

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE QUÍMICA



**“SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD
BIOLÓGICA DE CHALCONAS Y FLAVONAS”**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

RICARDO ANTONIO DOMÍNGUEZ RIVERA

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

DOCENTES DIRECTORES:

M.Sc. BESSY EVELYN GÁLVEZ

Dr. GUILLERMO DÍAZ Crespín

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, FEBRERO DEL 2021

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

RECTOR

M.Sc. ROGER ARMANDO ARIAS

SECRETARIO GENERAL

ING. FRANCISCO ALARCÓN

FISCAL

LIC. RAFAEL HUMBERTO PEÑA MARÍN

FACULTAD CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DECANO

LIC. MAURICIO HERNÁN LOVO

VICEDECANA

M.Sc. ZOILA VIRGINIA GUERRERO

SECRETARIO

LIC. JAIME SALINAS ESPINOZA

DIRECTOR ESCUELA DE QUÍMICA

LIC. NELSON MAURICIO COTO

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | Página |
|---|---------------|
| ÍNDICE DE TABLAS | i |
| ÍNDICE DE FIGURAS | iii |
| ABREVIATURAS | vii |
| RESUMEN | ix |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 3 |
| 3. OBJETIVOS | 5 |
| 3.1. OBJETIVO GENERAL | 5 |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 5 |
| 4. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA | 7 |
| 4.1. GENERALIDADES | 7 |
| 4.1.1. Productos naturales y sus análogos como fuentes de nuevos medicamentos | 7 |
| 4.1.2. Química del grupo carbonilo | 8 |
| 4.1.3. Flavonoides | 11 |
| 4.1.4. Biosíntesis de flavonoides | 12 |
| 4.2. CHALCONAS | 15 |
| 4.2.1. Síntesis de chalconas | 17 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2.2. Otras reacciones para la síntesis de chalconas | 23 |
| 4.2.3. Aplicaciones biológicas de las chalconas | 26 |
| 4.3. FLAVONAS | 30 |
| 4.3.1. Síntesis de flavonas | 31 |
| 4.3.2. Otras reacciones para la síntesis de flavonas | 34 |
| 4.3.3. Aplicaciones biológicas de las flavonas | 37 |
| 4.4. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE FLAVONOIDES | 40 |
| 4.4.1. Aislamiento y purificación de flavonoides | 40 |
| 4.4.2. Caracterización de flavonoides | 42 |
| 4.5. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS FLAVONOIDES | 45 |
| 4.5.1. Método de difusión en disco M44-A | 46 |
| 5. METODOLOGÍA | 49 |
| 5.1. MATERIALES Y EQUIPO | 49 |
| 5.1.1. Reactivos | 49 |
| 5.1.2. Instrumentos | 49 |
| 5.2. TÉCNICAS GENERALES | 50 |
| 5.2.1. Filtración al vacío | 50 |
| 5.2.2. Cromatografía en capa fina | 51 |
| 5.3. METODOLOGÍAS GENERALES DE SÍNTESIS | 51 |

| | |
|---|----|
| 5.3.1. Síntesis de flavanonas | 51 |
| 5.3.2. Síntesis de 2'-hidroxichalconas | 51 |
| 5.3.3. Síntesis de 3-hidroxi flavonas | 52 |
| 5.4. PROCEDIMIENTOS GENERALES DE SÍNTESIS | 52 |
| 5.4.1. Procedimiento general para la síntesis de la 2-fenil-2,3-dihidro-4 <i>H</i> -croman-4-ona (3) | 52 |
| 5.4.2. Procedimiento general para la síntesis de la 3-(4-clorofenil)-1-(2-hidroxifenil)-2-propen-1-ona (5) | 53 |
| 5.4.3. Procedimiento general para la síntesis de la 3-(4-dimetilaminofenil)-1-(2-hidroxifenil)-2-propen-1-ona (7) | 54 |
| 5.4.4. Procedimiento general para la síntesis de la 3-hidroxi-2-fenil-4 <i>H</i> -cromen-4-ona (8) | 54 |
| 5.4.5. Procedimiento general para la síntesis de la 2-(4-clorofenil)-3-hidroxi-4 <i>H</i> -cromen-4-ona (9) | 55 |
| 5.4.6. Procedimiento general para la síntesis de la 2-[4-(dimetilamino)fenil]-3-hidroxi-4 <i>H</i> -cromen-4-ona (10) | 56 |
| 5.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS PRODUCTOS | 56 |
| 5.5.1. Método de difusión en disco | 56 |
| 6. DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE LOS PRODUCTOS | 59 |
| 6.1. Compuesto 2-fenil-2,3-dihidro-4 <i>H</i> -croman-4-ona (3) | 59 |
| 6.2. Compuesto 3-(4-clorofenil)-1-(2-hidroxifenil)-2-propen-1-ona (5) | 59 |
| 6.3. Compuesto 3-(4-dimetilaminofenil)-1-(2-hidroxifenil)-2-propen-1-ona (7) | 60 |
| 6.4. Compuesto 3-hidroxi-2-fenil-4 <i>H</i> -cromen-4-ona (8) | 60 |
| 6.5. Compuesto 2-(4-clorofenil)-3-hidroxi-4 <i>H</i> -cromen-4-ona (9) | 61 |
| 6.6. Compuesto 2-[4-(dimetilamino)fenil]-3-hidroxi-4 <i>H</i> -cromen-4-ona (10) | 61 |

| | | |
|---------------|---|------------|
| 7. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 63 |
| 7.1. | SÍNTESIS DE FLAVANONAS | 63 |
| 7.1.1. | Síntesis de la 2-fenil-2,3-dihidro-4H-croman-4-ona (3) | 63 |
| 7.2. | SÍNTESIS DE 2'-HIDROXICALCONAS | 68 |
| 7.2.1. | Síntesis de la 3-(4-clorofenil)-1-(2-hidroxifenil)-2-propen-1-ona (5) | 68 |
| 7.2.2. | Síntesis de la 3-(4-dimetilaminofenil)-1-(2-hidroxifenil)-2-propen-1-ona (7) | 71 |
| 7.3. | SÍNTESIS DE 3-HIDROXIFLAVONAS | 79 |
| 7.3.1. | Síntesis de la 3-hidroxi-2-fenil-4H-cromen-4-ona (8) | 79 |
| 7.3.2. | Síntesis de la 2-(4-clorofenil)-3-hidroxi-4H-cromen-4-ona (9) | 82 |
| 7.3.3. | Síntesis de la 2-[4-(dimetilamino)fenil]-3-hidroxi-4H-cromen-4-ona (10) | 85 |
| 7.4. | DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA | 88 |
| 7.4.1. | Actividad antifúngica contra <i>Candida albicans</i> | 88 |
| 7.4.2. | Actividad antifúngica contra <i>Aspergillus niger</i> | 89 |
| 8. | CONCLUSIONES | 95 |
| 9. | RECOMENDACIONES | 97 |
| 10. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 99 |
| 11. | ANEXO | 115 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|---|---------------|
| Tabla 1. <i>Estructura química de algunos flavonoides</i> | 16 |
| Tabla 2. <i>Estructura química de algunos flavonoides que presentan actividad biológica</i> | 38 |
| Tabla 3. <i>Señales características de algunos flavonoides en NMR, IR y UV-Vis</i> | 45 |
| Tabla 4. <i>Puntos de corte y correlación entre los métodos M44-A y M27-A para Candida spp</i> | 47 |
| Tabla 5. <i>Fases móviles utilizadas para realizar Cromatografía en capa fina</i> | 51 |
| Tabla 6. <i>Condiciones de reacción para la formación de (3)</i> | 64 |
| Tabla 7. <i>Condiciones de reacción para la formación de (5)</i> | 69 |
| Tabla 8. <i>Condiciones de reacción para la formación de (7) siguiendo la metodología A₂</i> | 72 |
| Tabla 9. <i>Condiciones de reacción para la obtención de (7) empleando la metodología A₂ modificada</i> | 73 |
| Tabla 10. <i>Condiciones de reacción para la síntesis de (7). Modificando relación estequiométrica entre (1) y (6)</i> | 74 |
| Tabla 11. <i>Condiciones de reacción para la síntesis de (10) empleando distintas metodologías</i> | 85 |
| Tabla 12. <i>Diámetros de inhibición obtenidos para los compuestos sintetizados contra C. albicans</i> | 89 |
| Tabla 13. <i>Diámetros de inhibición obtenidos para los compuestos sintetizados contra A. niger</i> | 90 |
| Tabla 14. <i>Coefficientes de correlación lineal y determinación para los datos obtenidos</i> | 91 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--|---------------|
| <i>Figura 1.</i> Compuestos conteniendo el grupo carbonilo | 8 |
| <i>Figura 2.</i> Diagrama de orbitales moleculares para el enlace C=O | 9 |
| <i>Figura 3.</i> Estructuras contribuyentes del grupo carbonilo | 9 |
| <i>Figura 4.</i> Reacciones del grupo carbonilo. Reacciones de a) Adición, b) Sustitución y c) Condensación | 10 |
| <i>Figura 5.</i> Tautomerismo ceto-enólico | 11 |
| <i>Figura 6.</i> Estructuras de la γ -benzopirano y algunos flavonoides | 12 |
| <i>Figura 7.</i> Biosíntesis de flavonoides | 14 |
| <i>Figura 8.</i> Estructura y numeración de las chalconas | 15 |
| <i>Figura 9.</i> Estructuras de la (a) benzalacetona y (b) 1,5-difuranil-1,4-pentadien-3-ona | 17 |
| <i>Figura 10.</i> Reacción general de Claisen-Schmidt | 18 |
| <i>Figura 11.</i> Productos secundarios de la reacción de Claisen-Schmidt | 18 |
| <i>Figura 12.</i> Mecanismo de reacción de Claisen-Schmidt en medio básico | 20 |
| <i>Figura 13.</i> Otras condiciones de reacción para realizar la condensación de Claisen-Schmidt | 21 |
| <i>Figura 14.</i> Estructura química del dimetilcarbamato de dimetilamonio (DIMCARB) | 23 |
| <i>Figura 15.</i> (A) síntesis de chalconas vía acoplamiento de Suzuki por Eddarir, (B) síntesis de chalconas vía acoplamiento de Suzuki a partir de sales de vinilpiridinio y ácidos fenilboránicos | 24 |

| | | |
|-------------------|---|---------------|
| Figura 16. | Síntesis de chalconas vía reacción de acoplamiento de Heck. (A) por Cavarischia. (B) Síntesis de chalconas vía acoplamiento de Heck a partir de cetonas con estructura de bases de Manich | 25 |
| Figura 17. | Síntesis de chalconas por reacción de olefinación de Wittig | 25 |
| Figura 18. | Reacción de olefinación de Julia-Kocienski para la obtención de chalconas | 26 |
| Figura 19. | Estructura de algunas chalconas y derivados con actividad biológica | 28 |
| Figura 20. | Estructura general y numeración de las flavonas | 30 |
| Figura 21. | Reacción general de Algar-Flynn-Oyamada para la obtención de 3-hidroxiflavonas (b) a partir de 2'-hidroxichalconas (a) | 32 |
| Figura 22. | Estructuras químicas de los productos secundarios formados en la reacción de Algar-Flynn-Oyamada | 32 |
| Figura 23. | Mecanismo de la reacción de Algar-Flynn-Oyamada | 33 |
| Figura 24. | Síntesis de flavonas (B) a partir de flavanonas (A) empleando acetato de manganeso (III), ácido perclórico y ácido acético | 35 |
| Figura 25. | Síntesis de flavonas por reordenamiento de Baker-Venkataraman | 35 |
| Figura 26. | Síntesis de flavonas por la reacción de Allan-Robinson | 36 |
| Figura 27. | Síntesis de flavonas asistida por ultrasonido | 36 |
| Figura 28. | Estructura de algunos flavonolignanos activos contra <i>S. aureus</i> | 39 |
| Figura 29. | Montaje de un equipo de cromatografía en columna | 41 |
| Figura 30. | Estructuras químicas de los reactivos empleados para la etapa de síntesis | 49 |
| Figura 31. | Esquema de filtración al vacío | 50 |
| Figura 32. | Reacción general para la síntesis de 2-fenil-2,3-dihidro-4H-croman-4-ona | 52, 63 |

| | | |
|-------------------|---|---------------|
| Figura 33. | Reacción general para la síntesis de la 3-(4-clorofenil)-1-(2-hidroxifenil)-2-propen-1-ona | 53, 68 |
| Figura 34. | Reacción general para la síntesis de (7), siguiendo la metodología B ₁ | 54, 78 |
| Figura 35. | Reacción general para la síntesis de (8) siguiendo la metodología A ₃ | 54 |
| Figura 36. | Reacción general para la obtención del producto (9) a partir de (5) aplicando la metodología A ₃ | 55 |
| Figura 37. | Reacción general para la síntesis de (10) aplicando la metodología B ₂ | 56, 86 |
| Figura 38. | Espectros de (A) FTIR y (B) UV-Vis (DMFA) obtenidos para el producto (3) | 65 |
| Figura 39. | Segmento del espectro de ¹ H-RMN (CDCl ₃) del producto (3) | 66 |
| Figura 40. | Equilibrio químico entre 2'-hidroxichalconas (A) y sus respectivas flavanonas (B) | 67 |
| Figura 41. | (A) espectro de IR del producto (5) y (B) espectro de UV-Vis (DMFA) del producto (5) | 70 |
| Figura 42. | Segmento del espectro de ¹ H-RMN (CDCl ₃) del producto (5) | 71 |
| Figura 43. | Reacción general para la obtención de (7) siguiendo la metodología A ₃ | 71 |
| Figura 44. | Reacción general para la obtención de (7) modificando la metodología A ₂ | 72 |
| Figura 45. | Espectro de UV-Vis (DMFA) para el producto (7) | 76 |
| Figura 46. | Espectro de IR para el producto (7) | 76 |
| Figura 47. | Sección del espectro de ¹ H-RMN (CDCl ₃) del producto (7) | 77 |
| Figura 48. | Reacción de retrocondensación del producto (7) | 78 |
| Figura 49. | Reacción general de síntesis del producto (8) siguiendo la metodología A ₃ | 79 |

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| Figura 50. | Espectros de (A) IR y (B) UV-Vis (DMFA) obtenidos para el producto (8) | 80 |
| Figura 51. | Sección del espectro de ^1H -RMN (CDCl_3) del producto (8) (color rojo) y del producto (3) en azul | 81 |
| Figura 52. | Reacción general de síntesis del producto (9) a partir de (5) aplicando la metodología A ₃ | 82 |
| Figura 53. | Espectros de IR (A) y de UV-Vis (DMFA) (B) obtenidos para el producto (9) | 83 |
| Figura 54. | Sección de los espectros de ^1H -RMN (CDCl_3) para los productos (5) (en azul) y (9) (en rojo) | 84 |
| Figura 55. | Espectro de IR (A) y espectro de UV-Vis (DMFA) (B) para el producto (10) | 87 |
| Figura 56. | Sección del espectro de ^1H -RMN de (7) en azul y de (10) en rojo | 88 |
| Figura 57. | Algunos flavonoides con actividad fungicida | 93 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------|---|
| ¹H-RMN | Resonancia magnética nuclear de protón |
| 4CL | Siglas en inglés para 4-Cumarato-CoA Ligasa (4-Coumarate-CoA Ligase) |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| Ar | Grupo arilo |
| ATR | Siglas en inglés para Reflectancia Total Atenuada (Attenuated Total Reflectance) |
| BHT | Butilhidroxitolueno |
| CA4H | Siglas en inglés para Ácido Cinámico 4-Hidroxilasa (Cinnamic Acid 4-Hydroxylase) |
| CDCl₃ | Cloroformo deuterado |
| CLSI | Siglas en inglés para Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute) |
| CoA | Coenzima A |
| DBU | 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno |
| DIMCARB | Dimetilcarbamato de dimetilamonio |
| DMFA | Dimetilformamida |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DPPH | Siglas en inglés para 2, 2'- difenil – 1 – picrilhidracilo (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) |
| EtOH | Etanol |
| EUROCAST | Acrónimo en inglés para Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) |
| FDA | Siglas en inglés para Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos de Norteamérica (Food and Drug Administration) |
| FTIR | Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier |
| GST | Siglas en inglés para Glutación – S- transferasa (Glutation-S-transferasa) |

| | |
|-----------------------|---|
| HO[·] | Ion hidroxilo |
| KF | Fluoruro de potasio |
| LCMS | Siglas en inglés para Cromatografía Líquida – Espectrometría de Masas (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) |
| MDM2 | Siglas en inglés para Doble Minuto Murino (Mouse double minute-2) |
| MeOH | Metanol |
| MIC | Siglas en inglés para Concentración Mínima Inhibitoria (Minimal Inhibitory Concentration) |
| MW | Siglas en inglés para Radiación de microondas (Microwave) |
| NADPH | Siglas en inglés de Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) |
| OH | Radical hidroxilo |
| ORAC | Siglas en inglés para Capacidad de Absorción de Radicales Oxígeno (Oxygen Radical Absorbance Capacity) |
| P.F. | Punto de fusión |
| PAL | Siglas en inglés para Fenilalanina Amonio Liasa (Phenylalanine Ammonia-Lyase) |
| Ph | Radical fenilo |
| ppm | Partes por millón |
| R | Grupo alquilo |
| THF | Tetrahidrofurano |
| TLC | Siglas en inglés para Cromatografía en Capa Fina (Thin – Layer Chromatography) |
| TMS | Tetrametilsilano |
| UFM | Unidades Formadoras de Colonia |
| US | Siglas en inglés para Ultrasonido (Ultrasound) |
| UV-Vis | Espectroscopia de ultravioleta-visible |
| VEGF | Siglas en inglés para Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (Vascular Endothelial Growth Factor) |
| VIH | Virus de Inmunodeficiencia Humana |

RESUMEN

Se ha desarrollado una serie de metodologías para la síntesis de diferentes flavonoides, basadas en las reacciones de Claisen-Schmidt y de Algar-Flynn-Oyamada, variando algunas condiciones experimentales como: temperatura, disolvente, estado físico del catalizador básico, pH y operación de work-up. Se sintetizaron 6 flavonoides en total: una flavanona (**3**), dos 2'-hidroxichalconas (**5**) y (**7**) y 3 3-hidroxi flavonas (**8-10**) a partir de 2-hidroxiacetofenona y distintos benzaldehídos 4-sustituídos. Los productos fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas UV-Vis, FTIR y ¹H-RMN. Además, se probó la actividad antifúngica de los flavonoides sintetizados, encontrándose que son más efectivos inhibiendo el crecimiento de *Aspergillus niger* que el de *Candida albicans*. Siendo los compuestos (**5**) y (**9**) los más sobresalientes de la serie. Sin embargo, no se logró demostrar que ninguno de los compuestos fuera más activo que los controles empleados.

1. INTRODUCCIÓN

La investigación realizada trata sobre la síntesis de distintos flavonoides, aplicando metodologías experimentales desarrolladas a partir de las reacciones de Claisen-Schmidt y de Algar-Flynn-Oyamada.

Los flavonoides conforman una amplia familia de metabolitos secundarios y productos sintéticos constituidos por estructuras básicas de unidades C6-C3-C6, encontrándose como pigmentos responsables de colores amarillo, anaranjado, rojo o incluso violeta en flores y frutos y como agentes terapéuticos experimentales respectivamente.¹

Los productos naturales, así como sus análogos sintéticos representan una pieza clave en el diseño de nuevos fármacos, entre ellos incluidos los flavonoides, pues han exhibido importantes resultados en pruebas in vitro. En este contexto, durante las últimas cuatro décadas, el interés y el desarrollo de nuevos fármacos antiinfecciosos, entre ellos antibióticos, antifúngicos y antivirales ha aumentado notablemente. Esto se ilustra con los datos reportados por diferentes estudios, los cuales apuntan que entre 1981 – 2010 se reportaron 193 fármacos antiinfecciosos, este número aumentó hasta 401 al realizar un conteo de los mismos reportados hasta el año 2019.^{2,3,4,5}

A partir de lo mencionado anteriormente, el objetivo del presente trabajo fue la aplicación de las metodologías experimentales diseñadas para realizar la síntesis de flavanonas, 2'-hidroxichalconas y 3-hidroxi flavonas, empleándose técnicas espectroscópicas para realizar la caracterización de los mismos, así como también determinar la actividad fungicida de los compuestos sintetizados contra la levadura *Candida albicans* y el hongo filamentoso *Aspergillus niger*, estudiándose la diferencia respecto a la capacidad exhibida por estos para inhibir el crecimiento de dichos microorganismos, así como la variación de la actividad biológica en función de los sustituyentes añadidos a los mismos a partir de los benzaldehídos de partida.

2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, uno de los problemas más importantes relacionados con la salud, es la creciente resistencia que diversos microorganismos desarrollan a fármacos comúnmente empleados para tratar enfermedades ocasionadas por los mismos.¹

Uno de los focos de atención más importantes para la investigación científica, en este contexto, es la producción de nuevos fármacos y tratamientos basados en la estructura química de diversos metabolitos secundarios, ya que estos cubren un gran número de características que son de importancia en cuanto a actividad farmacológica.^{2,4,5}

Si bien, se han desarrollado diferentes metodologías para la obtención de un gran número de compuestos de interés biológico, así como para realizar la evaluación de la actividad farmacológica de los mismos, el estudio de los métodos clásicos sigue siendo una herramienta de gran utilidad e importancia en el área de la síntesis orgánica, pues permite conocer con detalle los aspectos intramoleculares que tienen mayor influencia sobre la reactividad de las sustancias que participan en una reacción química, de la misma forma que brindan profundo conocimiento sobre el comportamiento de las sustancias químicas frente a una gran variedad de condiciones experimentales, información valiosa al momento de desarrollar nuevas metodologías de síntesis o la optimización de las ya existentes.^{3,4}

Así, a partir de lo anterior, se estudiaron las reacciones de Claisen-Schmidt y de Algar-Flynn-Oyamada, con el objetivo de desarrollar metodologías experimentales para la síntesis de distintos flavonoides a partir de reactivos (2-hidroxiacetofenona y aldehídos 4-sustituidos) disponibles en la Escuela de Química de la Universidad de El Salvador, así como en el contexto de las condiciones experimentales de la misma, y a su vez realizar pruebas para determinar la capacidad antifúngica de los mismos, frente a las dos cepas de hongos *Candida albicans* y *Aspergillus niger*.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

- Sintetizar, caracterizar y evaluar la actividad biológica de una familia de flavonoides.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar metodologías experimentales para la síntesis de flavanonas, 2'-hidroxichalconas a partir de 2-hidroxiacetofenona y benzaldehídos 4-sustituidos.
- Desarrollar metodologías experimentales para la síntesis de 3-hidroxi flavonas a partir de flavanonas y 2'-hidroxichalconas.
- Purificar y caracterizar los productos obtenidos utilizando técnicas espectroscópicas como espectroscopia de ultravioleta-visible, de infrarrojo y de resonancia magnética nuclear de protón.
- Determinar la actividad antifúngica de los productos sintetizados frente a la levadura *Candida albicans* y el hongo filamentoso *Aspergillus niger*.

4. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

4.1. GENERALIDADES

4.1.1. Productos Naturales y sus análogos como fuentes de nuevos medicamentos

Se han publicado diversidad de artículos que muestran los avances logrados en cuanto a la búsqueda, síntesis y comercialización de compuestos químicos, que fungen como nuevos medicamentos para el tratamiento de diferentes enfermedades, actuando como anticancerígenos, antiinflamatorios, antitumorales, entre otros. Los compuestos mencionados suelen ser productos naturales o análogos estructurales de los mismos, obtenidos de manera total o parcialmente sintética. A su vez, muchos de estos compuestos son moléculas relativamente pequeñas, que poseen características estructurales como anillos heterocíclicos y la presencia de uno o varios centros quirales, siendo dichas características, de gran importancia en el descubrimiento y optimización, desarrollo y mercadeo de nuevos fármacos.^{2,3}

La introducción de herramientas como la química combinatoria y de técnicas como la síntesis orientada hacia la diversidad estructural, han permitido la generación de grandes bibliotecas de compuestos químicos con posible actividad biológica, facilitando la evaluación de las propiedades de varias familias de análogos estructurales, basados o no en productos naturales. Sin embargo, solo un pequeño número de ellos, pasa a formar parte del grupo de nuevas entidades químicas, que posteriormente se aprueban como fármacos. Esto refleja la necesidad que aún existe por optimizar dichas metodologías; incorporar, en mayor medida, el uso de los productos naturales para el diseño de nuevos compuestos bioactivos y la realización de búsquedas colaborativas y más profundas respecto de los compuestos que se han sintetizado y sometido previamente a ensayos biológicos.^{4,5,6,7}

En este contexto, el estudio de las propiedades terapéuticas de algunos productos naturales, como los flavonoides, ha sido foco de interés para muchos científicos desde hace muchos años. No obstante, para el año 2017, solamente 2 tratamientos basados en compuestos polifenólicos habían sido aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA, por sus siglas en inglés: Food and Drug Administration), uno de los cuales, es una combinación de varios polifenoles extraídos de las hojas de té verde, llamado Polyphenon E[®] aprobado en el 2006, que se administra en forma de ungüento para el tratamiento de verrugas genitales. Luego, en el año 2012, se aprobó el uso de Crofelemer, una proantocianidina

oligomérica, que se emplea en el manejo de algunos efectos secundarios, causados por los medicamentos indicados para el tratamiento contra el VIH. Por otra parte, también se han desarrollado diferentes metodologías para la síntesis de flavonoides, derivados y análogos estructurales de estos, muchos de los cuales, han exhibido gran potencial respecto de su actividad biológica y farmacológica. Sin embargo, aun cuando la mayoría de estos compuestos han mostrado resultados prometedores en las pruebas *in vitro*, son muy pocos los que superan las fases clínicas, previas a su aprobación como nuevos fármacos; por tanto, la investigación relacionada con las modificaciones, que se pueden realizar sobre la estructura base de los flavonoides con el fin de potenciar su actividad biológica, es una actividad que continúa desarrollándose en la actualidad.^{8, 9}

4.1.2. Química del grupo Carbonilo

El grupo carbonilo es un grupo funcional en el que un átomo de carbono se encuentra unido a un átomo de oxígeno por medio de un doble enlace. Se trata de una de las funciones más importantes dentro de la química orgánica, pues se le puede encontrar en gran diversidad de compuestos orgánicos como los aldehídos, las cetonas, carbohidratos, los ácidos carboxílicos y sus derivados, entre los que se encuentran las amidas, los ésteres, los anhídridos y los haluros de ácido carboxílico, cuyas estructuras generales se muestran en la figura 1.^{10, 11}

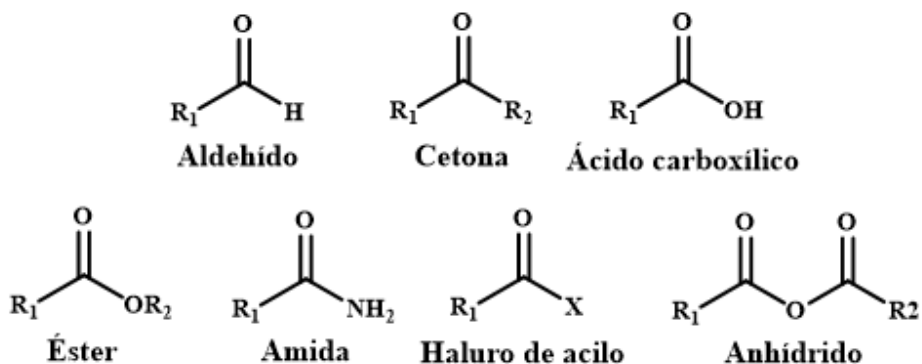


Figura 1. Compuestos conteniendo el grupo carbonilo. R₁ y R₂ pueden ser grupos alquilo o arilo, X = halógeno, usualmente Cl o Br.

La distribución de carga en el grupo carbonilo no es equitativa, esto debido a la diferencia de electronegatividad entre el átomo de carbono (2.5) y el átomo de oxígeno (3.5), provocando que los electrones del enlace se localicen la mayor parte del tiempo sobre el átomo de oxígeno, de

esta forma, se obtiene una carga parcial negativa (δ^-) sobre este, mientras que el carbono adquiere una carga parcial positiva (δ^+). Esta distribución, se puede explicar observando el diagrama de orbitales moleculares para el grupo carbonilo, el cual se muestra en la figura 2, en el que se aprecia que, el par de electrones que forma parte del enlace π , recibe mayor contribución por parte del orbital p del átomo de oxígeno, encontrándose, por tanto, más cerca de este átomo, generando la distribución de carga mencionada previamente. Al tratarse de un enlace doble, también se destacan características como la fuerza del enlace, que es de 720 kJ mol^{-1} en el caso del doble enlace carbono-oxígeno, con respecto a la fuerza de un enlace sencillo, que es de 351 kJ mol^{-1} ; la distancia entre ambos átomos también se ve influenciada, teniendo así que, para el doble enlace carbono-oxígeno, la longitud de enlace es de 1.21 \AA , es más corto, comparado con la longitud de un enlace sencillo entre los mismos átomos, la cual es de 1.43 \AA ; además, los ángulos de enlace en torno al átomo de carbono son de aproximadamente 120° , debido a la hibridación sp^2 de sus orbitales.¹²

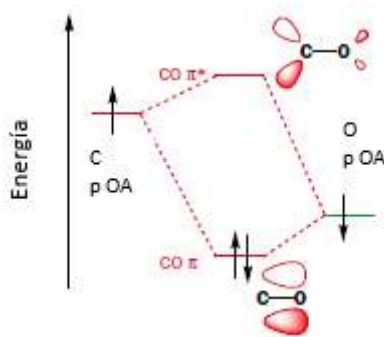


Figura 2. Diagrama de orbitales moleculares para el enlace C=O. Fuente: Modificado de Clayden J.; Greeves N.; Warren S.; Wothers P. (2000). Organic Chemistry. 1ª Edición. OUP Oxford.

El grupo carbonilo se encuentra estabilizado por resonancia del par electrónico en el enlace π , cuyas estructuras contribuyentes se muestran en la figura 3:

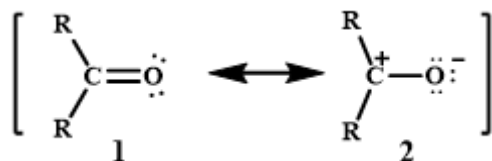


Figura 3. Estructuras contribuyentes del grupo carbonilo.

La estructura contribuyente número 2 es minoritaria con respecto a la primera, puesto que, en esta, hay un mayor número de cargas formales. Sin embargo, esta estructura ilustra la reactividad de este grupo funcional: el oxígeno actúa como un nucleófilo, pues dispone de pares electrónicos que le permiten actuar como una base de Lewis; por otro lado, el carbono con deficiencia electrónica y carga positiva, es un buen electrófilo, actuando como un ácido de Lewis. La deficiencia electrónica del carbono en el grupo carbonilo, puede ser estabilizada por un nucleófilo externo. Cuando esto ocurre, se pueden tener las situaciones ejemplificadas en la figura 4:¹³

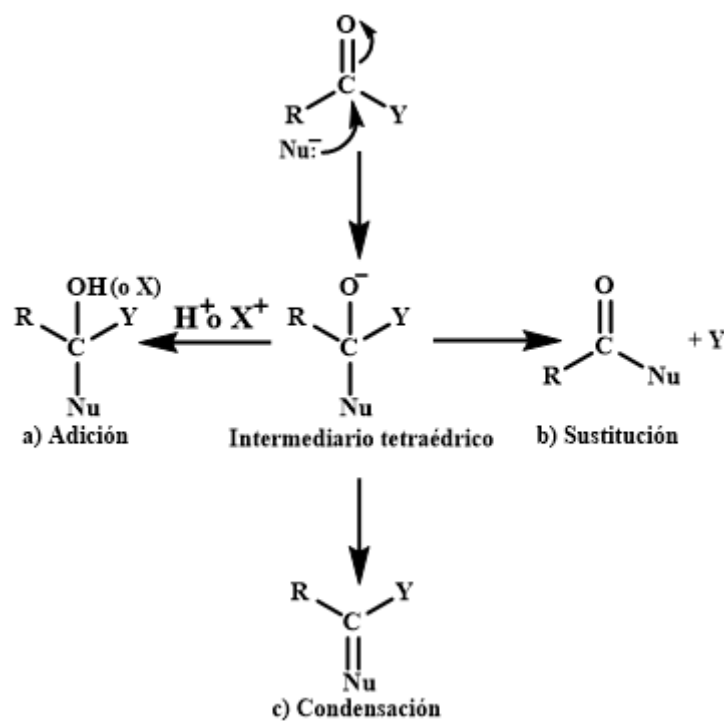


Figura 4. Reacciones del grupo carbonilo. Reacciones de a) Adición, b) Sustitución y c) Condensación.

- a) **Reacción de adición:** ocurre cuando, tras el ataque del nucleófilo, el producto formado es el obtenido al generarse el correspondiente alcohol o alcóxido.¹³
- b) **Reacción de sustitución:** esta reacción tiene lugar cuando uno de los grupos es eliminado del intermediario tetraédrico para restablecer el grupo carbonilo.¹³
- c) **Reacción de condensación:** el producto de condensación se forma cuando, tras la pérdida del oxígeno del grupo carbonilo, se forma un doble enlace con el nucleófilo.¹³

Otro aspecto importante, que debe considerarse con respecto a la reactividad de los compuestos que contienen el grupo carbonilo, es la acidez de los hidrógenos alfa, llamados así, por encontrarse enlazados al carbono alfa con respecto al grupo carbonilo, cuya posición es adyacente a este. Estos hidrógenos son fácilmente sustraídos por una base, formándose el correspondiente ion enolato, que se muestra en la figura 5:¹²

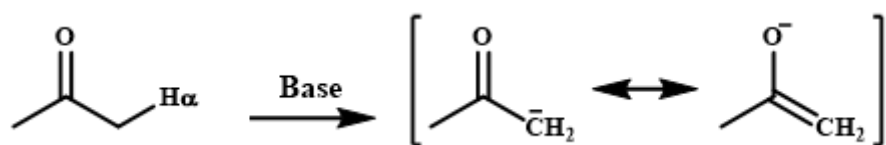


Figura 5. Tautomerismo ceto-enólico.

Este ion, contribuye de forma significativa a la reactividad de los compuestos que contienen el grupo carbonilo, especialmente en las reacciones que dan lugar a la formación de un nuevo enlace carbono-carbono.¹²

4.1.3. Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios categorizados dentro de la familia de los polifenoles, ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se encuentran, generalmente, en las vacuolas de las plantas, dentro de órganos como las hojas, las raíces y las flores, desempeñando diferentes funciones biológicas, entre las que se pueden mencionar: actúan como pigmentos amarillos, anaranjados e incluso azules o violetas, utilizados por las plantas para atraer polinizadores; protegen a las plantas de la radiación ultravioleta excesiva; regulan los niveles de especies oxigenadas altamente reactivas, como los iones superóxido, por ejemplo; también, intervienen en el proceso de crecimiento de las plantas, ya que participan en la regulación y transporte de algunas fitohormonas, particularmente, de auxinas como el ácido indolacético.^{14, 15,}
16

Químicamente, los flavonoides se pueden considerar como derivados de la γ -benzopirano, conocida comúnmente como cromona (figura 6), distinguiéndose diferentes compuestos, en función de los sustituyentes y el grado de oxidación en la estructura base

mencionada, así, por ejemplo, se tienen: chalconas, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavanoles, flavonoles, entre otros, cuyas estructuras se han colocado en la figura 6.^{14, 16}

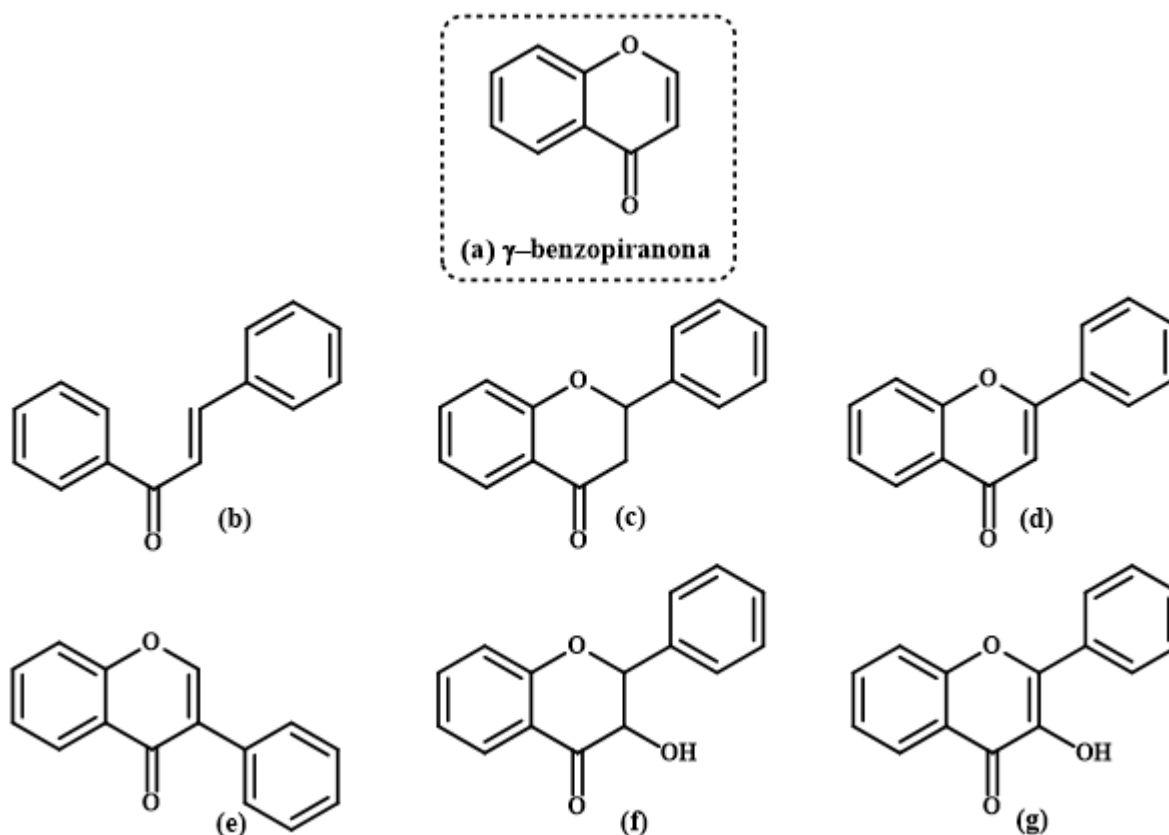


Figura 6. Estructuras de la (a) γ -benzopirano y algunos flavonoides. Las estructuras de los flavonoides son: (b) chalcona, (c) flavanona, (d) flavona, (e) isoflavona, (f) flavanol y (g) flavonol.

