

40



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

FUNCIONALIZACION DE LA
7-HIDROXICUMARINA

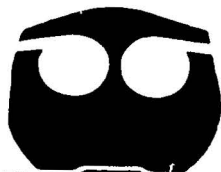
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

LORELEI MARTINEZ MICHEL



MÉXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



EXAMENES REGIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Paginación


Discontinua

JURADO ASIGNADO:

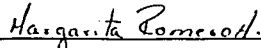
PRESIDENTE	Prof. María Alicia Hernández Campos
VOCAL	Prof. Blas Flores Pérez
SECRETARIO	Prof. Lucía Hernández Garcíadiego
1er SUPLENTE	Prof. Simón Hernández Ortega
2do SUPLENTE	Prof. Georgina Duarte Lisci

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 201, Departamento de Química Orgánica, División de Estudios de Posgrado, UNAM, Ciudad Universitaria, México, D.F., 04510

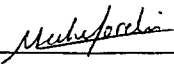
ASESOR


M. en C. Blas Flores Pérez

SUPERVISOR TECNICO


M. en C. Margarita Romero Ávila

SUSTENTANTE


Lorelei Martínez Michel

La Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo excepcional.

NOMBRE: Lorelei Martínez Michel

FECHA: 31. Oct 2002

SUBSCRIPCIÓN: México

*“¡Bienaventurado el hombre
que halla la sabiduría
y obtiene la inteligencia,
porque su ganancia es más que
la ganancia de la plata,
y sus beneficios más que
los del oro fino!”*

Pr 3, 13-14

PARA....

Dios, porque siempre me ha iluminado y nunca se ha apartado de mi lado.

Mis padres Lorelei Michel Olmo y Miguel Ángel Martínez Jaik por haberme dado la vida, por todo el amor y la confianza que siempre me han tenido, por sus consejos y sus regaños, pero sobre todo por ser un gran ejemplo de perseverancia y lucha constante. Hoy gracias a ustedes he alcanzado una de mis más grandes metas. Que orgullo es tenerlos como mis padres, los adoro!

Mi hermano Miguel Ángel, por compartir el mismo troquel. Gracias por todas esas pláticas llenas de apodosos y de buen humor, pero más que nada por ser siempre un gran apoyo.

Todos los Michel por el cariño, la confianza, el apoyo y el patrocinio que siempre me han brindado. No tengo palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mi formación académica. Mil gracias a todos. Los quiero mucho.

Paco, por ser más que mi mejor amigo y mi apoyo incondicional en todo momento. Gracias por el cariño y la confianza que siempre me has tenido, por consentirme y ser tan comprensivo, pero sobre todo por toda esa chispa que le has inyectado a mi vida.

Mis amigos de la Generación 97 y a todos aquellos que compartieron conmigo un tiempo y un espacio a lo largo de mi carrera. Gracias a todos por esas largas prácticas llenas de buen humor, por los buenos y malos ratos, pero más que nada por dejarme ser parte de sus vidas.

Todos aquellos con los que conviví y compartí parte de mi vida durante toda mi estancia en el H. Laboratorio 201: Blas, Mago, Paco, Robert, Cris, Andrea, Ivette, David, Chucho, Rafá, Fidel, Octavio, Alex, Liz y Tomas. Gracias a todos por soportar mis histerias y malos ratos, pero al mismo tiempo gracias por el apoyo y la amistad que siempre me brindaron. Créanme que los voy a extrañar.

Gracias...

A la M. en C. Margarita Romero Ávila y al M. en C. Blas Flores Pérez por haber puesto todo cuanto pudieron para sacarme adelante junto con este proyecto.

A los miembros del jurado por la disposición que tuvieron para revisar y hacer las sugerencias que hacen de éste, un mejor trabajo.

A los miembros de la USAI:

Al QFB Oscar Salvador Yáñez Muñoz, a la QFB Rosa Isela Del Villar Morales y a la M. en C. Margarita Romero Ávila por los espectros de RMNH¹ y C¹³; a la Q Marisela Gutiérrez Franco por los espectros de infrarrojo; a la Q Georgina Duarte Lisci por los espectros de masas de baja y alta resolución; a la QFB Margarita Guzmán Villanueva, a Nayeli López Balbiaux y a Yeni Islas Fonseca por los análisis elementales.

A la Sra. Josefina Betancourt Peña por la elaboración de las cromatoplaques. Gracias por consentirme a lo largo de mi estancia en el laboratorio.

A todos, mil gracias. Sin ustedes y sin su apoyo no hubiera sido posible completar este trabajo.

INDICE

I. Introducción	1
II. Objetivo	4
III. Antecedentes	6
Desarrollo Histórico	7
Química y Distribución de las Cumarinas	8
Nomenclatura	11
Distribución y Función de las Cumarinas en la Naturaleza	11
Exposición a las Cumarinas	13
Metabolismo	14
Toxicidad	14
Aplicaciones Farmacológicas	16
Aplicaciones Industriales	18
Métodos de Síntesis	19
Propiedades Físicas	21
Reactividad	22
III. Resultados y Discusión	25
A) Síntesis de la 7-Hidroxycumarina	26
B) Uso del Hidroxilo en la Funcionalización de la 7-hidroxycumarina	31
C) Estudio de la Aminometilación en la 7-hidroxycumarina.....	40

D) Estudio de la Nitración de la 7-hidroxycumarina	46
IV. Parte Experimental	50
V. Conclusiones	60
VI. Bibliografía	62
VII. Espectroscopía y Anexos	68

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la búsqueda de sustancias que influyan en la actividad inmunológica y que sean eficientes en el tratamiento en enfermedades como el cáncer y el SIDA, ha tomado un gran interés por lo que, en los últimos años, se ha estimulado la síntesis y estudio de compuestos de origen natural.

Algunos productos naturales son metabolitos secundarios típicos, producidos por organismos en respuesta a estímulos externos, como cambios nutrimentales e infecciones entre otros. Desde hace mucho tiempo, estos productos sintetizados por plantas, hongos, bacterias, insectos y otros animales^{1,2,3} se han aislado como moléculas biológicamente activas y han sido ampliamente reconocidas en la industria farmacéutica por su amplia diversidad estructural y por su vasto intervalo de actividades farmacológicas. De hecho, aproximadamente un tercio de los fármacos más vendidos en el mundo son productos naturales o derivados de estos, que generalmente cuentan con antecedentes etnofarmacológicos⁴.

La cumarina y sus derivados, son productos naturales ampliamente distribuidos en varias familias de plantas y bacterias. Estos compuestos se han utilizado desde hace años por sus propiedades saborizantes en productos alimentarios y tabaco; como ingrediente en la manufactura de productos como jabones, detergentes, cremas y lociones; en materiales plásticos, en pinturas y sprays para neutralizar olores^{3,5} y como remedio medicinal para infinidad de padecimientos, entre ellos la brucelosis⁶. En los últimos años, se han publicado una variedad de actividades biológicas basadas en el núcleo de la cumarina. Los efectos incluyen actividad antialérgica⁷, antiinflamatoria⁶, antidermatofítica^{3,7,8}, antiosteoporótica⁷, antibacteriana y antifúngica^{3,7,9,10}, anticoagulante^{3,6,7}, estrogénica³, antihelmíntica³, sedativa e hipnótica³, analgésica³, antitrombótica¹², acción vasodilatadora¹² y antitumoral^{3,6,11-14}. De manera relevante, algunos tipos de cumarina también han

demostrado tener efectos inhibitorios en la DNA girasa, la cual puede estar relacionada con la actividad anti-VII-F^{3,16}.

A pesar de todas las actividades biológicas encontradas, el campo que está creciendo y tomando gran interés es el uso de la cumarina y la 7-hidroxycumarina en oncología, sobre todo en el tratamiento contra el cáncer de próstata, el cáncer pulmonar, el cáncer de mama y el cáncer renal^{14,17,18}, así como otro tipo de melanomas malignos^{3,14}.

Tal parece que las propiedades farmacológicas, bioquímicas y quimioterapéuticas de las cumarinas dependen del patrón de sustitución^{12,15} en el núcleo. En un estudio reciente se encontró que la 7-hidroxi-8-nitrocumarina también presenta un comportamiento citostático y citotóxico¹¹. Probablemente los estudios farmacológicos que puedan realizarse a los derivados de cumarina y la 7-hidroxycumarina, que contengan grupos funcionales con efectos conocidos, puedan significar un avance en el descubrimiento de nuevos compuestos que de alguna forma permitan erradicar enfermedades como el cáncer y el SIDA. Por esta razón es importante contar con rutas sintéticas cortas y eficientes para construir estos compuestos, a fin de poder contar con ellos y determinar su principal actividad.

La presente tesis presenta un estudio para sintetizar y funcionalizar a la 7-hidroxycumarina.

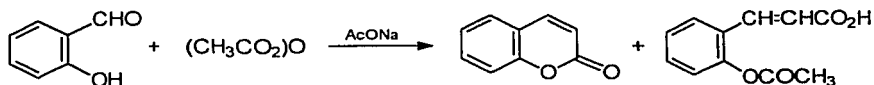
OBJETIVO

- ❖ Encontrar las condiciones de reacción que hagan posible la funcionalización selectiva de la 7-hidroxycumarina, con miras a preparar precursores para la síntesis de compuestos con actividad biológica.

ANTECEDENTES

DESARROLLO HISTÓRICO

La cumarina fue aislada por primera vez a partir del haba tonka (*Dipterix odorata*) en 1820 por Vogel, pero no fue sino hasta 1868 cuando W. H. Perkin logró obtener la cumarina sintética idéntica a la aislada por Vogel². Dicha síntesis se llevó a cabo haciendo reaccionar la sal de sodio del anhídrido acético con salicilaldehído. Esta reacción hoy lleva su nombre (Esquema I).

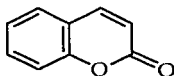


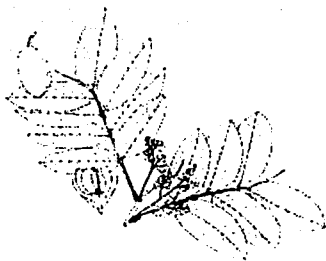
Esquema I. Reacción de Perkin

La fórmula condensada de la cumarina propuesta por Perkin era incorrecta, sin embargo, ese mismo año tanto Fitting como Strecker de manera independiente, llegaron a la fórmula que hoy es universalmente aceptada: $C_9H_6O_2$.

Hoy en día las síntesis más importantes de cumarinas se basan en el uso de derivados de fenol o salicilaldehídos como materias primas. En este sentido, las cumarinas se sintetizan haciendo uso de la reacción de Perkin, Knoevenagel o H. von Pechmann¹⁶.

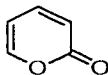
El nombre cumarina proviene de la palabra caribeña "coumarou" que significa árbol Tonka, el cual en cierto tiempo fue conocido botánicamente como *Coumarouna odorata*. Ahora se conoce como Cumarina a cualquier compuesto cuya estructura principal sea la siguiente²:



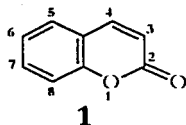
*Dipterix orodata*

QUÍMICA Y DISTRIBUCIÓN DE LAS CUMARINAS^{1,2}

Desde el punto de vista estructural, las cumarinas y sus derivados son un grupo de lactonas derivadas del ácido o-hidroxicinámico. Se puede decir que la cumarina pertenece a un grupo de compuestos conocidos como benzopironas², las cuales están formadas por un anillo bencénico unido a una pirona, es decir, a un anillo heterocíclico de seis miembros que contiene un átomo de oxígeno y cinco carbonos con una hibridación sp^2 . Podemos encontrar tanto α - como γ -pironas, siendo los prefijos α y γ los que se refieren a la posición en la cual se encuentra el carbonilo. La estructura de la α -pirona se muestra a continuación:



La cumarina (**1**) y sus derivados son benzo- α -pironas, mientras que por ejemplo los flavonoides contienen una γ -pirona.

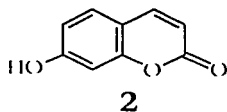


Muchas cumarinas están compuestas de cadenas isoprenoides unidas a alguno de los carbonos que componen el núcleo o a cualquiera de los átomos de oxígeno presentes, por ejemplo un oxígeno fenólico. Estas cadenas isoprenoides pueden consistir de una o hasta tres unidades por lo que podemos encontrar muchas variaciones de este tipo de estructura entre las cumarinas. De hecho, la mayoría de las cumarinas están oxigenadas en C-7, por tanto la 7-hidroxicumarina se considera frecuentemente como el padre de toda una gama de cumarinas complejas. Las cumarinas también pueden encontrarse en la naturaleza en combinación con azúcares o glicósidos.

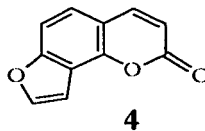
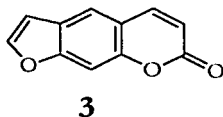
Se han descrito más de mil derivados de cumarina, desde simples cumarinas conteniendo grupos alquilo o hidroxilo hasta cumarinas complejas con sustituyentes benzoil, furanoil y piranoil². Sin embargo, debido a la gran cantidad de cumarinas que se han encontrado y sintetizado, es difícil establecer una clasificación específica por tanto, se nombran a partir de los grupos funcionales que tengan presentes.

Varios autores han clasificado a las cumarinas según el tipo de estructura que presentan en^{2,3}:

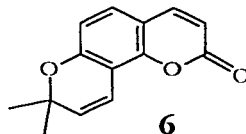
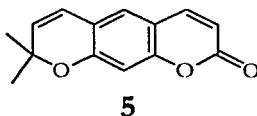
a) Simple: La cual incluye a la cumarina (**1**) y a los derivados hidroxilados, alcoxilados y alquilados del compuesto padre o 7-hidroxicumarina (**2**), así como sus glicósidos.



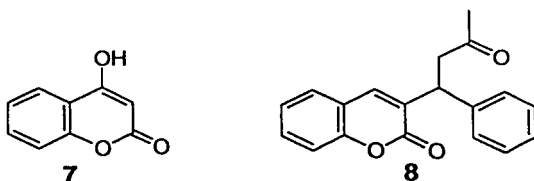
b) Furanocumarinas: Estos compuestos están formados por un anillo furánico de cinco miembros unido al núcleo de la cumarina (**1**). La mayoría de los miembros de este grupo son derivados de la furanocumarina de tipo lineal o psoraleno (**3**) y de su isómero más estable y de tipo angular o angelicina (**4**). Cabe señalar que los términos lineal y angular se refieren a la orientación del anillo furánico con respecto al núcleo de la cumarina (**1**). Las dihidrofuranocumarinas y las dihidropiranocumarinas también pertenecen a este grupo.



c) Piranocumarinas: Los miembros de éste grupo son análogos a las furanocumarinas pero contienen anillos de seis miembros. En este caso, también tenemos piranocumarinas de tipo lineal y angular como es el caso de la xantiletina (**5**) y la seselina (**6**).



d) Cumarinas sustituidas en el anillo de la pirona: Como ejemplo de este grupo tenemos la 4-hidroxycumarina (**7**) y la warfarina (**8**), ésta última es ampliamente usada como rodenticida y anticoagulante oral.



NOMENCLATURA³

La nomenclatura de las cumarinas es frecuentemente problemática, de hecho, la cumarina (**1**) se conoce de varias maneras: 2-oxo-1,2-benzo-pirano, 5,6-benzo- α -pirona, 5,6-benzo-2-pirona, 1,2-benzopirona, 2H-benzopiran-2-ona, 2H-benzo[b]piran-2-ona, anhídrido cumarínico y 2H-cromen-2-ona^{2,3}. La mayoría de los derivados de cumarina se han aislado a partir de miles de especies de plantas y microorganismos, lo cual ha sido motivo de problemas ya que generalmente se han asignado nombres derivados del Latín, el nombre coloquial de la planta de donde fueron descubiertos o del lugar donde la planta crece. Esto dió como resultado que un mismo compuesto tenga varios nombres triviales diferentes, los cuales frecuentemente no dan información sobre su composición estructural, de ahí que sea necesario consultar un índice de nombres triviales para verificar una estructura en particular. En el caso de la cumarina (**1**), el nombre más sistemático es: 2H-benzopiran-2-ona o cumarina.

DISTRIBUCIÓN Y FUNCIÓN DE LAS CUMARINAS EN LA NATURALEZA

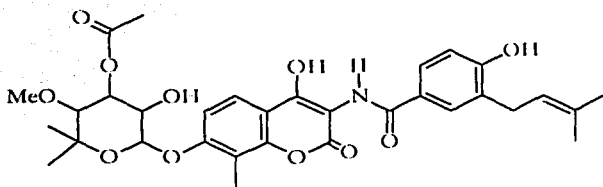
La cumarina (**1**) es la estructura básica para numerosos compuestos naturales con importantes y diversas actividades fisiológicas. De hecho, se encuentran

ampliamente distribuidas ya sea en forma libre o como glucósidos en varias familias de plantas dicotiledóneas como las Apiaceae (*Amni majus*), Asteraceae (*Trilisa odoratissima*), Fabriaceae (*Melilotus officinalis*), Rosaceae (*Prunus mahaleb* L.), Rubiaceae (*Asperula odorata*), Rutaceae (*Ruta graveolens*) y Umbelliferae^{2,3,19} entre otras. También podemos encontrarlas en plantas monocotiledóneas, especialmente en las gramíneas y las orquídeas³. Podemos encontrar cumarinas en el tronco, tallo, follaje, flores y frutas, quienes al parecer contienen la mayor cantidad de cumarinas así como en sus semillas, y que pueden aislarse mediante la extracción por disolventes.

Se han encontrado cumarinas en el aceite esencial del clavo, canela, lavanda y en el té verde^{6,20}. Por otro lado, podemos encontrar comúnmente cumarinas en el pasto, maíz y plantas de forraje en donde parecen actuar como repelentes en contra de escarabajos y otros invertebrados. También pueden formarse como respuesta a heridas traumáticas en la planta, durante el proceso de marchitado y durante el secado de la planta³.

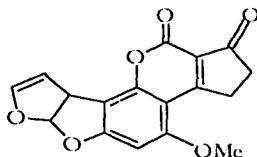
Se ha encontrado que la distribución de las cumarinas biológicamente activas en las plantas se debe a su habilidad para inhibir el crecimiento y esporulación de hongos, organismos patógenos y otras enfermedades³.

La mayoría de las cumarinas naturales en existencia han sido aisladas de plantas, pero también de microorganismos y animales³. Las levaduras del género *Streptomyces* producen antibióticos como la novobiocina (9), el cartruesin y la coumermicina A₁.



9

Por otra parte, las aflatoxinas son un grupo de metabolitos fúngicos altamente tóxicos que se distribuyen en el hongo *Aspergillus* sp. El miembro más común de este grupo es la aflatoxina B₁ (10), producida por *A. flavus* y *A. parasiticus*.



10

Se han encontrado cumarinas en algunos tipos de alga verde como es el caso del *Dasycladus vermicularis*, quien ha demostrado producir 3,6,7-trihidroxycumarina³. También se han encontrado algunos metabolitos en el molusco *Lamellaria* sp. y se han extraído otros de una glándula de castor³.

EXPOSICIÓN A LAS CUMARINAS

Las cumarinas están listadas por el Concilio Europeo (E 88,388) como "Principio Activo" y su nivel máximo permitido en alimentos y en bebidas no-alcohólicas es de 2 mg/kg, sin embargo, en bebidas alcohólicas y en confitería se permite hasta 10 mg/kg y en chicles hasta 50 mg/kg²⁰.

Con base a datos de ingesta para alimentos, bebidas, productos de confitería, chicles y bebidas alcohólicas, se estima que el consumo máximo diario de

cumarinas es de 0.07 mg/kg para una persona de 60 Kg. Lo anterior sin tomar en cuenta que también estamos en contacto con las cumarinas por uso de cosméticos y fragancias. A pesar de lo anterior, aun no se han publicado efectos adversos en el hombre, en respuesta a dosis que alcanzan más de 100 veces el consumo máximo diario^{3,20}.

METABOLISMO⁶

Cuando se administra por vía oral, la cumarina se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal y se distribuye a todo el cuerpo. Todo el compuesto se metaboliza y finalmente se excreta. Sin embargo, entre cada especie existen diferencias cuantitativas y cualitativas en las rutas de eliminación de los metabolitos de la cumarina²⁰.

La principal vía metabólica de la cumarina en el humano es la 7-hidroxicumarina, reacción catalizada por una enzima específica del hígado denominada CYP2A6 (cumarina-7-hidroxilasa). Posteriormente se conjuga a glucurónido, reacción catalizada por la enzima UDP-glucuronil transferasa, y es excretado casi completamente en su forma conjugada en la orina. En otras especies como los roedores y los conejos, la principal vía metabólica es la 3-hidroxicumarina la cual se hidroliza y forma los ácidos o-hidroxifenil-láctico y el ácido o-hidroxifenilacético, los cuales están asociados con efectos hepatotóxicos y carcinogénicos.

TOXICIDAD

En el Código Federal de Registro de los Estados Unidos publicado el 5 de marzo de 1954, la FDA en su Título 21, Parte 189.130 establece que todos los

alimentos a los que se les haya adicionado cualquier tipo de cumarina, son legalmente considerados como adulterados²¹. Esta prohibición se basó en reportes de hepatotoxicidad en ratas y perros alimentados con cumarinas^{6,20}, pero para entonces, no se habían realizado estudios en humanos.

Posterior al trabajo realizado en 1954, se publicaron varios estudios sobre la toxicidad de la cumarina en varias especies de animales^{22,23}. Sin embargo, en 1969, Shilling²² *et al.* demostraron que a diferencia de los roedores y conejos, quienes excretan la cumarina en orina como 3-hidroxycumarina, en el humano, la cumarina se excreta en orina como 7-hidroxycumarina (70-80%) y como ácido o-hidroxifenilacético (6%). Otros autores confirman lo anterior, Moran *et al.*⁶, mostró que un promedio de 63% de una dosis total de cumarina se recuperó como 7-hidroxycumarina en un lapso de 24 horas.

Un gran número de estudios se han realizado tanto en animales como en humanos y todos han demostrado que las cumarinas en humanos no son mutagénicas, teratogénicas o fototóxicas^{6,37}. Al parecer la toxicidad se presenta en aquellas especies y variedades que metabolizan la cumarina, cualitativa y cuantitativamente, diferente a como lo hace el humano^{3,6,20}.

