



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO SOBRE SÍNTESIS, ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE
MÍMICOS DE CURCUMINA Y DERIVADOS.

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en D. MARCO ANTONIO OBREGÓN MENDOZA

Dr. RAÚL GUILLERMO ENRÍQUEZ HABIB.
INSTITUTO DE QUÍMICA UNAM

Ciudad de México, Febrero 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

ESTUDIO SOBRE SÍNTESIS, ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE
MÍMICOS DE CURCUMINA Y DERIVADOS.

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en D. MARCO ANTONIO OBREGÓN MENDOZA

**Dr. RAÚL GUILLERMO ENRÍQUEZ HABIB.
INSTITUTO DE QUÍMICA UNAM**



**Posgrado
Ciencias
Químicas**

Ciudad de México, Febrero 2021

Jurado Asignado

Presidente: Dr. Francisco Yuste López

Vocal: Dr. José Ignacio Regla Contreras

Vocal: Dr. José Federico del Río Portilla

Vocal: Dr. Andrés Navarrete Castro

Secretario: Dra. Patricia Guadarrama Acosta

Sitio donde se desarrolló el proyecto de investigación:

Instituto de Química de la UNAM laboratorio 1-5

Sustentante: M en D. Marco Antonio Obregón Mendoza

Tutor: Dr. Raúl Guillermo Enríquez Habib

Agradecimientos:

Mis más amplios agradecimientos a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas e Instituto de Química de la UNAM, por otorgarme un lugar para realizar mis estudios de doctorado.

Agradezco al CONACyT por la beca otorgada (CVU 599367 Becario 603692) para realizar mis estudios de doctorado.

Agradezco de manera muy especial a mi director de tesis el Dr. Raúl Guillermo Enríquez Habib por sus enseñanzas éticas e intelectuales que me otorgó durante mis estudios de doctorado.

Agradezco de manera muy especial a mi compañera de vida la Lic. Lizbeth Soto por sus sabios consejos para tranquilizarme en momentos difíciles. Además, por su alta responsabilidad en la familia y el apoyo incondicional que me ha otorgado para dedicarme de manera exclusiva a mis estudios de doctorado, también agradezco a mis hijos Gandhi Alejandro Obregón y Elizabeth Alejandra Obregón ya que me han inspirado en ser mejor durante esta vida.

Agradezco de manera muy especial a mi padre Antonio Obregón y madre Clotilde Mendoza por el apoyo que me han otorgado durante toda mi vida.

Agradezco a los integrantes de mi comité tutor: Dr. Francisco Yuste López y Dra. Isabel Aguilar Laurents por sus enseñanzas durante las reuniones semestrales, también agradezco a los integrantes del jurado: Dra. Patricia Guadarrama Acosta, Dr. José Ignacio Regla Contreras, Dr. José Federico del Río Portilla y Dr. Andrés Navarrete Castro, por sus muy acertadas observaciones y correcciones hechas en la tesis para la mejora de su calidad.

Agradezco a mis compañeros: M en C. William Meza y M en C. Yair Alvarez Ricardo por sus enseñanzas y consejos otorgados durante mis estudios de doctorado, y a la Dra. M. Mirian Estévez Carmona, Dra. Julia Cassani Hernández y Dra. Imma Arias Olgúin por el apoyo otorgado durante mis estudios de doctorado.

Agradezco a los técnicos académicos del Instituto de Química de la UNAM que me apoyaron en la obtención de los datos necesarios para la realización de esta tesis:

M en C. Ma. Teresa Obdulia Ramírez Apan, Dra. M. Isabel Chávez, M en C. Antonio Nieto Camacho, Dr. Rubén Alfredo Toscano, M. en C. Simón Hernández Ortega, Dr. Rubén Luis Gaviño Ramírez, Q. María de los Ángeles Peña Ortiz, M. en C. Héctor Ríos Olivares, Q.F.B. María del Rocío Patiño Maya, Q. María de la Paz Orta Pérez, I.Q. Luis Velasco Ibarra, Dra. María del Carmen García González y Dr. Francisco Javier Pérez Flores.

Agradezco al personal del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas: M en C. Josefina Tenopala García, Ana María Nuñez, Ana Valeria Barrientos González, L. A. Mary Cruz Salazar García y Lic. Jesús Gumaro Viacobo Flores, por apoyarme de manera incondicional y oportuna en todos los trámites administrativos.

Esta tesis se realizó en el laboratorio 1-5 del Instituto de Química de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Raúl Guillermo Enríquez Habib. El proyecto contó con la beca otorgada por el CONACyT (CVU 599367 BECARIO 603692) además de los proyectos de apoyo CONACyT: CB 252524, FOINS-307152 y DGAPA PAPIIT: IN208516, IT200720.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente tesis doctoral han sido publicados en los siguientes artículos:

Obregón-Mendoza, M.A.; Estévez-Carmona, M.M.; Hernández-Ortega, S.; Soriano-García, M.; Ramírez-Apan, M.T.; Orea, L.; Pilotzi, H.; Gnecco, D.; Cassani, J.; Enríquez, R.G. **Retro-Curcuminoids as Mimics of Dehydrozingerone and Curcumin: Synthesis, NMR, X-ray, and Cytotoxic Activity.** *Molecules* **2017**, *22*, 33.

Obregón-Mendoza, M.A., Estévez-Carmona, M. , Alvarez-Ricardo, Y. , Meza-Morales, W. , Escobedo-Martínez, C. , Soriano-García, M. and Enríquez, R. **Crystal Structure, Synthesis and Biological Activity of Ether and Ester *Trans*-Ferulic Acid Derivatives.** *International Journal of Organic Chemistry*, **2018**, *8*, 359-377

Obregón-Mendoza, M.A.; Arias-Olguín, I.I.; Estévez-Carmona, M.M.; Meza-Morales, W.; Alvarez-Ricardo, Y.; Toscano, R.A.; Arenas-Huertero, F.; Cassani, J.; Enríquez, R.G. **Non-Cytotoxic Dibenzyl and Difluoroborate Curcuminoid Fluorophores Allow Visualization of Nucleus or Cytoplasm in Bioimaging.** *Molecules* **2020**, *25*, 3205.

Algunos resultados experimentales fueron presentados en el siguiente congreso:

Marco-A. Obregón Mendoza, William Meza, Yair Alvarez-Ricardo, M. Mirian Estévez-Carmona, Carolina Escobedo, Manuel Soriano, Raúl G. Enríquez. **Synthesis and structure of mono, di , tri and tetra benzylated curcuminoids.** QPNT-P1-C. 53^o Congreso Mexicano de Química-SQM, 2-5, octubre **2018**.

ÍNDICE

Abreviaturas y símbolos.....	6
Resumen.....	8
Abstract.....	9
Introducción.....	10
1. Antecedentes.....	10
1.1 La degradación de curcumina.....	10
1.2 Biosíntesis de curcumina y curcuminoides.....	13
1.3 Desventajas de la curcumina.....	14
1.4 Metabolismo de la curcumina.....	14
1.5 Interacción de curcumina con dianas moleculares que inducen apoptosis.....	16
1.6 Regulación del factor nuclear kappa beta (NF- κ B) por curcumina.....	19
1.7 Inducción de la apoptosis por la curcumina mediante fenoles y los dobles enlaces conjugados.....	22
1.8 Modificación sintética de la curcumina.....	23
1.9 Compuestos curcuminoides.....	24
1.10 Otros compuestos análogos de curcumina.....	27
2. Hipótesis.....	37
3. Objetivo general.....	38
4. Objetivos particulares.....	38
5. Metodología sintética.....	40
5.1 Síntesis de precursores (productos de condensación aldólica; hemi-curcuminoides, chalconas, di-chalconas).....	40
5.2 Síntesis de cloruros de ácido.....	41
5.3 Síntesis de los <i>retro</i> -curcuminoides.....	41
5.4 Síntesis de compuestos hidrogenados (zingerona y análogos).....	43
5.5 Síntesis de éteres y ésteres derivados del ácido ferúlico.....	44
5.6 Síntesis de los bencilidenos.....	45
5.7 Síntesis de pirazolinas.....	47
5.8 Síntesis de chalconas (C-3) y di-chalconas (C-5).....	48
5.9 Síntesis de curcuminoides bencilados.....	48
5.10 Síntesis de heptanoides (difencil-curcuminoides).....	49
5.11 Síntesis de complejos Zn y B de curcuminoides.....	51
6. Metodología de los ensayos biológicos.....	52
6.1 Ensayo de citotoxicidad.....	53
6.2 Inducción de la peroxidación lipídica y la cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	54
6.3 Actividad antioxidante por captura del radical libre 2, 2-difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH).....	56
7. Resumen de resultados.....	56
8. Discusión de resultados.....	59
8.1 Características espectroscópicas (RMN 1 H) de los <i>retro</i> -curcuminoides.....	59

8.2	Análisis de IR de los <i>retro</i> -curcuminoides.	66
8.3	Espectrometría de masas (EM) de los <i>retro</i> -curcuminoides.	68
8.4	Rayos-X de los <i>retro</i> -curcuminoides.	70
8.5	Características espectroscópicas (RMN ¹ H) de los <i>retro</i> -curcuminoides del éster metílico del ácido ferúlico.	73
8.6	Análisis de IR de los <i>retro</i> -curcuminoides derivados del éster metílico del ácido ferúlico.	74
8.7	Espectrometría de masas (EM) de los <i>retro</i> -curcuminoides derivados del éster metílico del ácido ferúlico.	75
8.8	Rayos-X de los <i>retro</i> -curcuminoides derivados del éster metílico del ácido ferúlico.	76
8.9	Características espectroscópicas (RMN ¹ H) de <i>retro</i> -curcuminoides hidrogenados (zingerona y análogos).	77
8.10	Análisis de IR de los <i>retro</i> -curcuminoides derivados de zingerona y análogos.	82
8.11	Espectrometría de masas (EM) de los <i>retro</i> -curcuminoides derivados de la zingerona y análogos.	83
8.12	Características espectroscópicas (RMN ¹ H) de los derivados del ácido ferúlico.	84
8.13	Análisis de IR de los derivados del ácido ferúlico.	88
8.14	Espectrometría de masas (EM) de los derivados del ácido ferúlico.	90
8.15	Rayos-X de los derivados del ácido ferúlico.	92
8.16	Características espectroscópicas (RMN ¹ H) de los bencilidenos.	94
8.17	Análisis de IR de los bencilidenos.	96
8.18	Espectrometría de masas (EM) de los bencilidenos.	98
8.19	Rayos-X de bencilidenos.	101
8.20	Características espectroscópicas (RMN ¹ H) de las pirazolinas.	103
8.21	Análisis de IR de las pirazolinas.	109
8.22	Espectrometría de masas (EM) de pirazolinas.	111
8.23	Rayos-X de la pirazolina 54.	113
8.24	Características espectroscópicas (RMN ¹ H) de chalconas (C-3) y di-chalconas (C-5).	114
8.25	Análisis de IR de chalconas y di-chalconas.	116
8.26	Espectrometría de masas de chalconas y di-chalconas.	119
8.27	Características espectroscópicas (RMN ¹ H) de curcuminoides bencilados.	124
8.28	Análisis de IR de curcuminoides bencilados.	134
8.29	Espectrometría de masas de los curcuminoides bencilados.	137
8.30	Rayos-X de curcuminoides bencilados.	143
8.31	Características espectroscópicas (RMN ¹ H) de bencilidenos de curcuminoides.	146
8.32	Características espectroscópicas (RMN ¹ H) de complejos de Zn y B de curcuminoides.	147
8.33	Análisis de IR del complejo con boro (compuesto 71).	152
8.34	Espectrometría de masas del complejo de curcumina di-bencilada con BF ₂ (compuesto 71).	153
8.35	Rayos-X del complejo de curcumina di-bencilada con BF ₂ (compuesto 71).	154
9.	Discusión de los ensayos biológicos.	156
9.1	Análisis de los ensayos biológicos de los <i>retro</i> -curcuminoides.	156
9.1.1	Análisis estadístico de los valores de IC ₅₀ de los <i>retro</i> -curcuminoides, mediante la prueba <i>t</i> de Student.	163
9.1.2	Mecanismos de acción de los <i>retro</i> -curcuminoides en nivel celular e interacción con dianas moleculares.	165
9.1.3	Acoplamiento molecular de curcumina y los <i>retro</i> -curcuminoides con las proteínas	

Akt-2 y el factor nuclear kappa-beta (NF- κ β).....	165
9.2 Análisis de los ensayos biológicos de los derivados del ácido ferúlico.....	175
9.3 Análisis de los ensayos biológicos de bencilidenos.....	178
9.4 Análisis de los ensayos biológicos de pirazolinas.....	179
9.5 Análisis de los ensayos biológicos de chalconas (C-3) y di-chalconas (C-5).....	182
9.6 Análisis de los ensayos biológicos de curcuminoides tipo heptanoides (63-66 y 67-69) y complejos de curcuminoides (70-71).....	184
9.7 Propiedades fluorescentes de curcuminoides bencilados y tinción celular.	186
10. Conclusiones.....	193
11. Equipos utilizados.	195
12. Pruebas físicas y caracterización espectroscópica de los compuestos sintetizados.	197
13. Referencias.	218
14. Anexos (Espectros de Resonancia Magnética Nuclear, Infrarrojo y Espectrometría de Masas)	230
15. Publicaciones Internacionales.	331

Abreviaturas y símbolos.

AcOEt	Acetato de etilo
br	Señal simple ancha
°C	grados Celsius
C.C.F.	Cromatografía de capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuteriado
CHCl ₃	Cloroformo
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ CH ₂ OCH ₂ CH ₃	Éter etílico, éter dietílico
d	Señal doble
DMSO- <i>d</i> 6	Dimetil sulfoxido hexa-deuterado
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo
EM	Espectrometría de Masas
Eq	Equivalente
EtOH	Etanol
g	gramo.
HCl	Ácido Clorhídrico
Hex.	Hexano
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
IR	Espectroscopia de Infrarrojo
λ	Longitud de onda
m	Señal múltiple (multiplete)
MeOH	Metanol.
Meq	Miliequivalentes
MHz	Megahertz.
NaOH	Hidróxido de Sodio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
NF-κβ	Factor nuclear kappa beta

nOe	Efecto nuclear Overhauser
p.f.	punto de fusión
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidronio [H ₃ O ⁺]
ppm	Partes por millón.
q	Señal cuádruple (cuarteto)
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono isótopo 13.
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno isótopo 1.
s	Señal simple (singulete)
t	Señal triple
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.
UV	Ultravioleta

Resumen.

La curcumina ha sido ampliamente estudiada debido a sus propiedades medicinales y su síntesis química ha sido un paso importante para la preparación de derivados (curcuminoides) y compuestos análogos. En este trabajo se sintetizaron diferentes familias de compuestos partiendo de sus productos de degradación (vainillina, deshidrozingeron, ácido ferúlico) en condiciones *in vitro*. Un total de 71 compuestos sintéticos y clasificados en ocho familias (*retro*-curcuminoides, derivados del ácido ferúlico (éteres o ésteres), bencilidenos, pirazolin, chalconas (C3), di-chalconas (C5), curcuminoides (C7) y complejos de curcuminoides) proporcionan una visión general de sus estructuras y propiedades biológicas. Algunos de esos aspectos son:

- 1) La actividad citotóxica óptima en los ésteres del ácido cinámico se debe principalmente a la ausencia de metoxilos en la posición *orto* de los anillos aromáticos.
- 2) La ausencia de fenoles en las familias de compuestos mencionados conlleva una disminución de la actividad antioxidante.
- 3) Las moléculas que presentan el sistema carbonílico α,β -insaturado (aceptores tipo Michael) pueden tener una actividad citotóxica selectiva como ocurre con los *retro*-curcuminoides, o no selectiva (promiscuidad enzimática) como es el caso de los bencilidenos, chalconas y di-chalconas.
- 4) Aunque se obtuvieron derivados biológicamente inactivos mediante la sustitución de los fenoles de curcumina con grupos voluminosos (ésteres cinámicos o éteres bencílicos), algunos curcuminoides mostraron una importante actividad como fluoróforos no citotóxicos.

Abstract.

Curcumin has been widely studied due to its medicinal properties. Its chemical synthesis has been an important step for the preparation of curcuminoids and analogous compounds. Herein, several families of compounds were synthesized starting from the degradation products (vanillin, dehydrozingerone and ferulic acid) of the curcumin molecule. A total of 71 compounds synthesized and classified into eight families (*retro*-curcuminoids, derivatives of ferulic acid (ethers or esters), benzylidenes, pyrazolines, chalcones (C3), di-chalcones (C5), curcuminoids (C7) and complexes of curcuminoids) allowed to obtain general characteristics of their behavior towards cytotoxicity and antioxidant activity, where the following findings outstand:

- 1) The optimal cytotoxic activity in cinnamic acid esters is mainly due to the absence of methoxyls in *ortho* positions of the aromatic rings.
- 2) The absence of phenols in these families of compounds leads to a decrease in antioxidant activity.
- 3) Molecules with the α,β -unsaturated carbonyl system (Michael acceptors) may have selective cytotoxic activity as observed with *retro*-curcuminoids, or non-selective (enzymatic promiscuity) as seen with benzilidene, chalcone and di-chalcone type of compounds.
- 4) Although biologically inactive derivatives were obtained by replacing the phenols of curcumin with bulky groups (cinnamic esters or benzyl ethers), some curcuminoids resulted into useful non-cytotoxic fluorophores.

Introducción.

Los productos naturales sirven como una fuente clave para el diseño, descubrimiento y desarrollo de fármacos candidatos para enfrentar diferentes enfermedades. La curcumina (1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadien-3,5-dicetona, Figura 1) comúnmente llamada diferuloilmetano [1] es el principal ingrediente activo de la especia asiática *Curcuma longa*. Esta molécula bioactiva recibe en la actualidad una gran atención debido a sus amplios atributos farmacológicos para tratar enfermedades humanas de los tiempos modernos [2].

Un amplio número de investigaciones han descrito las propiedades medicinales beneficiosas de la curcumina desde diferentes puntos de vista [3,4]. La curcumina se ha utilizado como un producto de origen natural para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y los estudios han confirmado que posee una actividad antiproliferativa contra varias células tumorales *in vitro* [5]. Otras investigaciones han descrito que la curcumina es un potente compuesto antioxidante ya que posee una gran capacidad de captura de radicales libres [6]. Además, varios análogos químicos como sus metabolitos o sus precursores han demostrado ser activos contra enfermedades inflamatorias [1,7]. Estas propiedades benéficas explican el interés científico mundial de esta molécula que incluye a sus derivados y análogos.

1. Antecedentes.

1.1 La degradación de curcumina.

En el estudio realizado por Peter y Donald en 1973 [8] se encontró que cuando la curcumina es sometida a una solución de NaOH al 5% se degrada principalmente en dos compuestos: ácido ferúlico y deshidozingerona (DHZ). En estudios posteriores, Sardjiman y colaboradores [9] coinciden en que la curcumina es inestable en un pH superior de 6.5 (causado por el metileno activo). Adicionalmente, en los trabajos de Ying-Jang [10] se estableció que las estructuras en las que se degrada esta molécula

en solución de buffer de fosfatos a pH de 7.2 son principalmente tres: ácido ferúlico, DHZ y vainillina, como se muestra en la Figura 1.

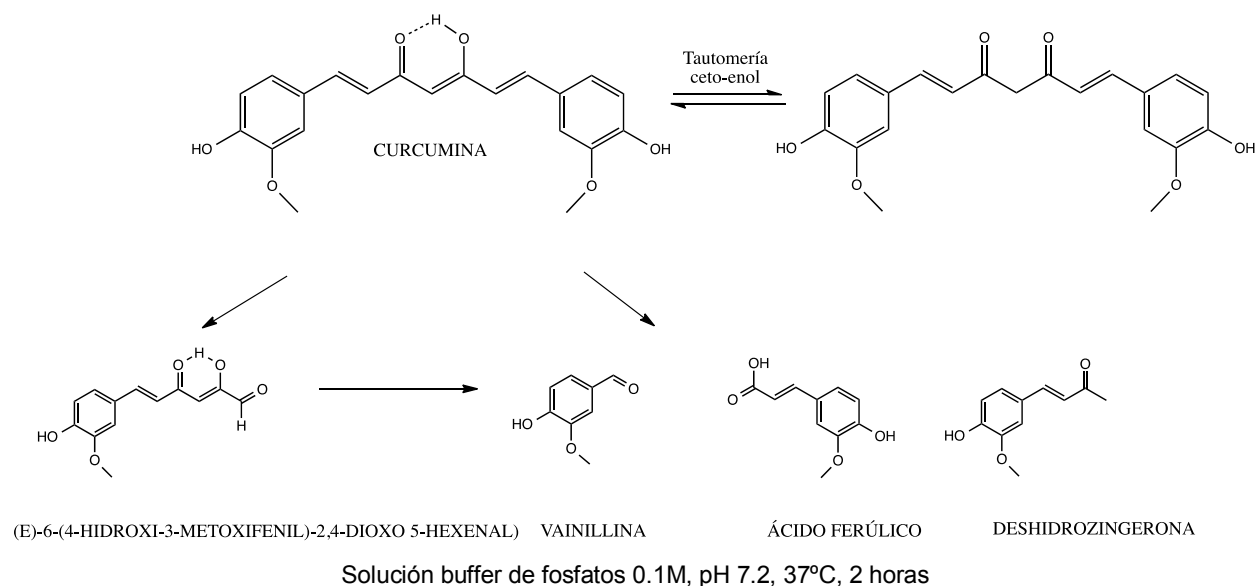


Figura 1. Curcumina y sus principales productos de degradación en pH básico. [10]

El ácido ferúlico es un metabolito presente en la biosíntesis y degradación de curcumina (Figura 1). Muchos alimentos básicos como el salvado de trigo, los alimentos integrales, las frutas cítricas, el plátano, el café, el jugo de naranja, la berenjena, los brotes de bambú, la remolacha, la col, la espinaca y el brócoli se encuentran entre las fuentes más ricas del ácido ferúlico [11]. Este compuesto está presente en semillas y hojas tanto en su forma libre como en su forma conjugada. El ácido ferúlico confiere rigidez a la pared celular vegetal y algunos de sus efectos biológicos reportados son: antioxidante y antiinflamatorio [12].

La DHZ es un compuesto fenólico que se relaciona con la degradación de la curcumina y en la literatura se denomina *hemi-curcuminoide* [13] (Figura 1). Además, se encuentra como un componente principal en los rizomas del *Zingiber officinale Roscoe* (jengibre). La DHZ ha sido ampliamente estudiada ya que posee numerosas actividades biológicas *v.gr.*: antimicrobiana, antioxidante, anti-enfermedad de

Parkinson, anti-enfermedad de Alzheimer, antitumoral, antidepresivo y antidiarreico [14–17].

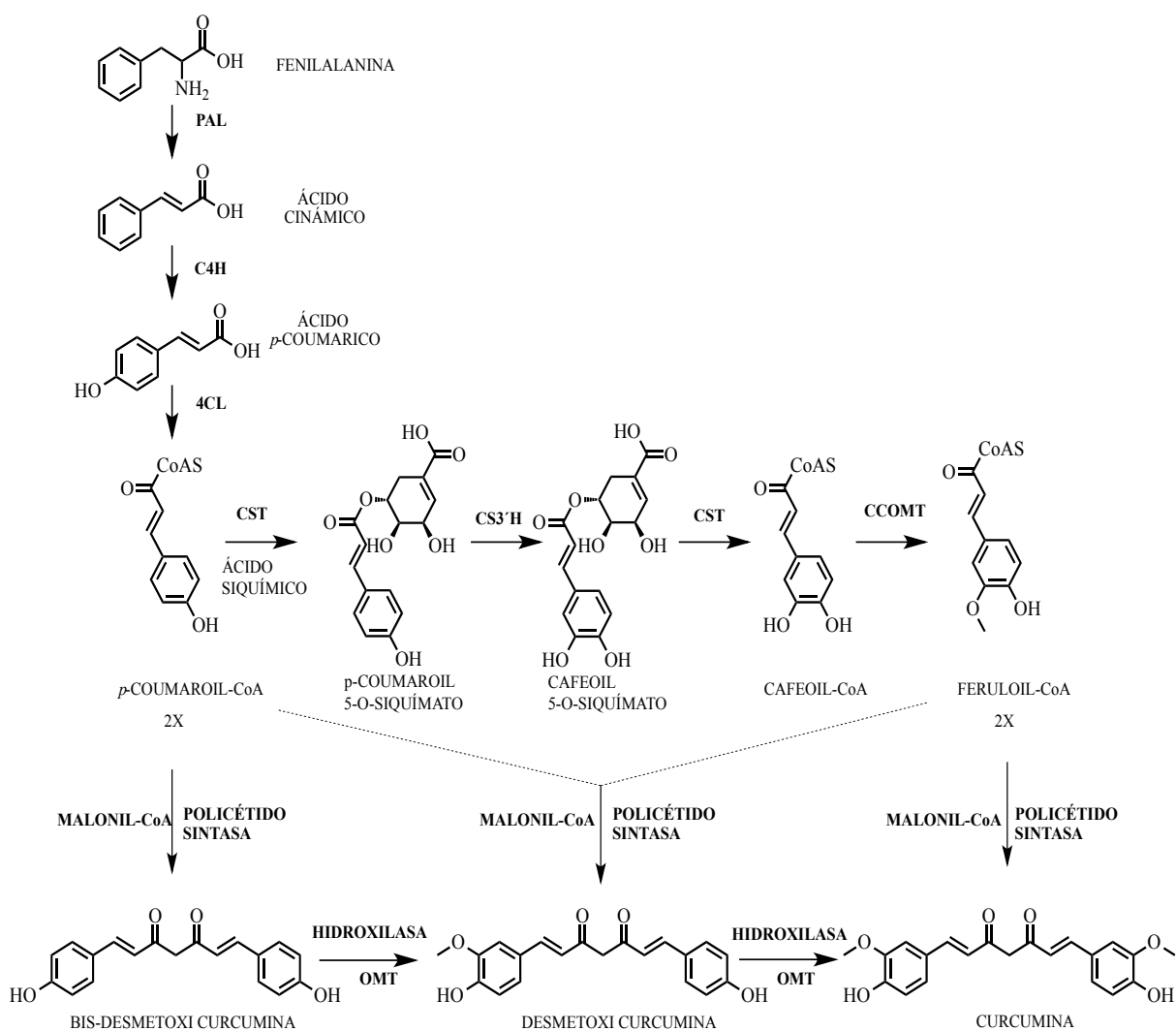
La DHZ puede sintetizarse en el laboratorio por medio de la condensación aldólica entre la vainillina con acetona (lo cual es una ventaja para diferentes propósitos experimentales) y es muy estudiado por ser una chalcona natural. Los derivados semisintéticos de DHZ tienen efectos diversos en su actividad biológica y los estudios de sus modificaciones estructurales se dirigen principalmente a la propiedad antioxidante [18].

Químicamente la DHZ y el ácido ferúlico están constituidos por un fenilo sustituidos con un grupo metoxilo (-OCH₃) en posición *orto* al fenol (Ph-OH) y un sistema carbonílico α,β -insaturado, un grupo metilo terminal o un ácido carboxílico (en el caso del ácido ferúlico). La DHZ y el ácido ferúlico (considerados como andamios moleculares) son intermediarios químicos versátiles en síntesis orgánica con posibilidades de formar nuevos enlaces. Un andamio molecular [19] se aplica ampliamente en química medicinal para producir compuestos bioactivos con una estructura central común, asociadas con actividades biológicas específicas.

Las comparaciones biológicas hechas entre curcumina y sus productos de degradación son las siguientes: a) la curcumina presenta mayor actividad antioxidante que la DHZ, b) el sistema de la β -dicetona presente en la curcumina no es necesario para inhibir la lipoperoxidación, debido a que la DHZ está desprovista de este sistema y aun así es capaz de inhibir la peroxidación de lípidos [20], c) los grupos fenólicos en ambos compuestos favorecen considerablemente las propiedades antioxidantes [5] ya que reaccionan con radicales libres para formar radicales fenoxi estables, d) el ácido ferúlico también tiene la capacidad para inhibir la peroxidación de los ácidos grasos [21].

1.2 Biosíntesis de curcumina y curcuminoides.

La biosíntesis de curcuminoides (ver Figura 2) inicia con la *L*-fenilalanina [22] e involucra dos unidades de *p*-coumaroil-CoA y un carbono central del ácido malónico. La posterior adición de grupos funcionales en los anillos aromáticos produce la curcumina. Estos datos fueron importantes en el desarrollo del trabajo experimental tomando como punto de partida algunas moléculas de esta ruta biosintética, *p. ej.*, el ácido cinámico.



PAL = Fenilalanina amonía liasa; **C4H** = Cinámato 4-hidroxilasa, **4CL** = 4-coumarato:CoA ligasa; **CST** = *p*-Coumaroil siquímato transferasa; **CS3'H** = *p*-Coumaroil 5-O-siquímato 3'hidroxilasa; **OMT** = *o*-Metiltransferasa; **CCOMT** = Cafeoil-CoA *O*-metiltransferasa.

Figura 2. Ruta para la biosíntesis de curcumina [23].

1.3 Desventajas de la curcumina.

A pesar de las múltiples actividades biológicas benéficas descritas para la curcumina, ésta posee una baja biodisponibilidad y un rápido metabolismo en la administración oral, hecho que contribuye a que aún no se apruebe su uso clínico como un agente terapéutico regular.

Las desventajas farmacocinéticas [6] y farmacodinámicas de la curcumina que limitan su biodisponibilidad provienen de: 1) la insolubilidad en agua, 2) su pobre absorción, 3) su metabolismo rápido, y 4) la rápida eliminación sistémica. Las razones que se han encontrado detrás de estas limitaciones son los siguientes; (A) la presencia de la β -dicetona en la estructura de la curcumina hace que reaccione como sustrato metabólico, (B) hay una alta disociación enzimática en la posición bencílica, (C) la inestabilidad de la β -dicetona propicia que la molécula reaccione fácilmente en pH básico.

1.4 Metabolismo de la curcumina.

Los compuestos identificados en el metabolismo de la curcumina cuando es administrada por distintas vías son presentados en la Figura 3, y se resalta que un metabolito terminal detectado por vía intravenosa e intraperitoneal, es el ácido ferúlico [24].

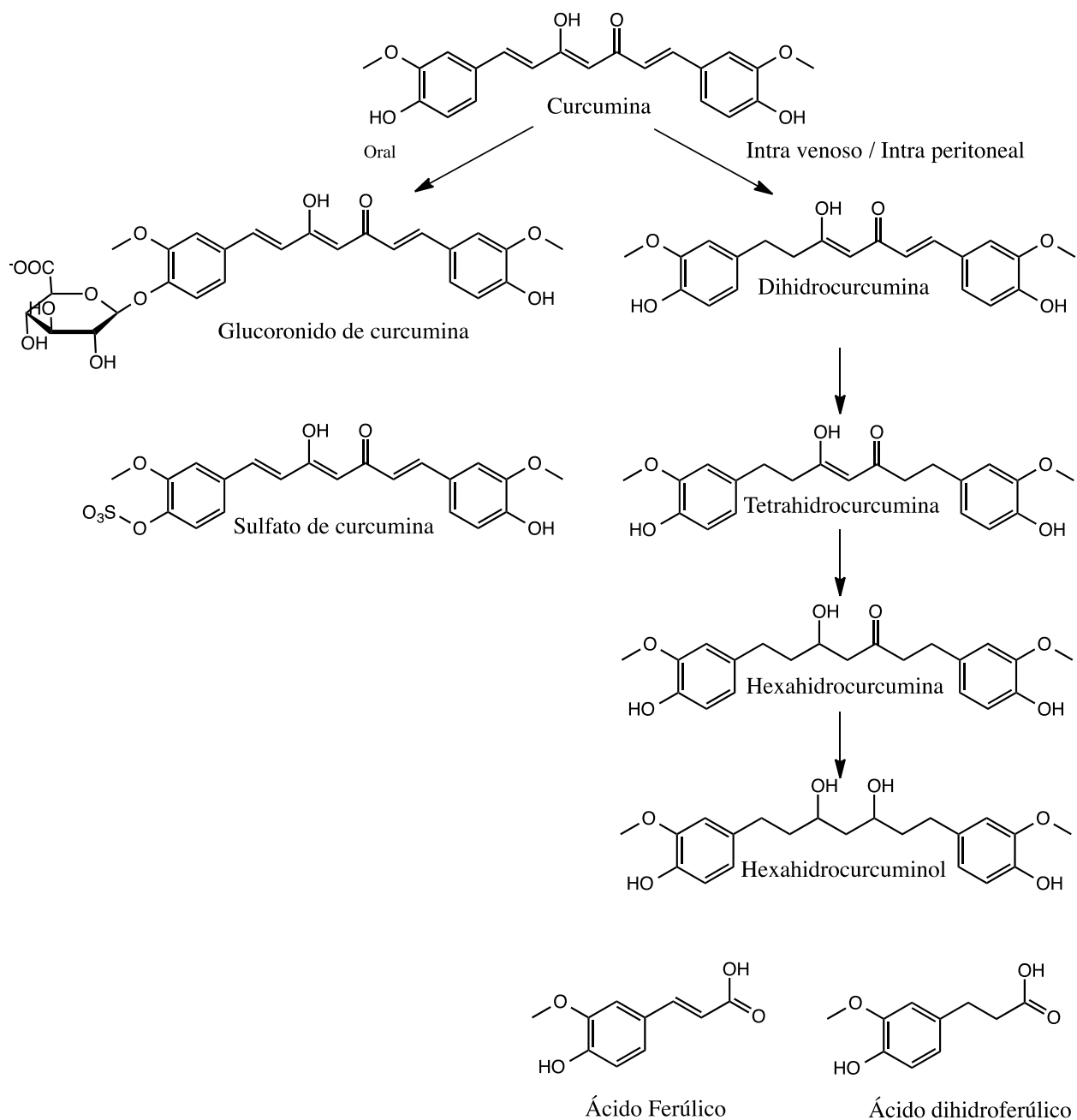


Figura 3. Metabolitos de la curcumina obtenidos por distintas vías de administración [25].

Las vías de degradación *in vivo* de la curcumina son esencialmente cuatro [26] *i.e.* reducción, conjugación, oxidación y ruptura. Los metabolitos mostrados en la Figura 4 coinciden con los observados en la fase I (reducción, productos obtenidos por la acción de reductasas hepáticas) y la fase II (conjugación) del metabolismo en roedores y humanos [4], pudiendo algunos de ellos ser obtenidos mediante síntesis orgánica.

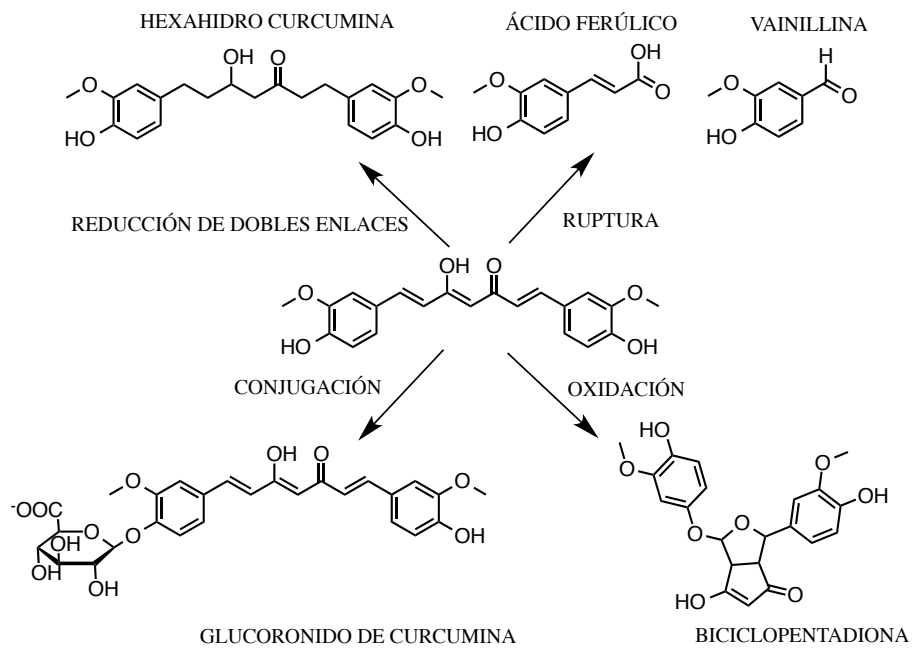


Figura 4. Metabolitos secundarios de curcumina.

1.5 Interacción de curcumina con dianas moleculares que inducen apoptosis.

La curcumina es una molécula que interacciona con múltiples objetivos (o dianas moleculares), y se ha descrito amplia efectividad apoptótica contra diferentes líneas celulares de cáncer en ensayos *in vitro*. Las múltiples dianas moleculares [27] que son afectadas y reguladas mediante la interacción [25] con curcumina se ilustran en la Tabla 1 encontrándose desde citocinas inflamatorias hasta factores de transcripción. Adicionalmente en la Figura 5 se ilustran las vías de señalización celular donde participa la curcumina.

Tabla 1. Objetivos moleculares que regula la curcumina [25].

Citocinas inflamatorias	Moléculas de adhesión	Proteínas cinasas	Enzimas
TNF α , IL-1b, IL-2, IL-18, IL-6, MCP-1, MIP-1 α , IL-12	ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1	ERK, JNK, p38, Akt	i-NOS, COX-2, 5-LOX, HO-1, MMP2, MMP9
Proteínas de apoptosis	Marcadores de estrés del retículo endoplasmático	Receptores y factores de crecimiento	Factores de transcripción
Caspasa-3,8,9, BAX, BCL-2, BCL-xL, AIF	GRP78, ATF6, IRE1, CHOP, XBP-1, GADD153	PDGF, EFGR, VEGF, TGFb	NF- κ β , Nr-f2, FOXO-3a, STAT-1, p53, p21

TNF α , factor de necrosis tumoral α ; IL-1b, interleucina-1b; IL-2, interleucina 2, IL-18, interleucina 18; IL-6, interleucina 6; MCP-1, proteína atrayente de quimio monocitos 1; MIP-1 α , proteína inflamatoria de macrófagos 1 α ; IL-12, interleucina 12; ICAM-1, molécula de adhesión intracelular 1; VCAM-1, moléculas de adhesión celular vascular 1; ELAM-1, molécula de adhesión de leucocitos endoteliales1; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible; 5-LOX, lipooxigenasa 5; COX-2, ciclooxigenasa 2; HO-1, hemo oxigenasa 1; MMP2, metaloproteasa de matriz 2; MMP9, metaloproteasa de matriz 9; GRP78, proteína regulada por glucosa 78; ATF6, activador del factor de transcripción 6; CHOP, proteína homóloga C/EBP; XBP-1, proteína de unión a la caja X 1; GADD153, gen 153 de detención del crecimiento y daño inducible por ADN; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; EFGR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; TGF β , factor de crecimiento transformante β ; ERK, cinasa extracelular regulada por señales; JNK, c-jun cinasas N-terminales; p38, proteína cinasa activada por mitógenos, Akt, proteína cinasa B (proteína serina-treonina cinasa); BAX, proteína X asociada a BCL2; BCL-2, linfoma de células B 2; BCL-xL, linfoma de células B extragrande; AIF, factor inductor de apoptosis; NF- κ β , factor nuclear kappa-beta; Nrf2, factor nuclear eritroide 2; FOXO3a, caja de orquilla 3a; STAT1, transductor de señal y activador de transcripción; p53, proteína supresora de tumores; p21, inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1A.

La curcumina controla diversas vías de transducción de señales. La unión a ligantes (factores de crecimiento y citocinas) induce la activación de rutas de señalización posteriores como las rutas PI3K/Akt. Estas vías juegan un papel

importante en la supervivencia celular, proliferación, apoptosis, angiogénesis, invasión y metástasis.

La activación de ruta PI3K/Akt restringe la señalización de p53 y la vía de apoptosis mediada por Bad que contribuye a la supervivencia de las células cancerosas [28]. Akt también inicia la ruta de señalización del factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) que favorece la expresión de las proteínas anti-apoptosis Bcl-2 y Bcl-xL. Además el NF- $\kappa\beta$ protege a las células cancerígenas contra la muerte celular y aumenta la actividad de crecimiento y reproducción.

Debido a lo anterior es importante remarcar que la curcumina actúa como un inhibidor del NF- $\kappa\beta$ y produce la activación de la cascada de caspasas 3 y 9 para producir la apoptosis de las células cancerígenas como se muestra en la Figura 5.

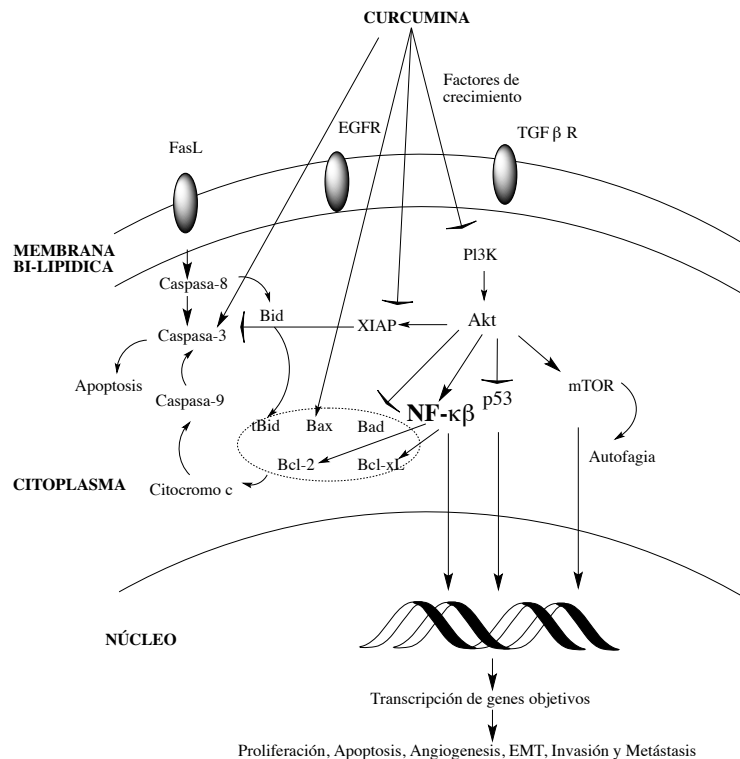


Figura 5. Mecanismo de señalización celular donde interviene la curcumina en la inducción de apoptosis [27,28].

1.6 Regulación del factor nuclear kappa beta (NF- κ B) por curcumina.

El factor nuclear κ B (NF- κ B), es un factor de transcripción de células eucariontes que se expresa de forma ubicua y es responsable de la regulación de numerosos genes. Se han descrito cinco subunidades para el NF- κ B: p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), p55 (RelB), p65 (RelA) y c-Rel (Rel). Cuando el NF- κ B es activado por estímulos tales como los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) o las citosinas pro-inflamatorias se transloca al núcleo celular e inicia la expresión del factor de necrosis tumoral α (TNF α) e interleucina 1 β (IL1 β).

La ruta de señalización clásica para la síntesis del NF- κ B (Figura 6) cuando se activa por los LPS [4] es la siguiente: Primero, las proteínas adaptadoras TRAF2 y TRAF6 se activan e inician la ruta de IKK que consiste de dos subunidades catalíticas (IKK α e IKK β) así como la subunidad reguladora (IKK γ /NEMO). Segundo, la IKK fosforila la proteína I κ B α que retiene el heterodímero p50/p65 en el citoplasma. Tercero, se libera el heterodímero NF- κ B (p50/p65) y la proteína I κ B α fosforilada se poli-ubitina en K48, desencadenando la degradación proteosomal. Finalmente el heterodímero NF- κ B (p50/p65) se transloca al núcleo y junto al cofactor CBP/p300 se unen al sitio κ B en el ADN e induce la expresión de los genes TNF α e IL1 β .

Se ha encontrado que el factor nuclear κ B (NF- κ B) es una proteína común que tanto la curcumina y un compuesto análogo nombrado CAPE la regulan mediante su inhibición, por lo tanto es necesario investigar si compuestos análogos participan en los mecanismos de señalización celular por las vías del Akt y del NF- κ B.

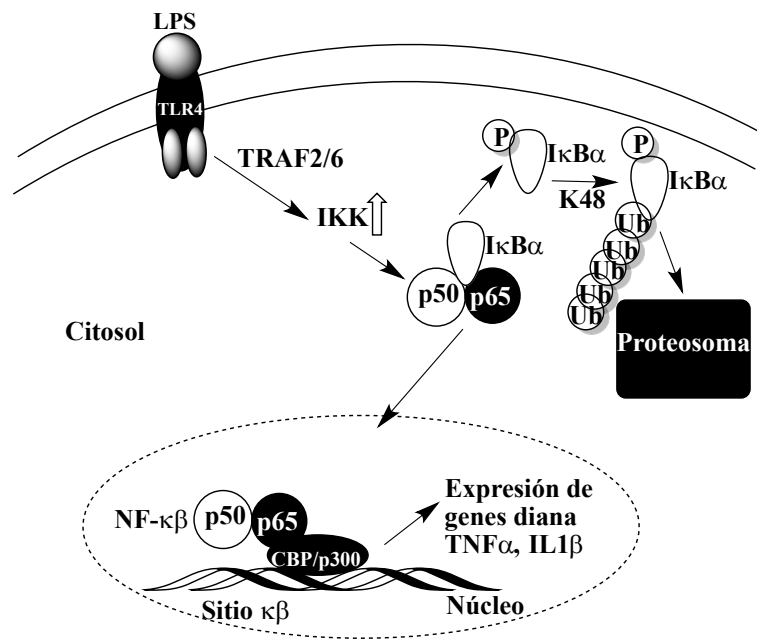


Figura 6. Ruta de señalización clásica para el factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) [4].

El éster fenólico del ácido cafeico ((CAPE), Figura 7) se ha seleccionado como un compuesto análogo ya que actúa de manera semejante a la curcumina mediante la inhibición del NF- $\kappa\beta$ y es importante debido a que se inicia la señalización de la proteína pro-apoptosis BAX. Además se ha encontrado que CAPE participa en la activación de la cascada de las caspasas por lo que se conduce a la muerte celular por apoptosis. El CAPE también es un compuesto antioxidante e inhibe la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS), que conduce a la protección del ADN.

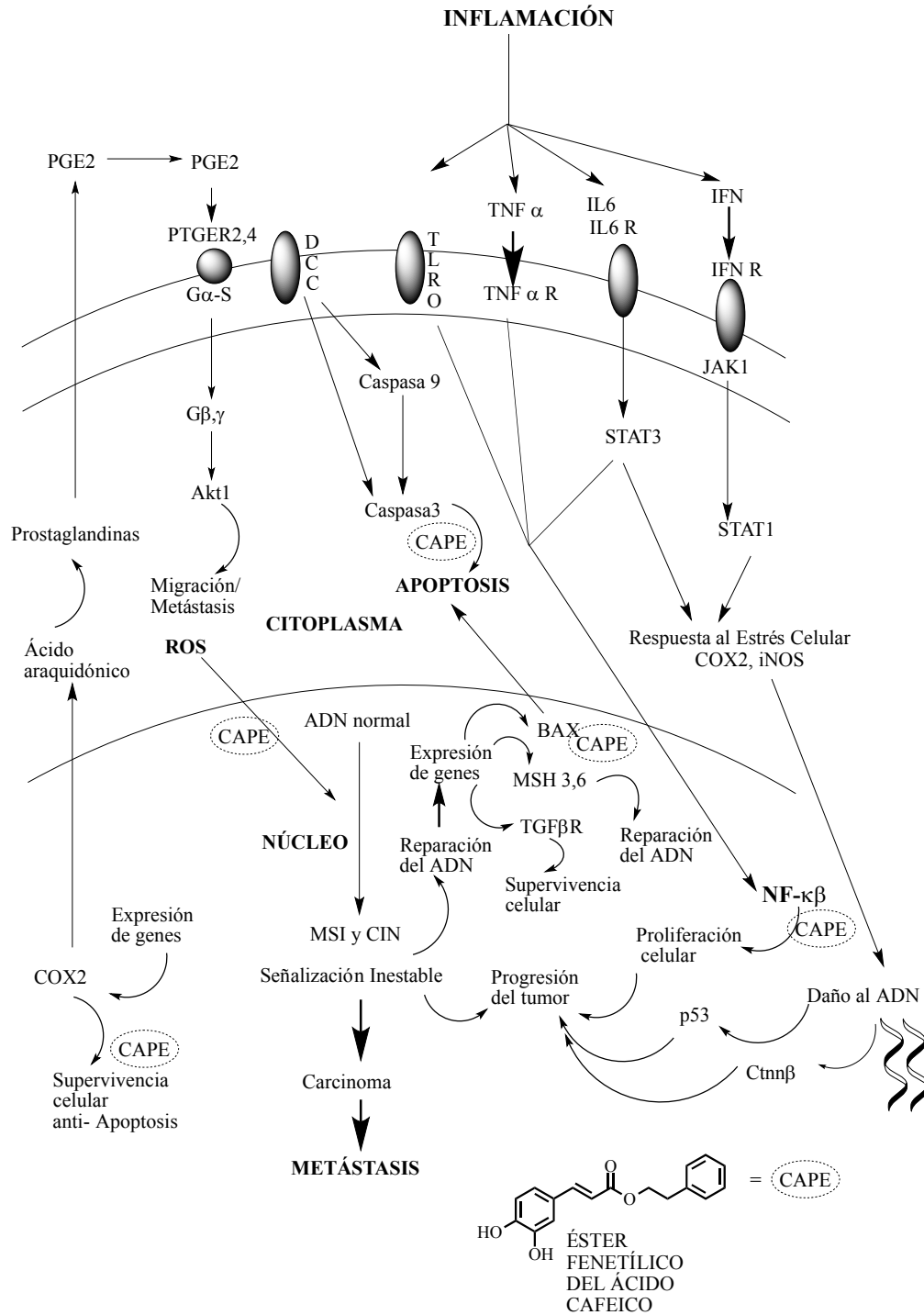


Figura 7. Vía representativa para la metástasis (colorrectal), los círculos con una línea punteada representan la ubicación aproximada del CAPE [29].

1.7 Inducción de la apoptosis por la curcumina mediante fenoles y los dobles enlaces conjugados.

La curcumina es considerada un polifenol que puede generar especies reactivas de oxígeno (ROS) *in situ* debido al metabolismo celular y podría transformarse en una molécula pro-oxidante en presencia de iones de cobre en conjunto con el citocromo P450 (CYP), lo cual produce daño al ADN y subsecuentemente la muerte celular por apoptosis [30,31] como se ilustra en la Figura 8.

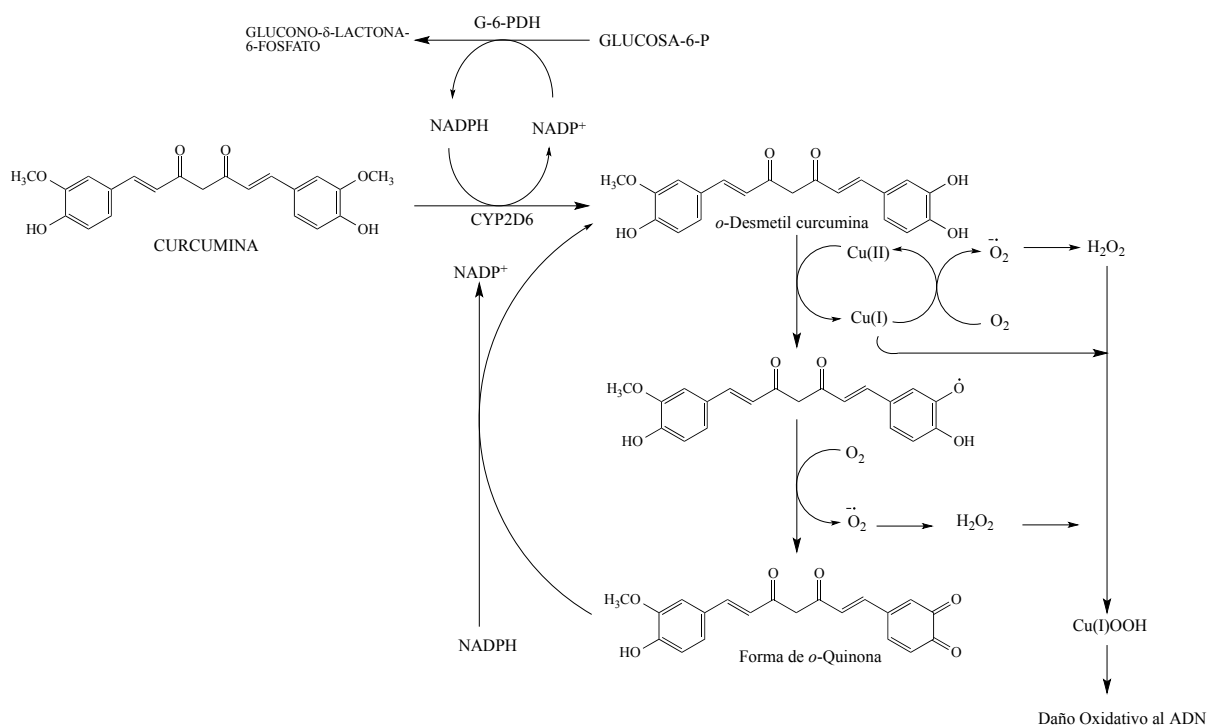


Figura 8. Un posible mecanismo para el daño del ADN mediado por Cu (II) inducido por la curcumina en presencia del CYP2D6 (gen del citocromo P450) [31].

Las glicoxalosas (Glo1 y Glo2) están involucradas por la vía glucolítica modificando el reactivo tóxico metilglioxal (MGO) en D-lactato mediante dos pasos de reacción usando glutatión (GSH) como cofactor. Los inhibidores de las glicoxalosas se consideran agentes antiinflamatorios y antitumorales.

La curcumina inhibe Glo1 por lo que al interior de la célula el MGO y el GSH pueden aumentar hasta niveles intolerables resultando en la alteración de las vías

metabólicas alterando el contenido celular de ATP y GSH que se agotan disminuyendo la supervivencia celular [32].

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) ejercen efectos positivos y negativos sobre la supervivencia celular y los niveles de ROS intracelulares son reguladas por el GSH que junto con la tiorredoxina reductasa afectan de manera positiva el inicio y la progresión del cáncer. La curcumina (aceptor tipo Michael) aumenta los niveles intracelulares de ROS al reaccionar con el GSH [33] formando aductos mediante un enlace de azufre-carbono [34] como se ilustra en la Figura 9.

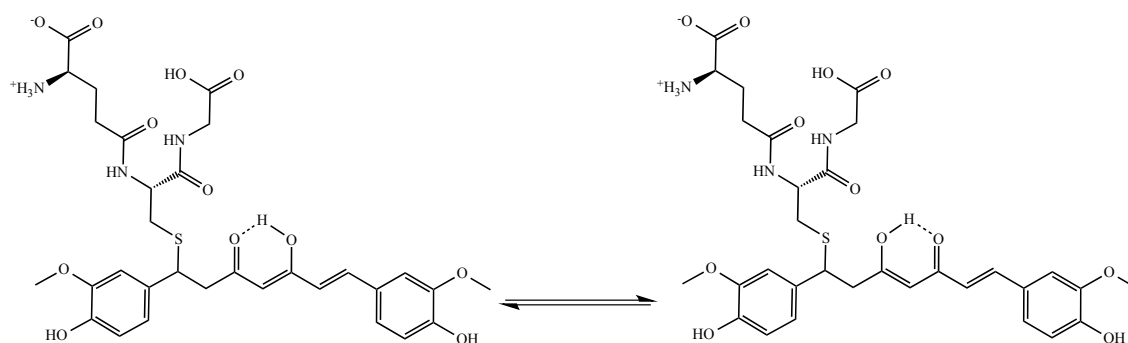
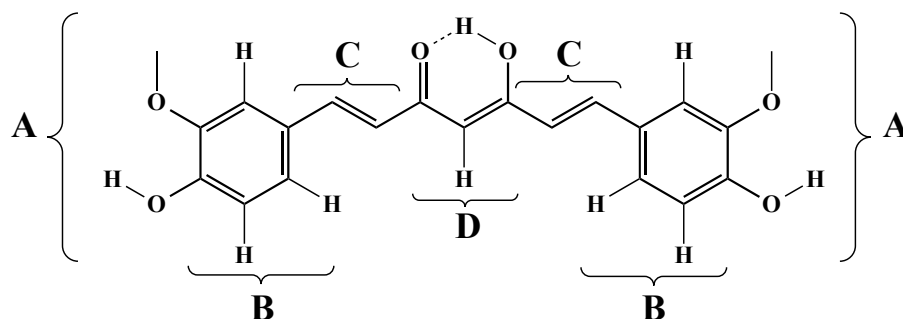


Figura 9. Interacción de la curcumina con glutatión (GSH) [35].

1.8 Modificación sintética de la curcumina.

Para hacer frente a la problemática farmacocinética de la curcumina se han propuesto diferentes estrategias de modificación tomando en cuenta sus grupos funcionales (Figura 10) dando origen a nuevos compuestos llamados curcuminoides (conservando la cadena del heptanoide con los grupos carbonilos y dos anillos aromáticos). La síntesis de nuevos compuestos relacionados se centra principalmente en la mejora sus actividades biológicas.



- A) Modificación de los grupos metoxilo ($-\text{OCH}_3$) u oxhidrilo ($-\text{OH}$) con posibilidad de introducción de diferentes sustituyentes en las posiciones *meta* y *para*.
- B) Introducción de nuevos grupos en los anillos aromáticos para las posiciones *orto* y *meta*.
- C) Modificación de los dobles enlaces de la cadena del heptanoide introduciendo grupos o realizando la reducción de los dobles enlace.
- D) Modificación del sistema 1,3-dicetona (equilibrio ceto-enol) así como la introducción de sustituyentes en el metileno.

Figura 10. Sitios de modificación sintética de la curcumina.

Para mejorar la biodisponibilidad de la curcumina se han utilizado varias estrategias como son: la síntesis de complejos metálicos [36–38], la creación de nanopartículas [39], la formación de *co*-cristales [40] y la preparación de nuevos derivados y compuestos análogos [1].

Las diferentes familias provenientes de la modificación sintética de la curcumina se nombran tomando en cuenta la longitud de la cadena carbonada principal (*p.ej.* difenil-heptanoides, curcuminoides de 7 átomos de carbono con dos grupos fenilo) y los derivados se centran principalmente en la preparación de éteres y ésteres [41].

1.9 Compuestos curcuminoides.

Los ingredientes farmacológicamente activos e identificados en las especias de cúrcuma son tres [42] (Figura 11): Curcumina, desmetoxicurcumina (DMC) y bis-desmetoxicurcumina (BDMC) y son responsables del color amarillo que presenta el rizoma. Estos compuestos son difíciles de separar y forman un complejo que co-

cristaliza conocido como curcumin C-3 y ha sido registrado comercialmente como C-3 complex® [43].

El complejo de curcumina (C3 complex®/ Bioperine®) es un extracto comercialmente estandarizado que contiene una mezcla de tres curcuminoides con piperina que aumentan en gran medida su biodisponibilidad [43]. Por lo tanto algunos compuestos análogos deben abordarse durante el desarrollo experimental ya que la BDMC (Figura 11) inhibe la proliferación y la supervivencia de varios tipos de células cancerosas [42] (mama, colon, glioma y leucemia), además de suprimir la metástasis.

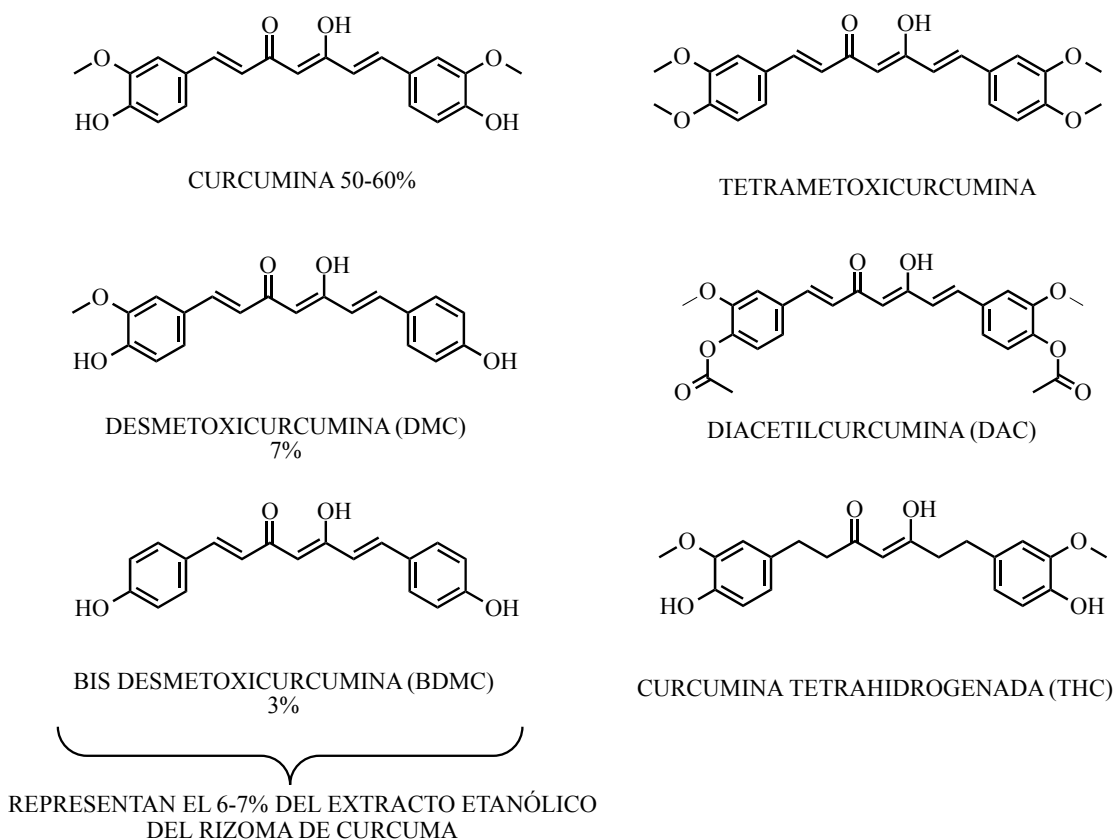


Figura 11. Curcuminoides tipo éteres y tipo éster.

Otros curcuminoides se pueden preparar de manera sintética sustituyendo los fenoles por grupos alquilo (tetrametoxicurcumina) o acilo (diacetilcurcumina), o

reduciendo los dobles enlaces de la cadena del heptanoide (curcumina tetra hidrogenada) como se muestran en la Figura 11.

La eterificación de fenoles se puede realizar utilizando condiciones suaves de reacción (Figura 12) para evitar productos secundarios debido a la presencia de un carbono β reactivo. El uso de acetona con carbonato de potasio es un medio de reacción adecuado y ha proporcionado las condiciones óptimas (reacción limpia y rápida) para aislar éteres importantes (éteres bencílicos) [44].

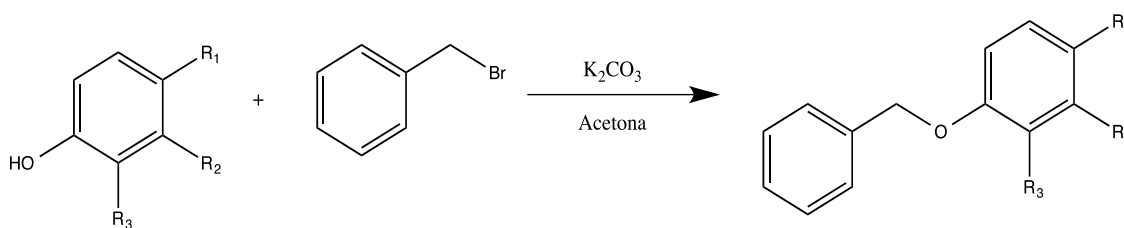


Figura 12. Eterificación de fenoles utilizando condiciones suaves de reacción.

Los derivados esterificados se pueden sintetizar utilizando un cloruro de acilo en disolventes apróticos (tetrahidrofurano ó cloroformo) y anhidros (Figura 13). Aunque hay distintas maneras de esterificar (*p.ej.* reacción de Steglich [45], tiempos de reacción > 240 minutos, temperatura estándar 40-60 °C) en algunos casos se prefiere el uso del cloruro de acilo ya que la reacción es rápida (tiempos de reacción < 60 minutos, 0 °C) y se evita el uso de calentamiento.

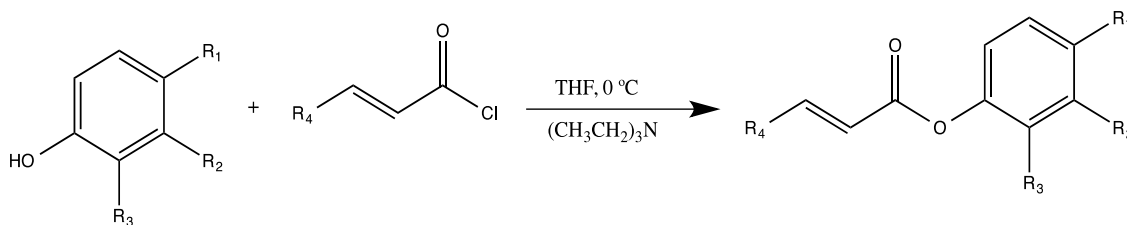


Figura 13. Esterificación de fenoles mediante el uso de un cloruro de acilo.

1.10 Otros compuestos análogos de curcumina.

Tomando en cuenta la estructura de curcumina, sus compuestos de degradación *in vitro*, su ruta biosintética y sus rutas metabólicas, se han elegido cuatro moléculas claves (deshidrozingerona, ácido ferúlico, ácido cinámico y vainillina) para generar diferentes familias de compuestos.

Los *retro*-curcuminoides son compuestos que guardan una relación estructural con curcumina y la principal característica de estos compuestos es la unión de dos subunidades aromáticas mediante un enlace tipo éster obtenidos sintéticamente, haciendo reaccionar un cloruro de ácido y un fenol (Ph-OH) conservando la funcionalidad de una cetona α , β insaturada .

Los mono carbonilos de curcumina (*hemi*-curcuminoides), chalconas y di-chalconas se preparan típicamente empleando una condensación aldólica tipo Claisen-Schmidt catalizando con una base fuerte [46]. El producto resultante en estas condiciones es una cetona α,β -insaturada [47]. Sin embargo, la obtención de un solo producto es variable debido reacciones secundarias y de polimerización. El producto secundario común en la reacción Claisen-Schmidt es el di-condensado (Figura 14, Ruta I, reacción tándem). El fragmento prop-2-en-1-ona también proporciona una función químicamente reactiva (carbono β) para las adiciones tipo Michael [48] que conducen a la formación de estructuras cíclicas debido a una nueva condensación (Figura 14, Ruta II).

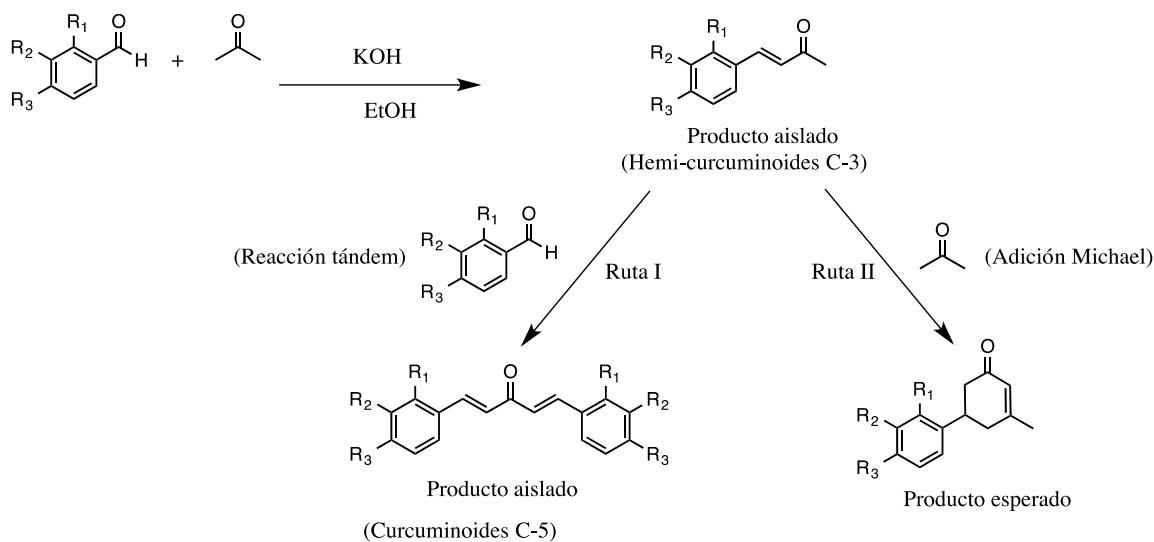


Figura 14. Reacción Claisen-Schmidt.

La manera de evitar la formación de subproductos por la reacción Claisen-Schmidt, se logra cuando la síntesis se realiza de manera dirigida [49]. La condensación aldólica dirigida permite obtener reacciones limpias debido a que un reactivo actúa exclusivamente como nucleófilo y otro como electrófilo, por lo tanto este tipo de condensaciones permite la obtención del enlace C-C de manera específica entre un carbono- α al grupo carbonilo y otro equivalente carbonílico como se muestra en la Figura 15.

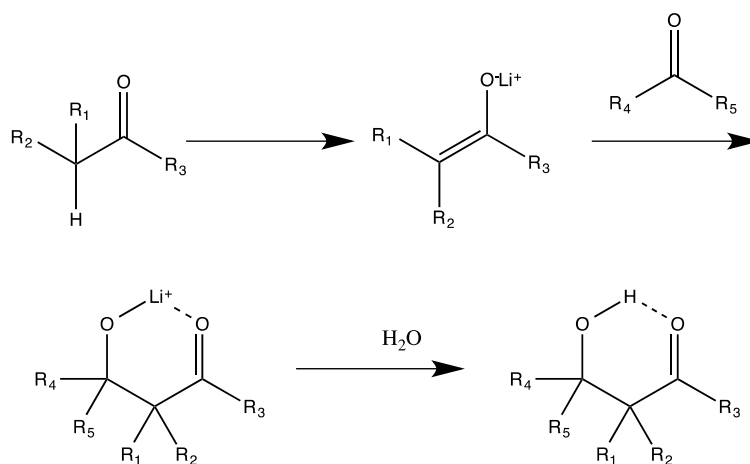


Figura 15. Condensación aldólica dirigida.

En la literatura [50] se consideran análogos de curcumina las chalconas (cadena de tres carbonos) y las di-chalconas (cadena de cinco carbonos) debido a que presentan el sistema carbonílico α,β -insaturado además de encontrarse flanqueadas por dos anillos aromáticos. Las diferentes familias análogas se representan en la Figura 16 e incluye a los bencilidenos y los pirazoles.

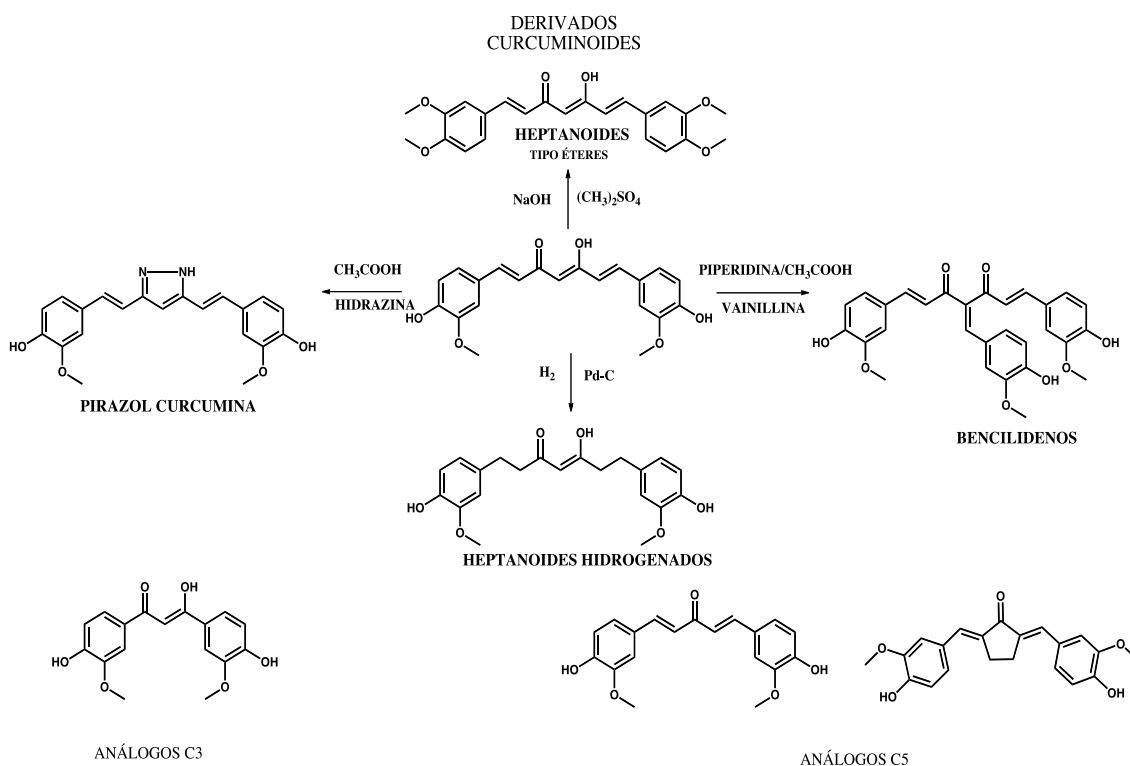


Figura 16. Productos derivados de la modificación sintética de curcumina y compuestos análogos.

En la síntesis de la familia de bencilidenos se optó por utilizar un compuesto tipo β -carbonílico (2,4-pentanodiona) y un aldehído aromático que reaccionan mediante una condensación tipo Knoevenagel [51] y la modificación a las condiciones clásicas de reacción utiliza un catalizador orgánico (piperidina) [52]. Bajo estas condiciones la reacción de Knoevenagel inicia con la formación de una carbinolamida (aldehído con piperidina), seguido del intercambio de un protón para generar el ion iminio que es atacado nucleofílicamente con un metileno activado (ion enolato de la 2,4-pentanodiona). La reacción concluye con la isomerización y la regeneración del

catalizador, generando como producto final un bencilideno el cuál es estable en estas condiciones de reacción (ver Figura 17).

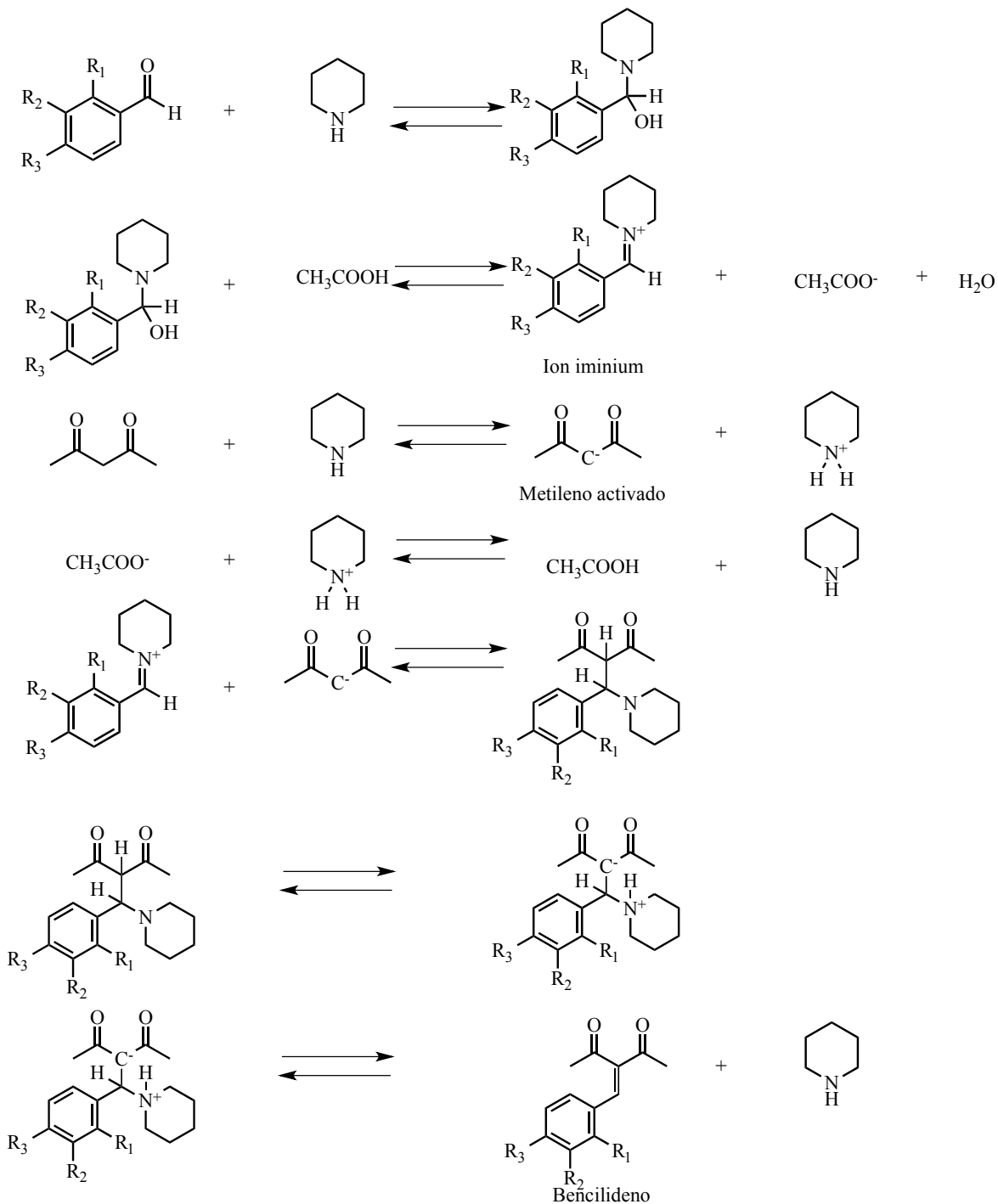


Figura 17. Síntesis de bencilidenos, reacción catalizada con piperidina.

La reacción de Knoevenagel es ventajosa para introducir un nuevo sistema α,β -insaturado en moléculas análogas a curcumina y el introducir una nueva función entre el sistema α,α -di-carbonilo (posición C1) permite preparar familias completas de bencilidenos de curcumina [53].

La obtención de productos cíclicos de curcumina mediante una reacción de anillación con hidracina base genera los pirazoles de curcumina, pero en el caso de hacer reaccionar compuestos mono carbonílicos α,β -insaturados con hidracina produce heterociclos tipo pirazolininas.

Los derivados de pirazolininas son ricos en electrones y desempeñan un papel importante en las diversas actividades biológicas. Estos compuestos heterocíclicos se producen ampliamente en la naturaleza en forma de alcaloides, vitaminas, pigmentos y se presentan como componentes de las células vegetal y animal [54]. Se ha prestado considerable atención a las pirazolininas simples y sustituidas debido a sus amplias actividades biológicas.

En la síntesis de pirazolininas, se parte convencionalmente de materias primas que conservan la funcionalidad de carbonilos α,β -insaturados (chalconas) con una hidracina sustituida [55] en reflujo y presencia de base. Hay reportes [54] que utilizan metodologías donde se irradia con ultrasonido o realizan la síntesis mediante el uso de materias primas más complejas a las referidas, por ejemplo las reacciones de cicloadición 1,3-dipolares empleado silil estanol acetilenos con trimetilsilil diazometano (ver Figura 18).

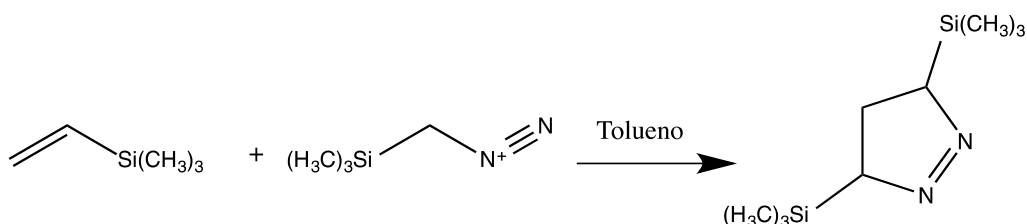


Figura 18. Cicloadiciones 1,3-dipolares para la obtención de pirazolininas.

Con una metodología convencional, las materias primas son relativamente simples de obtener en el laboratorio aunque se puede requerir tiempos prolongados de reflujo. Un mecanismo de reacción plausible se presenta en la Figura 19, donde el ácido acético es el reactivo ácido-base capaz de protonar y desprotonar los intermediarios de reacción para obtener el heterociclo deseado.

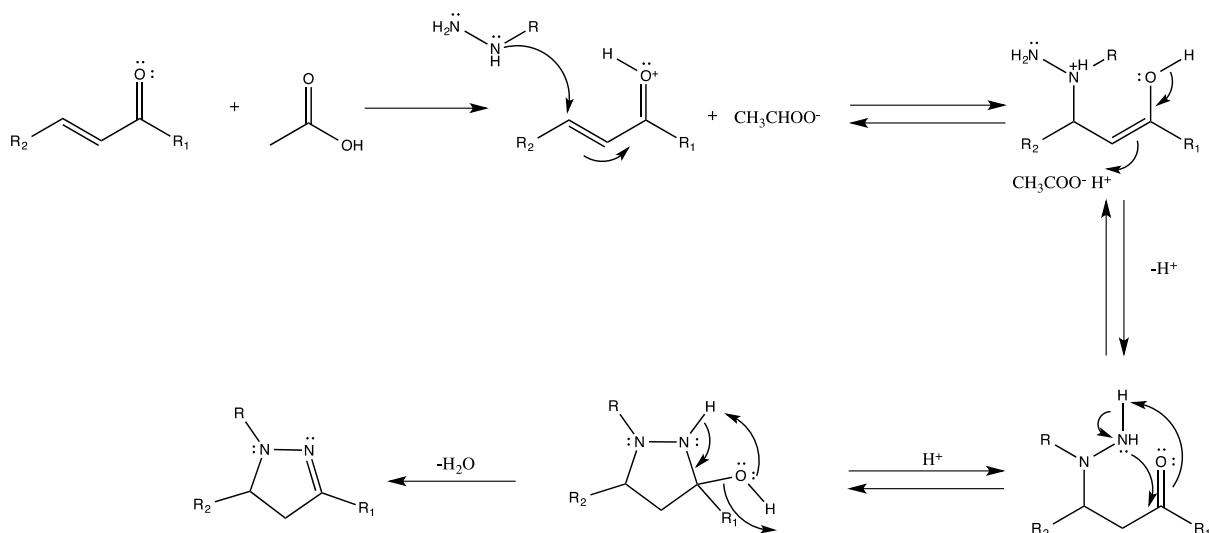


Figura 19. Mecanismo de reacción para la síntesis de pirazolinas.

Los curcuminoides hidrogenados (por ejemplo curcumina tetrahidrogenada [56], Figura 11) tienen una cadena carbonada de 7 átomos y las posiciones del alqueno α,β pueden ser reducidas con hidrógeno (H_2) y paladio sobre carbono (Pd-C) al 5% ó 10%. La zingerona se considera un análogo estructural de la curcumina hidrogenada ya que contiene la mitad simétrica y se puede sintetizar mediante la hidrogenación [57] de la DHZ (Figura 20).

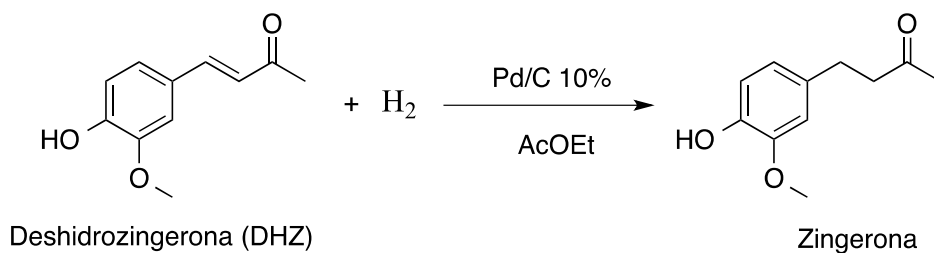
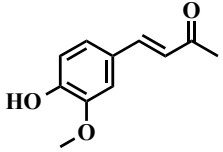
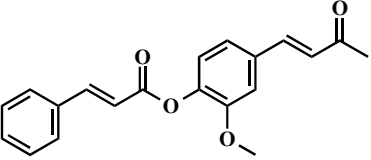
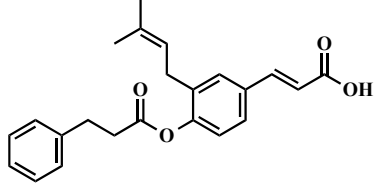
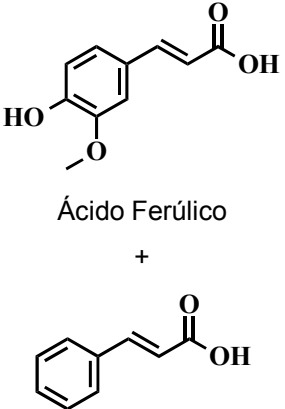
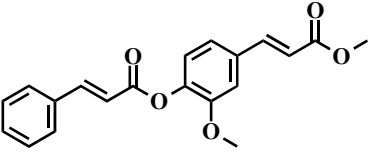
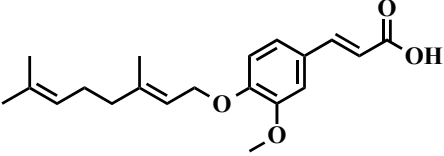
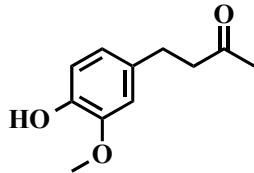
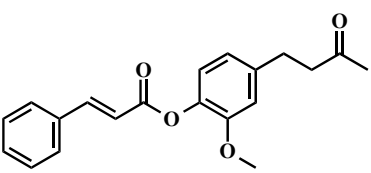
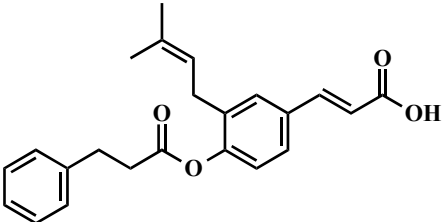
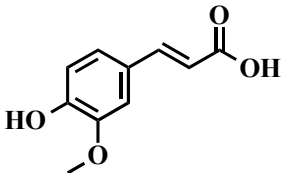
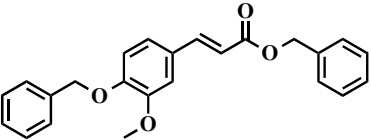
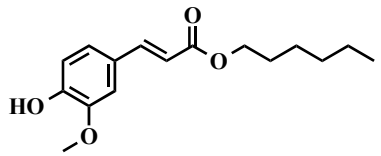
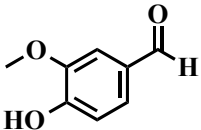
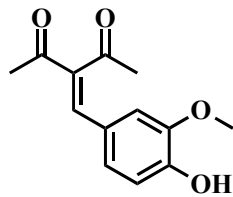
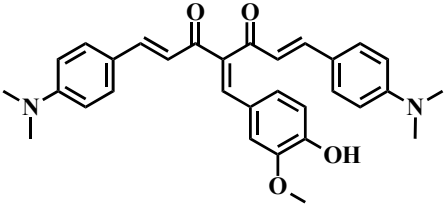
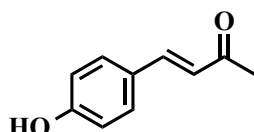
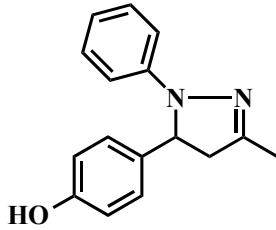
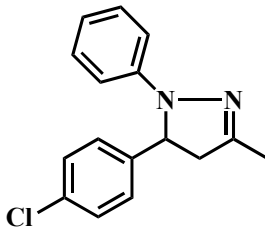
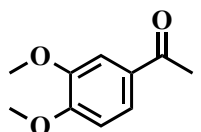
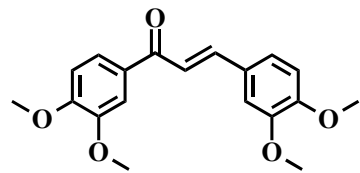
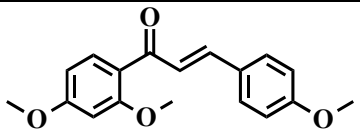


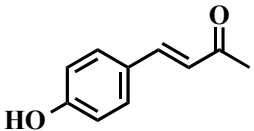
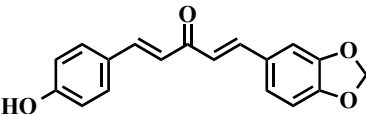
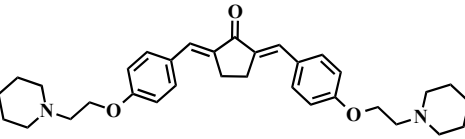
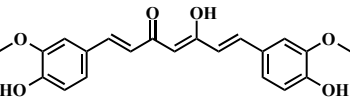
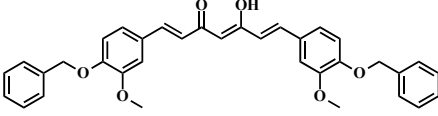
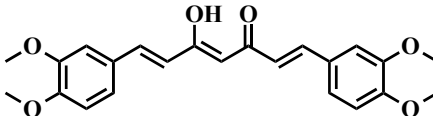
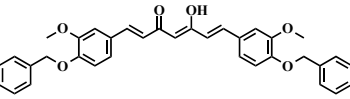
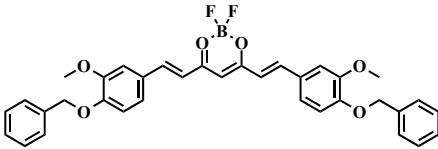
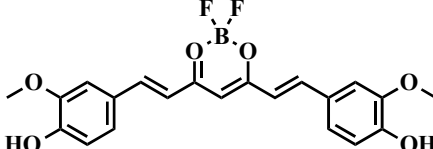
Figura 20. Obtención de Zingerona

Algunas de las materias primas con posibilidad de formación de nuevos enlaces se ilustran en la Tabla 2. Aunque los ésteres del ácido cinámico se han nombrado como *retro*-curcuminoides debido a que son compuestos nuevos y guardan una relación con la curcumina el resto de los nombres se han elegido de acuerdo con la literatura.

Tabla 2. Materias primas con posibilidad de enlace.

Materia Prima	Origen	Familia Objetivo	Ejemplo en referencias
 <p>Deshidrozingeronona (DHZ)</p>	<p>Degradación de curcumina en pH básico</p>	 <p><i>Retro-curcuminoides</i></p>	 <p>Bacarin ésteres del ácido cinámico [29]</p>
 <p>Ácido Ferúlico + Ácido cinámico</p>	<p>Biosíntesis y degradación de curcumina</p>	 <p><i>Retro-curcuminoides</i> (ésteres metílicos del ácido ferúlico)</p>	 <p>Ácido 3-(4-geraniloxi-3-metoxifenil)-2-<i>trans</i> propenoico</p>
 <p>Zingerona</p>	<p>Análogo de la tetra hidro curcumina</p>	 <p><i>Retro-curcuminoides hidrogenados</i></p>	 <p>Bacarin</p>

 <p>Ácido Ferúlico</p>	<p>Biosíntesis y degradación de curcumina</p>	 <p>Éteres y ésteres del ácido ferúlico</p>	 <p>Hexil ferulato [58]</p>
 <p>Vainillina</p>	<p>Degradación de curcumina</p>	 <p>Bencilidenos</p>	 <p>Bencilidenos [59]</p>
	<p>Análogo del ácido <i>p</i>-hidroxi cinámico en la biosíntesis de curcumina y de sus productos de degradación</p>	 <p>Pirazolinas</p>	 <p>Pirazolinas [16,60,61]</p>
 <p>3,4-Dimetoxi benzofenona</p>	<p>Compuesto que conserva el anillo de la tetra-metoxi curcumina</p>	 <p>Análogos C-3 (Chalconas)</p>	 <p>(Metochalcona) Análogos de Chalconas [62]</p>

	<p>Análogo del ácido <i>p</i>-hidroxi cinámico en la biosíntesis de curcumina.</p>	 <p>Análogos C-5 (Di-Chalconas)</p>	 <p>Difenil pentanoides [42] o mono carbonil curcuminoides [63]</p>
 <p>Curcumina</p>	<p>Proviene del extracto de cúrcuma en mayor proporción</p>	 <p>Curcuminoides (Éteres de 7 átomos de carbono)</p>	 <p>Éteres de curcumina [53,64]</p>
 <p>Curcumina di-bencilada</p>	<p>Éter bencilico de curcumina (derivado sintético)</p>	 <p>Complejos de curcumina</p>	 <p>Complejos [65,66]</p>

2. Hipótesis.

La síntesis de análogos a los productos de degradación de curcumina que contienen el sistema carbonílico α,β -insaturado con sustituyentes variables en sus sistemas aromáticos, conducirá a la obtención de moléculas con propiedades antioxidantes o citotóxicas similares o superiores a las de su precursor.

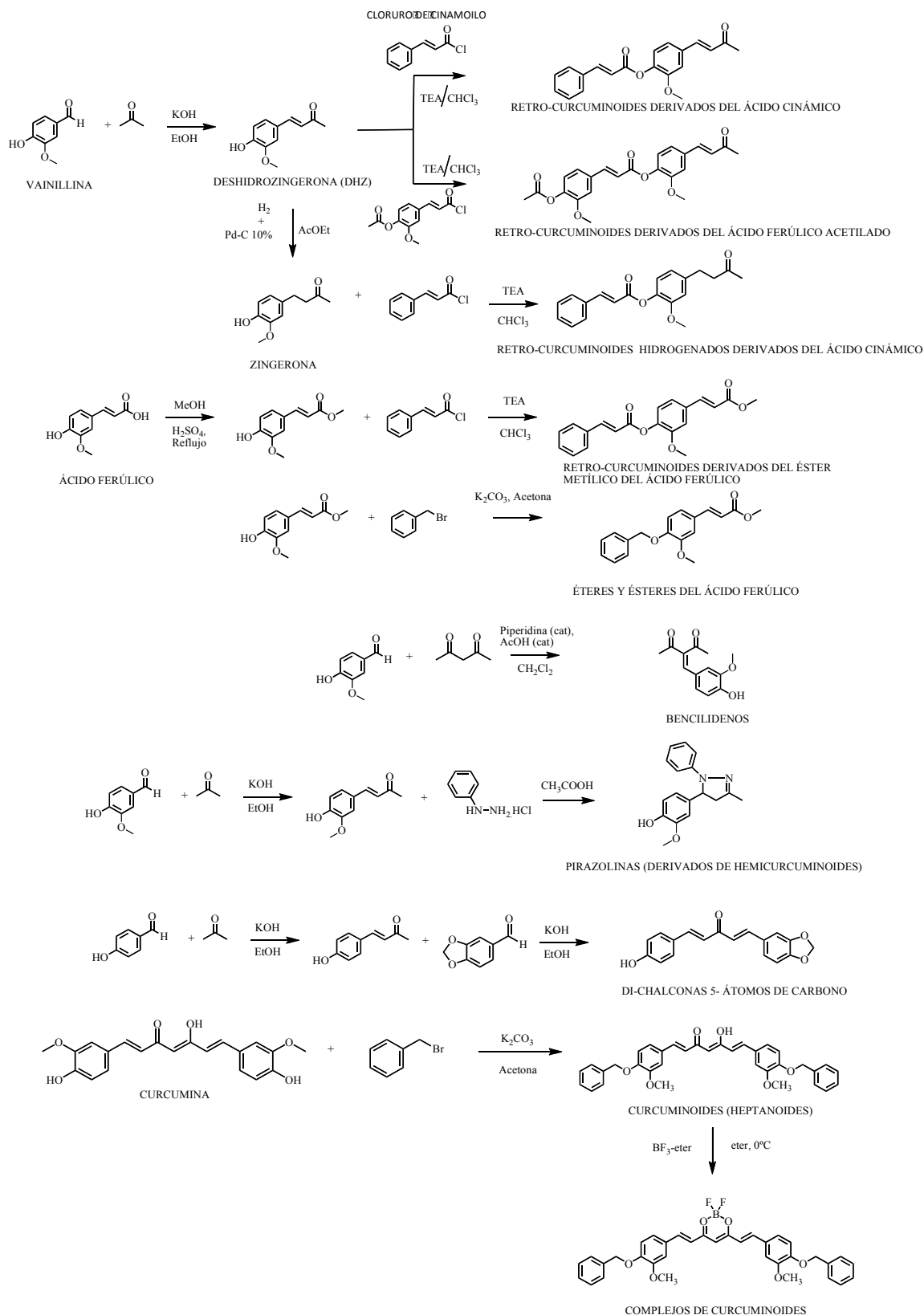
3. Objetivo general.

Sintetizar y caracterizar una serie de derivados de vainillina, ácido ferúlico, curcuminoides y análogos de curcumina para estudiar sus actividades biológicas abarcando las siguientes familias estructurales de compuestos:

- 1) *Retro*-curcuminoides,
- 2) Derivados del ácido ferúlico,
- 3) Bencilidenos,
- 4) Pirazolinas,
- 5) Análogos de Curcumina, chalconas (C-3)
- 6) Di-chalconas (C-5),
- 7) Curcuminoides y
- 8) Complejos Metálicos.

4. Objetivos particulares.

1. Realizar la síntesis de *retro*-curcuminoides enlazando el fenol de la DHZ, zingerona y de los compuestos relacionados en posiciones *orto*, *meta* y *para*, con el ácido ferúlico acetilado y el ácido cinámico. (ver Esquema 1)
2. Sintetizar una familia de derivados del ácido ferúlico, bencilidenos y pirazolinas así como de análogos de curcumina. (ver Esquema 1)
3. Sintetizar una familia de derivados de curcumina así como de nuevos complejos.
4. Caracterizar estructuralmente los compuestos obtenidos mediante el análisis espectroscópico.
5. Caracterizar los compuestos por difracción de rayos-X de monocristal cuando sea posible.
6. Estudiar la inhibición de la lipoperoxidación (TBARS) y la captura del radical DPPH, así como la actividad citotóxica de los compuestos sintetizados.



Esquema 1. Familias sintéticas.

Para el cumplimiento de los objetivos y corroboración de la hipótesis se propone el siguiente diagrama de flujo.

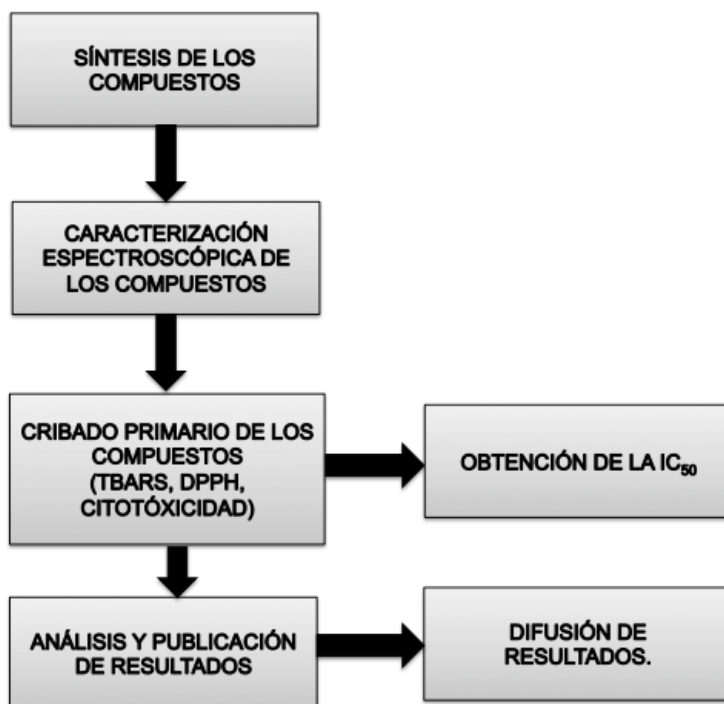


Diagrama de flujo para el desarrollo del tema de tesis.

5. Metodología sintética.

5.1 Síntesis de precursores (productos de condensación aldólica; hemi-curcuminoides, chalconas, di-chalconas).

Los precursores condensados con el sistema carbonílico α,β -insaturado **1**, **3-5** (Figura 21) y **50-52** se obtuvieron mediante una reacción tipo Claisen-Schmidt. En un matraz redondo de 250 ml se disolvió 1 meq de aldehído correspondiente en 50 ml de acetona, posteriormente se adicionó 2 ml de hidróxido de potasio 6N en etanol y se dejó en agitación constante en temperatura ambiente. Las reacciones se siguieron con C.C.F. hasta observar la desaparición de las materias primas, una vez concluido el tiempo de reacción se adicionó hielo y una solución de ácido clorhídrico al 5% hasta obtener un pH = 6; se evaporó el disolvente residual y se extrajo con 45 ml de AcOEt (3 x 15 ml). Los extractos se combinan y se secan sobre Na_2SO_4 , una vez filtrado el

residuo sólido, el disolvente se elimina en presión reducida. El producto resultante se trata con disolventes adecuados para su recristalización.

El procedimiento experimental para la obtención de chalconas (compuestos **56-58**, Figura 26) y di-chalconas (compuestos **59-62**, Figura 27) y los aldehídos y cetonas que se hicieron reaccionar se indican en los esquemas de reacción correspondientes.

5.2 Síntesis de cloruros de ácido.

Los compuestos **2** y **12** (Figura 21) se prepararon a partir del ácido cinámico o ácido ferúlico acetilado (**11**), adicionando a un matraz redondo 1 meq del ácido correspondiente disuelto en THF anhidro; posteriormente se agregó una cantidad catalítica de dimetilformamida (DMF) y finalmente 1.1 meq de cloruro de tionilo disuelto en THF dejando la reacción en reflujo durante 3 h. Una vez concluida la reacción se evaporó el THF, posteriormente el crudo se secó a presión reducida e inmediatamente se utilizó para las reacciones de esterificación correspondientes.

5.3 Síntesis de los *retro*-curcuminoides.

Procedimiento experimental general. En un matraz redondo de tres bocas se añadió una solución de DHZ o su análogo (1.0 eq disuelto en cloroformo o THF) y se dejó enfriar a 0°C en un baño de hielo. Posteriormente se agregó gota a gota una solución del cloruro del ácido correspondiente (**2** ó **12**, 1.0 eq, en cloroformo o THF) y una solución de trietilamina (TEA, 1.2 eq en cloroformo o THF). La mezcla de reacción se retiró del baño de hielo y se agitó a temperatura ambiente dando seguimiento por C.C.F. hasta observar el consumo de las materias primas.

La reacción se concluyó mediante la adición de hielo, evaporando el disolvente orgánico y extrayendo con 45 ml de AcOEt (3 x 15 ml). Los extractos se mezclaron y se secaron con Na₂SO₄, una vez filtrado el residuo sólido el disolvente se eliminó a presión reducida. Con este procedimiento se obtuvieron los *retro*-curcuminoides **6-10**,

13-16 (Figura 21), 18-19, 24-27 (Figura 22) y el éster cinámico de curcumina (69) (Figura 30) obtenido a partir del cloruro de cinamoilo y curcumina.

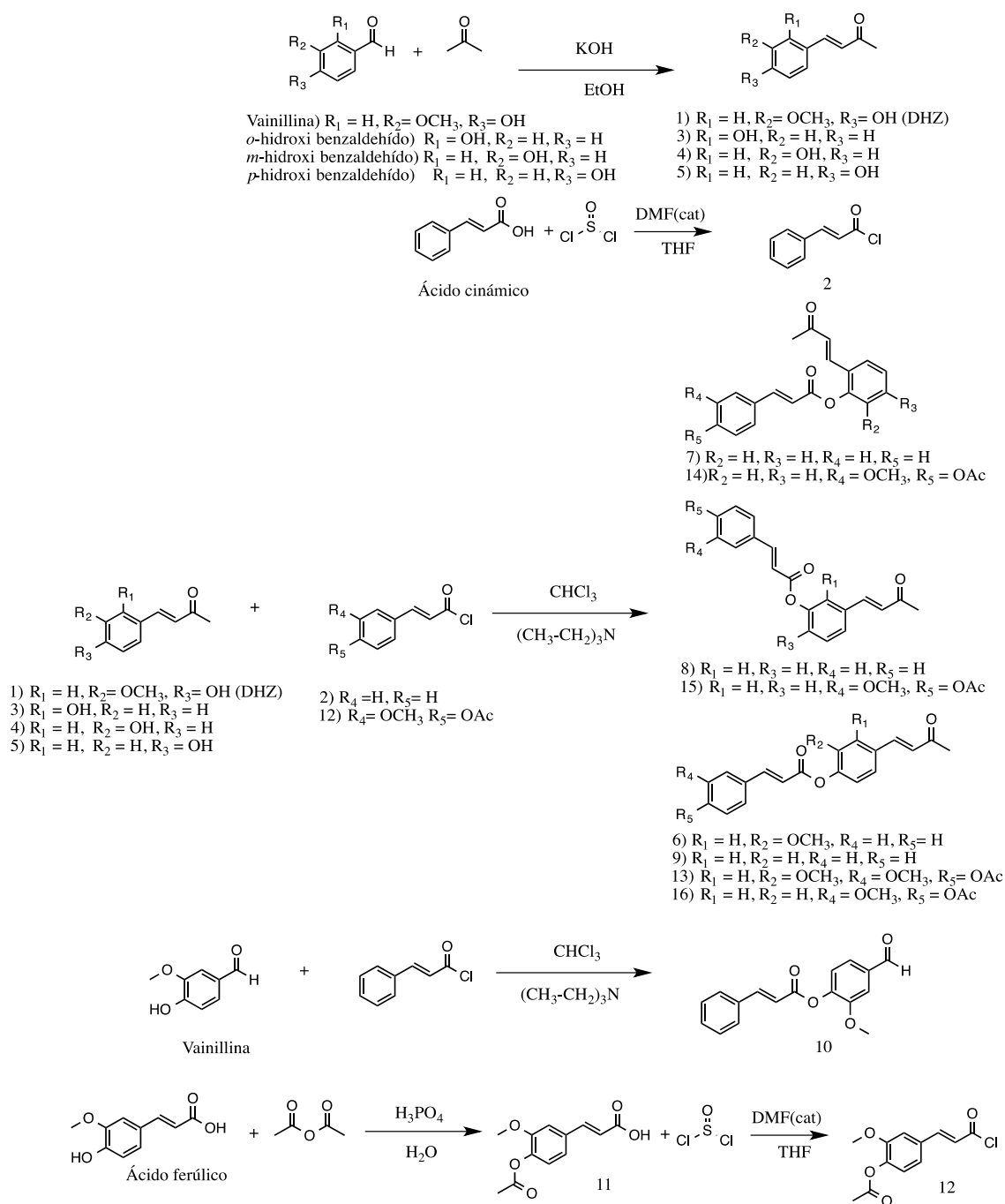


Figura 21. Síntesis de precursores y familia de *retro*-curcuminoides.

5.4 Síntesis de compuestos hidrogenados (zingerona y análogos).

Los intermediarios hidrogenados (**20-23**, Figura 22) se obtuvieron mediante una reacción de hidrogenación catalítica en dos fases: En un matraz redondo de 100 ml de tres bocas se disolvieron 150 mg de los materias primas condensadas (**1**, **3-5**) en 60 ml de AcOEt, la mezcla de reacción se purgó con una atmósfera de argón y posteriormente se hicieron reaccionar en una atmósfera de hidrógeno agregando el 10% de Pd/C-10% como catalizador.

La reacción se dejó agitar a temperatura ambiente aproximadamente durante 6 h con seguimiento por C.C.F. usando hexano: acetato de etilo (Hex:AcOEt)::7:3 como eluyente hasta observar la desaparición de las materias primas. Finalizada la reacción se filtró con un embudo de vidrio sinterizado y cama de celita. El disolvente se evaporó a presión reducida proporcionando el producto crudo, que se purificó por medio de cromatografía en columna utilizando como medio de elución Hex:AcOEt::7:3.

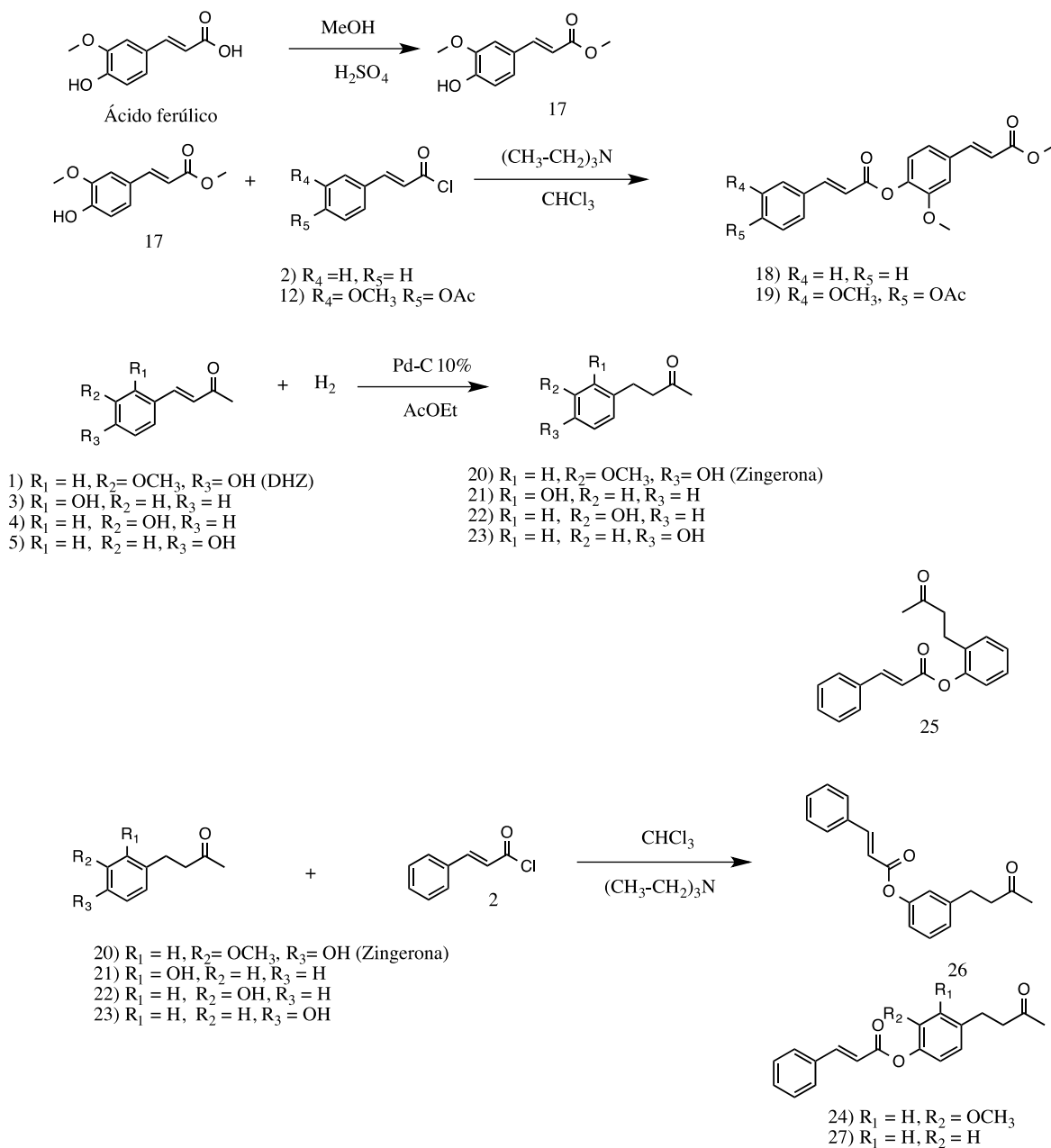


Figura 22. Retro-curcuminoides hidrogenados.

5.5 Síntesis de éteres y ésteres derivados del ácido ferúlico.

En las reacciones de eterificación y esterificación se utilizaron materias primas distintas (haluros de alquilo o haluros de bencilo), mismas que se indican en el esquema de reacción de la Figura 23 y empleando como base para la extracción del protón ácido del fenol o del ácido carboxílico carbonato de potasio (K_2CO_3) o TEA

((CH₃-CH₂)₃N). El procedimiento experimental para la obtención individual de cada compuesto se indica en la sección de caracterización espectroscópica.