En un sentido estructural, los flavonoides, se identifican con un esqueleto básico de la forma $C_6 - C_3 - C_6$, ya sea en compuestos con porciones lineales, como las chalconas (figura 6 (b)); o cicladas, como en el caso de los demás flavonoides mostrados en la figura 6. Por lo tanto, otras variaciones, dependen de los sustituyentes en cualquiera de los anillos de los mismos.¹⁴

4.1.4. Biosíntesis de flavonoides

Las plantas sintetizan flavonoides a partir de p-cumaril-CoA y tres unidades de malonil-CoA. El proceso da inicio con la fenilalanina, un aminoácido producido en la ruta del ácido shikímico, la cual es posteriormente transformada en ácido cinámico, por la acción de la enzima fenilalanina

amonioliasa (PAL, por sus siglas en inglés Phenylalanine Ammonia-Lyase), tras la pérdida de su grupo amino durante la reacción de desaminación oxidativa. Después, se da la incorporación de un grupo hidroxilo en la posición 4 del anillo aromático del ácido cinámico, formándose el ácido p-cumarínico, la enzima que interviene en este proceso es la ácido cinámico 4-hidroxilasa (CA4H, por sus siglas en inglés Cinnamic Acid 4-Hydroxylase). Dicha reacción requiere de oxígeno molecular y de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH por sus siglas en inglés Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) para efectuar la oxidación. Luego, por la acción de la enzima p-cumarato CoA ligasa (4CL, por sus siglas en inglés *p*-Coumarate-CoA Ligase), el ácido p-cumarínico es convertido en p-cumaril-CoA. La unión del p-cumaril-CoA con las tres unidades de malonil-CoA, da lugar a la formación y alargamiento de una cadena lineal, la cual tiene, inicialmente, la estructura de un tetracétido de fenilpropenoide, esta reacción es mediada por la enzima chalcona sintasa, que usa como sustrato el p-cumaril-CoA. Este policétido se pliega de forma bastante específica, permitiendo, en primer lugar, que ocurra una ciclación por una condensación tipo Claisen y, más adelante, la formación de un nuevo anillo aromático por enolización de los grupos cetónicos, ambas reacciones son catalizadas por la enzima chalcona sintasa, siendo el producto formado la chalcona de la naringenina. Posteriormente, la chalcona de la naringenina se transforma en su correspondiente flavanona, conocida como naringenina, por la acción de la enzima chalcona isomerasa. Tanto la chalcona de la naringenina como la naringenina, son los principales precursores de los demás flavonoides, cuando, por la acción catalítica de diferentes enzimas, se llevan a cabo procesos de hidroxilación, metilación, glucosilación, acilación, oxidación y reducción, entre otros, permitiendo la formación de estos. La biosíntesis de flavonoides es un proceso regulado, principalmente, porque depende de la acción enzimática de la fenilalanina amonioliasa, la cual es, a su vez, dependiente de la luz solar. De la misma forma, la producción de dicha enzima, se encuentra relacionada con la respuesta de las plantas ante condiciones de estrés, tales como las infecciones, la disminución de la temperatura ambiente, la poca disponibilidad de agua o el exceso de radiación ultravioleta.^{14, 15, 16, 17}

A continuación, en la figura 7, se esquematiza el proceso de biosíntesis de flavonoides:

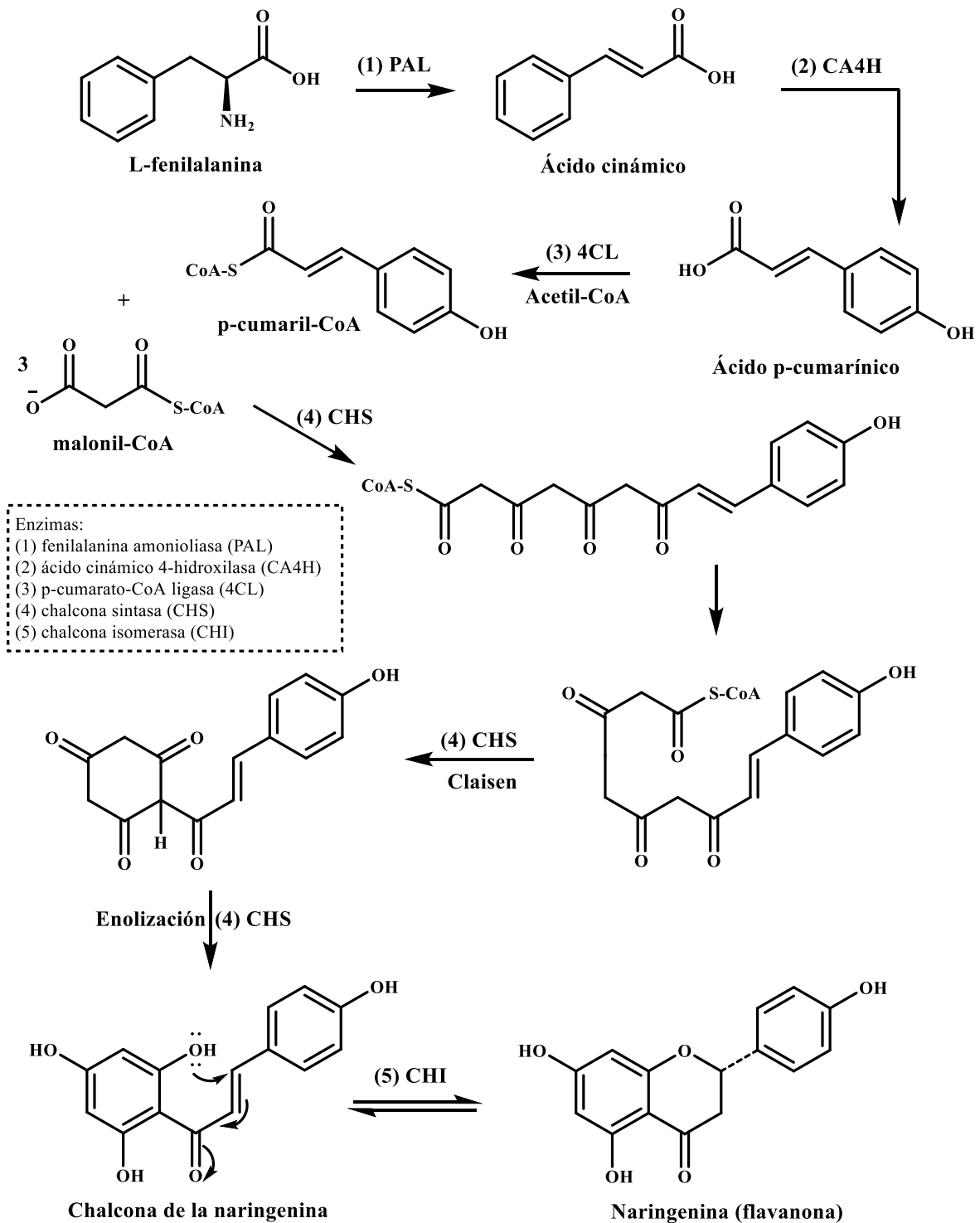


Figura 7. Biosíntesis de flavonoides.

4.2. CHALCONAS

Las chalconas pertenecen a un extenso grupo de metabolitos secundarios llamados flavonoides, específicamente al subgrupo de los chalconoides. Además de proveer color a las hojas y flores de las plantas, las chalconas, también se caracterizan por su actividad farmacológica, encontrándose que, por ejemplo, actúan como antioxidantes, antiinflamatorios, antibacteriales y anti leishmania. Es común encontrar este tipo de compuestos en frutas, vegetales, legumbres y en alimentos a base de soya, así como también a sus isómeros estructurales, las flavanonas.^{18, 19, 20}

La estructura base de las chalconas, 1,3-difenilpropenona, se muestra en la figura 8, así como el sistema de numeración empleado en la misma.^{21, 22}

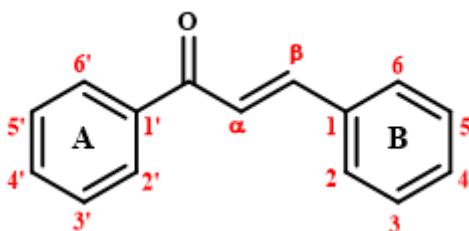
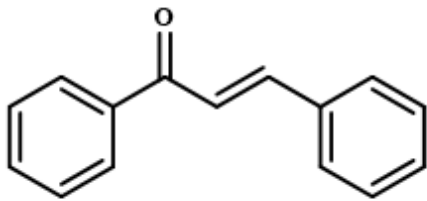
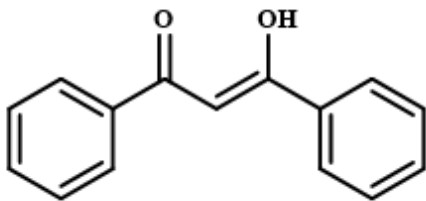
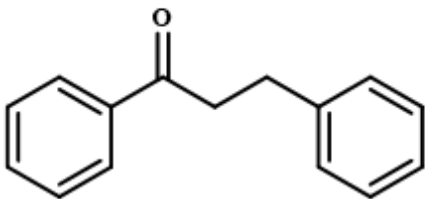
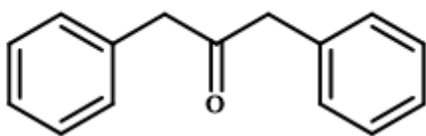
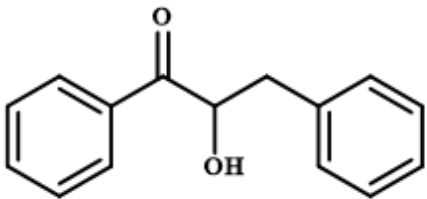
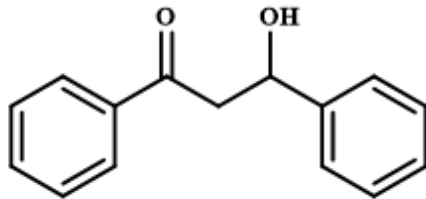
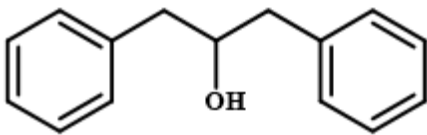
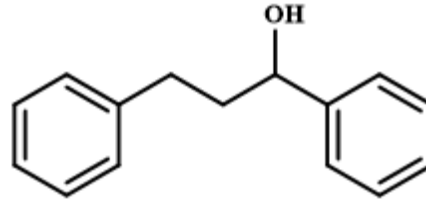


Figura 8. Estructura y numeración de las chalconas.

Se observa en la figura 8 que las chalconas poseen un segmento lineal conformado por 3 átomos de carbono. El primero de ellos, es el carbono del grupo carbonilo, adyacentes a este se tienen, el anillo aromático nombrado como A, cuya numeración cuenta con apóstrofes y designa a las posiciones primas; y, por otro lado, se tiene el sistema olefínico al que pertenecen los carbonos 2 y 3, que usualmente se nombran utilizando las letras griegas alfa y beta respectivamente, así como los átomos de hidrógeno unidos a los mismos. Unido al carbono β , se tiene el segundo anillo aromático, que recibe el nombre de B, en este se emplean números ordinarios para designar las posiciones de los hidrógenos u otros sustituyentes dentro del mismo.^{21, 22}

Variaciones sobre la estructura general de las chalconas producen diversos compuestos que forman parte la familia de los chalconoides, principalmente las que se realizan sobre el grupo carbonilo y el doble enlace carbono – carbono, obteniéndose así, β -hidroxichalconas, chalcanos, hidroxichalcanos, chalcanonas, entre otros. Las estructuras de algunos chalconoides se muestran en la tabla 1.²²

Tabla 1. Estructura química de algunos chalconoides.

| Estructuras químicas de algunos chalconoides comunes | |
|--|--|
|  <p>a) Chalcona</p> |  <p>b) 3-hidrochalcona</p> |
|  <p>c) 1-chalcanona</p> |  <p>d) 2-chalcanona</p> |
|  <p>e) 2-chalcanonol</p> |  <p>f) 3-chalcanonol</p> |
|  <p>g) 2-chalcanol</p> |  <p>h) 1-chalcanol</p> |

Algunos compuestos presentes en la naturaleza como chalconas y 2-chalcanoles, estructuras (a) y (e) respectivamente en la tabla 1 y derivados sintéticos de los mismos, han sido estudiados debido a su actividad farmacológica. Por ejemplo, se han reportado estudios acerca de la hidroxilación estereoselectiva de chalconas en la posición α , con el fin de sintetizar compuestos como flavanoles y flavanonas, que han exhibido importantes resultados en pruebas biológicas. También, existen publicaciones relacionadas con el efecto antiproliferativo de algunos

chalconoides, entre ellos, el dímero de un glucósido de chalconol, extraído del palmito salvaje, que mostró ser efectivo al inhibir significativamente la proliferación de células cancerígenas asociadas al cáncer de próstata a concentraciones de 20, 40 y 100 μM .^{23,24}

4.2.1. Síntesis de Chalconas

Siendo las chalconas importantes puntos de partida para la síntesis de otros flavonoides, y, además, compuestos que exhiben actividad biológica y farmacológica notable, existe bastante interés en la comunidad científica por la preparación de las mismas dentro del laboratorio; así, se han desarrollado diferentes metodologías de síntesis para la obtención de estas.²⁵

A continuación, se presentan algunos de los métodos que diferentes autores han empleado para sintetizar chalconas, así como ejemplos de metodologías desarrolladas recientemente:

a. Reacción de Condensación de Claisen-Schmidt

La reacción de condensación de Claisen-Schmidt, es uno de los métodos más comunes para la obtención de chalconas, se trata de la condensación aldólica entre aldehídos y cetonas empleando catalizadores ácidos o básicos. La reacción recibe este nombre debido a los trabajos realizados por el químico alemán Rainer Ludwig Claisen (1851-1930) y el químico suizo Charles – Claude Alexandre Claparède (1858-1913) quienes obtuvieron dibenzalacetona, estructura (a) mostrada en la figura 9, por condensación de benzaldehído con acetona, utilizando como catalizador, ácido clorhídrico; además de los resultados obtenidos por J. Gustav Schmidt quien sintetizó el mismo compuesto, pero utilizando un catalizador alcalino, y también llevó a cabo la reacción con otras combinaciones de aldehídos y acetona, obteniendo entre sus productos la 1,5-difuranil-1,4-pentadienil-3-ona, estructura (b) en la figura 9.^{26,27}

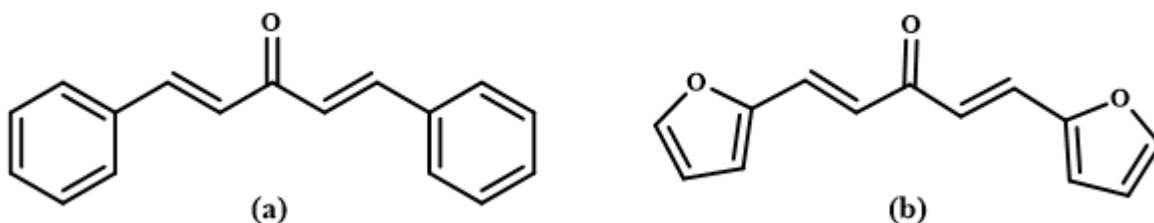


Figura 9. Estructuras de la (a) benzalacetona y (b) 1,5-difuranil-1,4-pentadien-3-ona.

Esta reacción se ha utilizado ampliamente debido a las conveniencias que presenta, por ejemplo, los materiales de partida son sencillos, en un sentido estructural, o en su defecto, fáciles de sintetizar; las condiciones de reacción, como temperatura, presión y tiempo no suelen ser tan extremas; se pueden emplear variedad de disolventes y catalizadores comunes. A continuación, en la figura 10 se muestra la reacción general de Claisen-Schmidt.²⁵



Figura 10. Reacción general de Claisen-Schmidt. Condensación aldólica entre (a) acetofenona y (b) benzaldehído para producir (c) chalcona.

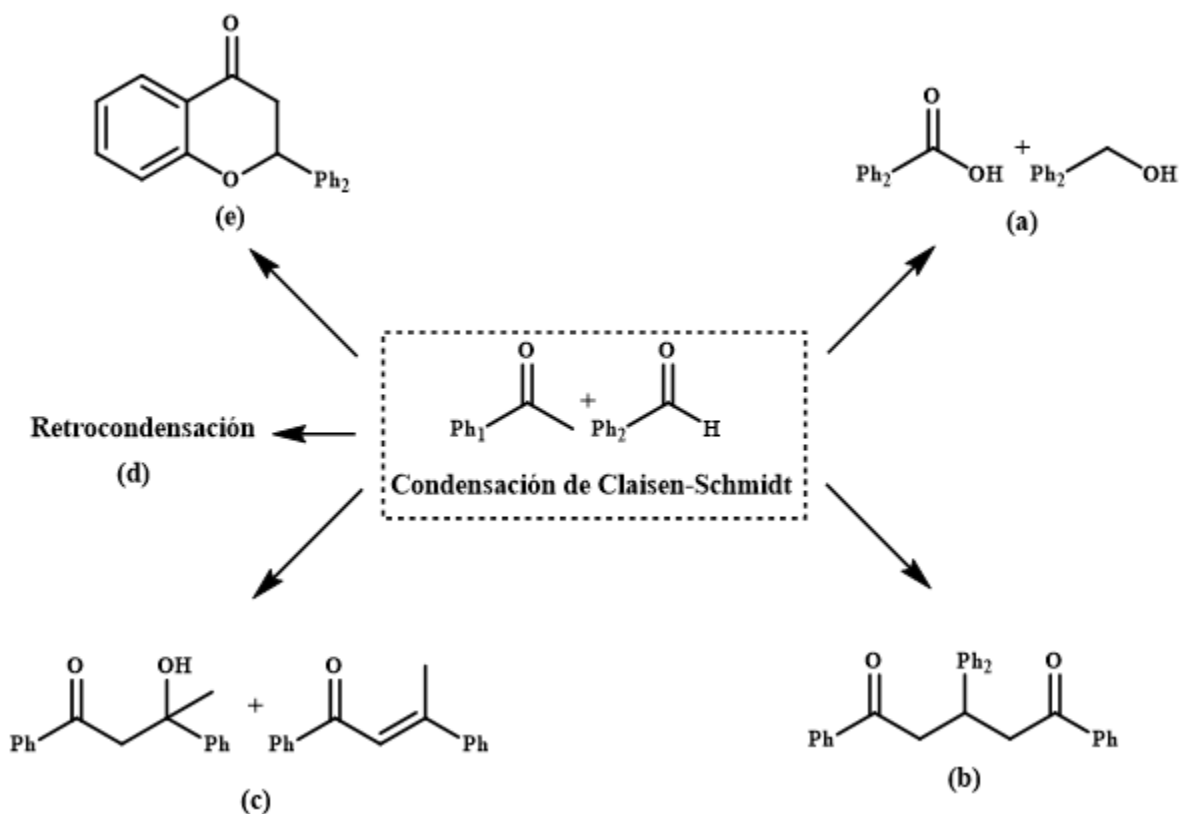


Figura 11. Productos secundarios de la reacción de Claisen-Schmidt. Productos de la reacción de Cannizzaro (a), formación de aductos de Michael (b), productos de autocondensación (c), regeneración de los reactivos o retrocondensación (d) y formación de flavanonas (e).

Algunos de los inconvenientes más importantes de esta reacción son: su lentitud sin el empleo de catalizadores en las cantidades adecuadas o la realización del procedimiento en rangos de temperatura que no favorecen las colisiones efectivas entre los reactivos, hacen que la reacción pueda demorar varios días; por otra parte, se tiene la formación de productos secundarios o productos no deseados, como los que derivan de la autocondensación de las cetonas, los productos de la reacción de Cannizzaro, la formación de los correspondientes aductos de Michael o de las respectivas flavanonas, que disminuyen significativamente la conversión de los reactivos en chalconas, tal como se muestra en la figura 11.^{28, 29, 30}

Si bien la reacción ocurre utilizando catalizadores ácidos o básicos, se emplean con mayor frecuencia los catalizadores básicos para la síntesis de chalconas, pues se han reportado mejores rendimientos bajo dichas condiciones, que los obtenidos al utilizar catalizadores ácidos comunes, aún cuando se ha llevado a cabo la reacción usando bases ordinarias, como NaOH o KOH para llevar a cabo la reacción. Se suelen utilizar concentraciones de base que varían entre 10 – 60 % p/V, la temperatura de reacción, habitualmente oscila entre los 0 – 50 °C, aunque varias reacciones se llevan a cabo a temperatura ambiente. El aumento o disminución de la temperatura depende, principalmente, de la facilidad con la que se forma el ion enolato (figura 5), cuando la base sustrae un protón alfa de la acetofenona utilizada, que corresponde al primer paso del mecanismo de reacción en medio básico, tal como observa en la figura 12. A su vez, la acidez del protón alfa depende, entre otros factores, del tipo de sustituyentes en el anillo aromático de la acetofenona, así, la pérdida del protón α se dificulta cuando el sustituyente es un nucleófilo; en tanto que, la presencia de un sustituyente electrofílico aumenta la acidez de los mismos. Luego, en la segunda etapa, el ion enolato realiza el ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico del aldehído, formándose un intermediario tetraédrico como el de la figura 4 y al mismo tiempo, el nuevo enlace carbono – carbono. Este es el paso determinante de la reacción, debido a la formación del nuevo enlace, y depende en gran medida del carácter electrofílico del aldehído, el cual se ve favorecido por el efecto de grupos sustractores de densidad electrónica, mientras que los grupos donadores de densidad electrónica inciden en la disminución del rendimiento de la reacción, pues añaden densidad electrónica al sistema conjugado, disminuyendo el carácter electrofílico del aldehído. Con la adición de ácido, se da la protonación del ion alcóxido, dando lugar a la tercera etapa de la reacción, que a la vez facilita la eliminación de una molécula de agua durante la etapa final del

proceso, generándose así el doble enlace carbono – carbono, con lo que se establece el sistema de la 1,3-diarilpropenona.^{25, 31, 32, 33}

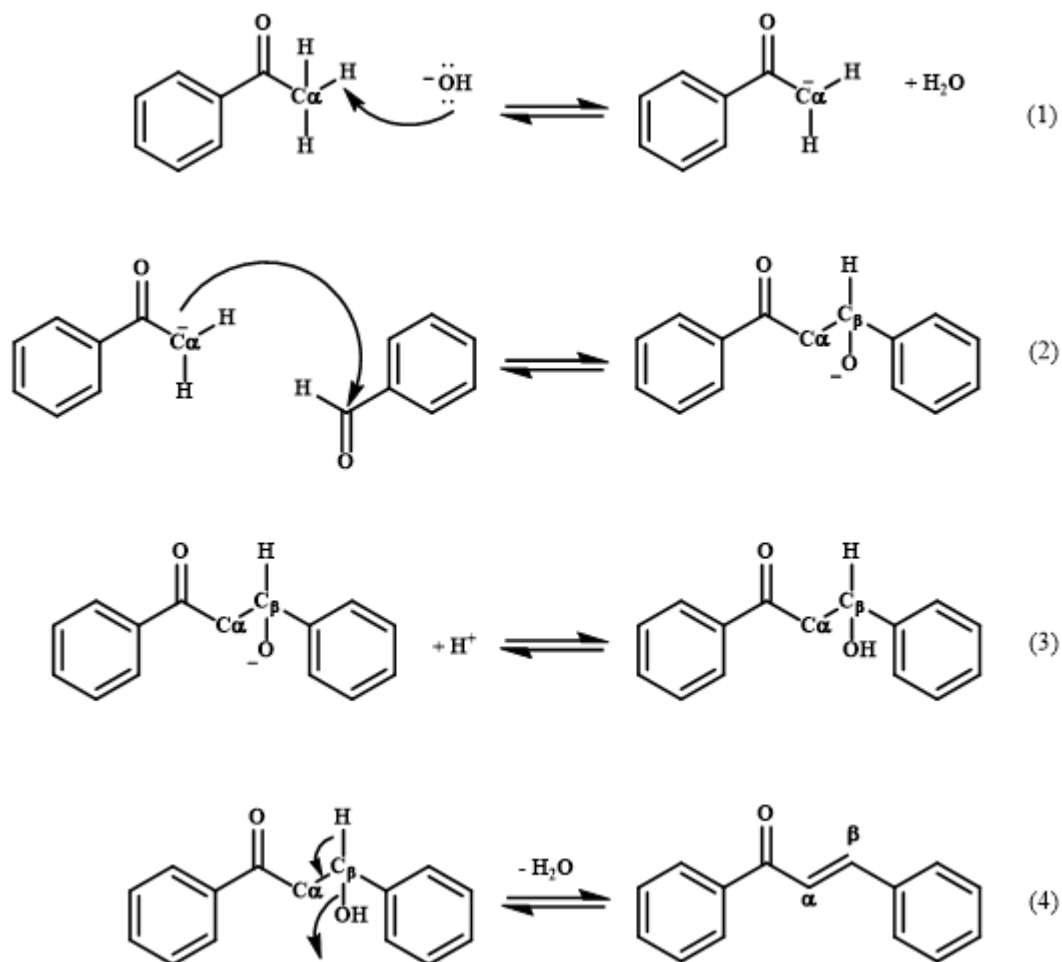


Figura 12. Mecanismo de reacción de Claisen-Schmidt en medio básico. (1) formación del ion enolato, (2) ataque nucleofílico del ion enolato al carbono carbonílico del aldehído, (3) protonación del alcóxido y (4) pérdida de agua y formación del doble enlace carbono – carbono.

El primer registro de síntesis de chalconas data de 1896, cuando el químico polaco Stanisław Kostanecki y sus colaboradores reportaron la obtención de las chalconas de 2, 3 y 4-hidroxibenzaldehído con acetofenona, además de sus correspondientes derivados acetilados y bromados, haciendo uso de la reacción de condensación de Claisen-Schmidt, específicamente, empleando condiciones de reacción similares a las utilizadas por Gustav Schmidt, es decir, catalizadores alcalinos.^{34, 35, 36}

Se han realizado diversas modificaciones a esta reacción, principalmente con respecto a las condiciones en que esta se lleva a cabo, los catalizadores utilizados y las fuentes de calentamiento. Seguidamente, se muestran algunas de las variaciones realizadas sobre la reacción clásica de Claisen-Schmidt en la figura 13.^{25, 37, 38}

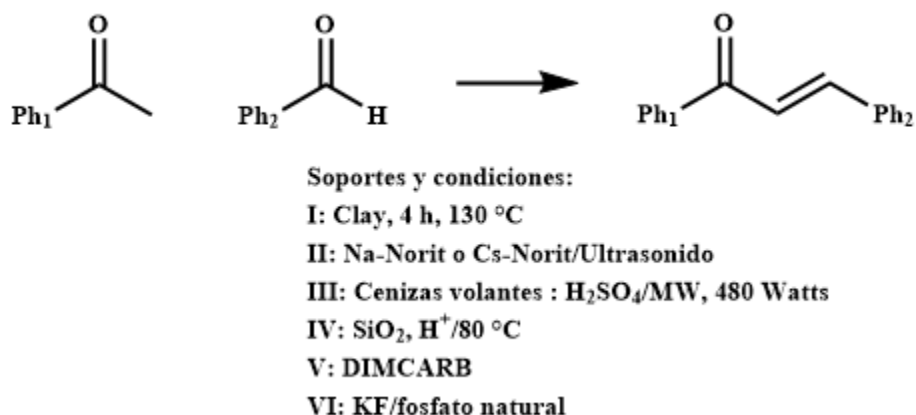


Figura 13. Otras condiciones de reacción para realizar la condensación de Claisen-Schmidt.

Así, por ejemplo, se tiene el uso de diferentes arcillas que actúan como catalizadores para llevar a cabo la condensación entre los aldehídos y las cetonas, como se especifica en las condiciones de reacción I (figura 13). Entre las principales arcillas que se han empleado se encuentran diferentes tipos de montmorillonitas, hectorita, bentonita y colinita. El rango de temperaturas en que se lleva a cabo la reacción depende de la estabilidad tanto de los reactivos como del catalizador, variando entre 130-150 °C. La fuente de calentamiento es la radiación de microondas, con tiempos de reacción que van de 1-5 h y se lleva a cabo en ausencia de disolvente. Sin embargo, entre los principales inconvenientes de esta metodología se encuentran los costos para la obtención de las arcillas y la formación de algunos productos secundarios.^{39, 40}

En la metodología número II, se describe el empleo de carbón activado tratado con disoluciones de metales alcalinos, entre ellos carbonato de sodio y de cesio e hidróxido de sodio, como catalizadores para efectuar la condensación entre acetofenonas y benzaldehídos, con el fin de obtener las correspondientes chalconas. Además del empleo de catalizadores a base de carbón activado comercial con diferentes composiciones y métodos de activación, se ha reportado el uso de carbón activado obtenido a partir de materiales de partida como huesos de res y cáscaras de

coco, e incluso el empleo de otros reactivos como el hidróxido de bario (soluble). Las reacciones generalmente se llevan a cabo a temperaturas que se encuentran en un rango de 25 – 50 °C, con tiempos de reacción que varían desde 10 minutos hasta 5 horas cuando se aplica sonicación o hasta de 24 horas a temperatura ambiente y sin sonicación, reportándose rendimientos desde 40 % hasta 75 %.^{41, 42, 43, 44, 45}

Por otra parte, también se han empleado como catalizadores de reacción, cenizas volantes, que es una combinación de óxidos metálicos producto de la combustión de carbón en las centrales termoeléctricas, mezcladas con ácido sulfúrico. Con el uso de este catalizador ácido y radiación de microondas como fuente de calentamiento a una potencia de 480 Watts en ausencia de disolvente, se han logrado sintetizar chalconas con rendimientos entre 90 - 94 % en tiempos de reacción bastante cortos, de 5 – 10 minutos tal como se muestra en las condiciones de reacción III de la figura 13. Además del rendimiento, otras ventajas de este método, son que el catalizador se emplea en pequeñas cantidades y se puede reactivar para ser utilizado posteriormente en otras 5 reacciones sin que el rendimiento se vea disminuido significativamente.^{38, 46, 47}

Otra metodología similar a la anterior, consiste en el uso de gel de sílice mezclado con ácido sulfúrico, como catalizador de la condensación de Claisen-Schmidt para producir chalconas con porcentajes de rendimiento superiores al 90 %. La reacción se lleva a cabo en ausencia de disolvente y la mezcla de reacción se calienta en horno a una temperatura de 80 °C por un periodo de 2 – 3.5 horas, condiciones que se muestran en la figura 13 IV.^{38, 43, 48}

En la reacción V de la figura 13 se describe el uso de dimetilcarbamato de dimetilamonio (DIMCARB siglas en inglés para dimethylammonium dimethylcarbamate), como catalizador de la reacción de Claisen-Schmidt, se trata de un aducto de dióxido de carbono y dimetilamina junto con el ion dimetilamonio, cuya estructura se muestra en la figura 14. Además de actuar como catalizador, se usa como disolvente para llevar a cabo la reacción, la cual ocurre a una temperatura de 50 °C, pues a temperaturas más altas el DIMCARB se disocia en sus respectivos componentes, característica que permite regenerar el catalizador, ya que los mismos pueden ser condensados nuevamente para ser usados en reacciones posteriores. La reacción puede demorar de 2 – 32 horas, con rendimientos que varían de 60 – 80 %.^{38, 49}

Asimismo, se ha aprovechado el carácter fuertemente básico del fluoruro de potasio soportado sobre fosfato natural (KF/fosfato natural), condición V de la figura 13 para efectuar la

síntesis de 2'-hidroxichalconas y flavanonas con rendimientos de 16 % - 44 % y 30 % - 58 % para ambos compuestos respectivamente. Los aldehídos y acetofenonas de partida junto con una pequeña cantidad de n-tetradecano se mezclan y son calentados a 180 °C en baño de aceite y posteriormente se agrega el catalizador, siendo el tiempo de reacción de 4 horas, obteniéndose los productos mencionados anteriormente en proporciones que varían entre 23 – 54 % y 37 – 39 % para las correspondientes 2'-hidroxichalconas y flavanonas.^{38, 43, 50}

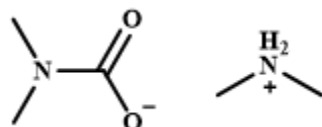


Figura 14. Estructura química del dimetilcarbamato de dimetilamonio (DIMCARB).

