



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“OBTENCIÓN DE NITRODERIVADOS A PARTIR DE COMPUESTOS  
NATURALES CON ESTRUCTURA FENILBENZOPIRANO Y  
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA”**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**Q.A. ROSARIO TAVERA HERNÁNDEZ**

Director de Tesis:  
Dr. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA  
INSTITUTO DE QUÍMICA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., julio 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**“OBTENCIÓN DE NITRODERIVADOS A PARTIR DE COMPUESTOS  
NATURALES CON ESTRUCTURA FENILBENZOPIRANO Y  
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA”**

**T E S I S**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**Q.A. ROSARIO TAVERA HERNÁNDEZ**



**Cd. Mx., Julio 2017**

## **JURADO**

**Presidente:** Dr. Rafael Castillo Bocanegra

**Vocal:** M. en C. José Manuel Méndez Stivalet

**Vocal:** Dra. María Isabel Aguilar Laurents

**Vocal:** Dra. María Margarita Canales Martínez

**Secretario:** Dr. José Fausto Rivero Cruz

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 2-10 del Departamento de Productos Naturales del  
Instituto de Química  
de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del  
Dr. Manuel Jiménez Estrada.

Los resultados derivados de este trabajo se presentaron en:

12ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Xalapa, Veracruz. 20 de mayo 2016. “Obtención de nitroderivados a partir de compuestos naturales de estructura 2-fenilbenzopirano”. Modalidad: cartel

XIII Reunión de la Academia Mexicana de Química de Química Orgánica. 7 de abril de 2017 en el Centro Internacional de Vinculación y Enseñanza, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. “Obtención de nitroderivados a partir de flavonoides con actividad citotóxica”. Modalidad: cartel

---

Q.A. Rosario Tavera Hernández

**Sustentante**

---

Dr. Manuel Jiménez Estrada

**Tutor**

## **A G R A D E C I M I E N T O S**

### *Agradecimientos institucionales*

La presente investigación fue financiada por:

Proyecto SEP-CONACYT Investigación Científica Básica No. CY-253979: “Productos Naturales como agentes antitumorales”

Agradezco al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada con folio 15BEPM0317-II para la realización de estudios de Maestría.

Agradezco al Posgrado de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por el programa y plantilla académica de excelencia, por la infraestructura y la organización que forman parte de él.

Agradezco al Instituto de Química por brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo de maestría, por brindar capacitación y cursos que enriquecieron mi conocimiento y desempeño en el presente trabajo de maestría.

Extiendo un agradecimiento muy especial al Dr. Manuel Jiménez Estrada por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por el apoyo, la confianza y la asesoría brindada para la realización del presente trabajo.

Agradezco al personal Técnico del Instituto de Química en específico a la *M. en C. Elizabeth Huerta Salazar*, a la *Q. María de los Ángeles Peña González* y a la *Dra. Ma. Isabel Chávez Uribe* del laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, a la *Q.F.B. María del Rocío Patiño Maya*, del laboratorio de Espectroscopía y Polarimetría; al *Dr. Francisco Javier Pérez Flores* y al *I. Q. Luis Velasco Ibarra*, del laboratorio de Espectrometría de Masas. Agradezco de manera muy especial al *M. en C. Antonio Nieto Camacho* por el apoyo y la asesoría durante la realización de pruebas de actividad antioxidante y anti-inflamatorias. Agradezco a la *M. en C. María Teresa Ramírez Apan* del laboratorio de Pruebas Biológicas. Agradezco a la *M. en C. Virginia Gómez Vidales* del laboratorio de Resonancia Paramagnética por su apoyo y asesoría brindada. Agradezco a la *M. en C. Lucía del Carmen Márquez*, a la *M en C. Lucero Mayra Ríos Ruíz* y a *Eréndira García* del laboratorio de Cromatografía y al *Q.F.B. Rafael Álvarez Chimal*.

Agradezco a la *Dra. María Margarita Canales Martínez* por el apoyo y disposición en la realización de pruebas antibacterianas en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Agradezco al *Dr. Uvaldo Hernández B.* del laboratorio de Difracción de Rayos X del Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable por el servicio brindado.

### *Agradecimientos a título personal*

Agradezco a toda mi familia en especial al Sr. Javier Tavera Díaz siempre te recordaré como una gran persona y te agradeceré toda la vida por tus enseñanzas, apoyo, confianza y cariño que me brindaste. Gracias papá.

Agradezco a mi mamá, Raquel Hernández, por el apoyo y cariño que me brindas en todo momento, a mis hermanos Rocío Tavera y Juan Tavera y a Roberto Sánchez por cuidarme y brindarme su ayuda y consejos cuando los necesito.

A mis compañeros de laboratorio Dalia Barrios, Patricia Ornelas, Javier Alvarado, Rafael Álvarez que me apoyaron y brindaron su amistad cuando ingresé al laboratorio. A Beatriz Mora Ramiro y a Gabriela Salazar Cervantes por su gran amistad, apoyo y confianza.

Agradezco a mis compañeras del laboratorio 2-10 por su ayuda y compañía brindada durante este tiempo.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
ÍNDICE DE ESQUEMAS .....	4
ÍNDICE DE TABLAS .....	5
ÍNDICE DE ESPECTROS .....	6
1. RESUMEN.....	10
2. ABSTRACT .....	10
3. INTRODUCCIÓN .....	11
4. ANTECEDENTES.....	13
4.1 Flavonoides .....	13
4.1.1 Generalidades .....	13
4.1.2 Estructura y clasificación .....	13
4.1.3 Capacidad antioxidante .....	15
4.1.4 Capacidad acomplejante.....	17
4.2 Importancia de los compuestos nitroaromáticos .....	18
4.3 Mecanismos de nitración aromática .....	19
4.3.1 Sustitución electrofílica aromática .....	19
4.3.2 Mecanismo de nitración de Ingold-Hughes.....	21
4.3.3 Nitración de fenoles .....	23
5. JUSTIFICACIÓN.....	32
6. HIPÓTESIS .....	32
7. OBJETIVOS.....	33
7.1 Objetivo General .....	33
7.2 Objetivos particulares.....	33
8. METODOLOGÍA.....	34
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	37
9.1 Obtención de nitroderivados .....	37
9.1.1 Determinación de la acidez de los sólidos ácidos .....	37
9.1.2 Nitración de naringina (1) .....	38
9.1.3 Nitración de Rutina (2).....	48
9.1.4 Nitración de Quercetina (3).....	53
9.1.5 Nitración de Crisina (4).....	58



9.2	Actividad biológica .....	63
9.2.1	Actividad antioxidante .....	63
9.2.2	Actividad antimicrobiana .....	65
9.2.3	Actividad anti-inflamatoria .....	67
9.2.4	Actividad citotóxica .....	68
10.	CONCLUSIONES .....	71
11.	SECCIÓN EXPERIMENTAL .....	73
11.1	Aspectos generales .....	73
11.2	Obtención de compuestos nitrados.....	74
11.3	Pruebas de actividad biológica.....	80
12.	Anexos.....	84
13.	BIBLIOGRAFÍA.....	118

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura genérica de flavonoides. ....	14
<b>Figura 2.</b> Clasificación de los flavonoides. ....	14
<b>Figura 3.</b> Estructuras derivadas del flavonoide. ....	15
<b>Figura 4.</b> Grupos presentes en flavonoides que favorecen la formación de complejos. ....	17
<b>Figura 5.</b> Sitios posibles de unión de un ion metálico. ....	17
<b>Figura 6.</b> a) Estructura del $N_2O_4$ . b) Estructura triangular del radical $\cdot NO_2$ . ....	24
<b>Figura 7.</b> Estructuras bases en las arcillas. a) Arreglo tetraédrico, b) Arreglo octaédrico. ....	26
<b>Figura 8.</b> Estructuras laminares 1:1 y 2:1 en arcillas. ....	26
<b>Figura 9.</b> Partícula característica de esmectita. ....	27
<b>Figura 10.</b> Configuraciones de grupos silanoles en la superficial del gel de sílice. ....	28
<b>Figura 11.</b> Estructura de los flavonoides sometidos a reacción de nitración y los nitroderivados obtenidos. ....	36
<b>Figura 12.</b> Espectros apilados de RMN $^1H$ del compuesto 1 y 1a. ....	42
<b>Figura 13.</b> Estructura del compuesto 1a. ....	43
<b>Figura 14.</b> Correlaciones observadas en el anillo B a través de experimentos de HMBC y COSY del derivado 1a. ....	45
<b>Figura 15.</b> Espectros apilados del compuesto 1 y el derivado 1b. ....	47
<b>Figura 16.</b> Correlaciones observadas en el anillo B a través de experimentos de HMBC del derivado 1b. ....	47
<b>Figura 17.</b> Espectros apilados de RMN $^1H$ del compuesto 2 y del derivado 2a. ....	50
<b>Figura 18.</b> Espectros de infrarrojo del compuesto 2a utilizando a) gel de sílice, b) tonsil y c) MNT-KFS en la reacción de nitración. ....	52
<b>Figura 19.</b> Espectros de RMN $^1H$ de 3 y del nitroderivado 3a. ....	55
<b>Figura 20.</b> Correlaciones observadas en el anillo B a través de experimentos de HMBC del derivado 3a. ....	56
<b>Figura 21.</b> Espectros apilados de RMN $^1H$ del compuesto 4 y el nitroderivado 4a. ....	60
<b>Figura 22.</b> Correlaciones observadas en el anillo A a través de experimentos de HMBC del derivado 4a. ....	60

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Productos de oxidación del catecol presente en el anillo B de un flavonoide. ....	16
<b>Esquema 2.</b> Mecanismos de nitración aromática a) polar y b) transferencia de un electrón. ....	20
<b>Esquema 3.</b> Mecanismo de nitración de Ingold-Hughes. ....	21
<b>Esquema 4.</b> Diagrama de energía potencial en una sustitución electrofílica aromática. ....	22
<b>Esquema 5.</b> Especies formadas por una ruptura homolítica y heterolítica de la molécula de $N_2O_4$ . ....	24
<b>Esquema 6.</b> Mecanismo de nitración de fenoles con $N_2O_4$ . ....	25
<b>Esquema 7.</b> Nitración de $\gamma$ -Tocoferol con el radical $\bullet NO_2$ . ....	25
<b>Esquema 8.</b> a) Condiciones de la reacción de nitración del fenol, b) Generación de ácido nítrico y c) Propuesta del mecanismo de reacción de nitración. ....	30
<b>Esquema 9.</b> Mecanismo de nitración del fenol a través de la formación del nitrato de acetilo. ....	31
<b>Esquema 10.</b> Reacción de nitración del compuesto 1. ....	39
<b>Esquema 11.</b> Mecanismo de reacción propuesto para la formación de 1a y 1b. ....	41
<b>Esquema 12.</b> Reacción de nitración del compuesto 2. ....	48
<b>Esquema 13.</b> Reacción de nitración del compuesto 3 utilizando una mezcla de gases $NO_x$ . ....	54
<b>Esquema 14.</b> Propuesta del mecanismo de reacción de nitración del compuesto 3 con $N_2O_4$ . ....	57
<b>Esquema 15.</b> Condiciones de reacción de nitración del compuesto 4. ....	58
<b>Esquema 16.</b> Propuesta del mecanismo de reacción de nitración del compuesto 4. ....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Acidez de los sólidos ácidos utilizados en reacciones de nitración.....	37
<b>Tabla 2.</b> Nitración del compuesto 1 con diversos sólidos ácidos. ....	39
<b>Tabla 3.</b> Comparación de los desplazamientos del compuesto 1 y 1a.....	44
<b>Tabla 4.</b> Datos de experimentos de Espectrometría de Masas y HPLC-MS del compuesto 1a .....	46
<b>Tabla 5.</b> Rendimiento de la reacción de nitración del compuesto 2 al utilizar diferentes sólidos ácidos .....	49
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de reacción de nitración a las que se sometió el compuesto 3.....	53
<b>Tabla 7.</b> Evaluación de diferentes cantidades de nitrato de bismuto manteniendo el volumen de 10 ml de ácido acético glacial .....	58
<b>Tabla 8.</b> Evaluación de actividad antioxidante por inhibición del radical DPPH .....	63
<b>Tabla 9.</b> Porcentaje de inhibición del radical DPPH por el flavonoide 3 y el derivado 3a a diferentes concentraciones .....	64
<b>Tabla 10.</b> Evaluación de actividad antimicrobiana de los compuestos 1-4 y sus nitroderivados .....	66
<b>Tabla 11.</b> Evaluación de actividad anti-inflamatoria de los compuestos 1-4 y sus nitroderivados por el modelo de edema en oreja de ratón inducido por TPA .....	68
<b>Tabla 12.</b> Evaluación de actividad inhibitoria de proliferación celular de los compuestos 1-4 y sus nitroderivados.....	69

## ÍNDICE DE ESPECTROS

<b>Espectro 1.</b> RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) de 1. ....	85
<b>Espectro 2.</b> RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, MeOH- $d_4$ ) de 1. ....	86
<b>Espectro 3.</b> RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 1a. ....	87
<b>Espectro 4.</b> RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz DMSO- $d_6$ ) de 1a. ....	88
<b>Espectro 5.</b> RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 1b. ....	89
<b>Espectro 6.</b> RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz DMSO- $d_6$ ) de 1b. ....	90
<b>Espectro 7.</b> RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 2. ....	91
<b>Espectro 8.</b> RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz DMSO- $d_6$ ) de 2. ....	92
<b>Espectro 9.</b> RMN $^1\text{H}$ (400 MHz DMSO- $d_6$ ) de 2a. ....	93
<b>Espectro 10.</b> RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz DMSO- $d_6$ ) de 2a. ....	94
<b>Espectro 11.</b> RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 3. ....	95
<b>Espectro 12.</b> RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz DMSO- $d_6$ ) de 3. ....	96
<b>Espectro 13.</b> RMN $^1\text{H}$ (500 MHz DMSO- $d_6$ ) de 3a. ....	97
<b>Espectro 14.</b> RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz DMSO- $d_6$ ) de 3a. ....	98
<b>Espectro 15.</b> RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 4. ....	99
<b>Espectro 16.</b> RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz DMSO- $d_6$ ) de 4. ....	100
<b>Espectro 17.</b> RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 4a. ....	101
<b>Espectro 18.</b> RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz DMSO- $d_6$ ) de 4a. ....	102
<b>Espectro 19.</b> IR (KBr/pastilla) del compuesto 2a al utilizar MNT-KFS durante la reacción de nitración. ....	103
<b>Espectro 20.</b> IR (KBr/pastilla) del compuesto 2a al utilizar tonsil durante la reacción de nitración. ....	104
<b>Espectro 21.</b> IR (KBr/pastilla) del compuesto 2a al utilizar gel de sílice durante la reacción de nitración. ....	105
<b>Espectro 22.</b> IR (KBr/pastilla) de MNT-KFS. ....	106
<b>Espectro 23.</b> IR (KBr/pastilla) de tonsil. ....	107
<b>Espectro 24.</b> IR (KBr/pastilla) del gel de sílice. ....	108
<b>Espectro 25.</b> Espectro de masas de baja resolución del compuesto 3a (IE+). ....	109
<b>Espectro 26.</b> Espectro de masas de alta resolución del compuesto 3a (DART+). ....	110
<b>Espectro 27.</b> Espectro de masas de baja resolución del compuesto 4 (IE+). ....	111
<b>Espectro 28.</b> Espectro de masas de baja resolución del compuesto 4a (IE+). ....	112
<b>Espectro 29.</b> Espectro de masas de alta resolución del compuesto 4a (DART+). ....	113

<b>Espectro 30.</b> Espectro de EPR del compuesto 3 bajo condiciones de nitración con MNT-KFS-Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .....	114
<b>Espectro 31.</b> Espectro de EPR del compuesto 3 bajo condiciones de nitración con ácido acético glacial-KNO <sub>3</sub> .....	115

## **CROMATOGRAMAS**

<b>Cromatograma 1.</b> HPLC-MS (ESI-) del compuesto 1a. ....	116
<b>Cromatograma 2.</b> HPLC-MS (ESI-) del compuesto 1b.....	116

## ABREVIATURAS

<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>ccf</b>	Cromatografía en capa fina
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria media
<b>COSY</b>	Espectroscopía de correlación
<b>δ</b>	Desplazamiento químico
<b>DART</b>	Análisis directo en tiempo real
<b>DMSO</b>	Sulfóxido de dimetilo
<b>DPPH</b>	2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo
<b>EM</b>	Espectrometría de masas
<b>EMAR</b>	Espectrometría de masas de alta resolución
<b>ESI</b>	Ionización por electrospray
<b>FAB</b>	Bombardeo rápido de átomos
<b>Glc</b>	Glucosa
<b>HMBC</b>	Correlación heteronuclear de múltiples enlaces
<b>HPLC-MS</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas
<b>HSQC</b>	Coherencia heteronuclear cuántica simple
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IE</b>	Impacto electrónico
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamiento
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µM</b>	Micromolar
<b>µL</b>	Microlitro
<b>Mg</b>	Miligramo
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>mL</b>	Mililitro
<b>Mm</b>	Milímetros
<b>Mmol</b>	Milimol
<b>MNT-KFS</b>	Montmorillonita KFS
<b>m/z</b>	Relación masa carga

<b>Nm</b>	Nanómetro
<b>Ppm</b>	Partes por millón
<b>Pf</b>	Punto de fusión
<b>Rha</b>	Ramnosa
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
<b>RPE</b>	Resonancia paramagnética electrónica
<b>SRB</b>	Sulforrodamina B
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>TPA</b>	Acetato de 12- <i>O</i> -tetradecanoilo forbol
<b>V</b>	Volts



## 1. RESUMEN

La modificación estructural de productos naturales representa una alternativa en la búsqueda de nuevas moléculas con actividad biológica. Muchos compuestos ejercen su acción primaria por la presencia del grupo nitro aromático, por lo que, resulta de interés preparar nitroderivados de productos naturales como los flavonoides y evaluar el efecto del grupo nitro en su actividad biológica.

En el presente trabajo se evaluaron diferentes condiciones de nitración utilizando sólidos ácidos y nitrato de bismuto, mezcla de gases NO<sub>x</sub> y ácido acético glacial con nitrato de bismuto para llevar a cabo la nitración de los flavonoides naringina, rutina, quercetina y crisina. Se obtuvieron los derivados 3'-nitronaringina (**1a**), 3',5'-dinitronaringina (**1b**), complejo de silicio con 2',5',6'-trinitrorutina (**2a**), 5'-nitroquercetina (**3a**) y 8-nitrocrisina (**4a**). La introducción del grupo nitro condujo a cambios en actividad biológica; de esta forma los derivados **1a**, **1b** y **2a** incrementaron su actividad anti-inflamatoria en comparación con la actividad de los flavonoides de partida. Los derivados **2a**, **3a** y **4a** ampliaron su espectro de acción contra las bacterias *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*, y los compuestos **3a** y **4a** potenciaron su actividad citotóxica en las líneas celulares cancerosas humanas U-251, PC-3, K562, HCT-15, MCF-7 y U-251, K562, MCF-7, SKLU-1 respectivamente.

## 2. ABSTRACT

Chemical modification of natural products is an alternative in drug discovery. There are numerous drugs with exert their primary pharmacological action because of the presence of an aromatic nitro group. It is of interest to prepare nitro derivatives of natural products such as flavonoids and to evaluate the effect of the nitro group on its biological activity.

In this investigation work was evaluated different nitration conditions using solid acids and bismuth nitrate, NO<sub>x</sub> gas mixture and glacial acetic acid with bismuth nitrate to carry out the nitration of naringin, rutin, quercetin and chrysin. 3'-nitronaringin (**3a**), 3', 5'-dinitronaringin (**1b**), 2', 5',6'-trinitrorutin silicon complex (**2a**), 5'-nitroquercetin (**3a**) and 8'-nitrochrysin derivatives were obtained. The nitro group introduction in flavonoids (**1-4**) lead to change their biological activity so **1a**, **1b** and **2a** derivatives presented better anti-inflammatory activity than parent compounds; **2a**, **3a** and **4a** derivatives extended their antibacterial spectrum against *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus* and **3a** and **4a** improved their citotoxic activity in the human cancer cell lines U-251, PC-3, K562, HTC-15, MCF-7 and U-251, K562, MCF-7, SKLU-1 respectively.

### 3. INTRODUCCIÓN

Los flavonoides conforman un amplio grupo de compuestos polifenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos, principalmente, en las plantas. A este grupo lo comprenden más de 8000 compuestos conocidos resultado de diversos patrones de hidroxilación, metilación, glicosilación y acilación. Este tipo de compuestos resultan de interés debido a la actividad biológica que se les ha atribuido, tal como antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatoria, anticancerígena y antiviral, principalmente.

La modificación estructural de productos naturales representa una alternativa para obtener nuevos compuestos con actividad biológica, esta última se puede deber al producto de un cambio en su potencia, selectividad o estabilidad. Los flavonoides son productos naturales y algunos de ellos son activos biológicamente; sin embargo, en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos resulta de interés obtener derivados de estos productos naturales que permitan cambiar su actividad biológica, con el objetivo de incrementar dicha actividad o bien, que exhiban alguna actividad biológica que originalmente el flavonoide no presenta.

El grupo nitro es un grupo funcional único, con una diversidad de acciones químicas y biológicas, por lo que algunos fármacos ejercen su acción primaria debida a la presencia de este grupo funcional. Considerando las características del grupo nitro y las propiedades biológicas de los flavonoides, en el presente trabajo se realizó la nitración aromática de flavonoides con estructura base 2-fenil benzopirano y se determinó la actividad antioxidante, anti-inflamatoria, antimicrobiana y citotóxica de los flavonoides y sus nitroderivados con el objetivo de evaluar el efecto del grupo nitro sobre su actividad biológica.

La nitración se realizó en los flavonoides naringina (**1**), rutina (**2**), quercetina (**3**) y crisina (**4**) bajo distintas condiciones de reacción, obteniéndose los derivados 3'-nitronaringina (**1a**), 3',5'-dinitronaringina (**1b**), complejo de silicio con 2',5',6'-trinitrorutina (**2a**), 5'-nitroquercetina (**3a**) y 8-nitrocrisina (**4a**) observando que el patrón de hidroxilación y glicosilación influyeron en su reactividad.

La evaluación de actividad biológica de los flavonoides sin modificar y sus nitroderivados mostraron que los derivados **1a**, **1b** y **2a** incrementaron su actividad anti-inflamatoria en comparación con la actividad de los flavonoides de partida. Los derivados **2a**, **3a** y **4a** ampliaron su espectro de acción contra las bacterias *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*, y los compuestos **3a** y **4a** potenciaron su actividad citotóxica contra algunas líneas celulares cancerosas humanas; sin embargo,

la introducción de grupos nitro en los compuestos **2** y **3** condujo a una disminución en su actividad antioxidante.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 Flavonoides

#### 4.1.1 Generalidades

Los productos naturales han jugado un papel clave en el descubrimiento de nuevos compuestos de importancia terapéutica, por lo que se pueden utilizar como estructuras bases para la obtención de nuevos compuestos. La modificación estructural de productos naturales, además de incrementar el espacio químico, es utilizada para mejorar la potencia en actividad biológica o selectividad, las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas o para reducir los efectos secundarios.<sup>1</sup>

Los flavonoides conforman un amplio grupo de compuestos polifenólicos que se encuentran principalmente en plantas. Este grupo lo comprenden más de 8000 compuestos conocidos y este número sigue incrementando debido a que la gran diversidad estructural proviene de diversos patrones de hidroxilación, metoxilación, glicosilación y acilación.<sup>2</sup>

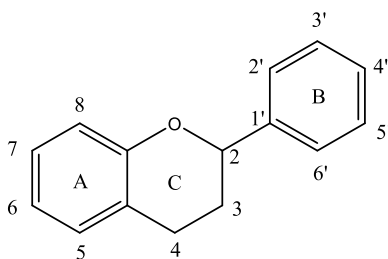
Flavonoide (del latín *flavus*, amarillo) es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas.<sup>3</sup> Son biosintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, a través de las vías del ácido shikímico y ácido malónico.<sup>4</sup>

El término flavonoide se utiliza generalmente para describir una gran cantidad de productos naturales que comparten una estructura base C6-C3-C6 denominado fenilbenzopirano.<sup>5</sup>

Los flavonoides se encuentran de forma natural en las frutas, vegetales, nueces, semillas y flores, por lo tanto, forman parte de la dieta humana. Estos compuestos polifenólicos han mostrado una amplia gama de efectos biológicos, dentro de los cuales se incluyen: acciones antibacteriales, antivirales, anti-inflamatorios, antialérgicas y antitumorales; ejerciendo los efectos antes mencionados al actuar como antioxidantes, captadores de radicales libres, inhibidores enzimáticos y agentes quelantes de cationes.<sup>6</sup>

#### 4.1.2 Estructura y clasificación

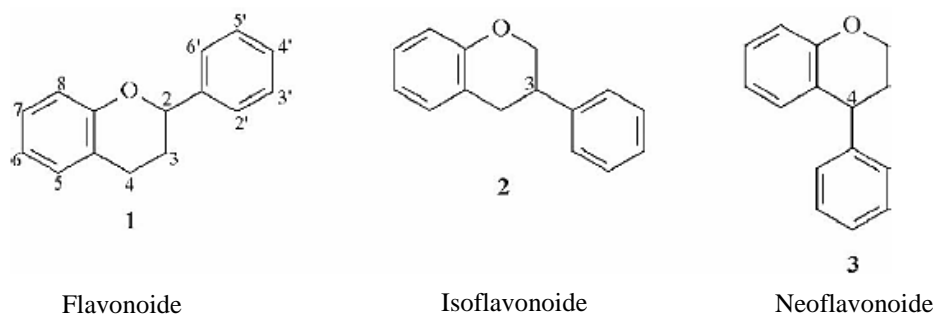
Los flavonoides comparten una estructura común de fenilbenzopirano (C6-C3-C6), mostrada en la Figura 1, formada por dos anillos aromáticos (A y B) unidos a través de un anillo de pirano (C).



**Figura 1.** Estructura genérica de flavonoides.

Dependiendo de la posición del anillo aromático (B) en el benzopirano, pueden distinguirse tres grupos de productos: flavonoides, isoflavonoides y neoflavonoides, éstos se muestran en la Figura 2.

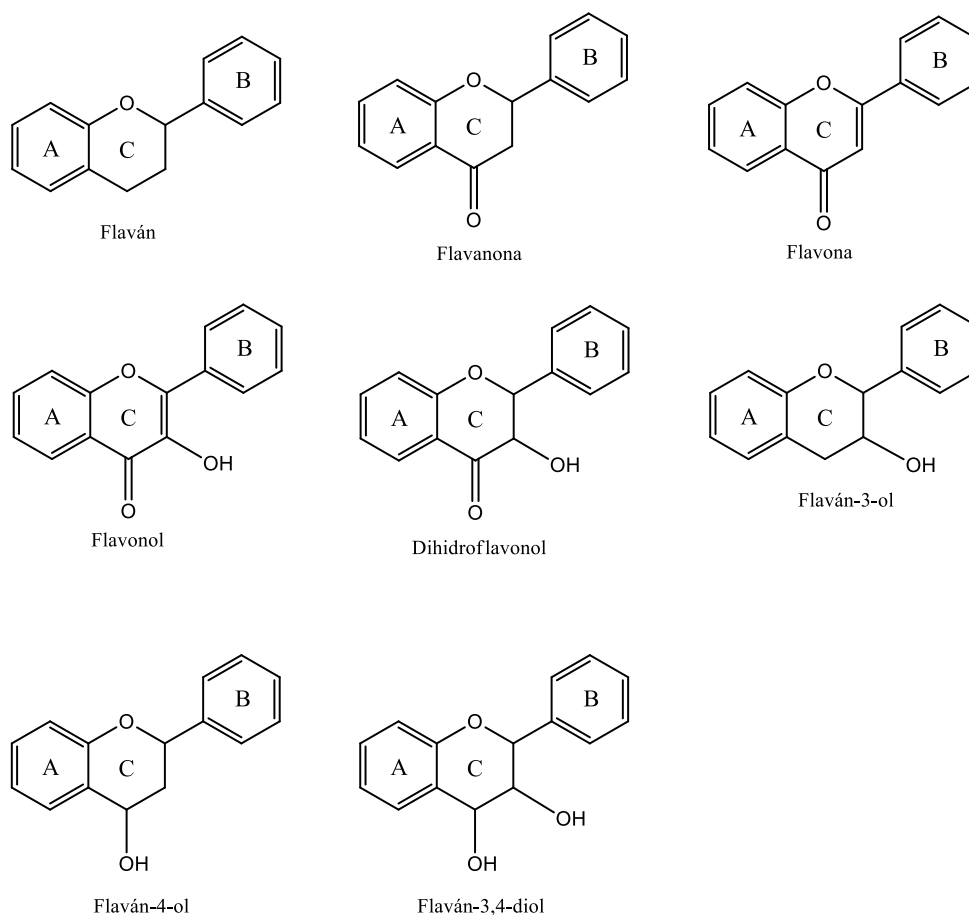
1. Flavonoides: 2-fenilbenzopirano.
2. Isoflavonoides: 3-fenilbenzopirano.
3. Neoflavonoides: 4-fenilbenzopirano.



**Figura 2.** Clasificación de los flavonoides.

El grupo de flavonoides e isoflavonoides comparten un precursor común llamado chalcona y por lo tanto están relacionados biogénica y estructuralmente.<sup>5</sup> Para los neoflavonoides se ha propuesto la teoría sobre una ruta biosintética paralela a la de los flavonoides e isoflavonoides caracterizada por una secuencia bio-oxidativa que conduce a la formación de 4-arilcumarina, estructura base de los neoflavonoides.<sup>7</sup>

En el presente trabajo se utilizaron flavonoides que presentan una estructura del tipo 2-fenilbenzopirano debido a su disponibilidad y diversidad. Este tipo de compuestos de acuerdo con el grado de oxidación y saturación en el anillo C, se derivan las estructuras ilustradas en la Figura 3.



**Figura 3.** Estructuras derivadas del flavonoide.

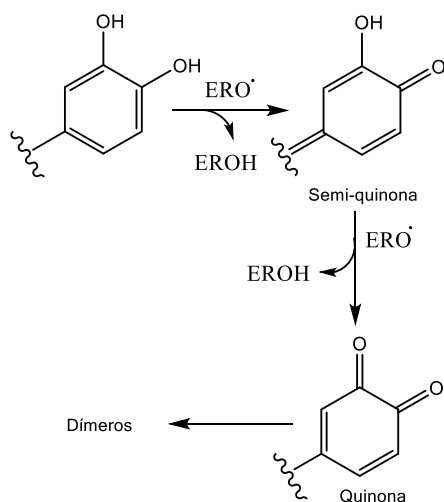
Los flavonoides se encuentran presentes en la naturaleza, principalmente glicosilados, sin embargo, las agliconas también se pueden encontrar como constituyentes mayoritarios en algunas plantas. La glicosilación puede ser a través de un grupo hidroxilo del flavonoide formando un acetal (*O*-glicósidos) o por unión directa carbono-carbono entre el C-1 del azúcar y un carbono de la aglicona (*C*-glicósidos). Los monosacáridos más comunes son la D-glucosa y L-ramnosa y otros menos frecuentes son galactosa, xilosa y arabinosa o combinaciones de éstos pueden unirse a los grupos hidroxilos o directamente a un átomo de carbono de la aglicona. La *O*-glicosilación ocurre frecuentemente en las posiciones C-3 y C-7. El gran número de flavonoides encontrados en la naturaleza es resultado de posibles combinaciones entre la aglicona y unidades de azúcares.<sup>4</sup>

#### 4.1.3 Capacidad antioxidante

La actividad antioxidante *in vitro* de los flavonoides se debe a la capacidad del grupo hidroxilo fenólico de donar un átomo de hidrógeno a un radical libre y deslocalizar el electrón en el sistema  $\pi$  para finalmente formar semi-quinonas o quinonas (Esquema 1).<sup>8</sup>

Estudios de relación estructura-actividad de flavonoides han mostrado que la presencia de *o*-dihidroxi en el anillo B, la conjugación del doble enlace entre los carbonos 2-3 y el grupo 4-oxo del anillo C, son esenciales para reaccionar con radicales libres de manera efectiva.<sup>9</sup> La presencia del grupo 3-hidroxi en el anillo C incrementa la capacidad captadora de radicales libres en los flavonoles, por el contrario, un grupo hidroxilo adicional en las posiciones 5 y 7 del anillo A, parecen ser menos importantes en su actividad antioxidante. Las características estructurales de los flavonoides contribuyen al aumento de estabilidad del radical aroxil.<sup>10</sup>

El grupo catecol en el anillo B es el sitio estructural que determina de manera fundamental la actividad antioxidante y esto es debido al bajo potencial de reducción que posee este grupo.<sup>11</sup> El mecanismo de actividad antioxidante, más probable, es a través de la donación de un átomo de hidrógeno; por ejemplo, a una especie reactiva de oxígeno resultando en la formación de una semi-quinona la cual puede donar un átomo de hidrógeno más para formar una quinona como se muestra en el Esquema 1. Se ha demostrado experimentalmente, a través de análisis de RPE (Resonancia Paramagnética Electrónica), que la distribución de spin durante la oxidación de quercetina involucra completamente al anillo B favoreciendo la donación de dos electrones con la consecuente formación de una orto-quinona.<sup>12</sup>



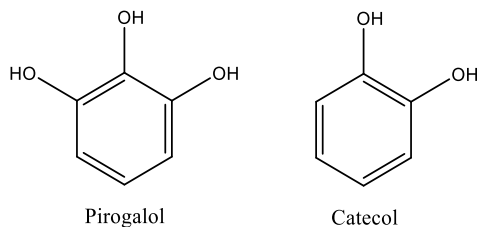
**Esquema 1.** Productos de oxidación del catecol presente en el anillo B de un flavonoide.

La capacidad de reducir radicales libres se relaciona con los bajos potenciales redox que poseen, en especial los flavonoles, en un rango de 0.23-1.75 V (a pH=7) siendo capaces de reducir a radicales libres oxidantes tal como, radicales superóxido ( $E_7 = 0.940$  V), peroxil ( $E_7 = 1.0$  V), alcoxil ( $E_7 = 1.6$  V) e hidroxil ( $E_7 = 2.31$  V) por donación de un átomo de hidrógeno.<sup>10</sup>

Biológicamente, los mecanismos que presentan los flavonoides como antioxidantes incluyen: supresión de la formación de las especies reactivas de oxígeno por inhibición de enzimas o quelando elementos traza involucrados en la producción de radicales libres y atrapando especies reactivas de oxígeno.<sup>13</sup>

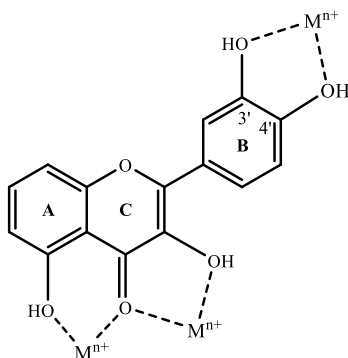
#### 4.1.4 Capacidad acomplejante

Los flavonoides, en cuya estructura presentan un núcleo de catecol y pirogalol, mostrados en la Figura 4, forman complejos estables con iones metálicos, como hierro, vanadio, manganeso, calcio, etc. La particularidades de estos metales son: buenos ácidos de Lewis, pueden actuar como aceptores de electrones y son activos en procesos redox haciéndolos proclives a coordinarse con un ligando.<sup>14</sup>



**Figura 4.** Grupos presentes en flavonoides que favorecen la formación de complejos.

En la figura 5 se presentan otros dominios, presentes en la estructura de los flavonoides, que pueden interactuar con iones metálicos e incluyen los grupos hidroxilos localizados en las posiciones 3',4' en el anillo B, el 3-hidroxi y el 4-carbonil, en el anillo C o el 5-hidroxi en el anillo A.<sup>10</sup>



**Figura 5.** Sitios posibles de unión de un ion metálico.



Estudios indican que la interacción entre gel de sílice con catecoles conduce a la formación de complejos monoméricos de silicio hexacoordinado.<sup>15</sup>

Algunos flavonoides presentan el grupo catecol en su estructura por lo que han sido utilizados como ligantes para formar complejos monoméricos de silicio hexacoordinados con tres unidades del flavonoide.<sup>16</sup>

#### **4.2 Importancia de los compuestos nitroaromáticos**

La nitración de compuestos aromáticos es importante en procesos industriales. Los compuestos nitro aromáticos son utilizados como explosivos y como sustratos clave para la preparación de otros compuestos destinados a diversos usos, tales como, colorantes, farmacéuticos, perfumes y plásticos.<sup>17</sup>

Desde el punto de vista del descubrimiento de nuevos compuestos con actividad biológica, los nitroderivados, en especial, aquéllos que contienen un grupo nitro aromático, son usados para el tratamiento de diversas enfermedades, tales como Parkinson, angina de pecho e insomnio.<sup>18,19</sup> Otros compuestos nitro aromáticos, son usados como agentes anti-infecciosos para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos.<sup>20</sup>

La presencia de un grupo nitro en un compuesto puede ocasionar problemas de toxicidad; sin embargo, estos riesgos pueden ser menores comparado con el beneficio obtenido en el tratamiento de una enfermedad aguda.<sup>17</sup>

Una de las razones por las que se continúa con el interés y los estudios de compuestos nitro aromáticos, es la forma en la cual pueden ejercer su acción a través de mecanismos que no pueden ser llevados a cabo por otro tipo de moléculas. Por lo tanto, la inclusión de compuestos nitro aromáticos en colecciones de moléculas, con posible actividad biológica, aumenta la probabilidad de encontrar la molécula que presente la mejor actividad.<sup>20</sup> Adicionalmente el grupo nitro presenta interés sintético al ser utilizado como un precursor en la obtención de compuestos a través de su transformación a otros grupos funcionales; por ejemplo, a un grupo amina.<sup>21</sup>

El grupo nitro es un grupo funcional único con una diversidad de acciones químicas y biológicas, debido a que es un grupo fuertemente electroattractor, genera sitios deficientes de densidad electrónica dentro de la molécula. Cuando estos nitroderivados interactúan con sistemas vivos los sitios deficientes de densidad electrónica pueden interactuar con una variedad de dianas biológicas intra y extracelulares; tales como proteínas, ácidos nucleicos, enzimas, etc., para producir cambios

biológicos. Los cambios biológicos, ocasionados por los nitroderivados, pueden afectar a todo el organismo, pero en muchos casos los efectos son selectivos; es decir, sólo afectan a bacterias, parásitos o células tumorales sin dañar el organismo huésped o células normales.<sup>17</sup>

Existen numerosos fármacos que ejercen su acción primaria debido a la presencia de un grupo nitro aromático. Los tipos estructurales y funciones son muy diversas e incluyen antibióticos, fármacos antiparasitarios, tranquilizantes, fungicidas, insecticidas, herbicidas y otros. En todos los casos el grupo nitro o algunos otros grupos electroattractores, por lo general, son necesarios para desempeñar el efecto biológico deseado.<sup>17</sup>

La importancia de efectuar la nitración en flavonoides radica en generar derivados con un grupo nitrogenado capaz de ser transformado en otros grupos funcionales y si es posible que, al modificar la estructura de los flavonoides, se potencie su actividad biológica, exhiba alguna actividad que originalmente no presentaba e inclusive disminuyan los efectos adversos provocados por compuestos de origen totalmente sintético. En este sentido, estudios indican que algunos flavonoides nitrados presentan actividad ansiolítica sin provocar depresión del sistema nervioso central (efectos sedativos y relajantes musculares), comúnmente ocasionados por las benzodiazepinas.<sup>22</sup> Varios derivados sintéticos de los flavonoides, por ejemplo, el 6,3'-dinitroflavona tiene un potente efecto ansiolítico, inclusive de 30-100 veces más que el diazepam,<sup>23</sup> y presenta la ventaja de no ocasionar efectos secundarios asociados con las benzodiazepinas. Estos compuestos nitrados, en general, presentan una alta afinidad a BDZ-Rs (Receptores a benzodiazepinas), por tanto, representan una alternativa al tratamiento de la ansiedad.

Se ha llevado a cabo la nitración de otras moléculas de origen natural, tales como: estrona,<sup>24</sup> cumarinas,<sup>25</sup> 3 $\beta$ -sitoesterol, acetato de colesterol<sup>26</sup> y estradiol<sup>27</sup>. Los nitro derivados de estrona han demostrado ser un inhibidor de ciertos tumores mamarios en rata,<sup>28</sup> de igual forma, nitro derivados del estradiol presentan citotoxicidad en líneas celulares de cáncer de mama.<sup>27</sup>

### **4.3 Mecanismos de nitración aromática**

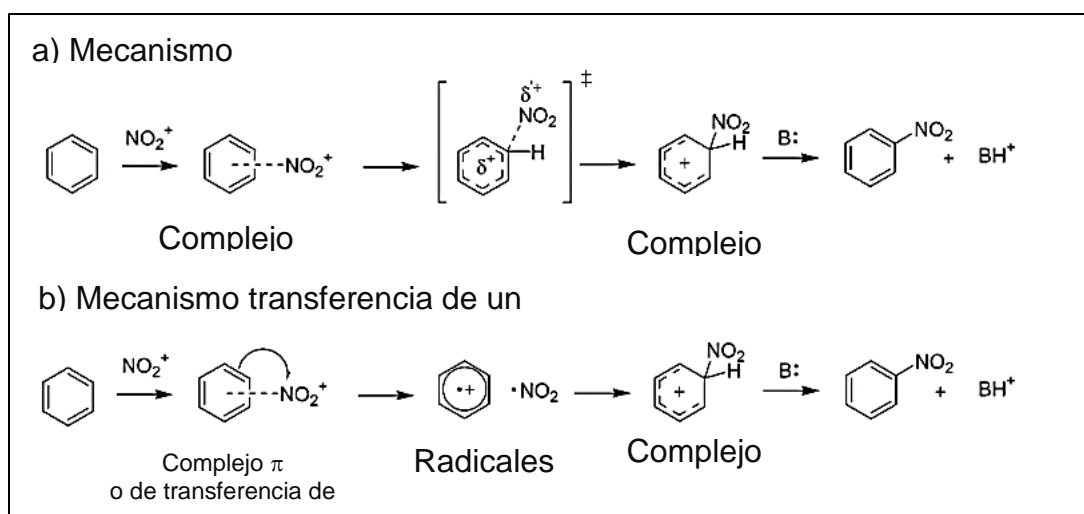
#### *4.3.1 Sustitución electrofílica aromática*

La nitración está definida como una reacción entre un compuesto orgánico y un agente nitrante para introducir un grupo nitro a un átomo de carbono (C-nitración), o para producir nitratos (O-nitración) o nitraminas (N-nitración).<sup>29</sup>

Dentro de las reacciones de nitración se pueden distinguir aquéllas que siguen un mecanismo iónico, por radicales libres o ion radical; sin embargo, el que se presenta con mayor frecuencia es a través de un mecanismo electrofílico el cual procede por la formación de ion nitronio. En particular la nitración aromática, llevada a cabo a través del método clásico, en el cual se requiere un exceso de ácido nítrico y ácido sulfúrico concentrado, sigue un mecanismo electrofílico.<sup>29</sup>

Las nitraciones electrofílicas son llevadas a cabo a través de una reacción de  $\text{HNO}_3$  y sus derivados catalizada por un ácido. Los agentes nitrantes tienen una fórmula general  $\text{NO}_2\text{-X}$ , los cuales son fuente del ion nitronio,  $\text{NO}_2^+$ . De acuerdo con la facilidad con la que se elimine X, se puede establecer una secuencia relativa de la actividad nitrante de las siguientes especies:  $\text{NO}_2^+ > \text{NO}_2^+ - \text{OH}_2 > \text{NO}_2 - \text{Cl} > \text{NO}_2 - \text{NO}_3 > \text{NO}_2 - \text{O}(\text{CO})\text{CH}_3 > \text{NO}_2 - \text{OH} > \text{NO}_2 - \text{OCH}_3$ . Sin embargo, existe una amplia variedad de agentes nitrantes.<sup>29</sup>

En el Esquema 2 se muestran los dos mecanismos propuestos de nitración aromática, el mecanismo polar descrito por Ingold y Hughes quienes consideran al ion nitronio ( $\text{NO}_2^+$ ) como el electrófilo que reacciona con el compuesto aromático ( $\text{ArX}$ ) para formar un intermediario  $\text{ArXNO}_2^+$ , referido como complejo  $\sigma$ . Posteriormente se elimina un protón del complejo  $\sigma$  ( $\text{ArXNO}_2^+$ ) para formar el compuesto nitrado neutro. Esta clásica interpretación del mecanismo de nitración es conocida como de Ingold-Hughes o mecanismo polar de dos electrones. Kerner y Wiss explican un mecanismo alternativo de nitración en donde asumen la transferencia de un electrón del compuesto aromático al ion nitronio. La unión de los dos productos resultantes de la transferencia de un electrón, el catión radical aromático ( $\text{ArH}^{+\bullet}$ ) y el radical  $\text{NO}_2^\bullet$ , generan el mismo intermediario de Ingold-Hughes,  $\text{ArXNO}_2^+$ .