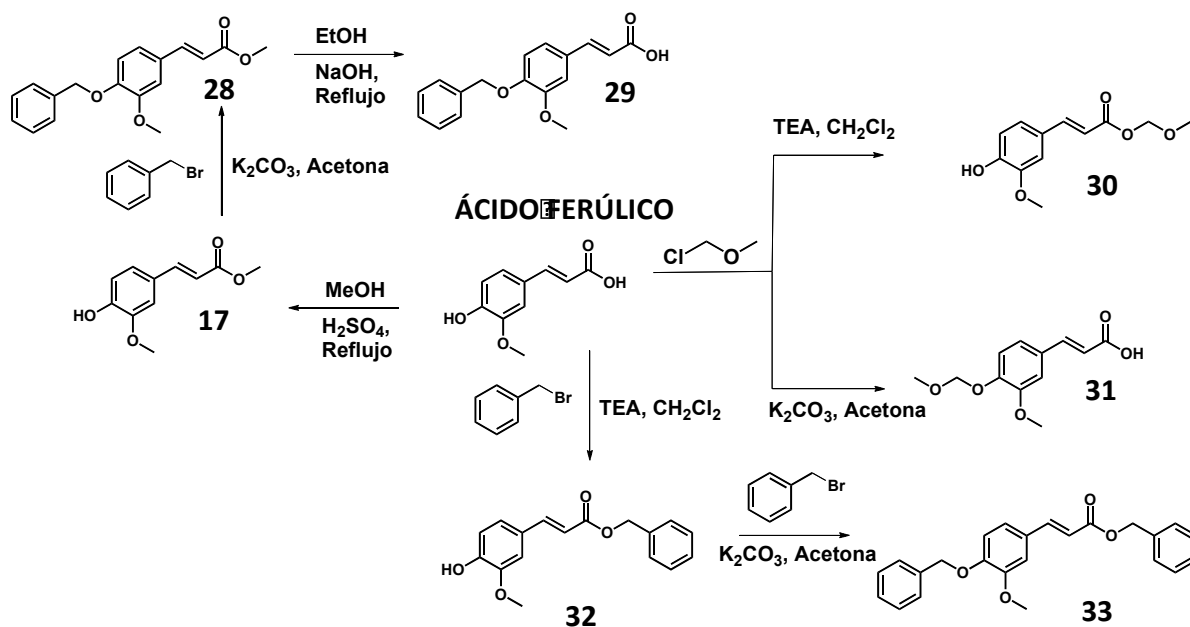


Figura 23. Derivados éteres y ésteres del ácido ferúlico.

5.6 Síntesis de los bencilidenos.

Se ensayaron dos métodos sintéticos para la obtención de este tipo de compuestos. En el método 1, se empleó 2,4-pentanodiona (1 meq) y el aldehído correspondiente (1 meq en THF) empleando como catalizador 10% de cloruro cúprico (CuCl₂) y adicionando 1 g de Na₂SO₄ como agente desecante con agitación en temperatura ambiente durante una semana. El resultado es el bencilideno correspondiente aunque con rendimientos menores al 20%, razón por la que no se consideró una ruta adecuada.

El método sintético número 2 condujo a mejores rendimientos y consistió en lo siguiente: en un matraz redondo de 250 ml se disolvió 1.2 meq de 2,4-pentanodiona en 30 ml de CH₂Cl₂ y se añadió 1 meq del aldehído correspondiente; posteriormente se adicionó 5% de piperidina, 5% de ácido acético glacial y 1 gramo de amberlita en perlas de 4 Ångstroms (malla 8-12, como agente desecante) dejando la reacción en agitación

constante en temperatura ambiente con seguimiento por C.C.F. empleando Hex:AcOEt::7:3 como eluyente.

Una vez concluida la reacción (24 horas en promedio) se filtró el exceso de amberlita en un embudo de vidrio sinterizado utilizando cama de celita, se evaporó el disolvente y se extrajo con 45 ml de acetato de etilo (3 x 15 ml). Los extractos se mezclaron y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro; una vez filtrado, el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto crudo resultante se purificó por medio de cromatografía en columna utilizando como medio de elución Hex:AcOEt::7:3. Con esta metodología se obtuvieron los compuestos **34-45** (Figura 24) y el bencilideno **68** (Figura 30)

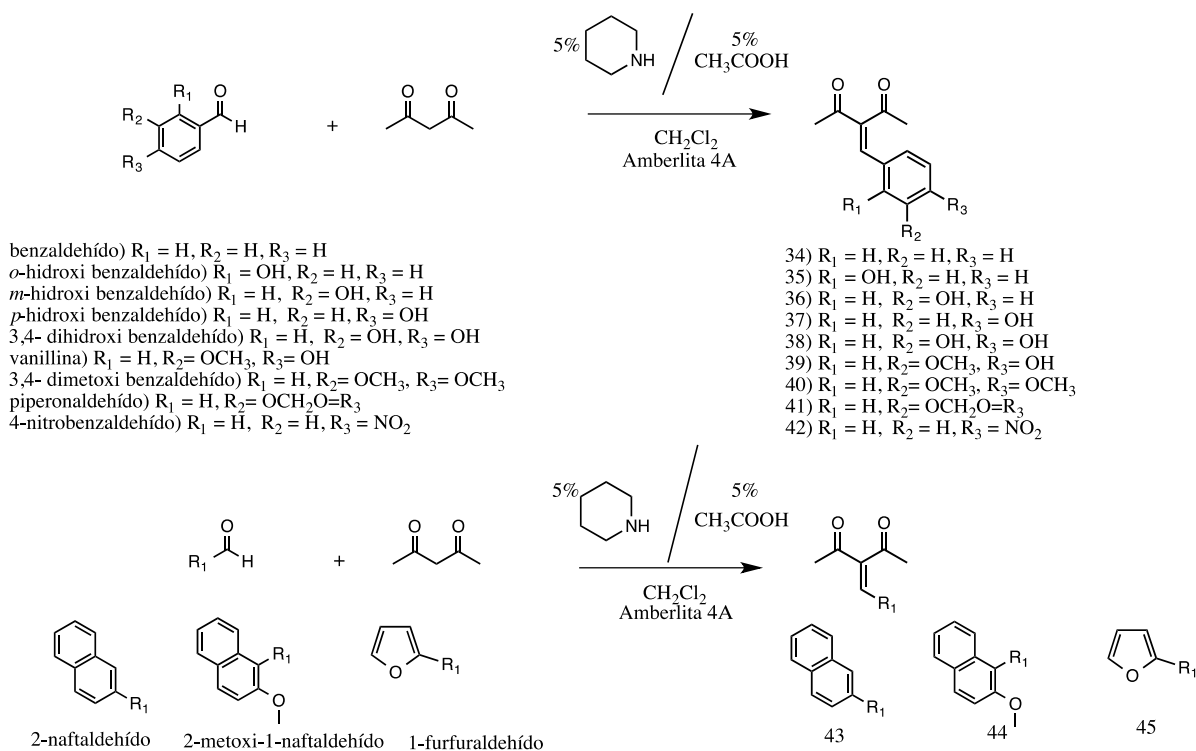


Figura 24. Familia de bencilidenos.

5.7 Síntesis de pirazolinas.

La familia de pirazolinas (Figura 25) se sintetizó con el siguiente procedimiento; en un matraz redondo de 100 ml se disolvió 1 meq del producto proveniente de la condensación aldólica (*p.ej.* compuestos **1**, **3-5**) en 20 ml de ácido acético; posteriormente se adicionó 1 meq de clorhidrato de fenilhidrazina y la mezcla de reacción se llevó a reflujo (tiempos de reacción promedio de 6 horas) con seguimiento mediante C.C.F. usando Hex:AcOEt::7:3 como eluyente hasta observar la desaparición de las materias primas.

La reacción se concluyó retirando el matraz del calentamiento, agregando hielo y neutralizando con NaHCO₃; finalmente se extrajo el producto con 45 ml de AcOEt (3 x 15 ml). Los extractos se mezclaron y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro; una vez filtrado el residuo sólido, el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto crudo resultante se purificó por medio de cromatografía en columna utilizando como medio de elución Hex:AcOEt::7:3. Con esta metodología se sintetizaron los compuestos **46-49** y **53-55** (Figura 25).

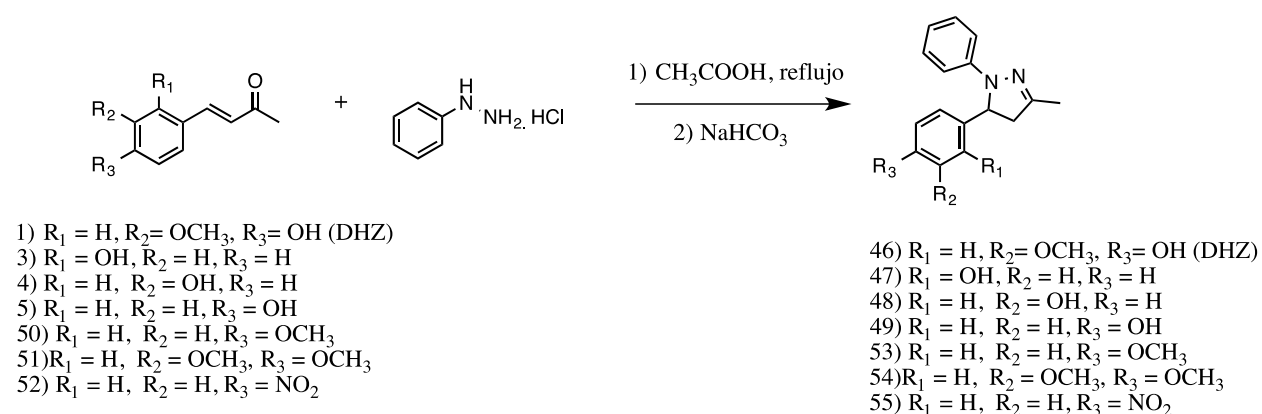


Figura 25. Familia de pirazolinas derivadas de *hemi*-curcuminoides.

5.8 Síntesis de chalconas (C-3) y di-chalconas (C-5).

Las chalconas **56-58** (Figura 26) y di-chalconas compuestos **59-62** (Figura 27) se obtuvieron siguiendo la metodología de la condensación tipo Claisen-Schmidt, como se indicó anteriormente.

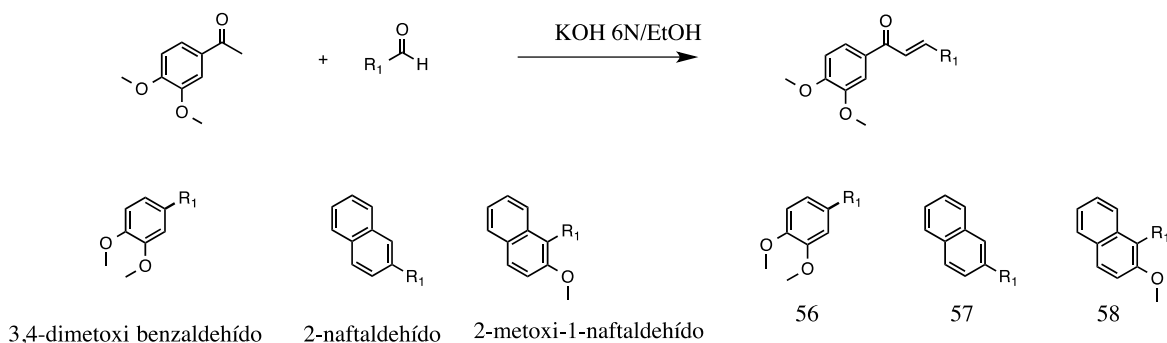


Figura 26. Chalconas, análogos de curcumina (C-3).

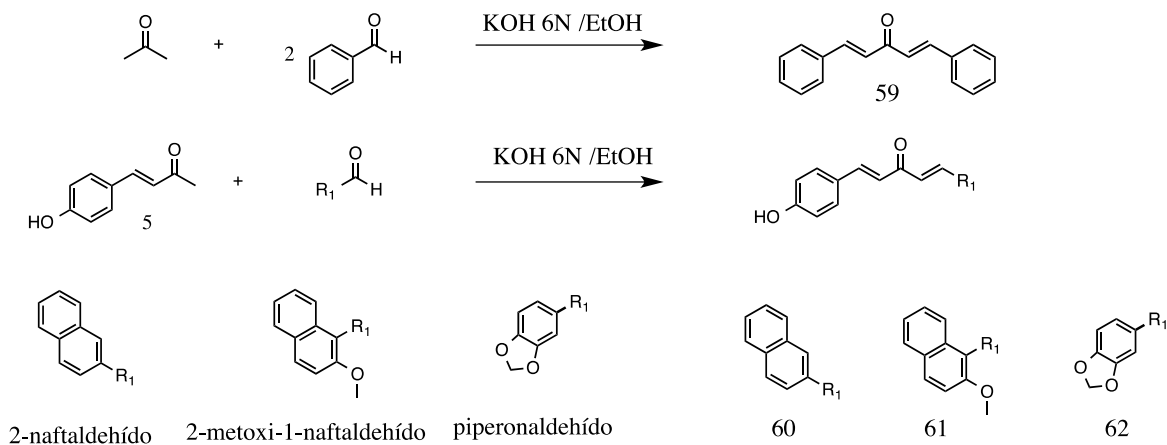


Figura 27. Di-Chalconas análogos de curcumina (C-5).

5.9 Síntesis de curcuminoides bencilados.

En un matraz redondo de 250 ml, se disolvió 1 g de curcumina en acetona anhidra y posteriormente se añadió gota a gota un exceso de bromuro de bencilo (6 eq. 1.9 ml) y un exceso de carbonato de potasio anhidro (6 eq. 1.12 g) previamente suspendido en acetona. La mezcla de reacción se dejó 48 h en agitación constante a

temperatura ambiente y monitoreando con C.C.F. utilizando como medio de elución Hex:AcOEt::7:3. La mono y di-bencilación de los fenoles procedió primero, posteriormente se observaron los compuestos tri y tetra bencilados. Una vez concluida la reacción, se filtró el residuo sólido y se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo sólido resultante se disolvió en acetato de etilo y se sometió a extracción líquido-líquido con agua. Finalmente, los cuatro curcuminoides bencilados resultantes (Figura 28) se separaron mediante cromatografía en columna eluyendo con Hex:AcOEt::7:3.

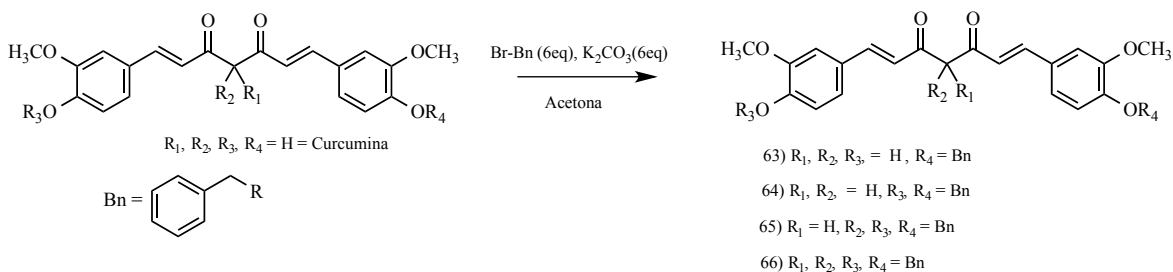


Figura 28. Curcuminoides bencilados (heptanoides)

5.10 Síntesis de heptanoides (difeníl-curcuminoides).

El compuesto **67** (Figura 29) es heptanoide que se obtuvo mediante la síntesis de Pabon [4]. En un matraz redondo de 250 ml se agregaron 2 meq de la 2,4-pentanodiona y 1 meq de trióxido de boro, posteriormente se adicionaron 50 ml de acetato de etilo y la mezcla de reacción se dejó en reflujo por 24 h. A este complejo formado, posteriormente se adicionaron 4 meq de benzaldehído seguido de 4 meq de n-tributil-borano y 5% de n-tributil-amina dejando la mezcla de reacción en reflujo por otras 24 h.

La reacción se concluyó adicionando ácido acético al 5% hasta un pH = 5 y se dejó en reflujo por 4 h, luego la reacción se dejó enfriar y se le realizaron 3 lavados con 90 ml de agua (3 x 30 ml), la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtró el residuo sólido y el disolvente se eliminó a presión reducida. Finalmente el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna eluyendo con Hex:AcOEt::7:3 obteniendo un sólido amarillo con un rendimiento del 60%.

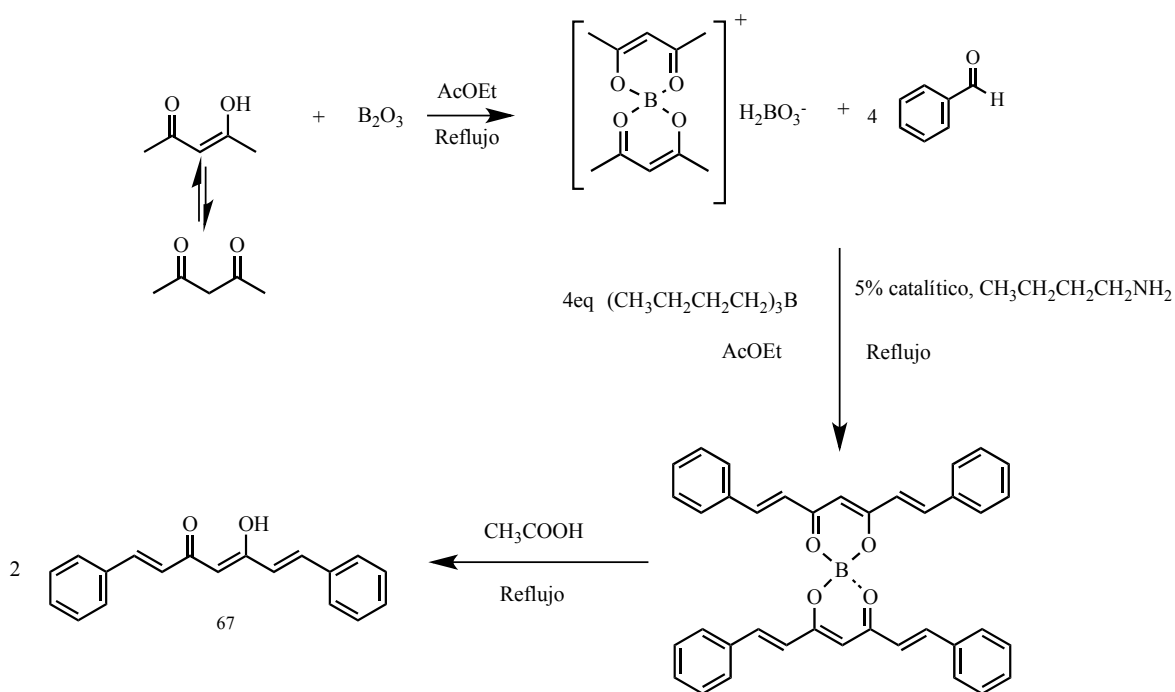


Figura 29. Síntesis del curcuminoide **67** (heptanoide).

Los compuesto **68** y **69** son considerados derivados tipo heptanoides (Figura 30) y se obtuvieron con los procedimientos experimentales indicados anteriormente para la síntesis de ésteres del ácido cinámico o bencilidenos.

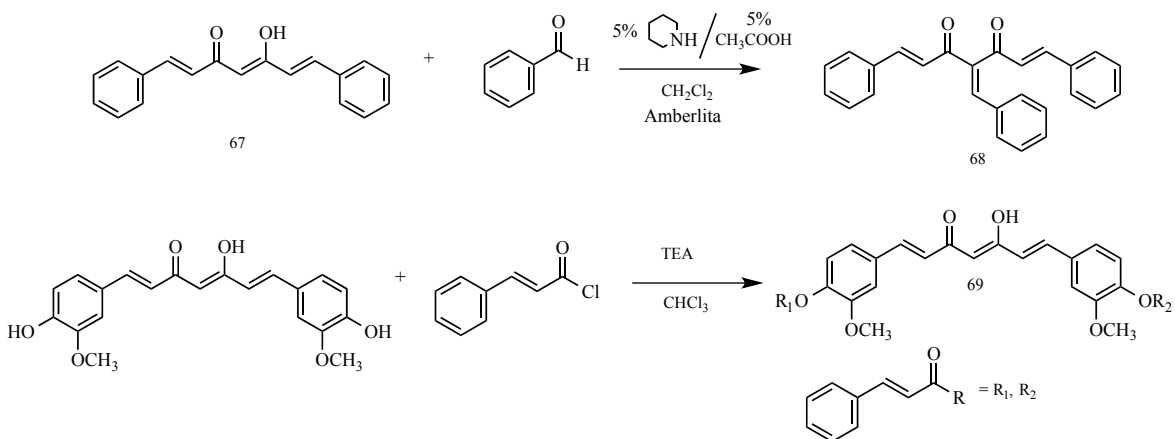


Figura 30. Síntesis de derivados heptanoides **68** (bencilideno) y **69** (éster cinámico de curcumina).

5.11 Síntesis de complejos Zn y B de curcuminoides.

Síntesis del complejo **70**. En un matraz redondo de 100 ml se adicionó 1 meq del curcuminoide **69** (disuelto en 30 ml acetato de etilo), posteriormente se adicionó 0.5 meq de acetato de zinc disueltos en 5 ml de metanol. La reacción se dejó en agitación constante en temperatura ambiente durante 24 h.

Transcurrido el tiempo de reacción se observó un precipitado que se filtró y se aplicaron 5 lavados continuos con agua destilada; el producto se secó al alto vacío obteniéndose el complejo **70** (Figura 31).

Síntesis del complejo **71**. En un matraz redondo de 250 ml se disolvieron 150 mg (0.27 meq) del curcuminoide di-bencilado (**64**) en 30 ml de éter etílico bajo atmósfera inerte, posteriormente la mezcla de reacción se colocó en un ultra-enfriador a 0°C y se adicionó gota a gota (tener precaución extrema) una solución de eterato de trifluoruro de boro ($\text{Et}_2\text{O} \cdot \text{BF}_3$, 0.4 meq). La reacción se dejó en agitación constante durante 12 h a 0°C y seguimiento con C.C.F. utilizando como medio de elución Hex:AcOEt::7:3.

Una vez concluida la reacción, se evaporó el éter etílico al vacío y el crudo resultante se disolvió en acetato de etilo (50 ml) sometiéndose a una extracción líquido-líquido usando agua destilada (3 x 20 ml) con la adición de NaHCO_3 sólido hasta un pH = 7. La fase orgánica se separó y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, y una vez filtrado el residuo sólido, el disolvente se eliminó a presión reducida. El complejo **71** se pudo cristalizar utilizando la mezcla de disolventes AcOEt/Hex, lográndose un monocristal adecuado empleando acetonitrilo en baja temperatura.

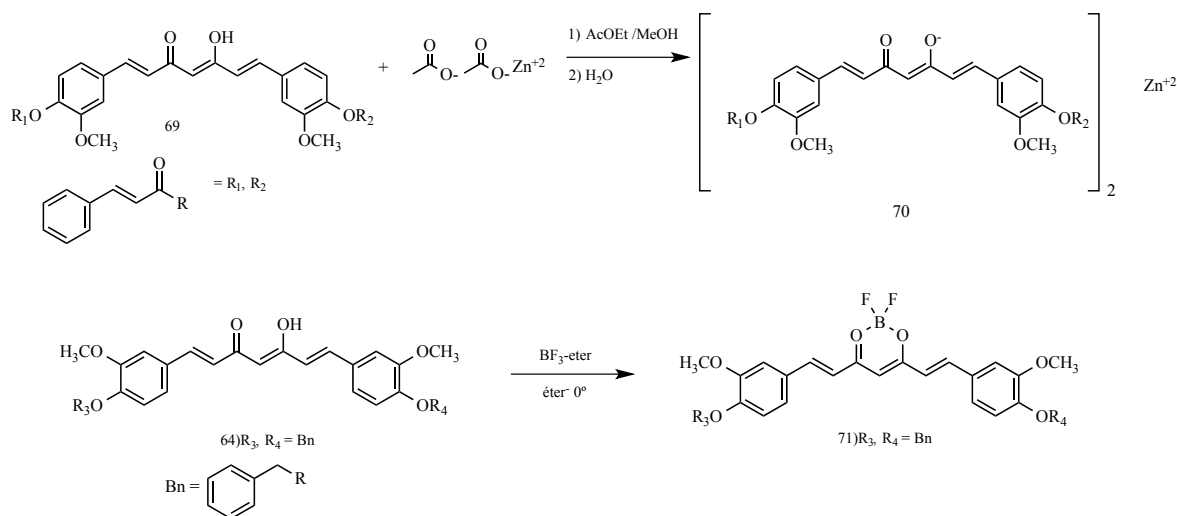


Figura 31. Complejos derivados de curcuminoides.

6. Metodología de los ensayos biológicos.

Todos los ensayos biológicos de citotoxicidad fueron realizados por la Maestra en Ciencias María Teresa Obdulia Ramírez Apan. Los ensayos de TBARS y captura de radicales DPPH fueron realizados por el Maestro en Ciencias Antonio Nieto Camacho en el Instituto de Química de la UNAM.

Para los ensayos de citotoxicidad se emplearon células en donde se habían ensayado anteriormente [42,67] compuestos curcuminoides y fueron proporcionadas por el laboratorio de pruebas biológicas, por lo que se utilizaron las siguientes líneas celulares:

U251: Glía de Sistema Nervioso Central, PC-3: Adenocarcinoma prostático, K562: Leucemia mielógena crónica humana, HCT-15: Adenocarcinoma de colon, MCF-7: Adenocarcinoma mamario humano, SKLU-1: Adenocarcinoma pulmonar, COS-7: Célula no tumoral de riñón de mono.

Las líneas celulares fueron suministradas por el Instituto Nacional del Cáncer (CNI de E.E. U.U.) y se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina 2 mM, 10000 ul/ml de penicilina G sódica, 10000 µg/ml de

sulfato de estreptomicina y 25 µg/ml de amfotericina B (Gibco) y 1% aminoácidos no esenciales (Gibco). Se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂ y una humedad relativa al 95%.

Las células se extrajeron de los matraces de cultivo tisular mediante el tratamiento con tripsina y se diluyeron con el medio de cultivo antes mencionado. De estas suspensiones celulares, se pipetearon 100 µl/pozo que contenían de 5×10^4 a 10×10^4 células por ml de suspensión celular y se sembraron en placas de microtitulación de 96 pozos (Costar) y se incubó a 37°C durante 24 h en una atmósfera de CO₂ al 5% y con una humedad relativa al 95%. La viabilidad de las células utilizadas en los experimentos superó el 95% según la determinación con el reactivo azul de tripano.

6.1 Ensayo de citotoxicidad.

Todos los compuestos sintetizados se ensayaron en distintas concentraciones (25, 50 ó 100 µM) sometiéndose a un cribado primario durante 48 h *in vitro* contra seis líneas celulares cancerosas humanas y una no tumoral.

Después del período de incubación, las células se fijaron al substrato de plástico mediante la adición de 50 µl de ácido tricloroacético frío al 50%. Las placas se incubaron a 4°C durante 1 h, se lavaron con agua corriente del grifo y se secaron al aire.

Después de la exposición de las líneas celulares con los compuestos en ensayo, se determinó la citotoxicidad utilizando el colorante de afinidad a proteínas sulforodamina B (SRB) midiendo el crecimiento celular como se describe en la referencia [68].

Las células fijadas con ácido tricloroacético se tiñeron mediante la adición de 0,4% de SRB. La solución de SRB libre se eliminó mediante lavado con ácido acético al 1%. Las placas se secaron al aire, y el colorante se solubilizó mediante la adición de

100 μ l de una solución de base tris (hidroximetil) aminometano a 10 mM . Las placas se colocaron en agitación durante 10 min, y se determinó la absorción a 515 nm usando un lector de placas ELISA (Synergy / HT, BIO-TEK Instrument, Inc., Winooski, VT, EE. UU.).

Los valores de IC_{50} se calcularon por triplicado siguiendo los protocolos estándares donde se trazó una curva de concentración-respuesta para cada compuesto y se estimó la concentración (IC_{50}) que resultó en una inhibición del 50% mediante un análisis de regresión no lineal. La citotoxicidad se determinó utilizando el colorante de unión a proteínas sulforodamina B (SRB) en el ensayo de microcultivo para medir el crecimiento celular.

6.2 Inducción de la peroxidación lipídica y la cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

El Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) es el proveedor de las ratas Wistar macho adultas (200-250 g). Los procedimientos y el cuidado de los animales se llevaron a cabo de conformidad con la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Manejo de Animales NOM-062-ZOO-1999. Las ratas se mantuvieron a $23 \pm 2^{\circ}C$ en un ciclo de 12 h/12 h luz-oscuridad con acceso libre a comida y agua.

Las ratas fueron sacrificadas con CO_2 y el tejido cerebral (cerebro completo) se diseccionó rápidamente y se homogeneizó en solución salina tamponada con fosfatos [69,70] (PBS) (0,2 g de KCl, 0,2 g de KH_2PO_4 , 8 g de NaCl y 2,16 g de $NaHPO_4 \cdot 7H_2O$, el pH se ajustó a 7.4) para producir un homogeneizado 1/10 (p/v). Posteriormente, el homogeneizado se centrifugó durante 10 min a 800 rcf (campo centrífugo relativo) para producir un sedimento que se descartó. El contenido de proteína sobrenadante se midió utilizando el reactivo de fenol Folin y Ciocalteu [71] y se ajustó con PBS a 2,666 mg de proteína/ml.

Como un índice de lipoperoxidación se midieron los niveles de TBARS usando homogeneizados de cerebro de rata de acuerdo con el método descrito por T.B. Ng y colaboradores [72].

Las muestras se prepararon en DMSO en distintas concentraciones (50 μ M y 100 μ M) y se mezclaron con 50 μ L de EDTA al 20 μ M, posteriormente se añadieron a 375 μ L del homogeneizado de cerebro y se incubó a 37°C durante 30 min. Para el control se utilizó como blanco 50 μ L de DMSO.

La lipoperoxidación se inició añadiendo 50 μ L de una solución de sulfato ferroso (FeSO_4) al 100 μ M y se incubó a 37°C durante 1 h. El contenido de TBARS se determinó según lo descrito por Ohkawa y colaboradores [73] con algunas modificaciones.

Se añadieron 500 μ L de ácido tiobarbitúrico TBA (1% de ácido 2-tiobarbitúrico en NaOH 0,05 N y ácido tricloroacético al 30%, en proporción 1:1) en cada tubo y la suspensión final se enfrió con hielo durante 10 min, se centrifugó a 13,400 rfc por 5 min y se calentó a 80°C en un baño de agua durante 30 min. Después se enfrió a temperatura ambiente y se midió la absorbancia de 200 μ L de sobrenadante a una longitud de onda de 540 nm en el equipo Bio-Tek Microplate Reader Synergy HT.

La concentración de TBARS se calculó por interpolación en una curva estándar de tetra-metoxipropano (TMP) como un precursor de malondialdehído (MDA) [74]. Los resultados se expresaron como nmoles de TBARS por mg de proteína. La relación de inhibición (IR [%]) se calculó usando la siguiente fórmula: $IR = (C-E) * 100 / C$, donde C es la absorbancia del control y E es la absorbancia de la muestra de prueba.

Finalmente los datos se analizaron mediante ANOVA seguida de la prueba de Dunnett para compararlos con el control. Los valores de $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos y la concentración inhibitoria al 50% (IC_{50}) se estimó mediante una regresión lineal.

6.3 Actividad antioxidante por captura del radical libre 2, 2-difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH).

La actividad de captura del radical DPPH se midió utilizando el método adaptado de Mellors y Tappel [75] ya el análisis se llevó a cabo en microplacas de 96 pozos. Una alícuota de 50 μL del compuesto de prueba (10 μM ó 100 μM) se mezcló con 150 μL de una solución etanólica de DPPH. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 30 min y se midió la absorbancia a 515 nm usando el lector ultra-microplate (Bio-Tek Microplate Reader Synergy HT, Inc., Winooski, VT, E.E.U.U.). El porcentaje de inhibición de cada compuesto se determinó por comparación con una solución blanco en etanol de DPPH a 100 μM .

7. Resumen de resultados.

Se obtuvo un total de 71 compuestos empleando la ruta sintética descrita en el Esquema 1.

Se sintetizaron **15** *retro*-curcuminoides; **5** *retro*-curcuminoides derivados del ácido cinámico, **4** *retro*-curcuminoides derivados del ácido ferúlico acetilado, **2** *retro*-curcuminoides derivados del éster metílico del ácido ferúlico y **4** *retro*-curcuminoides hidrogenados derivados del ácido cinámico.

Los *retro*-curcuminoides se generaron a partir las combinaciones individuales de los productos de degradación de la curcumina (DHZ, vainillina o el éster metílico del ácido ferúlico) con los cloruro de acilo correspondientes. Por otro lado, esta familia de compuestos se obtuvo con rendimientos de hasta un 90% como se muestra en la tabla 3.

Se sintetizaron **7** derivados del ácido ferúlico (éteres o ésteres) y los sustituyentes (metilo, bencilo, metil metil éter (MOM)) se eligieron por considerarse favorables para mejorar la liposolubilidad [76]. Los productos obtenidos fueron de fácil purificación y con rendimientos de hasta un 90%.

El grupo de bencilidenos resultó de gran interés aportando una de las familias más amplias (**12** compuestos con diferentes sustituyentes en los anillos aromáticos) por el hecho de que la actividad biológica de las 1,3-dicetonas (análogos de la curcumina) se vio aumentada [59] por la introducción de un grupo bencilideno en la posición alfa central del sistema.

Los rendimientos en las reacciones para producir los bencilidenos alcanzó hasta un 70%, presentándose menores rendimientos (ca. 30%) en los derivados que poseen un fenol como sustituyente, lo que fue indicativo de que parte del catalizador utilizado (piperidina) se consume con la desprotonación del fenol.

Se sintetizaron **7** compuestos de la familia de pirazolinas, dando prioridad a tener derivados con y sin grupos fenólicos debido a la importancia biológica [54]. Fue importante para el trabajo experimental preparar este grupo de compuestos heterocíclicos ya que tienen una analogía estructural con los pirazoles de curcumina [59]. Los rendimientos alcanzaron hasta un 60% debido a la dificultad de separar el producto deseado del ácido acético (ver Figura 19) y los rendimientos menores (ca. 40%) se presentaron en los compuestos que poseen un grupo fenólico libre.

Las razón por la que solo se sintetizaron **3** chalconas (C3) y **4** di-chalconas (C5), se debe a que se subrayó conocer el comportamiento biológico de nuevos compuestos análogos de curcumina [77]. Otra razón considerada en este trabajo, fue la desventaja descrita [78] para la reacción de Claisen-Schmidt ya que hubo una variación notable en el rendimiento [47] que va desde el 15% para las di-chalconas hasta un 55% para las chalconas (en la literatura [79] se justifica reportándose subproductos de polimerización).

Los **7** curcuminoides (C7) sintetizados son importantes para la búsqueda de las propiedades biológicas del derivado esterificado (éster cinámico) y del derivado eterificado (éter bencilico) de curcumina [50], mientras que los **2** complejos derivados de curcuminoides se exploraron como posibles compuestos que potencian la actividad

biológica respecto de sus respectivos ligantes (complejo con zinc [51,65] y con boro [80]). Los rendimientos obtenidos en estos heptanoides alcanzó el 75%.

Para la síntesis de todos los grupos estructurales fue necesario preparar **14** precursores (**8** compuestos condensados con el sistema carbonílico α,β -insaturado, **2** cloruros de ácido y **4** derivados hidrogenados).

Tabla 3. Rendimientos por familia.

Familia	Rendimiento
1) <i>Retro</i> -curcuminoides	75%- 90%
2) Derivados del ácido ferúlico	70%- 90%
3) Bencilidenos	30%-70%
4) Pirazolinás	45% 60%
5) Chalconas (C-3)	50% 55%
6) Di-chalconas (C-5)	15-20%
7) Curcuminoides	60%
8) Complejos	70-75%

Tanto con la curcumina como con los **69** productos sintéticos se realizaron bioensayos primarios que incluyen; captura del radical libre DPPH, las pruebas TBARS y pruebas de citotoxicidad en líneas celulares. Todos los compuestos se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas.

Se caracterizaron 23 nuevas estructuras cristalinas mediante la técnica de rayos-X y se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Nuevas estructuras cristalinas reportadas en esta tesis.

Familia de Compuestos	Número del Compuesto	Total
<i>Retro</i> -curcuminoides (ácido cinámico)	6-9	4
<i>Retro</i> -curcuminoides (ácido ferúlico acetilado)	13-16	4
<i>Retro</i> -curcuminoides (ésteres metílicos del ácido ferúlico)	18-19	2
Derivados del ácido ferúlico	28,29-31, 33	5
Bencilidenos	37, 39, 44,	3
Pirazolinas	54	1
Curcuminoides, 7 átomos de carbono	64-66	3
Complejos de curcuminoides	71	1

8. Discusión de resultados.

8.1 Características espectroscópicas (RMN ¹H) de los *retro*-curcuminoides.

Los *retro*-curcuminoides producen cuatro señales dobles en RMN de hidrógeno como característica principal, originadas por la presencia de dos sistemas de alquenos α,β -insaturados que se diferencian claramente uno del otro mediante sus desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento (aproximadamente 16 Hz); se asignan dos señales dobles características que corresponden a las posiciones α,β de un carboxilo tipo éster (R-COO-R) y dos dobles característicos de las posiciones α,β que corresponden al carbonilo de la cetona (C=O); las constantes de acoplamiento para ambos grupos corresponden a los alquenos con geometría *trans*.

Todos los espectros presentan una señal característica entre 2.3 ppm y 2.4 ppm que corresponde al metilo alfa (α) al grupo cetona, y para aquellos compuestos que tienen un metoxilo en los anillos aromáticos se observa una señal cerca de 3.8 ppm. Se observan varias señales múltiples en la región aromática que corresponden adecuadamente a dos anillos aromáticos. Estas señales están presentes en los espectros de las Figuras 32-34 de los *retro*-curcuminoides provenientes del ácido

cinámico (*retro*-curcuminoides **6 y 9**). Las Figuras 35 y 36 corresponden al espectro de hidrógeno del compuesto **16**, un *retro*-curcuminóide derivado del ácido ferúlico acetilado.

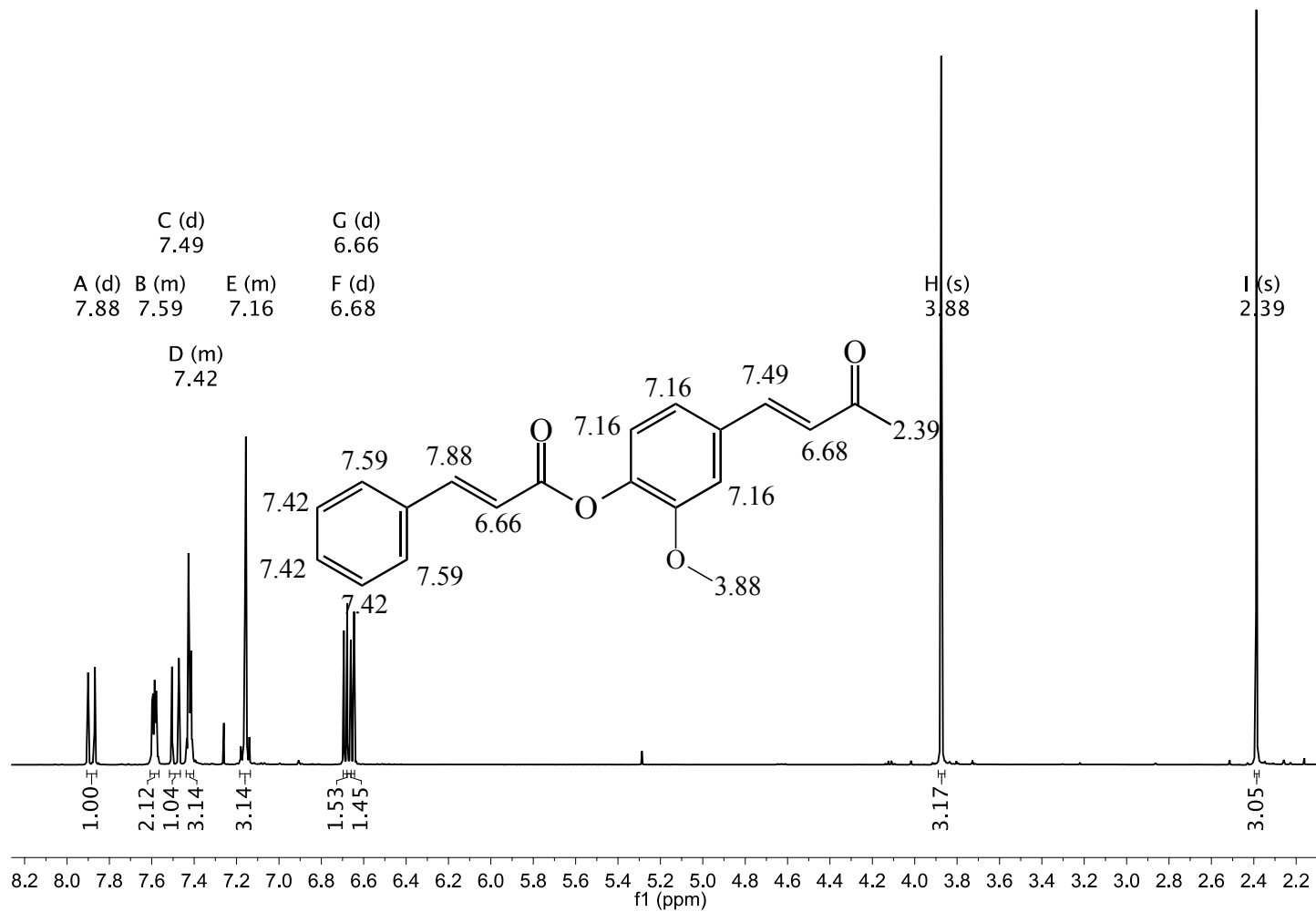


Figura 32. Espectro de RMN de ¹H del compuesto **6** (500 MHz, CDCl₃).

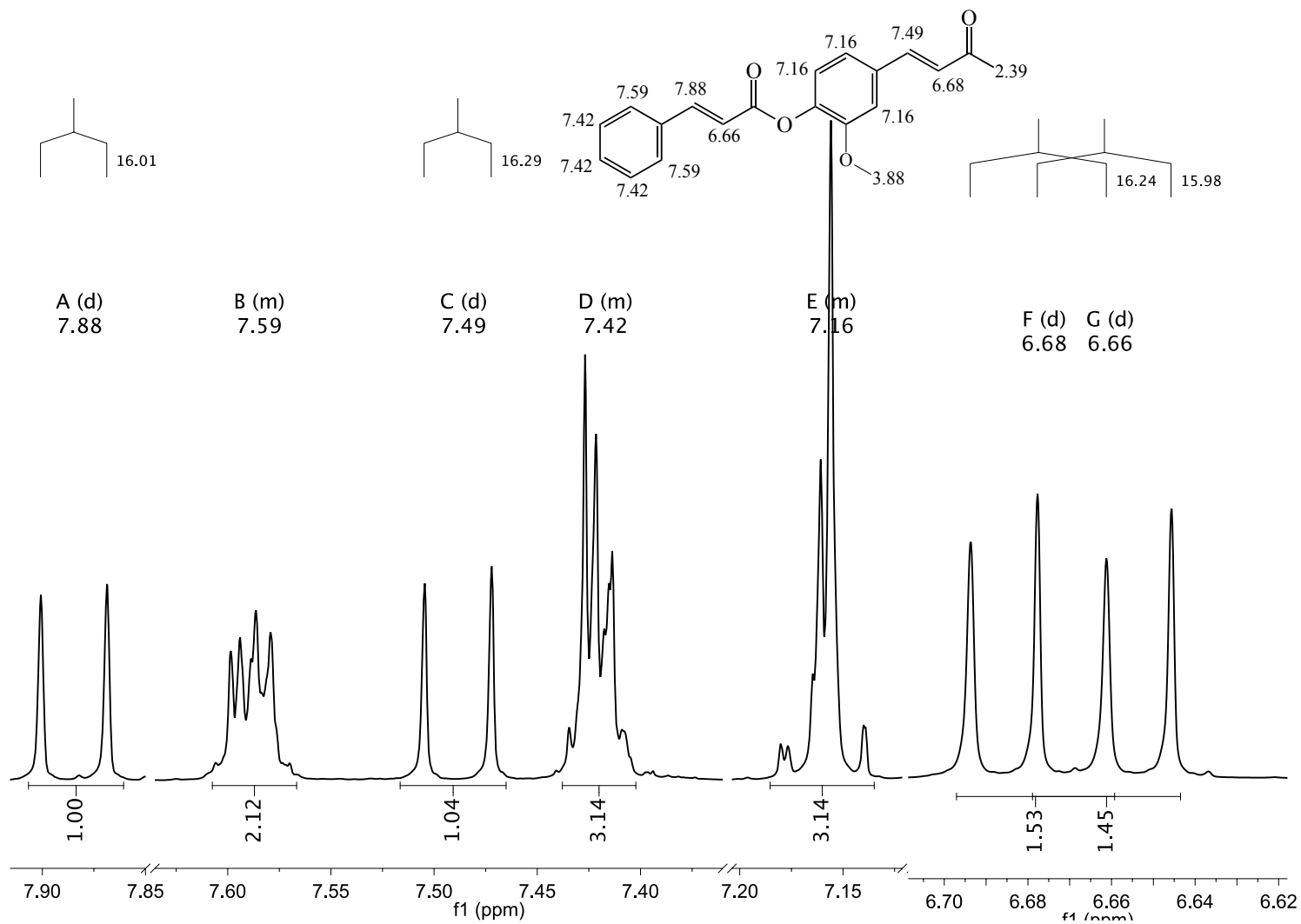


Figura 33. Expansión del espectro de RMN de ¹H del compuesto **6** (500 MHz, CDCl₃).

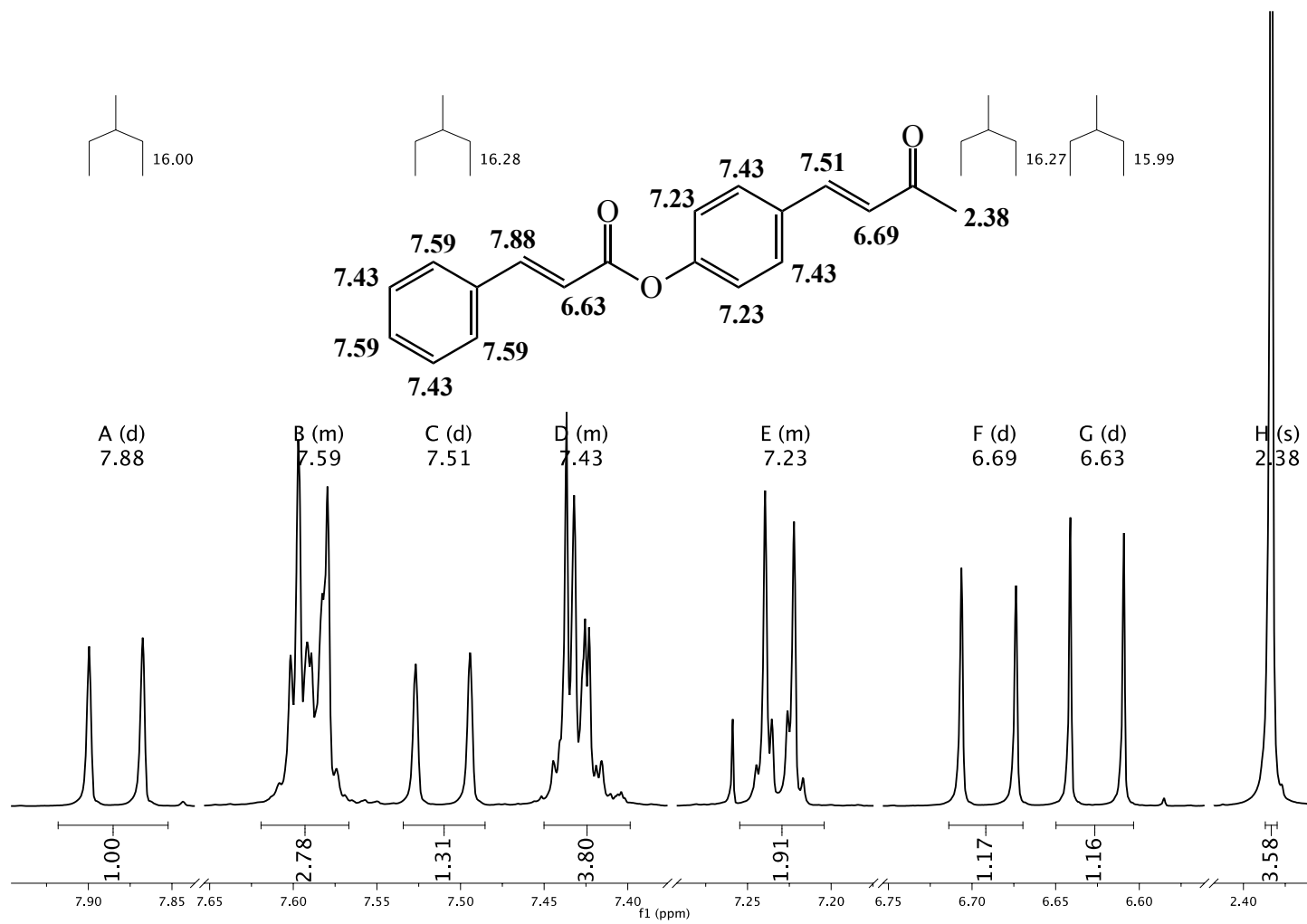


Figura 34. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **9** (500 MHz, CDCl_3).

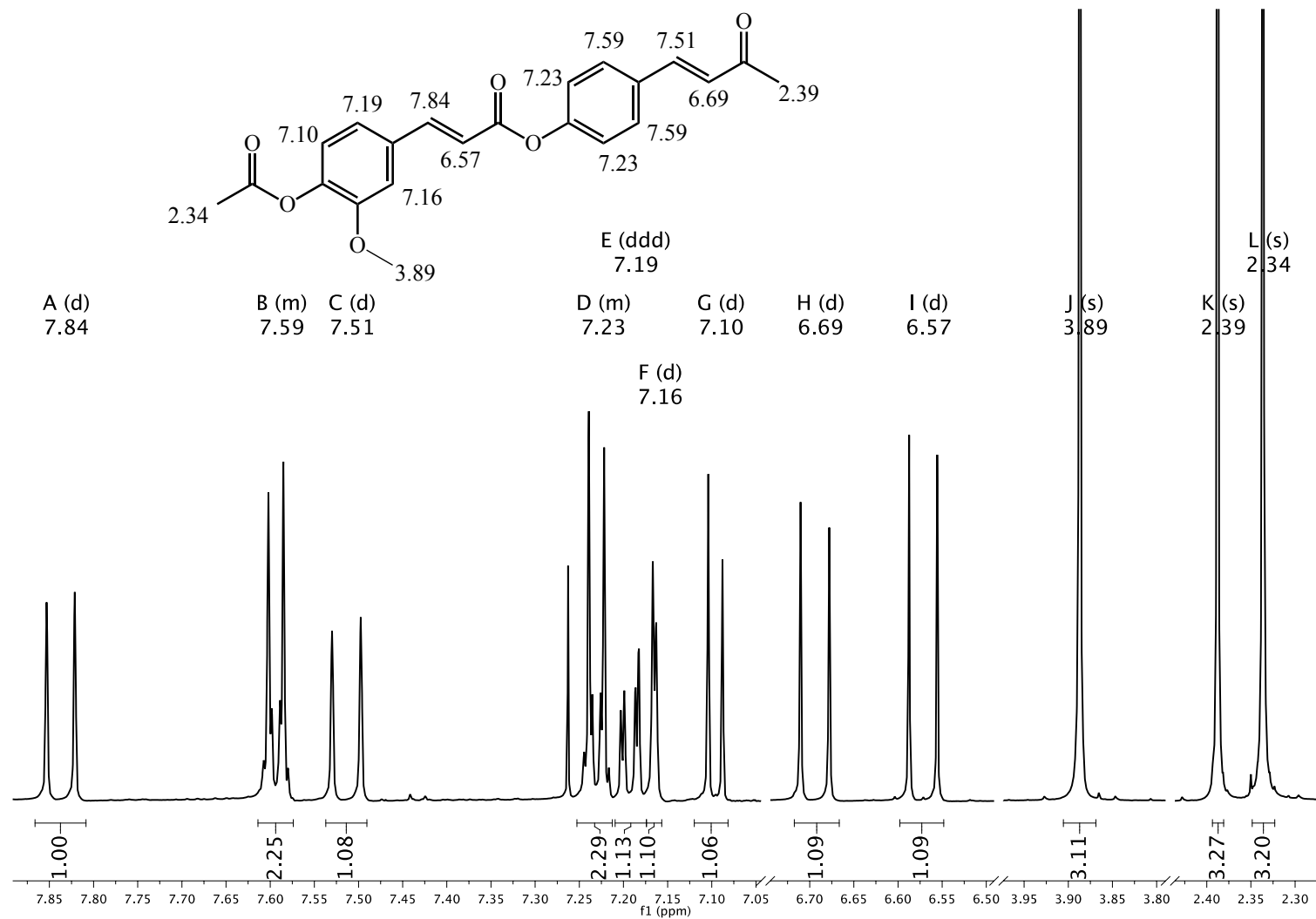


Figura 35. Espectro de RMN de hidrógeno del *retro*-curcuminoide derivado del ácido ferúlico acetilado, compuesto **16** (500 MHz, CDCl₃).

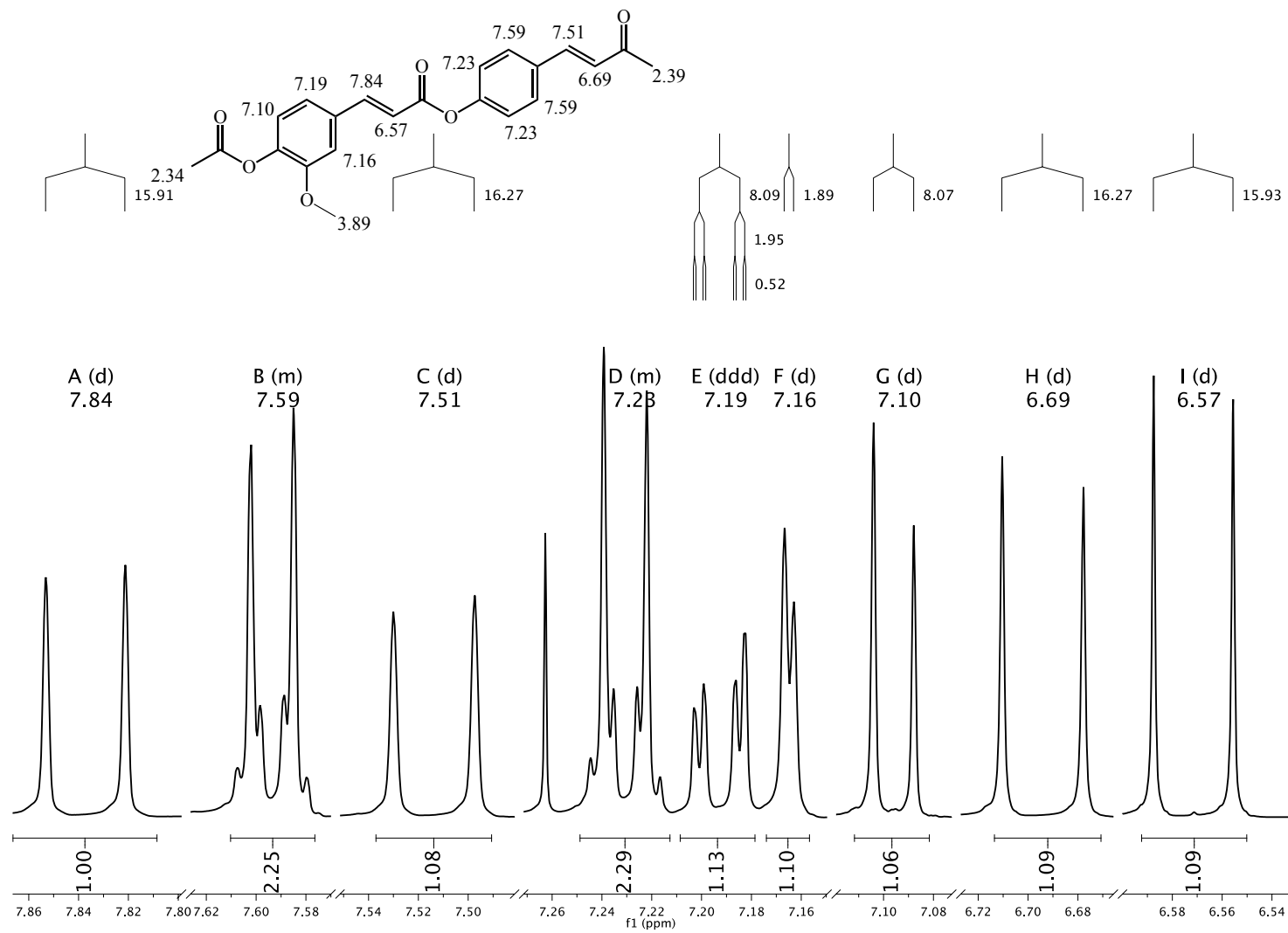


Figura 36. Expansión del espectro de RMN de hidrógeno del compuesto **16** (500 MHz, CDCl₃).

8.2 Análisis de IR de los *retro*-curcuminoides.

Los espectros de IR de los *retro*-curcuminoides derivados del ácido cinámico (compuestos **6-9**) mostraron bandas características de absorción que corresponden al grupo carbonilo del éster, en los compuestos **6** (en 1733 cm^{-1}) **7** (en 1728 cm^{-1}), **8** (en 1717 cm^{-1}), y **9** (en 1726 cm^{-1}) originados por los estiramientos del grupo carbonilo del éster. Adicionalmente, se observan dos bandas intensas para los compuestos **6** (en 1122 cm^{-1} y 1254 cm^{-1}), **7** (en 1133 cm^{-1} y 1220 cm^{-1}), **8** (en 1150 cm^{-1} y 1257 cm^{-1}) y **9** (1140 cm^{-1} y 1214 cm^{-1}) originadas por los estiramientos simétricos y asimétricos del éster.

En los espectros de IR de esta familia se observan bandas características de absorción correspondientes al carbonilo de la cetona, en los compuestos **6** (en 1680 cm^{-1}) **7** (en 1634 cm^{-1}), **8** (en 1631 cm^{-1}) y **9** (en 1662 cm^{-1}) originadas por los estiramientos fuertes del grupo carbonilo de la cetona (C=O) conjugada [81], adicionalmente presentan una banda intensa para **6** (en 1306 cm^{-1}), **7** (en 1309 cm^{-1}), **8** (en 1310 cm^{-1}), **9** (en 1309 cm^{-1}) debido a la torsión de la cetona.

Finalmente se observaron absorciones de baja intensidad para los *retro*-curcuminoides derivados del ácido cinámico correspondiente a los estiramientos -C-H que se presentan en los anillos aromáticos, para los compuestos **6** (en 3069 cm^{-1}), **7** (en 3060 cm^{-1}), **8** (en 3052 cm^{-1}) y **9** (en 3062 cm^{-1}). El espectro de infrarrojo del compuesto **9** (Figura 37) muestra estas señales características .

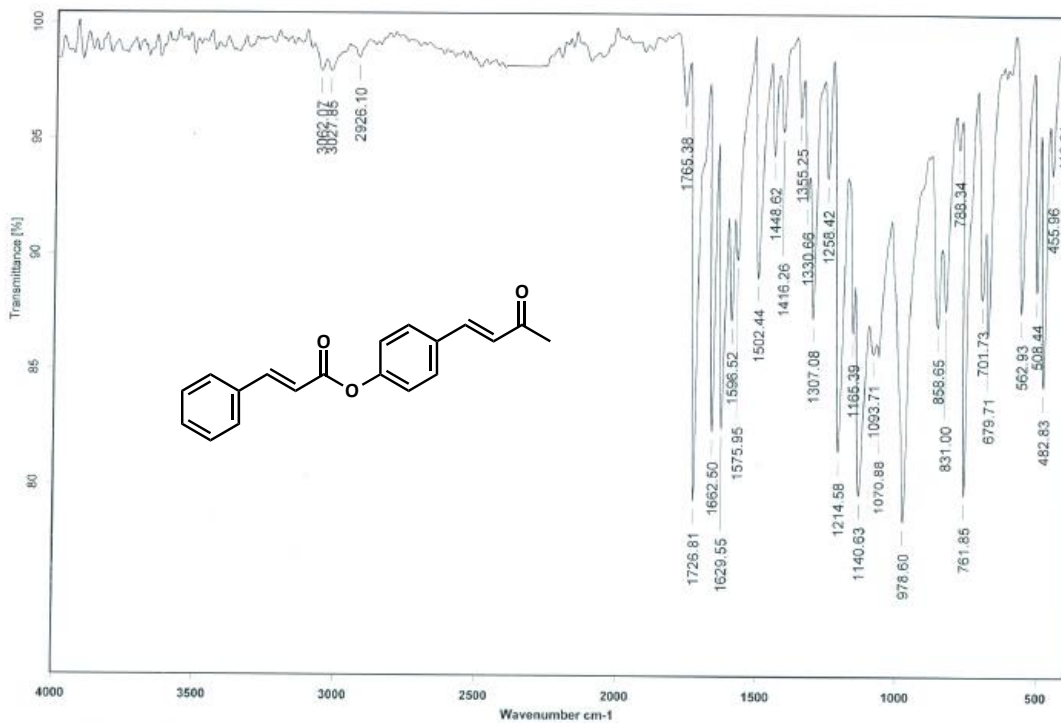


Figura 37. Espectro de IR del compuesto **9**.

Los *retro*-curcuminoides derivados del ácido ferúlico acetilado (compuestos **13-16**) mostraron bandas características de absorción debido a la presencia del carbonilo del éster, para los compuestos **13** (en 1758 cm⁻¹), **14** (en 1759 cm⁻¹), **15** (en 1762 cm⁻¹) y **16** (en 1757 cm⁻¹) originadas por sus estiramientos, adicionalmente se observan dos bandas intensas para los compuestos **13** (en 1120 cm⁻¹ y 1152 cm⁻¹), **14** (en 1120 cm⁻¹ y 1201 cm⁻¹), **15** (en 1117 cm⁻¹ y 1150 cm⁻¹) y **16** (en 1119 cm⁻¹ y 1166 cm⁻¹) debido a los estiramientos simétricos y asimétricos del éster.

Estos *retro*-curcuminoides presentaron bandas características de absorción fuerte por la presencia del carbonilo de la cetona, para los compuestos **13** (en 1664 cm⁻¹), **14** (en 1632 cm⁻¹), **15** (en 1665 cm⁻¹) y **16** (en 1632 cm⁻¹) las cuales son originadas por los estiramientos de la cetona (C=O, cetona conjugada), adicionalmente presentan una banda intensa de absorción para **13** (en 1196 cm⁻¹), **14** (en 1258 cm⁻¹), **15** (en 1191 cm⁻¹) y **16** (en 1256 cm⁻¹) debido a la torsión de la cetona.

Los *retro*-curcuminoides derivados del ácido ferúlico acetilado mostraron bandas de absorción de baja intensidad correspondiente a los anillos aromáticos, para los compuestos **13** (en 3010 cm⁻¹), **14** (en 3011 cm⁻¹), **15** (en 3070 cm⁻¹) y **16** (en 3066 cm⁻¹). En el espectro de infrarrojo del compuesto **16** (Figura 38) se observan este tipo de señales características.

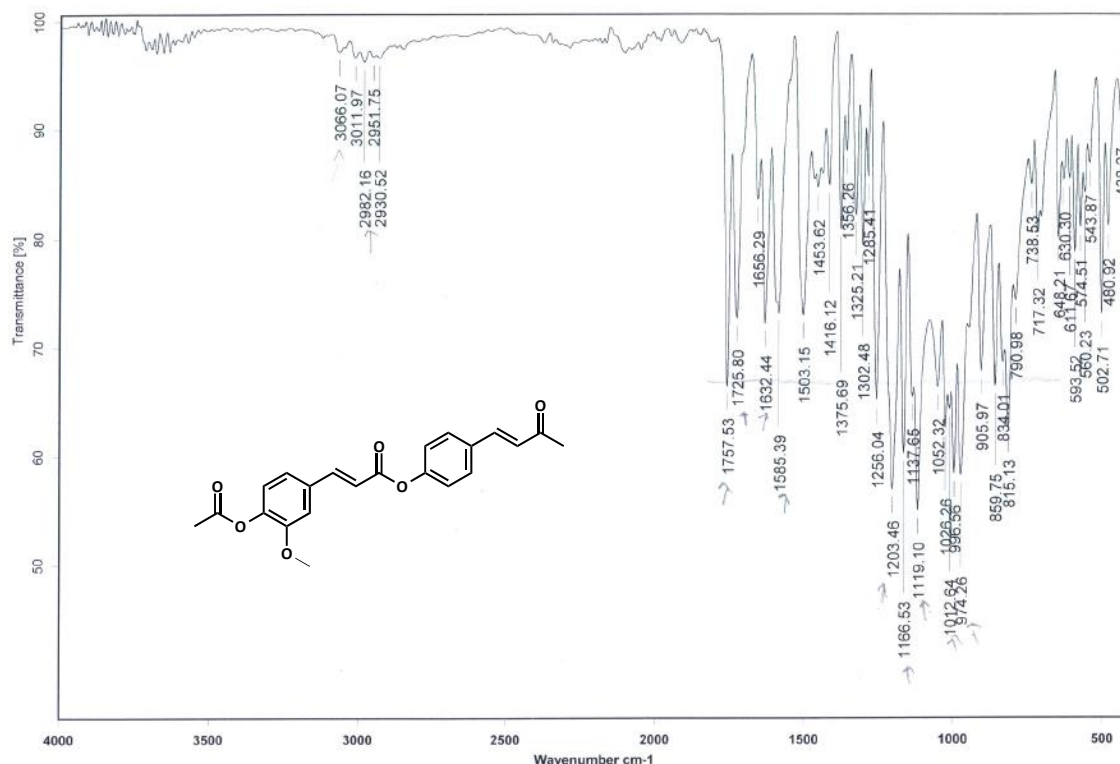


Figura 38. Espectro de IR del compuesto **16**.

8.3 Espectrometría de masas (EM) de los *retro*-curcuminoides.

Los *retro*-curcuminoides derivados del ácido cinámico se caracterizaron por espectrometría de masas, los que mostraron un pico base con m/z para **7**, **8** y **9** en [293⁺]. Los *retro*-curcuminoides derivados del ácido ferúlico acetilado mostraron un pico base con m/z para **13** en [411⁺] y para los compuestos **14**, **15** y **16** en [381⁺], los espectros de masas corresponden adecuadamente al ion molecular protonado [M⁺H⁺] de cada uno de los compuestos.

La fragmentación principal de los *retro*-curcuminoides se llevó mediante el rompimiento del enlace del éster, y uno de los picos principales persistente en los espectros es el que corresponde al ion oxonio de la (*E*)-(3-fenilalilidina) con una relación m/z en [131⁺] (Figura 39). El espectro de masas correspondiente al compuesto **9** se encuentra en la Figura 40.

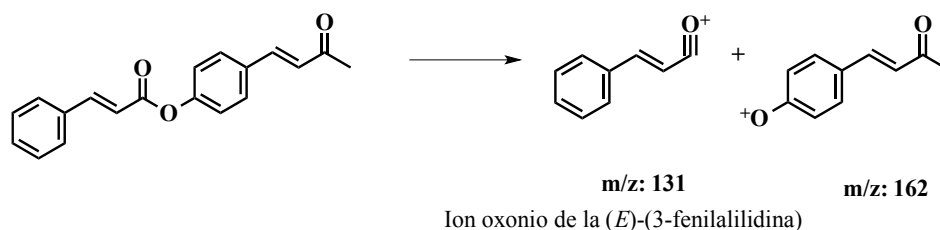


Figura 39. Patrón de fragmentación del retro-curcuminoides **9**.

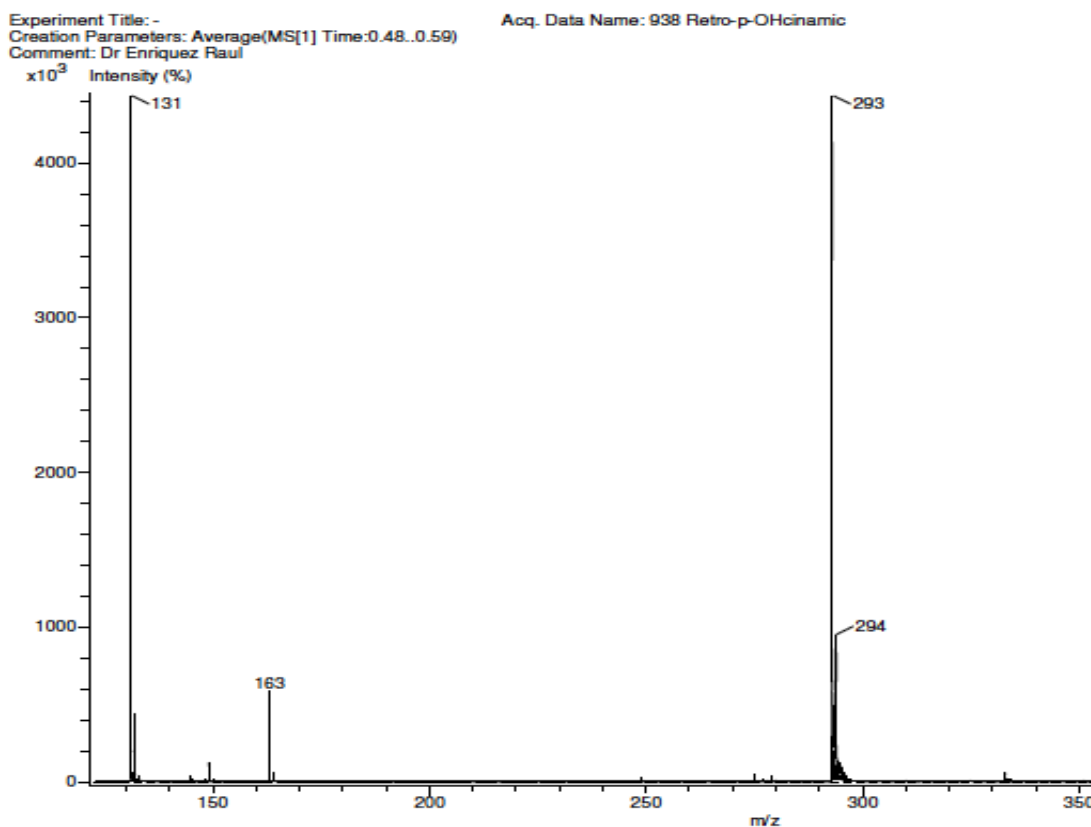
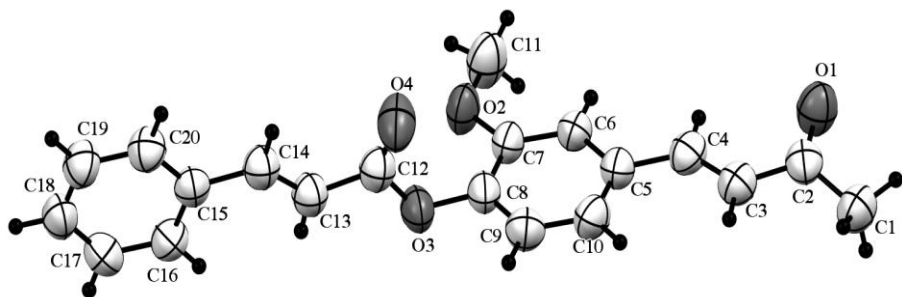


Figura 40. Espectro de Masas del compuesto **9**.

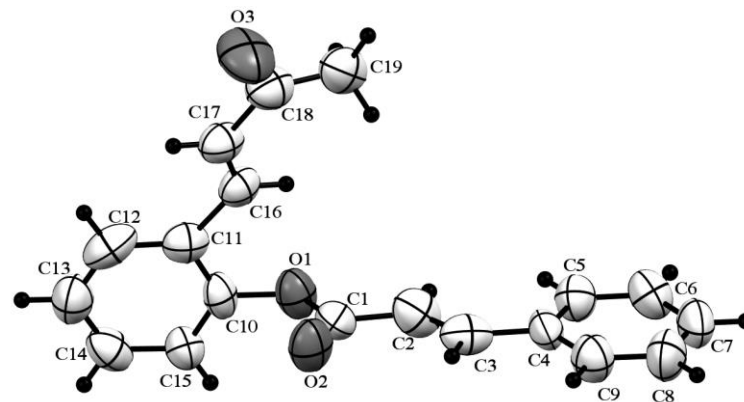
8.4 Rayos-X de los *retro*-curcuminoides.

Las estructuras cristalinas de todos los *retro*-curcuminoides confirman que se encuentran formados por dos anillos aromáticos a través de un enlace tipo éster y la unidad común es un cinamato. Por otro lado, se confirma que los hidrógenos de los sistemas α,β -insaturados se encuentran en posición *trans* para las dos secciones moleculares. Los dobles enlaces y los grupos carbonilos (éster o cetona) son coplanares y están de acuerdo con estructuras reportadas anteriormente [82].

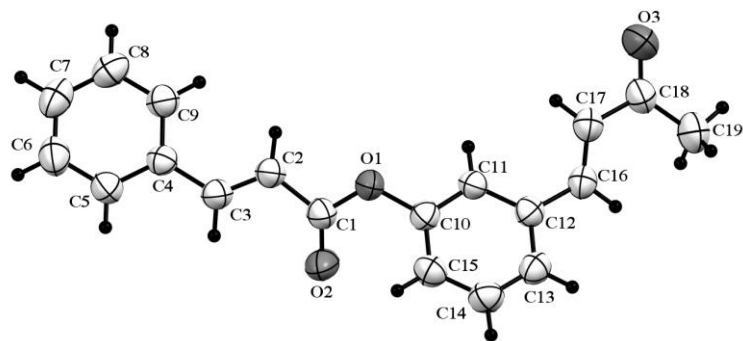
Las estructuras cristalinas se encuentran estabilizadas por interacciones de van der Waals y por enlaces intermoleculares de hidrógeno tipo C-H...O, las moléculas adyacentes están interconectadas por interacciones débiles tipo C-H... π que contribuyen a la estabilización de la celda cristalina [83]. Las estructuras cristalinas de los *retro*-curcuminoides derivados del ácido cinámico se encuentran en la Figura 41 y las del ácido ferúlico acetilado en la Figura 42.



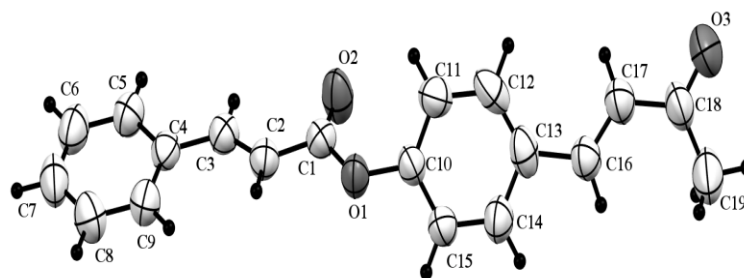
Compuesto 6



Compuesto 7

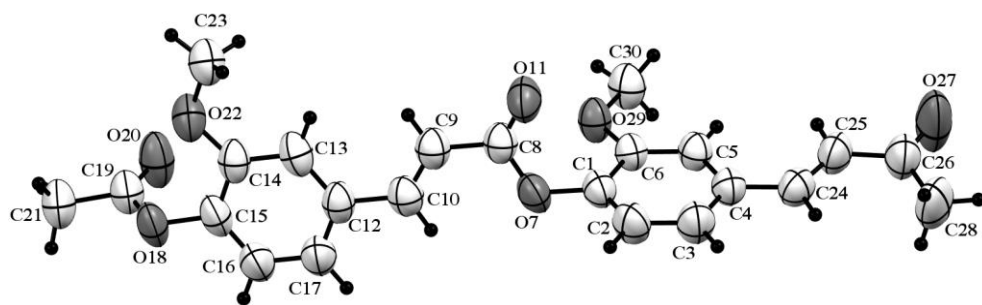


Compuesto 8

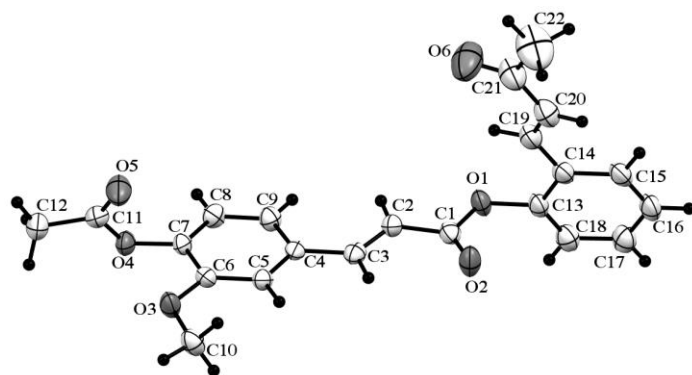


Compuesto 9

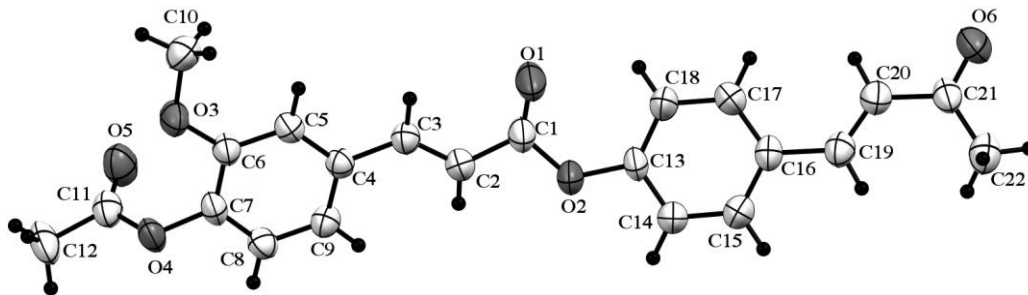
Figura 41. *Retro*-curcuminoïdes derivados del ácido cinámico y análogos de la DHZ.



Compuesto 13



Compuesto 14



Compuesto 16

Figura 42. *Retro*-curcuminoïdes derivados del ácido ferúlico acetilado.

8.5 Características espectroscópicas (RMN ^1H) de los *retro*-curcuminoideos del éster metílico del ácido ferúlico.

Los *retro*-curcuminoideos derivados del éster metílico del ácido ferúlico, presentan cuatro dobletes característicos para los alquenos correspondientes a las posiciones alfa, beta (α,β) de los carboxilos con constantes de acoplamiento aproximadas de 16 Hz (geometría *trans*). El singlete en 2.32 ppm corresponde al acetilo del segundo anillo aromático y el de 3.81 ppm al metilo del éster. Adicionalmente, hay dos señales en 3.87 ppm asignadas para los metoxilos de los anillos aromáticos y los múltiples entre 7.0-7.2 ppm integran adecuadamente para los dos fenilos sustituidos. El espectro del compuesto **19** que se presenta en la Figura 43.

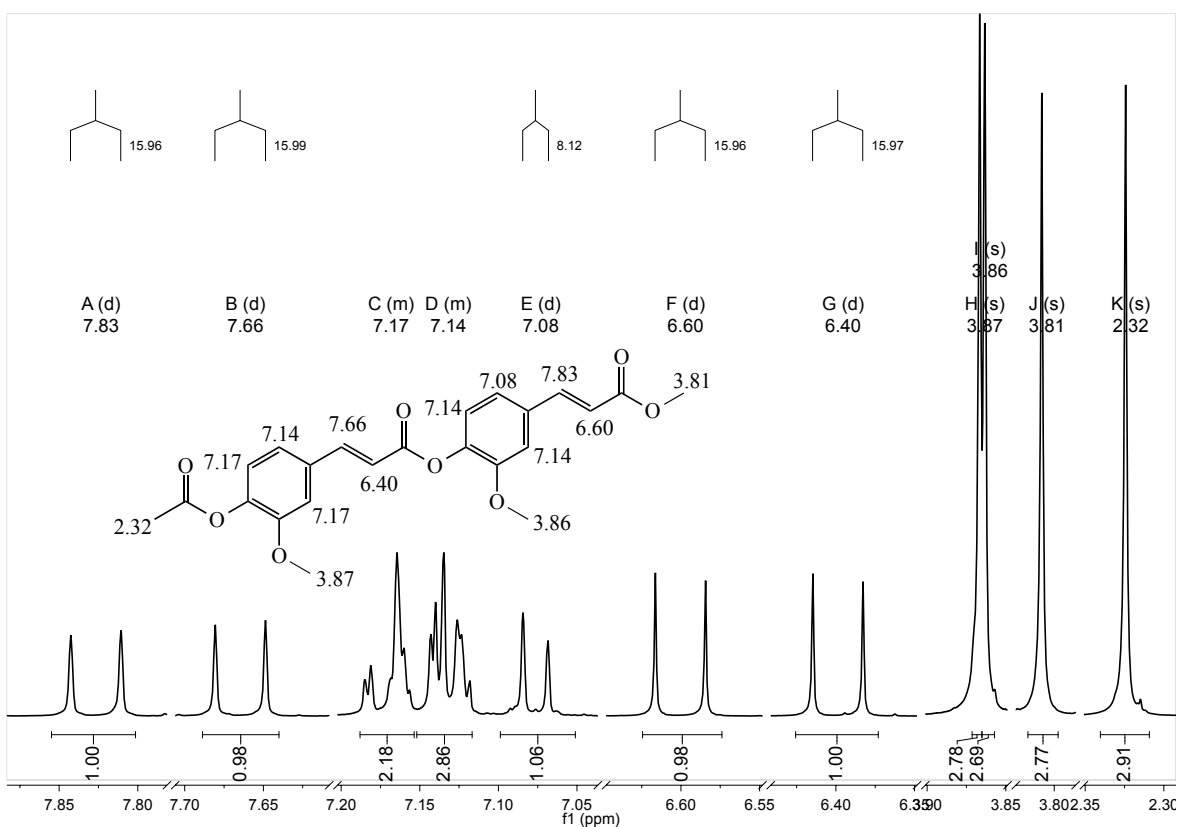


Figura 43. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **19** (500 MHz, CDCl_3).

8.6 Análisis de IR de los *retro*-curcuminoides derivados del éster metílico del ácido ferúlico.

Los *retro*-curcuminoides **18** y **19** se encuentran constituidos principalmente por el grupo funcional éster y sus espectros de IR presentan dos bandas de absorción intensas *i.e.* **18** (en 1692 cm^{-1} y 1733 cm^{-1}), y **19** (en 1716 cm^{-1} y 1719 cm^{-1}) originadas por los estiramientos fuertes del grupo carbonilo. Adicionalmente se observan dos bandas intensas para **18** (en 1118 cm^{-1} y 1244 cm^{-1} , para **19** (en 1119 cm^{-1} y 1258 cm^{-1}) originadas por los estiramientos simétricos y asimétricos del éster. Las bandas de absorción de baja intensidad corresponden a los anillos aromáticos: **18** (en 3007 cm^{-1}) y **19** (en 3008 cm^{-1}). En el espectro de infrarrojo del compuesto **19** (Figura 44) se observan claramente estas señales características.

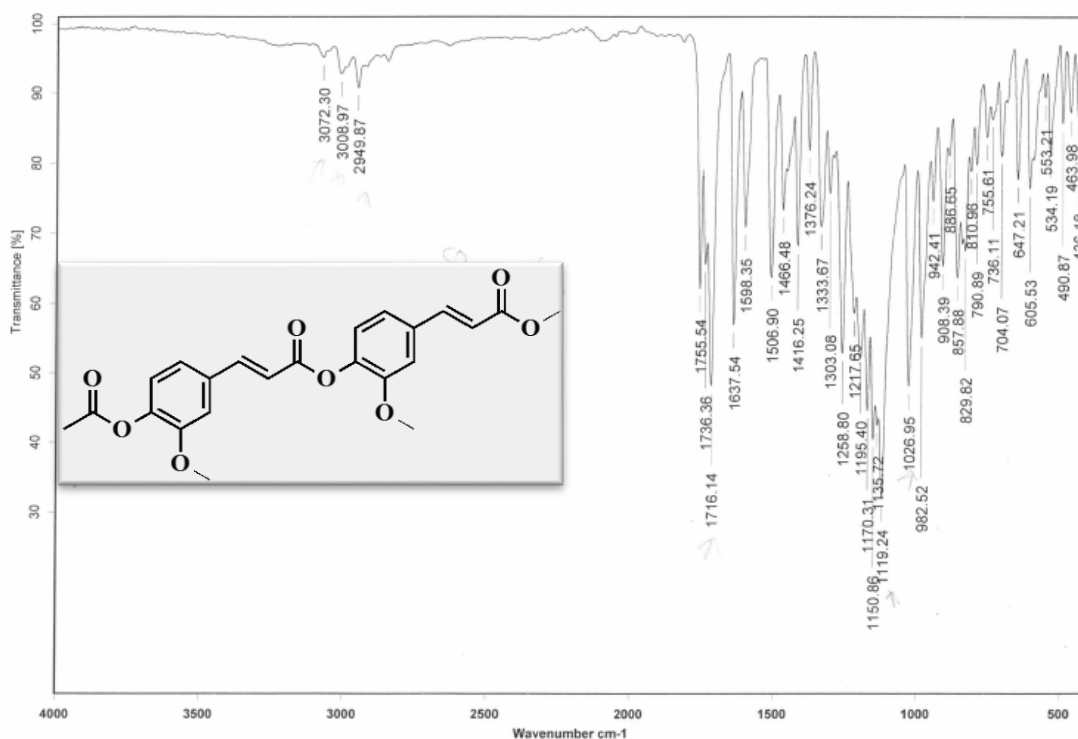


Figura 44. Espectro de IR del compuesto **19**.

8.7 Espectrometría de masas (EM) de los *retro*-curcuminoides derivados del éster metílico del ácido ferúlico.

Los *retro*-curcuminoides derivados del éster metílico del ácido ferúlico mostraron un pico base con relación m/z [339⁺] para **18** y en [427⁺] para **19**, lo que corresponde adecuadamente al ion molecular protonado [M⁺H⁺] de cada uno de ellos.

La fragmentación principal de los compuestos ocurre mediante el rompimiento del enlace del éster, y uno de los picos característicos para estos compuestos es el que corresponde al ion oxonio del (*E*)-(3-(4-acetoxi-3-metoxifenil) alilidina) con una relación m/z de [219⁺]. Posteriormente, al perderse el acetilo del anillo aromático se forma un segundo ion oxonio con relación m/z en [177⁺]. El patrón de fragmentación de estos compuestos se muestra en la Figura 45 y su espectro en la Figura 46.

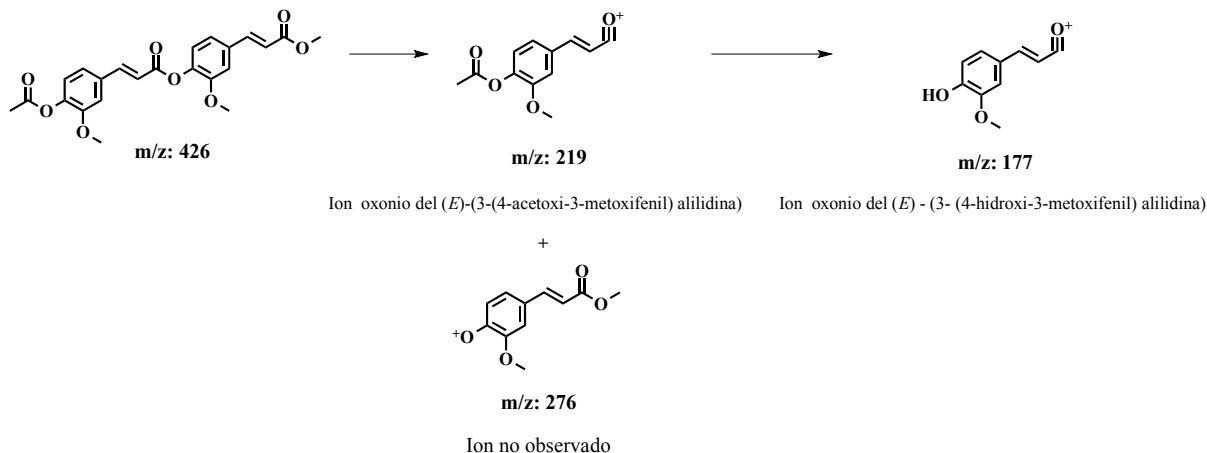


Figura 45. Patrón de fragmentación del *retro*-curcuminoide **19** (derivado del éster metílico del ácido ferúlico).

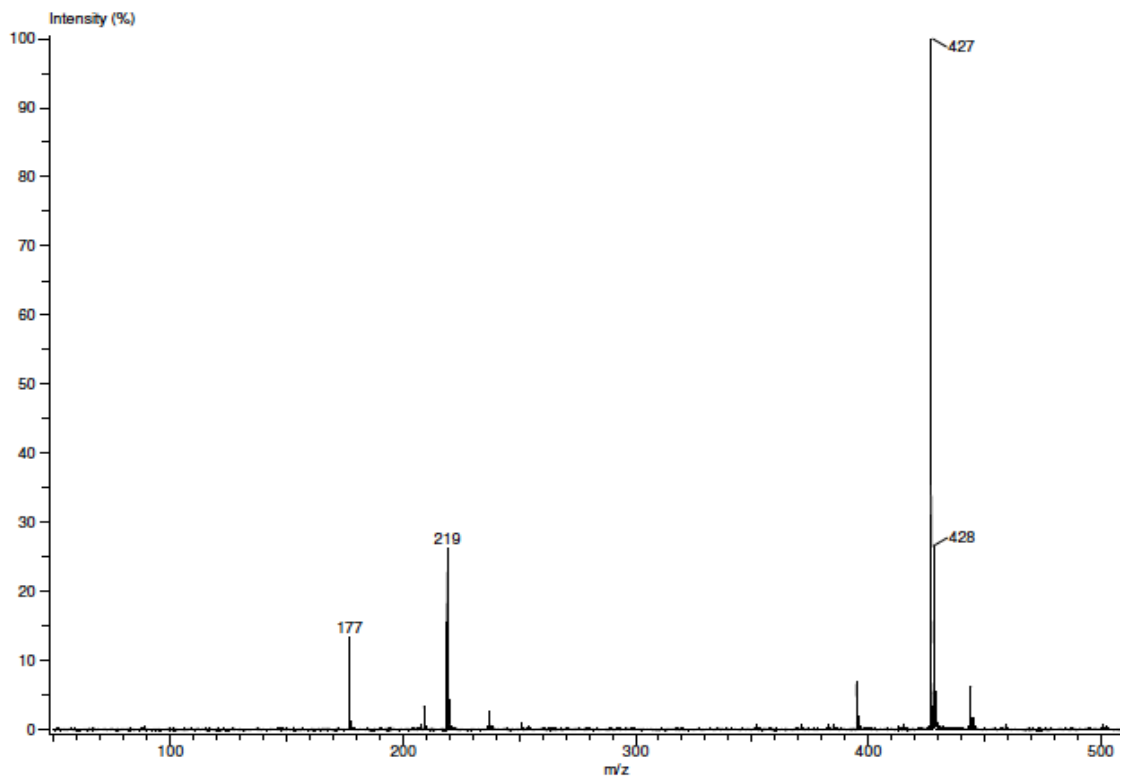
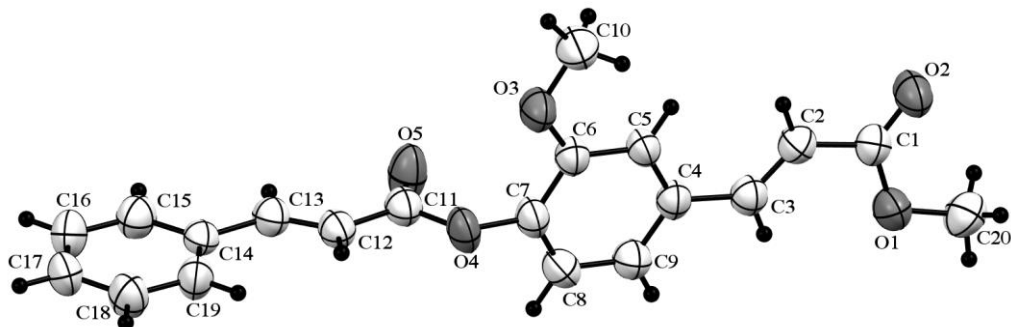


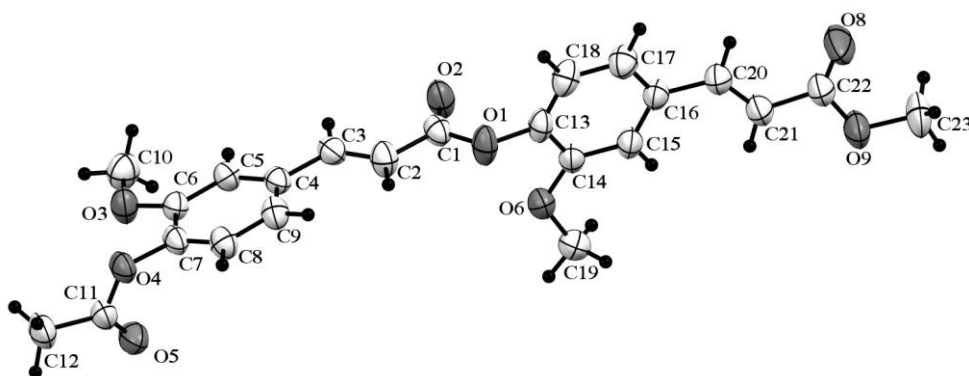
Figura 46. Espectro de Masas del compuesto **19**.

8.8 Rayos-X de los *retro*-curcuminoides derivados del éster metílico del ácido ferúlico.

Las estructuras cristalinas de los *retro*-curcuminoides **18** y **19** confirman que se encuentran unidos a través de un enlace tipo éster en las posiciones *para*, y poseen como unidad común el éster metílico del ácido ferúlico. Las estructuras cristalinas confirman que los protones de los sistemas α,β -insaturados se encuentran en posición *trans* y los dobles enlaces son coplanares con los grupos carbonilos de los ésteres como se muestra en la Figura 47.



Compuesto 18



Compuesto 19

Figura 47. *Retro*-curcuminoides derivados del éster metílico del ácido ferúlico.

8.9 Características espectroscópicas (RMN ^1H) de *retro*-curcuminoides hidrogenados (zingerona y análogos).

En los *retro*-curcuminoides hidrogenados se observan dos grupos de señales características; el primer grupo se conforma por dos múltiples (sistema AB y triples de dobles (td)) causados por los dos metilenos en las posiciones (α,β) al carbonilo de la cetona. El segundo grupo comprende dos señales dobles correspondientes al sistema α,β -insaturado del éster, con constantes de acoplamiento de aproximadamente 16 Hz (*trans*).

Los espectros los *retro*-curcuminoides hidrogenados contienen un singulete que corresponde a la señal del metilo de la posición α a la cetona, además en la región de los protones aromáticos se observan dos multipletes correspondientes al fenilo del cinamato que integra para cinco hidrógenos (2 y 3) bien diferenciados del sistema

aromático del anillo de la zingerona. Los ejemplos de este grupo de señales se presentan en los espectros de RMN-¹H las Figuras 48-50 correspondientes a los *retro*-curcuminoides hidrogenados **24** y **27**.

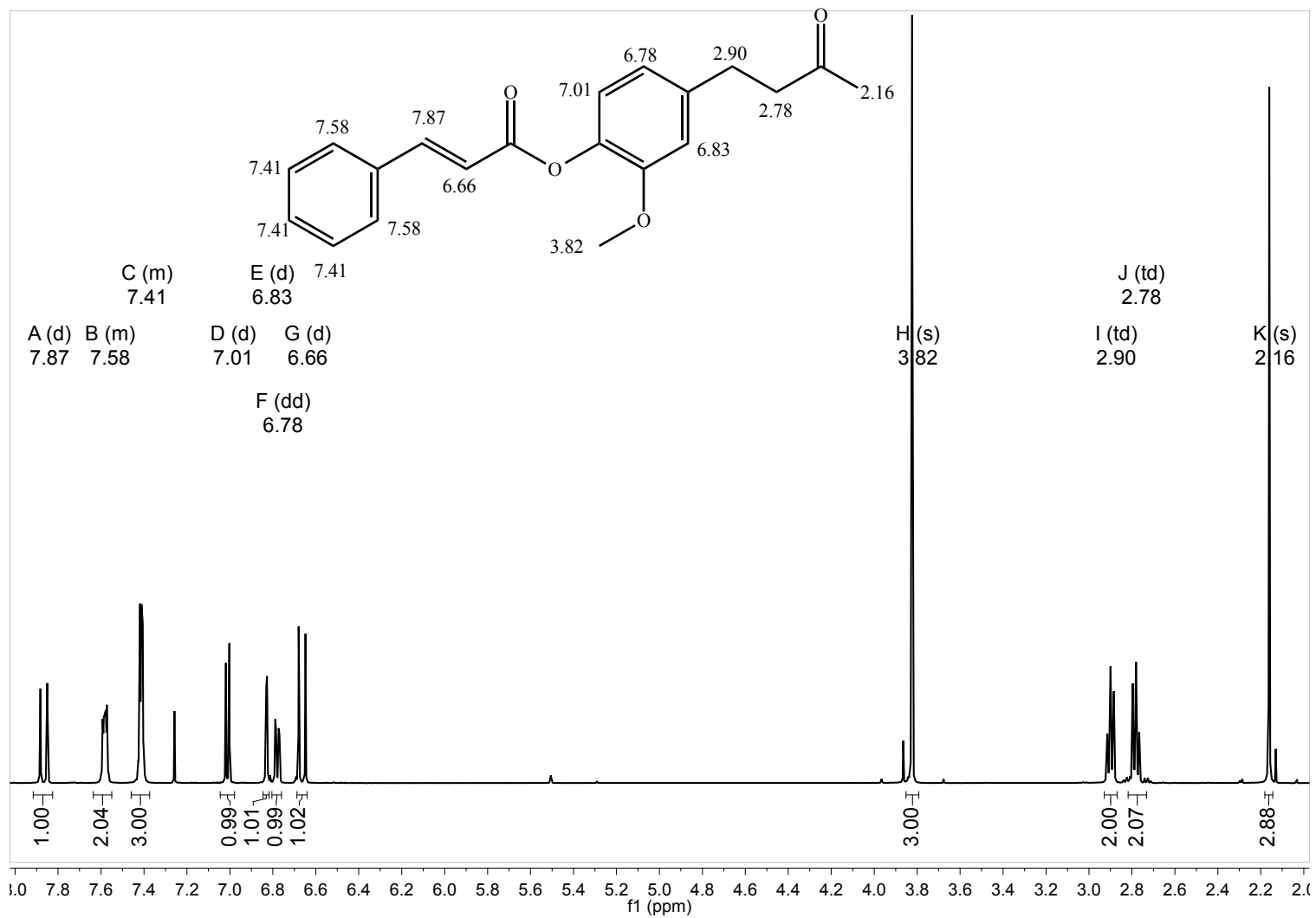


Figura 48. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **24** (500 MHz, CDCl_3).

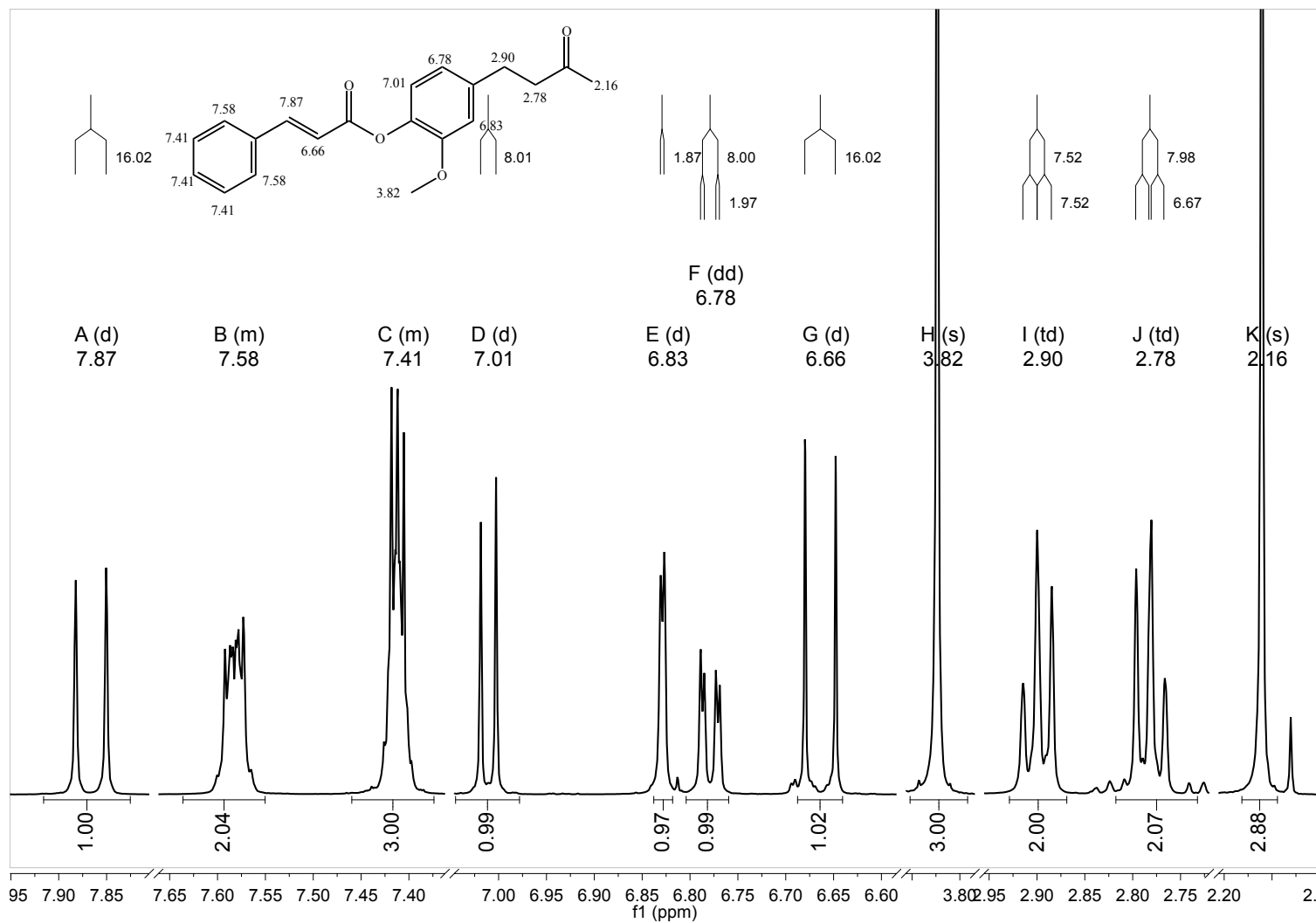


Figura 49. Expansión del espectro de RMN de ^1H del compuesto **24** (500 MHz, CDCl_3).

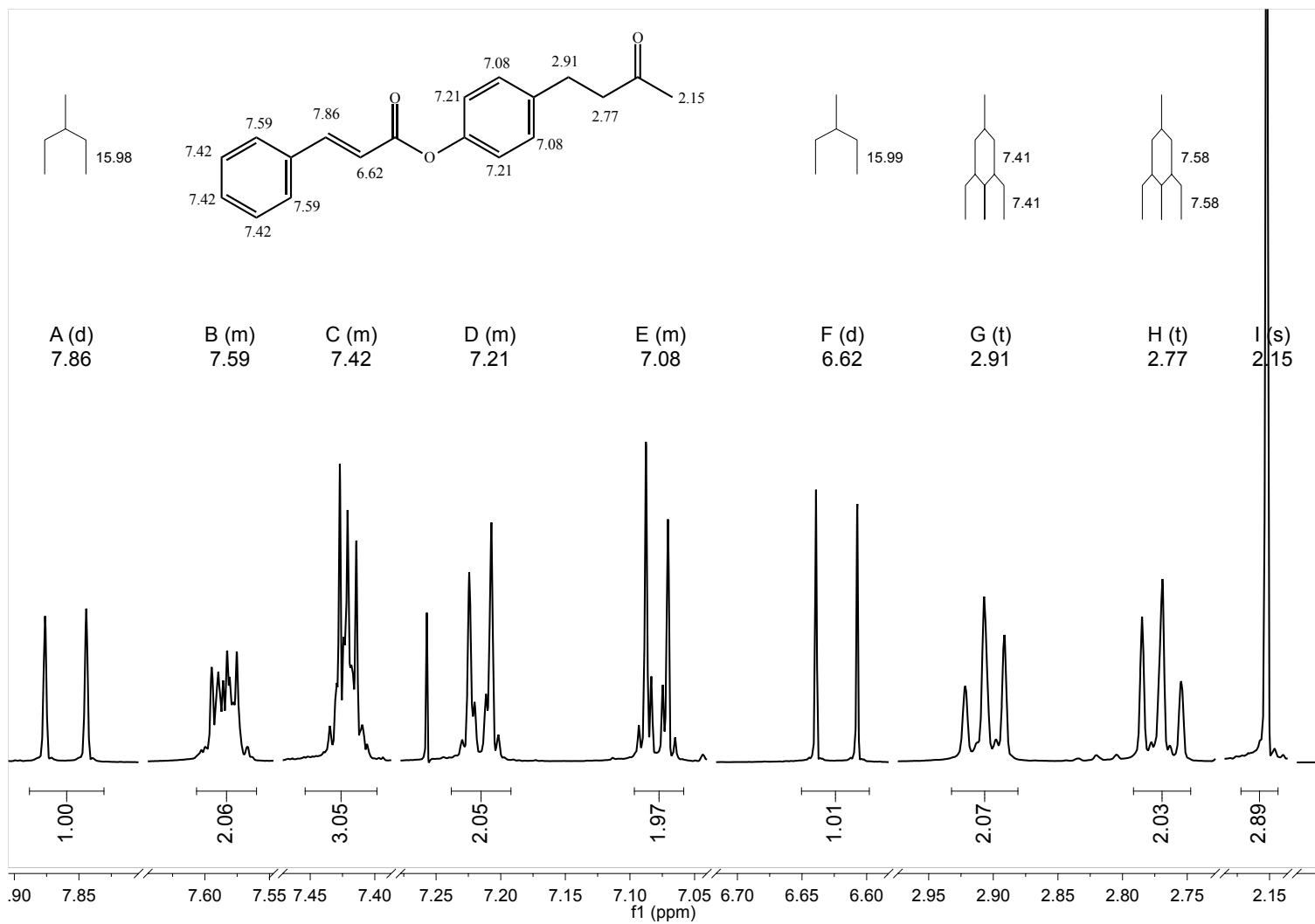


Figura 50. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **27** (500 MHz, CDCl_3).

8.10 Análisis de IR de los *retro*-curcuminoides derivados de zingerona y análogos.

Los *retro*-curcuminoides de la zingerona y compuestos análogos obtenidos con el cloruro del ácido cinámico (compuestos **24-27**) mostraron bandas características de absorción para el grupo carbonilo del éster (-COO-), para **24** en 1730 cm^{-1} , **25** en 1712 cm^{-1} , **26** en 1714 cm^{-1} y **27** en 1708 cm^{-1} y son originadas por los estiramientos fuertes del grupo carbonilo, adicionalmente se observan dos bandas intensas de absorción para **24** en 1140 cm^{-1} y 1198 cm^{-1} , **25** en 1099 cm^{-1} y 1133 cm^{-1} , **26** en 1137 cm^{-1} y 1255 cm^{-1} y **27** en 1136 cm^{-1} y 1198 cm^{-1} debido a los estiramientos simétricos y asimétricos del éster.

Los *retro*-curcuminoides de la zingerona y compuestos análogos tienen bandas características de absorción intensas para el grupo carbonilo de la cetona (C=O), para **24** (en 1631 cm^{-1}), **25** (en 1632 cm^{-1}), **26** (en 1633 cm^{-1}) y **27** (en 1632 cm^{-1}) originadas por los estiramientos fuertes del grupo carbonilo, adicionalmente se presenta una banda intensa para **24** (en 1302 cm^{-1}), **25** (en 1308 cm^{-1}), **26** (en 1308 cm^{-1}) y **27** (en 1312 cm^{-1}) debido a la torsión de la cetona.

Esta familia de compuestos muestra bandas características de absorción de baja intensidad correspondientes a los anillos aromáticos para los compuestos **24** (en 3009 cm^{-1}), **25** (en 3030 cm^{-1}), **26** (en 3064 cm^{-1}) y **27** (en 3066 cm^{-1}) y son originadas por los estiramientos C-H. En el espectro de infrarrojo del compuesto **27** se observan las señales características (Figura 51).

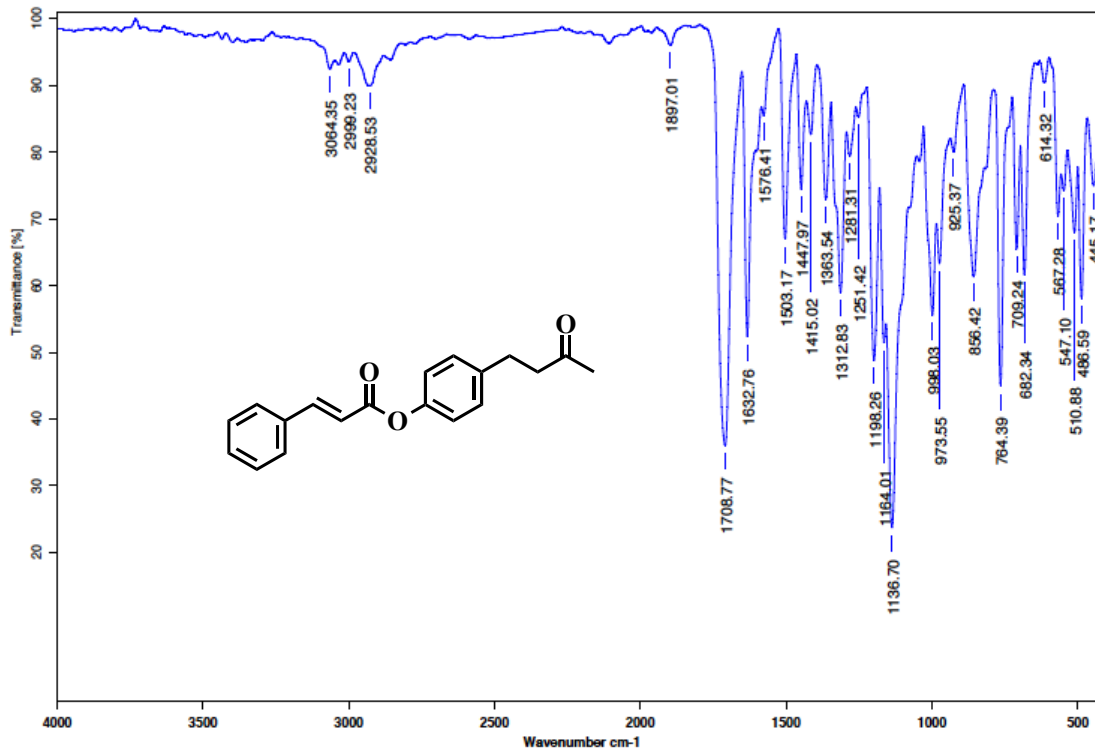


Figura 51. Espectro de IR del compuesto 27.

8.11 Espectrometría de masas (EM) de los *retro*-curcuminoides derivados de la zingerona y análogos.

Los *retro*-curcuminoides de zingerona así como sus análogos muestran un pico característico con relación m/z para el compuesto **24** en $[324^+]$ y **25**, **26** y **27** en $[294^+]$. La fragmentación principal de estos compuestos ocurre mediante el rompimiento del enlace del éster por lo que se observa el pico base característico en $[131^+]$ que corresponde al ion oxonio de la (*E*)-(3-fenilalilidina). El patrón de fragmentación de compuesto **27** se muestra en la Figura 52 y su espectro en la Figura 53.

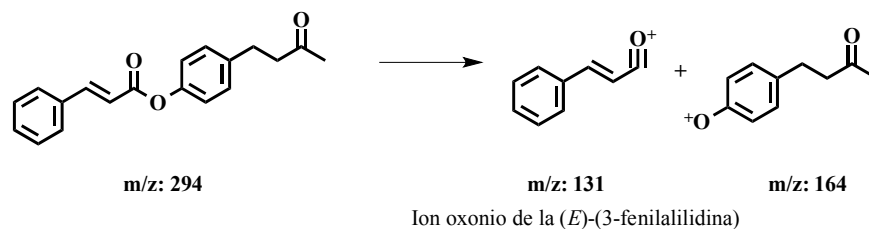


Figura 52. Patrón de fragmentación del compuesto 27.

