



# Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

# Posgrado en Ciencias Biológicas

# MODIFICACIÓN DE $\delta$ TOCOTRIENOL Y MODELADO MOLECULAR CON 5-LIPOXIGENASA

Tesis que presenta

# JIMMY JOSUÉ CEBALLOS CRUZ

En opción al título de

# DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: OPCIÓN BIOTECNOLOGÍA)

Mérida, Yucatán, México

2022

#### CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C. POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



#### RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Jimmy Josué Ceballos Cruz** titulado "**Modificación de**  $\delta$  **tocotrienol y modelado molecular con 5-lipoxigenasa**", fue realizado en la **Unidad de Biotecnología**, en la línea de Química de Productos Naturales, en el Laboratorio de Química Orgánica del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** bajo la dirección del **Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez** y co- dirección del **Dr. Denis Séraphin** del Laboratorio de Sustancias de Origen Natural y Análogos Estructurales (SONAS) de la **Universidad de Angers**, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

Dra. Cecilia Hernández Zepeda Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 26 de abril de 2022

#### **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo espuesto en la presente Declaración.

Jimmy Josué Ceballos Cruz

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado "Valoración de los recursos vegetales, naturales y renovables de la Península de Yucatán" (SEP-CONACYT-ANUIES-ECOS NORD 276520 / M16A02) bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y el Dr. Denis Séraphin.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, por permitirme formar parte de su equipo, por su gran apoyo, por todo su empeño y dedicación para con este proyecto y mi formación, gracias a él he aprendido mucho en estos años.

Al Dr. Denis Seraphin por abrirme las puertas de su laboratorio, por su gran paciencia al cuestionar y de ese modo enseñar, gracias por su calidez y amabilidad.

A los Dres. Jean-Jacques Hélesbeux y Guillaume Viault por su apoyo, instrucción y guía.

Al Dr. Rubén M. Carballo, por brindarme un espacio en su laboratorio para continuar con mi aprendizaje y el desarrollo del proyecto, e igualmente por sus valiosas aportaciones a lo largo de la realización de este trabajo.

Al Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez, por sus aportes continuos al proyecto, mi formación y la revisión minusciosa, paso a paso, en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Ramiro F. Quijano Quiñones por su apoyo en la exploración teórica del comportamiento químico de los compuestos, y por extender su mano para ayudarme.

Al Dr. Gumersindo Mirón López por su apoyo en la adquisición de datos de Resonancia Magnética Nuclear, y por su ayuda incondicional.

A los Dres. Rocío de Lourdes Borges Argáez, Raúl Tapia Tussell por la revisión y corrección del presente documento.

A la Q.B.B. Karlina Garcia Sosa por su apoyo técnico en la obtención de datos de UV, así como la capacitación y sugerencias para emplear el equipo de Cromatografía de Liquidos de Alta Eficiencia del laboratorio.

A la M.Ed. Fabiola Escalante Erosa por su apoyo técnico en el laboratorio en la etapa inicial de trabajo.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán y a todas las personas que conforman esta institución por apoyarme en cada momento hasta la conclusión de esta etapa.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de este trabajo (beca nacional 275151).

#### LISTA DE PRODUCTOS GENERADOS

Ceballos-Cruz, J.J., Hélesbeux, J., Viault, G., Séraphin, D., Mirón-Lopez, G., Carballo, R.M., Richomme, P., Peña-Rodriguez, L.M. (2022). Photochemical transformations of chalcone-vitamin E hybrids. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 66, 120-129.

#### DEDICATORIAS

A הוהי porque por ti todo es.

A mis padres José Antonio y Genny, por hacer todo cuanto han podido para que sea feliz. A mi hermana Yenni y sobrino Yossef por ser parte de mis alegrías.

A mi esposa Lía y mi hijo Orel, mis compañeros de aventura.

¡Los amo!

### ÍNDICE

INTRODUCCIÓN1
CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA3
1.1. ANTECEDENTES
1.2. JUSTIFICACIÓN19
1.3. HIPÓTESIS
1.4. OBJETIVO GENERAL20
1.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS20
1.6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL21
CAPÍTULO II. OBTENCIÓN DE δ-TOCOTRIENOL23
2.1. INTRODUCCIÓN23
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS24
2.2.1. Prospección y monitoreo de compuestos presentes con actividad antioxidante24
2.2.2. Análisis por resonancia magnética nuclear25
2.2.3. Obtención de extracto BOD25
2.2.4. Fraccionamiento primario general25
2.2.5. Fraccionamiento secundario A25
2.2.6. Fraccionamiento secundario B25
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN26 2.4. CONCLUSIONES

CAPÍTULO III. TRANSFORMACIONES FOTOQUÍMICAS DE HÍBRIDOS CHALCONA-
VITAMINA E
3.1. INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO29
3.2. PHOTOCHEMICAL TRANSFORMATIONS OF CHALCONE-VITAMIN E HYBRIDS
3.2.1. Abstract
3.2.2. Resumen
3.2.3. Introduction
3.2.4 Experimental31
3.2.5. Results and discussion34
3.2.6. Conclusions40
3.2.7. Acknowledgements40
3.3. SUPPORTING INFORMATION41
CAPÍTULO IV. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS TIPO CHALCONA PRENILADA
4.1. INTRODUCCIÓN57
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS59
4.2.1. Síntesis de O-(N,N-dietilcarbamoil)-δ-tocoferol (13)
4.2.2. Síntesis de 5-bromo-δ-tocoferol (17)60
4.2.3. Síntesis de 5-formil-δ-tocoferol (20)60
4.2.4. Síntesis de 5-(1-hidroxietil)-δ-tocoferol (21)61
4.2.5. Síntesis del tosilato de 5-formil-δ-tocoferol (22)61

4.2.6. Síntesis del tosilato de 5-(1-hidroxietil)-δ-tocoferol (23)	62
4.2.7. Síntesis de 5-acetil-6-O-tosil-(+)-δ-tocoferol (24)	63
4.2.8. Síntesis de la 6'-O-tosil-δ-tocoferol-3,4,5-trimetoxi- <i>retro</i> -chalcona (3)	64
4.2.9. Síntesis de la δ-tocoferol-3,4,5-trimetoxi- <i>retro</i> -chalcona (4)	64
4.2.10. Síntesis de la 6'-O-tosil-δ-tocoferol-3,4,5-trimetoxi-chalcona (1)	65
4.2.11. Síntesis de la δ-tocoferol-3,4,5-trimetoxi-chalcona (2)	66
4.2.12. Análisis por resonancia magnética nuclear	67
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
4.4. CONCLUSIONES	77
CAPÍTULO V. SÍNTESIS DE OTROS ESQUELETOS TIPO FLAVONOIDE	
PRENILADOS	79
5.1. INTRODUCCIÓN	79
5.1.1. Flavonoides	79
5.1.2. Isoflavonoides y Neoflavonoides	84
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	85
5.2.1. Síntesis de $\delta$ -tocoferol-3-fluoro-4-metoxi-flavanona (50)	85
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	86
5.4. CONCLUSIONES	94

CAPÍTULO VI. MODIFICACIONES EN LA CADENA LATERAL	
6.1. INTRODUCCIÓN	97
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS	102
6.2.1. Epoxidación de $\delta$ -tocotrienol a temperatura ambiente	102
6.2.2. Epoxidación de $\delta$ -tocotrienol a 0 °C	102
6.2.3. Análisis por resonancia magnética nuclear	
6.2.4. Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia	103
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	103
6.4. CONCLUSIONES	108
CAPÍTULO VII. EXPLORACIÓN DEL POTENCIAL PARA LA INHIBIC	IÓN DE 5-
LIPOXIGENASA DE LOS DERIVADOS DE VITAMINA E POR ACOP MOLECULAR	LAMIENTO 111
LIPOXIGENASA DE LOS DERIVADOS DE VITAMINA E POR ACOP MOLECULAR	LAMIENTO 111 111
LIPOXIGENASA DE LOS DERIVADOS DE VITAMINA E POR ACOP MOLECULAR	LAMIENTO 111 111 111
LIPOXIGENASA DE LOS DERIVADOS DE VITAMINA E POR ACOP MOLECULAR. 7.1.INTRODUCCIÓN. 7.2. MATERIALES Y MÉTODOS. 7.2.1. Preparación de ligandos y proteína.	LAMIENTO 111 111 111 114
LIPOXIGENASA DE LOS DERIVADOS DE VITAMINA E POR ACOP MOLECULAR. 7.1.INTRODUCCIÓN. 7.2. MATERIALES Y MÉTODOS. 7.2.1. Preparación de ligandos y proteína. 7.2.2. Parámetros para el acoplamiento molecular.	LAMIENTO 111 111 111 114 114
LIPOXIGENASA DE LOS DERIVADOS DE VITAMINA E POR ACOP MOLECULAR. 7.1.INTRODUCCIÓN. 7.2. MATERIALES Y MÉTODOS. 7.2.1. Preparación de ligandos y proteína. 7.2.2. Parámetros para el acoplamiento molecular. 7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	LAMIENTO 111 111 111 114 114 114
LIPOXIGENASA DE LOS DERIVADOS DE VITAMINA E POR ACOP MOLECULAR	LAMIENTO 111 111 111 114 114 114 115 119
LIPOXIGENASA DE LOS DERIVADOS DE VITAMINA E POR ACOP MOLECULAR	LAMIENTO 111 111 111 114 114 114 115 119 121
LIPOXIGENASA DE LOS DERIVADOS DE VITAMINA E POR ACOP MOLECULAR	LAMIENTO 111 111 111 114 114 114 115 119 121

BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

#### LISTADO DE FIGURAS

**Figura 1.1**. Rutas de formación de mediadores inflamatorios eicosanoides, A: ruta de 5-LOX, B: ruta de COX.

**Figura 1.2**. Antiinflamatorios (antagonistas de sitios de unión de leucotrienos) aprobados para el tratamiento del asma.

**Figura 1.3**. Estructura de la enzima 5-LOX; a) El monómero presenta un dominio terminal (amarillo) y un dominio catalítico (rosa); b) ampliación del hierro no-hemo coordinado en el dominio catalítico.

Figura 1.4. Ciclo catalítico del hierro no-hemo presente en la enzima 5-LOX.

Figura 1.5. Ejemplos de inhibidores de 5-LOX tipo redox.

Figura 1.6. Ejemplos de inhibidores de 5-LOX ligantes de hierro.

Figura 1.7. Ejemplos de inhibidores de 5-LOX no redox.

Figura 1.8. Inhibidores 5-LOX con mecanismos de acción no descritos.

Figura 1.9. Productos naturales inhibidores de 5-LOX.

Tabla 1.1. Inhibidores de 5-LOX y su estado en pruebas clínicas.

Figura 1.10. Estructuras polifenólicas con actividad inhibidora de 5-LOX.

Figura 1.11. Vitamina E, tocoferoles y tocotrienoles.

**Tabla 1.2**. Actividad inhibitoria de los vitameros de vitamina E sobre 5-LOX, (CI<sub>50</sub> en  $\mu$ M) (Pein, *et al.*, 2018).

Figura 1.12. Análogos carbamato de tocotrienoles con actividad antiproliferativa.

Figura 1.13. Análogos éter de tocotrienoles con actividad antiproliferativa.

Figura 1.14. Análogos tipo éster de tocotrienoles con actividad antiproliferativa.

**Figura 1.15**. Análogos de  $\delta$ -tocotrienol que presentan anillo de benzoxazina fusionado con actividad antiproliferativa.

Figura 1.16. Análogos de γ-tocotrienol polietilenglicolados con mayor biodisponibilidad.

Figura 1.17. Estructura de tocoflexol.

Figura 1.18. Tocotrienoles o-formilados.

Figura 1.19. Híbrido fenazina-δ-tocotrienol.

Figura 1.20. Estrategia experimental para la obtención del material de partida.

Figura 1.21. Modificaciones propuestas para realizar sobre el material de partida.

**Figura 2.1**. Diagrama de obtención de d-tocotrienol a partir de semillas de *B. orellana*, empleando dos fraccionamientos secundarios diferentes.

**Figure 3.1.** Structures of synthesized chalcone and retrochalcone-vitamin E hybrids: (*E*)-6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (**1**), (*E*)-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (**2**), (*E*)-6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-retrochalcone (**3**) and (*E*)-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-retrochalcone (**4**).

**Figure 3.2.** Chalcone and retrochalcone-vitamin E hybrids **1-4** and their photoisomerization products. (*Z*)-6'-*O*-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (**5**), 3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-flavanone (**6**), (*Z*)-6'-*O*-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-retrochalcone (**7**), 3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-3deoxyanthocyanidin (**8**), (*Z*)-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-retrochalcone (**9**) and 3,4,5-trimethoxy- $\delta$ tocopherol-3-deoxyanthocyanidin hemiketal (**10**).

**Figure 3.3.** Theoretical energy diagrams of the photoisomerization of the two pairs of *E* chalcone/retrochalcone hybdrids. A) tosyloxy-chalcone (1), B) hydroxy-chalcone (2), C) tosyloxyretrochalcone (3), D) hydroxy-retrochalcone (4). Singlet state  $\bigcirc$ ; triplet state  $\blacktriangle$ ; suggested path for *E*-*Z* isomerization  $\blacksquare$ .

**Figure 3.4.** <sup>1</sup>H-NMR spectrum (400 MHz, acetone- $d_6$ ) of **1** after sunlight irradiation (t = 20 min): *E* (s-*trans*) isomer  $\Box$ , *Z* (s-*cis*) isomer  $\bullet$ .

**Figure 3.5.** Formation of photoisomerization products during light irradiation of *E*-retrochalcone **3** in acetone- $d_6$  (A); and in deuterated chloroform (B): *E*-retrochalcone **3**  $\bullet$ , *Z*-retrochalcone **7**  $\blacktriangle$ , 3-deoxyanthocyanidin **8**, cyclobutane core dimer .

**Figure 3.1S.** Stacked <sup>1</sup>H-NMR spectra (400 MHz, acetone-d<sub>6</sub>) from time-course study monitoring sunlight irradiation of 6'-*O*-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (**1**). a) t=0 min, b) t=60 min darkness, c) t=5 min sunlight, d) t=10 min sunlight, e) t=15 min sunlight, f) t=20 min sunlight.

Figure 3.2S. Stacked <sup>1</sup>H-NMR spectra (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) from time-course study monitoring sunlight

irradiation of 6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (1). a) t=0 min, b) t=60 min darkness, c) t=5 min sunlight, d) t=10 min sunlight, e) t=15 min sunlight, f) t=20 min sunlight.

**Figure 3.3S.** Stacked <sup>1</sup>H-NMR spectra (400 MHz, acetone-d<sub>6</sub>) from time-course study monitoring sunlight irradiation of 3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (**2**). a) t=0 min, b) t=60 min darkness, c) t=5 min sunlight, d) t=10 min sunlight, e) t=60 min sunlight.

**Figure 3.4S.** Stacked <sup>1</sup>H-NMR spectra (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) from time-course study monitoring sunlight irradiation of 3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (2). a) t=0 min, b) t=60 min darkness, c) t=5 min sunlight, d) t=10 min sunlight, e) t=60 min sunlight.

**Figure 3.5S.** Stacked <sup>1</sup>H-NMR spectra (400 MHz, acetone-d<sub>6</sub>) from time-course study monitoring sunlight irradiation of 6'-*O*-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-*retro*chalcone (**3**). a) t=0 min, b) t=60 min darkness, c) t=5 min sunlight, d) t=10 min sunlight, e) t=15 min sunlight, f) t=20 min sunlight, g) t=25 min sunlight, h) t=30 min sunlight, i) t=60 min sunlight.

**Figure 3.6S.** Stacked <sup>1</sup>H-NMR spectra (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) from time-course study monitoring sunlight irradiation of 6'-*O*-tosyl-3,4,5-trimethoxy-δ-tocopherol-*retro*chalcone (**3**). a) t=0 min, b) t=60 min darkness, c) t=5 min sunlight, d) t=10 min sunlight, e) t=15 min sunlight, f) t=20 min sunlight, g) t=25 min sunlight, h) t=30 min sunlight, i) t=60 min sunlight.

**Figure 3.7S.** Stacked <sup>1</sup>H-NMR spectra (400 MHz, acetone-d<sub>6</sub>) from time-course study monitoring sunlight irradiation of 3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-retrochalcone (4). a) t=0 min, b) t=60 min darkness, c) t=5 min sunlight, d) t=10 min sunlight, e) t=15 min sunlight.

**Figure 3.8S.** Stacked <sup>1</sup>H-NMR spectra (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) from time-course study monitoring sunlight irradiation of 3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-retrochalcone (4). a) t=0 min, b) t=60 min darkness, c) t=5 min sunlight, d) t=10 min sunlight, e) t=15 min sunlight.

**Figure 3.9S.** Photoisomerization process monitoring for *E*-chalcone **1**: A) in deuterated chloroform, B) in acetone- $d_6$ ; *E*-chalcone **(**, *Z*-chalcone **(5**).

**Figure 3.10S.** Characteristic <sup>1</sup>H-NMR signals (chemical shifts in  $\delta$ ; coupling constants in Hz) of photoisomerization products **7** and **8**.

**Figure 3.11S.** Stacked UV-vis spectra from time-course study monitoring sunlight irradiation of 6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-retrochalcone (**3**). a) In chloroform, b) In acetone. **Figure 3.12S.** Schematic illustration for the distribution of 3-deoxyanthocyanidin (8) in reverse micelle-like aggregates, encapsulating moisture. The number of monomers shown in the aggregate are for visualization purposes only.

**Figure 3.13S.** Stacked <sup>1</sup>H-NMR spectra (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) showing changes in chemical shift values of key proton signals of 3-deoxyanthocyanidin **8** (evidence of aggregation process during time-course study).

**Figure 3.14S.** Proposed reaction pathways for the conversion of 6'-*O*-tosyl-3,4,5-trimethoxy-δ-tocopherolretrochalcone (**3**) to 3-deoxyanthocyanidin (**8**).

**Figure 3.15S.** <sup>1</sup>H-NMR spectrum (400 MHz, acetone-d<sub>6</sub>) of 6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (**1**).

**Figure 3.16S.** <sup>13</sup>C-NMR spectrum (100 MHz, acetone-d<sub>6</sub>) of 6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (1).

**Figure 3.17S.** <sup>1</sup>H-NMR spectrum (400 MHz, acetone-d<sub>6</sub>) of 3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (2).

**Figure 3.18S.** <sup>13</sup>C-NMR spectrum (100 MHz, acetone-d<sub>6</sub>) of 3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (2).

**Figure 3.19S.** <sup>1</sup>H-NMR spectrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) of 6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-retrochalcone (**3**).

**Figure 3.20S.** <sup>13</sup>C-NMR spectrum (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) of 6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-retrochalcone (**3**).

**Figure 3.21S.** <sup>1</sup>H-NMR spectrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) of 3,4,5-trimethoxy-δ-tocopherol-retrochalcone (4).

Figure 3.22S. <sup>13</sup>C-NMR spectrum (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) of 3,4,5-trimethoxy-∂-tocopherol-retrochalcone (4).

Figura 4.1. Estructura general y numeración del esqueleto de chalcona.

Figura 4.2. Algunas de las estrategias utilizadas para la síntesis de chalconas.

Figura 4.3. Metodologías más comunes para la síntesis de acetofenonas.

Figura 4.4. Ruta sintética para la obtención de 2'-hidroxiacetofenonas, a partir de *N*,*N*-dietilcarbamato.

**Figura 4.6.** Espectros apilados de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de la carbamoilación de  $\delta$ -tocoferol. A) crudo de reacción con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. B) *O*-(*N*,*N*-dietilcarbamoil)- $\delta$ -tocoferol (**13**) obtenido utilizando NaH.

Figura 4.7. Pruebas realizadas para el rearreglo por orto-metalación.

Figura 4.8. Metalación inducida por intercambio con halógeno.

**Figura 4.9.** Racionalización de la regioselectividad de la formilación de vitamina E por el efecto SIBL en el núcleo cromanol.

**Figura 4.10.** Comparación de espectros de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del producto de adición de metil litio sobre 5-formil- $\delta$ -tocoferol (**21**), a) crudo de reacción, b) diastereoisómero A, c) diastereoisómero B.

Figura 4.11. Estrategia de obtención de derivados tipo chalcona y retro-chalcona.

**Figura 4.12.** Ruta sintética establecida para la obtención de chalconas preniladas con esqueleto de tipo cromanol.

**Figura 4.13.** Chalconas y retrochalconas hibridos de  $\delta$ -tocoferol (**11**) y  $\delta$ -tocotrienol (**12**), sintetizadas aplicando el camino sintético desarrollado que incluye condensación de Claisen-Schmidt como se muestra en la figura 4.12.

**Figura 4.14.** Espectros de RMN-<sup>1</sup>H apilados de (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de las muestras de purificación de la trimetoxiretrochalcona (**3**), a) muestra inicial, b) fracción A, c) fracción C.

**Figura 4.15.** Ampliación de espectros de RMN-<sup>1</sup>H apilados de (CDCI<sub>3</sub>, 400 MHz) de las muestras de purificación de la trimetoxiretrochalcona (**3**), a) muestra inicial, b) fracción A, c) fracción B.

Figura 4.16. Isómeros geométricos del esqueleto chalcona.

Figura 4.17. Chalconas de Glycyrrhiza glabra estables ante la irradiación con luz solar.

Figura 4.18. Equilibrios para la formación del catión flavilio a partir del esqueleto chalcona.

Figura 4.19. Dímeros de chalcona con núcleo de ciclobutano, productos de fotocicloadición.

Figura 5.1. Esqueleto 2-fenil-benzopirano.

Figura 5.2. a) esqueleto de flavona, b) esqueleto de flavanona.

Figura 5.3. Flavonoides aislados de las partes aéreas de Cyperus rotundus por Ibrahim, et al. (2018).

Figura 5.4. Flavonoides mildona (a) y mildbenona (b).

Figura 5.5. Piranoflavanonas aisladas de Paulownia tomentosa (Hanáková, et al, 2017).

Figura 5.6. Flavonoides prenilados aislados de Paulownia tomentosa (Hanáková, et al, 2017).

Figura 5.7. Ciclación oxidativa de chalconas utilizada por Sashidhara, et al. (2012).

Figura 5.8. Ciclación de difenildionas utilizada por Romanelli, et al. (2010).

Figura 5.9. Anillación de halofenoles utilizada por Yang, et al. (2010).

Figura 5.10. Olefinación utilizada por Das y Gosh (2011).

Figura 5.11. Arilación sobre C-2 utilizada por Kim, et al. (2012).

**Figura 5.12.** Esqueleto base de: a) isoflavonoides (3-fenil-benzopirano), b) neoflavonoides (4-fenil-benzopirano).

Figura 5.13. 3-aril-cumarinas preniladas aisladas de fuentes naturales.

Figura 5.14. Ciclación en medio básico de la chalcona 41.

**Figura 5.15**. Comparación de espectros de RMN-<sup>1</sup>H (An- $d_6$ , 400 MHz) de las muestras obtenidas en la síntesis de la flavanona (**50**), a) crudo de reacción, b) fracción A, c) fracción B.

**Figura 5.16**. Ampliación de espectros de RMN-<sup>1</sup>H (An- $d_6$ , 400 MHz) de las muestras obtenidas en la síntesis de la flavanona (**50**), a) crudo de reacción, b) fracción A, c) fracción B.

Figura 4.17. Productos formados durante la oxidación por DDQ de la flavanona 50.

**Figura 5.18.** Espectros de RMN-<sup>1</sup>H en (An-d<sub>6</sub>, 400 MHz) de las muestras obtenidas en la reacción con DDQ de la  $\delta$ -tocoferol-3-fluoro-4-metoxi-flavanona (**50**), a) crudo de reacción, b) fracción A, c) fracción D.

**Figura 5.19**. Estrategia utilizada por Zheng y cols. (2003) para la obtención de flavonas a partir de ωcloro-acetofenonas.

**Figura 5.20**. Comparación de espectros de derivados de *∂*-tocoferol. a) derivado tipo flavona (**58**) y b) derivado tipo aurona (**60**).

**Figura 5.21.** Ataques que puede sufrir el derivado epóxido de chalcona, dando lugar a una aurona o una flavona.

**Figura 5.22.** Condensación del derivado tipo 2-bromo-2'-hidroxiacetofenona de  $\delta$ -tocoferol bajo distintas condiciones de reacción conduce a la obtención del híbrido tipo aurona de  $\delta$ -tocoferol.

Figura 5.23. Condensación de Knovenagel para obtener el derivado tipo 3-acetil-cumarina de δ-tocoferol.

**Figura 5.24**. Condensación tipo Knovenagel para obtener el derivado tipo 3-aril-cumarina de  $\delta$ -tocoferol (65).

Figura 6.1. Tococromanoles con cadenas mono y biinsaturadas encontrados en fuentes vegetales.

Figura 6.2. Algunos tococromanoles naturales funcionalizados en la cadena lateral

Figura 6.3. Algunos meroterpenoides cíclicos derivados de tococromanoles.

**Figura 6.4.** Dominios propuestos por Birringer y colaboradores, que influencian la actividad antiinflamatoria de los derivados de tococromanoles.

Figura 6.5. Monoepóxido de δ-tocotrienol aislado de S. tortile, por Kato y colaboradores.

Figura 6.6. Derivados de epotilonas sintetizados por Altmann y col.

Figura 6.7. Paullonas sintetizadas por Xie

**Figura 6.8.** Epoxidación a temperatura ambiente. a) Monitoreo δT3 vs reacción (ciclohexano/AcOEt 7:3), b) Análisis de fracciones aisladas por cromatografía en columna (en rectángulos se marcan dos distintas fracciones que pertencen al grupo de biepóxidos).

**Figura 6.9**. a) Apilado de cromatogramas, MeOH: 100%. b) Cromatograma de la mejor separación obtenida con mezclas MeOH/H<sub>2</sub>O, MeOH: 90%, H<sub>2</sub>O: 10%.

**Figura 6.10.** a) Apilado de cromatogramas, ACN: 100%. b) Cromatograma con separación mejorada con mezclas H<sub>2</sub>O/ACN, (ACN:70%, H<sub>2</sub>O: 30%).

**Figura 6.11.** a) Cromatograma de la mejor separación obtenida con mezclas  $H_2O/ACN$ . Gradiente ACN: 20% - 40 min, 60% - 60 min, 70% - 90 min, 70% - 130 min, 100% - 145 min. b) Ampliación del cromatograma entre 110 y 124 min.

**Figura 6.12**. Cromatogramas de las separaciones de la mezcla de epóxidos obtenidos utilizando la columna PFP. a) ACN: 100%, b) ACN: 50%, H<sub>2</sub>O: 50%, c) ACN: 40%, H<sub>2</sub>O: 60%.

Figura 6.13. Propuesta probada para la obtención de productos de ruptura con funcionalización de aldehído.

Figura 7.1. Estructuras base de derivados utilizados para acoplamiento molecular sobre 5-LOX.

**Figura 7.2.** Sitio de unión alostérico situado entre los dominios catalítico (rojo) y tipo C2 (superior, azul) de 5-LOX.

Figura 7.3. Modelo lineal de la actividad inibitoria vs score.

 Tabla 7.1. Tabla resumen del modelo lineal de la actividad inibitoria vs score.

**Figura 7.4** Comparación de concentracion inhibitoria experimental contra calculada para el conjunto de entrenamiento.

**Figura 7.5.** Comparación del error asociado a las concentraciones experimentales contra la diferencia absoluta de las concentraciones absolutas ( $CI_{exp} - CI_{calc}$ ) del conjunto de entrenamiento.

**Figura 7.6.** Comparación del error asociado a las concentraciones experimentales contra la diferencia absoluta de las concentraciones absolutas ( $CI_{exp} - CI_{calc}$ ) del conjunto de prueba.

**Figura 7.7.** Concentraciones inhibitorias medias calculadas para los análogos propuestos, con resultado menor a 600 nM.

Figura 7.8. Superposición de poses de los analógos con menores concentraciones inhibitorias.

**Figura A1.1.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del O-acetil-δ-tocoferol (18).

**Figura A1.2.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de 5-formil-δ-tocoferol (**20**).

**Figura A1.3.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del tosilato de 5-formil-δ-tocoferol (22).

**Figura A1.4.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del tosilato de 5-(1-hidroxietil)-δ-tocoferol (23).

**Figura A1.5** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del tosilato de 5-acetil-δ-tocoferol (**24**).

**Figura A1.6.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de la 6'-*O*-tosil- $\delta$ -tocoferol-3,4,5-trimetoxi-*retro*-chalcona (**3**).

**Figura A1.7.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) la 6'-O-tosil-δ-tocoferol-3,4,5-trimetoxi-chalcona (1).

**Figura A1.8.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de la  $\delta$ -tocoferol-3,4,5-trimetoxi-*retro*-chalcona (4).

**Figura A1.9**. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de la  $\delta$ -tocoferol-3,4,5-trimetoxi-chalcona (2).

**Figura A1.10.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (An-d<sub>6</sub>, 400 MHz) de la 6'-*O*-tosil- $\delta$ -tocoferol-3-fluoro-4-metoxi-*retro*-chalcona (**31**).

**Figura A1.11.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (An-d<sub>6</sub>, 400 MHz) de la 6'-O-tosil- $\delta$ -tocoferol-3-fluoro-4-metoxichalcona (**41**).

**Figura A1.12.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (An-d<sub>6</sub>, 400 MHz) de la 6'-O-tosil- $\delta$ -tocoferol-4-fluoro-chalcona (**39**).

**Figura A1.13.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (An-d<sub>6</sub>, 400 MHz) de la 6'-O-tosil- $\delta$ -tocotrienol-3, 4, 5-trimetoxichalcona (1).

**Figura A1.14.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (An-d<sub>6</sub>, 400 MHz) de la 6'-*O*-tosil- $\delta$ -tocotrienol-3-fluoro-4-metoxichalcona (**45**).

**Figura A1.15.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (An-d<sub>6</sub>, 400 MHz) de la 6'-O-tosil- $\delta$ -tocotrienol-4-fluoro-chalcona (**43**).

**Figura A1.16.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (An-d<sub>6</sub>, 400 MHz) de la  $\delta$ -tocoferol-3-fluoro-4-metoxi-flavanona (**50**).

**Figura A1.17.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H en (CDCI<sub>3</sub>, 400 MHz) del compuesto obtenido por medio de la condensación del derivado ω-bromoacetofenona con benzaldehído en medio básico, derivado tipo aurona (**60**).

**Figura A1.18.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H en (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del epóxido de chalcona (**61**) sintetizado por condensación de Darzens.

**Figura A1.19.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H en (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del producto producto secundario (**62**) de la condensación de 2-bromo-2'-hidroxiacetofenona con benzaldehído

Figura A1.20. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del derivado 3-acetilcumarina-tocoferol (63)

Figura A1.21. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del producto (64) del tratamiento de 5-formil-tocoferol con piperidina.

Figura A1.22. Espectro de RMN-1H de la 3-fenilcumarina (65) obtenida por condensación utilizando DCC.

Figura A1.23. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de la mezcla de epóxidos.

**Figura A1.24.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del monoepóxido 1.

Figura A1.25. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del monoepóxido 2.

**Figura A1.26.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del biepóxido 1.

**Figura A1.27.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del biepóxido 2.

**Figura A1.28**. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCI<sub>3</sub>, 400 MHz) de la mezcla de monoepóxidos de  $\delta$ -tocotrienol.

**Figura A1.29**. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCI<sub>3</sub>, 400 MHz) de la mezcla de glicoles de  $\delta$ -tocotrienol.

**Figura A1.30**. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del derivado de escición de  $\delta$ -tocotrienol de mayor longitud (**67**).

**Figura A1.31**. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del derivado de escición de  $\delta$ -tocotrienol de longitud media (**68**).

**Figura A1.32**. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del derivado de escición de  $\delta$ -tocotrienol de menor longitud (**69**).

Tabla A2.1. Cuadro resumen del modelo lineal.

Figura A2.1. Curva de regresión lineal.

Figura A2.2. Gráfico de residuales vs valores ajustados para el modelo lineal.

Figura A2.3. Gráfico Q-Q del modelo de regresión lineal.

Figura A3.1 Interacciones del ácido garcinoico ( $\delta$ -AG) con 5-LOX.

Figura A3.2. Interacciones del compuesto SHOEtdGA (125S) con 5-LOX

Figura A3.3. Interacciones del compuesto 3F4MeOdT3Chalc (48) con 5-LOX

Figura A3.4. Interacciones del compuesto 4CldT3Aurona (116) con 5-LOX

Figura A3.5 Interacciones del compuesto 4FdT3Aurona (115) con 5-LOX

Figura A3.6. Interacciones del compuesto dT3Aurona (60) con 5-LOX

**Figura A3.7.** Interacciones de compuestos con menor concentracion inhibitoria calculada con residuos en el sitio de unión alostérico de 5-LOX (escala de distancia en angstroms).

 Tabla A4.1. Conjunto de entrenamiento para modelo por acoplamiento molecular.

 Tabla A4.2. Conjunto de prueba para modelo por acoplamiento molecular.

**Figura A4.1.** Estructuras base de compuestos utilizados para predicción de actividad por medio de acoplamiento molecular

**Figura A4.2.** Cuadros con asignación de claves de acuerdo con la estructura base y sustitución de los compuestos utilizados para el acoplamiento molecular

#### RESUMEN

La inflamación es una repuesta fisiológica benéfica para la reparación de tejidos, sin embargo, cuando se produce de forma no controlada, puede llevar a la degeneración del tejido, asi como el desarrollo de enfermedades como aterosclerosis, hepatitis crónica, colitis, fibrosis pulmonar, psoriasis y artritis reumatoide, ya que este proceso descontrolado ha sido considerado como su mecanismo patogénico básico. Con base en la evidencia acumulada se ha establecido la correlación entre la biosíntesis de leucotrienos, un tipo de mediadores inflamatorios de naturaleza lipídica, y algunas de estas enfermedades, convirtiendo a la dioxigenasa 5-lipoxigenasa, una enzima clave en la biosíntesis de leucotrienos, en una diana biológica de gran interés

Actualmente, el único inhibidor de la enzima 5-lipoxigenasa en el mercado es el fármaco zileuton, cuyo uso es limitado por presentar hepatotoxicidad y un perfil farmacocinético pobre, requiriendo múltiples dosis diarias. Lo anterior enfatiza la necesidad de buscar y desarrollar nuevos, y más eficientes, inhibidores de 5-lipoxigenasa para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación.