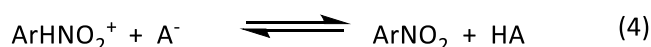


**Esquema 2.** Mecanismos de nitración aromática a) polar y b) transferencia de un electrón.

A pesar de que el mecanismo propuesto por Ingold-Hughes ha predominado, el mecanismo por transferencia de un electrón sería probable en compuestos aromáticos con bajo potencial redox<sup>30-32</sup> o en nitraciones fotoquímicas.<sup>33</sup>

#### 4.3.2 Mecanismo de nitración de Ingold-Hughes

En la nitración a través del ion nitronio Ingold demostró que la expresión de la rapidez de la reacción toma diversas formas bajo diferentes condiciones de reacción; sin embargo, para todos los casos de estudios, la reacción procede a través del ion nitronio ( $\text{NO}_2^+$ ). En el Esquema 3 se muestran los pasos en el mecanismo de sustitución electrofílica aromática en la reacción de nitración propuesta por Ingold-Hughes.<sup>29</sup>

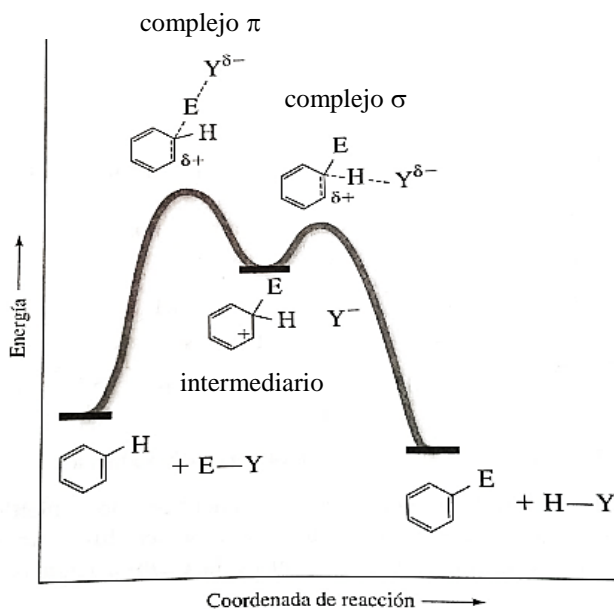


#### Esquema 3. Mecanismo de nitración de Ingold-Hughes.

Los dos primeros pasos involucran la transformación de  $\text{HNO}_3$  al ion  $\text{NO}_2^+$  catalizada por un ácido. Después el ion  $\text{NO}_2^+$  reacciona con el compuesto aromático para formar el intermediario de Wheland o complejo sigma ( $\sigma$ ). La desprotonación del intermediario de Wheland completa la reacción de nitración a través de la regeneración de la aromaticidad del sistema. El último paso también regenera el catalizador ácido. Durante la reacción entre el compuesto aromático y el ion lineal  $\text{NO}_2^+$ , este último no contiene un orbital molecular de enlace vacío, se tiene lugar a un desplazamiento del par de electrones  $\pi$  al átomo de oxígeno más electronegativo cuando el ion  $\text{NO}_2^+$  se acerca al compuesto aromático, es decir, el ion  $\text{NO}_2^+$  es un electrófilo polarizable.<sup>29</sup>

La nitración aromática de compuestos activados es considerada una reacción de sustitución cuyo estado de transición de mayor energía es más parecido a los compuestos de partida que a los intermediarios. En el primer paso de la reacción de nitración aromática se propone la formación del complejo  $\pi$  seguido por su conversión al complejo  $\sigma$  a través de la formación del intermediario ciclohexadienilo. En este caso el paso determinante de la reacción depende de la interacción del compuesto aromático y el agente nitrante para formar el complejo  $\pi$ .<sup>34</sup>

En el Esquema 4 se muestra el diagrama general de energía potencial de una sustitución electrofílica aromática.



**Esquema 4.** Diagrama de energía potencial en una sustitución electrofílica aromática.

Dada la importancia de la naturaleza del anillo aromático y del agente nitrante Ingold observó efectos en la reactividad de compuestos aromáticos, bajo condiciones de nitración, debidos al tipo de sustituyentes. De esta manera, grupos sustituyentes electrodonadores en el benceno incrementan la reactividad mientras que los electroattractores la disminuyen. Por otro lado, la obtención de nitro compuestos, mayoritariamente *orto* y *para* cuando el benceno tiene grupos electrodonadores se explicó por el efecto de estos grupos al incrementar la densidad electrónica en las posiciones *orto* y *para* con respecto al sustituyente mientras que para el benceno con grupos sustituyentes electroattractores se genera una disminución de densidad electrónica en las posiciones *orto* y *para* siendo la posición *meta* la menos afectada observándose una sustitución *meta* para estos casos.<sup>29</sup>

### 4.3.3 Nitración de fenoles

Una mezcla de ácido nítrico concentrado y ácido sulfúrico han sido utilizados como el reactivo nitrante más común para introducir grupos nitro al benceno, alquil bencenos y compuestos aromáticos menos reactivos, pero los compuestos aromáticos con alta reactividad, particularmente los que pueden oxidarse con facilidad como anilina, fenoles, pirroles, etc. requieren condiciones de nitración más suaves<sup>35</sup>. Debido a que los nitro fenoles son precursores sintéticos importantes, resulta de interés desarrollar procedimientos de nitración para este tipo de compuestos empleando condiciones suaves de reacción.

La nitración de fenoles está bien documentada en la literatura; sin embargo, la nitración directa de productos naturales requiere condiciones especiales de reacción debido a la polifuncionalidad que presentan, tal es el caso de los flavonoides, los cuales son polifenoles susceptibles a oxidarse fácilmente presentando una serie de reacciones colaterales que generan una mezcla compleja de productos no deseados, es por ello que se requiere establecer condiciones de nitración para compuestos fenólicos que no afecte la estructura original de este tipo de moléculas.

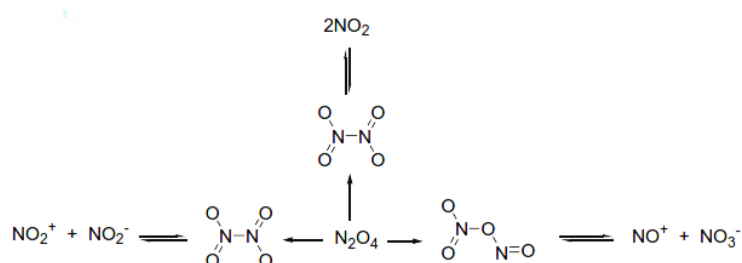
Puesto que el ion nitronio en solución es obtenido mezclando ácido nítrico o cualquier otro compuesto de la forma  $\text{NO}_2 - \text{X}$  que en presencia de un ácido fuerte, el cual puede ser de Brönsted o Lewis<sup>36</sup>, establecen condiciones de nitración; bajo estos requerimientos se han establecido una serie de condiciones de nitración de compuestos fenólicos fundamentadas en la formación del ion nitronio y en química verde utilizando sales inorgánicas como nitratos metálicos, ácidos orgánicos, gel de sílice modificada y arcillas ácidas, microondas y ultrasonido; sin embargo, también se pueden establecer condiciones de nitración con óxidos de nitrógeno.<sup>35</sup>

Considerando las características estructurales de los flavonoides, provistas de unidades fenólicas se requiere establecer condiciones de nitración favorables para este tipo de compuestos. Una de las condiciones que se proponen es con uso de sólidos ácidos y nitratos metálicos, por ejemplo, nitrato de bismuto el cual se ha reportado como un buen agente nitrante para compuestos aromáticos.<sup>37</sup> De igual forma el empleo de gases  $\text{NO}_x$  representa una alternativa en la nitración de compuestos aromáticos y finalmente el uso de ácidos orgánicos como el ácido acético glacial en presencia de un agente nitrante se puede considerar un medio apropiado para someter estructuras fenólicas a reacciones de nitración. A continuación, se hace una breve revisión de estos métodos.

### 4.3.3.1 Nitración con Óxidos de nitrógeno

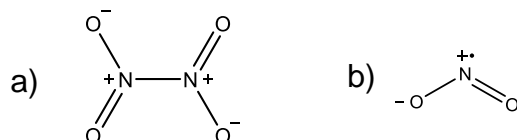
Se ha llevado a cabo la oxidación THF con HNO<sub>3</sub> obteniéndose ácido succínico y una mezcla de gases conformada por NO<sub>2</sub>, NO, N<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub><sup>38,39</sup> en donde el N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> es considerado el agente nitrante.<sup>40</sup>

El tetróxido de dinitrógeno se presenta como una mezcla de especies en equilibrio. Una disociación homolítica conduce al radical <sup>•</sup>NO<sub>2</sub> cuando se encuentra en su forma líquida; sin embargo, una ruptura heterolítica en condiciones polares conduce a las especies NO<sup>+</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>+</sup>, tal como se muestra en el Esquema 5.<sup>41</sup>



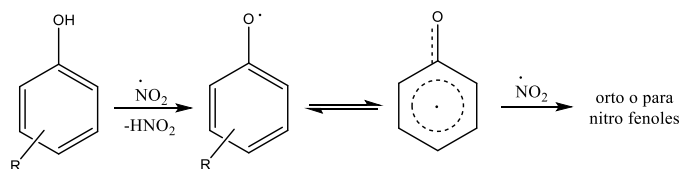
**Esquema 5.** Especies formadas por una ruptura homolítica y heterolítica de la molécula de N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

Se han propuesto diversas estructuras para la molécula del tetróxido de dinitrógeno; sin embargo, análisis de Rayos-X<sup>42</sup> pone en evidencia la estructura plana mostrada en la Figura 6. El enlace N-N es débil (3-8 Kcal/mol) y es más largo (1.6-1.7 Å) que un enlace sencillo (1.4 Å).<sup>43</sup> La ruptura del enlace N-N propicia que se genere un isómero al formarse un enlace entre un átomo de oxígeno y de nitrógeno;<sup>44</sup> este isómero se muestra en el Esquema 5. Por otro lado, el dióxido de nitrógeno es una molécula paramagnética con geometría triangular.<sup>43</sup>



**Figura 6.** a) Estructura del N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. b) Estructura triangular del radical <sup>•</sup>NO<sub>2</sub>.

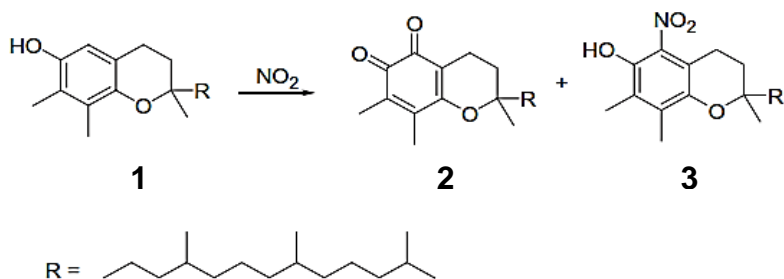
Investigaciones de la reacción de fenoles polisustituidos con un exceso de dióxido de nitrógeno.<sup>45</sup> Estudios cinéticos<sup>46</sup> indican que el mecanismo involucra inicialmente la abstracción de un átomo de hidrógeno seguida de una reacción entre el radical fenoxilo y el radical <sup>•</sup>NO<sub>2</sub> que se presenta en el Esquema 6.



**Esquema 6.** Mecanismo de nitración de fenoles con  $N_2O_4$ .

En un estudio en donde se llevaron a cabo las reacciones de fenoles con dióxido de nitrógeno en diferentes disolventes a temperatura ambiente,<sup>47</sup> se encontró que la reacción de nitración resultó ser la más favorecida obteniéndose los productos mono y dinitro fenoles; sin embargo, también se observaron otros subproductos de reacciones de oxidación, nitrosación y dimerización, lo cual describe la complejidad de la reactividad del dióxido de nitrógeno que depende de diversos factores como la energía de disociación de enlace (-O-H), potenciales de oxidación, naturaleza del sustrato y polaridad del disolvente.

Cooney y colaboradores llevaron a cabo la reacción de nitración del  $\gamma$ -Tocoferol (1) con el radical  $\bullet NO_2$  reportando la formación de dos productos: el fenólico *orto* mono nitrado (3) y la orto quinona (2).<sup>48</sup> En el Esquema 7 se pueden observar los productos de nitración del  $\gamma$ -Tocoferol.



**Esquema 7.** Nitración de  $\gamma$ -Tocoferol con el radical  $\bullet NO_2$ .

#### 4.3.3.2 Nitración de fenoles con Sólidos ácidos

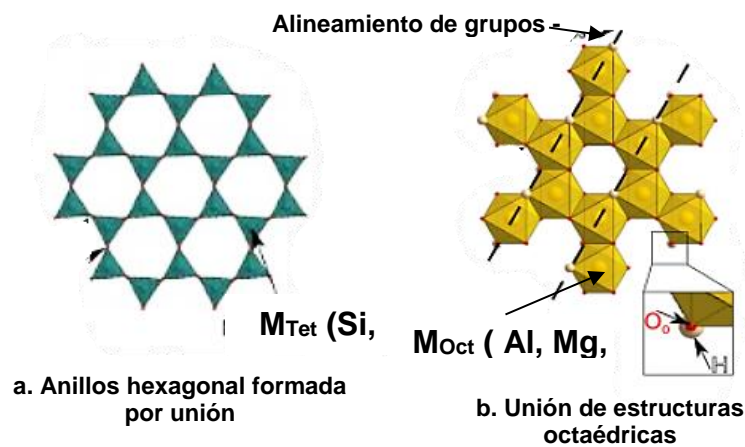
##### 4.3.3.2.1 Generalidades de los sólidos ácidos

Los sólidos ácidos como las arcillas, gel de sílice, aluminosilicatos naturales o sintéticos y zeolitas han sido utilizados como catalizadores para sustituir algunos catalizadores líquidos dañinos y tóxicos. La capacidad catalítica de estos sólidos se debe al área superficial que pueden proveer, a su composición y estructura que le permiten actuar como ácidos de Lewis y de Brönsted. Los sólidos

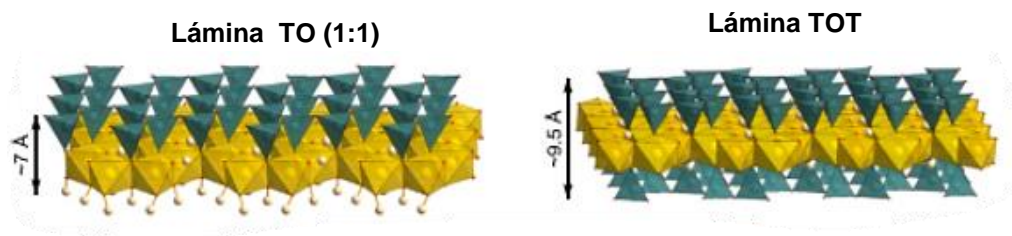


ácidos que resultan de interés para este trabajo son montmorillonita-KFS (MNT-KFS) y tonsil; estos sólidos son considerados bentonitas, un tipo de arcilla que han recibido un tratamiento con ácidos minerales y, por lo tanto, se consideran arcillas sintéticas.<sup>36</sup>

Las arcillas encuentran, de manera natural, en forma de rocas o de polvos blancos, presentan plasticidad al contacto con el agua y capacidad de intercambio iónico. Las estructuras bases de las arcillas son arreglos tetraédricos,  $M_{Tet}O_4$  ( $M_{Tet} = Si$  o  $Al$ ), que están unidos por tres vértices formando anillos hexagonales y arreglos octaédricos  $M_{Oct}O_4$  ( $M_{Oct} = Al, Mg$  o  $Fe$ ) compartiendo aristas y se disponen en láminas apiladas. La asociación de una lámina octaédrica con una o dos hojas tetraédricas forman la capas de la arcilla denominadas estructuras 1:1 o TO (Tetraédrica-Octaédrica) y 2:1 o TOT (Tetraédrica-Octaédrica-Tetraédrica) respectivamente.<sup>49</sup> En la Figura 7 se ilustran los arreglos octaédricos y tetraédricos que conforman la arcilla y en la Figura 8 se muestra las estructuras laminares que forman los arreglos tetraédricos y octaédricos.

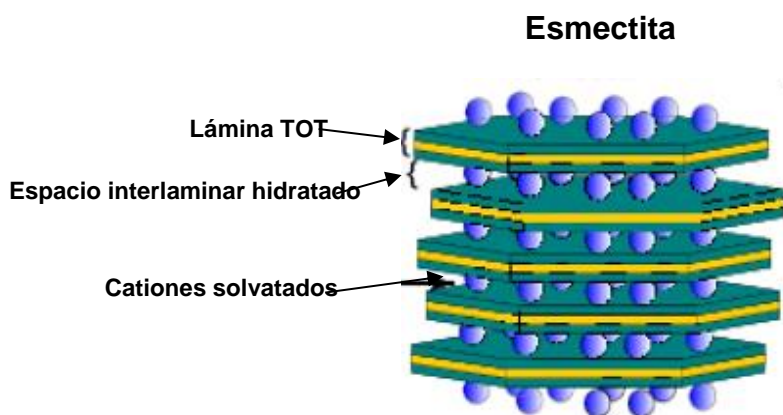


**Figura 7.** Estructuras bases en las arcillas. a) Arreglo tetraédrico, b) Arreglo octaédrico.



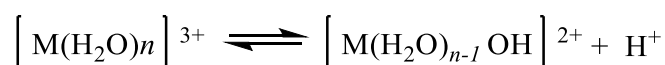
**Figura 8.** Estructuras laminares 1:1 y 2:1 en arcillas.

De acuerdo a la estructura y composición de las arcillas se encuentra el grupo de las esmectitas caracterizado por tener estructuras dioctaédrica (cuando  $M_{Oct}$  es trivalente por ejemplo  $Al^{3+}$ ) o trioctaédrica (cuando  $M_{Oct}$  es divalente por ejemplo  $Mg^{2+}$ ) con un arreglo laminar 2:1, es decir, presenta una lámina octaédrica entre dos tetraédricas, con espacios interlaminares en donde se localizan cationes como  $Na^{1+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  y moléculas de agua; en la Figura 9 se muestra una estructura característica de una esmectita. Dentro de las esmectitas se distinguen las bentonitas cuyo principal constituyente mineral es montmorillonita, la cual se encuentra presente entre el 80-90% y su estructura es la de una esmectita.<sup>50</sup> La principal característica de las montmorillonitas es su capacidad para intercambiar iones con los cationes interlaminares originando un cambio en sus propiedades químicas y catalíticas;<sup>51</sup> de esta forma, el tratamiento de montmorillonitas con ácidos minerales, como ácido sulfúrico, provoca una severa modificación en las estructuras laminares generando sílice amorfa tridimensional. Se han utilizado varios ácidos minerales para generar arcillas con acidez de Brönsted, las cuales se han convertido en sólidos importantes como fuentes de protones en reacciones químicas.<sup>52</sup>



**Figura 9.** Partícula característica de esmectita.

La habilidad de las esmectitas de donar protones y actuar como ácidos de Brönsted, o de aceptar electrones y comportarse como ácidos de Lewis, explican sus propiedades catalíticas. La acidez de Brönsted deriva de la disociación de las moléculas coordinadas a los cationes intercambiables de acuerdo a la siguiente reacción:



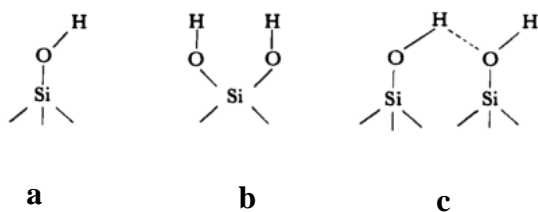
La acidez de los compuestos de Lewis se debe a los cationes  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  y puede ser incrementada por el intercambio de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  que se encuentran en el espacio interlamilar por iones  $\text{Al}^{3+}$  cuando se trata la arcilla con una solución de  $\text{AlCl}_3$ .<sup>53</sup>

Como ya se mencionó anteriormente, las bentonitas de origen natural pueden ser modificadas con ácidos minerales; las dos arcillas sintéticas más comunes son MNT-KSF y montmorillonita K-10 (MNT-K10), ambas son obtenidas por el tratamiento de las montmorillonitas naturales con ácido sulfúrico.<sup>54</sup> Molu y Yurdako reportaron la composición de la MNT-KFS para la cual se tiene:  $\text{SiO}_2$ , 55%;  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 18%;  $\text{MgO}$ , 3.0%;  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , 4.0%;  $\text{CaO}$ , 3.0%;  $\text{Na}_2\text{O}$ , <0.5%;  $\text{K}_2\text{O}$ , 1.5%; sulfato, 5.0%.<sup>55</sup>

La acidificación de una arcilla provoca un cambio en el área superficial, porosidad, tipo y concentración de iones. La acidez de Brönsted en arcillas es debido al ácido libre presente en arcillas activadas con ácidos minerales, también se puede deber a la disociación de moléculas de agua presentes en el espacio interlamilar. Durante la activación ácida los cationes de  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  son removidos de la hoja octaédrica y reubicados en el espacio interlamilar donde actúan como ácidos de Lewis. De esta forma, un tratamiento ácido promueve la actividad catalítica debido a que se incrementa el número de sitios ácidos de Brönsted y de Lewis. Sin embargo, una elevada acidez conlleva una gran actividad catalítica pero una pobre selectividad.<sup>52</sup>

El gel de sílice puede llegar a tener una superficie de  $5\text{-}800\text{ m}^2\text{g}^{-1}$  y es usado como adsorbente en la deshidratación de gases y fluidos y como soporte y catalizador en reacciones químicas. Las reacciones químicas catalizadas por gel de sílice, usualmente, proceden bajo condiciones suaves y con alta quimioselectividad, regioselectividad y estereoselectividad; son operacionalmente fáciles de utilizar.<sup>56</sup>

La superficie del gel de sílice consiste en una lámina de grupos silanoles ( $\text{SiOH}$ ) estos grupos, que se muestran en la Figura 10, presentan tres diferentes configuraciones: a) aislado, b) geminal y c) vecinal.



**Figura 10.** Configuraciones de grupos silanoles en la superficie del gel de sílice.

Los grupos silanoles son ligeramente ácidos. El valor del  $pK_a$  de los grupos silanoles de la superficie, determinado por Schindler y Kamber, es de 6.8. Aunque la fuerza ácida o básica del gel de sílice es débil esta cualidad resulta útil como catalizador en reacciones químicas. El usar gel de sílice permite que los reactivos puedan ser activados (o polarizados) y se eviten reacciones secundarias.<sup>57</sup> El gel de sílice resulta ser de elección como soporte sólido gracias a que es accesible, estable, poroso y se pueden anclar diversos grupos orgánicos a su superficie para generar sitios catalíticos.<sup>58</sup>

#### 4.3.3.2.2 *Nitración de fenoles con sólidos ácidos*

Se ha descrito la nitración de fenoles empleando arcillas ácidas, por ejemplo, MNT-K10 impregnada con nitrato de cobre (II) para obtener compuestos nitrados a partir de aromáticos activados con rendimientos del 75-98% y alta regioselectividad.<sup>59</sup> En variantes del método anterior se utilizan diversos sistemas nitrantes como  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3/\text{MNT-K10}$ ,<sup>60</sup>  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3/\text{MNT-KSF}$ ,<sup>27,61</sup> Zn, Mo, W/MNT-KFS,<sup>62</sup>  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2/\text{arcilla}$ ,<sup>63</sup>  $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{SiO}_2$ <sup>64</sup> y  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3/\text{arcilla}$ <sup>65</sup> para llevar a cabo la nitración de compuestos aromáticos. El orden de reactividad observado de diversos nitratos metálicos en la nitración de compuestos aromáticos es el siguiente:  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 > \text{AgNO}_3 > \text{KNO}_3 > \text{NaNO}_3 > \text{NH}_4\text{NO}_3 > \text{Pb}(\text{NO}_3)_2 > \text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ .<sup>60</sup>

Samajdar, Necker y Banik investigaron la nitración de compuestos aromáticos poco activados y activados, entre éstos últimos el fenol, utilizando MNT-KFS y nitrato de bismuto en THF; estas condiciones resultaron excelentes para llevar a cabo la reacción de nitración obteniendo buenos rendimientos y alta regioselectividad. Además, se indica que la reacción de nitración depende fundamentalmente de la naturaleza del soporte sólido, así, dos sólidos adsorbentes de estructura idéntica con diferente área superficial (tamaño de partícula), pueden dar diferente distribución en los productos obtenidos. Estos autores, por investigaciones anteriores, argumentan que la unión del nitrato de bismuto al grupo hidroxilo libre ubicado en la estructura multimetálica de la montmorillonita es importante para la formación del ion nitronio.<sup>66</sup>

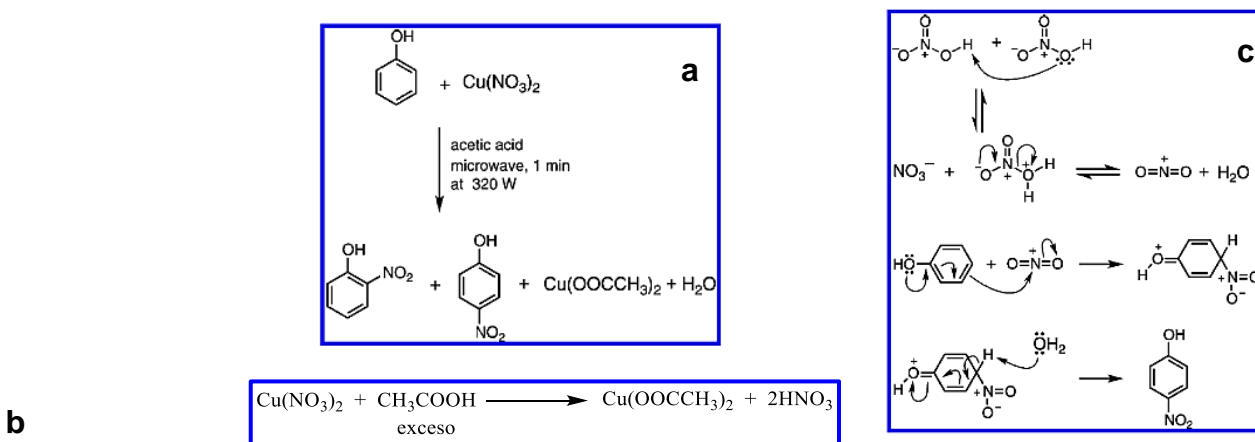
#### 4.3.3.3 *Nitración de fenoles con ácido acético glacial y nitratos metálicos*

Se han llevado a cabo reacciones de nitración de fenoles utilizando ácido acético glacial y diversos nitratos metálicos encontrándose algunas variantes en las condiciones de reacción.

Una de las condiciones de nitración de fenoles incluye una mezcla de nitrato de sodio y ácido acético glacial aplicando irradiación microondas; bajo estas condiciones se obtuvieron productos fenólicos mononitrados en pocos minutos y con altos rendimientos.<sup>67</sup> De manera similar se ha utilizado nitrato de calcio y ácido acético glacial bajo irradiación microondas obteniendo buenos rendimientos (60-83%) y alta regioselectividad; el mecanismo de nitración que se propone para este último método involucra la formación de pequeñas concentraciones de ácido nítrico, fuente del ion nitronio, necesario para llevarse a cabo una sustitución electrofílica aromática de compuestos fenólicos.<sup>68</sup>

Por otro lado, Yadav y colaboradores<sup>69</sup> sometieron diversos fenoles a condiciones de nitración empleando nitrato de cobre (II) y ácido acético glacial bajo irradiación microondas y calentamiento a 120°C, observando un oscurecimiento de la mezcla de reacción y la formación de gases marrones. Bajo estas condiciones se identificó un sólido correspondiente al acetato de cobre(II) bajo estas evidencias se propuso un mecanismo a través de la formación de HNO<sub>3</sub> debida a una reacción ácido base con la consecuente generación del ion nitronio seguida de una sustitución electrofílica aromática. Este mecanismo se muestra en el Esquema 8.

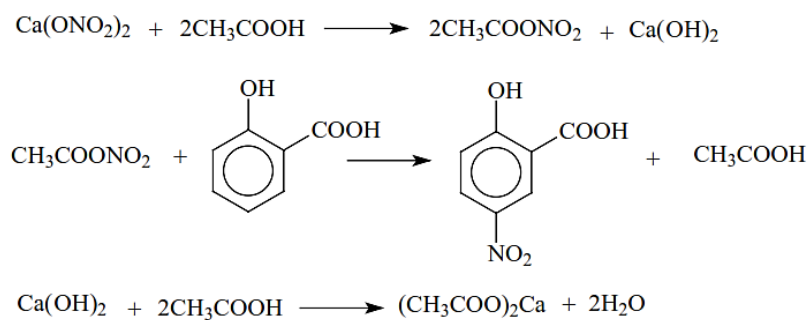
Las condiciones de nitración antes descritas son consideradas como metodologías sencillas, regioselectivas y amigables con el ambiente.



**Esquema 8.** a) Condiciones de la reacción de nitración del fenol, b) Generación de ácido nítrico y c) Propuesta del mecanismo de reacción de nitración.

En un trabajo monográfico de química verde<sup>70</sup> se reporta nitración del fenol, utilizando nitrato de calcio, ácido acético glacial y sometido a una temperatura de 80°C, en lugar de aplicar irradiación microondas como Bose *et al.*,<sup>68</sup> se observa una regioselectividad del isómero *p*-nitro fenol. Sin

embargo, el mecanismo propuesto es mediante la formación del nitrato de acetilo el cual actúa como agente nitrante. Este mecanismo se muestra en el Esquema 9.



**Esquema 9.** Mecanismo de nitración del fenol a través de la formación del nitrato de acetilo.

## **5. JUSTIFICACIÓN**

Los productos naturales han sido una fuente importante en el descubrimiento y desarrollo de nuevos compuestos con actividad biológica. Algunos productos naturales han sido identificados como compuestos líderes en la síntesis total o semisíntesis de otros compuestos con actividad biológica mejorada en comparación con los propios productos naturales.

Los flavonoides son un grupo de productos naturales caracterizados por tener una estructura base de fenilbenzopirano y por tener diversas actividades biológicas. La modificación estructural de este tipo de compuestos con la introducción de un grupo funcional que contenga nitrógeno, tal como, el grupo nitro representa una fuente de nuevos compuestos con probable actividad biológica, ya que este grupo confiere características químicas y biológicas únicas a una molécula, razón por la cual algunos fármacos ejercen su acción primaria, potencializan o confieren alguna actividad que antes no presentaban. Además, los compuestos nitro aromáticos pueden ser utilizados como estructuras base para la obtención de otros derivados nitrogenados.

## **6. HIPÓTESIS**

Dadas las propiedades químicas y biológicas del grupo nitro aromático en la acción en diversos compuestos de importancia farmacológica; la introducción del grupo nitro en productos naturales con estructuras aromáticas, del tipo flavonoide, modificará sus características estructurales produciendo un cambio en su actividad antioxidante, anti-inflamatoria, citotóxica y antibacteriana.

## 7. OBJETIVOS

### 7.1 Objetivo General

Preparar nitroderivados a partir de estructuras 2-fenilbenzopirano y determinar si la introducción del grupo nitro genera algún cambio en su actividad antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatoria y citotóxica.

### 7.2 Objetivos particulares

- Establecer condiciones suaves de nitración para los flavonoides naringina (1), rutina (2), quercetina (3) y crisina (4) utilizando catálisis ácida asistida con arcillas y nitrato de bismuto, ácido acético glacial y nitrato de bismuto y mezcla de gases NO<sub>x</sub>.
- Identificar los derivados nitrados de los flavonoides a través de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Evaluar la actividad antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatoria y citotóxica de los flavonoides sin modificar y los nitro derivados.
- Establecer posibles relaciones estructura-actividad de los derivados obtenidos.



## 8. METODOLOGÍA

En este apartado se describe de manera breve los métodos utilizados para la obtención de los compuestos nitroderivados y las metodologías llevadas a cabo en la evaluación de la actividad antioxidante, anti-inflamatoria, antibacteriana y citotóxica.

Los flavonoides naringenina, rutina, quercetina y crisina (**1-4**) fueron comercialmente adquiridos y sometidos a condiciones de nitración suaves y referidas para fenoles o se realizaron modificaciones para adecuar estas condiciones a polifenoles.

Las condiciones de reacción propuestas fueron: a) nitración asistida con sólidos ácidos y nitrato de bismuto, b) nitración con mezcla de gases  $\text{NO}_x$  y c) nitración con ácido acético glacial y nitrato de bismuto.

En la reacción de nitración con sólidos ácidos se emplearon tres tipos de sólidos y nitrato de bismuto pentahidratado utilizando THF como disolvente y aplicando una temperatura de 40 °C; los sólidos ácidos que se utilizaron fueron: gel de sílice, tosil y MNT-KFS. Los compuestos **1-4** se sometieron bajo estas condiciones resultando favorables para los flavonoides **1** y **2**.

Los compuestos **3** y **4** se sometieron a reacción de nitración utilizando ácido acético glacial y nitrato de bismuto para el compuesto **4** y ácido acético glacial y nitrato de potasio para el compuesto **3** a una temperatura de 40 °C. Se optimizó el rendimiento del derivado **4a** variando la cantidad de nitrato de bismuto utilizando 0.5, 0.75 y 1 mmol.

La nitración del compuesto **3** se llevó a cabo burbujeando una mezcla de gases  $\text{NO}_x$  formada por la adición de THF a un volumen de  $\text{HNO}_3$  al 66%. La mezcla de gases  $\text{NO}_x$  se burbujeó al compuesto **3** disuelto en THF bajo un baño de hielo.

Las reacciones de nitración se monitorearon utilizando cromatografía en capa fina (ccf) y la determinación estructural de los compuestos **1-4** y sus nitroderivados se realizó utilizando resonancia magnética nuclear RMN en una y dos dimensiones. Se emplearon técnicas de espectrometría de masas (EM) de alta y baja resolución, infrarrojo (IR) y cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS por sus siglas en inglés) para complementar la caracterización de los productos.

Se llevó a cabo la evaluación de actividad antioxidante, anti-inflamatoria, antimicrobiana y citotóxica de los compuestos **1-4** y los nitroderivados **1a**, **1b**, **2a**, **3a** y **4a** (presentados en la Figura 11) con el

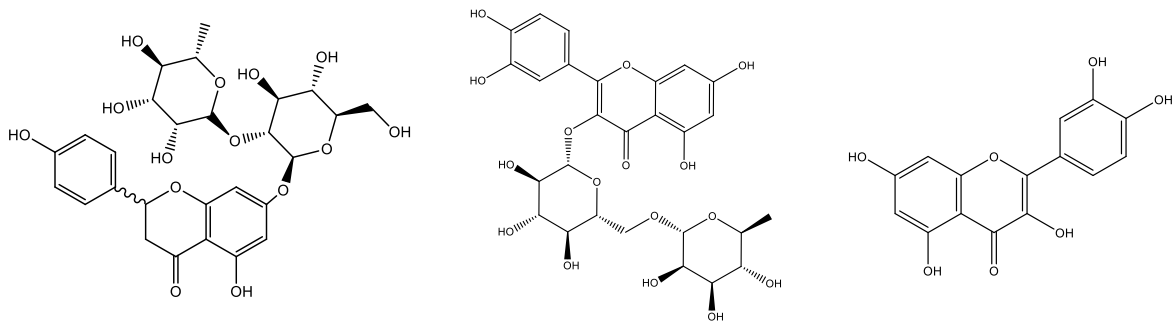
objetivo de determinar la existencia de algún cambio en la actividad de los compuestos nitrados con respecto a los compuestos de partida.

La actividad antioxidante se evaluó por la capacidad captadora del radical 2,2-difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH), el cual es un radical estable centrado en nitrógeno y se mide a través de un método espectrofotométrico por el cambio de coloración de la solución generado por la disminución del radical DPPH en el medio.

La actividad antimicrobiana se evaluó por el método de difusión en agar Kirby-Baüer en el cual se mide el halo de inhibición (mm) del crecimiento bacteriano alrededor de discos impregnados con 2 mg de los compuestos a evaluar. Las bacterias que se inocularon fueron: *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*.

La actividad anti-inflamatoria se evaluó a través del modelo de edema en oreja de ratón inducido por TPA. Se cuantificó la disminución del edema después de cuatro horas de la aplicación tópica de 1 µg del compuesto. Esta disminución del edema se calculó por la diferencia de pesos entre una muestra de 7 mm de diámetro de la oreja con tratamiento y la oreja control.

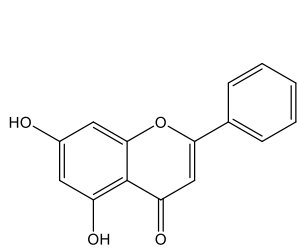
En la sección experimental se encuentra con mayor detalle la descripción de la obtención de los compuestos nitrados y las metodologías llevadas a cabo en la evaluación de la actividad biológica.



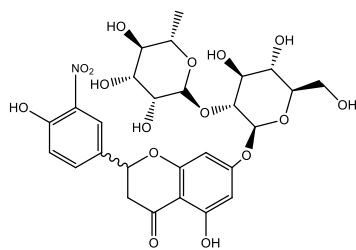
**Naringina (1)**

**Rutina (2)**

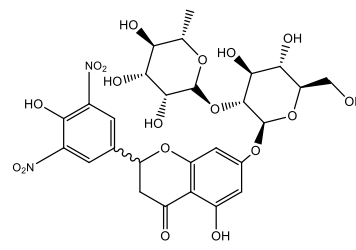
**Quercetina**



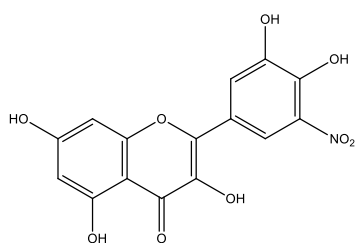
**Crisina (4)**



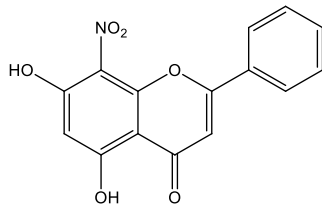
**3'-nitronaringina**



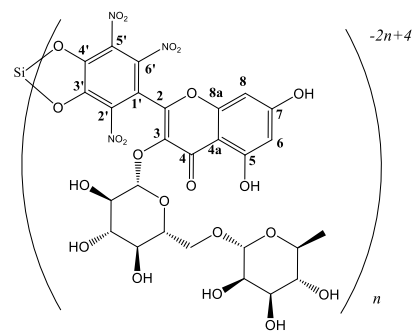
**3',5'-**



**5'-nitroquercetina**



**8-nitrocrisina**



**complejo de silicio  
con 2',5',6'-**

**Figura 11.** Estructura de los flavonoides sometidos a reacción de nitración y los nitroderivados obtenidos.

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se exponen y analizan los resultados obtenidos en la preparación de nitro derivados a partir de algunos flavonoides comunes, naringina (1), rutina (2), crisina (3) y quercetina (4), así como también, la estabilidad de estos compuestos al emplear diversas condiciones de reacción de nitración. Finalmente se dan a conocer los resultados de actividad antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatoria y citotóxica analizando el efecto que produce la introducción del grupo nitro en la estructura aromática de los flavonoides 1-4 en su actividad biológica. Los espectros de RMN, IR, masas y los cromatogramas se encuentran en la sección de anexos.

### 9.1 Obtención de nitroderivados

#### 9.1.1 Determinación de la acidez de los sólidos ácidos

La acidez del medio en una reacción de nitración a través del método clásico es un factor importante para la formación del ion nitronio. Algunos investigadores como Samajdar *et al*<sup>61</sup> y Bose<sup>24</sup> sugieren la importancia de las interacciones entre el nitrato metálico con los grupos hidroxilos de la superficie de los sólidos para la formación del ion nitronio.

Para observar la importancia de la acidez en la formación del ion nitronio, utilizando sólidos ácidos, se determinó este parámetro de las superficies del gel de sílice, tonsil y MNT-KFS.

La acidez de las superficies de los sólidos ácidos, antes mencionados, fue determinada a través de una titulación ácido-base siguiendo la metodología empleada por Kumar *et al.*<sup>71</sup> Los resultados se expresan en miliequivalentes (mequiv) de KOH por 100 g de sólido y se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Acidez de los sólidos ácidos utilizados en reacciones de nitración.

Sólido	mequiv KOH/100g de sólido
Gel de sílice	135
Tonsil	160
MNT-KFS	383

Los resultados indican que la arcilla MNT-KFS es el sólido más ácido al requerir 383 miliequivalentes de KOH/100 g de sólido; este resultado se debe a que es una arcilla sintética tratada con un ácido mineral. Sin embargo, tonsil, al ser también una arcilla sintética y presentar una estructura similar a

la MNT-KFS, fue 2.4 veces menos ácida que MNT-KFS y presenta una acidez muy cercana al gel de sílice.

