UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE FENILBUTAZONA A PARTIR DE BENCILIDEN MALONATOS SUSTITUIDOS

TESIS

Para acreditar la experiencia recepcional de la carrera de:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

Presenta:
Dan Leví Contreras Hernández

Directores del trabajo:

Dr. Omar David Muñoz Muñiz
Unidad SARA
Universidad Veracruzana

Dra. Maribel Vázquez Hernández
Unidad SARA
Universidad Veracruzana

Xalapa, Veracruz. Enero, 2014

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

CARTA DE ACEPTACIÓN DE TRABAJO RECEPCIONAL CONCLUIDO

"Síntesis de Análogos de Fenilbutazona a Partir de Benciliden Malonatos Sustituidos"

MODALIDAD TESIS

QUE PARA ACREDITAR LA EXPERIENCIA RECEPCIONAL DE LA CARRERA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Dan Levi Contreras Hernández

DIRECTOR(A) DEL TRABAJO RECEPCIONAL

Dr. Omar David Muñoz Muñiz
Director del trabajo

Dra. Maribel Vazquez Hernández
Co-directora del trabajo

Dr. Miguel Angel Domínguez Ortiz
Sinodal

M. En C. Vicente Velázquez Melgarejo
Sinodal

XALAPA, VERACRUZ **8 de Enero del 2014**

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica de la Universidad Veracruzana, bajo la dirección y asesoría de los profesores Dr. Omar David Muñoz Muñiz y La Dra. Maribel Vázquez Hernández.

Agradecimientos

A mi Padre

Sr. Abel Contreras Lozada que con su esfuerzo, paciencia y amor, me impulso toda mi vida a superarme a mí mismo cada día, sabiendo que la única manera de alcanzar una meta es trabajando arduamente.

A mi madre

Sra. Vianey Hernández Hernández que con amor, me aconsejaba que luchara y estudiara fuertemente para ser alguien en la vida, ahora te doy las gracias porque tu amor y paciencia me hicieron el hombre que soy.

A mis hermanos

Esther Contreras Hernández

Isaí Hafid Contreras Hernández

Pilares con los que he convivido a lo largo de mi vida, fundamentales en mi desarrollo académico y moral, que han sido un motivo más por el que me he esforzado a lograr esto.

A mi amiga y compañera indispensable en mi vida *Olivería Esperanza Hernández García*, quien siempre estuvo ahí para alentarme, apoyarme que con su amor me hizo una mejor persona a ti que me brindaste tu amistad amor te doy las gracias porque sin duda fuiste y eres un pilar mi vida gracias.

A mi director de Tesis el *Dr. Omar David Muñoz Muñiz* que me brindo la mano y me dio la oportunidad de trabajar a su lado, por su paciencia y apoyo de día a día que mostro y por darme su amistad muchas gracias.

Dra. Maríbel Vázquez Hernández que con paciencia y consejos me ayudo a sacar adelante este trabajo y por dejarme trabajar con usted gracias.

Dr. Miguel Ángel Domínguez Ortíz que no solo fue mi sinodal si no tutor académico y maestro que gracias a forma de enseñar química orgánica y productos naturales me enamore de estas ramas de la química que me fascinan, gracias por ser tan buen maestro.

Al Maestro en Ciencias ***Vicente Velásquez Melgarejo*** le doy las gracias de igual forma no solo por ser mi sinodal si no por ser mi maestro de laboratorio de química orgánica su dedicación en el aula no fue en vano gracias por todo.

En agradecimiento especial les doy las gracias a todos mis amigos con los que compartí banca en el aula y toda la generación S080 a la cual pertenecí, y a los buenos académicos que imparten clases en el área le las ciencias químicas de la facultad de QFB le agradezco su apoyo que me brindaron en mi estancia en esta casa de estudios.

A quien debo todo lo que soy en mi vida YAH:

- *Dad gracias en todo, porque esta es la voluntad de Dios para con vosotros en Cristo Jesús. 1 Tesalonicenses 5:18*
- *Todo lo puedo en Jesús que me fortalece. Filipenses 4:13*

Resumen

La fenilbutazona es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que impide la formación de prostaglandinas en el organismo, por lo tanto reduce la inflamación y el dolor, es muy utilizada en casos de espondilitis anquilopoyética, ataques agudos de gota, y artritis reumatoide. Se han descrito en la literatura varias reacciones adversas al tratamiento con fenilbutazona, por lo que es necesario contar con nuevas entidades químicas con el mismo efecto farmacológico y sin efectos secundarios. En este sentido, utilizando el mismo anillo farmacofórico de la fenilbutazona pero cambiando la cadena lateral del fármaco por un sustituyente α, β- insaturado se podrían obtener moléculas hiperconjugadas con diversos sistemas π, este le conferirán estabilidad contra partículas radicalarias involucradas en los procesos inflamatorios.

De esta forma, en el presente proyecto se llevó a cabo la síntesis de sistemas 1,3-dicarbonílicos α,β-insaturados a partir de la reacción de la condensación aldólica entre malonato de dimetilo con benzaldehído, *p*-hidroxibenzaldehído, *p*-fluorobenzaldehído, y vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehido). Los productos obtenidos se purificaron y posteriormente se caracterizaron por RMN-^{1}H. A los productos de esta síntesis se les evaluó la actividad inhibitoria del radical libre DPPH y el poder reductor del ion Fe^{+3} mediante el ensayo FRAP. El siguiente paso consistió en hacer reaccionar los productos obtenidos con 1,2-difenilhidracina para formar los análogos de fenilbutazona, los productos de la reacción se caracterizaron por métodos espectroscópicos y se evaluaron sus propiedades antioxidantes con los ensayos *in vitro* anteriormente mencionados.

Índice

Indice de tablas ..... *iv*
Indice de espectros ..... *iv*

Introducción *1*
1. Antecedentes *3*
1.1 Radicales libres *3*
1.2 Antiinflamatorios no esteroideos (aines) *6*
1.2.1 Mecanismo de acción de los aines *6*
1.3 Principales pirazolonas (fenilbutazona, oxifenbutazona y suxibuzona). *7*
1.3.1 Fenilbutazona *7*
1.3.2 Oxifenbutazona *8*
1.3.3 suxibuzona *8*
1.4 Síntesis de sistemas 1,3-dicarbonilicos α,β-insaturados *10*
1.5 Síntesis de pirazoles *12*
2. Técnicas para la evaluación de la actividad antioxidante *13*
2.1 Ensayo DPPH *13*
2.2 Ensayo FRAP *16*
3. Planteamiento del problema *17*
4. Hipótesis *17*
5. Objetivos *17*
6. Metodología *18*
6.1 Consideraciones generales *18*
6.2 Metodología de síntesis *19*
6.2.1 Diagrama de trabajo *19*
6.2.2 Ruta general de síntesis *20*
6.3 Síntesis de los sistemas 1, 3-dicarbonilicós α, β-insaturados *20*
6.3.1 Método general de preparación de los benciliden malonatos correspondiente (1, 2, 3 y 4) *21*
6.4 Ensayos para la obtencion de los analogos de fenilbutazona *22*
6.4.1 Síntesis de 4-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden)-1,2 difenilpirazoliden -3,5-diona *22*
6.4.1.1 Método 1 ..... *22*

6.4.1.2 Método 2 ..... *23*
6.4.1.3 Método 3 ..... *23*
6.4.1.4 Método 4 ..... *24*
6.4.1.5 Método 5 ..... *25*
6.4.1.6 Método 6 ..... *26*
6.5 Determinación de la capacidad secuestradora del radical DPPH *28*
6.6 Determinación del potencial reductor férrico (FRAP) *28*
7. Resultados y Discusión *29*
7.1 Sistemas 1, 3-dicarbónilicos α, β-insaturados *29*
7.1.1. 2-benziliden malonato de dimetilo *31*
7.1.2 2-(4-fluorobenziliden) malonato de dimetilo *31*
7.1.3 2-(4-hidroxibenziliden) malonato de dimetilo *32*
7.1.4 2-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden) malonato de dimetilo *33*
7.2 Determinación de la capacidad antioxidante *34*
7.3 Análisis de los intentos para la obtención de los análogos de fenilbutazona *37*
7.3.1 Método 1 ..... *38*
7.3.2 Método 2 ..... *39*
7.3.3 Método 3 ..... *40*
7.3.4 Método 4 ..... *41*
7.3.5 Análisis del hidrazobenceno *42*
7.3.6 Método 5 ..... *43*
7.3.7 Método 6 ..... *46*
8. Conclusión *51*
9. Referencias bibliográficas *52*

Índice de tablas

		Pág.
Tabla 1	Reacciones de la capacidad inhibitoria de radicales libres en DPPH.	**15**

Índice de espectros

		Pág.
Espectro 1	Espectro de RMN-^{1}H del 2-benziliden malonato de dimetilo.	**31**
Espectro 2	Espectro de RMN-^{1}H del 2-(4-fluorobenziliden) malonato de dimetilo.	**32**
Espectro 3	Espectro de RMN-^{1}H del 2-(4-hidroxibenziliden) malonato de dimetilo.	**33**
Espectro 4	Espectro de RMN-^{1}H del 2-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden) malonato de dimetilo.	**34**
Espectro 5	Espectro de RMN-^{1}H del 4-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden)-1,2 difenilpirazoliden-3,5-diona, método 1.	**38**
Espectro 6	Espectro de RMN-^{1}H de 4-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden)-1,2 difenilpirazoliden-3,5-diona, método 2.	**39**
Espectro 7	Espectro de RMN-^{1}H de 4-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden)-1,2 difenilpirazoliden-3,5-diona, método 3.	**40**
Espectro 8	Espectro de RMN-1H del ácido malónico, Método 4.	**41**
Espectro 9	Espectro de RMN-^{1}H 1,2-difenilpirazolidina-3,5-diona método 4.	**42**
Espectro 10	Espectro de RMN-^{1}H de la difenilhidrazina.	**42**
Espectro 11	Espectroscopia de RMN-^{1}H de la difenilhidrazina, tomado de Spectral Database for Organic.	**43**
Espectro 12	Espectro de RMN-^{1}H 3-hidrazino-3-oxo-propanoato de metilo, obtenido mediante el método 5.	**44**
Espectro 13	(RMN-^{1}H, $CDCl_3$), anillo de pirazolidina 3,5-diona método 5.	**45**

Espectro 13 Espectro de RMN-^{1}H del homólogo de fenilbutazona obtenido mediante el método 6. **47**

Espectro 14 Predicción de (RMN-^{1}H) del homólogo de fenilbutazona obtenido mediante el método 6, obtenido programa de computo MestReNova. **47**

Espectro 15 Espectroscopia infrarroja del producto obtenido en el método 6. **48**

Espectro 16 Predicción del espectro de RMN-^{1}H para el homólogo dimérico de la fenílbutazona. **49**

Introducción

La preparación de compuestos orgánicos con posible actividad biológica es una de las actividades más importantes en el quehacer científico de nuestros días, existe un interés particular en aquellos que se pueden preparar mediante estrategias sintéticas, económicas, sencillas y en poco tiempo.

El estudio de nuevos compuestos con potencial efecto secuestrador o inhibidor de radicales libres cada vez adquiere más relevancia en los campos de la biología, la nutrición, la industria química, alimentaria y farmacología, lo que hace necesario determinar la capacidad antioxidante de compuestos en forma pura (moléculas aisladas) o en mezclas complejas (alimentos o muestras biológicas) mediante métodos *in vitro* simples, rápidos y confiables.

En el presente trabajo, se han preparado diversos sistemas α, β-insaturados mediante la condensación aldólica entre malonato de dimetilo y benzaldehído, *p*-hidroxibenzaldehído, *p*-fluorobenzaldehído y vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehido). A los benciliden malonatos resultantes se les determinó la capacidad antioxidante mediante el ensayo de captura de radicales libres (DPPH) (Quintanar y Calderón, 2009), y el ensayo FRAP, que mide la capacidad reductora de sales férricas. Los resultados obtenidos demostraron que el sistema α, β-insaturado derivado de vainillina (sistema 4) presentó los valores más altos en ambas pruebas (Figura 1).

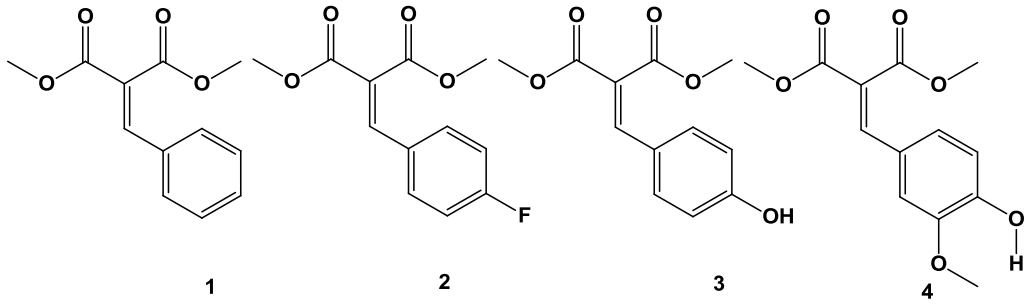


Figura 1. Sistemas 1,3-dicarbonílicos α, β-insaturados

Posteriormente, los sistemas 1,3-dicarbonílicos α,β-insaturados sintetizados se hicieron reaccionar con 1,2-difenilhidrazina con el objetivo de preparar análogos estructurales de la fenilbutazona, los cuales conservan el segmento farmacofórico de éste agente antiinflamatorio, además de un sistema α, β-insaturado que tienen la capacidad de participar en la captura de radicales libres, y que en algunos casos actúan como mediadores de los procesos inflamatorios (Figura 2).

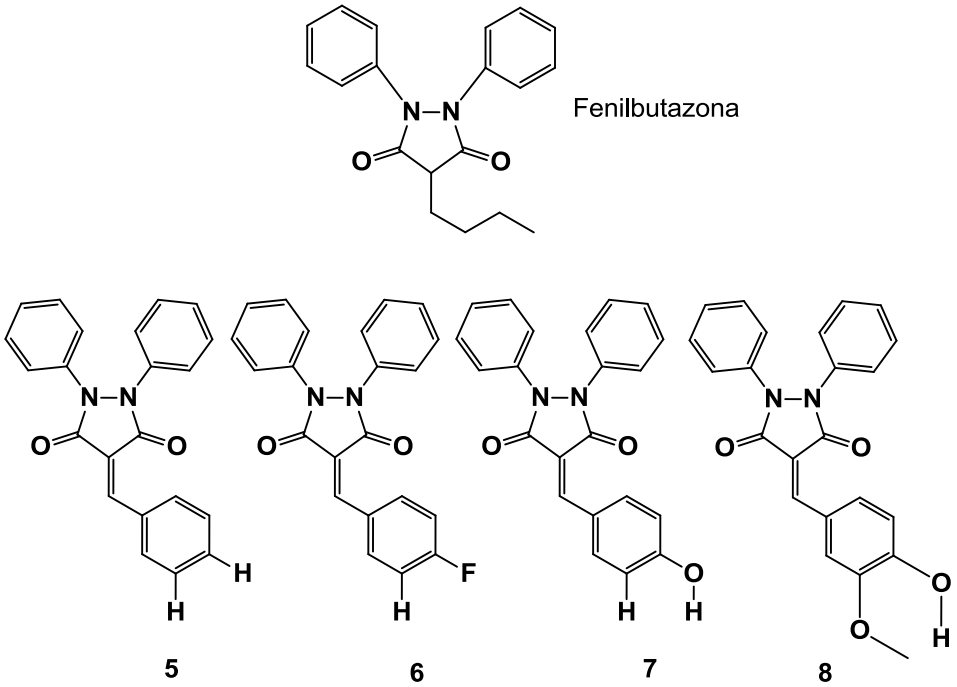


Figura 2. Análogos de fenilbutazona

1. Antecedentes

1.1 Radicales libres

Los radicales libres son átomos o moléculas extremadamente reactivas, debido a que en el orbital externo de su estructura tienen uno o más electrones sin aparear, tienden a captar un electrón de otros átomos (Figura 3) con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica (octeto completo). Estos mismos ocasionan la destrucción de las macromoléculas de la célula (ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y proteínas), induciendo una disminución en la resistencia al ambiente y un incremento en la fragilidad celular (Velázquez Paniagua *et al.,* 2004). El término "radical libre" enfatiza una reactividad más alta comparada con moléculas cuyos átomos están ligados a otros por enlace covalente (enlace por compartición de electrones). Una entidad química oxidante al sustraer el electrón que necesita para estabilizarse se reduce, mientras la molécula reductora estable que lo pierde se oxida y se convierte a su vez en un nuevo radical libre al quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena (Maldonado Saavedra *et al*., 2010).

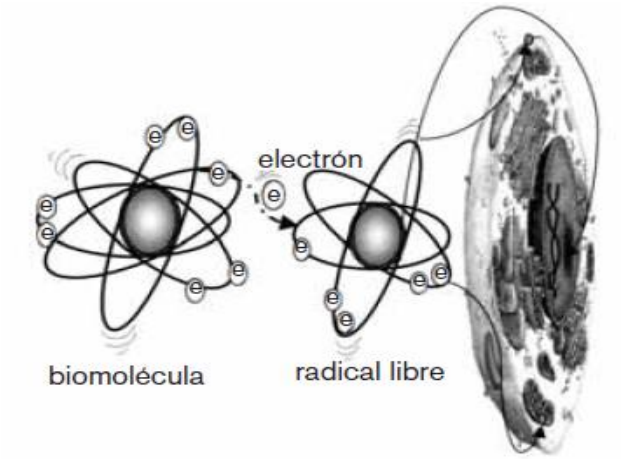


Figura 3. Interacción de los radicales libres con biomoléculas tomado de Velázquez Paniagua *et al.,* 2004.

Los radicales libres se producen como resultado de los procesos fisiológicos propios del organismo, como el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio, o bien son generados por factores ambientales como la contaminación industrial, el tabaco, la radiación, los medicamentos, los aditivos químicos en alimentos procesados y los pesticidas (Velázquez Paniagua *et al.,* 2004).

Una de las paradojas de la naturaleza es que el oxígeno, el cual es imprescindible para mantener la vida de los organismos aerobios, en determinadas condiciones puede ser tóxico, ocasionando a veces la muerte. Retroalimentando la idea anterior, tenemos que en 1946, Michaelis describió la reducción univalente secuencial del oxígeno como mecanismo molecular de cuatro pasos de transferencia de un electrón, con la formación del radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radical hidroxilo (HO·) como los intermediarios de la reducción parcial del oxígeno y con formación de agua como producto final y de reducción total, estos son los tres intermediarios de la reducción parcial del oxígeno (Boveris, 2005). En este proceso como consecuencia de la interacción del O_2^- con el óxido nítrico (NO) se genera peroxinitríto (ONOO.) siendo estas especies reactivas de oxigeno (ROS) (Figura 4) o también conocidos como metabolitos activos de oxigeno (MADO) (Garrido, 2007).

$$O_2 \rightarrow \mathbf{O_2^-} \rightarrow \mathbf{H_2O_2} \rightarrow \mathbf{HO-} \rightarrow H_2O$$

$$O_2^- + NO \rightarrow \mathbf{ONOO}.$$

Figura 4. Reducción univalente secuencial del oxígeno y formación de peroxinitríto.

