

Trabajo de Fin de Grado

**SÍNTESIS DE DERIVADOS DE
PRODUCTOS NATURALES COMO
POTENCIALES AGENTES
ANTICANCERÍGENOS**

***SYNTHESIS OF NATURAL PRODUCTS
DERIVATIVES AS POTENTIAL
ANTICANCER AGENTS***

Pablo Ramos Fernández

Grado en Biología

Sección de Biología

Facultad de Ciencias

Universidad de La Laguna

Curso: 2018/2019

Tutora: Dr. Celina Elena García González

Resumen

Las chalconas son metabolitos secundarios polifenólicos que presentan posibles actividades farmacológicas, siendo una de las más destacadas la actividad anticancerígena, considerándose un aspecto muy interesante para su aplicación en el campo de la medicina. El trabajo de fin de grado que se expone se basa en la síntesis sencilla y en pocos pasos de reacción de moléculas basadas en su estructura, realizando modificaciones posteriores en los sustituyentes con la finalidad de estudiar su posible actividad antitumoral frente a células leucémicas humanas. Este proyecto se basa en una chalcona que se sintetiza a través de una condensación de Claisen-Schmidt, conteniendo un grupo azida y un átomo de flúor, derivatizando, posteriormente, haciendo uso de la reacción de reducción de azidas de Staudinger, reacciones para sintetizar iminas y la reacción de cicloadición de Huisgen. Los compuestos sintetizados se monitorizan a través de cromatografía de capa fina, se purifican por cromatografía en columna de gel de sílice y por cristalización, y se visualiza su estructura química a través de espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C y de espectrometría de masas de alta resolución.

Abstract

Chalcones are polyphenolic secondary metabolites that present possible pharmacological activities, being one of the most outstanding the anticancer activity, considering itself a very interesting aspect for its application in the field of medicine. The work presented in this document is based on the simple synthesis and in a few reaction steps of molecules based on its structure, making later modifications on the substituents in order to test their possible antitumoral activity on human leukemic cells. The work is based on a chalcone that is synthesized through a Claisen-Schmidt condensation, containing an azide group and a fluorine atom, derivatizing, subsequently, making use of the Staudinger azide reduction reaction, imine synthesis reactions and the Huisgen cycloaddition reaction. The synthesized compounds are monitored through thin layer chromatography, purified by silica gel column chromatography and crystallization, and their chemical structure is visualized through ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy and high resolution mass spectrometry.

Índice

Abreviaturas	4
1. Introducción	5
1.1. Flavonoides	6
1.1.1. Datos Generales.....	6
1.1.2. Estructura Química	7
1.1.3. Chalconas.....	8
1.2. Química “Click”	9
1.2.1. Cicloadición de Huisgen	9
1.3. Síntesis de Iminas	11
1.4. Condensación de Claisen-Schmidt	12
1.5. Reacción de Staudinger	13
2. Objetivos	15
3. Material y Métodos	16
3.1. Material	16
3.2. Técnicas Experimentales	16
3.2.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	16
3.2.2. Cromatografía en Capa Fina (CCF)	16
3.2.3. Cromatografía en Columna (CC)	17
3.2.4. Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRMS).....	17
3.3. Métodos	17
3.3.1. Condensación de Claisen-Schmidt	17
3.3.2. Reacción de Staudinger	18
3.3.3. Síntesis de Iminas	18
3.3.4. Cicloadición de Huisgen	18
4. Resultados y Discusión	19
5. Conclusiones	27

Abreviaturas

°C	Grados Celsius
CC	Cromatografía en Columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
mmol	Milimol
ml	Mililitro
μl	Microlitro
RMN (¹H y ¹³C)	Resonancia Magnética Nuclear de Protón y Carbono 13
THF	Tetrahidrofurano
PBu₃	Tributilfosfina
DIPEA	N,N-Diisopropiletilamina

1. Introducción

Los productos naturales son recursos muy importantes para el desarrollo de un gran número de fármacos, pudiendo obtenerse de plantas, animales y microorganismos. Además, la aplicación de técnicas biológicas moleculares permite la producción específica de determinados compuestos en bacterias y levaduras. En el pasado, antes de la era post-genómica y del cribado de alto rendimiento, más del 80 % de los fármacos eran sustancias naturales o sintetizados a partir de las mismas (semisintéticos o sintéticos).¹

Una de las aplicaciones más importantes que tienen hoy en día los productos naturales es su utilización en el desarrollo de anticancerígenos. El cáncer es una de las enfermedades con más incidencia en la población mundial, siendo una de la que más muertes provoca y considerándose un tema prioritario de salud pública. Está provocado por una incontrolada proliferación de las células (tumor) y su posible propagación a diferentes partes del cuerpo (metástasis), pudiendo producir la muerte. Algunas de las causas a nivel celular que pueden provocar esta enfermedad son las siguientes: resistencia a señales exógenas de inhibición del crecimiento, generación de sus propias señales mitogénicas o extracelulares, evasión de la apoptosis o errores en su sistema de regulación de la multiplicación. Los hábitos que favorecen su aparición son el tabaquismo (principal), el consumo de dietas hipercalóricas ricas en grasas saturadas y pobres en frutas, verduras y hortalizas, el sedentarismo (obesidad o sobrepeso), la contaminación del aire y determinadas enfermedades infecciosas como el Virus del Papiloma Humano (VPH) y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Hay diferentes tipos de cánceres, teniendo cada uno sus causas y tratamiento específicos.²

¹ Harvey, A. L. 2008. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, Volumen 13, pp. 894-901.

² Rubio Sánchez, S. 2009. Flavonoides con actividad antitumoral: identificación del mecanismo de acción. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

1.1. Flavonoides

1.1.1. Datos Generales

Estas sustancias químicas son la familia de polifenoles más abundante dentro del mundo vegetal (se encuentran en todas las plantas terrestres y algunas algas *Charophyta*), siendo pigmentos naturales y metabolitos secundarios que protegen de agentes oxidantes (polución ambiental, rayos UV, etc.), entre otras propiedades. Se encuentran en flores, frutas, verduras, hortalizas, hojas, bebidas (vino, cerveza, té negro, té verde, ...), etc., siendo el ser humano incapaz de producirlas. Tienen normalmente una coloración amarilla (del latín *flavus* = “amarillo”).^{3,4}

Existe la posibilidad de que los flavonoides existieran desde hace mil millones de años y de que hayan permanecido en la naturaleza debido a su importancia en la misma, pero la primera descripción de los mismos probablemente haya sido cuando Robert Boyle en 1664 describió los efectos que tenían los pigmentos que se encontraban en las flores utilizando medios ácidos y básicos. El primero que se identificó fue la citrina (**Figura 1**), una sustancia que aisló de la cáscara del limón el bioquímico y fisiólogo húngaro Albert Szent-Györgyi en 1930.^{2,3}

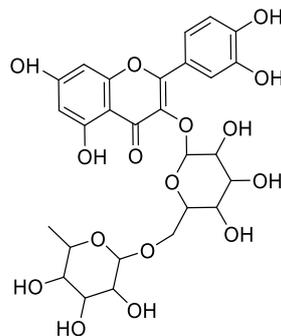


Figura 1. Estructura química de la citrina.

Las propiedades que presentan estas moléculas son muy variadas: antibacterianas, antihemorrágicas, antineoplásicas, antiinflamatorias, antivirales, hepatoprotectoras,

³ Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. & Tuñón, J., 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.*, 1. Volumen 17.