En el presente trabajo se empleó δ-tocotrienol, un componente del complejo conocido como vitamina E que ha demostrado la capacidad de inhibir la enzima 5-lipoxigenasa y disminuir la producción de leucotrienos, como material de partida para el desarrollo de nuevas entidades químicas por medio de la funcionalizaión de la cadena lateral, así como la hibridación con estructuras de productos naturales de distintas clases con actividad antiinflamatoria. Los compuestos obtenidos por procesos semisintéticos incluyeron derivados de tocotrienol epoxidados en la cadena lateral y derivados con cadenas laterales de distintas longitudes. Mientras que los nuevos híbridos obtenidos poseen estructuras de tipo chalcona, retrochalcona, 3-fenilcumarina, flavanona, flavona y aurona preniladas. Asimismo, se reporta la suceptibilidad de los derivados de tipo chalcona y retrochalcona prenilados a sufrir diversas transformaciones como consecuencia de su exposición a la luz, y la influencia de factores como la sustitución y disolventes utilizados en los procesos y productos generados.

En cuanto al potencial antiinflamatorio de los derivados por medio de la inhibición de la enzima 5-lipoxigenasa, se realizó la exploración por modelamiento de las interacciones proteínaligando con base en acoplamiento molecular, llevando a la selección de candidatos para futuros estudios.

#### ABSTRACT

Inflammation is a benefic physiologic response for tissue repair; however, uncontrolled inflammatory reactions could lead to tissue degeneration, also development of diseases such as atherosclerosis, chronic hepatitis, colitis, pulmonary fibrosis, psoriasis, and rheumathoid arthritis, since this type of processes have been considered as their basic pathogenic mechanism. Based on the available data, correlation between leukotriene production and some of previously mentioned diseases has been stablished, thus 5-lipoxigenase, a key enzime for biosynthesis of this class of mediators, becoming an important biological target.

Currently, zileuton represents the only 5-lipoxigenase inhibitor in the market; however, clinical application is limited because of its hepatotoxicity and poor pharmacokinetic profile, which requires multiple doses per day. These facts emphasize the need for searching and developing new, and more efficient, 5-lypoxigenase inhibitors for the treatment of inflammation-related diseases.

In the present work  $\delta$ -tocotrienol, a member of vitamin E capable of inhibit 5-lipoxigenase and decrease leukotriene production, was employed as starting material for the synthesis of new chemical compounds via side chain functionalization, and hybridization with scaffolds of different natural product classes with anti-inflammatory activity. Compounds obtainded by semisynthetic processes included tocotrienol derivatives with truncated or oxirane moiety inserted into side chain. Novel hybrids mixing natural product scaffolds yielded prenylated chalcone, retrochalcone, 3-phenylcoumarin, flavanone, flavone, and aurone type derivatives. In addition, susceptibility of prenylated chalcone and retrochalcone derivatives to suffer light-driven phototransformations was investigated, and the influence of solvent and substitution on these processes and their outcome are discussed.

For exploration of anti-inflammatory potential, 5-lipoxigenase inhibition was assessed based on molecular docking results of derivatives, this analysis allowed the selection of candidates for further studies.

#### INTRODUCCIÓN

La inflamación es una respuesta del tejido dañado por agentes físicos o patógenos; esta respuesta es caracterizada por enrojecimiento, tumefacción, calor y dolor (Nesaretnam y Meganathan, 2011; Male *et al.*, 2006). De forma general, el proceso inflamatorio incluye el aumento del suministro sanguíneo al área afectada y en la permeabilidad capilar, permitiendo el paso inusual de proteínas y leucocitos fuera de las vénulas para alcanzar los tejidos circundantes. Así, la respuesta del sistema inmune permite a los leucocitos, anticuerpos y moléculas complementarias del sistema, entrar a los tejidos dañados para fagocitar y destruir patógenos, reconociendo y destruyendo también células infectadas (Male *et al.*, 2006).

Normalmente, en los seres vivos, las macromoléculas, células y tejidos se encuentran en constante daño y reparación, con la continua producción de desechos, por lo que muchos tejidos envejecidos se encuentran en un estado de inflamación, aunque sin signos de infección. La homeostasis normal para la remodelación de algunos órganos reemplaza 10-15% de las células anualmente, lo que señala a la inflamación como un mecanismo adaptativo para el mantenimiento de los tejidos (Nesaretnam y Meganathan, 2011; Male *et al.*, 2006).

Actualmente se reconocen dos tipos de inflamación: aguda y crónica. La inflamación aguda se define como una respuesta transitoria benéfica a condiciones dañinas, que facilita la reparación, el recambio y la adaptación de muchos tejidos. La inflamación crónica es un proceso persistente generado mediante diversos mecanismos que eventualmente dañan elementos estructurales y celulares de los tejidos. Sin embargo, la inflamación crónica presenta similitud con el patrón molecular de la inflamación aguda (Rådmark, 2015; Male *et al.*, 2006). Aun cuando se reconoce a la inflamación como un proceso necesario para la vida, que la mayor parte de las veces es benéfica, las reacciones inflamatorias pueden ser excesivas, desencadenando inflamación crónica que generalmente lleva a la degeneración del tejido (Rådmark, 2015; Male *et al.*, 2006).

Las condiciones fisiológicas para las cuales se ha considerado la inflamación crónica como un mecanismo patogénico incluyen reacciones de hipersensibilidad a fármacos, productos tóxicos, picaduras de insectos, y enfermedades como aterosclerosis, hepatitis crónica, colitis, cirrosis, fibrosis pulmonar, psoriasis y artritis reumatoide. Esta estrecha relación justifica la existencia de numerosos fármacos, cuyo efecto es potenciar los efectos benéficos de la inflamación, controlando las secuelas negativas (Gil, 2002).
# **CAPÍTULO I**

# PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### **1.1. ANTECEDENTES**

Actualmente se reconocen dos tipos de agentes aplicables para el tratamiento de procesos inflamatorios: corticoesteroides y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (Sendrowski *et al.*, 2008). Los corticoesteroides son capaces de suprimir muchos de los eventos iniciales de la respuesta inflamatoria, inhibiendo la vasodilatación y el aumento de permeabilidad vascular, y por lo tanto la migración de leucocitos. El principal mecanismo por el cual actúan los corticoesteroides es apagando múltiples genes que codifican mediadores químicos de inflamación, e.g. citocinas, quimioquinas, moléculas de adhesión, enzimas de inflamación, receptores y proteínas (Coutinho y Chapman, 2011; Barnes, 2006).

Aun cuando los corticoesteroides han demostrado su efectividad, su uso por vía oral durante tiempos prolongados ha sido asociado con efectos secundarios severos como insuficiencia adrenal, síndrome de Cushing, ulceración péptica, osteoporosis, enfermedades metabólicas, aumento de riesgo de enfermedades cardiovasculares, debilidad o atrofia muscular, crecimiento impar, diabetes, activación de infección, cambios de humor y retraso en la curación de heridas; adicionalmente, la incidencia de estos efectos parece aumentar al incrementarse la dosis (Coutinho y Chapman, 2011; Sendrowski *et al.*, 2008). Sin embargo, el uso de dosis altas, por tiempos reducidos y en situaciones de emergencia, parece mostrar menores efectos adversos que el uso prolongado con dosis bajas (Sendrowski *et al.*, 2008).

Por su parte los AINES comprenden un grupo de fármacos desarrollados debido a las limitaciones en el uso de corticoesteroides, demostrando en algunos casos, no sólo actividad antiinflamatoria, sino también analgésica y antipirética. La actividad analgésica de los AINES se ha relacionado con su capacidad para suprimir la producción de mediadores de inflamación tipo eicosanoide (Burnett y Levy, 2012; Sendrowski *et al.*, 2008).

Se conoce como eicosanoides a los ácidos grasos poliinsaturados derivados del metabolismo de los ácidos eicosapolioicos: el ácido araquidónico (AA) y el ácido eicosapentaenoico (Bostock *et al.*, 2011). Los eicosanoides se clasifican en dos grupos: los prostanoides y los leucotrienos; los primeros se caracterizan por la ciclación parcial de la cadena, existen en todos los tejidos

de los mamíferos e incluyen a las prostaglandinas, las prostaciclinas y los tromboxanos. El segundo grupo, los leucotrienos, se caracteriza por la presencia de tres dobles enlaces conjugados, en una cadena abierta y un grupo carboxilo terminal (Joshi y Saraswat, 2004).

La síntesis de prostanoides (Figura 1.1) es catalizada por la enzima prostaglandina H sintasa, también conocida como ciclooxigenasa (COX); esta enzima puede presentarse como dos diferentes isoenzimas, COX-1 o COX-2, dependiendo del tejido en el que se encuentra. Los AINEs como la aspirina, el ibuprofeno y la indometacina son inhibidores antagonistas de COX-1 o COX-2, compitiendo con el ácido araquidónico, su sustrato natural. Sin embargo, la inhibición de COX-1 o COX-2 como estrategia para el tratamiento de la inflamación ha presentado limitaciones debido al desarrollo de efectos secundarios no deseados como daños severos en el tracto gastrointestinal y el riesgo de problemas cardiovasculares (Khanapure *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2003). Por otra parte, los leucotrienos, que son formados vía la enzima 5-lipoxigenasa (5-LOX) (Figura 1.1), exhiben potentes efectos proinflamatorios, como el aumento de permeabilidad de vasos capilares, mediado por el leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) y la quimiotaxis ejercida por el leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) (Rådmark, 2015; Gil, 2002).

Para evitar los eventos implicados en el proceso inflamatorio e inhibir o suprimir los signos de la inflamación, se ha empleado la inhibición de las enzimas responsables de la síntesis de prostanoides y los leucotrienos como una estrategia para suprimir la producción de los mediadores inflamatorios. Para el combate de la inflamación generada por leucotrienos se han desarrollado, principalmente, antagonistas de los sitios receptores de unión de leucotrienos (receptores CysLT<sub>1</sub>) que incluyen los fármacos montelukast (Singulair®, Staytal®, Pluralais®, Lukanex®), zafirlukast (Accolate®) y pranlukast (Onon®, Ultair®, Azlaire®) (Figura 1.2), aprobados únicamente para tratamiento del asma (Peters-Golden y Henderson, 2007).

Sin embargo, los medicamentos antiinflamatorios comúnmente utilizados no interfieren con la síntesis de leucotrienos; de hecho, los fármacos antiinflamatorios no esteroideos utilizados pueden aumentar la producción de leucotrienos, mientras que los corticoesteroides pueden aumentar la expresión de receptores de leucotrienos, potenciando sus efectos (Peters-Golden y Henderson, 2007).



**Figura 1.1**. Rutas de formación de mediadores inflamatorios eicosanoides, A: ruta de 5-LOX, B: ruta de COX.



**Figura 1.2**. Antiinflamatorios (antagonistas de sitios de unión de leucotrienos) aprobados para el tratamiento del asma.

El desarrollo de fármacos capaces de suprimir la producción de leucotrienos es de particular importancia, ya que además de sus efectos proinflamatorios, la producción excesiva o aberrante de estos eicosanoides contribuye a la patofisiología de enfermedades cardiovasculares, asma y cáncer (Rådmark, 2015; Steinhilber y Hofmann, 2014; Peters-Golden y Henderson, 2007). En la proliferación del cáncer los leucotrienos contribuyen a la regulación positiva de EGFR (receptor de factor de crecimiento epidérmico), mientras que, en el asma, los leucotrienos actúan uniéndose a receptores CysLT<sub>1</sub> externos de la membrana plasmática de células estructurales e inflamatorias, que median en la broncoconstricción sostenida, secreción de moco, y edema en las vías aéreas (Rådmark, 2015; Bishayee y Khuda-bukhsh, 2013; Peters-Golden y Henderson, 2007).

Con base en lo mostrado en la Figura 1.1, la inhibición de la 5-LOX es clave para suprimir la producción de los leucotrienos. Esta enzima (Figura 1.3) es usualmente descrita como una proteína monomérica, pero con la posibilidad de formación de homodímeros; en los mamíferos 5-LOX contiene 672 o 673 aminoácidos y consiste de dos dominios, un dominio N-terminal (residuos del 1-112) formado por láminas  $\beta$  y un dominio C-terminal catalítico (residuos 126-673) con estructura predominantemente helicoidal y que contiene hierro no hemo (Rådmark, 2015; Peters-Golden y Henderson, 2007). El dominio N-terminal es un sándwich  $\beta$  con bucles de unión a ligantes, compuesto de dos láminas  $\beta$  antiparalelas de cuatro hebras. El dominio catalítico, compuesto de varias hélices  $\alpha$ , se une al hierro prostético (Rådmark, 2015).



**Figura 1.3**. Estructura de la enzima 5-LOX; a) El monómero presenta un dominio terminal (amarillo) y un dominio catalítico (rosa); b) ampliación del hierro no-hemo coordinado en el dominio catalítico.

Durante la biosínteis de leucotrienos, la 5-LOX realiza dos funciones catalíticas, la inserción de oxígeno molecular la actividad dioxigenasa, formando el ácido 5por hidroperoxieicosatetraenoico (5-HpETE) por la ruptura homolitica y abstracción de hidrógeno pro-S en el carbono-7 y el rearreglo de radical, así como la formación del epóxido leucotrieno A<sub>4</sub>, por la actividad LTA<sub>4</sub> sintasa. En el mecanismo de reacción, el hierro actúa como un aceptor y donador de electrones durante la abstracción de hidrógeno y formación de peróxido (Figura 1.4), este hierro se encuentra coordinado por tres residuos de histidina (His-367, His-372, His-550) y el carboxilato del residuo isoleucina terminal (Ile-673) (Rådmark, 2015).

A la fecha se ha demostrado que la ruta de la 5-LOX tiene un papel importante en el desarrollo de enfermedades alérgicas como el asma y los desórdenes inflamatorios. Además, existe evidencia de que la ruta de 5-LOX puede estar involucrada en la tumorogénesis, especialmente en cáncer de próstata y ciertas formas de leucemia, por tanto, la inhibición de la enzima responsable resulta una interesante diana terapéutica en la obtención de fármacos para el tratamiento de estas enfermedades y la inflamación en general (Steinhilber y Hofmann, 2014).



Figura 1.4. Ciclo catalítico del hierro no-hemo presente en la enzima 5-LOX.

La mayor parte de los inhibidores de 5-LOX conocidos se unen al sitio catalítico y muestran en mayor o menor grado inhibición competitiva de la enzima. De acuerdo al modo de acción de la inhibición, es posible reconocer tres tipos de inhibidores de 5-LOX: tipo redox, ligantes de hierro y no redox (Steinhilber y Hofmann, 2014).

Los inhibidores tipo redox ocasionan la reducción del hierro en el sitio activo de la enzima en su forma ferrosa (Fe<sup>+2</sup>) inactivando la capacidad biosintética de leucotrienos de la enzima. En esta clase podemos encontrar al ácido nordihidroguaiarético, fenidona y BW-755C (Figura 1.5). La eficacia de estos no puede ser atribuida solamente a los efectos sobre la 5-lipoxigenasa, debido a que las alteraciones en estados redox pueden interactuar con otros sistemas redox biológicos, como otras oxigenasas y hemoglobina (Bäck, 2009; Peters-Golden y Brock, 2003).

Los inhibidores ligantes de hierro en general contienen la estructura *N*-hidroxilurea e inhiben la actividad enzimática quelatando el átomo de hierro del sitio activo de la enzima. En este grupo se encuentran zileuton, atreleuton y setileuton (Figura 1.6) (Bäck, 2009).

Adicionalmente, entre los inhibidores no redox desarrollados hasta ahora se encuentran el naftalenonitrilo L739,010 y el metoxitetrahidropirano ZD2138/ICID2138 (Figura 1.7) (Bäck, 2009).

Actualmente existe un número considerable de inhibidores de 5-LOX en desarrollo. En la Tabla 1.1 se enlistan los inhibidores y la etapa en la que se encuentran para su uso en las diversas enfermedades (Steinhilber y Hofmann, 2014; Bishayee y Khuda-bukhsh, 2013; Ducharme *et al.*, 2010; Tardif *et al.*, 2010; Masferrer *et al.*, 2010; Rossi *et al.*, 2010; Elmgreen *et al.*, 1989).



Ácido nordihidroguaiarético (NDGA)

Fenidona

BW-755C

Figura 1.5. Ejemplos de inhibidores de 5-LOX tipo redox.



Figura 1.6. Ejemplos de inhibidores de 5-LOX ligantes de hierro.







Figura 1.8. Inhibidores 5-LOX con mecanismos de acción no descritos.

Hasta ahora, el único fármaco aprobado como inhibidor de 5-LOX por la FDA (Food and Drug Administration) es zileuton (Figura 1.6), comercializado para el tratamiento del asma. Sin embargo, éste presenta inconvenientes como un perfil farmacocinético poco favorable con una vida media corta de 2-3 h y hepatotoxicidad, factores que limitan su uso clínico. (Steinhilber y Hofmann, 2014; Bäck, 2009; Peters-Golden y Henderson, 2007). Actualmente se ha reportado el desarrollo de ABT-761, un derivado de zileuton (Figura 1.6), con una mayor vida media de 15-18 horas, y setileuton (MK-0633) (Figura 1.6), una cumarina amino-oxazol-sustituida.

Entre los fármacos inhibidores de 5-LOX existentes (Tabla 1.1), es evidente la presencia de productos naturales, como el ácido nordihidroguaiarético (Figura 1.5), hiperforin, curcumina, baicaleina, catequina, escopolina y licopodina (Figura 1.9), asimismo, otros productos de origen semisintético con estructuras derivadas de polifenoles con capacidad antiinflamatoria como chalconas, flavonoides y cumarinas (Figura 1.10) (Reddy *et al.*, 2010; Burnett *et al.*, 2009; Detsi *et al.*, 2009; Kontogiorgis y Hadjipavlou-litina, 2005; Kim *et al.*, 2004; Babu *et al.*, 2002; Sogawa *et al.*, 1993).

Fármaco	Diana	Estado	Actividad sobre 5-LOX	
Curcumina	5-LOX	Neoplasma pancreático: Fase II	5-LOX Cl₅₀=8 μM 5-LOX RAW264.7 Cl₅₀=0.3 μM	
AA-861	5-LOX	Artritis reumatoide: Fase II	5-LOX en leucocitos polimorfonucleares de cobayo Cl₅₀=0.8 mM	
Auranofin	5-LOX/LTA sintasa	Leucemia linfocítica crónica: Fase II	5-LOX CI <sub>50</sub> = 31 μM	
Baicaleina	5-LOX/12-LOX	Osteoartritis (flavocoxid, + catequina): Fase II completada		
BW A4C BW B70C	5-LOX 5-LOX			
CDC	5-LOX, 12-LOX, 15-LOX	Adenocarcinoma: Fase I Cáncer renal: Fase II	5-LOX 1.89 μM	
Esculetina	12-LOX/síntesis de LT		Inhibe 5-LOX a 0.1-1.0 $\mu M$	
ETI	5-LOX/biosíntesis de LTC4	Voluntarios saludables: Fase I	5-LOX 25 μM	
Licopodina	5-LOX			
NDGA	5-LOX	Cáncer de próstata, tumor cerebral, tumores de SNC, neoplasia: Fase II completada	5-LOX Cl₅₀= 10 μM	
Zileuton	5-LOX/síntesis de LTB4	Cáncer de pulmón, cuello y cabeza: Fase II completada Asma: aprobado por la FDA y lanzado en 1997 Leucemia mieloide crónica (+ imatinib): Fase I	Macrófagos de ratas KO Cl <sub>50</sub> = 21.1 μM	
Tenidap	5-LOX/COX-1		Inhibicion de la producción de IL-1 Cl <sub>50</sub> =3 μM in vitro.	
Atreleuton (VIA-2291)	5-LOX	Enfermedades cardiovasculares: Fase II completada		
Setileuton	5-LOX	Asma, COPD, aterosclerosis: fase II completada	5-LOX Cl₅₀= 3.9 nM	
PF-4191834	5-LOX	Asma: Fase II completada	5-LOX CI <sub>50</sub> = 229 nM	

Tabla 1.1. Inhibidores de 5-LOX y su estado en pruebas clínicas.



Figura 1.10. Estructuras polifenólicas con actividad inhibidora de 5-LOX.

Entre los productos naturales con capacidad para inhibir la producción de leucotrienos se encuentra también la vitamina E (Figura 1.11), que ha demostrado actividad sobre 5-LOX humana recombinante aislada, así como, sobre leucocitos polimorfonucleares (Tabla 1.2) (Pein *et al.*, 2018).

La vitamina E natural consta de cuatro tocoferoles (T) y cuatro tocotrienoles (T3), en sus formas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ; estos productos, también conocidos como tococromanoles o tocoles, contienen una "cabeza" polar de grupo cromanol y una cadena lateral isoprenoide. Dependiendo del precursor poliprenílico de la cadena lateral, se puede distinguir a los tocoferoles con precursor fitilo y cadena lateral saturada, y a los tocotrienoles cuyo precursor es el geranilgeranilo con cadena tri-insaturada (Sen *et al.*, 2007).

Los tocoles son antioxidantes primarios que depuran radicales lipídicos peroxilo (ROO<sup>•</sup>) por la donación de átomos de hidrógeno y también son efectivos supresores de oxígeno singulete, reaccionan además con otras especies reactivas de oxígeno, como los radicales superóxido y oxhidrilo, que son producidas constantemente durante el metabolismo normal (Janisch *et al.*, 2005).

Los ocho tocoles en la familia de la vitamina E comparten homología estructural y por tanto eficacia antioxidante comparable. Sin embargo, algunos estudios indican que los miembros de la familia de la vitamina E poseen funciones biológicas únicas usualmente no compartidas. Se ha reportado que esto se debe a que la cadena insaturada permite la penetración más eficiente en los tejidos a través de las capas de ácidos grasos como en el cerebro y el hígado. Debido a su mejor distribución en las capas de ácidos grasos, los tocotrienoles presentan un mayor

potencial de depuración de radicales y por lo tanto un mayor poder antioxidante que los tocoferoles (Sen *et al.*, 2007). Los tocotrienoles han demostrado también actividades hipocolesterolémica, anticáncer, neuroprotectora, antidiabética, antiinflamatoria, antioxidante, inmunoestimulante, cardioprotectora, hepatoprotectora y nefroprotectora (Ahsan *et al.*, 2014; Sen *et al.*, 2007).



Figura 1.11. Vitamina E, tocoferoles y tocotrienoles.

	α–T	β <b>-</b> Τ	γ-Τ	δ-Τ	α-Τ3	β <b>-</b> Τ3	γ-T3	δ-T3
5 LOV recombinante	>1	0.75	0.91	0.31	0.33	0.19	0.20	0.17
J-LOX recombinance		(0.15)*	(0.15)	(0.10)	(0.08)	(0.03)	(0.06)	(0.10)
5 LOX on DMNI	808	57	502	85	277	95	132	60
J-LOX EII FIVINL	(159)	(2)	(199)	(5)	(90)	(5)	(33)	(15)

Tabla 1.2. Actividad inhibitoria de los vitámeros de vitamina E sobre 5-LOX.

Desviación estándar; (CI<sub>50</sub> en µM); (Pein *et al.,* 2018).

Los tocotrienoles se localizan en el endospermo de cereales como trigo, arroz y cebada, centeno, maíz, triticale, mijo y avena; en los frutos oleaginosos de cocotero, en las especies de palmas, e igualmente en semillas de especies vegetales como uva, almendra, amaranto y el achiote. En este último se observa únicamente presencia de tocotrienoles, principalmente  $\delta$ -tocotrienol, por lo que es considerado como una fuente viable para la obtención de este producto (Ahsan *et al.*, 2015; Sen *et al.*, 2007; Frega *et al.*, 1998).

En resumen, los polifenoles como las chalconas, cumarinas, flavonoides, así como las distintas formas de vitamina E, han exhibido diversidad de actividades biológicas, incluyendo actividad antioxidante, por lo que se les atribuye capacidad de depuración de radicales libres. Este hecho toma relevancia, ya que las especies reactivas de oxígeno se encuentran implicadas en los procesos inflamatorios, y la interacción de estos antioxidantes naturales con las especies

reactivas de oxigeno ha motivado estudios de sus efectos en la formación de derivados eicosanoides proinflamatorios, a partir del metabolismo del ácido araquidónico. Por lo tanto, la evidencia señala que los productos naturales y su intrincado marco ofrecen a los químicos farmacéuticos un rango de quimiotipos no enlistados para el descubrimiento de fármacos (Rodrigues *et al.*, 2016; Janisch *et al.*, 2005; O'Leary *et al.*, 2004).

Los productos naturales usualmente poseen estructuras base biológicamente relevantes y patrones de farmacóforos que han evolucionado como características preferidas para la unión proteína-ligando. En el periodo entre 1981 y 2019, 30.4% de los nuevos fármacos aprobados tuvieron su origen en estructuras de productos naturales, ya sea como derivados semisintéticos, o bien por presentar grupos farmacóforos identificados previamente de fuentes naturales. Dicho porcentaje de fármacos, demuestra que los productos naturales han sido y siguen siendo fuentes invaluables de inspiración para el diseño de fármacos efectivos. Así, los programas de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos pueden beneficiarse en gran medida de la incorporación de fragmentos derivados de productos naturales (Newman y Cragg, 2020; Rodrigues *et al.,* 2016).

Existen distintas estrategias en diseño de fármacos que incluyen el mejoramiento de compuestos conocidos con aproximaciones de química farmacéutica, y la identificación de nuevos estructuras base de interés (Steinhilber y Hofmann, 2014). En la literatura, se encuentran reportes de modificación de tocotrienoles, sin embargo, la mayor parte de ellos se centran en el mejoramiento de la biodisponibilidad, pero sólo un número reducido tiene como objetivo el mejoramiento de la actividad biológica de forma directa, siendo en este caso explorada la actividad anticancerígena.

Elnagar *et al.* (2010) desarrollaron una serie de análogos de tocotrienol redox-silentes con actividades antiproliferativas y anti-invasivas mejoradas, comparadas con el compuesto inicial ( $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -tocotrienoles). Estos análogos fueron diseñados con características carbamato y éter, con sustituyentes alifáticos, olefínicos y aromáticos (Figuras 1.12 y 1.13).

Behery *et al.* (2010) sintetizaron análogos esterificados de  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -tocotrienoles obteniendo aumentos de actividad antiproliferativa y antimigratoria de células cancerígenas, de entre estos análogos sobresale el maleato de  $\alpha$ -tocotrienol demostrando solubilidad en agua 1,000 veces mayor que el compuesto inicial, aumento en la estabilidad química, menor descomposición en plasma de rata y aumento en bioactividad inhibiendo efectivamente la proliferación (Figura 1.14).



Figura 1.12. Análogos carbamato de tocotrienoles con actividad antiproliferativa.



Figura 1.13. Análogos éter de tocotrienoles con actividad antiproliferativa.





Behery *et al.* (2013) llevaron a cabo la síntesis de 42 nuevos compuestos, generados con el objetivo de obtener análogos de  $\delta$ -tocotrienol con un anillo de benzoxazina fusionado obteniendo actividad antiproliferativa con valores de Cl<sub>50</sub> en el rango nanomolar contra líneas celulares del panel NCI-60 (Figura 1.15).



**Figura 1.15**. Análogos de  $\delta$ -tocotrienol que presentan anillo de benzoxazina fusionado con actividad antiproliferativa.

Abu-Fayyad *et al.* (2015) sintetizaron análogos polietilénglicolados de γ-tocotrienol (Figura 1.16), observando retención de la actividad citotóxica contra líneas celulares cancerígenas, y aumentando la biodisponibilidad en un factor de tres con respecto a un sistema de liberación emulsionado.



Figura 1.16. Análogos de γ-tocotrienol polietilénglicolados con mayor biodisponibilidad.

Liu *et al.* (2016) sintetizaron un análogo de vitamina E (tocoflexol) derivado de  $\delta$ -tocotrienol diseñado para exhibir un mejor perfil farmacocinético que el compuesto inicial (Figura 1.17); la síntesis fue llevada a cabo en ocho pasos utilizando como material de partida  $\delta$ -tocotrienol, con retención de la configuración en el carbono-2 y con un rendimiento general de 24%.



Figura 1.17. Estructura de tocoflexol.

Recientemente, Alsabil *et al.* (2017) lograron la síntesis de tocotrienoles *o*-formilados en posición 5 o 7 (Figura 1.18), y Viault *et al.* (2018) la síntesis de un híbrido fenazina-δ-tocotrienol (Figura 1.19) a través de la formación de una estructura de ortoquinona, ambas funcionalizaciones sobre el anillo de cromanol.



	<b>R</b> <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
7-formil-β-T3	Me	CHO
5-formil-γ-T3	CHO	Me
5-formil-δ-T3	CHO	Н
7-formil-δ-T3	Н	CHO

Figura 1.18. Tocotrienoles o-formilados.

Figura 1.19. Híbrido fenazina-δ-tocotrienol.

De acuerdo con la información anterior, en el presente trabajo se plantea la variación química de tococromanoles para la obtención de derivados, con fragmentos fusionados de estructuras de productos naturales, por medio de semisíntesis, con la finalidad de obtener nuevas estructuras con potencial para inhibir la enzima 5-lipoxigenasa y que por tanto, puedan ser útiles como alternativas de estudio posterior en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con inflamación.

Para la evaluación de actividad inhibitoria sobre 5-lipoxigenasa se han utilizado, modelos in vitro que miden la producción de LTB4 y 5-HpETE, directamente por la enzima recombiante semipurificada, o bien en leucocitos polimorfonucleares (Pein et al., 2018), y con base en este resultado es posible conocer las concetraciones inhibitorias al realizar tratamientos con diferentes compuestos de interés. Sin embargo, la evaluación del potencial de compuestos químicos sobre dianas de interés biológico no se restringe a modelos experimentales, ya que se ha reportado la predicción de diversas actividades biológicas, por medio de modelos in silico (Sisa et al., 2020; Dinh et al., 2020; UI Haq et al., 2016) Así el modelamiento molecular y también de las interacciones con diana de interés son una fuente útil de información en la prospección virtual, dichas interacciones pueden ser estudiadas por programas de acoplamiento molecular para conocer los modos de unión a proteínas.

La prospección por medio de acoplamiento molecular permite, además de conocer el modo de unión de ligandos a sitios específicos de proteinas, también, generar una clasificación de compuestos de acuerdo con la estimación de la afinidad proteína-ligando que es obtenida en forma de resultado numérico, pudiendo de este modo estudiar compuestos de con estructuras muy diversas y sin precisar de un conjunto de compuestos de entrenamiento, ya que la estimación es realizada por medio de funciones con base en campos de fuerza, datos empíricos, o bien conocimiento previo (Prieto-Martinez *et al.*, 2018; Vilar y Costanzi, 2012).

A pesar de su versatilidad, entre algunas limitantes del acoplamiento molecular se encuentran la necesidad de un modelo tridimensional de la diana de interés obtenida por cristalografía de rayos X, así como conocimiento del funcionamiento biológico de la diana (Vilar y Costanzi, 2012). En el caso de la enzima 5 lipoxigenasa, el acceso a la estructura tridimensional por medio del repositiorio RSCB Protein Data Bank, asi como un extenso, estudio del funcionamiento de esta enzima, hacen posible proponer el uso de dicha herramienta para explorar el potencial antiinflamatorio de los compuestos de interés en este trabajo.

## **1.2. JUSTIFICACIÓN**

La inflamación crónica es una respuesta fisiológica estrechamente relacionada con una variedad de enfermedades y en general con el proceso de envejecimiento. Este proceso es regulado por mediadores químicos, de los cuales los leucotrienos son de gran importancia. La biosíntesis de estos mediadores se ha relacionado directamente con enfermedades como asma, cáncer, aterosclerosis y artritis, convirtiendo a la enzima responsable de su biosíntesis, la 5-lipoxigenasa, en una diana terapéutica de gran importancia.

Actualmente se encuentra en el mercado y en desarrollo una cantidad limitada de inhibidores de la enzima 5-lipoxigenasa, presentando además serias desventajas, por lo que es relevante la búsqueda de compuestos con actividad inhibitoria de esta enzima.

Una de las estrategias para el desarrollo de fármacos es la modificación semisintética, tomando como base fragmentos de productos naturales bioactivos. Por su parte, los tocotrienoles han demostrado actividad antiinflamatoria, asimismo, se han reportado en cantidades sustanciales de fuentes naturales, por lo que la exploración del potencial inhibidor de lipoxigenasa de derivados semisintéticos representa una opción viable en la búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios, pudiendo emplear como una valiosa herramienta el acoplamiento molecular de dichos derivados sínteticos con la enzima de interés.

# **1.3. HIPÓTESIS**

La incorporación de fragmentos, inspirados en productos naturales, a la estructura de tocotrienol para la obtención de anillos heterocíclicos o cadenas laterales funcionalizadas de distinta longitud dará lugar a derivados con mayor potencial para la inhibición de la enzima 5-lipoxigenasa, en comparación con el compuesto inicial.

### **1.4. OBJETIVO GENERAL**

Preparar derivados semisintéticos de tocotrienoles y evaluar su potencial antiinflamatorio utilizando como modelo la inhibición de la enzima 5-lipoxigenasa.

