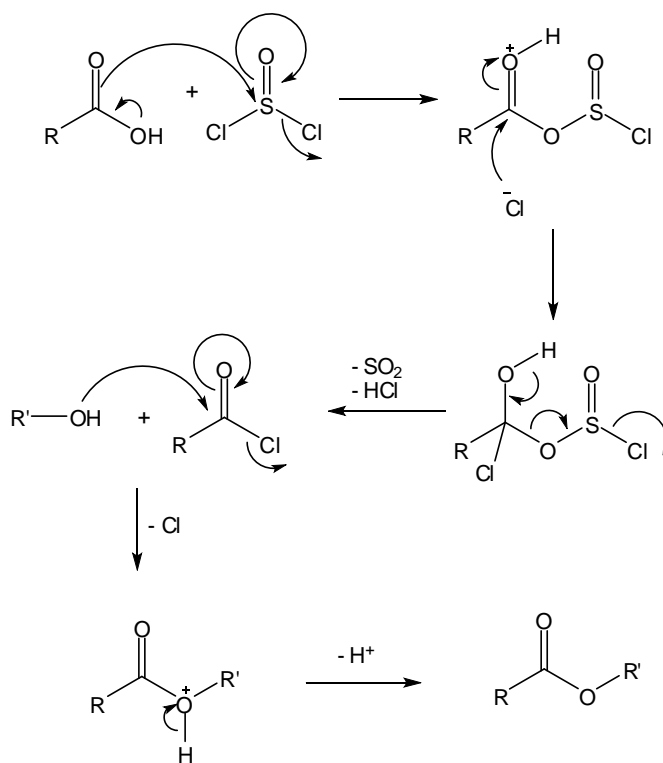
La reacción de esterificación se realizó en dos pasos. Como primer paso se sintetizó en cloruro de ácido, utilizando como solvente cloruro de tionilo y manteniendo a ebullición durante 4 horas aproximadamente. La reacción se siguió por cromatografía en placa fina. Posteriormente, el exceso de cloruro de tionilo se evaporó a presión reducida, para luego mantener el haluro de ácido bajo atmósfera inerte de nitrógeno y así evitar su descomposición.

En el segundo paso de reacción, siempre bajo atmósfera inerte de nitrógeno, se agregó carbonato de potasio para neutralizar el medio ácido que se genera, y por último se agregó el alcohol, en este caso el bromuro de (11-hidroxiundecil)trifenilfosfonio (**3**), disuelto en acetonitrilo anhidro. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 hrs. El producto principal se purifica por cromatografía en columna flash utilizando como eluyente una mezcla de solventes bastante polar, acetato de etilo y metanol (4:1). Se necesita una polaridad tan alta en la fase móvil debido a que el producto de reacción, bromuro de (11-(3,4,5-tris(benziloxi)benzoiloxi)undecil)trifenilfosfonio (**4**), presenta un catión trifenilfosfonio en su estructura. Por lo tanto, al ocupar una fase móvil de baja polaridad, el producto quedará retenido en la sílica (de carácter polar) y no se logrará su purificación.

El producto final es de consistencia viscosa, lo que dificultó la eliminación completa del solvente, el cual siempre queda ocluido en el producto. Esto se logra ver

en la caracterización a través de $^1\text{H-RMN}$, donde a campo alto se logran distinguir las señales características del acetato de etilo, y además la integración de protones da un número mayor al esperado en esa zona del espectro. El rendimiento de la reacción fue de un 37.2 %. Entre los factores que pueden haber afectado la síntesis se pueden destacar, en primer lugar, a pesar de la fase móvil utilizada algo del producto finalmente quedó retenido en la sílica gel durante su purificación.

El mecanismo general para las reacciones de esterificación a través de cloruros de acilo se muestra en el Esquema 7.



Esquema 7. Esterificación vía haluro de acilo

Como se mencionó anteriormente, la importancia de bencilar los grupos hidroxilos del ácido gálico radica en que estos no compitan en la reacción de esterificación con el haluro de acilo, como se puede observar mejor en el mecanismo anterior.

