

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y  
FISIOLOGÍA Y DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA



**SÍNTESIS DE NUEVOS ISOFLAVONOIDES Y ESTUDIO DE SUS EFECTOS SOBRE  
LA RELAJACIÓN DEL MÚSCULO LISO VASCULAR Y SU AFINIDAD POR LOS  
RECEPTORES ESTROGÉNICOS  $\alpha$  Y  $\beta$**

Memoria presentada en  
la Facultad de Medicina  
de la Universidad de  
Zaragoza para optar al  
Grado de Doctor por:

M<sup>a</sup> ELVIRA LUQUE PARDOS



JOSÉ OCTAVIO ALDA TORRUBIA, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza, y

ELISABET PIRES EZQUERRA, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Química Orgánica y Química Física de la Escuela Politécnica Superior de Huesca,

**CERTIFICAN:**

Que la presente memoria titulada **“Síntesis de nuevos isoflavonoides y estudio de sus efectos sobre la relajación del músculo liso vascular y su afinidad por los receptores estrogénicos  $\alpha$  y  $\beta$ ”** ha sido realizada en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias y en el Departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Medicina de Zaragoza bajo nuestra dirección y autorizamos su presentación.

Zaragoza, 25 de enero de 2009

Dr. José Octavio Alda

Dra. Elisabet Pires



**A mi familia**

**A David**

*¿Qué sentido tendría para un médico descubrir el origen de una enfermedad si no pudiera curarla o aliviarla?*

*Os dirijo a vosotros, médicos, hacia la alquimia, con el fin de que obtengáis un remedio puro...capaz de conseguir el mayor grado de virtud y de poder.*

*Porque no está en los designios de Dios que los remedios existan para nosotros ya preparados, hervidos y salados, si no que los preparemos nosotros y aprendamos en nuestro proceso...*

Paracelso (1493-1541)



## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Elisabet Pires**, sin duda alguna una de las personas más importantes durante la realización de este trabajo. Sin su ayuda y su apoyo nada de esto habría sido posible. Durante todo este tiempo ha sido una compañera y amiga más que una jefa. He podido contar con ella para todo y siempre ha tenido buenas palabras. Gracias por hacerme tan fácil lo que a veces no lo era. Me gustaría que todas las personas que me encuentre a lo largo de la vida sean como tú.

Al **Dr. José Octavio Alda**, por haberme dado la oportunidad de integrarme en su prestigioso grupo de investigación, así como por todo lo que he aprendido estando en su laboratorio de transporte iónico.

Al **Dr. José Antonio Mayoral**, por despertarme aun más la pasión por la Química cuando fui su alumna en el último año de carrera.

A la **Dra. Desireé Pereboom** por su inestimable ayuda a la hora de la redacción de este trabajo.

A **Marta Sofía**, que desde su llegada al solitario laboratorio de Medicina, todo cambió. Gracias por tener siempre una sonrisa y apoyarme cuando más lo he necesitado. Sigue así, no cambies nunca.

A todos mis compañeros del laboratorio **Héctor, Nacho, Marta, Laura, Eugenio, M<sup>a</sup> Rosa, Clara, Nuria**, con los que tan buenos momentos he compartido dentro y fuera de la Facultad.

A mis amigas de toda la vida, **Ana y M. Tere**, que aunque no han seguido muy de cerca mi trabajo les agradezco que estuvieran ahí cada vez que las he necesitado. Se que he contado con su apoyo incondicional en cada momento.

A mis compañeros de **Cruz Roja**, con los que nunca hay tiempo para el aburrimiento.

Aunque siempre se dejan para el final deberían estar al principio porque sin duda son los más importantes.

Mis padres, **Elvira y Francisco**, a los que tengo tanto que agradecer. Sin su apoyo, ni esto ni nada de lo que he conseguido en la vida habría sido posible. Siempre han estado ahí, apoyándome, incluso si la decisión que había tomado no era la correcta. Ha habido momentos duros y de tensión pero ellos siempre han tenido palabras de ánimo, que en algunas ocasiones no he sabido agradecer. Pido perdón por ello. Sólo espero que estén tan orgullosos de mí como yo lo estoy de ellos.

Mi hermano, **Rubén**, una de las personas más importantes en mi vida y una de las mejores personas que conozco. Se que voy a poder contar con él siempre que lo necesite y aunque ahora esté lejos se que siempre va a estar ahí.

**David**, la persona que me devolvió la sonrisa y con la que espero pasar el resto de mi vida. Gracias por hacerme ver lo que realmente importa y por tu amor incondicional.

Mis abuelos, personas entrañables, que algunos nos han dejado por el camino, pero a las que siempre recordaré.

**Isabel y Antonio**, que se han convertido en mi segunda familia y siempre me han hecho sentir como en casa.

Al principio parecía imposible, por lo menos por mi parte, abordar este tema tan apasionante y tan desconocido a la vez para mí, pero con la ayuda de todos ellos ha sido posible y una vez más he demostrado que cuando se quiere, se puede.



# ÍNDICE





<b>4.2. Resolución de compuestos quirales.....</b>	<b>70</b>
4.2.1. Métodos de resolución de compuestos quirales.....	70
4.2.2. Determinación de la configuración absoluta.....	73
<b>4.3. Resultados y discusión de la síntesis.....</b>	<b>77</b>
4.3.1. Ruta general de síntesis de isoflavonoides.....	79
4.3.2. Síntesis de derivados de daidzeína.....	83
4.3.2.1. Síntesis de 2,4-dihidroxi-metoxidesoxibenzoínas.....	83
4.3.2.2. Síntesis de 7-hidroxi-metoxiisoflavonas.....	85
4.3.2.3. Síntesis de hidroxisoflavonas.....	87
4.3.2.4. Síntesis de hidroxisoflavanonas.....	90
4.3.2.5. Síntesis de cis y trans 7,4'-dihidroxiisoflavan-4-ol.....	92
4.3.2.6. Síntesis de 7,4'-dihidroxiisoflavano (equol).....	93
4.3.3. Síntesis de derivados de genisteína.....	94
4.3.3.1. Síntesis de 2,4,6-trihidroxi-metoxidesoxibenzoínas .....	94
4.3.3.2. Síntesis de 5,7-dihidroxi-metoxisoflavonas.....	97
4.3.3.3. Síntesis de hidroxisoflavonas.....	99
4.3.3.4. Síntesis de 5,7,4'-trihidroxiisoflavanona.....	101
4.3.3.5. Síntesis de cis y trans 5,7,4'-trihidroxiisoflavan-4-ol.....	102
4.3.3.6. Síntesis de 5,7,4'-trihidroxiisoflavano.....	102
4.3.3.7. Síntesis de 2,4-dihidroxi-6,4'-dimetoxidesoxibenzoína.....	103
4.3.3.8. Síntesis de hidroxidimetoxisoflavonas.....	105
4.3.3.9. Síntesis de 5,7,4'-trihidroxiisoflavano.....	106
4.3.4. Resolución con fase estacionaria quiral.....	107
4.3.4.1. Elección de la columna.....	107
4.3.4.2. Condiciones de separación y obtención de los enantiómeros....	108
4.3.4.3. Medida de la rotación óptica, dicroísmo circular y asignación de la configuración absoluta.....	111
<b>4.4. Métodos y caracterización de compuestos sintetizados.....</b>	<b>117</b>
4.4.1. Descripción de los aparatos utilizados.....	119
4.4.2. Síntesis de 2,4-dihidroxi-3'-metoxidesoxibenzoína.....	120
4.4.3. Síntesis de 7-hidroxi-3'-metoxisoflavona.....	124
4.4.4. Síntesis de 7,3'-dihidroxiisoflavona.....	128
4.4.5. Síntesis de 7,3'-dihidroxiisoflavanona.....	132
4.4.6. Síntesis de 2,4-dihidroxi-4'-metoxidesoxibenzoína.....	136
4.4.7. Síntesis de 7-hidroxi-4'-metoxisoflavona.....	140
4.4.8. Síntesis de 7,4'-dihidroxiisoflavona.....	144
4.4.9. Síntesis de 7,4'-dihidroxiisoflavanona.....	148

4.4.10. Síntesis del equol.....	152
4.4.11. Síntesis de 2,4-dihidroxi-3',5'-metoxidesoxibenzoína.....	156
4.4.12. Síntesis de 7-hidroxi-3',5'-dimetoxiisoflavona.....	160
4.4.13. Síntesis de 7,3',5'-trihidroxiisoflavona.....	164
4.4.14. Síntesis de 7,3',5'-trihidroxiisoflavanona.....	171
4.4.15. Síntesis de 2,4,6-trihidroxi-3'-metoxidesoxibenzoína.....	175
4.4.16. Síntesis de 5,7-dihidroxi-3',-metoxiisoflavona.....	179
4.4.17. Síntesis de 5,7,3'-trihidroxiisoflavona.....	183
4.4.18. Síntesis de 2,4,6-trihidroxi-4'-metoxidesoxibenzoína.....	187
4.4.19. Síntesis de 5,7-dihidroxi-4'-metoxiisoflavona.....	191
4.4.20. Síntesis de 5,7,4'-trihidroxiisoflavona.....	195
4.4.21. Síntesis de 5,7,4'-dihidroxiisoflavanona.....	199
4.4.22. Síntesis de 2,4,6-trihidroxi-3',5'-metoxidesoxibenzoína.....	203
4.4.23. Síntesis de 5,7-dihidroxi-3',5'-dimetoxiisoflavona.....	207
4.4.24. Síntesis de 5,7,3',5'-tetrahidroxiisoflavona.....	211
4.4.25. Síntesis de 2,6-dihidroxi-4,4'-dimetoxidesoxibenzoína y 2,4-dihidroxi 6,4'-dimetoxidesoxibenzoína.....	215
4.4.26. Síntesis de 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiisoflavona.....	222
4.4.27. Síntesis de 7-hidroxi-5,4'-dimetoxiisoflavona.....	226
4.4.28. Condiciones de separación y obtención de los enantiómeros.....	230
4.4.29. Medida de la rotación óptica, dicroísmo circular y asignación de la configuración absoluta.....	240
<b>5. MÚSCULO LISO VASCULAR .....</b>	<b>245</b>
<b>5.1. Introducción.....</b>	<b>247</b>
<b>5.2. Tono vascular.....</b>	<b>248</b>
5.2.1. Actividad eléctrica de las células musculares.....	248
5.2.2. Proteínas contráctiles.....	249
5.2.3. El calcio.....	251
5.2.3.1. Entrada de Ca <sup>2+</sup> del medio extracelular.....	252
5.2.3.2. Liberación del Ca <sup>2+</sup> desde los depósitos intracelulares.....	253
5.2.3.3. Disminución de Ca <sup>2+</sup> citosólico.....	253
<b>5.3. Contracción del músculo liso.....</b>	<b>254</b>
5.3.1. Mecanismo de la contracción. Puentes cruzados.....	254
5.3.2. Acoplamiento excitación-contracción en el músculo liso.....	255
5.3.3. Papel de la proteína quinasa Rho.....	257
5.3.4. Tipos de contracción muscular.....	258

<b>5.4. Relajación del músculo liso.....</b>	<b>259</b>
5.4.1. Mecanismo de la relajación.....	259
5.4.2. Vía de relajación NO/GMPc/GK1c.....	260
<b>5.5. Determinación de la actividad vasorrelajante.....</b>	<b>262</b>
<b>5.6. Resultados de la actividad vasorrelajante.....</b>	<b>266</b>
5.6.1. Derivados de daidzeína.....	267
5.6.2. Derivados de genisteína.....	276
<b>6. RECEPTORES ESTROGÉNICOS.....</b>	<b>281</b>
<b>6.1. Estrógenos.....</b>	<b>283</b>
6.1.1. Estructura química.....	283
6.1.2. Biosíntesis y metabolismo.....	283
6.1.3. Acción de los estrógenos.....	285
6.1.4. Estrógenos y canales iónicos.....	288
<b>6.2. Receptores estrogénicos.....</b>	<b>289</b>
6.2.1. Tipos de receptores estrogénicos. Mecanismos de acción.....	290
6.2.2. Distribución de los receptores estrogénicos en el organismo.....	300
6.2.3. Afinidad por los receptores estrogénicos $\alpha$ y $\beta$ .....	301
<b>6.3. Determinación de la afinidad y estudio estadístico.....</b>	<b>308</b>
6.3.1. Ensayo competitivo de las isoflavonas.....	308
6.3.2. Estudio estadístico.....	308
<b>6.4. Resultados de receptores estrogénicos.....</b>	<b>309</b>
<b>6.5. Correlación IC<sub>50</sub> receptores - IC<sub>50</sub> baño.....</b>	<b>317</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>321</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>325</b>
<b>9. ANEXO I.....</b>	<b>339</b>

# **1. INTRODUCCIÓN GENERAL**





## 1.1. FITOESTRÓGENOS

Los fitoestrógenos se definen como una serie de compuestos de naturaleza no esteroidea, procedentes de distintas especies vegetales y/o de la conversión metabólica de sus precursores, que presentan actividad estrogénica. Todos los fitoestrógenos conocidos son compuestos difenólicos de similitudes estructurales con los estrógenos, tanto naturales como sintéticos.

Las isoflavonas son compuestos pertenecientes a la familia de los fitoestrógenos. Los mecanismos a través de los cuales ejercen sus acciones son fundamentalmente: interacción con receptores estrogénicos, inhibición enzimática, unión a proteínas plasmáticas y actividad antioxidante<sup>1</sup>.

**1. Interacción con receptores estrogénicos:** las isoflavonas se unen a los receptores estrogénicos dando lugar a la formación de un complejo ligando-receptor que es funcionalmente equivalente al formado por el estradiol y capaz de inducir la actividad transcripcional correspondiente. Sin embargo, la afinidad de las isoflavonas por el receptor estrogénico es menor que la del estradiol, siendo muy baja hacia los receptores de tipo alfa y de mayor cuantía hacia los del tipo beta. Por lo tanto, es de esperar una mayor acción de las isoflavonas en aquellos tejidos en que los receptores beta estén presentes en cantidades relevantes, tales como sistema nervioso central, hueso y pared vascular.

**2. Inhibición enzimática:** las isoflavonas presentan actividad como inhibidores de numerosos enzimas, entre los que destacan las tirosinquinazas, También las isoflavonas son capaces de actuar sobre otras muchas enzimas, como las topoisomerasas I y II, aromatasa, 5 $\alpha$ -reductasa, sulfotransferasas, colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa, ciclooxigenasa, 17 $\beta$ -hidroxidehidrogenasa, lipooxigenasa, etc.

**3. Actuación sobre proteínas plasmáticas:** las isoflavonas producen un incremento de los niveles circulantes de S.H.B.G. (Sex Hormone Binding Globulin), debido a lo cual se produce un descenso en la fracción libre circulante de los estrógenos endógenos.

**4. Actividad antioxidante:** se traduce en una acción protectora de la pared vascular por disminución de la oxidación del LDL-colesterol.

---

<sup>1</sup> Beltrán E. *Rev. Fitoter.* 2003;4:23-40.

**5. Otros mecanismos de acción:** inhibición de la unión del tromboxano A a su receptor plaquetario, incremento de la respuesta vasodilatadora a la acetilcolina, efecto vasodilatador por incremento de la NO-sintasa y disminución de la endotelina-1, aumento de los receptores hepáticos para la LDL, etc.

Los fitoestrógenos son considerados desde el punto de vista farmacológico, como unos compuestos de indudable potencial en la terapéutica de los trastornos de la menopausia y de posible aplicación en la lucha contra las enfermedades neoplásicas. Su acción agonista estrogénica explicaría el alivio de los síntomas vegetativos climatéricos, así como sus posibles efectos beneficiosos en la prevención de la osteoporosis posmenopáusica mediante diversos mecanismos: modulación de citoquinas, modulación de factores de crecimiento mediados por receptores estrogénicos y su actuación como inhibidores enzimáticos<sup>2</sup>.

En cuanto a su efecto beneficioso sobre la piel, parece estar en relación con la capacidad de las isoflavonas de incrementar la producción de ácido hialurónico, a la vez que producen un aumento en la expresión del gen responsable de la producción de colágeno<sup>3</sup>.

Su acción como antagonistas estrogénicos débiles, sus efectos sobre las globulinas transportadoras de hormonas sexuales, su papel como inhibidores enzimáticos o de la angiogénesis o sus acciones antioxidantes, entre otras, permiten explicar su acción positiva frente a distintas líneas celulares cancerosas.

Hace unos años nuestro grupo de investigación publicó unos trabajos donde se ponía de manifiesto la importancia tanto del equol como de la genisteína a la hora de inhibir el cotransporte  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ . Ésta es otra de las múltiples aplicaciones que pueden tener las isoflavonas y sus derivados<sup>4,5</sup>.

---

<sup>2</sup> Heim M, Frank O, Kampmann G, et al. *Endocrinology*. Feb **2004**;145(2):848-859.

<sup>3</sup> Miyazaki K, Hanamizu, et al. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. May-Jun **2002**;15(3):175-183.

<sup>4</sup> Alda JO, Mayoral JA, Lou M, et al. *Biochem Biophys Res Commun*. Apr 16 **1996**;221(2):279-285.

<sup>5</sup> Martínez RM, Gimenez I, Lou JM, et al. *Am J Clin Nutr*. Dec **1998**;68(6 Suppl):1354S-1357S.

### 1.1.1. Aspectos históricos y epidemiológicos

La historia de los fitoestrógenos es relativamente antigua, ya que desde 1927 se conoce que los extractos de algunas plantas muestran actividad estrogénica. Esto, sin embargo, no se supo apreciar adecuadamente, ya que en aquel momento se estaba iniciando el conocimiento sobre las funciones fisiológicas de los estrógenos en los mamíferos. Más tarde fue Walz, en 1931, quien descubrió que los alimentos ricos en soja tienen un alto contenido de sustancias con acción estrogénica, especialmente genisteína y daidzeína pertenecientes a la familia de las isoflavonas. En aquel momento este descubrimiento no se consideró de especial relevancia y el interés por este tipo de compuestos sólo resurgiría años más tarde. Es a partir de 1946 cuando se identifica que los compuestos vegetales con acción estrogénica (fitoestrógenos) pueden tener actividad biológica<sup>6</sup>.

La actividad estrogénica de los fitoestrógenos se conoció por primera vez en relación con un síndrome conocido como la “enfermedad del trébol” que sufría un grupo de ovejas de Australia Occidental. Después de pastar en praderas de trébol rojo denominado *Trifolium subterraneum* (Fig.1.1), las ovejas sufrían un desorden reproductivo, que daba lugar a una infertilidad permanente.



FIG. 1.1. Trébol rojo (*Trifolium subterraneum*)<sup>7</sup>

Buscando la causa de la infertilidad, los investigadores identificaron las isoflavonas genisteína y daidzeína y sus precursores biochanina A y formononetina como los componentes del trébol. En la figura 1.2 se muestran las estructuras de la genisteína, la daidzeína y sus precursores.

<sup>6</sup> Haya J. *Toko-Gin Pract.* **2002**;61(6):337-363.

<sup>7</sup> Navarro MC. *Ginecología y obstetricia clínica.* **2005**;6(3):159-165.

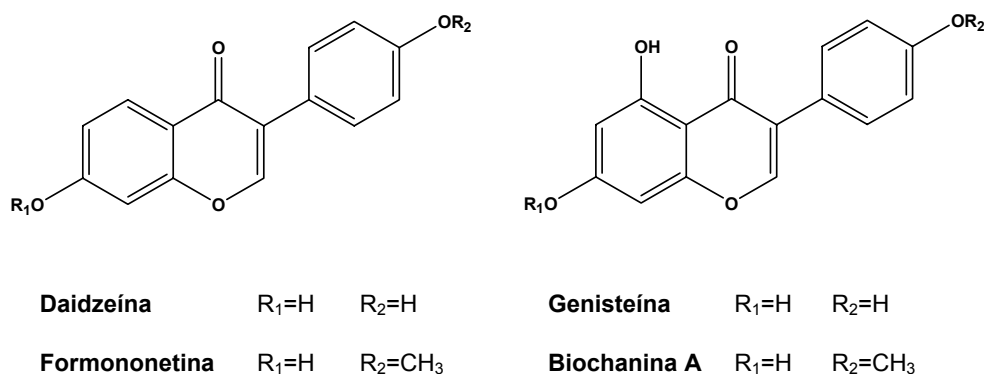


FIG. 1.2. Estructura química de la daidzeína, genisteína y sus precursores

Se describió que el contenido de formononetina, pero no el de biochanina A o genisteína, estaba relacionado positivamente con la estrogenicidad del trébol. Estudios posteriores llevaron a la identificación de equol en la orina de ovejas a las que se había suministrado formononetina y en el plasma de ovejas que habían consumido el trébol rojo. El equol poseía una actividad estrogénica superior a la de la daidzeína y O-desmetilangolensina y se concluyó que era el equol el responsable de los efectos estrogénicos observados en las ovejas. Bastó con cambiar el alimento del ganado para que recuperaran la fertilidad. Estos problemas de fertilidad como consecuencia del consumo de fitoestrógenos es una rareza, y únicamente se han podido comprobar, además de en las ovejas australianas, en leopardos criados en cautividad y alimentados con compuestos para felinos con un alto contenido de fitoestrógenos, y en las codornices de California, que se vuelven estériles en los años de sequía. En este último caso, la dieta normal escasea y la comida disponible posee un contenido de fitoestrógenos superior al habitual, a consecuencia de las condiciones de la sequía. Salvo estos casos anecdóticos, no se observan problemas de fertilidad en ninguna especie animal, incluido el hombre, como consecuencia del consumo de fitoestrógenos.

El conocimiento profundo y actual que tenemos de los fitoestrógenos arranca de 1982, cuando Axelson y posteriormente en 1984 Setchell identificaron isoflavonas en la orina de humanos.

Desde hace unos años se han venido publicando en la literatura varios estudios epidemiológicos que sugieren que una dieta rica en fitoestrógenos se relaciona con un menor riesgo de padecer enfermedad cardiovascular, y algunos cánceres como el de mama, endometrio, próstata y colon. Aunque inicialmente se pensaba que la menor incidencia de estas patologías entre la población oriental era

debida a cuestiones genéticas o constitucionales, pronto se vio que esto no era así, ya que cuando los orientales (especialmente los japoneses) emigraban a Estados Unidos y adoptaban la dieta occidental, tenían la misma tasa de estas enfermedades que sus conciudadanos occidentales, punto que demuestra que no se trata de una cuestión genética.

En los últimos años han aumentado rápidamente las publicaciones relacionadas con los efectos de los fitoestrógenos. Algunas conclusiones señalan que su administración reduce patologías crónicas como la enfermedad coronaria, aterosclerosis, hipercolesterolemia, cáncer, osteoporosis y sintomatología climatérica. Sin embargo, otros datos no son tan concluyentes porque éstos resultados están basados en estudios observacionales y no en ensayos clínicos.

### **1.1.2. Definición y clasificación**

Los fitoestrógenos son moléculas de origen vegetal que estructural y funcionalmente son muy similares a los estrógenos. Su habilidad para comportarse como estrógenos débiles es la que hizo que se les denominase fitoestrógenos (fito: vegetal, estrógeno: acción estrogénica). Sus distintas actividades biológicas son debidas en parte a su capacidad de actuar como agonistas o antagonistas estrogénicos. Como agonistas estrogénicos, los fitoestrógenos imitan a los estrógenos endógenos y causan efectos estrogénicos. Como antagonistas estrogénicos, pueden bloquear o alterar a los receptores estrogénicos e impedir la actividad estrogénica, provocando efectos antiestrogénicos.

Existen más de 4.000 fitoestrógenos descritos, que se agrupan en dos familias farmacológicas: lignanos, isoflavonoides (Fig.1.3). De todos ellos el grupo más importante es el de las isoflavonas, de las cuales destacan dos: la genisteína y la daidzeína.

Estos compuestos se encuentran en una gran variedad de plantas, especialmente cereales, legumbres y hortalizas, y se puede decir que todos los humanos consumimos fitoestrógenos en nuestra dieta, siendo más importante la ingesta de éstos cuanto más abunden los vegetales en ella. Señalar también que se encuentran no sólo en alimentos, sino también en bebidas como el vino tinto, la cerveza o el whisky, que contienen una pequeña cantidad de fitoestrógenos procedentes de los productos vegetales utilizados en su fabricación.

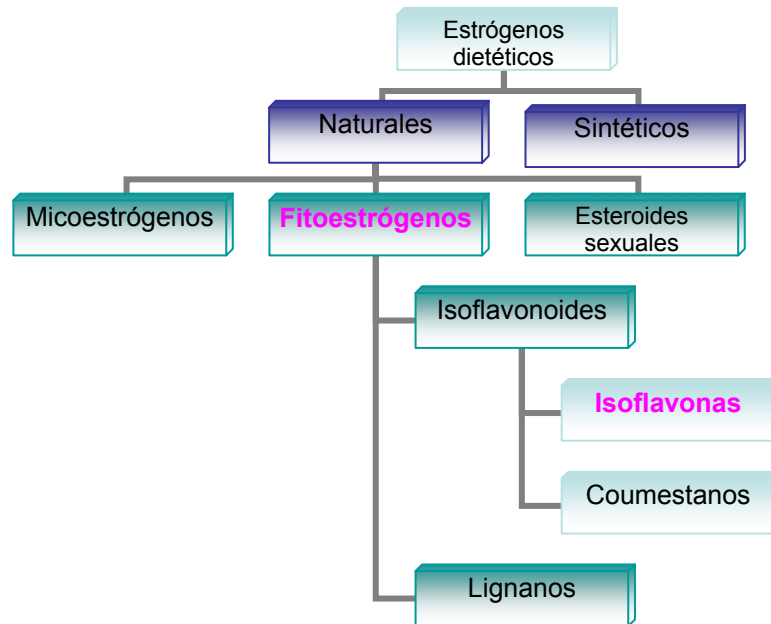


FIG. 1.3. Clasificación de los fitoestrógenos

Sin embargo, los granos de soja (Fig. 1.4) son la fuente más abundante de fitoestrógenos (isoflavonas), lo cual hará que las poblaciones que consumen habitualmente este producto vegetal como las orientales, sean las que incorporen una mayor riqueza de fitoestrógenos en su dieta.



FIG. 1.4. Fruto de soja

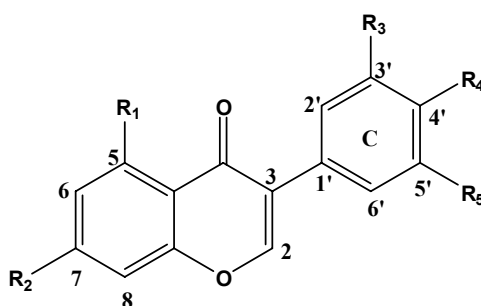
## 1.2. ISOFLAVONAS

Las isoflavonas son sin duda las que despiertan un mayor interés en el grupo de los fitoestrógenos. Es tal su supremacía, que a efectos prácticos se superponen los términos “isoflavonas” y “fitoestrógenos” y el uso los ha convertido en prácticamente sinónimos. Casi todos los datos conocidos sobre los fitoestrógenos provienen del estudio de las isoflavonas, especialmente de la genisteína y la daidzeína, que son sus representantes más importantes.

Las isoflavonas son prácticamente exclusivas de las legumbres, tales como las lentejas, las alubias, los garbanzos, los guisantes, etc. La concentración más alta de isoflavonas se encuentra en la soja. Los productos derivados de la semilla de la soja (tales como la harina, la leche, o el tofu) contienen concentraciones importantes de isoflavonas, mientras que otros productos procedentes de la soja, pero no de su semilla (como los brotes o la salsa), contienen escasa cantidad de éstas. En conjunto, una dieta rica en este tipo de productos puede contener de 0,1 a 1 mg de isoflavonoides por gramo de alimento consumido.

### 1.2.1. Estructura química de las isoflavonas

Las isoflavonas son componentes biológicos naturales existentes en las plantas. Su estructura general (3-fenilbenzopiran-4-ona) posee un grupo benzopirona y un grupo fenilo (anillo C) unido al carbono 3. La unión a este carbono es lo que diferencia a las isoflavonas de las flavonas ya que en estas últimas el grupo fenilo está unido al carbono 2 (Fig. 1.5).



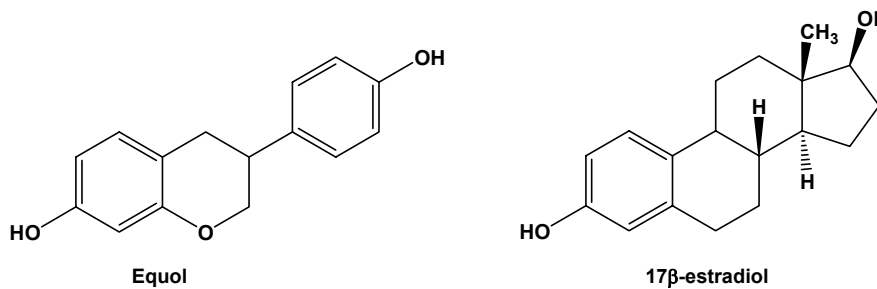
Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Derivados de daidzeína	H	OH	H/OH	H/OH	H/OH
Derivados de genisteína	OH	OH	H/OH	H/OH	H/OH

FIG. 1.5. Estructura de las isoflavonas sintetizadas en este trabajo

Una característica destacable de la estructura química de las isoflavonas es que contienen uno o varios grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático. Las isoflavonas presentan como estructura general la estructura representada en la figura 1.5 donde la variación de sustituyentes  $R_1$ - $R_5$  da lugar a un gran número de compuestos.

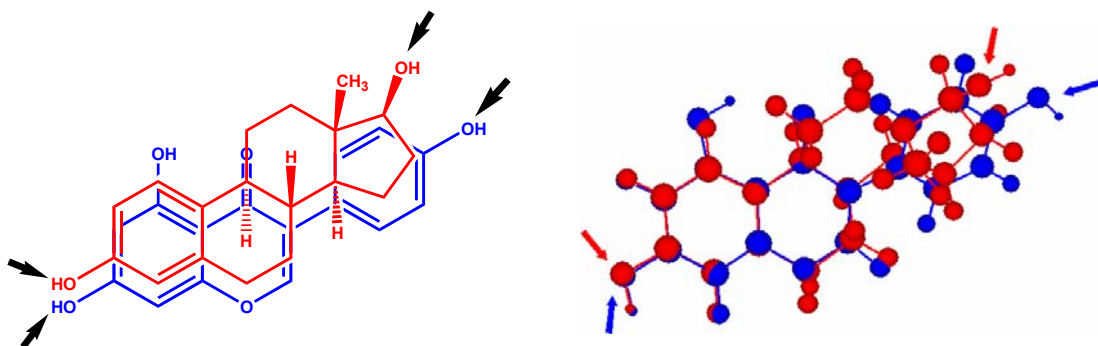
Las propiedades estéricas e hidrofóbicas de un compuesto son las que permiten su unión a los receptores, al igual que los enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilos y los sitios de unión del receptor<sup>8</sup>.

Los isoflavonoides poseen una estructura química similar a los estrógenos naturales por ello presentan la capacidad de unirse a los receptores estrogénicos. (Fig. 1.6).



**FIG. 1.6.** Estructura química del equol y del 17β-estradiol

Así, cuando se superponen las estructuras optimizadas de la genisteína y el estradiol, se aprecia como la disposición de los grupos hidroxilo de cada una de ellas es muy similar, con una ligera desviación en la posición del grupo hidroxilo en 4' de la genisteína (Fig. 1.7)<sup>9</sup>.



**FIG. 1.7.** Superposición de las estructuras del estrógeno 17β-estradiol y la isoflavona genisteína

<sup>8</sup> Ososki AL, Kennelly EJ. *Phytother Res.* Sep **2003**;17(8):845-869.

<sup>9</sup> Setchell KD, Cassidy A. *J Nutr.* Mar **1999**;129(3):758S-767S.



### 1.2.2. Metabolismo de los isoflavonoides

Desde que en 1935 Marrian describiera por primera vez la presencia de equol en orina de yeguas, éste y otros isoflavonoides han sido detectados en diversos fluidos biológicos de distintas especies de mamíferos. En 1982 Axelson identificó la presencia del equol en orina humana<sup>10</sup>. Posteriormente se encontraron otros isoflavonoides como formononetina, dihidrodaidzeína, O-demetilangolesina y 3',7-dihidroxi-flavano<sup>11</sup>.

Los isoflavonoides excretados por un individuo son el producto del metabolismo de los isoflavonoides ingeridos. Para el ser humano la principal fuente dietética de estos compuestos son las legumbres, y especialmente la soja. Estudios recientes demuestran que el enantiómero S del equol es el único enantiómero producido por la flora intestinal humana a partir de isoflavonas de soja<sup>12</sup>.

Los isoflavonoides se absorben en el tracto intestinal, tanto en intestino delgado como en el grueso. Se transportan al hígado por la vena porta donde se conjugan predominantemente con ácido glucurónico<sup>13</sup>.

La eliminación fecal y urinaria supone menos del 25% del total de los isoflavonoides ingeridos. La metabolización degradativa es por lo tanto la principal vía de eliminación de la daidzeína y la genisteína.

Los isoflavonoides también pueden ser excretados a través de las heces cuando la reabsorción intestinal es incompleta. La daidzeína es fermentada por bacterias fecales humanas en condiciones anaerobias obteniéndose los metabolitos dihidrodaidzeína, 3,(4-hidroxifenil) benzopiran-4,7-diol y equol. Cuando la genisteína es fermentada se obtiene únicamente dihidrogenisteína<sup>14</sup>. Como la composición de la flora bacteriana intestinal varía de unos individuos a otros, en sujetos con menor degradación intestinal bacteriana las concentraciones plasmáticas en una forma libre son mayores, así como su biodisponibilidad.

Lactobacilli, bacteroides y bifidobacterias son los tres tipos principales de bacterias que hidrolizan los enlaces glicosídicos. Otras bacterias degradan los isoflavonoides rompiendo la molécula por el anillo B del benzopirano (Fig. 1.8). Entre éstas, las pertenecientes a las especies clostridium y eubacterium catabolizan los

<sup>10</sup> Axelson M, Kirk DN, Farrant RD, et al. *Biochem J.* Feb 1 1982;201(2):353-357.

<sup>11</sup> Bannwart C, Adlercreutz H, Wähälä K, et al. *Biomed Environ Mass Spectrom.* 1988;17(1):1-6.

<sup>12</sup> Setchell K, Clerici C. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:1072-1079.

<sup>13</sup> Setchell KD, Brown NM, Desai PB, et al. *J Nutr.* Apr 2003;133(4):1027-1035.

<sup>14</sup> Chang YC, Nair MG. *J Nat Prod.* Dec 1995;58(12):1892-1896.

isoflavonoides del mismo modo que los rhizobia de la raíces: la ruptura del anillo B de la molécula produce phloroglucinol en los compuestos con sustituciones OH en las posiciones 5 y 7 y resorcinol en los 7-sustituidos, además de un amplio espectro de otros metabolitos derivados del anillo B<sup>15</sup> (Fig.1.8).

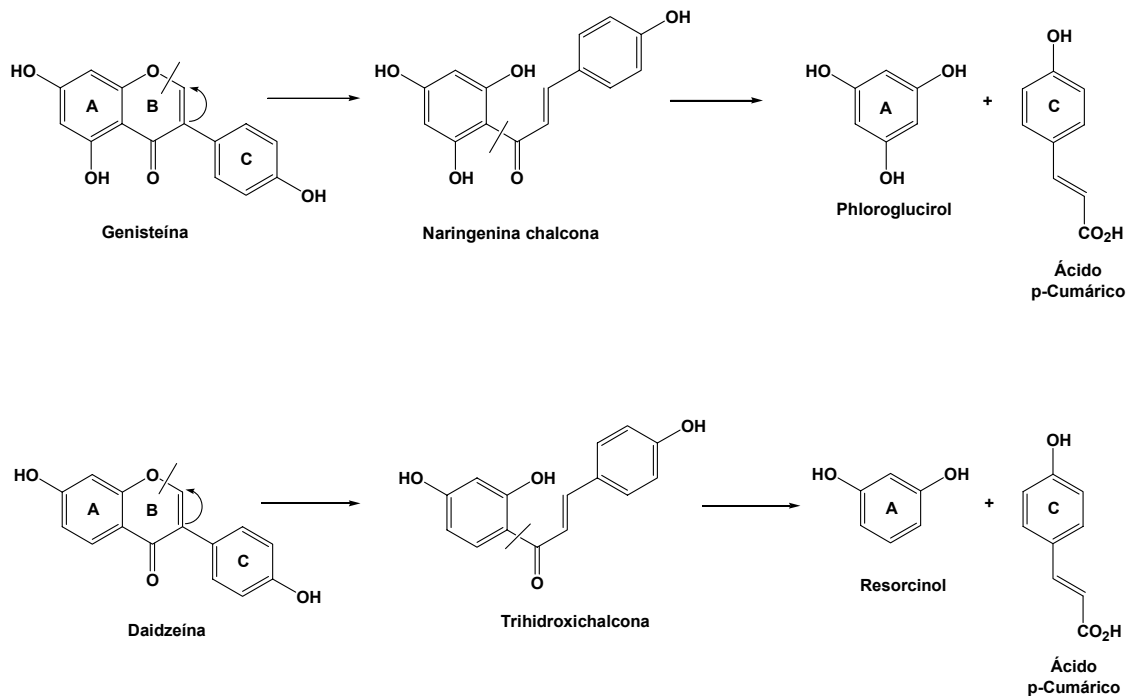
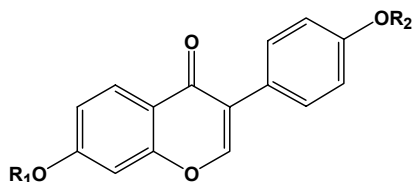


FIG.1.8. Degradación bacteriana de los isoflavonoides

Las vías de metabolización hepática de los isoflavonoides son la glucuroconjugación y la sulfoconjugación. Yasuda y col. mostraron en su trabajo cómo administrando daidzeína oralmente a ratas y analizando la bilis excretada, se detectaba daidzeína y sus conjugados mono y bisulfato, monoglucuronato y sulfoglucuronato (daidzeína 4'-sulfato, daidzeína 7,4'-disulfato, daidzeína 7 $\beta$ -D-glucuronato-4'-sulfato), denominados M-1, M-2, M-3 y M-4<sup>16</sup> (Fig.1.9).



Metabolitos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Daidzina	glucosa	H
Daidzeína	H	H
M-1	H	SO <sub>3</sub>
M-2	SO <sub>3</sub>	SO <sub>3</sub>
M-3	glucurónico	H
M-4	glucurónico	SO <sub>3</sub>

FIG. 1.9. Metabolitos hepáticos de la daidzeína

<sup>15</sup> Rao JR, Cooper JE. *J Bacteriol.* Sep **1994**;176(17):5409-5413.

<sup>16</sup> Yasuda T, Kano Y, Saito K, et al. *Biol Pharm Bull.* Oct **1994**;17(10):1369-1374.

Los isoflavonoides que se encuentran en la sangre y orina se encuentran básicamente en su forma conjugada.

La biochanina A es desmetilada dando genisteína, que a su vez se degrada posteriormente para producir p-etilfenol y ácidos orgánicos<sup>17</sup> (Fig.1.10).

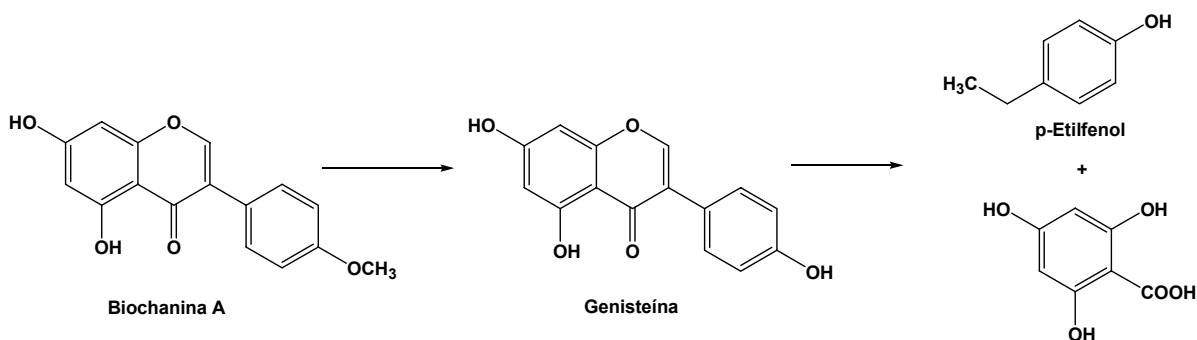


FIG. 1.10. Metabolismo de la biochanina A

La formononetina es principalmente desmetilada para dar daidzeína que posteriormente se transforma, por hidrogenación en equol. En otra ruta alternativa, la reducción sin desmetilación previa, da como producto mayoritario de excreción el O-metil-equol. Por último, la degradación del anillo genera O-desmetilangolensina como otro producto de degradación de la formononetina (Fig. 1.11).

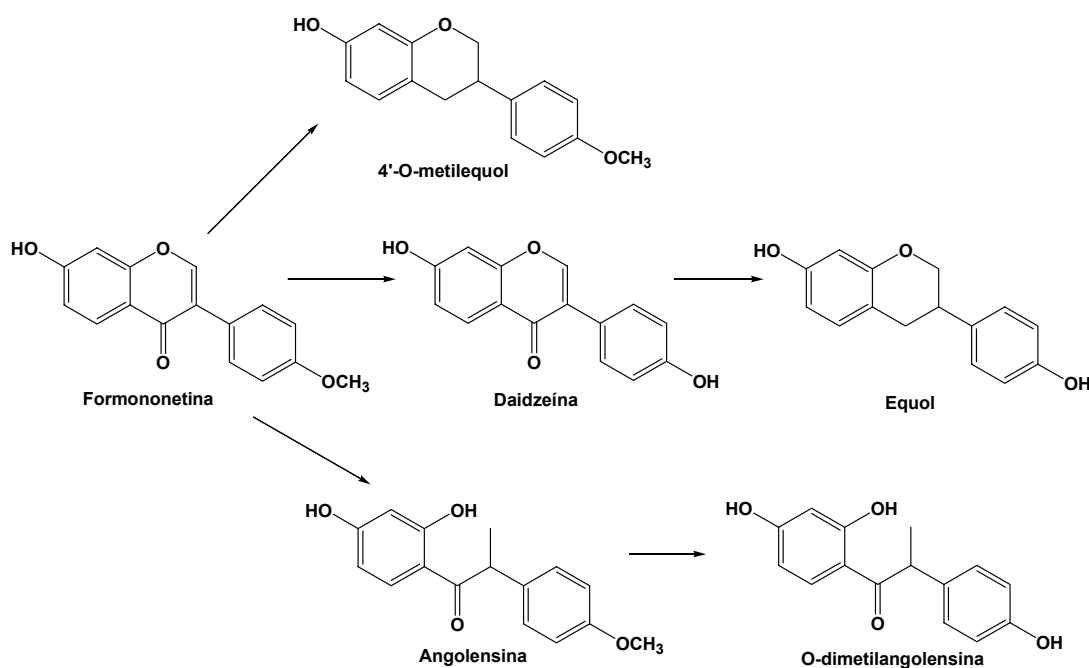


FIG. 1.11. Metabolismo de la formononetina

<sup>17</sup> Lundh T. *Proc Soc Exp Biol Med.* Jan 1995;208(1):33-39.

En 1993, Joannou aisló e identificó en orina humana una serie de metabolitos tras la ingesta de dieta de soja: tetrahidrodaidzeína, 6'-hidroxi-O-demetilangolensina, 2-deshidro-O-desmetilangolensina, genisteína, equol, gliciteína, daidzeína y O-desmetilangolensina<sup>18</sup>.

La dihidrodaidzeína y el deshidroequol ya habían sido descritos como productos intermedios del metabolismo de la daidzeína, cuyos catabolitos finales son O-desmetilangolensina y equol<sup>19</sup>.

La cuantificación de estos metabolitos<sup>20</sup> llevó a la conclusión de que la O-desmetilangolensina y el equol son ambos metabolitos de la daidzeína, y que existe aparente variabilidad individual en el modo de degradación, lo que hace excretar a unos sujetos mayor concentración de uno u otro metabolito.

En otro estudio de los mismos autores no se encontró deshidroequol en aquellos individuos con predisposición a la eliminación de equol. En cambio si se encontró dihidrodaidzeína, lo que sugirió la idea de que ésta podría ser la precursora del equol. La tetrahidrodaidzeína y la 2-deshidro-O-desmetilangolensina fueron propuestos como los intermedios más probables del equol y de la O-desmetilangolensina respectivamente (Fig.1.12)

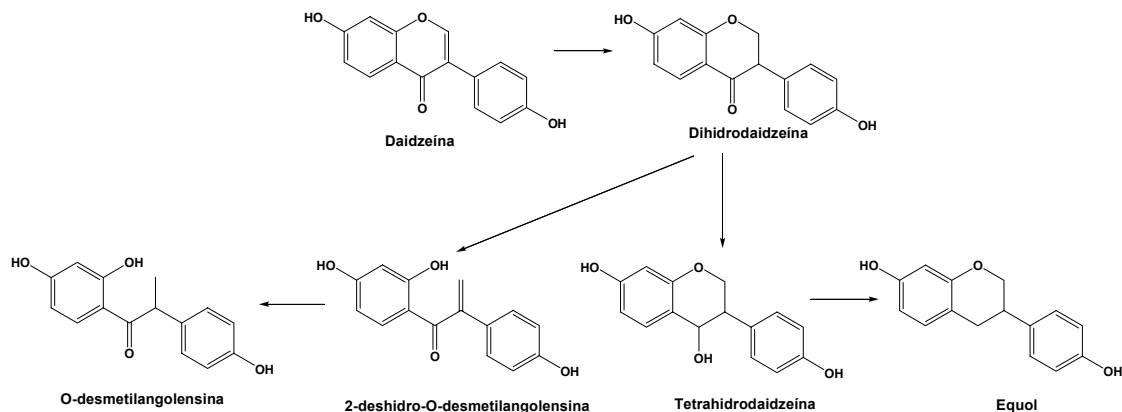


FIG. 1.12. Rutas metabólicas para la daidzeína.

<sup>18</sup> Kelly GE, Nelson C, Waring MA, et al. *Clin Chim Acta*. Dec 31 **1993**;223(1-2):9-22.

<sup>19</sup> Adlercreutz H, Hockerstedt K, Bannwart C, et al. *J Steroid Biochem*. **1987**;27(4-6):1135-1144.

<sup>20</sup> Joannou GE, Kelly GE, Reeder AY, et al. *J Steroid Biochem Mol Biol*. Aug **1995**;54(3-4):167-184.

La conversión de daidzeína a equol vía dihidrodaidzeína y tetrahidrodaidzeína puede llevarse a cabo por transposición o por deshidratación y reducción como se muestra en la figura 1.13.

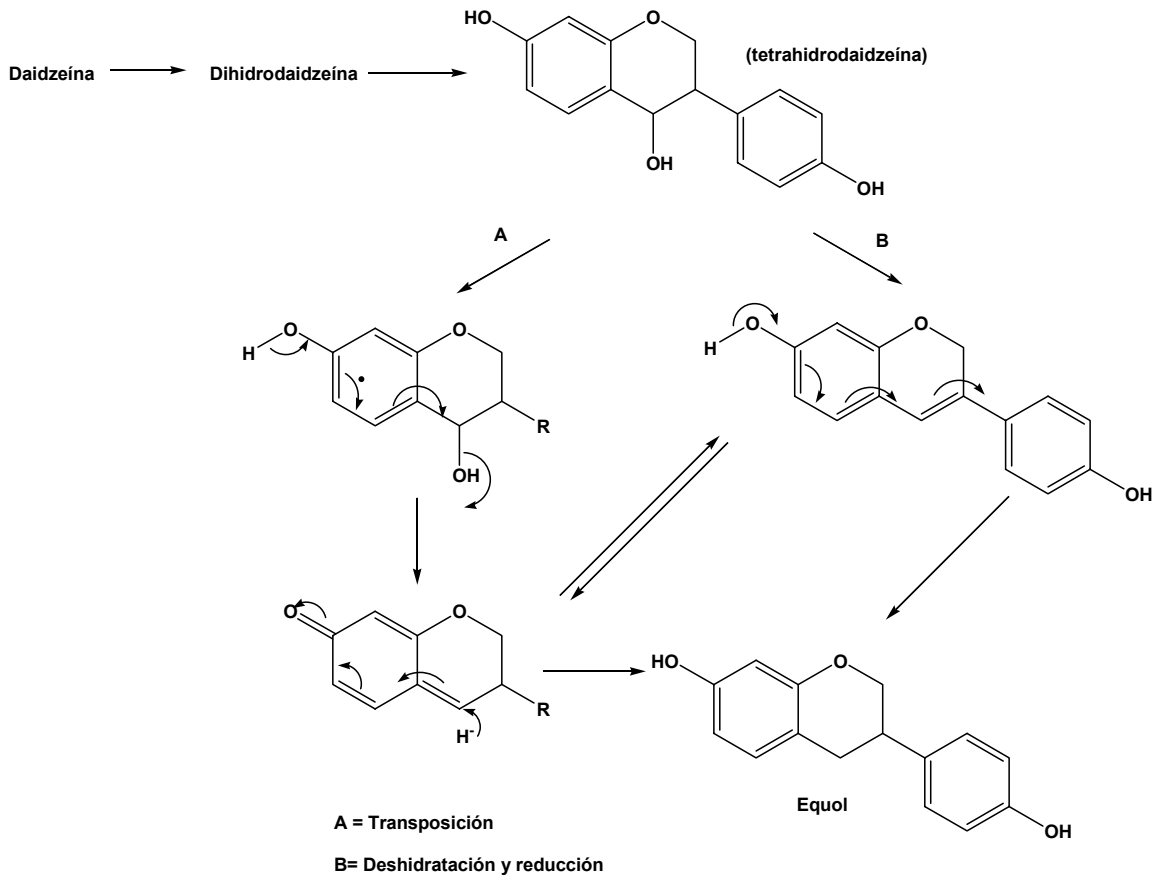


FIG. 1.13. Mecanismos de transformación de la tetrahidrodaidzeína en equol

La primera vez que se identificó la dihidrogenisteína y la 6-hidroxi-O-desmetilangolensina como productos de la genisteína, se propuso una ruta metabólica para ésta similar a la de la daidzeína (Fig. 1.14).

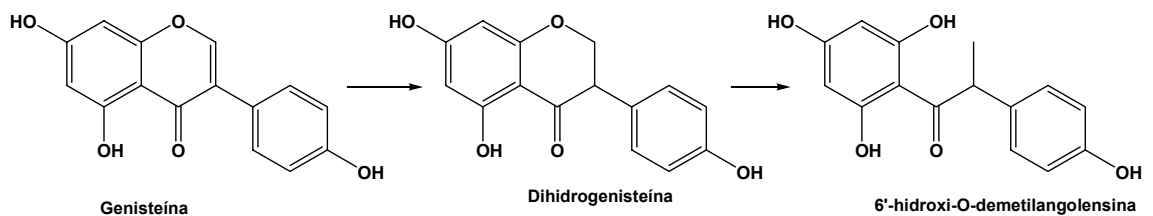


FIG. 1.14. Ruta metabólica para la genisteína.

### 1.2.3. Efectos sistémicos de las isoflavonas

El perfil clínico de las isoflavonas es extremadamente variado, teniendo efectos en las mujeres e incluso en los varones. Podemos decir a grandes rasgos, que los fitoestrógenos, y en concreto las isoflavonas, han demostrado tener numerosas funciones biológicas sobre algunos tipos de enfermedades crónicas, entre las que se podrían citar distintos tipos de cáncer, la menopausia (sobre todo como paliativo de los síntomas de la misma), enfermedades cardiovasculares, enfermedad renal, problemas óseos, hipercolesterolemia, su función como inhibidores de enzimas...

Como ya se ha comentado anteriormente, por su estructura química similar a los estrógenos naturales, los isoflavonoides tienen la capacidad de unirse a los receptores estrogénicos.

La actividad estrogénica de los isoflavonoides es débil, sin embargo las concentraciones plasmática pueden llegar a ser muy superiores a las del 17 $\beta$ -estradiol. En cuanto a su unión a los receptores estrogénicos, el equol presenta una afinidad 1000 veces menor que el estrógeno endógeno, mientras que la genisteína se une al receptor con una afinidad 175 veces menor<sup>21</sup>.

Pueden comportarse como agonistas, activando la señal hormonal, o como antagonistas, compitiendo por la ocupación del lugar del estrógeno en el receptor impidiendo que éste se una, dependiendo del tejido o de la especie.

#### 1.2.3.1. Efectos cardiovasculares

La enfermedad cardiovascular constituye la principal causa de muerte en la mujer posmenopáusica. En la edad fértil, la mujer goza de cierta protección contra la enfermedad coronaria, que se pierde con la deprivación estrogénica de la menopausia. La incidencia de enfermedad cardiovascular en la mujer menopáusica es de 3-6 casos /1.000.

Al comparar los niveles de mortalidad por enfermedad coronaria entre las poblaciones de Japón y EE.UU. se ve una mortalidad ocho veces menor en las mujeres orientales. La posible implicación de la dieta en este hecho y en especial las diferencias en cuanto a la ingesta de soja, es un aspecto comprobado desde hace varias décadas. Esta importante acción cardioprotectora atribuida a la soja, ha sido el

---

<sup>21</sup> Molteni A, Brizio-Molteni L, Persky V. *J Nutr.* Mar 1995;125(3 Suppl):751S-756S.

punto de partida de muchos ensayos clínicos que han buscado confirmar su beneficio<sup>22</sup>.

Estudios demuestran que las isoflavonas presentan propiedades hipocolesterolemicas debido a que disminuyen el LDL e incrementan los niveles de HDL<sup>23</sup>. Otro de los beneficios que presentan las isoflavonas es que reducen la presión sanguínea<sup>24</sup>.

#### 1.2.3.1.1. Actividad hipocolesteremiante

Carroll fue el primer investigador que publicó que la proteína de soja reducía el nivel plasmático de colesterol en conejos hipercolesterolemicos<sup>225</sup>. A sus estudios siguieron los del grupo italiano de Sirtori en humanos hipercolesterolemicos<sup>26</sup> y muchos otros confirmando dicha hipótesis.

Ya en 1976, Siddiqui había atribuido a la biochanina A y la formononetina (4'-metil éteres de genisteína y daidzeína) propiedades hipolipidémicas<sup>27</sup>. En 1995 Anderson publicó un metaanálisis definitivo asociando el consumo de soja con la reducción del colesterol plasmático<sup>28</sup>.

Se ha demostrado que la presencia de genisteína estimula la producción de receptores para las LDL<sup>29</sup>. Asimismo, Kirk describió que ratones carentes del gen para los receptores de LDL no manifestaban cambios en los niveles séricos de colesterol, a diferencia de ratones normales, cuando eran alimentados con suplementos de isoflavonoides<sup>30</sup>.

#### 1.2.3.1.2. Efecto en la formación de la placa ateromatosa

Las LDL oxidasas se han identificado como uno de los factores más altamente relacionados con la aparición y desarrollo de la lesión ateromatosa. Tikkanen<sup>31</sup> atribuye la actividad beneficiosa de los isoflavonoides a sus propiedades antioxidantes, que prevendrían la oxidación de las lipoproteínas LDL causantes de la lesión

<sup>22</sup> Robertson TL, Kato H, Rhoads GG, et al. *Am J Cardiol*. Feb **1977**;39(2):239-243.

<sup>23</sup> Ogita H, Node K, Kitakaze M. *Curr Drug Metab*. Dec **2003**;4(6):497-504.

<sup>24</sup> Rivas M, Garay RP, Escanero JF, et al. *J Nutr*. Jul **2002**;132(7):1900-1902.

<sup>25</sup> Hamilton RM, Carroll KK. *Atherosclerosis*. Jul-Aug **1976**;24(1-2):47-62.

<sup>26</sup> Sirtori CR, Agradi E, Conti F, et al. *Lancet*. Feb 5 **1977**;1(8006):275-277.

<sup>27</sup> Siddiqui MT, Siddiqui M. *Lipids*. Mar **1976**;11(3):243-246.

<sup>28</sup> Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME. *N Engl J Med*. Aug 3 **1995**;333(5):276-282.

<sup>29</sup> Baum JA, Teng H, Erdman JW, Jr., et al. *Am J Clin Nutr*. Sep **1998**;68(3):545-551.

<sup>30</sup> Kirk EA, Sutherland P, Wang SA, et al. *J Nutr*. Jun **1998**;128(6):954-959.

<sup>31</sup> Tikkanen MJ, Wähälä K, Ojala S, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 17 **1998**;95(6):3106-3110.

ateromatosa. De hecho se ha demostrado que la genisteína es capaz de inhibir in vitro la oxidación de las LDL<sup>332</sup>.

La genisteína como inhibidor de enzimas tirosina quinasas tiene efectos positivos sobre diferentes mecanismos implicados en la formación de trombos y lesiones ateromatosas.

#### 1.2.3.1.3. Actividad antihipertensiva

La contractilidad de las arterias en baño de órganos con anillos de aorta estimulada por diversas sustancias fue sensible a la genisteína<sup>33</sup>. También flavonoides de estructura química análoga mostraron efecto vasodilatador en aorta de rata<sup>34</sup>. En un estudio llevado a cabo en nuestro laboratorio se observó que la genisteína puede vasorrelajar el lecho vascular renal incluso sin haber sido previamente estimulado por agentes vasoconstrictores de igual modo que lo hace la furosemida<sup>35,36</sup>.

#### 1.2.3.2. Efectos renales

El efecto de las isoflavonas sobre la función renal no está bien definido todavía. Hay evidencia de que las isoflavonas pueden jugar un papel beneficioso en la enfermedad renal crónica.

En un estudio en pacientes nefríticos, sometidos a un cambio de sus dietas usuales a dietas vegetarianas a base de soja durante ocho semanas, se vio como el LDL colesterol y el colesterol sérico total, bajaban significativamente así como la excreción urinaria de proteínas (la cual esta incrementada en pacientes con insuficiencia renal crónica) se redujo significativamente, aproximadamente un tercio<sup>3737</sup>. No fue posible concluir específicamente en este estudio que la isoflavona de la soja era la responsable del mejoramiento de la función renal. Sin embargo, otros datos sugieren que la proteína de soja tiene un efecto benéfico directo sobre la función renal, donde se mostró en humanos con diferentes tipos de insuficiencia renal crónica, demostraron también una reducción moderada de la proteinuria y la preservación de la función renal<sup>3838</sup>.

---

<sup>32</sup> Kapiotis S, Hermann M, Held I, et al. *Arterioscler Thomb Vasc Biol.* Nov **1997**;17(11):2868-2874.

<sup>33</sup> Toma C, Jensen PE, Prieto D, et al. *Br J Pharmacol.* Mar **1995**;114(6):1266-1272.

<sup>34</sup> Machha A, Anwar-ul H. *Life Sci.* **2003**;74:603-612.

<sup>35</sup> Gimenez I, Martinez RM, Lou M, et al. *Hypertension.* Feb **1998**;31(2):706-711.

<sup>36</sup> Giménez I. Tesis Doctoral. *Universidad de Zaragoza.* **1997**.

<sup>37</sup> D'Amico G, Gentile MG, Manna G, et al. *Lancet.* May 9 **1992**;339(8802):1131-1134.

<sup>38</sup> Ranich T, Bhatena SJ, Velasquez MT. *J Ren Nutr.* Oct **2001**;11(4):183-193.



En nuestro laboratorio se demostró que a nivel renal, la inhibición de la actividad del cotransporte  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  en la cara luminal del asa de Henle de la nefrona por parte de los isoflavonoides, produce un aumento de la excreción de agua y sodio. Este hecho se comprueba con la administración de genisteína<sup>35, 36</sup>.

Este efecto sin embargo, no va acompañado de estimulación de kaliuresis ni de magnesiuresis, a diferencia de lo que ocurre con los diuréticos del asa, lo que hace de los isoflavonoides buenos candidatos para la administración a pacientes hipertensos que necesitan elevar la diuresis y la natriuresis<sup>39</sup>.

### 1.2.3.3. Efectos sobre el hueso

Algunos estudios con animales muestran resultados positivos en cuanto a la mejora de masa ósea después de una administración suplementaria de proteínas de soja o extractos de soja enriquecidos con isoflavonas. Estudios epidemiológicos realizados en pacientes evidenciaron la relación entre la ingesta diaria de fitoestrógenos y su efecto sobre la masa ósea, llegando a la conclusión que las proteínas de soja y la ingesta de fitoestrógenos son beneficiosas para mantener o mejorar la masa ósea en las mujeres posmenopáusicas<sup>40</sup>.

En un estudio reciente del año 2007 se observó que ratas ovariectomizadas desarrollaron cambios en el hueso similares a los observados en mujeres con osteoporosis como disminución del peso del fémur y pérdida del contenido mineral del hueso. El tratamiento con isoflavonas aumenta significativamente la densidad ósea. Estos resultados sugieren que las isoflavonas que contiene el trébol rojo son efectivas en la reducción de la pérdida ósea inducida por la ovariectomía<sup>41</sup>.

La ipriflavona (7-isopropilisoflavona) es una isoflavona sintética que carece de actividad estrogénica pero que tiene una notable similitud en estructura química con la daidzeína y la genisteína. Cuando se suministran dosis de 600 mg/d, la ipriflavona previene la pérdida de hueso y aumenta la formación de éste<sup>42</sup>. Curiosamente la daidzeína es uno de los metabolitos de esta isoflavona (Fig. 1.15).

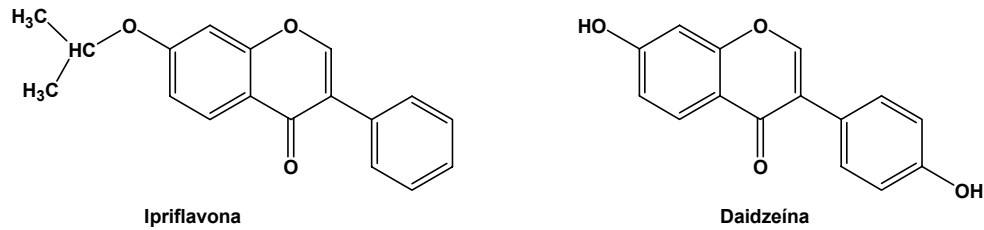
---

<sup>39</sup> Rivas M. *Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. 1999.*

<sup>40</sup> Greendale GA, FitzGerald G, Huang MH, et al. *Am J Epidemiol.* Apr 15 **2002**;155(8):746-754.

<sup>41</sup> Occhiuto F, Pasquale RD, Guglielmo G, et al. *Phytother Res.* Feb **2007**;21(2):130-134.

<sup>42</sup> Cheng SL, Zhang SF, Nelson TL, et al. *Calcif Tissue Int.* Nov **1994**;55(5):356-362.



**FIG. 1.15.** Estructura química de la ipriflavona

Se describió un efecto bifásico de la genisteína. A dosis bajas se comporta de forma similar a los estrógenos, reduciendo la pérdida de masa ósea en el mismo modelo de rata quirúrgicamente posmenopáusicas. A dosis altas podría tener efectos adversos sobre las funciones de las células óseas, aunque es muy poco probable que estas dosis puedan ser alcanzadas por ingestión dietética de genisteína<sup>43</sup>.

#### **1.2.4. Efectos celulares de las isoflavonas**

##### 1.2.4.1. Inhibición enzimática

Una preocupación constante acerca del efecto estrogénico de los fitoestrógenos es si este tipo de compuestos es capaz de estimular el crecimiento de los tumores mamarios dependientes de estrógenos en las mujeres. Se estableció que los fitoestrógenos ejercen un efecto bifásico sobre el crecimiento celular de las células tumorales, estimulando el crecimiento cuando se utilizan concentraciones menores de 5  $\mu$ M e inhibiendo el crecimiento a concentraciones elevadas. Una explicación a estos resultados aparentemente contradictorios podría darse a partir de un estudio más detallado de las interacciones entre los dos tipos de receptores a estrógenos, el RE $\alpha$  y el RE $\beta$ <sup>44</sup>.

Además de los efectos derivados de su unión a los receptores estrogénicos, las isoflavonas son capaces de inhibir diversos enzimas implicados en numerosos procesos orgánicos.

<sup>43</sup> Anderson JJ, Ambrose WW, Garner SC. *Proc Soc Exp Biol Med.* Mar 1998;217(3):345-350.

<sup>44</sup> García-Solis P, Aceves C. *ALAN.* 2005;55(3).

#### 1.2.4.1.1. Inhibición de tirosinquinasa

La actividad de las tirosinquinasa es inhibida por la genisteína por la vía de interacción con el sitio de unión con el ATP. En 1987 Akiyama descubrió que la genisteína era un inhibidor de las proteínas tirosinquinasa, abriendo así una vía de investigación de las señales de transducción en células normales y mutadas<sup>45</sup>. Esta familia de enzimas juega un papel fundamental en una serie de sucesos relacionados entre otros con la división celular y la carcinogénesis: inhibición de la expresión de oncogenes y modulación de la expresión de diversos factores de crecimiento y sus receptores. Como resultado de la reducción del número de receptores inducido por las isoflavonas a través de la inhibición de las tirosinquinasa, se reduce la actividad de los factores de crecimiento correspondientes, con la consiguiente inhibición del crecimiento tumoral.

Estos factores de crecimiento se encuentran también implicados en los procesos de angiogénesis por un mecanismo que todavía hoy no se conoce con exactitud<sup>46</sup>, Esta acción tendrá importancia en lo que respecta al crecimiento tumoral, e incluso en el establecimiento de tumores secundarios (metástasis). Otra posibilidad interesante de la genisteína en relación con la capacidad de inhibir la angiogénesis, es su aplicación en patologías con incremento de la misma como la artritis reumatoide, la retinopatía diabética o la soriasis. Hace unos años se describió la inhibición de la neovascularización ocular in vivo, lo que sugirió su posible utilidad en oftalmología para tratar la angiogénesis corneal<sup>47</sup>.

Por otra parte, los inhibidores de la tirosinquinasa como la genisteína, antagonizan la contractilidad vascular en respuesta a un amplio rango de agentes contracturantes y reducen la resistencia en distintas arterias, con el consiguiente beneficio vascular. Esta actuación sobre el músculo liso vascular incluye la inhibición reversible del incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular y la regulación del efecto del  $Ca^{2+}$  en el aparato contráctil de las células de dicho músculo. Además, las tirosinquinasa actúan en los procesos de agregación plaquetaria y en el metabolismo osteoclastico por lo que su inhibición por las isoflavonas se traduciría en efectos positivos sobre la trombogénesis y la osteoporosis menopáusica<sup>48</sup>.

---

<sup>45</sup> Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, et al. *J Biol Chem*. Apr 25 **1987**;262(12):5592-5595.

<sup>46</sup> Ambra R, Rimbach G, de Pascual Teresa S, et al. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. Jan **2006**;16(1):35-43.

<sup>47</sup> Kruse FE, Joussen AM, Fotsis T, et al. *Ophthalmology*. Feb **1997**;94(2):152-156.

<sup>48</sup> Gao YH, Yamaguchi M. *Int J Mol Med*. Mar **2000**;5(3):261-267.

#### 1.2.4.1.2. Acción sobre enzimas implicadas en el ciclo celular

Las isoflavonas son capaces de actuar sobre otras muchas enzimas, tales como las topoisomerasa I y II, que catalizan cambios topológicos en el ADN, y que son necesarias en la replicación del mismo. En este caso, las isoflavonas actúan sobre el complejo topoisomerasa-ADN induciendo la apoptosis o muerte celular programada, tal y como se ha observado en líneas celulares de cáncer de mama<sup>49</sup>.

#### 1.2.4.1.3. Acción sobre el metabolismo y transporte de estrógenos y andrógenos

La aromatasas, enzima implicada en la formación del 17- $\beta$  estradiol a partir de sus precursores androgénicos, es también inhibida por la genisteína, con la consiguiente reducción en la producción de esta hormona, lo que puede tener una especial importancia en los tumores hormonodependientes, como el de mama. Algo parecido sucede con las familias enzimáticas de las 17- $\beta$  esteroide deshidrogenasas y las sulfotransferasas, implicadas asimismo en el metabolismo de los estrógenos, así como con la 5- $\alpha$  reductasa, enzima convertidora de la testosterona en dihidrotestosterona e implicada en el cáncer de próstata<sup>50</sup>. Las isoflavonas y lignanos también modulan la producción de globulina transportadora de hormonas sexuales (sex hormona binding globulin, SHBG), estimulando su síntesis por parte de los hepatocitos, e incrementando sus niveles plasmáticos en humanos con la consiguiente reducción de los valores de estradiol libre circulante<sup>51</sup>.

#### 1.2.4.1.4. Acción sobre enzimas implicados en procesos inflamatorios

Algunos fitoestrógenos (lignanos, isoflavonas) se comportan también como inhibidores de enzimas relacionados con los procesos inflamatorios, como la ciclooxigenasa o la lipooxigenasa, así como de otras enzimas, como la colesterol-7 $\alpha$ -hidroxilasa, implicada en la formación de ácidos grasos biliares a partir del colesterol, y la  $\alpha$ -glucosidasa, que interviene en el metabolismo de la glucosa y otros procesos<sup>51</sup>.

---

<sup>49</sup> Yamashita Y, Kawada S, Nakano H. *Biochem Pharmacol.* Feb 15 **1990**;39(4):737-744.

<sup>50</sup> Le Bail JC, Champavier Y, Chulia AJ, et al. *Life Sci.* Feb 25 **2000**;66(14):1281-1291.

<sup>51</sup> Pino AM, Valladares LE, Palma MA, et al. *J Clin Endocrinol Metab.* Aug **2000**;85(8):2797-2800.

#### 1.2.4.2 Mujeres premenopáusicas

El efecto estrogénico de los isoflavonoides in vivo se ha estudiado en diversos trabajos. Cassidy descubrió que la administración de isoflavonoides a mujeres premenopáusicas alarga el ciclo menstrual, aumentando la fase folicular<sup>52</sup> (los picos de LH y FSH fueron suprimidos y las concentraciones plasmáticas de estradiol aumentaron). Lu<sup>53</sup> observó la reducción de las concentraciones plasmáticas de hormonas esteroideas  $17\beta$ -estradiol, progesterona y deshidroepiandrosterona sulfato, con alargamiento del ciclo menstrual, como consecuencia del consumo de la leche de soja.

La duración del ciclo menstrual, como muestran datos epidemiológicos, es uno de los factores de riesgo de cáncer de mama. El promedio de la duración el ciclo en los países occidentales, en los cuales el riesgo de cáncer de mama es alto, es 28-29 días, mientras que la duración media del ciclo menstrual en mujeres japonesas es de 32 días, para las cuales el riesgo de cáncer de mama es de 4 a 5 veces menor.

#### 1.2.4.3. Mujeres posmenopáusicas

Datos epidemiológicos y ensayos clínicos demuestran que la terapia estrogénica después de la menopausia ofrece protección contra enfermedades cardiovasculares, reduce la osteoporosis, mejora las funciones cognitivas y alivia los síntomas menopáusicos asociados con la gran pérdida de estrógenos<sup>54</sup>. Dada la poca conformidad con la convencional terapia hormonal de reemplazo que se da con miedo de posibles incrementos en el riesgo del desarrollo de cáncer de mama y por sus efectos secundarios, están siendo estudiadas constantemente fuentes alternativas de estrógenos exógenos.

Las isoflavonas de la soja pueden ser una fuente de estrógenos exógenos y los bajos casos de osteoporosis, cáncer de mama y síntomas menopáusicos en las mujeres de países que consumen soja como un alimento básico, ha sido atribuido en parte a la ingesta de isoflavonas.

El síndrome climatérico es el conjunto de síntomas derivado de la falta de estrógenos. Lo primero que hay que considerar de las isoflavonas es su eficacia en la eliminación de la sintomatología climatérica, especialmente su síntoma principal, los

---

<sup>52</sup> Cassidy A, Bingham S, Setchell KD. *Am J Clin Nutr.* Sep **1994**;60(3):333-340.

<sup>53</sup> Lu LJ, Anderson KE, Grady JJ, et al. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* Jan **1996**;5(1):63-70.

<sup>54</sup> Ribot C, Tremollieres F. *Gynecol Obstet Fertil.* May **2007**;35(5):388-397.

sofocos. Éstos son sin duda el síntoma más frecuente y llamativo de las mujeres climatéricas. Su incidencia es muy variable en las distintas culturas. Hay que destacar que se observa en múltiples estudios retrospectivos epidemiológicos una clara relación entre la dosis de isoflavonas consumidas y la tasa de sofocos<sup>55</sup>. Este efecto se explica con la hipótesis de una acción agonista estrogénica a nivel del centro termorregulador en el hipotálamo (el hipotálamo posee receptores estrogénicos  $\beta$ ), con disminución de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y, por tanto, de las gonadotropinas hipofisarias y de los esteroides ováricos<sup>56</sup>.

Con los datos de que disponemos actualmente, podemos afirmar que las isoflavonas de la soja son una buena alternativa para el tratamiento de los sofocos del síndrome climatérico.

#### 1.2.4.4. Hombres

Hasta la fecha, se han hecho pocos estudios que midan el efecto de las isoflavonas específicamente en hombres. El cáncer de próstata es sensible a la terapia estrogénica y se conoce que la ingesta de isoflavonas es más alta en países en los cuales los casos de cáncer de próstata son menores. En un análisis del plasma y el fluido prostático de hombres asiáticos los cuales tienen un menor riesgo de cáncer de próstata en relación con los hombres europeos, se encontraron altas concentraciones de las isoflavonas equol y daidzeína<sup>57</sup>.

La feminización observada en hombres alcohólicos con cirrosis hepática sin incremento en los niveles circulantes de hormonas esteroideas endógenas se atribuye al contenido en fitoestrógenos de bebidas alcohólicas como cerveza, sake y bourbon derivados respectivamente de la cebada, arroz y maíz, fuentes naturales de isoflavonoides<sup>58</sup>.

En un estudio sobre el potencial efecto endocrino de los fitoestrógenos en ratas macho, se vio que los isoflavonoides son estrógeno-agonistas en la próstata de roedores adultos. Administrada neonatalmente no se observaron efectos de la genisteína inicialmente, pero el eje gonadal-sistema nervioso central y el comportamiento sexual fueron afectados durante el desarrollo. Los cambios fueron

---

<sup>55</sup> Coon JT, Pittler MH, Ernst E. *Phytomedicine*. Feb **2007**;14(2-3):153-159.

<sup>56</sup> Nicholls J, Lasley BL, Nakajima ST, et al. *J Nutr*. Apr **2002**;132(4):708-714.

<sup>57</sup> Morton MS, Chan PS, Cheng C, et al. *Prostate*. Jul 1 **1997**;32(2):122-128.

<sup>58</sup> Gavaler JS, Rosenblum ER, Deal SR, et al. *Proc Soc Exp Biol Med*. Jan **1995**;208(1):98-102.

similares a los producidos por el DES (dietilestilbestrol, potente estrógeno), aunque fueron necesarias mayores dosis de isoflavonoides<sup>59</sup>.

#### 1.2.4.5. Niños

La proteína de soja se ha convertido en ingrediente habitual en las preparaciones de leches infantiles. Existe controversia acerca de los posibles efectos que la ingesta de isoflavonoides pudiera tener en el desarrollo posterior, puesto que se ha estimado una ingesta diaria total de isoflavonas de 3 mg por Kg de peso<sup>60</sup>.

---

<sup>59</sup> Santti R, Makela S, Strauss L, et al. *Toxicol Ind Health*. Jan-Apr 1998;14(1-2):223-237.

<sup>60</sup> Irvine CHG, Fitzpatrick MG, Alexander SL. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1998;217(3):247-253.





## **2. PLANTEAMIENTO**



## PLANTEAMIENTO

La revisión realizada en la introducción muestra que diversos isoflavonoides poseen actividades beneficiosas para el organismo por su actividad vasorrelajante o su actividad estrogénica, ésta última utilizada en terapia hormonal sustitutiva (THS) sin conocer el mecanismo celular por el que se produce.

También se ha mencionado la similitud estructural entre las isoflavonas y el 17- $\beta$ -estradiol (Fig. 1.7), posible causa de su comportamiento estrogénico. Esto llevaría a pensar que una variación en la posición y número de grupos hidroxilo libres en los anillos aromáticos de las isoflavonas podría variar su actividad.

El campo de los isoflavonoides muestra por tanto un gran interés tanto desde el punto de vista químico, ante la posibilidad de modificaciones estructurales, como desde el punto de vista farmacológico, por sus posibles aplicaciones.

Por todo ello, en este trabajo se ha planteado la síntesis de nuevos isoflavonoides así como la valoración de su actividad vasorrelajante y afinidad estrogénica.



### **3. OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

1. Síntesis y caracterización de nuevas familias de moléculas con una estructura básica de isoflavonas.
2. Resolución de mezclas racémicas de derivados de isoflavonas e identificación de sus enantiómeros.
3. Determinación del efecto vasorrelajante de cada uno de los compuestos sintetizados en el modelo de músculo liso de anillo de aorta.
4. Determinación de su afinidad por los receptores estrogénicos  $\alpha$  y  $\beta$ .
5. Implicación de los receptores estrogénicos en la vasorrelajación.

Dado que el abordaje de los objetivos de esta tesis requiere de metodologías pertenecientes a áreas del conocimiento distintas (la síntesis y caracterización estructural corresponden a la Química Orgánica mientras que el estudio funcional está dentro de la Biología Celular), en adelante se han diferenciado los siguientes apartados:

- ✓ Síntesis de isoflavonoides, que se corresponde con los objetivos 1 y 2.
- ✓ Músculo liso vascular, que se corresponde con el objetivo 3.
- ✓ Receptores estrogénicos, que se corresponde con el objetivo 4 y 5.





## **4. SÍNTESIS DE ISOFLAVONOIDES**



#### 4.1. ANTECEDENTES DE LA SÍNTESIS

Desde la elucidación de la estructura de la crisina (5,7-dihidroxi flavona) (Fig. 4.1) en 1893 por Kostanecki, se han aislado numerosas flavonas e isoflavonas de fuentes naturales<sup>61</sup>. La padmakasteína (4',5-dihidroxi-7-metoxiisoflavanona), la ferreirina (5,7,2'-trihidroxi-4'-metoxiisoflavanona) y la homoferreirina (5,7-dihidroxi-2',4'-dimetoxiisoflavanona) (Fig. 4.1) son los primeros ejemplos de isoflavonas descubiertas en el reino vegetal<sup>62</sup>.

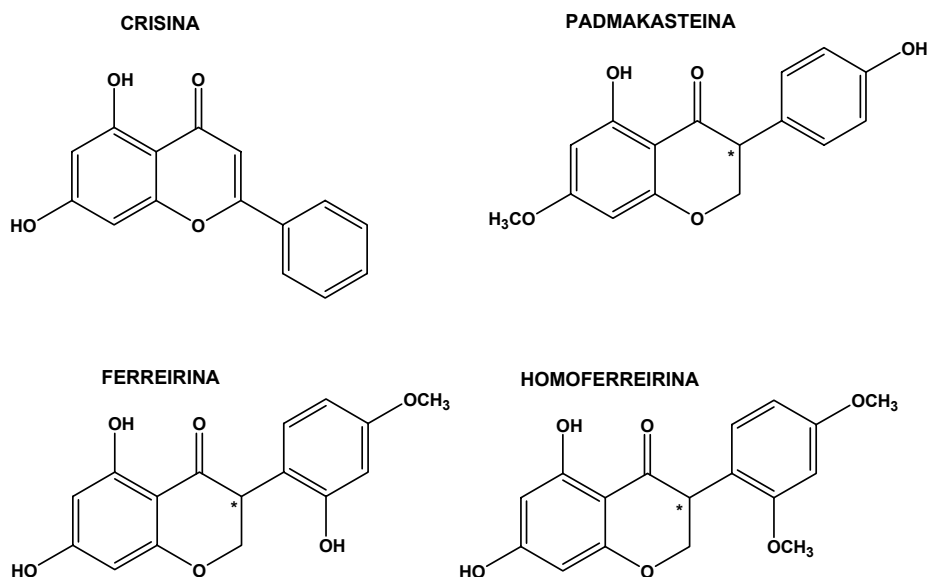


FIG. 4.1. Estructura de diferentes flavonas e isoflavonas

El equol (Fig. 4.2), obtenido inicialmente por Marrian y Haslewood en 1935, a partir de orina de yeguas preñadas<sup>63</sup>, fue descrito como un dihidroxifenol ópticamente activo de fórmula molecular  $C_{15}H_{14}O_3$ <sup>64</sup>. Estudios posteriores sobre el comportamiento químico de dicha sustancia condujeron a la asignación inequívoca de su estructura molecular: 3-(4-hidroxifenil)-7-hidroxicromano o 3,4-dihidro-3-(4-hidroxifenil)-2H-1-benzopirano-7-ol<sup>65</sup>.

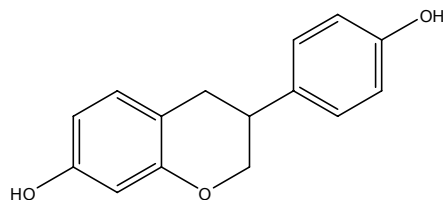


FIG. 4.2. Molécula de equol

<sup>61</sup> Warburton WK. *Quart. Revs.* **1954**;18(1):77-87.

<sup>62</sup> King F, Neill K. *J. Chem. Soc.* **1952**;Dec:4752-4756.

<sup>63</sup> Marrian GF, Haslewood GA. *Biochem J.* **1932**;26(4):1227-1232.

<sup>64</sup> Marrian GF, Beall D. *Biochem J.* Jul **1935**;29(7):1586-1589.

<sup>65</sup> Anderson E, Marrian G. *J. Biol. Chem.* **1938**;9:649-656.

En los años siguientes muchos otros compuestos fueron aislados de orina humana e identificados como fitoestrógenos con estructura de isoflavonoides. Desde entonces se han investigado los posibles efectos biológicos de este tipo de sustancias. Por ello ha sido preciso desarrollar métodos analíticos, cualitativos y cuantitativos, para su estudio en fluidos y tejidos biológicos. Junto con esto, fue necesario disponer de isoflavonoides sintéticos; en primer lugar como modelos para confirmar las estructuras de los nuevos productos aislados de la naturaleza y en segundo lugar, para probar su potencial actividad fisiológica y poder establecer relaciones estructura actividad con vistas a aplicaciones farmacológicas.

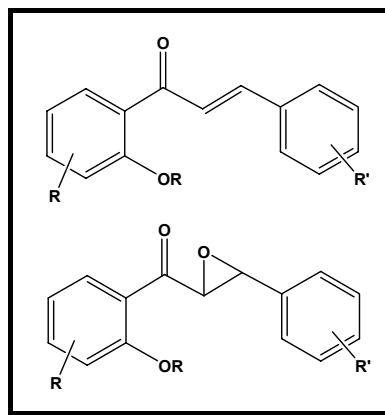
#### **4.1.1. Síntesis de isoflavonas**

Los métodos sintéticos tradicionalmente empleados se centran en la obtención de diversas isoflavonas (3-fenil-4H-1-benzopiran-4-onas) que permiten el acceso a diferentes isoflavonoides mediante posteriores reacciones de funcionalización. En muchos casos las desoxibenzoínas o las chalconas pueden servir de productos de partida para las correspondientes isoflavonas naturales que habitualmente presentan sustituciones polihidroxi y/o metoxi en los anillos aromáticos.

En general la síntesis de isoflavonas implica varios pasos, incluyendo secuencias de protección y desprotección de los grupos hidroxilo libres y con rendimientos globales normalmente bajos.

A continuación, se recogen las distintas síntesis descritas hasta la fecha para isoflavonas, agrupando las referencias según el producto de partida utilizado.

a) *Síntesis de isoflavonas a partir de chalconas y epóxidos de chalconas:*



Un posible método de síntesis de isoflavonas parte de chalconas (bencilidenacetofenonas), que se obtienen por la condensación de la acetofenona y el aldehído aromático correspondiente<sup>66</sup>.

Una de las ventajas que presenta partir de estos productos es que todos los átomos de carbono del esqueleto de la isoflavona están presentes desde el principio.

Los primeros experimentos para transformar este tipo de compuestos en isoflavonas fueron llevados a cabo en los años 60 en el laboratorio de Seshadri.

La transposición de epóxidos de chalcona, es catalizada por trifluoruro de boro eterato, obteniéndose un compuesto que es sometido a hidrogenación catalítica y posterior tratamiento ácido, obteniéndose la correspondiente isoflavona (Fig. 4.3).

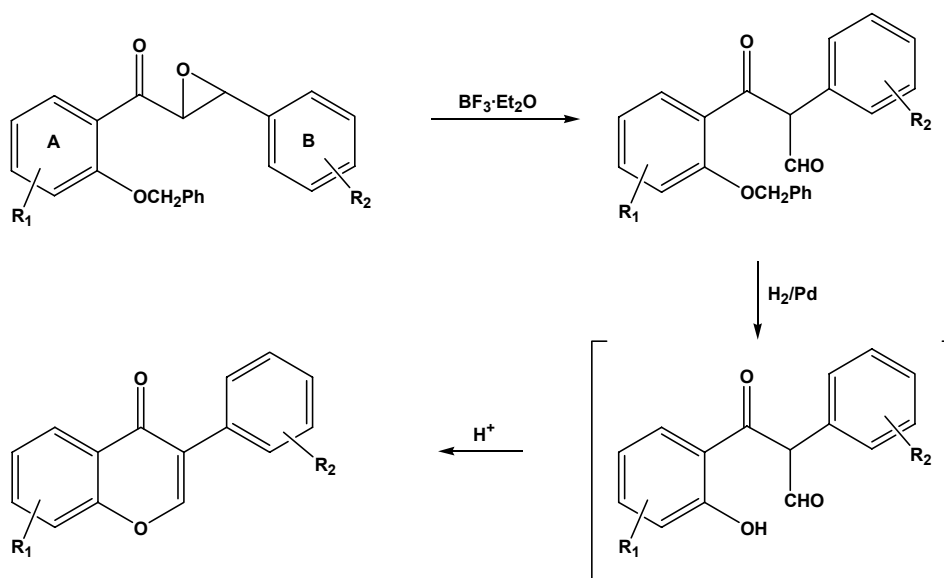


FIG. 4.3. Utilización de epóxidos de chalcona

<sup>66</sup> Lévai A. *J. Heterocyclic Chem.* **2004**;41:449-459.

Otra posibilidad de convertir las chalconas en isoflavonas es mediante el empleo de sales de talio. El primer ejemplo fue publicado en 1968 por Ollis y col. (Fig. 4.4) que emplea el acetato de talio para la oxidación<sup>66</sup>.

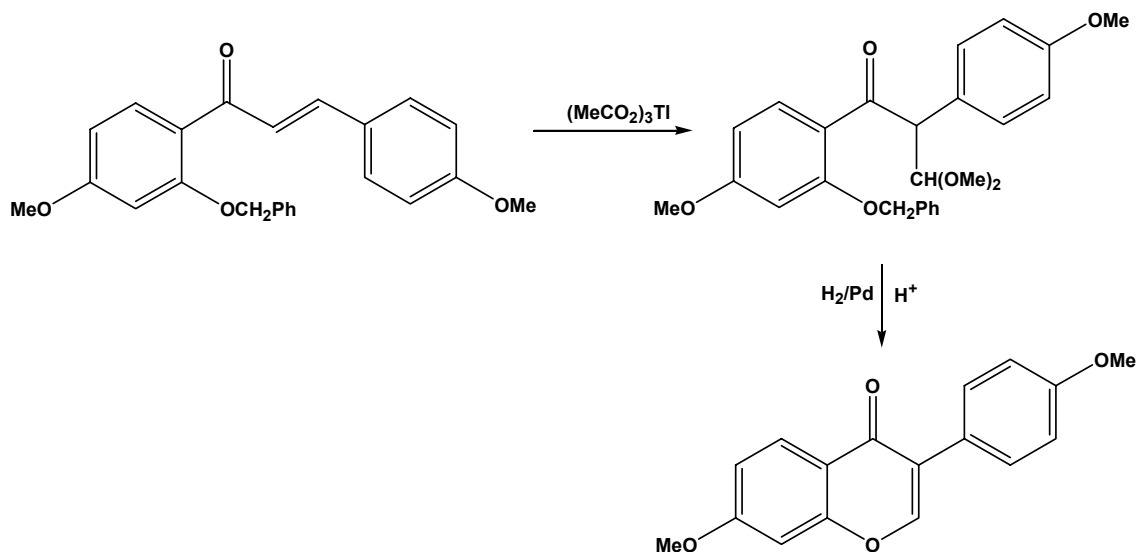


FIG. 4.4. Oxidación mediante acetato de talio

En 1970, McKillop y col. describieron la utilización de nitrato de talio como reactivo para la oxidación de chalconas. Este oxidante fue utilizado con éxito para una conversión similar a la que alcanzaron Ollis y col. con el acetato de talio (III) en 1968.(Fig. 4.5)

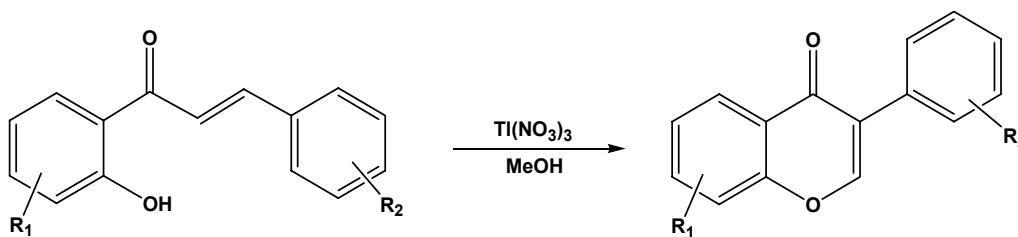
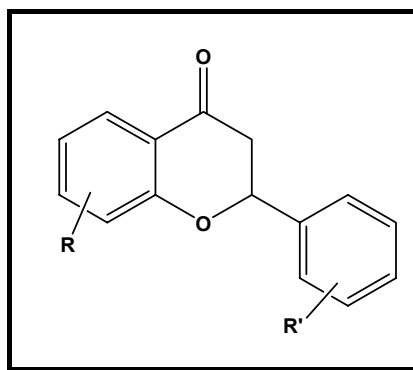


FIG. 4.5. Oxidación mediante nitrato de talio (III)

b) Síntesis de isoflavonas a partir de flavonas :



Los primeros ejemplos que nos encontramos en la literatura de conversión de flavonas en isoflavonas datan de 1965. Este método al igual que el anterior presenta la ventaja que todos los átomos de carbono están presentes en la molécula de partida<sup>66</sup>.

En 1990, Kinoshita y col. partiendo de flavanonas y a partir de una transposición oxidativa mediada por nitrato de talio (III) (TTN) en metanol / cloroformo conteniendo 70% de ácido perclórico, consiguieron la migración del grupo arilo para dar las correspondientes isoflavonas (Fig. 4.6)

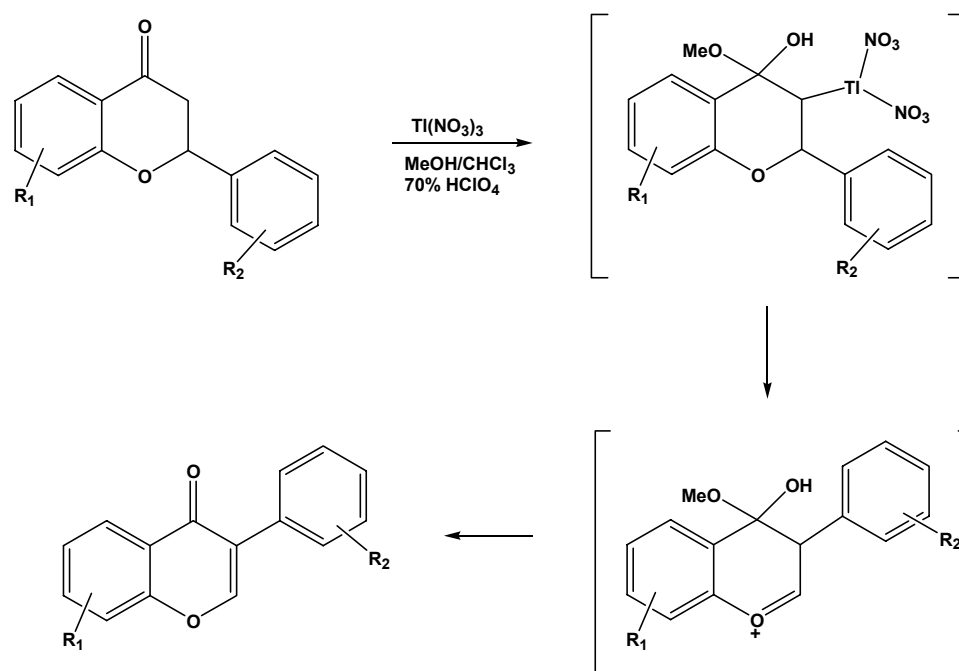


FIG. 4.6. Transposición de flavonas utilizando reactivos de talio

La misma reacción de oxidación puede conseguirse sustituyendo el uso de reactivos tóxicos de talio por otros como [hidroxi(tolisoxi) ]yodobenceno (PhI(OH)OTs) en acetonitrilo<sup>67</sup> o iodobenceno (IB) en presencia de ácido metanosulfónico (MsOH) o

<sup>67</sup> Prakash O, Pahuja S, Goyal S. *Synlett*. 1990;6:337-338.

p-toluensulfónico (TsOH) en diclorometano<sup>68</sup> obteniéndose selectivamente la isoflavona frente a la flavona homóloga (Fig. 4.7).

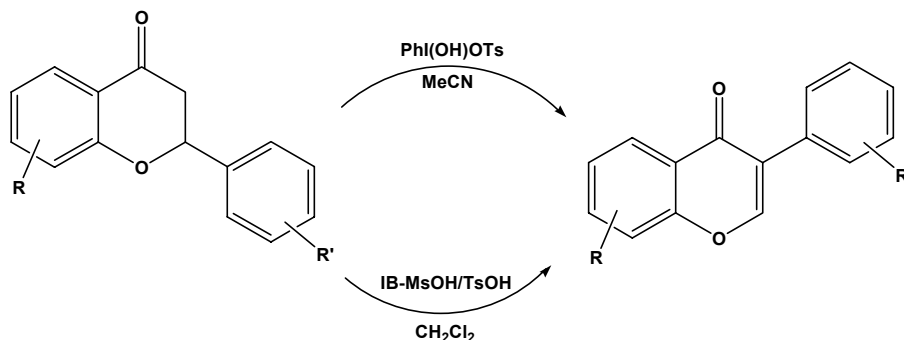
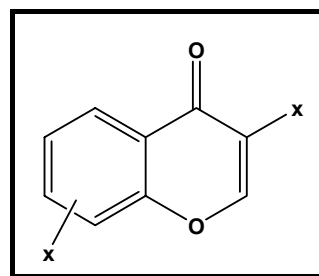


FIG. 4.7. Transposición de flavonas utilizando iodobenceno

c) Síntesis de isoflavonas a partir de  
3 halocromonas:



La arilación directa de 3-bromo o 3-iodocromonas, en una reacción de acoplamiento con ácidos arilborónicos o sus ésteres catalizada por tetrakis(trifenilfosfina)paladio, da lugar también a isoflavonas<sup>69</sup> (Fig. 4.8).

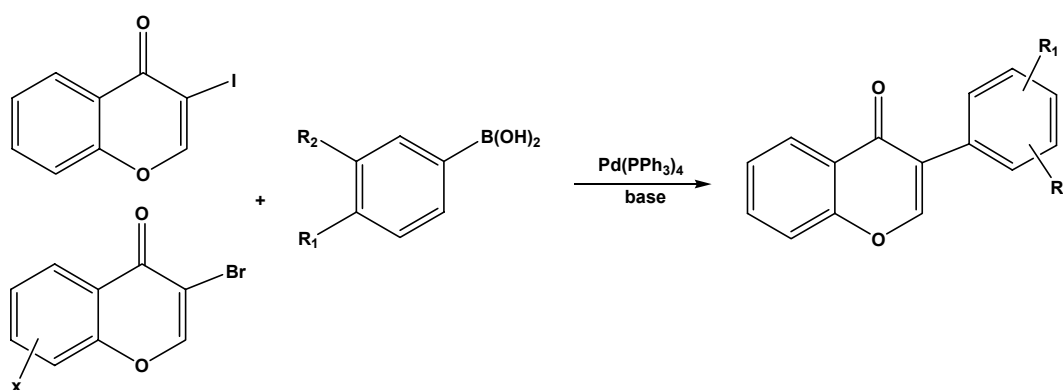


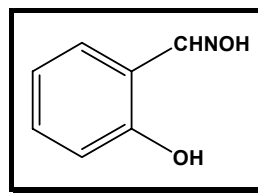
FIG. 4.8. Arilación de halocromonas

<sup>68</sup> Prakash O, Tanwar MP. *J. Chem. Research.* **1995**;6:213.

<sup>69</sup> Yokoe I, Sugita Y, Shirataki Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**;37(2):529-530.



d) Síntesis de isoflavonas a partir de salicilaldoximas:



Otra ruta de síntesis descrita en la literatura utiliza salicilaldoximas como productos de partida<sup>70</sup>. Éstas son oxidadas a óxidos de nitrilo que reaccionan con estirenos  $\omega$ -metoxi-sustituidos o  $\omega$ -dialquilaminosustituidos (enaminas) para dar regioselectivamente isoxazoles 4-fenil-sustituidos. Los isoxazoles son reducidos sobre Ni-Raney para dar  $\beta$ -hidroxicetonas o 1,3-dicetonas, que en medio ácido conllevan una ciclación conduciendo a la obtención de isoflavonas (Fig. 4.9)

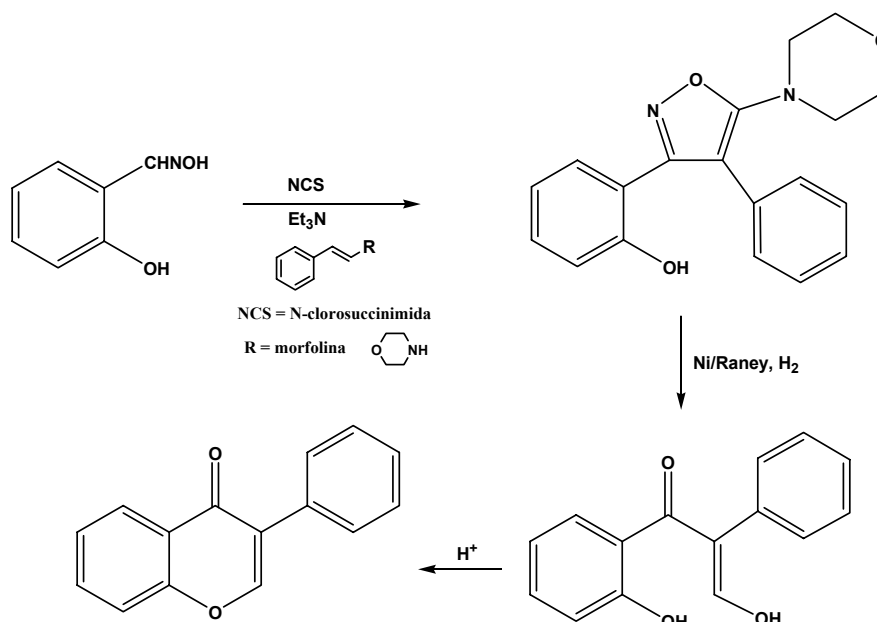
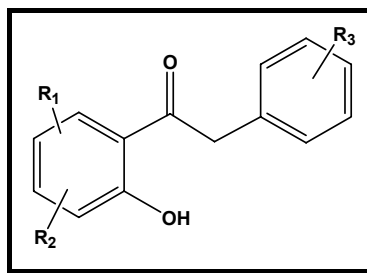


FIG. 4.9. Utilización de salicilaldoximas

<sup>70</sup> Thomsen I, Torssell KBG. *Acta Chem. Scand.* **1988**;42(5):303-308.

e) *Síntesis de isoflavonas a partir de bencilhidroxifenilcetonas:*



El primer método sintético descrito de este tipo fue llevado a cabo por Wessely y col. en 1933. La síntesis consiste en la formilación del grupo metileno de la bencilhidroxifenilcetona de partida empleando formiato de etilo y sodio, seguido de una reacción de cierre de anillo para obtener la 2-hidroxiisoflavanona, obteniéndose la isoflavona buscada por deshidratación del compuesto anterior (Fig. 4.10). La reacción transcurre con mejores rendimientos cuando los grupos hidroxilo del anillo aromático (salvo el implicado en la ciclación) están protegidos.

Un año más tarde, en 1934, Venkataraman y col emplearon este mismo método para sintetizar numerosas isoflavonas sustituidas.

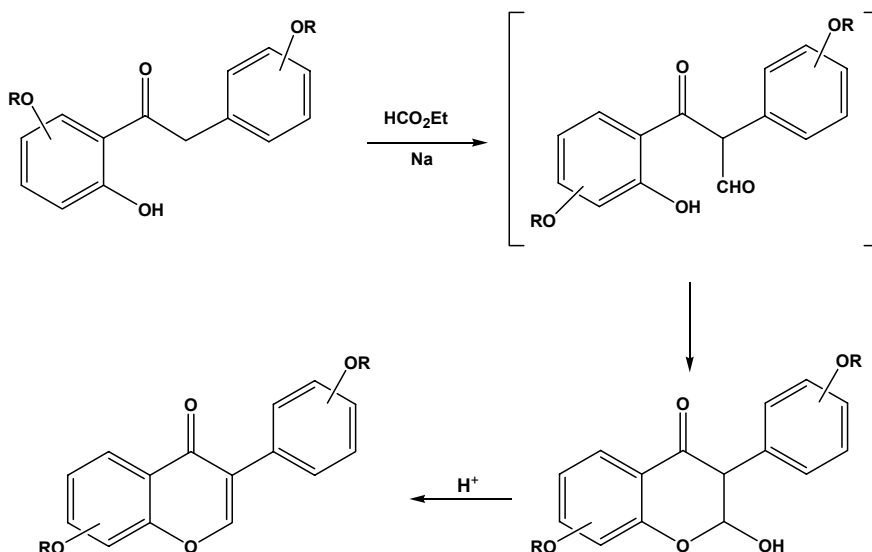


FIG. 4.10. Síntesis de isoflavonas por formilación de bencilhidroxifenilcetonas<sup>66</sup>

En 1952 Baker y col. mejoraron el método sintetizando una serie de hidroxiisoflavonas sin necesidad de proteger los grupos hidroxilo, haciendo reaccionar bencil o-hidroxifenilcetonas con grupos hidroxilo con n+1 equivalentes de cloruro de etiloxalilo en piridina y por posterior hidrólisis alcalina suave del éster y descarboxilación. En la figura 4.11 se muestra como ejemplo la síntesis de la genisteína por este método.

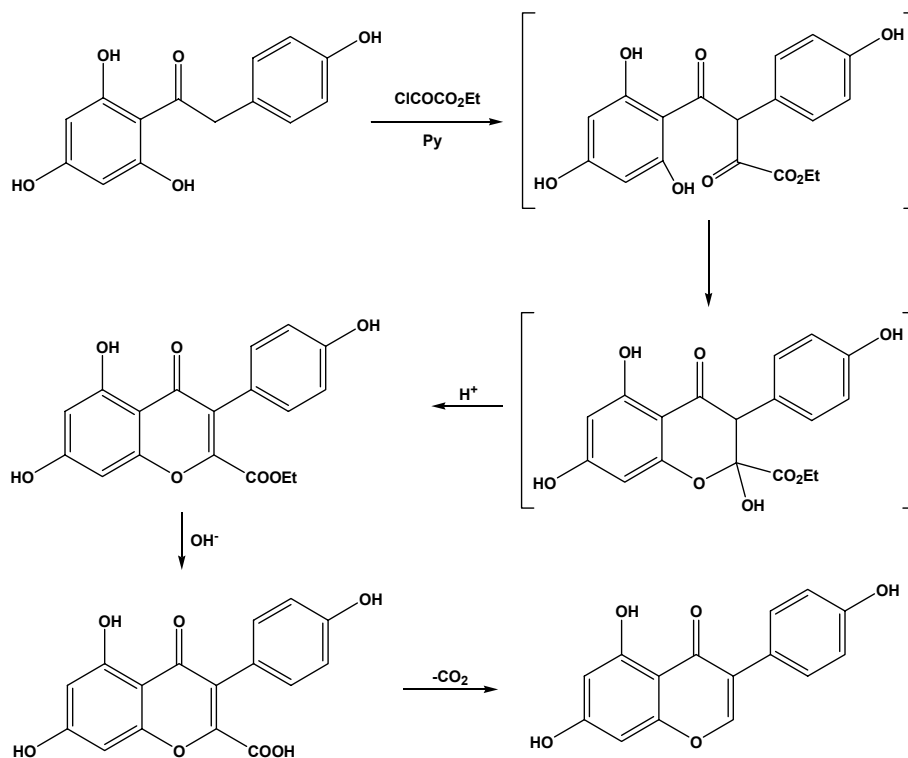


FIG. 4.11. Síntesis de la genisteína<sup>66</sup>

Otro método empleado para la síntesis de isoflavonas sustituidas fue propuesto por Sathe y Venkataraman en 1950. Se basa en la formilación del grupo metileno de las 2-hidroxidesoxibenzoínas mediante el empleo de ortoformiato de etilo, piridina y piperidina (Fig. 4.12).

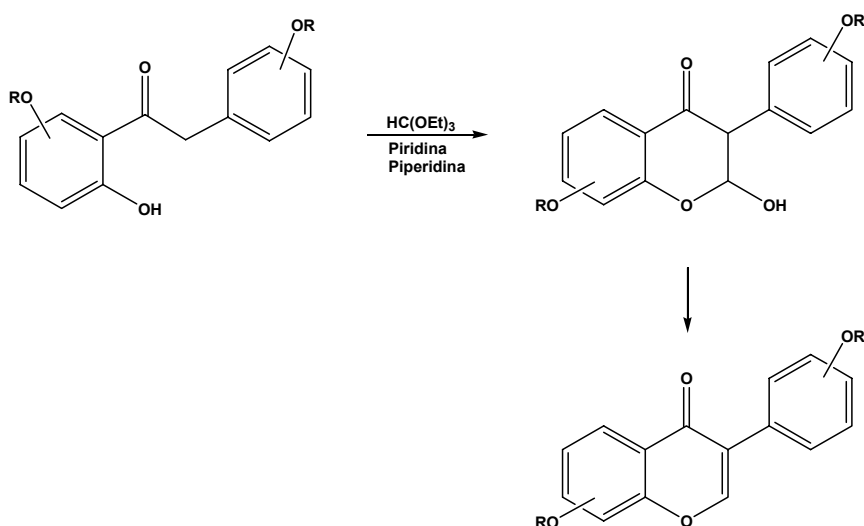


FIG. 4.12. Empleo de ortoformiato de etilo, piridina y piperidina<sup>66</sup>

En 1957 Farkas propuso el empleo de cianuro de zinc para llevar a cabo la formilación y así obtener las isoflavonas sustituidas (Fig. 4.13).

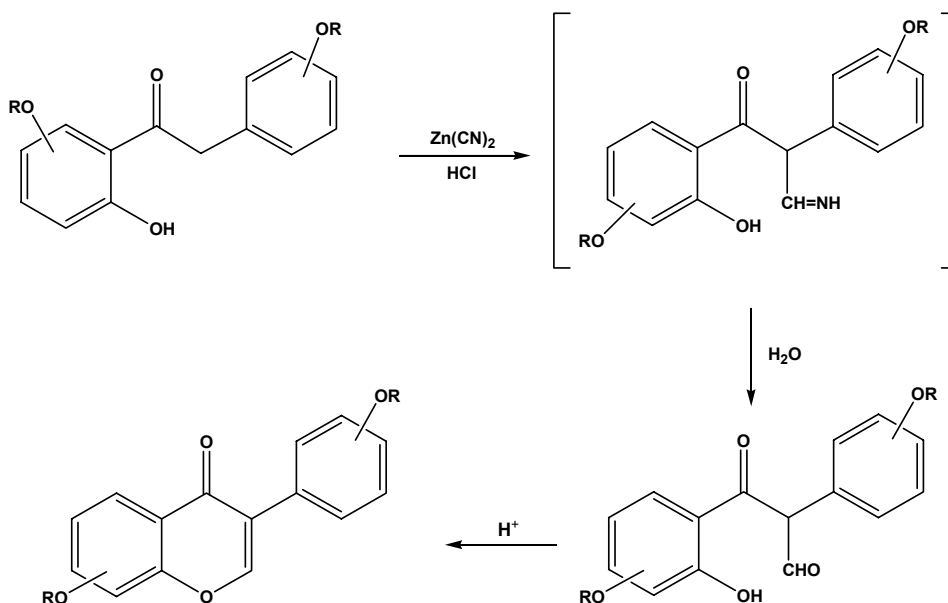


FIG. 4.13. Empleo de cianuro de zinc<sup>66</sup>

Bass utilizó en 1976 N,N-dimetilformamida como fuente de carbono para la formación del ciclo. Adición y ciclación transcurren en un solo paso y con buenos rendimientos (Fig. 4.14).

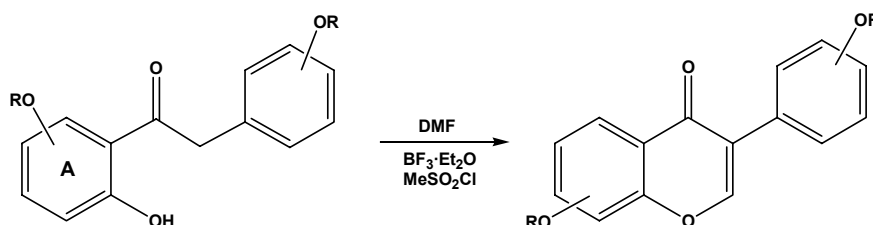


FIG. 4.14. Empleo de N,N-dimetilformamida<sup>66</sup>

Este método es el que se ha seguido a lo largo de este trabajo para cerrar el anillo en todos los compuestos sintetizados.

El mayor volumen de trabajos publicados sobre síntesis de isoflavonoides se debe a Adlercreutz y colaboradores. En los primeros trabajos de este grupo de investigación se describe la síntesis de varias isoflavonas naturales con actividad estrogénica a partir de metoxi-desoxibenzoínas preparadas por condensación de Hoesch<sup>11</sup>.

En la ciclación para obtener el anillo de pirano siguiendo el método de Bass<sup>71</sup> se utiliza dimetilformamida (DMF) como fuente de carbono y trifluoruro de boro eterato en cloruro de mesilo como catalizador. Esta reacción permite el acceso a numerosas polihidroxi y/o metoxi isoflavonas sin necesidad de proteger los grupos hidroxilo.

Asimismo los ensayos de O-desmetilación en el otro anillo con los reactivos comúnmente utilizados HI y HBr dan rendimientos bajos en las polihidroxiisoflavonas deseadas. Sin embargo, cuando se intentó dicha desprotección con tribromuro de boro en diclorometano, reactivo más selectivo, se formaron los productos buscados con altos rendimientos y pureza (Fig. 4.15).

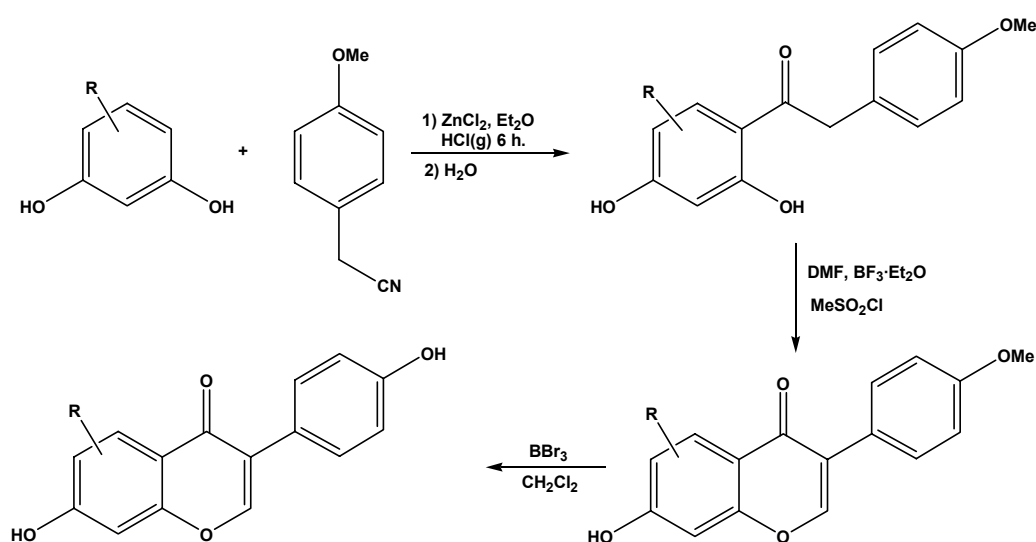


FIG. 4.15. Síntesis de isoflavonas por condensación de Hoesch

Años más tarde, y basándose en un método previamente descrito por Luk estos mismos investigadores publicaron la síntesis en un solo paso de 19 polihidroxiisoflavonas partiendo de los polihidroxiifenoles adecuados, sin proteger los grupos OH y ácidos fenilacéticos. Las desoxibenzoínas intermedias, formadas por acilación de Friedel-Crafts catalizada por trifluoruro de boro, sufren ciclación directa por reacción con dimetilformamida (DMF). Se alcanzan rendimientos que varían entre el 50 y el 98%<sup>72</sup> (Fig. 4.16).

<sup>71</sup> Bass R.J. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1976**;2:78-79.

<sup>72</sup> Wähälä K, Hase T.A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1991**;1(12):3005-3008.

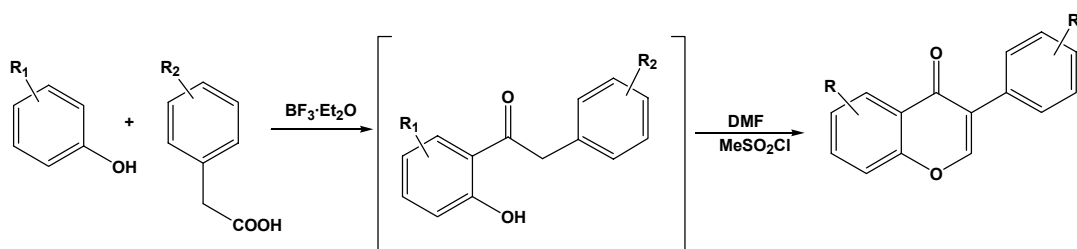


FIG. 4.16. Síntesis de isoflavonas en un solo paso

Además de la síntesis de isoflavonas, se han descrito métodos para su transformación en derivados como equol e intermedios hidrogenados debido al creciente interés de estos productos, tras su detección en la orina, como posibles metabolitos de las isoflavonas.

#### 4.1.2. Reducción de isoflavonas

##### a) Reducción total

##### 1. Pd/C en CH<sub>3</sub>COOH

La reducción de isoflavonas para sintetizar los isoflavonoides naturales aislados de orina, confirmar su estructura y ensayar su actividad biológica fue completada por primera vez por Wessely y Prillinger<sup>73</sup> con resultados satisfactorios. Así, la hidrogenación catalítica de daidzeína usando como catalizador Pd/C suspendido en ácido acético y agitado previamente en atmósfera de H<sub>2</sub> proporcionó equol de forma racémica. De la misma forma se obtuvo el 7-hidroxi-4-metoxiisoflavano a partir de formononetina (Fig. 4.17).

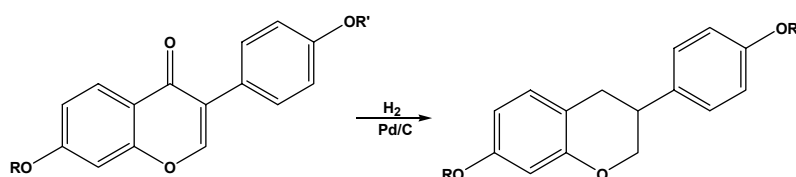


FIG. 4.17. Reducción de isoflavonas

El tratamiento previo del catalizador según el método descrito por estos autores fue considerado necesario para conseguir rendimientos aceptables a presión atmosférica. Un gran inconveniente que presenta este método es la gran cantidad de catalizador que se requiere para llevar a cabo la reacción de hidrogenación. Se intentó el empleo de menor cantidad del mismo o recuperarlo y someterlo a un tratamiento

<sup>73</sup> Wessely F, Prillinger F. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1939**;72:629-633.

posterior con oxígeno, Los intentos de mejorar la reacción aumentando la temperatura y la presión de hidrógeno, condujeron no sólo al producto deseado sino también a una serie de productos más hidrogenados<sup>74</sup>.(Fig. 4.18).

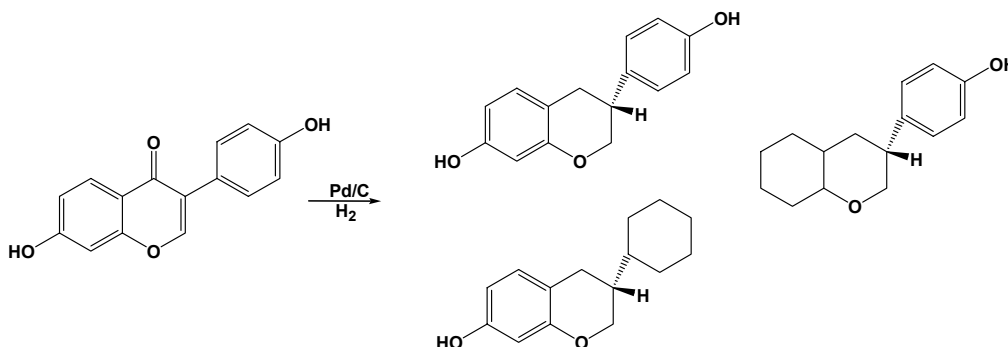


FIG. 4.18. Productos obtenidos de la hidrogenación aumentando la temperatura y la presión de H<sub>2</sub>

### 2.- NH<sub>4</sub>COH en CH<sub>3</sub>COOH sobre Pd/C

La transferencia de hidrógeno es una alternativa muy atractiva para realizar hidrogenaciones y el reactivo más común para llevar a cabo estas reducciones es el formiato de amonio (HCOONH<sub>4</sub>). Ram y Spicer en el año 1988 observaron que tanto aldehídos como cetonas se reducían a grupos metileno empleando este reactivo y utilizando ácido acético como disolvente<sup>75</sup>.

En el año 2004 el grupo de Muthyala y col emplearon formononetina como producto de partida y observaron que con formiato de amonio en ácido acético como disolvente y 10% Pd/C como catalizador se obtenía un 11% de equol metiléter. El resto de productos que se obtenía eran los resultantes de reducciones parciales de alguno de los dobles enlaces o del grupo cetónico. En investigaciones posteriores con otros disolventes como tetrahidrofurano o etanol, se observó solamente una reducción parcial del doble enlace de los isoflavonoides, como ya estaba descrito en la literatura<sup>75</sup>.