A pesar de que existen ya numerosos estudios que indican que las cumarinas no son tóxicas para el humano, hoy en día, la FDA aun no levanta su prohibición, lo que contradice la posición de la FEMA (Flavour and Extracts Manufacturers Association) quien reconoce a las cumarinas como GRAS (Generally Recognized as Safe).

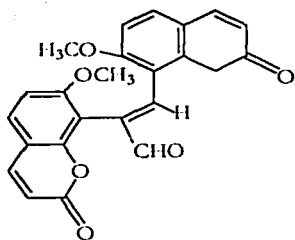
APLICACIONES FARMACOLÓGICAS

A través de los años las cumarinas se han utilizado como remedios medicinales en el tratamiento de varias enfermedades como son dolores gástricos, gota, reumatismo, hemorroides, insomnio, tos, resfríos, hipertensión, epilepsia y calambres entre otros^{6,7,24}.

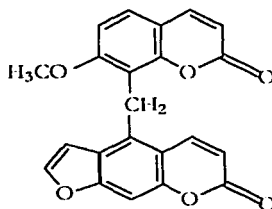
Por ejemplo, la descripción del uso de cumarinas presentes en *Meliloti herba* como medicamento es realmente empírica, sin embargo, se han publicado varias aplicaciones de esta planta en la medicina tradicional alemana. Los extractos de esta planta se han utilizado para síntomas y signos de insuficiencia venosa crónica traducido como dolores en las piernas, reumas, comezón e hinchazón. También se ha publicado su uso como remedio para heridas, inflamación, insomnio y dolores en general^{3,25}.

Por su parte, las cumarinas también han sido ampliamente empleadas en la medicina tradicional china y japonesa. Recientemente se aislaron⁷ a partir de extractos de la "fruta cnidii" (*Cnidium monnieri* L. Cusson), llamada Schechaugzi por los chinos y Jashoshi por los japoneses, cuatro nuevas cumarinas: el cnidimonal (**11**), la cnidimarina (**12**), el 5-formilxantotoxol (**13**) y el hidrato de la 2-deoximeranzina (**14**). Los extractos han sido usados en el tratamiento contra la impotencia y frigidez²⁶, así como en enfermedades de la piel²⁷.

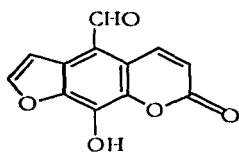
En estudios farmacológicos recientes se encontró que la actividad de los extractos crudos y de algunos de sus constituyentes, es mucho más amplia, mostrando como en otras cumarinas, actividad antialérgica^{28,29}, antidermatofítica²⁹, antiosteoporótica³⁰⁻³², antibacteriana y antifúngica³³.



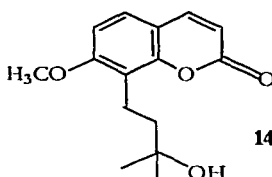
11



12



13

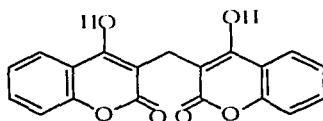


14

Por otra parte, las furanocumarinas juegan un papel importante en el tratamiento de psoriasis y otras enfermedades dermatológicas.

Se ha observado que la cumarina y algunos de sus derivados presentan actividad antitumoral y antimetastásicas³⁵ incluyendo la prevención del desarrollo de cáncer. En este sentido, se ha demostrado que derivados cumarínicos, como el 8-metoxiprosaleno, evita la formación de cáncer de piel en modelos animales al ser expuestos a la luz U.V.³⁴, mientras que la 7-hidroxi-8-nitrocumarina¹⁵ y la 7-hidroxi-6-nitrocumarina^{38,39}, entre otros derivados de 7-hidroxycumarina³⁹, presentan un efecto citostático en melanocitos malignos. En realidad aun no se conoce el mecanismo de acción en el tratamiento contra el cáncer, pero hoy en día se siguen realizando varios estudios al respecto^{38,39,40}. Por su parte, el fencuprón y la warfarina (8), disminuyen el desarrollo de metástasis. De hecho,

ambos compuestos presentan actividad anticoagulante, lo mismo que el dicumarol (15), quien junto con la warfarina es antagonista de la Vitamina K.



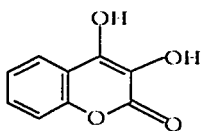
15

Así mismo, se ha observado que algunos derivados de cumarina han sido efectivos en el tratamiento de linfoedema protéico⁴⁰, infecciones crónicas como es el caso de la brucelosis, micoplasmosis y toxoplasmosis y en desórdenes del sistema inmune⁶.

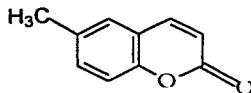
APLICACIONES INDUSTRIALES⁶

La cumarina tiene una amplia variedad de aplicaciones industriales gracias a su fuerte olor. Entre sus aplicaciones podemos encontrar la de fijador de perfumes, potenciador de aceites naturales como la lavanda, como aditivo alimentario en combinación con la vainillina, como estabilizador del sabor y olor en los tabacos y como enmascarador de olores en pinturas y gomas.

La cumarina tiene muchos derivados naturales y sintéticos, pero solo unos cuantos son de importancia económica. Entre ellos, tenemos la 3,4-dihidroxicumarina (16) utilizada en perfumes, la 6-metilcumarina (17) utilizada como un potenciador de sabor y la 7-hidroxicumarina (2) usada en bloqueadores solares y como abrillantadores fluorescentes. Por otra parte, la 7-amino-4-metilcumarina y la 7-hidroxi-4-metilcumarina, se utilizan como tintas láser.



16



17

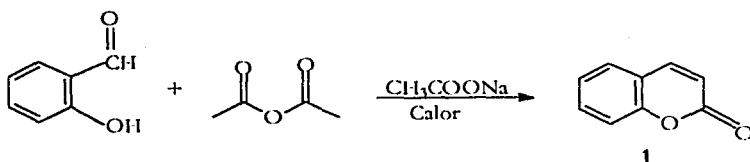
MÉTODOS DE SÍNTESIS

A partir de 1868, con la síntesis de Perkin, muchas cumarinas extraídas naturalmente, se han sintetizado también químicamente. La síntesis de cumarinas simples con grupos metoxi e hidroxilo se hace generalmente por medio de la reacción de Perkin, aun a pesar de que los rendimientos son realmente bajos.

Puesto que la formación del anillo de la pirona es el paso más importante en la síntesis de cumarinas, se han desarrollado varios métodos para introducirle grupos funcionales. Una estrategia es preparar el fenol que contendrá los sustituyentes deseados para la cumarina antes de formar el anillo de la pirona. De otra manera, puede sintetizarse primero el núcleo de la cumarina y posteriormente funcionalizarlo con los grupos deseados³.

1. Síntesis de Perkin

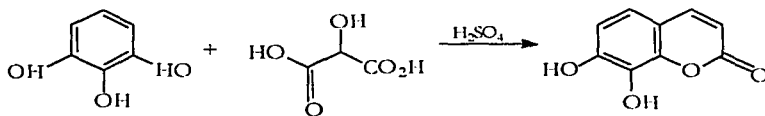
En este método, un salicilaldehído es calentado a 180° C con acetato de sodio o acetato de potasio y anhídrido acético, para formar el núcleo de la cumarina. El acetato resultante es fácilmente hidrolizado sin afectar el anillo de la pirona. Este método es especialmente ventajoso, dado que no da lugar a la formación de cromonas isoméricas (Esquema II).



Esquema II. Síntesis de Perkin

2. Síntesis de von Pechmann

Una de las síntesis más simples de cumarinas es la desarrollada por H. von Pechmann, en la cual el fenol es tratado con ácido málico en presencia de ácido sulfúrico. Mediante éste método se logra sintetizar una gran variedad de cumarinas como es la cumarina (1) y la 7-hidroxicumarina (2) (Esquema III):



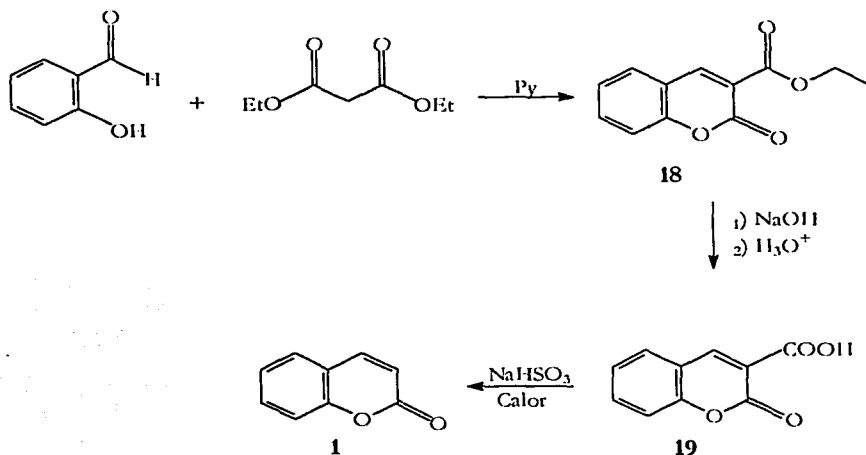
Esquema III. Síntesis de von Pechmann

Usando un β -cetoéster en lugar del ácido málico, se obtienen cumarinas 4-sustituídas. Este método presenta inconvenientes ya que algunos fenoles tienden a formar cromonas 2-sustituídas en lugar del producto esperado, especialmente cuando el agente de condensación es el pentóxido de fósforo; en este sentido es preferible usar ácido clorhídrico o cloruro de zinc en lugar del ácido sulfúrico.

3. Síntesis de Knoevenagel

Una condensación de o-hidroxibenzaldehído con malonato de dietilo en piridina (Py) caliente produce la correspondiente 3-carbetoxicumarina (18). La saponificación y liberación de la sal del compuesto anterior, dan lugar al ácido

cumarin-3-carboxílico (19), el cual a través de una reacción de descarboxilación en presencia de bisulfito de sodio genera la cumarina correspondiente. Esquema (IV):



Esquema IV. Síntesis de Knoevenagel

PROPIEDADES FÍSICAS

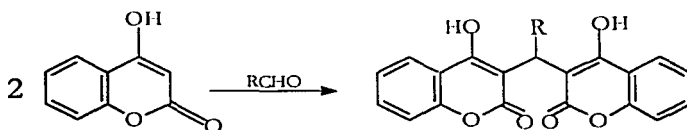
La cumarina es un sólido incoloro pero de olor muy característico y placentero. Tiene un peso molecular es de 146.15 g/mol, un punto de fusión (p.f.) de 68-70° C y un punto de ebullición (p.eb.) de 303° C. La cumarina tiene una absorción máxima de U.V. de 272 nm en cloroformo y es soluble en etanol, cloroformo y en aceites, mientras que es moderadamente soluble en agua caliente y ligeramente soluble en agua fría a 20° C⁶.

La propiedad física más obvia de las cumarinas es que tienen un espectro de absorción bastante bien definido y manifiestan una fluorescencia muy característica ante la excitación con la luz ultravioleta alrededor de los 365 nm. Por tanto, esta propiedad ha sido ampliamente utilizada en la detección de cumarinas en cromatografía en papel y capa fina.

REACTIVIDAD⁴¹

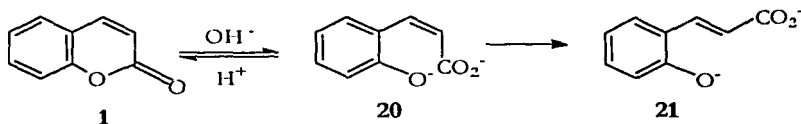
Las cumarinas presentan carácter aromático en cuestión de reactividad. En este sentido, el núcleo de la cumarina es susceptible a sustitución electrofílica. La sulfonación y nitración se dan inicialmente en el anillo carbocíclico en posición C-6, pero puede introducirse un segundo grupo en posición C-3. En contraste, la sustitución con bromo se da en posición C-3 y no en el anillo carbocíclico. Lo mismo que la clorometilación⁴¹.

Las propiedades del anillo heterocíclico de la cumarina se ven influenciadas por la presencia de ciertos sustituyentes. Por ejemplo, un grupo hidroxilo en posición C-4 intensifica la reactividad electrofílica de la pirona a tal grado, que la sustitución por un grupo nitro, ácido sulfónico (SO₃H) o por halógeno, toma lugar en posición C-3 antes que en posición C-6. Este sistema es susceptible también al ataque por aldehídos para dar una dicumarina (Esquema V):



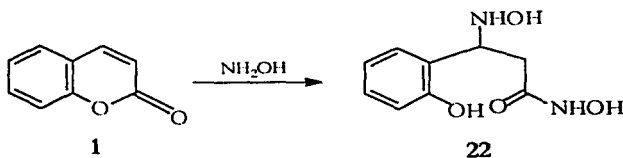
Esquema V.

La reactividad dominante en el anillo heterocíclico de la cumarina es el ataque nucleofílico más que electrofílico, por lo que la reacción se da en posición C-4 antes que en C-6. En general, nucleófilos débiles atacan la posición C-4 como es el caso del bisulfito, el cianuro y los alcóxidos, sin embargo, los nucleófilos fuertes atacan la posición C-2, rompiendo el anillo de la pirona dando como resultado la formación de ácido cumarínico (20), el cual si se somete por tiempos prolongados a la base puede isomerizarse a su forma trans para dar el ácido cumárico (21) (Esquema VI). La reacción de formación del compuesto (20) es reversible a la cumarina en presencia de un ácido fuerte, no así cuando se forma el ácido trans cumárico (21).



Esquema VI.

La cumarina no reacciona en presencia de aminas, pero sí en presencia de hidroxilamina, dando como resultado la formación del ácido hidroxámico (22) (Esquema VII)

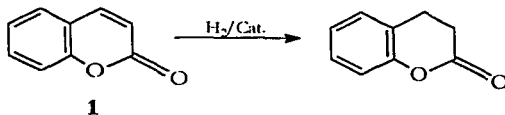


Esquema VII

La reacción de la cumarina con el agente de Grignard puede dar diferentes productos, dependiendo del sitio de ataque. Sin embargo, normalmente se da

una mezcla muy compleja y la reacción realmente no tiene un valor práctico³⁴. Aquí el problema es la naturaleza irreversible de adición, controlada cinéticamente, lo cual no se da en las reacciones antes descritas, ya que éstas son reversibles y están sujetas a un control termodinámico lo cual favorece la formación del más estable.

La reducción del anillo heterocíclico de la cumarina con hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4), presenta el mismo inconveniente que la reacción con agente de Grignard, no así si se hace mediante una hidrogenación catalítica (Esquema VIII).



Esquema VIII.

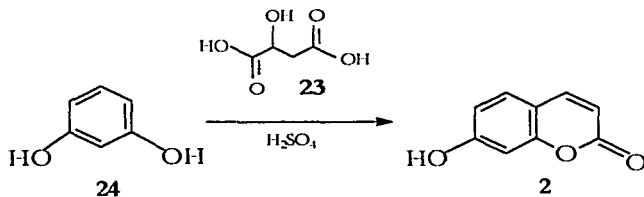
*RESULTADOS
Y
DISCUSIÓN*

La química y reactividad de la 7-hidroxycumarina (**2**) se ha estudiado poco, de ahí nuestro interés por estudiar la funcionalización de este compuesto, para obtener derivados de esta cumarina con posible actividad biológica o intermedios para la construcción de estructuras más complejas.

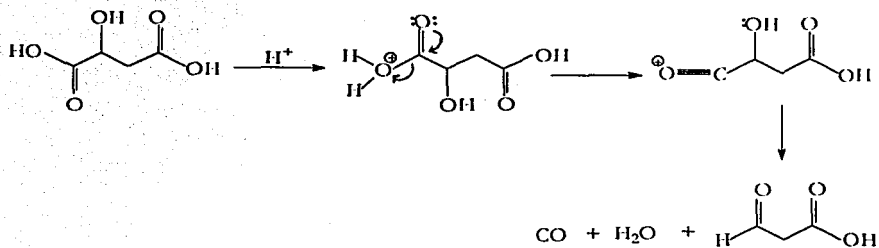
Como primer paso, se sintetizó de manera eficiente y sencilla la 7-hidroxycumarina y posteriormente se llevaron a cabo varias reacciones sobre este sustrato con la finalidad de funcionalizarla. El método de síntesis de la 7-hidroxycumarina, así como las reacciones sobre este sustrato, se describen a continuación:

A) SÍNTESIS DE LA 7-HIDROXICUMARINA

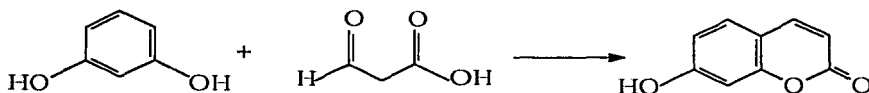
La forma más simple para obtener la 7-hidroxycumarina (**2**) es mediante la reacción de Pechmann⁴².



Éste encontró que los derivados de cumarina podían obtenerse cuando el ácido málico (**23**) reaccionaba con un derivado de fenol (**24**) en presencia de ácido sulfúrico concentrado. Para que el proceso se pueda llevar a cabo, primero el ácido málico debe transformarse, por descarboxilación, en ácido malonaldehídico (Esquema IX) y posteriormente reaccionar con el derivado de fenol (Esquema X).



Esquema IX



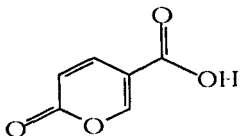
Esquema X

Toda vez que reproducimos la técnica original (método I) y debido a los bajos rendimientos obtenidos, decidimos que era pertinente realizar algunas modificaciones a la técnica. Por lo que, considerando que al generar cuantitativamente el compuesto 1,3-dicarbonílico se incrementaría el rendimiento de la reacción, se decidió variar el orden de adición de las materias primas, obteniéndose los resultados que se indican en la Tabla I.

Método	Orden de Adición	Rendimiento
I	Resorcinol + ácido málico + ácido sulfúrico	29.15% (0.4385g)
II	Resorcinol + ácido sulfúrico + ácido málico	15.18% (0.2239g)
III	Ácido málico + ácido sulfúrico + resorcinol	40.17% (0.6007g)

Tabla I. Rendimientos de las metodologías utilizadas

En todos los casos se obtuvo el producto con un p.f de 202-204° C, observándose un mayor rendimiento cuando el ácido málico y sulfúrico se mezclan 10 minutos antes de que se adicione el resorcinol (método III). Esto aunque en apariencia lógico, tomando en cuenta que es necesario primero generar primero el compuesto 1,3-dicarbonílico, que será susceptible al ataque del resorcinol, era el método que ofrecía menores posibilidades de éxito, debido a la reacción colateral conocida del ácido málico con ácido sulfúrico para formar ácido cumálico (25).



25

Por su parte, la metodología II fue la que dió un menor rendimiento lo que sugiere que posiblemente parte del resorcinol se sulfonó, limitando así la cantidad de resorcinol libre para reaccionar con el compuesto 1,3-dicarbonílico. Es importante mencionar que estas condiciones de reacción eran las idóneas para asegurar que en cuanto se formara el compuesto 1,3-dicarbonílico, reaccionar ía inmediatamente con el resorcinol, no dando tiempo a la formación del ácido cumálico (25).

Con estos resultados tal vez sólo reste hacer un estudio del tiempo en el que se mantienen mezclados tanto el resorcinol con el ácido sulfúrico como el ácido málico con el ácido sulfúrico.

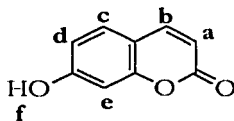
La estructura de la 7-hidroxicumarina (2) se determinó en base a los datos espectroscópicos que se detallan a continuación. Cabe mencionar que en el caso del espectro de RMNC¹³, se utilizó un programa de cómputo (ACD labs) para calcular el desplazamiento teórico.

**IR pastilla (cm⁻¹)
(Espectro 1)**

3172.90	Banda ancha de tensión O-H de fenol
1682.34	Grupo carbonilo de α -pirona
1603.50, 1565.62	Enlace C=C anillo aromático
1236.68, 1134.68	Bandas anchas de lactona

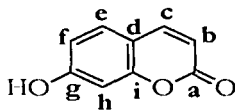
**RMN ¹H (Acetona d-6)
(Espectro 2)**

Desplazamiento (ppm)	Señales	Asignación
9.48	(s, 1 H; desaparece con D ₂ O)	f
7.86	(d, 1H; J = 9.9 Hz)	b
7.51	(d, 1H; J = 8.1 Hz)	c
6.85	(dd, 1H; J = 8.4 Hz, 2.4Hz)	d
6.75	(d, 1H; J = 2.4 Hz)	e
6.17	(d, 1H; J = 9.6 Hz)	a



**RMN ^{13}C (Acetona *d*-6)
(Espectro 3)**

Desplazamiento		Carbono	
Teórico	Experimental	Número	Tipo
161.60	161.95	g	C
160.70	160.04	a	C
155.70	156.90	i	C
144.30	144.67	c	CII
129.50	130.40	e	CH
113.30	113.72	f	CH
111.50	112.87	d	C
111.50	112.79	b	CH
102.50	103.24	h	CH



**Espectrometría de Masas (*m/z*)
(Espectro 4)**



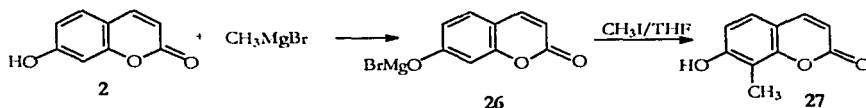
M^+	PB (100%)
162	162

**Espectrometría de Masas
de Alta Resolución
Anexo I**

Masa Calculada	Masa Observada
162.0317	162.0301

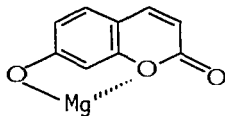
B) USO DEL HIDROXILO EN LA FUNCIONALIZACIÓN DE LA 7-HIDROXICUMARINA

Nuestro primer intento consistió en formar el fenolato de magnesio (26), adicionando a la 7-hidroxicumarina (2) un equivalente de bromuro de metil magnesio para posteriormente metilar en posición C-8, por la adición de dos equivalentes de yoduro de metilo (CH_3I) en presencia de THF (Esquema XI)



Esquema XI.

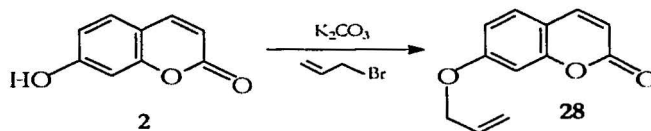
Con este procedimiento se aisló un producto que, aunque con un p.f. fue de 214-218° C, diferente, resultó ser la 7-hidroxicumarina (2). En este sentido, podemos sugerir que el intermedio O-magnésiano (26) generado es muy estable en THF, (Esquema XII) y al no poder utilizar éter como disolvente pues la 7-hidroxicumarina (2) es insoluble en éste, decidimos no modificar ninguna condición de reacción y entonces se procedió a utilizar otro tipo de química sobre este sustrato.