Por otro lado, es interesante el hecho de que al caracterizar mediante ^1H -RMN las señales de los carbonos metilénicos correspondientes a los grupos bencilo aparecen como tres singuletes con integración de 2H en la zona de 5.1 ppm aproximadamente. Al hacer un análisis rápido según la estructura del compuesto uno debería esperar solo dos singuletes con integración de 4H y 2H debido al plano de simetría de la molécula. Para investigar esto, se realizó un espectro bidimensional HMQC. En la Figura 9 muestra la región correspondiente a los carbonos metilénicos.

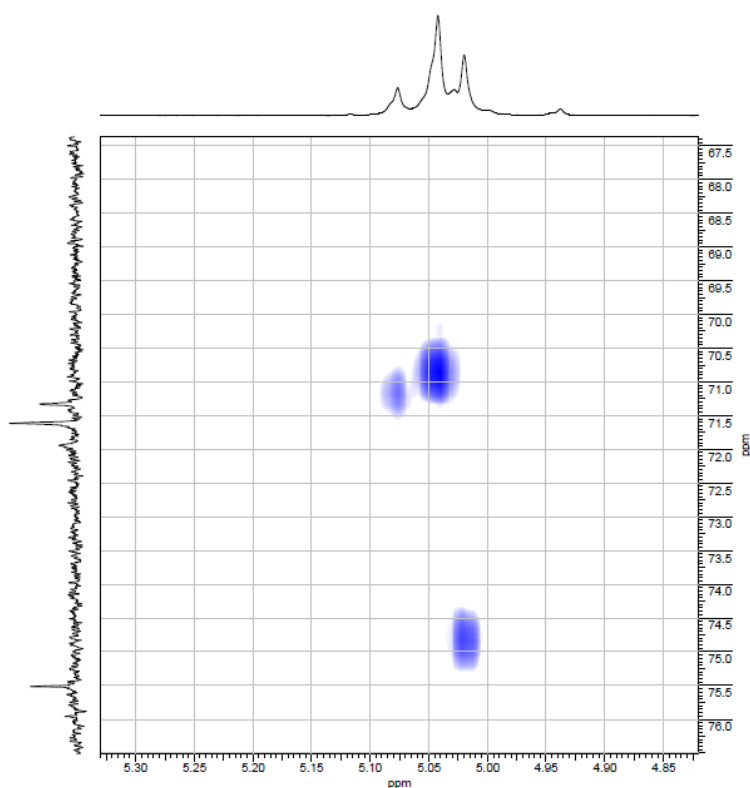
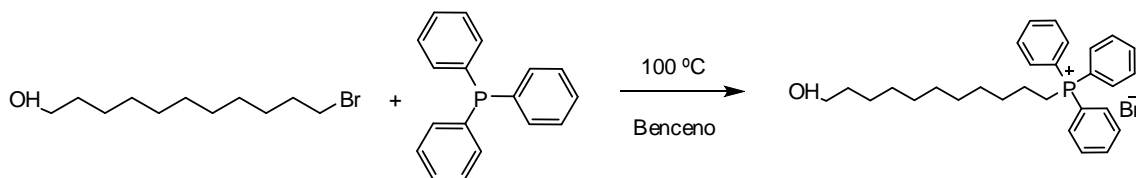


Figura 9. Espectro HMQC del compuesto 4

Como se observa en la Figura 9, el espectro muestra que cada singulete coincide con una señal de los carbonos metilénicos, lo que nos confirma que estos últimos se diferencian completamente unos de los otros. También es interesante destacar que este comportamiento sólo aparece cuando se tiene el éster de cadena larga con el catión trifenilfosfonio, mientras que cuando se tiene el ácido bencilado los

carbonos metilénicos no se diferencian. Esto sugiere algún tipo de interacción intramolecular que permite la diferenciación de estos grupos.