Los mismos autores probaron otro método para llevar a cabo reducciones totales. Se intentó un cambio de catalizador, eligiendo para ello Ni Raney aunque sólo se obtuvieron mezclas de productos parcialmente hidrogenados.

<sup>74</sup> Lamberton JA, Suares H, Watson K. *Aust. J. Chem.* **1978**;31(2):455-457.

<sup>75</sup> Muthyala R, Ju Y, Sheng S, et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**;12:1559-1567.

### 3.- $\text{NH}_4\text{COH}$ en $\text{CH}_3\text{COOH}$ sobre 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$

Cuando Muthyala y col. ensayaron el catalizador de Pearlman (20%  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ ), se consiguió una elevada efectividad en la reducción. Con este catalizador se consiguió reducir la formononetina a equol metiléter con un 68% de rendimiento (Fig. 4.19), mejorando notablemente los resultados

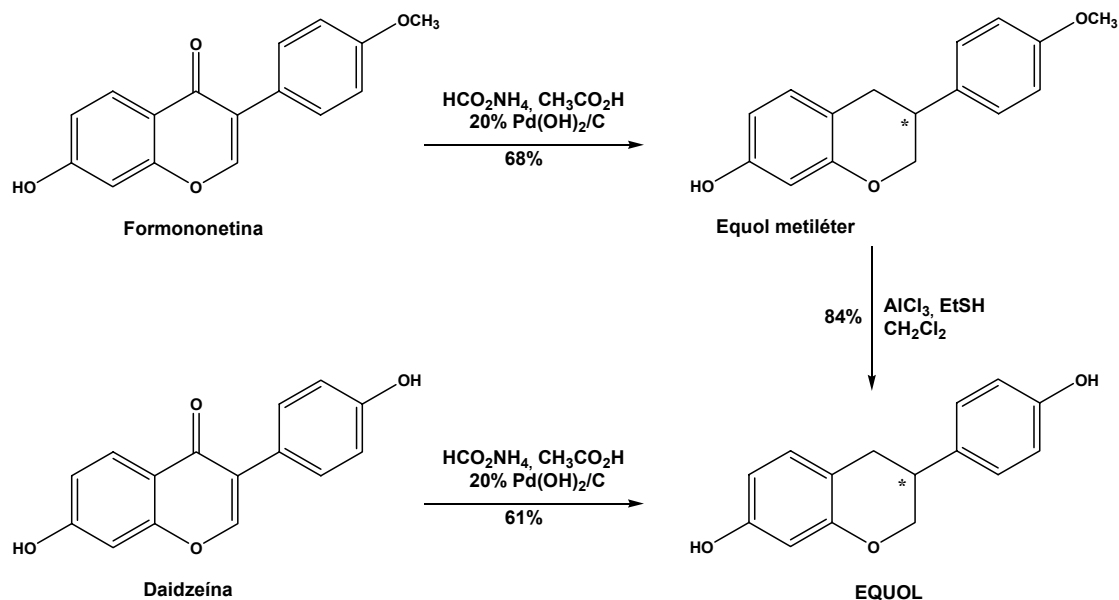


FIG. 4.19. Reducción de formononetina y daidzeína a equol<sup>75</sup>

La desprotección del grupo metoxi ( $\text{OCH}_3$ ) del equol metiléter se lleva a cabo mediante tricloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) en presencia de etanotiol (EtSH), obteniéndose equol con un 84% de rendimiento. El rendimiento global de estos dos pasos de reacción fue del 57%. Partiendo directamente de la daidzeína y siguiendo este mismo método de reducción se obtuvo equol con un 61% de rendimiento (Fig. 4.18).

### 4.- Mt1B8, bacteria anaerobia del intestino de ratón

Como se ha visto anteriormente, la conversión de daidzeína en equol es conocida desde hace varios años, sin embargo hasta el momento no se disponía de ninguna información acerca de la correspondiente formación de 5-hidroxi-equol a partir de genisteína.



Con posterioridad a la conclusión del trabajo experimental de esta tesis ha aparecido un trabajo publicado<sup>76</sup> donde consiguen aislar una bacteria anaerobia (Mt1B8) del intestino de ratón, que convierte daidzeína a través de dihidrodaidzeína a equol, así como genisteína a través de dihidrogenisteína a 5-hidroxi-equol (Fig. 4.20), observándose que la conversión de genisteína a 5-hidroxi-equol es más rápida que en el caso de la daidzeína.

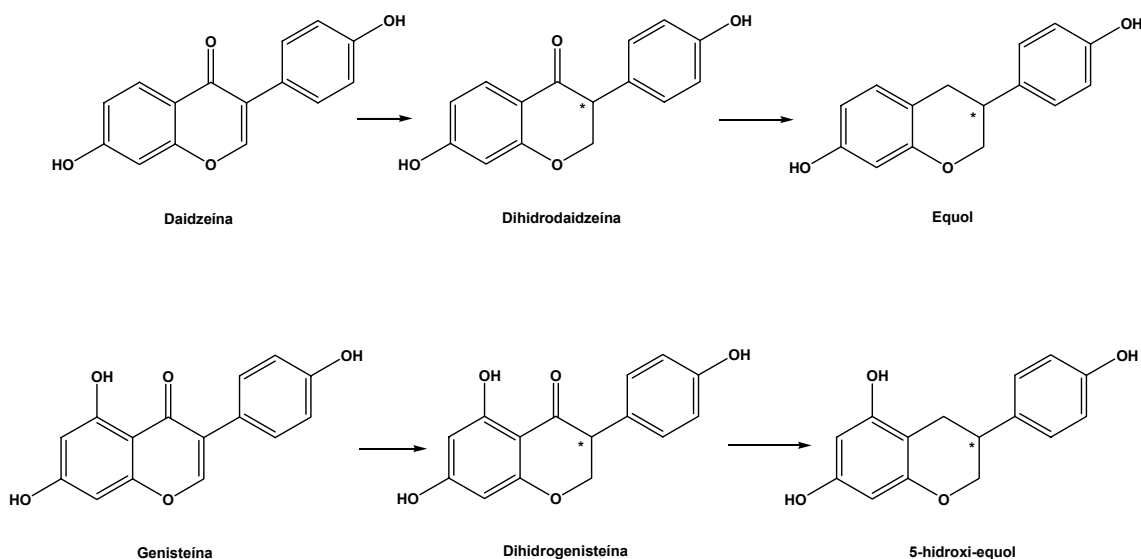


FIG. 4.20. Reducción total de las isoflavonas

### b) Reducción parcial

Tener acceso a isoflavonas parcialmente reducidas puede resultar de gran interés cuando se desea llevar a cabo un estudio sistemático de actividad biológica de esta familia de compuestos.

Las reducciones parciales de isoflavonas son menos corrientes en la literatura. Isoflavonas no sustituidas o metoxisustituidas han sido reducidas por hidrogenación catalítica o con reactivos como borohidruro sódico para dar isoflavanonas, isoflavan-3-enos u ocasionalmente cis y trans isoflavan-4-oles, pero los resultados publicados por varios grupos de investigación no permiten elegir uno de los métodos como óptimo para la síntesis de estos compuestos<sup>77</sup>(Fig. 4.21).

<sup>76</sup> Matthies A, Clavel T, Haller D. *Appl Environ Microbiol.* **2008**;74(15):4847-4852.

<sup>77</sup> Visser FR, Lane GA. *Aut. J. Chem.* **1987**;40:1705-1711.

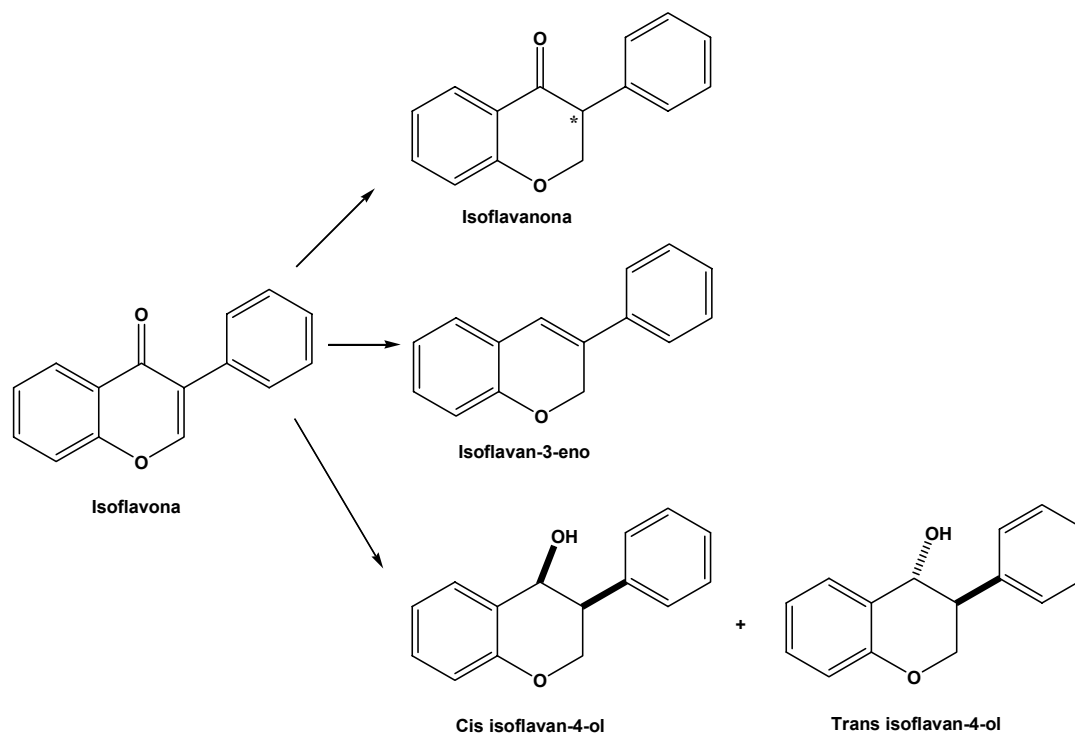


FIG. 4.21. Reducción parcial de isoflavonas

En 1989, Wähälä describió la síntesis de la dihidrodaidzeína (4',7-dihidroxiisoflavanona) a partir de daidzeína (4',7-dihidroxiisoflavona) mediante reducción por transferencia de hidrógeno usando formiato de amonio con Pd/C como catalizador. La ventaja que proporcionaba este método es que la protección de los grupos OH era innecesaria<sup>78</sup> (Fig. 4.22).

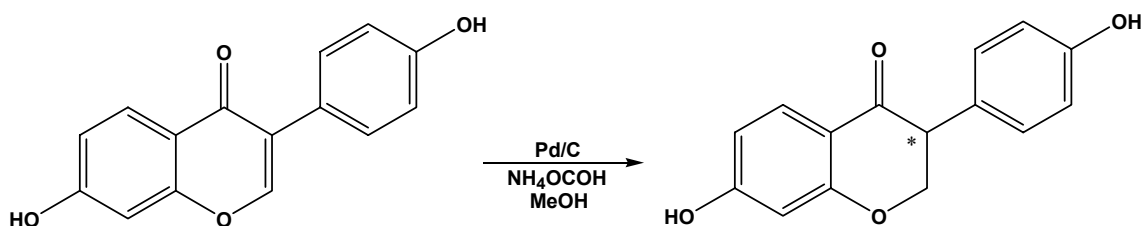


FIG. 4.22. Reducción de isoflavonas por transferencia de hidrógeno

Estos autores también publicaron la síntesis de los correspondientes isoflavan-4-oles. Partiendo de dihidrodaidzeína, por reducción con exceso de borohidruro de litio en tetrahidrofurano, se obtiene una mezcla de los dos estereoisómeros de tetrahidrodaidzeína: cis y trans 4',7-dihidroxiisoflavan-4-oles en proporción 70:30<sup>79</sup> (Fig. 4.23).

<sup>78</sup> Wähälä K, T. A. Hase TA. *Heterocycles*. **1989**;28(1):183-186.

<sup>79</sup> Wähälä K, Koskimies JK, Mesilaakso M, et al. *J. Org. Chem.* **1997**;62(22):7690-7693

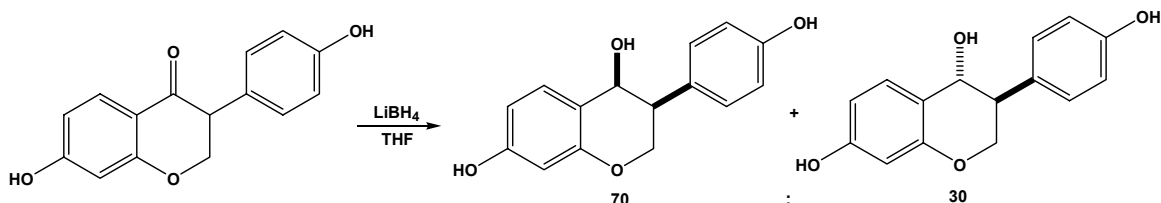


FIG. 4.23. Síntesis de isoflavanoles

Los intentos de obtener estos mismos compuestos a partir de daidzeína por reducción directa con borohidruro sódico en un solo paso no dieron resultado.

#### 4.1.3. Síntesis enantioselectiva de isoflavonoides

Aunque dentro de la familia de los isoflavonoides existe gran diversidad estructural, la quiralidad de los compuestos no planares como isoflavanonas, isoflavan-4-oles e isoflavanos puede deberse únicamente a la asimetría en tres átomos de carbono. Sin embargo hasta 1995 no se publicó ningún trabajo cuyo objetivo fuera la síntesis enantioselectiva de este tipo de sustancias<sup>80</sup>.

Versteeg y colaboradores desarrollaron el primer método enantioselectivo de síntesis de isoflavanos (Fig. 4.24). La estrategia seguida fue la siguiente: alfa-bencilación estereoselectiva de derivados de ácido fenilacético, posterior eliminación reductiva del auxiliar quiral y ciclación, conduciendo a la formación del esqueleto isoflavonoide.

Como auxiliares quirales se probaron en primer lugar ( $\pm$ )-4-bencil-2-oxazolidinonas previamente utilizadas con buenos resultados por otros autores, pero el rendimiento obtenido en este caso fue bajo, y cuando se intentó mejorarlo se redujo la selectividad<sup>81</sup>.

<sup>80</sup> Versteeg M, Bezuidenhout B, Ferreira D. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**;13:1317-1318.

<sup>81</sup> Evans DA, Britton TC, Ellman JA. *Tetrahedron Letters.* **1987**;28(49):6141-6144.

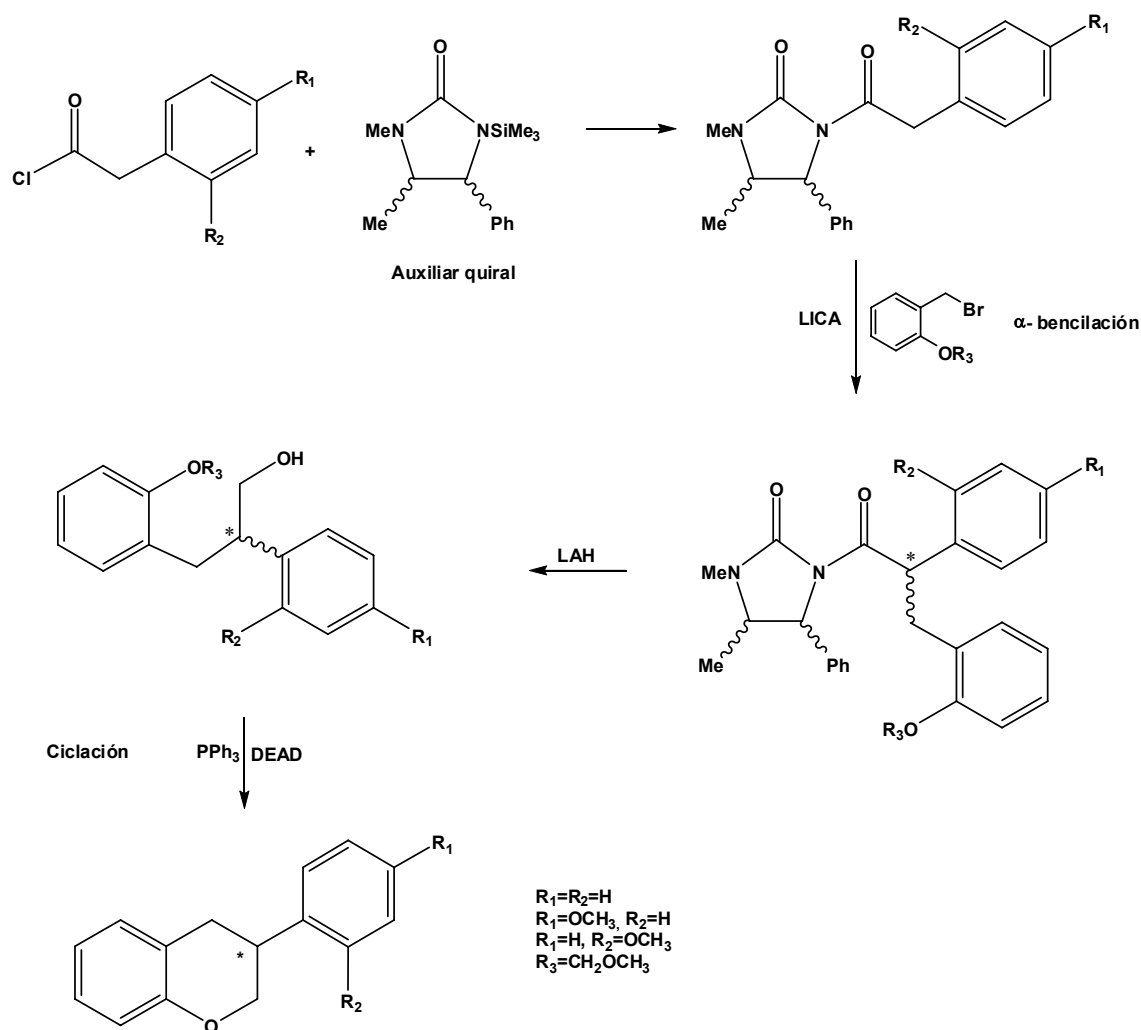


FIG. 4.24. Síntesis enantioselectiva de isoflavonoides

Al cambiar el auxiliar quiral por (4*S*,5*R*)-(+)-y (4*R*,5*S*)-(-)-*N*-metil-*N*'-trimetilsililimidazolidin-2-onas, las *N*-acilimidazolidinonas resultantes de la condensación con los cloruros de ácido fenilacético correspondientes, pudieron ser alquiladas por tratamiento con isopropilciclohexilamida de litio (LICA), con bromuro de 2-*O*-metoximetilbencilo, obteniendo excelentes rendimientos y selectividad. La posterior reducción con hidruro de litio y aluminio (LAH) permitió la obtención de 2,3-diarilpropan-1-oles. Como paso final de síntesis, el mejor método de ciclación de los ensayados fue el de Mitsunobu que emplea trifenilfosfina ( $\text{PPh}_3$ ) y azodicarboxilato de dietilo (DEAD) en tetrahidrofurano<sup>82</sup> (Fig. 4.24).

La estereoquímica del paso de alquilación se explica por la preferencia de formación del enolato  $Z^{80}$ . Así, el ataque del electrófilo se produce por la cara opuesta al radical fenilo del auxiliar quiral.

<sup>82</sup> Shih TL, Wyvratt MJ, Mrozik H. *J. Org. Chem.* **1987**;52(10):2029-2033.

De esta forma la alquilación de (4*S*,5*R*)-(+)-*N*-fenilacetilimidazolidinonas conduce mayoritariamente a la obtención de (-)-propanoles que son transformados en (3*R*)-isoflavanos, obteniéndose los isómeros 3*S* a partir del otro enantiómero del auxiliar quiral.

En el año 2005 Xiu-Ling Wang y colaboradores publicaron un trabajo en el que se mostraba como una bacteria intestinal humana anaeróbica gram negativa denominada Julong 723 era capaz de metabolizar la isoflavona dihidrodaidzeína a *S*-equol bajo condiciones anaeróbicas. Sin embargo, esta bacteria no es capaz de producir equol a partir de daidzeína, tetrahidrodaidzeína ni deshidroequol, que son los intermediarios más frecuentes en el metabolismo anaeróbico de la dihidrodaidzeína<sup>83</sup>.

Recientemente y con posterioridad a la conclusión de la parte experimental de este trabajo ha aparecido publicado un artículo donde se desarrolla una síntesis enantioselectiva para obtener *S*-(-) equol a través de una sustitución alílica<sup>84</sup> (Fig. 4.25).

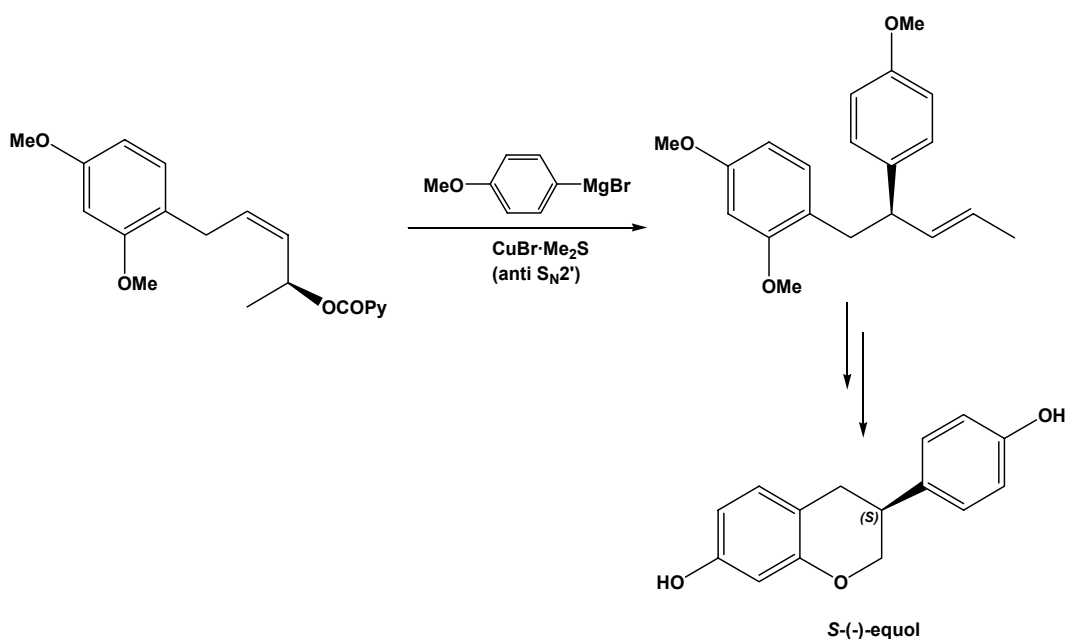


FIG. 4.25. Síntesis enantioselectiva a través de una sustitución alílica

A parte de estos intentos no se conocen más síntesis enantioselectivas para estos productos. La estrategia comúnmente utilizada ha sido la resolución de mezclas racémicas a la que dedicaremos el siguiente apartado.

<sup>83</sup> Xiu-Ling W, Hor-Gil H, Je Hyeon L, et al. *Appl. environ. microbiol.* **2005**;71(1):214-219.

<sup>84</sup> Takashima Y, Kobayashi Y. *Tetrahedron Lett.* **2008**;49(35):5150-5158.

## 4.2. RESOLUCIÓN DE COMPUESTOS QUIRALES

### 4.2.1. Métodos de resolución de compuestos quirales

La separación de compuestos quirales es un tema de gran interés en diversos campos, incluyendo la investigación biomédica. A menudo, los enantiómeros de un compuesto utilizado como fármaco muestran diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico<sup>85</sup>. La proporción de moléculas quirales sintéticas o naturales introducidas en el mercado como enantiómeros puros ha aumentado visiblemente en los últimos años. Entre estos fármacos cabe citar algunos de uso tan extendido como los antihipertensivos enalapril o metildopa, así como una gran variedad de antibióticos.

Dado que en muchos casos los compuestos se obtienen mediante procesos sintéticos no enantioselectivos, la resolución y cuantificación de mezclas racémicas por técnicas analíticas es necesaria.

La técnica más comúnmente utilizada en la separación de enantiómeros es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Ésta puede efectuarse mediante tres métodos<sup>86</sup>:

- a. Separación indirecta, usando auxiliares quirales para transformar el par de enantiómeros en diastereómeros que son separados posteriormente mediante cromatografía con fase acquiral.
- b. Separación directa usando una fase estacionaria quiral.
- c. Separación directa usando aditivos quirales en la fase móvil.

En la actualidad existen un gran número de fases estacionarias quirales comerciales tanto para fase normal como para fase reversa. En ellas, los selectores quirales pueden encontrarse depositados sobre soportes inorgánicos, fundamentalmente sílice derivatizada o unidos covalentemente a ella. Se pueden clasificar los selectores quirales en<sup>87</sup>:

---

<sup>85</sup> Williams K, Lee E. *Drugs*. Oct **1985**;30(4):333-354.

<sup>86</sup> Allemark S. 2ª ed. *Prentiu Hall*, N. Y. **1991**.

<sup>87</sup> Berthod A, Nair U, Bagwill C, et al. *Talanta*. **1996**;43 (10):1767-1782.

1. Selectores quirales sintéticos:
  - Polímeros quirales tales como poliacrilamidas.
  - Pequeñas moléculas como éteres corona o compuestos que permiten interacciones múltiples (fases tipo Pirkle).
2. Selectores quirales naturales:
  - Aminoácidos como prolina o hidroxiprolina.
  - Proteínas como la albúmina bovina (BSA) o la  $\alpha$ -glicoproteína (AGP).
  - Polipéptidos macrocíclicos como la vancomicina.
3. Selectores quirales semisintéticos, derivados de productos naturales modificados:
  - Polisacáridos derivatizados (celulosa, amilosa)
  - Ciclodextrinas

Uno de los problemas más importantes en muchas de las fases estacionarias quirales es su limitado campo de aplicación y que a menudo sólo separan determinadas familias de productos. De las anteriormente citadas, las fases basadas en polisacáridos resultan ser las más versátiles, separando una amplia variedad de productos.

Las fases estacionarias quirales de naturaleza glucídica más empleadas utilizan como selectores derivados de celulosa o amilosa (Fig. 4.26), generalmente ésteres (acetatos o benzoatos) y arilcarbamatos. Dichos derivados se obtienen por modificación de los grupos hidroxilo libres de las uniones de glucosa.

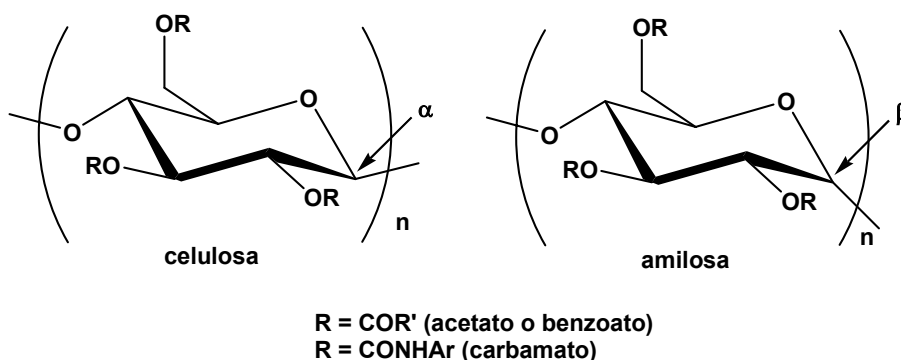


FIG. 4.26. Selectores quirales de naturaleza glucídica

En las fases quirales comerciales, estos selectores se depositan sobre soportes de sílice, lo que hace que las columnas sean incompatibles con la utilización de determinados disolventes orgánicos como derivados clorados, puesto que el

selector sería disuelto parcialmente por el eluyente, con la consiguiente pérdida del mismo.

Para evitar este inconveniente se han desarrollado nuevas fases estacionarias derivadas de polisacáridos en las que el selector está fijado covalentemente a la sílice, las cuales presentan la ventaja de ser resistentes a los distintos disolventes orgánicos usuales y pueden ser utilizados tanto en fase directa como reversa<sup>88</sup>. La estabilidad de estas fases frente a los disolventes orgánicos y su gran capacidad de resolución las hace especialmente útiles para la cromatografía semipreparativa.

Con las fases comerciales derivadas de polisacáridos se han conseguido buenas resoluciones de fármacos como pranoprofeno, verapamil, propanolol, metoprolol, pindolol, worferina, oxazepam o ditiagem<sup>89</sup>.

En la literatura nos encontramos con numerosos artículos que describen una buena separación de los enantiómeros tanto del equol, como de la dihidrodaidzeína como de la dihidrogenisteína, siempre utilizando fase reversa.

En el año 2004 Muthyala y col. lograron separar los dos enantiómeros del equol utilizando una columna semipreparativa<sup>75</sup> (Fig. 4.27).

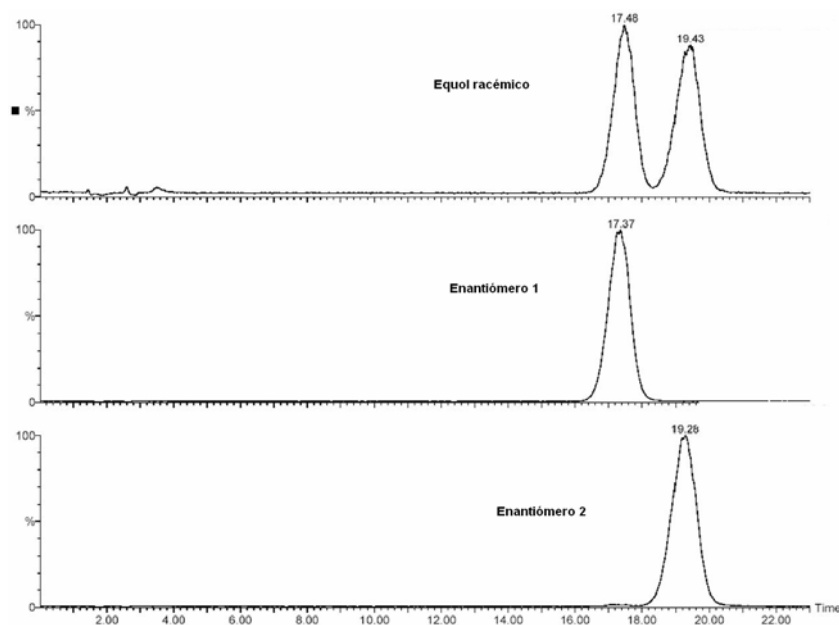


FIG. 4.27. Separación de equol racémico mediante cromatografía líquida en fase quiral

<sup>88</sup> Oliveros L, López P, Minguillón CF, P. *Journal of liquid chromatography*. **1995**;18 (8):1521-1532.

<sup>89</sup> Franco P, Senso A, Minguillon C, et al. *Journal of chromatography*. **1998**;796(2):265-272.



Un año más tarde Wang y col. publicaron la separación de los enantiómeros de la dihidrogenisteína y la dihidroaidzeína<sup>90</sup> (Fig. 4.28).

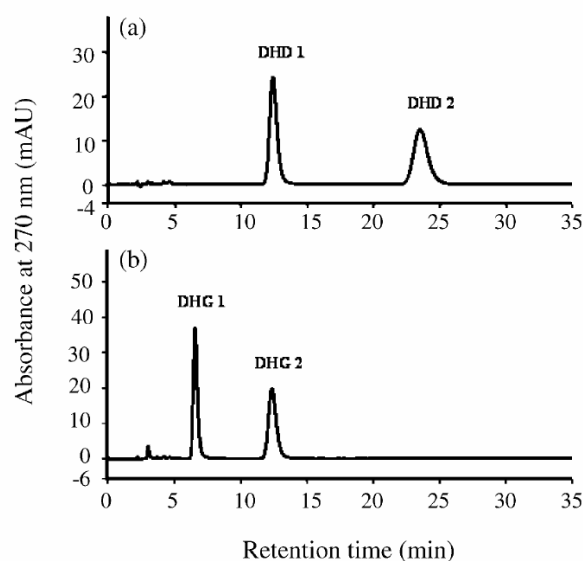


FIG. 4.28. Separación de DHD y DHG racémicas mediante HPLC

#### 4.2.2. Determinación de la configuración absoluta

Una vez separados los enantiómeros será necesaria la asignación de la configuración absoluta de cada uno de ellos.

En el caso del equol, aislado de la fracción cetohidroxiestrina de la orina de yeguas preñadas, no fue determinada su configuración absoluta hasta los años 60. Distintos autores confirmaron inequívocamente que el isómero natural del equol es el enantiómero de configuración absoluta  $S^{91,92}$ . La asignación se hizo por comparación de las curvas de dispersión óptica rotatoria (ORD) y dicroísmo circular (CD) del éter dimetilado del equol con las de los compuestos de referencia: éter dimetílico de la *R*-(-)-dihidropterocarpina y *S*-(-)-5,7,3',4'-tetrametoxiisoflavano, de configuración absoluta establecida, en las regiones de absorción UV de los compuestos (Fig. 4.29 y 4.30).

<sup>90</sup> Wang X, Shin HK, Hur H, et al. *Journal of Biotechnology*. **2005**;115:261-269.

<sup>91</sup> Verbit J, Clark-Lewis JW. *Tetrahedron*. **1968**;24(16):5519-5527.

<sup>92</sup> Kurosawa K, Ollis WD, Redman BT, et al. *Phytochemistry*. **1978**;17(8):1423-1426.

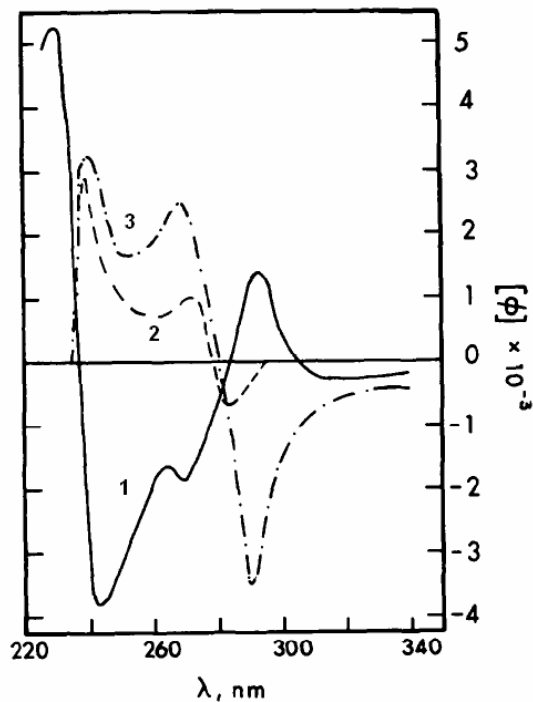


FIG. 4.29. Curvas ORD de los isoflavonoides: *R*-(-)-dihidroterocarpina dimetiléter (1), *S*-(-)-5,7,3',4'-tetrametoxiisoflavano (2) y *S*-(-)- equol dimetiléter (3)

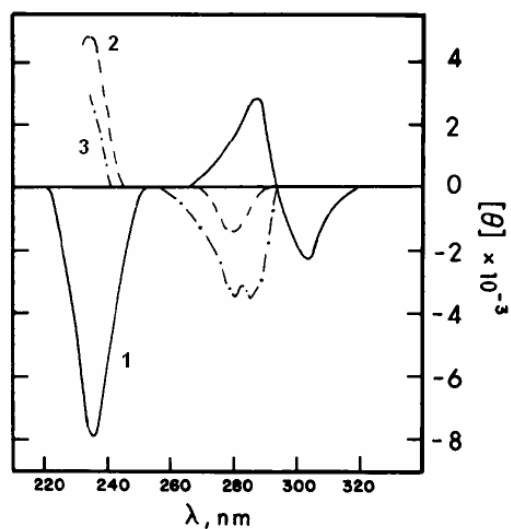


FIG. 4.30. Curvas CD de los isoflavonoides: *R*-(-)-dihidroterocarpina dimetiléter (1), *S*-(-)-5,7,3',4'-tetrametoxiisoflavano (2) y *S*-(-)- equol dimetiléter (3)

El efecto Cotton de los isoflavanos debido a dos transiciones electrónicas a longitudes de onda cercanas a 230 y 290 nm se observa claramente en ambas curvas.

El éter dimetílico del equol presenta un efecto Cotton del mismo signo que el *S*-(-)-5,7,3',4'-tetrametoxiisoflavano, claramente contrario al de la *R*-(-)-

dihidropterocarpina, lo que permitió asignar la configuración *S* a este derivado del equol natural y por tanto al equol natural (Fig. 4.31)

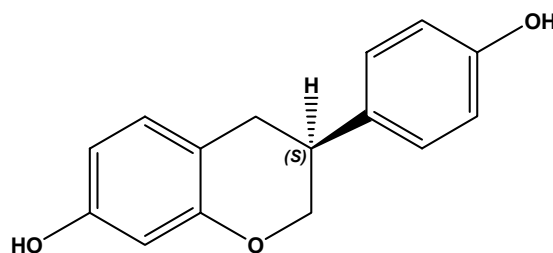


FIG. 4.31. Estructura química del enantiómero natural del equol

También se ha determinado la configuración absoluta de los enantiómeros tanto de la dihidroaidzeína como de la dihidrogenisteína.

En el caso de los enantiómeros de la dihidroaidzeína, separados mediante HPLC sobre fase estacionaria quiral se comprobó que el enantiómero que eluía en primer lugar era el de configuración *R* al poseer mismo valor de rotación específica que el producto previamente aislado del duramen extraído del *Pericopsis mooniana* que había sido descrito como el isómero *R* de rotación específica<sup>93</sup>  $-20,7^\circ$ .

Aunque la configuración absoluta para la dihidrogenisteína no ha podido ser determinada debido a la falta de datos previos, se comparó indirectamente con los datos obtenidos para la dihidroaidzeína, así se asumió que el enantiómero que eluye en primer lugar con una rotación específica de  $-26,2^\circ$  es la forma *R*.

Los espectros de dicroísmo circular de los enantiómeros de la DHD en etanol muestran un efecto Cotton en la región de 250-360 nm. La forma *R* de la DHD [DHD(1)] muestra un amplio efecto Cotton negativo a 320 nm y un efecto positivo a 282 nm, mientras que la forma *S* [DHD(2)] muestra la correspondiente imagen especular (Fig. 4.31).

El primer enantiómero eluido de la DHG [DHG(1)] muestra un efecto Cotton negativo a 305 nm y un efecto positivo a 338 nm, mientras que la forma *S* [DHG(2)] muestra la correspondiente imagen especular (Fig. 4.32).

<sup>93</sup> Maurice A, Peter J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1976**;1:186-191.

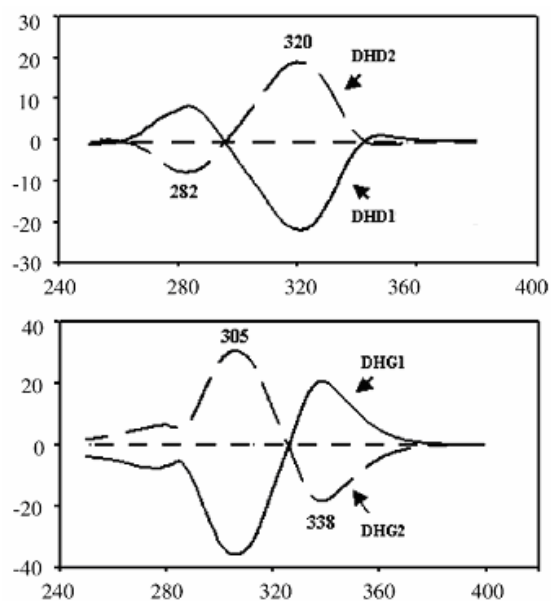


FIG. 4.32. Espectros de dicroísmo circular de los enantiómeros de la DHD y la DHG<sup>90</sup>

Sin embargo al comprobar las configuraciones absolutas de las moléculas presentadas en este artículo (Fig. 4.33), se observa un error en la asignación. Tal y como se aprecia en la figura 4.33 la molécula de configuración *R* fue asignada erróneamente como (*S*) dihidrodaidzeína y lo mismo para la dihidrogenisteína, lo que puede inducir a error cuando se intenta comparar asignaciones de productos relacionados con los descritos en este artículo.

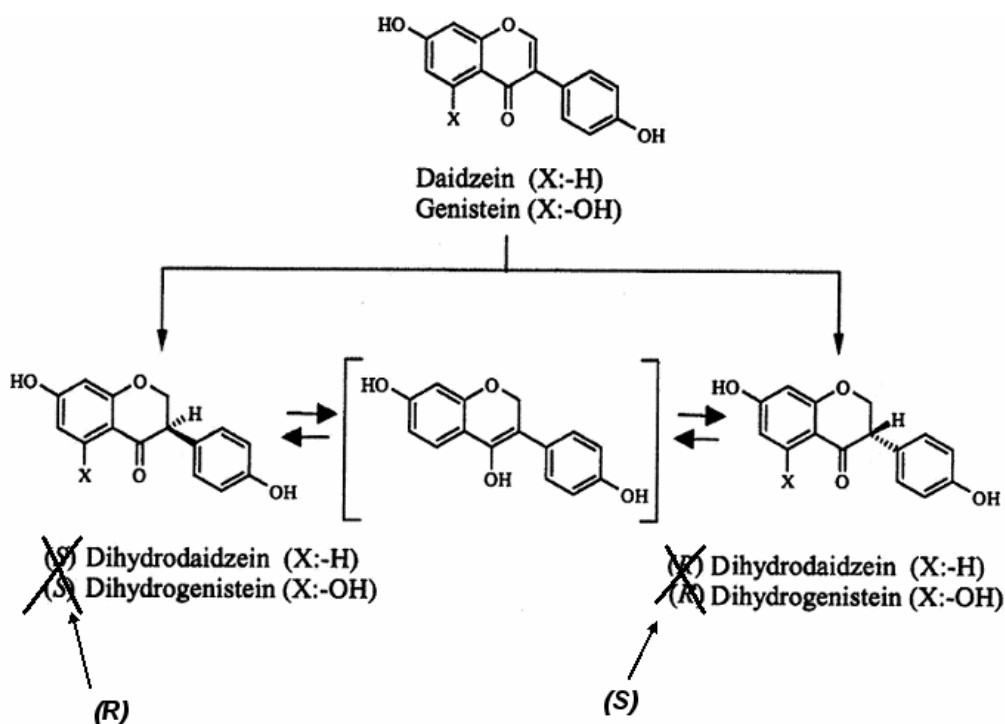


FIG. 4.33. Asignación errónea de las configuraciones

### 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA SÍNTESIS

En una tesis anterior desarrollada en nuestro grupo de investigación<sup>94</sup> se puso a punto un método de síntesis para el equol siguiendo el método propuesto por Adlercreutz y col. Este método proporcionó buenos resultados por lo que se decidió utilizarlo en el siguiente trabajo para la obtención de diversas familias, lo que demostrará en su caso, la versatilidad del mismo.

Como se ha comentado, uno de los objetivos de la presente memoria es alcanzar la síntesis de una serie de moléculas con estructura básica de isoflavonas, pero distintamente sustituidas, para el estudio posterior de actividad tanto en la acción vasorrelajante en el músculo liso como su afinidad por los receptores estrogénicos.

A pesar de que la estructura de ciertos receptores estrogénicos ya era conocida y ante la imposibilidad de llevar a cabo un estudio estructura/actividad, se decidió realizar la optimización geométrica de las moléculas objetivo comparándolas con la geometría de la molécula del estradiol, molécula que presenta las actividades buscadas.

Se llevó a cabo una optimización estructural de la geometría de la molécula de estradiol, daidzeína, genisteína y equol, observándose como la posición de los grupos OH parece decisiva a la hora de modular la actividad de dichos compuestos (Fig. 4.34).

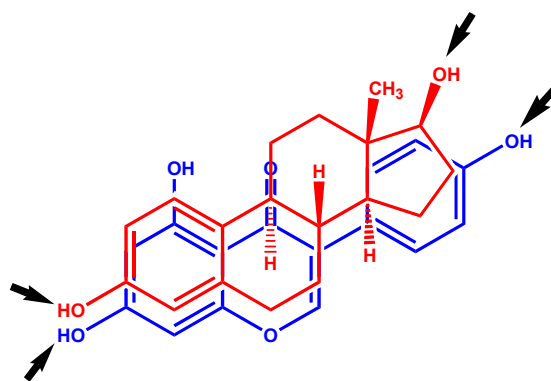


FIG. 4.34. Superposición de las estructuras del estrógeno 17 $\beta$ -estradiol y la isoflavona genisteína

<sup>94</sup> Martínez R. Tesis Doctoral *Universidad de Zaragoza*. 1997.

Por ello se decidió sintetizar moléculas que mantuviesen la estructura básica de isoflavona pero que introdujeran variaciones tanto en la posición de los grupos OH de los anillos A y C, como en el número de los mismos, así como en la rigidez de la estructura básica, eliminando el doble enlace de isoflavonas para dar lugar a una variedad de isoflavonoles e isoflavanos.

Las siguientes figuras muestran las moléculas objetivo del trabajo. Se han clasificado en 2 grupos importantes como familia de la daidzeína, todas aquellas que sólo poseen 1 grupo hidroxilo (OH) en el anillo A (en posición 5) y la familia de la genisteína aquellas con 2 grupos hidroxilo (OH) en el anillo A (posiciones 5,7) (Fig. 4.35 y 4.36).

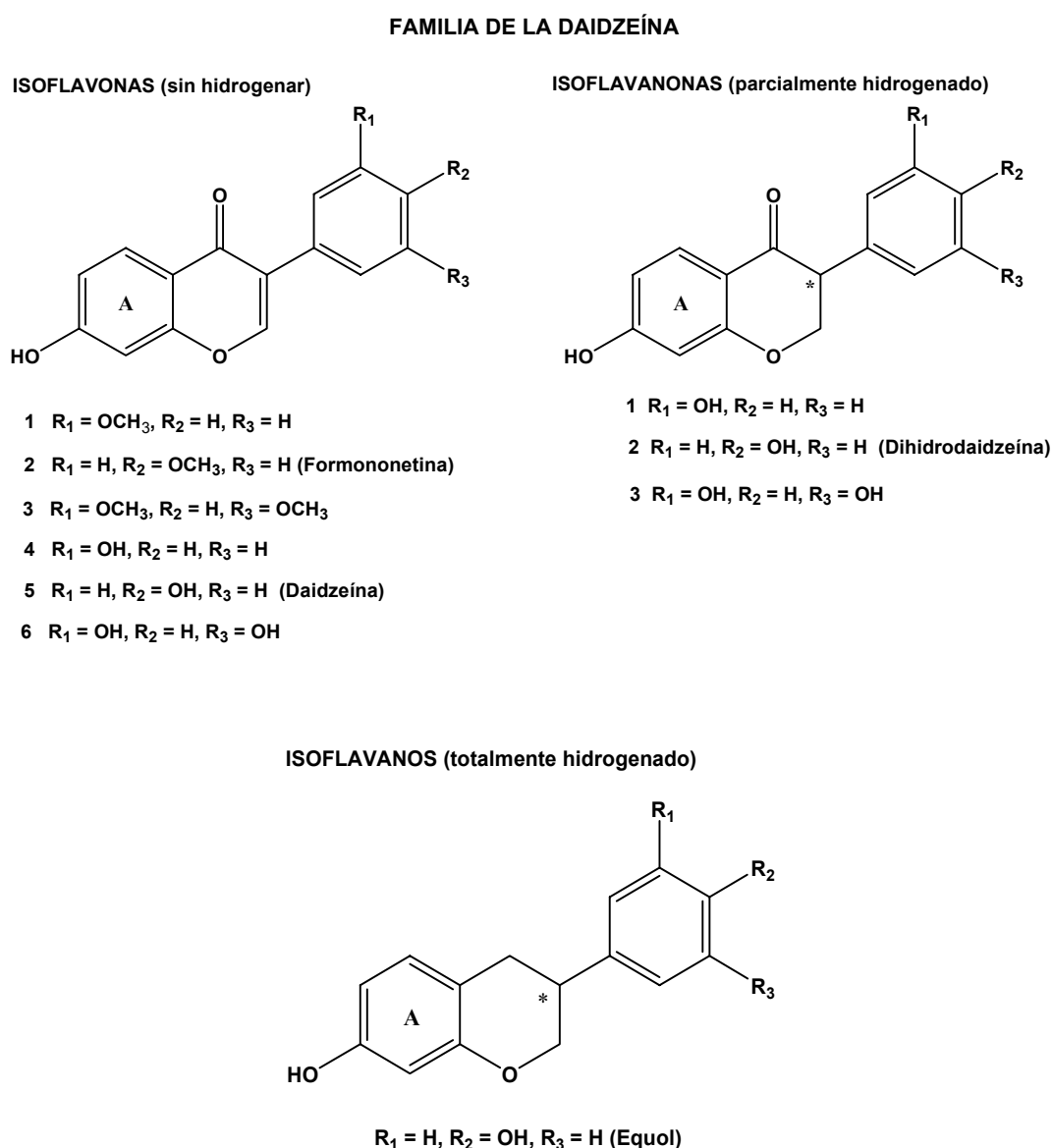
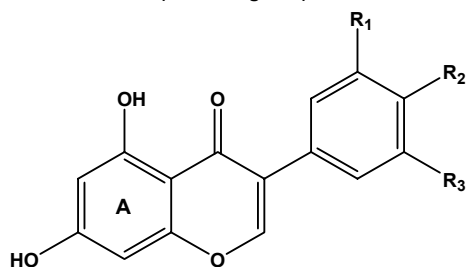


FIG. 4.35. Moléculas a sintetizar de la familia de la daidzeína

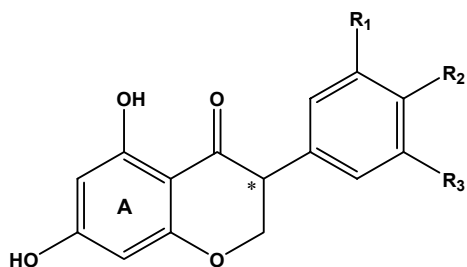
## FAMILIA DE LA GENISTEÍNA

## ISOFLAVONAS (sin hidrogenar)



- 1  $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{H}$
- 2  $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OCH}_3, R_3 = \text{H}$  (Biochanin A)
- 3  $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OCH}_3$
- 4  $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{H}$
- 5  $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$  (Genisteína)
- 6  $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OH}$

## ISOFLAVANONAS (parcialmente hidrogenado)



- 1  $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{H}$
- 2  $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$  (Dihidrogenisteína)
- 3  $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OH}$

## ISOFLAVANOS (totalmente hidrogenado)

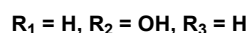
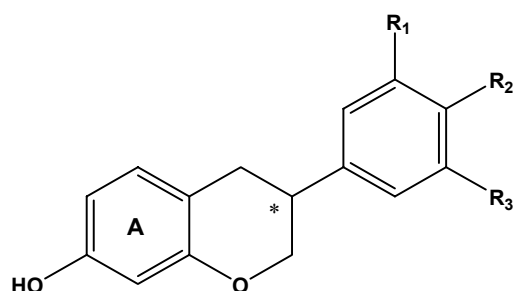


FIG. 4.36. Moléculas a sintetizar de la familia de la genisteína

## 4.3.1. Ruta general de síntesis de isoflavonoides

El método utilizado en nuestro grupo<sup>94</sup> para la síntesis de isoflavonoides es el que parte de la correspondiente desoxibenzoína basada en un método descrito por el grupo de Adlercreutz<sup>11</sup>. Esta síntesis en cuatro pasos permitirá obtener no sólo el isoflavano final con rendimientos aceptables, sino también los productos intermedios que serán, a su vez, caracterizados y ensayados en los diferentes test biológicos que se describen en este trabajo, con el fin de establecer relaciones entre los resultados obtenidos y la estructura. En la figura 4.37 se muestra el esquema sintético general tomando el equol como ejemplo.

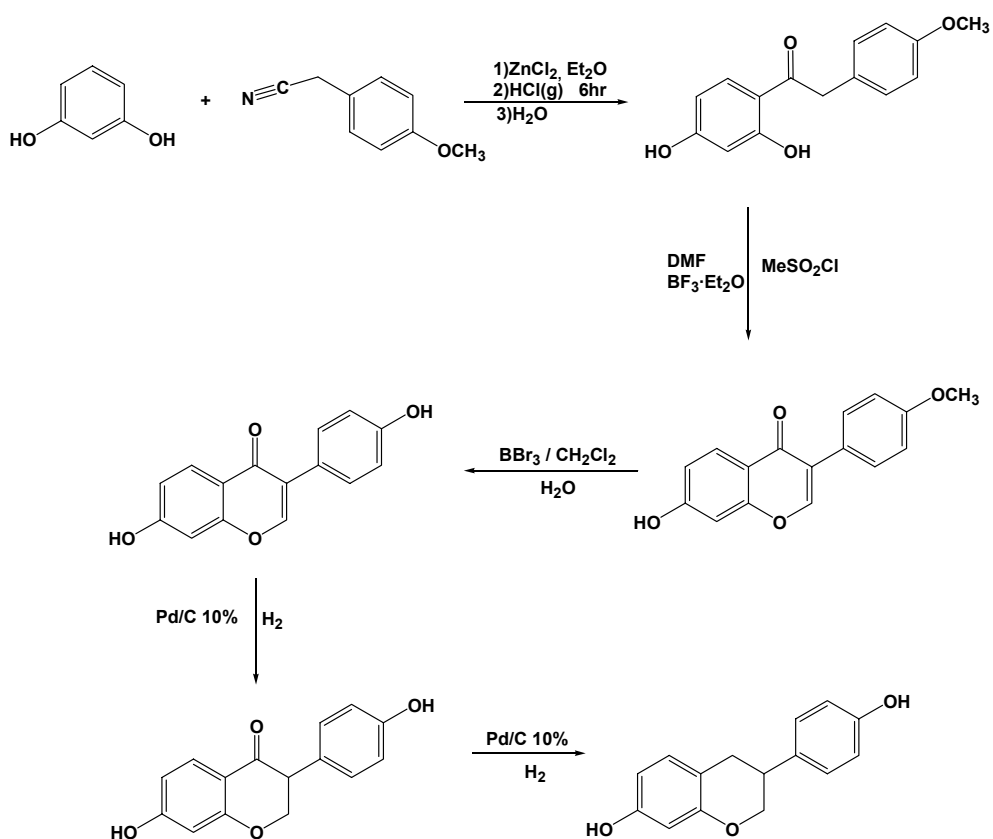


FIG. 4.37. Síntesis del equol

El primer paso es la condensación de Hoesch entre fenol y cianuro de bencilo para dar la desoxibenzoína correspondiente con buenos rendimientos. El mecanismo propuesto es la formación en medio ácido de una sal de iminio que reacciona con el resorcinol y la posterior hidrólisis del producto intermedio proporciona el producto deseado con buenos rendimientos (Fig. 4.38).

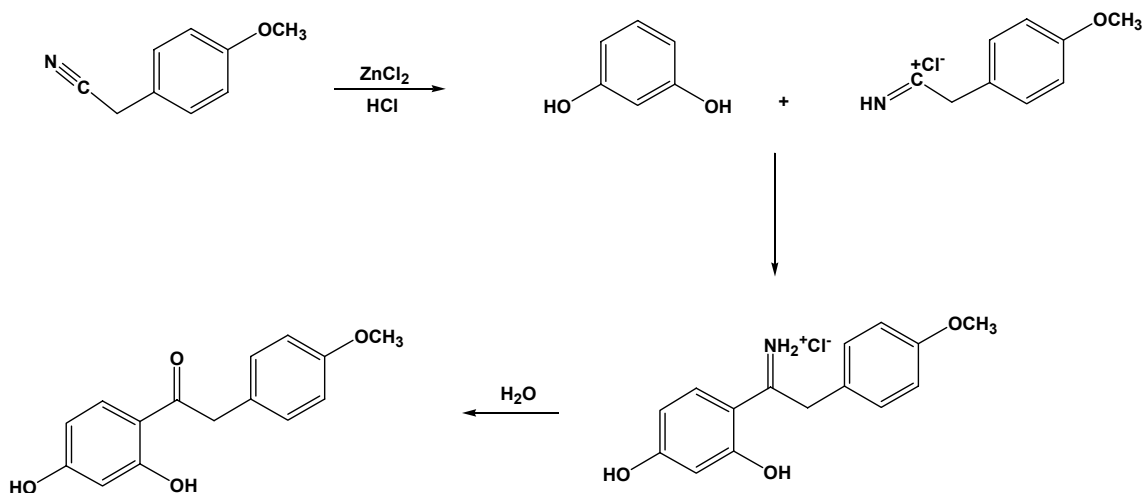


FIG. 4.38. Mecanismo de la condensación de Hoesch



La segunda reacción es la ciclación de la desoxibenzoína, catalizada por un ácido de Lewis (trifluoruro de boro eterato ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ), utilizando dimetilformamida (DMF), disolvente polar aprótico, como fuente de carbono. Se obtiene la metoxiisoflavona formononetina, isoflavonoide natural, también con buenos rendimientos (Fig. 4.39).

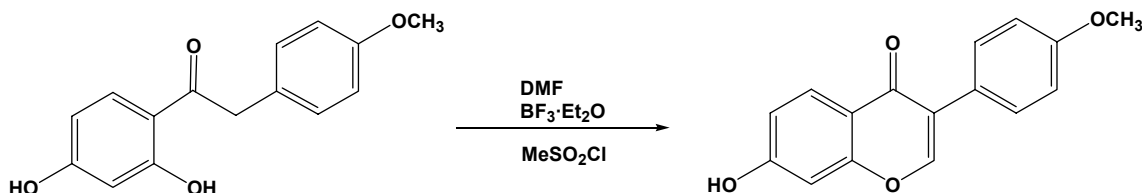


FIG. 4.39. Ciclación de la desoxibenzoína

La posterior desprotección de la metoxiisoflavona con tribromuro de boro en diclorometano da lugar a la dihidroxiisoflavona. (Fig. 4.40).

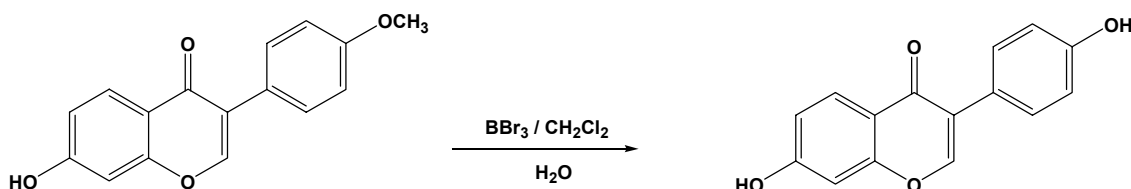


FIG. 4.40. Desprotección de la metoxiisoflavona

Se podría obtener directamente el equol por una hidrogenación catalítica de la isoflavona, lo que implicaría la reducción total del sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado en el anillo B (Fig. 4.41).

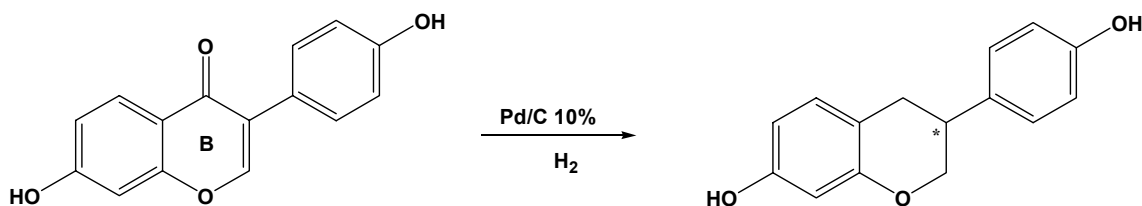


FIG. 4.41. Reducción catalítica de la daidzeína para obtener equol

La posibilidad de efectuar reducciones parciales puede conducir a la obtención de productos como isoflavanonas o isoflavanoles, interesantes para ensayar su actividad biológica y así poder establecer comparaciones (Fig. 4.42).

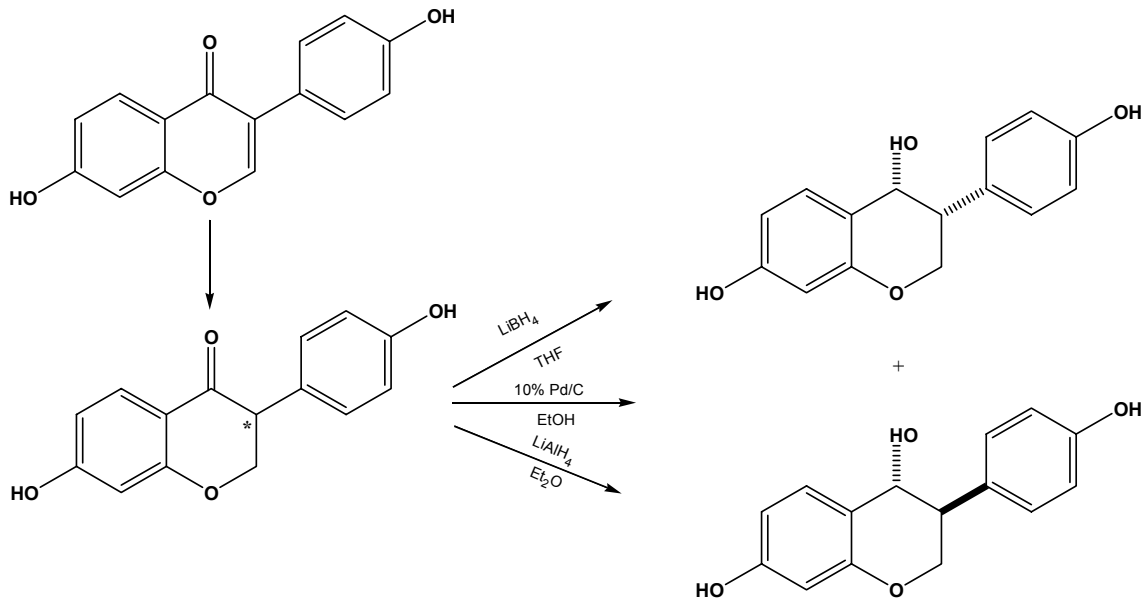


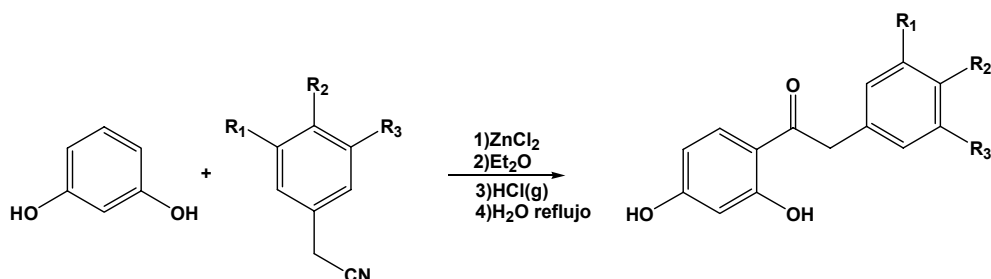
FIG. 4.42. Reducción parcial de la isoflavona<sup>79</sup>

El borohidruro de litio ( $\text{LiBH}_4$ ) y el hidruro doble de litio y aluminio ( $\text{LiAlH}_4$ ) son los reactivos más comunes para reducir este tipo de compuestos a los alcoholes correspondientes. Estos compuestos se caracterizan por su capacidad de donar iones hidruro ( $\text{H}^-$ ).

A continuación se describe la obtención de cada una de las familias de los compuestos elegidos con mayor detalle.

### 4.3.2. Síntesis de derivados de daidzeína

#### 4.3.2.1. Síntesis de 2,4-dihidroxi-metoxidesoxibenzoinas

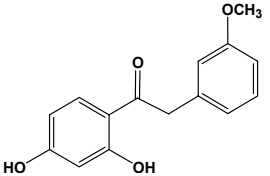
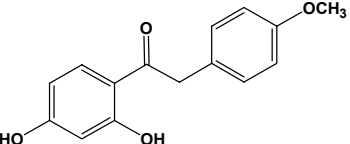
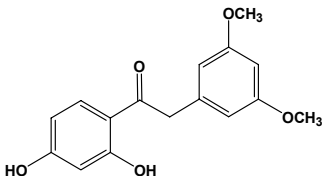


Se describe ampliamente el primer paso para la síntesis de la 2,4-dihidroxi-3'-metoxidesoxibenzoina que se tomará como ejemplo. Como el resto de productos sintetizados en su primera etapa siguen una metodología similar se ha decidido resumir las condiciones de la síntesis a modo de esquema mostrando sólo las diferencias más significativas que se han podido dar a lo largo de la misma (Tabla I).

Este primer paso de síntesis consiste en la condensación de Hoesch entre el resorcinol y el 3-metoxifenilacetnitrilo, utilizando ZnCl<sub>2</sub> como catalizador (los catalizadores de Zn son comúnmente utilizados en reacciones donde son necesarios ácidos de Lewis y además intervengan grupos nitrilos). Mediante borboteo prolongado de HCl se consigue la formación del clorhidrato derivado de 3-hidroxifenilacetnitrilo. La reacción se deja a temperatura ambiente durante 12 horas durante las cuales se produce la condensación con resorcinol. A continuación se somete a reflujo con agua destilada. Se deja enfriar y el producto precipita separándose del medio de reacción por filtrado a vacío. En el caso concreto que nos ocupa, el producto se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice. Las condiciones y rendimientos tanto de este producto como de los análogos sintetizados se recogen en la siguiente tabla.

Los productos obtenidos se caracterizan mediante <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, IR, que se recogen en el apartado 4.4 de esta memoria.

**Tabla I.** Resumen de las condiciones de reacción y rendimientos de la síntesis de 2,4-hidroxi- metoxidesoxibenzoínas.

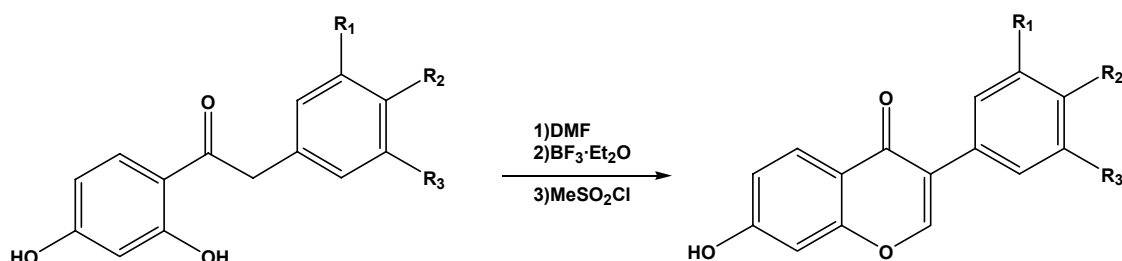
Producto	Tiempo de reacción	Condiciones de capa fina	<sup>(1)</sup> Purificación	<sup>(2)</sup> Rto.
<p>2,4-dihidroxi-3'-metoxidesoxibenzoína [<b>D-OH-3'</b> (I)]</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> <p>R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = H</p> </div>  </div>	5 h.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 7:2	Cromatografía de columna en gel de sílice	50%
<p>2,4-dihidroxi-4'-metoxidesoxibenzoína [<b>D-OH-4'</b> (I)]</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> <p>R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>3</sub> = H</p> </div>  </div>	5 h.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 7:2	Recristalización con etanol absoluto (EtOH)	75%
<p>2,4-dihidroxi-3',5'-metoxidesoxibenzoína [<b>D-OH-3'5'</b> (I)]</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> <p>R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub></p> </div>  </div>	6 h.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 10:2	Cromatografía de columna en gel de sílice	70%

(1) En todos los casos se ensayaron tanto la purificación por columna como la recristalización. Para cada producto se recoge el método que ofrece mejores resultados.

(2) El rendimiento es en producto aislado.

#### 4.3.2.2. Síntesis de 7-hidroxi-metoxiisoflavonas

Al igual que se ha procedido con el primer paso se describe la síntesis de la 7-hidroxi-3'-metoxiisoflavona a modo de ejemplo y se recogen en la tabla II las condiciones y los rendimientos para el resto de los derivados.

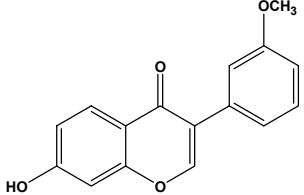
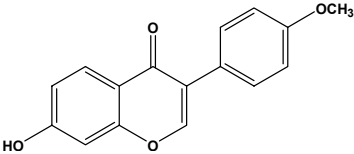
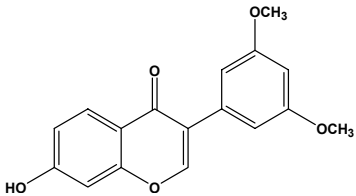


Este segundo paso es la ciclación de la 2,4-dihidroxi-3'-metoxidesoxibenzoína empleando como medio de reacción a la vez que reactivo dimetilformamida (DMF). Se añade gota a gota trifluoruro de boro eterato (BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O) que se emplea como catalizador de la reacción. Seguidamente se calienta la mezcla de reacción y se añade una disolución de cloruro de metansulfonilo (MeSO<sub>2</sub>Cl) en dimetilformamida seca. Se eleva la temperatura y se deja progresar la reacción. Completada la reacción se deja enfriar y se vierte la mezcla sobre agua destilada fría. El sólido precipitado se filtra y lava con agua destilada fría, se seca en estufa de vacío en presencia de pentóxido de fósforo a 50°C y el producto obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice.

Como puede observarse en la tabla II los rendimientos para los tres casos son comparables, apreciándose únicamente una variación en los tiempos de reacción y en el método de purificación.

Los productos obtenidos se caracterizan mediante <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, IR, que se recogen en el apartado 4.4 de esta memoria.

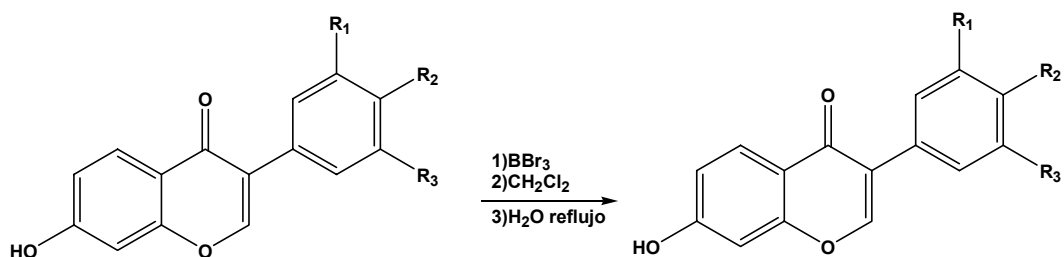
**Tabla II.** Resumen de condiciones de reacción y rendimientos de la síntesis de 7-hidroxi-metoxiisoflavonas.

Producto	Tiempo de reacción	Condiciones de capa fina	<sup>(1)</sup> Purificación	<sup>(2)</sup> Rto.
<p>7-hidroxi-3'-metoxiisoflavona [<b>D-OH-3' (II)</b>]</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> <p>R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = H</p> </div>  </div>	3,5 h.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 7:2	Cromatografía de columna en gel de sílice	82%
<p>7-hidroxi-4'-metoxiisoflavona [<b>D-OH-4' (II)</b>] (formononetina)</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> <p>R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>3</sub> = H</p> </div>  </div>	3 h.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 7:2	Recristalización con etanol absoluto (EtOH)	80%
<p>7-hidroxi-3',5'-dimetoxiisoflavona [<b>D-OH-3'5' (II)</b>]</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> <p>R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub></p> </div>  </div>	2,5 h.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 7:2	Cromatografía de columna en gel de sílice	82%

(1) En todos los casos se ensayaron tanto la purificación por columna como la recristalización. Para cada producto se recoge el método que ofrece mejores resultados.

(2) El rendimiento es en producto aislado.

#### 4.3.2.3. Síntesis de hidroxiisoflavonas

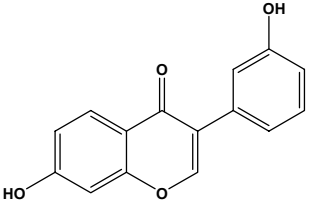
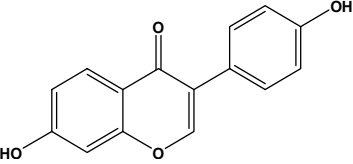
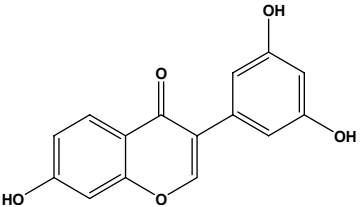


El siguiente paso corresponde a la desprotección del grupo hidroxilo. La 7-hidroxi-3'-metoxiisoflavona se trata con tribromuro de boro como agente de desprotección. La reacción se deja progresar a temperatura ambiente durante 27 horas hasta la conversión total del producto de partida. Transcurrido este tiempo se decanta el cloruro de metileno y la mezcla de reacción se somete a reflujo con agua destilada hidrolizando el exceso de reactivo y el complejo de boro. La mezcla se deja enfriar y el producto precipita pudiendo ser obtenido por filtración a vacío y lavado con agua destilada fría. Tras secado en estufa de vacío en presencia de pentóxido de fósforo a 50°C el sólido que se purifica primero por lavados con etanol absoluto y seguidamente por cromatografía de columna en gel de sílice.

La misma metodología es aplicada al resto de derivados. Los resultados se recogen en la tabla III.

Los productos obtenidos se caracterizan mediante <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, IR, que se recogen en el apartado 4.4 de esta memoria.

**Tabla III.** Resumen de condiciones de reacción y rendimientos de la síntesis de hidroxisoflavonas

Producto	Tiempo de reacción	Capa fina	<sup>(1)</sup> Purificación	<sup>(2)</sup> Rto.
<p>7,3'-dihidroxiisoflavona [<b>D-OH-3'</b>]</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> <p>R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = H</p> </div>  </div>	27 h.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 7:2	Cromatografía de columna en gel de sílice	60%
<p>7,4'-dihidroxiisoflavona [<b>D-OH-4'</b>] (Daidzeína)</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> <p>R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = OH R<sub>3</sub> = H</p> </div>  </div>	24 h.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 7:2	Recristalización con etanol absoluto (EtOH)	75%
<p>7,3',5'-trihidroxiisoflavona [<b>D-OH-3'5'</b>]</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> <p>R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = OH</p> </div>  </div>	24 h.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 8:2	Cromatografía de columna en gel de sílice	75%

(1) En todos los casos se ensayaron tanto la purificación por columna como la recristalización. Para cada producto se recoge el método que ofrece mejores resultados.

(2) El rendimiento es en producto aislado.



Al realizar la desprotección de la 7-hidroxi-3',5'-dimetoxiisoflavona se aprecia no sólo la aparición del producto deseado sino también aquel que corresponde a la desprotección parcial de uno de los grupos metoxi. Aunque el objetivo es la obtención del producto totalmente desprotegido (7,3',5'-trihidroxiisoflavona), el subproducto obtenido (7,3'-dihidroxi-5'-metoxiisoflavona), resulta igualmente interesante en cuanto a su actividad biológica, ya que se esperaría que interactúe de diferente modo al no tener el mismo número de grupos hidroxilo libres. Por ello se considera oportuna la separación por cromatografía de columna de ambos productos y el estudio por separado de la actividad de los mismos.

En las figuras 4.43 y 4.44 se puede apreciar como en el espectro de  $^1\text{H-RMN}$  del subproducto aparece una señal en la zona de 3.7 ppm que integra por 3 protones correspondientes a los protones del grupo  $\text{OCH}_3$  no hidrolizado, mientras que en el espectro de  $^1\text{H-RMN}$  del producto totalmente desprotegido no aparece dicha señal.

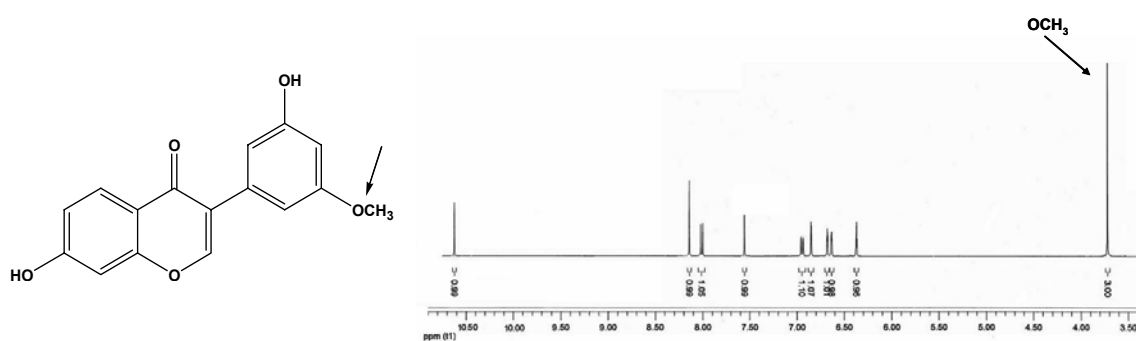


FIG. 4.43.  $^1\text{H-RMN}$  de la 7,3'-dihidroxi-5'-metoxiisoflavona

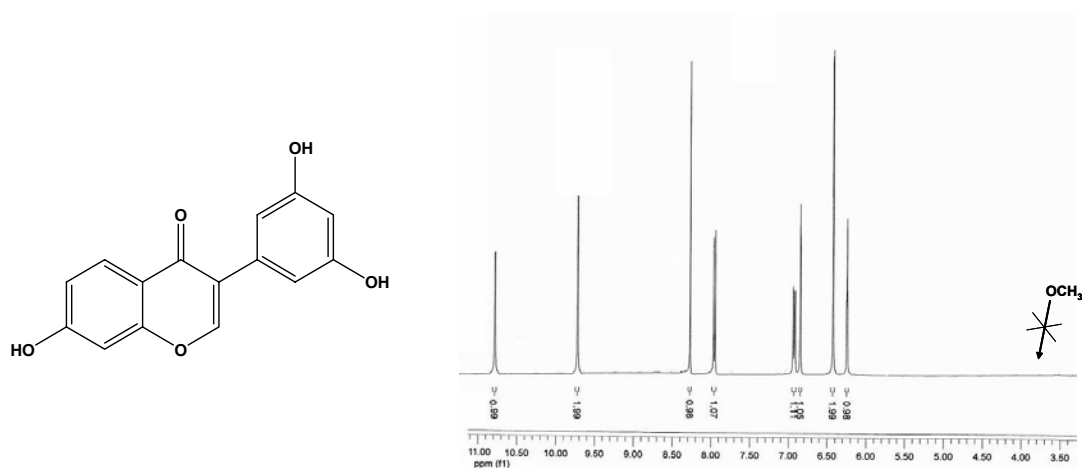
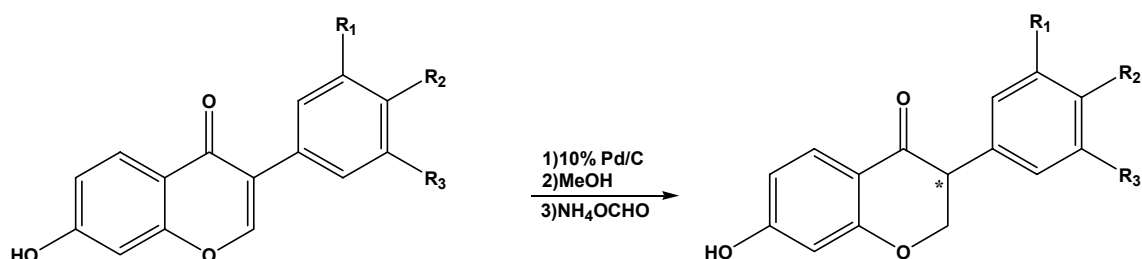


FIG. 4.44.  $^1\text{H-RMN}$  de la 7,3',5'-trihidroxiisoflavona

#### 4.3.2.4. Síntesis de hidroxiisoflavanonas



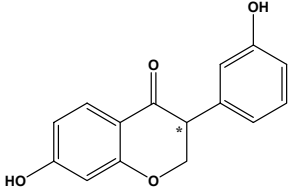
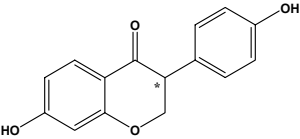
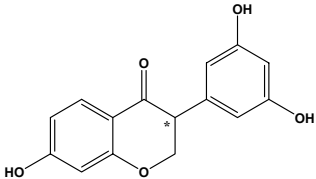
La hidrogenación parcial de la isoflavona mediante el empleo de hidrógeno en presencia de catalizadores de Pd da lugar a complejas mezclas de reacción compuestas por el producto totalmente hidrogenado y diversos productos resultantes de la hidrogenación parcial del grupo carbonilo. Una forma de evitar la formación de estos subproductos es utilizar ortoformiato de amonio  $\text{NH}_4\text{OCHO}$ <sup>78</sup> como agente de transferencia de hidrógeno. La reacción se realiza en metanol seco utilizando Pd/C como catalizador. El catalizador se activa previamente mediante el borboteo de corriente de argón. La mezcla de reacción se somete a reflujo ( $80^\circ\text{C}$ ) durante 3 horas y se deja hasta que no se aprecia progresión en la reacción. La mezcla se deja enfriar y se filtra para eliminar el catalizador. Se recupera el producto por eliminación del disolvente a vacío. Se obtiene así un sólido que se seca y se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice.

El producto se obtiene como una mezcla racémica. Es conocido como la presencia de quiralidad en las moléculas y en concreto en isoflavanos, puede afectar a su actividad biológica<sup>75</sup>. Por ello, se decide realizar la separación de dicha mezcla por HPLC utilizando fase estacionaria quiral, de modo a poder obtener cada uno de los enantiómeros y evaluar su actividad biológica por separado. La resolución y caracterización de dichos compuestos se recoge en el apartado 4.3.4 de este capítulo.

Se aplica la misma metodología al resto de derivados. Los resultados se recogen en la tabla IV. Los rendimientos moderados obtenidos puede ser debido tanto a la poca solubilidad del producto en el eluyente empleado para su purificación y que parte del producto que se obtiene está totalmente hidrogenado.

Los productos obtenidos se caracterizan mediante  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, IR, que se recogen en el apartado 4.4 de esta memoria.

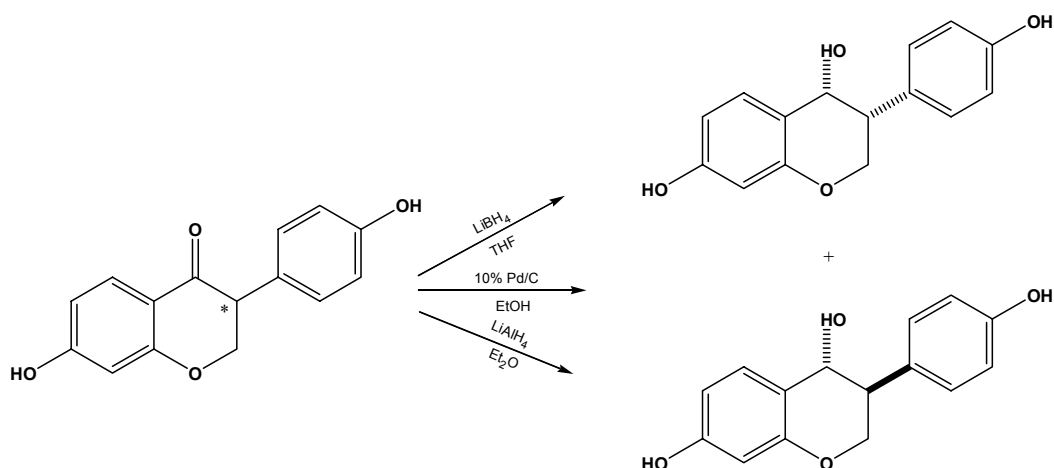
**Tabla IV.** Resumen de condiciones de reacción y rendimientos de la síntesis de hidroxiiisoflavanonas.

Producto	Tiempo de reacción	Condiciones de capa fina	<sup>(1)</sup> Purificación	<sup>(2)</sup> Rto.
<p>7,3'-dihidroxiisoflavanona [DHD-OH-3']</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> <p>R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = H</p> </div>  </div>	3 h.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 8:2	Cromatografía de columna en gel de sílice	50%
<p>7,4'-dihidroxiisoflavanona [DHD]</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> <p>R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = OH R<sub>3</sub> = H</p> </div>  </div>	5 h.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 7:2	Cromatografía de columna en gel de sílice	60%
<p>7,3',5'-trihidroxiisoflavanona [DHD-OH-3'5']</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> <p>R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = OH</p> </div>  </div>	8 h.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 7:2	Cromatografía de columna en gel de sílice	46%

(1) En todos los casos se ensayaron tanto la purificación por columna como la recristalización. Para cada producto se recoge el método que ofrece mejores resultados.

(2) El rendimiento es en producto aislado.

#### 4.3.2.5. Síntesis de cis y trans 7,4'-dihidroxiisoflavan-4-ol



Partiendo de la 7,4'-dihidroxiisoflavanona se intentó llevar a cabo la hidrogenación del grupo carbonilo para obtener los dioles cis y trans 7,4'-dihidroxiisoflavan-4-ol. Se probaron diversos métodos sin embargo, ninguno de ellos condujo a los productos deseados.

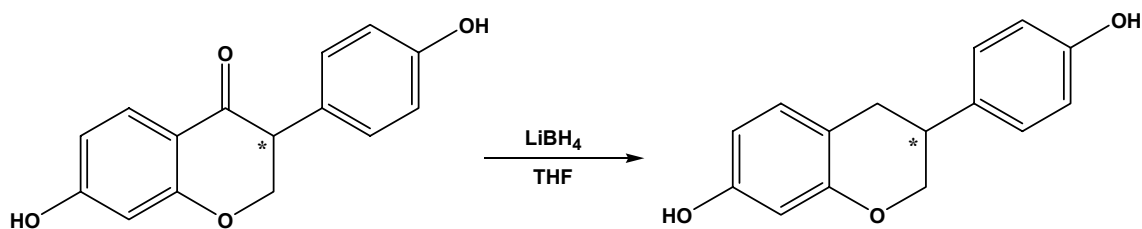
En primer lugar se ensayó un método descrito por Wähälä en 1997<sup>79</sup>. En él se emplea borohidruro de litio ( $\text{LiBH}_4$ ) como agente reductor y tetrahidrofurano (THF) como medio de reacción. Al finalizar la reacción se vierte sobre una disolución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en baño de hielo y se extrae el producto con  $\text{AcOEt}$ . Se evapora el disolvente obteniéndose un sólido. Al realizar un espectro de  $^1\text{H-RMN}$  al producto obtenido se comprueba que la hidrogenación ha sido total obteniéndose como producto equol.

En un segundo intento de hidrogenar la dihidrodaidzeína a sus correspondientes dioles se empleó hidruro de litio y aluminio ( $\text{LiAlH}_4$ ) como reductor y dietiléter ( $\text{Et}_2\text{O}$ ) como disolvente. En este caso la hidrogenación no tiene lugar recuperándose daidzeína al final de la reacción.

Por último, se ensayó una reducción con 10% Pd/C como catalizador en etanol como disolvente e hidrógeno como reductor. El resultado fue de nuevo la hidrogenación del grupo  $\text{C=O}$  y la obtención de equol en lugar de los correspondientes dioles.

Ante la dificultad de obtener estos compuestos y la falta de tiempo se desistió en hacer nuevos intentos quedando la tarea pendiente para futuros trabajos.

#### 4.3.2.6. Síntesis del 7,4'-dihidroxiisoflavano (equol)

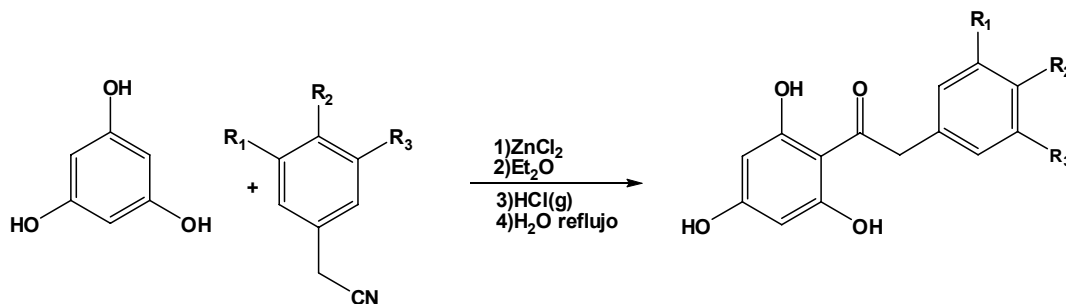


Para la obtención de equol se siguió uno de los métodos descritos en el apartado anterior. Se utilizó  $\text{LiBH}_4$  como reductor en THF seco como disolvente. Se deja progresar la reacción a temperatura ambiente durante 24 horas hasta que la conversión del producto de partida es del 100%. La reacción se vierte sobre una disolución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y el producto se obtiene por extracción con AcOEt. El sólido obtenido se caracteriza por  $^1\text{H}$ -RMN para saber si es el producto deseado. Se comprueba que la hidrogenación ha sido total obteniéndose como producto final el equol. El producto se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice empleando el mismo eluyente que para la capa fina. El sólido purificado se obtiene con un rendimiento del 65%.

El producto obtenido se caracteriza mediante  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, IR, que se recoge en el apartado 4.4 de esta memoria.

### 4.3.3. Síntesis de derivados de genisteína

#### 4.3.3.1. Síntesis de 2,4,6-trihidroxi-metoxidesoxibenzoínas

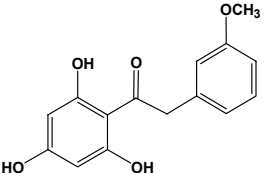
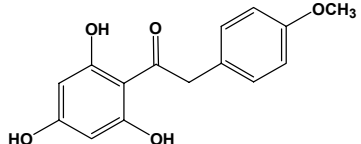
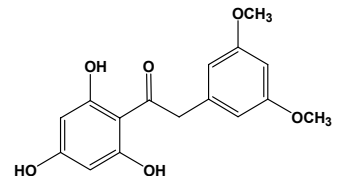


Se describe ampliamente el primer paso para la síntesis de la 2,4,6-trihidroxi-3'-metoxidesoxibenzoína. Como el resto de productos sintetizados en su primera etapa siguen una metodología similar se ha decidido resumir las condiciones de síntesis de los restantes productos a sintetizar a modo de esquema mostrando sólo las diferencias más significativas que se han podido dar a lo largo de la síntesis (tabla V).

Este primer paso de síntesis, al igual que sucedía con los derivados de la daidzeína, consiste en la condensación de Hoesch pero en este caso el producto de partida es el phloroglucinol y los distintos metoxifenilacetronitrilos, utilizando ZnCl<sub>2</sub> como catalizador y éter como medio de reacción. Se borbotea HCl durante 6,5 horas en el medio de reacción. La reacción se deja a temperatura ambiente durante 12 horas. Se decanta el éter sobrante y la reacción se somete a reflujo con agua destilada. Se deja enfriar y el producto precipitado se separa mediante filtración y se lava con agua destilada fría. Junto con el producto deseado precipita el ácido 3-metoxifenilacético proveniente de la hidrólisis uno de los productos de partida. Para su eliminación se realizan lavados con NaHCO<sub>3</sub>. Posteriormente, el producto se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice.

Los productos obtenidos se caracterizan mediante <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, IR que se recogen en el apartado 4.4 de esta memoria.

**Tabla V.** Resumen de condiciones de reacción y rendimientos de la síntesis de 2,4,6-trihidroxi-metoxibenzoínas

Producto	Tiempo de reacción	Condiciones de capa fina	<sup>(1)</sup> Purificación	<sup>(2)</sup> Rto.
<p>2,4,6-trihidroxi-3'-metoxidesoxibenzoína [<b>G-OH-3'</b> (I)]</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> <p>R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = H</p> </div>  </div>	6,5 h.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 7:3	Cromatografía de columna en gel de sílice	50%
<p>2,4,6-trihidroxi-4'-metoxidesoxibenzoína [<b>G-OH-4'</b> (I)]</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> <p>R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>3</sub> = H</p> </div>  </div>	5 h.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 7:2	Recristalización con cloroformo (CHCl <sub>3</sub> )	65%
<p>2,4,6-trihidroxi-3',5'-metoxidesoxibenzoína [<b>G-OH-3'5'</b> (I)]</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> <p>R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub></p> </div>  </div>	6,5 h.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 7:2	Cromatografía de columna en gel de sílice	45%

(1). En todos los casos se ensayaron tanto la purificación por columna como la recristalización. Para cada producto se recoge el método que ofrece mejores resultados.

(2) El rendimiento es en producto aislado.

Se aprecia, no obstante, como para el caso de derivados de genisteína los rendimientos son algo menores que para los derivados de daidzeína. Los problemas de solubilidad pueden ser la causa de este descenso.

Tanto en el caso de 2,4,6-trihidroxi-3'-metoxidesoxibenzoína [G-OH-3' (I)] como de 2,4,6-trihidroxi-3',5'-metoxidesoxibenzoína [G-OH-3'5'(I)] se observa la aparición de un subproducto que se separó por cromatografía de columna y se identificó mediante  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ RMN como el ácido proveniente de la hidrólisis del benzonitrilo de partida. (Fig. 4.45 y 4.46). En estos casos se decidió realizar unos lavados con  $\text{NaHCO}_3$  previos a la purificación por columna para eliminar este subproducto que podía interferir en la correcta purificación de los productos.

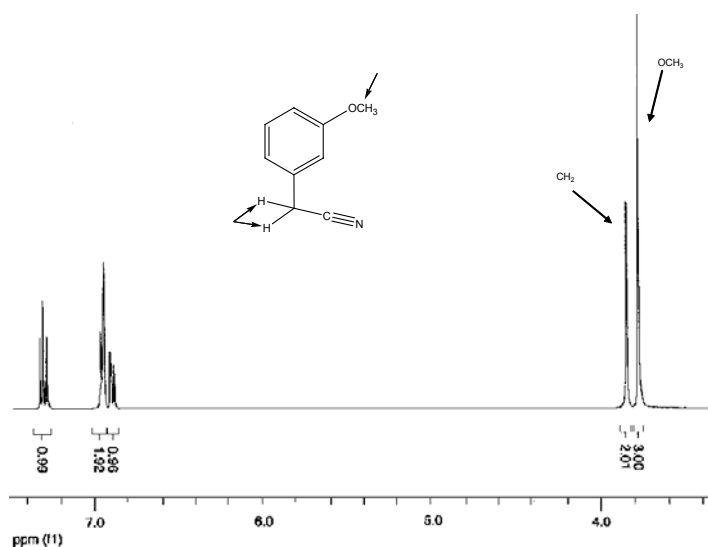


FIG. 4.45.  $^1\text{H}$ -RMN de 3-metoxifenilacetnitrilo

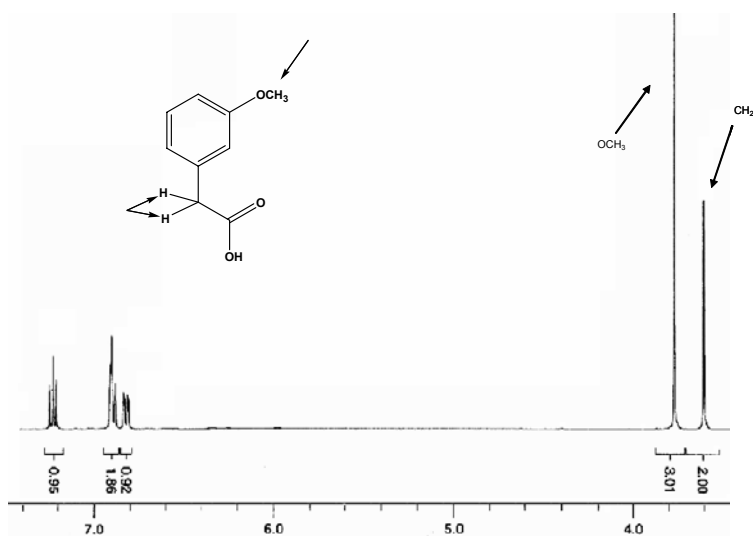
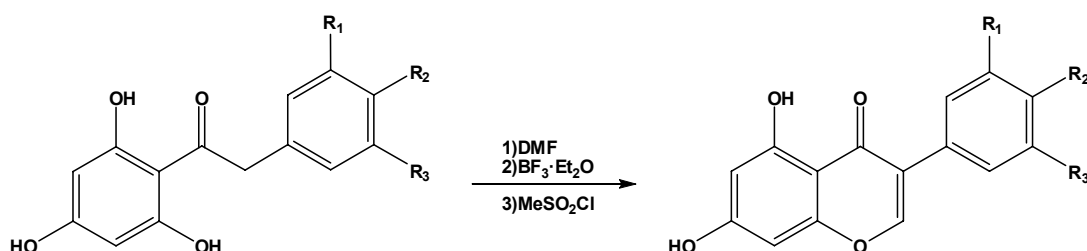


FIG. 4.46.  $^1\text{H}$ -RMN de 3-metoxifenilacético



#### 4.3.3.2. Síntesis de 5,7-dihidroxi-metoxiisoflavonas

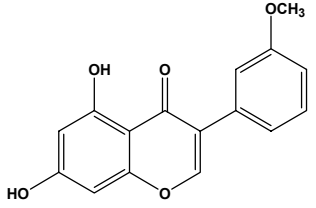
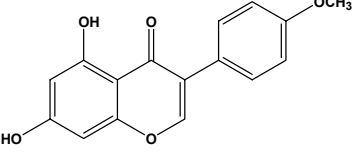
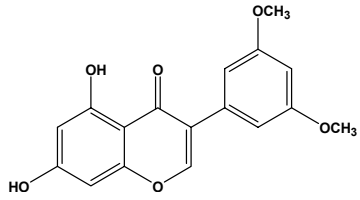


Este segundo paso de reacción es la ciclación de 2,4,6-trihidroxi-3'-metoxidesoxibenzoína empleando como medio de reacción dimetilformamida (DMF) siendo ésta además una fuente de carbono. Se añade gota a gota trifluoruro de boro eterato ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) que actúa como catalizador de la reacción. Se calienta la mezcla de reacción y se añade una disolución de cloruro de metansulfonilo ( $\text{MeSO}_2\text{Cl}$ ) en dimetilformamida seca. Se eleva la temperatura y se deja progresar la reacción. Se sigue por capa fina empleando como eluyente una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$  7:2. Transcurridas 3 horas se deja enfriar la reacción y se vierte la mezcla sobre agua destilada fría. El producto precipita, se lava con agua destilada fría, se seca en estufa de vacío se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice empleando.

La tabla VI recoge los resultados de todos los derivados sintetizados.

Los productos obtenidos se caracterizan mediante  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, IR que se recogen en el apartado 4.4 de esta memoria.

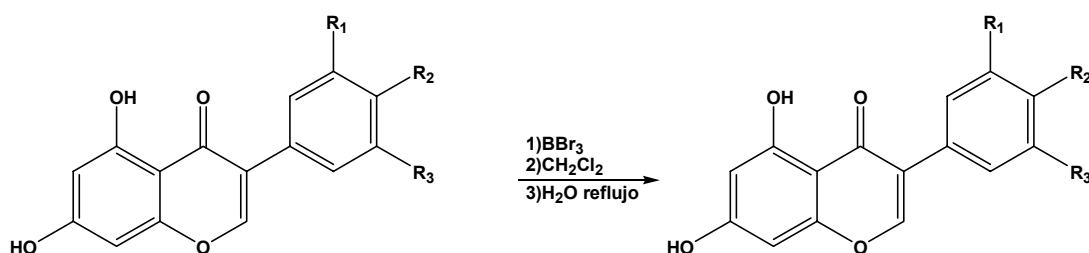
**Tabla VI.** Resumen de condiciones de reacción y rendimientos de la síntesis de 5,7-dihidroxi-metoxiisoflavonas

Producto	Tiempo de reacción	Condiciones de capa fina	(1)Purificación	(2)Rto.
<p>5,7-dihidroxi-3'-metoxiisoflavona [<b>G-OH-3' (II)</b>]</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> <p>R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = H</p> </div>  </div>	3 h.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 7:2	Cromatografía de columna en gel de sílice	76%
<p>5,7-dihidroxi-4'-metoxiisoflavona [<b>G-OH-4'(II)</b>] (<b>Biochanina</b>)</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> <p>R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>3</sub> = H</p> </div>  </div>	3 h.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 7:2	Recristalización con etanol absoluto (EtOH)	50%
<p>5,7-dihidroxi-3',5'-dimetoxiisoflavona [<b>G-OH-3'5'(II)</b>]</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> <p>R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub></p> </div>  </div>	3,5 h.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 7:2	Cromatografía de columna en gel de sílice	79%

(1) En todos los casos se ensayaron tanto la purificación por columna como la recristalización. Para cada producto se recoge el método que ofrece mejores resultados.

(2) El rendimiento es en producto aislado.

#### 4.3.3.3. Síntesis de hidroxisoflavonas

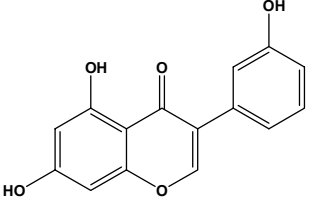
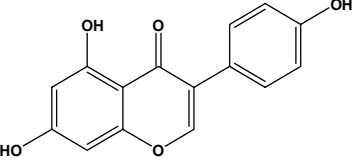
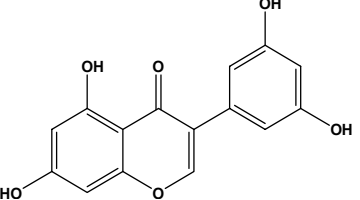


El siguiente paso corresponde a la desprotección del grupo hidroxilo. La 5,7-dihidroxi-3'-metoxisoflavona se disuelve en cloruro de metileno seco y se emplea tribromuro de boro como agente desprotector. La reacción se deja progresar a temperatura ambiente durante 25 horas hasta que la conversión del producto de partida es del 100%. Transcurrido este tiempo se decanta el cloruro de metileno y la mezcla de reacción se somete a reflujo con agua destilada hidrolizando el exceso de reactivo y el complejo de boro. La mezcla se deja enfriar precipitando un sólido que se filtra a vacío, se lava con agua destilada fría y se seca en estufa a vacío en presencia de pentóxido de fósforo a 50°C. Por último, se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice.

La tabla VII recoge los resultados de todos los derivados sintetizados.

Los productos obtenidos se caracterizan mediante <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, IR que se recogen en el apartado 4.4 esta memoria.

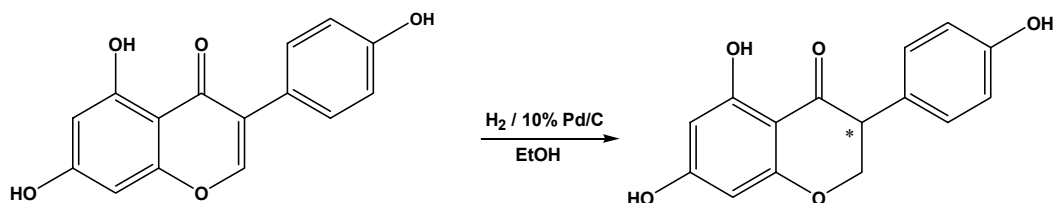
Tabla VII. Resumen de condiciones de reacción y rendimientos de la síntesis de hidroxisoflavonas

Producto	Tiempo de reacción	Condiciones de capa fina	<sup>(1)</sup> Purificación	<sup>(2)</sup> Rto.
<p>5,7,3'-trihidroxiisoflavona [G-OH-3']</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> <p>R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = H</p> </div>  </div>	25 h.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 8:2	Cromatografía de columna en gel de sílice	90%
<p>5,7,4'-trihidroxiisoflavona [G-OH-4'] (Genisteína)</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> <p>R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = OH R<sub>3</sub> = H</p> </div>  </div>	24 h.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 7:2	Recristalización con etanol absoluto (EtOH)	70%
<p>5,7,3',5'-tetrahidroxiisoflavona [G-OH-3'5']</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> <p>R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = OH</p> </div>  </div>	25 h.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 7:2	Cromatografía de columna en gel de sílice	69%

(1) En todos los casos se ensayaron tanto la purificación por columna como la recristalización. Para cada producto se recoge el método que ofrece mejores resultados.

(2) El rendimiento es en producto aislado.

#### 4.3.3.4. Síntesis de 5,7,4'-trihidroxiisoflavanona



En el caso de la genisteína se ensayó tanto la hidrogenación con 10% Pd/C como el empleo de HCOONH<sub>4</sub><sup>78</sup> como agente de transferencia de hidrógeno.

El empleo de hidrógeno en este caso proporcionó mejores rendimientos que el método de transferencia de hidrógeno empleando HCOONH<sub>4</sub>.

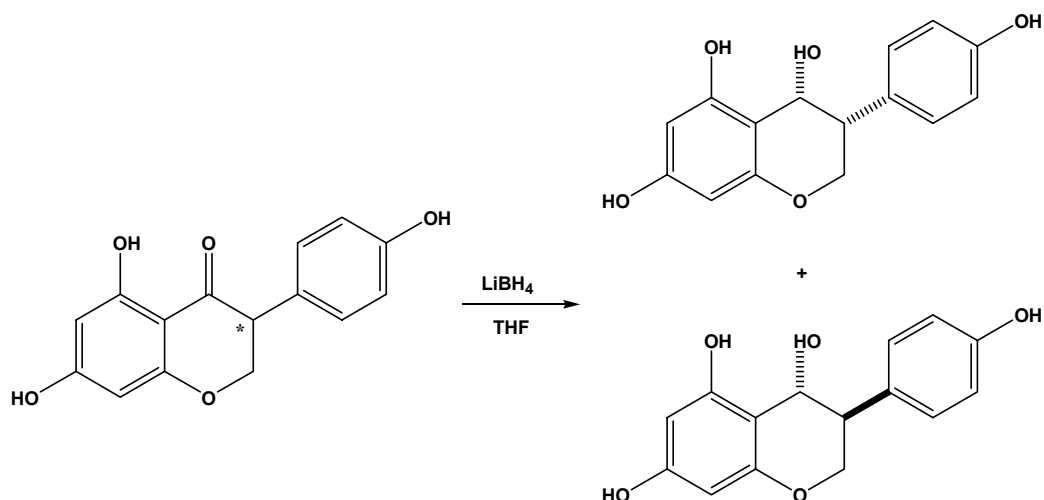
El disolvente se desgasifica durante 2 horas en corriente de argón. Se añade el catalizador y se sigue pasando corriente de argón durante 30 minutos para activarlo. Seguidamente se añade el producto que se quiere reducir y se hace atmósfera de hidrógeno. El sistema de agitación elegido en este caso es agitación mecánica utilizando un “shaker”, lo que permite una mejor mezcla del hidrógeno con el medio de reacción. Trascurreda 1 hora y tras comprobar que no hay presencia del producto de partida, la disolución se filtra a vacío y se lava el catalizador sucesivamente con EtOH. Se evapora el disolvente y se obtiene un sólido se seca en estufa de vacío obteniéndose un sólido que se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice empleando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:AcOEt 7:1. El sólido purificado resulta ser el producto y se obtiene con un rendimiento del 70%.

Se obtiene como mezcla racémica que al igual que para el derivado de daidzeína se realizará la separación de dicha mezcla por HPLC utilizando fase estacionaria quiral, de modo a poder obtener cada uno de los enantiómeros y evaluar su actividad biológica por separado. La resolución de dichos compuestos se recoge en el apartado 4.3.4 de este capítulo.

El producto obtenido se caracteriza mediante <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, IR y se recoge en el apartado 4.4 de esta memoria.

La síntesis de los derivados sustituidos en las posiciones 3' y 3',5' no se pudo llevar a cabo por falta de tiempo, quedando pendiente este trabajo para futuras investigaciones.

#### 4.3.3.5. Síntesis de cis y trans 5,7,4'-trihidroxiisoflavan-4-ol

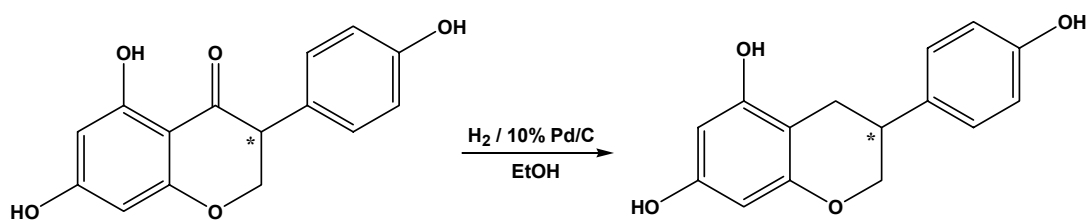


Partiendo de la 5,7,4'-trihidroxiisoflavanona se intentó llevar a cabo la hidrogenación del grupo carbonilo para obtener los dioles cis y trans 5,7,4'-trihidroxiisoflavan-4-ol.

La hidrogenación que se probó fue un método descrito por Wähälä en 1997<sup>79</sup>. En él se emplea borohidruro de litio ( $\text{LiBH}_4$ ) base de Lewis fuerte en tetrahidrofurano (THF) disolvente dipolar aprótico.

En este caso y al igual que ocurría con los derivados de daidzeína la reacción no tuvo lugar.

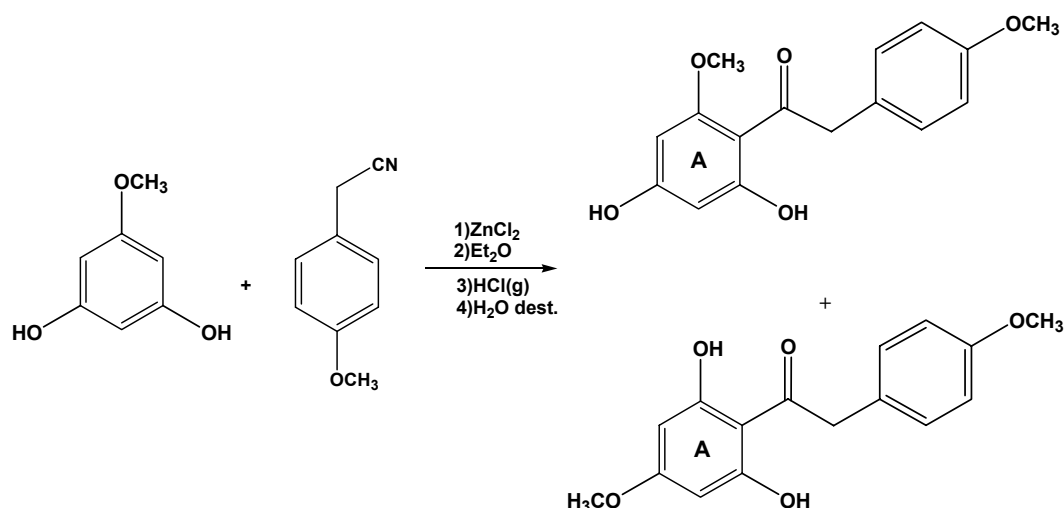
#### 4.3.3.6. Síntesis del 5,7,4'-trihidroxiisoflavano



Para la obtención del isoflavano, se procede de la misma manera que para la hidrogenación parcial sólo que en este caso la cantidad de catalizador que se emplea es mayor. Transcurridos 60 minutos del comienzo de la reacción se hace una capa fina empleando como eluyente una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :AcOEt 7:1. No se aprecia reacción. Se decidió prolongar el tiempo de reacción sin observarse en ningún momento ninguna progresión.

Los intentos de hidrogenar totalmente la genisteína únicamente conllevaron a la hidrogenación parcial del doble enlace dando como producto final la dihidrogenisteína. Se pensó que el grupo hidroxilo adyacente al grupo carbonilo podría estar impidiendo la reducción del grupo carbonilo, debido a la formación de un enlace de hidrogeno intramolecular, por lo que se decidió partir del producto que tuviese el grupo OH protegido en forma de grupo metoxi y reproducir toda la ruta sintética.

#### 4.3.3.7. Síntesis de 2,4-dihidroxi-6,4'-dimetoxidesoxibenzoína



En este primer paso de reacción se parte de los dos productos de partida con un grupo hidroxilo protegido. Puesto que este producto de partida no presenta simetría en su estructura hay dos posibles posiciones de ataque. Uno de los productos finales será el resultante de la acilación entre los dos grupos OH y el otro producto será aquel que resulte del ataque en el carbono situado entre el grupo OH y el grupo OCH<sub>3</sub>.

La condensación de Hoesch se produce entre el 5-metoxiresorcinol y el 4-metoxifenilacetnitrilo, utilizando ZnCl<sub>2</sub> como catalizador y éter como medio de reacción. En las mismas condiciones descritas en apartados anteriores, se observa en la capa fina que los productos de partida han desaparecido y aparecen dos manchas que suponemos que son los dos posibles productos de la condensación. Los productos se purifican mediante cromatografía de columna en gel de sílice, empleando como eluyente una CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:AcOEt 14:1. El rendimiento para este paso de reacción es del 11,90% para 2,6-dihidroxi-4,4'-dimetoxidesoxibenzoína (I) y 48,35% para la 2,4-dihidroxi-6,4'-dimetoxidesoxibenzoína (II).

Observando los espectros de <sup>1</sup>H-RMN de cada producto (Fig. 4.47 y 4.48) es fácil saber cuál corresponde a cada uno de ellos ya que los protones del anillo A en la

estructura (I) aparecen como una sola señal a 5,99 ppm que integra por 2H al ser equivalentes los H del anillo, mientras que los protones de la estructura (II) aparecen como dos singletes a 5,95 y 6,02 ppm que integran por 1H cada uno.

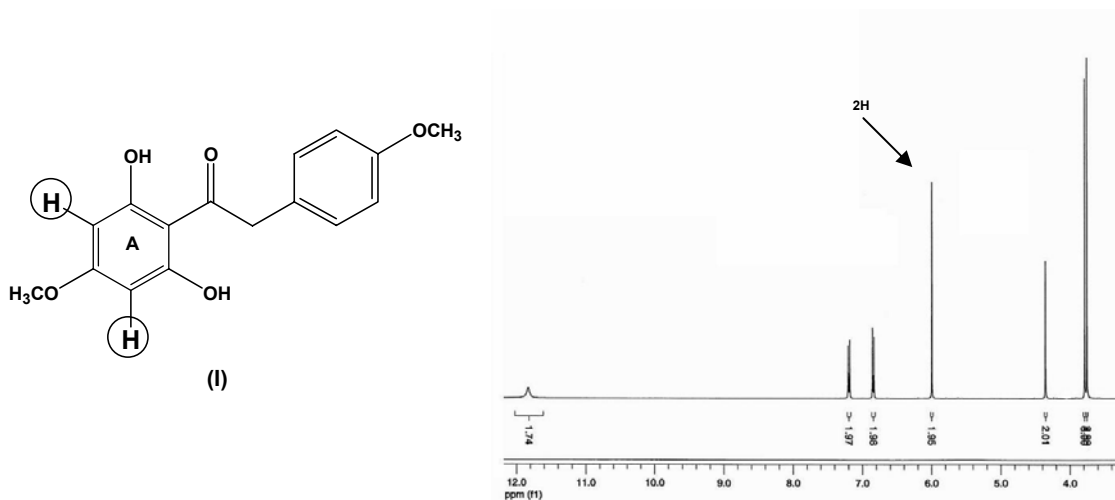


FIG. 4.47. <sup>1</sup>H-RMN de la 2,6-dihidroxi-4,4'-dimetoxidosoxibenzoína (I)

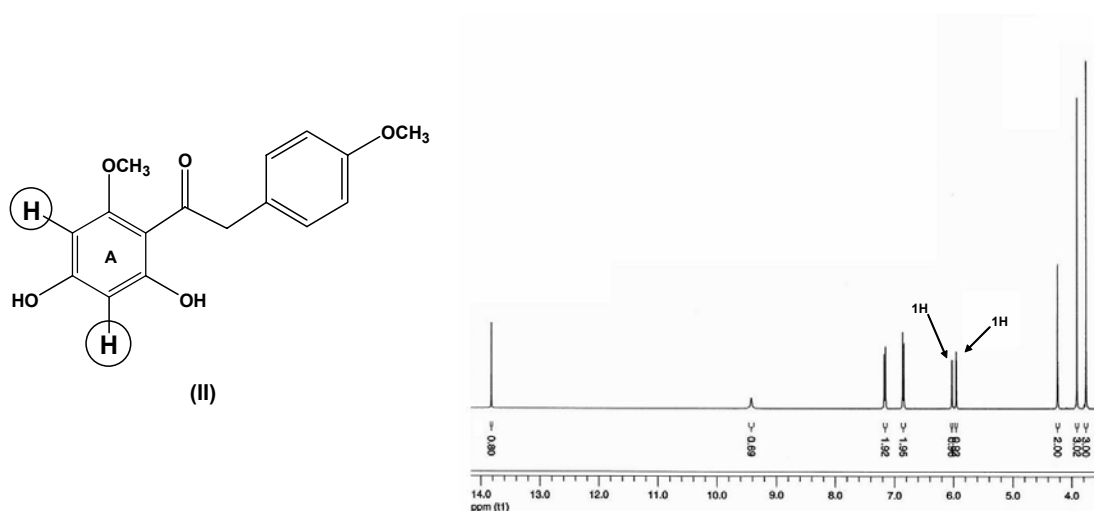


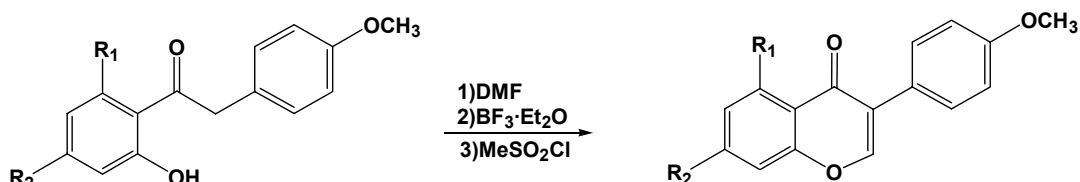
FIG. 4.48. <sup>1</sup>H-RMN de la 2,4-dihidroxi-6,4'-dimetoxidosoxibenzoína (II)

Sendos productos obtenidos se caracterizan mediante <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, IR que se recogen en el apartado 4.4 esta memoria.



#### 4.3.3.8. Síntesis de hidroxí-dimetoxiisoflavonas

La ruta sintética se siguió paralelamente en los dos productos obtenidos debido al interés de poseer los grupos OH diferentemente protegidos en las moléculas finales y estudiar su actividad.



Se sigue la misma metodología descrita en los apartados anteriores.

La tabla VIII recoge los resultados de todos los derivados sintetizados.

Los productos obtenidos se caracterizan mediante  $^1\text{H-RMN}$ ,  $^{13}\text{C-RMN}$ , IR que se recogen en el apartado 4.4 de esta memoria.