Esquema XII

Una segunda posibilidad era llevar a cabo una reacción tipo Claisen, por lo que fue necesario realizar la O-alkilación de la 7-hidroxicumarina (2) por el método de Williamson. En este sentido, la alquilación del oxígeno se llevó a cabo calentando la 7-hidroxicumarina con bromuro de alilo, siendo la base utilizada el

carbonato de potasio, a fin de formar el alcóxido, el cual mediante una reacción de sustitución sobre el bromo del alilo, formó el éter correspondiente (28).



El producto crudo obtenido fue un sólido, el cual se purificó por cromatografía en columna (cromatografía flash), utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo, obteniéndose un sólido ligeramente rosado el cual se purificó mediante una recrystalización con eter/hexano obteniéndose la 7-(2-propeniloxy)-cumarina (28) como cristales blancos con un rendimiento de 71% (0.4376g).

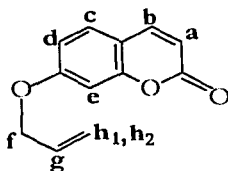
Los análisis espectroscópicos del producto son los siguientes. Cabe mencionar que en el caso del espectro de RMNC¹³, se utilizó un programa de cómputo (ACD labs) para calcular el desplazamiento teórico.

**IR pastilla (cm⁻¹)
(Espectro 5)**

3080, 3010, 990	Banda de enlace C-H insaturado (=CH ₂) Vinílico
1424, 1399	Banda de enlace C-H saturado (metileno)
1723	Grupo carbonilo de α-pirona
1613, 1511	Enlace C=C anillo aromático
1126	Banda de enlace C-O-C
1227	Banda ancha de lactona

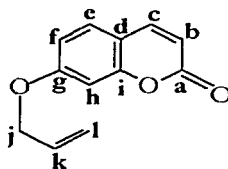
**RMN ¹H (DMSO)
(Espectro 6)**

<i>Desplazamiento (ppm)</i>	<i>Señales</i>	<i>Asignación</i>
7.97	(d, 1H; J = 9.3 Hz)	b
7.61	(d, 1H; J = 8.4 Hz)	c
6.97	(dd, 1H; J = 2.7 Hz, 2.4 Hz)	d
6.93	(d, 1H; J = 2.4 Hz)	e
6.27	(d, 1H; J = 9.3 Hz)	a
6.03	(dddd, 1H; J = 17.2 Hz, 10.5 Hz, 5.2 Hz, 5.4 Hz)	g
5.41	(dtd, 1H; J = 17.4 Hz, 3.3 Hz, 1.5 Hz)	h₁
5.28	(dtd, 1H; J = 10.5 Hz, 3.0 Hz, 1.5 Hz)	h₂
4.66	(ddd, 2H; J = 5.1 Hz, 1.6 Hz, 1.5 Hz)	f

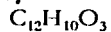


RMN ^{13}C (DMSO)
(Espectro 7)

Desplazamiento		Carbono	
Teórico	Experimental	Número	Tipo
160.70	161.28	a	C
156.77	160.26	g	C
155.40	155.31	i	C
143.00	144.29	c	CH
132.58	132.94	k	CH
128.30	129.48	e	CH
117.20	118.11	l	CH ₂
112.69	112.83	f	CH
112.50	112.55	b	CH
112.10	112.43	d	C
101.30	101.44	h	CH
68.75	68.81	j	CH ₂



Espectrometría de Masas (m/z)
(Espectro 8)

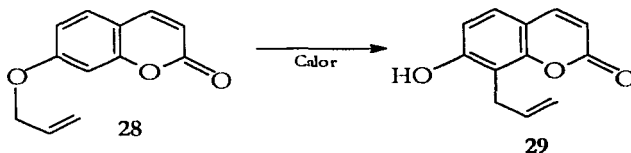


M^+	PB (100%)
202	202

**Espectrometría de Masas
de Alta Resolución
(Anexo II)**

<i>Masa Calculada</i>	<i>Masa Observada</i>
202.0630	202.0619

Una vez obtenida la 7-(2-propeniloxi)-cumarina (**28**), decidimos llevar a cabo sobre ésta, una transposición tipo Claisen para formar una unión C-C en la 7-hidroxycumarina (**2**), por migración del grupo alilo desde el oxígeno al carbono 6 u 8. Esta reacción, llevada a cabo a altas temperaturas, implica una transposición seguida de una enolización para regenerar el anillo aromático.



Para llevar a cabo la transposición fue necesario buscar un disolvente que tuviera un punto de ebullición (p.cb.) alto, de tal forma que se llevara a cabo eficientemente la transposición. Se probaron varios disolventes entre ellos, el xileno cuyo p.cb. es de 140° C, la decalina cuyo p.cb. es de 190° C y finalmente el difenileter cuyo p.cb. es de 260° C, siendo éste último quien mejor rendimiento de reacción mostró (Tabla II).

DISOLVENTE	CONDICIONES	RENDIMIENTO
Xileno	140° C	13.4%
Decalina	190° C	16.2%
Difenileter	260° C	68.7%

Tabla II

Puesto que ambas posiciones orto se encontraban libres, se obtuvieron dos productos, los cuales se purificaron por cromatografía en columna (cromatografía flash), siendo el producto transpuesto en C-8 el que se obtuvo en mayor rendimiento (69%, 0.4290 g). El otro producto tuvo un rendimiento del 1% (0.0062 g).

Los análisis espectroscópicos de la 8-(2-propenil)-7-hidroxicumarina (29) son los siguientes. Cabe mencionar que en el caso del espectro de RMNC¹³, se utilizó un programa de cómputo (ACD labs) para calcular el desplazamiento teórico.

*IR pastilla (cm⁻¹)
(Espectro 9)*

3332	Banda ancha de tensión O-H de fenol
2975, 1435, 1406	Banda de enlace C-H saturado (metileno)
1699	Grupo carbonilo de α -pirona
1600, 1569	Enlace C=C anillo aromático
1302, 1233	Banda ancha de lactona
831	Aromático tetrasustituído

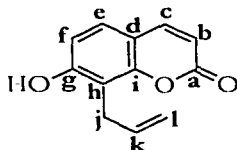
**RMN ¹H (CDCl₃ + DMSO)
(Espectro 10)**

Desplazamiento (ppm)	Señales	Asignación
8.65	(s, 1 H; desaparece con D ₂ O)	e
7.63	(d, 1H; J = 7.2 Hz)	b
7.18	(d, 1H; J = 6.3 Hz)	d
6.88	(d, 1H; J = 6.3 Hz)	c
6.17	(d, 1H; J = 6.9 Hz)	a
6.00	(dddd, 1H; J = 12.7 Hz, 7.6 Hz, 4.6 Hz, 4.5 Hz)	g
5.08	(dtd, 1H; J = 12.7 Hz, 2.7 Hz, 1.2 Hz)	h₁
4.98	(dtd, 1H; J = 7.5 Hz, 2.4 Hz, 1.2 Hz)	h₂
3.59	(ddd, 2H; J = 4.8 Hz, 1.2 Hz, 1.2 Hz)	f

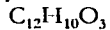


RMN ^{13}C ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$)
(Espectro 11)

Desplazamiento		Carbono	
Teórico	Experimental	Número	Tipo
162.11	161.87	a	C
158.03	158.83	g	C
153.62	153.40	i	C
144.47	144.25	c	CH
135.42	135.06	k	CH
126.52	126.34	e	CH
115.47	115.04	l	CH_2
113.22	113.77	f	CH
113.01	112.55	b	CH
112.28	111.70	h	C
112.12	111.34	d	C
28.55	26.60	j	CH_2



Espectrometría de Masas (m/z)
(Espectro 12)



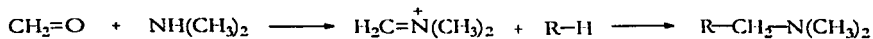
M^+	PB (100%)
202	202

***Espectrometría de Masas
de Alta Resolución
(Anexo III)***

<i>Masa Calculada</i>	<i>Masa Observada</i>
202.0630	202.0616

C) ESTUDIO DE LA AMINOMETILACIÓN EN LA 7-HIDROXICUMARINA

La reacción de Mannich consiste en la condensación de una amina primaria o secundaria con formaldehído y un compuesto que contenga al menos un átomo de hidrógeno de alta reactividad, en presencia de un ácido como catalizador. La característica esencial de esta reacción es el reemplazo del átomo de hidrógeno reactivo por un grupo aminometilo⁴⁵ (Esquema XIII).

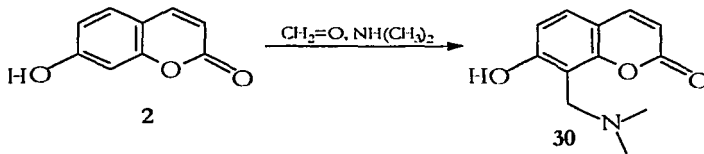


Esquema XIII

Desde hace tiempo, la reacción de Mannich ha sido de gran interés en síntesis orgánica principalmente porque las bases de Mannich son muy reactivas y pueden ser fácilmente transformadas en otros compuestos⁴⁶. Esta reacción ha sido un método bastante atractivo para introducir una cadena en posición orto o para a varios fenoles⁴⁷. Es por esto que se decidió probar la reacción de Mannich en la 7-hidroxycumarina, considerando que el carácter activante del hidroxilo sobre el anillo bencénico facilitaría este tipo de reacción.

Como primer paso, hicimos reaccionar un equivalente de formaldehído con un equivalente de clorhidrato de dimetilamina para formar el ion iminio, el cual sería el reactivo electrofílico que atacaría nuestro sustrato. Posteriormente se adicionó la 7-hidroxycumarina y la cantidad necesaria de etanol para lograr la solubilización de ésta. Esta mezcla se calentó a reflujo durante un día, observándose la formación de un producto, pero a pesar de la acidez del medio, que se sabe cataliza este tipo de reacciones, se observó que la formación de dicho producto

transcurría de manera muy lenta, así que se decidió adicionar 1.5ml. de ácido acético glacial para aumentar la acidez del medio. Con esto observamos la presencia de materia prima y un incremento en la formación de producto, que al cabo de una semana parecía ya no seguir reaccionando. Se trabajó la reacción obteniéndose un producto crudo, el cual se extrajo de acetato de etilo y se purificó por cromatografía en placa de 20 x 20, utilizando como eluyente una mezcla de cloroformo/metanol (95:5). Se obtuvo un aceite ligeramente amarillento con un rendimiento de 20% (0.0152 g), que correspondió a la 7-hidroxicumarina aminometilada en posición C-8 (**30**) (Esquema XIV)



Esquema XIV

Cabe hacer notar que el formaldehído utilizado para formar el ion iminio es un compuesto con bajo punto de ebullición (- 21° C) y, que aunque se encuentra en disolución acuosa, podría estarse volatilizando haciendo que la concentración real de formaldehído fuera menor y por lo tanto la del ion iminio formado, provocando con esto que gran parte de la materia prima (**2**) quedara sin reaccionar.

Por otro lado, se plantea la posibilidad de que la electronegatividad impartida por la parte heterocíclica de nuestra materia prima (**2**), sea lo suficientemente grande como para impedir, aún con la activación que pueda dar el grupo hidroxilo en la posición 7 de nuestra materia prima, que se dé una reacción de sustitución

electrofílica aromática, dando como resultado rendimientos de reacción muy bajos.

La misma metodología se aplicó en medio básico, utilizando hidróxido de sodio (NaOH 1N) como catalizador, esperando el mismo resultado. Desafortunadamente se obtuvo un polímero completamente insoluble y que por tanto no se caracterizó. En este sentido, podemos decir que la 7-hidroxicumarina posiblemente se este comportando de manera semejante a un fenol en presencia de formaldehído e hidróxido de sodio, formando polímeros reticulados tipo baquelita.

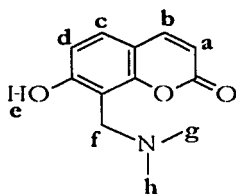
Los análisis espectroscópicos de la 8-N,N-dimetilaminometil-7-hidroxicumarina (30) son los siguientes. Cabe mencionar que en el caso del espectro de RMNC¹³, se utilizó un programa de cómputo (ACD labs) para calcular el desplazamiento teórico.

IR pastilla (cm⁻¹)
(Espectro 13)

3418	Banda ancha de tensión O-H de fenol
2959, 1493, 1470	Banda de enlace C-H saturado (metilo, metileno)
1715	Grupo carbonilo de α -pirona
1605, 1585, 1590	Enlace C=C anillo aromático
1358	Banda de enlace C-N
1239, 1114	Banda ancha de lactona
836	Aromático tetrasustituído

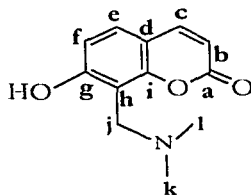
RMN ¹H (DMSO)
(Espectro 14)

<i>Desplazamiento (ppm)</i>	<i>Señales</i>	<i>Asignación</i>
7.91	(d, 1 H; J = 9.3 Hz)	b
7.46	(d 1 H; J = 8.4 Hz)	c
6.72	(d, 1H; J = 8.4 Hz)	d
6.16	(d, 2H; J = 9.6 Hz)	a
3.90	(s, 2H)	f
2.35	(s, 6 H)	g,h

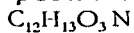


RMN ^{13}C (DMSO)
(Espectro 15)

Desplazamiento		Carbono	
Teórico	Experimental	Número	Tipo
161.84	162.75	a	C
156.40	160.24	g	C
153.76	153.09	i	C
143.88	145.03	c	CH
127.05	128.64	e	CH
114.98	113.23	f	CH
112.96	110.60	b	CH
112.59	110.46	d	C
107.55	107.89	h	C
51.57	53.05	j	CH ₂
-44.93	43.82	k, l	CH ₃



Espectrometría de Masas (m/z)
(Espectro 16)



M*	PB (100%)
219	219

**Espectrometría de Masas
de Alta Resolución
(Anexo IV)**

<i>Masa Calculada</i>	<i>Masa Observada</i>
219.0895	219.0883

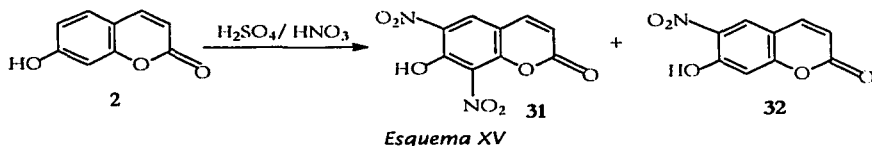
D) ESTUDIO DE LA NITRACIÓN DE LA 7-HIDROXICUMARINA

Poco ha sido el trabajo que se ha realizado para nitrar las cumarinas de manera directa^{11,49}, sin embargo, se sabe que la nitración de la cumarina se da inicialmente en el anillo aromático en posición C-6 y que puede introducirse un segundo grupo en posición C-3^{41,50}. Tomando en consideración esto y el hecho de que inicialmente la cumarina puede sufrir un ataque electrofílico en la parte carbocíclica, decidimos probar la reacción de nitración típica para un anillo aromático, esperando con ello una sustitución a la posición C-6 y C-8 libres en nuestro compuesto.

En un primer intento hicimos reaccionar la 7-hidroxicumarina (2) con ácido nítrico en ácido acético glacial, sin embargo, a pesar de que consideramos que bajo estas condiciones se lograría nitrar selectivamente nuestra materia prima (2), la metodología se desechó al observarse la formación de más de cinco productos, además de la materia prima, al cabo de 1 día de reacción.

En un segundo intento, se formó una mezcla sulfonítrica, la cual se hizo reaccionar con la 7-hidroxicumarina, obteniéndose así tres productos que se purificaron mediante una cromatografía en columna (cromatografía flash), eluyendo con una mezcla de hexano/acetona (1:1). Sin embargo, no se obtuvo la separación de estos compuestos. En un segundo intento por separarlos, se realizó una cromatografía en capa fina utilizando una placa de 20 x 20, eluyendo con una mezcla de cloroformo/mezcla acuosa (85:15), sin embargo la separación no fue eficiente. Pensando en que los r.f. tan cercanos nos impedirían su separación, se procedió ahora a utilizar una placa de 1m utilizando como eluyente una mezcla de CHCl₃/Mezcla Acuosa (7:3), obteniéndose de esta manera solo dos productos

puros, un producto dinitrado en C-6 y C-8 (**30**) con un rendimiento de 15% (0.0240 g) y un producto nitrado en C-6 (**31**) con un rendimiento de 3% (0.0043 g). (Esquema XV)



Tal parece que la nitración directa sobre las cumarinas ha resultado difícil, pues al analizar nuestros resultados hemos observado que, aún cuando es imposible hacer comparaciones con algunos trabajos reportados^{11,49, 50} puesto que las condiciones de trabajo han sido distintas, en todos los casos los rendimientos resultan muy bajos. En este sentido, se sugiere que posiblemente a pesar de contar con un grupo activante como es hidroxilo en nuestra materia prima (**2**), la densidad electrónica que genera la parte heterocíclica de nuestra molécula disminuye la reactividad en el anillo aromático, dando como resultado un rendimiento de reacción muy bajo, tal como se observó en el caso de la aminometilación de la 7-hidroxycumarina.

Los análisis espectroscópicos de la 6,8-dinitro-7-hidroxycumarina (**30**) son los siguientes. En este caso, la cantidad obtenida no fue suficiente para caracterizar el compuesto mediante espectrometría de masas y RMNC¹³

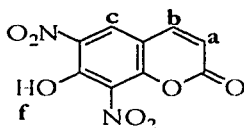
IR pastilla (cm⁻¹)
(Espectro 16)

3425	Banda ancha de tensión O-H de fenol
1740	Grupo carbonilo de α -pirona
1616	Enlace C=C anillo aromático
1522, 1383	Banda de enlace C-NO ₂ aromático
1256, 1115	Banda ancha de lactona

RMN ¹H (CD₃OD)
(Espectro 17)

Desplazamiento (ppm)	Señales	Asignación
8.26	(s, 1H)	c
7.77	(d 1 H; J = 9.6 Hz)	b
6.04	(d, 1H; J = 9.3Hz)	a

El singlete correspondiente al protón del hidroxilo (f) no aparece debido a que la muestra se analizó en metanol. El metanol intercambia con el hidroxilo de la molécula, impidiendo que el protón se vea.



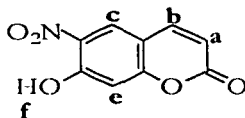
Los análisis espectroscópicos de la 7-hidroxi-6-nitrocumarina (**32**) son los siguientes. En este caso, la cantidad obtenida no fue suficiente para caracterizar el compuesto mediante RMNC¹³. Los análisis correspondientes al espectro de masas no se presentan debido a que la muestra no desorbió mediante la técnica de FAB⁺ y por tanto no se observó el ión molecular.

IR pastilla (cm⁻¹)
(Espectro 18)

3241	Banda ancha de tensión O-H de fenol
3074	Banda de enlace C-H insaturado
1734	Grupo carbonilo de α -pirona
1636, 1615	Enlace C=C anillo aromático
1529, 1397	Banda de enlace C-NO ₂ aromático
1297, 1111	Banda ancha de lactona
826	Aromático tetrasustituído

RMN ¹H (CD₃OD)
(Espectro 19)

Desplazamiento (ppm)	Señales	Asignación
8.54	(s, 1H)	c
8.06	(d 1H; J = 9.6 Hz)	b
7.04	(s, 1H)	e
6.40	(d, 1H; J = 9.6 Hz)	a



El singlete correspondiente al protón del hidroxilo (**f**) no aparece debido a que la muestra se analizó en metanol. El metanol intercambia con el hidroxilo de la molécula, impidiendo que el protón se vea.

Espectrometría de Masas (m/z)
(Espectro 16)
C₉H₅O₅N

(M + H) ⁺	PB (100%)
208	102

PARTE EXPERIMENTAL

Los espectros de infrarrojo (IR) se realizaron en un espectrómetro Perkin-Elmer® FTIR 1605. Las determinaciones se hicieron en pastilla de bromuro de potasio. Las unidades se expresan en cm^{-1} .

Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C se realizaron en un espectrofotómetro Varian Unity Inova® empleando una frecuencia de 300 MHz, utilizando Tetrametilsilano como referencia interna y cloroformo (CDCl_3), dimetilsulfóxido (DMSO), metanol (CD_3OD), acetona (acetona- d_6) y agua (D_2O) como disolvente. Los desplazamientos químicos (δ) de las señales están dados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) están expresadas en Hertz (Hz). Para las multiplicidades se utilizan las siguientes abreviaturas: s, singulete; d, doblete; dd doble de dobles; dtd, doblete tripleteado de doble; ddd, doblete dobleteado de doble; dddd, doblete dobleteado de doblete doble.

Los espectros de masas se realizaron en un espectrómetro JEOL® JMS SX 102A doble sector de geometría inversa, la técnica empleada fue Ionización Electrónica por detección de iones positivos (EI^+). Con esta técnica se obtiene el valor m/e del ión molecular (M^+), el pico base (PB) 100% y los iones fragmento. El programa de temperatura para la sonda de introducción directa fue de 20°C inicial hasta 300°C , con una velocidad de calentamiento de 16°C por minuto. La cámara de ionización se colocó a una temperatura de 300°C . El intervalo de masas más utilizado fue de 33 a 800 UMA y el estándar de calibración que se utilizó fue perfluoroqueroseno.

Empleando el mismo instrumento pero a temperatura ambiente, también se utilizó la técnica de FAB^+ (Fast Atom Bombardment), la cual se utiliza para muestras no volátiles o térmicamente inestables. En esta técnica, el analito fue disuelto en una matriz (alcohol 3-nitrobenílico) y así, la muestra y la matriz

fueron bombardeadas con un haz de átomos rápidos para desorber los iones y fragmentos de ambos. Los de la matriz produjeron una señal de fondo. Mediante esta técnica se obtienen iones *pseudomoleculares*, en este caso $[M+H]^+$.

El análisis elemental se realizó en un Elemental Analyzer EA 1108 el cual permite determinar el porcentaje de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre, basado en el método cuantitativo de "rápida combustión dinámica". Es decir, el instrumento convierte toda sustancia orgánica e inorgánica a productos de combustión, a una temperatura de 1020° C, y posteriormente los manda a una columna cromatográfica donde cada componente es separado y cuantificado.

