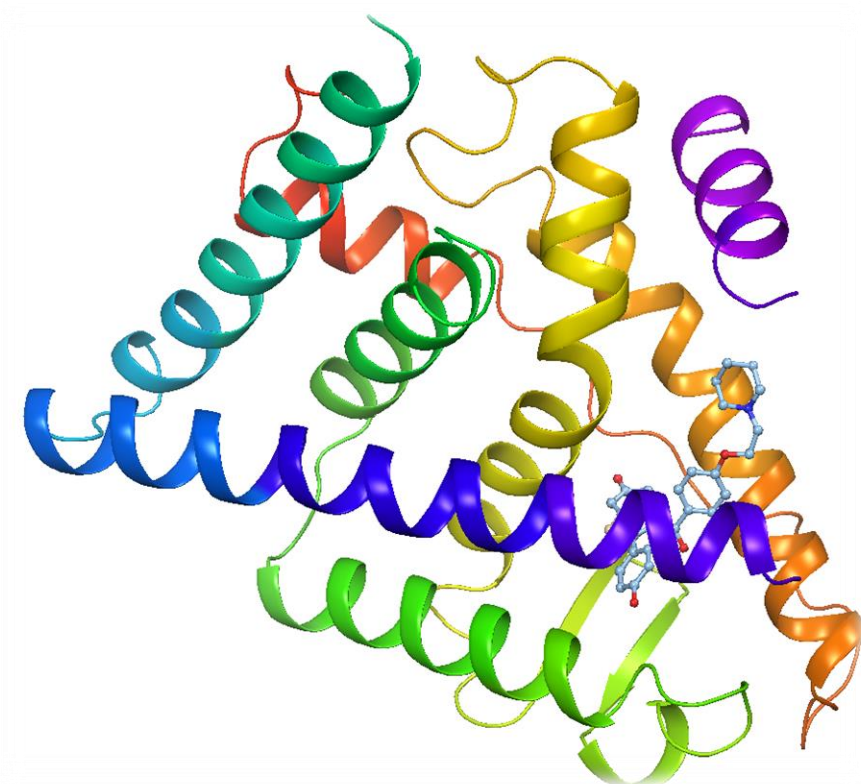


PREPARACIÓN DE MODULADORES SELECTIVOS DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS A PARTIR DE PRODUCTOS NATURALES TIPO LIGNANO



TUTORA: ANA ESTÉVEZ BRAUN

COTUTOR: ÁNGEL AMESTY ARRIETA

ALUMNA: SANDRA MARRERO PÉREZ

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. IMPORTANCIA DE LA BÚSQUEDA DE NUEVOS SERMS.....	2
2.1. ANTECEDENTES DE COMPUESTOS TIPO LIGNANOS CON ACTIVIDAD ESTROGÉNICA.....	4
3. OBJETIVOS.....	7
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
4.1. MATERIAL.....	8
4.1.1. Técnicas cromatográficas.....	8
4.1.2. Técnicas instrumentales.....	8
4.1.3. Disolventes y reactivos.....	8
4.1.4. Técnicas de modelización molecular.....	8
4.1.5. Obtención de los lignanos bursehernina y dimetilétermatairesinol.....	8
4.2 MÉTODOS.....	9
4.2.1. Preparación del producto 1a.....	9
4.2.2 Preparación del producto 1b.....	9
4.2.3. Procedimiento general para la obtención de los productos 1c y 2a.....	10
4.2.4. Procedimiento general para la obtención de los productos 1d y 2b.....	11
4.2.5. Procedimiento general de obtención de los productos 1g y 2d.....	11
4.2.6. Procedimiento general para la obtención de los productos 1e y 2c.....	12
4.2.7. Preparación del producto 1f.....	13
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
5.1. PREPARACIÓN DE LOS DERIVADOS 1A – 1F Y 2A – 2D.....	15
5.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS.....	19
5.3. ESTUDIO Y ANÁLISIS DEL DOCKING MOLECULAR.....	20
6. CONCLUSIONES.....	23
7. BIBLIOGRAFÍA.....	24

1. RESUMEN:

Los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos son moléculas que actúan regulando la expresión génica de los receptores α/β de estrógeno, donde realizan actividad agonista o antagonista dependiendo del tejido diana específico. Muchos de ellos constituyen un tratamiento de primera línea contra el cáncer de mamá metastásico ER-positivo y la osteoporosis posmenopáusica. Sin embargo, el tratamiento prolongado con tamoxifeno, raloxifeno, etc. aumenta el riesgo de cáncer de endometrio y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares o cerebrovasculares. Por lo que existe una necesidad urgente de identificar nuevos SERMs. Debido a los antecedentes de actividad estrogénica de lignanos naturales, en este trabajo nos hemos planteado la preparación de una serie de derivados como potenciales SERMs.

ABSTRACT:

Selective modulators of estrogen receptors are molecules that act by regulating the gene expression of the α / β estrogen receptors, where they perform agonist or antagonist activity depending on the specific target tissue. Many of them constitute a first-line treatment against ER-positive metastatic breast cancer and postmenopausal osteoporosis. However, prolonged treatment with tamoxifen, raloxifene, etc. increases the risk of endometrial cancer and the development of cardiovascular or cerebrovascular diseases. So there is an urgent need to identify new SERMs. Due to the history of estrogenic activity of natural lignans, in this work we have considered the preparation of a series of derivatives as potential SERMs.

2. INTRODUCCIÓN

Los estrógenos son hormonas endógenas responsables del desarrollo y crecimiento de los órganos sexuales femeninos, de los caracteres sexuales y del instinto sexual. La hormona folículo estimulante (FSH) estimula la producción de éstos en los ovarios y la placenta ejerciendo diversos efectos en la mujer. También es sintetizada, en menor proporción, en los testículos y la corteza suprarrenal. ⁽¹⁾

El estradiol (Figura 1) es el estrógeno más potente, junto con la estrona y el estriol. Tiene estructura de esteroide con 18 átomos de carbono dispuestos en tres anillos de 6 miembros y uno de 5. El anillo aromático contiene un grupo hidroxilo que es el responsable en la unión selectiva y de la alta afinidad a receptores de estrógenos (RE). ⁽²⁾

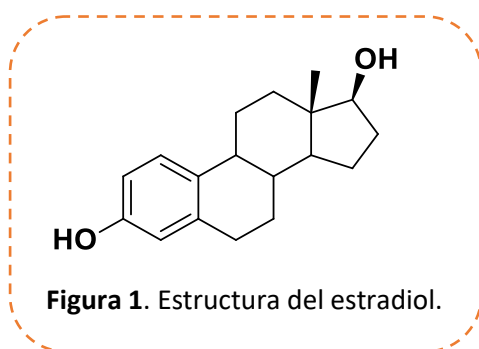


Figura 1. Estructura del estradiol.

Sin embargo, la estructura de esteroide se ha visto que no es necesaria para ejercer la actividad estrogénica, ya que, hay moléculas como el dietilestilbestrol (Figura 2) que no contiene dicha estructura y posee a su vez actividad estrogénica. ⁽³⁾

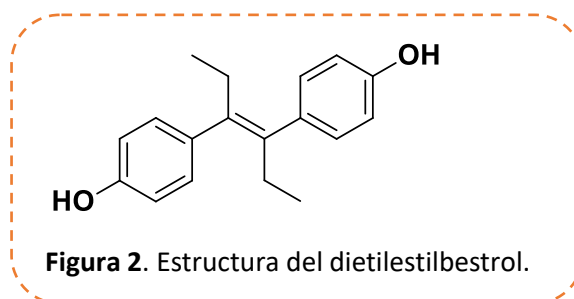


Figura 2. Estructura del dietilestilbestrol.

2.1. Importancia de la búsqueda de nuevos SERMs.

Los receptores de estrógenos (RE) son proteínas intracelulares que median, en su mayoría, los efectos producidos por los estrógenos. Éstos son clasificados en dos subtipos, el receptor estrogénico α (RE- α) y el receptor estrogénico β (RE- β) (Figura 3). ⁽⁴⁾ Los RE pueden ser activados mediante una reacción de alta afinidad con un ligando. Ambos están localizados simultáneamente en varios tejidos, salvo en las glándulas mamarias, útero e hígado donde solo se expresa el RE- α ; y en el pulmón, ovario, testículos y próstata donde destaca la presencia del RE- β .