**Tabla VIII.** Resumen de condiciones de reacción y rendimientos de la síntesis de hidroxí-dimetoxiisoflavonas

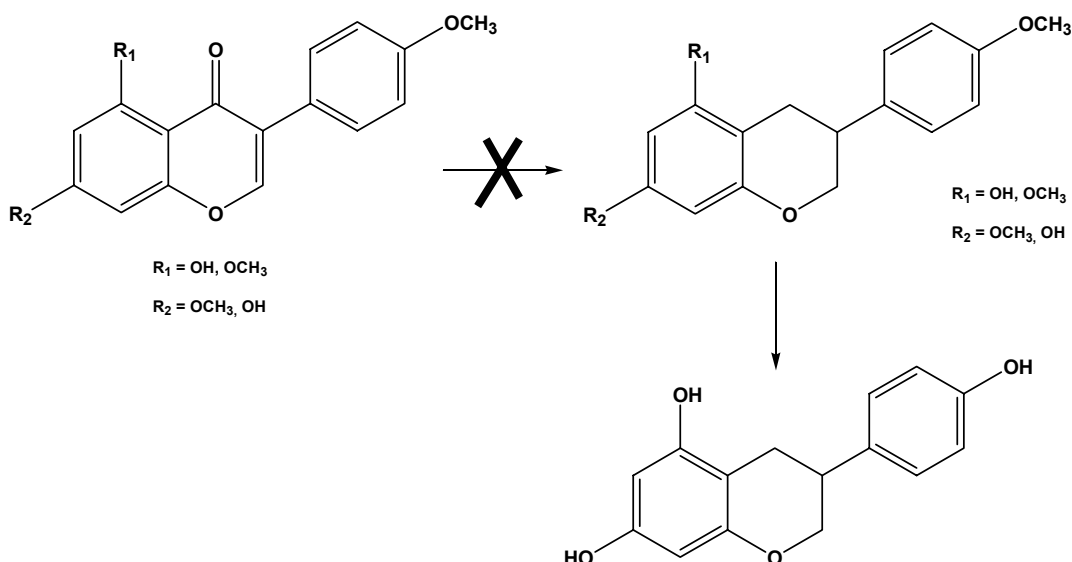
Producto	Tiempo de reacción	Condiciones de capa fina	<sup>(1)</sup> Purificación	<sup>(2)</sup> Rto.
<p><b>5-hidroxí-7,4'-dimetoxiisoflavona</b></p>	3 h.	$\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$ 7:2	Recristalización con etanol absoluto (EtOH)	78%
<p><b>7-hidroxí-5,4'-dimetoxiisoflavona</b></p>	3,5 h.	$\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$ 7:2	Cromatografía de columna en gel de sílice	61%

(1) En todos los casos se ensayaron tanto la purificación por columna como la recristalización. Para cada producto se recoge el método que ofrece mejores resultados.

(2) El rendimiento es en producto aislado.

#### 4.3.3.9. Síntesis de 5,7,4'-trihidroxiisoflavano

Lo que se pretende con este paso de reacción es la hidrogenación total de los derivados de la genisteína con los grupos OH protegidos y una vez hidrogenados proceder a su desprotección.



Para llevar a cabo este tipo de reducciones el disolvente se destilada y degasifica mediante corriente de argón. Se añade el catalizador y se sigue pasando corriente de argón durante 30 minutos para activarlo. Seguidamente se añade el producto que se quiere reducir y se hace atmósfera de hidrógeno. El sistema de agitación elegido en este caso es agitación mecánica utilizando un “shaker”, lo que permite una mejor mezcla del hidrógeno con el medio de reacción. Transcurridos 45 minutos y tras comprobar que todavía hay presencia del producto de partida, se deja reaccionando 3 horas más. La disolución se filtra a vacío y se lava el catalizador sucesivamente con EtOH. Se evapora el disolvente y se obtiene un sólido se seca en estufa de vacío. Se caracteriza mediante  $^1\text{H-RMN}$  y  $^{13}\text{C-RMN}$ . Se comprueba que no ha tenido lugar.

Por motivos de tiempo nos ha sido imposible llevar a cabo más intentos de reducción quedando abierta la idea para futuras investigaciones.

#### 4.3.4. Resolución con fase estacionaria quiral

Como se ha mencionado en los antecedentes, la técnica de HPLC con fases estacionarias quirales se ha utilizado con buenos resultados para la separación de enantiómeros del equol.<sup>75</sup> Por ello ha sido la técnica elegida para la separación de las mezclas racémicas de los productos obtenidos (DHD-OH-3' DHD, DHD-OH-3',5', equol y DHG).

##### 4.3.4.1. Elección de la columna

A la hora de abordar el problema de la separación por HPLC de los enantiómeros de los distintos isoflavonoides sintetizados, el primer paso es la elección de la columna a utilizar. En nuestro grupo, se disponían de distintas columnas analíticas comerciales, cuyas fases estacionarias quirales eran derivados de amilosa o celulosa fijados covalentemente sobre sílice, lo que permite el uso de disolventes clorados, que muchas veces mejoran las separaciones. Los polisacáridos utilizados como selectores quirales, diferentemente derivatizados como benzoatos o arilcarbamatos, se presentan en la figura 4.49. Todos ellos poseen, además, una cadena insaturada, 10-undecanoilo, distribuida a lo largo del polímero, lo que permite la fijación covalente a la sílice. Dicha cadena no ha sido representada en la figura para mayor claridad de la misma.

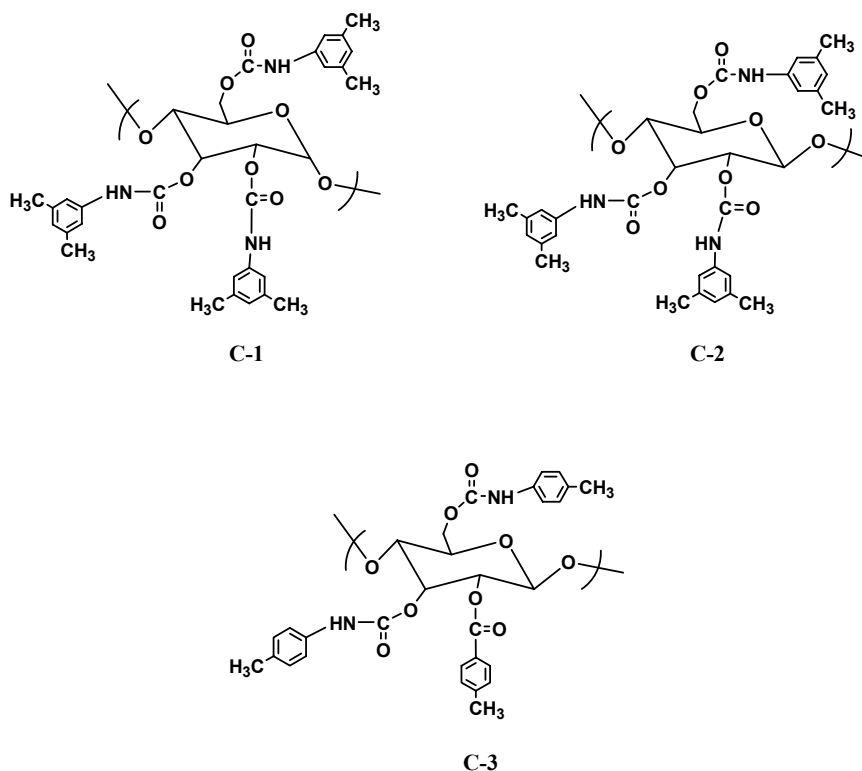


FIG. 4.49. Unidades monoméricas de los selectores quirales de cada columna

C-1: 10-undecanoato/3,5-dimetilfenilcarbamato de amilosa

C-2: 10-undecanoato/3,5-dimetilfenilcarbamato de celulosa

C-3: 10-undecanoato/p-metilbenzoato de celulosa

La primera columna que se probó fue la C-3 (Teknokroma TR-HPLC Chiral 5 $\mu$ m 15x0.46) con los productos dihidrodaidzeína y dihidrogenisteína. Los productos se resolvieron en sus enantiómeros obteniéndose una mayor pureza en los enantiómeros de la dihidrodaidzeína que en la dihidrogenisteína.

Posteriormente se probaron las columnas C-1 (Chiralpak 4,6 mm x 250 mm IB Daicel) y C-2 (Chiralpak 4,6 mm x 250 mm IA Daicel), siendo la primera inadecuada para la separación, ya que la columna no resolvía los compuestos en sus enantiómeros. Sin embargo, la C-2 no sólo resolvía los compuestos sino que además mejoraba la separación entre los picos. Por lo tanto fue ésta la columna que se empleó para separar los enantiómeros de todos los productos con quiralidad sintetizados en este trabajo.

#### 4.3.4.2. Condiciones de separación y obtención de los enantiómeros

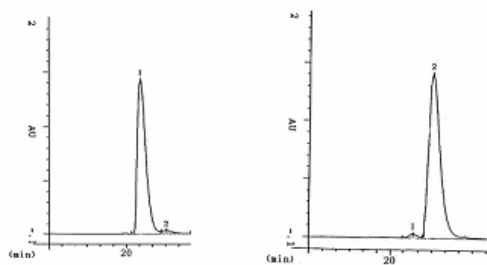
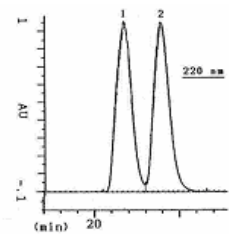
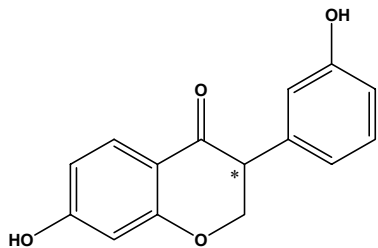
En todos los casos se inyectaron muestras de los compuestos disueltos en etanol en la misma columna (C2) ya que es con ésta con la que se consiguió la mejor separación.

En cada caso hubo que ajustar las condiciones de separación probando varias mezclas de disolventes hasta encontrar la mezcla apropiada para separar lo mejor posible los enantiómeros. En la mayoría de los casos se empleó una mezcla hexano:etanol en distintas proporciones, salvo en el caso de la DHD-OH-3',5' que fue necesario el empleo además de cloroformo para obtener una mejor separación de los picos. En general la adición de cloroformo produce afinamiento de los picos mejorando la resolución de la separación.

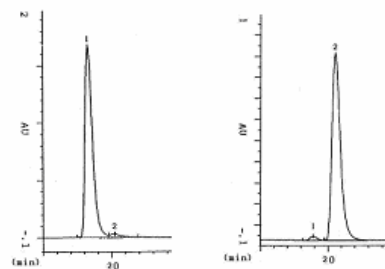
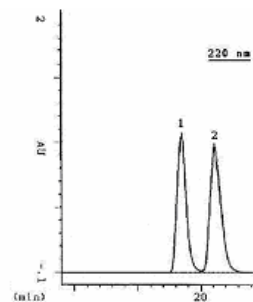
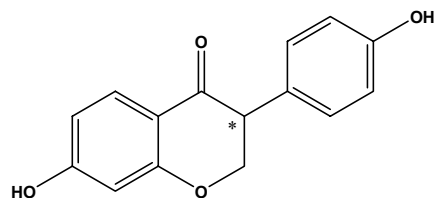
Seguidamente se visualizaron los cromatogramas a las dos longitudes de onda de máxima absorción de cada uno de los productos, observándose que con esta columna (C2) se obtenía una buena separación de cada uno de ellos.

A continuación se recogen los cromatogramas para los distintos productos.

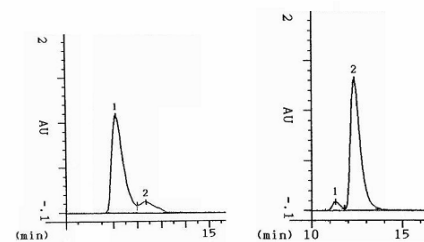
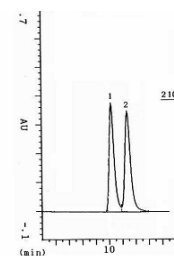
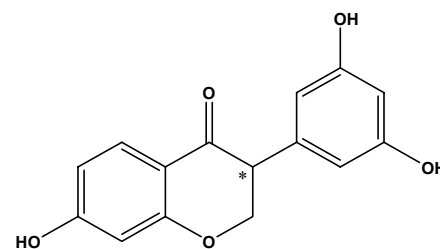
**7,3'-dihidroxiisoflavanona**  
**(DHD-OH-3')**



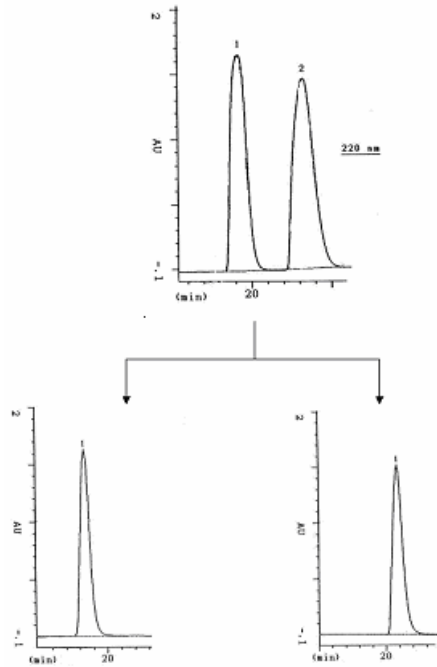
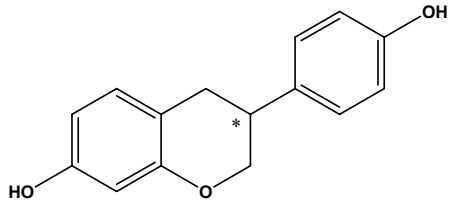
**7,4'-dihidroxiisoflavanona**  
**(DHD)**



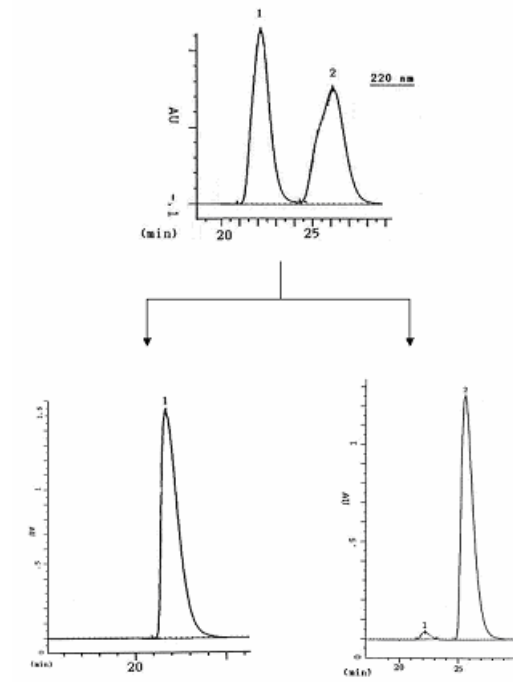
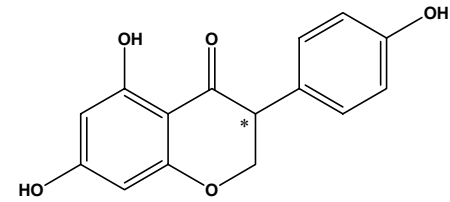
**7,3',5'-trihidroxiisoflavavona**  
**(DHD-OH-3',5')**



**7,4'-dihidroxiisoflavano  
(EQUOL)**



**5,7,4'-dihidroxiisofavanona  
(DHG)**



Estos resultados son los que se obtuvieron de la columna analítica, pero ya que nuestro objetivo era probar en los diferentes test biológicos los dos enantiómeros, necesitábamos obtener cierta cantidad de cada uno de ellos. Como se disponía de suficiente producto racémico se decidió hacer la separación en una columna semipreparativa. Ésto conllevaba unas pruebas iniciales de escalado y de carga, donde se encontraron problemas de solubilidad, ya que estos productos no son muy solubles en los disolventes que se emplean para su separación, lo que limitó en gran medida la concentración del producto inyectado.

Los detalles experimentales de las separaciones se recogen en el apartado 4.4.28.

El escalado del método a semipreparativo permitió la obtención de ambos enantiómeros por inyecciones sucesivas de muestra de los diferentes productos racémicos disueltos en etanol en la columna semipreparativa Chiralpack IA Daicel 20mm x 250mm, visualizando los cromatogramas a  $\lambda = 280$  nm.

Se recogieron las muestras eluidas a la salida del detector en tres fracciones: la primera y la última correspondientes a los dos picos puros y una fracción intermedia recogida entre la bajada del primer pico y la subida del segundo con mezclas de ambos enantiómeros. Se juntaron y evaporaron todas las fracciones recogidas de cada producto.

Finalmente, se cromatografiaron ambas fracciones por separado, en las mismas condiciones, para comprobar la eficacia de la separación.

#### 4.3.4.3. Medida de la rotación óptica, dicroísmo circular y asignación de la configuración absoluta

Algunas de las moléculas sintetizadas en este trabajo ya habían sido descritas con anterioridad, como es el caso del equol, dihidroaidzeína y dihidrogenisteína<sup>75, 90</sup>, para las cuales una simple medida del poder óptico rotatorio nos permitiría asignar la configuración de los enantiómeros separados por HPLC.

Sin embargo, este proceso de asignación de configuraciones absolutas no resulta evidente para el resto de los compuestos sintetizados. Por ello se decidió realizar junto con la medida del poder óptico rotatorio un estudio de dicroísmo circular.

Los poderes ópticos rotatorios de los enantiómeros separados se midieron a 25°C y en concentraciones 7mg/ml.

Se realizaron 20 medidas de cada muestra haciendo una media para calcular el valor de  $(\alpha)_D$  según la fórmula:  $(\alpha)_D = \alpha_o/lc \times 100$ ,

siendo  $\alpha_o$  el valor dado por el aparato

l, la longitud de la celda en dm =1

c, la concentración de la sustancia en g/100 ml

A continuación se recogen los resultados así como las conclusiones de asignación de la configuración absoluta en cada caso, comenzando por los compuestos ya descritos en la literatura.

### EQUOL

El primer pico eluido presentó una rotación específica de signo positivo ( $\alpha_D = +20,39$ ) que según la literatura corresponde al isómero *R*. Además, el espectro de dicroísmo circular obtenido muestra un efecto Cotton positivo a 280 nm (Fig. 4.50), coincidente también con lo descrito en la literatura para este enantiómero<sup>75</sup>.

El segundo pico eluido presentó una rotación específica de signo negativo ( $\alpha_D = -20,39$ ) y un espectro de dicroísmo circular imagen especular del anterior por lo que se asignó como el enantiómero *S*.

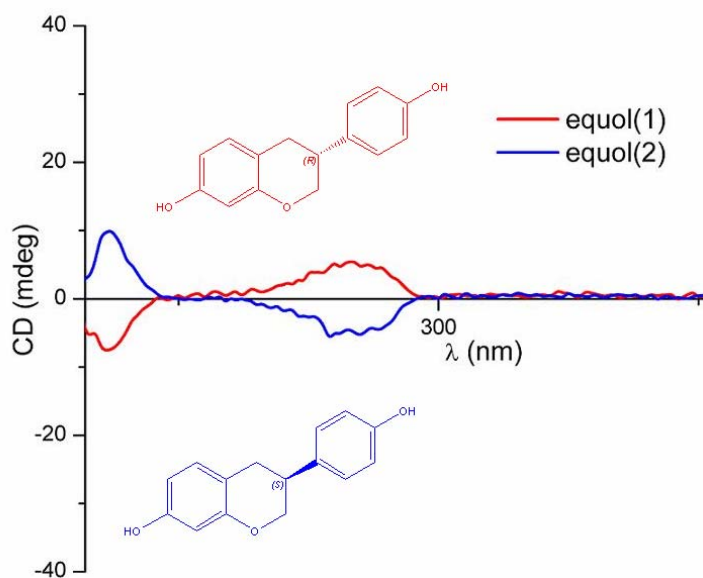


FIG. 4.50. Espectro de dicroísmo circular (CD) del equol



## DERIVADOS DE DAIDZEÍNA

En primer lugar se comentarán los resultados referentes a la daidzeína. El primer pico eluido presenta una rotación específica de signo negativo ( $\alpha_D = -46,0$ ) y un espectro de dicroísmo circular con un efecto Cotton positivo a 280 nm y un efecto Cotton negativo a 325 nm (Fig. 4.51).

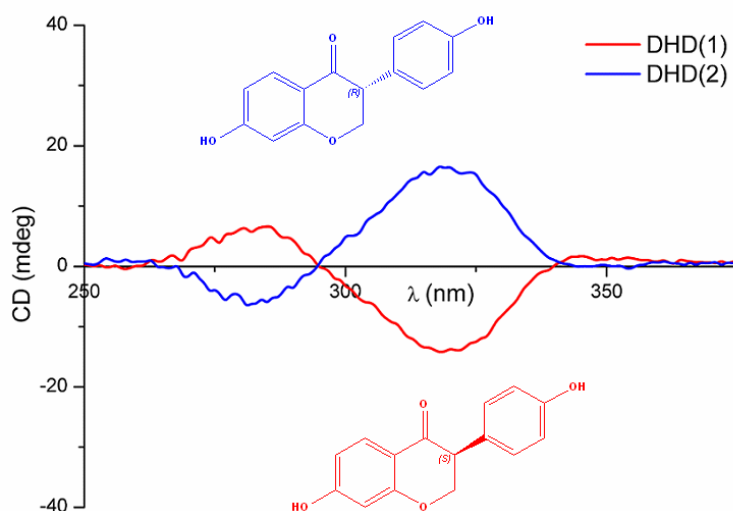


FIG. 4.51. Espectro de dicroísmo circular (CD) de DHD

Como se ha comentado con anterioridad, existían datos bibliográficos sobre la asignación de configuraciones absolutas para la dihidrodaidzeína. Sin embargo, dichos resultados no ofrecían una garantía suficiente al haberse detectado un error a la hora de asignar gráficamente las configuraciones absolutas de los carbonos asimétricos. Por ello, para la asignación de la configuración absoluta de este producto se decidió hidrogenar una muestra para la obtención de equol.

La hidrogenación del producto que llamamos DHD(1) por eluir en primer lugar, dio como resultado equol al que se midió el poder óptico rotatorio y proporcionó un valor de rotación específica de signo negativo, correspondiente al isómero S (Fig. 4.52).

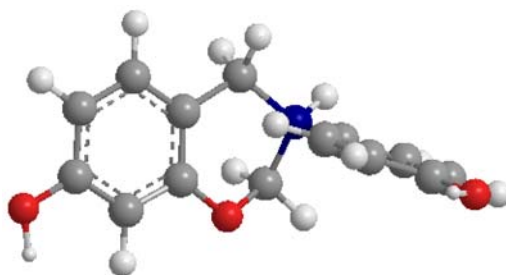
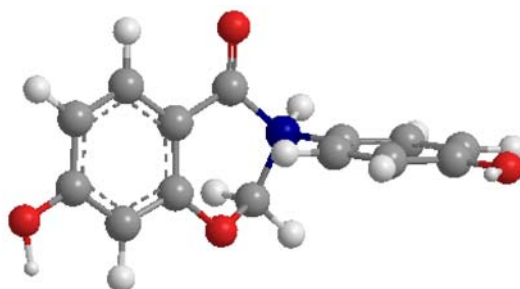


FIG. 4.52. Isómero S del equol

Debido a que en la hidrogenación se mantiene en la dihidroaidzeína la distribución espacial de los grupos en el carbono estereogénico se puede asignar la configuración *S* al enantiómero que eluye en primer lugar (Fig. 4.53).



**FIG. 4.53.** Isómero *S* de la DHD

Revisando la literatura, estos datos coinciden con las conclusiones del artículo de Lévai<sup>95</sup> en el que postula un efecto Cotton negativo para las transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  que aparecen a una longitud de onda entre 325-352 nm y que se corresponde con el isómero (*S*).

Por lo tanto el pico que eluye en segundo lugar será el isómero (*R*) con una rotación específica de signo positivo ( $\alpha_D = +41,9$ ).

Una posible explicación para entender las diferencias encontradas en los valores de los poderes ópticos rotatorios de ambos enantiómeros puede ser la presencia de impurezas. Como se ha comentado anteriormente de la separación no se pudieron obtener los enantiómeros puros al 100% encontrándose una pequeña proporción del otro enantiómero, lo cual interfiere en la medida.

Asignada la configuración de los isómeros de la DHD y basándonos en el artículo de Lévai<sup>95</sup>, se podría asignar mediante los espectros de dicroísmo circular como enantiómeros (*R*) todos aquellos productos de la misma familia que presenten un efecto Cotton positivo a 325-352 nm.

En las figuras 4.54 y 4.55 se representan los espectros de dicroísmo circular de la DHD-OH-3' y DHD-OH-3',5'.

<sup>95</sup> Lévai A. *Acta Chim. Slov.* **1998**;45(3):267-284.

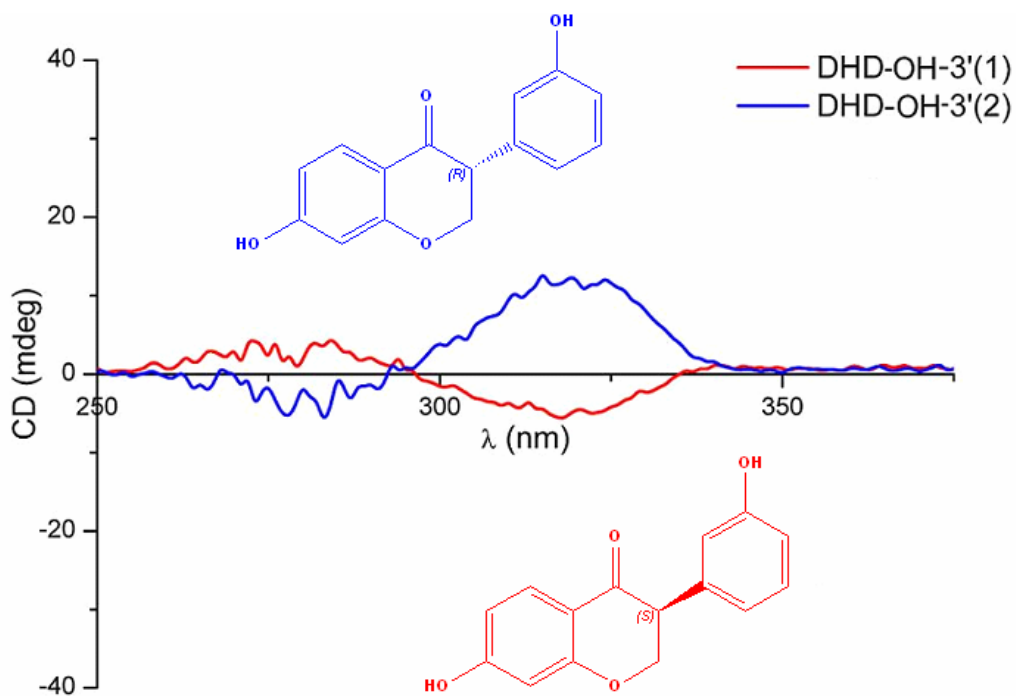


FIG. 4.54. Espectro de dicroísmo circular (CD) de DHD-OH-3'

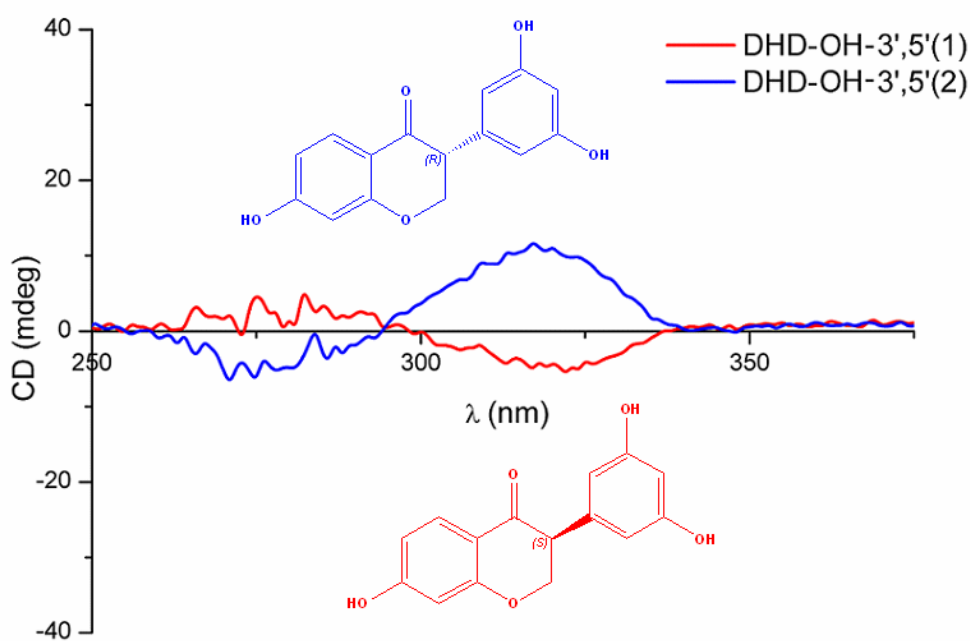


FIG. 4.55. Espectro de dicroísmo circular (CD) de DHD-OH-3',5'

## DIHIDROGENISTEÍNA

Para la dihidrogenisteína se observó que el enantiómero que eluye en primer lugar posee una rotación específica menor que 0 ( $\alpha_D = -28,90$ ) y presenta un espectro de dicroísmo circular con un efecto Cotton negativo entre 325-350nm. Por comparación con los resultados obtenidos en el caso de la dihidroaidzeína y teniendo en cuenta que el cromóforo en todos ellos no varía, sólo cambia la posición de los sustituyentes, se podría asignar tentativamente a este producto una configuración (S). Además coincide con lo descrito en el artículo de Lévai para isoflavonas<sup>95</sup>.

Por lo tanto, el pico que eluye en segundo lugar y presenta una rotación específica positiva ( $\alpha_D = +25,3$ ), correspondería al enantiómero R (Fig. 4.56).

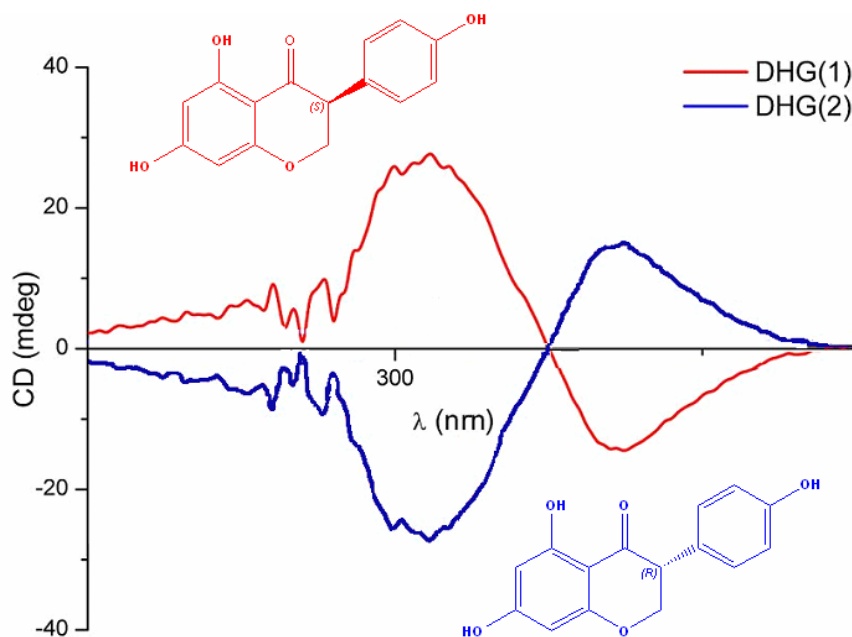


FIG. 4.56. Espectro de dicroísmo circular (CD) de DHG

## **4.4. MÉTODOS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS SINTETIZADOS**



#### 4.4.1 Descripción de los aparatos utilizados

Los equipos utilizados en las diferentes técnicas desarrolladas en este capítulo fueron los siguientes:

Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN se llevaron a cabo en un Bruker ARX (300 MHz).

Para las separaciones de los correspondientes enantiómeros se emplearon cromatógrafos Waters 600E con detector de fotodiodos 996 y Waters 610 con detector de UV 486.

Para la realización de los espectros de IR se empleó un espectrofotómetro ATI Mattson FTIR.

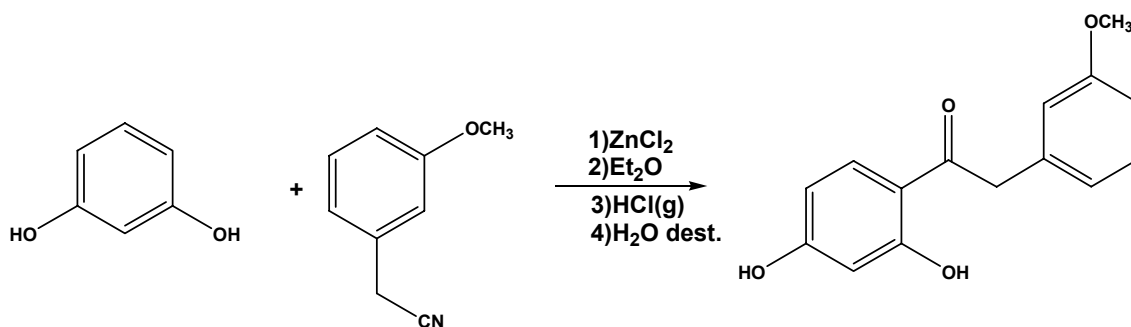
La polarimetría se realizó en un polarímetro Jasco P 1020.

Los dicroísmos fueron realizados en un espectrofotómetro Jasco J 810.

Para hallar el punto de fusión se empleó un analizador Büchi 510 y Sanyo Gallenkamp PLC.

El análisis elemental se llevó a cabo en un analizador elemental de C, H, N, S Perkin Elmer 2400.

#### 4.4.2. Síntesis de 2,4-dihidroxi-3'-metoxidesoxibenzoína [D-OH-3' (I)]



En un matraz de dos bocas, previamente secado en estufa, se disuelven 11 g. (0,10 moles) de resorcinol (1,3-dihidroxibenceno) en 40 ml de éter dietílico seco. Una vez disuelto todo el resorcinol se añaden 4 g. (0,03 moles) de cloruro de zinc anhidro. Sobre la mezcla agitada y enfriada en baño de hielo se añade con un embudo de adición durante 1 hora una disolución de 15 g. (0,10 moles) de 3-metoxifenilacetoniitrilo disueltos en 25 ml de éter dietílico. A continuación se borbotea cloruro de hidrógeno gas sobre la mezcla de reacción durante 5 horas.

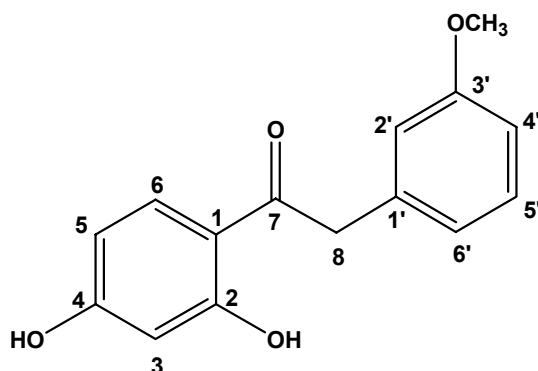
Transcurrido este tiempo se deja la reacción a temperatura ambiente durante 14 horas. Se decanta el éter sobrante y se añaden 300 ml de agua destilada y la mezcla se mantiene a reflujo ( $110^\circ\text{C}$ ) durante 2 horas.

Al dejar enfriar durante varias horas, precipita el producto sólido que se filtra, se lava con agua destilada fría y se seca en estufa de vacío en presencia de pentóxido de fósforo a  $50^\circ\text{C}$ . El producto se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice empleando las mismas condiciones de elución que en la capa fina.

Se obtienen 12,91 g. (0,05 moles) de un sólido que es la 2,4-dihidroxi-3'-metoxidesoxibenzoína, lo que representa un rendimiento del 50%.



El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

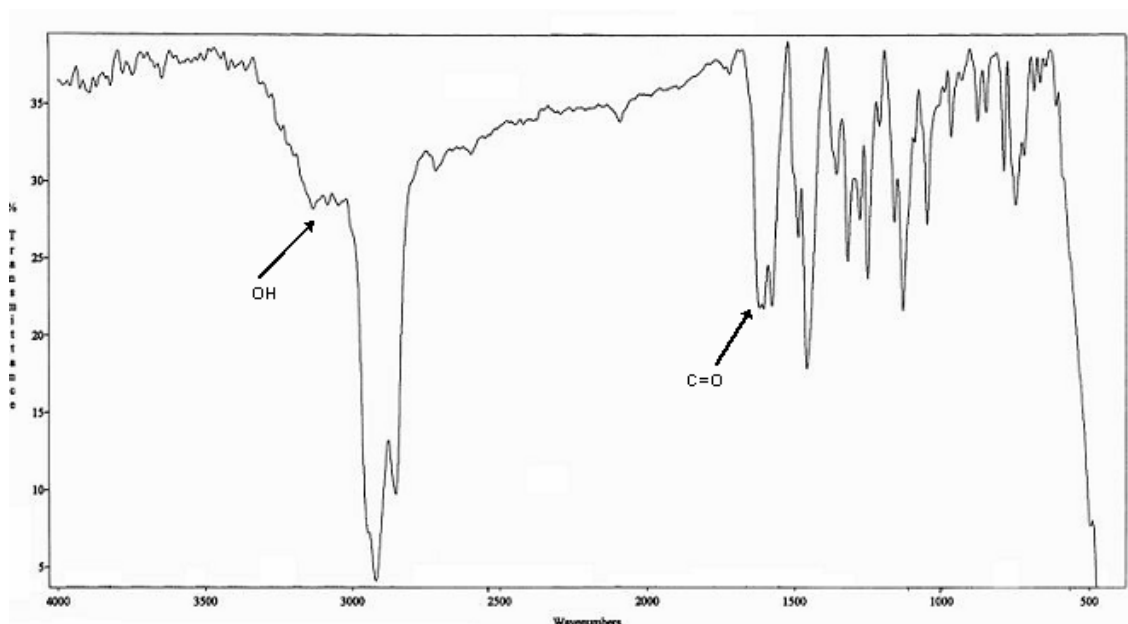


### 1.- Análisis elemental al producto:

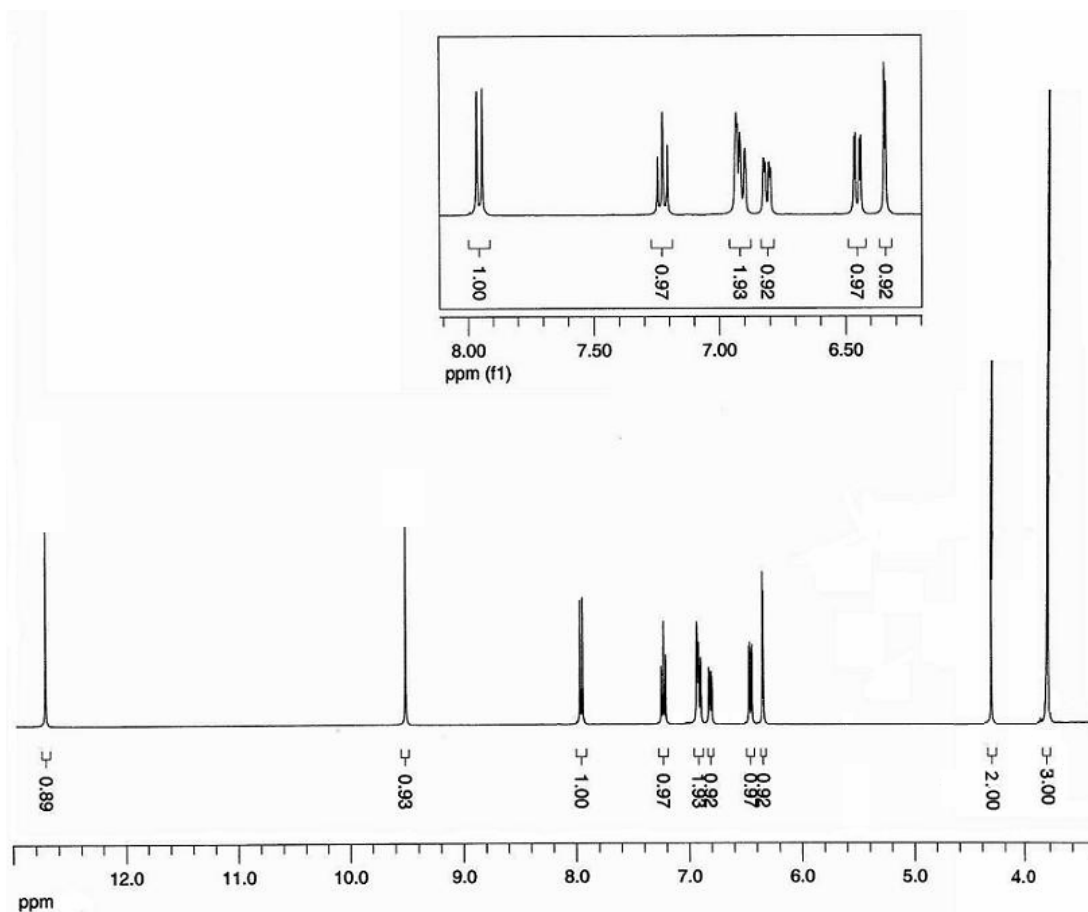
<i>VALOR CALCULADO</i>	<i>VALOR OBSERVADO</i>
C = 69,76%	C = 68,31%
H = 5,46%	H = 4,54%
O = 24,78%	O = 27,15%

### 2.- Punto de fusión: °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3133 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1620 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)

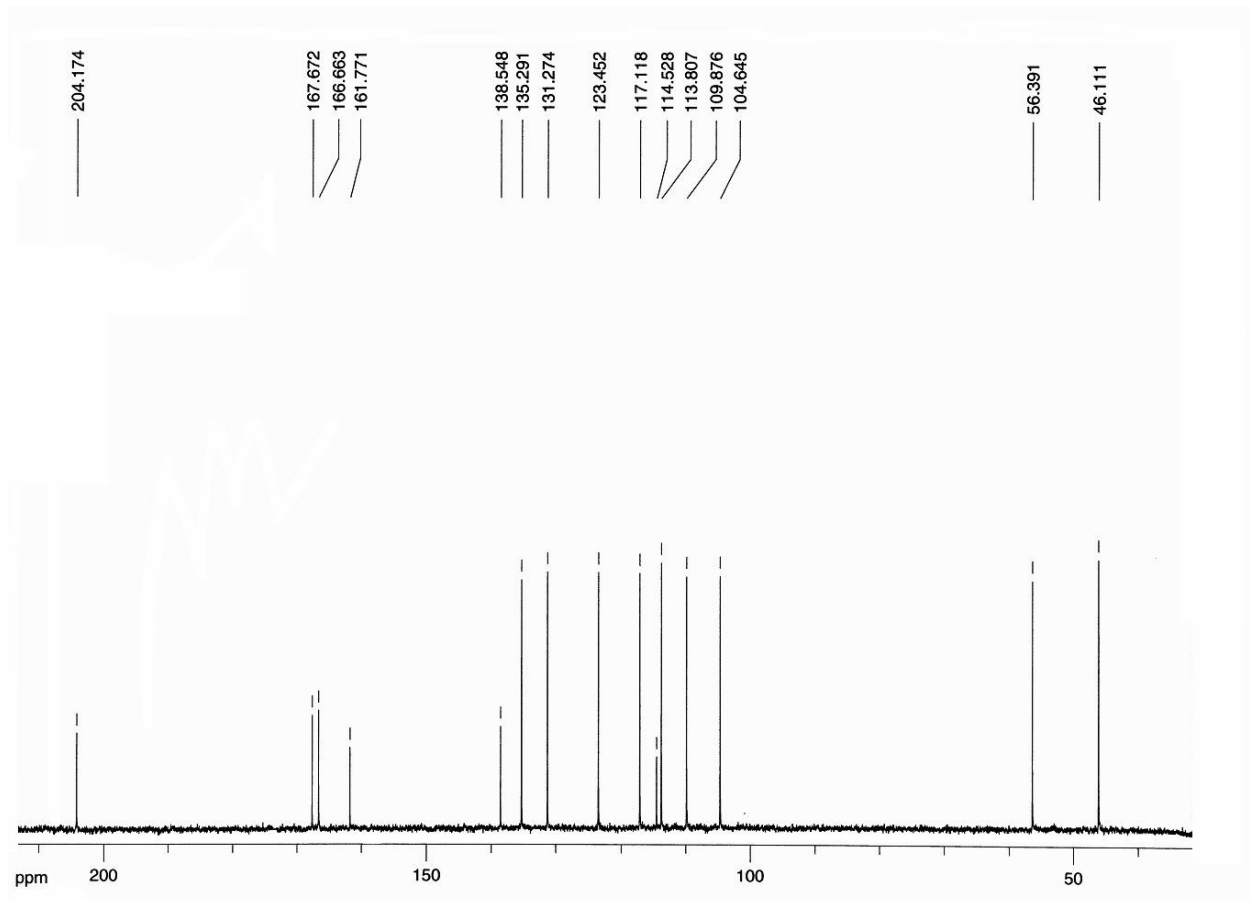


### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.57 y 4.58).



**<sup>1</sup>H-RMN(d<sub>6</sub>- acetona, δ ppm):** 3,72 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4,22 (s, 2H, H8), 6,30 (s, 1H, Ph-H3), 6,42 (d, 1H, Ph-H5, J=8,8 Hz), 6,78 (m, 1H, Ph-H6'), 6,90 (m, 2H, Ph-H2', Ph-H4') 7,19 (dd, 1H, Ph-H5', J=7,8Hz), 7,91 (d, 1H, Ph-H6, J=8,8Hz), 9,47 (s, 1H, OH), 12,68 (s, 1H, OH)

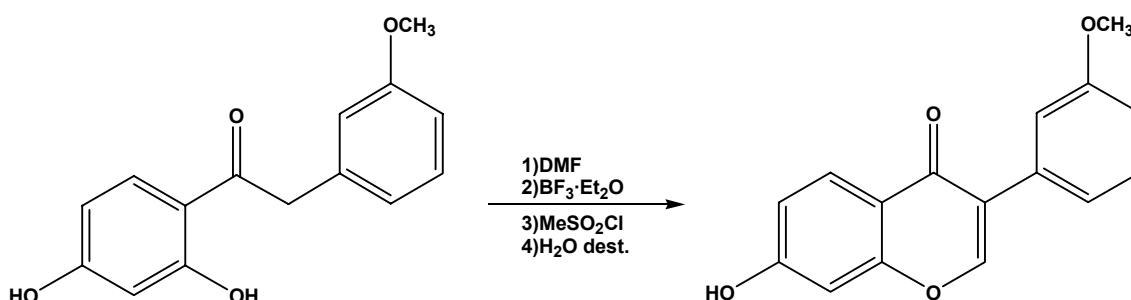
FIG. 4.57. <sup>1</sup>H-RMN de [D-OH-3'] (I)



**<sup>13</sup>C-RMN(*d*<sub>6</sub>-acetona, δ ppm):** 46,11 (C8), 56,39 (OCH3), 104,64 (C3), 109,87 (C5), 113,80 (C4'), 114,53 (C2'), 117,11 (C1), 123,45 (C6'), 131,27 (C5'), 135,29 (C6), 138,54 (C1'), 161,77 (C3'), 166,66 (C2), 167,67 (C4), 204,17 (C7)

FIG. 4.58. <sup>13</sup>C-RMN de [D-OH-3' (I)]

#### 4.4.3. Síntesis de 7-hidroxi-3'-metoxiisoflavona [D-OH-3' (II)]



En un matraz de dos bocas, previamente secado en estufa, se disuelven 10 g. (38,76 mmol) del producto obtenido en el primer paso de reacción, 2,4-dihidroxi-3'-metoxidesoxibenzoína, en 170 ml de dimetilformamida seca bajo atmósfera de argón. Se añaden con jeringuilla 20 ml (4 equivalentes) de trifluoruro de boro-éter.

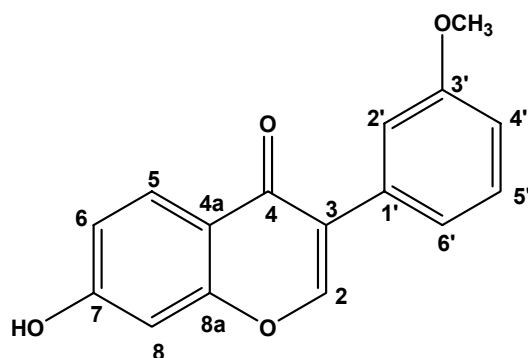
La mezcla de reacción se calienta a  $50^\circ\text{C}$  y se añade una disolución de cloruro de metansulfonilo (9 ml, 3 equivalentes) en dimetilformamida seca (90 ml). Una vez añadida la disolución se eleva la temperatura a  $100^\circ\text{C}$  y se deja progresar la reacción.

La reacción se sigue por capa fina (se toma una alícuota, se rompe el complejo con agua destilada y se extrae con éter), eluyendo con una mezcla 7:2  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :AcOEt.

Transcurridas 3,5 horas de reacción se deja enfriar y se vierte la mezcla de reacción sobre 700 ml de agua destilada muy fría. Precipita un sólido que se filtra a vacío, se lava con agua destilada fría, se seca en estufa de vacío en presencia de pentóxido de fósforo a  $50^\circ\text{C}$  y se purifica el producto por cromatografía de columna en gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :AcOEt 7:2.

Así se obtienen 8,50 g. (31,71 mmol) de un sólido que resultó ser la 7-hidroxi-3'-metoxiisoflavona lo que representa un rendimiento del 82%.

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

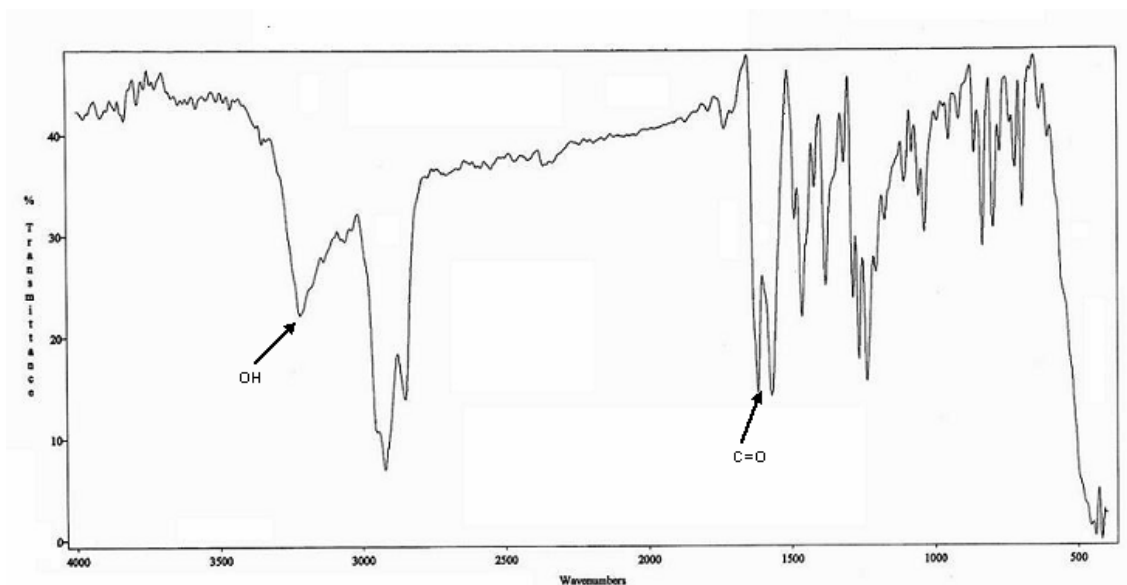


### 1.- Análisis elemental al producto:

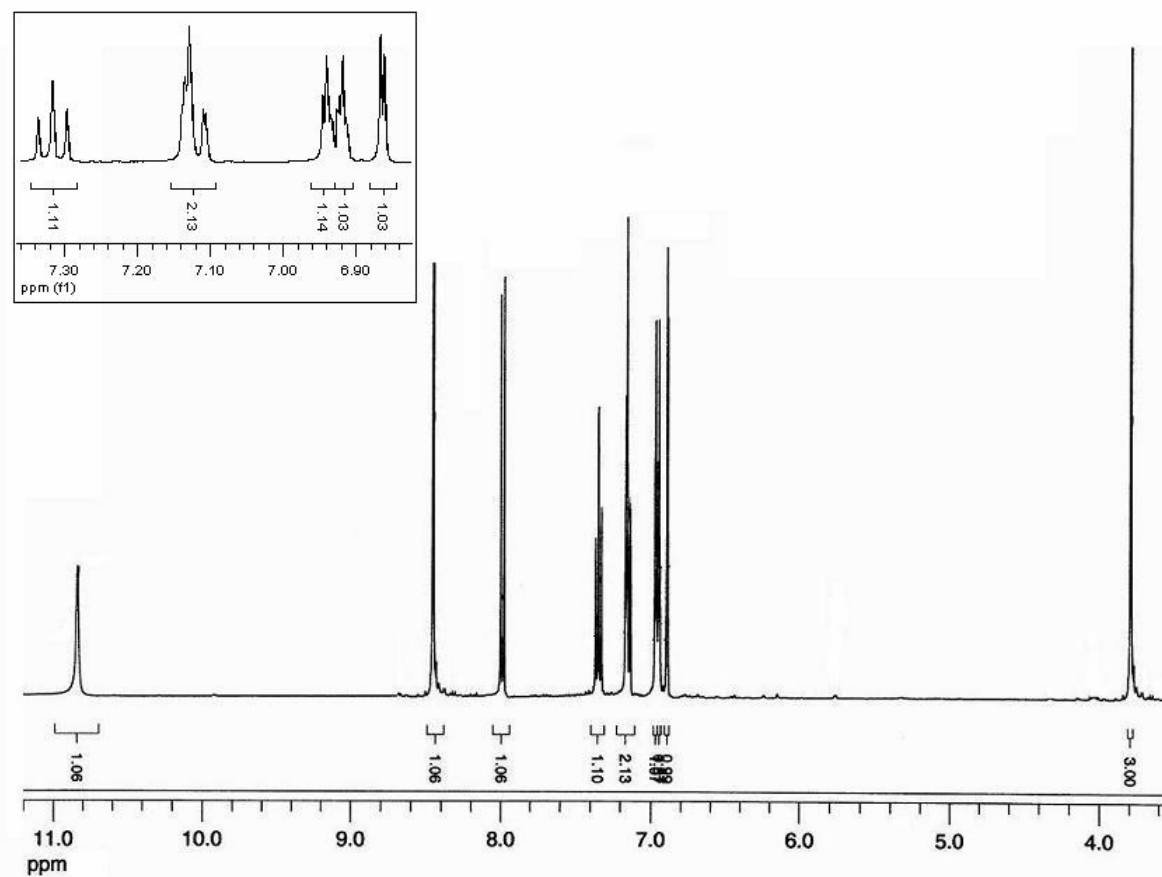
VALOR CALCULADO	VALOR OBSERVADO
C = 71,64 %	C = 70,89 %
H = 4,51 %	H = 4,25 %
O = 23,86 %	O = 24,86 %

### 2.- Punto de fusión: °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3219 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1619 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)

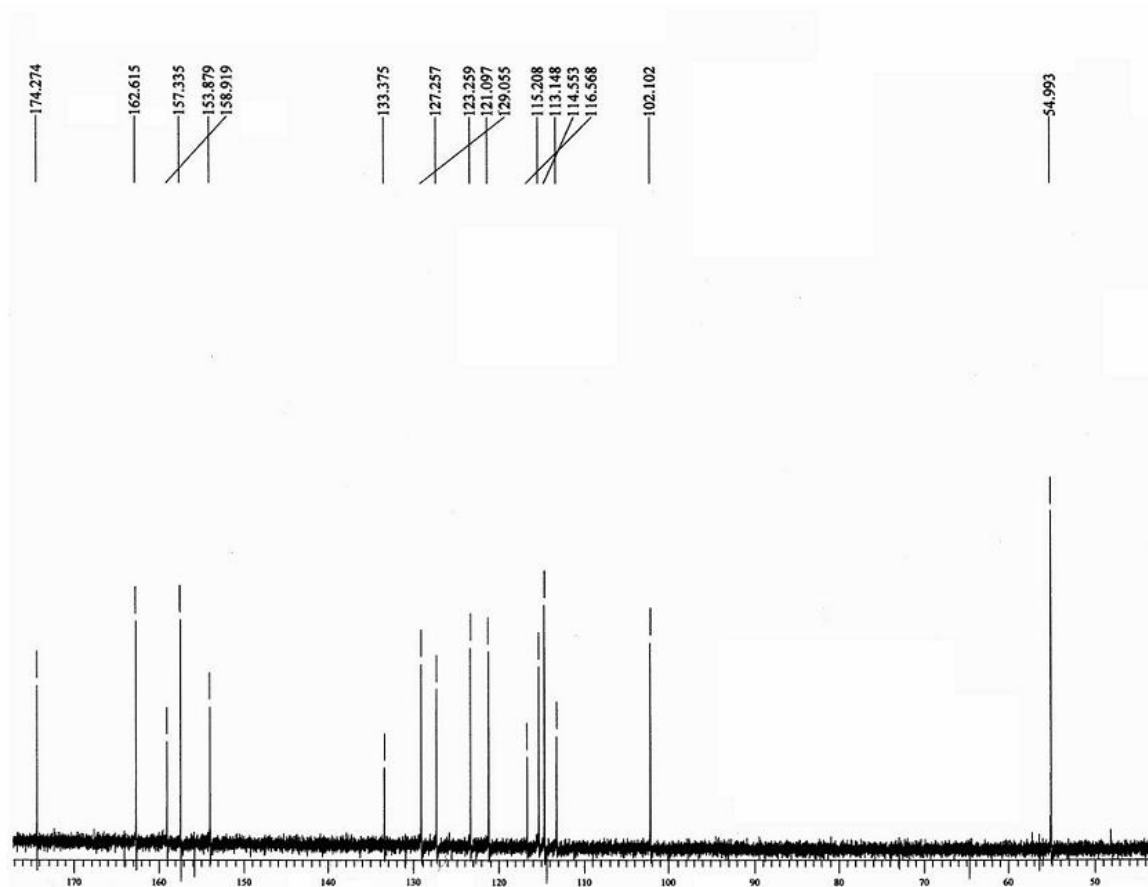


### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.59 y 4.60).



**$^1\text{H}$ -RMN( $d_6$ -DMSO,  $\delta$  ppm):** 3,78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6,88 (s, 1H, Ph-H8), 6,93 (d, 1H, Ph-H6, J=8,8 Hz), 6,95-6,96 (m, 1H, Ph-H6'), 7,12-7,15 (m, 2H, Ph-H2', Ph-H4'), 7,33 (dd, 1H, Ph-H5', J=7,8 Hz), 7,98 (d, 1H, Ph-H5, J=8,8 Hz), 8,40 (s, 1H, H2), 10,83 (s, 1H, OH)

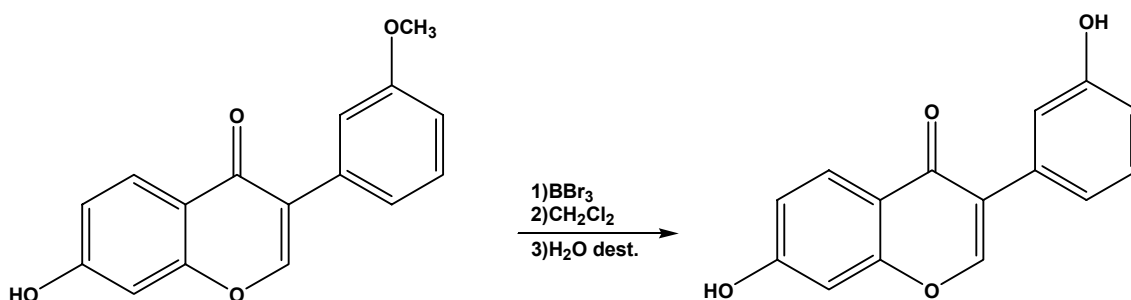
FIG. 4.59.  $^1\text{H}$ -RMN de [D-OH-3' (II)]



**<sup>13</sup>C-RMN(d<sub>6</sub>- DMSO, δ ppm):** 54,99 (OCH<sub>3</sub>), 102,10 (C8), 113,15 (C4'), 114,55 (C2'), 115,21 (C6), 116,57 (C4a), 121,1 (C6'), 123,26 (C3), 127,26 (C5), 129,06 (C5'), 133,37 (C1'), 153,88 (C2), 157,33 (C8a), 158,92 (C3'), 162,61 (C7), 174,27 (C4)

**FIG. 4.60.** <sup>13</sup>C-RMN de [D-OH-3' (II)]

#### 4.4.4. Síntesis de 7,3'-dihidroxiisoflavona [D-OH-3']



En un matraz de dos bocas, previamente secado en estufa, se disuelven 8,52 g. (31,8 mmol) del producto de la reacción anterior, 7-hidroxi-3'-metoxiisoflavona, en 200 ml de diclorometano seco bajo atmósfera de argón. Se añaden, gota a gota, con embudo de adición, 80 ml (2,5 equivalentes) de tribromuro de boro disolución 1M en cloruro de metileno. La reacción se deja progresar a temperatura ambiente durante 27 horas hasta que por capa fina se comprueba que no existe avance de la misma o que el producto de partida ha reaccionado por completo (se toma una alícuota, se rompe el complejo con agua destilada y se extrae con éter), eluyendo con una mezcla 7:2  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :AcOEt.

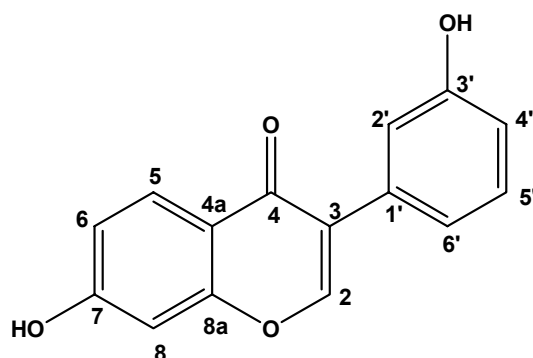
Se evapora el diclorometano y la mezcla de reacción se somete a reflujo de agua destilada (500 ml, 110°C) durante 4 horas. De esta manera se hidroliza el exceso de reactivo y el complejo de boro.

La mezcla se deja enfriar, precipitando un sólido que se filtra a vacío, se lava con agua destilada fría y se seca en estufa de vacío en presencia de pentóxido de fósforo a 50°C. El producto se purifica primero por lavados con etanol absoluto y seguidamente por cromatografía de columna en gel de sílice empleando el mismo eluyente que para la capa fina, obteniéndose un sólido que resultó ser el producto.

Así se obtienen 4,81 g. (18,89 mmol) de un sólido que resultó ser la 7,3'-dihidroxiisoflavona que representa un rendimiento del 60%.



El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

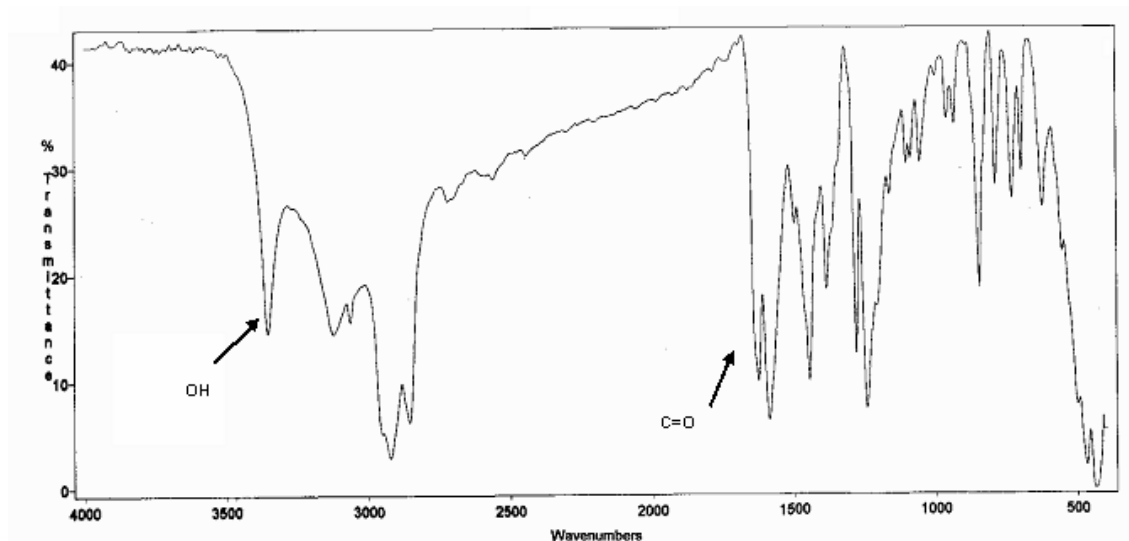


### 1.- Análisis elemental al producto:

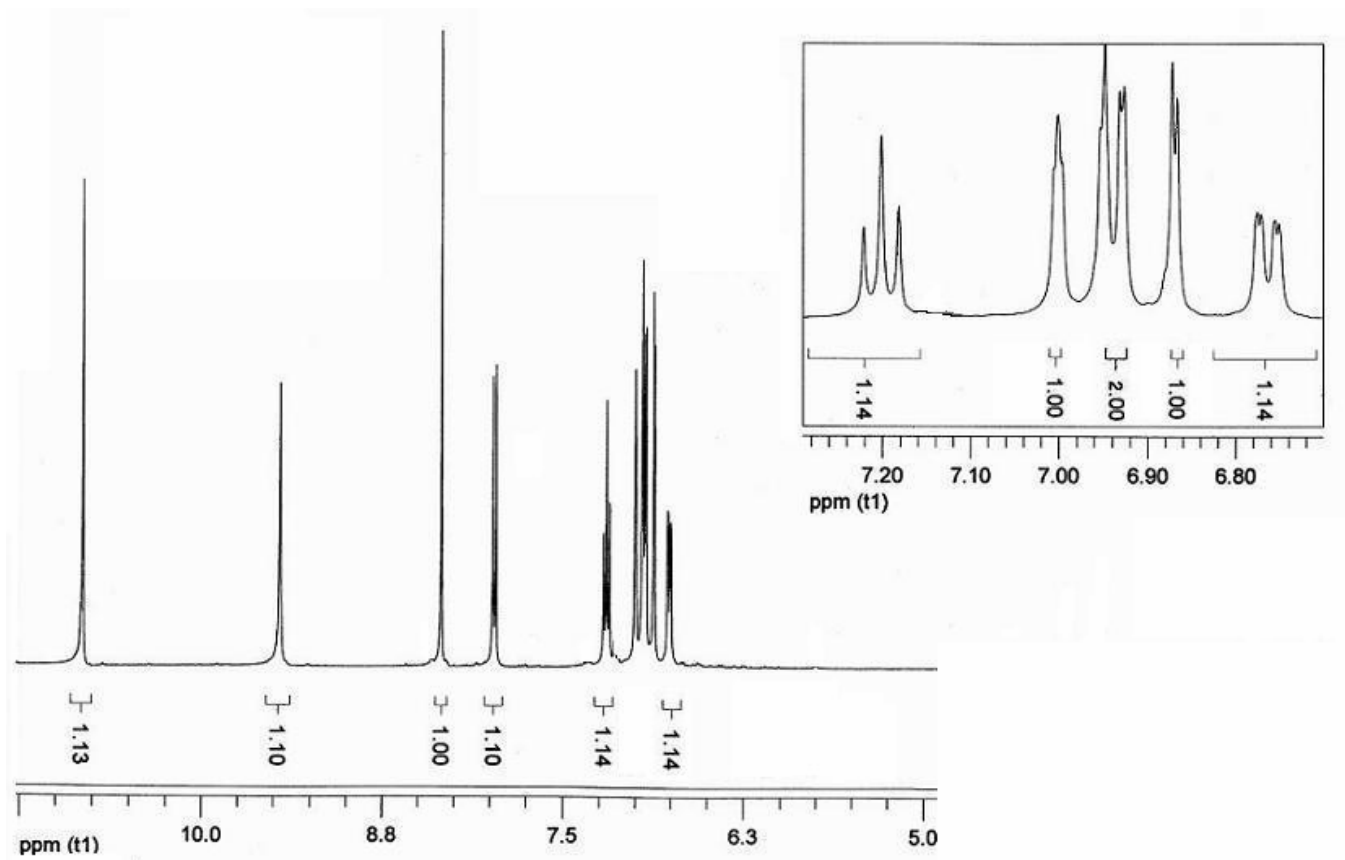
VALOR CALCULADO	VALOR OBSERVADO
C = 70,86 %	C = 71,12 %
H = 3,96 %	H = 4,05 %
O = 25,17 %	O = 24,83 %

### 2.- Punto de fusión: °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3355 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1623 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)

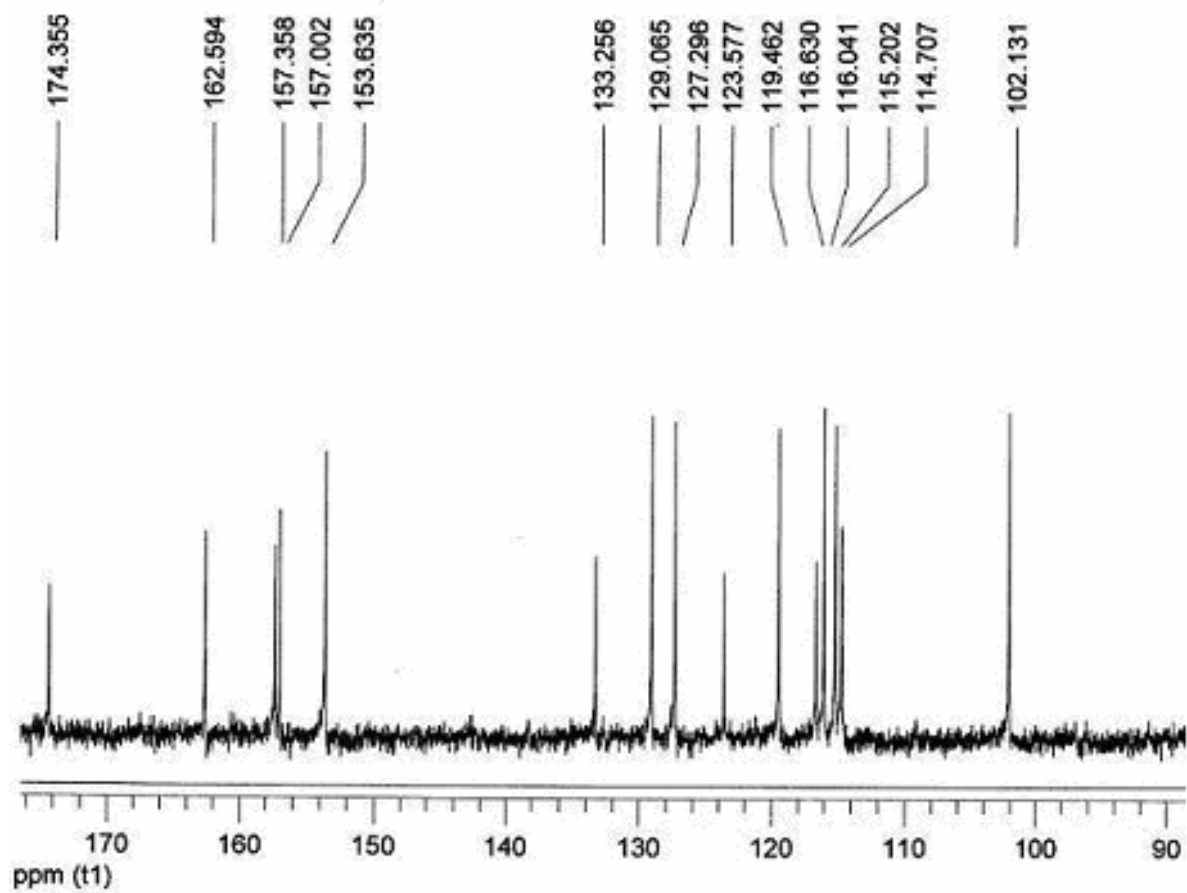


### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.61 y 4.62).



**<sup>1</sup>H-RMN(d<sub>6</sub>- DMSO, δ ppm):** 6,72-6,80 (m, 1H, Ph-H8), 6,88-6,90, (m, 1H, Ph-H6), 6,92-6,96 (m, 2H, Ph-H2', Ph-H4'), 7,00-7,20 (m, 1H, Ph-H6'), 7,21 (dd, 1H, Ph-H5', J=7,8 Hz), 7,97 (d, 1H, Ph-H5, J=8,7 Hz) 8,34 (s, 1H, H2), 9,46 (s, 1H, OH), 10,82 (s, 1H, OH)

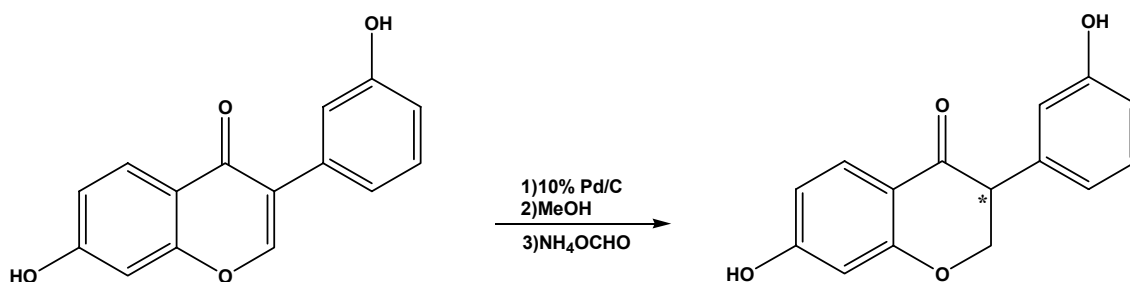
**FIG. 4.61.** <sup>1</sup>H-RMN de [D-OH-3']



<sup>3</sup>C-RMN(*d*<sub>6</sub>- DMSO, δ ppm): 102,13 (C8), 114,71 (C6), 115,20 (C2'), 116,04 (C4'), 116,63 (C4a), 119,46 (C6'), 123,57 (C3), 127,29 (C5), 129,06 (C5'), 133,25 (C1'), 153,63 (C2), 157,01 (C3'), 157,36 (C8a), 162,59 (C7), 174,35 (C4)

FIG. 4.62. <sup>13</sup>C-RMN de [D-OH-3']

#### 4.4.5. Síntesis de 7,3'-dihidroxiisoflavanona [DHD-OH-3']

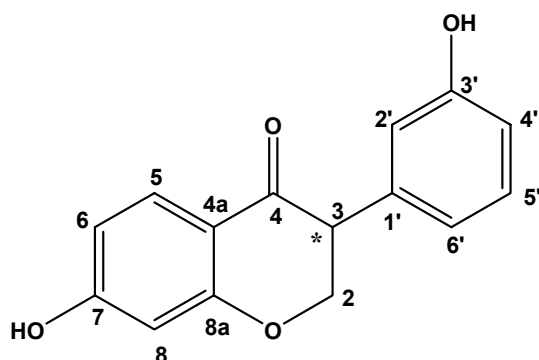


En un matraz de dos bocas, previamente secado en estufa, se añaden 40 ml de metanol seco y 0,50 g. de 10% Pd/C. Con un borboteador se pasa corriente de argón durante 30 minutos para activar el catalizador. En otro matraz se disuelven en 120 ml de metanol seco 0,49 g. (7,87 mmol) de formiato de amonio ( $\text{HCOONH}_4$ ) y 0,50 g. (1,98 mmol) del producto de la reacción anterior, 7,3'-dihidroxiisoflavona. Se añade esta última disolución a la disolución que contiene el catalizador y se deja la reacción en atmósfera de argón. La mezcla de reacción se somete a reflujo ( $80^\circ\text{C}$ ) y se deja progresar durante 3 horas. Se comprueba por capa fina que ha reaccionado todo el producto de partida tomando una alícuota del crudo de reacción, eluyendo con una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$  8:2.

La mezcla se deja enfriar y se filtra sobre papel de filtro. Es necesario lavar con abundante cantidad de metanol para recuperar todo el producto. Se obtiene un sólido que se seca en estufa de vacío en presencia de pentóxido de fósforo a  $50^\circ\text{C}$ . El producto se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$  8:2.

Se obtienen así 0,24 g (0,94 mmol) de un sólido que resultó ser la 7,3'-dihidroxiisoflavanona que representa un rendimiento del 50%.

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

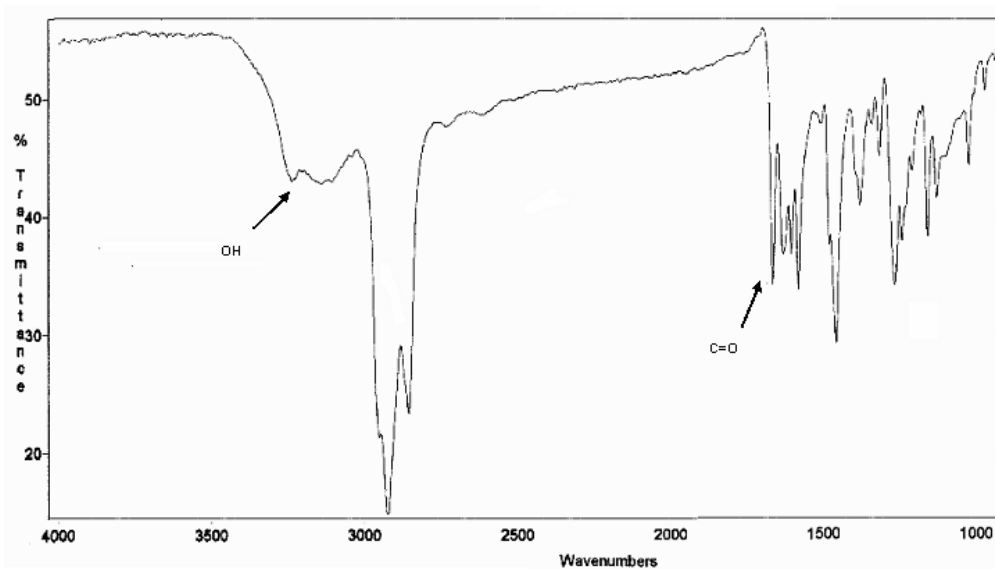


### 1.- Análisis elemental al producto:

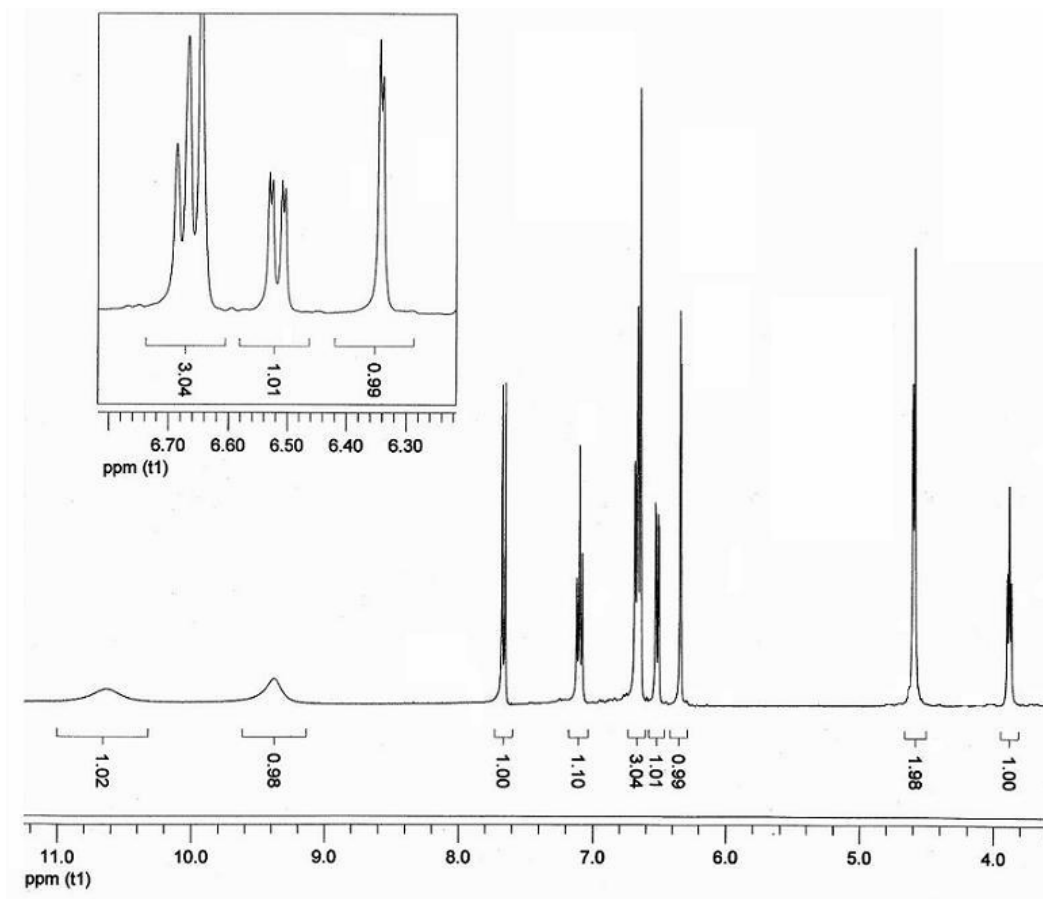
VALOR CALCULADO	VALOR OBSERVADO
C = 70,31 %	C = 70,89%
H = 4,72 %	H = 5,01%
O = 24,97 %	O = 24,1%

### 2.- Punto de fusión: °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3239 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1660 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)

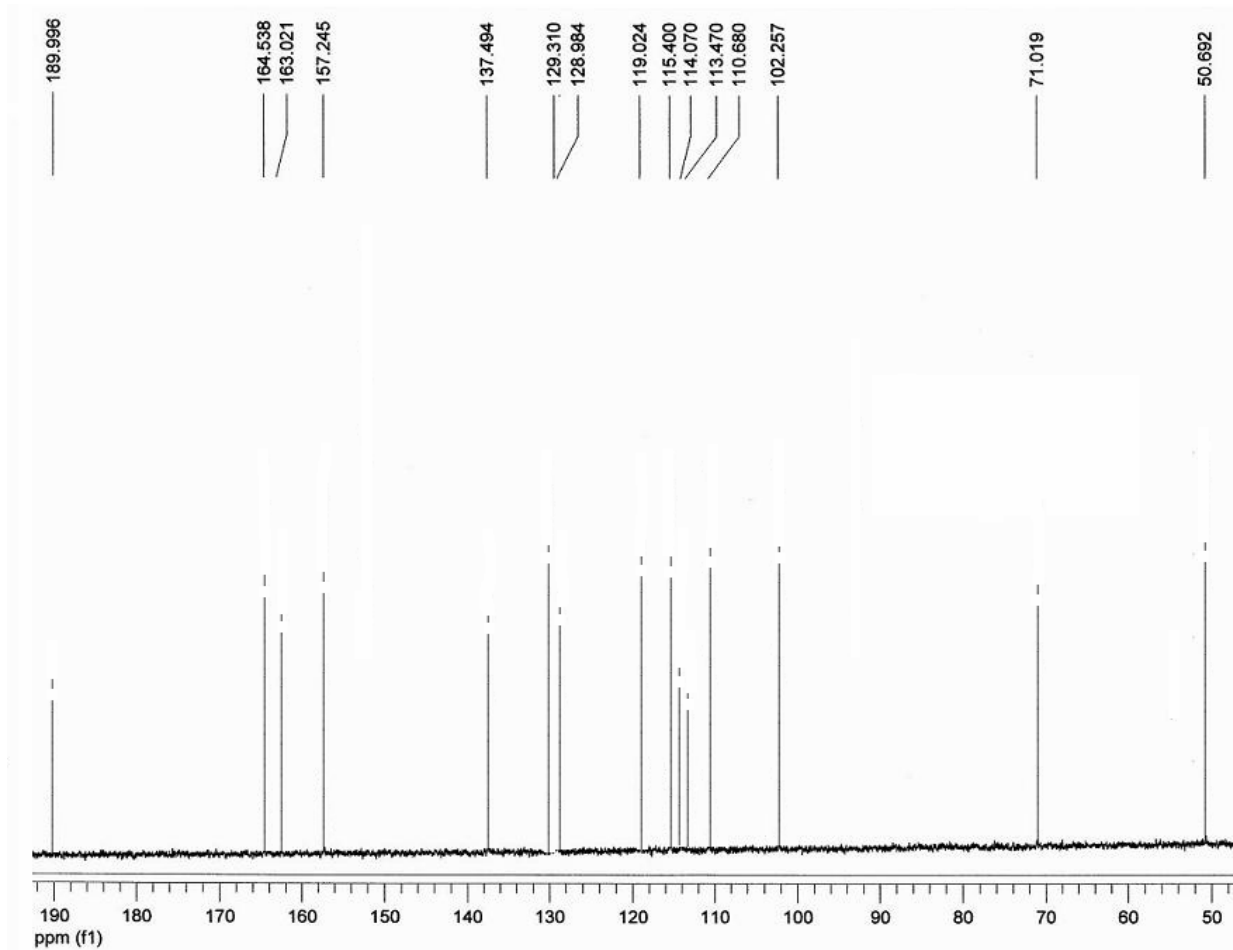


### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.63 y 4.64).



**<sup>1</sup>H-RMN(d<sub>6</sub>- DMSO, δ ppm):** 3,88 (dd, 1H, H3, J=5,83 Hz), 4,50-4,60 (m, 2H, H2), 6,34 (d, 1H, Ph-H8, J=2,1 Hz), 6,51 (dd, 1H, Ph-H6, J=2,1 Hz, J=8,7 Hz), 6,62-6,72 (m, 3H, Ph-H2', Ph-H4', Ph-H6'), 7,10 (dd, 1H, Ph-H5', J=7,6 Hz), 7,71 (d, 1H, Ph-H5, J=8,7 Hz), 9,38 (s, 1H, OH), 10,64 (s, 1H, OH)

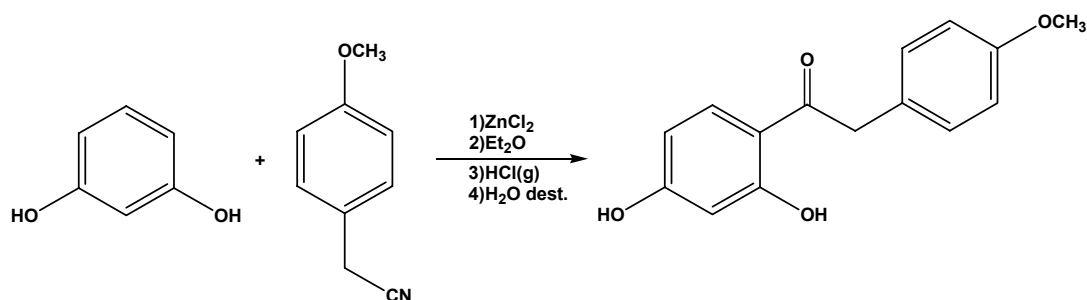
**FIG. 4.63.** <sup>1</sup>H-RMN de [DHD-OH-3]



**$^{13}\text{C-RMN}(\text{d}_6\text{-DMSO}, \delta \text{ ppm})$ :** 50,69 (C3), 71,01 (C2), 102,25 (C8), 110,68 (C2'), 113,47 (C6), 114,05 (C4'), 115,40 (C4a), 119,02 (C6'), 128,98 (C5'), 129,31 (C5), 137,49 (C1'), 157,24 (C3'), 163,02 (C8a), 164,53 (C7), 189,99 (C4)

**FIG. 4.64.**  $^{13}\text{C-RMN}$  de [DHD-OH-3']

#### 4.4.6. Síntesis de 2,4-dihidroxi-4'-metoxidesoxibenzoína [D-OH-4' (I)]



El método de síntesis es idéntico al descrito en el apartado 4.4.2. El producto obtenido se purifica mediante recristalización con etanol absoluto, obteniéndose un sólido que resulta ser el producto buscado, la 2,4-dihidroxi-4'-metoxidesoxibenzoína.

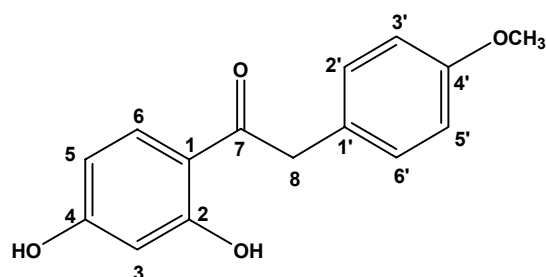
Las cantidades empleadas son las que se detallan a continuación:

- 1,3-dihidroxibenceno (resorcinol): 11 g. (0,1 moles)
- Éter etílico seco: 40ml
- Cloruro de zinc anhidro: 4 g.(0,03 moles)
- 4-metoxifenilacetoniitrilo: 15 g. (0,1 moles)
- Éter dietílico seco: 25 ml
- Agua destilada: 300 ml

Finalmente se obtienen 19,35 g. (0,07 moles) de un sólido que resultó ser 2,4-dihidroxi-4'-metoxidesoxibenzoína que representa un rendimiento del 75%.



El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

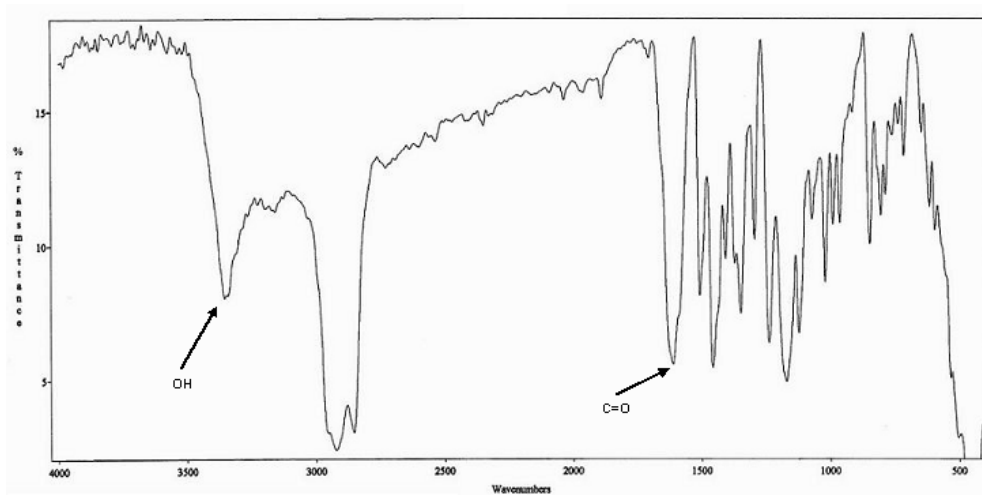


### 1.- Análisis elemental al producto:

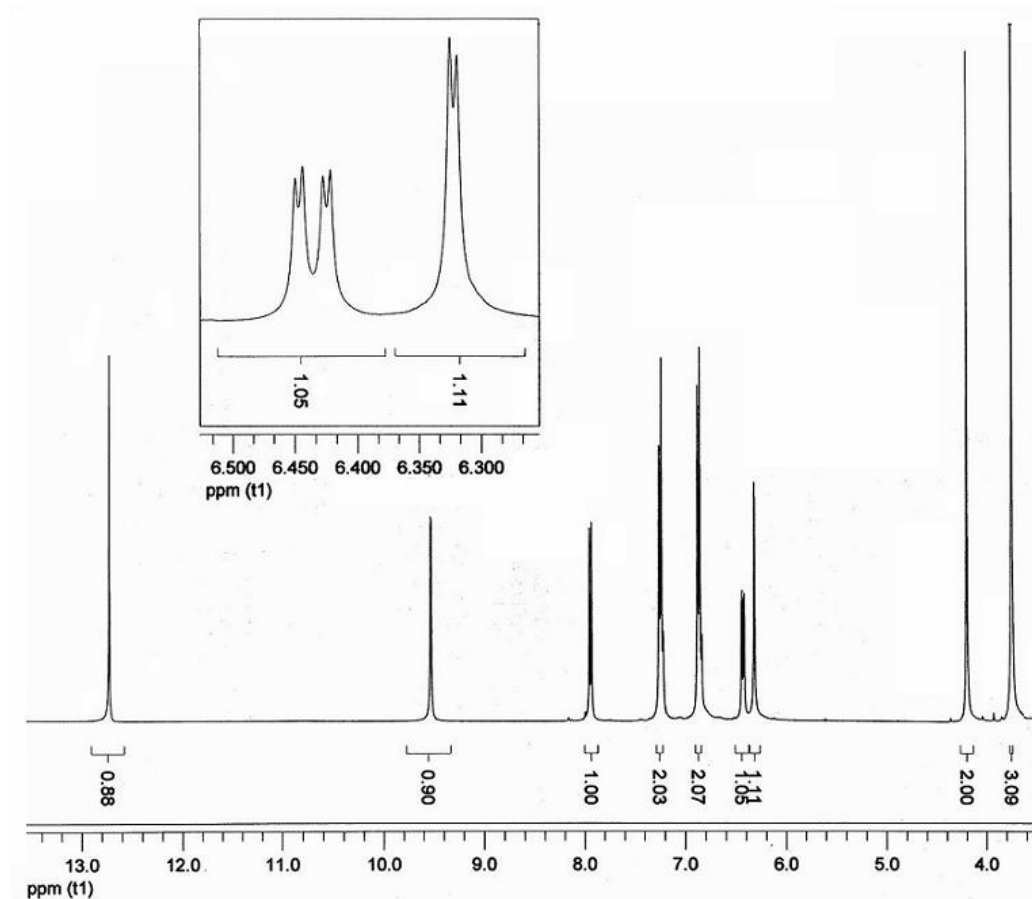
VALOR CALCULADO	VALOR OBSERVADO
C = 69,76%	C = 69,73%
H = 5,46%	H = 5,13%
O = 24,78%	O = 25,14%

### 2.- Punto de fusión: 159-160 °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3354 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1612 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)

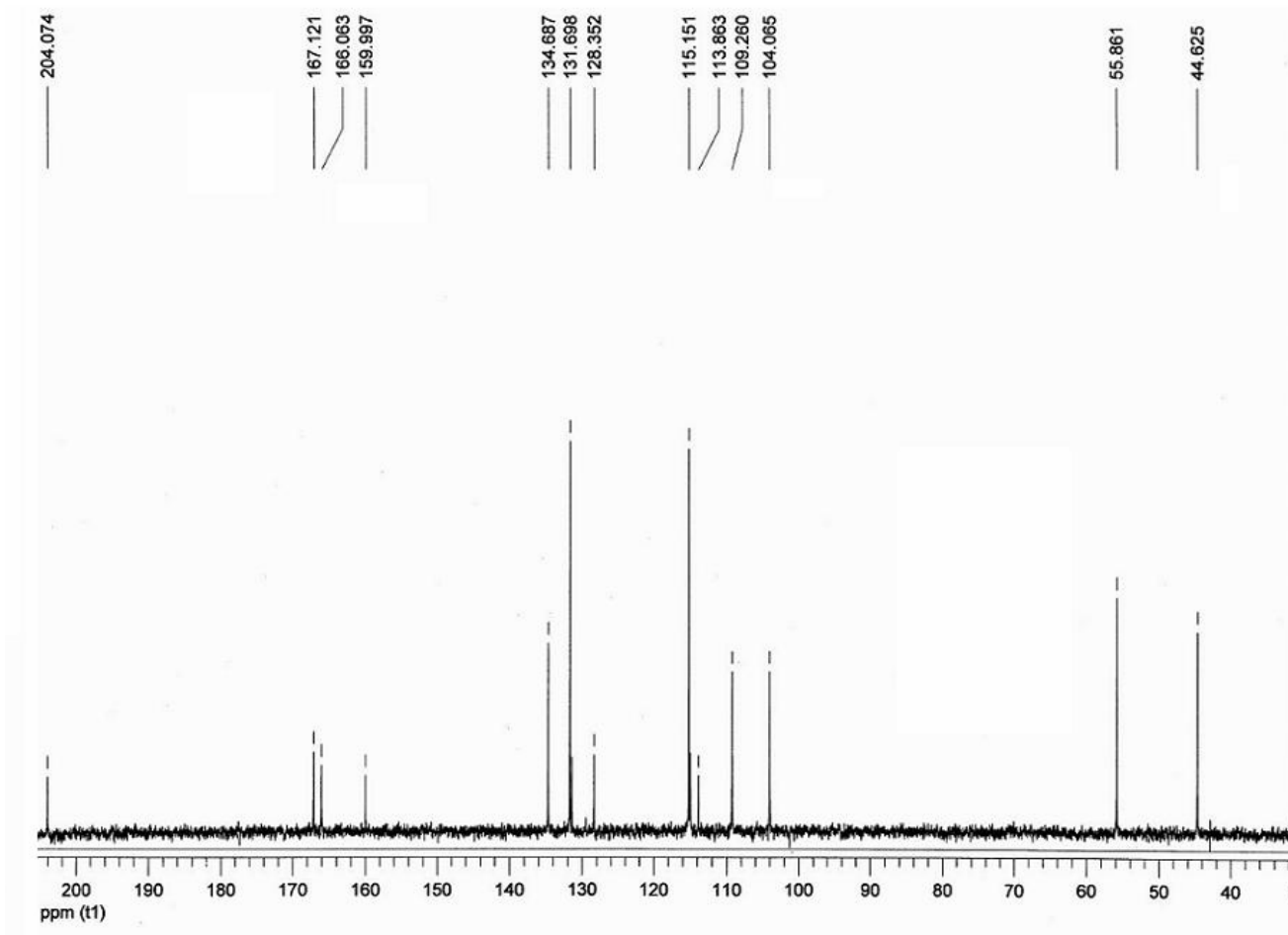


### 4- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.65 y 4.66).



**<sup>1</sup>H-RMN(d<sub>6</sub>-acetona, δ ppm):** 3,75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4,21 (s, 2H, H<sub>8</sub>), 6,32 (d, 1H, Ph- H<sub>3</sub>, J= 2,3 Hz), 6,43 (dd, 1H, Ph-H<sub>5</sub>, J=8,8 Hz, J=2,3 Hz), 6,87 (d, 2H, Ph-H<sub>3'</sub>, Ph-H<sub>5'</sub>, J=8,6 Hz), 7,25 (d, 2H, Ph-H<sub>2'</sub>, Ph-H<sub>6'</sub>, J=8,6 Hz), 7,94 (d, 1H, Ph-H<sub>6</sub>, J=8,8Hz), 9,53 (s, 1H, OH), 12,73 (s, 1H, OH)

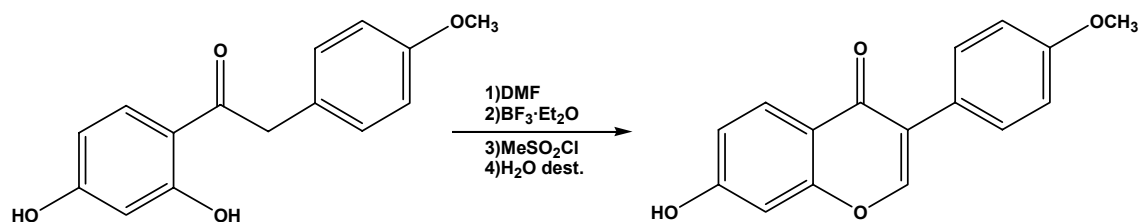
FIG. 4.65. <sup>1</sup>H-RMN de [D-OH-4'] (I)



**<sup>13</sup>C-RMN(*d*<sub>6</sub>-acetona, δ ppm):** 44,62 (C8), 55,86 (OCH3), 104,07 (C3), 109,26 (C5), 113,86 (C1), 115,15 (C3'), 128,35 (C1'), 131,69 (C2'), 134,69 (C6), 159,99 (C4'), 166,07 (C2), 167,12 (C4), 204,07 (C7)

**FIG. 4.66.** <sup>13</sup>C-RMN de [D-OH-4' (I)]

#### 4.4.7. Síntesis de 7-hidroxi-4'-metoxiisoflavona [D-OH-4'(II)]



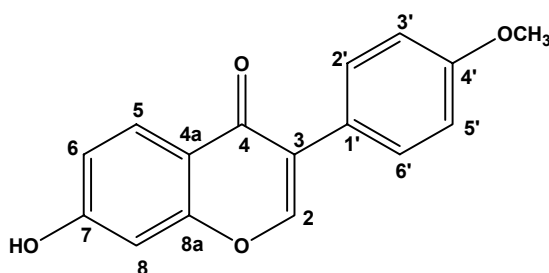
El método de síntesis es idéntico al descrito en el apartado 4.4.3. El tiempo de reacción en este caso es de 3 horas. El producto obtenido se purifica mediante recristalización con etanol absoluto, obteniéndose un sólido que es la 7-hidroxi-4'-metoxiisoflavona (formononetina).

Las cantidades empleadas son las que se detallan a continuación:

- 2,4-dihidroxi-4'-metoxidesoxibenzoína: 10 g. (38,76 mmol)
- Dimetilformamida seca: 170 ml
- Trifluoruro de boro-éter: 20 ml (4 equivalentes)
- Metansulfonilo: 9 ml (3 equivalentes)
- Dimetilformamida seca: 90 ml
- Agua destilada: 700 ml

Así se obtienen 8,29 g. (30,93 mmol) de un sólido que resultó ser la 7-hidroxi-4'-metoxiisoflavona que representa un rendimiento del 80%.

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

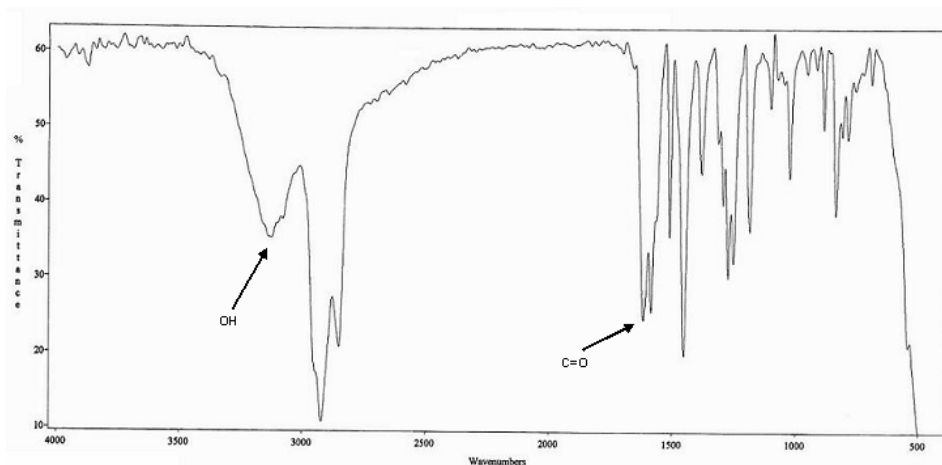


### 1.- Análisis elemental al producto:

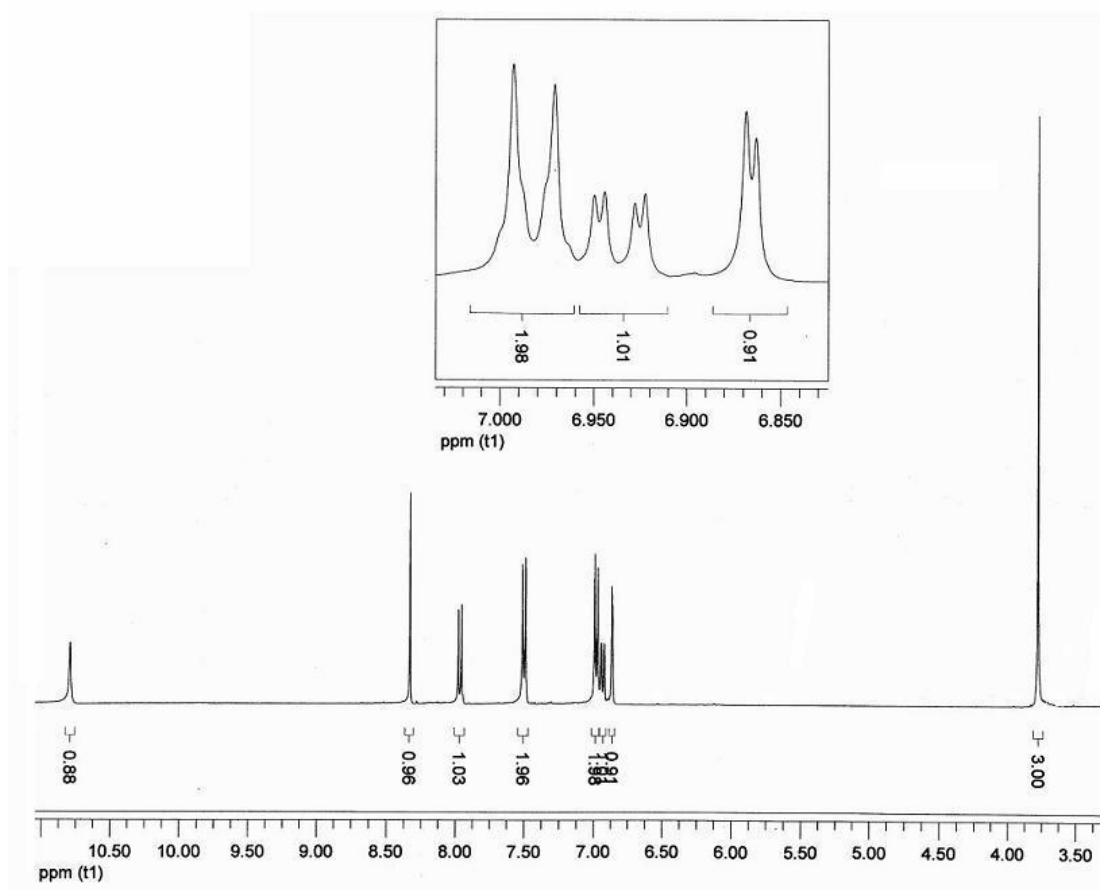
VALOR CALCULADO	VALOR OBSERVADO
C = 71,64 %	C = 71,34 %
H = 4,51 %	H = 4,36 %
O = 23,86 %	O = 24,3 %

### 2.- Punto de fusión: 249-251 °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3125 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1618 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)

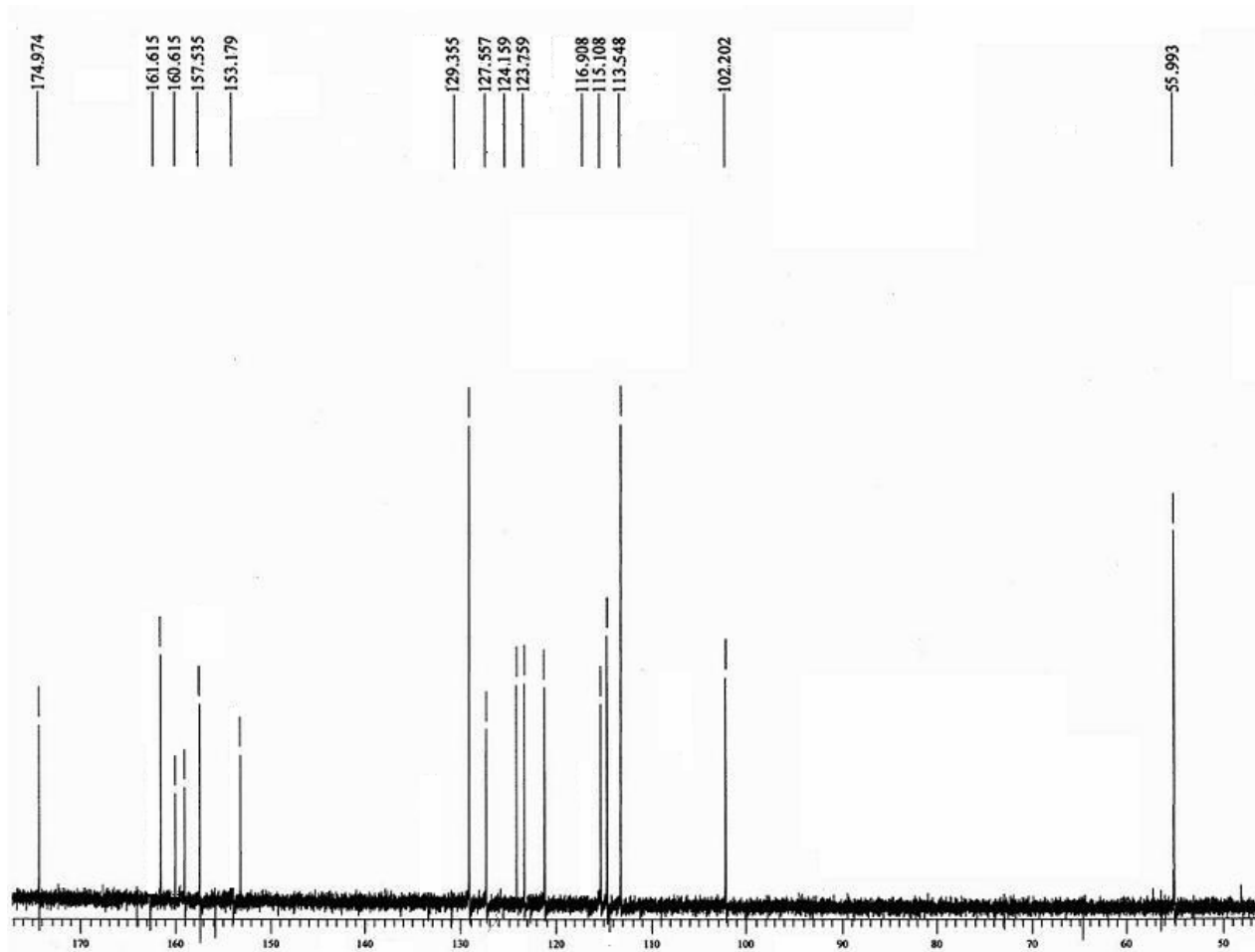


### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.67 y 4.68).



**$^1\text{H-RMN}(d_6\text{-DMSO}, \delta \text{ ppm})$ :** 3,78 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6,87(d, 1H, Ph-H8,  $J=2,1$  Hz), 6,94 (dd, 1H, Ph-H6,  $J= 2,1$  Hz,  $J=8,7$  Hz), 6,98 (d, 2H, Ph-H3', Ph-H5',  $J=8,7$  Hz), 7,51 (d, 2H, Ph-H2', Ph-H6',  $J=8,7$  Hz), 7,97 (d, 1H, Ph-H5,  $J=8,76$  Hz), 8,33 (s, 1H, H2 ), 10,80 (s, 1H, OH )

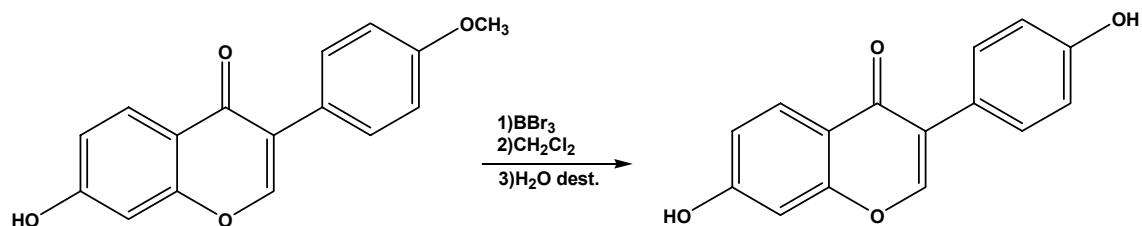
**FIG. 4.67.**  $^1\text{H-RMN}$  de [D-OH-4' (II)]



**$^{13}\text{C-RMN}(\text{d}_6\text{-acetona}, \delta \text{ ppm})$ :** 55,99 ( $\text{OCH}_3$ ), 102,20 (C8), 113,54 (C3', C5'), 115,10 (C6), 116,90 (C4a), 123,75 (C1'), 124,15 (C3), 127,55 (C5), 129,35 (C2', C6'), 153,17 (C2), 157,53 (C8a), 160,61 (C4'), 161,61 (C7), 174,97 (C4)

**FIG. 4.68.**  $^{13}\text{C-RMN}$  de [D-OH-4' (II)]

#### 4.4.8. Síntesis de 7,4'-dihidroxiisoflavona (daidzeína)



El método de síntesis es idéntico al descrito en el apartado 4.4.4. El tiempo de reacción en este caso es de 24 horas. El producto obtenido se purifica mediante recristalización con etanol absoluto, obteniéndose un sólido que es la 7,4'-dihidroxiisoflavona.

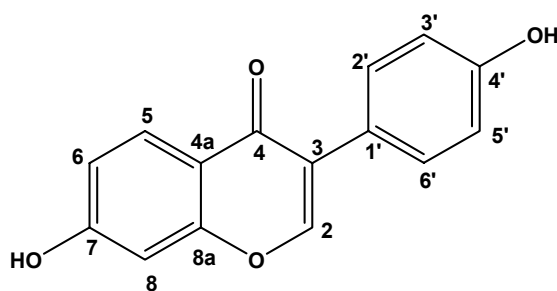
Las cantidades empleadas son las que se detallan a continuación:

- 7-hidroxi-4'-metoxiisoflavona: 8,51 g. (31,80 mmol)
- Diclorometano seco: 200 ml
- Tribromuro de boro disolución 1M en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 13,57 ml (2,5 equivalentes)
- Agua destilada: 500 ml

Finalmente se obtienen 6,14 g. (23,61 mmol) de un sólido que resultó ser 7,4'-dihidroxiisoflavona que representa un rendimiento del 75%.



El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

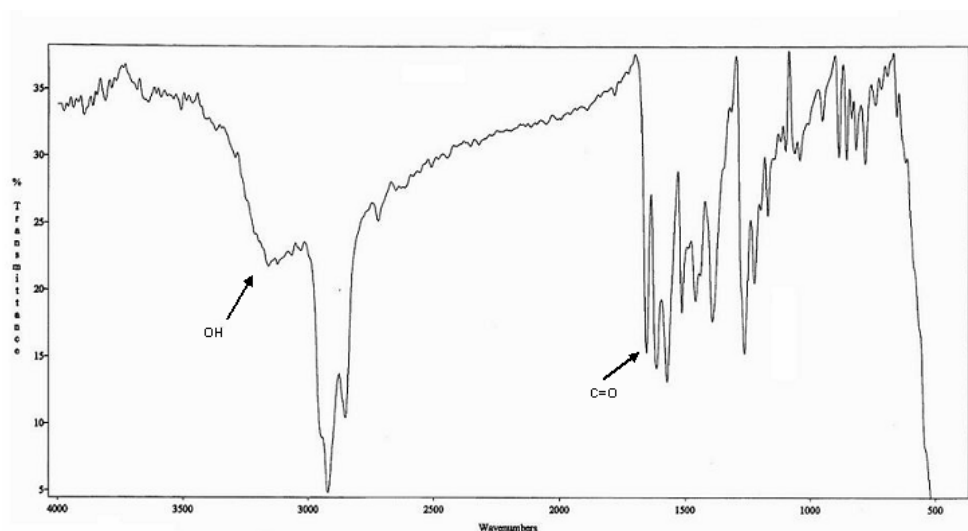


### 1.- Análisis elemental al producto:

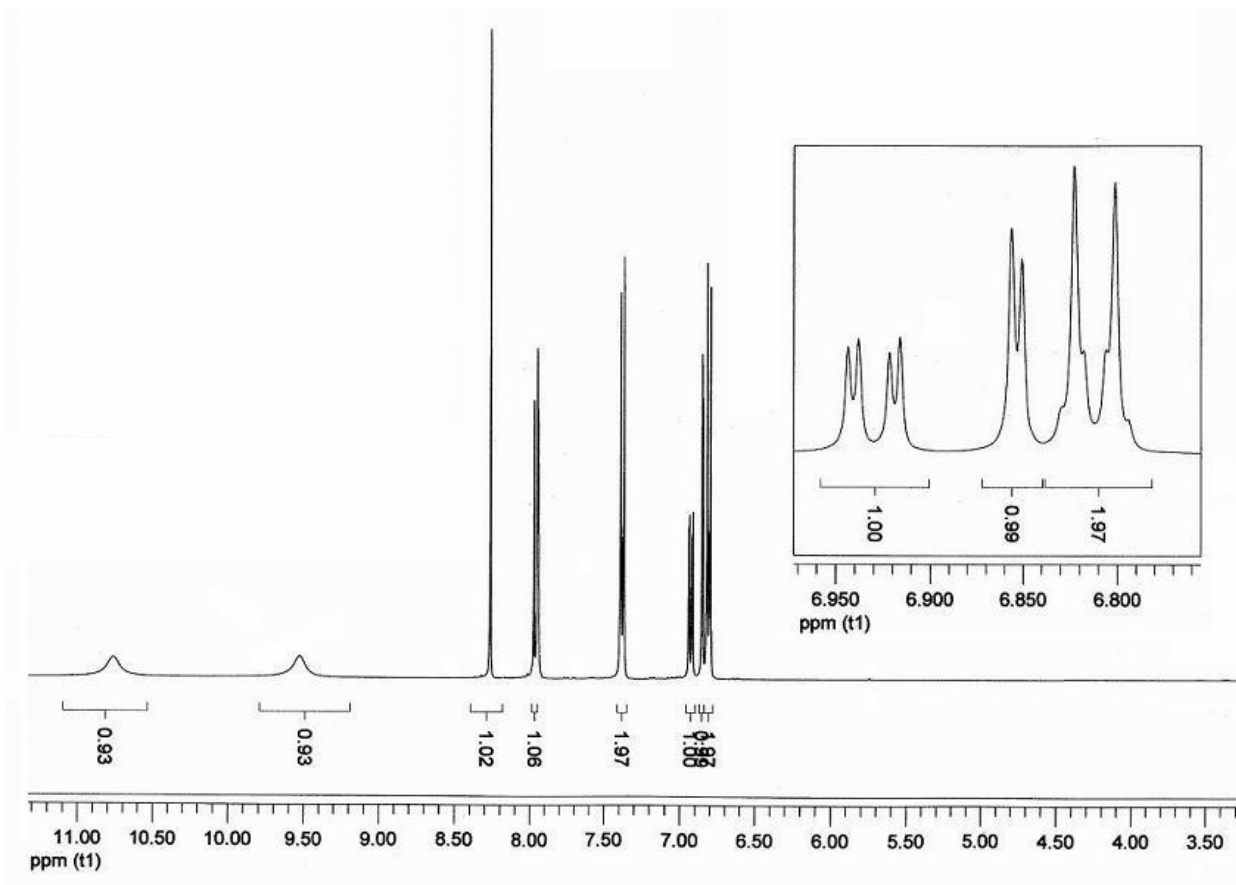
<i>VALOR CALCULADO</i>	<i>VALOR OBSERVADO</i>
C = 70,86 %	C = 70,50 %
H = 3,96 %	H = 3,75 %
O = 25,17 %	O = 25,75 %

### 2.- Punto de fusión: 249-251 °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3160 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1655 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)

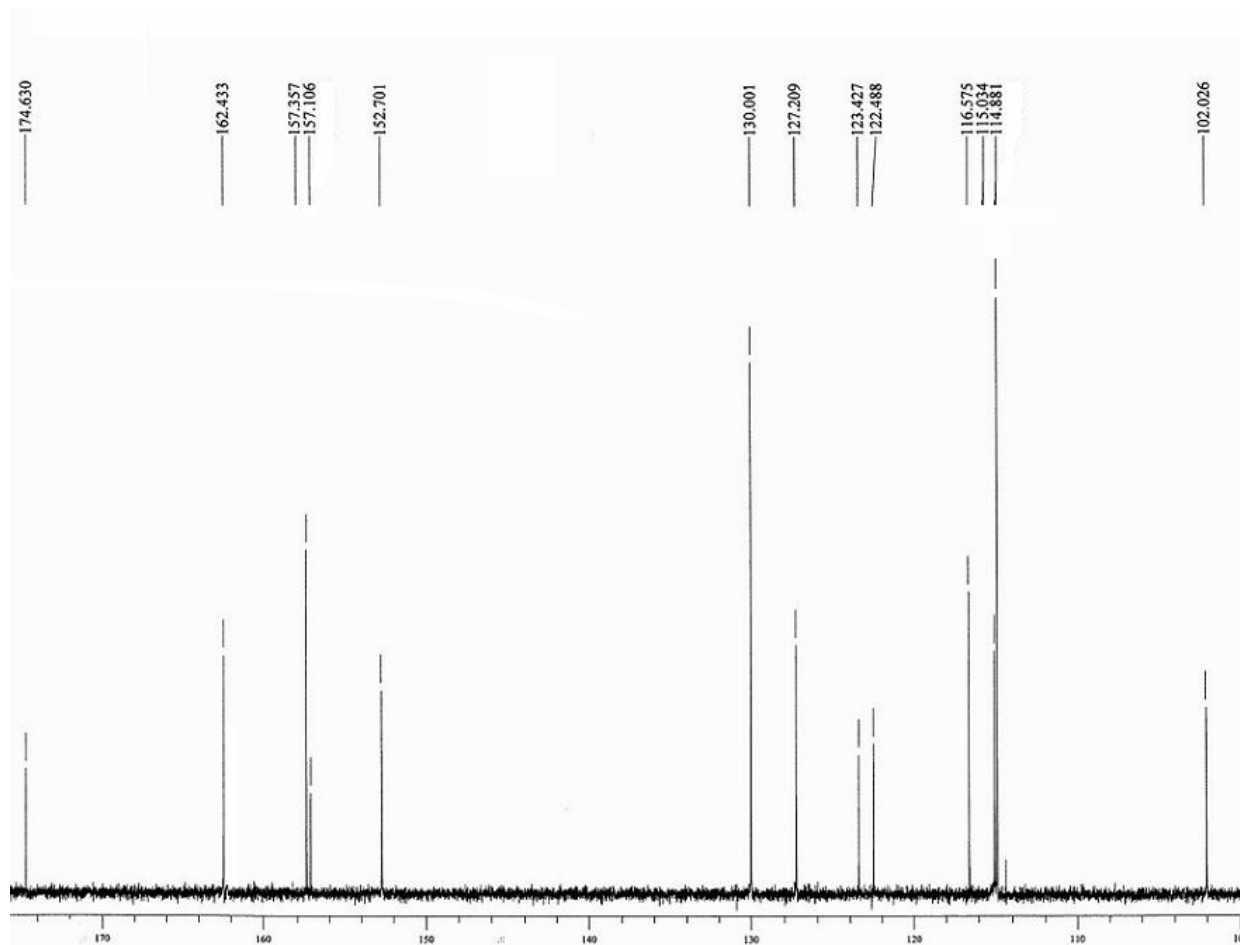


### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.69 y 4.70).