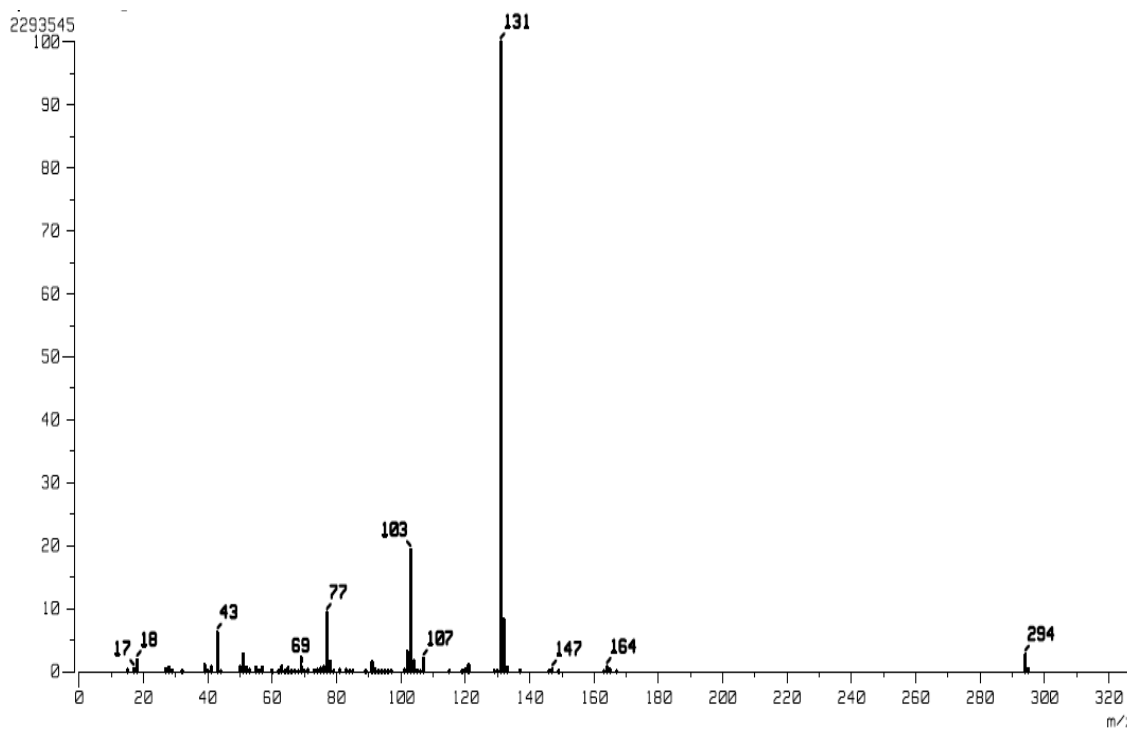


Figura 53. Espectro de Masas del compuesto **27**.

8.12 Características espectroscópicas (RMN ^1H) de los derivados del ácido ferúlico.

Todos los derivados del ácido ferúlico producen dos señales dobles correspondientes al alquenos del sistema α,β -insaturado (éster o ácido carboxílico) con una constante de acoplamiento de aproximadamente 16 Hz (*trans*). Se observan tres tipos de dobles en la región aromática que se asignan para el anillo perteneciente al ácido ferúlico y están bien diferenciados de los múltiples originados por otros anillos aromáticos.

Una característica espectral común es la señal correspondiente al fenol presente en los derivados tipo éster (compuestos **17**, **30** y **32**). El protón correspondiente al ácido carboxílico (compuestos **29** y **31**) desaparece por intercambio con el deuterio del disolvente.

Las señales de RMN de los compuestos **29** y **32** producen casi el mismo patrón de multiplicidad en la sección aromática, pero la presencia del fenol (5.90 ppm) en el derivado **32** induce una diferencia significativa de patrones con respecto al compuesto **29** (ácido carboxílico). Los espectros de las Figura 54 y 55 ilustran estas comparaciones.

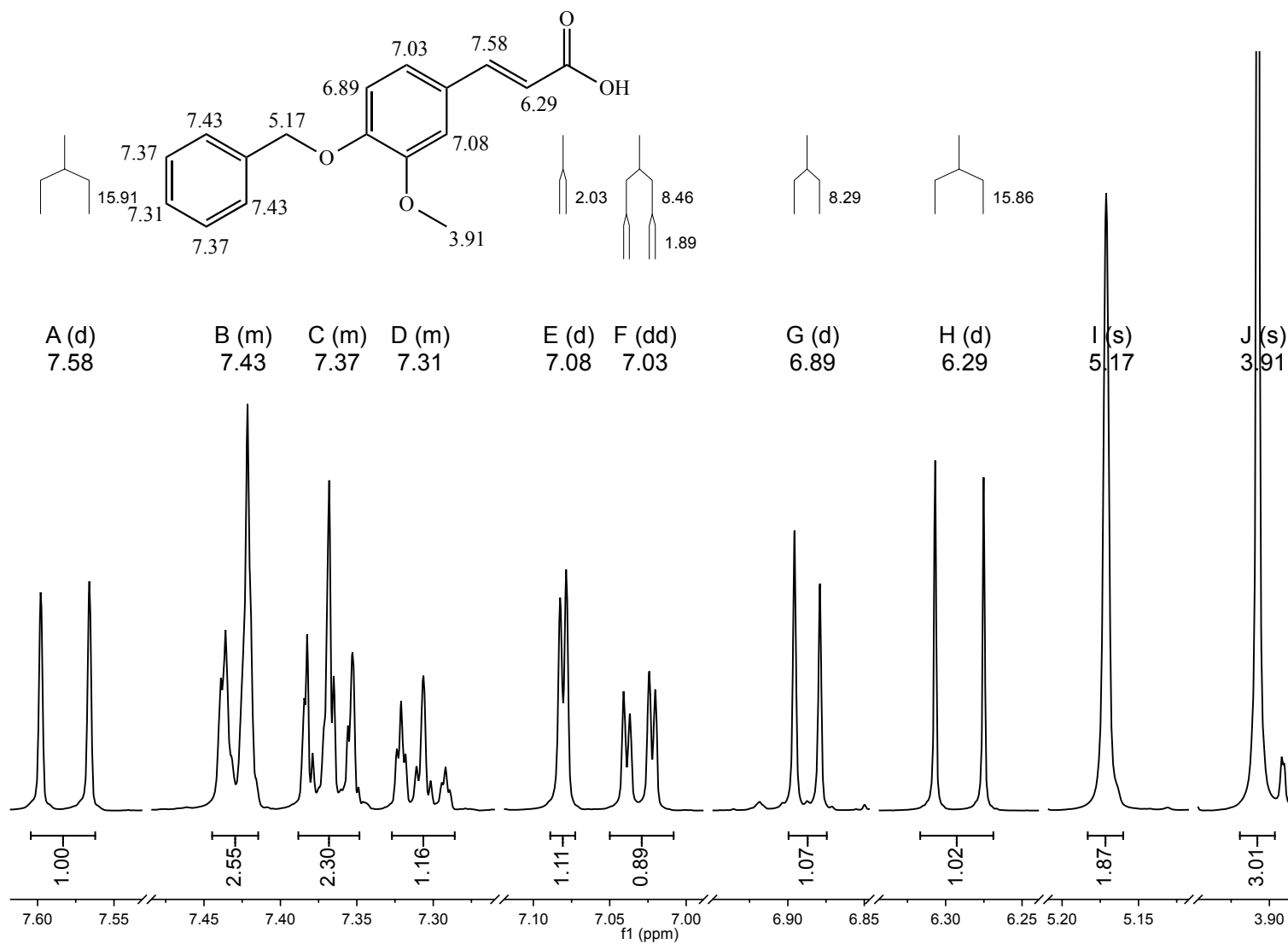


Figura 54. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **29** (500 MHz, CDCl_3).

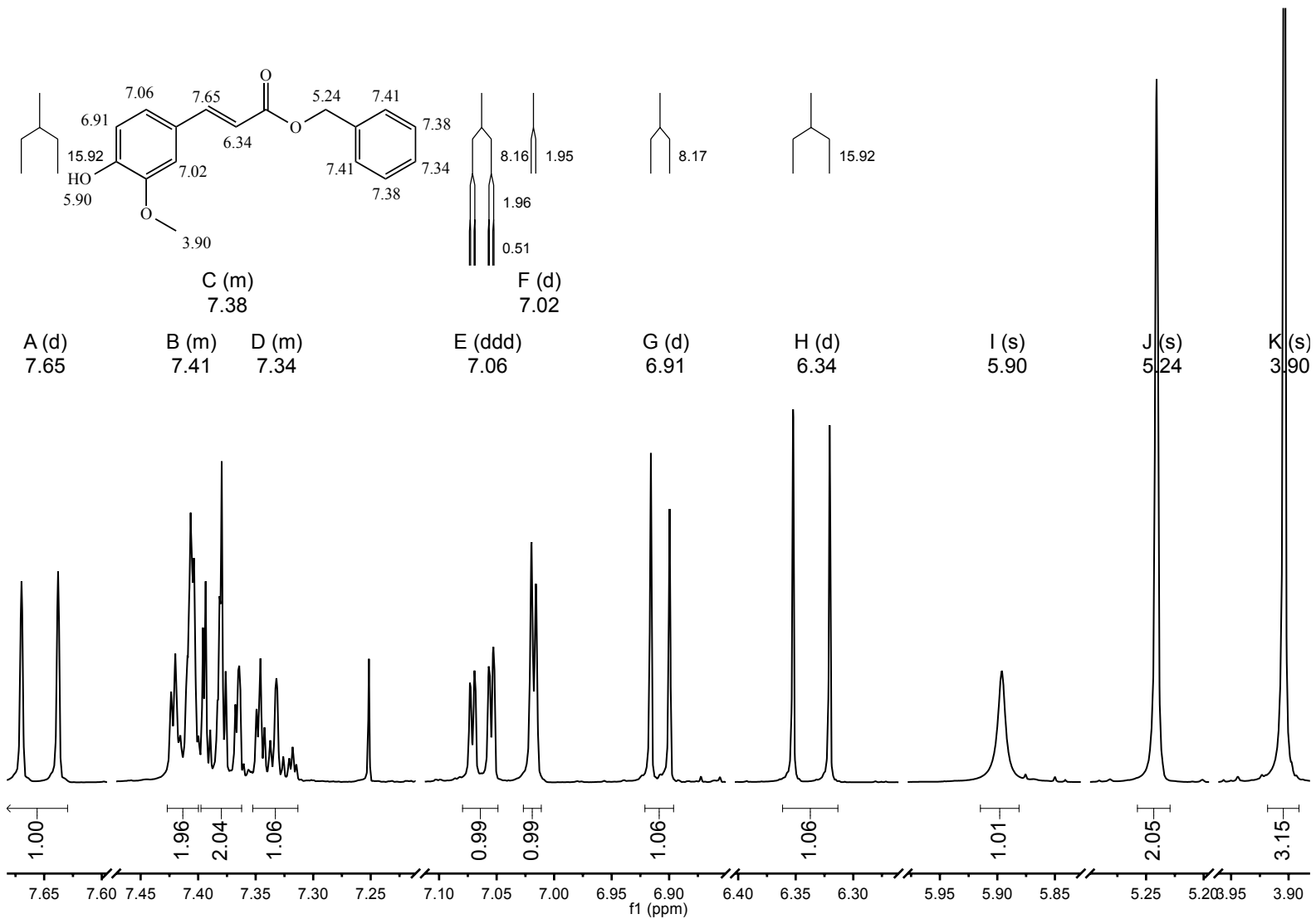


Figura 55. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **32**, nótese la señal de un fenol en 5.90 ppm (500 MHz, CDCl_3).

8.13 Análisis de IR de los derivados del ácido ferúlico.

Los derivados del ácido ferúlico se encuentran constituidos por los grupos funcionales éter y éster, y esta familia de compuestos tiene las señales características de un ácido carboxílico libre o un fenol libre. La diferencia en sus espectros de IR será una señal ancha de 3000 cm^{-1} a 2800 cm^{-1} originada por el puente de hidrógeno de un ácido carboxílico, comparada con respecto a una señal muy ancha de 3500 cm^{-1} a 3400 cm^{-1} que corresponde a un fenol y se originada por los estiramientos del enlace Ph-O-H.

El compuesto **29** (éter bencílico de ácido ferúlico) posee una señal de absorción intensa que corresponde al ácido carboxílico en 1669 cm^{-1} y es originada por el estiramiento del carbonilo, se observan además dos bandas de absorción en 1265 cm^{-1} y 1312 cm^{-1} originadas por la torsión y estiramiento del grupo carbonilo (-COO-). El espectro de IR muestra un ligero ensanchamiento de las señales a partir de 2847 cm^{-1} originado por el estiramiento del enlace O-H del ácido carboxílico. Las bandas de absorción de baja intensidad observadas en 3004 cm^{-1} corresponden a los anillos aromáticos y son originadas por el estiramiento del enlace C-H de los anillos aromáticos. El espectro de infrarrojo del compuesto **29** se muestra en la Figura 56.

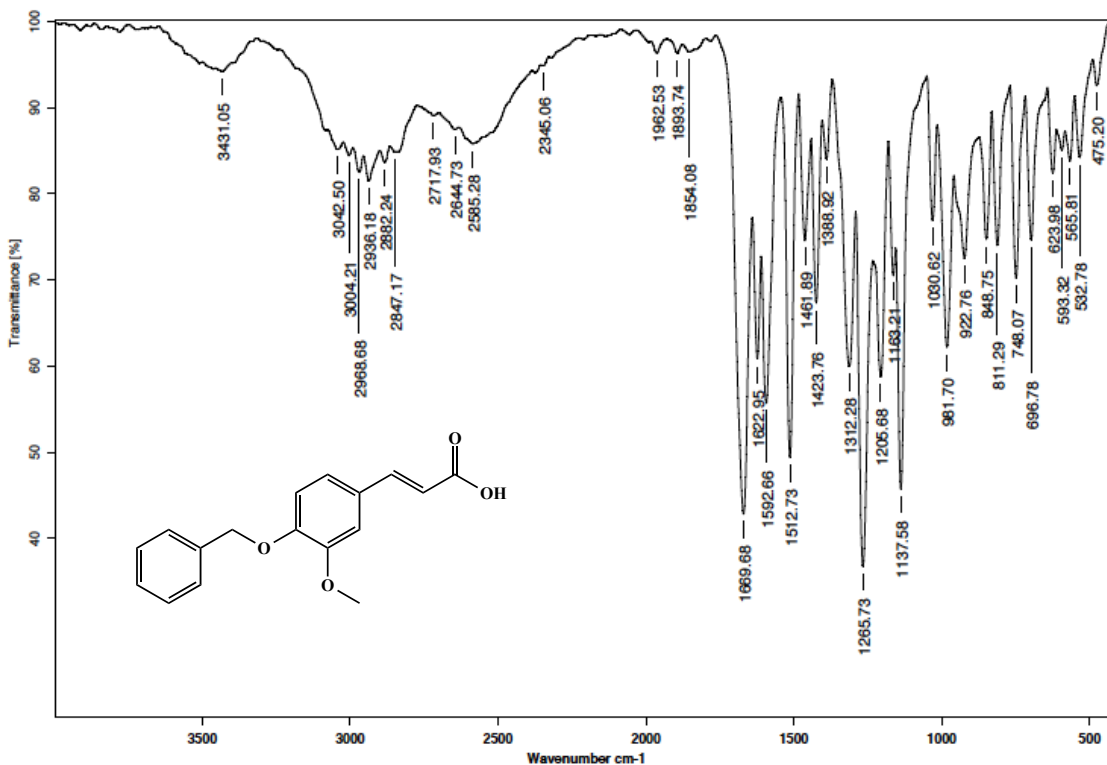


Figura 56. Espectro de IR del compuesto **29**.

El compuesto **32** tiene una banda de absorción intensa en 1703 cm^{-1} originada por los fuertes estiramientos del éster; adicionalmente se observan dos bandas intensas de absorción en 1157 cm^{-1} y 1268 cm^{-1} debido a los estiramientos simétricos y asimétricos del grupo carbonilo. El compuesto **32** cuenta con un fenol libre y presenta una banda muy ancha e intensa en 3404 cm^{-1} , originada por el estiramiento del enlace O-H. Finalmente se observan bandas de absorción de baja intensidad a partir de 3009 cm^{-1} que corresponden a los estiramientos del enlace C-H de los anillos aromáticos. En el espectro de la Figura 57 se muestran las señales características para el compuesto **32**.

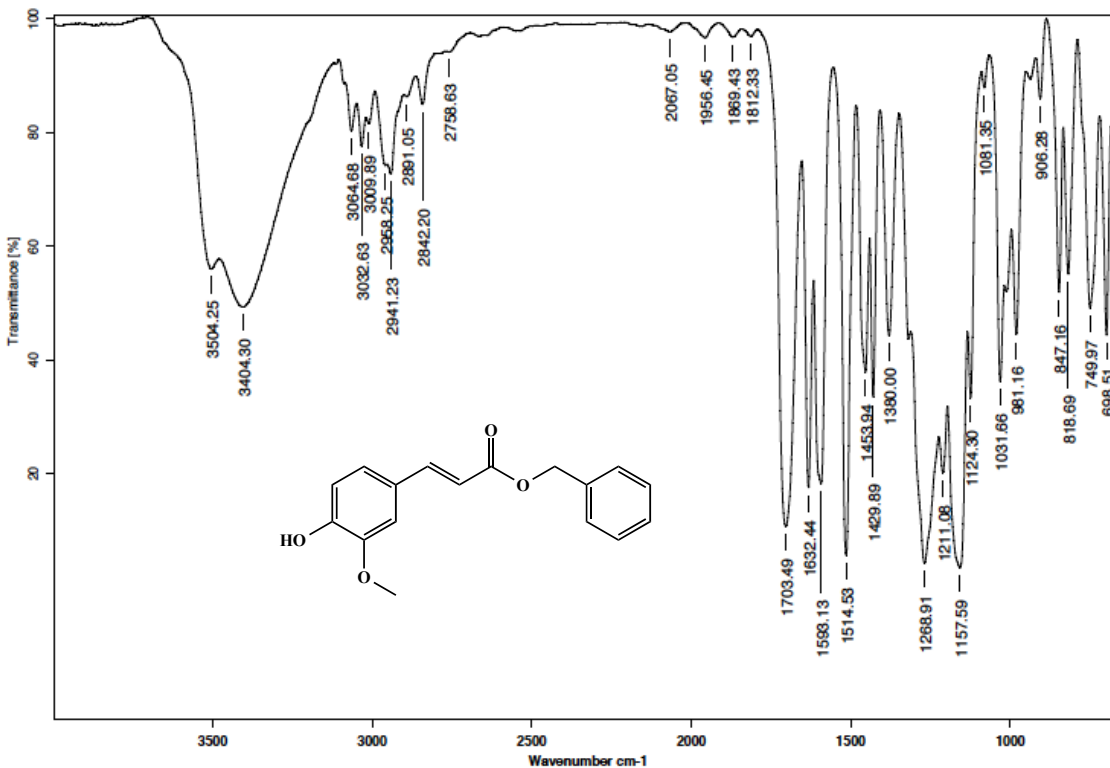


Figura 57. Espectro de IR de compuesto 32.

8.14 Espectrometría de masas (EM) de los derivados del ácido ferúlico.

El espectro de masas de compuesto 30 (Figura 58) que corresponde al éster-MOM del ácido ferúlico muestra un pico con relación $m/z = [239^+]$ correspondiente a su ion molecular. La fragmentación de este compuesto se lleva mediante el rompimiento del enlace del éster, dando un pico base en $m/z = [177^+]$ que corresponde al ion oxonio del (*E*)-(3-(4-Hidroxi-3-metoxifenil) alilidina).

En esta familia de compuestos se identificó que la fragmentación se lleva mediante el rompimiento de los enlaces en las posiciones oxigenadas (Figura 59), ya que el compuesto 31 (m/z en $[238^+]$, Figura 60) presenta un pico base con relación m/z en $[44^+ + 1]$ y un pico característico con relación m/z en $[193^+ + 1]$. Las relaciones de m/z para los compuestos 30 y 31 corresponden adecuadamente a sus iones moleculares protonados $[M^+H^+]$.

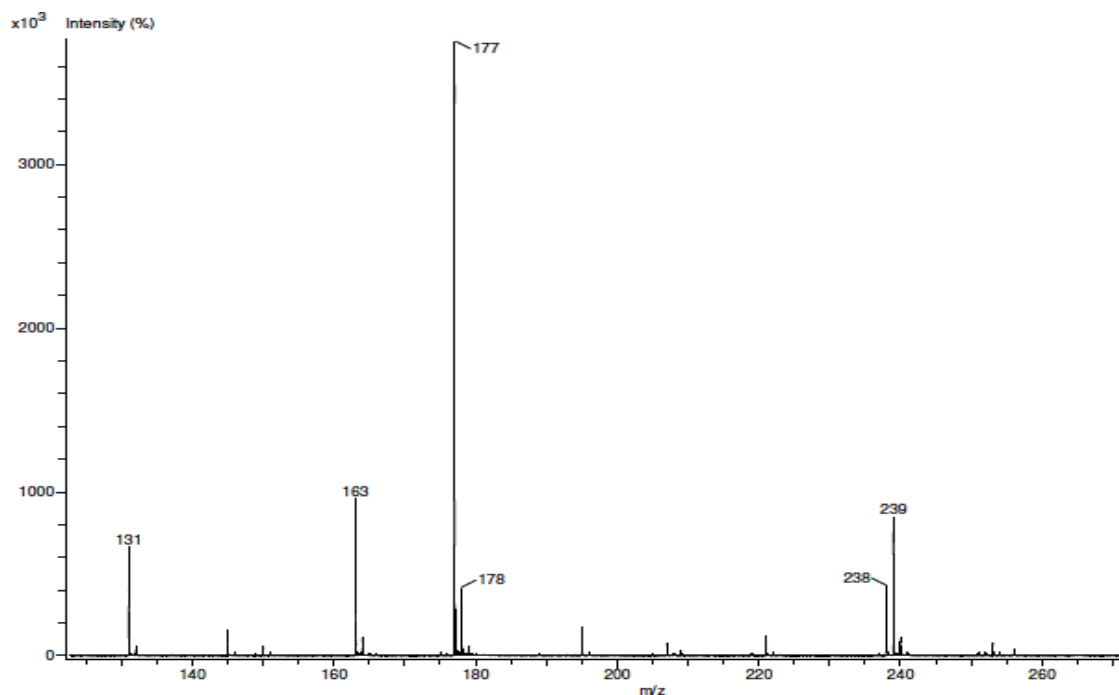


Figura 58. Espectro de Masas del compuesto 30.

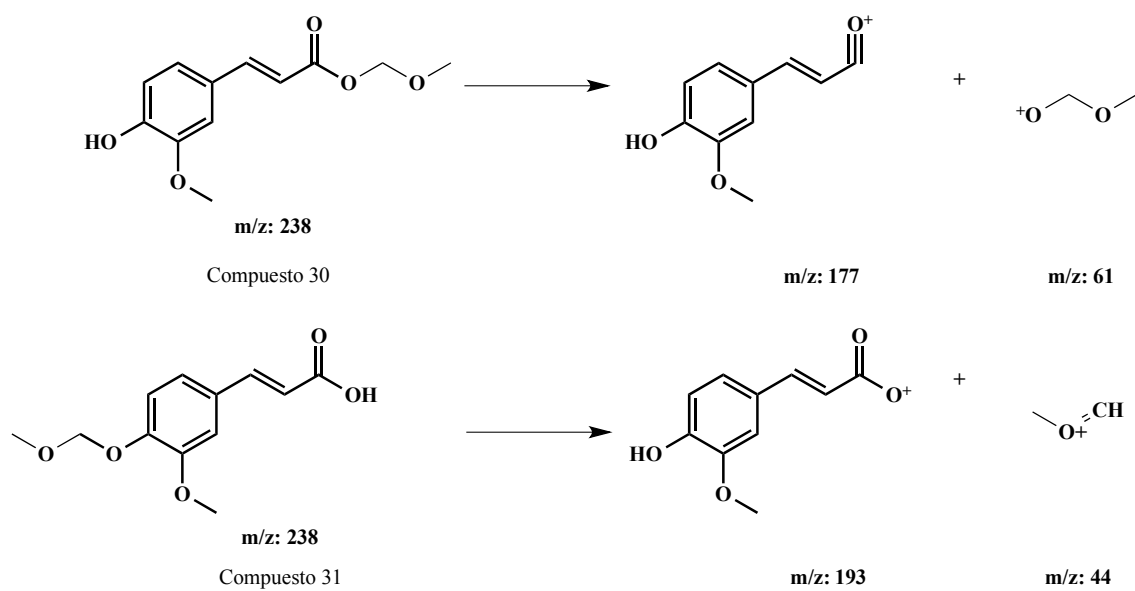


Figura 59. Patrón de fragmentación de derivados MOM del ácido ferúlico.

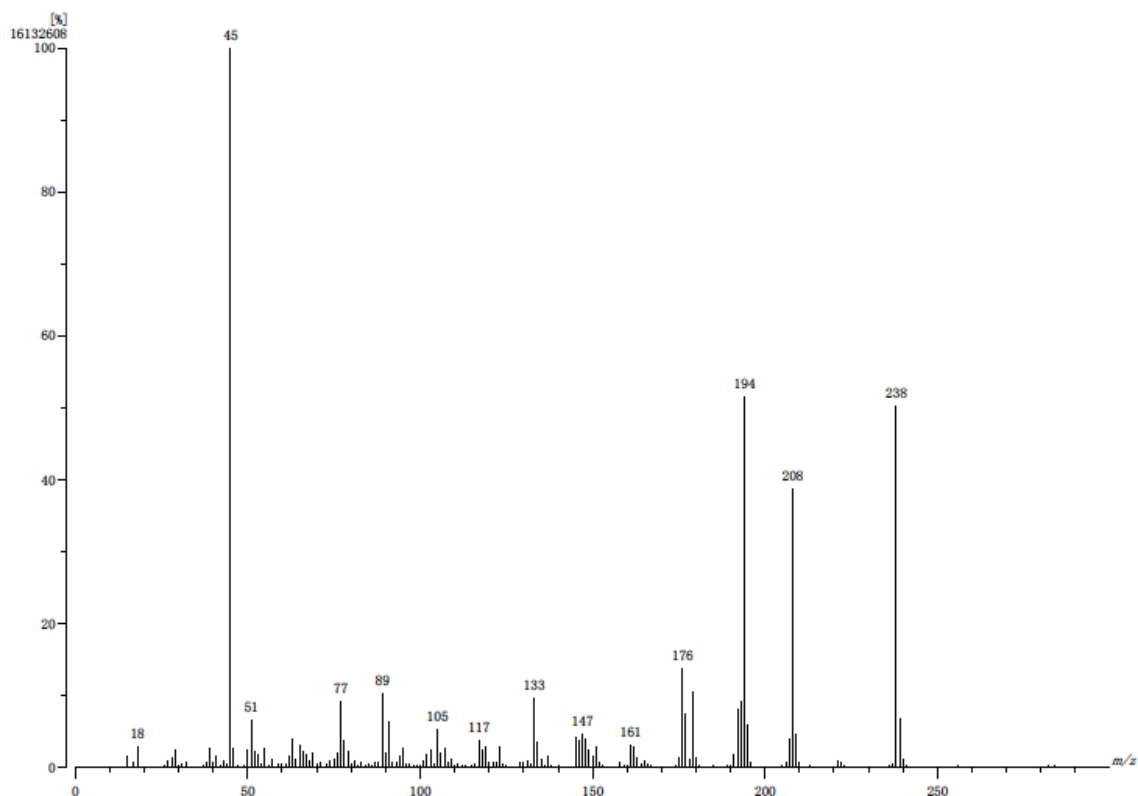
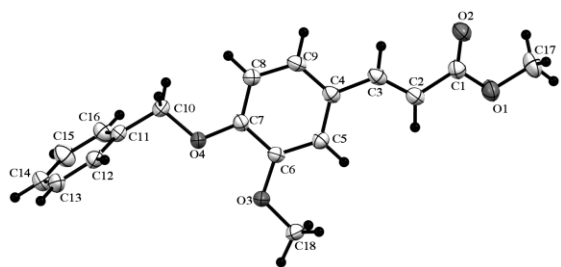


Figura 60. Espectro de Masas del compuesto **31**.

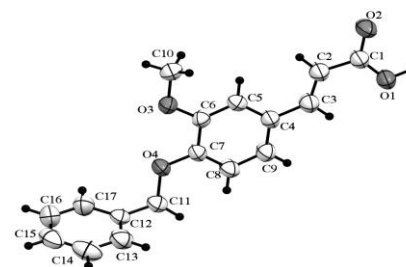
8.15 Rayos-X de los derivados del ácido ferúlico.

Se confirma por difracción de rayos-X que la unidad común en la familia de éteres y ésteres del ácido ferúlico es el ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenoico (ácido ferúlico), donde se observa que los protones del sistema α,β -insaturado posee la geometría *trans* lo cual está en acuerdo con la RMN de hidrógeno.

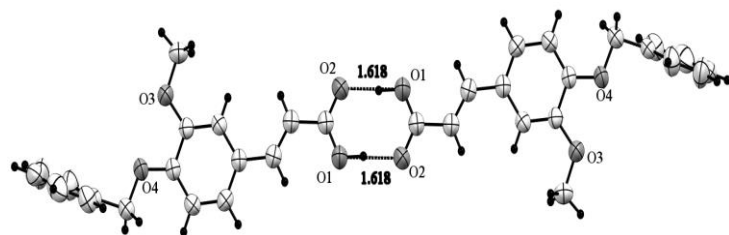
Las moléculas que conservan la función del ácido carboxílico (compuestos **29** y **31**) muestran interacciones intermoleculares tipo O-H \cdots O y se estabilizan en forma de dímeros (Figura 61). Además, hay varias interacciones tipo C-H \cdots O que estabilizan el resto de las moléculas dentro de las celdas cristalinas a distancias normales de los radios de van der Waals.



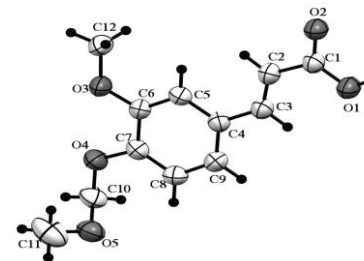
Compuesto 28



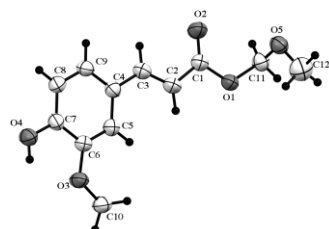
Compuesto 29



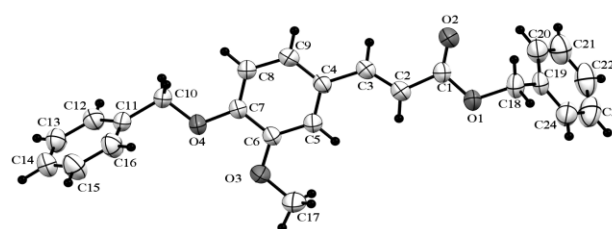
Dímero del compuesto 29



Compuesto 31



Compuesto 30



Compuesto 33

Figura 61. Rayos X de los derivados éteres y ésteres del ácido ferúlico.

8.16 Características espectroscópicas (RMN ^1H) de los bencilidenos.

La familia de bencilidenos posee una particularidad en la RMN de hidrógeno ya que los metilos ($-\text{CH}_3$) en las posiciones α a las cetonas ($\text{C}=\text{O}$) no son equivalentes, observándose como singuletes diferentes y es debido al efecto anisotrópico producido por el anillo aromático presente en la parte central de cada derivado.

El ejemplo de este tipo de señales se puede observar en la Figura 62 y corresponde al bencilideno obtenido a partir del *p*-hidroxibenzaldehído y 2,4-pentanodiona. Para asignar adecuadamente el desplazamiento químico de cada metilo ($-\text{CH}_3$) fue necesario realizar experimentos del efecto nuclear Overhauser de manera diferencial (nOe diferencial), irradiando la señal del protón ubicado en la posición bencílica (Figura 63).

Con el experimento anterior fue posible determinar que el metilo ($-\text{CH}_3$) con menor desplazamiento químico es el que no se encuentra en el plano de desprotección del anillo aromático. Por otro lado, el protón que se desplaza a frecuencias mayores de 7 ppm es el que recibe la desprotección del anillo aromático (protón bencílico) sumada a la desprotección de conjugación del doble enlace (posición β) con el grupo carbonilo.

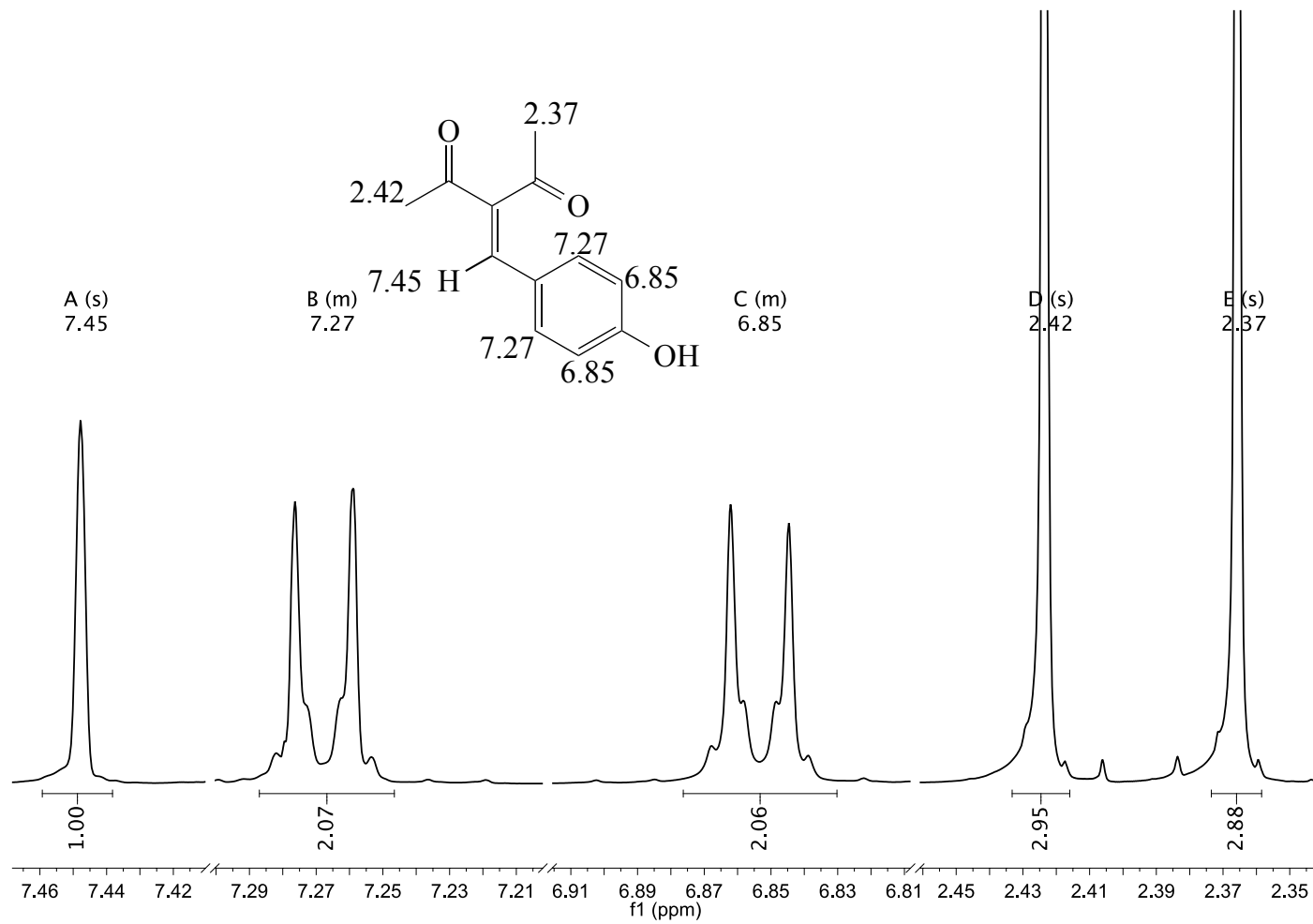


Figura 62. Espectro de RMN de hidrógeno del compuesto **37** (500MHz, CDCl₃).

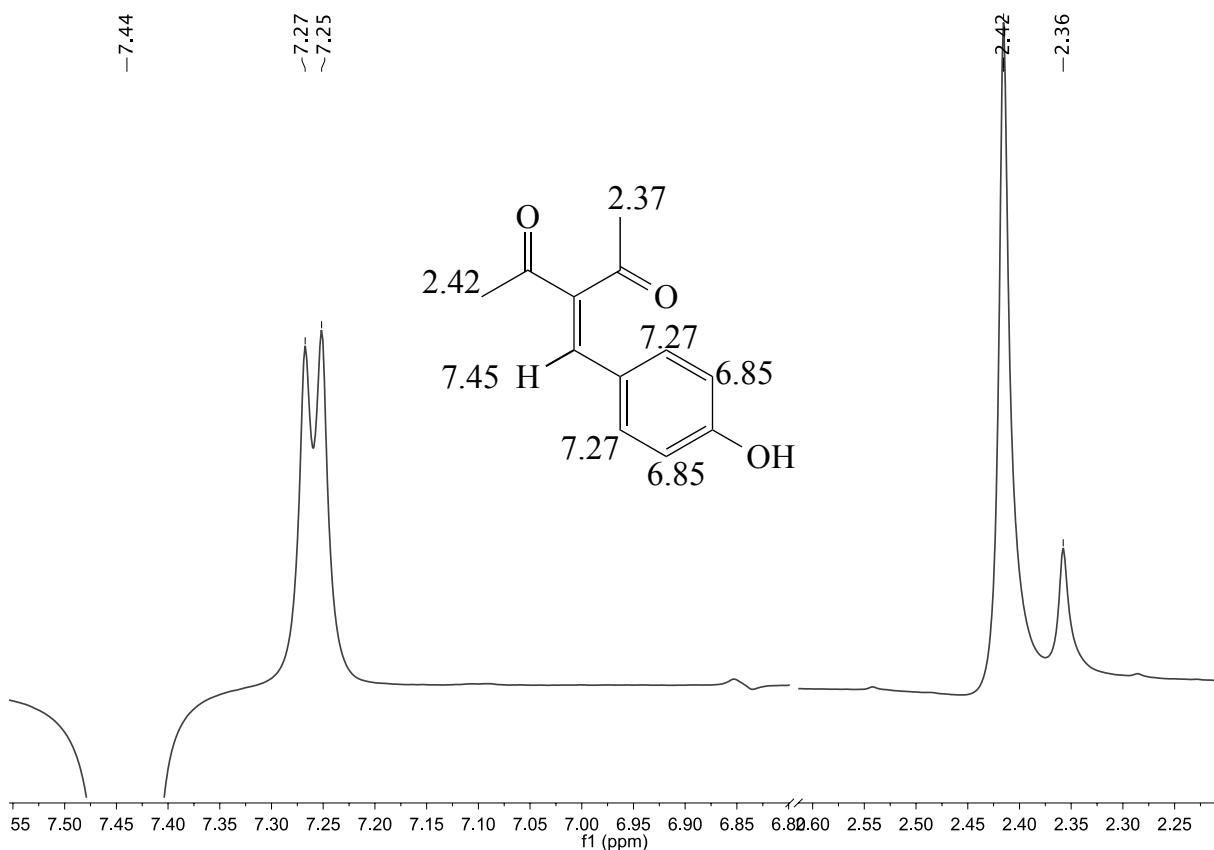


Figura 63. Espectro de nOe diferencial del compuesto **37** irradiando selectivamente la señal de 7.45 ppm (500MHz, CDCl₃).

8.17 Análisis de IR de los bencilidenos.

La familia de bencilidenos presenta dos isómeros geométricos (*E* y *Z*) con respecto a la cetona α,β -insaturada, y se espera obtener en sus espectros de IR en solución (CHCl₃ o CCl₄) cuatro bandas de absorción características [84], para cuatro diferentes carbonilos de cetona etiquetados como A, B, C y D. El ejemplo de la Figura 64 indica los tipos de carbonilos del compuesto **44** (derivado de la 2,4-pentanodiona con el 2-metoxi-1-naftaldehído).

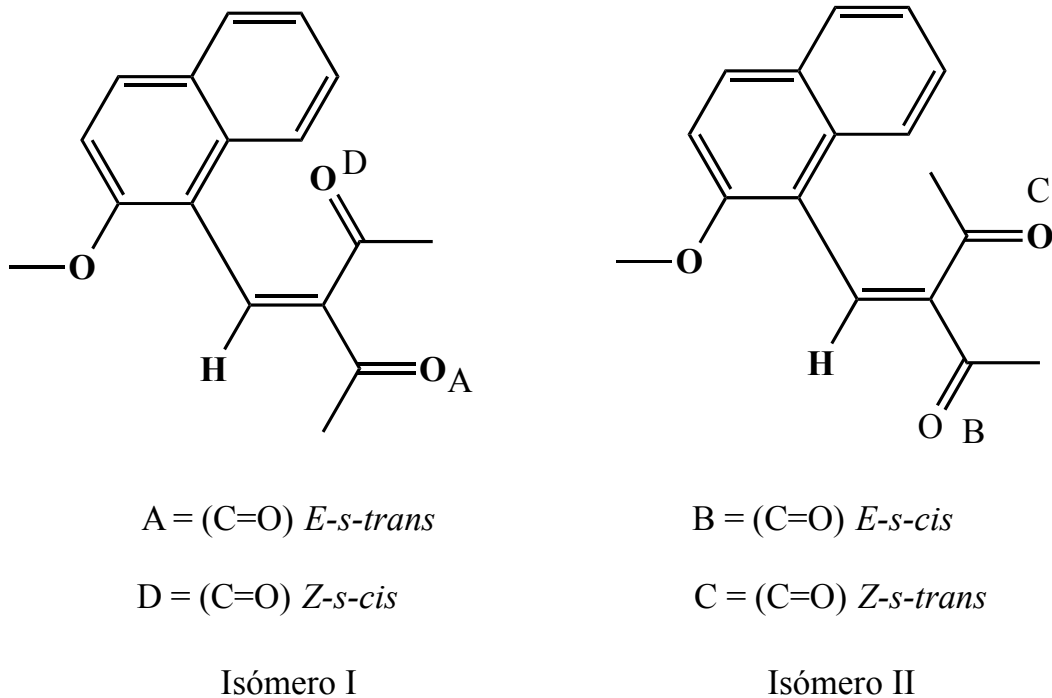


Figura 64. Isómeros geométricos del compuesto **44**.

En el espectro experimental de IR del compuesto **44** solo se encontraron dos bandas de absorción intensas (1646 cm^{-1} y en 1695 cm^{-1}) para los estiramientos del grupo carbonilo de cetona ($C=O$) ya que el espectro se realizó en pastilla y en la muestra se encuentra solo uno de los dos isómeros.

En trabajos anteriores [84] se ha demostrado que las diferencias en los valores de las frecuencias de absorción para los carbonilos etiquetados como A y D (Isómero I) son más altas con respecto a los carbonilos B y C (Isómero II, $\Delta\nu_{C-B} \leq 8 \text{ cm}^{-1}$).

El compuesto **44** muestra una diferencia de frecuencias de absorción $\Delta\nu_{2-1} = 49 \text{ cm}^{-1}$, y corresponde al isómero I. La señal en 1646 cm^{-1} se asigna para el carbonilo A y la de 1695 cm^{-1} para el carbonilo D, la frecuencia del carbonilo D es más alta ya que se rompe la conjugación entre el alqueno y la cetona [84].

En el espectro de IR del compuesto **44** se presenta una banda de absorción intensa en 1252 cm^{-1} originada por la torsión del carbonilo. Las bandas de absorción originadas por los estiramientos del enlace -C=C- en el bencilideno se presentan en 1605 cm^{-1} y los sobretonos en 3005 cm^{-1} corresponden a los estiramientos del enlace C-H del anillo del naftaleno. En la Figura 65 se encuentra el espectro de IR del compuesto **44**.

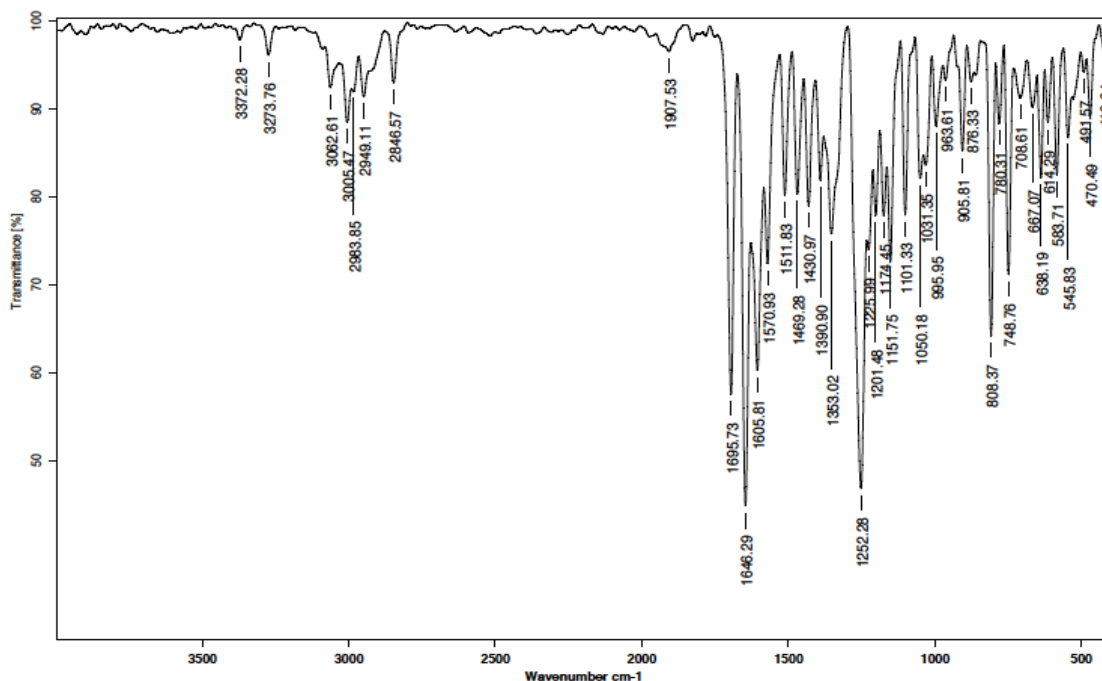


Figura 65. Espectro de IR del compuesto **44**.

8.18 Espectrometría de masas (EM) de los bencilidenos.

El bencilideno **39** (obtenido de 2,4-pentanodiona y vainillina) mostró un pico característico del ion molecular con relación m/z en $[234^+]$ y la fragmentación del enlace C-C en la posición alfa de la cetona origina la formación de un pico base característico con relación m/z en $[43^+]$, correspondiente a los iones oxonio de etilidino y 2-oxoeten-1-ilio (Figura 66). La relación m/z del compuesto **39** corresponde adecuadamente al ion molecular protonado $[M^+H^+]$ y su espectro se muestra en la Figura 67.

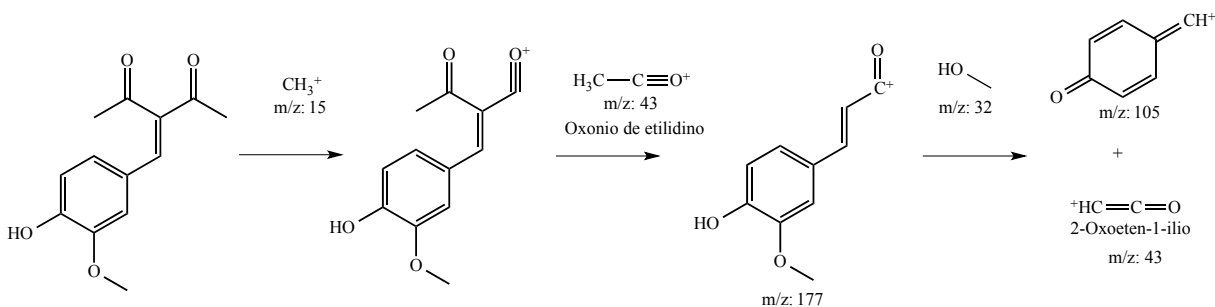


Figura 66. Patrón de fragmentación del compuesto 39.

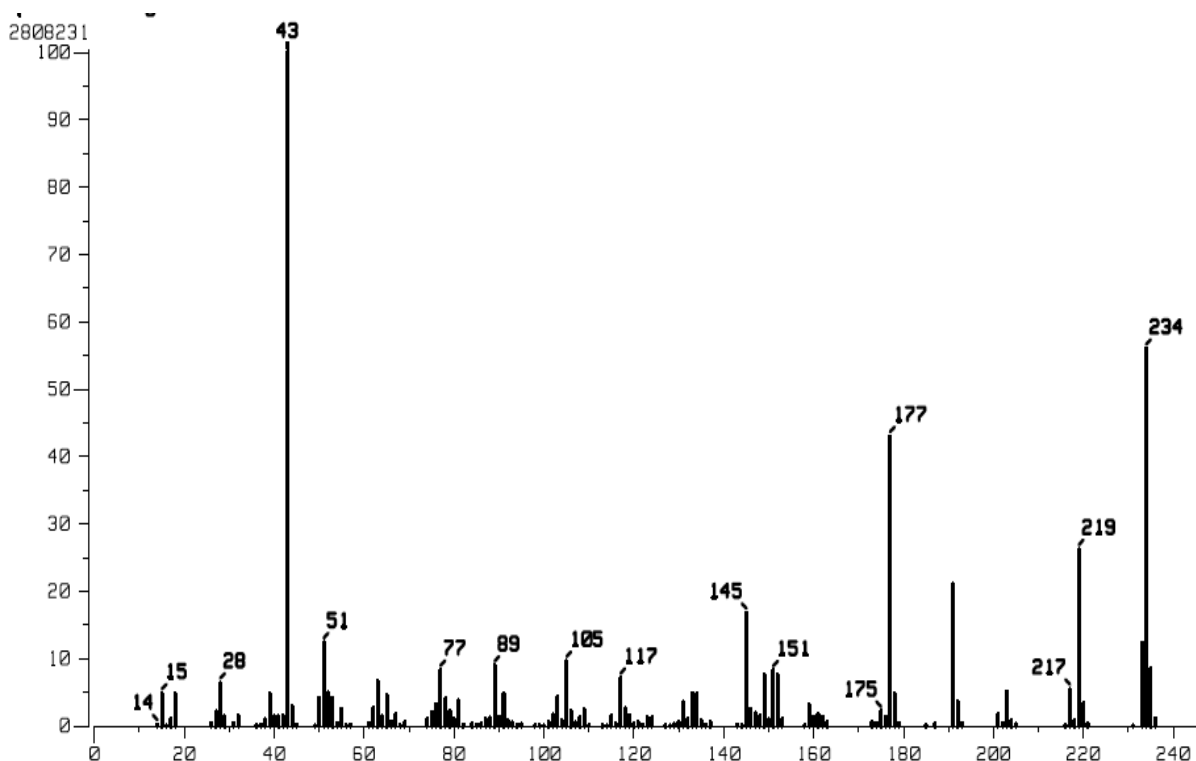


Figura 67. Espectro de masas del compuesto 39.

El bencilideno **44** (obtenido de la 2,4-pentanodiona con 2-metoxi-1-naftaldehído) mostró un pico del ion molecular característico con relación m/z en $[268^+]$; inicialmente se forma un pico base con m/z en $[237^+]$ originado por la fragmentación del metoxilo del anillo de naftaleno, posteriormente se fragmenta mediante el rompimiento del enlace C-C en la posición alfa a la cetona y el espectro de masas muestra un pico característico con relación m/z en $[43^+]$ que corresponde a la formación del ion oxonio de etilidino y al ion 2-oxoeten-1-ilio (Figura 68). La relación m/z del bencilideno **44** corresponde

adecuadamente al ion molecular protonado $[M+H]^+$ y su espectro se muestra en la Figura 69.

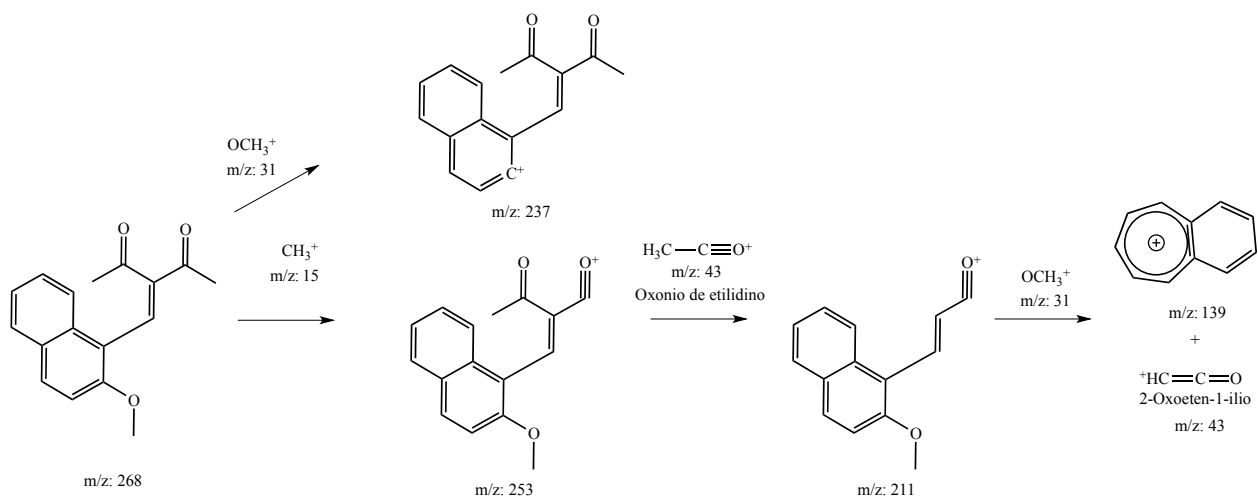


Figura 68. Patrón de fragmentación del compuesto 44.

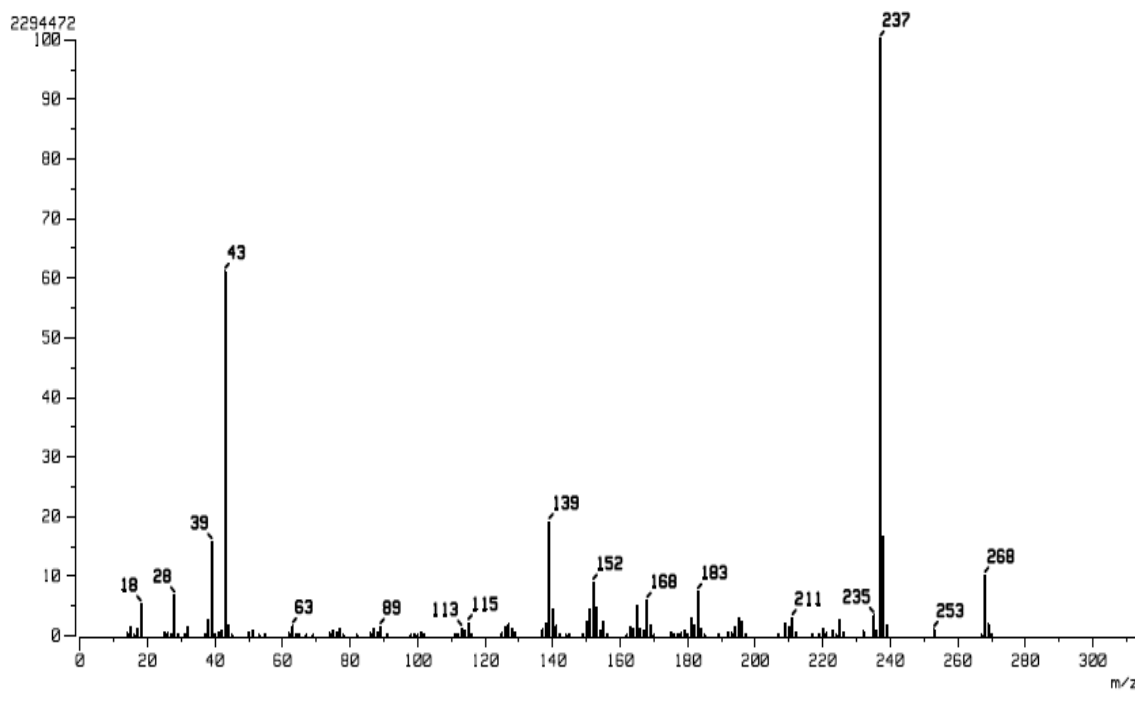
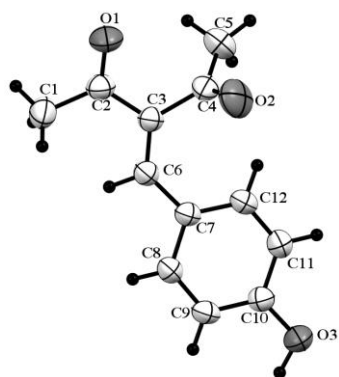


Figura 69. Espectro de Masas del compuesto 44.

8.19 Rayos-X de bencilidenos.

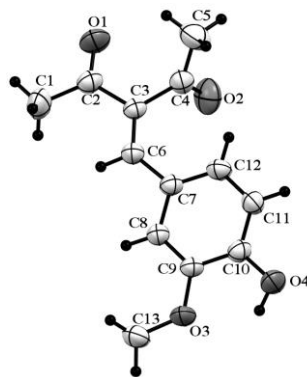
Los bencilidenos obtenidos del *p*-hidroxibenzaldehído, la vainillina y el 2-metoxi-1-naftaldehído con la 2,4-pentanodiona se lograron cristalizar (ver Figura 70 A,B,C) y los rayos-X revelaron una característica común muy importante; los carbonilos de las cetonas no son coplanares y se encuentran en posición *anti*, lo cual está de acuerdo con la RMN de hidrógeno e IR. Las interacciones débiles tipo C-H...O [85] (Figura 70 D, E) son las responsables de que los carbonilos se encuentren en posición *anti* (Figura 70 F), contribuyendo a la estabilización de las estructuras cristalinas [86].

En los rayos-X de los compuestos **37**, **39** y **44** se observa una coplanaridad entre la porción del bencilideno del O1-C2-C3-C6-C7, por lo que se obtiene el isómero cristalizado número I, donde la configuración del carbonilo conjugado se encuentra con la geometría *E-s-trans* y correlaciona adecuadamente con sus espectros de IR.



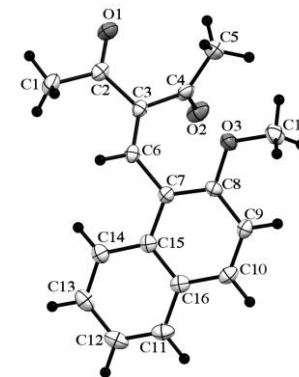
Compuesto 37

A



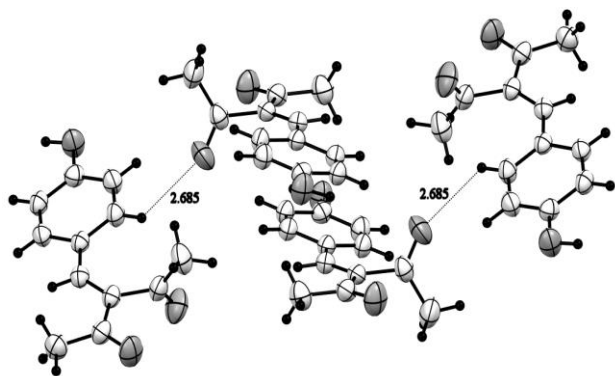
Compuesto 39

B

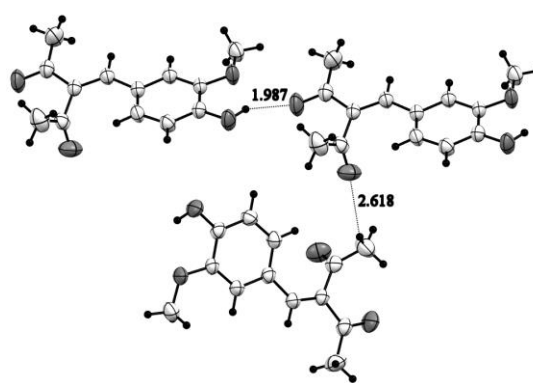


Compuesto 44

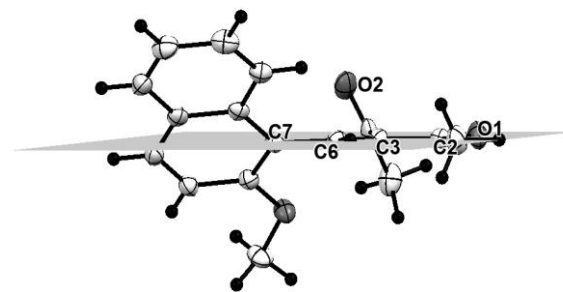
C



D



E



F

Figura 70. Rayos X de los bencilidenos derivados de *p*-OH benzaldehído, vainillina y 2-metoxi-1-naftaldehído con la 2,4-pentanodiona.

8.20 Características espectroscópicas (RMN ^1H) de las pirazolinas.

La familia de pirazolinas presentan un espectro de segundo orden para los protones correspondientes al anillo del heterociclo, los protones del metileno (H-C-H) en la pirazolinas son diastereotópicos. Por lo tanto las señales serán magnéticamente diferentes y las proyecciones de Newman proporcionan el método adecuado para ilustrar cómo los de hidrógeno se pueden diferenciar.

A medida que se rotan los átomos en la molécula alrededor del enlace químico el entorno químico exacto de los dos átomos diastereotópicos siempre es distinto. La Figura 71 muestra las proyecciones de Newman de dos isómeros rotacionales (rotámeros) de una pirazolina que resulta al realizar la rotación cuando se observa el enlace $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$. La posición alfa se encuentra a un enlace de distancia de la amina y la posición beta se encuentra a dos enlaces de distancia.

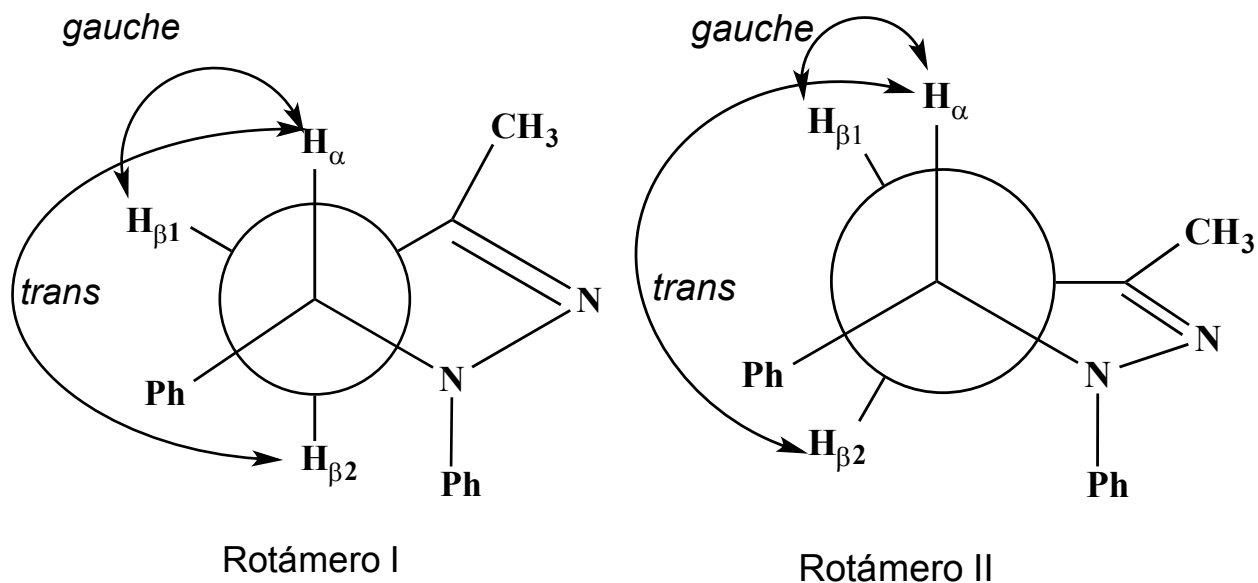


Figura 71. Rotámeros de una pirazolina en proyección de Newman.

El protón en el carbono alfa ($\text{C}\alpha$) está etiquetado como H_{α} , y los dos protones en el carbono beta ($\text{C}\beta$) están etiquetados como $\text{H}_{\beta 1}$ y $\text{H}_{\beta 2}$. Aunque $\text{H}_{\beta 1}$ y $\text{H}_{\beta 2}$ pueden

parecer idénticos (dibujando la molécula en dos dimensiones), las dos proyecciones de Newman resultantes de la rotación sobre el enlace $C\alpha-C\beta$ revelan que los protones beta (β) no experimentan el mismo entorno químico. Los ángulos diedros entre los planos definidos en el rotámero I por $H\alpha-C\alpha-C\beta$ y por $C\alpha-C\beta-H\beta 1$ pueden ser de 60° , por lo tanto la relación que guardan entre sí es *gauche*, mientras que para el protón etiquetado como $H\beta 2$ en relación con $H\alpha$ el ángulo diedro es de 180° , por lo que se encuentran en una posición *trans* uno del otro. Lo mismo ocurre con el rotámero II aunque los ángulos diedros son menores de 60° y 180° .

La curva de Karplus es una función matemática que se basa en la superposición orbital [87,88], donde se relaciona el valor de la constante de acoplamiento (J) en función del ángulo diedro gemelo o vecino (Figuras 72 y 73). El ángulo diedro generado por tres enlaces modula la 3J observada. La 3J máxima con un ángulo diedro a 0° tiene valores típicos que van de 8 Hz a 10 Hz, y la 3J máxima con un ángulo diedro a 180° se alcanza entre 10 Hz a 17 Hz.

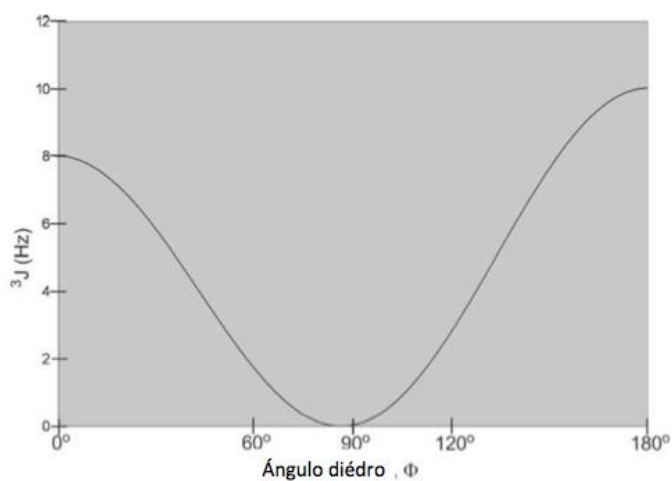


Figura 72. Curva de Karplus para protones vecinales (Temperatura ambiente).

La magnitud de la constante de acoplamiento geminal (2J) también varía en función del ángulo de enlace. Para carbonos sp^3 con un ángulo de enlace de aproximadamente 109.5° la 2J es 12 Hz, como se ilustra en la Figura 73.

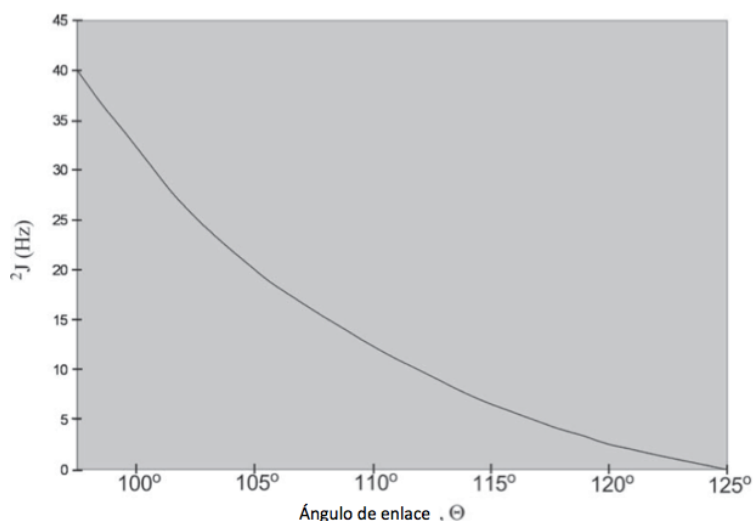


Figura 73. Curva de Karplus para protones geminales (Temperatura ambiente).

El espectro de hidrógeno experimental de una pirazolina presenta la señal del protón $H\alpha$ del heterociclo multiplicada como doble de dobles (dd) y muestra acoplamientos independientes con cada protón del metileno ($H\beta_1$ y $H\beta_2$). Los protones del metileno se multiplican individualmente (sistema ABX) como una señal doble de doble de cuartetos (ddq), presentando un acoplamiento geminal fuerte (17 Hz) y dos acoplamientos vecinales (uno con el protón $H\alpha$ y otro con el metilo de la imina). El metilo de la imina se acopla independientemente con cada protón diasterotópico del heterociclo ($H\beta_1$ y $H\beta_2$) por lo que debería mostrar una señal en forma de doble de dobles (dd), aunque en algunos espectros experimentales la señal colapsa obteniéndose una multiplicidad que se parece a un triplete (t).

La asignación de los protones diasterotópicos $H\beta_1$ y $H\beta_2$ se realiza basándose en la curva de Karplus, ya que hay dos constantes de acoplamiento diferentes con respecto al protón $H\alpha$ (una de aproximadamente 8 Hz y otra de aproximadamente 12 Hz). Se ha asignado $H\beta_2$ para la señal con la constante de acoplamiento mayor (12 Hz y en posición *trans* con respecto a $H\alpha$). Los espectros de RMN de hidrógeno para los compuestos **49** y **54** son ilustrados en las Figuras 74-76.

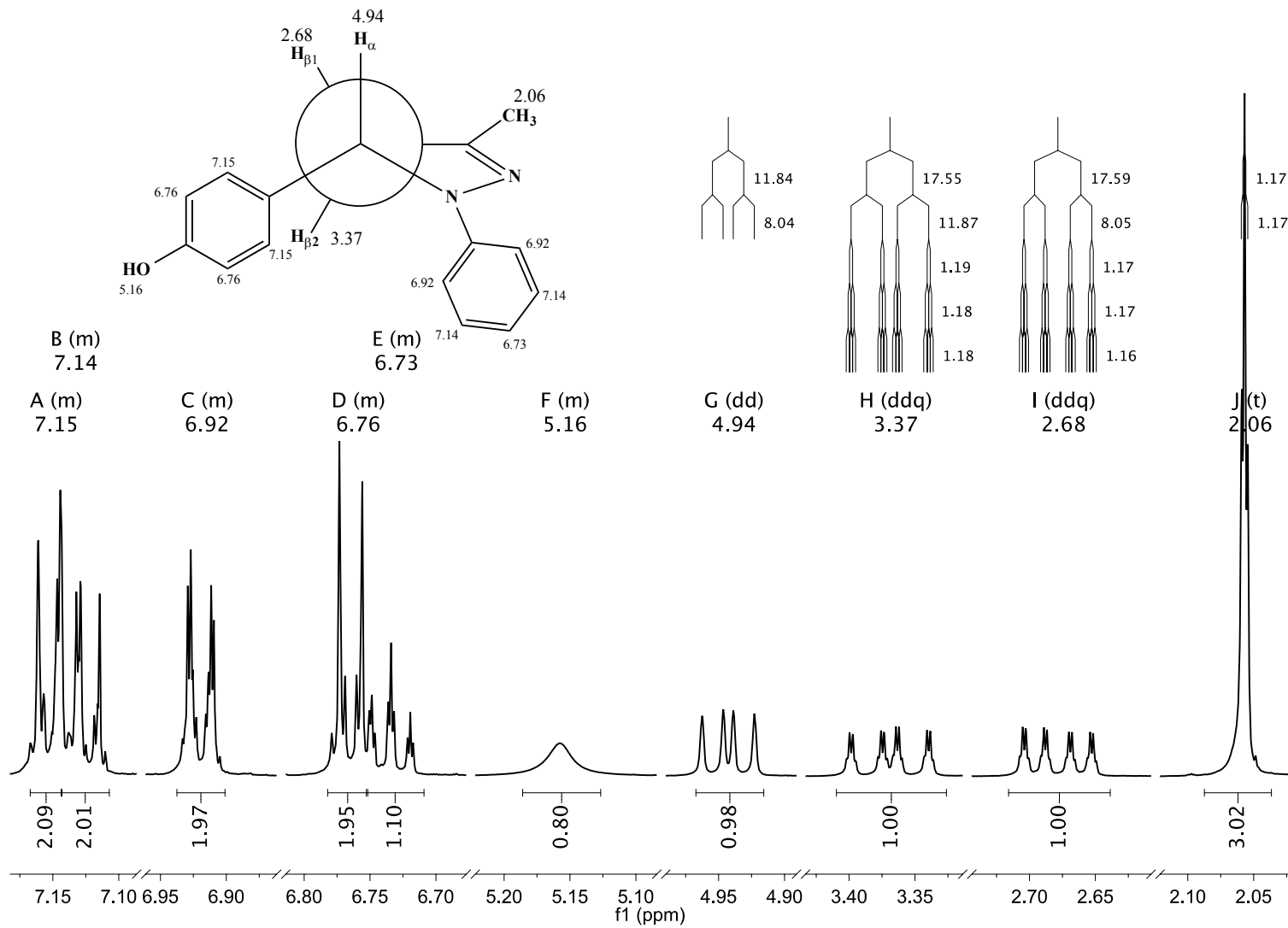


Figura 74. Expansión del espectro de RMN de hidrógeno del compuesto **49** (500 MHz, CDCl₃).

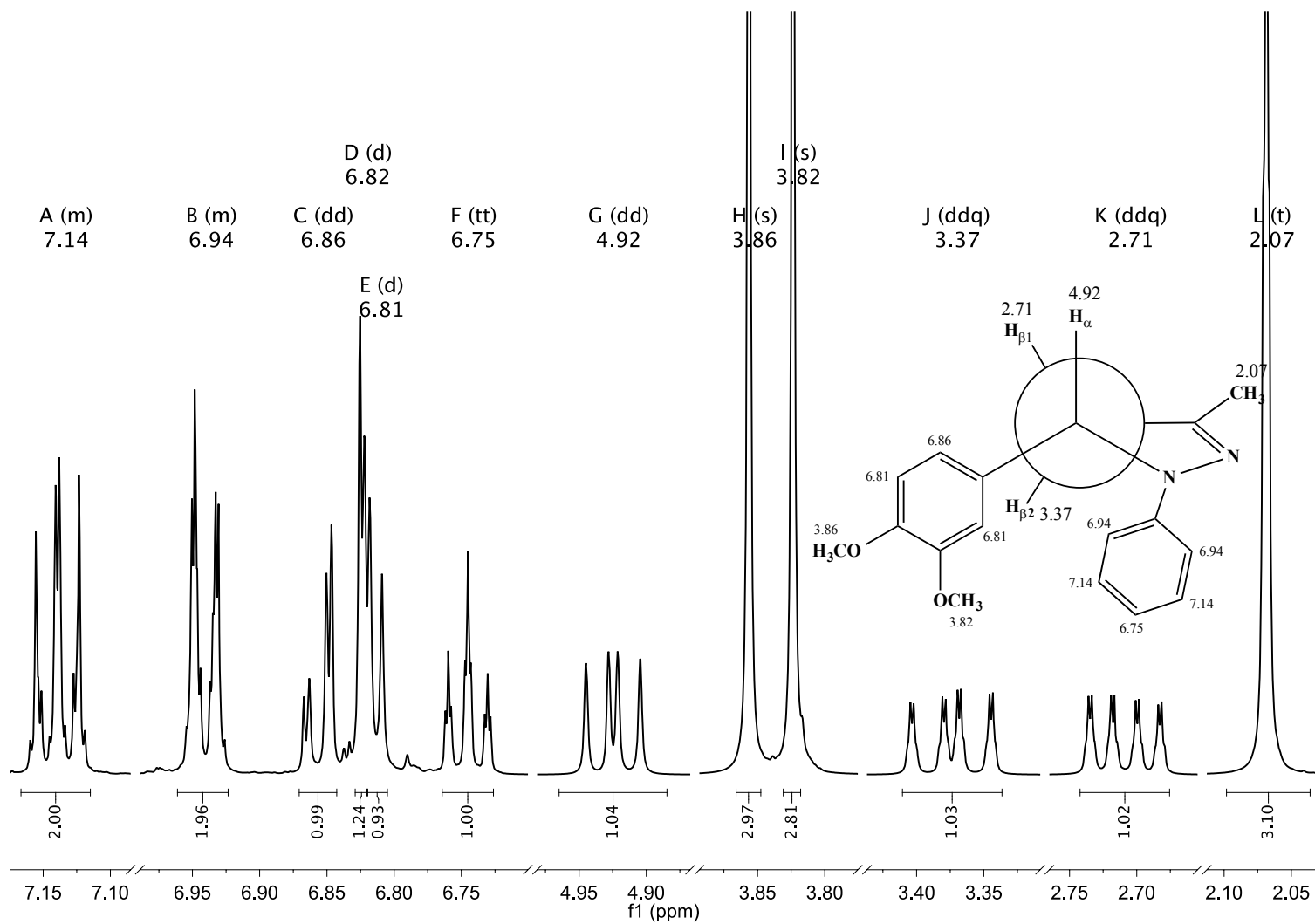


Figura 75. Espectro de RMN de hidrógeno del compuesto **54** (500MHz, CDCl₃).

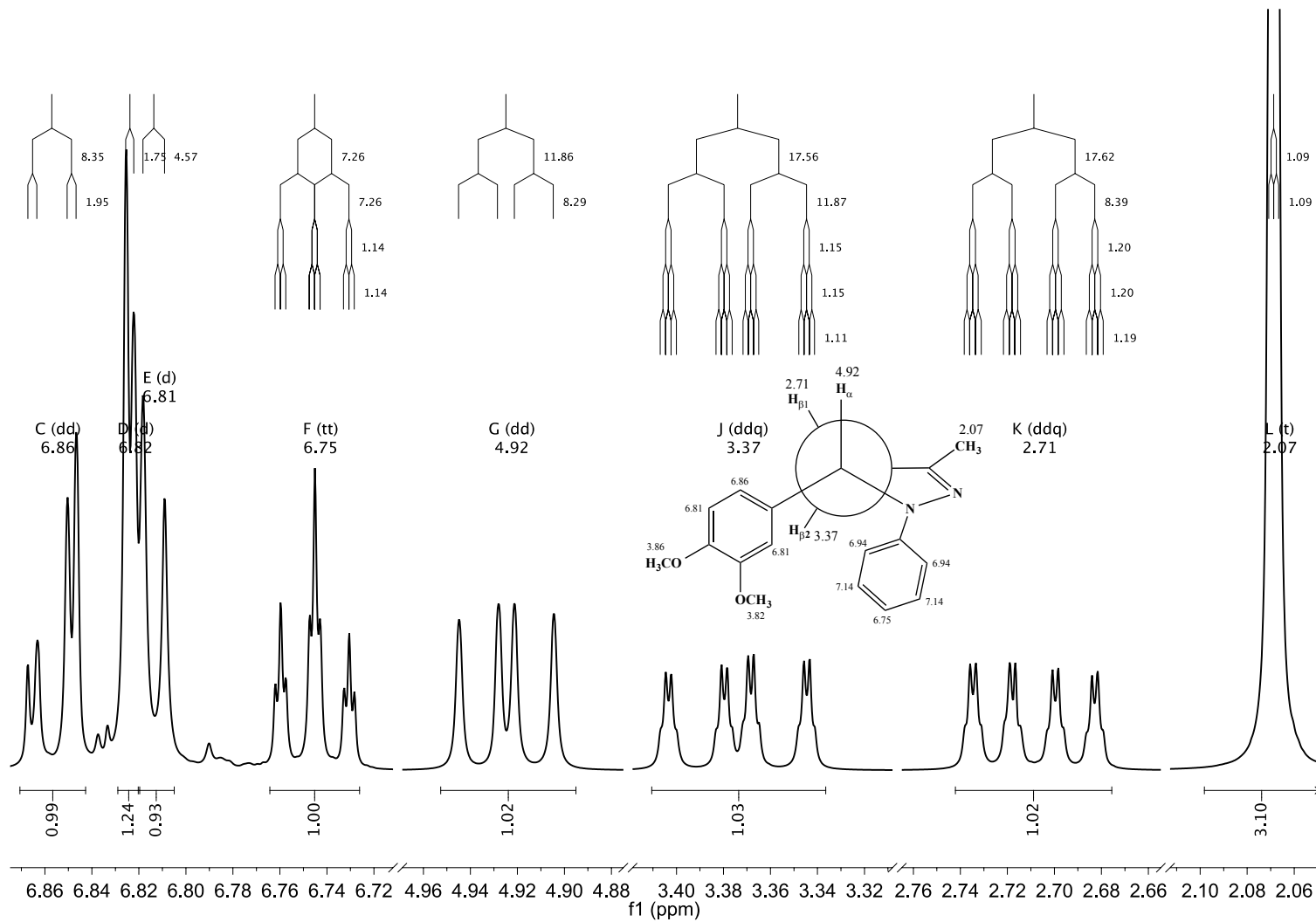


Figura 76. Expansión del espectro de RMN de hidrógeno del compuesto **54** (500 MHz, CDCl₃).

8.21 Análisis de IR de las pirazolinas.

La pirazolina **46** (obtenida de DHZ con la fenil hidracina) presenta una banda de absorción ensanchada en 3382 cm^{-1} originada por los estiramientos del fenol (Ph-O-H), además de una banda de absorción de fuerte intensidad en 1596 cm^{-1} que corresponde al grupo imina del ciclo originadas por los estiramientos del enlace -C=N [89]. La banda de absorción intensa que se presenta en 1500 cm^{-1} corresponde a los estiramientos originados de los enlaces -C=C- de los anillos aromáticos. Adicionalmente se presentan dos absorciones en 1206 cm^{-1} y 1268 cm^{-1} originadas por los estiramiento del enlace C-N. Se presentan sobretonos en 3006 cm^{-1} y son originados por los estiramientos del enlace C-H de los anillo aromáticos. El espectro de infrarrojo del compuesto **46** (Figura 77) presenta las señales características de una pirazolina.

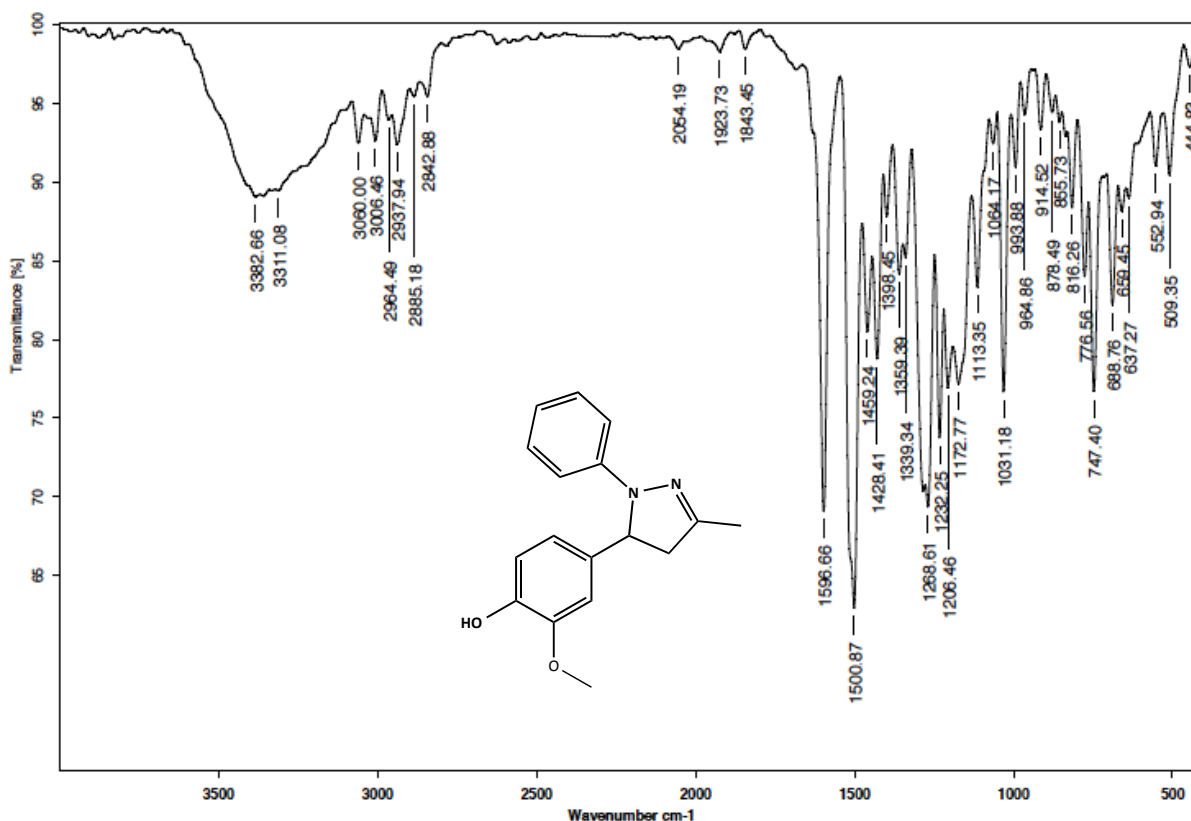


Figura 77. Espectro de IR del compuesto **46**.

La pirazolina **49** presenta una banda de absorción ensanchada en 3426 cm^{-1} y una banda de absorción de fuerte intensidad en 1595 cm^{-1} que corresponden al grupo imina del ciclo originadas por los estiramientos del enlace -C=N- . La banda de absorción intensa en 1502 cm^{-1} es originada por los estiramientos del enlace -C=C- de los anillos aromáticos, adicionalmente se observan dos bandas de mediana intensidad ligeramente ensanchadas en 1230 cm^{-1} y 1254 cm^{-1} originadas por los estiramiento del enlace -C-N- .

Este compuesto presenta un fenol en la posición *para* y se observa una banda de absorción intensa y ensanchada en 3068 cm^{-1} debido a los estiramientos del enlace Ph-O-H . Los sobretonos en 3034 cm^{-1} corresponden a los estiramientos del enlace C-H de los anillo aromáticos. El espectro de infrarrojo del compuesto **49** se ilustra en la Figura 78.

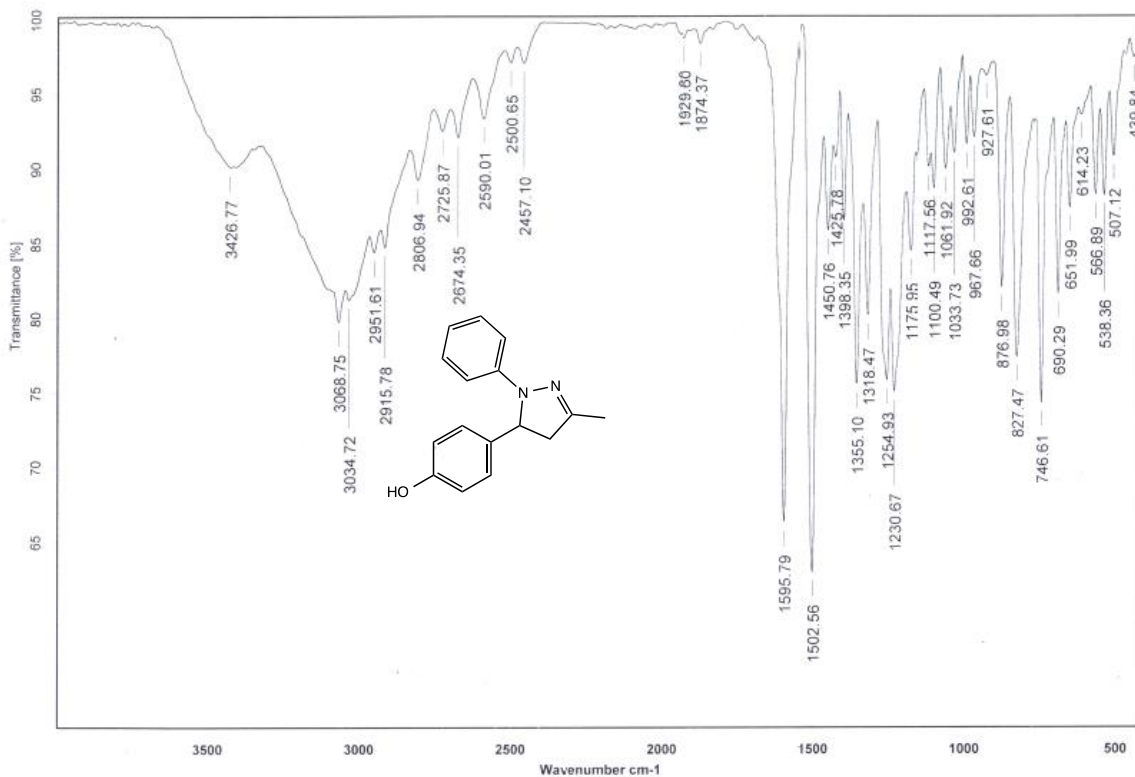


Figura 78. Espectro de IR del compuesto **49**.

8.22 Espectrometría de masas (EM) de pirazolinas.

La familia de pirazolinas se caracterizó por espectrometría de masas y se fragmenta con la pérdida del fenilo del heterociclo, observándose el ion característico con m/z en $[159^+]$. La subsecuente fragmentación donde se identifica la pérdida de ácido cianhídrico $[90]$ con m/z en $[27^+]$, finaliza con la obtención del ion tropilio (Figura 79) con relación $m/z = [91^+]$. La m/z del compuesto **49** mostró un pico base con relación m/z en $[252^+]$ correspondiendo adecuadamente al ion molecular protonado $[M^+H^+]$ y su espectro se muestra en la Figura 80.

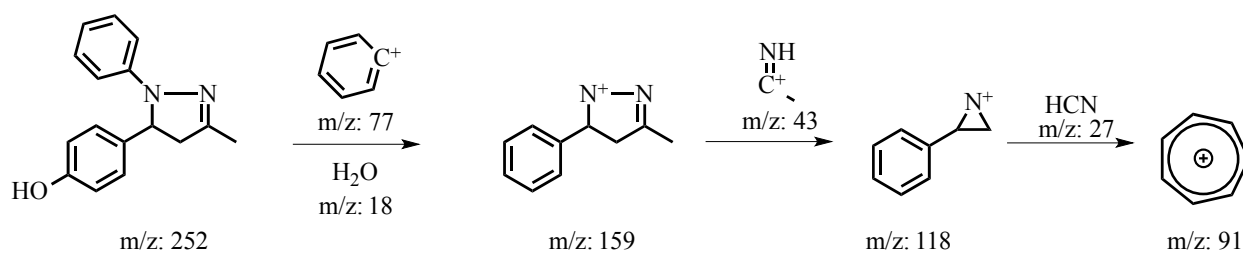


Figura 79. Patrón de fragmentación de la pirazolina **49**.

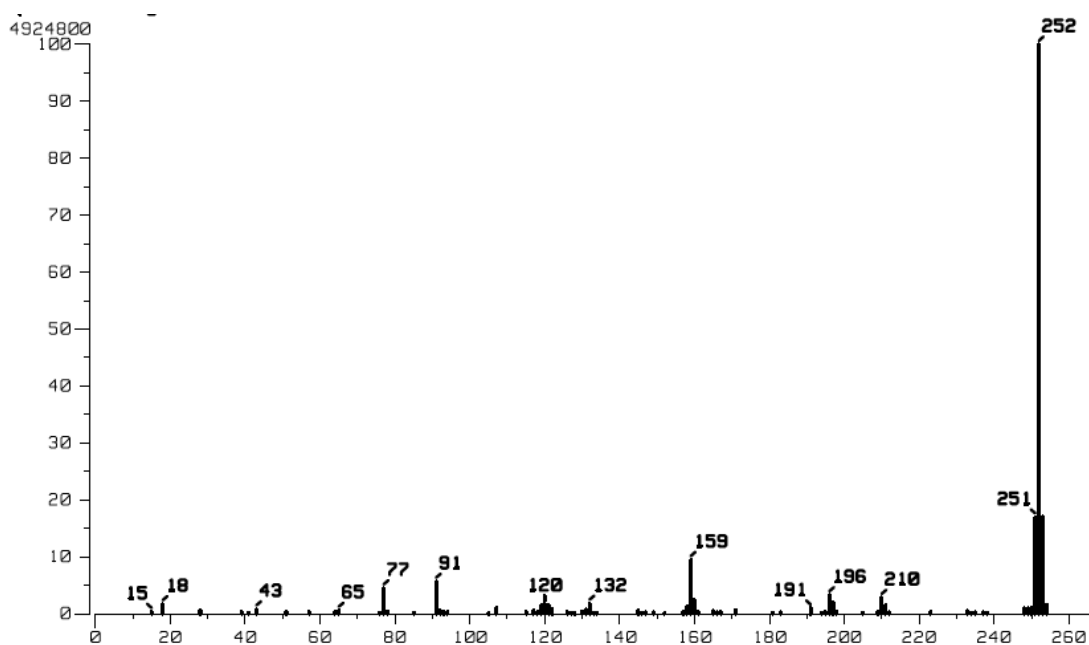


Figura 80. Espectro de masas del compuesto **49**.

La pirazolina número **54** muestra un pico base con m/z en $[296^+]$ y en su espectro de masas se observa un pico con m/z en $[159^+]$, correspondiente al ion del heterociclo originado por la pérdida de un fenilo y dos metoxilos. Se observa el pico característico del ion tropilio con relación m/z en $[91^+]$, formado por la pérdida de ácido cianhídrico (Figura 81). La m/z de este compuestos corresponde adecuadamente al ion molecular protonado $[M^+H^+]$ y su espectro se muestra en la Figura 82.

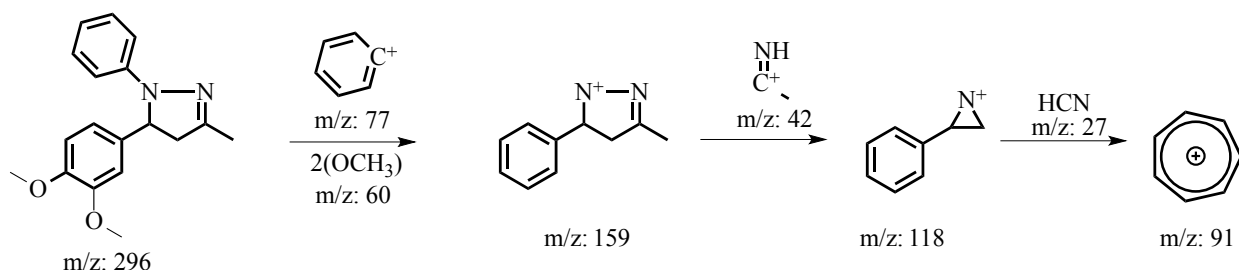


Figura 81. Patrón de fragmentación de la pirazolina **54**.

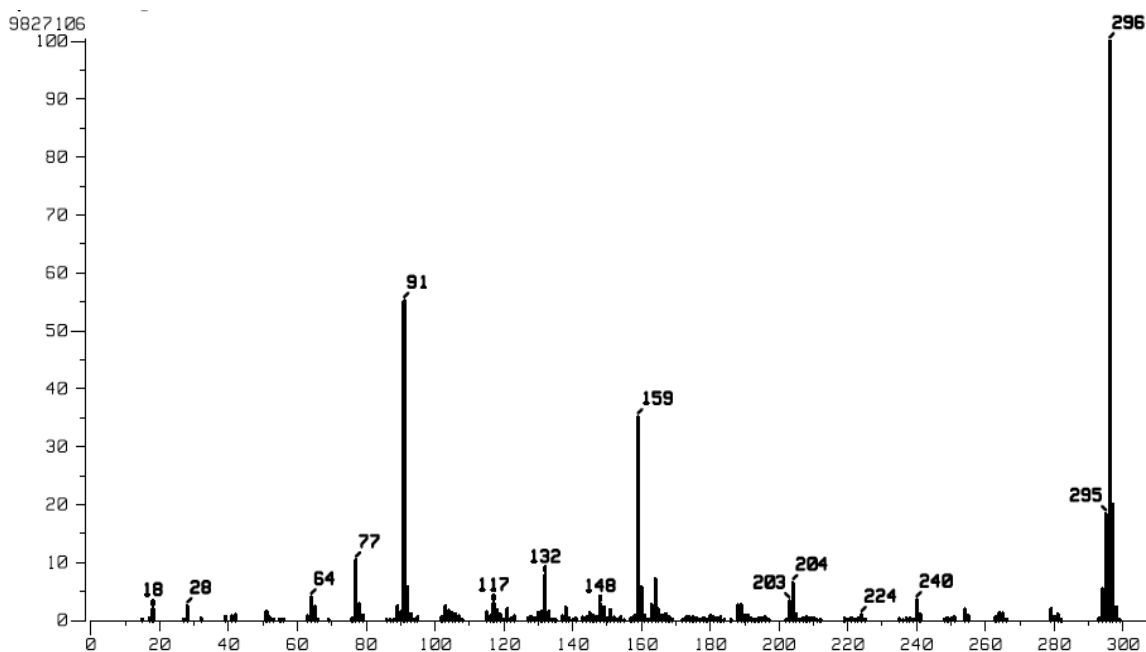


Figura 82. Espectro de masas del compuesto **54**.

8.23 Rayos-X de la pirazolina 54.

La estructura de rayos-X de la pirazolina **54** confirma la formación de un heterociclo con dos átomos de nitrógeno (Figura 83) formando un anillo, en el cual están conectados dos sustituyentes aromáticos. El anillo aromático que se une al C-5 se encuentra sustituido con dos metoxilos en las posiciones C-15 y C-16. Por otro lado se confirman las características de este tipo de ciclos presentándose un doble enlace en la posición N2-C3, así como un metileno en la posición C4 y está de acuerdo con la RMN de hidrógeno. El carbono de la posición C5 que se encuentra tetrasustituido y es un centro quiral, encontrándose en la estructura cristalina el par enantiomérico de la pirazolina ya que la síntesis no se realizó de manera asimétrica.

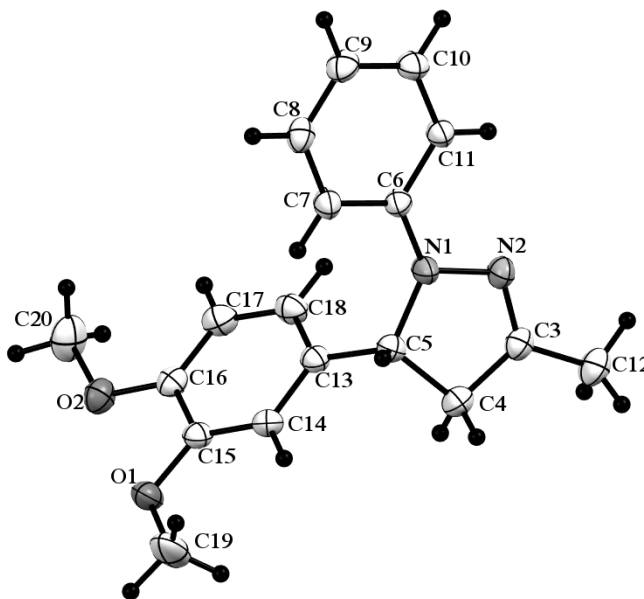


Figura 83. Rayos -X del compuesto **54**.

8.24 Características espectroscópicas (RMN ^1H) de chalconas (C-3) y di-chalconas (C-5)

En el análisis realizado por RMN de hidrógeno se puede comprobar que bajo las condiciones experimentales utilizadas la obtención del isómero geométrico favorecido para el doble enlace es el *trans*, por lo que las magnitudes de las constantes de acoplamiento de los alquenos α y β formados en estas series de compuestos están en el promedio de 15 Hz a 16 Hz.

Los protones vinílicos se encuentran muy desplazados debido a la conjugación del enlace π que se presenta entre el alqueno y el grupo carbonilo, por lo que es normal encontrar dos señales dobles en la región aromática (6.5 ppm y 8.5 ppm).

El espectro de la Figura 84 corresponde a la chalcona **57**, obtenida mediante la reacción de condensación entre 3,4-dimetoxi benzofenona y 2-naftaldehído. Sus señales se encuentran mayoritariamente en la región entre 6.9 ppm y 8.1 ppm, dando dos dobles que corresponden al enlace vinílico con constantes de acoplamiento de 15.5 Hz (lo que es indicativo de la obtención de una *E*-chalcona).

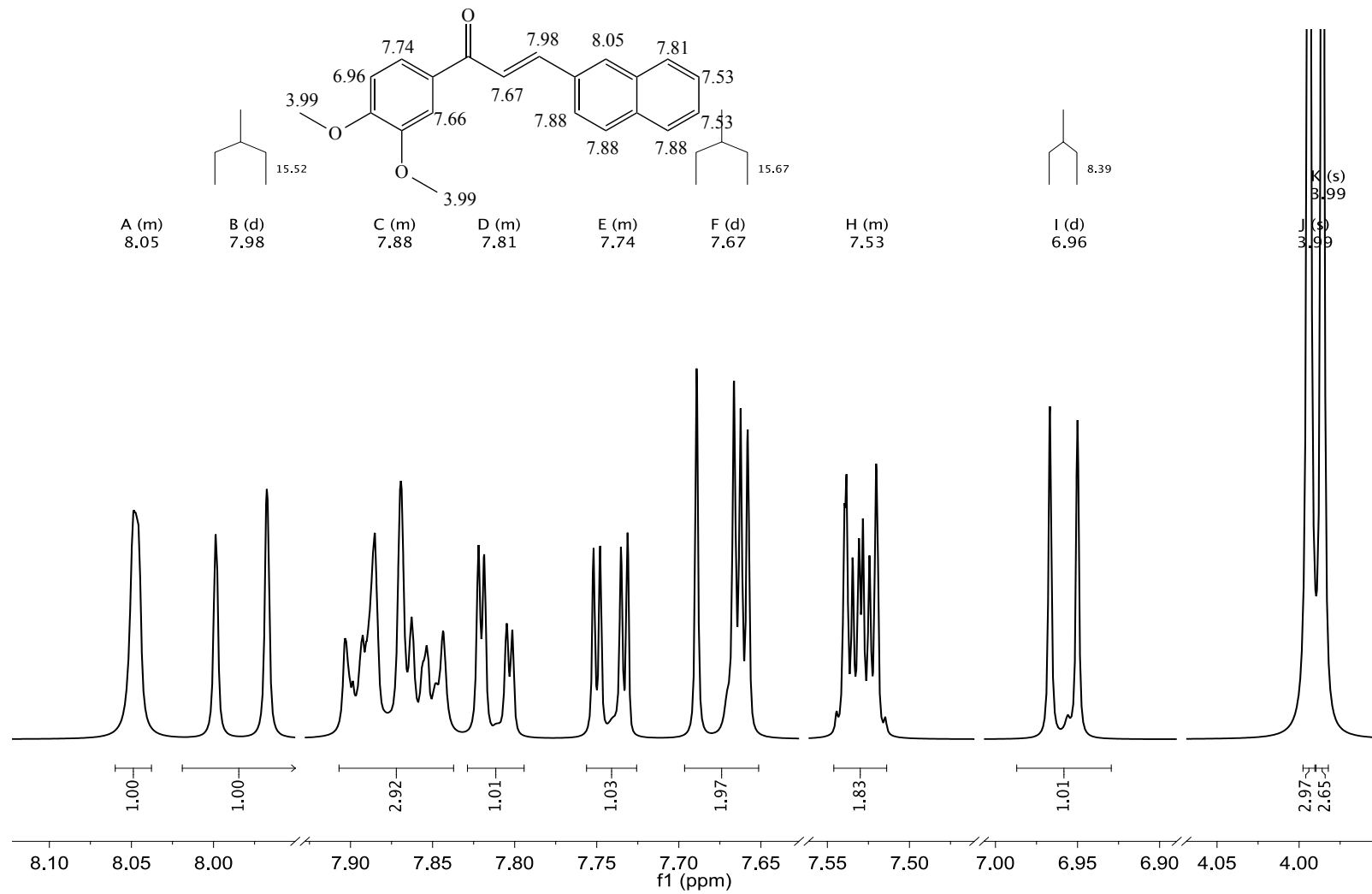


Figura 84. Espectro de RMN de ^1H de la chalcona **57** (500 MHz, CDCl_3).

8.25 Análisis de IR de chalconas y di-chalconas.

Los espectros de IR de las chalconas (compuestos **57** y **58**) muestran bandas características de absorción para el grupo carbonilo de la cetona; en el compuesto **57** se encuentra en 1654 cm^{-1} (C=O, cetona conjugada) y en el **58**, en 1655 cm^{-1} (C=O, cetona conjugada) originadas por los estiramientos fuertes del grupo carbonilo [91,92]. Adicionalmente, se observan dos bandas intensas para **57** en 1578^{-1} y 1595 cm^{-1} , para **58** en 1579 cm^{-1} y 1599 cm^{-1} originadas por los estiramientos del enlace -C=C- de los anillos aromáticos [81]. La presencia de una banda intensa del **57** en 1151 cm^{-1} y del **58** en 1142 cm^{-1} se atribuyen a los estiramientos del enlace C-O debido a la presencia de los metoxilos. Finalmente se observan sobretonos para el compuesto **57** en 3080 cm^{-1} y para el compuesto **58** en 3067 cm^{-1} , originados por los estiramientos del enlace C-H de los anillos aromáticos. Los espectros de IR que muestra estas características corresponden a las Figuras 85 y 86.

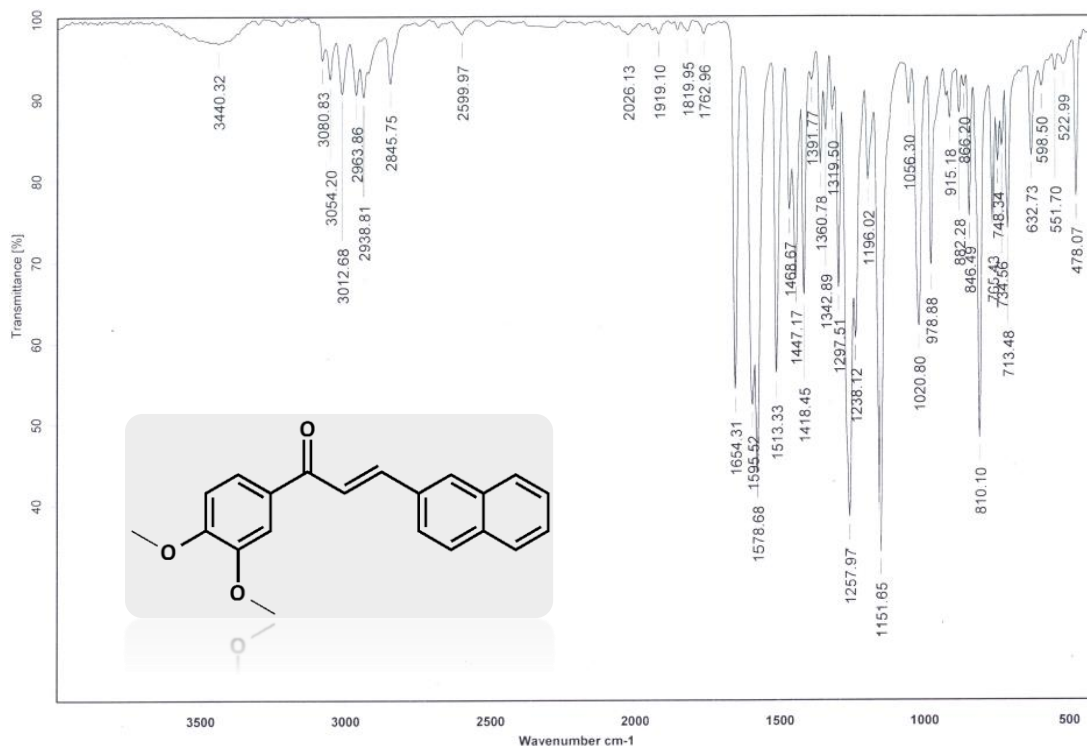


Figura 85. Espectro de IR del compuesto **57**.

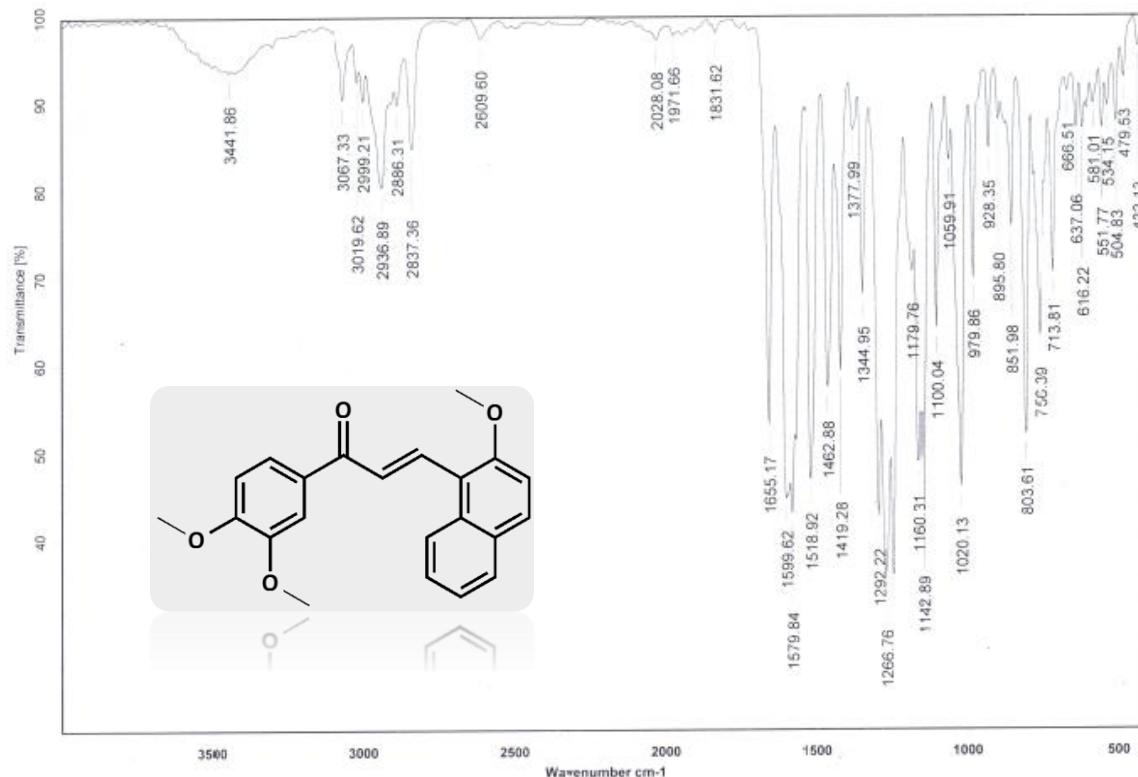


Figura 86. Espectro de IR del compuesto **58**.

Los espectros de IR de las di-chalconas (compuestos **60** y **61**) muestran bandas características de absorción para el grupo carbonilo de la cetona, para **60** en 1617 cm⁻¹ y **61** en 1584 cm⁻¹ originadas por los estiramientos fuertes del grupo carbonilo (C=O, cetona conjugada). Adicionalmente, se observan dos bandas intensas para **60** en 1599 cm⁻¹ y 1594 cm⁻¹, y **61** en 1562 cm⁻¹ y 1508 originadas por los estiramientos del enlace -C=C-. Las dos bandas intensas para **60** en 1112 cm⁻¹ y 1166 cm⁻¹, y **61** en 1151 cm⁻¹ y 1255 cm⁻¹ que se deben a las torsiones del enlace C-O originadas por la presencia de los carbonilos. Las señales anchas observadas para **60** en 3227 cm⁻¹ y **61** en 3135 cm⁻¹ se deben a los estiramientos originados por los enlaces de los fenoles (Ph-O-H). Los sobretonos observados para **60** en 3059 cm⁻¹ y **61** en 3015 cm⁻¹ son originadas por los estiramientos del enlace C-H de los anillos aromáticos. Los espectros de IR de estos compuestos se muestran en las Figuras 87 y 88.

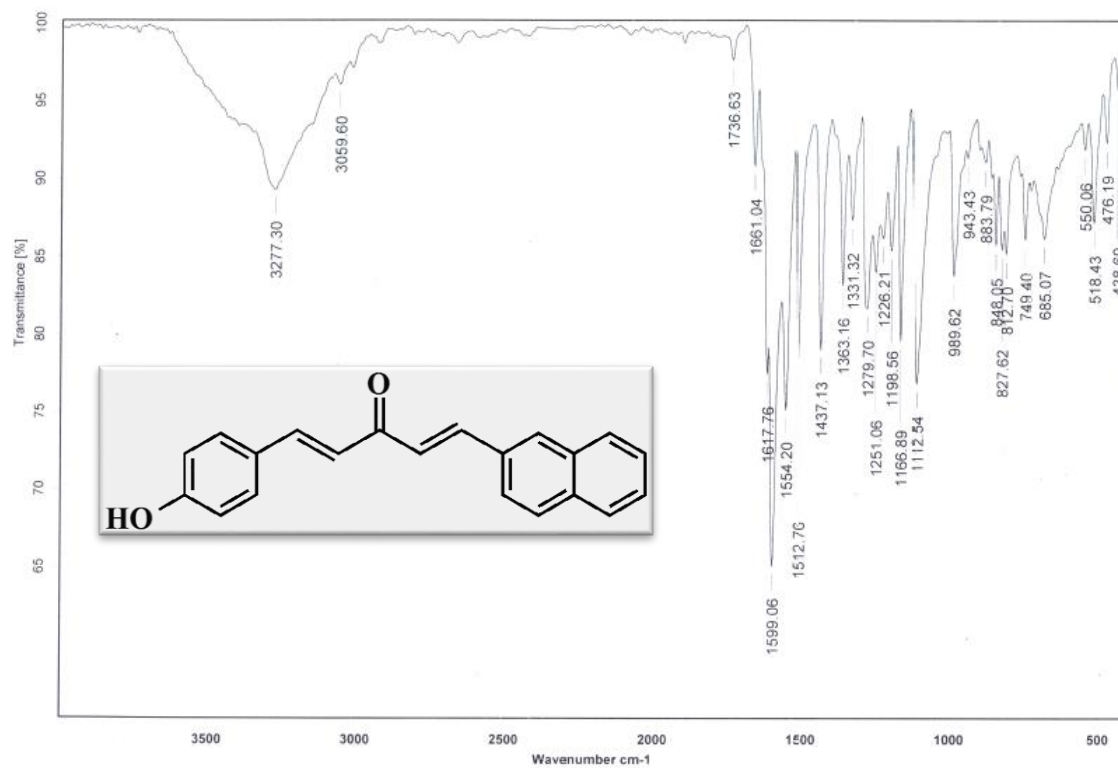


Figura 87. Espectro de IR del compuesto 60.