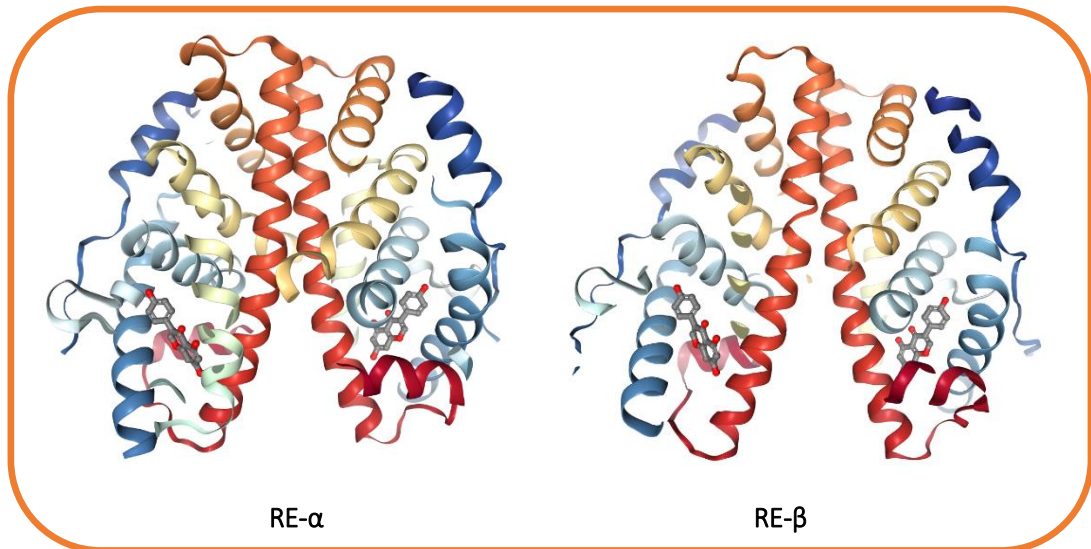


Figura 3. Estructura de los REs: RE- α (PDB:1x7r) y RE- β (PDB: 1x7j).

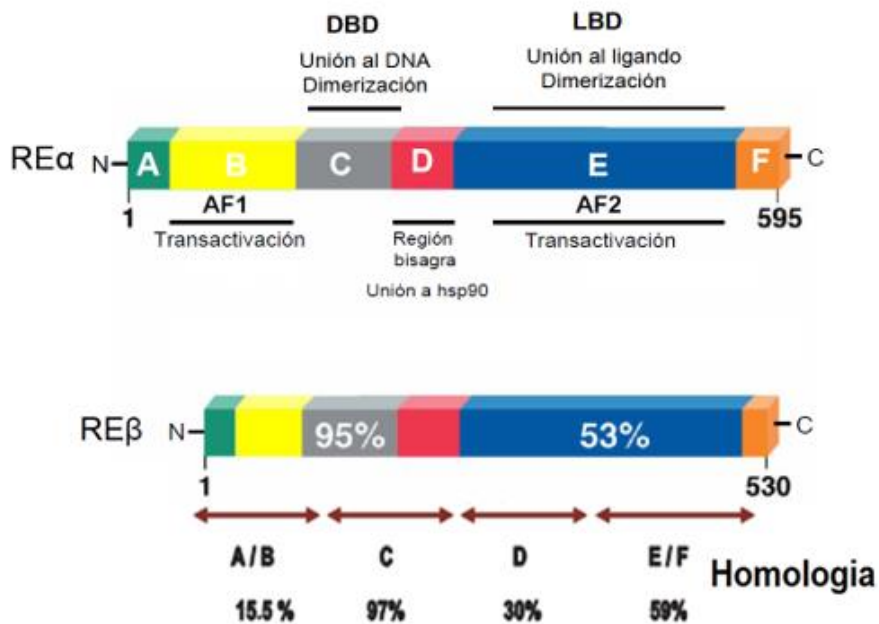


Figura 4. Homología entre los receptores estrogénicos α y β .

Los **moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs)** son ligandos selectivos de los receptores de estrógeno que actúan produciendo cambios conformacionales en ellos. Presentan actividad mixta, es decir, en los tejidos óseos y cardiovascular actúan como los estrógenos, mientras que, en tejidos mamario, urinario y SNC actúan como antiestrógenos. Se comportan como agonistas de los ER- α y antagonistas de los ER- β .

El tamoxifeno, es un SERM de primera generación, comercializado para el tratamiento del cáncer de mama dependiente de estrógenos. Sin embargo, debido a que se asocia con mayor riesgo de cáncer endometrial en tratamientos prolongados y otros efectos adversos (enfermedad tromboembólica, sofocos, sangrado, etc) se debe analizar las situaciones en las que usarlo.⁽⁵⁾

El raloxifeno es un SERM de segunda generación utilizado para tratar los desórdenes metabólicos de los huesos en mujeres postmenopáusicas y en la prevención de cáncer de mama en casos de alto riesgo. Sin embargo, se ha visto que la incidencia de mortalidad por ictus debida al empleo de este fármaco aumenta, por lo que debe vigilarse el uso de raloxifeno en mujeres postmenopáusicas que tengan historial de ictus.

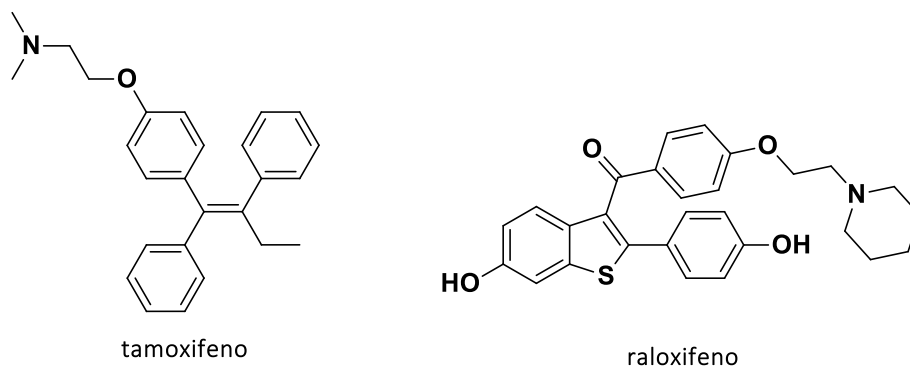


Figura 5. Estructura del tamoxifeno y raloxifeno.

Debido a que estos compuestos, ya comercializados, presentan varios efectos negativos tras su uso prolongado surge la necesidad de búsqueda de nuevas moléculas tipo SERMs.

2.1. Antecedentes de compuestos tipo lignanos con actividad estrogénica

Los fitoestrógenos son sustancias de origen vegetal que actúan, al igual que los estrógenos, mediante la unión a los RE actuando como agonista o antagonista. Esta unión es principalmente al receptor estrogénico β . Entre los fitoestrógenos se incluyen las isoflavonas, lignanos y cumestanos. ⁽⁶⁾

Los lignanos son productos naturales, ampliamente distribuidos en el reino vegetal, que derivan de la ruta del ácido shikímico, y resultan de la unión de dos unidades de fenilpropano (C_6-C_3) enlazados por sus carbonos centrales (C_8-C_8). Se encuentran en una gran variedad de especies vegetales. ⁽⁷⁾

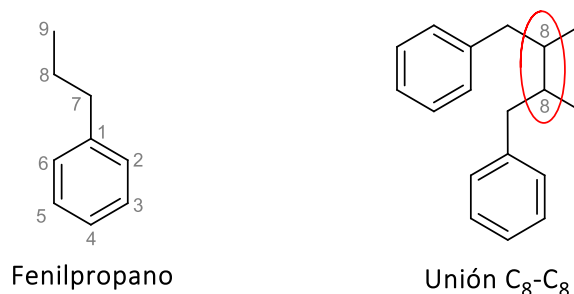
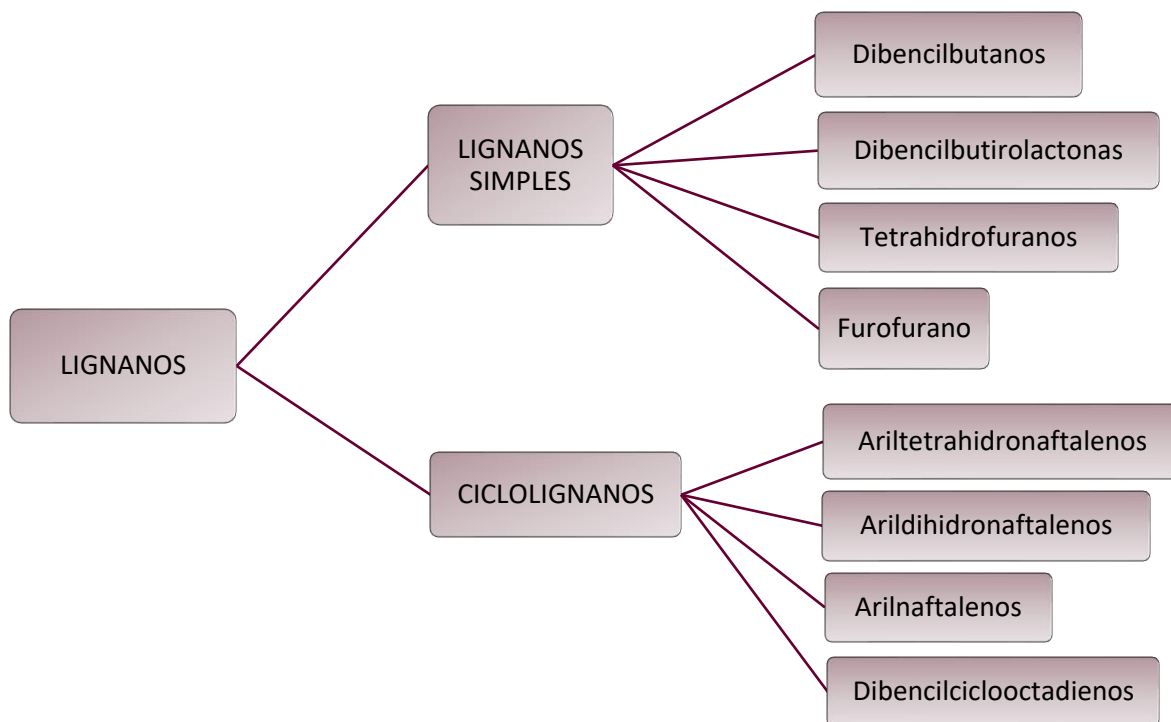


Figura 6. Estructura de los lignanos.