**$^1\text{H-RMN}(d_6\text{-DMSO}, \delta \text{ ppm}):$**  6,81 (d, 2H, Ph-H3', Ph-H5', J=8,6 Hz), 6,85 (d, 1H, Ph-H8, J=2,2 Hz), 6,93 (dd, 1H, Ph-H6, J=2,2 Hz, J=8,8 Hz), 7,38 (d, 2H, Ph-H2', Ph-H6', J=8,6 Hz), 7,96 (d, 1H, Ph-H5, J=8,8 Hz), 8,26 (s, 1H, H2), 9,52 (s, 1H, OH), 10,76 (s, 1H, OH)

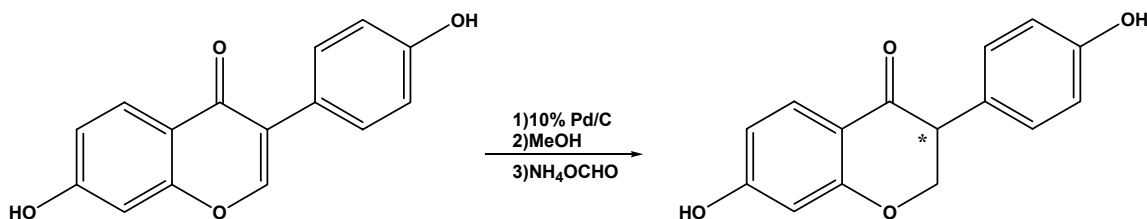
FIG. 4.69.  $^1\text{H-RMN}$  de daidzeína



**$^{13}\text{C-RMN}(d_6\text{-DMSO}, \delta \text{ ppm})$ :** 102,03 (C8), 114,88 (C3',C5'), 115,03 (C6), 116,57 (C4a), 122,49 (C3), 123,43 (C1'), 127,21 (C5), 130,00 (C2', C6'), 152,70 (C2), 157,10 (C4'), 157,35 (C8a), 162,43 (C7), 174,63 (C4)

**FIG. 4.70.**  $^{13}\text{C-RMN}$  de daidzeína]

#### 4.4.9. Síntesis de 7,4'-dihidroxiisoflavanona (DHD)



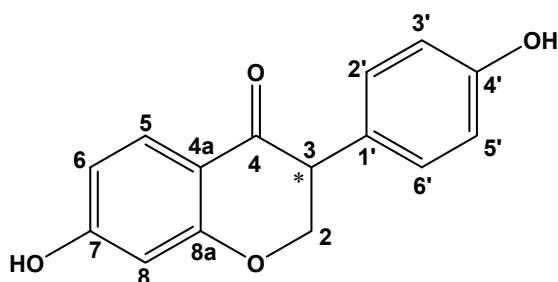
El método de síntesis es idéntico al descrito en el apartado 4.4.5. El tiempo de reacción en este caso es de 5 horas. El producto obtenido se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$  7:2, obteniéndose un sólido que es la 7,4'-dihidroxiisoflavanona.

Las cantidades empleadas son las que se detallan a continuación:

- 7,4'-dihidroxiisoflavona: 2,04 g. (8 mmol)
- 10% Pd/C: 2,04 g.
- Metanol seco: 160 ml
- Formiato de amonio: 2,01 (32 mmol)

Finalmente se obtienen 1,23 g. (4,80 mmol) de un sólido que resultó ser 7,4'-dihidroxiisoflavanona que representa un rendimiento del 60%.

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

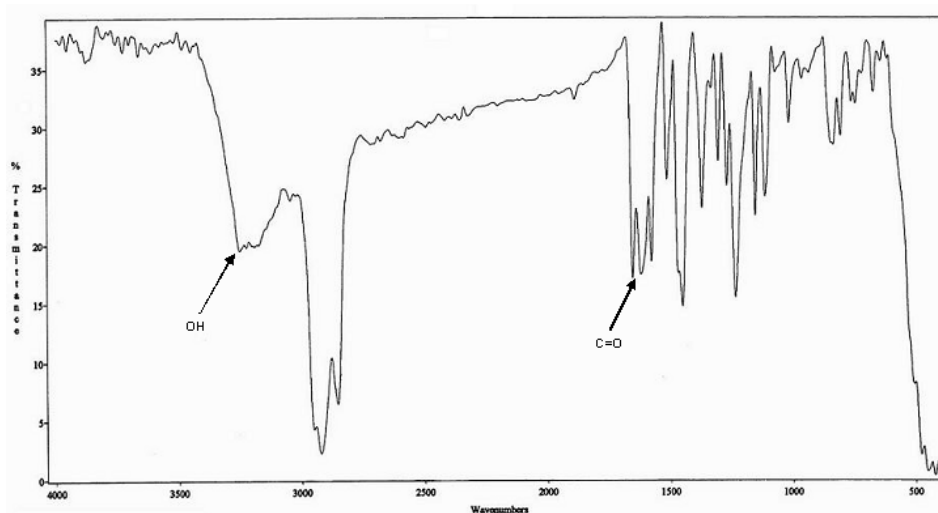


### 1.- Análisis elemental al producto:

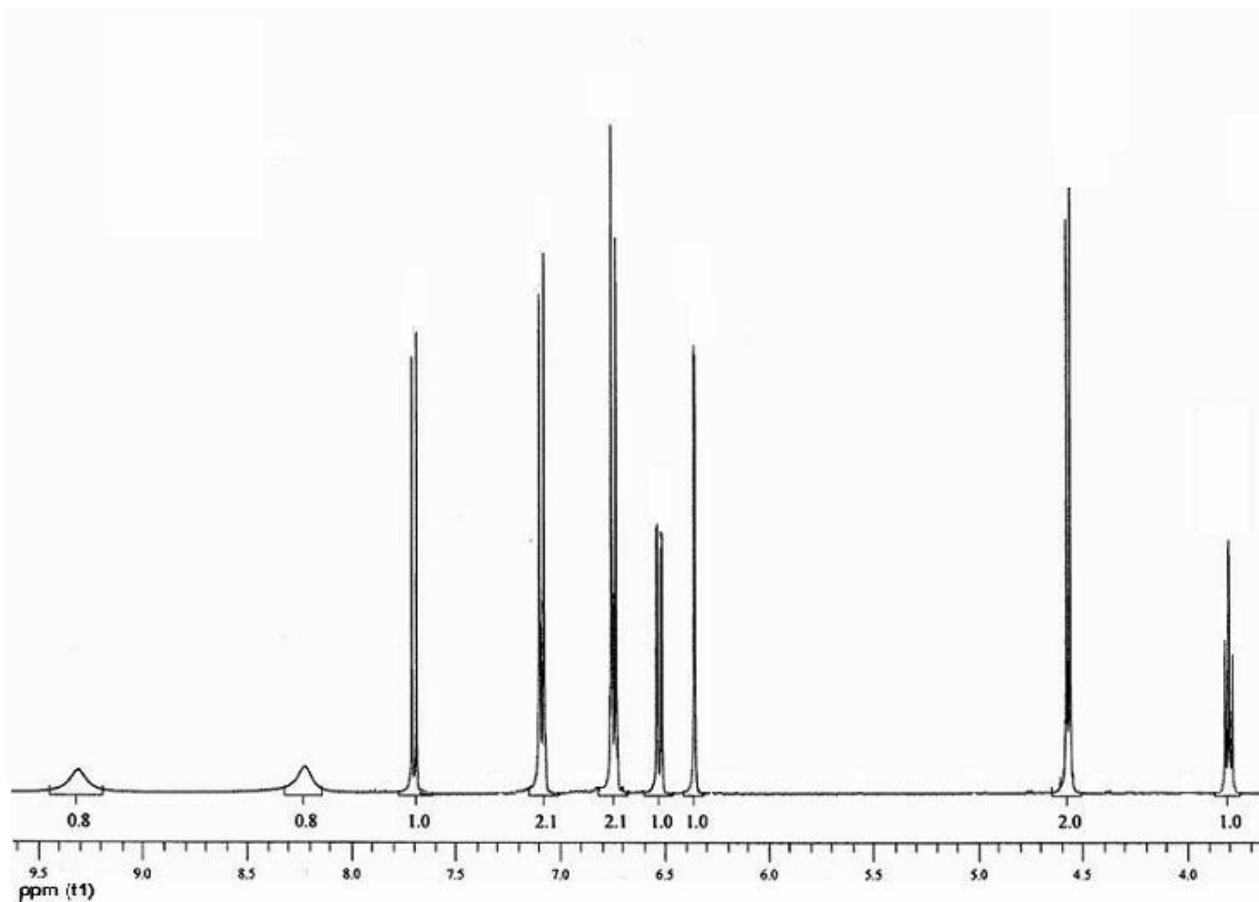
VALOR CALCULADO	VALOR OBSERVADO
C = 70,31 %	C = 70,17 %
H = 4,72 %	H = 4,78 %
O = 24,97 %	O = 25,05 %

### 2.- Punto de fusión: 250-252 °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3253 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1653 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)

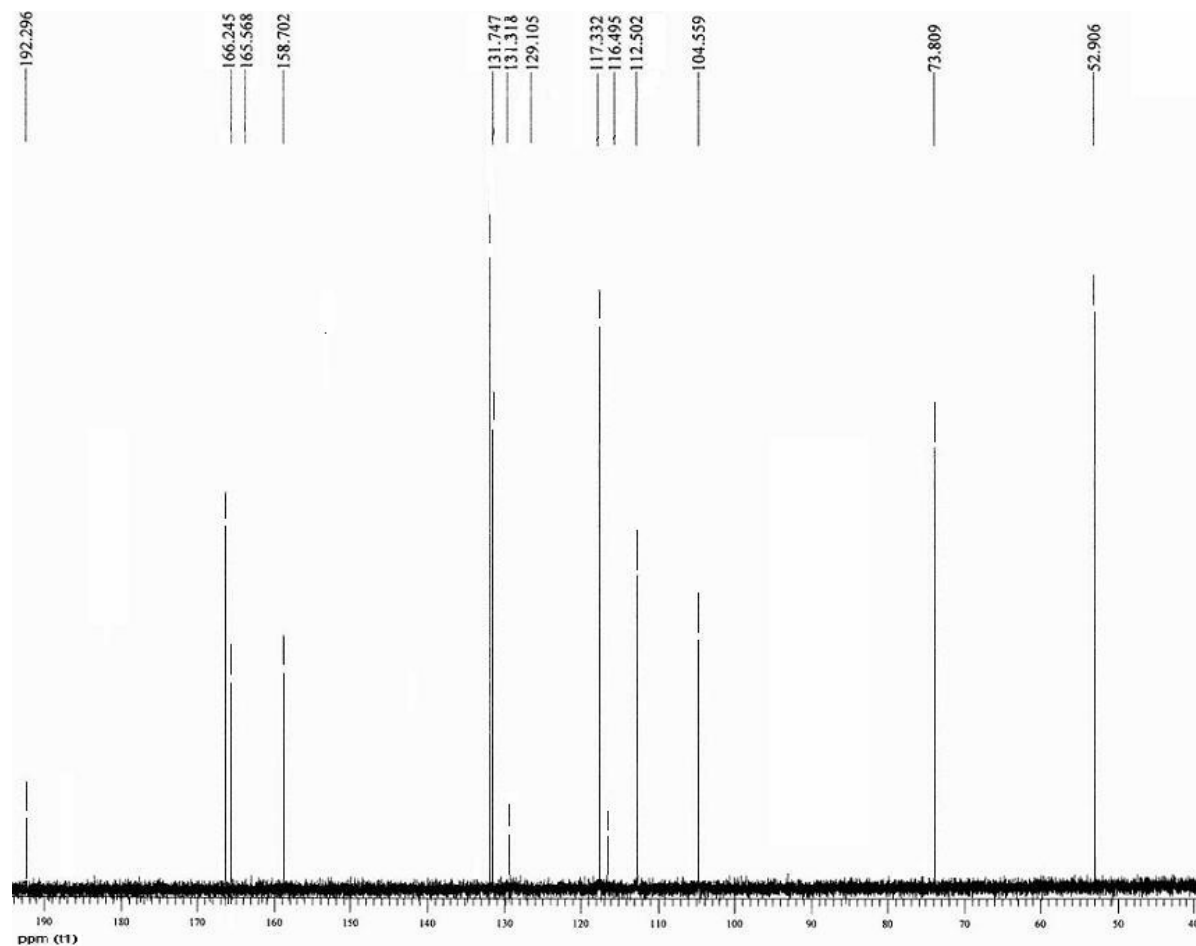


### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.71 y 4.72).



**<sup>1</sup>H-RMN(d<sub>6</sub>-acetona, δ ppm):** 3,85 (dd, 1H, H3, J=6,6 Hz), 4,6 (d, 2H, H2, J=6,6 Hz), 6,41 (d, 1H, Ph-H8, J=2,2 Hz), 6,57 (dd, 1H, Ph-H6, J=2,2 Hz, J=8,6 Hz), 6,78 (d, 2H, Ph-H3', Ph-H5', J=8,6 Hz), 7,13 (d, 2H, Ph-H2', Ph-H6', J=8,6 Hz), 7,74 (d, 1H, Ph-H5, J=8,6 Hz), 8,30 (s, 1H, OH), 9,40 (s, 1H, OH)

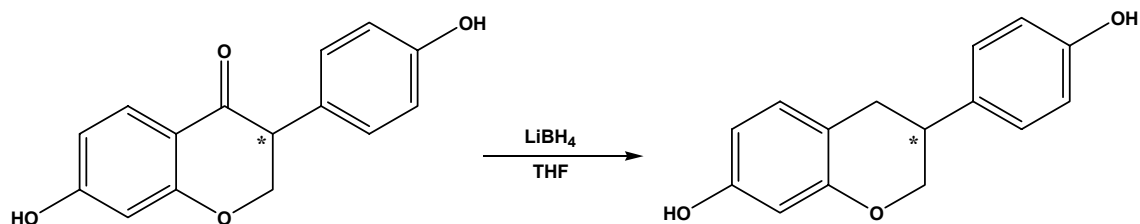
FIG. 4.71. <sup>1</sup>H-RMN de [DHD]



**$^{13}\text{C-RMN}(\text{d}_6\text{- acetona}, \delta \text{ ppm})$ :** 52,91 (C3), 73,81 (C2), 104,56 (C8), 112,50 (C6), 116,49 (C4a), 117,33 (C3',C5'), 129,10 (C1'), 131,32 (C5), 131,74 (C2',C6'), 158,70 (C4'), 165,57 (C8a), 166,24 (C7), 192,29 (C4)

**FIG. 4.72.**  $^{13}\text{C-RMN}$  de [DHD]

#### 4.4.10. Síntesis de 7,4'-dihidroxiisoflavano (equol)



En un matraz de dos bocas, previamente secado en estufa, se añaden 0,89 g. (41 mmol) de  $\text{LiBH}_4$  y 70 ml de THF seco. Sobre esta disolución enfriada en baño de hielo, se añade otra disolución formada por 0,15 g. (0,59 mmol) de dihidrodaidzeína (DHD) y 20 ml de THF seco. La adición se realiza en atmósfera de argón. Trascorridos 15 minutos se quita el baño de hielo y la corriente de argón y se deja progresar la reacción a temperatura ambiente durante 24 horas. Se comprueba por capa fina que ha reaccionado todo el producto de partida tomando una alícuota del crudo de reacción, eluyendo con una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$  7:2.

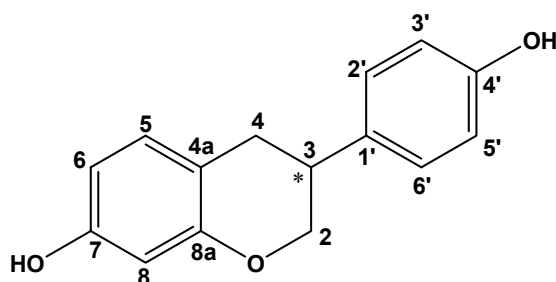
La reacción se vierte sobre una disolución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  que está en baño de hielo. El producto se extrae con AcOEt, la fase orgánica se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Eliminando el disolvente se obtiene un sólido que se seca en estufa de vacío en presencia de pentóxido de fósforo.

El producto se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice empleando el mismo eluyente que para la capa fina.

Finalmente se obtienen 0,09 g. (0,38 mmol) de un sólido que resultó ser el 7,4'-dihidroxiisoflavano que representa un rendimiento del 65 %.



El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

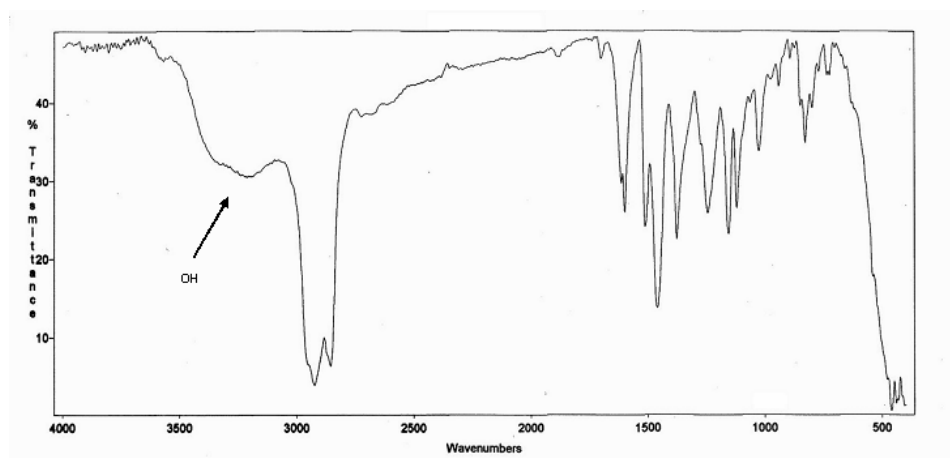


### 1.- Análisis elemental al producto:

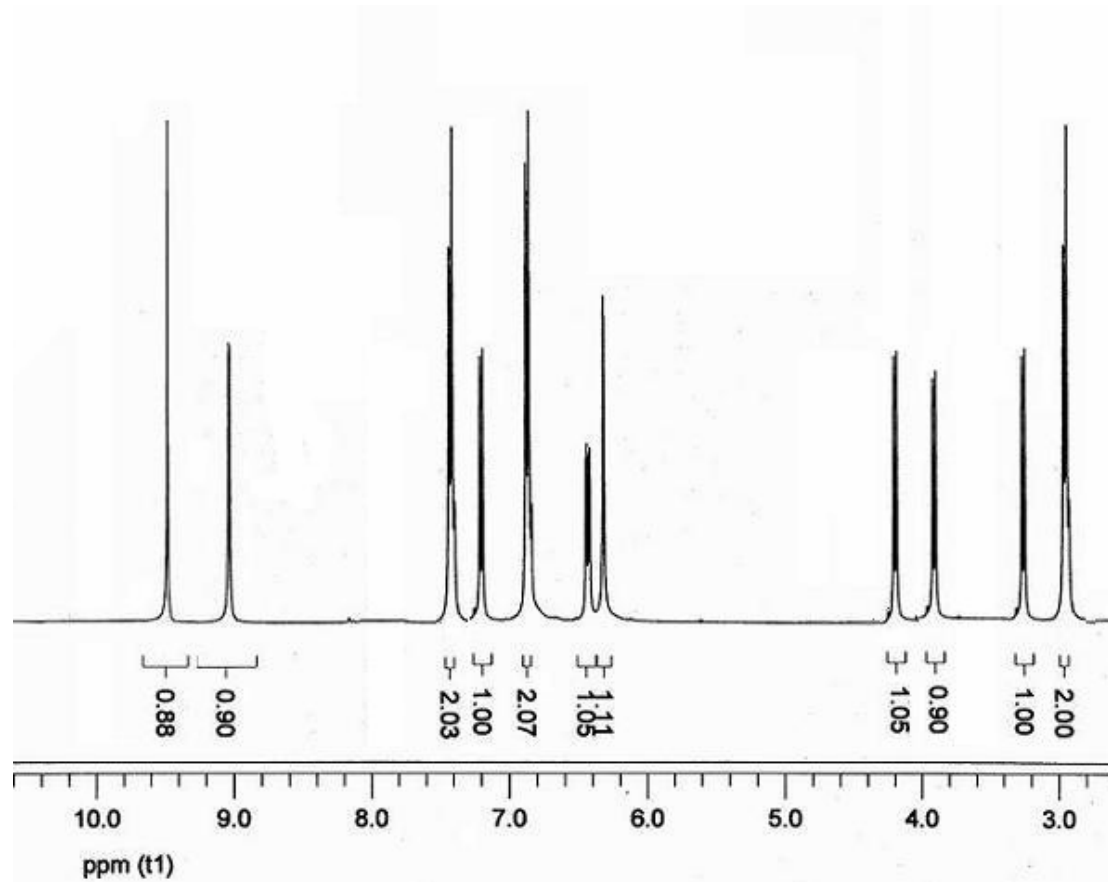
<i>VALOR CALCULADO</i>	<i>VALOR OBSERVADO</i>
C = 74,36	C = 74,56
H = 5,82	H = 5,79
O = 19,81	O = 19,65

### 2.- Punto de fusión: 189-192 °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3240 $\text{cm}^{-1}$ (OH)

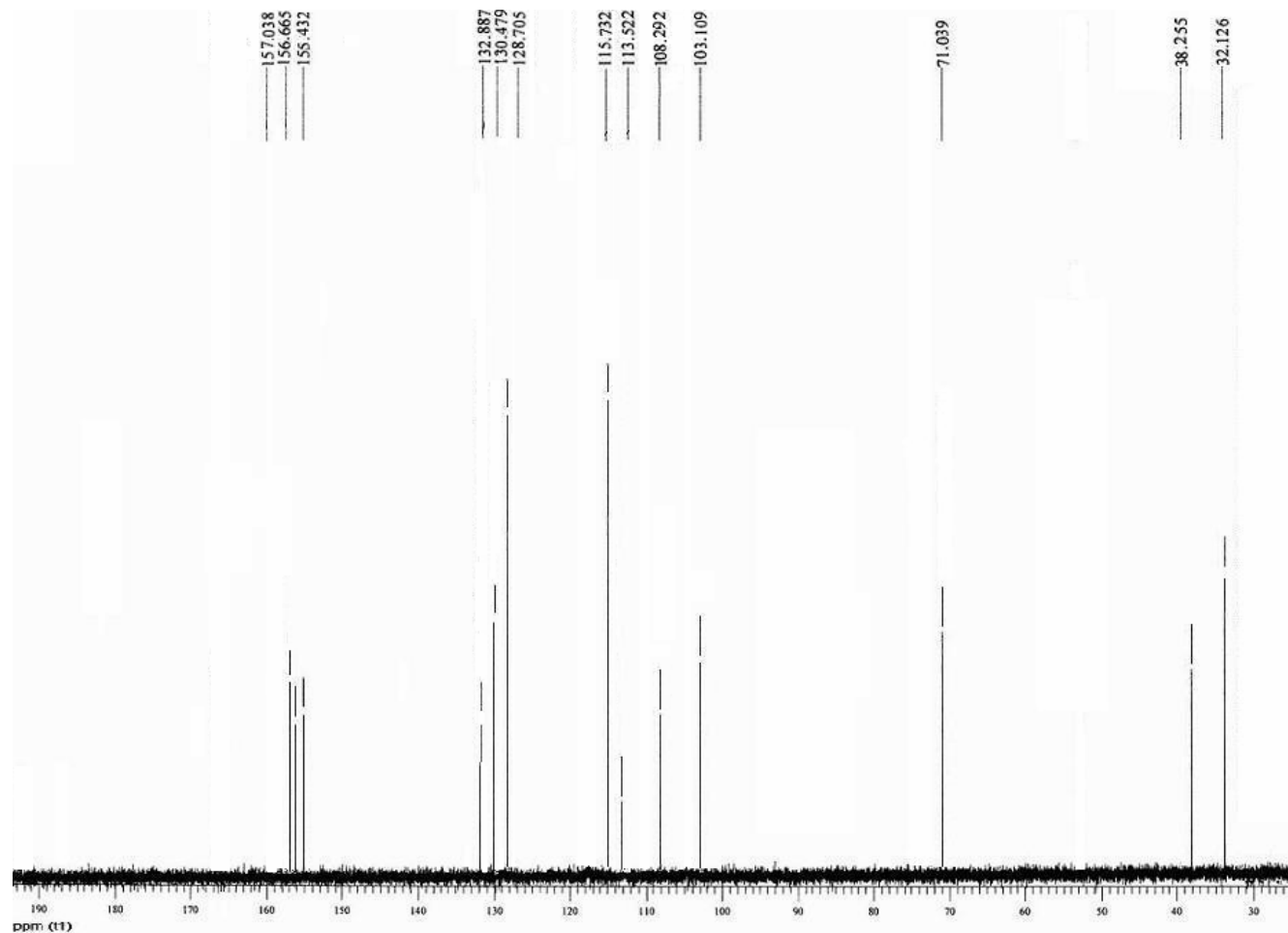


### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.73 y 4.74).



**<sup>1</sup>H-RMN(d<sub>6</sub>-acetona, δ ppm):** 2,91-3,02 (m, 2H, H4), 3,18-3,27 (m, 1H, H3), 3,92-4,02 (m, 1H, H2), 4,17-4,28 (m, 1H, H2), 6,20 (d, 1H, Ph-H8, J=2,4 Hz), 6,38 (dd, 1H, Ph-H6, J=2,4 Hz, J=8,3 Hz), 6,81 (d, 2H, Ph-H3', Ph-H5', J=8,5 Hz), 7,10 (d, 1H, Ph-H5, J=8,3 Hz), 7,19 (d, 2H, Ph-H2', Ph-H6', J=8,5 Hz), 9,15 (s, 1H, OH), 9,45 (s, 1H, OH)

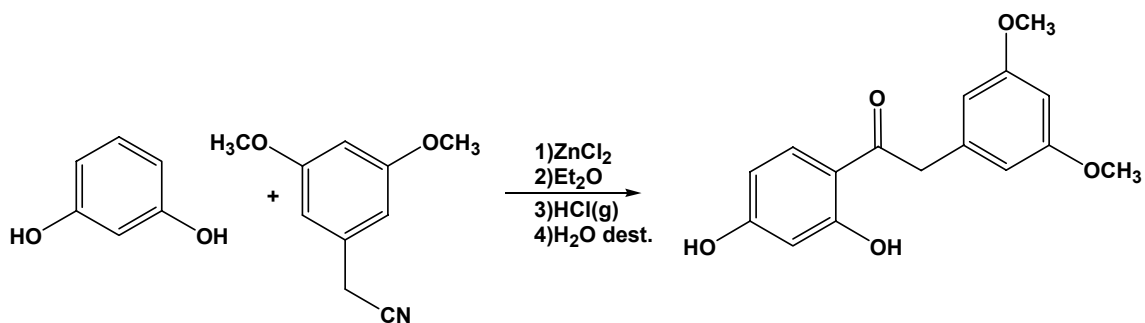
FIG.4.73. <sup>1</sup>H-RMN de [equol]



**<sup>13</sup>C-RMN(*d*<sub>6</sub>- acetona, δ ppm):** 32,12 (C4), 38,25 (C3), 71,03 (C2), 103,10 (C8), 108,29 (C6), 113,54 (C4a), 115,73 (C3',C5'), 128,70 (C2',C6') 130,47, (C5), 132,88 (C1'), 155,43 (C4'), 156,66 (C8a), 157,03 (C7)

**FIG. 4.74.** <sup>13</sup>C-RMN de de [equol]

#### 4.4.11. Síntesis de 2,4-dihidroxi-3',5'-metoxidesoxibenzoína [D-OH-3'5'(I)]



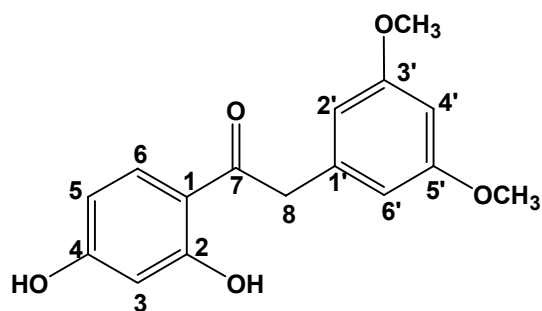
El método de síntesis es idéntico al descrito en el apartado 4.4.2. El tiempo de reacción en este caso es de 6 horas. El producto obtenido se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$  10:2, obteniéndose un sólido que es la 2,4-dihidroxi-3',5'-dimetoxidesoxibenzoína.

Las cantidades empleadas son las que se detallan a continuación:

- 1,3-dihidroxibenceno (resorcinol): 4,90 g. (45,1 mmol)
- Éter etílico seco: 40 ml
- Cloruro de zinc anhidro: 2 g. (15,05 mmol)
- 3,5-dimetoxifenilacetónitrilo: 7,90 g. (45,1 mmol)
- Éter dietílico seco: 15 ml
- Agua destilada: 200 ml

Finalmente se obtienen 9,10 g. (31,60 mmol) de un sólido que resultó ser la 2,4-dihidroxi-3',5'-dimetoxidesoxibenzoína que representa un rendimiento del 70%.

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

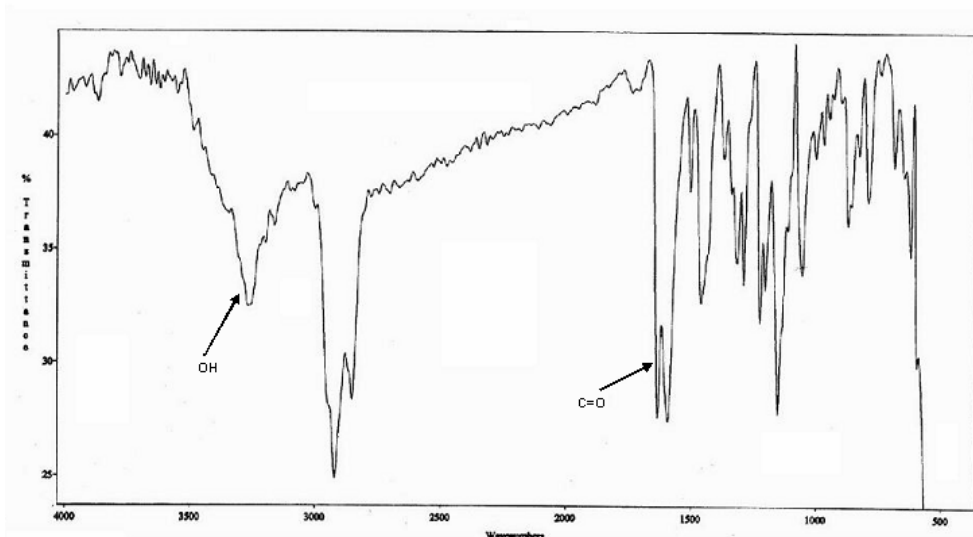


### 1.- Análisis elemental al producto:

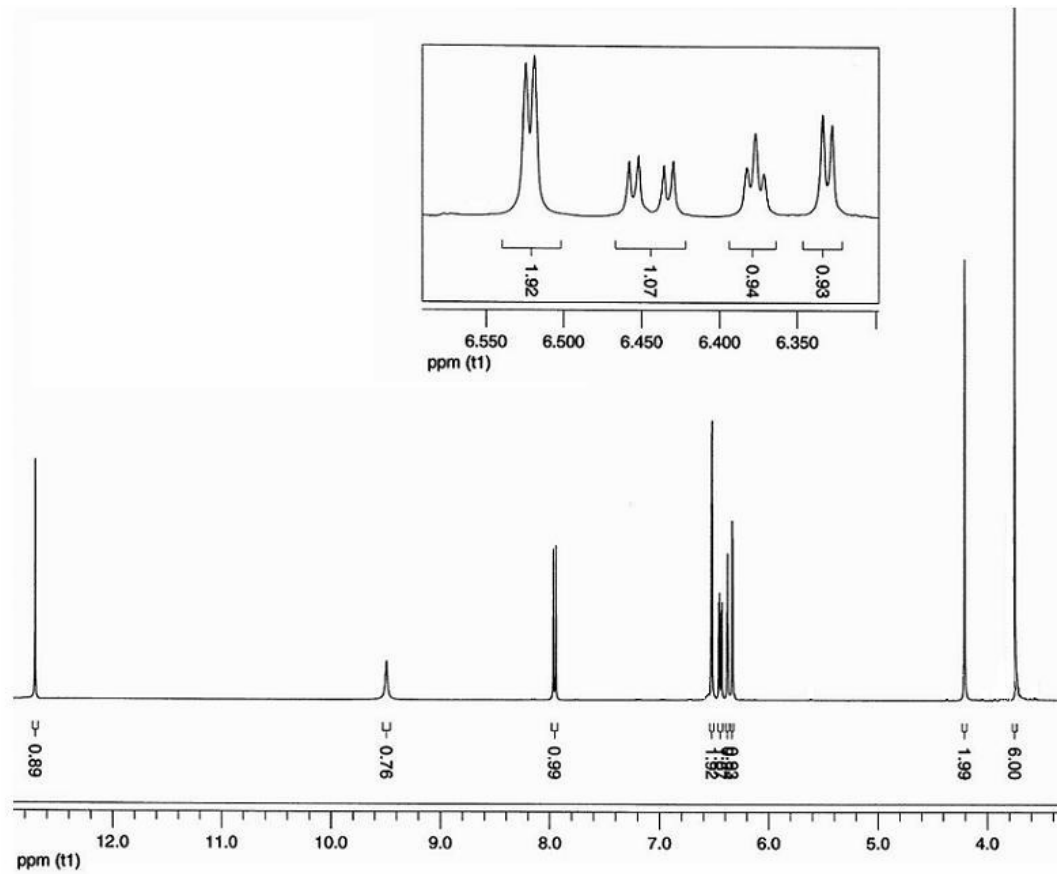
VALOR CALCULADO	VALOR OBSERVADO
C = 66,66 %	C = 66,03 %
H = 5,59 %	H = 5,43 %
O = 27,75 %	O = 28,54 %

### 2.- Punto de fusión: °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3270 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1634 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)

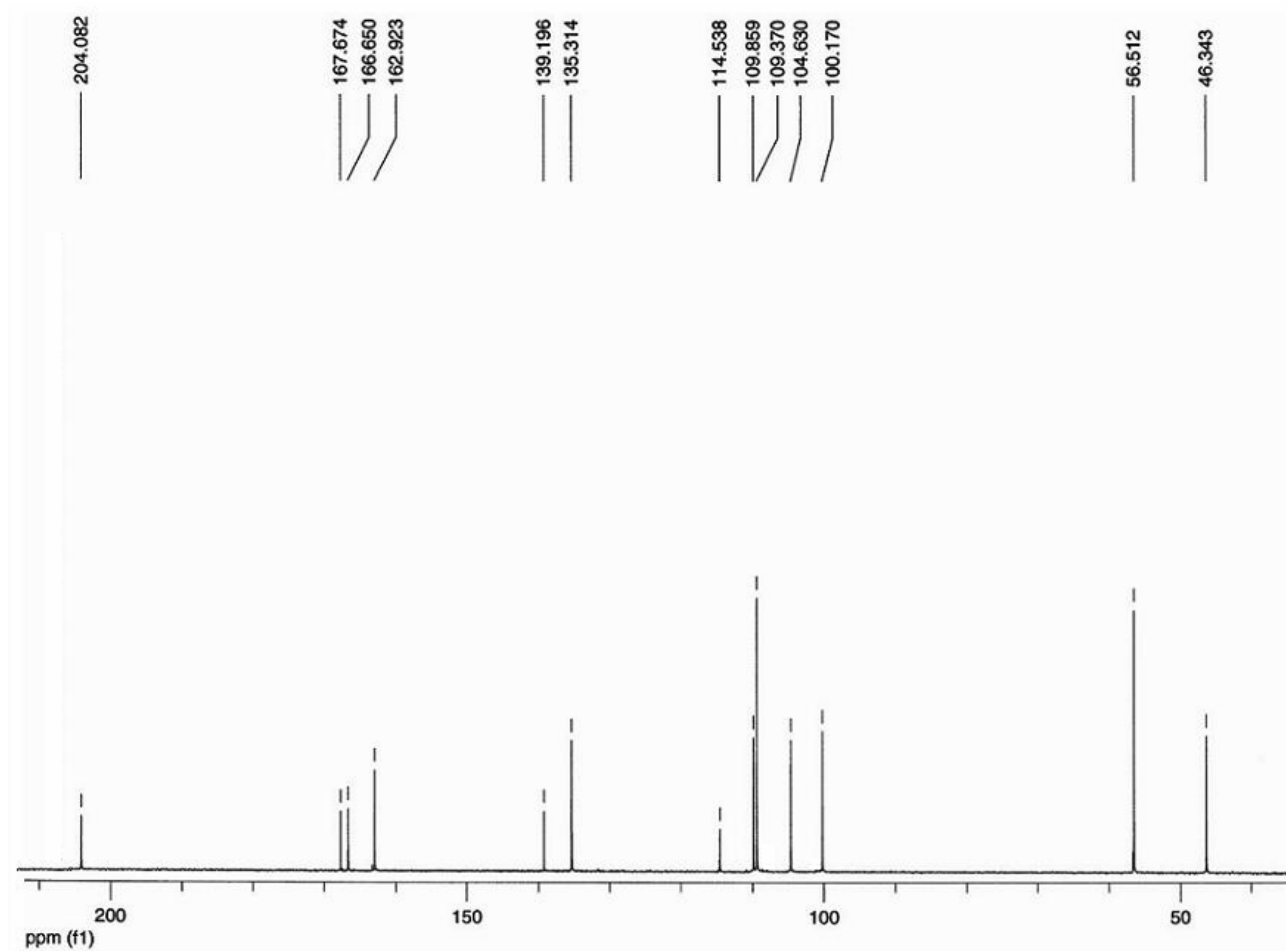


### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.75 y 4.76).



**<sup>1</sup>H-RMN(d<sub>6</sub>-acetona, δ ppm):** 3,75 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4,21 (s, 2H, H<sub>8</sub>), 6,33 (d, 1H, Ph-H<sub>3</sub>, J= 2,40 Hz), 6,37 (t, 1H, Ph-H<sub>4</sub>', J=2,20 Hz), 6,44 (dd, 1H, Ph-H<sub>5</sub>, J=8,80 Hz, J=2,4 Hz), 6,52 (d, 2H, Ph-H<sub>2</sub>', Ph-H<sub>6</sub>', J=2,20 Hz), 7,95 (d, 1H, Ph-H<sub>6</sub>, J=8,80 Hz), 9,50 (s, 1H, OH), 12,73(s, 1H, OH)

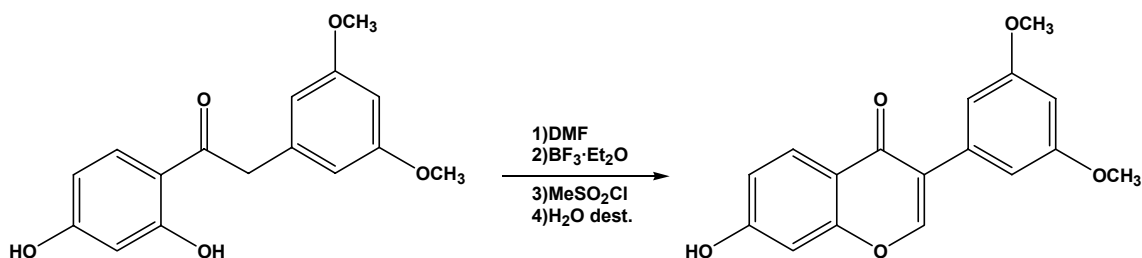
FIG. 4.75 <sup>1</sup>H-RMN de [D-OH-3'5'(I)]



**<sup>13</sup>C-RMN(*d*<sub>6</sub>-acetona, δ ppm):** 46,34 (C8), 56,51 (OCH<sub>3</sub>), 100,17 (C4'), 104,63 (C3), 109,37 (C2', C6'), 109, 85 (C5), 114,53 (C1), 135,31 (C6), 139,16 (C1'), 162,92 (C3', C5'), 166,65 (C2), 167,67 (C4), 204,08 (C7)

**FIG. 4.76.** <sup>13</sup>C-RMN de [D-OH-3'5'(I)]

#### 4.4.12. Síntesis de 7-hidroxi-3',5'-dimetoxiisoflavona [D-OH-3'5'(II)]



El método de síntesis es idéntico al descrito en el apartado 4.4.3. El tiempo de reacción en este caso es de 2,5 horas. El producto obtenido se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$  7:2, obteniéndose un sólido que es la 7-hidroxi-3',5'-dimetoxiisoflavona.

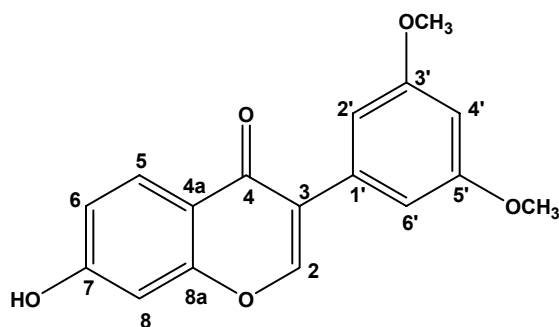
Las cantidades empleadas son las que se detallan a continuación:

- 2,4-dihidroxi-4'-metoxidesoxibenzoína: 3,72 g. (12,92 mmol)
- Dimetilformamida seca: 55 ml
- Trifluoruro de boro-éter: 6,60 ml (4 equivalentes)
- Metansulfonilo: 3 ml (3 equivalentes)
- Dimetilformamida seca: 30 ml
- Agua destilada: 400 ml

Finalmente se obtienen 3,17 g. (10,63 mmol) de un sólido que resultó ser la 7-hidroxi-3',5'-dimetoxiisoflavona que representa un rendimiento del 82%.



El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

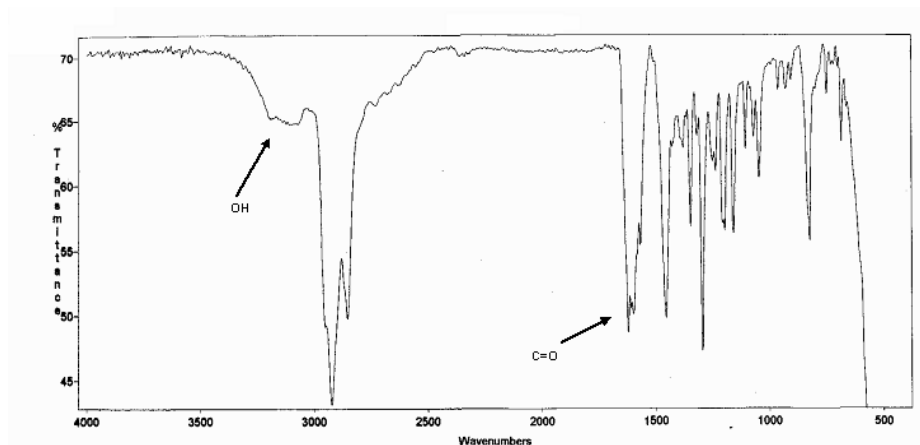


### 1.- Análisis elemental al producto:

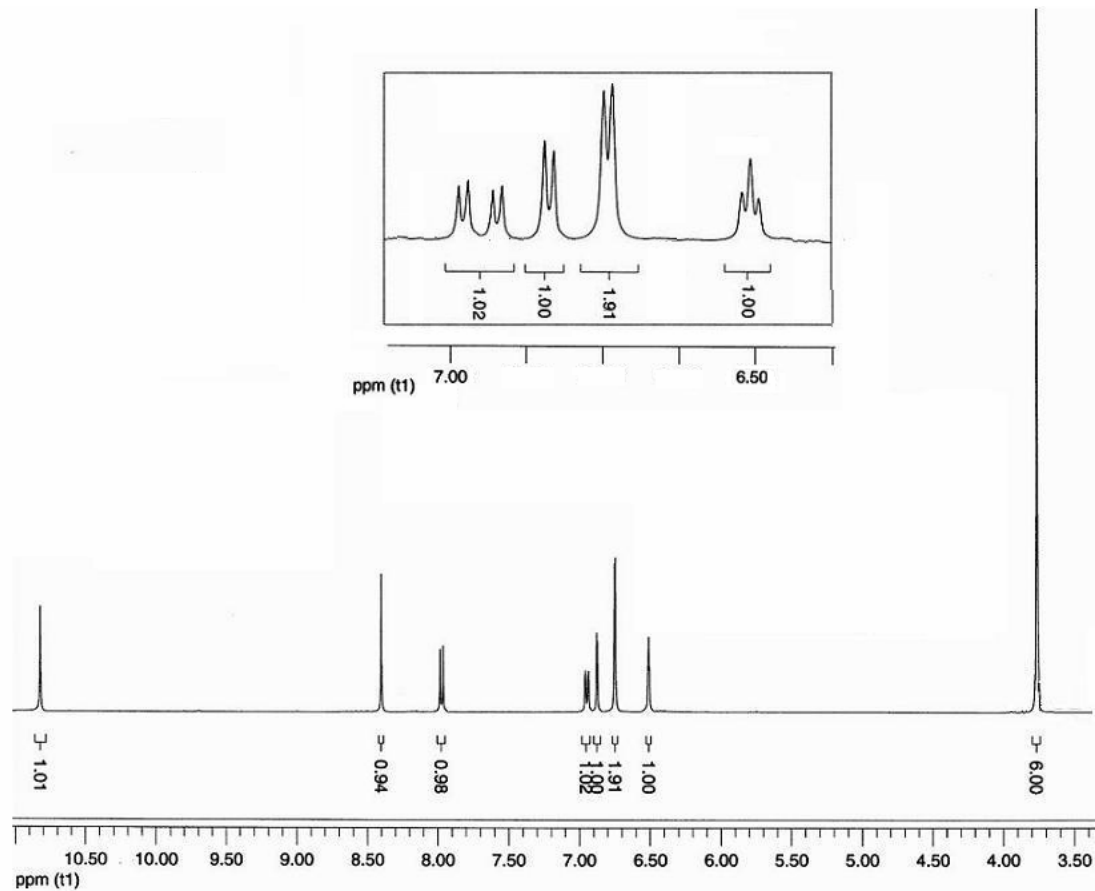
VALOR CALCULADO	VALOR OBSERVADO
C = 68,45 %	C = 67,57 %
H = 4,73 %	H = 5,41 %
O = 26,82 %	O = 27,02 %

### 2.- Punto de fusión: °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3120 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1618 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)

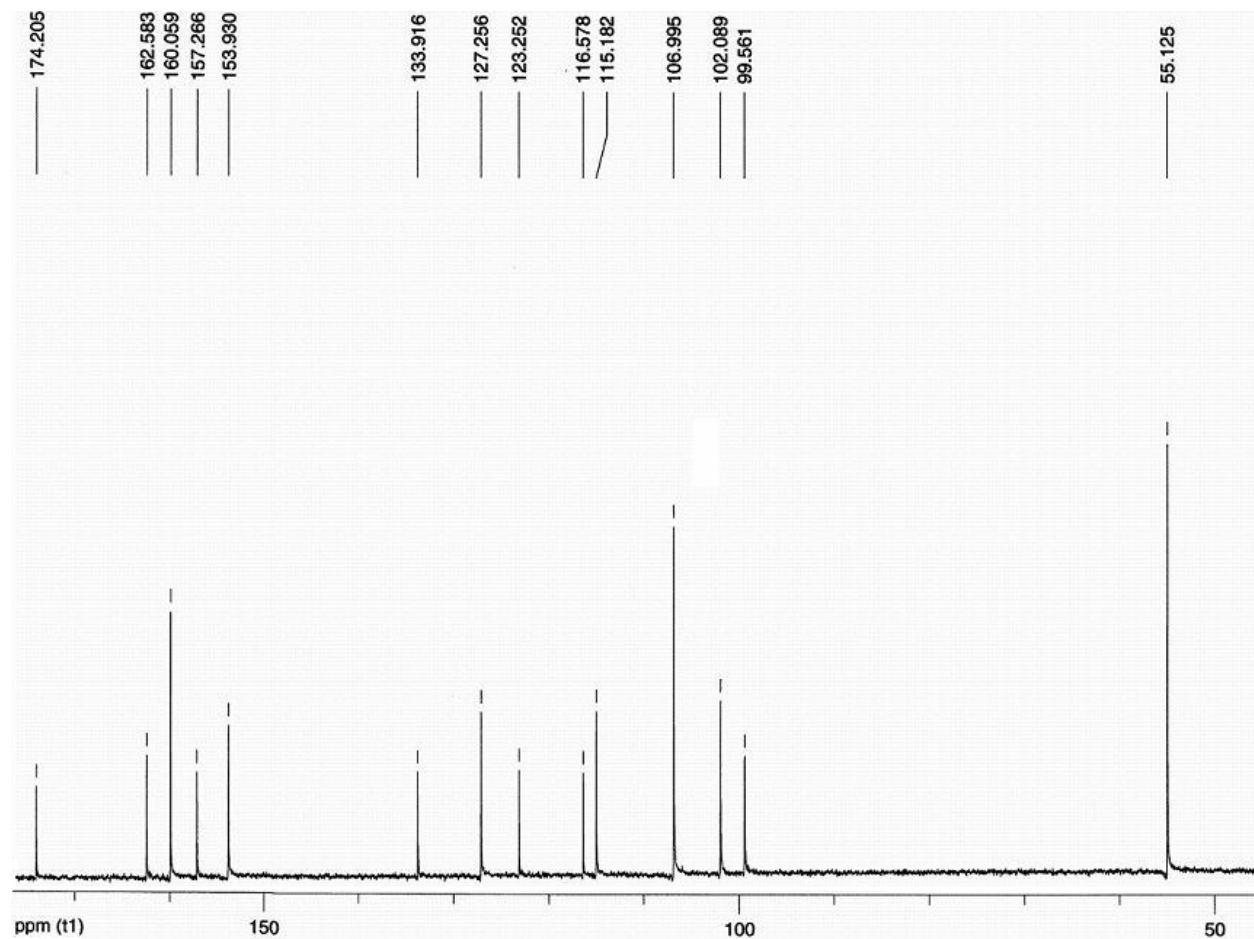


### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.77 y 4.78).



**<sup>1</sup>H-RMN(d<sub>6</sub>- DMSO, δ ppm):** 3,76 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 6,51 (t, 1H, Ph-H4', J=2,20 Hz), 6,75 (d, 2H, Ph-H2', Ph-H6', J=2,20 Hz), 6,87 (d, 1H, Ph- H8, J=2,10 Hz), 6,94 (dd, 1H, Ph-H6, J=2,01 Hz, J=8,70 Hz), 7,97 (d, 1H, Ph-H5, J=8,70 Hz), 8,40 (s, 1H, H2), 10,82 (s, 1H, OH)

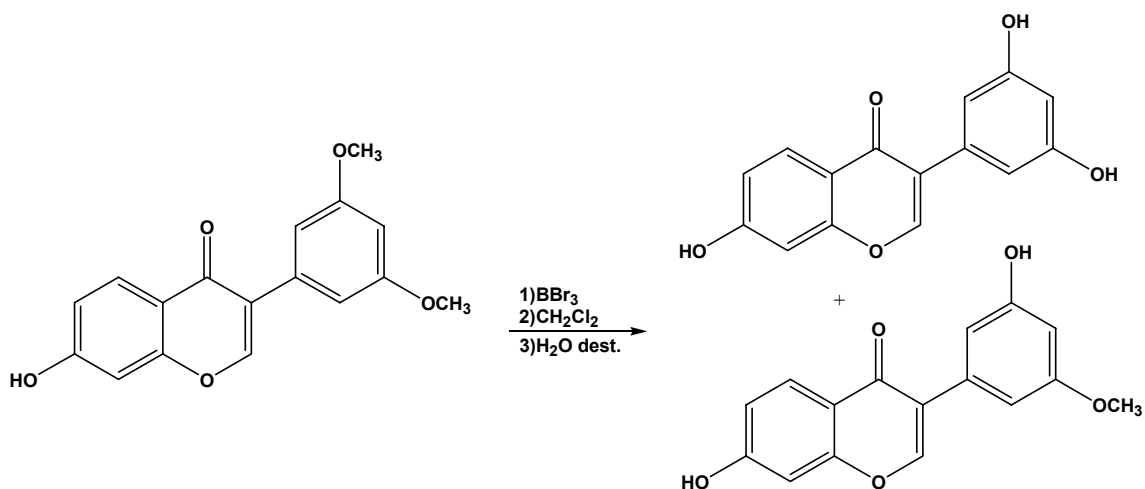
**FIG. 4.77.** <sup>1</sup>H-RMN de [D-OH-3'5'(II)]



**<sup>13</sup>C-RMN(*d*<sub>6</sub>- DMSO, δ ppm):** 54,70 (OCH<sub>3</sub>), 99,14 (C4'), 101,67 (C8), 106,57 (C2', C6'), 114,76 (C6), 116,15 (C4a), 122,83 (C3), 126,83 (C5), 133,49 (C1'), 153,51 (C2), 156,84 (C8a), 159,64 (C3', C5'), 162,16 (C7), 173,78 (C4)

**FIG. 4.78.** <sup>13</sup>C-RMN de [D-OH-3'5'(II)]

#### 4.4.13. Síntesis de 7,3',5'-trihidroxiisoflavona [D-OH-3'5']



El método de síntesis es idéntico al descrito en el apartado 4.4.4. El tiempo de reacción en este caso es de 24 horas. El producto obtenido se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$  8:2 obteniéndose tanto el producto deseado la 7,3',5'-trihidroxiisoflavona como el compuesto proveniente de la hidrólisis de un solo grupo  $\text{OCH}_3$ , la 7,3'-dihidroxi-5'-metoxiisoflavona.

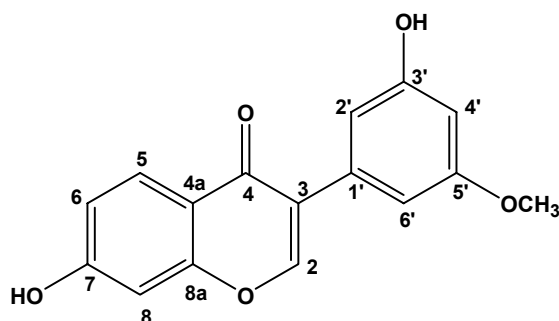
Las cantidades empleadas son las que se detallan a continuación:

- 7-hidroxi-3',5'-dimetoxiisoflavona: 3 g. (10 mmol)
- Diclorometano seco: 250 ml
- Tribromuro de boro disolución 1M en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 8,50 ml (5 equivalentes)
- Agua destilada: 200 ml

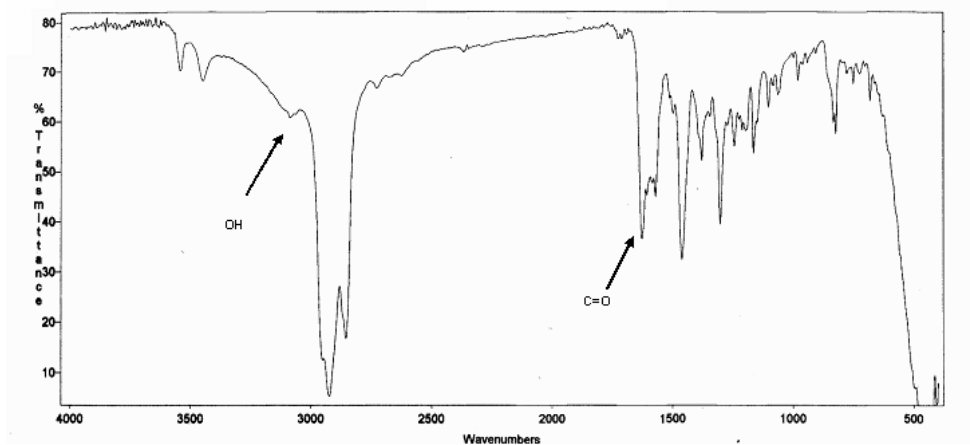
Finalmente se obtienen 2,01 g. (7,4 mmol) de un sólido que resultó ser la 7,3',5'-trihidroxiisoflavona que representa un rendimiento del 75 % y 0,28 g. (1 mmol) de la 7,3'-dihidroxi-5'-metoxiisoflavona que representa un rendimiento del 10 %.

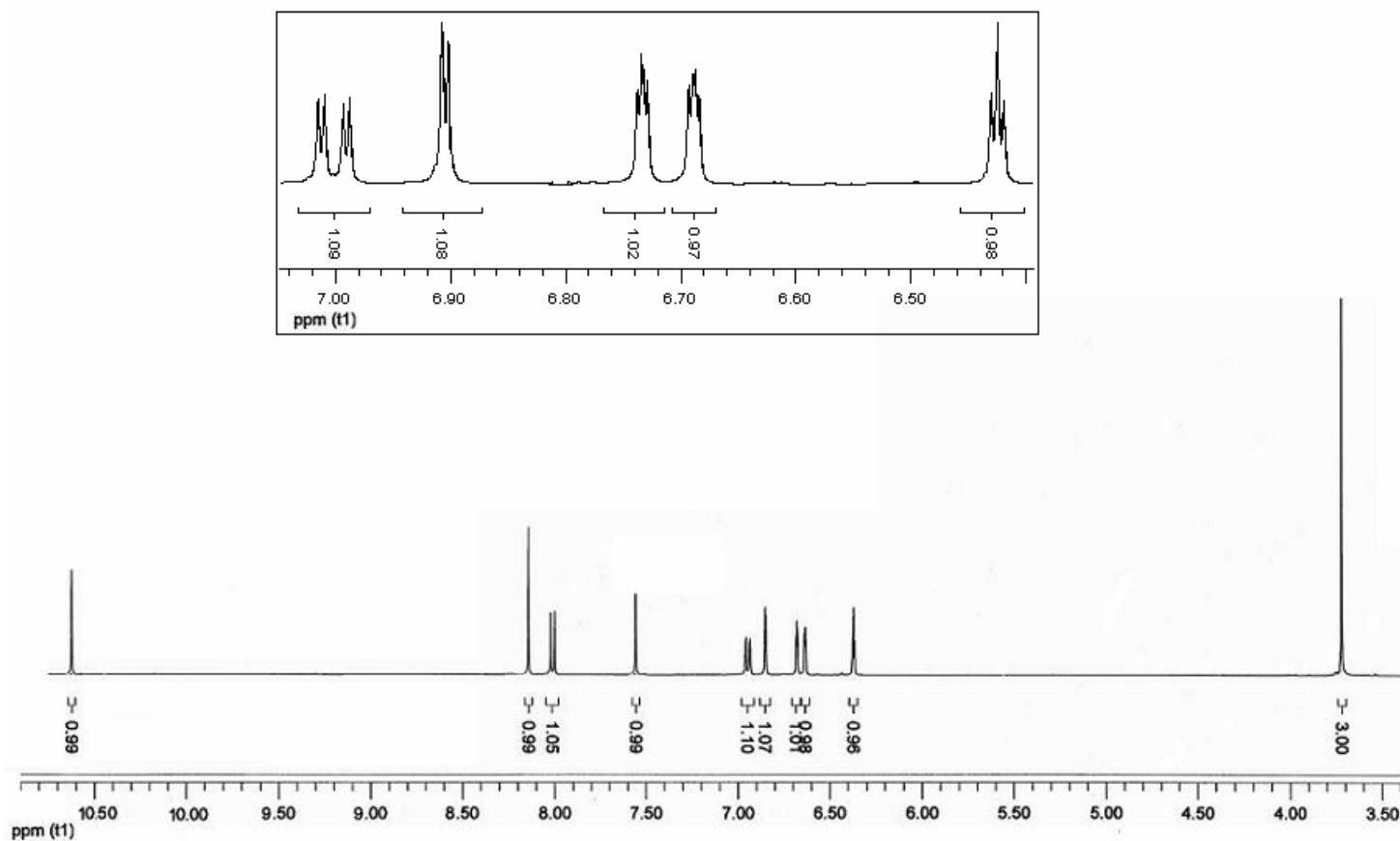
**7,3'-dihidroxi-5'-metoxiisoflavona**

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

**1.- Análisis elemental al producto:**

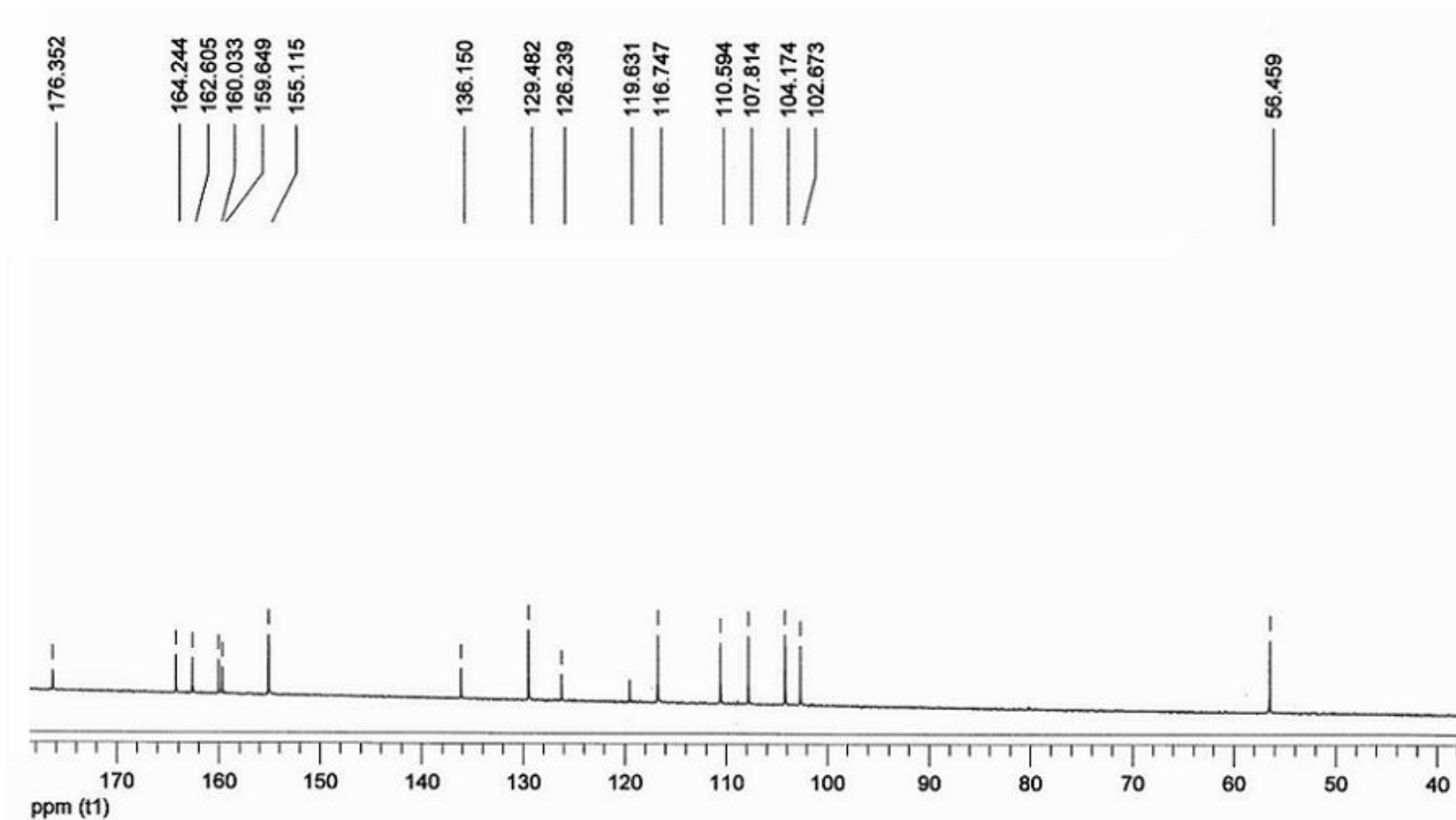
<i>VALOR CALCULADO</i>	<i>VALOR OBSERVADO</i>
C = 67,60 %	C = 67,21 %
H = 4,25 %	H = 4,40 %
O = 28,14 %	O = 28,39 %

**2.- Punto de fusión: °C****3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3087  $\text{cm}^{-1}$  (OH), 1626  $\text{cm}^{-1}$  (C=O)****4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.79 y 4.80).**



***<sup>1</sup>H-RMN(d<sub>6</sub>-acetona, δ ppm):*** 3,77 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6,42 (dd, 1H, Ph-H4', J=2,20 Hz), 6,67-6,79 (m, 1H, Ph-H2'), 6,72-6,74 (m, 1H, Ph-H6'), 6,90 (d, 1H, Ph-H8, J=2,20 Hz), 7,00 (dd, 1H, Ph-H6, J=2,20 Hz, J=8,70 Hz), 7,55 (s, 1H, OH), 8,07 (d, 1H, Ph-H5, J=8,7Hz), 8,19 (s, 1H, H2), 10,65 (s, 1H, OH)

**FIG. 4.79.** <sup>1</sup>H-RMN de [D-OH-3'5 (subproducto)]

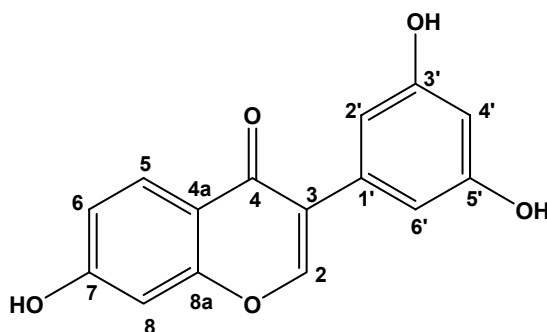


$^{13}\text{C}$ -RMN( $d_6$ -acetona,  $\delta$  ppm): 56,46 (OCH<sub>3</sub>), 102,67 (C4'), 104,17 (C8), 107,81 (C6'), 110,59 (C2'), 116,74 (C6), 119,63 (C4a), 126,24 (C3), 129,48 (C5), 136,15 (C1'), 155,11 (C2), 159,65 (C5'), 160,03 (C8a), 162,60 (C3'), 164,24 (C7), 176,35 (C4)

FIG.4.80.  $^{13}\text{C}$ -RMN de [D-OH-3'5' subproducto]

### 7,3',5'-trihidroxiisoflavona

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

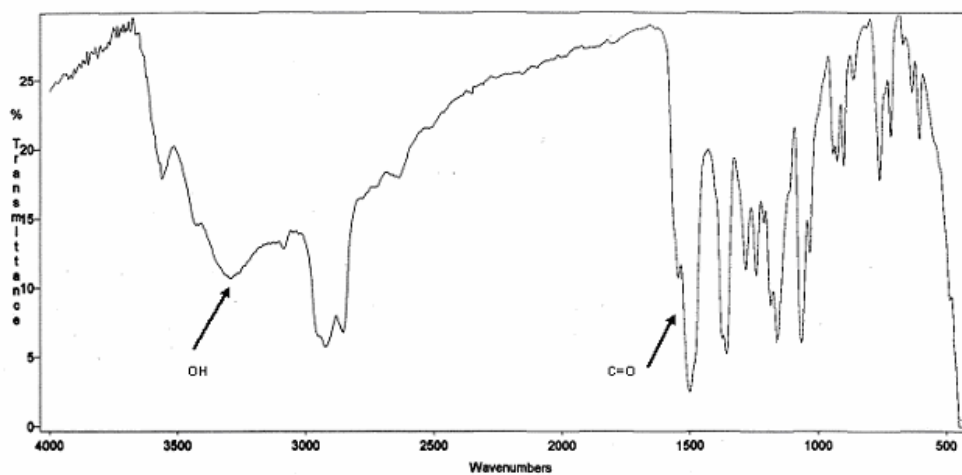


#### 1.- Análisis elemental al producto:

VALOR CALCULADO	VALOR OBSERVADO
C = 66,67 %	C = 66,96 %
H = 3,73 %	H = 3,19 %
O = 29,60 %	O = 29,85 %

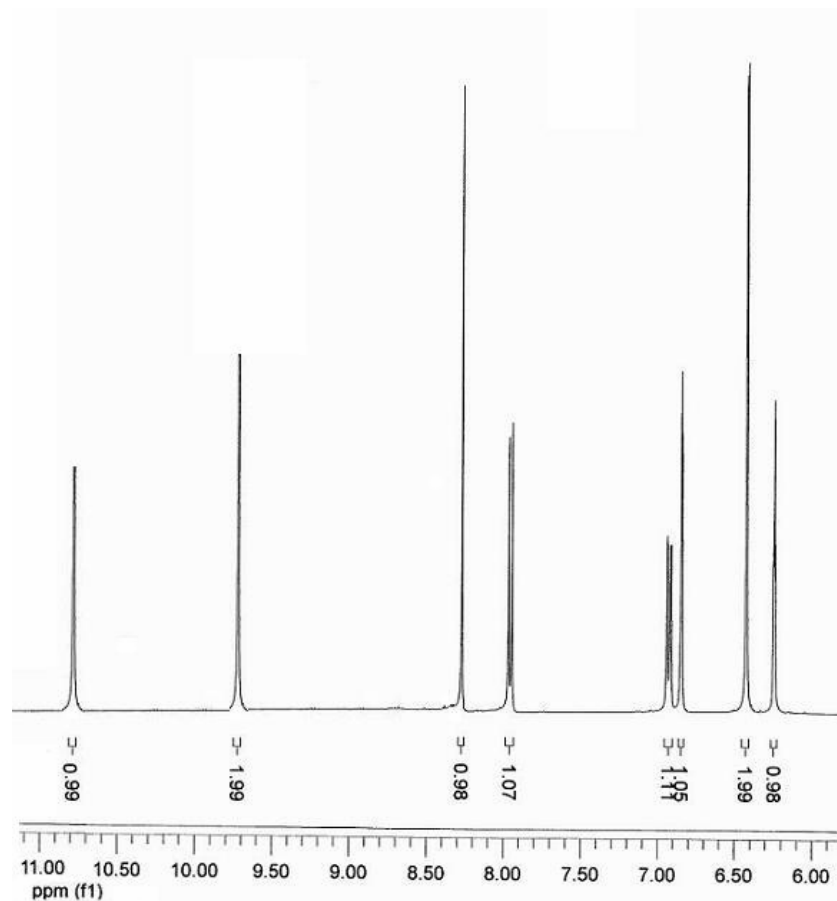
#### 2.- Punto de fusión: °C

#### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3245 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1610 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)



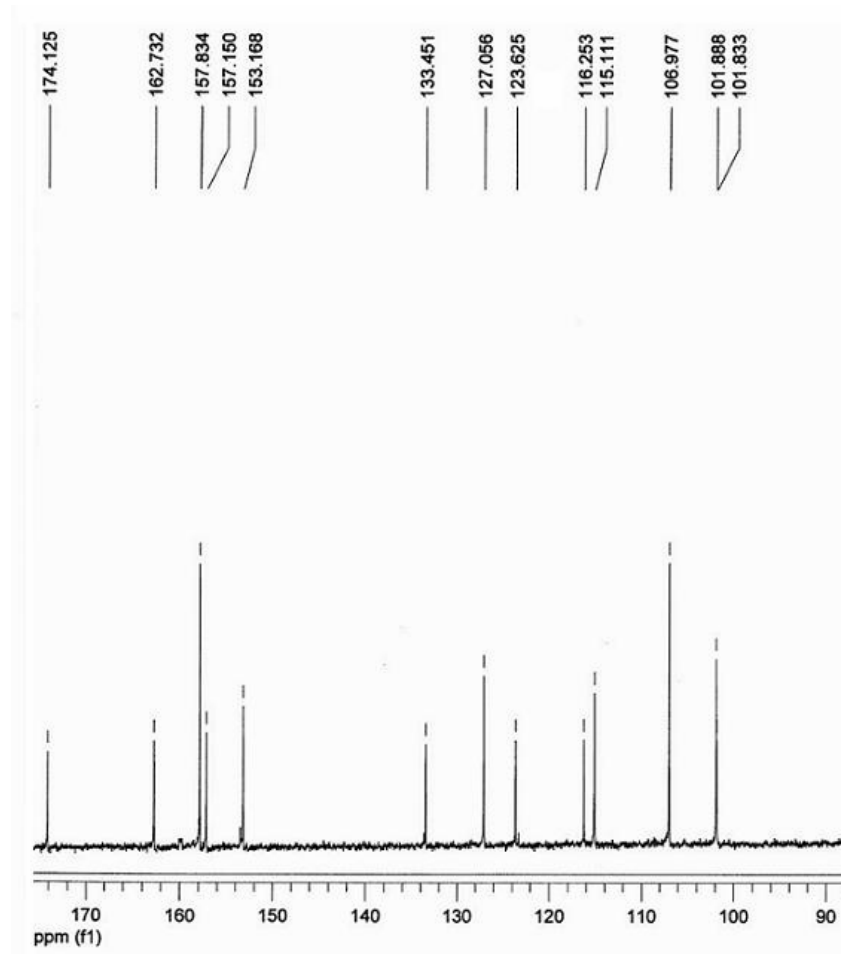
#### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.81 y 4.82).





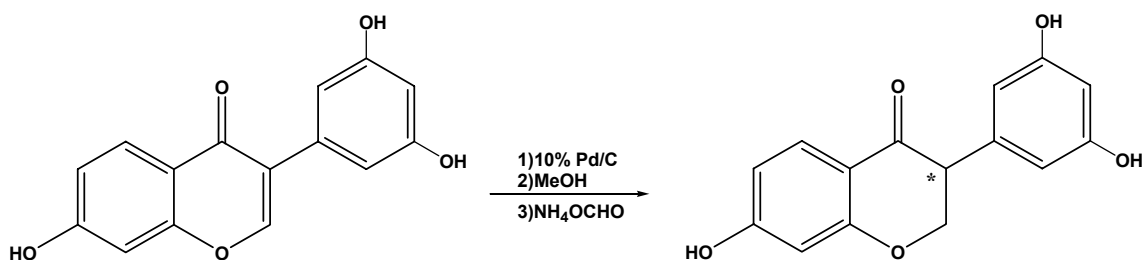
**<sup>1</sup>H-RMN(d<sub>6</sub>- DMSO, δ ppm):** 6,24 (t, 1H, Ph-H4', J=2,10 Hz), 6,42 (d, 2H, Ph-H2', Ph-H6', J=2,10 Hz), 6,84 (d, 1H, Ph-H8, J=2,20 Hz), 6,92 (dd, 1H, Ph-H6, J=2,20 Hz, J=8,7 Hz), 7,95 (d, 1H, Ph-H5, J=8,7Hz), 8,26 (s, 1H, H2), 9,76 (s, 2H, OH), 10,80 (s, 1H, OH)

**FIG. 4.81.** <sup>1</sup>H-RMN de [D-OH-3'5]



**<sup>13</sup>C-RMN(*d*<sub>6</sub>- DMSO, δ ppm):** 101,83 (C8), 101,88 (C4'), 106,97 (C2', C6'), 115,11 (C6), 116,25 (C4a), 123,62 (C3), 127,05 (C5), 133,45 (C1'), 153,16 (C2), 157,15 (C3', C5'), 157,83 (C8a), 162,73 (C7), 174,12 (C4)

**FIG. 4.82.** <sup>13</sup>C-RMN de [D-OH-3'5']

**4.4.14. Síntesis de 7,3',5'-trihidroxiisoflavanona [DHD-OH-3'5']**

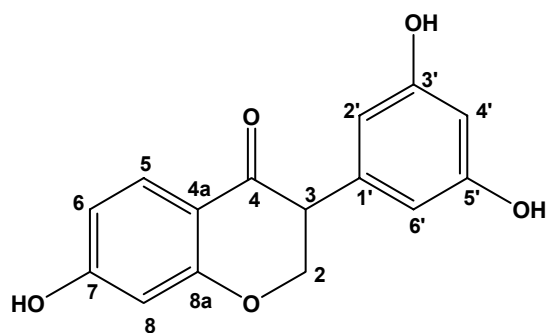
El método de síntesis es idéntico al descrito en el apartado 4.4.5. El tiempo de reacción en este caso es de 8 horas. El producto obtenido se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$  7:2 obteniéndose el producto deseado la 7,3',5'-trihidroxiisoflavanona.

Las cantidades empleadas son las que se detallan a continuación:

- 7,3',5'-trihidroxiisoflavona: 0,50 g. (1,85 mmol)
- 10% Pd/C: 0,50 g.
- Metanol seco: 100 ml
- Formiato de amonio: 0,46 g. (4 mmol)

Finalmente se obtienen 0,23 g. (0,84 mmol) de un sólido que resultó ser la 7,3',5'-trihidroxiisoflavanona que representa un rendimiento del 46 %.

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

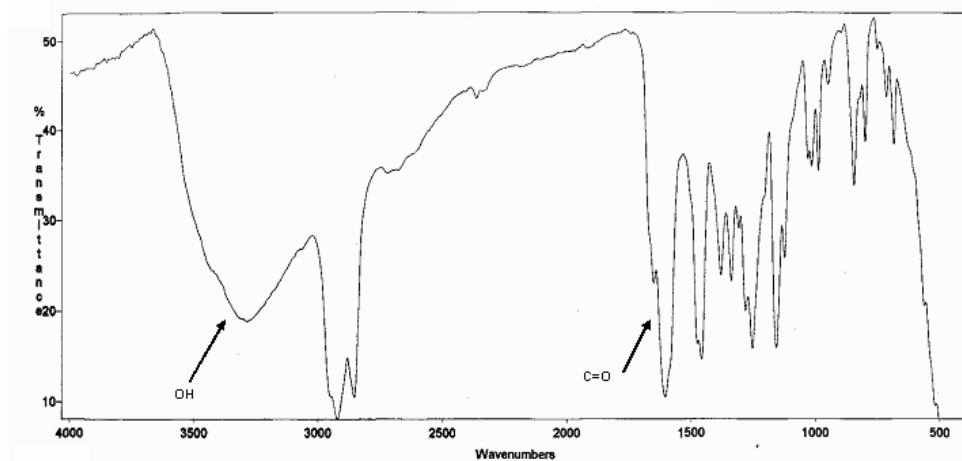


### 1.- Análisis elemental al producto:

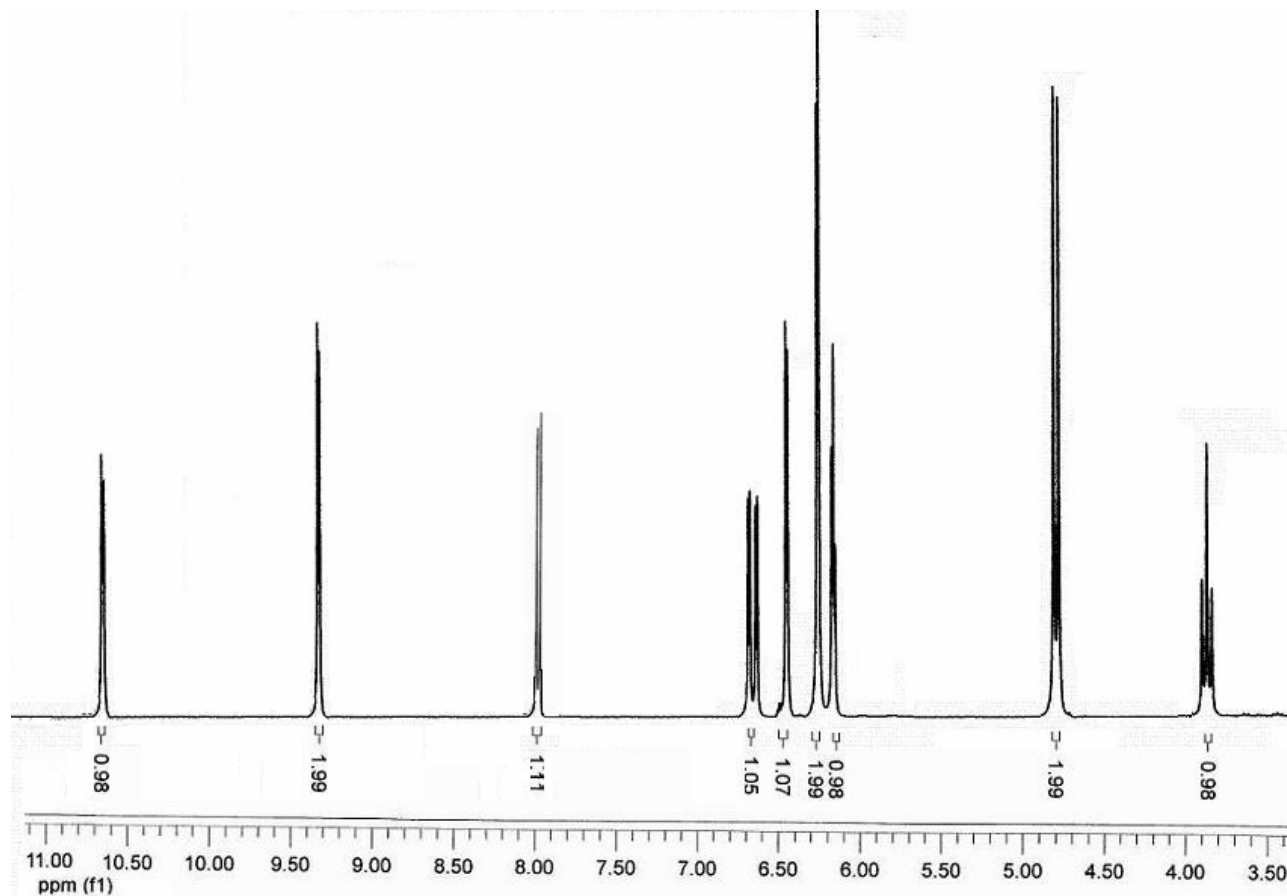
<i>VALOR CALCULADO</i>	<i>VALOR OBSERVADO</i>
C = 66,17 %	C = 66,39 %
H = 4,44 %	H = 4,67 %
O = 29,38 %	O = 28,94 %

### 2.- Punto de fusión: °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3287 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1603 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)

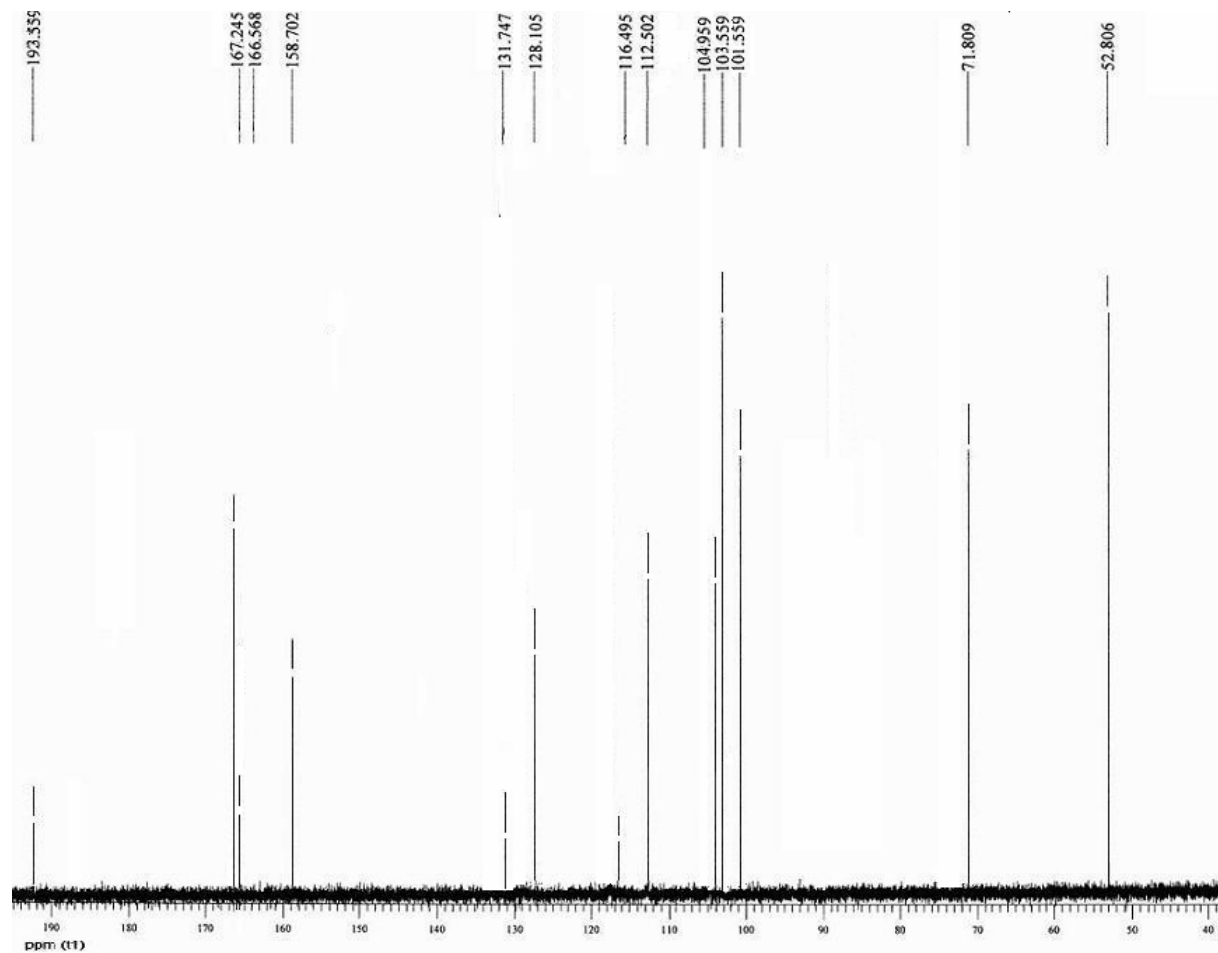


### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.83 y 4.84).



**<sup>1</sup>H-RMN(d<sub>6</sub>-acetona, δ ppm):** 3,71 (dd, 1H, H3, J=6,6 Hz), 4,63 (d, 2H, H2, J=6,6 Hz), 6,25 (t, 1H, Ph-H4', J=2,20 Hz), 6,30 (d, 2H, Ph-H2', Ph-H6', J=2,20 Hz), 6,45 (d, 1H, Ph-H8, J=2,20 Hz), 6,60 (dd, 1H, Ph-H6, J=2,20 Hz, J=8,80 Hz), 7,96 (d,1H, Ph-H5, J=8,80 Hz), 9,32 (s, 2H, OH), 10,65 (s, 1H, OH)

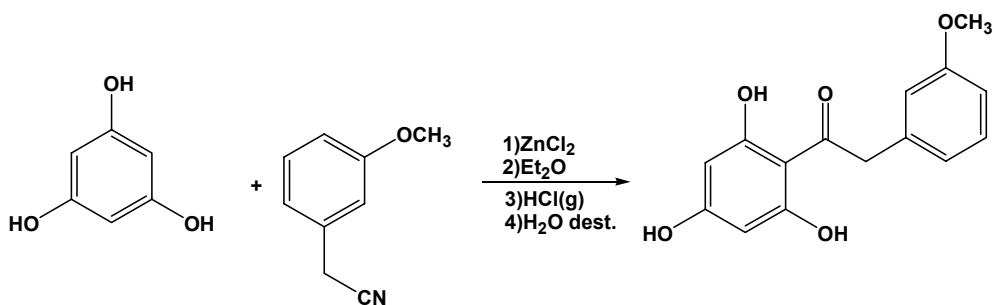
**FIG. 4.83.** <sup>1</sup>H-RMN de [DHD-OH-3'5]



**<sup>13</sup>C-RMN(*d*<sub>6</sub>-acetona, δ ppm):** 52,80 (C3), 71,80 (C2), 101,55 (C4'), 103,55 (C2', C6'), 104,95 (C8), 112,50 (C6), 116,49 (C4a), 128,10 (C5), 131, 74 (C1'), 158,70 (C3', C5'), 166,56 (C8a), 167,24 (C7), 193,55 (C4)

**FIG. 4.84.** <sup>13</sup>C-RMN de [DHD-OH-3'5]

#### 4.4.15. Síntesis de 2,4,6-trihidroxi-3'-metoxidesoxibenzoína [G-OH-3'(I)]



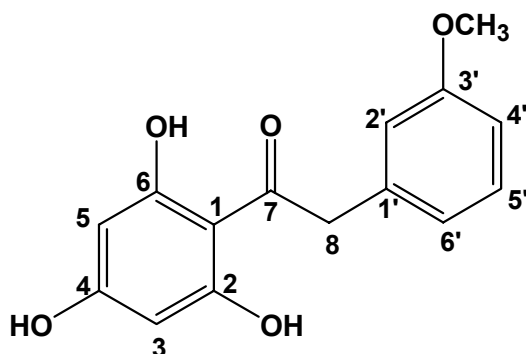
El método de síntesis es idéntico al descrito en el apartado 4.4.2. El tiempo de reacción en este caso es de 6,5 horas. Debido a la presencia de 3-metoxifenilacético (derivado procedente de la hidrólisis de uno de los productos de partida, 3-metoxifenilacetónitrilo), que interfiere en la purificación por columna del producto deseado, se procede a su eliminación sometiendo a la mezcla a lavados con una disolución de bicarbonato (NaHCO<sub>3</sub>). Una vez eliminado el subproducto el producto se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:AcOEt 7:3, obteniéndose así el producto puro, la 2,4,6-trihidroxi-3'-metoxidesoxibenzoína.

Las cantidades empleadas son las que se detallan a continuación:

- 1,3,5-trihidroxi-benceno (Phloroglucinol): 16,21 g. (0,10 mol)
- Éter etílico seco: 40 ml
- Cloruro de zinc anhidro: 4 g. (0,03 mol)
- 3-metoxifenilacetónitrilo: 15 g. (0,10 mol)
- Éter dietílico seco: 30 ml
- Agua destilada: 300 ml

Así se obtienen 13,70 g. (50 mmol) de un sólido que resultó ser la 2,4,6-trihidroxi-3'-metoxidesoxibenzoína que representa un rendimiento del 50 %.

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

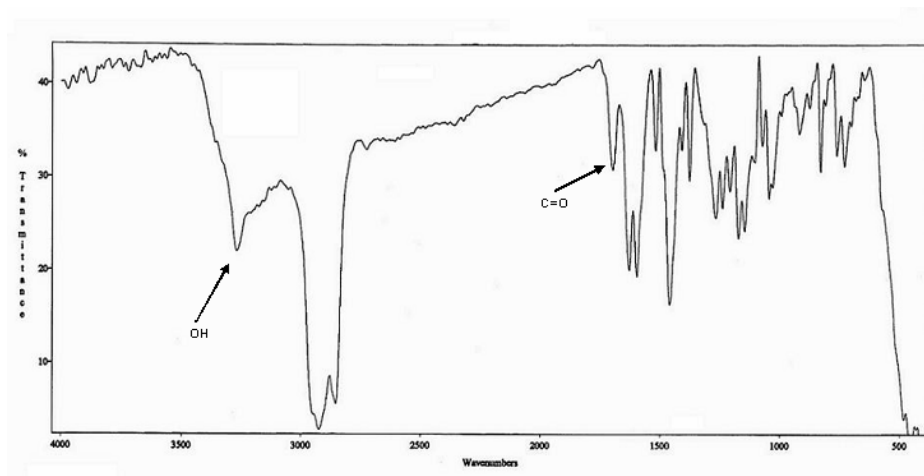


1.- Análisis elemental al producto:

<i>VALOR CALCULADO</i>	<i>VALOR OBSERVADO</i>
C = 65,69 %	C = 65,90 %
H = 5,15 %	H = 5,35 %
O = 29,17 %	O = 28,75 %

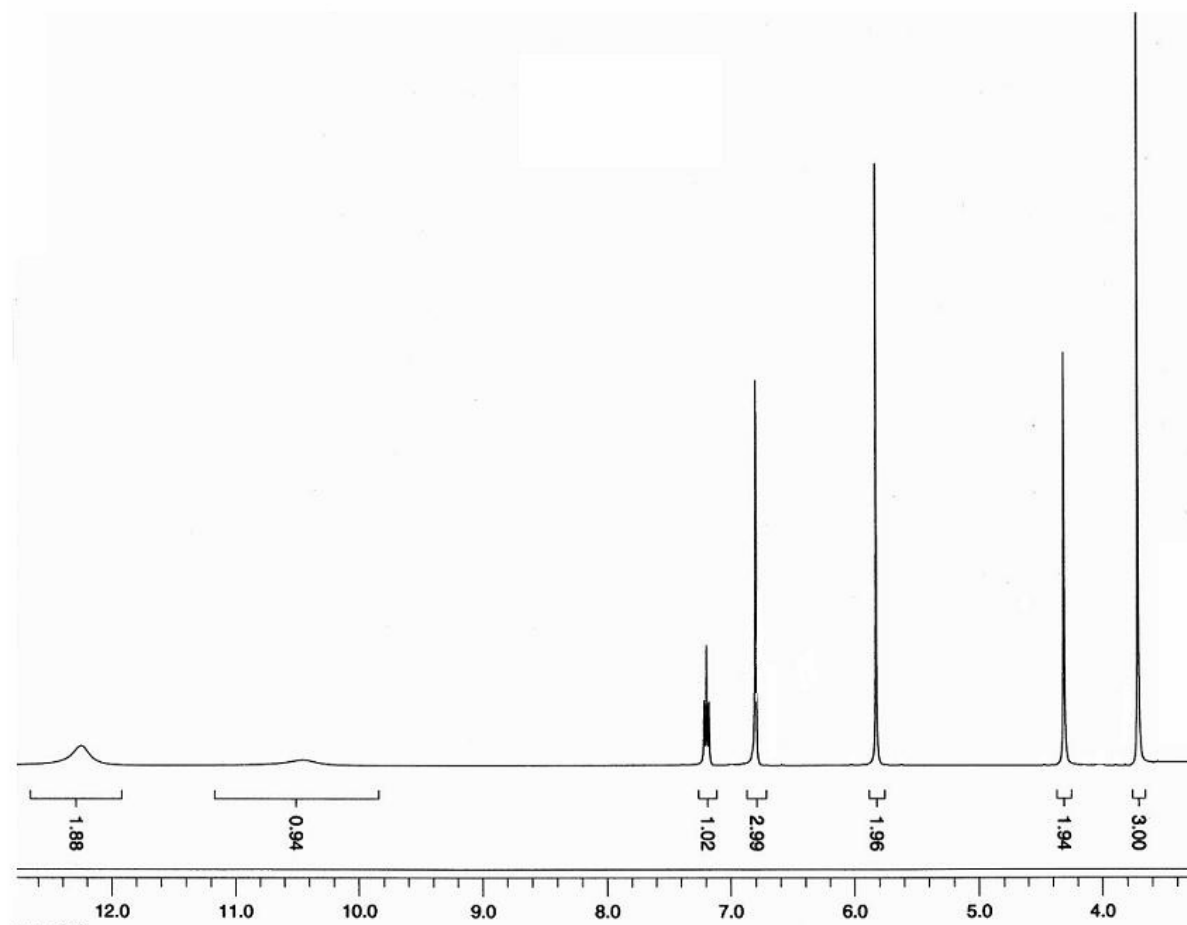
2.- Punto de fusión: °C

3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3264  $\text{cm}^{-1}$  (OH), 1627  $\text{cm}^{-1}$  (C=O)



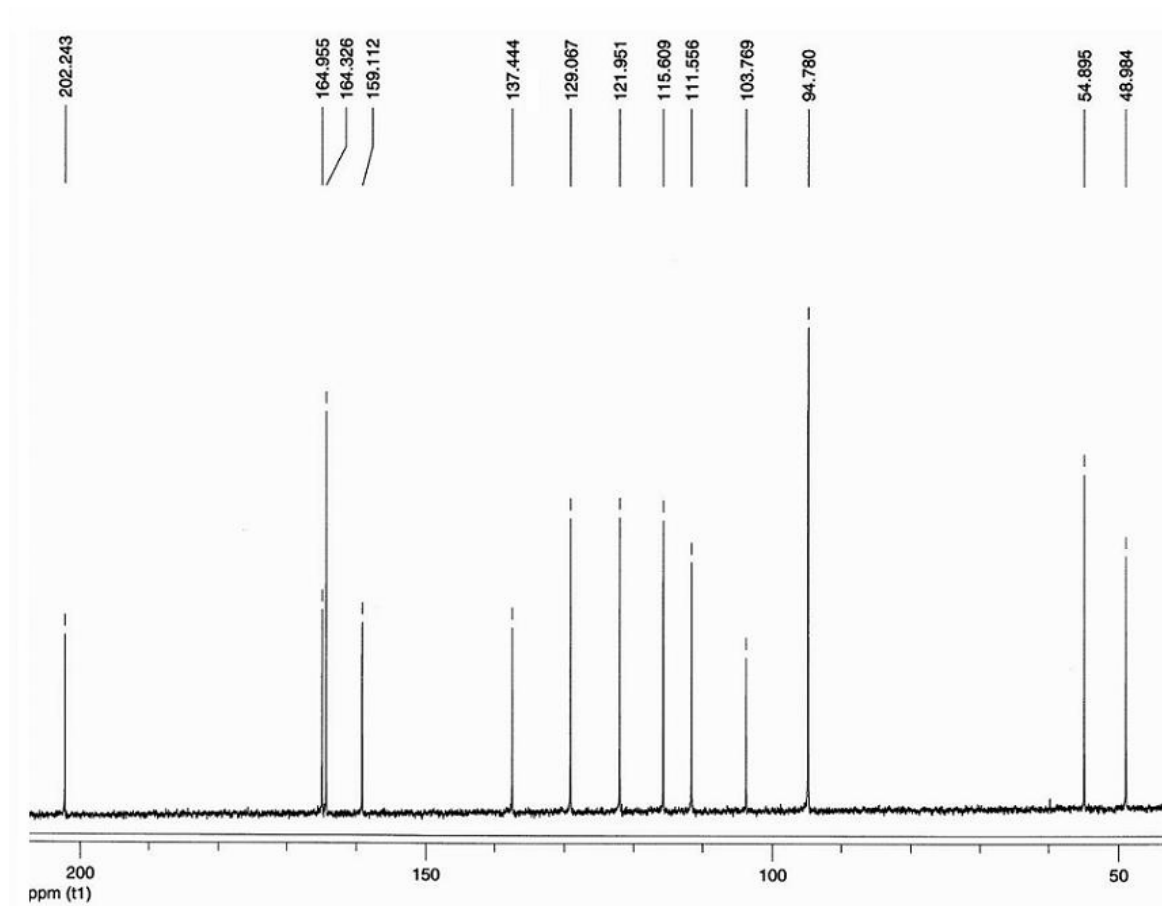
4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.85 y 4.86).





**$^1\text{H-RMN}(\text{d}_6\text{-DMSO}, \delta \text{ ppm}):$**  3,71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4,31 (s, 2H, H8), 5,82 (s, 2H, Ph-H3, Ph-H5), 6,77-6,79 (m, 3H, Ph-H2', Ph-H4', Ph-H6'), 7,19 (m, 1H, Ph-H5'), 10,48 (s, 1H, OH), 12,26 (s, 2H, OH)

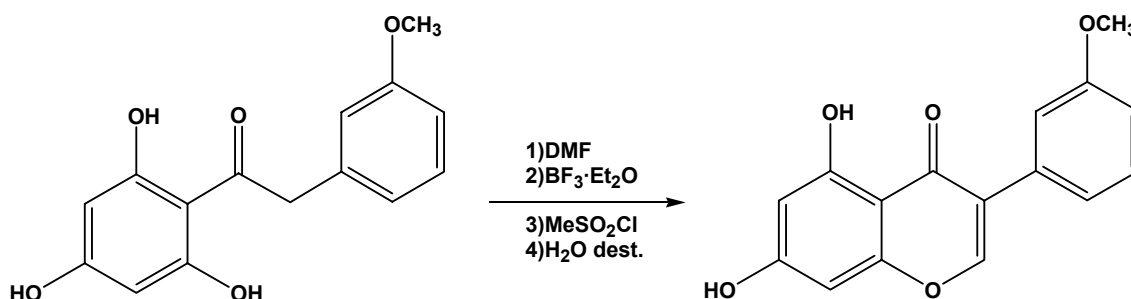
**FIG. 4.85.**  $^1\text{H-RMN}$  de [G-OH-3'(I)]



**<sup>13</sup>C-RMN(d<sub>6</sub>-DMSO, δ ppm):** 48.98 (C8), 54.89 (OCH<sub>3</sub>), 94.78 (C3, C5), 103.77 (C1), 111.55 (C4'), 115.61 (C2'), 121.95 (C6'), 129.07 (C5'), 137.44 (C1'), 159.11 (C3'), 164.32 (C2, C6), 164, 95 (C4), 202,24 (C7)

**FIG. 4.86.** <sup>13</sup>C-RMN de [G-OH-3'(I)]

#### 4.4.16. Síntesis de 5,7-dihidroxi-3',-metoxiisoflavona [G-OH-3'(II)]



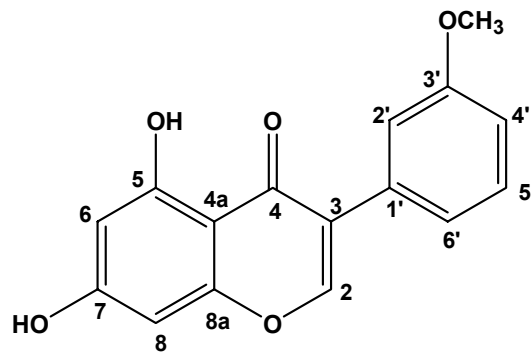
El método de síntesis es similar al descrito en el apartado 4.4.3. El tiempo de reacción en este caso es de 3 horas. La mezcla de reacción resultante se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :AcOEt 7:2, obteniéndose así un sólido que es la 5,7-dihidroxi-3',-metoxiisoflavona.

Las cantidades empleadas son las que se detallan a continuación:

- 2,4,6-trihidroxi-3'-metoxidesoxibenzoína: 7,53 g. (27,48 mmol)
- Dimetilformamida seca: 100 ml
- Trifluoruro de boro-éter: 14 ml (4 equivalentes)
- Metansulfonilo: 6,5 ml (3 equivalentes)
- Dimetilformamida seca: 40 ml
- Agua destilada: 400 ml

Así se obtienen 5,93 g. (20,88 mmol) de un sólido que resultó ser la 5,7-dihidroxi-3',-metoxiisoflavona que representa un rendimiento del 76 %.

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

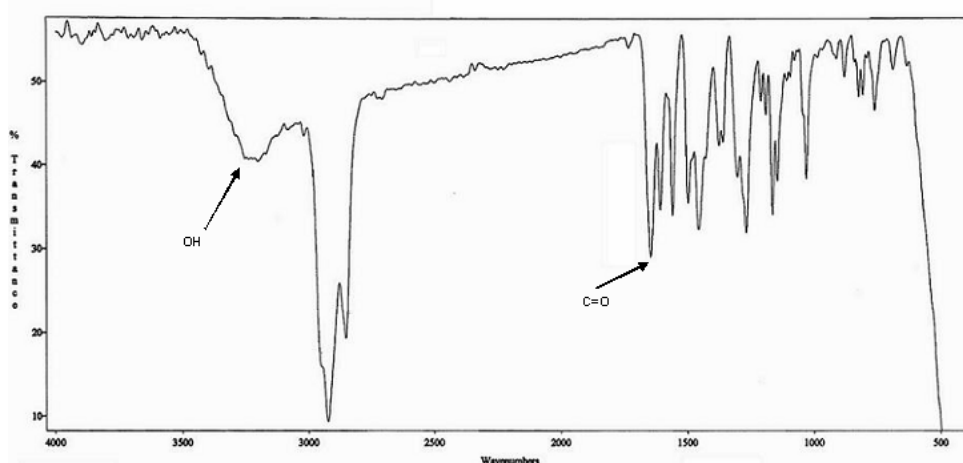


### 1.- Análisis elemental al producto:

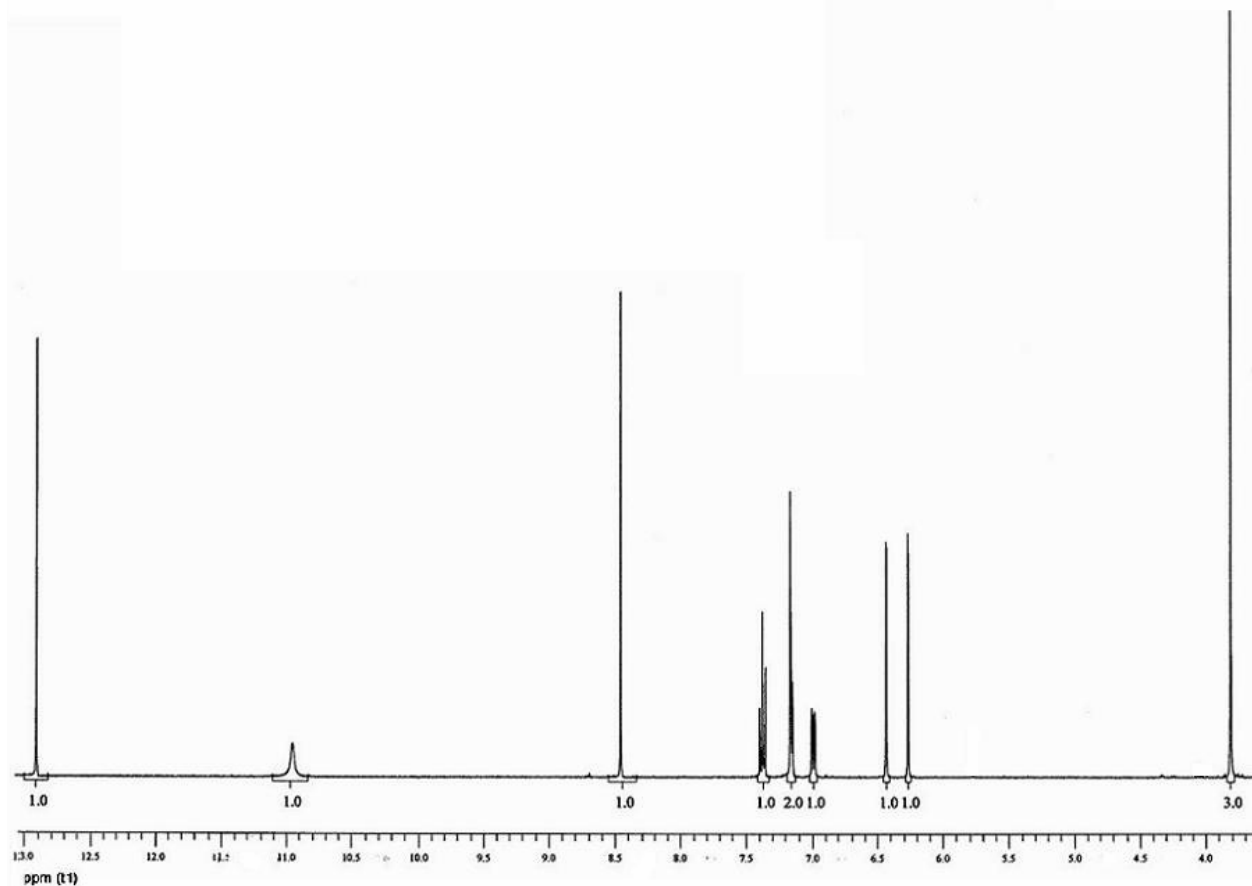
<i>VALOR CALCULADO</i>	<i>VALOR OBSERVADO</i>
C = 67,60 %	C = 67,01 %
H = 4,25 %	H = 4,45 %
O = 28,14 %	O = 28,54 %

### 2.- Punto de fusión: °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3249 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1646 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)

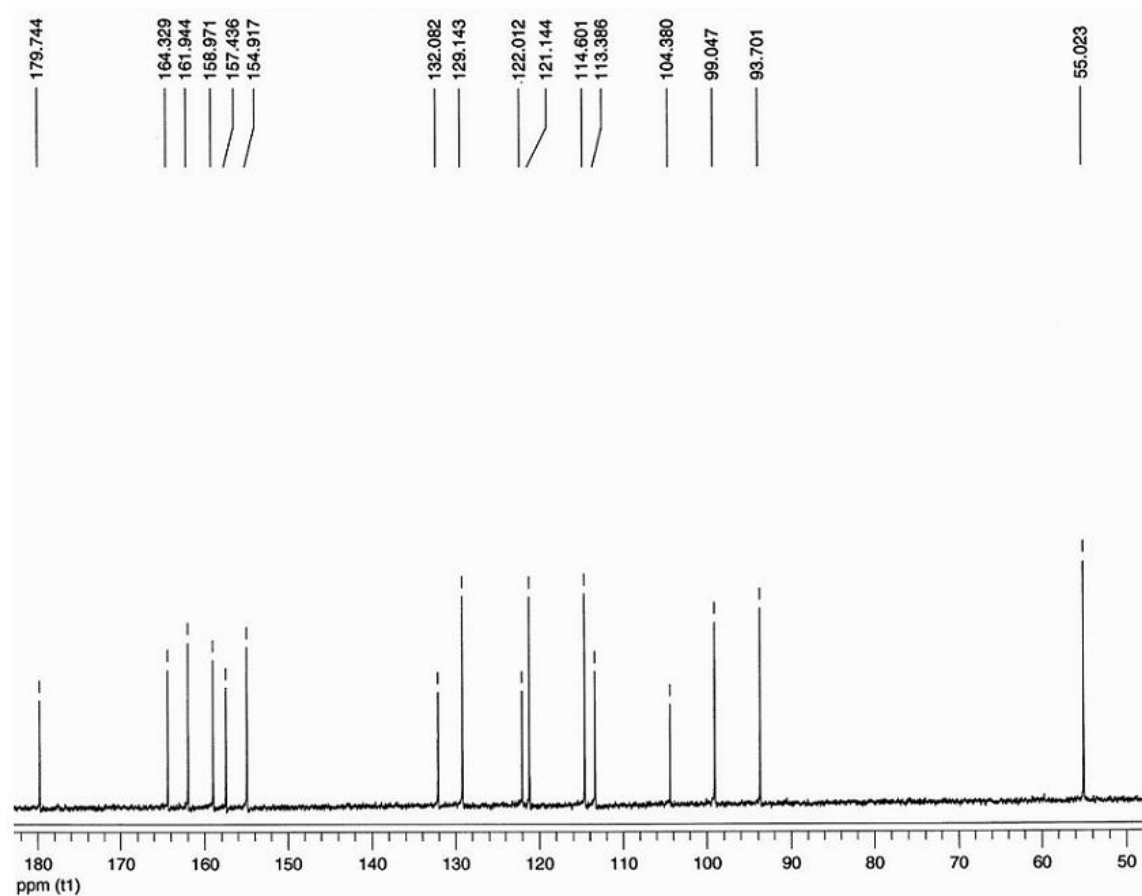


### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.87 y 4.88).



**<sup>1</sup>H-RMN(d<sub>6</sub>- DMSO, δ ppm):** 3,78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6,24 (d, 1H, Ph-H6, J=2,1 Hz), 6,41 (d, 1H, Ph-H8, J=2,1 Hz), 6,93-6,96 (m, 1H, Ph-H6'), 7,11-7,13 (m, 2H, Ph-H2', Ph-H4'), 7,33-7,35 (m, 1H Ph-H5'), 8,38 (s, 1H, H2), 10,91 (s, 1H, OH), 12,88 (s, 1H, OH)

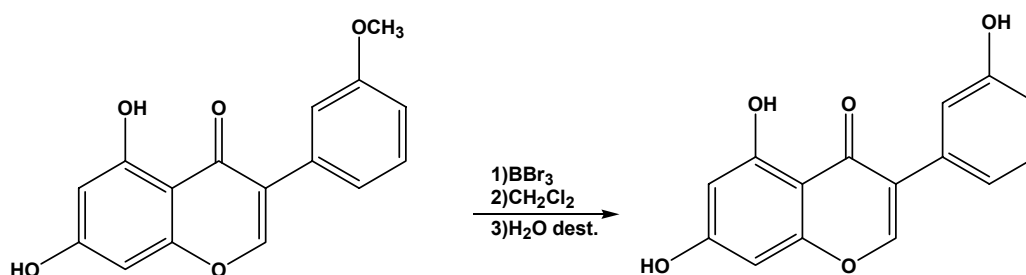
**FIG. 4.87.** <sup>1</sup>H-RMN de [G-OH-3'(II)]



**<sup>13</sup>C-RMN(d<sub>6</sub>- DMSO, δ ppm):** 54,61 (OCH<sub>3</sub>), 93,28 (C8), 98,63 (C6), 103, 96 (C4a), 112,97 (C4'), 114,18 (C2'), 120,73 (C6'), 121,59 (C3), 128,72 (C5'), 131,66 (C1'), 154,50 (C2), 157,02 (C3'), 158,55 (C8a), 161,53 (C5), 163,91 (C7), 179,33 (C4)

**FIG. 4.88.** <sup>13</sup>C-RMN de [G-OH-3'(II)]

#### 4.4.17. Síntesis de 5,7,3'-trihidroxiisoflavona [G-OH-3']



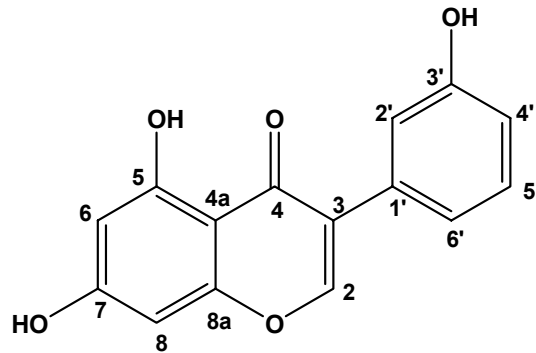
El método de síntesis es similar al descrito en el apartado 4.4.4. El tiempo de reacción en este caso es de 25 horas. La mezcla de reacción resultante se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :AcOEt 7:2, obteniéndose así un sólido que es la 5,7,3'-trihidroxiisoflavona.

Las cantidades empleadas son las que se detallan a continuación:

- 5,7-dihidroxi-3'-metoxiisoflavona: 5,70 g. (20 mmol)
- Diclorometano seco: 200 ml
- Tribromuro de boro disolución 1M en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 8,5 ml (2,5 equivalentes)
- Agua destilada: 200 ml

Se obtienen 4,86 g. (18 mmol) de un sólido que resultó ser la 5,7,3'-trihidroxiisoflavona que representa un rendimiento del 90 %.