4.2.2. Otras reacciones para la síntesis de chalconas

Si bien, la condensación de Claisen-Schmidt es uno de los métodos más utilizados para sintetizar chalconas, se han reportado varios métodos para obtener este tipo de compuestos. A continuación, se presentan algunos de los más representativos:

a. Síntesis de chalconas vía acoplamiento de Suzuki

La síntesis de chalconas haciendo uso de esta metodología se basa en los trabajos realizados por Akira Suzuki en 1979, que consiste en la formación de nuevos enlaces carbono – carbono, ocupando paladio como catalizador de dicha reacción. El primer registro de síntesis de chalconas vía acoplamiento de Suzuki data del año 2003 y fue realizado por Said Eddarir y su equipo de trabajo, quienes obtuvieron una serie de chalconas con rendimientos desde 68 % hasta 93 %, aplicando condiciones de reacción similares a las reportadas por Mustapha Haddach en 1999 para la síntesis de diferentes cetonas, tal como se muestra en la figura 15 A, siendo el solvente tolueno anhidro, utilizándose como base carbonato de cesio y como catalizador tetrakis(trifenilfosfina)-paladio (0). Trabajos más recientes incluyen la síntesis de chalconas a partir de tetrafluoroborato de *N*-vinilpridinio y ácidos fenilborónicos (figura 15 B) con rendimientos 60 % – 92 %, siendo el uso de sales como sustratos de esta reacción, una novedad; así como los procesos que involucran carbonilación y descarboxilación de algunos reactivos que participan en la reacción de acoplamiento.^{25, 43, 51, 52, 53}

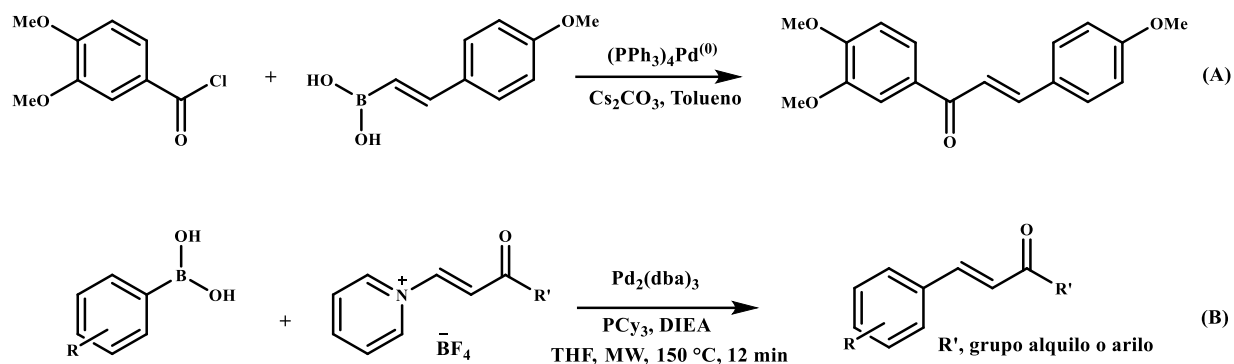


Figura 15. (A) síntesis de chalconas vía acoplamiento de Suzuki por Eddarir, basada en la metodología de Haddach. (B) síntesis de chalconas vía acoplamiento de Suzuki a partir de sales de vinilpiridinio y ácidos fenilborónicos.

b. Síntesis de chalconas vía reacción de acoplamiento de Heck

Además de la reacción mencionada previamente, los catalizadores a base de paladio son utilizados en la reacción de acoplamiento de Heck, cuyos materiales de partida suelen ser ácidos fenilborónicos o haluros de arilo y cetonas insaturadas. En 2003 Cavarischia y su equipo reportaron la primera síntesis de chalconas empleando las condiciones de reacción de Heck, mezclando cantidades equimolares de 1-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona y acetato de 4-yodofenilo disueltas en acetonitrilo/trietilamina proporción 3.5:1, y acetato de paladio (II) como catalizador en presencia de trifenilfosfina, agitando todos los componentes en reflujo a 85 °C bajo atmósfera de argón durante 4 horas, obteniendo la correspondiente chalcona con un 94 % de rendimiento, como se muestra en la figura 16 A. Posteriormente, se desarrollaron otras metodologías basadas en la reacción de Heck, algunas de las cuales incluyen el uso de cetonas con estructuras de bases de Mannich (figura 16 B) como precursoras para la formación de chalconas en presencia de haluros de arilo, en condiciones de reacción similares a las anteriores, cuyos rendimientos fueron moderados; además de procesos de carbonilación empleando, nuevamente como catalizador de la reacción, complejos a base de paladio y partiendo de haluros de arilo, principalmente yoduros, estireno y dióxido de carbono con rendimientos superiores al 73 %.^{25, 53, 54, 55, 56, 57}

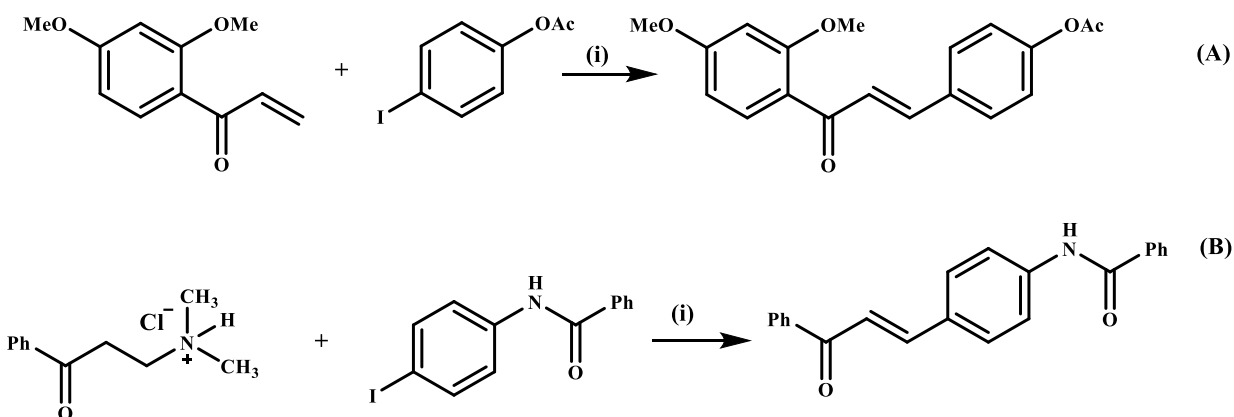


Figura 16. (A) Síntesis de chalconas vía reacción de acoplamiento de Heck. (i): Pd(OAc)₂, Ph₃P, CH₃CN, Et₃N, reflujo a 85 °C, 4 horas. (B) Síntesis de chalconas vía acoplamiento de Heck a partir de cetonas con estructura de bases de Manich, (i) Pd(OAc)₂, DMFA, trietilamina, 140 °C, 30 min.

c. Síntesis de chalconas vía reacción de Wittig

Dado que las chalconas poseen dentro de su estructura química básica un doble enlace, la síntesis de estas puede desarrollarse a partir de reacciones de olefinación, por ejemplo, la olefinación de Wittig a partir de la correspondiente 1-fenil-2-(trifenilfosforaniliden)etanona y benzaldehído. La reacción se completa tras 30 horas en reflujo usando como disolvente tetrahidrofurano, con rendimientos cercanos al 70 %. Posteriormente, se llevó a cabo la misma reacción, utilizando sílica gel como soporte de los materiales de partida y calentando la mezcla por radiación de microondas, reduciendo el tiempo de reacción a un máximo de 6 minutos, al mismo tiempo que los rendimientos se elevaron a un rango de entre 86 – 90 %, tal como se observa en la figura 17.^{25, 58}

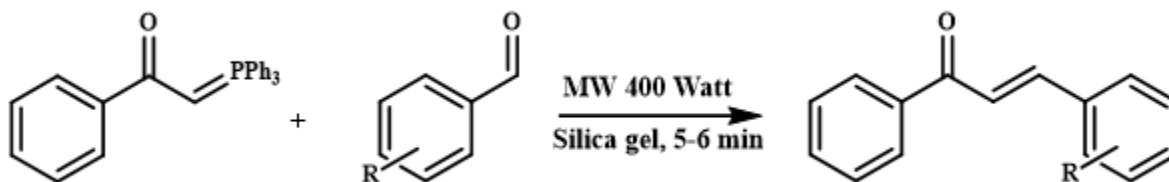


Figura 17. Síntesis de chalconas por reacción de olefinación de Wittig. R = H, Cl, Br, OMe y Me en distintas posiciones.

d. Síntesis de chalconas vía olefinación de Julia-Kocienski

Se trata de una metodología más reciente para la obtención de chalconas, basada en la reacción de olefinación de Julia-Kocienski. Data del año 2010 y fue realizada por Atul Kumar y su equipo de trabajo, a partir de diferentes aldehídos aromáticos y empleando sulfonas como reactivos de Julia, THF como disolvente y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) como base no nucleofílica, es decir, una base estéricamente impedida que es débilmente nucleofílica. La reacción tarda entre 13 – 21 horas para completarse, generando las respectivas chalconas, con rendimientos entre 24 % - 88 %. A continuación, en la figura 18, se muestra el esquema general de dicha reacción.^{25, 59}

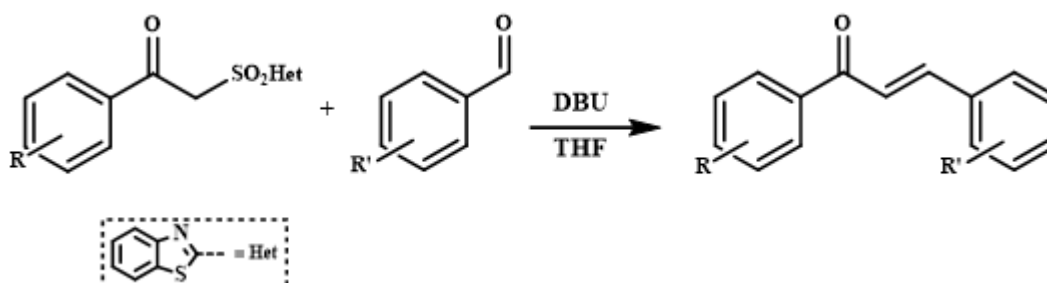


Figura 18. Reacción de olefinación de Julia-Kocienski para la obtención de chalconas.

4.2.3. Aplicaciones biológicas de las chalconas

Diversidad de chalconas de origen natural y sintético se han reportado como compuestos de gran interés biológico, debido a su actividad antimalárica, anti-leishmania, anti-cáncer, antioxidante, anti-tuberculosis, antimitótica, antifúngica, antibacterial, entre otras. Aunque estos compuestos han presentado excelentes resultados en las pruebas in vitro, las concentraciones que se requieren para que los resultados de las pruebas in vivo sean similares, son muy altas, dificultando su aprobación como nuevos fármacos. Esto ha motivado que se incremente el número de estudios relacionados con la extracción de chalconas de diferentes plantas, la síntesis de nuevas chalconas y derivados de estas, que sean semejantes en propiedades biológicas a las que han sido previamente estudiadas, pero actuando a menores concentraciones.^{9, 59}

A continuación, se presentan algunos ejemplos de chalconas que poseen actividad biológica notable:

En 1990 se publicó un estudio realizado por Koichi Shudo y su equipo de trabajo, en el que se probó la actividad de diversos compuestos químicos contra células asociadas a la leucemia mieloide en comparación con el ácido retinoico. Los resultados mostraron que dos de los compuestos sintetizados, conteniendo estructuras de chalcona, fueron más activos que el ácido retinoico, los cuales fueron el ácido 4-[(*E*)-3-[3,5-bis(trimetilsilil)fenil]-3-oxoprop-1-enil] benzoico y el ácido 4-[(*E*)-[3,5-bis(trimetilgermil)fenil]-3-oxoprop-1-enil] benzoico, estructuras mostrada en la figura 19 (A). Incluso los derivados-mono sustituidos en la posición 3, exhibieron actividad significativa contra las células mencionadas previamente durante las pruebas in vitro.⁶⁰

Satyanarayana y Rao publicaron en 1995 los resultados de su investigación, relacionada con la actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética de una serie de sidnonas conteniendo estructuras de chalconas. Algunos de los compuestos sintetizados por el equipo de trabajo, demostraron ser efectivos en las pruebas in vivo realizadas, en comparación con los respectivos controles positivos empleados. A pesar de la efectividad de algunos de los compuestos obtenidos, las concentraciones en que se administraron a las ratas y ratones de prueba fueron mayores a las correspondientes de los controles positivos. En la figura 19 (B) se muestra la estructura de los compuestos que obtuvieron los resultados más significativos.⁶¹

De la misma forma, se han publicado algunos artículos de revisión que recopilan información sobre la actividad biológica y farmacológica de diversas chalconas y compuestos relacionados.

Por ejemplo, el artículo de revisión publicado en 2004 por James Sikorski, en el que se hace mención de chalconas sintéticas y presentes de forma natural en diversas plantas, que poseen actividad antioxidante, anti-cáncer, antiinflamatoria, entre otras. Respecto a la actividad antioxidante, se ha estudiado la capacidad inhibitoria que estos poseen sobre los procesos asociados a los radicales libres que intervienen en la formación de sustancias sumamente reactivas y tóxicas, conocidos por provocar graves problemas salud, ya que suelen ser mutagénicos y carcinogénicos. Así, compuestos como las licochalconas B y D, figura 19 (C), extraídas de las raíces de *Glycyrrhiza inflata*, son capaces de reducir la formación de radicales libres como superóxidos (O_2^-), evitando significativamente el proceso de peroxidación lipídica, a la vez que mostraron buenos resultados en la prueba de capacidad antioxidante DPPH o radical 2,2'-difencil-1-picrilhidrazilo (DPPH, nombre en inglés del radical 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl); así como

también la brousochalcona A, figura 19 (C), extraída de *Broussonetia papyrifera*, que resultó ser igual de efectiva comparada con antioxidantes comerciales como el butilhidroxitolueno (BHT) o naturales como el α -tocoferol o vitamina E.⁶²

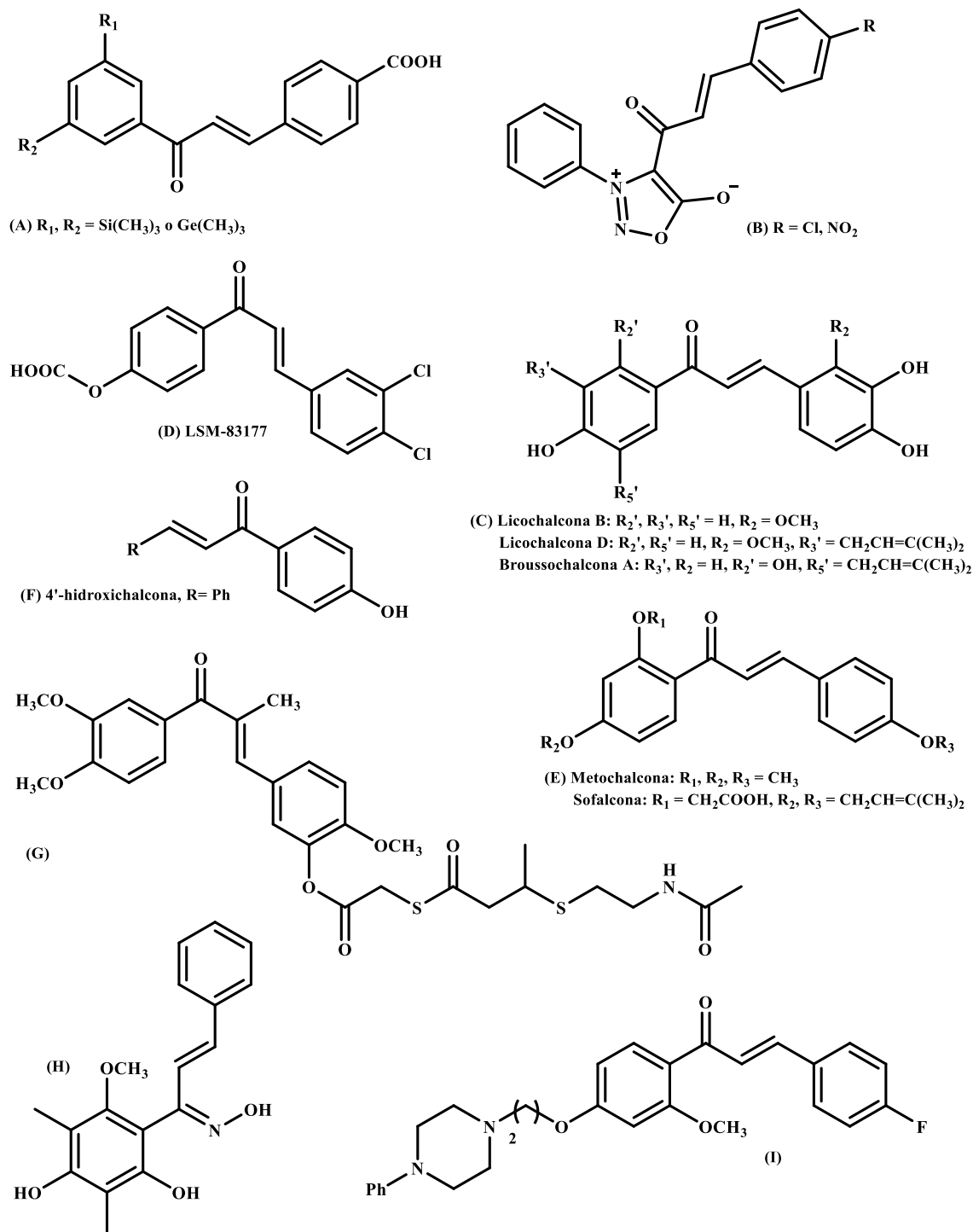


Figura 19. Estructura de algunas chalconas y derivados con actividad biológica.

Por otra parte, también se mencionan algunas chalconas que han sido estudiadas por su capacidad de inhibir la proliferación de células cancerígenas. Algunos mecanismos de acción se centran en la función de proteínas como la p53, que es la responsable de controlar los procesos de proliferación celular y de activar mecanismos de reparación cuando ocurren defectos en la síntesis de ADN. Sin embargo, el mecanismo de regulación de dicho supresor tumoral, se basa en la unión de este con la proteína MDM2, por sus siglas en inglés mouse double minute-2, causando la disminución o cese de la función de la p53. Por ello, el desarrollo de algunos tratamientos contra el cáncer, se basan en la inactivación de la unión entre ambas proteínas, tal es el caso de un grupo de chalconas sintetizadas por un equipo de trabajo de Hoffmann-La Roche, con la capacidad de unirse al extremo N-terminal de la proteína MDM2, inactivando en gran medida el efecto de la unión entre esta y la proteína p53. Una chalcona en particular, la LSM-83177, cuya estructura se muestra en la figura 19 (D), disminuyó la actividad de la proteína MDM2 en un porcentaje mayor al 70 % a una concentración de 40 μM .^{62, 63, 64}

En el mismo documento, se reportan la metochalcona y sofalcona, figura 19 (E), que han sido empleadas y en algunos países comercializadas como fármacos colerético y anti-úlceras respectivamente, aunque aún se encuentran en estado de fármacos experimentales, poseen muy buena actividad como protectores de la mucosa gástrica e inhibiendo el crecimiento de colonias de *Helicobacter pylori*.⁶²

Algunos estudios relacionados con la actividad fungicida de las chalconas datan de inicios de la década de los 90. Por ejemplo, en 1991, Bilgin y su equipo de trabajo reportaron la síntesis de 19 chalconas que fueron probadas contra diferentes especies del género *Candida*. Siendo la 4'-hidroxichalcona, mostrada en la figura 19 (F), la más importante de la serie, ya que su capacidad fungicida fue similar a la de los controles positivos, observándose gran eficacia contra la especie *Candida parapsilosis*.⁶⁵

Por otra parte, en el año 2007 se sintetizaron y patentaron derivados de compuestos conteniendo estructura de chalcona, figuras 19 (G) y (H) respectivamente, que demostraron ser efectivos fungicidas, dichos compuestos presentan otros rasgos estructurales como oximas y cadenas alquílicas azufradas.^{66, 67}

En el año 2019, Bonvicini y su grupo de trabajo, reportaron la síntesis de una larga serie de chalconas y derivados de las mismas, algunas de las cuales exhibieron valores de inhibición del

crecimiento de especies de *Candida* y otros hongos, comparables a los de los fungicidas utilizados como controles positivos. Aunque los compuestos han sido probados en ensayos in vitro solamente, un compuesto en particular, mostrado en la figura 19 (I) mostró mayor efectividad inhibiendo el crecimiento de hongos que los fungicidas de control. Además, otras características de interés clínico, son la capacidad de este compuesto para inhibir la formación de hifas y de biopelículas, ambas asociadas con los procesos de resistencia de dichos microorganismos, convirtiéndolo en un excelente candidato para futuras investigaciones.⁶⁸

4.3. FLAVONAS

Las flavonas, al igual que las chalconas, pertenecen al amplio grupo de metabolitos secundarios conocidos como flavonoides. Se les encuentra en una gran variedad de frutas, vegetales y algunas especias, siendo los responsables de los colores amarillo y anaranjado en diversas plantas. La estructura base de las flavonas es la γ -benzopirano, figura 6 (a). Estructuralmente, se componen de tres diferentes anillos, denominados A, B y C. El sistema empleado para indicar su numeración inicia con el átomo de oxígeno del anillo C, que ocupa la posición 1, en tanto que la posición 4 le pertenece al carbono que forma parte del grupo carbonilo. La numeración continúa en el anillo A, desde la posición 5 hasta la 8, mientras que en el anillo B se tienen las posiciones que van desde 1' hasta 6', tal como se muestra en la figura 20.^{18, 21, 69}

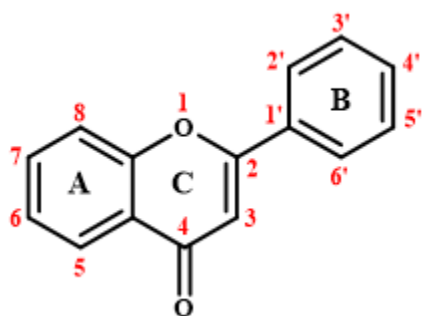


Figura 20. Estructura general y numeración de las flavonas.

Diversas flavonas de origen natural y sintético han sido estudiadas con el fin de desarrollar nuevos tratamientos contra diferentes enfermedades, debido a la actividad biológica que estas

exhiben. Sin embargo, muy pocos tratamientos que incluyen flavonas o compuestos relacionados, son comercializados actualmente, entre ellos, la diosmina comercializada como Daflon®, o el Flavoxato, utilizados como tratamientos para problemas de las vías circulatorias y como relajante muscular respectivamente.^{18, 21}

Modificaciones en el anillo C de la estructura general de las flavonas, conducen a la formación de otros flavonoides, entre ellos, 3-hidroxi flavonas, flavanonas, flavanoles, entre otros, como los mostrados previamente en la figura 6.¹⁴

4.3.1. Síntesis de flavonas

Existen distintas metodologías para sintetizar flavonas y otros flavonoides similares, debido a que estos compuestos son objeto de estudio en diversos campos de la investigación científica. Algunos de los métodos más usuales implican la ciclación de 2'-hidroxichalconas, la oxidación de flavanonas, reacciones de reordenamiento y de acoplamiento usando catalizadores metálicos, entre otros.^{21, 70}

a. Reacción de Algar-Flynn-Oyamada

La reacción de Algar-Flynn-Oyamada es una metodología para la obtención de 3-hidroxi flavonas, conocidas también como flavanoles, a partir de sus correspondientes 2'-hidroxichalconas. Motivados por el desarrollo de metodologías que permitieran realizar la síntesis de diversos flavonoides, tanto Joseph Algar junto a John Flynn en 1934 como Taichiro Oyamada en 1935 estudiaron el efecto del peróxido de hidrógeno sobre disoluciones alcohólicas alcalinas de 2'-hidroxichalconas, obteniendo las correspondientes 3'-hidroxi flavonas con rendimientos desde moderados a muy buenos. Ambos procedimientos son similares, siendo la temperatura de reacción, la variante dentro de los mismos; en tanto que Algar y Flynn llevaron a cabo la reacción a altas temperaturas, Oyamada la realizó en un rango de temperatura de entre 0 – 5 °C, siendo el último quien obtuvo mayores porcentajes de rendimiento (40 % - 90 %).^{71, 72}

La reacción general a partir de los procedimientos mencionados anteriormente, consiste en la ciclación oxidativa de 2'-hidroxichalconas en medio básico, empleando como agente oxidante peróxido de hidrógeno, tal como se muestra en la figura 21.

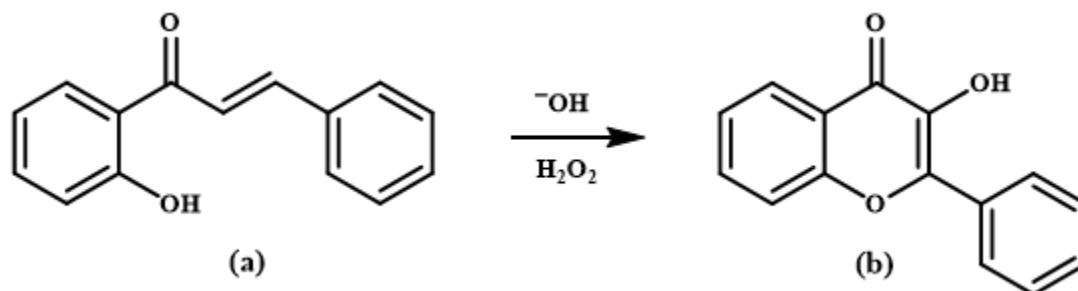


Figura 21. Reacción general de Algar-Flynn-Oyamada para la obtención de 3-hidroxi flavonas (b) a partir de 2'-hidroxichalconas (a).

A pesar que la reacción procede de tal forma que la mayor parte de reactivo se transforma en la correspondiente 3-hidroxi flavona, existen ocasiones en que se forman algunos productos secundarios, entre ellos, las respectivas auronas y los productos de oxidación generados a partir de la reacción de retrocondensación de la 2'-hidroxichalcona, tal como se muestra en la figura 22, y que además afectan el rendimiento de la misma.^{73, 74}

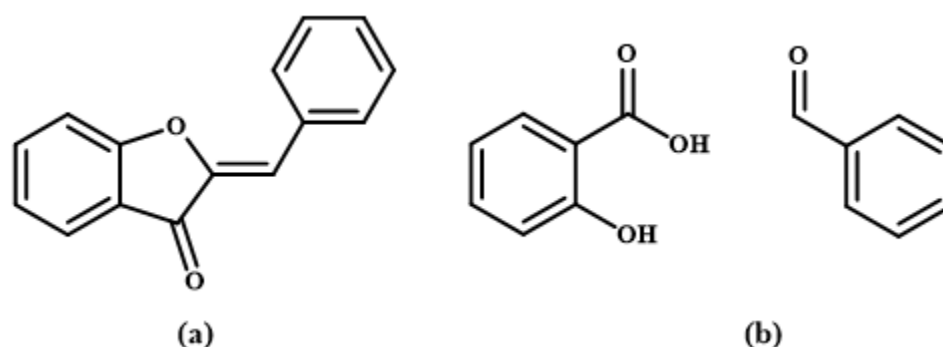


Figura 22. Estructuras químicas de los productos secundarios formados en la reacción de Algar-Flynn-Oyamada. (a) Aurona, (b) productos de retrocondensación de la 2'-hidroxichalcona.

El mecanismo de reacción que explica la formación de las 3-hidroxi flavonas sigue siendo tema de debate en la comunidad científica, pues se han sugerido diferentes hipótesis referentes a este proceso, entre las que se encuentran i) la ciclación y oxidación del epóxido de la chalcona y ii) la ciclación de la chalcona para formar la respectiva flavanona y posterior oxidación a 3-hidroxi flavona. Algunos autores sostienen que la formación de epóxidos de 2'-hidroxichalconas no es viable en medio fuertemente básico, empleando peróxido de hidrógeno como oxidante, por

lo que sugieren que la reacción procede de acuerdo con el segundo mecanismo. Sin embargo, debido a pruebas derivadas de estudios computacionales y experimentales de la reacción, es el primer mecanismo el que se ha desarrollado con más detalle y que, por lo tanto, se emplea con mayor aceptación. Por ejemplo, se han reportado varias metodologías en que se describe la síntesis de los epóxidos de diferentes 2'-hidroxichalconas en disoluciones de basicidad media, utilizando como agente oxidante disolución de peróxido de hidrógeno al 30 %. Por otra parte, el seguimiento de la reacción de Algar-Flynn-Oyamada por medio de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS, por sus siglas en inglés Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) y resonancia magnética nuclear de protón ^1H -RMN ha permitido demostrar la formación de los epóxidos de 2'-hidroxichalconas como intermediarios de la formación de las correspondientes 3-hidroxi-flavonas, bajo las condiciones de reacción mencionadas, en un amplio rango de temperaturas, por tanto, las estructuras de los epóxidos de 2'-hidroxichalconas se incluyen en el mecanismo de reacción, mostrado en la figura 23.^{73, 74, 75, 76, 77}

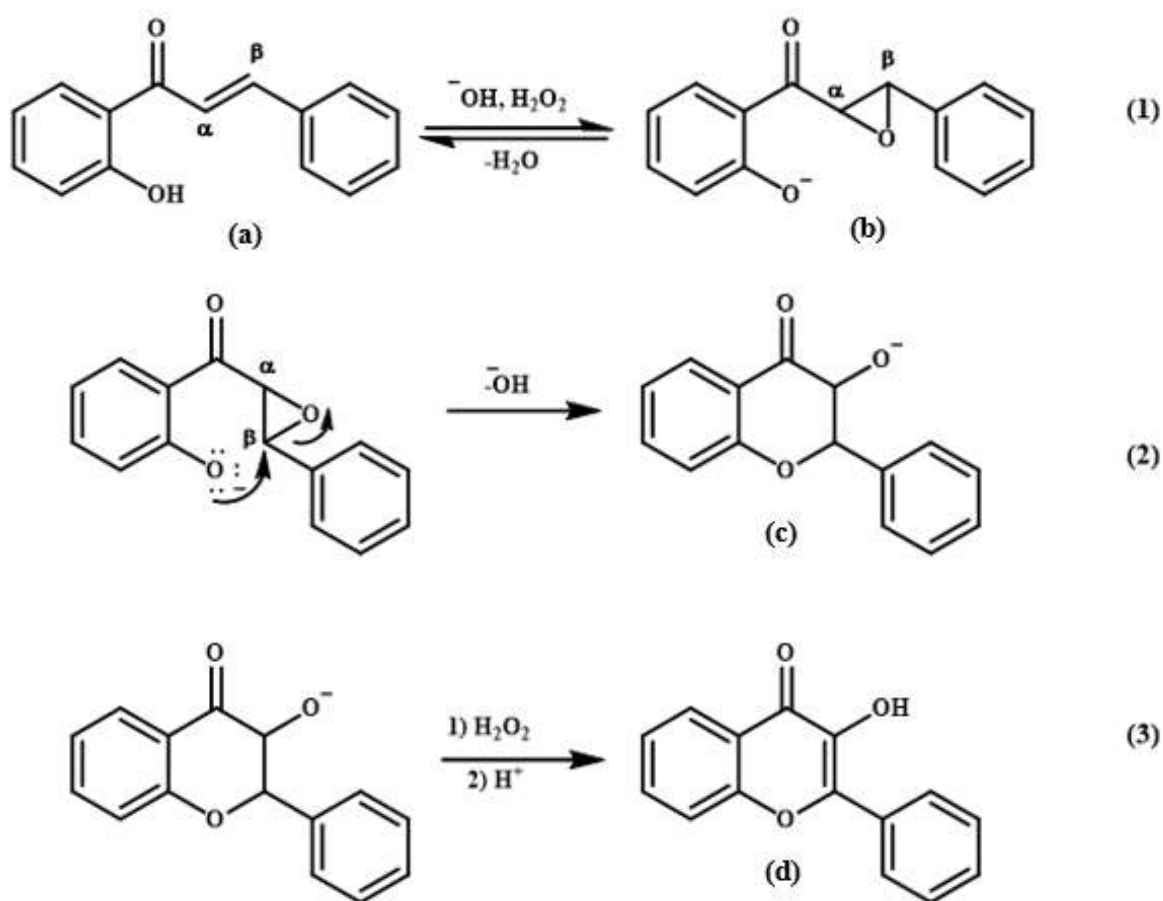


Figura 23. Mecanismo de la reacción de Algar-Flynn-Oyamada.

Así, el primer paso del mismo, es la formación del epóxido (b) de la 2'-hidroxichalcona (a), al mismo tiempo que se da la desprotonación del grupo hidroxilo de esta. Posteriormente, ocurre la etapa de ciclación, en la que tiene lugar el ataque nucleofílico intramolecular del fenóxido, formado durante la primera etapa, al carbono β de (b), para formar el correspondiente flavonóxido (c). Esta es la etapa determinante de la reacción y depende en gran medida de la nucleofilicidad del fenóxido y electrofilicidad del C_β en el intermediario (b), propiedad que a su vez se ve afectada por los sustituyentes presentes en los anillos A y B de este, así, los sustituyentes donadores de densidad electrónica en A y sustractores de densidad electrónica en B son los que favorecen la formación de las 3-hidroxi flavonas, en tanto que, los sustituyentes donadores de densidad electrónica pueden propiciar el ataque nucleofílico en la posición α del epóxido y la consecuente formación de la respectiva aurona (figura 22). Finalmente, la última etapa del mecanismo consta de la formación del doble enlace entre los átomos de carbono 2 y 3 de (c) y la neutralización del medio para obtener la 3-hidroxi flavona (d).^{73, 74, 75, 76, 77}

4.3.2. Otras reacciones para la síntesis de flavonas

La reacción de Algar-Flynn-Oyamada es una metodología ampliamente utilizada para la obtención de 3-hidroxi flavonas, algunos otros métodos sintéticos han permitido obtener productos como las flavonas, figura 20. Entre los métodos más comunes se encuentran:

a. Oxidación de flavanonas a flavonas

Estructuralmente hablando, las flavonas se diferencian de las flavanonas por la presencia de un doble enlace entre los átomos de carbono 2 y 3 en el anillo C de las primeras, tal como se muestra en las estructuras (c) y (d) de la figura 6. Por ello, los métodos de síntesis de flavonas a partir de su respectiva flavanona, consisten en la formación del doble enlace mencionado previamente, proceso que ha sido estudiado desde inicios de los años 1960. Sin embargo, las primeras metodologías se caracterizaron por el uso de reactivos altamente contaminantes y tóxicos como el bromo, posteriormente se trabajó haciendo uso de yodo en presencia de ácido acético. En el año 2005, Gopan y su equipo de trabajo realizaron la oxidación de flavanonas en medio ácido, para ello, las flavanonas de partida fueron calentadas a 100 °C durante una hora en presencia de ácido perclórico al 70 % y acetato de manganeso (III) en ácido acético, generando así las

correspondientes flavonas con rendimientos casi cuantitativos, variando entre 90 – 96 %, tal como se muestra en la figura 24.^{21, 78}

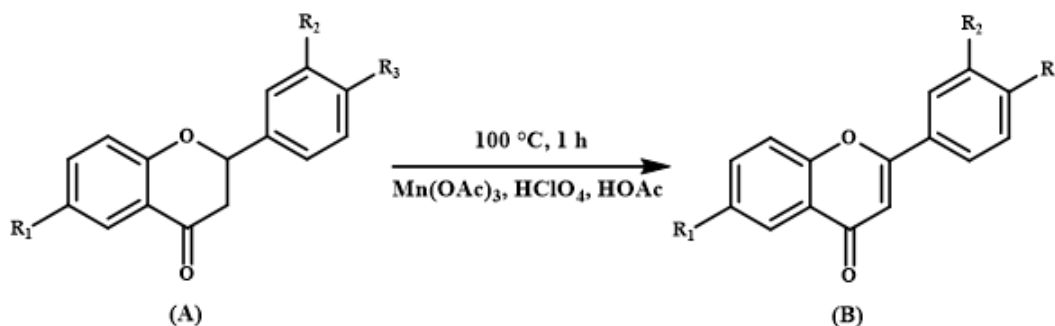


Figura 24. Síntesis de flavonas (B) a partir de flavanonas (A) empleando acetato de manganeso (III), ácido perclórico y ácido acético. R₁, R₂, R₃ = H, CH₃, Cl o NO₂.

b. Síntesis de flavonas por reacción de reordenamiento de Baker-Venkataraman

Se trata de una reacción química que permite la obtención de flavonas (c) a partir de la ciclación de 1,3-dicetonas, como la estructura (b) en la figura 25, cuando la misma es sometida a calentamiento en presencia de ácidos. Este comportamiento fue observado individualmente por Wilson Baker en 1933 y por Krishnasami Venkataraman en 1934, quienes obtuvieron flavonas a partir de benzoatos de 2-acetilfenilos, estructura (a) en la figura 25. La formación de las flavonas se explicó a partir del reordenamiento químico que experimenta (a) en medio básico, en el cual, tiene lugar la transposición intramolecular de un grupo benzofilo desde el oxígeno del éster hasta el carbono α de la cetona, formándose así (b) y posteriormente (c). Aunque se han probado otras metodologías para llevar a cabo la ciclación de (b) por ejemplo, el calentamiento en presencia de glicerol, la metodología que proporciona mejores rendimientos de reacción (94 – 97 %) es el calentamiento en presencia de ácido sulfúrico y ácido acético glacial.^{21, 79, 80, 81}

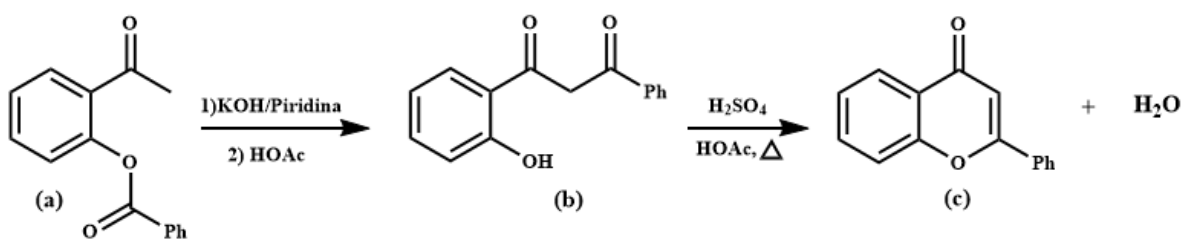


Figura 25. Síntesis de flavonas por reordenamiento de Baker-Venkataraman.

c. Síntesis de flavonas por la reacción de condensación de Allan-Robinson

Otra alternativa para la síntesis de flavonas, es la reacción de Allan-Robinson, que consiste en la condensación entre 2-hidroxiacetofenonas con anhídridos de ácidos aromáticos en presencia de la sal del mismo ácido como catalizador de la reacción, como se observa en la figura 26. Otros catalizadores de la reacción pueden ser bases como trimetilamina o piridina. La reacción se lleva a cabo en calentamiento, pero temperaturas muy altas pueden provocar la formación de productos secundarios, disminuyendo el porcentaje de rendimiento de esta.²¹

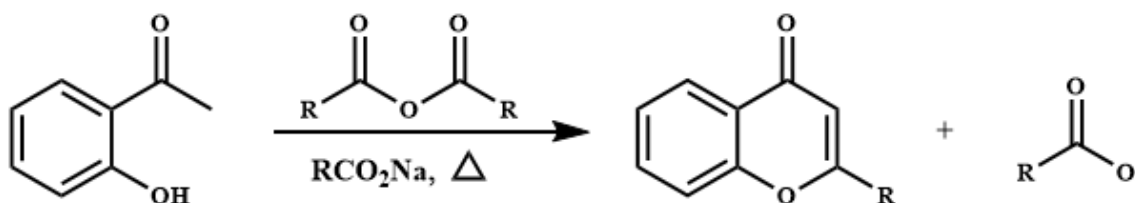


Figura 26. Síntesis de flavonas por la reacción de Allan-Robinson. R = grupo arilo.

d. Síntesis de flavonas asistida por ultrasonido

Otro método para la síntesis de flavonas consiste en la oxidación de 2'-hidroxichalconas, usando para dicho fin, cloruro de yodo en presencia de dimetilsulfóxido (DMSO). El procedimiento publicado en 2016 por Lahyani y Trabelsi se basa en el proceso de activación sonoquímica, por medio del ultrasonido a una frecuencia de 20 kHz y en condiciones de calentamiento medias (50 °C). La reacción se completa en 30 minutos y genera la respectiva flavona sin la formación de productos secundarios, con rendimientos casi cuantitativos superiores al 90 %. A continuación, en la figura 27 se muestran las condiciones de esta reacción:⁸²

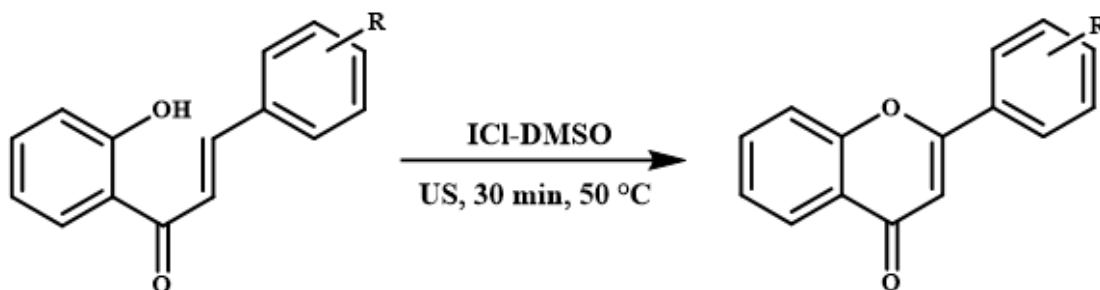


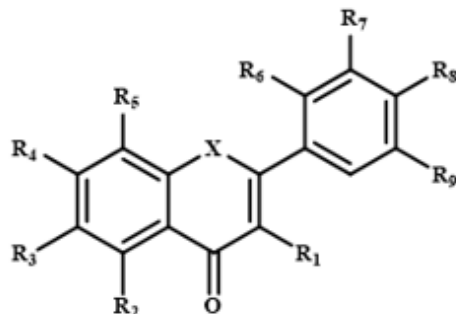
Figura 27. Síntesis de flavonas asistida por ultrasonido. R = H, Cl, OCH₃. US: ultrasonido, frecuencia 20 kHz.