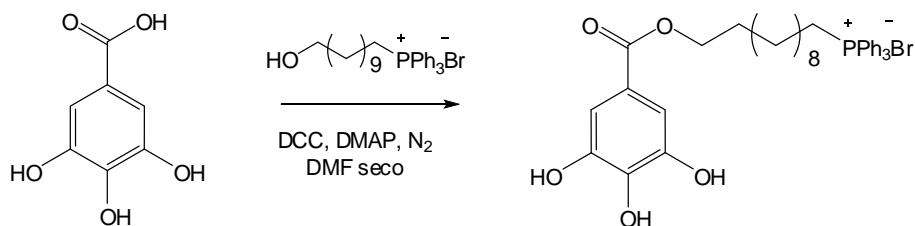
Por otro lado, en el Esquema 8 se presenta la formación del bromuro de (11-hidroxiundecil)trifenilfosfonio (**3**) utilizado en la reacción anterior.



Esquema 8. Formación sal de fosfonio

La formación de la sal de fosfonio se realizó a partir del 11-bromoundecan-1-ol con trifetilfosfina usando como solvente benceno. La reacción se mantuvo con agitación a reflujo por 24 hrs. Idealmente, una vez formada la sal de fosfonio esta debería precipitar, por ser insoluble en benceno. Sin embargo, lo que se observó fue la aparición de una nueva fase aceitosa. Una vez terminada la reacción, se eliminó el solvente y el residuo aceitoso se lavó con éter de petróleo frío con agitación constante hasta lograr que la sal de fosfonio solidificara. Este comportamiento parece ser característico de las sales de fosfonio de cadena larga. El rendimiento de la reacción fue de un 34 %, bajo para este tipo de síntesis. No está muy clara la razón del porqué de este rendimiento, pero al parecer el largo de cadena podría aumentar la solubilidad de la sal de fosfonio en el benceno. Esto podría causar que algo del compuesto quede disuelto en el benceno que no logró ser eliminado, y que al solidificar con éter de petróleo, una parte se vaya en los lavados de los cristales formados.

4.4.- Esterificación del ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico.



Esquema 9. Esterificación del ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico

Esta reacción se realizó utilizando la esterificación de Steglich a partir del ácido gálico. Posteriormente se adicionó DCC, DMAP y por último el bromuro de (11-hidroxiundecil)trifenilfosfonio (**3**), todo bajo atmósfera inerte de nitrógeno. En este caso se utilizó como solvente DMF anhidro debido a que los reactivos tenían mucha mejor solubilidad. La reacción se mantuvo durante 7 horas con agitación a temperatura ambiente. En esta síntesis se observó la aparición de un producto mayoritario por cromatografía en placa fina. Éste se purificó por cromatografía en columna flash con sílice de gel usando una mezcla de solventes de acetato de etilo y metanol (2:1), que al igual que en el caso del compuesto anterior, bromuro de (11-(3,4,5-tris(benziloxi)benzoiloxi)undecil)trifenilfosfonio (**4**), se necesita una alta polaridad en la fase móvil para que el compuesto no quede retenido en la sílica gel. Como se puede ver, para este compuesto se necesitó una polaridad mayor, ya que además de tener un catión trifenilfosfonio presenta los hidroxilos fenólicos sin bencilar. El producto de reacción es de consistencia viscosa, esperable debido a su largo de cadena, en donde también siempre se observó solvente ocluido en los espectros de ¹H RMN, a pesar de haber tenido al compuesto en alto vacío para eliminarlo.