## 1.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Establecer una metodología eficiente para el aislamiento de  $\delta$ -tocotrienol a partir de las semillas de la especie vegetal *Bixa orellana*.
- 2. Aplicar metodologías sintéticas disponibles para la preparación de derivados de tococromanol.
- 3. Evaluar la importancia de las modificaciones estructurales realizadas sobre el potencial para la inhibición de 5-lipoxigenasa.

## **1.6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

La estrategia experimental del presente trabajo incluye la extracción de semillas de *B. orellana*, y procesos cromatográficos sucesivos para la obtención del material de partida (Figura 1.20), así como las modificaciones a realizar sobre el material de partida.



Figura 1.20. Estrategia experimental para la obtención del material de partida.

Tomando como material de inicio el  $\delta$ -tocotrienol obtenido se proponen diversas modificaciones estructurales, que incluyen funcionalización y ruptura de la cadena lateral e inclusión de fragmentos para la formación de análogos tipo cumarina, chalcona y flavona, con potencial para inhibir la enzima 5-lipoxigenasa, a través de las metodologías de síntesis química orgánica (Figura 1.21). Se observa en la Figura 1.21 la sustitución seleccionada para los derivados tipo chalcona, flavanona y cumarina, de izquierda a derecha en orden de menor a mayor número de sustituyentes en el anillo añadido sobre la estructura de la vitamina E. La selección de sustituyentes atiende a criterios de actividad biológica, teniendo grupos metoxilo, ya que se ha observado que los compuestos que presentan anillos con metoxilos son capaces de inhibir la enzima 5-LOX, posiblemente por la interacción de carácter polar de estos grupos con estructuras específicas de la enzima. Asimismo, el anillo sin sustitución surge de la necesidad de obtener una estructura base, para la comparación en cuanto aumento o disminución de actividad inhibitoria. Por su parte, la sustitución con el heteroátomo flúor ha sido descrita como de importancia farmacéutica por considerarse un isóstero del hidrógeno, al presentar un volumen similar, pudiendo ejercer cambios en la distribución electrónica en el anillo aromático y consecuentemente modificando potencialmente su interacción con la diana (Patani y LaVoie, 1996). Además del aumento en la afinidad de derivados fluorados, también se ha documentado que esta sustitución puede mejorar características farmacocinéticas y fisicoquímicas como estabilidad metabólica y paso a través de membranas (Gomes et al., 2017; Shah y Westell,

2007). Finalmente, la introducción de ambos grupos, flúor y metoxilo, en una misma estructura resulta interesante como punto de encuentro en el cual convergen las dos influencias mencionadas.





Finalmente, para evaluar el potencial antiinflamatorio de los derivados semisintéticos del presente trabajo se propone el modelado de las interacciones proteína ligando con la enzima 5-lipoxigenasa, por medio de acoplamiento, utilizando los resultados de estimación de afinidad relativa generados y asociarlos a la inhibición por parte de los distintos ligandos.

# **CAPÍTULO II**

# **OBTENCIÓN DE δ-TOCOTRIENOL**

## 2.1. INTRODUCCIÓN

Se conoce como vitamina E a la familia de compuestos con grupo cromanol con una cadena lateral larga isoprenoide; dependiendo de la naturaleza de la cadena lateral, se pueden distinguir a los tocoferoles y tocotrienoles (Sen *et al.*, 2007).

Todos los tocoles exhiben actividad antioxidante mediante la donación de átomos de hidrógeno y se localizan en el endospermo de las semillas de cereales como trigo, arroz, cebada y avena, y en otras, como las semillas de uva y almendras, y en especies de palmas (Janisch *et al.*, 2005).

Una de las especies reconocida por presentar un contenido particularmente alto de tocotrienoles es la palma *Elaeis guineensis*, siendo el contenido mayor a los 800 mg/kg en el aceite crudo extraído de los frutos, presentando predominantemente las formas  $\gamma$  y  $\alpha$  (Ahsan *et al.*, 2015).

Debido a su similitud estructural, los tocotrienoles y tocoferoles pueden ser difíciles de separar (Tan y Foley, 2002), sin embargo, existe otra especie vegetal que contiene únicamente tocotrienoles, *Bixa orellana*, conocida como achiote o annato. En las semillas de esta especie la vitamina E se encuentra principalmente como  $\delta$ -tocotrienol, y el contenido general de tocotrienoles oscila en el rango de 140-147 mg/100 g de semillas secas, por lo cual representan una opción viable para el aislamiento de tocotrienoles (Frega *et al.*, 1998).

El achiote o annato (*Bixa orellana*) es un arbusto nativo de América tropical, y que es apreciado como condimento y una fuente clave de pigementos naturales, utilizados en la industria alimentaria, cosmética y textil. Se ha reportado que América Latina provee cerca del 60% de la producción global de achiote, siendo Perú, Brazil y México los países con mayor producción (Gómez-Linton *et al.*, 2021).

Para la extracción de tococromanoles presentes en las semillas de achiote se han empleado y comparado diversos métodos que incluyen extracciones clásicas por maceración y soxhlet, así

como asistidas por ultrasonido, destilación de subproductos oleosos y el empleo de fluidos supercríticos directo sobre semillas.

En el trabajo realizado por Gómez-Linton *et al.* (2021) se comparó un ciclo de maceración con diclorometano, extracción con aparato soxhlet con diclorometano, sonicación con lactato de etilo, sonicación pulsada con acetato de isopropilo y también sonicación continua, encontrando, que si bien el uso de una extracción asistida por ultrasonido hacía posible obtener mejores extracciones al compararse con la maceración probada, la extracción exhaustiva con aparato soxhlet lograba extracciones similares a las logradas por sonicación.

Se ha descrito que las semillas de *B. orellana* contienen además geranilgeraniol, y debido a esto se ha reportado una metodología para la separación de geranilgeraniol y tocotrienol por destialción, a partir de una disolución aceitosa formada como subproducto posterior a la remoción de los colorantes de anatto por extracción en medio básico (Tan y Foley, 2002). Para lograr esto, es necesario como paso inicial, remover posibles residuos de agua en un evaporador rotatorio, posteriormente añadir aceite de salvado de arroz hasta obtener un contenido de 10% de este último en la disolución y proceder a la destilación, empleando temperaturas desde los 115° C hasta los 200° C para finalmente obtener distintas fracciones con diferentes composiciones, poseyendo las obtenidas a menores temperaturas mayormente geranilgeraniol y las obtenidas alrededor de 200° C mayores porcentajes de tocotrienol.

En el trabajo realizado por Vardanega *et al.* (2019) empleando CO<sub>2</sub> supercrítico, logró la extracción de tocotrienoles y geranilgeraniol a partir de las semillas completas de *B. orellana*, en un proceso de dos pasos de forma secuencial, utilizando como primer paso CO<sub>2</sub> de baja densidad (10 MPa, 60° C, 290 kg/m<sup>3</sup>) y posteriormente de mayor densidad (20 MPa, 40° C, 840 kg/m<sup>3</sup>) generando dos fracciones una rica en geranilgeraniol (408 mg de geranilgeraniol y 44 mg de tocotrienol por gramo de extracto) y la segunda rica en tocotrienoles (132 mg de geranilgeraniol y 226 mg de tocotrienol por gramo de extracto).

## 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.2.1. Prospección y monitoreo de compuestos presentes con actividad antioxidante

El monitoreo de las fracciones con análogos de vitamina E se realizó por cromatografía en capa delgada (CCD) utilizando los reveladores: ácido fosfomolíbdico, KMnO<sub>4</sub> básico, y una disolución del radical difenilpicrilhidrazilo (DPPH) al 0.2% en EtOH absoluto.

## 2.2.2. Análisis por resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-<sup>1</sup>H) se obtuvieron en un espectrómetro Varian/Agilent Premium Compact 600, con sonda de 5 mm, o un espectrómetro JEOL 400HY, utilizando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>), marca Aldrich. Los desplazamientos químicos se proporcionan en partes por millón (ppm) y referidos a los protones residuales del disolvente deuterado.

## 2.2.3. Obtención de extracto BOD

En total, 955.2 g de semillas de *B. orellana* se maceraron con 3 L de diclorometano  $(CH_2CI_2)$  durante 48 h y posteriormente se filtró para retener las semillas. El extracto se concentró en un evaporador rotatorio y se recuperó el disolvente, realizando seis ciclos de extracción, obteniendo 76.1 g de extracto crudo.

Con un proceso similar al anterior se procesaron 4 kg de semillas, macerando cada 2 kg con 3 L de  $CH_2CI_2$ , realizando seis ciclos, y obteniendo en total 342.8 g de extracto crudo.

## 2.2.4. Fraccionamiento primario general

Cada extracto crudo se sometió a fraccionamiento por cromatografía líquida a vacío CLV con  $CH_2CI_2$ , obteniendo para el extracto de 76.1 g, 18.4 g de una fracción rica en vitamina E, y para el extracto de 342.8 g, 149.0 g de fracción enriquecida.

## 2.2.5. Fraccionamiento secundario A

La fracción obtenida a partir de 1 kg de semilla (18.4 g) se fraccionó en porciones de aproximadamente 3 g, por columna de exclusión en gel por sephadex LH-20 con la mezcla  $Hx/CH_2Cl_2/MeOH$  (20:20:1). Luego de reunir las fracciones análogas, se obtuvieron 2.5 g de una fracción enriquecida con  $\delta$ -tocotrienol (vitámero mayoritario). Finalmente, purificando el compuesto por medio de cromatografía en columna y eluyendo con  $CH_2Cl_2$ , se obtuvo 1.7 g de  $\delta$ -tocotrienol puro.

## 2.2.6. Fraccionamiento secundario B

La fracción obtenida a partir de 4 kg de semilla (149.0 g) fue resuspendida en  $CH_2CI_2$  y filtrada a través de celita 545, removiendo posteriormente el disolvente.

Unos 25 g de la fracción obtenida fueron mezclados con 30 g de gel de sílice, empacando la mezcla en una precolumna plástica para su separación. La separación se llevó a cabo por medio de un aparato de separación cromatográfico CombiFlash, utilizando una columna de gel de sílice de 330 g, flujo 120 mL/min, presión máxima de 200 psi con los disolventes A: ciclohexano y B: ciclohexano/AcOEt (7:2), iniciando con 100% A y llevando a los 7 min hasta 25% B, manteniendo esta mezcla hasta 35 min; la detección se realizó a 254 y 295 nm, y la recolección se inició a los 12 min.

Las fracciones obtenidas fueron analizadas por cromatografía en capa delgada, utilizando como agente revelador KMnO<sub>4</sub>, obteniendo una fracción de 3 g con  $\delta$ -tocotrienol.

#### <u>δ-tocotrienol</u>

#### Aceite amarillo pálido

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz,)  $\delta$ : 6.50 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 6.40 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 5.17 (m, 3H), 5.04 (br, OH), 2.77-2.65 (m, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.13-2.05 (m, 6H), 1.98-1.94 (m, 4H), 1.85-1.72 (m, 2H), 1.71 (s, 3H), 1.63 (s, 6H), 1.62 (s, 3H), 1.62-1.50 (m, 2H), 1.29 (s, 3H).

#### 2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El monitoreo de la extracción de semillas permitió determinar que después de la sexta extracción la cantidad de compuestos con actividad antioxidante frente a DPPH, es indetectable al realizar el revelado.

Como resultado de los fraccionamientos sucesivos, y con ayuda del monitoreo de actividad antioxidante se logró el aislamiento del componente principal con actividad antioxidante presente en las semillas de *B. orellana*, mediante dos distintos procedimientos de fraccionamiento (Figura 2.1).

En el espectro de RMN-1H del compuesto obtenido por medio del fraccionamiento secundario A, se observan cinco señales singuletes correspondientes a seis metilos, una a  $\delta$  1.29 generada por un metilo unido a un carbono sp<sup>3</sup>, tres señales a  $\delta$  1.62, 1.63 y 1.71 correspondientes a cuatro metilos unidos a carbonos sp<sup>2</sup>, y la última a  $\delta$  2.15 característica de metilos unidos a anillos aromáticos. Asimismo, presenta una señal múltiple a  $\delta$  5.17 generada por tres hidrógenos vinílicos, y dos señales dobles de protones aromáticos a  $\delta$  6.40 y 6.50 con constante de acoplamiento de 3.0 Hz, característica de hidrógenos en posición para en anillos de benceno tetrasustituidos.



**Figura 2.1**. Diagrama de obtención de  $\delta$ -tocotrienol a partir de semillas de *B. orellana*, empleando dos fraccionamientos secundarios diferentes.

Comparando los datos espectroscópicos con los reportados en la literatura, (Ohnmacht *et al.*, 2008), se logró la identificación del compuesto como  $\delta$ -tocotrienol, siendo el mismo aislado mediante el fraccionamiento B. Este hecho es consistente con la literatura, ya que para *B. orellana* se reporta la presencia exclusiva de tocotrienoles, y predominantemente  $\delta$ -tocotrienol.

En ambos casos, procesos de separación A y B, se obtienen cantidades que superan los estimados del contenido de  $\delta$ -tocotrienol en semillas de *B. orellana* reportados en la literatura, 147 mg por cada 100 g de semillas secas (Frega *et al.*, 1998), obteniendo variación en la

cantidad obtenida, pudiendo ser debida al distinto momento de obtención del material vegetal, e igualmente dejando de lado el grado de pureza de la fracción obtenida por el método B.

Ambas fracciones pueden ser utilizadas tal como se obtienen con distintos fines. Con base en reportes de que los compuestos presentes en las semillas de *B. orellana*, además de los tocotrienoles, apocarotenoides y terpenos lineales (Jondiko y Pattenden, 1989), poseen características estructurales que coinciden con la reactividad de la cadena lateral (cadenas con múltiples dobles enlaces), se propone el uso del material obtenido por el método B para las modificaciones sobre el anillo de cromanol, siendo posteriormente purificados con mayor facilidad, mientras que el material obtenido por el método A sea utilizado para las modificaciones sobre la cadena lateral, por la posibilidad de obtener una amplia variedad de productos del material de partida, lo que dificultaría en gran medida su separación.

### 2.4. CONCLUSIONES

A partir de semillas completas de *B. orellana*, se establecieron dos metodologías para el aislamiento y purificación de  $\delta$ -tocotrienol, que pueden ser utilizados con distintos fines según el tipo y abundancia de impurezas que presentan. Asimismo, ambas metodologías permiten una recuperación adecuada de  $\delta$ -tocotrienol, de acuerdo con el contenido reportado en las semillas de la especie vegetal seleccionada.

# **CAPÍTULO III**

# TRANSFORMACIONES FOTOQUÍMICAS DE HÍBRIDOS CHALCONA-VITAMINA E

# 3.1. INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Manuscrito "Photochemical transformations of chalcone-vitamin E hybrids" publicado en la revista *Journal of the Mexican Chemical Society* (*J. Mex. Chem. Soc.* 2022, 66(1), 120-129, DOI: http://dx.doi.org/10.29356/jmcs.v66i1.1670).

Autores: Jimmy Josué Ceballos-Cruz, Jean-Jacques Hélesbeux, Guillaume Viault Denis Séraphin, Gumersindo Mirón-Lopez, Rubén M. Carballo, Pascal Richomme, Luis Manuel Peña-Rodriguez.

## 3.2. PHOTOCHEMICAL TRANSFORMATIONS OF CHALCONE-VITAMIN E HYBRIDS.

## 3.2.1. Abstract

Chalcone-vitamin E hybrids 6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy-&tocopherol-chalcone (1), 3,4,5trimethoxy-&tocopherol-chalcone (2), 6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy-&tocopherol-retrochalcone (3) and 3,4,5-trimethoxy-&tocopherol-retrochalcone (4) were synthesized as part of a search for new biological activities in these types of derivatives. We report herein on the photoisomerization products of hybrids 1-4, and the effects of the solvent and substitution patterns in producing secondary products such as flavanone 6, 3-deoxyanthocyanidin 8, and hemiketal 10. Photochemically-induced changes are considered important since structural modifications and/or the presence of additional products can affect the biological activity of this type of semisynthetic hybrids.

## 3.2.2. Resumen

Los híbridos de chalcona-vitamina E, 6'-O-tosil-3,4,5-trimetoxi- $\delta$ -tocoferol-chalcona (1), 3,4,5trimetoxi- $\delta$ -tocoferol-chalcona (2), 6'-O-tosil-3,4,5-trimetoxi- $\delta$ -tocoferol-retrochalcona (3) y 3,4,5trimetoxi- $\delta$ -tocoferol-retrochalcona (4), fueron sintetizados como parte de la búsqueda de nuevos perfiles de actividad biológica para este tipo de derivados. En este trabajo reportamos los productos de fotoisomerización de los híbridos 1-4, y los efectos del disolvente, así como de distintos patrones de sustitución en la generación de productos secundarios como la flavanona **6**, la 3-deoxiantocianidina **8**, y el hemicetal **10**. Los cambios fotoinducidos son considerados de gran importancia debido a que la modificación en la estructura y/o la presencia de productos adicionales puede afectar la actividad biológica de este tipo de híbridos semisintéticos.

### 3.2.3. Introduction

Vitamin E is a group of phytochemicals comprising two major classes, tocopherols and tocotrienols, which share a common chroman-6-ol ring bearing a geranylgeranyl side chain in tocotrienols, and a fully saturated polypropenyl side chain in tocopherols (Wong *et al.*, 2015). Both are naturally occurring metabolites found in fruits, vegetables, nuts and edible oils, with tocotrienols having a more restricted distribution (Khor et al., 2021; Jiang, 2014). All vitamin E isoforms are potent antioxidants and exhibit antiinflammatory effects. Mechanistic studies have demonstrated that the antiinflammatory activity *in vitro* and *in vivo* assays occurs through inhibition of ciclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase (Harlan *et al.*, 2020), and suppression of signaling pathways of inflammatory mediators NF-kb and JAK-STAT6 and JAK-STAT3 (Reiter *et al.*, 2007). Currently, inflammatory-related diseases are recognized as a major cause of morbidity in humans; since the inflammatory process can contribute to the development more severe health problems such as cancer (Reiter *et al.*, 2007), development of anti-inflammatory drugs is an important subject for medicinal chemistry.

Chalcones are a group of secondary metabolites found in fruits and vegetables, characterized by a propenone core linking two phenyl rings (Shaik *et al.*, 2020). Because of their diverse biological activities, which include antimicrobial, anticancer, antitumor, antioxidant, antihyperglycemic and anti-inflammatory, the chalcone skeleton is considered a privileged scaffold with potential in medicinal chemistry (Zhuang *et al.*, 2017). Recently, prenylated chalcones, and specifically pyranochalcones, have been investigated for their pharmacological properties, particularly a potent anti-inflammatory activity (Damodar *et al.*, 2016). In view of this, the combination of two well-known precursors known for their anti-inflammatory activity, i.e. a chalcone and vitamin E, to produce a new class of pyranochalcones, represents a useful strategy for the preparation of new hybrids with an improved anti-inflammatory activity. To date, the only report dealing with the preparation of similar chalcone-vitamin E hybrids describes the applicability of a synthetic method, without evaluating their biological activity (Narender y Papi Reddy, 2007).

Recently, as part of a project dealing with the search for new biological activities in chalconevitamin E hybrids we observed a photoisomerization of the propenone moiety in the reaction products. Since spatial arrangement is of great importance in the interaction of drugs with biological targets, careful attention should be paid to changes in the torsion angles of the bonds in the propenone moiety of the chalcone core which can occur as a result of *E-Z* photoisomerization (Nicodem y Matos, 1981). Furthermore, the many potential uses for chalcones in technology (Sidharth *et al.*, 2014) and medicine (Maldonado *et al.*, 2018), makes the possibility of phototransformation a major concern. Recent studies on the photoirradiation of chalcones and anthocyanins have contributed to the understanding of the network of chemical reactions that can occur in different reaction media (Leydet *et al.*, 2013; Pina *et al.*, 2012a), revealing that equilibrium in aqueous medium can lead to new skeletons depending on pH, light, and substitution patterns (Leydet *et al.*, 2013). We wish to report herein on the conditions favoring the photoisomerization of the propenone moiety in chalcone-vitamin E hybrids as well as on the structure of a number of secondary products obtained under these conditions.



**Figure 3.1.** Structures of synthesized chalcone and retrochalcone-vitamin E hybrids: (*E*)-6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (1), (*E*)-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherolchalcone (2), (*E*)-6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-retrochalcone (3) and (*E*)-3,4,5trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-retrochalcone (4).

## 3.2.4. Experimental

All solutions were freshly prepared and samples were protected from light before their analysis. Direct sunlight was used as irradiation source in photoreactive processes.

## NMR spectrometry

<sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance or JEOL HY 400 MHz NMR spectrometers, using the specified deuterated solvents and their corresponding residual solvent

signals as internal reference. For monitoring, spectra were recorded at reported irradiation times using 4 mg mL<sup>-1</sup> solutions for each analog.

#### UV-visible spectroscopy

UV-visible spectra (200-800 nm) of **3** were recorded on an Agilent Cary 60 UV-Vis spectrophotometer using the specified solvent and spectra recorded at the specified irradiation times.

#### Synthetic procedures

(*E*)-6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (1) and (*E*)-6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-*retro*chalcone (3)

In a 50 mL round bottom flask, 5-acetyl-6-*O*-tosyl- $\delta$ -tocopherol or 5-formyl-6-*O*-tosyl- $\delta$ -tocopherol (0.36 mmol) was dissolved with ethanol (10 mL). A solution of 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde or 3',4',5'-trimethoxyacetophenone (0.37 mmol, 1 equiv.) in ethanol (5 mL), and lithium hydroxide (1.40 mmol, 3.9 equiv.) was added and the reaction mixture was allowed to stir at room temperature (25 °C), until TLC showed the presence of the chalcone as the major product (cerium ammonium molybdate was used as stain). The reaction was quenched by adding 1M HCl (5 mL) until a color change from orange to yellow was observed; water was then added (10 mL) and the aqueous mixture was extracted three times with methylene chloride (15 mL). The combined organic fractions were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and the solvent removed under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography eluting with a mixture of n-hexane and ethyl acetate 9:1 v/v, to yield **1** or **3**.

(*E*)-6'-*O*-tosyl-3,4,5-trimethoxy-δ-tocopherol-chalcone (1). (48% yield) Pale yellow oil  $R_f = 0.34$  (hexane-ethylacetate 8:2); <sup>1</sup>H NMR (acetone- $d_6$ , 400 MHz) δ 7.66 (2H, d, J = 8.2 Hz), 7.32 (2H, d, J = 8.2 Hz), 7.12 (1H, d, J = 16.1 Hz), 7.01 (1H, s), 6.96 (2H, s), 6.81 (1H, d, J = 16.1 Hz), 3.88 (6H, s), 3.78 (3H, s), 2.57 (2H, dt, J = 7.8, 4.0 Hz), 2.30 (3H, s), 2.18 (3H, s), 1.84 – 1.68 (2H, m), 1.63 – 1.56 (2H, m), 1.55 – 1.49 (2H, m), 1.49 – 1.29 (10H, m), 1.28 (3H, s), 1.27 – 1.21 (2H, m), 1.19 – 1.06 (8H, m), 0.87 (6H, d, J = 6.7 Hz), 0.86 (3H, d, J = 6.7 Hz); <sup>13</sup>C NMR (acetone- $d_6$ , 100 MHz) δ 193.7, 154.8 (2C), 151.5, 146.9, 146.6, 141.7, 139.3, 134.0, 132.4, 131.1, 130.9 (2C), 129.4, 129.2 (2C), 127.8, 122.8, 120.2, 107.1 (2C), 77.4, 60.8, 56.7 (2C),

40.7, 40.2, 38.3 (2C), 38.1, 38.1, 33.6, 33.5, 31.1, 28.8, 25.6, 25.2, 24.5, 23.1, 23.0, 21.7, 21.6, 21.1, 20.2, 20.2, 16.6.

<u>(*E*)-6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-*retro*chalcone (3).</u> (50 % yield) Pale yellow oil  $R_{r}$ =0.37 (hexane-ethylacetate 8:2); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  7.63 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.58 (1H, d, J = 15.9 Hz), 7.48 (1H, d, J = 15.9 Hz), 7.33 (2H, s), 7.18 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.84 (1H, s), 3.97 (6H, s), 3.95 (3H, s), 2.74 (2H, t, J = 6.7 Hz), 2.37 (3H, s), 2.13 (3H, d, J = 0.7 Hz), 1.87 – 1.70 (2H, m), 1.54 – 1.48 (2H, m), 1.45 – 1.26 (9H, m), 1.25 (3H, s), 1.23 – 1.00 (10H, m), 0.86 (9H, d, J = 6.7 Hz), 0.84 (3H, d, J = 6.7 Hz); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  189.0, 153.4 (2C), 151.0, 145.5, 142.6, 140.4, 136.6, 133.5, 133.1, 129.7 (2C), 129.4, 128.7 (2C), 127.7, 125.8, 122.8, 121.5, 106.3 (2C), 76.0, 61.1, 56.5 (2C), 40.0, 39.5, 37.6 (3C), 37.4, 32.9, 32.8, 30.8, 28.1, 24.9, 24.6, 24.0, 22.8, 22.7, 21.8, 21.2, 21.1, 19.9, 19.8, 16.5.

(*E*)-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (**2**) and (*E*)-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherolretrochalcone (**4**)

In a 50 mL round bottom flask, a suspension of 3,4,5-trimethoxy-6'-*O*-tosyl- $\delta$ -tocopherolchalcone (1) or 3,4,5-trimethoxy-6-*O*-tosyl- $\delta$ -tocopherol-*retro*chalcone (3) (0.17 mmol) in MeOH (10 mL) was refluxed for 5 minutes until complete dissolution. A methanolic solution (5 mL) of NaOH 2M was added and reflux continued until complete consumption of the starting material was observed by TLC. The reaction was quenched with 1M HCl aqueous solution (15 mL) until a color change from red to yellow was observed; the resulting mixture was diluted with water (10 mL) and extracted three times with methylene chloride (20 mL). The combined organic fractions were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and after removing the solvent under reduced pressure, the crude reaction product was purified by flash chromatography, eluting with a mixture of *n*-hexane and ethyl acetate 9:1 v/v, to produce 2 or 4.

<u>(*E*)-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone</u> (2). (43 % yield) Orange oil *R*=0.34 (hexaneethylacetate 8:2); <sup>1</sup>H NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  8.65 (1H, s), 7.39 (1H, d, *J* = 16.0 Hz), 7.11 (1H, d, *J* = 16.0 Hz), 7.03 (2H, s), 6.64 (1H, s), 3.88 (6H, s), 3.76 (3H, s), 2.70 (2H, t, *J* = 6.8 Hz), 2.14 (3H, s), 1.81 – 1.67 (2H, m), 1.63 – 1.56 (2H, m), 1.55 – 1.48 (2H, m), 1.47 – 1.28 (10H, m), 1.27 (3H, s), 1.20 – 1.03 (7H, m), 0.88 (3H, d, *J* = 6.7 Hz), 0.87 (6H, d, *J* = 6.7 Hz), 0.86 (3H, d, *J* = 6.7 Hz); <sup>13</sup>C NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  196.9, 154.7 (2C), 149.7, 146.2, 144.7, 141.4, 131.5, 130.8, 128.8, 124.9, 119.8, 117.5, 106.9 (2C), 76.1, 60.7, 56.6 (2C), 40.6, 40.2, 38.3, 38.2, 38.1, 38.1, 33.6, 33.5, 31.9, 28.7, 25.6, 25.2, 24.5, 23.1, 23.0, 21.9, 21.7, 20.2, 20.1, 16.8.

<u>(*E*)-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-*retro*chalcone (**4**).</u> (55 % yield) Yellow gum *R*=0.20 (hexaneethylacetate 8:2); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  7.96 (1H, d, *J* = 15.7 Hz), 7.79 (1H, d, *J* = 15.7 Hz), 7.29 (2H, d, *J* = 0.9 Hz), 6.57 (1H, s), 3.93 (9H, s), 2.85 (2H, t, *J* = 6.8 Hz), 2.16 (3H, s), 1.81 (2H, m), 1.53 – 1.47 (2H, m), 1.43 – 1.27 (9H, m), 1.25 (3H, s), 1.20 – 1.00 (10H, m), 0.86 (6H, d, *J* = 6.7 Hz), 0.85 (3H, d, *J* = 6.1 Hz), 0.83 (3H, d, *J* = 6.5 Hz); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  190.7, 153.2 (2C), 149.1, 146.2, 142.4, 139.1, 134.0, 130.7, 125.3, 121.4, 118.1, 116.8, 106.3 (2C), 75.0, 61.1, 56.4 (2C), 39.8, 39.5, 37.6 (3C), 37.4, 32.9, 32.8, 31.3, 28.1, 24.9, 24.6, 23.8, 22.8, 22.7, 21.3, 21.1, 19.9, 19.8, 16.6.

#### 3.2.5. Results and discussion

During the synthesis of the chalcone and retrochalcone-vitamin E hybrids **1-4** (Fig. 3.1), the <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the purified protected *E* chalcone **1** showed, in addition to the vinylic proton signals at  $\delta 6.81$  (d, J = 16.1 Hz, H $\alpha$ ) and  $\delta 7.12$  (d, J = 16.1 Hz, H $\beta$ ), the presence of a new set of signals at  $\delta 6.28$  (d, J = 12.8 Hz, H $\alpha$ ) and  $\delta 6.84$  (d, J = 12.8 Hz, H $\beta$ ), which appeared over time. This suggested the possibility of an isomerization of the propenone moiety to produce the corresponding *Z* (s-*cis*) isomer **5**. The fact that these changes were observed only when solutions of **1** in deuterated chloroform or acetone-d<sub>6</sub> were exposed to sunlight (Fig. 3.2), and the absence of this new set of signals when similar samples were kept in the dark, confirmed that the changes were due to a photoisomerization process and ruled out the possibility of impurities present in the solvent being responsible for the changes.

Since photoisomerization of the propenone moiety in chalcones has been previously reported (Maldonado *et al.*, 2018; Sidharth *et al.*, 2014; Leydet *et al.*, 2013; Iwata *et al.*, 1997; Nicodem y Matos, 1981), the potential photoisomerization of the chalcone-vitamin E hybrids **1** and **2**, together with that of the corresponding retrochalcone hybrids **3** and **4**, was studied theoretically using computational chemistry methods. Energetic calculations on the change of the torsion angle of the carbon-carbon double bond in the propenone moiety showed that the two pairs of *E* chalcone/retrochalcone hybrids follow a path that goes from the excited triplet state ( $T_1$ ), passing through a conical intersection to get to the singlet state ( $S_0$ ), to yield the corresponding *Z* isomer (Fig. 3.3). Since the calculated energy required to excite *E* chalcones **1–4** from the singlet to the triplet state is between 2.31 - 2.71 eV, and the fact that this amount of energy can

be readily supplied by a photon of visible light (Yadav, 2005), the photoisomerization of these four hybrids is expected to occur based on theoretical calculations.



**Figure 3.2.** Chalcone and retrochalcone-vitamin E hybrids **1-4** and their photoisomerization products. (*Z*)-6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (**5**), 3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-flavanone (**6**), (*Z*)-6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-retrochalcone (**7**), 3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-3-deoxyanthocyanidin (**8**), (*Z*)-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-retrochalcone (**9**) and 3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-3-deoxyanthocyanidin hemiketal (**10**).



**Figure 3.3.** Theoretical energy diagrams of the photoisomerization of the two pairs of *E* chalcone/retrochalcone hybdrids. A) tosyloxy-chalcone (1), B) hydroxy-chalcone (2), C) tosyloxy-*retro*chalcone (3), D) hydroxy-*retro*chalcone (4). Singlet state  $\bigcirc$ ; triplet state  $\blacktriangle$ ; suggested path for *E*-*Z* isomerization  $\blacksquare$ .

To demonstrate that this process was responsible for the observed changes, <sup>1</sup>H-NMR data was obtained during a time-course study in which samples of each hybrid (1-4), dissolved in either deuterated chloroform or acetone-d<sub>6</sub>, were exposed to sunlight for different periods of time (Fig. 3.1S-3.8S). Samples of the protected chalcone **1** dissolved in deuterated chloroform or acetone-d<sub>6</sub> showed evidence of a light-induced *E-Z* isomerization by the presence of two AB spin systems corresponding to the  $\alpha$  and  $\beta$  protons of the propenone moiety of each isomer (Fig. 3.4). The photoisomerization of **1** reached equilibrium after 5 min, showing a slightly higher proportion for *Z* isomer (**5**) formation in the sample prepared in acetone-d<sub>6</sub> (Fig. 3.9S). However, when a solution of the unprotected chalcone **2** in deuterated chloroform was exposed to sunlight, no photoisomerization appeared to take place as indicated by the <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the sample. Alternatively, sunlight exposure of an acetone-d<sub>6</sub> solution of **2** for one hour led to flavanone **6**, identified by the absence of the signals for the vinylic protons in its <sup>1</sup>H-NMR spectrum and the presence of the characteristic signals corresponding to H-2 ( $\delta$  5.39, dd, *J*= 13.4, 2.9 Hz) and H-3 ( $\delta$  3.06, dd, *J*= 16.4, 13.3 Hz;  $\delta$  2.73, dd, *J*= 16.4, 2.9 Hz) of the flavanone's C-ring [Fig. 3.3S(e)].