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

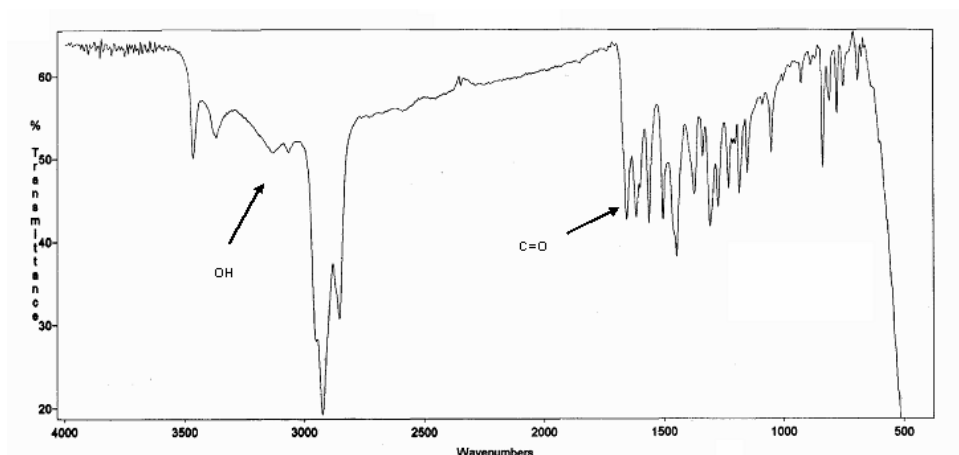


### 1.- Análisis elemental al producto:

<i>VALOR CALCULADO</i>	<i>VALOR OBSERVADO</i>
C = 66,67 %	C = 66,91 %
H = 3,73 %	H = 3,64 %
O = 29,60 %	O = 29,47 %

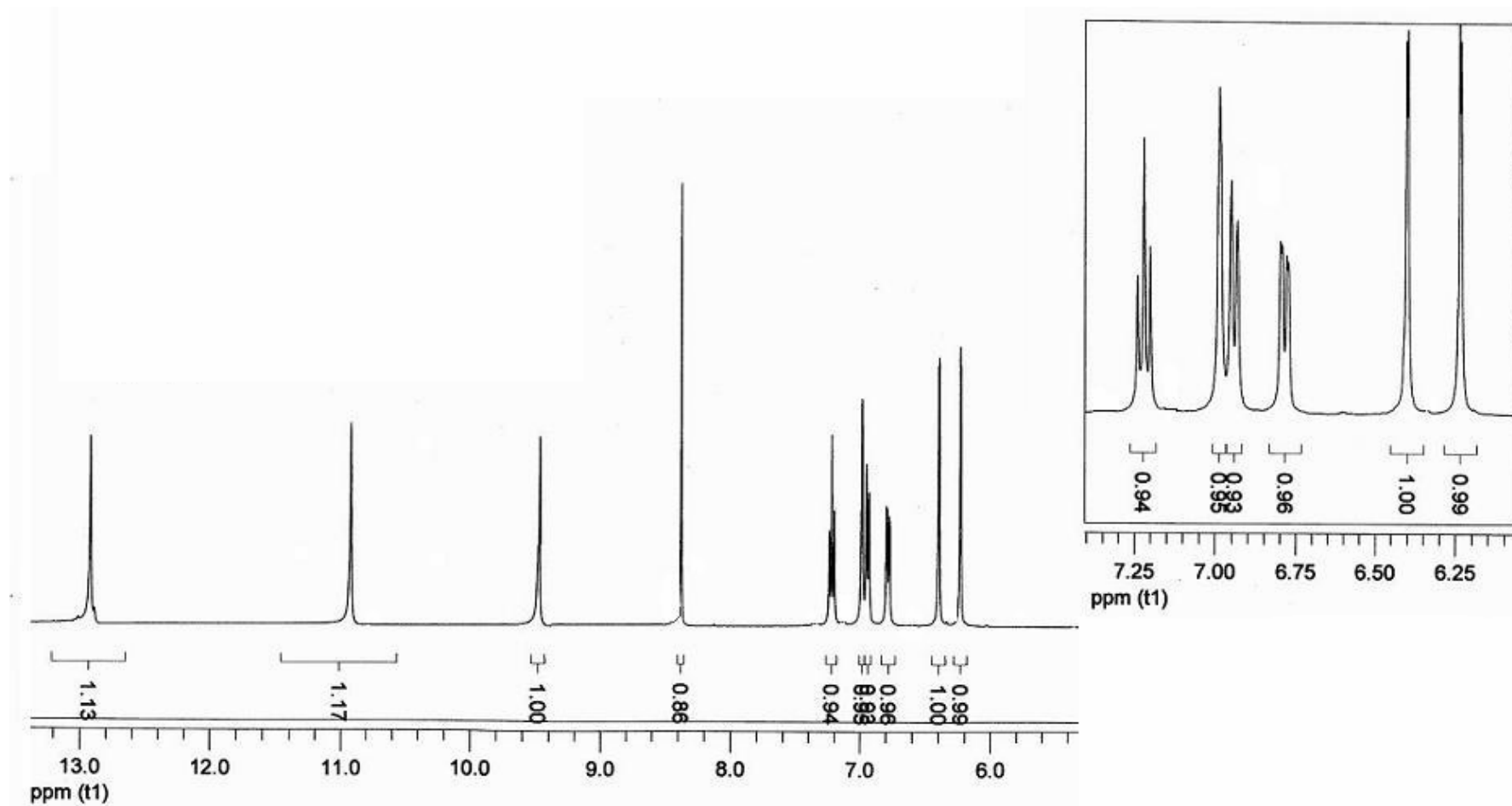
### 2.- Punto de fusión: °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3130 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1652 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)



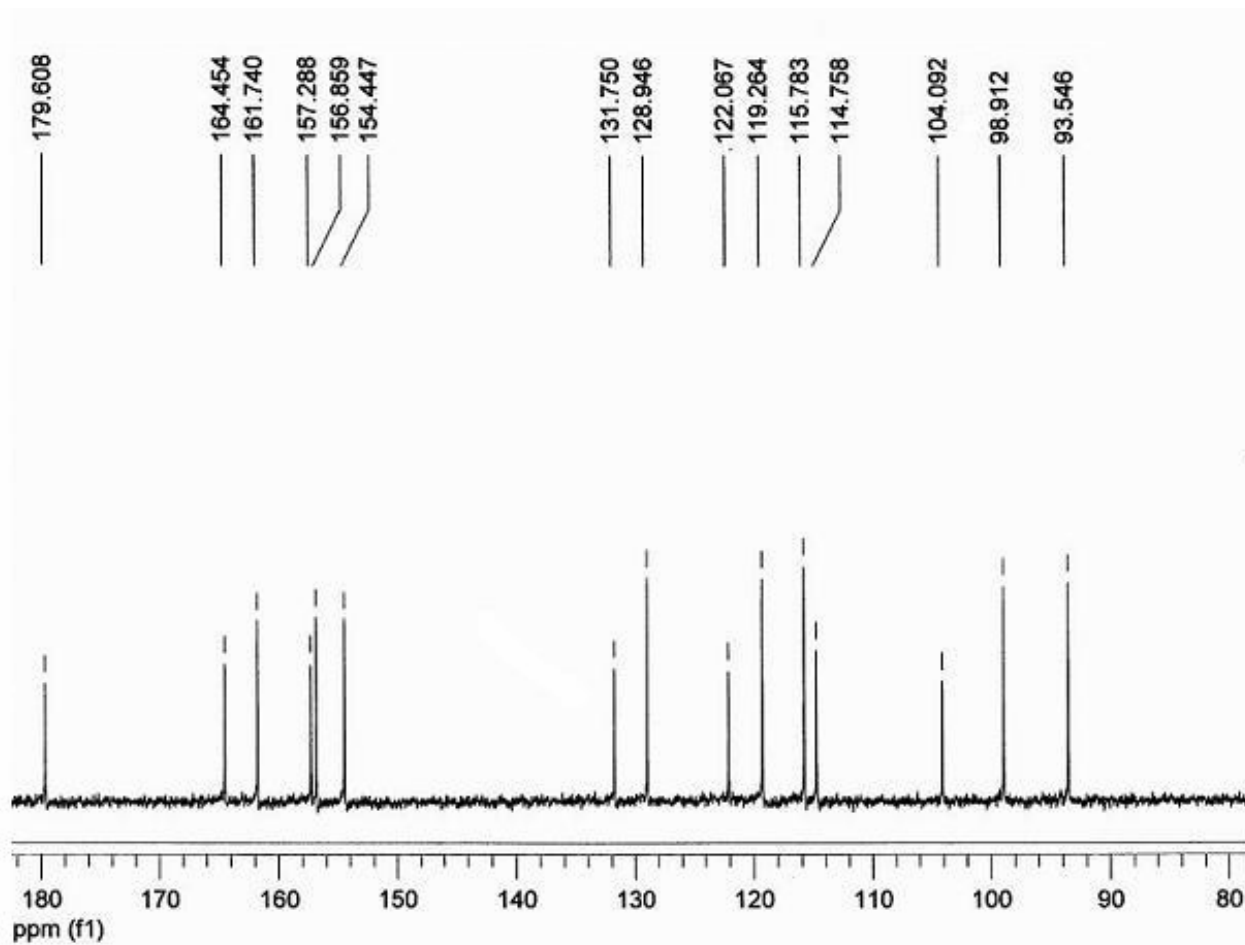
### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.89 y 4.90).





$^1\text{H-NMR}(\text{d}_6\text{-DMSO}, \delta \text{ ppm})$ : 6,29 (d, 1H, Ph-H6,  $J=2,1$  Hz), 6,43 (d, 1H, Ph-H8,  $J=2,1$  Hz), 6,75-6,77 (m, 1H, Ph-H6') 6,90-7,1 (m, 2H, Ph-H2', Ph4'), 7,25 (m, 1H, Ph-H5'), 8,21 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 9,5 (s, 1H, OH) 11,0 (s, 1H OH), 12,99 (s, 1H OH)

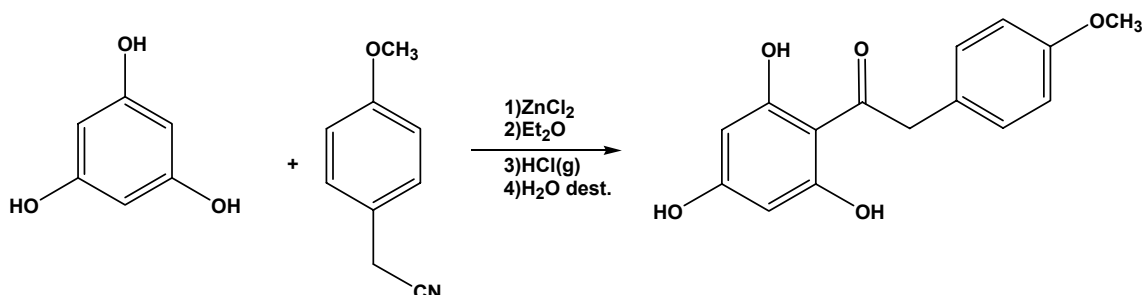
FIG. 4.89.  $^1\text{H-NMR}$  de [G-OH-3']



**$^{13}\text{C-RMN}(\text{d}_6\text{-DMSO}, \delta \text{ ppm})$ :** 93,54 (C8), 98,91 (C6), 104,09 (C4a), 114,76 (C2'), 115,78 (C4'), 119,26 (C6'), 122,06 (C3), 128,94 (C5'), 131,75 (C1'), 154,44 (C2), 156,86 (C3'), 157,29 (C8a), 161,74 (C5), 164,45 (C7), 179,61 (C4)

**FIG. 4.90.**  $^{13}\text{C-RMN}$  de [G-OH-3']

#### 4.4.18. Síntesis de 2,4,6-trihidroxi-4'-metoxidesoxibenzoína [G-OH-4'(I)]



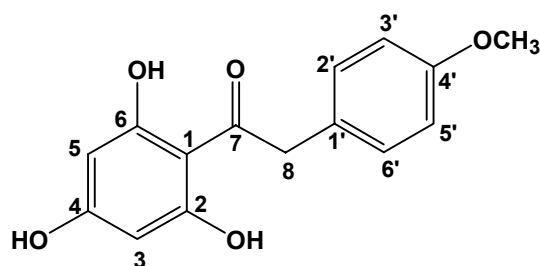
El método de síntesis es idéntico al descrito en el apartado 4.4.2. El tiempo de reacción para este paso es de 5 horas y el método de purificación es mediante recristalización con cloroformo, obteniéndose así un sólido que es la 2,4,6-trihidroxi-4'-metoxidesoxibenzoína.

Las cantidades empleadas son las que se detallan a continuación:

- 1,3,5-trihidroxibenceno (Phloroglucinol): 16,21 g. (0,10 mmol)
- Éter etílico seco: 40 ml
- Cloruro de zinc anhidro: 4 g. (0,03 mol)
- 4-metoxifenilacetónitrilo: 15 g. (0,03 mol)
- Éter dietílico seco: 30 ml
- Agua destilada: 300 ml

Así se obtienen 17,72 g. (65 mmol) de un sólido que resultó ser la 2,4,6-trihidroxi-4'-metoxidesoxibenzoína que representa un rendimiento del 65 %.

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

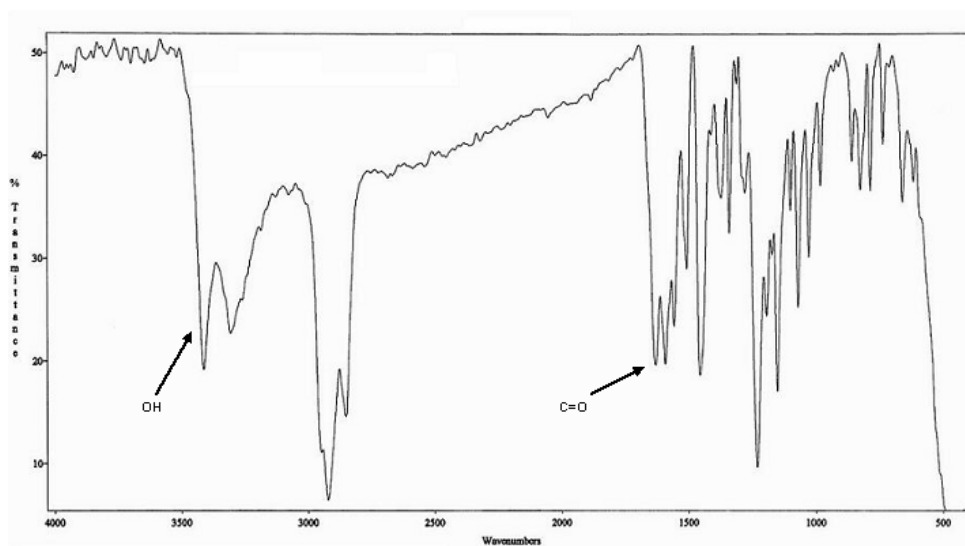


### 1.- Análisis elemental al producto:

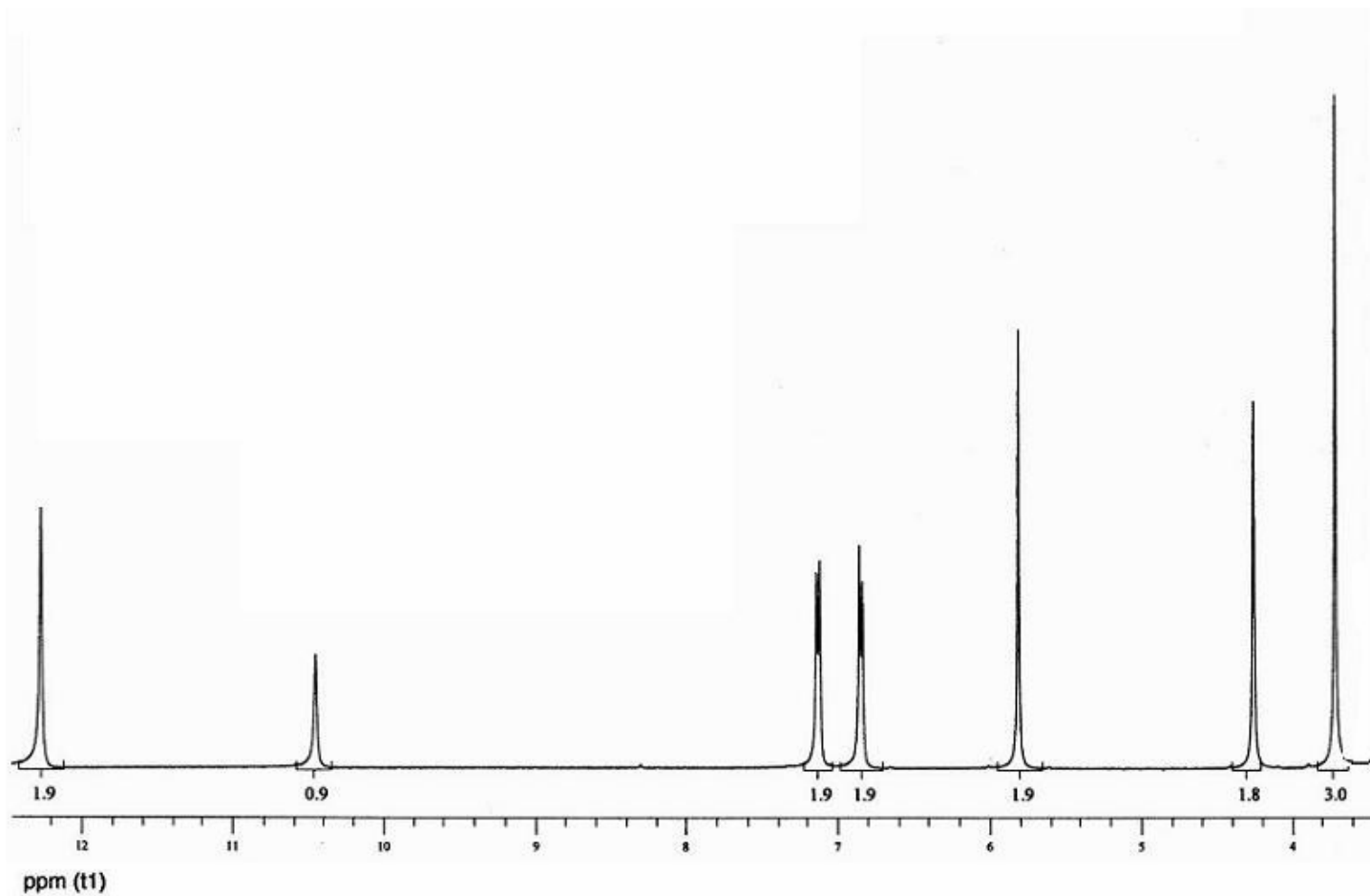
<i>VALOR CALCULADO</i>	<i>VALOR OBSERVADO</i>
C = 65,69 %	C = 66,01 %
H = 5,15 %	H = 5,28 %
O = 29,17 %	O = 28,71 %

### 2.- Punto de fusión: 201-202 °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3262 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1634 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)

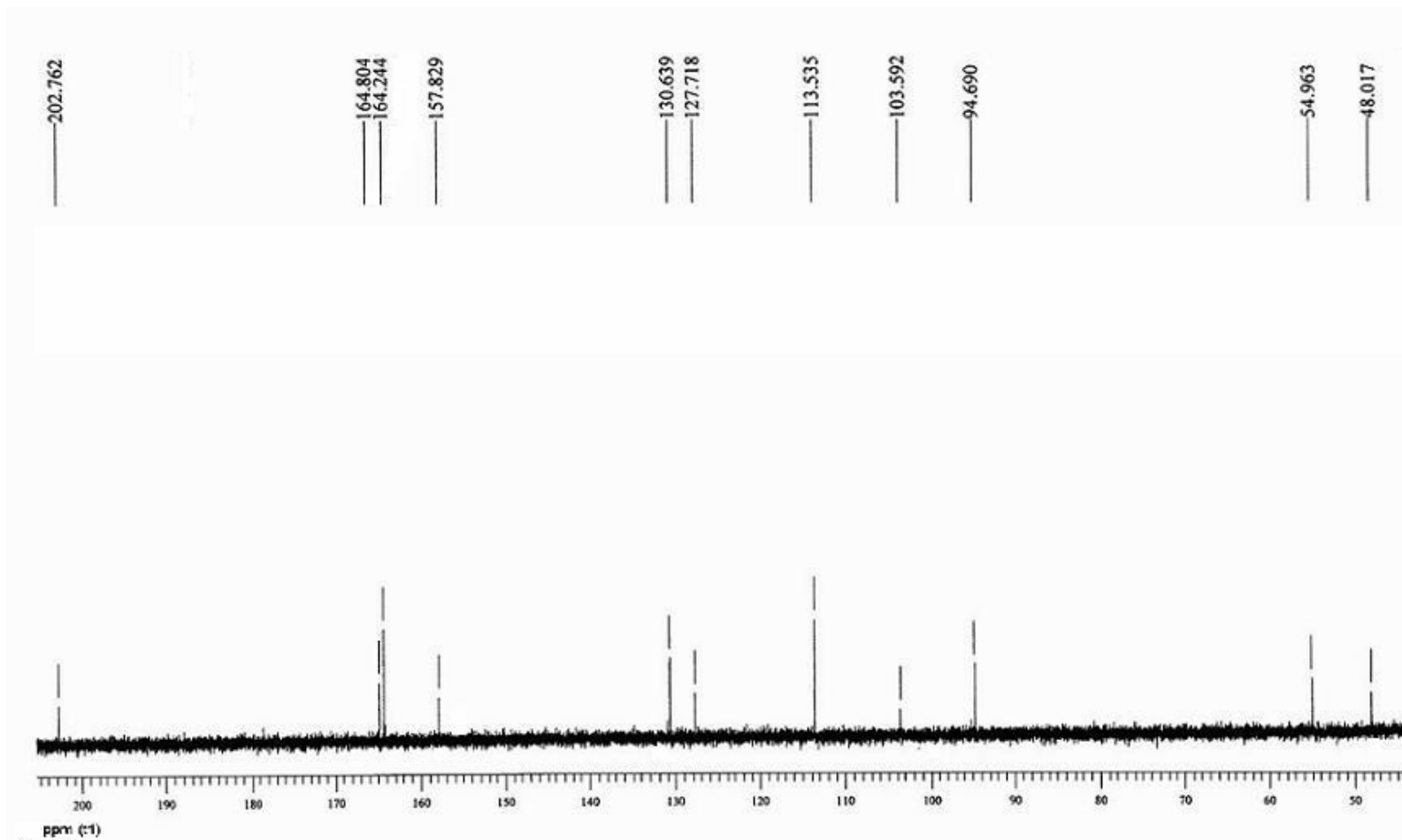


### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.91 y 4.92).



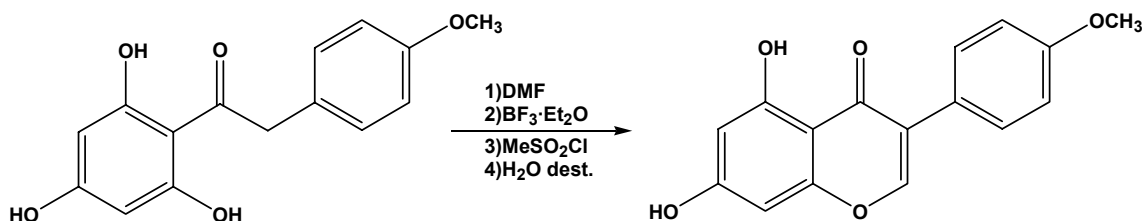
**<sup>1</sup>H-RMN(d<sub>6</sub>-DMSO, δ ppm):** 3,71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4,25 (s, 2H, H8), 5,81 (s, 2H, Ph-H3, Ph-H5), 6,84 (d, 2H, Ph-H3', Ph-H5', J=8,1 Hz), 7,12 (d, 2H, Ph-H2', Ph-H6', J=8,1 Hz), 10,45 (s, 1H, OH), 12,26 (s, 2H, OH)

**FIG. 4.91.** <sup>1</sup>H-RMN de [G-OH-4'(I)]



**<sup>13</sup>C-RMN(d<sub>6</sub>-DMSO, δ ppm):** 48,02 (C8), 54,96 (OCH<sub>3</sub>), 94,69 (C3, C5), 103,59 (C1), 113,53 (C3', C5'), 127,71 (C1'), 130,64 (C2', C6'), 157,83 (C4'), 164,24 (C4), 164,80 (C2), 202,76 (C7)

**FIG. 4.92.** <sup>13</sup>C-RMN de [G-OH-4'(I)]

**4.4.19. Síntesis de 5,7-dihidroxi-4'-metoxiisoflavona (biochanina A) [G-OH-4'(II)]**

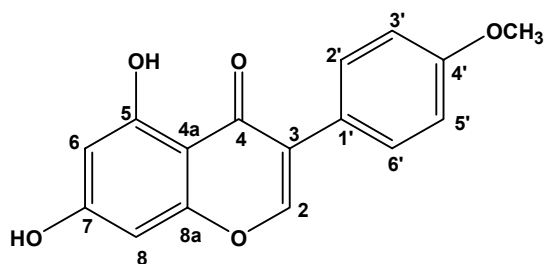
El método de síntesis es similar al descrito en el apartado 4.4.3. El tiempo de reacción es de 3 horas y el método de purificación es mediante recrystalización con etanol absoluto, obteniéndose así un sólido que es la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiisoflavona.

Las cantidades empleadas son las que se detallan a continuación:

- 2,4,6-trihidroxi-4'-metoxidesoxibenzoína: 7,53 g. (27,48 mmol)
- Dimetilformamida seca: 100 ml
- Trifluoruro de boro-éter: 14 ml (4 equivalentes)
- Metansulfonilo: 6,50 ml (3 equivalentes)
- Dimetilformamida seca: 40 ml
- Agua destilada: 400 ml

Se obtienen 3,81 g. (13,74 mmol) de un sólido que resultó ser la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiisoflavona que representa un rendimiento del 50 %.

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

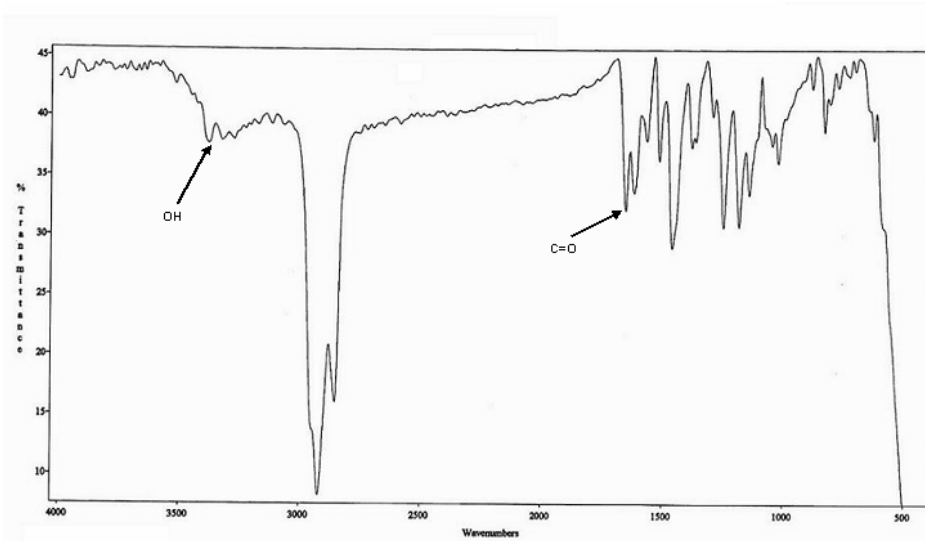


### 1.- Análisis elemental al producto:

<i>VALOR CALCULADO</i>	<i>VALOR OBSERVADO</i>
C = 67,60 %	C = 68,01 %
H = 4,25 %	H = 3,58 %
O = 28,14 %	O = 28,41 %

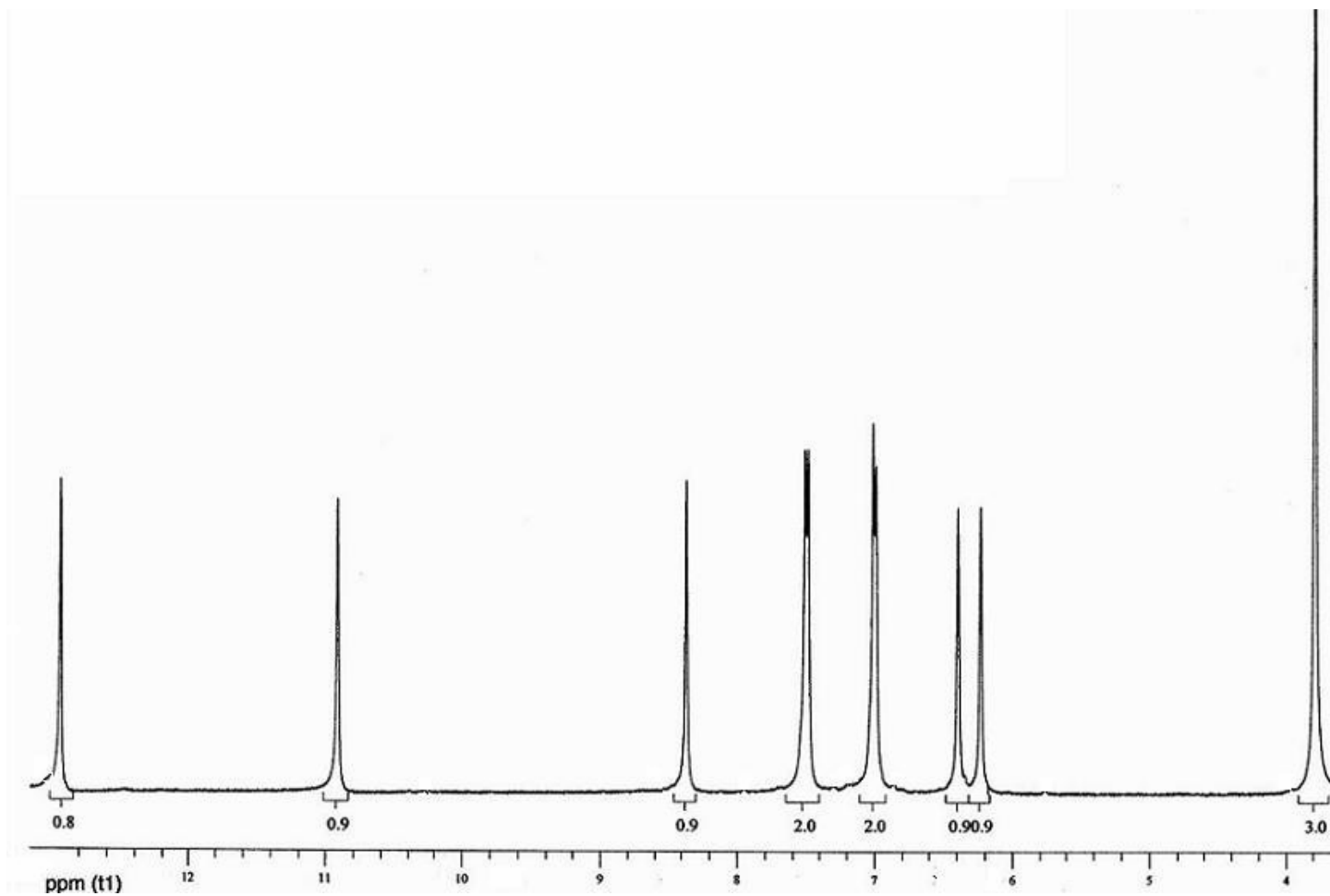
### 2.- Punto de fusión: °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3392 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1648 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)



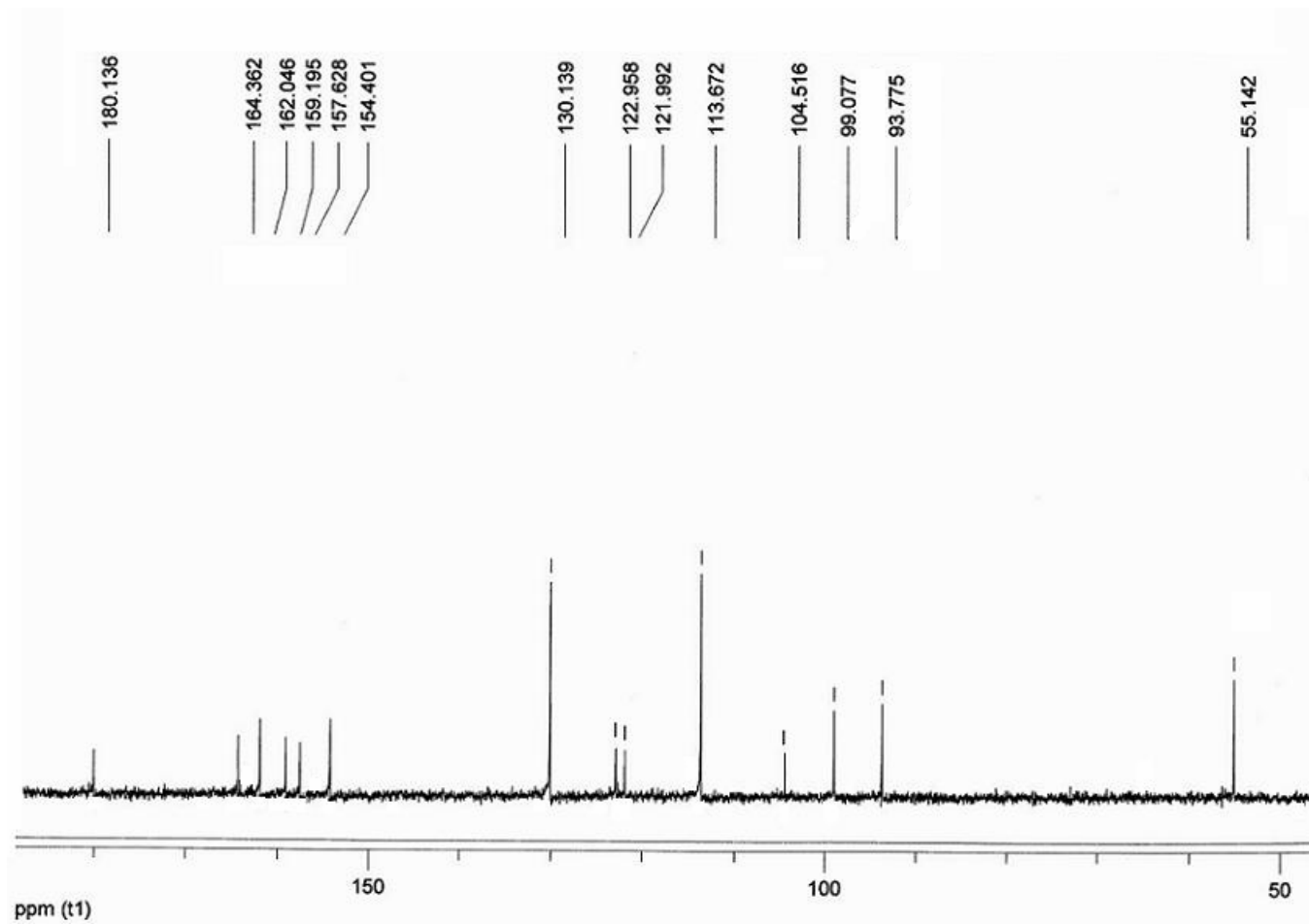
### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.93 y 4.94).





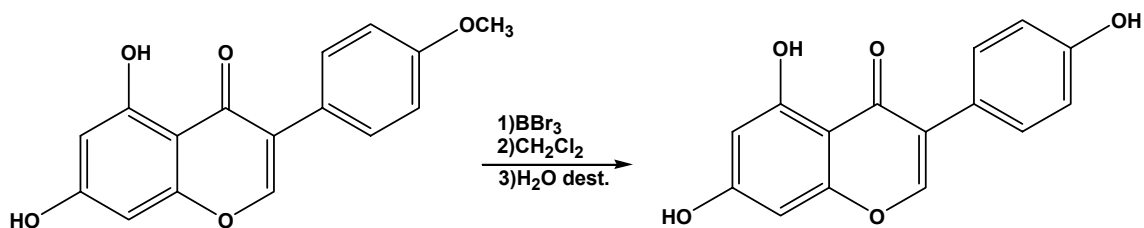
**$^1\text{H-RMN}(\text{d}_6\text{-DMSO}, \delta \text{ ppm})$ :** 3,78 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6,23 (s, 1H, Ph-H6), 6,39 (s, 1H, Ph-H8), 6,99 (d, 2H, Ph-H3', Ph-H5',  $J=7,9 \text{ Hz}$ ), 7,50 (d, 2H, Ph-H2', Ph-H6',  $J=7,9 \text{ Hz}$ ), 8,36 (s, 1H, H2), 10,91 (s, 1H, OH), 12,93 (s, 1H, OH)

**FIG. 4.93.**  $^1\text{H-RMN}$  de [G-OH-4'(II)]



**<sup>13</sup>C-RMN(*d*<sub>6</sub>-DMSO, δ ppm):** 55,14 (OCH<sub>3</sub>), 93,77 (C8), 99,07 (C6), 104,51 (C4a), 113,67 (C3', C5'), 121,99 (C1'), 122,95 (C3), 130,13 (C2', C6'), 154,40 (C2), 157,62 (C8a), 159,19 (C4'), 162,04 (C5), 164,36 (C7), 180,13 (C4)

**FIG. 4.94.** <sup>13</sup>C-RMN de [G-OH-4'(II)]

**4.4.20. Síntesis de 5,7,4'-trihidroxiisoflavona (genisteína) [G-OH-4']**

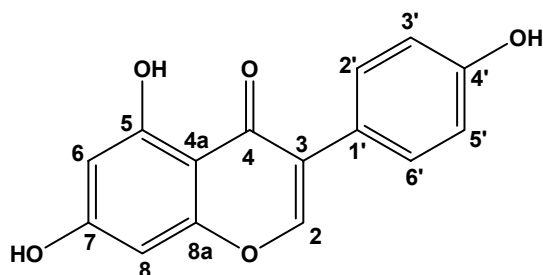
El método de síntesis es idéntico al descrito en el apartado 4.4.4. El tiempo de reacción en este caso es de 24 horas. La única diferencia es que el producto obtenido se purifica mediante recristalización con etanol absoluto, obteniéndose un sólido que es la 5,7,4'-dihidroxiisoflavona.

Las cantidades empleadas son las que se detallan a continuación:

- 5,7-hidroxi-4'-metoxiisoflavona: 2 g. (7,04 mmol)
- Diclorometano seco: 80 ml
- Tribromuro de boro en cloruro de metileno 1M: 18 ml (2,5 equivalentes)
- Agua destilada: 80 ml

Obteniéndose así 1,32 g. (4,92 mmol) de un sólido que resultó ser la 5,7,4'-trihidroxiisoflavona que representa un rendimiento del 70 %.

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

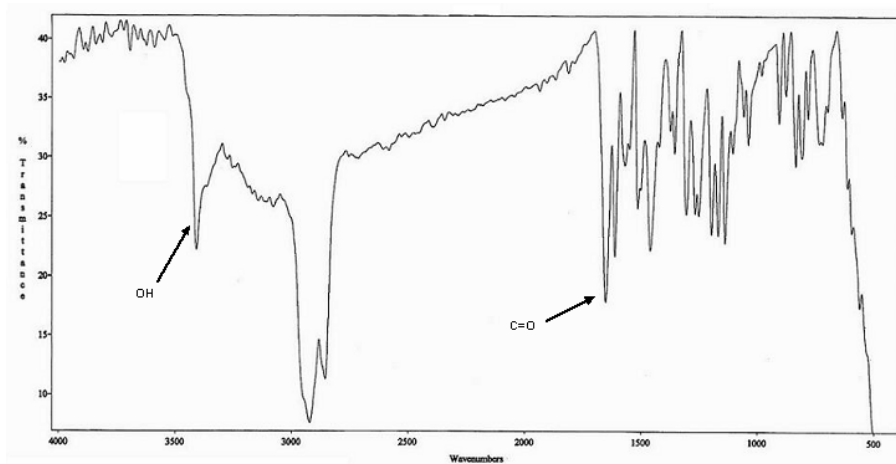


### 1.- Análisis elemental al producto:

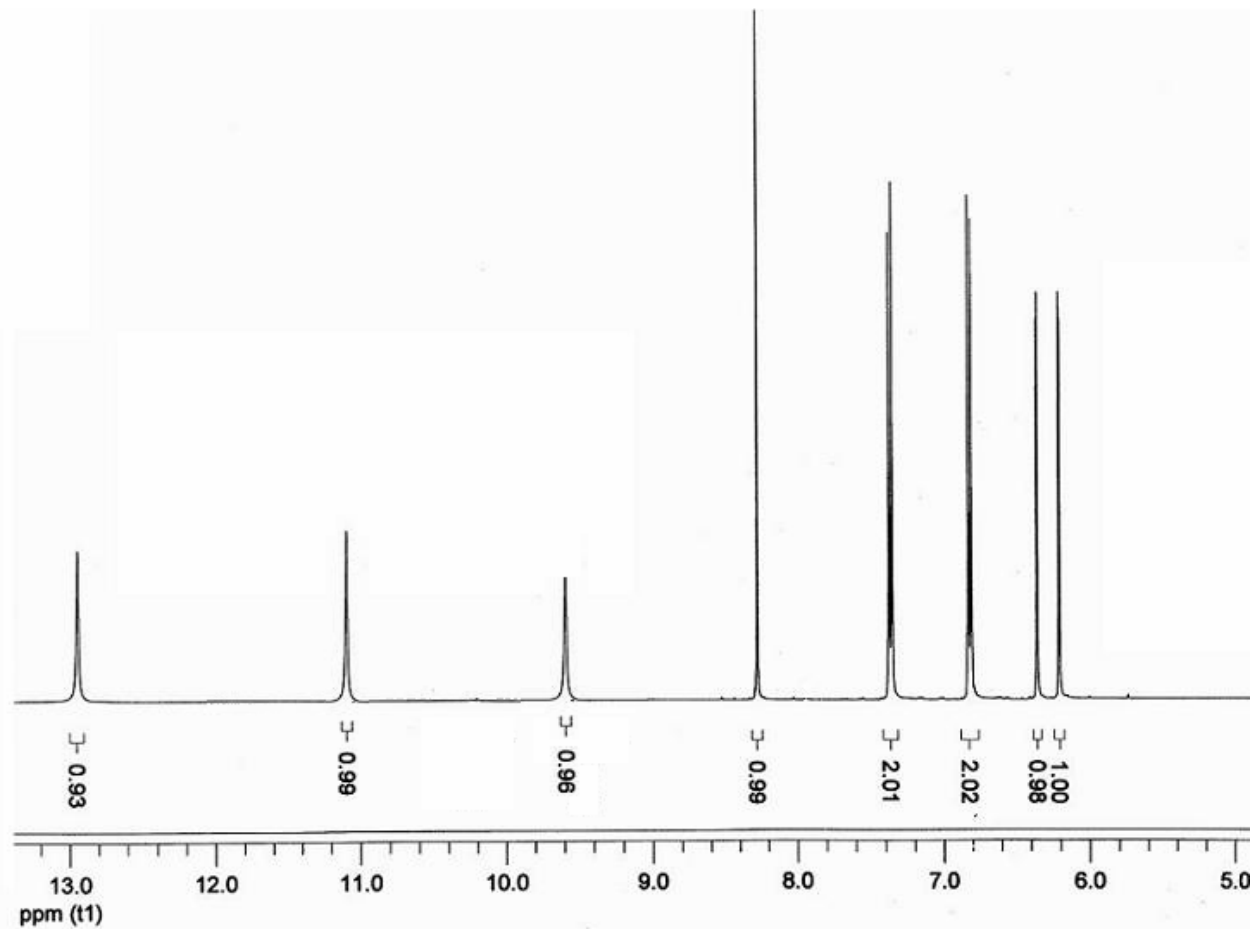
<i>VALOR CALCULADO</i>	<i>VALOR OBSERVADO</i>
C = 66,67 %	C = 66,87 %
H = 3,73 %	H = 3,55 %
O = 29,60 %	O = 29,58 %

### 2.- Punto de fusión: 297-298 °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3408 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1652 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)

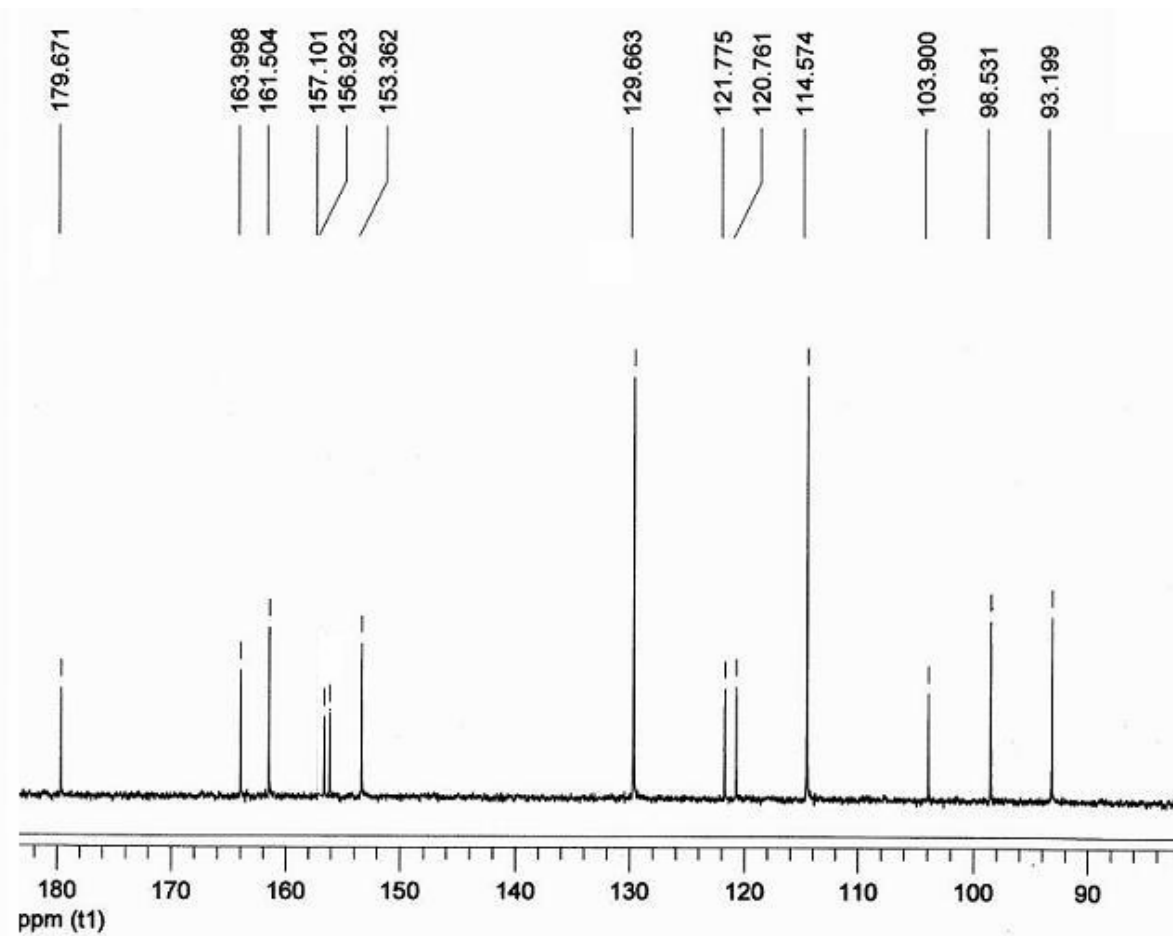


### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.95 y 4.96).



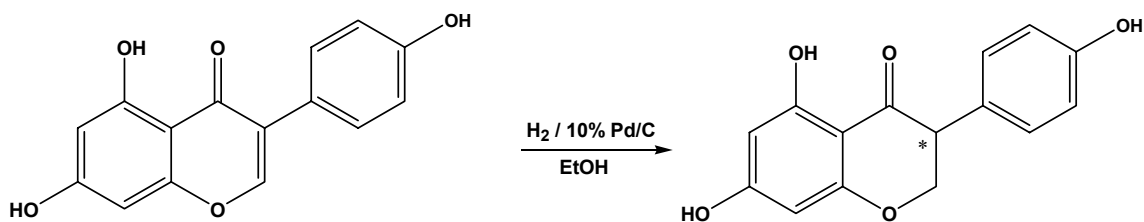
**<sup>1</sup>H-RMN(d<sub>6</sub>- DMSO, δ ppm):** 6,21 (d, 1H, Ph-H6, J=2,1 Hz), 6,35 (d, 1H, Ph-H8, J=2,1 Hz), 6,82(d, 2H, Ph-H3', Ph-H5', J=8,6 Hz), 7,36 (d, 2H, Ph-H2', Ph-H6', J=8,6 Hz), 8,28 (s, 1H, H2), 9,60 (s, 1H, OH), 11,15 (s, 1H OH), 12,94 (s, 1H OH)

**FIG. 4.95.** <sup>1</sup>H-RMN de [G-OH-4']



**<sup>13</sup>C-RMN(d<sub>6</sub>- DMSO, δ ppm):** 93,20 (C8), 98,53 (C6), 103,90 (C4a), 114,57 (C3',C5'), 120,76 (C1'), 121,77 (C3), 129,66 (C2', C6'), 153,36 (C2), 156,92 (C8a), 157,10 (C4'), 161,50 (C5), 163,99 (C7), 179,67 (C4)

FIG. 4.96. <sup>13</sup>C-RMN de [G-OH-4']

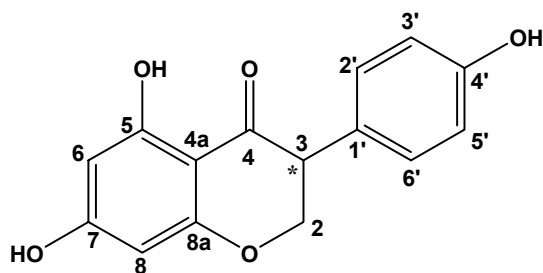
**4.4.21. Síntesis de 5,7,4'-trihidroxiisoflavanona [DHG]**

El método de reducción para este compuesto varía con respecto al descrito en el apartado 4.4.5, ya que en este caso se emplea el hidrógeno como método de transferencia en lugar de utilizar HCOONH<sub>4</sub>.

En un matraz de dos bocas, previamente secado en estufa, se añaden 300 ml de etanol seco y transcurrida 1 hora de borboteo de argón se añaden 12,40 g. (116,72 mmol) de 10% Pd/C. Se sigue borboteando argón durante 30 minutos. Seguidamente se añaden 0,5 g. (1,85 mmol) de 5,7,4'-trihidroxiisoflavona y se hace atmósfera de hidrógeno. El sistema de agitación elegido en este caso es agitación mecánica utilizando un "shaker", lo que permite una mejor mezcla del hidrógeno con el medio de reacción. Trascurreda 1 hora y tras comprobar que no hay presencia del producto de partida, la disolución se filtra a vacío y se lava el catalizador sucesivamente con EtOH. Se evapora el disolvente y se obtiene un sólido que se seca en estufa de vacío obteniéndose un sólido que se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice empleando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:AcOEt 7:1.

Así se obtienen 0,35 g. (1,29 mmol) de un sólido que resultó ser la 5,7,4'-trihidroxiisoflavanona que representa un rendimiento del 70 %.

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

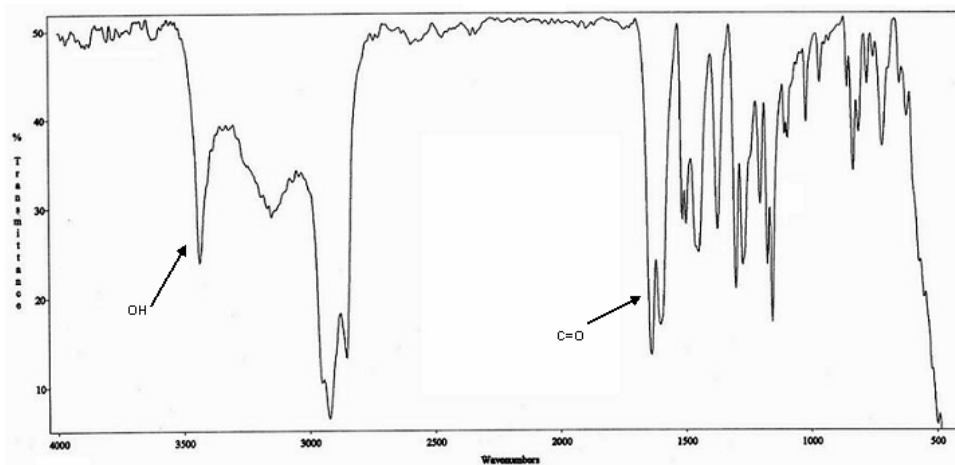


### 1.- Análisis elemental al producto:

<i>VALOR CALCULADO</i>	<i>VALOR OBSERVADO</i>
C = 66,17 %	C = 65,09 %
H = 4,44 %	H = 4,54 %
O = 29,38 %	O = 30,37 %

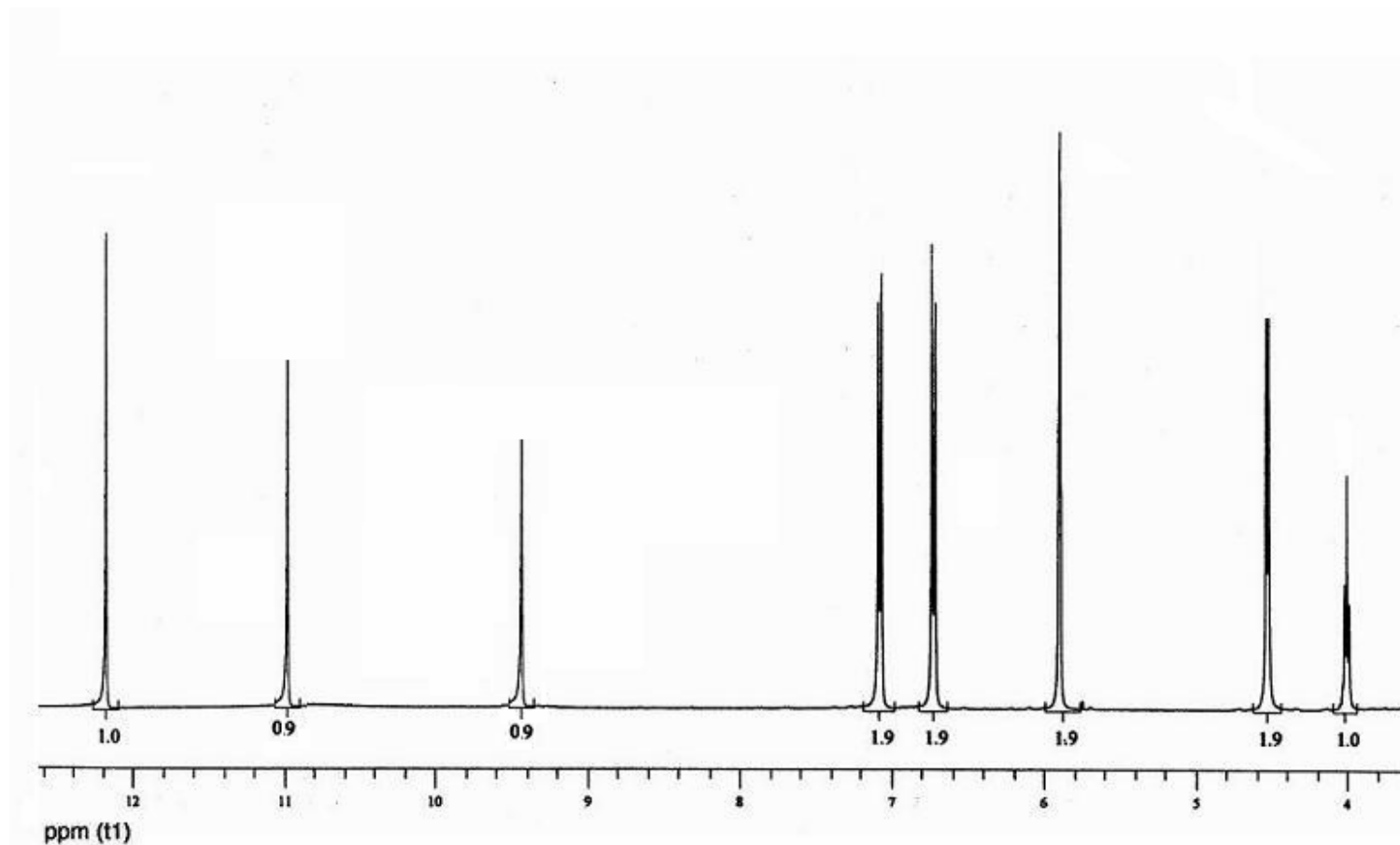
### 2.- Punto de fusión: °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3463 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1641 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)



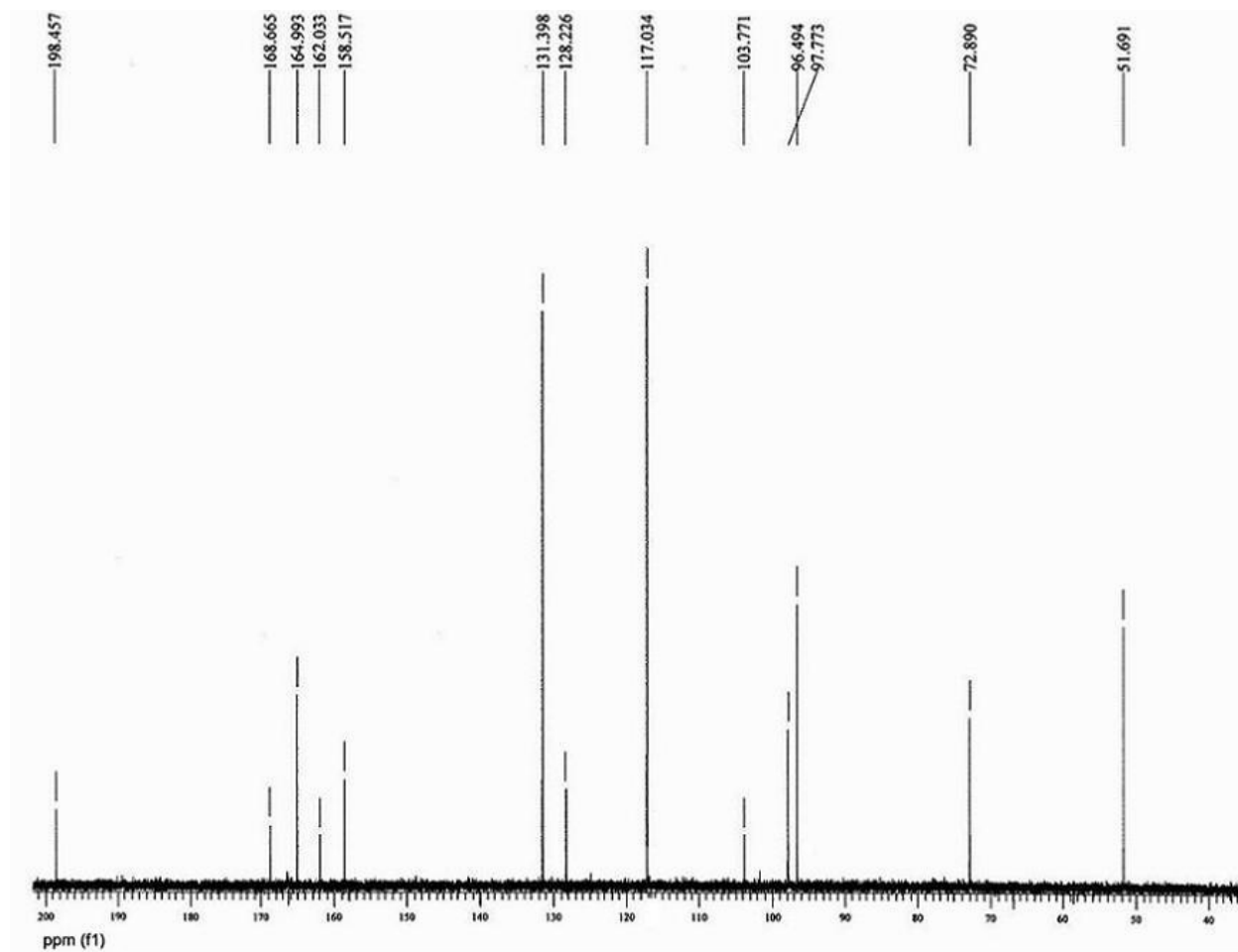
### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.97 y 4.98).





**$^1\text{H-RMN}(\text{d}_6\text{-DMSO}, \delta \text{ ppm})$ :** 3,99 (dd, 1H, H3,  $J=6,56$  Hz), 4,52 (d, 2H, H2,  $J=6,56$  Hz), 5,80-5,85 (m, 2H, Ph-H6, Ph-H8), 6,71 (d, 2H, Ph-H3', Ph-H5',  $J=8,6$  Hz), 7,08 (d, 2H, Ph-H2', Ph-H6',  $J=8,6$  Hz), 9,43 (s, 1H, OH), 11,03 (s, 1H, OH), 12,17 (s, 1H, OH)

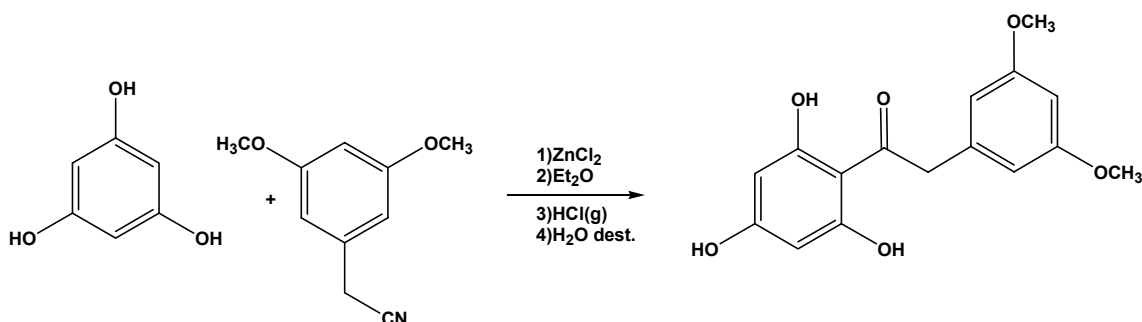
FIG. 4.97.  $^1\text{H-RMN}$  de [DHG]



**$^{13}\text{C-RMN}(d_6\text{-acetona}, \delta \text{ ppm})$ :** 51,69 (C3), 72,89 (C2), 96,49 (C8), 97,77 (C6), 103,77 (C4a), 117,03 (C3', C5'), 128,22 (C1'), 131,39 (C2', C6'), 158,51 (C4'), 162,03 (C8a), 164,93 (C5), 168,66 (C7), 198,45 (C4)

**FIG. 4.98.**  $^{13}\text{C-RMN}$  de [DHG]

#### 4.4.22. Síntesis de 2,4,6-trihidroxi-3',5'-metoxidesoxibenzoína [G-OH-3',5'(I)]



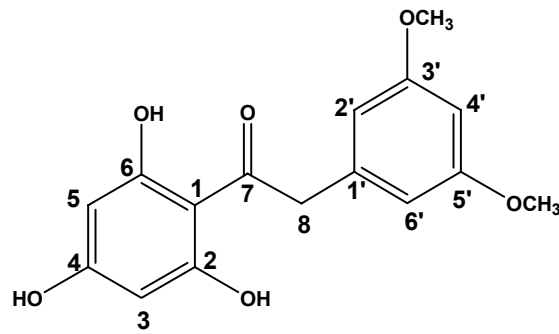
El método de síntesis es similar al descrito en el apartado 4.4.2. El tiempo de reacción es de 6,5 horas. Debido a la presencia de 3,5-dimetoxifenilacético (derivado procedente de la hidrólisis de uno de los productos de partida, 3,5-dimetoxifenilacetónitrilo), que interfiere en la purificación por columna del producto deseado, se procede a su eliminación sometiendo a la mezcla a lavados con una disolución de bicarbonato ( $\text{NaHCO}_3$ ). Una vez eliminado el subproducto el producto se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :AcOEt 10:1, obteniéndose así el producto puro, la 2,4,6-trihidroxi-3',5'-dimetoxidesoxibenzoína.

Las cantidades empleadas son las que se detallan a continuación:

- 1,3,5-trihidroxibenceno (Phloroglucinol): 7,30 g. (45,15 mmol)
- Éter etílico seco: 100 ml
- Cloruro de zinc anhidro: 2 g. (15,05 mmol)
- 3,5-dimetoxifenilacetónitrilo: 8 g. (45,15 mmol)
- Éter dietílico seco: 20 ml
- Agua destilada: 200 ml

Se obtienen así 6,20 g. (20,3 mmol) de un sólido que resultó ser la 2,4,6-trihidroxi-3',5'-dimetoxidesoxibenzoína que representa un rendimiento del 45 %.

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

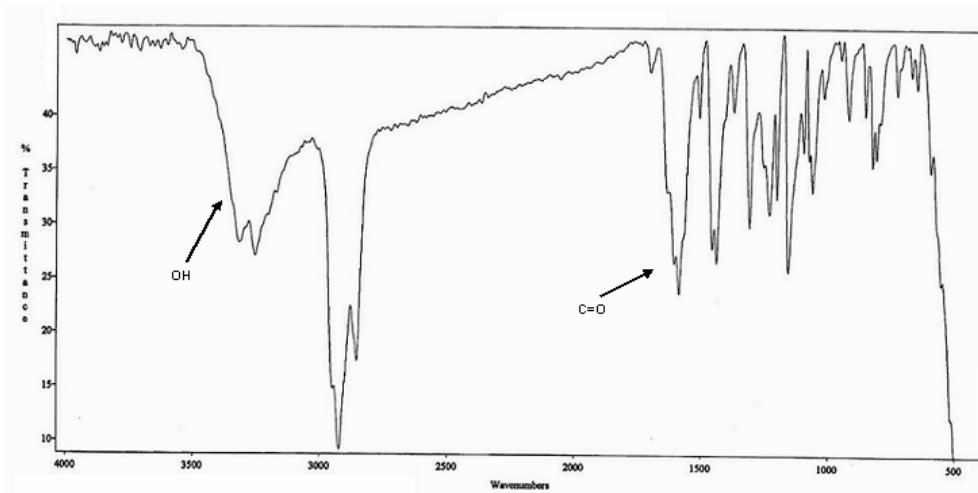


### 1.- Análisis elemental al producto:

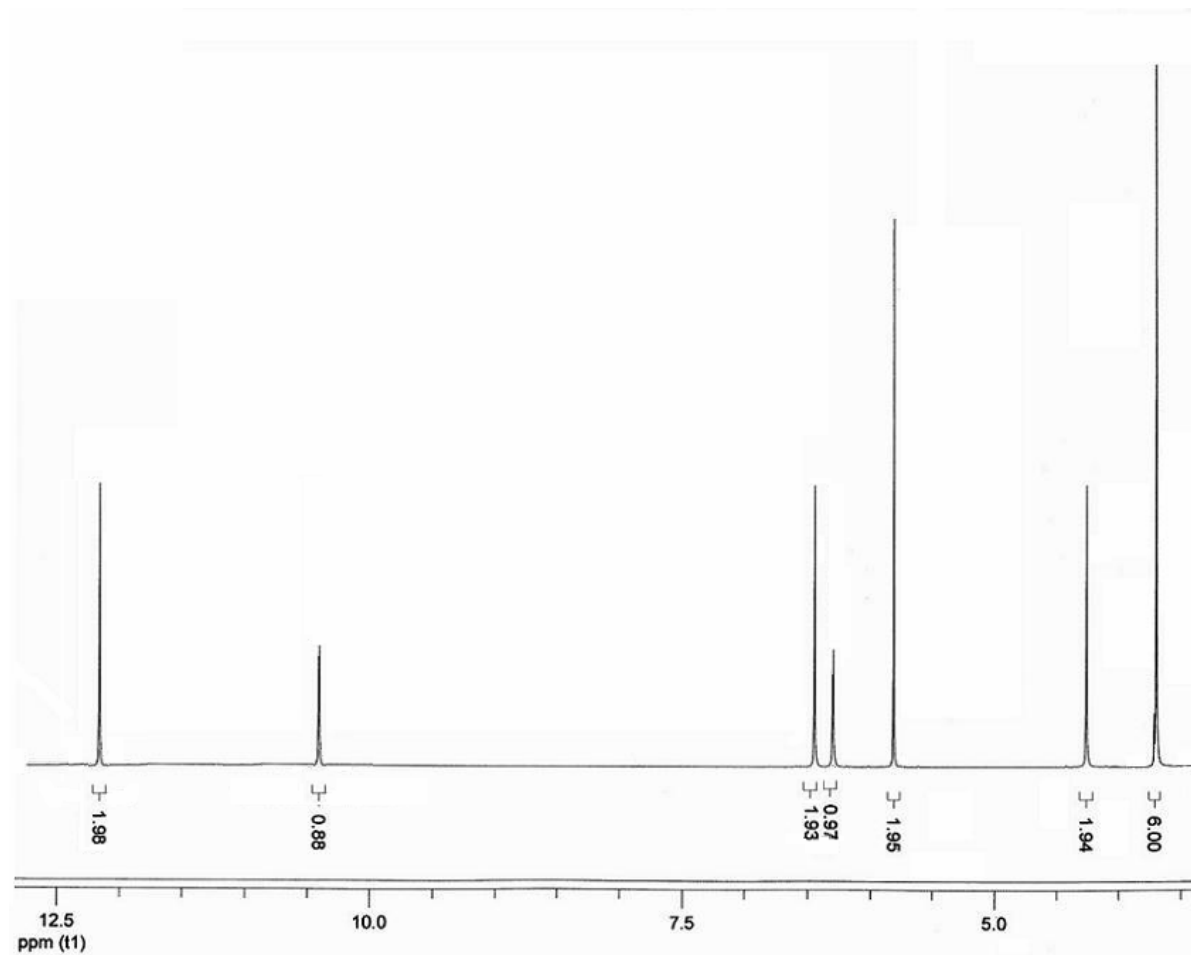
<i>VALOR CALCULADO</i>	<i>VALOR OBSERVADO</i>
C = 63,15 %	C = 63,76 %
H = 5,30 %	H = 5,12 %
O = 31,55 %	O = 31,12 %

### 2.- Punto de fusión: °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3316 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1632 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)

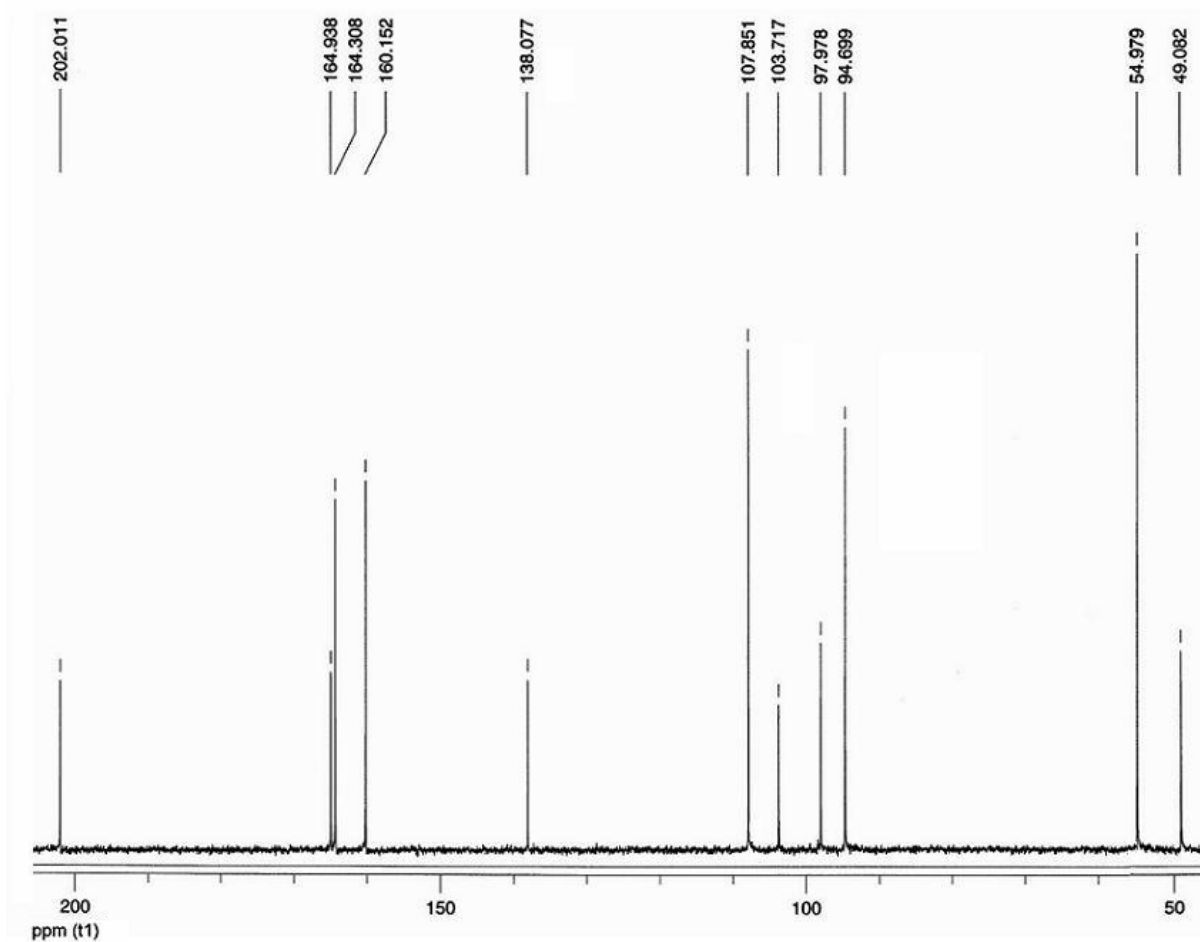


### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.99 y 4.100).



**$^1\text{H-RMN}(d_6\text{-DMSO}, \delta \text{ ppm})$ :** 3,69 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>) 4,25 (s, 2H, H<sub>8</sub>), 5,81 (s, 2H, Ph-H<sub>3</sub>, Ph-H<sub>5</sub>), 6,35 (t, 1H, Ph-H<sub>4</sub>', J=2,20 Hz), 6,40 (d, 2H, Ph-H<sub>2</sub>', Ph-H<sub>6</sub>', J=2,20), 10,45 (s, 1H, OH), 12,25 (s, 2H, OH)

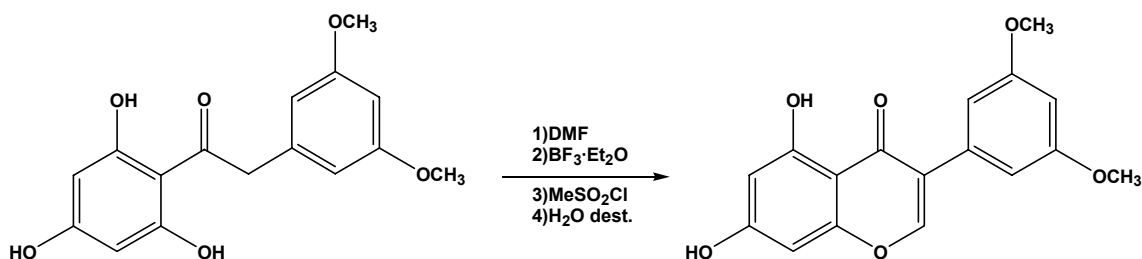
**FIG. 4.99.**  $^1\text{H-RMN}$  de [G-OH-3',5'(I)]



**$^{13}\text{C-RMN}(\text{d}_6\text{-DMSO}, \delta \text{ ppm})$ :** 49,08 (C8), 54,79 (OCH3), 94,69 (C3), 97,97 (C4'), 103,71 (C1), 107,85 (C2', C6'), 138,07 (C1'), 160,52 (C3', C5'), 164,30 (C4), 164,93 (C2, C6), 202,01 (C7)

**FIG. 4.100.**  $^{13}\text{C-RMN}$  de [G-OH-3',5'(I)]

#### 4.4.23. Síntesis de 5,7-dihidroxi-3',5'-dimetoxiisoflavona [G-OH-3',5'(II)]



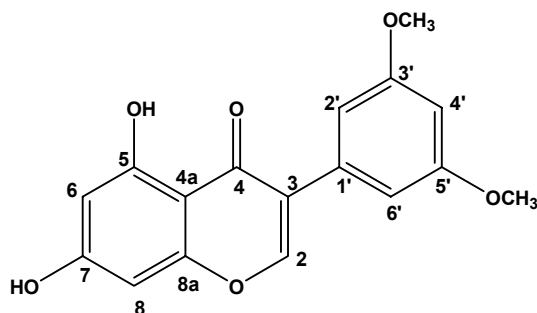
El método de síntesis es similar al descrito en el apartado 4.4.3. En este caso el tiempo de reacción es de 3,5 horas. La mezcla de reacción resultante se somete a separación mediante cromatografía de columna de sílice, usando como eluyente una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$  7:1, obteniéndose así un sólido que es la 5,7-dihidroxi-3',5'-dimetoxiisoflavona.

Las cantidades empleadas son las que se detallan a continuación:

- 2,4,6-trihidroxi-3',5'-metoxidesoxibenzoína: 4,75 g. (15,65 mmol)
- Dimetilformamida seca: 70 ml
- Trifluoruro de boro-éter: 8 ml (4 equivalentes)
- Metansulfonilo: 4 ml (3 equivalentes)
- Dimetilformamida seca: 40 ml
- Agua destilada: 600 ml

Así se obtienen 3,88 g. (12,36 mmol) de un sólido que resultó ser la 5,7-dihidroxi-3',5'-dimetoxiisoflavona que representa un rendimiento del 79 %.

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

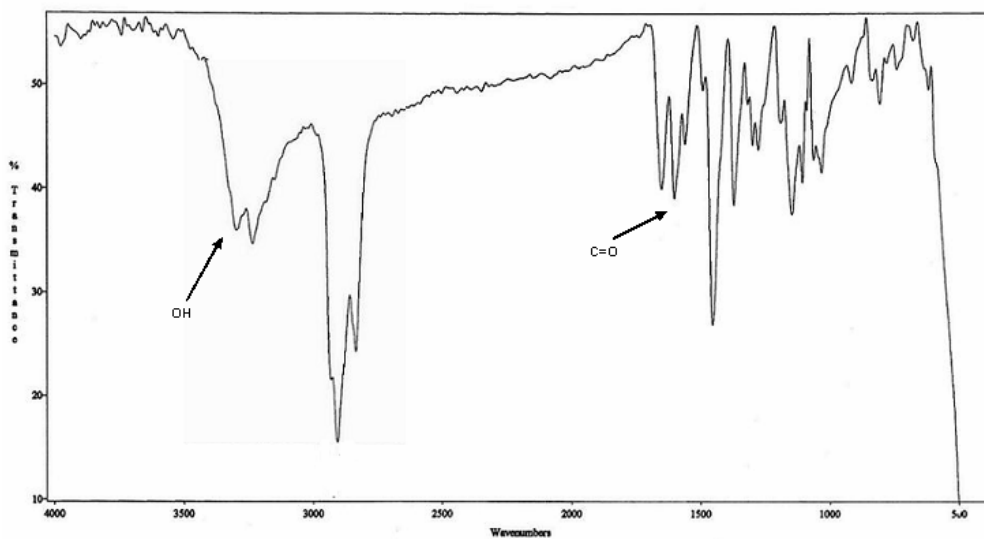


### 1.- Análisis elemental al producto:

<i>VALOR CALCULADO</i>	<i>VALOR OBSERVADO</i>
C = 64,97 %	C = 65,05 %
H = 4,49 %	H = 4,12 %
O = 30,54 %	O = 30,83 %

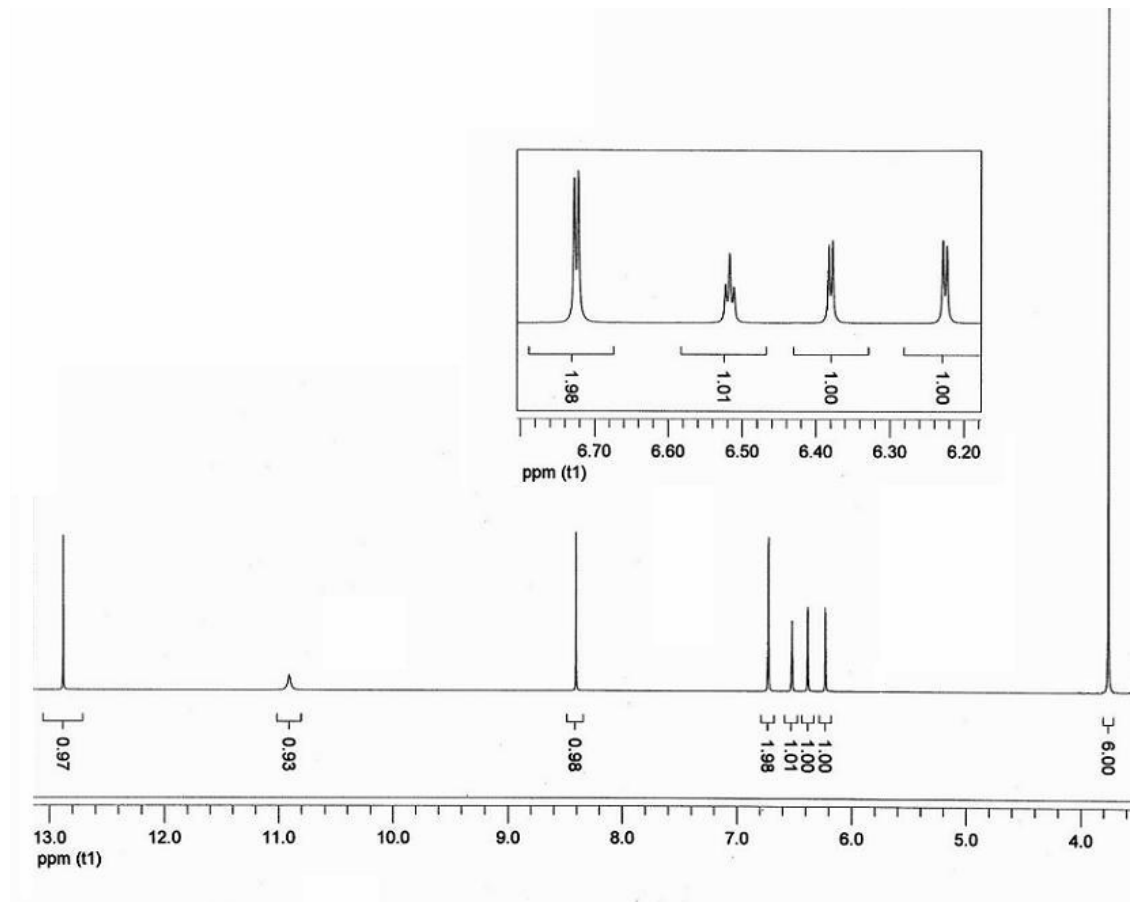
### 2.- Punto de fusión: °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3289 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1654 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)



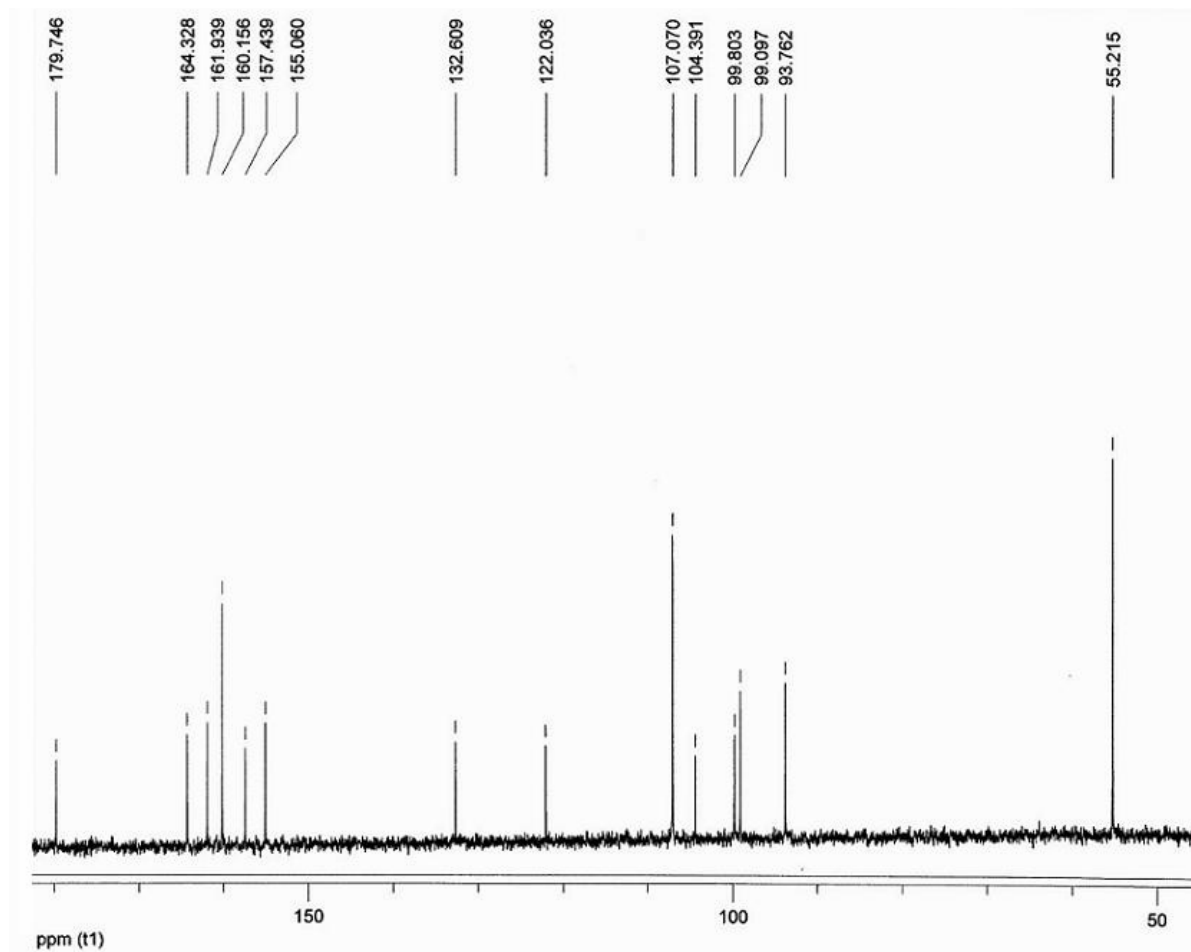
### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.101 y 4.102).





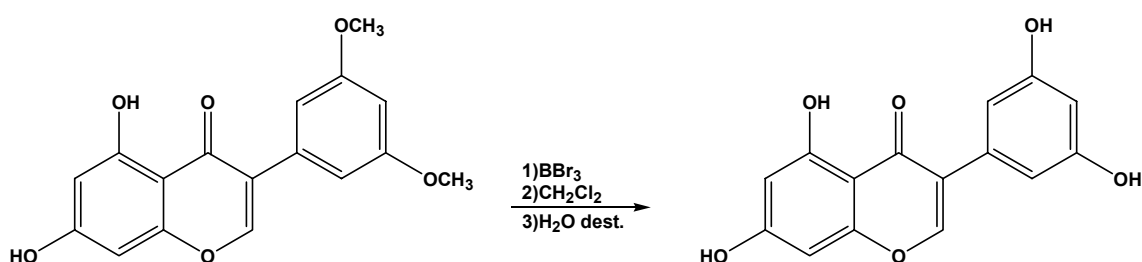
**<sup>1</sup>H-RMN(d<sub>6</sub>- DMSO, δ ppm):** 3,76 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 6,22 (d, 1H, Ph-H6, J=2,10 Hz), 6,37 (d, 1H, Ph-H8, J=2,10 Hz), 6,51 (t, 1H, Ph-H4', J=2,20 Hz), 6,72 (d, 2H, Ph-H2', Ph-H6', J=2,20 Hz), 8,40 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 10,90 (s, 1H, OH), 12,88 (s, 1H, OH)

**FIG. 4.101.** <sup>1</sup>H-RMN de [G-OH-3',5'(II)]



**$^{13}\text{C-RMN}(\text{d}_6\text{-DMSO}, \delta \text{ ppm})$ :** 55,21 ( $\text{OCH}_3$ ), 93,76 (C8), 99,09 (C6), 99,80 (C4'), 104,39 (C4a), 107,07 (C2', C6'), 122,03 (C3), 132,61 (C1'), 155,06 (C2), 157,44 (C8a), 160,15 (C3', C5'), 161,94 (C5), 164,33 (C7), 179,74 (C4)

**FIG. 4.102.**  $^{13}\text{C-RMN}$  de [G-OH-3',5'(II)]

**4.4.24. Síntesis de 5,7,3',5'-tetrahidroxiisoflavona [G-OH-3',5']**

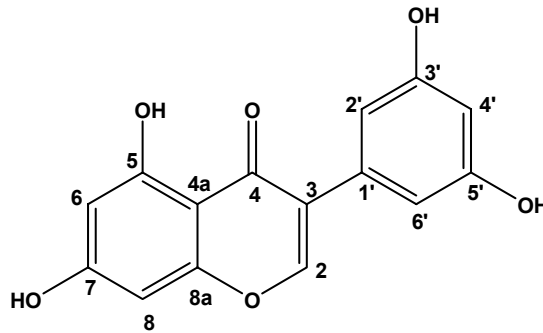
El método de síntesis es similar al descrito en el apartado 4.4.4. El tiempo de reacción es de 25 horas. La mezcla de reacción resultante se somete a separación mediante cromatografía de columna de sílice, usando como eluyente una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :AcOEt 8:2, obteniéndose así un sólido que es la 5,7,3',5'-tetrahidroxiisoflavona.

Las cantidades empleadas son las que se detallan a continuación:

- 5,7-dihidroxi-3',5'-dimetoxiisoflavona: 3,75 g. (11,95 mmol)
- Diclorometano seco: 70 ml
- Tribromuro de boro disolución 1M en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 60 ml (5 equivalentes)
- Agua destilada: 200 ml

Obteniéndose así 2,36 g. (8,25 mmol) de un sólido que resultó ser la 5,7,3',5'-tetrahidroxiisoflavona que representa un rendimiento del 69 %.

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

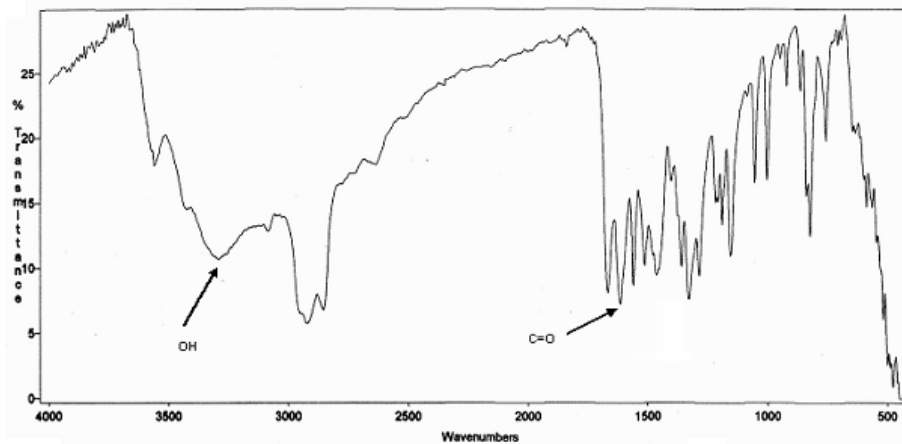


### 1.- Análisis elemental al producto:

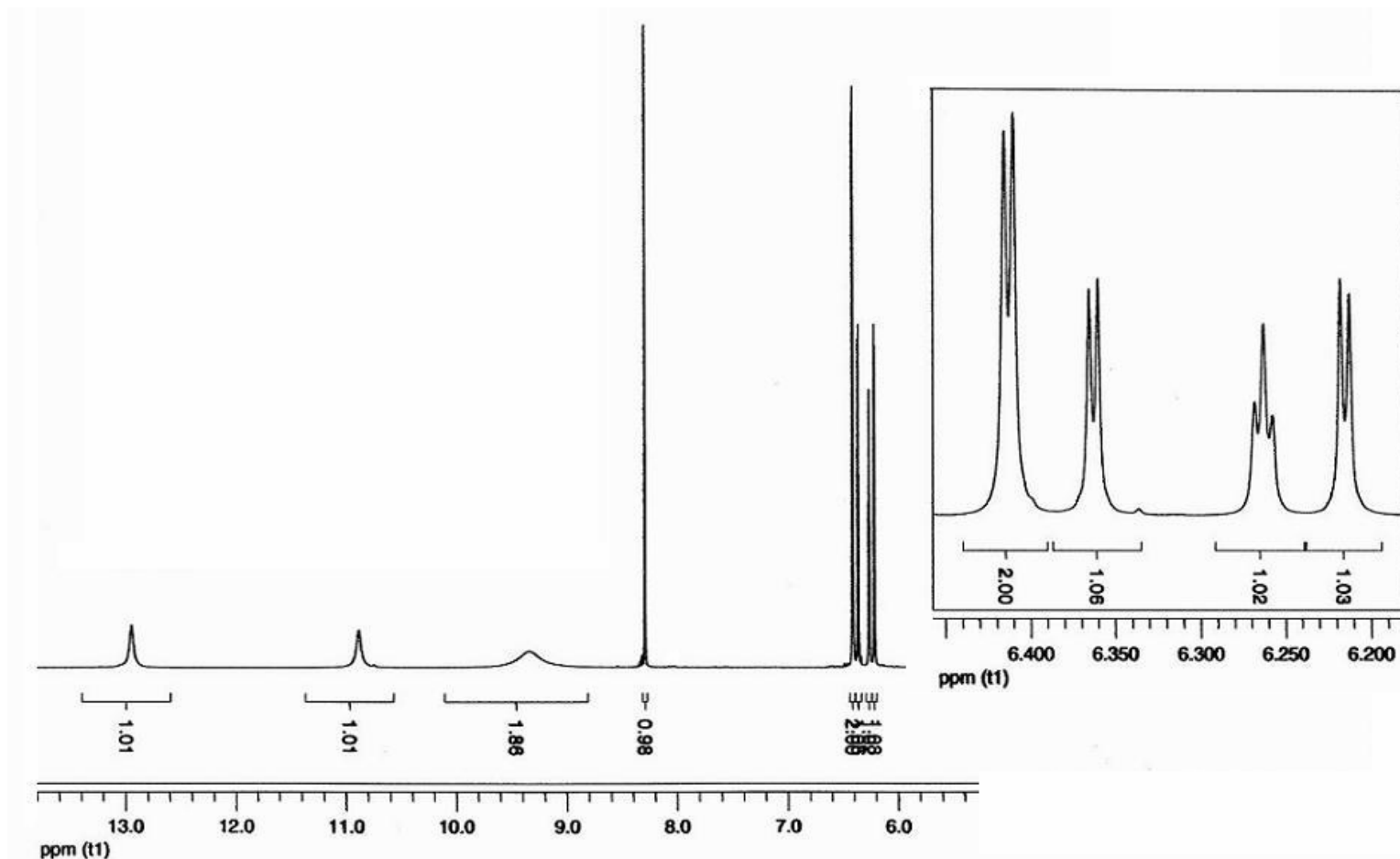
<i>VALOR CALCULADO</i>	<i>VALOR OBSERVADO</i>
C = 62,94 %	C = 63,45 %
H = 3,52 %	H = 3,57 %
O = 33,54 %	O = 32,98 %

### 2.- Punto de fusión: °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3294 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1615 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)

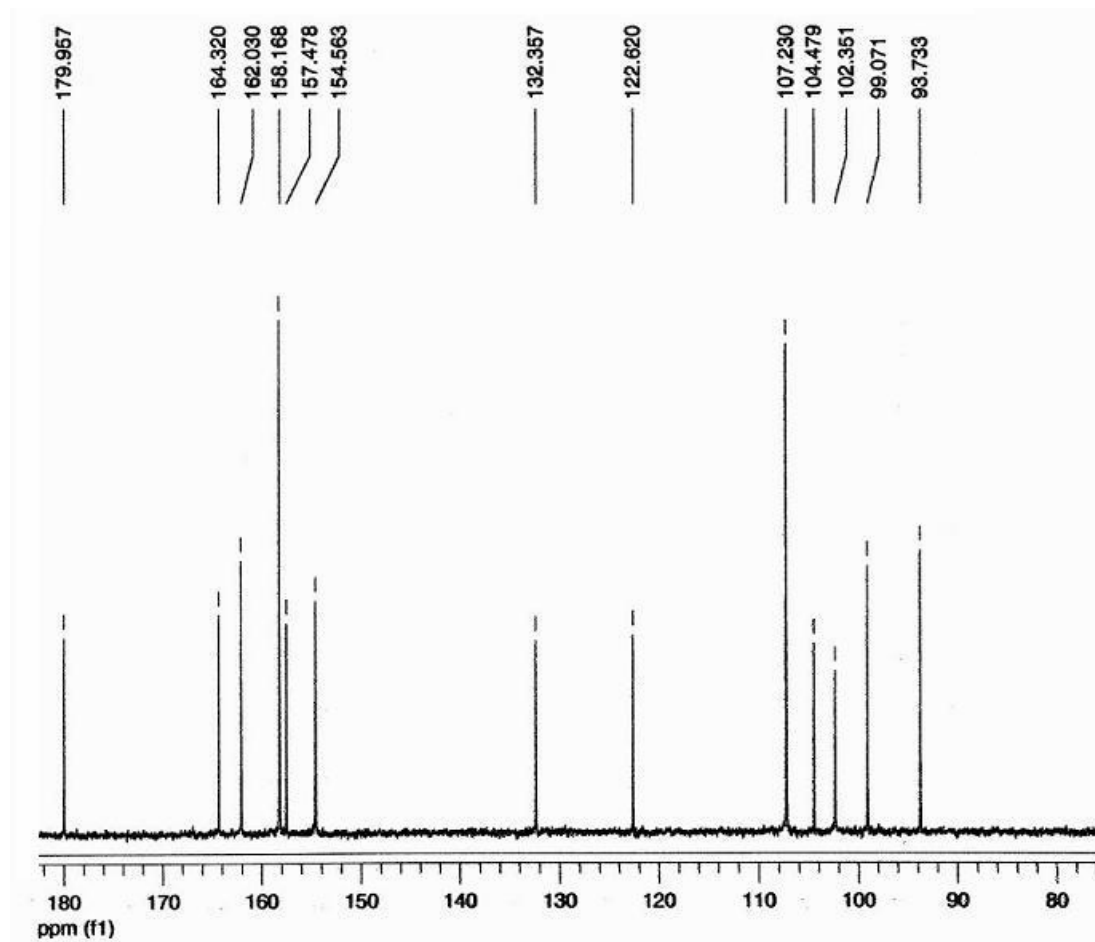


### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.103 y 4.104).



**$^1\text{H}$ -RMN( $d_6$ - DMSO,  $\delta$  ppm):** 6,21 (d, 1H, Ph-H6,  $J=2,10$  Hz), 6,27 (t, 1H, Ph-H4',  $J=2,10$  Hz), 6,36 (d, 1H Ph-H8,  $J=2,10$  Hz), 6,42 (d, 2H, Ph-H2', Ph-H6',  $J=2,10$  Hz), 8,29 (s, 1H, H2), 9,33 (s, 2H, OH), 10,88 (s, 1H, OH), 12,94 (s, 1H, OH)

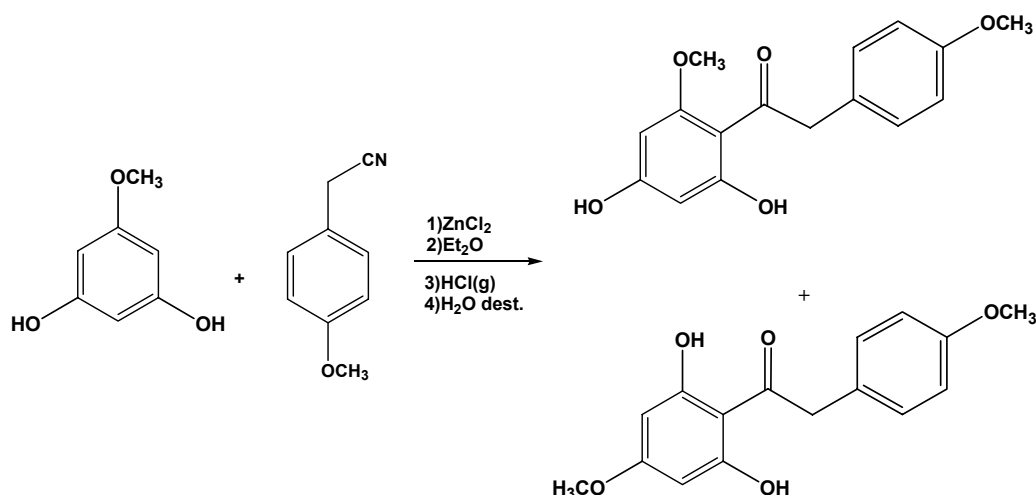
FIG. 4.103.  $^1\text{H}$ -RMN de [G-OH-3',5']



**<sup>13</sup>C-RMN(*d*<sub>6</sub>- DMSO, δ ppm):** 93,73 (C8), 99,07 (C6), 102,35 (C4'), 104,47 (C4a), 107,23 (C2', C6'), 122,62 (C3), 132,35 (C1'), 154,56 (C2), 157,47 (C8a), 158,16 (C3', C5'), 162,03 (C5), 164,32 (C7), 179,95 (C4)

**FIG. 4.104.** <sup>13</sup>C-RMN de [G-OH-3',5']

#### 4.4.25. Síntesis de 2,6-dihidroxi-4,4'-dimetoxidesoxibenzoína y 2,4-dihidroxi-6,4'-dimetoxidesoxibenzoína



El método de síntesis es idéntico al descrito en el apartado 4.4.2. El tiempo de reacción en este caso es de 6 horas. De esta reacción se esperaría la obtención de dos productos en proporción 2:1 ya que la acilación puede tener lugar en dos posiciones distintas. Los dos productos se separaron mediante cromatografía de columna en gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:AcOEt 14:1. El primer producto eluido es un sólido y corresponde a la 2,6-dihidroxi-4,4'-dimetoxidesoxibenzoína y el segundo es un sólido que es la 2,4-dihidroxi-6,4'-dimetoxidesoxibenzoína.

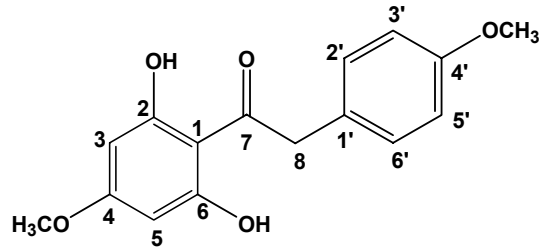
Las cantidades empleadas son las que se detallan a continuación:

- 5-metoxiresorcinol: 2 g. (14,27 mmol)
- Éter etílico seco: 10 ml
- Cloruro de zinc anhidro: 0,70 g. (4,13 mmol)
- 4-metoxifenilacetronitrilo: 2,10 g. (14,27 mmol)
- Éter dietílico seco: 10 ml
- Agua destilada: 50 ml

Así se obtienen 0,49 g. (1,70 mmol) de la 2,6-dihidroxi-4,4'-dimetoxidesoxibenzoína lo que representa un rendimiento del 11,90% y 1,99 g. (6,90 mmol) de la 2,4-dihidroxi-6,4'-dimetoxidesoxibenzoína lo que representa un rendimiento del 48,35%, lo que representa una proporción 4:1 de los productos, mientras que la esperada por distribución estadística era de 2:1.

**2,6-dihidroxi-4,4'-dimetoxidesoxibenzoína**

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

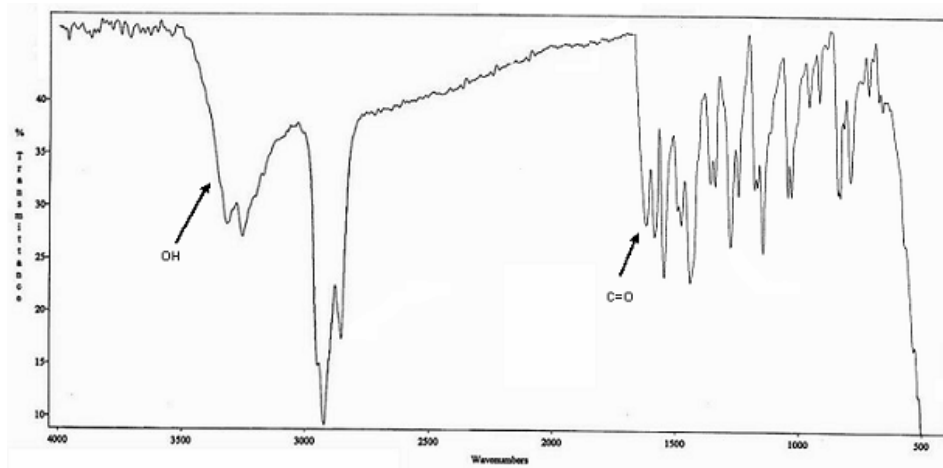


**1.- Análisis elemental al producto:**

<i>VALOR CALCULADO</i>	<i>VALOR OBSERVADO</i>
C = 68,45 %	C = 69,07 %
H = 4,73 %	H = 5,29 %
O = 26,82 %	O = 25,64 %

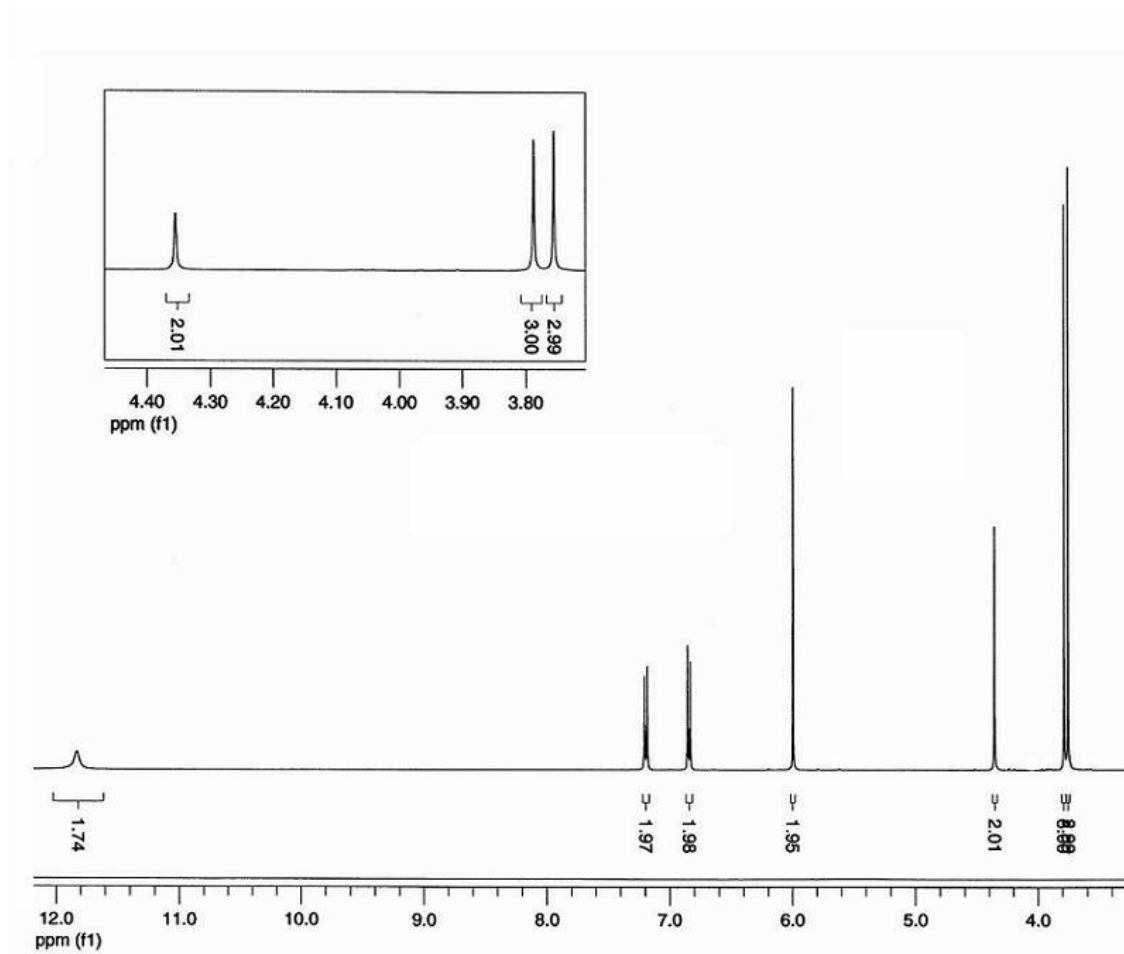
**2.- Punto de fusión: °C**

**2.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3197  $\text{cm}^{-1}$  (OH), 1650  $\text{cm}^{-1}$  (C=O)**



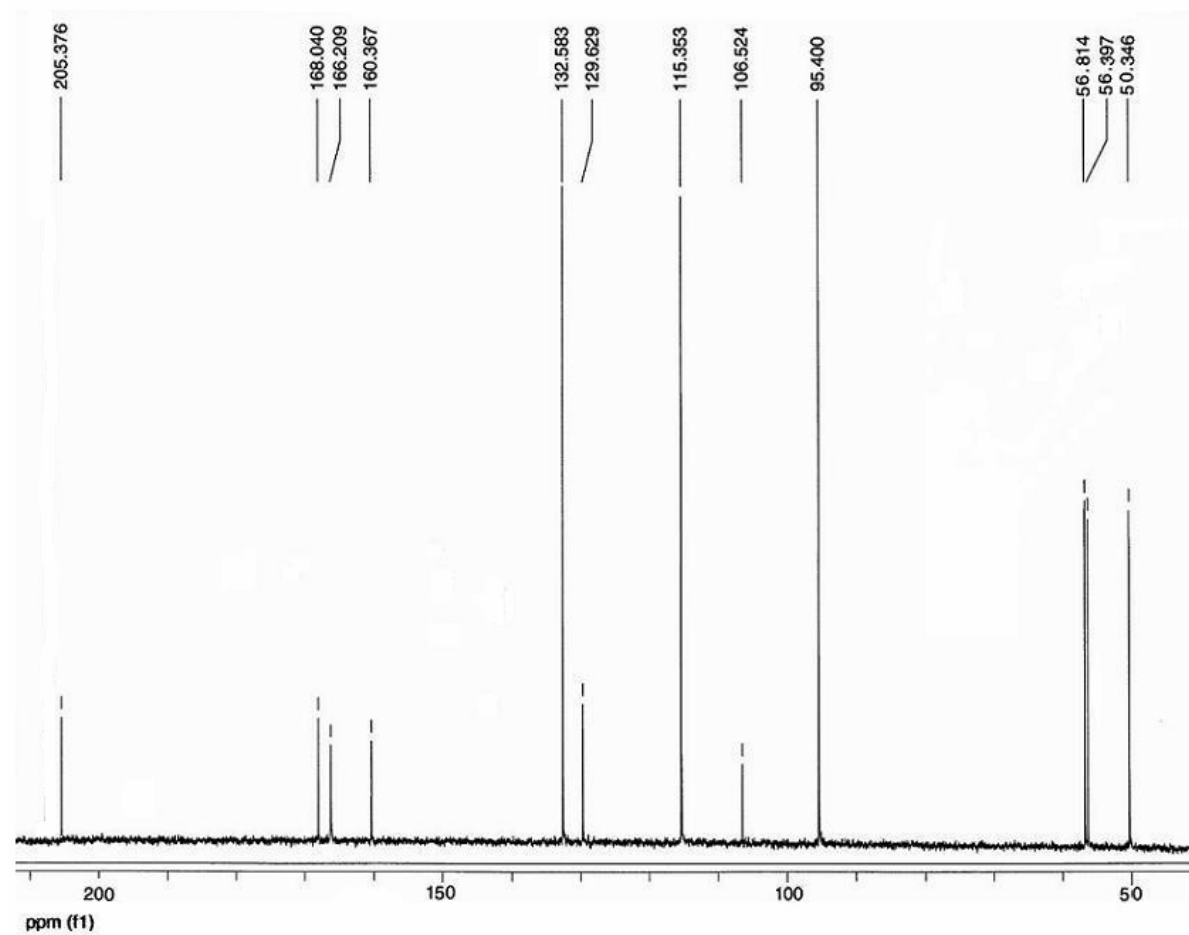
**4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.105 y 4.106).**





**$^1\text{H}$ -RMN( $d_6$ -acetona,  $\delta$  ppm):** 3,75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4,36 (s, 2H, H8), 5,99 (s, 2H, Ph-H3, Ph-H5), 6,85 (d, 2H, Ph-H3', Ph-H5', J=8,6 Hz), 7,19 (d, 2H, Ph-H2', Ph-H6', J=8,6 Hz), 11,78 (s, 2H, OH)

**FIG. 4.105.**  $^1\text{H}$ -RMN de 2,6-dihidroxi-4,4'-dimetoxidesoxibenzoina

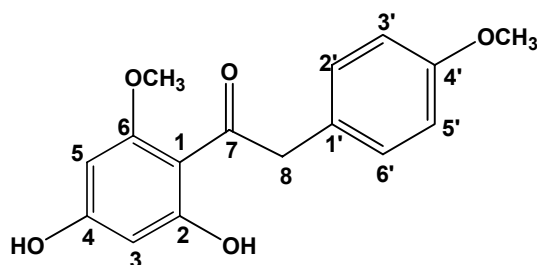


**$^{13}\text{C-RMN}(\text{d}_6\text{-acetona}, \delta \text{ ppm})$ :** 50,34 (C8), 56,39 (OCH<sub>3</sub>), 56,81 (OCH<sub>3</sub>), 95,40 (C3, C5) 106,52 (C1), 115,35 (C3', C5'), 129,62 (C1'), 132,58 (C2', C6'), 160,36 (C4'), 166,21 (C2, C6), 168,04 (C4), 205,37 (C7)

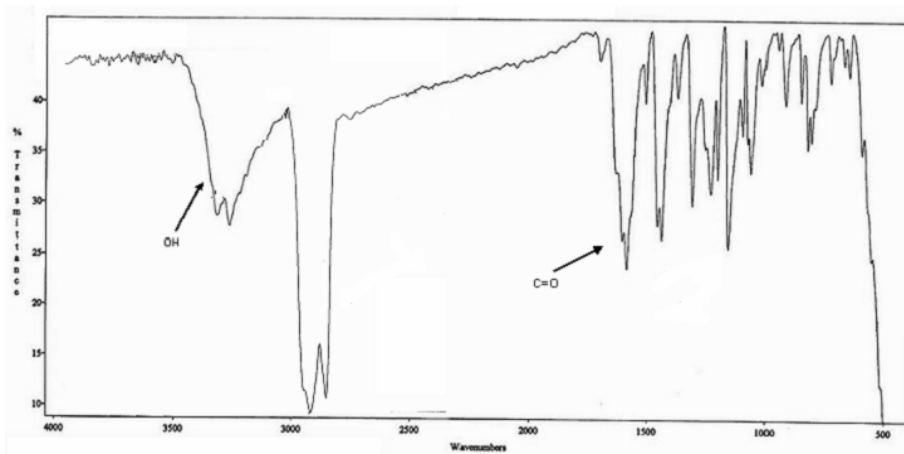
**FIG. 4.106.**  $^{13}\text{C-RMN}$  de 2,6-dihidroxi-4,4'-dimetoxidesoxibenzoína

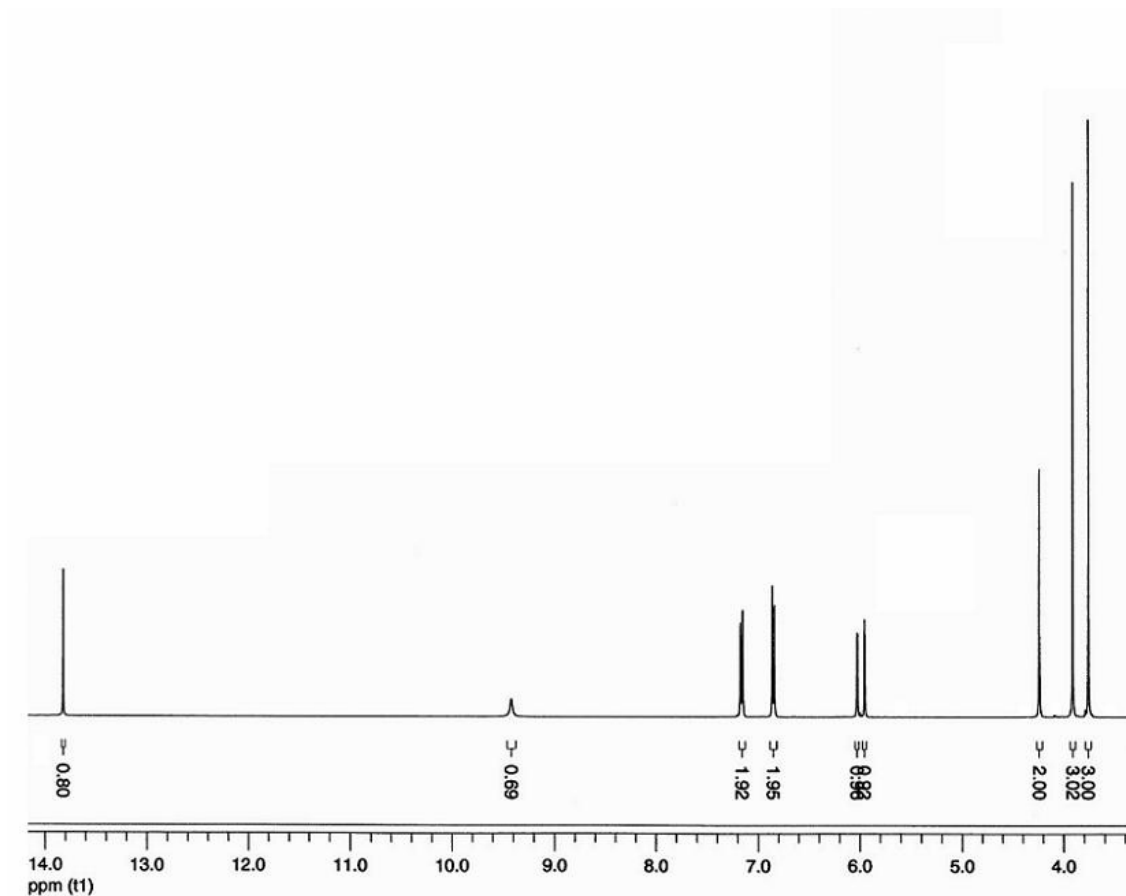
**2,4-dihidroxi-6,4'-dimetoxidesoxibenzoína**

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

**1.- Análisis elemental al producto:**

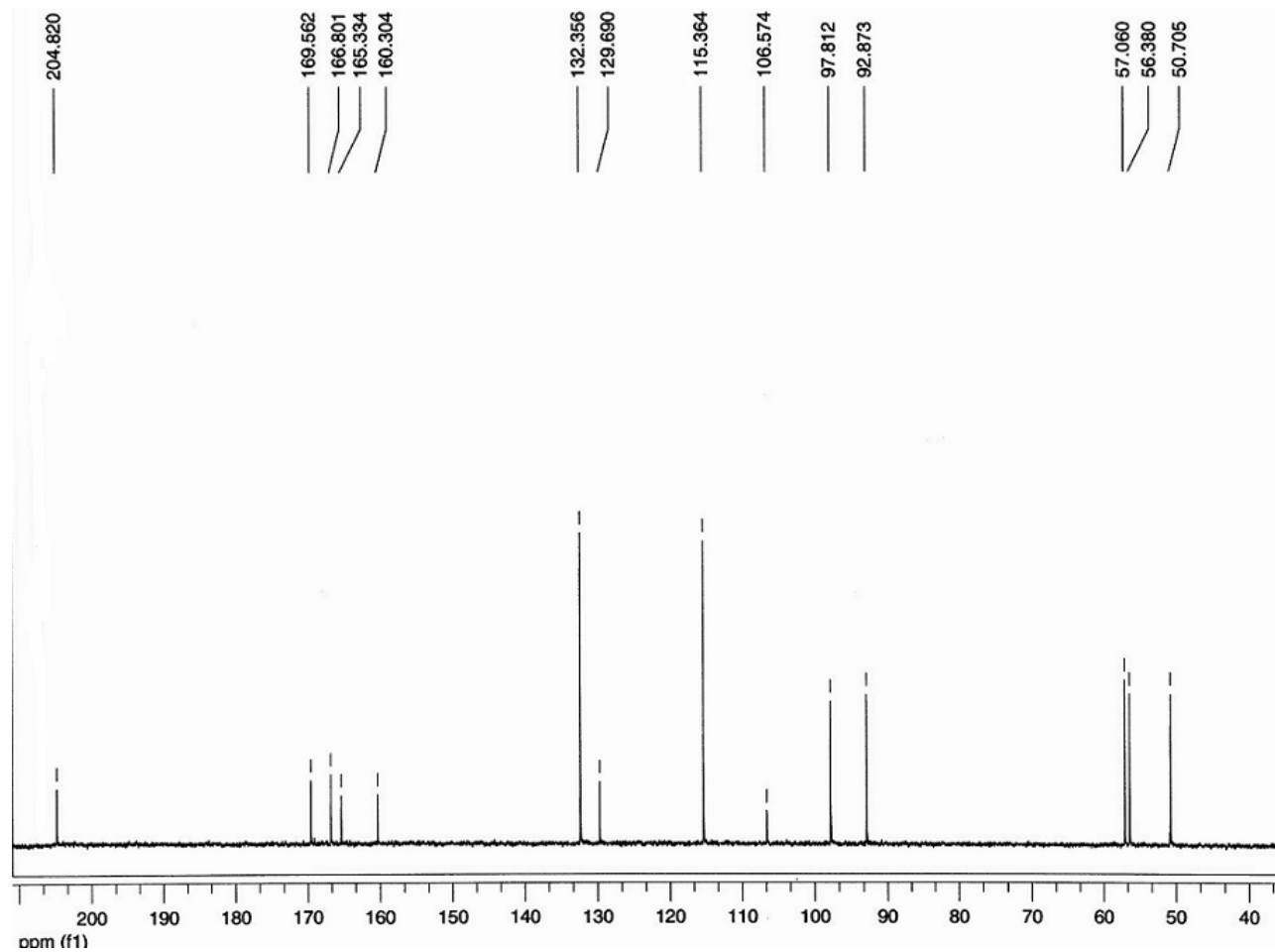
<b>VALOR CALCULADO</b>	<b>VALOR OBSERVADO</b>
C = 68,45 %	C = 68,87%
H = 4,73 %	H = 4,58 %
O = 26,82 %	O = 26,55 %

**2.- Punto de fusión: °C****3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3158  $\text{cm}^{-1}$  (OH), 1623  $\text{cm}^{-1}$  (C=O)****4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.107 y 4.108).**



**<sup>1</sup>H-RMN(d<sub>6</sub>-acetona, δ ppm):** 3,71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4,24 (s, 2H, H<sub>8</sub>), 5,95 (d, 1H, Ph-H<sub>3</sub>, J=2,2 Hz), 6,02 (d, 1H, Ph-H<sub>5</sub>, J=2,2 Hz), 6,85 (d, 2H, Ph-H<sub>3'</sub>, Ph-H<sub>5'</sub>, J=8,6 Hz), 7,16 (d, 2H, Ph-H<sub>2'</sub>, Ph-H<sub>6'</sub>, J=8,6 Hz), 9,43 (s, 1H, OH), 13,83 (s, 1H, OH)

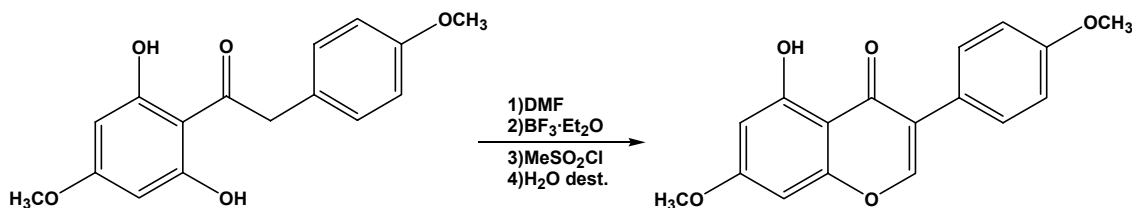
**FIG. 4.107.** <sup>1</sup>H-RMN de 2,4-dihidroxi-6,4'-dimetoxidesoxibenzoína



**<sup>13</sup>C-RMN(*d*<sub>6</sub>-acetona, δ ppm):** 50,70 (C8), 56,38 (OCH<sub>3</sub>), 57,06 (OCH<sub>3</sub>), 92,87 (C5), 97,81 (C3) 106,57 (C1), 115,36 (C3', C5'), 129,69 (C1'), 132,35 (C2', C6'), 160,30 (C4'), 165,33 (C2), 166,80 (C4), 169,56 (C6), 202,76 (C7)

**FIG. 4.108.** <sup>13</sup>C-RMN de 2,4-dihidroxi-6,4'-dimetoxidesoxibenzoína

#### 4.4.26. Síntesis de 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiisoflavona



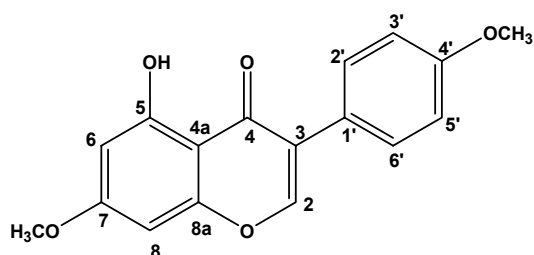
El método de síntesis es idéntico al descrito en el apartado 4.4.3. El tiempo de reacción en este caso es de 3 horas. El producto obtenido se purifica mediante recristalización con etanol absoluto, obteniéndose un sólido que es la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiisoflavona.