En 1954 Gerschman y Col, sugirieron que la mayoría de los efectos tóxicos sobre los organismos vivos con una elevada concentración de oxígeno podrían ser debidos a la formación de radicales libres derivados del mismo. Esta afirmación enunciada en 1954, llegó a interesar a los biólogos y a los clínicos después de 15 años, cuando en 1969 McCord y Fridovich descubrieron la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Figura 5) que cataliza la reacción de eliminación de un radical libre del superóxido $2O_2^-$ convirtiéndolo en oxígeno O_2 y peróxido de hidrogeno H_2O_2, por lo que se considera una importante defensa antioxidante natural de la células expuestas a las especies reactivas de oxígeno (ROS).

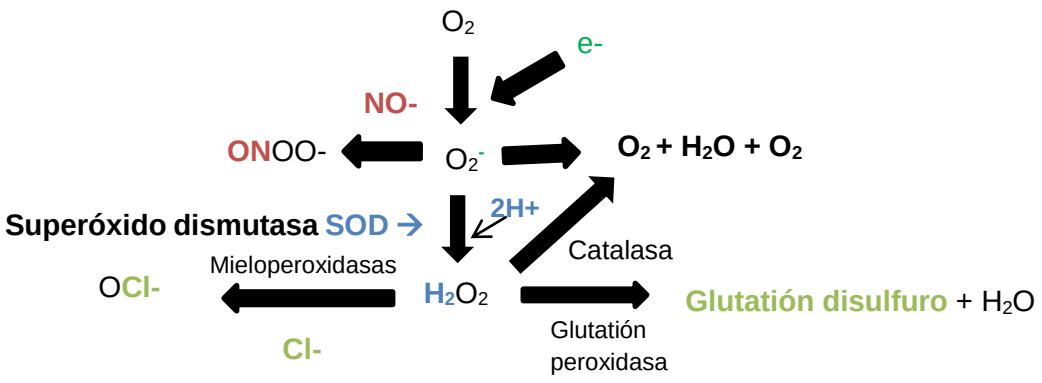


Figura 5. Formación de especies reactivas de oxigeno (ROS).

El análisis de estas reacciones enzimáticas ha permitido realizar tres observaciones. La primera es que los ROS sólo se generan en situaciones de aerobiosis, dado que la presencia de O_2 es una condición indispensable. La segunda, que la síntesis de superóxido es el primer acontecimiento común en todo el proceso, dando lugar posteriormente al resto de los ROS. Finalmente, tienen que existir determinados mecanismos intracelulares que generen electrones libres y desencadenen la síntesis de superóxido.

Hoy en día se sabe que los radicales libres derivados del oxígeno están implicados en la patogenia de muchas enfermedades, siendo capaces de dañar en forma reversible o irreversible a diversas biomoléculas muy importantes para ciertas actividades celulares fundamentales para la vida. Los efectos deletéreos (dañinos o perjudiciales) del oxígeno a través de la formación de radicales libres se pueden observar en diversas patologías tales como los procesos inflamatorios, lesiones por isquemia-reperfusión, carcinogénesis, envejecimiento etc. (Korc *et al*., 1995).

1.2 Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

1.2.1 Mecanismo de acción de los aines

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son un grupo de fármacos que tienen como efecto primario inhibir la síntesis de prostaglandinas, a través de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX) (Loza, 2011).

Este grupo de fármacos presenta una serie de acciones farmacológicas bien establecidas (Nuñes Cámara *et al*., 2001):

- Analgesia y antipirética, que se relaciona con el uso clínico a dosis bajas, generalmente únicas o durante cortos periodos de tiempo.
- Antiinflamatoria, que se manifiesta a dosis mayores y de forma pautada y continuada.
- Antiagregante plaquetario, acción no compartida, consecuencia de la inhibición de la COX-1.
- Uricosúrica (que aumenta la excreción de ácido úrico en la orina), solo es apreciable con algunos AINEs (fenilbutazona, sulfinpirazona, y a dosis altas de salicilatos).

Los AINEs normalmente inhiben de manera no selectiva la actividad enzimática de las isoformas COX-1 y COX-2 o en todo casi en mayor medida la COX-1 lo cual trae como consecuencia la aparición de los efectos secundarios a nivel gastrointestinal, renal y hematológico, mientras que sus beneficios terapéuticos dependerán de la inhibición de la COX-2 (Hall *et al*., 2001).

Por otro lado, la COX-1 tiene características de enzima constitutiva y en el control de funciones fisiológicas se expresa en la mayoría de los tejidos (mucosa gástrica, plaquetas y riñones) y es responsable de la síntesis de prostaglandinas (PG) con función de protección de la mucosa gástrica. La COX-2 (principal isoenzima asociada a la inflamación) tiene características de enzima inducible en determinadas células bajo circunstancias patológicas por el curso de diversas

citoquinas y mediadores de la inflamación COX-2 las cuales se encuentran mayormente en tejido dañado o inflamado (Nuñes Cámara *et al*., 2001).

1.3 Principales pirazolonas (fenilbutazona, oxifenbutazona y suxibuzona)

El grupo de las pirazolonas, en el que se incluye la fenilbutazona (Figura 6), contiene en su estructura una cetona derivada del pirazol y, junto a los oxicams, se incluye dentro de los ácidos enólicos. Las pirazolonas son ácidos débiles, cuyo pKa oscila entre 3,5-6,5, propiedad que les confiere el protón disociable en el carbono 4 del anillo pentano. Su absorción, rápida y extensa, se ve favorecida por el medio ácido del estómago, donde mayoritariamente se encuentran en forma no ionizada (Ballesteros, 2004).

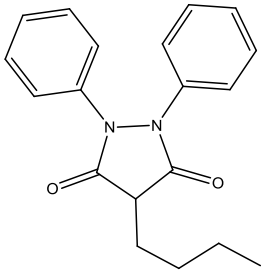


Figura 6. Fenilbutazona.

1.3.1 Fenilbutazona

La fenilbutazona fue sintetizada por primera vez en 1946 por H. Stenzyl en Suiza, para ser comercializada por los Laboratorios Geigy con el nombre de Butazolidina®. Se introdujo en la práctica veterinaria a principios de la década de los 50 y tal vez sea el fármaco más empleado en medicina equina.

Los fármacos como la fenilbutazona se utilizan principalmente en el tratamiento de la inflamación, dolor y edema, así como también en las osteoartritis, artritis reumatoides y disturbios musculo esqueléticos, gota, espondilitis anquilopoyética (Batlouni, 2009). La fenilbutazona tiene efecto hipouricemiante por lo que es recomendado en caso de hiperuricemia (Cruz *et al*., 2006).

Cabe mencionar que es uno de los fármacos antinflamatorios que más reacciones adversas ha presentado con efectos hematológicos como agranulocitosis que se

caracteriza por una reducción severa y selectiva de los neutrófilos circulantes (Banchero y Giachetto, 2002).

A nivel pulmonar la fenilbutazona ha presentado reportes junto con otros AINEs como naproxeno, azapropazona, nabumetona, sulindaco y ácido tolfendamico reacciones alérgicas, neumonitis, alveolitis, infiltrado pulmonar, y fibrosis pulmonar, ha tenido reportes de toxicidad hepatocelular y colestasia (es la detención del flujo de bilis hacia el duodeno). (Hall *et al*., 2001).

1.3.2 Oxifenbutazona

La oxifenbutazona es un fármaco desarrollado por los laboratorios Geigy en 1956, con actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética. Es una pirazolona y se clasifica dentro del grupo terapéutico de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), con una estructura química (Figura 7) que corresponde al 4-butil-1-(4-hidroxifenil)-2-fenil-3,5-pirazolidindiona, $C_{19}H_{20}N_2O_3$ (Merck, 1996 b).

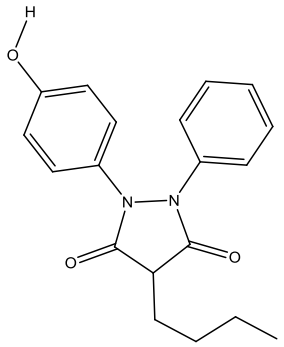


Figura 7. Oxifenbutazona.

1.3.3 Suxibuzona

La suxibuzona (Figura 8) es un fármaco descubierto y desarrollado por los laboratorios Dr. Esteve S.A con actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética. Es una pirazolona y se clasifica dentro del grupo terapéutico de los antiinflamatorios

no esteroideos (AINEs), con una estructura química que corresponde al hemisuccinato de 4-hidroximetil-1,2-difenil-lidina-3,5-diona), $C_{24}H_{26}N_2O_6$.

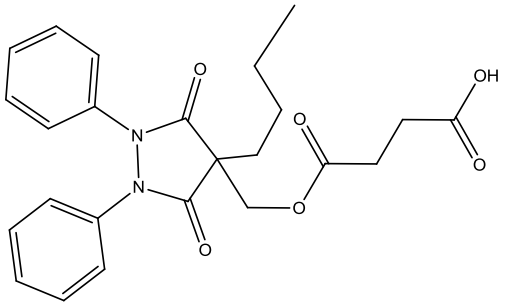


Figura 8. Suxibuzona.

La organización mundial de la salud (OMS) propuso el nombre de suxibuzona para esta molécula que se denominó, en las fases iniciales de su desarrollo, como AE17, se sintetiza a partir de la fenilbutazona (Merck, 1996a).

Este compuesto se ha utilizado desde 1969 en medicina humana y desde 1971 en veterinaria para el tratamiento de alteraciones inflamatorias y procesos dolorosos de intensidad leve del sistema músculo esquelético, tales como; contusiones, artritis, osteoartritis, tendosinovitis, miositis, en diversas especies animales: perro, caballo, cerdo, ternero y aves.

La sustitución en la fenilbutazona del hidrógeno en la posición 4 por un ácido succínico confiere a la suxibuzona propiedades farmacológicas y químicas distintas, fue diseñado y sintetizado con el fin de reducir las reacciones adversas a nivel gastrointestinales. Entre los animales la suxibuzona se metaboliza a Fenilbutazona por lo que se le considera un profármaco (Andrews *et al*., 2009).

La oxifenbutazona (OFBZ) es un análogo de la fenilbutazona (FBZ) que tiene un grupo fenólico en la posición *para* de un anillo de benceno, es un metabolito activo mayoritario de la Fenilbutazona que se forma por metabolismo hepático, cuenta con actividad terapéutica y es usado como antiinflamatorio de uso humano y veterinario con mejores propiedades terapéuticas que la fenilbutazona (Dudley y Burley, 1959).

La presencia de un hidroxilo fenólico suprime casi toda la actividad analgésica, potencia el efecto antipirético e iguala la actividad antiinflamatoria con respecto a la FBZ. En suma, la OFBZ posee características similares (bajo volumen de distribución, usos terapéuticos, interacciones, porcentaje de unión a proteínas, etc.) a la FBZ (Ballesteros, 2004).

De acuerdo a lo anterior podemos considerar que el diseño molecular y farmacológico tanto de la suxibuzona (profármaco) y la oxifenbutazona (metabolito activo de la fenilbutazona) no mejoraron la selectividad por la isoenzima COX-2, lo cual abre una ventana de oportunidad para el desarrollo de nuevas estructuras que mejoren dicha selectividad a través de la modificación estructural.

1.4 Síntesis de sistemas 1, 3-dicarbonílicos α, β-insaturados

Dada la importancia de las reacciones formadoras de enlaces carbono-carbono, la literatura aporta cada vez más ejemplos: reacciones de condensación aldólica (Figura 9), formación de enonas (Figura 10), reacción de Wittig (Figura 11), (Luna *et al*., 2011) que resultan en ocasiones con condiciones muy drásticas para llevarlas a cabo o los reactivos son de difícil adquisición y se necesitan varios pasos para llegar al producto: por otro lado existen metodologías desarrolladas para efectuar condensaciones aldólicas en condiciones menos agresivas como en el caso de la reacción propuesta por Smith y Liu en el 2008 (Figura 12) que se lleva temperatura ambiente y utiliza como catalizador prolina y DMSO (dimetil sulfóxido) como disolvente.

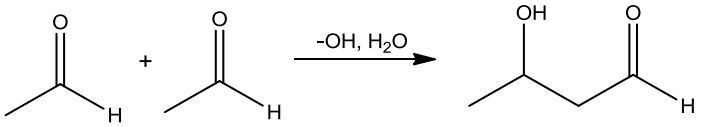


Figura 9. Reacciones de condensación aldólica. Tomado de Groutas, 2002.

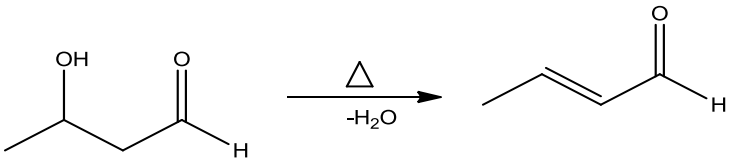


Figura 10. Formación de la enona en medio básico, Tomado de Groutas, 2002.

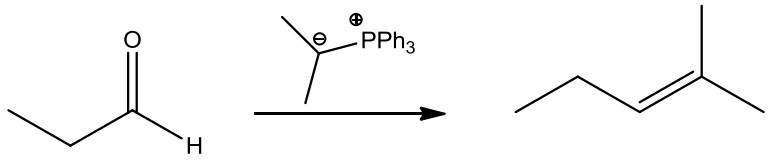


Figura 11. Reacción de Wittig, Tomado de Groutas, 2002.

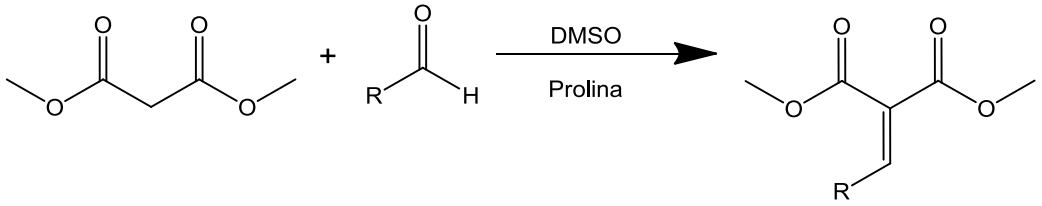
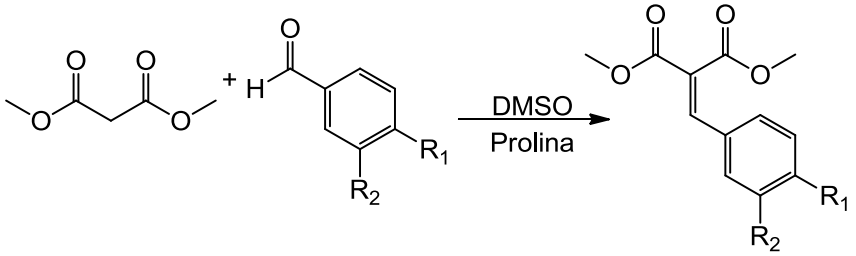


Figura 12. Condensación aldólica propuesta por Smith y Liu, 2008.

La obtención de sistemas 1,3-dicarbonílicos α,β-insaturados puede llevarse a cabo usando métodos plenamente probados, la condensación aldólica por el método propuesto por Amos Smith y Liu (2008) (Figura 13) es una reacción de elección para trabajar en condiciones suaves de temperatura y agitación por 24 h, por lo que se eligió para preparar los sistemas 1,3-dicarbonílicos-α,β-insaturados propuestos mediante la reacción de un sistema dicarbonílico apropiado malonato de dimetilo y 4 aldehídos aromáticos benzaldehído, *p*-hidroxibenzaldehído, *p*-fluorobenzaldehído y vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehido).



1:R_1 R_2 = H
2:R_1 = F, R_2 = H
3:R_1 = OH, R_2 = H
4:R_1 = OH, R_2 = OCH_3

Figura 13. Síntesis de sistemas 1, 3-dicarbonílicos α, β-insaturados.

1.5 Síntesis de pirazoles

El método general aplicable en la mayoría de los casos para la preparación de derivados de pirazoles (Figura 14) consiste en la adición de hidroxilamina o una hidracina, a un compuesto 1,3-dicarbonílico, o un precursor de dicha especie. La reacción se efectúa mediante un intermediario de cetoxima o hidrazona que subsecuentemente experimenta la ciclación (Paquette, 2005).

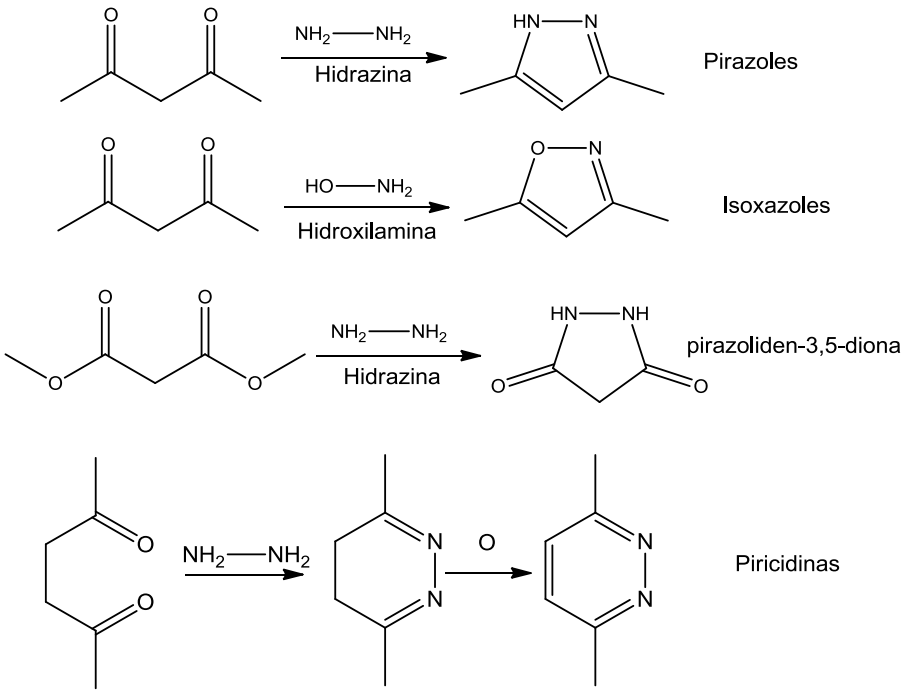


Figura 14. Derivados de pirazoles, Tomado de Paquette, 2005.

2. Técnicas para la evaluación de la actividad antioxidante

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante *in vitro*, una de las estrategias más aplicadas en la medición de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar esta actividad frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración del agente atrapador de radicales. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*. Alternativamente, diversos compuestos cromógenos (ABTS, DPPH, DMPD, y FRAP) son utilizados para determinar la capacidad de las moléculas y compuestos fenólicos que contienen los frutos para captar los radicales libres generados, operando así en contra los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación, que implican a especies reactivas de oxígeno (EROS), los métodos más utilizados son FRAP y DPPH (Kouskoski *et al*., 2005).

2.1 Ensayo DPPH

Este ensayo fue propuesto originalmente por (Brand–Williams *et al* 1995). El método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) es un ensayo colorimétrico simple basado en la disminución en la absorbancia a 517 nm del radical DPPH (púrpura) después de la adición de un compuesto antioxidante en la solución (Figura 15). La adición de un antioxidante determina el debilitamiento de este color, y la proporción se relaciona con la eficacia neutralizadora del radical, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante (Castañeda *et al*., 2008) y la disminución de absorbancia a 517 nm se mide (Domínguez Ortiz *et al.*, 2010).