Los puntos de fusión son reportados en grados centígrados (°C) y se determinaron en un aparato Fisher-Johns[®].

Las purificaciones se realizaron por cromatografía en columna (cromatografía flash) utilizando sílica-gel Merck[®] 60 (230-400 mesh) como adsorbente y por cromatografía en capa fina (cromatografía en placa) utilizando placas de vidrio de 20 x 20 cm o de 20 cm x 1 m cubiertas con sílica-gel 60 GF-254 Merck[®] como adsorbente.

La pureza de los productos, así como el monitoreo de las reacciones se determinó cualitativamente por cromatografía en capa fina (ccf) utilizando placas de vidrio de 5.0 x 1.0 cm cubiertas con sílica-gel 60 GF-254 Merck[®] como adsorbente y como reveladores vapores de yodo o lámpara de luz ultravioleta (UVSL-25).

Todos los reactivos utilizados son de la compañía Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI).

Tanto el metanol como el cloroformo utilizados para la extracción de los productos obtenidos, fueron previamente destilados a fin de eliminar impurezas. La acetona se secó con P_2O_5 y posteriormente se utilizó recién destilada.

OBTENCIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LA 7-HIDROXICUMARINA (2)

Método I

En un matraz bola de 50 mL de una boca equipado con un agitador magnético y refrigerante, se colocaron 3 g (2.7×10^{-2} mol) de resorcinol, 2.4 g (1.79×10^{-2} mol) de ácido málico y 6.1 mL (1.14×10^{-1} mol) de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla de reacción se colocó en un baño de aceite a 120°C , hasta la completa suspensión de la efervescencia (aproximadamente 1 hora), posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se trató con un exceso de hielo, obteniéndose un precipitado naranja, se filtró y se lavó con agua fría. Se recristalizó de etanol/agua, obteniéndose la 7-hidroxycumarina (2) como un sólido naranja con punto de fusión de $202\text{-}204^\circ \text{C}$ (reportado $225\text{-}228^\circ \text{C}$) y con un rendimiento de 29% (0.4385g).

Método II

En un matraz bola de 50 mL de una boca, equipado con un agitador magnético y refrigerante, se colocaron 3 g (2.7×10^{-2} mol) de resorcinol y 6.1 mL (1.14×10^{-1} mol) de ácido sulfúrico concentrado, se mezclaron durante 10 minutos. Posteriormente se adicionaron 2.4 g (1.79×10^{-2} mol) de ácido málico; la mezcla se agitó durante 10 minutos más, después se colocó en un baño de aceite a 120°C , hasta la completa suspensión de la efervescencia; la mezcla se trabajó de la misma manera que en el método I. El rendimiento que se obtuvo fue del 15% (0.2239 g) con un p.f. de $202\text{-}204^\circ \text{C}$.

Método III

En un matraz bola de 50 mL de una boca, equipado con agitador magnético y refrigerante, se colocaron 2.4 g (1.79×10^{-2} mol) de ácido málico y 6.1 mL

(1.14×10^{-1} mol) de ácido sulfúrico concentrado, la mezcla se agitó durante 10 minutos. Posteriormente se adicionaron 3 g (2.7×10^{-2} mol) de resorcinol, agitándose ésta durante 10 minutos más, se colocó la mezcla de reacción en un baño de aceite a 120°C , hasta la completa suspensión de la efervescencia; la mezcla se trabajó de la misma manera que en el método I. El rendimiento que se obtuvo fue del 40% (0.6007g) con un p.f de $202-204^\circ \text{C}$.

IR (pastilla cm^{-1}): 3172, 1682, 1603, 1565, 1236, 1134, 833

RMN¹H 300 MHz (acetona- d_6 , ppm): $\delta = 9.48$ (s, 1H), 7.86 (d, 1H; J = 9.9 Hz), 7.51 (d, 1H; J = 8.1 Hz), 6.84 (dd, 1H; J = 8.5 Hz, 2.4 Hz), 6.75 (d, 1H; J = 2.4 Hz), 6.17 (d, 1H; J = 9.6 Hz)

RMN¹³C 300 MHz (acetona- d_6 , ppm): $\delta = 200.2, 161.9, 161.0, 156.9, 144.6, 130.4, 113.7, 112.8, 103.2$

MS (EI+, m/z): 162 (M⁺), 162 (PB 100%)

HS-MS: 162.0301 observado

AE (Método CHNS): C 64.59673 % ; H 3.90997 %

OBTENCIÓN DE LA 7-(2-PROPENILOXI)-CUMARINA

En un matraz bola de 25 mL de una boca, equipado con agitador magnético, se colocaron 0.1 g (6.17×10^{-4} mol) de 7-hidroxycumarina y 35 mL de acetona seca, bajo atmósfera de N_2 . Posteriormente se adicionaron 0.0857 g (6.15×10^{-4} mol) de carbonato de potasio anhidro y 3 mL (0.0346 mol) de bromuro de alilo. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente por 10 minutos, para posteriormente calentarla a reflujo por 12 horas y finalmente a temperatura ambiente por otras 5 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se purificó por gradiente en cromatografía en columna, utilizando como eluyente hexano hasta una mezcla de hexano /acetato de etilo (7:3), obteniéndose un sólido ligeramente rosado, el cual se recrystalizó de éter/hexano, obteniéndose 7-(2-propeniloxi)cumarina (**25**) como un sólido blanco con punto de fusión de 62-64° C y con un rendimiento de 71% (0.4376 g).

IR (pastilla cm^{-1}): 3406, 3080, 3010, 1723, 1613, 1511, 1399, 1227, 1126, 996, 843

RMN¹H 300 MHz (DMSO, ppm): δ = 7.97 (d, 1H; J = 9.3Hz), 7.61 (d, 1H; J = 8.4Hz), 6.97 (dd, 1H; J = 2.7 Hz, 2.4 Hz), 6.93 (d, 1H; J = 2.4 Hz), 6.27 (d, 1H; J = 9.3Hz), 6.03 (dddd, 1H; J = 17.28 Hz, 10.5 Hz, 5.25 Hz, 5.4 Hz), 5.41 (dtd, 1H; J = 17.4 Hz, 3.3 Hz, 1.5 Hz), 5.28 (dtd, 1H; J = 10.5 Hz, 3 Hz, 1.5 Hz), 4.66 (ddd, 2H; J = 5.17 Hz, 1.65 Hz, 1.5 Hz)

RMN¹³C 75.5 MHz (DMSO, ppm): δ = 161.2, 160.2, 155.3, 144.2, 132.9, 129.4, 118.1, 112.8, 112.5, 112.4, 101.4, 68.8

MS (EI+, m/z): 202 (M^+), 202 (PB 100%)

HR-MS: 202.0619 observada

AE (Método CHNS): C 69.73407 % ; H 4.990181 %

OBTENCION DE LA 8-(2-PROPENIL)-7-HIDROXICUMARINA

En un matraz bola de 100 mL equipado con un refrigerante, se colocaron 0.1 g (4.95×10^{-4} mol) de 7-(2-propeniloxi)-cumarina (**25**) y 20 mL de difeniléter. Posteriormente el matraz se colocó en un baño de aceite a 260° C durante 20 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se purificó por cromatografía en columna a gradiente, utilizando como eluyente hexano hasta una mezcla de hexano/acetato de etilo (7:3). Se obtuvieron 2 productos, pero solo el producto mayoritario se recristalizó de éter/hexano, obteniéndose un sólido de color blanco con un p.f. de 144-146° C y un rendimiento de 69% (0.4290 g) que corresponde a la 8-(2-propenil)-7-hidroxicumarina (**26**).

IR (pastilla cm^{-1}): 3332, 2972, 1699, 1600, 1569, 1435, 1406, 1302, 1246, 1105, 831

RMN¹H 300 MHz (CDCl_3 , ppm): δ = 8.65 (s, 1H), 7.56 (d, 1H; J = 7.2 Hz), 7.18 (d, 1H; J = 6.3 Hz), 6.88 (d, 1H; J = 6.3 Hz), 6.85 (d, 1H; J = 6.9 Hz), 6.00 (dddd, 1H; J = 12.7 Hz, 7.6 Hz, 4.6 Hz, 4.5 Hz), 5.08 (dtd, 1H; J = 12.75 Hz, 2.7 Hz, 1.2 Hz), 4.98 (dtd, 1H; J = 7.5 Hz, 2.4 Hz, 1.2 Hz)

RMN¹³C 75.5 MHz (CDCl_3 , ppm): δ = 161.8, 158.8, 153.4, 144.2, 135.0, 126.3, 115.0, 113.7, 112.229, 111.7, 111.3, 26.6

MS (EI+, m/z): 202 (M⁺), 202 (PB 100%)

HR-MS: 202.0616 observada

AE (Método CHNS): C 70.6565 % ; H 5.0205 %

OBTENCIÓN DE LA 8-N,N-DIMETILAMINOMETIL-7-HIDROXICUMARINA

En un matraz bola de 25mL equipado con agitador magnético, se colocaron 0.05mL (6.48×10^{-4} mol) de formaldehído y 0.0524g (6.48×10^{-4} mol) de clorhidrato de dimetilamina. Esta mezcla se dejó en agitación a 0° C durante 10 minutos y posteriormente se adicionaron 5mL de etanol, 0.1 g (6.17×10^{-4} mol) de 7-hidroxicumarina y finalmente 1.5mL de ácido acético glacial como catalizador. La mezcla de reacción se dejó 7 días con calentamiento a reflujo, se enfrió y se evaporó el disolvente al vacío para obtener un sólido de color rosa, el cual se disolvió en 5 mL de agua y se llevó a pH de 8 con NaOH 2N. Posteriormente se extrajo con acetato de etilo (4 x 20mL), se secó con CaCl₂ y Na₂SO₄, se filtró y evaporó el disolvente al vacío, se purificó por cromatografía en capa fina, utilizando una placa de 1m y como eluyente una mezcla de cloroformo/metanol (95:5) obteniéndose un aceite ligeramente amarillento correspondiente a la 8-N,N-dimetilaminometil-7-hidroxicumarina con un rendimiento de 20% (0.0152 g).

IR (película cm⁻¹): 3418, 2926, 1715, 1605, 1585, 1493, 1470, 1358, 1239, 1114, 836

RMN¹H 300 MHz (DMSO, ppm): δ = 7.91 (d, 1H; J = 9.3 Hz), 7.46 (d, 1H; J = 8.4 Hz), 6.72 (d, 1H; J = 8.4 Hz), 6.16 (d, 1H; J = 9.6 Hz), 3.90 (s, 2H), 2.35 (s, 6H)

RMN¹³C 75.5 MHz (DMSO, ppm): δ = 162.7, 160.2, 153.0, 145.0, 128.6, 113.2, 110.6, 110.4, 107.8, 53.05, 43.8.

MS (EI+, m/z): 219 (M⁺), 219 (PB 100%)

HR-MS: 219.0883 observado

OBTENCIÓN DE LA 7-HIDROXI-6,8-DINITROCUMARINA Y LA 7-HIDROXI-6-NITROCUMARINA

En un matraz bola de 5 mL equipado con agitador magnético, se colocaron 0.9 mL (9.18×10^{-3} mol) de ácido sulfúrico y 0.04 mL (7.18×10^{-4} mol) de ácido nítrico. La mezcla se dejó en agitación a 0° C durante 10 minutos y posteriormente se adicionaron 0.1 g (6.17×10^{-4} mol) de 7-hidroxycumarina y 0.15 mL más de ácido sulfúrico. Una vez terminada la adición de la 7-hidroxycumarina, se dejó por 10 minutos en agitación, y se añadió hielo de agua para obtener un precipitado de color naranja, el cual se filtró y se secó para posteriormente purificarlo por cromatografía en capa fina, utilizando como eluyente una mezcla (7:3) de cloroformo/mezcla acuosa*. Se obtuvieron 2 productos, ambos sólidos de color amarillo:

El producto dinitrado en posición C-6 y C-8 con un p.f. de 220° C (desc) y un rendimiento de 15 % (0.024 g).

IR (película cm^{-1}): 3425, 1740, 1616, 1522, 1383, 1256, 1115

RMN¹H 300 MHz (CD_3OD , ppm): δ = 8.26 (s, 1H), 8.77 (d, 1H; J = 9.6 Hz), 6.04 (d, 1H; J = 9.3 Hz).

El producto nitrado en C-6 con un p.f. de 200° C (desc) y un rendimiento de 3% (0.0043 g).

IR (película cm^{-1}): 3241, 3074, 1734, 1636, 1616, 1529, 1480, 1397, 1297, 1111

RMN¹H 300 MHz (CD_3OD , ppm): δ = 8.54 (s, 1H), 8.06 (d, 1H; J = 9.6 Hz), 7.047 (s, 1H), 6.40 (d, 1H; J = 9.6 Hz).

MS (FAB⁺, ANB): 208 (M^+), 102 (PB 100%)

* Composición de la mezcla acuosa: cloroformo, metanol, agua (60:40:0.4)

CONCLUSIONES

- ❖ Se obtuvo la 7-hidroxycumarina con un 40% de rendimiento.
- ❖ Se obtuvo la 7-(2-propeniloxi)-cumarina con un 71% de rendimiento.
- ❖ Se obtuvo la 8-(2-propenil)-7-hidroxycumarina con un 69% de rendimiento.
- ❖ Se obtuvo la 8-N,N-dimetilaminometil-7-hidroxycumarina con un rendimiento del 20%.
- ❖ Se obtuvo la 6,8-dinitro-7-hidroxycumarina con un 15% de rendimiento.
- ❖ Se obtuvo la 7-hidroxi-6-nitrocumarina con un 3% de rendimiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cotton, C.M., **Etnobotany. Principles and applications.**, 1996, Chinchester, Jonh Wiley & Sons.
2. Murray, R.D.H., Méndez, J., Brown, S.A., **The Natural Coumarins. Occurrence, Chemistry and Biochemistry.**, 1982, New York, Jonh Wiley & Sons.
3. O'Kennedy, R., Thornes, R.D., **Coumarins. Biology, applications and mode of action.**, 1997, Chinchester, Jonh Wiley & Sons.
4. Harvey, A.L., Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? **Trends. Pharmacol. Sci.**, 1999, 20: 196-198.
5. Cohen, A.J., Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. **Food and Chemical Toxicology.**, 1979, 17: 277-289.
6. Egan, D., O'Kennedy, R., Moran, E., The pharmacology, metabolism, analysis and applications of coumarin and coumarin-related compounds. **Drug. Metab. Rev.**, 1990, 22: 503-529.
7. Jin-Na, C., Purusotam, B., Zheng-Tao, W., *et. al.* Coumarins from the Fruits of *Cnidium monnieri*. **Journal of Natural Products.**, 2000, 63(4): 485-488.
8. Soine, T.O., Naturally occurring coumarins and related physiological activities. **J. Pharm. Sci.**, 1964, 53: 231-264.
9. Sardari, S., Mori, Y., Horita, K., Micetich, R.G., Nishibe, S., Danashtalab, M., Synthesis and antifungal activity of coumarin and angular furanocoumarins. **Bioorg. Med. Chem.**, 1999, 7(9): 1933-1940.
10. Laurin, P., Klich, M., Dupuis-Hamelin, C., Mauvais, P., Synthesis and in vitro evaluation of novel highly potent coumarin inhibitors of gyrase B. **Bioorganic Med. Chem. Lett.**, 1999, 9: 2079-2084.
11. Egan, D., James, P., Cook, D., O'Kennedy, R., Studies on the cytostatic and cytotoxic effects and mode of action of 8-nitro-7-hydroxycoumarin. **Cancer Lett.**, 1997, 201-211.

12. Hoult, J.R.S., Paya, M., Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **Gen. Pharmac.**, 1996, 27: (4), 713-722.
13. Maucher, A., Kager, M., Von Angerer, E., Evaluation of the antitumor activity of coumarin in prostate cancer models. **J. Clin. Res. Clin. Oncol.**, 1993, 119: 150-154.
14. Jimenez-Orozco, F.A., Molina-Guameros, J.A., Mendoza-Patiño, N., León-Cedeño, F., Flores-Pérez, B., Santos-Santos, E., Mandoki, J.J., Cytostatic activity of coumarin metabolites and derivatives in the B-16-F10 murine melanoma cell line. **Melanoma Research.**, 1999, 9: 243-247.
15. Finn, G., Creaven, B., Egan, D., Study of the in vivo cytotoxic potential of natural and synthetic coumarin derivatives, using human normal and neoplastic skin cell lines. Próximamente publicado en **Melanoma Research 2002**.
16. Mattern, U., Lürer, P., Kreusch, D., **Biosynthesis of coumarins.**, pp 623-633. En: Barton, D., Nakanishi, K., Meth-Cohn, O., Sankawa, U., **Comprehensive natural products chemistry.**, 1999, Vol. 1, Oxford, Elsevier Science Ltd.
17. Marshall, M.E., Mendelson, L., Butler, K., Ruley, L., Cantrell, J., Wiseman, C., Treatment of metastatic renal cell carcinoma with coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidine: a pilot study. **J. Clin. Oncol.**, 1987, 5: (6), 862-866.
18. Marshall, M.E., Butler, K., Hersmansen, D., Treatment of hormone-refractory stage D carcinoma of prostate with coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidine: a pilot study. **Prostate.**, 1990, 17: 95-97.
19. Lejarazo Gómez, Eva Florencia. Síntesis de Derivados de Cumarinas. Tesis de Licenciatura, UNAM, Fac. Química, 1994.
20. Lake, B.G., Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. **Food and Chemical Toxicology.**, 1999, 37: 423-453.
21. **Code of Federal Regulations. Food and Drugs. Title 21. Parts 170-199.** Office of the Federal Register, National Archives and Records Administration. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.

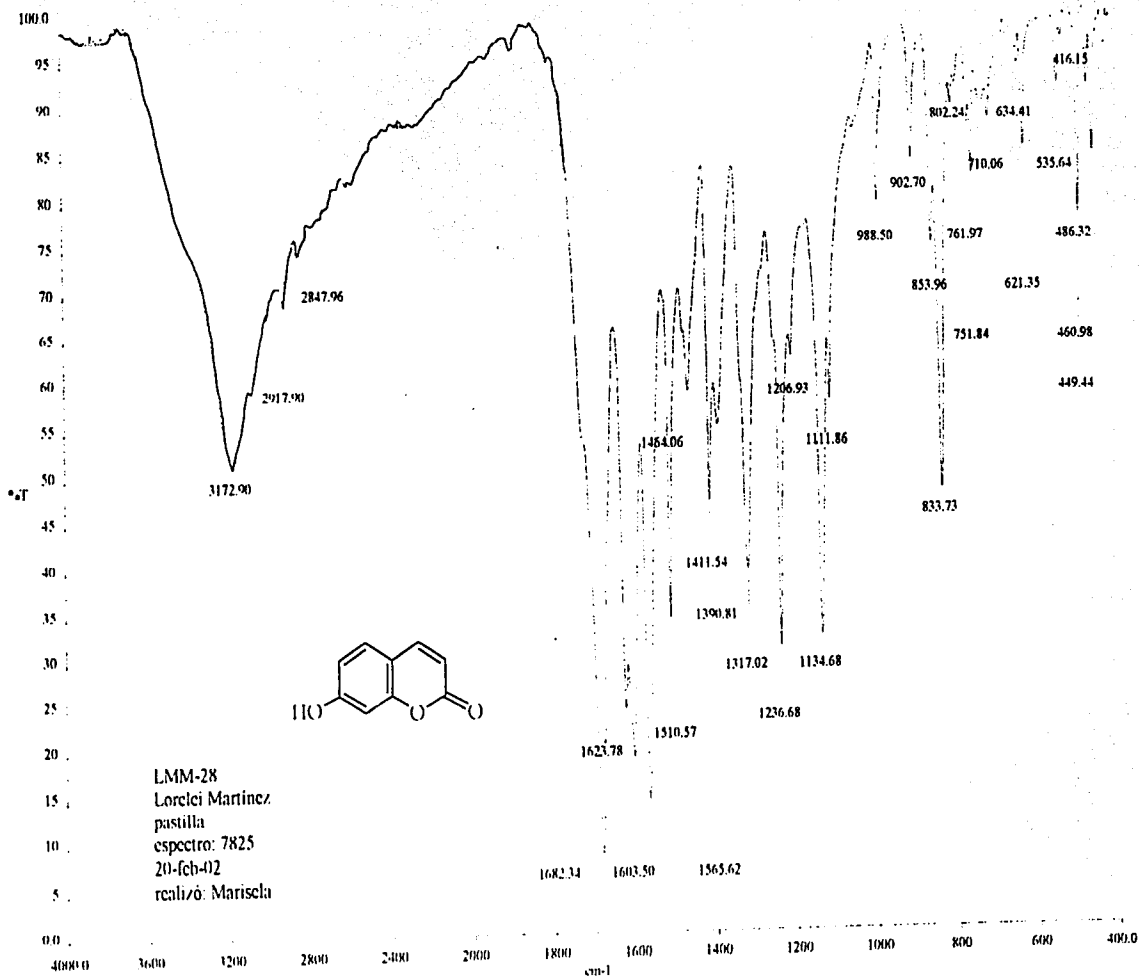
22. Shilling, W.H., Crampton, R.F., Longland, R.C., Metabolism of coumarin in man. **Nature.**, 1969, 21: 664-665.
23. Hazleton, I.W., Tusing, T.W., Zeitlin, B.R., Thiessen, R., Murer, H.K., Toxicity of coumarin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.**, 1956, 118: 348-358.
24. Ojala, T., Biological screening of plant coumarins. Thesis. Helsinki, 2201. www.thesis.helsinki.fi/julkaisut/mat/farma/uk/ojala/biologic.pdf
25. Madus, G. **Lehrbuch der biologischen Heilmittel. Part 1. Heilpflanzen, Vol 2. Leipzig: Georg Thieme, 1938**, pp 1862-1865. En: O'Kennedy, R, Thornes, R.D., **Coumarins. Biology, applications and mode of action.**, 1997, Chinchester, Jonh Wiley and Sons.
26. Ou, M. **Chinese-English Manual of Commonly Used Traditional Chinese Medicine.**, 1989, Joint Publising Co. Ltd., Hong Kong, pp 522.
27. **Pharmacopoea of the People's Republic of China.**, 1995, Guangdong Scientific and Technical House: Guangdong, People's Republic of China, Vol. 1, pp 276.
28. Yamahara, J., Kozuka, M., **Chem. Pharm. Bull.**, 1985, 33, 1676-1680.
29. Chen, Z.C., Duan, X.B., *et al.* **Acta Pharm. Sin.**, 1988, 23, 96-99.
30. Honda, G., Tabata, M., Baba, K., **Shayakugaku Zasshi.**, 1984, 38, 221-226.
31. Liao, J., Zhu, Q.A., Lu., H.J., **Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao.**, 1997, 18, 519-521.
32. Li, C.Y., Wu, T., Li, Q., **Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao.**, 1997, 18, 286-288.
33. Xie, H., Li, Q.T, Huang, L. F., **Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao**, 1994, 15, 371-374.
34. García Herrera, V. Efecto cistostático de la cumarina y la 7-hidroxycumarina en distintas líneas celulares de cáncer de pulmón. Tesis de licenciatura. UNAM. Fac. Química. 1999.