El rendimiento de la reacción fue de un 4,7 %, el cual es bastante bajo. Se puede explicar por las múltiples complicaciones que tuvo esta síntesis. En primer lugar, se utilizó como reactivo el ácido gálico, el cual tiene tres hidroxilos en su estructura que compiten con el bromuro de (11-hidroxiundecil)trifenilfosfonio (**3**) en la reacción de esterificación, para formar un diéster cíclico entre dos moléculas del ácido gálico. Por

esta razón se utiliza la esterificación de Steglich, ya que la reacción procede en condiciones suaves y el intermediario de la reacción no es tan reactivo como un haluro de acilo, que favorecería la formación del diéster entre dos moléculas del ácido gálico. Además, se utilizó alta dilución. En segundo lugar, y el factor más importante que explica el bajo rendimiento obtenido, fueron los problemas en la purificación del compuesto. En el momento de la purificación por cromatografía en columna, el seguimiento de ésta por cromatografía en placa fina mostró que aparecía un tercer compuesto que corría con el frente del solvente, desapareciendo el producto a purificar. Esto no aparecía cuando se hacía el seguimiento por cromatografía en placa fina al crudo de la reacción, cuando se buscaba la fase móvil adecuada para la purificación. Finalmente, al término de ésta, no se obtuvo nada del compuesto esperado, donde sólo aparecía éste nuevo producto. Para tratar de superar este inconveniente, la segunda vez que se hizo la síntesis, la purificación se realizó por cromatografía pero usando una columna mucho más corta con la misma fase móvil. Lo que se buscó con esto, es que el compuesto esté el menor tiempo posible en contacto con la sílica de la columna durante la purificación, y así evitar la formación de este nuevo producto. De esta forma se logró obtener algo del producto deseado, aunque de igual manera apareció el nuevo compuesto que corría con el frente del solvente. Esto hace presumir que el producto de reacción, el Bromuro de (11-(3,4,5-trihidroxibenzoiloxi)undecil)trifenilfosfonio (**5**), reacciona con la sílica de la columna en las condiciones que se realiza la purificación, es decir con una fase móvil de acetato de etilo y metanol (2:1), y aplicando un poco de presión de aire para realizar la cromatografía flash. Este problema en la purificación no se tuvo en el caso del compuesto 4, bromuro de (11-(3,4,5-tris(benziloxi)benzoiloxi)undecil)trifenilfosfonio, en donde la única diferencia en sus estructuras moleculares es que éste último tiene los hidroxilos aromáticos bencilados. Por lo tanto, la reacción de descomposición debe proceder a través de éstos con la sílica de la columna. En el caso de futuras síntesis con este tipo de compuestos, se debería probar en la purificación otro tipo de relleno para la cromatografía en columna, reemplazando la sílice de gel, de carácter ácido, por otro tipo de empaque, como por ejemplo la alúmina, de carácter básico. Es de esperar que no se tenga el mismo problema en la purificación.

4.5.- Ensayo de viabilidad celular.-

Se realizó el ensayo de reducción enzimática de MTT para el bromuro de (11-(3,4,5-tris(benziloxi)benzoiloxi)undecil)trifenilfosfonio **(4)** y para el bromuro de (11-(3,4,5-trihidroxibenzoiloxi)undecil)trifenilfosfonio **(5)** en células tumorales TA3 de ratón. Este ensayo fue realizado en el Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. A continuación se presentan los resultados de toxicidad obtenidos.

Compuesto	IC ₅₀ (μM)
(4)	42.8 ± 0.029
(5)	6.4 ± 1.0

Esquema 10. Tabla de la concentración en la velocidad de respiración

El ensayo fue realizado utilizando 1×10^5 células/mL. Las células se mantuvieron en medio de cultivo que contenía el compuestos durante 48 hrs, luego fueron privadas del medio, lavadas e incubadas con MTT (0,5 mg/mL) durante 1 h a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente los cristales de formazán fueron solubilizados con 20μL de tritón al 10% en HCl 0,01N y luego se leyeron en un lector de placas a 570 nm. Los resultados representan el promedio de 3 experimentos independientes ± SD. M: Molar.

La citotoxicidad del compuesto **(5)**, que tiene los grupos hidroxilos del galato libres, fue 6,7 veces mayor que el compuesto **(4)**, lo cual sugiere que estos grupos funcionales son importantes en la alteración del funcionamiento mitocondrial.