4.3.3. Aplicaciones biológicas de las flavonas

De la misma forma que las chalconas, las flavonas son ampliamente estudiadas debido a su actividad biológica y farmacológica, actuando, por ejemplo, como antitumorales, anticancerígenos, antiinflamatorios, antioxidantes, antimicrobianos, entre otros. Entre los flavonoides más importantes por sus aplicaciones terapéuticas se encuentran las 3-hidroxi-flavonas y las flavonas. Ambas familias de compuestos se encuentran extensamente distribuidas en el reino vegetal y muchos otros de origen sintético, figuran en el limitado número de sustancias internacionalmente aprobadas como complemento para algunos tratamientos médicos de diferentes tipos de enfermedades. A continuación, se mencionan diversos ejemplos de este tipo de compuestos y sus aplicaciones:⁶⁹

Diversas flavonas, 3-hidroxi-flavonas y compuestos similares han sido reportados como potentes antioxidantes, ya que poseen la capacidad de disminuir o inhibir la oxidación de distintas biomoléculas, proceso que ocurre por la acción de radicales libres como superóxido, hidroxilo y peroxilo, entre otros, sobre estas. Así, compuestos como la miricetina, el kaempferol, la quercetina (3-hidroxi-flavonas) y la luteolina (flavona), estructuras mostradas en la tabla 2, fueron estudiadas por Guohua y su equipo de trabajo, con el fin de determinar la capacidad antioxidante de los flavonoides, usando para ello el método de la capacidad de absorción de radical oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés oxygen radical absorbance capacity). Las pruebas fueron realizadas frente a los radicales peroxilo e hidroxilo, empleando como control positivo el antioxidante comercial Trolox®, un análogo de la vitamina E. El equipo concluyó que los flavonoides con un mayor número de grupos hidroxilo libres poseen mayor capacidad antioxidante, siendo la miricetina el flavonoide más sobresaliente de la serie estudiada. Por otra parte, el equipo observó que un patrón de sustitución con grupos OH en las posiciones 3' y 4', incrementa la capacidad antioxidante de los flavonoides. Posteriormente, Greeff junto con su equipo de trabajo reportaron un estudio relacionado con la capacidad antioxidante de 2-fenilquinolin-4-onas, análogos estructurales de las flavonas, mostrados en la tabla 2, los cuales exhibieron muy buenos resultados frente al estándar Trolox®, aún a concentraciones de 0.001 mM. Sin embargo, ninguno de estos ha sido aprobado para ser utilizado como tratamiento clínico, pues existen diferencias significativas entre las pruebas in vitro e in vivo, por lo que se hace necesario que se retornen a la fase experimental, en busca de nuevos resultados.^{69, 83, 84}

Tabla 2. Estructura química de algunos flavonoides que presentan actividad biológica.



| Flavonoide | X | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | R6 | R7 | R8 | R9 |
|------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|-----|
| Apigenina | O | H | OH | H | OH | H | H | H | OH | H |
| 6-hidroxi-2-fenilquinolinona | NH | H | H | OH | H | H | H | H | H | H |
| 8-hidroxi-2-fenilquinolinona | NH | H | H | H | H | OH | H | H | H | H |
| Miricetina | O | OH | OH | H | OH | H | H | OH | OH | OH |
| Kaempferol | O | OH | OH | H | OH | H | H | H | OH | H |
| Luteolina | O | H | OH | H | OH | H | H | OH | OH | H |
| Quercetina | O | OH | OH | H | OH | H | H | OH | OH | H |
| Tricina ^a | O | H | OH | H | OH | H | H | OMe | OH | OMe |

^a Uno de los flavonoides extraídos de *Artemisia giraldii*.

Algunos flavonoides anteriormente mencionados y otros como la apigenina han sido incluidos en estudios relacionados con actividad anticancerígena. Por ejemplo, Knekt y su equipo de trabajo condujeron una investigación durante 24 años, en torno a la influencia de la ingesta de alimentos ricos en flavonoides, principalmente quercetina, sobre el desarrollo de cáncer pulmonar. Cerca de 10, 000 personas participaron del estudio realizado, en el que se dio seguimiento a la dieta alimenticia de los mismos, que fueron categorizados por género, edad, fumadores o no fumadores, con o sin antecedentes de problemas respiratorios crónicos. De este estudio se concluyó que existe una relación significativa entre la ingesta de alimentos con alto contenido de flavonoides y el posterior desarrollo de cáncer pulmonar, la cual es inversamente proporcional, es decir, a mayor ingesta de flavonoides corresponde un menor riesgo de desarrollar este padecimiento. El equipo de trabajo señaló también, que el efecto es principalmente protector, pues las personas categorizadas como fumadores y con padecimientos respiratorios previos disminuyeron en menor grado la probabilidad de desarrollar este tipo de cáncer. En una revisión científica realizada por Shukla y Gupta, se hace mención de la actividad anticancerígena de la apigenina, estructura mostrada en la tabla 2, y en la que también se informa sobre la acción de esta flavona en la

prevención del cáncer pulmonar. De hecho, la apigenina se une a la proteína factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF (por sus siglas en inglés Vascular Endothelial Growth Factor), impidiendo el proceso de angiogénesis o crecimiento capilar en los tumores asociados a este cáncer, y a su vez la propagación de este.^{69, 85, 86}

El uso de flavonas y 3-hidroxi flavonas como agentes antimicrobianos también ha sido estudiado, demostrándose que varios flavonoides de origen natural y sintético son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos. Zheng y su equipo de trabajo reportaron en 1995 el aislamiento de tres diferentes flavonas de *Artemisia giraldii*, las cuales fueron probadas contra diferentes cepas de bacterias y hongos, obteniéndose valores de concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés Minimal Inhibitory Concentration) en rangos comprendidos entre los 500 – 1000 $\mu\text{g/mL}$, siendo así más efectivas que algunos sesquiterpenoides de la misma planta. Las estructuras de las flavonas aisladas se muestran en la tabla 2. Posteriormente, Guz y colaboradores sintetizaron una serie de flavonas y flavonolignanos, cuya estructura se muestra en la figura 28, que fueron sometidos a ensayos con el fin de determinar la capacidad de los mismos para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*; si bien, los compuestos ensayados fueron capaces de inhibir en cierta medida el crecimiento *S. aureus*, lo hicieron en conjunto con el control positivo, ya que al utilizarlos de forma independiente, se requería de grandes concentraciones para conseguir la inhibición de crecimiento del mismo.^{69, 87, 88, 89}

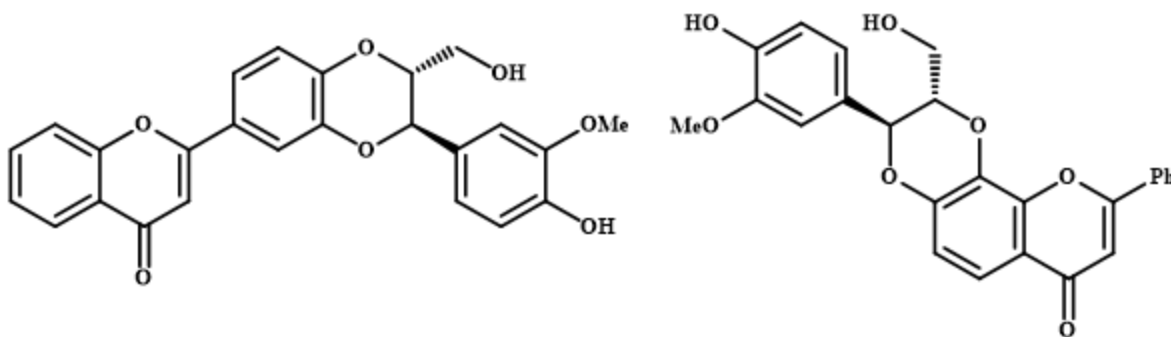


Figura 28. Estructura de algunos flavonolignanos activos contra *S. aureus*.

A su vez, se han realizado estudios relacionados con la actividad antimicótica de algunos flavonoides. La quercetina, una 3-hidroxi flavona, ha mostrado ser efectiva inhibiendo el

crecimiento de *Trichophyton rubrum*, una especie de hongo dermatofito asociado a problemas como el pie de atleta, con una concentración mínima inhibitoria de 125 µg/mL en comparación con antimicóticos de referencia como el fluconazol y cerulenin, con MIC de 63 y 125 µg/mL respectivamente, tal como se publicó en el estudio realizado por Takahasi y colaboradores. La ventaja de la quercetina sobre los antimicóticos de referencia, es su acción específica sobre mecanismos bioquímicos propios del microorganismo, por lo que se ha sugerido la realización de posteriores pruebas in vivo. Recientemente, Al Aboody y Mickymaray han publicado una larga lista de más de 50 flavonoides que poseen actividad antimicótica, además, se mencionan y describen los principales mecanismos por los cuales los flavonoides son capaces de inhibir el crecimiento de los hongos, entre los que se destacan el rompimiento de las membranas celulares, inhibición de la formación de pared celular, división celular, síntesis de proteínas, y otros más.^{69, 90, 91}

4.4. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE FLAVONOIDES

4.4.1. Aislamiento y purificación de flavonoides

El aislamiento de flavonoides desde material vegetal o desde el seno de una reacción química, es una operación de gran importancia para su caracterización y posteriores aplicaciones. Los procedimientos para llevar a cabo dicha operación pueden ser de tipo físico o químico, siendo predominantemente usados los del primer tipo mencionado. Cuando se trata de flavonoides sintetizados en el laboratorio, una técnica común para separarlos de las impurezas o subproductos formados durante la reacción, es la recristalización, la cual puede efectuarse habiendo o no realizado previamente una extracción líquido-líquido. Sin embargo, la técnica considerada universal para aislar flavonoides naturales o sintéticos es la cromatografía en columna de gel de sílice, la cual se describe a continuación.⁹²

a. Cromatografía en columna de gel de sílice

Consiste en la separación de los componentes de una mezcla, al hacerlos pasar a través de un sólido poroso y de área superficial alta, como el dióxido de silicio (conocido también como gel de sílice) previamente activado por una mezcla de solventes, que en conjunto conforman la fase estacionaria. La separación ocurre cuando la mezcla de los componentes de interés, disuelta en la mezcla de solventes antes mencionada (llamada fase móvil) se hace pasar a través de una columna de gel de

sílice activado, entonces cada uno de los componentes comienza a ser eluido en función de la afinidad de estos con la fase estacionaria, así, los componentes con mayor afinidad a esta serán retenidos una mayor cantidad de tiempo en la columna, en tanto que aquellos con menor afinidad viajarán más rápido a través de la misma. La correcta separación de los componentes depende de la uniformidad de la fase estacionaria y de la relación de polaridad entre los componentes de la mezcla y las diferentes fases. Cada componente separado que es eluido se recolecta en tubos de ensayo, lo que conforma las distintas fracciones. Las fracciones de cada componente común se unen en un solo frasco y se elimina el disolvente para obtenerlos de forma pura. A continuación, en la figura 29 se muestra un esquema del montaje de un equipo de cromatografía en columna.⁹²

93

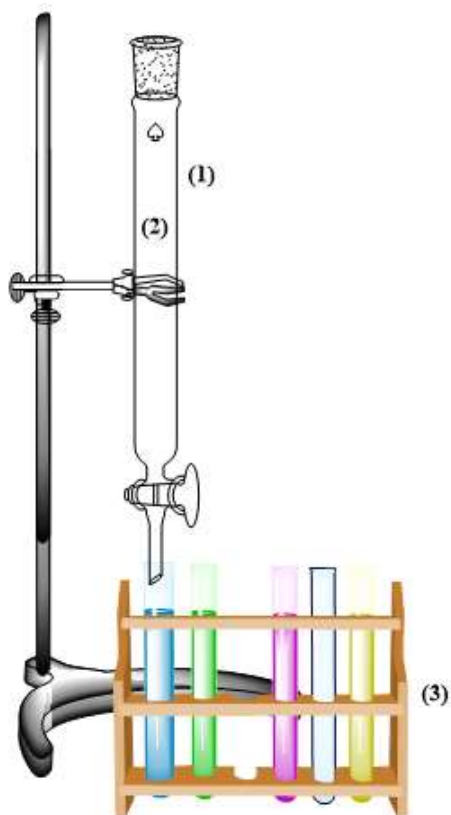


Figura 29. Montaje de un equipo de cromatografía en columna. (1) Columna cromatográfica, (2) Ubicación de fase estacionaria y recorrido de la fase móvil, (3) Fracciones recolectadas.

4.4.2. Caracterización de flavonoides

La caracterización estructural de los flavonoides es un proceso de mucha importancia para un gran número de aplicaciones, ya que el conocimiento exacto de la identidad de estos, es indispensable para la comprensión y estudio de sus propiedades físicas y químicas. En este sentido, el análisis espectroscópico de los flavonoides se ha convertido en la opción más confiable y utilizada para identificar la estructura de los mismos. Algunos de los métodos más comunes son la espectroscopia de resonancia magnética nuclear, la espectroscopia de infrarrojo y la espectroscopia de ultravioleta-visible. Los fundamentos de las metodologías mencionadas se describen a continuación.^{92,94}

a. Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

La región infrarroja (IR) del espectro electromagnético cubre el intervalo previo a la región del espectro visible (7.8×10^{-7} m) a aproximadamente 10^{-4} m, pero únicamente la porción media desde 2.5×10^{-6} m a 2.5×10^{-5} m es utilizada por los químicos orgánicos. Por lo regular las longitudes de onda en la región IR se dan en micrómetros y las frecuencias se dan en números de onda en lugar de Hertz. El número de onda es el recíproco de la longitud de onda en centímetros, y por lo tanto se expresa en unidades de cm^{-1} . Por tanto, la región IR útil es de 4000 a 400 cm^{-1} , que corresponde a las energías de 48.0 kJ/mol a 4.8 kJ/mol (11.5-1.5 kcal/mol). Cuando se irradia una molécula con radiación electromagnética, la energía se absorbe si la frecuencia de la radiación coincide con la frecuencia de la vibración. El resultado de esta absorción de energía es una amplitud incrementada por la vibración. Dado que cada frecuencia absorbida por una molécula corresponde a un movimiento molecular específico, se puede encontrar qué tipos de movimientos tiene una molécula, midiendo su espectro en el IR. Al interpretar estos movimientos, se puede encontrar qué tipos de enlaces (grupos funcionales) están presentes en la molécula.

La espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés Fourier-Transform Infrared Spectroscopy) resulta de gran utilidad para el análisis de diversos compuestos químicos, pues transforma las señales registradas por el equipo en un espectro interpretable, el cual brinda información estructural sobre la muestra analizada. Dicha técnica se basa en la combinación de los haces de radiación infrarroja, que previamente impactaron un divisor de haz (interferometría), en uno solo, el cual incide sobre la muestra y genera una respuesta llamada

interferograma, en el detector, la cual es decodificada mediante la aplicación de la transformación matemática denominada transformada de Fourier. El interferograma decodificado da como resultado un espectro que posee señales características reconocibles por los analistas.⁹⁵

b. Espectroscopia de Ultravioleta-visible (UV-Vis)

Los compuestos con dobles enlaces conjugados son comunes en la naturaleza, varios de los cuales existen como pigmentos, siendo los responsables de los colores brillantes de las frutas y las flores. La región del ultravioleta del espectro electromagnético se extiende del extremo de longitud de onda corta de la región visible (4×10^{-7} m) al extremo de longitud de onda larga de la región de rayos X (10^{-8} m), pero el intervalo angosto de 2×10^{-7} m a 4×10^{-7} m es la porción de mayor interés para los químicos orgánicos. Las absorciones en esta región se miden por lo regular en nanómetros (nm). Por lo tanto, el intervalo de ultravioleta de interés es de 200 a 400 nm. Con la radiación UV, la energía absorbida corresponde a la cantidad necesaria para promover un electrón de un orbital a otro en una molécula conjugada. Se registra un espectro de ultravioleta irradiando la muestra con luz UV cambiando continuamente su longitud de onda. Cuando la longitud de onda corresponde al nivel de energía requerido para excitar un electrón a un nivel más alto, se absorbe energía. Se detecta esta absorción y se muestra en una gráfica que traza la absorbancia (A) en función de la longitud de onda. La absorptividad molar es una constante física característica de la sustancia particular que se observa y, por lo tanto, característica del sistema electrónico π particular en la molécula. Los valores típicos para los dienos conjugados están en el intervalo de coeficiente de absorptividad molar ($\epsilon=10,000$ a $25,000$). A diferencia de los espectros de IR y de RMN, los cuales muestran varias absorciones, para una molécula dada, los espectros de UV frecuentemente constan de un solo pico o señal. Por lo regular, el pico es ancho y se identifica su posición notando la longitud de onda en la parte más alta de este (λ_{\max}).⁹⁵

c. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (NMR)

Varios tipos de núcleos atómicos con número de protones y neutrones impar, es decir, espín nuclear diferente de cero se comportan como si estuvieran girando alrededor de un eje, de manera similar al movimiento de rotación de la Tierra. Debido a que tienen carga positiva, estos núcleos actúan como pequeños imanes en forma de barra e interactúan con un campo magnético externo. En ausencia de un campo magnético externo, los espines de los núcleos magnéticos se orientan al azar; sin embargo, cuando se coloca una muestra que contiene estos núcleos entre los polos de un

imán poderoso, los espines adoptan orientaciones específicas. Al girar, un núcleo de ^1H o ^{13}C puede orientarse de tal manera que su propio campo magnético se alinea con (paralelo a) o contra (antiparalelo a) el campo magnético del imán; sin embargo, las dos orientaciones no tienen la misma energía y probablemente no son iguales. Si ahora se irradian los núcleos orientados con radiación electromagnética de la frecuencia apropiada, éstos absorben energía y el estado de menor energía invierte su espín al estado de mayor energía. Cuando ocurre la inversión del espín, se dice que los núcleos magnéticos están en resonancia con la radiación aplicada. La frecuencia exacta necesaria para la resonancia depende de la fuerza del campo magnético externo y de la identidad de los núcleos. Todos los núcleos en las moléculas están rodeados por electrones. Cuando se aplica a la molécula un campo magnético externo, los electrones que se mueven alrededor de los núcleos aplican por sí mismos pequeños campos magnéticos locales; estos campos magnéticos locales actúan en oposición al campo aplicado de tal manera que el campo efectivo que actúa sobre el núcleo es un poco más débil que el campo aplicado. Al describir este efecto de los campos locales, se dice que los núcleos están protegidos del efecto total del campo aplicado por los electrones que lo rodean. Debido a que cada núcleo específico en una molécula está en un ambiente electrónico diferente y los campos magnéticos efectivos en cada uno de ellos son diferentes también. Pueden detectarse estas pequeñas diferencias en los campos magnéticos efectivos experimentados por los diferentes núcleos y por tanto se puede observar una señal distinta para cada uno de los núcleos de ^{13}C y de ^1H químicamente distintos en una molécula.⁹⁵

Cada una de las técnicas mencionadas anteriormente, entre muchas otras, aporta información diferente y valiosa para determinar la estructura de los flavonoides. A continuación, en la tabla 3, se muestra información sobre los tipos de espectroscopia previamente descritas de interés para la caracterización de distintos flavonoides.^{92,94}

Tabla 3. Señales características de algunos flavonoides en NMR, IR y UV-Vis.

| Flavonoide | ¹ H-RMN δ (ppm) ^a | | | | | | | FTIR $\bar{\nu}$ (cm ⁻¹) ^b | | | | | UV-Vis λ_{\max} (nm) ^h |
|--------------------------------|---|------------------------------|-----------------|---------------|-------------|--------------------------------|--------------------------------|---|------------------|------------------|-------------------|------------------|---|
| | H α | H β | 2'-OH | 3-OH | 3-H | 3-H _{ax} ⁱ | 3-H _{eq} ⁱ | C=O ^c | C=C ^d | O-H ^e | =C-H ^f | C-O ^g | |
| Chalcona | 7.15-8.23, J = 15-17 Hz | 7.45-8.07 J = 15-17 Hz | NA | NA | NA | NA | NA | 1650- 1685 | 1550- 1640 | NA | 965 | NA | 220-270, 340-390 |
| 2'- hidroxichalcona | 7.15-8.23, J = 15-17 Hz | 7.45-8.07 J = 15-17 Hz | 10.41- 13.23 | NA | NA | NA | NA | 1640- 1670 | 1550- 1640 | Do ^j | 965 | NA | 220-280, 345-435 |
| Flavona | NA | NA | NA | NA | 6.3- 6.8 | NA | NA | 1640- 1660 | 1580- 1660 | NA | 800- 840 | 1050- 1150 | 250-280, 304-350 |
| Flavanona | NA | NA | NA | NA | NA | 2.9-3.5, J = 13, 17 Hz | 2.5-2.9, J = 3, 17 Hz | 1680 | 1600- 1640 | NA | NA | 1050- 1150 | 270-295, 300-330 |
| 3-hidroxi flavona | NA | NA | NA | 5.91- 6.97 | NA | NA | NA | 1652- 1658 | 1660- 1680 | 3400- 3600 | NA | 1050- 1150 | 250-280, 360-400 |

Notas: ^aDesplazamientos químicos δ , reportados en unidades de partes por millón (ppm), ^b bandas características en el infrarrojo, reportadas como número de onda (cm⁻¹), ^c tensión del grupo carbonilo, ^d tensión del doble enlace carbono-carbono, ^e tensión del grupo hidroxilo, ^f flexión del enlace carbono-hidrógeno de sistema olefínico, ^g tensión del enlace carbono-oxígeno en anillo de seis miembros, ^h bandas de máxima absorción en el ultravioleta-visible reportadas en nanómetros (nm), ⁱ protones axial y ecuatorial ubicados en el carbono 3 de las flavanonas, ^j Do: débilmente observable, usualmente no se observa, NA: no aplica.

4.5. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS FLAVONOIDES

La capacidad de las sustancias químicas para inhibir el crecimiento de hongos e incluso provocar su muerte, se conoce como actividad antifúngica o antimicótica. Existe diversidad de métodos para medir la actividad antifúngica de compuestos químicos aislados o desarrollados para tal fin, cada uno de los cuales presenta ventajas específicas con respecto a la información que se desea conocer y del tipo de hongo al que se le aplican las pruebas. Sin embargo, uno de los métodos más empleados es la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) siguiendo protocolos estandarizados internacionalmente, los cuales permiten conocer la mínima concentración requerida para ocasionar la inhibición del crecimiento de hongos después de un tiempo específico de incubación. Los métodos estandarizados usados para determinar la MIC son los métodos de microdilución en caldo, denominados M27-A para levaduras, el M38-A para hongos filamentosos, ambos pertenecientes a los métodos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI siglas en inglés para Clinical and Laboratory Standards Institute) y el método del Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUROCAST por su acrónimo en inglés European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) empleado para levaduras fermentadoras. Pese a la aceptación de los métodos mencionados anteriormente, en la mayoría de estudios de nuevos compuestos que pueden actuar como antifúngicos, se opta por la realización de una prueba previa que permite concluir respecto a la necesidad de medir o no la concentración

mínima inhibitoria. Una de estas pruebas es el método de difusión en disco, que se describe a continuación.^{96,97}

4.5.1. Método de difusión en disco M44-A

Se trata de un método estandarizado para la determinación de la sensibilidad de especies de levaduras a ciertos antifúngicos. Es ampliamente utilizado para rutinas de comparación entre distintos laboratorios y como prueba preliminar a la medición de la concentración mínima inhibitoria. El CLSI, en el año 2003 estandarizó este método, publicado preliminarmente como documento M44-P. Posteriormente, en el año 2004, la misma institución publicó el documento definitivo, conocido como M44-A para diferentes especies del género *Candida*, con altos grados de correlación entre esta prueba y las respectivas MIC al ocupar discos de fluconazol 25 µg y voriconazol 1 µg. Sin embargo, una desventaja de este método es la falta de correlación para otras especies, razón por la cual, se sigue modificando el mismo, con el fin de obtener resultados reproducibles para un amplio número de especies de hongos, cabe mencionar que la difusión del antifúngico en el agar representa también un problema en ciertas ocasiones para el correcto desarrollo de este.^{96,97,98,99}

El método de difusión en disco se basa en la determinación de la sensibilidad que presentan las levaduras a los antifúngicos de referencia y a aquellos que están siendo evaluados como potenciales nuevos antifúngicos. Esto es posible cuando se realiza la medición del halo de inhibición de los compuestos que se difunden en el medio sólido. Los halos de inhibición son comparados con los de los antifúngicos de referencia, para establecer si son más o menos efectivos que estos inhibiendo el crecimiento de las levaduras. Si el grado de inhibición del posible nuevo antifúngico es comparable con el generado por el antifúngico de referencia, se procede a medir la MIC para este; cuando se emplean levaduras y antifúngicos estándar en las condiciones de trabajo especificadas en el documento M44-A, existe mayor probabilidad para que los resultados de ambas pruebas se puedan correlacionar satisfactoriamente. A continuación, en la tabla 4 se muestran los puntos de corte, que definen los límites de cada categoría de distinción clínica para ambos métodos, y la correlación entre los diámetros de inhibición y la respectiva MIC para algunas especies de *Candida*.^{96,97,98,99}

Tabla 4. Puntos de corte y correlación entre los métodos M44-A y M27-A para *Candida spp.*

| Antifúngico | Carga del disco (µg) | Diámetro (mm) M44-A | | | MIC (µg/mL) M27-A | | |
|---------------------|----------------------|---------------------|---------|------|-------------------|---------|-----|
| | | R | I | S | R | I | S |
| Fluconazol | 25 | ≤ 14 | 15 – 18 | ≥ 19 | ≥ 64 | 16 – 32 | ≤ 8 |
| Voriconazol | 1 | ≤ 13 | 14 – 16 | ≥ 17 | ≥ 4 | 2 | ≤ 1 |
| Caspofungina | 5 | ≤ 10* | - | ≥ 11 | > 2* | - | ≤ 2 |

R: resistente, I: intermedio, S: sensible, * no sensible

Las condiciones detalladas en el documento M44-A y que deben seguirse para asegurar la reproducibilidad de los resultados son utilizar como medio de cultivo el agar Mueller-Hinton + 2 % glucosa + 0.5 mg/mL azul de metileno, amortiguar hasta un pH comprendido entre 7.2 – 7.4, el inóculo debe ser 0.5 McFarland o equivalente a 1.5×10^8 UFM/mL, 35 °C como temperatura de incubación, tiempo de incubación de 24 horas, extendiéndose a 48 horas para algunas especies de *Candida* como *C. glabrata* y *C. krusei* y carga de discos impregnados con antifúngico como los mostrados en la tabla 4.^{96, 97, 98, 99}

Descritos los aspectos teóricos relacionados con la investigación, en las siguientes secciones se describen los aspectos metodológicos sobre la síntesis, caracterización y determinación de actividad antifúngica de los flavonoides.

5. METODOLOGÍA

5.1. MATERIALES Y EQUIPOS

5.1.1. Reactivos

Los reactivos empleados para la síntesis de flavanonas, 2'-hidroxichalconas y flavonas fueron la 2-hidroxiacetofenona, benzaldehído, 4-clorobenzaldehído y 4-(dimetilamino)benzaldehído, cuyas estructuras se muestran en la figura 30, utilizados sin ningún proceso previo de purificación y adquiridos de la casa comercial Sigma-Aldrich.

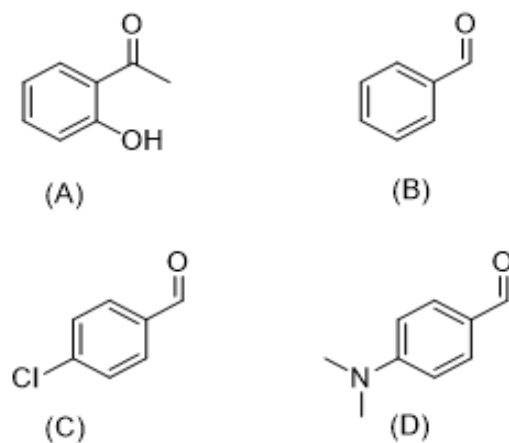


Figura 30. Estructuras químicas de los reactivos empleados para la etapa de síntesis. (A) 2-hidroxiacetofenona, (B) benzaldehído, (C) 4-clorobenzaldehído y (D) 4-(dimetilamino)benzaldehído.

5.1.2. Instrumentos

A excepción del equipo para la realización de los espectros de resonancia magnética nuclear de protón, que se encuentra en el Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA) de la Universidad de Costa Rica, todos los demás equipos se encuentran en la Escuela de Química de la Universidad de El Salvador.

a. Punto de fusión

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher – Johns Melting-point de placa metálica. De 0 – 300 °C. Los puntos de fusión se reportan en grados Celsius.

b. Espectroscopia de Infrarrojo

Los espectros de IR se midieron en un equipo de FTIR con Unidad de Reflectancia Total Atenuada (ATR) acoplada. SHIMADZU, modelo IRAffinity-1 con cristal de seleniuro de zinc. Los valores de número de onda (ν_{\max}) se reportan en cm^{-1} .

c. Espectroscopia de Ultravioleta-Visible

Se utilizó un espectrofotómetro SHIMADZU modelo UV-1700 Pharmaspec en el rango de los 200 a 400 nm. Los valores de longitud de onda de máxima absorción (λ_{\max}) se reportan en nm para cada compuesto disuelto en dimetilformamida (DMFA).

d. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Protón

Los espectros de ^1H -RMN se realizaron en un instrumento Bruker Ascend 600 (frecuencia de 600 MHz). Los desplazamientos químicos se reportan relativos al estándar tetrametilsilano (TMS) y en unidades de partes por millón (ppm). Se empleó cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente, cuya señal aparece a 7.26 ppm. Las constantes de acoplamiento se reportan en unidades de Hz.

5.2. TÉCNICAS GENERALES

5.2.1. Filtración al vacío

La filtración se llevó a cabo empleando Kitazatos Pyrex de 250 mL a presión reducida, utilizando bomba de vacío y trampa de gases. El esquema general del proceso de filtración al vacío se muestra en la figura 31.

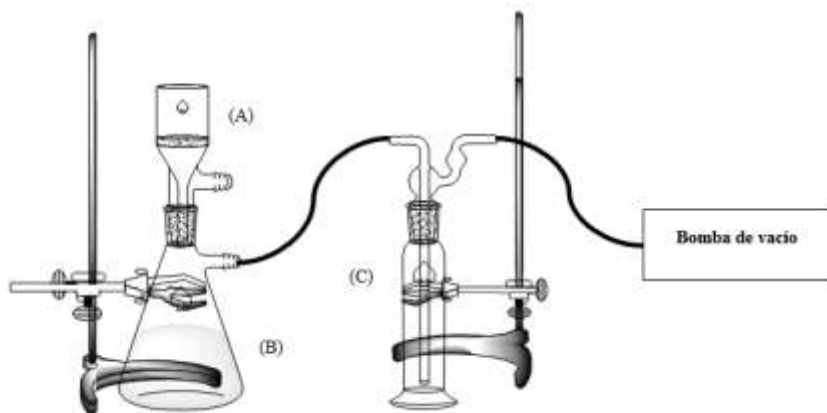


Figura 31. Esquema de filtración al vacío. (A) Embudo Buchner, (B) Kitazato, (C) Trampa de gases.

5.2.2. Cromatografía en capa fina

Todas las reacciones fueron monitoreadas por cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés Thin – Layer Chromatography). Se utilizaron cromatofolios, o placas para cromatografía en capa fina, de aluminio recubiertos con gel de sílice 60 F₂₅₄ de 20 x 20 cm. Las placas fueron reveladas observándose bajo luz ultravioleta. Las fases móviles empleadas se detallan a continuación en la tabla 5.

Tabla 5. Fases móviles utilizadas para realizar Cromatografía en capa fina.

| | Fase móvil | Proporción |
|---|---|------------|
| A | CH ₂ Cl ₂ /C ₆ H ₁₂ | 1:1 |
| B | CH ₂ Cl ₂ /C ₆ H ₁₂ | 7.5:2.5 |

5.3. METODOLOGÍAS GENERALES DE SÍNTESIS

5.3.1. Síntesis de flavanonas

Método A₁: se disolvieron en etanol cantidades equimolares de 2-hidroxiacetofenona y del respectivo benzaldehído. Se agregó disolución acuosa de KOH 10 % (200 µL/mmol de 2-hidroxiacetofenona). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación magnética durante 2 horas a temperatura ambiente. Al finalizar la reacción, se agregó hielo a la mezcla de reacción. Se filtró, lavó y secó el sólido al vacío.

5.3.2. Síntesis de 2'-hidroxichalconas

Método A₂: se mezclaron en un balón de fondo redondo cantidades equimolares de 2-hidroxiacetofenona y el respectivo benzaldehído, utilizando etanol como disolvente. Se agregó disolución acuosa de KOH 40 % (200 µL/mmol de 2-hidroxiacetofenona). Se dejó la mezcla de reacción con agitación magnética durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadió hielo a la mezcla de reacción. Se filtró y secó al vacío el sólido obtenido.

Método B₁: en un balón de fondo redondo se mezclaron 2-hidroxiacetofenona y el respectivo benzaldehído en proporción 2:1, disueltos en metanol. Se agregó NaOH en perlas (1.8

mmol/mmol de 2-hidroxiacetofenona). Se calentó la mezcla de reacción a reflujo (65 °C) durante 5 horas. Posteriormente, se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se neutralizó usando HCl 2 M, añadiendo el ácido gota a gota mientras la mezcla permaneció en agitación. El sólido obtenido se filtró y secó al vacío.

5.3.3. Síntesis de 3-hidroxi flavonas

Método A₃: la flavanona o 2'-hidroxichalcona correspondiente se disolvió en etanol y se le agregó disolución acuosa de NaOH 10 % (580 µL/mmol de flavanona o 2'-hidroxichalcona). Luego, se añadió H₂O₂ 30 % (1350 µL/mmol de flavanona o 2'-hidroxichalcona). Se mantuvo la mezcla de reacción con agitación magnética en baño de hielo (5 °C) durante 3 horas. Se vertió la mezcla de reacción en HCl 5 N con agitación constante. El sólido resultante se filtró y secó al vacío.