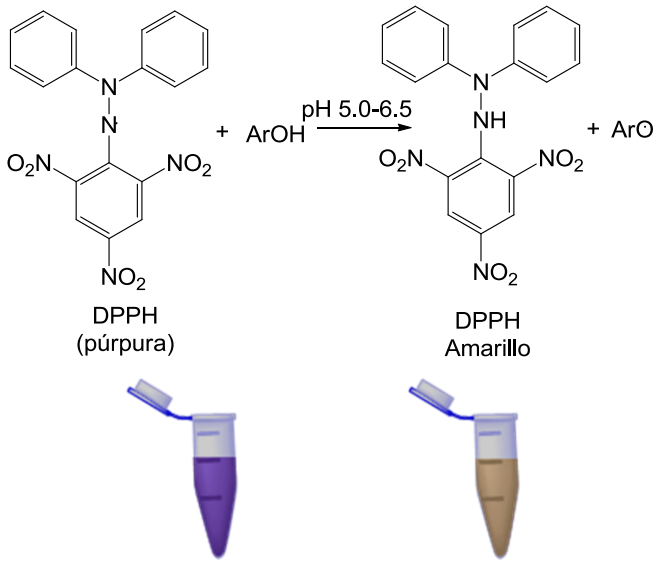


Figura 15. Actividad inhibitoria del radical DPPH. (Tomado de Molyneux P, 2004).

Las reacciones más aceptadas para definir la capacidad de captación de radicales libres en el ensayo DPPH (Figura 16) son inicialmente atribuidas a la alta reactividad de los sustituyentes hidroxilo:

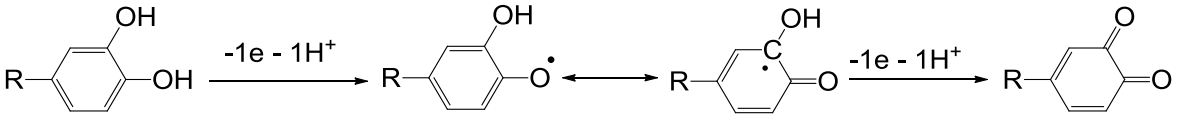


Figura 16. Reacciones de la capacidad inhibitoria de radicales libres en DPPH. Tomado de Osorio *et al*., 2009.

Las reacciones de los radicales libres presentes en el ensayo DPPH se muestran en la Tabla 1, la reacción (1) muestra la reducción del grupo $Ar(OH)_n$ ante el radical DPPH, mientras que la reacción (2ª) representa el acoplamiento entre 2 radicales para formar dímeros derivados de especies químicas con sustituyentes hidroxilo, la reacción (2b) muestra el acoplamiento entre un radical DPPH y un radical químico con sustituyentes hidroxilo y finalmente la reacción (2c) representa probablemente el mecanismo de terminación predominante, el cual se produce mediante la formación de una quinona más estable, a partir de una semiquinona, por pérdida de un electrón, este mecanismo es observado comúnmente en los flavonoides (Osorio *et al*., 2009).

Tabla 1 .Reacciones de la capacidad inhibitoria de radicales libres en DPPH, tomado de Osorio *et al*., 2009		
1 Ar-OH + DPPH•	→	Ar-O• + DPPH-H
2a Ar-O• + Ar-O•	→	Ar-O-O-Ar
2b Ar-O• + DPPH•	→	Ar-O-DPPH
2c Ar-O• (semiquinona)	→	Ar=O (quinona)

Una situación similar ocurre al estudiar el mecanismo del ácido ascórbico frente al radical DPPH. En la primera etapa el ácido ascórbico cede un hidrógeno debido a la diferencia en la banda de energía entre el radical DPPH y el ácido ascórbico (Figura 17).

Se produce una transferencia de electrones de doble enlace hacia el oxígeno que sufrió la pérdida de un electrón, repitiendo la misma acción en el siguiente átomo de oxígeno que sufrió la pérdida del átomo de hidrógeno, hasta establecerse el equilibrio de energía. De acuerdo a esta reacción, el ácido ascórbico cede dos hidrógenos, explicando así su eficiencia como un excelente antioxidante (Villanueva Tiburcio *et al*., 2010).

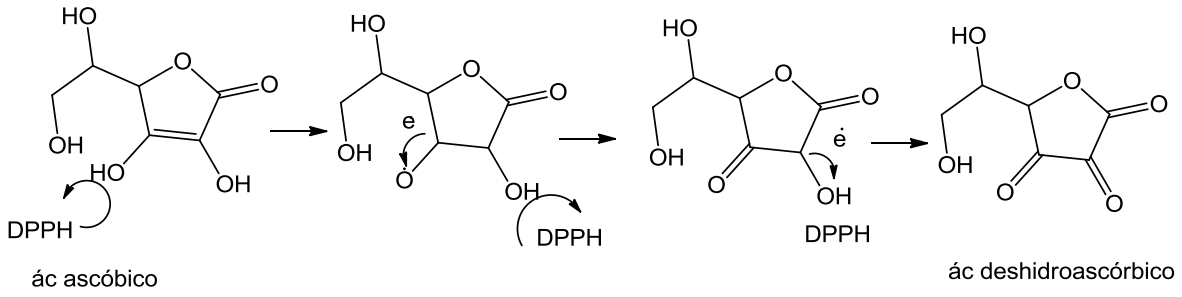


Figura 17. Mecanismo de reacción del ácido ascórbico frente al radical DPPH. Tomado de Villanueva Tiburcio *et al*., 2010.

La actividad antioxidante de las muestras se determina mediante el cálculo de la concentración inhibitoria media (IC_{50}), que es la concentración requerida por la muestra para disminuir la absorbancia del radical DPPH al 50 % (Barrón *et al*., 2011).

2.2 Ensayo FRAP

El ensayo FRAP se utiliza para medir la actividad antioxidante total y se basa en la capacidad de las moléculas para reducir el catión Fe^{3+} a Fe^{2+}. Este método fue modificado recientemente para su uso en microplacas, dando una buena reproducibilidad y un rendimiento de procesamiento de muestras más alto (Benzie y Strain, 1996).

Esta técnica mide la capacidad de una muestra para reducir el complejo incoloro tripiritriazina férrica (Fe^{3+}-TPTZ) al complejo azulado tripiriditriazina ferroso (Fe^{2+}-TPTZ) (Figura 18) que presenta absorbancia a 593 nm o 595 nm. (Martínez Vásquez, 2006; Benzie y Strain, 1996; Palomino *et al*., 2009).

Donde TPTZ es el ligando 2, 4, 6-tripiridil-s-triazina.

FRAP: $\mathbf{Fe\ (TPTZ)_2^{3+} + Ar(OH)n \longrightarrow Fe\ (TPTZ)_2^{2+} + ArO^{\cdot} + H^{+}}$

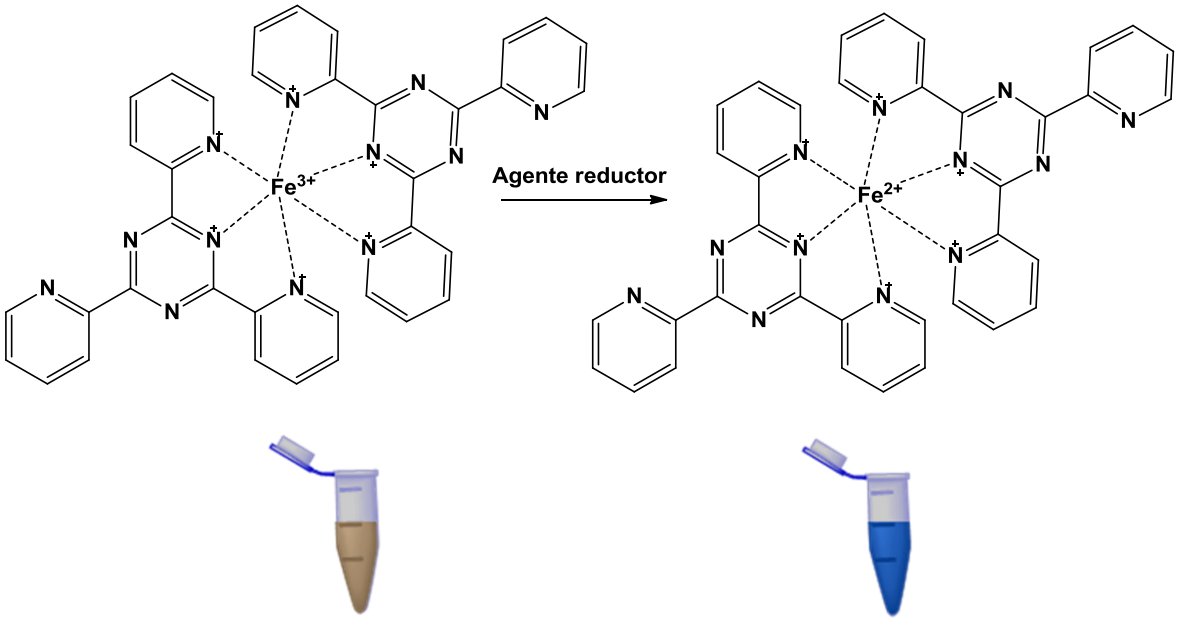


Figura 18. Ensayo FRAP: $(Fe\ (III)\ (TPTZ)_2)^{3+}$ $(Fe\ (II)\ (TPTZ)_2)^{2+}$ (Catión férrico y ferroso de tripiriditriazina) tomado de Benzie y Strain, 1996).

3. Planteamiento del problema

La fenilbutazona es un antiinflamatorio no esteroideo, que presenta diversas reacciones adversas al medicamento (RAM) al inhibir en mayor grado a la isoenzima COX-1 por lo que representa una oportunidad para el desarrollo de nuevos fármacos conservando parte de su estructura.

A pesar de que existen análogos de la fenilbutazona como la suxibuzona y oxifenbutazona no se ha logrado disminuir las reacciones adversas al medicamento ni mejorado su selectividad a la isoenzima COX-2.

En este sentido se propone desarrollar nuevos análogos de la fenilbutazona conteniendo en su estructura un sistema α,β-insaturado, el cual le conferirá una mayor estabilidad al interactuar con radicales libres y otras especies reactivas que participan en el desarrollo de diversos procesos inflamatorios. Por lo tanto es posible esperar que esta clase de sistemas disminuyan las reacciones adversas presentadas por la fenilbutazona.

4. Hipótesis

La reacción entre sistemas 1, 3-dicarbonílicos α, β-insaturados y la 1,2-difenilhidrazina permite la obtención de los análogos de la fenilbutazona.

5. Objetivos

Objetivo general

Realizar la síntesis de los análogos de la fenilbutazona a partir de sistemas 1,3-dicarbonílicos α, β-insaturados.

Objetivos particulares

- Preparar los sistemas 1, 3-dicarbonílicos α,β-insaturados derivados del benzaldehído, *p*-hidroxibenzaldehído, *p*-fluorobenzaldehído y 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los sistemas 1,3-dicarbonílicos α,β-insaturados mediante los ensayos DPPH y FRAP.
- Sintetizar los análogos de fenilbutazona correspondiente.
- Caracterizar espectroscópicamente por RMN-^{1}H a los productos obtenidos.

6. Metodología

6.1 Consideraciones generales

El material de laboratorio utilizado para el desarrollo de este trabajo consistió en material de vidrio y barras de agitación los cuales se lavaron y secaron en una estufa a una temperatura de 90 °C durante 24 horas antes de su uso.

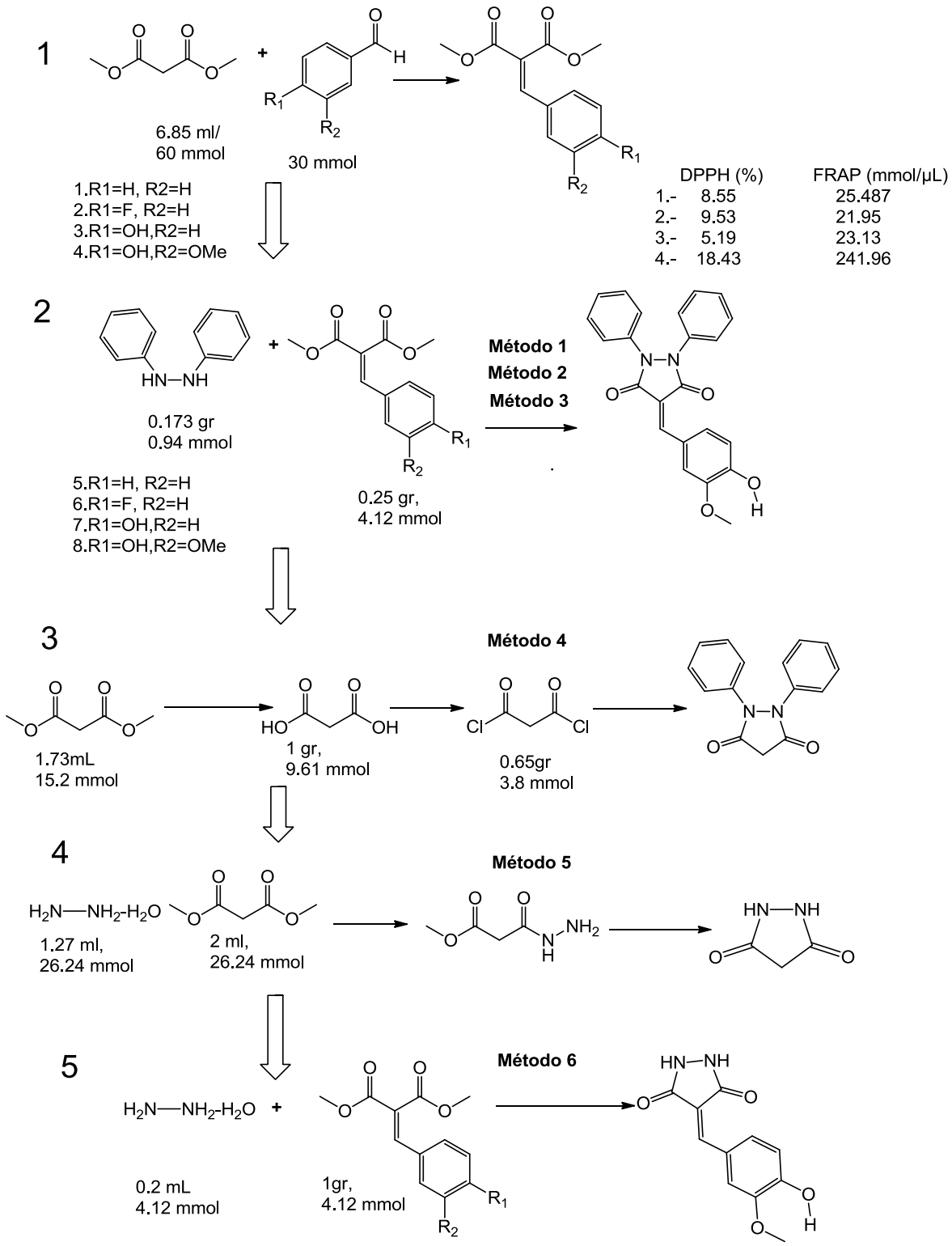
En las reacciones se usó agua purificada simple, los disolventes orgánicos utilizados para el desarrollo de las reacciones se trataron por destilación fraccionada previa a su uso.

La cromatografía en capa fina para el seguimiento de las reacciones se llevó a cabo en cromatofolios Merck DC-F_{254} de gel de sílice sobre aluminio, utilizando como fase móvil una mezcla de hexano/acetato de etilo (6:4) y (8:2) y como agentes reveladores luz ultravioleta, solución de ninhidrina al 3% en *n*-butanol para la detección de grupos amino. La purificación de los compuestos se llevó a cabo por cromatografía en columna empleando sílica gel 60-PF_{254} de Merck.

Los espectros de RMN (Resonancia magnética nuclear) se obtuvieron en un espectrómetro Varian modelo Mercury Plus a 300 Megahertz (MHz) para ^{1}H y 75.4 MHz para ^{13}C. Los desplazamientos químicos (δ) se reportaron en partes por millón (ppm) con respecto a la referencia interna de tetrametilsilano (TMS). Las constantes de acoplamiento (*J*) están dadas en Hertz (Hz). La multiplicidad de las señales se denotaron con las siguientes abreviaturas: *s* para indicar una señal simple, *d* para una señal doble, *t* para una señal triple, *m* para señales múltiples y a para señales anchas. La predicción de los espectros de RMN–^{1}H (Resonancia magnética nuclear de hidrogeno) se obtuvieron por el programa de computo MestReNova versión: 8.14-12489© 2013.

6.2 Metodología de síntesis

6.2.1 Diagrama de trabajo



6.2.2 Ruta general de síntesis

La ruta general de síntesis para los sistemas 1,3-dicarbónilicos α,β-insaturados y los análogos de fenilbutazona se muestra en la figura (Figura 19).

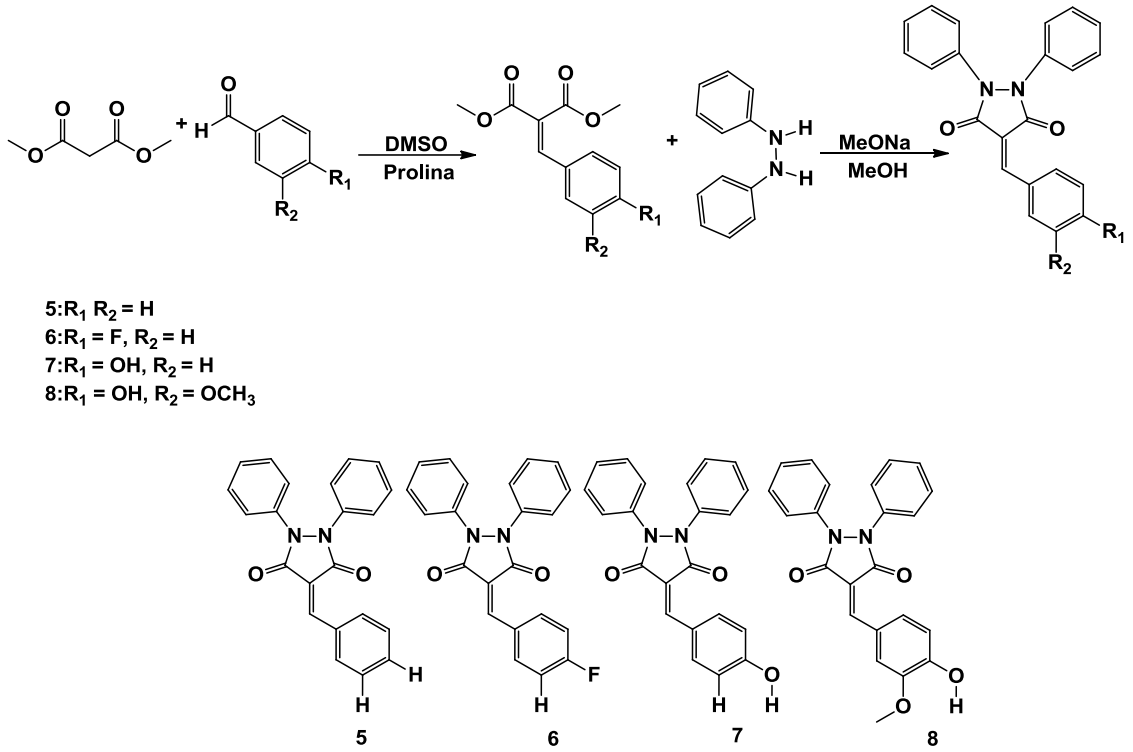
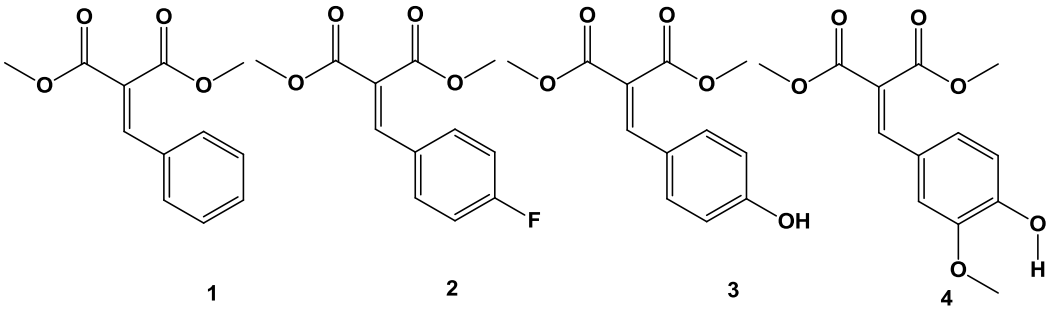


Figura 19. Ruta general de síntesis

6.3 Síntesis de los sistemas 1, 3-dicarbonilicós α, β-insaturados

En este trabajo se prepararon sistemas 1,3-dicarbónilicos α,β-insaturados a partir de la reacción siguiendo la metodología propuesta por Smith y Liu en el 2008 (Figura 20) utilizando 4 aldehídos aromáticos diferentes (benzaldehído, *p*-fluorobenzaldehído, *p*-hidroxibenzaldehído, 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehido).