Las cantidades empleadas son las que se detallan a continuación:

- 2,6-dihidroxi-4,4'-dimetoxidesoxibenzoína : 0,23 g. (0,71 mmol)
- Dimetilformamida seca: 10 ml
- Trifluoruro de boro-éter: 1 ml (4 equivalentes)
- Metansulfonilo: 0,50 ml (3 equivalentes)
- Dimetilformamida seca: 5 ml
- Agua destilada: 90 ml

Obtienen así 0,16 g. (0,53 mmol) de la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiisoflavona lo que representa un rendimiento del 78%.

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

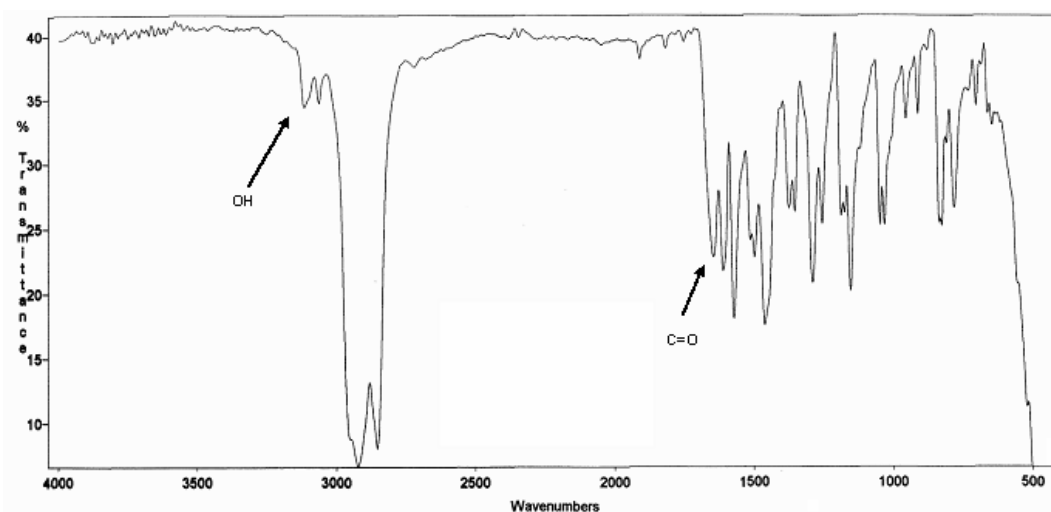


### 1.- Análisis elemental al producto:

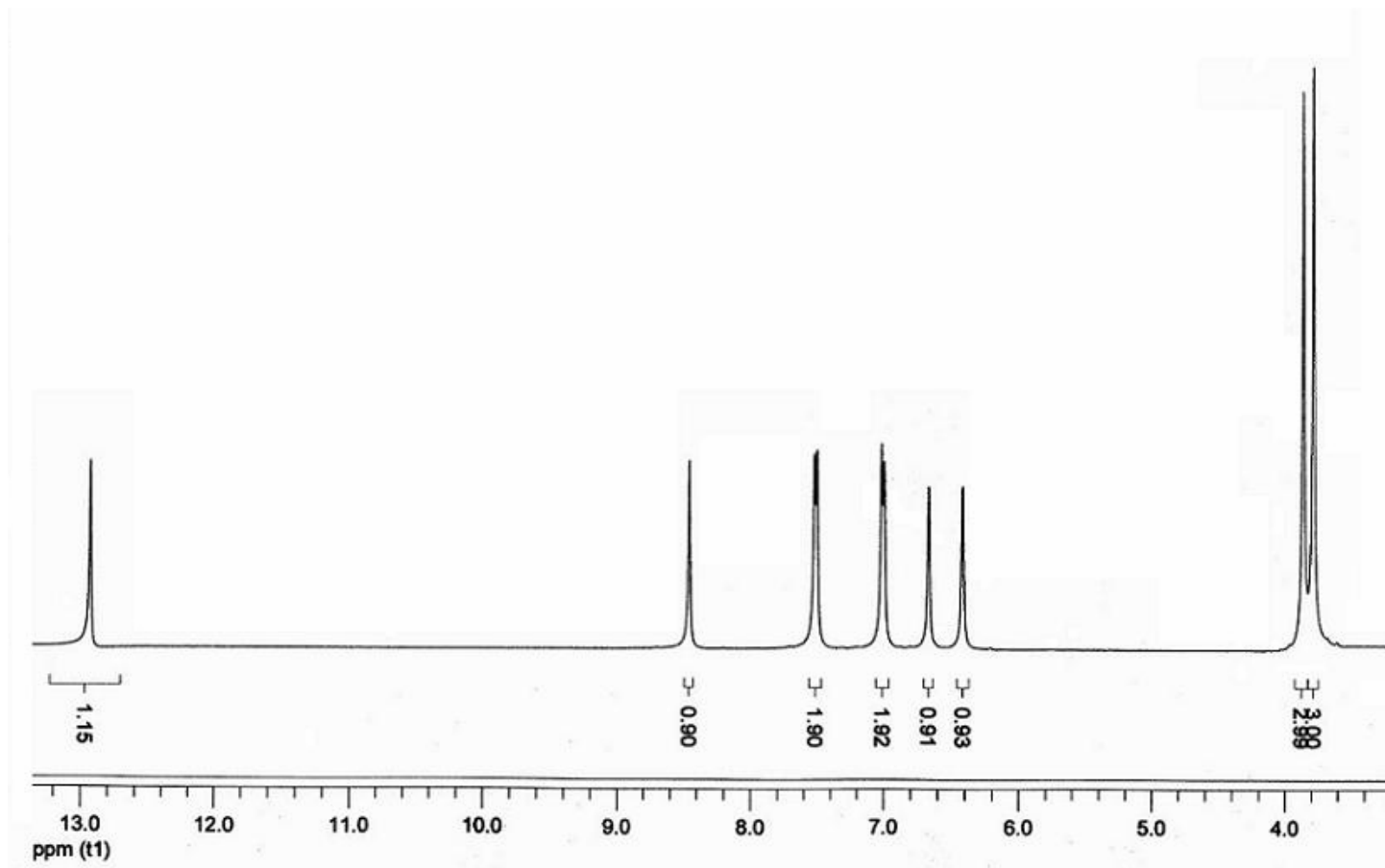
<i>VALOR CALCULADO</i>	<i>VALOR OBSERVADO</i>
C = 68,45 %	C = 68,87 %
H = 4,73 %	H = 5,23 %
O = 26,82 %	O = 25,9 %

### 2.- Punto de fusión: °C

### 3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ , $\text{cm}^{-1}$ ): 3115 $\text{cm}^{-1}$ (OH), 1644 $\text{cm}^{-1}$ (C=O)



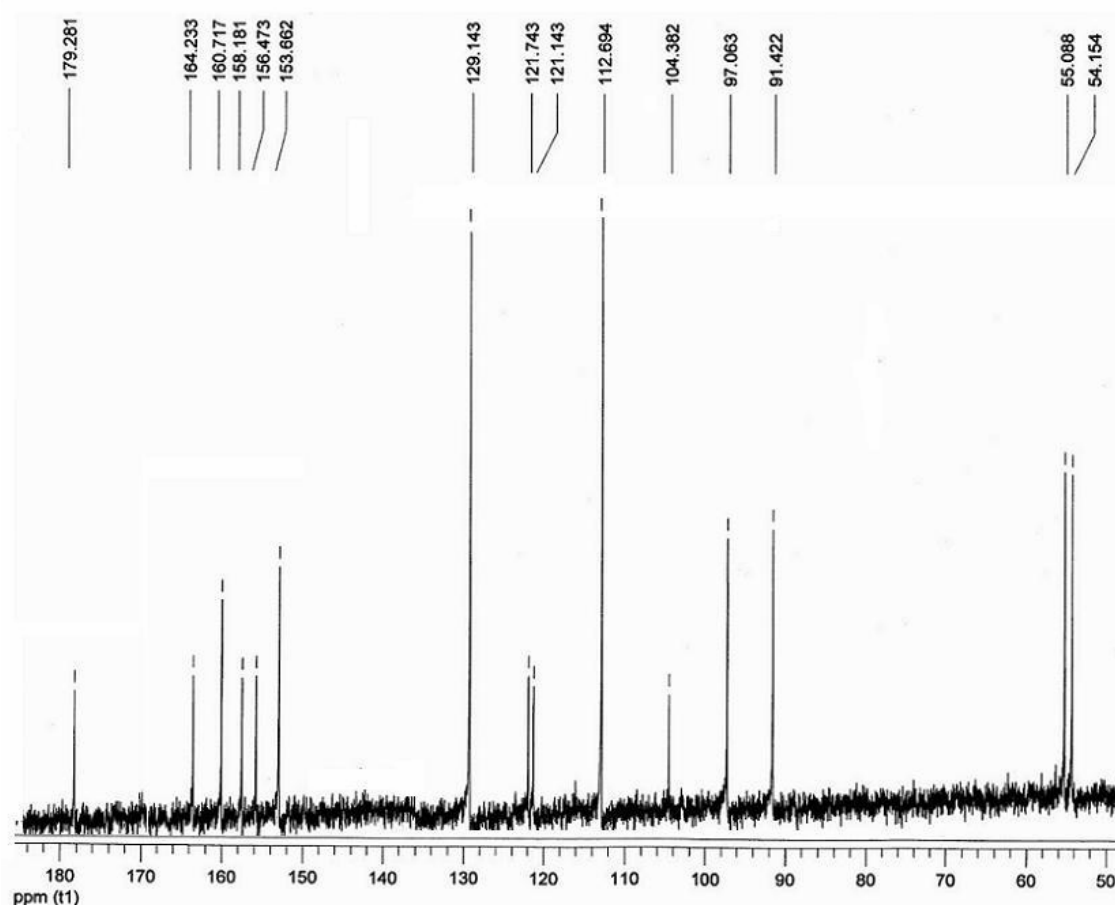
### 4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.109 y 4.110).



**<sup>1</sup>H-RMN(d<sub>6</sub>-DMSO, δ ppm):** 3,79 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6,41 (d, 1H, Ph-H<sub>6</sub>, J=2,10 Hz), 6,66 (d, 1H, Ph-H<sub>8</sub>, J=2,10 Hz), 7,00 (d, 2H, Ph-H<sub>3'</sub>, Ph-H<sub>5'</sub>, J=7,9 Hz), 7,51 (d, 2H, Ph-H<sub>2'</sub>, Ph-H<sub>6'</sub>, J=7,9 Hz), 8,45 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 12,93 (s, 1H, OH)

**FIG. 4.109.** <sup>1</sup>H-RMN de 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiisoflavona

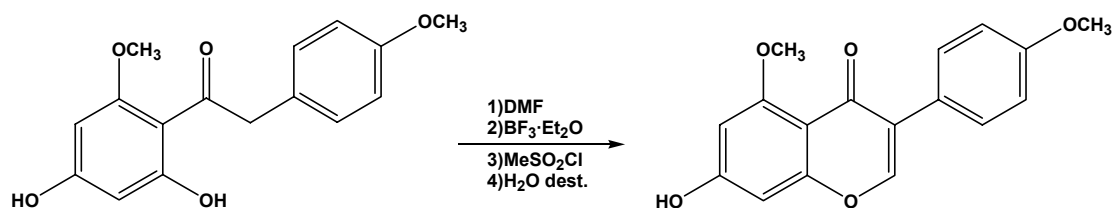




$^{13}\text{C}$ -RMN( $d_6$ -DMSO,  $\delta$  ppm): 54,15 (OCH<sub>3</sub>), 55,08 (OCH<sub>3</sub>), 91,42 (C8), 97,06 (C6), 104,38 (C4a), 112,69 (C3', C5'), 121,14 (C3), 121,74 (C1'), 129,14 (C2', C6'), 153,66 (C2), 156,47 (C8a), 158,18 (C4'), 160,71 (C5), 164,23 (C7), 179,28 (C4)

FIG. 4.110.  $^{13}\text{C}$ -RMN de 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiisoflavona

#### 4.4.27. Síntesis de 7-hidroxi-5,4'-dimetoxiisoflavona



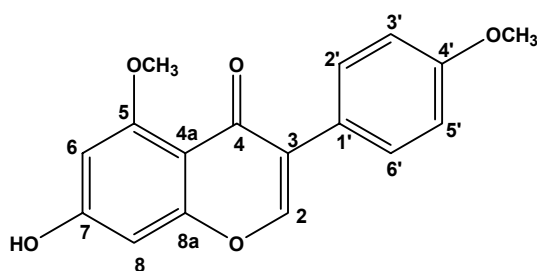
El método de síntesis es idéntico al descrito en el apartado 4.4.3. El tiempo de reacción en este caso es de 3,5 horas. El producto se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :AcOEt 7:2, obteniéndose un sólido que es la 7-hidroxi-5,4'-dimetoxiisoflavona.

Las cantidades empleadas son las que se detallan a continuación:

- 2,4-dihidroxi-6,4'-dimetoxidesoxibenzoína: 1,60 g. (5,55 mmol)
- Dimetilformamida seca: 30 ml
- Trifluoruro de boro-éter: 3 ml (4 equivalentes)
- Metansulfonilo: 3,9 ml (3 equivalentes)
- Dimetilformamida seca: 15 ml
- Agua destilada: 400 ml

Así se obtiene 1 g. (3,35 mmol) de la 7-hidroxi-5,4'-dimetoxiisoflavona lo que representa un rendimiento del 61%.

El producto se caracterizó mediante las siguientes técnicas:

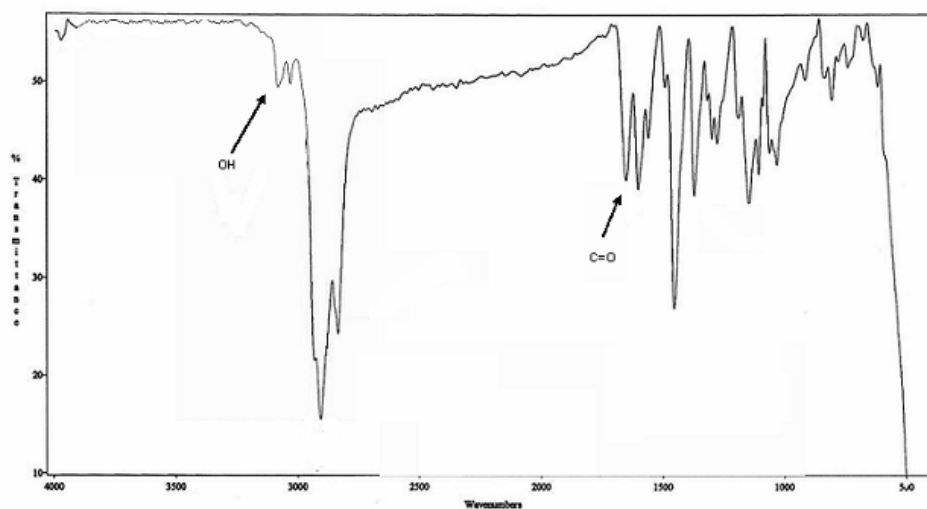


### 1.- Análisis elemental al producto:

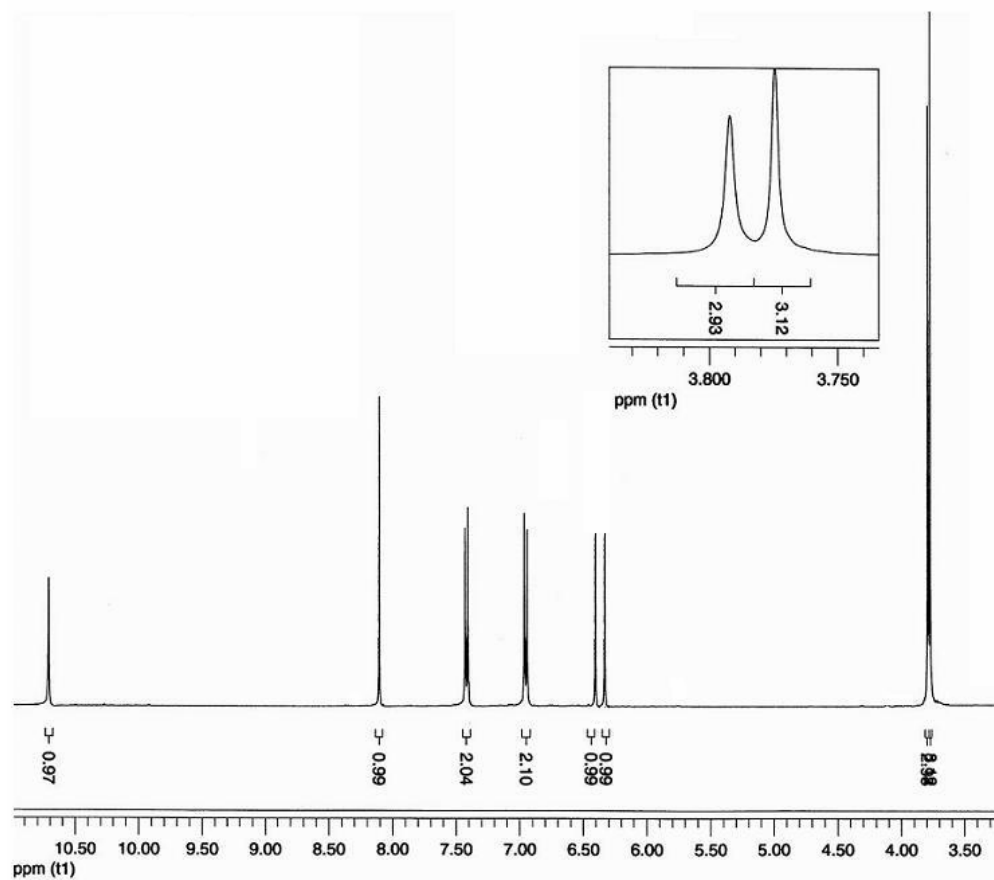
<i>VALOR CALCULADO</i>	<i>VALOR OBSERVADO</i>
C = 68,45 %	C = 68,38 %
H = 4,73 %	H = 5,67 %
O = 26,82 %	O = 26,05 %

### 2.- Punto de fusión: °C

3.- IR ( $\nu_{\text{máx}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3130  $\text{cm}^{-1}$  (OH), 2812  $\text{cm}^{-1}$  (C-H), 1665  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1294  $\text{cm}^{-1}$  (C-O)

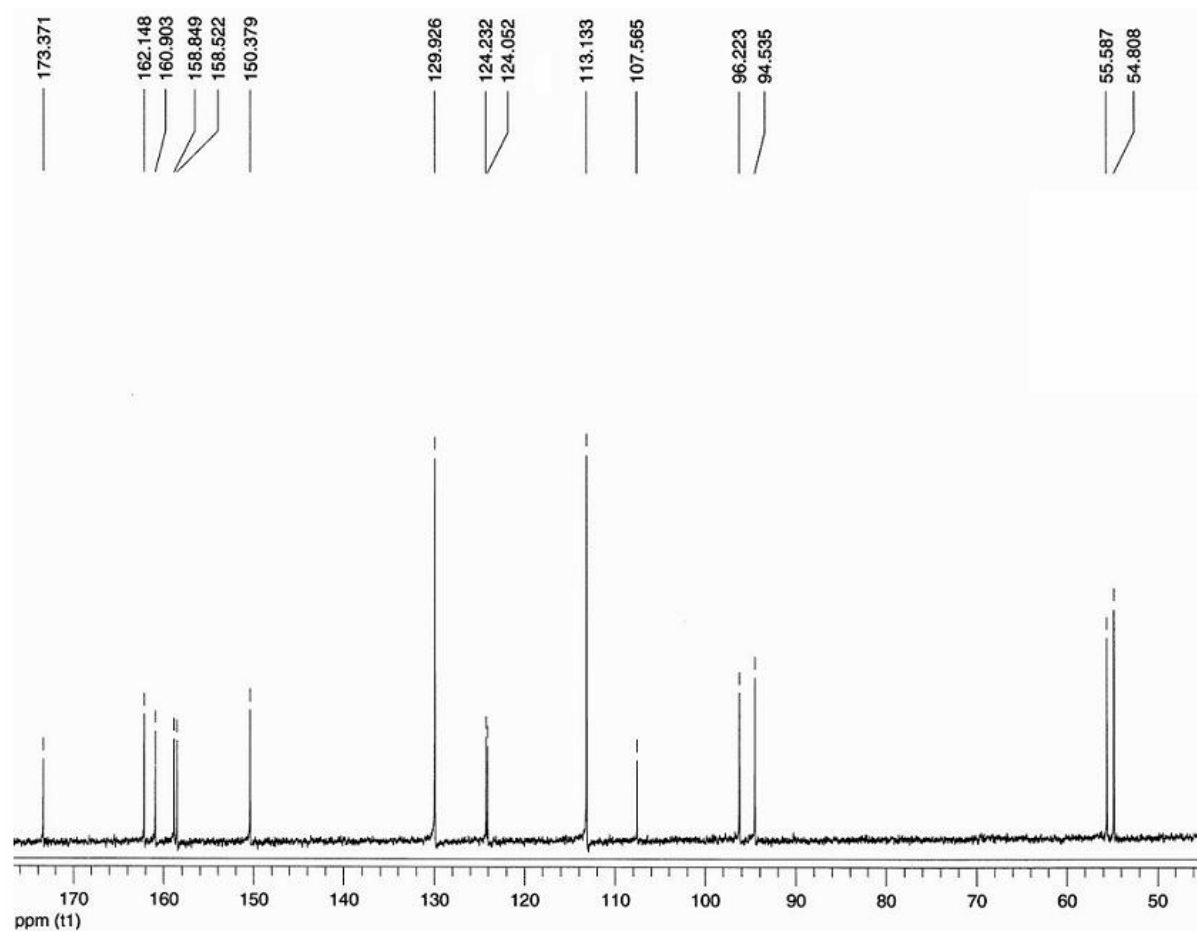


4.- Espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono ( $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN) (Fig. 4.111 y 4.112).



**<sup>1</sup>H-RMN(d<sub>6</sub>-DMSO, δ ppm):** 3,77 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,79 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6,38 (d, 1H Ph-H6, J=2,10 Hz), 6,40 (d, 1H Ph-H8, J=2,10 Hz), 6,95 (d, 2H, Ph-H3', Ph-H5', J=8,80 Hz), 7,41 (d, 2H, Ph-H2', Ph-H6', J=8,80 Hz), 8,10 (s, 1H, H2), 10,71 (s, 1H, OH)

**FIG. 4.111.** <sup>1</sup>H-RMN de 7-hidroxi-5,4'-dimetoksiisoflavona

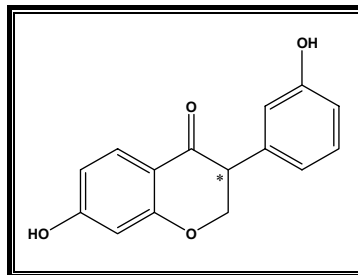


**$^{13}\text{C-RMN}(\text{d}_6\text{-DMSO}, \delta \text{ ppm})$ :** 54,80 ( $\text{OCH}_3$ ), 55,58 ( $\text{OCH}_3$ ), 94,53 (C8), 96,22 (C6), 107,56 (C4a), 113,13 (C3', C5'), 124,05 (C1'), 124,23 (C3), 129,92 (C2', C6'), 150,37 (C2), 158,52 (C8a), 158,84 (C4'), 160,90 (C5), 162,14 (C7), 173,37 (C4)

**FIG. 4.112.**  $^{13}\text{C-RMN}$  de 7-hidroxi-5,4'-dimetoxiisoflavona

#### 4.4.28 Condiciones de separación y obtención de los enantiómeros

##### *7,3'-dihidroxiisoflavona* (DHD-OH-3')



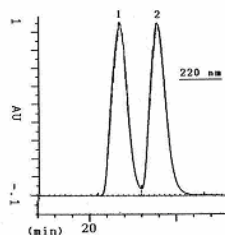
La concentración de producto inyectado en la columna analítica fue 2mg/ml. El disolvente empleado en todos los casos fue EtOH. En la columna C-2 (Chiralpak IA Daicel 4,6 mm x 250 mm) se inyectaron 7  $\mu$ l a un flujo de 1  $\mu$ l/min y se probaron distintas proporciones hexano:etanol. La mejor separación se consiguió utilizando como eluyente una mezcla 90:10 hexano:etanol. En estas condiciones los tiempos de retención correspondientes a ambos enantiómeros son:

$$t_1 = 21,73 \text{ min}$$

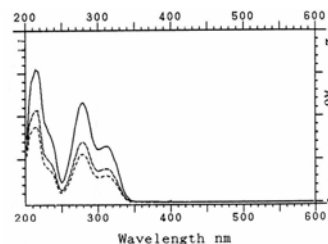
$$t_2 = 23,91 \text{ min}$$

visualizando los cromatogramas a  $\lambda = 220$  y 280 nm (longitudes de ondas de máxima absorción de la DHD-OH-3').

En las figuras 4.113 y 4.114 se muestra el cromatograma obtenido y el espectro UV respectivamente de ambos enantiómeros en el eluyente utilizado.



**FIG. 4.113.** Cromatograma correspondiente a los enantiómeros de la DHD-OH-3'



**FIG. 4.114.** Espectro UV de ambos enantiómeros de la DHD-OH-3' en hexano/etanol

Como se disponía de suficiente producto racémico se decidió hacer la separación en una columna semipreparativa, lo que conllevaba unas pruebas iniciales de escalado y de carga.

Tras las pruebas de carga y debido a la baja solubilidad del producto se observó que las mejores condiciones de separación eran las que se describen a continuación.

Fase estacionaria: columna quiral C-2 (Chiralpak IA Daicel 20mm x 250 mm)  
Fase móvil: hexano:etanol 90:10  
Concentración: 25mg/ml EtOH  
Flujo: 18ml/min  
Volumen de inyección: 250  $\mu$ l

La separación semipreparativa permitió la obtención de ambos enantiómeros por inyecciones sucesivas en HPLC de una muestra de DHD-OH-3' racémica disuelta en etanol, visualizando los cromatogramas a  $\lambda = 280$  nm.

Se recogieron las muestras eluidas a la salida del detector en tres fracciones: la primera y la última correspondientes a los dos picos puros y una fracción intermedia recogida entre la bajada del primer pico y la subida del segundo con mezclas de ambos enantiómeros.

Se juntaron y evaporaron todas las fracciones recogidas de cada producto. Se obtuvieron 21,7 mg del primer enantiómero, que se denominó DHD-OH-3'(1) y 21,3 mg del segundo, DHD-OH-3'(2).

Finalmente, se cromatografiaron ambas fracciones por separado, en las mismas condiciones, para comprobar la eficacia de la separación.

DHD-OH-3'(1) se obtuvo con un 96,85% de pureza, conteniendo un 3,15% de DHD-OH-3'(2) (Fig. 4.115).

DHD-OH-3'(2) se obtuvo con un 98,43% de pureza, conteniendo un 1,57% de DHD-OH-3'(1) (Fig. 4.116).

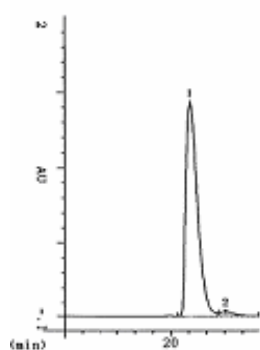


FIG. 4.115. Cromatograma de DHD-OH-3'(1)

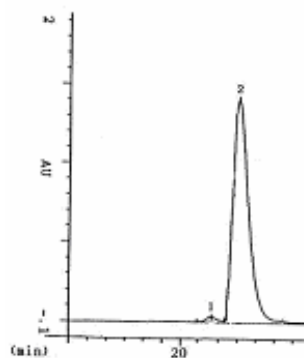
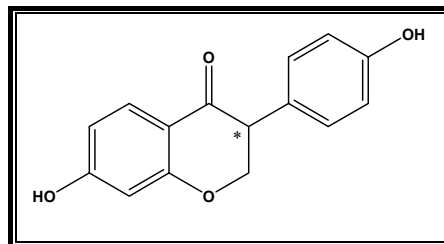


FIG. 4.165. Cromatograma de DHD-OH-3'(2)

**7,4'-dihidroxiisofavanona  
(DHD)**



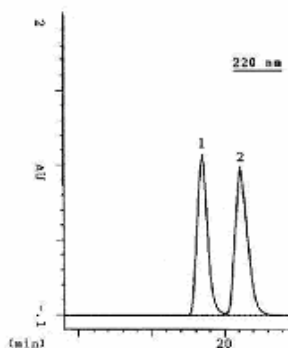
La concentración de producto inyectado en la columna analítica fue 20mg/ml. En la columna C-2 (Chiralpak IA Daicel 4,6 mm x 250 mm) se inyectaron 7  $\mu$ l a un flujo de 1  $\mu$ l/min y se probaron distintas proporciones hexano:etanol. La mejor separación se consiguió utilizando como eluyente una mezcla 90:10 hexano:etanol. En estas condiciones los tiempos de retención correspondientes a ambos enantiómeros son:

$$t_1 = 18,51 \text{ min}$$

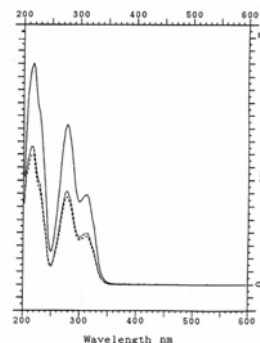
$$t_2 = 21,03 \text{ min}$$

visualizando los cromatogramas a  $\lambda = 220$  y 280 nm (longitudes de ondas de máxima absorción de la DHD).

En las figuras 4.117 y 4.118 se muestra el cromatograma obtenido y el espectro UV respectivamente de ambos enantiómeros en el eluyente utilizado.



**FIG. 4.117.** Cromatograma correspondiente a los enantiómeros de la dihidrodaidzeína



**FIG. 4.118.** Espectro UV de ambos enantiómeros de la dihidrodaidzeína en hexano/etanol

Como se disponía de suficiente producto racémico se decidió hacer la separación en una columna semipreparativa, lo que conllevaba unas pruebas iniciales de escalado y de carga.

Tras las pruebas de carga y debido a la baja solubilidad del producto se observó que las mejores condiciones de separación eran las que se describen a continuación.



Fase estacionaria: columna quiral C-2 (Chiralpak IA Daicel 20mm x 250 mm)

Fase móvil: hexano:etanol 88:12

Concentración: 20mg/ml EtOH

Flujo: 20ml/min

Volumen de inyección: 250  $\mu$ l

Ambos enantiómeros se obtuvieron por inyecciones sucesivas en HPLC de una muestra de dihidroaidzeína racémica disuelta en etanol, visualizando los cromatogramas a  $\lambda = 280$  nm.

Se recogieron las muestras eluidas a la salida del detector en tres fracciones: la primera y la última correspondientes a los dos picos puros y una fracción intermedia recogida entre la bajada del primer pico y la subida del segundo con mezclas de ambos enantiómeros.

Se juntaron y evaporaron todas las fracciones recogidas de cada producto. Se obtuvieron 45,5 mg del primer enantiómero, que se denominó DHD(1) y 32,8 mg del segundo, DHD(2).

Finalmente, se cromatografiaron ambas fracciones por separado, en las mismas condiciones, para comprobar la eficacia de la separación.

DHD(1) se obtuvo con un 97,9% de pureza, conteniendo un 2,1% de DHD(2) (Fig. 4.119).

DHD(2) se obtuvo con un 98,7% de pureza, conteniendo un 1,3% de DHD(1) (Fig. 4.120).

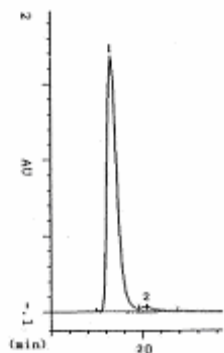


FIG. 4.119. Cromatograma de DHD(1)

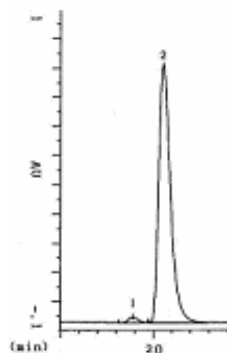
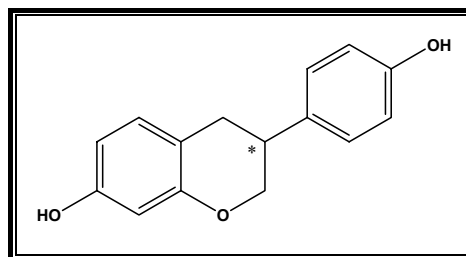


FIG. 4.120. Cromatograma de DHD(2)

**7,4'-dihidroxiisoflavano  
(EQUOL)**



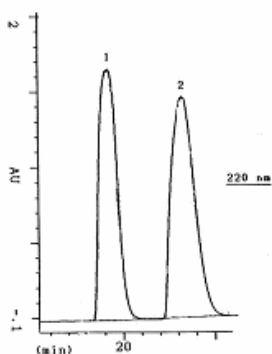
La concentración de producto inyectado en la columna analítica fue 2mg/ml. En la columna C-2 (Chiralpak IA Daicel 4,6 mm x 250 mm) se inyectaron 7  $\mu$ l a un flujo de 1  $\mu$ l/min y se probaron distintas proporciones hexano:etanol. La mejor separación se consiguió utilizando como eluyente una mezcla 88:12 hexano:etanol. En estas condiciones los tiempos de retención correspondientes a ambos enantiómeros son:

$$t_1 = 19,33 \text{ min}$$

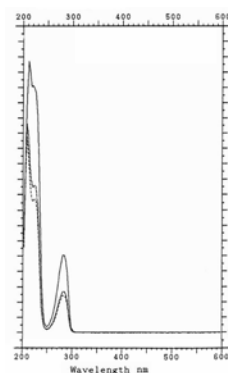
$$t_2 = 23,44 \text{ min}$$

visualizando los cromatogramas a  $\lambda = 220$  y 280 nm (longitudes de ondas de máxima absorción del equol).

En las figuras 4.121 y 4.122 se muestra el cromatograma obtenido y el espectro UV respectivamente de ambos enantiómeros en el eluyente utilizado.



**FIG. 4.121.** Cromatograma correspondiente a los enantiómeros del equol



**FIG. 4.122.** Espectro UV de ambos enantiómeros del equol en hexano:etanol

Como se disponía de suficiente producto racémico se decidió hacer la separación en una columna semipreparativa, lo que conllevaba unas pruebas iniciales de escalado y de carga.

Tras las pruebas de carga y debido a la baja solubilidad del producto se observó que las mejores condiciones de separación eran las que se describen a continuación.

Fase estacionaria: columna quiral C-2 (Chiralpak IA Daicel 20mm x 250 mm)

Fase móvil: hexano:etanol 88:12

Concentración: 31mg/ml EtOH

Flujo: 18ml/min

Volumen de inyección: 250  $\mu$ l

Ambos enantiómeros se obtuvieron por inyecciones sucesivas en HPLC de una muestra de equol racémico disuelto en etanol, visualizando los cromatogramas a  $\lambda = 280$  nm.

Se recogieron las muestras eluidas a la salida del detector en tres fracciones: la primera y la última correspondientes a los dos picos puros y una fracción intermedia recogida entre la bajada del primer pico y la subida del segundo con mezclas de ambos enantiómeros.

Se juntaron y evaporaron todas las fracciones recogidas de cada producto. Se obtuvieron 46,9 mg del primer enantiómero, que se denominó E(1) y 42,7 mg del segundo, E(2).

Finalmente, se cromatografiaron ambas fracciones por separado, en las mismas condiciones, para comprobar la eficacia de la separación.

E(1) se obtuvo con un 100% de pureza (Fig. 4.123) al igual que E(2) (Fig. 4.124).

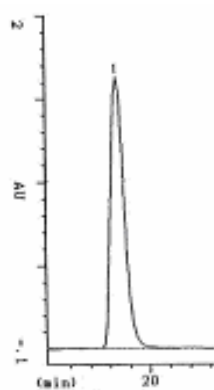


FIG. 4.123. Cromatograma de E(1)

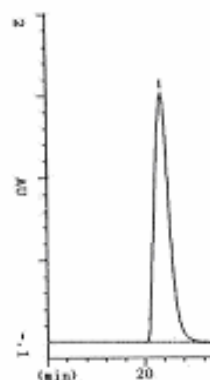
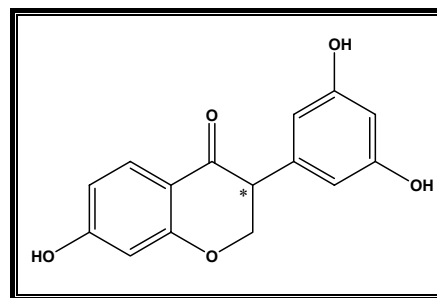


FIG. 4.124. Cromatograma de E(2)

**7,3',5'-trihidroxiisoflavavona**  
(DHD-OH-3',5')



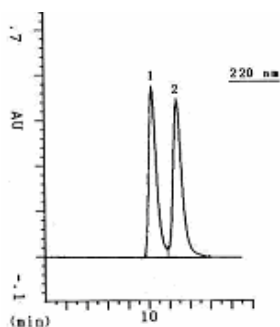
La concentración de producto inyectado en la columna analítica fue 1mg/ ml. En la columna C-2 (Chiralpak IA Daicel 4,6 mm x 250 mm) se inyectaron 7  $\mu$ l a un flujo de 1  $\mu$ l/min y se probaron distintas proporciones hexano:cloroformo:etanol. La mejor separación se consiguió utilizando como eluyente una mezcla 78:8:14 hexano:cloroformo:etanol. En estas condiciones los tiempos de retención correspondientes a ambos enantiómeros son:

$$t_1 = 10,21 \text{ min}$$

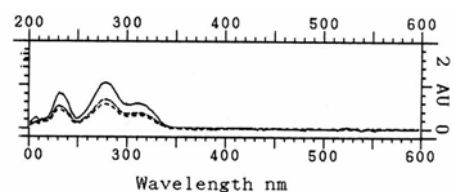
$$t_2 = 11,41 \text{ min}$$

visualizando los cromatogramas a  $\lambda = 220$  y 280 nm (longitudes de ondas de máxima absorción de la DHD-OH-3',5').

En las figuras 4.125 y 4.126 se muestra el cromatograma obtenido y el espectro UV respectivamente de ambos enantiómeros en el eluyente utilizado.



**FIG. 4.125.** Cromatograma correspondiente a los enantiómeros de la DHD-OH-3',5'



**FIG. 4.126.** Espectro UV de ambos enantiómeros de la DHD-OH-3',5' en hexano:cloroformo:etanol

Como se disponía de suficiente producto racémico se decidió hacer la separación en una columna semipreparativa, lo que conllevaba unas pruebas iniciales de escalado y de carga.

Tras las pruebas de carga y debido a la baja solubilidad del producto se observó que las mejores condiciones de separación eran las que se describen a continuación.

Fase estacionaria: columna quiral C-2 (Chiralpak IA Daicel 20mm x 250 mm)

Fase móvil: hexano:cloroformo:etanol 78:8:14

Concentración: 20mg/ml EtOH

Flujo: 18ml/min

Volumen de inyección: 200  $\mu$ l

El escalado del método a semipreparativo permitió la obtención de ambos enantiómeros por inyecciones sucesivas en HPLC de una muestra de DHD-OH-3',5' racémica disuelta en etanol, visualizando los cromatogramas a  $\lambda = 280$  nm.

Se recogieron las muestras eluidas a la salida del detector en tres fracciones: la primera y la última correspondientes a los dos picos puros y una fracción intermedia recogida entre la bajada del primer pico y la subida del segundo con mezclas de ambos enantiómeros.

Se juntaron y evaporaron todas las fracciones recogidas de cada producto. Se obtuvieron 26,8 mg del primer enantiómero, que se denominó DHD-OH-3',5'(1) y 31,6 mg del segundo, DHD-OH-3',5'(2).

Finalmente, se cromatografiaron ambas fracciones por separado, en las mismas condiciones, para comprobar la eficacia de la separación.

DHD-OH-3',5'(1) se obtuvo con un 88,24% de pureza, conteniendo un 11,76% de DHD-OH-3',5'(2) (Fig. 4.127).

DHD-OH-3',5'(2) se obtuvo con un 94,5% de pureza, conteniendo un 5,53% de DHD-OH-3',5'(1) (Fig. 4.128).

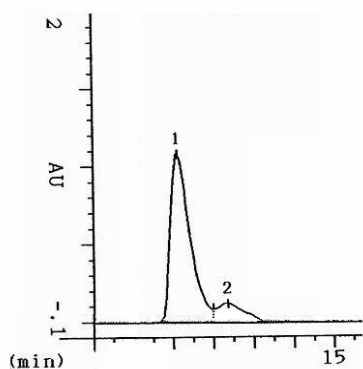


FIG. 4.127. Cromatograma de DHD-OH-3',5'(1)

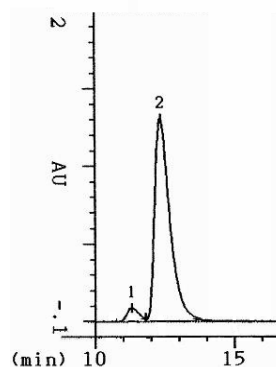
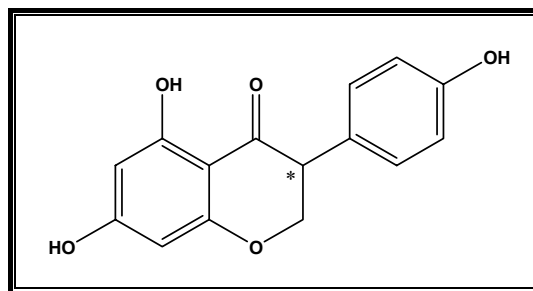


FIG. 4.128. Cromatograma de DHD-OH-3',5'(2)

**5,7,4'-dihidroxiisofavanona (DHG)**

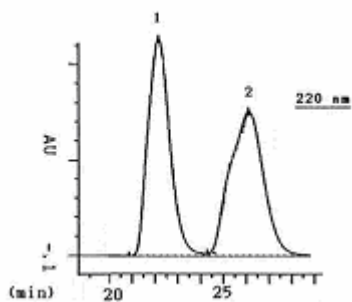
La concentración de producto inyectado en la columna analítica es 2mg/ml. En la columna C-2 (Chiralpak IA Daicel 4,6 mm x 250 mm) se inyectaron 7  $\mu$ l a un flujo de 1  $\mu$ l/min y se probaron distintas proporciones hexano:etanol. La mejor separación se consiguió utilizando como eluyente una mezcla 90:10 hexano:etanol. En estas condiciones los tiempos de retención correspondientes a ambos enantiómeros son:

$$t_1 = 22,20 \text{ min}$$

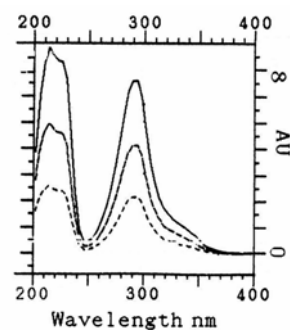
$$t_2 = 25,67 \text{ min}$$

visualizando los cromatogramas a  $\lambda = 220$  y 280 nm (longitudes de ondas de máxima absorción de la dihidrogenisteína).

En las figuras 4.129 y 4.130 se muestra el cromatograma obtenido y el espectro UV respectivamente de ambos enantiómeros en el eluyente utilizado.



**FIG. 4.129.** Cromatograma correspondiente a los enantiómeros de la dihidrogenisteína



**FIG. 4.130.** Espectro UV de ambos enantiómeros de la dihidrogenisteína en hexano/etanol

Como se disponía de suficiente producto racémico se decidió hacer la separación en una columna semipreparativa, lo que conllevaba unas pruebas iniciales de escalado y de carga.

Tras las pruebas de carga y debido a la baja solubilidad del producto se observó que las mejores condiciones de separación eran las que se describen a continuación.

Fase estacionaria: columna quiral C-2 (Chiralpak IA Daicel 20mm x 250 mm)  
Fase móvil: hexano: etanol 90:10  
Concentración: 33mg/ml EtOH  
Flujo: 18ml/min  
Volumen de inyección: 250  $\mu$ l

La separación semipreparativa permitió la obtención de ambos enantiómeros por inyecciones sucesivas en HPLC de una muestra de dihidrogenisteína racémica disuelta en etanol, visualizando los cromatogramas a  $\lambda = 280$  nm.

Se recogieron las muestras eluidas a la salida del detector en tres fracciones: la primera y la última correspondientes a los dos picos puros y una fracción intermedia recogida entre la bajada del primer pico y la subida del segundo con mezclas de ambos enantiómeros.

Se juntaron y evaporaron todas las fracciones recogidas de cada producto. Se obtuvieron 27,8 mg del primer enantiómero, que se denominó DHG(1) y 31,2 mg del segundo, DHG(2).

Finalmente, se cromatografiaron ambas fracciones por separado, en las mismas condiciones, para comprobar la eficacia de la separación.

DHG(1) se obtuvo con un 100% de pureza (Fig. 4.131), mientras que DHG(2) se obtuvo con un 98% de pureza, conteniendo un 2% de DHG(1) (Fig. 4.132).

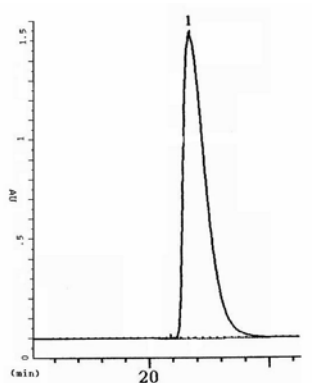


FIG. 4.131. Cromatograma de DHG(1)

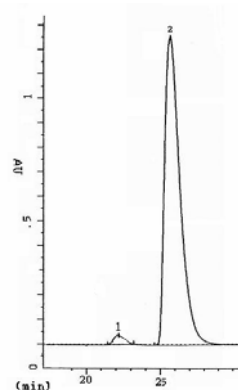
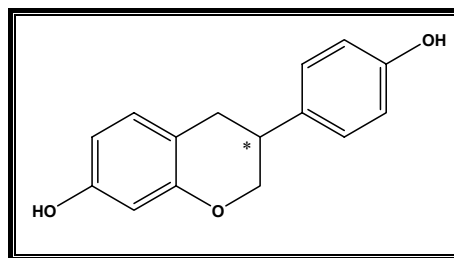


FIG. 4.132. Cromatograma de DHG(2)

#### 4.4.29 Medida de la rotación óptica, dicroísmo circular y asignación de la configuración absoluta

##### **7,4'-dihidroxiisoflavano (EQUOL)**



Se disolvieron 7,6 mg de cada uno de los enantiómeros de equol en 1 ml de etanol absoluto en sendos matraces aforados.

Se midió el poder óptico rotatorio de cada muestra a 25°C en un polarímetro.

Se realizaron 20 medidas de cada muestra y se halló el valor medio,  $\alpha_D$ .

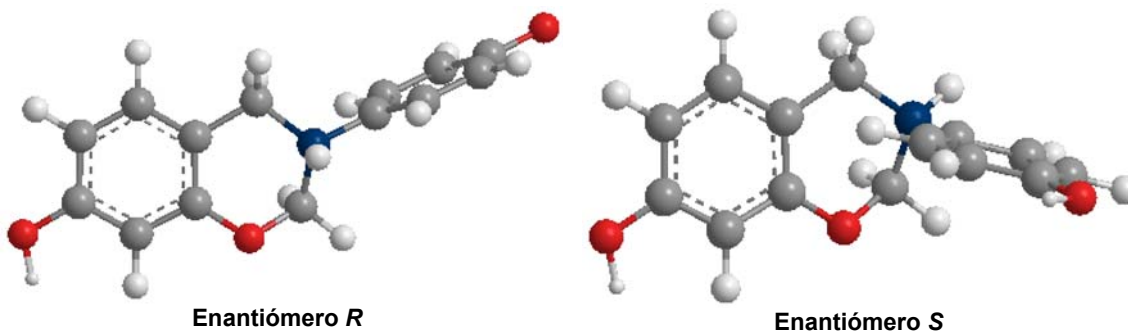
Se calculó  $(\alpha)_D$  para cada uno de los isómeros ópticos:

$$(\alpha)_D = +20,39 \text{ para E(1)}$$

$$(\alpha)_D = -20,39 \text{ para E(2)}$$

Estos valores se aproximan al poder óptico rotatorio descrito en la literatura para el isómero natural del equol, isómero (S), disuelto en etanol<sup>96</sup>  $(\alpha)_D = -21,5$ .

El enantiómero que se eluye en segundo lugar, E2, corresponde por lo tanto al isómero natural del equol, de configuración absoluta (S).

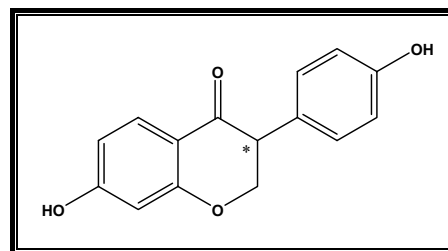


A partir de estas disoluciones se realizaron las medidas de dicroísmo circular mediante dilución de las muestras hasta una concentración de  $10^{-4}$ M.

<sup>96</sup> Buckingham J. *Chapman and Hall*. 1994, 1st ed.



**7,4'-dihidroxiisofavanona**  
(DHD)



Se disolvieron 8,9 mg de cada uno de los enantiómeros en 1 ml de etanol absoluto en sendos matraces aforados.

Se midió el poder óptico rotatorio de cada muestra a 25°C en un polarímetro.

Se realizaron 20 medidas de cada muestra y se halló el valor medio,  $\alpha_D$ .

Se calculó  $(\alpha)_D$  para cada uno de los isómeros ópticos:

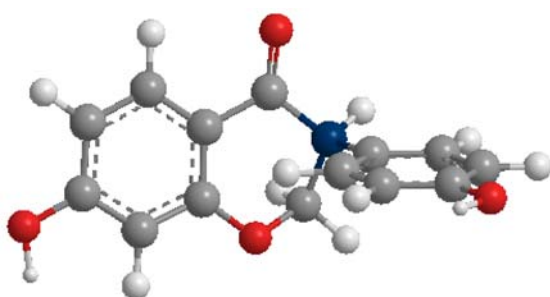
$$(\alpha)_D = -46,0 \text{ para DHD(1)}$$

$$(\alpha)_D = +41,9 \text{ para DHD(2)}$$

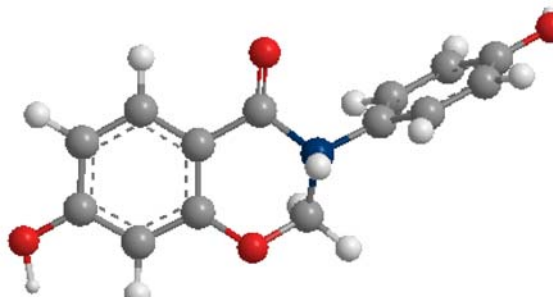
La asignación de la configuración absoluta de los enantiómeros de la DHD se realizó mediante la derivatización a equol, por reacción de hidrogenación sobre Pd/C. Se decidió hidrogenar el enantiómero que presentaba un valor de  $(\alpha)_D < 0$  en las siguientes condiciones:

- DHD: 10 mg.
- EtOH: 14 ml
- Pd/C: 50 mg.

La muestra de equol obtenido proporcionó un  $(\alpha)_D < 0$ , asignándose inequívocamente la configuración S a este compuesto.



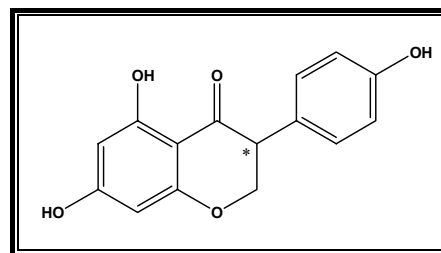
**Enantiómero S**



**Enantiómero R**

A partir de estas disoluciones se realizaron las medidas de dicroísmo circular mediante dilución de las muestras hasta una concentración de  $10^{-4}$ M.

**5,7,4'-dihidroxiisofavanona**  
(DHG)



Se disolvieron 8,3 mg de cada uno de los enantiómeros en 1 ml de etanol absoluto en sendos matraces aforados.

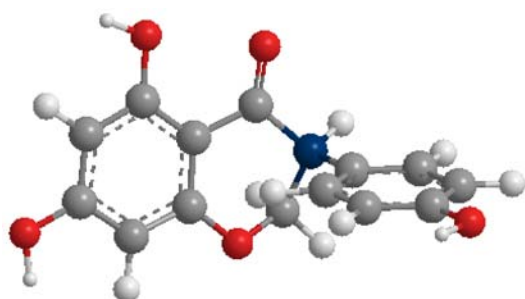
Se midió el poder óptico rotatorio de cada muestra a 25°C en un polarímetro.

Se realizaron 20 medidas de cada muestra y se halló el valor medio,  $\alpha_D$ .

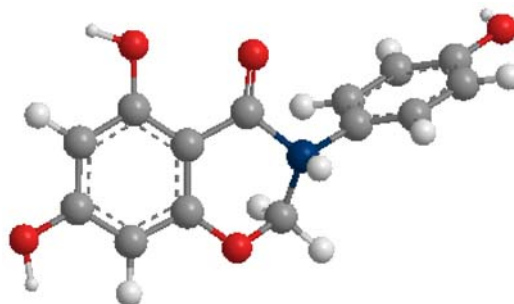
Se calculó  $(\alpha)_D$  para cada uno de los isómeros ópticos:

$$(\alpha)_D = -28,90 \text{ para DHG(1)}$$

$$(\alpha)_D = +25,3 \text{ para DHG(2)}$$



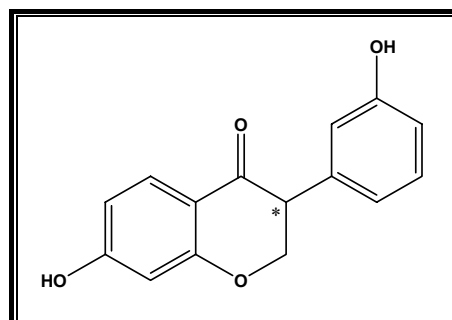
Enantiómero S



Enantiómero R

A partir de estas disoluciones se realizaron las medidas de dicroísmo circular mediante dilución de las muestras hasta una concentración de  $10^{-4}$ M.

**7,3'-dihidroxiisoflavona**  
(DHD-OH-3')



Se disolvieron 8,2 mg de cada uno de los enantiómeros en 1 ml de etanol absoluto en sendos matraces aforados.

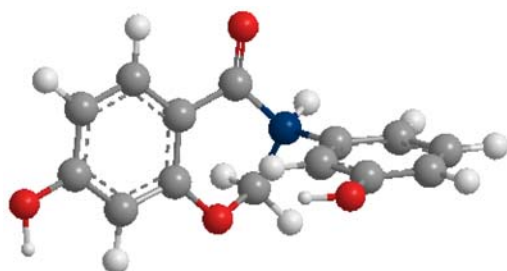
Se midió el poder óptico rotatorio de cada muestra a 25°C en un polarímetro.

Se realizaron 20 medidas de cada muestra y se halló el valor medio,  $\alpha_D$ .

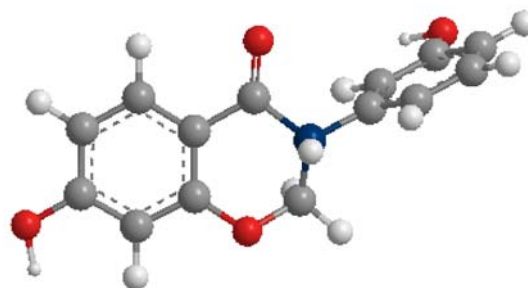
Se calculó  $(\alpha)_D$  para cada uno de los isómeros ópticos:

$$(\alpha)_D = -44,67 \text{ para DHD-OH-3'(1)}$$

$$(\alpha)_D = +41,23 \text{ para DHD-OH-3'(2)}$$



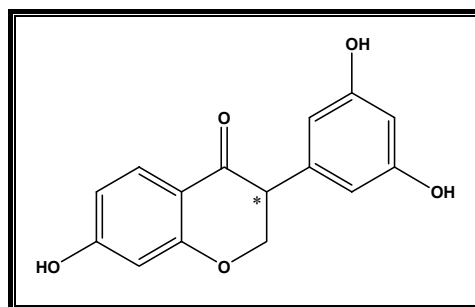
Enantiómero S



Enantiómero R

A partir de estas disoluciones se realizaron las medidas de dicroísmo circular mediante dilución de las muestras hasta una concentración de  $10^{-4}$ M.

**7,3',5'-trihidroxiiisoflavavona**  
(DHD-OH-3',5')



Se disolvieron 8,1 mg de cada uno de los enantiómeros en 1 ml de etanol absoluto en sendos matraces aforados.

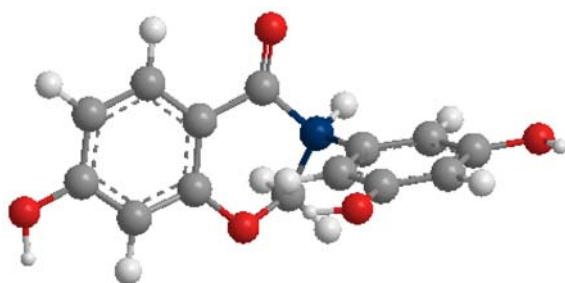
Se midió el poder óptico rotatorio de cada muestra a 25°C en un polarímetro.

Se realizaron 20 medidas de cada muestra y se halló el valor medio,  $\alpha_D$ .

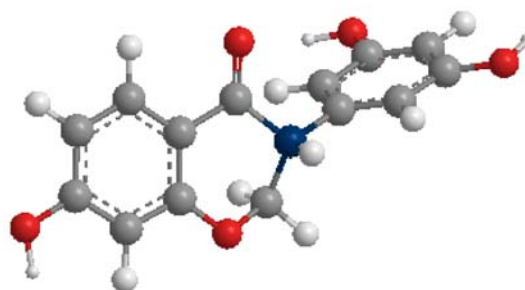
Se calculó  $(\alpha)_D$  para cada uno de los isómeros ópticos:

$$(\alpha)_D = -37,42 \text{ para DHD-OH-3',5'(1)}$$

$$(\alpha)_D = +32,46 \text{ para DHD-OH-3',5'(2)}$$



Enantiómero S



Enantiómero R

A partir de estas disoluciones se realizaron las medidas de dicroísmo circular mediante dilución de las muestras hasta una concentración de  $10^{-4}$ M.



## **5. MÚSCULO LISO VASCULAR**



## 5.1. INTRODUCCIÓN

Las paredes de los distintos órganos huecos están constituidas por músculo liso cuya función principal es asegurar su motilidad. El músculo liso forma parte de las siguientes estructuras: sistema vascular, sistema respiratorio, sistema reproductivo, sistema urinario, globo ocular y sistema gastrointestinal. La regulación de la actividad del músculo liso se realiza por medio de terminaciones nerviosas del sistema nervioso autónomo (simpáticas y parasimpáticas) y de hormonas circulantes.

Las células del músculo liso son uninucleadas, pequeñas y uniformes. Tienen un diámetro de 1 a 5  $\mu\text{m}$ , una longitud entre 20 y 500  $\mu\text{m}$  y un volumen de unos 3.500  $\mu\text{m}^3$ .

El músculo liso se puede dividir en dos tipos principales: músculo liso **unitario** o visceral y **multiunitario** (Fig. 5.1)<sup>97</sup>.

El músculo liso **unitario** está formado por una masa de cientos a miles de fibras musculares lisas que se contraen juntas como una única unidad. Las fibras habitualmente están dispuestas en láminas o fascículos y sus membranas celulares están adheridas entre sí en múltiples puntos, de modo que la fuerza que se genera en una fibra muscular se puede transmitir a la siguiente. Además, las fibras celulares están unidas por muchas uniones en hendidura a través de las cuales los iones pueden fluir libremente desde una célula muscular a otra, de modo que los potenciales de acción o flujo iónico simple sin potenciales de acción puede viajar desde una fibra a otra y hacer que las fibras musculares se contraigan simultáneamente. Este tipo de músculo liso también se conoce como músculo liso visceral porque se encuentra en la pared de la mayor parte de las vísceras del cuerpo, por ejemplo el tubo digestivo, las vías biliares, los uréteres, y muchos vasos sanguíneos.

El músculo liso **multiunitario** está formado por células musculares lisas separadas y discretas. Cada una de las fibras actúa independientemente de las demás y con frecuencia está inervada por una única terminación nerviosa. La superficie externa de estas fibras está cubierta por una capa delgada de sustancia similar a una membrana basal, una mezcla de colágeno fino y glucoproteínas que aísla las fibras separadas entre sí. La característica más importante de las fibras musculares lisas multiunitarias es que cada una de ellas se puede contraer independientemente de las demás y su control se ejerce principalmente por señales nerviosas. Algunos ejemplos

---

<sup>97</sup> Guyton&Hall. *Elsevier Saunders*. 2006.

de músculo liso multiunitario son el músculo ciliar del ojo, el músculo del iris y los piloerectores que producen la erección del pelo cuando los estimula el sistema nervioso simpático.

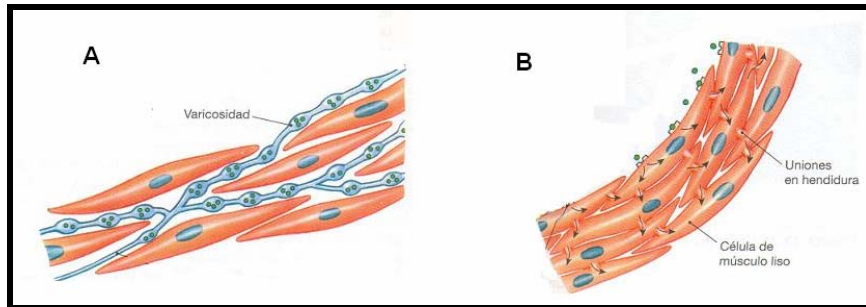


FIG. 5.1. Músculo multiunitario (A) y unitario (B)

El músculo liso también se suele dividir frecuentemente en **fásico** y **tónico**.

El músculo liso **fásico** es aquel que mantiene pobremente el tono (estado de contracción sostenida) y se contrae a una velocidad relativamente alta. Un ejemplo de este tipo de músculo liso son los de la vena porta o el antro del estómago.

El músculo liso **tónico** mantiene el tono de manera más efectiva, aunque tiene una velocidad de contracción más baja. Son músculos lisos tónicos los de las vías aéreas y la musculatura vascular.

## 5.2. TONO VASCULAR

El tono vascular está controlado por un balance entre señales celulares que median la generación de fuerza, contracción y la liberación de ésta o relajación<sup>98</sup>.

### 5.2.1. Actividad eléctrica de las células musculares

La actividad muscular depende de la actividad intrínseca o miogénica de las células, así como de factores extrínsecos. Las células musculares están conectadas unas con otras a través de las uniones intercelulares comunicantes (*gap junctions*), pero su densidad y distribución depende del tramo del vaso y de la especie animal. El estímulo eléctrico se propaga a través de las uniones intercelulares entre las células musculares.

<sup>98</sup> Woodrum DA, Brophy CM. *Mol Cell Endocrinol*. May 25 2001;177(1-2):135-143.



Las células musculares vasculares presentan variaciones periódicas del potencial de membrana. La variación de éste se debe a la activación e inactivación de canales iónicos o a la acción de bombas. Estos eventos eléctricos rítmicos son responsables de las contracciones musculares cíclicas y rítmicas e influyen en la probabilidad de aparición de potenciales de acción<sup>99</sup>.

### 5.2.2. Proteínas contráctiles

En el músculo se encuentran una serie de proteínas con distintas funciones a nivel de la contracción: proteínas contráctiles, actina y miosina, y proteínas reguladoras de la contracción: tropomiosina, caldesmón y calponina.

El aparato contráctil del músculo liso está formado por tres tipos de filamentos, gruesos, delgados e intermedios, y por los denominados cuerpos densos y áreas densas (Fig. 5.2).

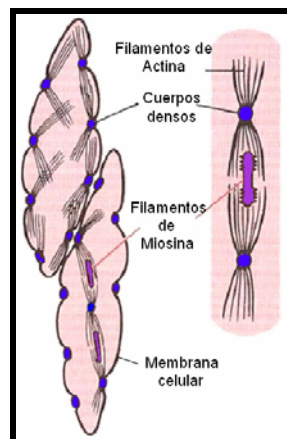


FIG. 5.2. Aparato contráctil del músculo liso

Los **filamentos gruesos** están constituidos por miosina. La molécula de miosina del músculo liso es un hexámero compuesto por dos cadenas asimétricas pesadas (200-204 KDa), cada una de las cuales con sendas cadenas ligeras de miosina (MLC) de 20 KDa y 17 KDa.

El filamento de miosina posee una cabeza con actividad ATPasa, donde se encuentran dos pares de cadenas ligeras (CLM): CLM17 (cadenas ligeras esenciales) y CLM20 (cadenas ligeras reguladoras) (Fig. 5.3). La fosforilación de CLM20 modula la cinética de los puentes cruzados y cumple un papel fundamental en la contracción del

<sup>99</sup> Bolton TB, Prestwich SA, Zholos AV, et al. *Annu Rev Physiol.* **1999**;61:85-115.

músculo liso. Los filamentos de miosina son largos, dando lugar a un gran número de puentes cruzados dispuestos en paralelo, y la inserción de múltiples filamentos a lo largo de la membrana celular lleva a una mayor contracción en paralelo<sup>100</sup>.

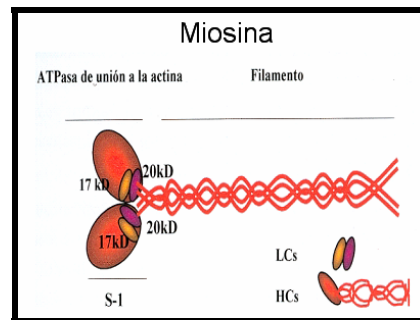


FIG. 5.3. Molécula de miosina del músculo liso. LCs: cadenas ligeras. HCs: cadenas pesadas<sup>101</sup>

Los **filamentos finos** se caracterizan por estar constituidos por F-actina y tropomiosina, carecen de troponina y tienen dos proteínas reguladoras: caldesmón y calponina (Fig. 5.4).

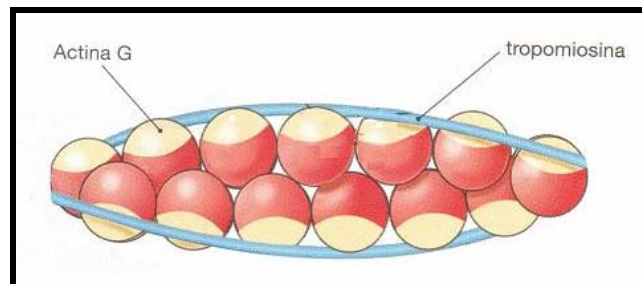


FIG. 5.4. Molécula de actina

El caldesmón del músculo liso es una proteína alargada que consiste en una única cadena polipeptídica de 75-80 nm. Los sitios de unión a otras proteínas como a la actina, y la actividad inhibitoria de la ATPasa de la actomiosina ha sido localizada en el dominio COOH terminal y en el dominio NH<sub>2</sub> terminal. A bajas concentraciones del complejo Ca<sup>2+</sup>-CaM, el caldesmón se une a la actina en una conformación que inhibe la ATPasa actinmiosina. La fosforilación del caldesmón conduce a su liberación de la actina y por lo tanto activa la ATPasa actinmiosina del músculo liso, interviniendo en la regulación de la contracción del músculo liso<sup>102</sup>.

<sup>100</sup> Horowitz A, Menice CB, Laporte R, et al. *Physiol Rev.* Oct **1996**;76(4):967-1003.

<sup>101</sup> Alcón S. Tesis Doctoral. Cáceres, Universidad de Extremadura. **2000**.

<sup>102</sup> Horiuchi KY, Samuel M, Chacko S. *Biochemistry.* **1991**;30:712-717.

La calponina es una proteína cuya expresión está casi exclusivamente restringida al músculo liso. Se trata de una molécula alargada que puede alcanzar los 18 nm cuando se encuentra extendida. Las actividades más importantes de la calponina son la unión a la F-actina e inhibición de la ATPasa de la actomiosina fosforilada. Ambas fueron localizadas en el dominio central de la molécula. La calponina está presente en el músculo liso en la misma concentración molar que la tropomiosina (1:1:7): 1 calponina, 1 tropomiosina y 7 actinas<sup>103</sup>.

Los **filamentos intermedios** desempeñan un escaso papel contráctil, pero forman parte del citoesqueleto. Son comunes en todos los tipos musculares, pero más abundantes en el músculo liso. Miden unos 10 nm de diámetro y son intermedios en cuanto a tamaño entre los filamentos de actina y los de miosina.

Los filamentos finos se insertan en las áreas densas y en los cuerpos densos, que son estructuras amorfas asociadas a la membrana celular o inmersas en el citoplasma, respectivamente. Existen cinco filamentos gruesos por cada cuerpo denso y, a la vez, cada filamento grueso está rodeado por 10 ó 15 filamentos finos que se insertan en los cuerpos densos.

### 5.2.3. El calcio

El calcio tiene un papel primordial en la regulación de la contracción del músculo liso. El aumento de la concentración de calcio intracelular, su unión a la proteína calmodulina y la activación de la kinasa de la cadena ligera de miosina, es el estímulo primario de la contracción muscular lisa. El aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se puede realizar de 2 formas: por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular a través del sarcolema (membrana celular del músculo liso) o bien por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares (Fig. 5.5). El retículo sarcoplásmico (RS) es el principal reservorio intracelular fisiológico de calcio de las células musculares lisas, aunque las mitocondrias y otros orgánulos también pueden almacenarlo<sup>104</sup>.

---

<sup>103</sup> Stafford WF, Mabuchi K, Takahashi K, et al. *J Biol Chem.* **1995**;270:10576-10579.

<sup>104</sup> Perpiñá M, Lloris A. *Arch Bronconeumol.* **2004**;40(1):16-22.

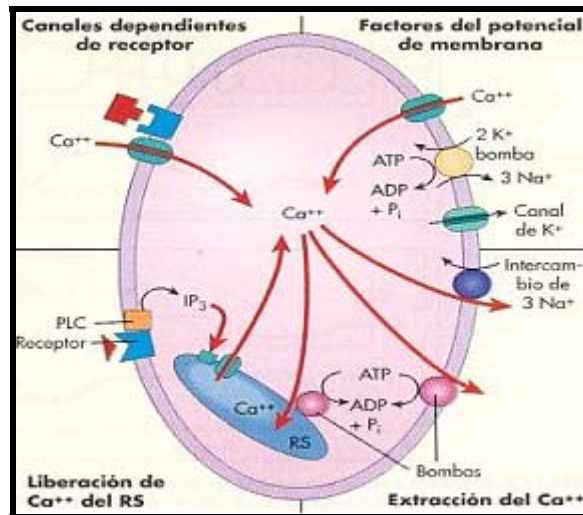


FIG. 5.5. Movimientos del  $\text{Ca}^{2+}$  en el músculo liso.

#### 5.2.3.1. Entrada de $\text{Ca}^{2+}$ del medio extracelular

El  $\text{Ca}^{2+}$  entra al citosol desde el medio extracelular durante los periodos de despolarización de la membrana, distorsiones mecánicas o estimulación por agonistas. Las vías de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular se realizan a través de canales  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes y canales catiónicos no selectivos activados por receptor<sup>105</sup> (Fig. 5.5).

##### Canales de $\text{Ca}^{2+}$ voltaje-dependientes

Cuando el miocito se ve expuesto a estímulos eléctricos o a concentraciones elevadas de  $\text{K}^+$ , la despolarización de la membrana celular determina la apertura en ella de un tipo concreto de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  conocidos como canales dependientes de voltaje (CDV). Existen al menos 6 tipos de CDV (L, N, P, Q, R y T), pero el que tiene relevancia en el músculo liso es el de tipo L (CDV activado por alto voltaje o sensible a las dihidropiridinas).

##### Canales catiónicos no selectivos activados por receptor (CRO)

Este tipo de canales poseen distinta permeabilidad a los iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Estos canales, permeables al calcio, pueden ser el principal método de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la célula que produce la contracción del músculo liso. Se sabe que

<sup>105</sup> Thorneloe KS, Nelson MT. *Can J Physiol Pharmacol*. Mar 2005;83(3):215-242.

contribuyen a la despolarización, lo que produce la activación de los CDV, a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y a la contracción.

#### 4.2.3.2 Liberación del $\text{Ca}^{2+}$ desde los depósitos intracelulares

La liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares se realiza a través de dos canales liberadores de calcio que son el receptor de rianodina y el receptor de inositol trifosfato<sup>104</sup>.

##### *Receptor de la rianodina*

Se ha identificado un tipo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana del retículo sarcoplásmico, sensibles a la rionodina (alcaloide vegetal) y cuya activación depende de la propia concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Estos canales son activados por la cafeína y bloqueados por el rojo de rutenio.

##### *Receptor de inositol trifosfato*

La unión de agonistas a receptores acoplados a proteínas G en el músculo liso provocan la activación de la fosfolipasa C que transforma el fosfatidil inositol difosfato ( $\text{PIP}_2$ ) en inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). El  $\text{IP}_3$  actúa liberando  $\text{Ca}^{2+}$  en las células de músculo liso.

#### 4.2.3.3 Disminución de $\text{Ca}^{2+}$ citosólico

La disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular va acompañada de relajación muscular. El  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular libre sale de la célula por medio de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática (PMCA) o por el intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . También disminuye el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por entrada al retículo sarcoplásmico (RS) desde el citosol (Fig. 5.5).

##### *Salida al medio extracelular*

La salida del calcio al medio extracelular se produce por el contrtransportador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y por la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática o ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  (PMCA).

El mecanismo de *intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$*  supone un gasto de energía a la célula procedente del gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$ , e introduce tres moléculas de  $\text{Na}^+$  por una molécula de  $\text{Ca}^{2+}$  que saca de la célula.

La *ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$*  está activada por la unión de la calmodulina al COOH terminal y regulada por la proteína kinasa. Requiere la hidrólisis de ATP para sacar el calcio en contra de gradiente electroquímico al espacio extracelular<sup>106</sup>.

#### Entrada al retículo sarcoplásmico

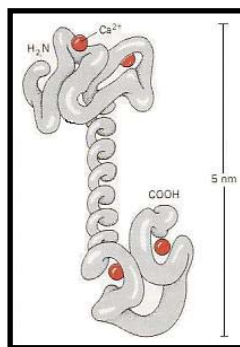
La membrana del retículo sarcoplásmico contiene la proteína  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa o bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico, que bombea activamente  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol al retículo sarcoplásmico.

La entrada y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula está modulada por la recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  por el retículo sarcoplásmico, la captación por parte de las mitocondrias, o por la salida del  $\text{Ca}^{2+}$  al medio extracelular.

### 5.3 CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO

#### 5.3.1. Mecanismo de la contracción. Puentes cruzados

Cuando se produce un estímulo, aumenta la concentración de calcio presente en el citosol. Sólo cuando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracitosólico supera en 4-10 veces los valores basales, tiene lugar la unión del ion  $\text{Ca}^{2+}$  con una proteína aceptadora de calcio, la calmodulina (CaM) (Fig. 5.6).

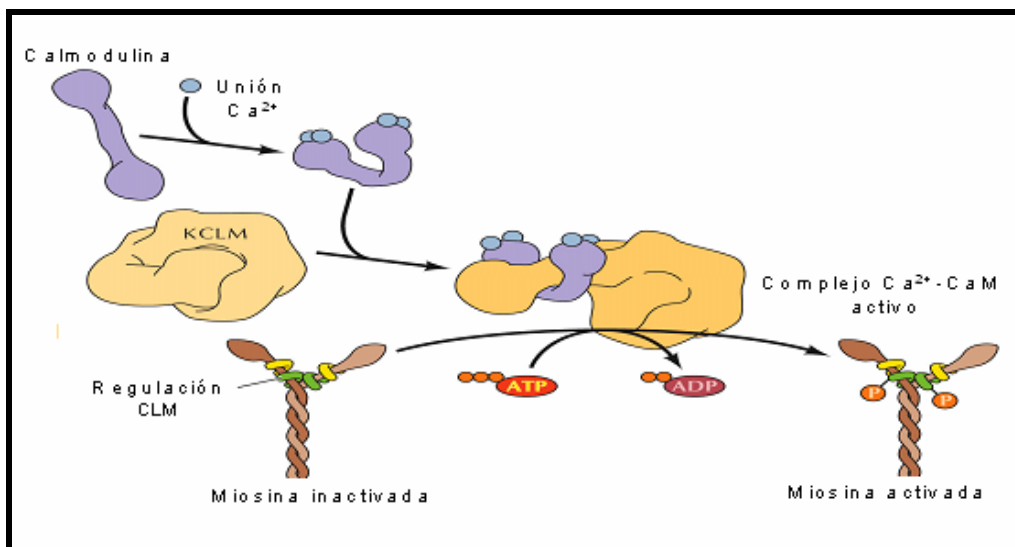


**FIG. 5.6.** Unión del  $\text{Ca}^{2+}$  en la calmodulina

Cuatro moles de  $\text{Ca}^{2+}$  se unen a cada mol de calmodulina y el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM formado activa una enzima, la kinasa de la cadena ligera de la miosina (KCLM), formando un complejo holoenzimático  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-KCLM el cual transfiere un grupo

<sup>106</sup> Wuytack F, Raeymaekers L. *J Bioenerg Biomembr.* Jun 1992;24(3):285-300.

fosfato desde el ATP a la cadena ligera de miosina concretamente a la serina 19 de la CLM20 (Fig. 5.7). Esta reacción de fosforilación promueve la interacción entre la actina y la miosina. La mayor parte de los filamentos de miosina tienen lo que se denominan **puentes cruzados** dispuestos de tal manera que los puentes de un lado basculan en una dirección y los del otro lado basculan en la dirección opuesta. Esto permite que la miosina tire de un filamento de actina en una dirección en un lado a la vez que tira de otro filamento de actina en la dirección opuesta en el otro lado. Este deslizamiento de los filamentos de actina sobre los de miosina son los causantes de la contracción. La utilidad de esta organización permite que las células musculares lisas se contraigan hasta un 80% de su longitud en reposo<sup>97</sup> (Fig. 5.7).



**FIG. 5.7.** Papel del  $Ca^{2+}$  y la calmodulina en la regulación de la contracción del músculo liso

### 5.3.2 Acoplamiento excitación-contracción en el músculo liso

El acoplamiento excitación-contracción o excitocontráctil, es el resultado de una serie de mecanismos que terminan con el aumento de  $Ca^{2+}$  citoplasmático de  $10^{-7}$  mol/l a aproximadamente  $10^{-6}$  mol/l y, en consecuencia, con la contracción muscular.

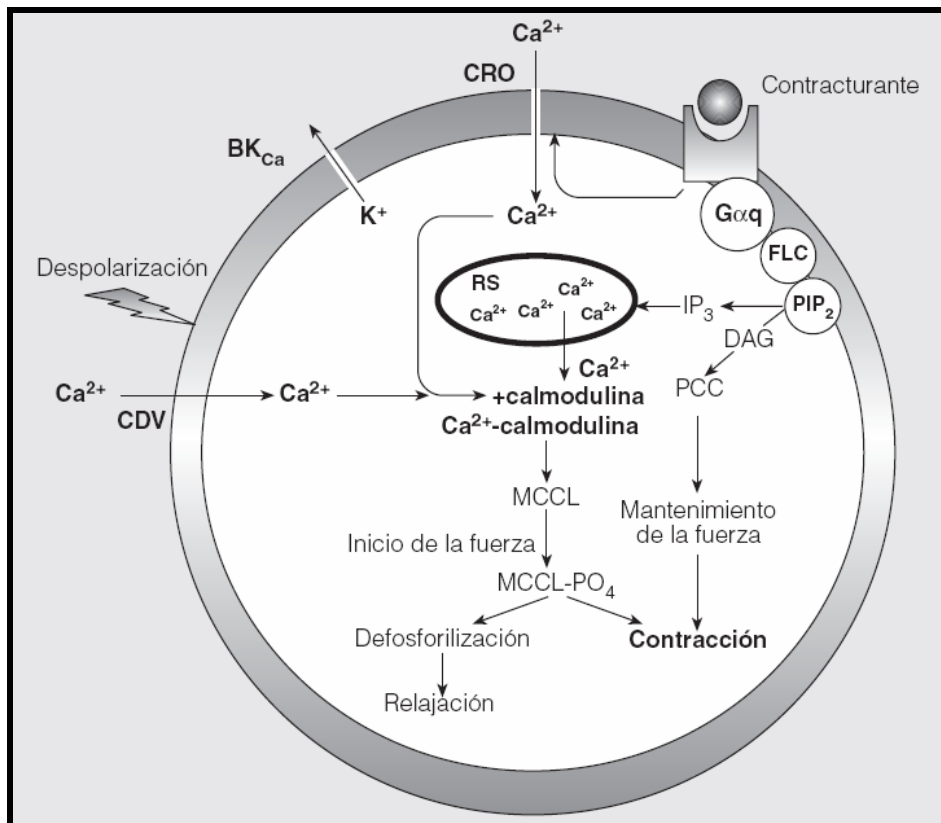
Existen dos tipos de acoplamientos en el músculo liso: acoplamiento electro-mecánico y acoplamiento fármaco-mecánico.

#### a) Acoplamiento electro-mecánico

La **despolarización** de la membrana celular induce la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  voltaje dependientes sensibles a las dihidropiridinas, que permiten las entradas de calcio. Se produce así un aumento del  $Ca^{2+}$  citosólico que provoca una liberación

adicional de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS al citosol. El aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular genera una respuesta contráctil. Algunos agonistas como la noradrenalina, activan canales de calcio, facilitando su entrada<sup>104</sup>.

Por el contrario, se produce inhibición de la contracción cuando se cierran los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  para impedir la entrada de estos cationes. También se produce inhibición si los canales de  $\text{K}^+$  que normalmente están cerrados, se abren, lo que permite que iones potasio difundan hacia el exterior de la célula. Esta apertura se debe a la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) o la activación de la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG) por el NO. Estas dos acciones aumentan el grado de negatividad en el interior de la célula muscular, un estado que se denomina **hiperpolarización** y que inhibe intensamente la contracción muscular<sup>97</sup> (Fig. 5.8).



**FIG. 5.8.** Movimientos del  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula muscular lisa durante la contracción

### b) Acoplamiento fármaco-mecánico

La consecuencia a que da lugar la estimulación del músculo liso por los contracturantes, resulta bastante más compleja. En estos casos, en los que los receptores de los agonistas están acoplados a la proteína G, la unión ligando-receptor



determina la activación de la subunidad  $\alpha$  de dicha proteína G (G $\alpha$ q), que unida a guanosín trifosfato (GTP) activa en la membrana citoplasmática una fosfolipasa C (FLC) capaz de catalizar la hidrólisis del fosfatidín inositol 4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>) y generara la síntesis de 2 señales intracelulares adicionales: el 1,2 diacilglicerol (DAG), que a su vez estimula una proteinquinasa C (PCC) y el inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>). El IP<sub>3</sub> difunde al citosol para actuar sobre receptores específicos localizados en la membrana del retículo sarcoplásmico (RS), que es, con las mitocondrias el depósito más importante de Ca<sup>2+</sup>. La activación del receptor IP<sub>3</sub> determina la apertura de canales específicos para el Ca<sup>2+</sup> presentes en el RS y la salida del catión al sarcoplasma a favor de gradiente modificará la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Fig.5.8)<sup>104</sup>.

### 5.3.3. Papel de la proteína quinasa Rho

Rho A y Rho quinasa juegan un papel importante en la regulación de la actividad de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (CLM). Rho A puede ser activada por algún agonista incluyendo la angiotensina II<sup>107</sup>. Su actividad es regulada por la unión de GTP. RhoA-GTP activa a Rho-quinasa, la cual fosforila la subunidad de la fosfatasa de la CLM de unión a la miosina (MYPT1) e inhibe su actividad así, promueve el estado de fosforilación de la MLC (Fig. 5.9). Con la activación de los agonistas se ha visto que se produce una translocación desde el citosol a la membrana plasmática de Rho quinasa y de Rho A.

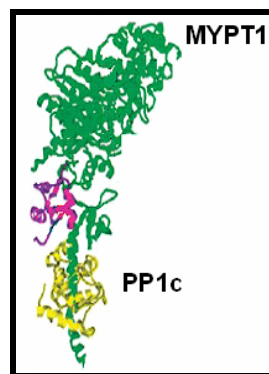


FIG. 5.9. Estructura de la miosin fosfatasa (MP)

La CPI-17, una pequeña proteína expresada en el músculo liso vascular de mamíferos, es fosforilada por la Rho-quinasa. Cuando está fosforilada (CPI-17-P) se une a la subunidad catalítica PP1c de la fosfatasa de la miosina, se inhibe la actividad enzimática y se prolonga la contracción del músculo liso (Fig. 5.9).

<sup>107</sup> Jackson EK, Andresen BT, Seasholtz TM, et al. *J Cardiovasc Pharmacol.* Apr **2005**;45(4):283-285.

Tanto la inhibición de la miosín fosfatasa por parte de la RhoA-kinasa como por la CPI-17-P favorecen el mecanismo de la contracción muscular<sup>108</sup> (Fig. 5.10).

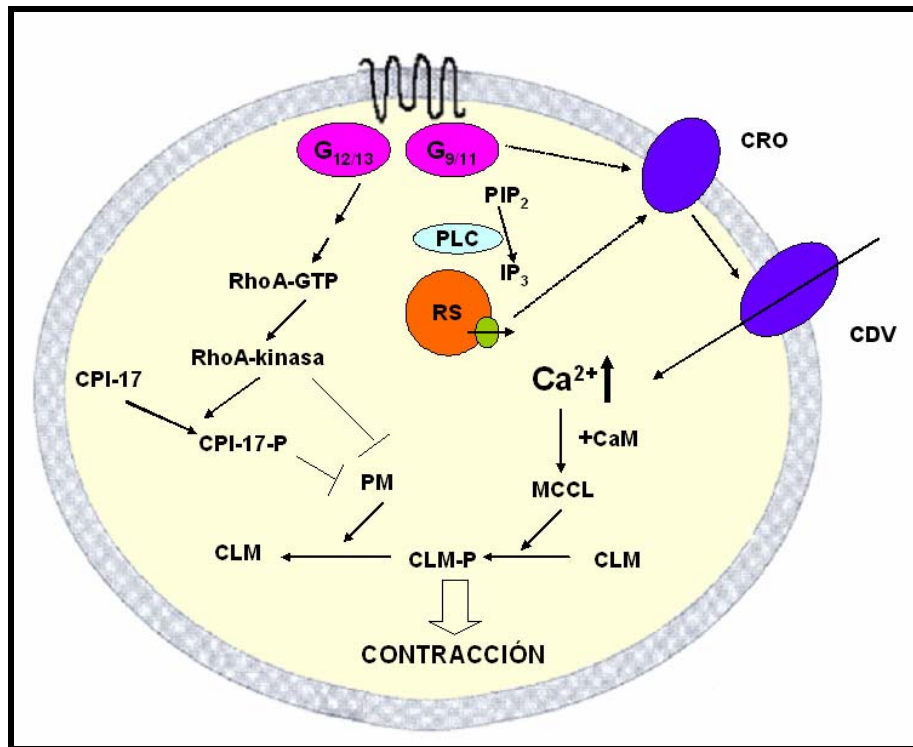


Fig. 5.10. Papel de la proteína quinasa Rho en la contracción

### 5.3.4. Tipos de contracción muscular

En los músculos lisos aislados se han descrito dos tipos de contracciones: isotónicas o isométricas.

Cuando un músculo se acorta al levantar una carga constante, y por lo tanto realiza una fuerza constante durante el acortamiento, la contracción es **isotónica**.

En la contracción **isométrica**, el músculo realiza fuerza a una longitud constante, sin acortamiento. En el método de músculo aislado, uno de los extremos se une a un soporte rígido y el otro a un transductor de fuerza. Antes de iniciar el experimento, se estira el músculo y se fija la longitud. Este estiramiento origina una tensión pasiva denominada tensión de reposo, de forma que el músculo se comporta como un cuerpo elástico. Para un estiramiento dado, la magnitud de la tensión de reposo es diferente y depende del tipo de músculo.

<sup>108</sup> Schlossmann J, Feil R, Hofmann F. *Annals of Medicine*. 2003;35:21-27.

## 5.4. RELAJACIÓN DEL MÚSCULO LISO

### 5.4.1. Mecanismo de la relajación

La relajación del músculo liso ocurre como consecuencia de una relajación pasiva, debida a la liberación del estímulo contráctil o a una relajación activa, inducida por señales que inhiben estímulos de mecanismo contráctil.

El proceso de relajación requiere una disminución intracelular de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y/o un incremento en la actividad de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (CLM). Cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  vuelve a su concentración de reposo ( $10^{-7}$  mol/l), la KCLM se inactiva con lo que la MCL20 no se fosforila. La inactivación de la fosforilación se debe a una fosfatasa que se une a la miosina (MP). En este momento tiene lugar la relajación del músculo liso (Fig.5.11)<sup>109</sup>.

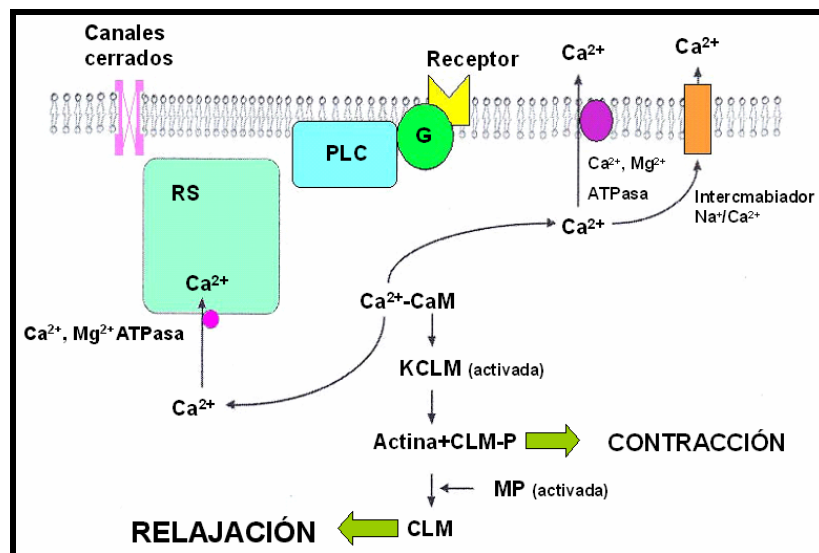


FIG. 5.11. Mecanismo de relajación del músculo liso

La liberación del calcio citosólico involucra al retículo sarcoplásmico y a la membrana plasmática. La captación de calcio del retículo sarcoplásmico es dependiente de la hidrólisis de ATP. La ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS cuando se fosforila une dos iones calcio, los cuales son translocados a la luz del retículo sarcoplásmico y liberados. El  $\text{Mg}^{2+}$  es necesario para la actividad del enzima (Fig. 5.11).

<sup>109</sup> Webb RC. *Adv Physiol Educ.* Dec 2003;27(1-4):201-206.

Hace unos años se identificaron dos proteínas de unión de calcio en el RS que contribuyen a retirar calcio del citosol, la calreticulina y la calsecuestrina. La membrana plasmática también contiene la ATPasa de calcio, además posee un intercambiador  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$  que contribuye a disminuir el calcio intracelular. Canales de calcio operados por ligandos o canales de calcio activados por voltaje localizados en la membrana plasmática son importantes en el influjo de calcio y en la contracción del músculo liso. La inhibición de estos canales conlleva a que no entre calcio en la célula y por lo tanto se relaje<sup>110</sup> (Fig. 5.11).

#### 5.4.2. Vía de relajación NO/GMPc/GKlc<sup>108</sup>

Otra vía importante en la relajación del músculo liso la juega el óxido nítrico (NO). El NO, inicialmente denominado factor relajante derivado del endotelio (EDRF) por Furchgott y Zawadzki en 1980, es un gas con características de radical libre, actúa como molécula mensajera de gran inestabilidad y vida corta, difundiendo por cualquier punto de la membrana de la célula productora, para actuar intercelularmente sin requerir ningún tipo de transportador de membrana. Es producido por una gran variedad de células y participa en una amplia variedad de importantes funciones biológicas incluyendo la de neurotransmisor, en el tono vascular y en la defensa celular.

El NO produce la relajación en el músculo liso al reducir la liberación de calcio intracelular estimulado por hormonas y por disminuir la afinidad del calcio por el aparato contráctil.

El NO actúa estimulando la guanilato ciclasa soluble (sGC), que produce la síntesis de cGMP y activa a una proteína quinasa tipo I dependiente de cGMP (GKlc) (Fig. 5.12).

El aumento de calcio generado por agonistas puede ser inhibido por el NO afectando a la síntesis de  $\text{IP}_3$  y a la recaptación de los almacenes intracelulares. La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los almacenes intracelulares puede ser modulada por la cGKI al actuar sobre los canales  $\text{IP}_3\text{R}$ . En microsomas de músculo liso se identificó una proteína fosforilada y asociada a la GKlc $\beta$  llamada IRAG. Se une a GKlc $\beta$  y al  $\text{IP}_3\text{R}$  en un complejo ternario. La fosforilación de IRAG por la GKlc $\beta$  inhibe la liberación del calcio inducido por el  $\text{IP}_3$ . La GKlc puede directamente inhibir la síntesis de  $\text{IP}_3$  por la fosfolipasa C.

---

<sup>110</sup> Sanders KM. *J Appl Physiol*. Sep 2001;91(3):1438-1449.

El NO estimula los canales de potasio  $BK_{Ca}$  (Maxi  $K^+$ ), produciendo la hiperpolarización de la membrana y el cierre de los canales de calcio tipo L, eliminando el influjo de calcio y produciendo por lo tanto la relajación del músculo liso. Los canales Maxi  $K^+$  pueden ser directamente fosforilados por la GKlc incrementando la actividad del canal (Fig. 5.12).

La GKlc regula la afinidad del calcio por el aparato contráctil. La GKlc fosforila a RhoA, induciendo la translocación de ésta desde la membrana citoplasmática al citosol, quedando inactiva la RhoA. Esta reacción podría disminuir la activación de Rho quinasa e incrementar la actividad de la fosfatasa de la miosina (MP), de ese modo conduce a la disminución de la afinidad por el calcio y a la relajación del músculo liso. Además la GKlc se une directamente a la MYPT1 fosforilándola, lo que conlleva a la activación de la fosfatasa de la miosina y a la disminución de la fosforilación de la MCL.

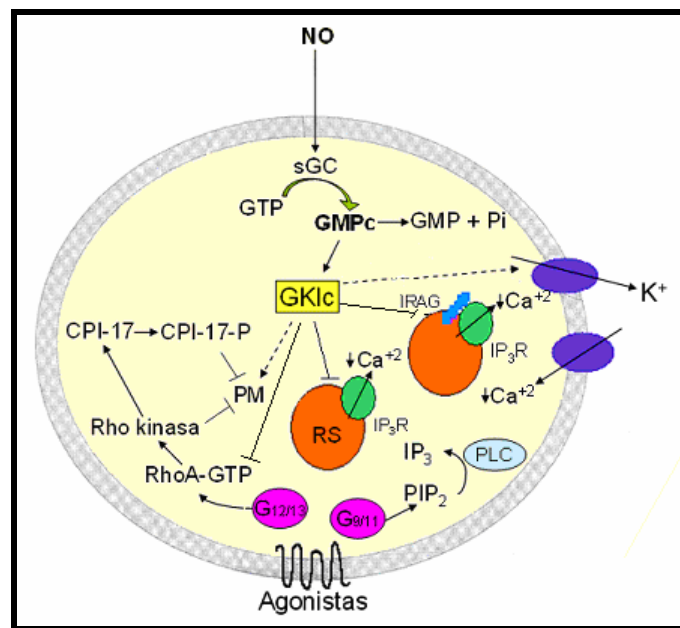


FIG. 5.12. Mecanismo de relajación mediado por la vía NO/GMPc/GKlc

## 5.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD VASORRELAJANTE

Las determinaciones de actividad vasorrelajante se realizaron según las técnicas de baño de órganos descritas por M. Valero y col.<sup>111</sup>. Brevemente: los animales utilizados fueron ratas macho Wistar, con un peso entre 250 y 300 g, alimentados con pienso estándar y mantenidos a una temperatura aproximada de 22°C (Fig. 5.13).



**FIG. 5.13.** Tipo de rata utilizado en los experimentos.

Los animales han sido manejados de acuerdo a la legislación vigente en materia de protección de animales para experimentación (Real Decreto 223/1998 de 14 de Marzo) y otros fines científicos (B.O.E. nº 67 de 18 de Marzo de 1988, pp. 8509-12), y según la Directiva Comunitaria emitida en Estrasburgo sobre la protección de los animales utilizados con fines experimentales y otros fines científicos (86/609/C EE: B.O.E nº 256 de 25 de Octubre de 1990, pp.31348-62).

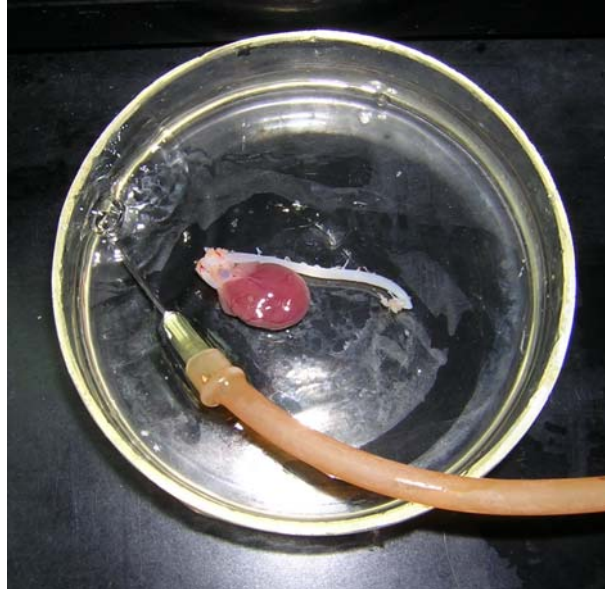
Para su sacrificio, primero se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/Kg) inyectado intraperitonealmente. Al cabo de unos minutos cuando el animal estaba completamente dormido se practicaba una dislocación cervical empleando una guillotina.

Tras el sacrificio se realizaba una laparotomía, abriendo la cavidad abdominal y extrayendo la arteria aorta torácica junto con el corazón (Fig. 5.14).

---

<sup>111</sup> Valero M. *Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. 2008.*

El corazón y la arteria se lavaron con solución salina fisiológica (SSF) y se introdujeron en una placa de Petri que contenía dicha solución gaseada con carbógeno (95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>). A continuación se extrajo el corazón, se limpió cuidadosamente la arteria y se eliminó el endotelio frotando con delicadeza la superficie de la íntima de la aorta con una pequeña varilla de cristal.



**FIG. 5.14.** Corazón y aorta en placa de petri con SSF y gaseada con carbógeno

La arteria se cortó en anillos de un tamaño de 3 mm de longitud aproximadamente, que fueron colocados individualmente entre ganchos de platino y sumergidos en copas de baño de órganos con 5 ml de solución Krebs, a temperatura constante de 37 °C y continuamente gaseados con carbógeno.

Uno de los dos extremos del anillo se ató a un soporte que se introdujo en la copa de baño de órganos y el otro se unió al transductor isométrico (Pioden UF1, Graham Bell House, Canterbury, UK).

A continuación se calibró el transductor para corregir las variaciones debidas a cambios en la temperatura, humedad relativa, etc. Se comenzó a registrar el valor inicial que capta el transductor en ese momento y se le considera cero. Posteriormente, se colocó una pesa de 1 g en el transductor y se volvió a registrar durante unos segundos, la nueva señal captada se tomó como el valor de 1 g. A cada anillo aórtico se le sometió a una tensión de 1 g.

La actividad mecánica se amplió con un amplificador (The MacLab Bridge Amp, Analog Digital Instruments, Castle Hill, Australia) y se filtró. Finalmente, la señal

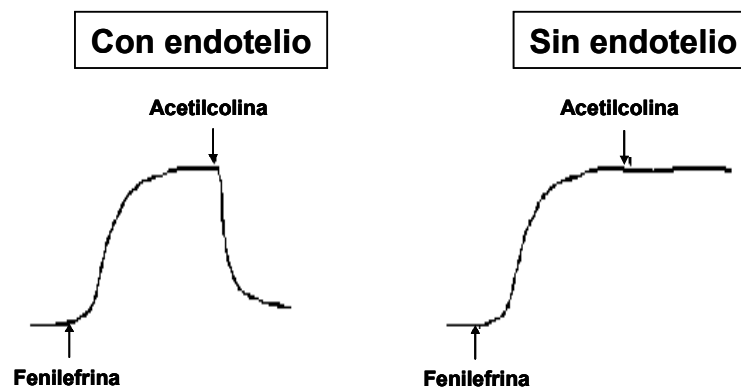
mecánica se almacenó en un ordenador mediante un programa de adquisición y tratamiento de datos (The MacLab System versión 4.2) para su posterior digitalización y análisis (Fig. 5.15). Los registros posteriormente se visualizaron en la pantalla del ordenador.



**FIG. 5.15.** Sistema de baño de órganos. Laboratorio de Transporte Iónico de Fisiología Humana.

A continuación los anillos se dejaron reposar aproximadamente una hora para la estabilización del tono muscular de la arteria, cambiando el líquido nutritivo cada 20 minutos.

Antes de comenzar cada experimento, se comprobó que el endotelio había sido eliminado de la aorta, para ello se precontrayeron los anillos con fenilefrina ( $1 \mu\text{M}$ ) y tras 15 minutos de incubación se añadió acetilcolina ( $1 \mu\text{M}$ ). Si el endotelio había sido retirado correctamente la acetilcolina no tenía efecto vasorrelajante, mientras que si el endotelio permanecía, la acetilcolina poseía efecto vasorrelajante (Fig. 5.16).



**FIG. 5.16.** Registro de la respuesta a la acetilcolina en anillos aórticos con y sin endotelio.



Para cuantificar las respuestas de las diferentes sustancias primero se contrajo el músculo liso vascular con fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) o KCl (80 mM). Tras 15 minutos de actuación se añadieron las diferentes sustancias a ensayar. Para medir la respuesta contráctil de la fenilefrina o KCl, se utilizó la siguiente fórmula expresando el resultado en porcentaje:  $(A_1 \cdot 100) / A_0$ , donde  $A_1$  es la respuesta motora que se produce al añadir la fenilefrina o KCl al baño, durante los 3 minutos de respuesta;  $A_0$  es el tono espontáneo, durante los 3 minutos de registro anteriores a la adición de la fenilefrina o KCl. La respuesta de las demás sustancias ensayadas se calculó con la siguiente fórmula, expresada también en porcentaje:  $(A_1 - A_2) \cdot 100 / (A_1 - A_0)$ , siendo  $A_2$  la respuesta motora que se produce al añadir las diferentes sustancias al baño (Fig. 5.17).

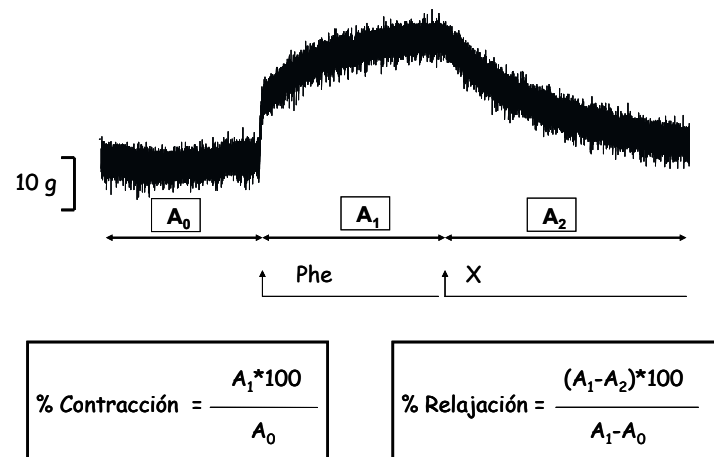


FIG. 5.17. Análisis de la señal

Todos los resultados han sido expresados como medida  $\pm$  error estándar. Las medidas calculadas han sido comparadas mediante el análisis de varianza (ANOVA). Se analizaron las diferencias con el test de Student's para muestras no pareadas, considerándose significativas las diferencias cuando el nivel de significación ( $p$ ) era menor de 0,05.

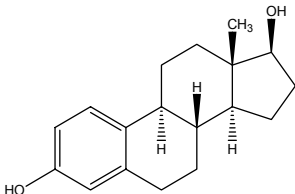
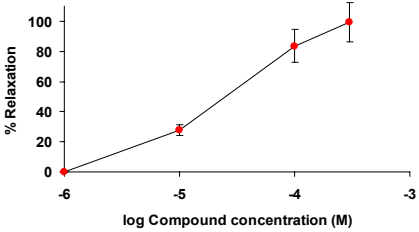
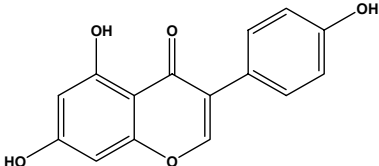
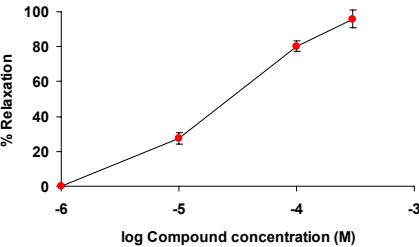
## 5.6. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD VASORRELAJANTE

La determinación de la actividad vasorrelajante descrita en el apartado anterior dio como resultado medidas en porcentaje de relajación inducido por diversas concentraciones (10, 33, 100, 200 y 300  $\mu\text{M}$ ) de los derivados sintetizados.

A partir de los valores encontrados, se determinó el  $\text{IC}_{50}$  es decir la concentración de producto que relaja un 50% expresado en  $\mu\text{M}$ . Los resultados corresponden a la media y desviación promedio (SEM) de 6 medidas.

Como moléculas prueba se probaron el  $17\beta$ -estradiol y la genisteína y se compararon sus valores con los ya descritos<sup>112</sup>. Se observa que los datos son muy similares ya que el valor descrito para el  $17\beta$ -estradiol es  $\text{IC}_{50} = 19,2 \mu\text{M}$  y el obtenido en nuestro ensayo es  $\text{IC}_{50} = 17,11 \mu\text{M}$ . Para la genisteína se obtuvieron en ambos casos valores alrededor de  $19 \mu\text{M}$  (Tabla I).

Tabla I. Actividad vasorrelajante de las moléculas prueba

MOLÉCULA	$\text{IC}_{50}$	SEM	GRÁFICA
<p><b><math>17\beta</math>-Estradiol</b></p> 	<b>17,11</b>	1,92	
<p><b>Genisteína</b></p> 	<b>19,49</b>	3,55	

En un intento de racionalizar los resultados de actividad vasorrelajante se agruparon los datos teniendo en cuenta: número y posición de grupos OH y  $\text{OCH}_3$  en el anillo C, efecto de la desprotección de los grupos, presencia de doble enlace en el anillo B, influencia del grupo carbonilo, presencia de isomería óptica.

<sup>112</sup> Valero M, Garay R, Gros P, et al. *European Journal of Pharmacology* **2006**;544:126-131.

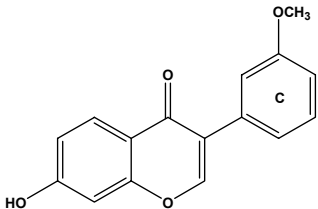
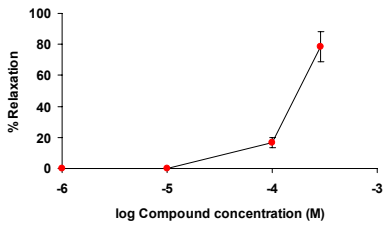
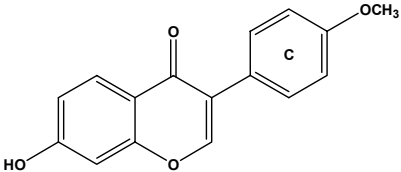
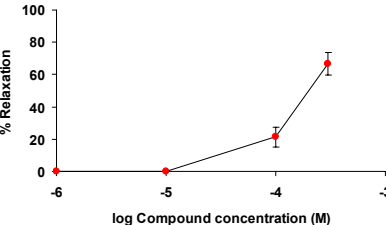
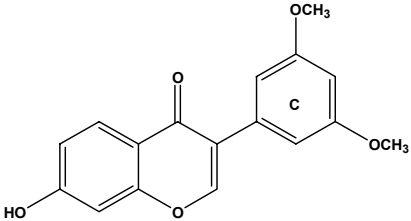
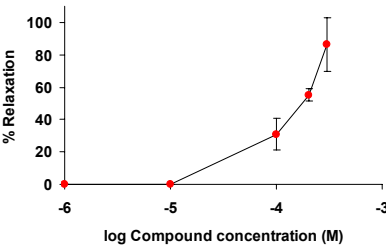
### 5.6.1. Derivados de daidzeína

#### ✓ Efecto de 1 ó 2 grupos OCH<sub>3</sub> en el anillo C

Como se puede observar en la tabla II al comparar los valores obtenidos, las moléculas que poseen un único grupo hidroxilo libre muestran una capacidad vasorrelajante comparable, a pesar del cambio de posición del grupo hidroxilo protegido. Se aprecia que la molécula que mejor actividad vasorrelajante presenta es la que posee dos grupos hidroxilo protegidos en las posiciones 3',5' con un IC<sub>50</sub> de 176 µM, pero la diferencia es muy poco significativa.

De esta observación se podría deducir que el cambio de posición del grupo hidroxilo protegido no afecta a los valores de IC<sub>50</sub>, mientras que la presencia de dos grupos coordinantes mejora sensiblemente la actividad.

Tabla II. Actividad vasorrelajante de moléculas con 1 grupo OH

MOLÉCULA	IC <sub>50</sub>	SEM	GRÁFICA
<p><b>D-OH-3' (II)</b></p> 	191,89	25,47	
<p><b>D-OH-4' (II)</b></p> 	196,04	25,60	
<p><b>D-OH-3',5' (II)</b></p> 	176,53	4,08	

✓ Efecto de la desprotección y posición de los grupos OH

Tal y como se observa en las tabla III, IV y V se podría decir que la desprotección del grupo metoxi solamente ha mejorado la actividad en el caso del OH en posición 3' ya que se pasa de un valor  $IC_{50} = 191 \mu M$  en la forma protegida a un valor  $IC_{50}$  de  $120 \mu M$  en la forma libre.

Tabla III. Efecto de la desprotección del OH en 3'

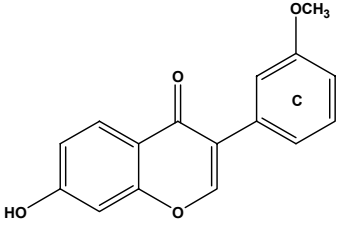
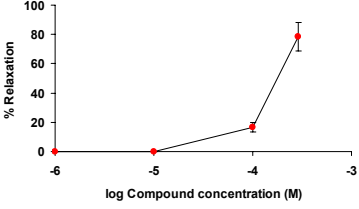
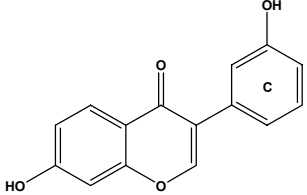
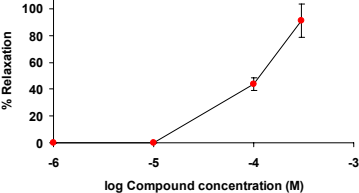
MOLÉCULA	$IC_{50}$	SEM	GRÁFICA
<p><b>D-OH-3' (II)</b></p> 	191,89	25,47	
<p><b>D-OH-3'</b></p> 	120,53	14,31	

Tabla IV. Efecto de la desprotección del OH en 4'

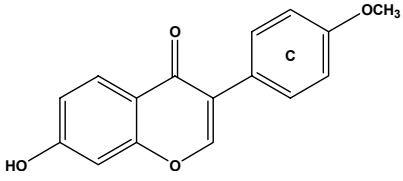
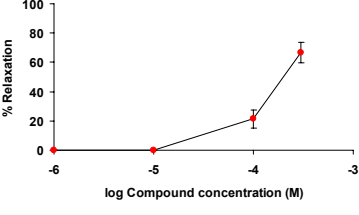
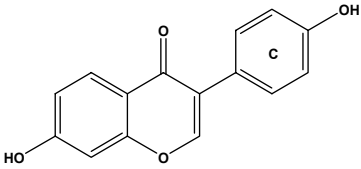
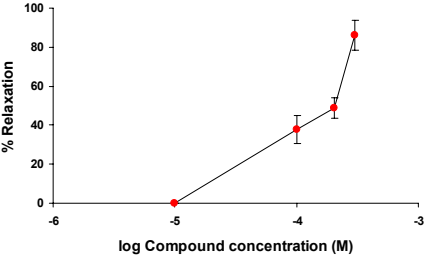
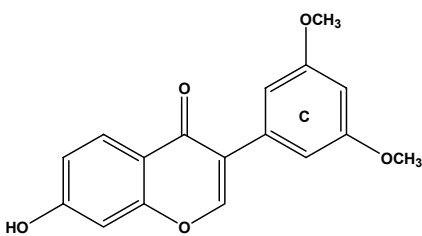
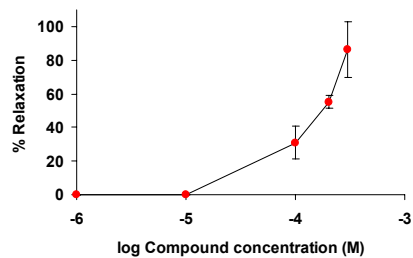
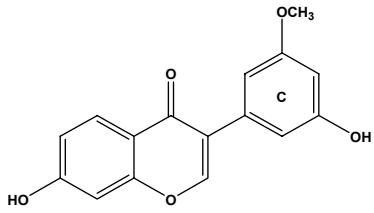
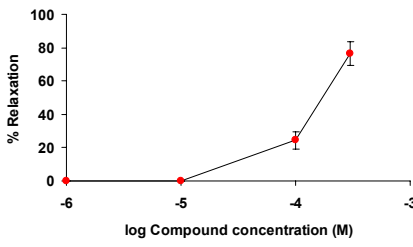
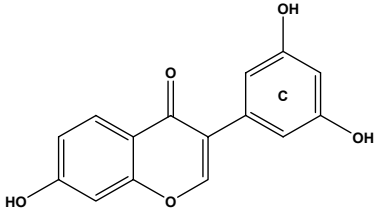
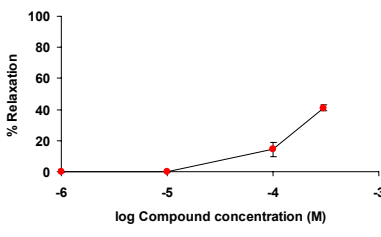
MOLÉCULA	$IC_{50}$	SEM	GRÁFICA
<p><b>D-OH-4' (II)</b></p> 	196,04	25,60	
<p><b>Daidzeína</b></p> 	199,88	59,01	

Tabla V. Efecto de la desprotección del OH en 3',5'

MOLÉCULA	IC <sub>50</sub>	SEM	GRÁFICA
<p><b>D-OH-3',5' (II)</b></p> 	176,53	4,08	
<p><b>D-OH-3',5' (subproducto)</b></p> 	178,79	23,78	
<p><b>D-OH-3',5'</b></p> 	>300	--	

Resulta sorprendente el descenso en el IC<sub>50</sub> del compuesto sustituido en 3',5' desprotegido. La presencia de un grupo adicional capaz de formar puentes de hidrógeno no mejora el comportamiento de la molécula en la vasorrelajación. Mientras que cuando se desprotege un sólo grupo la actividad a penas varía con respecto a la molécula con los dos grupos en forma de OCH<sub>3</sub>.