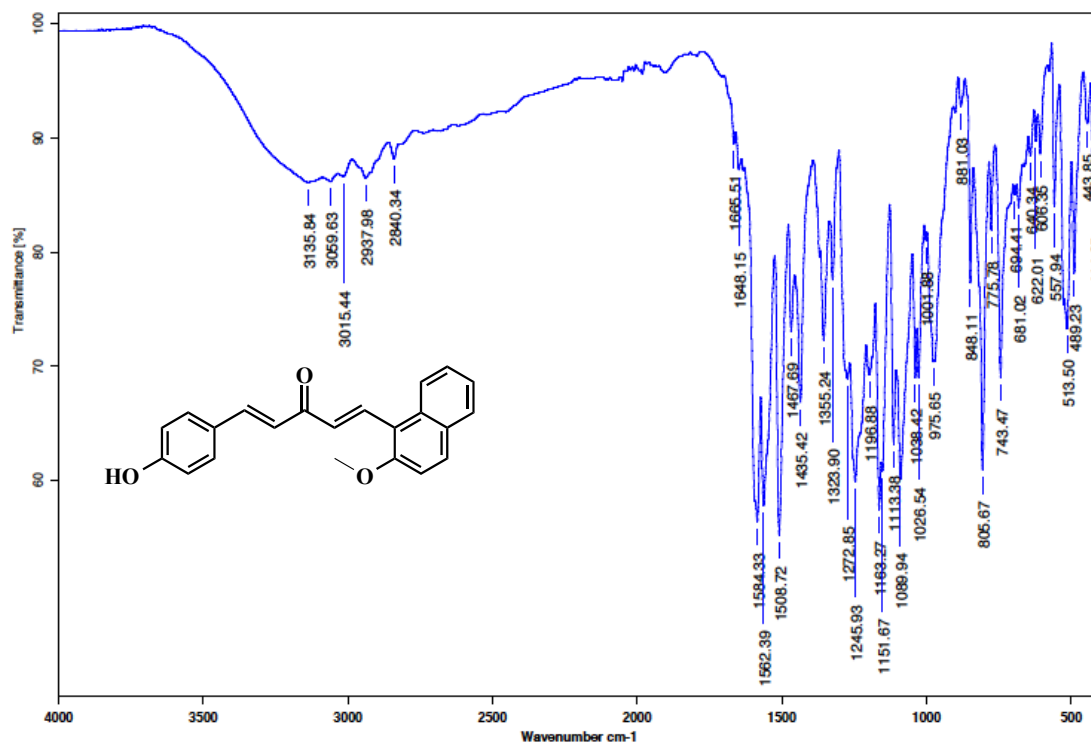


Figura 88. Espectro de IR del compuesto 61.

8.26 Espectrometría de masas de chalconas y di-chalconas.

Las chalconas y di-chalconas presentan patrones de fragmentación normales [93], como es el rompimiento en las dos posiciones alfas al carbonilo [94]. Los fragmentos principales del compuesto **57**, corresponden a los iones originados por el rompimiento del enlace -C-C=O-C- como se muestra en la Figura 89. Un pico con $m/z = [287^+]$ es observado debido a la pérdida de un metoxilo y los picos con relaciones m/z en $[181^+]$ y $[152^+]$ corresponden a los iones producidos por el rompimiento del carbonilo de la cetona en las posiciones antes mencionadas. El pico base de este compuesto con relación $m/z = [318^+]$ corresponde adecuadamente al ion molecular protonado $[M^+H^+]$ y su espectro de masas se muestra en la Figura 90.

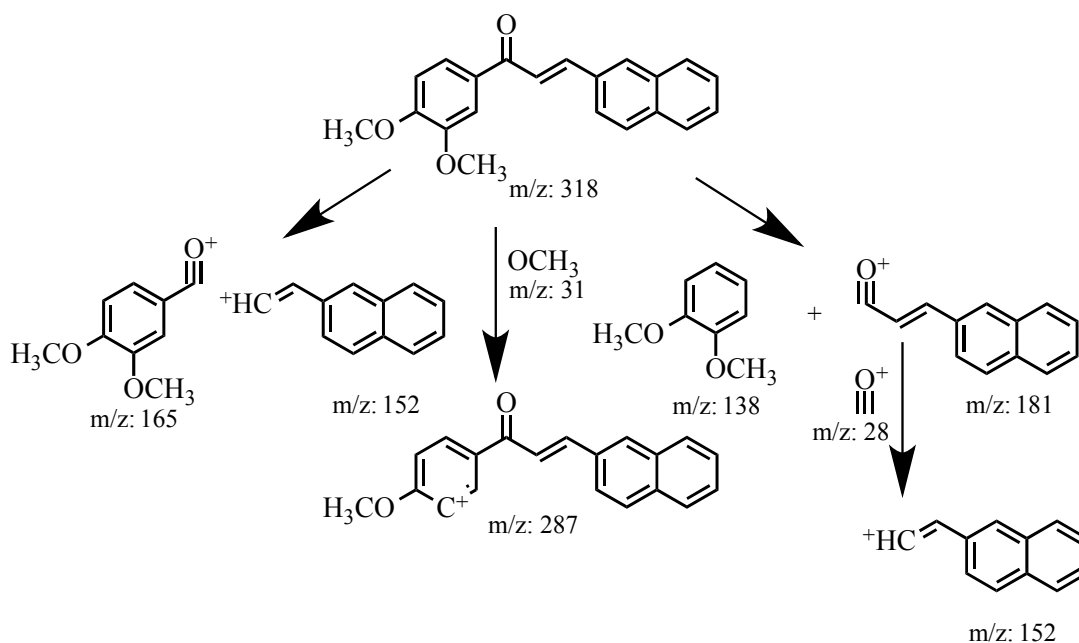


Figura 89. Patrón de fragmentación de la chalcona **57**.

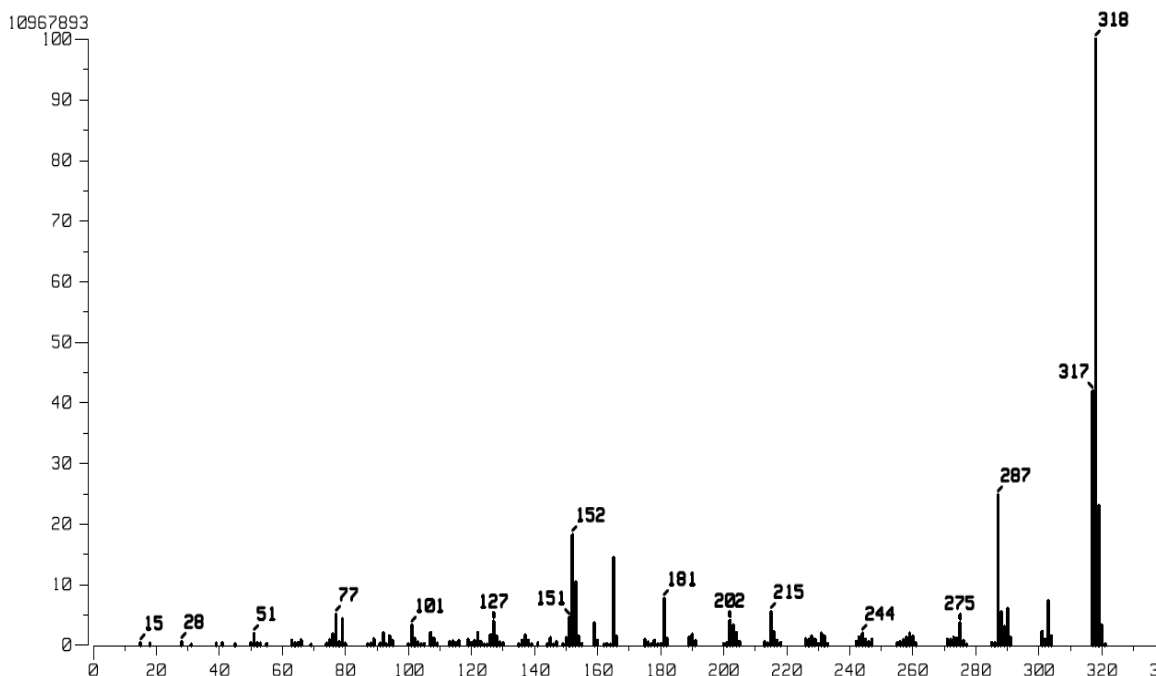


Figura 90. Espectro de masas de la chalcona **57**.

En la chalcona **58** se observa un pico base con relación m/z en $[317^+]$ debido a la pérdida de un metoxilo y los picos observados con relaciones $m/z = [165^+]$ y $[137^+]$ corresponden a los iones producidos por el rompimiento del carbonilo de la cetona en las dos posiciones alfas (Figura 91). El pico con relación $m/z = [348^+]$ corresponde adecuadamente al ion molecular protonado $[M^+H^+]$ y su espectro de masas se muestra en la Figura 92.

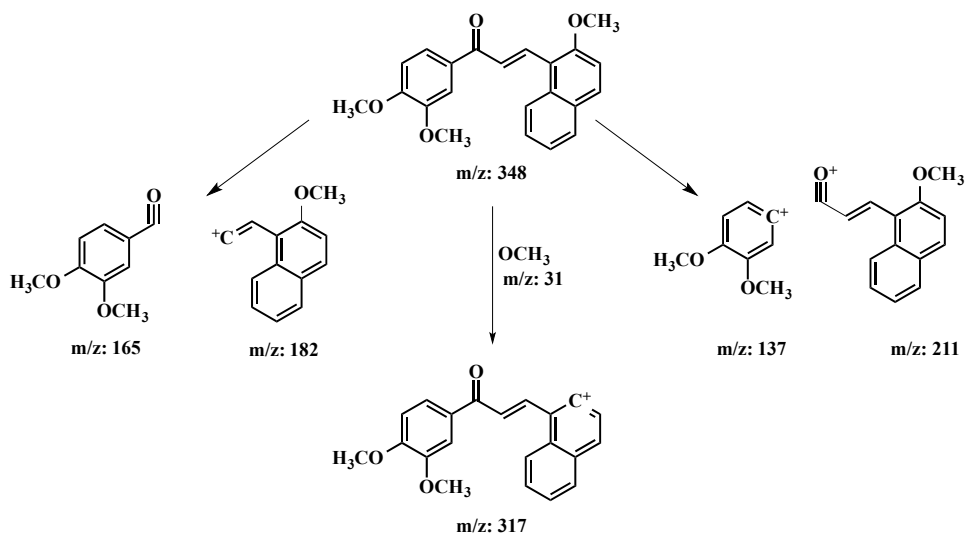


Figura 91. Patrón de fragmentación de la chalcona **58**.

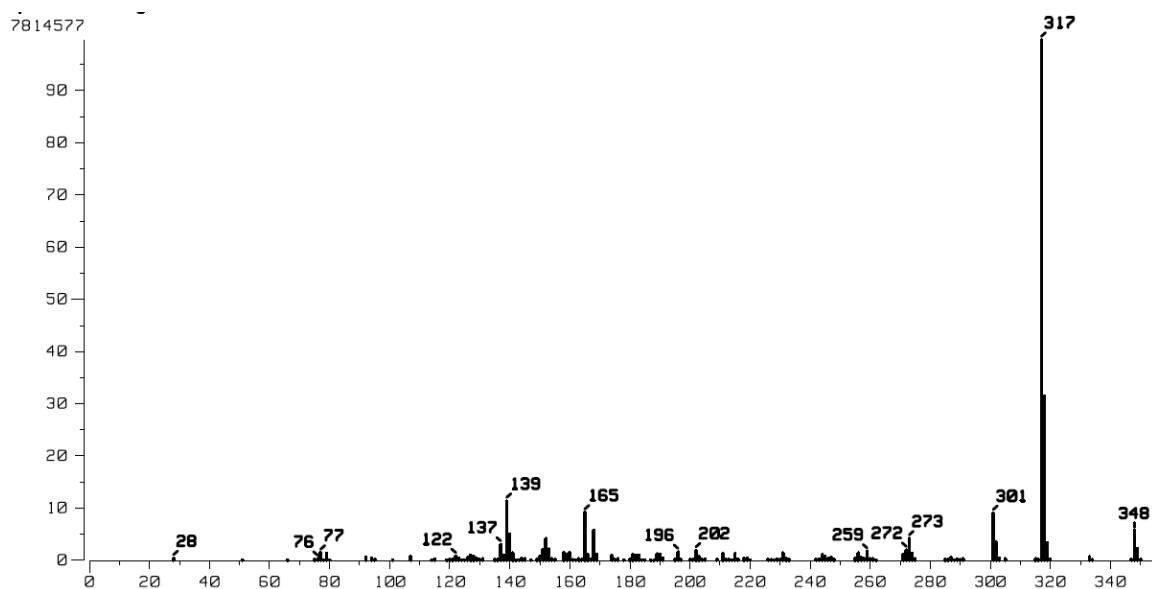


Figura 92. Espectro de Masas del compuesto **58**.

La di-chalcona **60** presenta un pico base con relación m/z en [300⁺] que corresponde al ion molecular protonado. Se observan picos característicos con relaciones m/z en [152⁺] y [147⁺] que corresponden a los iones encontrados por el rompimiento del carbonilo de la cetona en las dos posiciones α , el pico con m/z en [118⁺+1] corresponde a una segunda fragmentación del carbonilo de la posición α

(Figura 93). La relación m/z de este compuesto corresponde adecuadamente al ion molecular protonado $[M+H]^+$ y su espectro de masas se muestra en la Figura 94.

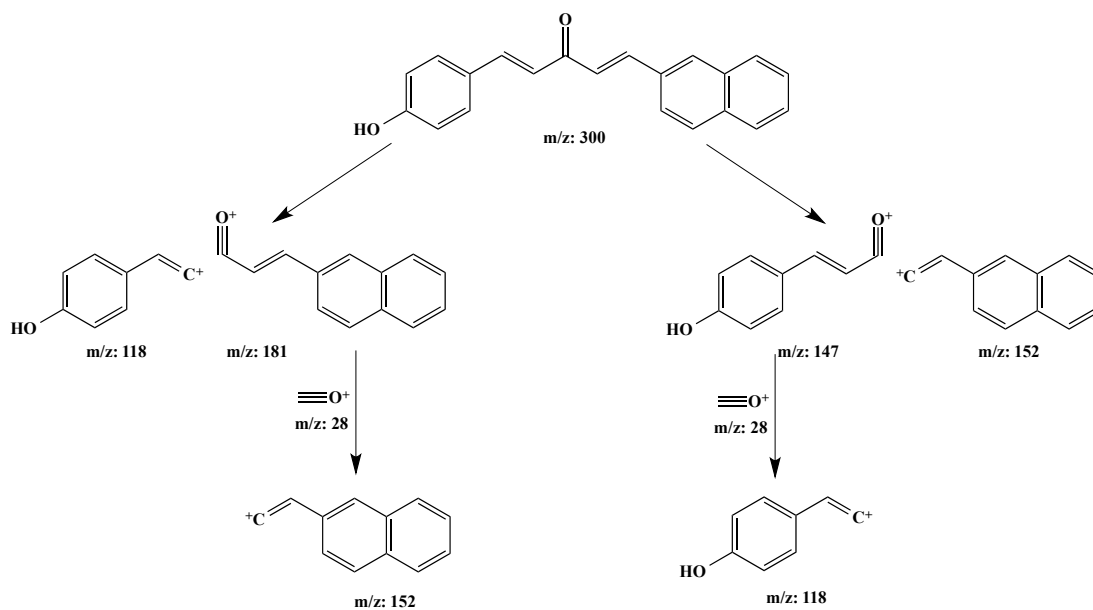


Figura 93. Patrón de fragmentación de la di-chalcona 60.

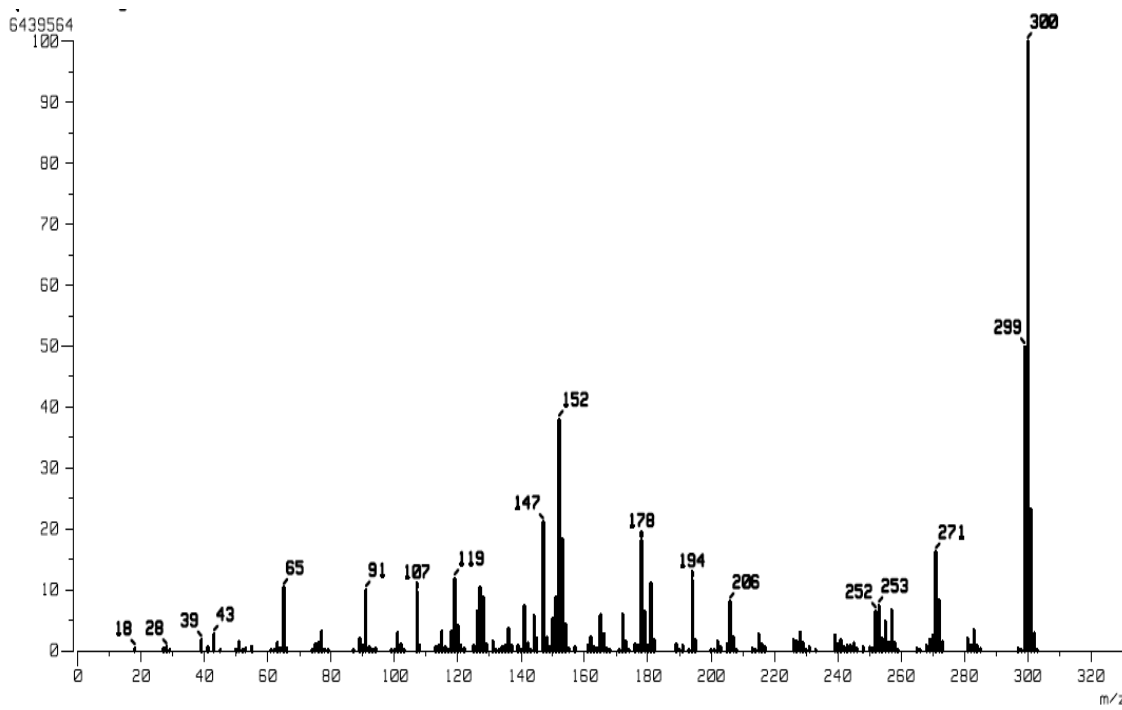


Figura 94. Espectro de Masas de la di-chalcona 60.

El espectro de masas de la di-chalcona **61** presenta un pico con relación $m/z = [299^+]$ que corresponde a la fragmentación de un metoxilo del anillo del naftaleno, posteriormente se observa un pico base con relación $m/z = [147^+]$ y un pico con relación $m/z = [119^+]$ que corresponden a las fragmentaciones del carbonilo de la cetona en las posiciones α (Figura 95). El compuesto **61** presenta el pico característico con $m/z = [330^+]$ que corresponde adecuadamente al ion molecular protonado $[M^+H^+]$ y su espectro de masas se muestra en la Figura 96.

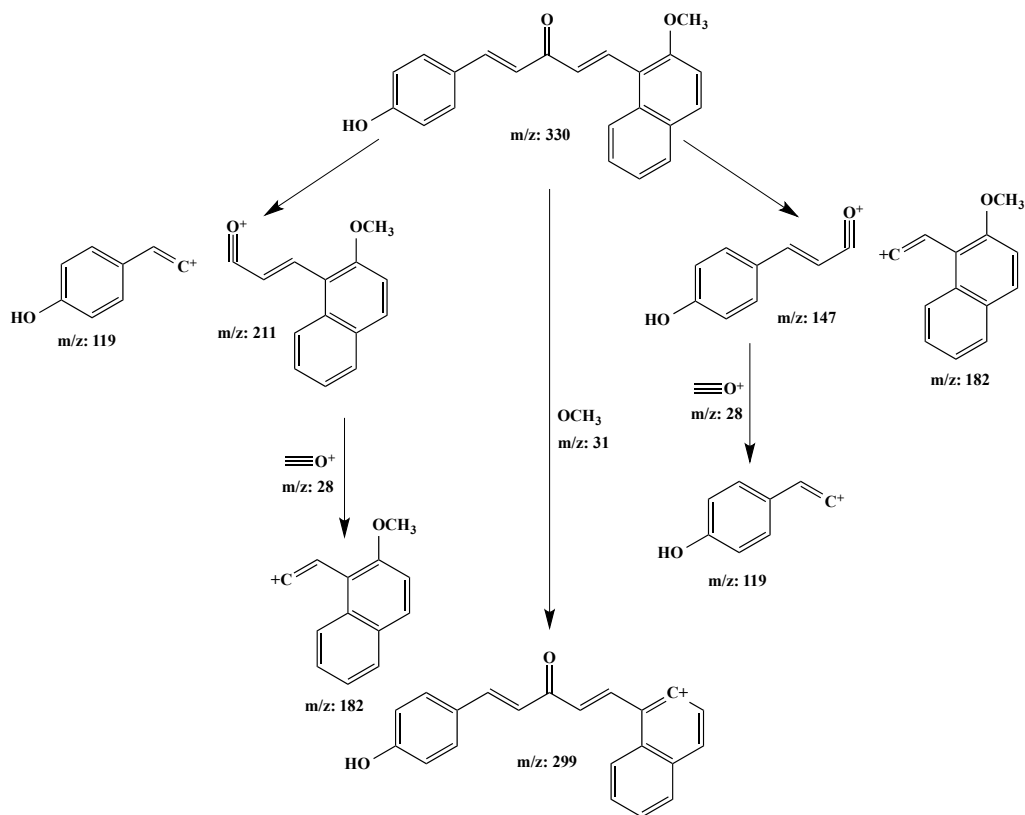


Figura 95. Patrón de fragmentación de la di-chalcona **61**.

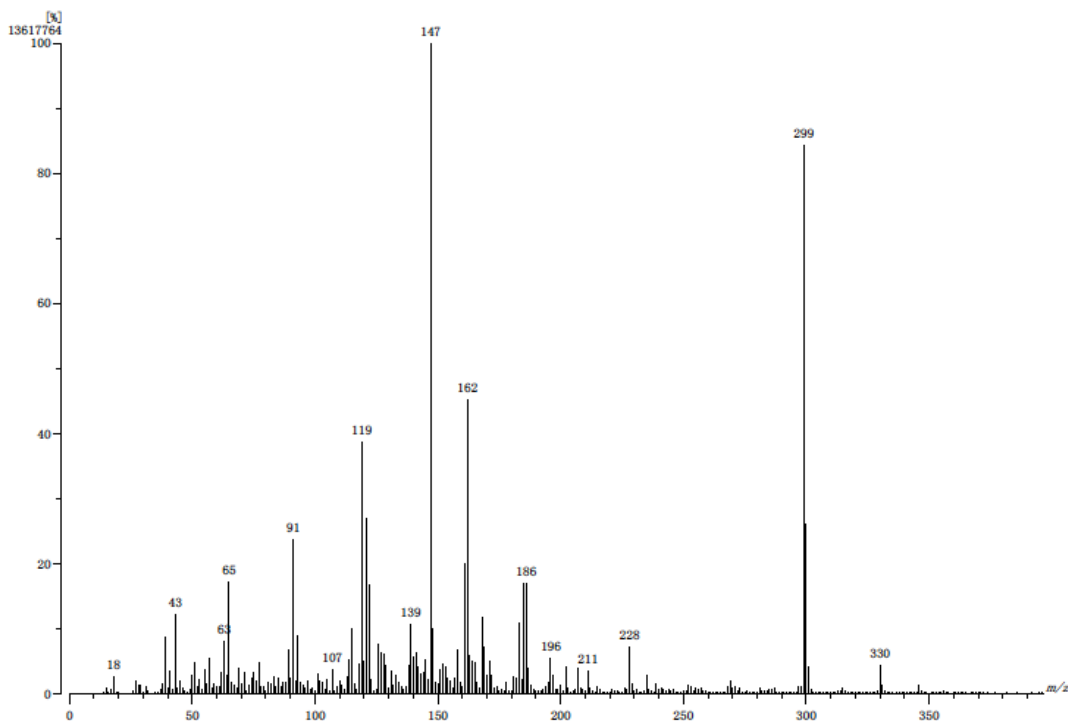


Figura 96. Espectro de Masas de la di-chalcona **61**.

8.27 Características espectroscópicas (RMN ^1H) de curcuminoides bencilados.

Los compuestos tipo heptanoides derivados del núcleo principal de curcumina, pueden presentar en la RMN de hidrógeno las señales características de un curcuminoide enolizado ya que la cadena carbonada del heptanoide generalmente está en equilibrio ceto-enol, por lo que se esperan dos señales; una señal para el metino central y una señal que corresponde al protón enolizado (muy desplazada, entre 16 ppm a 18 ppm). Los compuestos **63** (curcuminoide mono-bencilado, Figuras 97 y 98), **64** (di-bencilado, Figuras 99 y 100) y **65** (tri-bencilado, Figuras 101 y 102) presentan las señales que corresponden al isómero enolizado, por otro lado el compuesto **66** (curcuminoide tetra-bencilado, Figuras 103 y 104) presenta el isómero di-ceto. La diferencia entre los cuatro curcuminoides bencilados será la presencia gradual de dos protones correspondientes al metileno, de cada grupo bencilo adicionado a la curcumina.

La asignación total de los protones para los compuestos mono (compuesto **63**) y tri-bencilado (compuesto **65**) se complica en la región aromática debido a la no equivalencia que presentan los protones de los anillos, mientras que para los curcuminoides di (compuesto **64**) y tetra-bencilados (compuesto **66**) los anillos aromáticos se presentan de forma equivalentes y sus espectros son de asignación más simple.

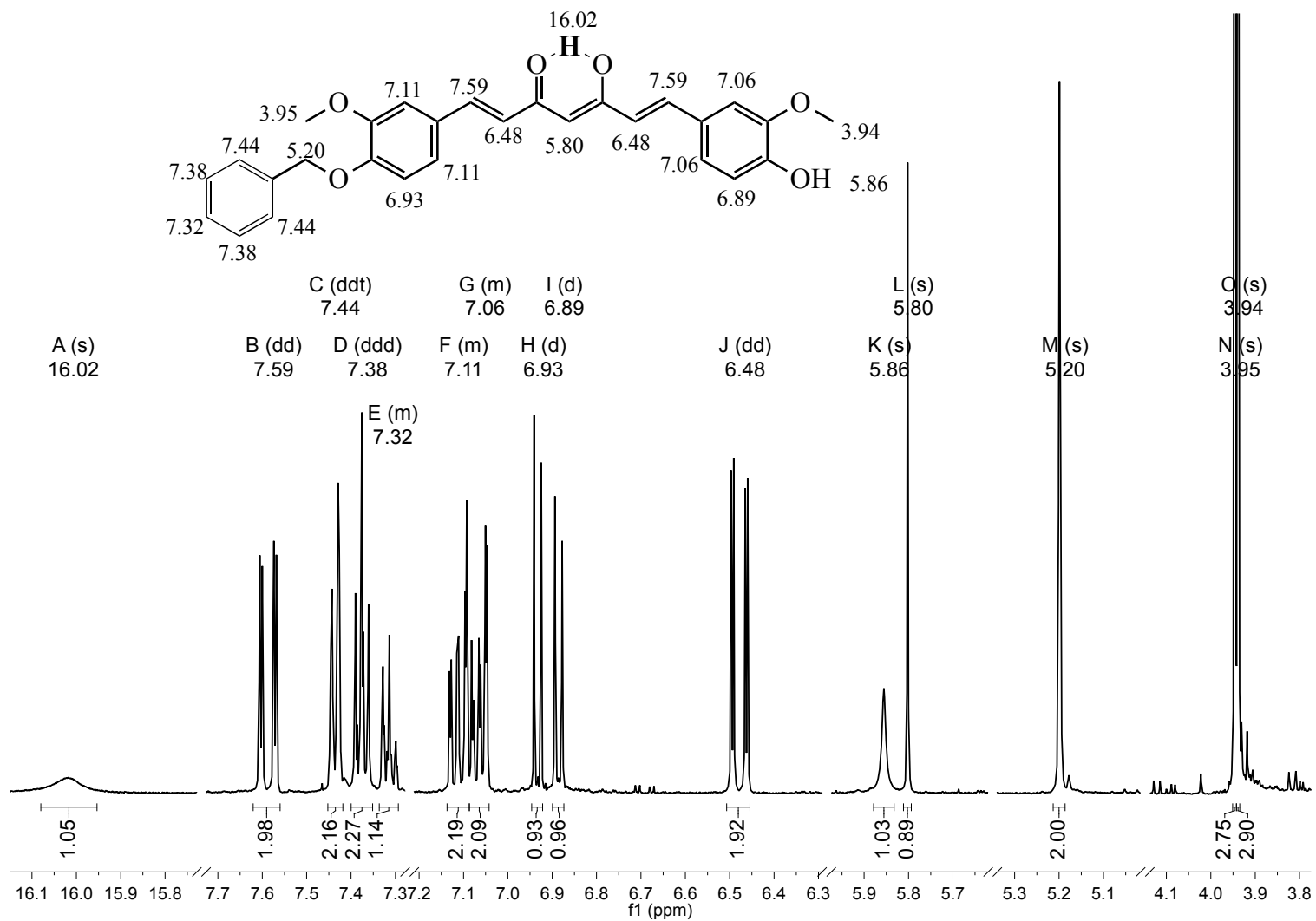


Figura 97. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **63** (500 MHz, CDCl_3).

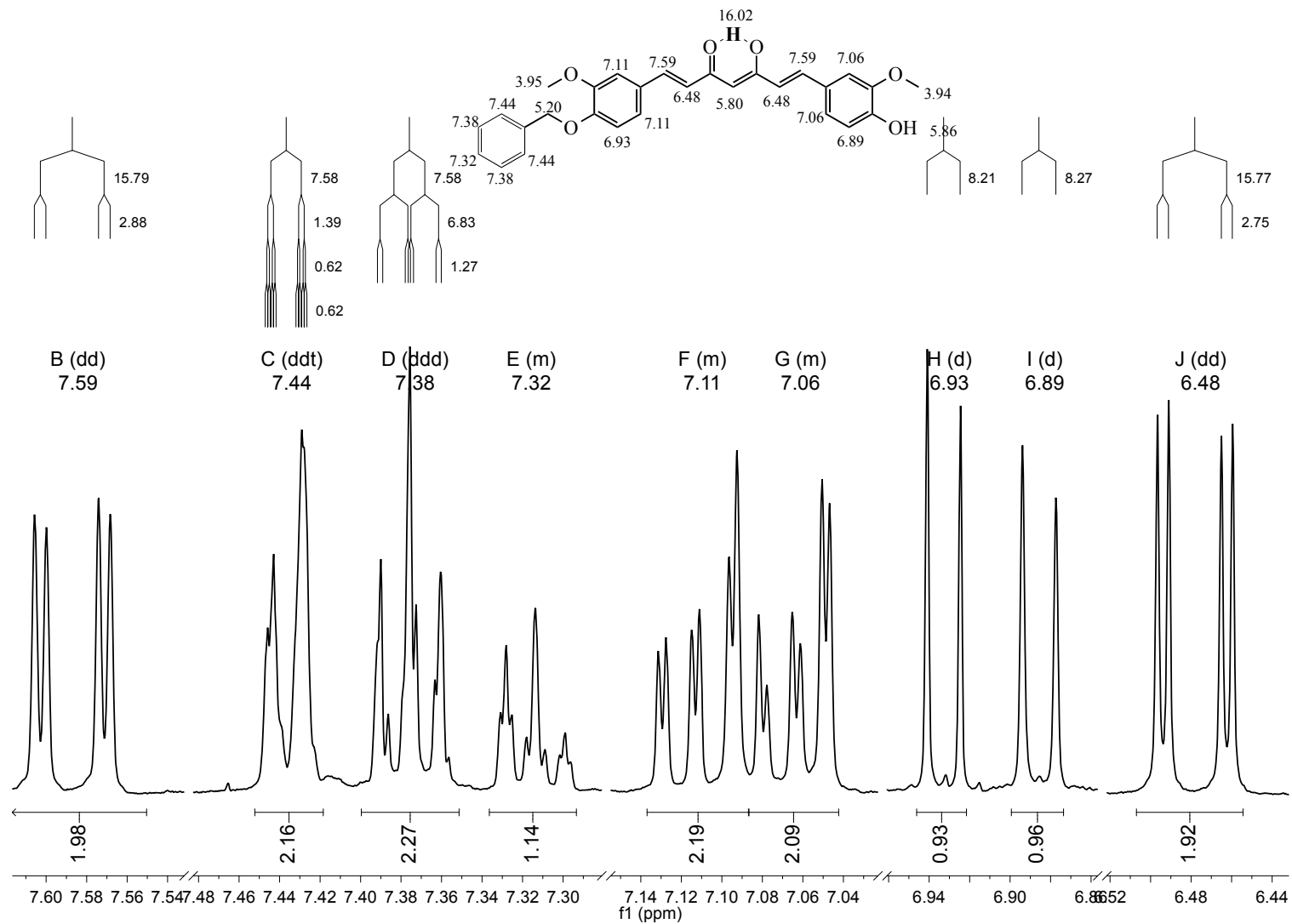


Figura 98. Expansión del espectro de RMN de ¹H del compuesto **63** (500 MHz, CDCl₃).

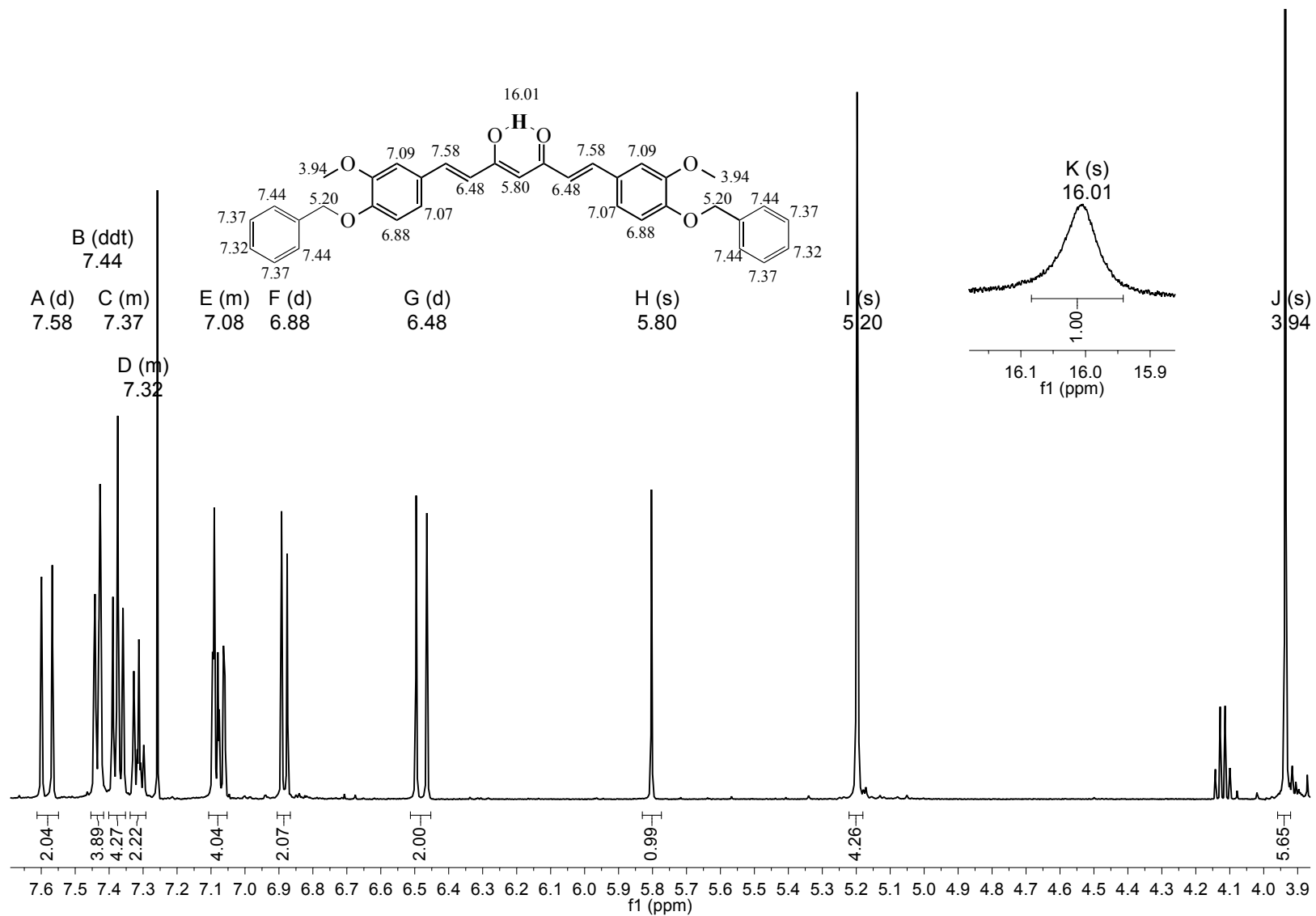


Figura 99. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **64** (500 MHz, CDCl_3).

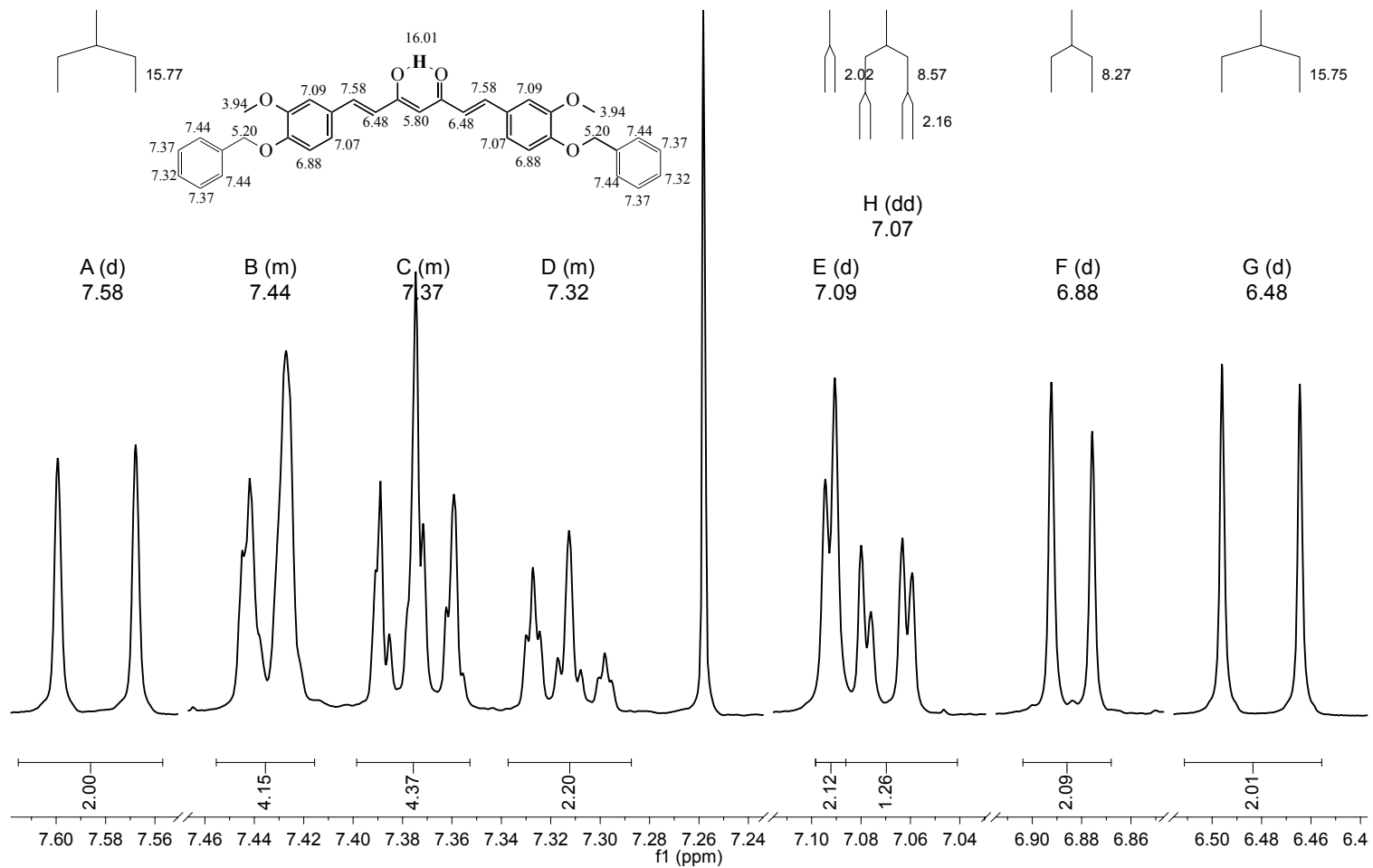


Figura 100. Expansión del espectro de RMN de ¹H del compuesto **64** (500 MHz, CDCl₃).

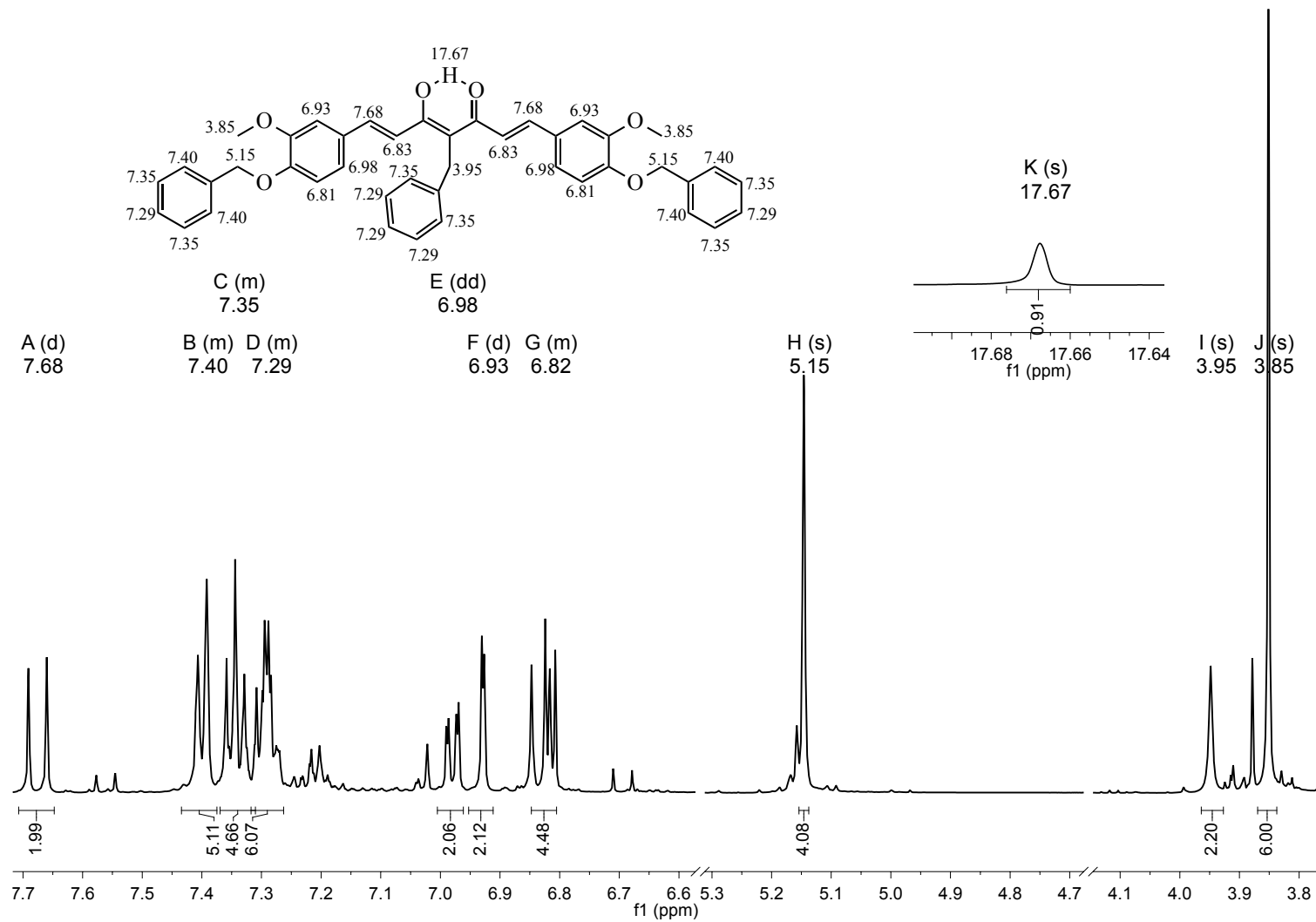


Figura 101. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **65** (500 MHz, CDCl_3).

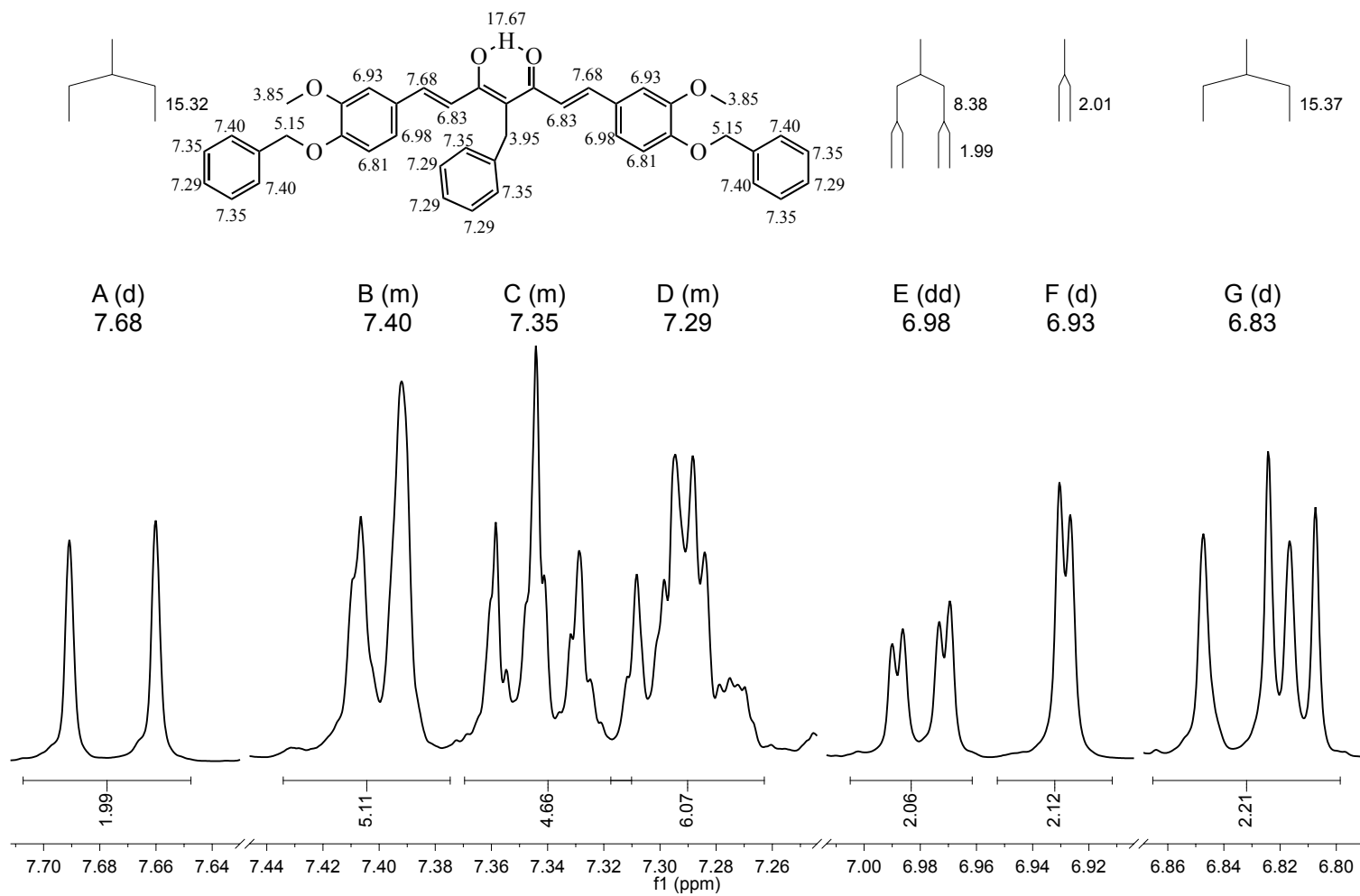


Figura 102. Expansión del espectro de RMN de ¹H del compuesto **65** (500 MHz, CDCl₃).

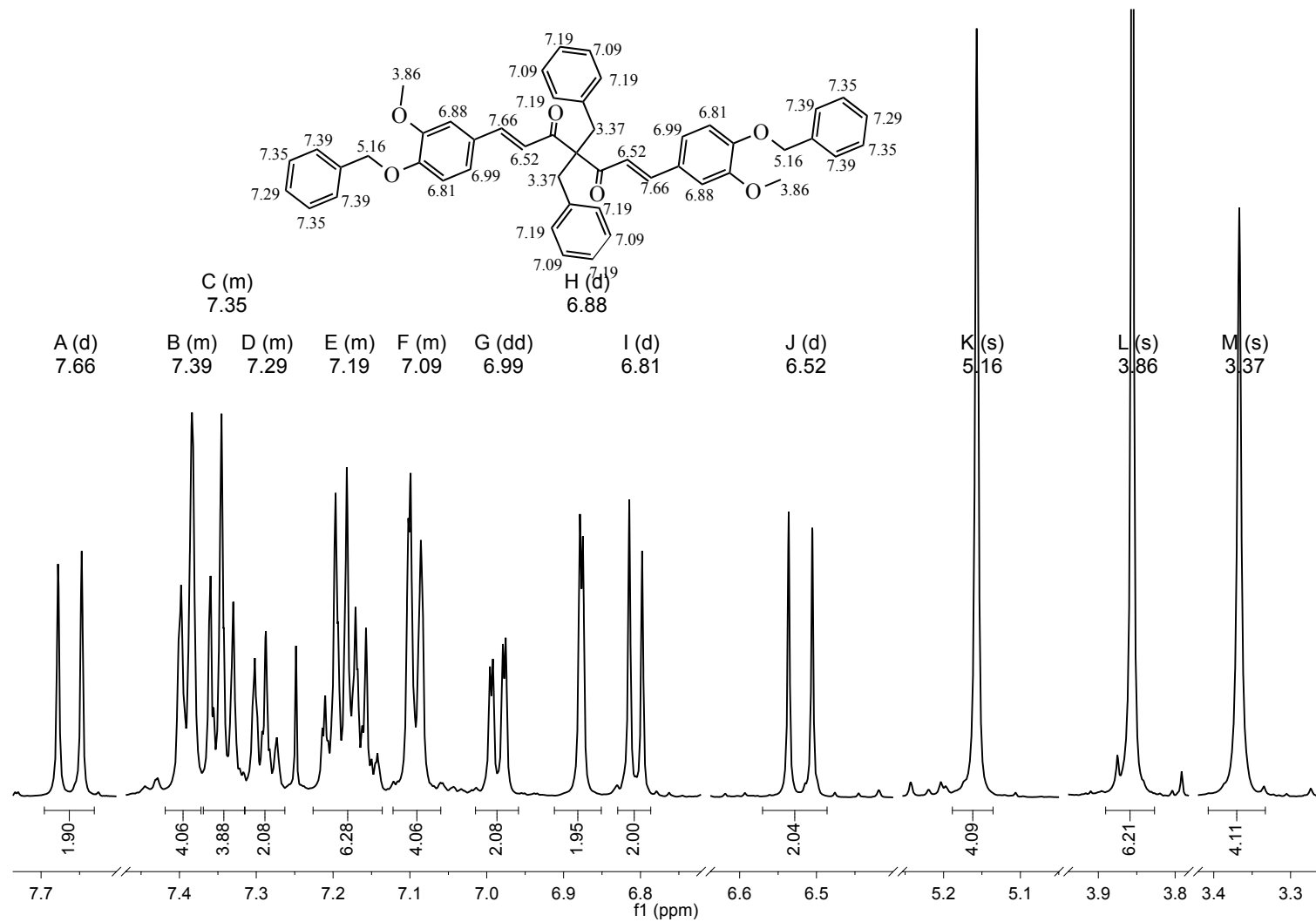


Figura 103. Espectro de RMN de ¹H del compuesto **66** (500 MHz, CDCl₃).

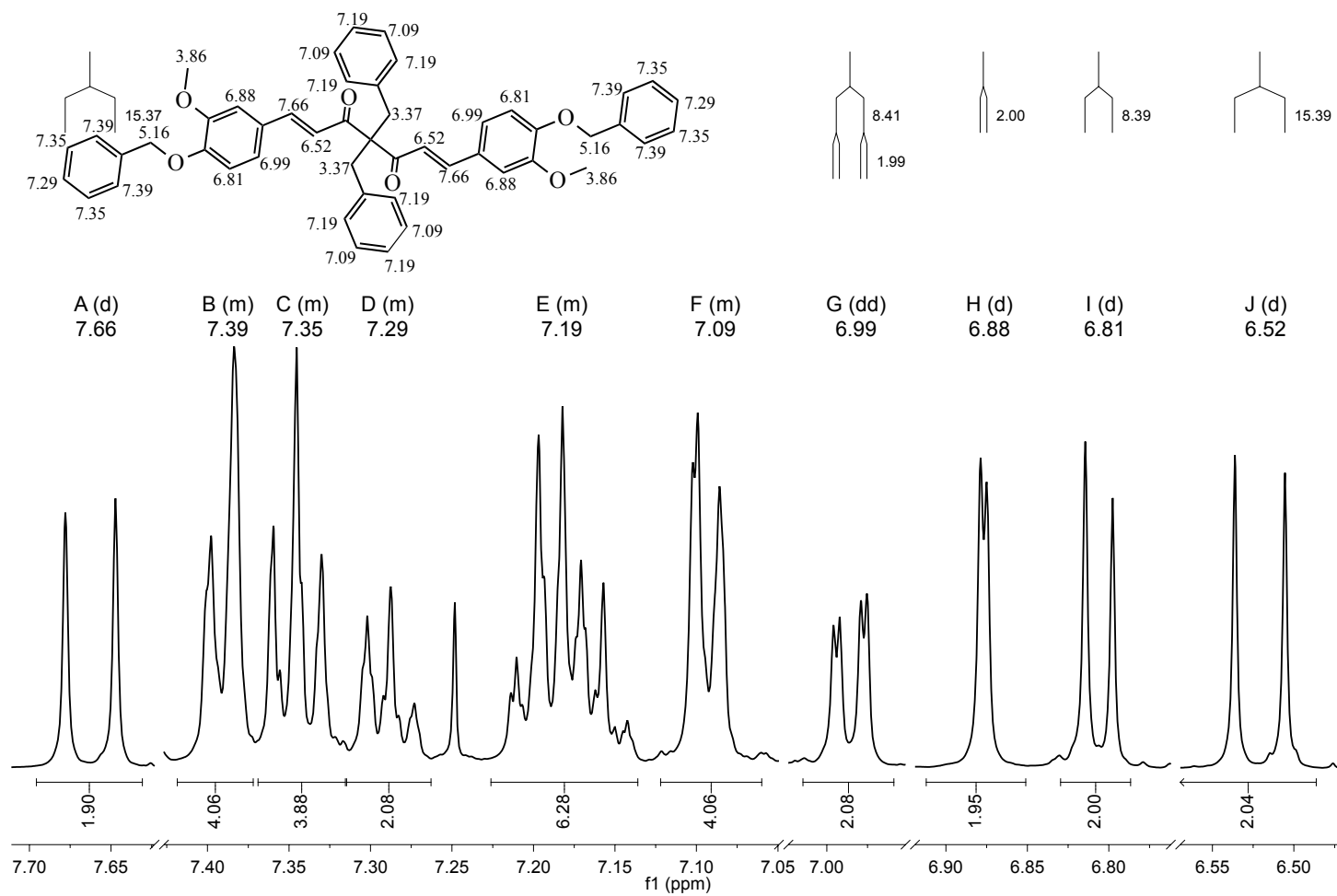


Figura 104. Expansión del espectro de RMN de ¹H del compuesto **66** (500 MHz, CDCl₃).

8.28 Análisis de IR de curcuminoides bencilados.

El espectro de IR del compuesto **63** (curcuminoide mono-bencilado) muestra la presencia de una banda ancha en 3513 cm^{-1} que es originada por el estiramiento del enlace O-H debido a la presencia de un fenol. Los sobretonos en 3013 cm^{-1} son originados por los estiramientos del enlace C-H debido a la presencia de los anillos aromáticos. Se observa una banda de intensidad media en 1624 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de estiramiento de los anillos aromáticos [95]. El espectro de IR posee dos bandas en 1583 cm^{-1} originadas por los estiramientos del enlace -C=C- y en 1507 cm^{-1} originada por los estiramientos de la cetona. El grupo bencilo se identifica por la señal de alta intensidad en 1127 cm^{-1} que corresponde a la vibración del enlace -C-O-C- [96]. El espectro de IR del curcuminoide **63** se encuentra en la Figura 105.

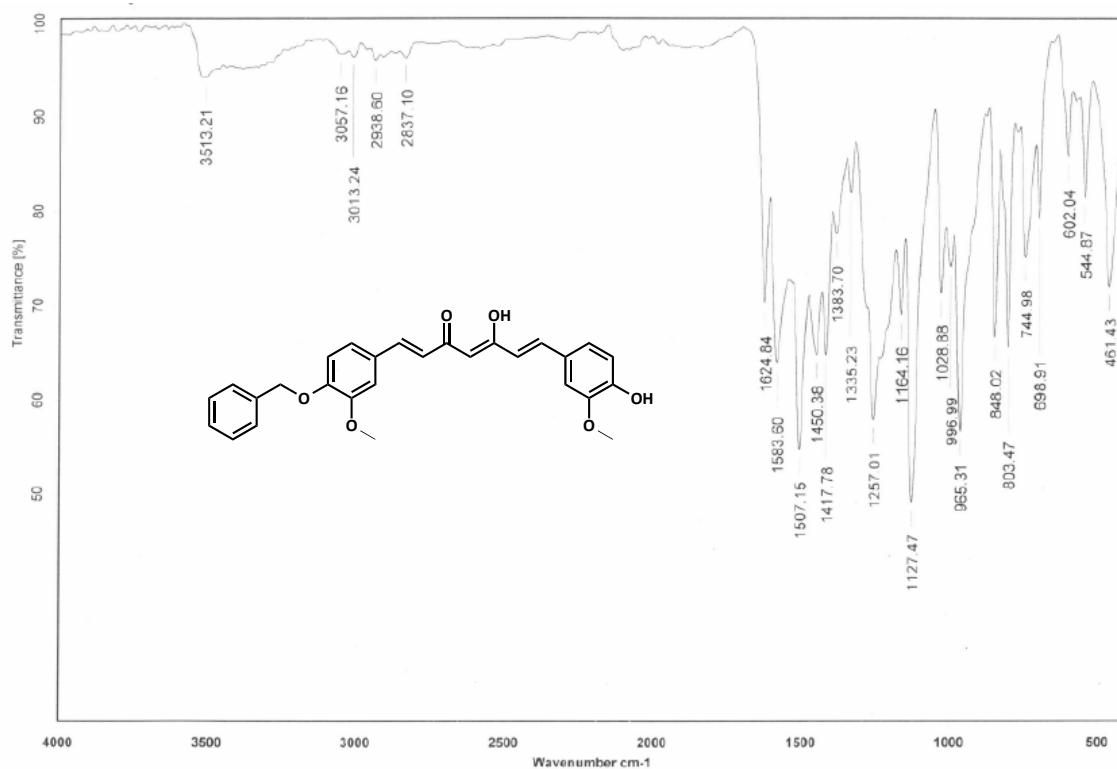


Figura 105. Espectro de IR del compuesto **63**.

El espectro de IR del compuesto **64** (curcuminoide di-bencilado) muestra sobretonos en 3042 cm^{-1} que corresponden a los estiramientos del enlace -C-H

originados por los anillos aromáticos. La presencia de dos bandas en 1733 cm^{-1} y 1625 cm^{-1} se origina por los estiramientos de los anillos aromáticos. Se observan dos bandas intensas en 1579 cm^{-1} (originadas por los estiramientos del enlace -C=C-) y en 1508 cm^{-1} originada por los estiramientos de los carbonilos (C=O). Finalmente los grupos bencilo se identifican por la presencia de dos señales en 1248 cm^{-1} y 1129 cm^{-1} originadas por las vibraciones de estiramientos del enlace C-O-C . El espectro de IR del curcuminoide **64** se encuentra en la Figura 106.

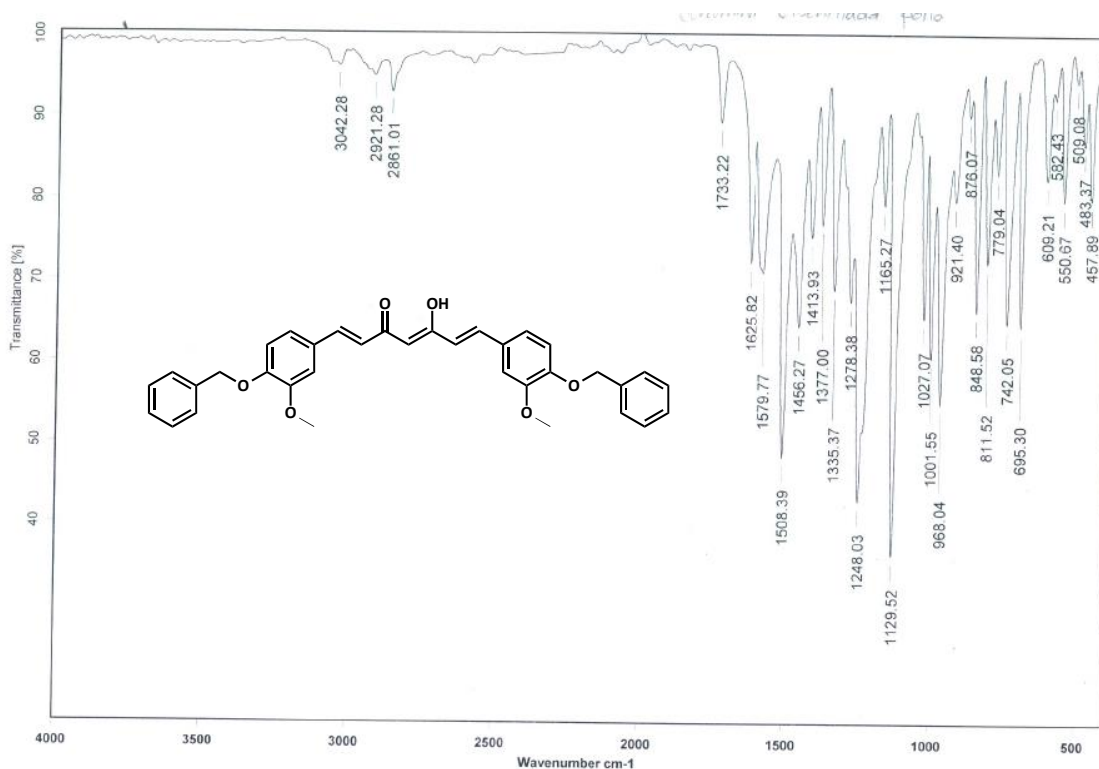


Figura 106. Espectro de IR del compuesto **64**.

El espectro IR del compuesto **65** (curcuminoide tribencilado) muestra la presencia de sobretonos en 3025 cm^{-1} y se debe a los estiramientos del enlace C-H originados por la presencia de los anillos aromáticos. Este curcuminoide presenta una señal ancha en 3424 cm^{-1} originada por los estiramientos del enlace O-H , indicando la enolización y coincide con su espectro de hidrógeno de RMN. Se observan dos bandas en 1735 cm^{-1} y 1617 cm^{-1} debido a los estiramientos de los anillos aromáticos. Las señales intensas que se presentan en 1589 cm^{-1} y 1509 cm^{-1} se originan por los

estiramientos del enlace $-C=C-$ y el estiramiento del carbonilo ($C=O$, cetona conjugada) respectivamente. Los grupos bencilo se identifican por la presencia de dos bandas en 1260 cm^{-1} y 1134 cm^{-1} que corresponden a las vibraciones del enlace $C-O-C$. El espectro de IR del curcuminoide **65** se encuentra en la Figura 107.

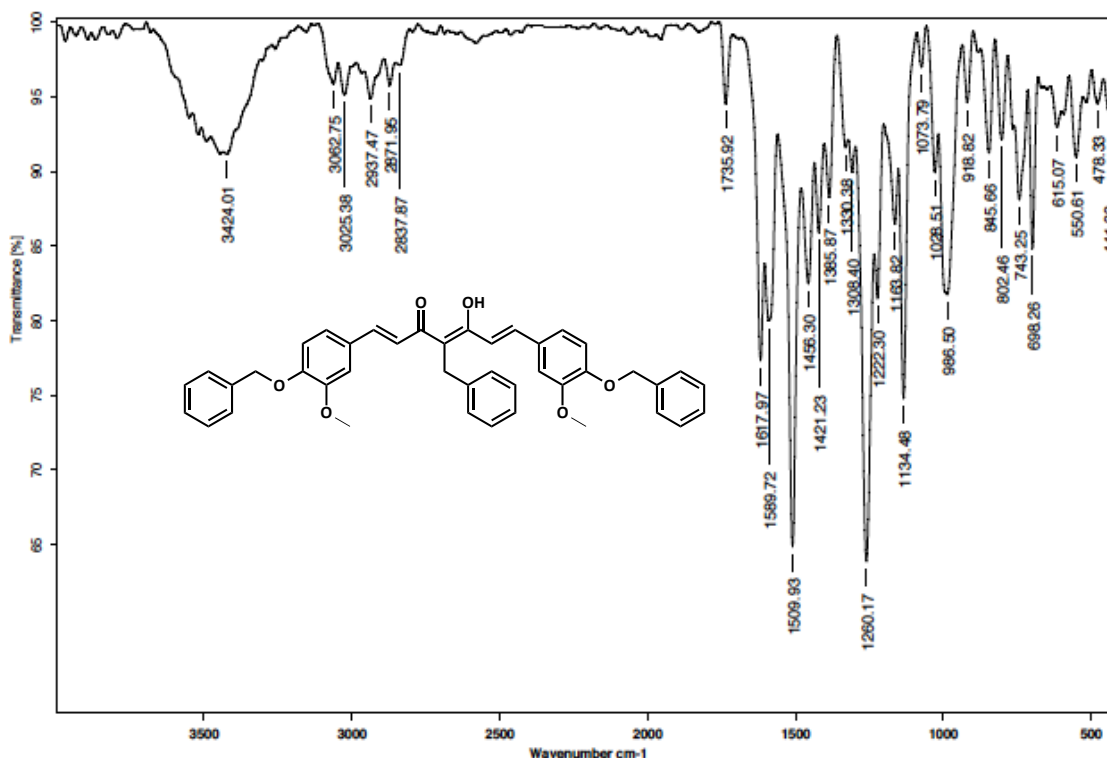


Figura 107. Espectro de IR del compuesto **65**.

El espectro de IR del compuesto **66** (curcuminoide tetra-bencilado) muestra la presencia de sobretonos en 3029 cm^{-1} debido a los estiramientos del enlace $C-H$ originados por la presencia de los anillos aromáticos. Se observa una banda de mediana intensidad en 1664 cm^{-1} debido los estiramientos de los anillos aromáticos. Se observan señales características en 1583 cm^{-1} (originadas por los estiramientos del enlace $-C=C-$) y en 1505 cm^{-1} , por los estiramientos de los carbonilos de las cetonas ($C=O$). Los grupos bencilo se identifican por la presencia de dos bandas en 1253 cm^{-1} y 1132 cm^{-1} que corresponden a las vibraciones del enlace $C-O-C$. El espectro de IR del curcuminoide **66** se encuentra en la Figura 108.

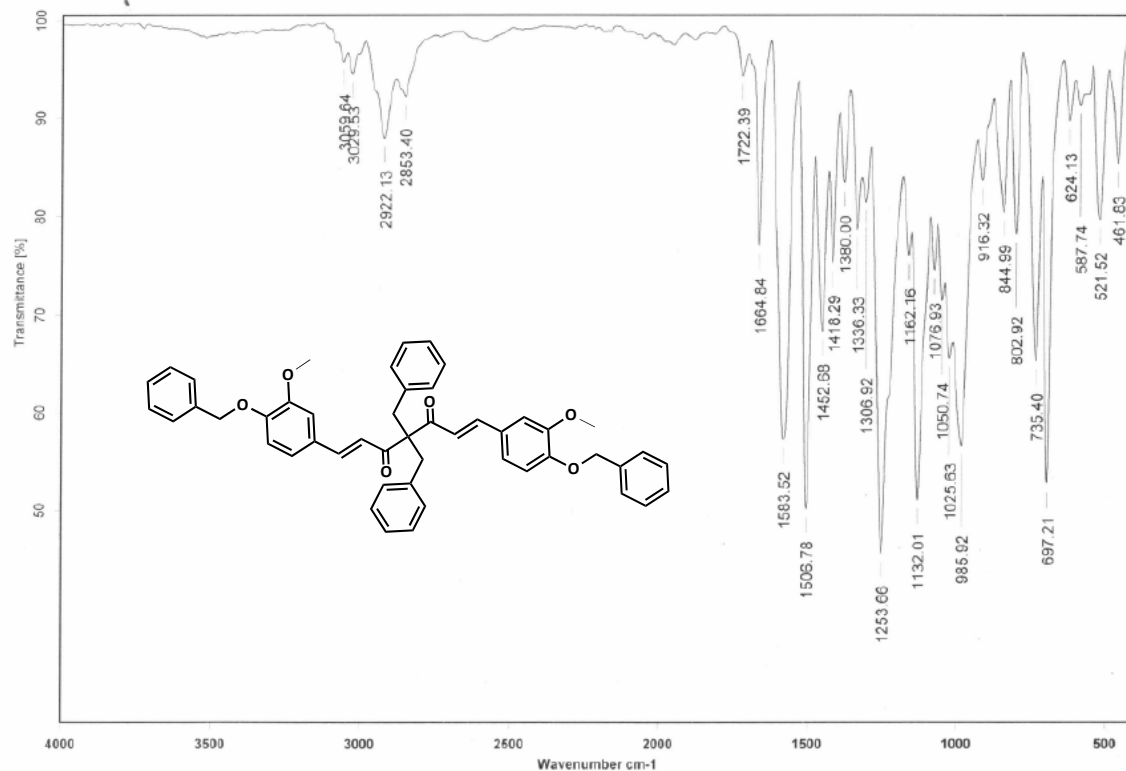


Figura 108 . Espectro de IR del compuesto **66**.

8.29 Espectrometría de masas de los curcuminoides bencilados.

El curcuminoides **63** presenta un pico base con m/z en $[459^+]$ que corresponde adecuadamente al ion molecular protonado $[M^+H^+]$, posteriormente se observa la fragmentación de las posiciones α al carbonilo de la cetona en (Figura 109) observándose picos con relaciones m/z correspondientes a $[311^+]$, $[283^+]$, $[267^+]$, $[191^+]$, $[177^+]$ y $[150^+]$. El espectro de masas del compuesto **63** se muestra en la Figura 110.

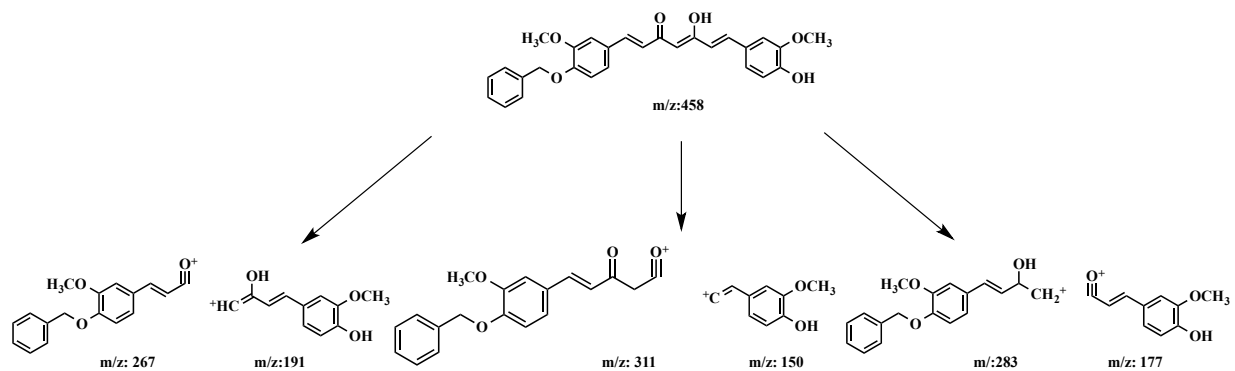


Figura 109. Patrón de fragmentación del curcuminoid **63**.

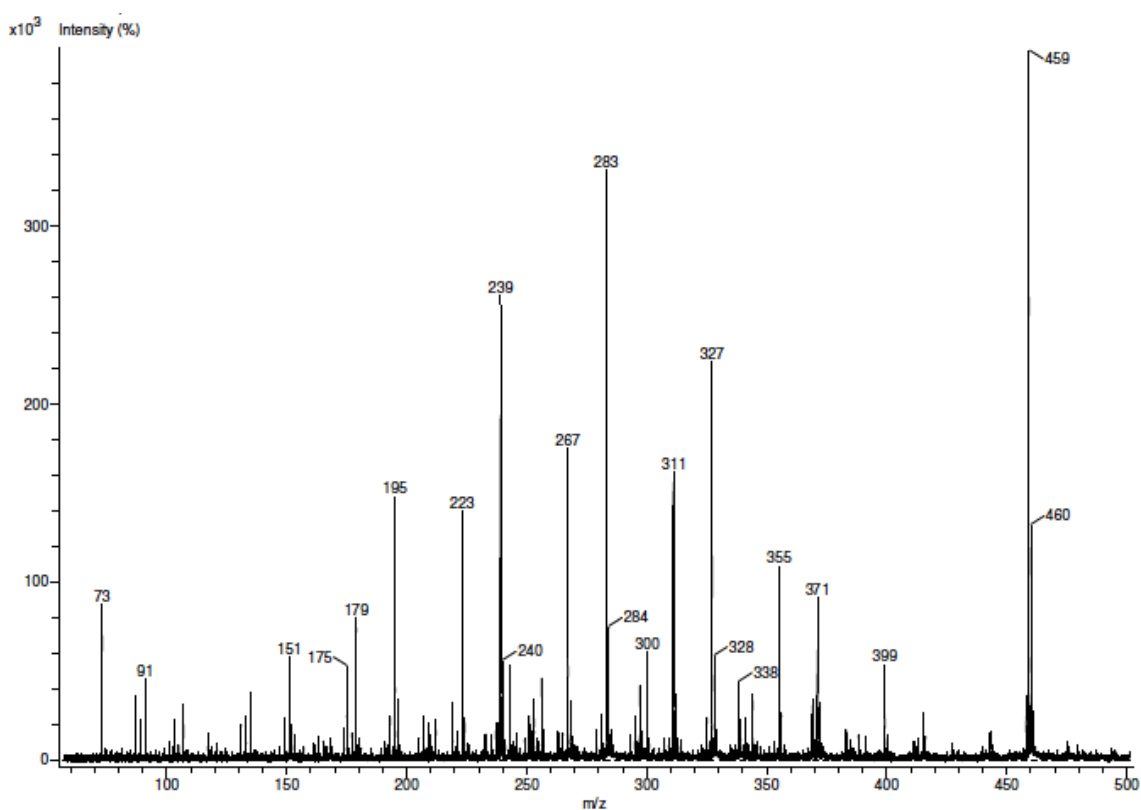


Figura 110. Espectro de masas del curcuminoid **63**.

El curcuminoid **64** presenta un pico base con relación $m/z = [548]^+$ que corresponde adecuadamente al ion molecular protonado $[M^+H^+]$, además se observan dos picos característicos correspondientes a la fragmentación del carbonilo de las cetonas en las posiciones α (Figura 111) con relaciones $m/z = [283]^+$ y $[243]^+$. El espectro de masas del compuesto **64** se muestra en la Figura 112.

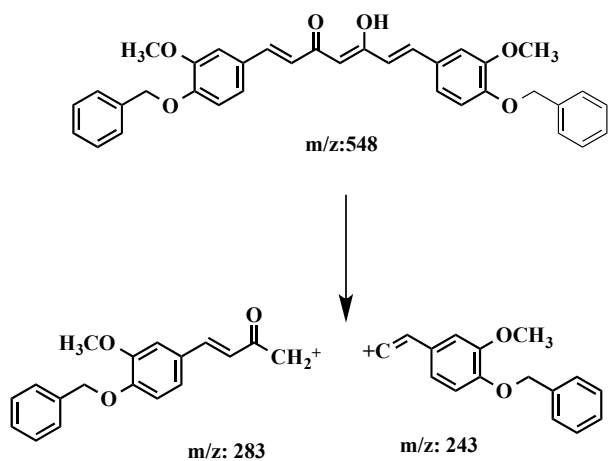


Figura 111. Patrón de fragmentación del curcuminoide **64**.

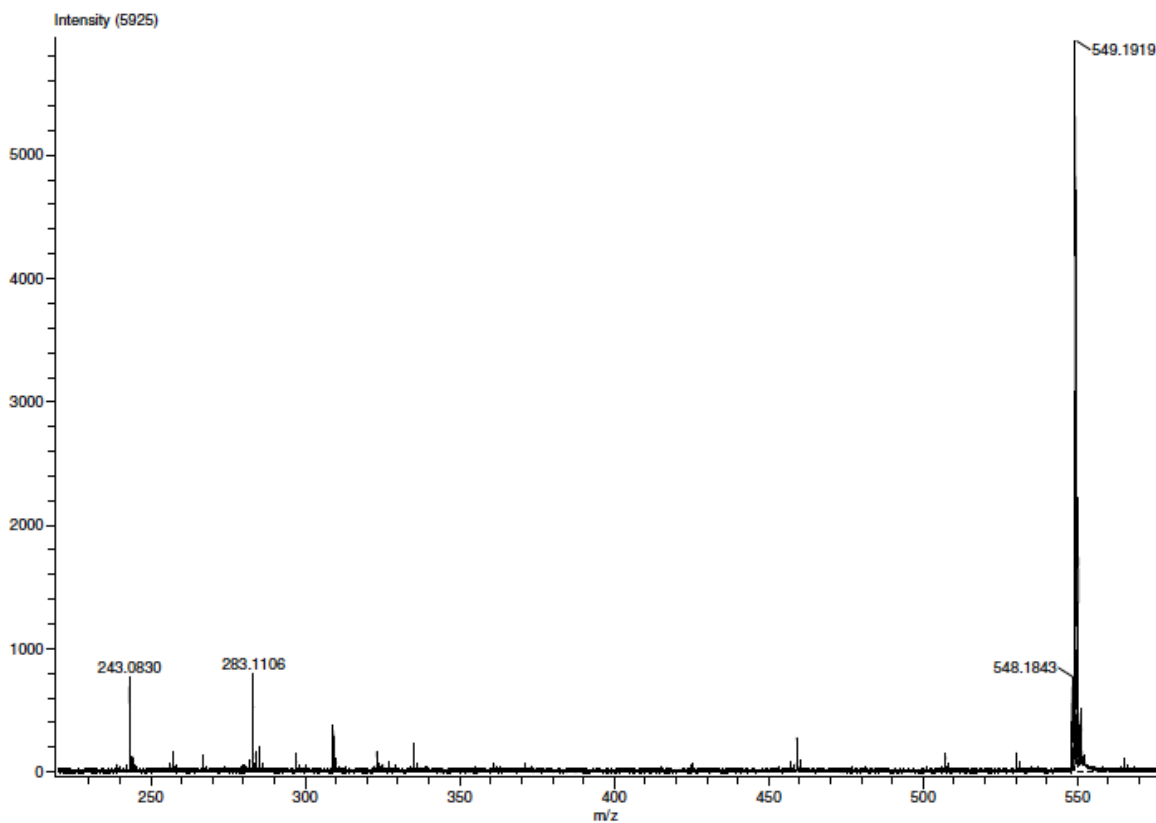


Figura 112. Espectro de masas del curcuminoide **64**.

El curcuminoide **65** (compuesto tri-bencilado) presenta un pico base con relación m/z en $[91^+]$, por lo que experimenta una fragmentación con pérdidas constantes del

ion tropilio (Figura 113) mostrando el pico del resto molecular resultante con relación m/z en $[547^+]$. Posteriormente se forman dos iones característicos que corresponden a las fragmentaciones de los carbonilos en las posiciones α con relaciones $m/z = [267^+]$ y $[177^+]$. El pico con relación m/z en $[638^+]$ corresponde adecuadamente al ion molecular protonado $[M^+H^+]$ del compuesto **65** y su espectro de masas se muestra en la Figura 114.

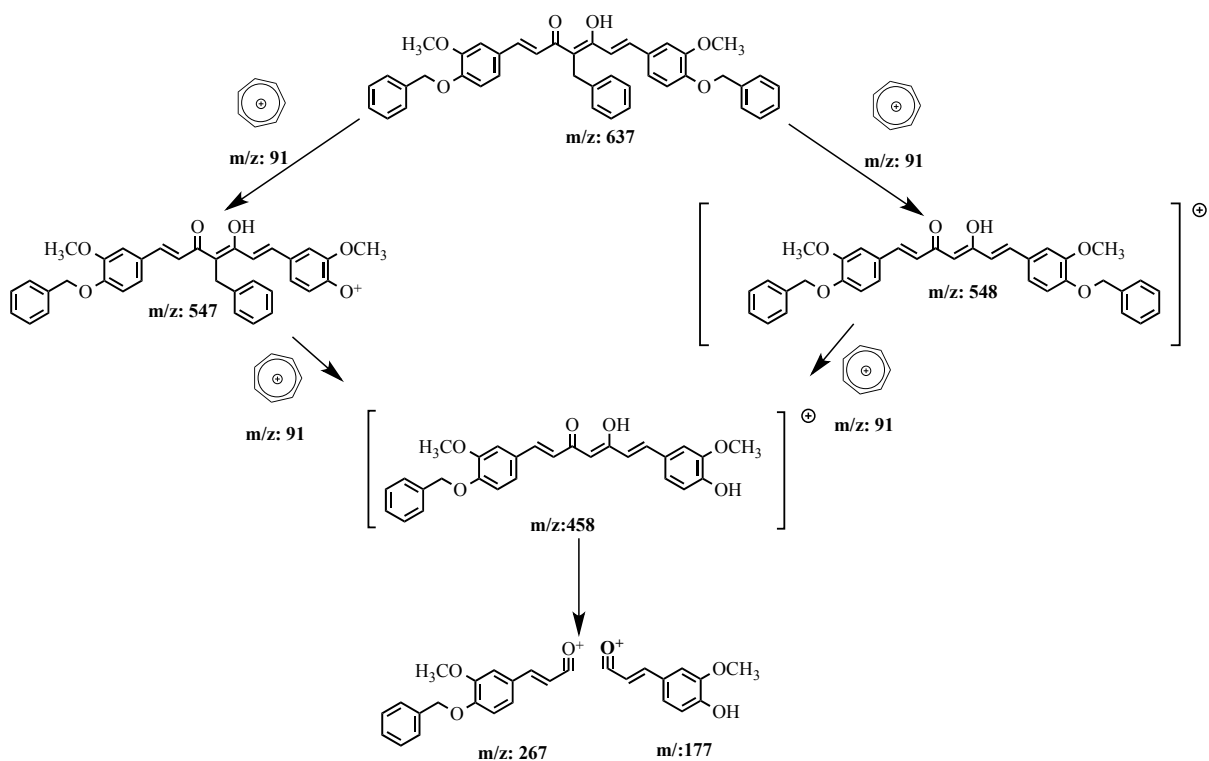


Figura 113. Patrón de fragmentación del curcuminoide **65**.

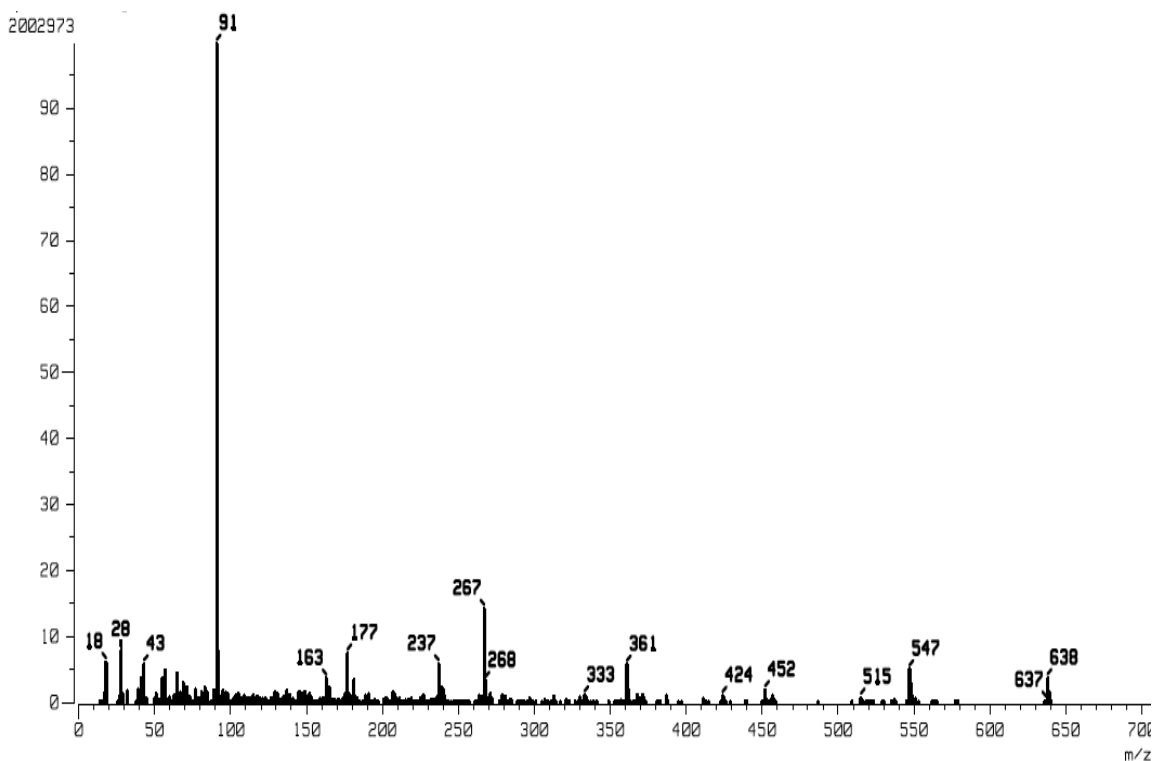


Figura 114. Espectro de masas del curcuminoide **65**.

El curcuminoide **66** (compuesto tetra-bencilado) presenta un pico base con relación $m/z = [91^+]$ correspondiente a la fragmentación del ion tropilio (Figura 115), además se encuentran los picos correspondientes de dicha pérdida con relaciones $m/z = [637^+]$ y $[547^+]$. Se observa un pico característicos que corresponde a la fragmentación del carbonilo de la cetona en la posición α con $m/z = [267^+]$. El pico del compuesto **66** se muestra con la relación $m/z = [728^+]$ correspondiendo adecuadamente al ion molecular protonado $[M^+H^+]$ y su espectro de masas se encuentra en la Figura 116.

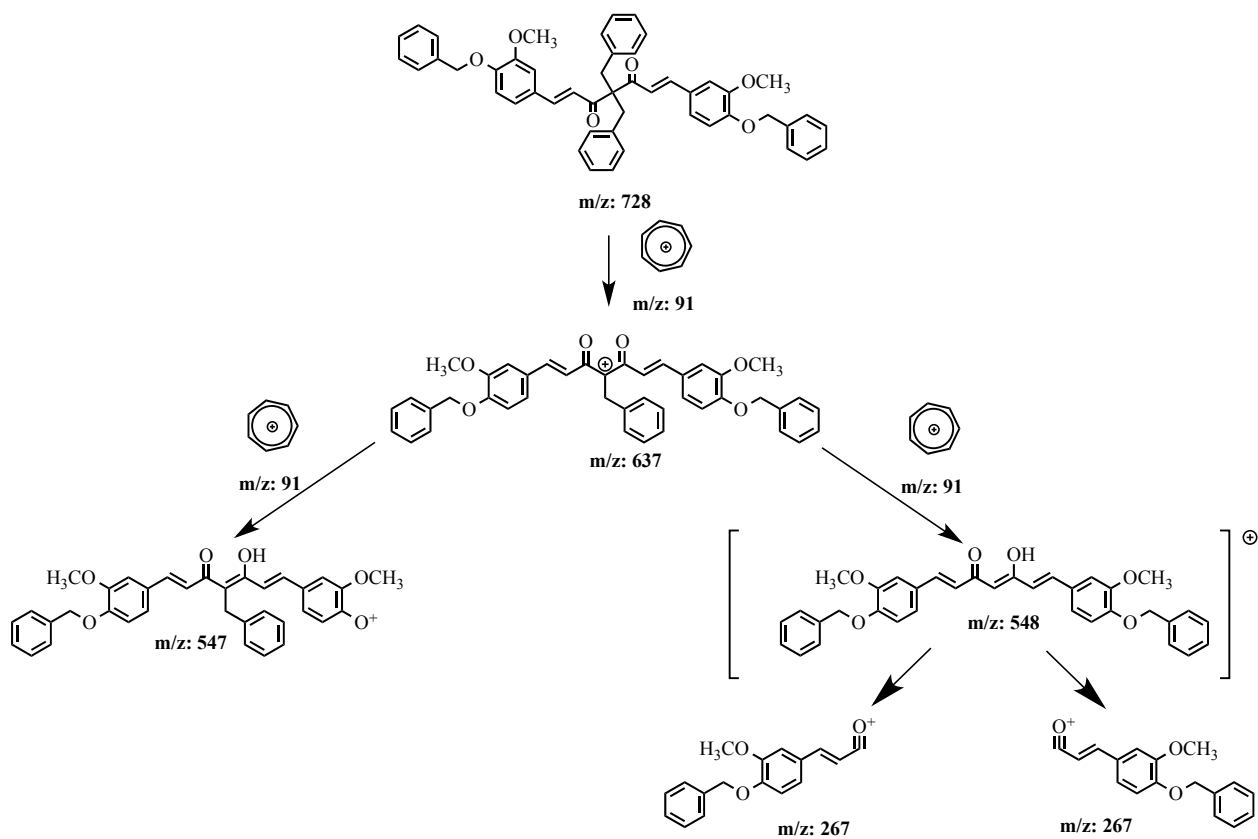


Figura 115. Patrón de fragmentación del curcuminóide 66.

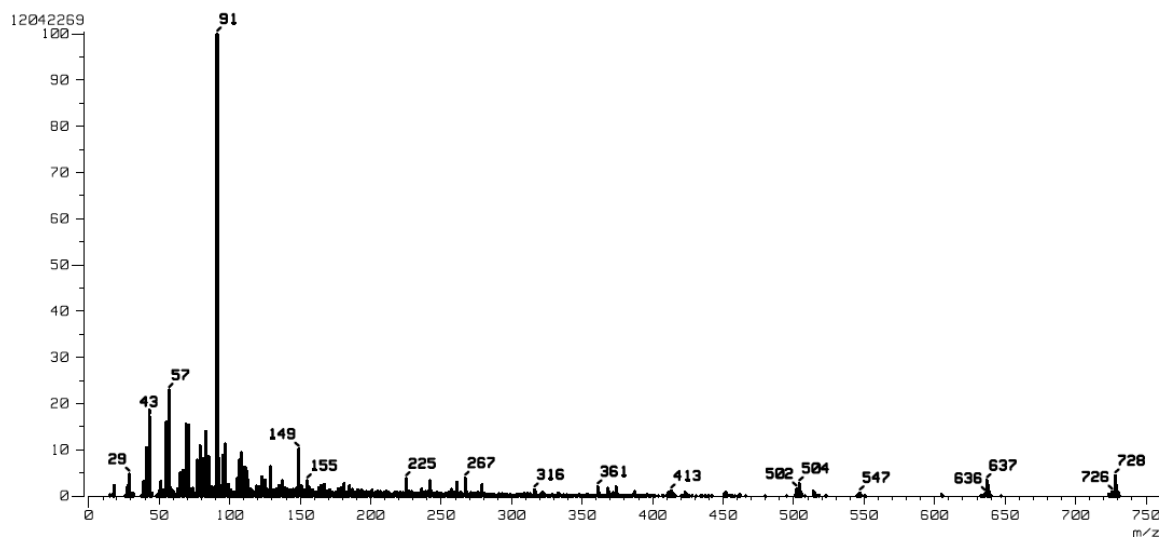
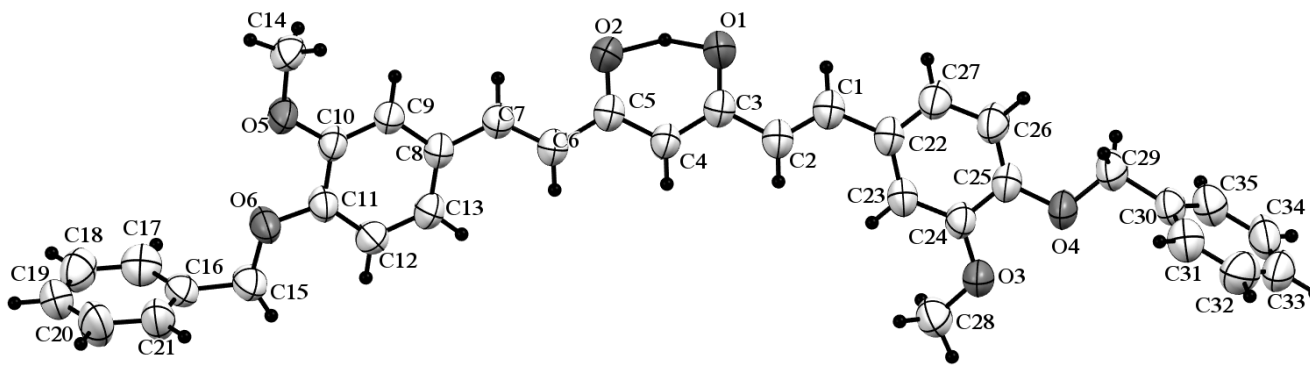


Figura 116. Espectro de masas del curcuminóide 66.

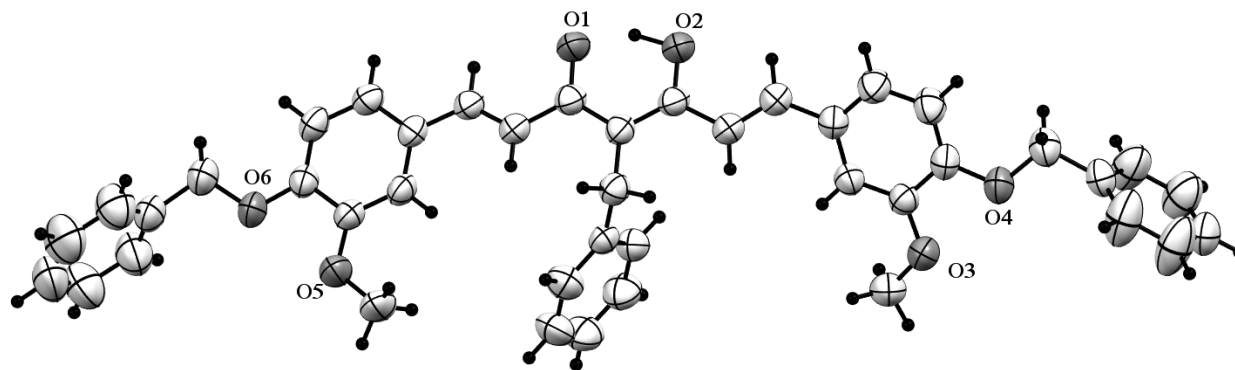
8.30 Rayos-X de curcuminoides bencilados.

El resultado de los experimentos de rayos-X presentados en la Figura 117 revela que las estructuras moleculares de los compuestos di-bencilado (**64**) y tri (**65**)-bencilado están formadas por dos anillos laterales sustituidos con benciloxi-metoxifenilo interconectados por un resto hepta-1,6-dieno-3,5-diona. El compuesto **65** presenta un bencilo adicional y está conectado al resto de la molécula en el átomo central de la cadena del heptanoide (entre el equilibrio ceto-enol). Lo anterior confirma la obtención de los derivados di y tri bencilados por rayos-X.

Los compuestos **64** y **65** mantienen enlaces de hidrógeno intramoleculares (O-H...O) que estabilizan el equilibrio ceto-enol formando anillos de seis miembros. Ambas estructuras moleculares están en acuerdo con lo experimentos de RMN de hidrógeno ya que los compuestos se encuentran como tautómeros enolizados y son estabilizados por un enlace de hidrógeno asistido por resonancia (RAHB) [97].



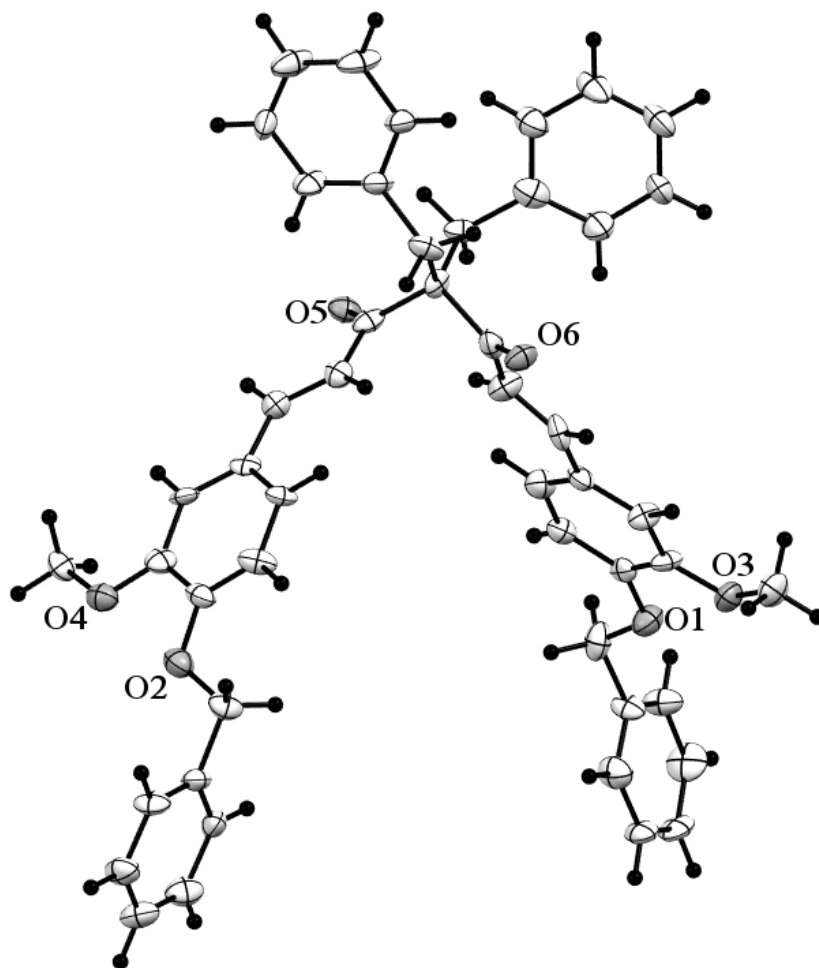
Compuesto 64



Compuesto 65

Figura 117. Rayos-X de los curcuminoides di y tri -bencilados.

La estructura del curcuminoide tetra-bencilado fue determinada usando un patrón de difracción con baja resolución. Sin embargo, la calidad de los cristales fue suficiente para determinar su estructura tridimensional con un valor de refinamiento = 12 (Figura 118). Por otro lado, este compuesto se caracterizó exitosamente mediante técnicas espectroscópicas de RMN, IR y EM. Los resultados obtenidos en difracción de rayos-X indican que los grupos carbonilos están en posiciones anti y la característica del compuesto tetra-bencilado es la ausencia de coplanaridad, lo que está en acuerdo con los hallazgos informados previamente [98,99] donde se reportan estructuras semejantes y en forma de tijeras.



Compuesto 66

Figura 118. Rayos-X del curcuminoide tetra-bencilado.

8.31 Características espectroscópicas (RMN ^1H) de bencilidenos de curcuminoides.

Los bencilidenos derivados de un curcuminoides (Compuesto **68**) produce diferencias espectroscópicas en los protones en las posiciones α , β de la cadena del heptanoide, ya que al adicionar un nuevo sustituyente voluminoso en la parte central de la molécula se produce la no equivalencia magnética, por lo que se obtendrán cuatro señales dobles (Figura 119), dos dobles para los protones α , α y dos dobles para los protones β , β .

Los desplazamientos químicos y las correlaciones de las señales del heptanoide se pueden comprobar recurriendo al experimento nOe diferencial. Por ejemplo, cuando se irradian secciones adecuadas de la molécula (Figura 120), con la señal de 7.14 ppm (protón vinílico en posición α) se obtienen las correlaciones de los protones en 7.82 ppm (posición beta β) y 7.90 ppm (singulete, posición bencílica central de un bencilideno).

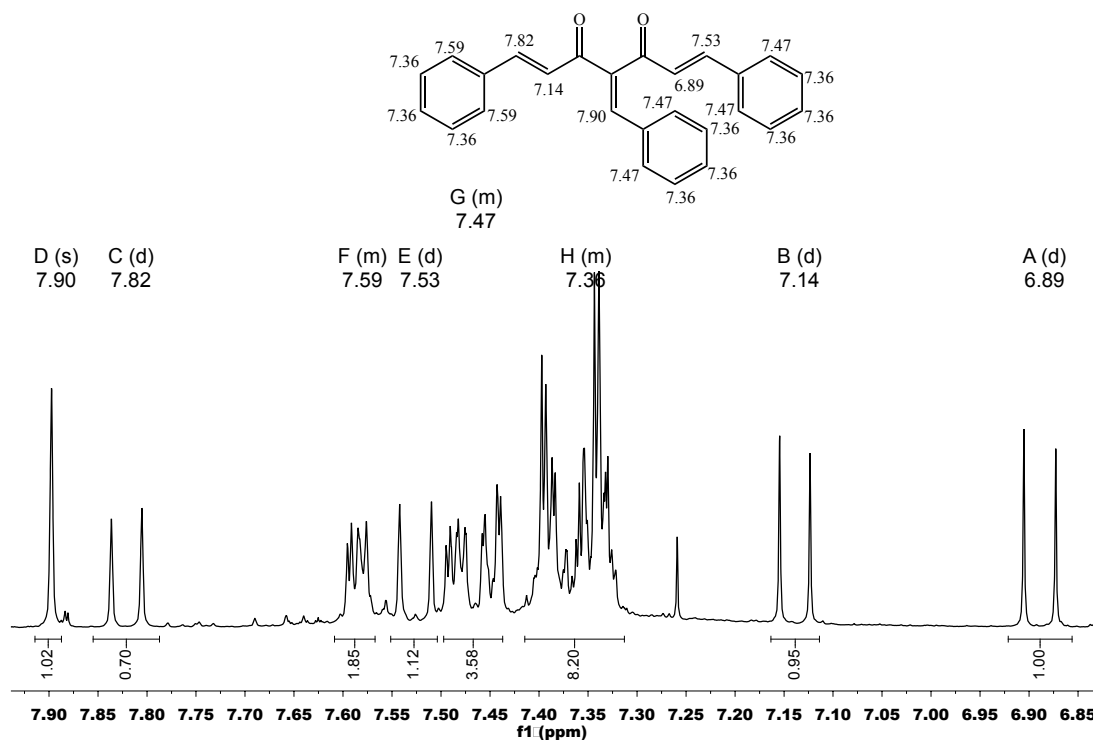


Figura 119. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **68** (500 MHz, CDCl_3).

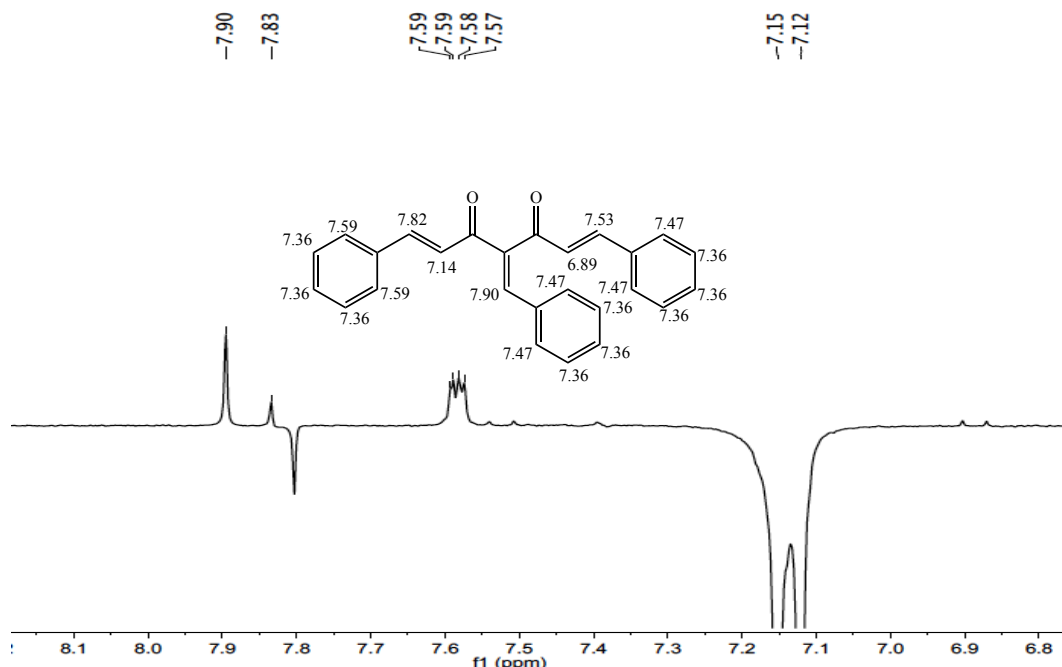


Figura 120. Experimento nOe diferencial del compuesto **68** irradiando 7.12-7.15 (500 MHz, CDCl_3).

8.32 Características espectroscópicas (RMN ^1H) de complejos de Zn y B de curcuminoides.

La formación de complejos metálicos (zinc) y no metálicos (boro) con curcuminoides afecta el desplazamiento químico de los protones ubicados en la cadena del heptanoide (sistemas α , β -insaturados), así como el desplazamiento químico del metino central.

Los desplazamientos químicos de la materia prima (**69**) y su complejo de Zn (**70**) muestran las siguientes diferencias: en el compuesto **69** los hidrógenos α , α' se encuentran en 7.02 ppm y los β , β' se encuentran en 7.68 ppm, mientras que el metino produce su señal en 6.23 ppm (ver Figura 121). El complejo de zinc (Compuesto **70**, Figura 122) muestra un efecto de protección hacia todos los hidrógenos cercanos al metal y los desplazamientos químicos de los protones α , α' se encuentran en 6.95 ppm y los protones β , β' en 7.57 ppm; el metino es observado en 5.88 ppm debido al carácter electro-positivo del zinc.

El complejo de boro (BF_2) obtenido del curcuminoide di-bencilado con $\text{Et}_2\text{O} \cdot \text{BF}_3$ (compuesto **71**, Figura 123) de manera opuesta al complejo de Zn, imparte un efecto de desprotección a los hidrógenos α , α' con desplazamientos en 7.11 ppm y β , β' en 7.97 ppm, apareciendo el metino central en 6.51 ppm. La materia prima (curcuminoide di-bencilado) tiene los hidrógenos α , α' en frecuencias menores (protegidos) en 6.48 ppm y los β , β' en 7.58 ppm, estando el metino central en 5.80 (compuesto **64**, Figura 99) ppm. Después de hacer estas comparaciones se confirma el carácter electroattractor dentro del ciclo generado por el BF_2 en el compuesto **71**.

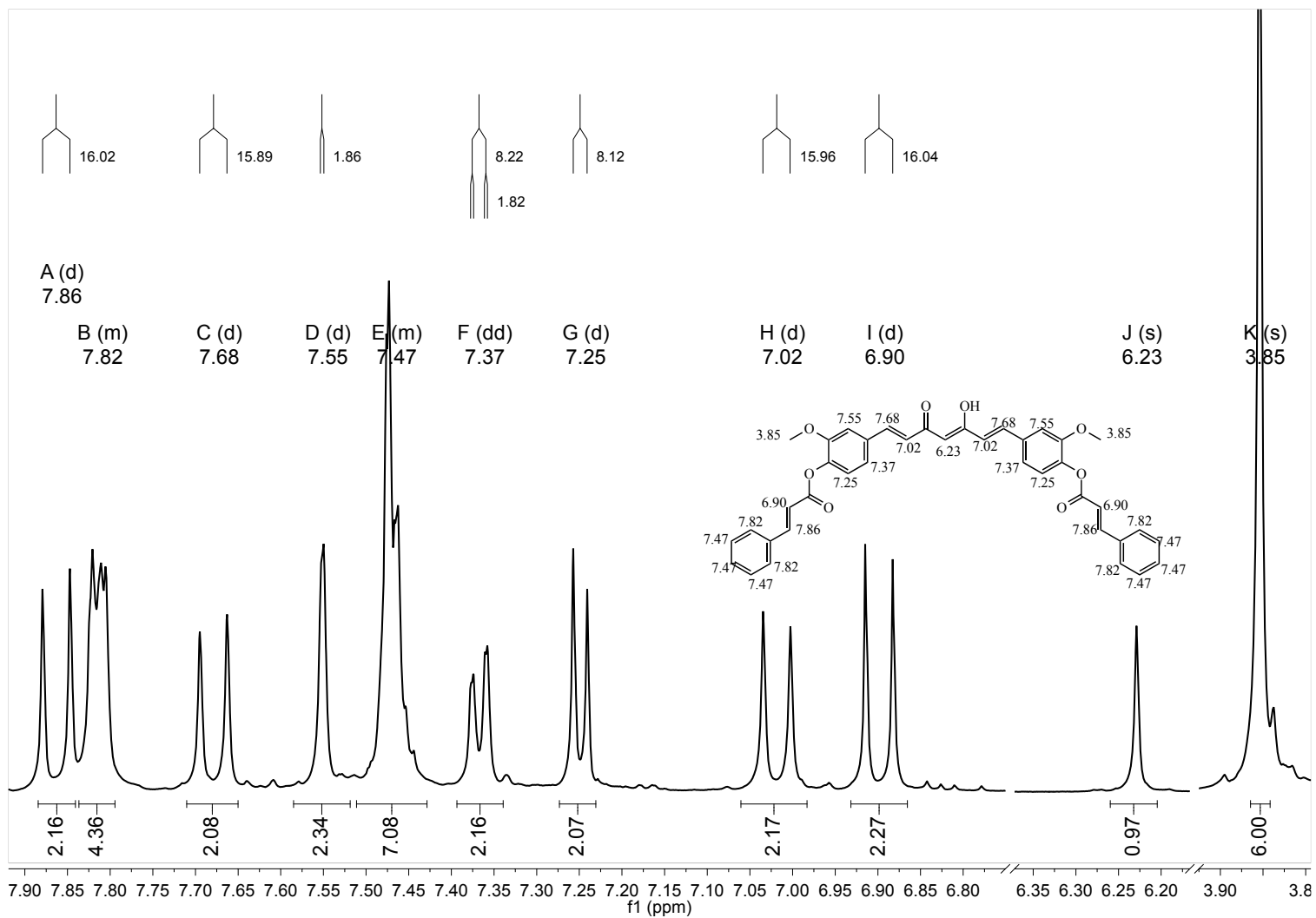


Figura 121. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **69** (500 MHz, DMSO- d_6).