### 9.1.2 Nitración de naringina (**1**)

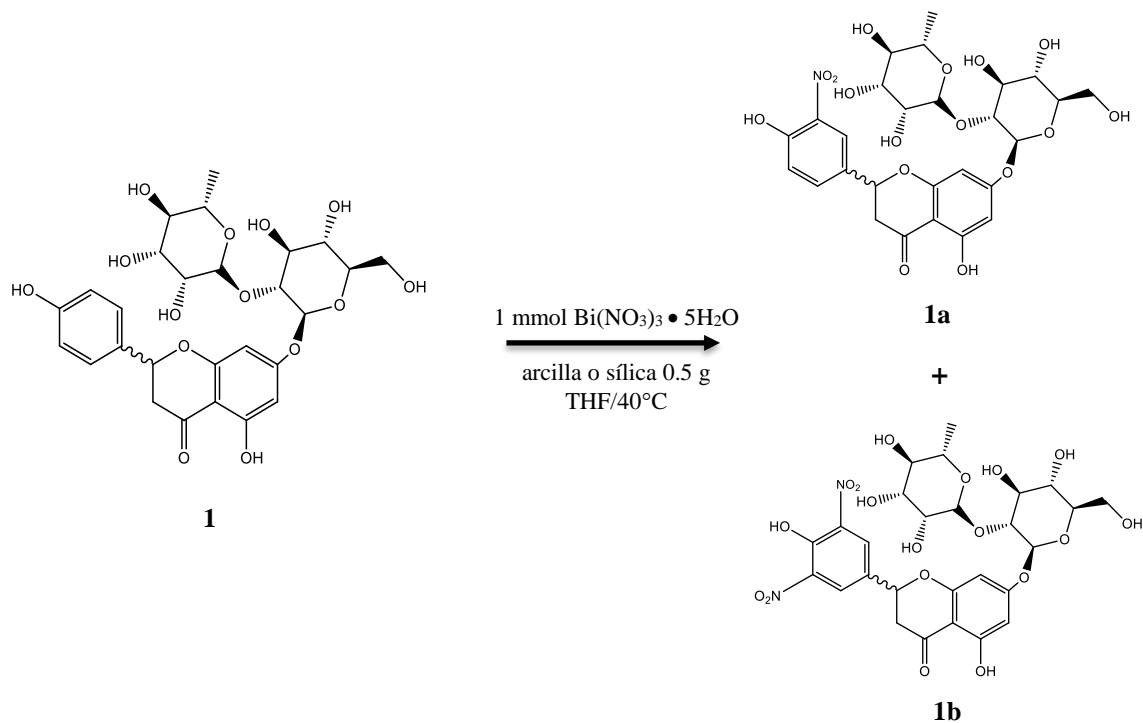
El flavonoide naringina (**1**) fue adquirido comercialmente como una mezcla de los enantiómeros *R* y *S*; sin embargo, se decidió trabajar con esta mezcla enantiomérica y someterla a reacción de nitración pues, el objetivo fue encontrar condiciones suaves de reacción para este tipo de flavonoide y obtener el nitro derivado.

El flavonoide naringina (**1**) pertenece al grupo de las flavanonas y no presentan conjugación entre el anillo B y C debido a la ausencia de un doble enlace entre el C-2 y C-3 lo que conlleva a la presencia de un centro quiral en C-2; este flavonoide se encuentra *O*-glicosilado en el oxígeno unido al C-7. Las características estructurales de compuesto **1** le dan la cualidad de tener alta polaridad y ser lábil a la presencia de ácidos fuertes. Considerando las características antes mencionadas se eligieron condiciones de nitración suaves empleando sólidos ácidos con diferencias en estructura y grado de acidez para evaluar cuál de ellos proveía el mejor rendimiento y selectividad.

Los sólidos empleados fueron gel de sílice, MNT-KFS y tonsil los cuales tienen la posibilidad de proveer una fuente de protones y gran área superficial requerida para promover la formación del ion nitronio. Como fuente de iones nitronio se ocupó nitrato de bismuto el cual es uno de los nitratos metálicos más eficaces en la nitración de compuestos aromáticos utilizando sólidos ácidos. Una de las ventajas de utilizar estas condiciones de nitración fue la facilidad para desechar los residuos y la separación de la mezcla de reacción.

Los tres sólidos ácidos promovieron la reacción de nitración obteniéndose como productos la mezcla de los compuestos *o*-mononitrado (**1a**) y *o*-dinitrado (**1b**) llevándose a cabo la sustitución en el anillo B en diferentes proporciones y rendimientos para cada una de las condiciones evaluadas.

En el Esquema 10 se presentan las condiciones de reacción de nitración establecidas para el compuesto **1**.



**Esquema 10.** Reacción de nitración del compuesto **1**.

Los resultados presentados en la Tabla 2 muestran el efecto de los sólidos ácidos en el rendimiento la reacción de nitración y en la formación de los productos **1a** y **1b** bajo las condiciones mostradas en el Esquema 10.

**Tabla 2.** Nitración del compuesto **1** con diversos sólidos ácidos.

Sólido ácido	Rendimiento <sup>a</sup> (%)	Proporción <b>1a:1b</b>
Gel de sílice	58	5:1
Tonsil	67	1:1
MNT-KFS	38	1:2

<sup>a</sup> Rendimiento: 1a+1b

Los porcentajes de rendimientos de las reacciones de nitración del compuesto **1** presentaron variación de acuerdo al sólido ácido que se utilizó. El mejor porcentaje de rendimiento se obtuvo al utilizar tonsil (67%) seguido del rendimiento con gel de sílice (58%) y el menor rendimiento se obtuvo con MNT-KFS (38%). Las proporciones de los productos *o*-mononitrado y *o*-dinitrado (**1a:1b**) variaron

en función del sólido ácido utilizado; de esta forma al utilizar gel de sílice se favoreció el producto **1a** sobre el producto **1b** al obtenerse una proporción de 5:1 respectivamente. Sin embargo, cuando se utilizó tonsil se obtuvo una proporción 1:1 (**1a:1b**) viéndose disminuida la proporción del compuesto **1a** en comparación a la obtenida con gel de sílice. Cuando se utilizó MNT-KFS se obtuvo una proporción 1:2 (**1a:1b**) viéndose favorecido el producto **1b**.

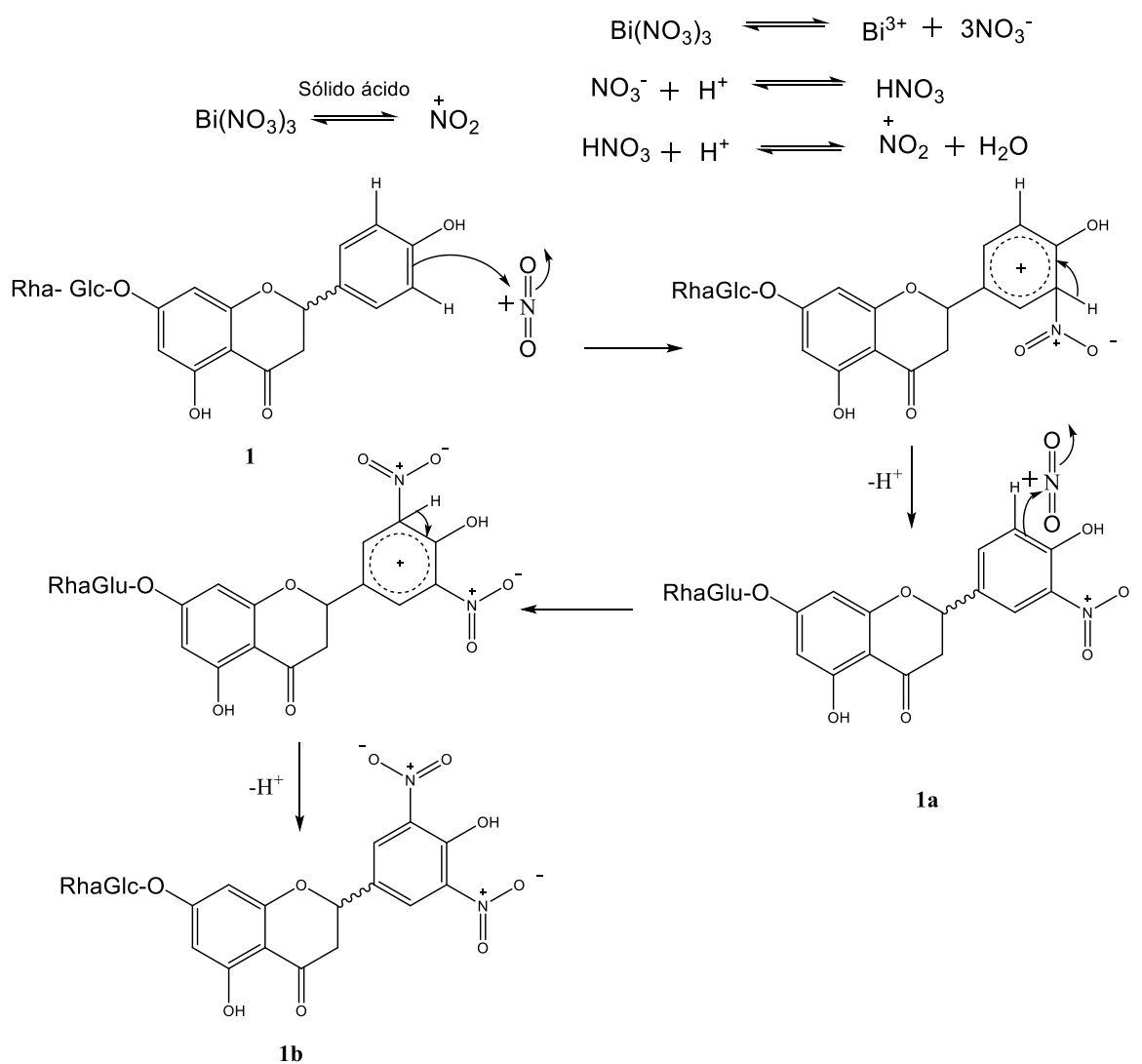
Si se relacionan estos resultados de la reacción de nitración con la acidez de la superficie de los sólidos, se puede inferir que la formación del ion nitronio no se lleva a cabo, principalmente, por efecto de la acidez de Brønsted que presentan los sólidos, ya que la gel de sílice presenta la menor acidez, en comparación con las arcillas tonsil y MNT-KFS (Tabla 2) y aun así promueve la reacción de nitración. Por lo tanto, se puede considerar que las interacciones entre los grupos hidroxilos de la superficie de los sólidos, presentes en los tres sólidos ácidos utilizados, y el nitrato de bismuto son, en mayor grado, responsables de la formación del ion nitronio; esta misma idea fue propuesta por Samajdar *et al*<sup>61</sup> y Bose,<sup>24</sup> quienes sugieren que la unión del nitrato de bismuto al grupo hidroxilo libre ubicado en la estructura multi metálica de la MNT-KFS es importante para la formación del ion nitronio.

Se observa una relación entre la acidez de Brønsted del sólido ácido y la proporción entre los productos **1a** y **1b**, de esta forma, conforme mayor cantidad de miliequivalentes de KOH requirió el sólido, es decir, presenta mayor acidez, se observó un aumento en la formación del producto **1b**. Este hecho sugiere que la presencia de protones incrementa la formación iones nitronio lo cual conlleva a una *o*-dinitración.

Comparando los resultados presentados en este trabajo con los obtenidos por Samajdar,<sup>37</sup> quien lleva a cabo la nitración de compuestos aromáticos bajo condiciones de reacción parecidas a las propuestas para el compuesto **1**, guardan similitud en observar diferentes proporciones de los derivados nitrados al cambiar la acidez de los sólidos. De la misma forma se refuerza la idea de la importancia de la interacción de los grupos hidroxilo de la superficie de los sólidos para la formación del ion nitronio sin descartar la importancia de la concentración de protones asociados a la MNT-KFS y tonsil para la formación del ion nitronio.

De acuerdo a lo anterior y al efecto de los sólidos ácidos en la reacción de nitración del compuesto **1**, el mecanismo de reacción que se propone es mediante la formación del ion nitronio por dos vías: a) interacción del nitrato de bismuto con los grupos hidroxilos ubicados en las superficies de los sólidos ácidos y b) por la formación del HNO<sub>3</sub>, promovida por los protones asociados al sólido y los nitratos

provenientes del nitrato de bismuto, seguido de su protonación y pérdida de agua. Una vez formado el ion nitronio se sigue de una sustitución electrofílica aromática en el anillo B y la recuperación de la aromaticidad por la pérdida de un protón. Este mecanismo se muestra en el Esquema 11.



**Esquema 11.** Mecanismo de reacción propuesto para la formación de **1a** y **1b**.

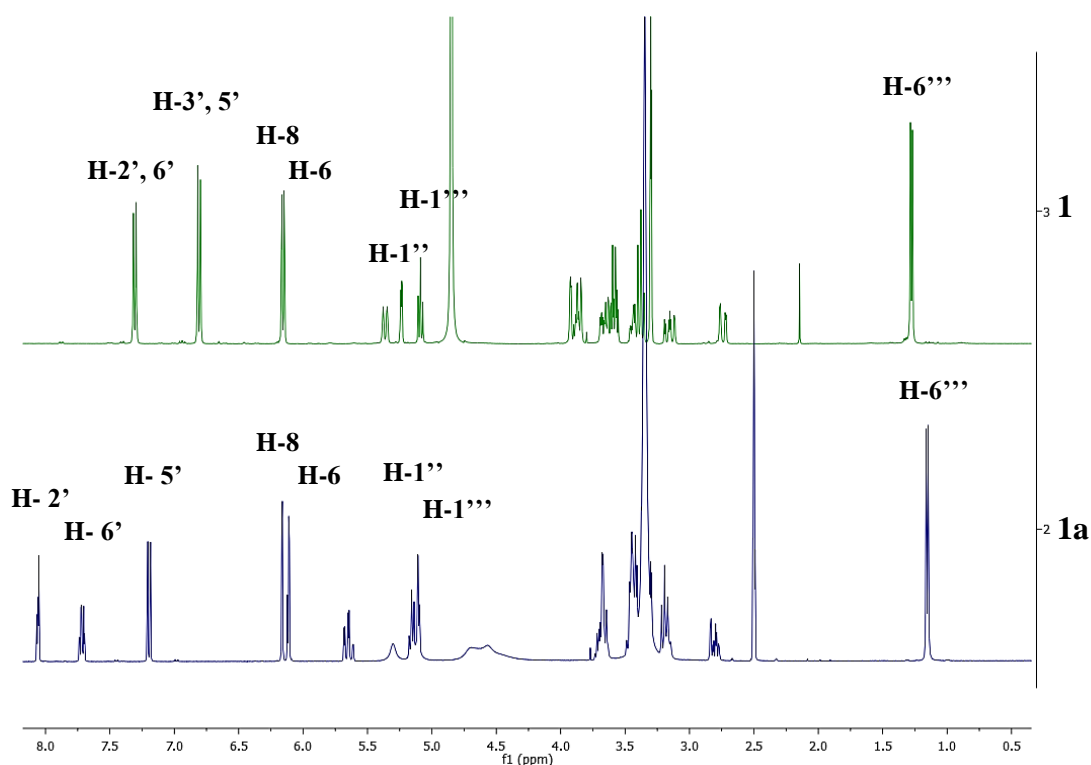
El compuesto (**1**) y los nitroderivados (**1a** y **1b**) fueron caracterizados por RMN. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **1**, debido a la mezcla de enantiómeros, se identificaron señales repetidas para los protones H-3 axial y ecuatorial, H-2 y para los algunos protones de la glucosa y ramnosa por



ejemplo, para H-2''', H-1'' y H-1''', se presentan como señales con diferentes intensidades y separadas por algunas ppm.

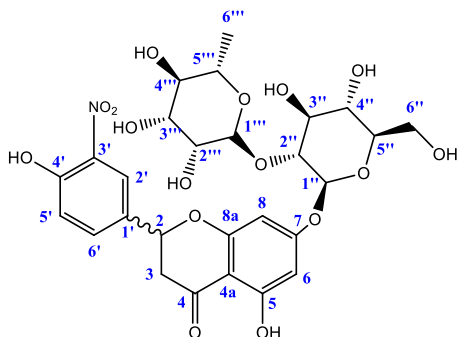
En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para el compuesto **1** se observan señales de carbonos que presentan desplazamientos aproximados a los correspondientes al C-2, C-3, C-5, C-7, C-8a, C-1' y C-1''' como consecuencia de la mezcla de enantiómeros del compuesto **1**.

Algunas de las señales importantes a considerar en el compuesto **1** son las correspondientes a la parte aromática del anillo A y B. Los dobletes en  $\delta_{\text{H}}$  6.17 y 6.19 se atribuyen a H-6 y H-8 respectivamente en anillo A; por la libre rotación del anillo B los protones unidos a C-3',5' y C-2',6' aparecen como dos pares de dobletes con una constante de acoplamiento *orto* ( $J \approx 8$  Hz). El doblete correspondiente a H-3',5' se encuentra a campo más alto que el doblete correspondiente a H-2',6' con un desplazamiento de 6.83 y 7.33 ppm respectivamente. Estas asignaciones se pueden observar en la Figura 12.



**Figura 12.** Espectros apilados de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **1** y **1a**.

El compuesto **1a** es uno de los productos de la reacción de nitración del compuesto **1** y su estructura se muestra en la Figura 13. A continuación se describen y analizan las principales señales en los espectros de RMN para establecer la posición del grupo nitro.



**Figura 13.** Estructura del compuesto **1a**.

Comparando las señales aromáticas en los espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **1** y **1a** se observa la desaparición del doblete a un desplazamiento de 6.83 ppm, correspondiente a H-3' y H-5', en el espectro del compuesto **1**. Por otro lado, en el espectro del compuesto **1a** se continúa observando los dobletes a  $\delta_{\text{H}}$  6.11 y 6.16 ppm correspondientes a H-6 y H-8 respectivamente; esto indica que la sustitución ocurrió únicamente en el anillo B.

Analizando las señales del anillo B en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **1a**; para H-5' se observa un doblete a  $\delta_{\text{H}}$  7.20 ppm con  $J = 8.6$  Hz debido al acoplamiento *orto* con H-6' y la señal integra para un protón. A campo más bajo, en 7.71 ppm, se encuentra un doble de dobles con  $J = 8.9, 2.2$  correspondiente a H-6' que presenta un acoplamiento *orto* con H-5' y un acoplamiento *meta* con H-2'. Finalmente, en  $\delta_{\text{H}}$  8.05 se encuentra un doblete con  $J = 2.2$  Hz, debido a un acoplamiento *meta* con H-6'.

El hecho de presentarse dos señales para H-6' y H-2' con desplazamientos y con multiplicidades diferentes indica que estos protones dejaron de ser equivalentes por la presencia de un grupo electroattractor en la posición C-3' el cual ejerce un efecto desprotector, de manera más drástica, sobre H-2' provocando que el desplazamiento de su señal sea la que se encuentre a campo más bajo (8.05 ppm). Por lo anterior se deduce una monosustitución en posición *orto* al grupo hidroxilo en el anillo aromático B en C-3'. En la Tabla 3 se enlistan los desplazamientos de los protones del anillo B del compuesto **1** y **1a** en donde se puede observar que la presencia del grupo electroattractor en la posición

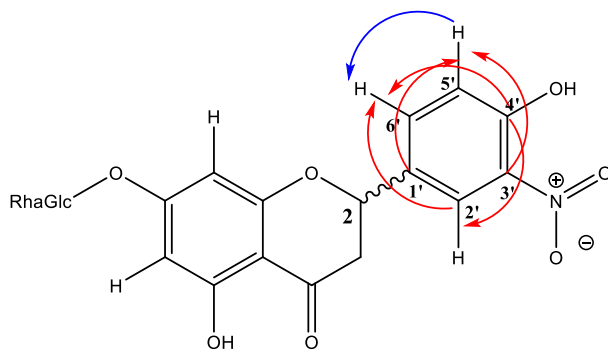
C-3' en el compuesto **1a** ejerce un efecto desprotector sobre todos los protones de este anillo provocando que todos se desplacen a campo más bajo.

**Tabla 3.** Comparación de los desplazamientos del compuesto **1** y **1a**

Protones	Desplazamientos (ppm)	
	<b>1</b>	<b>1a</b>
H-2'	7.33	8.05
H-5'	6.83	7.20
H-3'	6.83	-
H-6'	7.33	7.71

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **1a** se observan dos señales adicionales en la zona aromática en comparación con el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **1**; esto indica que la introducción del grupo nitro en el anillo aromático rompió con la simetría del anillo B y por lo tanto los C-2', C-6' y C-3', C-5' dejaron de ser equivalentes y cada uno de los carbonos presenta una señal con  $\delta_{\text{C}}$  de 123.67, 133.58, 136.61, 119.39 ppm para C-2', C-6', C-3' y C-5' respectivamente.

Las asignaciones de los protones aromáticos para el producto **1a** fueron apoyadas en experimentos de RMN en dos dimensiones HMBC, HSQC y COSY en donde se encontraron las correlaciones mostradas en la Figura 14. A través del experimento de HMBC, para el C-5', no se observó ninguna correlación carbono-hidrógeno a tres enlaces de distancia ya que C-3' y C-1' estas sustituidos por el grupo nitro y el benzofurano respectivamente. A través del experimento de COSY, a tres enlaces de distancia se observa una correlación H-H entre H-5' y H-6'. Otras correlaciones importantes carbono-hidrógeno a tres enlaces de distancia es entre el C-4' con H-2' y H-6', C-2 con H-2' y H-6', C-1' con H-5' y C-2' con H-6'.



**Figura 14.** Correlaciones observadas en el anillo B a través de experimentos de HMBC y COSY del derivado **1a**.

En la Figura 12 se muestran los espectros apilados de flavonoide **1** y el derivado **1a** en donde se siguen observando las señales de los carbonos anoméricos de la glucosa (H-1'', 5.15 ppm) y ramnosa (H-1''', 5.11 ppm) y el grupo metilo de la ramnosa (H-6''', 1.15 ppm), con lo que se comprueba que las condiciones de nitración evaluadas resultaron suaves y permitieron conservar la integridad de otros grupos funcionales del compuesto **1** con peso y fórmula molecular de 580.5 g/mol y  $C_{27}H_{32}O_{14} \cdot xH_2O$  respectivamente; estos datos son reportados por el proveedor y se verificaron por análisis de HPLC-MS mostrando una relación  $m/z$  de 579.6 para el ion molecular  $[M-H]^-$  correspondiente a un pico con tiempo de retención de 12.5 min.

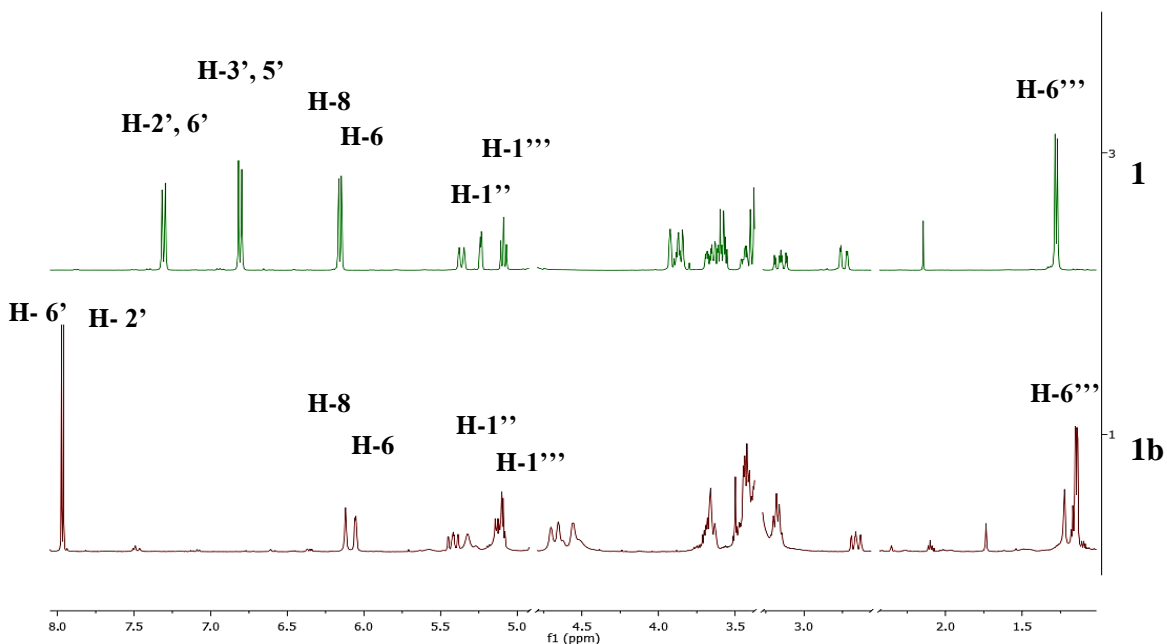
Experimentos adicionales de espectrometría de masas de baja resolución (EM) y de alta resolución (EMAR) y análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) apoyaron la identificación del compuesto **1a** con una masa esperada de 625 g/mol con una fórmula molecular de  $C_{27}H_{31}NO_{16}$ . Los iones moleculares y fórmula molecular del compuesto **1a** se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Datos de experimentos de Espectrometría de Masas y HPLC-MS del compuesto **1a**

Técnica	Ion molecular o fórmula molecular
Espectrometría de masas de baja resolución. Técnica FAB +	$m/z = [M+H]^+ 626$
Espectrometría de masas de alta resolución. Técnica DART +	$m/z = [M+H]^+ 626.1710$ Composición: $C_{27}H_{32}NO_{16}$
HPLC-MS (ESI-)	Tiempo de retención: 16.4 min; $m/z = [M-H]^- 624.1$

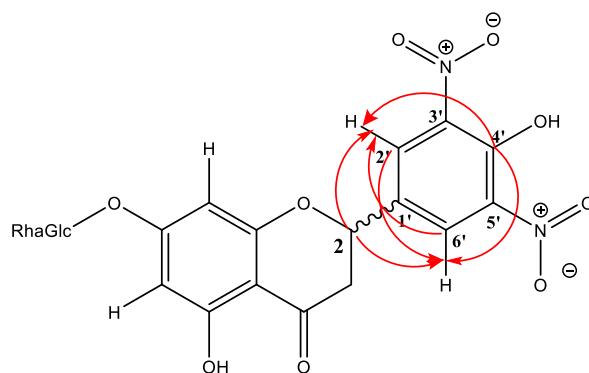
El derivado **1b** corresponde al producto *o*-dinitrado cuya estructura se muestra en la Figura 17. La sustitución del compuesto **1b** se determinó a través de experimentos de RMN. En la Figura 16 se presentan los espectros apilados del compuesto **1** y **1b** en donde se pueden observar las señales correspondientes a H-6 y H-8 a  $\delta_H$  96.45 y 95.07 ppm respectivamente y la desaparición de la señal correspondiente a los protones H-3' y H-5' en el espectro de RMN  $^1H$  del compuesto **1**, esto sugieren que el compuesto **1b** se encuentra sustituido en el anillo B. Adicionalmente en el espectro de RMN  $^1H$  del compuesto **1b** se presentan dos singuletes a  $\delta_H$  6.97 y 7.98 ppm correspondientes a H-2' y H-6, respectivamente lo que confirma que se llevó a cabo una disustitución *orto* al grupo hidroxilo posicionado en C-4'. La presencia de grupos nitro en las posiciones C-3' y C-5' causó un desplazamiento a campo más bajo de las señales de H-2' y H-6', de 7.33 (d), en el espectro de RMN  $^1H$  del compuesto **1**, a 7.96 (s) y 7.97 (s), en el espectro de RMN  $^1H$  del compuesto **1b**.

Las señales de los protones unidos a los carbonos anoméricos de la glucosa y ramnosa se observan en  $\delta_H$  5.13 y 5.10 ppm respectivamente, también se puede observar la presencia del grupo metilo de la ramnosa ubicado en 1.15 ppm. Estas señales indican la conservación de la glucosa y ramnosa después de haber sometido el compuesto **1** a condiciones de nitración.



**Figura 15.** Espectros apilados del compuesto **1** y el derivado **1b**.

Para asignar los carbonos y protones aromáticos, se analizaron los espectros de RMN en dos dimensiones, HMBC y HSQC. En la Figura 17 se muestran las correlaciones a dos y tres enlaces de distancia de carbono-hidrógeno, presentando correlación entre el C-2 con H-2' y 6', C-1' con H-2', C-6' con H-2', C2' con H-6', C-3' con H-2' y C4' con H-2' y 6' en el anillo B.

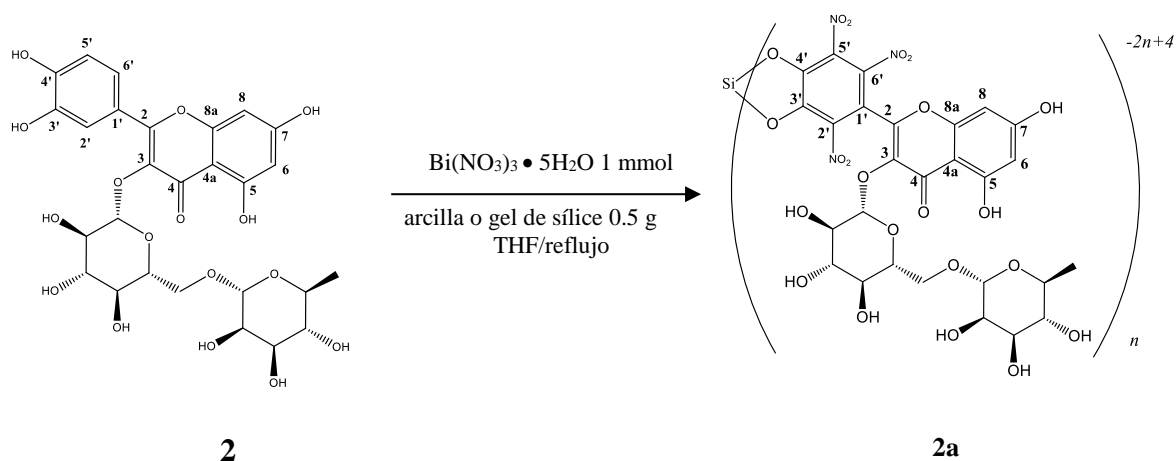


**Figura 16.** Correlaciones observadas en el anillo B a través de experimentos de HMBC del derivado **1b**.

Experimentos de HPLC-MS confirmaron la masa molecular esperada para el compuesto **1b** al arrojar una relación  $m/z$  de 669.3 para el ion molecular  $[M-H]^-$ .

### 9.1.3 Nitración de Rutina (2)

El compuesto **2** se sometió a las mismas condiciones de nitración que el compuesto **1** utilizando gel de sílice, MNT-KFS y tonsil como catalizadores de la reacción de nitración; estas condiciones se muestran en el Esquema 12. La diferencia estructural del flavonoide **2** en comparación con el flavonoide **1**, debida a la presencia del grupo catecol en el anillo B, condujo a una trinitración en las posiciones C-2', C-5' y C-6' atribuida a la alta activación de este anillo aromático. Adicionalmente se ha reportado<sup>72,73,15</sup> que el grupo catecol en presencia de gel de sílice o sólidos que contengan unidades tetraédricas de óxido de silicio son adecuadas para la formación de complejos con silicio adicionalmente la presencia de grupos nitro en el anillo aromático provocan un aumento de acidez en los protones de los grupos hidroxilo del catecol favoreciendo la formación del complejo con silicio. El compuesto **2a** no formó cristales; sin embargo, la estructura que se propone para este derivado es un complejo de silicio con el compuesto 2',5',6'-trinitrorutina; esta propuesta se apoya en estudios de RMN y Espectroscopia Infrarroja.



**Esquema 12.** Reacción de nitración del compuesto **2**.

En la Tabla 5 se muestran los rendimientos del producto **2a** obtenidos con las condiciones de reacción mostradas en el Esquema 12. El mayor rendimiento se obtuvo al utilizar tonsil (30%), seguido del de gel de sílice (25%) y finalmente con MNT-KFS (14%). Al utilizar tonsil y gel de sílice se obtienen rendimientos similares, este resultado se puede atribuir a que la acidez de Brönsted de ambos sólidos son parecidas; sin embargo, cuando se utiliza MNT-KFS el rendimiento es aproximadamente la mitad que cuando se utiliza tonsil y gel de sílice; esto se puede deber que el sólido MNT-KFS tiene una mayor acidez de Brönsted y conlleva a la formación de otros subproductos disminuyendo el rendimiento del compuesto **2a**.

El compuesto **2a** presentó una alta polaridad, e inclusive, solubilidad en agua por lo que su aislamiento fue posible únicamente a través de cromatografía en placa preparativa; siendo ésta una de las causas por lo que los rendimientos obtenidos fueron menores al 50%.

**Tabla 5.** Rendimiento de la reacción de nitración del compuesto **2** al utilizar diferentes sólidos ácidos

Sólido ácido	Rendimiento (%)
Gel de sílice	25
Tonsil	30
Montmorillonita KFS	14

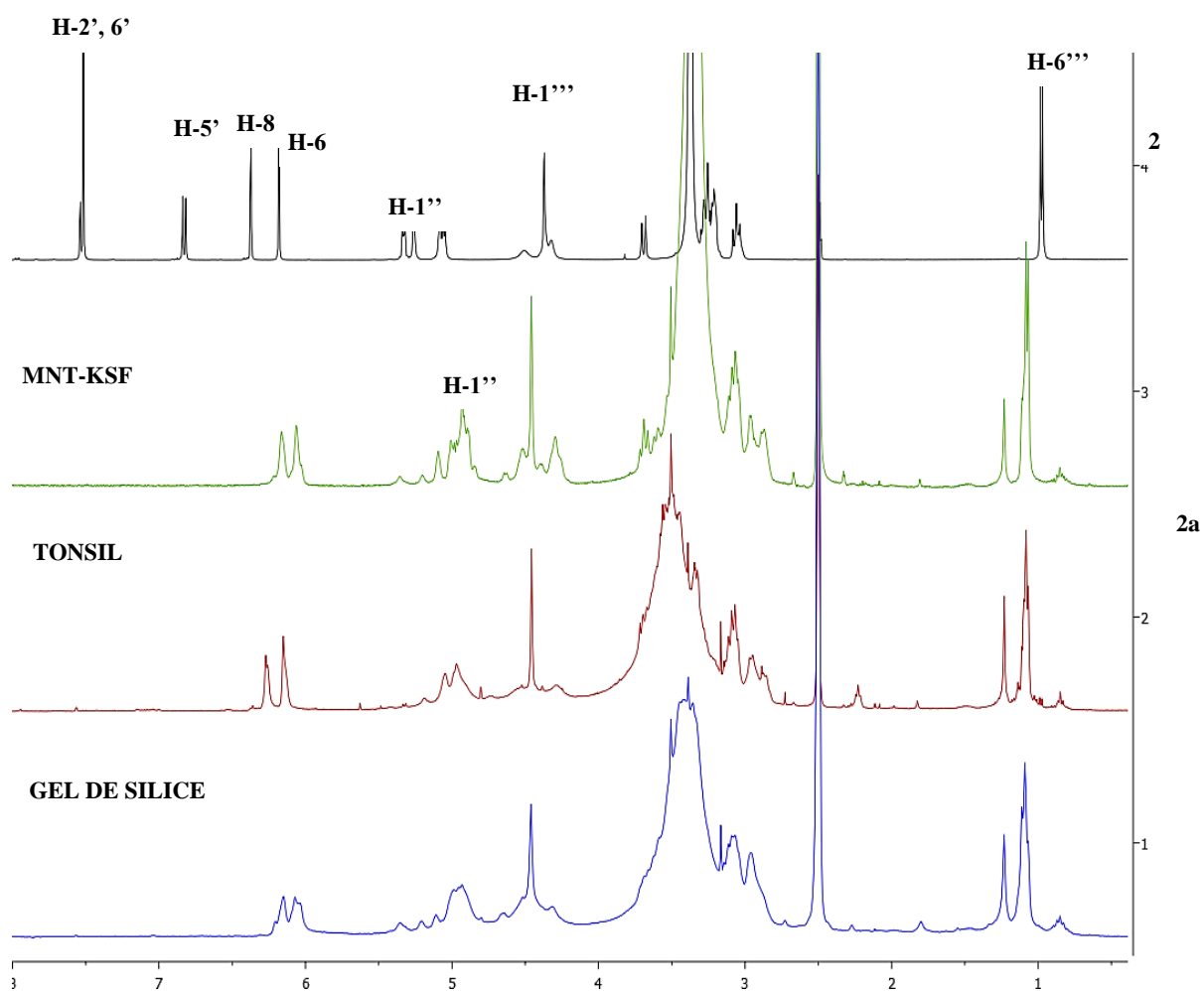
De manera similar que en la reacción de nitración del compuesto **1**, durante la reacción de nitración del compuesto **2**, la formación del ion nitronio se atribuye a la interacción del nitrato de bismuto con la red multimetálica de los sólidos ácidos ya que se llevó a cabo la nitración del compuesto **2** inclusive al utilizar gel de sílice, el cual es el sólido con menor acidez de Brønsted, sin embargo no se descarta que los protones asociados a los sólidos también sean responsables de la formación del ion nitronio a través de la protonación de iones nitrato provenientes del nitrato de bismuto con la consecuente formación del ion nitronio.

El mecanismo de nitración que se propone es a través de una sustitución electrofílica aromática del anillo B en las posiciones *orto* y *para* a los dos grupos hidroxilos generando un anillo aromático completamente sustituido. Esta trinitración favorece un incremento en la acidez de los grupos hidroxilos ubicados en C3' y C-4' facilitando su desprotonación y la formación de un complejo con silicio, este último presente en la red multimetálica del tonsil, gel de sílice y MNT-KFS.

La estructura del compuesto **2a** se propone de acuerdo a experimentos de RMN, espectroscopia infrarroja y a las investigaciones de Doddi *et al.*<sup>16</sup> quienes han formado complejos de silicio hexacoordinado con diversos flavonoides.



En la Figura 17 se muestran los espectros apilados de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **2** y el nitroderivado, **2a**, obtenido al utilizar gel de sílice, MNT-KFS y tonsil. Para cada uno de los espectros se observa la desaparición de las señales aromáticas correspondientes a los hidrógenos unidos a C-2', C-5' y C-6', presentes en el espectro del compuesto **2** a  $\delta_{\text{H}}$  6.83 y 7.53 ppm, lo que permite inferir una trisustitución en el anillo B.



**Figura 17.** Espectros apilados de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **2** y del derivado **2a**.

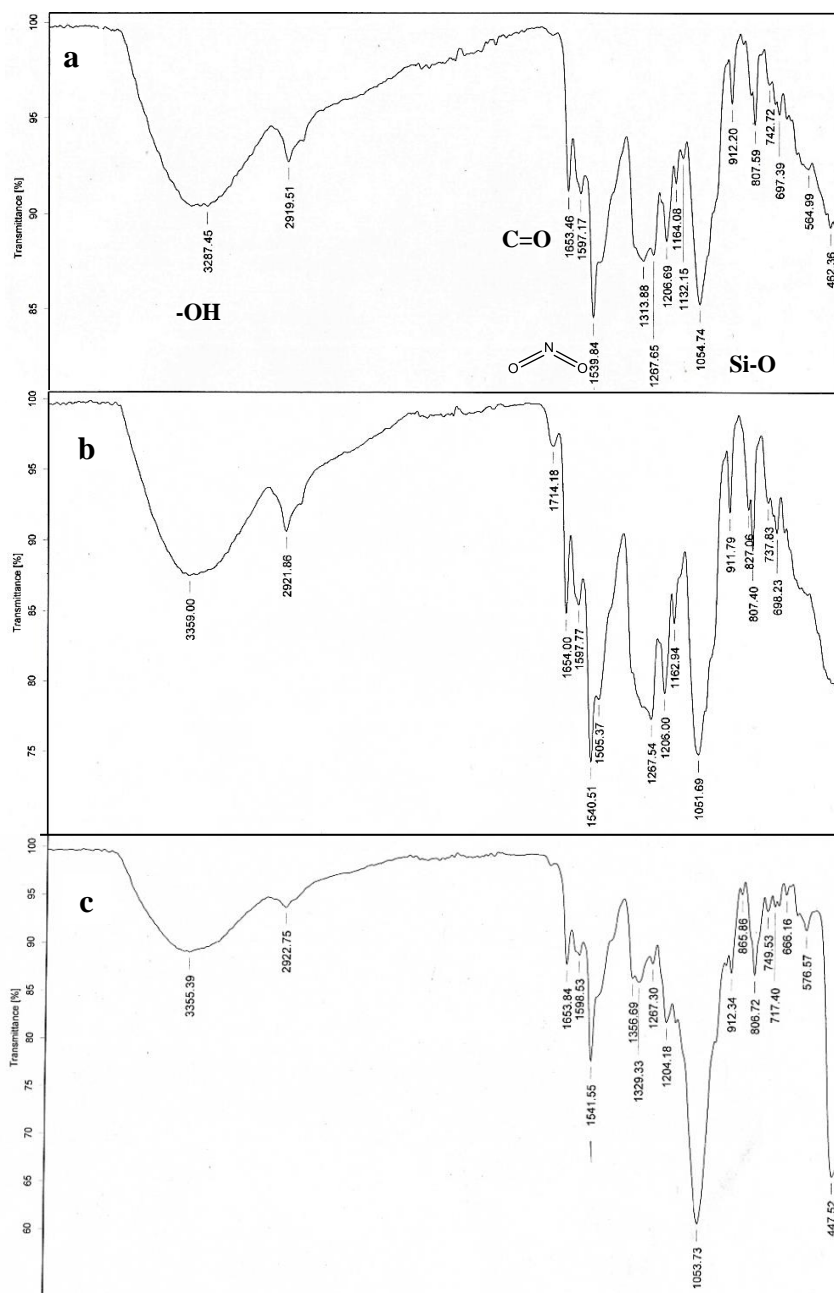
En los espectros del compuesto **2a** se puede observar dos dobletes a  $\delta_{\text{H}}$  6.14 y 6.26 ppm correspondientes a H-6 y H-8 respectivamente.

En los espectros del compuesto **2a** se continúan observando los protones unidos a los carbonos anoméricos; una señal en  $\delta_{\text{H}}$  4.46 ppm que corresponde a H-1''', protón unido carbón anomérico de la ramnosa, y en  $\delta_{\text{H}}$  5.05 ppm aparece una señal ancha correspondiente a H-1'' e identificada como

el protón unido al carbón anomérico de la glucosa por correlacionar a un enlace de distancia con el carbono desplazado a 101.1 ppm correspondiente a C-1''. En  $\delta_H$  1.09 ppm se presenta un doblete correspondiente a los protones del metilo de la ramnosa (C-6'') y entre 2.9 y 3.7 se encuentran las señales de los protones de la glucosa y la ramnosa.

Analizando los espectros de infrarrojo del derivado **2a** obtenido al utilizando cada uno de los sólidos ácidos, se puede observar una banda de alta intensidad y ancha entre 3280 y 3360  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a la vibración del estiramiento del enlace O-H, entre 1653 y 1654  $\text{cm}^{-1}$  se observa la banda de absorción de la vibración de estiramiento del enlace -C=O ubicado en el anillo C, entre 1539 y 1541  $\text{cm}^{-1}$  se observa una banda intensa asignada a la vibración de estiramiento asimétrico del grupo nitro y entre 1051 y 1054  $\text{cm}^{-1}$  se observa una muy intensa asignada a la vibración de estiramiento asimétrico del enlace Si-O, la cual es muy parecida a la bandas de absorción observadas en los espectros de infrarrojo de gel de sílice (1067  $\text{cm}^{-1}$ ), MNT-KFS (1028  $\text{cm}^{-1}$ ) y tonsil (1027  $\text{cm}^{-1}$ ). Los espectros de IR del compuesto **2a** y de los sólidos se encuentran en anexos. En la Figura 19 se observan los Espectros de infrarrojo en donde se compara los espectros del compuesto **2a** al utilizar cada uno de los sólidos ácidos en la reacción de nitración y para los tres se observan un patrón de bandas muy similares que indican la presencia de silicio en el derivado **2a**.