1. 2-benziliden malonato de dimetilo
2. 2-(4-fluorobenziliden) malonato de dimetilo
3. 2-(4-hidroxibenziliden) malonato de dimetilo
4. 2-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden) malonato de dimetilo

Figura 20. Sistemas 1, 3-dicarbónilicos α, β-insaturados preparados

6.3.1 Método general de preparación de los benciliden malonatos correspondiente (1, 2, 3 y 4)

En un matraz balón de 50 mL se colocaron 345 mg (3 mmol) de prolina disueltas en 15 mL de DMSO, posteriormente se adicionó (30 mmol) el aldehído correspondiente, la mezcla se agitó durante 5 min antes de la adición del malonato de dimetilo 6.85 mL (60 mmol). La mezcla de reacción se dejó agitando a temperatura ambiente durante 24 horas, al cabo de este tiempo se concentró en rotavapor para eliminar los disolventes y la reacción se diluyó con acetato de etilo (EtOAc) 40 mL y se colocó en un embudo de separación y se lavó con agua (2 x30 mL). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se eliminó utilizando el rotavapor. La purificación de los productos se realizó mediante cromatografía en columna, utilizando una fase móvil en proporción (9:1) de hexano/acetato de etilo o por cristalización en hexano/acetato de etilo si el producto era sólido.

1: 2-benziliden malonato de dimetilo: ^{1}H RMN, (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 3.82 (s, 6H), 7.39 (m, 5H), 7.77 (s, 1H).

2: 2-(4-fluorobenziliden) malonato de dimetilo: ^{1}H RMN, (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 3.8 (s, 6H), 7.06 (t, 2H *J*=9.1 Hz), δ=7.40 (dd, 2H, *J*=8.2 Hz, *J*=8.2 Hz), 7.71 (s, 1H).

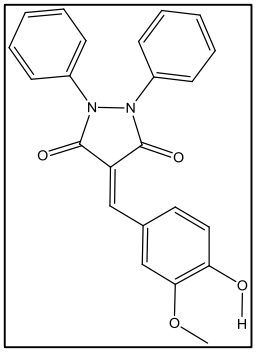
3: 2-(4-hidroxibenziliden) malonato de dimetilo: ^{1}H RMN, (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 3.85 (d, 6H), 5.86 (s, 1H), 6.82 (d, 2H, *J*=9.1 Hz), 7.33 (d, 2H, *J*=9.1Hz), 7.77 (s, 1H).

4: 2-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden) malonato de dimetilo: ^{1}H RMN, (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 3.84 (s, 3H), 3.89 (s, 6H), 5.94 (s, 1H), 6.92 (d, 2H, *J*=9.1 Hz), 7.00 (t, 1H, *J*= 8.18 Hz), 7.68 (s, 1H).

6.4 Ensayos para la obtención de los análogos de fenilbutazona

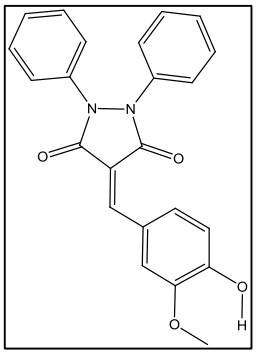
6.4.1 Síntesis de 4-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden)-1,2 difenilpirazoliden -3,5-diona

6.4.1.1 Método 1



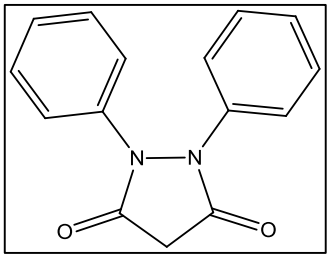
En un matraz limpio y seco de 100 mL se colocó 0.173 gr (0.939 mmol) de hidrazobenceno y 2.25 mg (0.0939 mmol, 10 %) de hidruro de sodio NaH en 15 mL tolueno y se agitó por 1 hora a temperatura ambiente. Después que el hidrazobenceno se activó, se adicionó 0.25 gr (0.939 mmol) a la mezcla previa el sistema 1,3-dicarbonílico α,β insaturado derivado 2-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden) malonato de dimetilo y se colocó a reflujo por 24 horas. Terminado el tiempo de reacción se enfrió el matraz y se concentró a sequedad en el rotavapor. Posteriormente se disolvió en 50 mL acetato de etilo y se lavó (2x50 mL) de agua para separar la fase orgánica y se secó con Na_2SO_4, se concentró nuevamente en el rotavapor a sequedad. Terminado el proceso se monitoreó la reacción en una placa de cromatografía de capa fina utilizando una fase móvil (8:2) de hexano/acetato de etilo, obteniéndose cristales de color naranja. La RMN ^{1}H de los cristales obtenidos se dio cuenta de que no se logró obtener el producto deseado, el espectro correspondiente se muestra en la figura 34.

6.4.1.2 Método 2



Se disolvió 0.25g (0.939 mmol) de 2-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden) malonato de dimetilo en 15 mL de tolueno seco, fueron colocados en un matraz balón y se le añadieron 12.38 mg (0.0939 mmol, 10%) de tricloruro de aluminio $AlCl_3$ y se agitó por media hora, después se adiciono 0.173 g (0.939 mmol) de hidrazobenceno, la mezcla se dejó reaccionar por 24 h. Al cabo de este tiempo, la mezcla se procesó de la misma forma que en el método 1. El análisis por RMN-^{1}H demostró que no fue posible establecer la obtención del producto deseado el espectro correspondiente se muestra en la figura 36.

6.4.1.3 Método 3

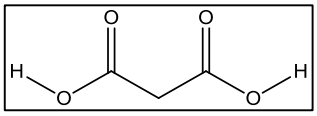


Preparación del 1,2-difenilpirazolidina-3,5-diona: En un matraz balón seco se colocó sodio metálico 549 mg (23.9 mmol) en 25 mL de metanol anhidro, y se adicionó 2. 1 gr (11.55 mol) de hidrazobenceno, la mezcla se calentó a 50 °C por 1 h, posteriormente se adicionaron 1.526 gr, 1.32 ml (11.50 mol) de malonato de dimetilo, después de 15 min, la mezcla preparada se calentó lentamente hasta llegar a los 150 °C para eliminar los compuestos volátiles, y después de 3 horas, se enfrió y se particióno en un embudo de separación en agua/ éter etílico (1:2), la fase orgánica se acidificó con HCl 2N. El precipitado se extrajo con CH_2Cl_2, y se lavó con una solución de NaCl y se secó con Na_2SO_4 anhidro, y se concentró a sequedad en el rotavapor y se recristalizó en etanol obteniendo un producto sólido anaranjado (Vennestrom y Holmes, 1985).

En otro matraz, se preparó una mezcla adicionando 4.56 gr (30 mmol) de 4-hidroxi,3-metoxibenzaldehído y se agitó con 345 mg de prolina durante 2 h, posteriormente se adicionó 1.26 g (5 mmol) de 1,2-difenilpirazolidina-3,5-diona recientemente preparada y se agitó por 24h a temperatura ambiente, terminada la reacción se concentró en el rotavapor para eliminar los disolventes, y se diluyó en

30 mL de acetato de etilo y se colocó en un embudo de separación y se lavó con agua (2x30 mL). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y el disolvente se eliminó utilizando el rotavapor. El análisis por RMN ^1H de los cristales obtenidos permitió confirmar la que no obtuvo el producto deseado (figura 38).

6.4.1.4 Método 4

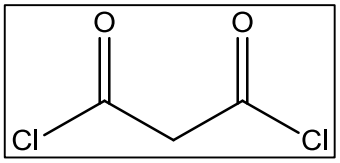


Obtención del cloruro del ácido del ácido malónico: En un matraz balón de 100 mL, se preparó una solución de malonato de dimetilo de 2 gr, 1.73 mL (15.12 mmol) y se añadió una solución metanólica de NaOH 2 N.

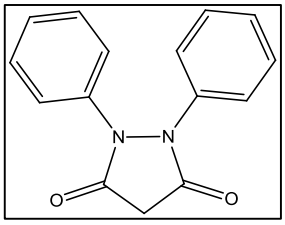
Después de 3 minutos de agitación la solución se volvió turbia y la sal del sodio del ácido carboxílico se precipitó, la mezcla se mantuvo en agitación hasta que todo el éster se consumió, y se monitoreó la reacción por cromatografía en capa fina.

Al finalizar la reacción, los disolventes se removieron utilizando el rotavapor, y el producto se disolvió en agua y añadió éter etílico para eliminar residuos del éster sin reaccionar y aislar el alcohol insoluble en el agua. La fase acuosa se enfrió y acidificó con HCl hasta pH de 2 a 3 y se extrajo el ácido 1,3-propanodioico con acetato de etilo. La solución se secó en Na_2SO_4 anhidro los disolventes se removieron utilizando el rotavapor y se aislaron por filtración lavando con diclorometano CH_2Cl_2 el producto obtenido fue en forma cristales blancos (Theodorou *et al*., 2007).

^1H RMN, (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 3.24 (s, 2H), 12.50 (s, 2H) (figura 40).



Preparación del cloruro de acilo: En un matraz balón se colocó 1g (9.61 mmol) del ácido 1-3 propanodioico en 15 mL de diclorometano CH_2Cl_2 y 2.4 g, 1.46 mL, (2.1 eq, 20.16 mmol) de cloruro de tionilo y se agitó por 24 h a temperatura ambiente, los disolventes se removieron utilizando el rotavapor. Los sólidos se lavaron con diclorometano (2 x 20 ml) y se filtró, los disolventes se removieron utilizando el rotavapor el producto como cristales de color beige.



Preparación del sistema 1,2-difenilpirazolidina-3,5-diona: En un matraz balón de 100 mL (Matraz A) se colocaron 0.65 g, (3.80 mmol) de 1,3 dicloro-propano-1,3-diona en 15 mL de diclorometano CH_2Cl_2 y se agregaron 0.97 gr, (7.98 mmol, 2.1 eq) 4-amino -N, N-dimetilpiridina y se agitó por una hora para activar el sistema, en otro matraz balón de 100 mL (Matraz B) se colocaron 0.7 gr (3.80 mmol) difenilhidrazina o hidrazobenceno en 15 mL de diclorometano CH_2Cl_2 y se agregó 1.16 g, 1.6 mL, (11.4 mmol) de trietilamina y se agitó por 30 min tiempo necesario para producir la desprotonación de la difenilhidrazina. La mezcla del matraz B se adicionó al matraz A gota a gota, se agitó y se llevó a reflujo por 24 horas, transcurrido el tiempo se enfrió la mezcla, se concentró a sequedad en el rotavapor y se disolvió en acetato de etilo y coloco en un embudo de separación y se lavó con agua (2 x 20 mL), la fase orgánica se concentró a sequedad en el rotavapor y se obtuvo un producto como solido oscuro. El análisis por RMN ^1H de los cristales obtenidos no permitió confirmar la obtención del producto deseado (figura 41).

6.4.1.5 Método 5

En un matraz balón de 100 mL se añadió 1.27 mL, (26.24 mmol) hidracina monohidratada NH_2-NH_2.$2H_2O$ a temperatura ambiente a una solución de malonato de dimetilo 2 mL, (3.468 gr, 26.24 mmol) en 15 mL de metanol y la mezcla se agitó por 24 h, formó 2 productos secundarios la 1,3-dihidracida-propano-1,3-diona sólido blanco y 3-hidrazino-3-oxo-propanoato de metilo (Figura 21) este último se obtuvo por filtración con 20 mL de etanol, la evaporación del filtrado dejo un residuo cristalino que se lavó con éter para remover el diéster (Metwally *et al*.,2010).

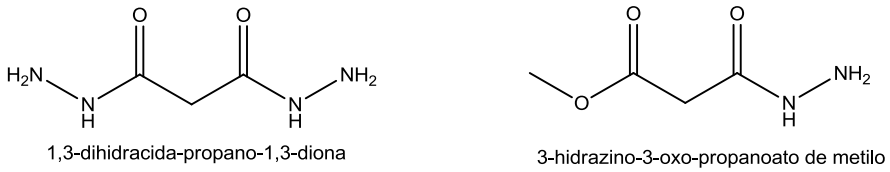


Figura 21. Estructuras de 1,3-dihidracida-propano-1,3-diona sólido blanco y 3-hidrazino-3-oxo-propanoato de metilo

El análisis espectroscópico por ^1H RMN fue el siguiente: ^1H RMN, (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 2.08 (s, 2H), 2.91 (s, 2H), 3.16 (s, 3H), 9.26 (s, 1H). Estas señales confirman la obtención del metil 3-hidrazinil-3-oxopropanoato (Figura 45).

El 3-hidrazino-3-oxo-propanoato de metilo se recristalizó 2 veces en etanol y se le adicionó una solución de metoxido de sodio 0.7g sodio metálico en 10 mL de metanol y se añadió gota a gota y se dejó agitando por 4 horas, la mezcla se dejó en el refrigerador por 24 h y después se filtró y el filtrado se acidificó con ácido acético glacial 3 mL y se concentró en el rotavapor a sequedad, obteniéndose cristales amarillos pero que no correspondían al producto deseado, el pirazoliden-3,5-diona (Figura 22).

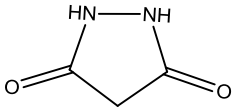
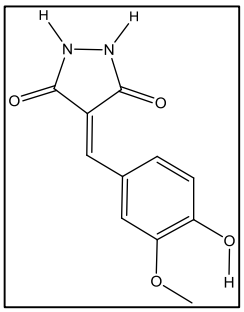


Figura 22. Pirazolidina-3,5-diona

6.4.1.6 Método 6



En un matraz balón de 100 mL limpio y seco se colocaron 15 mL de metanol anhidro y se agregó 1g (4.126 mmol) de 2-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden) malonato de dimetilo, a la mezcla de reacción se incorporó 0.21g (1.57 mmol, 2 eq) de tricloruro de aluminio $AlCl_3$ como catalizador, y se agitó por 30 min, transcurridos los 30 min se agregó a la mezcla 0.2 mL (4.126 mmol) de hidracina monohidratada NH_2NH_2-H_2O y se colocó a reflujo por 5 horas. Transcurrido el tiempo de reacción se concentró en el rotavapor para eliminar el disolvente, y en un embudo de separación se partición la mezcla en 30 ml de agua y 60 mL de acetato de etilo y se separó, después la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, el producto se concentró nuevamente para eliminar el disolvente, y se aplicó en una placa semipreparativa y se eluyó con una fase móvil de hexano/acetato de etilo (6:4) el producto tuvo un Rf= 0.50 y un Pf.= 175-176 °C (Figura 23).

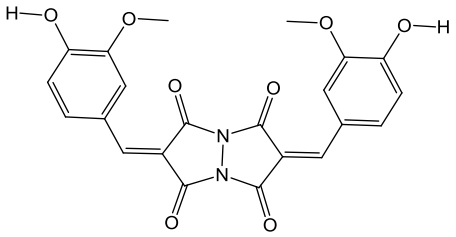


Figura 23. Estructura del dímero

El análisis del espectro de RMN–^{1}H mostró las siguientes señales: ^{1}H RMN, (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 3.98 (s, 3H), 5.98 (s, 1H), 6.98 (d, 1H, *J*=10.34Hz), 7.22 (d, 1H, *J*=10.34 Hz), 7.54 (s, 1H), 8.58 (s, 1H) (Figura 48).

6.5 Determinación de la capacidad secuestradora del radical DPPH

Se preparó una solución del radical DPPH en metanol (9 x 10^{-5} Molar). A 2.9 mL de ésta solución se le adicionaron 100 µL del producto a analizar. Las muestras se incubaron durante 30 min a 37 ° C en un baño de agua, y la disminución de absorbancia a 517 nm se midió (A_E). Una muestra blanco conteniendo 100 µL de metanol se le adicionó a la solución de DPPH, y su absorbancia se midió a 517nm (A_B). La actividad secuestradora de radicales libres se calculó utilizando la siguiente ecuación (Domínguez Ortiz *et al.,* 2010).

$$\%\ Inhibición = \left[\frac{AB - AE}{AB}\right] x100$$

6.6 Determinación del potencial reductor férrico (FRAP)

La evaluación de la actividad antioxidante: se realizó mediante el ensayo FRAP (Potencial antioxidante para reducir el Fe^{+3}) basado en la capacidad reductiva del ion férrico a pH bajo, empleando una curva patrón de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ y expresado en mM de Fe^{+2}mg.100g^{-1}.

Reactivos y soluciones empleadas para la preparación de la solución FRAP: Buffer de acetato de sodio 300 mM pH: 3.6 ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$) y $C_2H_4O_2$. Solución 10mM TPTZ (2, 4, 6 tris (2-piridil)-s-triazina) en una solución 40mM de HCl. Solución 20 mM de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$.

Preparación de la solución FRAP (Fe^{+3}-TPTZ) (Blanco) y solución patrón de Fe^{+2}: La solución FRAP se preparó mediante la mezcla de 25mL de la solución TPTZ y 2.5 mL de la solución $FeCl_3 \cdot 6H_2O$. Se midió la absorbancia a 595 nm a 37°C. La solución de Fe^{+2} (patrón) se preparó a partir $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ en un rango de 0,1 a 2 mM.

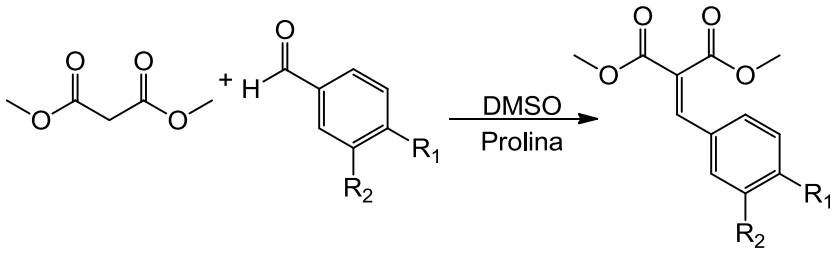
Se mezclaron 3 mL de la disolución FRAP con 300 µL de agua y 100 µL de muestra. La absorbancia fue medida a 595 nm cada 15 seg durante 30 min empleando un

espectrofotómetro Ultravioleta-Visible. La temperatura se mantuvo a 37°C y los resultados sé expresaron en mmoles reducidos de ($FeSO_4$) (forma reducida del Fe^{+2}) µL de muestra (Sulbarán *et al*., 2011).