4.6.- Determinación de la respiración celular.-

La medición del consumo de oxígeno en células tumorales TA3 de ratón fue realizado en el Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. A continuación se presentan los resultados obtenidos.

Para el bromuro de (11-(3,4,5-tris(benziloxi)benzoiloxi)undecil)trifenilfosfonio (**4**) se obtienen las siguientes curvas sobre la velocidad de oxidación mitocondrial de duroquinol (Figura 10):

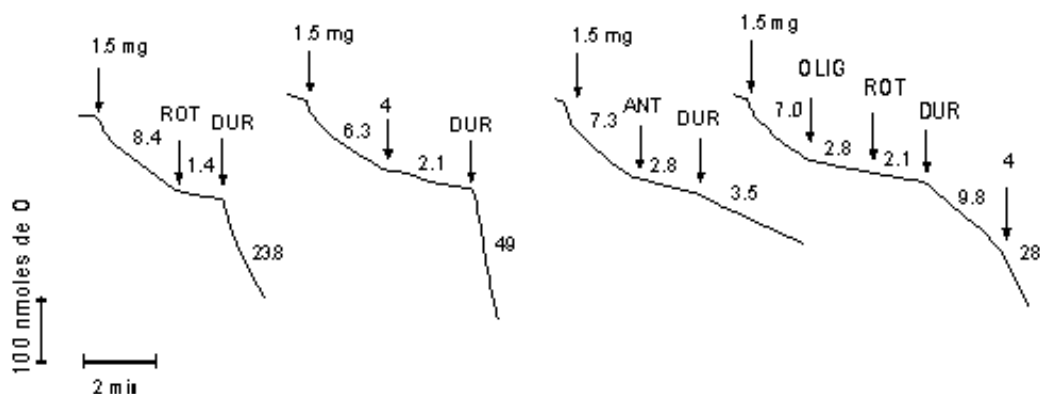


Figura 10. Efecto del compuesto 4 sobre la velocidad de oxidación de duroquinol en células TA3

En los puntos indicados por las flechas, se agregaron al medio de respiración de las células TA3 (1,5mg de proteínas), el compuesto (**4**) (0,23 mM), duroquinol (DUR) 0,5 mM, rotenona (ROT) 0,6 uM, Antimicina A (ANT) 0,2 ug/mL y oligomicina 1 ug/mL. Los números indican la velocidad de consumo de oxígeno como nmol/min por mg de proteínas. La acción del compuesto (**4**) sobre el complejo b-c₁ se estudió usando duroquinol como dador de electrones al Complejo III de la cadena respiratoria.

En la Figura 10 se muestra que el duroquinol revirtió completamente la inhibición de la respiración producida por rotenona (inhibe el Complejo I) y el compuesto (**4**), pero no aquella producida por antimicina A.

De estos resultados se puede concluir que el compuesto **(4)** interfiere con los componentes del sistema de transferencia de electrones, al igual que la rotenona, en alguna región entre el NADH y la ubiquinona; Complejo I. Además estos resultados indican que el compuesto **(4)** no inhibe el flujo de electrones desde el Complejo III al oxígeno.

Por otro lado, existe un aumento de la velocidad de consumo de oxígeno desde el Complejo III hasta el oxígeno al agregar el compuesto **(4)**, previamente inhibido con oligomicina, indicando un efecto desacoplante.