En trabajos realizados por Doddi *et al.*<sup>16</sup> reportan la formación de algunos complejos de silicio hexacoordinados con tres unidades de flavonoides que presentan un grupo catecol en su estructura, además indican que la formación de complejos con silicio se favorece con aquellos grupos catecoles que se encuentran sustituidos con grupos electroattractores, como el grupo nitro, debido a que se incrementa la acidez de los grupos hidroxilos facilitándose la desprotonación de los hidroxilos. Esto apoya la propuesta de la formación de un complejo con silicio llevándose a cabo, primero, la trinitración del anillo B del compuesto **2** y posteriormente la formación del complejo de silicio con el derivado 2',5',6'-trinitro rutina. El número de unidades del derivado 2',5',6'-trinitro rutina presentes en el compuesto **2a** no fue posible determinarlo por lo que perspectivas para elucidar completamente estructura de este producto es realizar RMN <sup>29</sup>Si y espectrometría en tándem masas, la cual es una técnica útil en la determinación de la masa de este tipo de complejos.



**Figura 18.** Espectros de infrarrojo del compuesto **2a** utilizando a) gel de sílice, b) tonsil y c) MNT-KFS en la reacción de nitración.

#### 9.1.4 Nitración de Quercetina (3)

La quercetina pertenece al grupo de los flavonoles y presenta un grupo hidroxilo en la posición C-3, adicionalmente tiene una doble ligadura entre los carbonos C-2 y C-3 y un grupo catecol en el anillo B, estas características estructurales le confieren la capacidad de oxidarse con facilidad y es por ello que es considerado un excelente antioxidante de origen natural; sin embargo, esta característica también representa una desventaja ya que le confiere una alta reactividad, inclusive, bajo condiciones suaves de nitración. Considerando las características de este flavonol se plantearon diversas condiciones de reacción de nitración presentadas en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Condiciones de reacción de nitración a las que se sometió el compuesto **3**

Flavonoide	Condiciones	Producto
Quercetina (3)	KNO <sub>3</sub> /AcOH glacial 40 °C Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> • 5H <sub>2</sub> O 1mmol, arcilla o gel de sílice 0.5 g /THF 40	Sólido café

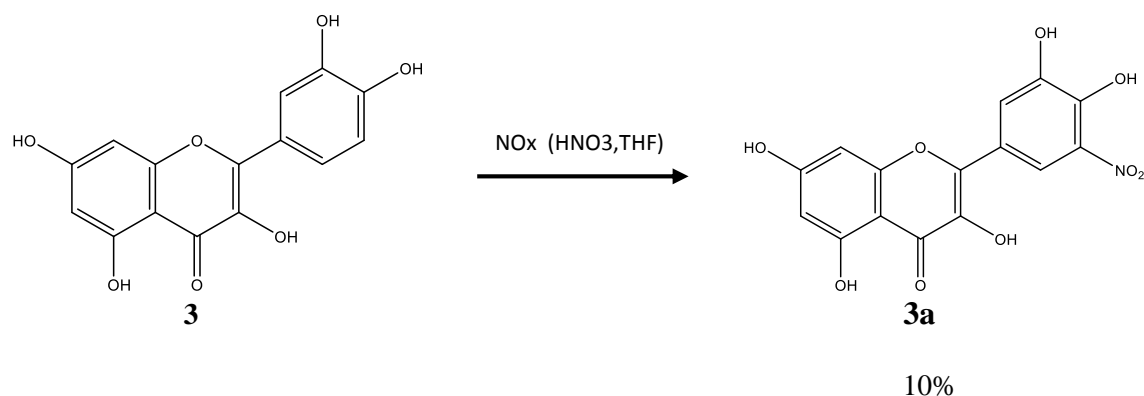
Al igual que los compuestos **1** y **2** el compuesto **3** se sometió a reacción de nitración empleando sólidos ácidos y nitrato de bismuto; sin embargo, estas condiciones de reacción no resultaron favorables para la formación de derivados nitrados y en lugar se obtuvo un sólido insoluble el cual no fue posible identificar a través de RMN y por análisis de Resonancia Paramagnética Electrónica se detectó un radical de naturaleza orgánica al presentar un factor g de 2.00400, característico para este tipo de radicales.

La formación de radicales bajo estas condiciones permitió determinar que la mezcla de compuesto **3** con el nitrato de bismuto conducía a reacciones colaterales, lo que llevó a plantear otras condiciones utilizando otro nitrato metálico como el de potasio en ácido acético glacial obteniéndose resultados parecidos a las condiciones antes evaluadas y de la misma manera, se identificó la presencia de un radical orgánico con un factor g de 2.00466.

La reactividad del compuesto **3** en condiciones ácidas y bajo la presencia de metales, permitió observar que se favorece la formación de radicales libres sobre la reacción de nitración.

Ante los resultados obtenidos se optó por la nitración con la mezcla de gases NO<sub>x</sub>. Estos gases fueron generados por la oxidación de THF con HNO<sub>3</sub> al 66% y burbujeados en una disolución del compuesto **3** en THF en baño de hielo. Estas condiciones mostradas en el Esquema 13 resultaron favorables al

identificar al derivado **3a** nitrado en la posición C-5', sin embargo, el rendimiento de la reacción fue del 10%.



**Esquema 13.** Reacción de nitración del compuesto **3** utilizando una mezcla de gases NOx.

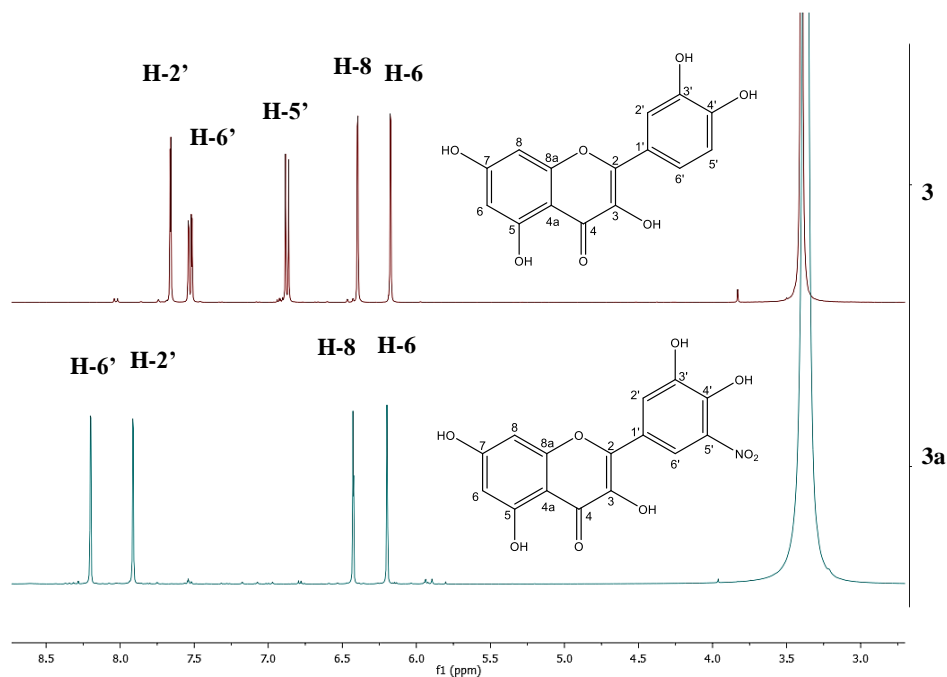
Para identificar el lugar donde se llevó a cabo la sustitución se realizaron experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y experimentos en dos dimensiones COSY, HSQC y HMBC tanto de la materia prima como del derivado **3a**, a continuación, se describen algunos desplazamientos de la zona aromática del compuesto **3** y el derivado **3a**.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **3** se observan cinco señales en la zona aromática; en  $\delta_{\text{H}}$  6.17 ppm un doblete que corresponde a H-6 con  $J = 2.03$  Hz debido a un acoplamiento *meta* con H-8, en  $\delta_{\text{H}}$  6.4 un doblete correspondiente al H-8 con una  $J = 2.03$  Hz; ambos protones presentes en el anillo A. En  $\delta_{\text{H}}$  6.87 ppm se encuentra un doblete correspondiente a H-5' con  $J = 8.53$  Hz atribuido a un acoplamiento *orto* con H-6', este último se encuentra en  $\delta_{\text{H}}$  7.53 y presenta un doble de dobles con  $J = 8.53, 2.21$  Hz debido al acoplamiento *orto* con H-5' y *meta* con H-2'. En  $\delta_{\text{H}}$  7.66 ppm se observa un doblete que corresponde a H-2' con  $J = 2.21$  Hz debido a un acoplamiento *meta* con H-6'.

En la Figura 19 se muestran los espectros apilados de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **3** y el derivado **3a**. Comparando ambos espectros se aprecia la desaparición de la señal correspondiente a H-5' en  $\delta_{\text{H}}$  6.87 ppm, en el espectro del compuesto **3**; por otro lado, en el espectro del derivado **3a**, se observa la presencia de las señales correspondientes a H-6 y H-8 en  $\delta_{\text{H}}$  6.2 y 6.4 ppm, respectivamente, lo cual sugiere una sustitución en el anillo aromático B.

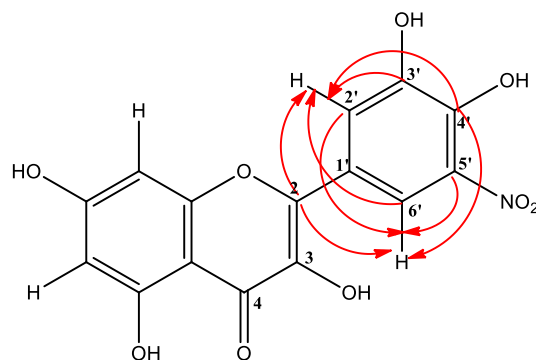
En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del derivado **3a** se observan dos dobletes en  $\delta_{\text{H}}$  7.91 y 8.20 ppm correspondientes a H-2' y H-6', respectivamente, con  $J =$  de 2.20 Hz, para ambos dobletes, debido a

un acoplamiento *meta* entre esos dos protones. El efecto desprotector del grupo nitro en la posición H-5' provoca que el desplazamiento de H-6' se ubique a campo más bajo que H-2'.



**Figura 19.** Espectros de RMN <sup>1</sup>H de **3** y del nitroderivado **3a**.

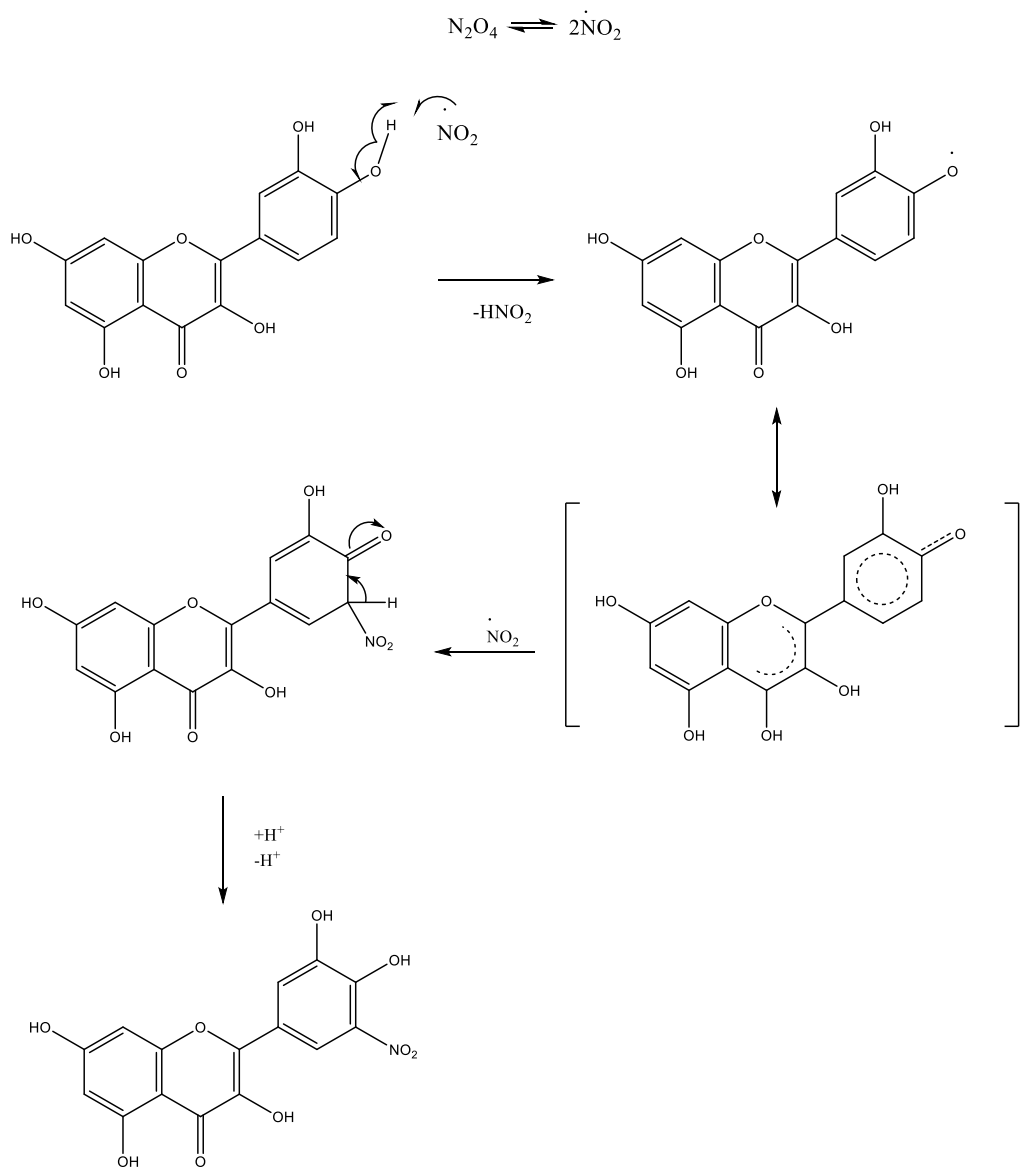
Con experimentos de RMN en dos dimensiones (HMBC, HSQC) se asignó la posición C-5' como el lugar donde se llevó a cabo la nitración al observarse correlación entre el C-2 y C-4' con los protones H-2' y H-6', otras correlaciones importantes son las encontradas entre el C-5' con H-6', C-3' con H-2', C-6' con H-2' y C-2' con H-6' a dos y tres enlaces de distancia. En la Figura 20 se muestran las correlaciones antes mencionadas en la estructura del derivado **3a**.



**Figura 20.** Correlaciones observadas en el anillo B a través de experimentos de HMBC del derivado **3a**.

Experimentos de EM de baja resolución, utilizando IE+, y EM de alta resolución, utilizando DART+, apoyaron la identificación del compuesto **3a** arrojando una relación masa carga de 347 para el ion molecular  $[M]^+$  y una fórmula molecular de  $C_{15}H_{10}NO_9$  para el ion molecular  $[M+H]^+$  lo cual corresponde a la masa y fórmula molecular esperada.

De acuerdo a los reportes de Schmid<sup>39</sup> y Jiménez *et al.*<sup>40</sup> quienes han utilizado la mezcla de gases  $NO_x$  para la nitración de compuestos aromáticos, atribuyen al dímero  $N_2O_4$  como el agente nitrante. Por lo tanto, el mecanismo de reacción de nitración propuesto para la formación del compuesto **3a** es mediante radicales libres con la formación del radical  $NO_2^{\cdot}$ , debido al equilibrio del dímero  $N_2O_4$ , el cual abstrae un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo del compuesto **3** para formar el radical fenoxilo seguido de la formación de un enlace sigma entre radical fenoxilo y el radical  $NO_2^{\cdot}$  y finalmente se recupera la aromaticidad del anillo B. De acuerdo a Rong *et al.*<sup>74</sup> el radical más estable de la quercetina es  $C4'-O^{\cdot}$ , por lo tanto las especies formadas a partir de este radical posicionan la densidad electrónica, predominantemente, en posiciones *orto* a  $C-4'$ , es decir en  $C-3'$  y  $C-5'$ , y en posición *para*, en  $C-1'$ , siendo  $C-5'$  la única posición disponible para llevarse a cabo la sustitución. El mecanismo propuesto se muestra en el Esquema 14.

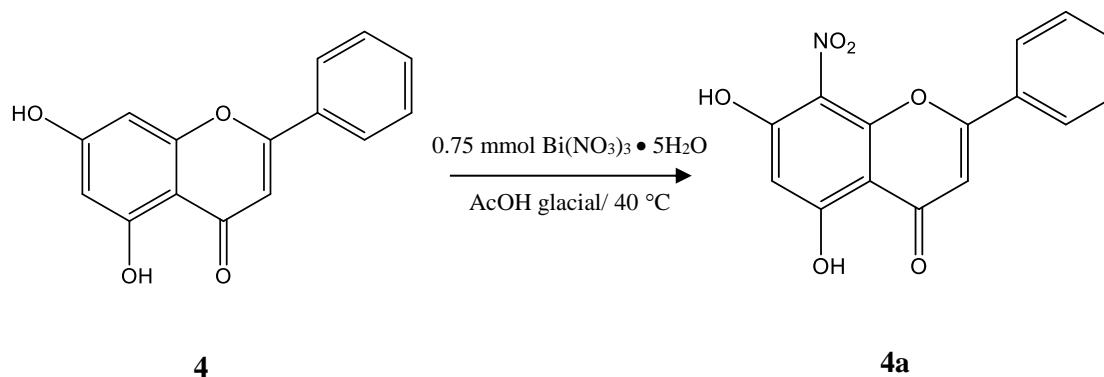


**Esquema 14.** Propuesta del mecanismo de reacción de nitración del compuesto **3** con N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.



### 9.1.5 Nitración de Crisina (4)

El compuesto **4**, a diferencia de los otros compuestos **1**, **2** y **3** no presenta sustitución de grupos hidroxilos en el anillo B, por lo que resulta un flavonoide con menor activación aromática en ese anillo y fueron requeridas otras condiciones de nitración; esto se comprobó al recuperar el compuesto **4** después de someterlo a condiciones de nitración utilizando sólidos ácidos y nitrato de bismuto. Las condiciones de reacción, mostradas en el Esquema 15, fueron establecidas proponiendo al nitrato de acetilo como agente nitrante, formado al reaccionar el ion acetato y el nitrato de bismuto. Estas condiciones resultaron adecuadas para obtener el producto mononitrado **4a**, con un incremento en el rendimiento de reacción de hasta un 79%, conforme se aumentó la cantidad de nitrato de bismuto a 1 mmol. En la Tabla 7 se muestran los rendimientos de reacción obtenidos al variar la cantidad de nitrato de bismuto.



**Esquema 15.** Condiciones de reacción de nitración del compuesto **4**.

**Tabla 7.** Evaluación de diferentes cantidades de nitrato de bismuto manteniendo el volumen de 10 ml de ácido acético glacial

Compuesto <b>4</b> (mmol)	$\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (mmol)	Rendimiento
1mmol	0.5 mmol	50 %
1mmol	0.75 mmol	60 %
1mmol	1mmol	79%

A diferencia de la nitración de los compuestos **1**, **2** y **3** en el compuesto **4** la sustitución se llevó a cabo en el anillo aromático A en la posición C-8 obteniéndose el derivado mononitrado **4a**. Esta selectividad de sustitución en el anillo A sobre el B se explica por la mayor activación que presenta el anillo A al tener dos grupos hidroxilo y el anillo B no cuenta con sustituyentes activantes.

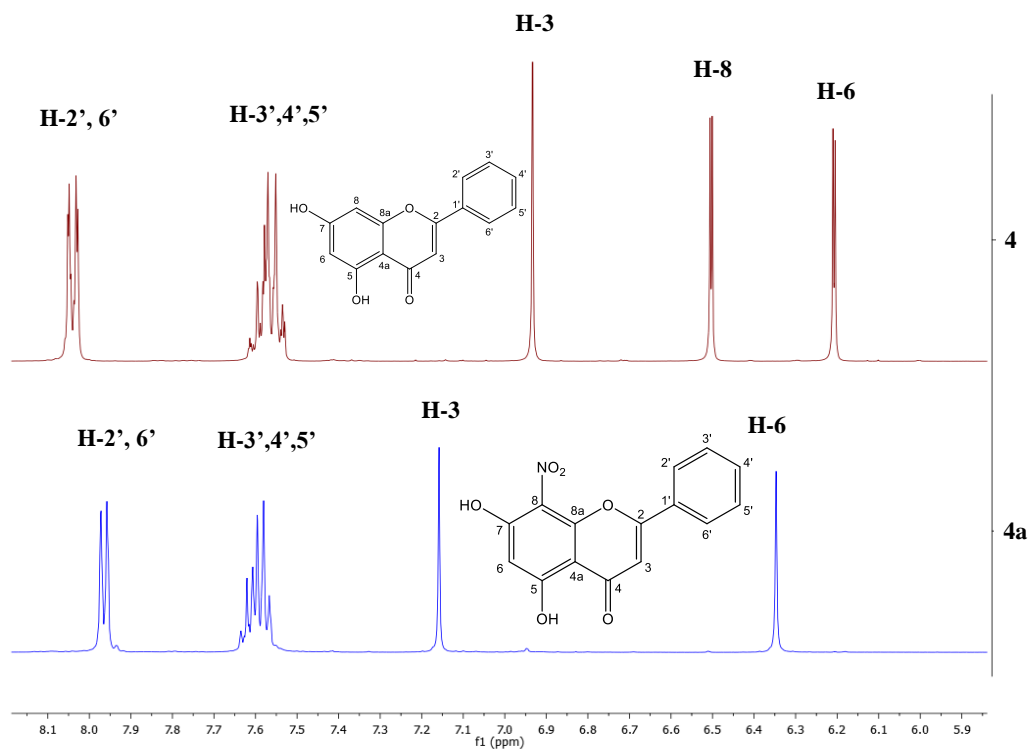
Para identificar el lugar donde se llevó a cabo la sustitución se realizaron experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y experimentos en dos dimensiones COSY, HSQC y HMBC tanto de la materia prima (**4**) como del derivado **4a**. A continuación se describen algunos desplazamientos de la zona aromática del compuesto **4** y el derivado **4a**.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **4** se presentan dos dobletes en  $\delta_{\text{H}}$  6.2 y 6.5 ppm correspondientes a H-6 y H-8, respectivamente, con  $J \approx 2.1$  Hz para cada doblete atribuido a un acoplamiento *meta* entre H-6 y H-8. En  $\delta_{\text{H}}$  6.93 ppm se encuentra un singulete correspondiente a H-3. En  $\delta_{\text{H}} = 7.57$  ppm se observa un multiplete que incluye las señales de H-3', H-4' y H-5' y en  $\delta_{\text{H}}$  8.04 ppm se presenta un multiplete que incluye las señales de H-2' y H-6'.

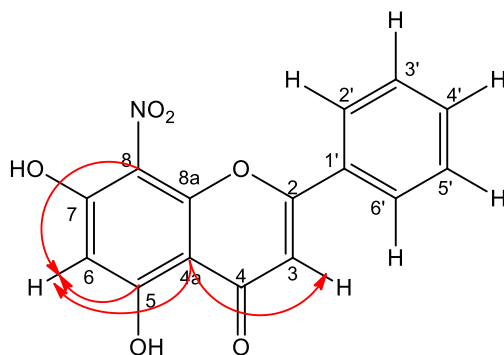
En la Figura 21 se muestran los espectros apilados de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **4** y el derivado **4a**. Comparando ambos espectros para el derivado **4a** se aprecia la desaparición del doblete en  $\delta_{\text{H}}$  6.50 ppm correspondiente a H-8 y la señal correspondiente a H-6 pasó de ser un doblete, con una constante de acoplamiento de 2.08 Hz, a un singulete desplazado a 6.35 ppm lo cual sugiere una sustitución en el anillo A en C-8. Los protones H-3 y H-6 (en  $\delta_{\text{H}}$  7.16 y 6.35 ppm respectivamente) sufrieron un desplazamiento a campo más bajo por efecto desprotector del grupo sustituyente nitro; los protones del anillo B se vieron menos afectados en sus desplazamientos.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **4** y **4a** se observa una señal para C-2' y C-6' (en  $\delta_{\text{C}}$  126.4 ppm), de igual forma ocurre para C-5' y C-3' representados por una señal en  $\delta_{\text{C}}$  129.3 debido a la equivalencia de estos carbonos.

Experimentos de RMN en dos dimensiones, HMBC, HSQC y COSY permitieron establecer la posición de sustitución al encontrarse correlación a tres enlaces de distancia del C-8 con el H-6, pero el C-6 no correlaciona con ningún protón; sin embargo, existe correlación a dos y tres enlaces de distancia de C-5 y C-4a con H-6 respectivamente. Adicionalmente para el anillo B se observan las correlaciones a tres enlaces de distancia entre C-4' con H-2' y H-6', C-1' con H-3' y H-5' y C-2 con H-2', H-6' y H-3. En la Figura 22 se muestran las correlaciones antes mencionadas para el anillo A confirmando la sustitución en C-8.



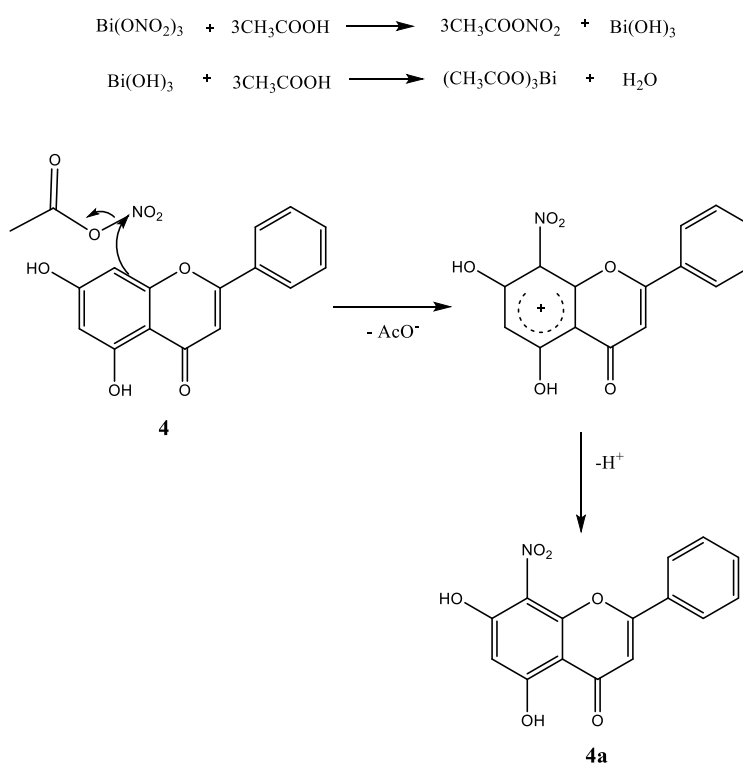
**Figura 21.** Espectros apilados de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **4** y el nitroderivado **4a**.



**Figura 22.** Correlaciones observadas en el anillo A a través de experimentos de HMBC del derivado **4a**.

Experimentos adicionales de EM de baja resolución, por la técnica de IE+, y EM de alta resolución, por DART+, arrojaron una relación masa carga de 299 para el ion molecular  $[\text{M}]^+$  y una fórmula molecular de  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{NO}_6$  para el ion  $[\text{M}+\text{H}]^+$  con relación masa carga de 300.05, respectivamente, siendo estos valores de masa y fórmula molecular esperados para el derivado **4a**.

El mecanismo de reacción que se propone para la obtención del compuesto **4a** es a través de la formación del nitrato de acetilo el cual actúa como agente nitrante y se sigue de una sustitución electrofílica aromática en el anillo A en C-8 por ser el anillo aromático más activado debido a la presencia de dos grupos hidroxilo en C-5 y C-7 y finalmente la pérdida de un protón para recuperar la aromaticidad del anillo A. En el Esquema 16 se representa el mecanismo de reacción propuesto para la formación del compuesto **4a**.



**Esquema 16.** Propuesta del mecanismo de reacción de nitración del compuesto **4**.

A pesar de la similitud en la estructura base de los compuestos **1-4** cada tipo de flavonoide requirió diversas condiciones de reacción de nitración. La variable a la que se pueden atribuir la diferencia en reactividad de cada compuesto es por el patrón de hidroxilación en el anillo A y B pues estos grupos hidroxilo influyen en el potencial redox del flavonoide haciéndolo más o menos susceptible a condiciones ácidas y oxidantes. Por ejemplo, el compuesto **3** que presenta un grupo catecol es el que tienen el potencial redox más bajo y se oxida con mayor facilidad ante condiciones ácidas y en presencia de metales oxidantes generando productos no deseados.

La selectividad de la reacción de nitración que se observó para todos los compuestos fue *orto* a un grupo hidroxilo por tratarse, este último, de un grupo activante. Adicionalmente la nitración se llevó, en la mayoría de los casos, en el anillo B esto se puede deber al libre giro que éste tiene en comparación con el anillo aromático A, lo que le da mayor probabilidad de reaccionar con la especie nitrante.

La *O*-glicosilación en los compuestos **1** y **2** no influyó en la nitración del anillo B, pero si influyó en la reactividad; si se compara la estructura del compuesto **2** con la del compuesto **3** la única diferencia es la *O*-glicosilación en C-3, hecho determinante para que el compuesto **3** fuera más reactivo ante la presencia de metales y medio ácido lo cual se puede relacionar con los potenciales redox de estos flavonoides. De acuerdo a investigaciones de Pietta<sup>10</sup>, el potencial ( $E_7$ ) para la quercetina (**3**) y rutina (**2**) son de 0.33 y 0.6 V, respectivamente, lo que significa que entre más bajo sea el potencial redox, el flavonoide es un reductor más fuerte capaz de donar con mayor facilidad un electrón o átomo de hidrógeno. En este sentido la quercetina (**3**) resulta un reductor más fuerte que rutina (**2**) y esto explica que se favorezca la formación de radicales libres en lugar de la reacción de nitración cuando el compuesto **3** se pone en contacto con el nitrato de bismuto.

## 9.2 Actividad biológica

Con fin de evaluar la existencia de un cambio de actividad biológica entre los flavonoides (**1-4**) y sus nitroderivados (**1a, 1b, 2a, 3a y 4a**) se procedió a realizar pruebas de actividad antioxidante, anti-inflamatoria, antibacteriana y de citotoxicidad, las cuales se presentan a continuación.

### 9.2.1 Actividad antioxidante

Los flavonoides, en su mayoría, presentan actividad antioxidante y características estructurales como la presencia de un grupo catecol en el anillo B, la insaturación entre C-2 y C-3 y un grupo hidroxilo en la posición C-3 favorecen la capacidad captadora de radicales libres. En la Tabla 8 se presentan los porcentajes de inhibición del radical DPPH a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . Se utilizó esta concentración debido a que la actividad de los compuestos **1, 1a, 1b, 4 y 4a** es baja y la evaluación de su actividad en concentraciones menores presenta mayor variabilidad en los resultados.

**Tabla 8.** Evaluación de actividad antioxidante por inhibición del radical DPPH

Compuesto	% de Inhibición del radical DPPH (%)	Concentración del compuesto
<b>1</b>	2.0 $\pm$ 0.3*	100 $\mu\text{M}$
<b>1a</b>	0.5 $\pm$ 0.3*	100 $\mu\text{M}$
<b>1b</b>	5.7 $\pm$ 0.6 *	100 $\mu\text{M}$
<b>2</b>	90.4 $\pm$ 0.3**	100 $\mu\text{M}$
<b>2a</b>	15.9 $\pm$ 0.8**	100 $\mu\text{M}$
<b>4</b>	1.4 $\pm$ 0.1***	100 $\mu\text{M}$
<b>4a</b>	2.8 $\pm$ 0.3***	100 $\mu\text{M}$

Los valores están expresados en el promedio de 4 experimentos independientes  $\pm$  error estándar de la media. Los resultados se analizaron mediante Análisis de Varianza y una prueba de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$  (\*) se consideraron como diferencia significativa.

Los valores están expresados en el promedio de 4 experimentos independientes  $\pm$  error estándar de la media. Los resultados se analizaron por t-student con  $p < 0.05$  se consideran con diferencia significativa entre los compuestos (\*\*) **2** y **2a** y (\*\*\*) **4** y **4a**.

Estos resultados indican que la introducción de un grupo nitro a las estructuras de los flavonoides **1, 2 y 4** produjo un cambio significativo en su actividad antioxidante siendo estos resultados más visibles

para el flavonoide **2**, el cual originalmente presenta una alta actividad captadora del radical DPPH, de 90.4%, y con la introducción de grupos nitro en su estructura su actividad disminuye aproximadamente a una sexta parte. En el caso de los flavonoides **1**, **4** y sus derivados **1a**, **1b** y **4a** la actividad captadora del radical DPPH es baja y se observa que para el derivado *orto* mononitrado, **1a**, disminuye; sin embargo, para el derivado *orto* dinitrado, **1b**, aumenta su actividad al doble en comparación con el flavonoide **1**. Lo mismo sucede con el derivado mononitrado **4a** en donde su actividad aumenta al doble con respecto al flavonoide **4** resaltando que la sustitución electrofílica aromática del compuesto **4** ocurrió en el anillo aromático A.

Para el compuesto **3** se realizaron pruebas preliminares de actividad antioxidante; sin embargo, mostraron un porcentaje de inhibición del radical DPPH muy similar, tanto para el compuesto **3** como para el derivado **3a** a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , pero a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  se observa una disminución de la actividad antioxidante para el derivado **3a**. Es por ello que se decidió determinar la  $\text{CI}_{50}$  para determinar con mayor claridad el efecto de la introducción del grupo nitro en el anillo aromático B. En la Tabla 9 se muestran los porcentajes de inhibición del radical DPPH a concentraciones de 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  y las concentraciones de los compuestos **3** y **3a** que inhiben al 50% el radical DPPH. Los valores de  $\text{CI}_{50}$  presentan diferencia significativa, por lo tanto, existe una disminución de actividad antioxidante del derivado **3a** con respecto al flavonoide **3**.

**Tabla 9.** Porcentaje de inhibición del radical DPPH por el flavonoide **3** y el derivado **3a** a diferentes concentraciones

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Inhibición del radical DPPH (%)	
	<b>3</b>	<b>3a</b>
<b>1</b>	10.36	7.19
<b>10</b>	61.61	37.40
<b>100</b>	95.26	96.77
<b>CI<sub>50</sub></b>	15.16 $\pm$ 0.56*	10.19 $\pm$ 0.05*

El valor de  $\text{CI}_{50}$  es resultado de tres curvas patrón. Los datos se analizaron por una prueba de t-student, los valores con  $p \leq 0.001$  (\*) presentaron diferencia significativa.

En términos generales la tendencia es la disminución de la capacidad captadora del radical DPPH, cuando se introduce grupos nitro en las estructuras de los flavonoides que inicialmente presentan buena actividad. Para los compuestos **1** y **4** que inicialmente no presentaron buena capacidad captadora del radical DPPH y aunque la introducción de un grupo nitro generó un aumento en su

capacidad captadora de este radical en los compuestos **4a** y **1b**, no fue lo suficiente para considerarlos activos.

### 9.2.2 Actividad antimicrobiana

La evaluación antimicrobiana de los compuestos **1**, **2**, **3**, y **4** y sus derivados **1a**, **1b**, **2a**, **3a** y **4a** se realizó de manera cualitativa por el método de difusión en agar de Kirby-Baier, en el cual se observa la susceptibilidad de las bacterias ante la presencia de compuestos con potencial en actividad antibacteriana al formarse un halo de inhibición alrededor de un disco impregnado con el compuesto de interés. En esta prueba se probó la susceptibilidad de dos bacterias gram positivas, *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*, y dos bacterias gram negativas, *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* colocando discos con 2 µg de los compuestos y sus derivados. Se utilizó cloranfenicol como control positivo.

En la Tabla 10 se muestra que el compuesto **1** y los derivados **1a** y **1b** no presentaron actividad contra las bacterias gram positivas; sin embargo, los derivados **1a** y **1b** inhibieron a *E. coli* aproximadamente a la mitad en comparación con el cloranfenicol y los compuestos **1** y **1b** inhibieron el crecimiento de *V. cholerae* en 52 y 65% con respecto al cloranfenicol. En esta serie de compuestos (**1-1b**) no se observó efecto de la introducción de grupos nitro en la estructura del compuesto **1** en la actividad antimicrobiana.

En el caso del compuesto **2** que inicialmente no presentó actividad antimicrobiana contra las bacterias gram positivas el derivado **2a** sí tuvo actividad contra estas bacterias; de esta forma, para *S. mutans* el derivado **2a** presentó 83% de actividad y para *S. aureus* 85% con respecto al cloranfenicol. Para las bacterias *E. coli* y *V. cholerae* el compuesto **2** y **2a** presentaron aproximadamente un 50 % de actividad con respecto al cloranfenicol.

Los compuestos **3** y **4** no presentaron actividad antimicrobiana contra las bacterias gram positivas y *E. coli*; sin embargo, sus derivados **3a** y **4a** resultaron activos contra estas bacterias. De esta forma el derivado **3a** presentó 39, 67 y 53% de actividad antimicrobiana contra las bacterias *S. mutans*, *S. aureus* y *E. coli* respectivamente en comparación con el cloranfenicol y el derivado **4a** presentó 53, 78, y 55% de actividad antimicrobiana contra las bacterias *S. mutans*, *S. aureus* y *E. coli* respectivamente en comparación con la actividad antimicrobiana que presentó el cloranfenicol.



**Tabla 10.** Evaluación de actividad antimicrobiana de los compuestos **1-4** y sus nitroderivados

Halos de inhibición* (mm)				
Compuesto	Gram positivas		Gram negativas	
	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<b>Cloranfenicol</b>	16.33 ± 0.58	9.00± 1.00	12.67 ± 0.58	13.33 ± 0.58
<b>1</b>	NA	NA	7.00 ± 0.00	7.00 ± 0.58
<b>1a</b>	NA	NA	6.00 ± 0.00	NA
<b>1b</b>	NA	NA	7.00 ± 0.00	8.67± 0.00
<b>2</b>	NA	NA	6.00± 0.00	7.00 ± 0.00
<b>2a</b>	13.70 ± 0.58	7.67 ± 0.58	7.00 ± 0.58	7.00 ± 0.00
<b>3</b>	NA	NA	NA	7.00 ± 0.00
<b>3a</b>	6.33 ± 0.58	6.00± 0.00	6.67 ± 0.58	6.00 ± 0.00
<b>4</b>	NA	NA	NA	7.00 ± 0.00
<b>4a</b>	10.30 ± 0.58	7.00± 0.00	7.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00

\*Los valores representan la longitud promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición ± la desviación estándar (n=3)

En resumen, la introducción del grupo nitro en el anillo A o B en los compuestos **2, 3 y 4** tuvo efecto al ampliar la actividad antimicrobiana contra bacterias gram positivas, *S. mutans* y *S. aureus*, y contra *E.coli*.

### 9.2.3 Actividad anti-inflamatoria

La actividad anti-inflamatoria se evaluó por la prueba de edema en oreja de ratón inducido por TPA con el fin de observar algún cambio de actividad de los compuestos **1**, **2**, **3** y **4** y sus derivados **1a**, **1b**, **2a**, **3a** y **4a** los cuales se administraron de manera tópica en una concentración de 1  $\mu\text{mol}$ /oreja. En los resultados mostrados en la Tabla 11 se comparan el edema producido en el ratón por TPA+disolvente (control) y el edema después del tratamiento con los compuestos (**1-4**) y sus derivados incluyendo la comparación entre los dos últimos.

El compuesto **1** no presentó diferencia significativa con el control lo que significa que no inhibió la inflamación; sin embargo, los derivados **1a** y **1b**, sí presentaron actividad anti-inflamatoria al presentar 26.1 y 20.9 % de inhibición del edema, respectivamente, por lo tanto, la presencia de grupos nitro en la estructura de estos derivados incrementaron significativamente la actividad anti-inflamatoria del compuesto **1**.

El compuesto **2** presentó actividad anti-inflamatoria al inhibir el edema 17.1% y el derivado **2a** inhibió 98.8%, esto indica que el complejo de silicio que se formó con el derivado 2',5',6'- trinitrorutina disminuyó significativamente el edema en comparación con el compuesto **2**; por tanto, la introducción de grupos nitro en el anillo B y la formación del complejo de silicio mejoró la actividad anti-inflamatoria.

Para los compuestos **3** y **4**, aunque inicialmente presentaron actividad anti-inflamatoria, la introducción del grupo nitro en el anillo B y A, respectivamente, no produjo algún cambio en la inhibición del edema en los nitroderivados **3a** y **4a**.

En general, los flavonoides *O*-glicosilados incrementaron su actividad anti-inflamatoria con la introducción de grupos nitro en su estructura; sin embargo, los compuestos **3a** y **4a** presentaron la misma actividad que los compuestos de los cuales derivan (**3** y **4**). Por lo tanto, la presencia de los disacáridos y los grupos nitro en el anillo B parecen ser importantes para mejorar la actividad anti-inflamatoria en el modelo evaluado.

**Tabla 11.** Evaluación de actividad anti-inflamatoria de los compuestos **1-4** y sus nitroderivados por el modelo de edema en oreja de ratón inducido por TPA

Muestra	Dosis	Edema (mg)	Inhibición (%)
<b>Control (TPA+ Metanol)</b>		16.88 ± 0.26	
<b>1</b>	1 µmol/oreja	15.43 ± 0.62 ++	<b>8.6</b>
<b>1a</b>	1 µmol/oreja	12.47 ± 0.44*, ++	<b>26.1</b>
<b>1b</b>	1 µmol/oreja	13.35 ± 0.50*, ++	<b>20.9</b>
<b>2</b>	1 µmol/oreja	14.00 ± 0.49*,●	<b>17.1</b>
<b>2a</b>	1 µmol/oreja	0.20 ± 0.08*●	<b>98.8</b>
<b>Control (TPA+ Metanol)</b>		16.88 ± 0.26	
<b>3</b>	1 µmol/oreja	12.10 ± 0.46*	<b>28.3</b>
<b>3a</b>	1 µmol/oreja	11.83 ± 0.38*	<b>29.9</b>
<b>Control (TPA+CHCl<sub>3</sub>)</b>		15.83 ± 0.26	
<b>4</b>	1 µmol/oreja	12.93 ± 0.38*	<b>23.0</b>
<b>4a</b>	1 µmol/oreja	12.20 ± 0.67*	<b>18.3</b>

Los datos representan el promedio de tres animales ± el error estándar de la media. Los resultados se analizaron mediante ANOVA y una prueba de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$  (\*) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control, los valores de  $p \leq 0.05$  (++) se consideraron como diferencia significativa entre los compuestos **1** y **1a**, **1** y **1b** y los valores  $p \leq 0.05$  (●) se considera como diferencia significativa entre los compuestos **2** y **2a**.