Método B₂: se disolvió la 2'-hidroxichalcona de partida en etanol y se agregó NaOH en perlas (500 mmol/mmol de 2'-hidroxichalcona). Luego, se adicionó H₂O₂ 30 % (40 mL/mmol 2'-hidroxichalcona) gota a gota. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación magnética durante 15 horas a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla de reacción y se realizó extracción líquido-líquido a las aguas madres usando 2 porciones de CH₂Cl₂ (25 mL cada una). Se secó la porción diclorometanólica con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente y se recolectó el producto formado.

5.4. PROCEDIMIENTOS GENERALES DE SÍNTESIS

5.4.1. Procedimiento general para la síntesis de la 2-fenil-2,3-dihidro-4H-croman-4-ona (3)

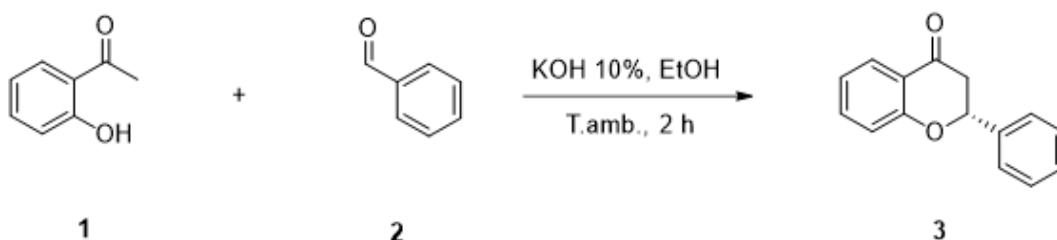


Figura 32. Reacción general para la síntesis de 2-fenil-2,3-dihidro-4H-croman-4-ona

Para la síntesis de **(3)** se empleó el método **A₁**: en un balón de fondo redondo de 25 mL equipado con agitador magnético se agregaron: 5 mL de etanol, 1.2 mL (10 mmol) de **(1)**, 1 mL (10 mmol) de **(2)** y además 2 mL de disolución acuosa al 10 % de KOH. La mezcla de reacción se dejó durante dos horas en agitación a temperatura ambiente. Se monitoreó la reacción por medio de TLC usando la fase móvil **A**. Transcurridas las 2 horas, se agregó hielo a la mezcla de reacción, obteniéndose un precipitado de color amarillo que fue posteriormente filtrado y secado al vacío (729.6 mg, **32.6** %). La formación del producto **(3)** se confirmó por medio de ¹H-RMN.

5.4.2. Procedimiento general para la síntesis de la 3-(4-clorofenil)-1-(2-hidroxifenil)-2-propen-1-ona (**5**)

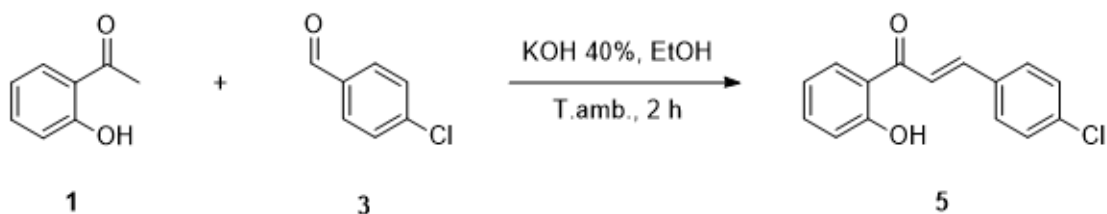


Figura 33. Reacción general para la síntesis de la 3-(4-clorofenil)-1-(2-hidroxifenil)-2-propen-1-ona

Para la obtención del producto **(5)** se utilizó la metodología **A₂**: usando etanol como disolvente (5 mL), se disolvieron 1.2 mL (10 mmol) de **(1)**, 1.4211 g (10 mmol) de **(4)** y 2 mL de KOH 40 % acuoso. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas y fue monitoreada por TLC usando la fase móvil **A**. Finalizada la reacción, se agregó hielo a la misma, formándose un sólido de color amarillo. El sólido obtenido fue filtrado y secado al vacío (1703.5 mg, **65.9** %). El espectro de ¹H-RMN del sólido obtenido permitió comprobar la formación del producto **(5)**.

5.4.3. Procedimiento general para la síntesis de la 3-(4-dimetilaminofenil)-1-(2-hidroxifenil)-2-propen-1-ona (7)

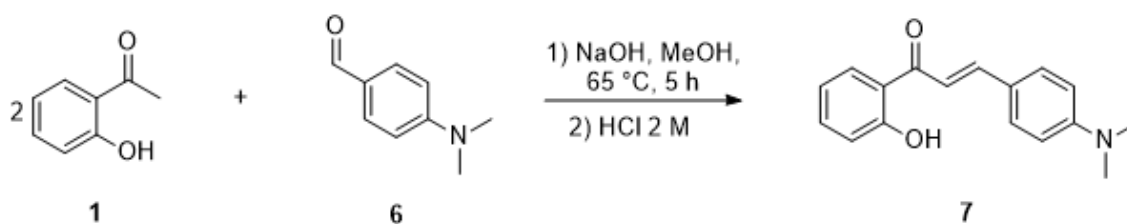


Figura 34. Reacción general para la síntesis de (7), siguiendo la metodología B₁

Se empleó la metodología B₁ para llevar a cabo la síntesis del producto (7). En un balón de fondo redondo equipado con agitador magnético y utilizando metanol como disolvente se agregaron: 0.5 mL (4 mmol) de (1), 298.6 mg (2 mmol) de (6) y 295.1 mg (7.4 mmol) de NaOH. La mezcla de reacción se calentó a reflujo a una temperatura de 65 °C durante 5 horas y se monitoreó por TLC empleando la fase móvil B. Al finalizar la reacción, se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente.

Posteriormente, se neutralizó la mezcla de reacción con 13 mL de HCl 2M, los cuales fueron añadidos gota a gota y midiendo constantemente el pH. Se formó un sólido de color rojo brillante, a un pH de 7, el cual fue lavado usando etanol frío y luego filtrado y secado al vacío (37.6 mg, 7.0 %). Se confirmó la formación del producto (7) por medio de su espectro de ¹H-RMN.

5.4.4. Procedimiento general para la síntesis de la 3-hidroxi-2-fenil-4H-cromen-4-ona (8)

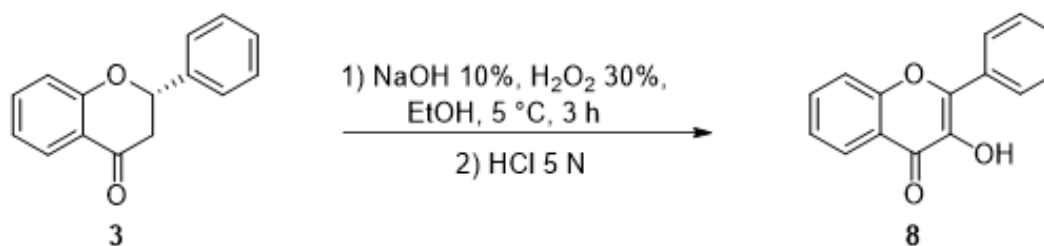


Figura 35. Reacción general para la síntesis de (8) siguiendo la metodología A₃

La metodología empleada para la síntesis del producto (**8**) fue la **A₃**: en un balón de fondo redondo equipado con agitador magnético y conteniendo etanol se disolvieron 109.4 mg (0.48 mmol) de (**3**), luego se le agregaron 2.8 mL de NaOH 10 % y 650 μ L de H₂O₂ 30 %. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación dentro de un baño de hielo a una temperatura de 5 °C durante 5 horas. La reacción se monitoreó por medio de TLC usando la fase móvil **A**.

Se finalizó la reacción, vertiendo en 5 mL de HCl 5 N en agitación la mezcla de reacción. El sólido blanco que precipitó se filtró y secó al vacío (86 mg, **75.3 %**). La formación del producto (**8**) se confirmó por medio del espectro de ¹H-RMN.

5.4.5. Procedimiento general para la síntesis de la 2-(4-clorofenil)-3-hidroxi-4H-cromen-4-ona (**9**)

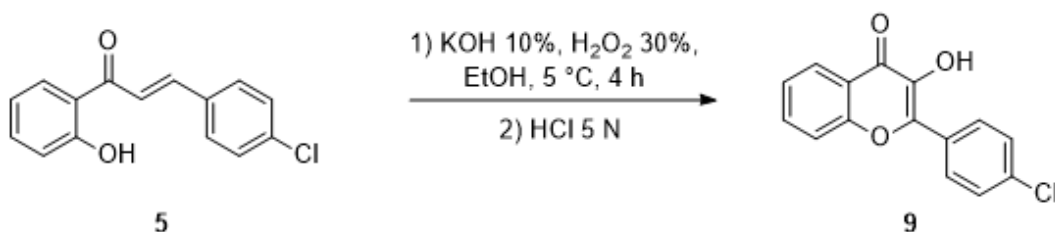


Figura 36. Reacción general para la obtención del producto (**9**) a partir de (**5**) aplicando la metodología **A₃**

Para realizar la síntesis del producto (**9**) se utilizó la metodología **A₃**. Sin embargo, en este caso se partió de la correspondiente 2'-hidroxichalcona (**5**), de la cual se disolvieron 129.9 mg (0.5 mmol) en etanol dentro de un balón de fondo redondo equipado con agitador magnético. Dentro del mismo, se agregaron también 2.8 mL de KOH 10 % y 650 μ L de H₂O₂ 30 % añadido gota a gota. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación y en baño frío (5 °C) durante 4 h. Se monitoreó la reacción por medio de TLC usando la fase móvil **A**. La mezcla de reacción se vertió en 10 mL de HCl 5 N, encontrándose este en agitación, formándose inmediatamente un sólido de color crema, que posteriormente fue filtrado y secado al vacío (98.4 mg, **72.2 %**). Se utilizó el espectro de ¹H-RMN del sólido obtenido para comprobar la formación de (**9**).

5.4.6. Procedimiento general para la síntesis de la 2-[4-(dimetilamino)fenil]-3-hidroxi-4H-cromen-4-ona (10)

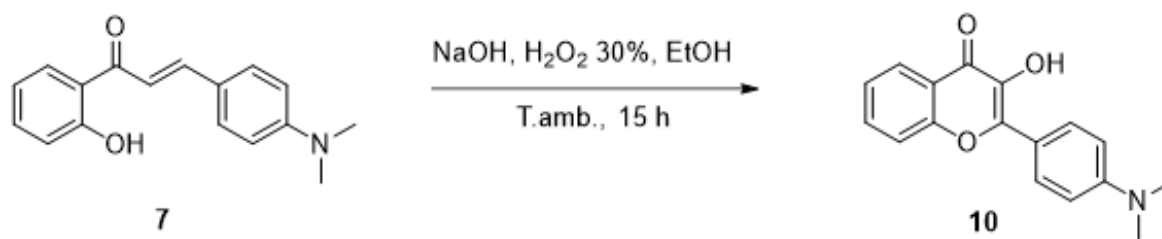


Figura 37. Reacción general para la síntesis de (10) aplicando la metodología B₂

La síntesis del producto (10) se llevó a cabo siguiendo la metodología B₂. En un balón de fondo redondo equipado con agitador magnético se disolvieron 13.2 mg (0.05 mmol) de (7) en etanol, luego se le agregaron 1.0127 g (25.3 mmol) de NaOH en perlas y 2 mL de H₂O₂ 30 % añadido gota a gota. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 15 horas, tiempo determinado por el seguimiento de la reacción con TLC, empleando la fase móvil B. Se filtró la mezcla de reacción, pues se obtuvo una pequeña cantidad de un sólido de color blanco que no se pudo recuperar tras la filtración. A las aguas madres se les realizó extracción líquido-líquido con dos porciones de CH₂Cl₂ (25 mL cada una). Se secó la porción diclorometanólica con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se dejó evaporar el disolvente, obteniéndose un sólido de color anaranjado (13.1 mg, 93.2 %). El espectro de ¹H-RMN mostró la formación del producto (10).

5.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS PRODUCTOS

5.5.1. Método de difusión en disco

La actividad biológica de los compuestos sintetizados fue determinada contra dos diferentes cepas de hongos: *Candida albicans* y *Aspergillus niger* empleando el método de Kirby-Bauer o de difusión en disco. Se prepararon disoluciones con 8 diferentes concentraciones (25, 40, 55, 100, 150, 200, 250 y 300 µg/mL) usando DMFA como disolvente, de acuerdo con las especificaciones del método M44-A del CLSI.

El control negativo consistió de un disco de papel Whatman N° 2 de 6 mm de diámetro, obtenido con un perforador, impregnado con DMFA.

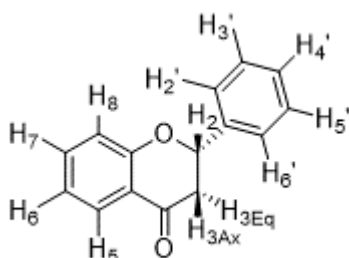
Los discos vacíos y esterilizados fueron impregnados con las disoluciones mencionadas anteriormente y DMFA como control negativo. Una vez evaporada la mayor parte de la DMFA, los discos fueron colocados en la superficie del medio empleado. Las cajas Petri se dejaron en reposo a temperatura ambiente de tal forma que hubiera difusión previa a la incubación, con el objetivo de disminuir el efecto de la variación en el tiempo entre la aplicación de cada disolución.

Como control positivo se emplearon los antifúngicos Ketoconazol 70 % en etanol y Cicloheximida 1 %. Después de la incubación de las placas a 25 °C por 72 horas, se midieron los diámetros de las zonas en que se observó total inhibición del crecimiento de microorganismos alrededor de cada disco (incluyendo el diámetro de este), midiendo el mismo en milímetros. Los valores promedio se obtuvieron al realizar dos mediciones para cada compuesto, a cada una de las concentraciones antes mencionadas, y para los controles positivos y negativos utilizados.^{100, 101}

En la siguiente sección se muestran los datos espectroscópicos correspondientes a los productos obtenidos tras la aplicación de las metodologías experimentales previamente descritas.

6. DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE LOS PRODUCTOS

6.1. Compuesto 2-fenil-2,3-dihidro-4*H*-croman-4-ona (3)



Estado físico: sólido

Color: amarillo

Fórmula molecular: C₁₅H₁₂O₂

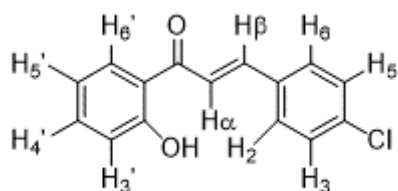
P.F. (°C): 67 ± 1

FTIR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹): 3036.12 (C_{sp3}-H), 1686.73 (C=O), 1147.57 (C-O-C)

UV-Vis λ_{\max} (DMFA, nm): 317.8

¹H-RMN (CDCl₃, 600 MHz, δ ppm): 7.94 (dd, J = 8.1, 1.7 Hz, 1H **H₇**), 7.63-7.69 (m, 1H **H₅**), 7.52 (ddd, J = 9.0, 5.4, 1.8 Hz, 2H **H_{3'}**, **H_{5'}**), 7.43-7.47 (m, 2H **H_{2'}**, **H_{6'}**), 7.40 (ddd, J = 7.3, 3.8, 1.4 Hz, 1H **H_{4'}**), 7.07 (dd, J = 3.5, 1.1 Hz, 1H **H₆**), 7.06 (dd, J = 3.4, 1.1 Hz, 1H **H₈**), 5.50 (dd, J = 13.4, 2.8 Hz, 1H **H₂**), 3.10 (dd, J = 16.9, 13.4 Hz, 1H **H_{3Ax}**), 2.91 (dd, J = 16.9, 2.9 Hz, 1H **H_{3Eq}**)

6.2. Compuesto 3-(4-clorofenil)-1-(2-hidroxifenil)-2-propen-1-ona (5)



Estado físico: sólido

Color: amarillo

Fórmula molecular: C₁₅H₁₁ClO₂

P.F. (°C): 132.1 ± 2.3

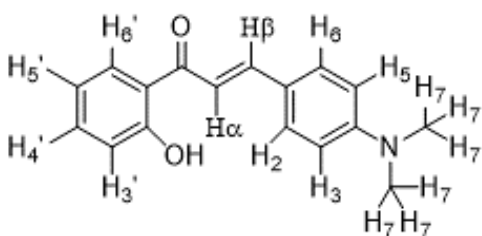
FTIR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹): 1638.49 (C=O), 1562.62 (C=C), 1088.69 (C-Cl), 982.56 (=C-H)

UV-Vis λ_{\max} (DMFA, nm): 319.2

¹H-RMN (CDCl₃, 600 MHz, δ ppm): 12.75 (s, 1H **OH**), 7.92 (dd, J = 8.1, 1.7 Hz, 1H **H_{6'}**), 7.87 (d, J = 15.5 Hz, 1H **H_{beta}**), 7.64 (d, J = 15.5 Hz, 1H **H_{alpha}**), 7.52 (ddd, J = 7.1, 6.1, 1.6 Hz, 1H **H_{5'}**),

7.43-7.41 (m, 2H **H₃**, **H₅**), 7.33 (ddd, J = 8.6, 7.5, 1.9 Hz, 2H **H₂**, **H₆**), 7.19 (d, J = 8.4 Hz, 1H **H_{3'}**), 6.96 (ddd, J = 8.2, 7.2, 1.2 Hz, 1H **H_{4'}**)

6.3. Compuesto 3-(4-dimetilaminofenil)-1-(2-hidroxifenil)-2-propen-1-ona (7)



Estado físico: sólido

Color: rojo brillante

Fórmula molecular: C₁₇H₁₇NO₂

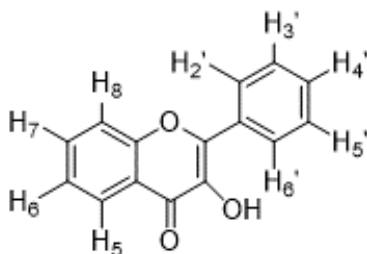
P.F. (°C): 173 ± 1

FTIR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹): 1620.20 (C=O), 1597.28 (C=C), 1433.67 (C_{Ar}-N), 1377.86 (C_{sp3}-H), 1309.12 (C_{sp3}-N), 988.13 (=C-H)

UV-Vis λ_{\max} (DMFA, nm): 400.0

¹H-RMN (CDCl₃, 600 MHz, δ ppm): 13.19 (s, 1H **OH**), 7.93 (d, J = 15.4 Hz, 1H **H_{\beta}**), 7.92 (d, J = 7.7 Hz, 1H **H_{6'}**), 7.58 (d, J = 8.9 Hz, 2H **H₃**, **H₅**), 7.47 (d, J = 15.2 Hz, 1H **H_{\alpha}**), 7.01 (d, J = 8.3 Hz, 1H **H_{4'}**), 6.93 (d, J = 7.3 Hz, 1H **H_{3'}**), 6.92 (d, J = 7.8 Hz, 1H **H_{5'}**), 6.71 (d, J = 8.8 Hz, 2H **H₂**, **H₆**), 3.07 (s, 6H **H₇**)

6.4. Compuesto 3-hidroxi-2-fenil-4H-cromen-4-ona (8)



Estado físico: sólido

Color: blanco crema

Fórmula molecular: C₁₅H₁₀O₃

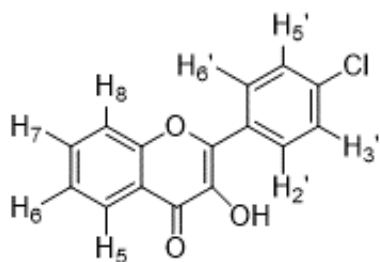
P.F. (°C): 157.3 ± 1.6

FTIR (ATR) ν_{\max} (cm⁻¹): 3200 (OH), 1625 (C=O), 1530 (C=C), 1115 (C-O-C)

UV-Vis λ_{\max} (DMFA, nm): 345.0

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 600 MHz, δ ppm): 8.27 (ddd, $J = 4.4, 3.6, 1.5$ Hz, 2H H_2' , H_6'), 7.72 (ddd, $J = 8.6, 7.1, 1.7$ Hz, 1H H_7), 7.61 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H H_6), 7.57-7.54 (m, 2H H_3' , H_5'), 7.56-7.55 (m, 1H H_5), 7.49 (dd, $J = 8.3, 6.4$ Hz, 1H H_4'), 7.45-7.41 (m, 1H H_8), 7.00 (s, 1H OH)

6.5. Compuesto 2-(4-clorofenil)-3-hidroxi-4H-cromen-4-ona (9)



Estado físico: sólido

Color: blanco crema

Fórmula molecular: $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{ClO}_3$

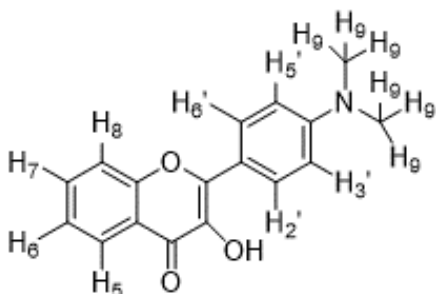
P.F. ($^\circ\text{C}$): 183 ± 6

FTIR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}): 3275.64 (OH), 1615.14 (C=O), 1569.70 (C=C), 1094.41 (C-O-C), 759.46 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-Cl}$)

UV-Vis λ_{max} (DMFA, nm): 347

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 600 MHz, δ ppm): 8.26 (dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, 1H H_5), 8.24-8.21 (m, 2H H_3' , H_5'), 7.72 (ddd, $J = 8.6, 7.1, 1.6$ Hz, 1H H_7), 7.59 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H H_8), 7.52-7.50 (m, 2H H_2' , H_6'), 7.45-7.41 (m, 1H H_6), 6.52 (s, 1H OH)

6.6. Compuesto 2-[4-(dimetilamino)fenil]-3-hidroxi-4H-cromen-4-ona (10)



Estado físico: sólido

Color: anaranjado

Fórmula molecular: $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_3$

P.F. ($^\circ\text{C}$): 212.5 ± 2.0

FTIR (ATR) ν_{max} (cm^{-1}): 3443.17 (OH), 1596.19 (C=O), 1556.89 (C=C), 1106.82 (C-O-C), 1286.94 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-N}$), 1196.43 ($\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-N}$)

UV-Vis λ_{\max} (DMFA, nm): 402.5

^1H -RMN (CDCl_3 , 600 MHz, δ ppm): 8.23 (dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H H_7), 8.21-8.18 (m, 2H H_3' , H_5'), 7.65 (ddd, $J = 8.6, 7.1, 1.7$ Hz, 1H H_6), 7.56 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H H_5), 7.38 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H H_8), 7.40-7.36 (m, 2H H_2' , H_6'), 6.81 (s, 1H OH), 3.07 (s, 6H H_9)

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el objetivo de sintetizar distintos flavonoides se emplearon diferentes metodologías experimentales, las cuales fueron descritas de forma general anteriormente. Dichas metodologías se basan en las reacciones de Claisen-Schmidt y de Algar-Flynn-Oyamada, que constituyen los procedimientos clásicos para la obtención de este tipo de compuestos. Se han obtenido tres tipos de flavonoides: flavanonas, 2'-hidroxichalconas y 3-hidroxi-flavonas, por lo tanto, la discusión de los resultados obtenidos, se basa en las metodologías desarrolladas para sintetizar cada uno de los tipos de flavonoides mencionados.

7.1. SÍNTESIS DE FLAVANONAS

La síntesis de flavanonas se llevó a cabo aplicando una metodología basada en la reacción de Claisen-Schmidt. Si bien, la reacción es conocida por ser utilizada para sintetizar chalconas, las 2'-hidroxichalconas pueden fácilmente ciclarse bajo las condiciones de esta reacción, formando las respectivas flavanonas. A continuación, se describe la metodología de síntesis utilizada para la obtención de flavanonas.¹⁰²

7.1.1. Síntesis de la 2-fenil-2,3-dihidro-4H-croman-4-ona (3)

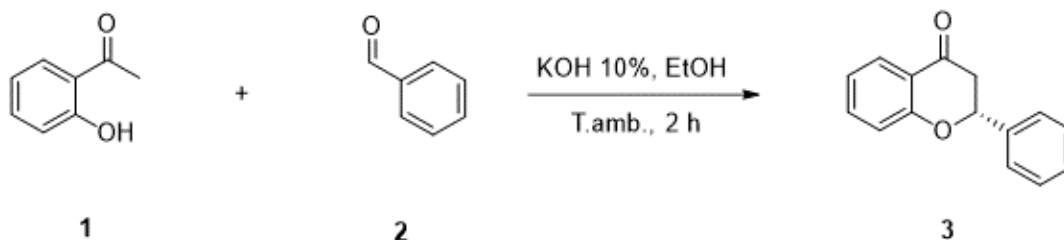


Figura 32. Reacción general para la síntesis de 2-fenil-2,3-dihidro-4H-croman-4-ona.

La reacción se llevó a cabo siguiendo la metodología general de síntesis **A₁** descrita en la sección 5.3.1., y consistió en la condensación aldólica entre cantidades equimolares de (1) y (2), figura 32, variando el catalizador básico con respecto al empleado en la mayoría de metodologías reportadas en la literatura, usándose disolución acuosa de KOH 10 %. Se usó KOH por su mayor fuerza

básica, en comparación con el NaOH, así, este sustrae con mayor facilidad un protón α de (1), generándose el ion enolato que se une a (2) por medio de un ataque nucleofílico al carbono carbonilo de este último.¹⁰³

A continuación, en la tabla 6, se muestran las condiciones de reacción empleadas para la obtención de (3).

Tabla 6. Condiciones de reacción para la formación de (3).

| Entrada | Reacción | Catalizador | T (°C) | t (h) | Resultado |
|----------------|-----------------|--------------------|---------------|--------------|---------------------|
| 1 | RADR01 | KOH 10 % | 31 | 2 | Producto sin aislar |
| 2 | RADR02 | KOH 10 % | 33 | 2 | Rendimiento 32.6 % |

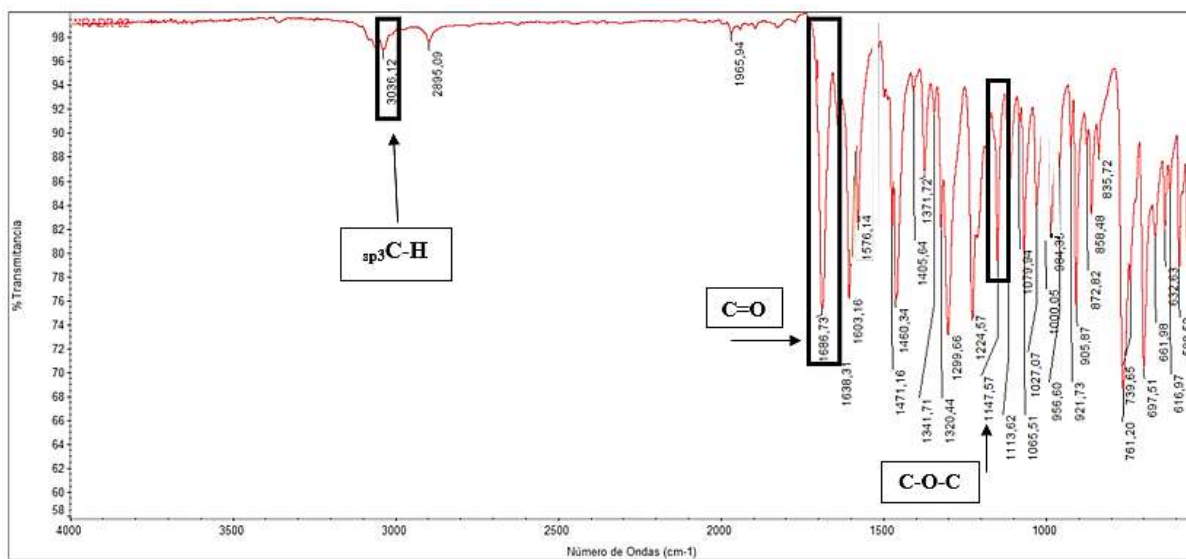
En el caso de la reacción en la entrada 1 (RADR01), tal como se muestra en la tabla anterior, se utilizó como catalizador básico KOH 10 %. Transcurridas 2 horas, se finalizó la reacción con la adición de hielo directamente a la mezcla de reacción, precipitando una pequeña cantidad de sólido color amarillo. El producto quedó retenido en los poros del papel filtro tras haber realizado la filtración del mismo desde la mezcla de reacción. Se intentó aislar este sólido añadiendo etanol caliente al papel filtro, sin ningún éxito. Adicionalmente, el KOH utilizado para llevar a cabo esta reacción presentaba señales de estar contaminado, ya que posteriormente se observó la aparición de coloración anaranjada en el mismo.

Al observarse que el KOH utilizado se encontraba contaminado, se procedió a cambiar el reactivo para llevar a cabo la reacción de la entrada 2 (RADR02) bajo las mismas condiciones descritas en la reacción de la entrada 1. En esta ocasión se obtuvo una mayor cantidad de sólido, el cual fue posteriormente filtrado.

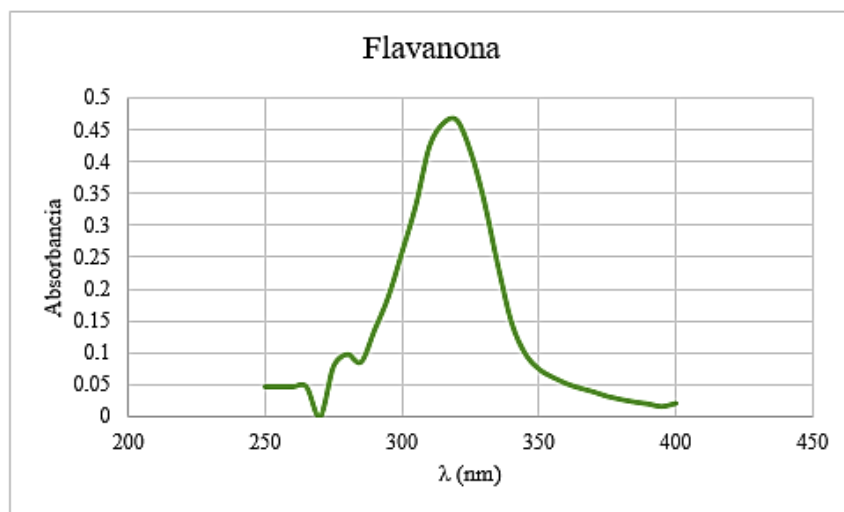
Los datos espectroscópicos del producto obtenido fueron utilizados para confirmar la formación de (3). Así, por ejemplo, la banda de máxima absorción en el espectro de ultravioleta-visible (λ_{max}) fue consistente con lo reportado en la literatura consultada, cuyo rango para las flavanonas es de 300-330 nm, el valor medido para el producto sintetizado fue de 317 nm (DMFA). A su vez, el espectro IR permitió identificar bandas de interés para la caracterización del producto,

siendo la más importante la señal correspondiente a la tensión del enlace C-O a 1147.57 cm^{-1} , la cual indica que el producto se encuentra ciclado, formando el anillo C, característico de las flavanonas.⁹²

A continuación, en la figura 38 se muestran los espectros UV-Vis e IR correspondientes al producto (3).



(A)



(B)

Figura 38. Espectros (A) FTIR y (B) UV-Vis (DMFA) obtenidos para el producto (3).

Además, se confirmó la formación del producto (**3**) por medio del respectivo espectro de resonancia magnética nuclear de protón. En la figura 39 se muestra un segmento de dicho espectro, en la que se pueden apreciar las señales correspondientes a los protones alifáticos ubicados en los carbonos 2 y 3 del anillo C de la flavanona.

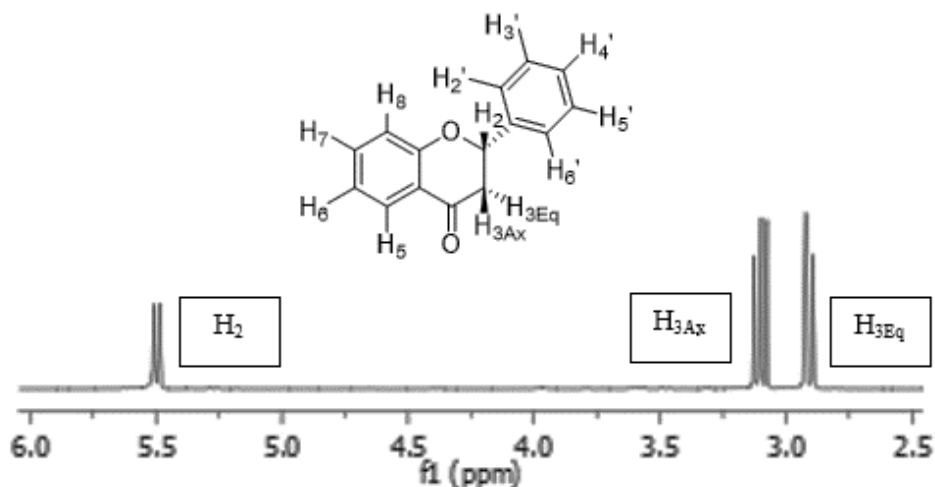


Figura 39. Segmento del espectro de ^1H -RMN (CDCl_3) del producto (**3**). Se observan las señales de los protones enlazados a los carbonos 2 y 3.

Las señales mostradas en la figura 39 son consistentes con las esperadas para el producto (**3**), así como sus constantes de acoplamiento.^{23, 104}

El protón H_2 que es el que se encuentra unido al centro estereogénico, suele aparecer cercano a los valores de las 6 ppm en los espectros de ^1H -RMN, presentando constantes de acoplamiento J de aproximadamente 13.0 y 3.0 Hz. En tanto que el protón denominado $\text{H}_{3\text{Ax}}$ por encontrarse en la posición axial del anillo C, aparece en valores de ppm intermedios entre el H_2 y el $\text{H}_{3\text{Eq}}$, encontrándose su desplazamiento químico δ sobre las 3.0 ppm, con valores de J de aproximadamente 17.0 y 13.0 Hz; en tanto que, el $\text{H}_{3\text{Eq}}$ aparece a δ cercanos a las 2.8 ppm, con valores de J de aproximadamente 17.0 y 3.0 Hz.^{104, 105}

En relación con lo mencionado anteriormente, para el caso del producto (**3**) el protón $\text{H}_{3\text{Eq}}$ se reporta a $\delta = 2.91$ ppm, siendo las constantes de acoplamiento de este las siguientes $J = 16.9$ y 2.9 Hz. Mientras que el $\text{H}_{3\text{Ax}}$ se reporta a $\delta = 3.10$ ppm y las constantes de acoplamiento para el

mismo son de 16.9 y 13.4 Hz. A su vez, el H₂ se reporta a $\delta = 5.50$ ppm con J = 13.4 y 2.8 Hz.^{104, 105}

A pesar de la existencia de distintas metodologías para la síntesis de este tipo de productos, la formación de la flavanona (**3**), bajo las condiciones de la reacción de Claisen-Schmidt, se explica en términos del equilibrio químico que existe entre las 2'-hidroxichalconas y sus respectivas flavanonas, tal como se muestra en la figura 40.^{106, 107, 108, 109, 110}

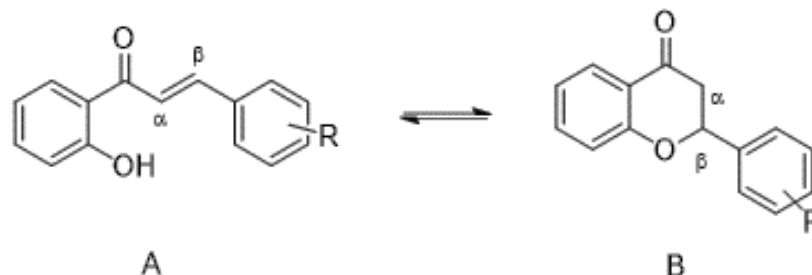


Figura 40. Equilibrio químico entre 2'-hidroxichalconas (A) y sus respectivas flavanonas (B).

Una gran cantidad de estudios han sido publicados desde la década de los 70, en los que se han abordado los diversos factores que favorecen la formación ya sea de 2'-hidroxichalconas o flavanonas. Desde cálculos computacionales hasta pruebas experimentales, los resultados de dichos estudios concluyen que los factores que mayor efecto poseen sobre el equilibrio mencionado son el pH, la cinética de la reacción y los efectos electrónicos que por resonancia afectan la nucleofilicidad del ion fenóxido y la electrofilicidad del carbono β (figura 34, estructura A), siendo así que sustituyentes donadores de densidad electrónica en el anillo A y sustituyentes sustractores de densidad electrónica en el anillo B, favorecen el equilibrio hacia la ciclación de la 2'-hidroxichalcona para producir la correspondiente flavanona. Este factor tiene importantes consecuencias sobre el pH, que afecta el equilibrio entre ambas especies, principalmente por la modificación de los valores de pK_a del protón β en la estructura A de la figura 34, siendo así que los valores de pH a los cuales existe de forma predominante una especie o la otra, dependen en gran medida de los sustituyentes que se encuentren en el anillo B de la misma.^{106, 107, 108, 109, 110}

7.2. SÍNTESIS DE 2'-HIDROXICALCONAS

Se realizó la síntesis de 2'-hidroxichalconas, siguiendo metodologías basadas en la reacción de condensación de Claisen-Schmidt entre benzaldehídos y 2-hidroxiacetofenona. En esta sección se utilizaron dos diferentes benzaldehídos como uno de los productos de partida, siendo estos el 4-clorobenzaldehído y el 4-(dimetilamino)benzaldehído, estructuras (4) y (6) respectivamente. A continuación, se describen las metodologías empleadas con el objetivo de sintetizar las correspondientes 2'-hidroxichalconas.