Even though the photoreactivity of *E*-chalcones **1** and **2** coincides with that previously described for simpler chalcone analogs (Norikane *et al.*, 2002), the experimental results showed that this reaction does not take place in deuterated chloroform, and that the flavanone **6** is obtained in acetone- $d_6$  instead of the expected *Z* chalcone. Similar cyclizations of simpler chalcone analogs of **2** leading to flavanone-type structures have been previously reported (Norikane *et al.*, 2002; Matsushima y Kageyama, 1985); in these cases, formation of a six-membered tautomeric intermediate by means of an intramolecular hydrogen bond, between the carbonyl and the unprotected *peri*-hydroxyl group, reportedly favors the cyclization of the unprotected *E*-chalcone **2** rather than the expected *Z*-isomerization (Norikane *et al.*, 2003; Norikane *et al.*, 2002). The inability of the *E*-chalcone **2** to form the flavanone **6** in deuterated chloroform under similar irradiation conditions, suggests that formation of the six-membered intermediate in this solvent is not favored.



**Figure 3.4.** <sup>1</sup>H-NMR spectrum (400 MHz, acetone- $d_6$ ) of **1** after sunlight irradiation (t = 20 min): *E* (s-*trans*) isomer  $\square$ , *Z* (s-*cis*) isomer  $\blacksquare$ .

Alternatively, sunlight exposure of both *E*-retrochalcone-hybrids **3** and **4** in deuterated chloroform and acetone- $d_6$  produced the expected photoisomerization products **7** and **9**, respectively; additionally, cyclization products 3-deoxyanthocyanidin **8** and the hemiketal derivative **10** were also observed, with the latter identified on the basis of the characteristic H-3 and H-4 signals (George *et al.*, 1999) at  $\delta$  5.86 (d, *J*= 9.8 Hz) and  $\delta$  6.78 (d, *J*= 9.8 Hz), respectively [Fig. 3.7S(d)]. The cyclization product **8** was identified on the basis of a new set of signals appearing at  $\delta$  9.29 (d, *J* = 9.1 Hz) and  $\delta$  9.66 (d, *J* = 9.2 Hz), which could be assigned to H-4 and H-3 of a flavylium system (Figures 3.6S and 3.10S), respectively (Devia *et al.*, 2002).
In addition to **7** and **8**, the <sup>1</sup>H-NMR of the crude photoisomerization reaction product from **3** showed weak signals at  $\delta$  4.96 and  $\delta$  4.71, suggesting the formation of a dimeric derivative bearing a cyclobutane core (Zhang *et al.*, 2013b). Even though similar dimers have been previously isolated from chalcone-rich sources, the limited number of examples, and the low yields in which they are obtained, indicate that formation of these type of products is not favored (Menezes y Diederich, 2019; Aljančić *et al.*, 2014; Pina *et al.*, 2012b).

The formation of 3-deoxyanthocyanidin (8) could be detected by the presence of a band at 500 nm, characteristic of flavylium-type skeletons (Kalchevski *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2013b), when using UV-vis spectroscopy to monitor the effect of sunlight irradiation on solutions of **3** in chloroform or acetone (Fig. 3.11S). These results, together with the development of a red pigmentation during sunlight irradiation of **3**, confirmed the identification of **8**. Although flavylium salts such as **8** are not expected to be stable in chloroform or acetone, its formation and stability could be explained on the basis of the amphiphilic properties of **8**, since its positively-charged "head" and its lipophilic "tail" could produce reverse micelle-type structures that encapsulate humidity in the medium (Fig. 3.12S) (Correa *et al.*, 2012; Mulinacci *et al.*, 2001).

The presence of different photoisomerization products during the irradiation of **3** indicates that their formation depends on the solvent used, with faster maxima on the production of both the *Z* isomer **7** and the 3-deoxyanthocyanidin **8** obtained in deuterated chloroform (Fig. 3.5). The favored formation of **8** in chloroform can be explained by the heterogeneity of the chloroform-water mixture which stabilizes micellar structures. Alternatively, the more hydrophilic acetone favors solubility and dispersion of the 3-deoxyanthocyanidin **8**, which in turn reduces aggregation and, consequently, stability (Sakhawat y Ejaz-ur-Rehman, 1987; Ionescu y De Fávere, 1982).

Finally, unlike the unprotected *E*-chalcone **2**, the unprotected *E*-retrochalcone **4** did produce the expected photoisomerization product **9**, together with the hemiketal derivative **10**, when exposed to sunlight in both deuterated chloroform and acetone- $d_6$ . In this case, the relative positions of the unprotected phenolic group and the conjugated carbonyl group in **4** prevented the cyclization to produce a flavanone-type product (Kalchevski *et al.*, 2018). The formation of hemiketal **10** during the photoisomerization of **4**, confirms that photoreactivity of chalcones can promote a complex equilibrium network to produce different derivatives (Basílio y Pina, 2016; Pina *et al.*, 2012b).



**Figure 3.5.** Formation of photoisomerization products during light irradiation of *E*-retrochalcone **3** in acetone- $d_6$  (A); and in deuterated chloroform (B): *E*-retrochalcone **3**  $\bigcirc$ , *Z*-retrochalcone **7**  $\blacktriangle$ , 3-deoxyanthocyanidin **8**  $\blacksquare$ , cyclobutane core dimer  $\_$ .

It is interesting to mention that while formation of anthocyanins structurally similar to **8** has been reported to occur via an hemiketal intermediate during acid treatment of retrochalcones bearing an unprotected C-2 phenolic group (Leydet *et al.* 2013), hemiketal **10** and 3-deoxyanthocyanidin **8** were not obtained as an intermediate and a product of the same reaction, but were obtained separately from the photoisomerization of the unprotected and protected *E*-retrochalcones **4** and **3**, respectively. The fact that photoisomerization of the protected *E*-retrochalcone **3** produces **8**, apparently without going through hemiketal intermediate **10**, strongly suggests that the tosyloxy group in **3** plays a key role in the reaction, since tosyloxy groups are known to activate specific positions and to participate in different reactions. Even though examples of tosyloxy involvement in photochemical reactions are limited, the proposed photocyclization leading to the formation of **8** can only be explained through the participation of the tosyloxy group, as a leaving group during the final aromatization/oxidation step (Fig. 3.14S) (Neo, *et al.*, 2010; Charlton *et al.*, 1980).

Photo-induced changes in pharmaceuticals are a major concern during its development since any modification of the original structure and physico-chemical features can decrease, enhance or change a biological activity, and have a great impact in effectiveness and safety. However, the new chemical species obtained during the photoirradiation of chalcone-vitamin E hybrids **1-4** possess the potential to improve desirable properties such as the enhanced antiproliferative activity observed in chalcones isomerized from the E to the Z form (Iwata *et al.*, 1997), or the improved antiproliferative activity and cytotoxicity of chalcone dimers when compared to that of parent chalcones (Menezes y Diederich, 2019).

## 3.2.6. Conclusions

In summary, the results of this investigation confirm that chalcone-vitamin E hybrids are photosensitive pigments, and that their reactivity depends on both intrinsic and extrinsic factors such as substitution patterns and solvent of choice, respectively. Variations explored in solvents and substitution patterns, can influence the outcome of photo-induced processes, displaying formation of different chemical species. Even though chalcone transformation under light irradiation has been previously described, the results obtained in this investigation show that there exist new pathways in the photochemical reactivity network of chalcones to produce novel derivatives representing relevant scaffolds in the development of new pharmaceuticals.

## 3.2.7. Acknowledgements

The authors wish to thank Ramiro Felipe Quijano-Quiñones for theoretical calculations, and Karlina García-Sosa and Mónica Nallely Arteaga-Rosas for technical assistance. JJC-C wishes to thank CONACYT for PhD scholarship No. 275151; financial support from SEP-CONACYT-ANUIES-ECOS-NORD (Mexico-France) collaborative Project No. 276520 is also gratefully acknowledged.



**Figure 3.1S.** Stacked <sup>1</sup>H-NMR spectra (400 MHz, acetone-d<sub>6</sub>) from time-course study monitoring sunlight irradiation of 6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (1). a) t=0 min, b) t=60 min darkness, c) t=5 min sunlight, d) t=10 min sunlight, e) t=15 min sunlight, f) t=20 min sunlight.



**Figure 3.2S.** Stacked <sup>1</sup>H-NMR spectra (400 MHz,  $CDCl_3$ ) from time-course study monitoring sunlight irradiation of 6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (1). a) t=0 min, b) t=60 min darkness, c) t=5 min sunlight, d) t=10 min sunlight, e) t=15 min sunlight, f) t=20 min sunlight.



**Figure 3.3S.** Stacked <sup>1</sup>H-NMR spectra (400 MHz, acetone-d<sub>6</sub>) from time-course study monitoring sunlight irradiation of 3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (**2**). a) t=0 min, b) t=60 min darkness, c) t=5 min sunlight, d) t=10 min sunlight, e) t=60 min sunlight.



**Figure 3.4S.** Stacked <sup>1</sup>H-NMR spectra (400 MHz,  $CDCl_3$ ) from time-course study monitoring sunlight irradiation of 3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (**2**). a) t=0 min, b) t=60 min darkness, c) t=5 min sunlight, d) t=10 min sunlight, e) t=60 min sunlight.



**Figure 3.5S.** Stacked <sup>1</sup>H-NMR spectra (400 MHz, acetone-d<sub>6</sub>) from time-course study monitoring sunlight irradiation of 6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-*retro*chalcone (**3**). a) t=0 min, b) t=60 min darkness, c) t=5 min sunlight, d) t=10 min sunlight, e) t=15 min sunlight, f) t=20 min sunlight, g) t=25 min sunlight, h) t=30 min sunlight, i) t=60 min sunlight.



**Figure 3.6S.** Stacked <sup>1</sup>H-NMR spectra (400 MHz,  $CDCl_3$ ) from time-course study monitoring sunlight irradiation of 6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-*retro*chalcone (**3**). a) t=0 min, b) t=60 min darkness, c) t=5 min sunlight, d) t=10 min sunlight, e) t=15 min sunlight, f) t=20 min sunlight, g) t=25 min sunlight, h) t=30 min sunlight, i) t=60 min sunlight.



**Figure 3.7S.** Stacked <sup>1</sup>H-NMR spectra (400 MHz, acetone-d<sub>6</sub>) from time-course study monitoring sunlight irradiation of 3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-retrochalcone (4). a) t=0 min, b) t=60 min darkness, c) t=5 min sunlight, d) t=10 min sunlight, e) t=15 min sunlight.



**Figure 3.8S.** Stacked <sup>1</sup>H-NMR spectra (400 MHz,  $CDCI_3$ ) from time-course study monitoring sunlight irradiation of 3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-retrochalcone (**4**). a) t=0 min, b) t=60 min darkness, c) t=5 min sunlight, d) t=10 min sunlight, e) t=15 min sunlight.



Figure 3.9S. Photoisomerization process monitoring for E-chalcone 1: A) in deuterated chloroform, B) in acetone- $d_6$ ; *E*-chalcone  $\bigcirc$ , *Z*-chalcone  $5 \land$ ).

	CDCI <sub>3</sub> *			
Position	E-retrochalcone	Z-retrochalcone	3-deoxyanthocyanidin	dimer
	(3)	(7)	(8)	
<i>α</i> (3)	7.48 d (15.9)	6.79 d (12.1)	9.66 d (9.2)	4.96**
$\beta$ (4)	7.58 d (15.9)	6.90 d (12.1)	9.29 d (9.1)	4.71**
8	6.84 s	6.36 s	7.77 s	u
2' y 6'	7.33 s	7.14 s	7.74 s	u
MeO 3' y 5'	3.97 s	3.88 s	4.03 s	u
MeO 4'	3.95 s	3.89 s	4.06 s	u

4' 5' 6'	α			
	2 3	β 4		
2' 1	ٺ	5		
	8			R
			. =	

	An-d <sub>6</sub> *			
Position	E-retrochalcone	Z-retrochalcone	3-deoxyanthocyanidin	dimer
	(3)	(7)	(8)	
α(3)	7.47 d (15.9)	6.58 d (12.1)	9.53 d (9.2)	4.94**
β(4)	7.53 d (16.0)	7.05 d (12.1)	9.02 d (9.1)	5.72**
8	6.87 s	6.58 s	8.23 s	u
2' y 6'	7.36 s	7.17 s	7.99 s	u
MeO 3' y 5'	3.94 s	3.87 s	4.05 s	u
MeO 4'	3.85 s	3.79 s	4.00 s	u

\*Spectroscopic data collected at 5 min of exposure to light \*\*Protons characteristic of cyclobutane core

u - unassigned

**Figure 3.10S.** Characteristic <sup>1</sup>H-NMR signals (chemical shifts in  $\delta$ ; coupling constants in Hz) of photoisomerization products 7 and 8.



**Figure 3.11S.** Stacked UV-vis spectra from time-course study monitoring sunlight irradiation of 6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-retrochalcone (**3**). a) In chloroform, b) In acetone.



**Figure 3.12S.** Schematic illustration for the distribution of 3-deoxyanthocyanidin (8) in reverse micelle-like aggregates, encapsulating moisture. The number of monomers shown in the aggregate are for visualization purposes only.



**Figure 3.13S.** Stacked <sup>1</sup>H-NMR spectra (400 MHz,  $CDCl_3$ ) showing changes in chemical shift values of key proton signals of 3-deoxyanthocyanidin **8** (evidence of aggregation process during time-course study).



**Figure 3.14S.** Proposed reaction pathways for the conversion of 6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-retrochalcone (**3**) to 3-deoxyanthocyanidin (**8**).



**Figure 3.15S.** <sup>1</sup>H-NMR spectrum (400 MHz, acetone-d<sub>6</sub>) of 6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (1).



**Figure 3.16S.** <sup>13</sup>C-NMR spectrum (100 MHz, acetone-d<sub>6</sub>) of 6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (1).



**Figure 3.17S.** <sup>1</sup>H-NMR spectrum (400 MHz, acetone-d<sub>6</sub>) of 3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (2).



**Figure 3.18S.** <sup>13</sup>C-NMR spectrum (100 MHz, acetone-d<sub>6</sub>) of 3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-chalcone (2).



**Figure 3.19S.** <sup>1</sup>H-NMR spectrum (400 MHz,  $CDCI_3$ ) of 6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-retrochalcone (**3**).



**Figure 3.20S.** <sup>13</sup>C-NMR spectrum (100 MHz,  $CDCI_3$ ) of 6'-O-tosyl-3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-retrochalcone (**3**).



**Figure 3.21S.** <sup>1</sup>H-NMR spectrum (400 MHz,  $CDCI_3$ ) of 3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-retrochalcone (4).



**Figure 3.22S**. <sup>13</sup>C-NMR spectrum (100 MHz,  $CDCI_3$ ) of 3,4,5-trimethoxy- $\delta$ -tocopherol-retrochalcone (4).

# **CAPÍTULO IV**

# SÍNTESIS DE ANÁLOGOS TIPO CHALCONA PRENILADA

# 4.1. INTRODUCCIÓN

Las chalconas son compuestos 1,3-difenilpropeno con características de cetona  $\alpha$ , $\beta$ -insaturada (Figura 4.1), que han sido encontradas en fuentes naturales y son importantes precursores relacionados en la biosíntesis de auronas y flavonoides (Nowakowska, 2007). Además de su relación e importancia biogenética con estos últimos, las chalconas han sido y siguen siendo un grupo de compuestos de gran interés sintético debido al número de actividades biológicas exhibidas y, por tanto, con potenciales aplicaciones farmacéuticas. Las actividades que se han demostrado con éxito para este grupo de compuestos incluyen antifúngica, antibacteriana, antitumoral, antioxidante y antiinflamatoria, entre otras (Bandgar *et al.*, 2010; Dimmock *et al.*, 1999).



Figura 4.1. Estructura general y numeración del esqueleto de chalcona.

Reddy *et al.* (2010) reportaron la síntesis de chalconas preniladas capaces de inhibir la formación de productos de la actividad de 5-LOX, dicho reporte pone de manifiesto el potencial de este grupo de compuestos como antiinflamatorios mediante la inhibición de leucotrienos en la vía de 5-LOX.

El reporte anterior incluye la síntesis de chalconas por medio de condensación de Claisen-Schmidt, que comprende el ataque de un enolato, derivado de acetofenona, a un benzaldehído; ésta puede ser llevada a cabo en presencia de bases alcalinas acuosas, Ba(OH)<sub>2</sub>, LiOH, con irradiación con microondas o ultrasonido (Patil *et al.*, 2009). Se han reportado además variadas estrategias para la síntesis del esqueleto chalcona, como acilación de Friedel-Crafts con cloruro de cinamoilo, rearreglo de Fries o foto-Fries de fenilcinamatos, reacción de Wittig de un iluro de trifenilbenzoilmetileno con aldehídos (Xu *et al.*, 1995), acoplamiento de Suzuki entre un cloruro de cinamoilo y ácidos fenilborónicos, o cloruro de benzoilo y ácidos estirilborónicos (Selepe y Van Heerden, 2013) y acoplamiento carbonilativo de Heck de haluros de arilo con estirenos en presencia de monóxido de carbono (Figura 4.2) (Wu *et al.*, 2010).



#### Figura 4.2. Algunas de las estrategias utilizadas para la síntesis de chalconas.

Aunque las metodologías son variadas, la síntesis por condensación de Claisen-Schmidt de benzaldehídos con acetofenonas es más utilizada debido en parte a la gran diversidad de benzaldehídos y acetofenonas comercialmente disponibles; sin embargo, como requisito para la aplicación de metodologías de condensación sobre compuestos aromáticos se tiene la formación de los precursores carbonílicos, esto es, mediante formilación o acetilación, para la obtención del benzaldehído o acetofenona, respectivamente. La obtención de las acetofenonas necesarias se ha descrito a través de diversas metodologías de obtención que incluyen de forma general: acetilación de Friedel-Crafts, rearreglo de Fries, reacción de Hoesch (Figura 4.3) (El-Desoky *et al.*, 2015).

Sin embargo, en el caso de los análogos de vitamina E, estas metodologías no son libremente aplicables, en especial con las diversas formas de tocotrienol, debido a la reactividad de los dobles enlaces en la cadena lateral con ácidos de lewis. Las metodologías compatibles con las diferentes formas de vitamina E soportan el uso de medios básicos, ácidos no concentrados en condiciones suaves, o bien el uso de reactivos organometálicos. Con base en el planteamiento de compatibilidad, y tomando como base las metodologías de metalación, se propone el uso de metalación *orto*-dirigida, produciendo un rearreglo de tipo Snieckus-Fries, reportada por Lo *et* 

*al.* (2014) (Figura 4.4) para la formación de un derivado *C*-acetilado de vitamina E, para la ulterior condensación con diversos benzaldehídos.



Figura 4.3. Metodologías más comunes para la síntesis de acetofenonas.



**Figura 4.4.** Ruta sintética para la obtención de 2'-hidroxiacetofenonas, a partir de *N*,*N*-dietilcarbamato.

# 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Todas las reacciones descritas a continuación fueron realizadas utilizando el compuesto  $\delta$ -tocoferol (**11**), producto comercialmente disponible a un menor precio que el  $\delta$ -tocotrienol (**12**), cuya semejanza en el anillo de cromanol lo convierte en un modelo de prueba adecuado.

## 4.2.1. Síntesis de O-(N,N-dietilcarbamoil)-δ-tocoferol (13)

En un matraz se colocaron 402.7 mg de  $\delta$ -tocoferol (**11**) y fueron disueltos en 10 mL de THF seco, a la mezcla se añadieron 207.3 mg de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, en agitación a temperatura ambiente. A la suspensión anterior se añadieron 0.19 mL de cloruro de dietilcarbamoilo, y se colocó a reflujo por 17 h. Transcurrido el tiempo, la reacción se detuvo retirando el disolvente por evaporación, se añadió agua y se extrajo con cloroformo, la fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, eliminando el disolvente.

La mezcla obtenida fue disuelta en 10 mL de *N*,*N*-dimetilformamida seca, se añadieron 80 mg de hidruro de sodio y 0.19 mL de cloruro de carbamoilo, se dejó reaccionar a temperatura ambiente con agitación constante, transcurrida una hora se agregaron 70 mg más de hidruro de sodio y 0.19 mL de cloruro de carbamoilo, y se dejó continuar la reacción por 17 h. Transcurrido el tiempo, la reacción se detuvo por adición lenta de ácido clorhídrico 1 M y agua, y se extrajo con dietil éter. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y el compuesto **13** se aisló por cromatografía en gel de sílice con éter de petróleo/acetato de etilo (95:5) teniendo un rendimiento de 42.7%.

## O-(N,N-dietilcarbamoil)-δ-tocoferol

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  6.70 (dd, J = 2.9, 0.8 Hz, 1H), 6.65 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 3.38 (s, 4H), 2.82 – 2.64 (m, 2H), 2.13 (s, 3H), 1.84 – 1.67 (m, 2H), 1.56 (s, 3H), 1.61 – 1.26 (m, 10H), 1.25 (s, 3H), 1.24 – 1.00 (m, 14H), 0.88 – 0.82 (m, 12H).

## 4.2.2. Síntesis de 5-bromo-δ-tocoferol (17)

A una disolución de 500 mg de  $\delta$ -tocoferol (**11**) en 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se le agregaron 265 mg de *N*-bromosuccinimida, la reacción se llevó a cabo a 0 °C, en baño de hielo, por 30 min. La reacción se detuvo agregando agua y separando la fase orgánica, la cual se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se separó por cromatografía en gel de sílice con éter de petróleo, con un rendimiento de 75.3%.

## <u>5-bromo-δ-tocoferol</u>

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 6.73 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 2.68 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.11 (d, J = 0.8 Hz, 3H), 1.88 - 1.71 (m, 2H), 1.61 - 0.98 (m, 21H), 1.24 (s, 3H), 0.90 - 0.81 (m, 12H).

## 4.2.3. Síntesis de 5-formil-δ-tocoferol (20)

Una mezcla de 500 mg de  $\delta$ -tocoferol (**11**), 960 mg de MgCl<sub>2</sub>, 1.4 mL de trietilamina, 5 mL de THF y 450 mg de paraformaldehído (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub> se colocó a reflujo, el cual se mantuvo hasta consumir todo el material de partida. La reacción fue detenida añadiendo HCl 1 M lentamente y luego extrayendo con éter etílico, la fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y se separó por cromatografía en gel de sílice con éter de petróleo/cloruro de metileno (95:5), obteniendo un rendimiento de 80.0%.

## <u>5-formil-\delta-tocoferol</u>

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 11.68 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 6.64 (t, J = 0.8 Hz, 1H), 3.04 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.19 (d, J = 0.8 Hz, 3H), 1.91 – 1.67 (m, 2H), 1.64 – 0.99 (m, 24H), 0.89 – 0.82 (m, 12H).

## 4.2.4. Síntesis de 5-(1-hidroxietil)-δ-tocoferol (21)

Una disolución de 52 mg de 5-formil- $\delta$ -tocoferol en 2 mL de dietil éter (Et<sub>2</sub>O) seco se colocó en un baño de hielo (0 °C). Se añadieron dos porciones de 0.15 mL de reactivo metil litio (1.6 M), dejando en agitación por 20 min posterior a la adición de las dos porciones.

La reacción fue detenida con cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl), y se añadieron 5 mL de éter, la fase orgánica se separó, se lavó con salmuera (NaCl), y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El crudo fue sometido a cromatografía en gel de sílice con éter de petróleo/dietil éter (9:1), obteniendo un rendimiento de 72.1%, considerando las dos fracciones que corresponden a los isómeros.

## Diastereomero 21a

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 7.91 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.26 (q, J = 6.6 Hz, 1H), 2.67 (dt, J = 16.8, 6.8 Hz, 1H), 2.55 (s, 1H), 2.46 (dt, J = 16.7, 6.9 Hz, 1H), 2.10 (d, J = 0.7 Hz, 3H), 1.84 - 1.66 (m, 2H), 1.63 - 0.92 (m, 21H), 1.53 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 1.21 (s, 3H), 0.88 - 0.83 (m, 12H).

## Diastereomero 21b

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  7.87 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.26 (q, J = 6.5 Hz, 1H), 2.73 – 2.63 (m, 1H), 2.50 (s, 1H), 2.46 (dt, J = 16.7, 6.3 Hz, 1H), 2.10 (s, 3H), 1.83 – 0.91 (m, 23H), 1.54 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 1.25 (s, 3H), 0.89 – 0.82 (m, 12H).

## 4.2.5. Síntesis del tosilato de 5-formil-δ-tocoferol (22)

Una mezcla de 48.8 mg de 5-formil- $\delta$ -tocoferol con 51 mg de cloruro de tosilo (TsCl) y 22 mg de hidruro de sodio (NaH 60%, en aceite mineral) fue suspendida y puesta en agitación en 5 mL de *N*,*N*-dimetilformamida seca, a temperatura ambiente por 16 horas. La reacción fue monitoreada por CCD con éter de petróleo/ dietil éter (95:5). La reacción se detuvo con NH<sub>4</sub>Cl, y se añadieron 5 mL de éter, la fase orgánica se separó, se lavó con agua y con salmuera (NaCl), y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, obteniendo el producto con 91.0% de rendimiento.

<u>5-formil-6-O-tosil-δ-tocoferol</u> [(R)-5-formil-2,8-dimetil-2-((4R,8R)-4,8,12-trimetiltridecil)croman-6il 4-metilbencenosulfonato] (**22**)

## Aceite amarillo

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>,400 MHz)  $\delta$ : 10.09 (s, 1H), 7.73 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.84 (s, 1H), 3.10-2.95 (m, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 1.82-1.64 (m, 2H), 1.57-1.45 (m, 3H), 1.43-1.99 (m, 18H) 1.24 (s, 3H), 0.86 (d, J = 6.8 Hz, 6H), 0.85 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.84 (d, J = 6.6 Hz, 3H).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ: 190.1, 151.3, 146.0, 145.5, 134.8, 131.9, 130.1 (×2), 128.6 (×2), 124.9, 123.2, 123.1, 76.4, 40.0, 39.5, 37.6, 37.5 (×2), 37.4, 32.9, 32.8, 30.5, 28.1, 24.9, 24.6, 24.0, 22.8, 22.7, 21.9, 21.2, 21.1, 19.9, 19.8, 17.2.

## 4.2.6. Síntesis del tosilato de 5-(1-hidroxietil)-δ-tocoferol (23)

Una disolución de 32.6 mg del tosilato 5-formil- $\delta$ -tocoferol en 2 mL de dietil éter (Et<sub>2</sub>O) seco, se colocó en un baño de hielo (0 °C). Se añadieron dos porciones de 0.06 mL de metil litio (1.6 M), dejando en agitación por 20 min posterior a la adición de las dos porciones. La reacción fue detenida con cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl), y se añadieron 5 mL de éter, la fase orgánica se separó, se lavó con salmuera (NaCl), y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, para obtener el producto con un rendimiento del 92.9%.

<u>5-(1-hidroxi-etil)-6-O-tosil-δ-tocoferol</u> [(2R)-5-(1-hidroxietil)-2,8-dimetil-2-((4R,8R)-4,8,12trimetiltridecil)croman-6-il 4-metilbencenosulfonato] (**23**)

Aceite amarillo pálido

## Diastereómero 23a

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 7.81 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.48 (s, 1H), 5.25 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 3.15 (dt, J = 16.9, 5.6 Hz, 1H), 2.82 (dt, J = 16.4, 7.7 Hz, 1H), 2.47 (s, 3H), 2.34 (sb, 1H) 2.02 (s, 3H), 1.74 (dd, J = 7.6, 5.7 Hz, 2H), 1.59-1.47 (m, 3H), 1.50 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 1.41-1.24 (m, 10H), 1.24 (s, 3H), 1.15-1.01 (m, 8H), 0.86 (d, J = 6.5 Hz, 6H), 0.86 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.84 (d, J = 6.6 Hz, 3H).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ: 151.5, 145.6, 139.1, 133.1, 133.0, 129.9 (x2), 128.7 (x2), 127.0, 122.0, 121.1, 75.9, 64.8, 41.2, 39.5, 37.6 (x3), 37.4, 32.9, 32.8, 30.9, 28.1, 24.9, 24.6, 23.9, 22.9, 22.8, 21.9, 21.7, 21.0, 20.1, 19.9, 19.8, 16.3.

#### Diastereómero 23b

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 7.81 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.50 (s, 1H), 5.24 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 3.04 (dt, J = 17.1, 6.4 Hz, 1H), 2.86 (ddd, J = 17.0, 7.7, 6.0 Hz, 1H), 2.47 (s, 3H), 2.31 (s, 1H), 2.02 (s, 3H), 1.81 (dt, J = 13.2, 6.1 Hz, 1H), 1.71 (ddd, J = 13.6, 7.9, 5.9 Hz, 1H), 1.57-1.47 (m, 3H), 1.50 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 1.44-1.22 (m, 9H), 1.26 (s, 3H), 1.19-0.99 (m, 9H), 0.86 (d, J = 6.6 Hz, 6H), 0.85 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 0.83 (d, J = 6.6 Hz, 3H).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ: 151.4, 145.6, 139.2, 133.2, 133.0, 129.9 (x2), 128.7 (x2), 126.9, 122.1, 120.9, 75.9, 65.0, 39.7, 39.5, 37.6, 37.5, 37.4, 32.9, 32.8, 31.1, 28.1, 24.9, 24.8, 24.6, 24.0, 22.9, 22.8, 21.9, 21.8, 21.1, 20.2, 19.9, 19.7, 16.3.

#### 4.2.7. Síntesis de 5-acetil-6-*O*-tosil-(+)-δ-tocoferol (24)

Una disolución de 6.3 mg de tosilato de 5-(1-hidroxietil)- $\delta$ -tocoferol en 1 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se añadió a una suspensión de 6.9 mg de clorocromato de piridinio en 1 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la mezcla de reacción se agitó por 45 min a temperatura ambiente. La reacción fue monitoreada por CCD con éter de petróleo/dietil éter (95:5), y revelado con 2,4-dinitrofenilhidrazina, obteniendo coloración azul para el producto deseado.

Concluida la reacción, el crudo de reacción se filtró a través de gel de sílice, lavando la sílice con dietil éter obteniendo el producto deseado con un rendimiento del 95.0%.

<u>5-acetil-6-O-tosil-(+)-δ-tocoferol</u> [(R)-5-acetil-2,8-dimetil-2-((4R,8R)-4,8,12trimetiltridecil)croman-6-il 4-metilbencenosulfonato] (**24**)

#### Aceite amarillo pálido

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  7.69 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.31 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.72 (s, 1H), 2.68-2.51 (m, 2H), 2.45 (s, 3H), 2.41 (m, 3H), 2.08 (s, 3H), 1.77-1.61 (m, 2H), 1.57-1.45 (m, 3H),

1.43-1.25 (m, 9H), 1.24 (s, 3H), 1.22-0.99 (m, 9H), 0.86 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), 0.85 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.84 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ: 201.8, 151.1, 145.6, 138.0, 132.6, 132.5, 129.9 (x2), 129.5, 128.6 (x2), 122.4, 118.5, 76.4, 40.2, 39.5, 37.5 (x2), 37.5, 37.4, 32.9, 32.8, 32.3, 30.6, 28.1, 24.9, 24.6, 24.1, 22.8, 22.7, 21.9, 21.0, 20.4, 19.9, 19.7, 16.5.

#### 4.2.8. Síntesis de la 6'-O-tosil-δ-tocoferol-3,4,5-trimetoxi-retro-chalcona (3)

Una mezcla de 14 mg de tosilato de 5-formil- $\delta$ -tocoferol (**22**), 5 mg de 3',4',5'-trimetoxi acetofenona y 2 mg (4 equivalentes) de hidróxido de litio (LiOH), disueltos en 3 mL de etanol (EtOH), se dejó en agitación a temperatura ambiente por 96 h, monitoreando por CCD con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

La reacción se detuvo añadiendo ácido clorhídrico 1 M, se agregaron 5 mL de dietil éter y se recuperó la fase orgánica, ésta se lavó con agua, salmuera (NaCl) y se secó sobre  $Na_2SO_4$  anhidro. La chalcona se aisló por CCDP con  $CH_2Cl_2$  (2 eluciones), dando un rendimiento del 50.1%.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  7.63 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 7.33 (s, 2H), 7.18 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.84 (s, 1H), 3.97 (s, 6H), 3.95 (s, 3H), 2.74 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.13 (d, J = 0.7 Hz, 3H), 1.87 - 1.70 (m, 2H), 1.54 - 1.48 (m, 2H), 1.45 - 1.26 (m, 9H), 1.25 (s, 3H), 1.23 - 1.00 (m, 10H), 0.86 (d, J = 6.7 Hz, 9H), 0.84 (d, J = 6.7 Hz, 3H).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  189.0, 153.4 (2C), 151.0, 145.5, 142.6, 140.4, 136.6, 133.5, 133.1, 129.7 (2C), 129.4, 128.7 (2C), 127.7, 125.8, 122.8, 121.5, 106.3 (2C), 76.0, 61.1, 56.5 (2C), 40.0, 39.5, 37.6 (3C), 37.4, 32.9, 32.8, 30.8, 28.1, 24.9, 24.6, 24.0, 22.8, 22.7, 21.8, 21.2, 21.1, 19.9, 19.8, 16.5.

#### 4.2.9. Síntesis de la $\delta$ -tocoferol-3,4,5-trimetoxi-*retro*-chalcona (4)

A 4.2 mg de 6'-O-tosil- $\delta$ -tocoferol-3,4,5-trimetoxi-retro-chalcona (**3**) se añadieron 2 mL de NaOH 2 M en MeOH, la mezcla se colocó en un baño de aceite a 70 °C con agitación por 5 min. Posteriormente se agregó HCl 1 M, se añadieron 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y se separó la fase orgánica, ésta se lavó con agua, salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La chalcona se

aisló por CCDP con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 eluciones), dando un rendimiento del 55.0%.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  7.96 (d, J = 15.7 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 15.7 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 0.9 Hz, 2H), 6.57 (s, 1H), 3.93 (s, 9H), 2.85 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.81 (m, 2H), 1.53 – 1.47 (m, 2H), 1.43 – 1.27 (m, 9H), 1.25 (s, 3H), 1.20 – 1.00 (m, 10H), 0.86 (d, J = 6.7 Hz, 6H), 0.85 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.83 (d, J = 6.5 Hz, 3H)

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  190.7, 153.2 (2C), 149.1, 146.2, 142.4, 139.1, 134.0, 130.7, 125.3, 121.4, 118.1, 116.8, 106.3 (2C), 75.0, 61.1, 56.4 (2C), 39.8, 39.5, 37.6 (3C), 37.4, 32.9, 32.8, 31.3, 28.1, 24.9, 24.6, 23.8, 22.8, 22.7, 21.3, 21.1, 19.9, 19.8, 16.6.