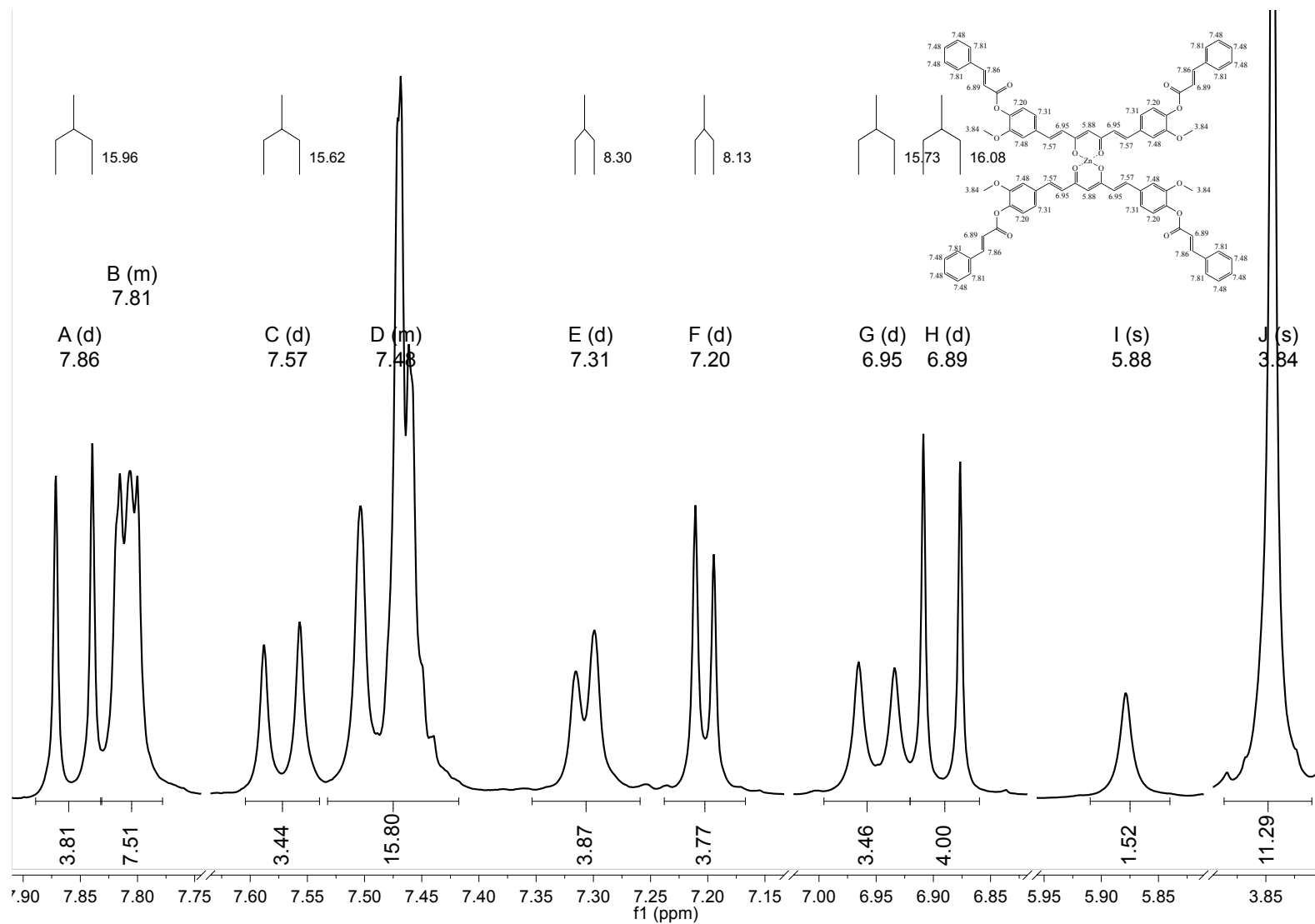


Figura 122. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **70** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

8.33 Análisis de IR del complejo con boro (compuesto 71).

El espectro IR del compuesto **71** (complejo de BF_2 curcuminoide di-bencilado, Figura 124) muestra la presencia de una señal intensa en 1526 cm^{-1} que corresponde a los estiramientos del enlace -C=C- , un carbonilo de cetona se indica con la presencia de una señal de alta intensidad en 1493 cm^{-1} y es originada por los estiramientos del enlace C=O . Además se observa la presencia de dos bandas en 1258 cm^{-1} y 1131 cm^{-1} que corresponden a las vibraciones del enlace C-O-C originadas por la presencia de los grupos bencilo. La presencia de dos bandas de absorción intensas en 1058 cm^{-1} y 1131 cm^{-1} son originadas por los enlaces BF y BO en el anillo del difluoroboronato [100].

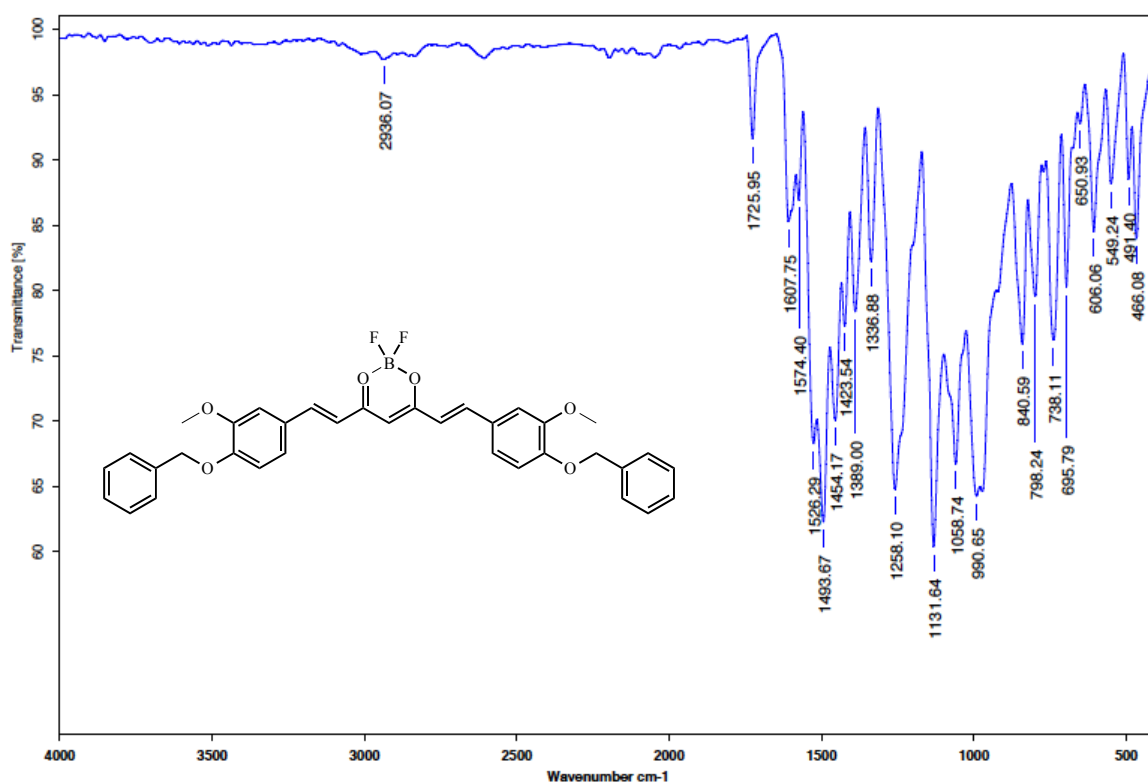


Figura 124. Espectro de IR del compuesto 71.

8.34 Espectrometría de masas del complejo de curcumina di-bencilada con BF_2 (compuesto 71).

El curcuminoide **71** presenta un pico base con relación $m/z = [45^+]$ correspondiente al fluoruro metaborónico que se origina de la fragmentación del complejo, además se observa un pico con relación m/z en $[91^+]$ correspondiente a las pérdidas del ion tropilio (Figura 125). El espectro de masas del compuesto **71** (Figura 126) mostró un pico con relación m/z en $[596^+]$ que está de acuerdo con el ion molecular.

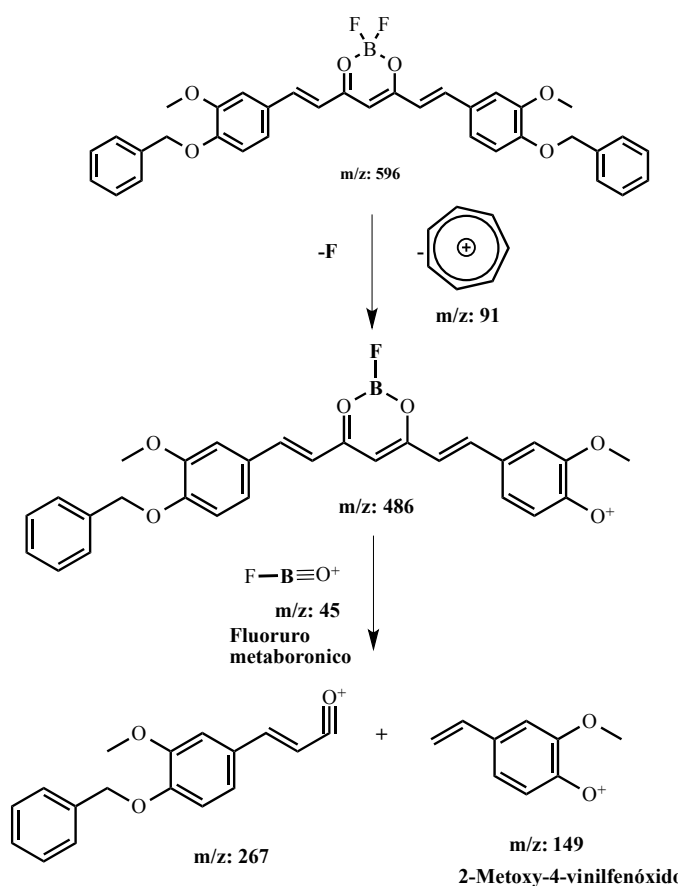


Figura 125. Patrón de fragmentación del compuesto **71**.

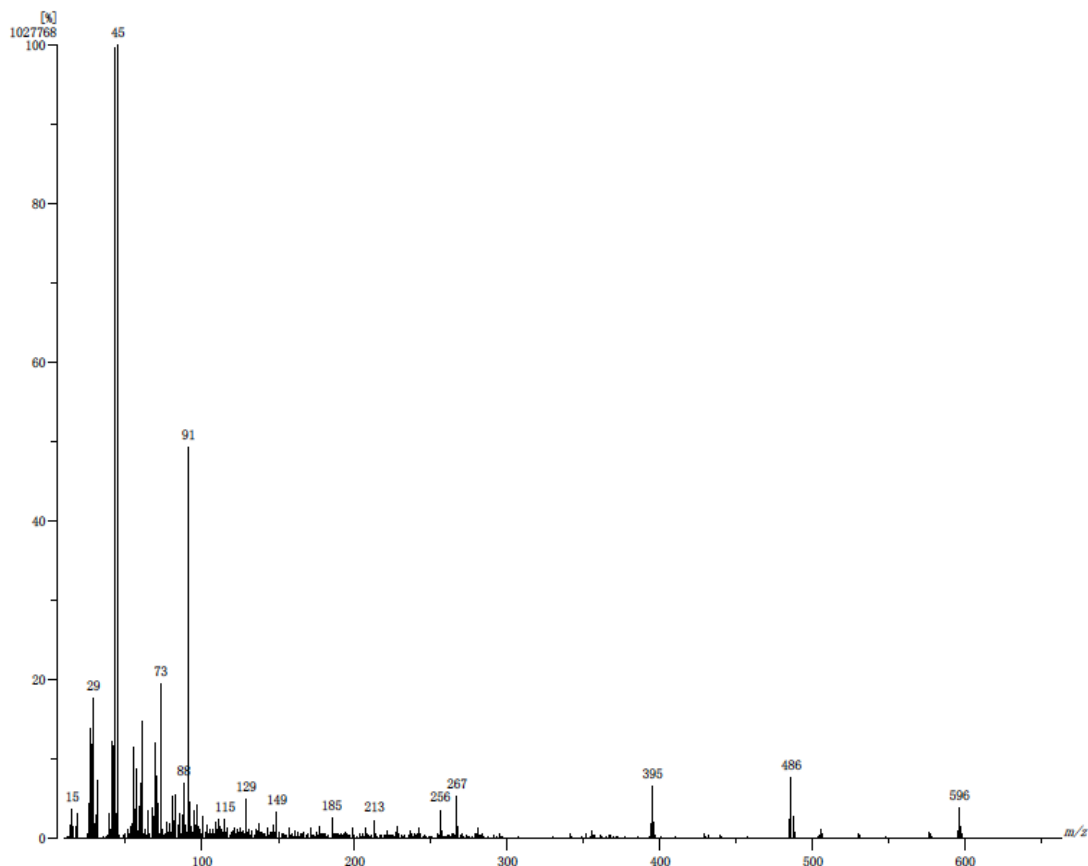


Figura 126. Espectro de masas del compuesto **71**.

8.35 Rayos-X del complejo de curcumina di-bencilada con BF₂ (compuesto 71).

La estructura determinada por difracción de rayos-X del compuesto **71** confirma la formación de un complejo con boro (BF₂) en la parte central (sistema ceto-enol) de la molécula (Figura 127 A). Las distancias entre B-O son 1.307 Å y 1.313Å y son casi simétricas a los átomos de oxígeno. Es importante resaltar que se conserva la coplanaridad en la cadena del heptanoide (C1- C7, Figura 127 B). Además cada molécula forma dos interacciones tipo H- F a 2.508 Å y 2.369 Å con dos moléculas adyacentes (Figura 127 C) como se reportó [101] en otros aductos de curcumina-BF₂. Una molécula de acetonitrilo está presente en la unidad asimétrica ya que es el disolvente con el que se creció el monocristal.

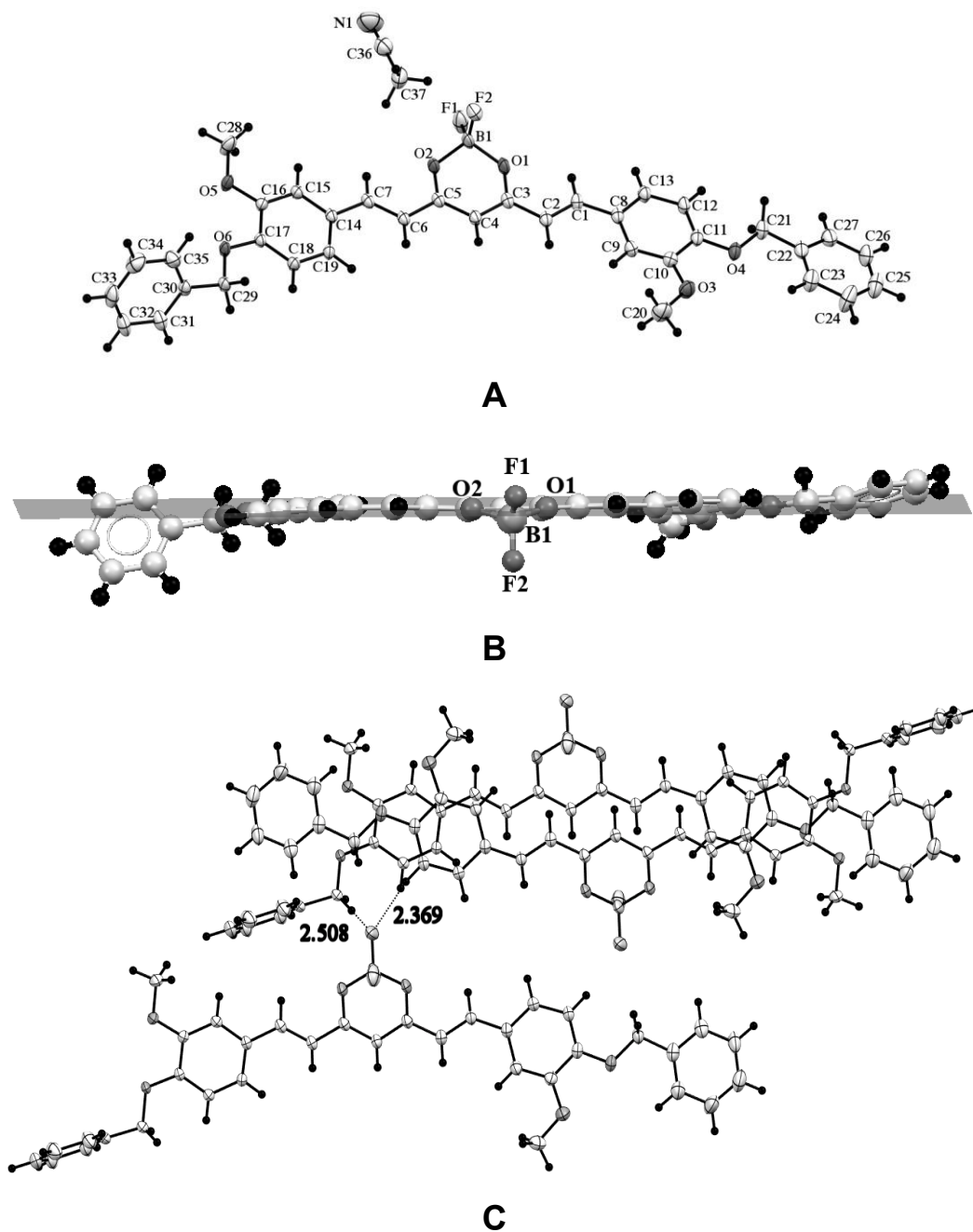


Figura 127. Rayos-X del compuesto 71 y su celda unitaria.

9. Discusión de los ensayos biológicos.

9.1 Análisis de los ensayos biológicos de los *retro*-curcuminoides.

La actividad citotóxica de los *retro*-curcuminoides **6-10** (Tabla 5), **13-16** (Tabla 6), **18-19** (Tabla 8) y **24-27** (Tabla 9) se midió en las líneas celulares cancerosas indicadas anteriormente mediante un bioensayo primario. Solo el compuesto **19** resultó ser tóxico para las células sanas (COS-7); sin embargo, los compuestos **7-9** y **14-16** mostraron actividad citotóxica potencial contra las líneas celulares K562, HCT-15, MCF-7 y SKLU-1.

Tabla 5. Bioensayo primario *retro*-curcuminoides derivados del ácido cinámico.

COMPUESTO	% DE INHIBICIÓN DE LA LIPOPEROXIDACIÓN (TBARS)		% DE INHIBICIÓN DEL RADICAL DPPH		ACTIVIDAD CITOTÓXICA % DE INHIBICIÓN A 25 µM						
	10µM	100µM	10µM	100µM	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS-7
	VAINILLINA	-2.48	0.67	2.25	2.54	NC	NC	NC	NC	NC	NC
1 (DHZ)	0.24	15.29	10.89	59.84	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
3	1.65	6.30	4.41	7.89	26.53	NC	10.16	NC	43.34	45.34	ND
4	0.00	1.54	1.75	2.10	12.63	NC	2.56	NC	32.2	19.14	ND
5	1.02	5.04	-0.19	7.04	55.11	14.46	26.74	57.7	7.1	31.4	ND
6	5.13	14.16	-2.42	-1.18	42.9	NC	21.67	NC	4.46	21.54	NC
7	1.97 ^a	4.33 ^a	-1.6	-1.3	100	100	100	100	100	100	NC
8	0.27 ^a	1.77 ^a	-1.0	0.3	100	86.65	100	100	100	100	NC
9	3.19 ^a	3.30 ^a	-0.9	0.00	35.18	NC	73.23	78.23	89.91	75.33	NC
10	-4.67	1.63	2.26	2.41	NC	NC	34.9	NC	NC	14.7	NC

^aSe ensayaron en 5 y 50µg/ml respectivamente. U251: Glía de Sistema Nervioso Central, PC-3: Adenocarcinoma prostático, K562: Leucemia mielógena crónica humana, HCT-15: Adenocarcinoma de colon, MCF-7: Adenocarcinoma mamario humano, SKLU: Adenocarcinoma pulmonar, COS7: Célula no cancerosa de riñón de mono, NC = No citotóxica, ND = No determinado.

Algunas de las materias primas se utilizaron como control para monitorear los cambios en las actividades biológicas de los *retro*-curcuminoides y los derivados sintéticos, por lo que también se les realizó el bioensayo primario a vainillina, la DHZ (Tabla 5), ácido ferúlico (Tabla 6) y zingerona (Tabla 9), para obtener los datos de las actividades citotóxicas.

Los resultados experimentales muestran la importancia del nuevo enlace químico formado en forma de éster ya que las materias primas fueron totalmente inactivas para las líneas celulares ensayadas.

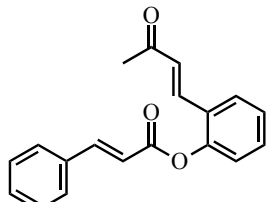
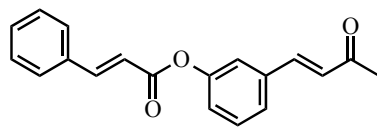
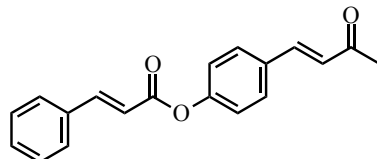
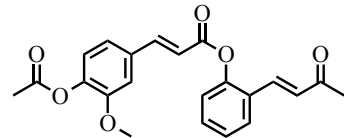
Tabla 6. Bioensayo primario de *retro*-curcuminodes derivados del ácido ferúlico acetilado.

COMPUESTO	% DE INHIBICIÓN DE LA LIPOPEROXIDACIÓN (TBARS)		% DE INHIBICIÓN DEL RADICAL DPPH		ACTIVIDAD CITOTÓXICA % DE INHIBICIÓN 50µM						
	10µM	100µM	5µM	50µM	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS-7
	ÁCIDO FERÚLICO	-4.07	4.06	19.90	76.81	NC	NC	NC	NC	NC	NC
11	1.78	6.66	-3.99	-2.19	NC	0.53	31.03	NC	NC	15.08	NC
13	10.37	24.31	-3.09	0.00	91.55	NC	36.75	NC	24.46	62.51	NC
14	14.85 ^a	96.18 ^a	-2.0	0.00	100	100	100	100	100	100	NC
15	3.81	7.88	-3.00	-1.5	100	100	72.4	77.02	100	100	NC
16	3.0	6.2	-3.20	-2.75	72.86	8.37	64.13	40.59	64.69	77.5	NC

^aSe ensayaron en 5 y 50µg/ml respectivamente. U251: Glía de Sistema Nervioso Central, PC-3: Adenocarcinoma prostático, K562: Leucemia mielógena crónica humana, HCT-15: Adenocarcinoma de colon, MCF-7: Adenocarcinoma mamario humano, SKLU: Adenocarcinoma pulmonar, COS7: Célula no cancerosa de riñón de mono, NC = No citotóxica.

Los compuestos **7**, **8** y **14** (sustituidos con el éster cinámico en posiciones *orto*, y *meta*,) mostraron valores de IC₅₀ comparable a la curcumina (Tabla 7) con mejor actividad citotóxica que el compuesto **9**, donde el enlace tipo éster se encuentra en la posición *para*.

Tabla 7. IC₅₀ de *retro*-curminoides deshidrogenados derivados del ácido cinámico y del ácido ferúlico acetilado.

Compuesto	IC ₅₀ (μM) Línea celular		
	K562	MCF-7	SKLU-1
Curcumina	9.75±0.6	10.43±1.8	7.78±0.64
 7	10.74±0.5	13.19±1.4	11.59±1.2
 8	12.8±1.9	18.68±2.5	12.85±0.9
 9	28.15±2.5	63.46±10.8	63.81±2.7
 14	8.60±0.44	12.01±0.62	8.07±0.55

K562: Leucemia mielógena crónica humana, MCF-7: Adenocarcinoma mamario humano, SKLU: Adenocarcinoma pulmonar

El *retro*-curcuminoide derivado del éster metílico del ácido ferúlico (compuesto **18**, ver Tabla 8) y los *retro*-curcuminoideos hidrogenados (compuestos **24-27**, ver Tabla 9) mostraron una selectividad citotóxica potencial contra las líneas celulares K562. Sin embargo, la familia más activa es la de *retro*-curcuminoideos que presentan el enlace vinílico (compuestos **7-9** y **14-16**) y esto se atribuye al sistema de cetona α,β-insaturada que se ha descrito anteriormente [102] como un potenciador de la actividad citotóxica (aceptor tipo Michael).

Lo anterior también puede explicar el efecto biológico de todos los *retro*-curcuminoides ya que aumenta un nuevo sistema (carbonilo α,β -insaturado) proveniente del nuevo enlace tipo éster. Es importante resaltar que la presencia de la cetona α,β -insaturada, a diferencia de otros grupos funcionales, suele aumentar la citotoxicidad [102].

Tabla 8. Bioensayo primario de *retro*-curcuminoides derivados del éster metílico del ácido ferúlico.

COMPUESTO	% DE INHIBICIÓN DE LA LIPOPEROXIDACIÓN (TBARS)		% DE INHIBICIÓN DEL RADICAL DPPH		ACTIVIDAD CITOTÓXICA % DE INHIBICIÓN A 25 μ M						
	10 μ M	100 μ M	10 μ M	100 μ M	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS-7
	*ÁCIDO FERÚLICO	-4.07	4.06	19.90	76.81	NC	NC	NC	NC	NC	NC
11	2.7	5.69	2.31	3.05	NC	0.53	31.03	NC	NC	15.08	0.6
17	10.51	34.52	11.7	60.39	NC	4.8	26.6	NC	NC	18.6	1.2
18	14.72	26.56	2.31	3.66	17.7	58.4	74.4	2.6	22.2	41.8	9.3
19	13.55	17.55	1.08	6.46	75.1	79.2	100	76.5	45.7	77.9	62.5 ^a

U251: Glía de Sistema Nervioso Central, PC-3: Adenocarcinoma prostático, K562: Leucemia mielógena crónica humana, HCT-15: Adenocarcinoma de colon, MCF-7: Adenocarcinoma mamario humano, SKLU: Adenocarcinoma pulmonar, COS7: Célula no cancerosa de riñón de mono, NC = No citotóxica.^a Notar alta toxicidad para la línea celular no tumoral, * analizado a 50 μ M para la actividad citotóxica.

Los valores de IC₅₀ (línea celular K562) de los *retro*-curcuminoides derivados del éster metílico del ácido ferúlico (compuesto **18**), contra los *retro*-curcuminoides hidrogenados (compuestos **24-27**) son mayores o iguales a 100 μ M. Este valor resultó ser equiparable y no permite hacer una diferencia entre la potencia biológica de grupos funcionales (éster metílico del ácido ferúlico y cetona para análogos de zingerona). Sin embargo, el éster metílico resultó ser superior en forma de *retro*-curcuminóide (compuesto **18**) al comparar su porcentaje de inhibición (Figura 128).

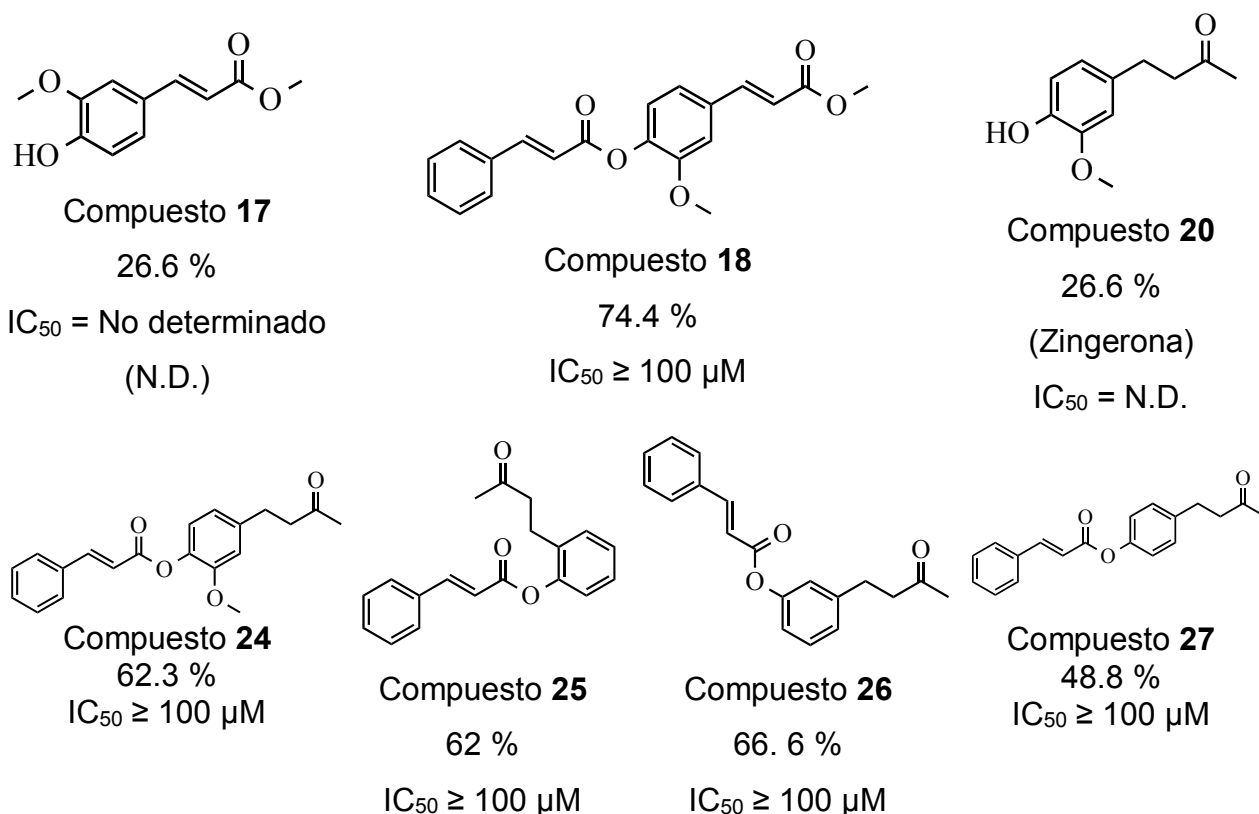


Figura 128. Comparación en el % de inhibición e IC₅₀ de *retro*-curcuminodes y sus materias primas con línea celular de leucemia K562 (Nótese que el éster **18** es más activos).

En el bioensayo primario la zingerona y los análogos hidrogenados (compuesto **21-23**) resultaron prácticamente no tóxicos para las líneas celulares ensayadas, pero al formar los derivados en forma de ésteres cinámicos (compuesto **24-27**) se observó el aumento de la citotoxicidad para la línea celular K562 (Tabla 9). Este resultado indica que los nuevos derivados en forma de *retro*-curcuminoides son más potentes que sus materias primas.

Tabla 9. Bioensayo primario de *retro*-curcuminoides hidrogenados.

COMPUESTO	% DE INHIBICIÓN DE LA LIPOPEROXIDACIÓN (TBARS)		% DE INHIBICIÓN DEL RADICAL DPPH		ACTIVIDAD CITOTÓXICA % DE INHIBICIÓN A 25 µM						
	10µM	100µM	10µM	100µM	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS-7
	DHZ	0.24	15.29	10.89	59.84	NC	NC	NC	NC	NC	NC
20 (ZINGERONA)	3.39	12.58	18.31	74.63	NC	NC	26.6	NC	NC	NC	NC
21	2.90	7.54	0.75	2.36	NC	NC	39.0	8.7	NC	10.2	NC
22	2.99	7.62	1.36	1.81	NC	32	23.4	7.0	NC	6.8	3.1
23	3.70	13.43	1.61	3.42	NC	10.8	28.6	0.5	NC	0.8	NC
24	2.32	9.89	-0.52	7.79	1.3	1.2	62.3	3.0	NC	9.4	NC
25	3.70	5.33	3.62	3.72	NC	7.4	62.0	15.2	1.9	10.3	3.0
26	-3.53	-0.79	2.51	2.16	NC	19	66.6	NC	71.7	7.4	NC
27	-2.52	1.48	2.81	3.16	3.0	NC	48.8	37.0	40.0	12.3	NC

U251: Glía de Sistema Nervioso Central, PC-3: Adenocarcinoma prostático, K562: Leucemia mielógena crónica humana, HCT-15: Adenocarcinoma de colon, MCF-7: Adenocarcinoma mamario humano, SKLU: Adenocarcinoma pulmonar, COS7: Célula no cancerosa de riñón de mono, NC = No citotóxica, ND = No determinado.

La comparación de la citotoxicidad para todos los *retro*-curcuminoides con respecto a sus precursores sintéticos, nos permite postular que el grupo funcional éster juega un papel importante en la actividad citotóxica *in vitro*.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren, que los derivados basados en compuestos análogos de deshidrozingerona (DHZ) y sustituidos con un éster (cinámico) en la posición *orto* muestran una actividad citotóxica mayor que sus precursores condensados. Además es importante indicar que los análogos sustituidos

con el éster cinámico en la posición *orto* (compuestos **9**, **14** y **25**) son más citotóxicos con respecto a los de posición *para* (compuestos **9**, **16** y **27**).

Los *retro*-curcuminoides **6**, **13** y **24** (derivados de la DHZ y zingerona) que poseen un metoxilo en posición *orto* al enlace del éster cinámico (Figura 129) resultaron menos activos, que los *retro*-curcuminoides análogos (**7-9**, **14-16** y **25-27**) donde no existe este grupo.

Los resultados anteriores están de acuerdo con un estudio previo [1], donde se sugiere que los curcuminoides deben contar con un fenol en la posición *orto* a un metoxilo para exhibir actividad citotóxica, lo cual es indicativo de un menor impedimento estérico en el anillo aromático, aunque en este caso, la derivación del fenol en un grupo éster resultó con menor actividad. El ejemplo se presenta en la Figura 129 mostrando la actividad citotóxica (% de inhibición) de la línea celular MCF-7.

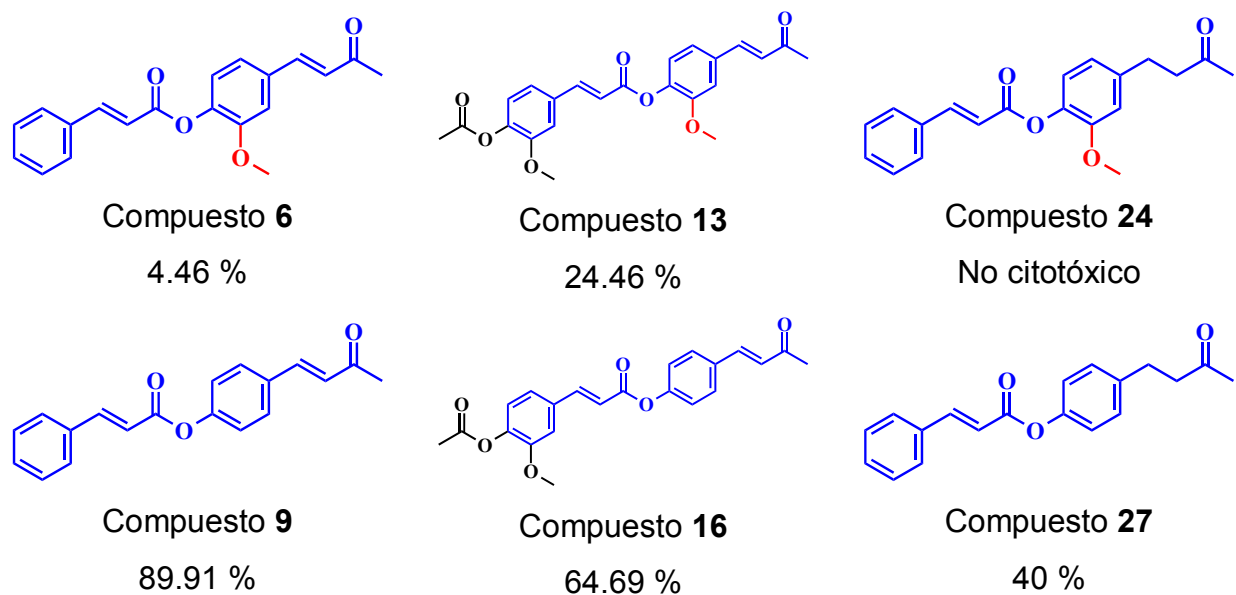


Figura 129. Comparación en la inhibición de la línea celular cancerígena MCF-7 con distintos *retro*-curcuminoide (Nótese un metoxilo extra en color rojo para los compuestos con menor actividad).

En general ninguno de los *retro*-curcuminoides resultaron activos para la captura del radical DPPH y para la prueba de inhibición de peroxidación de lípidos (TBARS). Estos resultados están de acuerdo con la estructura molecular que presentan y con reportes anteriores [103], donde se indica que la curcumina es un compuesto antioxidante que dona átomos de hidrógeno provenientes de los fenoles. Por lo tanto, al cambiar un fenol de los precursores por un éster cinámico (ausencia de fenoles), se disminuye la actividad antioxidante.

9.1.1 Análisis estadístico de los valores de IC₅₀ de los *retro*-curcuminoides, mediante la prueba *t* de Student.

Para evidenciar las diferencias significativas de la actividad citotóxica se calculó la prueba *t* de Student de manera desapareada contrastando cada IC₅₀ de la curcumina con respecto a los *retro*-curcuminoides, lo que permitió tener una comparación estadística entre de los compuestos más activos. Los valores se consideraron significativos con un valor de $p < 0.05$ y los resultados del estadístico de prueba se encuentran en las tablas 10-12.

Tabla 10. Prueba *t* para la línea celular K562 (Leucemia mielógena crónica humana)

Compuesto	Valor de IC ₅₀	SEM*	N	Valor de p	Significancia estadística
Curcumina	9.75	0.6	3	-	-
7	10.74	0.5	3	0.2737	No es estadísticamente significativa
8	12.8	1.9	3	0.2006	No es estadísticamente significativa
9	28.15	2.5	3	0.0020	Es estadísticamente significativa
14	8.60	0.44	3	0.1971	No es estadísticamente significativa

*SEM = Error estándar de la media.

Los resultados obtenidos en la prueba *t* de Student para la IC₅₀ de la actividad citotóxica, los compuestos **7**, **8** y **14** no mostraron significancia estadística en las líneas celulares K562 y MCF-7, mientras que los compuestos **7** y **8** mostraron significancia

estadística para la línea celular SKLU-1 y tienen menor actividad citotóxica (mayor valor de IC₅₀) con respecto a la curcumina.

Tabla 11. Prueba *t* para la línea celular MCF-7 (Adenocarcinoma mamario humano)

Compuesto	Valor de IC ₅₀	SEM*	N	Valor de p	Significancia estadística
Curcumina	10.43	1.8	3	-	-
7	13.19	1.4	3	0.2928	No es estadísticamente significativa
8	18.68	2.5	3	0.0553	No es estadísticamente muy significativa
9	63.46	10.8	3	0.0084	Es estadísticamente muy significativa
14	12.01	0.62	3	0.4532	No es estadísticamente significativa

*SEM = Error estándar de la media.

El *retro*-curcuminoide **9** mostró mucho menor actividad citotóxica con respecto a la curcumina, entonces su valor de IC₅₀ es estadísticamente muy significativa para las tres líneas celulares ensayadas (K562, MCF-7, SKLU).

Tabla 12. Prueba *t* para la línea celular SKLU (Adenocarcinoma pulmonar)

Compuesto	Valor de IC ₅₀	SEM*	N	Valor de p	Significancia estadística
Curcumina	7.78	0.64	3	-	-
7	11.59	1.2	3	0.0487	Es estadísticamente significativa
8	12.85	0.9	3	0.0101	Es estadísticamente significativa
9	63.81	2.7	3	0.0001	Es estadísticamente muy significativa
14	8.07	0.55	3	0.7484	No es estadísticamente significativa

*SEM = Error estándar de la media.

Del análisis estadístico se puede afirmar que los *retro*-curcuminoideos deben contener dos sistemas carbonílicos α,β -insaturados para una actividad citotóxica de consideración y no es necesario que contengan el grupo metoxilo en los anillos

aromáticos. Con respecto al éster cinámico es necesario que se enlace en la posición *orto* y *meta*, pero no en la posición *para* ya que ello disminuye significativamente la actividad citotóxica. De esta forma se obtienen compuestos citotóxicos para las líneas celulares K562 y MCF-7, sin significancia estadística respecto al valor de IC₅₀ de curcumina.

9.1.2 Mecanismos de acción de los *retro*-curcuminoides en nivel celular e interacción con dianas moleculares.

De los posibles mecanismos de acción analizados para los *retro*-curcuminoides se deduce que estos difícilmente podrían ser moléculas pro-oxidantes como ocurre con curcumina con grupos fenólicos libres cuando interactúa con Cu (II).

Por otro lado los *retro*-curcuminoides poseen dos subunidades de carbonilos α,β -insaturados por lo que se pueden considerar como aceptores tipo Michael, la unidad correspondiente al ácido cinámico a menudo se emplea para el diseño de fármacos [29]. Las cetonas α,β -insaturadas se consideran activas para enlazarse a los tioles (*i.e.* glutatión (GSH) intracelular), por lo tanto, la vía del GSH es un mecanismo de acción plausible para que los *retro*-curcuminoides produzcan la muerte celular.

9.1.3 Acoplamiento molecular de curcumina y los *retro*-curcuminoides con las proteínas Akt-2 y el factor nuclear kappa-beta (NF- κ β).

Para poder explicar los mecanismos de señalización al interior de la célula con dianas u objetivos moleculares que producen la apoptosis, se han elegido dos rutas de señalización muy concretas; la ruta Akt y la del factor nuclear kappa-beta (NF- κ β) que se seleccionaron debido al mecanismo de acción de curcumina y del éster fenético del ácido cafeíco (CAPE)), debido a que comparten semejanzas estructurales con las familias de *retro*-curcuminoides bajo estudio.

El modelado molecular es la base para analizar las interacciones moleculares. El objetivo de este modelado es predecir la morfología de un ligando. El software ocupado

para este propósito es: "SwissDock", y se utilizó para calcular la energía libre de unión [104] de los *retro*-curcuminoides cuando se acoplaron con las proteínas.

La curcumina y los *retro*-curcuminoides más activos (**7-9** y **14**), fueron acoplados computacionalmente contra dos receptores; Akt-2 y el NF- κ β (subunidad p65) para determinar un posible potencial citotóxico comparando estas vías de señalización.

A partir del análisis de acoplamiento molecular ($\Delta G_{\text{unión}}$, Kcal/mol, Tabla 13), se puede observar que en las energías libres de unión con la proteína Akt-2 y la curcumina ($\Delta G_{\text{unión}} = -7.0$ kcal/ mol) presenta valores semejantes de acoplamiento, comparado con los *retro*-curcuminoides **7** y **14**.

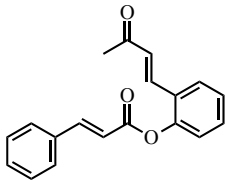
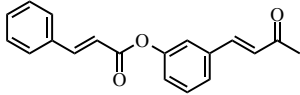
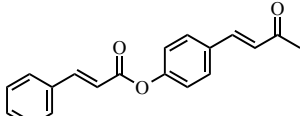
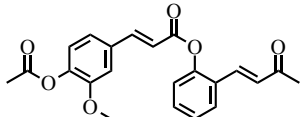
En el compuesto **14** ($\Delta G_{\text{unión}} = -6.84$ kcal/mol) el resultado del acoplamiento probablemente esta relacionado con la obtención de valores semejantes de la IC_{50} experimental (línea celular K562) con respecto a la curcumina, donde su valor ($IC_{50} = 8.60 \pm 0.44$) no presentó diferencia estadística significativa con la curcumina ($IC_{50} = 9.75 \pm 0.6$).

El análisis del acoplamiento molecular con el receptor NF- κ β (A), demostró que tres *retro*-curcuminoides (**7**, **8** y **14**) se acoplan a la proteína con valores cercanos a los encontrados en la curcumina ($\Delta G_{\text{unión}} = -6.90$ Kcal/mol), por lo que es plausible explicar que los compuestos actúan de manera semejante a la curcumina.

Para el NF- κ β (B), los *retro*-curcuminoides **7**, **8** y **14** presentaron los mejores valores de afinidad de unión con respecto a las otras proteínas, ya que las energías de unión bajas y negativas muestran que las interacciones son favorables entre el ligante y el receptor [105]. Por lo que estos compuestos se dirigen más a la interacción con el NF- κ β que con el receptor Akt-2

El orden de clasificación basado en los valores de acoplamiento con los receptores Akt-2 y NF- κ β (B) es el siguiente: curcumina > *retro*-curcuminoides **14** > **7** > **8** > **9**. Los mejores valores de acoplamiento son para los *retro*-curcuminoides que presentan el enlace del éster cinámico en la posición *orto* (compuestos **14** y **7**) y el valor menos favorable es para el *retro*-curcuminoides con el enlace del éster en la posición *para* (compuesto **9**), lo cual puede correlacionar con los resultados de citotoxicidad (IC₅₀) encontrados de manera experimental.

Tabla 13. Resultados de acoplamiento molecular de curcumina y los *retro*-curcuminoides con las proteínas Akt-2 y NF- κ β .

$\Delta G_{\text{unión.}}$ = Energías libre de unión estimadas (Kcal/mol)			
Compuesto	Akt-2	NF- κ β p65 (A)	NF- κ β p65 (B)
	$\Delta G_{\text{Unión.}}$	$\Delta G_{\text{Unión.}}$	$\Delta G_{\text{Unión.}}$
Curcumina	-7.0	-6.91	-7.06
	-6.68	-7.08	-7.02
7			
	-6.59	-6.77	-6.81
8			
	-6.11	-6.02	-5.47
9			
	-6.84	-6.82	-7.2
14			

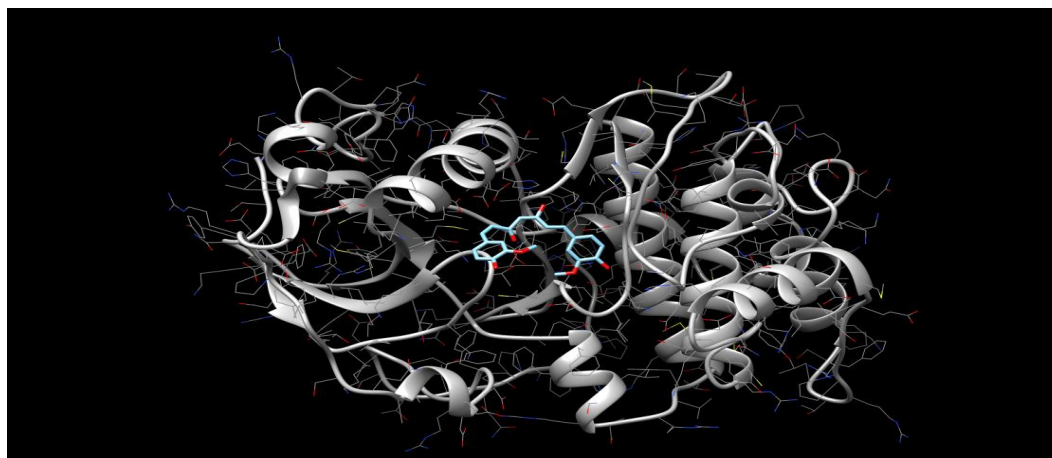
El acoplamiento molecular es usado ampliamente tanto para la predicción de interacciones ligante-receptor y para obtener una mejor comprensión de la actividad biológica [106]. A partir de los resultados obtenidos, los *retro*-curcuminoides analizados en alguna medida responden a un efecto citotóxico mediante vías de señalización semejantes a la curcumina, ya que sus valores de acoplamiento permiten suponer alguna interacción con los receptores Akt-2 y NF- κ β .

Las imágenes del acoplamiento molecular estimado con las proteínas, se presentan en la Figura 130 (Akt-2) y Figura 131 (NF- κ β) para curcumina y el compuesto **7**. Para los compuestos **8** y **9** se muestran en las Figuras 132 (Akt-2) y 133 (NF- κ β), finalmente las Figuras 134 (Akt-2) y 135 (NF- κ β) muestran las imágenes de los acoplamientos para el compuesto **14**.

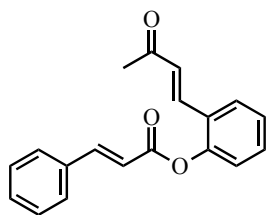
Compuesto

Proteína AKt-2

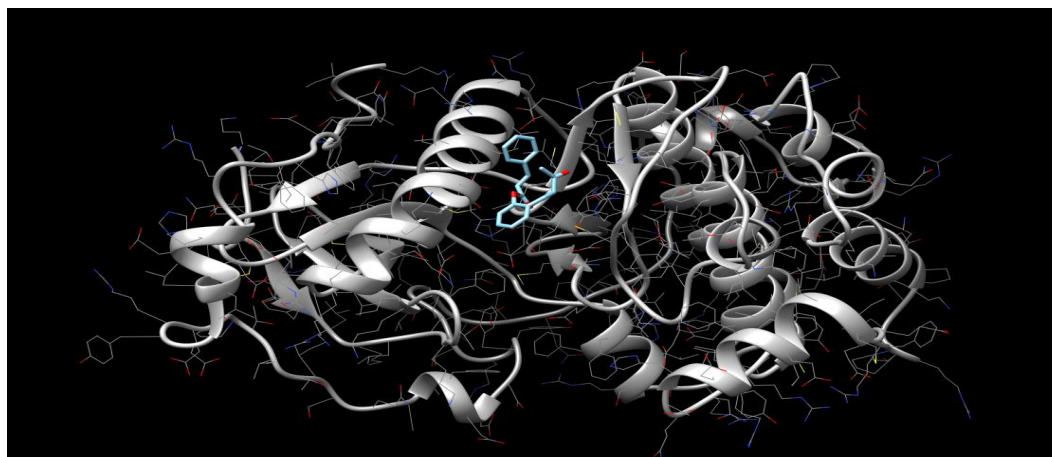
Curcumina



$$\Delta G_{\text{unión}} = -7.0 \text{ kcal/mol}$$



7



$$\Delta G_{\text{unión}} = -6.68 \text{ kcal/mol}$$

Figura 130. Comparación de los resultados de acoplamiento molecular entre curcumina y el *retro*-curcuminoide **7** para la proteína Akt-2.

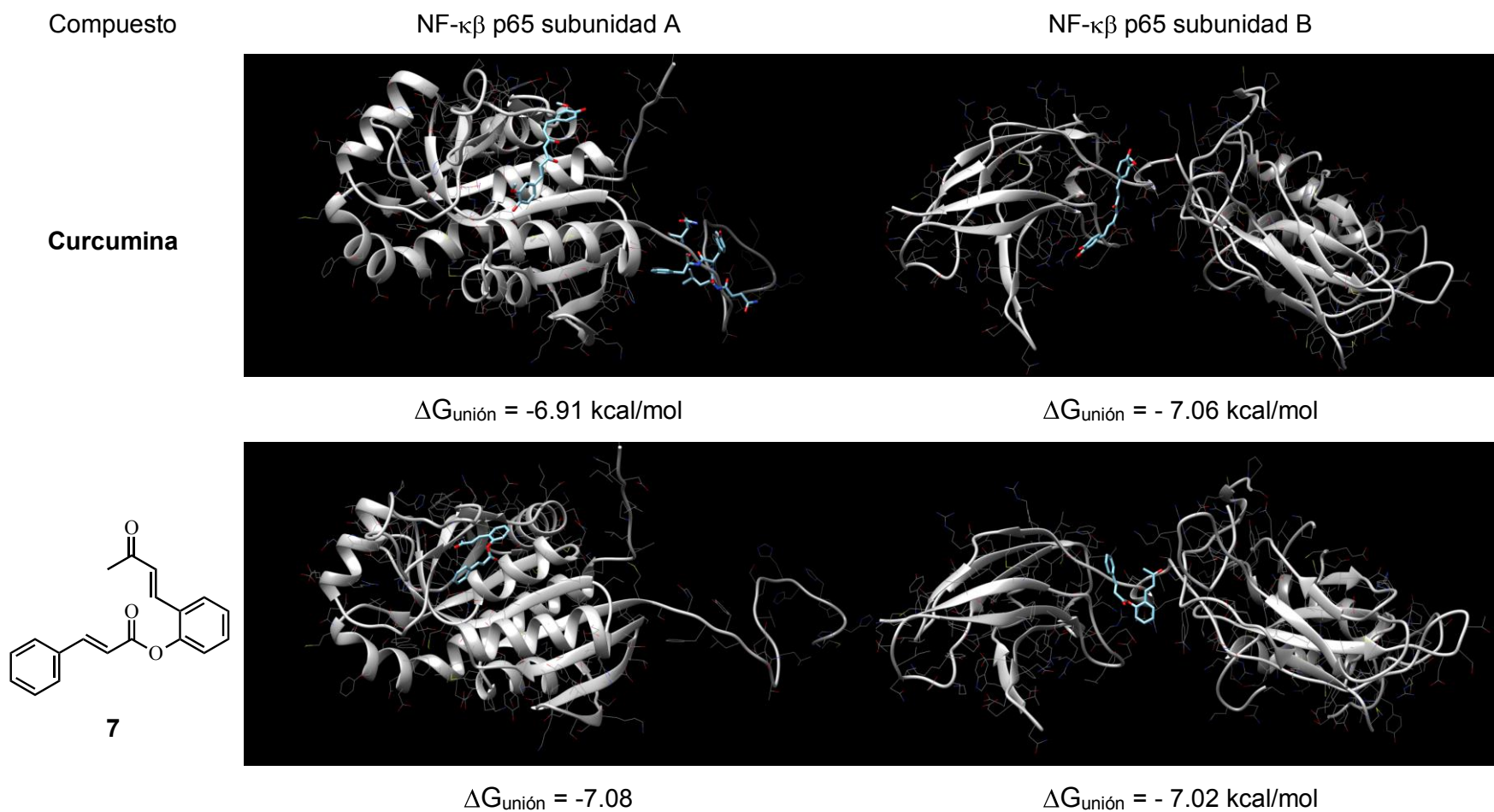
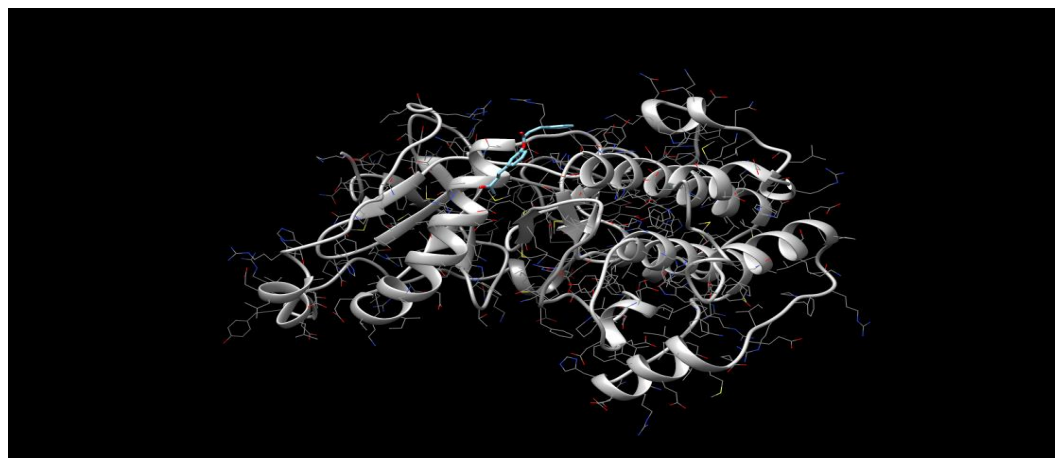
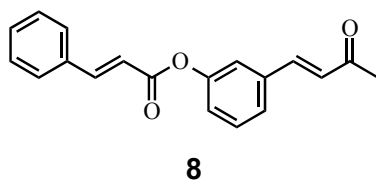


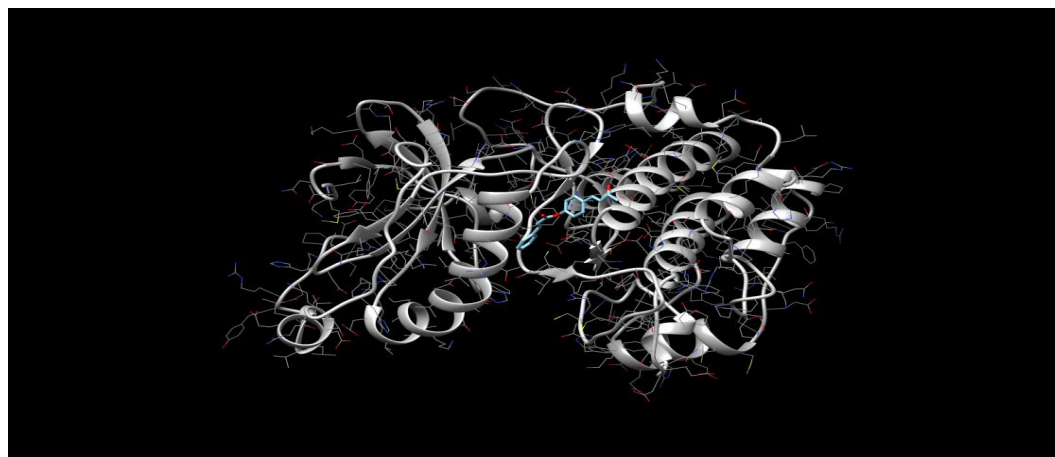
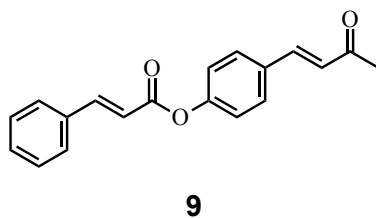
Figura 131. Comparación de los resultados de acoplamiento molecular entre curcumina y el *retro*-curcuminoide **7** para el NF- κ B.

Compuesto

Proteína Akt-2



$$\Delta G_{\text{unión}} = -6.59 \text{ kcal/mol}$$



$$\Delta G_{\text{unión}} = -6.11 \text{ kcal/mol}$$

Figura 132. Comparación de los resultados de acoplamiento molecular entre los *retro*-curcuminoides 8 y 9 para la proteína Akt-2.

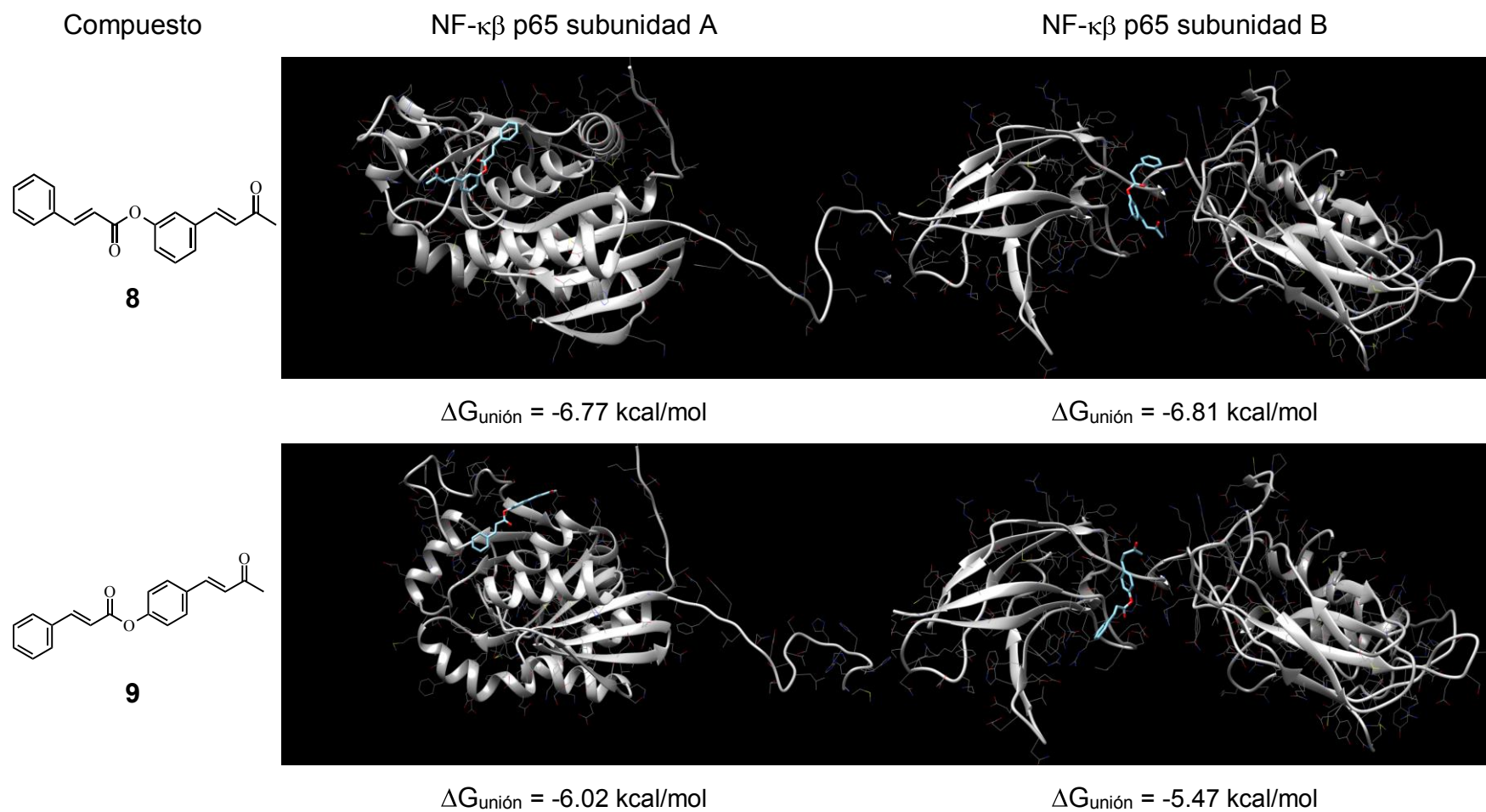
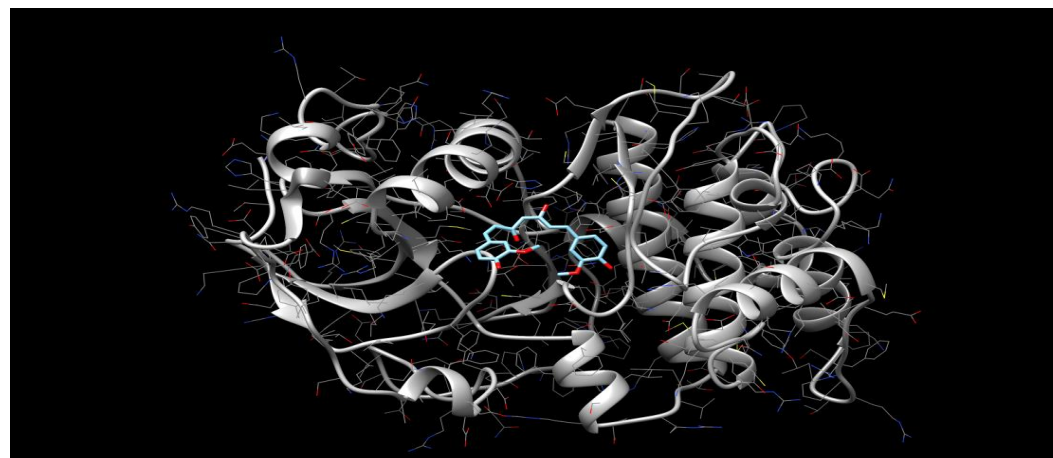


Figura 133. Comparación de los resultados de acoplamiento molecular entre los *retro*-curcuminoide **8** y **9** para el NF- κ B.

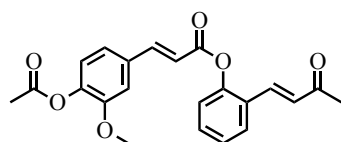
Compuesto

Proteína Akt-2

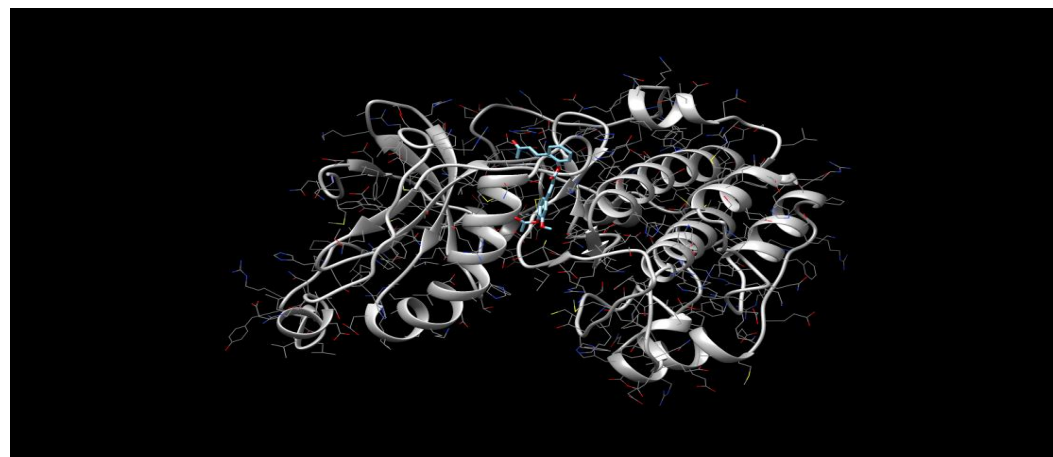
Curcumina



$$\Delta G_{\text{unión}} = -7.0 \text{ kcal/mol}$$



14



$$\Delta G_{\text{unión}} = -6.84 \text{ kcal/mol}$$

Figura 134. Comparación de los resultados de acoplamiento molecular entre curcumina y el *retro*-curcuminoide **14** para la proteína Akt-2.

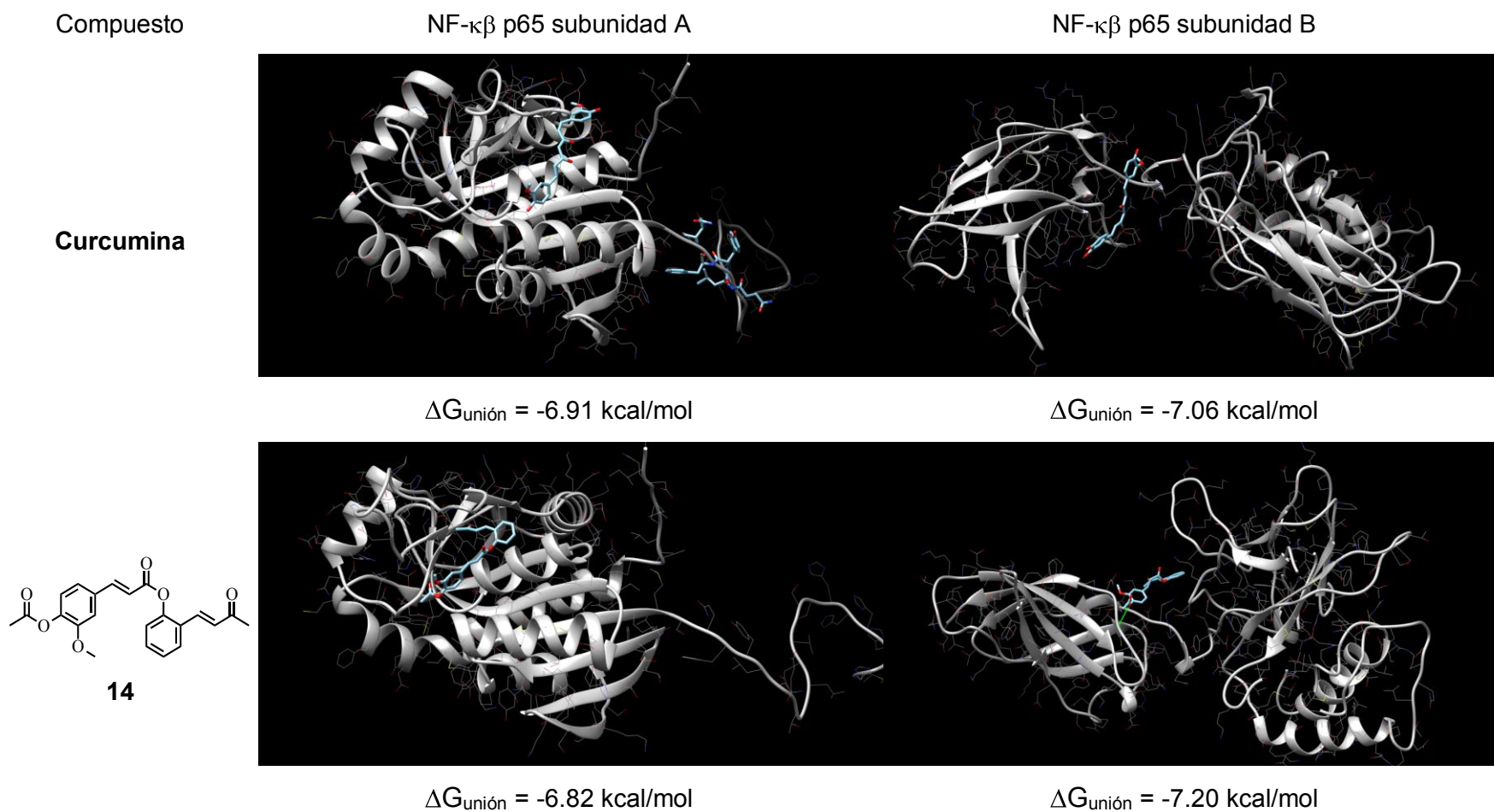


Figura 135. Comparación de los resultados de acoplamiento molecular entre curcumina y el *retro*-curcuminoide **14** para el NF- κ B.

9.2 Análisis de los ensayos biológicos de los derivados del ácido ferúlico.

Los derivados del ácido ferúlico (**17**, **28-33**) mostraron una baja actividad citotóxica (Tabla 14) en todas las líneas celulares cancerígenas (los compuestos se ensayaron a 50 μ M). Solo el compuesto **32** inhibió las líneas celulares cancerígenas PC-3 y K562 en un 59% y 48% respectivamente, pero resultó tóxico para la línea celular no tumoral (COS-7) inhibiéndola en un 53%. Los compuestos **28** y **33**, también inhibieron el crecimiento de la línea celular K562 en un 72% y 32% respectivamente.

Esta familia de compuestos no presentó actividades citotóxicas relevantes, aunque es notable que la adición del grupo bencilo al ácido ferúlico (compuestos **28**, **32** y **33**) mejora la actividad citotóxica *in vitro*, posiblemente debido al incremento de la lipofilia de los compuestos como se ha informado anteriormente [107]. Estos hallazgos no coinciden con Jayaprakasam y colaboradores [108], quienes reportaron una actividad anticancerígena y antioxidante de los ésteres del ácido ferúlico en bajas concentraciones.

Tabla 14. Bioensayo primario para derivados del ácido ferúlico.

COMPUESTO	% DE INHIBICIÓN DE LA LIPOPEROXIDACIÓN (TBARS)		% DE INHIBICIÓN DEL RADICAL DPPH		ACTIVIDAD CITOTÓXICA % DE INHIBICIÓN A 50 µM						
	10µM	100µM	10µM	100µM	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS-7
	ÁCIDO FERÚLICO	-4.07	4.06	19.90	76.81	NC	NC	NC	NC	NC	NC
17	10.5	34.52	11.76	60.39	NC	4.8	26.6	NC	NC	18.6	1.2
28	4.31	7.48	0.49	0.39	NC	24.8	72.5	16.3	NC	20.9	17.7
29	7.46	13.8	1.27	3.19	5.8	16.6	17	5.7	7.8	18.1	22.2
30	12.24	30.19	9.95	56.76	NC	NC	7.7	NC	NC	NC	NC
31	2.02	1.45	5.39	30.10	NC	8	20.3	NC	6.5	12	7.0
32	40.61	96.68	12.84	59.95	25.5	59.4	48.0	26.9	25.4	20.2	52.6
33	6.08	9.16	1.03	0.83	NC	15.3	32.4	15.5	14.6	27.4	31.3

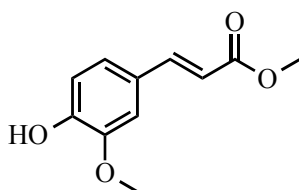
U251: Glía de Sistema Nervioso Central, PC-3: Adenocarcinoma prostático, K562: Leucemia mielógena crónica humana, HCT-15: Adenocarcinoma de colon, MCF-7: Adenocarcinoma mamario humano, SKLU: Adenocarcinoma pulmonar, COS7: Célula no cancerosa de riñón de mono, NC = No citotóxica.

Los compuestos **17**, **30** y **32** inhibieron la lipoperoxidación inducida por sulfato ferroso en el cerebro de la rata, y se debe a que preservan el fenol actuando mediante la estabilización de algún radical fenoxi formado *in vivo*.

Sorprendentemente, el compuesto **32** mostró una inhibición del 96.68 % para la lipoperoxidación y dado que es el compuesto más activo, se subraya que su actividad se debe a una mejor lipofilia por la presencia del éster bencílico y puede ayudar a penetrar las membranas celulares donde se lleva a cabo la peroxidación lipídica [109].

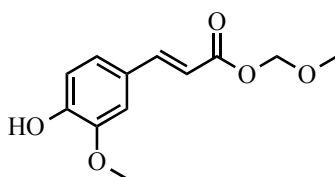
Los compuestos **17**, **30** y **32** que presentan un fenol (Figura 136), resultaron ser medianamente activos para el atrapamiento de radicales libres DPPH *in vitro* con una

inhibición de hasta un 60%. Estos resultados son consistentes con la estructura molecular ya que la propiedad antioxidante del ácido ferúlico y sus derivados está asociada con el fenol que forma un enlace de hidrógeno intramolecular en la posición *orto* con un grupo metoxilo, debido a esto hay una estabilización del radical fenoxi que se forma [110].



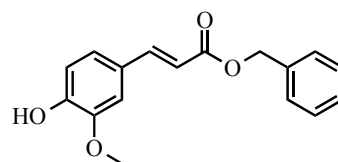
Compuesto **17**

60.39%



Compuesto **30**

56.76%



Compuesto **32**

59.95%

Figura 136. Ésteres del ácido ferúlico que presentan un fenol y actividad de inhibición del radical libre DPPH a 100 μ M.

9.3 Análisis de los ensayos biológicos de bencilidenos.

La familia de bencilidenos (**34-45**, Tabla 15), las chalconas (**56-58**) y las di chalconas (**59-62**) así como el bencilideno **68** derivado de un heptanoide (ver Tabla 19) presentaron la misma propiedad de actividad citotóxica *in vitro*, debido a que muestran altos porcentajes de inhibición hacia células cancerígenas (los resultados podrían considerarse excelentes).

En la familia de los bencilidenos se observa una inhibición no selectiva parecida a lo reportado anteriormente [62] en análogos de chalconas, ya que conforme se inhiben las células cancerígenas se inhiben también las células no tumorales COS-7 (excepto en el caso del compuesto **42**).

Los resultados de las citotoxicidades son acordes al aumento de la actividad biológica, que puede asociarse a la familia de compuestos con propiedades de aceptores tipo Michael. Se sugiere que el reemplazo de los metilenos activos (2,4-pentanodiona) con los sistemas α,β -insaturados (bencilidenos) suelen potenciar las actividades biológicas [59].

El único compuesto de la familia de bencilidenos con una actividad antioxidante importante fue el **38** (IC_{50} Lipoperoxidación = 30.74 ± 1.26) y se atribuye a la presencia de dos fenoles en su estructura molecular.

Tabla 15. Bioensayo primario para la familia de bencilidenos.

COMPUESTO	% DE INHIBICIÓN DE LA LIPOPEROXIDACIÓN (TBARS)		% DE INHIBICIÓN DEL RADICAL DPPH		ACTIVIDAD CITOTÓXICA % DE INHIBICIÓN A 25 μ M						
	50 μ M	100 μ M	50 μ M	100 μ M	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS-7
	34	-2.10	ND	-1.13	ND	94.4	32.2	89.1	94.48	63.42	100
35	3.0	ND	2.0	ND	30.0	26.5	35.3	33.0	33.0	28.0	23.0
36	1.32	ND	0.93	ND	38.0	27.5	95.4	84.5	NC	46.0	49.4
37	2.94	ND	1.91	ND	NC	49.08	23.14	27.58	NC	34.6	10.08
38	90.95	ND	92.68	ND	20.0	31.0	47.8	25.0	15.7	32.8	22.7
39	10.51	ND	17.88	ND	38.48	48.62	56.99	31.69	22.60	51.2	20.13
40	1.04	ND	2.83	ND	51.96	48.62	60.17	59.55	38.36	70.3	33.98
41	3.17	ND	2.22	ND	90.06	87.86	82.29	85.81	55.89	75.3	53.40
42	7.60	1.06	0.93	1.06	95.35	88.97	93.38	64.39	67.53	100	24.57
43	0.49	ND	1.70	ND	94.71	99.75	85.69	93.73	93.29	100	76.13
44	-0.14	ND	0.57	ND	53.22	84.41	68.22	60.79	26.44	60.5	23.71
45	-0.40	ND	0.7	ND	90.0	80.22	85.20	75.00	90.30	78.3	78.4

U251: Glía de Sistema Nervioso Central, PC-3: Adenocarcinoma prostático, K562: Leucemia mielógena crónica humana, HCT-15: Adenocarcinoma de colon, MCF-7: Adenocarcinoma mamario humano, SKLU: Adenocarcinoma pulmonar, COS7: Célula no cancerosa de riñón de mono, NC = No citotóxica, ND = No determinado.

9.4 Análisis de los ensayos biológicos de pirazolininas.

Aunque las pirazolininas (**46-48**) y (**54-55**), presentaron actividades citotóxicas mejores (ver Tabla 16) con respecto a sus precursores condensados (grupo carbonilo α,β -insaturado, *hemi*-curcuminoides **1**, **3**, **4**, **51** y **52**), esta familia de compuestos resultó ser muy tóxica para las células no tumorales COS-7. El compuesto **55** y el compuesto **46** induce una inhibición del 53.9% y 100% respectivamente, demostrando

su falta de selectividad. Estos compuestos se describen como promiscuos, y su posible uso terapéutico está limitado por su alto grado de toxicidad.

Tabla 16. Bioensayo primario para la familia de pirazolinas.

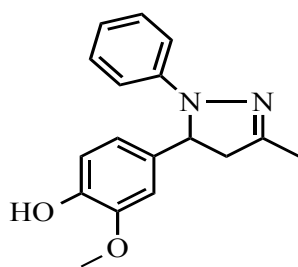
COMPUESTO	% DE INHIBICIÓN DE LA LIPOPEROXIDACIÓN (TBARS)		% DE INHIBICIÓN DEL RADICAL DPPH		ACTIVIDAD CITOTÓXICA % DE INHIBICIÓN A 25 μ M						
	50 μ M	100 μ M	50 μ M	100 μ M	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS-7
	46	96.48	ND	39.72	ND	100	56.92	86.68	94.95	57.4	100
47	97.03	ND	23.29	ND	81.50	80.37	82.80	86.33	46.16	86.9	61.86
48	30.76	ND	3.50	ND	81.66	62.0	94.53	72.38	35.21	93.4	54.29
49	95.27	ND	9.53	ND	NC	NC	20.4	19.7	NC	NC	NC
50	2.04	ND	2.01	ND	12	NC	NC	64.8	8.2	2.8	8.1
51	4.26	ND	1.49	ND	16.6	40.7	NC	56.5	NC	28.6	NC
52	9.79	ND	2.58	ND	73.4	32.3	62.8	100	42.8	100	77.7
53	97.03	ND	1.75	ND	NC	28.1	NC	46.4	NC	20.3	NC
54	96.86	ND	2.73	ND	100	43.04	77.37	94.38	73.9	100	92.4
55	96.92	ND	7.11	ND	26.91	23.14	41.92	34.13	14.5	28.83	53.9

U251: Glía de Sistema Nervioso Central, PC-3: Adenocarcinoma prostático, K562: Leucemia mielógena crónica humana, HCT-15: Adenocarcinoma de colon, MCF-7: Adenocarcinoma mamario humano, SKLU: Adenocarcinoma pulmonar, COS7: Célula no cancerosa de riñón de mono, NC = No citotóxica, ND = No determinado. IC_{50} Lipoperoxidación de los compuestos (**46**)= 6.02 ± 0.10 , (**47**)= 3.23 ± 1.86 , (**49**)= 34.23 ± 0.23 , (**53**)= 2.79 ± 0.14 , (**54**)= 7.12 ± 0.18 , (**55**)= 2.79 ± 0.15

La literatura [54] indica que las pirazolinas poseen actividades antifúngicas, antiinflamatorias [111], antibacterianas y antitumorales debido a que los heterociclos de nitrógeno son ricos en electrones, pero en los reportes no hay estudios detallados sobre la toxicidad en células no tumorales. Los resultados experimentales obtenidos

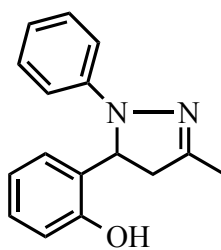
resaltan, ya que por primera vez se están ensayando estos compuestos nitrogenados en distintas líneas celulares (tumoraes) que además incluye una línea celular sana (COS-7, no tumoral).

Tanto las pirazolininas con fragmentos moleculares fenólicos y no fenólicos (Figura 137) resultaron ser activas para la prueba de TBARS, sugiriendo que las funciones nitrogenadas son las que participan mayormente inhibiendo la peroxidación de lípidos. Los compuestos más activos para estas pruebas son el **53** y el **55** (ausencia de fenoles).



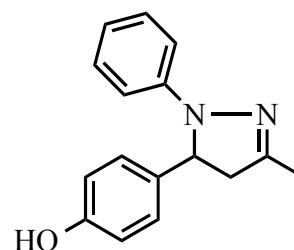
Compuesto **46**

$6.02 \pm 0.10 \mu\text{M}$



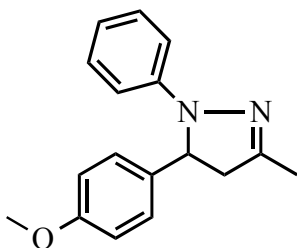
Compuesto **47**

$3.23 \pm 1.86 \mu\text{M}$



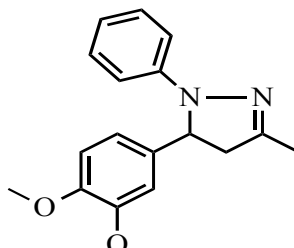
Compuesto **49**

$34.23 \pm 0.23 \mu\text{M}$



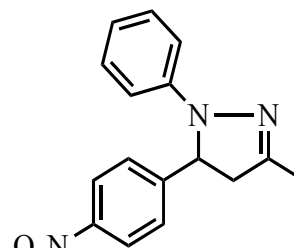
Compuesto **53**

$2.79 \pm 0.14 \mu\text{M}$



Compuesto **54**

$7.12 \pm 0.18 \mu\text{M}$



Compuesto **55**

$2.79 \pm 0.15 \mu\text{M}$

Figura 137. Pirazolininas activas para la prueba de TBARS (IC_{50}).

9.5 Análisis de los ensayos biológicos de chalconas (C-3) y di-chalconas (C-5).

En el caso de las chalconas (Tabla 17) y di-chalconas (Tabla 18) se observó citotoxicidad del 100% para las células no tumorales COS-7 y resalta que los compuestos **56** y **59-62** resultaron sumamente activos (100% de inhibición) en una concentración de 25 μ M para la mayoría de la líneas cancerígenas ensayadas.

Estas familias de compuestos poseen un sistema carbonílico α,β -insaturado que se conjuga mediante resonancia, generando especies para una reacción de adición tipo Michael [112,113] en la posición β al carbonilo; esta propiedad química tiene un papel importante en la citotoxicidad ya que no se presenta una selectividad adecuada.

Las chalconas y di-chalconas sintetizadas en este trabajo difícilmente se propondrían utilizar como compuestos exitosos para aplicaciones terapéuticas dada su alta toxicidad. Estos resultados coinciden con reportes anteriores [114] en donde se describen como compuestos multi-objetivos (multi-target) teniendo una alta promiscuidad de inhibición enzimática, que repercute mostrando una alta inhibición de células tanto cancerígenas como no tumorales *in vitro*.

Tabla 17. Bioensayo primario para las chalconas (C-3).

COMPUESTO	% DE INHIBICIÓN DE LA LIPOPEROXIDACIÓN (TBARS)		% DE INHIBICIÓN DEL RADICAL DPPH		ACTIVIDAD CITOTÓXICA % DE INHIBICIÓN A 25 μ M						
	50 μ M	100 μ M	50 μ M	100 μ M	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS-7
	56	7.79	ND	1.96	ND	97.7	100	100	100	88.7	100
57	91.70	ND	4.28	ND	20.8	45.1	NC	45.5	12.8	40.9	10.8
58	12.35	ND	-8.29	ND	45.3	63.0	99.3	82.5	16.1	83.5	56.3

U251: Glía de Sistema Nervioso Central, PC-3: Adenocarcinoma prostático, K562: Leucemia mielógena crónica humana, HCT-15: Adenocarcinoma de colon, MCF-7: Adenocarcinoma mamario humano, SKLU: Adenocarcinoma pulmonar, COS7: Célula no cancerosa de riñón de mono, NC = No citotóxica, ND = No determinado.

Por lo anterior, las chalconas se consideran como un arma de doble filo [62]. Por un lado, brindan oportunidades (síntesis simple) para explorar estas sustancias con diversas dianas moleculares, lo que las convierte en estructuras privilegiadas para el diseño de fármacos. Por otro lado sin embargo, presentan una alta promiscuidad enzimática o poca selectividad como se ha encontrado experimentalmente en este trabajo.

Tabla 18. Cribado primario para di-chalconas (C-5).

COMPUESTO	% DE INHIBICIÓN DE LA LIPOPEROXIDACIÓN (TBARS)		% DE INHIBICIÓN DEL RADICAL DPPH		ACTIVIDAD CITOTÓXICA % DE INHIBICIÓN A 25 μ M						
	50 μ M	100 μ M	50 μ M	100 μ M	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS-7
	59	7.51	ND	-1.72	ND	100	100	100	100	100	100
60	32.22	ND	-2.37	ND	100	100	100	100	41.7	100	100
61	39.62	ND	6.14	ND	100	100	100	100	86.1	100	100
62	21.22	ND	4.04	ND	19.5	44.3	0.0	100	24.8	65.3	100

U251: Glía de Sistema Nervioso Central, PC-3: Adenocarcinoma prostático, K562: Leucemia mielógena crónica humana, HCT-15: Adenocarcinoma de colon, MCF-7: Adenocarcinoma mamario humano, SKLU: Adenocarcinoma pulmonar, COS7: Célula no cancerosa de riñón de mono, NC = No citotóxica, ND = No determinado.

9.6 Análisis de los ensayos biológicos de curcuminoides tipo heptanoides (63-66 y 67-69) y complejos de curcuminoides (70-71).

Los cuatro compuestos bencilados (**63-66**), el curcuminoides (**67**) y el éster cinámico de curcumina (**69**), presentan una actividad citotóxica baja con respecto a curcumina (ver Tabla 19).

Es importante resaltar que el porcentaje en la inhibición celular en los compuestos **63-66** siguen un patrón: A medida que se agrega un grupo bencilo al núcleo principal de curcumina, se observa una disminución progresiva de la actividad citotóxica, efecto que es muy marcado en las líneas celulares MCF-7 y SKLU-1.

Estos resultados se vuelven muy relevantes destacando que la presencia de los dos fenoles incluyendo el sistema en equilibrio ceto-enol son muy importantes para reflejar el efecto citotóxico conocido para la curcumina, y al verse sustituidos con grupos bencilos disminuye su actividad.

La inhibición de células cancerígenas por la curcumina mono-bencilada (compuesto **63**), concuerda con lo reportado anteriormente [115] en donde se indica que los fenoles son claves para la exhibición de actividad antioxidante y anticancerígena.

Por otro lado, los compuestos **64** y **65** (di y tri-bencilados) y el compuesto **69** (éster cinámico) no mostraron un efecto citotóxico relevante, aunque cuentan con el sistema conjugado de una bis-enona y tengan un sitio razonable para una unión selectiva a receptores tipo Michael de una molécula diana [113].

El compuesto **66** sin fenoles y sin la conjugación en los sistemas de 1,3-dicetona mostró la actividad citotóxica más baja contra tres (HCT-15, MCF-7 y SKLU-1) de las seis líneas celulares tumorales probadas. Se enfatiza que los compuestos bencilados **64-66** y los complejos **70-71** no mostraron actividad citotóxica contra las células no tumorales COS-7.

Tabla 19. Bioensayo primario para curcuminoides y complejos de curcumina.

COMPUESTO	% DE INHIBICIÓN DE LA LIPOPEROXIDACIÓN (TBARS)		% DE INHIBICIÓN DEL RADICAL DPPH		ACTIVIDAD CITOTÓXICA % DE INHIBICIÓN A 25 μ M						
	10 μ M	100 μ M	10 μ M	100 μ M	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS-7
	CURCUMINA	94.55	96.64	25.49	94.21	96.55	66.9	78.57	91.7	100	100
63	56.26	96.37	11.72	77.51	85.4	88.8	96.1	90.7	93.0	71.9	66.4
64	10.78	36.74	1.15	8.28	16.0	12.9	NC	17.4	64.8	20.6	NC
65	6.29	13.83	9.58	26.53	8.5	12.7	10.9	18.3	58.3	15.5	NC
66	6.89	9.13	-0.65	2.24	9.4	12.8	7.8	12.5	37.4	9.3	NC
67	8.22	72.41	-1.98	1.73	47.5	31.2	54.7	25.0	48.7	53.0	70.0
68	43.25	ND	1.62	ND	91.5	100	92.2	93.4	100	82.4	100
69	6.97	21.65	0.77	8.51	NC	22.1	67.3	NC	NC	6.2	NC
70	-3.56	6.36	1.65	4.59	NC	NC	38.6	NC	NC	3.5	NC
71	8.19	21.0	0.71	11.3	2.4	NC	NC	6.7	19.6	13.8	NC

U251: Glía de Sistema Nervioso Central, PC-3: Adenocarcinoma prostático, K562: Leucemia mielógena crónica humana, HCT-15: Adenocarcinoma de colon, MCF-7: Adenocarcinoma mamario humano, SKLU: Adenocarcinoma pulmonar, COS7: Célula no cancerosa de riñón de mono, NC = No citotóxico, ND = No determinado. IC₅₀ Curcumina = 1.30 μ M (DPPH y TBARS)

La prueba de (TBARS).

Los resultados reflejan claramente una disminución notable en el porcentaje de inhibición de TBARS y se correlaciona directamente con el grado de sustitución que va desde el curcuminoide monobencilado (compuesto **63**) al curcuminoide tetrabencilado (compuesto **66**). Estos resultados destacan porque la sustitución de los fenoles con grupos bencilos inhibe la actividad antioxidante.

Actividad de captura del radical (DPPH).

Es notable la disminución de esta actividad en todos los compuestos bencilados (**63-66** y **71**) y los esterificados (**69-70**) en comparación con curcumina. La relación entre los sustituyentes añadidos a la curcumina y la reducción progresiva de la eliminación de radicales libres DPPH se confirma por la hipótesis de que el resto de fenol y la di-cetona libre en la curcumina es necesario para exhibir los efectos antioxidantes conocidos [103].

9.7 Propiedades fluorescentes de curcuminoides bencilados y tinción celular.

Los compuestos derivados de heptanoides (**63-66** y **71**) no son citotóxicos y pueden ser descartados como productos exitosos, después de que el propósito con el que fueron sintetizados se abatió.

Sin embargo, al estudiarse las propiedades espectroscópicas de los derivados bencilados **63-66** y el compuesto **71** resaltaron sus importantes propiedades fluorescentes lo que indujo a la búsqueda de aplicaciones biológicas tomando como ventaja su baja citotoxicidad. Dadas propiedades fluorescentes de algunos productos con respecto a la curcumina, se convirtieron en candidatos para explorar su utilidad para la tinción celular.

Un fluoróforo ideal debe tener las características siguientes: una fluorescencia fuerte [116], un sistema pi (π) de electrones altamente conjugado con una estructura simétrica [117], una emisión de fluorescencia preferentemente mayor de 600 nm, un gran desplazamiento de Stokes y un alto rendimiento cuántico [118], además de una baja citotoxicidad [116,117] como lo que precisamente fue encontrado en los derivados bencilados principalmente los compuestos **64** y **71** que cumplen con estos requisitos.

El diseño estructural del compuesto **71** está implicado con la sustitución de los fenoles terminales por un donador débil (D) como el grupo bencilo, unido a la cadena π , donde el BF_2 es un aceptor (A) fuerte que mantiene una simetría para llegar a una arquitectura D- π -A- π -D.

El uso de $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ para la obtención del compuesto **71** fue ventajoso debido al desplazamiento de la emisión de fluorescencia del boro hacia el rojo [119], encontrando que emite en 662 nm (ver Tabla 20) y cae dentro de la región del infrarrojo cercano (NIR, 650-900 nm).

En el caso de la curcumina que es un colorante natural y emite una fuerte fluorescencia [120] se descarta su uso como un compuesto para el monitoreo de sistemas biológicos, debido a su bajo rendimiento cuántico ($\Phi = 0.01$) [121] y su considerable actividad citotóxica contra varias líneas celulares de cáncer humano.

Los compuestos derivados bencilados **63-66** y el compuesto **71** se disolvieron en dimetilformamida (DMF) y posteriormente fueron expuestos a la luz visible y ultravioleta observando que los compuestos **64** y **71** emiten luz brillante que se compara con respecto a la curcumina (ver Figura 138). Los espectros de absorbancia (ver Anexo) fueron medidos en una concentración de 1×10^{-5} mol/L encontrando un máximo de absorción en 428 nm (compuesto **63**), 425 nm (compuesto **64**), 442 nm (compuesto **65**), 350 nm (compuesto **66**) y 510 nm (compuesto **71**) debido a las transiciones $\pi\text{-}\pi^*$ [99,122].

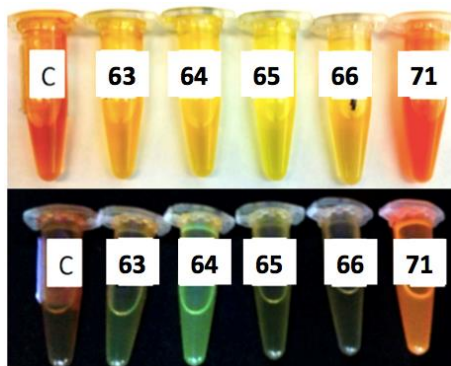


Figura 138. Emisión observada para curcumina y los derivados bencilados bajo luz visible (arriba) y luz ultravioleta (abajo). C: curcumina.

Los compuestos **64** y **71** cumplieron con los siguientes criterios: i) síntesis en un solo paso de reacción y en condiciones suaves [119], ii) se presenta la mejora de las propiedades fluorescentes debido a que se preserva el sistema conjugado D- π -D [123,124] sin modificar la coplanaridad de la cadena heptanoide, iii) Se mejoran las propiedades lipofílicas [125,126] con una reducción de la actividad citotóxica.

En el caso de los compuestos **63**, **64** y **65**, su emisión máxima de fluorescencia se mejoró con respecto a la curcumina (Figura 139) desplazándose hacia la región del NIR, mostrando un desplazamiento batocrómico de 556 nm, 560 nm y 534 nm respectivamente.

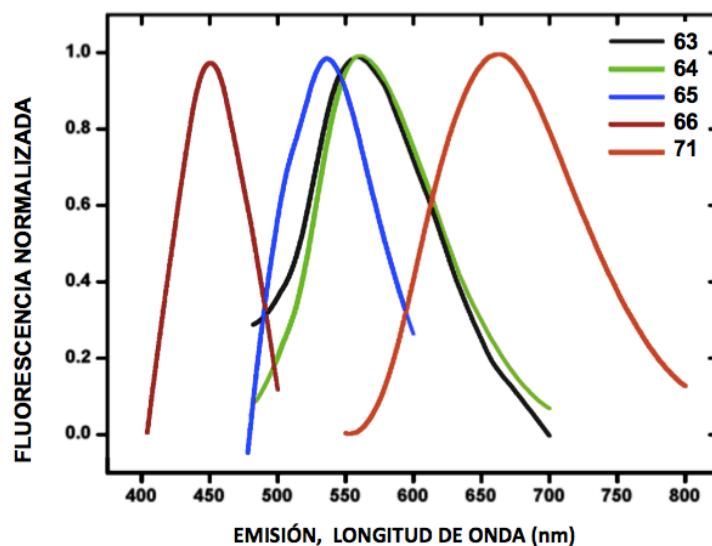


Figura 139. Espectro de fluorescencia de los curcuminoides bencilados.

El compuesto **63** mostró un rendimiento cuántico bajo ($\Phi = 0.0016$) y la fluorescencia de emisión máxima para el compuesto **65** se observó a 534 nm cayendo fuera de la región NIR. En el caso del compuesto **66**, el derivado tetra-bencilado no mostró ninguna mejora en sus propiedades de fluorescencia (Tabla 20). Por lo tanto, el compuesto **64** mostró las mejores propiedades de fluorescencia entre toda la familia de derivados de curcumina bencilada.

Tabla 20. Propiedades fluorescentes de los compuestos **63-66**, **71** y curcumina.

Compuesto	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}/\text{nm}$	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ^a	$\lambda_{\max}^{\text{if}}/\text{nm}$	Φ ^b
Curcumina	420 *	-----	520 *	0.01 *
63	428	76,900	556	0.0016
64	425	28,200	560	0.023
65	442	29,500	534	0.025
66	350	37,900	450	0.01
71	510	76,500	662	0.021

$\lambda_{\max}^{\text{abs}}/\text{nm}$ y $\lambda_{\max}^{\text{if}}/\text{nm}$ representan la longitud de onda máxima de absorción lineal y fluorescencia de fotón único, respectivamente. ^aCoefficiente de extinción molar (ϵ), ^bRendimiento cuántico (Φ) se determinó a temperatura ambiente, en DMF diluido con buffer tris (50 mM, pH = 7.5) y utilizando sulfato de quinina como referencia ($\Phi_r = 0.55$ en H_2SO_4 1N)[127], *[121].

Estos resultados indican que existe una fuerte correlación entre las propiedades fluorescentes y el grado de sustitución de cada derivado de curcumina bencilada. La introducción de grupos bencilo terminales en los compuestos **64** y **65** se refleja en cambios significativos de desplazamientos de Stokes (más de 90 nm) y un aumento al doble del rendimiento cuántico en comparación con curcumina.

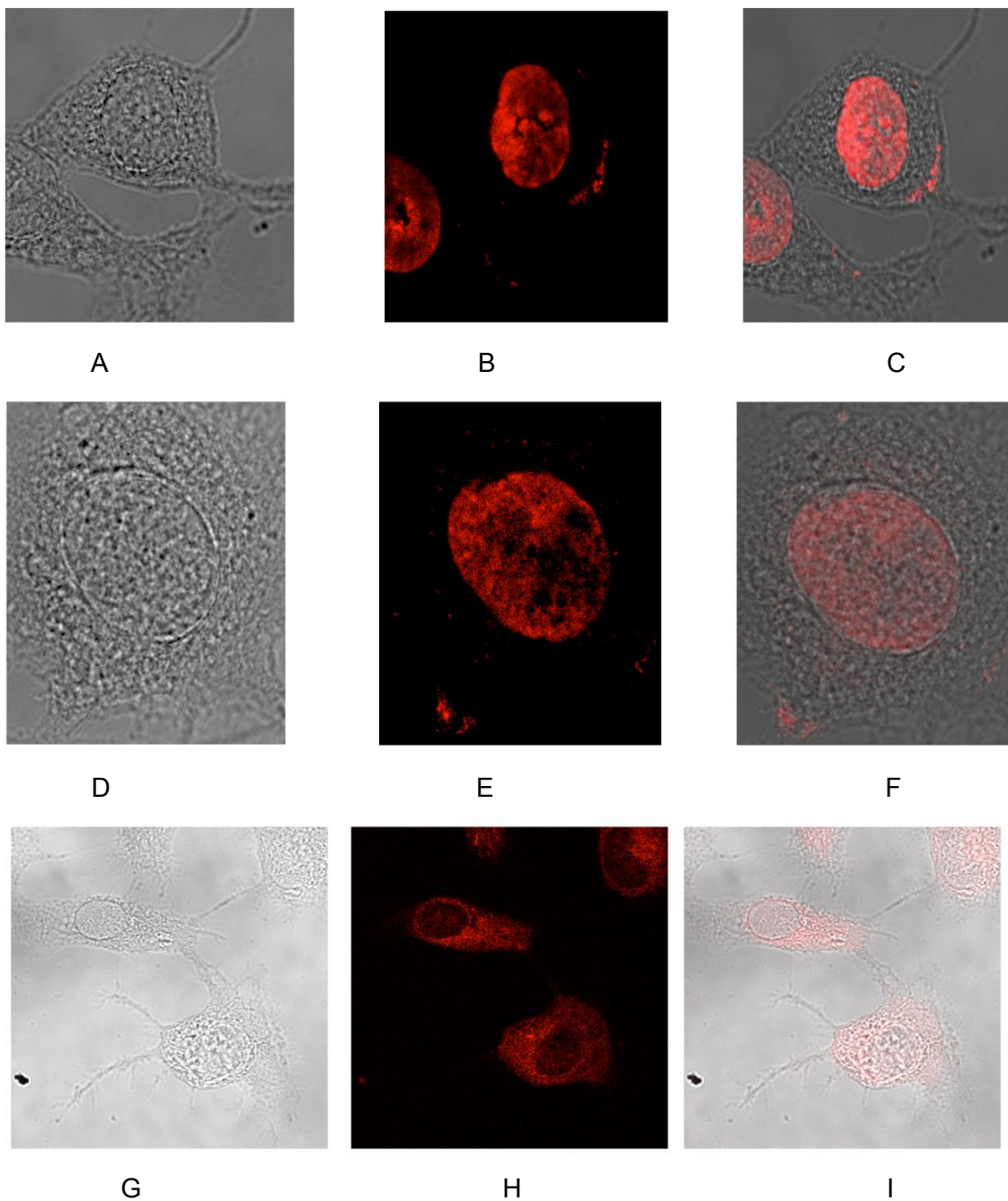
Los compuestos de fluorescencia a base de curcumina deben preservar la simetría y la coplanaridad molecular de la cadena heptanoide como se muestra en la estructura de rayos X del compuesto **71** (ver Figura 127), ya que esta propiedad permite una alta conjugación de sistema de electrones pi (π), que se traduce en la mejora de propiedades fluorescentes (aumento de desplazamiento de Stokes, intensidad de fluorescencia y rendimiento cuántico).

Los compuestos **64** y **71** presentan una emisión de fluorescencia de $\lambda_{\text{max}}^{1f}/\text{nm} = 560$ nm y $\lambda_{\text{max}}^{1f}/\text{nm} = 662$ respectivamente cerca de la región del infrarrojo (NIR). Con un rendimiento cuántico de $\Phi = 0.023$ y $\Phi = 0.021$ (dos veces mayor que curcumina [121]). Por lo tanto se pueden utilizar como compuestos para tinción celular ya que la adición de grupos bencilos permite una lipofilicidad mayor y la penetración de membranas celulares.

La línea celular de astrocitos humanos SVG (no tumoral) y las líneas celulares de astrocitos humanos (tumoraes) U-87 y U-251 se seleccionaron con base en los criterios siguientes: a) los astrocitos son células que desempeñan diferentes funciones vitales para mantener función cerebral adecuada y b) los astrocitos junto con otras células cerebrales a menudo se usan para comprender la base de las enfermedades neurológicas que junto con el cáncer, representan uno de los principales problemas de salud humana.

Después de estas consideraciones, los derivados de curcumina **64** y **71** fueron expuestos a astrocitos y astrocitos durante 24 h. La microscopía de fluorescencia confocal mostró que tanto el compuesto **64** como el compuesto **71** son fluoróforos que

tiñen el núcleo o el citoplasma respectivamente (ver Imagen 1) y la penetración de las membranas celulares se debe al buen coeficiente de reparto que presentan ambos compuestos con valores de $\log P = 2.16 \pm 0.069$ y 1.82 ± 0.222 , respectivamente.



El compuesto **64** cruzó tanto la membrana citoplasmática y la del núcleo ya que tiñe solo el núcleo de las células sanas SVG (A = campo claro, B = fluorescencia, C = transposición) y las células cancerígenas U-87MG (D = campo claro, E = fluorescencia, F = transposición). Mientras que el compuesto **71** también cruzó la membrana citoplasmática pero no la del núcleo, tiñendo solo el citoplasma de células sanas SVG (G = campo claro, H = fluorescencia, I = transposición).

Imagen 1. Tinción de células en núcleo y citoplasma con el compuesto **64** y **71**.

El compuesto **64** resultó ser un fluoróforo versátil, ya que puede excitarse con una luz láser de 405 nm y la detección se puede realizar en un rango de 420 a 480 nm, presentando un pico máximo de detección a 460 nm, claramente dentro de la longitud de onda azul (420-490 nm).

El compuesto **71** se excitó con una luz láser de 560 nm y de 647 nm y la detección cayó dentro del rango de la región del infrarrojo cercano (NIR) 657-750 nm, por lo que se puede considerar como un fluoróforo ideal para la tinción de células y tejidos vivos.

10. Conclusiones.

Los resultados obtenidos demuestran que el sistema carbonilo α - β -insaturado (*retro*-curcuminoídes) se relaciona ampliamente con la actividad citotóxica, sin embargo algunas familias de compuestos (bencilidenos, chalconas y di-chalconas) resultaron muy tóxicas para las células no tumorales COS-7. Por ello, que se debe evaluar cuidadosamente el uso de los aceptores tipo Michael como fármacos terapéuticos exitosos.

La mayoría de las moléculas no mostraron actividades antioxidantes importantes, lo que es indicativo de que las familias de compuestos no siguen los mismos mecanismos de señalización para producir de la muerte celular con respecto a la curcumina.

La sustitución de una cetona α , β -insaturada por un anillo de pirazolina induce aumento de la actividad citotóxicas aunque la actividad antioxidante se relaciona más con la presencia de los nitrógenos en el heterociclo que con los fenoles.

Para hacer frente al problema de la selectividad en los compuestos muy promiscuos (*v. gr.*, chalconas, bencilidenos, di-chalconas, pirazolininas) se propone sintetizar ésteres cinámicos o éteres bencilícos con un metoxilo en la posición *orto* de

los anillos aromáticos, ya que los hallazgos experimentales apoyan que la presencia de dichos grupos disminuyen las actividades citotóxicas.

Aunque la mayoría de familias sintetizadas resultaron más activas que sus precursores, solo los *retro*-curcuminoides fueron comparables en la actividad citotóxica (valores de IC₅₀ sin diferencia estadística significativa) con respecto a curcumina. Los resultados indican que para obtener actividades biológicas favorables en los curcuminoides (heptanoides), es importante conservar el sistema de la cetona α,β -insaturada así como grupos fenólicos.

Por lo antes expuesto se concluye que la hipótesis planteada se cumple parcialmente, ya que los resultados obtenidos en este estudio demuestran que las modificaciones sintéticas hechas a cada materia prima resultó con el aumento de la actividad citotóxica, exceptuando a los curcuminoides.

Los resultados experimentales apoyan que ninguna familia de compuestos mimetiza todos los efectos biológicos de la curcumina (antioxidante y citotóxica), incluso cuando se sintetizó la familia de curcuminoides (bencilados, éster cinámico) donde se abatieron las actividades propias de la molécula. La ausencia de citotoxicidad y el hallazgo simultáneo de propiedades de fluorescencia extraordinarias permitió que varios de estos compuestos pudieran ser considerados como excelentes fluoróforos para la tinción de células vivas. Por ello, se llevó a cabo el registro preliminar de una patente ante el IMPI (# MX/a/2020/011181 folio MX/E/2020/064096).

Se cumplió mayoritariamente con los objetivos del presente trabajo y se sintetizaron 71 compuestos como se describe en el esquema de reacción, haciendo su caracterización espectroscópica, citotóxica y antioxidante.

11. Equipos utilizados.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato digital Electrothermal Engineering IA9100 en tubos capilares abiertos y no están corregidos.

Los espectros de IR se realizaron en pastillas de KBr o película, usando un espectrofotómetro FT-IR Bruker Tensor 27 en el rango de 4000-400 cm^{-1} (los espectros se muestran en el material anexo).

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se analizaron con distintos espectrómetros Bruker Fourier de 400 MHz, 500 MHz ó 700 MHz, algunos espectros de RMN de ^1H se realizaron en equipos Varian de 300 MHz ó 600 MHz, se utilizó el TMS como referencia interna y como disolventes el CDCl_3 o $\text{DMSO-}d_6$, para el espectro de RMN ^{19}F del compuesto **71** se realizó con un espectrómetro Varian 300MHz.

La espectrometría de masas se realizó utilizando los equipos JEOL SX 102A o JMS-T100LC, mediante el modo de ionización de impacto electrónico (IE^+), bombardeo con átomos rápidos (FAB^+), o con la técnica de análisis directo en tiempo real (DART^+), y los espectros se muestran en el material anexo.

La difracción de rayos X de monocristal (DXR) se llevó a cabo utilizando un difractómetro Bruker, modelo Smart Apex, equipado con radiación de $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$) o $\text{Mo K}\alpha$ ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) y detector CCD bidimensional y dispositivo de baja temperatura. La recopilación y reducción de datos se realizó utilizando los programas APEX y SAINT-Plus [128] y fueron resueltos usando SHELX-2014 [129] por medio de métodos directos. Los datos se refinaron mediante el procedimiento de mínimos cuadrados de matriz completa en F_2 con factores de temperatura anisotrópicos para los átomos que no son de hidrógeno. Las posiciones de todos los átomos de H se calcularon geoméricamente, y se utilizó un modelo de conducción en el refinamiento, con distancias C-H en el rango de 0.93-0.97 Å y $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2U_{\text{eq}}(\text{C})$. El software utilizado para presentación del material fue PARST97 [130] y Mercury 3.7 [131].

Las mediciones de absorción máxima de ultravioleta se registraron con un espectrofotómetro Shimadzu U160 UV-Visible (los espectros se muestran en el material anexo). Las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo utilizando un espectrofluorómetro ISS-PC1 (ISS, Champaign, IL, EE. UU.) a 20 °C, en una cubeta de cuarzo de 1 cm de longitud. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ) de los compuestos **63-66** y **71** se midieron en comparación con sulfato de quinina como estándar de fluorescencia ($\Phi_{st} = 0.55$ en H₂SO₄ 1N).

Se utilizó el servicio web “QuickCalcs” para calcular la *t* de Student de manera desapareada. Se utilizó el servicio web SwissDock [132–134] (<http://www.swissdock.ch/>) para acoplar (tipo de acoplamiento [135]: preciso, flexibilidad de la proteína a 5 Å, mismo sitio de unión) la curcumina y los *retro*-curcuminoides con las proteínas Akt-2 y el NF- κ β (subunidad p65 cadenas A y B).

Se utilizaron como ligantes la curcumina (CCDC-676884) y los *retro*-curcuminoides cristalizados. Como dianas moleculares se utilizaron las proteínas cristalizadas que se encuentran en la base de datos del Protein Data Bank (PDB) con los códigos: 3E88 (Akt-2) 1LE5 (NF- κ β, subunidad p65), la energía de unión de cada proteína con el ligante se analizó de acuerdo a los procesos establecidos [136]. Con el programa COACH [137] (Universidad de Michigan) se estableció la secuencia del sitio de unión y se encuentra en el material anexo. Las imágenes gráficas estimadas así como la minimización de energía para los compuestos se produjeron utilizando el software UCSF Chimera 1.15.

Tinción de inmunofluorescencia y microscopía. La línea de células gliales fetales humanas SVG y las líneas celulares de glioblastoma humano U-251 y U-87 se obtuvieron de cultivos con confluencia del 90%, se separaron y se cultivaron 2×10^4 células en 1 ml de medio fetal bovino DMEM-10% sobre poli-L-lisina. Las células se expusieron durante 24 h al compuesto **64** ó **71** a una concentración de 20 μ M, disuelto en DMF y diluido con medio PBS haciendo una concentración apropiada inferior a 0.1%

de DMF [138]. Después de la exposición, las células se lavaron con 1 ml de PBS y se fijaron con metanol absoluto a -20 °C durante 5 min. Luego, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron durante 5 min. Finalmente, las células se fijaron, se montaron y se observaron en un microscopio confocal láser Leica TCS SP8x (Wetzlar, Alemania). Las imágenes se analizaron con el software Leica LAS X (Wetzlar, Alemania).

El coeficiente de partición se midió de acuerdo con el método del matraz agitado [139,140]. Una solución 100 µM del compuesto **64** ó **71** en 1-octanol (600 µL) previamente saturado con agua (600 µL). se sometió a agitación con vortex durante 3 min y luego se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min. La fase del 1-octanol se separó y se usó una alícuota (100 µL) de cada fase para la cuantificación por espectrofotometría ultravioleta (UV).

12. Pruebas físicas y caracterización espectroscópica de los compuestos sintetizados.

A continuación se reporta la espectroscopia con la que se caracterizaron los productos sintéticos, inicialmente se realizó la RMN ¹H como medio de control para todos los compuestos, posteriormente se realizaron las pruebas de IR y EM principalmente para los compuestos nuevos y se muestran en el material anexo.

	Número de compuesto
	1, 2, 3, 4, 5, 11, 12, 17, 20, 21, 22, 23, 50, 51, 52, 67. (Materias Primas).
Compuestos ya reportados en la literatura	10, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 53, 54, 55, 56, 57, 59, 63, 64, 65, 66, 68, 69.
Nuevos compuestos sintetizados	6, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 24, 25, 26, 27, 30, 44, 58, 60, 61, 62, 70, 71.

(*E*)-4-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-but-3-en-2-ona (**1**) (Deshidrozingeronona, DHZ). Polvo amarillo cristalizado en AcOEt/Hex. 75% de rendimiento, p.f. 126 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.45 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.11–7.05 (m, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.59 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 2.37 (s, 3H).

Cloruro de cinamoilo (**2**). Agujas blancas cristalinas con olor irritante característico. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.84 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.61–7.55 (m, 2H), 7.51–7.38 (m, 3H), 6.65 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H).

(*E*)-4-(2-Hidroxifenil)-but-3-en-2-ona (**3**). Polvo amarillo cristalizado en AcOEt/Hex, 65% de rendimiento, p.f. 138.5 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.86 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 7.48 (dd, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.26 (td, *J* = 7.7, 7.3, 1.7 Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.02 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 6.95 – 6.90 (m, 2H), 2.43 (s, 3H).

(*E*)-4-(3-Hidroxifenil)-but-3-en-2-ona (**4**). Polvo amarillo, cristalizado en AcOEt/Hex., 70% de rendimiento, p.f. 95 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.48 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 7.28–7.23 (m, 1H), 7.12–7.06 (m, 3H), 6.95 (ddd, *J* = 8.1, 2.3, 1.1 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 2.39 (s, 3H).