7.2.1. Síntesis de la 3-(4-clorofenil)-1-(2-hidroxifenil)-2-propen-1-ona (5)

En la figura 33, mostrada a continuación, se aprecia la reacción general utilizada para la obtención de (5), la cual es similar a la reacción realizada para la obtención de (3). Sin embargo, para esta reacción se varió la concentración del catalizador básico, utilizando disolución de KOH 40 %, de acuerdo con las concentraciones de base sugeridas en la literatura, que son de entre 15 % - 60 %, para la síntesis de chalconas.^{111, 112}

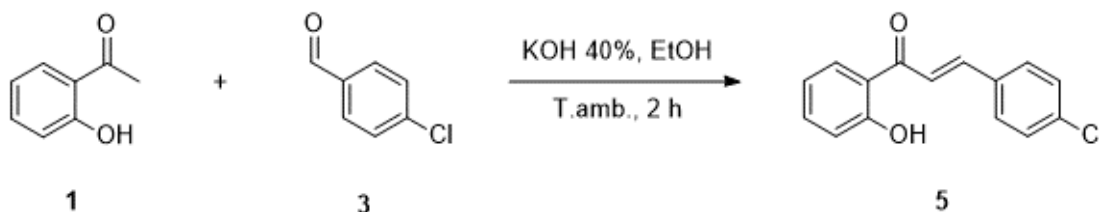


Figura 33. Reacción general para la síntesis de la 3-(4-clorofenil)-1-(2-hidroxifenil)-2-propen-1-ona.

La metodología empleada para la síntesis del producto (5) fue la denominada A₂, la cual consistió en la mezcla de cantidades equimolares de (1) y (4) disueltos en etanol y usando disolución de KOH 40 % como catalizador básico de la reacción. El producto se obtuvo tras dos horas de mantener en agitación los materiales de partida. Posterior a ello, se realizó el work-up, o aislamiento del producto, de la reacción añadiendo hielo a la misma. Las condiciones a las cuales se llevó a cabo esta reacción se describen a continuación en la tabla 7.

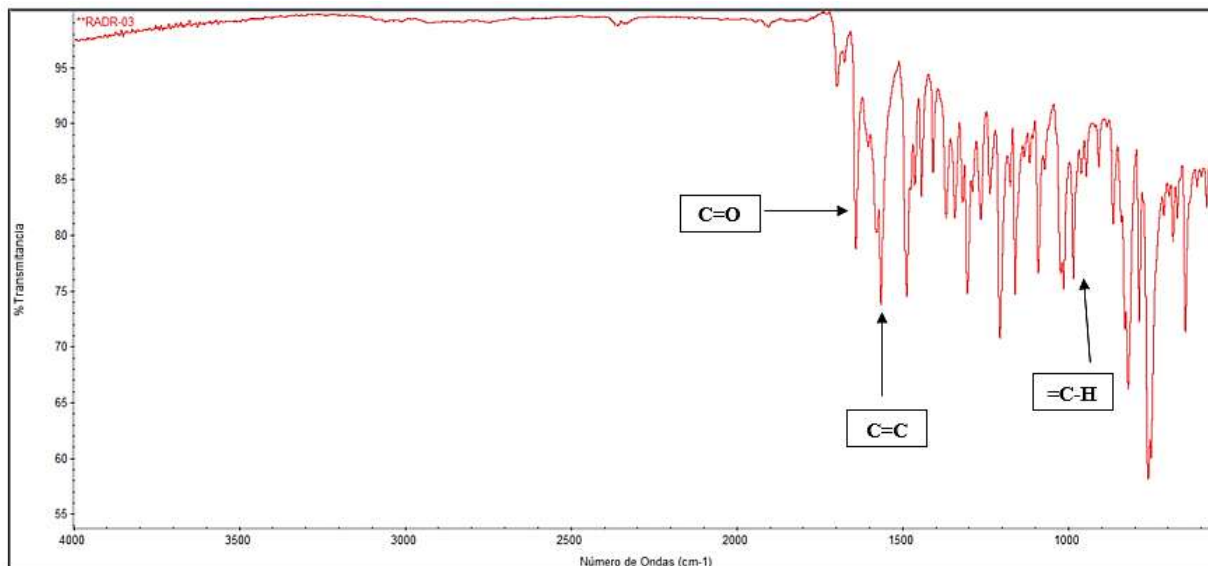
Tabla 7. Condiciones de reacción para la formación de (5).

| Entrada | Reacción | Catalizador | T (°C) | t (h) | Resultados |
|---------|----------|-------------|--------|-------|--|
| 1 | RADR03 | KOH 40 % | 32 | 2 | Formación de sólido amarillo. Rendimiento: 65.9 % |

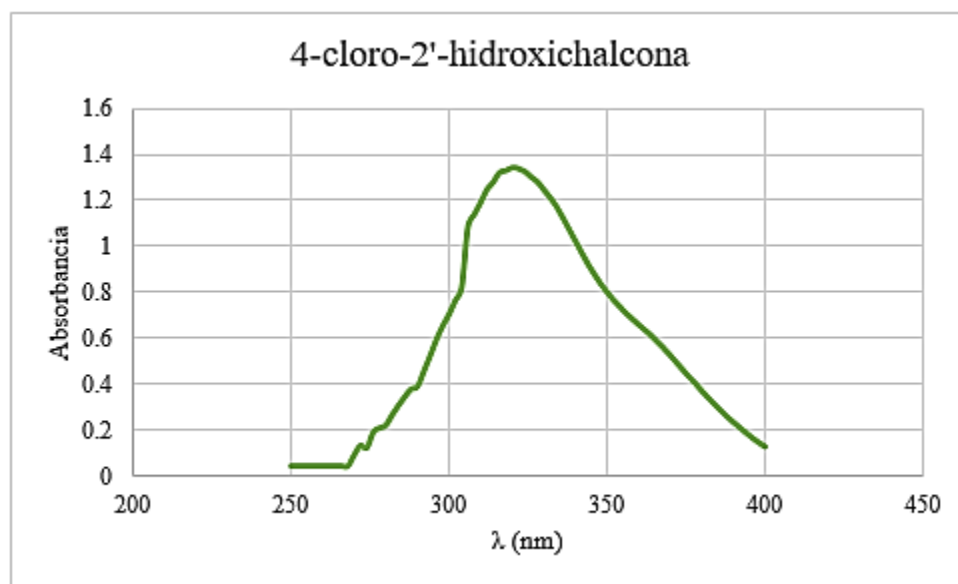
Posteriormente, se procedió a analizar los diferentes espectros obtenidos para el producto (5). Por ejemplo, la banda de máxima absorción obtenida a partir del espectro UV-Vis para este compuesto en DMFA fue identificada a una λ_{\max} de 319.2 nm, figura 41 B. En la literatura consultada, el rango en el que se encuentra esta banda de absorción para las 2'-hidroxichalconas es de 345 – 435 nm. Sin embargo, la presencia de sustituyentes sustractores de densidad electrónica ocasiona que esta banda experimente un desplazamiento hipsocrómico, es decir, a menores longitudes de onda, lo que explica el valor de longitud de onda de máxima absorción obtenido para (5).⁹⁴

Por otra parte, se buscaron las señales características para la identificación de 2'-hidroxichalconas en el espectro IR obtenido para el producto (5), en la imagen 41 A, se muestra el respectivo espectro, siendo las señales más importantes, las asociadas con la formación del doble enlace, en el caso del producto (5), estas señales fueron encontradas a 1552.62 cm^{-1} que corresponde a la tensión del doble enlace entre los átomos de carbono α y β , así como la señal encontrada a 982.56 cm^{-1} correspondiente a la flexión del enlace C-H para un sistema olefínico con configuración *trans*.⁹²

Además, la formación del doble enlace, se determinó mediante el espectro de $^1\text{H-RMN}$ del producto (5). La sección de dicho espectro que se muestra en la figura 42, permite observar las señales correspondientes a los desplazamientos químicos de los protones α y β del producto formado. El protón α aparece desplazado a campo más alto con respecto al protón β , esto debido al efecto de la polarización ocasionada por la presencia del grupo carbonilo. En el espectro las señales se encuentran a 7.64 ppm (H_α), mientras que el H_β aparece a campo más bajo con un desplazamiento químico $\delta = 7.87\text{ ppm}$.⁹²



(A)



(B)

Figura 41. (A) espectro IR del producto (5) y (B) espectro UV-Vis (DMFA) del producto (5).

La constante de acoplamiento entre los protones α y β obtenida a partir del espectro de ^1H -RMN fue de 15.5 Hz, valor que es consistente con los encontrados en la literatura para un sistema

olefínico cuya configuración es *trans* (15 – 17 Hz). Así, con la información mencionada previamente se confirmó la formación del producto esperado (**5**).⁹²

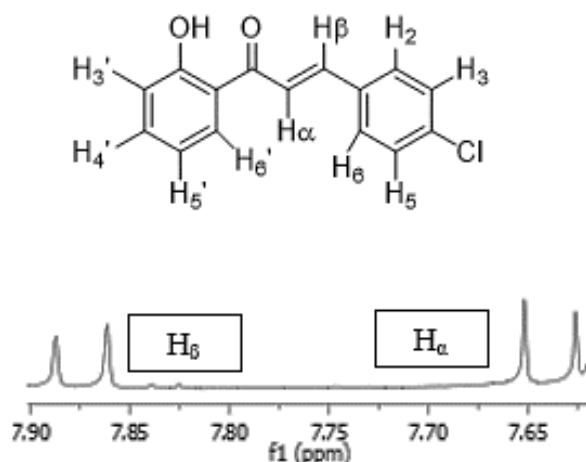


Figura 42. Segmento del espectro de ¹H-RMN (CDCl₃) del producto (**5**) en el que se aprecian los protones α y β.

7.2.2. Síntesis de la 3-(4-dimetilaminofenil)-1-(2-hidroxifenil)-2-propen-1-ona (**7**)

Con el objetivo de obtener el producto (**7**) se aplicaron distintas metodologías de síntesis, las cuales se describen a continuación. Los primeros intentos para obtener esta 2'-hidroxichalcona constaron en la aplicación de la metodología **A₂**, dados los resultados obtenidos previamente en la síntesis de (**5**). A continuación, en la figura 43 se muestra la reacción para la síntesis de (**7**) aplicando la metodología **A₂**.

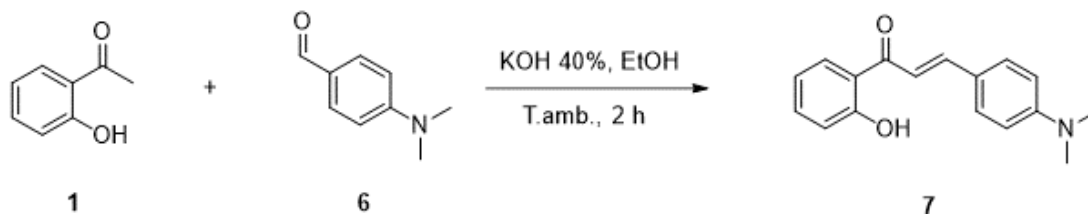


Figura 43. Reacción general para la obtención de (**7**) siguiendo la metodología **A₃**.

Al igual que para el producto (**5**), se utilizó disolución de KOH 40 % como catalizador básico de la reacción, además de cantidades equimolares de los materiales de partida, tal como se

puede apreciar en la tabla 8, donde se detallan las condiciones de reacción empleadas para la obtención de (7), entradas 1 y 2.

Tabla 8. Condiciones de reacción para la formación de (7) siguiendo la metodología A₂.

| Entrada | Reacción | Catalizador/Disolvente | T (°C) | Relación molar | t (h) | Resultados |
|---------|----------|------------------------|--------|----------------|-------|------------------|
| 1 | RADR06 | KOH 40 % / EtOH | 33 | 1:1 | 24 | Aldehído impuro. |
| 2 | RADR07 | KOH 40 % / EtOH | 33 | 1:1 | 2 | Aldehído impuro. |

En el caso de la reacción en la entrada 1, después de 2 horas de mantener en agitación la mezcla de reacción, no se observó progreso en la misma, de acuerdo con las placas de TLC. Razón por la cual se dejó el resto del día, hasta completar las 24 horas, tiempo después del cual, se suspendió la reacción con la adición de hielo, obteniéndose solamente el aldehído impuro. De forma similar ocurrió con la reacción de la entrada 2, como después de 2 horas no se observó progreso en la reacción (TLC) se suspendió la misma, obteniéndose nuevamente el aldehído impuro.

Se decidió utilizar NaOH en estado sólido en lugar de la disolución de KOH empleada en las entradas 1 y 2, para evitar la presencia de agua en la reacción, esto con el objetivo de obtener el producto esperado. La reacción general que muestra las modificaciones realizadas a la metodología A₂ se muestran en la figura 44.

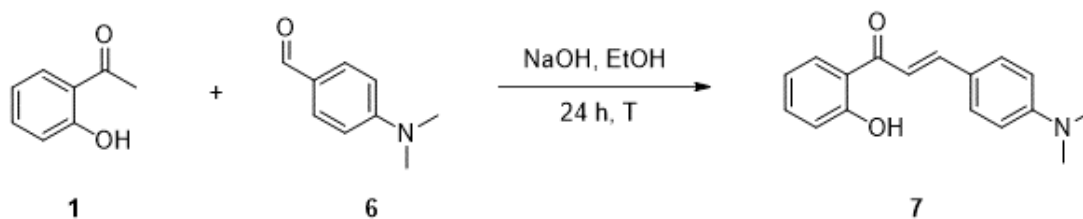


Figura 44. Reacción general para la obtención de (7) modificando la metodología A₂. El tiempo de reacción fue primero de 24 horas a t.amb., mientras que luego fue de 24 horas a t.amb. más 24 horas a 60 °C.

En la tabla 9 se muestran las condiciones de reacción utilizadas para modificar la metodología A₂.

Tabla 9. Condiciones de reacción para la obtención de (7) empleando la metodología A₂ modificada.

| Entrada | Reacción | Catalizador/Disolvente | T (°C) | R.M. | t (h) | pH _i /pH _f | Resultados | |
|---------|----------|------------------------|-----------|------|----------|----------------------------------|------------|---------------------|
| 1 | RADR09 | (S) | NaOH/EtOH | 31 | 1:1 | 24 | - | Aldehído impuro |
| | | (A) | NaOH/EtOH | 60 | 1:1 | 24 | 8.0/7.0 | Rendimiento: 4.21 % |

Nota: R.M: relación molar entre (1) y (6), pH_i: pH inicial, pH_f: pH final, - (no se realizó medición).

Atendiendo a los cambios realizados en la metodología, la reacción en la entrada 1 de la tabla 9 (RADR09) se llevó a cabo inicialmente durante 24 horas a temperatura ambiente sin que se obtuviese el producto (7). Razón por la cual, la mezcla de reacción se dividió en dos porciones: RADR09_(S) y RADR09_(A). En el caso de la porción RADR09_(S), fue inicialmente filtrada, obteniéndose un sólido amarillento, mientras que a las aguas madres se les realizó extracción líquido-líquido con C₆H₁₂, fue secada con Na₂SO₄ anhidro, filtrada y se evaporó el disolvente, obteniéndose un sólido amarillento, el cual, junto con el obtenido previamente, resultaron ser el aldehído impuro.

Por otra parte, a la segunda porción, RADR09_(A) se le trató con 10 mL de MeOH frío y se agregó nuevamente NaOH. En esta ocasión, la mezcla de reacción se calentó a reflujo (60 °C) durante 24 horas. Las placas de TLC no mostraron avance de la reacción, por lo que se decidió finalizarla añadiendo HCl concentrado, gota a gota, pues se encontró en la literatura que la adición de ácido como operación de work-up, aislamiento del producto, facilita la obtención del mismo, pues detiene la acción catalítica de la base al completarse la reacción. Así, se obtuvo un sólido de color rojo brillante, cuyo punto de fusión (171-175 °C) fue similar con el reportado en la literatura para el producto (7) (176-177 °C).^{113, 114, 115, 116}

En vista de los resultados obtenidos en la reacción anterior, se decidió modificar nuevamente la metodología con el objetivo de aumentar su rendimiento, obtener reproducibilidad y además verificar la misma. En este sentido, se montaron 3 nuevas reacciones de forma asincrónica, en las que se sustituyó el uso de EtOH por MeOH, el empleo de NaOH en perlas al igual que en la reacción anterior, variándose en esta ocasión la relación estequiométrica de los reactivos.

A continuación, en la tabla 10 se muestran las condiciones de reacción utilizadas, modificando la estequiometría de la reacción.

Tabla 10. Condiciones de reacción para la síntesis de (7). Modificando relación estequiométrica entre (1) y (6).

| Entrada | Reacción | Catalizador/Disolvente | T (°C) | R.M. | t (h) | pH _f | Resultados | |
|---------|----------|------------------------|-----------|------|----------|-----------------|------------------------|------------------------|
| 1 | RADR10 | 10 _a | NaOH/MeOH | 60 | 1:1 | 3.5 | 7.0 | Aldehído impuro |
| | | 10 _b | NaOH/MeOH | 60 | 1:1 | 6 | 7.0 | Rendimiento: 0.71 % |
| 2 | RADR11 | NaOH/MeOH | 60 | 2:1 | 3.5 | 7.0 | Rendimiento: 1.52 % | |
| 3 | RADR12 | NaOH/MeOH | 60 | 1:2 | 5 | 7.0 | Rendimiento: 7.1 % | |

Nota: R.M.: relación molar entre (6) y (1), pH_f: pH final, a y b fracciones en que se dividió la reacción.

En el caso de la reacción en la entrada 1 (tabla 10), se emplearon perlas de NaOH y se utilizó MeOH como disolvente, calentando a reflujo (60 °C) durante 3.5 horas. Después de este tiempo, la reacción se dividió en dos partes. La primera parte RADR10_a se neutralizó añadiendo gota a gota HCl concentrado, obteniéndose nada más el aldehído impuro. Por otra parte, la segunda porción se mantuvo a reflujo por un total de 6 horas, tiempo después del cual se neutralizó con

HCl concentrado, obteniéndose una mezcla de sólidos, los cuales fueron filtrados y posteriormente lavados con EtOH frío, aislándose, así, el producto deseado (**7**) como un sólido rojo de características similares al obtenido previamente, aunque con un menor porcentaje de rendimiento en relación con la reacción anterior (entrada 1, tabla 9).

Luego, se trabajó con una relación estequiométrica 2:1 (entrada 2, tabla 10) entre (**6**) y (**1**), es decir, con un exceso de aldehído, manteniendo las demás condiciones de reacción. Al neutralizar la mezcla de reacción añadiendo disolución de HCl gota a gota, después de 3.5 horas se obtuvo el producto (**7**), del cual se recogió una segunda cosecha al filtrar nuevamente las aguas madres, consiguiéndose aumentar ligeramente el rendimiento hasta un 1.52 % con respecto al 0.71 % obtenido en la reacción anterior (entrada 1).

Finalmente, se llevó a cabo la reacción detallada en la entrada 3 (RADR12), en la que se utilizó una relación estequiométrica 1:2 entre (**6**) y (**1**), esta vez con un exceso de cetona. La reacción se mantuvo en calentamiento a reflujo por un periodo de 5 horas. Luego, se añadió disolución de HCl gota a gota para detener la reacción, manteniendo en agitación la mezcla de reacción, obteniéndose mayoritariamente el producto deseado (**7**) y una pequeña cantidad de aldehído impuro que fue eliminado al realizar lavado con etanol frío. El sólido obtenido presentó características similares a las obtenidas previamente (entrada 1, tabla 9), siendo este un sólido de color rojo brillante que fundió a 174 °C.

Se utilizó el producto obtenido de la reacción en la entrada 3 (tabla 10) para realizar la etapa de caracterización. Se obtuvo el espectro UV-Vis, del cual se identificó la λ_{max} a 400.0 nm, el desplazamiento a mayores longitudes de onda con respecto al producto (**5**) se explica por la presencia del grupo dimetilamino en la posición 4 (anillo B) del producto, el cual es donador de densidad electrónica. El espectro UV-Vis se muestra en la figura 45.⁹²



Figura 45. Espectro UV-Vis (DMFA) para el producto (7).

Las bandas características del producto (7) en el IR son las que se identificaron a 1597.28 cm^{-1} correspondiente a la vibración de tensión del doble enlace carbono – carbono y a 988.13 cm^{-1} que corresponde a la flexión del enlace C-H en un sistema olefínico con configuración *trans*. El respectivo espectro IR para el producto (7) se muestra en la figura 46.

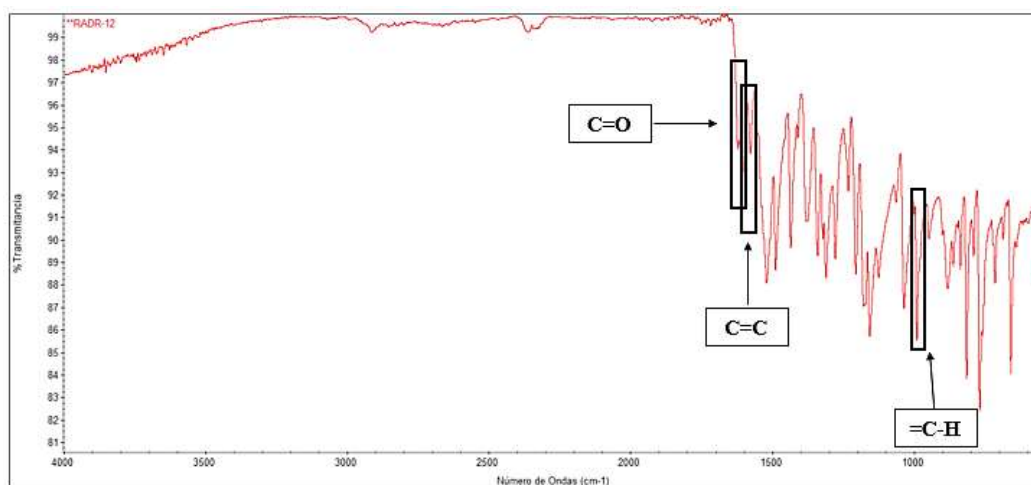


Figura 46. Espectro IR para el producto (7).

Además de la información utilizada anteriormente, se empleó el espectro de ^1H -RMN para confirmar la formación del producto. El protón β fue encontrado a $\delta = 7.93$ ppm, mientras que el H_α se identificó a $\delta = 7.47$ ppm. Ambos protones comparten una constante de acoplamiento $J = 15.2$ Hz, que podría indicar que estos se encuentran en la configuración *trans*, en la figura 47 se muestra la sección del espectro en que se aprecian las señales para ambos protones.⁹²

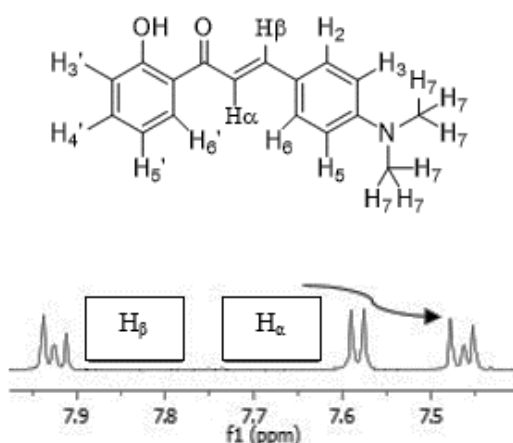


Figura 47. Sección del espectro de ^1H -RMN (CDCl_3) en que se muestran las señales correspondientes a los protones α y β de (7).

No se logró aumentar el porcentaje de rendimiento con que se obtuvo el producto (7) a más de un 7 %. Se identificaron dos factores principales que afectaron el rendimiento de la reacción. El primero de ellos es el proceso de retrocondensación del producto (7), el cual se ve favorecido por la naturaleza del sustituyente en la posición 4 del aldehído (6). La literatura consultada sugiere que la formación del nuevo enlace carbono-carbono se ve favorecida por la presencia de sustituyentes sustractores de densidad electrónica en la posición 4 de los aldehídos de partida, en tanto que los donadores de densidad electrónica disminuyen la electrofilicidad del carbono carbonilo del aldehído, dificultando el ataque del nucleófilo, así, con la formación del producto se daba también su descomposición, como se muestra en la figura 48. El segundo factor que pudo influir en el bajo rendimiento de la reacción fue la pureza del aldehído, ya que, si bien el punto de fusión del mismo fue ligeramente menor (68°C) en comparación con el reportado en la literatura (72 - 75°C) y que las placas cromatográficas no mostraron la presencia de impurezas. Existe la

probabilidad que parte del mismo se hubiera descompuesto, dejando así solamente pequeñas cantidades del aldehído disponibles para reaccionar.¹¹⁷

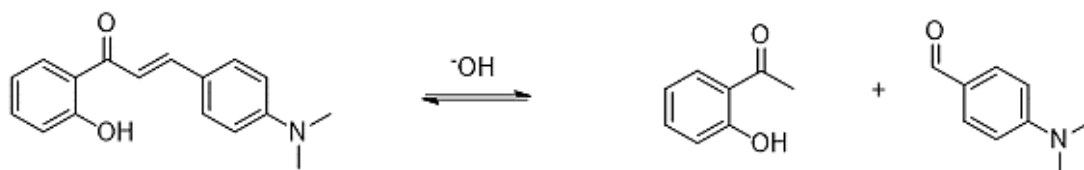


Figura 48. Reacción de retrocondensación del producto (7).

Tomando en cuenta todos los aspectos mencionados anteriormente, se describió la metodología **B₁** para la síntesis del producto (7), la cual fue detallada en la sección 5.3.2. y cuya reacción general se muestra en la figura 34.

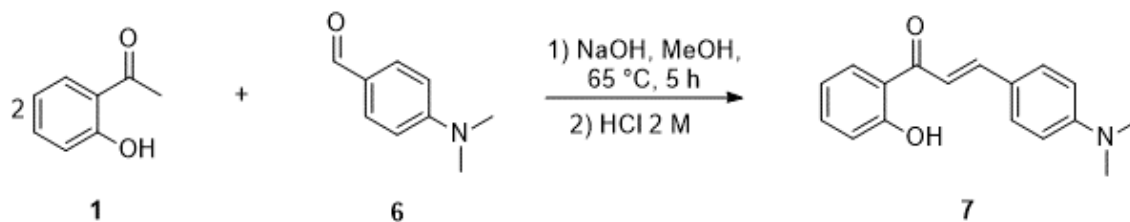


Figura 34. Reacción general para la síntesis de (7), siguiendo la metodología **B₁**.

7.3. SÍNTESIS DE 3-HIDROXIFLAVONAS

Posterior a la síntesis de las 2'-hidroxichalconas, se llevó a cabo la síntesis de 3-hidroxi-2-fenil-4H-cromen-4-ona empleando metodologías basadas en la reacción de Algar-Flynn-Oyamada, partiendo de dos distintos sustratos: flavanonas y 2'-hidroxichalconas previamente sintetizadas. A continuación, se describen los procedimientos realizados para la obtención de las mismas.

7.3.1. Síntesis de la 3-hidroxi-2-fenil-4H-cromen-4-ona (8)

La síntesis del producto (8) se realizó a partir de la oxidación de (3) con H₂O₂ en presencia de NaOH como catalizador básico de la reacción, con una concentración de 10 % en disolución acuosa. Se empleó la metodología denominada A₃, siendo el agente oxidante (H₂O₂) utilizado al 30 %, a una temperatura de 5 °C. Transcurridas 3 horas, se finalizó la reacción, agregando la mezcla de reacción a un beaker conteniendo HCl 5 N en agitación, precipitando el producto en forma de un sólido color blanco crema. A continuación, en la figura 49, se muestra la reacción general y las condiciones para la obtención de este producto.

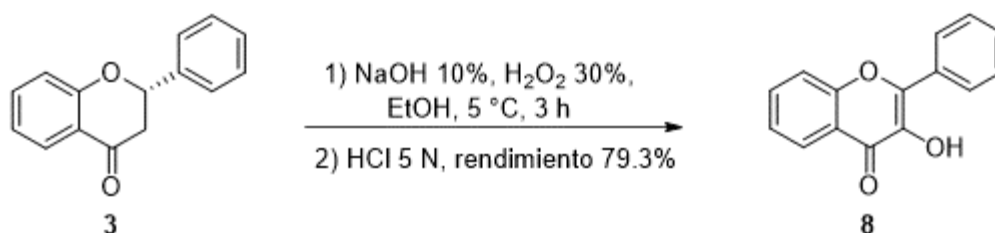
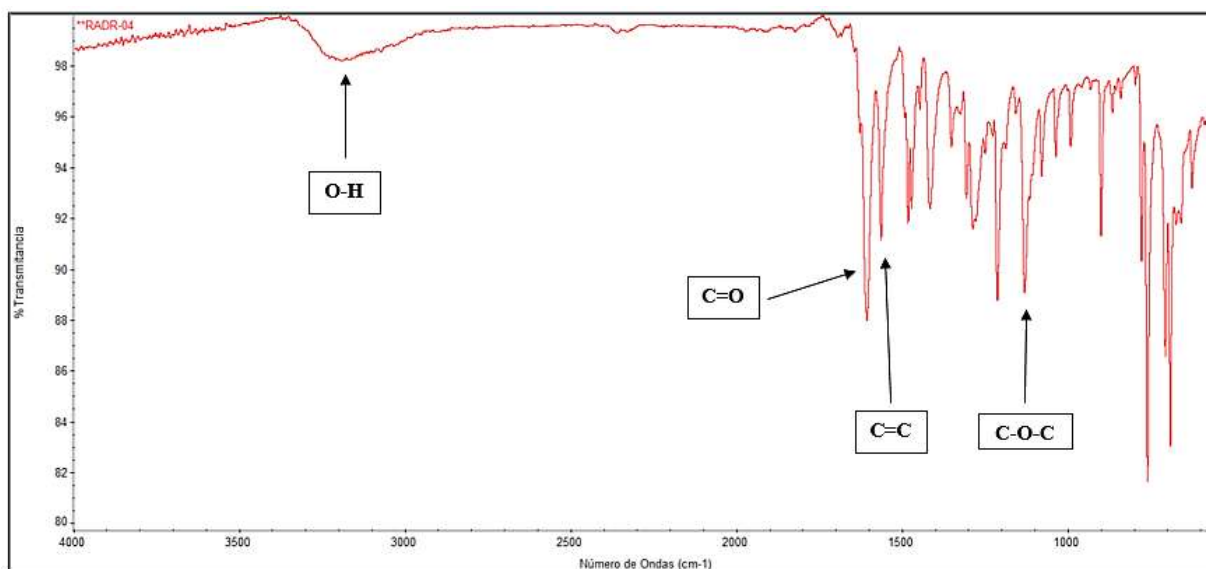
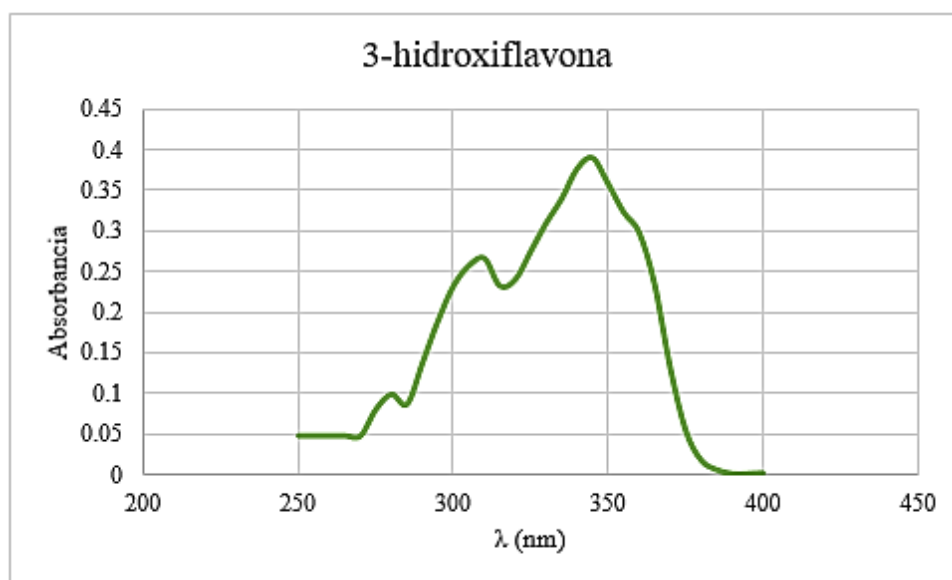


Figura 49. Reacción general de síntesis del producto (8) siguiendo la metodología A₃.

El producto se caracterizó utilizando la información obtenida a partir de los correspondientes espectros UV-Vis, IR y ¹H-RMN. A continuación, en la figura 50 se muestran los dos primeros espectros mencionados.



(A)



(B)

Figura 50. Espectros (A) IR y (B) UV-Vis (DMFA) obtenidos para el producto (8).

En el espectro IR (figura 50 A) se han señalado las bandas características del producto (8). Entre las que se encuentran: la señal a 3200 cm^{-1} correspondiente al grupo OH ubicado en la posición 3 (anillo C) de la flavona, así como la señal a 1530 cm^{-1} correspondiente a la tensión del

doble enlace carbono-carbono y la señal que corresponde a la tensión del enlace C-O tipo éter a 1115 cm^{-1} , la cual indica la presencia del anillo C en el producto.⁹²

Por otra parte, el espectro UV-Vis, permite observar la banda de máxima absorción a una longitud de onda de 345.0 nm y una banda más pequeña a 306.0 nm , característico de este tipo de compuestos.⁹²

El espectro de $^1\text{H-RMN}$ (figura 51) permitió confirmar la formación del producto (8), específicamente por la desaparición de las señales correspondientes a la flavanona (3) ($\delta = 2.5 - 6.0\text{ ppm}$) pertenecientes a los protones H_2 , $\text{H}_{3\text{Ax}}$ y $\text{H}_{3\text{Eq}}$, debido a la formación del doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C presente en (8). Además, se confirmó la formación de la 3-hidroxi flavanona por la aparición de la señal del grupo OH en la posición 3 de (8) a $\delta = 7.00\text{ ppm}$.⁹²

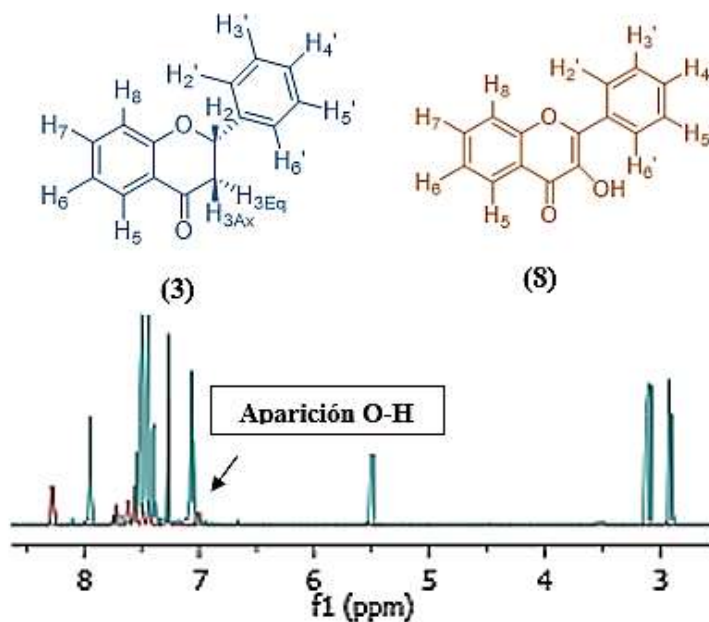


Figura 51. Sección del espectro de $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) del producto (8) en rojo, al comparar con el espectro del producto (3), en azul, Se aprecia que las señales entre $2.5 - 6\text{ ppm}$ (H_2 y H_3) han desaparecido. Además, se observa la aparición de la señal del OH a 7 ppm en el espectro rojo, cuya señal no aparece en el espectro de (3).

7.3.2. Síntesis de la 2-(4-clorofenil)-3-hidroxi-4H-cromen-4-ona (9)

La síntesis del producto (9) también se realizó aplicando la metodología A₃, con la diferencia de que el producto de partida en esta reacción fue la 2'-hidroxichalcona (5), a continuación, en la figura 52, se muestra la reacción general y las condiciones experimentales para la obtención de este producto.