35. Jiménez-Orozco, F.A., López-González, J.S., Nieto-Rodríguez, A., Velasco-Velasquez, M.A., *et al.*, Decrease of cyclin D1 in the human lung adenocarcinoma cell line A-427 by 7-hydroxycoumarin. **Lung Cancer.**, 2001, 34: 185-194.
36. Moran, E., O'Kennedy, R., Thomas, R.D., **J. Chromatogr.**, 1987, 416: 165.
37. Pillai, S.P., Menon, S.R., Mitscher, L.A., Pillai, C.A., Shankel, D.A., Umbelliferone analogues and their potential to inhibit benzo- α -pyrone and hydrogen peroxide induced mutations. **J. Nat. Prod.**, 1999, 62: 1358-1362.
38. Finn, G.J., Kenealy, E., Cleaven, B.S., Egan, D., In vitro cytotoxic potential and mechanism of action of selected coumarins, using human renal cell lines. Proximamente publicado en **Cancer Lett.**, 2002.
39. Finn, G.J., Creaven, B., Egan, D., Study of the in vitro cytotoxic potential of natural and synthetic coumarin derivatives using human normal and neoplastic skin cell lines. **Melanoma Research.**, 2001, 11: 461-467.
40. Dempsey, E., O'Sullivan, C., Smyth, M., Egan, D., O'Kennedy, R., Wang, J., Development of an antibody-based amperometric biosensor to study the reaction of 7-hydroxycoumarin with specific antibody. **Analyst.**, 1993, 118: 411-413.
41. Barton, D., Ollis, D., **Comprehensive Organic Chemistry. The synthesis and reactions of organic compounds.**, 1979, London, Schemes, Vol. 4.
42. Sethna, S., Phadke, R., The Pechmann Reaction. **Organic Reactions.**, 1953, Vol. VII.
43. Joule, J.A., Millis, K., **Heterocyclic Chemistry.**, 2000, Blackwell Science, 4^a ed.
44. Ross, S., Finkelstein, M., Peterson, R., **J. Am. Chem. Soc.**, 1958, 80: 4327.
45. Blicke, F.F., The Mannich Reaction. **Organic Reactions.**, 1942, Vol. I.
46. Tramontini, M., Advances in the chemistry of Mannich bases. **Synthesis**, 1973, 703-775.
47. Omura, Y., *et al.* Regioselective Mannich reaction of phenolic compounds. **Tetrahedron Lett.**, 2001, 42: 7273-7275.

48. Palmer, M., **The structure and reactions of heterocyclic compounds.**, 1967, Edward Arnold Publishers, London.
49. Bansal, V., Khanna, R. N., Regioselective mononitration of coumarins using chromium nitrate as nitrating agent. **Synthetic Communications.**, 2002, 32 (9), 1345-1350.
50. Barenji, A., Nandi, G., Metal reagents in organic reactions: Reactions of coumarins with thallium (III) salts. **Heterocycles.**, 1987, Vol. 26, No. 5, 1221-1226.

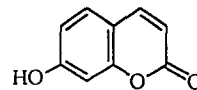
*ESPECTROSCOPIA
Y
ANEXOS*

ESPECTRO 1

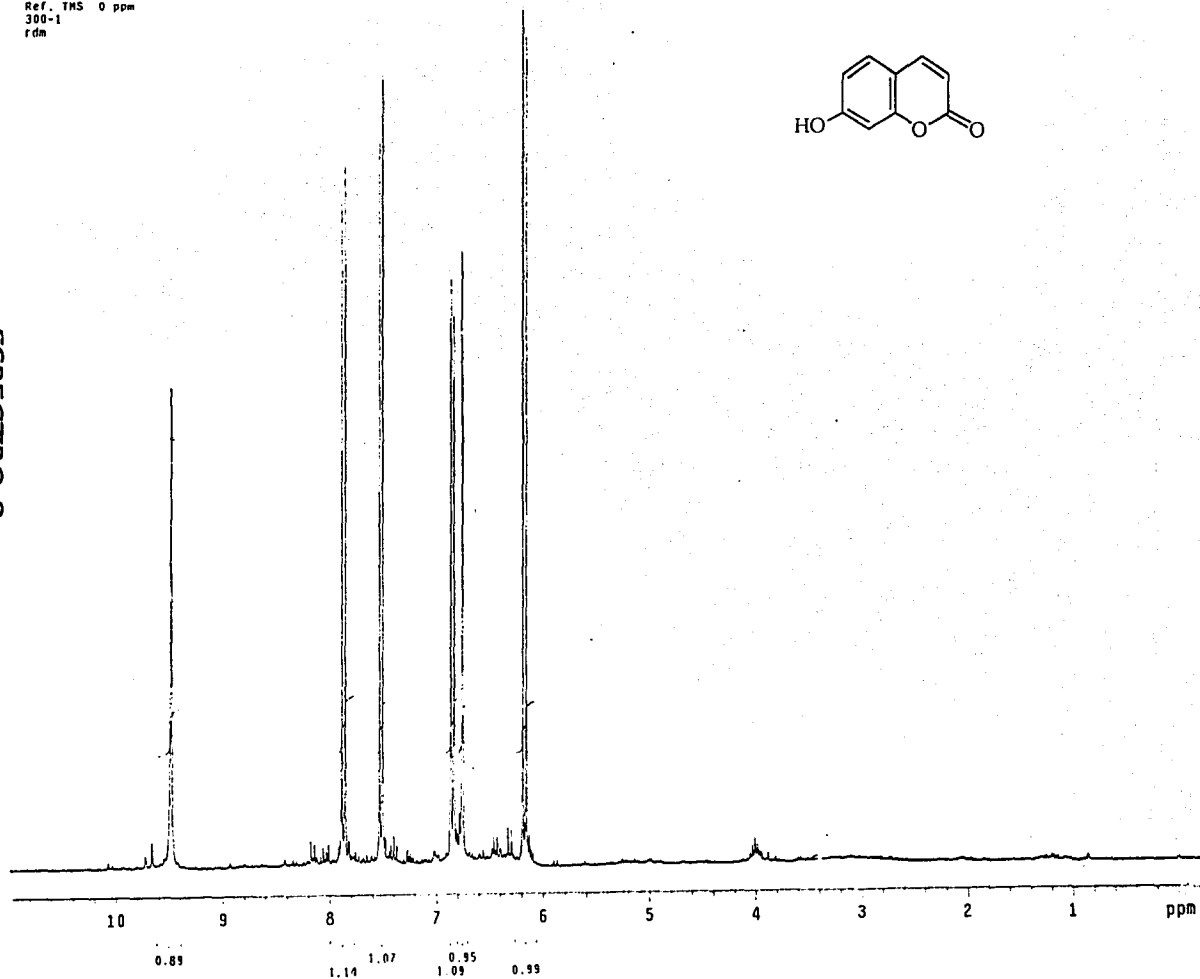


LMM-28
 Lorelei Martinez
 pastilla
 espectro: 7825
 20-fch-02
 realizo: Marisela

A. C. Ojás y otros, Lucio Martínez
LHM-28/Acetona d-6
1H 300.2 MHz
Ref. TMS 0 ppm
300-1
rdm

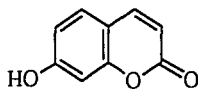


ESPECTRO 2

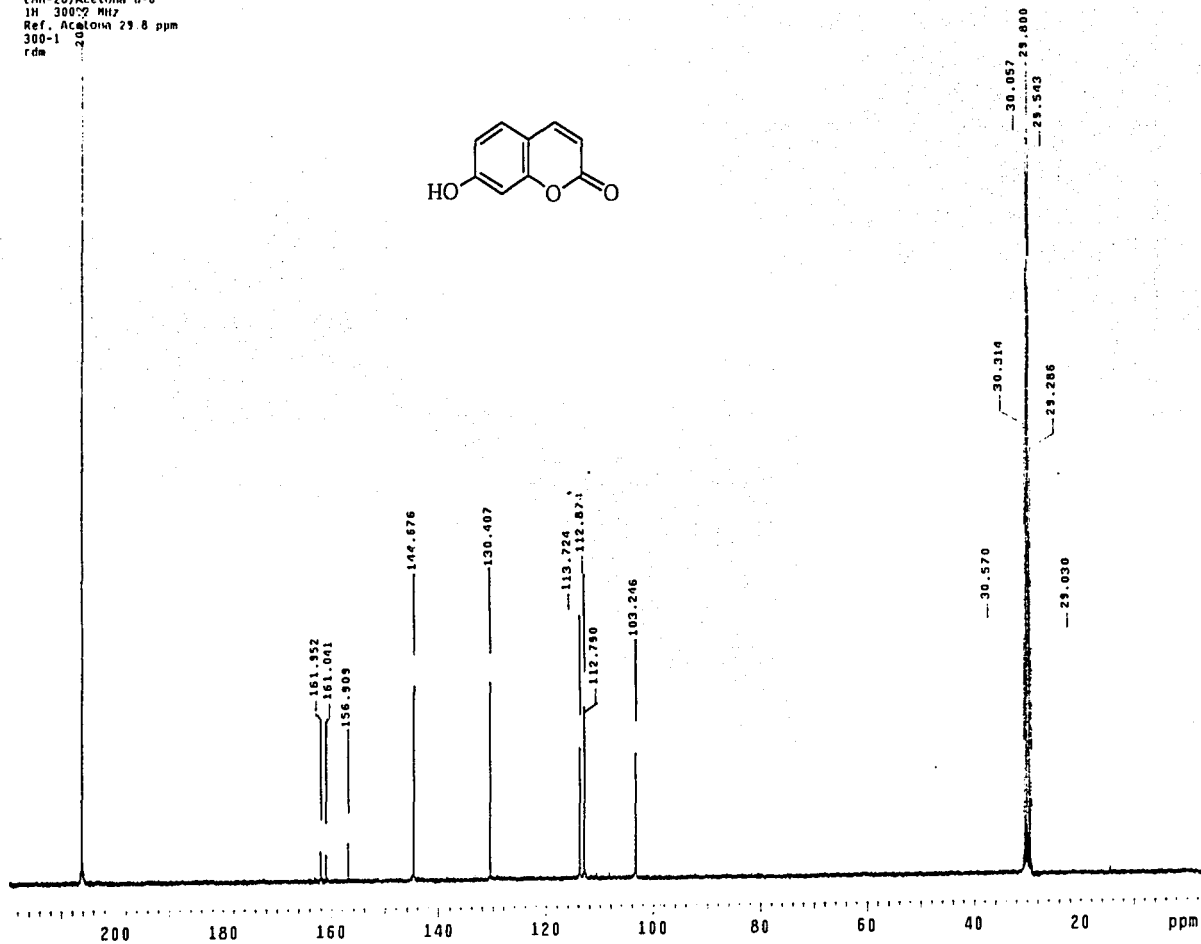


7-HIDROXICUMARINA

USA1
21/FERFRO/2002
M.C. Blas Flores/Lorelei Martinez
LMM-28/Acetona d-6
1H 300.02 MHz
Ref. Acetona 29.8 ppm
300-1
rdm

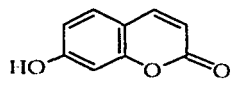
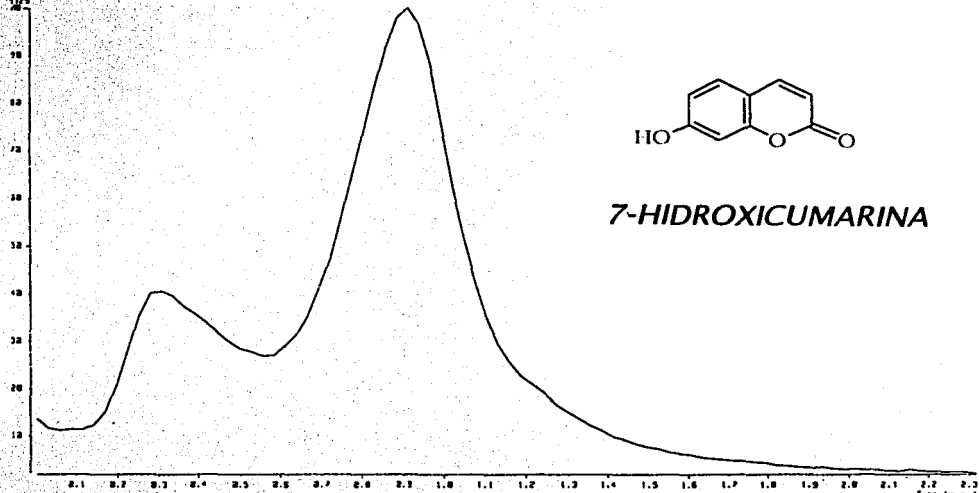


ESPECTRO 3

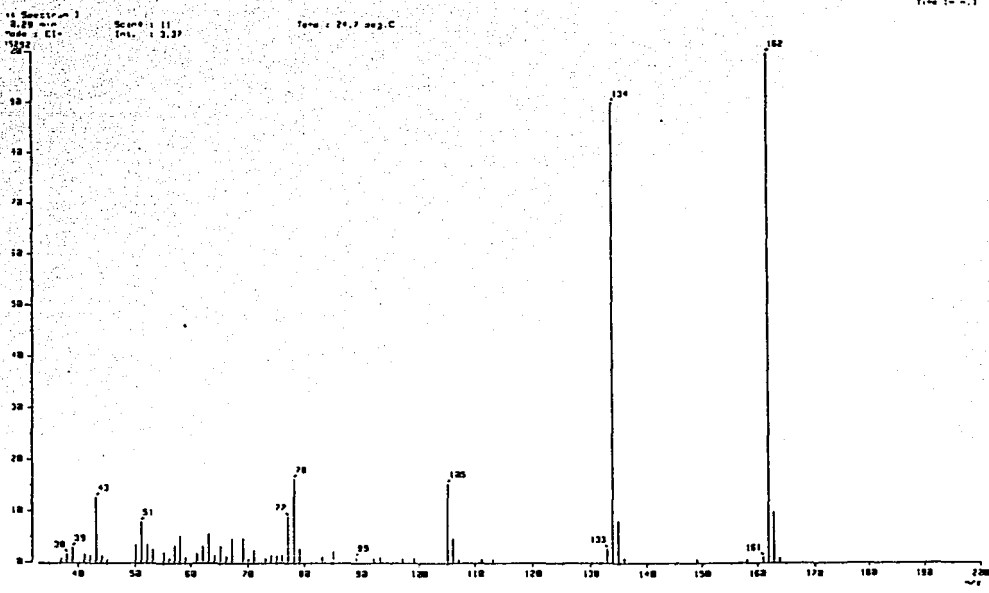


7-HIDROXICUMARINA

1
 : 074306_LYN-26_001 Date : 19-Feb-1992 16:36
 : LGPI, Fac. de Quimica, UNFM.
 : Directo... Ion Mode : EI+
 : 400000 Normal Ion (M+Linear)
 Range : m/z 33 to 200 Output RT Range : 0.00 to 2.32 min



7-HIDROXICUMARINA



ESPECTRO 4

[Elemental Composition]

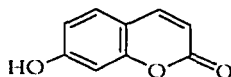
Data : OT4626 LMM-28_001 Date : 10-Apr-102 20:25
 Sample: Default parameters for B scan high-resolution
 Note : Current control, internal scan
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 RT : 0.42 min Scan#: 5
 Elements : C 20/1, H 20/1, O 7/1
 Mass Tolerance : 10ppm, 20mmu if m/z > 2000
 Unsaturation (U.S.) : -1.0 - 20.0

Observed m/z	Int%	Err[ppm / mmu]	U.S.	Composition
162.0301	100.0	-9.8 / -1.6	7.0	C 9 H 6 O 3

[Theoretical Ion Distribution]

Molecular Formula : C9 H6 O3
 (m/z 162.0317, MW 162.1448, U.S. 7.0)
 Base Peak : 162.0317, Averaged MW : 162.1451(a), 162.1459(w)

m/z	INT.	
162.0317	100.0000	*****
163.0351	10.2144	*****
164.0370	1.0674	*
165.0398	0.0737	
166.0421	0.0042	
167.0446	0.0002	



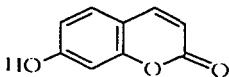
7-HIDROXICUMARINA

EAGER 200 - SUMMARY

Company name: USAI
Operator ID: NLB/YIF
Method in use: CHNS

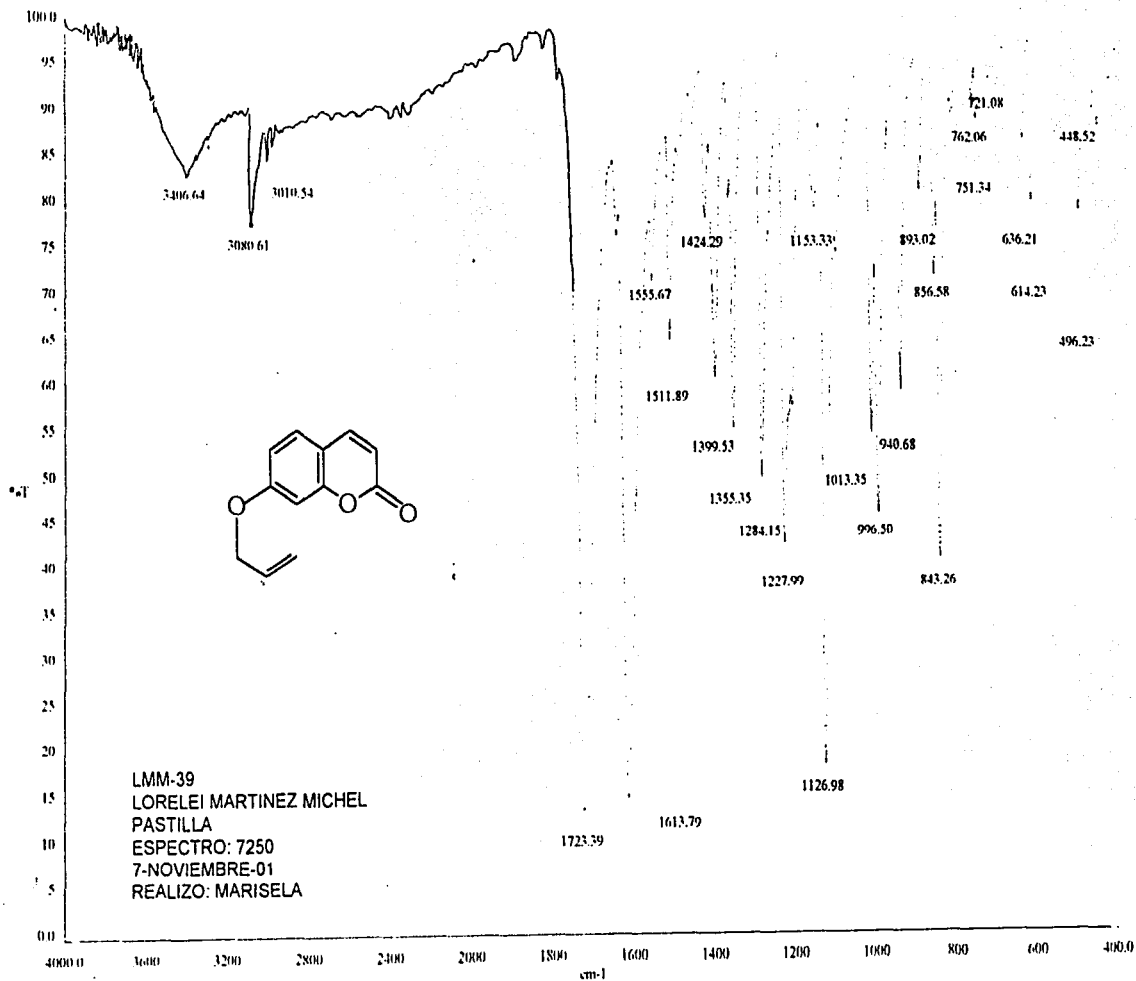
Sample Name	No. Analysis	Filename	Weight
LMM-28	1	OT838a	2.049

Component name	Concentrations
Nitrogen (%)	3.38x10 ⁻²
Carbon (%)	64.59673
Hydrogen (%)	3.90997
Sulphur (%)	0