#### 9.2.4 Actividad citotóxica

La actividad citotóxica se evaluó a través de una prueba preliminar utilizando el ensayo de unión a proteínas con el colorante sufrorodamina B. La concentración de los compuestos fue de 50 µM y se evaluaron en las líneas celulares cancerosas humanas U-251, PC-3, K-562, HCT-15, MFC-7 y SKLU-1. Los valores presentados en la Tabla 12 son el promedio de un experimento realizado por triplicado.

Esta prueba preliminar de actividad citotóxica realizada para los flavonoides **1**, **2**, **3** y **4** y los derivados, **1a**, **1b**, **2a**, **3a** y **4a**, permitió observar que la nitración produjo un cambio al incrementar la actividad citotóxica en los derivados **3a** y **4a**.

En la Tabla 12 los flavonoides **1** y **2** y sus respectivos derivados, **1a** y **2a**, no presentaron actividad citotóxica importante pues los porcentajes de inhibición de crecimiento celular no superan el 50%. Sin embargo, el compuesto **1b** presentó 60.2% de actividad de inhibición de proliferación en la línea celular K-562.

Aunque el compuesto **3** presentó actividad citotóxica importante para la línea celular K562 con 66.5% de inhibición de proliferación celular, la nitración del compuesto **3** en la posición C-5' del anillo B provocó un incremento en su actividad frente a las líneas celulares U-251, PC-3, K562, HCT-15 y MCF-7 presentando entre 51.5% y 86.8% de inhibición de proliferación celular. De manera similar, el compuesto **4** no presentó actividad citotóxica importante para ninguna línea celular; sin embargo, el derivado **4a** incrementó el porcentaje de inhibición de proliferación para las líneas celulares U-251, K562, MCF-7 y SKLU-1 con valores entre 55.1 y 99.7%.

**Tabla 12.** Evaluación de actividad inhibitoria de proliferación celular de los compuestos **1-4** y sus nitroderivados

<b>% de inhibición de proliferación celular en líneas cancerosas humanas</b>						
<b>Compuestos</b>	<b>U-251</b>	<b>PC-3</b>	<b>K562</b>	<b>HCT-15</b>	<b>MCF-7</b>	<b>SKLU-1</b>
<b>1</b>	1.1	1.2	17.7	23.7	11.4	NC
<b>1a</b>	NC	2.7	1.1	22.4	32.7	NC
<b>1b</b>	1.03	5.85	<b>60.2</b>	0.7	16.7	10.6
<b>2</b>	NC	NC	14.6	16.7	7.1	1
<b>2a</b>	NC	NC	2.3	16.3	18.8	NC
<b>3</b>	46.1	NC	<b>66.5</b>	24.7	35.4	49.2
<b>3a</b>	<b>86.8</b>	<b>65.0</b>	<b>83.2</b>	<b>54.7</b>	<b>51.5</b>	25.4
<b>4</b>	37.0	NC	5.2	17.0	16.7	39.4
<b>4a</b>	<b>99.7</b>	24.2	<b>62.8</b>	7.22	<b>55.1</b>	<b>73.6</b>

Concentración: 50  $\mu$ M vehículo DMSO. U251= glía de sistema nervioso central, PC-3= próstata, K562= leucemia, HCT-15= colon, MCF-7= mama, SKLU= pulmón. NC= no citotóxico

En términos generales, los flavonoides *O*-glicosilados, **1** y **2**, y sus derivados, **1a** y **2a**, no presentaron actividad citotóxica importante para las líneas celulares evaluadas, a excepción del compuesto **1b** el cual presentó actividad citotóxica contra la línea celular K562.

El compuesto **3** presentó actividad citotóxica importante para la línea celular K562 y la introducción de un grupo nitro en la posición C-5' del anillo B incrementó su actividad citotóxica, por lo tanto, la presencia de un grupo hidroxilo en la posición C-3 y un grupo nitro en la posición C-5' resultaron importantes para incrementar su actividad citotóxica en las líneas celulares U-251, K562, MCF-7 y SKLU-1.

La introducción de un grupo nitro en la posición C-8 del anillo A en el flavonoide **4** resultó importante para incrementar la actividad citotóxica, en especial, para la línea celular U-251 para la cual presentó 99.7% de inhibición de proliferación celular.

En resumen, la introducción de grupos nitro al compuesto **1** fue importante para incrementar su capacidad anti-inflamatoria. De manera similar la nitración en el anillo B en el compuesto **2**, produjo un incremento importante de actividad anti-inflamatoria al inhibir el 99.8% del edema; además, esta modificación también permitió que el derivado **2a** ampliara su actividad antimicrobiana contra las bacterias gram positivas, pero, le provocara una disminución de su capacidad captadora del radical DPPH.

En el caso del compuesto **3** la nitración resultó importante para incrementar su actividad citotóxica contra líneas celulares U-251, PC-3, K562, HCT-15 y MCF-7 presentando entre 51.5% y 86.8%; la modificación también incrementó su espectro de actividad antimicrobiana contra las bacterias gram positivas y *E. coli*.

De manera similar que el compuesto **3**, la introducción de un grupo nitro en el anillo A en el compuesto **4**, resultó importante para aumentar su actividad citotóxica contra las líneas celulares U-251, K562, MCF-7 y SKLU-1 con porcentajes de inhibición de proliferación celular entre 55.1 y 99.7%; también se incrementó su espectro de acción antimicrobiana contra bacterias gram positivas y *E. coli*.

## 10. CONCLUSIONES

- Se logró la nitración de los flavonoides naringina (**1**), rutina (**2**), quercetina (**3**) y crisina (**4**) y la evaluación preliminar de la actividad antioxidante, anti-inflamatoria, antibacteriana y citotóxica de los flavonoides y sus nitroderivados: 3'-nitro naringina (**1a**), 3',5'-dinitronaringina (**1b**), complejo de silicio con 2',5',6'-trinitrorutina (**2a**), 5'-nitro quercetina (**3a**) y 8-nitrocrisina (**4a**).
- El número y disposición de los grupos hidroxilos en el anillo B y la *O*-glicosilación fueron factores estructurales que influyeron en la reactividad de cada flavonoide y en el establecimiento de las condiciones de reacción de nitración.
- La mejor condición de nitración para el compuesto **1** y **2** fue con sólidos ácidos y nitrato de bismuto. En estas condiciones de nitración la acidez de Brønsted y la interacción del nitrato de bismuto con la superficie de los sólidos fueron importantes para la formación del ion nitronio y la proporción de los productos **1a** y **1b**. La presencia de un grupo catecol en el anillo B condujo a la trinitración del compuesto **2** lo que favoreció la formación de un complejo con silicio.
- El compuesto **3** resultó lábil a condiciones ácidas y a la presencia de nitratos metálicos. La nitración con una mezcla de gases NO<sub>x</sub> resultó favorable para la obtención del producto **3a**.
- El compuesto **4** al no presentar grupos hidroxilos en el anillo B la nitración ocurrió en el anillo A bajo condiciones ácidas y nitrato de bismuto.
- La introducción del grupo nitro en las estructuras aromáticas de los flavonoides **1**, **2**, **3** y **4** produjo un cambio en la actividad biológica. Para los compuestos **1** y **4** la presencia del grupo nitro no resultó importante para que sus nitroderivados incrementaran su actividad antioxidante de manera considerable y para los compuestos **2** y **3** la presencia de grupos nitro en el anillo B provocó una disminución de su actividad antioxidante.
- Los nitroderivados **1a**, **1b** y **2a** presentaron mayor actividad anti-inflamatoria que los compuestos **1** y **2**. Los derivados **2a**, **3a** y **4a** ampliaron su actividad antimicrobiana contra

bacterias gram positivas y *E. coli* y los compuestos **3a** y **4a** incrementaron la actividad citotóxica contra líneas celulares cancerosas humanas.

- La *O*-glicosilación y grupos nitro en el anillo B de la estructura base de los flavonoides, resultó importante para incrementar la actividad anti-inflamatoria. Para las agliconas la introducción de un grupo nitro en el anillo A o B resultó importante para incrementar su actividad antibacteriana y citotóxica.

## 11. SECCIÓN EXPERIMENTAL

### 11.1 Aspectos generales

Los compuestos **1-4**, el THF, MNT-KFS 20-40 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>, el ácido acético glacial y el nitrato de bismuto pentahidratado fueron adquiridos en Sigma-Aldrich; los reactivos y disolvente se utilizaron directamente del envase. Los disolventes como metanol y acetato de etilo utilizados en la purificación de los compuestos fueron destilados previamente. El gel de sílice que se utilizó para las reacciones de nitración fue de malla 40-240 y se utilizó directamente del envase.

La purificación por cromatografía en columna abierta se llevó a cabo con gel de sílice malla 40-240. Las fracciones obtenidas de la columna y las reacciones de nitración fueron monitoreadas por cromatografía en capa fina (en cromatofolios ALUGRAM® Xtra SIL G/UV<sub>254</sub> de 0.2 mm de espesor), visualizando en lámpara de ultravioleta y se utilizó revelador de flavonoides (solución de ácido de difenilbórico-2-aminoetil éster al 1% en MeOH).

Los espectros de RMN se adquirieron en equipos Varian Inova 500 MHz, Bruker Avance III a 400 MHz y Bruker Avance 300 MHz; los desplazamientos químicos se reportan en ppm referenciados con el disolvente. Los espectros de IR se realizaron en un equipo FT-IR Bruker Tensor 750.

La espectrometría de masas se llevó a cabo en un Espectrómetro de masas, The MStation JMS-700 y Espectrómetro de masas Jeol, The AccuTOF JMS-T100LC.

Los cromatogramas fueron obtenidos en un equipo Agilent 1200 Series Binary SL con una columna Synergi 4u Polar-RP 80a 150 x 2.0 mm con un flujo de 0.2 ml/min utilizando como eluyente MeOH:H<sub>2</sub>O 1% ácido acético (inicial 40:60 y final 100:0) y los espectros de masas fueron adquiridas por un espectrómetro de masas Bruker Esquire 6000.

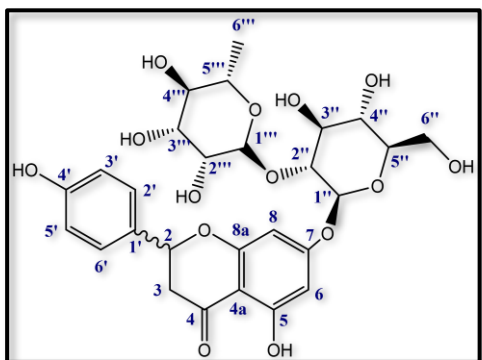
Los espectros de RPE fueron adquiridos en un Espectrómetro Jeol JES-TE300. Los puntos de fusión fueron tomados con un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

La actividad antioxidante y anti-inflamatoria se realizaron por el M. en C. Antonio Nieto Camacho en el Instituto de Química. La evaluación de actividad citotóxica fue realizada por la M. en C. Teresa Ramírez Apan en el Instituto de Química y la evaluación de actividad antibacteriana fue realizada por la Dra. María Margarita Canales Martínez en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. La metodología empleada para cada evaluación se describe más adelante.



## 11.2 Obtención de compuestos nitrados

### Nitración de Naringina (1)



**1**

En un matraz de bola se colocó 1 mmol de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.408 g), se adicionó 10 ml de THF y se mantuvo en agitación, bajo calentamiento a 40 °C, hasta lograr su disolución; posteriormente, se adicionó 500 mg de arcilla: MNT-KFS, tonsil, o gel de sílice manteniendo la agitación hasta su total incorporación finalmente se adicionó 1 mmol de compuesto **1** (0.580 g) y se mantuvo en agitación a 40 °C hasta por 4 h. La

reacción se monitoreó realizando cromatografía en capa fina cada media hora utilizando un sistema de elución conformado por AcOEt, MeOH y agua en una proporción 7.7:1.3:1 respectivamente. Las placas se revelaron con una disolución de borato de 2-aminoetil difenilo al 1% en MeOH y se observaron bajo luz natural. El compuesto **1** y el derivado **1a** presentaron el mismo factor de retención; sin embargo, los compuestos nitrados presentaron una coloración anaranjada bajo luz natural al ser revelados con la disolución antes mencionada. La mezcla de reacción se filtró a gravedad y la arcilla o gel de sílice se extrajo con 20 ml de MeOH, se evaporó el disolvente y la mezcla de reacción se separó por cromatografía en columna abierta comenzando AcOEt e incrementando la polaridad hasta una proporción 90:10 AcOEt:MeOH. Los productos nitrados precipitaron conforme se evaporó el disolvente. El derivado **1a** se presentó como un polvo amarillo claro y el **1b** como un polvo color marrón.

#### - Naringina (1)

Descripción: polvo amarillo claro, soluble en MeOH y DMSO. Punto de fusión: 166 °C

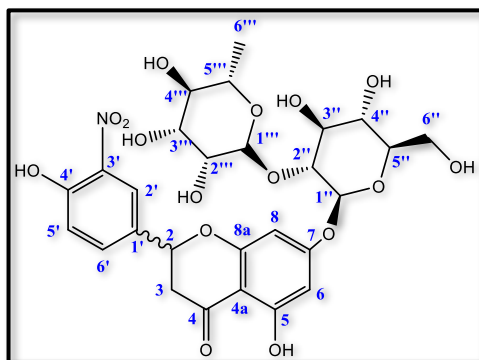
**NMR  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta$ (ppm)** 2.76 (1H, 2dd,  $J = 17.2, 2.72$  Hz, H-3ec), 3.18 (1H, 2dd,  $J = 17.2, 2.9$  Hz, H-3ax), 5.38 (1H, dt,  $J = 12.8, 2.3$  Hz, H-2), 6.17 (1H, d,  $J = 2.26$ , H-6), 6.19 (1H, d,  $J = 2.24$  Hz, H-8), 6.83 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-3',5'), 7.33 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-2',6'). Glucosa 5.11 (1H, t,  $J = 7.3$  Hz, H-1''). Rannosa 1.30 (6H d,  $J = 6.3$  Hz, 6'''), 5.26 (1H, 2d,  $J = 1.5$  Hz, 1''').

**NMR  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta$ (ppm)** 43.95, 44.15 (C-3), 80.67, 80.71 (C-2), 96.74 (C-8), 97.84 (C-6), 104.90 (C-4a), 116.33 (C-3',5'), 129.16, 129.10 (C-2',6'), 130.83, 130.75 (C-1'), 159.10 (C-4'), 164.65 (C-8a), 164.98 (C-5), 166.57 (C-7), 198.53 (C-4). Glucosa 62.25 (C-6''), 72.16 (C-4''),

78.10 (C-5'), 78.94, 79.02 (C-3'), 79.17 (C-2'), 99.32, 99.37 (C-1'). Ramnosa 18.22 (C-6''), 69.98 (C-5''), 71.21 (C-3''), 72.16 (C-2''), 73.90 (C-4''), 102.57, 102.51 (C-1'').

EM (ESI -)  $m/z$  579.6 [M-H]<sup>-</sup>

- 3'-nitronaringina (1a)



**1a**

Ramnosa 5.10 (1-H, 2d,  $J = 1.4$  Hz, H-1''), 1.15 (3H, 2d,  $J = 6.3$  Hz, H-6'').

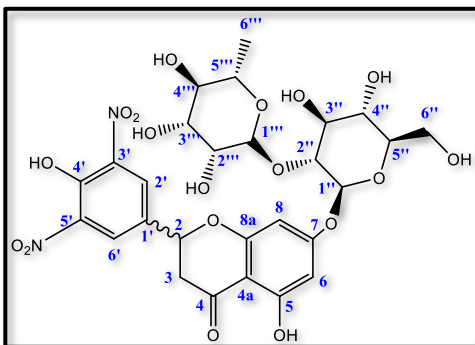
Descripción: Sólido amarillo claro, soluble en MeOH y DMSO. Punto de fusión: 166-167°C.

NMR <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ(ppm) 2.80(1H, 2dd,  $J = 17.14, 2.98$  Hz, H-3 ec), 5.65 (1H, td,  $J = 13.22, 2.88$  Hz, H-2), 6.11 (1H, 2d,  $J = 2.2$  Hz, H-6), 6.16 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 7.20 (1H, 2d,  $J = 8.56$  Hz, H-5'), 7.71 (1H, 2dd,  $J = 8.86, 2.23$  Hz, H-6'), 8.05 (1H, 2d,  $J = 2.2$  Hz, H-2'); Glucosa 5.15 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz, H-1'');

NMR <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO) δ(ppm) 41.90 (C-3), 77.41, 77.58 (C-2), 95.15 (C-8), 96.63 (C-6), 103.27 (C-4a), 119.39 (C-5'), 123.67, 123.84 (C-2'), 129.56, 129.44 (C-1'), 133.58, 133.67 (C-6'), 136.61 (C-3'), 152.2 (C-4'), 162.35, 162.48 (C-8a), 162.91 (C-5), 164.91, 164.76 (C-7), 196.56, 196.71 (C-4); Glucosa 60.45 (C-6'), 70.37 (C-4'), 76.89 (C-5'), 76.13 (C-3'), 77.41 (C-2'), 97.44, 97.29 (C-1'), Ramnosa 18.02 (C-6''), 68.27 (C-5''), 69.59 (C-3''), 70.48 (C-2''), 71.82 (C-4''), 100.39 (C-1'').

EM (ESI -)  $m/z$  624.1 [M-H]<sup>-</sup>

- 3',5'-dinitronaringina (1b)



**1b**

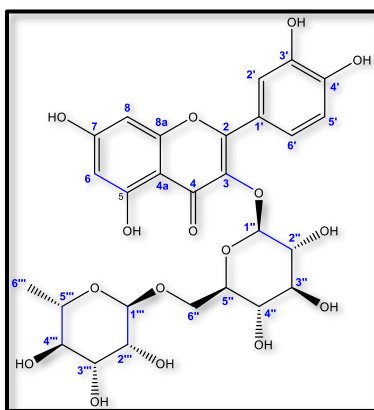
Descripción: sólido marrón, soluble en metanol.

NMR <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ(ppm) 2.66 (1H, 2dd,  $J = 17.26, 2.95$  Hz, H-3 ec), 5.42 (1H, 2dd,  $J = 18.3, 2.7$  Hz, H-2), 6.05, (1H, 2d,  $J = 1.93$  Hz, H-6), 6.12 (d,  $J = 2.3$  Hz, H-8), 7.96 (1H, s, H-2'), 7.97 (1H, s, H-6'). Glucosa 5.10 (1H d,  $J = 7.3$  Hz, H-1''); Ramnosa 5.09 (1H, 2d,  $J = 1.3$  Hz, H-1''), 1.14 (3H, 2d,  $J = 2.7$  Hz, H-6'')

**NMR  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO)  $\delta(\text{ppm})$**  197.42, 197.24 (C-4), 164.72, 167.87 (C-7), 162.97 (C-5), 162.80 (C-8a), 159.48 (C-4'), 142.88 (C-3'), 129.62 (C-6'), 129.44 (C-2'), 113.16 (C-1'), 103.27 (C-4a), 96.45 (C-6), 95.07 (C-8), 78.27, 78.04 (C-2), 41.71, 41.50 (C-3), Glucosa: 97.46, 97.28 (C-1''), 77.16 (C-5''), 76.86 (C-3''), 76.14 (C-2''), 69.80 (C-4''), 60.45 (C-6''), Ramnosa: 100.40 (C-1'''), 71.86 (C-4'''), 70.43 (C-2'''), 69.60 (C-3'''), 68.31 (C-5'''), 18.06 (C-6''').

**EM (ESI -)  $m/z$   $[\text{M}-\text{H}]^-$**  : 669.3

### Nitración de Rutina (2)



**2**

En un matraz de bola se colocó 1 mmol de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.408 g), se adicionó 10 ml de THF y se mantuvo en agitación, bajo calentamiento a 40 °C, hasta lograr su disolución; posteriormente, se adicionó 500 mg de arcilla: MNT-KFS, tonsil o gel de sílice manteniendo la agitación hasta su total incorporación finalmente se adicionó 1 mmol del compuesto **2** (0.610 g) y se mantuvo en agitación a 40 °C por 30 minutos. La reacción se monitoreó realizando cromatografía en capa fina cada 10 minutos utilizando un sistema de elución conformado por AcOEt, MeOH y  $\text{H}_2\text{O}$  en una proporción 7.5:1.5:1 respectivamente; el compuesto **2a** se observó como una mancha anaranjada bajo luz visible. La mezcla de reacción se filtró a gravedad y la arcilla o gel de sílice se extrajo con 20 ml de MeOH, se evaporó el disolvente y la mezcla de reacción se separó por cromatografía en placa preparativa empleando el mismo sistema de elución utilizado en cromatografía en capa fina.

#### - Rutina (2)

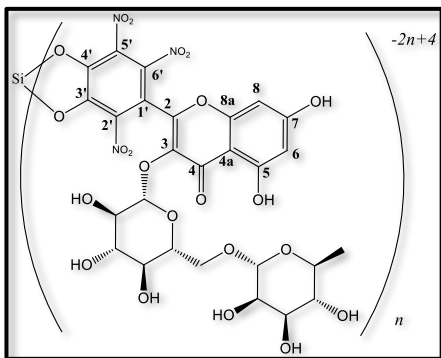
Sólido amarillo claro, soluble en MeOH, DMSO. Punto de fusión: 195 °C

**NMR  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm)** 12.58 (1H, s, 5-OH), 7.53 (2H, sobrepuesto, H-2' y H-6'), 6.83 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-5'), 6.37 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 6.18 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6). Glucosa 5.33 (1H, d,  $J = 7.4$ , H-1''), 0.98 (3H, d,  $J = 6.1$  Hz, H-6''),

**NMR  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm)** 177.39 (C-4), 164.08 (C-7), 161.24 (8a), 156.64 (C-5), 156.45 (C-2), 148.43 (C-4'), 144.77 (C-3'), 133.33 (C-3), 121.62 (C-6'), 121.20 (C-1'), 116.29 (C-2'),

115.25 (C-5'), 104.00 (C-4a), 101.20 (C-1''), 100.77 (C-1'''), 98.70 (C-6), 93.62 (C-8), 76.47 (C-3''), 75.94 (C-5''), 74.11 (C-2''), 71.88 (C-4'''), 70.59 (C-3'''), 70.40 (C-2'''), 70.04 (C-4''), 68.27 (C-5'''), 67.03 (C-6''), 17.76 (C-6''').

- **2',5',6' trinitro rutina (2a)**



**2a**

Sólido rojo, soluble en MeOH, H<sub>2</sub>O y DMSO.

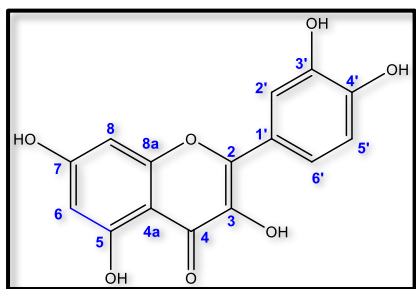
**NMR <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm)** 6.26 (1H, d, *J* = 2.2, H-8), 6.14 (1H, d, *J* = 2.2, H-6), 5.05 (1H, d, *J* = 7.15, H-1''), 4.46 (1H, s, H-1'''), 1.09 (1H, d, *J* = 6.5, H-6''').

**NMR <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO) δ (ppm)** 176.98 (C-4), 103.81 (C-4a), 101.08 (C-1''), 100.33 (C-1'''), 99.38 (C-6), 94.07 (C-8), 76.61 (C-3''), 76.07 (C-5''), 73.84 (C-2''),

72.15 (C-4'''), 70.64 (C-3'''), 70.20 (C-2'''), 69.80 (C-4''), 68.05 (C-5'''), 66.63 (C-6''), 17.88 (C-6''').

**IR (KBr) ν<sub>max</sub>** : 3359 (O-H), 2922 (C-H), 1654 (C=O), 1540 (N-O), 1051 (Si-O)

**Nitración de Quercetina (3)**



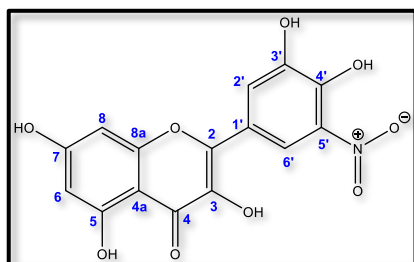
**3**

Se colocó 1 mmol del compuesto **3** (0.3030g) y 10 ml de THF en un matraz fondo redondo con entrada lateral conectada a un matraz erlenmeyer de 125 mL, con tapón horadado, a través de un puente de vidrio. La disolución del compuesto **3** en THF se mantuvo en agitación y con baño de hielo mientras se burbujeaba la mezcla de gases NO<sub>x</sub> formada por la adición de 0.4 ml de THF, gota a gota, a 0.8 ml de HNO<sub>3</sub> al 66%

contenido en el matraz de erlenmeyer con agitación magnética. El burbujeo de gases se mantuvo por aproximadamente 5 minutos, posteriormente se retiró la fuente de gases y se mantuvo en agitación por 20 minutos más. Se evaporó el THF a presión reducida y el sólido obtenido se sometió a

recristalización en MeOH obteniéndose un sólido anaranjado correspondiente al producto 5'-nitroquercetina (**3a**).

- **Quercetina (3)**



**3a**

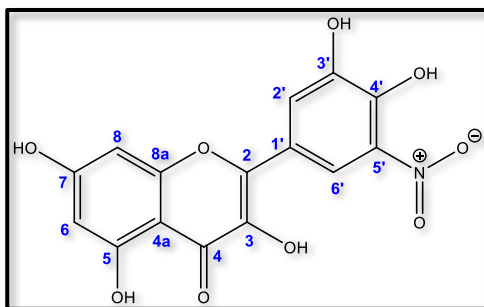
Descripción: sólido amarillo, soluble en MeOH, punto de fusión: > 290°C

**NMR <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm)** 7.7 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2'), 7.5 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, H-6'), 6.9 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 6.2 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6).

**NMR <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO) δ (ppm)** 175.88 (C-4), 163.91 (C-7), 160.76 (C-5), 156.18 (C-8a), 147.74 (C-4'), 146.85 (C-2), 145.10 (C-3'), 135.77 (C-3), 122.00 (C-1'), 120.04 (C-6'), 115.65 (C-5'), 115.10 (C-2'), 103.06 (C-4a), 98.23 (C-6), 93.41 (C-8).

**EM (IE+) *m/z*** 302 [M]

- **5'-nitroquercetina (3a)**



**3a**

Descripción: sólido anaranjado, soluble en AcOEt, punto de fusión > 290 °C.

**NMR <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm)** 8.20 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-6'), 7.91 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2'), 6.43 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6).

**NMR <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO) δ (ppm)** 176.03 (C-4), 164.28 (C-7), 160.80 (C-5), 156.19 (C-8a), 147.63 (C-3'), 144.01 (C-4'), 143.03 (C-2), 137.37 (C-5'), 136.98 (C-3), 121.27 (C-1'), 117.54 (C-2'), 114.64 (C-6'), 103.18 (C-4a), 98.42 (C-6), 93.53 (C-8).

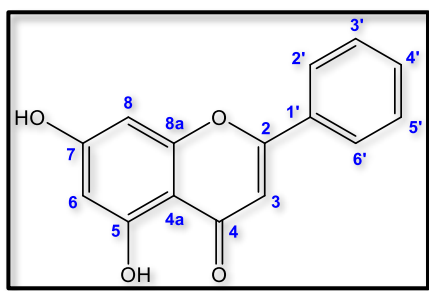
**EM (IE+) *m/z*** 347 [M]

**EMAR-IES *m/z*** 348.03577 [M+H]<sup>+</sup> (Calculado para C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>N<sub>1</sub>O<sub>9</sub> 348.03556)

## Nitración de Crisina (4)

En un matraz bola de 50 ml se disolvió 0.75 mmol de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.3640g) en 10 ml de ácido acético glacial a temperatura ambiente y una vez formada una suspensión se adicionó 1 mmol de crisina (0.2549 g). La mezcla se sometió a calentamiento a una temperatura de 40 °C con agitación por aproximadamente 8 minutos hasta observar la aparición de gases rojos; la mezcla de reacción se mantuvo en calentamiento por un 1 minuto más, posteriormente se retiró de la fuente de calentamiento y se colocó en baño de hielo, conservando la agitación hasta observar el cambio de color de la mezcla de reacción de color rojo a amarillo. Transcurrido este cambio se observó la precipitación de un sólido el cual se filtró y se sometió a extracción con 20 mL de agua a temperatura ambiente una ocasión seguida de dos extracciones sucesivas con 20 mL de MeOH caliente obteniéndose 163 mg de un sólido amarillo claro.

### - Crisina (4)



**4**

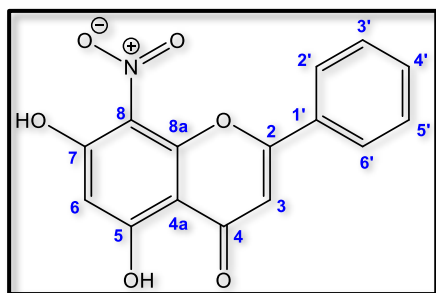
Sólido amarillo claro parcialmente soluble en AcOEt, MeOH y DMSO, Punto de fusión: 284-286 °C.

**NMR  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm)** 8.04 (2H, m, H-2', 6'), 7.57(3H, m, H-3', 4', 5'), 6.93 (1H, s, H-3), 6.50 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 6.21 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6).

**NMR  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm)** 181.84 (C-4), 164.41(C-7), 163.14 (C-2), 161.45 (C-5), 157.44 (8a), 131.97 (C-4'), 130.70 (C-1'), 129.10 (C-3', 5'), 126.38 (C-2', 6'), 105.16 (C-3), 103.96 (C-4a), 99.01 (C-6), 94.11 (C-8).

**EM (IE+)  $m/z$**  254 [M]

- **8-nitrocristina (4a)**



**4a**

Descripción: sólido amarillo, parcialmente soluble en AcOEt, MeOH y DMSO. Punto de fusión: > 290°C

**NMR <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm)** 7.96 (2H, m, H-2', 6'), 7.6 (3H, m, H-3', 5', 4'), 7.16 (1H, s, H-3), 6.35 (1H, s, H-6).

**NMR <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm)** 181.25 (C-4), 163.06 (C-2), 162.58 (C-5), 158.45 (C-7), 149.99 (C-8a), 132.49 (C-4'), 129.95 (C-1'), 129.29 (C-3', 5'), 126.35 (C-2', 6'), 121.68 (C-8), 105.95 (C-3), 102.89 (C-4a), 99.12 (C-6).

**EM (IE+) *m/z*** 299 [M]

**EMAR-IES *m/z*** 300.05121 [M+H]<sup>+</sup> (Calculado para C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>N<sub>1</sub>O<sub>6</sub> 300.05081)

### 11.3 Pruebas de actividad biológica

#### Actividad captadora del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

La capacidad antioxidante, de los flavonoides **1,2,3**, y **4** y sus derivados **1a**, **1b**, **2a**, **3a** y **4a**, se evaluó midiendo de manera indirecta por la reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) mediante una técnica espectrofotométrica ya descrita.<sup>75,76</sup>

Se colocaron 50 µL de los flavonoides y sus derivados, en concentraciones de 1, 10 y 100 µM, en una microplaca de 96 pozos; posteriormente se agregaron 150 µL de una solución etanólica de DPPH 133.33 µM (concentración final 100 µM). La placa se incubó a 37 °C durante 30 minutos en oscuridad y con agitación. Después se midió la densidad óptica (DO) de cada pozo a 515 nm en un lector de microplacas marca Bio-Tek modelo ELx-808. La actividad sobre el DPPH se expresa como porcentaje de inhibición del radical DPPH y se calcula con la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición del radical DPPH} = \left( \frac{C - E}{C} \right) * 100$$

Donde:

C=DO del DPPH a 100  $\mu$ M

E=DO de la mezcla de DPPH 100  $\mu$ M+ muestra

Cada concentración de los flavonoides y derivados se realizó por triplicado para cada uno de los cinco experimentos independientes.

### **Actividad antibacteriana**

La actividad antimicrobiana para los flavonoides **1,2,3**, y **4** y sus derivados **1a, 1b, 2a, 3a** y **4a**, se realizó de manera cualitativa por el método de difusión en agar de Kirby-Baüer.<sup>77</sup> Se utilizaron dos cepas bacterianas gram positivas, *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*, y dos gram negativas *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*, de las cuales fueron inoculadas cinco colonias en caldo Müeller-Hilton; posteriormente, se incubaron a 37 °C por 18-24 horas hasta que la turbidez del medio fuera equivalente al estándar número 0.5 de MacFarland. Se sumergió un hisopo en la suspensión de bacterias y se inoculó en la superficie de una placa con agar Müeller-Hilton. Los discos de 0.5mm de diámetro de papel Whatman No 5 impregnados de 2 mg de los compuestos **1-4** y de los derivados (**1a, 1b, 2a, 3a, 4a**) y secos se colocaron manualmente sobre la superficie del agar utilizando una pinza estéril. Adicionalmente se colocó sobre el agar un sensidisco con 25  $\mu$ g de clorafenicol el cual será utilizado como control positivo. Una vez colocados los sensidiscos sobre el agar Müeller-Hilton se colocó la placa en una incubadora a 36 °C por 24 horas. Posteriormente se midió la zona de inhibición con una regla de calibración en milímetros y el compuesto se reporta como activo en caso de existir zona de inhibición. La prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio.

### **Actividad anti-inflamatoria**

La actividad anti-inflamatoria se realizó a través del ensayo de edema en la oreja de ratón inducido con acetato de 12-*O*-tetradecanoilo forbol (TPA). Se emplearon ratones machos de la cepa CD1 (25-30 g). Los animales (n=3) se colocaron en cajas de acrílico transparente a temperatura constante de 24 °C, con un fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad y con agua y alimento. Bajo anestesia general con pentobarbital sódico (31.5 mg/kg, IP), en la oreja derecha se aplicaron 10  $\mu$ L de una solución etanólica de TPA (0.25 mg/ml). Diez minutos después, en la misma oreja se aplicó 1  $\mu$ mol del



compuesto disuelto en 20  $\mu$ L del vehículo (metanol o diclorometano). En la oreja izquierda se le aplicaron 10  $\mu$ L de etanol y 20  $\mu$ L del vehículo del compuesto. Al grupo control se le aplicó la misma cantidad de etanol y vehículo, en la oreja izquierda, que el grupo tratado, sin embargo, en la oreja derecha se aplicó 10  $\mu$ L de una solución etanólica de TPA (0.25 mg/ml) y 20  $\mu$ L del vehículo (metanol o diclorometano). Cuatro horas después de la aplicación de TPA, los animales se sacrificaron con CO<sub>2</sub> para tomar una muestra de 7 mm de diámetro de ambas orejas. El incremento del peso de la muestra derecha con respecto a la izquierda representa el edema. La inhibición del edema se calcula con formula:

$$\% \text{ de Inhibición} = [(C-E) / C] \cdot 100$$

en donde

C=Edema del grupo control (tratado con TPA)

E=Edema del grupo experimental (TPA mas el compuesto)

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguida de una prueba de Tukey con  $p \leq 0.05$ .

### **Actividad citotóxica**

Las líneas celulares de colón de cáncer (HCT-15), cáncer de mama (MCF-7), leucemia (K-262 CLM), sistema nervioso central (U-251 Glio) y cáncer de próstata (PC-3) fueron adquiridas en el Instituto Nacional del Cáncer (Estados Unidos de América). La citotoxicidad de células tumorales fue determinada usando sulforrodamina B (SRB) el cual es un colorante que se a proteína en un ensayo de microcultivo para medir la viabilidad y el crecimiento celular.

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2mM L-glutamina, 100 IU/ml de penicilina G, 100  $\mu$ g/ml de sulfato de esptreptomicina y 0.25  $\mu$ g/ml de amfotericina B. Se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Para el ensayo, las células fueron suspendidas en una solución al 0.1% de tripsina-EDTA; la viabilidad de las células fue contada usando un hematocitometro y diluido con medio para tener las siguientes densidades 5 $\times$ 10<sup>4</sup> células/ml (K562, MCF-7), 7.5 $\times$ 10<sup>4</sup> células/ml (U251, PC-3 y 10 $\times$ 10<sup>4</sup> células/ml (HTC-15). Se sembraron 100  $\mu$ l/pozo de las suspensiones celulares antes mencionadas en placas de 96 pozos y se incubaron a 37 °C para permitir la adhesión de las células

adicionalmente se utilizó una placa como testigo (evaluación a tiempo cero) en la cual se colocaron los mismos volúmenes de cada línea celular y del blanco (medio de crecimiento RPMI-1640). Después de 24 horas las células fueron tratadas con 100 µL de los compuestos a evaluar previamente disueltos en medio RPMI-1640 y DMSO al 1% para después incubarlas por 48 horas a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. A la placa que se utilizó como testigo sólo se le adicionó 100 µL del medio de cultivo RPMI-1640. Después de 48 horas las células adheridas fueron fijadas agregando 50 µL de una solución fría al 50 % (m/vol) de ácido trifluoroacético y se incubó a 4 °C por 60 minutos. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con agua y se dejaron secar a temperatura ambiente. Después, las células fijadas con ácido trifluoroacético fueron tratadas con 100 µL de una solución de SRB (0.4% m/vol en 1% de ácido acético) por 30 minutos a temperatura ambiente en este paso la SRB (colorante aniónico) se une a las proteínas de las células cancerosas previamente fijadas con ácido trifluoroacético. La SRB no unida fue removida con 4 lavados de una solución de ácido acético al 1% y la SRB unida fue extraída con 100 µL de una solución de base Tris 10 mM no amortiguada. Se determinó la densidad óptica (DO) de las muestras tratadas en un lector de microplacas Bio Kinetis a una longitud de onda de 515 nm. La intensidad del color es directamente proporcional al número de células vivas. El porcentaje de inhibición de crecimiento celular (%IC) se determinó utilizando la siguiente expresión:

$$\%IC=100 - \left(\frac{B}{A} \times 100\right)$$

Donde:

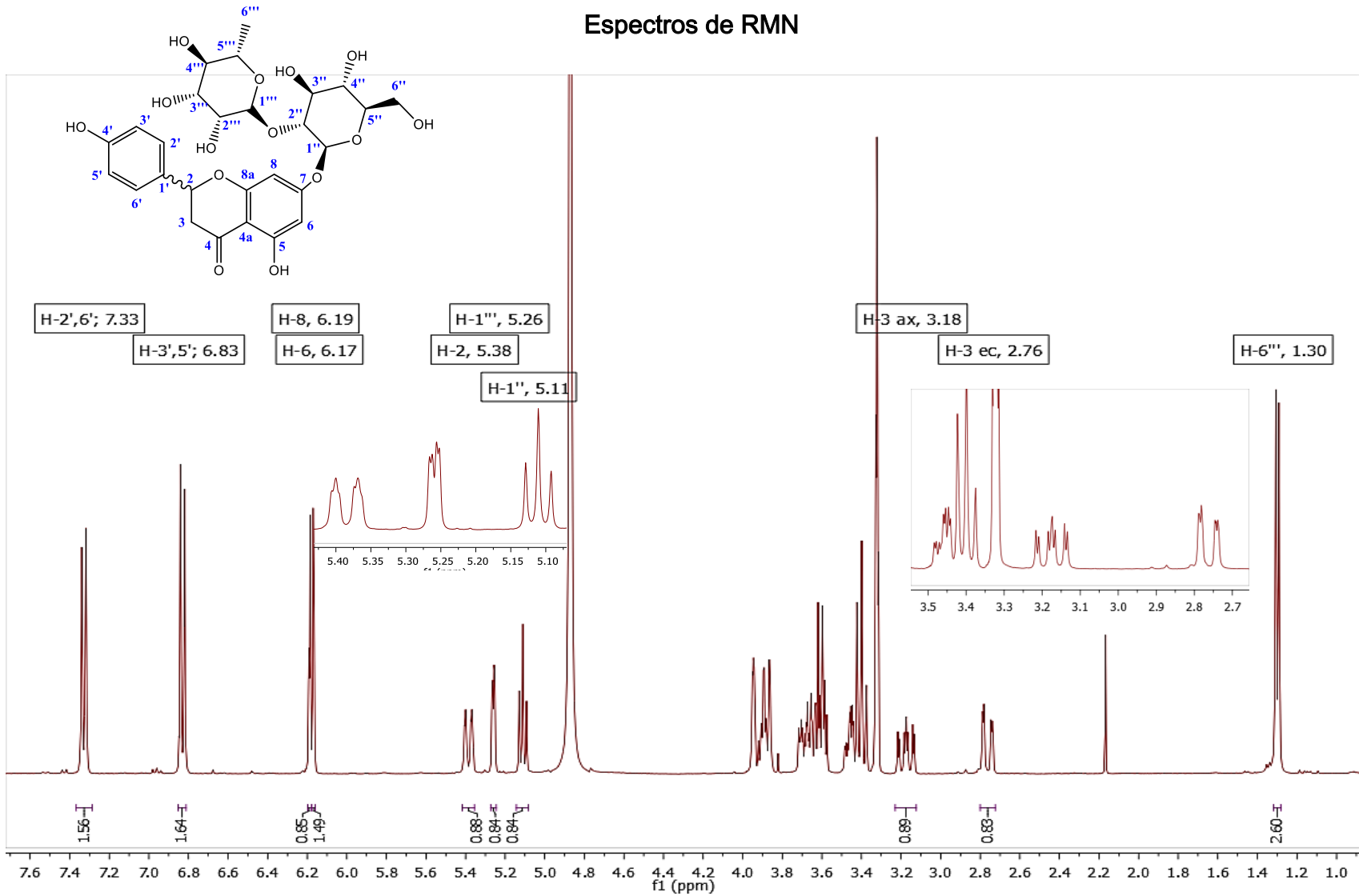
%IC: porcentaje de inhibición del crecimiento celular.

B= densidad óptica promedio de las células tratadas con el compuesto en estudio.