⁴ Álvarez Castro, E. & Orallo Cambeiro, F., 2010. Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *Offarm*, 22(10), pp. 11-196.

antioxidantes, antialérgicas, antiagregantes, vasodilatadoras, etc., ayudando a combatir enfermedades como el cáncer, la cardiopatía isquémica o la arterioesclerosis. También tienen la capacidad de modular la actividad de muchas enzimas, estimular las comunicaciones a través de las uniones comunicantes, regular el crecimiento y la diferenciación celulares mediante el control de los niveles de las auxinas, dar coloración (promueve la polinización), capacidad de fijar metales (p.ej. hierro y cobre), etc.^{3,4}

1.1.2. Estructura Química

Los flavonoides son polifenoles de bajo peso molecular que tienen en común un esqueleto fenil-benzo- γ -pirona o fenil- γ -cromona ($C_6-C_3-C_6$), siendo los C_6 anillos aromáticos que están unidos por tres carbonos que pueden dar lugar o no a un tercer anillo central pirona o pirano. Se encuentran libres o en forma de heterósidos en los vegetales, siendo esto último lo más frecuente.^{2,3,4}

Se clasifican en diferentes grupos atendiendo a la apertura o no del anillo central, al grado de saturación y a los sustituyentes presentes en el mismo. Éstos son los diferentes grupos de flavonoides: flavonoles, flavanoles, chalconas, antocianidinas, isoflavonas, flavonas, flavanonoles, auronas y flavanonas (**Figura 2**).^{2,4}

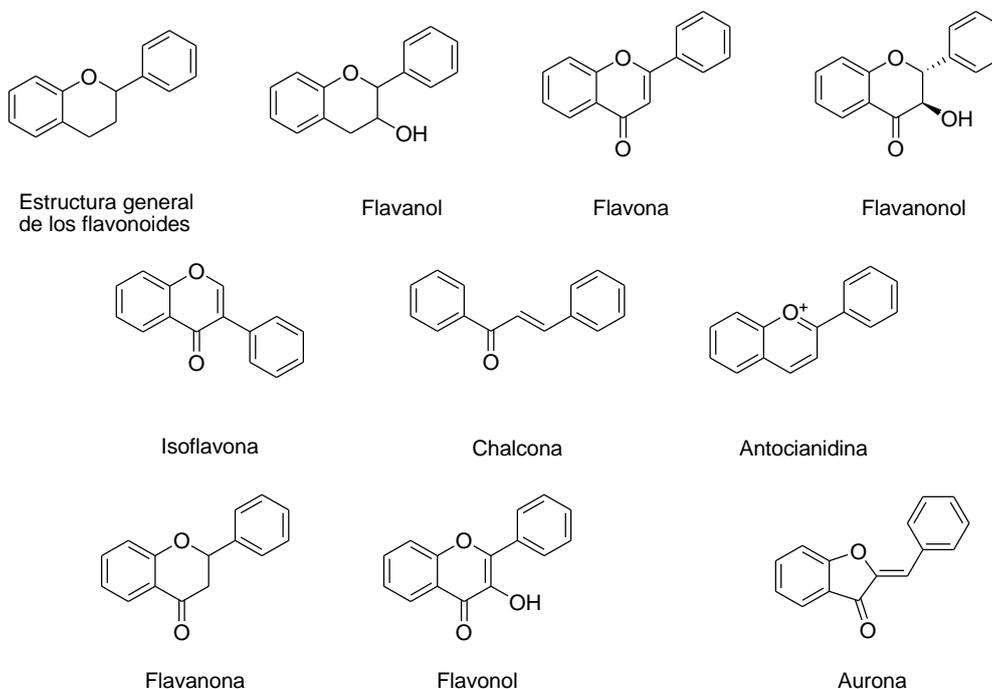


Figura 2. Estructuras químicas de los flavonoides.

1.1.3. Chalconas

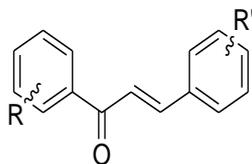


Figura 3. Estructura general de las chalconas.

Dentro de los flavonoides, está incluido el grupo de las chalconas (1,3-difenilprop-2-en-1-ona) (**Figura 3**). Estas sustancias (también llamadas “benzalacetofenonas”) son cetonas aromáticas α,β -insaturadas que están formadas por dos anillos aromáticos unidos por una cadena alifática de tres carbonos, siendo su nombre acuñado por Kostanecki y Tambor en 1899 y descritas por primera vez en los años 70 por Dore y Viel. Su color amarillo se debe al grupo cetó-etilénico (cromóforo) y cambia dependiendo de los auxocromos que estén presentes en el vegetal.^{5,6}

Su biosíntesis se produce en el citosol de las células por la chalcona sintasa a través de la ruta de los policétidos, a partir de un éster-CoA (p.ej. cinamoil-CoA) y el 3-malonil-CoA. Presentan propiedades citotóxicas frente a determinados cánceres y tienen actividad antituberculosa, antileucémica, antimalárica, antifúngica, antileishmaniosis, antiviral, analgésica, anestésica, etc.⁷

Todo esto hace que estas moléculas tengan un gran valor dentro del campo de la medicina y sobre todo en la lucha contra el cáncer, siendo de gran interés para el desarrollo de nuevos fármacos.

⁵ Patil, C. B., Mahajan, S. K., Katti, S. A. 2005. Chalcone: A Versatile Molecule. *J. Pharm. Sci. &Res*, Vol. 1(3), pp. 11-22.

⁶ Gaonkar, S.L. & Vignesh, U.N. 2017. Synthesis and pharmacological properties of chalcones: a review. *Research on Chemical Intermediates*, 11, Volumen 43, p. 6043.

⁷ Ducki, S. 2007. The development of chalcones as promising anticancer agents. *IDrugs*, 10(1), 42-46.

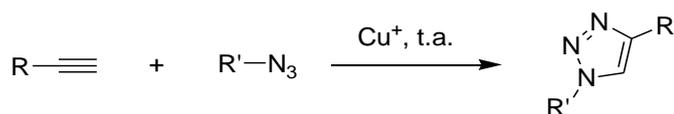
1.2. Química “Click”

Es una filosofía química desarrollada por el químico estadounidense Karl Barry Sharpless y colaboradores en 2001, que determina una nueva forma de síntesis usando las transformaciones más fiables y prácticas, llevando a cabo la unión rápida de unidades pequeñas, imitando lo que ocurre en la naturaleza.⁸

Para que una reacción sea considerada de tipo “click” tiene que tener las características siguientes: tolerancia a condiciones de reacción en diferentes interfases, a una gran variedad de grupos funcionales, a la alcalinidad, a la temperatura y a la acidez; uso de productos fáciles de eliminar, con gran disponibilidad, baratos y con escasa o nula nocividad en el medioambiente; facilidad para llevarla a cabo; formación de un sólo compuesto de forma cuantitativa y con alta regioespecificidad y alta selectividad; realización de los procedimientos de purificación y separación más sencillos posibles; condiciones simples de reacción y similares o iguales a las ambientales; termodinámicamente favorable y formación de enlaces heteroátomo-carbono.^{8,9}

Las diferentes reacciones que pueden enmarcarse como “click” se pueden clasificar en cuatro categorías: del carbonilo no aldólicas, de adición a enlaces múltiples carbono-carbono, de cicloadición y de sustitución nucleofílica/apertura de anillo.⁸

1.2.1. Cicloadición de Huisgen



Esquema 1. Reacción de cicloadición de Huisgen.

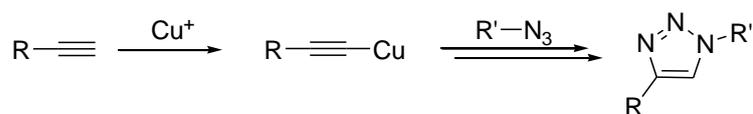
Esta cicloadición es una reacción química orgánica que fue desarrollada por el químico alemán Rolf Huisgen en la década de los 60. Consiste en la reacción entre un dipolarófilo y un 1,3-dipolo para formar un anillo heterocíclico de cinco miembros. La reacción entre azidas y alquinos para formar 1,2,3-triazoles es la prototipo dentro de la Química “Click”. Se la considera como la más versátil y efectiva dentro de este tipo de química, especialmente la que está

⁸ Díaz Díaz, D., Finn, M. G., Sharpless, K. B., Fokin, V. V. & Hawker, C. J. 2008. Cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos. I: Principales aspectos sintéticos. *Anales de Química*, 104(3), pp. 173-180.