7-HIDROXICUMARINA

ESPECTRO 5

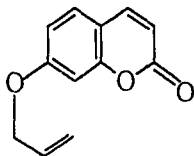


LMM-39
 LORELEI MARTINEZ MICHEL
 PASTILLA
 ESPECTRO: 7250
 7-NOVIEMBRE-01
 REALIZO: MARISELA

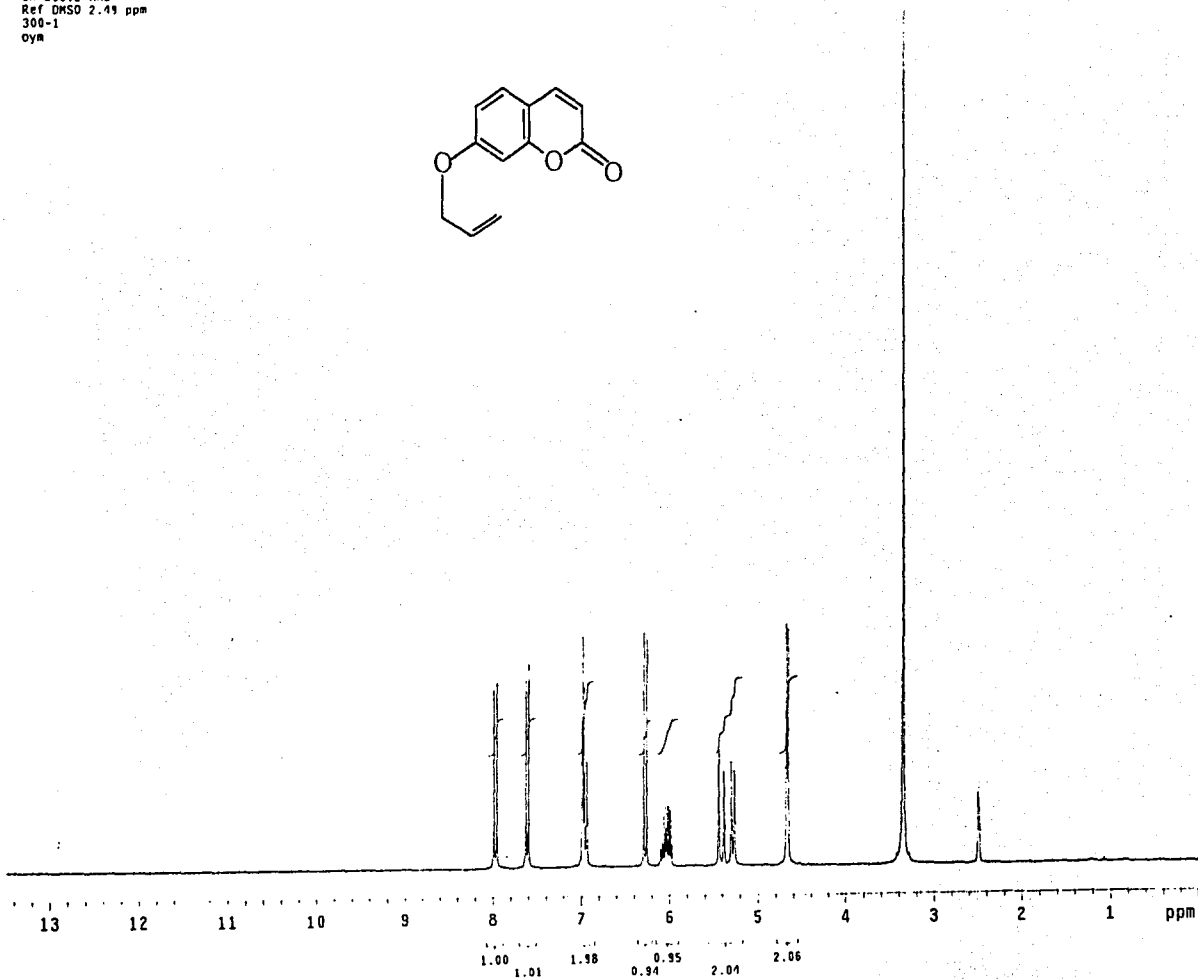
a\spectra\7250.sp

7-(2-PROPENILOXI)-CUMARINA

5 noviembre 2001
M. C. Blas Flores / Lorelei Martinez
LNM-39 / DMSO
1H 300.2 MHz
Ref DMSO 2.49 ppm
300-1
oym

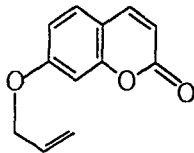


ESPECTRO 6

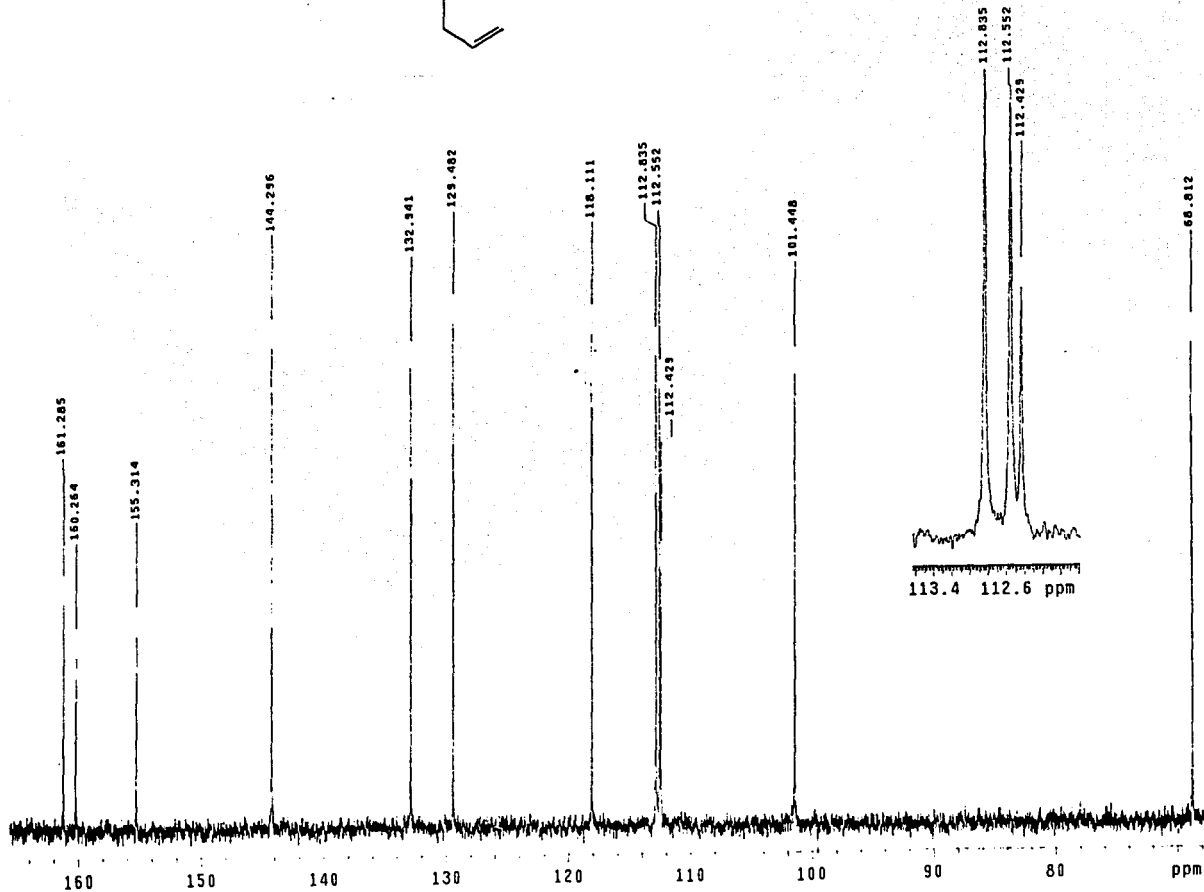


7-(2-PROPENILOXI)-CUMARINA

USA1
5 noviembre 2001
W. C. Blas Flores / Lorelei Martínez
LNM-39 / DMSO
13C 75.5 MHz
Ref. DMSO 39.5 ppm
300-2
oym



ESPECTRO 7

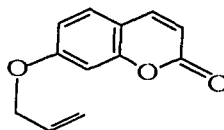


7-(2-PROPENILOXI)-CUMARINA

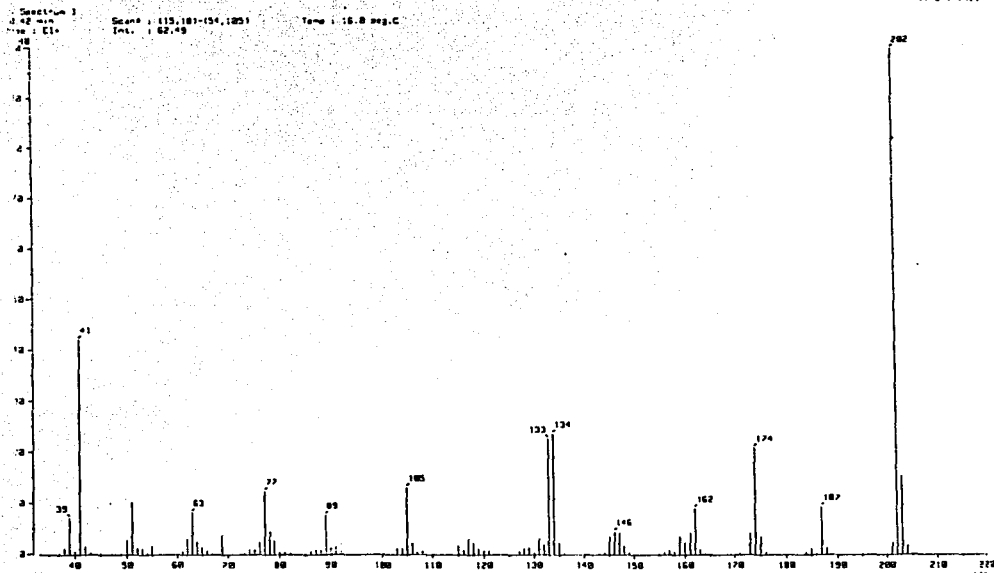
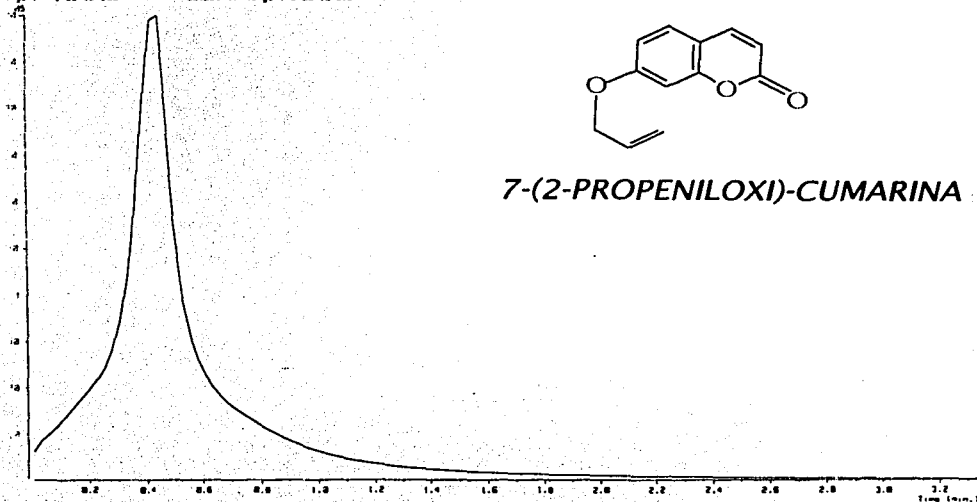
013587_0m-19_882

Date : 86-Nov-18 18:05

SP1, Fac. de Química, UNFM, Ion Mode : EI+
Direct
40.00 : Normal Ion (40°C-Liner) Output RT Range : 0.00 to 3.34 min.
File : 013587 to 882



7-(2-PROPENILOXI)-CUMARINA



ESPECTRO 8

[Elemental Composition]

Data : OT4014_LMM-39_001

Date : 08-Nov-101 10:08

Sample: Default parameters for B scan high-resolution

Note : Current control, internal scan

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

RT : 0.11 min

Scan#: 2

Elements : C 15/1, H 15/1, O 5/0

Mass Tolerance : 10ppm, 10mmu if m/z < 1000, 20mmu if m/z > 2000

Unsaturation (U.S.) : -1.0 - 20.0

Observed m/z	Int%	Err[ppm / mmu]	U.S.	Composition
202.0619	100.0	-5.6 / -1.1	8.0	C 12 H 10 O 3

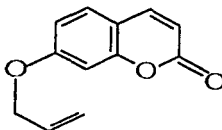
[Theoretical Ion Distribution]

Molecular Formula : C12 H10 O3

(m/z 202.0630, MW 202.2096, U.S. 8.0)

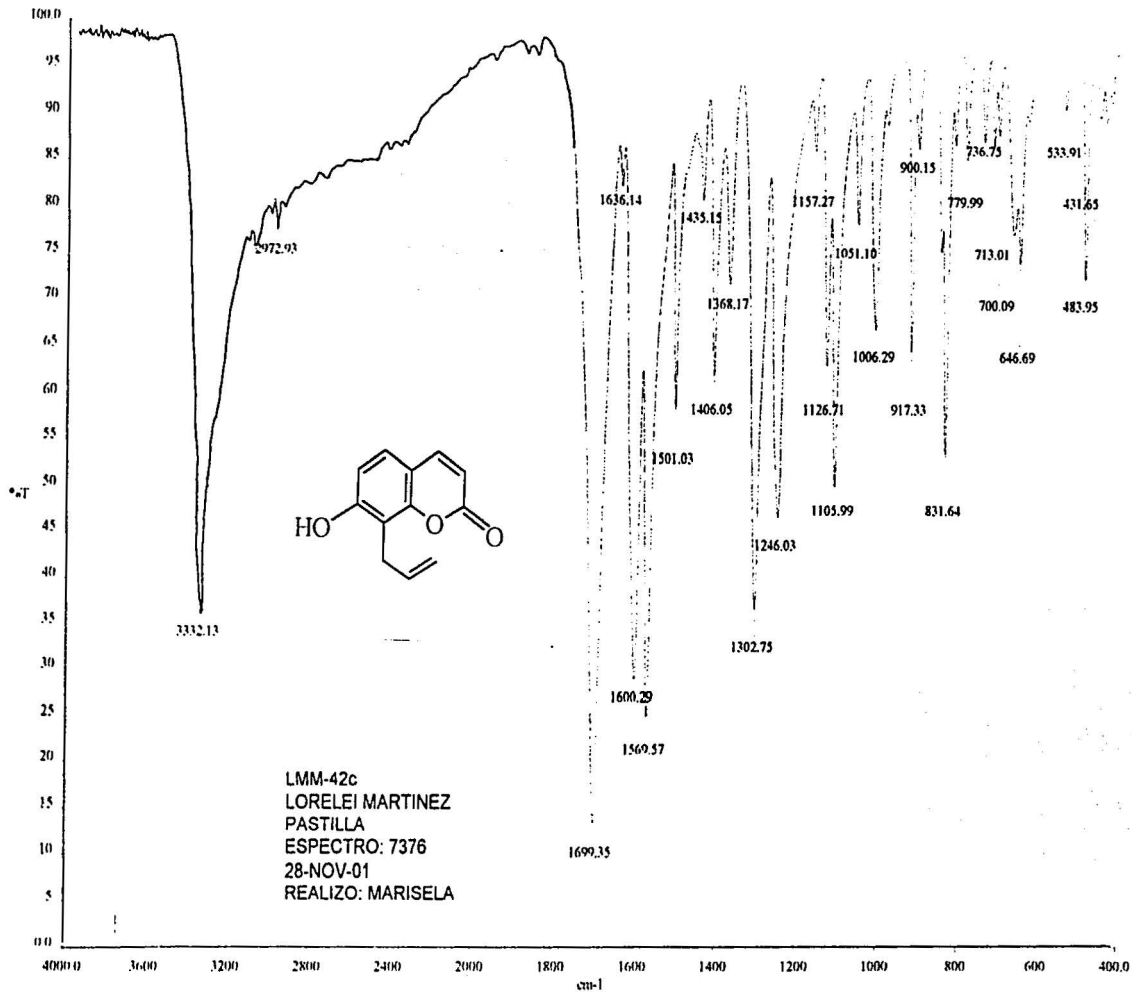
Base Peak : 202.0630, Averaged MW : 202.2101(a), 202.2109(w)

m/z	INT.	
202.0630	100.0000	*****
203.0664	13.6111	*****
204.0687	1.4535	*
205.0714	0.1141	
206.0739	0.0071	
207.0764	0.0004	



7-(2-PROPENILOXI)-CUMARINA

ESPECTRO 9



a\spectra\anrh.001

8-(2-PROPENIL)-7-HIDROXICUMARINA

EAGER 200 - SUMMARY

Company name : USAI
 Operator ID : NLB/YIF
 Method in use : CHNS

#	Group	Sample Name	Sample Num.	Filename	Weight
92	1	LMM-39	92	OT729a	1.086

Component name Concentrations

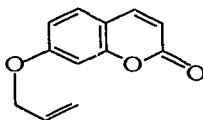
Nitrogen (%) 0
 Carbon (%) 69.88161
 Hydrogen (%) 4.996818

#	Group	Sample Name	Sample Num.	Filename	Weight
93	1	LMM-39	93	OT729b	1.139

Component name Concentrations

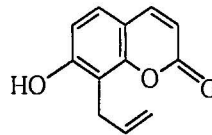
Nitrogen (%) 0
 Carbon (%) 69.58654
 Hydrogen (%) 4.983544

	Average	Group 1 Std. Dev.	% Rel. S. D.	Variance
Nitrogen (%)	0	0	0	0
Carbon (%)	69.73407	.2111811	.3028377	4.459744E-02
Hydrogen (%)	4.990181	9.458375E-03	.1895397	8.946087E-05

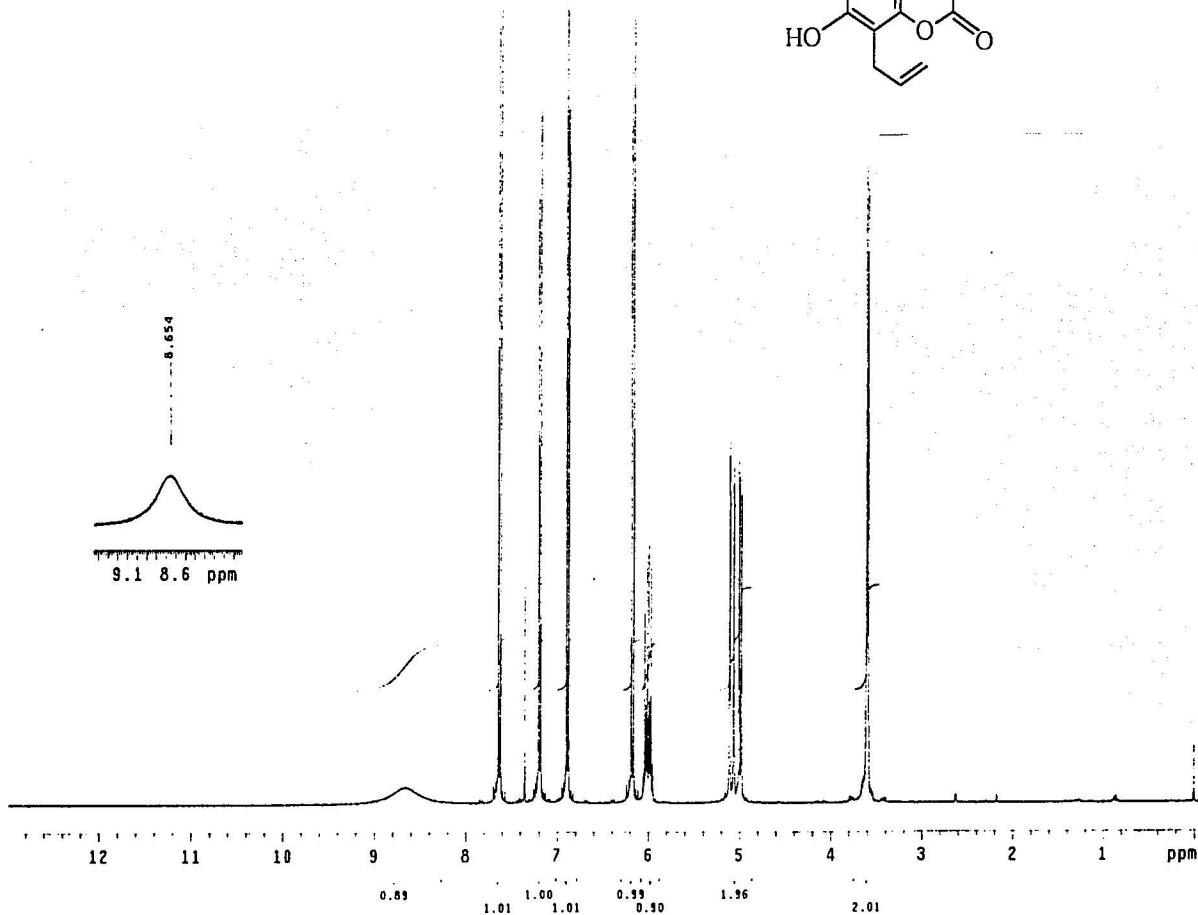


7-(2-PROPENILOXI)-CUMARINA

USAT
27 noviembre 2001
M. C. Blas Flores / Lorelei Martinez
LMM-42C / CINC13 + gata DMSO
III 400 MHz
Ref. TMS 0 ppm
400
nym

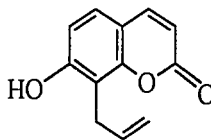


ESPECTRO 10

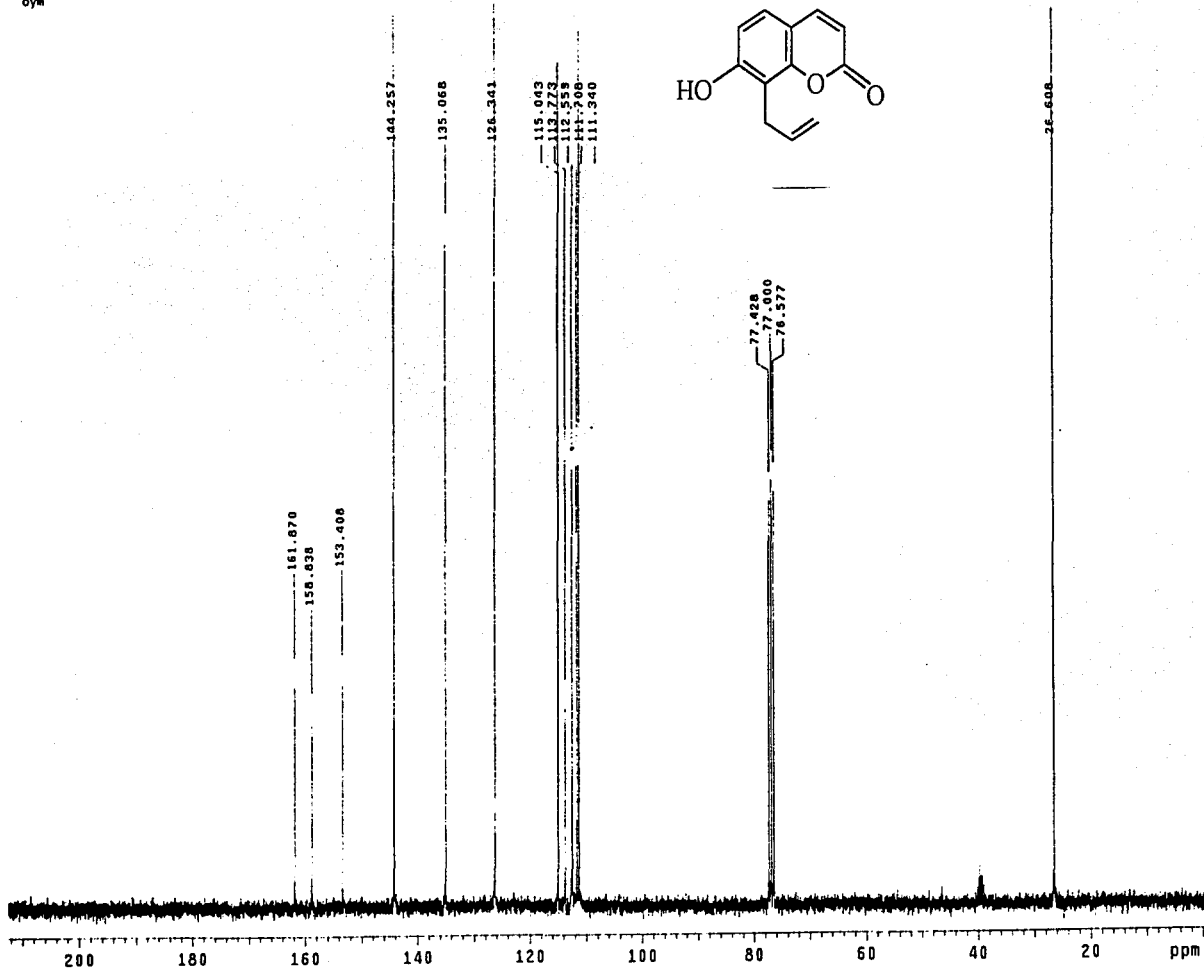


8-(2-PROPENIL)-7-HIDROXICUMARINA

27 noviembre 2001
W. C. Bins Flores / Lorelei Martinez
LNM-426 / CDC13 + gota DMSO
13C 75.5 MHz
ref. CDCl3 77 ppm
300-2
oym