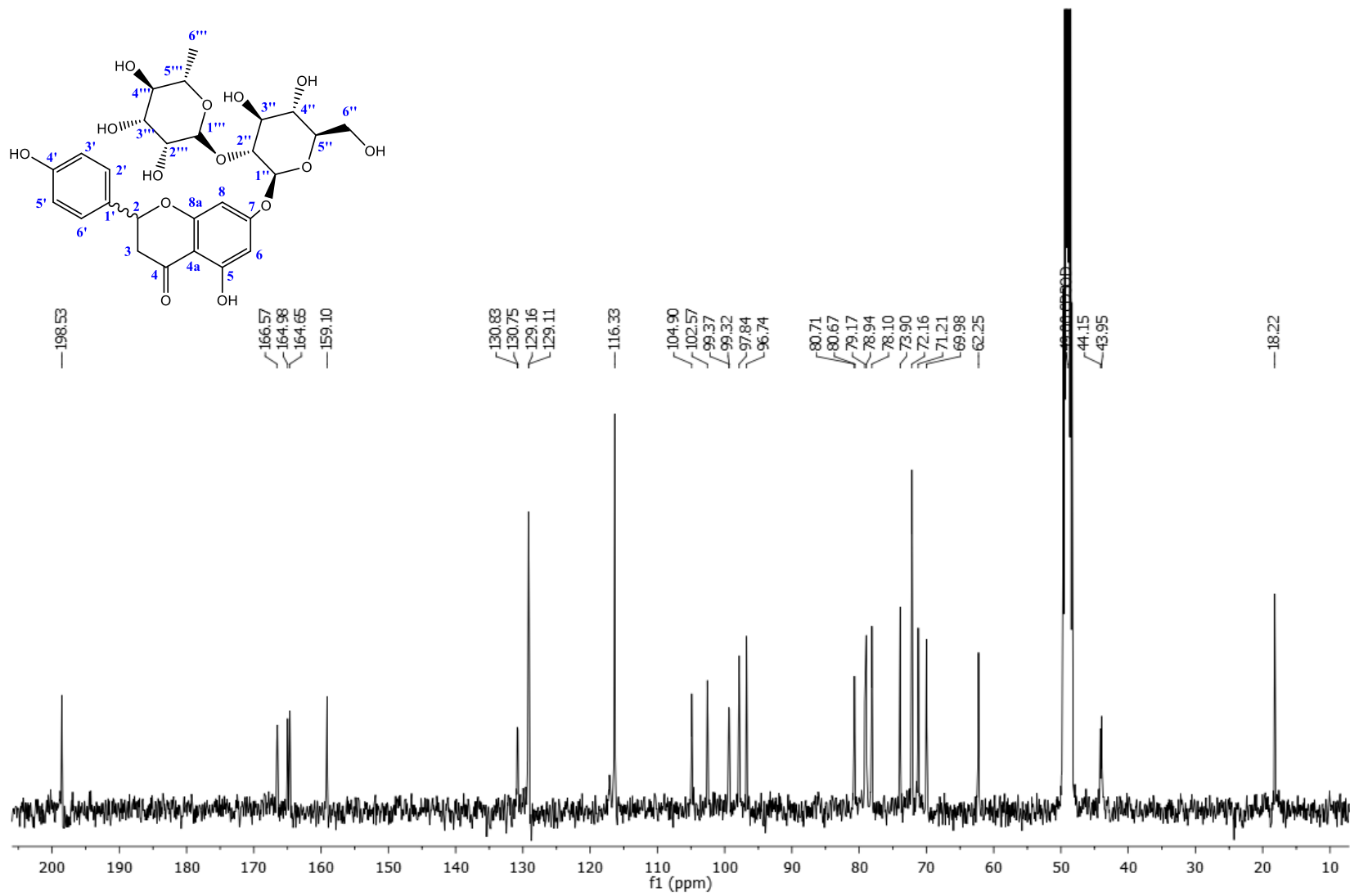
A= densidad óptica promedio de las células sin tratar.

# **12. Anexos**

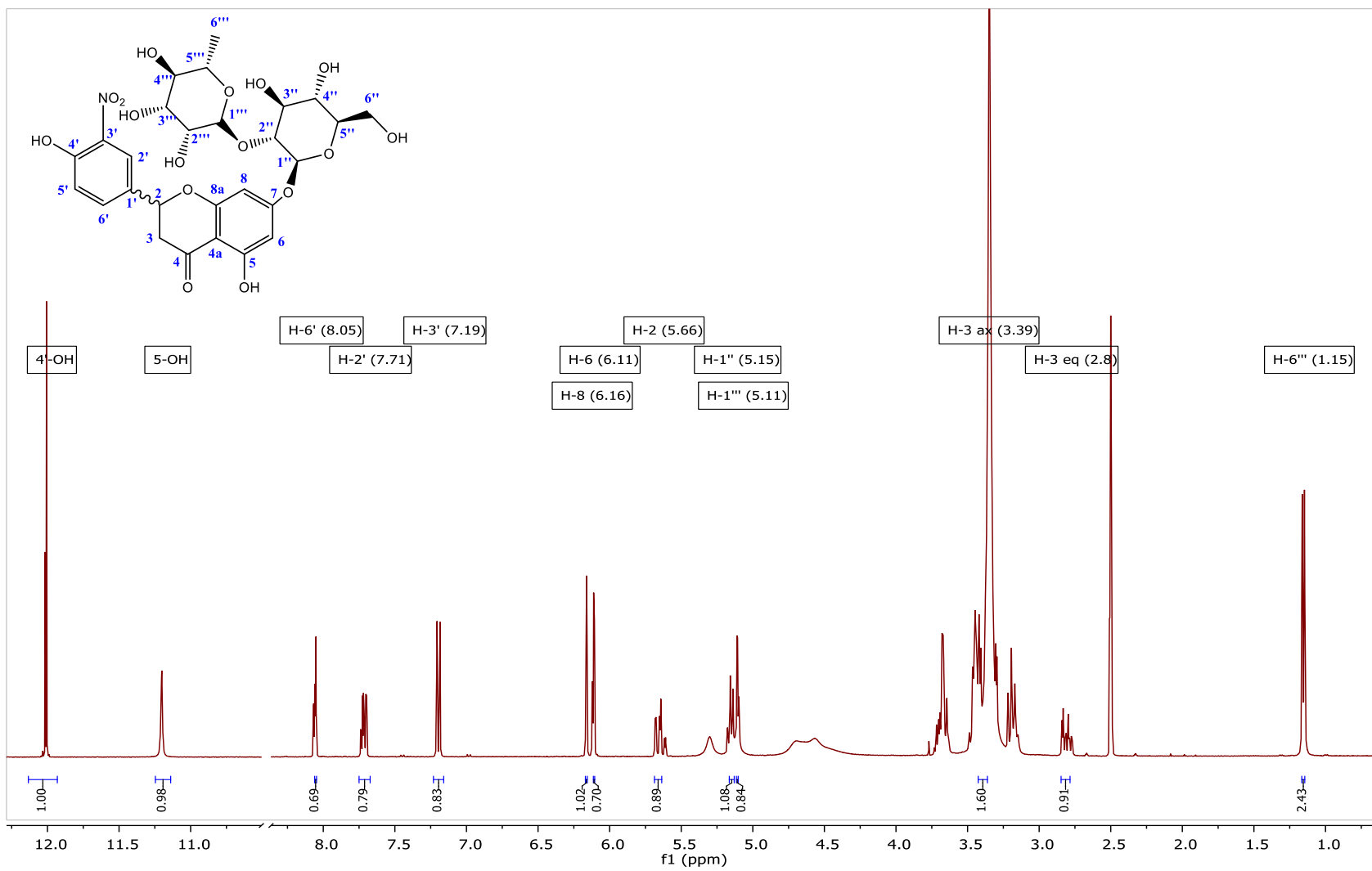
## Espectros de RMN



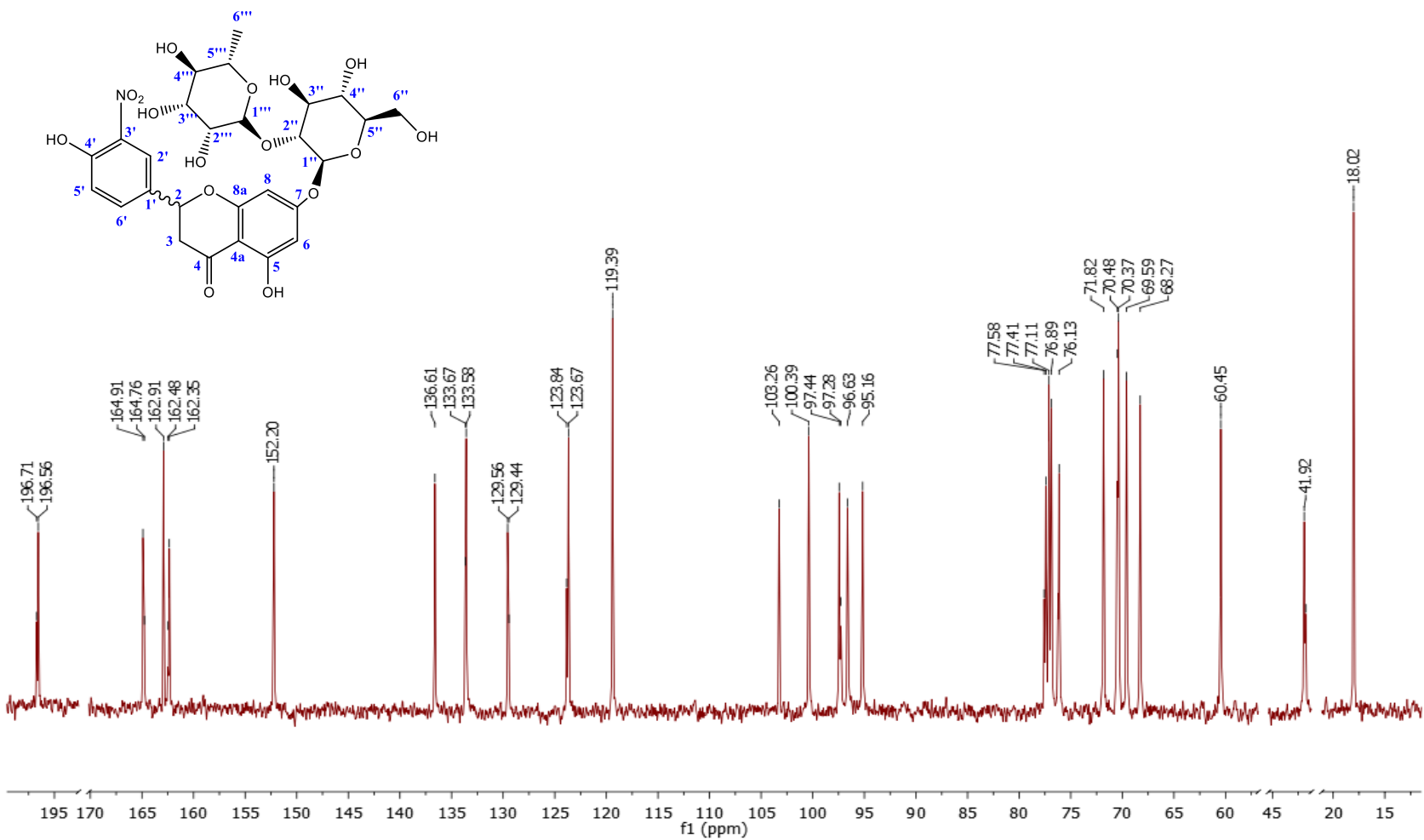
Espectro 1. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) de 1.



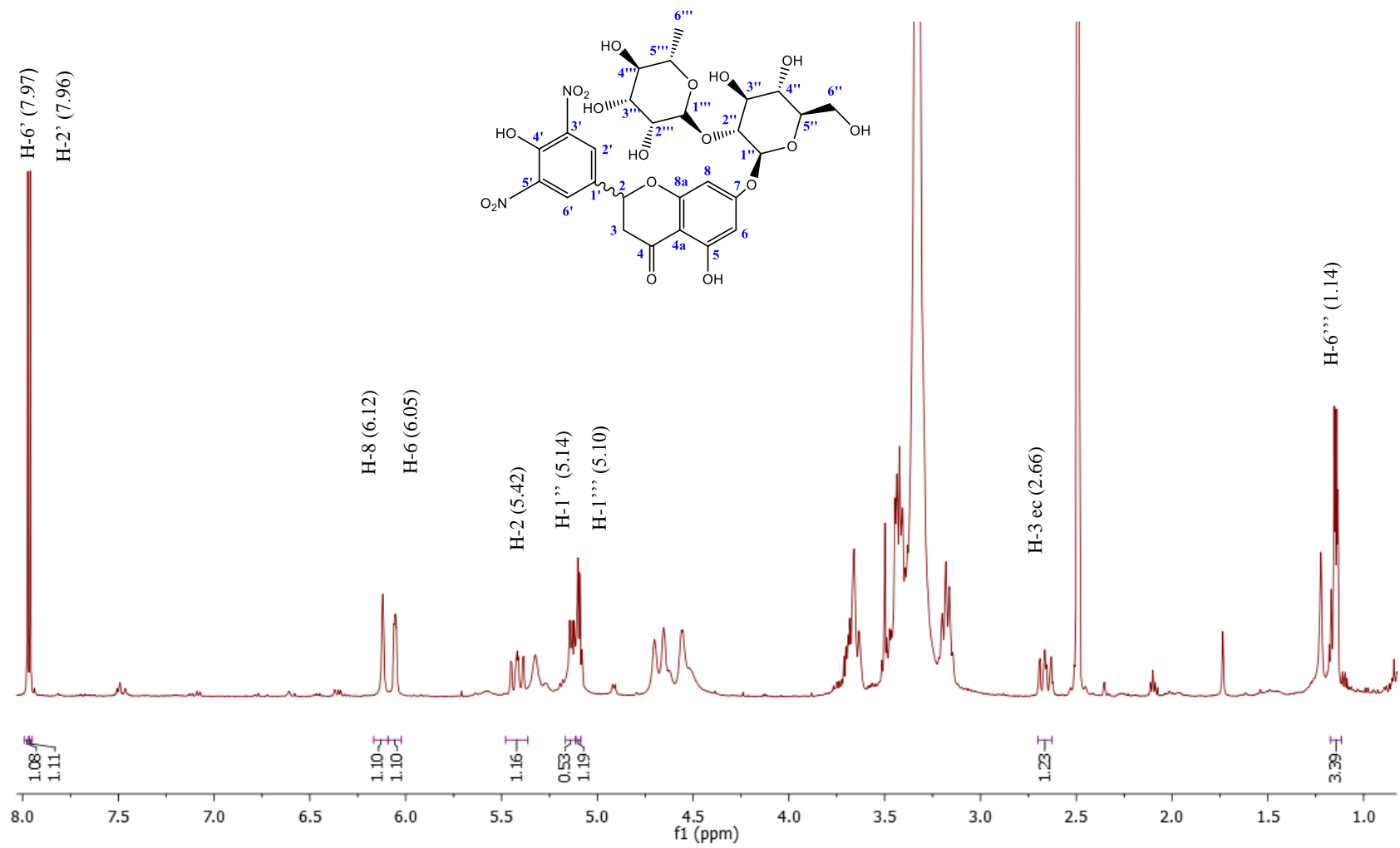
**Espectro 2.** RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) de 1.



**Espectro 3.** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) de **1a**.

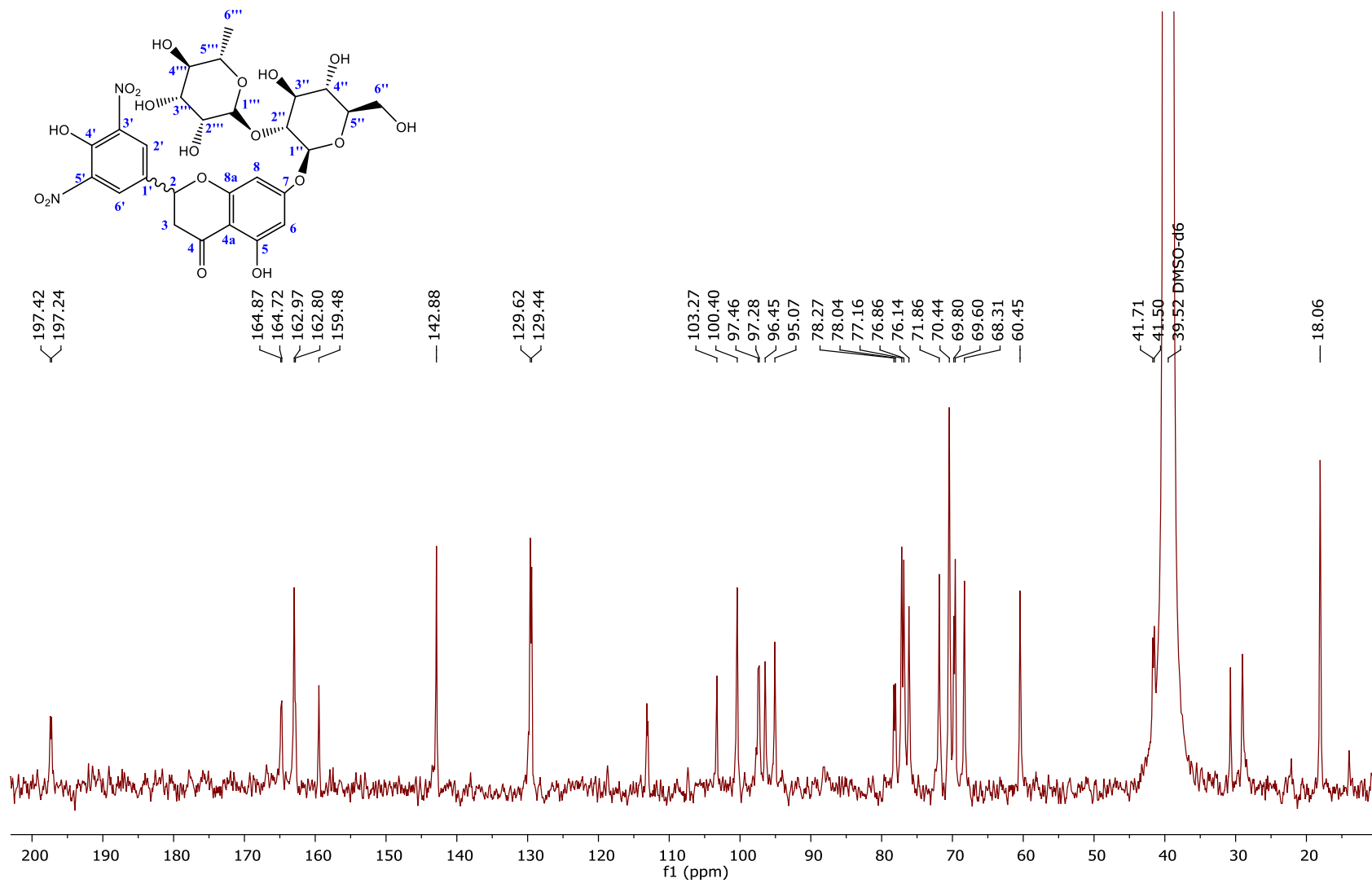


**Espectro 4.** RMN <sup>13</sup>C (100 MHz DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **1a**.

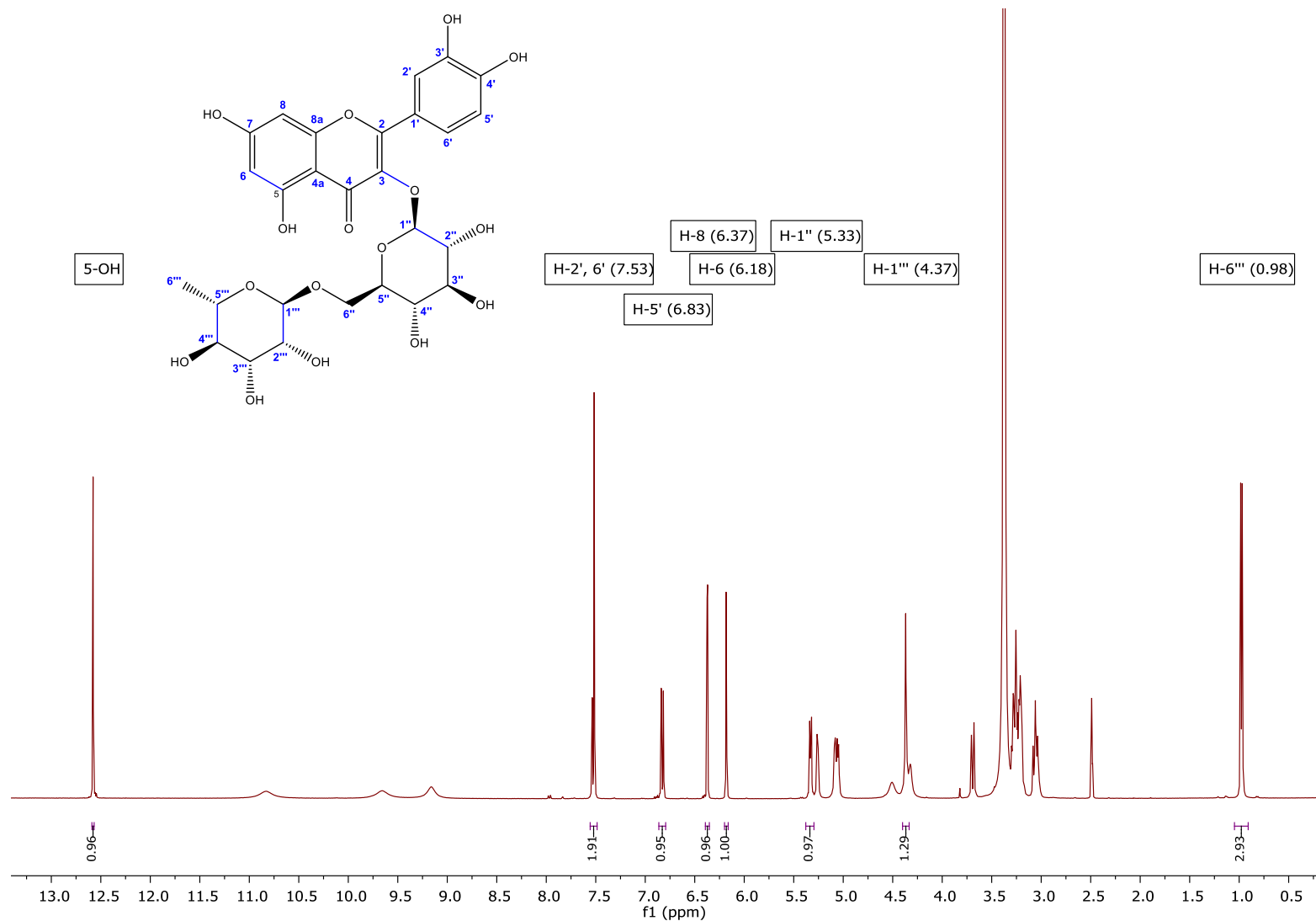


**Espectro 5.** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) de **1b**.

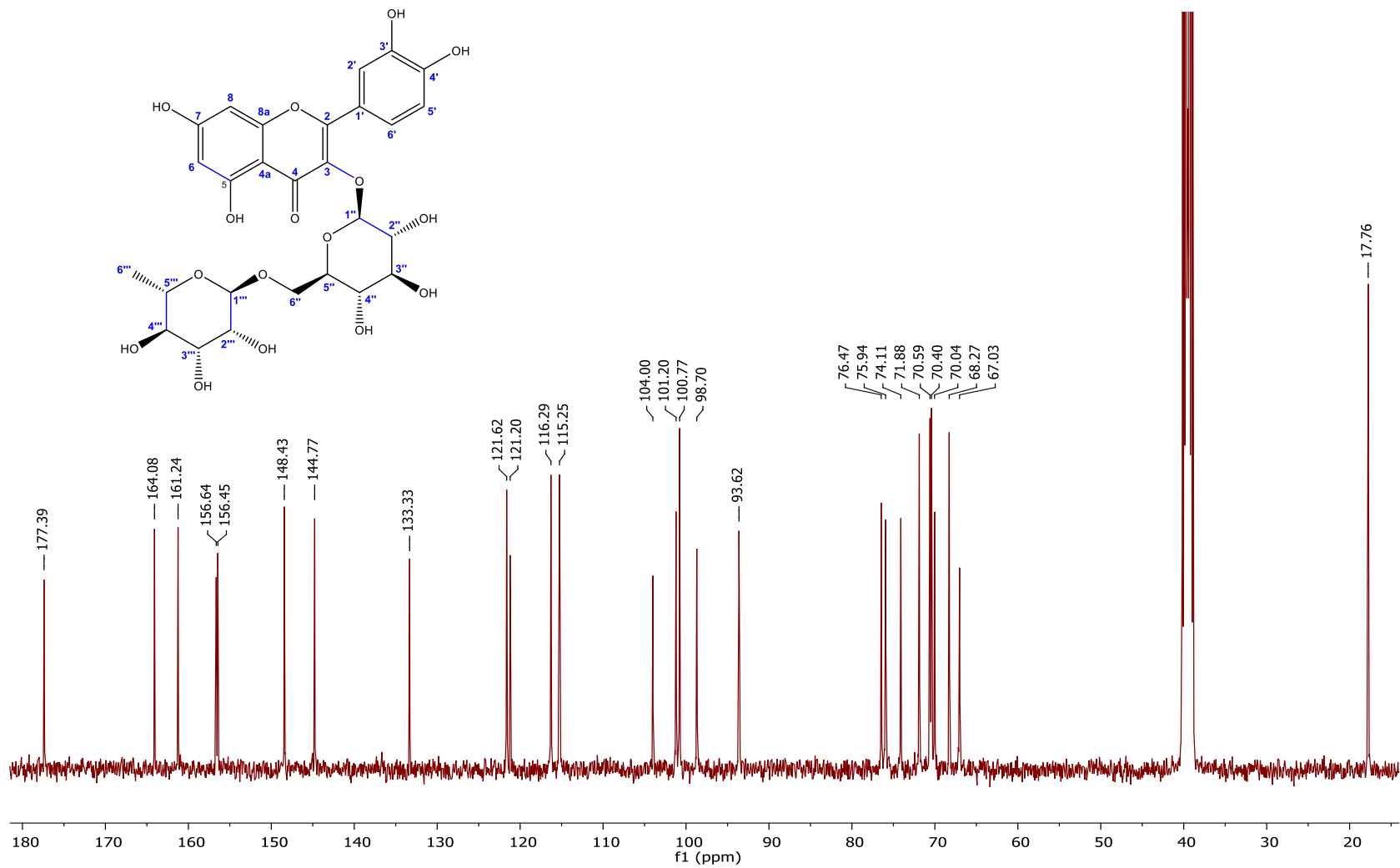




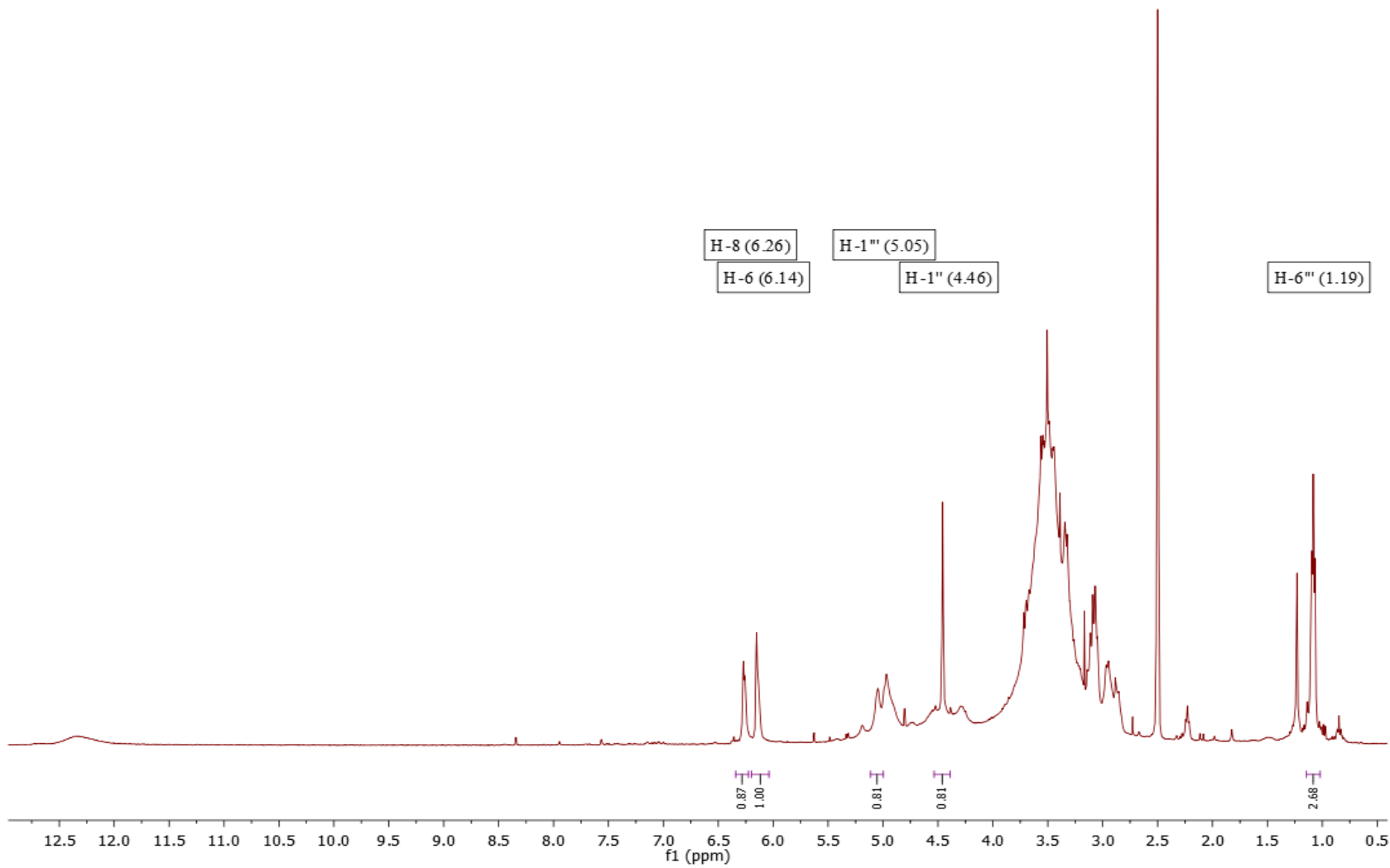
**Espectro 6.** RMN <sup>13</sup>C (100 MHz DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **1b**.



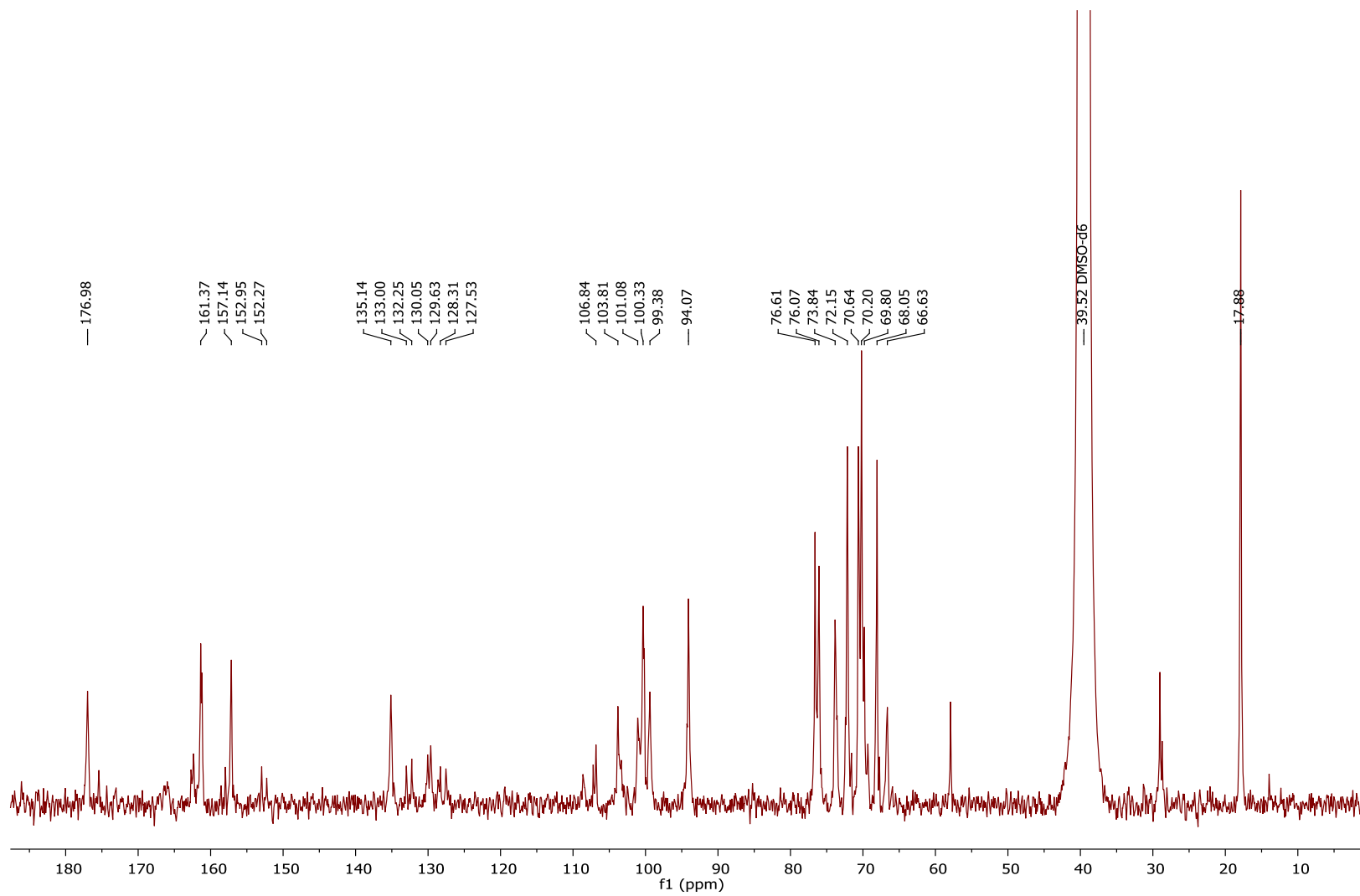
**Espectro 7. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 2.**



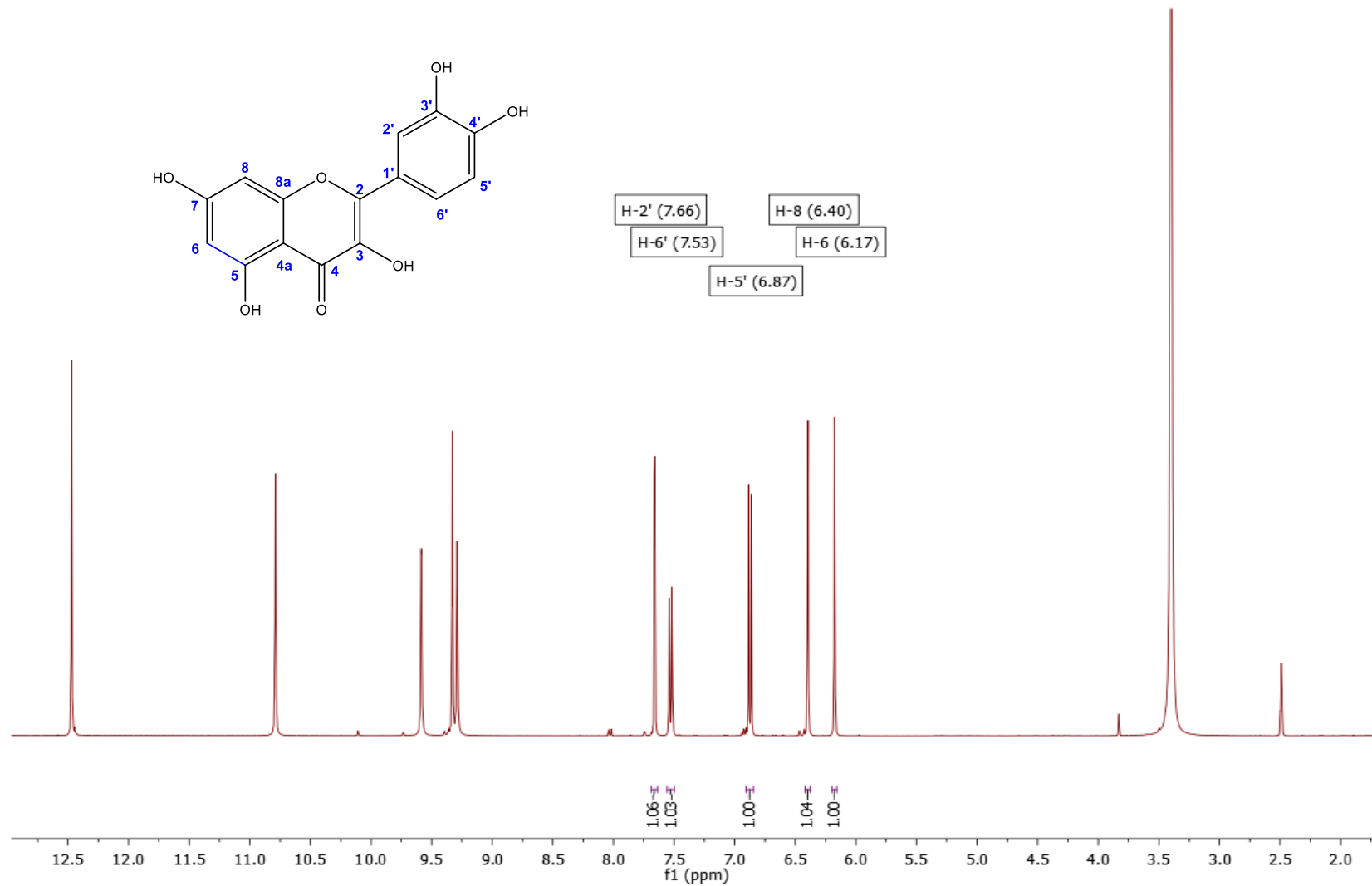
Espectro 8. RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz  $\text{DMSO-}d_6$ ) de 2.



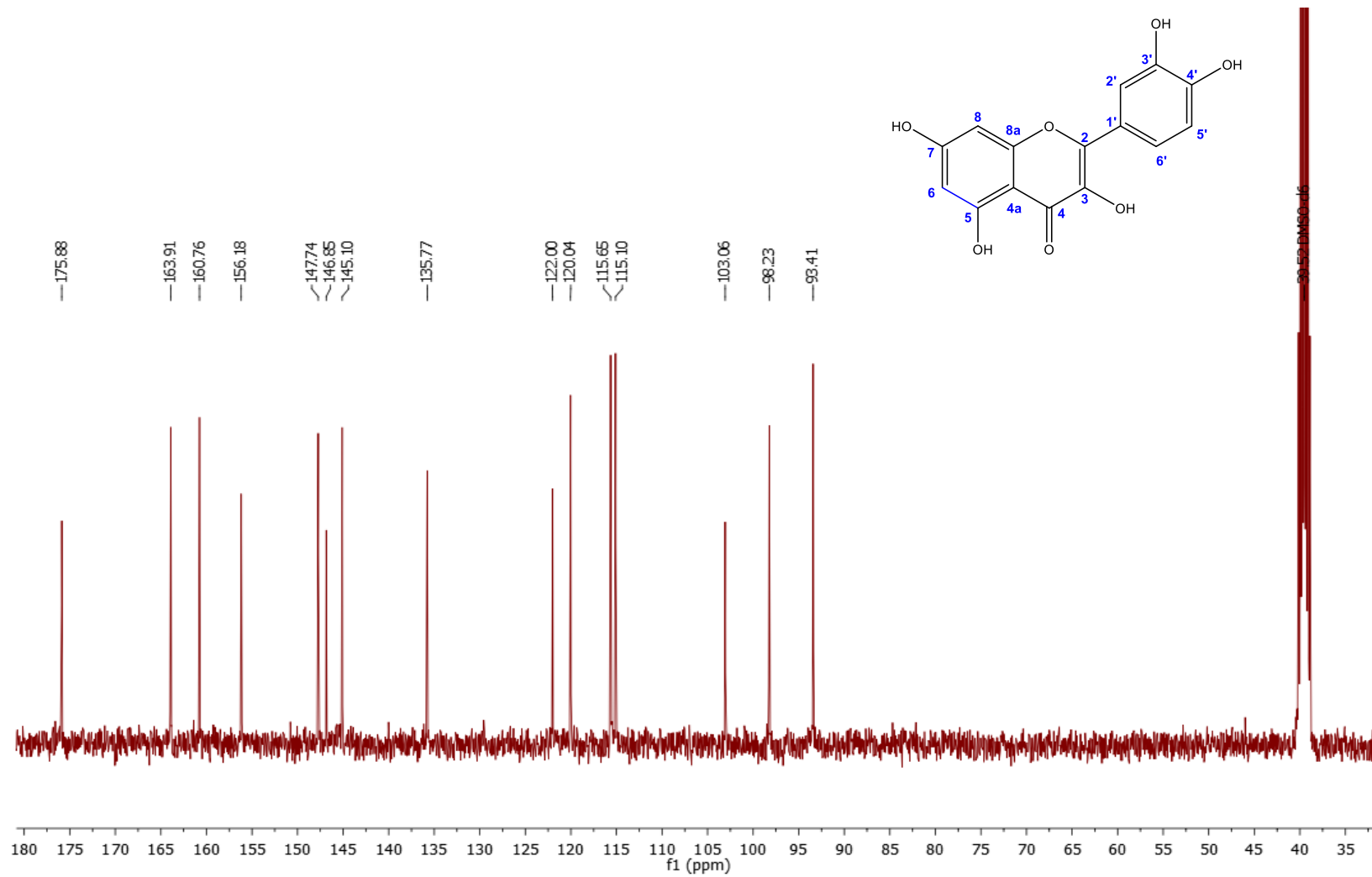
**Espectro 9.** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz DMSO- $d_6$ ) de **2a**.



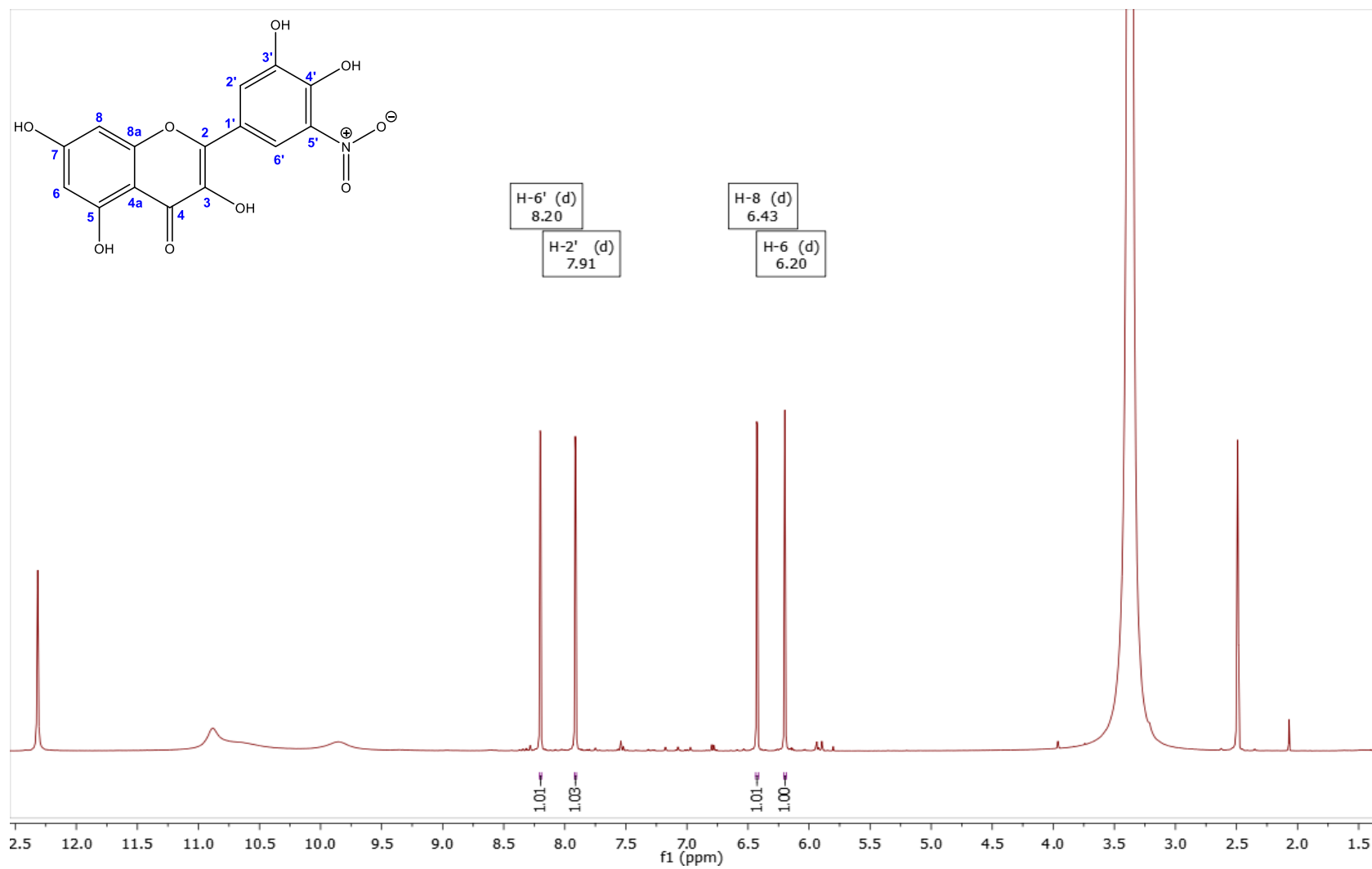
**Espectro 10.** RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz DMSO- $d_6$ ) de **2a**.