Para el bromuro de (11-(3,4,5-trihidroxibenzoiloxi)undecil)trifenilfosfonio **(5)** se obtiene la siguiente curva sobre el consumo de oxígeno en mitocondrias de células TA3 (Figura 11):

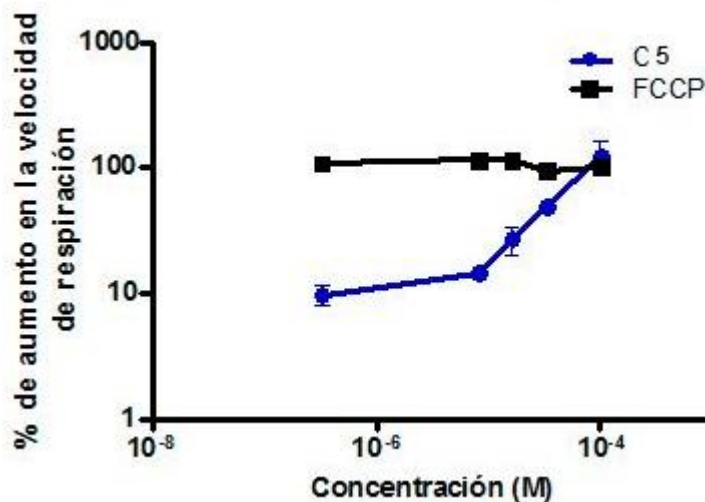


Figura 11. Consumo de oxígeno en mitocondrias de células TA3

La medición se realizó utilizando 0,3 mg de proteína mitocondrial en una cámara de 0,6 mL utilizando medio de fosforilación en presencia de oligomicina (2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína), glutamato + malato (2,5 mM c/u) como sustratos y en presencia o ausencia de 0,3 μM FCCP. El consumo de oxígeno se midió polarográficamente a 25 °C con un electrodo de Clark N° 5331 (Yellow Spring Instrument) usando un monitor

YSI modelo 53 acoplado a un inscriptor de 100 mV Goerz RE 511. Los experimentos representan al menos 3 experimentos independientes \pm SD.

En la Figura 11 se observa que el aumento de la velocidad de consumo de oxígeno provocado por el compuesto **5** es dependiente de la concentración y alcanza valores similares a los obtenidos con carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona (FCCP), el cual es considerado un desacoplante clásico del proceso de fosforilación oxidativa.

5. CONCLUSIONES.-

Se verifica la factibilidad de sintetizar compuestos derivados del ácido gálico que sean portadores de cationes trifenilfosfonio con potencial actividad biológica.

Con respecto a la potencial actividad biológica, se realizaron los ensayos de viabilidad y respiración celular para el bromuro de (11-(3,4,5-tris(benziloxi)benzoiloxi)undecil)trifenilfosfonio **(4)**, y para el bromuro de (11-(3,4,5-trihidroxibenzoiloxi)undecil)trifenilfosfonio **(5)**. Estos presentan una citotoxicidad en concentraciones de orden micromolar, similar a la reportada en trabajos anteriores para los ésteres derivados del ácido gálico con un largo de cadena equivalente. De los datos se observa que el compuesto **(5)** es el que presenta una citotoxicidad mayor. En el caso de la medición del consumo de oxígeno, se confirma que el compuesto **(4)** inhibe la respiración celular, interfiriendo en el flujo de electrones en el complejo I del sistema de la cadena respiratoria. Para el compuesto **(5)** se confirma un efecto desacoplante de la fosforilación oxidativa.

Se utilizaron dos estrategias sintéticas para la obtención de los derivados del ácido gálico. La primera ruta está compuesta de 3 pasos, en la cual se esterificó a través de la formación del haluro de acilo, obteniendo como producto el derivado del ácido gálico portador del catión trifenilfosfonio con los hidroxilos fenólicos bencilados. Se alcanza un rendimiento aceptable en la síntesis de aproximadamente un 37 %. Como no se logró realizar la debencilación de los grupos hidroxilos, se utilizó una segunda ruta más directa de síntesis a partir del ácido gálico mediante la esterificación de Steglich, obteniendo un rendimiento bastante bajo de un 5 % aproximadamente. Este rendimiento se explica debido a las posibles reacciones laterales, y en mayor medida, a los problemas en la purificación del producto.

De los resultados obtenidos, se puede observar que es necesario perfeccionar estas rutas de síntesis, para lograr mejorar sustancialmente los rendimientos obtenidos en el caso de seguir con esta línea de investigación.