⁹ Kolb, H.C. & Sharpless, K.B. 2003. The Growing Impact of Click Chemistry on Drug Discovery. *Drug Discovery Today*, 8, pp. 1128-1137.

catalizada por Cu^+ , siendo el camino más eficaz y favorable termodinámicamente para llevar a cabo la síntesis de estas sustancias. La fabricación de nuevos materiales, la biología molecular y la síntesis orgánica son algunos de los campos en los que cobra una gran importancia.^{8,10}

La cicloadición específica comentada anteriormente se realiza a temperatura ambiente y está catalizada por Cu^+ , que se puede añadir directamente al medio en forma de sales (p.ej. CuI), oxidando Cu^0 en presencia de sales de Cu^{2+} o mediante la reducción de Cu^{2+} (CuSO_4) a Cu^+ por un agente reductor como el ascorbato sódico o el ácido ascórbico, siendo más conveniente esta última opción al ser más barata y al ser normalmente las sales de Cu^{2+} más puras que las de Cu^+ . Al estar catalizada por Cu^+ , se produce una unión regioespecífica entre alquinos y azidas para dar 1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos, además de aumentar la velocidad de reacción y acortar el tiempo de la misma. La introducción de Cu^+ soluciona el problema de la mezcla de 1,4 y 1,5 regioisómeros que se da en las reacciones no catalizadas por el mismo, teniendo una baja regioselectividad y necesitando elevadas temperaturas (más de 80°C). Se lleva a cabo en disolventes tanto próticos como apróticos, además de en un amplio rango de pH.^{8,10}



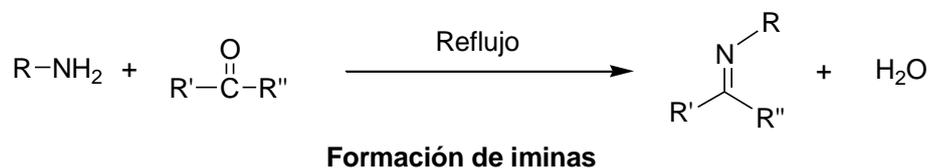
Esquema 2. Reacción de cicloadición de Huisgen.

La coordinación π del Cu^+ al fragmento $\text{C}\equiv\text{C}$ o la presencia de una base en el medio de reacción (que capta el hidrógeno del alquino) forman el acetiluro de cobre. Seguidamente, la azida se coordina con el cobre y el nitrógeno terminal de ésta realiza un ataque nucleofílico al carbono sustituido del acetileno, produciéndose un 3-triazolil complejo de cobre y formándose finalmente el triazol.¹¹

¹⁰ Heravi, M. M., Tamimi, M., Yahyavi, H. & Hosseinnejad, T. 2015. Huisgen's Cycloaddition Reactions: A Full Perspective. *Current Organic Chemistry*, 20(999): 1-1.

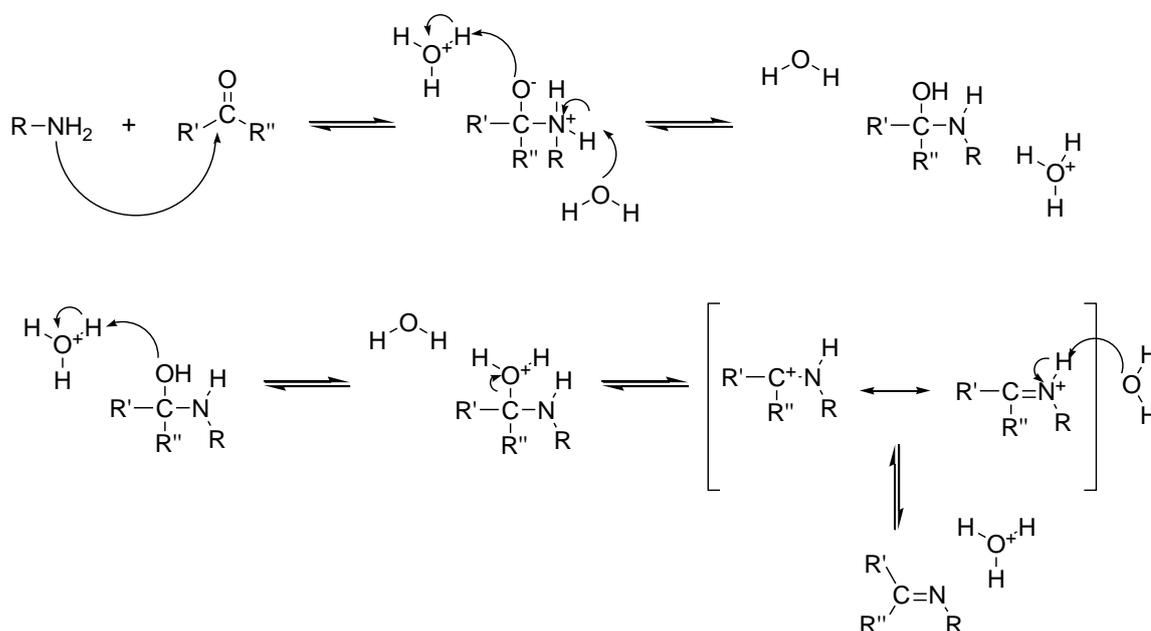
¹¹ Nolte C., Mayer P., Straub B.F. 2007. Isolation of a copper (I) triazolide: a "click" intermediate. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, pp. 2101–2103.

1.3. Síntesis de Iminas



Esquema 3. Reacción de síntesis de iminas.

Las cetonas o los aldehídos pueden reaccionar con las aminas o el amoníaco para dar lugar a las iminas (bases de Schiff) a la temperatura de ebullición del disolvente que se esté usando, siendo reacciones de condensación en las que se produce la pérdida de una molécula de agua (*Esquema 3*).¹²



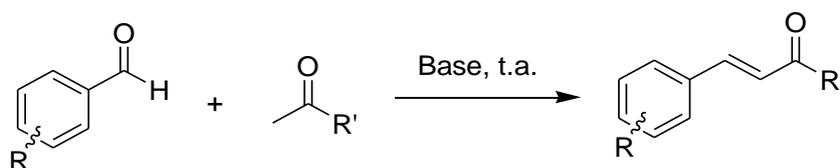
Esquema 4. Reacción de síntesis de iminas.

¹² Tema 10: Aldehídos y cetonas. Grupo de Síntesis Orgánica. Universitat Jaume I.

El mecanismo de reacción es el siguiente: primero, se produce un ataque por parte del nitrógeno nucleofílico del amoníaco o de la amina al carbono electrofílico del grupo carbonilo de la cetona o del aldehído. A continuación, el oxígeno se protona y la amina se desprotona, dando lugar a un compuesto inestable llamado “carbinolamina”. Posteriormente, se produce una protonación en el grupo hidroxilo de ésta y pierde una molécula de agua y un protón, formándose la imina (*Esquema 4*).¹²

El segundo paso (en donde se forma la carbinolamina) se produce en medio ácido; pero si éste lo es demasiado, se produce la protonación completa de la amina y se transforma en amonio, lo que lleva a la pérdida de su nucleofilia y se inhibe la primera etapa. Cuanto más se acerca el pH del medio a los extremos tanto básico como ácido, más disminuye la velocidad de reacción, aumentando ésta en valores intermedios del mismo (a 4,5 está el óptimo aproximadamente).¹²