El término lignano debe restringirse a las uniones tipo C₈-C₈ entre las subunidades, mientras que los compuestos que tienen cualquier otro tipo de unión deben considerarse como neolignanos. Los lignanos se clasifican en:



Esquema 1. Clasificación de los lignanos.

Éstos presentan un gran número de actividades biológicas como antitumoral, antiparasitaria, antimicrobiana, así como estrogénica.

La enterolactona y el enterodiol son ejemplos de lignanos que son fitoestrógenos, y por tanto, poseen propiedades estrogénicas y antiestrogénicas.

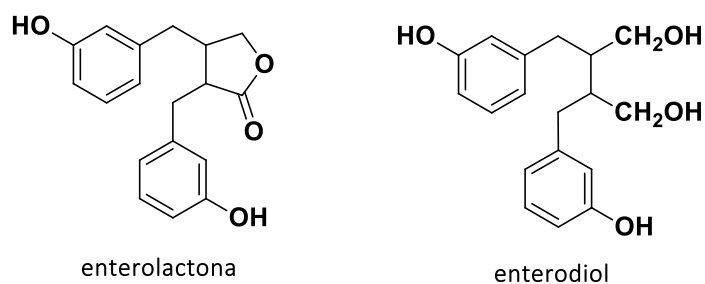
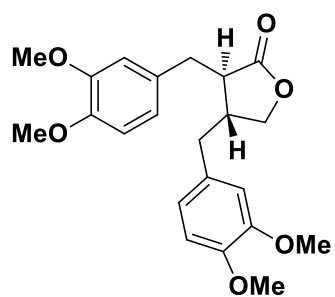


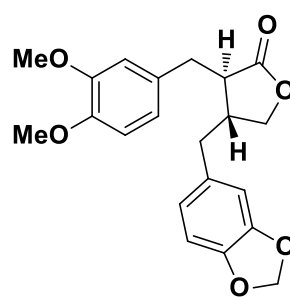
Figura 7. Estructuras de fitoestrógenos tipo lignanos.

En este trabajo se ha preparado una serie de derivados con potencial actividad SERM a partir de dos lignanos tipo dibencilbutirolactonas. Éstos se aislaron de la parte aérea de la especie endémica canaria *Bupleurum salicifolium*.⁽⁸⁾

A continuación, se muestran las estructuras de los lignanos mencionados, denominados bursehernina (L-1) y dimetiléter-matairesinol (L-2).



bursehernina (L-1)



dimetiléter matairesinol (L-2)

Figura 8. Estructura de la bursehernina y dimetiléter matairesinol.

3. OBJETIVOS

- ❖ Preparar derivados de dos lignanos naturales bursehernina y dimetiléter matairesinol como potenciales SERMs mediante modificaciones en los sustituyentes de los anillos aromáticos y en el anillo lactónico.
- ❖ Caracterizar espectroscópicamente todos los compuestos obtenidos.
- ❖ Realizar estudios de Modelización molecular tipo Docking al objeto de abordar el modo de unión de las moléculas sintetizadas con los receptores de estrógenos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Técnicas cromatográficas:

- ❖ **Cromatografía en capa fina (CCF):** Se emplearon placas de gel de sílice (20x20 cm) de tipo G, con marcador de fluorescencia a 254 nm, de la empresa Macherey-Nagel Sil G/UV254. Los productos se detectaron bajo la luz visible.
- ❖ **Cromatografía en placa preparativa (CCP):** Se usaron cromatoplasmas (20x20 cm) de gel de sílice tipo GF, con base de vidrio e indicador de fluorescencia a 254 nm, de la empresa Analtech. Se utilizaron distintas mezclas de disolventes como eluyentes. La detección de los productos se realizó también bajo la luz visible.

4.1.2. Técnicas instrumentales:

- ❖ **Resonancia magnética nuclear (RMN):** Los espectrómetros Bruker Avance 500 y Bruker Avance 600 fueron los equipos con los que se realizaron los espectros de resonancia magnética nuclear. El desplazamiento químico (δ) se mide en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) se describen en Hertzios (Hz). Las multiplicidades de las señales para los espectros ^1H -RMN se describen como singlete (s), singlete ancho (sa), doblete (d), triplete (t), multiplete (m) y doble doblete (dd). Los disolventes utilizados para hacer los espectros de RMN fueron metanol deuterado y cloroformo deuterado (CDCl_3)
- ❖ **Espectrometría de masas de baja (EM) y de alta resolución (EMAR):** Esta técnica analiza la masa y el patrón de fragmentación de los compuestos químicos. Nos proporciona información sobre la composición y fórmula molecular de las sustancias químicas analizadas. Se emplearon los espectrómetros VGC Micromass ZAB-2F y Fisons Instruments VG Autospec.

4.1.3. Disolventes y reactivos:

Los reactivos y disolventes se utilizaron en su forma comercial sin purificación. Se adquirieron de las compañías, Scharlab, Aldrich, Merck o Panreac. Los disolventes fueron convenientemente secados cuando la reacción requería condiciones anhidras.

4.1.4. Técnicas de modelización molecular:

- ❖ Programa Maestro 11.1, interfaz gráfica de Schödinger Small Molecule Drug Discovery.
- ❖ Base de datos del Protein Data Bank (PDB).
- ❖ Programa Glide 7 de Schrödinger usando el modo de extra precisión (XP).

4.1.5. Obtención de los lignanos bursehernina y dimetilétermatairesinol:

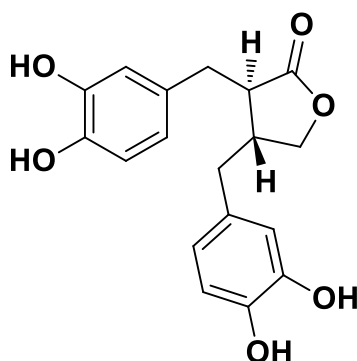
Los lignanos L-1 y L-2 fueron aislados de fracciones enriquecidas de los mismos obtenidos del extracto etanólico de la especie *Bupleurum salicifolium*.

4.2 MÉTODOS

A continuación, se describen los procedimientos seguidos para la obtención de los derivados, por razones de número de palabras exigidas en esta memoria solo se dan los datos espectroscópicos de tres de ellos.

4.2.1. Preparación del producto 1a:

Bajo atmósfera inerte 59 mg de L-1 (0.16 mmol) fueron tratados con 3 equiv de BBr_3 (0.477 mL, 0.477 mmol) en CH_2Cl_2 seco (2 mL), durante 24 horas a temperatura ambiente con agitación magnética. El disolvente fue eliminado a vacío y el crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en capa preparativa (CCP) utilizando como disolvente hexano/AcOEt al 40% para obtener, cuantitativamente, 52.6 mg del producto. ⁽⁹⁾



$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 6.72 (1H, d, $J=8.1$ Hz), 6.68 (2H, dd, $J=4.7$, 6.9 Hz), 6.54 (1H, d, $J=2.0$ Hz), 6.51 (1H, dd, $J=2.0$, 8.0 Hz), 6.41 (1H, dd, $J=2.0$, 8.0 Hz), 4.05 (1H, dd, $J=7.7$, 8.9 Hz), 3.87 (1H, dd, $J=8.6$, 8.8 Hz), 3.33 (1H, m), 2.82 (2H, m), 2.61 (1H, m), 2.49 (2H, m), 2.37 (1H, m).

$^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 181.7, 146.4, 145.2, 144.9, 131.5, 130.8, 122.0, 121.1, 117.5, 116.9, 116.5, 72.9, 49.1, 47.8, 42.6, 38.6, 35.2.

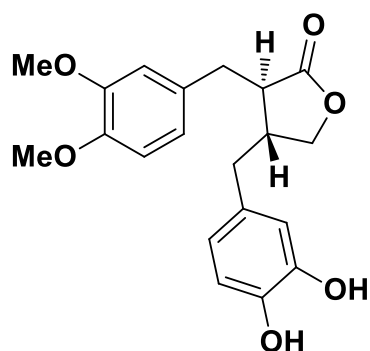
EM (IE) m/z (%): 123 ($[\text{M}^+]$, 100); 124 (57); 330 (33); 331 (20); 151 (19); 77 (15); 125 (15).

EMAR: 330.1123 (calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_6$ $[\text{M}^+]$ 330.1103).