Si se comparan las moléculas con los grupos OH desprotegidos se observa como la posición de los mismos influye notablemente en la actividad. Así, el mejor resultado de IC<sub>50</sub> se obtiene con la molécula que posee el grupo OH en posición 3'. Mientras que la presencia de dos grupos en posición 3' y 5' merma considerablemente la actividad.

✓ Efecto de la rigidez de la molécula

Como se puede observar en las tablas VI y VII al hidrogenar el doble enlace del ciclo, lo que implica una pérdida de rigidez en la molécula, se pierde la actividad vasorrelajante.

Tabla VI. Efecto de la hidrogenación del doble enlace

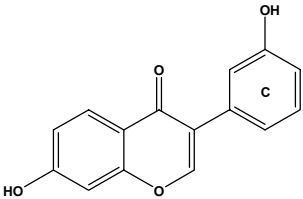
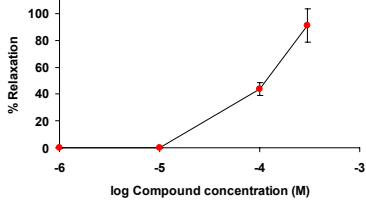
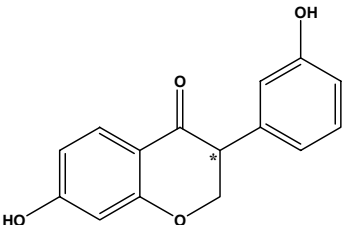
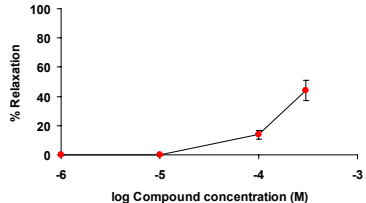
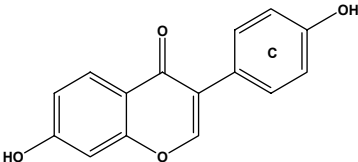
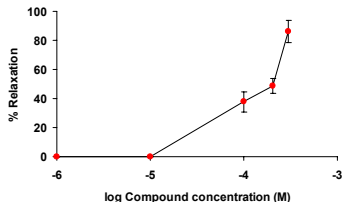
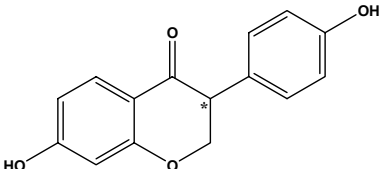
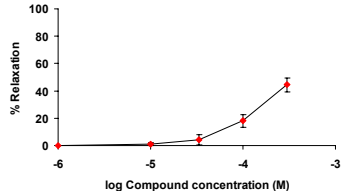
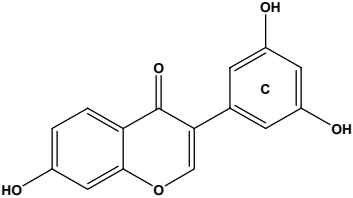
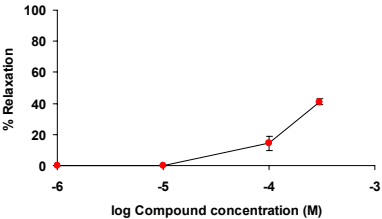
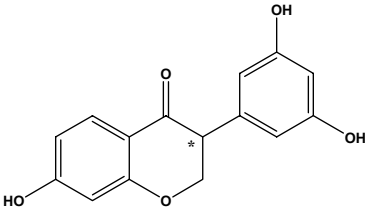
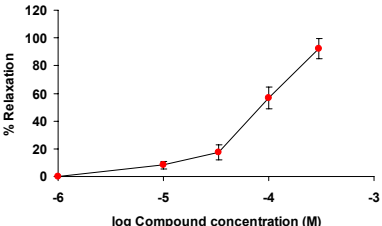
MOLÉCULA	IC <sub>50</sub>	SEM	GRÁFICA
<p><b>D-OH-3'</b></p> 	120,53	14,31	
<p><b>DHD-OH-3' Racémica</b></p> 	>300	--	

Tabla VII. Efecto de la hidrogenación del doble enlace

MOLÉCULA	IC <sub>50</sub>	SEM	GRÁFICA
<p><b>Daidzeína</b></p> 	199,88	59,01	
<p><b>DHD Racémica</b></p> 	>300	--	

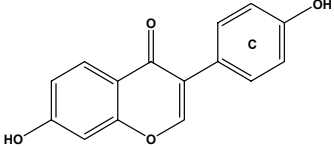
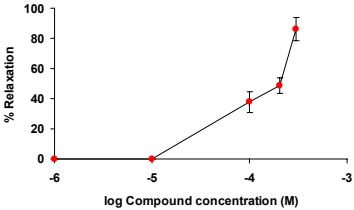
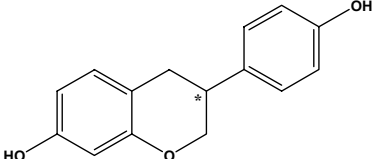
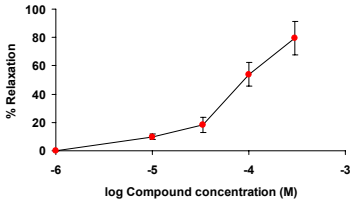
Sin embargo, en el caso de la molécula con los OH en las posiciones 3',5' se vuelve a observar un comportamiento diferente al de sus análogos monosustituídos. Para este compuesto la pérdida de la rigidez mejora sustancialmente la actividad vasorrelajante pasando de unos valores de  $IC_{50} > 300$  a valores de  $IC_{50} = 87 \mu M$ , siendo este valor el mejor observado hasta el momento.

**Tabla VIII.** Efecto de la hidrogenación del doble enlace

MOLÉCULA	$IC_{50}$	SEM	GRÁFICA
<p><b>D-OH-3',5'</b></p> 	>300	--	
<p><b>DHD-OH-3'5' Racémica</b></p> 	87,65	16,33	

En el caso de llevar a cabo la reducción completa del ciclo, es decir, la eliminación tanto del doble enlace como del grupo carbonilo (tabla IX), se observa que se mejora considerablemente la actividad de la molécula.

**Tabla IX.** Influencia del grupo carbonilo

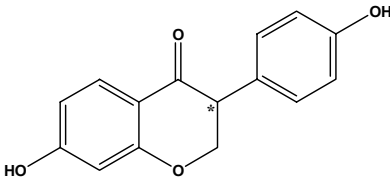
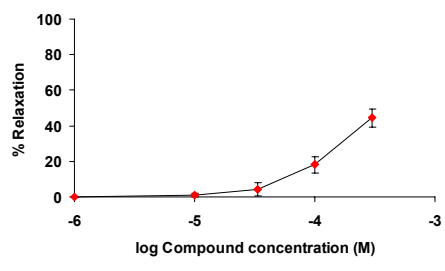
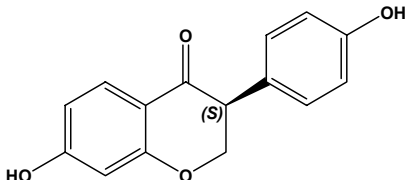
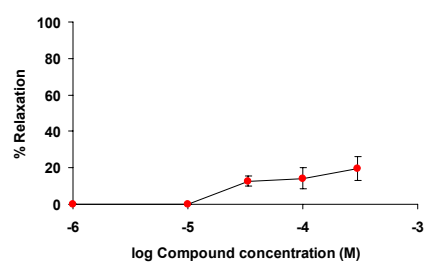
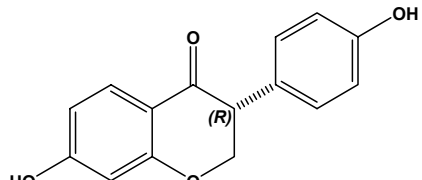
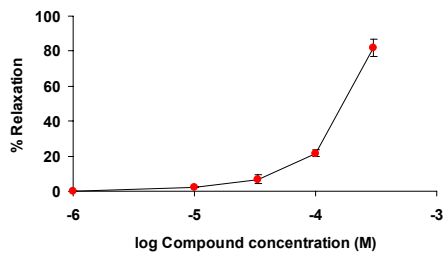
MOLÉCULA	$IC_{50}$	SEM	GRÁFICA
<p><b>Daidzeína</b></p> 	199,88	59,01	
<p><b>EQUOL Racémico</b></p> 	83,45	16,26	

### ✓ Efecto de los enantiómeros

Estudios sobre el comportamiento de los dos enantiómeros de equol en otras actividades muestra como se pueden alcanzar distintos valores según el enantiómero ensayado<sup>75</sup>. Por lo que resulta de vital importancia resolver las mezclas racémicas en sus correspondientes enantiómeros, y estudiar su actividad.

Para la dihidroaidzeína (DHD) si se comparan los resultados de la mezcla racémica con los obtenidos para los dos enantiómeros se aprecia un mayor efecto vasorrelajante en uno de las enantiómeros frente al otro (DHD-(S)  $IC_{50} > 300 \mu M$ , DHD-(R)  $IC_{50} = 178 \mu M$ ) y frente a la DHD racémica ( $IC_{50} > 300 \mu M$ ) (Tabla X).

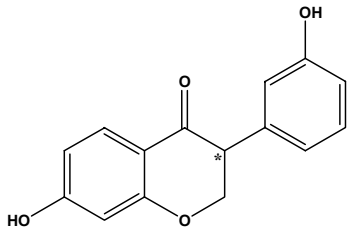
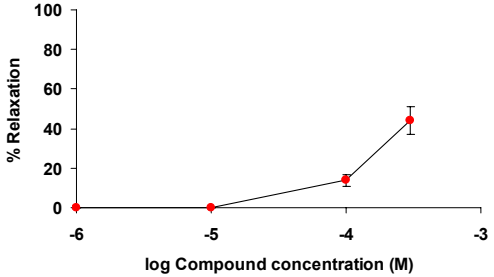
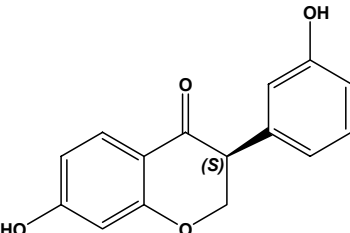
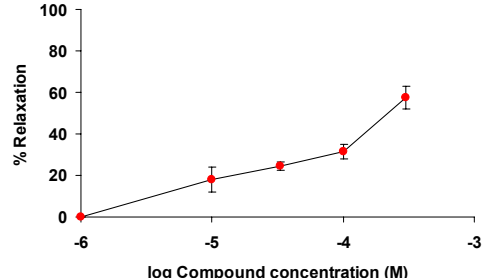
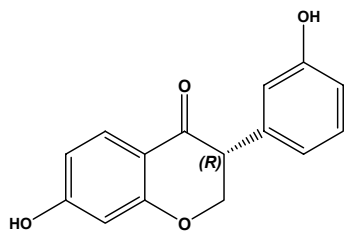
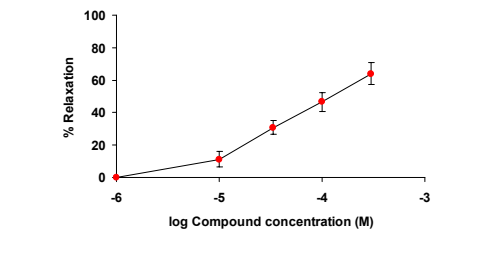
Tabla X. Actividad vasorrelajante de los enantiómeros de DHD

MOLÉCULA	$IC_{50}$	SEM	GRÁFICA
<p><b>DHD Racémica</b></p> 	>300	--	
<p><b>DHD (S)</b></p> 	>300	--	
<p><b>DHD (R)</b></p> 	178,02	23,97	



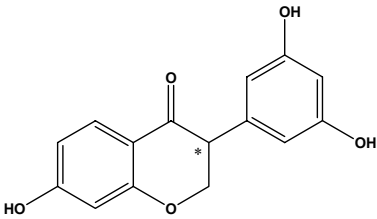
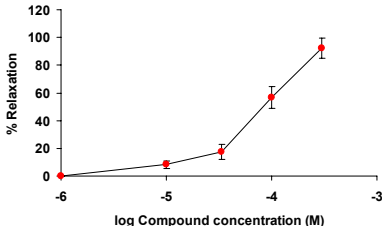
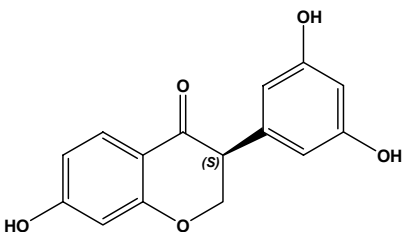
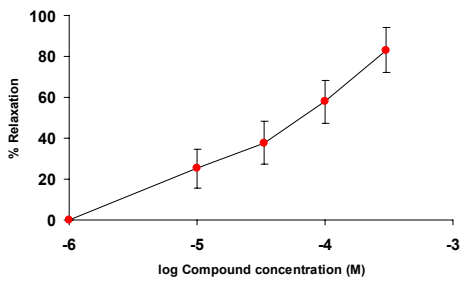
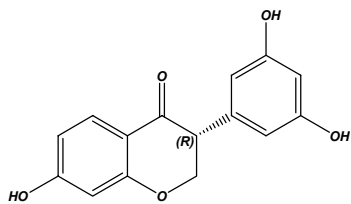
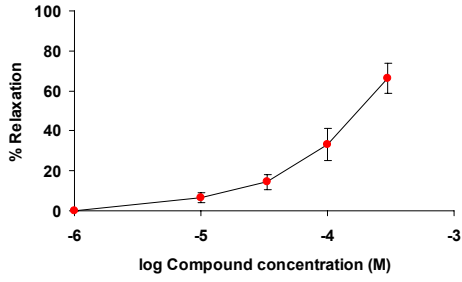
En el caso del compuesto con el grupo OH en posición 3', se observa lo mismo cuando se comparan los valores de la mezcla con la de los enantiómeros. La mezcla racémica presenta un  $IC_{50} > 300$  mientras que uno de los enantiómeros, el enantiómero *R*, ha disminuido significativamente este valor de  $IC_{50}$  a 118  $\mu$ M (Tabla XI).

Tabla XI. Actividad vasorrelajante de los enantiómeros de DHD-OH-3'

MOLÉCULA	$IC_{50}$	SEM	GRÁFICA
<p><b>DHD-OH-3' Racémica</b></p> 	>300	--	
<p><b>DHD-OH-3' (S)</b></p> 	236,13	36,15	
<p><b>DHD-OH-3' (R)</b></p> 	118,46	28,26	

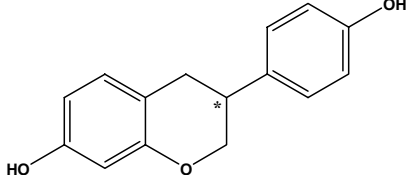
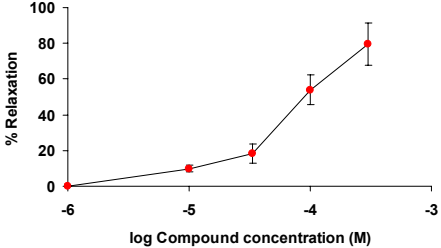
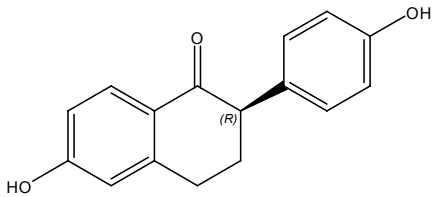
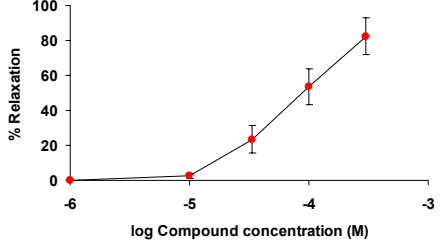
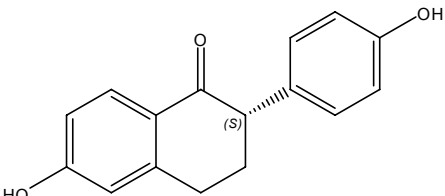
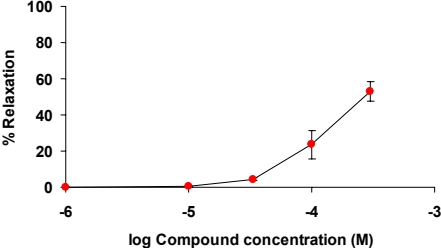
De nuevo el compuesto DHD-OH-3',5' presenta un comportamiento diferente al de sus análogos, siendo en este caso el enantiómero de configuración S el que presenta mejor actividad vasorrelajante (Tabla XII).

**Tabla XII.** Actividad vasorrelajante de los enantiómeros de DHD-OH-3',5'

MOLÉCULA	IC <sub>50</sub>	SEM	GRÁFICA
<p><b>DHD-OH-3',5' Racémica</b></p> 	87,65	16,33	
<p><b>DHD-OH-3',5' (S)</b></p> 	61,28	16,14	
<p><b>DHD-OH-3',5' (R)</b></p> 	159,70	21,70	

Para los enantiómeros del equol se observa que no se mejora el valor de  $IC_{50}$  al realizar la separación de la mezcla racémica, pero si se ve que los valores de ambos enantiómeros son muy diferentes (Tabla XIII).

**Tabla XIII.** Actividad vasorrelajante de los enantiómeros del equol

MOLÉCULA	$IC_{50}$	SEM	GRÁFICA
<p><b>EQUOL Racémico</b></p> 	83,45	16,26	
<p><b>EQUOL (R)</b></p> 	87,43	25,93	
<p><b>EQUOL (S)</b></p> 	258,64	42,13	

Como conclusión a este apartado podríamos decir que en todos los compuestos con estructura isoflavanona, la actividad vasorrelajante mejora en alguno de los enantiómeros respecto de la mezcla racémica. Esto demuestra la importancia de la resolución y estudio por separado de compuestos óptimamente activos.

En el caso de isoflavanos como el equol, los enantiómeros por separado no mejoran la actividad de la mezcla racémica.

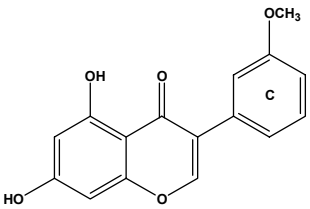
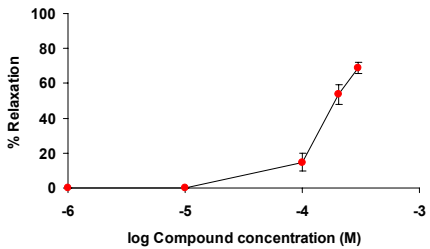
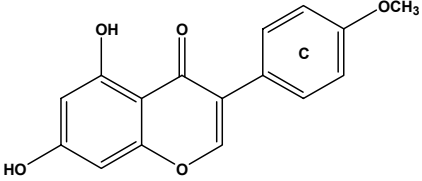
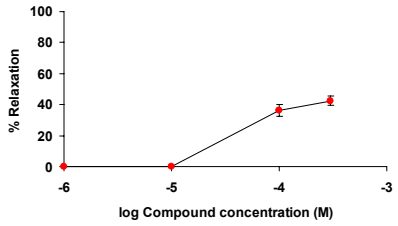
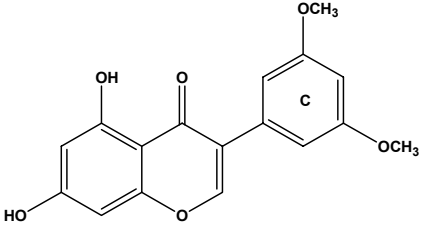
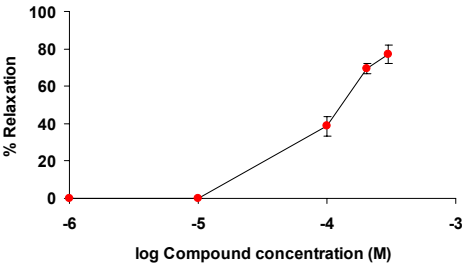
### 5.6.2 Derivados de genisteína

El mismo estudio comparativo realizado con los derivados de daidzeína se plantea para los derivados de genisteína.

#### ✓ Efecto de 1 ó 2 grupos OCH<sub>3</sub> en el anillo C

Se observa en la tabla XIV como el cambio de posición del grupo OCH<sub>3</sub> en el anillo C afecta en el valor de IC<sub>50</sub>. Así cuando el grupo metoxi está en posición 3' y 4' tenemos unos valores IC<sub>50</sub>=200 μM y >300 μM respectivamente, mientras que cuando los sustituyentes se encuentran en las posiciones 3',5' se mejora la actividad vasorrelajante obteniéndose un valor de IC<sub>50</sub>=144 μM.

Tabla XIV. Actividad vasorrelajante de moléculas con 1 grupo OH

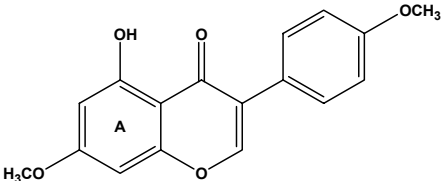
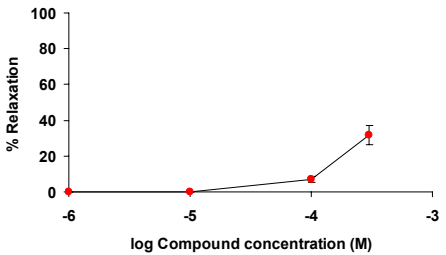
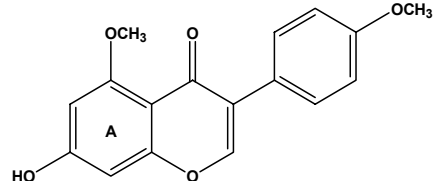
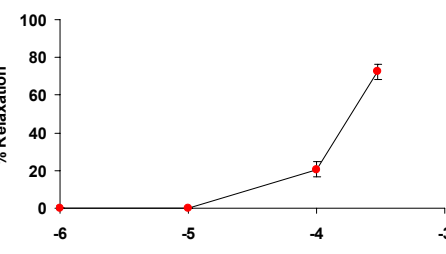
MOLÉCULA	IC <sub>50</sub>	SEM	GRÁFICA
<p><b>G-OH-3' (II)</b></p> 	200,05	61,24	
<p><b>G-OH-4' (II)</b></p> 	>300	--	
<p><b>G-OH-3',5' (II)</b></p> 	144,75	48,07	

✓ **Efecto de un grupo hidroxilo protegido como OCH<sub>3</sub> en el anillo A y C**

La presencia de dos grupos hidroxilo en el anillo A la molécula de genisteína permite el estudio de la influencia de cada uno de ellos en la actividad. Así se observa que la presencia de un grupo hidroxilo protegido como metoxi en la posición 7 del anillo A da un valor de IC<sub>50</sub>>300, mientras que si este mismo grupo está en la posición 5 el IC<sub>50</sub> = 198 µM (Tabla XV).

Esto confirma la necesidad de tener el grupo OH en posición 5 para mantener la actividad en los derivados de isoflavonas.

**Tabla XV.** Efecto de los grupos OCH<sub>3</sub> en los dos anillos

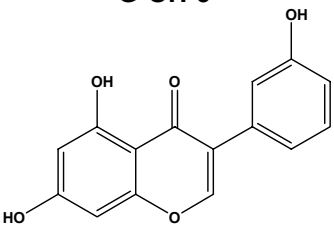
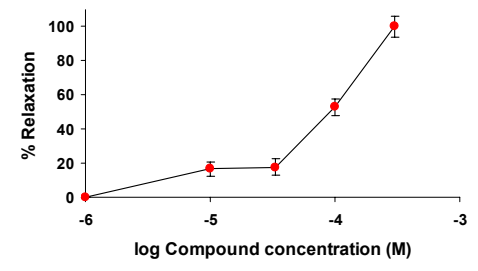
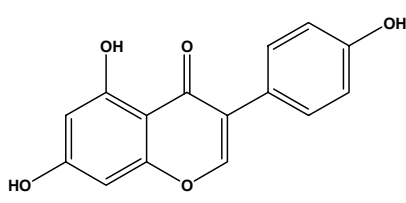
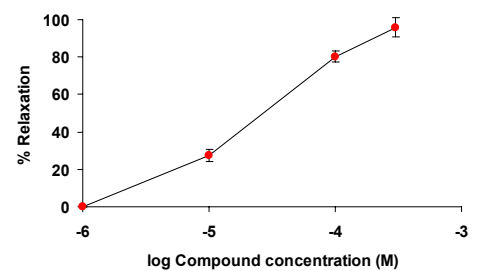
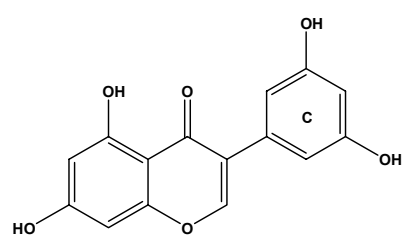
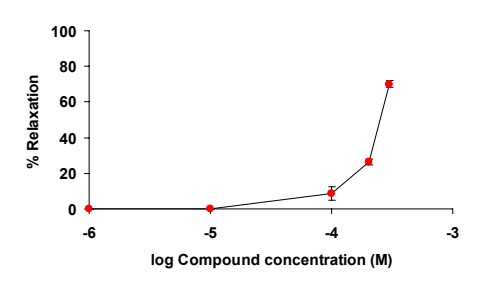
MOLÉCULA	IC <sub>50</sub>	SEM	GRÁFICA										
<p><b>Análogo equol/genisteína (II)</b> (otro prod.)</p> 	>300	--	 <table border="1"> <caption>Data for 7-methoxy derivative graph</caption> <thead> <tr> <th>log Compound concentration (M)</th> <th>% Relaxation</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>-6</td><td>0</td></tr> <tr><td>-5</td><td>0</td></tr> <tr><td>-4</td><td>~8</td></tr> <tr><td>-3.5</td><td>~35</td></tr> </tbody> </table>	log Compound concentration (M)	% Relaxation	-6	0	-5	0	-4	~8	-3.5	~35
log Compound concentration (M)	% Relaxation												
-6	0												
-5	0												
-4	~8												
-3.5	~35												
<p><b>Análogo equol/genisteína (II)</b> (producto)</p> 	198,05	11,57	 <table border="1"> <caption>Data for 5-methoxy derivative graph</caption> <thead> <tr> <th>log Compound concentration (M)</th> <th>% Relaxation</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>-6</td><td>0</td></tr> <tr><td>-5</td><td>0</td></tr> <tr><td>-4</td><td>~20</td></tr> <tr><td>-3.5</td><td>~75</td></tr> </tbody> </table>	log Compound concentration (M)	% Relaxation	-6	0	-5	0	-4	~20	-3.5	~75
log Compound concentration (M)	% Relaxation												
-6	0												
-5	0												
-4	~20												
-3.5	~75												

✓ **Efecto de 1 ó 2 grupos OH libres en el anillo C**

Se observa que el valor más bajo de IC<sub>50</sub> para las moléculas sintetizadas en este trabajo es el de la genisteína con un IC<sub>50</sub> = 19 µM. Cuando se cambia la posición del grupo OH del anillo C de 4' a 3' el efecto vasorrelajante desciende considerablemente pero aun así es uno de los valores más bajos que se han obtenido en este estudio IC<sub>50</sub> = 95 µM. En cambio cuando se añade otro grupo OH en el anillo C la molécula tiene un efecto vasorrelajante bastante menor (IC<sub>50</sub> = 239 µM ) que el que

presentan las otras dos moléculas, como ocurría en los derivados de daidzeína (Tabla XVI).

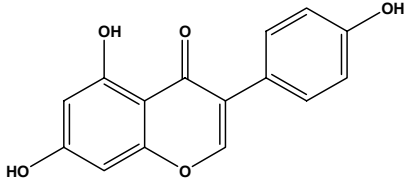
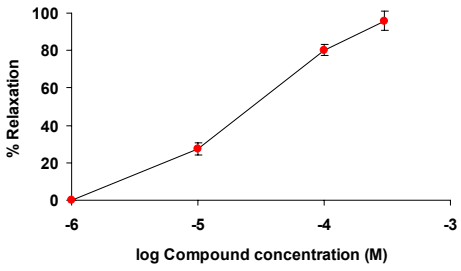
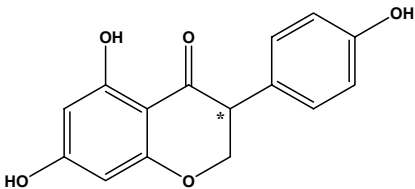
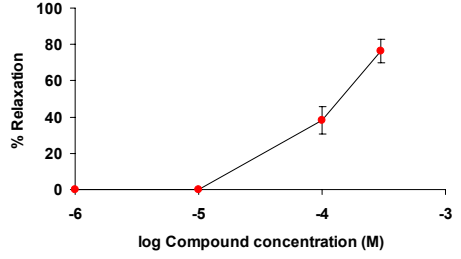
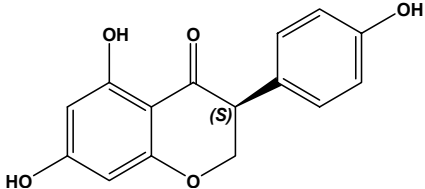
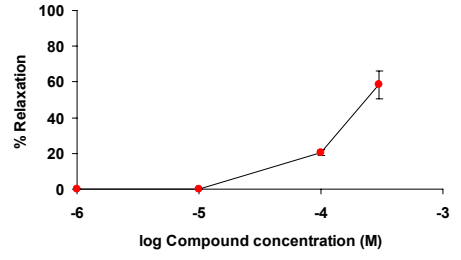
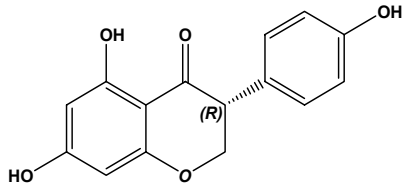
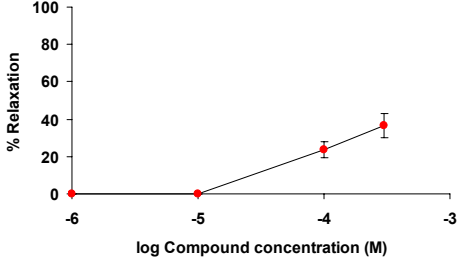
**Tabla XVI.** Efecto de 1 ó 2 grupos OH libres en el anillo C

MOLÉCULA	IC <sub>50</sub>	SEM	GRÁFICA
<p><b>G-OH-3'</b></p> 	<b>95,65</b>	<b>7,39</b>	
<p><b>Genisteína</b></p> 	<b>19,49</b>	<b>3,55</b>	
<p><b>G-OH-3',5'</b></p> 	<b>239,88</b>	<b>9,61</b>	

### ✓ Efecto de la rigidez en la molécula y efecto de los enantiómeros

Al hidrogenar la molécula de genisteína se pierde actividad lo mismo que sucedía con la daidzeína. Al contrario de lo que sucedía con la daidzeína en este caso la mezcla racémica es la que mayor efecto vasorrelajante presenta. Resolver en sus enantiómeros no mejoró el efecto vasorrelajante (Tabla XVII).

Tabla XVII. Efecto de la rigidez en la molécula y efecto de los enantiómeros

MOLÉCULA	IC <sub>50</sub>	SEM	GRÁFICA
<p><b>Genisteína</b></p> 	19,49	3,55	
<p><b>DHG-Racémica</b></p> 	140,46	21,91	
<p><b>DHG (S)</b></p> 	246,50	--	
<p><b>DHG (R)</b></p> 	>300	--	

Como resumen de los resultados de la actividad vasorrelajante podemos concluir:

- ✓ El cambio de posición del grupo OH en el anillo C de 4' a 3' tiene distinto efecto según se trate de daidzeína o genisteína, por lo que no existe una pauta generalizable en este aspecto.

- ✓ La presencia de dos grupos hidroxilo en el anillo C, en los derivados de daídzeína, supone una mejora sustancial de la actividad vasorrelajante para los compuestos parcialmente hidrogenados con mayor libertad conformacional.
- ✓ El ensayo de enantiómeros aislados en la actividad vasorrelajante tampoco muestra un comportamiento generalizable, aunque salvo para el equol y dihidrogenisteína, uno de los enantiómeros presenta mejor  $IC_{50}$  que la mezcla racémica, demostrando la importancia del estudio de los enantiómeros por separado.
- ✓ Puesto que se ha observado que al hidrogenar totalmente la daidzeína a equol se mejoran los resultados de vasorrelajación, pensamos que al hidrogenar totalmente la G-OH-4', y la G-OH-3' mejoraremos todavía más los resultados obtenidos, dejando este estudio pendiente para posteriores investigaciones.
- ✓ Así, los compuestos que mejor actividad vasorrelajante han presentado en este estudio son genisteína, equol y el enantiómero S de 7,3',5'-trihidroxiisoflavanona [DHD-OH-3',5']



## **6. RECEPTORES ESTROGÉNICOS**



## 6.1. ESTRÓGENOS

Los estrógenos son hormonas esteroideas con acciones reconocidas en la mayoría de los tejidos. Como hormonas sexuales tienen un papel fundamental en el establecimiento del fenotipo femenino, aunque cada vez son más las evidencias de su papel en el control de diferentes funciones en el varón. Son la llave reguladora del crecimiento y diferenciación celular<sup>113</sup>.

### 6.1.1. Estructura química

El estrógeno natural más potente en seres humanos es el 17- $\beta$ -estradiol (E2), seguido por la estrona (E1) y el estriol (E3) (Fig. 6.1). Cada una de estas moléculas es un esteroide de 18 carbonos, con un anillo fenólico A y un grupo hidroxilo o cetona en posición 17 del anillo D. La principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y la alta afinidad a receptores estrogénicos es que la molécula posea al menos 1 grupo OH a cada lado de la estructura<sup>114</sup>.

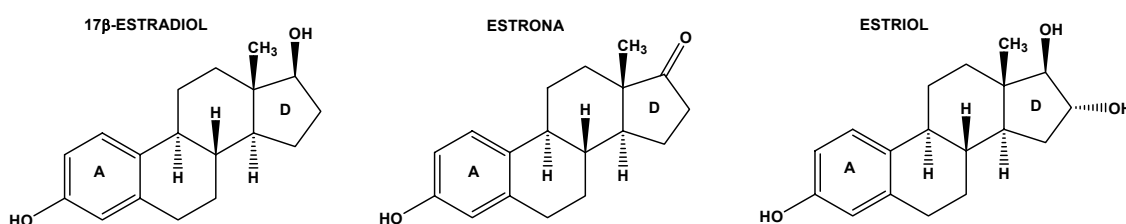


FIG. 6.1. Estrógenos naturales

### 6.1.2. Biosíntesis y metabolismo

Los estrógenos esteroideos se forman a partir de androstenediona o testosterona como precursores inmediatos. La reacción comprende aromatización del anillo A; ésta es catalizada en tres pasos por un complejo de enzima monooxigenasa (aromatasa) que utiliza la forma reducida NADPH y oxígeno molecular como co-sustratos (Fig. 6.2).

<sup>113</sup> Bahamonde MI. *Tesis Doctoral. Barcelona, Universitat Pompeu Fabra. 2003.*

<sup>114</sup> Miller C, Collinia M, Harrisb H. *Bio. Med. Chem. 2003*;13:2399-2403.

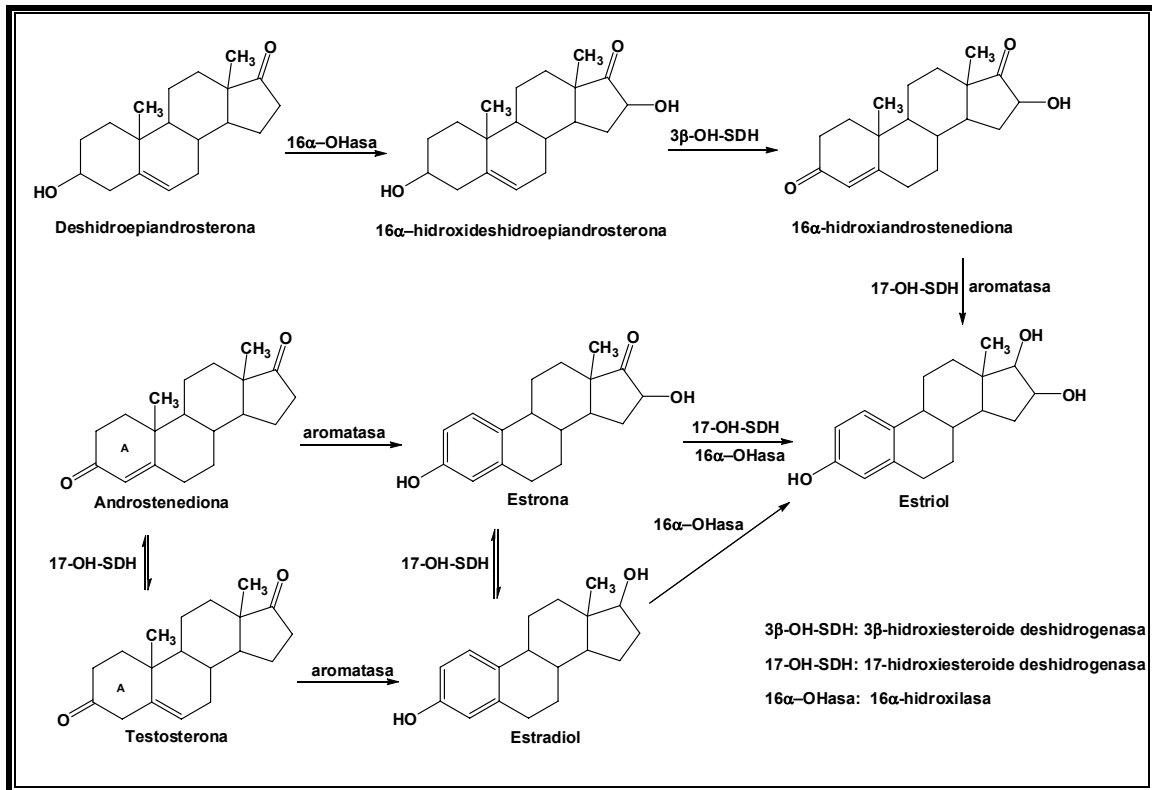


FIG. 6.2. Ruta biosintética de los estrógenos

Los ovarios constituyen la principal fuente de estrógenos circulantes en mujeres premenopáusicas siendo el principal producto secretado el estradiol. Para la síntesis de éste es necesaria la acción combinada de las gonadotropinas LH, que van a estimular las células intersticiales del estroma y el cuerpo lúteo del ovario y las gonadotropinas FSH que fijarán su acción sobre las células granulosas del folículo de Graaf. La actividad de aromatasas es inducida por estas gonadotropinas, que actúan por medio de receptores de membrana plasmática para incrementar las concentraciones intracelulares de adenosín-3',5'- monofosfato cíclico (AMP-cíclico, AMPc). Las gonadotropinas y el AMPc también incrementan la actividad de la enzima de desintegración de la cadena lateral del colesterol y facilitan el transporte del colesterol (el precursor de todos los esteroides) hacia las mitocondrias de células que sintetizan esteroides. El estradiol secretado se oxida de manera reversible hasta generar estrona mediante la 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa, y esos dos estrógenos pueden convertirse en estrionol. Esas transformaciones ocurren principalmente en el hígado. Los tres estrógenos y sus metabolitos se conjugan con ácido glucurónico y se excretan a la orina y a la bilis<sup>115</sup>.

<sup>115</sup> Goodman, Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 2006. McGraw-Hill.

La determinación cuantitativa de estos metabolitos en orina es importante porque permite estimar la velocidad de recambio de las hormonas esteroideas, con su consiguiente utilidad en el diagnóstico de determinadas patologías. Los metabolitos biliares pueden sufrir más transformaciones metabólicas por acción de la flora intestinal siendo reabsorbidos en la circulación portal.

Las concentraciones de estradiol en plasma en el hombre son bajas siendo variable en el caso de la mujer. En concreto, los niveles plasmáticos aumentan en las niñas en la pubertad alcanzando valores de 30 pg/ml al llegar a las fases II y III de desarrollo mamario y niveles de tipo adulto que oscilan entre los 10 y 200 pg/ml al llegar la menarquía o poco después.

### 6.1.3. Acción de los estrógenos

Los estrógenos tienen múltiples acciones biológicas. Sus acciones nucleares específicas están determinadas por la estructura de la hormona, el subtipo de isoforma del receptor estrogénico implicado, las características del gen diana promotor y el equilibrio entre las proteínas coactivadoras y correpresoras que modulan la respuesta transcripcional final del complejo entre estrógenos y sus receptores.

Los estrógenos afectan al crecimiento, diferenciación celular y a la función de los tejidos del sistema reproductor (glándulas mamarias, ovarios, útero y vagina) y a las funciones reguladoras en otros tejidos del organismo.

En el **hueso**, los estrógenos pueden tener efectos sistémicos sobre el metabolismo de los minerales, contribuyendo a un balance positivo de calcio. Modulan a nivel del hueso los osteoblastos por diferentes mecanismos, por un lado intervienen en la "homeostasis del calcio" aumentando los niveles de calcitonina y por otro aumentan la absorción del calcio a nivel intestinal. Los estrógenos alteran la secreción de la hormona paratiroidea, por ello en mujeres posmenopáusicas se observan mayores incidencias de osteoporosis. Debido a todas estas acciones, la terapia hormonal de reemplazo (THR) tiene un efecto positivo en la masa ósea del esqueleto de la mujer posmenopáusica<sup>116</sup>.

---

<sup>116</sup> Terán Dávila J, Teppa Garrán A. *Rev Obstet Ginecol Venez* 2003;63:135-148.

En el **hígado**, los estrógenos estimulan la producción de proteínas, factores de la coagulación y receptores para las lipoproteínas hepáticas. Los estrógenos tienen numerosas acciones sobre el metabolismo lipídico aumentando las concentraciones séricas de triglicéridos y reduciendo en cierta medida el colesterol total. Incrementan las concentraciones de HDL (lipoproteína de alta densidad) y disminuye las LDL (lipoproteínas de baja densidad) y la apoproteína B. Por lo tanto actúan como protectores de enfermedades cardiovasculares tales como la hipertensión o la enfermedad coronaria, las más comunes del mundo moderno<sup>117</sup>.

A nivel **neuronal**, los estrógenos tienen un efecto neuroprotector ya que interactúan de forma sinérgica con las neurotrofinas que reducen la generación de amiloide beta remodelando las dendritas, activando la glia e induciendo sinapsis<sup>118</sup>.

En el **ojo** disminuye la presión intraocular, la resequedad corneal y la aparición de cataratas<sup>119</sup>.

En **piel y mucosas** favorecen su hidratación, aunque también causan retención hídrica<sup>120</sup>.

En las **células endoteliales** producen vasodilatación al incrementar la formación y descarga del óxido nítrico y de prostaciclina reduciendo el tono vascular e inhibiendo la apoptosis<sup>121</sup>.

Mackenzie en 1984 sugirió que las hormonas sexuales podían ejercer una influencia vasodilatadora. El volumen sanguíneo aumenta durante la gestación y disminuye la resistencia vascular debido a la disminución del tono vascular, lo cual ha sido atribuido a la influencia del incremento del nivel de las hormonas sexuales vasoactivas. Estudios experimentales han documentado que los estrógenos incrementan el flujo sanguíneo en el tracto reproductor de las hembras y pueden modular el tono vascular y el flujo sanguíneo de otros órganos al actuar sobre las células endoteliales y células musculares lisas (Tabla I).

---

<sup>117</sup> Mendelsohn M, Karas R. *N Engl J Med.* **1999**;340(23):1801-1811.

<sup>118</sup> Tripanichkul W, Sripanichkulchai K. *Brain Research.* **2007**;1164:24-31.

<sup>119</sup> Siesky B, Harris A, Patel C, et al. *Eur J Ophthalmol.* **2008**;18:320-323.

<sup>120</sup> Brincat M. *Climacteric.* **2005**;8:110-123.

<sup>121</sup> Karpuzoglu E, Ahmed S. *Nitric Oxide.* **2006**;15:177-186.

**Tabla I.** Efectos vasculares beneficiosos y posible aplicación clínica de los estrógenos<sup>122</sup>

Endotelio	Promueven la proliferación/migración Promueve la liberación de EDRF Inhibe la liberación de EDCFs
Músculo liso	Inhibe la proliferación/migración Relajación y vasodilatación de VSM
Otros efectos vasculares	Antiateroesclerótica Antioxidante Disminuye lipoproteínas de baja densidad Incrementa lipoproteínas de alta densidad Inhibe la oxidación de lipoproteínas Disminuye la homocisteína del plasma Cambios en la coagulación sanguínea Disminuye el colágeno vascular
Aplicaciones clínicas	Enfermedades de arterias coronarias Hipertensión tras la menopausia Tromboembolismos

(EDRF: factor relajante derivado del endotelio, EDCF: factor contráctil derivado del endotelio, VSM: músculo liso vascular)

La influencia de los estrógenos sobre la función vasomotora presenta variaciones entre las diferentes regiones del organismo, las especies y el género de éstas. Recientemente se ha encontrado que no hay diferencias en la contracción vascular entre ratas machos normales y castrados, pero esta diferencia aumenta en hembras intactas comparadas con hembras ovariectomizadas, sugiriendo que estas diferencias de género en el tono vascular está relacionado con los estrógenos<sup>123</sup>.

La diferencia de género en la regulación de la función vascular puede explicar parcialmente el hecho de que hay mayor incidencia de hipertensión en hombres y en mujeres post-menopáusicas con respecto a las mujeres durante el periodo fértil.

Las hormonas sexuales como la progesterona, testosterona y los estrógenos causan relajación en vasos sanguíneos sin endotelio. El efecto vasorrelajante de los estrógenos es mayor que el efecto de la progesterona o de la testosterona. El alto

<sup>122</sup> Orshal J, Khalil R. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **2004**;286(2):R233-249

<sup>123</sup> Crews JK, Khalil RA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Apr **1999**;19(4):1034-1040.

nivel de estrógenos en el plasma de las hembras puede explicar la reducción de la contracción vascular en éstas en comparación con los machos. Sin embargo, las grandes diferencias en la contracción pueden estar relacionadas con los receptores, ya que las hembras tienen más receptores estrogénicos en sus vasos que los hombres<sup>124</sup> (Tabla II).

**Tabla II.** Niveles en plasma de las hormonas sexuales<sup>122</sup>

Nivel en Plasma	♂	♀ premenopausia	♀ posmenopausia
<b>Estrógenos (pg/ml)</b>	15-25	<b>100-700</b>	0-60
<b>Progesterona (pg/ml)</b>	25-100	50-700	200-500
<b>Testosterona (ng/ml)</b>	4-10	0,3-0,7	0,1-0,7

#### 6.1.4. Estrógenos y canales iónicos

La contracción de las células vasculares musculares lisas (VML) esta producida por el incremento de la concentración del calcio intracelular debido a la liberación del calcio del retículo sarcoplásmico (RS) y a la entrada de este ion del medio extracelular. La estimulación de la cadena ligera de la miosin (CLM), la Rho kinasa y la kinasa de proteínas activadora de mitogénesis (MAPK), al igual que la inhibición de la fosfatasa de la CLM y la activación de la proteinquinasa C (PKC) contribuyen a la contracción de las células lisas vasculares<sup>125</sup>. Numerosos estudios han concluido que los estrógenos producen una rápida relajación al movilizar el calcio. Algunos estudios sugieren que los estrógenos inhiben la contracción inducida por agonistas o por el KCl, por el influjo de  $Ca^{2+}$  y por el  $Ca^{2+}$  intracelular, sin embargo no afecta a la liberación de  $Ca^{2+}$  de los almacenes intracelulares<sup>126</sup>. Por lo tanto, los estrógenos tienen un efecto directo sobre las células musculares lisas jugando un importante papel en la regulación del tono del músculo vascular liso al actuar sobre la permeabilidad de los canales iónicos en estas células, produciendo relajación al bloquear la entrada de  $Ca^{2+}$  del medio extracelular a través de canales dependientes de voltaje<sup>123</sup> (Fig. 6.3).

<sup>124</sup> Musey PI, Adlercreutz H, Gould KG, et al. *Life Sci.* **1995**;57(7):655-664.

<sup>125</sup> Somlyo AP, Somlyo AV. *J Physiol.* Jan 15 **2000**;522 Pt 2:177-185.

<sup>126</sup> Freay AD, Curtis SW, Korach KS, et al. *Circ Res.* Aug **1997**;81(2):242-248.



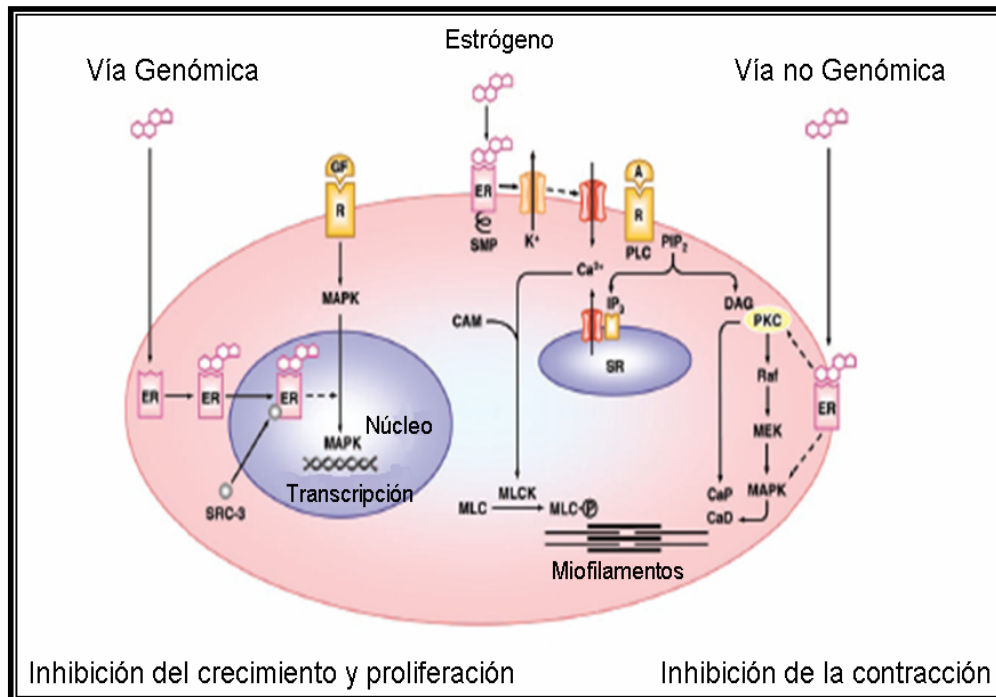


FIG. 6.3. Efecto de los estrógenos en las VSM<sup>122</sup>

La acción de los estrógenos sobre los canales de potasio ha sido descrita tanto en las células musculares lisas como en las endoteliales. Estudios funcionales han demostrado que agonistas de los estrógenos, como el 17- $\beta$ -Estradiol, producen relajación por un mecanismo endotelio independiente a través de los canales de  $K_{ATP}$  en aorta aislada de rata y en arteria coronaria de porcino.

## 6.2. RECEPTORES ESTROGÉNICOS

Los receptores estrogénicos son proteínas pertenecientes a la “super familia de receptores nucleares”, la cual incluye otros receptores de hormonas esteroideas y tiroideas, el receptor de la vitamina D y otros muchos aún no identificados y cuya actividad depende de la unión a un ligando hormonal. Todos estos receptores muestran un alto grado de homología y son activados por moléculas pequeñas, de carácter lipófilo, que se unen a los mismos en un área hidrofóbica específica para cada ligando<sup>127</sup>.

<sup>127</sup> Parker MG, Arbuckle N, Dauvois S, et al. *Ann N Y Acad Sci*. Jun 11 1993;684:119-126.

Aunque conocido desde hace varias décadas, el receptor estrogénico ha sido objeto recientemente de una nueva atención al introducirse en la clínica una nueva familia de fármacos denominados "moduladores selectivos del receptor estrogénico" cuyo valor terapéutico en el tratamiento de la osteoporosis y otras complicaciones de la menopausia ha superado claramente a los estrógenos naturales o sintéticos que son simplemente agonistas o antagonistas de este receptor.

El interés por modificar y mejorar el perfil clínico de la terapia hormonal de sustitución se ha centrado en diversas líneas de investigación. Estos receptores estrogénicos se expresarían selectivamente en aquellos tejidos en los cuales se deseara la estimulación del receptor estrogénico (por ejemplo, el hueso) y no expresarlo (o expresarlo a bajos niveles), en otros, como por ejemplo, el endometrio. Se hacía necesario encontrar entonces, un activador específico de tales receptores.

### **6.2.1. Tipos de receptores estrogénicos. Mecanismos de acción**

#### **A) Receptores estrogénicos nucleares**

El primer receptor estrogénico fue identificado por Jensen<sup>128</sup> en 1962 en diferentes tejidos de rata. Cuatro años más tarde, Toft y Gorski<sup>129</sup> aislaron por primera vez receptores de estrógeno del útero de rata. Tras varios años infructuosos, tratando de identificar un receptor estrogénico variante, en 1996 Kuiper y col.<sup>130</sup> y Mosselman y col.<sup>131</sup> identificaron y clonaron un nuevo receptor tejido-específico, tejido-específico, en el timo, ovario y testículo, tanto en ratas como en humanos. Lo denominaron receptor estrogénico  $\beta$  (RE $\beta$ ) y receptor estrogénico  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) al previamente conocido. Se tuvo así, la primera evidencia de que existen formas variantes, no mutadas, del receptor estrogénico, las cuales son capaces de activarse con el estradiol.

El RE $\alpha$  fue clonado de células MCF-7 procedentes de un tumor de mama humano. Es una proteína que contiene 595 aminoácidos y un peso molecular de 66 kDa. Está codificado por un gen localizado en el cromosoma 6.

El RE $\beta$ , fue clonado a partir de células de próstata de rata con un peso molecular de 53 kDa. El gen que expresa el RE $\beta$  humano se localiza en el cromosoma

<sup>128</sup> Jensen E, Jacobson H. *Recent Prog Horm Res.* **1962**;18:387-414.

<sup>129</sup> Toft D, Gorski J. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1966**;55:1574-1581.

<sup>130</sup> Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 11 **1996**;93(12):5925-5930.

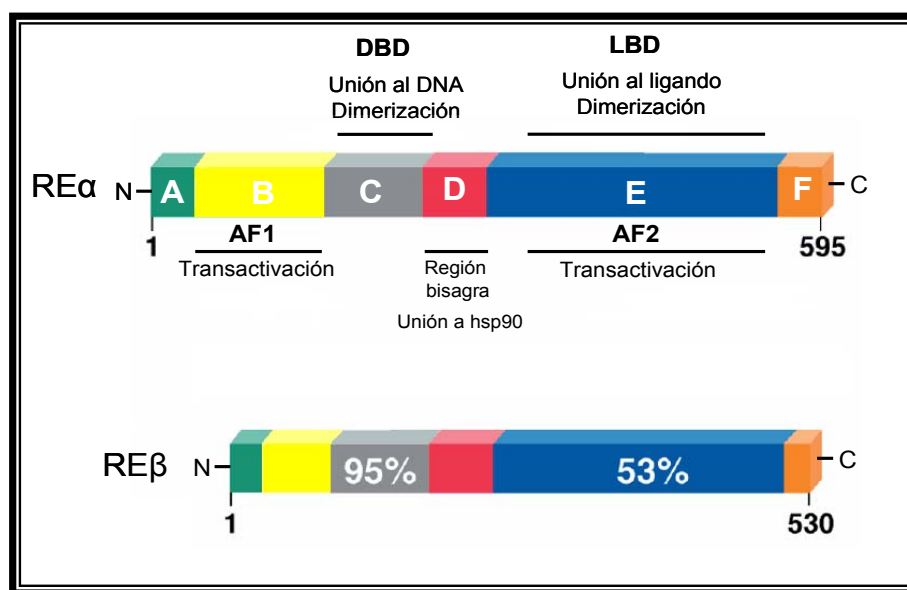
<sup>131</sup> Mosselman S, Polman J, Dijkema R. *FEBS Lett.* Aug 19 **1996**;392(1):49-53.

14, expresándose en una amplia variedad de tejidos, incluyendo los cardiovasculares, los pulmones, el cerebro, la próstata, la vejiga...

### **Estructura de los receptores estrogénicos**

Las diferencias estructurales entre ambos tipos de receptores hace posible el diseñar ligandos que se unan selectivamente a uno u otro, constituyendo la base molecular del concepto de los moduladores selectivos del receptor estrogénico (SERMs)

Los receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$  tienen 6 dominios funcionales<sup>132</sup> (Fig. 6.4).



**FIG. 6.4.** Estructura de los dos tipos de receptores

- *La región A/B*, localizada en el extremo amino terminal. Este dominio tiene una función de activación de la transcripción genética (AF-1) y varios sitios de fosforilación, importantes en el proceso de activación de la proteína especialmente en los procesos donde el receptor es activado en ausencia de hormona.

- *La región C*, el dominio de unión del ADN (DBD). Posee 9 residuos de cisteínas que son conservadas en los diferentes receptores esteroideos, ocho de ellas están coordinadas alrededor de dos iones de Zn<sup>2+</sup> para formar dos dedos de zinc que le confieren la capacidad de unirse específicamente al ADN, estas regiones específicas del ADN se denominan Elementos de Respuesta Estrogénica (ERE). Los ERE están formados por dos secuencias de cinco nucleótidos específicos, separadas

<sup>132</sup> Hanstein B, Djahansouzi S, Dall P, et al. *Eur J Endocrinol.* Mar 2004;150(3):243-255.

por tres nucleótidos indiferentes. La secuencia consenso del ERE es palindrómica, de modo que se leen indistintamente en ambas cadenas complementarias del ADN.

- *La región D o región bisagra*, que se encuentra entre DBD y LBD con una longitud variable. No está bien diferenciada, participa en la unión a la proteína chaperón de hsp90, la cual está unida al receptor mientras éste se encuentre en un estado inactivo.

- *La región E/F*: es el dominio de unión al ligando (LBD), donde se une la hormona ( $E_2$ ). Se encuentra en el extremo carboxi terminal. Otras funciones de este dominio incluyen la función de activación de la transcripción o AF-2, dimerización, asociación con otras proteínas co-activadoras o co-represoras de la transcripción, fosforilación y localización nuclear. A pesar de que esta región está conservada entre los diferentes receptores esteroideos, es altamente específica para su hormona, es decir una estrógeno con alta afinidad, pero no otras hormonas esteroideas.

El receptor estrogénico  $\alpha$  presenta una actividad transcripcional dependiente del ligando y está mediada por dos dominios de activación separados: AF-1 localizado en el extremo N terminal (dominio A/B) y AF-2, que es dependiente de la hormona, localizado en el dominio de unión del ligando<sup>133</sup>.

Mientras los dominios de activación del RE $\alpha$  están bien caracterizados, no está todavía claro cómo contribuyen a la actividad transcripcional del receptor las regiones homólogas del RE $\beta$ .

Estudios "in vitro" indican que el RE $\beta$  también contiene un dominio AF-2 con un extremo C terminal, sin embargo, este dominio juega un papel diferente en ambos receptores<sup>134</sup>.

Los dominios funcionales de los RE $\alpha$  y RE $\beta$  (denominados dominios de unión a ADN y dominios de unión al ligando) presentan un alto grado de homología, 95% y 53% respectivamente (Fig. 5.4), mientras que existe una considerable divergencia en el extremo N-terminal de ambos receptores (18% de homología)<sup>135</sup>.

Ambos receptores estrogénicos muestran una elevada afinidad por los estrógenos y una considerable homología en la región donde se unen al ADN. Desde el punto de vista farmacológico, el dominio de unión de los ligandos, que muestra una homología del 60%, es el que más interesa, ya que es la zona del receptor donde se

<sup>133</sup> Tora L, White J, Brou C, et al. *Cell*. Nov 3 **1989**;59(3):477-487.

<sup>134</sup> Cowley SM, Parker MG. *J Steroid Biochem Mol Biol*. Apr-Jun **1999**;69(1-6):165-175.

<sup>135</sup> Hall JM, Couse JF, Korach KS. *J Biol Chem*. Oct 5 **2001**;276(40):36869-36872.

fijarán de forma más o menos selectiva y con mayor o menor afinidad las diferentes moléculas ya sean estrógenos puros o moduladores selectivos.

La estructura del dominio de unión del ligando (LBD) de ambas isoformas del receptor estrogénico ha sido totalmente dilucidada mediante análisis cristalográficos (Fig. 6.5).

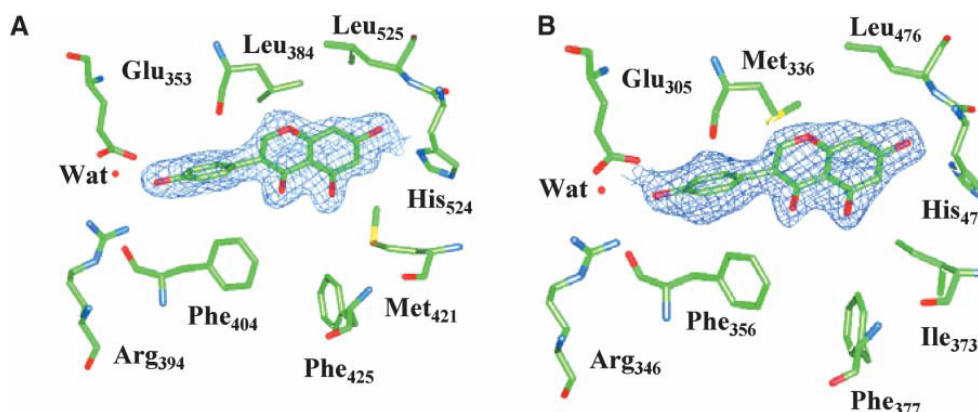


FIG. 6.5. Estructura del dominio de unión del ligando de los tipos de recetores: a) RE $\alpha$  y b) RE $\beta$ <sup>136</sup>

Este dominio está formado por 12 hélices situadas en tres capas antiparalelas y la orientación de la hélice 12 es crucial para que se unan uno u otro ligando (Fig. 6.6), lo que permite explicar las interacciones que tienen lugar entre agonistas, agonistas parciales, moduladores selectivos y antiestrógenos esteroideos (antagonistas puros) y, lo que es más importante, diseñar nuevos fármacos que actúen selectivamente<sup>137</sup>.

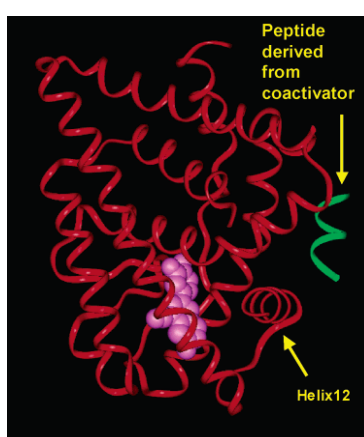


FIG. 6.6. Estructura del ER $\beta$ <sup>138</sup>

<sup>136</sup> Manas E, Xu Z, Unwalla R, et al. *Structure*. **2004**;12:2197-2207.

<sup>137</sup> Meegan MJ, Lloyd DG. *Curr Med Chem*. Feb **2003**;10(3):181-210.

<sup>138</sup> Mewshaw R, Edsall R, Yang C. *J Med Chem*. **2005**;48:3953-3979.

### ***Mecanismo de acción: Vía genómica***

Requiere horas o días para que ocurra, es una acción retardada, como por ejemplo la remodelación de las alteraciones lipídicas, ya que requiere fenómenos de transcripción y traducción con la consecuente modulación de más de 100 proteínas.

El receptor esteroideo es activado al unirse un ligando, en este caso el estradiol y actúa como un factor transcripcional al unirse el ADN estimulando la transcripción de ciertos genes, de ahí su nombre de receptor nuclear, ya que ejerce su función a nivel del núcleo. Este modo de acción se ha denominado "genómico"<sup>139</sup> ya que requiere la activación del receptor nuclear al unir su hormona específica después de haber atravesado la membrana, homo o heterodimerización del complejo hormona-receptor y el reconocimiento de una secuencia específica en el ADN. El proceso de transcripción es activado al formarse el complejo de iniciación de la transcripción que incluye diferentes co-activadores, co-represores y proteínas reguladoras de la transcripción.

La transcripción estimulada por el receptor estrogénico es finalmente regulada dependiendo del tejido donde ocurre. El control tan específico parece depender de la composición del complejo de iniciación de la transcripción. Un grupo de factores transcripcionales basales interactúa con el complejo hormona-receptor para formar un complejo de preiniciación, al cual se le van a unir una serie de proteínas co-reguladoras llamadas: proteínas de interacción con receptores o RIPs. Estos co-reguladores pueden activar (co-activadores) o reprimir (co-represores) la transcripción. Este proceso, donde se sintetiza ARN que dará las nuevas proteínas, requiere por lo menos 1 ó 2 horas tras el tratamiento con la hormona<sup>140</sup>.

El receptor estrogénico (RE) es una proteína monocatenaria, que en su estado nativo está unida a otras proteínas, que actúan como chaperones y la mantienen en estado inactivo. La llegada del ligando al dominio de unión a la hormona del RE hace que se produzca interacción entre este ligando y al menos tres aminoácidos del receptor. El resultado es que se produce un cambio conformacional en el RE que le hace perder afinidad por las proteínas que le acompañaban en su estado nativo, y se produce la formación de un monómero estradiol-RE.

---

<sup>139</sup> Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, et al. *Pharmacol Rev.* Dec 2000;52(4):513-556.

<sup>140</sup> Marquez D, Pietras R. *Oncogene.* 2001;20:5420-5430.

La primera reacción que se produce es una dimerización del complejo ligando-RE: dos monómeros ligando-RE reaccionan para constituir el homodímero. El RE tiene dos dedos de zinc por los que es capaz de interactuar con regiones específicas del ADN denominadas Elementos de Respuesta Estrogénica (ERE). La secuencia del ERE es palindrómica, de modo que se lee indistintamente en ambas cadenas complementarias del ADN. Este dímero formado se une a un péptido llamado proteína adaptadora (represora o activadora) y todo este complejo se fijará al ADN para iniciar la transcripción (Fig. 6.7).

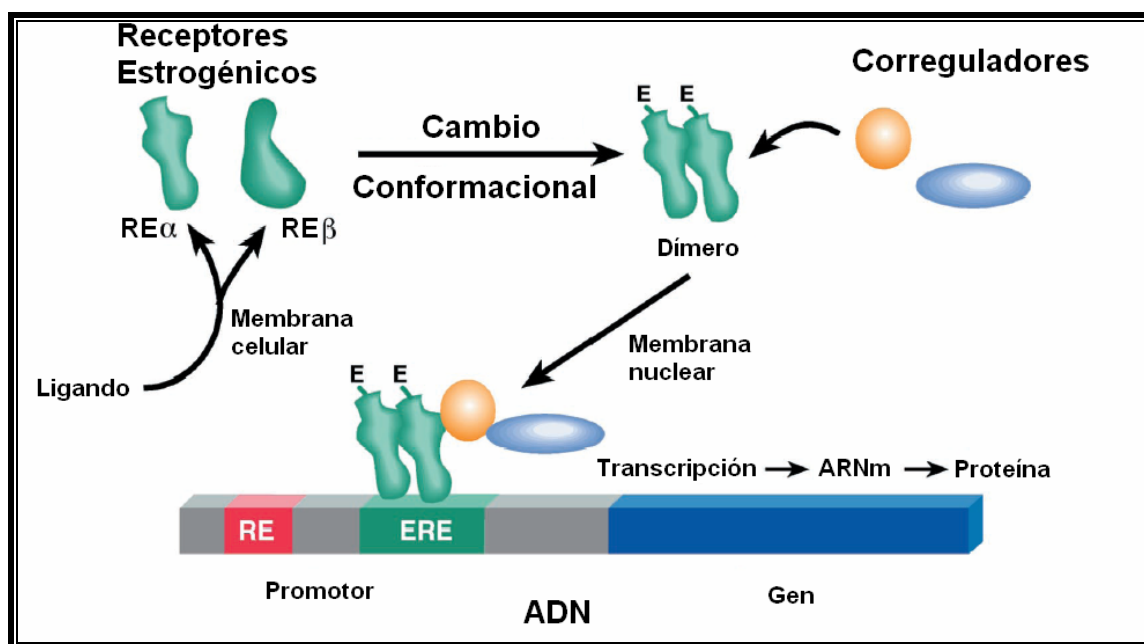


FIG. 6.7. Efecto genómico del mecanismo de acción de los estrógenos

Por otro lado, cabe destacar que aunque el receptor alfa y el receptor beta guardan homología en su dominio de unión al DNA, como se verá más adelante, tienen diferencias importantes en el sitio de unión a la hormona. Esto hace que posean afinidad de unión diferente por los diversos compuestos esteroideos, por ejemplo, el receptor  $\alpha$  tiene mayor afinidad por el dietilestilbestrol (DES) que por el  $17\beta$ -estradiol y a su vez por un modulador de receptores de estrógenos como es el tamoxifeno. El receptor  $\beta$  es más afín por el fitoestrógeno genisteína que por el tamoxifeno. Esto implica que de acuerdo a la distribución de los receptores en los tejidos, su acción será diferente<sup>141</sup>.

Como hemos señalado anteriormente, los estrógenos ejercen acciones a través de la unión con receptores localizados en el interior del núcleo. El efecto final de

<sup>141</sup> Kuiper GG, Shughrue PJ, Merchenthaler I, et al. *Front Neuroendocrinol.* Oct 1998;19(4):253-286.

la unión de la hormona con el receptor es la transcripción de RNA mensajero y por lo tanto, la síntesis proteica.

Hoy se sabe que entre estos dos extremos hay una serie de pasos intermedios que explican por qué un compuesto esteroideo puede tener diferentes acciones en diversos tejidos. Si el esteroide que se ha unido al receptor es diferente, la conformación espacial que adquiera el complejo hormona-receptor será distinta y, por lo tanto, se unirá a otra proteína adaptadora; el resultado es que se fijará de manera diferente al DNA de modo que la acción biológica resultante no será la misma<sup>142</sup>

Un ejemplo de proteína adaptadora o coactivador del músculo liso vascular es el coactivador-3 del receptor estrogénico (SRC-3). Se encuentra altamente expresado en este tipo de células, interacciona con el dímero formado por el estrógeno y su receptor y activa la transcripción de una serie de genes. Esto sugiere que el SRC-3 facilita el efecto vasoprotector dependiente del receptor estrogénico durante un daño vascular<sup>143</sup>.

### **B) Receptores Estrogénicos de Membrana**

Algunos de los efectos que ejercen los estrógenos sobre el aparato cardiovascular y sobre la activación del sistema nervioso son muy rápidos y no pueden ser explicados por su acción a través de receptores nucleares.

En 1967 Szego y Davis describieron por primera vez la idea de que el estrógeno podía inducir efectos rápidos al aumentar la producción de AMPc pocos segundos después de la administración de estradiol<sup>144</sup>. Diez años más tarde, Pietras y Szego demostraron la presencia de sitios específicos de unión a estrógenos en la superficie de las células hepáticas<sup>145</sup>.

Hasta el momento se ha demostrado la presencia de receptores estrogénicos de membrana (REm) en distintos tejidos y líneas celulares utilizando: E-HP (peroxidasa conjugada con estradiol) o E2-BSA-FITC (17 $\beta$ -estradiol acoplado a albúmina y a fluoresceína), un compuesto impermeable incapaz de atravesar la membrana celular<sup>146</sup>. Este método de fluorescencia ha demostrado la presencia de

<sup>142</sup> MacDonell D. *Wyeth-Ayerst International Inc. The New Science of HRT Meeting*. 1998:6-9.

<sup>143</sup> Salom JB, Burguete MC, Perez-Asensio FJ, et al. *J Cereb Blood Flow Metab*. Apr 2001;21(4):422-429.

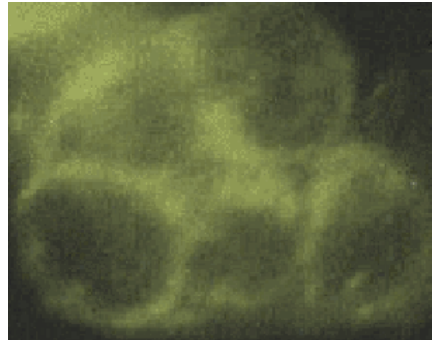
<sup>144</sup> Szego CM, Davis JS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 1967;58(4):1711-1718.

<sup>145</sup> Pietras RJ, Szego CM. *Nature*. Jan 6 1977;265(5589):69-72.

<sup>146</sup> Nadal A, Roperio AB, Laribi O, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 10 2000;97(21):11603-11608.



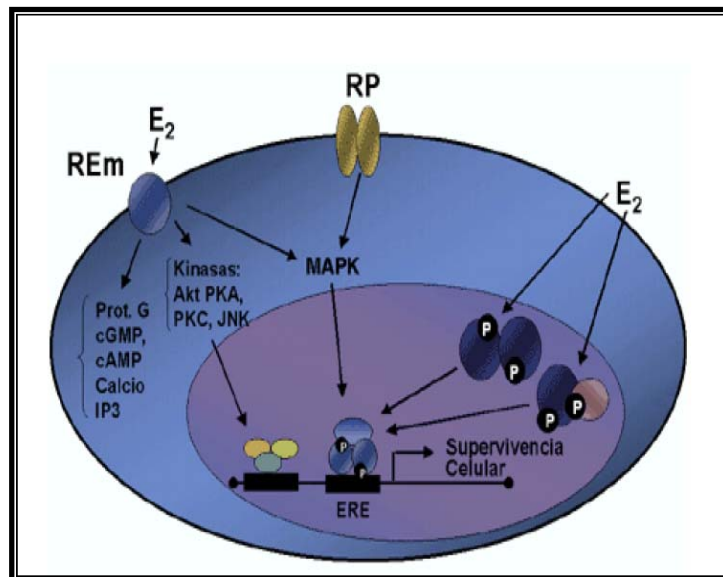
receptores estrogénicos de membrana en células de cultivos celulares de adenocarcinoma de mama, MCF-7 y en células endoteliales<sup>140</sup> (Fig. 6.8).



**FIG. 6.8.** Tinción del receptor estrogénico de membrana utilizando E2-BSA-FITC en células MCF-7 de cáncer de mama<sup>147</sup>

### Mecanismo de acción: Vía no genómica

El modo de acción “no-genómico” del estrógeno y en general de todas las hormonas esteroideas es pues un proceso rápido, que ocurre en unos pocos segundos o minutos; no requiere de los procesos de transcripción y síntesis de nuevas proteínas, para poder producir su efecto primario, por esta razón debe ser mediado por un receptor localizado en la membrana (REm)<sup>113</sup> (Fig. 6.9).



**FIG. 6.9.** Efectos “no genómico” del mecanismo de acción de los estrógenos<sup>148</sup>

<sup>147</sup> Berthois Y, Pourreau-Schneider N, Gandilhon P, et al. *J Steroid Biochem.* Dec **1986**;25(6):963-972.

<sup>148</sup> Watson CS, Gametchu B. *Proc Soc Exp Biol Med.* Jan **1999**;220(1):9-19.

Entre estos efectos rápidos se encuentran flujos de iones, influyendo en el potencial de membrana, descarga de vesículas secretoras o activación de proteínas quinasas asociadas a la membrana<sup>149</sup>.

Esta vía se produce tras la interacción de los compuestos estrogénicos con un sitio de unión específico, seguido de la generación de diferentes cascadas de señales intracelulares, que pueden directamente o por comunicación cruzada estimular la activación de mecanismos genómicos<sup>113</sup>.

En 1977 se demostraron sitios específicos de unión a estrógeno en **células uterinas** aisladas de rata. Entre las funciones principales del receptor estrogénico de membrana en el útero están la activación de una o más cascadas de señales que puedan facilitar la absorción de compuestos mediada por hormonas y la posibilidad de que la unión de la hormona a la membrana represente una manera de transportar el estrógeno en vesículas endocíticas hasta el núcleo para que ejerza su función nuclear<sup>150</sup>.

En 1998 el grupo de Bernad Soria describió un sitio de unión para los estrógenos en la membrana plasmática de las **células  $\beta$  del páncreas**. La unión de estos al receptor produce un incremento en el GMPC, que estimula a la PKG, la cual fosforila al canal de potasio  $K_{ATP}$ , despolariza la membrana plasmática e incrementa el  $Ca^{2+}$  y como consecuencia incrementa la secreción de insulina por el páncreas<sup>146</sup>.

En **monocitos**, la producción de una corriente de  $Ca^{2+}$  después de estimular con E2, induce la producción de óxido nítrico (NO)<sup>151</sup>.

En **células endoteliales** el estrógeno o el compuesto impermeable a la membrana celular E2-BSA (17 $\beta$ -estradiol acoplado a albúmina) puede estimular la producción de GMPC, NO y activar además quinasas celulares<sup>151</sup>.

La deficiencia de estrógeno está asociada a una pérdida de hueso significativa. Existe evidencia de la presencia de sitios de unión y efectos agudos a estrógeno en **osteoblastos y osteoclastos**, entre ellos están, aumentos de  $Ca^{2+}$  intracelular,

---

<sup>149</sup> Kelly MJ, Levin ER. *Trends Endocrinol Metab.* May-Jun **2001**;12(4):152-156.

<sup>150</sup> Pietras RJ, Szego CM. *Biochem Biophys Res Commun.* Aug 30 **1984**;123(1):84-91.

<sup>151</sup> Stefano GB, Prevot V, Beauvillain JC, et al. *Circulation.* Apr 4 **2000**;101(13):1594-1597.

inositol trifosfato y diacilglicerol, AMPc, GMPc, así como la activación de la Kinasa de Proteínas Activadora de Mitogénesis o MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase)<sup>152</sup>.

Los mecanismos protectores de los estrógenos en el **sistema cardiovascular** son mediados por ambos receptores estrogénicos, tanto el nuclear como el de membrana. Los estrógenos tienen efectos rápidos que ayudan a preservar el flujo coronario, incluyendo la estimulación de la óxido nítrico sintetasa y la consecuente producción de NO y GMPc. Además inhiben canales de Ca<sup>2+</sup> del músculo liso vascular, reduciendo de esa manera la acción de ciertos vasoconstrictores que actúan a través de este mecanismo. Todo esto da como resultado una vasodilatación y mejor perfusión del corazón<sup>117</sup>.

Utilizando diferentes modelos de isquemia cerebral tanto *in vitro* como *in vivo* se ha demostrado que el estradiol es capaz de preservar tanto las neuronas como el endotelio neurovascular, además de limitar la extensión de la lesión y disminuir la mortalidad<sup>153</sup>.

La gran diversidad de mecanismos descritos, instó a un grupo de investigadores a proponer en el año 1998 la clasificación de Mannheinen (tabla III), en la cual se intentó organizar los efectos esteroideos rápidos en distintas categorías, dependiendo del mecanismo que éstos involucren<sup>113</sup>.

**Tabla III.** Clasificación Manneheim de la acción no genómica de los esteroides

<p><b>A. Directo:</b> donde los esteroides son los únicos agonistas que actúan para generar una respuesta rápida.</p> <p><b>B. Indirecto:</b> donde los esteroides necesitan otro agonista para poder generar una respuesta rápida.</p> <p><b>I. Inespecífico:</b> no involucran receptor; podrían incluir posibles efectos de los esteroides sobre la fluidez de la membrana.</p> <p><b>II. Específico:</b> involucra un receptor de esteroides con especificidad de ligando.</p> <p><b>a. Receptor nuclear de esteroides clásico:</b> pertenecientes a la superfamilia de los receptores de hormonas esteroideas.</p> <p><b>b. Receptor de esteroides no clásicos</b></p>
---

<sup>152</sup> Endoh H, Sasaki H, Maruyama K, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 9 1997;235(1):99-102.

<sup>153</sup> Simpkins JW, Rajakumar G, Zhang YQ, et al. *J Neurosurg.* Nov 1997;87(5):724-730.

Hasta el momento muchos aspectos de la acción alternativa de los estrógenos requieren de una mayor investigación, principalmente aquellos relacionados con la clonación y caracterización de los nuevos receptores de membrana implicados en la señalización rápida de los esteroides. Uno de los puntos más importantes a considerar estaría relacionado con la relevancia fisiológica, fisiopatológica y clínica de esta nueva acción rápida de los esteroides y el aporte que estos estudios podrían tener en la aplicación de nuevos compuestos para el tratamiento de ciertas enfermedades<sup>113</sup>.

### 6.2.2. Distribución de los receptores estrogénicos en el organismo

La distribución de los receptores estrogénicos es desigual en el organismo, habiendo determinados órganos y sistemas que tienen los dos tipos de receptores. Esto explica la acción selectiva de los estrógenos en diferentes tejidos. En algunos de ellos son agonistas, en otros son antagonistas y en ocasiones no tienen efectos. En el caso del útero y la mama sólo existen receptores  $\alpha$ , mientras el cerebro, el hueso tienen receptores  $\beta$ <sup>154</sup> (Fig. 6.10).

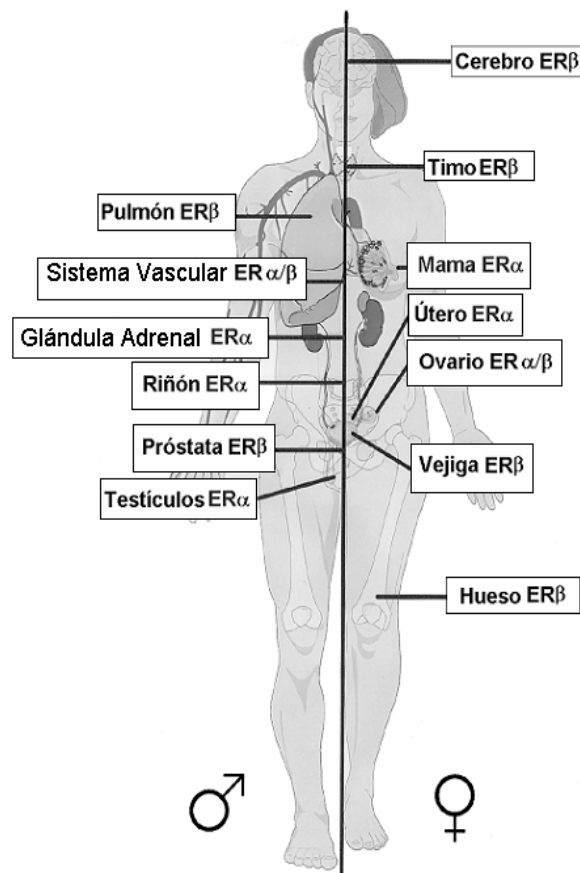


FIG. 6.10. Diagrama de la distribución anatómica de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$ <sup>9</sup>

<sup>154</sup> Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, et al. *Endocrinology*. Oct 1998;139(10):4252-4263.

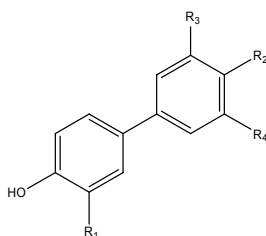
### 6.2.3. Afinidad por los receptores estrogénicos $\alpha$ y $\beta$

Desde un punto de vista estructural ha de tenerse en cuenta que el receptor estrogénico (RE) se une a moléculas de distinta naturaleza, sean o no de estructura esteroidea, como por ejemplo las isoflavonas, de su unión con los receptores estrogénicos derivan muchas de sus acciones tisulares. Los fitoestrógenos son capaces de interactuar con enzimas y receptores; gracias a su estructura estable y a su bajo peso molecular pueden atravesar la membrana celular<sup>155</sup>.

Para que un ligando se una a los receptores estrogénicos éste debe presentar un anillo aromático, grupos hidroxilo y un carácter hidrofóbico en su estructura. El 17 $\beta$ -estradiol contiene dos grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 17 del esqueleto esteroideo, de carácter hidrofóbico, a una distancia aproximada entre sí de unos 12 Å. Existen notables similitudes estructurales de los fitoestrógenos con el 17- $\beta$ -estradiol, que se traducen en la capacidad de unión de los mismos al RE, si bien con diferente grado de afinidad según el compuesto de que se trate. La actividad estrogénica se ve negativamente afectada tanto por la metilación como por la glicosilación de los grupos hidroxilo fenólicos.

En los últimos años se han publicado varios trabajos sobre el estudio de la actividad estrogénica de diversas familias de compuestos. Los estudios, cuyo resumen se recogen a continuación, se estructuran siempre de modo análogo al planteado en esta tesis. Partiendo de una estructura básica, se realizan modificaciones y se estudia su efecto tanto en la actividad como en la selectividad  $\alpha$ ,  $\beta$ , algunos de ellos incluyen también estudios de docking con el receptor. Todos los resultados de estas publicaciones se recogen en el anexo I, al final de este trabajo.

Mewshaw<sup>156</sup> y colaboradores realizaron estudios sobre derivados de bifenilo.



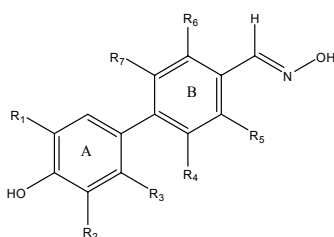
Algunas de las conclusiones de este trabajo muestran como la presencia del grupo hidroxilo en uno de los anillos es indispensable para su actividad en receptores

<sup>155</sup> Adlercreutz H. *Proc Soc Exp Biol Med.* Mar **1998**;217(3):241-246.

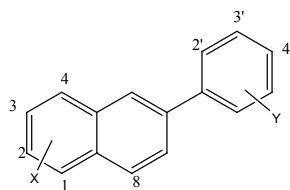
<sup>156</sup> Edsall R, Harris H, Manasa E, et al. *Bio Med Chem.* **2003**;11:3457-3474.

estrogénicos. Las moléculas más selectivas son las que poseen como estructura base un 4-OH-bifenilo sustituido en 3'. Siendo los sustituyentes más efectivos cloro y trifluorometilo.

Un trabajo posterior del mismo autor<sup>157</sup> muestra como la presencia de un grupo dador de puentes de hidrógeno (grupo oxima) en la posición 4' mejora la selectividad de los derivados de bifenilo



Este mismo grupo también exploró la actividad de derivados de naftilo con similitud estructural con las isoflavonas en receptores estrogénicos<sup>138</sup>



Como se observa en la tabla IV de resultados, la presencia en posición 4' del grupo hidroxilo mejora tanto la actividad como la selectividad de las moléculas.

**Tabla IV.** Resultados de actividad

Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )
	16,3	211	12,945
	2000	5000	2,5
	374	1345	3,5963

<sup>157</sup> Yang C, Edsall R, Harris H. *Bio Med Chem* **2004**;12:2553-2570.

La introducción de átomos de cloro o fluor en ciertas posiciones de la molécula mejoran los resultados.

También se recogen estudios de docking con el receptor de la molécula con OH en posición 2 y 4' (Fig. 6.11)

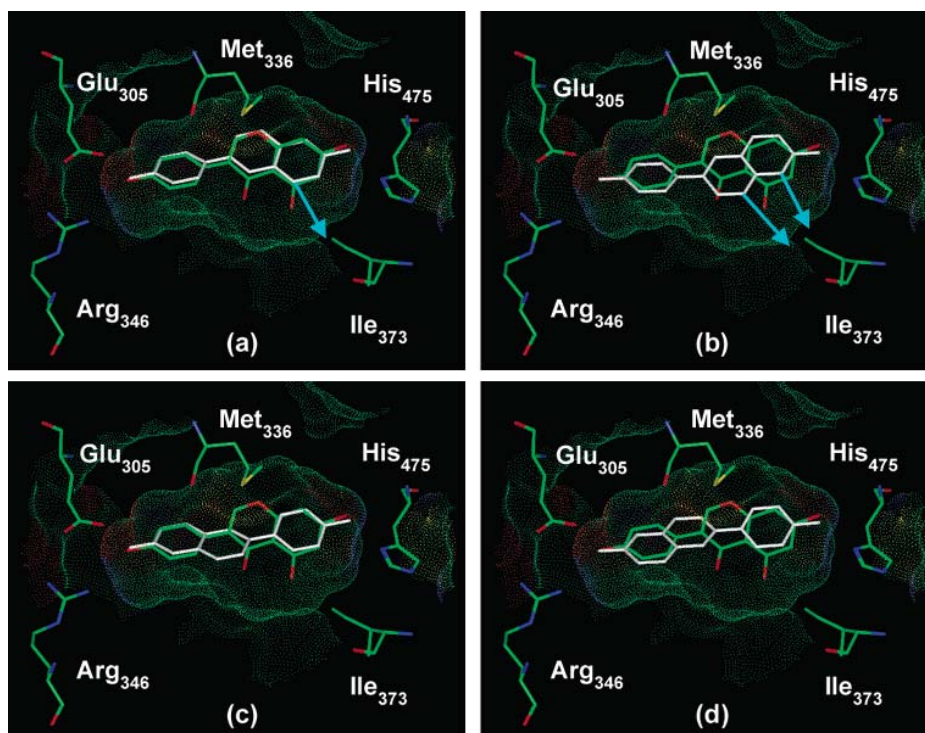
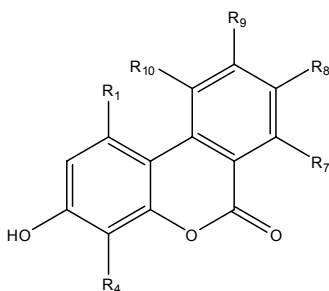


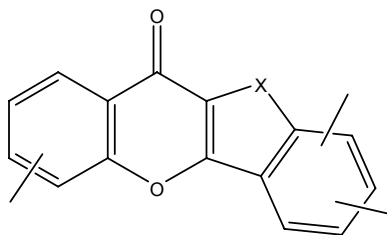
FIG. 6.11. Cuatro posibles orientaciones de la molécula en el LBD del RE $\beta$  identificadas mediante docking

El estudio de Sun<sup>158</sup> sobre benzocromenos sustituidos muestra de nuevo la importancia de la presencia de grupos hidroxilo en 3 y 8 para mantener la actividad. También se aprecia un notable incremento de la selectividad con la presencia de pequeños sustituyentes hidrofóbicos en posiciones 4, 7 y 10.



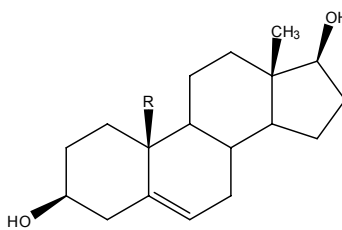
<sup>158</sup> Sun W, Cama L, Birzin E, et al. *Bio Med Chem Lett*. 2006;16:1468-1472.

Se ha estudiado también la actividad de flavonas e isoflavonas condensadas mediante un anillo de furano o tiofeno<sup>114</sup>



En este caso parece que la fijación de la estructura por puentes oxo o tio mejora la selectividad y de nuevo la presencia de grupos hidroxilo son imprescindibles para la actividad estrogénica.

Por último citaremos el trabajo de Blizzard<sup>159</sup> sobre derivados de estradiol



Al igual que ocurría con los derivados de benzocromenos la presencia de sustituyentes hidrofóbicos, en este caso un grupo etilo o vinilo, mejora mucho la selectividad.

En el caso de las isoflavonas, comparadas con el 17 $\beta$ -estradiol, éstas tienen relativamente poca afinidad por el receptor estrogénico alfa (RE $\alpha$ ) y aunque su afinidad por el receptor estrogénico beta (RE $\beta$ ) es mayor, es levemente menor que la que presenta la hormona esteroidea<sup>9</sup>.

Las isoflavonas, como pertenecientes al grupo de los fitoestrógenos, van a tener acción estrogénica débil y ésta no va ser igual para todas las moléculas. Para evaluar la potencia estrogénica relativa de estas sustancias en cultivos de células humanas se ha usado como punto de referencia arbitrario un valor de 100 para el estradiol.

<sup>159</sup> Blizzard T, Gude C, Morgan J. *Bioorg Med Chem Lett.* **2006**;16:834-838.



En los trabajos de Kinjo<sup>160,161,162</sup> se muestran una comparativa de afinidad por el receptor estrogénico  $\alpha$  y  $\beta$  de algunas isoflavonas y derivados. En el eje de abscisas se representa el % de unión al receptor estrogénico del  $17\beta$ -estradiol marcado isotópicamente con tritio ( $^3\text{H}$ ) y en el eje de ordenadas está representado el exceso de competidor frente a estradiol marcado (Fig. 6.12).

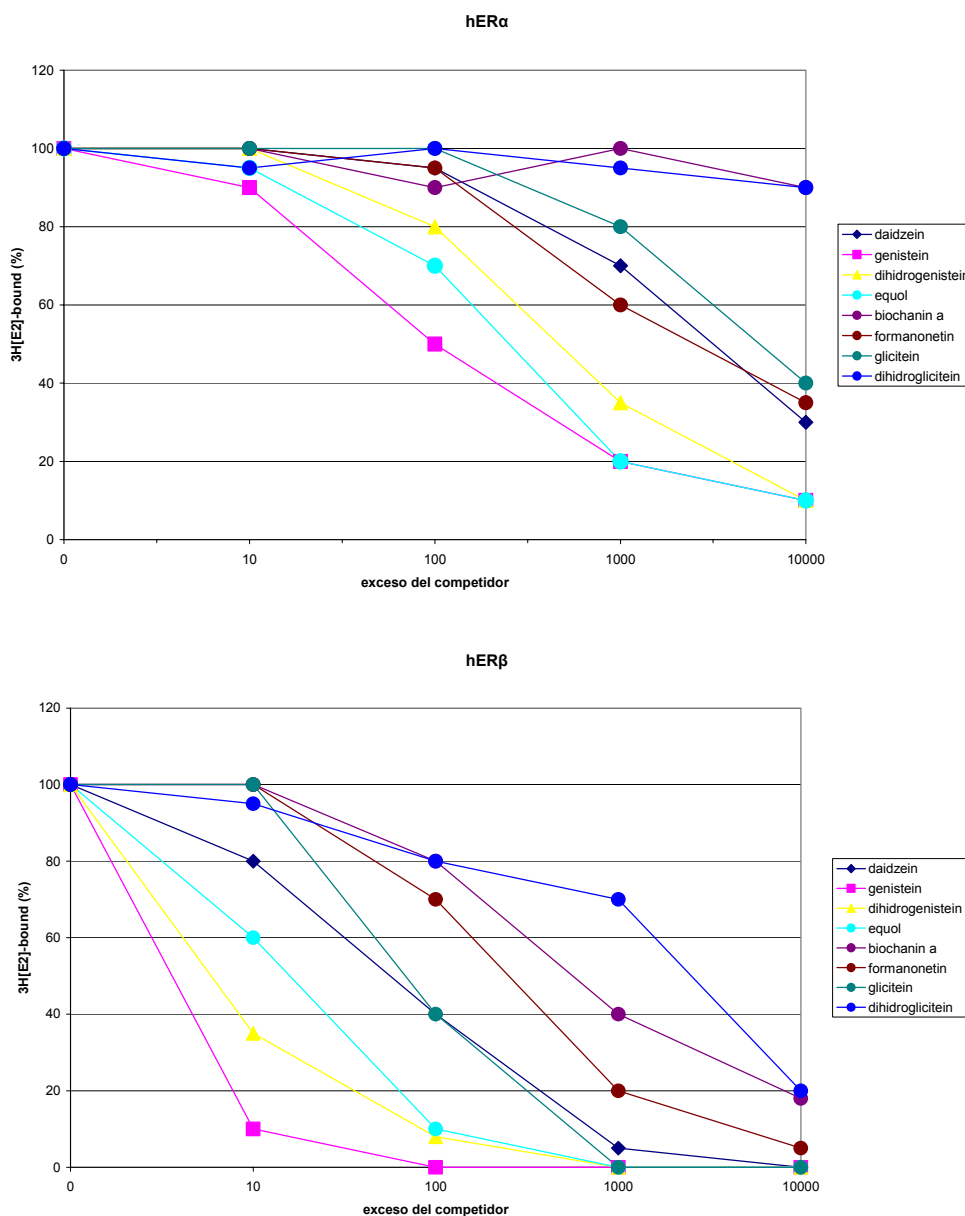


FIG. 6.12. Ensayos de unión a los receptores estrogénicos de compuestos estrogénicos

<sup>160</sup> Morito K, Hirose T, Kinjo J, et al. *Biol Pharm Bull.* Apr **2001**;24(4):351-356.

<sup>161</sup> Morito K, Aomori T, Hirose T, et al. *Biol Pharm Bull.* Jan **2002**;25(1):48-52.

<sup>162</sup> Kinjo J, Tsuchihashi R, Morito K, et al. *Biol Pharm Bull.* Feb **2004**;27(2):185-188.

De aquí se puede deducir que la isoflavona que más afinidad de unión tiene por ambos receptores es la genisteína, siendo muy superior su afinidad por el RE $\beta$  que por el RE $\alpha$  como queda de manifiesto en la figura 6.10, ya que sólo hace falta una concentración 10 veces superior de esta isoflavona frente al estradiol marcado para desplazar al 90% de éste.

Comparando acciones RE $\alpha$  y RE $\beta$  en perfiles clínicos se ha observado mayor afinidad de las isoflavonas por el receptor estrogénico  $\beta$  en cerebro, hueso, sistema lipídico y aparato cardiovascular, ya que son los lugares donde existen receptores beta.

No se ha demostrado acciones sobre hígado, mama y útero, ya que sólo tienen receptores estrogénicos  $\alpha$ <sup>163</sup>. Esta diferencia de afinidad hacia ambas isoformas del receptor estrogénico, es debida probablemente a la diferente secuencia de aminoácidos de la región F del dominio de unión de ambos tipos de receptor estrogénico (Fig. 6.4).

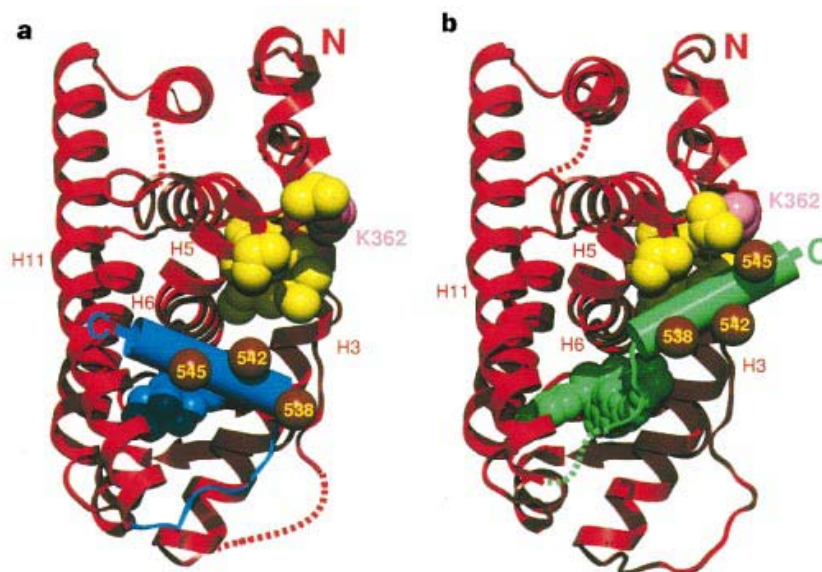
Dada la naturaleza selectiva de sus acciones sobre los diferentes receptores estrogénicos, se podría considerar a las isoflavonas como verdaderos moduladores selectivos de dichos receptores (SERM)<sup>164</sup>, cuyas acciones se efectuarían básicamente en aquellos órganos y tejidos diana en los que los RE $\beta$  se encuentran en cantidades relevantes, tales como el sistema nervioso central, hueso y pared vascular e, inversamente, no actuarían en aquellos órganos con expresión preferencial del RE $\alpha$ , como la mama y el endometrio. Aunque las isoflavonas, concretamente la genisteína, se ligan al RE $\beta$  con casi la misma eficiencia que el estradiol, la concentración requerida para inducir actividad transcripcional es de 104 veces mayor para la genisteína que para el estradiol; algo similar sucede para la daidzeína, el equol o la gliciteína. Además, el tipo de actividad transcripcional inducido por las isoflavonas no es exactamente el mismo que el producido por el estradiol, lo que podría tener su explicación en el hecho de que la estructura conformacional del complejo isoflavona-receptor es diferente de la del complejo estradiol-receptor: concretamente, la hélice 12 de la superficie AF-2 se encuentra en una posición diferente según que el ligando sea el 17 $\beta$ -estradiol u otro ligando.

---

<sup>163</sup> Foth D, Cline JM, Romer T. *Zentralbl Gynakol.* **2000**;122(2):96-102.

<sup>164</sup> Setchell KD. *J Am Coll Nutr.* Oct **2001**;20(5 Suppl):354S-362S; discussion 381S-383S.

En la figura 6.13 se muestra el complejo LBD-E2 en azul y LBD-RAL en verde. Aquí se puede apreciar el cambio conformacional según se una un ligando u otro<sup>165</sup>.



**FIG. 6.13.** a) Complejo LBD-E2 representado en azul, b) complejo LBD-RAL representado en verde

La menor actividad transcripcional de las isoflavonas queda parcialmente compensada por el hecho de que presentan una mayor facilidad de acceso a los RE que el propio estradiol, debido a que la fracción circulante libre de este último es tan sólo de un 4-5%, en tanto que las isoflavonas pueden circular libres en más de un 50%. De esta mayor facilidad de acceso al RE se desprende que, en presencia de estrógenos endógenos, las isoflavonas puedan comportarse como antagonistas estrogénicos, en tanto que, en ausencia de estrógenos, lo hacen como agonistas débiles.

También hay que tener en cuenta la quiralidad de las moléculas a la hora de estudiar su afinidad por los RE. En el trabajo de Muthyala<sup>75</sup> se ha estudiado la afinidad del equol racémico y de sus enantiómeros encontrándose resultados muy interesantes, ya que el enantiómero S tiene el doble de afinidad por el receptor estrogénico  $\beta$  si lo comparamos con el equol racémico.

De esta revisión bibliográfica y en un primer intento por determinar los parámetros estructurales que podrían determinar la actividad estrogénica se recopilaron los datos de afinidad por los receptores estrogénicos  $\alpha$  y  $\beta$ . Los valores de actividad vienen expresados en  $IC_{50}$  (concentración a la que se ocupan el 50% de los

<sup>165</sup> Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, et al. *Nature*. Oct 16 1997;389(6652):753-758.

receptores en nM). Con el programa ChemDraw se optimizó la geometría molecular y se cuantificaron las distancias entre los OH más distantes de la molécula en Armstrong (para poder compararlos con la distancia que presentan estos mismos grupos en la molécula de estradiol), así como, el ángulo formado por dichos OH y el carbono que se encuentra a una distancia intermedia. Sin embargo, al existir una gran variedad en las actividades y su forma de medida no fue posible una racionalización de las mismas por lo que se decidió realizar el estudio centrándose exclusivamente en derivados de isoflavona. Todos los datos relativos a los compuestos revisados se recogen al final de este trabajo en el anexo I.

### **6.3. DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD Y ESTUDIO ESTADÍSTICO**

#### **6.3.1. Ensayo competitivo de las isoflavonas**

La afinidad por los receptores estrogénicos  $\alpha$  y  $\beta$  se determinó siguiendo la técnica de Morito<sup>160</sup>. Se incubaron 250  $\mu$ l de la mezcla TKE (20nM Tris-HCl, pH 7.4, 1mM EDTA, 20mM KCl), conteniendo 5  $\mu$ l de RE $\alpha$  o RE $\beta$  con 2,5 pmol [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$  estradiol a 0°C durante 16 horas en presencia de varias concentraciones de isoflavonas.

La fracción unida y libre fueron separadas mediante la adición de volúmenes iguales de dextrano y carbono activado (0,5% carbono activado y 0,05% dextrano) en TKE. Las muestras se sometieron a centrifugación a 15000 rpm durante 1 hora y 300  $\mu$ l del sobrenadante sirvieron para determinar radiación  $\beta$  por escintilación.

Los receptores estrogénicos  $\alpha$  y  $\beta$  fueron adquiridos de Takara Shuzo Co. Sus concentraciones fueron de 0,6% y 0,3% de proteína total, siendo estables a -80°C durante varios meses.

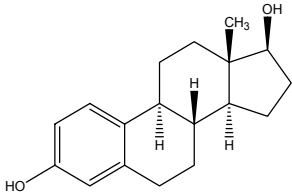
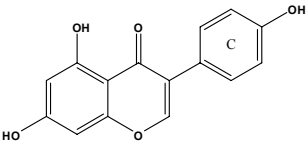
#### **6.3.2. Estudio estadístico**

Los estudios estadísticos se aplicaron, por medio del programa SPSS versión 15, a los datos de IC<sub>50</sub> de afinidad  $\alpha$  y  $\beta$  y de vasorrelajación. Los test utilizados fueron el Pearson Corr utilizado clásicamente y los test Tau b de Kendall y el test de Pearman utilizado sólo para muestras no paramétricas.

## 6.4. RESULTADOS DE RECEPTORES ESTROGÉNICOS

Uno de los objetivos de esta tesis consiste en estudiar la afinidad de las nuevas moléculas sintetizadas por los receptores estrogénico  $\alpha$  y  $\beta$  así como su selectividad relativa. Para ello se han utilizado dos moléculas patrón, el 17 $\beta$ -estradiol que presenta una buena afinidad por los receptores  $\beta$  y la genisteína que además de una elevada afinidad presenta una mayor selectividad (Tabla V).

**Tabla V.** Valores de afinidad para el 17 $\beta$ -Estradiol y la genisteína

MOLÉCULA	IC <sub>50</sub> $\alpha$ (nM)	S.D.	IC <sub>50</sub> $\beta$ (nM)	S.D.	$\alpha/\beta$
<b>17<math>\beta</math>-Estradiol</b> 	0.82	0.04	0.77	0.03	1.1
<b>Genisteína (G-OH-4')</b> 	148	3.61	3.8	0.45	38.9

De entre todas las moléculas testadas se ha encontrado que la mayor afinidad por el receptor estrogénico  $\beta$  la presenta la molécula de 17 $\beta$ -estradiol, seguida de la genisteína, equol racémico y una de nuestras moléculas sintetizadas (G-OH-3'), siendo los valores de IC<sub>50</sub> (nM) 0,77<3,8<64,6<86,3. A continuación se va a detallar cómo afectan en la afinidad cambios en la posición de los grupos OH, presencia de un carbono asimétrico, localización de los grupos OH...

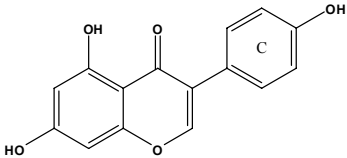
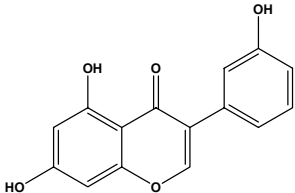
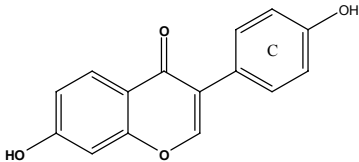
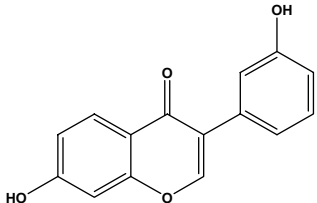
### ✓ Cambio en la posición de un OH en el anillo C

Al comparar la G-OH-4' con la G-OH-3' se observa que la afinidad por el receptor estrogénico  $\beta$  ha variado considerablemente pasando de un valor de IC<sub>50</sub> = 3,8 nM a un valor de IC<sub>50</sub> = 86,3 nM, lo que supone una pérdida de afinidad por dicho receptor (Tabla VI).

Si se comparan las moléculas D-OH-4' y D-OH-3' se observa que, al igual que ocurría con la molécula de genisteína, se pierde afinidad por el receptor estrogénico  $\beta$ , pasando de un valor de  $IC_{50} = 410$  nM a un valor  $IC_{50} = 1891$  nM (Tabla VI).

Los anteriores resultados de afinidad demuestran que un cambio en la posición original (4') del grupo hidroxilo (OH) en el anillo C resulta crítico para la afinidad por el receptor estrogénico  $\beta$ .

**Tabla VI.** Cambio en la posición de un OH en el anillo C

MOLÉCULA	$IC_{50\alpha}$ (nM)	S.D.	$IC_{50\beta}$ (nM)	S.D.	$\alpha/\beta$
<p><b>Genisteína (G-OH-4')</b></p> 	148	3.61	<b>3.8</b>	0.45	38.9
<p><b>G-OH-3'</b></p> 	724	5.1	<b>86.3</b>	0.91	8.4
<p><b>Daidzeína (D-OH-4')</b></p> 	na	-	<b>410</b>	2,63	-
<p><b>D-OH-3'</b></p> 	1997	10.51	<b>1891</b>	8.89	1.1

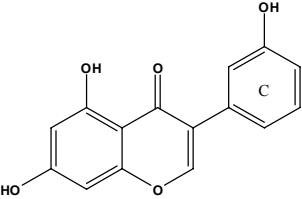
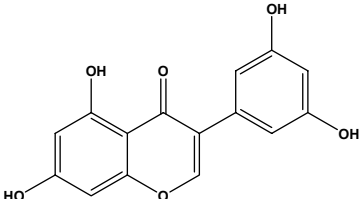
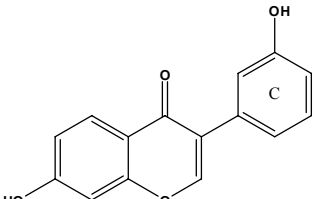
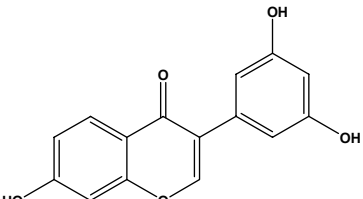
✓ **Adición de un grupo OH en el anillo C**

Al observar las moléculas G-OH-3' y G-OH-3',5' se aprecia que la adición de un segundo grupo OH en el anillo C disminuye la afinidad por el receptor estrogénico  $\beta$  pasando de un valor  $IC_{50} = 86,3$  nM a un valor  $IC_{50} = 4663$  nM (Tabla VII).

En el caso de la D-OH-3' y D-OH-3',5' se llega a los mismos resultados pasando de un valor de  $IC_{50} = 1891$  nM a un valor de  $IC_{50} > 10000$  nM, perdiéndose toda afinidad por el receptor estrogénico  $\beta$  (Tabla VII).

De todo ello podemos concluir que un aumento en el número de grupos OH en anillo C empeora la afinidad por el receptor.

**Tabla VII.** Efecto de la adición de de un OH en el anillo C

MOLÉCULA	$IC_{50\alpha}$ (nM)	S.D.	$IC_{50\beta}$ (nM)	S.D.	$\alpha/\beta$
<p><b>G-OH-3'</b></p> 	724	5.1	<b>86.3</b>	0.91	8.4
<p><b>G-OH-3',5'</b></p> 	13201	41.63	<b>4663</b>	9.12	2.8
<p><b>D-OH-3'</b></p> 	1997	10.51	<b>1891</b>	8.89	1.1
<p><b>D-OH-3',5'</b></p> 	21746	38.67	<b>na</b>	-	-

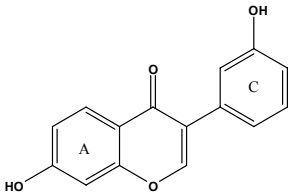
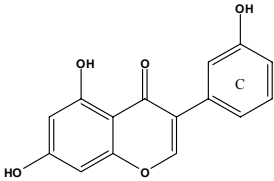
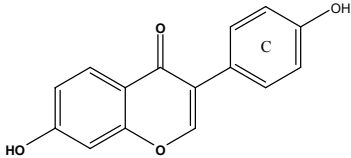
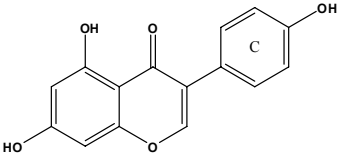
✓ **Adición de un grupo OH en el anillo A**

Al comparar las moléculas D-OH-4' y G-OH-4', donde la única diferencia existente es la presencia de un grupo OH adicional en el anillo A, se comprueba que ese grupo es esencial para tener una buena afinidad por los receptores estrogénicos  $\beta$ , ya que los valores de  $IC_{50}$  experimentan una drástica disminución pasando de valores de  $IC_{50} = 410$  nM a valores  $IC_{50} = 3,8$  nM (Tabla VIII).

Ocurre lo mismo si se comparan las moléculas D-OH-3' y G-OH-3' siendo sus  $IC_{50}$  1891 y 86,3 nM respectivamente (Tabla VIII).

Se puede concluir que las isoflavonas aumentan su afinidad al tener dos grupos OH uno en la posición 5 y otro en la posición 7 en vez de sólo un grupo en posición 7.

**Tabla VIII.** Efecto de la adición de un OH en el anillo A

MOLÉCULA	$IC_{50\alpha}$ (nM)	S.D.	$IC_{50\beta}$ (nM)	S.D.	$\alpha/\beta$
<p><b>D-OH-3'</b></p> 	1997	10.51	<b>1891</b>	8.89	1.1
<p><b>G-OH-3'</b></p> 	724	5.1	<b>86.3</b>	0.91	8.4
<p><b>Daidzeína (D-OH-4')</b></p> 	na	-	<b>410</b>	2,63	-
<p><b>Genisteína (G-OH-4')</b></p> 	148	3.61	<b>3.8</b>	0.45	38.9

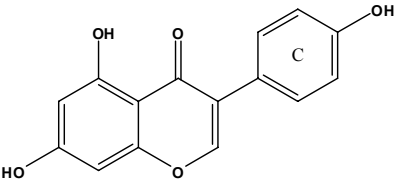
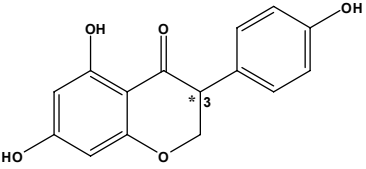
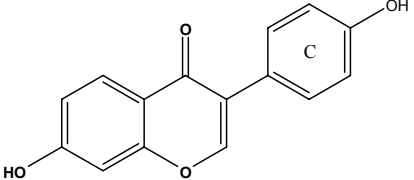
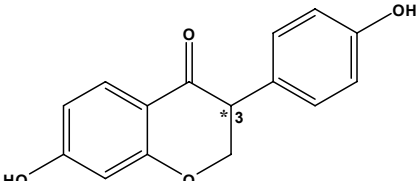


✓ **Efecto de la rigidez de la molécula**

Al hidrogenar parcialmente las moléculas tanto de daidzeína como de genisteína para obtener DHD y DHG, se va a disminuir la rigidez molecular, lo que permitirá la presencia de un mayor número de conformaciones. Si se comparan los valores de las moléculas sin hidrogenar con las parcialmente hidrogenadas se puede observar que en el caso de la daidzeína se produce una pequeña disminución de la afinidad, pasando de valores de  $IC_{50} = 410$  nM a valores  $IC_{50} = 571$  nM. En el caso de la genisteína el cambio de valores es mucho más significativo aumentando el valor de  $IC_{50} = 3,8$  nM a  $IC_{50} = 181$  nM (Tabla IX).

Como conclusión se muestra que la presencia del doble enlace en la molécula y por lo tanto una mayor rigidez conformacional mejora la afinidad.

**Tabla IX.** Efecto de la rigidez de la molécula

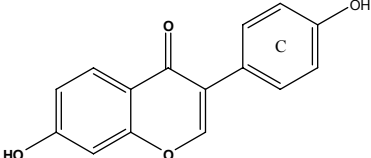
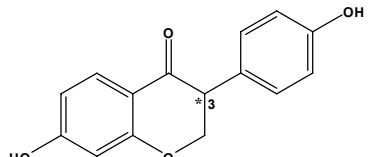
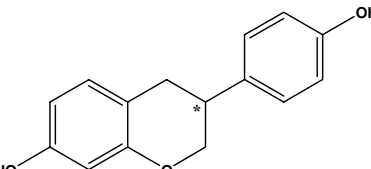
MOLÉCULA	$IC_{50\alpha}$ (nM)	S.D.	$IC_{50\beta}$ (nM)	S.D.	$\alpha/\beta$
<b>Genisteína (G-OH-4')</b>					
	148	3.61	<b>3.8</b>	0.45	38.9
<b>DHG-Racémica</b>					
	1700	15.16	<b>181</b>	3.28	9.4
<b>Daidzeína (D-OH-4')</b>					
	na	-	<b>410</b>	2,63	-
<b>DHD-Racémica</b>					
	1570,5	18.25	<b>571</b>	3.92	2.8

✓ **Hidrogenación total de la molécula**

De la hidrogenación completa de la daidzeína se obtiene el equol. Observando los valores de  $IC_{50}$  se aprecia como se ha mejorado enormemente la afinidad en la molécula totalmente hidrogenada pasando de un valor  $IC_{50} = 410$  nM para la D-OH-4',  $IC_{50} = 571$  nM para la DHD y  $IC_{50} = 64,6$  nM para el equol (Tabla X).