7. Resultados y discusión

7.1 Sistemas 1, 3-dicarbónilicos α, β-insaturados

En el presente trabajo se prepararon sistemas 1,3-dicarbonílicos α,β-insaturados que serían la base para la síntesis de los análogos de fenilbutazona. La síntesis de los sistemas se llevó a cabo utilizando la reacción desarrollada por Smith y Liu en 2008 (Figura 24), utilizando 4 aldehídos diferentes (benzaldehído, *p*-hidroxibenzaldehído, vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehido) y *p*-fluorobenzaldehído).



1:R_1 R_2 = H
2:R_1 = F, R_2 = H
3:R_1 = OH, R_2 = H
4:R_1 = OH, R_2 = OCH_3

Figura 24. Reacción de condensación.

Esta reacción fue catalizada por L-prolina en condiciones muy suaves a temperatura ambiente y agitación por 24 h y como disolvente aprótico utilizó al DMSO (Dimetil sulfóxido), por lo que es una reacción viable para la síntesis de estas moléculas, en comparación con otras posibles rutas de síntesis que necesitan varios pasos y siendo complicadas y utilizando reactivos de difícil adquisición,

El mecanismo de reacción propuesto es básicamente el mismo que opera en la condensación de Knoevenagel, en la que la adición nucleofílica sobre el aldehído por parte de un sistema 1,3-α,β-dicarbonílico, es catalizada mediante la prolina que juega un papel importante en la formación del intermediario de tipo sal de iminio, un buen electrófilo. Posteriormente se produce la eliminación intramolecular de la prolina para dar paso al sistema α,β-insaturado correspondiente (Figura 25) (Erkkila et al., 2007; Lee et al., 2011; Venkatanarayana y Dubey, 2012).

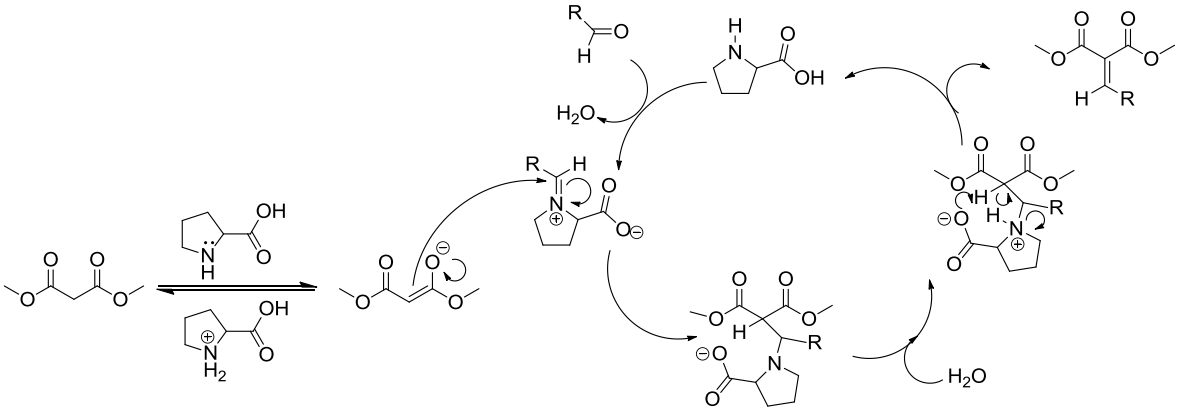


Figura 25. Mecanismo de reacción propuesto para la sistemas 1, 3-dicarbónilicos α, β-insaturados.

7.1.1. 2-benziliden malonato de dimetilo

El primer compuesto preparado bajo la metodología propuesta fue el 2-benziliden malonato de dimetilo. El producto obtenido fue un aceite trasparente de color amarillo, que reveló con luz UV de onda corta empleando una fase móvil Hexano/Acetato de etilo (8:2), con un Rf = 0.29 y se obtuvo un rendimiento del 69.63%. El análisis espectroscópico RMN-^{1}H del compuesto mostró las siguientes señales en7.77 ppm una señal simple correspondiente al hidrogeno vinílico (3), una señal múltiple en 7.39 ppm que correspondió a los hidrógenos aromáticos (4, 5, 6) y una señal simple en 3.82 ppm asignada a los grupos metoxilos del malonato de dimetilo (1, 2) (Figura 26).

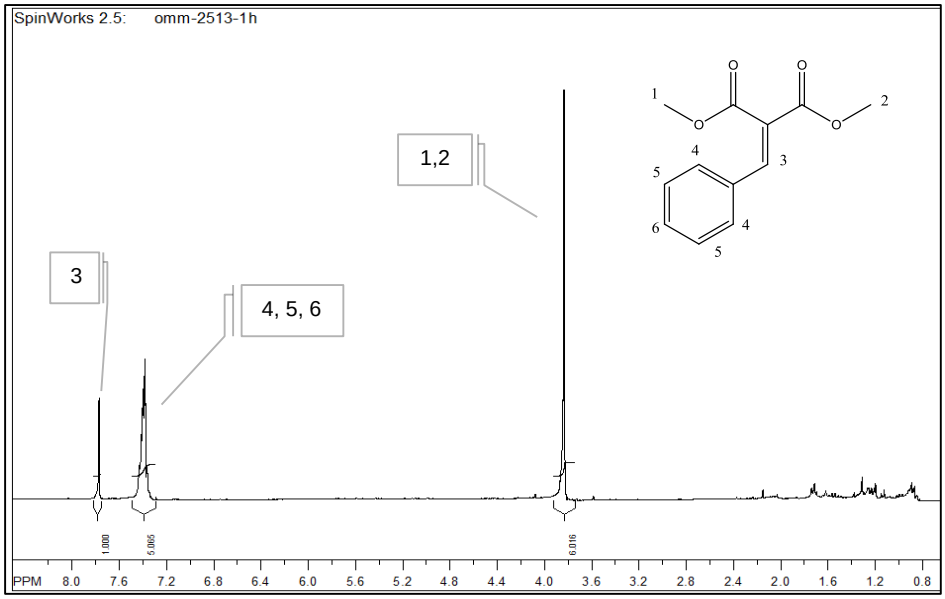


Figura 26. (RMN-^{1}H, $CDCl_3$) del 2-benziliden malonato de dimetilo

7.1.2 2-(4-fluorobenziliden) malonato de dimetilo

El 2-(4-fluorobenziliden) malonato de dimetilo fue obtenido en forma de aceite incoloro, la cromatografía en capa fina utilizando una fase móvil de Hexano: Acetato de (8:2), mostro absorción de luz ultravioleta con un Rf=0.35 y se obtuvo un rendimiento del 73.3%. El espectro de RMN-^{1}H mostró señales características de los sistemas α,β-insaturados con los siguientes desplazamientos químicos: en 7.71

ppm una señal simple que correspondió al hidrogeno vinílico (3), en 40 ppm una señal doble de dobles por acoplamiento a larga distancia con el átomo de flúor (4) y en 7.06 ppm una señal triple para los hidrógenos *meta* (5) del anillo aromático y finalmente en 3.83 ppm una señal simple correspondiente a los hidrógenos de los grupos metilo del diéster (1, 2) (Figura 27).

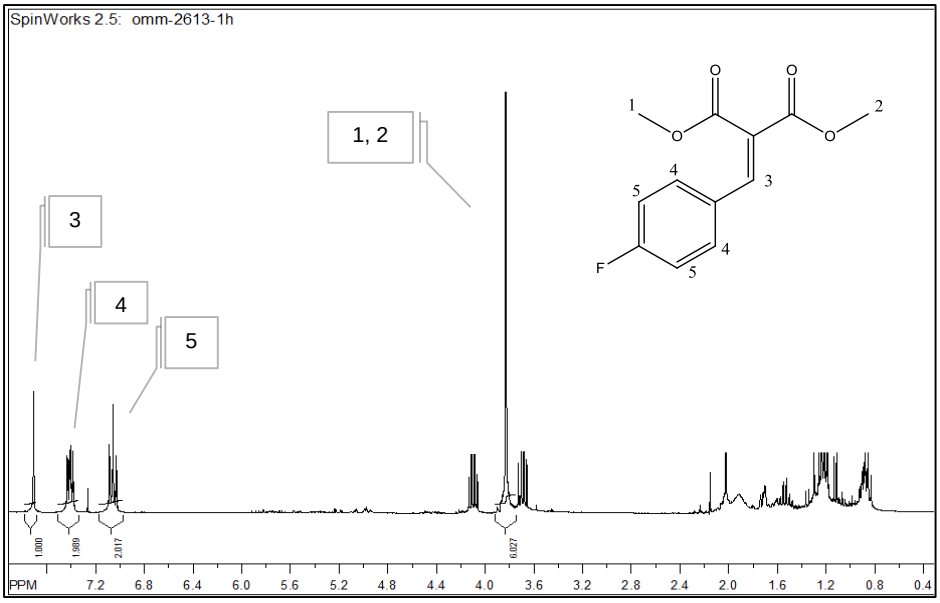


Figura 27. (RMN-^{1}H, $CDCl_3$) del 2-(4-fluorobenziliden) malonato de dimetilo

7.1.3 2-(4-hidroxibenziliden) malonato de dimetilo

El 2-[(4-hidroxifenil) metilen] malonato de dimetilo obtenido resultó ser un sólido cristalino de color amarillo, la cromatografía en capa fina revelada con luz ultravioleta de onda corta y usando una fase móvil de Hexano: Acetato de etilo (8:2) presentó un Rf=0.11 y se obtuvo un rendimiento del 92.6%. La espectroscopía de RMN-^{1}H mostró los siguientes desplazamientos químicos: en 7.77 ppm una señal simple correspondiente al hidrógeno vinílico (3), en 7.33 ppm una señal doble (4) acoplada con la señal doble (5) que aparece en 6.82 ppm presentando una *J*=9.09 Hz para ambos casos, en 5.86 ppm una señal simple correspondiente al hidrogeno fenólico del grupo Ar-OH (6), en 3.85 y 3.75 ppm una señal simple para cada uno de los metoxilos (1, 2) del diéster (Figura 28).

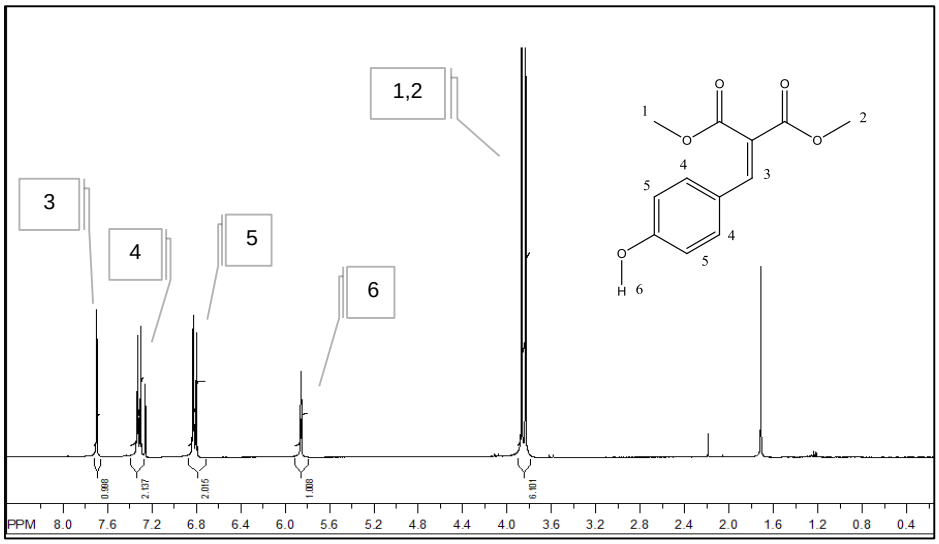


Figura 28. (RMN-^{1}H, $CDCl_3$) del 2-(4-hidroxibenziliden) malonato de dimetilo.

7.1.4 2-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden) malonato de dimetilo

El 2-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden) malonato de dimetilo obtenido fue solido cristalino y color blanquecino, con un Rf=0.13 cuando se eluyó con una fase móvil Hexano: Acetato de etilo (8:2) y se obtuvo un rendimiento del 84.3%. La espectroscopia de RMN-^{1}H mostró señales características con los siguientes desplazamientos: una señal simple 7.68 ppm que corresponde al hidrogeno vinílico (3), en 6.70 ppm una señal triple correspondiente a los hidrógenos del anillo (4), y una señal doble en 6.92 ppm correspondiente a los hidrógenos (5), en δ=5.94 ppm un señal simple que correspondió al grupo hidroxilo del anillo aromático (ArOH) (6), en δ=3.92 ppm y 3.88 dos señales simples correspondientes a los metoxilos del éster del malonato (1, 2), finalmente en 3.84 ppm una señal simple asignada al metoxilo aromático MeO-Ar (7) (Figura 29).

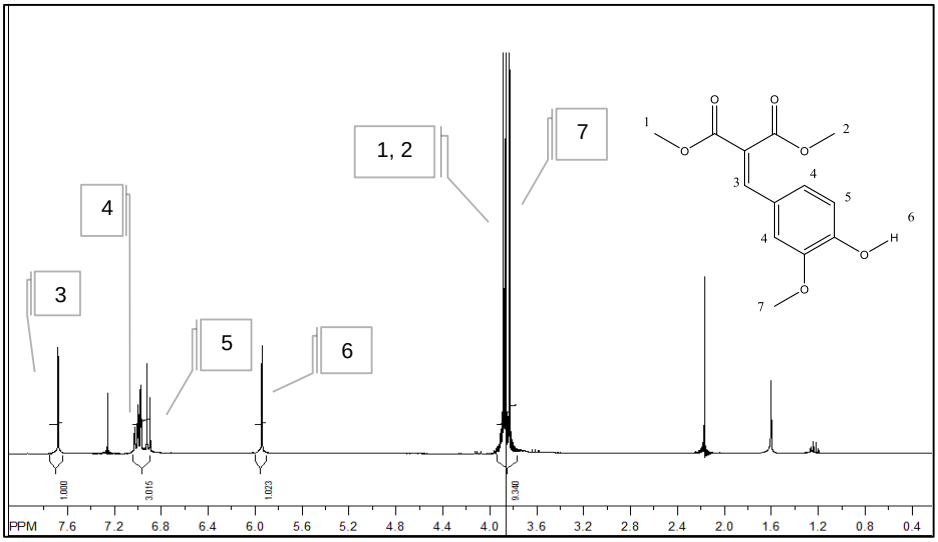


Figura 29. (RMN-^{1}H, $CDCl_3$) del 2-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden) malonato de dimetilo.

7.2 Determinación de la capacidad antioxidante

Existen numerosos métodos para cuantificar la actividad antioxidante total, los cuales se han aplicado a diferentes tipos de muestras biológicas. Estos métodos se basan generalmente en la captación o secuestro de radicales libres generados en la mezcla de reacción (O2 •$^-$, •OH, ROO•, $ONOO^-$, etc.), mientras que otros están basados en la reducción de iones metálicos tales como el Fe^{3+} o el Cu^{2+} (Sánchez-Moreno 2002; Schlesier *et al*., 2002; Prior *et al*., 2005).

Se sabe que los antioxidantes pueden actuar por múltiples mecanismos, dependiendo del sistema de reacción o la fuente radicalaria u oxidante, es por eso que se evaluó la capacidad antioxidante de radicales libres por el ensayo de DPPH y su poder reductor del ion férrico por el ensayo FRAP a los sistemas preparados (1, 2, 3, 4) (Figura 30).

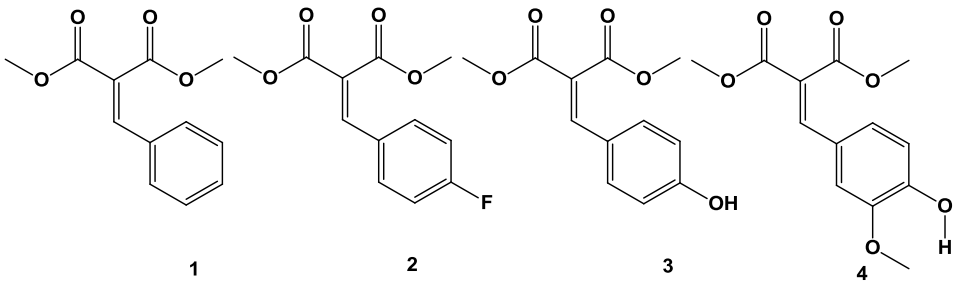
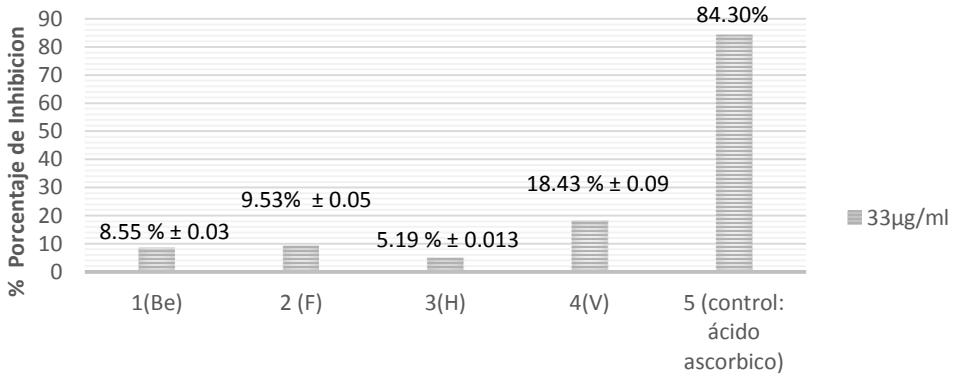


Figura 30. Sistemas 1, 3-dicarbonílicos α, β-insaturados.

Se utilizaron pruebas *in vitro* rápidas, fiables que proporcionaron información valiosa de la posible actividad biológica que pueden ejercer estas moléculas en un organismo; por ejemplo, el ensayo DPPH es una técnica que se basa en la donación de protones (H^+) por parte del moléculas contenidas en un extracto o de moléculas puras como es el caso de los sistemas evaluados, el valor obtenido se expresa en el porcentaje de inhibición del radical DPPH (Domínguez Ortiz *et al*., 2010). Los resultados obtenidos en la evaluación de los cuatro sistemas 1,3-dicarbonílicos α,β-insaturados mostró que el derivado (4V, 2-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden malonato de dimetilo) tuvo un mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH a una concentración de 33 µg/ml en comparación con los tres análogos restantes, pero en menor medida cuando se le comparó con el ácido ascórbico (Ac. Ascórbico *vs* **4V**: 84.3 *vs* 18.43 %,(Gráfica 1), el IC 50 para esta especie química es de 89.52 µg/ml necesarios para disminuir en un 50% al radical DPPH. Este resultado permitió seleccionar este análogo (**4**) para continuar en la preparación.



Grafica 1. % Inhibición del Radical DPPH.

De acuerdo a lo observado en Osorio *et al*., 2009; Villanueva Tiburcio *et al*., 2010, el mecanismo de las reacciones más probable de una molécula inhibidora/antioxidante frente radical DPPH en el proceso inhibidor del sistema 2-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden) malonato de dimetilo es el siguiente (Figura 31).