4.2.2 Preparación del producto 1b:

34.6 mg de L-1 (0.09 mmol) disueltos en CH_2Cl_2 seco (5 mL) se hicieron reaccionar con una disolución de 7 equiv de AlCl_3 (0.47 mmol, 62.28 mg) en CH_2Cl_2 seco (4 mL). La mezcla de reacción se mantuvo una hora a temperatura ambiente, bajo atmósfera inerte de argón con agitación magnética. A continuación, se trató con una solución saturada de NaCl, la fase orgánica separada y la acuosa extraída con acetato de etilo (AcOEt) (3x10 mL). La fase orgánica se secó con MgSO_4 , se filtró y se concentró. ⁽¹⁰⁾

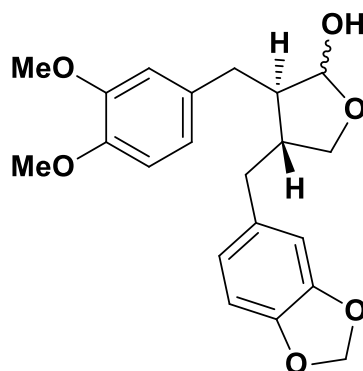
El crudo de reacción se purificó en CCP usando como disolvente hexano/AcOEt al 60%. Se obtuvieron 17.7 mg del producto (53%).



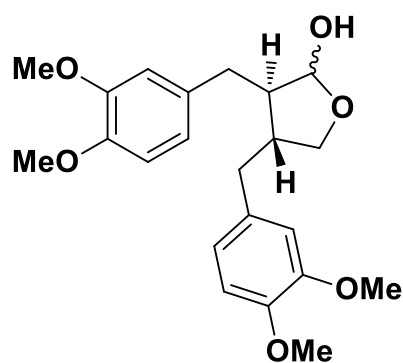
4.2.3. Procedimiento general para la obtención de los productos 1c y 2a:

1 equiv de lignano disuelto en tolueno anhidro (3 mL) se hace reaccionar con 3 equiv de DIBAL durante 2 horas a -78°C usando nitrógeno líquido. A continuación, la mezcla de reacción se deja a temperatura ambiente y se añade una disolución saturada de NH_4Cl (5 mL) y se extrae con AcOEt (3x10 mL). Las fases orgánicas reunidas son secadas sobre MgSO_4 , filtradas y concentradas. El crudo se purifica en CCP utilizando como disolvente hexano/AcOEt al 50%. ⁽¹¹⁾

- **Producto 1c:** Se siguió el procedimiento general anterior usando 50 mg de L-1 (0.134 mmol) y 0.405 mL de DIBAL (0.405 mmol). Se obtuvo 27.4 mg de producto (55%).



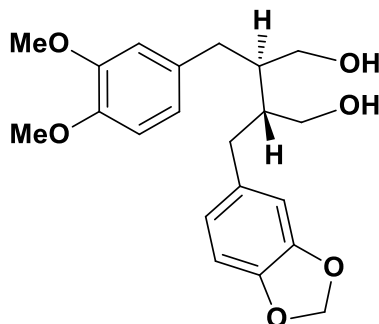
- **Producto 2a:** Se utilizó 30 mg de L-2 (0.07 mmol) y 0.232 mL de DIBAL (0.232 mmol). Se obtuvieron 36.4 mg (100%) del producto.



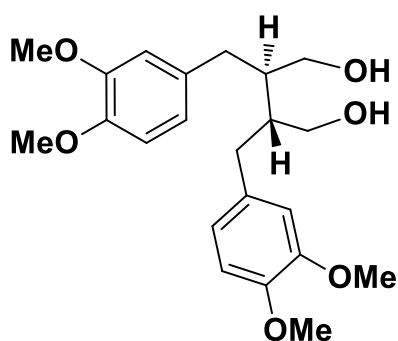
4.2.4. Procedimiento general para la obtención de los productos 1d y 2b:

1 equiv de lignano disuelto en THF (3.5 mL) se hace reaccionar con 10 equiv de LiAlH_4 y THF (1.77 mL), con agitación bajo atmósfera inerte. Se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se trata a continuación con una disolución saturada de NH_4Cl y se acidifica con HCl 1N, se extrae con AcOEt (3x10 mL). Las fases orgánicas reunidas se secan sobre MgSO_4 , se filtran y concentran. El crudo se purifica a través de CCP utilizando como disolvente hexano- AcOEt al 60%.⁽¹²⁾

- **Producto 1d:** siguiendo el procedimiento general anterior, 51.4 mg de L-1 (0.138 mmol) fueron tratados con 53 mg de LiAlH_4 (1.38 mmol). Se obtuvo 54.7 mg (100%) del producto.



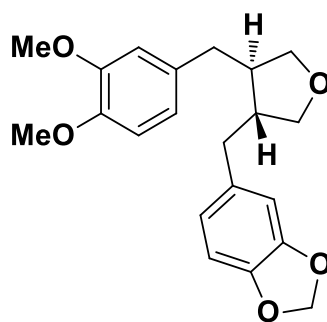
- **Producto 2b:** se utilizó 30 mg de L-2 (0.07 mmol) y 26.6 mg de LiAlH_4 (0.7 mmol). Se obtuvo 31.4 mg (100%) de producto.



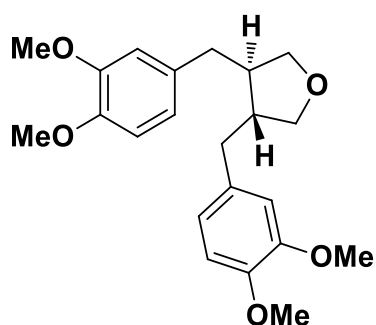
4.2.5. Procedimiento general de obtención de los productos 1g y 2d:

1 equiv del diol **1d** o **2b** se trata con 7 equiv de piridina y CH_2Cl_2 (2 mL). A la mezcla se adiciona 1 equiv de TsCl y se deja a temperatura ambiente durante 24 horas. A continuación se le añade H_2O y se extrae con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se lava con HCl y NaHCO_3 , se seca con MgSO_4 , se filtra y concentra. El crudo se purifica en CCP usando como disolvente hexano/ AcOEt al 60%.⁽¹³⁾

- **Producto 1g:** Siguiendo el procedimiento general se utilizó 104 mg del producto **1d** (0.277 mmol), 0.2 mL de piridina (1.95 mmol) y 54 mg de TsCl (0.277 mmol). Se obtuvieron 7.3 mg (7%).



- **Producto 2d:** Se utilizó 14.6 mg del **producto 2b** (0.037 mmol), 21.7 μL de piridina (0.26 mmol) y 7 mg de TsCl (0.037 mmol). Se obtuvieron 2.5 mg (18%) del producto.



^1H -RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 6.69 (2H, d, $J=8.2$ Hz), 6.56 (2H, dd, $J=1.9$, 8.1 Hz), 6.52 (2H, d, $J=1.9$ Hz), 3.84 (2H, dd, $J=6.7$, 8.7 Hz), 3.79 (6H, s), 3.77 (6H, s), 3.46 (2H, m), 2.57 (2H, m), 2.47 (2H, m), 2.12 (2H, m).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 148.9, 147.4, 133.0, 120.6, 112.0, 111.2, 73.3, 55.9, 55.8, 46.6, 39.1.

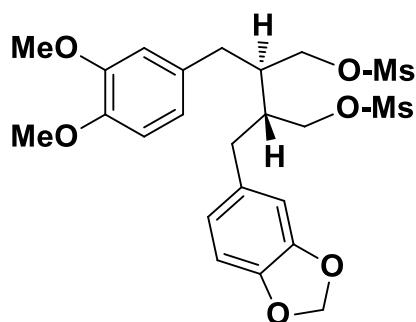
EM (IE) m/z (%): 151 ($[\text{M}^+]$, 100); 152 (95); 372 (82); 373 (40); 121 (34); 137 (33); 153 (26); 107 (25); 106 (19).

EMAR: 372.1942 (calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_5$ $[\text{M}^+]$ 372.1937).

4.2.6. Procedimiento general para la obtención de los productos 1e y 2c:

1 equiv del producto **1d/2b** se trata con 6 equiv de Et_3N en CH_2Cl_2 seco (5 mL) se enfría a 0°C para añadirle 6 equiv de MsCl, y se deja reaccionar 1 hora a temperatura ambiente bajo atmósfera inerte. El producto obtenido se extrae con CH_2Cl_2 y la fase orgánica se seca con MgSO_4 , se filtra y concentra. El crudo se purifica por CCP utilizando como disolvente hexano/AcOEt al 50%.⁽¹³⁾

- **Producto 1e:** Se utilizó 100 mg del **producto 1d** (0.267 mmol), 0.25 mL de Et_3N (1.6 mmol) y 0.15 mL de MsCl (1.6 mmol). Se obtuvo 38.5 mg (27%) del producto deseado.



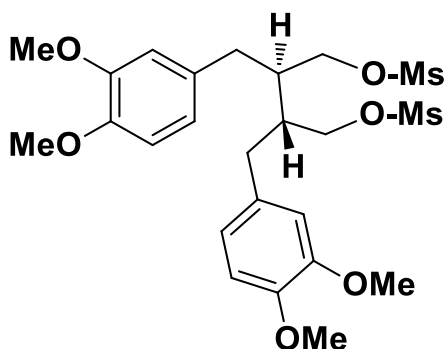
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 6.78 (1H, d, $J=8.5$ Hz), 6.72 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 6.67 (2H, d, $J=6.6$ Hz), 6.58 (2H, m), 5.92 (2H, dd, $J=1.2, 3$ Hz), 4.20 (4H, m), 3.85 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.12 (6H, s), 2.84 (2H, m), 2.58 (2H, m), 2.25 (2H, m).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 149.2, 148.0, 147.8, 146.3, 132.2, 131.0, 122.0, 121.0, 112.0, 111.3, 109.1, 108.4, 101.0, 69.1, 55.9, 55.9, 40.3, 40.2, 37.3, 34.0, 33.8.