<u>6'-O-tosil-d-tocoferol-3-fluoro-4-metoxi-retro-chalcona</u> [(R)-5-((E)-3-(3-fluoro-4-methoxyphenyl)-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,8-dimethyl-2-((4R,8R)-4,8,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yl 4methylbenzenesulfonate] (**31**)

#### Aceite amarillo

RMN-<sup>1</sup>H (acetona- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$ : 7.86 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.75 (dd, J = 12.2, 1.5 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.49 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 7.33-7.24 (m, Hz, 3H), 6.91 (s, 1H), 4.01 (s, 3H), 2.81 (q, J = 6.1 Hz, 2H), 2.30 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 1.82 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 1.65-1.31 (m, 11H), 1.29 (s, 3H), 1.27-1.03 (m, 10H), 0.92-0.83 (m, 12H).

RMN-<sup>13</sup>C (acetona- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$ : 186.9 (d, J = 2 Hz), 152.8 (d, J = 245 Hz), 152.7 (d, J = 11 Hz), 151.7, 146.5, 141.3, 136.9, 133.8, 131.9 (d, J = 5 Hz), 130.7 (x2), 129.5, 129.2 (x2), 127.6, 126.9 (d, J = 3 Hz), 126.8, 123.6, 122.1, 116.4 (d, J = 19 Hz), 113.8 (d, J = 2 Hz), 76.7, 56.8, 40.5, 40.1, 38.1 (x3), 38.0, 33.5, 33.3, 31.4, 28.7, 25.5, 25.1, 24.1, 23.0, 22.9, 22.0, 21.6, 21.5, 20.1, 20.0, 16.6.

## 4.2.10. Síntesis de la 6'-O-tosil-&-tocoferol-3,4,5-trimetoxi-chalcona (1)

Una mezcla de 20 mg de tosilato de 5-acetil- $\delta$ -tocoferol (**24**) se mezclaron con 6.5 mg de 3,4,5trimetoxibenzaldehído y 3.7 mg (4 equivalentes) de hidróxido de litio (LiOH), 3 mL de etanol (EtOH), se dejó en agitación a temperatura ambiente por 96 h, monitoreando por CCD con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

La reacción se detuvo añadiendo ácido clorhídrico 1 M, se agregaron 5 mL de dietil éter y se recuperó la fase orgánica, ésta se lavó con agua, salmuera (NaCl) y se secó sobre  $Na_2SO_4$ 

anhidro. La chalcona se aisló por CCDP con éter de petróleo/acetato de etilo (8:2) (2 eluciones) obteniendo un rendimiento de 48.3%.

RMN-<sup>1</sup>H (acetona- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  7.66 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.12 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.96 (s, 2H), 6.81 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 3.88 (s, 6H), 3.78 (s, 3H), 2.57 (dt, J = 7.8, 4.0 Hz, 2H), 2.30 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 1.84 – 1.68 (m, 2H), 1.63 – 1.56 (m, 2H), 1.55 – 1.49 (m, 2H), 1.49 – 1.29 (m, 10H), 1.28 (s, 3H), 1.27 – 1.21 (m, 2H), 1.19 – 1.06 (m, 8H), 0.87 (d, J = 6.7 Hz, 6H), 0.86 (d, J = 6.7 Hz, 3H)

RMN-<sup>13</sup>C (acetona- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  193.7, 154.8 (2C), 151.5, 146.9, 146.6, 141.7, 139.3, 134.0, 132.4, 131.1, 130.9 (2C), 129.4, 129.2 (2C), 127.8, 122.8, 120.2, 107.1 (2C), 77.4, 60.8, 56.7 (2C), 40.7, 40.2, 38.3 (2C), 38.1, 38.1, 33.6, 33.5, 31.1, 28.8, 25.6, 25.2, 24.5, 23.1, 23.0, 21.7, 21.6, 21.1, 20.2, 20.2, 16.6.

## 4.2.11. Síntesis de la δ-tocoferol-3,4,5-trimetoxi-chalcona (2)

A 6.9 mg de la 6'-O-tosil- $\delta$ -tocoferol-3,4,5-trimetoxi-chalcona (**1**) se añadieron 2 mL de NaOH 2 M en MeOH, la mezcla se colocó en un baño de aceite a 70 °C con agitación por 2 min. Posteriormente se agregó HCl 1 M, se añadieron 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y se separó la fase orgánica, ésta se lavó con agua, salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La chalcona se aisló por CCDP con éter de petróleo/acetato de etilo (7:3) (2 eluciones) obteniendo un rendimiento de 43.0%.

RMN-<sup>1</sup>H (acetona- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  8.65 (s, 1H), 7.39 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 7.11 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 7.03 (s, 2H), 6.64 (s, 1H), 3.88 (s, 6H), 3.76 (s, 3H), 2.70 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.81 - 1.67 (m, 2H), 1.63 - 1.56 (m, 2H), 1.55 - 1.48 (m, 2H), 1.47 - 1.28 (m, 10H), 1.27 (s, 3H), 1.20 - 1.03 (m, 7H), 0.88 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.87 (d, J = 6.7 Hz, 6H), 0.86 (d, J = 6.7 Hz, 3H)

RMN-<sup>13</sup>C (acetona- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$  196.9, 154.7 (2C), 149.7, 146.2, 144.7, 141.4, 131.5, 130.8, 128.8, 124.9, 119.8, 117.5, 106.9 (2C), 76.1, 60.7, 56.6 (2C), 40.6, 40.2, 38.3, 38.2, 38.1, 38.1, 33.6, 33.5, 31.9, 28.7, 25.6, 25.2, 24.5, 23.1, 23.0, 21.9, 21.7, 20.2, 20.1, 16.8.

## 4.2.12. Análisis por resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-<sup>1</sup>H) se obtuvieron en un espectrómetro JEOL 400HY, utilizando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>), marca Aldrich. Los desplazamientos químicos se proporcionan en partes por millón (ppm)

# 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la formación del carbamato de tocoferol **13** se exploraron dos diferentes condiciones de reacción de forma sucesiva, utilizando dos bases diferentes. Mientras que el uso de  $K_2CO_3$  no resultó en una conversión completa de la materia prima en **13**, con una conversión del 40% con base en las integrales de las señales en posiciónes 5 y 7, el uso de una base más fuerte como el hidruro de sodio (NaH) resultó en el consumo total del material inicial (Figura 4.6).



6.8 6.6 6.4 6.2 6.0 5.8 5.6 5.4 5.2 5.0 4.8 4.6 4.4 4.2 4.0 3.8 3.6 3.4 3.2 3.0 2.8 2.6 2.4 2.2 2.0 1.8 1.6 1.4 1.2 1.0 0.8 0. fl(ppm)

**Figura 4.6.** Espectros apilados de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de la carbamoilación de  $\delta$ -tocoferol. A) Crudo de reacción con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. B) *O*-(*N*,*N*-dietilcarbamoil)- $\delta$ -tocoferol (**13**) obtenido utilizando NaH.

Sin embargo, al intentar el rearreglo de Snieckus-Fries y la transferencia de metilo del éter de silicio, para la formación del derivado tipo acetofenona de  $\delta$ -tocoferol (**14**), no se observó cambio alguno, aun utilizando una mayor cantidad de equivalentes del reactivo LDA, ni a –78 °C, ni a 0 °C. Tampoco se obtuvieron resultados positivos al intentar llevar a cabo solamente el rearreglo para obtener el intermediario **15**. Es por esto que, con el fin de comprobar si se llevaba a cabo la metalación *orto*-dirigida por carbamato, se repitió el protocolo, deteniendo la reacción con agua deuterada. Al no observar el intercambio del hidrógeno H-5 por deuterio

(16), se confirmó que la orto-metalación no se estaba llevando a cabo (Figura 4.7).

Debido a que no fue posible utilizar la propuesta anterior, se procedió a la bromación con *N*bromosuccinimida obteniendo el derivado 5-bromado (**17**), con el fin de lograr la metalación por intercambio del halógeno y posteriormente atrapar el anión formado utilizando el electrófilo cloruro de acetilo, para conseguir la formación del derivado tipo acetofenona (**14**). Sin embargo, como resultado de este proceso se obtuvo el derivado *O*-acetilado (**18**) (Figura 4.8), con intercambio de bromo por hidrógeno, independientemente del uso de uno o más equivalentes del cloruro de acetilo o anhídrido acético como agente acilante.



Figura 4.7. Pruebas realizadas para el rearreglo por orto-metalación.

Dado que el electrófilo utilizado resultó ser ineficiente para atrapar el anión derivado del intercambio de bromo, se eligió una clase de electrófilo caracterizada por su capacidad de combinarse con compuestos organometálicos para la formación de cetonas, esta clase se conoce como las amidas de Weinreb.

La amida correspondiente para la formación del derivado tipo acetofenona, *N*-hidroxi-*N*-metoxiacetamida (**19**), fue sintetizada, aunque con bajo rendimiento, y utilizada para atrapar el intermediario de intercambio metálico; sin embargo, nuevamente se obtuvo el derivado tocoferol O-acetilado (18) (Figura 4.8).



Figura 4.8. Metalación inducida por intercambio con halógeno.

La opción a seguir para la obtención del derivado tipo acetofenona fue utilizar 5-formil- $\delta$ -tocoferol (**20**) (Figura 4.12), un compuesto carbonílico previamente sintetizado con éxito (Alsabil *et al.*, 2017) para luego obtener, por ataque de un reactivo organometálico metilante y subsecuente oxidación, el derivado acetofenona **14**.

La formilación realizada exhibe alta regioselectividad generando como producto mayoritario el derivado 5-formilado. La mayor reactividad de la posición 5, en comparación con la posición 7, ha sido explicada por medio de la localización de enlaces inducida por tensión (SIBL, Strain-Induced Bond Localization). Este efecto asume que la unión de un anillo aromático a un ciclo, requisitos cumplidos por el núcleo cromanol, ocasiona tensión, que a su vez deriva en la rehibridización en los átomos con geometría comprometida, de este modo, los nuevos enlaces dentro del anillo aromático presentan longitudes distintas. Dichas longitudes son directamente afectadas por la suma de los ángulos formados entre los carbonos del ciclo adyacente, mayores ángulos tendrán menor carácter "p" generando un enlace de menor longitud dentro del anillo aromático y, por tanto, mayor localización de los enlaces (Patel *et al.*, 2009; Rosenau *et al.*, 2005; Stanger, 1998). Como consecuencia de la menor deslocalización de los electrones del anillo aromático se obtiene una reactividad distinta para las posiciones 5 y 7, privilegiando la obtención del derivado cuya síntesis involucra el flujo electrónico hacia la posición 5, como se muestra en la Figura 4.9.

A partir del derivado 5-formilado (20), se realizó la adición del reactivo metil litio obteniendo el par diastereomérico (21) en proporción 1:1 (Figura 4.10). Antes de llevar a cabo la oxidación para la obtención del derivado tipo acetofenona (14), ante la suceptibilidad del fenol a la oxidación, fue necesario proteger el fenol en el derivado 5-formilado (20) por medio de una reacción de tosilación. De esta manera, la adición del reactivo metil litio y la oxidación al

derivado tipo acetofenona (23) se llevaron a cabo con éxito y buenos rendimientos (Figura 4.12).



😳 Enlace localizado por tensión

**Figura 4.9.** Racionalización de la regioselectividad de la formilación de vitamina E por el efecto SIBL en el núcleo cromanol.

Contando con los derivados de tocoferol tipo benzaldehído y acetofenona fue posible proponer tanto la obtención de derivados tipo 2'-hidroxi-chalconas preniladas (5-acetil-tococromanol (23) + benzaldehído comercial) como derivados tipo 2'-hidroxi-*retro*-chalconas preniladas (5-formil-tococromanol (21) + acetofenona comercial) a través de condensación de Claisen-Schmidt (Figura 4.11).







Figura 4.11. Estrategia de obtención de derivados tipo chalcona y retro-chalcona.

El distinto arreglo en la cadena de propenona de los derivados tipo chalcona y retro-chalcona propuestos permiten explorar las variaciones en actividad generados por cambios sutiles pero importantes, ya que suponen una distribución electrónica debido al cambio de posición del carbonilo, asi como las posibles interacciones polares que puedan generarse por la proximidad o lejanía de dicho carbonilo con respecto al grupo fenol presente inicialmente en los cromanoles.

Para la reacción de condensación se evaluaron distintos reactivos como hidróxido de potasio (KOH/EtOH) (Zhang *et al.*, 2013a), diisopropilamina de litio (LDA/THF), pirrolidina (pirrolidina/DMF) (Gu *et al.*, 2014) e hidróxido de litio (LiOH/EtOH) (Bhagat *et al.*, 2006), siendo éste último el único mediante el cual se obtuvieron resultados positivos para la formación de las chalconas tosiladas deseadas (**1** y **3**) (Figura 3.12).

Aun cuando se ha reportado la posibilidad de prescindir de grupos protectores en reacciones de condensación (Won *et al.*, 2005; Konishi *et al.*, 1983), en este caso se encontró que la formación de la *retro*-chalcona requiere del grupo protector, ya que bajo condiciones de reacción semejantes no fue posible obtener de forma directa la retrochalcona (**4**) a partir de la condensación del derivado formilado (**20**) con la acetofenona comercial correspondiente (Figura 4.12).

Finalmente, la desprotección de las chalconas se realizó utilizando una disolución fuertemente básica de NaOH 2 M en MeOH, demostrando que periodos cortos de reacción (hasta 2 min), en

agitación a 70 °C, son suficientes para la desprotección completa del producto tosilado. De este modo, utilizando la secuencia de reacciones mencionadas fue posible obtener una ruta sintética para obtener derivados tipo chalcona prenilada a partir de  $\delta$ -tocoferol (**2** y **4**).

Aplicando la estrategia desarrollada para la obtención de análogos tipo chalcona prenilada sobre  $\delta$ -tocoferol y  $\delta$ -tocotrienol fue posible obtener diversas chalconas y retrochalconas, cuyas estructuras se muestran a continuación (Figura 4.13).



Figura 4.12. Ruta sintética establecida para la obtención de chalconas preniladas con esqueleto de tipo cromanol.

Durante el proceso de purificación de la retrochalcona **3** se observó la generación de una impureza, dicha impureza fue separada, y comparada con el espectro de la fracción completa inicial y la *retro*-chalcona aislada de la misma muestra (Figuras 4.14 y 4.15). En los espectros se observa que tanto la fracción A (*retro*-chalcona deseada), como la fracción B (impureza aislada) presentan señales atribuibles a la cadena prenílica del tocoferol, así como los grupos metoxilo del anillo añadido durante la reacción de condensación. De igual forma, en la región aromática se observan señales atribuibles al sistema AA'BB' del grupo protector, el protón H-7 del núcleo de cromanol y las señales dobles correspondientes a los protones  $\alpha$  y  $\beta$  de la unión propenona (que evidencian la estructura de chalcona), por lo anterior se asume que la impureza es un isómero del compuesto deseado, también de tipo chalcona. No obstante,

además de la diferencia en desplazamiento químico, la constante de acoplamiento de los protones  $\alpha$  y  $\beta$  de la estructura de propenona presentan una diferencia clave, para la fracción A la J = 16.0 Hz, mientras que para la fracción B es J = 12.4 Hz, la diferencia señala la aparición del isómero geométrico *cis* (fracción B), formado a partir del producto *trans* (fracción A).



**Figura 4.13.** Chalconas y retrochalconas hibridos de  $\delta$ -tocoferol (**11**) y  $\delta$ -tocotrienol (**12**), sintetizadas aplicando el camino sintético desarrollado que incluye condensación de Claisen-Schmidt como se muestra en la figura 4.12.

Además de las diferencias en cuanto a las características mencionadas, el cambio en la proporción de las integrales de los dos compuestos demuestra que el compuesto mayoritario en la fracción B se ha generado durante el proceso de separación, observando un cambio de proporción *trans/cis* de 94:6 en la muestra inicial a 77:23 en la fracción A, sin considerar la cantidad de isómero *cis* separada en la fracción B, comprobando un aumento mayor al 17% de isómero *cis*. El fenómeno observado, asi como las subsecuentes transformaciones han sido documentadas en el capitulo 3 de este trabajo, sin embargo, algunas precisiones adicionales necesarias relacionadas con estos procesos se incluyen a continuación.

Con respecto al fenómeno observado, se sabe que el doble enlace en la estructura de propenona de una chalcona puede encontrarse en geometrías *cis* (Z) o *trans* (E), sin embargo, termodinámicamente el isómero *trans* es más estable, por lo que la mayor parte de las chalconas en la naturaleza han sido aisladas en esta forma (Figura 3.16) (Padhye *et al.*, 2009; Ducki *et al.*, 1998).


**Figura 4.14.** Espectros de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) apilados de las muestras de purificación de la trimetoxiretrochalcona (**3**), a) muestra inicial, b) fracción A, c) fracción C.



7.65 7.60 7.55 7.50 7.45 7.40 7.35 7.30 7.25 7.20 7.15 7.10 7.05 7.00 6.95 6.90 6.85 6.80 6.75 6.70 6.65 6.60 6.55 6.50 6.45 6.40 6.35 6.30 f1 (ppm)

**Figura 4.15.** Ampliación de espectros de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) apilados de las muestras de purificación de la trimetoxiretrochalcona (**3**), a) muestra inicial, b) fracción A, c) fracción B.

A su vez, las chalconas son consideradas como compuestos sensibles a la luz, debido a su fotorreactividad reportada con luz UV. Existen en la literatura diversos ejemplos de *cis* chalconas preparadas a partir de *trans* chalconas por medio de irradiación con luz ultravioleta, a longitudes de onda definidas, lámparas de luz solar, e incluso luz de día, en diversos disolventes con propiedades que cubren un amplio rango de características, incluyendo disolventes de baja polaridad como benceno y de mayor polaridad tanto apróticos como próticos, dioxano y metanol, respectivamente (Sidharth *et al.*, 2014; lwata *et al.*, 1997; Nicodem y Matos, 1981; Noyce y Jorgenson, 1963; Noyce y Jorgenson, 1961).



### Figura 4.16. Isómeros geométricos del esqueleto chalcona.

lwata *et al.* (1997) describieron la isomerización de 3-hidroxi-3'-metoxichalcona y 3-hidroxi-4'metoxichalcona de la forma E cisoide (*trans* s-*cis*) a la forma Z cisoide (*cis* s-*cis*), por irradiación de disoluciones metanolicas con luz de día. Y reporta tiempos de conversión de chalconas fototransformadas de *trans* a *cis* entre 1 y 3 días, obteniendo en el día 1 una conversión de 65%, y posteriormente alcanzar un equilibrio con proporción de los productos *trans/cis* 15:85, generalmente, al cabo de los tres días.

Sin embargo, se ha descrito que no todas las chalconas sufren fotoisomerización, como las aisladas de regaliz (*Glycyrrhiza glabra*), que incluyen licochalcona A, echinatina e isoliquiritigenina (Figura 3.17); éstas poseen en común un grupo hidroxilo en la posición 2' o 4, y se propone que debido a esto resisten la fotoconversión (Iwata, *et al.*, 1997).

En contraste, se ha observado que la introducción de grupos metoxilo en posiciones 2, 4 y 6 en el anillo B de las chalconas aumenta la suceptibilidad a la fotoconversión, disminuyendo la energía libre de activación, y proponiendo que reduce el carácter de doble enlace del enlace  $C\alpha$ - $C\beta$ .



Figura 4.17. Chalconas de Glycyrrhiza glabra estables ante la irradiación con luz solar.

Es posible separar los isómeros *trans* y *cis* de chalcona, y la conversión se evidencia en RMN-<sup>1</sup>H por una reducción en el desplazamiento de las señales de los protones olefinicos  $H_{\alpha}$  y  $H_{\beta}$ , y una disminución en su constante de acoplamiento (Iwata *et al.*, 1997), cambios observados al comparar el espectro de la fracción B con respecto al componente mayoritario de la muestra inicial.

Aunque se ha llevado a cabo la isomerización de chalconas del isómero *cis* al *trans*, utilizando ácido sulfúrico concentrado e irradiando con luz solar (Noyce y Jorgenson, 1963; Noyce y Jorgenson, 1961), el fenómeno de fotoisomerización no es el único cambio que las chalconas pueden sufrir. Dependiendo de los sustituyentes presentes también pueden formar núcleos distintos, como el catión flavilio, formando la antocianidina correspondiente; este cambio se puede llevar a cabo por medio de equilibrios reversibles bajo la acción de cambios en el pH e irradiación luminosa de la disolución (Figura 3.18) (Leydet *et al.*, 2013). Además, algunas chalconas, igualmente con iluminación UV, son capaces de entrecruzarse, y los grupos carbonil  $\alpha$ , $\beta$ -insaturados son responsables de esta reacción, por lo que se ha reportado la obtención de dimeros de chalconas por fotocicloadición intermolecular 4n(2+2), generando un núcleo de ciclobutano como unión, en disolución de cloroformo expuesta a luz UV, con resultados variables en términos de composición de productos (Figura 3.19) (Yaylı *et al.*, 2005; Sidharth, et *al.*, 2014; Lei, *et al.*, 2017). Es por esto que se sugiere en todo caso proteger las disoluciones de chalconas de la luz (Padhye, *et al.*, 2009).

Con respecto a la posible actividad biológica de las *cis*-chalconas, no se ha reportado si existe diferencia en actividad en modelos de inflamación entre los distintos isómeros, pero se ha observado que pueden exhibir diferente actividad sobre modelos tumorales (Iwata *et al.*, 1997). Por tanto, se vuelve importante el estudio de esta isomerización, ya que la presencia de productos de esta reacción puede cambiar la actividad biológica de una muestra.



Figura 4.18. Equilibrios para la formación del catión flavilio a partir del esqueleto chalcona.



Figura 4.19. Dímeros de chalcona con núcleo de ciclobutano, productos de fotocicloadición.

## 4.4. CONCLUSIONES

El núcleo de cromano presenta características electrónicas definidas, debidas a la oxigenación en posiciones opuestas del anillo aromático y la tensión generada por el ciclo de pirano, las cuales le confieren gran oxidabilidad, hecha patente en el importante papel de los vitámeros de vitamina E como agentes antioxidantes, y la alta selectividad al reaccionar con electrófilos, conformando retos importantes para la obtención de nuevos derivados híbridos.

Tomando en cuenta las características mencionadas, fue posible establecer caminos sintéticos para la obtención de nuevos híbridos tipo chalcona y *retro*-chalcona de seis y cuatro pasos a partir de distintas formas de vitamina E ( $\delta$ -tocoferol y  $\delta$ -tocotrienol). A su vez, fue posible explorar la suceptibilidad de los híbridos ante condiciones medioambientales que pueden generar la aparición de nuevos derivados en la muestra expuesta.

# CAPÍTULO V

# SÍNTESIS DE OTROS ESQUELETOS TIPO FLAVONOIDE PRENILADOS

## 5.1. INTRODUCCIÓN

## 5.1.1. Flavonoides

Los flavonoides son una clase importante de productos naturales, particularmente ellos pertenecen a los metabolitos con estructura polifenólica, El término flavonoide es utilizado generalmente para describir una amplia colección de productos naturales que incluyen el esqueleto fenil-benzopirano (Figura 5.1) (Panche *et al.*, 2016; Marais *et al.*, 2006).



Figura 5.1. Esqueleto 2-fenil-benzopirano.

Los flavonoides pueden subdividirse en diferentes grupos dependiendo del carbono del anillo C al cual se une el anillo B, el grado de insaturación y oxidación del anillo C, siendo: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, flavanoles o catequinas, antocianidinas y chalconas (Panche *et al.*, 2016).

Biogenéticamente, las chalconas son precursores inmediatos de las flavanonas, y algunas flavanonas se isomerizan por apertura de anillo a chalconas durante el aislamiento de la fuente vegetal o tratamiento con bases. A su vez, las flavanonas son intermediarios de la biosíntesis de otros grupos de flavonoides que incluyen a las flavonas. Las flavonas (Figura 5.2a) presentan un enlace doble entre las posiciones 2 y 3 y un carbonilo en posición 4 del anillo C. Por su parte, las flavanonas (Figura 5.2b) son también llamadas dihidroflavonas, y prescinden del doble enlace entre los carbonos 2 y 3 en el anillo C del esqueleto flavonoide (Panche *et al.*, 2016; Grayer y Veitch, 2006).

En la naturaleza, los flavonoides son extraídos de plantas, encontrándose en varias partes anatómicas. Son utilizados por los vegetales para el crecimiento y defensa, constituyendo un conjunto ampliamente distribuidos en el reino plantae y característicos en las plantas superiores, siendo fácilmente reconocidos como pigmentos de flores para las angiospermas, siendo responsables del color, y aroma, en frutos como atractores de polinizadores para la dispersión de semillas y germinación de esporas, no estando restringido a dichas partes. La mayor parte presentan baja toxicidad para mamíferos y algunos han sido ampliamente utilizados en medicina, debido a que exhiben efectos biológicos como antihepatotóxico, antiinflamatorio, antiulceroso, antiviral, antiarteroesclerótico, antioxidante, antitumoral, antiosteoporótico, antibacterial, antifúngico. También han demostrado ser capaces de inhibir Ca<sup>+2</sup>-ATPasa, ciclooxigenasa, enzimas como aldosa reductasa. xantina oxidasa. fosfodiesterasa y lipoxigenasa (Panche et al., 2016; Agrawal, 2011).



Figura 5.2. a) Esqueleto de flavona, b) esqueleto de flavanona.

Entre los flavonoides capaces de inhibir la enzima 5-lipoxigenasa, en la literatura se han reportado los flavonoides cyperaflavósido, vitexina, orientina, cinarósido, quercetin 3-*O*-D-glucopiranósido obtenidos de las partes aéreas de *Cyperus rotundus* con Cl<sub>50</sub> desde 5.9 hasta 2.3 μM (Figura 5.3) (Ibrahim *et al.*, 2018).



**Figura 5.3.** Flavonoides aislados de las partes aéreas de *Cyperus rotundus* por Ibrahim *et al.* (2018).

Ali *et al.* (2012) aislaron la pirano-flavanona mildona y la pirano-chalcona correspondiente mildbenona que demostraron también potencial para inhibición de lipoxigenasa con  $CI_{50}$  de 41.8 y 59.7  $\mu$ M, respectivamente (Figura 5.4).



Figura 5.4. Flavonoides mildona (a) y mildbenona (b).

Mientras que Hanáková, et al, (2017) extrajeron una gran variedad de flavonoides geranilados de los frutos de *Paulownia tomentosa* que presentan  $CI_{50}$  entre 2.46 µM hasta 0.5 µM, incluso menores que el fármaco que se encuentra actualmente en el mercado (zileuton, 0.35 µM) (Figuras 5.5 y 5.6), todo esto señalando a los flavonoides prenilados como importantes e interesantes compuestos para su estudio con respecto a la inhibición de 5-lipoxigenasa.



Figura 5.5. Piranoflavanonas aisladas de Paulownia tomentosa (Hanáková et al., 2017).

La síntesis de conocidos y nuevos flavonoides prenilados es una parte esencial para el desarrollo de análogos, así como la exploración de nuevos perfiles de actividad biológica. Existe actualmente una gran diversidad de estrategias para la síntesis de flavonas, que pueden agruparse en ciclación oxidativa de chalconas, ciclación de difenildionas, anillación de halofenoles, ciclación por olefinación y arilación sobre C-2.

Una de las dos estrategias más utilizadas es la ciclación oxidativa de chalconas (Figura 5.7), teniendo como ejemplo, el procedimiento utilizado por Sashidhara *et al.* (2012) que reportan la síntesis sencilla de flavonas con importancia farmacéutica a partir de 2-hidroxichalconas bajo condiciones libres de disolvente, en presencia de yodo molecular.

$R_1$ $R_2$					
	HO			∥ ⊂R3	
	$R_5$		R <sub>4</sub>		
Compuesto	R <sub>1</sub>	 R₂	R <sub>3</sub>	R4	R₅
diplacona M	Н	ОН	OMe	Н	OH V
3',4'-O-diMe-5'-OH-diplacona	OH	OMe	OMe	Н	7
mimulona F	Н	ОН	Н	Н	HO HO
mimulona G	Н	ОН	Н	Н	OH O
3'-O-Me-diplacona	Н	ОН	OMe	Н	Y Y Y
tomentodiplacona G	Н	ОН	OMe	Н	OH O
tomentodiplacona B	Н	OH	OMe	Н	HO
6-prenil-3'-O-Me-eriodictiol	Н	ОН	OMe	Н	Y ~ Z
mimulona	Н	OH	Н	Н	
3'-O-Me-5'-MeO-diplacona	OMe	OH	OMe	Н	
diplacona	Н	OH	OH	Н	V XX
3'-O-Me-diplacol	Н	OH	OMe	OH	
3'-O-Me-5'-OH-diplacona	OH	OH	OMe	Н	
bonanniol A	Н	OH	Н	OH	

Figura 5.6. Flavonoides prenilados aislados de Paulownia tomentosa (Hanáková et al., 2017).



Figura 5.7. Ciclación oxidativa de chalconas utilizada por Sashidhara et al. (2012).

La segunda estrategia más utilizada es la ciclación de difenildionas (Figura 5.8) como la descrita por Romanelli *et al.* (2010) para obtener flavonas utilizando un catalizador reutilizable, catalizada por un heteropoliácido en gel de sílice (catalizador ácido de Preyssler).



Figura 5.8. Ciclación de difenildionas utilizada por Romanelli et al. (2010).

La anillación de halofenoles (Figura 5.9) ha sido utilizada en trabajos como el realizado por Yang *et al.*, (2010) que obtuvieron una amplia diversidad de cromonas con rendimientos de entre 68 a 92%, utilizando una metodología de ciclocarbonilación selectiva catalizada por paladio libre de ligantes, para hacer reaccionar *o*-iodofenoles con acetilenos terminales y monóxido de carbono en un líquido iónico de sal de fosfonio.



Figura 5.9. Anillación de halofenoles utilizada por Yang et al. (2010).

Utilizando la ciclación por olefinación (Figura 5.10) Das y Gosh (2011) realizaron la síntesis de piroflavonas en medio acuoso mediante la reacción de Wittig fotoinducida a partir de los compuestos ariloxicarbonil y las sales de bromuro de fosfonio adecuadas.

Finalmente, Kim *et al.* (2012) llevaron a cabo la arilación selectiva en posición 2 de cromonas (Figura 5.11) vía activación de enlaces C-H mediante paladio, para la obtención de las flavonas respectivas.



Figura 5.10. Olefinación utilizada por Das y Gosh (2011).



Figura 5.11. Arilación sobre C-2 utilizada por Kim et al. (2012).

### 5.1.2. Isoflavonoides y neoflavonoides

Los isoflavonoides (3-fenil-benzopiranos) y neoflavonoides (4-fenil-benzopiranos) (Figura 5.12), son los otros dos grupos mayores en los que pueden clasificarse los productos naturales con esqueleto fenil-benzopirano (Marais *et al.*, 2006; Donelly y Sheridan, 1988; Dewick, 1988). Su distribución en la naturaleza se encuentra más restringida, y su origen biogenético se encuentra relacionado con la biosíntesis de flavonoides general, incluyendo en el caso de los isoflavonoides la migración del anillo aromático B desde la posición 2 a la posición 3 del benzopirano vía un intermediario hidroxilado (Dewick, 2009); sin embargo para la síntesis de neoflavonoides se ha considerado una distinta convergencia de los precursores malonil y cinamoil vía ácido floroglucinolpropiónico para la generación del esqueleto base (Harborne, 1973).





Se ha considerado que algunas cumarinas pueden ser situadas como grupos menores de estas clases de compuestos, perteneciendo las 3-aril-cumarinas y 4-aril-cumarinas a los isoflavonoides y neoflavonoides, respectivamente. Pese a que el reducido número de aril-

cumarinas encontradas en la naturaleza (Figura 5.13) no se ha descrito con múltiples o potentes actividades, derivados sintéticos con dicho núcleo han sido estudiados en múltiples ocasiones por la diversidad de actividades que presentan (Botta, *et al.*, 2009).



Figura 5.13. 3-Aril-cumarinas preniladas aisladas de fuentes naturales.

## **5.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 5.2.1. Síntesis de δ-tocoferol-3-fluoro-4-metoxi-flavanona (50)

Una mezcla de 86.6 mg de la 6'-O-tosil- $\delta$ -tocoferol-3-fluoro-4-metoxi-chalcona (**41**), 5 mL de metanol y 140.1 mg de carbonato de potasio se calentó a reflujo, con agitación contante, por 1.5 h. Posteriormente, la reacción se detuvo añadiendo una disolución de ácido clorhídrico 1 M, la mezcla se extrajo con dietil éter, y la fase orgánica se lavó con una disolución saturada de cloruro de sodio y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de eliminar el disolvente con presión reducida, el crudo se purificó por cromatografía en columna flash utilizando como eluyente la mezcla éter de petróleo/dietil éter (95:5), recuperando 62.5 mg del producto (rendimietno de 91.3%)  $\delta$ -tocoferol-3-fluoro-4-metoxi-flavanona (**50**).