**Espectro 11.** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) de **3**.

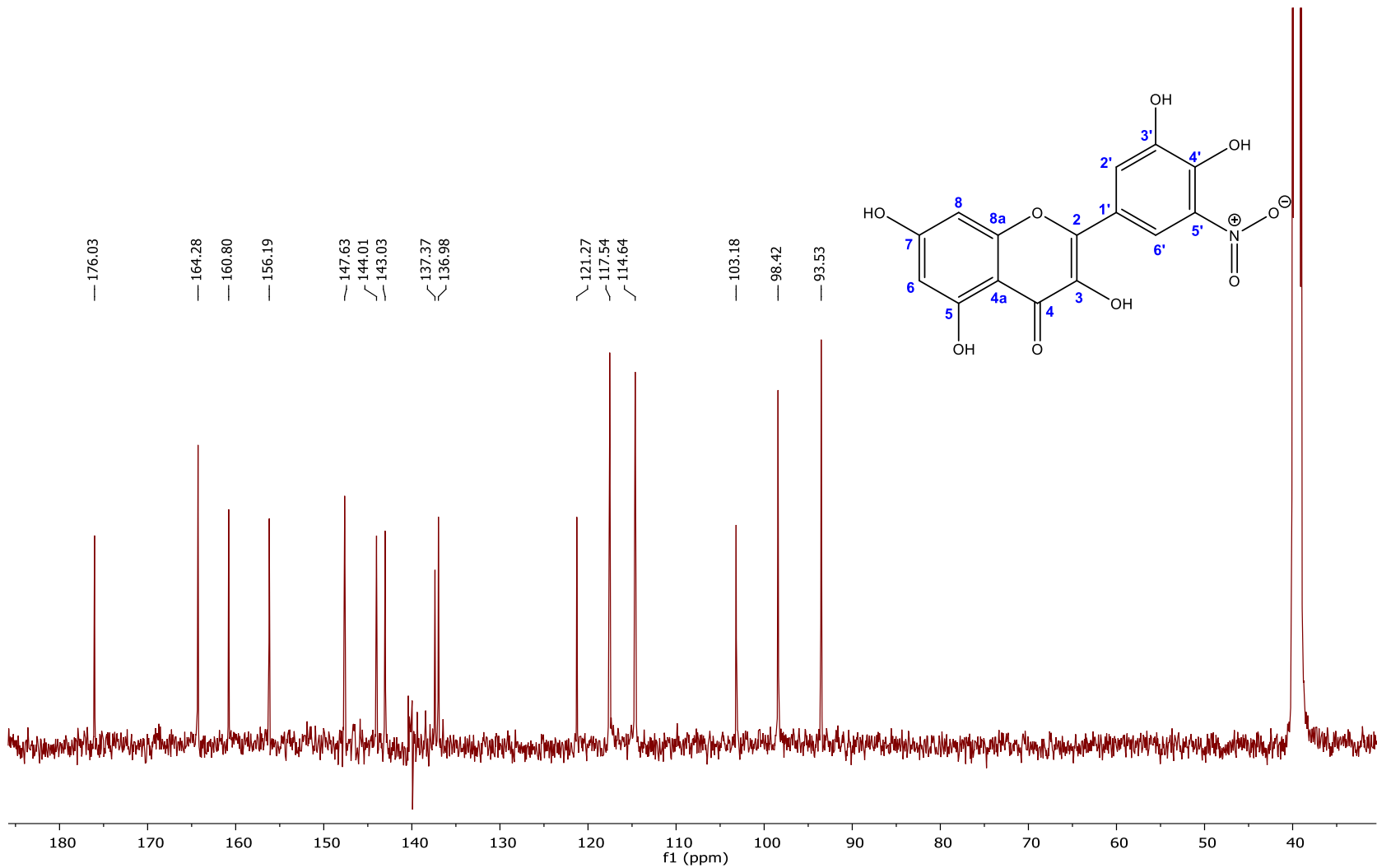


**Espectro 12.** RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz  $\text{DMSO-}d_6$ ) de **3**.

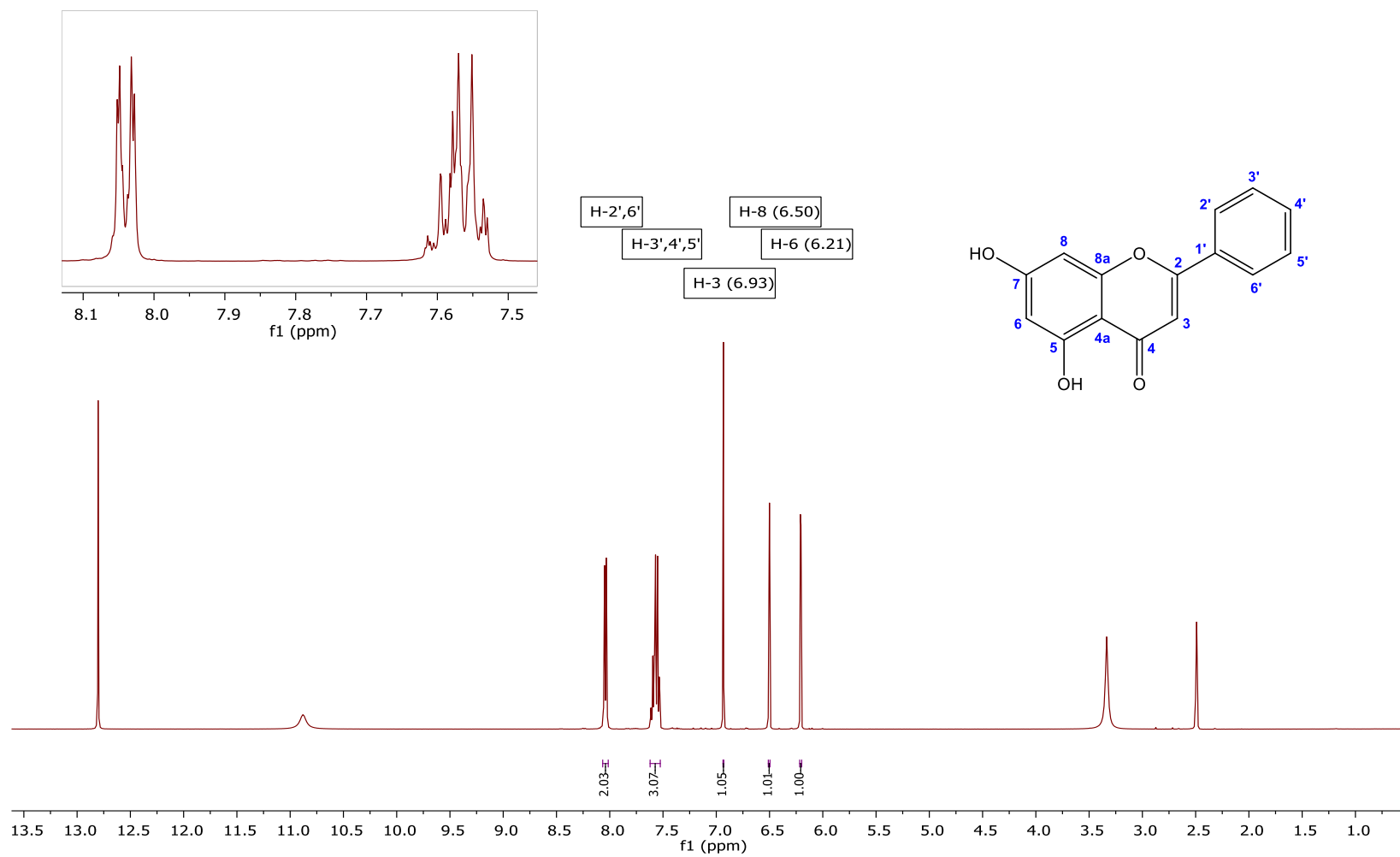


**Espectro 13.** RMN <sup>1</sup>H (500 MHz DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **3a**.

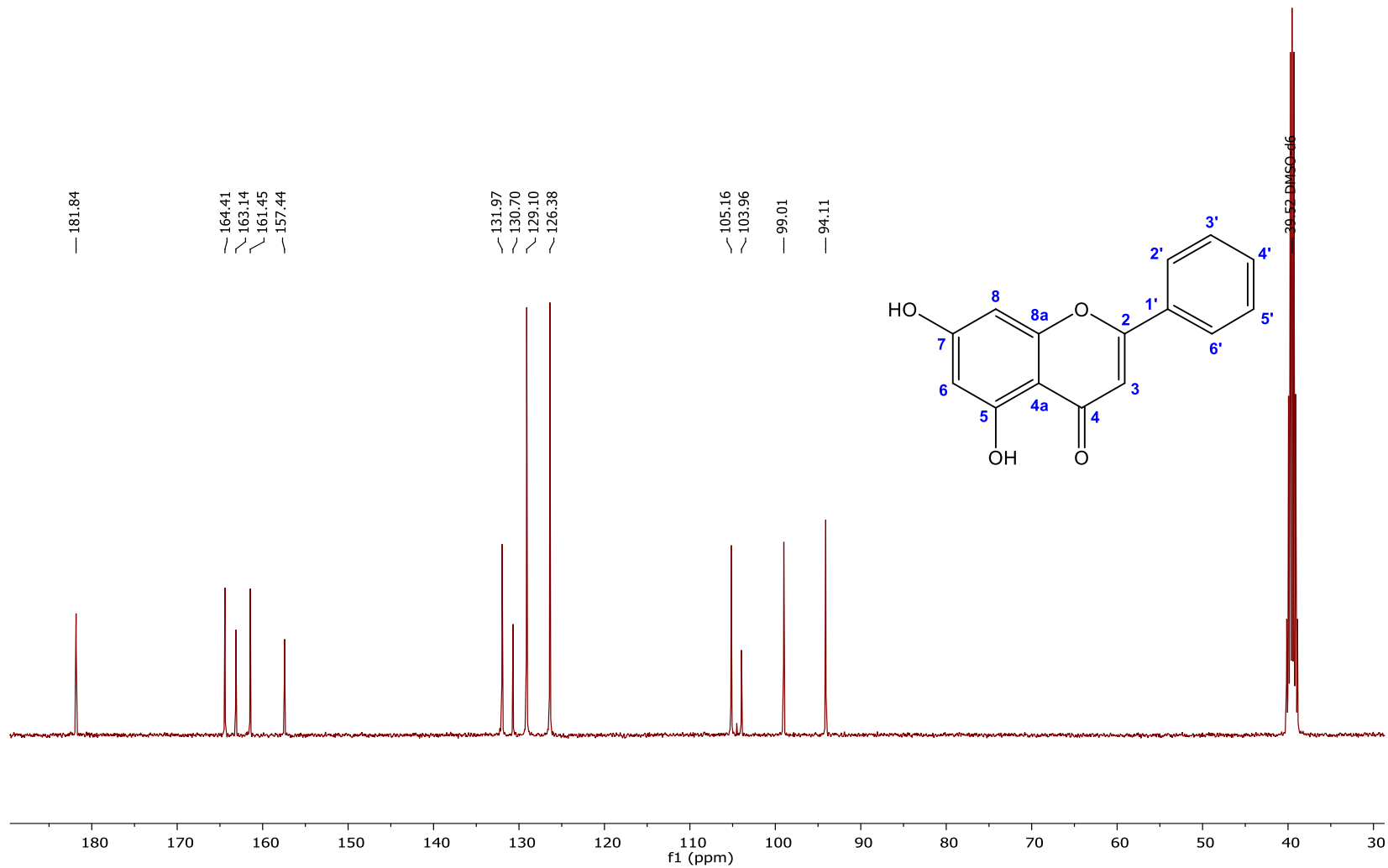




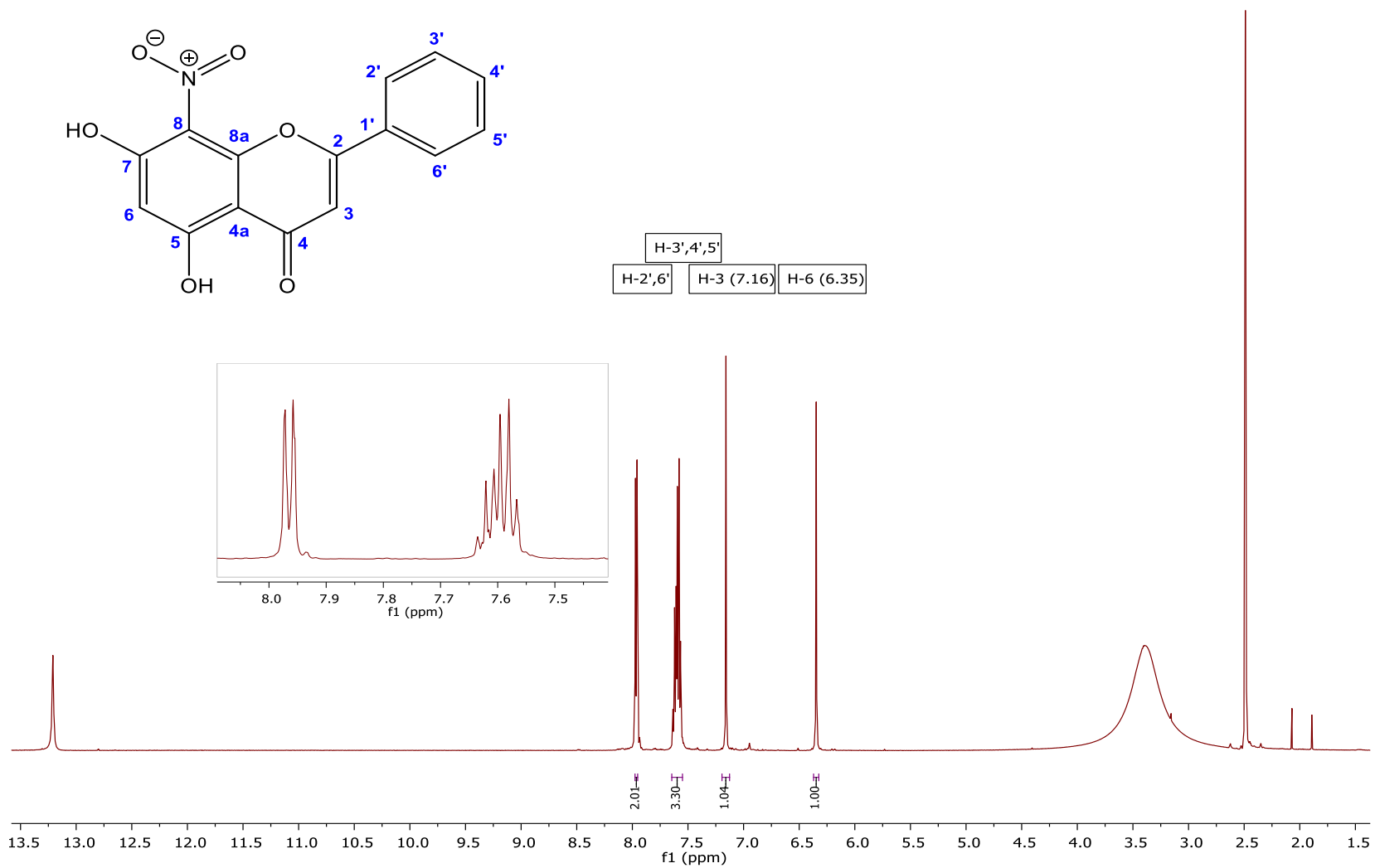
**Espectro 14.** RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz DMSO- $d_6$ ) de **3a**.



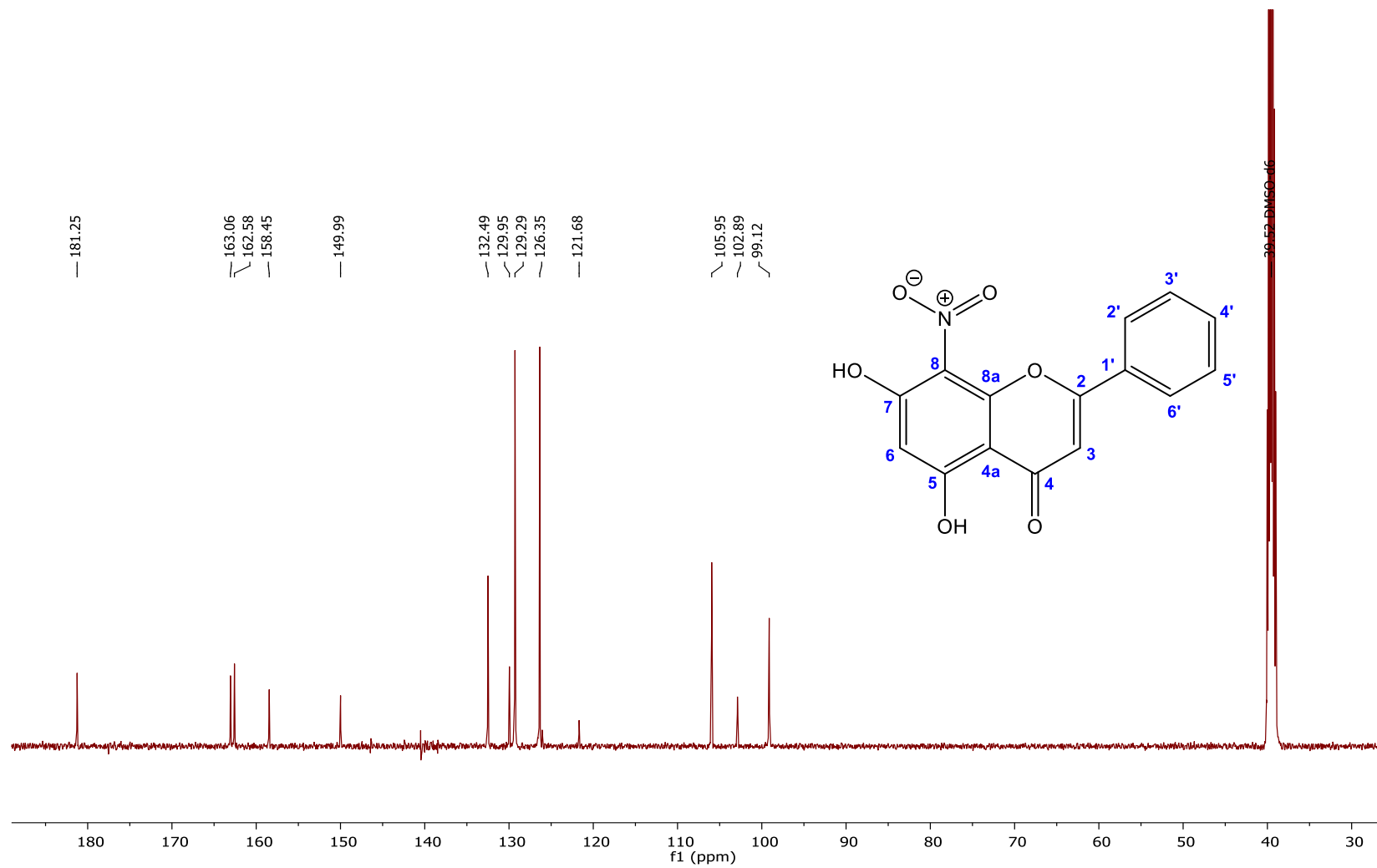
**Espectro 15.** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) de **4**.



**Espectro 16.** RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz DMSO- $d_6$ ) de **4**.

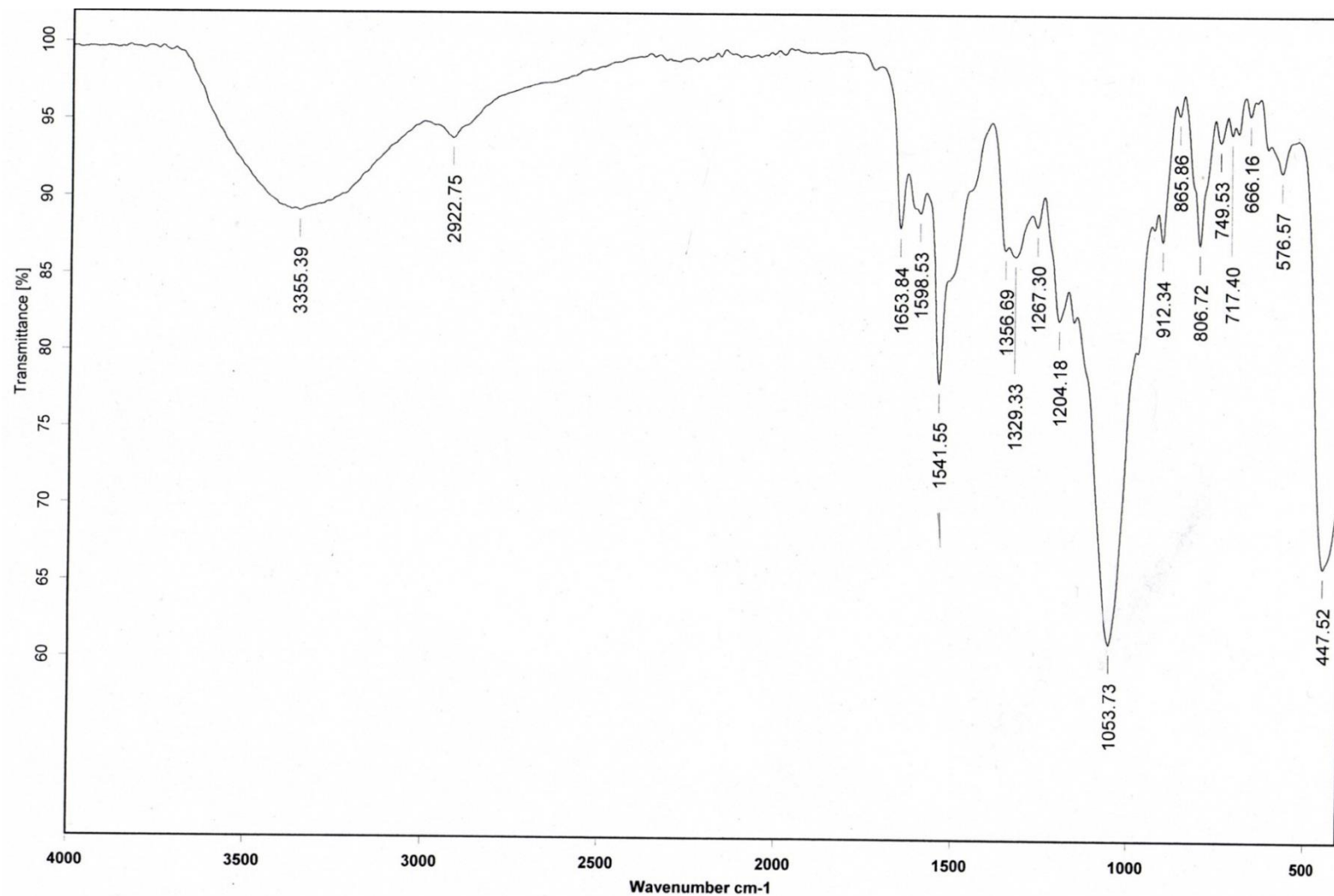


**Espectro 17.** RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **4a**.

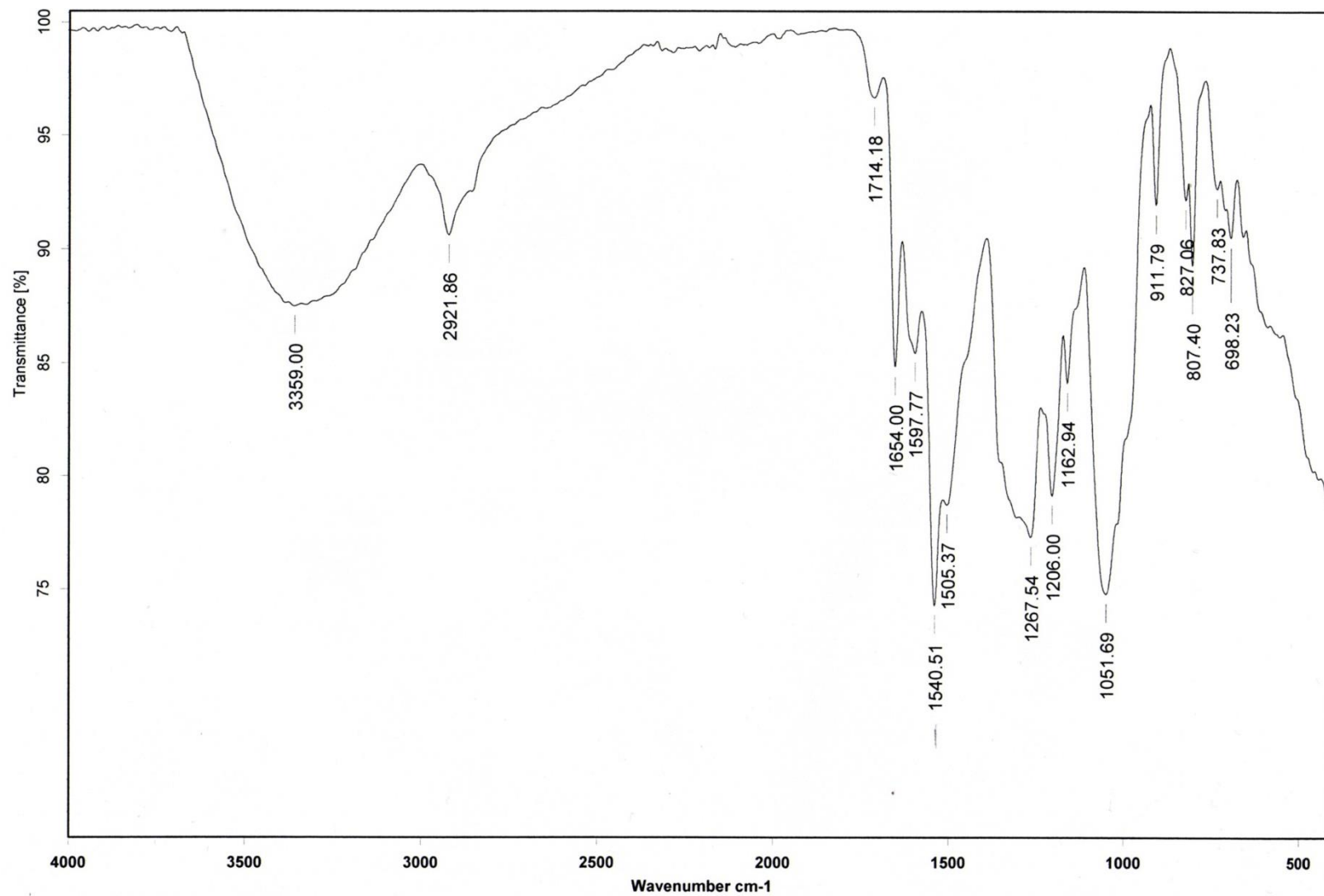


**Espectro 18.** RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz DMSO- $d_6$ ) de **4a**.

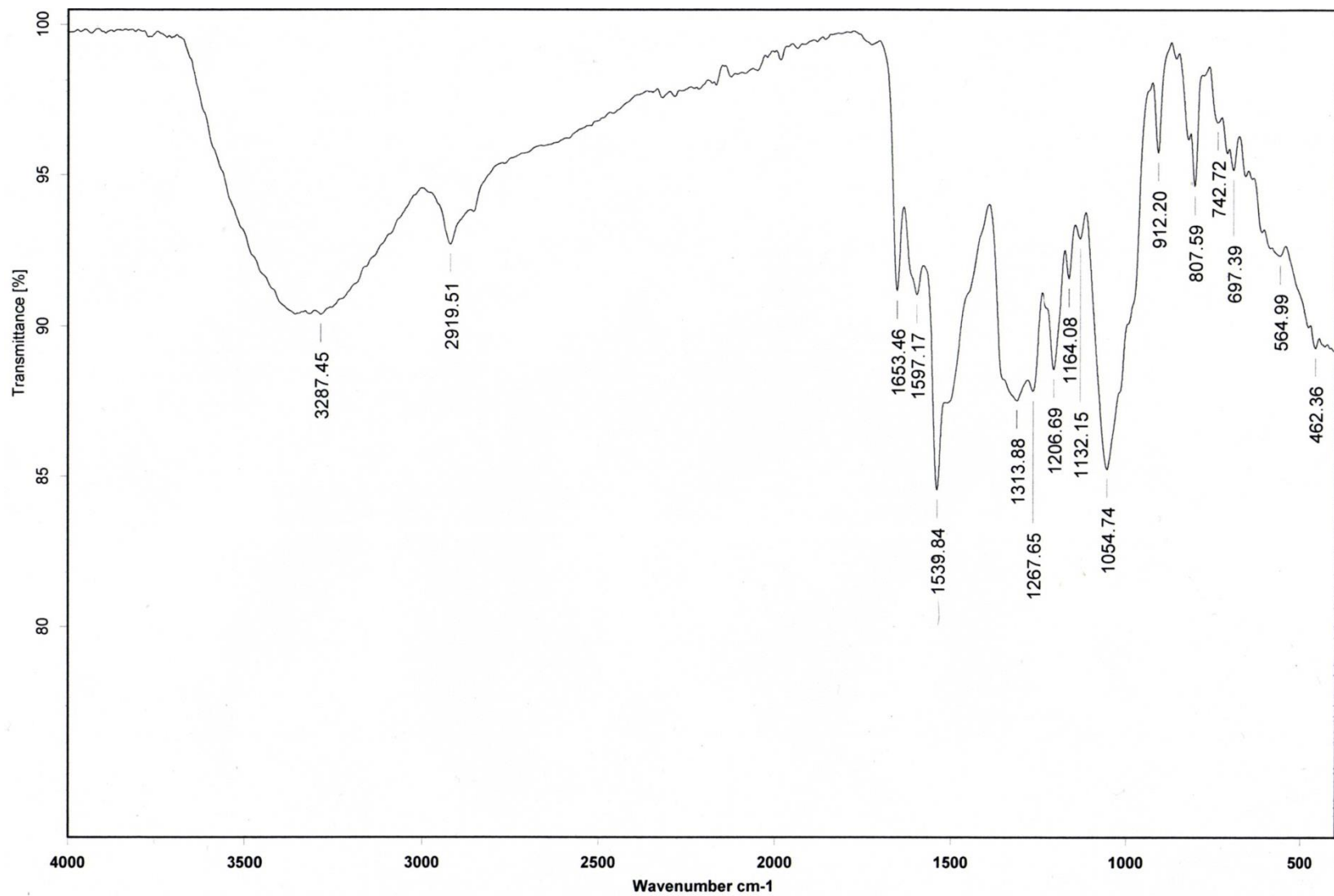
## ESPECTROSCOPIA INFRARROJA



**Espectro 19.** IR (KBr/pastilla) del compuesto **2a** al utilizar MNT-KFS durante la reacción de nitración.

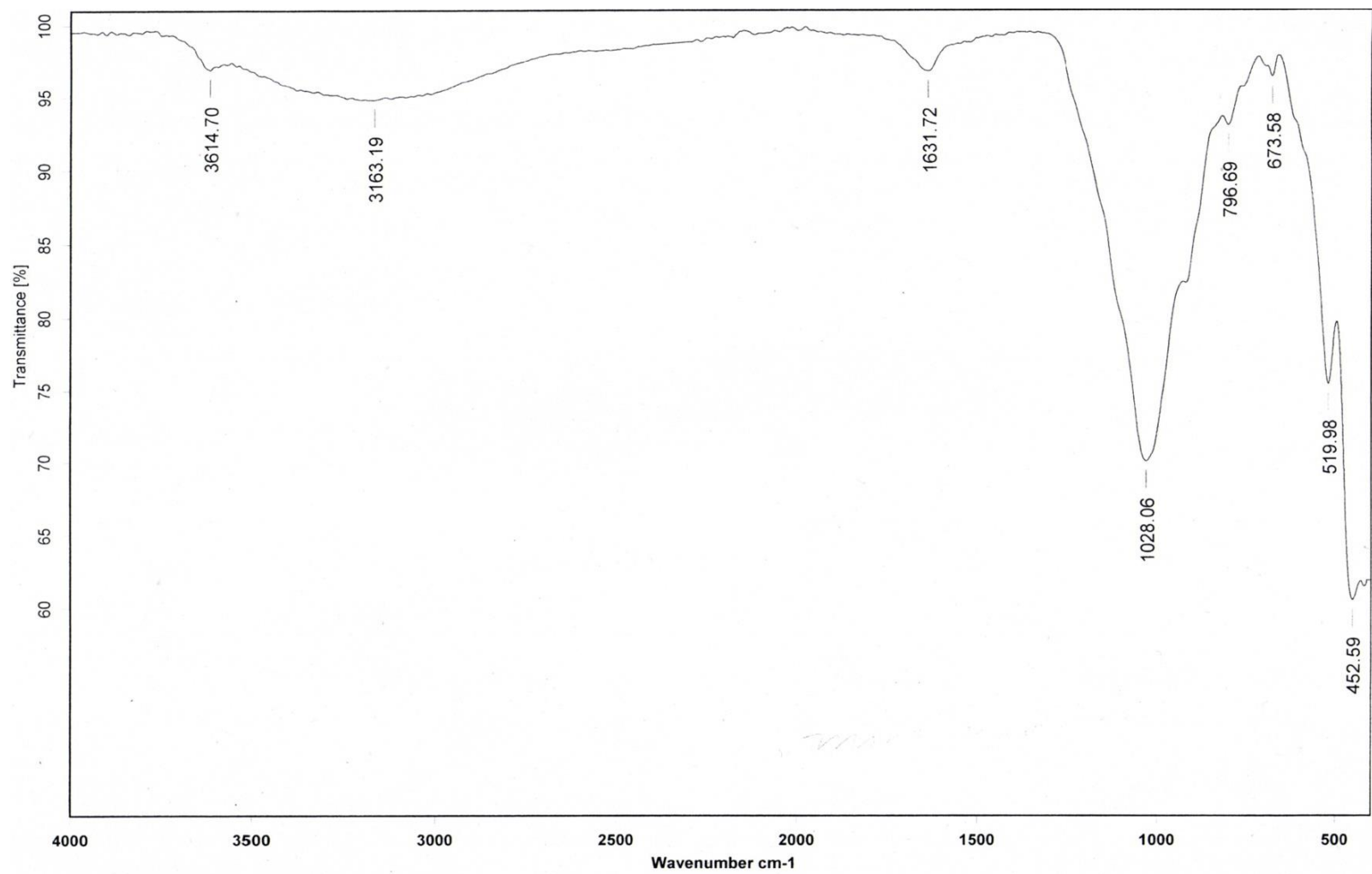


**Espectro 20.** IR (KBr/pastilla) del compuesto **2a** al utilizar tonsil durante la reacción de nitración.

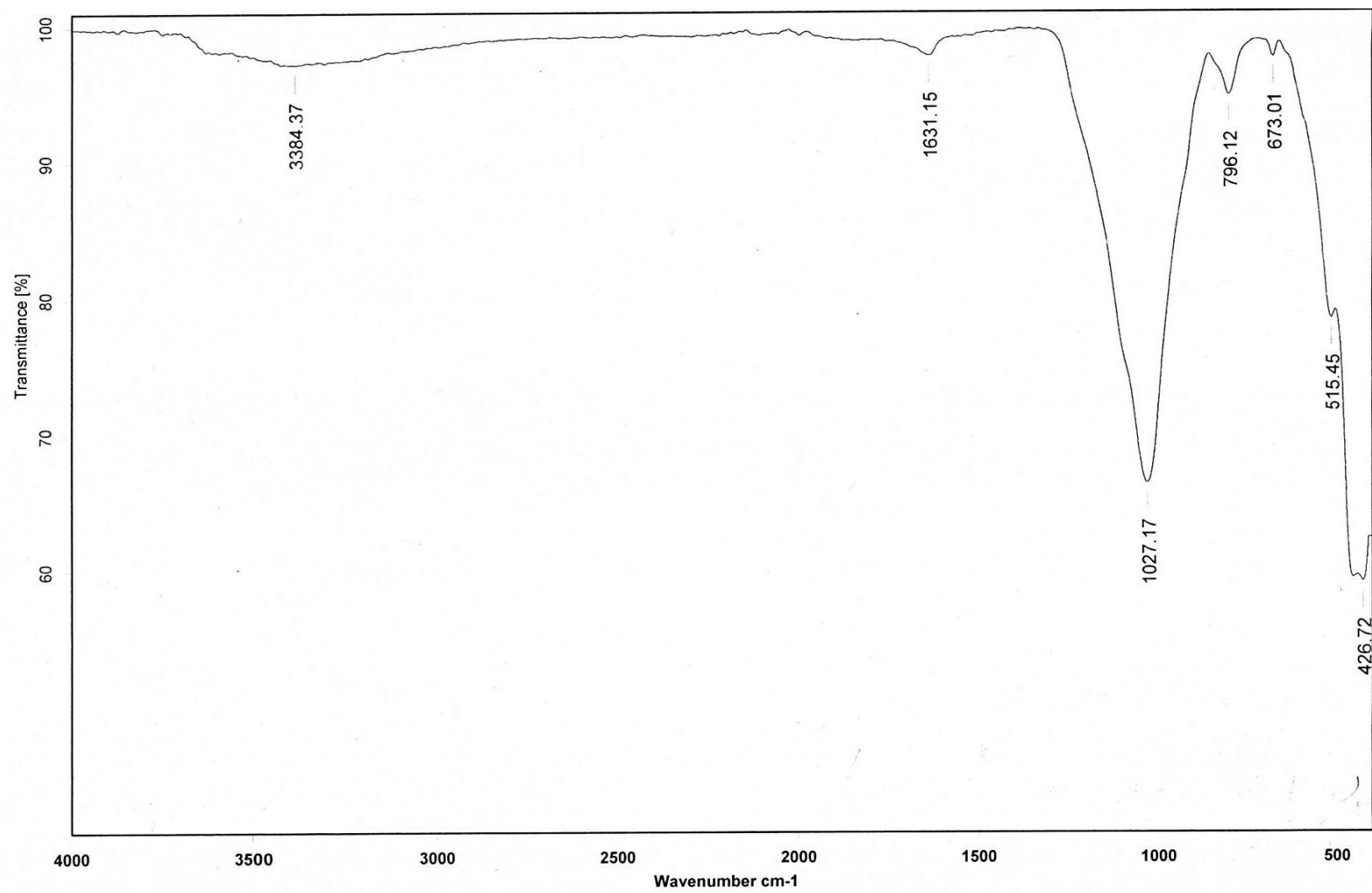


**Espectro 21.** IR (KBr/pastilla) del compuesto **2a** al utilizar gel de sílice durante la reacción de nitración.

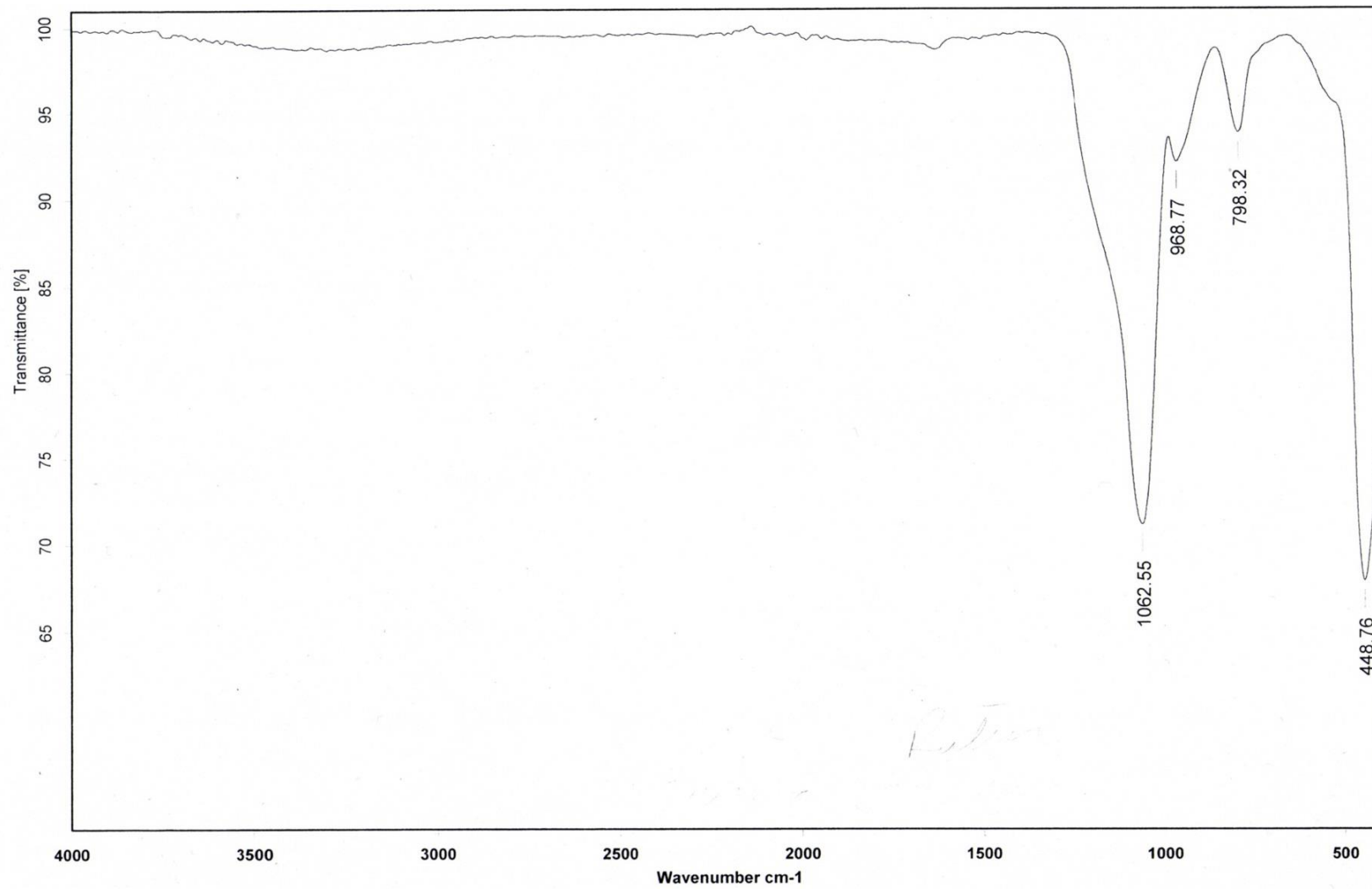




**Espectro 22.** IR (KBr/pastilla) de MNT-KFS.



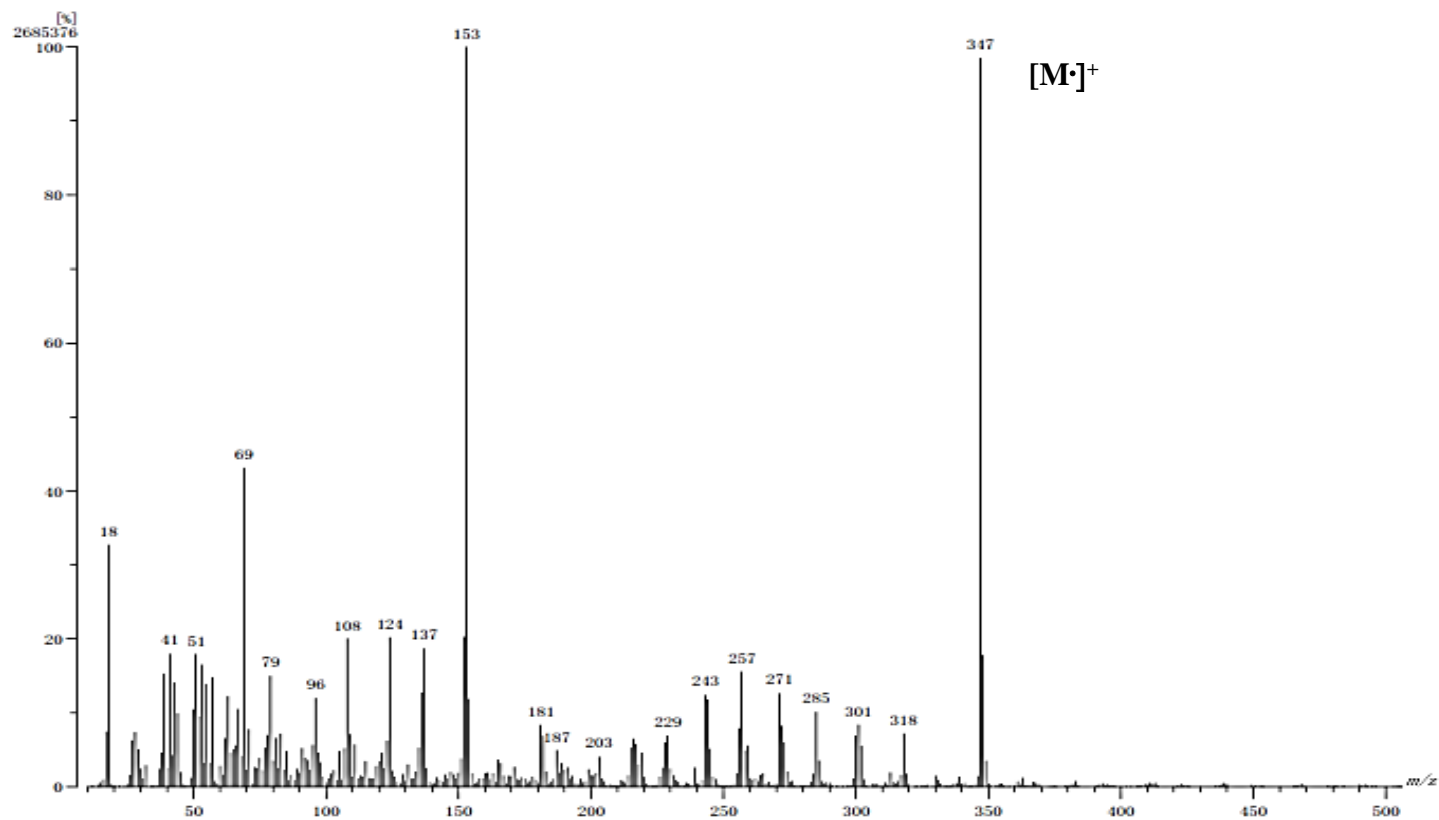
**Espectro 23.** IR (KBr/pastilla) de tonsil.