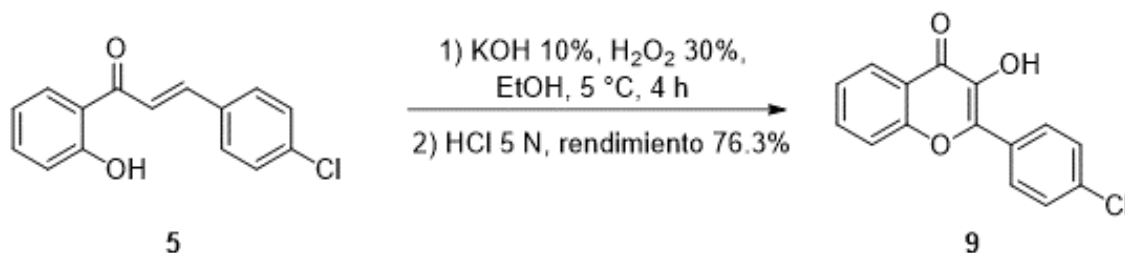
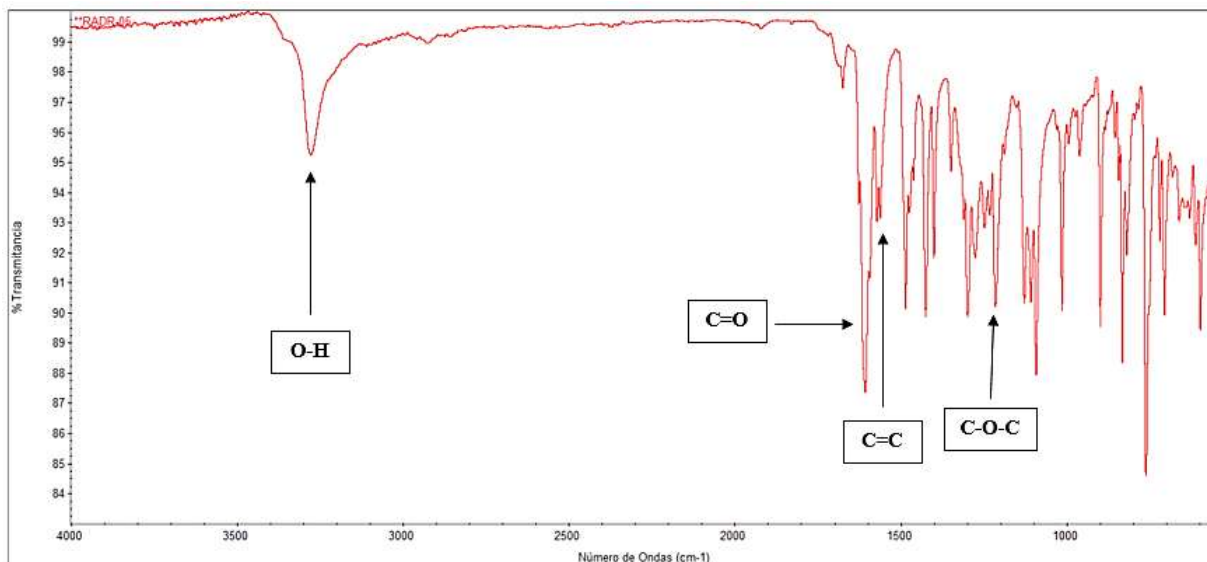


Figura 52. Reacción general de síntesis del producto (9) a partir de (5) aplicando la metodología A₃.

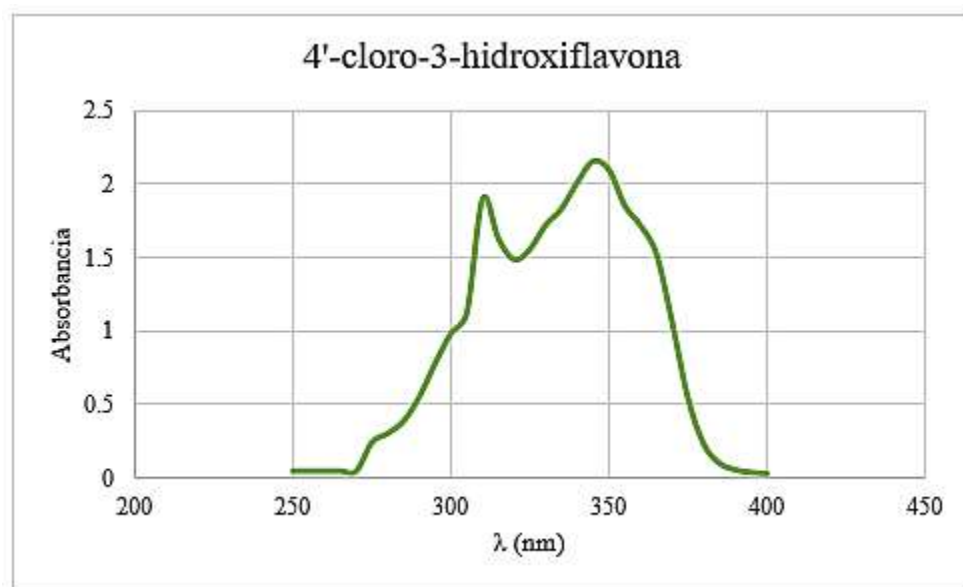
Se aprecia en la figura 52 que las condiciones de reacción para la obtención del producto (9) son similares a las utilizadas para la síntesis de (8), variando solamente el tiempo de reacción, que en este caso fue de 4 horas.

El producto se obtuvo al realizar work-up vertiendo la mezcla de reacción lentamente sobre HCl 5 N con agitación, formándose un sólido de color crema, el cual fue posteriormente caracterizado utilizando los datos derivados de los correspondientes espectros IR, UV-Vis y ¹H-RMN.

Respecto al espectro UV-Vis, la longitud de onda a la cual ocurrió la máxima absorción se identificó a 347.0 nm, mientras que otra banda fue registrada a 310.0 nm. El ligero desplazamiento hipsocrómico se debe a la presencia del cloro en la posición 4' de (9). A continuación, en la figura 53 se muestran los respectivos espectros IR y UV-Vis para este producto.⁹²



(A)



(B)

Figura 53. Espectros IR (A) y UV-Vis (DMFA) (B) obtenidos para el producto (9).

En cuanto al espectro IR (figura 53 A) se han señalado las bandas características para el producto (9). Siendo las más importantes las correspondientes a la tensión del doble enlace C-C, que apareció a 1569.70 cm⁻¹, mientras que la señal que indica que la 2'-hidroxichalcona (5) se

cicló para la formar la correspondiente 3-hidroxi flavona (enlace tipo éter) fue identificada a un valor de 1094.41 cm^{-1} . En tanto que la señal de tensión del OH aparece a 3275.64 cm^{-1} .⁹²

Por otra parte, en la figura 54, se muestran superpuestos los espectros de ^1H -RMN para el producto (5) en color azul, y para el producto (9) en color rojo, observándose la desaparición de las señales correspondientes a los H_α a 7.64 ppm y H_β a 7.87 ppm del doble enlace en (5). De esta forma, se confirmó la formación del producto (9).⁹²

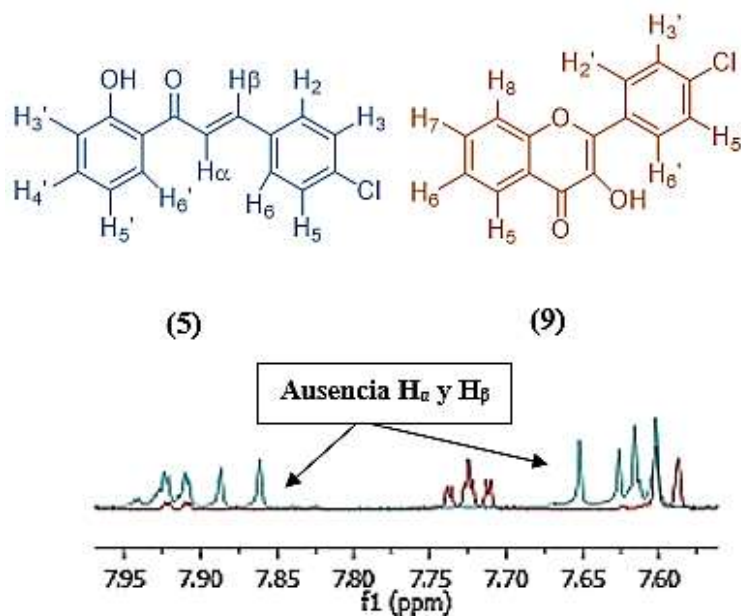


Figura 54. Sección de los espectros de ^1H -RMN (CDCl_3) para los productos (5) (en azul) y (9) (en rojo). Se aprecia la ausencia de las señales correspondientes al doble enlace de (5) en el espectro rojo.

7.3.3. Síntesis de la 2-[4-(dimetilamino)fenil]-3-hidroxi-4H-cromen-4-ona (10)

Para realizar la síntesis del producto (10), se procedió a llevar a cabo la reacción partiendo del respectivo benzaldehído (6) y de la cetona (1) bajo las condiciones de reacción detalladas en la entrada 1 de la tabla 11.

Tabla 11. Condiciones de reacción para la síntesis de (10) empleando distintas metodologías.

| Entrada | Reacción | Catalizador | T (°C) | t (h) | Resultados |
|---------|----------|-------------|--------|-------|--------------------|
| 1 | RADR08 | NaOH | 5 | 4 | Aldehído impuro |
| 2 | RADR13 | NaOH | 5 | 22 | Aldehído impuro |
| 3 | RADR14 | NaOH | 31 | 15 | Rendimiento 93.2 % |

Se realizó la reacción de la entrada 1, variando con respecto a las reacciones anteriores el estado físico del catalizador, que para esta reacción se aplicó en forma de perlas de NaOH, para evitar el exceso de agua en el medio y además los materiales de partida, utilizando en este caso la cetona (1) y el aldehído (6). Transcurrido el tiempo de reacción, después de neutralizar y purificar se obtuvo el aldehído de partida impuro.

En vista de los resultados obtenidos en el primer intento para sintetizar el producto (10), se planteó modificar la metodología A₃, variando el tiempo de reacción. En la entrada 2, se mostraron las condiciones de reacción empleadas para la síntesis del producto (10) a partir de (7).

Finalizada la reacción descrita en la entrada 2 al añadir CH₃COOH concentrado para neutralizar la mezcla de reacción, no se obtuvo ningún producto sólido. Por lo tanto, se procedió a realizar extracción líquido-líquido con CH₂Cl₂, sin embargo, al evaporar el disolvente solamente se obtuvo el aldehído impuro.

Se observó por medio de TLC que, con la neutralización de la mezcla de reacción, se daba la descomposición del producto, por lo tanto, el siguiente intento para sintetizar el producto (10)

consistió en una nueva metodología modificada, la cual fue denominada **B₂**, y que fue previamente descrita en la sección 5.3.3. En la figura 37 se muestra la reacción general siguiendo dicha metodología.

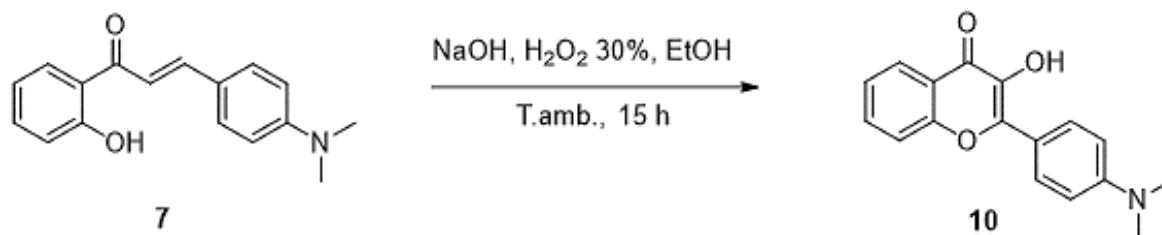


Figura 37. Reacción general para la síntesis de (**10**) aplicando la metodología **B₂**.

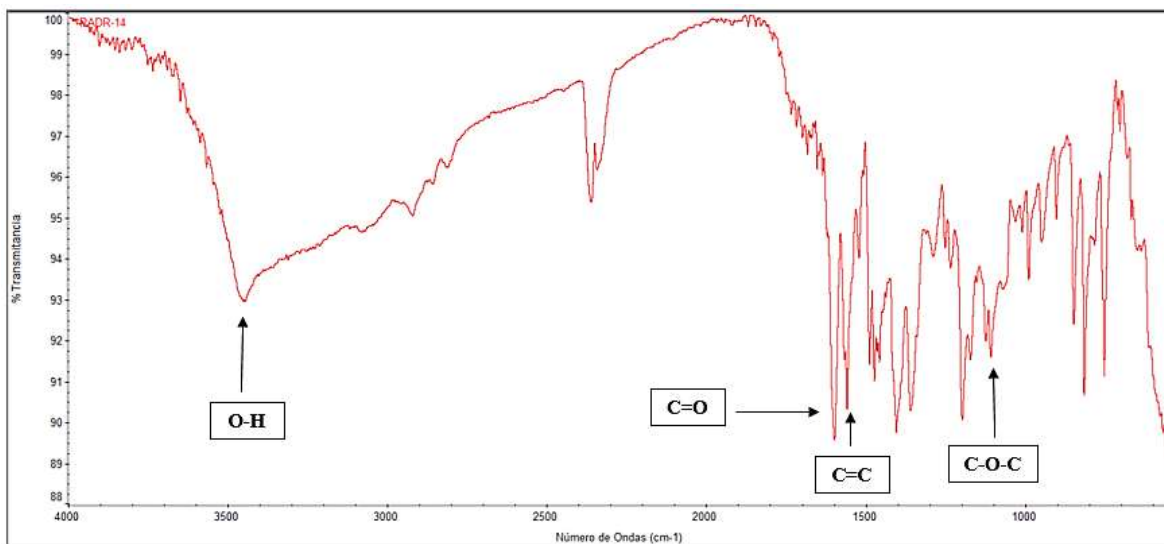
En la tabla 11, entrada 3, se han especificado las condiciones de reacción ensayadas para la síntesis de (**10**) usando la metodología **B₂**.

Para la reacción descrita en la entrada 3, se trabajó nuevamente con el producto (**7**) como material de partida, dejando la mezcla de reacción en agitación a temperatura ambiente, empleando H₂O₂ 30 % como agente oxidante y perlas de NaOH como catalizador básico. Transcurridas las 15 horas, se observó la formación del producto mediante TLC, por lo que se llevó a cabo la extracción líquido-líquido con CH₂Cl₂ (2 x 25 mL) sin previa neutralización. La fase diclorometanólica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se dejó evaporar el disolvente, obteniéndose el producto (**10**) como un sólido anaranjado.

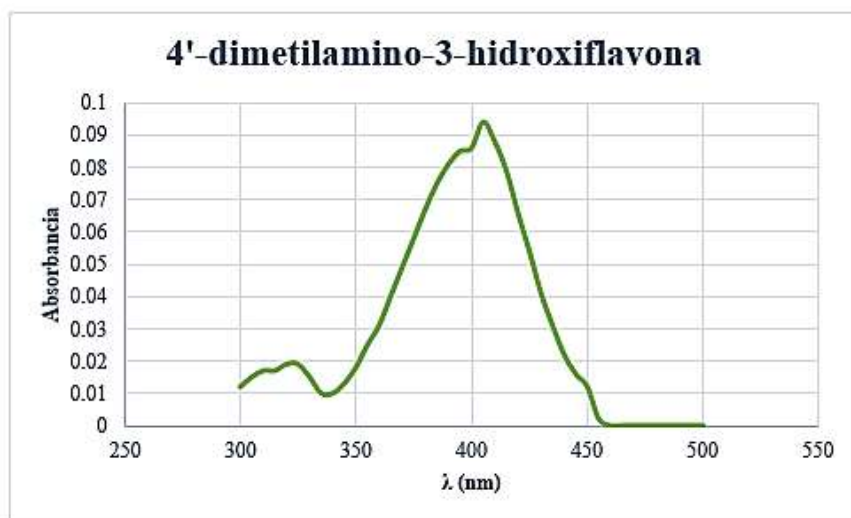
Posteriormente, se utilizó la información derivada de los espectros correspondientes al producto para confirmar la identidad del mismo. A continuación, se muestra el espectro UV-Vis (figura 55 B), en la que se observa que la λ_{max} para el producto (**10**) se identificó a 405.0 nm, siendo consistente con los valores esperados para una 3-hidroxiflavona.⁹²

En la figura 55 A, se muestra el espectro IR para (**10**) en el que se han señalado las bandas características de este producto, como la tensión del grupo OH a 3443.17 cm⁻¹, la tensión del grupo carbonilo a 1596.19 cm⁻¹, la tensión del enlace doble entre los átomos de carbono 2 y 3 a 1556.89 cm⁻¹ y la señal a 1106.82 cm⁻¹ que corresponde a la tensión del enlace tipo éter (C-O-C) que indica que el producto se encuentra ciclado.⁹²

Finalmente, se confirmó por medio del espectro de ^1H -RMN la formación del producto (10) y se evidenció por la pérdida de los protones del doble enlace entre los carbonos α y β . En la figura 56 se han superpuesto los espectros de (7) en azul y de (10) en rojo, notándose la ausencia de las señales correspondientes a los protones antes mencionados en el espectro rojo. Indicando que el producto respectivo es la 3-hidroxi flavona (10).⁹²



(A)



(B)

Figura 55. Espectro IR (A) y espectro UV-Vis (DMFA) (B) para el producto (10).

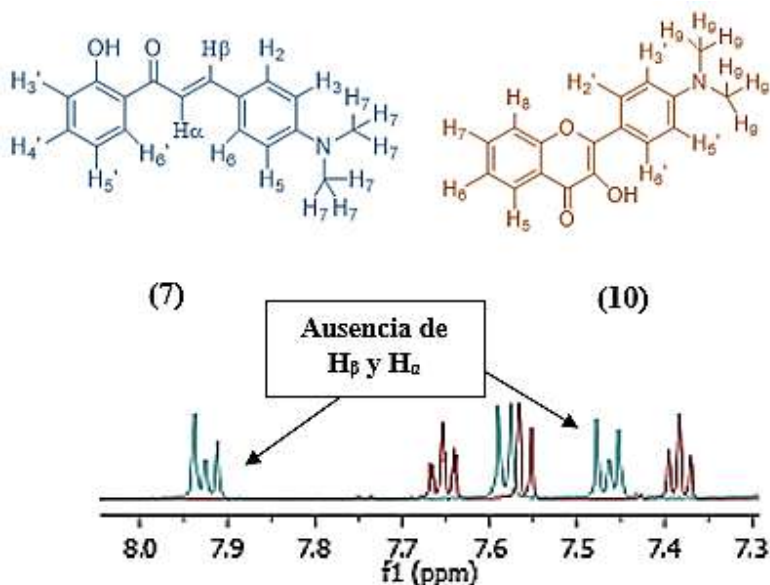


Figura 56. Sección del espectro de ^1H -RMN (CDCl_3) de (7) en azul y de (10) en rojo en el que se aprecia la ausencia de las señales correspondientes a los protones α y β .

7.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

La determinación de la actividad antifúngica de los compuestos sintetizados se llevó a cabo siguiendo una metodología basada en el método oficial M44-A. Sin embargo, se varió la temperatura de incubación la cual se disminuyó a $25\text{ }^\circ\text{C}$, el tiempo de incubación se aumentó de 48 a 72 horas y la concentración de control positivo Ketoconazol, que se usó al 70 % en etanol, siendo la carga del disco para el método oficial de $50\ \mu\text{g}$. Los microorganismos empleados fueron la levadura *Candida albicans* y el hongo filamentoso *Aspergillus niger*.^{100, 101}

7.4.1. Actividad antifúngica contra *Candida albicans*

En la tabla 12 se muestran los resultados de las pruebas realizadas. Se han colocado los halos de inhibición promedio para cada uno de los compuestos sintetizados a las diferentes concentraciones ensayadas. También, se reportó un valor de inhibición para el control negativo, DMFA, el cual fue de $16.36\ \text{mm}$, en comparación con los valores reportados para los controles positivos Ketoconazol que fue de $62.13\ \text{mm}$ y Cicloheximida cuyo diámetro de inhibición fue de $12.05\ \text{mm}$. En vista de

los valores obtenidos para los compuestos sintetizados, los diámetros de inhibición señalados en color amarillo corresponden a aquellos que son mayores al valor obtenido para la DMFA, pues todos los diámetros de inhibición son menores a los del Ketoconazol y mayores a los de la Cicloheximida.

Tabla 12. Diámetros de inhibición obtenidos para los compuestos sintetizados contra *C. albicans*.

| Concentración ($\mu\text{g/mL}$) | Halos de inhibición promedio para los compuestos sintetizados (mm) | | | | | |
|---------------------------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| | (3) | (8) | (5) | (9) | (7) | (10) |
| 25 | 14.28 | 16.11 | 16.51 | 18.64 | 15.88 | 15.01 |
| 40 | 13.85 | 15.19 | 15.66 | 18.64 | 15.8 | 15.79 |
| 55 | 16.62 | 15.03 | 15.58 | 19.4 | 17.04 | 15.83 |
| 100 | 13.47 | 16.18 | 14.66 | 15.29 | 15.62 | 15.41 |
| 150 | 15.44 | 14.83 | 15.75 | 14.78 | 15.94 | 17.74 |
| 200 | 15.1 | 14.51 | 14.03 | 15.22 | 14.81 | 16.69 |
| 250 | 15.22 | 15.62 | 15.26 | 14.5 | 14.1 | 18.14 |
| 300 | 15.28 | 13.8 | 13.8 | 15.32 | 14.42 | 16.62 |
| DMFA | | | 16.36 | | | |
| Ketoconazol | | | 62.13 | | | |
| Cicloheximida (1%) | | | 12.05 | | | |

El mayor diámetro de inhibición se reporta para el compuesto (9) con un valor de 19.4 mm a una concentración de 55 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el valor mínimo corresponde al producto (3) a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ que generó un halo de inhibición de 13.47 mm. La concentración para la que se obtuvo un mayor número de diámetros de inhibición mayores a los de la DMFA es de 55 $\mu\text{g/mL}$, siendo 3 los valores que superan los del control negativo. El compuesto que obtuvo un mayor número de diámetros de inhibición mayores a los de la DMFA, o el compuesto más activo de la serie fue el producto (10) con cuatro valores superiores a los del control negativo, seguido de (9) para el cual se reportan 3 valores.

7.4.2. Actividad antifúngica contra *Aspergillus niger*

En la tabla 13 se han colocado los diámetros de inhibición promedio para los diferentes compuestos sintetizados. En este caso, el control negativo, DMFA, también inhibió el crecimiento de este microorganismo, cuyo diámetro de inhibición fue de 12.73 mm, mientras que para los controles

positivos Ketoconazol y Cicloheximida 1 % los diámetros de inhibición fueron de 25.99 y 12.79 mm respectivamente. Se muestran en color amarillo los diámetros de inhibición que son mayores al obtenido para la DMFA y que a su vez son mayores al valor reportado para la Cicloheximida 1 %. Los valores que son mayores a los del control negativo pero menores a los de la Cicloheximida 1 % se muestran en color verde. Todos los diámetros de inhibición fueron menores en comparación con el obtenido para el Ketoconazol.

Tabla 13. Diámetros de inhibición obtenidos para los compuestos sintetizados contra *A. niger*.

| Concentración (µg/mL) | Halos de inhibición promedio para los compuestos sintetizados (mm) | | | | | |
|-------------------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| | (3) | (8) | (5) | (9) | (7) | (10) |
| 25 | 13.94 | 15.65 | 14.22 | 14.14 | 11.36 | 14.59 |
| 40 | 14.05 | 13.46 | 15.31 | 13.25 | 11.37 | 14.36 |
| 55 | 13.20 | 15.38 | 15.34 | 13.30 | 13.29 | 16.82 |
| 100 | 15.84 | 13.51 | 18.57 | 12.41 | 13.83 | 16.42 |
| 150 | 12.71 | 13.10 | 12.87 | 11.35 | 12.03 | 12.08 |
| 200 | 11.86 | 12.95 | 13.51 | 11.91 | 12.48 | 11.90 |
| 250 | 11.81 | 13.24 | 14.01 | 12.84 | 12.22 | 12.06 |
| 300 | 11.92 | 13.42 | 14.37 | 13.45 | 12.75 | 12.26 |
| DMFA | | | 12.73 | | | |
| Ketoconazol | | | 25.99 | | | |
| Cicloheximida (1%) | | | 12.79 | | | |

Se observa en la tabla 13, que en general *A. niger* fue más susceptible a los compuestos ensayados, ya que la mayoría de diámetros de inhibición obtenidos para los mismos, son mayores tanto en comparación con el reportado para el control negativo como para el del control positivo Cicloheximida 1 %. Tanto (5) como (8) resultaron ser los productos más activos, inhibiendo el crecimiento de este microorganismo a todas las concentraciones ensayadas, siendo todos sus valores superiores a los de la DMFA y de la Cicloheximida 1 %. El mayor diámetro de inhibición fue registrado para el producto (5) con un valor de 18.57 mm. Al igual que para el ensayo anterior, la concentración más efectiva fue la de 55 µg/mL, pues todos los compuestos reportaron actividad mayor a la de la DMFA y la Cicloheximida 1 % a dicha concentración. Solo se reportó un valor que fue mayor comparado al de la DMFA, pero menor al de la Cicloheximida 1 %, que fue de 12.75 mm y corresponde a la 2'-hidroxichalcona (7).

Sin embargo, a partir de los valores obtenidos y del proceso metodológico empleado, se derivan las siguientes observaciones:

- 1) El 79.2 % de los valores obtenidos para la prueba contra *C. albicans* son menores a los obtenidos para el control negativo, en tanto que un 66.7 % de los valores registrados para *A. niger* son mayores a los obtenidos para el control negativo y para uno de los controles positivos (Cicloheximida 1 %).
- 2) A pesar de la observación anterior, no se logró identificar al responsable de la actividad antifúngica, ya que como se observa en las tablas 12 y 13 los diámetros obtenidos para cada uno de los compuestos son similares al valor obtenido para la DMFA. Esto se debe a que los discos impregnados con las disoluciones de los compuestos sintetizados, fueron colocados sin permitir la total evaporación del disolvente. Razón por la cual no se puede asegurar que la actividad biológica depende exclusivamente de los productos o del disolvente.
- 3) Con motivo de lo anterior, no se modificaron los diámetros de inhibición. Ya que, a pesar de que la metodología dicta restar el diámetro del disolvente a los diámetros de los productos obtenidos, este paso no fue realizado, porque dificultaría el análisis de los datos, pues se reportaría que todos los compuestos son menos efectivos que la DMFA inhibiendo el crecimiento de los hongos utilizados en la prueba.
- 4) El problema del disolvente, se ve claramente reflejado en la ausencia de linealidad para los resultados obtenidos, tal como se muestra en la tabla 14. Se calculó el valor del coeficiente de determinación para ambas series de datos, observándose que fue imposible establecer relación lineal entre la inhibición del crecimiento y la concentración de los productos.

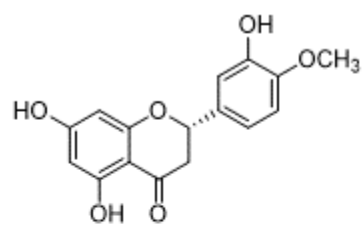
Tabla 14. Coeficientes de correlación lineal y determinación para los datos obtenidos.

| Microorganismo | Coeficiente de correlación línea (r) y de determinación (r ²) para los productos obtenidos. | | | | | |
|--------------------|---|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| | (3) | (8) | (5) | (9) | (7) | (10) |
| <i>C. albicans</i> | 0.27855 | -0.6075 | -0.4062 | -0.7953 | -0.83619 | 0.71399 |
| | 0.07759 | 0.369 | 0.165 | 0.6324 | 0.69922 | 0.50978 |
| <i>A. niger</i> | -0.71290902 | -0.63754005 | -0.34654879 | -0.28641028 | 0.20410016 | -0.73959506 |
| | 0.50823927 | 0.40645731 | 0.12009606 | 0.08203085 | 0.04165688 | 0.54700086 |

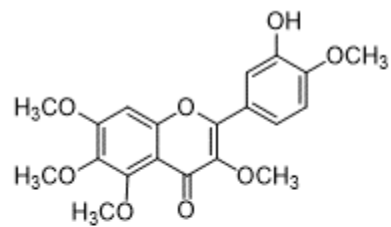
Nota: los coeficientes de correlación lineal se muestran en la columna superior y los coeficientes de determinación se muestran en las columnas inferiores para ambos microorganismos.

Existen estudios realizados en torno a la relación entre la actividad antifúngica y la estructura química de diversos flavonoides. Así, por ejemplo, en el caso de las 2'-hidroxichalconas, la introducción de grupos donadores de densidad electrónica en la posición 4 del anillo B genera productos con muy poca actividad antifúngica, en tanto que, los que poseen grupos sustractores de densidad electrónica suelen presentar mayor actividad en comparación con los anteriormente mencionados. De acuerdo con los resultados de las tablas 12 y 13, se observa que dicha relación se cumple en mayor grado para la prueba realizada con *A. niger*, notándose que el producto (5), el cual posee un sustituyente cloro (grupo sustractor de densidad electrónica) en la posición 4 del anillo B, es más activo que el producto (7) que posee en la posición 4 del anillo B un grupo dimetilamino (donador de densidad electrónica). Algunos estudios apuntan que, esto se debe a que las 2'-hidroxichalconas son capaces de inhibir la acción de enzimas como la Glutación-S-transferasa (GST), enzima involucrada en procesos de defensa celular, por la formación de aductos de Michael entre extremos sulfhidrilo como los del glutatión reducido y el carbono β de las 2'-hidroxichalconas, así, mientras más electrófilo sea el carbono β más favorecida se ve la formación de este aducto y consecuentemente la inactivación de la enzima, siendo los sustituyentes sustractores de densidad electrónica los que aumentan la electrofilicidad de este carbono.^{118, 119}

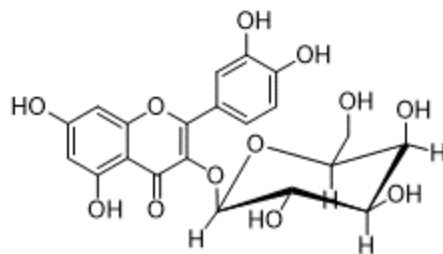
En cuanto a la actividad de las 3-hidroxi flavonas, existe diversidad de métodos por los que son capaces de inhibir el crecimiento de los hongos. Sin embargo, varios estudios demuestran que las 3-hidroxi flavonas más polares y con altos grados de hidroxilación presentan mayor actividad fungicida. Esta relación no se cumplió en su totalidad para los compuestos sintetizados ya que las 3-hidroxi flavonas (8), (9) y (10) presentan actividad fungicida similar. Estudios demuestran que algunos flavonoides naturales como la hesperitina, la quercetina, el hiperósido, la trifolina y la 3,5,6,7,3',4'-hexametoxiflavona, cuyas estructuras se muestran en la figura 57, poseen gran incidencia en algunos procesos enzimáticos por la formación de complejos con los centros metálicos de algunas enzimas, interviniendo, por ejemplo, en el proceso de fosforilación durante los procesos metabólicos y los mecanismos de replicación del material genético, inhibiendo con mayor facilidad el crecimiento de distintas especies de hongos.^{120, 121, 122, 123, 124}



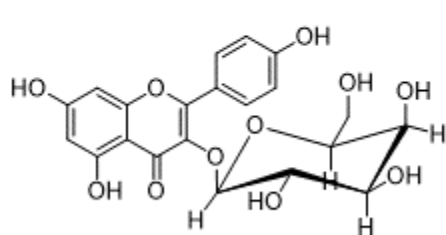
Hesperitina



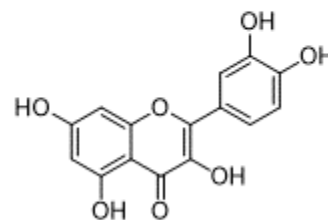
3,4,5,3',4'-hexametoxiflavona



Hiperósido



Trifolin



Quercetina

Figura 57. Algunos flavonoides con actividad fungicida.

8. CONCLUSIONES

Con base en la información consultada y los resultados obtenidos y presentados en el documento se han elaborado las siguientes conclusiones:

Se desarrollaron 5 diferentes metodologías para la síntesis de flavonoides, las cuales están basadas en las reacciones de Claisen-Schmidt y de Algar-Flynn-Oyamada. Aplicando estas metodologías, se obtuvieron 3 diferentes tipos de flavonoides: flavanonas, 2'-hidroxichalconas y 3-hidroxi-2-fenil-4*H*-cromen-4-ona. Los factores que tienen mayor incidencia en el progreso y rendimiento de las reacciones son:

- 1) El pH, dado que se establecen equilibrios químicos que dependen en gran medida del mismo, principalmente para la síntesis de 2'-hidroxichalconas. En la cual, el pH favorece ya sea la formación de este producto o la formación de flavanonas, e incluso puede facilitar la reacción de retrocondensación.
- 2) Los efectos electrónicos ocasionados por la presencia de distintos sustituyentes en los anillos aromáticos de los reactivos, y la naturaleza de los mismos. Observándose que los grupos sustractores de densidad electrónica en los aldehídos de partida favorecieron, en casi todos los casos, las reacciones tanto de ciclación, como las de formación de 2'-hidroxichalconas.

La etapa de caracterización permitió identificar la formación de los productos planteados, utilizándose técnicas espectroscópicas para la realización de esta etapa. Las técnicas empleadas fueron espectroscopia de ultravioleta-visible, de infrarrojo y de resonancia magnética nuclear de protón. Confirmándose la formación de los siguientes productos:

- 2-fenil-2,3-dihidro-4*H*-croman-4-ona (**3**)
- 3-(4-clorofenil)-1-(2-hidroxifenil)-2-propen-1-ona (**5**)
- 3-(4-dimetilaminofenil)-1-(2-hidroxifenil)-2-propen-1-ona (**7**)
- 3-hidroxi-2-fenil-4*H*-cromen-4-ona (**8**)
- 2-(4-clorofenil)-3-hidroxi-4*H*-cromen-4-ona (**9**)
- 2-[4-(dimetilamino)fenil]-3-hidroxi-4*H*-cromen-4-ona (**10**).