## Flavanona 50 (diastereomero I)

RMN-<sup>1</sup>H (acetona- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$  7.36 (dd, J = 12.4, 1.6 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.18 (t, J = 8.6 Hz, 1H), 6.77 (s, 1H), 5.42 (dd, J = 13.0, 2.7 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.16 (t, J = 6.9 Hz,

2H), 3.02 (dd, *J* = 16.5, 13.1 Hz, 1H), 2.81 (s, 3H), 2.77 (s, 2H), 2.75 (dd, *J* = 16.5, 3.0 Hz, 1H), 2.18 (s, 2H), 1.84 – 1.72 (m, 2H), 1.64 – 1.04 (m, 17H), 1.26 (s, 3H), 0.91 – 0.83 (m, 12H).

### 5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la obtención de derivados tipo flavona prenilada, se ha descrito la síntesis a partir de las chalconas correspondientes en un solo paso, sin embargo, los reactivos oxidantes utilizados frecuentemente como yodo, presentan incompatibilidad con la estructura del fácilmente oxidable δ-tocotrienol, y derivados de vitamina E con el fenol desprotegido. Por otro lado, es posible ciclar la chalcona para obtener la flavanona correspondiente en medio ácido o básico, y posteriormente realizar la oxidación en el anillo C, formando un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, obteniendo por consecuencia la flavona correspondiente. Siendo ésta una aproximación compatible con la estructura de la vitamina E, se planteó llevarla a cabo para obtener flavonas y a su vez las flavanonas intermedias correspondientes.

Debido a la obtención de los derivados de tipo flavanona como subproductos de la desprotección de los híbridos de tipo chalcona, se consideró la opción de incluir estos derivados para los ensayos de actividad inhibitoria de la enzima 5-LOX, ya que tanto flavanonas naturales y sintéticas no preniladas, como naringenina y hesperetina, y preniladas como tomentodiplacona G, B, H, L y M, mimulonas F, G y H, paulownionas A y B han mostrado actividad antiinflamatoria, y específicamente las flavanonas preniladas sigmoidina A y sigmoidina B exhiben actividad potente para la inhibición de la enzima 5-LOX (Hanakova *et al.*, 2015; Bano, *et al.*, 2013; Njamen, *et al.*, 2004).

Al obtenerse como subproductos, los rendimientos de los derivados de tipo flavanona no eran satisfactorios para su uso subsecuente en reacciones de oxidación, sin embargo, como se muestra en la Figura 4.15, a partir de la 6'-O-tosil- $\delta$ -tocoferol-3-fluoro-4-metoxi-chalcona (**41**), la ciclación puede ser llevada a cabo en medio básico utilizando K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> obteniendo el producto con un rendimiento de 91.3% (Figura 5.14). El análisis de las señales e integrales de las mismas en el espectro de la flavanona obtenida (**50**) sugiere un producto puro, sin embargo, la multiplicidad de la señal con desplazamiento químico entre 2.68 y 2.77 ppm, que corresponde al protón H-2 del anillo C, no es consistente con las características esperadas, esto es, una señal doble de dobles, presentándose en cambio como una señal doble de doble de dobles, sugiriendo entonces una mezcla de diastereoisómeros, ya que debido a la presencia del centro estereogénico en la posición 2 de las flavanonas, éstas pueden adoptar dos configuraciones 2*S* 

y 2*R*. Previamente se ha reportado que someter a 2'-hidroxichalconas a condiciones ácidas o básicas lleva a la formación de flavanonas racémicas; esta reacción también se puede dar lentamente bajo condiciones fisiológicas o bien de forma espontánea en disoluciones, igualmente produciendo la mezcla racémica de flavanonas (Mondal *et al.*, 2011; Marais *et al.*, 2006; Bohm, 1998).



Figura 5.14. Ciclación en medio básico de la chalcona 41.

Para confirmar la suposición anterior, la muestra fue sometida a cromatografía en columna, obteniendo dos fracciones cuyos espectros de RMN-<sup>1</sup>H se muestran en las Figuras 5.15 y 5.16. Se observa para la fracción A una señal que corresponde con la multiplicidad esperada (doble de dobles), mostrando la obtención de uno de los diastereómeros puros, mientras que la fracción B muestra todavía la mezcla en una proporción semejante a la inicial.



**Figura 5.15**. Comparación de espectros de RMN-<sup>1</sup>H (An- $d_6$ , 400 MHz) de las muestras obtenidas en la síntesis de la flavanona (**50**), a) crudo de reacción, b) fracción A, c) fracción B.



1.28 3.26 3.24 3.22 3.20 3.18 3.16 3.14 3.12 3.10 3.08 3.06 3.04 3.02 3.00 2.98 2.96 2.94 2.92 2.90 2.88 2.86 2.84 2.82 2.80 2.78 2.76 2.74 2.72 2.70 2.68 2.66 f1 (com)

**Figura 5.16**. Ampliación de espectros de RMN-<sup>1</sup>H (An- $d_6$ , 400 MHz) de las muestras obtenidas en la síntesis de la flavanona (**50**), a) crudo de reacción, b) fracción A, c) fracción B.

Como se mencionó anteriormente, algunas chalconas se pueden ciclar formando una mezcla racémica de flavanonas, pero se ha reportado que flavanonas ópticamente activas de fuentes naturales pueden racemizarce durante el crecimiento de la planta o procedimientos de aislamiento (Krause y Galensa, 1991); un ejemplo de lo anterior es la naringina, presente en cítricos inmaduros en la forma epimérica 2*S*, y que durante la maduración de los frutos es almacenada en vesículas y sufre una epimerización en la posición 2. Este efecto también ha sido reportado al comparar jugos recién exprimidos y jugos comerciales, y dicho cambio ha sido asociado a diferencias de sabor. Se ha reportado también que a 70 °C la 2*S*-naringenina, aglicona de la naringina, se racemiza en un periodo de tres horas en disoluciones únicamente de metanol y agua, por lo que los resultados de algunos análisis podrían ser afectados. Además, la racemización puede ocurrir también en fluidos fisiológicos, como el ambiente ácido del estómago, que puede tener efectos en la actividad al ser administrados por vía oral (Yañez *et al.*, 2007; Witsuba *et al.*, 2006).

Aun cuando las flavanonas son obtenidas formando parte de mezclas diastereoméricas 1:1, se considera importante realizar los ensayos de actividad inhibitoria empleando la mezcla para conocer el potencial en la inhibición enzimática como primer paso en la prospección incluso si hubiese racemización, y tomando también en consideración que en trabajos previos se han

realizado bioensayos de actividad antiinflamatoria sobre mezclas racémicas de flavanonas mostrando resultados positivos (Bano *et al.*, 2013).

Posteriormente, la flavanona **50** fue sometida a oxidación con DDQ, reactivo utilizado para deshidrogenación de las posiciones adyacentes a carbonilos o anillos aromáticos, obteniéndose la flavona correspondiente (**56**, fracción D) con un rendimiento de 11.3% y una baja regioselectividad, resultado de la obtención de subproductos de deshidrogenación (Figuras 5.17 y 5.18).



Figura 5.17. Productos formados durante la oxidación por DDQ de la flavanona 50.





Otras condiciones fueron aplicadas para la deshidrogenación de flavanona utilizando las metodologías reportadas por Lockhande *et al.* (2014), que incluye el uso de CuCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O en dimetilsulfóxido, y por Barontini *et al.* (2010) que utilizan el ácido 2-yodoxibenzoico (IBX) en dimetilsulfóxido, sin embargo, el producto deseado fue escasamente detectado durante el seguimiento de las reacciones por cromatografía en capa fina, resultando para la primera metodología en la descomposición total de la muestra, mientras que para la segunda, se obtuvo descomposición parcial.

Como metodología alternativa para la obtención de flavonas se consideró la estrategia utilizada por Zheng *et al.* (2003) condensando ω-haloacetofenonas con benzaldehídos para la obtención de las flavonas correspondientes (Figura 5.19).



**Figura 5.19**. Estrategia utilizada por Zheng *et al.* (2003) para la obtención de flavonas a partir de  $\omega$ -cloro-acetofenonas.

Para la inserción del halógeno en la posición 2 de la acetofenona (24) se utilizó *N*bromosuccinamida como fuente de bromo, en diclorometano a temperatura ambiente; sin embargo, no se observó la formación del compuesto halogenado, recuperándose únicamente materia prima.

Cambiando las condiciones de reacción utilizando como catalizador ácido *p*-toluensulfónico en reflujo fue posible obtener el compuesto monohalogenado deseado (**57**), así como los productos di y trihalogenado, con rendimiento de 66% para el compuesto monohalogenado y un 22% de material de partida recuperado.

De acuerdo con la estrategia utilizada, la acetofenona halogenada fue sometida a condensación con benzaldehído en medio básico utilizando hidróxido de sodio en metanol a

reflujo, obteniendo un compuesto amarillo intenso. En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto obtenido se observaron señales correspondientes a la estructura de tocoferol y benzaldehído, y una señal simple con 6.75 ppm posible indicativo de la flavona deseada (**58**).

Igualmente, utilizando la estrategia presentada por Zheng *et al.* (2003), se realizó la secuencia de ciclación intramolecular en medio básico del derivado tipo 2-bromo-2'-hidroxiacetofenona, y posterior condensación con benzaldehído, para obtener la aurona correspondiente (**60**). Al examinar los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de los dos últimos compuestos obtenidos se observó que en ambos casos se obtuvo la aurona (**60**) y no la flavona correspondiente (**58**), con base en el intenso color amarillo del producto y el desplazamiento de la señal simple a 6.75 ppm (Figura 5.20). Lo anterior fue confirmado al comparar los productos con la flavona obtenida por deshidrogenación de flavanona con DDQ (**56**) y con flavonoides reportados en la literatura.



**Figura 5.20**. Comparación de espectros de derivados de  $\delta$ -tocoferol. a) derivado tipo flavona (**58**) y b) derivado tipo aurona (**60**).

Con la finalidad de obtener la flavona deseada se hizo uso de hidróxido de litio para obtener el producto de condensación sin ciclar, esto es, lograr la unión del benzaldehído sin llegar a la obtención de la aurona, logrando la obtención de un intermediario de reacción que presenta

señales a 4.06 y 3.87 ppm, indicando la retención del grupo protector tosilo y la adición de la estructura del benzaldehído. Este compuesto corresponde a el producto de una condensación de Darzens (**61**) (Arai et *al.*,1999) que, al calentarse a reflujo en medio básico, genera la aurona correspondiente. Esto indica, contrario a lo que se pudiese proponer, que la aurona que se genera de forma directa en reflujo, lo hace vía el epóxido de chalcona **61** y no vía ciclación intramolecular con posterior condensación con benzaldehído.

Teneniendo en cuenta ahora que la reacción procede por el epóxido de chalcona, se consideró que además de poder realizarse la ciclación en posición  $\alpha$ , sería posible controlar la reacción de modo que se obtuviera el producto del ataque en posición  $\beta$ , la flavona, de acuerdo con los resultados reportados por Gowan *et al.* (1955), De Meyer *et al.* (1991) y Patonay *et al.* (1996) (Figura 5.21).





Para esto se realizó la condensación del derivado tipo 2-bromo-2'-hidroxiacetofenona (**57**) con benzaldehído a 0 °C, observando por cromatografía en capa fina la desaparición del material de partida y obteniendo exclusivamente el epóxido de chalcona (**61**), y dejando reaccionar posteriormente a temperatura ambiente, obteniendo además de la aurona (**60**), un compuesto que, de acuerdo con sus características espectroscópicas, específicamente da señales dobles a 3.09 y 3.20 ppm (J = 13.8 Hz) que forman un sistema AB, se propone puede ser un derivado tipo auronol (**62**) (Thi Lan *et al.*, 2015) (Figura 5.22).



**Figura 5.22.** Condensación del derivado tipo 2-bromo-2'-hidroxiacetofenona de  $\delta$ -tocoferol bajo distintas condiciones de reacción conduce a la obtención del híbrido tipo aurona de  $\delta$ -tocoferol.

Por otro lado, se exploró la obtención de cumarinas por condensación del derivado 5-formiltocoferol (**20**) con reactivos que presentan metilenos activos, como el acetoacetato de etilo con catálisis básica de piperidina, formando por condensación de Knoevenagel la 3-acetil-cumarina correspondiente (**63**).



**Figura 5.23**. Condensación de Knovenagel para obtener el derivado tipo 3-acetil-cumarina de  $\delta$ -tocoferol.

Con la finalidad de obtener 3-fenilcumarinas correspondientes se recurrió al uso de ácido fenilacético como reactivo con metileno activo, y se procedió a la condensación básica, sin embargo, no se observó la formación de la cumarina deseada, en cambio se obtuvo un compuesto rojizo como único producto, que posterior al análisis de su espectro de RMN-<sup>1</sup>H, se sugiere es el aminal (**64**) formado por el ataque de dos unidades de catalizador piperidina sobre el carbonilo del 5-formil-tocoferol (Figura 5.24). La formación de dicho producto sugiere que el metileno del ácido fenilacético no es lo suficientemente activo para condensarse a través de dicho procedimiento, por lo que se cambiaron las condiciones utilizando el reactivo deshidratante *N*,*N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) en DMSO a 110 °C, metodología a través de la cual se obtuvo la 3-fenilcumarina (**65**) correspondiente.



**Figura 5.24**. Condensación tipo Knovenagel para obtener el derivado tipo 3-aril-cumarina de  $\delta$ -tocoferol (65).

### **5.4. CONCLUSIONES**

La secuencia de ciclación-oxidación a partir de híbridos de tocoferol tipo chalcona permite el acceso a nuevos derivados tipo flavanona como mezcla diastereomérica equimolecular separable, así como nuevos híbridos de tipo flavona, en conjunto con otros derivados con grados y posiciones de insaturación diversos. Si bien la baja regioselectividad hacia el híbrido de flavanona actua en detrimento de la propuesta inicial, puede ser utilizada en la diversificación para la exploración del espacio químico de los híbridos tipo flavona.

La obtención de los derivados de tipo aurona y 3-fenil-cumarina, como parte de híbridos con fragmentos de flavonoides, a partir de los derivados 5-acetilado protegido (**24**) y 5-formilado (**20**) de  $\delta$ -tocoferol añade valor a la obtención de estos últimos, demostrando su versatilidad para acceder a nuevas entidades químicas.

# **CAPÍTULO VI**

# **MODIFICACIONES EN LA CADENA LATERAL**

## 6.1. INTRODUCCIÓN

Entre el grupo de productos considerados vitamina E, se ha reportado que los pares análogos de tocoferoles y tocotrienoles han exhibido distintos resultados en los ensayos de actividad biológica en los cuales han sido evaluados, teniendo los tocotrienoles mayor bioactividad como anticancerígenos, antidiabéticos, antiinflamatorios, antioxidantes, inmunoestimulantes, así como cardio-, neuro-, hepato- y nefroprotectores. Dichos pares de análogos presentan diferencias estructurales únicamente en la cadena lateral, saturación total para tocoferoles y tres insaturaciones para tocotrienoles (Ahsan *et al.*, 2014). Esta observación permite proponer que, a través de modificaciones estructurales sobre la cadena lateral exclusivamente, también es posible modular la actividad de los tococromanoles.

En la naturaleza existe una gran diversidad de cromanoles con modificaciones en la cadena lateral, además de los ya mencionados tocoferoles y tocotrienoles, es posible encontrar tocodienoles y tocomonoenoles (Figura 6.1), en aceites de semillas.



Figura 6.1. Tococromanoles con cadenas mono y biinsaturadas encontrados en fuentes vegetales.

Con respecto a modificaciones que implican la funcionalización de la cadena lateral podemos encontrar muchos y muy variados análogos, en estos predominan las funciones oxigenadas, hidroxilos, carbonilos, formilos, así como carboxilos. Incluyendo productos aislados de especies terrestres como el ácido  $\delta$ -garcinoico, garcinal, y la serie de aplexicromanoles y aplexicromanal obtenidos a partir de las especies *Garcinia kola*, *G. amplexicaulis*, así como otras especies perteneciente a la familia Clusiaceae o los litchtocotrienoles A-G aislados de *Litchi chinensis* (Figura 6.2).



Figura 6.2. Algunos tococromanoles naturales funcionalizados en la cadena lateral

Así también se ha logrado el aislamiento de derivados de tococromanol de fuentes marinas como son esponjas, ascidias, algas verdes y sobre todo algas pardas, a partir de estas últimas se logó el aislamiento de una serie de derivados denominados sargacromanoles.

La diversidad química de derivados tipo cromanol encontrados a la fecha en la naturaleza es

amplia, incluyendo compuestos policíclicos formados por el plegamiento y ciclación de la cadena lateral prenílica, formando distintos tipos de meroterpenos (Figura 6.3).





La mayor parte de los productos presentados anteriormente han sido estudiados por la posible actividad antiinflamatoria que pudiesen exhibir, utilizando para esto modelos tan diversos como la disminución de la producción de óxido nítrico, disminución de producción de prostaglandinas, inhibición de las enzimas ciclooxigenasas y lipoxigenasas, en enzimas semipuras, macrófagos o células cancerígenas, por lo cual no es posible observar de manera directa una tendencia y análisis de los factores estructurales que influencian la actividad antiinflamatoria. No obstante, Birringer *et al.* (2018) proponen la identificación de dominios generales que modulan la

actividad antiinflamatoria de estos meroterpenoides.

Estableciendo como líneas generales (Figura 6.4):

- 1. La presencia del dominio tococromanol señalizador es indispensable para la actividad.
- 2. La actividad del dominio señalizador depende en gran medida del patrón de metilación.
- La actividad depende de la longitud de la cadena, siendo la mayor cuando se tiene la longitud hasta C-13'.
- 4. La presencia de dobles enlaces en los carbonos 4', 8', y 12', ejerce poca influencia.
- 5. Cuando existen sustituyentes hidroxilo o carboxilo en las posiciones 9', 10' y 15' exhibe actividad moderada.
- 6. La ciclación parcial o total la cadena lateral aumenta la actividad.
- 7. Exhibe la mayor actividad cuando la posición 13' presenta sustituyentes hidroxilo o carboxilo.



**Figura 6.4.** Dominios propuestos por Birringer y colaboradores, que influencian la actividad antiinflamatoria de los derivados de tococromanoles.

Los lineamientos generales presentados previamente consideran observación y contraste de información de derivados oxidados, sin embargo, se excluye la funcionalización de tipo oxirano, ya que en la naturaleza únicamente se ha reportado el aislamiento del 11',12'-epoxi-δ-tocotrienol (Figura 6.5) a partir del alga parda *Sargassum tortile* (Kato *et al.*, 1975), y cuya estereoquímica no ha sido claramente definida, además de carecer de estudios de actividad antiinflamatoria.



Figura 6.5. Monoepóxido de δ-tocotrienol aislado de S. tortile.

Como se expone, existe escasa información sobre derivados epoxidados de tocotrienoles, con excepción del trabajo realizado por Bentinger *et al.* (2008), quienes demostraron que mezclas no caracterizadas de monoepóxidos y biepóxidos de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocotrienoles pueden afectar el metabolismo de lípidos en células HepG2 disminuyendo la biosíntesis de colesterol y aumentando la biosíntesis de coenzima Q. Siguiendo la misma línea de estudio, Xu et al. (2017) demostraron que una mezcla de monoepóxidos de  $\alpha$ -tocotrienol puede aumentar la curación de heridas en ratones diabéticos, posiblemente por estimulación de angiogénesis y migración celular.

La evidencia anterior implica la posibilidad de mejorar la interacción de derivados de vitamina E, por la inclusión de anillos de oxirano. De igual forma, los trabajos de Altmann *et al.* (2000) y Xie *et al.* (2005) (Figuras 6.6 y 6.7), muestran a través de análogos de epotilonas y paullonas, respectivamente, que el cambio estructural de una insaturación por un anillo oxirano es capaz de ejercer cambios en la actividad exhibida por los compuestos, al interactuar con dianas biológicas.





R	х	polimerización de tubulina %	IC <sub>50</sub> (nM) KB-31	IC <sub>50</sub> (nM) KB-8511	R	х	polimerización de tubulina %	IC <sub>50</sub> (nM) KB-31	IC <sub>50</sub> (nM) KB-8511
Me	S	83	0.13±0.02	0.09±0.02	Me	S	76	0.45±0.03	0.23±0.03
н	NMe	97	0.13±0.01	0.46±0.03	н	NMe	86	0.46±0.09	0.91±0.10
Me	NMe	99	0.14±0.01	0.38±0.10	Me	NMe	94	0.21±0.01	0.73±0.04
Н	CH=CH	78	0.11±0.01	0.10±0.02	Н	CH=CH	90	0.59±0.04	0.38±0.03

polimerización	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>
de tubulina	(nM)	(nM)
%	KB-31	KB-8511
69	2.15±0.07	1.91±0.07
90	0.19±0.05	0.18±0.01
83	2.70±0.76	1.44±0.46
49	2.92±0.18	626±32
	polimerización de tubulina % 69 90 83 49	polimerización de tubulina % IC <sub>50</sub> (nM) KB-31   69 2.15±0.07   90 0.19±0.05   83 2.70±0.76   49 2.92±0.18

Figura 6.6. Derivados de epotilonas sintetizados por Altmann et al. (2000).

Mientras, Knödler *et al.* (2008) establece la relación de la actividad inhibitoria sobre 5-LOX por parte de fenoles lipídicos con núcleo resorcinol, dejando claramente señalado que el número de insaturaciones en la cadena lateral es un factor importante en la actividad de estos compuestos, ya que al reducirse el número de insaturaciones se obtiene una disminución en la actividad del análogo, sin embargo no logran establecer claramente la relación que existe entre



la actividad y la variación de la longitud de la cadena en dichos análogos.

Figura 6.7. Paullonas sintetizadas por Xie (2005).

Es con base en las observaciones anteriores, que se propuso explorar la variación de la actividad de compuestos derivados de  $\delta$ -tocotrienol, con distintas longitudes de cadena lateral, e igualmente la variación de la actividad inhibidora de 5-LOX al realizar oxidaciones en la cadena lateral por la inclusión de características de epóxido.

## 6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.2.1. Epoxidación de $\delta$ -tocotrienol a temperatura ambiente

Unos 22.7 mg de  $\delta$ T3 (**12**) fueron disueltos en 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en agitación constante a temperatura ambiente, posteriormente se añadieron dos equivalentes de mCPBA 85% (11.62 mg, 1 equivalente), uno cada hora, y se dejó reaccionar por 17 h.

Transcurrido el tiempo, la reacción fue detenida extrayendo con una disolución de NaHCO<sub>3</sub> saturada, y secada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, el disolvente fue retirado, y la mezcla de reacción sometida a cromatografía en columna con éter de petróleo/AcOEt (8:1).

## 6.2.2. Epoxidación de δ-tocotrienol a 0 °C

Unos 103.8 g de  $\delta$ T3 (**12**) se disolvieron en 12 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se colocaron en un baño de hielo. Una disolución de *m*CPBA 85% fue preparada disolviendo 56 mg (1 equivalente) en 3 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y se añadió por goteo, 0.5 mL cada 10 min, luego de añadir toda la disolución, la mezcla de reacción se dejó reaccionar por 20 min más en el baño de hielo, retirando el baño después y dejando en agitación por 17 h.

Transcurrido el tiempo, la reacción fue detenida extrayendo con una disolución de NaHCO<sub>3</sub> saturada, y secada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, el disolvente fue retirado, y la mezcla de reacción sometida a cromatografía en columna con éter de petróleo/AcOEt (8:1).

### 6.2.3. Análisis por resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-<sup>1</sup>H) se obtuvieron en un espectrómetro JEOL 400HY o un espectrómetro Anasazi Eft 90, utilizando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>), marca Aldrich. Los desplazamientos químicos se proporcionan en partes por millón (ppm) y referidos a los protones residuales del disolvente deuterado.

### 6.2.4. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia

Se realizó la búsqueda de un sistema adecuado para la separación de los derivados monoepoxidados de  $\delta$ -tocotrienol, utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia marca Waters, separations module e2695 con detector PDA 2998, y una columna Luna®C<sub>18</sub> 100Å, 150 mm × 4.6 mm × 5 µm (Phenomenex). Las inyecciones realizadas fueron de 10 µL, en distintos sistemas en gradiente e isocráticos, con flujo de 0.5 mL/min, y la detección se realizó a  $\lambda$  = 300 nm.

### 6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de la epoxidación a temperatura ambiente fue posible conocer el desarrollo de la reacción de epoxidación sobre  $\delta$ -tocotrienol. En la Figura 6.8 se puede observar que los distintos derivados formados se agrupan según el grado de epoxidación en la cadena lateral al ser analizados por cromatografía en capa delgada.

Lo anterior fue confirmado por el análisis de las distintas fracciones aisladas, en cuyos espectros (Anexo 1) se observa un decremento en la integral del conjunto de señales correspondientes a los protones vinílicos (alrededor de 5 ppm) y un aumento coherente en el conjunto de señales alrededor de 2.7 ppm, los protones de carbonos unidos a oxígeno, lo cual indica el grado de epoxidación de cada fracción.

Debido a la pequeña cantidad de material obtenida para cada fracción (2.3 mg de monoepóxido mezcla 1, 2.0 mg de monoepóxido mezcla 2, 1.3 mg de biepóxido mezcla 1 y 1.7 mg de biepóxido mezcla 2) no se prosiguió con la caracterización, en cambio, tomando el conocimiento adquirido sobre el monitoreo de la formación de derivados epoxidados se planteó

la posibilidad de aumentar la cantidad de material inicial y disminuir el número de derivados generados.



**Figura 6.8.** Epoxidación a temperatura ambiente. a) Monitoreo  $\delta$ T3 vs reacción en CCD corrida en ciclohexano/AcOEt (7:3), b) Análisis de fracciones aisladas por cromatografía en columna (en rectángulos se marcan dos distintas fracciones que pertencen al grupo de biepóxidos).

Con base en los resultados obtenidos, y tomando en cuenta el protocolo de epoxidación a temperatura reducida utilizado por Neighbors *et al.* (2005), se decidió disminuir la temperatura con un baño de hielo (0 °C), y utilizar únicamente un equivalente de *m*CPBA, con la finalidad de restringir la formación mayoritaria de monoepóxidos.

Al llevar a cabo la separación fue posible detectar la formación mayoritaria de derivados monoepoxidados con un rendimiento de 49%, y recuperación de 34% del material de partida ( $\delta$ -tocotrienol), que al comparar con el procedimiento a temperatura ambiente, para el cual se tiene obtención de 47% de mezcla de monoepóxidos, así como 54% de mezcla de biepóxidos, sin recuperación de material de partida, convierten al procedimiento a temperatura reducida en un procedimiento más adecuado para la obtención de derivados monoepoxidados.

Para la búsqueda de sistemas de separación aplicables a los compuestos monoepoxidados se recurrió a la cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa, restringiéndose al uso de los modificadores metanol (MeOH) y acetonitrilo (ACN).

Es posible observar en la Figura 6.9 que utilizando mezclas MeOH/H<sub>2</sub>O no se obtiene separación alguna de los monoepóxidos contenidos en la muestra, generando un único pico con  $t_R$  = 36.6 min.

Por el contrario, por medio del uso de mezclas ACN/H<sub>2</sub>O (Figura 6.10) es posible observar la separación de picos que se propone son generados por distintos derivados monoepoxidados de  $\delta$ -tocotrienol.



**Figura 6.9**. a) Apilado de cromatogramas, MeOH: 100%. b) Cromatograma de la mejor separación obtenida con mezclas  $MeOH/H_2O$  (90:10).



**Figura 6.10.** a) Apilado de cromatogramas, ACN: 100%. b) Cromatograma con separación mejorada con mezclas ACN/H<sub>2</sub>O (70:30).

Observando la mayor separación con el sistema con elución en gradiente, indicado en la Figura 6.11, en la cual se observan tres picos con  $t_R$  = 113.6, 116.4, 119.6 min, los cuales se propone corresponden cada uno a los distintos regioisómeros epoxidados en las posiciones 3', 7' y 11', presentando, sin embargo, la problemática de no poder observar la separación de los seis posibles isómeros.



**Figura 6.11.** a) Cromatograma de la mejor separación obtenida con mezclas  $H_2O/ACN$ . Gradiente ACN: 20% - 40 min, 60% - 60 min, 70% - 90 min, 70% - 130 min, 100% - 145 min. b) Ampliación del cromatograma entre 110 y 124 min.

Con el objetivo de lograr una mejor separación, se optó por el cambio de fase estacionaria a otra de fase reversa de tipo pentafluorofenil (PFP), recomendada para la separación de compuestos aromáticos. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la Figura 6.12. En el cromatograma de la Figura 6.12b es posible observar la formación de seis picos no resueltos entre 30 y 45 min, para los cuales se propone que cada pico corresponde a cada uno de los seis diastereoisómeros monoepoxidados.

De acuerdo con Jang *et al.* (2005), es posible realizar la separación de mezclas diasteroméricas de tococromanoles con oxidaciones en la cadena lateral por CLAE en columnas de  $C_{18}$  con sistemas de MeOH/H<sub>2</sub>0, utilizando proporciones que implican un bajo uso del modificador MeOH (25%), requiriendo por lo tanto mayores tiempos de separación. Al aplicar dicho principio en la elución, como se puede observar en el cromatograma de la Figura 6.12c, los tiempos de retención de los componentes de la mezcla aumentan y la resolución disminuye, posiblemente por difusión longitudinal.

Debido a los resultados obtenidos, se propone la derivatización de los analitos para la modificación de sus características fisicoquímicas, esperando un impacto positivo en los tiempos de retención para la separación de los diferentes diastereisómeros.

Con respecto a la propuesta de generar derivados de tococromanoles con cadena lateral de tres distintas longitudes con el extremo formilado, se llevó a cabo la secuencia de reacciones mostradas en la Figura 6.13. La secuencia incluye la protección del fenol, por medio de acetilación, de acuerdo con el protocolo señalado por Mojtahedi y Samadian (2013), seguido por epoxidación con *m*CPBA, apertura del anillo de oxirano para la formación de dioles

vecinales con ácido perclórico y, finalmente, la ruptura hasta tres aldehídos de distinta longitud (**67-69**) con peryodato de sodio, de acuerdo con la metodología reportada por West *et al.* (2008).



**Figura 6.12**. Cromatogramas de las separaciones de la mezcla de epóxidos obtenidos utilizando la columna PFP. a) ACN: 100%, b) ACN: 50%, H<sub>2</sub>O: 50%, c) ACN: 40%, H<sub>2</sub>O: 60%.

Fue posible detectar cada intermedio y producto final de la secuencia sintética propuesta. Sin embargo, es preciso señalar la baja estabilidad de los derivados escindidos con funcionalidad de formilo al final de la cadena lateral (**67-69**), posiblemente oxidándose a ácidos carboxílicos, apoyado por la conservación de la integral de las señales correspondientes a la estructura, excepto la señal generada por los protones de aldehído (9.7-9.8 ppm).

Una segunda aproximación es la oxidación de los dobles enlaces del δ-tocotrienol con KMnO<sub>4</sub> para obtener los ácidos carboxílicos directamente. Para esta secuencia igualmente es necesaria la protección del fenol, y se utilizó igualmente el grupo acetato, posteriormente la ruptura oxidativa se realizó utilizando KMnO<sub>4</sub> en acetona a reflujo, obteniendo una mezcla, que

al comparar por CCD parece contener los tres ácidos correspondientes, sin embargo, al mismo tiempo una gran diversidad de subproductos fue observada, por lo que no se continuó con la exploración de dicha alternativa.



**Figura 6.13**. Propuesta probada para la obtención de productos de ruptura con funcionalización de aldehído.

### 6.4. CONCLUSIONES

El uso de las insaturaciones en la cadena lateral del  $\delta$ -tocotrienol constituye una estrategia útil para su funcionalización; asimismo, el uso de ácido *m*-cloroperbenzoico, debido a su

mecanismo de oxidación por inserción de oxígeno a dobles enlaces, es compatible con el núcleo de cromano.

Es posible preferenciar la generación de derivados monoepoxidados de  $\delta$ -tocotrienol, por medio del control de temperatura y equivalentes utilizados de ácido *m*-cloroperbenzoico. Sin embargo, no fue posible llevar a cabo la separación de los seis diastereoisómeros correspondientes incluso haciendo uso de cromatográfia líquida de alta eficiencia con columna de fase reversa.

Haciendo uso de la misma estrategia de epoxidación en conjunto con la apertura-ruptura de cada anillo de oxirano fue posible ganar acceso a derivados de cadena corta, sin embargo, estos últimos presentan baja estabilidad.
## **CAPÍTULO VII**

# EXPLORACIÓN DEL POTENCIAL PARA LA INHIBICIÓN DE 5-LIPOXIGENASA DE LOS DERIVADOS DE VITAMINA E POR ACOPLAMIENTO MOLECULAR

### 7.1. INTRODUCCIÓN

El acoplamiento molecular puede ser utilizado para modelar la interacción entre una molécula pequeña, el ligando, y una proteína a nivel atómico, lo cual permite caracterizar su comportamiento en el sitio de unión de proteínas diana (Meng *et al.*, 2011). Los algoritmos de acoplamiento molecular ejecutan predicciones cuantitativas de las energías de unión, proveyendo una clasificación para los ligando evaluados (Ferreira *et al.*, 2015).

El proceso de acoplamiento para la identificación de las conformaciones más suceptibles a ocurrir en la unión involucra dos pasos básicos: la exploración del gran espacio conformacional que representan los modos potenciales de unión (usualmente referido como pose) y la determinación de la energía de interacción asociada a cada conformación predicha. Estos pasos implican por tanto métodos de muestreo y esquemas de puntaje (usualmente referido como *scoring*), que los programas de acoplamiento molecular realizan y aplican a través de un proceso cíclico, en el cual la conformación del ligando es evaluada por funciones que le otorgan un puntaje, y este proceso se lleva a cabo en repetidas ocasiones hasta que converge a una solución de mínima energía (Ferreira *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2011).