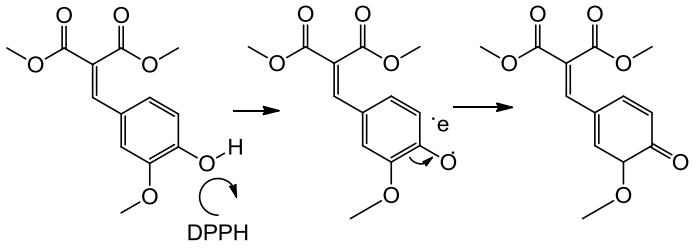
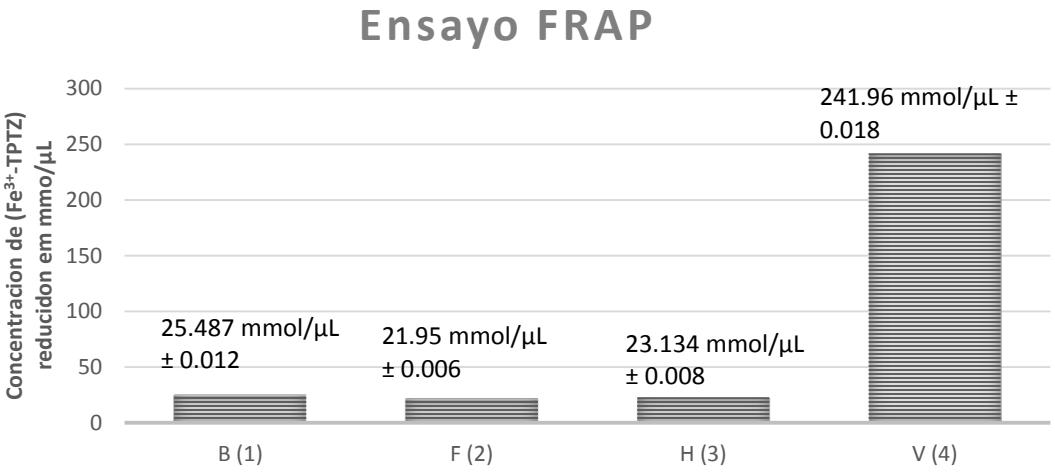


Figura 31. Proceso inhibidor del sistema 2-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden de dimetilo frente al radical DPPH.

Es importante mencionar que la actividad antioxidante de una sustancia puede ejercerse por diferentes mecanismos por lo cual en este trabajo también realizamos el ensayo FRAP para determinar el poder reductor de los cuatro benciliden malonatos preparados, se ha demostrado que la actividad de donar el protones documentada para el ensayo DPPH no necesariamente está ligada con la capacidad para reducir metales, por lo que la actividad reductora se llevó acabo según el método de Benzie y Strain, 1996.

El ensayo FRAP es una técnica capaz de detectar compuestos con un menor potencial redox y por lo tanto se considera un método adecuado para evaluar la capacidad de los antioxidantes para modular el tono redox de células y tejidos (Griffin y Bhagooli, 2004), en este sentido la reducción ocurre cuando una especie química gana electrones y simultáneamente disminuye su número de oxidación $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$.

Los resultados obtenidos en el ensayo FRAP demuestran que el sistema 4 derivado de vainillina es el que presento un mayor poder reductor de los 4 sistemas como se observa al compararlos con los sistemas (1, 2, 3) Grafica 2.



Grafica 2. Poder reductor en el ensayo FRAP.

7.3 Análisis de los intentos para la obtención de los análogos de fenilbutazona

En el presenta trabajo se realizaron varios intentos para obtener los análogos de fenilbutazona, en total 4 reacciones y 2 más para obtener un anillo homólogo al producto deseado con hidracina (Figura 32).

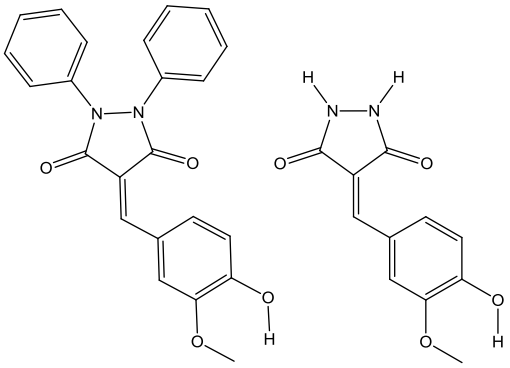


Figura 32. Análogo de la fenilbutazona y molécula homologa.

7.3.1 Método 1

En esta aproximación a la preparación del análogo de la fenilbutazona se empleó como base hidruro de sodio NaH al 10 %, haciéndose reaccionar con hidrazobenceno para posteriormente atacar a los grupos carbonilo del sistema 1,3-dicarbónilicos α, β-insaturados derivado de la vainillina (Figura 33). De acuerdo a lo observado en la espectroscopia de RMN-^{1}H no se pudo caracterizar el producto deseado, ya que la señales observadas no correspondían a las señales esperadas, además de que los grupos metoxilos del malonato no desaparecieron, por lo que la formación del anillo de pirazolona no ocurrió (Figura 34).

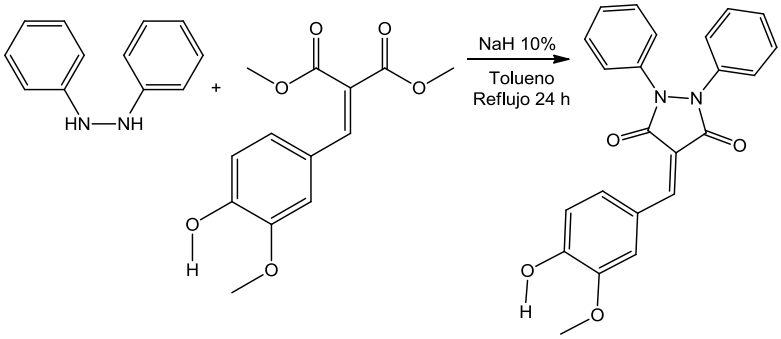


Figura 33. Método 1 para la preparación del análogo de fenilbutazona.

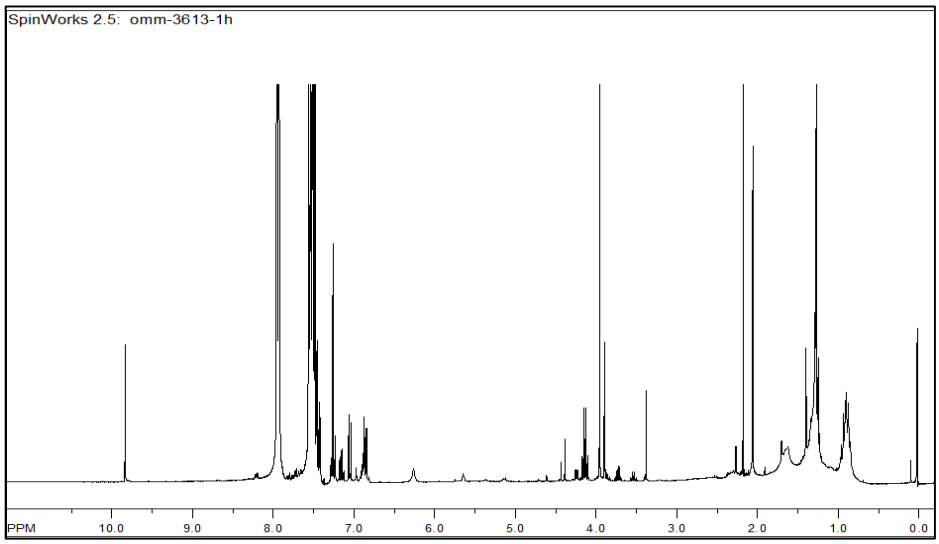


Figura 34. (RMN-^{1}H, $CDCl_3$) de 4-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden)-1,2 difenilpirazoliden-3,5-diona, método 1.

7.3.2 Método 2

En la reacción 2 se utilizó como catalizador tricloruro de aluminio al 10%, que reaccionó en primera instancia con el sistema 1,3-dicarbónilico α,β-insaturado (Figura 35) formando un complejo de coordinación con el oxígeno del grupo carbonilo para hacer más fácil el ataque nucleofílico por parte de la difenilhidrazina; sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en la espectroscopia de RMN-^{1}H (Figura 36) la reacción no precedió satisfactoriamente pues se observaron las señales de la materia prima sin reaccionar, ya que las señales de los grupos metoxilos del grupo éster tendrían que haber desaparecido tras la formación del anillo de pirazolona.

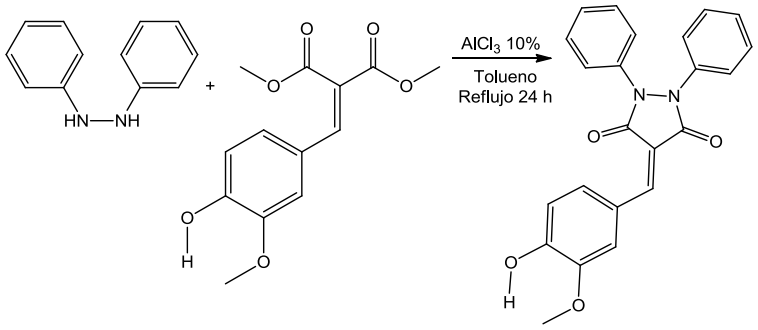


Figura 35. Método 2 para la preparación del análogo de fenilbutazona.

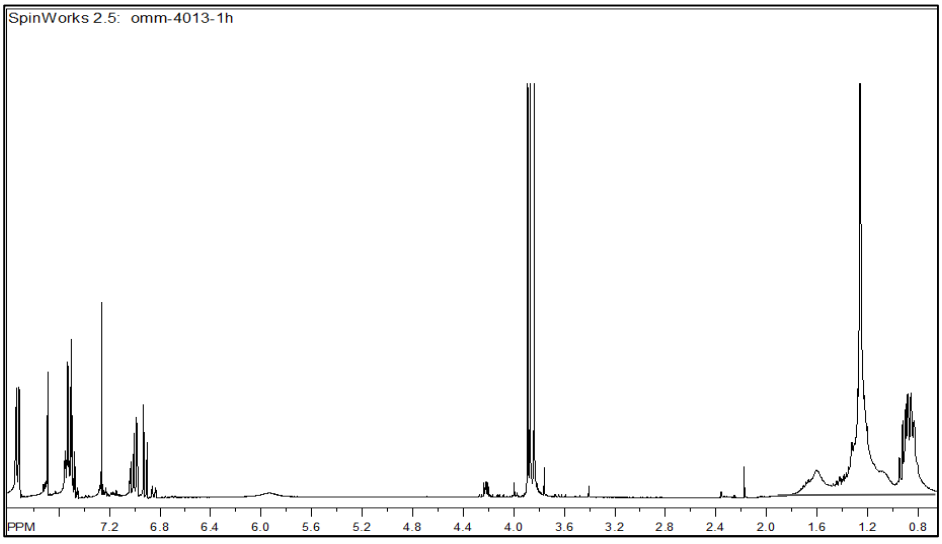


Figura 36. (RMN-^{1}H, $CDCl_3$) de 4-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden)-1,2 difenilpirazoliden-3,5-diona, método 2.

7.3.3 Método 3

En el tercer intento para la obtención del análogo de la fenilbutazona se utilizó sodio metálico Na en metanol para formar *in situ* una base fuerte ($MeO^{-+}Na$), el cual se hizo reaccionar previamente con la difenilhidrazina para desprotonarla y hacerla más nucleofílica y, posteriormente se sometió a reflujo (Figura 37). De acuerdo a lo observado en el espectro de RMN-^{1}H no fue posible ubicar las señales esperadas para el producto deseado, ya que se continuó observando las señales correspondientes a los grupos metoxilos del malonato de dimetilo (Figura 38).

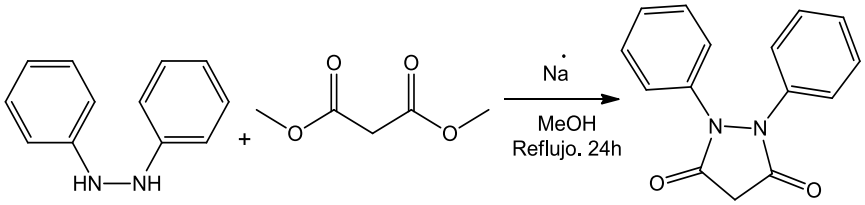


Figura 37. Método 3 para la preparación del análogo de fenilbutazona.

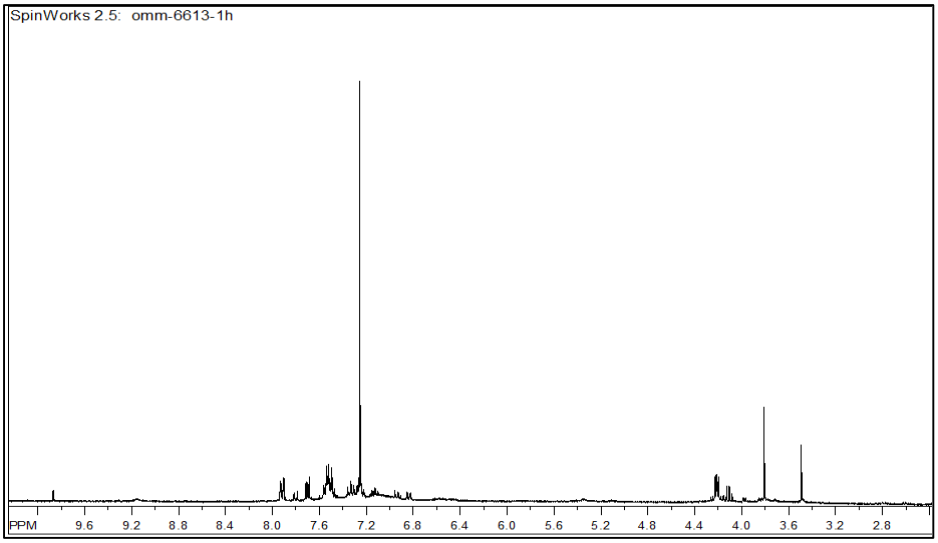


Figura 38. (RMN-^{1}H, $CDCl_3$) de 4-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden)-1,2 difenilpirazoliden-3,5-diona, método 3.

7.3.4 Método 4

De acuerdo a los experimentos realizados anteriormente se realizó un cuarto ensayo (Figura 39) en la cual, malonato de dimetilo se hidrolizó al ácido malónico correspondiente como se muestra en el espectro de RMN-^{1}H (Figura 40). El producto obtenido se hizo reaccionar con cloruro de tionilo para obtener el cloruro de ácido correspondiente, posteriormente se trató con *N, N*-dimetil amino piridina. A la mezcla de reacción preparada se le adicionó la difenilhidrazina previamente tratada con trietilamina y la mezcla de reacción se dejó agitando a temperatura ambiente. Sin embargo, el análisis por RNMN-^{1}H (Figura 41) permitió establecer que la reacción no correspondía al producto esperado.

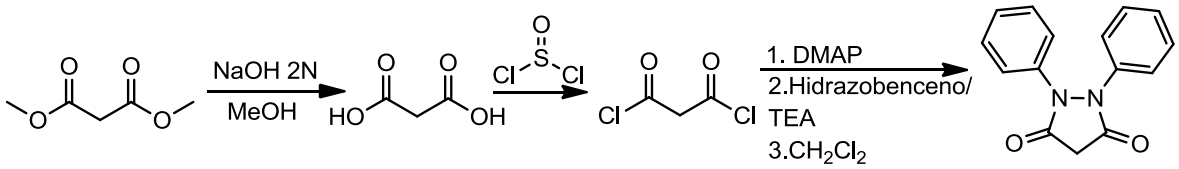


Figura 39. Método 4 para la preparación del análogo de fenilbutazona.

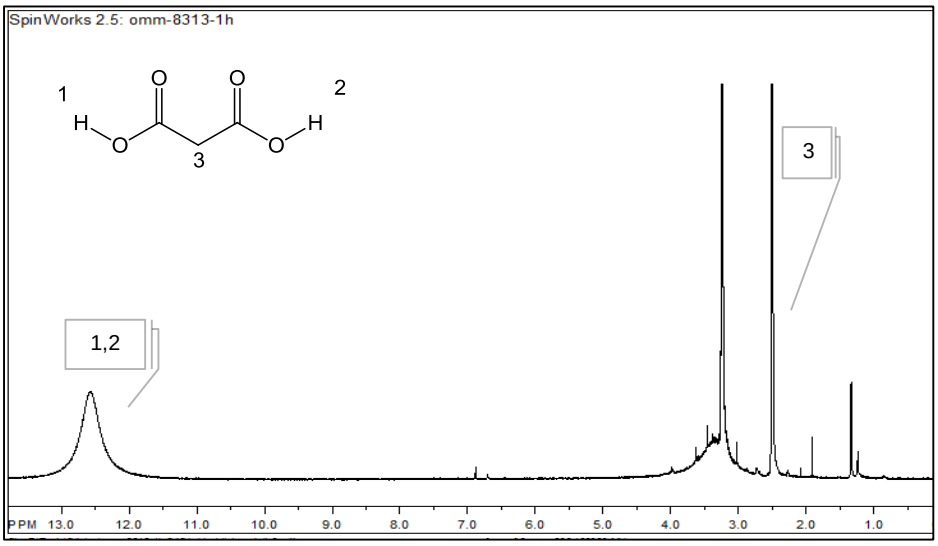


Figura 40. (RMN-1H, DMSO-d_6) del ácido malónico, Método 4.

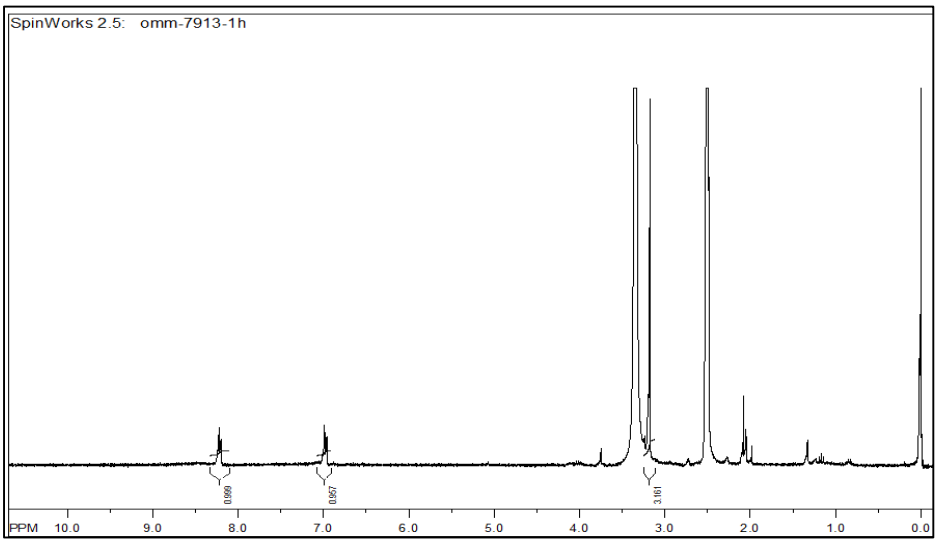


Figura 41. (RMN-^{1}H, $CDCl_3$), 1,2-difenilpirazolidina-3,5-diona método 4.

7.3.5 Análisis del hidrazobenceno

Observando los resultados obtenidos en las cuatro reacciones anteriores se procedió a analizar por RMN-^{1}H a la difenilhidrazina (Figura 42) y se comparó con el espectro reportado en la literatura (Figura 43).