De estos resultados se podría sugerir que en esta familia de moléculas la presencia del grupo carbonilo sin el grupo OH en posición 5 representa un impedimento a la hora de unirse a los receptores estrogénicos.

**Tabla X.** Efecto de la hidrogenación total de la molécula

MOLÉCULA	$IC_{50\alpha}$ (nM)	S.D.	$IC_{50\beta}$ (nM)	S.D.	$\alpha/\beta$
<p><b>Daidzeína (D-OH-4')</b></p> 	Na	-	<b>410</b>	2,63	-
<p><b>DHD-Racémica</b></p> 	1570,5	18.25	<b>571</b>	3.92	2.8
<p><b>Equol</b></p> 	320	2.19	<b>64.6</b>	0.48	5.0

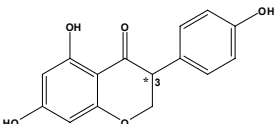
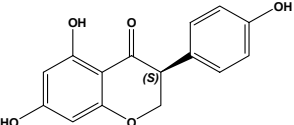
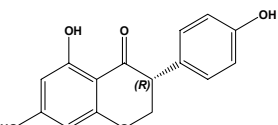
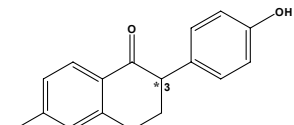
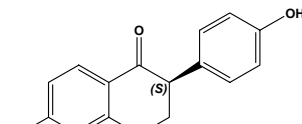
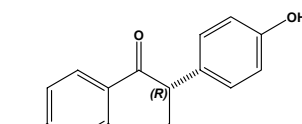
✓ **Efecto de los enantiómeros**

Al resolver la mezcla racémica de la DHG en sus correspondientes enantiómeros se observa que ambos presentan un valor de  $IC_{50}$  muy parecido y próximo al valor de la mezcla racémica (Tabla XI).

Sin embargo, en el caso de la DHD uno de los enantiómeros (*R*) presenta un valor de  $IC_{50}$  casi 3 veces inferior al que presenta el otro enantiómero y una mejor selectividad (Tabla XI).

Como conclusión podemos decir que no se observa pauta en el comportamiento de los enantiómeros frente a las mezclas racémicas.

**Tabla XI.** Efecto de los enantiómeros

MOLÉCULA	$IC_{50\alpha}$ (nM)	S.D.	$IC_{50\beta}$ (nM)	S.D.	$\alpha/\beta$
<b>DHG-Racémica</b> 	1700	15.16	<b>181</b>	3.28	9.4
<b>DHG (S)</b> 	1987	13.48	<b>186</b>	2.15	10.7
<b>DHG (R)</b> 	1805	11.01	<b>194</b>	1.98	9.3
<b>DHD-Racémica</b> 	1570,5	18.25	<b>571</b>	3.92	2.8
<b>DHD (S)</b> 	3976,5	23.09	<b>1667</b>	12.02	2.4
<b>DHD (R)</b> 	2710	11.72	<b>560</b>	4.81	4.8

El estudio de la selectividad (relación de afinidad  $\alpha/\beta$ ) para las moléculas ensayadas cuyos valores de afinidad y selectividad se han mostrado en el apartado anterior, mostró un comportamiento similar al observado para la afinidad, es decir, el compuesto que presenta una elevada afinidad por el receptor  $\beta$  también presenta una buena selectividad por dicho receptor.

Así, como resumen de los resultados de afinidad por los receptores estrogénicos se puede concluir que:

- ✓ El cambio de posición del grupo hidroxilo del anillo C de 4' a 3' resulta crítico para la afinidad por el receptor estrogénico  $\beta$ .
- ✓ Un aumento en el número de grupos hidroxilo en el anillo C empeora la afinidad y selectividad por el receptor estrogénico  $\beta$ .
- ✓ Un aumento en el número de grupos hidroxilo en el anillo A mejora la afinidad y selectividad por el receptor estrogénico  $\beta$ .
- ✓ La presencia de doble enlace en el anillo de piranona y por tanto una mayor rigidez conformacional mejora la afinidad por el receptor estrogénico  $\beta$ .
- ✓ La actividad de enantiómeros y mezclas racémicas no presentan diferencias significativas.

## 6.5. CORRELACIÓN IC<sub>50</sub> RECEPTORES - IC<sub>50</sub> VASORRELAJACIÓN

Uno de los objetivos del presente trabajo es demostrar la implicación de los receptores estrogénicos en la vasorrelajación. A primera vista, se observa la existencia de unas pautas de comportamiento tanto a nivel de actividad vasorrelajante como de receptores estrogénicos:

- ✓ La presencia de un segundo grupo hidroxilo empeora el comportamiento.
- ✓ La genisteína proporciona los mejores resultados.
- ✓ La hidrogenación parcial empeora en todos los casos la actividad.
- ✓ La resolución de enantiómeros solo presenta mejora de comportamiento para la familia de derivados de daidzeína (un OH en posición 4') en sus isómeros *R*.

En vista de estas conclusiones meramente cualitativas se decidió realizar un estudio de correlación entre los valores de afinidad obtenidos como IC<sub>50</sub> tanto para el receptor alfa como para el beta con las medidas de vasorrelajación obtenidas en el baño de órganos. Los resultados se muestran en las tablas XII, XIII, XIV. En ellas se puede ver la correlación de Pearson, Tau-b de Kendall y Spearman, las cuales muestran significatividades con  $p < 0,05$  entre el baño y cada uno de los receptores.

**Tabla XII.** Índices de correlación de Pearson

		IC <sub>50</sub> baño	IC <sub>50</sub> α	IC <sub>50</sub> β
IC <sub>50</sub> baño	Correlación de Pearson	1	0,671(*)	0,671(*)
	Sig. (bilateral)	-	0,034	0,024
	N	11	10	11
IC <sub>50</sub> α	Correlación de Pearson	0,671(*)	1	0,683(*)
	Sig. (bilateral)	0,034	-	0,029
	N	10	10	10
IC <sub>50</sub> β	Correlación de Pearson	0,671(*)	0,683(*)	1
	Sig. (bilateral)	0,024	0,029	-
	N	11	10	11

\* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

**Tabla XIII.** Índices de correlación de Tau-b de Kendall

		<b>IC<sub>50</sub> baño</b>	<b>IC<sub>50</sub>α</b>	<b>IC<sub>50</sub>β</b>
<b>IC<sub>50</sub> baño</b>	Correlación de Tau- b de Kendall	1	0,552(*)	0,673(**)
	Sig. (bilateral)	-	0,029	0,005
	N	11	10	11
<b>IC<sub>50</sub>α</b>	Correlación de Tau- b de Kendall	0,552(*)	1	0,689(**)
	Sig. (bilateral)	0,029	-	0,006
	N	10	10	10
<b>IC<sub>50</sub>β</b>	Correlación de Tau- b de Kendall	0,673(**)	0,689(**)	1
	Sig. (bilateral)	0,005	0,006	-
	N	11	10	11

\* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

**Tabla XIV.** Índices de correlación de Rho de Spearman

		<b>IC<sub>50</sub> baño</b>	<b>IC<sub>50</sub>α</b>	<b>IC<sub>50</sub>β</b>
<b>IC<sub>50</sub> baño</b>	Correlación de Rho de Spearman	1	0,669(*)	0,817(**)
	Sig. (bilateral)	-	0,034	0,002
	N	11	10	11
<b>IC<sub>50</sub>α</b>	Correlación de Rho de Spearman	0,669(*)	1	0,818(**)
	Sig. (bilateral)	0,034	-	0,004
	N	10	10	10
<b>IC<sub>50</sub>β</b>	Correlación de Rho de Spearman	0,817(**)	0,818(**)	1
	Sig. (bilateral)	0,002	0,004	-
	N	11	10	11

\* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

De estos datos se puede concluir que con un 95 % de probabilidad, los receptores estrogénicos están implicados en la vasorrelajación inducida por isoflavonoides. Lo que concuerda con lo observado a nivel cualitativo.





## **7. CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

Además de las conclusiones particulares recogidas en cada capítulo del presente trabajo, a modo de conclusiones generales se puede decir que:

1. Se ha demostrado la utilidad del método de síntesis de isoflavonas con la obtención de diversos derivados que varían la posición de algunos grupos funcionales.
2. La separación de los enantiómeros de la DHG, DHD, DHD-OH-3', DHD-OH-3',5' y equol, las medidas de rotación específica y las medidas de dicroísmo circular, han permitido demostrar que todos los enantiómeros *R* presentan un signo positivo en la rotación específica, así como un efecto Cotton positivo en el rango 325-350 nm.
3. Modificaciones en el número de sustituyentes y posición de los mismos influyen decisivamente en la actividad vasorrelajante de esta familia de compuestos.
4. En la actividad vasorrelajante de los nuevos isoflavonoides se ha demostrado la importancia del estudio de los enantiómeros por separado.
5. Los resultados de afinidad sugieren que un cambio en la posición original (4') del grupo hidroxilo (OH) en el anillo C resulta crítico para la afinidad por el receptor estrogénico  $\beta$ .
6. El estudio estadístico muestra una relación entre la afinidad por los receptores estrogénicos  $\alpha$  y  $\beta$  y la actividad vasorrelajante lo que sugiere que estos receptores están implicados en la vasorrelajación inducida por isoflavonoides.



## **8. BIBLIOGRAFÍA**



**BIBLIOGRAFÍA**

1. Beltrán E. Interés terapéutico de los fitoestrógenos en ginecología. *Rev. Fitoter.* 2003;4:23-40.
2. Heim M, Frank O, Kampmann G, et al. The phytoestrogen genistein enhances osteogenesis and represses adipogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. *Endocrinology.* Feb 2004;145(2):848-859.
3. Miyazaki K, Hanamizu T, Iizuka R, et al. Genistein and daidzein stimulate hyaluronic acid production in transformed human keratinocyte culture and hairless mouse skin. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* May-Jun 2002;15(3):175-183.
4. Alda JO, Mayoral JA, Lou M, et al. Purification and chemical characterization of a potent inhibitor of the Na-K-Cl cotransport system in rat urine. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 16 1996;221(2):279-285.
5. Martínez RM, Giménez I, Lou JM, et al. Soy isoflavonoids exhibit in vitro biological activities of loop diuretics. *Am J Clin Nutr.* Dec 1998;68(6 Suppl):1354S-1357S.
6. Haya J, Camil Castelo-Branco C, Pérez-Medina T. Phytoestrogens: basic knowledge and clinical utility. *Toko-Gin Pract.* 2002;61(6):337-363.
7. Navarro MC. Mecanismo de acción de las isoflavonas. *Ginecología y obstetricia clínica.* 2005;6(3):159-165.
8. Ososki AL, Kennelly EJ. Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytother Res.* Sep 2003;17(8):845-869.
9. Setchell KD, Cassidy A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr.* Mar 1999;129(3):758S-767S.
10. Axelson M, Kirk DN, Farrant RD, et al. The identification of the weak oestrogen equol [7-hydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)chroman] in human urine. *Biochem J.* Feb 1 1982;201(2):353-357.
11. Bannwart C, Adlercreutz H, Wähälä K, et al. Identification of the phytoestrogen 3',7-dihydroxyisoflavan, an isomer of equol, in human urine and cow's milk. *Biomed Environ Mass Spectrom.* 1988;17(1):1-6.
12. Setchell K, Clerici C. S-Equol, a potent ligand for estrogen receptor  $\beta$ , is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *Am J Clin Nutr.* . 2005;81:1072-1079.
13. Setchell KD, Brown NM, Desai PB, et al. Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes. *J Nutr.* Apr 2003;133(4):1027-1035.
14. Chang YC, Nair MG. Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria. *J Nat Prod.* Dec 1995;58(12):1892-1896.

15. Rao JR, Cooper JE. Rhizobia catabolize nod gene-inducing flavonoids via C-ring fission mechanisms. *J Bacteriol.* Sep 1994;176(17):5409-5413.
16. Yasuda T, Kano Y, Saito K, et al. Urinary and biliary metabolites of daidzin and daidzein in rats. *Biol Pharm Bull.* Oct 1994;17(10):1369-1374.
17. Lundh T. Metabolism of estrogenic isoflavones in domestic animals. *Proc Soc Exp Biol Med.* Jan 1995;208(1):33-39.
18. Kelly GE, Nelson C, Waring MA, et al. Metabolites of dietary (soya) isoflavones in human urine. *Clin Chim Acta.* Dec 31 1993;223(1-2):9-22.
19. Adlercreutz H, Hockerstedt K, Bannwart C, et al. Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG). *J Steroid Biochem.* 1987;27(4-6):1135-1144.
20. Joannou GE, Kelly GE, Reeder AY, et al. A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Aug 1995;54(3-4):167-184.
21. Molteni A, Brizio-Molteni L, Persky V. In vitro hormonal effects of soybean isoflavones. *J Nutr.* Mar 1995;125(3 Suppl):751S-756S.
22. Robertson TL, Kato H, Rhoads GG, et al. Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California. Incidence of myocardial infarction and death from coronary heart disease. *Am J Cardiol.* Feb 1977;39(2):239-243.
23. Ogita H, Node K, Kitakaze M. The role of estrogen and estrogen-related drugs in cardiovascular diseases. *Curr Drug Metab.* Dec 2003;4(6):497-504.
24. Rivas M, Garay RP, Escanero JF, et al. Soy milk lowers blood pressure in men and women with mild to moderate essential hypertension. *J Nutr.* Jul 2002;132(7):1900-1902.
25. Hamilton RM, Carroll KK. Plasma cholesterol levels in rabbits fed low fat, low cholesterol diets: effects of dietary proteins, carbohydrates and fibre from different sources. *Atherosclerosis.* Jul-Aug 1976;24(1-2):47-62.
26. Sirtori CR, Agradi E, Conti F, et al. Soybean-protein diet in the treatment of type-II hyperlipoproteinaemia. *Lancet.* Feb 5 1977;1(8006):275-277.
27. Siddiqui MT, Siddiqi M. Hypolipidemic principles of *Cicer arietinum*: biochanin-A and formononetin. *Lipids.* Mar 1976;11(3):243-246.
28. Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med.* Aug 3 1995;333(5):276-282.
29. Baum JA, Teng H, Erdman JW, Jr., et al. Long-term intake of soy protein improves blood lipid profiles and increases mononuclear cell low-density-lipoprotein receptor messenger RNA in hypercholesterolemic, postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* Sep 1998;68(3):545-551.



30. Kirk EA, Sutherland P, Wang SA, et al. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr.* Jun 1998;128(6):954-959.
31. Tikkanen MJ, Wähälä K, Ojala S, et al. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 17 1998;95(6):3106-3110.
32. Kapiotis S, Hermann M, Held I, et al. Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Nov 1997;17(11):2868-2874.
33. Toma C, Jensen PE, Prieto D, et al. Effects of tyrosine kinase inhibitors on the contractility of rat mesenteric resistance arteries. *Br J Pharmacol.* Mar 1995;114(6):1266-1272.
34. Machha A, Anwar-ul H. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci.* 2003;74:603-612.
35. Gimenez I, Martinez RM, Lou M, et al. Salidiuretic action by genistein in the isolated, perfused rat kidney. *Hypertension.* Feb 1998;31(2):706-711.
36. Giménez I. Tesis Doctoral. *Universidad de Zaragoza.* 1997.
37. D'Amico G, Gentile MG, Manna G, et al. Effect of vegetarian soy diet on hyperlipidaemia in nephrotic syndrome. *Lancet.* May 9 1992;339(8802):1131-1134.
38. Ranich T, Bhathena SJ, Velasquez MT. Protective effects of dietary phytoestrogens in chronic renal disease. *J Ren Nutr.* Oct 2001;11(4):183-193.
39. Rivas M. Estudio clínico del efecto de los isoflavonoides en pacientes con hipertensión arterial esencial ligera o moderada. *Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.* 1999.
40. Greendale GA, FitzGerald G, Huang MH, et al. Dietary soy isoflavones and bone mineral density: results from the study of women's health across the nation. *Am J Epidemiol.* Apr 15 2002;155(8):746-754.
41. Occhiuto F, Pasquale RD, Guglielmo G, et al. Effects of phytoestrogenic isoflavones from red clover (*Trifolium pratense* L.) on experimental osteoporosis. *Phytother Res.* Feb 2007;21(2):130-134.
42. Cheng SL, Zhang SF, Nelson TL, et al. Stimulation of human osteoblast differentiation and function by ipriflavone and its metabolites. *Calcif Tissue Int.* Nov 1994;55(5):356-362.
43. Anderson JJ, Ambrose WW, Garner SC. Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized, lactating rat model. *Proc Soc Exp Biol Med.* Mar 1998;217(3):345-350.

44. García-Solis P, Aceves C. Estudio de factores nutricionales asociados a la prevención de cáncer mamario. Importancia de los modelos animales. *ALAN*. 2005;55(3).
45. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*. Apr 25 1987;262(12):5592-5595.
46. Ambra R, Rimbach G, de Pascual Teresa S, et al. Genistein affects the expression of genes involved in blood pressure regulation and angiogenesis in primary human endothelial cells. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. Jan 2006;16(1):35-43.
47. Kruse FE, Jousen AM, Fotsis T, et al. [Inhibition of neovascularization of the eye by dietary factors exemplified by isoflavonoids]. *Ophthalmologe*. Feb 1997;94(2):152-156.
48. Gao YH, Yamaguchi M. Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclasts: involvement of protein kinase inhibition and protein tyrosine phosphatase activation. *Int J Mol Med*. Mar 2000;5(3):261-267.
49. Yamashita Y, Kawada S, Nakano H. Induction of mammalian topoisomerase II dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids, genistein and orobol. *Biochem Pharmacol*. Feb 15 1990;39(4):737-744.
50. Le Bail JC, Champavier Y, Chulia AJ, et al. Effects of phytoestrogens on aromatase, 3beta and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. *Life Sci*. Feb 25 2000;66(14):1281-1291.
51. Pino AM, Valladares LE, Palma MA, et al. Dietary isoflavones affect sex hormone-binding globulin levels in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. Aug 2000;85(8):2797-2800.
52. Cassidy A, Bingham S, Setchell KD. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am J Clin Nutr*. Sep 1994;60(3):333-340.
53. Lu LJ, Anderson KE, Grady JJ, et al. Effects of soya consumption for one month on steroid hormones in premenopausal women: implications for breast cancer risk reduction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. Jan 1996;5(1):63-70.
54. Ribot C, Tremollieres F. Hormone replacement therapy in postmenopausal women: all the treatments are not the same. *Gynecol Obstet Fertil*. May 2007;35(5):388-397.
55. Coon JT, Pittler MH, Ernst E. *Trifolium pratense* isoflavones in the treatment of menopausal hot flashes: a systematic review and meta-analysis. *Phytomedicine*. Feb 2007;14(2-3):153-159.
56. Nicholls J, Lasley BL, Nakajima ST, et al. Effects of soy consumption on gonadotropin secretion and acute pituitary responses to gonadotropin-releasing hormone in women. *J Nutr*. Apr 2002;132(4):708-714.

57. Morton MS, Chan PS, Cheng C, et al. Lignans and isoflavonoids in plasma and prostatic fluid in men: samples from Portugal, Hong Kong, and the United Kingdom. *Prostate*. Jul 1 1997;32(2):122-128.
58. Gavaler JS, Rosenblum ER, Deal SR, et al. The phytoestrogen congeners of alcoholic beverages: current status. *Proc Soc Exp Biol Med*. Jan 1995;208(1):98-102.
59. Santti R, Makela S, Strauss L, et al. Phytoestrogens: potential endocrine disruptors in males. *Toxicol Ind Health*. Jan-Apr 1998;14(1-2):223-237.
60. Irvine CHG, Fitzpatrick MG, Alexander SL. Phytoestrogens in soy-based infant foods: Concentrations, daily intake, and possible biological effects *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1998;217(3):247-253.
61. Warburton WK. The isoflavones. *Quart. Revs*. 1954;18(1):77-87.
62. King F, Neill K. The chemistry of extractives from hardwoods .10. The constitution of ferreirin and of homoferreirin *J. Chem. Soc*. 1952;Dec:4752-4756.
63. Marrian GF, Haslewood GA. Equol, a new inactive phenol isolated from the ketohydroxyoestrin fraction of mares' urine. *Biochem J*. 1932;26(4):1227-1232.
64. Marrian GF, Beall D. The constitution of equol. *Biochem J*. Jul 1935;29(7):1586-1589.
65. Anderson E, Marrian G. The identification of equol as 7-hydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl) chroman and the synthesis of racemic equol methyl ether. *J. Biol. Chem*. 1938;9:649-656.
66. Lévai A. Synthesis of isoflavones. *J. Heterocyclic Chem*. 2004;41:449-459.
67. Prakash O, Pahuja S, Goyal S. 1,2-aryl shift in the hypervalent iodine oxidation of flavanones - a new useful synthesis of isoflavones. *Synlett*. 1990;6:337-338.
68. Prakash O, Tanwar MP. Hypervalent iodine oxidation of flavanones - convenient and useful syntheses of flavones and isoflavones. *J. Chem. Research*. 1995;6:213.
69. Yokoe I, Sugita Y, Shirataki Y. Facile synthesis of isoflavones by the cross-coupling reaction of 3-iodochomone with arylboronic acids. *Chem. Pharm. Bull*. 1989;37(2):529-530.
70. Thomsen I, Torssell KBG. Use of nitrile oxides in synthesis - a novel synthesis of chalcones, flavanones, flavones and isoflavones. *Acta Chem. Scand*. 1988;42(5):303-308.
71. Bass RJ. Synthesis of chromones by cyclization of 2-hydroxyphenyl ketones with boron trifluoride diethyl ether and methanesulfonyl chloride. *J. Chem.Soc. Chem. Commun*. 1976;2:78-79.

72. Wähälä K, Hase TA. Expedient synthesis of polyhydroxyisoflavones. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1991;1(12):3005-3008.
73. Wessely F, Prillinger F. On the constitution of equol. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1939;72:629-633.
74. Lamberton J, Soares H, Watson K. Catalytic hydrogenation of isoflavones. The preparation of (±)-equol and related isoflavans. *Aust. J. Chem.* 1978;31:455-457.
75. Muthyala R, Ju Y, Sheng S, et al. Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. *Bioorg. Med. Chem.* 2004;12:1559-1567.
76. Matthies A, Clavel T, Haller D. Conversion of daidzein and genistein by an anaerobic bacterium newly isolated from mouse intestine. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(15):4847-4852.
77. Visser FR, Lane GA. Selectivity of the Hydrogenation of 2',4',7-Tribenzyloxyisoflavone. *Aut. J. Chem.* 1987;40:1705-1711.
78. Wähälä K, T. A. Hase TA. Hydrogen Transfer Reduction of Isoflavones. *Heterocycles.* 1989;28(1):183-186.
79. Wähälä K, Koskimies JK, Mesilaakso M, et al. The synthesis, structure, and anticancer activity of cis- and trans-4',7-dihydroxyisoflavan-4-ols. *J. Org. Chem.* 1997;62(22):7690-7693.
80. Versteeg M, Bezuidenhout B, Ferreira D. The first enantioselective synthesis of isoflavonoids, (R)-isoflavans and (S)-isoflavans. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1995;13:1317-1318.
81. Evans DA, Britton TC, Ellman JA. Contrasteric carboximide hydrolysis with lithium hydroperoxide. *Tetrahedron Letters.* 1987;28(49):6141-6144.
82. Shih TL, Wyvratt MJ, Mroziak H. Total synthesis of (+/-)-5-o-methyllicoricidin. *J. Org. Chem.* 1987;52(10):2029-2033.
83. Xiu-Ling W, Hor-Gil H, Je Hyeon L, et al. Enantioselective synthesis of S-equol from dihydrodaidzein by a newly isolated anaerobic human intestinal bacterium. *Appl. environ. microbiol.* 2005;71(1):214-219.
84. Takashima Y, Kobayashi Y. New synthesis route to S-(-) equol through allylic substitution. *Tetrahedron Lett.* 2008;49(35):5150-5158.
85. Williams K, Lee E. Importance of drug enantiomers in clinical pharmacology. *Drugs.* Oct 1985;30(4):333-354.
86. Allemark S. Chromatography Enantioseparations: Methods and Applications. 2<sup>a</sup> ed. *Prentiu Hall, N.Y.* 1991.

87. Berthod A, Nair U, Bagwill C, et al. Derivatized vancomycin stationary phases for LC chiral separations *Talanta*. 1996;43 (10):1767-1782
88. Oliveros L, López P, Minguillón CF, P. Chiral chromatographic discrimination ability of a cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate/10-undecenoate mixed derivative fixed on several chromatographic matrices. *Journal of liquid chromatography*. 1995;18 (8):1521-1532.
89. Franco P, Senso A, Minguillon C, et al. 3,5-dimethylphenylcarbamates of amylose, chitosan and cellulose bonded on silica gel - Comparison of their chiral recognition abilities as high-performance liquid chromatography chiral stationary phases *Journal of chromatography*. 1998;796(2):265-272.
90. Wang X, Shin HK, Hur H, et al. Enhanced biosynthesis of dihydrodaidzein and dihydrogenistein by a newly isolated bovine rumen anaerobic bacterium. *Journal of Biotechnology*. 2005;115:261-269.
91. Verbit J, Clark-Lewis JW. Optically active aromatic chromophores—VIII : Studies in the isoflavonoid and rotenoid series *Tetrahedron*. 1968;24(16):5519-5527.
92. Kurosawa K, Ollis WD, Redman BT, et al. Absolute configurations of isoflavans *Phytochemistry*. 1978;17(8):1423-1426.
93. Maurice A, Peter J. Phytochemical examination of *Pericopsis* species. *J. Chem. Soc. Perkin Trans*. 1976;1:186-191.
94. Martínez R. Tesis Doctoral "Aislamiento e identificación de factores inhibidores del cotransporte Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>". *Universidad de Zaragoza*. 1997.
95. Lévai A. Utilization of the chiroptical spectroscopies for the structure elucidation of flavonoids and related benzopyran derivatives. *Acta Chim. Slov*. 1998;45(3):267-284.
96. Buckingham J. Dictionary of natural products. *Chapman and Hall*. 1994, 1st ed.
97. Guyton&Hall. Tratado de Fisiología Médica. *Elsevier Saunders*. 2006.
98. Woodrum DA, Brophy CM. The paradox of smooth muscle physiology. *Mol Cell Endocrinol*. May 25 2001;177(1-2):135-143.
99. Bolton TB, Prestwich SA, Zholos AV, et al. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. *Annu Rev Physiol*. 1999;61:85-115.
100. Horowitz A, Menice CB, Laporte R, et al. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev*. Oct 1996;76(4):967-1003.
101. Alcón S. Vías de acoplamiento estímulo-contracción en la vesícula biliar. *Tesis Doctoral*. Cáceres, *Universidad de Extremadura*. 2000.
102. Horiuchi KY, Samuel M, Chacko S. Mechanism of the inhibition of acto-heavy meromyosin ATPase by the actin/calmodulin binding domain of caldesmon. *Biochemistry*. 1991;30:712-717.

103. Stafford WF, Mabuchi K, Takahashi K, et al. Physical characterization of calponin. *J Biol Chem.* 1995;270:10576-10579.
104. Perpiñá M, Lloris A. Los broncodilatadores, esos fármacos maravillosos. *Arch Bronconeumol.* 2004;40(1):16-22.
105. Thorneloe K, Nelson M. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. *Can J Physiol Pharmacol.* 2005;83(3):215-242.
106. Wuytack F, Raeymaekers L. The Ca(2+)-transport ATPases from the plasma membrane. *J Bioenerg Biomembr.* Jun 1992;24(3):285-300.
107. Jackson EK, Andresen BT, Seasholtz TM, et al. Enhanced activation of RhoA by angiotensin II in SHR preglomerular microvascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* Apr 2005;45(4):283-285.
108. Schlossmann J, Feil R, Hofmann F. Signaling through NO and cGMP-dependent kinases. *Annals of Medicine.* 2003;35:21-27.
109. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ.* Dec 2003;27(1-4):201-206.
110. Sanders KM. Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J Appl Physiol.* Sep 2001;91(3):1438-1449.
111. Valero M. Estudio de los mecanismos intracelulares de la vasorelajación del músculo liso de aorta de rata. *Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.* 2008.
112. Valero M, Garay R, Gros P, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) chloride channel and Na-K-Cl cotransporter NKCC1 isoform mediate the vasorelaxant action of genistein in isolated rat aorta. *European Journal of Pharmacology* 2006;544:126-131.
113. Bahamonde MI. Estudio funcional y molecular del canal maxi-Cl<sup>-</sup> activado por antiestrógenos. *Tesis Doctoral. Barcelona, Universitat Pompeu Fabra.* 2003.
114. Miller C, Collinia M, Harrisb H. Constrained phytoestrogens and analogues as ER beta selective ligands. *Bio. Med. Chem.* 2003;13:2399-2403.
115. Goodman, Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. *McGraw-Hill.* 2006.
116. Terán J, Teppa A. Actualidad en el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 2003;63:135-148.
117. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.* Jun 10 1999;340(23):1801-1811.
118. Tripanichkul W, Sripanichkulchai K. 17beta-estradiol reduces nitrotyrosine immunoreactivity and increases SOD1 and SOD2 immunoreactivity in nigral neurons in male mice following MPTP insult. *Brain Research.* 2007;1164:24-31.

119. Siesky B, Harris A, Patel C, et al. Comparison of visual function and ocular hemodynamics between pre and post-menopausal women. *Eur J Ophthalmol.* 2008;18:320-323.
120. Brincat M. Estrogens and the skin. *Climacteric.* 2005;8:110-123.
121. Karpuzoglu E, Ahmed S. Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: implications for immunity, autoimmune diseases and apoptosis. *Nitric Oxide.* 2006;15:177-186.
122. Orshal J, Khalil R. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286(2):R233-249.
123. Crews JK, Khalil RA. Antagonistic effects of 17 beta-estradiol, progesterone, and testosterone on Ca<sup>2+</sup> entry mechanisms of coronary vasoconstriction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Apr 1999;19(4):1034-1040.
124. Musey PI, Adlercreutz H, Gould KG, et al. Effect of diet on lignans and isoflavonoid phytoestrogens in chimpanzees. *Life Sci.* 1995;57(7):655-664.
125. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol.* Jan 15 2000;522 Pt 2:177-185.
126. Freay AD, Curtis SW, Korach KS, et al. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by estrogen in depolarized rat and mouse aorta. Role of nuclear estrogen receptor and Ca<sup>2+</sup> uptake. *Circ Res.* Aug 1997;81(2):242-248.
127. Parker MG, Arbuckle N, Dauvois S, et al. Structure and function of the estrogen receptor. *Ann N Y Acad Sci.* Jun 11 1993;684:119-126.
128. Jensen E, Jacobson H. Basic guides to the mechanism of estrogen actions. *Recent Prog Horm Res.* 1962;18:387-414.
129. Toft D, Gorski J. A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1966;55:1574-1581.
130. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 11 1996;93(12):5925-5930.
131. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* Aug 19 1996;392(1):49-53.
132. Hanstein B, Djahansouzi S, Dall P, et al. Insights into the molecular biology of the estrogen receptor define novel therapeutic targets for breast cancer. *Eur J Endocrinol.* Mar 2004;150(3):243-255.
133. Tora L, White J, Brou C, et al. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell.* Nov 3 1989;59(3):477-487.

134. Cowley SM, Parker MG. A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Apr-Jun 1999;69(1-6):165-175.
135. Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem.* Oct 5 2001;276(40):36869-36872.
136. Manas E, Xu Z, Unwalla R, et al. Understanding the Selectivity of Genistein for Human Estrogen Receptor- $\beta$  Using X-Ray Crystallography and Computational Methods. *Structure.* 2004;12:2197-2207.
137. Meegan MJ, Lloyd DG. Advances in the science of estrogen receptor modulation. *Curr Med Chem.* Feb 2003;10(3):181-210.
138. Mewshaw R, Edsall R, Yang C. ER $\beta$  Ligands. 3. Exploiting Two Binding Orientations of the 2-Phenyl-naphthalene Scaffold To Achieve ER $\beta$  Selectivity. *J Med Chem.* 2005;48:3953-3979.
139. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, et al. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev.* Dec 2000;52(4):513-556.
140. Marquez D, Pietras R. Membrane-associated binding sites for estrogen contribute to growth regulation of human breast cancer cells. *Oncogene.* 2001;20:5420-5430.
141. Kuiper GG, Shughrue PJ, Merchenthaler I, et al. The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol.* Oct 1998;19(4):253-286.
142. MacDonell D. Mechanism of action of estrogens. *Wyeth-Ayerst International Inc. The New Science of HRT Meeting.* 1998:6-9.
143. Salom JB, Burguete MC, Perez-Asensio FJ, et al. Relaxant effects of 17-beta-estradiol in cerebral arteries through Ca(2+) entry inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab.* Apr 2001;21(4):422-429.
144. Szego C, Davids J. Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1967;58:1711-1718.
145. Pietras R, Szego C. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells *Nature* 1977;265(5589):69-72.
146. Nadal A, Ropero AB, Laribi O, et al. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 10 2000;97(21):11603-11608.
147. Berthois Y, Pourreau-Schneider N, Gandilhon P, et al. Estradiol membrane binding sites on human breast cancer cell lines. Use of a fluorescent estradiol conjugate to demonstrate plasma membrane binding systems. *J Steroid Biochem.* Dec 1986;25(6):963-972.



148. Watson CS, Gametchu B. Membrane-initiated steroid actions and the proteins that mediate them. *Proc Soc Exp Biol Med*. Jan 1999;220(1):9-19.
149. Kelly MJ, Levin ER. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab*. May-Jun 2001;12(4):152-156.
150. Pietras R, Szego C. Specific internalization of estrogen and binding to nuclear matrix in isolated uterine cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;123(1):84-91.
151. Stefano G, Prevot V, Beauvillain J. Cell-surface estrogen receptors mediate calcium-dependent nitric oxide release in human endothelia. *Circulation*. 2000;101(13):1594-1597.
152. Endoh H, Sasaki H, Maruyama K, et al. Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. Jun 9 1997;235(1):99-102.
153. Simpkins JW, Rajakumar G, Zhang YQ, et al. Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat. *J Neurosurg*. Nov 1997;87(5):724-730.
154. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. Oct 1998;139(10):4252-4263.
155. Adlercreutz H. Evolution, nutrition, intestinal microflora, and prevention of cancer: a hypothesis. *Proc Soc Exp Biol Med*. Mar 1998;217(3):241-246.
156. Edsall R, Harris H, Manasa E, et al. ER $\beta$  Ligands. Part 1: The Discovery of ER $\beta$  Selective Ligands which Embrace the 4-Hydroxy-biphenyl Template. *Bio Med Chem*. 2003;11:3457-3474.
157. Yang C, Edsall R, Harris H. ER $\beta$  Ligands. Part 2: Synthesis and structure-activity relationships of a series of 4-hydroxy-biphenyl-carbaldehyde oxime derivatives. *Bio Med Chem* 2004;12:2553-2570.
158. Sun W, Cama L, Birzin E, et al. 6H-Benzo[c]chromen-6-one derivatives as selective ER $\beta$  agonists. *Bio Med Chem Lett*. 2006;16:1468-1472.
159. Blizzard T, Gude C, Morgan J. Androstenediol analogs as ER beta selective. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16:834-838.
160. Morito K, Hirose T, Kinjo J, et al. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol Pharm Bull*. Apr 2001;24(4):351-356.
161. Morito K, Aomori T, Hirose T, et al. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (II). *Biol Pharm Bull*. Jan 2002;25(1):48-52.
162. Kinjo J, Tsuchihashi R, Morito K, et al. Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine. *Biol Pharm Bull*. Feb 2004;27(2):185-188.

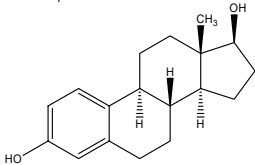
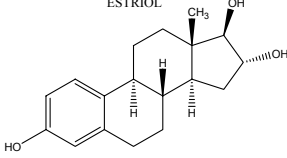
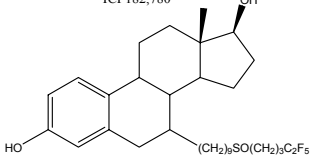
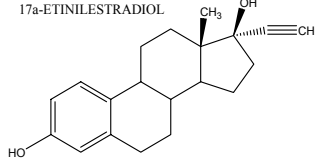
163. Foth D, Cline JM, Romer T. Effect of isoflavones on mammary gland and endometrium of postmenopausal macaques (*Macaca fascicularis*). *Zentralbl Gynakol.* 2000;122(2):96-102.
164. Setchell KD. Soy isoflavones--benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs). *J Am Coll Nutr.* Oct 2001;20(5 Suppl):354S-362S; discussion 381S-383S.
165. Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature.* Oct 16 1997;389(6652):753-758.
166. Harris H, Bapat A, Gonder D, et al. The ligand binding profiles of estrogen receptors alpha and beta are species dependent. *Steroids.* 2002;67:379-384.
167. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* Mar 1997;138(3):863-870.

## **9. ANEXO I**



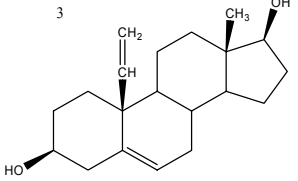
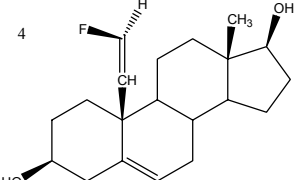
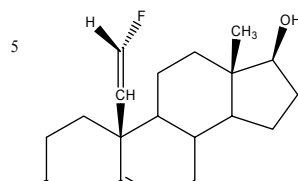
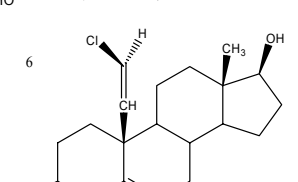
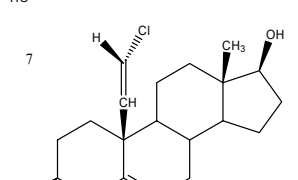
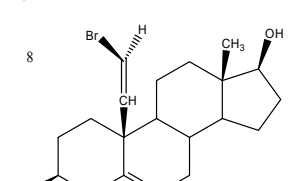
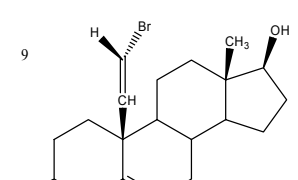
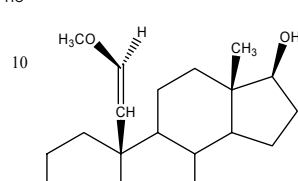
Tal y como se anunciaba en el apartado 6.2.3., en este anexo se recoge la revisión bibliográfica realizada para esta tesis de las sustancias que presentan actividad estrogénica y los datos de su afinidad por los receptores estrogénicos  $\alpha$  y  $\beta$ . Sus valores vienen expresados en  $IC_{50}$  (concentración a la que se ocupan el 50% de los receptores en nM).

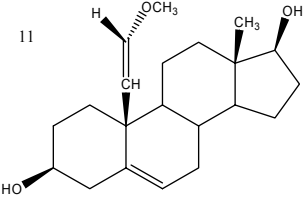
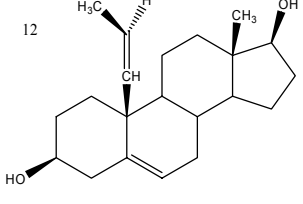
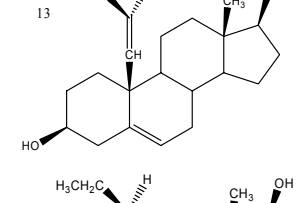
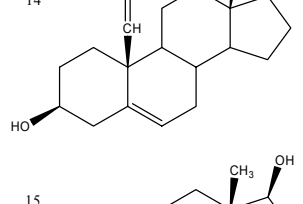
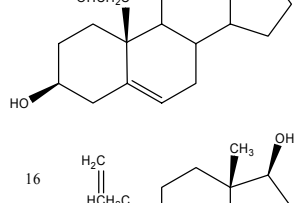
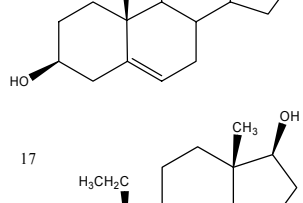
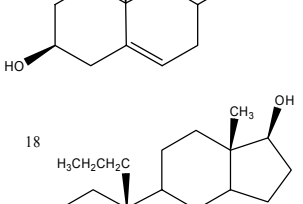
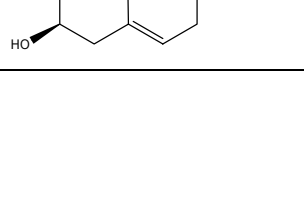
## Anexo I

	Molécula	ER $\beta$ $IC_{50}$ (nM)	ER $\alpha$ $IC_{50}$ (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>ESTEROIDES<sup>114166167,</sup></b>	17 $\beta$ -ESTRADIOL 	3,6	3,2	0,8889	10.856	155,5
	ESTRIOL 	16,8	49,1	2,9226	10.856	155,4
	ICI 182,780 	5,8	6,4	1,1034	-	-
	17a-ETINILESTRADIOL 	9,65	2,34	0,2425	10.782	154,3

<sup>166</sup> Harris H, Bapat A, Gonder D, et al. *Steroids*. **2002**;67:379-384.

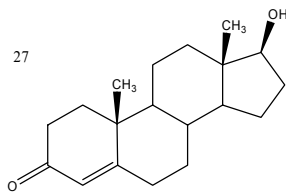
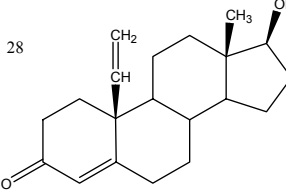
<sup>167</sup> Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, et al. *Endocrinology*. Mar **1997**;138(3):863-870.

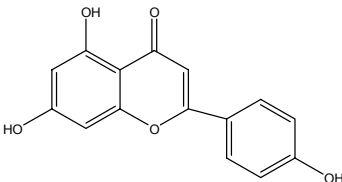
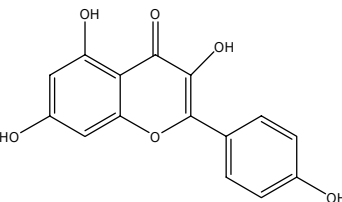
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
ANÁLOGO ESTEROIDES <sup>159, 166</sup>		11	2236	203,27	9,332	138
		25	4280	171,2	9,303	134,9
		22	4165	189,32	9,305	135,1
		83	6690	80,602	9,137	149,1
		122	5600	45,902	9,434	151,5
		212	10000	47,17	9,291	134,1
		210	3984	18,971	9,431	151,7
		303	3349	11,053	9,29	134,5

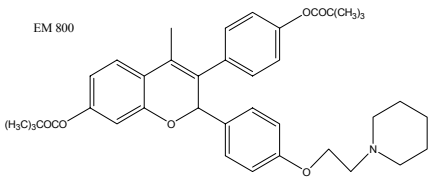
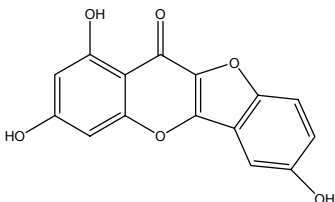
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
ANÁLOGO ESTEROIDES		1299	10000	7,6982	9,322	135,7
		16	1956	122,25	9,318	135,2
		96	1164	12,125	9,157	154,5
		361	3042	8,4266	9,314	135,2
		1619	10000	6,1767	9,256	134,1
		128	1738	13,578	9,231	133
		16	2329	145,56	9,185	131,5
		132	5155	39,053	9,15	130,4

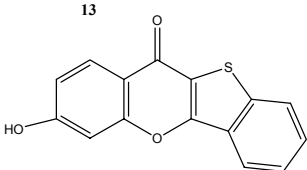
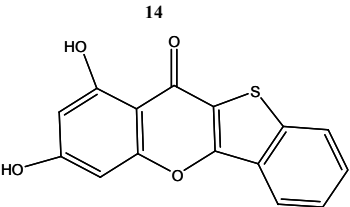
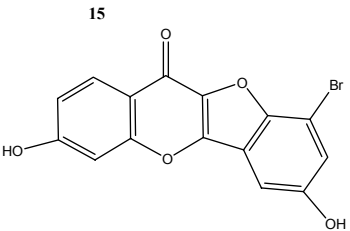
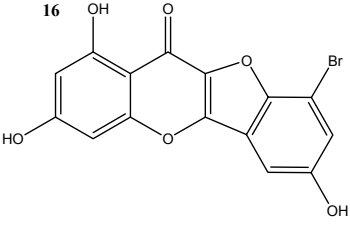
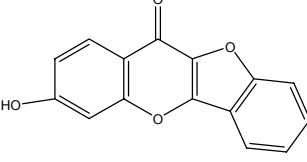
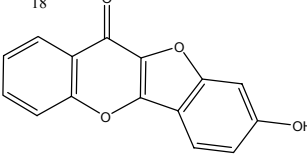
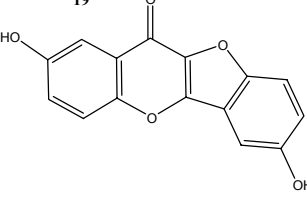
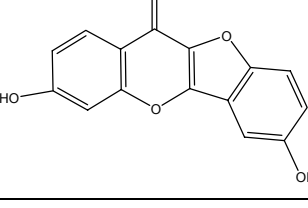
Molécula		ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
ANÁLOGO ESTEROIDES		17	425	25	9,345	136,4
		381	8419	22,097	9,348	136,4
		286	4643	16,234	9,213	132,6
		10	210	21	9,273	134,7
		1754	6324	3,6055	9,369	145,3
		230	10000	43,478	9,424	139,2
		25	1053	42,12	9,907	149,1
		14	147	10,5	9,699	147,5

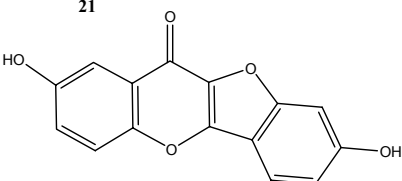
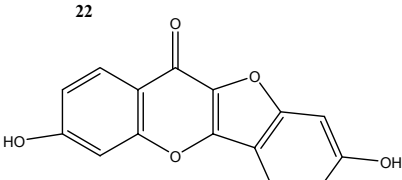
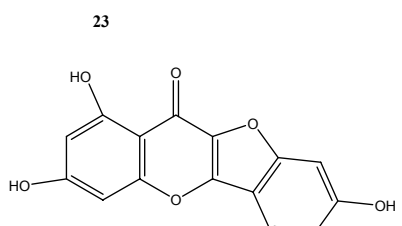
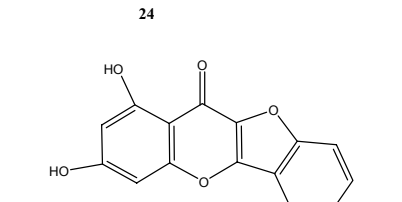
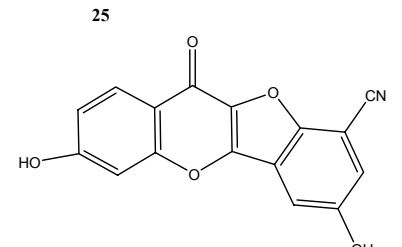
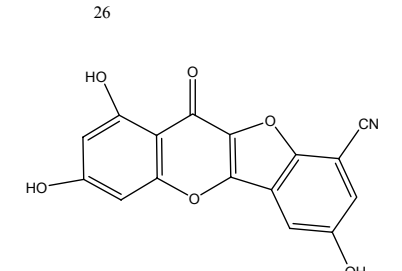


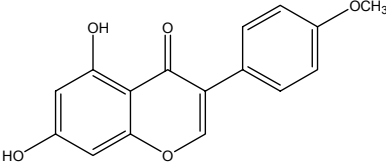
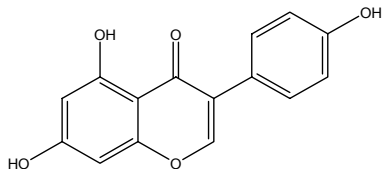
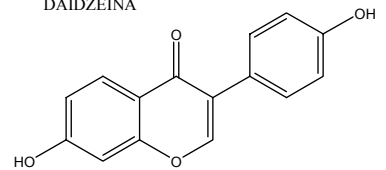
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>ANÁLOGO ESTEROIDES</b>	<p>27</p> 	10000	10000	1	-	-
	<p>28</p> 	782	10000	12,788	-	-

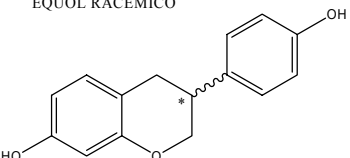
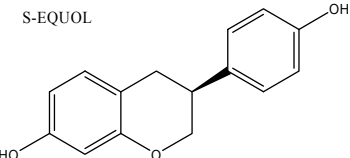
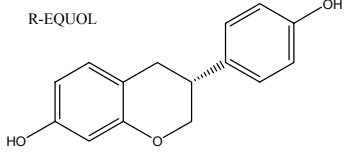
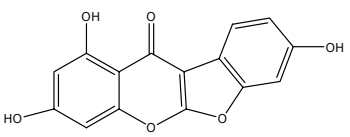
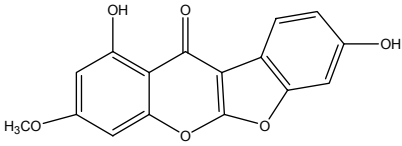
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>FLAVONAS<sup>114, 166</sup></b>	<p>APIGENINA</p> 	130	1253	9,6385	10.547	100,3
	<p>KAEMPFEROL</p> 	106	2800	26,415	10.723	102,7

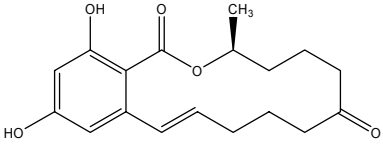
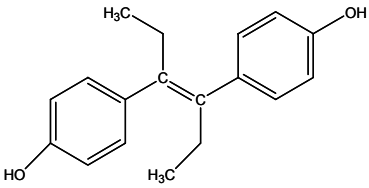
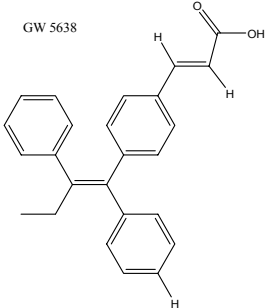
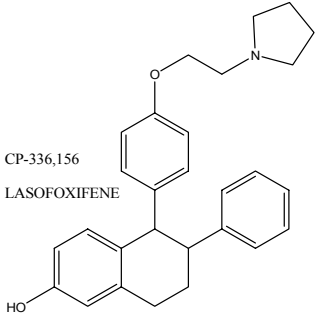
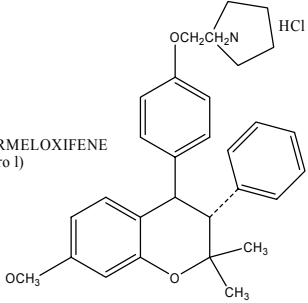
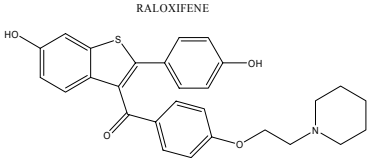
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>DERIVADOS DE FLAVONAS<sup>114, 166</sup></b>	<p>EM 800</p> 	521	2966	5,6929	-	-
	<p>6</p> 	42	2951	70,262	10,085	101,3

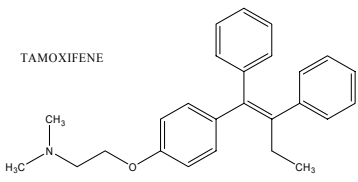
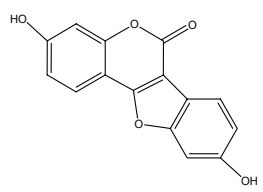
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
DERIVADOS DE FLAVONAS	13 	2933	6000	2,0457	-	-
	14 	762	3672	4,8189	-	-
	15 	1740	6000	3,4483	10,093	101,5
	16 	343	1260	3,6735	10,107	101,4
	17 	6000	6000	1	-	-
	18 	6000	6000	1	-	-
	19 	44	182	4,1364	11,098	129,3
	20 	847	6000	7,0838	10,113	101,8

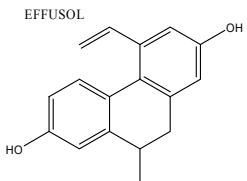
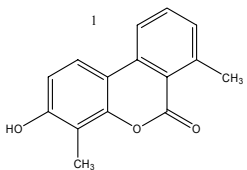
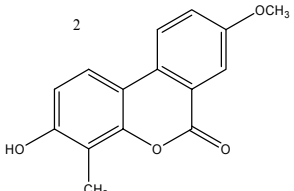
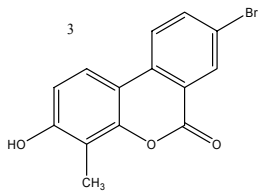
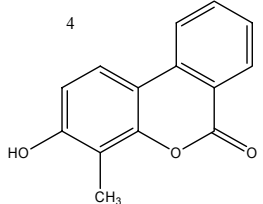
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>DERIVADOS DE FLAVONAS</b>	21 	192	1500	7,8125	11,799	151,8
	22 	32	555	17,344	11,421	124,4
	23 	4,4	68	15,455	11,406	123,9
	24 	3200	6000	1,875	-	-
	25 	6000	6000	1	-	-
	26 	1340	1550	1,1567	10,066	101

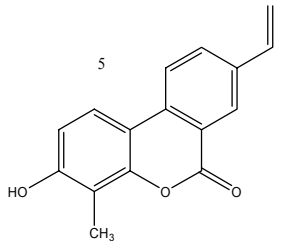
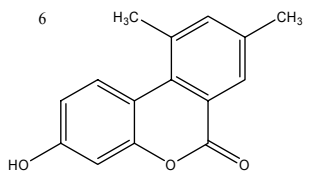
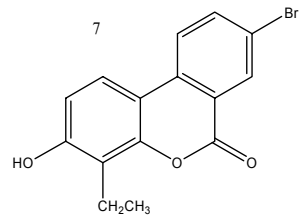
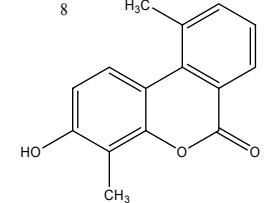
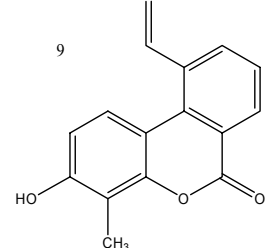
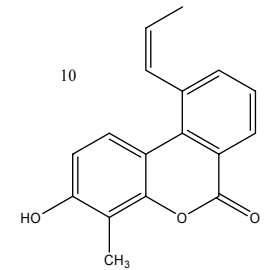
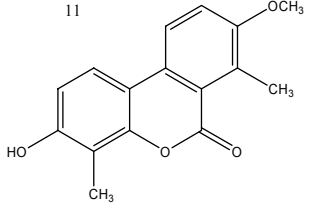
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
ISOFLAVONAS <sup>114, 166</sup>	BIOCHANIN A 	3100	-	-	-	-
	GENISTEINA 	10	395	39,5	12.017	162,6
	DAIDZEINA 	410	-	-	11.935	163.935

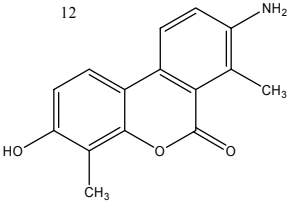
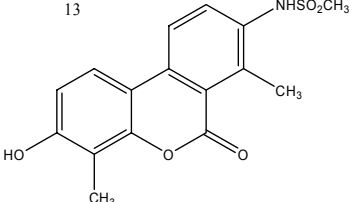
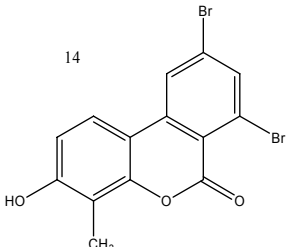
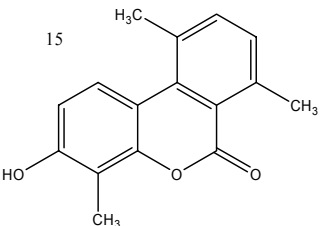
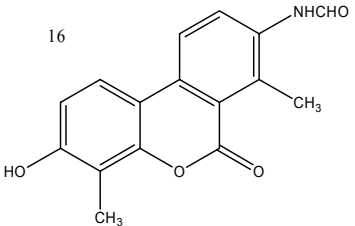
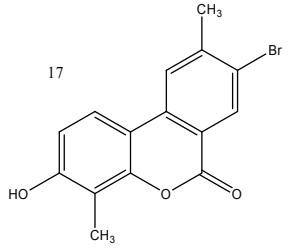
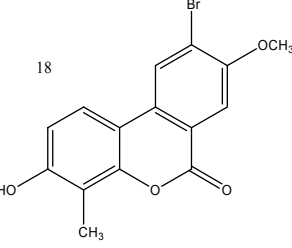
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
DERIVADOS DE ISOFLAVONAS <sup>114</sup>	EQUOL RACÉMICO 	-	-	-	11.940	164,3
	S-EQUOL 	-	-	-	9.727	107,5
	R-EQUOL 	-	-	-	9.727	107,5
	LUPINALBIN A 	1,7	28	16,471	11,75	139,8
	12 	127	2728	21,48	-	-

		ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
OTRAS ESTRUCTURAS	ZEARALENONE 	48,5	96,9	1,9979	-	-
	DES 	1,07	1,4	1,3084	12.063	170,2
	GW 5638 	20,4	46,1	2,2598	-	-
	CP-336,156 LASOFOXIFENE 	12,4	19,4	1,5645	-	-
	LEVORMELOXIFENE (Isómero I) 	125	128	1,024	-	-
	RALOXIFENE 	44	7,9	0,1795	11.674	163,3

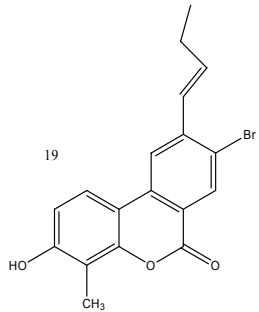
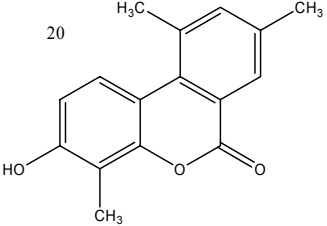
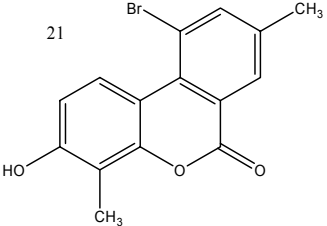
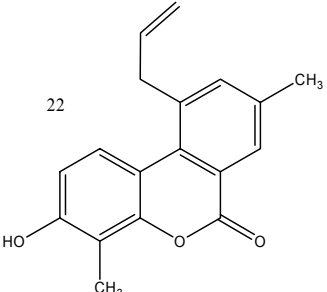
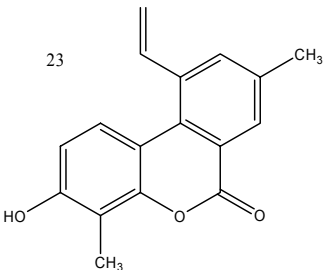
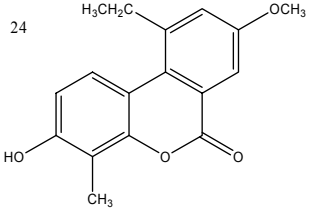
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
OTRAS ESTRUCTURAS <sup>166</sup>	<p>TAMOXIFENE</p> 	206	197	0,9563	-	-
	<p>COUMESTROL</p> 	2,52	18,6	7,381	11.334	168,3

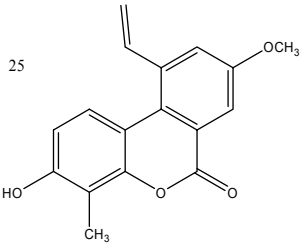
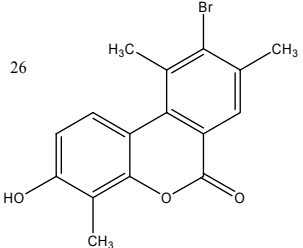
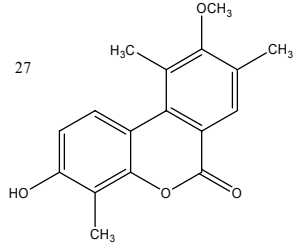
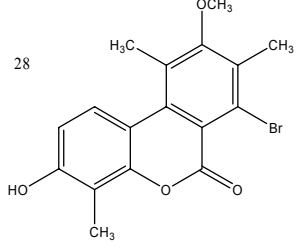
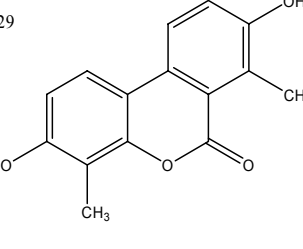
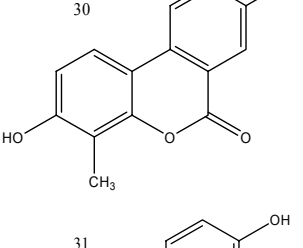
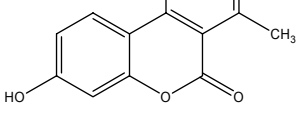
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
6H-BENZO(c)CHROMEN-6-ONE DERIVATIVES <sup>158</sup>	<p>EFFUSOL</p> 	12	240	20	9.907	174,1
	<p>1</p> 	93	10000	107,53	-	-
	<p>2</p> 	308	10000	32,468	-	-
	<p>3</p> 	128	10000	78,125	-	-
	<p>4</p> 	1450	10000	6,8966	-	-

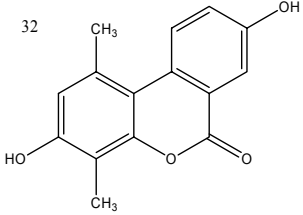
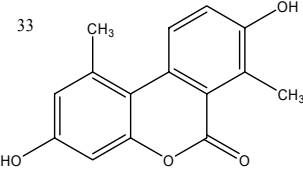
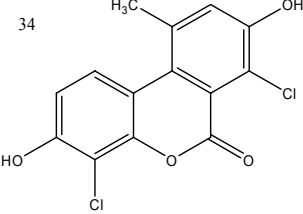
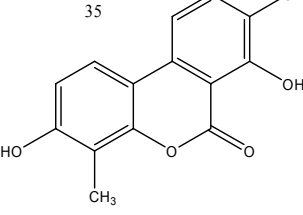
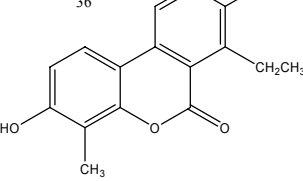
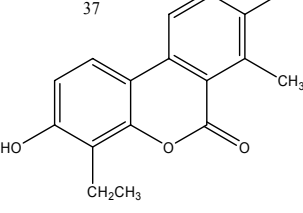
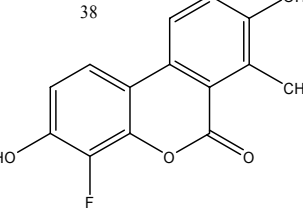
6H-BENZO(c)CHROMEN-6-ONE DERIVATIVES	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	$\alpha/\beta$	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
		310	4590	14,806	-	-
	90	585	6,5	-	-	
	2340	5460	2,3333	-	-	
	326	10000	30,675	-	-	
	208	10000	48,077	-	-	
	116	3030	26,121	-	-	
	117	1000	8,547	-	-	

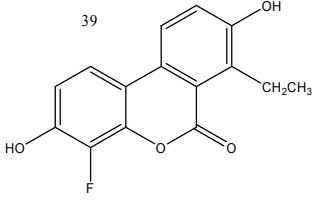
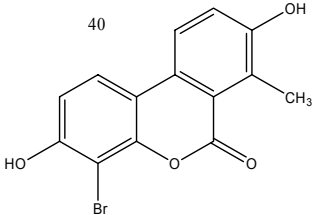
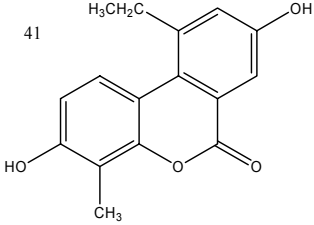
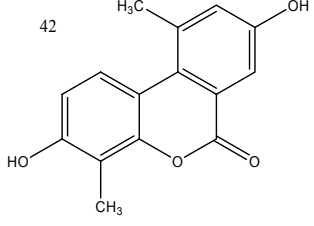
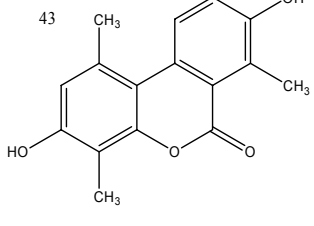
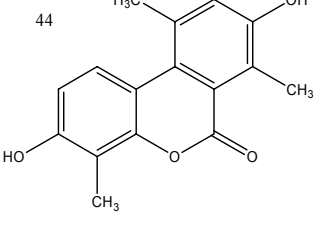
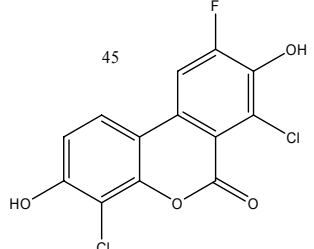
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	$\alpha/\beta$	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>6H-BENZO(c)CHROMEN-6-ONE DERIVATIVES</b>		279	14300	51,254	-	-
		433	4258	9,8337	-	-
		24	597	24,875	-	-
		80	3074	38,425	-	-
		957	10000	10,449	-	-
		215	6850	31,86	-	-
		77	10000	129,87	-	-

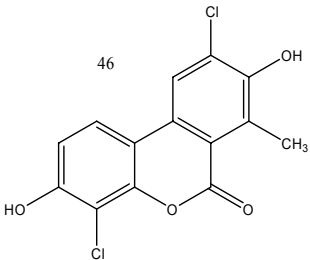
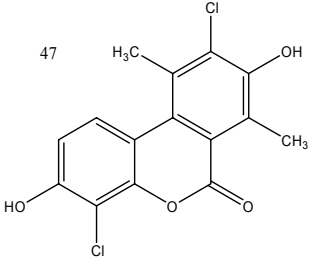
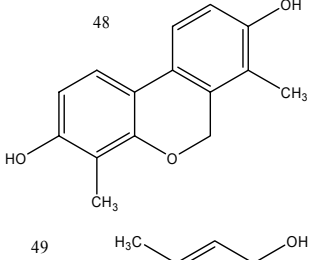
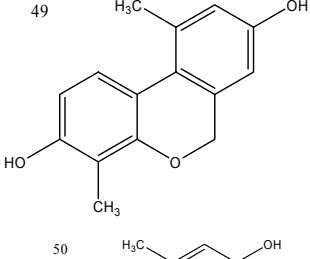
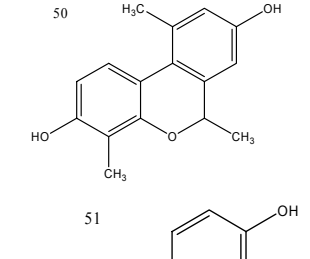
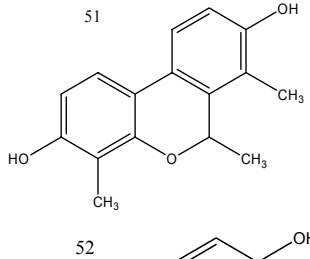
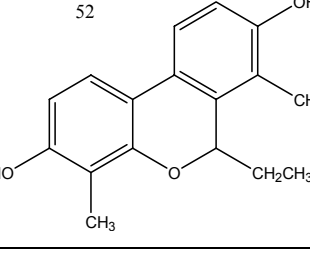


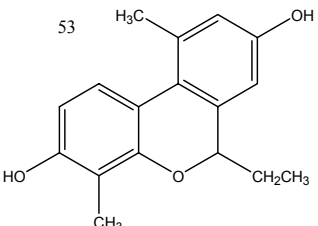
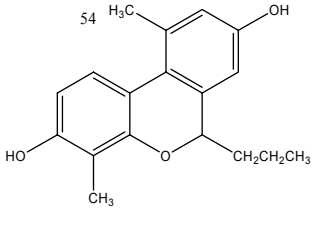
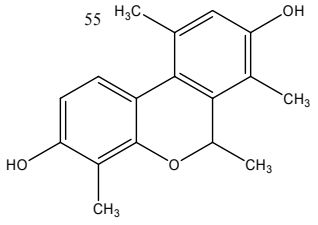
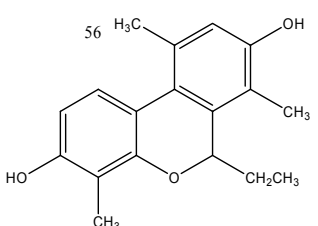
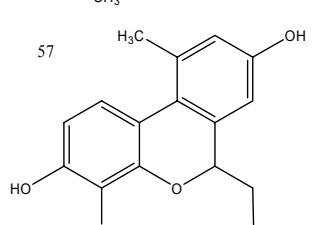
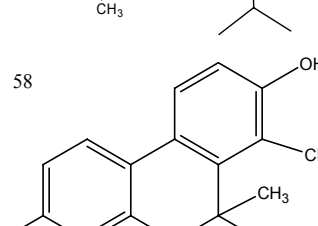
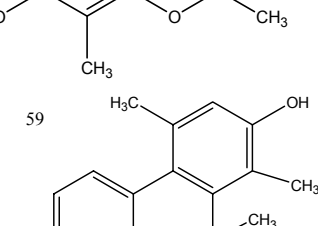
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	$\alpha/\beta$	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>6H-BENZO(c)CHROMEN-6-ONE DERIVATIVES</b>	 <p>19</p>	26	1090	41,923	-	-
	 <p>20</p>	20	3710	184	-	-
	 <p>21</p>	44	3120	70,909	-	-
	 <p>22</p>	35	10000	285,71	-	-
	 <p>23</p>	10	10000	1000	-	-
	 <p>24</p>	69	9830	142,46	-	-

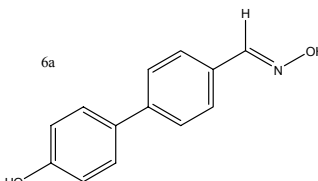
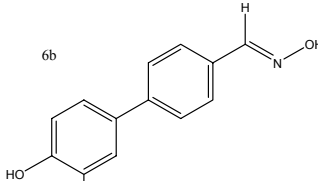
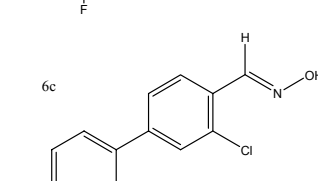
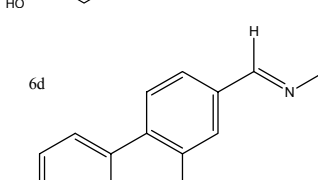
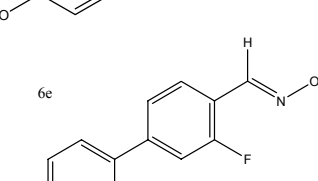
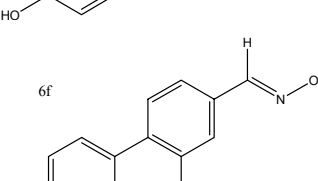
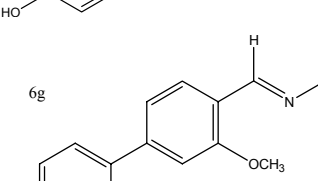
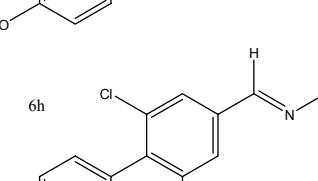
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>6H-BENZO(c)CHROMEN-6-ONE DERIVATIVES</b>		53	10000	188,68	-	-
		57	10000	175,44	-	-
		16	4160	260	-	-
		1,15	225	195,65	-	-
		4,1	159	38,78	9,81	177,3
		46	654	14,217	9,81	176,3
		49	1170	23,878	9,803	177,5

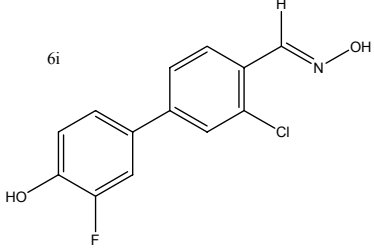
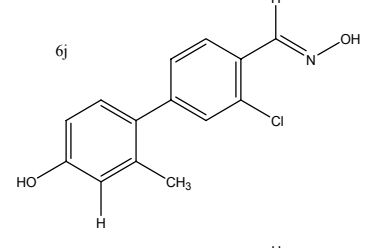
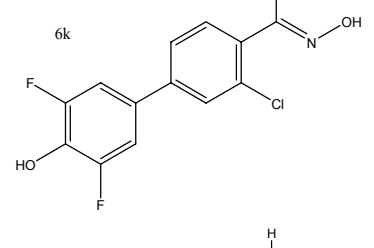
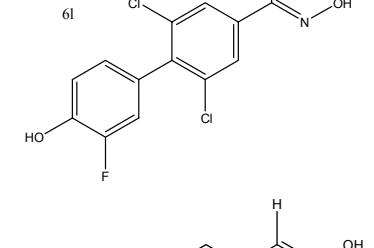
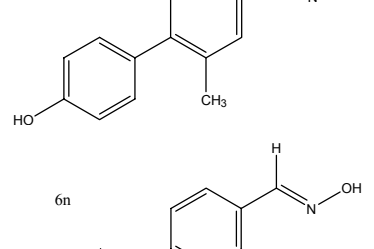
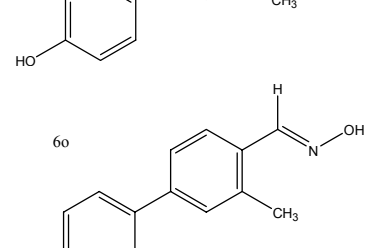
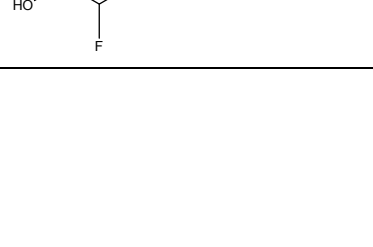
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>6H-BENZO(c)CHROMEN-6-ONE DERIVATIVES</b>		27	488	18,074	9,87	172,9
		67	1860	27,761	9,869	174
		18	2521	140,06	9,814	175,6
		82	1280	15,61	9,822	176,7
		14	484	34,571	9,814	178,4
		7,8	229	29,359	9,799	178,7
		54	1580	29,259	9,812	177,7

	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>6H-BENZO(c)CHROMEN-6-ONE DERIVATIVES</b>		21	228	10,857	9,823	178,1
		67	1920	28,657	9,809	177,9
		91	1780	19,56	9,824	171,2
		54	583	10,796	9,866	172,3
		6,7	785	117,16	9,876	175
		5,7	716	125,61	9,809	173,4
		180	11600	64,444	9,825	178,8

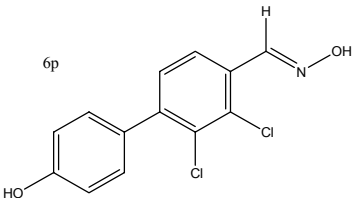
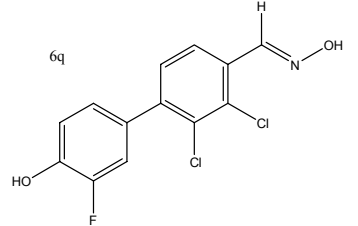
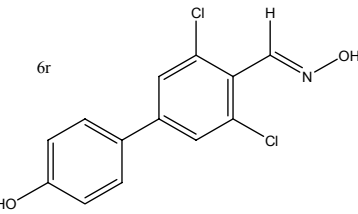
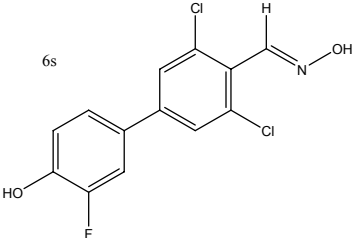
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>6H-BENZO(c)CHROMEN-6-ONE DERIVATIVES</b>		19	524	27,579	9,813	177,9
		22	597	27,136	9,794	171,4
		88	4610	52,386	9,799	176,6
		74	1030	13,919	9,808	173,9
		24	1210	50,417	9,804	174,4
		8	335	41,875	9,793	175,5
		3,2	101	31,563	9,794	175,7

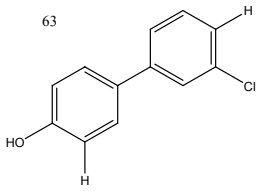
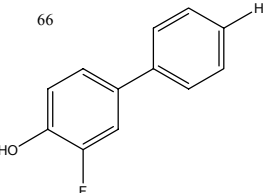
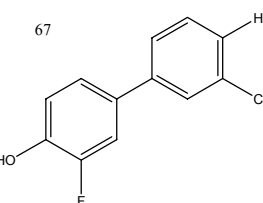
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>6H-BENZO(c)CHROMEN-6-ONE DERIVATIVES</b>		8	435	54,375	9,802	174,3
		22	626	28,455	9,806	170,8
		9	237	26,333	9,768	169,9
		2,3	129	56,087	9,736	166,6
		49	627	12,796	9,804	174,5
		45	468	10,4	9,787	178
		13	157	12,077	9,742	168,2

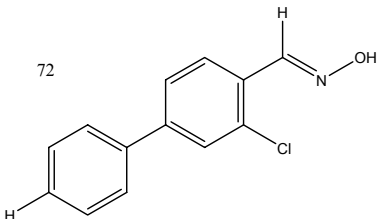
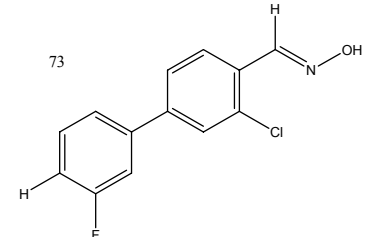
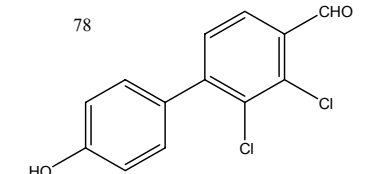
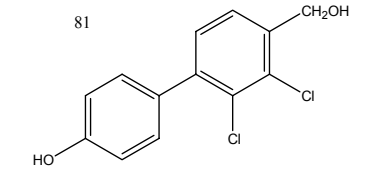
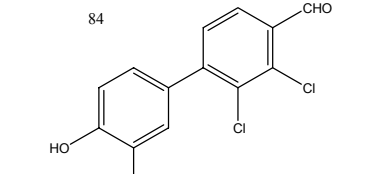
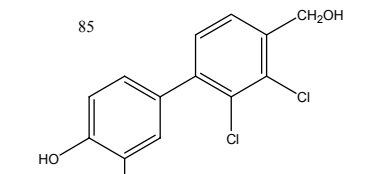
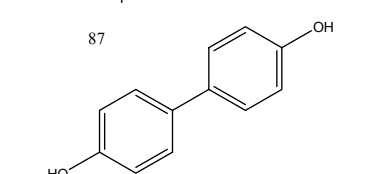
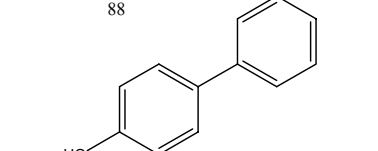
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
4-HYDROXY-BIPHENYL-CARBALDEHYDE OXIME DERIVATIVES <sup>157</sup>	6a 	3275	10000	3,0534	11,985	173,7
	6b 	660	10000	15,152	12,024	173,6
	6c 	83	2167	26,108	11,966	172,8
	6d 	98	398	4,0612	11,965	170,4
	6e 	161	1720	10,683	11,986	173
	6f 	386	3450	8,9378	11,978	170,9
	6g 	882	7990	9,059	11,469	172
	6h 	34	156	4,5882	11,995	173,4

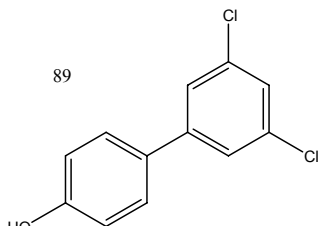
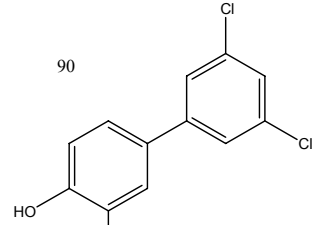
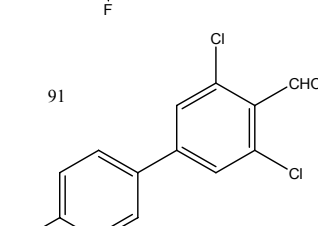
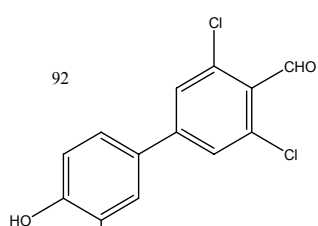
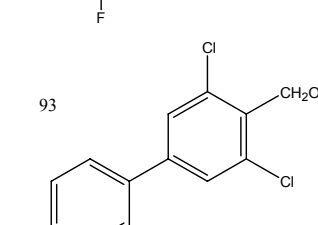
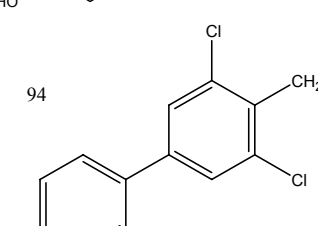
		Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>4'-HYDROXY-BIPHENYL-CARBALDEHYDE OXIME DERIVATIVES</b>	6i		54	2613	48,389	11,982	172,6
	6j		35	201	5,7429	12,115	179,6
	6k		268	10000	37,313	12,023	172,2
	6l		29	84	2,8966	12,155	174,1
	6m		607	4523	7,4514	12,038	167,4
	6n		163	3193	19,589	11,966	173,1
	6o		122	10000	81,967	12,003	172

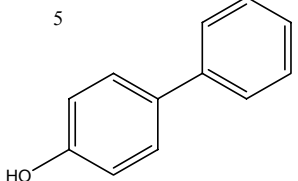
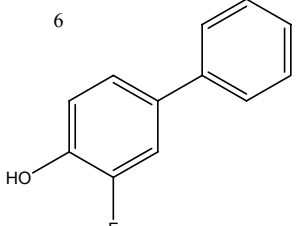
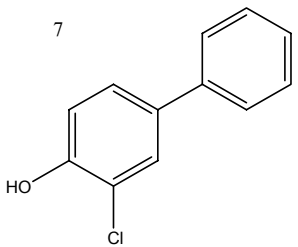
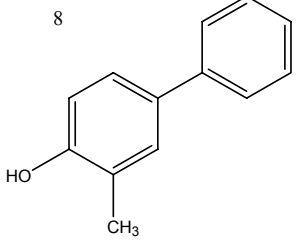
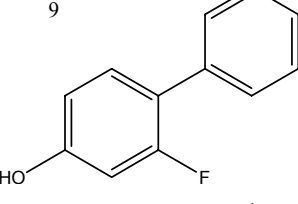
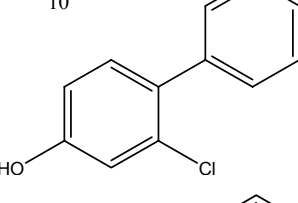
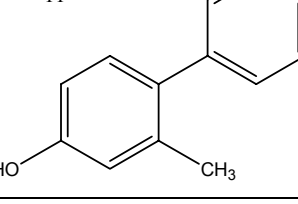


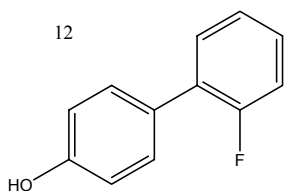
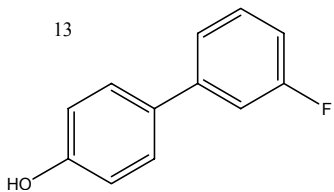
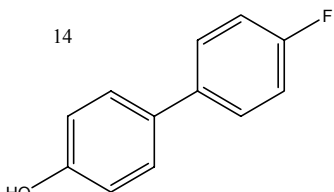
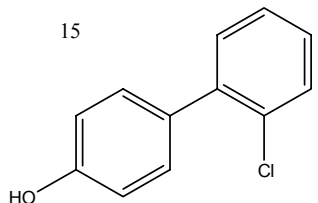
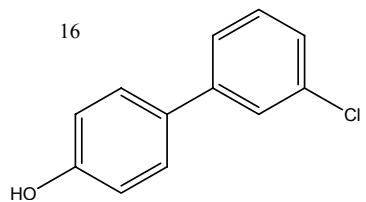
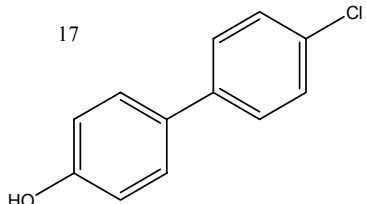
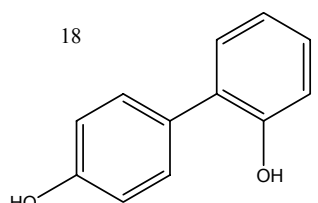
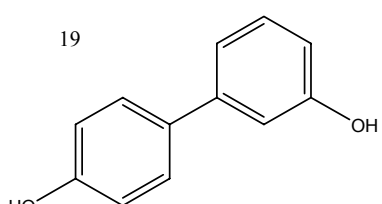
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>4'-HYDROXY-BIPHENYL-CARBALDEHYDE OXIME DERIVATIVES</b>	 <p>6p</p>	49	851	17,367	11,937	168,7
	 <p>6q</p>	81	1957	24,16	11,95	170,1
	 <p>6r</p>	8	64	8	12,082	175,2
	 <p>6s</p>	9	270	30	12,091	175,2

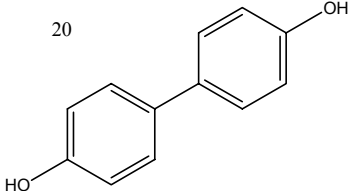
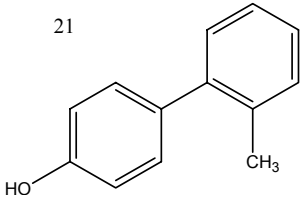
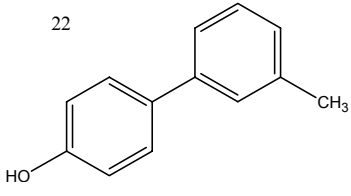
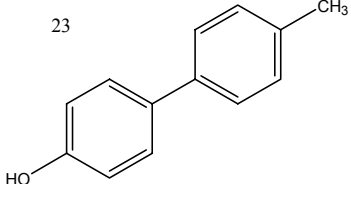
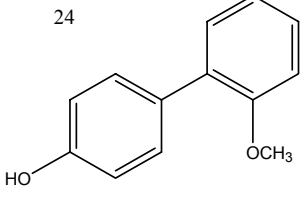
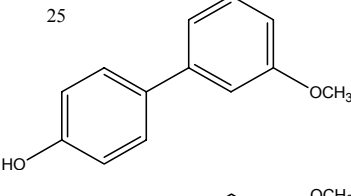
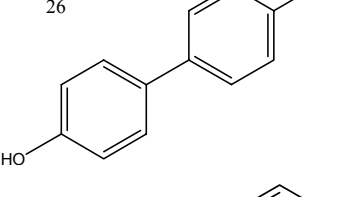
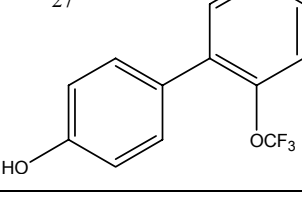
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>SUBSTITUTED BIPHENYL DERIVATIVES<sup>157</sup></b>	 <p>63</p>	401	7230	18,03	-	-
	 <p>66</p>	3330	27000	8,1081	-	-
	 <p>67</p>	271	6670	24,613	-	-

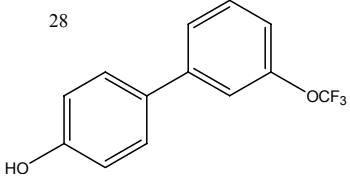
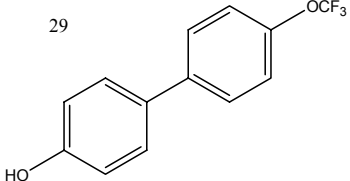
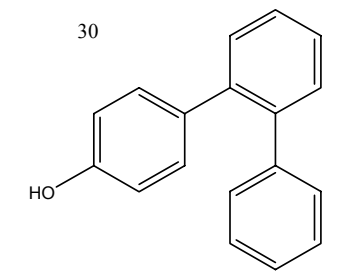
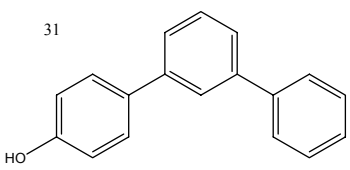
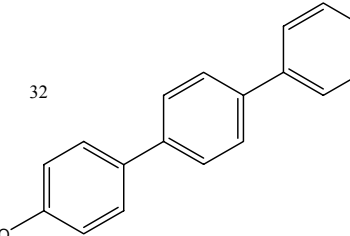
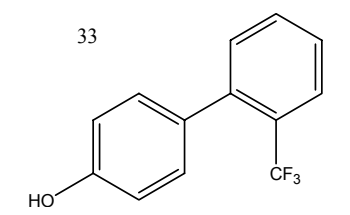
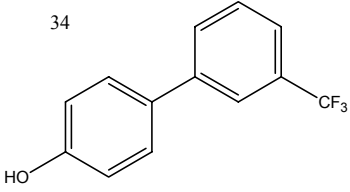
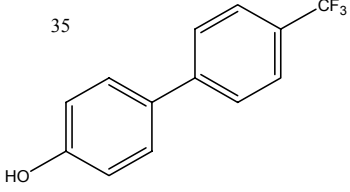
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
SUBSTITUTED BIPHENYL DERIVATIVES	72 	4420	30000	6,7873	-	-
	73 	8500	30000	3,5294	-	-
	78 	111	3710	33,423	-	-
	81 	42	1033	24,595	10,527	159,4
	84 	122	2189	17,943	-	-
	85 	22	671	30,5	10,538	159,5
	87 	2640	41500	15,72	9,847	177,8
	88 	8415	78000	9,2692	-	-

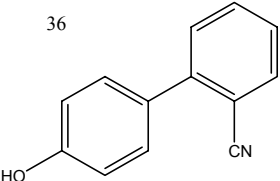
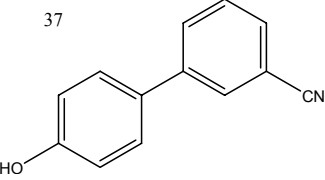
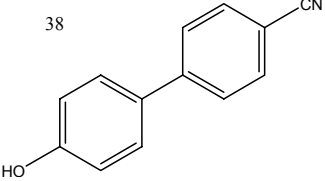
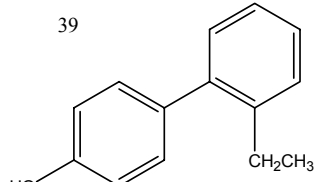
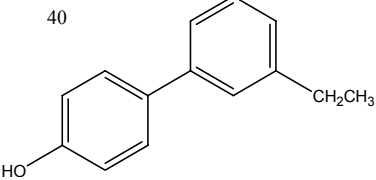
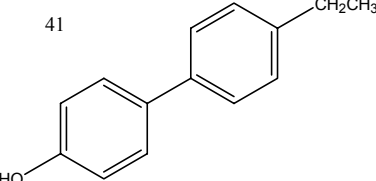
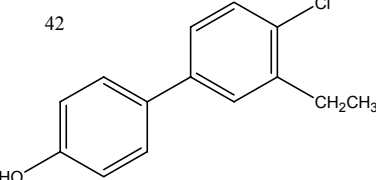
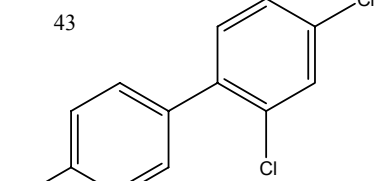
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>SUBSTITUTED BIPHENYL DERIVATIVES</b>		83	2013	24,253	-	-
		173	2595	15	-	-
		69	5007	72,565	-	-
		89	5000	56,18	-	-
		122	2529	20,73	10,772	168,8
		82	3765	45,915	10,734	168,6

	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
4-HYDROXY-BIPHENYL TEMPLATE <sup>156</sup>	5 	8415	78000	9,2692	-	-
	6 	3330	27000	8,1081	-	-
	7 	3110	12000	3,8585	-	-
	8 	15000	-	-	-	-
	9 	2010	13000	6,4677	-	-
	10 	605	2277	3,7636	-	-
	11 	4000	13890	3,4725	-	-

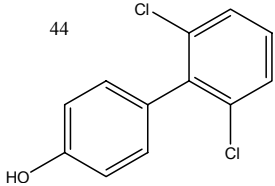
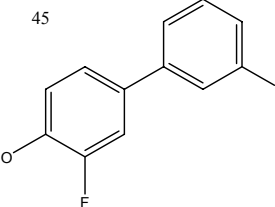
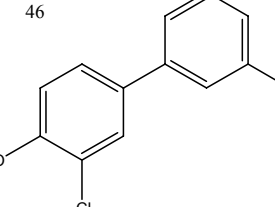
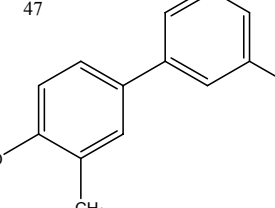
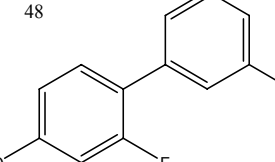
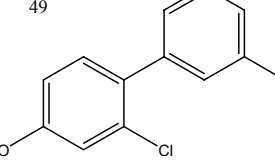
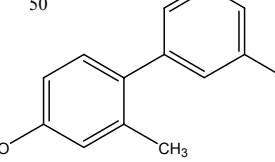
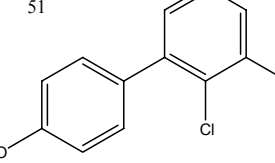
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>4-HYDROXY-BIPHENYL TEMPLATE</b>	12 	4097	23000	5,6139	-	-
	13 	1220	15000	12,295	-	-
	14 	4337	23000	5,3032	-	-
	15 	1018	6700	6,5815	-	-
	16 	401	7230	18,03	-	-
	17 	1343	12433	9,2576	-	-
	18 	23000	-	-	6,242	93,3
	19 	2187	20000	9,1449	8,722	139,2

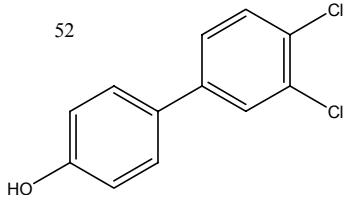
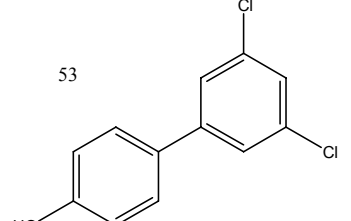
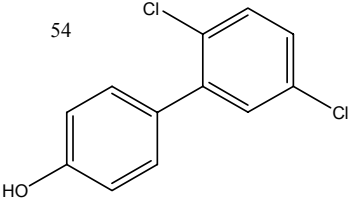
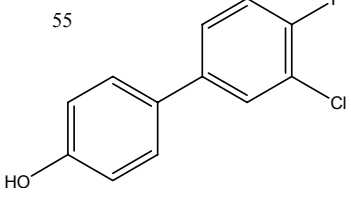
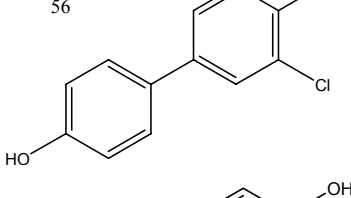
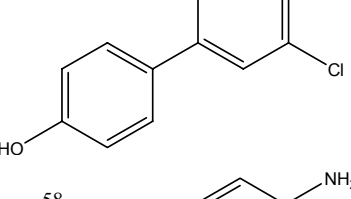
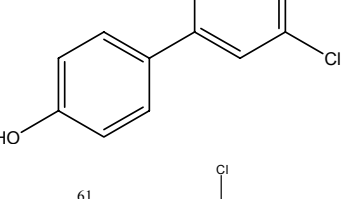
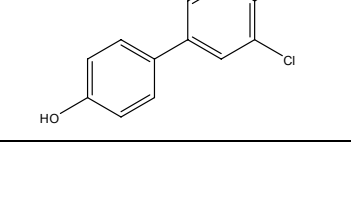
		Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
		<b>4-HYDROXY-BIPHENYL TEMPLATE</b>		 <p>20</p>	2640	41500	15,72
 <p>21</p>	1373			12755	9,2899	-	-
 <p>22</p>	1312			7433	5,6654	-	-
 <p>23</p>	1392			21000	15,086	-	-
 <p>24</p>	4587			20000	4,3601	-	-
 <p>25</p>	2335			20000	8,5653	-	-
 <p>26</p>	2413			23000	9,5317	-	-
 <p>27</p>	145			1215	8,3793	-	-

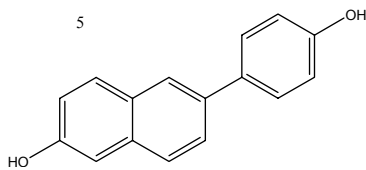
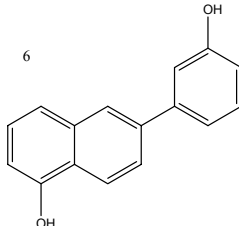
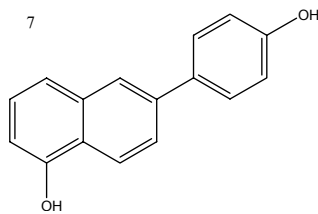
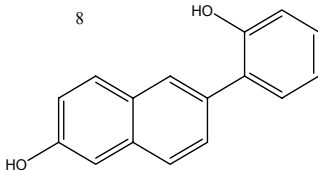
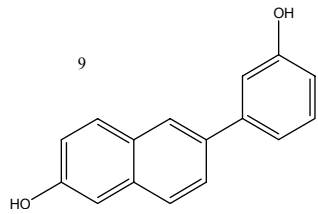
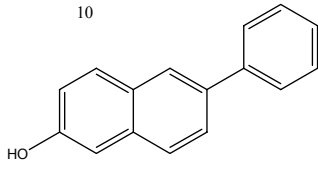
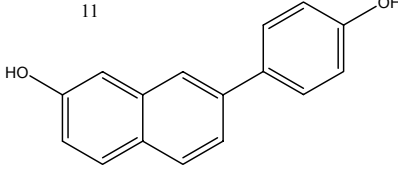
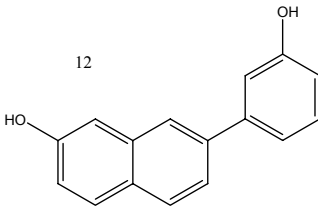
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>4-HYDROXY-BIPHENYL TEMPLATE</b>	28 	134	2115	15,784	-	-
	29 	641	3920	6,1154	-	-
	30 	168	1355	8,0655	-	-
	31 	1270	10200	8,0315	-	-
	32 	16000	23000	1,4375	-	-
	33 	532	2375	4,4643	-	-
	34 	109	2270	20,826	-	-
	35 	519	5385	10,376	-	-

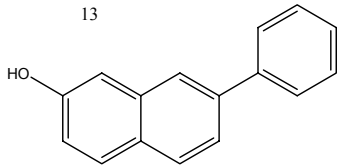
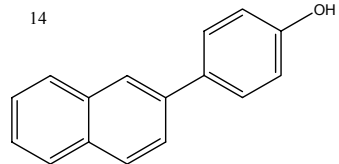
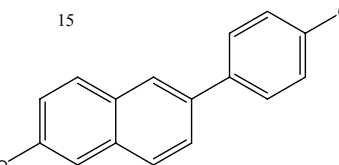
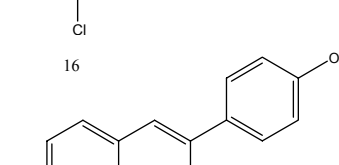
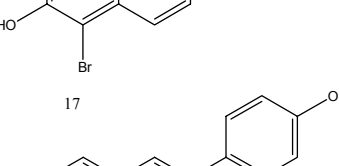
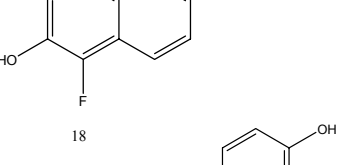
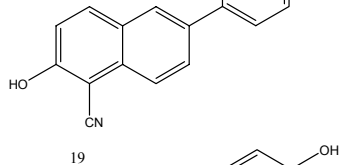
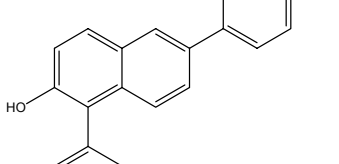
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	$(\alpha/\beta)$	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>4-HYDROXY-BIPHENYL TEMPLATE</b>	36 	1845	23000	12,466	-	-
	37 	2620	8200	3,1298	-	-
	38 	8790	20000	2,2753	-	-
	39 	393	1810	4,6056	-	-
	40 	261	4690	17,969	-	-
	41 	566	4185	7,394	-	-
	42 	64,5	703	10,899	-	-
	43 	153	1585	10,359	-	-

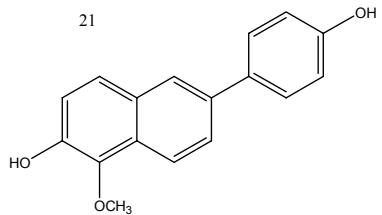
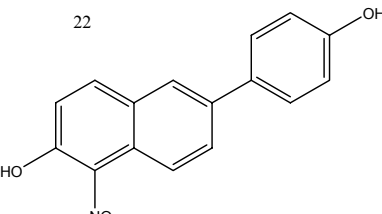
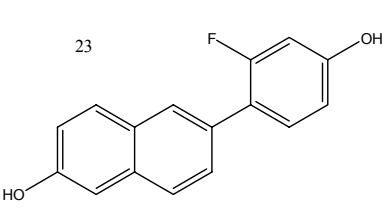
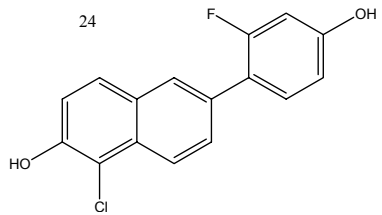
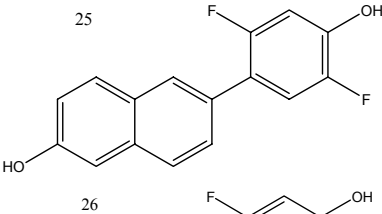
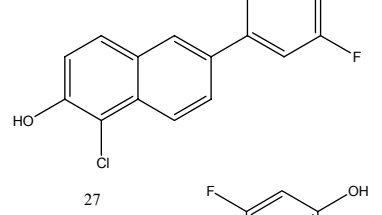
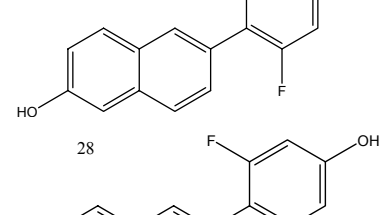
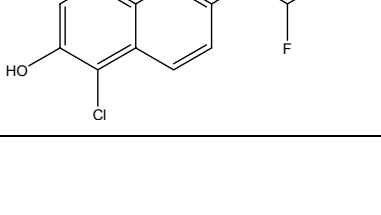


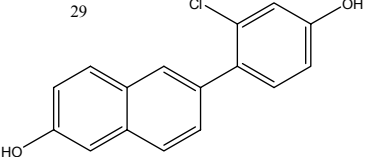
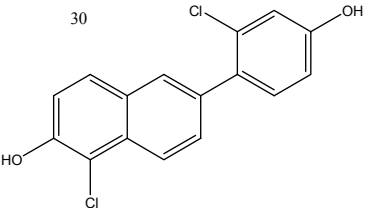
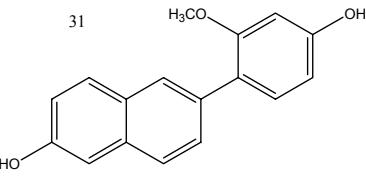
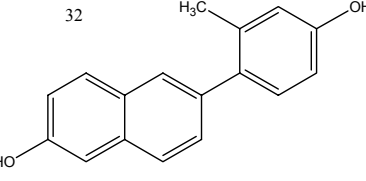
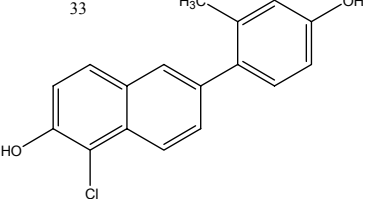
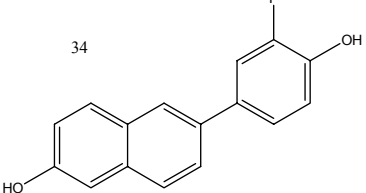
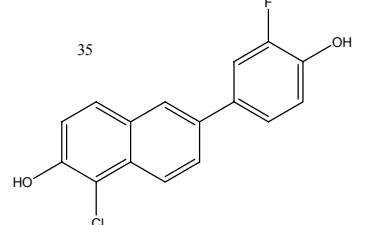
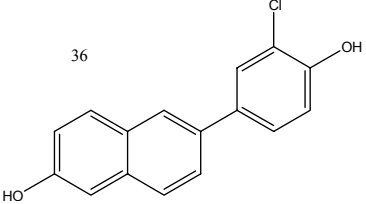
4-HYDROXY-BIPHENYL TEMPLATE	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	$(\alpha/\beta)$	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">44</div>  </div>	326	2525	7,7454	-	-
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">45</div>  </div>	271	6670	24,613	-	-	
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">46</div>  </div>	1325	4780	3,6075	-	-	
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">47</div>  </div>	2065	6890	3,3366	-	-	
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">48</div>  </div>	199	1794	9,0151	-	-	
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">49</div>  </div>	209	722	3,4545	-	-	
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">50</div>  </div>	416	1565	3,762	-	-	
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">51</div>  </div>	220	1890	8,5909	-	-	

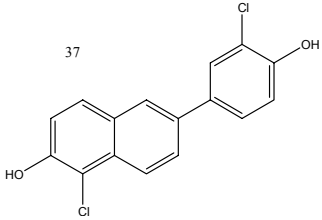
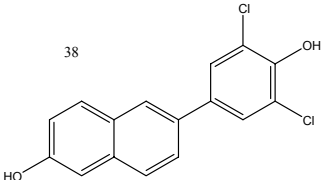
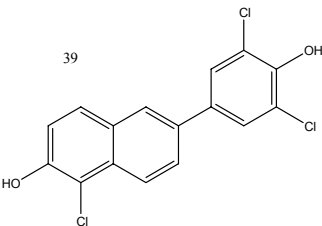
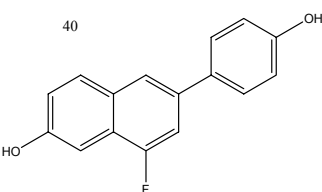
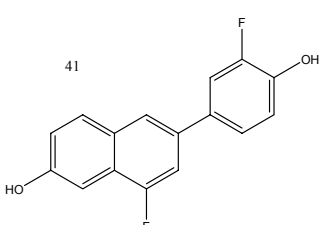
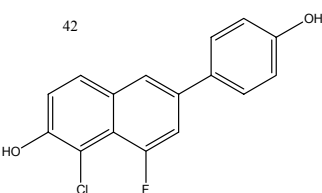
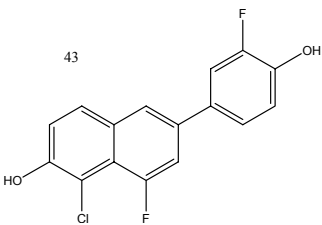
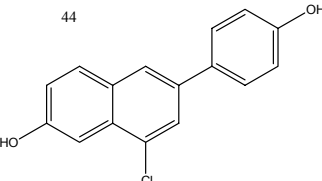
4-HYDROXY-BIPHENYL TEMPLATE	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	$\alpha/\beta$	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">52</div>  </div>	73	1800	24,658	-	-
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">53</div>  </div>	83	2013	24,253	-	-	
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">54</div>  </div>	83,5	977	11,701	-	-	
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">55</div>  </div>	509	6020	11,827	-	-	
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">56</div>  </div>	166	2575	15,512	-	-	
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">57</div>  </div>	305	8900	29,18	9,803	177,8	
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">58</div>  </div>	2950	20000	6,7797	-	-	
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">61</div>  </div>	<b>69</b>	5007	<b>72</b>	-	-	

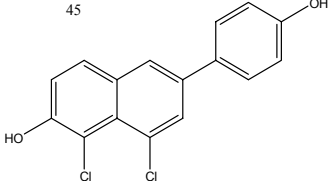
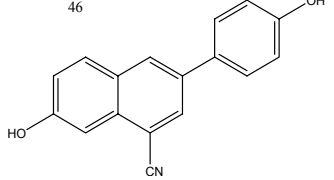
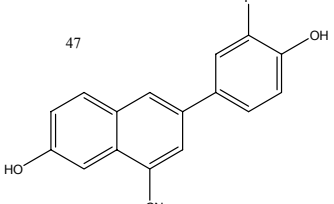
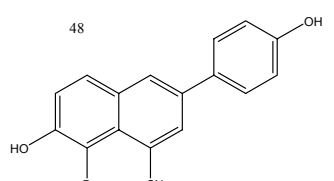
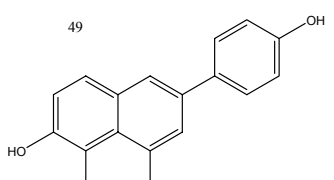
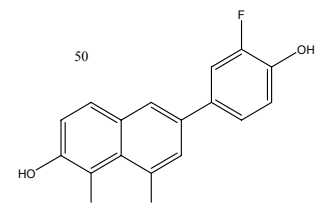
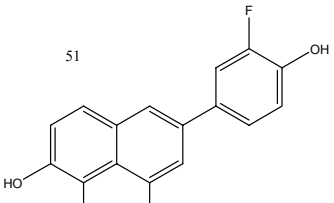
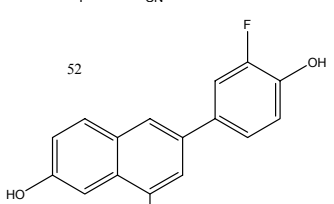
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>2-PHENYLNAPHTHALENE<sup>138</sup></b>	5 	16,3	211	12,945	12,028	171,1
	6 	205	1452	7,0829	9,51	120,3
	7 	5,8	22	3,7931	10,796	142,4
	8 	2000	5000	2,5	8,147	119,8
	9 	30	230	7,6667	11,134	146,8
	10 	374	1345	3,5963	-	-
	11 	44	442	10,045	11,222	161,4
	12 	566	2642	4,6678	10,82	164,1

	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>2-PHENYLNAPHTHALENE</b>	13 	527	3405	6,4611	-	-
	14 	245	638	2,6041	-	-
	15 	2,52	91	36,111	12,036	172,3
	16 	13	266	20,462	11,993	171,5
	17 	7	77	11	12,035	171,5
	18 	81	1402	17,309	11,993	171,1
	19 	748	1231	1,6457	11,992	171,2
	20 	17	282	16,588	12,032	172,2

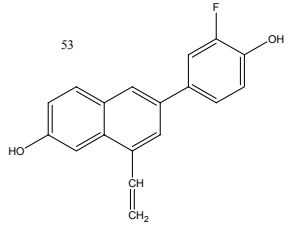
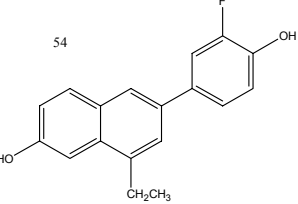
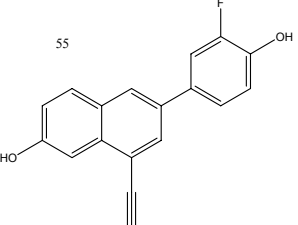
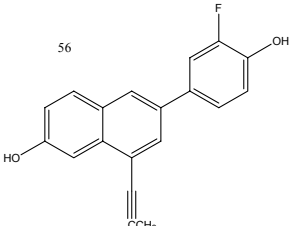
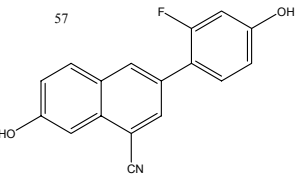
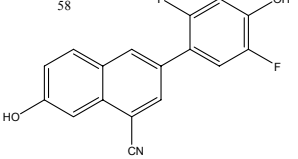
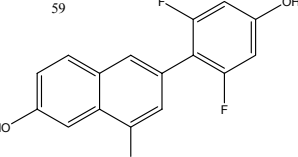
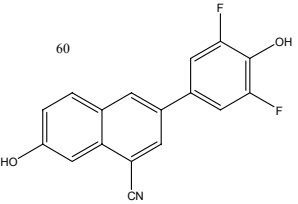
	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>2-PHENYLNAPHTHALENE</b>		114	884	7,7544	12,035	173
		199	709	3,5628	11,998	172,6
		2	24	12	11,983	171,4
		1,2	58	48,333	12,03	174,7
		2,8	27	9,6429	12,049	173,8
		8,5	118	13,882	12,045	174,6
		2,3	10,3	4,4783	12,15	171,6
		3,4	35	10,294	12,122	172,4

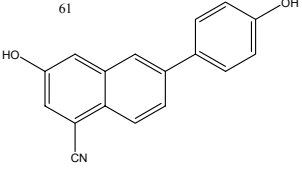
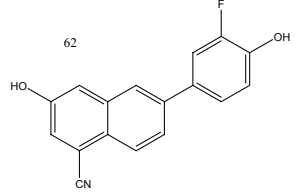
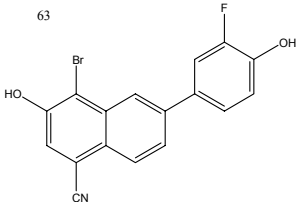
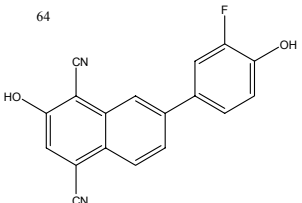
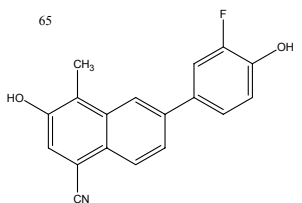
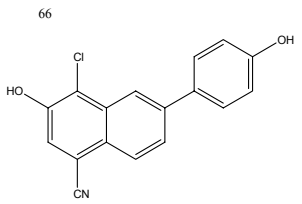
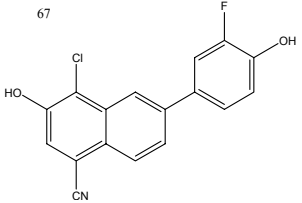
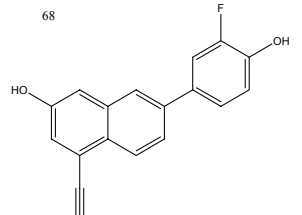
Molécula		ER $\beta$	ER $\alpha$	$(\alpha/\beta)$	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
		IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (nM)			
<b>2-PHENYLNAPHTHALENE</b>	29 	1,4	10	7,1429	12,016	175,2
	30 	3,3	36	10,909	12,019	176
	31 	27	174	6,4444	11,99	168,2
	32 	10	40	4	11,974	171,1
	33 	13	40	3,0769	11,982	172
	34 	5	92	18,4	12,038	171
	35 	4	143	35,75	12,035	172,2
	36 	11	107	9,7273	11,992	170,6

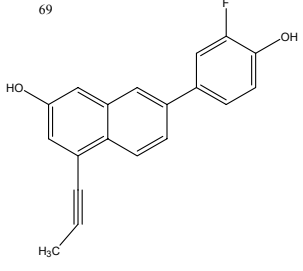
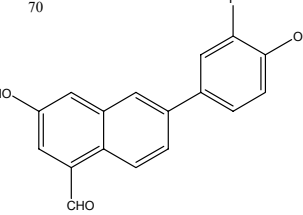
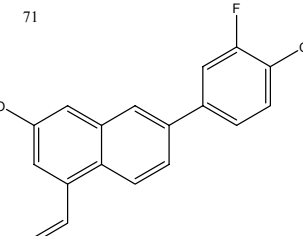
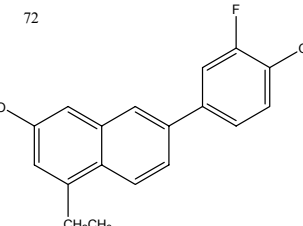
		ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>2-PHENYLNAPHTHALENE</b>		32	356	11,125	12,037	172,3
		8,4	92	10,952	12,03	172,3
		10,6	519	48,962	12,013	171
		1,6	22	13,75	12,032	171,3
		1,5	21	14	11,999	171,2
		1,1	40	36,364	12,033	170,9
		2,5	125	50	12,041	173,5
		2,3	30	13,043	12,029	173,7

	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>2-PHENYLNAPHTHALENE</b>	45 	9	43	4,7778	11,994	173
	46 	2,3	105	45,652	12,03	171,5
	47 	2,7	210	77,778	11,995	170,9
	48 	12	131	10,917	11,988	172,9
	49 	6	109	18,167	12,028	173,2
	50 	11	299	27,182	12	172,5
	51 	5,6	312	55,714	12,045	172,3
	52 	3,4	231	67,941	12,029	172



	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>2-PHENYLNAPHTHALENE</b>		4,4	254	57,727	12,027	172,4
		2,4	235	97,917	11,993	170,8
		6,3	247	39,206	12,034	171,7
		10	343	34,3	12,037	171,6
		0,5	26	52	12,019	174,4
		6,9	186	26,957	11,993	171,8
		2,2	45	20,455	12,008	171,4
		58	548	9,4483	12,046	171,4

	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>2-PHENYLNAPHTHALENE</b>	61 	2	84	42	11,212	161
	62 	2,1	96	45,714	11,22	160,9
	63 	4,5	116	25,778	11,271	161,9
	64 	28	877	31,321	11,261	161,6
	65 	6	406	67,667	11,29	162,1
	66 	3	98	32,667	11,239	162,4
	67 	2,6	55	21,154	11,232	161,9
	68 	1,2	73	60,833	11,2	

	Molécula	ER $\beta$ IC <sub>50</sub> (nM)	ER $\alpha$ IC <sub>50</sub> (nM)	( $\alpha/\beta$ )	Distancia OH's (Å)	Ángulo (°)
<b>2-PHENYLNAPHTHALENE</b>	69 	5,5	180	32,727	11,224	161,1
	70 	1,1	73	66,364	11,183	161,1
	71 	7,3	527	72,192	11,192	161,5
	72 	2,5	113	45,2	11,164	159,6