(*E*)-4-(4-Hidroxifenil)-but-3-en-2-ona (**5**). Polvo amarillo cristalizado en AcOEt/Hex. 75% de rendimiento, p.f. 112 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.59 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.47–7.42 (m, 2H), 6.95–6.89 (m, 2H), 6.61 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 2.39 (s, 3H).

2-Metoxi-4-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-il) fenil cinamato (**6**). Polvo amarillo cristalizado en AcOEt/Hex., 80% de rendimiento, p.f. 132 °C. RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.88 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.59 (dd, *J* = 6.6, 2.9 Hz, 2H), 7.49 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.42 (dd, *J* = 4.9, 1.9 Hz, 3H), 7.16 (d, *J* = 3.7 Hz, 3H), 6.67 (dd, *J* = 16.1, 9.1 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 2.39 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 198.10, 164.59, 151.59, 146.95, 145.68, 143.71, 142.67, 141.69, 134.06, 133.29, 130.71, 128.92, 128.29, 127.23, 123.40, 121.49, 116.57, 111.30, 55.92, 27.46. IR (cm⁻¹): 3069, 3012, 2933, 1733, 1254, 1122, 1030, 971. m/z [M+H]⁺: 322 (calculado) ion molecular no observado.

2-((*E*)-3-Oxobut-1-en-1-il) fenil cinamato (**7**). Polvo verde cristalizado en éter etílico/Hex., 90% de rendimiento p.f. 138.9 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.93 (dd, *J* = 16.1, 0.5 Hz, 1H), 7.72 -7.58 (m, 4H), 7.49-7.41 (m, 4H), 7.30 (dddd, *J* = 7.9, 7.4, 1.2, 0.6 Hz, 1H), 7.22 (ddd, *J* = 8.2, 1.3, 0.4 Hz, 1H), 6.72 (dd, *J* = 18.8, 16.2 Hz, 2H), 2.34 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 198.03, 165.02, 151.61, 149.65, 147.59, 136.58, 133.92, 131.31, 130.99, 129.04, 128.87, 128.45, 127.53, 127.34, 126.35, 123.19, 116.38, 27.62. IR (cm⁻¹); 3060, 3030, 1728, 1634, 1600, 1133, 984. m/z [M+H]⁺ : 293.

3-((*E*)-3-Oxobut-1-en-1-il) fenil cinamato (**8**). Agujas amarillas cristalizado en CH₂Cl₂/Hex, 90% de rendimiento. p.f. 100 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.89 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J* = 16.0, 3.0 Hz, 2H), 7.53-7.35 (m, 7H), 7.22 (dt, *J* = 6.9, 2.3 Hz, 1H), 6.72 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.64 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 2.38 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 198.10, 165.16, 151.25, 147.04, 142.25, 136.05, 134.02, 130.84, 130.59, 129.95, 129.06, 129.02, 128.34, 128.26, 127.92, 125.75, 123.66, 121.06, 116.90, 27.67. IR (cm⁻¹); 3052, 2923, 1717, 1663, 1631, 1310, 1257, 1150, 977. m/z [M+H]⁺ : 293.

4-((*E*)-3-Oxobut-1-en-1-il) fenil cinamato (**9**). Polvo blanco cristalizado en AcOEt/Hex. con un rendimiento del 90%. p.f. 139.15 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.87 (dd, *J* = 16.0, 15.9 Hz, 2H), 7.63-7.47 (m, 4H), 7.48-7.37 (m, 3H), 7.29-7.20 (m, 2H), 6.66 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.53 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 2.38 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 198.17, 164.96, 162.43, 152.44, 148.60, 147.08, 142.29, 133.98, 133.69, 132.03, 131.23, 130.84, 129.37, 129.03, 128.99, 128.54, 128.31, 127.13, 122.25, 116.84, 116.73, 27.56. IR (cm⁻¹); 3062, 3027, 2926, 1726, 1662, 1629, 1214, 1140, 978. m/z [M+H]⁺ : 293.

4-Formil-2-metoxifenil cinamato (**10**). Polvo blanco cristalizado en AcOEt/Hex. con un rendimiento del 85%. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 9.97 (s, 1H), 7.90 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.60 (m, 2H), 7.56-7.48 (m, 2H), 7.43 (m, 3H), 7.31 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 191.06, 164.29,

152.14, 147.37, 145.06, 135.19, 134.03, 130.89, 129.02, 128.39, 124.79, 123.55, 116.35, 110.86, 56.14. IR (cm⁻¹): 1727, 1701, 1632, 1595, 1500, 1268, 1136. m/z [M+H]⁺: 282.

Ácido (*E*)-3-(4-acetoxi-3-metoxifenil) acrílico (**11**). En un matraz de 250 mL se agregó 1 meq de ácido ferúlico suspendido en 30 mL de agua destilada y se le agregó 5% de ácido fosfórico, y 2 meq de anhídrido acético; la reacción se dejó en agitación constante a temperatura ambiente y el curso de la reacción se siguió mediante C.C.F. (CH₂Cl₂:MeOH:: 95:5); una vez concluida la reacción se agregó hielo, y NaHCO₃ hasta pH = 7, el producto precipitó, se filtró y finalmente se recristalizó en MeOH, 80% de rendimiento, producto blanco cristalino con un p.f. 205 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.62 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.13–7.10 (m, 2H), 7.06–7.03 (m, 1H), 6.38 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 2.31 (s, 3H).

Acetato del (*E*)-4-(3-cloro-3-oxoprop-1-enil)-2-metoxifenilo (**12**). Polvo blanco con olor irritante característico. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.80 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.28–6.98 (m, 3H), 6.60 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 2.33 (s, 3H).

2-Metoxi-4-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-il)-fenil-(*E*)-3-(4-acetoxi-3-metoxifenil) acrilato (**13**). Polvo cristalino incoloro, recristalizado Éter/Hex., con un rendimiento del (80%), p.f. 181 °C. RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.84 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 7.3 Hz, 5H), 7.09 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 6.61 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 3.89 (s, 6H), 2.40 (s, 3H), 2.34 (s, 3H); RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 20.63, 27.30, 27.60, 55.90, 111.35, 116.70, 121.50, 123.40, 133.4, 141.70, 142.76, 146.29, 151.56, 164.60, 168.6, 198.3. IR (cm⁻¹): 3079, 3010, 1758, 1722, 1196, 1152, 1120, 1027, 978. m/z [M+H]⁺: 411.

2-((*E*)-3-Oxobut-1-en-1-il)-fenil-(*E*)-3-(4-acetoxi-3-metoxifenil) acrilato (**14**). Agujas verdes cristalizadas en Éter /Hex., con un rendimiento del 90%. p.f. 160 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.88 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.66 (dd, 2H), 7.49-7.41 (m, 1H), 7.33-7.17 (m, 4H), 7.10 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 6.64 (d, *J* = 16 Hz,

1H), 3.90 (s, 3H), 2.34 (s, 6H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 198.02, 168.65, 164.89, 151.54, 149.58, 146.81, 142.04, 136.49, 132.80, 131.32, 128.82, 127.52, 127.30, 126.39, 123.41, 123.15, 121.69, 116.55, 111.53, 55.97, 27.69, 20.61. IR (cm⁻¹); 3072, 3011, 2956, 1759, 1733, 1604, 1258, 1201, 1120, 984. m/z [M+H]⁺: 381.

3-((*E*)-3-Oxobut-1-en-1-il)-fenil-(*E*)-3-(4-acetoxi-3-metoxifenil) acrilato (**15**). Agujas incoloras cristalizado en CH₂Cl₂/ Éter/Hex., con un rendimiento del 90%. p.f. 101.6 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.84 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 7.47-7.36 (m, 3H), 7.25 -7.15 (m, 3H), 7.10 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.72 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 6.58 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 2.34 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 198.07, 168.67, 164.98, 151.50, 151.17, 146.24, 142.18, 141.89, 136.06, 132.93, 129.94, 127.91, 125.77, 123.60, 123.38, 121.50, 121.00, 117.07, 111.48, 55.92, 27.64, 20.60. IR (cm⁻¹); 3070, 2945, 1762, 1720, 1611, 1237, 1191, 1150, 975. m/z [M+H]⁺: 381.

4-((*E*)-3-Oxobut-1-en-1-il)-fenil-(*E*)-3-(4-acetoxi-3-metoxifenil) acrilato (**16**). Agujas incoloras cristalizado en AcOEt/Hex., con un rendimiento del 88%. p.f. 172 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.84 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 7.26-7.15 (m, 4H), 7.10 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.70 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.58 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.34 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 198.11, 168.64, 164.78, 152.34, 151.47, 146.29, 142.21, 141.89, 132.89, 132.08, 129.37, 127.16, 123.38, 122.21, 121.50, 117.02, 111.46, 55.93, 27.58, 20.61. IR (cm⁻¹); 3066, 2982, 1757, 1725, 1632, 1585, 1256, 1203, 1166, 1119, 1012, 974. m/z [M+H]⁺: 381.

(*E*)-3-(4-Hidroxi-3-metoxifenil) acrilato de metilo (**17**). En un matraz de 100 mL conteniendo 5 meq de ácido ferúlico en 20 mL de metanol anhidro se agregaron 0.2 mL de ácido sulfúrico y la solución se calentó a reflujo durante 6 h. Una vez concluida la reacción, se agregó NaHCO₃ por partes hasta pH = 6 y la mezcla de reacción se extrajo con 60 mL de AcOEt (3 x 20 mL). Los extractos orgánicos se mezclaron y se secaron con Na₂SO₄, el residuo sólido se filtró y el disolvente se evaporó a presión

reducida; se obtuvo un líquido amarillento con 82% de rendimiento. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.62 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.07 (ddd, $J = 8.2, 2.0, 0.5$ Hz, 1H), 7.02 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.29 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 5.96 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.80 (s, 3H) RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 167.70, 147.98, 146.76, 144.93, 126.92, 122.99, 115.12, 114.72, 109.38, 55.90, 51.56. IR (cm^{-1}): 3379, 2942, 1705, 1510, 1429, 1236. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 208.

2-Metoxi-4-((*E*)-3-metoxi-3-oxoprop-1-en-1-il)-fenil cinamato (**18**). Polvo blanco cristalizado en AcOEt/Hex., con un rendimiento del 90%. p.f. de 148 °C. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.88 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.63–7.56 (m, 2H), 7.45–7.39 (m, 3H), 7.19–7.11 (m, 3H), 6.66 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.41 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.81 (s, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 167.24, 164.66, 151.54, 146.95, 144.18, 141.53, 134.13, 133.29, 130.72, 128.96, 128.32, 123.37, 121.22, 117.97, 116.65, 111.34, 55.95, 51.71. IR (cm^{-1}): 3007, 1733, 1692, 1631, 1244, 1118, 1032. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 339.

(*E*)-2-Metoxi-4-((*E*)-3-metoxi-3-oxoprop-1-en-1-il)-fenil-3-(4-acetoxi-3-metoxifenil) acrilato (**19**). Agujas blancas cristalizadas de MeOH con un rendimiento del 75%. p.f. 218 °C. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.83 (d, $J = 16$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.22–7.00 (m, 6H), 6.60 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.40 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.81 (s, 3H) 2.32 (s, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 168.67, 167.23, 164.50, 151.50, 151.47, 146.18, 144.15, 141.82, 141.46, 133.33, 133.06, 123.34, 121.56, 121.21, 118.01, 116.85, 111.41, 111.33, 55.95, 55.92, 51.72, 20.62. IR (cm^{-1}): 3008, 1755, 1716, 1637, 1598, 1506, 119, 1026. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 427.

4-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-butan-2-ona (**20**). Zingerona, líquido amarillo claro con un rendimiento del 94%. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 6.81 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.70 – 6.63 (m, 2H), 5.81 (s, 1H), 3.84 (s, 3H), 2.84 – 2.79 (m, 2H), 2.74 – 2.70 (m, 2H), 2.12 (s, 3H).

4-(2-Hidroxifenil)-butan-2-ona (**21**). Líquido color ámbar con un rendimiento del 85%. RMN ¹H (500 MHz,) δ (ppm) 7.64 (s, 1H), 7.13–7.05 (m, 2H), 6.90–6.82 (m, 2H), 2.88 (td, *J* = 5.9, 1.2 Hz, 2H), 2.82 (td, *J* = 5.9, 1.2 Hz, 2H), 2.15 (s, 3H).

4-(3-Hidroxifenil)-butan-2-ona (**22**). Polvo blanco amorfo cristalizado en AcOEt/Hex., con un rendimiento del 90%. p.f. 83 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.16 – 7.11 (m, 1H), 6.72 (dd, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1H), 6.68 (dt, *J* = 6.7, 1.6 Hz, 2H), 5.77 (s, 1H), 2.87 – 2.82 (m, 2H), 2.79 – 2.73 (m, 2H), 2.15 (s, 3H).

4-(4-Hidroxifenil) butan-2-ona (**23**). Polvo amarillo claro cristalizado en AcOEt/Hex., con un rendimiento del 90%. p.f. 78.5 °C . RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.04–7.00 (m, 2H), 6.77–6.73 (m, 2H), 2.85–2.80 (m, 2H), 2.75–2.71 (m, 2H), 2.14 (s, 3H).

Cinamato de 2-metoxi-4-(3-oxobutil)-fenilo (**24**). Polvo blanco cristalizado en AcOEt/Hex., con un rendimiento del 90%. p.f. 77 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.87 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.66–7.51 (m, 2H), 7.48–7.36 (m, 3H), 7.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.87–6.73 (m, 2H), 6.66 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 2.90 (td, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.78 (td, *J* = 8.0, 6.6 Hz, 2H), 2.16 (s, 1H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 207.73, 165.10, 151.02, 146.49, 140.02, 138.00, 134.26, 130.58, 128.94, 128.28, 122.74, 120.36, 117.04, 112.73, 55.89, 45.16, 30.12, 29.61. IR (cm⁻¹): 3009, 2950, 1730, 1707, 1631,1602, 1507, 1419, 1302, 1265,1198, 1140. m/z [M+H]⁺ : 324.

Cinamato de 2-(3-oxobutil)-fenilo (**25**). Líquido amarillo claro con un rendimiento del 90%. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.89 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.72–7.51 (m, 2H), 7.43 (m, 3H), 7.32–7.23 (m, 2H), 7.23–7.14 (m, 1H), 7.14–6.97 (m, 1H), 6.65 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 2.92–2.79 (m, 2H), 2.79–2.66 (m, 2H), 2.12 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 207.70, 165.46, 148.96, 146.90, 134.06, 133.00, 130.81, 130.24, 128.36, 127.46, 126.22, 122.47, 116.90, 43.73, 30.01, 24.19. IR (cm⁻¹): 2931, 1712, 1632, 1489, 1449, 1133. m/z [M+H]⁺ : 295.

Cinamato de 3-(3-oxobutil)-fenilo (**26**). Líquido claro con un rendimiento del 90%. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.91–7.80 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.62–7.54 (m, 2H), 7.46–7.38 (m, 3H), 7.35–7.27 (m, 1H), 7.10–7.04 (m, 1H), 7.04–6.96 (m, 2H), 6.62 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 3.26–2.88 (m, 2H), 2.78 (m, 2H), 2.15 (s, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 207.58, 165.41, 150.88, 146.57, 142.74, 134.16, 130.70, 129.44, 128.99, 128.29, 125.83, 121.48, 119.36, 117.29, 44.84, 30.10, 29.43. IR (cm^{-1}): 3060, 2924, 1714, 1633, 1486, 1446, 1225, 1137. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 294.

Cinamato de 4-(3-oxobutil)-fenilo (**27**). Polvo blanco cristalizado en AcOEt/Hex., 90% de rendimiento. p.f. 70 °C. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.86 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.63–7.55 (m, 2H), 7.42 (m, 3H), 7.26–7.17 (m, 2H), 7.12–7.04 (m, 2H), 6.62 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 2.91 (m, 2H), 2.77 (m, 2H), 2.15 (s, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 207.72, 165.51, 149.06, 146.52, 138.53, 134.17, 130.69, 129.29, 128.99, 128.29, 121.58, 117.31, 45.12, 30.10, 29.08. IR (cm^{-1}): 3064, 2928, 1708, 1632, 1503, 1312, 1198, 1136. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 294.

(*E*)-3-(4-(Benciloxi)-3-metoxifenil) acrilato de metilo (**28**). En un matraz redondo de 100 mL, 1 meq del compuesto **17** se disolvió en 30 mL de acetona anhidra y posteriormente se añadió 1.1 meq of K_2CO_3 seguido de 1.1 meq de bromuro de bencilo y se dejó en agitación constante a temperatura ambiente. El transcurso de la reacción se siguió por C.C.F. (Hex:AcEtO::70:30). Una vez concluida la reacción se filtró en celita para la eliminación de impurezas sólidas y la acetona se evaporó, finalmente el exceso de disolvente se eliminó en presión reducida, se obtuvo un polvo café con un rendimiento del 78%, p.f. 97.1 °C. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.61 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.42 (ddt, $J = 7.6, 1.4, 0.7$ Hz, 2H), 7.36 (tt, $J = 6.6, 0.8$ Hz, 2H), 7.30(m, 1H), 7.06 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.02 (ddd, $J = 8.2, 2.1, 0.5$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.30 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 5.18 (s, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.79 (s, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 167.58, 150.24, 149.74, 145.12, 144.69, 143.62, 136.55, 128.58, 127.96, 127.71, 127.16, 122.30, 115.59, 113.44, 110.27, 70.82, 55.95, 51.54. IR (cm^{-1}): 2942, 1700, 1627, 1592, 1508, 1255. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 300.

Ácido (*E*)-3-(4-(benciloxi)-3-metoxifenil) acrílico (**29**). En un matraz redondo de 100 mL, 1 meq del compuesto **28** se disolvió en 20 mL de etanol y posteriormente se agregó 10 mL de una solución 1M de NaOH, la mezcla de reacción se calentó a reflujo por 30 min. La reacción se concluyó agregando HCl 1N hasta un pH = 6 y se extrajo con 60 mL de AcOEt (3 /20 mL). Las fracciones orgánicas se concentraron y se secaron con Na₂SO₄, se filtró el sólido y se evaporó el disolvente en presión reducida; se obtuvo un polvo blanco, cristalizado en AcOEt/Hex., con un rendimiento del 74%. p.f. 192.9 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃); δ (ppm) 7.58 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.43 (m, 2H), 7.37 (m, 2H), 7.31 (m, 1H), 7.08 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.03 (m, 1H), 6.89 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.29 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 5.17 (s, 2H), 3.91 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 168.86, 150.03, 149.70, 144.38, 136.58, 128.56, 127.96, 127.92, 127.24, 122.23, 116.74, 113.50, 110.30, 70.78, 55.95. IR (cm⁻¹); 2968, 1669, 1592, 1423, 1265. m/z [M+H]⁺ : 285.

Metoximetil (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) acrilato (**30**). En un matraz de tres bocas de 100 mL se agregó 1.0 meq de ácido ferúlico (0.1940 g) y se disolvió en 30 mL of CH₂Cl₂, posteriormente se agregó por separado 1.1 meq of trietilamina y 1.1 meq de clorometil metil eter (Cl-MOM), la mezcla de reacción se dejó en agitación constante a temperatura ambiente y se siguió con C.C.F. (Hex:AcOEt::70:30). La reacción se concluyó evaporando los disolventes y realizando una extracción con 60 mL de AcOEt (3 x 20 mL c/u) y agua, la fase orgánica se concentró y se secó con Na₂SO₄ finalmente se evaporó en presión reducida, obteniéndose un polvo café con un rendimiento del 68%, p.f. 80 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃); δ (ppm) 7.68 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.08 (m, 1H), 7.04 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.31 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.00 (s, 1H), 5.37 (s, 2H), 3.93(s, 3H), 3.52 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 166.59, 148.18, 146.80, 145.78, 126.76, 123.19, 114.86, 114.76, 109.44, 90.35, 57.55, 55.90. IR (cm⁻¹); 3266, 2944, 1716, 1627, 1508. m/z [M+H]⁺ : 239.

Ácido (*E*)-3-(3-metoxi-4-(metoximetoxi) fenil) acrílico (**31**). En un matraz de tres bocas de 100 mL se agregó 1.0 meq de ácido ferúlico (0.1940 g) y se disolvió en 10 mL de acetona anhidra, posteriormente se agregó por separado 1.0 meq de K₂CO₃ y 1.1 meq

de clorometil metil éter (Cl-MOM). La mezcla de reacción se dejó en agitación constante a temperatura ambiente y se monitoreo con C.C.F. (Hex:AcOEt::70:30). La reacción se concluyó filtrando los residuo sólidos y evaporando el disolvente en presión reducida, se obtuvo un polvo blanco con un rendimiento del 92%, p.f. 134.8 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃); δ (ppm) 7.74 (d, *J* = 15.99 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 8.28 Hz, 1H), 7.10 (m, 2H), 6.34 (d, *J* = 15.99 Hz, 1H), 5.28 (s, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.52 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 172.56, 149.89, 148.97, 146.86, 128.43, 122.74, 115.82, 115.54, 110.57, 95.19, 56.37, 55.97. IR (cm⁻¹); 3438, 1688, 1622, 1506. m/z [M+H]⁺ : 239.

Acrilato de bencilo del (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenilo) (**32**). En un matraz de tres bocas de 100 mL se agregó 1.0 meq de ácido ferúlico (0.1940 g) y se disolvió en 30 mL de CH₂Cl₂, posteriormente se agregó por separado 1.1 meq de trietilamina y 1.1 meq de bromuro de bencilo, la mezcla de reacción se dejó en agitación constante a temperatura ambiente y se monitoreo con C.C.F. (Hex:AcOEt::70:30). La reacción se concluyó evaporando los disolventes y realizando una extracción con 60 mL de AcOEt (3 x 20 mL c/u) y agua, Las fracciones extraídas se mezclaron y se secaron con Na₂SO₄, posteriormente se filtró el residuo sólido y el disolvente se eliminó en presión reducida, se obtuvo un polvo amarillo claro con un rendimiento del 73%, pf. 57.3 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.65 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.38 (m, 5H), 7.06(ddd, *J* = 8.1, 2.0, 0.5 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 2 Hz, 1H) 6.91 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.34 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 5.90 (s, 1H), 5.24 (s, 2H), 3.90 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 167.05, 148.03, 146.75, 145.23, 136.17, 128.56, 128.24, 128.19, 126.93, 123.13, 115.22, 114.71, 109.33, 66.22, 55.91. IR (cm⁻¹); 3404, 2941, 1703, 1632, 1593, 1514. m/z [M+H]⁺ : 286.

Acrilato de bencilo del (*E*)-3-(4-(benciloxi)-3-metoxifenilo) (**33**). En un matraz de tres bocas de 100 mL se agregó 1 meq del compuesto **32** y se disolvió en 30 mL de acetona anhidra, posteriormente se agregó por separado 1 meq de K₂CO₃ y 1.1 meq de bromuro de bencilo. La mezcla de reacción se dejó en agitación constante a temperatura ambiente y se monitoreó con C.C.F. (Hex:AcOEt::70:30). La reacción se

concluyó filtrando los residuos sólidos y eliminando el disolvente en presión reducida, se obtuvo un polvo blanco con un rendimiento del 84%, p.f. 86.3 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃); δ (ppm) 7.65 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.45 - 7.27 (m, 10H), 7.06 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.02 (ddd, *J* = 8.3, 2.1, 0.5 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.35 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 5.24 (s, 2H), 5.18 (s, 2H), 3.90 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 166.97, 150.32, 149.76, 145.62, 145.03, 136.56, 136.16, 128.61, 128.57, 128.24, 128.19, 128.00, 127.70, 127.18, 122.44, 115.67, 113.43, 110.22, 70.85, 66.23, 55.96. IR (cm⁻¹); 2937, 1697, 1628, 1505, 1255, 1157, 1135. m/z [M+H]⁺: 284 (374⁺- 92⁺).

3-Benciliden-pentan-2,4-diona (**34**). Líquido amarillo claro con un rendimiento del 55%. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.49 (s, 1H), 7.42–7.38 (m, 5H), 2.43 (s, 3H), 2.29 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 205.49, 196.37, 139.74, 132.91, 130.61, 129.66, 129.01, 31.62, 26.52. m/z [M+H]⁺: 188.

3-(2-Hidroxibenciliden)pentan-2,4-diona (**35**). Polvo amarillo cristalizado en AcOEt/Hex., 50% de rendimiento, p.f. 95 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.46 (s, 1H), 7.28 – 7.23 (m, 2H), 6.89 – 6.86 (m, 2H), 6.70 (s, 1H), 2.43 (s, 3H), 2.36 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 205.88, 197.60, 156.30, 141.59, 140.08, 133.06, 130.34, 123.38, 118.32, 115.81, 31.77, 26.44.

3-(3-Hidroxibenciliden)pentan-2,4-diona (**36**). Polvo amarillo cristalizado en AcOEt/Hex., 45% de rendimiento, p.f. 128 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.44 (s, 1H), 7.28– 7.23 (m, 1H), 6.94–6.87 (m, 3H), 6.38 (s, 1H), 2.43 (s, 3H), 2.33 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 206.88, 196.91, 156.44, 142.59, 140.08, 134.06, 130.34, 122.38, 118.21, 115.81, 31.78, 26.48.

3-(4-Hidroxibenciliden)pentan-2,4-diona (**37**). Polvo amarillo oscuro cristalizado en AcOEt/Hex., 30% de rendimiento, p.f. 120 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.45 (s, 1H), 7.29–7.23 (m, 2H), 6.88–6.83 (m, 2H), 2.42 (s, 3H), 2.37 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 207.73, 197.61, 159.24, 141.20, 139.73, 132.17, 124.43, 116.32, 31.68, 26.15. IR (cm⁻¹): 3320, 1702, 1630, 1600, 1574, 1510, 1281, 1225, 1170.

3-(3,4-Dihidroxibenciliden)pentan-2,4-diona (**38**). Polvo amarillo cristalizado en AcOEt/Hex., 45% de rendimiento. p.f. 133 °C. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆-CDCl₃) δ (ppm) 8.81 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 6.94 (m, 1H), 6.83 (m, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.32 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆-CDCl₃) δ (ppm) 206.23, 196.52, 148.45, 145.30, 140.59, 139.40, 124.24, 123.80, 116.31, 115.74, 31.46, 26.05.

3-(4-Hidroxi-3-metoxibenciliden)pentan-2,4-diona (**39**). Polvo amarillo oscuro cristalizado en AcOEt/Hex., 50% de rendimiento, p.f. 127 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.41 (s, 1H), 7.00–6.96 (m, 1H), 6.95–6.90 (m, 2H), 6.18 (s, 1H), 3.88 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.33 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 206.41, 196.48, 148.40, 146.75, 140.57, 140.12, 125.07, 124.98, 114.98, 111.56, 55.91, 31.65, 26.26. IR (cm⁻¹): 3371, 1695, 1647, 1579, 1516, 1267, 1203, 1173.

3-(3,4-Dimetoxibenciliden)pentan-2,4-diona (**40**). Polvo amarillo oscuro cristalizado en AcOEt/Hex., 65% de rendimiento, p.f. 98 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.42 (s, 1H), 7.03 (ddd, *J* = 8.4, 2.2, 0.6 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.33 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 206.18, 196.31, 151.34, 149.08, 140.91, 139.82, 125.55, 124.22, 112.03, 111.15, 55.94, 55.85, 31.68, 26.32. IR (cm⁻¹): 3011, 1693, 1652, 1597, 1514, 1462, 1393, 1275, 1234, 1154. m/z [M+H]⁺: 248.

3-(Benzo-*d*]-[1,3]-dioxol-5-ilmetilen)pentan-2,4-diona (**41**). Polvo amarillo claro cristalizado en AcOEt/Hex., 15% de rendimiento. p.f. 76 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.37 (s, 1H), 6.95 (ddd, *J* = 8.1, 1.9, 0.6 Hz, 1H), 6.87 (dt, *J* = 1.9, 0.4 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.02 (s, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.33 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 205.92, 196.31, 149.96, 148.40, 141.06, 139.60, 126.91, 126.00, 108.85, 108.78, 101.79, 31.67, 26.37. IR (cm⁻¹): 2908, 1706, 1653, 1596, 1503, 1490, 1449, 1357, 1264, 1236, 1178.

3-(4-Nitrobenziliden)pentan-2,4-diona (**42**). Polvo amarillo claro cristalizado en AcOEt/Hex., 60% de rendimiento, p.f. de 88 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.27–8.23 (m, 2H), 7.59–7.55 (m, 2H), 7.51 (s, 1H), 2.47 (s, 3H), 2.29 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 204.21, 195.99, 148.49, 145.65, 139.30, 136.48, 130.25, 124.11, 31.73, 26.67. IR (cm⁻¹): 3106, 1707, 1664, 1594, 1519, 1345, 1236, 1172. m/z [M+H]⁺: 233.

3-(Naftalen-2-ilmetilen)pentan-2,4-diona (**43**). Polvo amarillo cristalizado en AcOEt/Hex. 70% de rendimiento, p.f. 72 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.91 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.84 (td, *J* = 9.0, 8.4, 1.8 Hz, 3H), 7.65 (s, 1H), 7.57–7.50 (m, 2H), 7.45 (dd, *J* = 8.6, 1.9 Hz, 1H), 2.46 (s, 3H), 2.32 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 205.63, 196.37, 142.82, 139.88, 133.97, 133.01, 130.82, 130.36, 128.80, 128.67, 127.81, 127.70, 126.94, 125.61, 31.72, 26.51. IR (cm⁻¹): 3058, 1703, 1658, 1609, 1360, 1240.

3-((2-Metoxinaftalen-1-il)-metilen)pentan-2,4-diona (**44**). Polvo amarillo claro cristalizado en AcOEt/Hex. 73% de rendimiento, p.f. 130 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.01 (s, 1H), 7.92–7.88 (m, 1H), 7.83–7.77 (m, 2H), 7.55–7.50 (m, 1H), 7.42–7.38 (m, 1H), 7.25 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.51 (s, 3H), 2.11 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 202.09, 196.78, 154.23, 144.68, 136.54, 132.21, 132.11, 128.75, 128.58, 127.66, 124.31, 123.48, 116.15, 112.63, 55.64, 29.99, 27.68. IR (cm⁻¹): 3005, 1695, 1646, 1605, 1252. m/z [M]⁺: 268.

3-(Furan-2-ilmetilen)pentan-2,4-diona (**45**). Líquido amarillo con un rendimiento del 70%. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.56 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.79 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 6.53–6.51 (m, 1H), 2.44 (s, 3H), 2.37 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 204.30, 195.81, 148.68, 146.45, 138.17, 124.88, 118.27, 112.87, 31.36, 25.98.

2-Metoxi-4-(3-metil-1-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-5-il)-fenol (**46**). Polvo amarillo cristalizado en AcOEt/Hex., 56% de rendimiento, p.f. 127 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.21–7.09 (m, 2H), 6.99 – 6.68 (m, 6H), 5.58 (s, 1H), 4.90 (dd, *J* = 11.8, 8.5 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.36 (ddq, *J* = 17.7, 11.8, 1.2 Hz, 1H), 2.78–2.60 (ddq, *J* = 17.7, 8.5,

1.2 Hz), 2.06 (t, $J = 1.3$ Hz 3H). IR (cm^{-1}): 3382, 2937, 1596, 1500, 1428, 1268, 1031. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 282.

2-(3-Metil-1-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-5-il)-fenol (**47**). Polvo amarillo cristalizado en AcOEt/Hex. 60% de rendimiento, p.f. 132 °C. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.22–7.17 (m, 3H), 7.14–7.09 (m, 3H), 6.95–6.90 (m, 1H), 6.90–6.84 (m, 2H), 4.80 (t, $J = 11.4$ Hz, 1H), 3.26 (ddq, $J = 17.5, 11.0, 0.9$ Hz, 1H), 2.97–2.88 (m, 1H), 2.10 (t, $J = 1.1$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 155.28, 155.11, 147.69, 130.75, 129.07, 128.93, 127.88, 125.70, 124.29, 121.94, 120.38, 117.48, 116.26, 67.78, 46.35, 16.09. IR (cm^{-1}): 3066, 1567, 1504, 1456, 1369, 1262, 1094. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 252.

3-(3-Metil-1-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-5-il)-fenol (**48**). Polvo verde oscuro, cristalizado en AcOEt/Hex. 50% de rendimiento, p.f. 195 °C. RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.27–7.24 (m, 1H), 7.21 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.10 (tt, $J = 7.6, 2.2$ Hz, 2H), 6.91–6.89 (m, 2H), 6.82–6.78 (m, 3H), 6.75–6.73 (m, 1H), 4.87 (dd, $J = 12.1, 8.5$ Hz, 1H), 3.36–3.29 (m, 1H), 2.59–2.53 (m, 1H), 1.95 (d, $J = 1.3$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (175 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 157.32, 150.56, 146.24, 144.75, 130.24, 129.09, 128.94, 125.38, 119.21, 117.75, 114.95, 113.24, 112.20, 65.19, 47.64, 15.48. IR (cm^{-1}): 3066, 1595, 1502, 1453, 1368, 1238, 1032, 1158. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 250.

4-(3-Metil-1-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-5-il)-fenol (**49**). Polvo café cristalizado en AcOEt/Hex. con un rendimiento del 50%. p.f. 157 °C. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.18–7.10 (m, 4H), 6.94–6.90 (m, 2H), 6.79–6.71 (m, 3H), 5.16 (s, 1H), 4.94 (dd, $J = 11.8, 8.0$ Hz, 1H), 3.37 (ddq, $J = 17.6, 11.9, 1.2$ Hz, 1H), 2.68 (ddq, $J = 17.6, 8.1, 1.2$ Hz, 1H), 2.06 (t, $J = 1.2$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 154.88, 148.83, 146.10, 135.15, 128.84, 127.25, 118.68, 115.86, 113.20, 64.36, 47.90, 15.90. IR (cm^{-1}): 3068, 1595, 1502, 1355, 1318, 1254, 1230. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 252.

(*E*)-4-(4-Metoxifenil)-but-3-en-2-ona (**50**). Polvo amarillo pálido cristalizado en AcOEt/Hex. 75% de rendimiento p.f. 76.5 °C. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.52–7.45 (m, 4H), 6.95–6.89 (m, 2H), 6.61 (d, $J = 16.2$ Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 2.36 (s, 3H).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 198.36, 161.65, 143.24, 129.98, 127.11, 125.07, 114.47, 55.40, 27.41. IR (cm^{-1}): 2943, 1681, 1662, 1601, 1512, 1423, 1360, 1252, 1174, 1023, 989. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 176.

(*E*)-4-(3,4-Dimetoxifenil)-but-3-en-2-ona (**51**). Polvo blanco cristalizado en AcOEt/Hex. 70% de rendimiento, p.f. 84 °C. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.46 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 7.13 (ddd, $J = 8.3, 2.1, 0.5$ Hz, 1H), 7.08 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.61 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 3.92 (s, 6H), 2.37 (s, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 198.28, 151.40, 149.33, 143.73, 127.37, 125.28, 123.00, 111.14, 109.70, 56.00, 55.92, 27.35. IR (cm^{-1}): 3012, 2917, 1664, 1617, 1592, 1509, 1420, 1222, 1159, 1136, 1016, 975. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 206.

5-(3,4-Dimetoxifenil)-3-metilciclohex-2-enona (**51a**), polvo amarillo cristalizado en AcOEt/Hex, rendimiento 25 %, p.f. 89°C. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 6.86 – 6.83 (m, 1H), 6.79 (ddd, $J = 8.2, 2.1, 0.6$ Hz, 1H), 6.76 – 6.75 (m, 1H), 5.97 (m, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.32 – 3.23 (m, 1H), 2.64 (ddt, $J = 16.2, 3.7, 0.7$ Hz, 1H), 2.56 – 2.49 (m, 3H), 2.01 (dt, $J = 1.4, 0.8$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 199.09, 161.57, 149.08, 147.97, 136.05, 126.53, 118.45, 111.43, 110.18, 55.97, 55.92, 44.19, 40.40, 39.23, 24.34. IR (cm^{-1}): 2916, 2836, 1657, 1590, 1512, 1590, 1512, 1245, 1139, 1021. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 246.

(*E*)-4-(4-Nitrofenil)-but-3-en-2-ona (**52**), polvo amarillo cristalizado en AcOEt/Hex. 40% de rendimiento, p.f. 106 °C. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 8.31–8.21 (m, 2H), 7.75–7.66 (m, 2H), 7.54 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 6.83 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 2.43 (s, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 197.5, 148.6, 140.7, 140.1, 130.4, 128.8, 124.2, 28.06. IR 3456.35, 3112.33, 2926.22, 1665.44, 1594.95, 1517.16, 1345.61, 1259.71, 1108.52, 977.24 cm^{-1} . m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 191.

3-Metil-5-(4-nitrofenil)-ciclohex-2-enona (**52a**), polvo amarillo cristalizado en AcOEt/Hex, rendimiento 20 %, p.f. 120°C. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 8.28–8.17 (m, 2H), 7.50–7.39 (m, 2H), 6.08 – 5.96 (m, 1H), 3.64–3.39 (m, 1H), 2.73 – 2.63

(m, 1H), 2.63 – 2.52 (m, 3H), 2.04 (dd, $J = 1.4, 0.8$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 197.61, 160.81, 150.52, 147.00, 127.70, 126.74, 124.09, 43.20, 40.55, 38.25, 24.32. IR (cm^{-1}): 3425, 2939, 1660, 1600, 1518, 1344, 1107. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 231.

Durante reacción de Claisen-Schmidt en condiciones básicas fuertes (KOH), para la obtención de los compuesto **51** y **52** se pudo aislar un producto terminal de anillación en cada reacción individual, proveniente de un ataque tipo Michael por una molécula adicional de acetona al producto condensado, seguido de una reacción de anillación de Robinson (Figura 140). Los aldehídos con los dos diferentes sustituyentes en la posición 4, electro-donador ($-\text{OCH}_3$) o electro-atractor ($-\text{NO}_2$) produjeron diferentes rendimientos; se obtuvo un mejor rendimiento **51**, **51a** (70%, 25%) usando 3,4-dimetoxibenzaldehído y un rendimiento bajo **52** y **52a** (40%, 20%) utilizando 4-nitro benzaldehído. Después de cada reacción, se aislaron con éxito dos productos (producto de condensación y producto de anillación) evitando la polimerización.

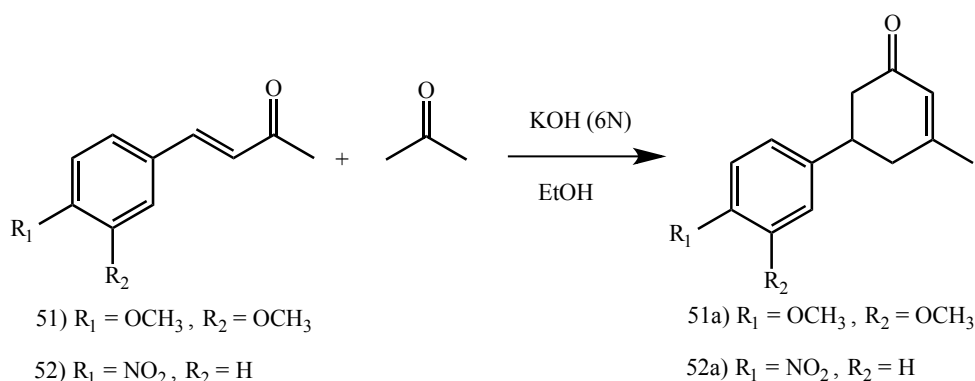


Figura 140. Reacción de adición tipo Michael a los compuestos **51** y **52**.

5-(4-Metoxifenil)-3-metil-1-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol (**53**), líquido amarillo, rendimiento 53%. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.23–7.18 (m, 2H), 7.16–7.09 (m, 2H), 6.95–6.90 (m, 2H), 6.88–6.82 (m, 2H), 6.72 (tt, $J = 7.5, 1.1$ Hz, 1H), 5.02–4.90 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.36 (ddq, $J = 17.5, 11.9, 1.2$ Hz, 1H), 2.67 (ddq, $J = 17.5, 8.0, 1.2$ Hz, 1H), 2.05 (t, $J = 1.2$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 158.82, 148.51, 146.11, 135.04, 128.80, 127.02, 118.55, 114.35, 113.11, 64.29, 55.25, 47.90, 15.94. IR (cm^{-1}): 2908, 1597, 1496, 1338, 1292, 1253, 1170, 1036.

5-(3,4-Dimetoxifenil)-3-metil-1-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol (**54**), polvo amarillo brillante, 45% de rendimiento, cristalizado en AcOEt/Hex. p.f. 127 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.17–7.11 (m, 2H), 6.96–6.92 (m, 2H), 6.89–6.79 (m, 3H), 6.75 (tt, *J* = 7.3, 1.2 Hz, 1H), 4.95–4.88 (m, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.37 (ddq, *J* = 17.6, 11.9, 1.1 Hz, 1H), 2.71 (ddq, *J* = 17.6, 8.4, 1.2 Hz, 1H), 2.07 (t, *J* = 1.2 Hz, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 149.52, 148.71, 146.37, 135.64, 128.79, 118.74, 117.98, 113.23, 111.42, 108.68, 64.93, 55.90, 47.96, 15.95. IR (cm⁻¹): 3446, 2934, 1596, 1509, 1459, 1411, 1363, 1252, 1131, 1028. *m/z* [M+H]⁺ : 296.

3-Metil-5-(4-nitrofenil)-1-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol (**55**) polvo amarillo oscuro con un rendimiento del 55%, cristalizado en AcOEt/Hex. p.f. 107 °C. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.21–8.16 (m, 2H), 7.50–7.45 (m, 2H), 7.38–7.32 (m, 2H), 7.18–7.12 (m, 2H), 6.77 (tt, *J* = 7.3, 1.1 Hz, 1H), 5.10 (dd, *J* = 12.0, 8.5 Hz, 1H), 3.47 (ddq, *J* = 17.6, 12.1, 1.2 Hz, 1H), 2.69 (ddq, *J* = 17.5, 8.1, 1.2 Hz, 1H), 2.08 (t, *J* = 1.2 Hz, 3H).

(*E*)-1,3-bis-(3,4-Dimetoxifenil)-prop-2-en-1-ona (**56**). Polvo amarillo cristalizado en EtOH rendimiento 50%. p.f 102 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.76 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.71–7.66 (m, 1H), 7.64–7.61 (m, 1H), 7.42 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.24 (ddd, *J* = 8.3, 2.0, 0.5 Hz, 1H), 7.17–7.16 (m, 1H), 6.94–6.89 (m, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.96–3.95 (m, 3H), 3.93 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 188.56, 153.07, 151.23, 149.19, 144.05, 131.51, 128.02, 122.82, 122.80, 119.61, 111.10, 110.81, 110.21, 109.89, 56.01, 55.93.

(*E*)-1-(3,4-Dimetoxifenil)-3-(naftalen-2-il)-prop-2-en-1-ona (**57**). Polvo amarillo cristalizado en MeOH con un rendimiento del 48%, p.f. 200.7 °C. RMN ¹H (500 MHz,) δ (ppm) 8.06–8.04 (m, 1H), 7.98 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.91–7.84 (m, 3H), 7.83–7.79 (m, 1H), 7.76–7.73 (m, 1H), 7.67 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.65 (m, 1H), 7.55–7.51 (m, 2H), 6.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.99 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz,) δ (ppm) 187.50, 152.25, 148.25, 143.01, 133.25, 132.35, 131.53, 130.37, 129.37, 127.62, 127.55, 126.73, 126.21, 125.68, 122.65, 121.98, 120.78, 109.81, 108.95, 55.06, 55.03.

(*E*)-1-(3,4-Dimetoxifenil)-3-(2-metoxinaftalen-1-il)-prop-2-en-1-ona (**58**). Polvo amarillo pálido cristalizado en MeOH, con un rendimiento del 55%, p.f. 140.5°C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.47 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 8.27 (dd, *J* = 8.7, 1.0 Hz, 1H), 7.92 – 7.85 (m, 2H), 7.83 – 7.78 (m, 1H), 7.73 – 7.67 (m, 2H), 7.53 (ddd, *J* = 8.5, 6.8, 1.4 Hz, 1H), 7.39 (ddd, *J* = 7.9, 6.8, 1.0 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.04 (s, 3H), 3.98 (s, 3H), 3.96 (s, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 192.14, 144.52, 137.07, 133.15, 131.60, 130.08, 129.51, 128.62, 128.36, 127.46, 127.25, 126.82, 123.59, 123.14, 112.88, 112.62, 110.92, 109.68, 56.40, 56.09, 56.05. IR (cm⁻¹): 2936, 2837, 1655, 1599, 1579, 1518, 1462, 1419, 1266, 1142, 1020. m/z [M]⁺: 348.

(1*E*,4*E*)-1,5-Difenilpenta-1,4-dien-3-ona (**59**). Polvo amarillo cristalizado en EtOH/H₂O, con un rendimiento del 80%, p.f. 107 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.74 (d, *J* = 15.9 Hz, 2H), 7.62–7.60 (m, 4H), 7.41–7.39 (m, 6H), 7.08 (d, *J* = 15.9 Hz, 2H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 188.87, 143.27, 134.78, 130.46, 128.92, 128.35, 125.40, 77.26, 77.00, 76.75. m/z [M+H]⁺: 234.

(1*E*,4*E*)-1-(4-Hidroxifenil)-5-(naftalen-2-il)-penta-1,4-dien-3-ona (**60**). Polvo amarillo cristalizado en MeOH, rendimiento 20%, p.f. 231 °C. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 10.08 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.99–7.92 (m, 4H), 7.89 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.68–7.63 (m, 2H), 7.59–7.54 (m, 2H), 7.47 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.88–6.84 (m, 2H). RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 188.18, 160.05, 143.25, 141.91, 133.77, 132.96, 132.49, 130.58, 130.12, 128.49, 128.43, 127.69, 127.27, 126.75, 126.07, 125.76, 124.03, 122.69, 115.90. IR (cm⁻¹): 3277, 1617, 1599, 1554, 1512, 1437, 1363, 1279, 1166, 1112. m/z [M]⁺: 300.

(1*E*,4*E*)-1-(4-Hidroxifenil)-5-(2-metoxinaftalen-1-il)-penta-1,4-dien-3-ona (**61**). Polvo café cristalizado en AcOEt/Hex. rendimiento del 15%, p.f. 92°C (descomposición). RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.26 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 8.22 (dd, *J* = 8.6, 1.1 Hz, 1H), 8.05 (dd, *J* = 9.1, 0.7 Hz, 1H), 7.94 (dd, *J* = 8.1, 1.4 Hz, 1H), 7.70 – 7.66 (m, 3H), 7.60 (ddd, *J* = 8.5, 6.8, 1.4 Hz, 1H), 7.57 – 7.54 (m, 2H), 7.44 (ddd, *J* = 8.0, 6.8, 1.1 Hz,

1H), 7.40 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.87 – 6.82 (m, 2H), 4.04 (s, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 189.06, 160.45, 144.06, 143.44, 135.31, 132.60, 132.38, 131.21, 130.86, 129.21, 129.04, 128.16, 126.23, 124.52, 124.33, 123.45, 123.36, 116.32, 113.93, 56.86. IR (CM^{-1}): 3015, 1584, 1562, 1508, 1435, 1245. m/z $[\text{M}]^+$: 330.

(1*E*,4*E*)-1-(Benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-5-(4-hidroxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona (**62**). Polvo amarillo cristalizado en MeOH con un rendimiento del 18%, p.f. 172 °C. RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 9.63 (br, 1H), 7.66 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 7.52 – 7.47 (m, 2H), 7.18 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.10 (dd, $J = 8.1, 1.7$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.89–6.85 (m, 2H), 6.84 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.03 (s, 2H). RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 187.57, 159.24, 148.75, 147.43, 142.34, 141.31, 129.37, 128.34, 125.02, 124.00, 122.84, 121.64, 115.21, 107.63, 105.59, 100.65. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 294 (calculado), ion molecular no observado.

(1*E*,6*E*)-1-(4-(Benciloxi)-3-metoxifenil)-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona (**63**). Polvo amarillo cristalizado en AcOEt/Hex., rendimiento 10% p.f. 91.6°C. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 16.02 (s, 1H), 7.59 (dd, $J = 15.8, 2.8$ Hz, 2H), 7.44 (m, 2H), 7.38 (ddd, $J = 7.54$ Hz, 6.83Hz, 1.28Hz, 2H), 7.32 (m, 1H), 6.93 (d, $J = 8.17$ Hz, 2H), 6.89 (d, $J = 8.25$ Hz, 2H), 6.48 (dd, $J = 15.8, 2.8$ Hz, 2H), 5.86 (s, 1H), 5.80 (s, 1H), 5.20 (s, 2H), 3.95 (s, 3H) 3.94 (s, 3H). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 183.42, 183.04, 146.79, 145.70, 144.59, 143.71, 140.57, 140.27, 128.61, 128.44, 127.99, 127.66, 127.20, 122.86, 122.33, 122.14, 121.77, 114.82, 113.55, 110.46, 109.64, 101.21, 70.87, 56.02, 55.93. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 459.

(1*E*,4*Z*,6*E*)-1,7-bis-(4-(Benciloxi)-3-metoxifenil)-5-hidroxihepta-1,4,6-trien-3-ona (**64**). Polvo amarillo cristalizado en AcOEt/Hex., 64% de rendimiento, p.f. 160 °C. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 16.01 (s, 1H), 7.58 (d, $J = 15.8$ Hz, 2H), 7.43 (m, 4H), 7.37(m, 4H), 7.31(ddt, $J = 8.30$ Hz, 6.28 Hz, 1.47 Hz, 2H), 7.08 (m, 4H), 6.88 (d, $J = 8.29$ Hz, 2H), 6.48 (d, $J = 15.8$ Hz, 2H), 5.80 (s, 1H), 5.20 (s, 4H), 3.94 (s, 6H). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 183.20, 150.17, 149.78, 140.31, 136.58, 128.60, 128.42,

127.98, 127.19, 122.33, 122.15, 113.54, 110.44, 101.27, 70.85, 55.99. m/z [M+H]⁺ : 549.

(1*E*, 4*Z*, 6*E*)-4-Bencil-1,7-bis-(4-(benciloxi)-3-metoxifenil)-5-hidroxihepta-1,4,6-trien-3-ona (**65**). Polvo amarillo cristalizado en AcOEt/Hex., 7% de rendimiento, p.f. 152 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 17.67 (s, 1H), 7.68 (d, *J* = 15.4 Hz, 2H), 7.40 (m, 5H), 7.34 (m, 5H), 7.30 (m, 5H), 6.98 (dd, *J* = 8.93Hz, 1.48Hz 2H), 6.93(d, *J* = 2.02Hz, 2H), 6.83(d, *J* = 15.4Hz, 2H), 6.82(d, *J* = 8.32 Hz, 2H) 5.15 (s, 4H), 3.95 (s, 2H), 3.85 (s, 6H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 194.50, 183.50, 150.12, 149.76, 149.67, 144.82, 141.62, 141.06, 136.57, 136.38, 128.89, 128.77, 128.58, 128.02, 127.96, 127.84, 127.42, 126.50, 123.41, 122.31, 121.97, 118.95, 113.49, 113.33, 110.62, 108.98, 70.81, 55.95, 31.80. m/z [M+H]⁺ : 638.

(1*E*, 6*E*)-4,4-Dibencil-1,7-bis-(4-(benciloxi)-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona (**66**). Polvo amarillo cristalizado en AcOEt/Hex., 15% de rendimiento, p.f. 147.4 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 17.67 (s, 1H), 7.66 (d, *J* = 15.4 Hz, 2H), 7.39 (m, 4H), 7.35 (m, 4H), 7.29 (m, 2H), 7.18 (m, 6H), 6.99(dd, *J* = 8.38Hz, 2.03Hz ,2H), 6.88(d, *J* = 2Hz ,2H), 6.81(d, *J* = 8.37Hz ,2H), 6.52 (d, *J* = 15.4Hz, 2H), 5.16 (s, 4H), 3.86 (s, 6H), 3.37 (s, 4H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 196.74, 150.81, 149.68, 143.72, 136.59, 136.40, 130.42, 128.61, 128.10, 128.01, 127.51, 127.12, 126.62, 123.50, 121.18, 113.26, 110.68, 70.77, 70.08, 56.11, 37.67. m/z [M+H]⁺ : 728.

(1*E*,4*Z*,6*E*) -5-Hidroxi-1,7-difenilhepta-1,4,6-trien-3-ona (**67**). Polvo amarillo cristalizado en AcOEt/Hex. 55% de rendimiento, p.f. 140 °C. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 16.10 (s, 1H), 7.75 – 7.69 (m, 4H), 7.66 (d, *J* = 15.9 Hz, 2H), 7.47–7.40 (m, 6H), 6.95 (d, *J* = 16.0 Hz, 2H), 6.20 (s, 1H). RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 182.69, 139.84, 134.15, 129.77, 128.46, 127.82, 123.79, 101.33.

(1*E*,6*E*)-4-Benciliden-1,7-difenilhepta-1,6-dien-3,5-diona (**68**). Polvo amarillo cristalizado en AcOEt/Hex., 20% de rendimiento, p.f. 106 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.90 (s, 1H), 7.82 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.60 – 7.57 (m, 2H), 7.53 (d, *J* = 16.2

Hz, 1H), 7.50 – 7.47 (m, 2H), 7.46 – 7.43 (m, 2H), 7.41 – 7.38 (m, 3H), 7.37–7.31 (m, 6H), 7.14 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 6.89 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 197.94, 187.04, 147.03, 145.26, 141.27, 140.48, 134.59, 134.07, 133.33, 131.07, 130.77, 130.51, 130.31, 128.92, 128.87, 128.67, 127.38, 121.96.

(2*E*,2'*E*)-((1*E*,3*Z*,6*E*)-3-Hidroxi-5-oxohepta-1,3,6-trien-1,7-diil)-bis-(2-metoxi-4,1-fenil)-bis-(3-fenilacrilato) (**69**). Polvo amarillo cristalizado en CHCl_3/Hex , con un rendimiento del 75%, p.f. 206 °C. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.86 (d, $J = 16.0$ Hz, 2H), 7.84 – 7.79 (m, 5H), 7.68 (d, $J = 15.9$ Hz, 2H), 7.55 (d, $J = 1.9$ Hz, 2H), 7.51 – 7.43 (m, 7H), 7.37 (dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.02 (d, $J = 16.0$ Hz, 2H), 6.90 (d, $J = 16.0$ Hz, 2H), 6.23 (s, 1H), 3.85 (s, 6H). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 183.22, 164.23, 151.32, 146.78, 140.93, 139.88, 133.79, 130.98, 129.03, 128.73, 128.68, 124.65, 123.45, 121.51, 116.70, 112.09, 101.78, 56.02, 45.68.

bis-((1*E*,3*Z*,6*E*)-1,7-bis(4-(Cinamoiloxi)-3-metoxifenil)-5-oxohepta-1,3,6-trien-3-iloxi) complejo de zinc (**70**). Polvo amarillo cristalizado en AcOEt/Hex , rendimiento 75%. p.f. 215 °C. RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 7.86 (d, $J = 16.0$ Hz, 4H), 7.83 – 7.78 (m, 8H), 7.57 (d, $J = 15.6$ Hz, 4H), 7.53 – 7.43 (m, 16H), 7.31 (d, $J = 8.3$ Hz, 3H), 7.20 (d, $J = 8.1$ Hz, 4H), 6.95 (d, $J = 15.7$ Hz, 3H), 6.89 (d, $J = 16.1$ Hz, 4H). RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 184.07, 164.83, 151.75, 147.19, 140.68, 137.66, 135.07, 134.34, 131.48, 130.47, 129.55, 129.22, 123.82, 121.30, 117.31, 112.15, 103.66, 56.44, 31.21. IR (cm^{-1}): 3055, 2933, 2836, 1726, 1630, 1503, 1403, 1297, 1246, 1134. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1321 (calculado) ión molecular no observado.

Complejo BF_2 del (1*E*,4*Z*,6*E*)-1,7-bis-(4-(Benciloxi)-3-metoxifenil)-5-hidroxihepta-1,4,6-trien-3-ona (**71**). Polvo rojo, rendimiento 70%, cristalizado en AcOEt/Hex , el mono cristal se obtuvo en acetonitrilo, p.f. 180 °C. RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 7.97 (d, $J = 15.6$ Hz, 2H), 7.52 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 7.47 – 7.43 (m, 6H), 7.43 – 7.39 (m, 4H), 7.37 – 7.33 (m, 2H), 7.17 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.12 (d, $J = 15.6$ Hz, 2H), 6.51 (s, 1H), 5.19 (s, 4H), 3.85 (s, 6H). RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 179.06, 151.52, 149.34, 146.75, 136.48, 128.49, 128.06, 127.95, 127.33, 124.91, 119.00, 113.18,

111.57, 101.44, 69.92, 55.73. ^{19}F NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) -138.14 (s, $^{10}\text{B-F}$), -138.20 (s, $^{11}\text{B-F}$). IR (cm⁻¹): 1725, 1526, 1493, 1258, 1131, 1058, 990. m/z [M]⁺ : 596.

13. Referencias.

1. Anand, P.; Thomas, S.G.; Kunnumakkara, A.B.; Sundaram, C.; Harikumar, K.B.; Sung, B.; Tharakan, S.T.; Misra, K.; Priyadarsini, I.K.; Rajasekharan, K.N.; Aggarwal, B. B. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *76*, 1590–1611.
2. Goel, A.; Kunnumakkara, A.B.; Aggarwal, B.B. Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75*, 787–809.
3. Basnet, P.; Skalko-Basnet, N. Curcumin: An anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules.* **2011**, *16*, 4567–4598.
4. Esatbeyoglu, T.; Huebbe, P.; Ernst, I.M.A.; Chin, D.; Wagner, A.E.; Rimbach, G. Curcumin-from molecule to biological function. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 5308–5332.
5. Ak, T.; Gülçin, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *174*, 27–37.
6. Kunnumakkara, A.B.; Anand, P.; Aggarwal, B.B. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett.* **2008**, *269*, 199–225.
7. Tatsuzaki, J.; Nakagawa-Goto, K.; Tokuda, H.; Lee, K.H. Cancer preventive agents 10. Prenylated dehydrozingerone analogs as potent chemopreventive agents. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2010**, *12*, 227–232.
8. Roughley, P.J.; Whiting, D.A. Experiments in the biosynthesis of curcumin. *J.C.S. Perkin I* **1973**, 2379–2388.
9. Sardjiman, S.S.; Reksohadiprodjo, M.S.; Hakim, L.; Van Der Goot, H.; Timmerman, H. 1,5-Diphenyl-1,4-pentadiene-3-ones and cyclic analogues as antioxidative agents. Synthesis and structure-activity relationship. *Eur. J. Med. Chem.* **1997**, *32*, 625–630.
10. Wang, Y.J.; Pan, M.H.; Cheng, A.L.; Lin, L.I.; Ho, Y.S.; Hsieh, C.Y.; Lin, J.K. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *15*, 1867–1876.
11. Zhao, Z.; Moghadasian, M.H. Chemistry, natural sources, dietary intake and

- pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chem.* **2008**, *109*, 691–702.
12. Graf, E. Antioxidant potential of Ferulic Acid. *Free Radic. Biol. Med.* **1992**, *13*, 435–448.
 13. Kondamudi, P.K.; Kovelamudi, H.; Nayak, P.G.; Rao, M.C.; Shenoy, R.R. Curcumin half analog modulates Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in inflammatory bowel disease. *Pharmacogn. Mag.* **2015**, *11*, S296–S302.
 14. Yogosawa, S.; Yamada, Y.; Yasuda, S.; Sun, Q.; Takizawa, K.; Sakai, T. Dehydrozingerone, a structural analogue of curcumin, induces cell-cycle arrest at the G2/M phase and accumulates intracellular ROS in HT-29 human colon cancer cells. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 2088–2093.
 15. Hampannavar, G.A.; Karpoormath, R.; Palkar, M.B.; Shaikh, M.S. An appraisal on recent medicinal perspective of curcumin degradant: Dehydrozingerone (DZG). *Bioorganic Med. Chem.* **2016**, *24*, 501–520.
 16. Ratković, Z.; Muškinja, J.; Burmudžija, A.; Ranković, B.; Kosanić, M.; Bogdanović, G.A.; Marković, B.S.; Nikolić, A.; Arsenijević, N.; Snežana, D.; Vukićević, R. D. Dehydrozingerone based 1-acetyl-5-aryl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles: Synthesis, characterization and anticancer activity. *J. Mol. Struct.* **2016**, *1109*, 82–88.
 17. Marchiani, A.; Mammi, S.; Siligardi, G.; Hussain, R.; Tessari, I.; Bubacco, L.; Delogu, G.; Fabbri, D.; Dettori, M.A.; Sanna, D.; Dedola, S.; Serra, P. A.; Ruzza, P. Small molecules interacting with α -synuclein: Antiaggregating and cytoprotective properties. *Amino Acids.* **2013**, *45*, 327–338.
 18. Liang, G.; Shao, L.; Wang, Y.; Zhao, C.; Chu, Y.; Xiao, J.; Zhao, Y.; Li, X.; Yang, S. Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both in vitro and in vivo as cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2623–2631.
 19. Hu, Y.; Bajorath, J. Target family-directed exploration of scaffolds with different SAR profiles. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 3138–3148.
 20. Feng, J.Y.; Liu, Z.Q. Phenolic and enolic hydroxyl groups in curcumin: Which plays the major role in scavenging radicals? *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 11041–11046.
 21. Mathew, S.; Abraham, T.E. Ferulic acid: An antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2004**, *24*, 59–83.
 22. Kita, T.; Imai, S.; Sawada, H.; Kumagai, H.; Seto, H. The biosynthetic pathway of curcuminoid in turmeric (*Curcuma longa*) as revealed by ^{13}C -labeled precursors. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72*, 1789–1798.
 23. Ramirez-Ahumada, M. del C.; Timmermann, B.N.; Gang, D.R. Biosynthesis of

- curcuminoids and gingerols in turmeric (*Curcuma longa*) and ginger (*Zingiber officinale*): Identification of curcuminoid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA thioesterases. *Phytochemistry*. **2006**, *67*, 2017–2029.
24. Anand, P.; Kunnumakkara, A.B.; Newman, R.A.; Aggarwal, B.B. Bioavailability of curcumin: Problems and promises. *Mol. Pharm.* **2007**, *4*, 807–818.
 25. Ghosh, S.; Banerjee, S.; Sil, P.C. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *83*, 111–124.
 26. Schneider, C.; Gordon, O.N.; Edwards, R.L.; Luis, P.B. Degradation of curcumin: From mechanism to biological implications. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 7606–7614.
 27. Sa, G.; Das, T. Anti cancer effects of curcumin: Cycle of life and death. *Cell Div.* **2008**, *14*, 1–14.
 28. Wang, M.; Jiang, S.; Zhou, L.; Yu, F.; Ding, H.; Li, P.; Zhou, M.; Wang, K. Potential mechanisms of action of curcumin for cancer prevention: Focus on cellular signaling pathways and miRNAs. *Int. J. Biol. Sci.* **2019**, *15*, 1200–1214.
 29. De, P.; Baltas, M.; Bedos-Belval, F. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents-a review. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 1672–1703.
 30. Kong, Y.; Ma, W.; Liu, X.; Zu, Y.; Fu, Y.; Wu, N.; Liang, L.; Yao, L.; Efferth, T. Cytotoxic activity of curcumin towards CCRF-CEM leukemia cells and its effect on DNA damage. *Molecules*. **2009**, *14*, 5328–5338.
 31. Sakano, K.; Kawanishi, S. Metal-mediated DNA damage induced by curcumin in the presence of human cytochrome P450 isozymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *405*, 223–230.
 32. Ravindran, J.; Prasad, S.; Aggarwal, B.B. Curcumin and cancer cells: How many ways can curry kill tumor cells selectively?. *AAPS J.* **2009**, *11*, 495–510.
 33. Larasati, Y.A.; Yoneda-Kato, N.; Nakamae, I.; Yokoyama, T.; Meiyanto, E.; Kato, J.Y. Curcumin targets multiple enzymes involved in the ROS metabolic pathway to suppress tumor cell growth. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–13.
 34. Fang, J.; Lu, J.; Holmgren, A. Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin: A novel molecular mechanism for its anticancer activity. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 25284–25290.
 35. Gupta, S.C.; Prasad, S.; Kim, J.H.; Patchva, S.; Webb, L.J.; Priyadarsini, I.K.; Aggarwal, B.B. Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1937–1955.

36. Zhang, W.; Chen, C.; Shi, H.; Yang, M.; Liu, Y.; Ji, P.; Chen, H.; Tan, R.X.; Li, E. Curcumin is a biologically active copper chelator with antitumor activity. *Phytomedicine*. **2016**, *23*, 1–8.
37. Sumanont, Y.; Murakami, Y.; Tohda, M.; Vajragupta, O.; Watanabe, H.; Matsumoto, K. Effects of manganese complexes of curcumin and diacetylcurcumin on kainic acid-induced neurotoxic responses in the rat hippocampus. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 1732–1739.
38. Asti, M.; Ferrari, E.; Croci, S.; Atti, G.; Rubagotti, S.; Iori, M.; Capponi, P.C.; Zerbini, A.; Saladini, M.; Versari, A. Synthesis and characterization of ⁶⁸Ga-labeled curcumin and curcuminoid complexes as potential radiotracers for imaging of cancer and Alzheimer's disease. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 4922–4933.
39. He, Y.; Huang, Y.; Cheng, Y. Structure evolution of curcumin nanoprecipitation from a micromixer. *Cryst. Growth Des.* **2010**, *10*, 1021–1024.
40. Sanphui, P.; Goud, N.R.; Khandavilli, U.B.R.; Nangia, A. Fast dissolving curcumin cocrystals. *Cryst. Growth Des.* **2011**, *11*, 4135–4145.
41. Escobedo-Martínez, C.; Guzmán-Gutiérrez, S.L.; Carrillo-López, M.I.; Deveze-Álvarez, M.A.; Trujillo-Valdivia, A.; Meza-Morales, W.; Enríquez, R.G. Diacetylcurcumin: Its Potential Antiarthritic Effect on a Freund's Complete Adjuvant-Induced Murine Model. *Molecules*. **2019**, *24*, 2643.
42. Jacob, J.N. Comparative studies in relation to the structure and biochemical properties of the active compounds in the volatile and nonvolatile fractions of turmeric (*C. longa*) and ginger (*Z. officinale*). *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2016**, *48*, 101–135.
43. Di Meo, F.; Filosa, S.; Madonna, M.; Giello, G.; Di Pardo, A.; Maglione, V.; Baldi, A.; Crispi, S. Curcumin C3 complex®/Biperine® has antineoplastic activity in mesothelioma: an in vitro and in vivo analysis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 1–11.
44. Mondal, R.; Mallik, A.K. Recent applications of potassium carbonate in organic synthesis. *Org. Prep. Proced. Int.* **2014**, *46*, 391–434.
45. Lutjen, A.B.; Quirk, M.A.; Barbera, A.M.; Kolonko, E.M. Synthesis of (*E*)-cinnamyl ester derivatives via a greener Steglich esterification. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, 5291–5298.
46. Nielsen, A.T.; Houlihan, W.J. The aldol condensation. *Org. React.* **2011**, 1–438.
47. Zhuang, C.; Zhang, W.; Sheng, C.; Zhang, W.; Xing, C.; Miao, Z. Chalcone: A privileged structure in medicinal chemistry. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 7762–7810.
48. Ghorai, M.K.; Samanta, S.; Das, S. Synthesis of 3,5-disubstituted cyclohex-2-en-1-one via a five-step domino reaction catalyzed by secondary amines: Formation of (*E*)- α,β -

- unsaturated methyl ketones. *Asian J. Org. Chem.* **2013**, *2*, 1026–1030.
49. Mukaiyama, T. The directed aldol reaction. *Org. React.* **1982**, *28*, 204–251.
 50. Zhao, S.; Pi, C.; Ye, Y.; Zhao, L.; Wei, Y. Recent advances of analogues of curcumin for treatment of cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *180*, 524–535.
 51. Paulpandiyan, R.; Arunadevi, A.; Raman, N. Role of Knoevenagel condensate pyrazolone derivative Schiff base ligated transition metal complexes in biological assay and cytotoxic efficacy. *Appl. Organomet. Chem.* **2017**, *31*, 1–11.
 52. Dalessandro, E. V.; Collin, H.P.; Guimarães, L.G.L.; Valle, M.S.; Pliego, J.R. Mechanism of the piperidine-catalyzed Knoevenagel condensation reaction in methanol: The role of iminium and enolate ions. *J. Phys. Chem. B.* **2017**, *121*, 5300–5307.
 53. Rodrigues, F.C.; Anil Kumar, N. V.; Thakur, G. Developments in the anticancer activity of structurally modified curcumin: An up-to-date review. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 76–104.
 54. Yusuf, M.; Jain, P. Synthetic and biological studies of pyrazolines and related heterocyclic compounds. *Arab. J. Chem.* **2014**, *7*, 553–596.
 55. Kitawat, B.S.; Singh, M. Synthesis, characterization, antibacterial, antioxidant, DNA binding and SAR study of a novel pyrazine moiety bearing 2-pyrazoline derivatives. *New J. Chem.* **2014**, *38*, 4290–4299.
 56. Lin, L.; Lee, K.H. Structure-activity relationships of curcumin and its analogs with different biological activities. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2006**, *33*, 785–812.
 57. Shih, H.C.; Chern, C.Y.; Kuo, P.C.; Wu, Y.C.; Chan, Y.Y.; Liao, Y.R.; Teng, C.M.; Wu, T.S. Synthesis of analogues of gingerol and shogaol, the active pungent principles from the rhizomes of *Zingiber officinale* and evaluation of their anti-platelet aggregation effects. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 3926–3951.
 58. Su, P.; Shi, Y.; Wang, J.; Shen, X.; Zhang, J. Anticancer agents derived from natural cinnamic acids. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2015**, *15*, 980–987.
 59. Banupriya, G.; Sribalan, R.; Padmini, V.; Shanmugaiah, V. Biological evaluation and molecular docking studies of new curcuminoid derivatives: Synthesis and characterization. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 1655–1659.
 60. Banerjee, D.; Kayal, U.; Karmakar, R.; Maiti, G. 3,4-Dihydro-2H-pyran promoted aerobic oxidative aromatization of 1,3,5-trisubstituted pyrazolines and Hantzsch 1,4-dihydropyridines. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 5333–5337.
 61. Martí-Centelles, R.; Falomir, E.; Carda, M.; Nieto, C.I.; Cornago, M.P.; Claramunt, R.M. Effects of curcuminoid pyrazoles on cancer cells and on the expression of telomerase related genes. *Arch. Pharm. (Weinheim).* **2016**, 532–538.

62. Zhou, B.; Xing, C. Diverse molecular targets for chalcones with varied bioactivities. *Med. Chem.* **2015**, *5*, 388–404.
63. Kumar, P.; Kandi, S.K.; Manohar, S.; Mukhopadhyay, K.; Rawat, D.S. Monocarbonyl curcuminoids with improved stability as antibacterial agents against *Staphylococcus aureus* and their mechanistic studies. *ACS Omega.* **2019**, *4*, 675–687.
64. Meza-Morales, W.; Machado-Rodriguez, J.C.; Alvarez-Ricardo, Y.; Obregón-Mendoza, M.A.; Nieto-Camacho, A.; Toscano, R.A.; Soriano-García, M.; Cassani, J.; Enríquez, R.G. A new family of homoleptic copper complexes of curcuminoids: Synthesis, characterization and biological properties. *Molecules.* **2019**, *24*, 1–17.
65. Banerjee, S.; Chakravarty, A.R. Metal complexes of curcumin for cellular imaging, targeting, and photoinduced anticancer activity. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2075–2083.
66. Kumar, B.; Singh, V.; Shankar, R.; Kumar, K.; Rawal, R. Synthetic and medicinal prospective of structurally modified curcumins. *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16*, 1–2.
67. Lozada-García, M.C.; Enríquez, R.G.; Ramírez-Apán, T.O.; Nieto-Camacho, A.; Palacios-Espinosa, J.F.; Custodio-Galván, Z.; Soria-Arteche, O.; Pérez-Villanueva, J. Synthesis of curcuminoids and evaluation of their cytotoxic and antioxidant properties. *Molecules.* **2017**, *22*, 1–12.
68. Sumantra Venil N. Cellular chemosensitivity assays: An overview. *Cancer Cell Cult. Methods Protoc.* **2011**, *731*, 219–236.
69. Domínguez, M.; Nieto, A.; Marin, J.C.; Keck, A.S.; Jeffery, E.; Céspedes, C.L. Antioxidant activities of extracts from *Barkleyanthus salicifolius* (Asteraceae) and *Penstemon gentianoides* (Scrophulariaceae). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5889–5895.
70. Rossato, J.I.; Ketzer, L.A.; Centurião, F.B.; Silva, S.J.N.; Lüdtke, D.S.; Zeni, G.; Braga, A.L.; Rubin, M.A.; Da Rocha, J.B.T. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem. Res.* **2002**, *27*, 297–303.
71. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, L.A.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275.
72. Ng, T.B.; Liu, F.; Wang, Z.T. Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sci.* **2000**, *66*, 709–723.
73. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **1979**, *95*, 351–358.
74. Esterbauer, H.; Cheeseman, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-Hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 407–421.
75. Mellors, A.; Tappel, A.L. The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and

- ubiquinol. *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 4353–4356.
76. Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3–25.
 77. Singh, V.D.; Salian, V. V.; Narayana, B.; Sarojini, B.K.; Kamni; Anthal, S.; Kant, R. Synthesis and crystal structure of a chalcone derivative. *Crystallogr. Reports.* **2017**, *62*, 1157–1159.
 78. Sreevidya, T. V.; Narayana, B.; Yathirajan, H.S. Synthesis and characterization of some chalcones and their cyclohexenone derivatives. *Cent. Eur. J. Chem.* **2010**, *8*, 174–181.
 79. Surya Prakash Rao, H.; Jothilingam, S. Solvent-free microwave-mediated Michael addition reactions. *J. Chem. Sci.* **2005**, *117*, 323–328.
 80. Agazzi, M.L.; Ballatore, M.B.; Durantini, A.M.; Durantini, E.N.; Tomé, A.C. BODIPYs in antitumoral and antimicrobial photodynamic therapy: An integrating review. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2019**, *40*, 21–48.
 81. Mapoung, S.; Mapoung, S.; Suzuki, S.; Fuji, S.; Naiki-Ito, A.; Kato, H.; Yodkeeree, S.; Yodkeeree, S.; Sakorn, N.; Sakorn, N.; Ovatlarnporn, C.; Takahashi, S.; Limtrakul, P. Dehydrozingerone, a curcumin analog, as a potential anti-prostate cancer inhibitor in vitro and in vivo. *Molecules.* **2020**, *25*.
 82. Nissa, M.N.; Aravindan, P.G.; Kasinath, V.; Gopalakrishnan, G.; Merazig, H.; Velmurugan, D. Crystal structures of 2-chloro cinnamoyl phenolate (I) and 3-chloro cinnamanilide (II). *Cryst. Res. Technol.* **2004**, *39*, 643–649.
 83. Nishio, M. CH/ π hydrogen bonds in crystals. *CrystEngComm.* **2004**, 130–158.
 84. Perjéssy, A.; Hrnčiar, P. Infrared spectra and conformation of substituted 3-benzylidene-2,4-pentanediones. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* **1982**, *38*, 499–504.
 85. Desiraju, G.R. The C-H-O hydrogen bond in crystals: What is it? *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 290–296.
 86. Mague, J.T.; Mohamed, S.K.; Akkurt, M.; Abdelhamid, A.A.; Albayati, M.R. Crystal structure of 5-(4-methylphenyl)-3-[(E)-2-(4-methylphenyl)ethenyl]cyclohex-2-en-1-one. *Acta Crystallogr. Sect. E Crystallogr. Commun.* **2015**, *71*, o436–o437.
 87. Karplus, M. Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11–15.
 88. Karplus, M. Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870–2871.
 89. Hayun, H.; Fauzan, R.N.; Wibowo, N.T.; Asrianingtiyas, A.; Afriliana, N.; Ananda, T.

- Synthesis and anti-inflammatory activity of 2-Methoxy-4-(1-phenyl-3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)phenol and its aminomethyl derivatives. *Asian J. Chem.* **2020**, *32*, 607–611.
90. Saad, E.F.; Hamada, N.M.; Sharaf, S.M.; El Sadany, S.K.; Moussa, A.M.; Elba, M. Mass spectrometric study of some pyrazoline derivatives. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 833–836.
 91. Perjéssy, A. Infrared spectra of substituted chalcones and some of their ferrocene analogues. *Chem. zvesti.* **1969**, *23*, 905–915.
 92. Hayun, H.; Arrahman, A.; Purwati, E.M.; Yanuar, A.; Fortunata, F.; Suhargo, F.; Syafiqah, D.W.; Ignacia, C.; Novalia, A.R. Synthesis, anti-inflammatory and antioxidant activity of mannich bases of dehydrozingerone derivatives. *J. Young Pharm.* **2018**, *10*, s6–s10.
 93. Itagaki, Y.; Kurokawa, T.; Sasaki, S.; Chang, C.-T.; Chen, F.-C. The mass spectra of chalcones, flavones and isoflavones. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1966**, *39*, 538–543.
 94. Van de Sande, C.; Serum, J.W.; Vandewalle, M. Mass spectra of chalcones and flavanones. The isomerisation of 2-Hydroxy-chalcone and flavanone. *Org. Mass Spectrom.* **1972**, *6*, 1333–1346.
 95. Yallapu, M.M.; Jaggi, M.; Chauhan, S.C. β -Cyclodextrin-curcumin self-assembly enhances curcumin delivery in prostate cancer cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* **2010**, *79*, 113–125.
 96. Chen, X.; Zou, L.Q.; Niu, J.; Liu, W.; Peng, S.F.; Liu, C.M. The stability, sustained release and cellular antioxidant activity of curcumin nanoliposomes. *Molecules.* **2015**, *20*, 14293–14311.
 97. Parimita, S.P.; Ramshankar, Y.V.; Suresh, S.; Row, T.N.G. Redetermination of curcumin: (1*E*,4*Z*,6*E*)-5-hydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)hepta-1,4,6-trien-3-one. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online.* **2007**, *63*.
 98. Judas, N.; Kaitner, B.; Mestrovic, E. 3,3-Dibenzylpentane-2,4-dione, C₁₉H₂₀O₂. *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* **1995**, *51*, 2123–2125.
 99. Xu, G.; Wang, J.; Si, G.; Mahong Wang; Wu, B.; Zhou, S. Two-photon absorption and cell imaging of two multi-branched dyes based on curcumin. *Dye. Pigs.* **2015**, *123*, 267–273.
 100. Svistunova, I. V.; Fedorenko, E. V. α -Substituted boron difluoride acetylacetonates. *Russ. J. Gen. Chem.* **2008**, *78*, 1515–1523.
 101. Laali, K.K.; M., R.B.; Bunge, S.D.; Xin, Q.; Borosky, G.L. Fluoro-curcuminoids and curcuminoid-BF₂ adducts: Synthesis, X-ray structures, bioassay, and computational/docking study. *J. Fluor. Chem.* **2016**, *191*, 29–41.
 102. Schultz, T.W.; Yarbrough, J.W. Trends in structure-toxicity relationships for carbonyl-

- containing α,β -unsaturated compounds. *SAR QSAR Environ. Res.* **2004**, *15*, 139–146.
103. Barclay, L.R.C.; Vinqvist, M.R.; Mukai, K.; Goto, H.; Hashimoto, Y.; Tokunaga, A.; Uno, H. On the antioxidant mechanism of curcumin: Classical methods are needed to determine antioxidant mechanism and activity. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2841–2843.
104. Urooj, S.; Dhariwal, A.; Singh, V.; Alrowais, F. In Silico Antituberculosis Drug Designing using UCSF Chimera. *Int. J. Eng. Adv. Technol.* **2019**, *9*, 1820–1823.
105. Adnan, M.; Chy, M.N.U.; Kamal, A.T.M.M.; Chowdhury, M.R.; Islam, M.S.; Hossain, M.A.; Tareq, A.M.; Bhuiyan, M.I.H.; Uddin, M.N.; Tahamina, A.; Azad, M. O. K.; Lim, Y. S.; Cho, D. H. Unveiling pharmacological responses and potential targets insights of identified bioactive constituents of cuscuta reflexa roxb. Leaves through in vivo and in silico approaches. *Pharmaceuticals.* **2020**, *13*, 50-69
106. Rudra, S.; Tahamina, A.; Emon, N.U.; Adnan, M.; Shakil, M.; Chowdhury, M.H.U.; Barlow, J.W.; Alwahibi, M.S.; Soliman Elshikh, M.; Faruque, M.O.; Uddin, S. B. Evaluation of various solvent extracts of Tetrastigma leucostaphylum (Dennst.) alston leaves, a bangladeshi traditional medicine used for the treatment of diarrhea. *Molecules.* **2020**, *25*, 4994-5012
107. Mancuso, C.; Santangelo, R. Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *65*, 185–195.
108. Jayaprakasam, B.; Vanisree, M.; Zhang, Y.; Dewitt, D.L.; Nair, M.G. Impact of alkyl esters of caffeic and ferulic acids on tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzyme, and lipid peroxidation. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5375–5381.
109. Zhang, L.W.; Al-Suwayeh, S.A.; Hsieh, P.W.; Fang, J.Y. A comparison of skin delivery of ferulic acid and its derivatives: Evaluation of their efficacy and safety. *Int. J. Pharm.* **2010**, *399*, 44–51.
110. Chen, J.H.; Ho, C.T. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2374–2378.
111. Insuasty-Obando, B. Las chalconas y su uso como precursores en la síntesis de compuestos heterocíclicos nitrogenados. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.* **2016**, *40*, 234–243.
112. Li, W.; Wu, W.; Yu, F.; Huang, H.; Liang, X.; Ye, J. Catalytic asymmetric Michael addition with curcumin derivative. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2505–2511.
113. Ahn, B.-Z.; Sok, D.-E. Michael acceptors as a tool for anticancer drug design. *Curr. Pharm. Des.* **1996**, *2*, 247–262.
114. Nelson, K.M.; Dahlin, J.L.; Bisson, J.; Graham, J.; Pauli, G.F.; Walters, M.A. The

- essential medicinal chemistry of curcumin. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1620–1637.
115. Roy, M.; Chakraborty, S.; Siddiqi, M.; Bhattacharya, R.K. Induction of apoptosis in tumor cells by natural phenolic compounds. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **2012**, *3*, 61–67.
116. Xu, G.; Wei, D.; Wang, J.; Jiang, B.; Wang, M.; Xue, X.; Zhou, S.; Wu, B.; Jiang, M. Crystal structure, optical properties and biological imaging of two curcumin derivatives. *Dye. Pigs.* **2014**, *101*, 312–317.
117. Xu, G.; Wang, J.; Si, G.; Mahong, W.; Hualin, C.; Bin, C.; Zhou, S. Preparation, photoluminescence properties and application for in vivo tumor imaging of curcumin derivative-functionalized graphene oxide composite. *Dye. Pigs.* **2017**, *141*, 470–478.
118. Si, G.; Zhou, S.; Xu, G.; Wang, J.; Wu, B.; Zhou, S. A curcumin-based NIR fluorescence probe for detection of amyloid-beta (A β) plaques in Alzheimer's disease. *Dye. Pigs.* **2019**, *163*, 509–515.
119. Chongzhao, R.; Xiaoyin, X.; Raymond, S.B.; Ferrara, B.J.; Neal, K.; Bacskai, B.J.; Medarova, Z.; Moore, A. Design, synthesis, and testing of difluoroboron-derivatized curcumins as near-infrared probes for in vivo detection of amyloid- β deposits. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15257–15261.
120. Fang-Ying, W.; Mei-Zhen, S.; Yan-Ling, X.; Yu-Mei, W.; Du-Qiu, T. Curcumin as a colorimetric and fluorescent chemosensor for selective recognition of fluoride ion. *J. Luminiscence.* **2010**, *130*, 304–308.
121. Park, K.S.; Seo, Y.; Kim, M.K.; Kim, K.; Kim, Y.K.; Choo, H.; Chong, Y. A curcumin-based molecular probe for near-infrared fluorescence imaging of tau fibrils in Alzheimer's disease. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 11194–11199.
122. Lorenz, V.; Liebing, P.; Suta, M.; Felix, E.; Liane, H.; Busse, S.; Wang, S.; Wickleder, C.; Edelman, F.T. Synthesis, structure, complexation, and luminescence properties of the first metal-organic curcumin compound Bis(4-triphenylsiloxy)curcumin. *J. Luminiscence.* **2019**, *211*, 243–250.
123. Rumi, M.; Ehrlich, J.E.; Heikal, A.A.; Perry, J.W.; Barlow, S.; Hu, Z.; McCord-Maughon, D.; Parker, T.C.; Röckel, H.; Thayumanavan, S.; Marder, S. R.; Beljonne, D.; Brédas, J. L. Structure-property relationships for two-photon absorbing chromophores: Bis-donor diphenylpolyene and bis(styryl)benzene derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9500–9510.
124. Albota, M.; Beljonne, D.; Brédas, J.L.; Ehrlich, J.E.; Fu, J.Y.; Heikal, A.A.; Hess, S.E.; Kogej, T.; Levin, M.D.; Marder, S.R.; McCord-Maughon, D.; Perry, J. W.; Rockel, H.; Rumi, M.; Subramaniam, G.; Webb, W. W.; Wu, X. L.; Xu, C.. Design of organic

- molecules with large two-photon absorption cross sections. *Science*. **1998**, *281*, 1653–1656.
125. Chauvignac, C.; Miller, C.N.; Srivastava, S.K.; Lewis, J.W.; Husbands, S.M.; Traynor, J.R. Major effect of pyrrolic N-benylation in norbinaltorphimine, the selective κ -opioid receptor antagonist. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1676–1679.
 126. Obregón-Mendoza, M.A.; Estévez-Carmona, M.M.; Alvarez-Ricardo, Y.; Meza-Morales, W.; Escobedo-Martínez, C.; Soriano-García, M.; Enríquez, R.G. Crystal structure, synthesis and biological activity of ether and ester trans-ferulic acid derivatives. *Int. J. Org. Chem.* **2018**, *8*, 359–377.
 127. Brouwer, A.M. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 2213–2228.
 128. Bruker APEX II. *APEX II* **2013**.
 129. Sheldrick, G.M. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* **2008**, *64*, 112–122.
 130. Nardelli, M. PARST: A system of fortran routines for calculating molecular structure parameters from results of crystal structure analyses. *J. Appl. Crystallogr.* **1995**, *28*, 659.
 131. Macrae, C.F.; Edgington, P.R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Shields, G.P.; Taylor, R.; Towler, M.; Van De Streek, J. Mercury: Visualization and analysis of crystal structures. *J. Appl. Crystallogr.* **2006**, *39*, 453–457.
 132. Grosdidier, A.; Zoete, V.; Michielin, O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 270–277.
 133. Stockinger, H.; Altenhoff, A.M.; Arnold, K.; Bairoch, A.; Bastian, F.; Bergmann, S.; Bougueleret, L.; Bucher, P.; Delorenzi, M.; Lane, L.; Mercier, P. L.; Lisacek, F.; Michielin, O.; Palagani, P. M.; Rougemont, J.; Schwede, T.; Mering, C. V.; Nimwegen, E. V.; Walther, D.; Xenarios, I.; Zavolan, M.; Zdobnov, E. M.; Zoete, V.; Appel, R. D. Fifteen years SIB Swiss Institute of Bioinformatics: Life science databases, tools and support. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 436–441.
 134. Grosdidier, A.; Zoete, V.; Michielin, O. EADock: Docking of Small Molecules Into Protein Active Sites With a Multiobjective Evolutionary Optimization. *PROTEINS: Struct. Funct. Bioinformatics.* **2007**, *67*, 1010–1025.
 135. Ethalsha, P.; Lydia, J.; Retna, A.M. Docking score of the isolated compound: 19-Hydroxy lochnericine - with different proteins. *Green Chem. Technol. Lett.* **2016**, *2*, 31–34.
 136. Daina, A.; Blatter, M.C.; Baillie Gerritsen, V.; Palagi, P.M.; Marek, D.; Xenarios, I.; Schwede, T.; Michielin, O.; Zoete, V. Drug design workshop: A web-based educational

- tool to introduce computer-aided drug design to the general public. *J. Chem. Educ.* **2017**, *94*, 335–344.
137. Yang, J.; Roy, A.; Zhang, Y. Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. *Bioinformatics.* **2013**, *29*, 2588–2595.
138. Jamalzadeh, L.; Ghafoori, H.; Sariri, R.; Rabuti, H.; Nasirzade, J.; Hasani, H.; Aghamaali, M.R. Cytotoxic effects of some common organic solvents on MCF-7, RAW-264.7 and human umbilical vein endothelial cells. *Avicenna J. Med. Biochem* **2016**, *1*, 1–6.
139. Andrés, A.; Rosés, M.; Ràfols, C.; Bosch, E.; Espinosa, S.; Segarra, V.; Huerta, J.M. Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (log D) from low drug amounts. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *76*, 181–191.
140. Sangster, J. Octanol-water partition coefficients of simple organic compounds. *J. Phys. Chem. Ref. Data.* **1989**, *18*, 1111.

14. Anexos (Espectros de Resonancia Magnética Nuclear, Infrarrojo y Espectrometría de Masas)

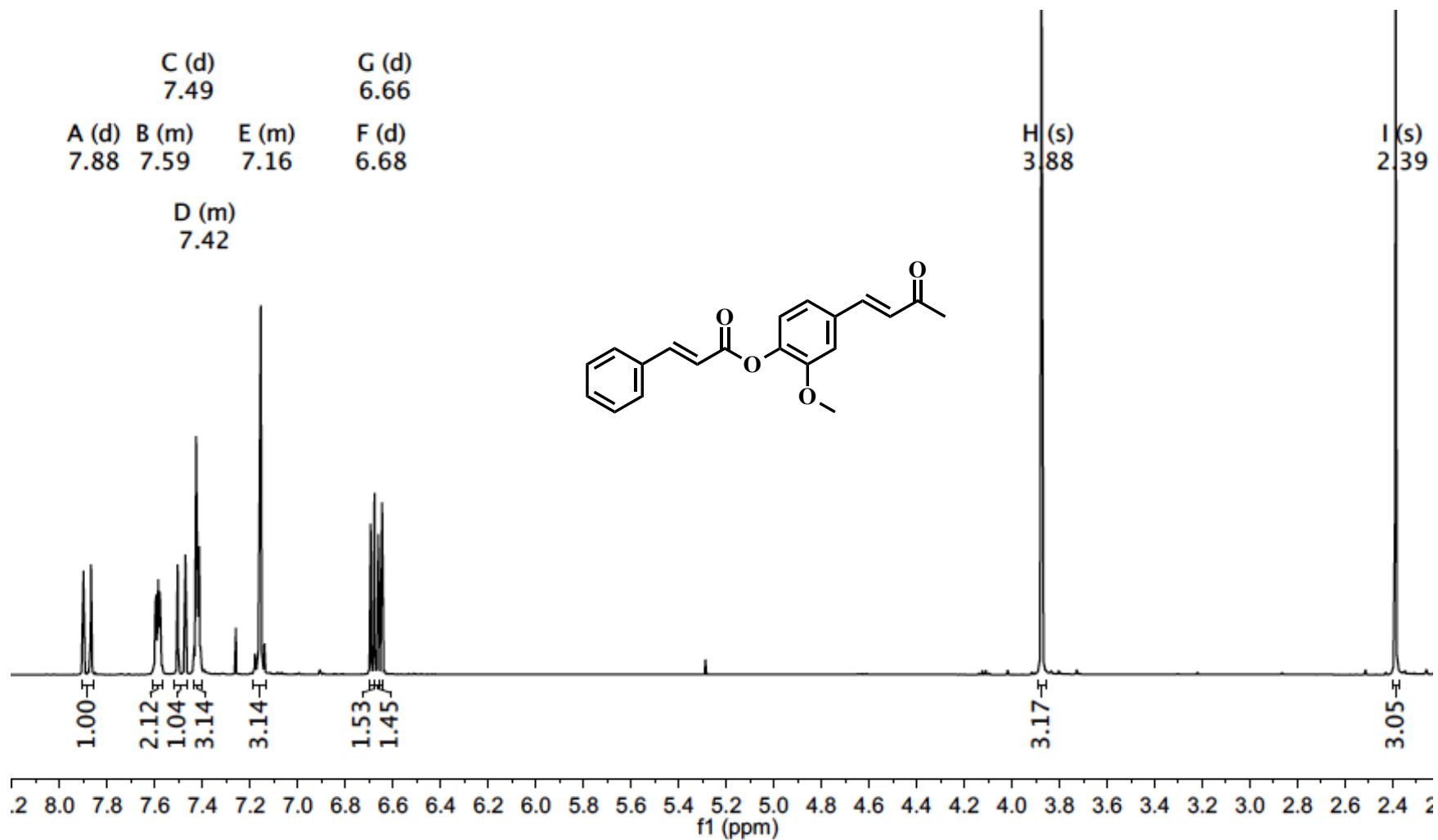


Figura A1. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 6.

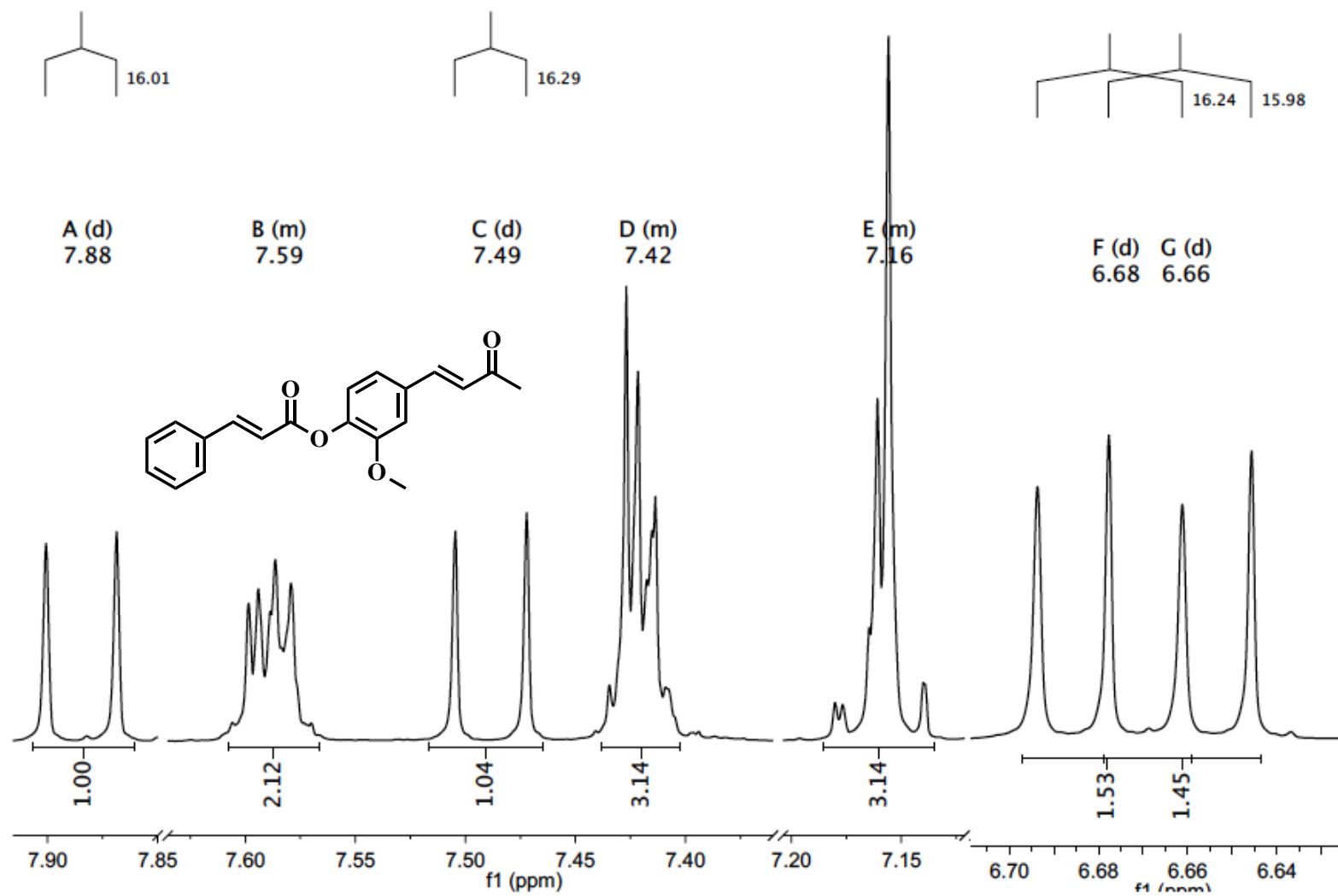


Figura A2. Espectro de RMN de ¹H (sección aromática) del compuesto **6**.

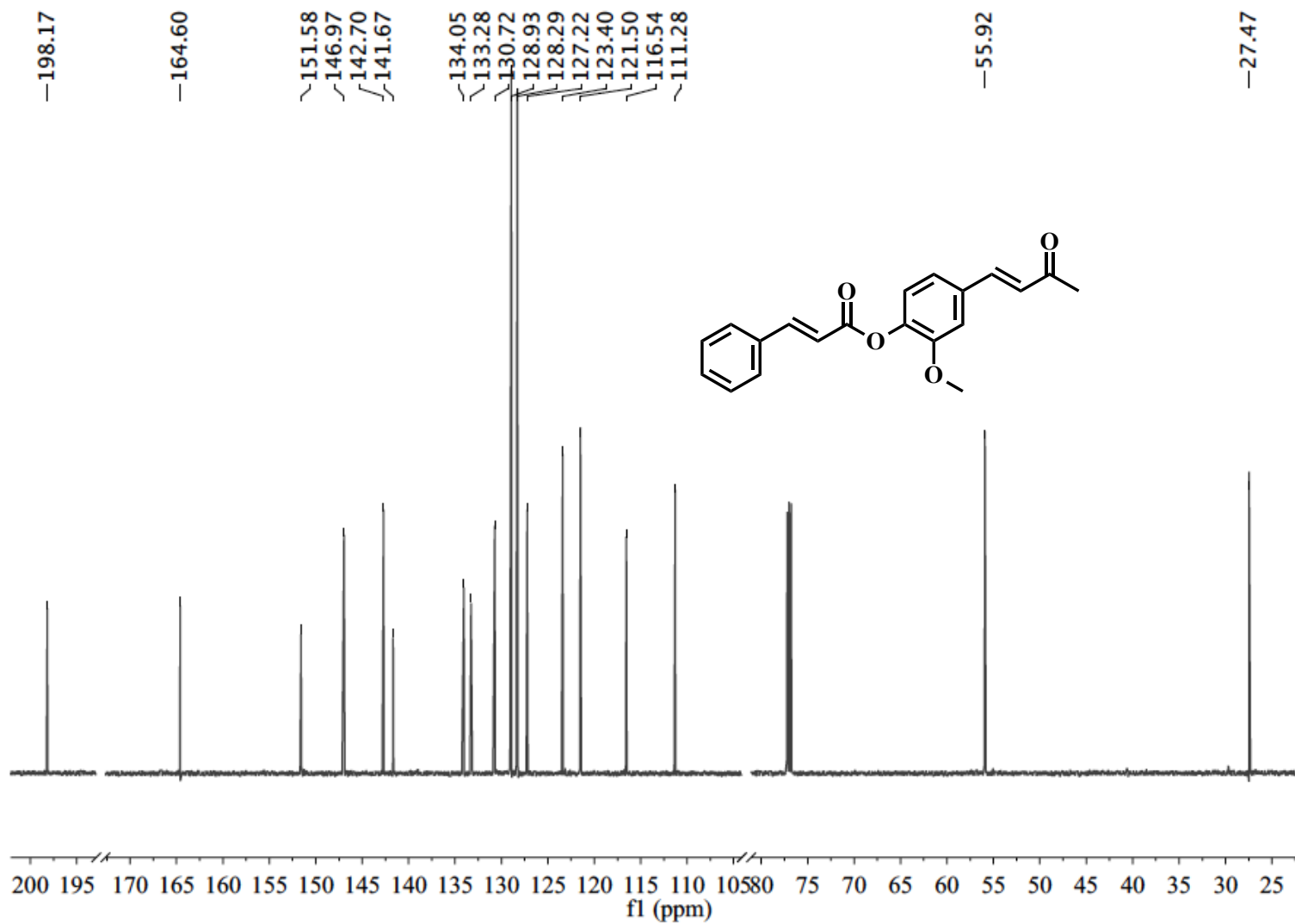


Figura A3. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **6**.

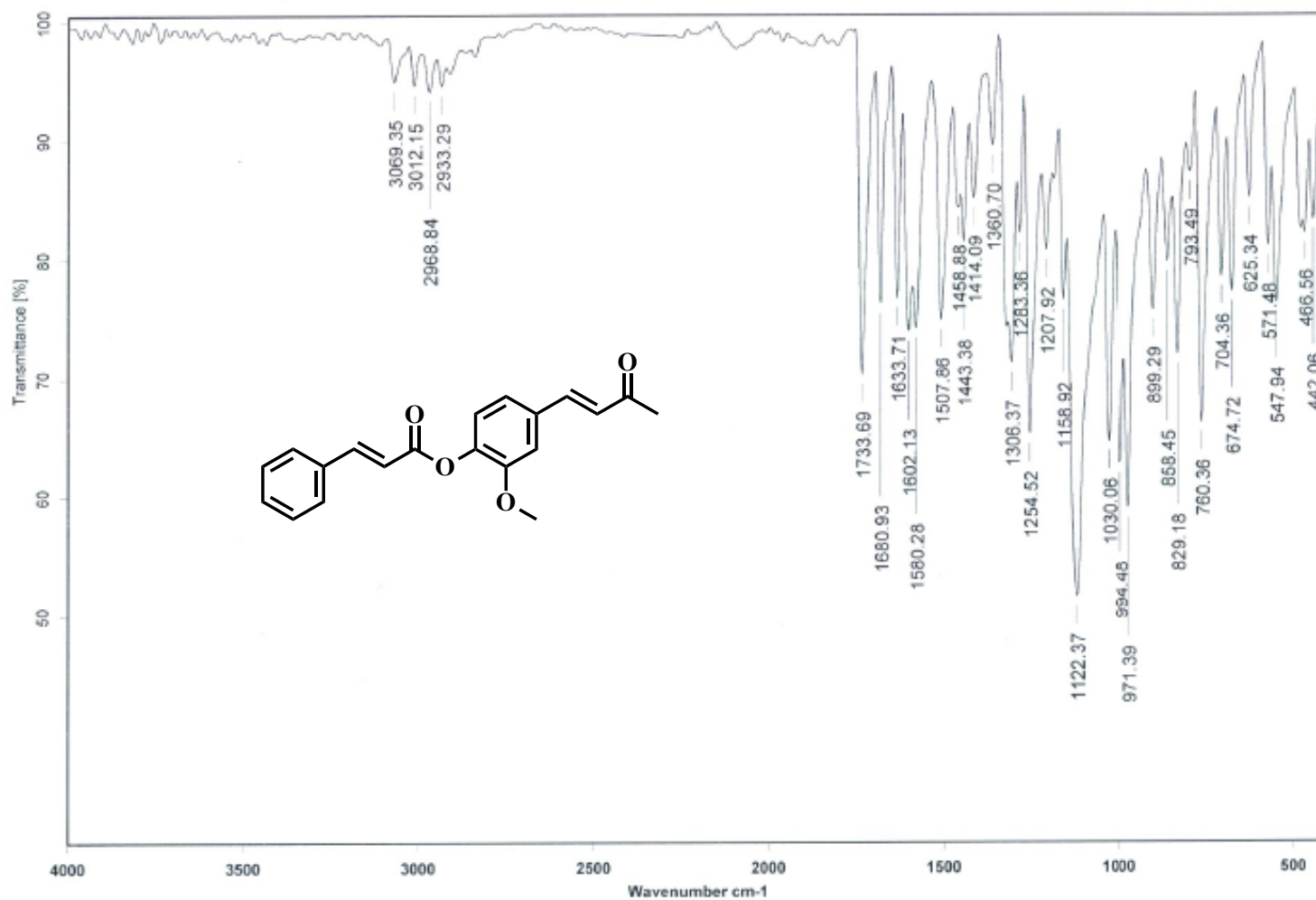


Figura A4. Espectro de IR del compuesto **6** (Pastilla de KBr).

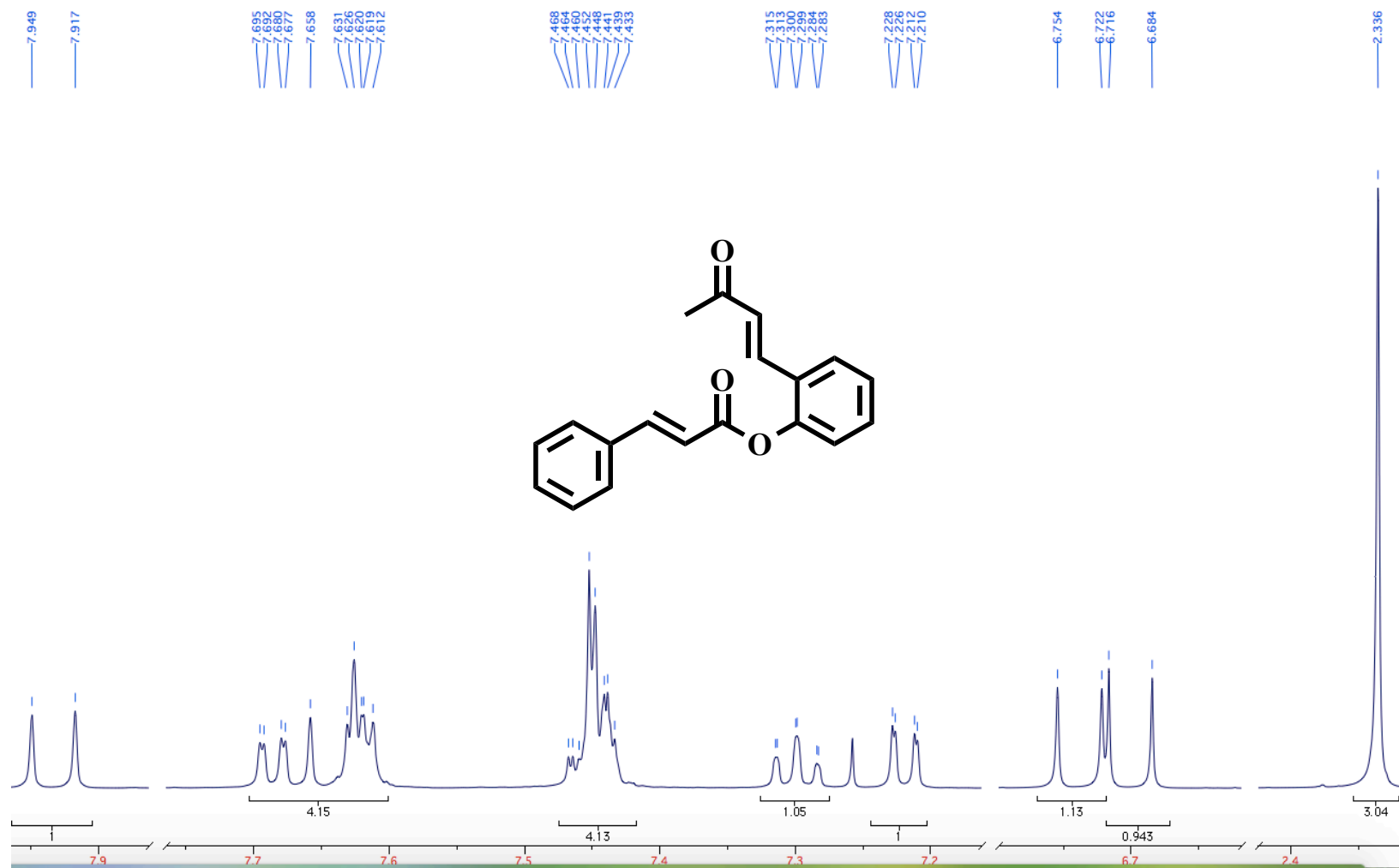


Figura A5. Espectro de RMN de ¹H del compuesto 7.

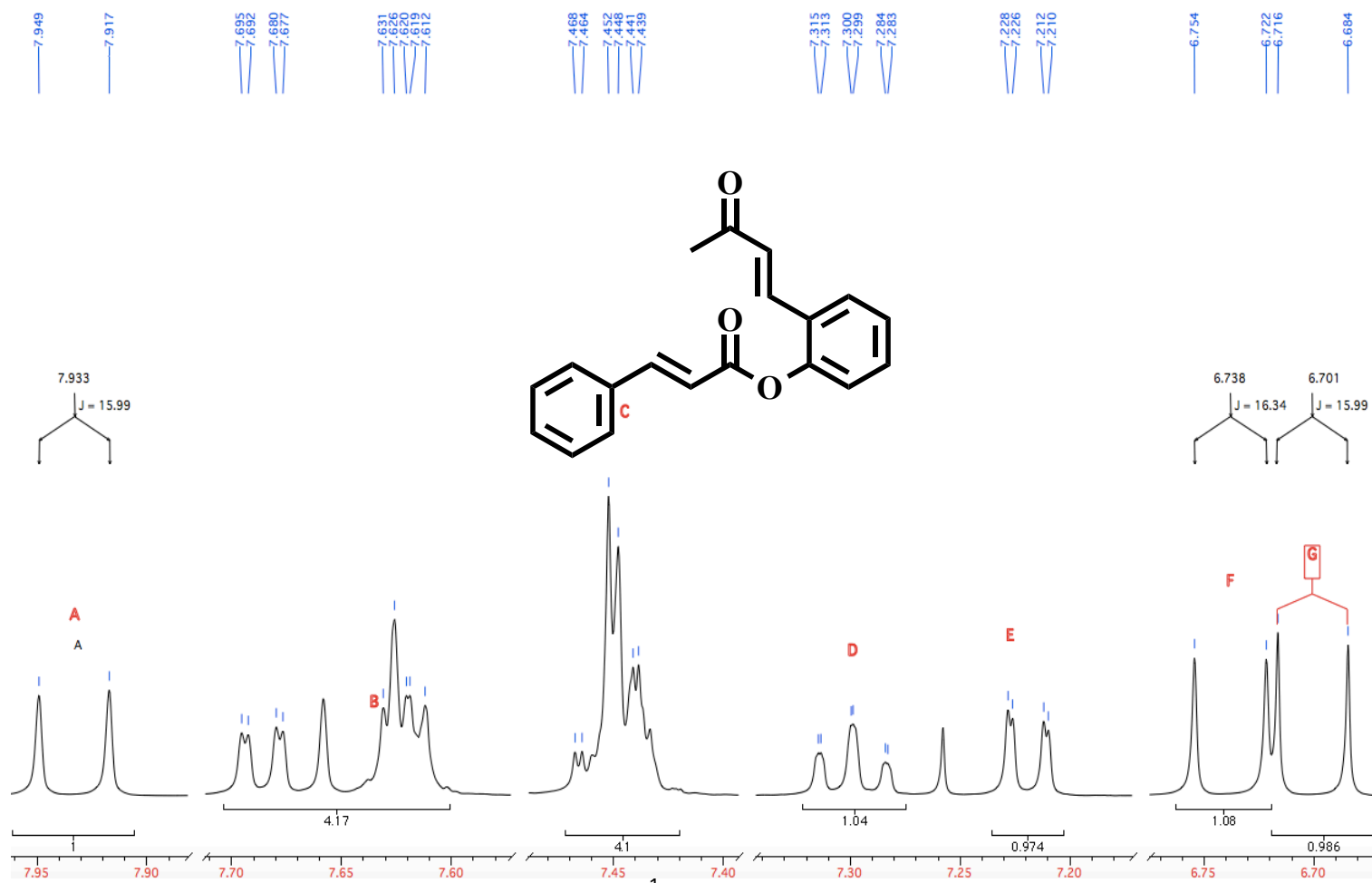


Figura A6. Espectro de RMN de ¹H (sección aromática) del compuesto 7.