En la etapa de búsqueda conformacional, los parámetros estructurales del ligando como los grados de libertad torsional, translacional y rotacional son modificados en incrementos. Los algoritmos de búsqueda conformacional efectúan esta tarea aplicando métodos de búsqueda sistemáticos y también estocásticos. En la etapa de asignación de puntajes se emplean funciones que estiman la energía de unión predicha para los complejos ligando-receptor. La variación de energía debida a la formación de la estructura ligando-receptor, es dada por la constante de unión ( $K_d$ ) y la energía libre de Gibbs ( $\Delta$ G). La predicción de esta energía se lleva a cabo evaluando los fenómenos fisicoquímicos más importantes involucrados en la unión del ligante con el receptor, que incluyen las interacciones intermoleculares, la desolvatación y el efecto entrópico (Ferreira *et al.*, 2015).

El acoplamiento molecular se ha establecido y empleado ampliamente con buenos resultados

para la identificación de nuevos compuestos bioactivos sobre proteínas diana específicas, por lo que actualmente se sitúa embebido en el flujo de trabajo para el descubrimiento y desarrollo de fármacos, en conjunto con otras herramientas *in silico* y técnicas experimentales. Entre las diversas aplicaciones del acoplamiento molecular podemos encontrar estudios de estructura-actividad, optimización de estructuras líderes, encontrar líderes potenciales por cribado virtual, proveer hipótesis de unión para facilitar predicciones en estudios de mutagénesis, estudio de mecanismos químicos y diseño de bibliotecas combinatorias (Prieto-Martínez *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2011; Morris y Lim-Wilby, 2008).

Aunque el acoplamiento molecular es empleado usualmente con el propósito de encontrar la orientación preferida de un ligando y asi modelar las interacciones con una macromolecula objetivo, también ha sido utilizado para la predicción de la actividad de ligandos (Vilar y Costanzi, 2012).

Las metodologías basadas en estructura más exactas para clasificar un conjunto de ligandos según su afinidad de unión con una proteína son métodos de primeros principios para el cálculo de su energía libre de unión, por ejemplo, a través de perturbación de energía libre (FEP, por sus siglas en inglés), sin embargo, estos requieren mayor tiempo y esfuerzo para la preparación y optimización del sistema para aplicarse a grandes conjuntos de compuestos. Si bien es cierto, que se considera que las funciones de *scoring* generan resultados que no correlacionan perfectamente con las afinidades experimentales aun cuando el cálculo se base en complejos geométricamente exactos, han demostrado la capacidad de clasificar compuestos activos e inactivos, lo que, en conjunto con su rapidez, convierten al acoplamiento molecular una atractiva herramienta para la predicción de actividades biológicas. Para realizar estas predicciones las funciones de *scoring* de acoplamiento molecular no requieren conjuntos de entrenamiento, entonces puede ser utilizado para correlacionar dichos resultados con las afinidades experimentales (Trisciuzzi *et al.*, 2018; Vilar y Costanzi, 2012).

De este modo, los resultados de acoplamiento molecular han sido empleados para la predicción de actividad biológica de ligandos para inhibir la quinasa B-Raf tipo II (Liu *et al.*, 2015), múltiples quinasas y metaloproteinasas de matriz (MMPs) (Fukunishi *et al.*, 2018) y el potencial androgénico de diversos compuestos (Trisciuzzi *et al.*, 2017).

En estudios previos se ha realizado acoplamiento molecular con la enzima 5-LOX específicamente sobre el sitio activo (Shaaban et al., 2020; Ul-Hag et al., 2016), utilizando como ligantes derivados de tipo 5-bencilidén-2-feniltiazolinonas y pirazologuinazolina, respectivamente (Figura 7.1). Sin embargo, también se ha reportado el uso de derivados de lípidos fenólicos con núcleo de tipo hidroquinona y resorcinol (Figura 7.1), así como derivados de vitamina E, en estudios de acoplamiento en un sitio alostérico propuesto, situado en la región intermedia entre los dominios catalítico y tipo-C2, cuyo volumen esta definido por los residuos GLN15, TYR81, TYR100, ARG101, TRP102, VAL110, GLU134, ASP170, ARG401 y GLU622 (Figura 7.2) (Sisa et al., 2020; Dinh et al. 2020; Pein et al., 2018). De acuerdo con los resultados obtenidos por Pein et al. (2018) para el acoplamiento molecular de ácido garcinoico, un derivado de vitamina E con sobresaliente inhibición sobre 5-LOX, y que presenta funcionalización carboxilo al final de la cadena lateral, las interacciones más relevantes para este ligando con la enzima son puentes de hidrógeno con los residuos TRP102 y VAL110, así como interacciones hidrofóbicas con VAL110, HIS130, LIS133, TYR383, ARG401. Por su parte, en el trabajo realizado por Sisa et al. (2020) con lípidos fenólicos, se señala la importancia de la formación de puentes de hidrógeno con TYR142 y presencia de la interacción con ARG138, en conjunto con la elongación de la cadena lateral desde 5 hasta 11 carbonos, ya que la perdida de dichas características deriva en disminución de actividad. Finalmente, Dinh et al. (2020) señala los puentes de hidrógeno con los residuos TRP102, VAL110, GLU134, ASP170 y ARG401 como relevantes para la de actividad inhibitoria de distintos derivados de vitamina E, presentando de forma conjunta el establecimiento de un modelo semicuantitativo para la estimación de la inhibición enzimática basado en los resultados del acoplamiento molecular.





5-benciliden-2-feniltiazolinonas





2-metoxi-6-alquil-1,4-hidroquinonas

**Figura 7.1.** Estructuras base de derivados utilizados para acoplamiento molecular sobre 5-LOX.

Con base en lo anterior y la posibilidad de acceso a una biblioteca de datos de compuestos derivados de vitamina E, se propuso realizar el acoplamiento molecular para los compuestos contenidos en el presente trabajo.



**Figura 7.2.** Sitio de unión alostérico situado entre los dominios catalítico (rojo) y tipo C2 (superior, azul) de 5-LOX.

## 7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.2.1. Preparación de los ligandos y la proteína

Las estructuras de los ligandos (Anexo 4) fueron las correspondientes a compuestos propuestos y otros obtenidos en este trabajo, así como las estructuras pertenecientes a una biblioteca química de análogos de vitamina E sintetizados en el laboratorio SONAS (Angers), los cuales han sido previamente evaluados para la inhibición de 5-LOX. Los ligandos fueron construidos utilizando el software ChemDraw y Chem3D (ChemOffice 16), y minimizados energéticamente utilizando el campo de fuerza MM2. La estructura de la enzima 5-lipoxigenasa estable fue obtenida desde el repositorio Protein Data Bank (PDB ID: 308Y), y utilizando el progama UCSF Chimera 1.14 se eliminaron las moléculas de agua y se retuvo la cadena B, se añadieron hidrógenos considerando puentes de hidrógeno, también se añadieron cargas utilizando el campo de fuerza AMBERff14SB para residuos estándar y Gasteiger para residuos no estándar.

### 7.2.2. Parámetros para el acoplamiento molecular

Para el acoplamiento molecular se utilizó el software AutoDock Vina 1.1.2 (Trott y Olson, 2009) via interfaz del progama UCSF Chimera 1.14, se definió la región de búsqueda (coordenadas x,

y, z) situada con centro en el punto x = -10.874, y = 74.1295, z = 26.4636 y con dimensiones x = 15.8183, y = 21.5337 y z = 21.8292 Å, región que incluye la cavidad interdominio, el sitio reportado previamente (Sisa et al., 2020; Dinh et al. 2020; Pein et al., 2018); para el ligando se asignaron cargas y removieron los hidrógenos no polares, y se definió el número de modos de unión en 10, exhaustividad de la búsqueda de 8 y máxima diferencia energética en 3 kcal/mol Los resultados fueron analizados con el software Discovery Studio Visualizer V19.1.0 (Biovia), para la visualización de interacciones no covalentes.

#### 7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con la metodología descrita se realizó el acomplamiento molecular en la estructura de la enzima 5-LOX, obteniendo el *score* para cada compuesto en la biblioteca química de análogos de vitamina E, definiendo dos grupos, el conjunto de entrenamiento y el conjunto de prueba. Utilizando el conjunto de entrenamiento fue posible establecer un modelo lineal que relaciona la actividad biológica (inhibición enzimática reportada) con el *score* (el cual en este caso es presentado como un estimado de la energía de unión para el complejo proteína-ligando) (Figura 7.3, tabla 7.1 y anexo 2).





Al comparar las concentraciones inhibitorias experimentales contra las concentraciones inhibitorias calculadas para el mismo conjunto de entrenamiento (Figura 7.4), así como el error experimental asociado al ensayo *in vitro* contra la diferencia absoluta de las concentraciones inhibitorias experimental y calculada (Figura 7.5), fue posible observar una mayor discrepancia entre los datos experimentales y las concentraciones inhibitorias ajustadas al modelo para los cuatro compuestos con mayor concentración inhibitoria.

	Variable dependiente
	Vscore
pIC50	-1.001***
	(0.066)
Constante	-0.430
	(0.498)
Observaciones	150
r <sup>2</sup>	0.605
r <sup>2</sup> ajustada	0.602
Error Est. Residual	0.416 (df = 148)
Estadístico F	226.833*** (df = 1; 148)

Tabla 7.1. Tabla resumen del modelo lineal de la actividad inibitoria vs score.

Nota: \*p<0.1; \*\*p<0.05; \*\*\*p<0.01





En el caso del conjunto de prueba, al emplear el modelo para la predicción de la concentración inhibitoria se encontró que la diferencia entre las concentraciones inhibitorias experimental y calculada fue en la mayoría de los casos superior al error experimental (Figura 7.6), aun así, quedando por debajo de la concentración inhibitoria experimental. Esto último nos indica desviaciones que pueden ser importantes para la aplicación del modelo para la predicción exacta de la actividad inhibitoria, sin embargo, estos resultados pueden ser de utilidad para

priorizar sobre enfoque de esfuerzos en la síntesis de análogos propuestos, así como el desarrollo de nuevas propuestas de inhibidores potenciales.



**Figura 7.5.** Comparación del error asociado a las concentraciones experimentales contra la diferencia absoluta de las concentraciones absolutas ( $CI_{exp} - CI_{calc}$ ) del conjunto de entrenamiento.





Posteriormente el modelo obtenido se empleó para la predicción de las concentraciones inhibitorias medias de análogos propuestos de tipo chalcona, retrochalcona, 3-fenilcumarina, R y S flavanonas, flavona, así como aurona y derivados de cadena corta, con estructura base de  $\delta$ -tocoferol,  $\delta$ -tocotrienol y ácido  $\delta$ -garcinoico. En la Figura 7.7 se muestran los resultados para todos aquellos análogos cuya concentración inhibitoria calculada fue menor a 600 nM. Es evidente que la mayor parte de los análogos híbridos de tipo flavanona fueron excluidos, asimismo el conjunto incluido de análogos de tipo flavona presentan altas concentraciones

inhibitorias. Por el contrario, los análogos de tipo aurona, así como el conjunto de intermedios desprotegidos de reacción de la ruta de síntesis de chalconas presentaron menores concentraciones inhibitorias.

Con base en los resultados anteriores, se seleccionaron los análogos con concentración inhibitoria calculada menor al ácido  $\delta$ -garcinoico, compuesto con mejor actividad inhibitoria de las estructuras incluidas en el modelo (57 nM).



**Figura 7.7.** Concentraciones inhibitorias medias calculadas para los análogos propuestos, con resultado menor a 600 nM.

Los compuestos marcados como SHOEtdGA (**125S**, 30 nM), 3F4MeOdT3Chalcona (**48**, 49 nM) y las auronas 4CldT3Aurona (**116**, 48 nM), 4FdT3Aurona (**115**, 21 nM) y dT3Aurona (**60**, 43 nM) fueron seleccionados, y se analizaron las interacciones que cada uno de éstos presentan con la enzima (Anexo 3) y se compararon con las presentadas por el ácido  $\delta$ -garcinoico, presentando todos los compuestos coincidencias en interacciones hidrofóbicas con los residuos ALA-388, ARG-401 y VAL397, mientras que otras coincidencias no fueron compartidas por todos los compuestos mencionados, que incluyen las interacciones hidrofóbicas con los residuos TYR-383, PHE-393 y HIS-624. Todas las interacciones señaladas corresponden a las que se presentan entre dichos residuos y la porción de cada molécula que corresponde al esqueleto de cromano, lo cual es consistente con el acomodamiento de cada compuesto en el bolsillo de unión, que, como puede apreciarse en la Figura 7.8, la orientación espacial de este núcleo coincide en gran medida.



Figura 7.8. Superposición de poses de los analógos con menores concentraciones inhibitorias.

Es preciso señalar que, de los cinco análogos seleccionados, cuatro de ellos, tienen como núcleo base para su formación el δ-tocotrienol (167 nM), lo cual nos indica que por medio de la inclusión de fragmentos de tipo flavonoide obteniendo nuevos híbridos, específicamente de tipo aurona, se puede obtener híbridos con actividad inhibitoria sobre 5-LOX mejorada.

#### 7.4. CONCLUSIONES

Se estableció un modelo para la estimación de actividad inhibitoria sobre 5-LOX por medio de acoplamiento molecular, y este fue utilizado para la predicción de actividad de derivados de vitamina E propuestos. De este modo, fue posible identificar compuestos que potencialmente poseen actividad similar al compuesto con mejor actividad en el modelo (ácido  $\delta$ -garcinoico) y, a su vez, una concentración inhibitoria menor a un tercio de la correspondiente al compuesto base ( $\delta$ -tocotrienol). En cuanto a las interacciones compartidas, son de tipo hidrofóbico y corresponden al acomodamiento de la cadena lateral dentro del sitio de unión, resaltando la importancia de la cadena lateral como una pieza clave para la actividad de los derivados.

## **CAPÍTULO VIII**

## **CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS**

#### **8.1. CONCLUSIONES GENERALES**

La aplicación de las dos metodologías utilizadas que incluyen el uso de cromatografía en columna clásica con permeación en gel, o bien utilizando cromatografía flash automatizada permiten el aislamiento y purificación de vitamina E en su forma  $\delta$ -tocotrienol a partir de fracciones enriquecidas obtenidas de las semillas completas de *Bixa orellana*, con rendimientos similares y de acuerdo con el contenido que ha sido reportado previamente para dicha fuente vegetal.

A través de la ruta semi-sintética establecida fue posible obtener no solamente derivados tipo chalcona prenilada, sino también de tipo *retro*-chalcona prenilada. A su vez fue posible comprobar la necesidad de contar con el fenol del núcleo de cromanol protegido por la susceptibilidad de éste a las condiciones básicas de condensación.

La fotosensibilidad de chalconas y retro-chalconas preniladas corresponde a reportes previos en cuanto a la isomerización *trans-cis*, así como la generación de otros derivados posterior a la irradiación. La cantidad de derivado formado, así como la rapidez del proceso, está fuertemente influenciada por los patrones de sustitución y el medio, imposibilitando, permitiendo y variando las cantidades encontradas de los derivados, destacando el caso de la *retro*-chalcona prenilada protegida, ya que ésta última es capaz de generar bajo las condiciones descritas en este trabajo el derivado correspondiente con esqueleto tipo flavilio, es decir, una 3desoxiantocianidina prenilada, cuya formación directa, sin equilibrios, no ha sido reportada previamente.

En cuanto a la generación de derivados tipo flavona, fue posible obtener acceso a ellos vía ciclación y posterior oxidación a partir de los derivados tipo chalcona prenilada, ya que otras aproximaciones no generaron los derivados objetivo. Sin embargo, como resultado de esta búsqueda, se establecíó la posibilidad de generar nuevos derivados que igualmente son de interés, esto es, de tipo flavanona y aurona preniladas.

La epoxidación y ruptura oxidativa son procesos de gran utilidad para la funcionalización de la cadena lateral de las formas de vitamina E que poseen insaturaciones en dicha porción de la

molécula. Aunque los productos generados presentan importantes retos en su manejo, como son la degradación de productos de ruptura oxidativa por desproporción, y la compleja separación de la mezcla diastereomérica de epóxidos.

Por medio de modelado y acoplamiento molecular fue posible estimar la inhibición de diversos análogos de vitamina E sobre la enzima 5-LOX. De acuerdo con los resultados obtenidos se tiene que los híbridos con esqueleto 2-aril-4-cromano (flavonas y flavanonas) poseen un bajo potencial de inhibición enzimática, mientras que los híbridos con esqueleto 2-bencilidénbenzofuran-3-ona (auronas) con baja o nula sustitución, poseen potencial como inhibidores de 5-LOX.

## 8.2. PERSPECTIVAS

Emplear las metodologías semi-sintéticas cuya aplicación exitosa ha sido corroborada en el presente trabajo con la finalidad de obtener análogos de tipo aurona y 3-aril-cumarina prenilados.

Explorar la utilización de una columna quiral para llevar a cabo el aislamiento de los diferentes diastereoisómeros monoepoxidados en la cadena lateral y posteriormente realizar la apertura del epóxido.

Realizar el ensayo de actividad inhibitoria sobre 5-LOX para cada uno de los nuevos derivados obtenidos en conjunto con bioensayos que brinden información de su potencial en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Abu-fayyad, A., Behery, F., Sallam, A.A., Alqahtani, S., Ebrahim, H., El Sayed, K.A., Kadoumi,
   A., Sylvester, P.W., Carroll, J.L., Cardelli, J.A. (2015). PEGylated γ-tocotrienol isomer of
   vitamin E: synthesis, characterization , in vitro cytotoxicity , and oral bioavailability.
   *European Journal of Pharmaceutics And Biopharmaceutics*, 96, 185-195.
- Agrawal A.D. (2011). Pharmacological activities of flavonoids: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 4, 1394-1398.
- Ahsan, H., Ahad, A., Iqbal, J., Siddiqui, W.A. (2014). Pharmacological potential of tocotrienols: a review. *Nutrition and Metabolism*, 11, 1-22.
- Ahsan, H., Ahad, A., Siddiqui, W.A. (2015). A review of characterization of tocotrienols from plant oils and foods. *Journal of Chemical Biology*, 8, 45-59.
- Ali, M.S., Ali, M.I., Ahmed, G., Afza, N., Lateef, M., Iqbal, L., Waffo, A.F.K., Ahmed, Z. (2012).
   Potent antioxidant and lipoxygenase inhibitory flavanone and chalcone from *Erythrina mildbraedii* Harms (Fabaceae) of Cameroon. *Zeitschrift für Naturforschung*, 67b, 98-102.
- Aljančić, I.S., Vučković, I., Jadranin, M., Pešić, M., Đorđević, I., Podolski-Renić, A., Stojković, S., Menković, N., Vajs, V.E., Milosavljević, S.M. (2014). Two structurally distinct chalcone dimers from *Helichrysum zivojinii* and their activities in cancer cell lines. *Phytochemistry*, 98, 190-196.
- Alsabil, K., Viault, G., Sour-Cherer, S., Helesbeux, J., Merza, J., Dumontet, V., Peña-Rodriguez, L.M., Richomme, P.,Seraphin, D. (2017). Efficient *ortho*-formylation in vitamin E series, application to the semi-synthesis of natural 5- and 7-formil-δ-tocotrienols revealing an unprecedented 5-bromo-7-formyl exchange. *Tetrahedron*, 73, 6863-6870.
- Altmann, K., Bold, G., Caravatti, G., FloÈrsheirmer, A., Guagnano, V., Wartmann, M. (2000). Synthesis and biological evaluation of highly potent analogues of epothilones B and D. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 10, 2765-2768.
- Arai, S., Shirai, Y., Ishida, T., Shioiri, T. (1999). Phase-transfer-catalyzed asymmetric darzens reaction. *Tetrahedron*, 55, 6375-6386.

- Babu, M.A., Shakya, N., Prathipati, P., Kaskhedikar, S.G., Saxena, A.K. (2002). Development of 3D-QSAR models for 5-lipoxygenase antagonists: chalcones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10, 4035-4041.
- Bäck, M. (2009). Inhibitors of the 5-lipoxygenase pathway in atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Design*, 15, 3116-3132.
- Bandgar, B.P., Gawande, S.S., Bodade, R.G., Totre, J.V., Khobragade, C.N. (2010). Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, antiinflammatory and antioxidant agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18, 1364-1370.
- Bano, S., Javed, K., Ahmad, S., Rathish I.G., Singh, S., Chaitanya, M., Arunasree, K.M., Alam,
  M.S. (2013). Synthesis of some novel chalcones, flavanones and flavones and evaluation of their anti-inflammatory activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 65, 51-59.
- Barnes, P.J. (2006). How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *British Journal of Pharmacology*, 148, 245-254.
- Barontini, M., Bernini, R., Crisante F., Fabrizi, G. (2010). Selective and efficient oxidative modifications of flavonoids with 2-iodoxybenzoic acid (IBX). *Tetrahedron*, 66, 6047-6053.
- Basílio, N., Pina, F. (2013). Chemistry and photochemistry of anthocyanins and related compounds: a thermodynamic and kinetic approach. *Molecules*, 21, 1502.
- Behery, F.A., Akl, M.R., Ananthula, S., Parajuli, P., Sylvester, P.W., El Sayed, K.A. (2013). Optimization of tocotrienols as antiproliferative and antimigratory leads. *European Journal* of *Medicinal Chemistry*, 59, 329-341.
- Behery, F.A., Elnagar, A.Y., Akl, M.R., Wali, V.B., Abuasal, B., Kaddoumi, A., Sylvester, P.W.,
   El Sayed, K.A. (2010). Redox-silent tocotrienol esters as breast cancer proliferation and
   migration inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18, 8066-8075.
- Bentinger, M., Tekle, M., Brismar, K., Chojnacki, T., Swiezewska, E., Dallner, G. (2008). Polyisoprenoid epoxides stimulate the biosynthesis of coenzyme Q and inhibit cholesterol synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 14645-14653.
- Bhagat, S., Sharma, R., Sawant, D.M., Sharma, L., Chakraborti, A.K. (2006). LiOH·H<sub>2</sub>O 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. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 244, 20-24.

- Birringer, M., Siems, K., Maxones, A., Frank, J., Lorkowski, S. (2018). Natural 6-hydroxychromanols and -chromenols: structural diversity, biosynthetic pathways and health implications. *Royal Society of Chemistry Advances*, 8, 4803-4841.
- Bishayee, K.; Khuda-Bukhsh, A.R. (2013). 5-lipoxygenase antagonist therapy: a new approach towards targeted cancer chemotherapy. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 45, 709-719.
- Bohm, B.A. (1998). Introduction to flavonoids. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 246, 305-306.
- Bostock, R.M., Savchenko, T., Lazarus, C., Dehesh, K. (2011). Eicosapolyenoic acids. Novel MAMPs with reciprocal effect on oomycete-plant defense signaling networks. *Plant Signaling and Behavior*, 6, 531-533.
- Botta, B., Menendez, P., Zappia, G., Alves de Lima, R., Torge, R., Delle Monachea, G. (2009).
  Prenylated isoflavanoids: botanical distribution, structures, biological activities and biotechnological studies. An update (1995-2006). *Current Medicinal Chemistry*, 16, 3414-3468.
- Burnett, B.P., Levy, R.M. (2012). 5-Lipoxygenase metabolic contributions to NSAID-induced organ toxicity. *Advances in Therapy*, 29, 79-98.
- Burnett, B.P., Swafford, W.S., Ehrenzweig, J., y Levy, R.M. (2009). A flavonoid mixture, dual inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase enzymes, shows superiority to glucosamine/chondroitin for pain management in moderate osteoarthritic dogs. *International Journal of Applied Research for Veterinnary Medicine*, 7, 1-12.
- Charlton, J.L., Lai, H.K., Lypka, G.N. (1980). Photoreactions of α-sulfonyloxyketones. *Canadian Journal of Chemistry*, 58, 458-462.
- Correa, N.M., Silber, J.J., Riter, R.E., Levinger, N.E. (2012). Nonaqueous polar solvents in reverse micelle systems. *Chemical Reviews*, 112, 4569-4602.

Coutinho, A.E. y Chapman, K.E. (2011). The anti-inflammatory and immunosuppressive effects

of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cell Endocrinology*, 335, 2-13.

- Damodar, K., Kim, J.K., Jun, J.G. (2016). Synthesis and pharmacological properties of naturally occurring prenylated and pyranochalcones as potent anti-inflammatory agents. *Chinese Chemical Letters*, 27, 698-702.
- Das, J. y Gosh, S. (2011). A new synthesis of flavones and pyranoflavone by intramolecular photchemical Wittig reaction in water. *Tetrahedron Letters*, 52, 7189-7194.
- De Meyer, N., Haemers, A., Mishra, L., Pandey, H.K., Pieters, L.A.C., Berghe, D.A.V., Vlietinck, A.J. (1991). 4'-hydroxy-3-methoxyflavones with potent antipicornavirus activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 34, 736-746.
- Detsi, A., Majdalani, M., Kontogiorgis, C.A., Hadjipavlou-litina, D. (2009). Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 8073-8085.
- Devia, B., Llabres, G., Wouters, J., Dupont, L., Escribano-Bailon, M.T., De Pascual-Teresa, S., Angenot, L., Tits, M. (2002). New 3-deoxyanthocyanidins from leaves of *Arrabidaea chica*. *Phytochemical Analysis*, 13, 114-120.
- Dewick, P.M. (1988) Isoflavonoids, en: The Flavonoids. Adances in Research since 1980, Harborne, J.B. (Ed.). Chapman & Hall, London, pp. 125.
- Dewick, P.M. (2009). Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, pp. 169.
- Dimmock, J.R., Elias, D.W., Beazely, M.A., Kandepu, N.M. (1999). Bioactivities of chalcones. *Currents in Medicinal Chemistry*, 6, 1125-1149.
- Dinh, C.P., Ville, A., Neukirch, K., Viault, G., Temml, V., Koeberle, A., Werz, O., Schuster, D., Stuppner, H., Richomme, P., Helesbeux, J. J., Séraphin, D. (2020). Structure-based design, semi-synthesis and anti-inflammatory activity of tocotrienolic amides as 5lipoxygenase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 202, 112518.

Donelly, D.M. X., Sheridan M.H. (1988). Neoflavonoids, en: The Flavonoids. Adances in

Research since 1980, Harborne, J.B. (Ed.). Chapman & Hall, London, pp. 211.

- Ducharme, Y., Blouin, M., Brideau, C., Châteauneuf, A., Gareau, Y., Grimm, E. L., Juteau, H., Laliberté, S., MacKay, B., Massé, F., Ouellet, M., Salem, M., Styhler, A., Friesen, R. W. (2010). The discovery of setileuton, a potent and selective 5-lipoxygenase inhibitor. *Medicinal Chemistry Letters*, 1, 170-174.
- Ducki, S., Forrest, R., Hadfield, J.A., Kendall, A., Lawrence, N.J., McGown, A.T., Rennison, D. (1998). Potent antimitotic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 8, 1051-1056.
- El-Desoky, E.I., Abozeid, M.A., Abdel-Rahman, A.H. (2015). Quinacetophenone: a simple precursor to privileged organic motifs. *Arabian Journal of Chemistry*, 12, 3380-3405.
- Elmgreen, J., Ronne, I.A., Nielsen, O.H. (1989). Inhibition of human neutrophils by auranofin: chemotaxis and metabolism of arachidonate via the 5-lipoxygenase pathway. *Rheumatic Diseases*, 48, 134-138.
- Elnagar, A.Y., Wali, V.B., Sylvester, P.W., El Sayed, K.A. (2010). Design and preliminary structure–activity relationship of redox-silent semisynthetic tocotrienol analogues as inhibitors for breast cancer proliferation and invasion. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18, 755–768.
- Ferreira, L., dos Santos, R., Oliva, G., Andricopulo, A. (2015). Molecular docking and structurebased drug design strategies. *Molecules*, 20, 13384-13421.
- Frega, N., Mozzon, M., Bocci, F. (1998). Identification and estimation of tocotrienols in the annatto lipid fraction by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 1723-1727.
- George, F., Figueiredo, P., Brouillard, R. (1999). Malvin Z-chalcone: an unexpected new open cavity for the ferric cation. *Phytochemistry*, 50, 1391-1394.
- Gil, A. (2002). Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56, 388-396.

- Gomes M.N., Muratov, E.N., Pereira, M., Peixoto, J.C., Rosseto, L.P., Cravo, P.B.L., Andrade, C.H., Neves, B.J. (2017). Chalcone derivatives: promising starting point for drug design. *Molecules*, 22, 1220.
- Gómez-Linton, D.R., Navarro-Ocaña, A., Román-Guerrero, A., Alavez, S., Pinzón-López, L., Mendoza-Espinoza, J.A., Pérez-Flores L.J. (2021). Environmentally friendly achiote seed extracts with higher δ-tocotrienol content have higher *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity than the conventional extract. *Journal of Food Science and Technology*, 58, 2579–2588.
- Gowan, J.E., Hayden, P.M., Wheeler T.S. (1955). A new synthesis of flavonols. *Journal of the Chemical Society*, 1955, 862-866.
- Grayer, R.E.J., Veitch, N.C. (2006). Flavanones and dihydroflavonols, en: Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications, Andersen, Ø.M., Markham, K.R. (Eds.). Taylor & Francis, United States of America, pp. 918-919. Gu, X., Wang, X., Wang, F., Sun, H., Liu, J., Xie, Y., Xiang, M. (2014). Pyrrolidine-mediated direct preparation of (*E*)-monoarylidene derivatives of homo- and heterocyclic ketones with various aldehydes. *Molecules*, 19, 1976-1989.
- Hanáková, Z., Hošek, J., Babula, P., Dall'Acqua, S., Václavík, J., Smejkal, K. (2015) Cgeranylated flavanones from *Paulownia tomentosa* fruits as potential anti-inflammatory compounds acting via inhibition of TNF-α production. *Journal of Natural Products*, 78, 850-863.
- Hanáková, Z., Hošek, J., Kutil, Z., Temml, V., Landa, P., Vaněk, T., Schuster, D., Dall'acqua, S., Cvačka, J., Polanský, O., Šmejkal, K. (2017). Anti-inflammatory activity of natural geranylated flavonoids: cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitory properties and proteomic analysis. *Journal of Natural Products*, 80, 999-1006.
- Harborne, J.B. (1973). Biosynthesis of phenolic compounds derived from shikimate, en: Biosynthesis. Volume 2 (Specialist Periodical Reports), Geissman, T.A. (Ed.). Royal Society of Chemistry, Norwich, pp. 237.
- Harlan, L., Mena, L.T., Ramalingam, L., Jayarathne, S., Shen, C.L., Moustaid-Moussa, N. (2020). Mechanisms Mediating Anti-Inflammatory Effects of Delta-Tocotrienol and Tart Cherry Anthocyanins in 3T3-L1 Adipocytes. *Nutrients*, 12, 3356.

- Ibrahim, S.R.M., Mohamed, G.A., Alshali, K.Z., Al Haidari, R.A., El-Kholyf, A.A., Zayeda, M.F. (2018). Lipoxygenase inhibitors flavonoids from *Cyperus rotundus* aerial parts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28, 320-324.
- Ionescu, L.G., De Fávere, V.T. (1982). Formation of micelles of cetyltrimethylammonium bromide in water-acetone solutions, en: Solution Behavior of Surfactants: Theoretical and Applied Aspects (Volume 1), Mittal, K.L., Fendler, E.J. (Eds.). Springer, Massachussets, pp. 407-416.
- Iwata, S., Nishino, T., Inoue, H., Nagata, N., Satomi, Y., Nishino, H., Shibata, S. (1997). Antitumorigenic activities of chalcones (II). Photo-isomerization of chalcones and the correlation with their biological activities. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 20, 1266-1270.
- Jang, K.H., Lee, B.H., Choi, B.W., Lee, H., Shin, J. (2005). Chromenes from the brown alga Sargassum siliquastrum. Journal of Natural Products, 68, 716-723.
- Janisch, K.M., Milde, J., Schempp, H. (2005). Vitamin C, vitamin E and flavonoids. *Developments in Ophthalmology*, 38, 59-69.
- Jiang, Q. (2014). Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 72, 76-90.
- Jondiko, I.J.O., Pattenden, G. (1989). Terpenoids and an apocarotenoid from seeds of *Bixa orellana*. *Phytochemistry*, 28, 3159-3162.
- Joshi, R.A., Saraswat, M. (2004). Guide to bio-chemistry. B. Jain Publishers, New Delhi, pp. 113-114.
- Kalchevski, D.A., Petrov, V., Tadjer, A., Nenov, A. (2018). Impacts of hydroxylation on the photophysics of chalcones: insights into the relation between the chemical composition and the electronic structure. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20, 8924-8934.
- Kato, T., Kumanireng, A.S., Ichinose, I., Kitahara, Y., Kakinuma, Y., Kato, Y. (1975). Structure and synthesis of active component from a marine alga, *Sargassum tortile*, which induces the settling of swimming larvae of *Coryne uchidai*. *Chemistry Letters*, 4, 335-338.