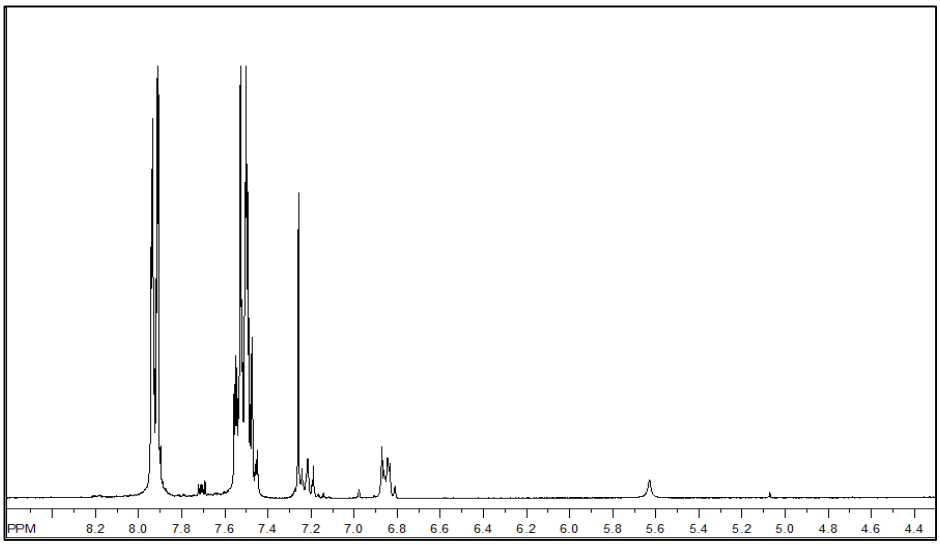


Figura 42. (RMN-^{1}H, $CDCl_3$), de la difenilhidrazina.

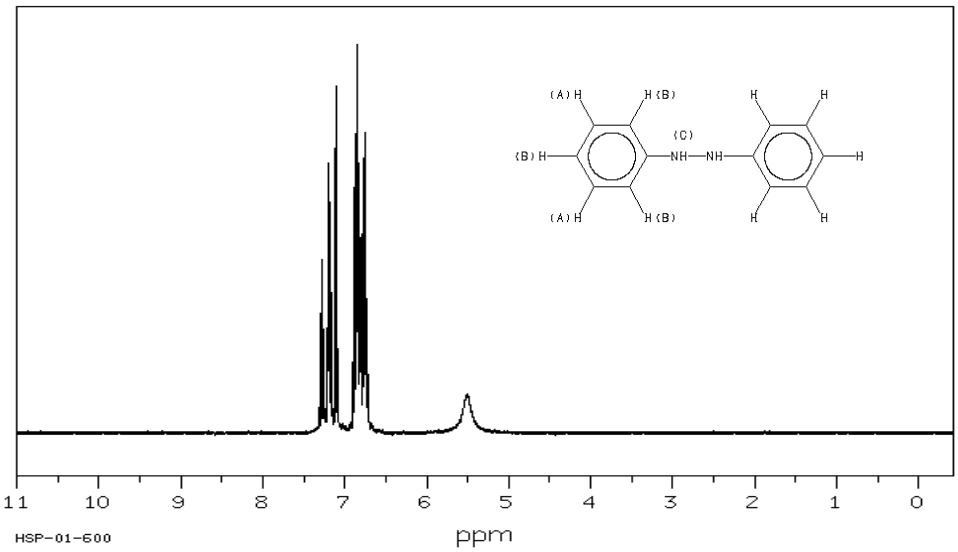


Figura 43. Espectroscopia de RMN-^{1}H en $CDCl_3$ de la difenilhidrazina, tomado de Spectral Database for Organic Compounds SDBS

Al hacer la comparación de los desplazamientos químicos y la multiplicidad de las señales de la difenilhidrazina se observa claramente que el reactivo empleado no corresponde al deseado. De igual forma, al comparar el punto de fusión de la materia prima con la reportada en la literatura se pudo constatar que se trataba de compuestos distintos (123-126 °C Literatura *vs* 65-70 °C Experimental).

7.3.6 Método 5

Como se mencionó en un principio se realizaron varias reacciones para poder obtener los análogos de fenilbutazona en total 4 reacciones y 2 más para obtener un anillo homólogo al producto deseado.

De acuerdo a lo observado anteriormente la difenilhidrazina era el reactivo principal para poder obtener los análogos de fenilbutazona, respecto a esto se buscó la manera de obtener una molécula homologa al producto deseado partiendo en esta ocasión de hidrazina. De acuerdo (Metwally *et al*., 2010) se montó la método 5 en la cual se partía de malonato de dimetilo e hidrazina monohidratada, que producía 2 compuestos principales (9, 10) (Figura 44).

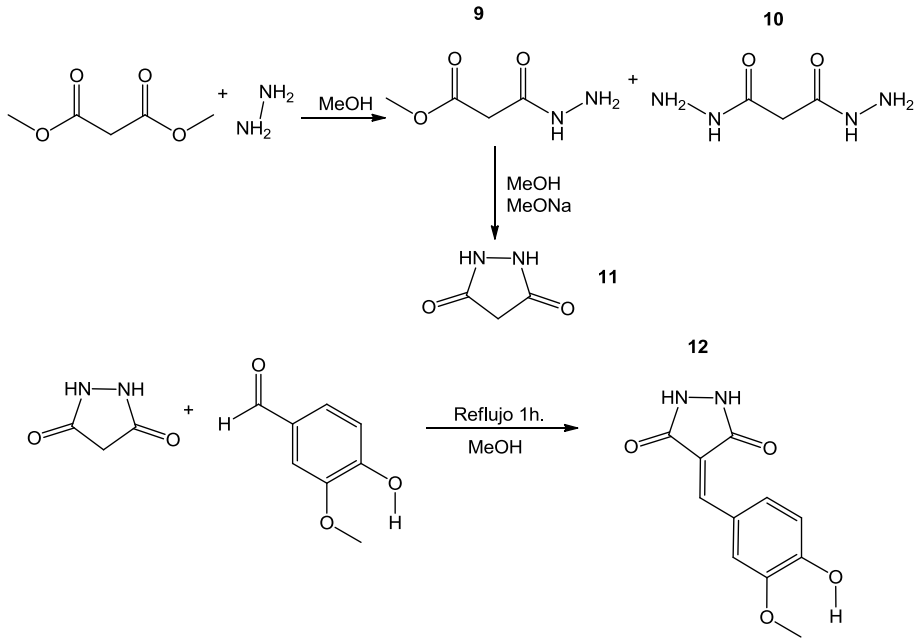


Figura 44. Síntesis del homólogo de fenilbutazona.

De acuerdo a lo analizado en la espectroscopia de RMN-^{1}H, las señales observadas permitieron la caracterización del 3-hidrazinil-3-oxopropanoato de metilo (Figura 45): una señal simple para 2H en 2.083 ppm asignada al amino terminal del segmento de hidrazina, en 2.91 ppm una señal simple para 2H que se asignó al metileno, en 3.16 ppm una señal simple para 3H correspondiente al grupo metoxilo y finalmente en 9.26 ppm una señal simple que integra para 1H y que se asignó al otro NH.

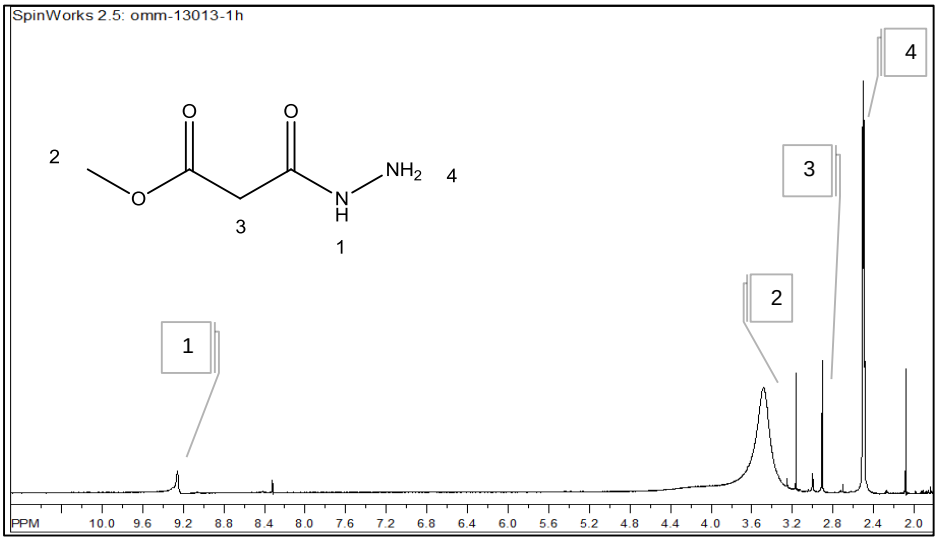


Figura 45. (RMN-^{1}H, $CDCl_3$), 3-hidrazino-3-oxo-propanoato de metilo método 5.

Al analizar en la espectroscopia de RMN-1H (Figura 46), para la preparación del anillo de pirazolidina 3,5-diona, las señales observadas no permitieron caracterizar el producto ya que las señales coinciden con las esperadas por lo que el producto no se obtuvo.

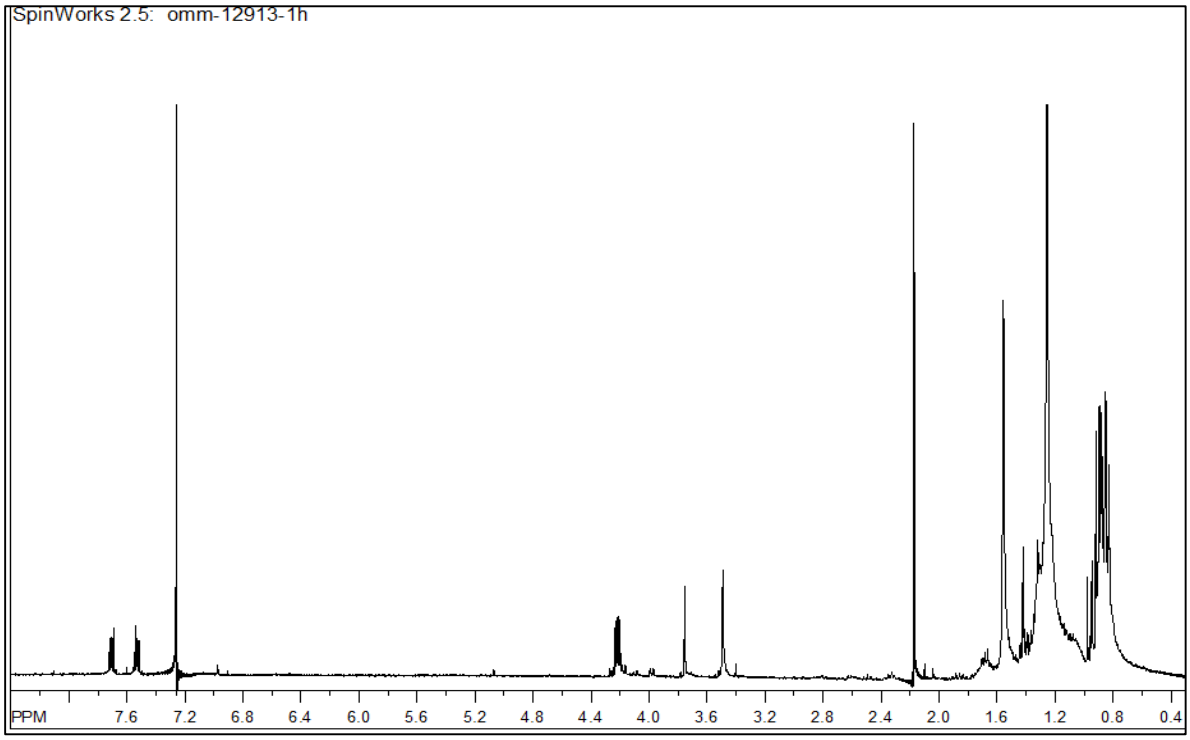


Figura 46. (RMN-^{1}H, $CDCl_3$), anillo de pirazolidina 3,5-diona método 5.

7.3.7 Método 6

Finalmente, la reacción 6 se realizó partir del sistema un 1,3-dicarbónilico α,β-insaturado derivado de la vainillina, 2-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden) malonato de dimetilo y se hizo reaccionar con hidrazina utilizando como catalizador al $AlCl_3$ (2 q.) en metanol (Figura 47).

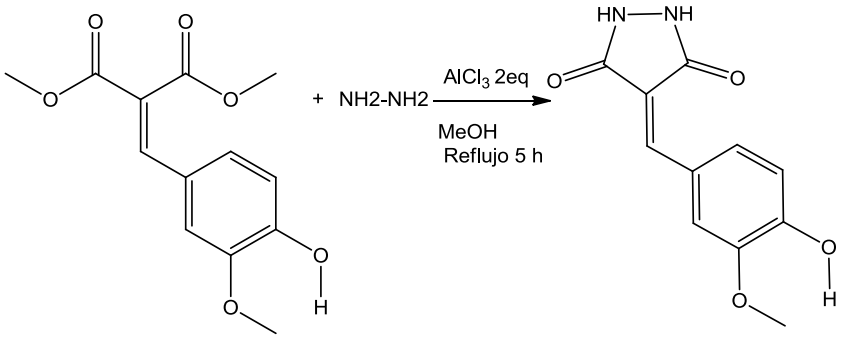


Figura 47. Síntesis del homólogo de fenilbutazona, método 6.

Una vez realizada la reacción, el producto obtenido fue aislado en una placa semipreparativa utilizando una fase móvil de hexano acetato de etilo (6:4), con un Rf=0.50 y un Pf=175-176 °C.

El análisis del espectro de RMN-^{1}H mostró las siguientes señales: en 3.98 ppm una señal simple que integra para 3H asignada al grupo metoxilo del fragmento de vainillina, en 5.98 ppm una señal simple y ancha que se asignó al hidroxilo presente en el anillo aromático, en 6.98, 7.22 ppm dos señales dobles asignadas para los protones aromáticos, 7.54 ppm una señal simple para el hidrógeno *orto* y en 8.58 ppm una señal simple para el protón vinílico; sin embargo, no fue posible identificar los hidrógenos del segmento de hidracina presentes en el anillo de pirazolona (figura 48). En la figura 49 se muestra la predicción de la RMN-^{1}H para la estructura del producto deseado que se realizó por el programa de software MestReNova.

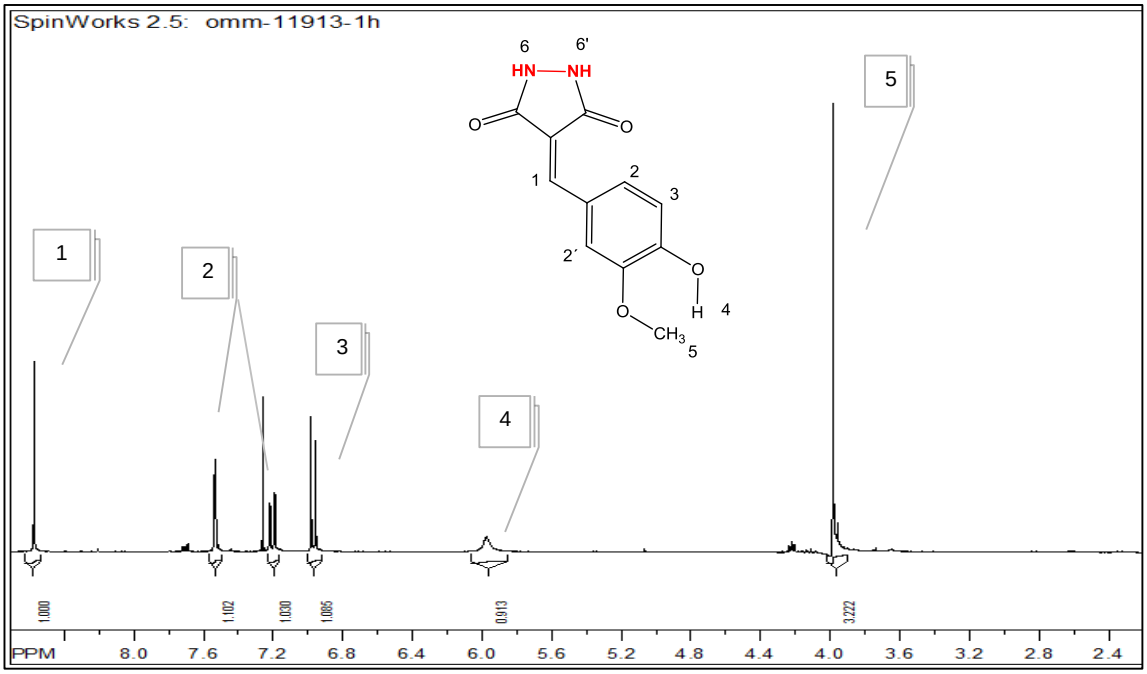


Figura 48. (RMN-^{1}H, $CDCl_3$) del homólogo de fenilbutazona obtenido mediante el método 6.

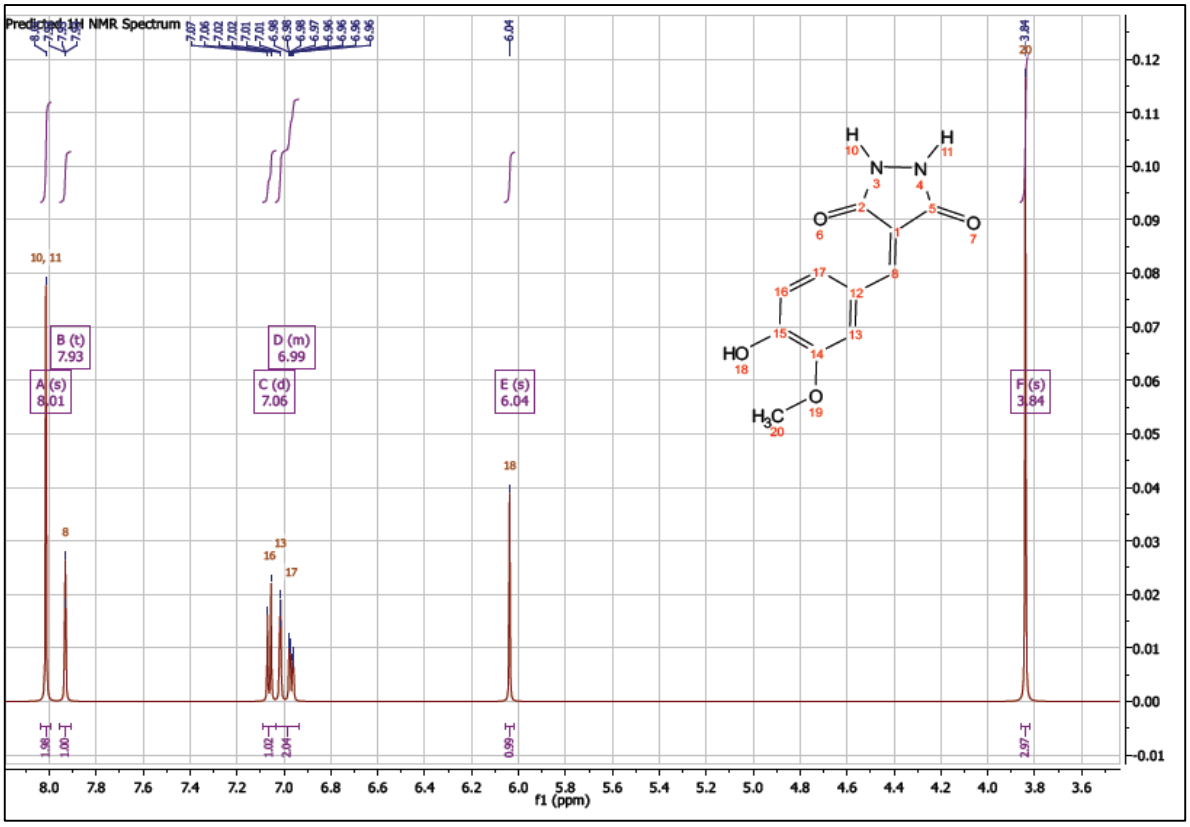


Figura 49. Predicción de (RMN-^{1}H) del homólogo de fenilbutazona obtenido mediante el método 6.