Los problemas relacionados con la metodología para la determinación de la actividad antifúngica imposibilitaron la identificación, de forma concluyente, de la acción fungicida

exhibida por los compuestos sintetizados y el establecimiento de la relación existente entre la estructura de los mismos y su capacidad para inhibir el crecimiento de las especies de hongos utilizadas en las pruebas. Sin embargo, de la serie de compuestos sintetizados, los más activos fueron (5) y (9), ambos compuestos poseen un átomo de cloro en la posición 4' y 4 respectivamente, siendo esto consistente con la información reportada en la literatura, en relación con el incremento de la actividad biológica en flavonoides que contienen átomos sustractores de densidad electrónica dentro de su composición química.^{118, 119}

9. RECOMENDACIONES

Algunas recomendaciones relacionadas con los aspectos metodológicos del trabajo realizado son:

- 1) Previo a la síntesis de 2'-hidroxichalconas, realizar un análisis de los efectos electrónicos causados por los sustituyentes presentes en los aldehídos y cetonas de partida, ya que ambos influyen en la termodinámica y cinética de cada reacción. Paralelamente, se deben estudiar los mecanismos de reacción para garantizar que las operaciones de síntesis generen la mayor cantidad de producto posible. En este sentido, con base en las experiencias de síntesis de los productos obtenidos se recomienda que, para las síntesis en las que se utilicen aldehídos con sustituyentes sustractores de densidad electrónica se añada un exceso de cetona. Mientras que para las síntesis que involucran aldehídos con grupos donadores de densidad electrónica, se sugiere controlar constante y meticulosamente el progreso de la reacción para determinar el momento óptimo de realizar la operación de work-up, usualmente neutralización.
- 2) Respecto a la síntesis de 3-hidroxi flavonas, especialmente para aquellas en las que los productos de partida poseen grupos donadores de densidad electrónica, se sugiere realizar el work-up de la reacción por medio de extracción líquido-líquido o cromatografía en columna sin neutralizar la mezcla de reacción.
- 3) Realizar nuevos estudios de la actividad antifúngica de este tipo de productos, siguiendo los métodos oficiales, para garantizar la reproducibilidad de los resultados con el fin de identificar nuevos compuestos bioactivos.
- 4) Con base en las experiencias durante la síntesis de 2'-hidroxichalconas, se recomienda controlar el pH, principalmente al momento de finalizar las reacciones, ya que se ha observado que es uno de los factores con mayor influencia en la pureza de los productos y en el rendimiento de la reacción, siendo importante la neutralización de la mezcla de reacción, sobre todo cuando se efectúa la síntesis de 2'-hidroxichalconas con grupos donadores de densidad electrónica en la posición 4 (anillo B). Siendo una opción viable para la síntesis de estos productos llevar a cabo las reacciones en medio ácido.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Panche A., Diwan A., Chandra S. (2016). Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* 5 (e47). Recuperado de: <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
2. Newman D. J., Cragg G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* 83. 770-803
3. Saldívar F. G., Prieto F. M., Medina J.F. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación Química* 28. 51-58
4. Barbero C., Furlán R., Mata E. (2011). Química Combinatoria. *Ciencia hoy.* 21 (124). 39-45. Recuperado de: <https://www.cienciahoy.org.ar/ch/ln/hoy124/Quimica%20combinatoria.pdf>
5. Jiménez C. (2013). El papel de los productos naturales en el mercado farmacéutico actual. *An. Quim.* 109 (2). 134-141
6. Macarron R. (2015). How dark is HTS dark matter? *Nat. Chem. Biol.* 11. 904-905
7. Wassermann A.M., Tudor M., Glick M. (2015). Deorphanization strategies for dark chemical matter. *Nat. Chem. Biol.* Recuperado de: <https://www.nature.com/articles/nchembio.1936>
8. Liu H. L., Jiang W. B., Xie M. X. (2010). Flavonoids: Recent Advances as Anticancer Drugs. *Recent. Pat. Anti-canc.* 5. 152-164
9. Hu M., Wu B., Liu Z. (2017). Bioavailability of Polyphenols and Flavonoids in the Era of Precision Medicine. *Mol. Pharmaceutics.* 14. 2861-2863

10. Orchin M., Macomber R., Pinhas A., Wilson R. (2005). *The Vocabulary and Concepts of Organic Chemistry*. 2nd edition. New Jersey, Estados Unidos, Editorial John Wiley & Sons
11. Hanson J. R. (2001). *Tutorial Chemistry Texts. Chapter 6: Functional Group Chemistry*. Cambridge, Reino Unido. Publicado por The Royal Society of Chemistry
12. Clayden J., Greeves N., Warren S. (2012). *Organic Chemistry*. England. Oxford: Oxford University Press Editorial
13. Carey F., Sundberg R. (2007). *Advanced Organic Chemistry. Part A: Structure and Mechanisms*. 5th edition. Nueva York, Estados Unidos. Editorial Springer Science
14. Amallesh S., Gouranga D., Sanjoy K. (2011). Roles of Flavonoids in Plants. *Int. J. Pharm. Sci. Tech.* 6 (1). 12-35
15. Buer C., Imin N., Djordjevic M. (2010). Flavonoids: New Roles for Old Molecules. *J. Integr. Plant. Biol.* 52 (1). 98-111
16. Havsteen B. H. (2002). The biochemistry and medicinal significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* 96. 67-202
17. Paul M. D. (2009). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 3^a edition. West Sussex, Reino Unido. Editorial John Wiley & Sons
18. Dyrager, C. (2012). *Design and Synthesis of Chalcone and Chromone Derivatives as Novel Anticancer Agents*. (Tesis doctoral). Department of Chemistry. University of Gothenburg. Ale Tryckteam. Sweden

19. Solankee A., Patel K., Patel R. (2012). A Facile Synthesis and Studies of Some New Chalcones and Their Derivatives Based On Heterocyclic Ring. *E-Journal of Chemistry*. 9 (4). 1897-1905
20. Tiwari B., Pratapwar A., Tapas A., Butle S., Vatkar B. (2010). Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Chalcone Derivatives. *Int. J. ChemTech. Res.* 2 (1). 499-503
21. Wagner H., Farkas L. (1975). The Flavonoids. Chapter 4: Synthesis of Flavonoids. Dordrecht, Holanda. Editorial Springer Science + Business Media
22. Pawan K., Mahesh B. (1989). Carbon-13 NMR Flavonoids. Chapter seven: Chalconoids. Amsterdam, Países Bajos. Editorial. Elsevier Science
23. Border Z., Marais C., Bezuidenhout B., Steenkamp J. (2008). Studies Towards the Stereoselective α -Hydroxylation of Flavanones. Biosynthetic Significance. *Aust. J. Chem.* 61. 122-130
24. Fatma M. (2014). New chalconol glycoside from the seeds of saw palmetto: antiproliferative and antioxidant effects. *Nat. Prod. Res.* Recuperado de: <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.960413>
25. Zhuang C., Zhang W., Sheng C., Zhang W., Xing C., Miao Z. (2017). Chalcone: a privileged structure in medicinal chemistry. *Chem. Rev.* 117 (12). 7762-7810
26. Claisen L., Claparède A. (1881). Condensationen von Ketonen mit Aldehyden. *Ber. Dtsch, Chem. Ges.* 14. 2460-2468
27. Schmidt. J. (1881). Ueber die Einwirkung von Aceton auf Furfurol und auf Bittermandelöl in Gegenwart von Alkalilauge. *Ber. Dtsch, Chem. Ges.* 14. 1459-1461

28. Bhagat S., Sharma R., Sawant D., Sharma L., Chakraborti A. (2006). LiOH•H₂O as a novel dual activation catalyst for highly efficient and easy synthesis of 1,3-diaryl-2-propenones by Claisen-Schmidt condensation under mild conditions. *J. Mol. Catal A-Chem.* 244. 20-24
29. Shriner L., Kurosawa T. (1930). Chalcones. II. Decomposition by alkali. *J. Am. Chem. Soc.* 52 (6). 2538-2540
30. Wachter-Jurcsak N., Radu C., Redin K. (1998). Addressing the unusual reactivity of 2-pyridinecarboxaldehyde and 2-quinolinecarboxaldehyde in base-catalyzed aldol reactions with acetophenone. *Tetrahedron Lett.* 39. 3903-3906
31. Patil C., Mahajan S., Katti S. (2009). Chalcone: a versatile molecule. *J. Pharm. Sci. & Res.* 1 (3). 11-22
32. Mellado M., Madrid A., Martínez Ú., Mella J., Salas C., Cuellar M. (2017). Hansch's analysis application to chalcone synthesis by Claisen-Schmidt reaction based in DFT methodology. *Chem. Pap.* 72. 703-709
33. Lahyani A., Chtourou M., Frikha M., Trabelsi M. (2014). Synthesis of chalcones via Claisen-Schmidt condensation reaction catalyzed by Silica-H₂SO₄ under ultrasound irradiation. *Journal of Advances in Chemistry.* 10 (6). 2874-2880
34. Velarde E., González A. (1995). Reacción de Claisen-Schmidt para la obtención de chalconas. *Revista de Química* 9 (2). 137-143
35. Bablich T., Kostanecki V. (1896). Ueber Oxybenzalacetophenone. *Ber. Dtsch, Chem. Ges.* 29. 233-236

36. Yerragunta V., Kumaraswamy T., Suman D., Anusha V., Patil P., Samhitha T. (2013). A review on chalcones and its importance. *Pharma Tutor. 1* (2). 54-59
37. Makrandi J., Shashi K., Surender K. (2004). An efficient synthesis of 2'-hydroxychalcones. *Asian J. Chem. 16* (2). 1189-1190
38. Aksoz B., Ertan R. (2011). Chemical and structural properties of chalcones I. *FABAD J. Pharm. Sci. 36*. 223-242
39. Ballini R., Bosica G., Maggi R., Ricciutelli M., Righi P., Sartori G., Sartorio R. (2001). Clay-catalysed solventless synthesis of *trans*-chalcones. *Green Chem. 3*. 178-180
40. Rocchi D., González J., Menéndez C. (2014). Montmorillonite Clay-promoted, solvent-free, cross-aldol condensations under focused Microwave irradiation. *Molecules. 19*. 7317-7326
41. Alcantara A., Marinas J., Sinisterra J. (1987). Synthesis of 2'-hydroxychalcones and related compounds in interfacial solid-liquid conditions. *Tetrahedron Lett. 28* (14). 1515-1518
42. Fuentes A., Marinas J., Sinisterra J. (1987). Catalyzed synthesis of chalcones under interfacial solid-liquid conditions with ultrasound. *Tetrahedron Lett. 28* (39). 4541-4544
43. Bukhari S., Jasamai M., Jantan I., Ahmad W. (2013). Review of methods and various catalysts used for chalcone synthesis. *Mini-Rev. Org. Chem. 10* (1). 73-83
44. Calvino V., Picallo M., López-Peinado A., Aranda R., Durán C. (2006). Ultrasound accelerated Claisen-Schmidt condensation: a green route to chalcones. *Appl. Surf. Sci. 252*. 6071-6074

45. Winter C., Caetano J., Caixeta A., Chaves A., Ostrosky I., Vaz B., Pérez C., Alonso C. (2016). Activated carbons for chalcone production: Claisen-Schmidt condensation reaction. *Chemical Engineering Journal*. 303 (1). 604-610
46. Thirunarayanan G., Mayavel P., Thirumurthy K. (2012). Fly-ash:H₂SO₄ catalyzed solvent free efficient synthesis of some aryl chalcones under microwave irradiation. *Spectrochim Acta A*. 91. 18-22
47. Vijayakumar S., Vanangamudi G., Thirunarayanan G. (2016). Preheated fly-ash as catalyst for the synthesis of chalcones under microwave irradiation, correlation studies and anti-microbial activities. *J. Pharm. Appl. Chem.* 2 (3). 153-162
48. Thirunarayanan G., Vanangamudi G. (2007). Synthesis of some aryl chalcones using silica-sulphuric acid reagent under solvent free conditions. *E-Journal of Chemistry*. 4 (1). 90-96
49. Kreher U., Rosamilia A., Raston C., Scott J., Strauss C. (2003). Direct preparation of monoaryldiene derivatives of aldehydes and enolizable ketones with DIMCARB. *Org. Lett.* 5 (17). 3107-3110
50. Macquarrie D., Nazih R., Sebt S. (2002). KF/natural phosphate as an efficient catalyst for synthesis of 2'-hydroxychalcones and flavanones. *Green Chem.* 4. 56-59
51. Eddarir S., Cotellet N., Bakkour Y., Rolando C. (2003). An efficient synthesis of chalcones based on the Suzuki reaction. *Tetrahedron Lett.* 44. 5359-5363
52. Haddach M., McCarthy J. (1999). A new method for the synthesis of ketones: the palladium catalyzed cross-coupling of acid chlorides with arylboronic acids. *Tetrahedron Lett.* 40. 3109-3112

53. Rullah K., Aluwi M., Yamin B., Juan J., Wai L. (2019). A diversity-oriented strategy using palladium-catalysed cross-coupling reactions for the synthesis of the enone system of chalcones. *Asian. J. Org. Chem.* 8. 1174
54. Heck R., Nolley J. (1972). Palladium-catalyzed vinylic hydrogen substitution reactions with aryl, benzyl and styryl halides. *J. Org. Chem.* 37 (14). 2320-2322
55. Bianco A., Cavarischia C., Farina A., Guiso M., Marra C. (2003). A new synthesis of flavonoids via Heck reaction. *Tetrahedron Lett.* 44. 9107-9109
56. Reichwald C., Shimony O., Sierra N., Jaffe C., Kunick C. (2008). A new Heck reaction modification using ketone Mannich bases as enone precursors: parallel synthesis of anti-leishmanial chalcones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18. 1985-1989
57. Wu X., Neumann H., Spannenberg A., Schulz T., Jiao H., Beller M. (2010). Development of a general palladium-catalyzed carbonylative Heck reaction of aryl halides. *J. Am. Chem. Soc.* 132. 14596-14602
58. Xu C., Guoying C., Huang X. (1995). Chalcones by the Wittig reaction of a stable ylide with aldehydes under microwave irradiation. *Org. Prep. Proced. Int.* 27 (5). 559-561
59. Kumar A., Sharma S., Deepak V., Srivastava S. (2010). Synthesis of chalcones and flavanones using Julia-Kocienski olefination. *Tetrahedron.* 66. 9445-9449
60. Yamakawa T., Kagechika H., Kawashi E., Hashimoto Y., Shudo K. (1990). Retinobenzoic acids. 5. Retinoidal activities of compounds having a trimethylsilyl or trimethylgermyl group(s) in human promyelocytic leukemia cells HL-60. *J. Med. Chem.* 33. 1430-1437

61. Satyanarayana K., Rao M. (1995). Synthesis and Antiinflammatory, Analgesic, and Antipyretic Testing of 4-[1-Oxo-(3-substituted aryl)-2-propenyl]-3-phenylsydnones and of 3-[4-[3-(Substituted ary)-1-oxo-2-propenyl]phenyl]sydnones. *J. Pharm. Sci.* 84 (2). 263-266
62. Ni L., Meng C., Sikorski J. (2004). Recent advances in therapeutic chalcones. *Expert Opin. Ther. Patents.* 14 (12). 1669-1691
63. Vassilev L., Vu B., Graves B., Carvajal D., Podlasky F., Filipovic Z., Kong N., Kammlott U., Lukacs C., Klein C., Fotouhi N., Liu E, (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303 (5659). 844-848
64. F. HOFFMANN-La Roche AG. Derivatives of phenoxy acetic acid and of phenoxyethyl tetrazole having antitumor activity patent. EP0947511 A1
65. Bilgin A., Palaska E., Abbasoglu U. (1991). Bazı Şalkon Türevlerinin Sentezleri ve Antifungal Etkileri Üzerinde Çalışmalar. *FABAD J. Pharm. Sci.* 16 81-87
66. Katsori A., Litina D. (2011). Recent progress in therapeutic applications of chalcones. *Expert Opin. Ther. Patents.* 21 (10). 1575-1596
67. Quincoces J., Peseke K., Molina R. (2007). Substituierte Acetophenonderivative patent. EP 1 764 363 A3
68. Bonvicini F., Gentilomi G., Bressan F., Gobbi S., Rampa A., Bisi A., Belluti F. (2019). Functionalization of the chalcone scaffold for the discovery of novel lead compounds targeting fungal infections. *Molecules.* 24 (2). 372-397
69. Singh M., Kaur M., Silakari O. (2014). Flavones: an important scaffold for medicinal chemistry. *Eur. J. Med. Chem.* 84. 206-239

70. Bansal M., Kaur K., Tomar J., Kaur L. (2017). Synthesis of flavones. *Biomed. J. Sci. & Tech. Res. I* (6). Recuperado de: <https://biomedres.us/pdfs/BJSTR.MS.ID.000530.pdf>
71. Algar J., Flynn J. (1934). A new method for the synthesis of flavonols. *Proceedings of the Royal Irish Academy*. 42. 1-8
72. Oyamada T. (1935). A new general method for the synthesis of the derivatives of flavonols. *J. Chem. Soc. Japan*. 55. 182-186
73. Serdiuk I., Roshal A., Blazejowski J. (2014). Quantum-chemical analysis of the Algar-Flynn-Oyamada reaction mechanism. *Chem. Heterocycl. Com.* 50 (3). 396-403
74. Shen X., Zhou Q., Xiong W., Pu W., Zhang W., Zhang G., Wang C. (2017). Synthesis of 5-substituted flavonols via the Algar-Flynn-Oyamada (AFO) reaction: the mechanistic implication. *Tetrahedron*. 73 (32). 4822-4829
75. Bhattacharyya S., Hatua K. (2014). Computational insight of the mechanism of Algar-Flynn-Oyamada (AFO) reaction. *RSC Adv.* 4. 18702-18709
76. Holt H., LeBlanc R., Dickson J., Brown T., Maddox J., Lee M. (2005). Reaction of chalcones with basic hydrogen peroxide: a structure and reactivity study. *Heterocycl. Commun.* 11 (6). 465-470
77. Bennett M., Burke A., O'Sullivan W. (1996). Aspects of the Algar-Flynn-Oyamada (AFO) reaction. *Tetrahedron*. 52 (20). 7163-7178
78. Singh O., Muthukrishnan M., Raj G. (2005). Manganese (III) acetate mediated oxidation of flavanones: a facile synthesis of flavones. *Synth. Commun.* 35 (20). 2723-2728

79. Baker W. (1933). Molecular rearrangement of some *o*-acyloxyacetophenones and the mechanism of the production of 3-acylchromones. *J. Chem. Soc.* 1381-1389
80. Mahal H., Venkataraman K. (1934). Synthetical experiments in the chromone group. Part XIV. The action of sodamide on 1-acyloxy-2-acetonaphthones. *J. Chem. Soc.* 1767-1769
81. Wheeler T. (1963). Flavone. *Organic Syntheses. Coll. 4.* 478-482
82. Lahyani A., Trabelsi M. (2016). Ultrasonic-assisted synthesis of flavones by oxidative cyclization of 2'-hydroxychalcones using iodine monochloride. *Ultrason. Sonochem.* 31. 626-630
83. Cao G., Sofic E., Prior R. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationship. *Free Radic. Biol. Med.* 22 (5). 749-760
84. Greeff J., Joubert J., Malan S., van Dyk S. (2012). Antioxidant properties of 4-quinolones and structurally related flavones. *Bioorg. Med. Chem.* 20. 809-818
85. Knekt P., Jarvinen R., Seppanen R., Heliovaara M., Teppo L., Pukkala E., Aromaa A. (1997). Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am. J. Epidemiol.* 146 (3). 223-230
86. Shukla S., Gupta S. (2010). Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharm. Res.* 27. 962-978
87. Zheng W., Tan R., Yang L., Liu Z. (1995). Two flavones from *Artemisia giraldii* and their antimicrobial activity. *Planta Med.* 62. 160-162

88. Guz N., Stermitz F., Johnson J., Beeson T., Willen S., Hsiang J., Lewis K. (2001). Flavonolignan and flavone inhibitors of a *Staphylococcus aureus* multidrug resistance pump: structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* 44 (2). 261-268
89. Stavri M., Piddock L., Gibbons S. (2007). Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J. Antimicrob.* 59. 1247-1260
90. Bitencourt T., Komoto T., Marins M., Fachin A. (2014). Antifungal activity of flavonoids and modulation of expression of genes of fatty acid synthesis in the dermatophyte *Trichopyton rubrum*. *BMC Proceedings.* 8 (Suppl 4). 53-54
91. Al Aboody M., Mickymaryay S. (2020). Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids. *Molecules.* 9 (2). 45-88
92. Feng W., Hao Z., Li M. (2017). Flavonoids: from biosynthesis to human health. Chapter 2: Isolation and Structure Identification of Flavonoids. IntechOpen. Recuperado de: <https://www.intechopen.com/books/flavonoids-from-biosynthesis-to-human-health/isolation-and-structure-identification-of-flavonoids>
93. Gaucher G. (1969). An introduction to chromatography. *J. Chem. Educ.* 46 (11). 729-733
94. Aksoz B., Ertan R. (2012). Spectral properties of chalcones II. *FABAD J. Pharm. Sci.* 37 (4). 205-216
95. McMurry J. (2008). Química Orgánica. 7ª Edición. Santa Fe, México D.F. CENGAGE Learning Editores
96. Arikan S. (2007). Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Med. Mycol. J.* 45. 569-587

97. Tapia C. (2009). Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Rev. Chil. Infect.* 26 (2). 144-150
98. Cavalieri S. et al. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. American Society for Microbiology. Recuperado de: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>
99. Lacasa E., Mazuelos E., Espinel-Ingroff A. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Revista Iberoamericana de Micología.* Recuperado de: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>
100. Rudrapal M., Satyanandam S., Swaroopini T., Lakshmi T., Jaha S., Zaheera S. (2013). Synthesis and antibacterial activity of some new hydrazones. *Med. Chem. Res.* 22. 2840-2846
101. González F., Castro N. (2012). Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. *Rev. CES Med.* 26 (1). 71-83
102. Nudelman N., Furlong J. (1991). Theoretical calculations of chemical interactions. VII. SCF-MO conformational studies of substituted 2'-hydroxychalcones. *Can. J. Chem.* 69. 865-869
103. Rayner-Canham G. (2000). Química Inorgánica Descriptiva. 2ª Edición. México D. F. PEARSON EDUCACIÓN. 191-193
104. Zainullin R., Kunakova R., Gareev V., Galyautdinov I., Sadretdinova Z., Muslimov Z., Odinokov V. (2018). Flavanones and flavones from Bashkir propolis. *Chem. Nat. Compd.* 54 (5). 975-977

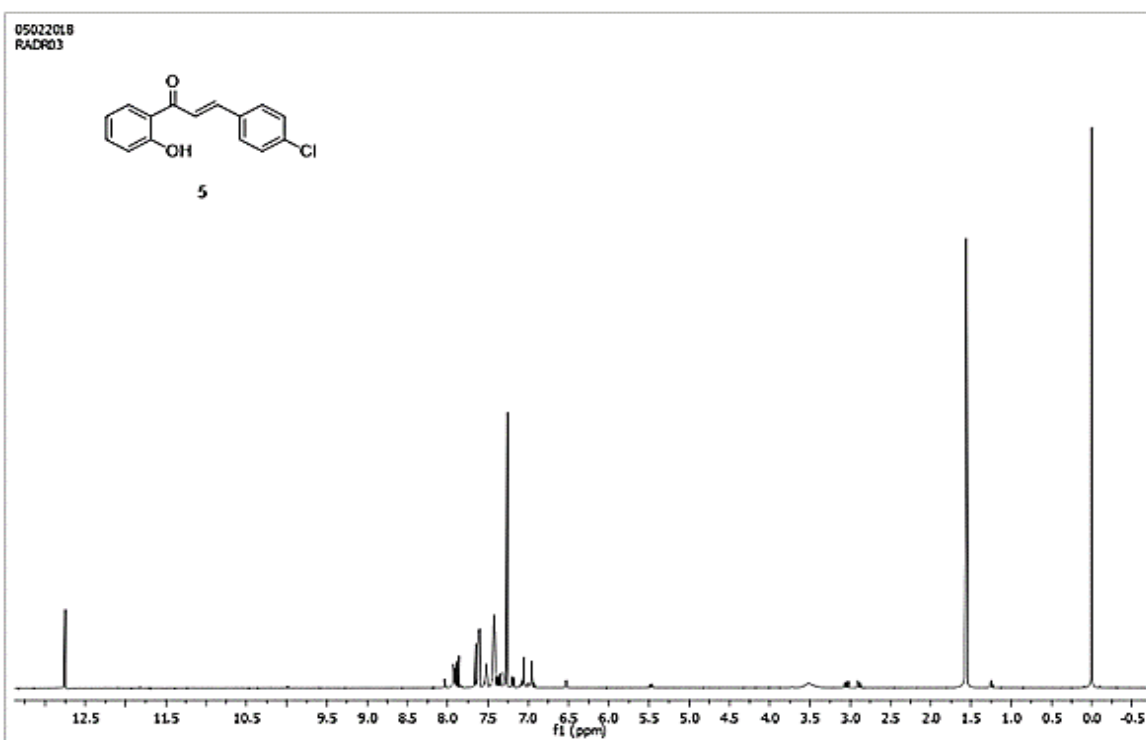
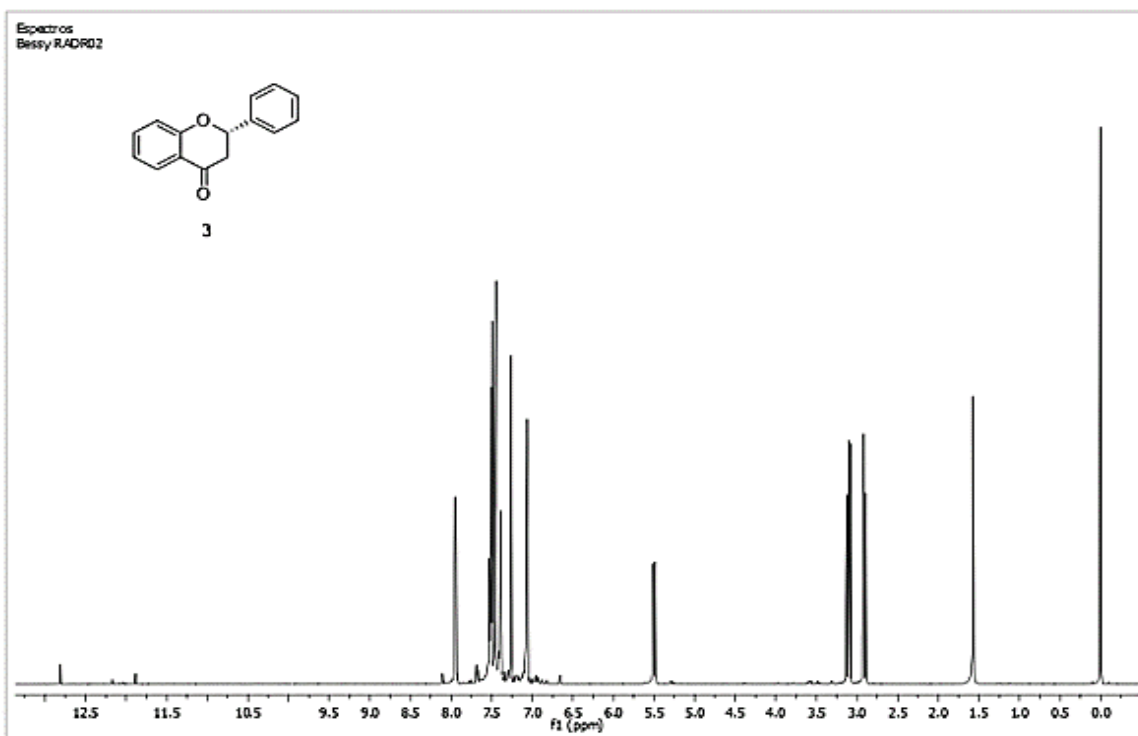
105. Vashchenko V., Kutulya L., Krivoshey A. (2007). Simple and effective protocol for Claisen-Schmidt condensation of hindered cyclic ketones with aromatics aldehydes. *Synthesis*. 14. 2125-2134
106. Ferreira D., Brandt E., Volstedt F., Roux D. (1975). Parameters regulating the α - and β -cyclization of chalcones. *J. Chem. Soc.* 1437-1446
107. Cisak A., Mielczarek C. (1992). Practical and theoretical aspects of flavanone-chalcone isomerisations. *J. Chem. Soc.* 1603-1607
108. Yamín L., Blanco S., Luco J., Ferreti F. (1997). Theoretical study of cyclization of 2'-hydroxychalcone. *J. Mol. Struct.* 390. 209-215
109. Mai J., Hoxha E., Morton C., Muller B., Adler M. (2013). Towards a dynamic covalent molecular switch: substituent effects in chalcone/flavanone isomerism. *Org. Biomol. Chem.* 11. 3421-3423
110. Muller B., Litberg T., Yocum R., Pniewski C., Adler M. (2016). Extended aromatic and heteroaromatic ring systems in the chalcone-flavanone molecular switch scaffold. *J. Org. Chem.* Recuperado de: <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b00986>
111. Wachter-Jurcsak N. (1999). Employing NMR spectroscopy to evaluate transmission of electronic effects in 4-substitued chalcones. *J. Chem. Educ.* 76 (5). 653-654
112. Cruz J. (2018). Preparación y caracterización de compuestos con estructura de chalcona. (Tesis maestría), Universidad de Salamanca, España

113. Liu B., Pang Y., Bouhenni R., Duah E., Parachuri S., McDonald L. (2015). A step toward simplified detection of serum albumin on SDS-page using an environment-sensitive flavone sensor. *Chem. Comm. (ESI)*. Recuperado de: <http://www.rsc.org/suppdata/c5/cc/c5cc03516c/c5cc03516c1.pdf>
114. Kurzwehnart A., Kandioller W., Bartel C., Bachler S., Trondl R., Muhlgassner G., Jakupec M., Arion V., Marko D., Keppler B., Hartinger C. (2012). Targeting the DNA-topoisomerase complex in a double-strike approach with topoisomerase inhibiting moiety and covalent DNA binder. *Chem. Comm. (ESI)*. Recuperado de: <http://www.rsc.org/suppdata/cc/c2/c2cc31040f/c2cc31040f.pdf>
115. Sukumaran S., Chee C., Viswanathan G., Buckle M., Othman R., Rahman N., Chung L. (2016). Synthesis, biological evaluation and molecular modelling of 2'-hydroxychalcones as acetylcholinesterase inhibitors. *Molecules*. 21. 955-965
116. Liu Z., Fang Q., Yu W., Xue G., Cao D., Jiang M., (2002). 2'-hydroxy-4''-dimethylaminochalcone. *Acta Crystallogr C*. 58. o-445-o-446
117. Gasull E., Silber J., Blanco S., Tomas F., Ferreti F. (2000). A theoretical and experimental study of the formation mechanism of 4-X-chalcones by the Claisen-Schmidt reaction. *J. Mol. Struct.* 503. 131-144
118. Batovska D., Parushev St.P., Slavova A., Bankova V., Tsvetkova I., Minova M., Najdenski H. (2007). Study on the substituent's effects of a series of synthetic chalcones against the yeast *Candida albicans*. *Eur. J. Med. Chem.* 42. 87-92
119. Lahtchev K., Batovska D., Parushev St.P., Ubiyovk V., Sibirny A. (2008). Antifungal activity of chalcones: a mechanistic study using various yeast strains. *Eur. J. Med. Chem.* 43. 2220-2228

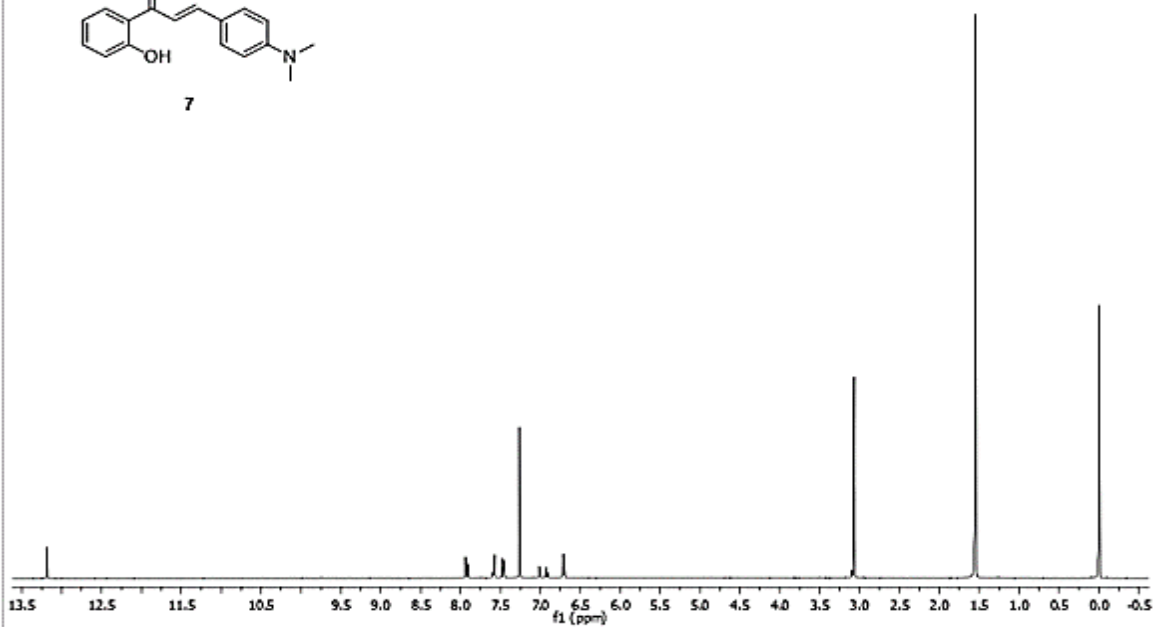
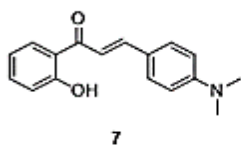
120. Havsteen B. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* 96. 67-202
121. Weidenborner M., Jha H. (1997). Antifungal spectrum of flavone and flavanone tested against 34 different fungi. *Mycol. Res.* 101 (6). 733-736
122. Samanta A., Das G., Kumar S. (2011). Roles of flavonoids in plants. *Int. J. Pharm. Sci. Thec.* 6 (1). 12-35
123. Li S., Zhang Z., Cain A., Wang B., Long M., Taylor J. (2005). Antifungal activity of Camptothecin, Trifolin and Hyperoside isolated from *Camptotheca acuminata*. *J. Agric. Food Chem.* 53. 32-37
124. Li S., Lo C., Ho C. (2006). Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. *J. Agric. Food Chem.* 54. 4176-4185

11. ANEXO

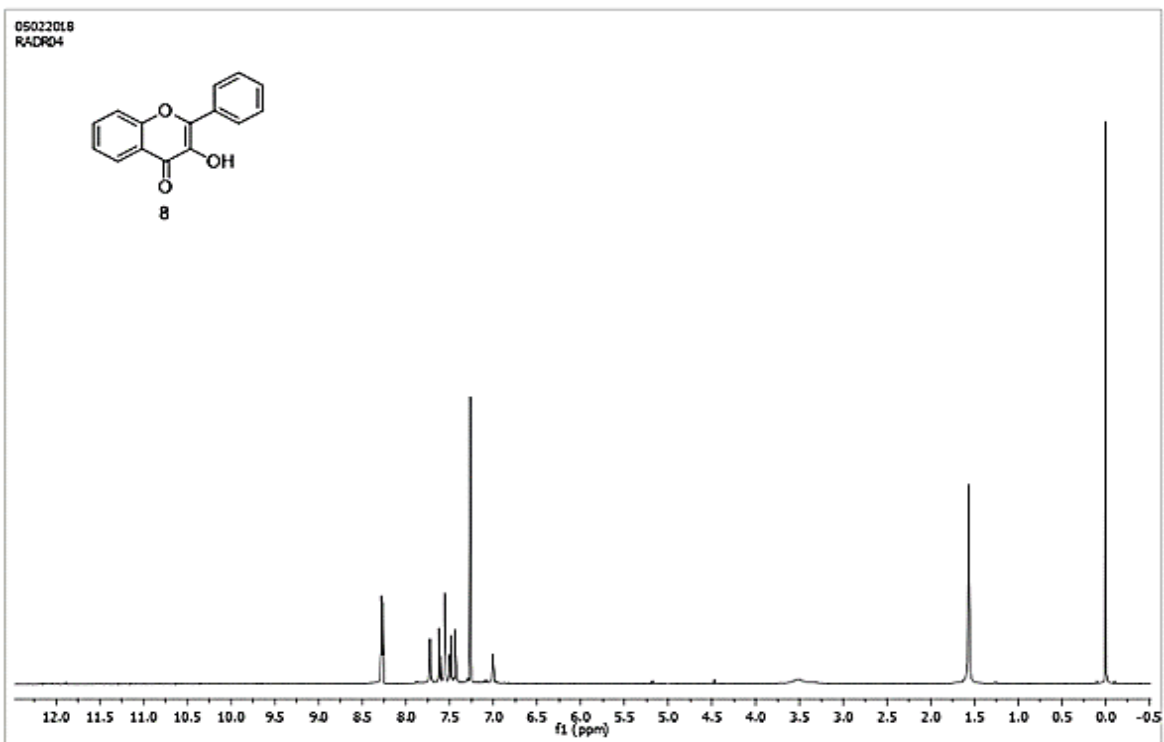
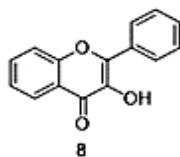
A.1 Espectros de ^1H -RMN de los productos sintetizados.



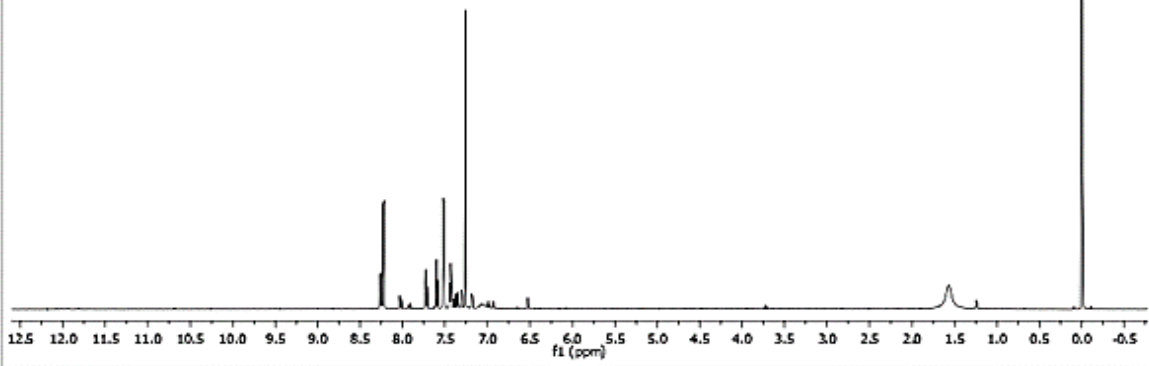
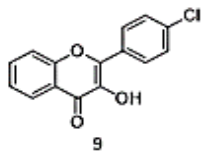
Espectros
Bessy RADRL2



05022018
RADR04



Espectro
RADR05



Espectro
RADR22