- Khanapure, S.P., Garvey, D.S., Janero, D.R., Letts, L.G. (2007). Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7, 311-340.
- Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96, 229-245.
- Kim, K.H., Lee, H.S., Kim, S.H., Kim J.N. (2012). Palladium-catalyzed oxidative arylation of chromones via a double C–H activation: an expedient approach to flavones. *Tetrahedron Letters*, 53, 2761-2764.
- Knödler, M., Conrad, J., Wenzig, E.M., Bauer, R., Lacorn, M., Beifuss, U., Carle, R., Schieber,
  A. (2008). Anti-inflammatory 5-(11'Z-heptadecenyl)- and 5-(8'Z,11'Z-heptadecadienyl)resorcinols from mango (*Mangifera indica* L.) peels. *Phytochemistry*, 69, 988-993.
- Konishi, F., Esaki, S., Kamiya, S. (1983). Synthesis and taste of some flavanone and dihydrochalcone glycosides in which carbohydrate moieties are located at differing positions of the aglycones. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47, 1419-1429.
- Kontogiorgis, C.A., Hadjipavlou-litina, D.J. (2005). Synthesis and antiinflammatory activity of coumarin derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48, 6400-6408.
- Krause, M., Galensa R. (1991). Analysis of enantiomeric flavanones in plant extracts by High-Performance Liquid Chromatography on cellulose triacetate based chiral stationary phase. *Chromalographia*, 32, 69-72.
- Lei, T., Zhou, C., Huang, M., Zhao, L., Yang, B., Ye, C., Xiao, H., Meng, Q., Ramamurthy, V., Tung, C., Wu, L. (2017). General and efficient intermolecular [2+2] photodimerization of chalcones and cinnamic acid derivatives in solution through visible-light catalysis, *Angewandte Chemie International Edition*, 56, 15407-15410.
- Leydet, Y., Batat, P., Jonusauskas, G., Denisov, S., Lima, J.C., Parola, A.J., Mcclenaghan, N.D., Pina, F. (2013). Impact of water on the *cis–trans* photoisomerization of hydroxychalcones. *The Journal of Physical Chemistry A*, 117, 4167-4173.
- Liu H., Lu S., Ran T., Zhang Y., Xu J., Xiong X., Xu A., Lu T., Chen Y. (2015). Accurate activity predictions of B-Raf type II inhibitors via molecular docking and QSAR methods. *Acta*

Physico-Chimica Sinica, 31, 2191-2206.

- Fukunishi, Y., Yamashita, Y., Mashimo, T., Nakamura, H. (2018). Prediction of proteincompound binding energies from known activity data: docking-score-based method and its applications. *Molecular Informatics*, 37, 1700120.
- Liu, X., Gujarathi, S., Zhang, X., Shao, L., Boerma, M., Compadre, C.M., Crooks, P.A., Hauer-Jensen, M., Zhou, D., Zheng, G. (2016). Synthesis of (2*R*,8'S,3'*E*)-δ-tocodienol, a tocoflexol family member designed to have a superior pharmacokinetic profile compared to δ-tocotrienol. Tetrahedron, 72, 4001-4006.
- Lo, H., Lin, C., Tseng, M., Chein, R. (2014). Lithiation of a silyl ether: formation of an ortho-Fries hydroxyketone. *Angewandte*, 53, 9026-9029.
- Lockhande, P.D., Dalvi, B.A., Humme, V.T., Nawghage B.R., Kareem A. (2014). Copper (II) chloride: A regioselective catalyst for oxidative armatization of pyrazoline, isoxazoline and 3-mehyl flavanones. *Indian Journal of Chemistry*, 53B, 1091-1097.
- Maldonado, T., Ferraudi, G., Lappin, A.G., Godoy, F. (2018). Kinetic and mechanistic observations on the photoindced isomerization reaction of organometallic chalcones: a steady state and flash photolysis study. *ChemPhotoChem*, 2, 95-104.
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D.B., Roitt, I. (2006). Immunology. Mosby-Elsevier, Canada, pp. 3, 5, 6, 15, 28.
- Marais, J.P.J., Deavours, B., Dixon, RA., Ferreira, D. (2006). The stereochemistry of flavonoids, en: The science of flavonoids, Grotewold, E. (Ed.). Springer Science, United States of America, pp. 1, 3-5.
- Masferrer, J., Zweifel, B.S., Hardy, M., Anderson, G.D., Dufield, D., Cortes-Burgos, L., Pufahl, R.A., Graneto, M. (2010). Pharmacology of PF-4191834, a novel, selective non-redox 5lipoxygenase inhibitor effective in inflammation and pain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 334, 294-301.
- Matsushima, R., Kageyama, H. (1985). Photochemical cyclization of 2'-hydroxychalcones. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions II, 6, 743-748.

Mendoza, J., Pina, F., Basílio, N., Guimarães, M., de Freitas, V., Cruz, L. (2018). Extending the

stability of red and blue colors of malvidin-3-glucoside-lipophilic derivatives in the presence of SDS micelles. *Dyes and pigments*, 151, 321-326.

- Menezes, J.C.J.M.D.S., Diederich M.F. (2019). Natural dimers of coumarin, chalcones, and resveratrol and the link between structure and pharmacology. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 18, 111637.
- Mojtahedi, M., Samadian, S. (2013). Efficient and rapid solvent-free acetylation of alcohols, phenols, and thiols using catalytic amounts of sodium acetate trihydrate. *Journal of Chemistry*, 2013, 1-7.
- Mondal, R., Das Gupta, A., Mallik, A.K. (2011). Synthesis of flavanones by use of anhydrous potassium carbonate as an inexpensive, safe, and efficient basic catalyst. *Tetrahedron Letters*, 52, 5020-5024.
- Morris, G.M., Lim-Wilby, M. (2008). Molecular Docking, en: Molecular Modeling of Proteins (Vol. 443), Kukol, A. (Ed.). Humana Press, pp. 366, 370.
- Mulinacci, N., Romani, A., Pinelli, P., Gallori, S., Giaccherini, C., Vincieri, F.F. (2001) Stabilisation of natural anthocyanins by micellar Systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 216, 23-31.
- Murray, R., Rodwell, V.W., Bender, D., Botham, K.M., Weil, P.A., Kennelly, P.J. (2003). Harper's illustrated biochemistry. McGraw-Hill, New York, pp. 200-201.
- Narender, T., Papi Reddy, K. (2007). A simple and highly efficient method for the synthesis of chalcones by using borontrifluoride-etherate. *Tetrahedron Letters*, 48, 3177-3180.
- Neighbors, J.D., Beutler, J.A., Wiemer, D.F. (2005). Synthesis of nonracemic 3deoxyschweinfurthin B. *Journal of Organic Chemistry*, 70, 925-931.
- Neo, A.G., López, C., Romero, V., Antelo, B., Delamano, J., Pérez, A., Fernández, D., Almeida, J.F., Castedo, L., Tojo, G. (2010). Preparation of phenanthrenes by photocyclization of stilbenes containing a tosyl group on the central double bond. A versatile approach to the synthesis of phenanthrenes and phenanthrenoids. *Journal of Organic Chemistry*, 75, 6764-6770.

Nesaretnam, K., Meganathan, P. (2011). Tocotrienols : inflammation and cancer. Annals of The

New York Academy of Sciences, 1229, 18-22.

- 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. *Journal of Natural Products*, 83, 770-803.
- Nicodem, D.E., Matos, J.A.M.G. (1981). Photoisomerization of chalcone: wavelength dependence. *Journal of Photochemistry*, 15, 193-202.
- Njamen, D., Mbafor, J.T., Fomum, Z.T., Kamanyl, A., Mbanya, J., Recio, M.C., Giner, R.M., Máñez, S., Ríos, J.L. (2004). Anti-inflammatory activities of two flavanones, sigmoidin A and sigmoidin B, from *Erythrina sigmoidea*. *Planta Medica*, 70, 104-107.
- Norikane, Y., Itoh, H., Arai, T. (2002). Photochemistry of 2'-hydroxychalcone. one-way cis-trans photoisomerization induced by adiabatic intramolecular hydrogen atom transfer. *Journal of Physical Chemistry A*, 106, 2766-2776.
- Norikane, Y., Nakayama, N., Tamaoki, N., Arai, T., Nagashima, U. (2003). Quantum chemical studies on photoinduced *cis-trans* isomerization and intramolecular hydrogen atom transfer of 2'-hydroxychalcone. *Journal of Physical Chemistry A*, 107, 8659-8664.
- Nowakowska, Z. (2007). A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42, 125-137.
- Noyce, D.S., Jorgenson, M.J. (1961). Carbonyl reactions. XII. The kinetics and mechanism of the *cis* to *trans* isomerization of substituted chalcones. *Journal of the American Chemical Society*, 83, 2525-2532.
- Noyce, D.S., Jorgenson, M.J. (1963). The isomerization of substituted cis-chalcones in sulfuric acid. Consequences of the two mechanisms. *Journal of the American Chemical Society*, 85, 2420-2426.
- O'Leary, K.A., Pascual-Tereasa, S., Needs, P.W., Bao, Y., O'Brien, N.M., Williamson, G. (2004). Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutation Research*, 551, 245-254.
- Ohnmacht, S., West, R., Simionescu R., Atkinson, J. (2008). Assignment of the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR of tocotrienols. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 46, 287-294.

- Padhye, S., Ahmad, A., Oswal, N., Sarkar, F.H. (2009). Emerging role of garcinol, the antioxidant chalcone from garcinia indica choisy and its synthetic analogs. *Journal of Hematology & Oncology*, *2*, 38.
- Palczewski, K. (2012). Chemistry and biology of vision. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 1612-1619.
- Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, 1-15.
- Patani G.A., LaVoie, J. (1996). Bioisosterism: a rational approach in drug design. Chemical Reviews, 96, 3147-3176.
- Patel, A., Böhmdorfer, S., Hofinger, A., Netscher, T., Rosenau, T. (2009). Bromination of non-α-tocopherols: a comparative synthetic, kinetic and computational study. *European Journal of Organic Chemistry*, 2009, 4873-4881.
- Patil, C.B., Mahajan, S.K., Katti, S.A. (2009). Chalcone: a versatile molecule. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1, 11-22.
- Patonay, T., Lévai, A. Nemes, C. (1996). Synthesis and cyclization of 1-(2-hydroxyphenyl)-2propen-1-one epoxides: 3-hydroxychromanones and -flavanones versus 2-(1hydroxyalkyl)-3-coumaranones. Journal of Organic Chemistry, 61, 5375-5383.
- Pein, H, Ville, A., Pace, S. Temml, V., Garscha, U., Raasch, M., Alsabil, K., Viault, G., Dinh, C., Guilet, D., Troisi, F., Neukirch, K., König, S., Bilancia, R., Waltenberger, B., Stuppner, H., Wallert, M., Lorkowski, S., Weinigel, C., Rummler, S., Birringer, M., Roviezzo, F., Sautebin, L., Helesbeux, J., Séraphin, D., Mosig, A.S., Schuster, D., Rossi, A., Richomme, P., Werz, O., Koeberle, A. (2018) Endogenous metabolites of vitamin E limit inflammation by targeting 5-lipoxygenase. *Nature Communications*, 9, 3834.
- Peters-Golden, M., Brock, T.G. (2003). 5-lipoxygenase and FLAP. *Prostaglandins, Leukotrienes* and Essential Fatty Acids, 69, 99-109.
- Peters-Golden, M., Henderson, W.R. (2007). Leukotrienes. *The New England Journal of Medicine*, 357, 1841-1854.

- Pina, F., Melo, M.J., Laia, C.A.T., Parola, A.J., Lima, J.C. (2012a). Chemistry and applications of flavylium compounds: a handful of colours. *Chemical Society Reviews*, 41, 869-908.
- Pina, F., Petrov, V., Laia, C.A.T. (2012b). Photochromism of flavylium systems. An overview of a versatile multistate system. *Dyes and Pigments*, 92, 877-889.
- Prieto-Martínez, F.D., Arciniega, M., Medina-Franco, J.L. (2018). Acoplamiento molecular: avances recientes y retos. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 21, 65-87.
- Rådmark, O., Werz, O., Steinhilber, D., Samuelsson, B. (2015). 5-lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1851, 331-339.
- Reddy, N.P., Aparoy, P., Mohan, T.C., Achari, C., Sridhar, P.R., Reddanna, P. (2010). Design , synthesis , and biological evaluation of prenylated chalcones as 5-LOX inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18, 5807-5815.
- Reiter, E., Jiang, Q., Christen, S. (2007). Anti-inflammatory properties of α- and γ-tocopherol. *Molecular Aspects of Medicine*, 28, 668-691.
- Rodrigues, T., Reker, D., Schneider, P., Schneider, G. (2016). Counting on natural products for drug design. *Nature Chemistry*, 8, 531-541.
- Romanelli, G.P., Virla, E.G., Duchowicz, P.R., Gaddi, A.L., Ruiz, D.M., Bennardi, D.O., Del Valle Ortiz, E., Autino, J.C. (2010). Sustainable synthesis of flavonoid derivatives, QSAR study and insecticidal activity against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6290-6295.
- Rosenau, T., Ebner, G., Stanger, A., Perl, S., Nuri, L. (2005). From a theoretical concept to biochemical reactions: strain-induced bond localization (SIBL) in oxidation of vitamin E. *Chemistry - A European Journal*, 11, 280-287.
- Rossi, A., Pergola, C., Koeberle, A., Hoffmann, M., Dehm, F., Bramanti, P., Cuzzocrea, S., Werz, O., Sautebin, L. (2010). The 5-lipoxygenase inhibitor, zileuton, suppresses prostaglandin biosynthesis by inhibition of arachidonic acid release in macrophages. *British Journal of Pharmacology*, 161, 555–570.

- Sakhawat, S.S., Ejaz-ur-Rehman. (1987). Effect of Temperature and Aprotic Solvents on the CMC of Sodium Dodecyl Sulphate, en: Interactions of Water in Ionic and Nonionic Hydrates, Kleeberg, H. (Ed.). Springer, Berlin, pp. 251-255.
- Sashidhara, K.V., Kumar, M., Kumar, A. (2012). A novel route to synthesis of flavones from salicylaldehyde and acetophenone derivatives. *Tetrahedron Letters*, 53, 2355-2359.
- Schneider, S., Brem, B., Jäger, W., Rehaber, H., Lenoir, D., Frank, R. (1999). Influence of solvent viscosity on the photoisomerization of a novel *trans*-stilbene derivative with hindered single bond torsion. *Chemical Physics Letters*, 308, 211-217.
- Selepe, M.A., Van Heerden, F.R. (2013). Review. Application of the Suzuki-Miyaura reaction in the synthesis of flavonoids. *Molecules*, 18, 4739-4765.
- Sen, C. K., Khanna, S., Roy, S. (2007). Tocotrienols in health and disease : The other half of the natural vitamin E family. *Molecular Aspects of Medicine*, 28, 692-728.
- Sendrowski, D.P., Jaanus, S.D., Semes, L.P., Stern, M.E. (2008). Anti-inflammatory drugs, en: Clinical Ocular Pharmacology, Bartlett J.D., Jaanus, S.D. (Eds.). Butterworth-Heinemann, USA, pp. 233-236.
- Shaaban, M.A., Kamal, A.M., Faggal, S.I., Farag, N.A., Aborehab, N.M., Elsahar, A.E., Mohamed, K.O. (2020). Design, synthesis, and biological evaluation of new pyrazoloquinazoline derivatives as dual COX-2/5-LOX inhibitors. *Archiv Der Pharmazie*, 353, 2000027.
- Shah, P., Westwell, A.D. (2007). The role of fluorine in medicinal chemistry. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 22, 527-540.
- Shaik, A., Bhandare, R.R., Palleapati, K., Nissankararao, S., Kancharlapalli, V., Shaik, S. (2020). Antimicrobial, antioxidant, and anticancer activities of some novel isoxazole ring containing chalcone and dihydropyrazole derivatives. *Molecules*, 25, 1047.
- Sidharth, S.N., Yuvaraj, A.R., Tay Joo Hui, Sarojini B.K., Mashitah, M.Y., Hegde, G. (2014). Light induced properties of chalcones correlated with molecular structure and photophysical properties for permanent optical storage device. *Advanced Materials Research*, 1033-1034, 1149-1153.

- Sisa, M., Dvorakova, M., Temml, V., Jarosova, V., Vanek, T., Landa, P. (2020). Synthesis, inhibitory activity and in silico docking of dual COX/5-LOX inhibitors with quinone and resorcinol core. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 204, 112620.
- Sogawa, S., Nihro, Y., Ueda, H., Izumi, A. (1993). 3,4-Dihydroxychalcones as potent 5lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 36, 3904-3909.
- Stanger, A. (1998). Strain-induced bond localization. The heteroatom case. *Journal of American Chemical Society*, 120, 12034-12040.
- Steinhilber, D., Hofmann, B. (2014). Recent advances in the search for novel 5-lipoxygenase inhibitors. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 114, 70-77.
- Tan, B., Foley, J. (2002). Tocotrienols and geranylgeraniol from *Bixa orellana* byproducts, US6350453B1, US Patent (https://patentimages.storage.googleapis.com/e1/85/c4/30a55594928e09/US6350453.pdf).
- Tardif, C., L'Allier, P.L., Ibrahim, R., Gregoire, J.C., Nozza, A., Cossette, M., Kouz, S., Lavoie, M., Paquin, J., Brotz, T.M., Taub, R., Pressacco, J. (2010). Treatment with 5-lipoxygenase inhibitor VIA-2291 (atreleuton) in patients with recent acute coronary syndrome. *Circulation: Cardiovascular Imagining*, 3, 298-307.
- Thi Lan, P.D., Vuong Nguyen, Q., Chien Vu, V., Nguyen Le, T., Hue Nguyen, T., Hang Pham,T., Minh Chau, V., Cuong Pham, V. (2015). Synthesis of auronol derivatives and their immunostimulating activity. Natural Product Communications 10, 591-594.
- Trisciuzzi, D., Alberga, D., Leonetti, F., Novellino, E., Nicolotti, O., Mangiatordi, G.F. (2018). Molecular Docking for Predictive Toxicology, en: Computational Toxicology: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology (vol. 1800), Orazio Nicolotti (Ed.). Humana Press, New York, pp. 181-198.
- Trisciuzzi, D., Alberga, D., Mansouri, K., Judson, R. S., Novellino, E., Mangiatordi, G. F., Nicolotti, O. (2017). Predictive structure-based toxicology approaches to assess the androgenic potential of chemicals. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 57, 2874-2884.

- Trott, O., Olson, A.J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31, 455-461.
- UI-Haq, Z., Khan, N., Zafar, S.K., Moin, S.T. (2016). Active site characterization and structure based 3D-QSAR studies on non-redox type 5-lipoxygenase inhibitors. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88, 26-36.
- Vardanega, R., Nogueira, G.C., Nascimento, C.D.O., Faria-Machado, A.F., Meireles, M.A.A. (2019). Selective extraction of bioactive compounds sequential from annatto seeds by supercritical CO<sub>2</sub> process. *Journal of Supercritical Fluids*, 150, 122-127.
- Viault, G., Helesbeux, J., Richomme, P., Séraphin, D. (2018). Concise semisynthesis of novel phenazine-vitamin E hybrids via regioselective tocopheryl ortho-quinone formation. *Tetrahedron Letters*, 59, 2627-2630.
- Vilar, S., Costanzi, S. (2012). Predicting the biological activities through QSAR analysis and docking-based scoring, en: Membrane protein structure and dynamics methods in molecular biology (vol. 914), Vaidehi, N., Klein-Seetharaman, J. (Eds.), Humana Press, New Jersey, pp. 271-284.
- West, R., Wang, Y., Atkinson, J. (2008). ω-di-(trideuteromethyl)-tocotrienols as probes for membrane orientation and dynamics of tocotrienols. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 51, 413-418.
- Won, S., Liu, C., Tsao, L., Weng, J., Ko, H., Wang, J., Lin, C. (2005). Synthetic chalcones as potential anti-inflammatory and cancer chemopreventive agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 103-112.
- Wong, W.Y., Ward, L.C., Fong, C.W., Yap, W.N., Brown, L. (2015). Anti-inflammatory γ- and δ-tocotrienols improve cardiovascular, liver and metabolic function in diet-induced obese rats. *European Journal of Nutrition*, 56, 133-150.Khor, B.H., Tiong, H.C., Tan, S.C., Wong, S.K., Chin, K.Y., Karupaiah, T., Ima-Nirwana, S.; Abdul Gafor, A. H. (2021). Effects of tocotrienols supplementation on markers of inflammation and oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLOS ONE*, *16*, e0255205.

- Wu, X. F., Neumann, H., Spannenberg, A., Schulz, T., Jiao, H. J., Beller, M. (2010).
   Development of a general palladium-catalyzed carbonylative Heck reaction of aryl halides.
   *Journal of the American Chemical Society*, 132, 14596-14602.
- Xie, X., Lemcke, T., Gussio, R., Zaharevitz, D.W., Leost, M., Meijer, L., Kunick, C. (2005). Epoxide-containing side chains enhance antiproliferative activity of paullones *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 655-661.
- Xu, C., Bentinger, M., Savu, O., Moshfegh, A., Sunkari, V., Dallner, G., Swiezewska, E., Catrina, S., Brismar, K., Tekle, M. (2017) Mono-epoxy-tocotrienol-α enhances wound healing in diabetic mice and stimulates in vitro angiogenesis and cell migration. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 31, 4-12.
- Xu, C., Chen, G., Huang, X. (1995). Chalcones by the Wittig reaction of a stable ylide with aldehydes under microwave irradiation. *The New Journal for Organic Synthesis*, 27, 559-561.
- Yadav, L.D.S. (2005). Organic Spectroscopy. Springer, Dordrecht, pp. 1-6.
- Yang, Q., Alper, H. (2010). Synthesis of chromones via palladium-catalyzed ligand-free cyclocarbonylation of *o*-iodophenols with terminal acetylenes in phosphonium saltionic liquids. *Journal of Organic Chemistry*, 75, 948-950.
- Yañez, J.A., Andrews, P.K., Davies, N.M. (2007). Methods of analysis and separation of chiral flavonoids, *Journal of Chromatography B*, 848, 159-181.
- Yaylı, N., Üçüncü, O., Aydın, E., Gök, Y., Yaşar, A., Baltacı, C., Yıldırım, N., Küçük, M. (2005). Stereoselective photochemistry of heteroaryl chalcones in solution and the antioxidant activities. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 169, 229-234.
- Zhang, J., Fu, X., Yang, N., Wang, Q., (2013a). Synthesis and cytotoxicity of chalcones and 5deoxyflavonoids. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-6.
- Zhang, X., Li, L., Wang, S., Que, S., Yang, W., Zhang, F., Gong, N., Cheng, W., Liang, H., Ye, M., Jia, Y., Zhang, Q. (2013b). Oxyfadichalcones A-C: three chalcone dimers fused through a cyclobutane ring from Tibetan medicine *Oxytropis falcata* Bunge. *Tetrahedron*, 69, 11074-11079.

- Zheng, X., Cao, J., Meng, W., Qing, F. (2003). Synthesis and anticancer effect of B-ring trifluoromethylated flavonoids. Bioorganic Medicinal Chemistry Letters, 13, 3423-3427.
- Zhuang, C., Zhang, W., Sheng, C., Zhang, W., Xing, C., Miao, Z. (2017). Chalcone: a privileged structure in medicinal chemistry. *Chemical Reviews*, 117, 7762-7810.

## ANEXOS



**Anexo 1.** Espectros de RMN-<sup>1</sup>H de compuestos obtenidos.

**Figura A1.1.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del O-acetil-δ-tocoferol (**18**).



**Figura A1.2.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de 5-formil-δ-tocoferol (**20**).



Figura A1.3. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del tosilato de 5-formil- $\delta$ -tocoferol (22).



**Figura A1.4.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCI<sub>3</sub>, 400 MHz) del tosilato de 5-(1-hidroxietil)- $\delta$ -tocoferol (23).



**Figura A1.5.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del tosilato de 5-acetil-δ-tocoferol (**24**).



**Figura A1.6.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de la 6'-O-tosil- $\delta$ -tocoferol-3,4,5-trimetoxi-*retro*-chalcona (**3**).


**Figura A1.7.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) la 6'-O-tosil- $\delta$ -tocoferol-3,4,5-trimetoxi-chalcona (1).



**Figura A1.8.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de la  $\delta$ -tocoferol-3,4,5-trimetoxi-*retro*-chalcona (4).



**Figura A1.9**. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de la δ-tocoferol-3,4,5-trimetoxi-chalcona (2).







**Figura A1.11.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (An-d<sub>6</sub>, 400 MHz) de la 6'-O-tosil- $\delta$ -tocoferol-3-fluoro-4-metoxi-chalcona (**41**).



**Figura A1.12.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (An-d<sub>6</sub>, 400 MHz) de la 6'-O-tosil- $\delta$ -tocoferol-4-fluoro-chalcona (**39**).



**Figura A1.13.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (An-d<sub>6</sub>, 400 MHz) de la 6'-O-tosil- $\delta$ -tocotrienol-3, 4, 5-trimetoxi-chalcona (1).



**Figura A1.14.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (An-d<sub>6</sub>, 400 MHz) de la 6'-O-tosil- $\delta$ -tocotrienol-3-fluoro-4-metoxi-chalcona (**45**).



**Figura A1.15.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (An-d<sub>6</sub>, 400 MHz) de la 6'-O-tosil- $\delta$ -tocotrienol-4-fluoro-chalcona (**43**).



**Figura A1.16.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (An-d<sub>6</sub>, 400 MHz) de la  $\delta$ -tocoferol-3-fluoro-4-metoxi-flavanona (**50**).



**Figura A1.17.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H en (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del compuesto obtenido por medio de la condensación del derivado ω-bromoacetofenona con benzaldehído en medio básico, derivado tipo aurona (**60**).



**Figura A1.18.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H en (CDCI<sub>3</sub>, 400 MHz) del epóxido de chalcona (**61**) sintetizado por condensación de Darzens.



**Figura A1.19.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H en (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del producto producto secundario (62) de la condensación de 2-bromo-2'-hidroxiacetofenona con benzaldehído



Figura A1.20. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del derivado 3-acetilcumarina-tocoferol (63)



**Figura A1.21.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del producto (**64**) del tratamiento de 5-formil-tocoferol con piperidina.



Figura A1.22. Espectro de RMN-1H de la 3-fenilcumarina (65) obtenida por condensación utilizando DCC.



**Figura A1.24.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del monoepóxido mezcla 1.



Figura A1.25. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del monoepóxido mezcla 2.



Figura A1.26. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del biepóxido mezcla 1.



Figura A1.27. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del biepóxido mezcla 2.



**Figura A1.28**. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de la mezcla de monoepóxidos de  $\delta$ -tocotrienol.



Figura A1.29. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de la mezcla de glicoles de  $\delta$ -tocotrienol.



**Figura A1.30**. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCI<sub>3</sub>, 400 MHz) del derivado de escición de  $\delta$ -tocotrienol de mayor longitud (**67**).



**Figura A1.31**. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del derivado de escición de  $\delta$ -tocotrienol de longitud media (**68**).





Anexo 2. Datos del modelo de regresión lineal.

Modelo	Im(rormula = DB_dock\$vscore ~ DB_dock\$piC50)				
	Min	1Q	Mediana	3Q	Max
Residuos	-0.93288	-0.23042	0.00418	0.20056	1.86894
		Estimado	Error estadndar	Valor t	P (> t )
Coeficientes	Intercepto	-0.43033	0.49845	-0.863	0.389
	Pendiente	-1.00146	0.06649	-15.061	<2e-2-16***
Error estandar residual	0.4162 en 14	18 grados de lil	pertad		
R <sup>2</sup> múltiple	0.6052				
R <sup>2</sup> ajustada	0.6025				
Estadistico F	226.8 en 1 y 148 DF, valor p: < 2.2e-16				

Tabla A2.1. Cuadro resumen del modelo lineal



Figura A2.1. Curva de regresión lineal



Figura A2.2. Gráfico de residuales vs valores ajustados para el modelo lineal



Figura A2.3. Gráfico Q-Q del modelo de regresión lineal



Anexo 3. Interacciones de compuestos con predicción de actividad relevate.

Figura A3.1. Interacciones del ácido garcinoico ( $\delta$ -AG) con 5-LOX.



Figura A3.2. Interacciones del compuesto SHOEtdGA (125S) con 5-LOX



Figura A3.3. Interacciones del compuesto 3F4MeOdT3Chalc (48) con 5-LOX



Figura A3.4. Interacciones del compuesto 4CldT3Aurona (116) con 5-LOX



Figura A3.5. Interacciones del compuesto 4FdT3Aurona (115) con 5-LOX



Figura A3.6. Interacciones del compuesto dT3Aurona (60) con 5-LOX



Figura A3.7. Interacciones de compuestos con menor concentracion inhibitoria calculada con residuos en el sitio de unión alostérico de 5-LOX.

Anexo 4. Estructuras de compuestos empleados para acoplamiento molecular.



 Tabla A4.1. Conjunto de entrenamiento para modelo por acoplamiento molecular.

aTE13diOH (a-AC)	106 (29)	HO OH OH
bKY382 (KA- 319)	211 (11)	
bKY410 (KA- 320)	470 (14)	
bKY414	1490 (86)	
bTE13diOH (b-AC)	91 (15)	HO OH OH
dKY69 (KA- 91)	80 (25)	
dTE13COOH (d-AG)	57 (9)	HO O O OH

dTE13diOH (d-AC)	148 (35)	HO OH OH
gTE13diOH (g-AC)	110 (0)	HO OH OH

 Tabla A4.2. Conjunto de prueba para modelo por acoplamiento molecular.

Clave	IC50 nM (Error)	Estructura
a-AG	401 (78)	
b-AG	154 (38)	HO HO HO
g-AG	303 (99)	HO O O O O O O O O O O O O O O O O O O
a-T3	332 (79)	

b-T3	186 (31)	
d-T3	167 (97)	HO
g-T3	197 (56)	HO
5-formyl-d- AC	172	HO HO O E O HO O HO O HO
a-CDMD-en	438 (67)	HO HO OH
a-deoxyAC	106 (11)	HO O E OH
d-CDMD-en	472 (143)	HO
d-deoxyAC	147 (54)	HO

dZ-AG	182 (47)	HO O OH
dZ-deoxyAC	137 (9)	HO OH
A97	174 (39)	HO O O OH
A101	171 (7)	
KA-321	625 (127)	O O O O O O O O O O O O O O O O O O O



**Figura A4.1.** Estructuras base de compuestos utilizados para predicción de actividad por medio de acoplamiento molecular

Flavanona	R <sub>1</sub>	C-2	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
70R	$C_{16}H_{33}$	R	Н	Н	Н
70S	$C_{16}H_{33}$	S	Н	Н	Н
71R	$C_{16}H_{33}$	R	Н	F	Н
71S	$C_{16}H_{33}$	S	Н	F	Н
50R	$C_{16}H_{33}$	R	F	MeO	Н
50S	$C_{16}H_{33}$	S	F	MeO	Н
72R	$C_{16}H_{33}$	R	MeO	MeO	MeO
72S	$C_{16}H_{33}$	S	MeO	MeO	MeO
73R	$C_{16}H_{27}$	R	н	н	н
73S	$C_{16}H_{27}$	S	Н	Н	Н
74R	$C_{16}H_{27}$	R	Н	F	Н
74S	$C_{16}H_{27}$	S	н	F	н
75R	$C_{16}H_{27}$	R	F	MeO	Н
75S	$C_{16}H_{27}$	S	F	MeO	Н
76R	$C_{16}H_{27}$	R	MeO	MeO	MeO
76S	$C_{16}H_{27}$	S	MeO	MeO	MeO

Cumarina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
65	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	Н	Н	Н
77	$C_{16}H_{33}$	Н	F	Н
78	$C_{16}H_{33}$	F	MeO	Н
79	$C_{16}H_{33}$	MeO	MeO	MeO
80	$C_{16}H_{27}$	Н	Н	Н
81	$C_{16}H_{27}$	Н	F	Н
82	$C_{16}H_{27}$	F	MeO	Н
83	$C_{16}H_{27}$	MeO	MeO	MeO
84	$C_{16}H_{25}O_2$	Н	Н	Н
85	$C_{16}H_{25}O_2$	Н	F	Н
86	$C_{16}H_{25}O_2$	F	MeO	Н
87	$C_{16}H_{25}O_2$	MeO	MeO	MeO

chalcona	retrochalcona	flavona	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R4
88	94	58	$C_{16}H_{33}$	Н	Н	Н
40	30	100	$C_{16}H_{33}$	Н	F	Н
42	32	56	$C_{16}H_{33}$	F	MeO	Н
2	4	101	$C_{16}H_{33}$	MeO	MeO	MeO
44	34	102	$C_{16}H_{27}$	н	н	Н
46	36	103	$C_{16}H_{27}$	Н	F	Н
48	38	104	$C_{16}H_{27}$	F	MeO	н
89	95	105	$C_{16}H_{27}$	MeO	MeO	MeO
90	96	106	$C_{16}H_{25}O_2$	н	н	Н
91	97	107	$C_{16}H_{25}O_2$	н	F	н
92	98	108	$C_{16}H_{25}O_2$	F	MeO	н
93	99	109	$C_{16}H_{25}O_2$	MeO	MeO	MeO

Aurona	R₁	R₂
60	$C_{16}H_{33}$	Н
110	$C_{16}H_{33}$	F
111	$C_{16}H_{33}$	CI
112	$C_{16}H_{33}$	HO
113	$C_{16}H_{33}$	MeO
114	$C_{16}H_{27}$	н
115	$C_{16}H_{27}$	F
116	$C_{16}H_{27}$	CI
117	$C_{16}H_{27}$	HO
118	$C_{16}H_{27}$	MeO
119	$C_{16}H_{25}O_2$	Н
120	$C_{16}H_{25}O_2$	F
121	$C_{16}H_{25}O_2$	CI
122	$C_{16}H_{25}O_2$	HO
123	$C_{16}H_{25}O_2$	MeO

Derivados simples	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
24	$C_{16}H_{33}$	Ac
23R	$C_{16}H_{33}$	( <i>R</i> ) C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O
23S	$C_{16}H_{33}$	(S) C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O
28	$C_{16}H_{27}$	Ac
27R	$C_{16}H_{27}$	( <i>R</i> ) C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O
27S	$C_{16}H_{27}$	(S) C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O
124	$C_{16}H_{25}O_2$	Ac
125R	$C_{16}H_{25}O_2$	( <i>R</i> ) C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O
125S	$C_{16}H_{25}O_2$	(S) C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O

**Figura A4.2.** Cuadros con asignación de claves de acuerdo con la estructura base y sustitución de los compuestos utilizados para el acoplamiento molecular