El análisis del producto obtenido mediante espectroscopia infraroja (Figura 50) proporcionó información sobre los grupos funcionales presentes en la muestra. En este espectro no fue posible observar las bandas correspondientes a la vibración de los grupos NH (3500 a 3600 cm-^{1}) este hecho permitió establecer que los nitrógenos se encontraban sustituidos.

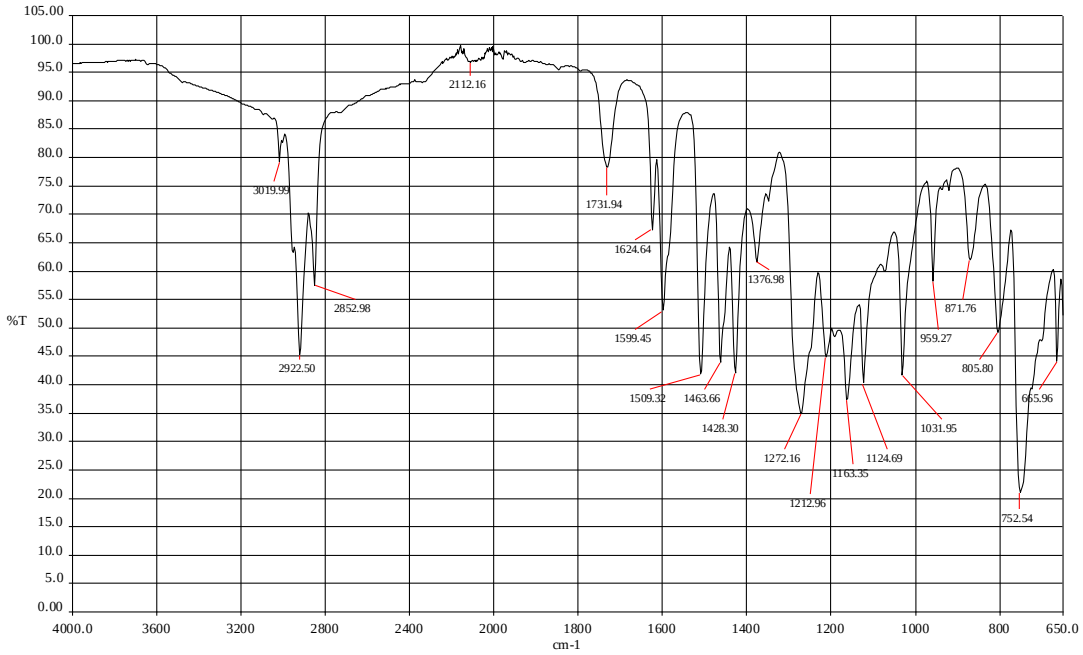


Figura 50. Espectroscopia infrarroja para el producto obtenido en el experimento 6.

Se propone a partir de todo lo anterior la existencia de una forma dimérica como producto obtenido en el experimento 6 que nos permite proponerla de acuerdo en la simulación la espectroscopia de RMN-^{1}H (Figura 51).

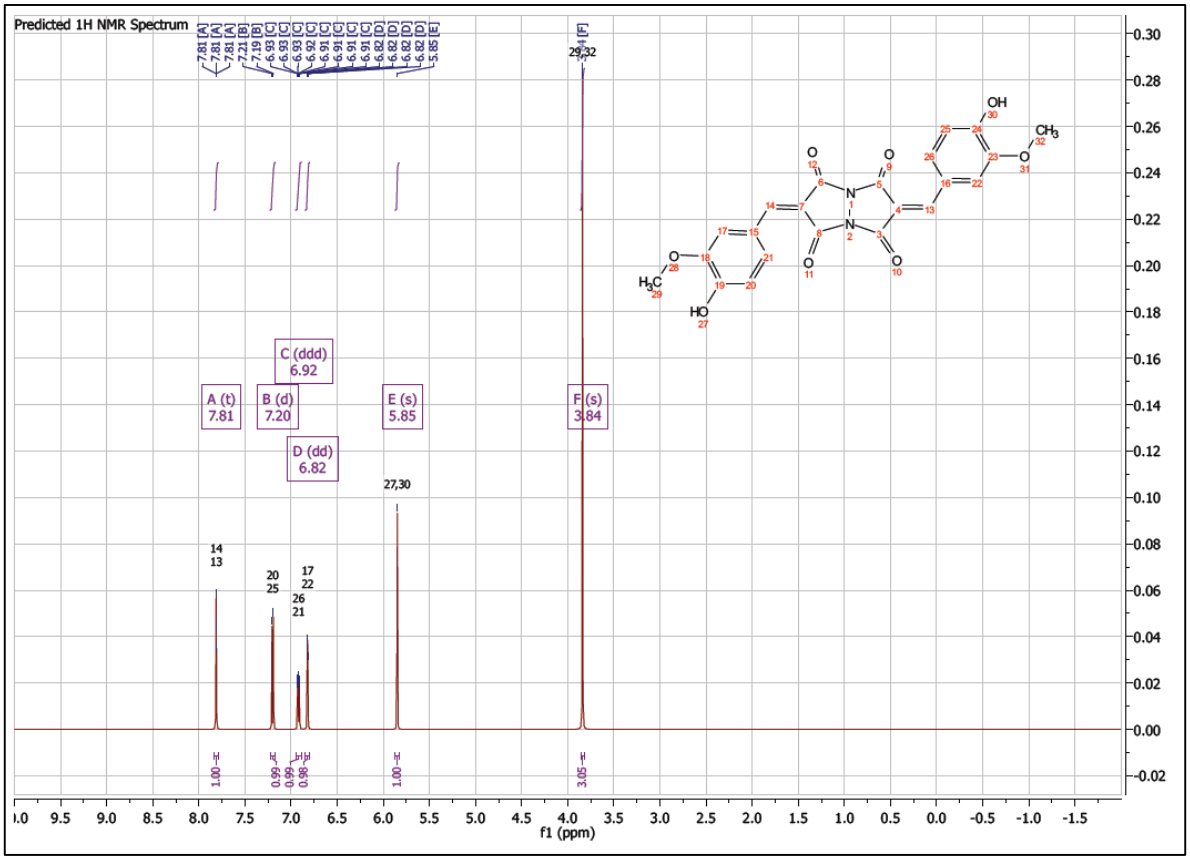


Figura 51. Espectro de RMN ^{1}H simulado para el homólogo dimérico de la fenílbutazona.

El sistema 1,3-dicarbonílico-α,β-insaturado se disolvió en metanol y se hizo reaccionar con 2 eq de $AlCl_3$ para formar un complejo de coordinación que lo hizo más reactivo al ataque nucleofílico de la hidrazina, esta base de Lewis al ser una amino primario reaccionó hasta que la fracción NH de la hidrazina llego hasta un amonió terciario ya que los carbonos del grupo dicarbonílico al estar desprotegidos por la atracción de densidad electrónica genero el $AlCl_3$ siguió reaccionando hasta la formación del dímero propuesto como se observa en la (Figura 52).

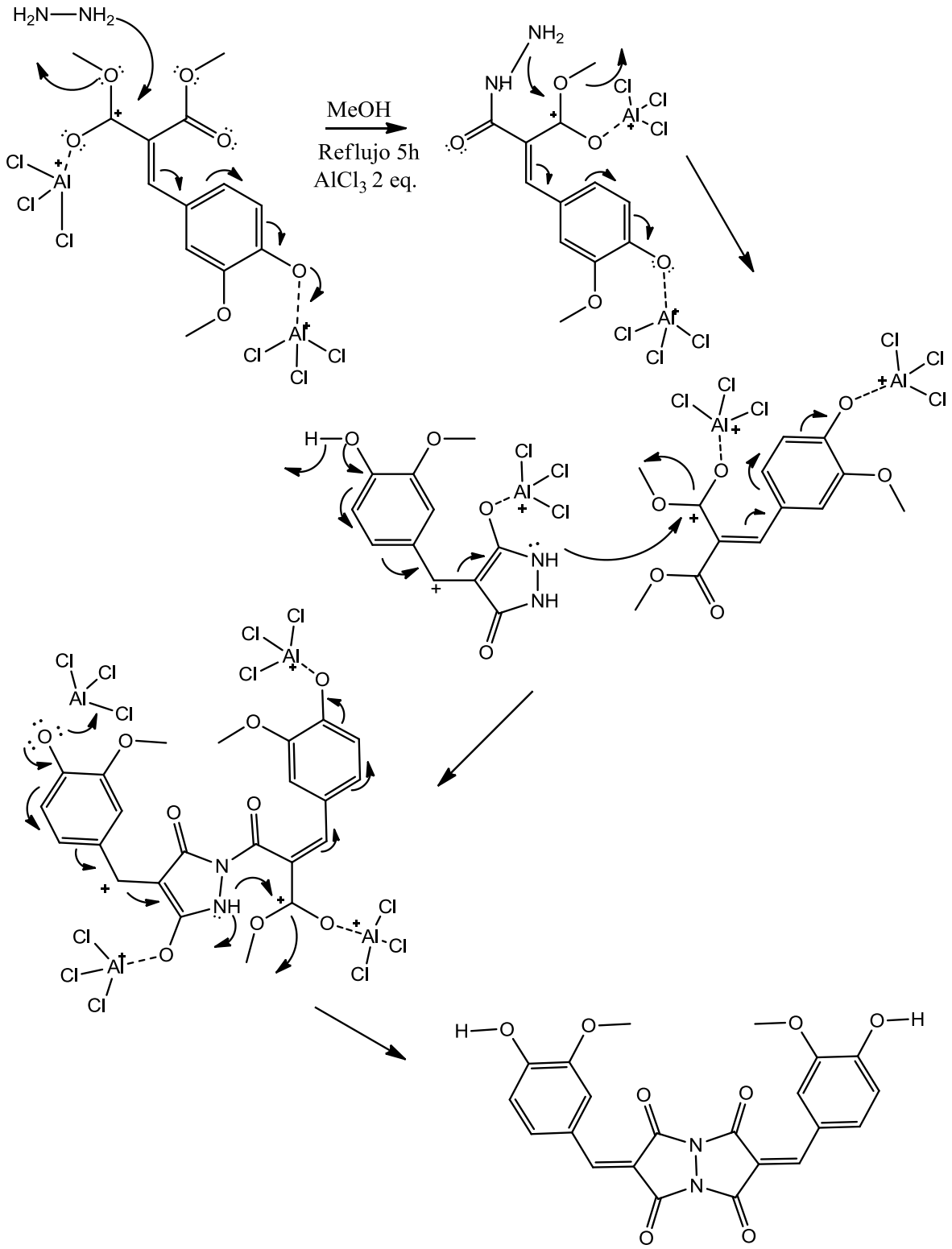


Figura 52. Mecanismo de reacción propuesto para la formación del dímero.

8. Conclusión

Se prepararon los 4 sistemas; 1,3-dicarbonílicos α, β-insaturados benciliden malonatos dimetílicos derivados de benzaldehído, *p*-hidroxibenzaldehído, *p*-fluorobenzaldehído y 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehido a partir del método propuesto por Smith y Liu en 2008, estas es una técnica eficiente para efectuar una condensación aldólica en un solo paso de reacción.

En el ensayo DPPH y el poder reductor de sales férricas por el ensayo FRAP, se observó que la especie química derivada de vainillina obtuvo un 18.43 % inhibición con una IC_{50} de 89.52 µg/ml del radical, frente los sistemas 1, 2, 3 que fueron inferiores. Al realizar el ensayo FRAP el sistema 4 derivado de vainillina es el que presentó un mayor poder reductor con 241.46 mmol/µL frente a los otros 3 sistemas 1, 2, 3.

Por último, se caracterizaron los 4 sistemas 1,3-dicarbonílicos α,β-insaturados por espectroscopia de RMN-^{1}H concluyendo que se obtuvieron estos productos. En las reacciones para obtener los análogos de fenilbutazona, no se logró obtener los productos deseados por las razones que ya se mencionaron, sin embargo, se logró la identificación los productos obtenidos.

9. Referencias bibliográficas

1. **Andrews FM, Reinemeyer CR, Longhofer SL**. Effects of top-drees formulatioss of Suxibuzone and Phenylbutazone on Development of gastric ulcers in horses. Veterinary therapeutics 2009; 10 (3):113-120.

2. **Barrón Yánez RM, García Mateos MR, Soto Hernández MR.** Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* Yakovlev. Fitotec 2011; 3:151-157.

3. **Ballesteros C.** Farmacocinética comparada de la fenilbutazona en diferentes especies animales: estudio alométrico Memoria para obtener el grado de Doctor Madrid, editorial: Universidad complutense de Madrid Facultad de Veterinaria departamento de toxicología y farmacología; 2004.

4. **Batlouni M.** Antiinflamatorios No Esteroides: Efectos Cardiovasculares, Cerebrovasculares y Renales. Sociedad Brasileña de Cardiología, SP – Brasil 2009; 94(4):538-546.

5. **Banchero P, Giachetto G**. Agranulocitosis inducida por medicamentos. Arch Pediatr Urug 2002; 73(2): 76-79.

6. **Benzie IF, Strain JJ**. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical Biochemistry 1996; 239 (1):70-6.

7. **Boveris A.** La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. Academia iberoamericana de farmacia 2005; 46 (1): 85-95.

8. **Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology 1995;28 (1):25-30

9. **Castañeda CB, Ramos LLE, Ibáñez VL**. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Horizonte Médico 2008; 8(1):56-72.

10. **Cruz Niesvaara D, Leiva Aranda I, Ibero Villa JL, Blanco López B.** Revisión y actualización de la hiperuricemia. SEMG 2006; 88:593-602

11. **Domínguez Ortiz MA, Muñoz Muñiz OD, García Rodríguez RV, Vázquez Hernández M, Gallegos Estudillo J, Cruz Sánchez JS**. Antioxidant and

antiinflammatory activity of *Moussonia* deppeana Rev Revistas científicas de América Latina, el Caribe y Portugal (Redalyc) 2010; 9:13-19.

12. Dudley F, Burley D. Phenylbutazone and its derivatives. British medical 1959:1087-1089.

13. Erkkila A, Majander I, Pihko PM. Iminium catalysis. Rev Chem. **2007**; *107*: 5416-5470.

14. Garrido AM. El peróxido de hidrogeno como mediador en el proceso de contracción relajación. Estudios *in vitro e in vivo.* Tesis doctoral. Madrid España: Universidad de Alcala; 2007.

15. Griffin, S, Bhagooli R. Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. Exp Mar. Biol. Ecol. 2004; 302: 201-211.

16. Groutas WC. Mecanismos de reacción en química orgánica problemas selectos y soluciones.1ª ed. México, DF: Mc Graw Hill; 2002. pág. 82-83.

17. Hall V, Murillo N, Rocha M, Rodríguez E. Antiinflamatorios no esteroidales (AINE's) 1era.ed. Edit. Farmacéuticas CIMED; 2001. pág. 3

18. Kouskoski EM, Asuero A, Troncoso AM, Mancini J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Cienc. Tecnol. Aliment Campinas 2005; 25:736-732.

19. Korc I, Bidegain M, Martell M. Radicales libres Bioquímica y sistemas antioxidantes implicados en la patogenia neonatal. Med Uruguay 1995; 11: 121-135.

20. Lee A, Michrowska A. Sulzer-Moss S, List B. The catalytic asymmetric Knoevenagel condensation. Angew Chem. Int. Ed. 2011; *50*: 1707-1710.

21. Loza E. AINEs en la práctica clínica: Lo que hay que saber. Rev IT del Sistema Nacional de Salud 2011; 35:88-95.

22. Luna LE, Martínez M, Prada DN, Cravero RM. Desarrollo de reacciones de condensación aldólica sobre soporte de celulosa. Avances en química y en biología 2011; 2:119-130.

23. Maldonado Saavedra O, Jiménez Vázquez EN, Bernabé Guapillo Vargas MR, Ceballos Reyes GM, Méndez Bolaina E. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. Med UV 2010; 33-39.

24. Martínez Vásquez J. “Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus*. Tesis de Licenciatura. Universidad Tecnológica de la Mixteca de Oaxaca; 2006, pág. 16.

25. Merck. The Merck index 11th ed. Eds. Merck &Co., Inc Whitehouse station N.J. USA, monografía n°9185, (1996a). Pag. 1542.

26. Merck. The Merck index 11th Ed eds. Merck &Co., Inc Whitehouse station N.J. USA, monografía n°7431, (1996b). Pag. 1254.

27. Metwally SAM, Abdel Moneim MI, Elossely YA, Awad RI, Hadeed-Abou A. Synthesis and crystal structure of some 3,5- pyrazolidinediones. Chemistry of heterocyclic compounds. 2010; 46(4):426-435.

28. Nuñes Cámara C, Ventura López P, Martínez Escudero JA. AINEs “clásicos” e inhibidores selectivos de la COX-2. INSALUD 2001; 2(4):1-8.

29. Osorio E, Montoya G, Bastida J. Caracterización fitoquímica de una fracción de biflavonoides de *Garcinia madruno:* su inhibición de la oxidación de LDL humana y su mecanismo de estabilización de especies radicalarias. QUÍMICA FARMACÉUTICA 2009; 16 (3): 369-377.

30. Palomino LR, García CM, Gil JH, Rojano BA, Durango DL. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). Revista de la facultad de química farmacéutica 2009; 16: 388-395.

31. Paquette LA. Fundamentos de Química Heterocíclica. Edit. Limusa. 2005, pág. 192-195.

32. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem 2005; 53:4290- 4302.

33. Quintanar Escorza M A, Calderón Salinas JV. La capacidad antioxidante total. bases y aplicaciones. Educación Bioquímica 2009; 28:89-101.

34. Sánchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. Food Sci Tech 2002; 8:121- 137.

35. Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. Free Rad Res 2002; 36:177-187.

36. Smith A B, Liu Z. Total synthesis of (-) -Aplaminal. Rev American Chemical Society 2008; 10:4363-4365.

37. Sulbarán B, Sierra E, Ojeda G, Berradre M, Fernández V, Peña J. Evaluación de la actividad antioxidante del tomate crudo y procesado. Fac. Agron. (LUZ) 2011; 28: 273-291.

38. Theodorou V, Skobridis K, Tzakos AG, Ragoussis V. A simple method for the alkaline hydrolysis of esters. Science Direct 2007; 48: 8230–8233.

39. Velázquez Paniagua M, Prieto Gómez B, Contreras Pérez R. El envejecimiento y los radicales libres. Ciencias 2004; 75:36-43.

40. Vennerstrom JL, Holmes TJ. Preparation and Evaluation of Electrophilic Derivatives of Phenylbutazone as Inhibitors of prostaglandin-H synthase. *J. Med. Chem.* 1987; 30:563-567.

41. Venkatanarayana M, Dubey PK. L-Proline-catalyzed Koevenagel condensation: A facile, Green synthesis of (*E*)-ethyl-2-cyano-3-(1H-indol-3-yl) acrylates and (*E*) - 3-(1H-indol-3-yl) acrylonitriles. Synthetic communications 2012; *42*:1746-1759.

42. Villanueva Tiburcio JE, Condezo Hoyos LA, Ramírez Asquieri ER. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cascara de camu-camu (M*yrciaria* dubia (H.B.K) McVaugah. Ciencia y tecnología de alimentos 2010; 30(1):151-160.