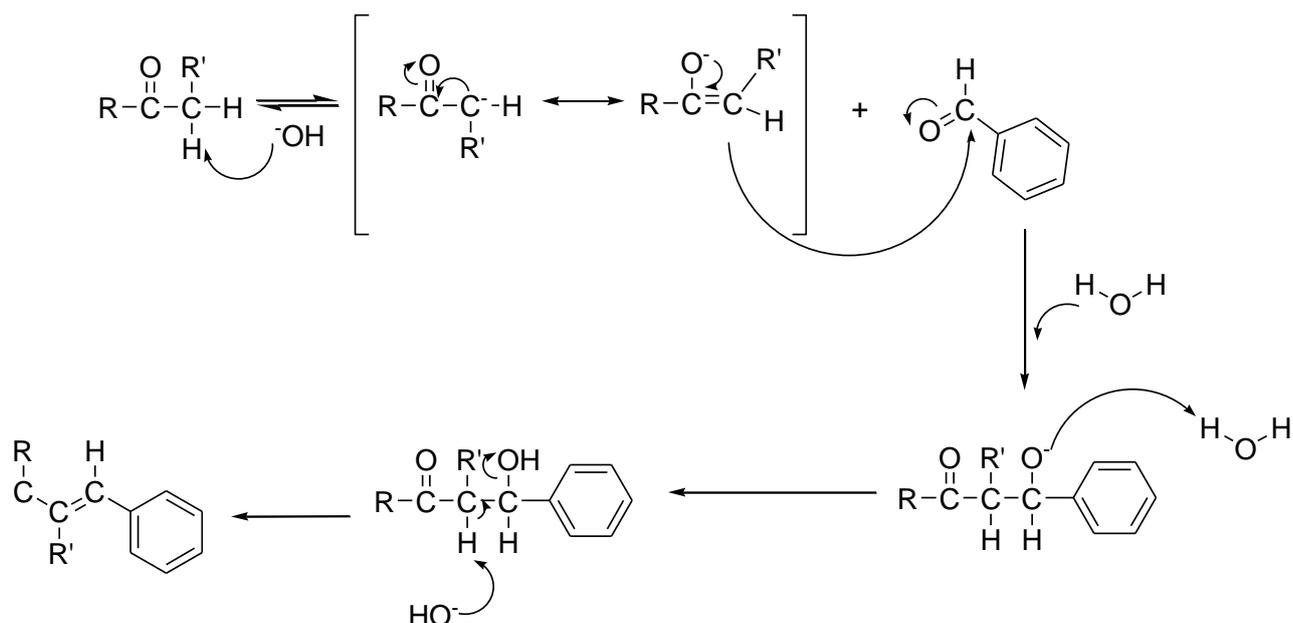
1.4. Condensación de Claisen-Schmidt



Esquema 5. Reacción de condensación de Claisen-Schmidt.

Esta reacción es una condensación aldólica cruzada que ocurre entre una cetona enolizable y un aldehído aromático, dando lugar a una cetona α,β -insaturada, realizándose, normalmente, en presencia de una base fuerte y a temperatura ambiente. Se usa un aldehído de este tipo debido a que no puede autocondensarse al ser incapaz de enolizarse, ya que no posee ningún hidrógeno en posición α respecto al grupo carbonilo, evitando la producción de sustancias indeseadas (*Esquema 5*).¹³

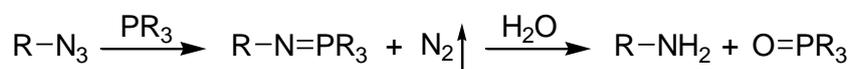
¹³ Perrin, C. L. & Chang, K. L. 2016. The complete mechanism of an aldol condensation. *J. Org. Chem.*, 81(13), pp. 5631-5635.



Esquema 6. Reacción de condensación de Claisen-Schmidt.

En primer lugar, el ion hidróxido proveniente de la base capta un hidrógeno del carbono α de la cetona, formándose el ion enolato. Posteriormente, este ion realiza un ataque nucleofílico al carbonilo del aldehído, dando lugar al ion alcóxido. Entre éste y el agua se da una reacción ácido-base, produciéndose una β -hidroxicetona y regenerándose el ion hidróxido. Se vuelve a producir otra reacción ácido-base entre un hidrógeno α de la β -hidroxicetona y el hidróxido, liberándose el hidroxilo presente en la β -hidroxicetona y dando lugar a una cetona α,β -insaturada (*Esquema 6*).¹³

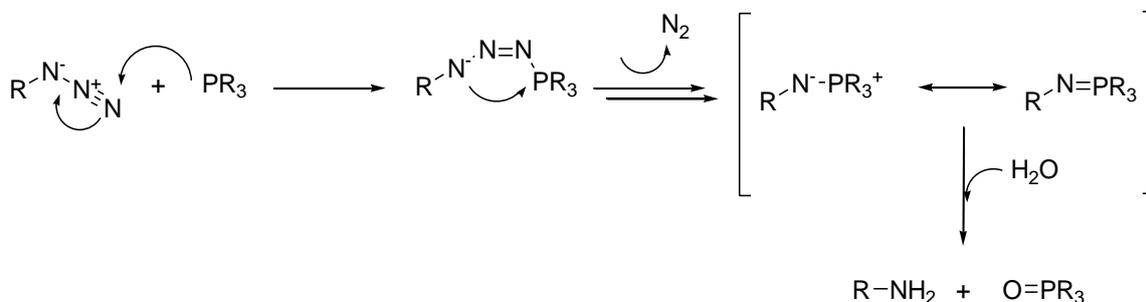
1.5. Reacción de Staudinger



Esquema 7. Reacción de Staudinger.

Fue descrita por H. Staudinger y J. Meyer en 1919, consistiendo en lo siguiente: la reacción entre una fosfina y una azida produce una fosfazida que, posteriormente, se convierte en un iminofosforano con liberación de nitrógeno gas y, finalmente, en una amina con la adición de agua, produciéndose además un óxido de fosfina (*Esquema 7*).¹⁴

Las principales características de esta reacción se exponen a continuación: el sustituyente de la azida puede ser muy variado, prácticamente cualquier compuesto trivalente fosforado reacciona con ésta, numerosos iminofosforanos son estables y la reacción presenta un rendimiento casi cuantitativo sin la formación de productos secundarios, desarrollándose muy rápidamente.¹⁴



Esquema 8. *Reacción de Staudinger.*

El primer paso es el ataque nucleofílico del fósforo de la fosfina al nitrógeno terminal de la azida, que da lugar a la fosfazida. Ésta entra en un estado de transición de cuatro miembros, perdiendo dos nitrógenos en forma de gas y convirtiéndose en un iminofosforano. La presencia posterior de agua provoca la hidrólisis de la molécula, formándose una imina y un óxido de fosfina (*Esquema 8*).¹⁴

¹⁴ Kürti, L. & Czako, B. 2005. Strategic applications of named reactions in organic synthesis. *Academic Press*, pp. 428.

2. Objetivos

Los objetivos que se proponen en este proyecto son los siguientes:

- Aprendizaje de métodos experimentales utilizados en Química Orgánica para la síntesis de compuestos.
- Síntesis de una nueva chalcona funcionalizada con un grupo azida y un átomo de flúor.
- Aplicación de la condensación de Claisen-Schmidt, la reacción de Staudinger, reacciones para sintetizar iminas y la cicloadición de Huisgen para la derivatización de la chalcona sintetizada.
- Aislamiento y purificación de los compuestos sintetizados.
- Aprendizaje de herramientas informáticas para complementar el trabajo experimental.
- Aprendizaje de la búsqueda de fuentes bibliográficas rigurosas y realización de una correcta gestión de las mismas, además del empleo de terminología específica relacionada con el campo de la Química Orgánica y la correcta organización de la información.

3. Material y Métodos

3.1. Material

Los reactivos utilizados para llevar a cabo las diferentes reacciones provienen de la empresa Sigma Aldrich, mientras que los disolventes empleados en dichas reacciones y en las purificaciones son de la marca Quimidroga.

3.2. Técnicas Experimentales

3.2.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Es una técnica analítica experimental que se utiliza para dilucidar la estructura molecular y la pureza de un compuesto en una muestra determinada. Se apoya en tres factores: la iluminación de la muestra con radiación electromagnética, el carácter magnético de los núcleos de las sustancias en estudio y la aplicación de un campo magnético intenso.

3.2.2. Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Es una cromatografía de adsorción (líquido-sólido) utilizada para comparar muestras, llevar a cabo seguimientos de reacciones y averiguar la pureza de una sustancia. Se realiza con una placa que contiene una fase estacionaria sólida adsorbente sobre un soporte determinado (vidrio, aluminio, etc.) y a la que se le añade una fase móvil (eluyente) dentro de una cubeta cromatográfica, que asciende por la placa por capilaridad (las fases pueden ser polares o apolares). Mientras asciende el eluyente por la capa, las sustancias añadidas subirán en mayor o menor medida dependiendo de la afinidad que tengan por cada una de las fases. En este proyecto, se utiliza una fase estacionaria de sílice y un disolvente de acetato de etilo/hexano como fase móvil. Se puede revelar con diferentes compuestos, utilizando en este trabajo el óleum. A diferencia de la cromatografía que se describe a continuación, la separación es más rápida y efectiva.