EM (IE) m/z (%): 530 ($[\text{M}]^+$, 100); 152 (100); 136 (100); 165 (69); 137 (65); 164 (60)

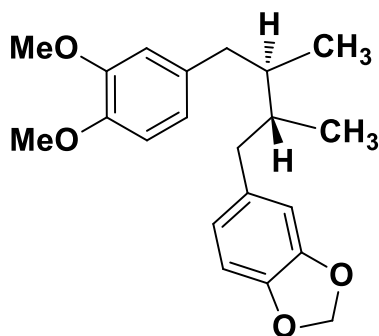
EMAR: 530.1242 (calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_{10}\text{S}_2$ $[\text{M}]^+$ 530.1280)

- **Producto 2c:** Se utilizó 48.6 mg del producto **2b** (0.124 mmol), 0.11 mL de Et_3N (0.747 mmol) y 59 μL de MsCl (0.747 mmol) Se obtuvo 1.7 mg (3%) del producto.



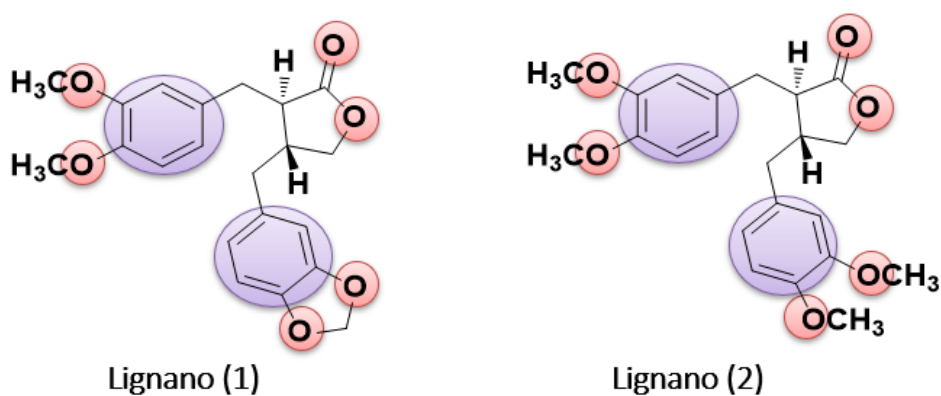
4.2.7. Preparación del producto 1f:

30.4 mg del producto **1e** (0.06 mmol) se trataron con 6 equiv de NaBH_4 (13 mg, 0.344 mmol), en 4 mL de HMPA. La reacción se dejó a 60°C durante 24 horas. A continuación se le añade NH_4Cl y se extrae con AcOEt (x3), se filtra y concentra. El crudo se purifica por CCP utilizando como disolvente hexano/ AcOEt al 30%, obteniendo 3.8 mg (19%).⁽¹³⁾



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de la purificación de fracciones del extracto etanólico de las hojas de *Bupleurum salicifolium* se obtuvieron cantidades apreciables de los lignanos L-1 y L-2. Un análisis de las estructuras de éstos nos permite reconocer distintas zonas de posibles interacciones de enlace de hidrógeno o de Van der Waals. Las modificaciones en estas zonas proporcionarán información sobre la importancia para la bioactividad de estos grupos funcionales.

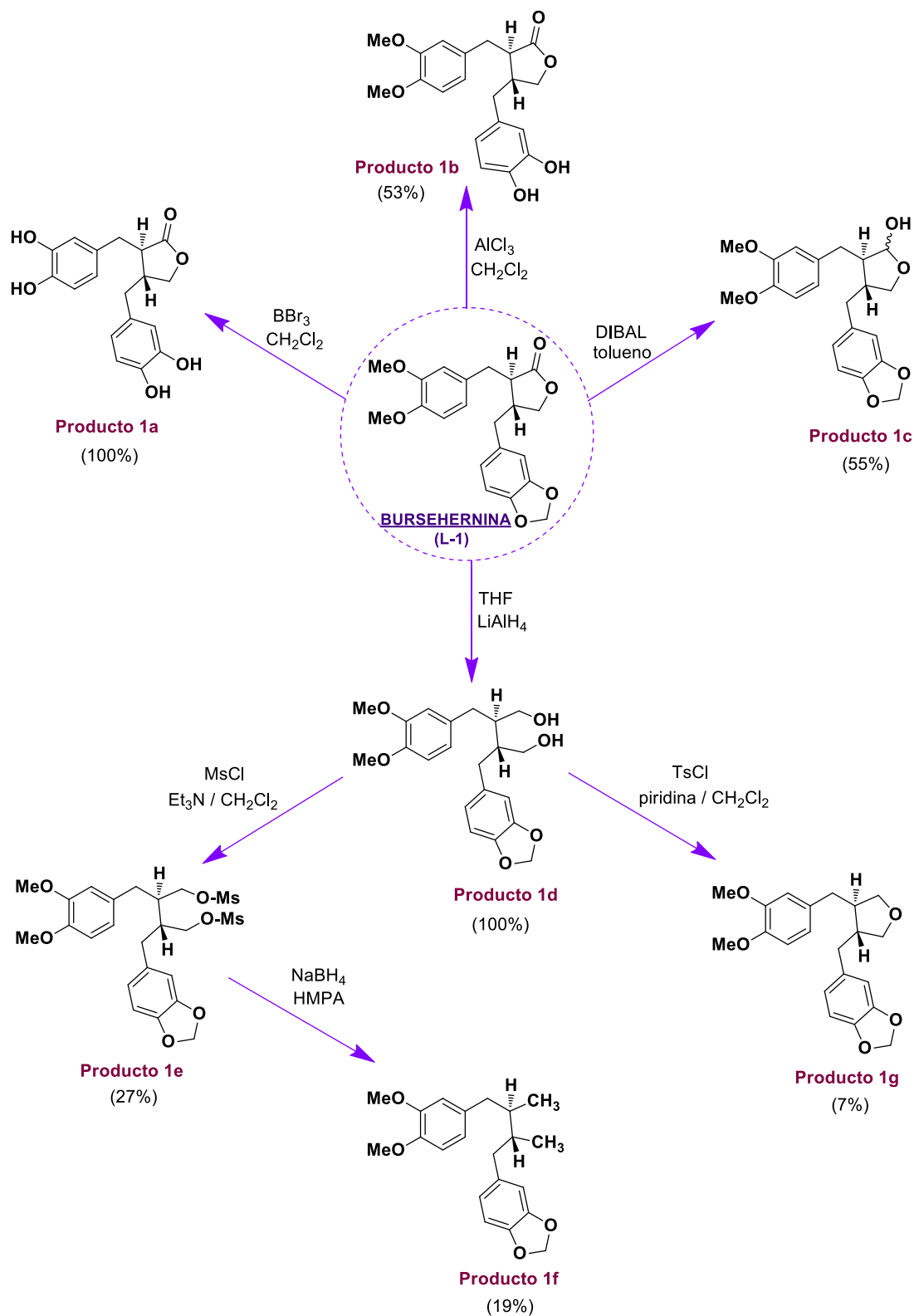


- Posibles sitios de interacción por enlace de Hidrógeno.
- Posibles sitios de interacción tipo Van der Waals.

Esquema 2. Análisis de los grupos funcionales de los dos lignanos.

5.1. Preparación de los derivados 1a – 1f y 2a – 2d

En el siguiente esquema se muestra las diferentes reacciones realizadas a partir del lignano bursehernina (L-1), que principalmente son modificaciones en los anillos aromáticos y en el anillo lactónico.



Esquema 3. Diferentes reacciones realizadas con bursehernina (L-1).

La mayor parte de las transformaciones tuvieron como objetivo la generación de grupos fenólicos para favorecer interacciones por enlace de hidrógeno con el receptor.

Lo primero que se llevó a cabo fue la desmetilación para obtener, cuantitativamente, el producto tetrahidroxilado **1a**. Esto se realizó con BBr_3 en CH_2Cl_2 . La estructura se confirmó observando la desaparición de la señal característica del grupo metilendioxi a δ 5.90 en el espectro de protón. Así como la no presencia de las señales singletes a δ 3.80 característica de los metoxilos.