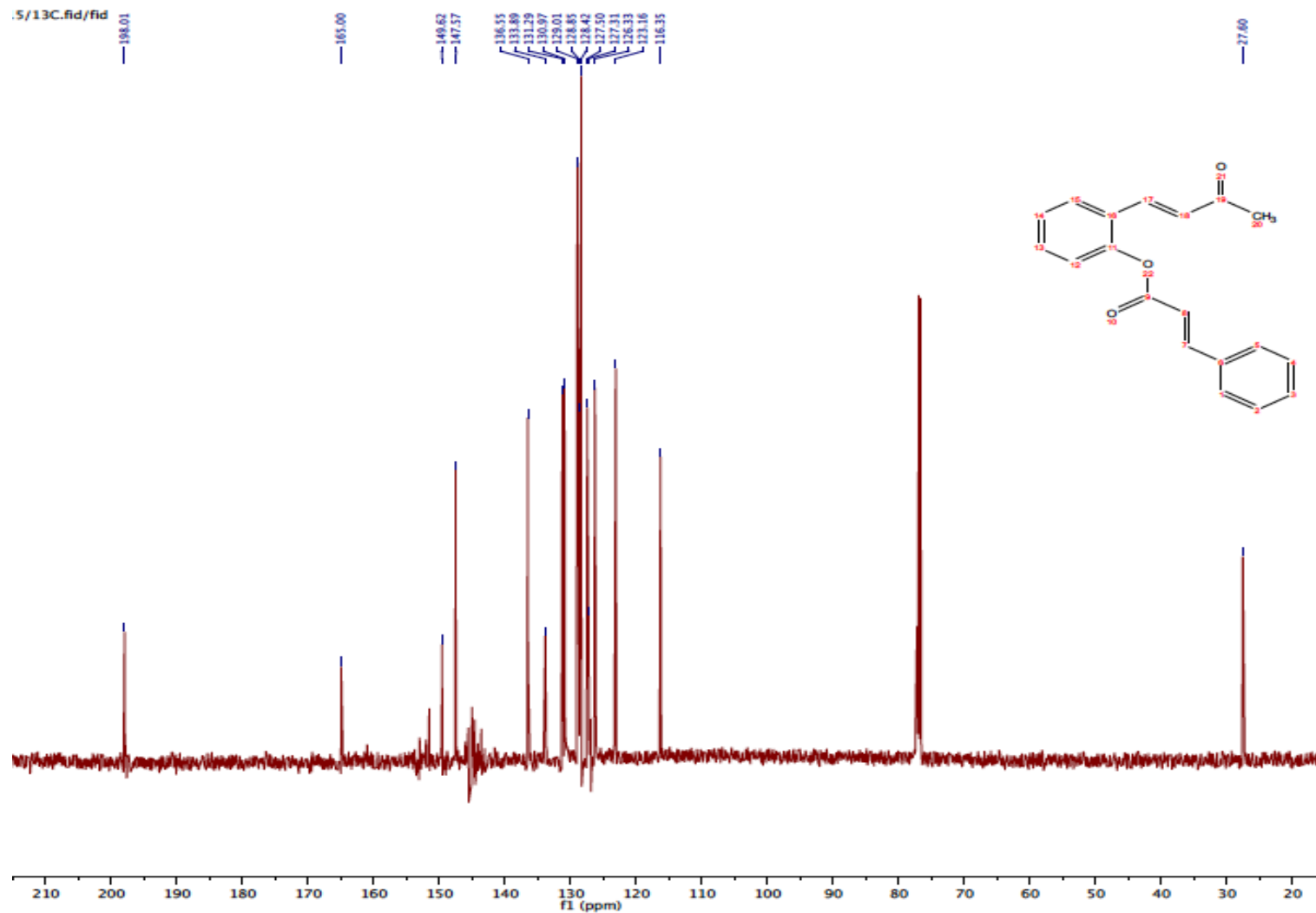


Figura A7. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 7.

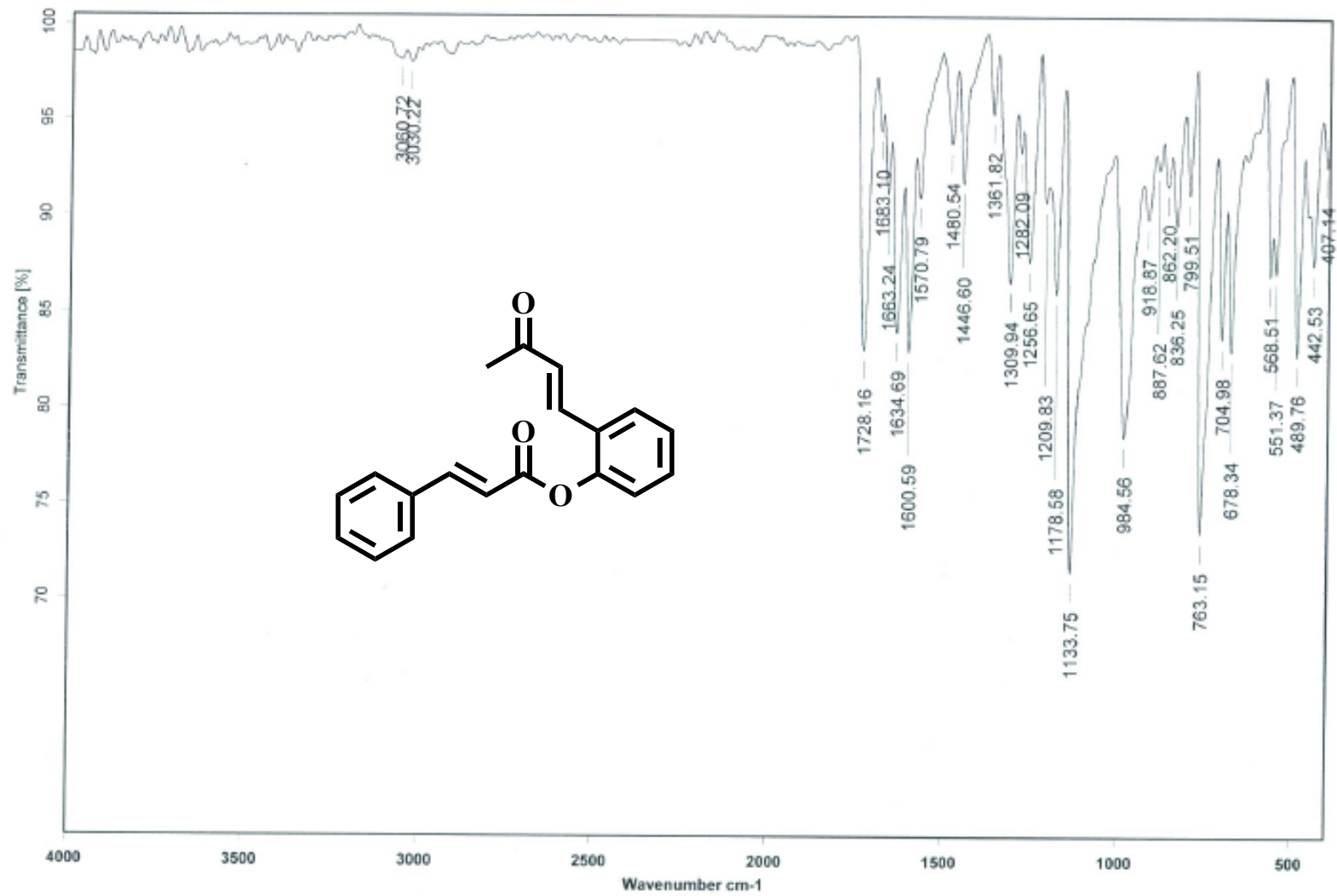


Figura A8. Espectro de IR del compuesto 7 (Pastilla de KBr).

Experiment Title: -
Creation Parameters: Average(MS[1] Time:0.71..0.81)
Comment: Dr Enriquez Raul

Acq. Data Name: 939 Retro-o-OHcinamic

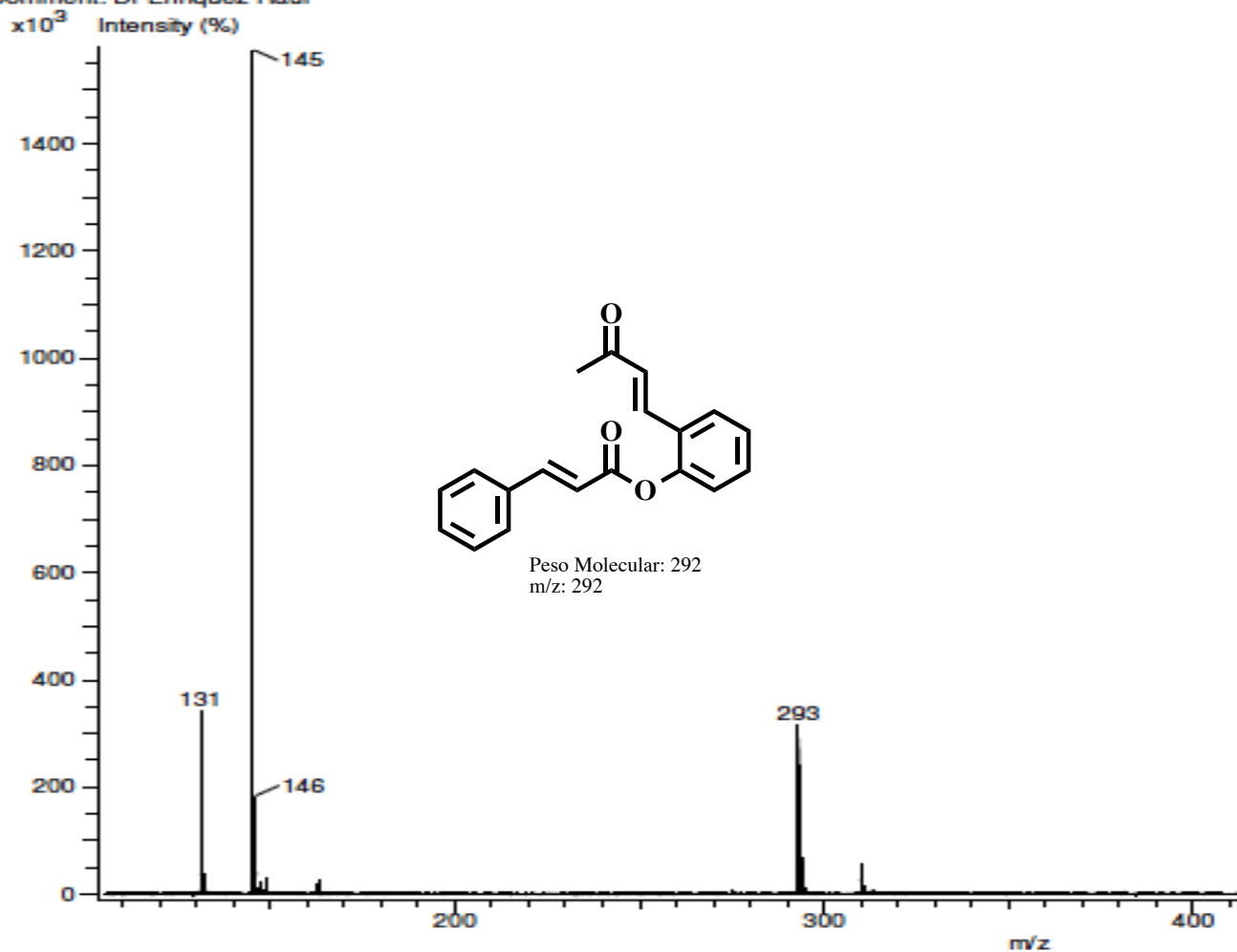


Figura A9. Espectro de Masas del compuesto 7 (DART⁺).

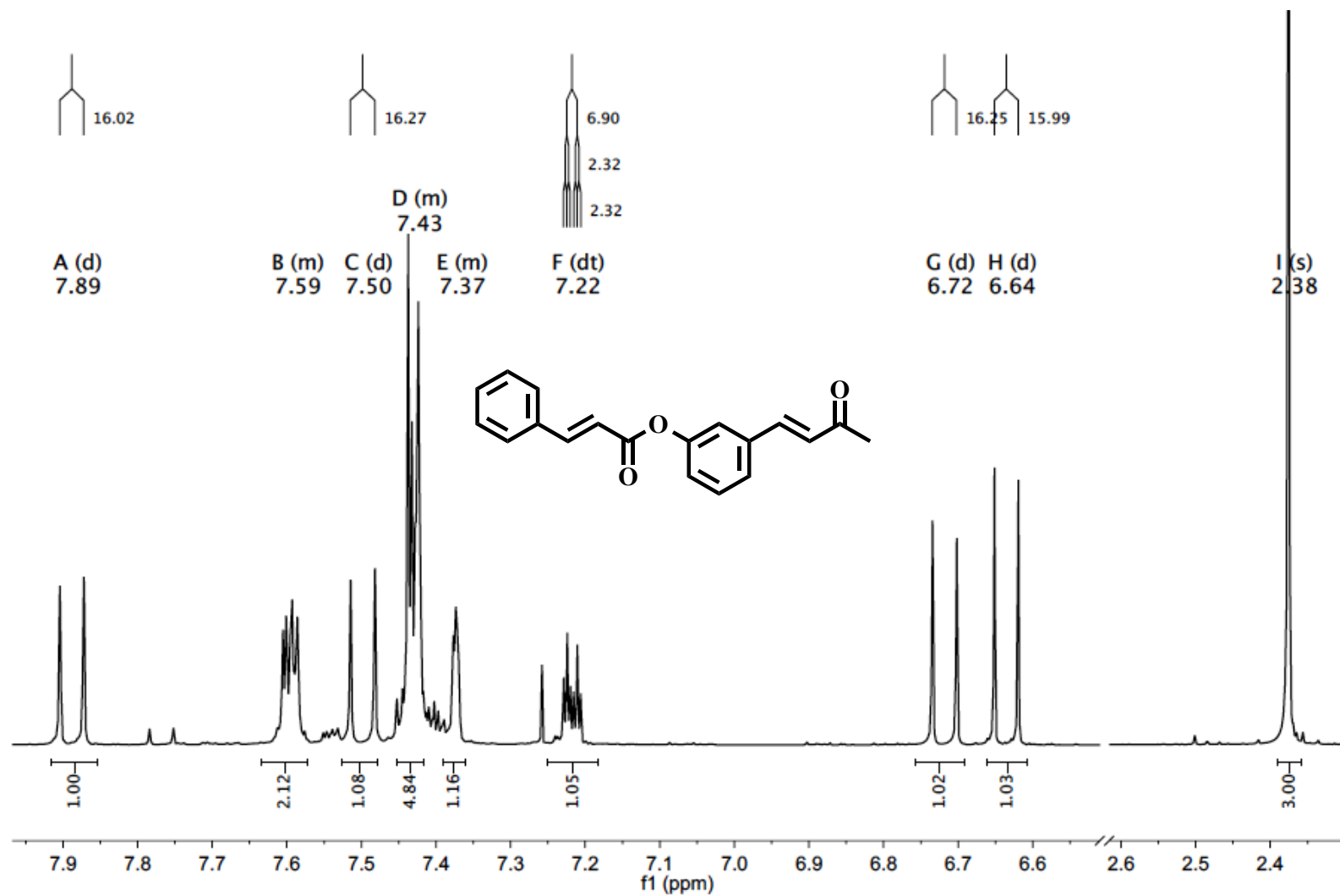


Figura A10. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 8.

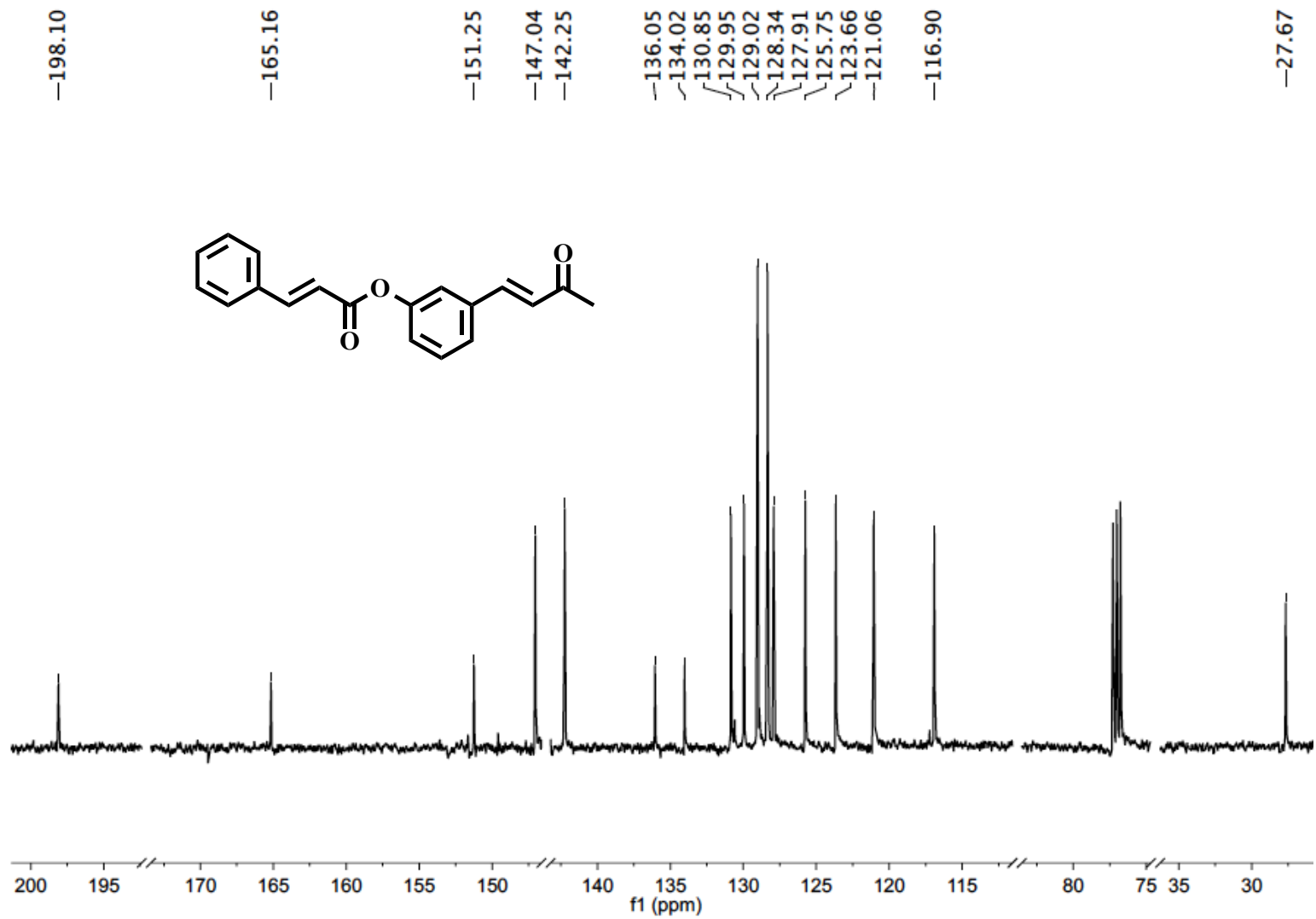


Figura A11. Espectro de RMN de ¹³C del compuesto 8.

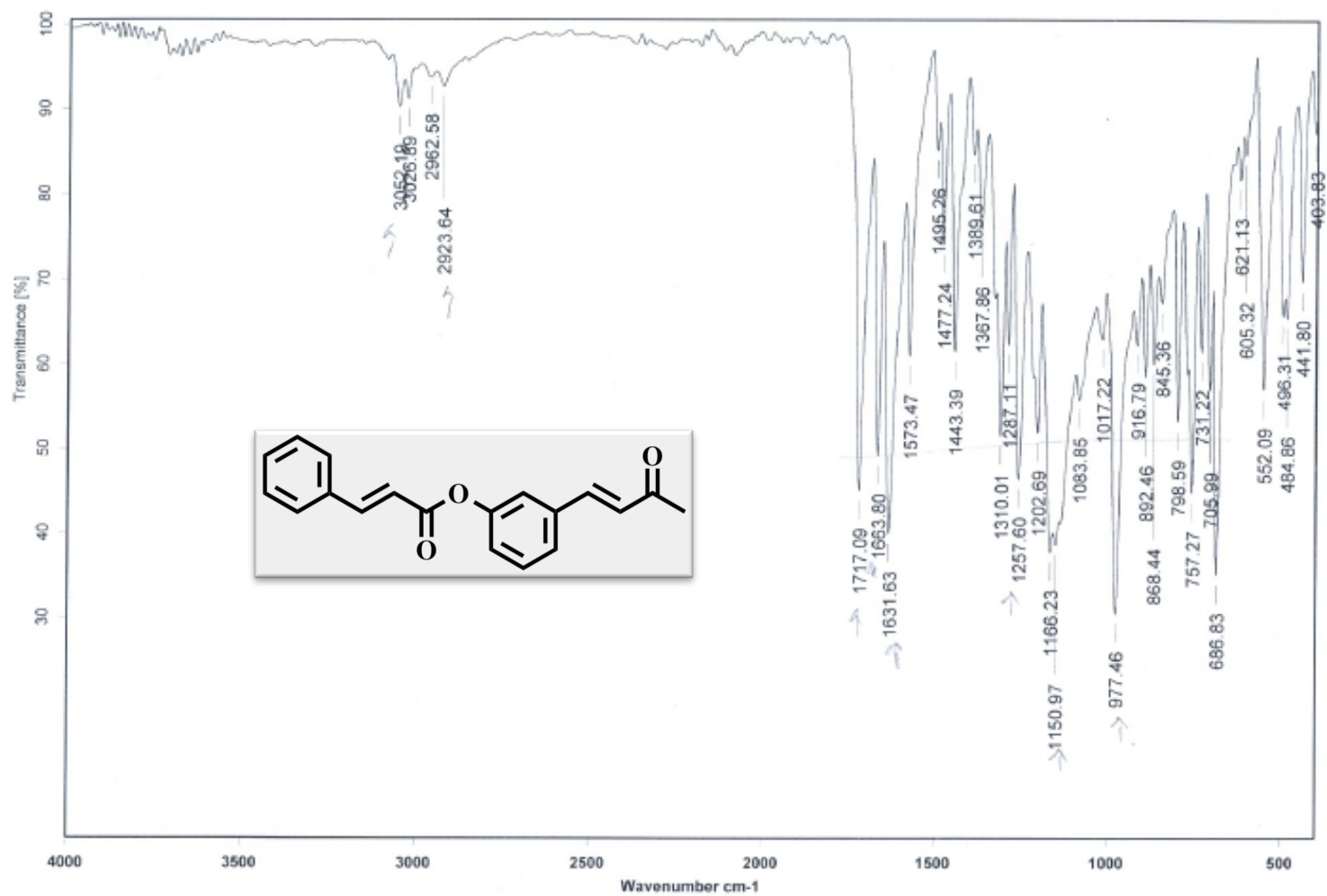


Figura A12. Espectro de IR del compuesto 8 (Pastilla de KBr).

Experiment Title: -
Creation Parameters: Average(MS[1] Time:0.41..0.42)
Comment: Dr Enriquez Raul

Acq. Data Name: 1195 Retro-m-OH-cinamic

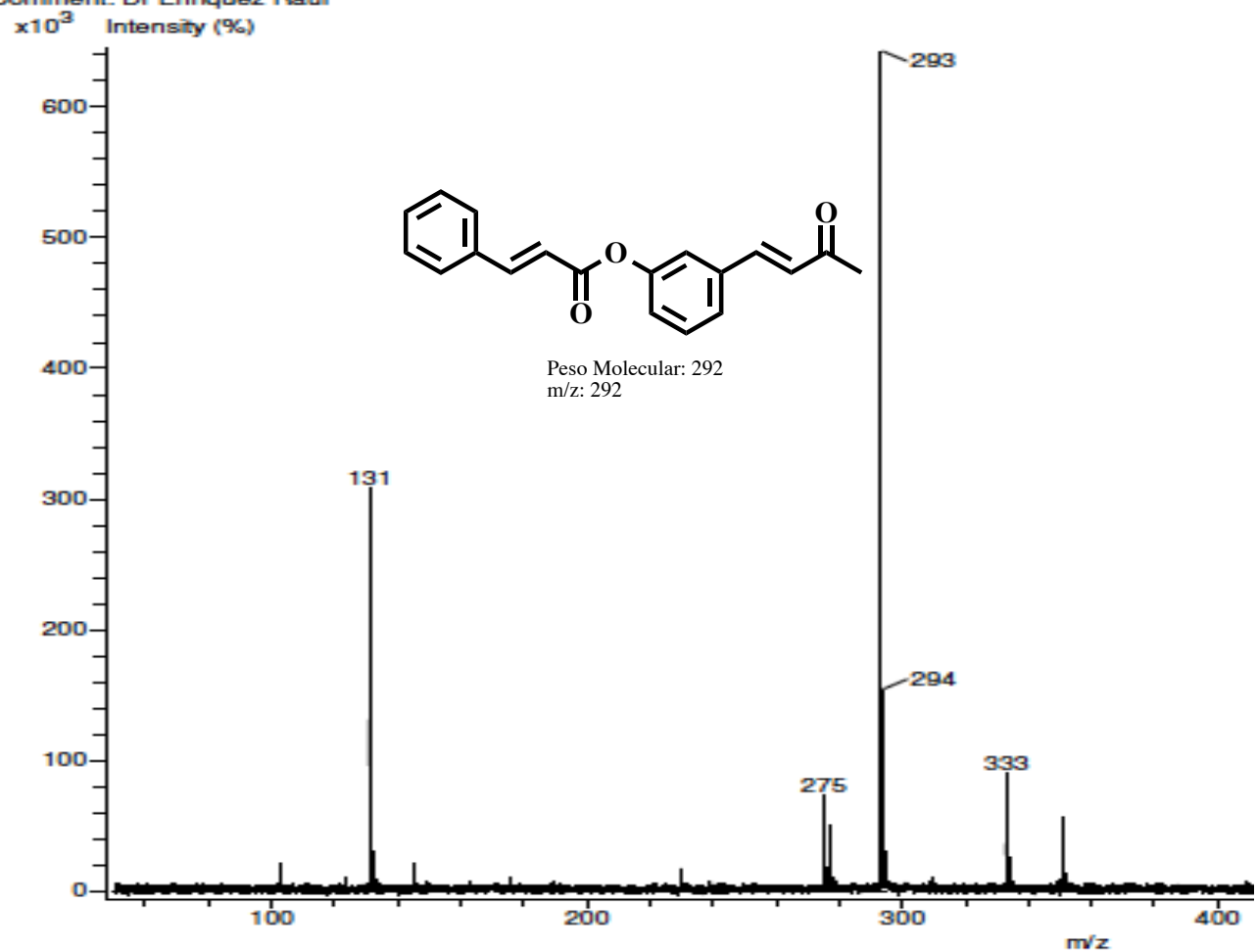


Figura A13. Espectro de Masas del compuesto 8 (DART⁺).

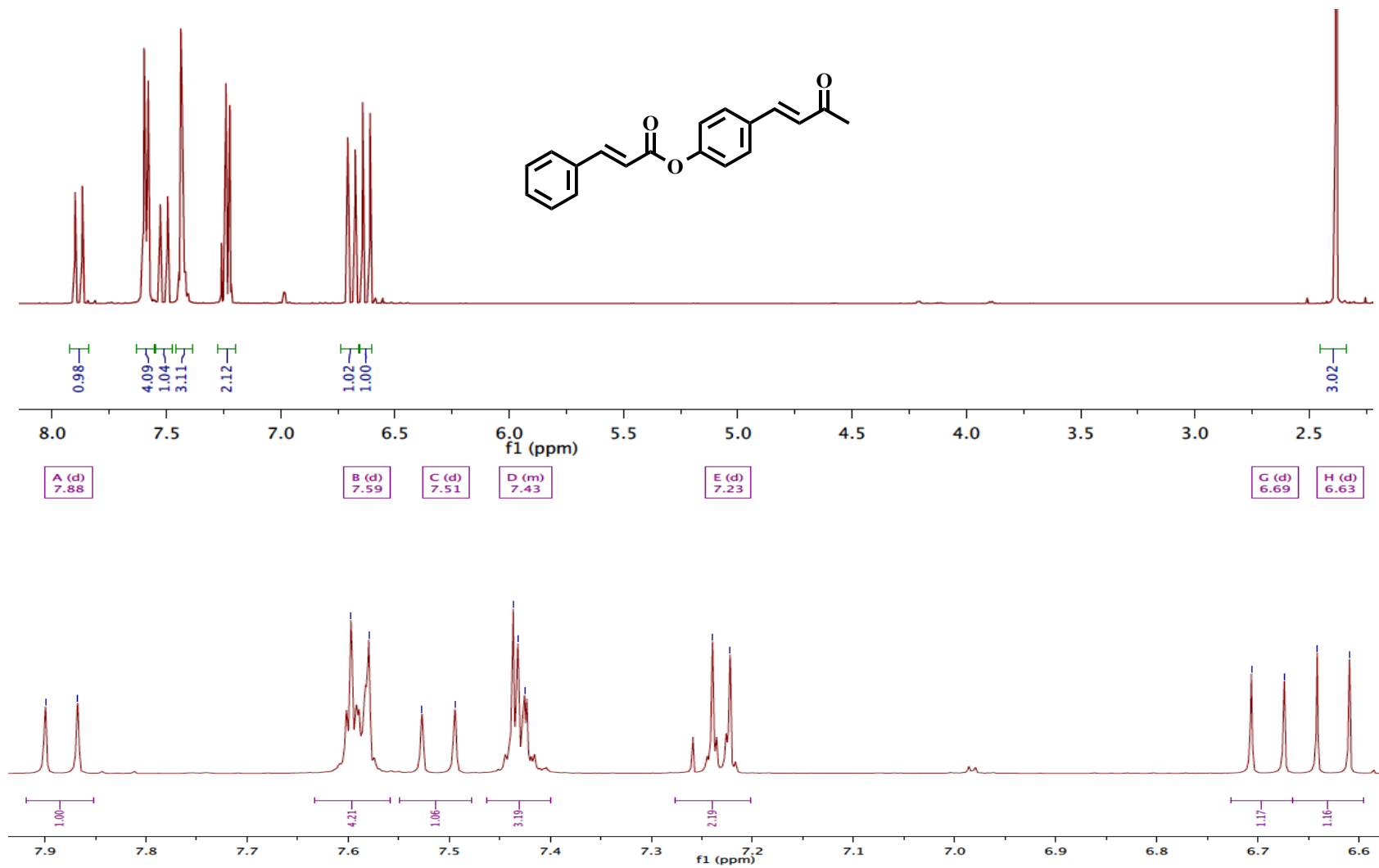


Figura A14. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 9.

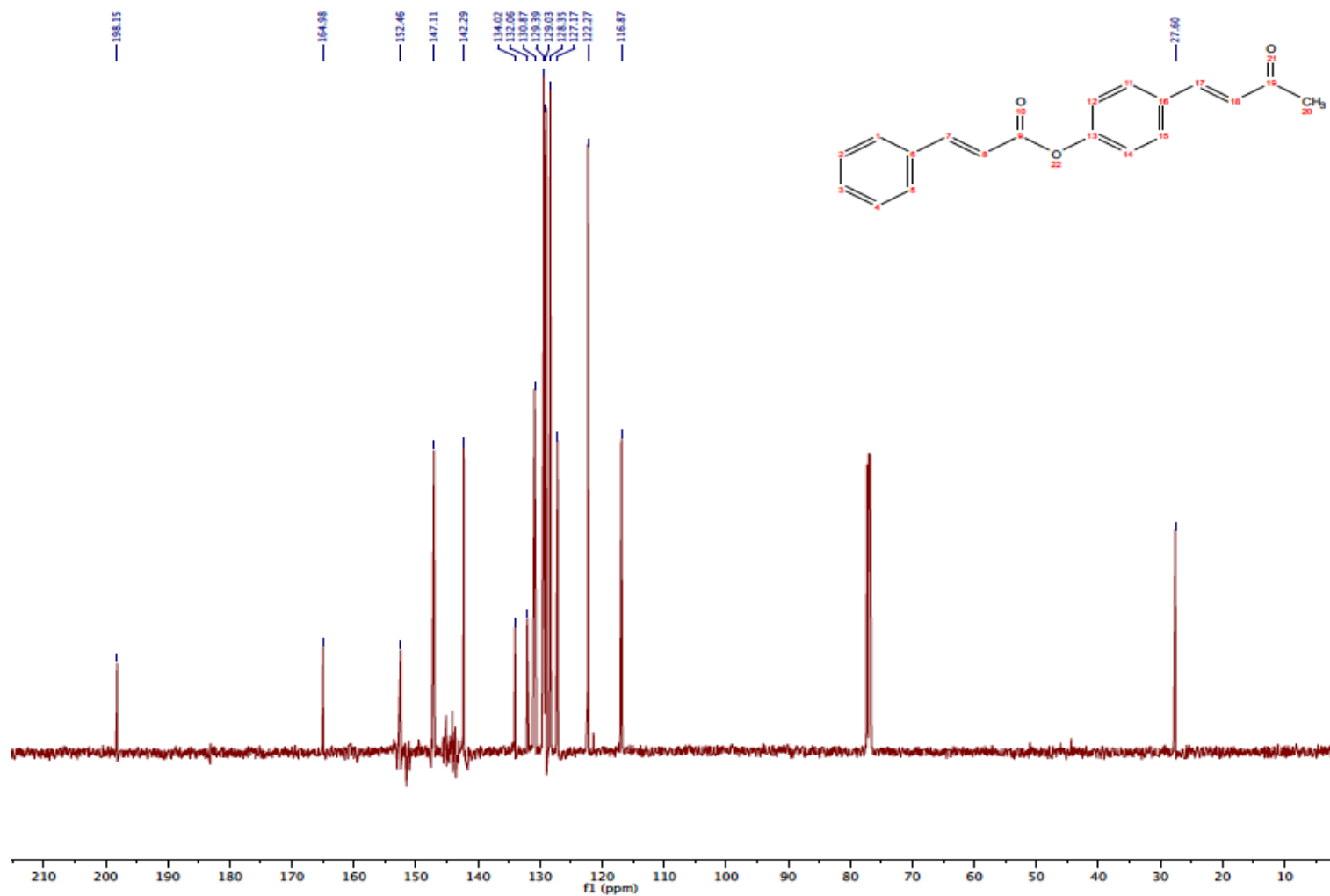


Figura A15. Espectro de RMN de ¹³C del compuesto 9.

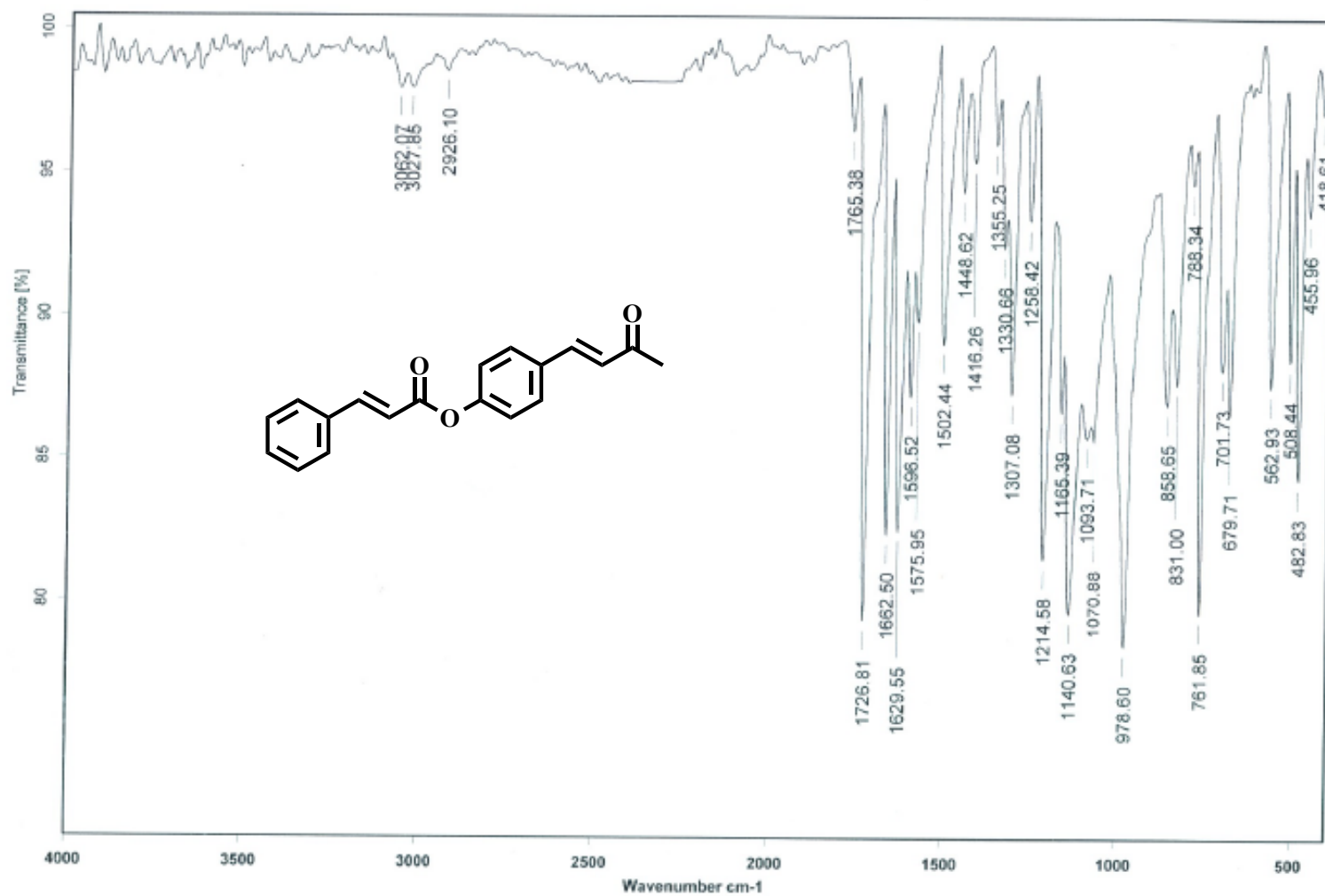


Figura A16. Espectro de IR del compuesto 9 (Pastilla de KBr).

Experiment Title: -
Creation Parameters: Average(MS[1] Time:0.48..0.59)
Comment: Dr Enriquez Raul

Acq. Data Name: 938 Retro-p-OHcinamic

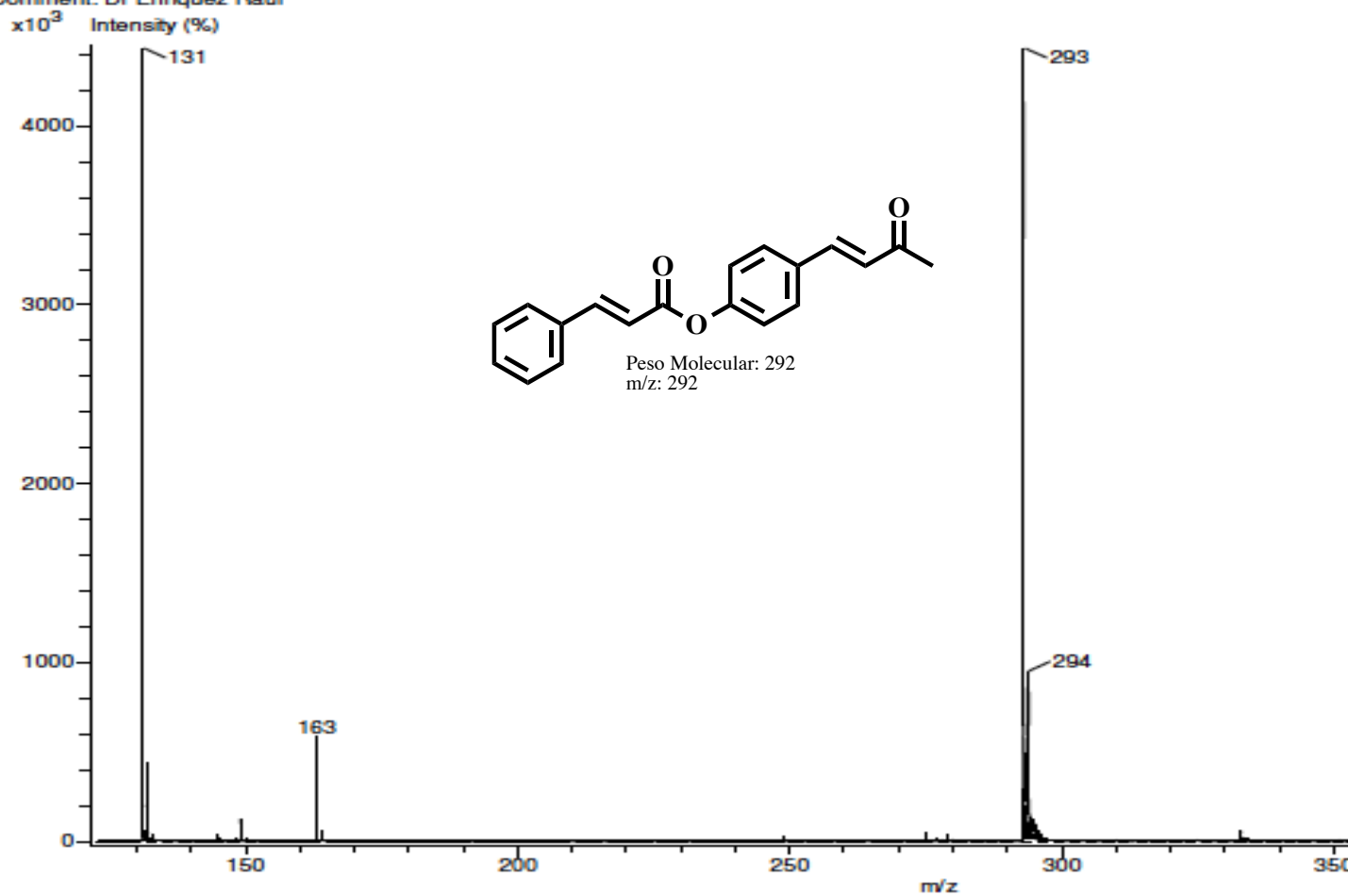


Figura A17. Espectro de Masas del compuesto 9 (DART⁺).

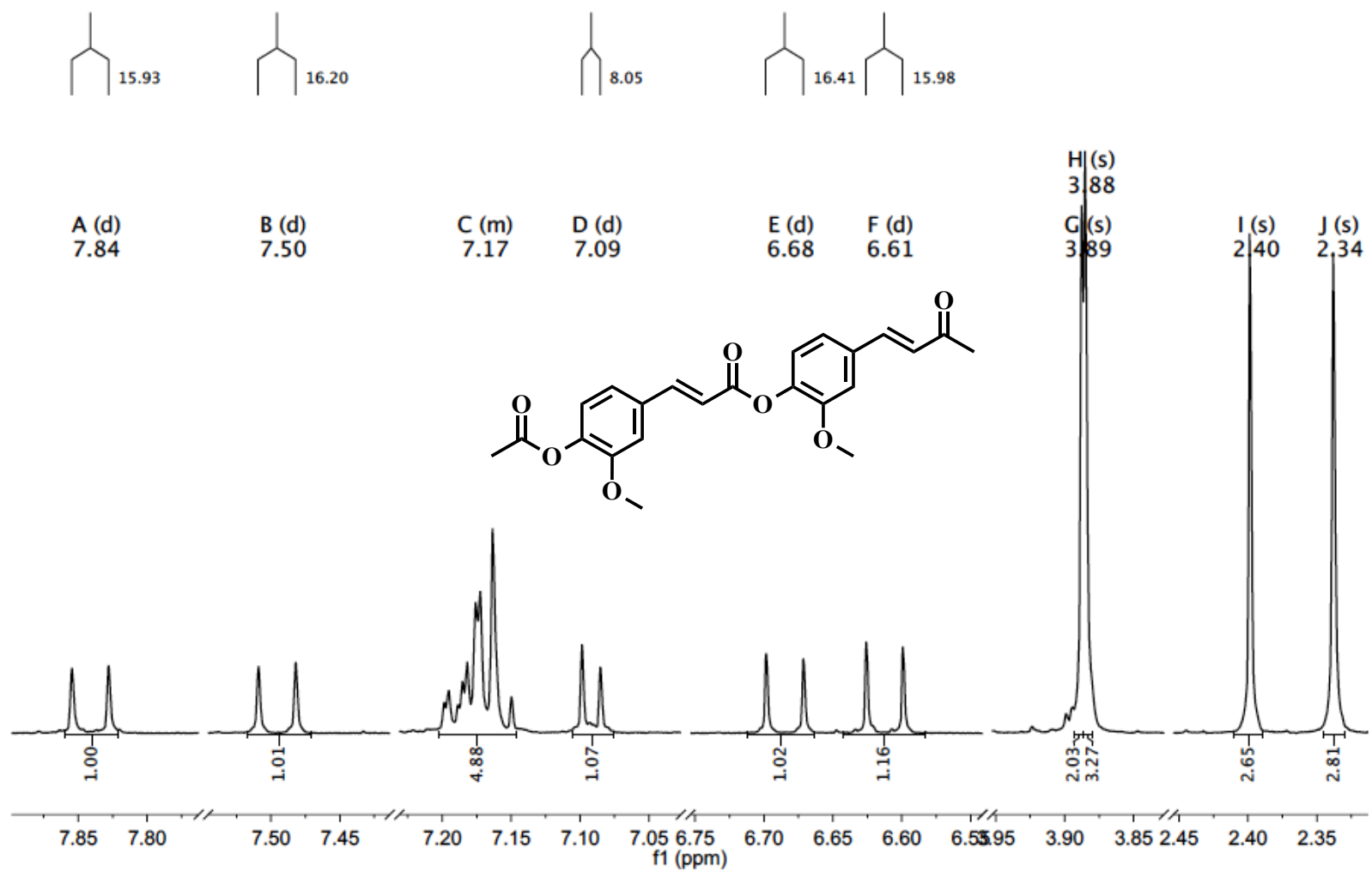


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 13.

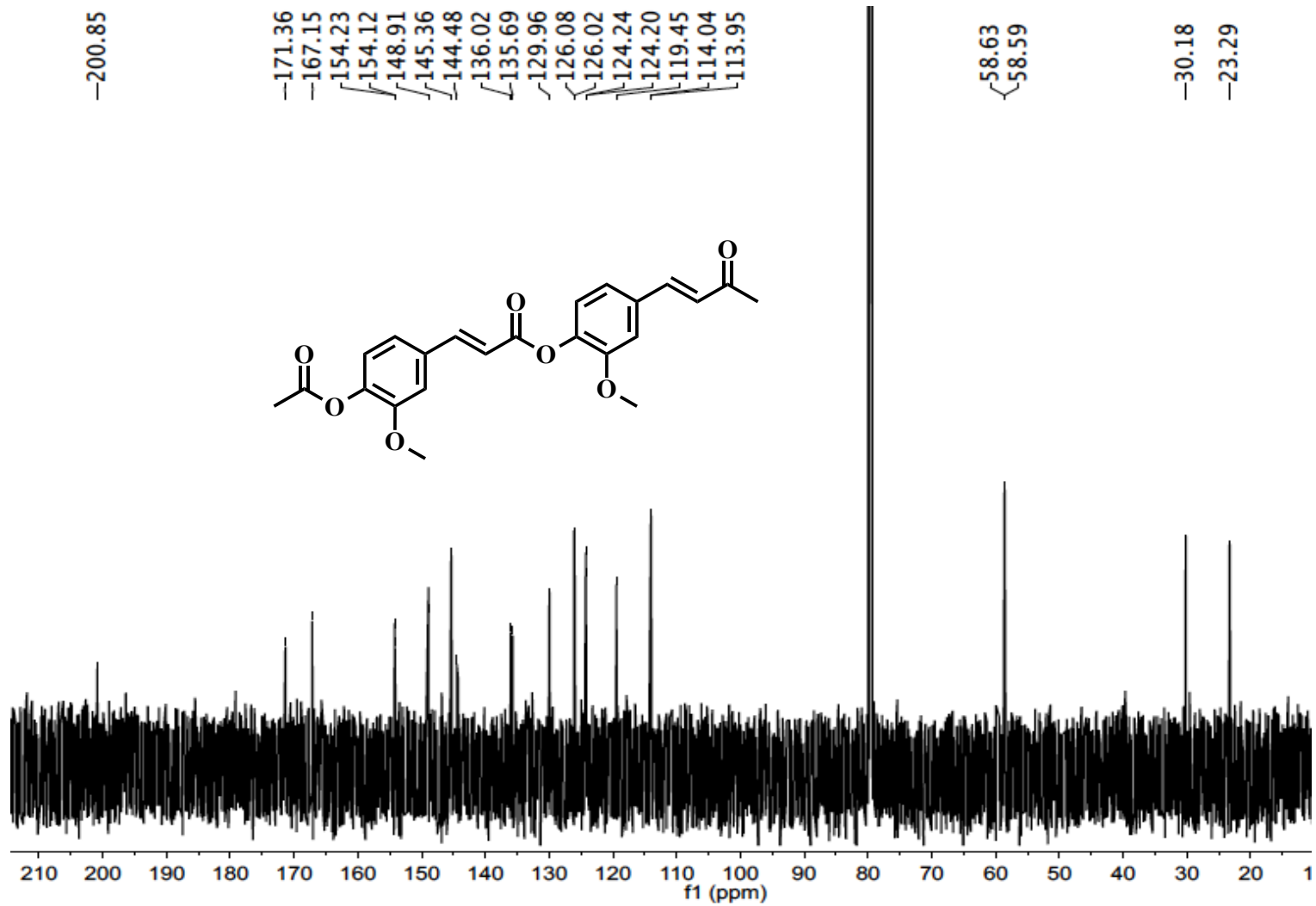


Figura A19. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 13.

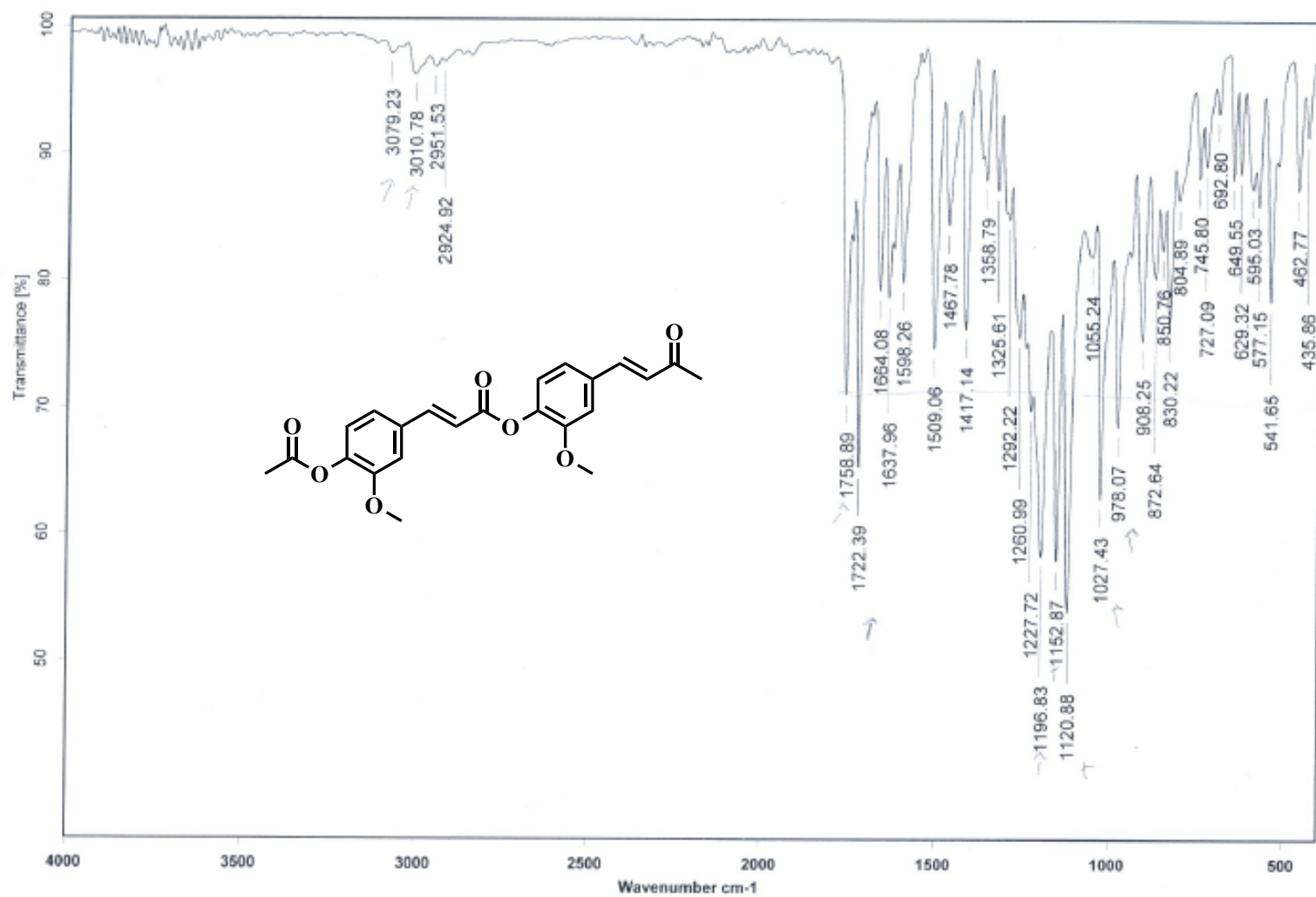


Figura A20. Espectro de IR del compuesto 13 (Pastilla de KBr).

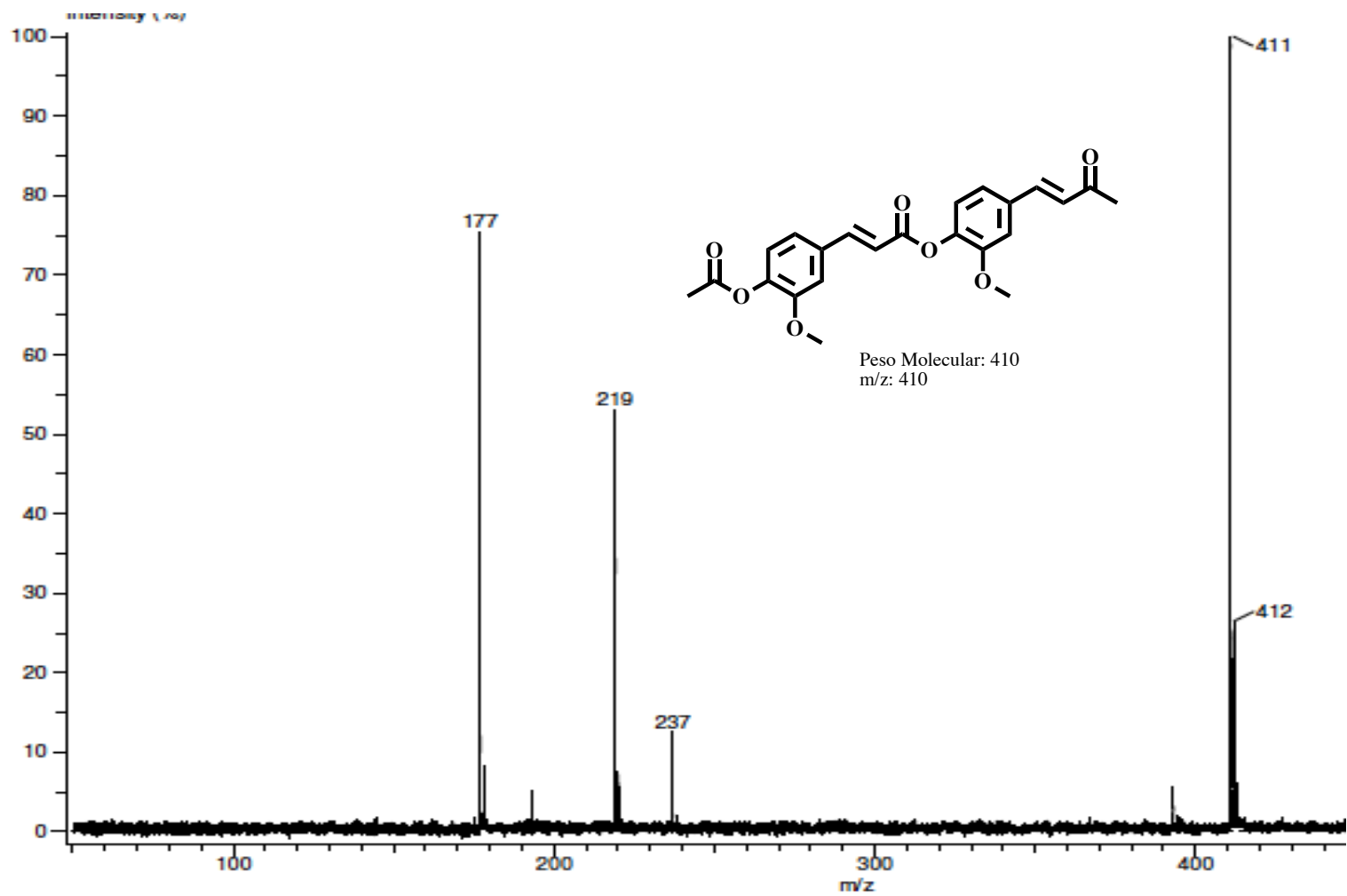


Figura A21. Espectro de Masas del compuesto 13 (DART⁺).

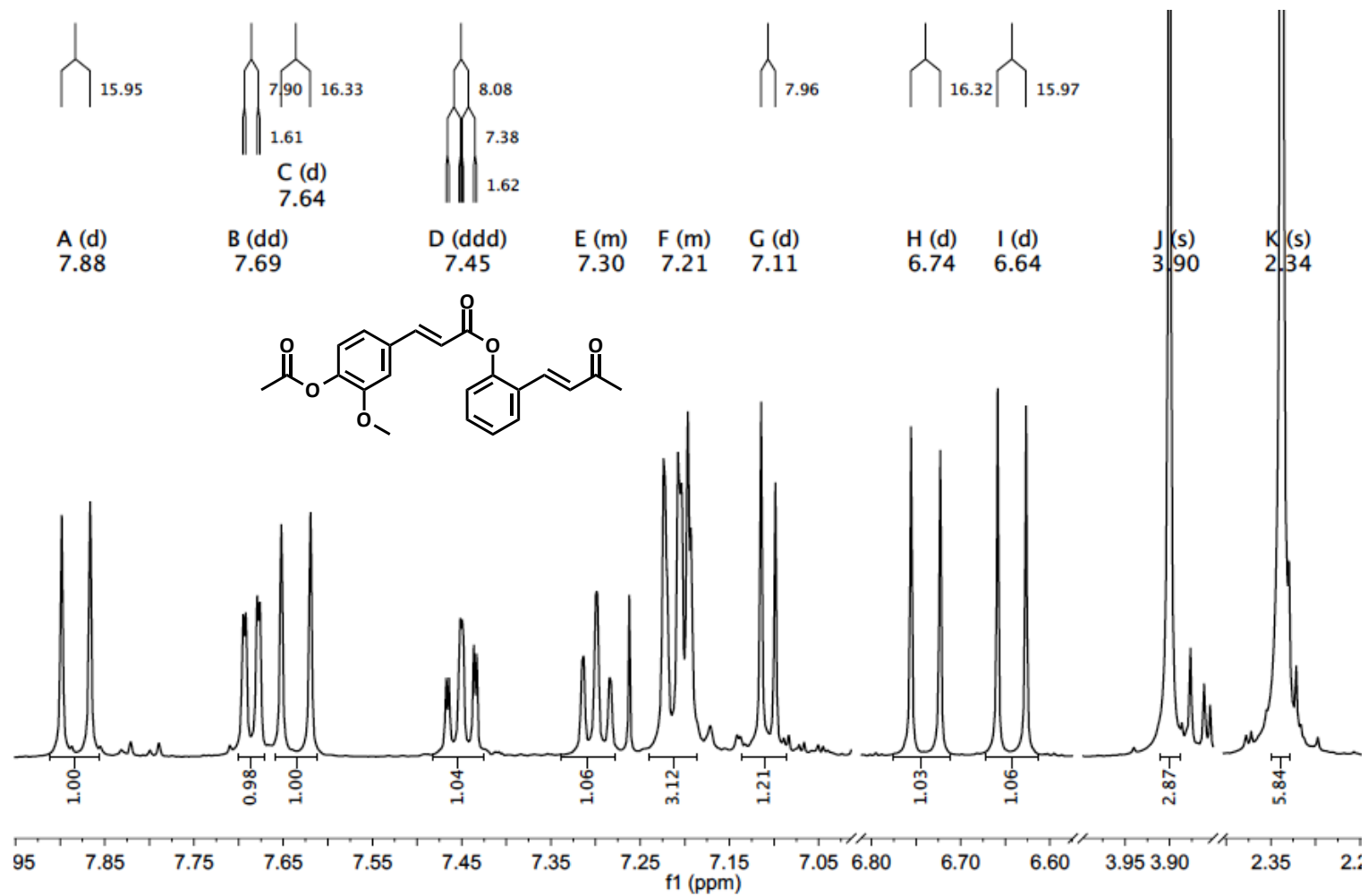


Figura A22. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 14.

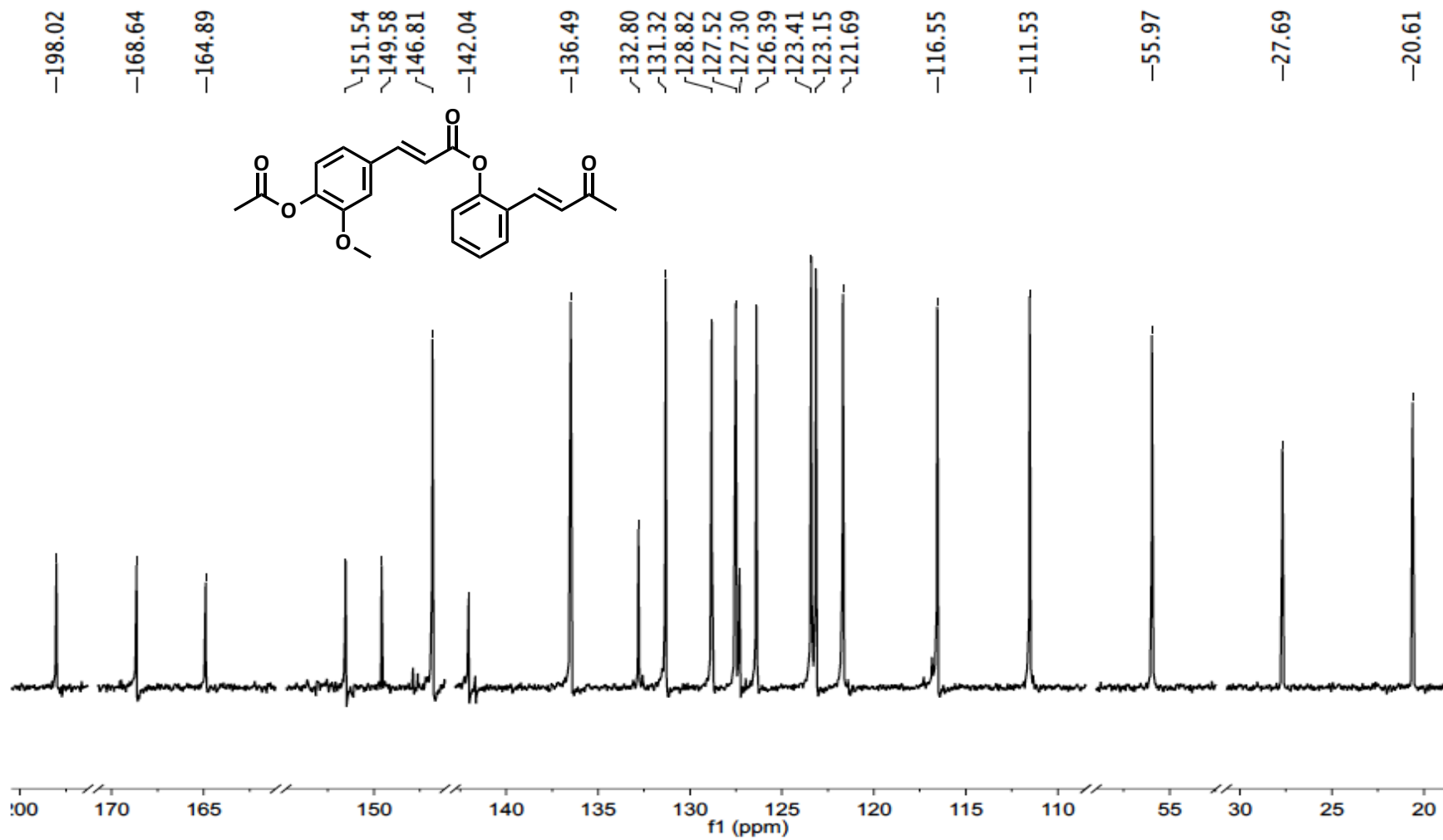


Figura A23. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 14.

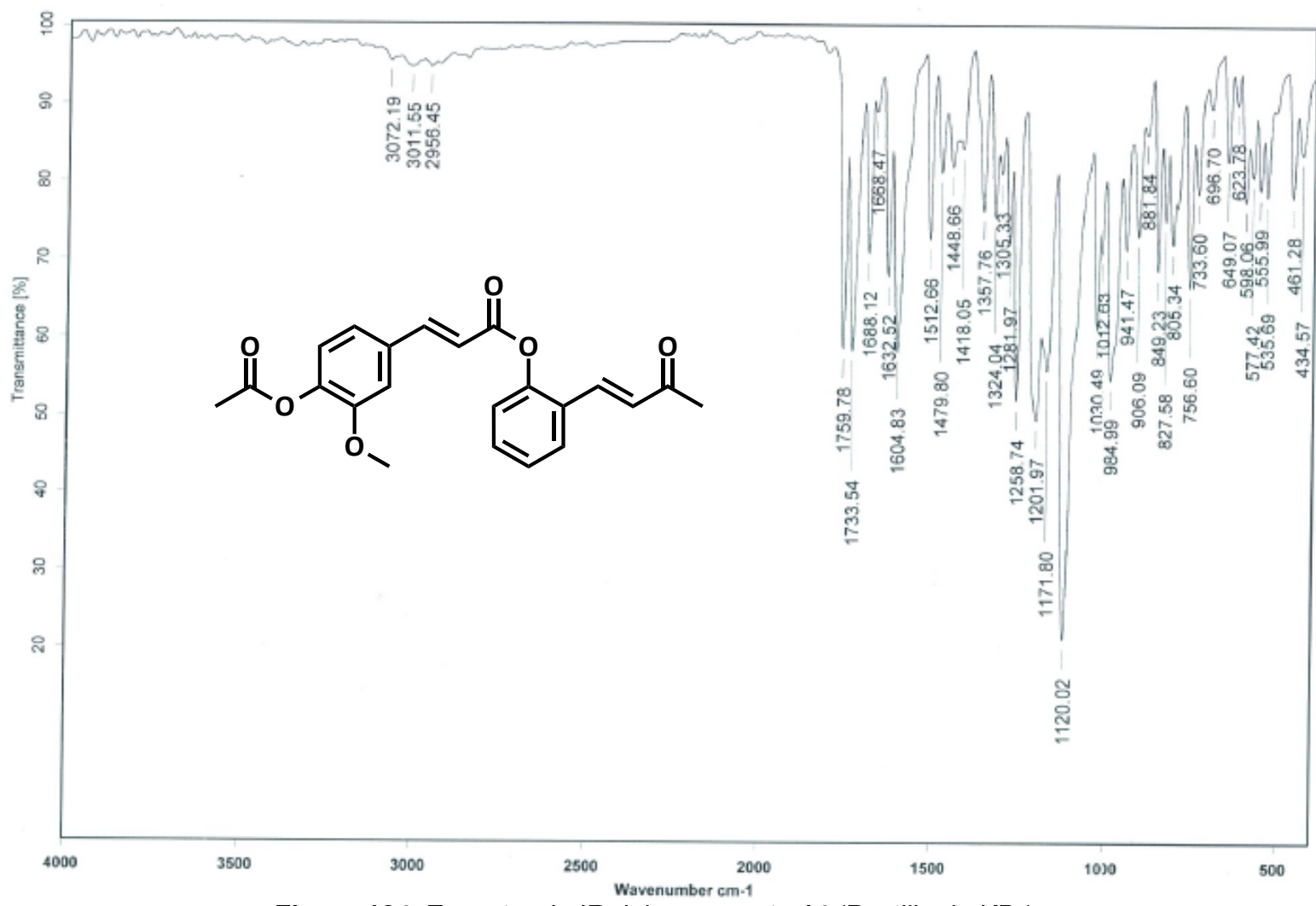


Figura 124. Espectro de IR del compuesto 14 (Pastilla de KBr).

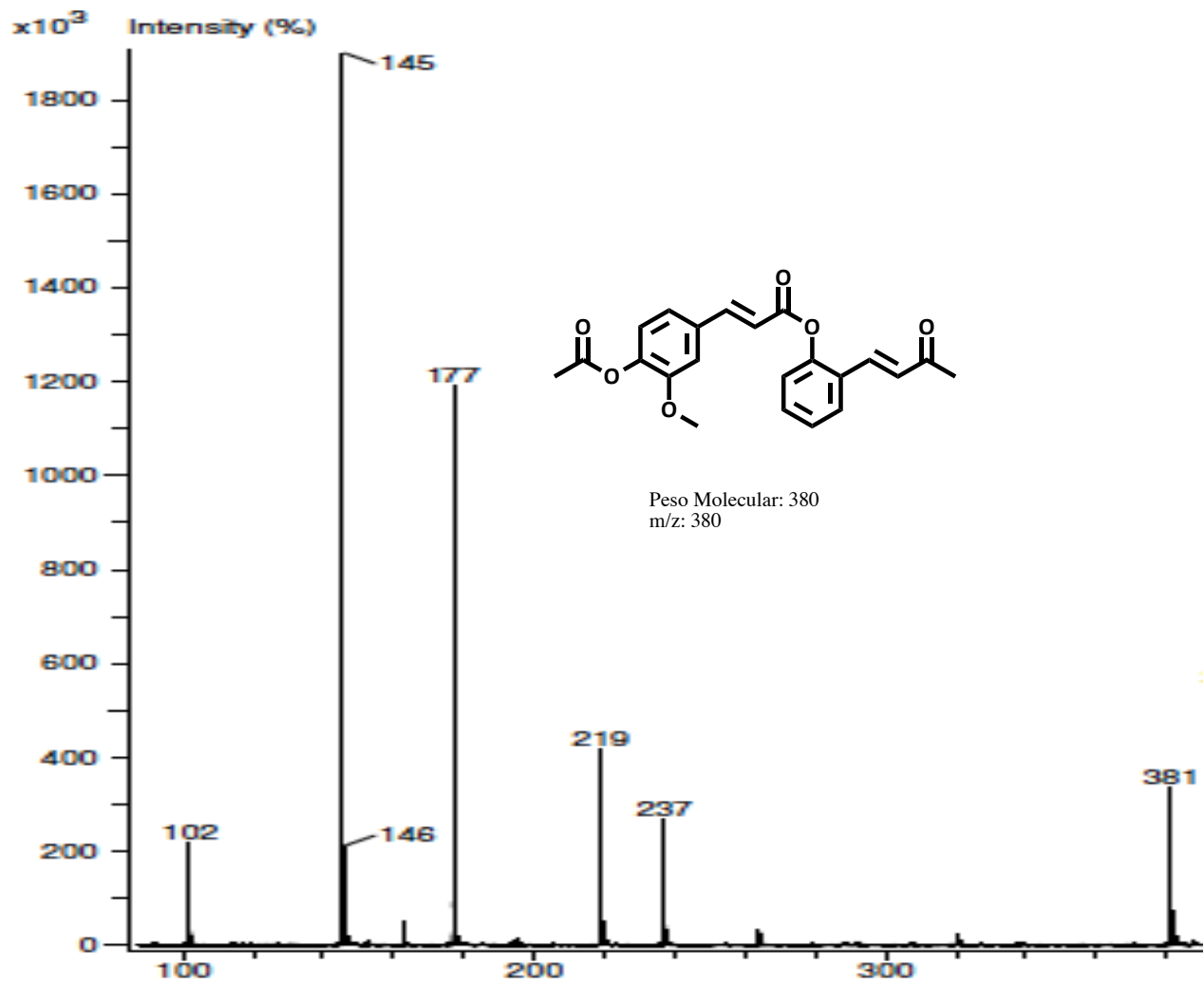


Figura A25. Espectro de Masas del compuesto 14 (DART⁺).

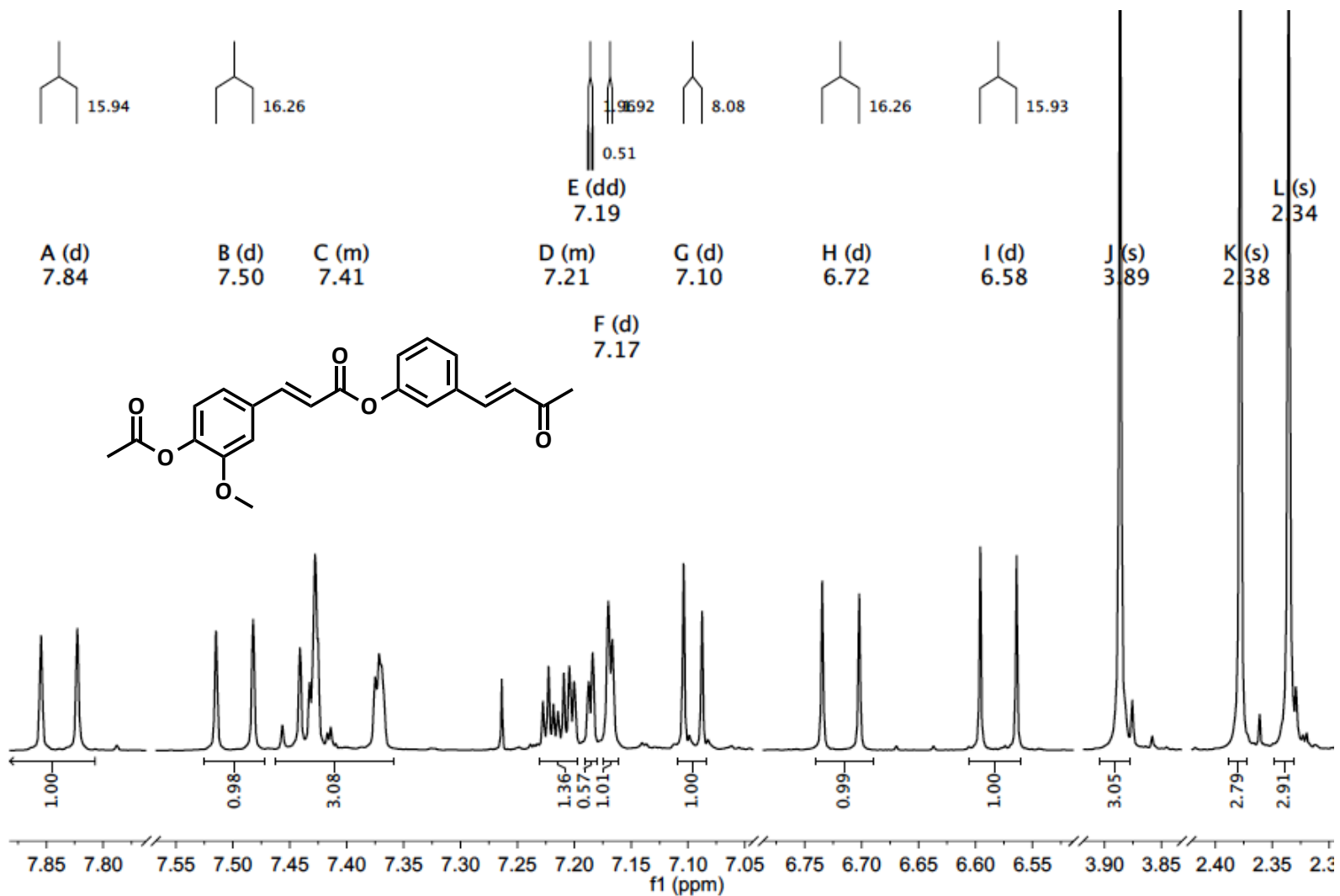


Figura A26. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 15.

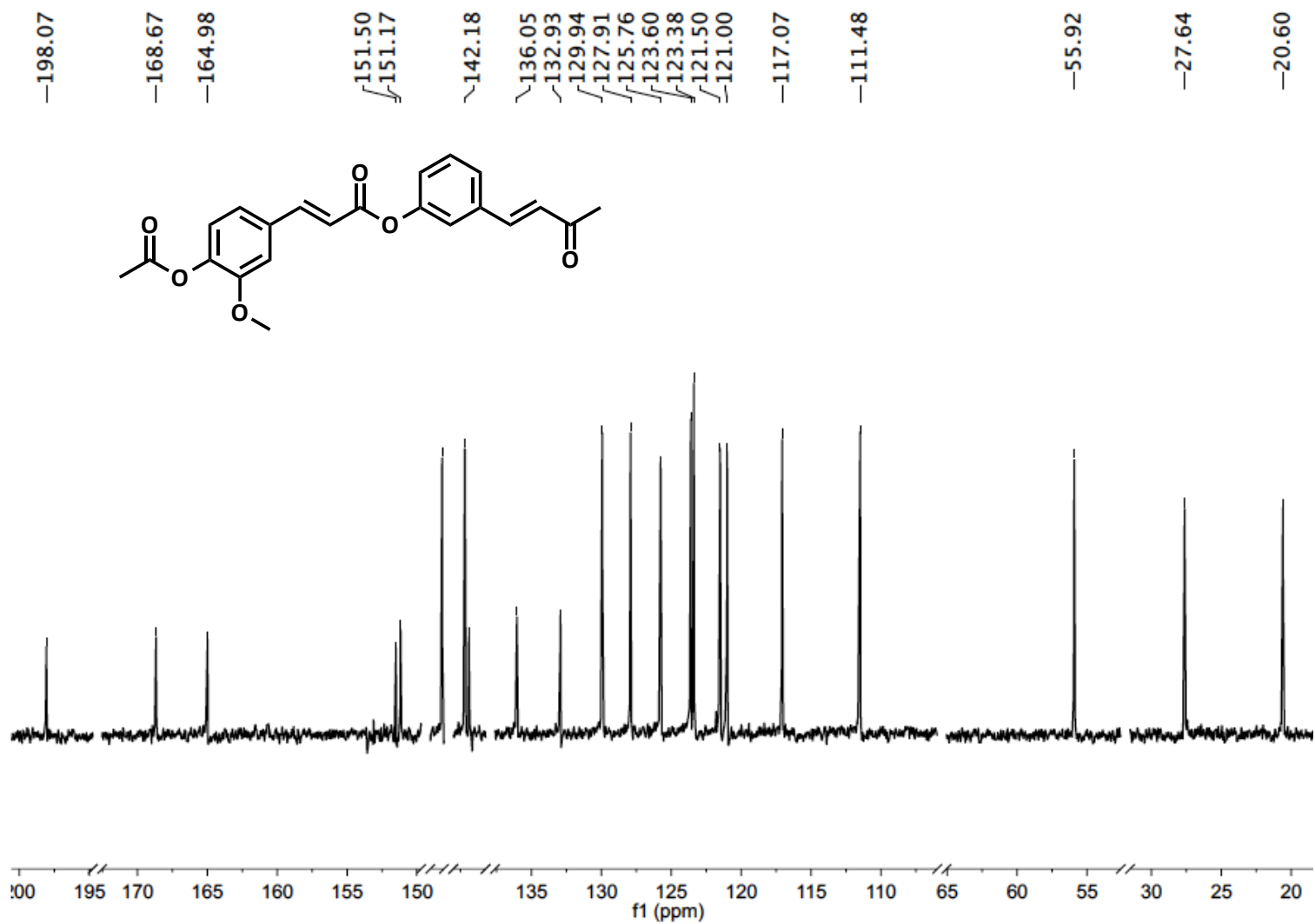


Figura A27. Espectro de RMN de ¹³C del compuesto 15.

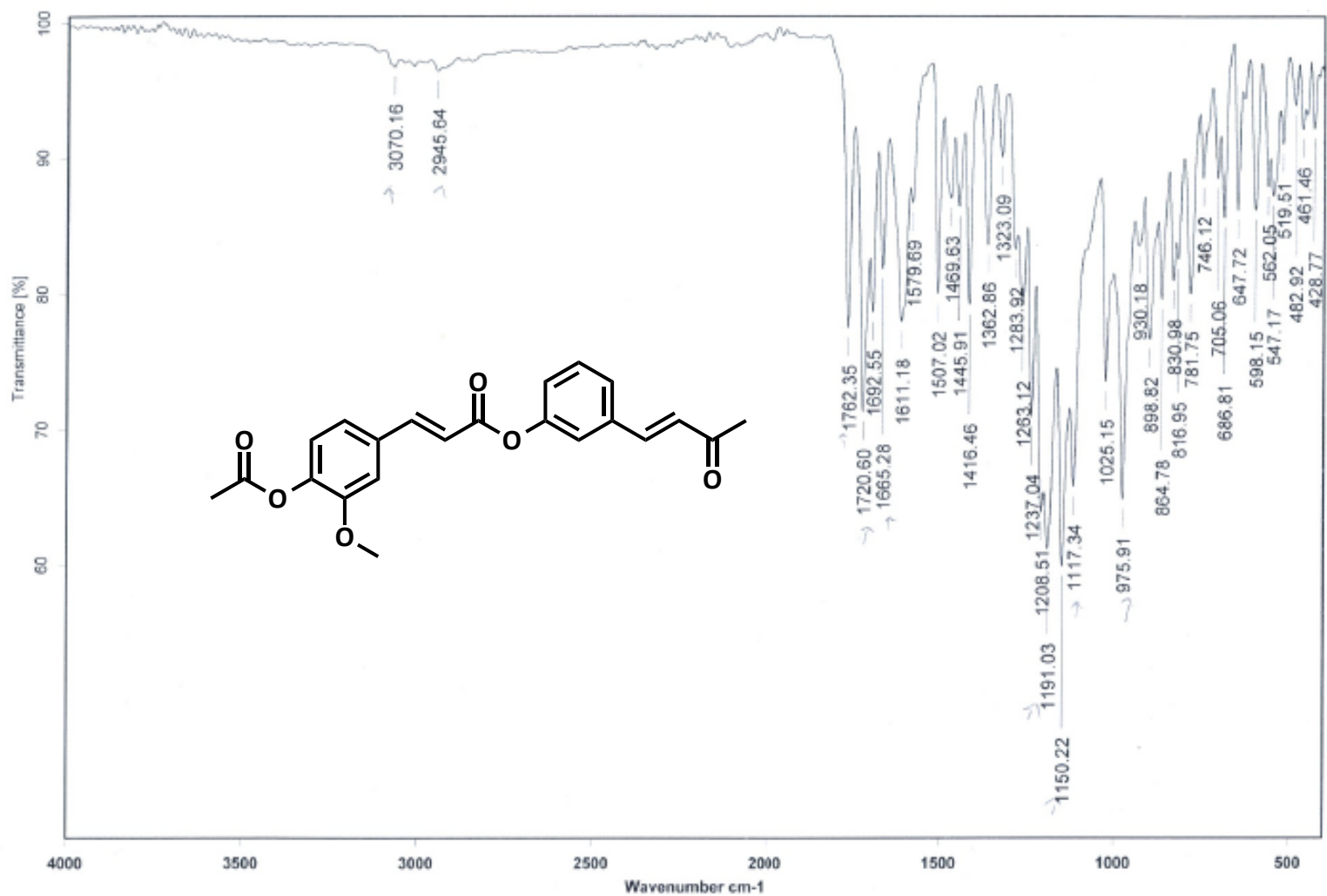


Figura A28. Espectro de IR del compuesto 15 (Pastilla de KBr).

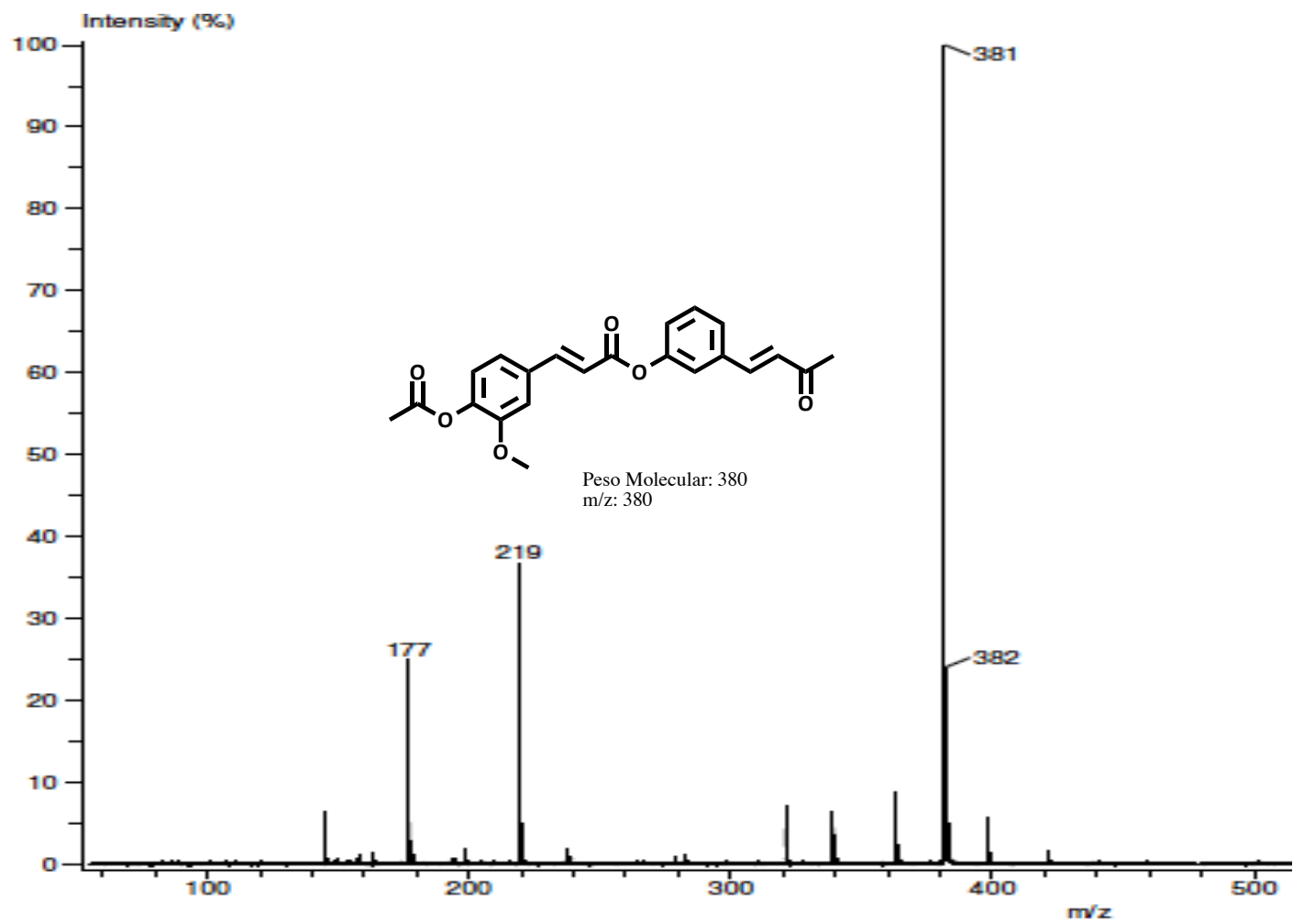


Figura A29. Espectro de Masas del compuesto 15 (DART⁺).

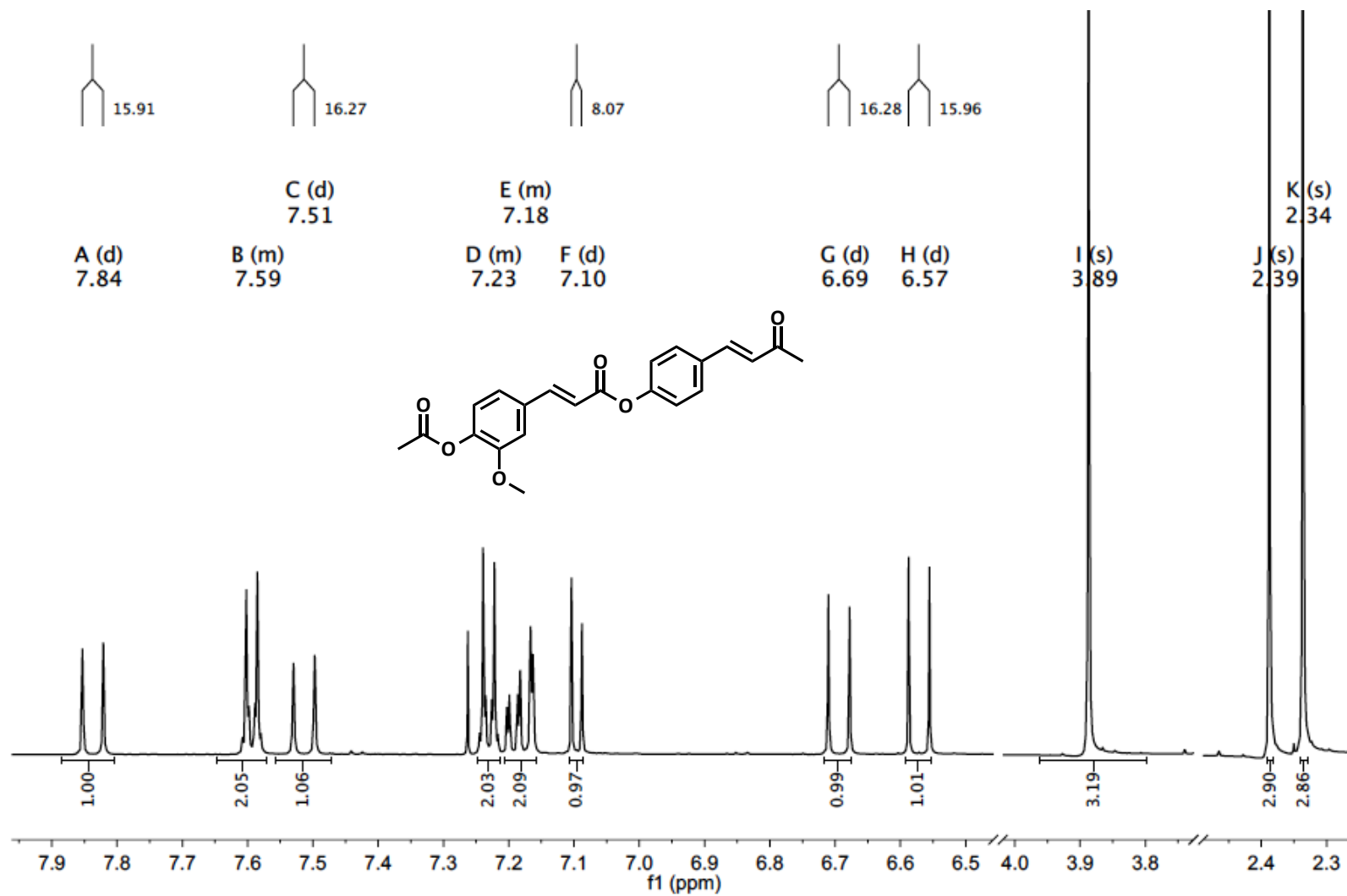


Figura A30. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 16.

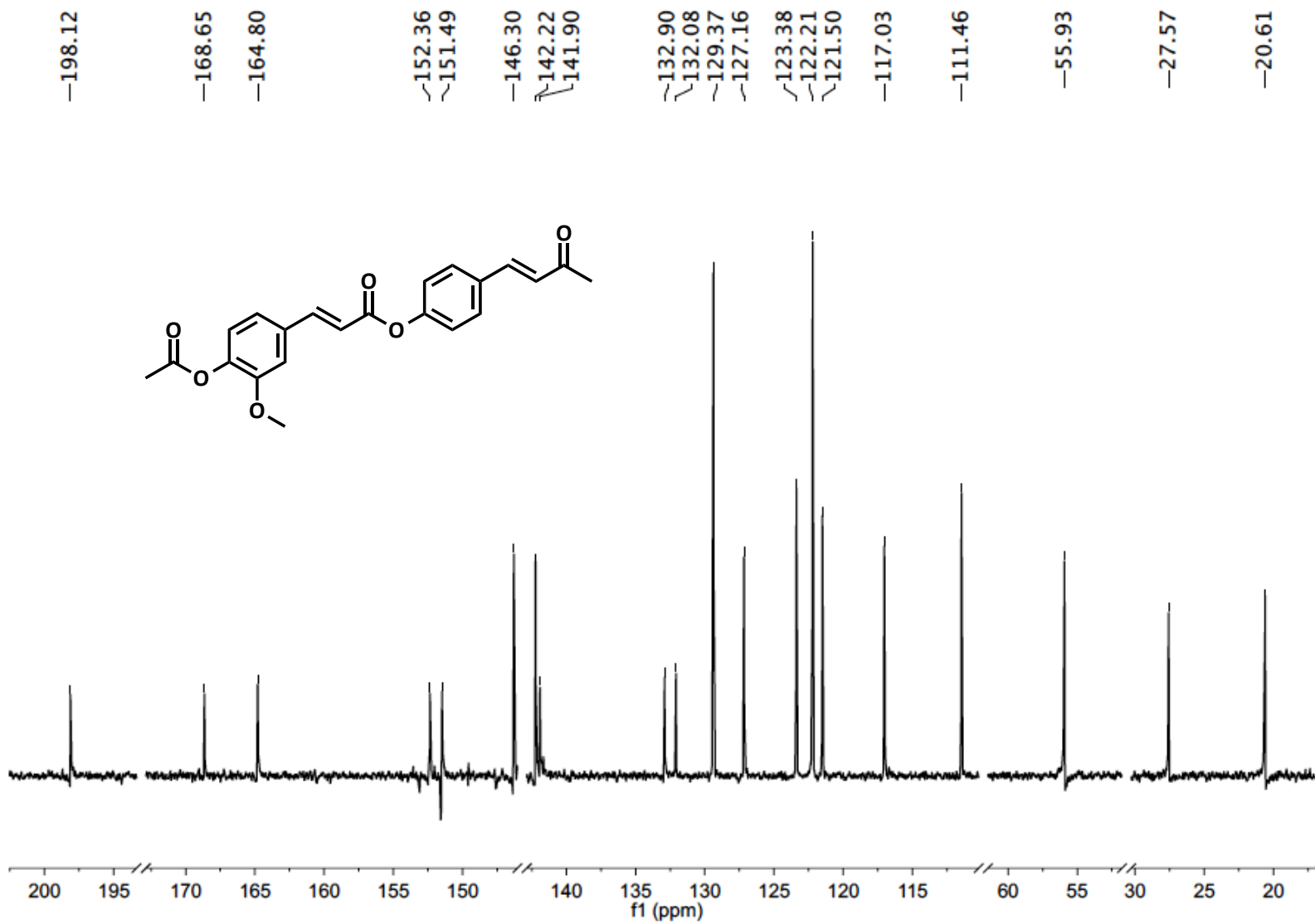


Figura A31. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 16.

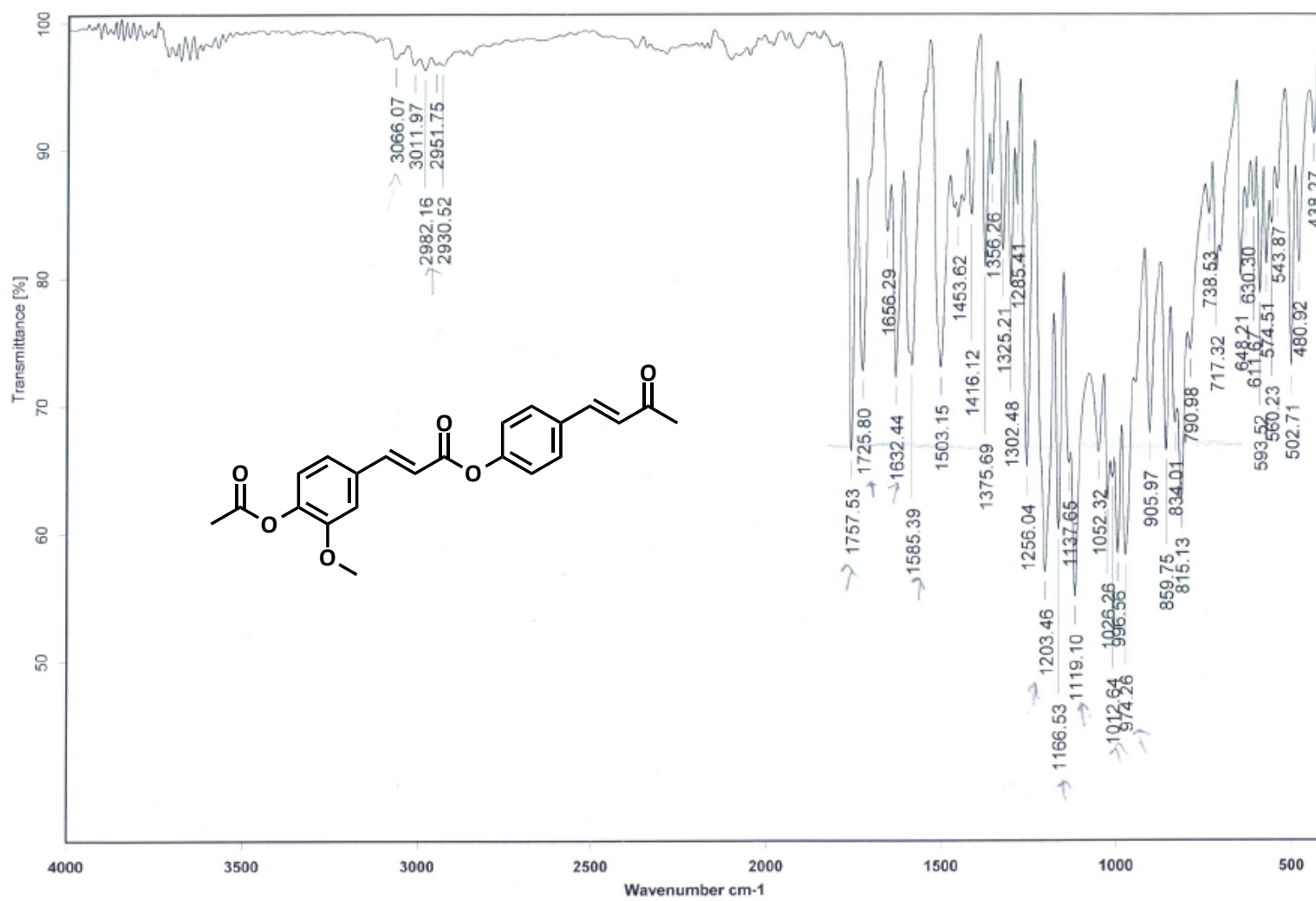


Figura A32. Espectro de IR del compuesto 16 (Pastilla de KBr).

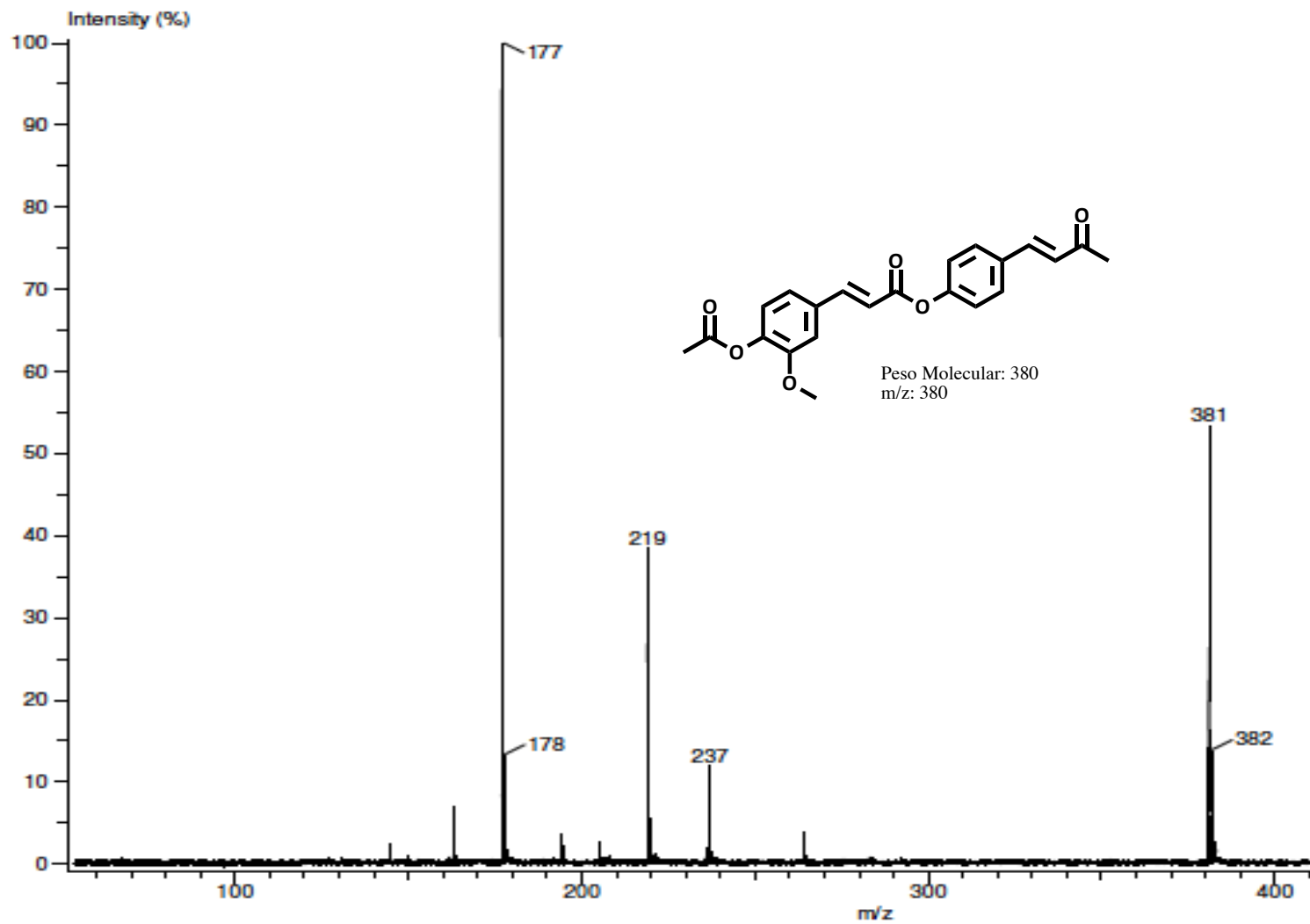


Figura A33. Espectro de Masas del compuesto **16** (DART⁺).

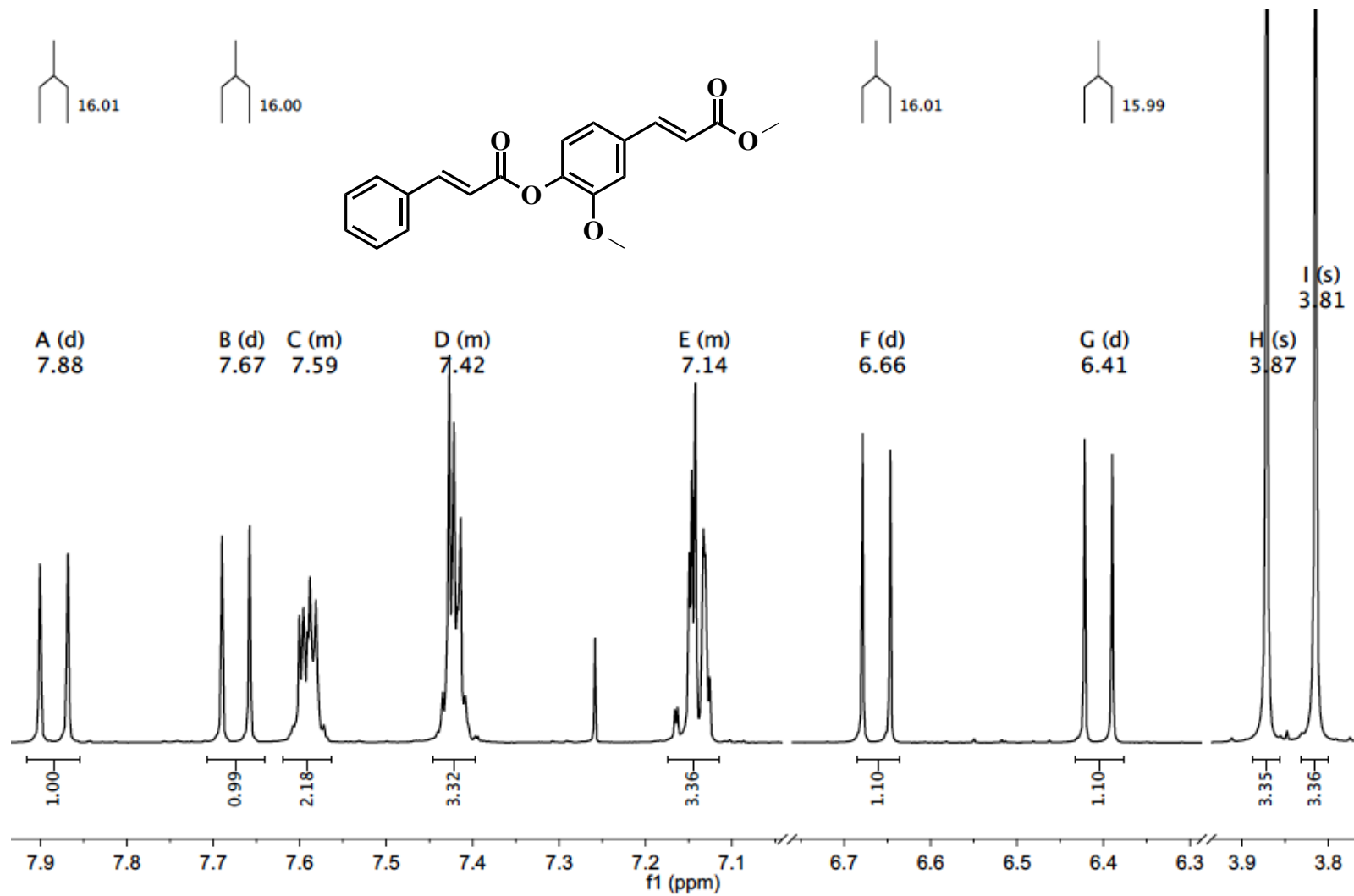


Figura A34. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 18.

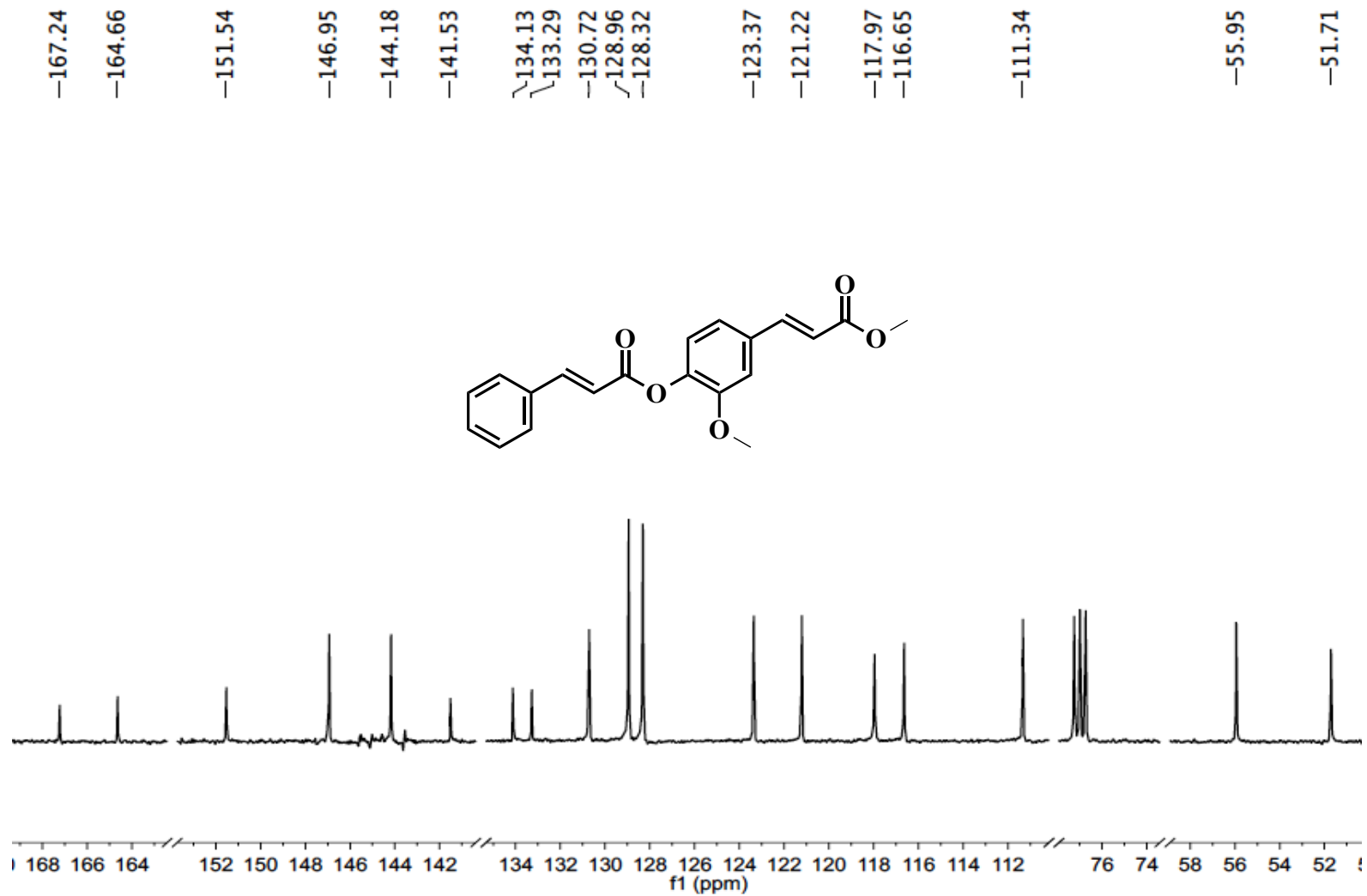


Figura A35. Espectro de RMN de ¹³C del compuesto 18.

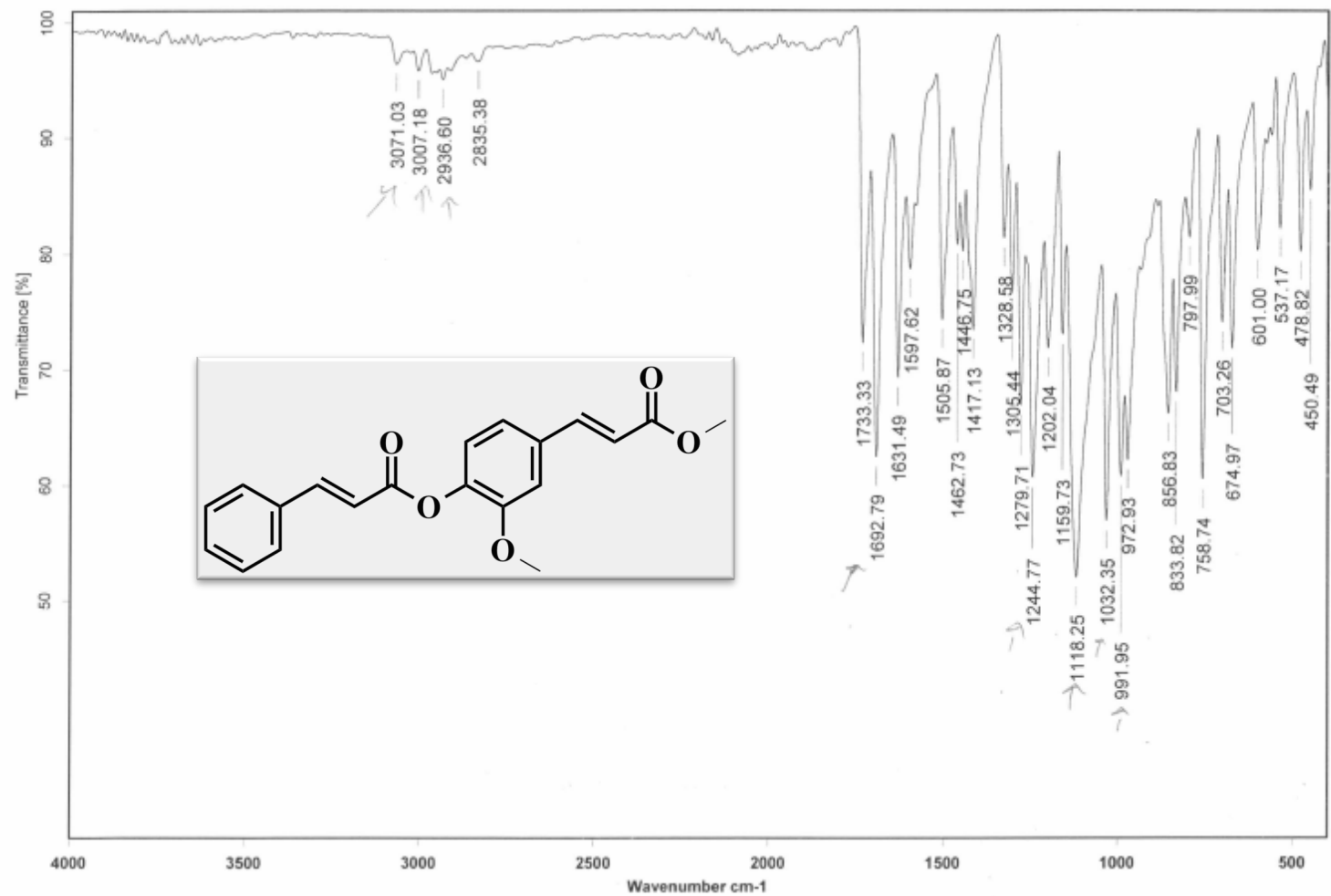


Figura A36. Espectro de IR del compuesto 18 (Pastilla de KBr).