3.2.3. Cromatografía en Columna (CC)

Es también una cromatografía de adsorción (líquido-sólido) y tiene como objetivo la purificación de diferentes compuestos mediante su separación en una columna cromatográfica. En ésta, de igual forma, hay una fase estacionaria y una fase móvil, que pueden ser apolares o polares. La columna se realiza de la siguiente manera: se añade un poco de arena, se agrega la fase estacionaria y se vierte la muestra que se pretende purificar, añadiendo posteriormente la fase móvil y recogiendo muestras en tubos de ensayo. En este trabajo, se utiliza como fase móvil un disolvente de acetato de etilo/hexano y como fase estacionaria el gel de sílice.

3.2.4. Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRMS)

Es una técnica de análisis experimental de alta sensibilidad que permite determinar la masa y estructura molecular de los compuestos analizados. Éstos se ionizan inicialmente para poder ser introducidos y acelerados dentro del espectrómetro, donde serán separados en función de su relación masa/carga (m/z) y produciéndose, posteriormente, una señal eléctrica que se procesará para dar el espectro de masas.

3.3. Métodos

3.3.1. Condensación de Claisen-Schmidt

Se agrega 1.0 g de 4-azida-3-fluorobenzaldehído (6,06 mmol), 729 μ l de 2-hidroxiacetofenona (6,06 mmol) y 50 ml de etanol en un matraz, añadiéndose gotas de NaOH acuoso 50 % hasta que el pH de la disolución sea mayor de 10 y agitándose a temperatura ambiente (48h), monitorizándose por CCF. Se detiene la reacción añadiendo agua y se insolubiliza el producto después de añadir HCl (10%) hasta la neutralización. Se realiza una filtración, se disuelve en diclorometano y se seca con $MgSO_4$ anhidro. Finalmente, se filtra de nuevo, se disuelve en metanol para que cristalice la sustancia final, se vuelve a filtrar, se pesa y se analiza por RMN (1H y ^{13}C).

3.3.2. Reacción de Staudinger

En un matraz, se añade 19 ml de THF, 261 μ l de PBU₃ (1,06 mmol) y 300 mg de la chalcona **1** (1,06 mmol), agitando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realiza una CCF, se filtra y se lleva a cabo una CC. Por último, se añade metanol para realizar una cristalización, se realiza otra filtración y se pesa el producto final, efectuando posteriormente un análisis por RMN (¹H y ¹³C).

3.3.3. Síntesis de Iminas

Se adiciona en un matraz 1 equivalente de la chalcona **2** y del benzaldehído **5**, **6** o **7**, además de 1 o 2 ml de etanol o tolueno, reaccionando a reflujo con agitación constante durante 8-12 h, 1 día o 2 días (dependiendo del caso). Una vez que se observa que no hay cambios por CCF, se purifica por CC y se pesa el compuesto, analizándose después por RMN (¹H y ¹³C).

3.3.4. Cicloadición de Huisgen

Método A:

Son agregados en un matraz 1 equivalente de la chalcona **1** y 1.2 equivalentes del alquino **12**, **13** o **14**, además de THF·H₂O 0.1 M (3:1) y 1.1 equivalentes de CuSO₄·H₂O 1.0 M (98 %) y de ascorbato de sodio 1 M, y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 3 días en agitación. Se filtra, se añade diclorometano y se seca con MgSO₄ anhidro, filtrando nuevamente. Se llevan a cabo una CC y varias CCF, se pesa y se analiza por RMN (¹H y ¹³C).

Método B:

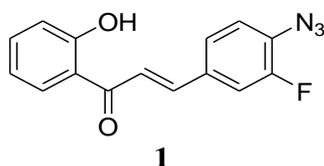
Se añade en un matraz 50,7 mg de la chalcona **1** (0,18 mmol), 27 μ l del alquino **11** (0,27 mmol), 2 ml de CH₃CN 0.1 M, 5 mg de CuI (0,03 mmol) y 150 μ l de DIPEA (0,86 mmol), dejando reaccionar a temperatura ambiente durante 3 días en agitación. Se filtra, se añade diclorometano y se seca con MgSO₄ anhidro, filtrando de nuevo. Se realizan una CC y varias CCF, pesándose y analizándose por RMN (¹H y ¹³C).

De los productos formados (azida, amina, iminas y triazoles) se toman muestras, se pesan y se preparan para su envío al Departamento de Bioquímica de la Universidad de Las Palmas de

Gran Canaria para determinar si presentan actividad antitumoral frente a células leucémicas humanas, además de realizar análisis de espectrometría de masas.

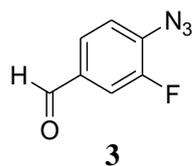
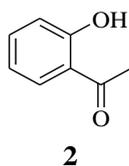
4. Resultados y Discusión

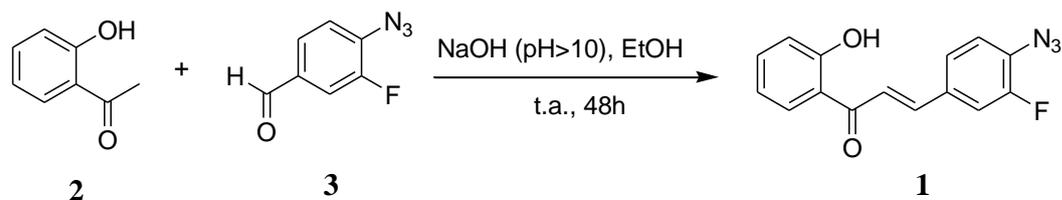
Para alcanzar los objetivos que se han fijado, es imprescindible disponer de los productos necesarios para llevar a cabo las diferentes reacciones que permitan producir las chalconas que se quieren obtener. Para ello, se sintetiza en primer lugar la chalcona **1**, que contiene un grupo azida y un átomo de flúor en el carbono adyacente.



La elección de esta chalcona se basa en los resultados descritos en el TFG de la graduada Judith Hernández Garcés (2018). En dicho trabajo, se obtienen chalconas diferentemente sustituidas sin el átomo de flúor, que muestran actividad antitumoral frente a una línea celular de leucemia humana, por lo que se opta por trabajar con estructuras parecidas a las utilizadas en el mismo trabajo. Seguidamente, el grupo azida es reducido a amina para generar el otro compuesto de partida, que permitirá, junto con la primera chalcona, la formación de otras sustancias de posible interés, como son las iminas y los triazoles.

En primer lugar, se realiza una condensación de Claisen-Schmidt entre la acetofenona **2** y el benzaldehído **3** en condiciones básicas y a temperatura ambiente, usando etanol como disolvente y transcurriendo 48 h, dando lugar a la chalcona **1** (*Esquema 9*).

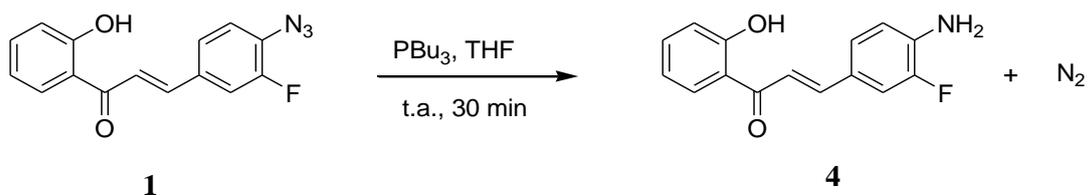




Esquema 9

La reacción se sigue por análisis de placa fina hasta su finalización. A continuación, se añade agua para parar la reacción y se neutraliza con una disolución acuosa de HCl (10%). El precipitado que se forma se filtra y se realiza una cristalización en metanol caliente, filtrándose y dando lugar a un sólido cristalino naranja. Las aguas madre se concentran y se someten a otro proceso de cristalización, pero ésta no se consigue y se obtiene un precipitado amarillo. Posteriormente, se lleva a cabo un experimento de RMN de ^1H y ^{13}C (el producto final se encuentra puro). El rendimiento de la reacción global fue del 66 %.