**Espectro 24.** IR (KBr/pastilla) del gel de sílice.

## ESPECTROMETRÍA DE MASAS

[ Mass Spectrum ]  
Data : Dr Jiménez Manuel221 Date : 19-Aug-2016 11:38  
Instrument : MStation  
Sample : 3010 MJE-RTH-Querc-nit1-gas  
Note : Operator:Carmen Garcia-Javier Perez  
Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]  
RT : 1.46 min Scan#: (49.51) Temp : 3276.7 deg.C  
BP : m/z 153 Int. : 256.10 (2685376)  
Output m/z range : 10 to 506 Cut Level : 0.00 %



**Espectro 25.** Espectro de masas de baja resolución del compuesto **3a** (IE+).

Data:3516 MJE-RTH-Querc-Nit-1-gas

Sample Name:Dr Jimenez Manue/ Operadores: Carmen Garcia-Javier Perez

Description:

Ionization Mode:ESI+

History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[50.0%];Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 0....

Acquired:10/4/2016 10:41:42 AM

Operator:AccuTOF

Mass Calibration data:Cal PEG 600

Created:10/4/2016 12:42:20 PM

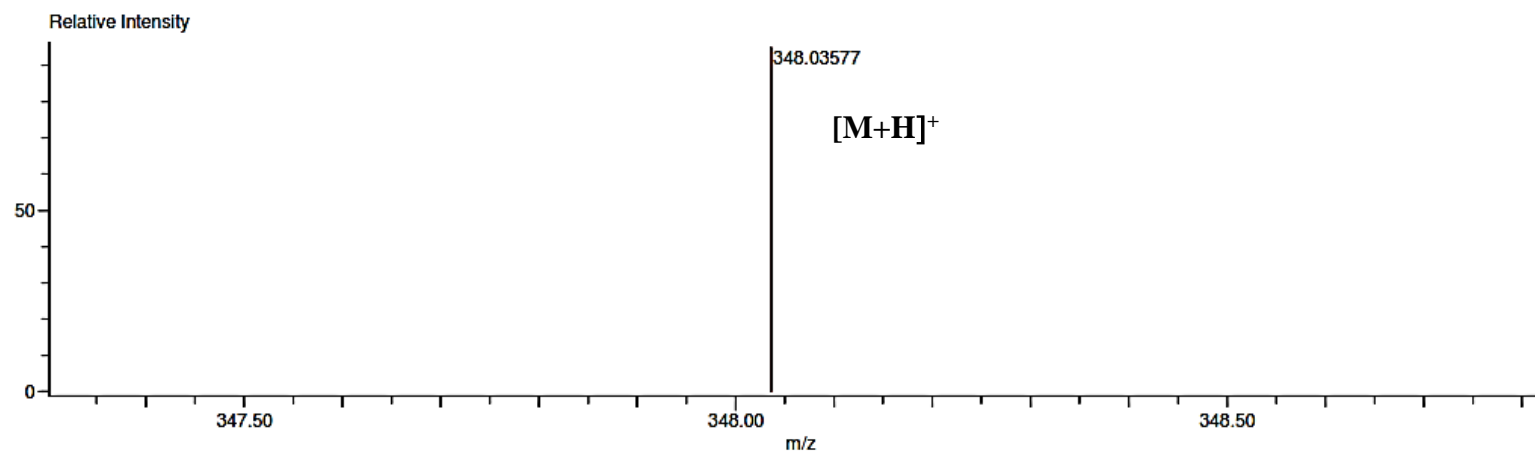
Created by:AccuTOF

Charge number:1

Tolerance:3.00(mmu)

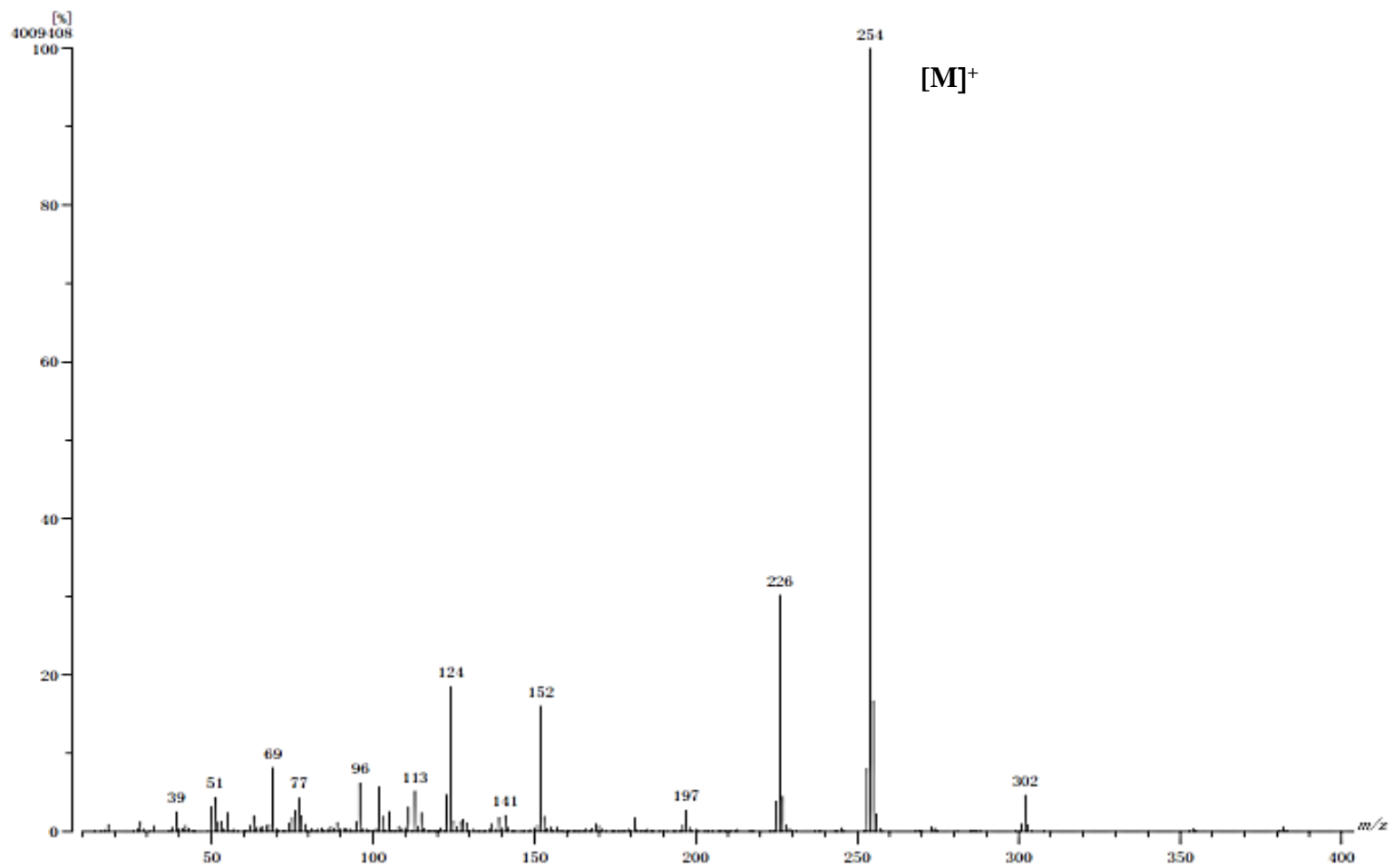
Unsaturation Number:0.0 .. 30.0 (Fraction:Both)

Element:<sup>12</sup>C:0 .. 42, <sup>1</sup>H:0 .. 65, <sup>14</sup>N:0 .. 1, <sup>16</sup>O:0 .. 9



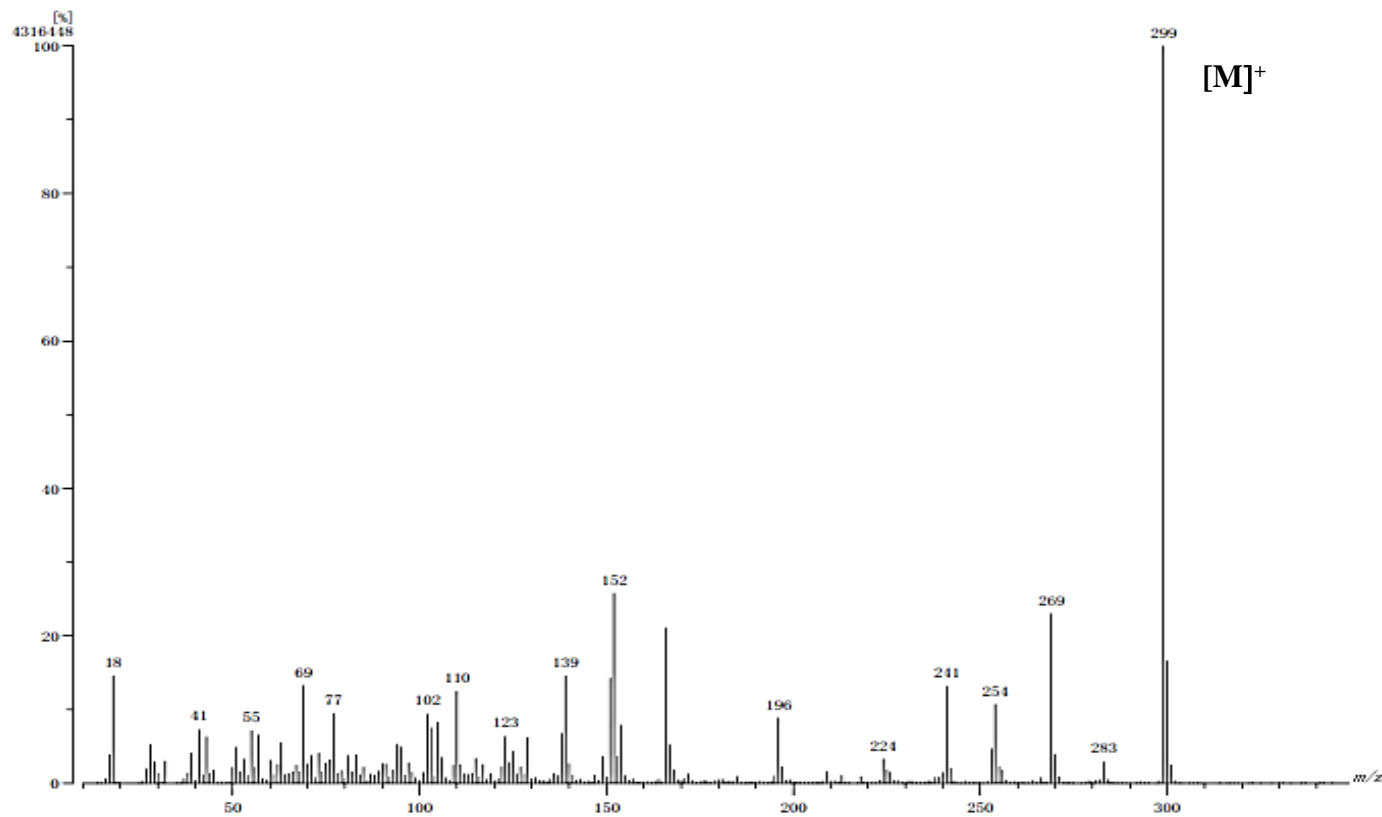
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
348.03577	89362.00	348.03556	0.21	0.60	<sup>12</sup> C <sub>15</sub> <sup>1</sup> H <sub>10</sub> <sup>14</sup> N <sub>1</sub> <sup>16</sup> O <sub>9</sub>	11.5

**Espectro 26.** Espectro de masas de alta resolución del compuesto **3a** (DART+).



**Espectro 27.** Espectro de masas de baja resolución del compuesto **4** (IE+).

[ Mass Spectrum ]  
Data : Dr Jiménez Manuel250 Date : 25-Aug-2016 11:35  
Instrument : MStation  
Sample : 3049 MJE-RTH-Crist-Nit-znaol  
Note : Operador:Carmen Garcia-Javier Perez  
Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]  
RT : 0.58 min Scan# : (20.21) Temp : 3276.7 deg.C  
BP : m/z 299 Int. : 411.65 (4316448)  
Output m/z range : 10 to 349 Cut Level : 0.00 %



**Espectro 28.** Espectro de masas de baja resolución del compuesto **4a** (IE+).

Data:3517 MJE-RTH-Crist-Nit-2-Sol

Sample Name:Dr Jimenez Manue/ Operadores: Carmen Garcia-Javier Perez

Description:

Ionization Mode:ESI+

History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[50.0%];Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 0....

Acquired:10/4/2016 10:39:06 AM

Operator:AccuTOF

Mass Calibration data:Cal PEG 600

Created:10/4/2016 12:45:24 PM

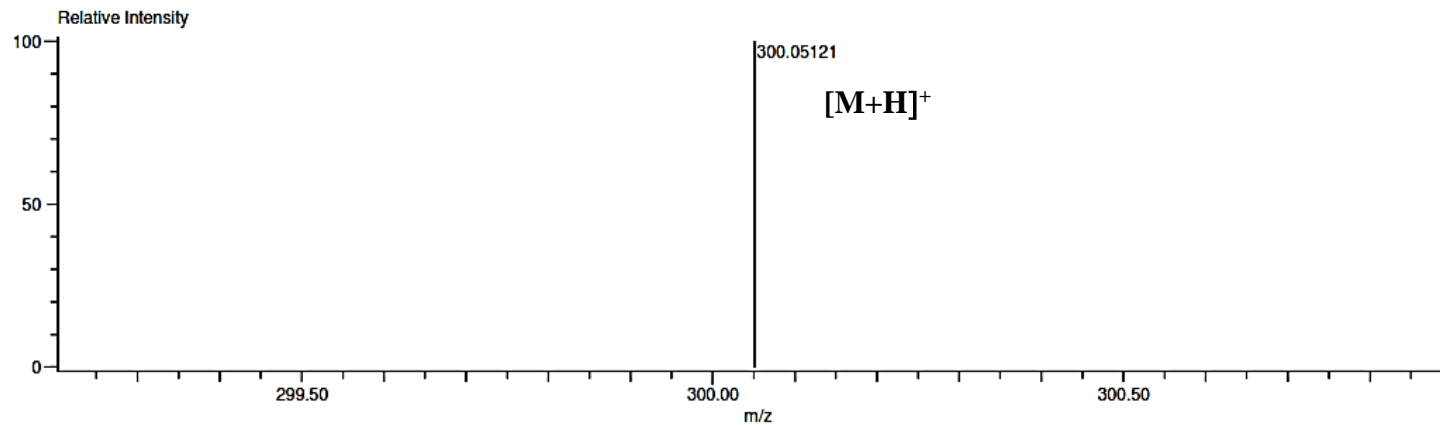
Created by:AccuTOF

Charge number:1

Tolerance:3.00(mmu)

Unsaturation Number:0.0 .. 30.0 (Fraction:Both)

Element:<sup>12</sup>C:0 .. 42, <sup>1</sup>H:0 .. 65, <sup>14</sup>N:0 .. 1, <sup>16</sup>O:0 .. 6

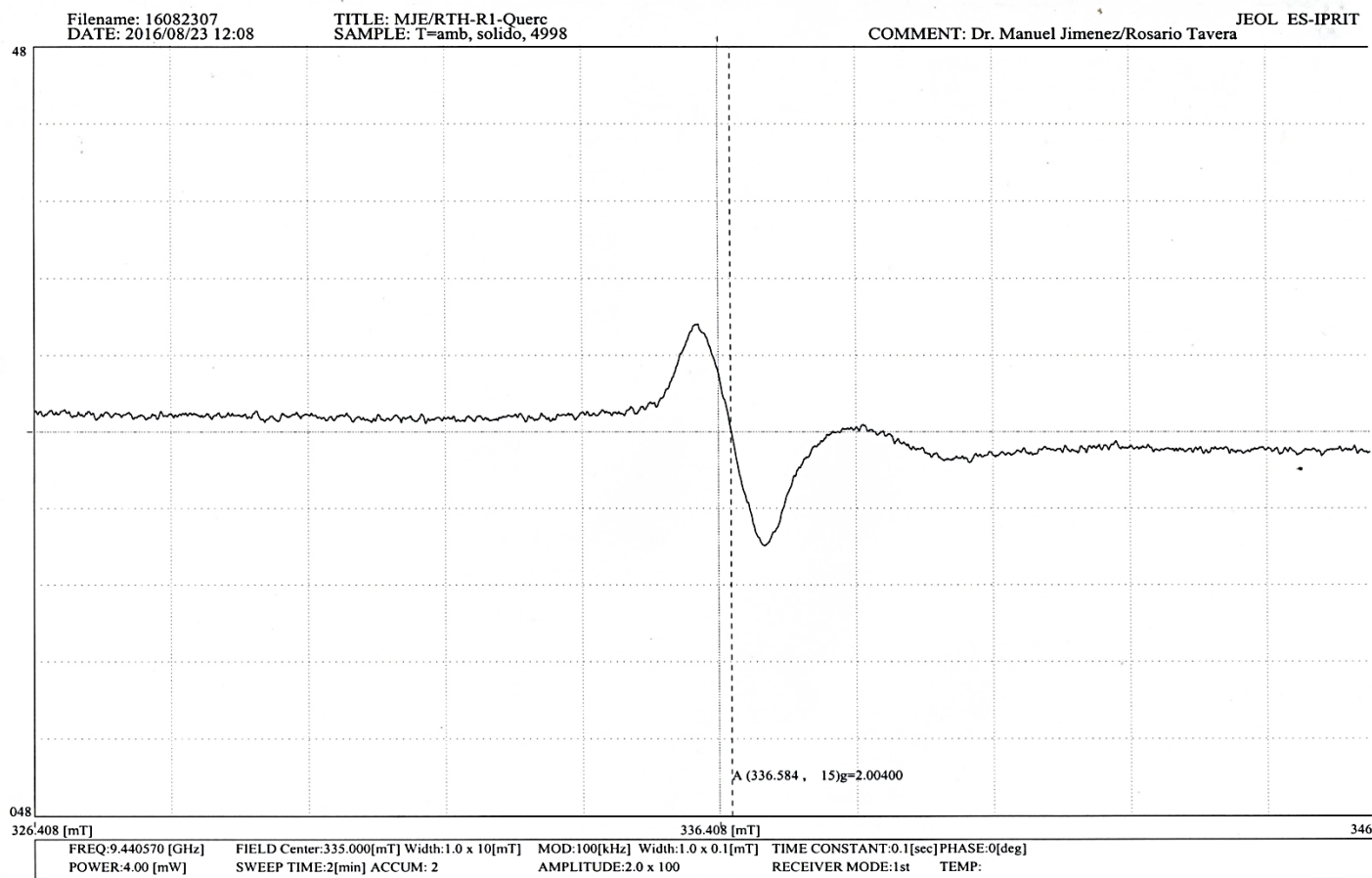


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
300.05121	50901.36	300.05081	0.40	1.34	<sup>12</sup> C <sub>15</sub> <sup>1</sup> H <sub>10</sub> <sup>14</sup> N <sub>1</sub> <sup>16</sup> O <sub>6</sub>	11.5

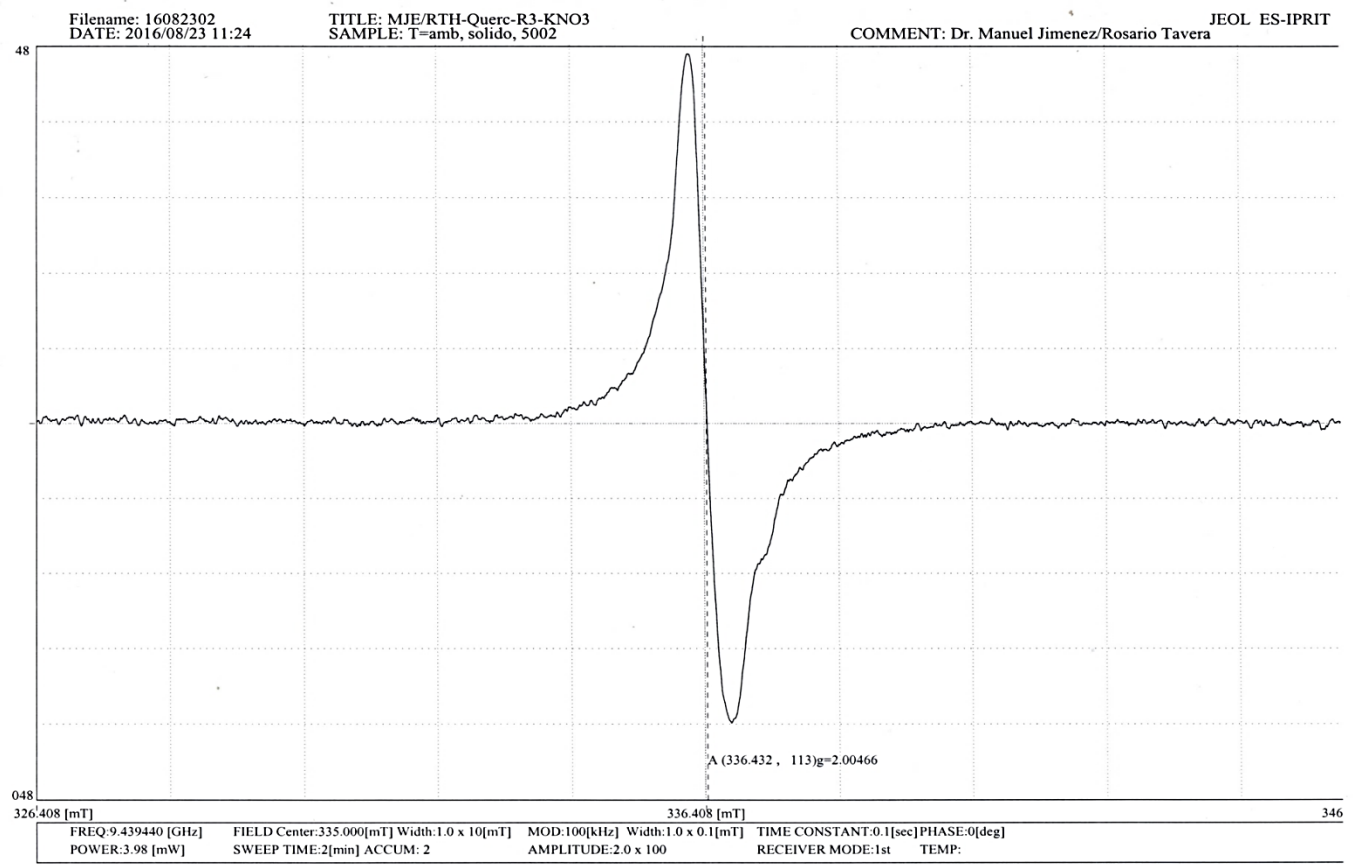
**Espectro 29.** Espectro de masas de alta resolución del compuesto **4a** (DART+).



## RESONANCIA PARAMAGNETICA ELECTRONICA



**Espectro 30.** Espectro de EPR del compuesto **3** bajo condiciones de nitración con MNT-KFS-Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.

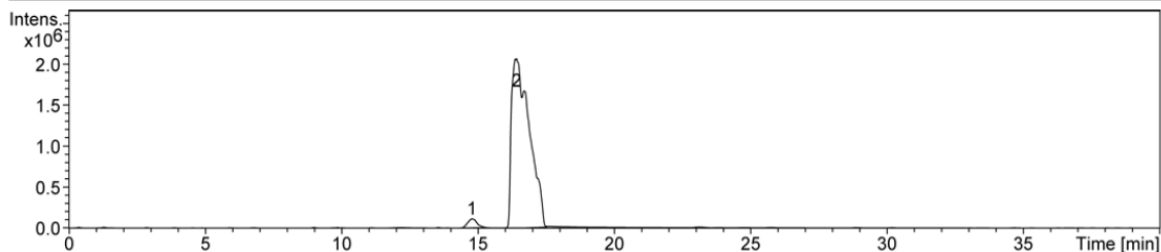


**Espectro 31.** Espectro de EPR del compuesto **3** bajo condiciones de nitración con ácido acético glacial-KNO<sub>3</sub>.

## CROMATOGRAMAS (HPLC-MS)

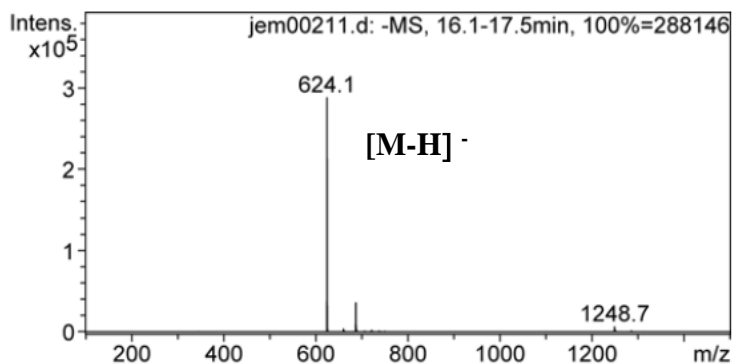
### Acquisition Parameter

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Std/Normal	Scan Begin	100 m/z	Scan End	1500 m/z
Capillary Exit	-141.3 Volt	Skim 1	-40.0 Volt	Trap Drive	76.9
Accumulation Time	250000 $\mu$ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off



#	RT [min]	Area	Area Frac %
1	14.8	2639250	2.7
2	16.4	95043319	97.3

### Cmpd 2, 16.4 min



#	m/z	I
1	624.1	288146
2	659.8	3593
3	661.8	1334
4	686.8	36020
5	688.5	2030
6	721.6	1770
7	1248.7	6353
8	1249.4	3566
9	1250.5	1415
10	1284.5	1344

**Cromatograma 1.** HPLC-MS (ESI-) del compuesto **1a**.

## Compound Mass Spectrum List Report

### Analysis Info

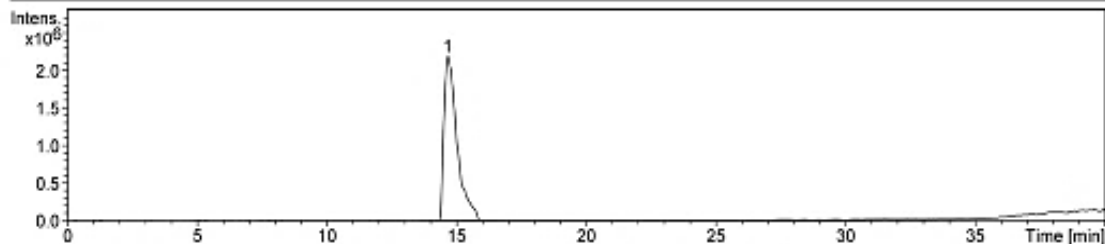
Analysis Name D:\Data\jem\jem00213.d  
Method Sria tecnica.m  
Sample Name MJE/RTH-Naring-di  
Comment 161019-jem-01

Acquisition Date 27/10/2016 11:13:36 a.m.

Operator Lucero Rios  
Instrument esquire6000

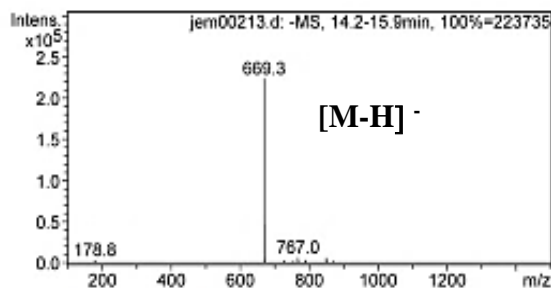
### Acquisition Parameter

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Std/Normal	Scan Begin	100 m/z	Scan End	1500 m/z
Capillary Exit	-136.2 Volt	Skim 1	-40.0 Volt	Trap Drive	71.0
Accumulation Time	250000 $\mu$ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off



#	RT [min]	Area	Area Frac %
1	14.7	7639933	100.0

### Cmpd 1, 14.7 min



#	m/z	I
1	178.8	3315
2	669.3	223735
3	727.0	2569
4	754.0	1762
5	767.0	6675
6	767.9	1938
7	789.0	3309
8	849.1	6143
9	850.0	2319
10	871.0	2000

**Cromatograma 2. HPLC-MS (ESI-) del compuesto 1b.**

### 13. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Chen, J.; Li, W.; Yao, H.; Xu, J. *Fitoterapia* **2015**, *103*, 231–241.
- (2) Rice-Evans, C. L.; Packer, L. *Flavonoids in health and disease*, 2a ed.; Marcel Dekker, Inc.: Nueva York, 2003.
- (3) García-Tirado, J.; Rieger-Reyes, C.; Saz-Peiró, P. *Med. Clin. (Barc)*. **2012**, *139* (8), 358–363.
- (4) Cazarolli, L. H.; Zanatta, L.; Alberton, E. H.; Figueiredo, M. S. R. B.; Folador, P.; Damazio, R. G.; Pizzolatti, M. G.; Silva, F. R. M. B. *Mini Rev. Med. Chem.* **2008**, *8* (13), 1429–1440.
- (5) Grotewold, E. *The science of flavonoids*; Springer: Ohio, EUA, 2006.
- (6) Cook, N. C.; Samman, S. *J. Nutr. Biochem.* **1996**, *7* (2), 66–76.
- (7) Harborne, J. B.; Mabry, T. J.; Mabry, H. *The Flavonoids*; Springer US, 1975.
- (8) Sekher Pannala, A.; Chan, T. S.; O'Brien, P. J.; Rice-Evans, C. A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *282*, 1161–1168.
- (9) Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20* (7), 933–956.
- (10) Pietta, P. G. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63* (7), 1035–1042.
- (11) Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Hara, Y.; Simic, M. G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1996**, 2497.
- (12) van Acker, S. A. B. E.; de Groot, M. J.; van den Berg, D.-J.; Tromp, M. N. J. L.; Donné-Op den Kelder, G.; Van Der Vijgh, W. J. F.; Bast, A. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9* (8), 1305–1312.
- (13) Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 572–584.
- (14) Haslam, E. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59* (2), 205–215.
- (15) Laine, R. M.; Arbor, A. (1993) *Patente US5216155 A Silicon and Aluminum Complexes*, Washington DC: EUA.
- (16) Doddi, A.; Kingston, J. V.; Ramkumar, V.; Suzuki, M.; Hojo, M.; Sudneendra Rao, M. N. *Phosphorus, Sulfur and Silicon* **2012**, *187*, 343–356.
- (17) Strauss, M. J. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* **1979**, *18*, 158–166.
- (18) Truong, D. D. *Clin. Interv. Aging* **2009**, *4* (1), 109–113.
- (19) Mattila, M.; Larni, H. *Drugs* **1980**, *374*, 353–374.
- (20) Patterson, S.; Wyllie, S. *Trends Parasitol.* **2014**, *30* (6), 289–298.
- (21) Ono, N. *The Nitro Group in Organic Synthesis*; Wiley VCH: Estados Unidos de América, 2001.
- (22) Paladani, A. C.; Medina, J. H. (1998). *Patente ES 2 177 811 T3 Uso de nitroflavonoides para el tratamiento de la ansiedad*. España

- (23) Marder, M.; Wasowski, C.; Jorge, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5* (22), 2717–2720.
- (24) Bose, A.; Sanjoto, W. P.; Villarreal, S.; Aguilar, H.; Banik, B. K. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (23), 3945–3947.
- (25) Bansal, V.; Khanna, R. N.; Campus, L. *Synth. Commun.* **2002**, *32* (9), 1345–1350.
- (26) Jimenez-Estrada, M.; Garcia, O.; Navarro, A.; Eusebio, J. L.; Álvarez, C.; Penierres, G.; Gutiérrez, R. *Steroids* **1997**, *62*, 500–503.
- (27) Bandyopadhyay, D.; Rivera, G.; Sanchez, J. L.; Rivera, J.; Granados, J. C.; Guerrero, A. M.; Chang, F. M.; Dearth, R. K.; Short, J. D.; Banik, B. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *82*, 574–583.
- (28) Rozhin, J.; Ludwig, E. H.; Corombos, J.; Horwitz, J. P.; Hughes, R.; Hughes, D. E.; Wilson, E.; Brooks, S. C. *Cancer Res.* **1983**, *43*, 2611–2617.
- (29) Olah, George a., Malhortra, R., Narang, S. C. *Nitration methods and mechanisms: Organic Nitro Chemistry Series*; Feuer, H., Ed.; VCH: Nueva York, USA, 1989.
- (30) Ebersson, L.; Radner, F. *Acc. Chem. Res.* **1987**, *20*, 53–59.
- (31) Schmitt, R. J.; Buttrill, S. E.; Ross, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 926–930.
- (32) Perrin, C. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5516–5518.
- (33) Tanaka, M.; Muro, E.; Ando, H.; Xu, Q.; Fujiwara, M. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2972–2978.
- (34) Olah, G. A. *Tetrahedron Lett.* **1970**, *4*, 240–248.
- (35) Vekariya, R. H.; Patel, H. D. *Synth. Commun.* **2014**, *44* (16), 2313–2335.
- (36) Sheldon, Roger Arthur, Van Bekkum, H. *Fine Chemicals through Heterogeneous Catalysis*; WILEY-VCH: Weinheim, 2001.
- (37) Samajdar, S.; Becker, F. F.; Banik, B. K. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (42), 8017–8020.
- (38) Svetlakov, N. V.; Nikitin, V. G.; Orekhova, A. O. *Russ. J. Appl. Chem.* **2002**, *75* (4), 669–671.
- (39) Schmid, H.; Maschka, A.; Frauenschill, I. L.; Abbildung, M.; Farbenindustrie, I. G. *Monatshefte für Chemie* **1949**, *80* (5), 670–677.
- (40) Jiménez-Estrada, M.; Ayala, J.; Reyes-Chilpa, R.; Navarro-Ocaña, A. *Rev. Latinoam. Química* **1999**, *27* (3), 81–88.
- (41) Shiri, M.; Zolfigol, M. A.; Kruger, H. G.; Tanbakouchian, Z. *Tetrahedron* **2010**, *66* (47), 9077–9106.
- (42) Broadley, J. S.; Monteath Robertson, J. *Nature* **1949**, *4178*, 915.
- (43) Riebsomer, J. L. *Chem. Rev.* **1944**, *3*, 157–233.
- (44) Pimentel, S.; Lima, F. C. A.; Silva, B. F.; Sa, C. P. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 2913–2920.
- (45) Hartshorn, M. P.; Judd, M. C.; Vannoort, R. W.; Wright, G. J. *Aust. J. Chem.* **1989**, *42*, 689.

- (46) Brunton, G.; Cruse, H. W.; Riches, K. M.; Whittle, A. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 2 (12), 1093–1094.
- (47) Astolfi, P.; Panagiotaki, M.; Greci, L. *European J. Org. Chem.* **2005**, No. 14, 3052–3059.
- (48) Cooney, R. V.; Harwood, P. J.; Franke, A. A.; Narala, K.; Sundström, A. K.; Berggren, P. O.; Mordan, L. J. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, 19 (3), 259–269.
- (49) Tournassat, C.; Bourg, I. C.; Steefel, C. I.; Bergaya, F. *Dev. Clay Sci.* **2015**, 6, 5–31.
- (50) Varma, R. S. *Tetrahedron* **2002**, 58 (7), 1235–1255.
- (51) Marina Vargas Rodríguez, Y.; Beltrán, H. I.; Vázquez-Labastida, E.; Linares-López, C.; Salmón, M. J. *Mater. Res.* **2007**, 22 (3), 788–800.
- (52) Chitnis, S. R.; Mohan Sharma, M. *React. Funct. Polym.* **1997**, 32 (1), 93–115.
- (53) Nagendrappa, G. *Resonance* **2002**, 7 (1), 64–77.
- (54) Sheldon, R. A.; Arends, I.; Hanefeld, U. *Green Chemistry and Catalysis*; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co: Weinheim, Alemania, 2007.
- (55) Molu, Z. B.; Yurdakoç, K. *Microporous Mesoporous Mater.* **2010**, 127 (1–2), 50–60.
- (56) Basu, B.; Paul, S. J. *Catal.* **2013**, 2013, 1–30.
- (57) Tanabe, K.; Misono, M.; Ono, Y.; Hideshi, H. *New Solid Acids and Bases: Their Catalytic Properties*; 1989; Vol. 51.
- (58) Polshettiwar, V.; Len, C.; Fihri, A. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, 253 (21–22), 2599–2626.
- (59) Laszlo, P.; Vandormael, J. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29 (44), 1843–1846.
- (60) Ravi, P.; Tewari, S. P. *Catal. Commun.* **2012**, 19, 37–41.
- (61) Samajdar, S. *Arkivoc* **2001**, 2001 (8), 27–33.
- (62) Yin, W. P.; Shi, M. *Tetrahedron* **2005**, 61 (46), 10861–10867.
- (63) Gigante, B.; Prazeres, A. O.; Marcelo-Curto, M. J.; Cornblis, A.; Laszlo, P. *J. Org. Chem.* **1995**, 60 (5), 3445–3447.
- (64) Mellor, J. M.; Mittoo, S.; Parkes, R.; Millar, R. W. *Tetrahedron* **2000**, 56 (40), 8019–8024.
- (65) Cornelis, A.; Laszlo, P.; Pannetreau, P. *J. Org. Chem.* **1983**, 48 (24), 4771–4772.
- (66) Kropp, P. J.; Breton, G. W.; Fields, J. D.; Tung, J. C.; Loomis, B. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122 (18), 4280–4285.
- (67) Badgujar, D. M.; Talawar, M. B.; Mahulikar, P. P. *Propellants, Explos. Pyrotech.* **2016**, 41 (1), 24–34.
- (68) Bose, A. K.; Ganguly, S. N.; Manhas, M. S.; Rao, S.; Speck, J.; Pekelny, U.; Pombo-Villars, E. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47 (12), 1885–1888.

- (69) Yadav, U.; Mande, H.; Ghalsasi, P. *J. Chem. Educ.* **2011**, *89* (3), 268–270.
- (70) Chandrasekaran, S.; Chaudhuri, M. K.; Devota, S.; Ghosh, P. K.; Yadav, J. S.; Bhaduri, S.; Lohray, B. B.; Gopalan, B.; Bhate, P.; Ranu, B. C.; Brakaspathy, R. *Monograph on Green Chemistry Laboratory Experiments*. <http://www.dst.gov.in/green-chem.pdf>.
- (71) Kumar, P.; Jasra, R. V.; Bhat, T. S. G. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1995**, *34*, 1440–1448.
- (72) Barnum, D. W. *Inorg. Chem.* **1972**, *11* (8), 1424–1429.
- (73) Boudin, A.; Cerveau, G.; Chuit, C.; Corriu, R. J. P.; Reye, C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25* (5), 474–476.
- (74) Rong, Y.; Wang, Z.; Wu, J.; Zhao, B. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2012**, *93*, 235–239.
- (75) Cotelle, N.; Bernier, J. L.; Catteau, J. P.; Pommery, J.; Wallet, J. C.; Gaydou, E. M. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20* (1), 35–43.
- (76) Gamez, E. J. C.; Luyengi, L.; Lee, S. K.; Zhu, L.; Zhou, B. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 706–708.
- (77) Cole, M. D. *Biochem. Syst. Ecol.* **1994**, *22* (8), 837–856.