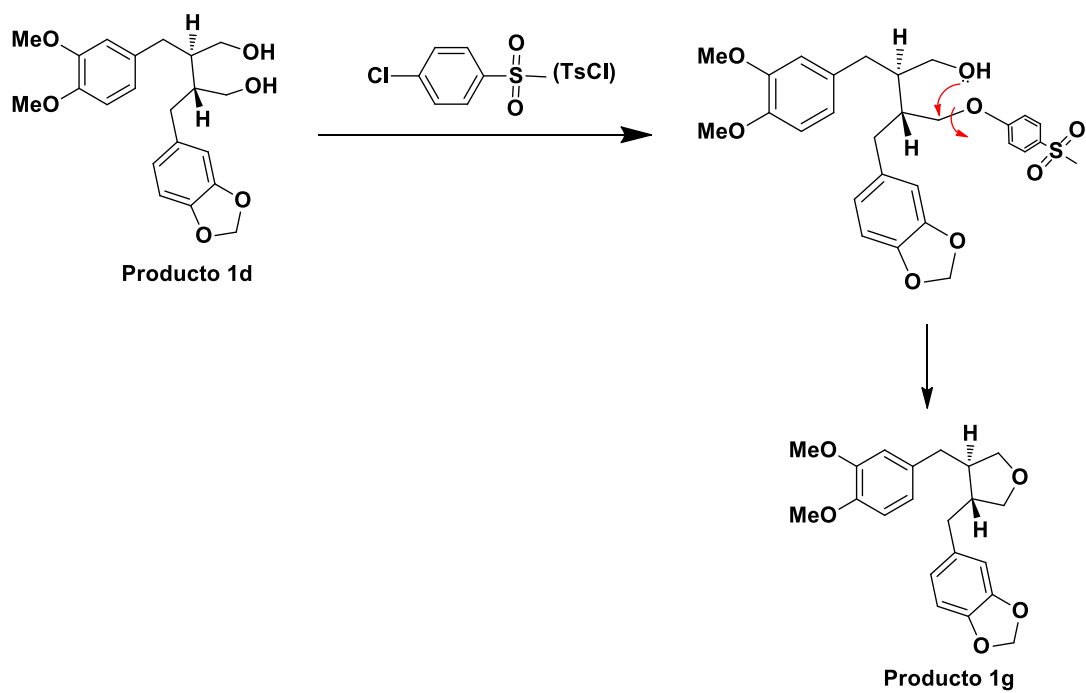
La ruptura del grupo metilendioxi para obtener el producto **1b** se logró con AlCl_3 en CH_2Cl_2 , obteniéndose el producto dihidroxilado con un rendimiento del 53%. La estructura se corroboró observando en el espectro de protón la ausencia de la señal del metilendioxi.

La reducción del carbonilo permite un cambio en esa zona de la molécula, de un aceptor a un dador de enlace de hidrogeno. Se utilizó como agente reductor el DIBAL en tolueno, a bajas temperaturas (-78°C). El producto **1c** fue obtenido con un rendimiento del 55%.

La apertura del anillo lactónico se realizó con LiAlH_4 y THF, obteniéndose, cuantitativamente, el producto **1d**. Se confirmó la estructura con la presencia de dos señales a δ 3.49 y 3.77 en el espectro de protón que integran 2H cada una y aparecen como multipletes características de los hidrógenos de los carbonos contiguos a los hidroxilos.

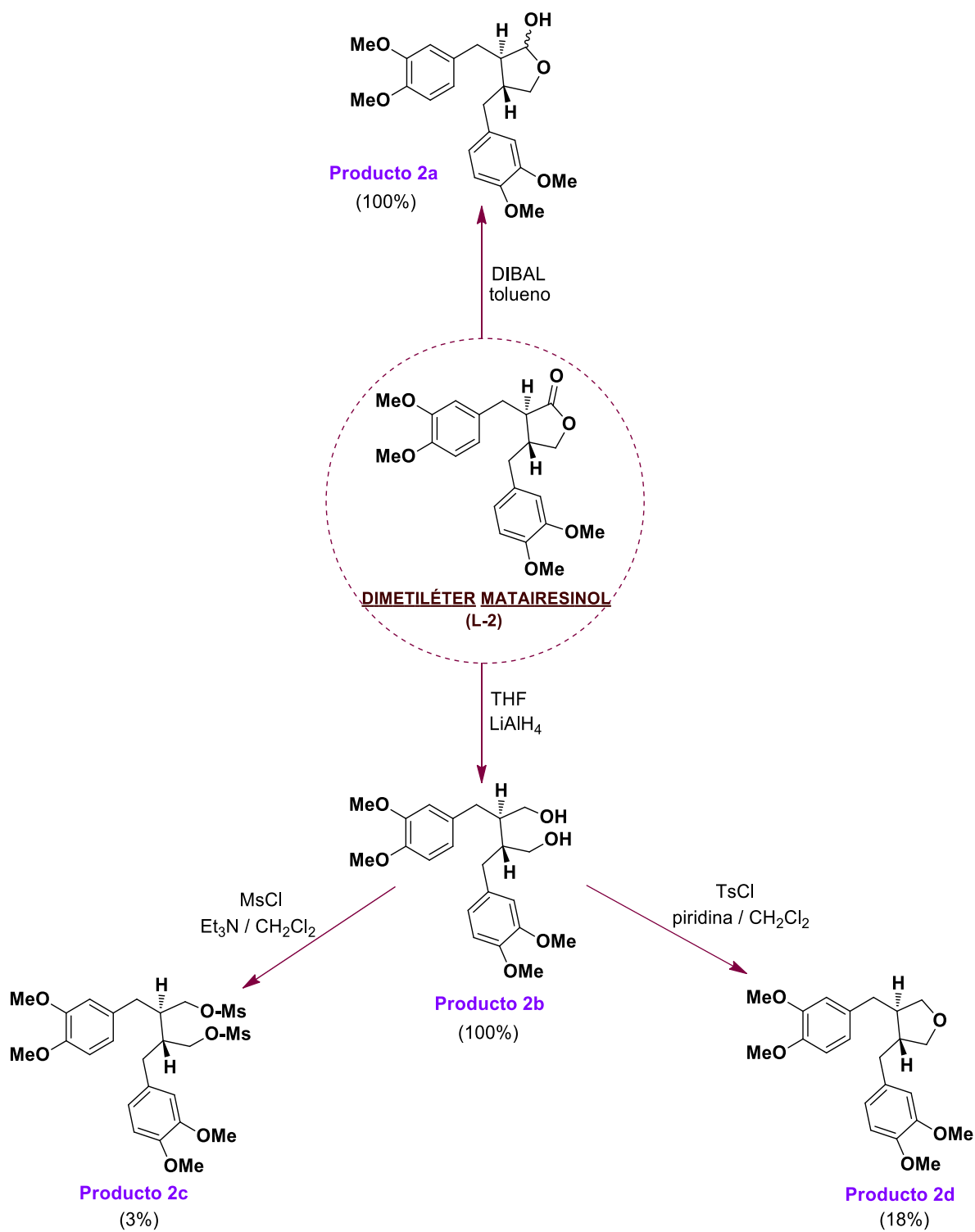
A partir del producto **1d** se formó el derivado mesilado (producto **1e**) tratándolo con MsCl y Et_3N , en un rendimiento del 27%. Este derivado mesilado se transformó en el producto **1f** bajo tratamiento con NaBH_4 y HMPA a 60°C , obteniéndose un rendimiento de 19%. Su estructura se confirmó con la aparición en el espectro de protón de dos señales que integran cada una por 3H y salen como doblete a δ 0.82 y 0.80 ppm, correspondientes a los metilos.

Por último, se sintetizó a partir del producto **1d**, un anillo tetrahidrofurano con 1 equiv de TsCl y piridina en CH_2Cl_2 seco, teniendo un rendimiento el producto **1g** de 7%. La estructura se confirmó con la presencia de dos señales multipletes a δ 3.44 y 3.83 que integra cada una por 2H pertenecientes a los hidrógenos contiguos al oxígeno del anillo tetrahidrofurano. El mecanismo de esta reacción se describe en el siguiente esquema:



Esquema 4. Mecanismo de formación de anillo tetrahidrofurano.

En el siguiente esquema se muestran las reacciones realizadas con L-2 siguiendo los procedimientos anteriores. Se muestran los productos obtenidos con sus correspondientes rendimientos.



Esquema 5. Diferentes reacciones realizadas con el dimetiléter matairesinol (L-2).

5.2. Caracterización de los productos

Las estructuras obtenidas se confirmaron por espectroscopía de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN. A modo de ejemplo se explicará la caracterización del compuesto **1g**.

En el espectro de ^1H -RMN se observó una señal a 2.10 ppm que integra para 2 hidrógenos que corresponde a los H4 y H3 del anillo tetrahidrofurano. Aparecen otros multipletes a 2.45 y 2.53 ppm que también integran para 2 hidrógenos correspondientes a los hidrógenos bencílicos. Además se detecta a 3.44 y 3.83 ppm otros multipletes que integran para 2 hidrógenos correspondientes a los presentes en 2 y 5, respectivamente. En 3.85 ppm observamos dos singletes que integran para 3H cada uno que coinciden con los dos metoxilos del anillo aromático. La señal característica del metilendioxi se puede apreciar a 5.84 ppm. A campo bajo se pueden observar los 6 hidrógenos aromáticos.

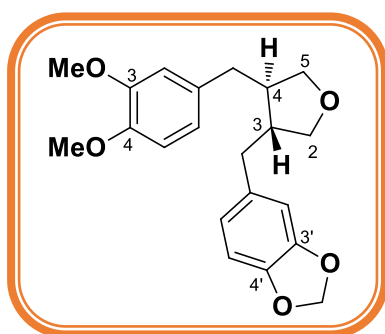


Figura 9. Estructura del compuesto **1g**.