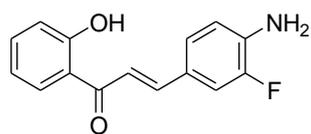
Posteriormente, el grupo azida de la chalcona **1** se reduce en forma de amina para dar el compuesto **4** mediante una reacción de Staudinger, utilizando para ello tributilfosfina (PBu_3) y dejando reaccionar durante 30 min en tetrahidrofurano (THF) a temperatura ambiente. Durante la reacción, se observa el desprendimiento de nitrógeno gas en forma de pequeñas burbujas (*Esquema 10*).



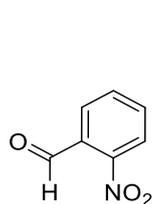
Esquema 10

Una vez finalizada la reacción, se lleva a cabo una CCF (está presente el compuesto) y una CC para purificarlo. Se cristaliza en metanol, se filtra y se obtienen cristales de color naranja (el espectro obtenido por RMN confirma la presencia de la sustancia final). El rendimiento que se obtiene es del 88 %.

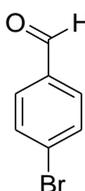
La chalcona **4** se somete a condiciones de síntesis de iminas con los benzaldehídos **5**, **6** y **7**, realizándose en etanol o tolueno a reflujo durante diferentes tiempos (*Esquemas 11, 12, 13 y 14*).



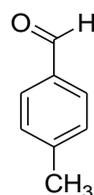
4



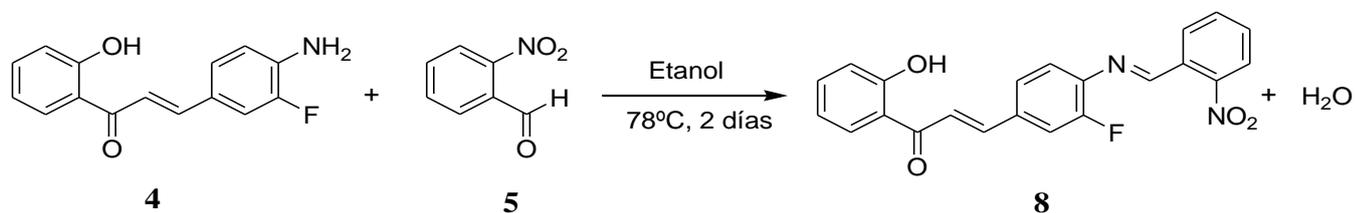
5



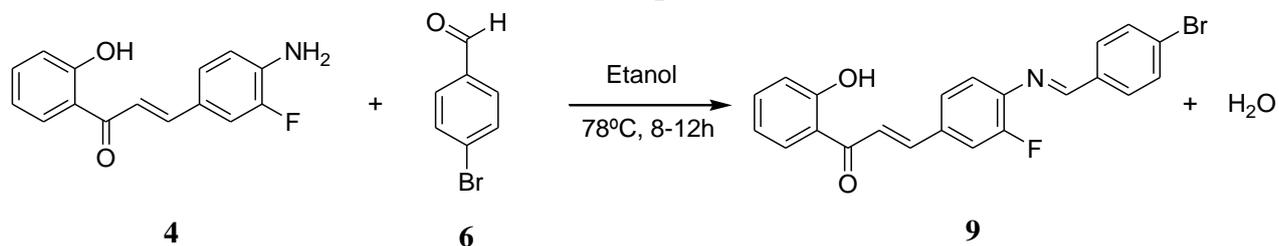
6



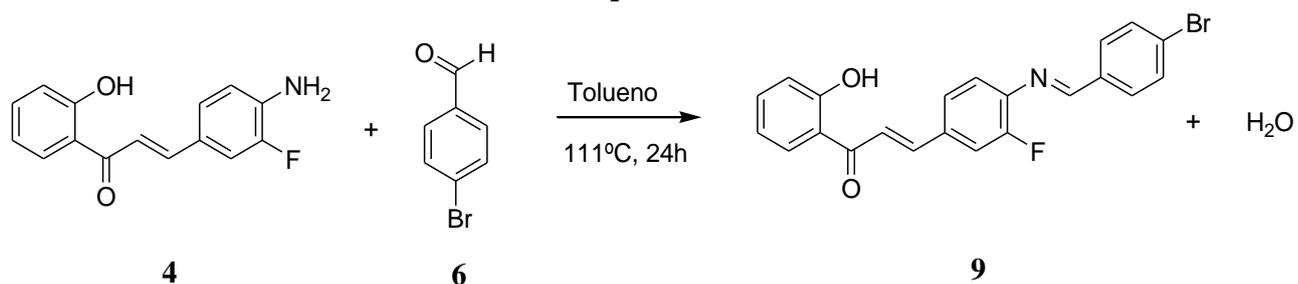
7



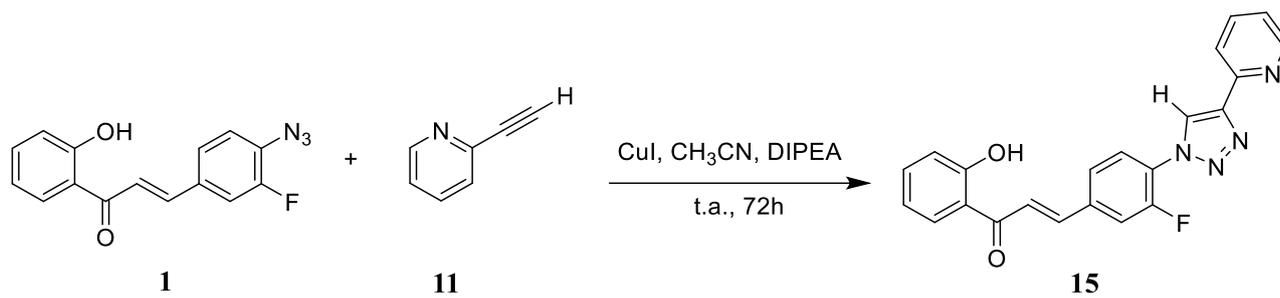
Esquema 11



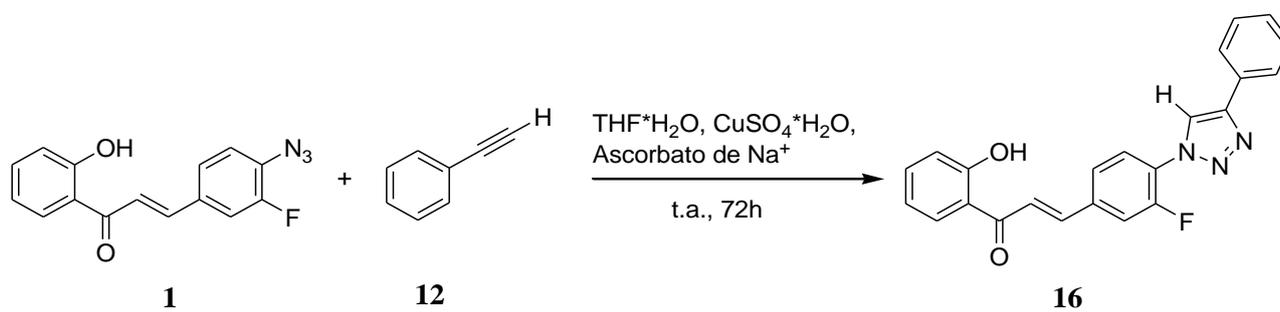
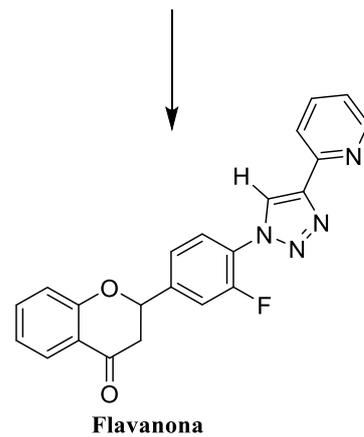
Esquema 12