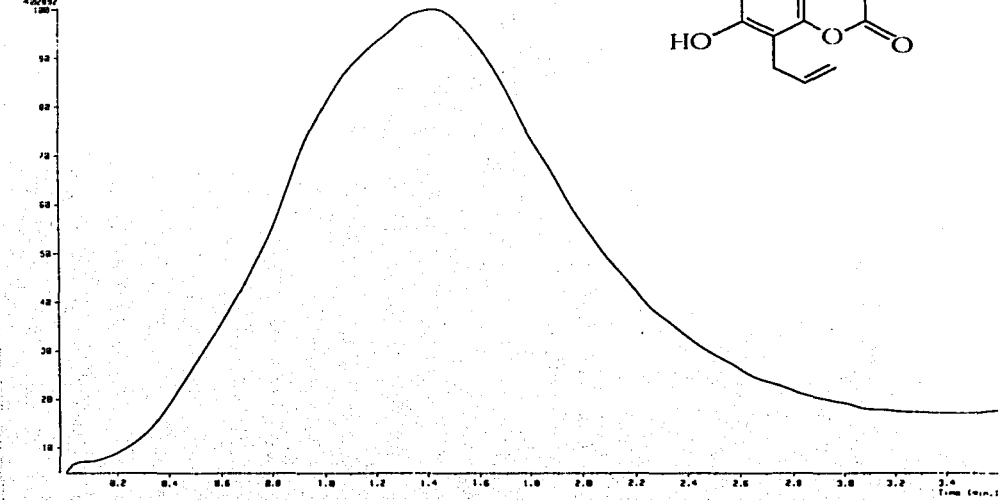
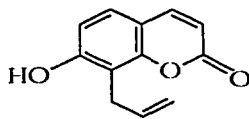


ESPECTRO 11

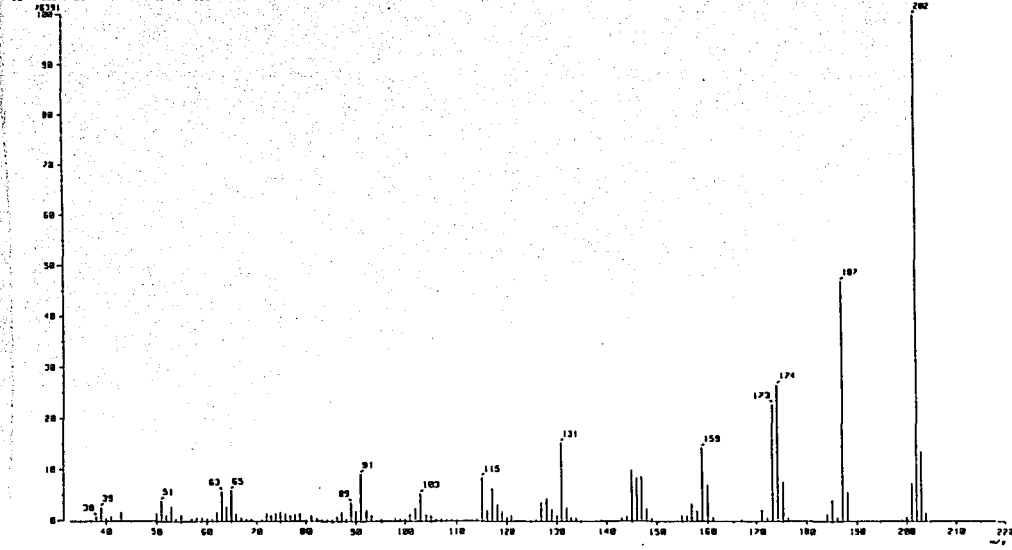


8-(2-PROPENIL)-7-HIDROXICUMARINA

[TIC]
 Date: 24-Nov-1991 02:19
 Sample: 014123_LPM-42C_001
 Method: LSP1, For. de Quimica, LAMV
 Inlet: Direct Ion Mode: EI+
 Ion Source: Normal Ion [M+Linear]
 TIC Range: Area 23 to 600 Output RT Range: 0.00 to 3.60 min
 422892



Mass Spectrum 3
 RT: 1.41 min Scan: 146,581-13,51-1111,1423 Temp: 60.6 deg.C
 Ion Mode: EI+ Int.: 7.29



8-(2-PROPENIL)-7-HIDROXICUMARINA

ESPECTRO 12

[Elemental Composition]

Data : OT5267_LMM-42C_001

Date : 13-Sep-102 03:31

Sample: Default parameters for B scan high-resolution

Note : Current control, internal scan

Inlet : Reserv.

Ion Mode : EI+

RT : 0.83 min

Scan#: 9

Elements : C 25/0, H 20/0, O 10/0

Mass Tolerance : 10ppm, 10mmu. if m/z < 1000, 20mmu if m/z > 2000

Unsaturation (U.S.) : -1.0 - 20.0

Observed m/z	Int%	Err[ppm / mmu]	U.S. Composition
202.0616	100.0	-7.1 / -1.4	8.0 C 12 H 10 O 3
		-36.1 / -7.3	-1.0 C 5 H 14 O 8

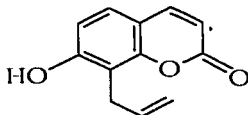
[Theoretical Ion Distribution]

Molecular Formula : C12 H10 O3

(m/z 202.0630, MW 202.2096, U.S. 8.0)

Base Peak : 202.0630, Averaged MW : 202.2101(a), 202.2109(w)

m/z	INT.	
202.0630	100.0000	*****
203.0664	13.6111	*****
204.0687	1.4535	*
205.0714	0.1141	
206.0739	0.0071	
207.0764	0.0004	



8-(2-PROPENIL)-7-HIDROXICUMARINA

EAGER 200 - SUMMARY

Company name : USAI
 Operator ID : NLB/YIF
 Method in use : CHNS

#	Group	Sample Name	Sample Num.	Filename	Weight
1481		LMM-42c	148	OT761a	1.137

Component name Concentrations

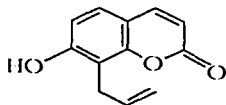
Nitrogen (%)	3.516221E-03
Carbon (%)	70.44598
Hydrogen (%)	5.020564

#	Group	Sample Name	Sample Num.	Filename	Weight
1491		LMM-42c	149	OT761b	1.05

Component name Concentrations

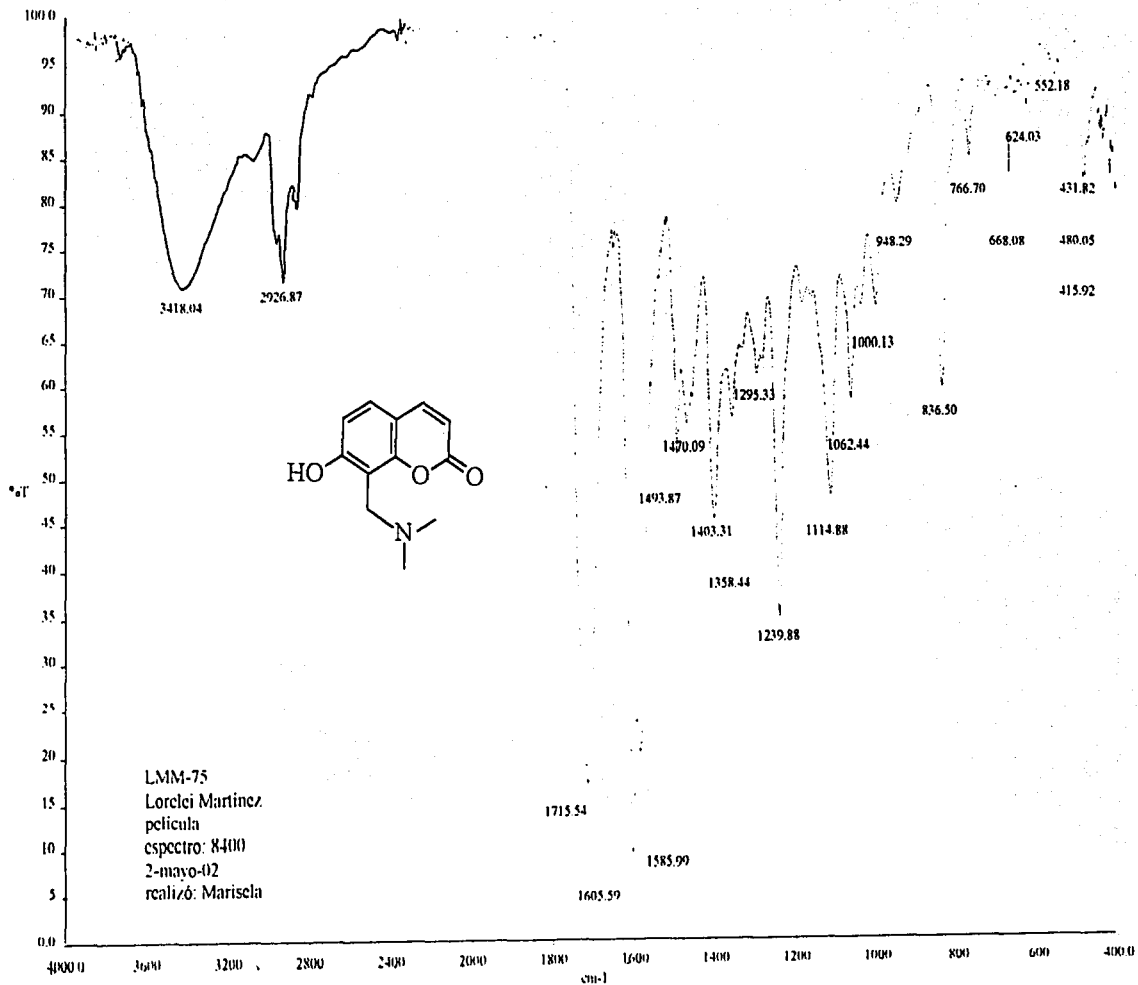
Nitrogen (%)	2.774429E-03
Carbon (%)	70.65656
Hydrogen (%)	5.020588

	Group 1			
	Average	Std. Dev.	% Rel. S. D.	Variance
Nitrogen (%)	3.145325E-03	5.245265E-04	16.67638	2.75128E-07
Carbon (%)	70.55127	.1486157	.2106492	2.208662E-02
Hydrogen (%)	5.020576	1.423577E-03	2.835486E-02	2.026572E-06



8-(2-PROPENIL)-7-HIDROXICUMARINA

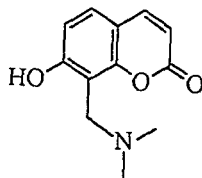
ESPECTRO 13



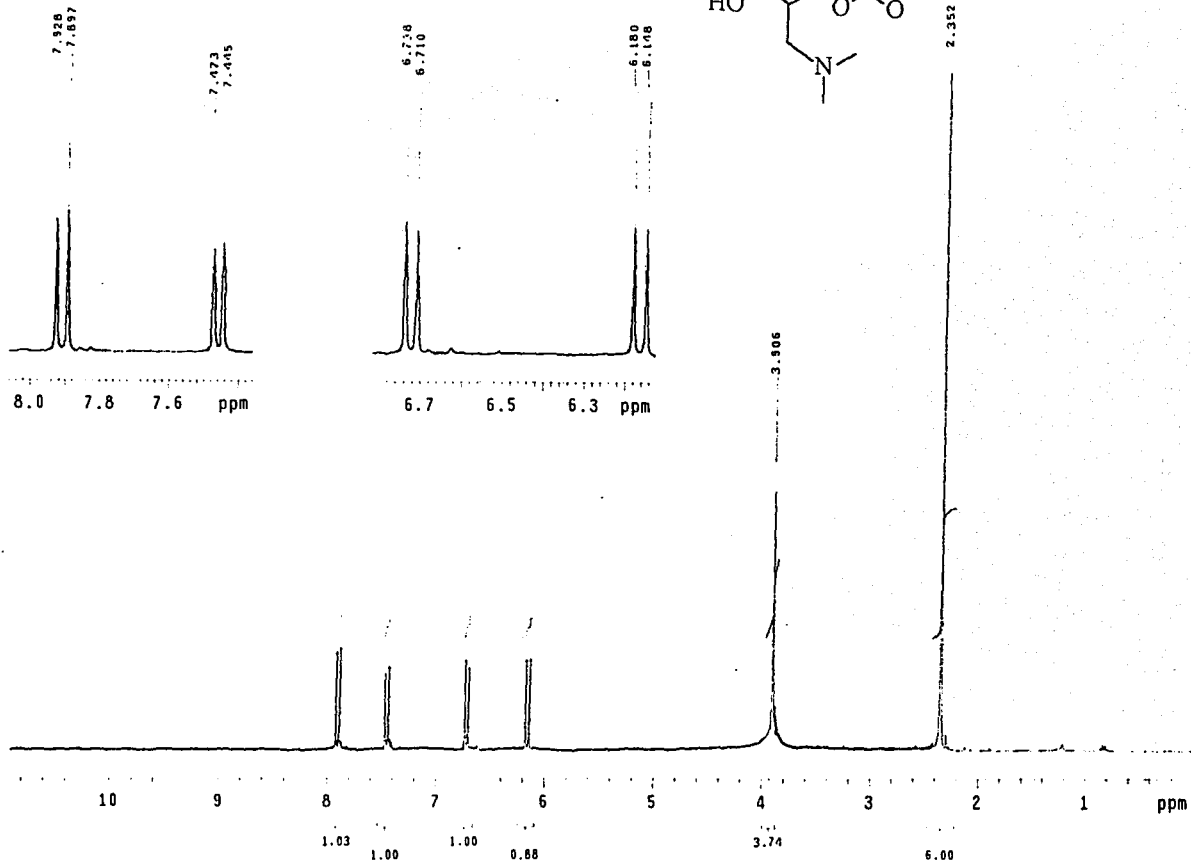
alarith 001

8-N,N-DIMETILAMINOMETIL-7-HIDROXICUMARINA

M. C. Blas Flores - Inés M. Martínez
IRM-1-447 DMSO
1H-299.7 MHz
Ref. DMSO 2.49 ppm
.000-2
oym

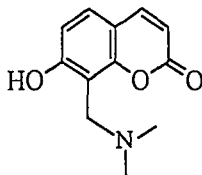


ESPECTRO 14

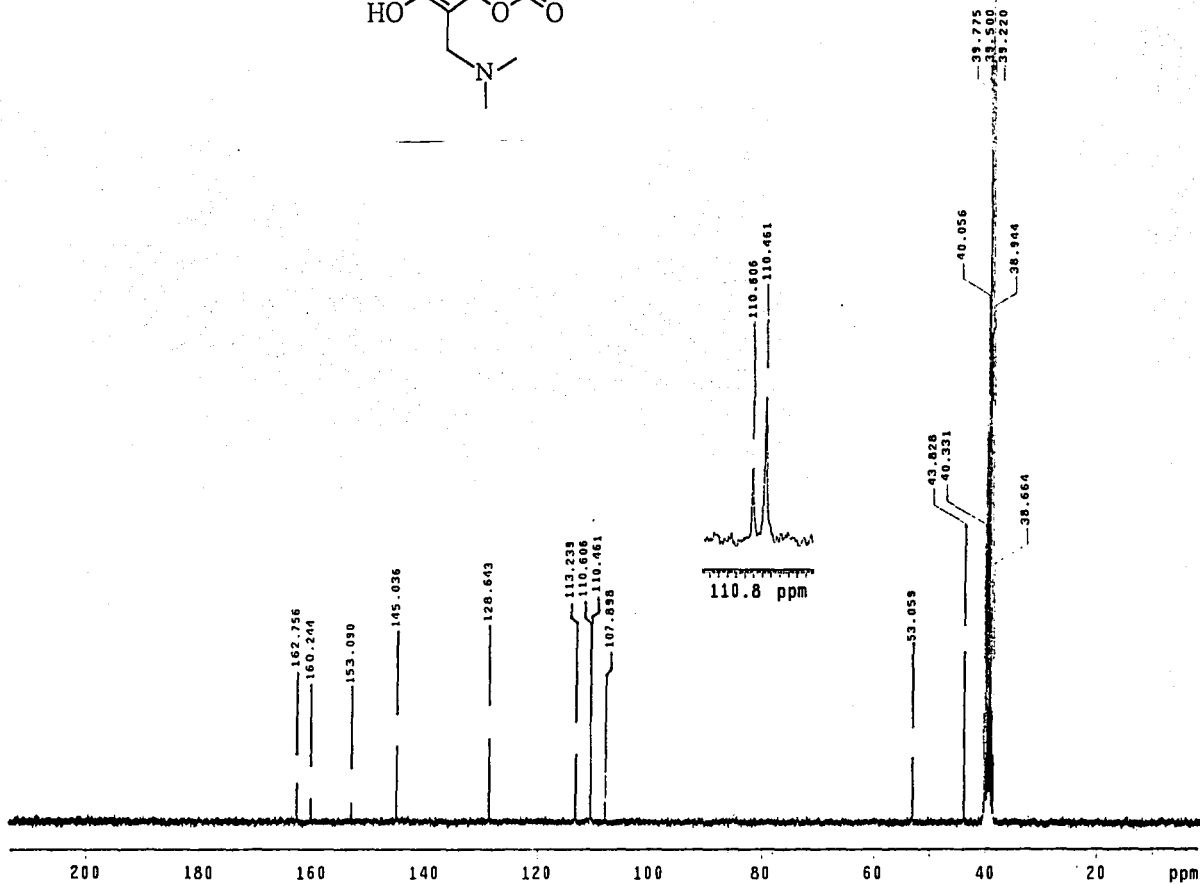


8-N,N-DIMETILAMINOMETIL-7-HIDROXICUMARINA

USA1
5 Septiembre 2002
M. C. Blas Flores / Lorelei Martinez
UMM-1-43 / DMSO
13C 75.5 MHz
Ref. DMSO 39.5 ppm
300-2
oym

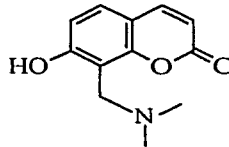


ESPECTRO 15

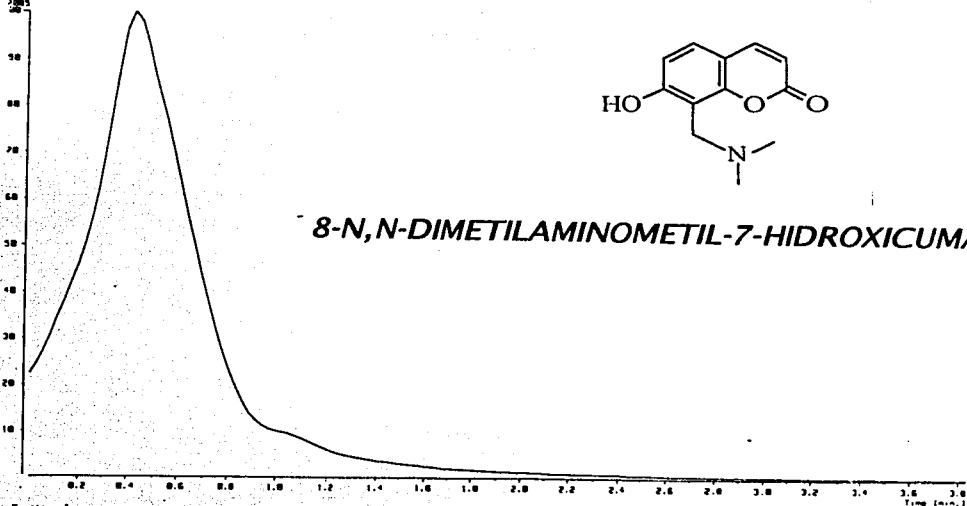


8-N,N-DIMETILAMINOMETIL-7-HIDROXICUMARINA

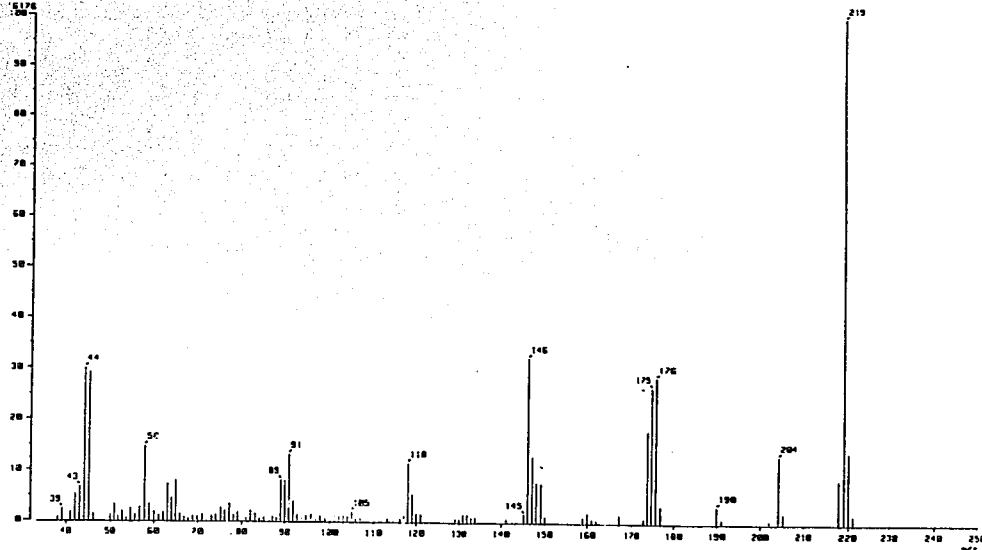
014743_LPM-75_201 Date : 24-Feb-1992 04:33
USP, Fac. de Quimica, UNFM.
Direct Ion Mode : E+
Detector : Normal Ion (MFL-Linear) Output RT Range : 2.00 to 3.03 min
Range : 400 to 600