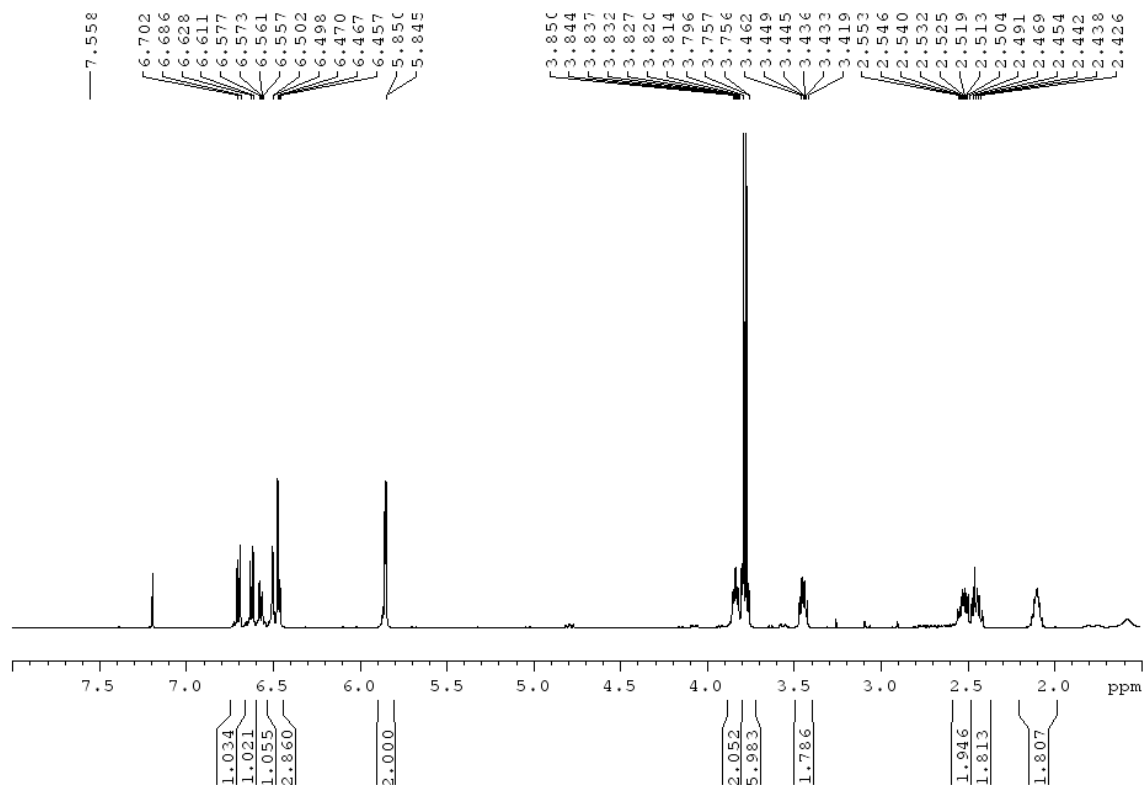


Figura 10. Espectro ^1H -RMN del compuesto **1g**.

En el espectro ^{13}C -RMN se perciben señales para 21 átomos de carbono, una de ellas a 100.9 ppm correspondiente al carbono del metilendioxi. Así mismo se ven las 12 señales de los carbonos aromáticos a campo bajo (148.9, 147.6, 147.4, 145.8, 134.2, 133.0, 121.5, 111.9, 111.2, 109.0, 108.0 ppm). A 73.3 ppm se ven dos señales correspondientes a los carbonos de la posición 5 y 2 del anillo tetrahidrofurano. Los dos metoxilos del anillo aromático se aprecian a 55.9 y 55.8 ppm. La señales que se observan a 46.6 y 46.5 ppm son atribuibles a los carbonos 3 y 4 del anillo tetrahidrofurano. Por último, las dos señales a 39.2 y 39.1 ppm pertenecen a los carbonos bencílicos.

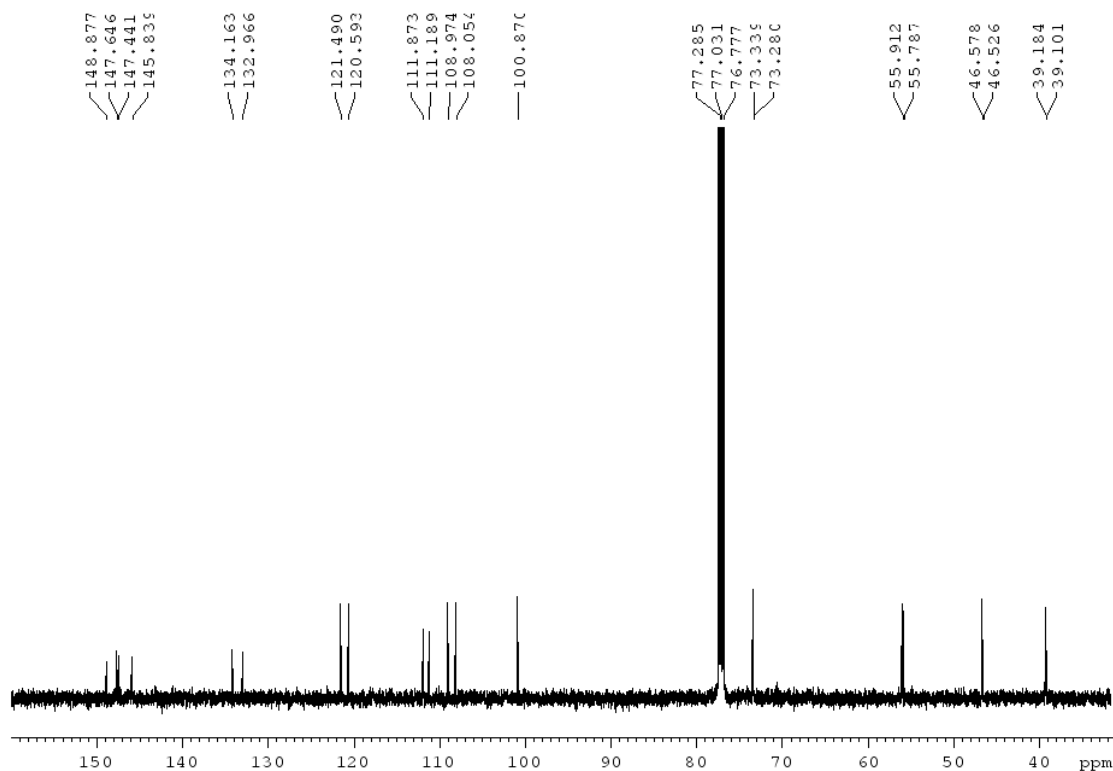


Figura 11. Espectro ^{13}C -RMN del compuesto **1g**.

5.3. Estudio y análisis del Docking molecular

El Docking molecular se puede definir como la predicción de la estructura del complejo ligando-receptor, donde el receptor habitualmente es una proteína y el ligando puede ser una molécula pequeña u otra proteína. Se ha utilizado como herramienta en el descubrimiento de fármacos para encontrar y optimizar los compuestos principales, mediante el cribado de bases de datos.⁽¹⁴⁾

En este método la proteína (receptor) se mantiene rígida mientras que el ligando es tratado como flexible para que adopte distintas “poses” en el sitio activo según el modo de unión con los distintos aminoácidos. La mejor pose del ligando se conoce como bioactiva y la afinidad del ligando se está relacionada con la energía libre de enlace ($\Delta G_{binding}$)⁽¹⁵⁾

Para llevar a cabo el estudio Docking molecular seleccionamos la estructura cristalina del receptor de estrógeno α (RE- α) formando complejo con la genisteína (PDB 1x7r) obtenida de la base de datos Protein Data Bank.

Los resultados obtenidos se ordenaron de acuerdo con el valor de la función de evaluación con los mejores valores de energía de enlace, en comparación con la genisteína (ligando de referencia)

Tabla 1. Resultados de los mejores valores de Docking score.

PROTEÍNA	LIGANDO	DOCKING SCORE (Kcal/mol)
1x7r	GENISTEÍNA	-11.31
	Compuesto 1d	-11.124
	Compuesto 1a	-11.068
	Compuesto 1b	-10.781
	Compuesto 1f	-10.475

Los resultados del estudio de modelización para los compuestos realizados revelan que los valores están bastante próximos al valor de Docking score de la genisteína (-11.31 Kcal/mol), por tanto, es de presuponer un posible efecto agonista sobre el receptor α estrogénico similar al que ejerce el fitoestrógeno ya mencionado. Se observa como los tres primeros compuestos que son los que mayor afinidad tienen se caracterizan por tener, al igual que la genisteína, grupos hidroxilos libres.

El estudio de las interacciones presentes en el Docking de la molécula **1a** muestra que la mayoría de las interacciones son de tipo hidrofóbicas (Tabla 2) y además presentan tres interacciones de enlace de hidrógenos entre los grupos hidroxilos y los residuos Arg 394, Leu 387 y Glu 353. También se puede apreciar la presencia de una interacción π – H stacking que tiene lugar entre el anillo aromático que soporta el metilendioxi y el residuo de Phe 425 (Figura 13). Por último, presenta una interacción π – π stacking con un residuo de Phe 404.

Tabla 2. Interacciones hidrofóbicas producidas en el compuesto **1a**.