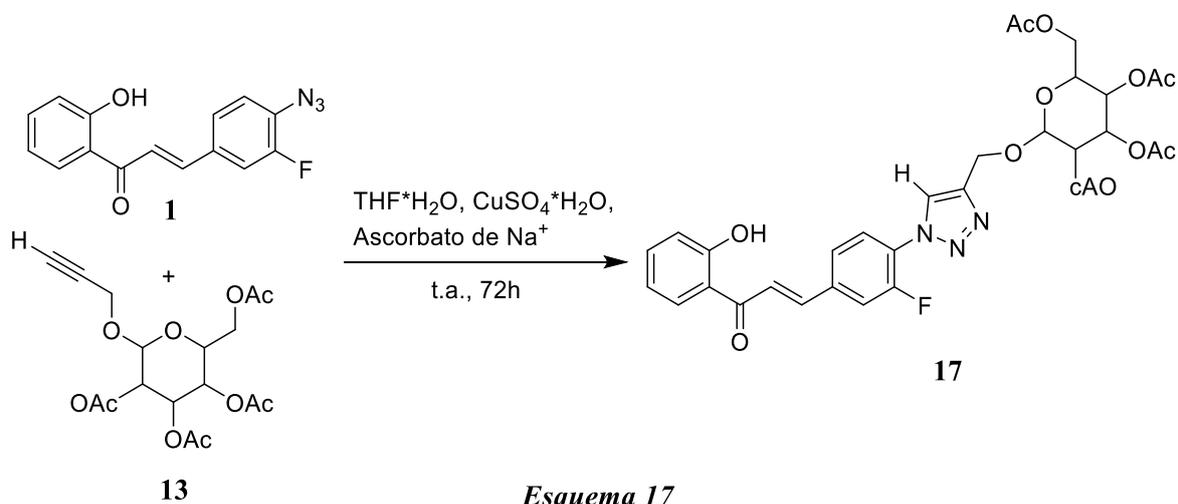
Esquema 13



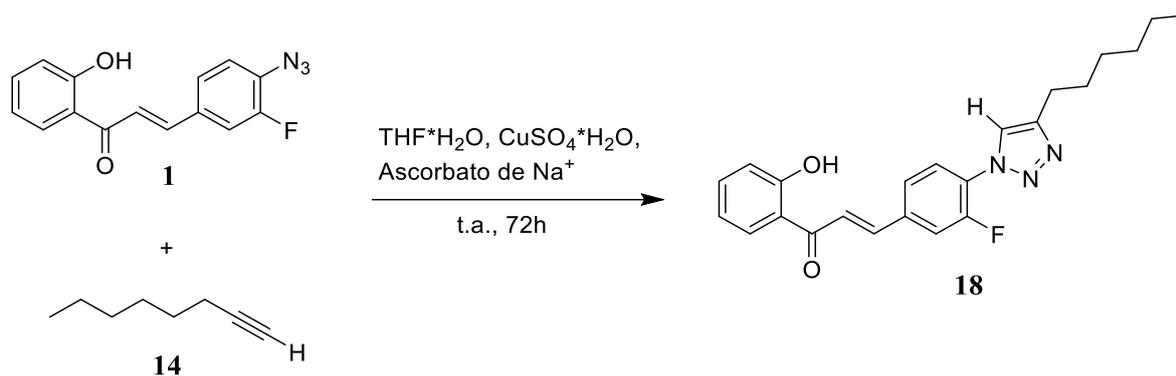
Esquema 15



Esquema 16



Esquema 17



Esquema 18

Una vez transcurridas las 72 h, se filtran las sustancias y se purifican por CC, además de hacer varias CCF (sólo queda producto final). Posteriormente, se hizo una cristalización de **18** en metanol, filtrando después y obteniéndose cristales amarillos. **16** y **18** presentaban aspectos de sólidos cristalinos amarillos, mientras que **17** de precipitado verde oscuro. A la vista de los resultados de los experimentos de resonancia, se confirmó que los compuestos **16**, **17** y **18** estaban puros, mientras que el **15** no se llegó a formar, aislándose una flavanona (*Esquema 15*). Los rendimientos obtenidos fueron del 59 % en **16**, 71 % en **17** y 69 % en **18**.

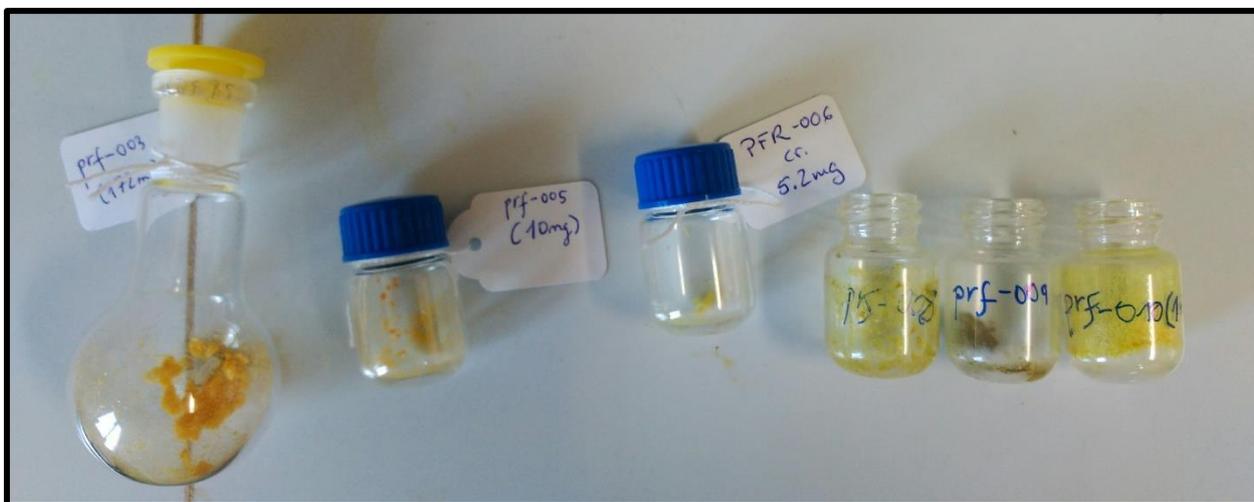


Imagen 1. Productos obtenidos.

3) Chalcona 1; 5) Chalcona 4; 6) Chalcona 9; 8,9 y 10) Chalconas 18, 17 y 16

Datos espectroscópicos de 1

^1H NMR (500 MHz, Cloroformo-*d*) δ 12.70 (s, 1H), 7.90 (dd, $J = 8.1, 1.7$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 7.51 (ddd, $J = 8.7, 7.1, 1.6$ Hz, 1H), 7.45-7.38 (m, 2H), 7.12 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.04 (dd, $J = 8.4, 1.2$ Hz, 1H), 6.96 (ddd, $J = 8.2, 7.2, 1.2$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, Cloroformo-*d*) δ 155.0 (d, $J = 250.6$ Hz), 143.0 (d, $J = 2.6$ Hz), 132.7 (d, $J = 6.9$ Hz), 130.4 (d, $J = 11.3$ Hz), 125.8 (d, $J = 3.2$ Hz), 118.8 (d, $J = 27.1$ Hz), 115.91 (d, $J = 19.5$ Hz). HRMS (ESI-FT-ICR) m/z : 282.0681 [M-H]⁺ calcd. for $\text{C}_{15}\text{FH}_9\text{N}_3\text{O}_2$: 282.0679.