8-N,N-DIMETILAMINOMETIL-7-HIDROXICUMARINA



0.44 min Scan# : (15,15) Time : 5.4 sec-C
Mode : E+ Int. : 30.15

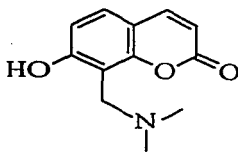


ESPECTRO 16

[Elemental Composition]

Data : OT4752_LMM-75_002 Date : 25-Apr-102 23:12
 Sample: Default parameters for B scan high-resolution
 Note : Current control, internal scan
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 RT : 1.15 min Scan#: 12
 Elements : C 20/1, H 30/1, O 5/1, N 5/1
 Mass Tolerance : 10ppm, 20mmu if m/z > 2000
 Unsaturation (U.S.) : -1.0 - 20.0

Observed m/z	Int%	Err [ppm / mmu]	U.S. Composition
219.0883	68.4	-5.7 / -1.2	7.0 C 12 H 13 O 3 N
		+0.5 / +0.1	7.5 C 10 H 11 O 2 N 4



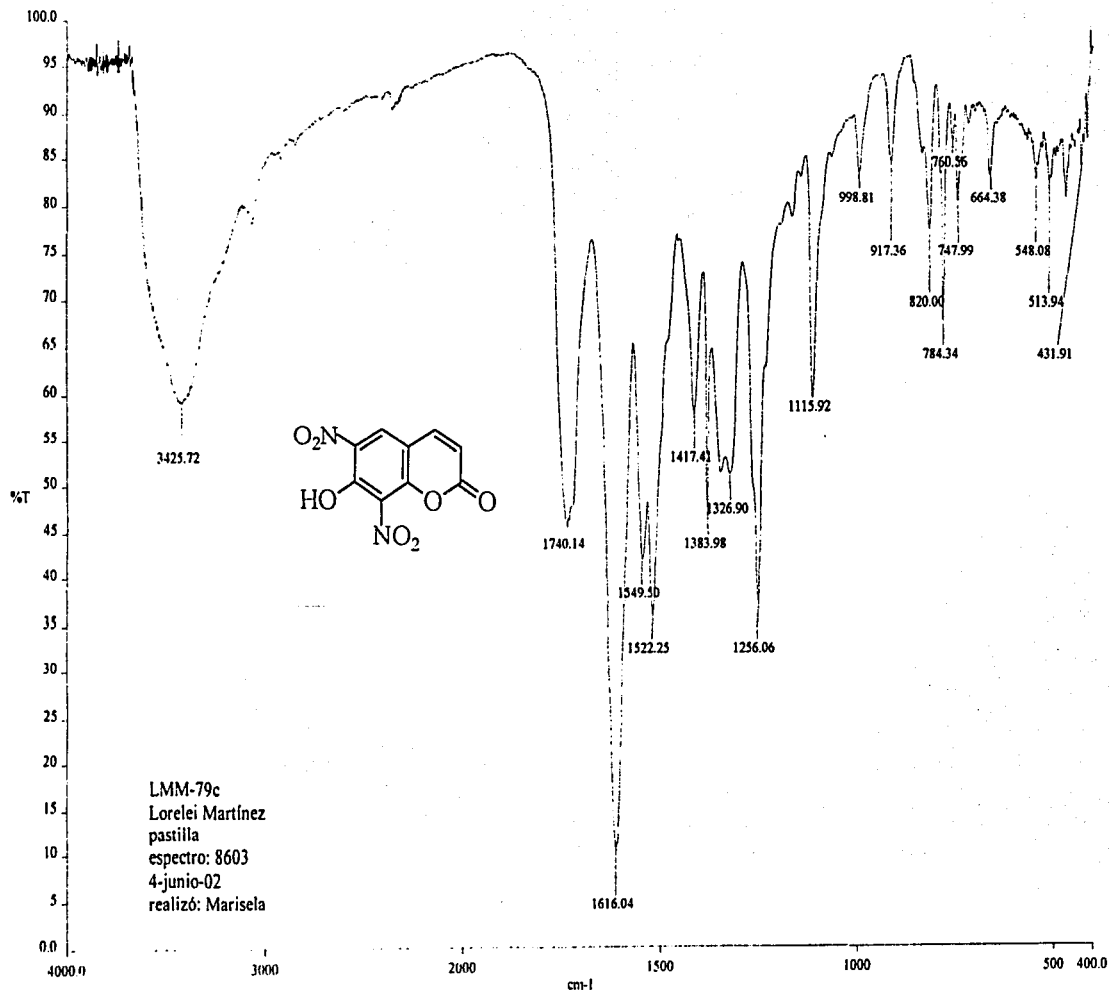
8-N,N-DIMETILAMINOMETIL-7-HIDROXICUMARINA

[Theoretical Ion Distribution]

Molecular Formula : C12 H13 N O3
 (m/z 219.0895, MW 219.2401, U.S. 7.0)
 Base Peak : 219.0895, Averaged MW : 219.2408(a), 219.2415(w)

m/z	INT.	
219.0895	100.0000	*****
220.0928	14.0235	*****
221.0951	1.5098	*
222.0977	0.1201	
223.1002	0.0076	
224.1026	0.0004	

ESPECTRO 17



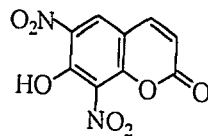
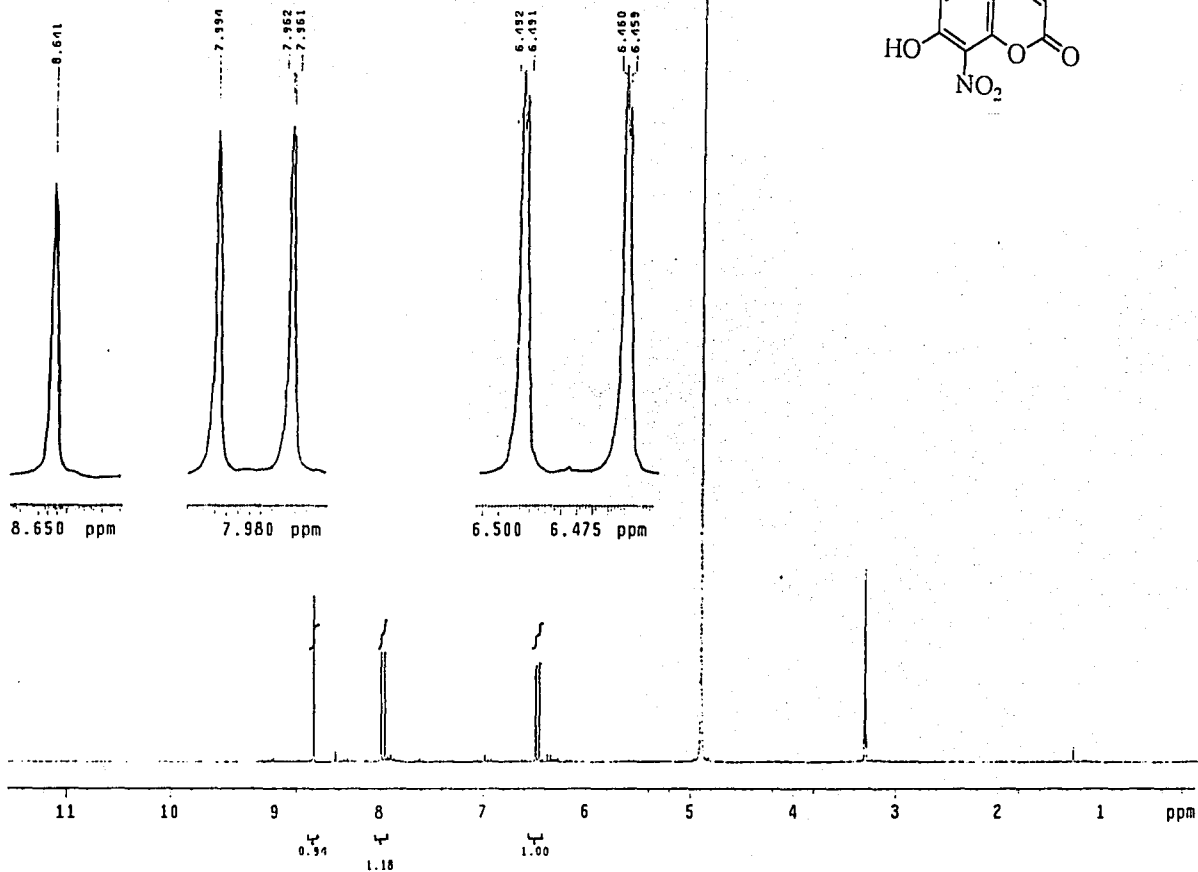
LMM-79c
 Lorelei Martínez
 pastilla
 espectro: 8603
 4-junio-02
 realizó: Marisela

a:\8603.sp

7-HIDROXI-6,8-DINITROCUMARINA

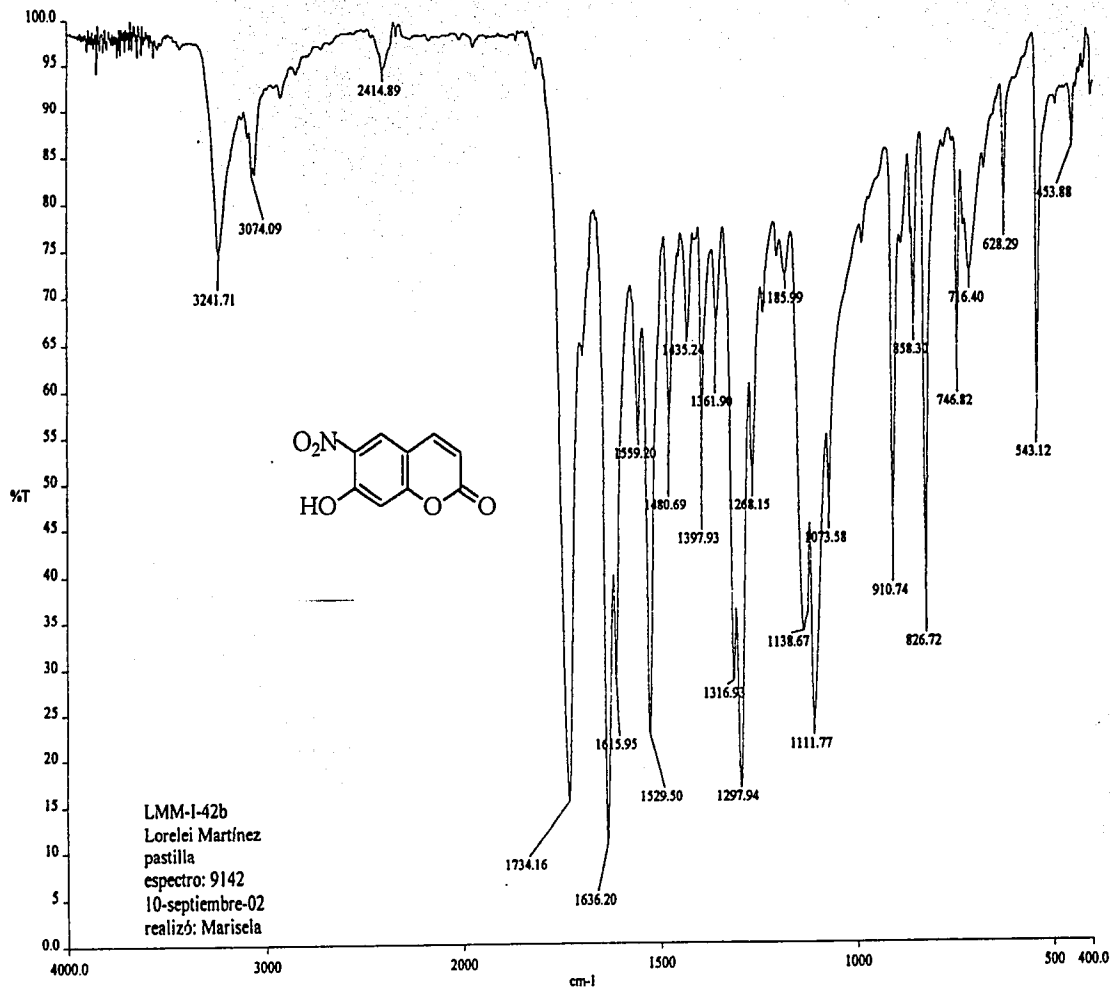
USA1
15 Febrero 2002
M. C. Blas Flores / Lorelei Martínez
IRM-50 / CD100
1H 294 / MHz
Ref. CD300 3.3 ppm
300-1
Oym

ESPECTRO 18



7-HIDROXI-6,8-DINITROCUMARINA

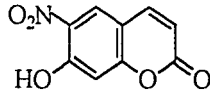
ESPECTRO 19



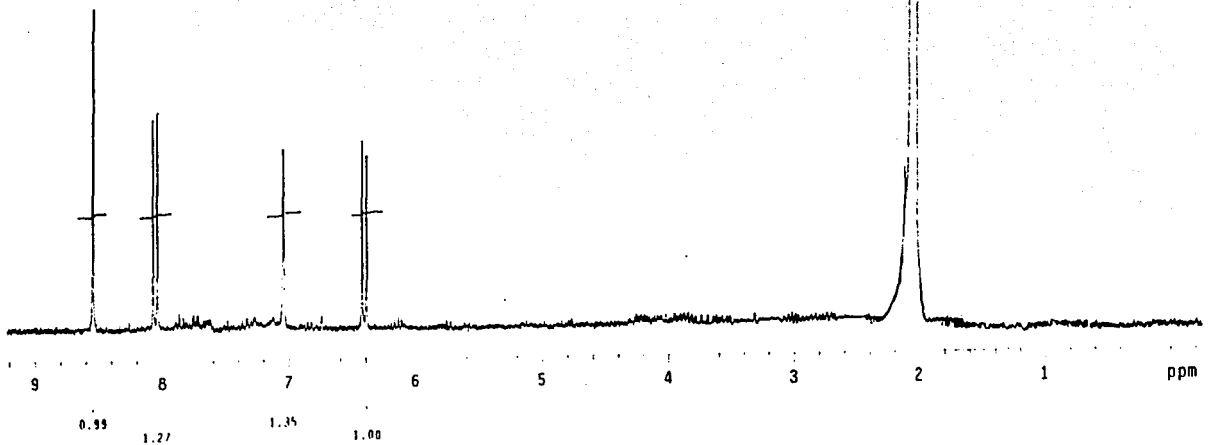
a:9142.sp

7-HIDROXI-6-NITROCUMARINA

USA1
7/5/07
Mas Flores P.
LUM-80/Arctona D6
IH 300.2 MHz
F01 - Acetona 2.04
300-1
RDM/VGM

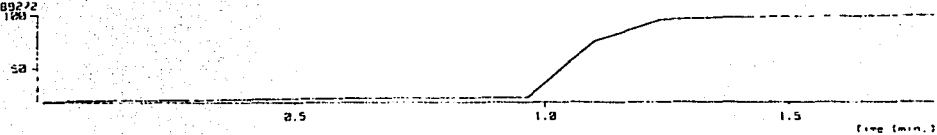


ESPECTRO 20

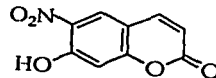
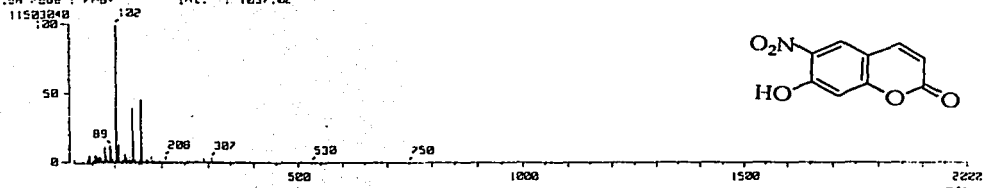


7-HIDROXI-6-NITROCUMARINA

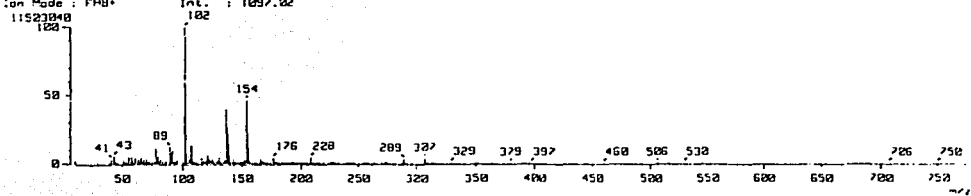
[TIC]
 Data : 015188_LHM-1-428_001 Date : 25-Jul-192 09:35
 Sampler: M1122/FAB
 Note : Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), F.O. UNAM
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB
 Ion Species : Normal Ion (MF-Linear)
 TIC Range : m/z 10 to 2000 Output RT Range : 2.20 to 1.79 min
 793892.2



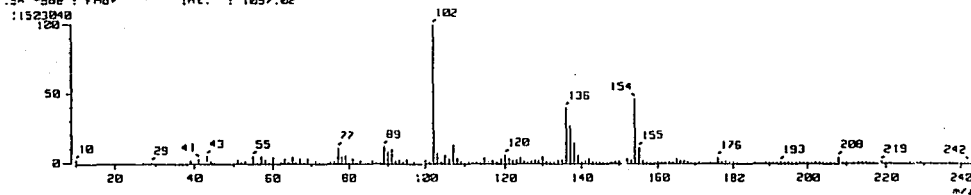
[Mass Spectrum]
 RT : 1.38 min Scan# : (10,13) Temp : 6.4 deg.C
 Ion Mode : FAB+ Int. : 1097.02



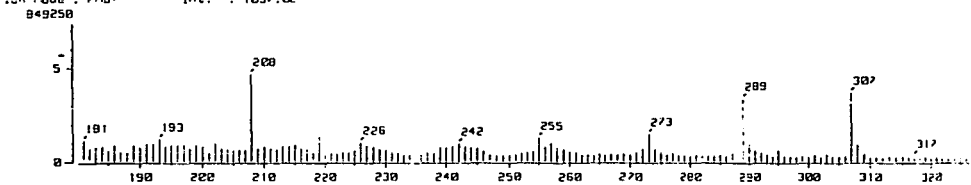
[Mass Spectrum]
 RT : 1.38 min Scan# : (10,13) Temp : 6.4 deg.C
 Ion Mode : FAB+ Int. : 1097.02



[Mass Spectrum]
 RT : 1.38 min Scan# : (10,13) Temp : 6.4 deg.C
 Ion Mode : FAB+ Int. : 1097.02



[Mass Spectrum]
 RT : 1.38 min Scan# : (10,13) Temp : 6.4 deg.C
 Ion Mode : FAB+ Int. : 1097.02

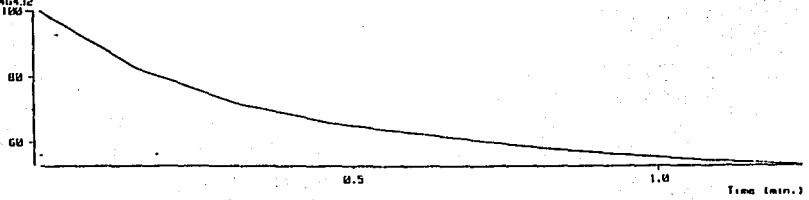


ESPECTRO 21

7-HIDROXI-6-NITROCUMARINA

(TIC)

Date : 01-Apr-90 12:21
Sample: M1512; ALCOHOL NITROGENCILCO
Note : Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigacion (USAI), F.O. UNM
Inlet : Direct Ion Mode : FID+
Ion Species : Normal Ion (M⁺-Linear)
TIC Range : m/z 0 to 2200 Output RT Range : 0.00 to 1.24 min
6354632



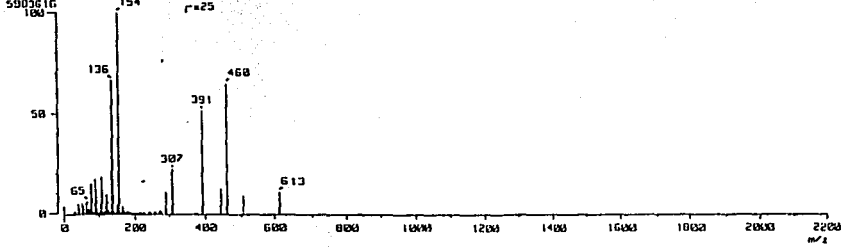
[Mass Spectrum]

RT : 0.47 min Scan# : 4 Temp : 0.0 deg.C

Ion Mode : FID+

Int. : 570.64

r=25

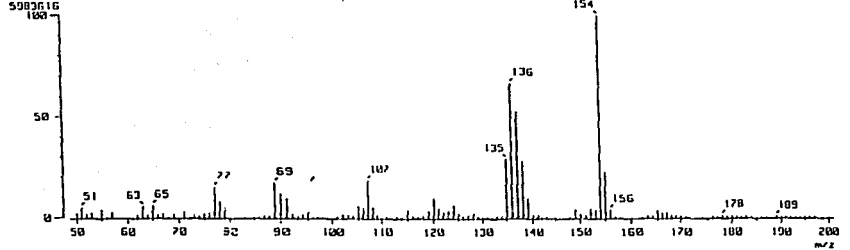


[Mass Spectrum]

RT : 0.47 min Scan# : 4 Temp : 0.0 deg.C

Ion Mode : FID+

Int. : 570.64



[Mass Spectrum]

RT : 0.47 min Scan# : 4 Temp : 0.0 deg.C

Ion Mode : FID+

Int. : 570.64

r=25