INTERACCIONES HIDROFÓBICAS	
Leu 384	Ile 424
Met 388	Trp 383
Leu 387	Hip 524
Leu 391	Leu 346
Leu 428	Gly 521

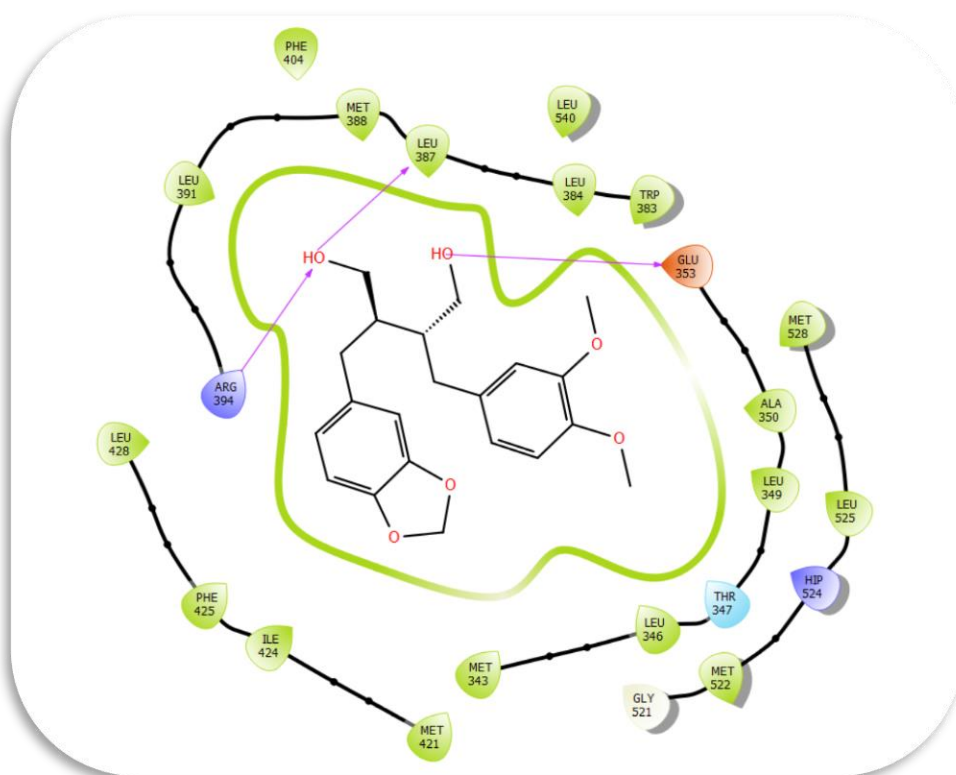
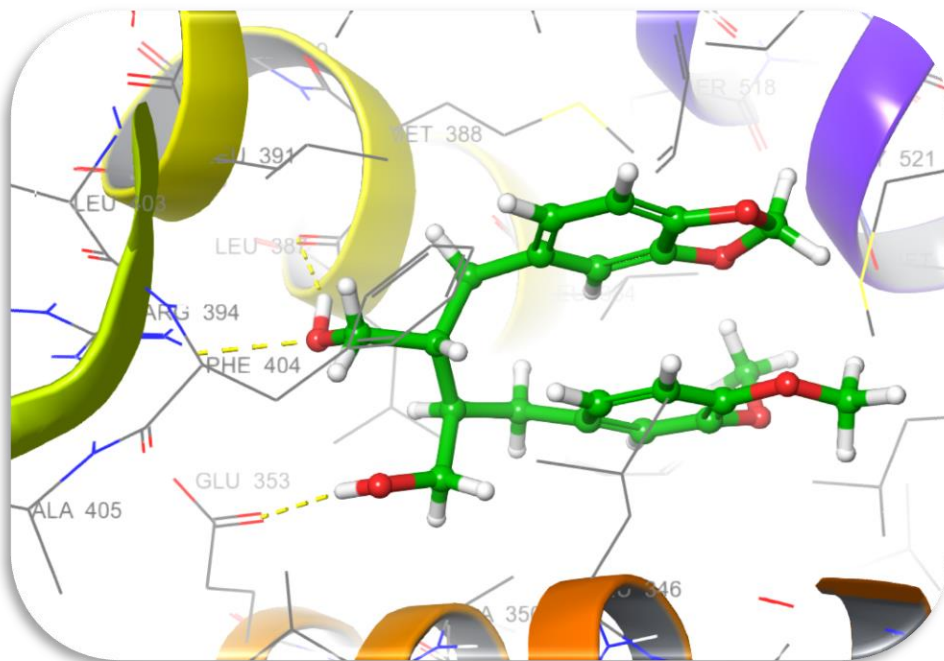


Figura 12. Docking molecular del compuesto **1a** con las principales interacciones.

6. CONCLUSIONES

Teniendo en consideración la necesidad de búsqueda de nuevos SERMs, así como los antecedentes de compuestos de naturaleza lignánica con actividad estrogénica se ha preparado un conjunto de derivados a partir de dos lignanos naturales tipo dibencilbutirolactona. La mayor parte de las transformaciones se centraron en el anillo lactónico y en los sustituyentes de los anillos aromáticos. Estudios de modelización predicen un comportamiento agonista sobre el receptor α -estrogénico, y los mejores valores se encontraron con los compuestos tipo diol resultante de la apertura del anillo lactónico. Los compuestos obtenidos serán evaluados biológicamente.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ⁽¹⁾ Melmed, S., Conn, P.M. *Endocrinology: Basic and Clinical Principles*. 2a ed. Totowa, NJ: Humana Press. **1997**
- ⁽²⁾ Duax, W.L., Griffin, J.F., Weeks, C.M., Wawrzak, Z. J. *The mechanism of action of steroid antagonists: Insights from crystallographic studies*. *Steroid Biochem.* **1988**; 31 (4): 481-492.
- ⁽³⁾ Zhu, B.T., Han, G., Shim, J., Wen, Y., Jiang, X. *Endocrinology: Quantitative Structure-Activity Relationship of Various Endogenous Estrogen Metabolites for Human Estrogen Receptor α and β Subtypes: Insights into the Structural Determinants Favoring a Differential Subtype Binding*. **2006**; 147 (9): 4138-4150.
- ⁽⁴⁾ Jordan, V. C. *The Science of Selective Estrogen Receptor Modulators: Concept to Clinical Practice*. *Clin. Cancer Res.* **2006**; 12 (17): 5010-5013.
- ⁽⁵⁾ Terán, D. J., Teppa, A. D. *Selective estrogen receptors modulators (SERMs): biochemistry, pharmacology, and clinical use in gynecology*. *Ginecol Obstet Mex.* **2005**; 73 (8): 424-435.
- ⁽⁶⁾ Boluda, C. J., Duque, B., Aragón, Z., *Lignanos: estructura y funciones en las plantas*. *Fitoterapia. Revista de fitoterapia.* **2005**; 5 (1): 55-68.
- ⁽⁷⁾ Boluda, C. J., Duque, B., Gulyas, G., Aragón, Z., Duque, A. Díez, F., *Enterolignanos y actividad estrogénica*. *Fitoterapia. Revista de fitoterapia.* **2005**; 6 (1): 45-47.
- ⁽⁸⁾ Estévez-Braun, A., Estévez-Reyes, A., González, A.G. *Structural and conformational analysis of new lignan butenolides*, *Tetrahedron*, **1994**, 50, 520
- ⁽⁹⁾ Vickery, E. H., Pahler, L. F., Eisenbraun, E. J., *Selective O-Demethylation of Catechol Ethers. Comparison of Boron Tribromide and Iodotrimethylsilane*. *J. Org. Chem.* **1979**; 44(24): 4444-4446
- ⁽¹⁰⁾ Mauro, B., Alcides, J.M., Paulo, R.R., *The Reaction of Safrole Derivatives with Aluminum Chloride*. *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**; 12(3): 346-353.
- ⁽¹¹⁾ Prashanth, K. A., Hsing-Jang, L., Tai, W. L., Kak-Shan, S., *General Approach to 2,3-Dibenzyl- γ -butyrolactone Lignans*. *J. Org. Chem.* **2010**; 2010 (18):3473-3480.
- ⁽¹²⁾ Yamauchi, S., Hayashi, Y., Nakashima, Y., Kirikihira, T., Yamada, K., Masuda, T., *Effect of Benzylic Oxygen on the Antioxidant Activity of Phenolic Lignans*. *J. Nat. Prod.* **2005**; 68(10): 1459-1470.
- ⁽¹³⁾ Yamauchi, S., Wukirsari, T., Ochi, Y., Nishiwaki, H., Nishi, K., Sugahara, T., Akiyama, K., Kishida, T., *Syntheses of cytotoxic novel arctigenin derivatives bearing halogen and alkyl groups on aromatic rings*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* **2017**; 27 (17): 4199-4203.
- ⁽¹⁴⁾ Brooijmans, N., Kuntz, I.D. *Molecular recognition and docking algorithms*. *Annu. Rev. Biophys, Biolmol. Struct.* **2003**; 32: 335-373.
- ⁽¹⁵⁾ Davis I.W.; Baker, D. *Rosetta Ligand Docking with Full Ligand and Receptor Flexibility*. *Journal of Molecular Biology.* **2009**; 385(2): 381-392.