Datos espectroscópicos de 4

^1H NMR (500 MHz, Cloroformo-*d*) δ 12.78 (s, 1H), 7.72 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H), 7.3-7.28 (m, 1H), 7.28 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 7.17 (dd, $J = 12.0, 1.9$ Hz, 1H), 7.11-7.06 (m, 1H), 6.84 (dd, $J = 8.4, 1.2$ Hz, 1H), 6.75 (ddd, $J = 8.2, 7.1, 1.2$ Hz, 1H), 6.60 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, Cloroformo-*d*) δ 193.5, 163.5, 151.2 (d, $J = 240.5$ Hz), 145.11 (d, $J = 2.7$ Hz), 137.8 (d, $J = 13.2$ Hz), 136.1, 129.4, 126.8 (d, $J = 2.6$ Hz), 125.3 (d, $J = 6.5$ Hz), 118.6 (d, $J = 20.5$ Hz), 114.8 (d, $J = 18.6$ Hz). HRMS (ESI-FT-ICR) m/z : 256.0776 [M-H]⁺ calcd. for $\text{C}_{15}\text{FH}_{11}\text{NO}_2$: 256.0774.

Datos espectroscópicos de 9

^1H NMR (500 MHz, Cloroformo-*d*) δ 12.75 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 7.93 (dd, $J = 8.1, 1.6$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.68-7.60 (m, 3H), 7.52 (ddd, $J = 8.7, 7.1, 1.6$ Hz, 1H), 7.50-7.44 (m, 2H), 7.21 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.05 (dd, $J = 8.4, 1.1$ Hz, 1H), 6.97 (ddd, $J = 8.2, 7.1, 1.2$ Hz, 1H). HRMS (ESI-FT-ICR) m/z : 422.0185 [M-H]⁺ calcd. for $\text{C}_{22}^{79}\text{BrFH}_{14}\text{NO}_2$: 422.0192.

Datos espectroscópicos de 16

^1H NMR (500 MHz, Cloroformo-*d*) δ 12.63 (s, 1H), 8.38 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 8.21 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.99–7.92 (m, 3H), 7.89 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 7.66 (dd, $J = 8.4$, 1.9 Hz, 1H), 7.62 (dd, $J = 11.9$, 1.9 Hz, 1H), 7.55 (ddd, $J = 8.6$, 7.1, 1.6 Hz, 1H), 7.52–7.45 (m, 2H), 7.45–7.34 (m, 1H), 7.07 (dd, $J = 8.4$, 1.1 Hz, 1H), 6.99 (ddd, $J = 8.2$, 7.1, 1.2 Hz, 1H). HRMS (ESI-FT-ICR) m/z : 384.1149 [M-H]⁺ calcd. for $\text{C}_{23}\text{FH}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$: 384.1148.

Datos espectroscópicos de 17

^1H NMR (500 MHz, Cloroformo-*d*) δ 12.61 (s, 1H), 8.17–8.08 (m, 2H), 7.93 (dd, $J = 8.1$, 1.6 Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 7.67–7.57 (m, 2H), 7.54 (ddd, $J = 8.5$, 7.2, 1.6 Hz, 1H), 7.06 (dd, $J = 8.4$, 1.1 Hz, 1H), 6.98 (ddd, $J = 8.2$, 7.1, 1.1 Hz, 1H), 5.22 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H), 5.12 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H), 5.09–5.02 (m, 2H), 4.94 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 4.73 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.29 (dd, $J = 12.4$, 4.8 Hz, 1H), 4.17 (dd, $J = 12.3$, 2.3 Hz, 1H), 3.76 (ddd, $J = 10.0$, 4.8, 2.3 Hz, 1H), 2.17 (d, $J = 0.7$ Hz, 4H), 2.10 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.00 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, Cloroformo-*d*) δ 193.03, 170.67, 169.45, 163.76, 142.06, 136.94, 129.67, 125.53, 124.95, 122.89, 119.84, 119.09, 118.86, 116.62, 116.45, 100.00, 77.28, 77.23, 77.02, 77.00, 76.77, 72.78, 72.05, 71.26, 68.36, 62.74, 61.90, 30.92, 29.71, 20.74, 20.60. HRMS (ESI-FT-ICR) m/z : 668.1885 [M-H]⁺ calcd. for $\text{C}_{32}\text{FH}_{31}\text{N}_3\text{O}_{12}$: 668.1892.

Datos espectroscópicos de 18

^1H NMR (500 MHz, Cloroformo-*d*) δ 12.63 (s, 1H), 8.13 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.93 (dd, $J = 8.0$, 1.6 Hz, 1H), 7.91–7.83 (m, 2H), 7.69 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 7.65–7.56 (m, 2H), 7.54 (ddd, $J = 8.6$, 7.1, 1.6 Hz, 1H), 7.06 (dd, $J = 8.4$, 1.1 Hz, 1H), 6.98 (ddd, $J = 8.2$, 7.1, 1.2 Hz, 1H), 2.82 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 1.75 (p, $J = 7.6$ Hz, 3H), 1.48–1.38 (m, 2H), 1.38–1.30 (m, 4H), 0.96–0.86 (m, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, Cloroformo-*d*) δ 193.10, 163.75, 153.93, 151.93, 149.31, 142.31, 142.29, 136.88, 136.32, 136.26, 129.67, 125.41, 125.39, 124.81, 122.51, 121.68, 121.60, 119.86, 119.06, 118.84, 116.62, 116.46, 77.28, 77.23, 77.03, 76.77, 31.58, 30.93, 29.71, 29.30, 28.92, 28.90, 25.63, 22.58, 14.07. HRMS (ESI-FT-ICR) m/z : 392.1770 [M-H]⁺ calcd. for $\text{C}_{23}\text{FH}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$: 392.1774.

5. Conclusiones

- La condensación de Claisen-Schmidt para la síntesis de chalconas no se ve afectada de manera negativa por la presencia del grupo azida y del flúor, siendo un buen método para su producción.
- La aplicación de la reacción de Staudinger a este tipo de sustancias es una buena elección para reducir el grupo azida a amina en chalconas, siendo en este caso la primera vez que se describe dicha reacción haciendo uso de PBU_3 en este tipo de sustratos.
- La mayoría de las reacciones para formar iminas no dan lugar a ningún producto, lo que sugiere cambiar las condiciones de reacción y/o las metodologías empleadas para obtener los compuestos deseados. El tipo de sustituyente puede influir en el transcurso favorable o desfavorable de la reacción, por lo que es un aspecto importante a tener en cuenta.
- Un gran número de las cicloadiciones 1,3-dipolares realizadas con la azido-chalcona con diferentes alquinos mostró buenos resultados, lo que demuestra que es un método sencillo y adecuado para la formación de 1,2,3-triazoles en chalconas.
- Las condiciones de reacción de cicloadición en presencia de DIPEA, CuI y CH_3CN no son las adecuadas para la derivatización de la azido-chalcona, ya que se produce su ciclación *in situ*, dando como resultado una flavanona. Habría que controlar los tiempos de reacción para observar si se puede impedir esta ciclación.
- La ciclación *in situ* de la azido-chalcona y la formación del triazol en las mismas condiciones abren una nueva línea de investigación para la síntesis de nuevas flavanonas con agrupamientos 1,2,3-triazoles en un sólo paso de reacción, lo cual puede ser muy interesante para futuros proyectos relacionados con este tema.

Conclusions

•The condensation of Claisen-Schmidt for chalcone synthesis is not negatively affected by the presence of the azide group and fluorine, being a good method for their production.

•The application of Staudinger's reaction to this type of substances is a good choice for reducing the azide group to amine in chalcones, being in this case the first time that this reaction is described using PBU_3 in this type of substrates.

• Most of the reactions to form imines do not result in any product, suggesting changing the reaction conditions and/or the methodologies used to obtain the desired compounds. The type of substitute may influence the favourable or unfavourable course of the reaction, so it is an important aspect to take into account.

• A large number of 1,3-dipolar cycloadditions performed with the azido-chalcone with different alkynes showed good results, demonstrating that it is a simple and suitable method for the formation of 1,2,3-triazoles in chalcones.

•The conditions of cycloaddition reaction in the presence of DIPEA, CuI and CH_3CN are not suitable for the derivatization of the azido-chalcone, since they are cyclized *in situ*, resulting in a flavanone. It would be necessary to control the reaction times to observe if it is possible to prevent this cyclization.

•The *in situ* cyclization of the azido-chalcone and the triazole formation under the same conditions open a new line of research for the synthesis of new flavanones with 1,2,3-triazole clusters in a single reaction step, which could be very interesting for future projects related to this topic.