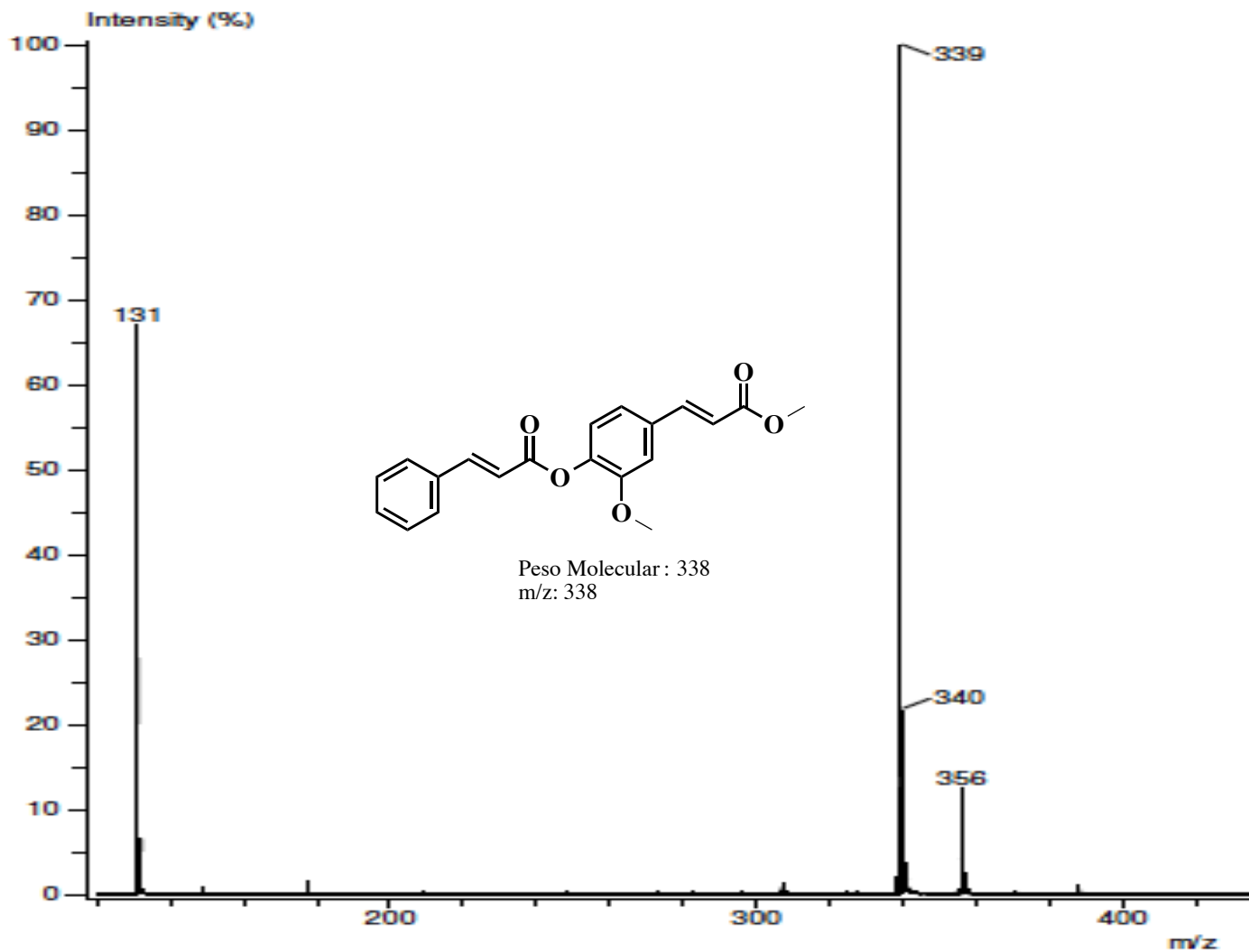


Figura A37. Espectro de Masas del compuesto 18 (DART⁺).

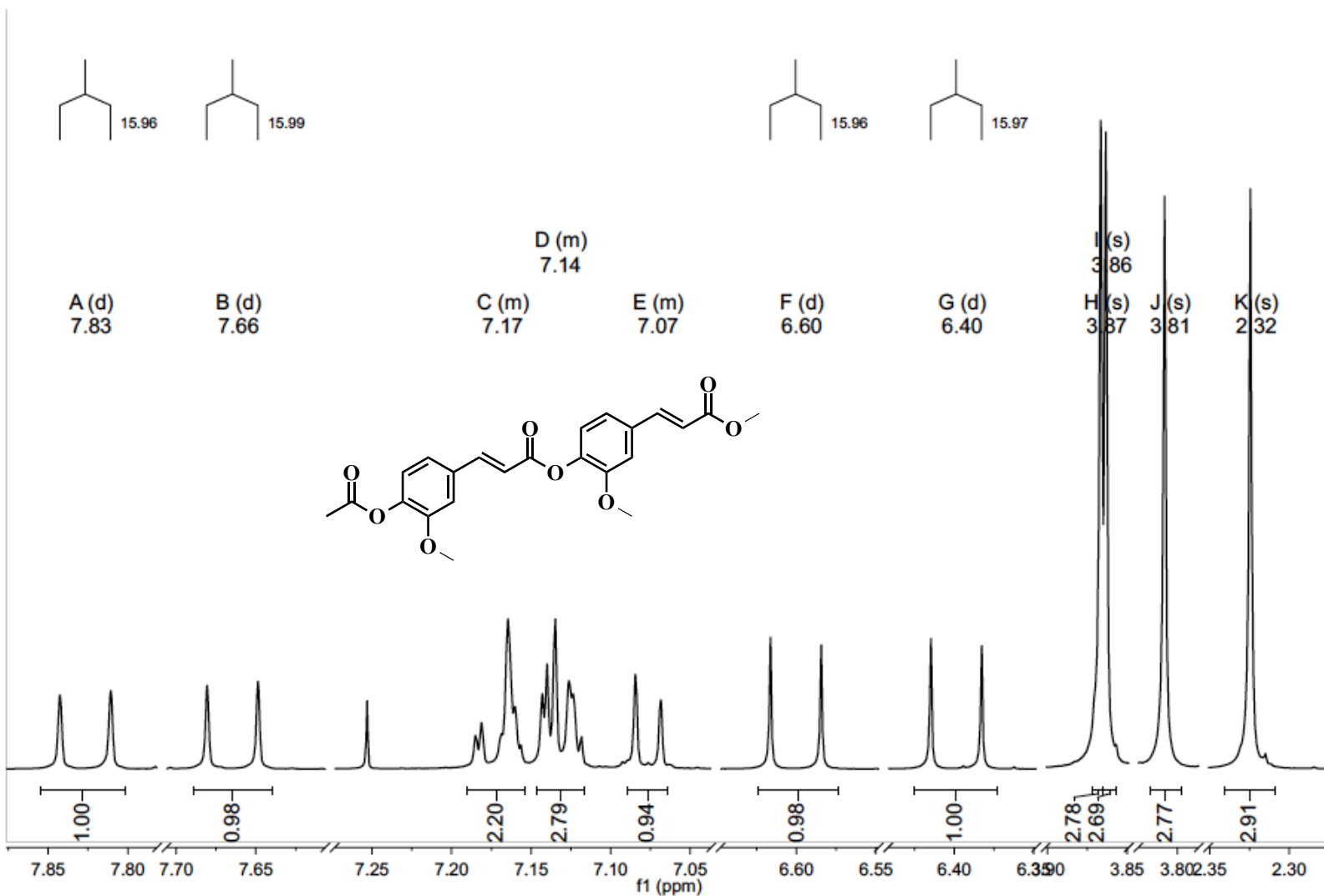


Figura A38. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 19.

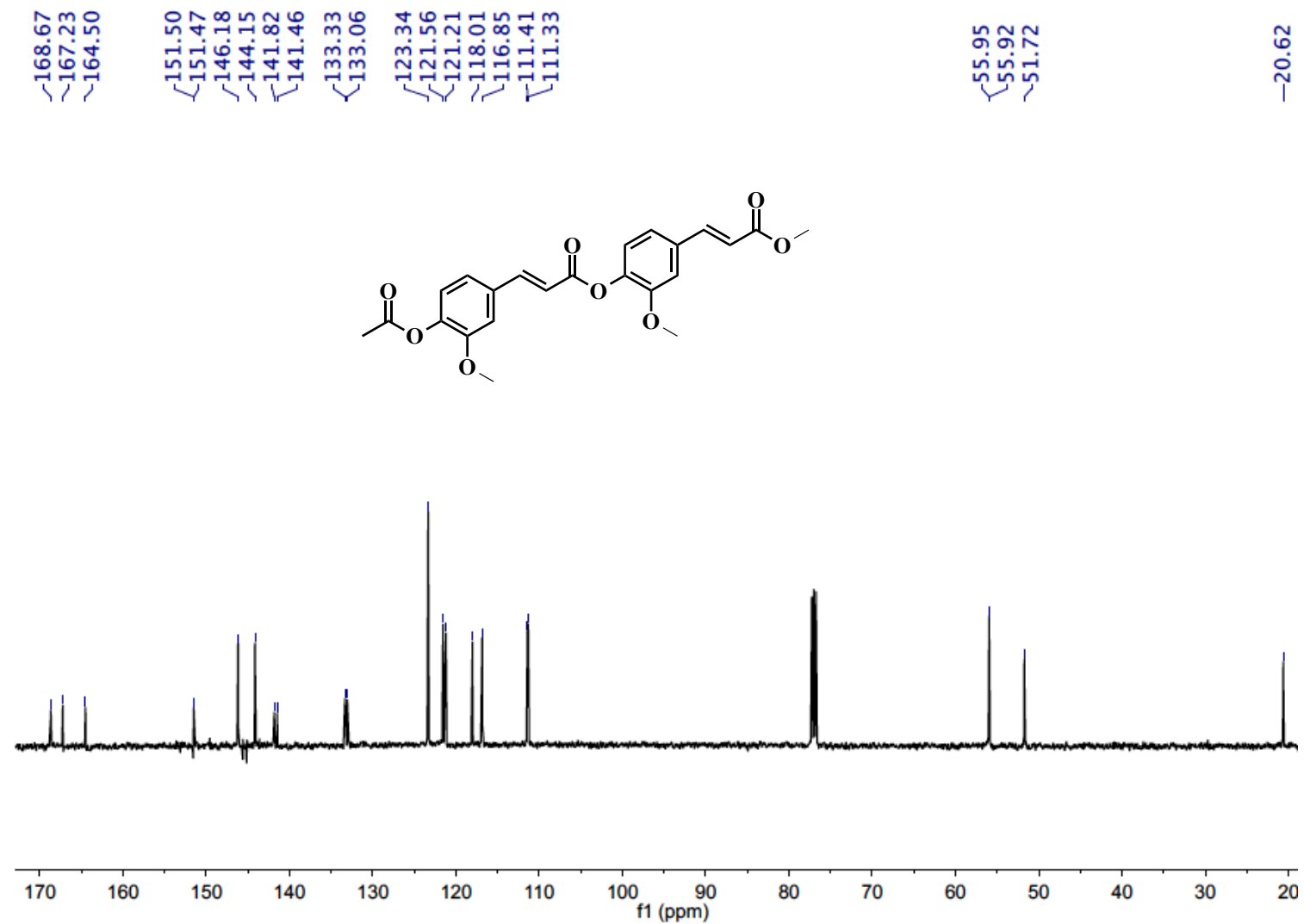


Figura A39. Espectro de RMN de ¹³C del compuesto 19.

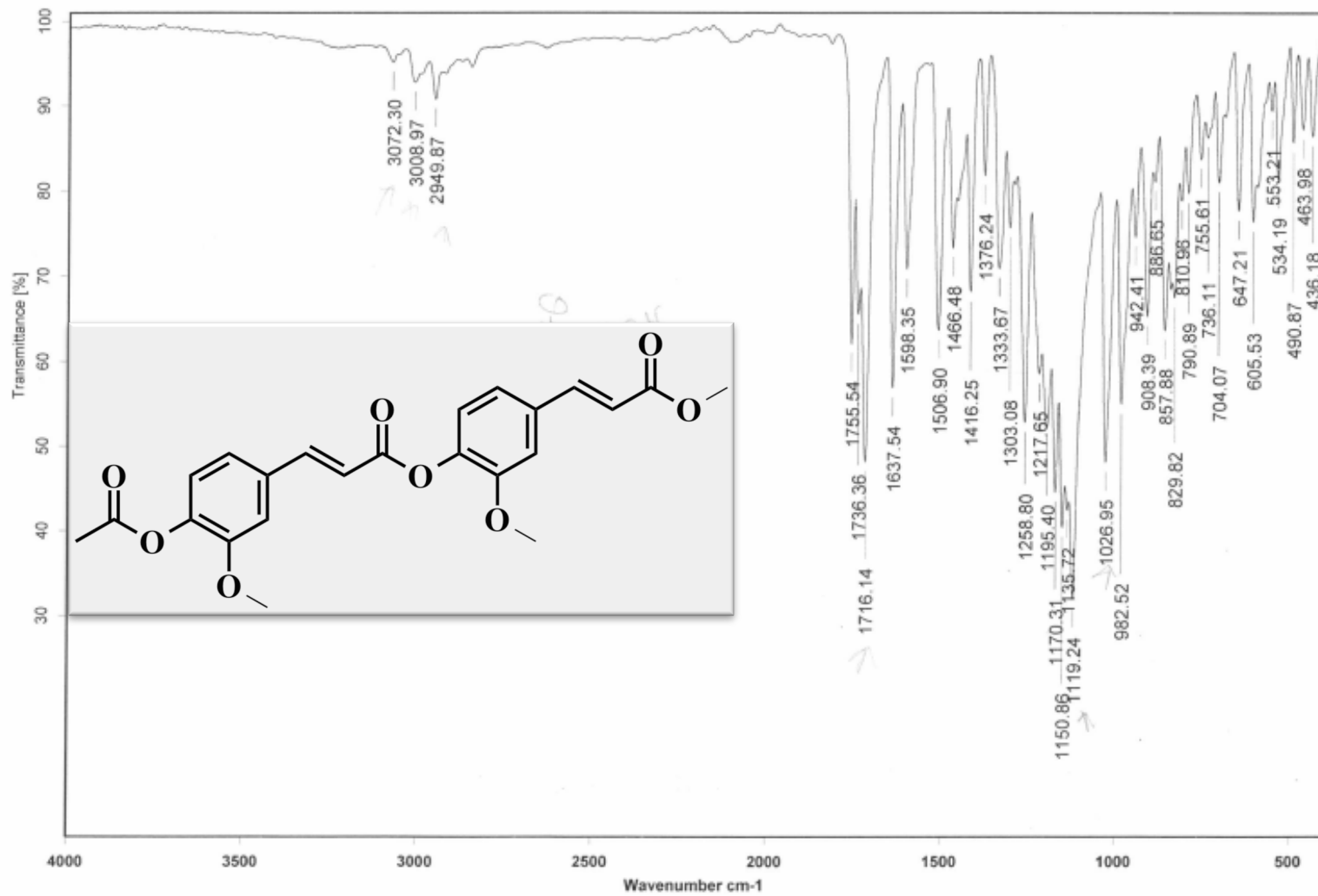


Figura A40. Espectro de IR del compuesto 19 (Pastilla de KBr).

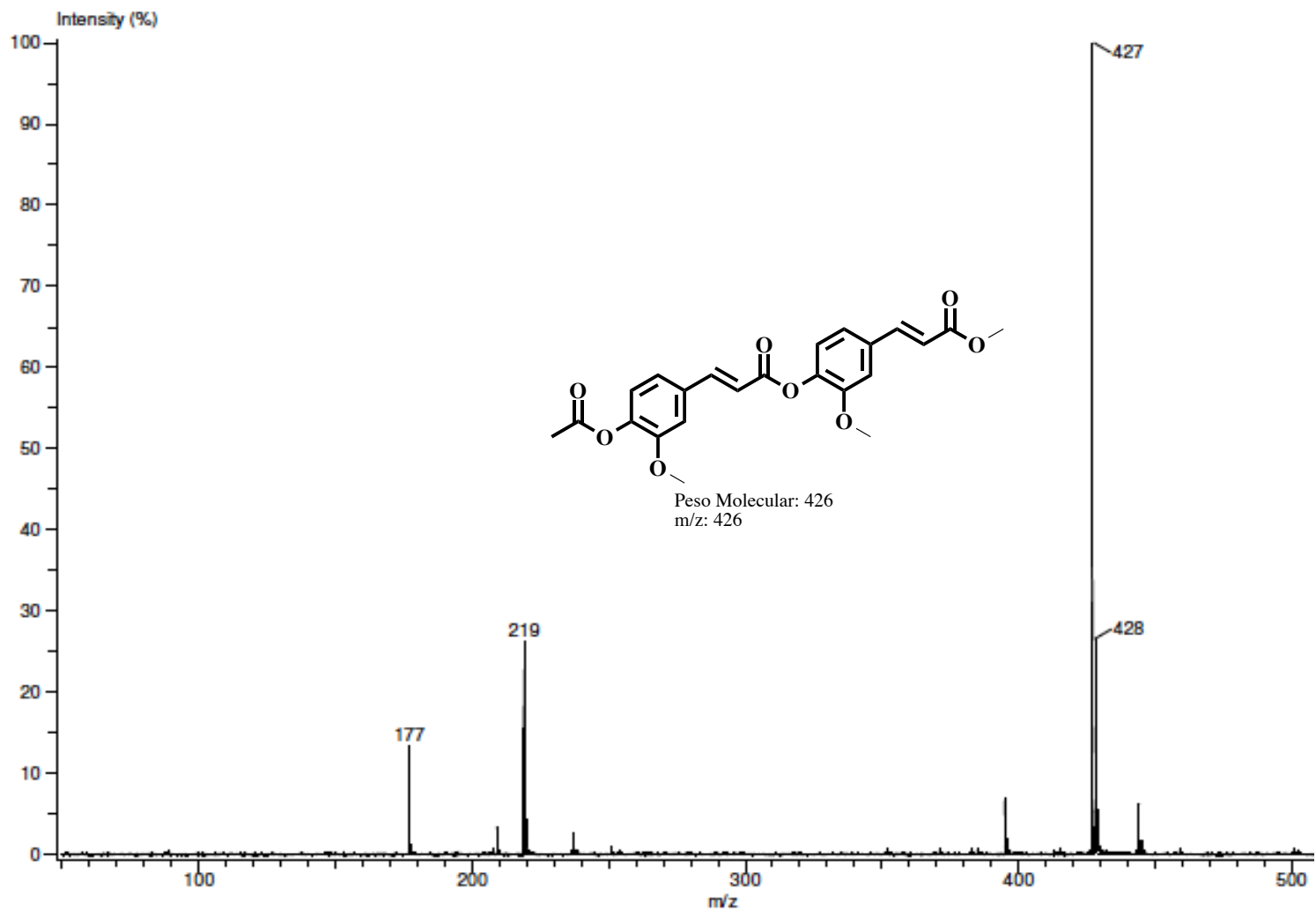


Figura A41. Espectro de Masas del compuesto **19** (DART⁺).

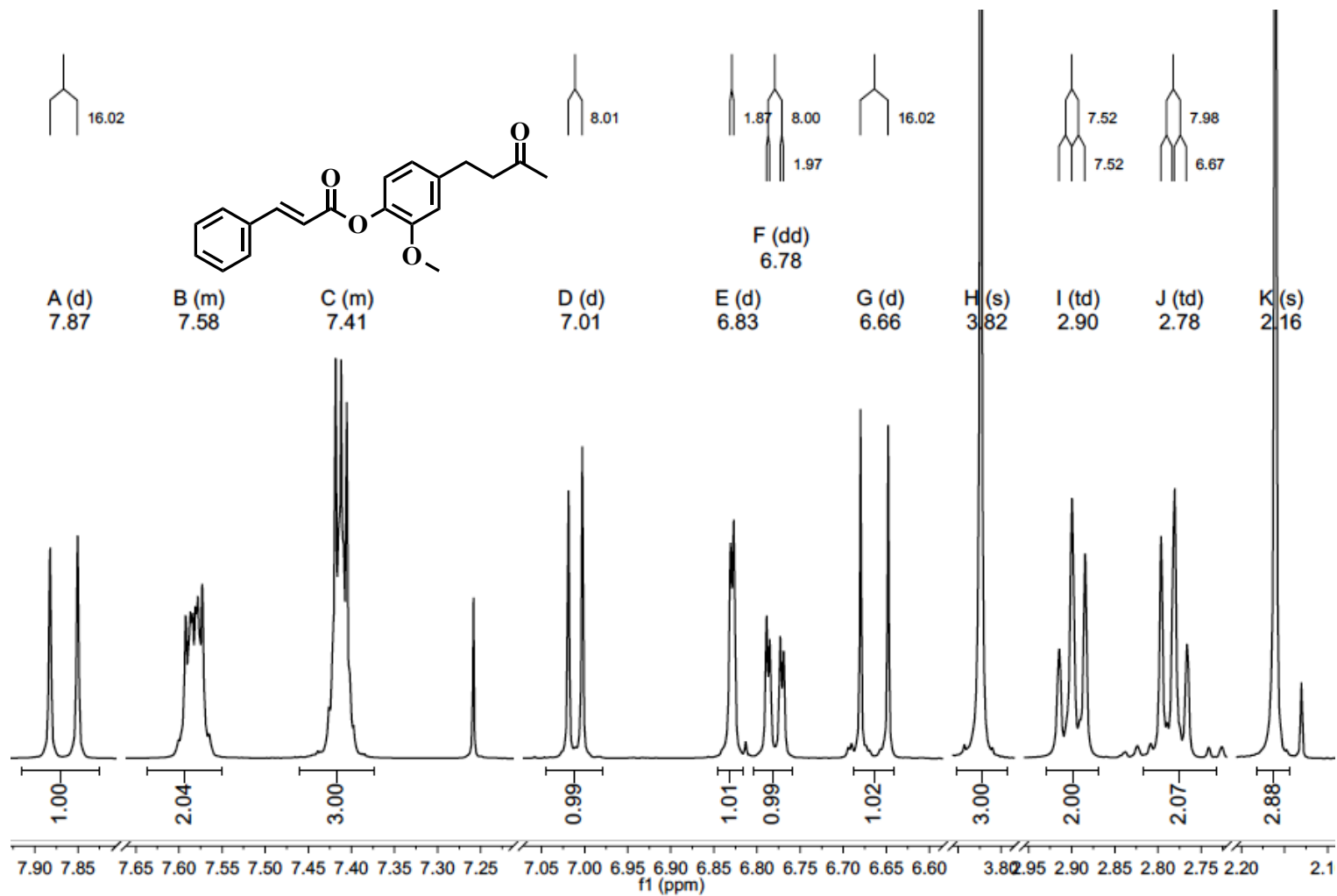


Figura A42. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 24.

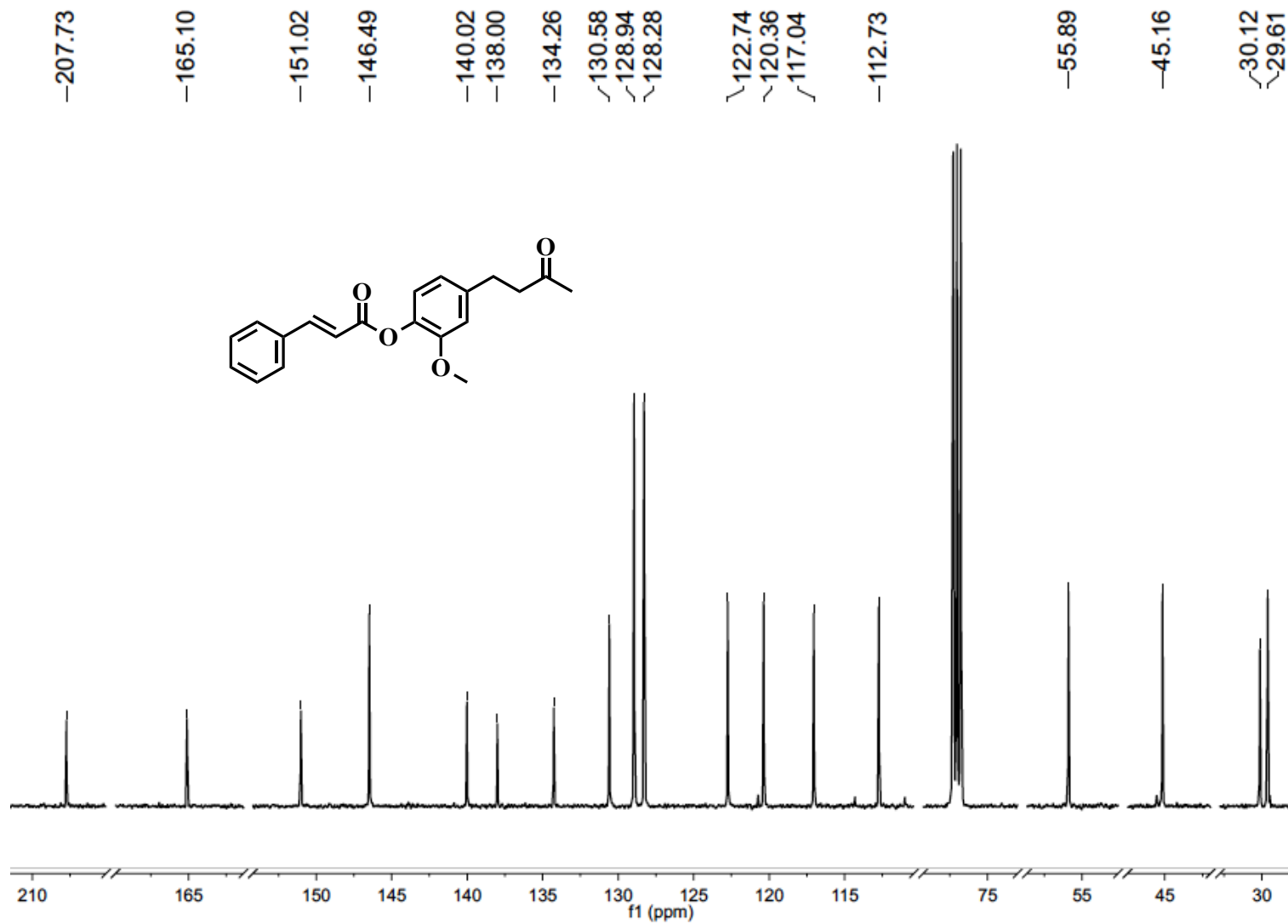


Figura A43. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 24.

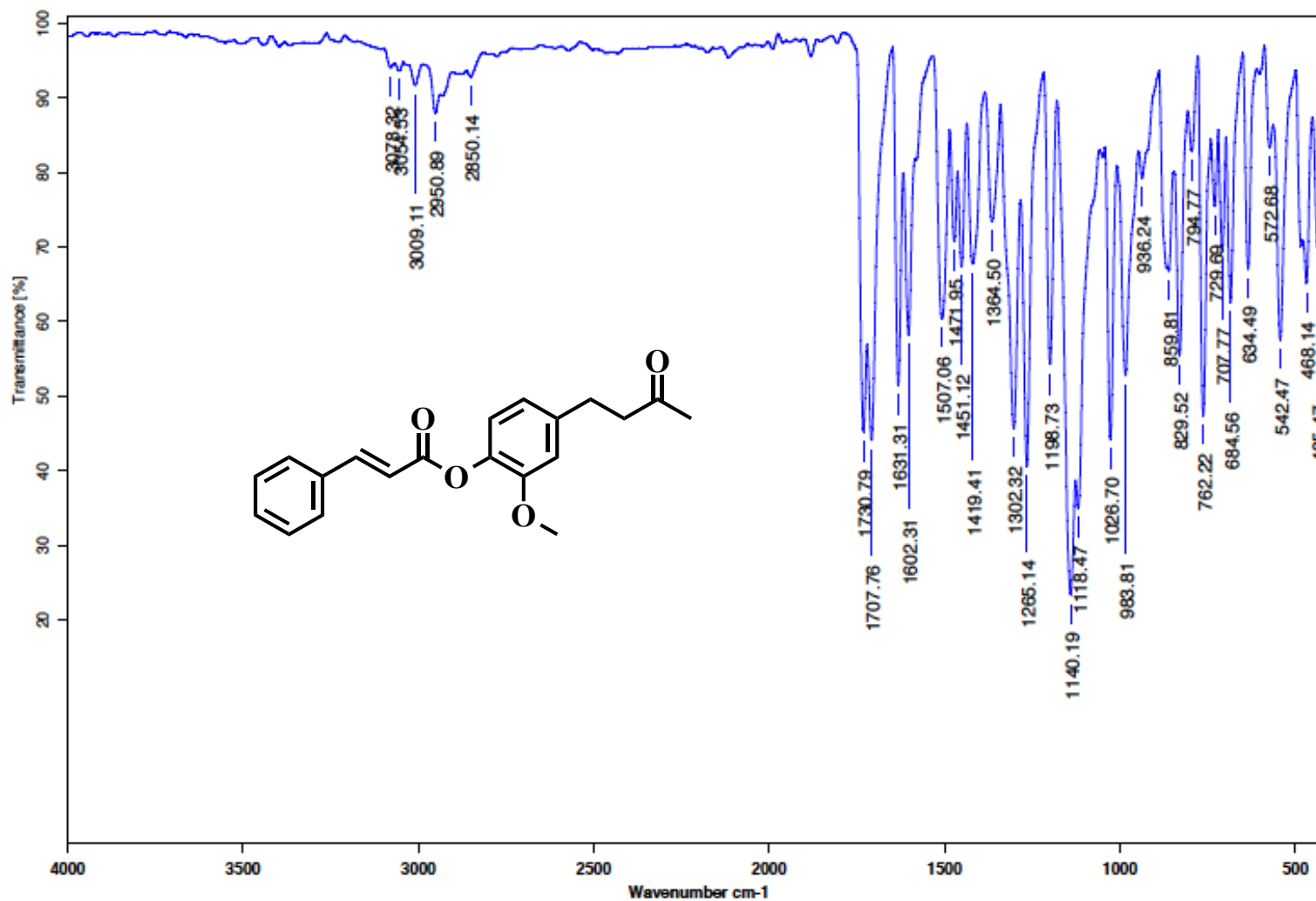


Figura A44. Espectro de IR del compuesto **24** (Pastilla de KBr).

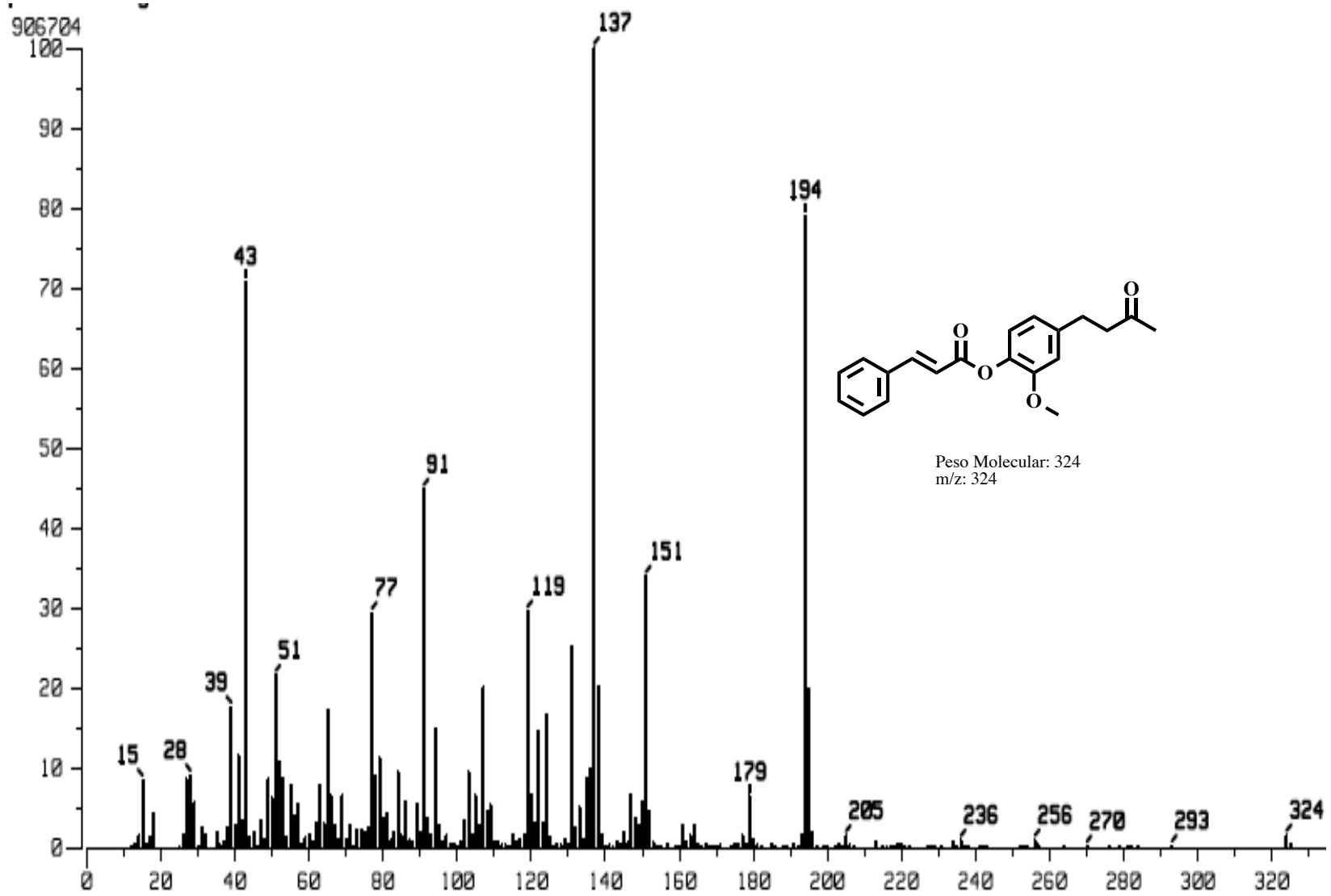


Figura A45. Espectro de Masas del compuesto **24** (IE⁺).

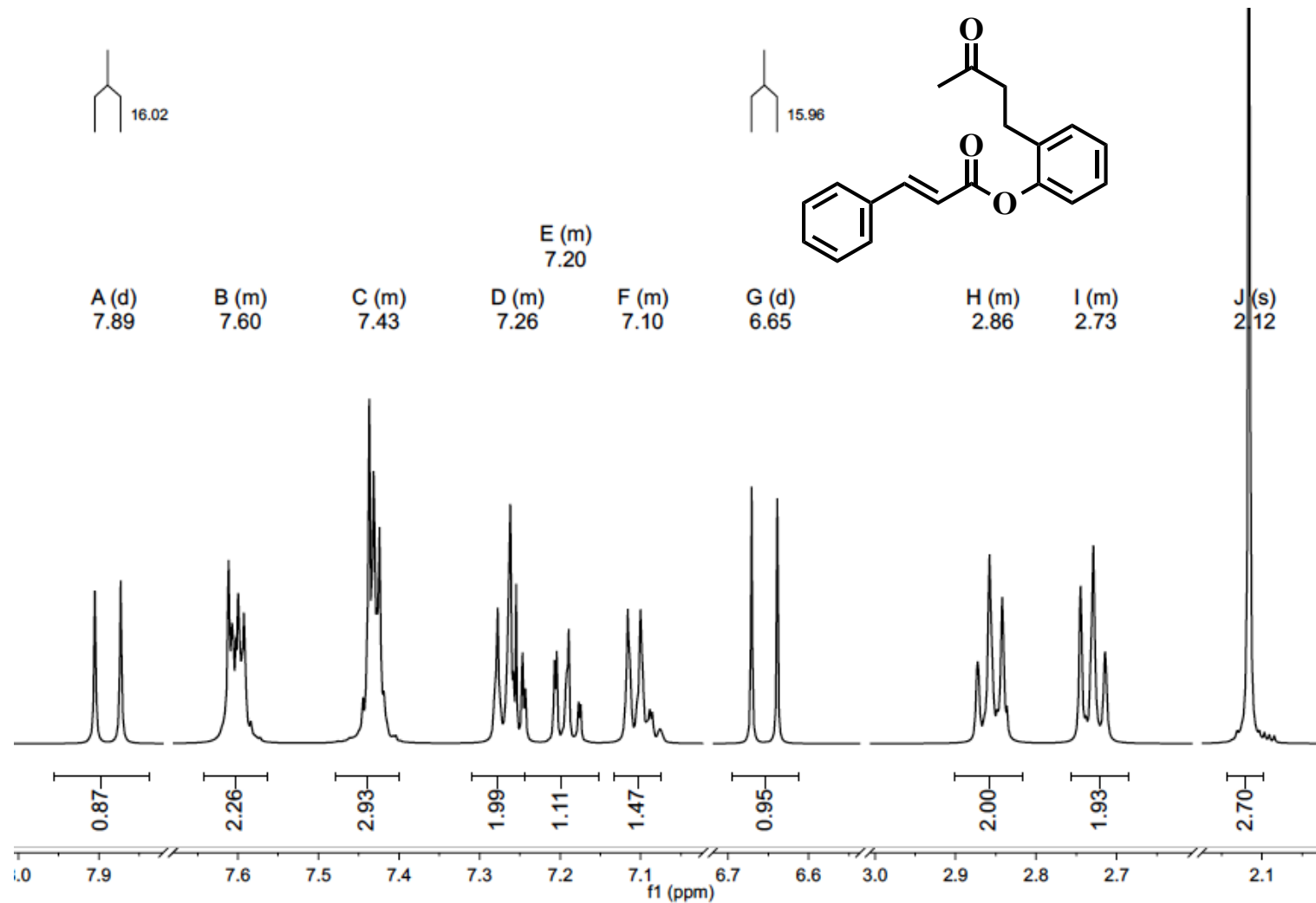


Figura A46. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 25.

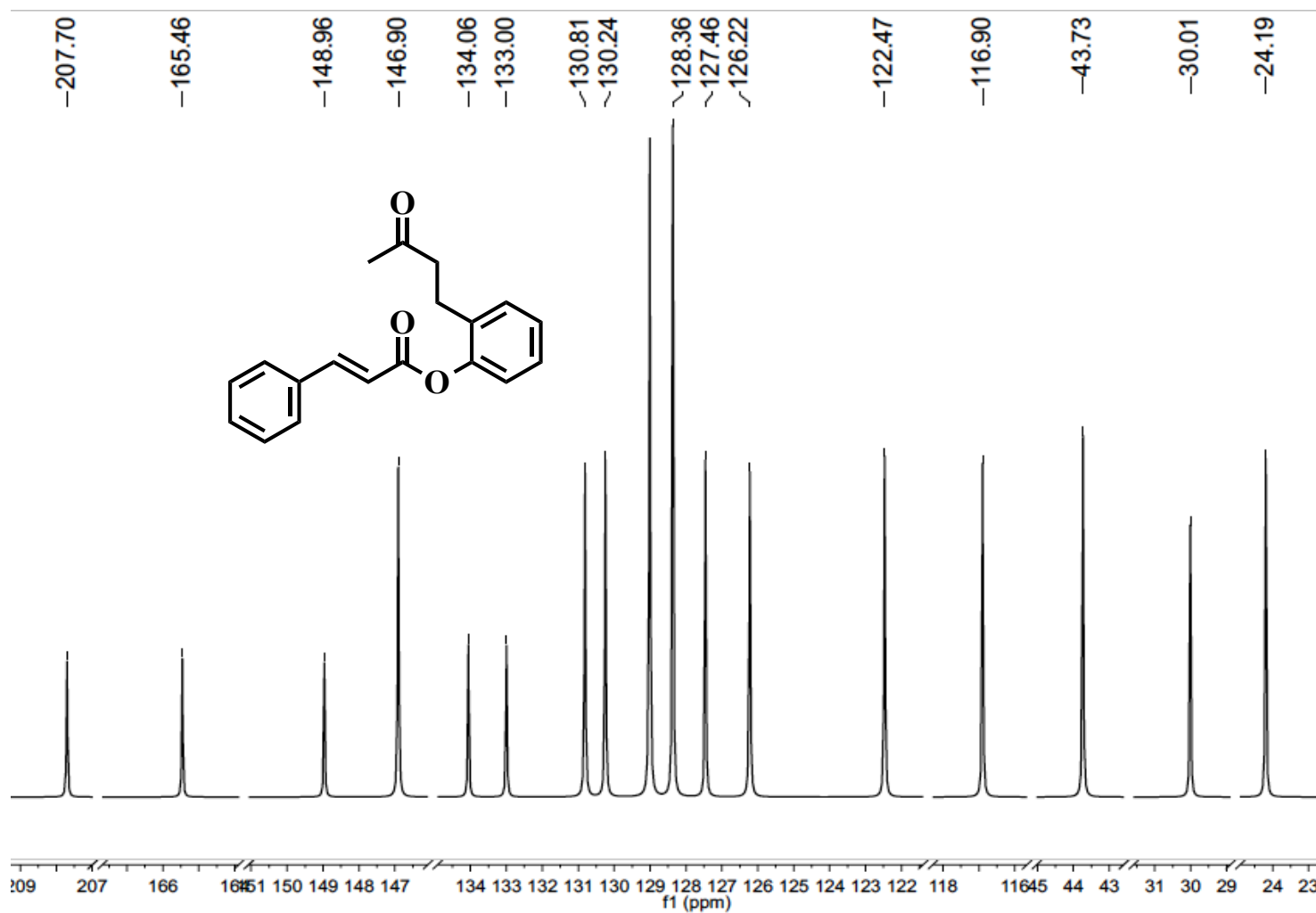


Figura A47. Espectro de RMN de ¹³C del compuesto 25.

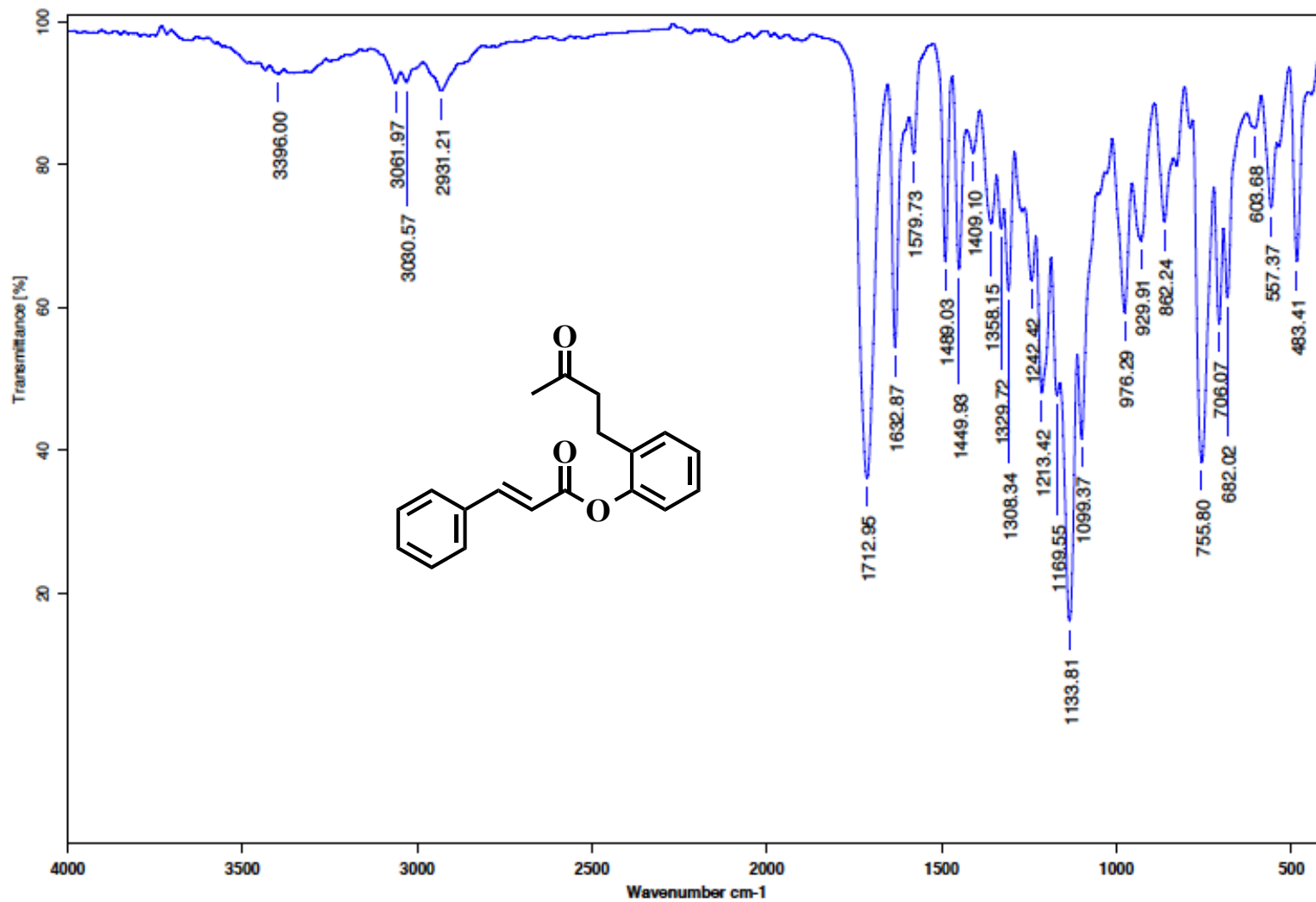


Figura A48. Espectro de IR del compuesto 25 (Película).

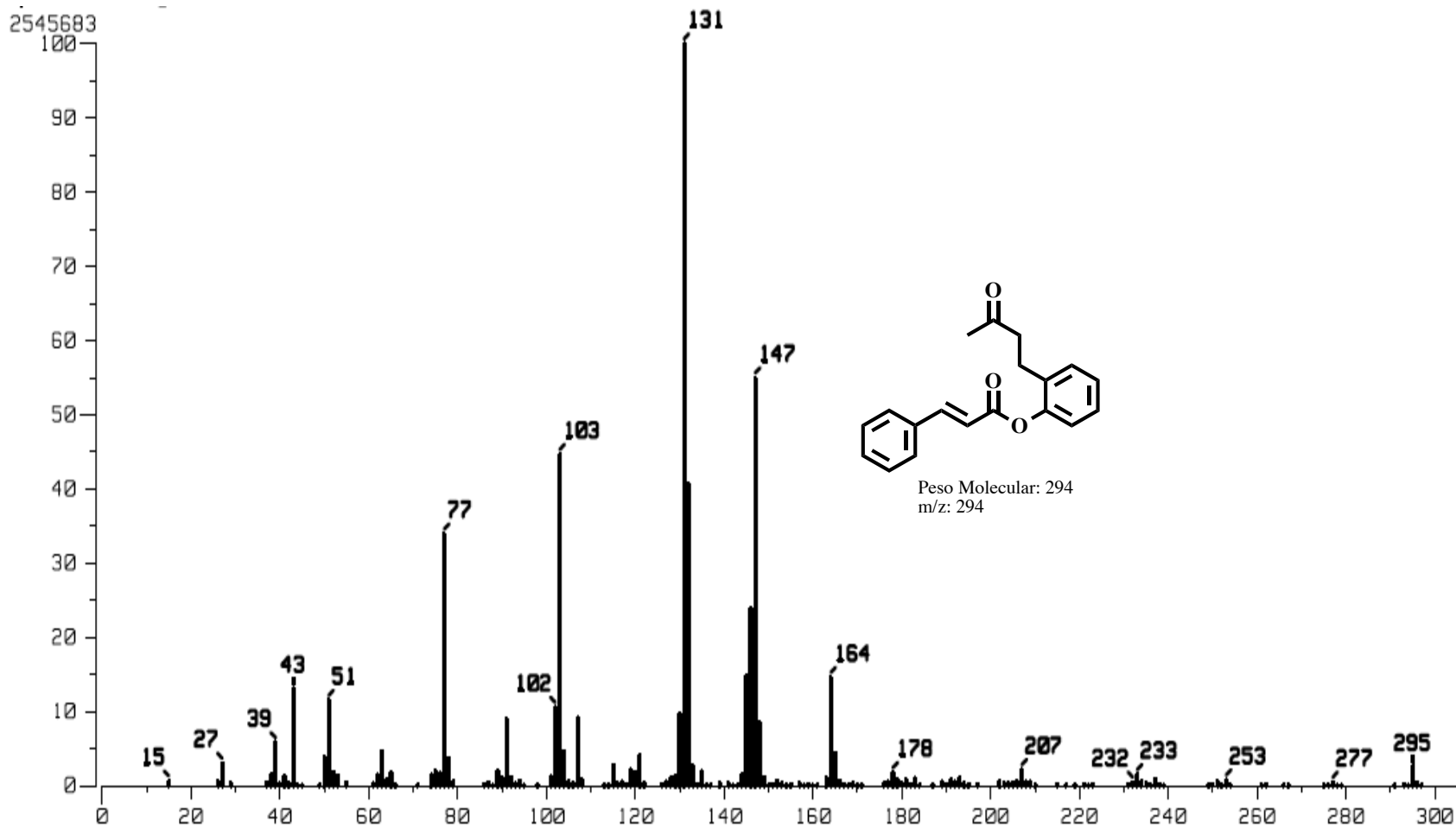


Figura A49. Espectro de Masas del compuesto **25** (IE⁺).

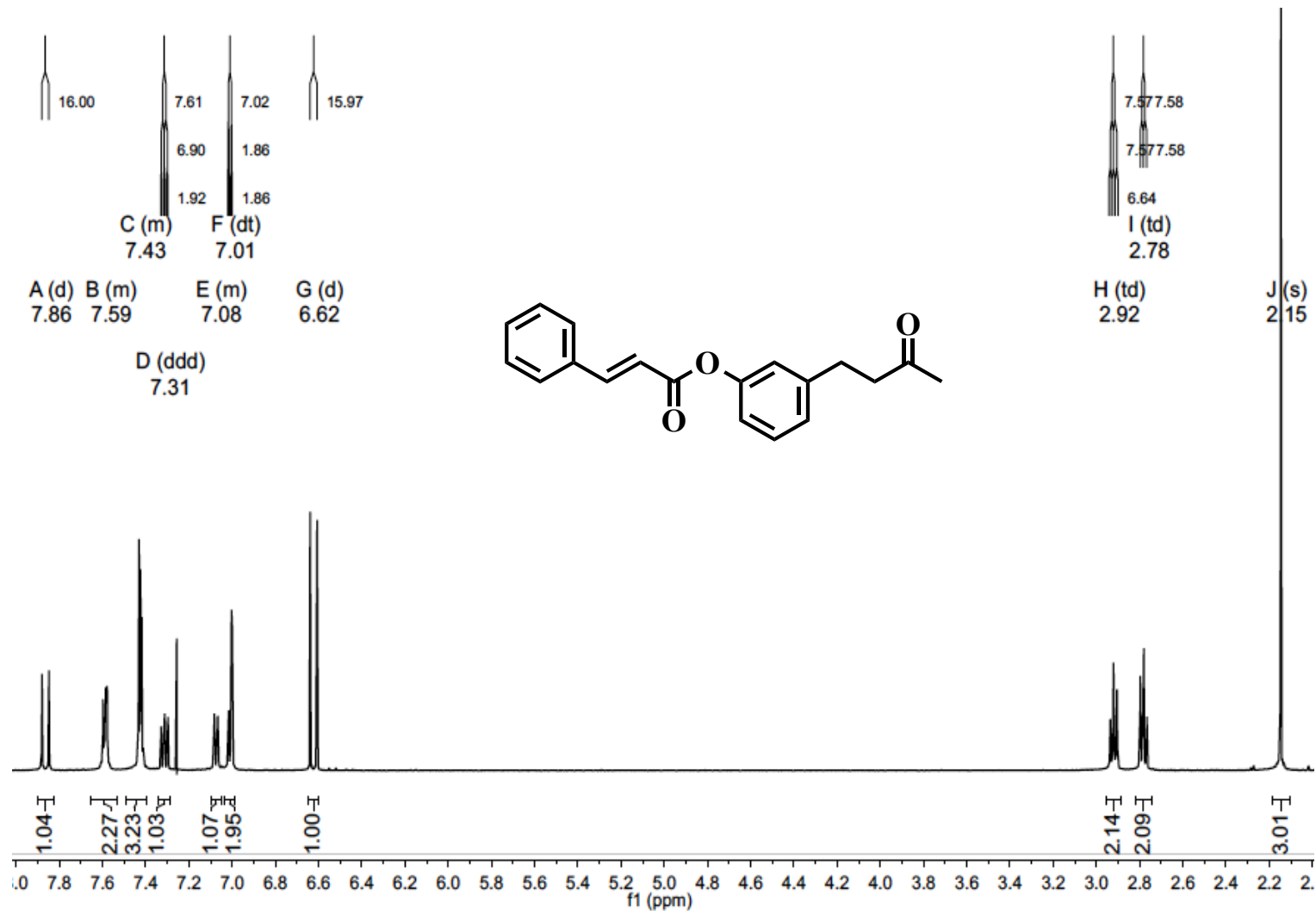


Figura A50. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 26.

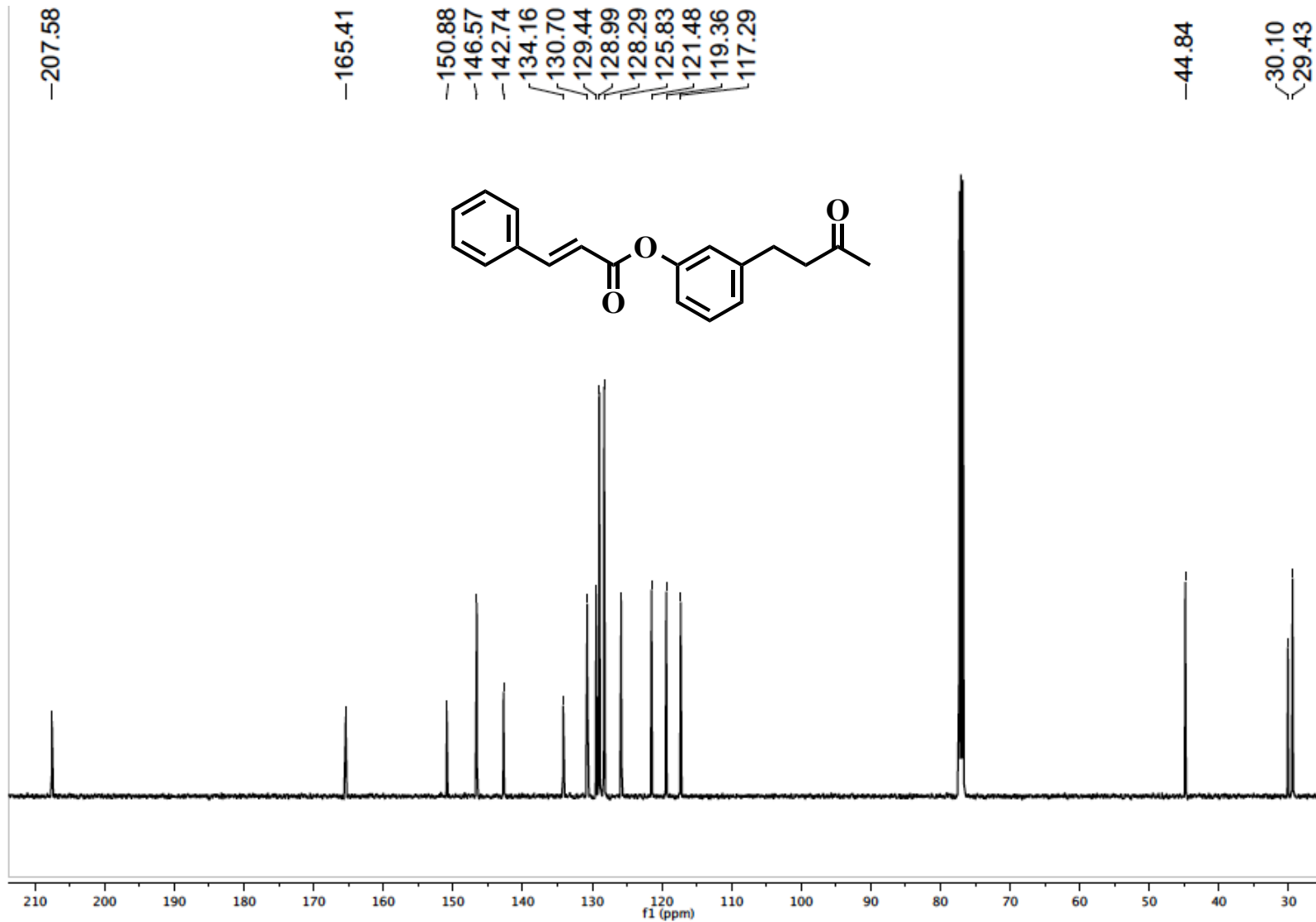


Figura A51. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 26.

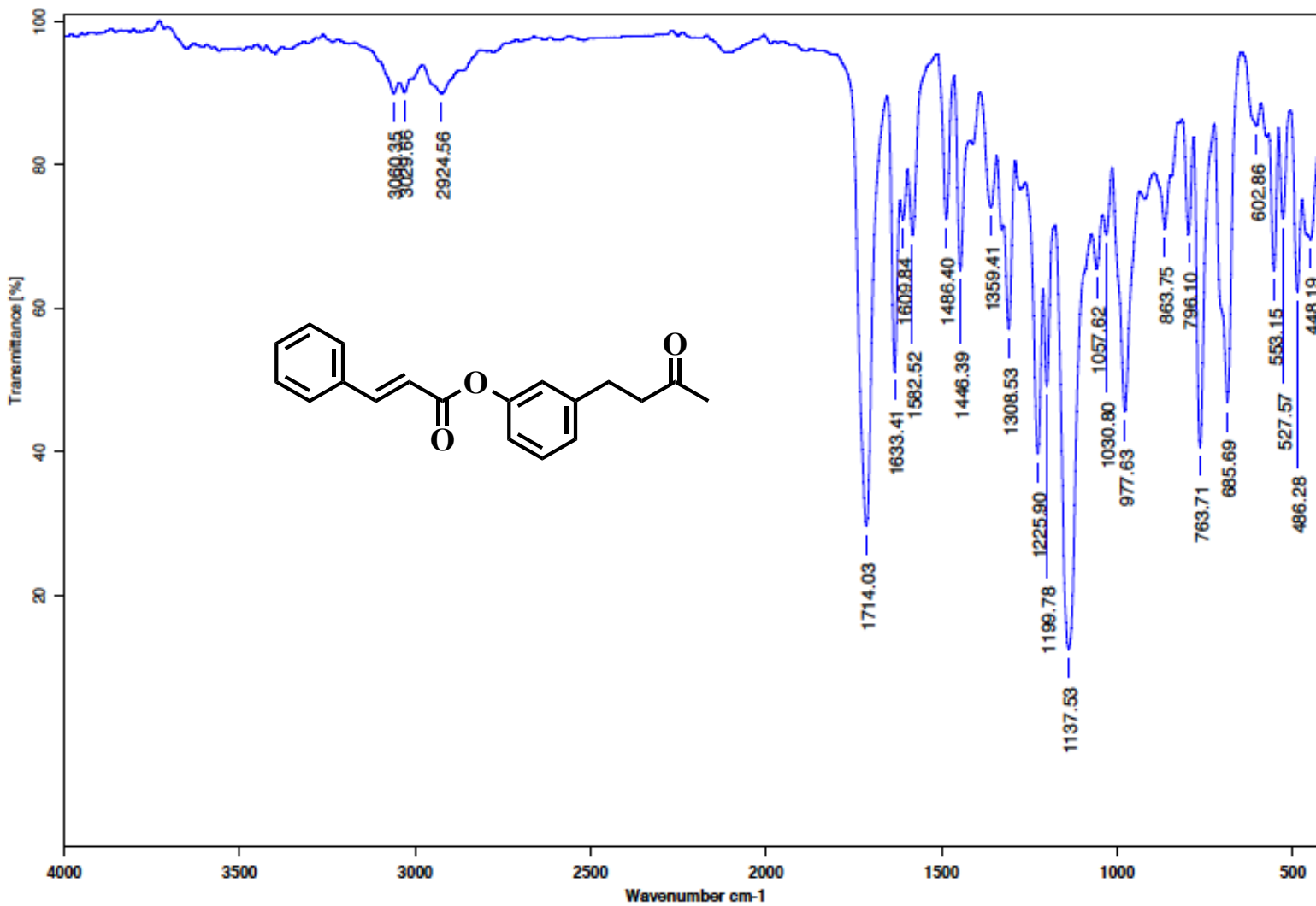


Figura A52. Espectro de IR del compuesto 26 (Película).

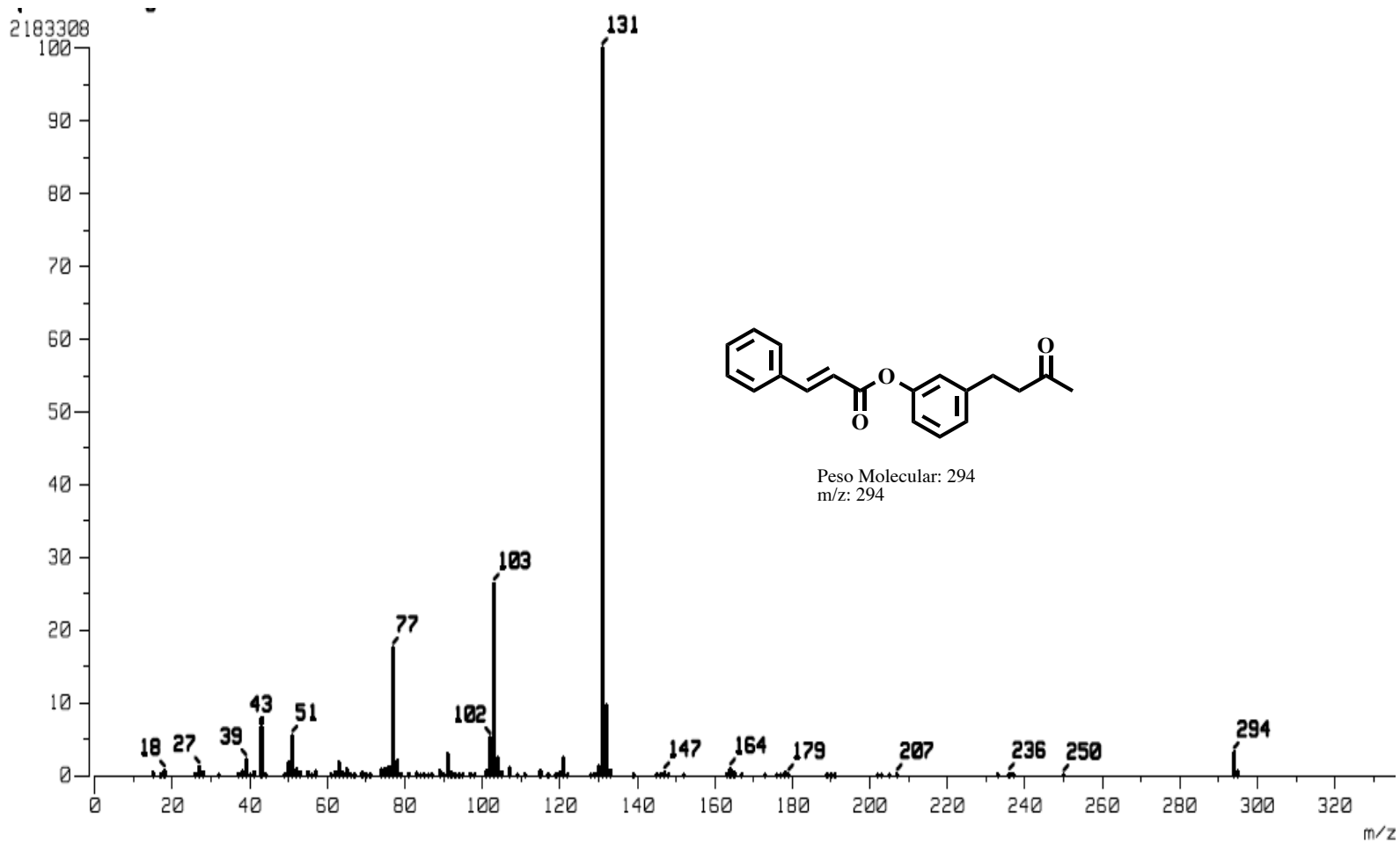


Figura A53. Espectro de Masas del compuesto **26** (IE⁺).

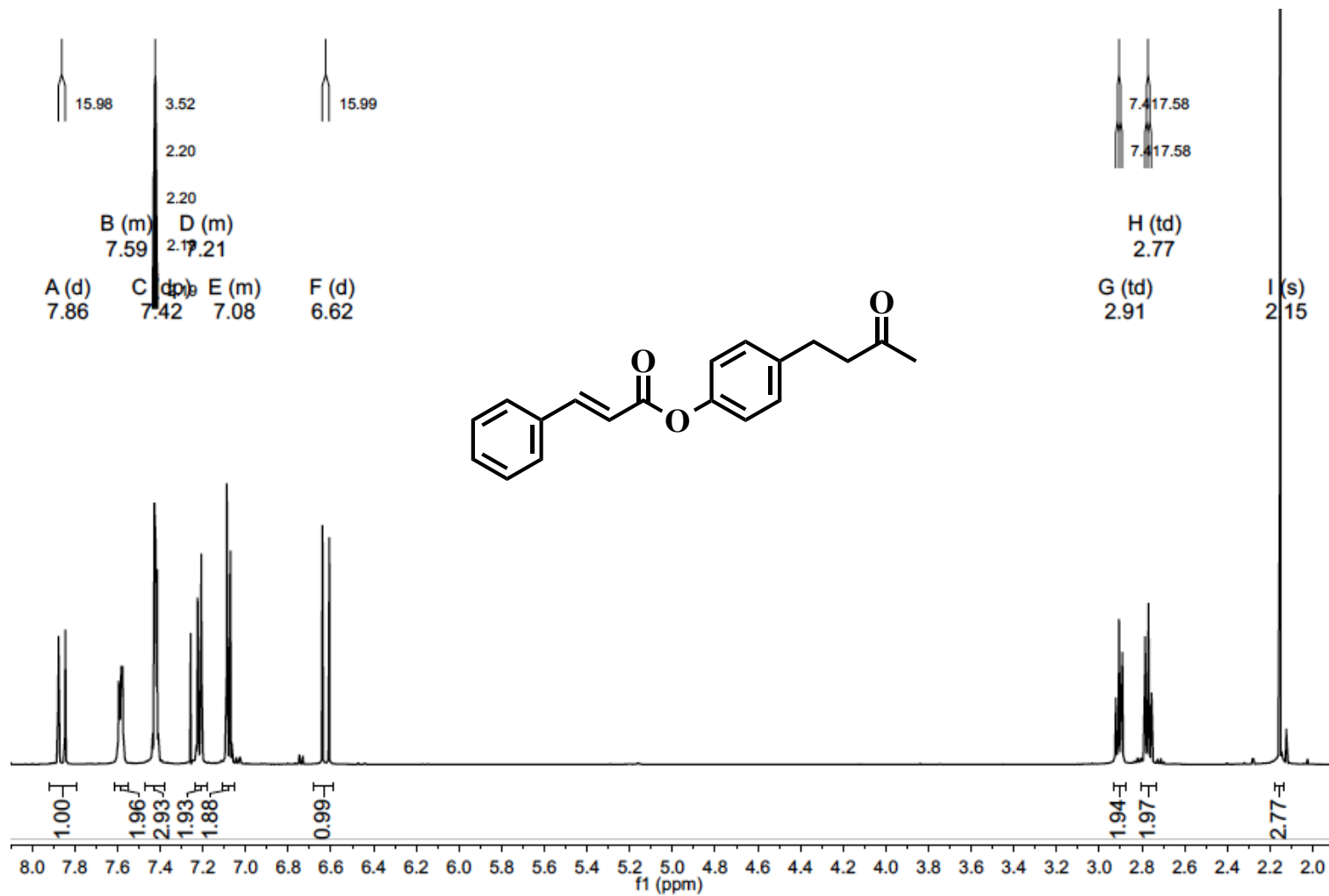


Figura A54. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 27.

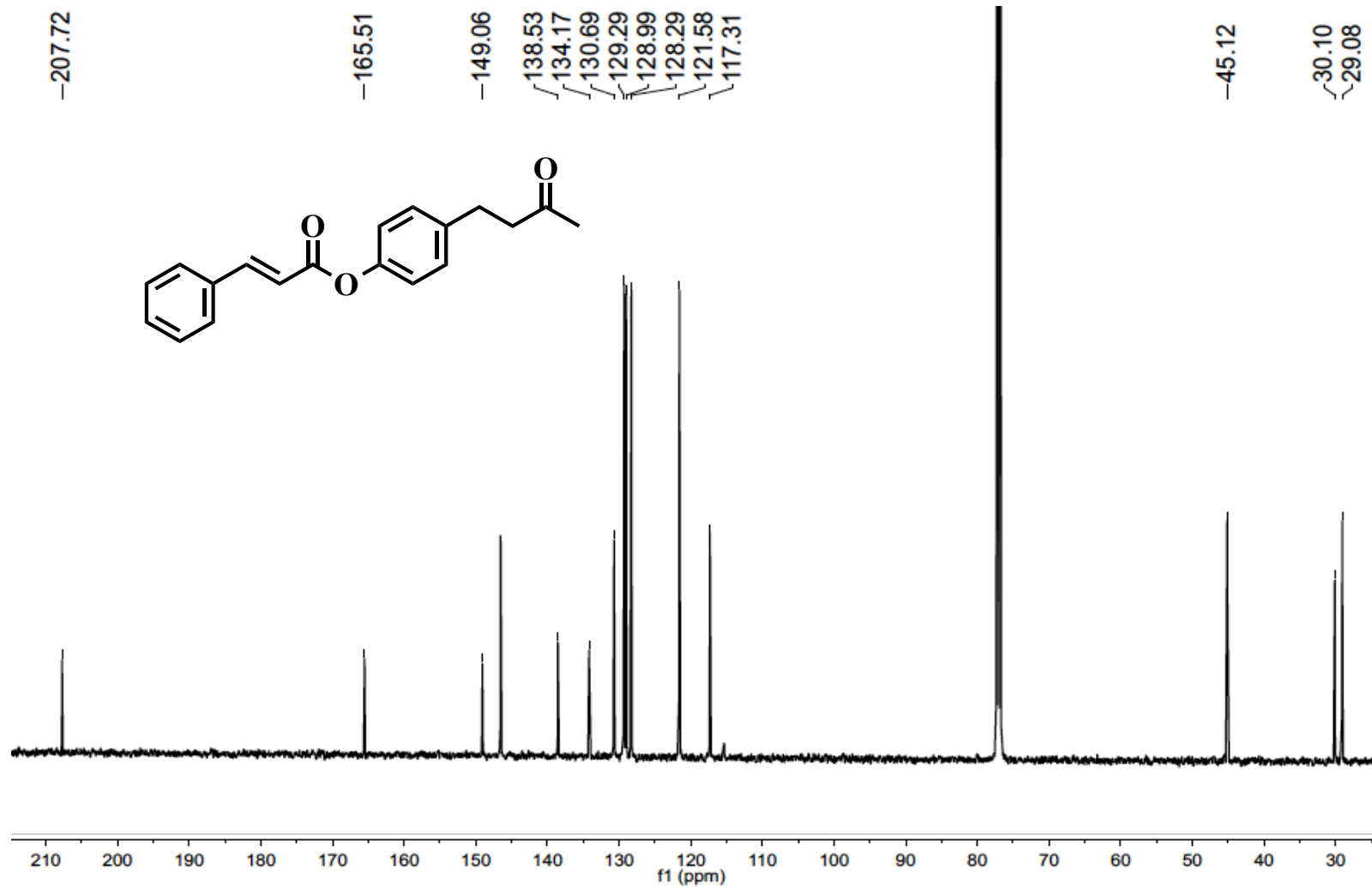


Figura A55. Espectro de RMN de ¹³C del compuesto 27.

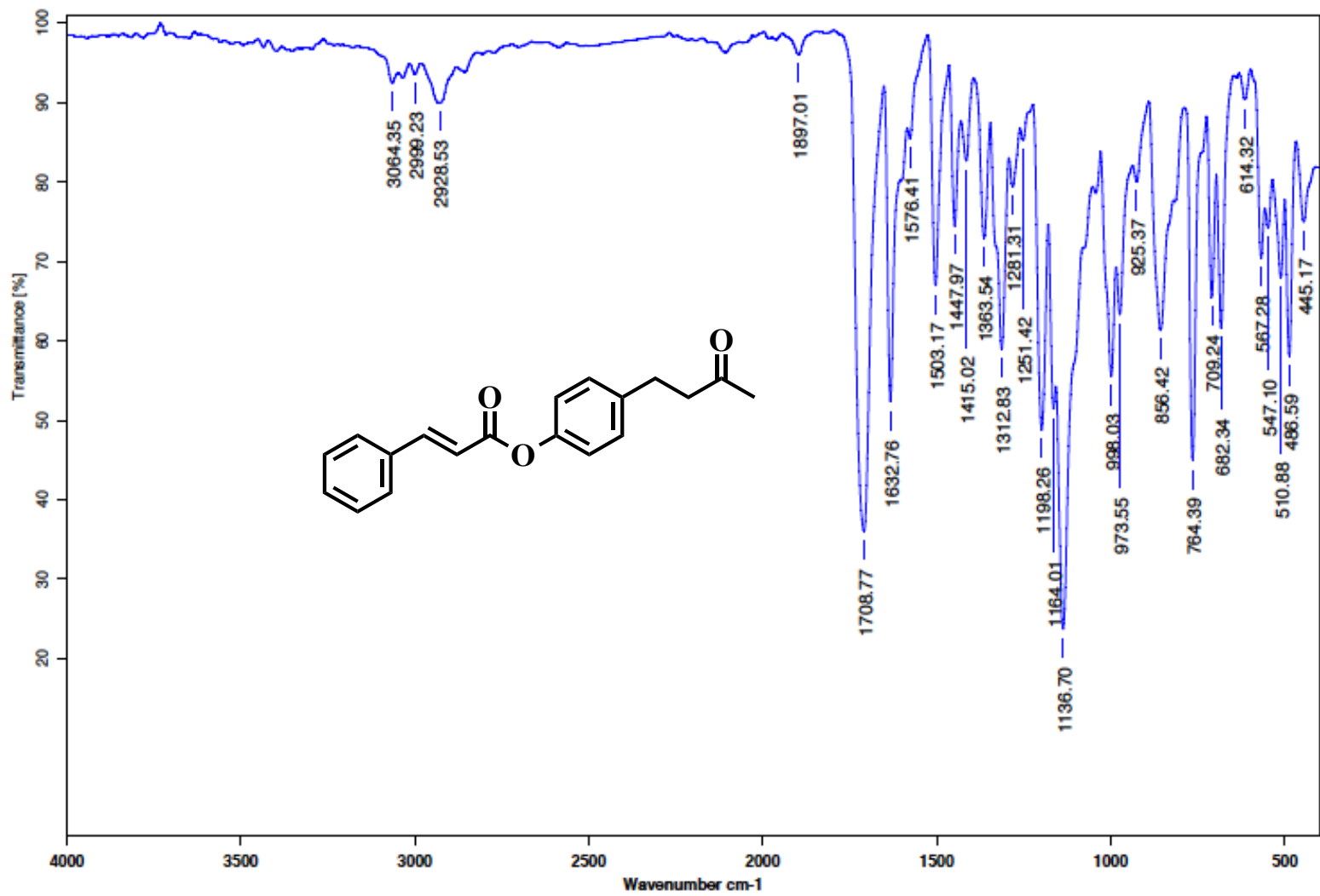


Figura A56. Espectro de IR del compuesto 27 (Pastilla de KBr).

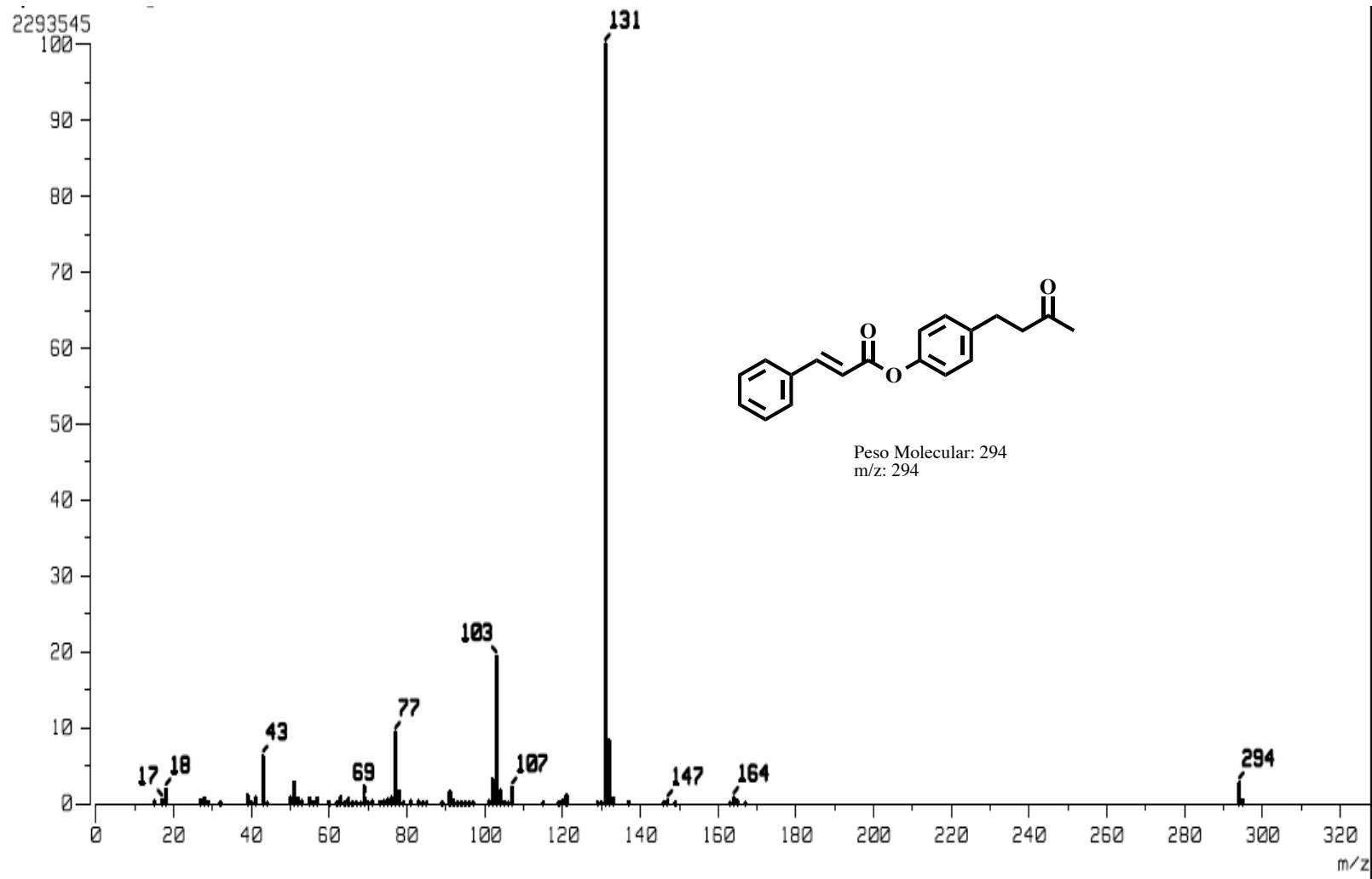


Figura A57. Espectro de Masas del compuesto 27 (IE⁺).

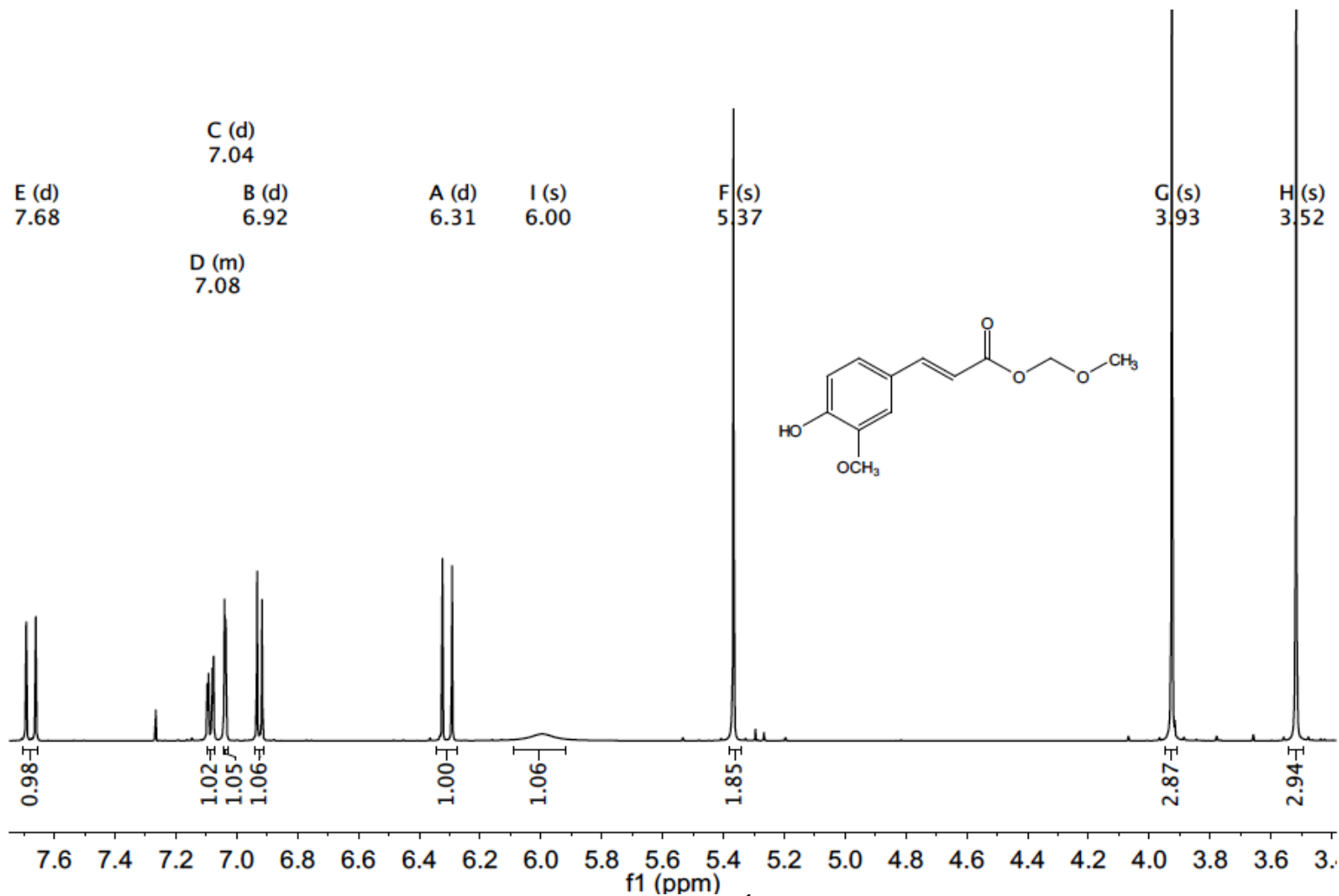


Figura A58. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 30.

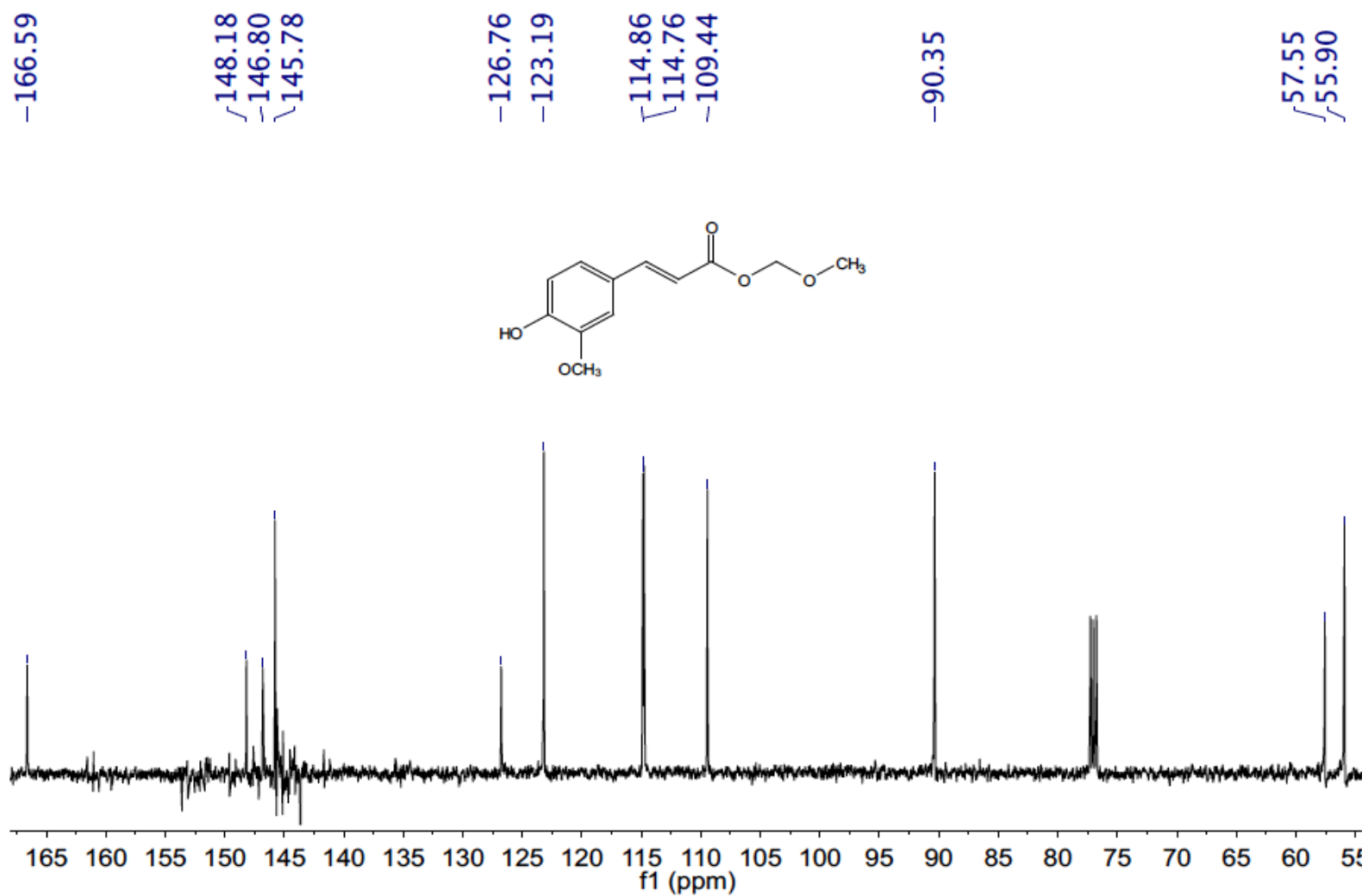


Figura A59. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 30.

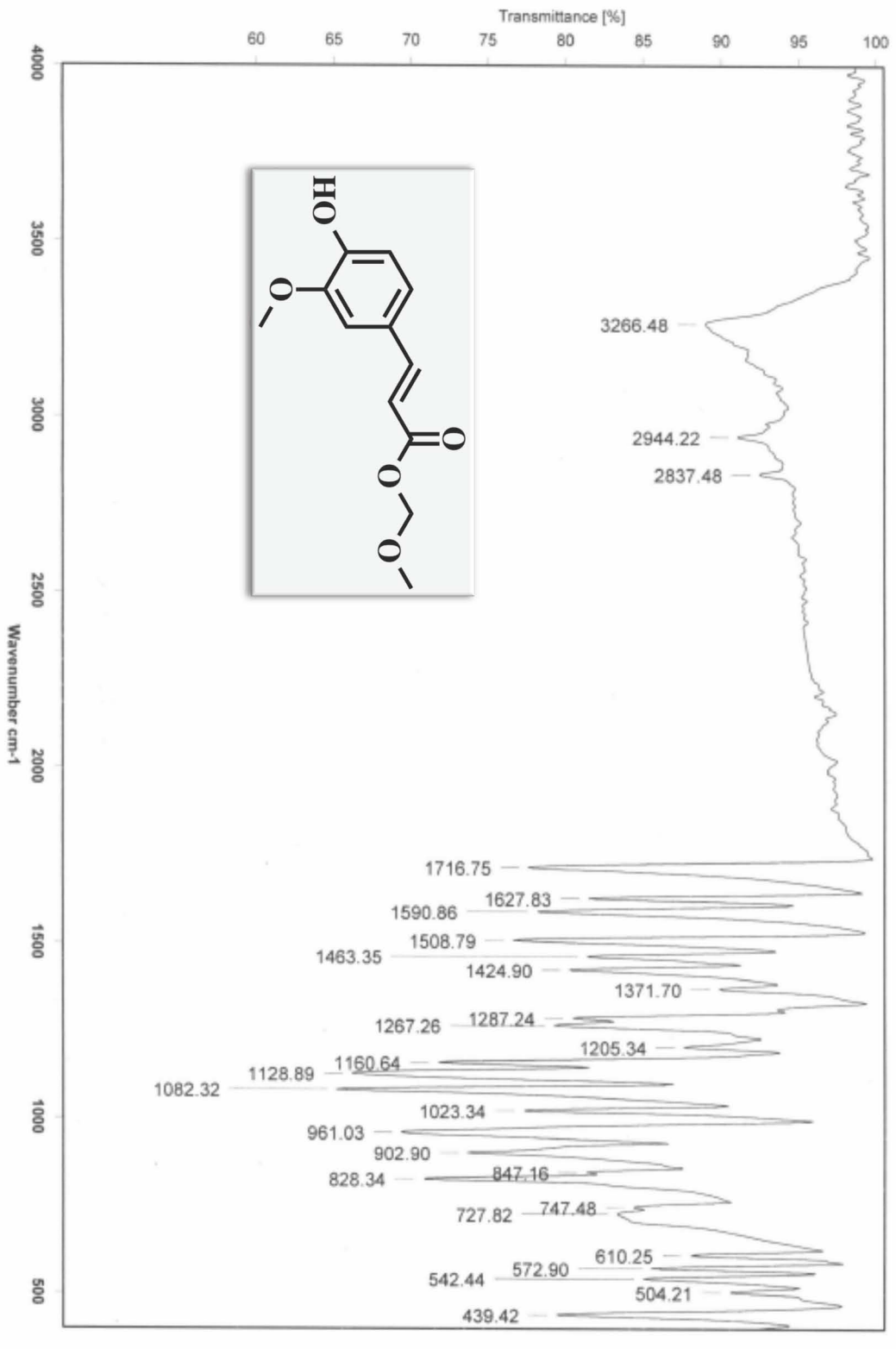


Figura A60. Espectro de IR del compuesto 30 (Pastilla de KBr).

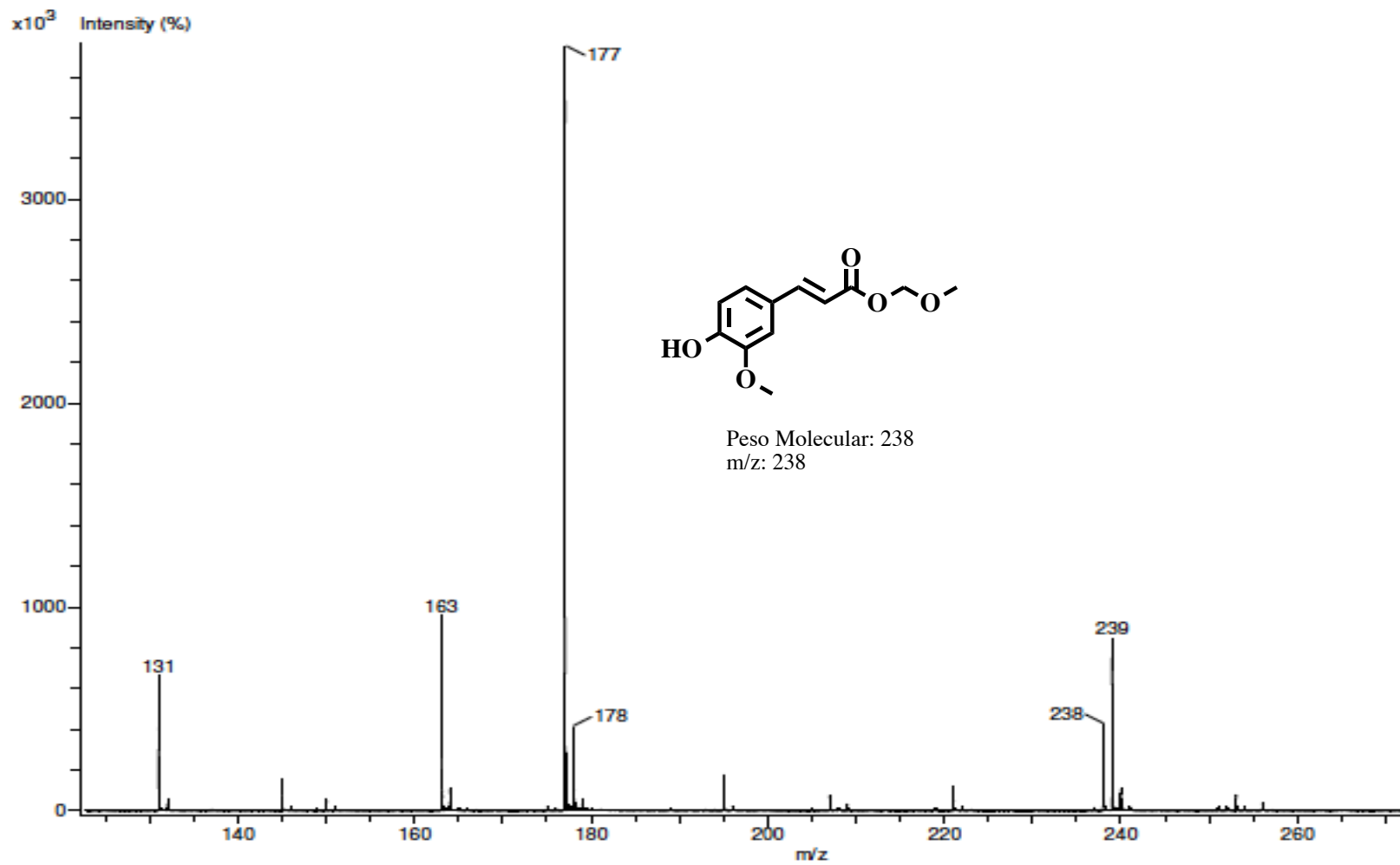


Figura A61. Espectro de Masas del compuesto 30 (FAB⁺).

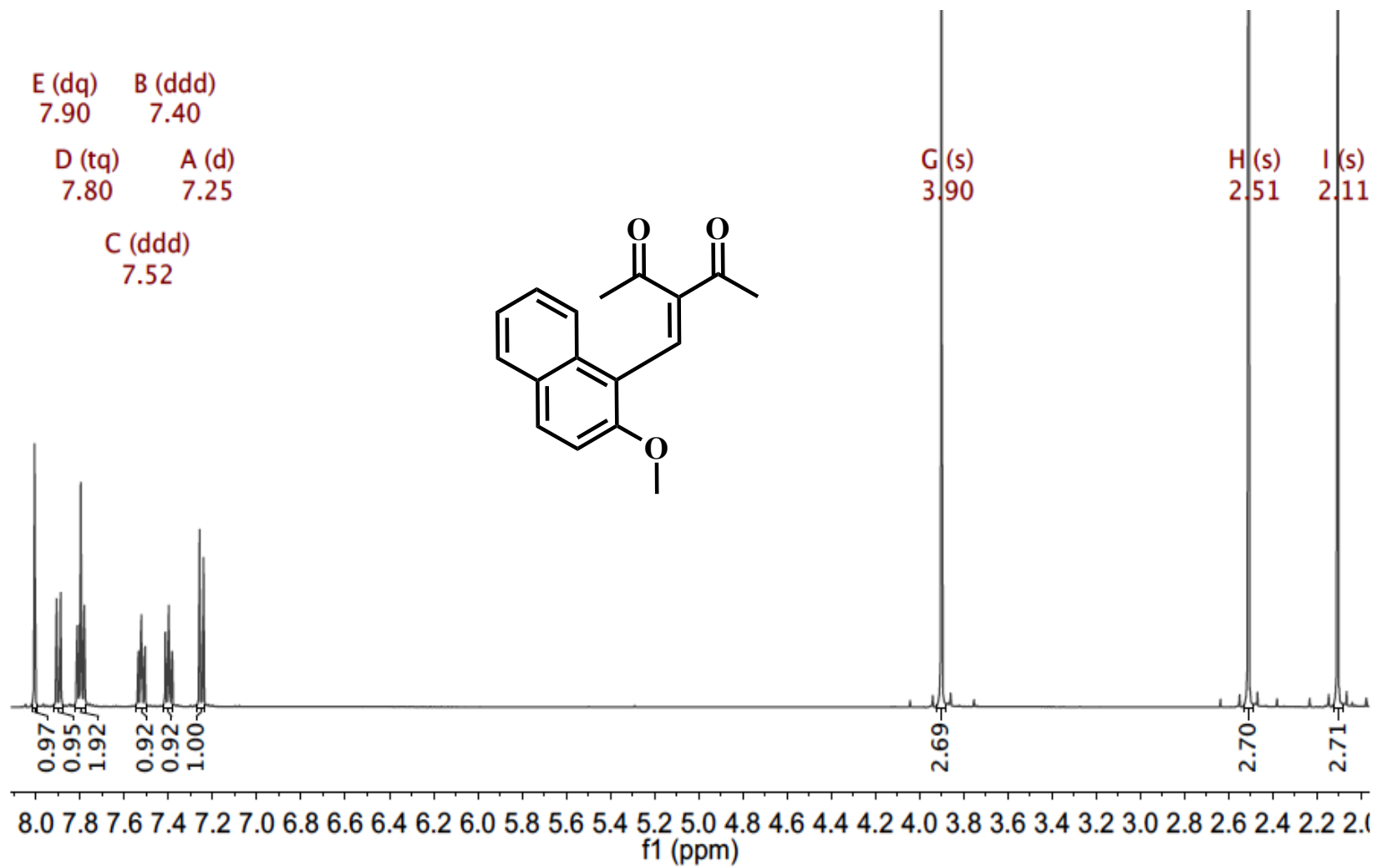


Figura A62. Espectro de RMN de ¹H del compuesto 44.

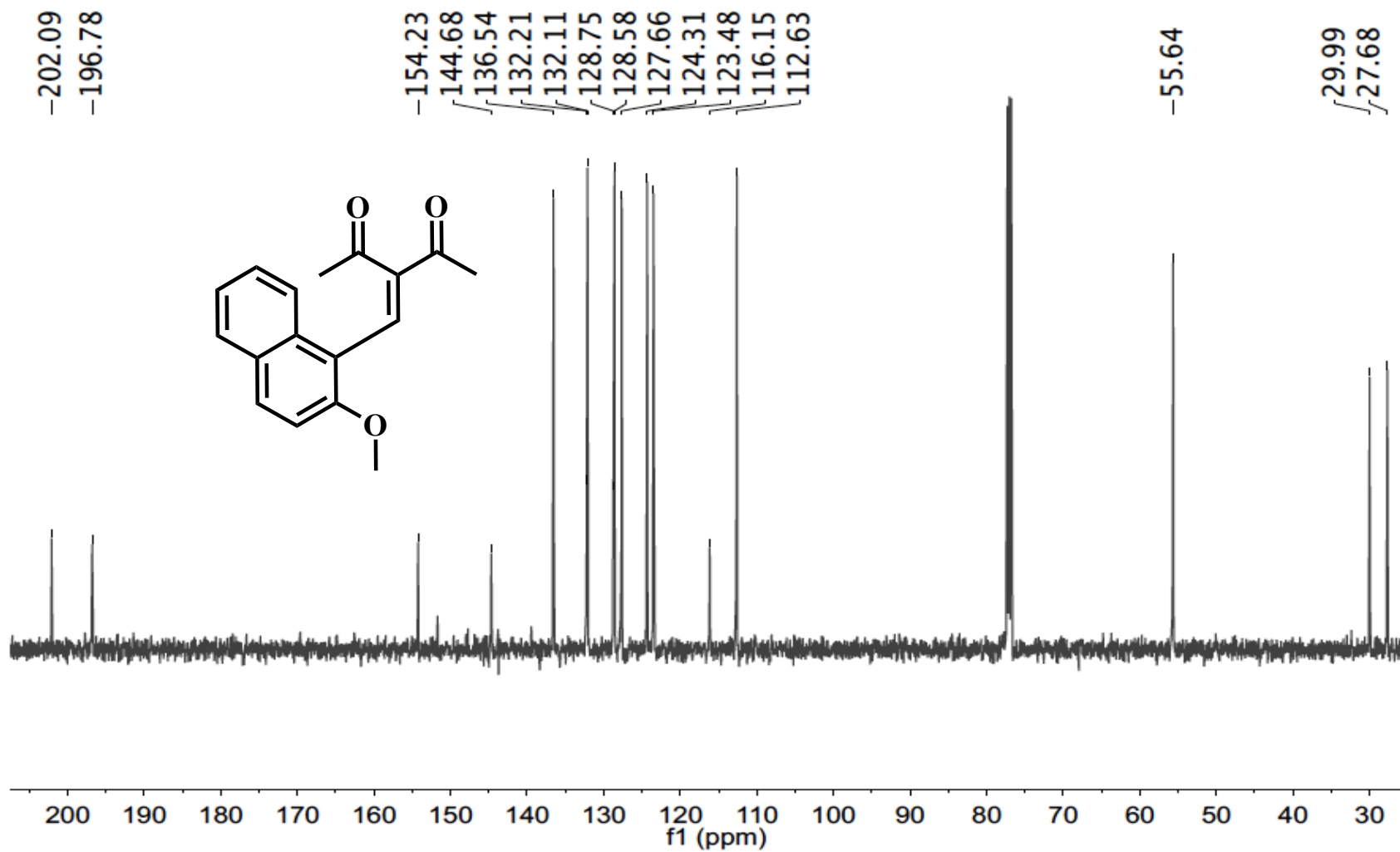


Figura A63. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 44.

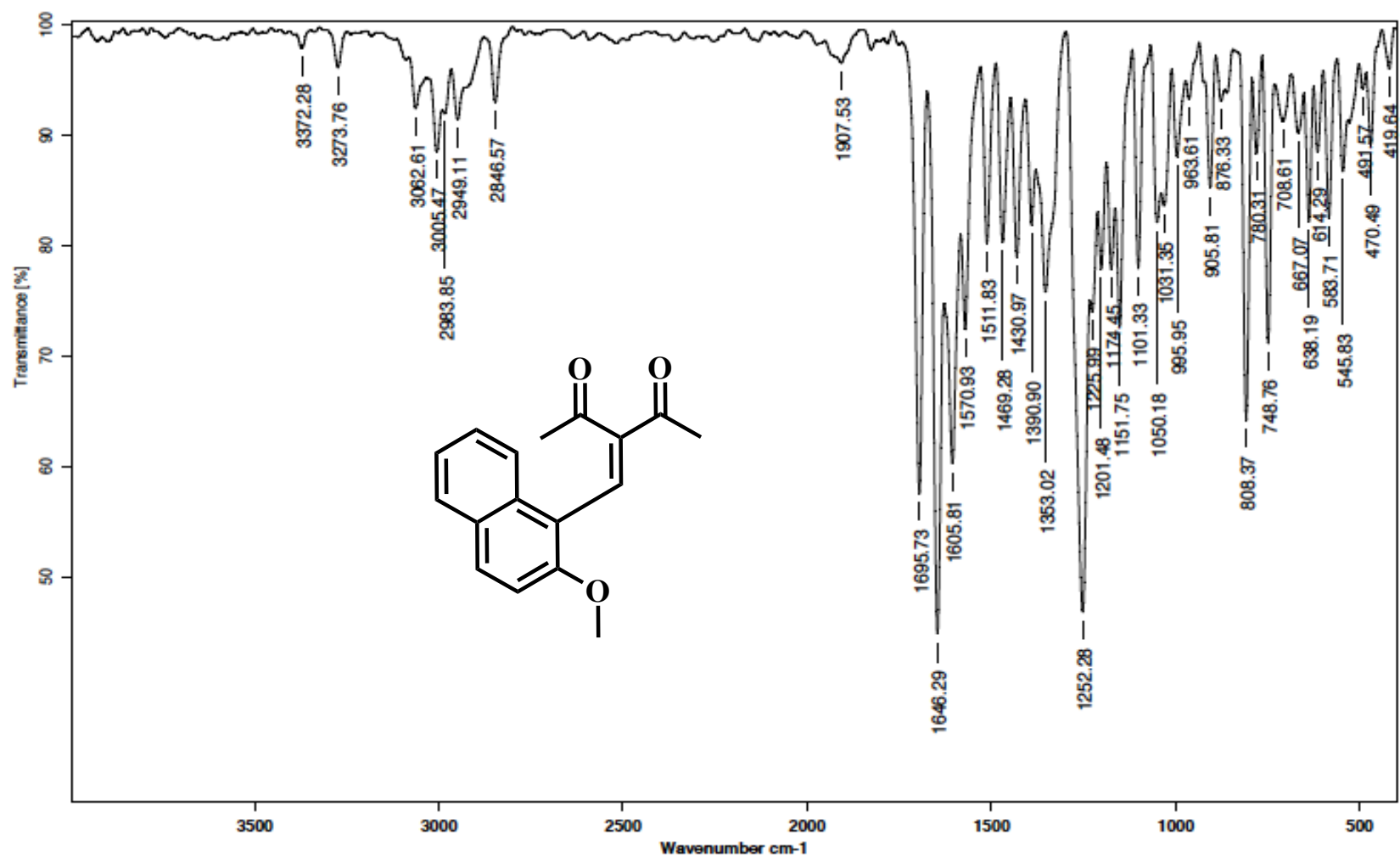


Figura A64. Espectro de IR del compuesto 44 (Pastilla de KBr).

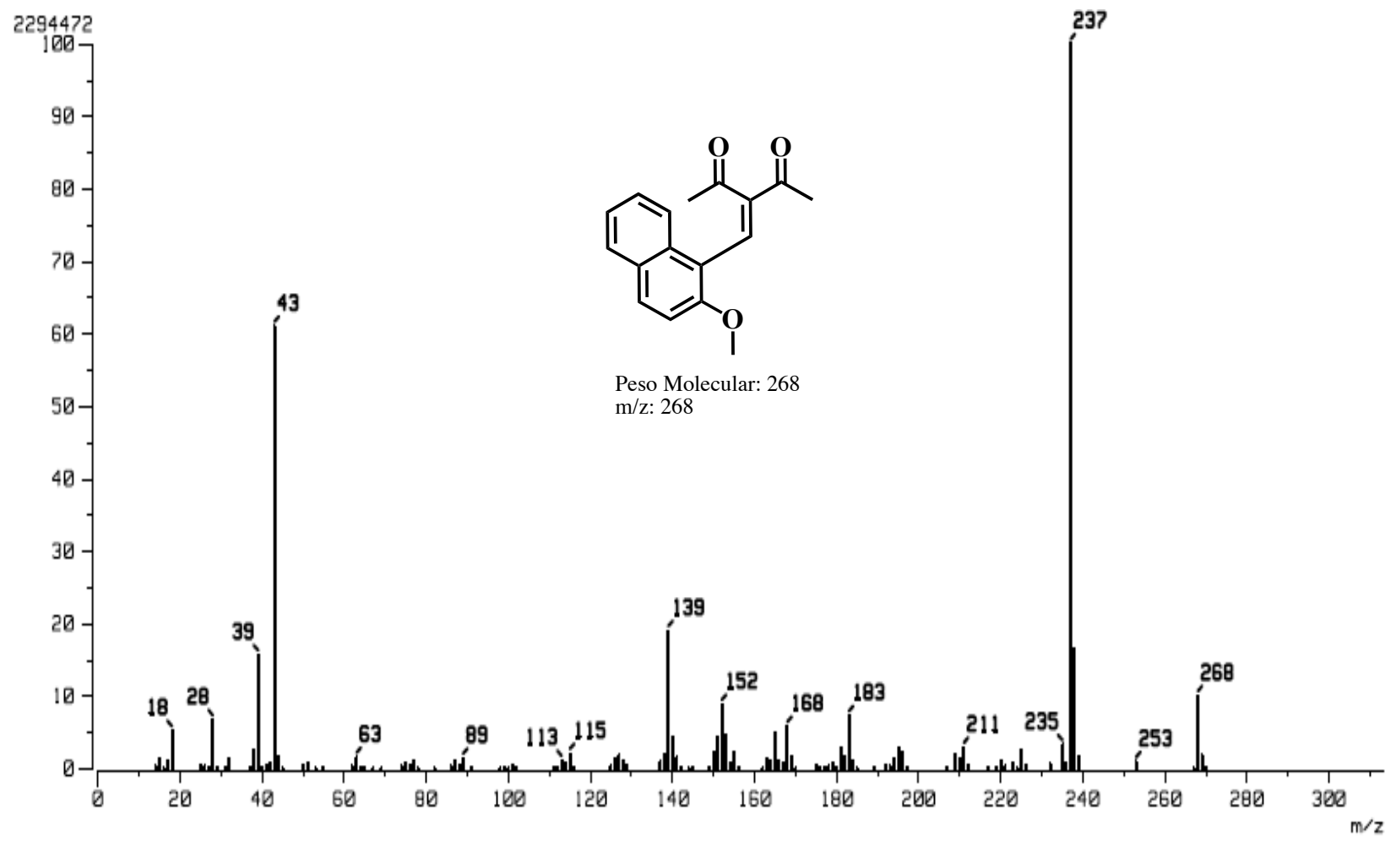


Figura A65. Espectro de Masas del compuesto 44 (IE⁺).

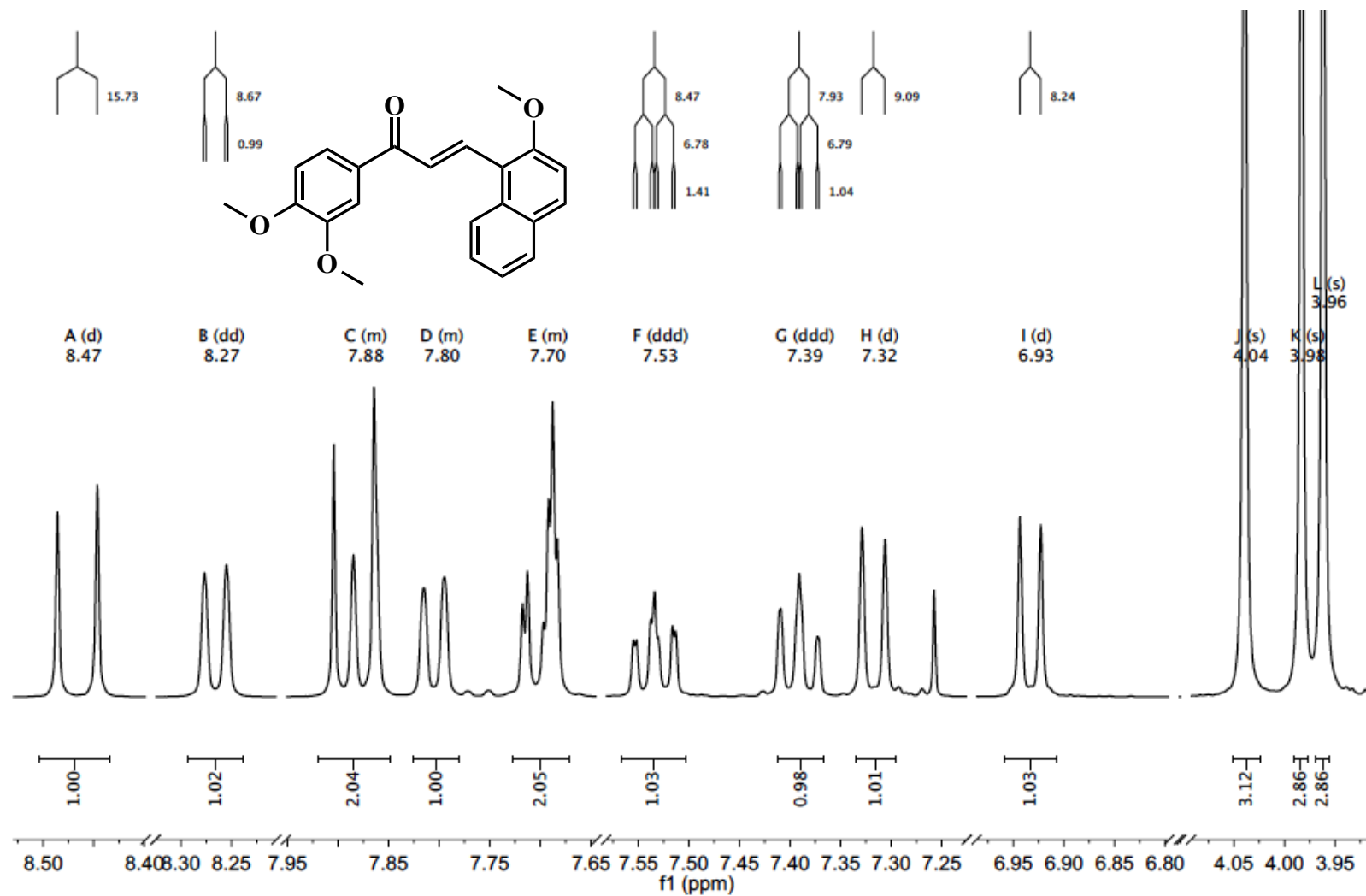


Figura A66. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 58.

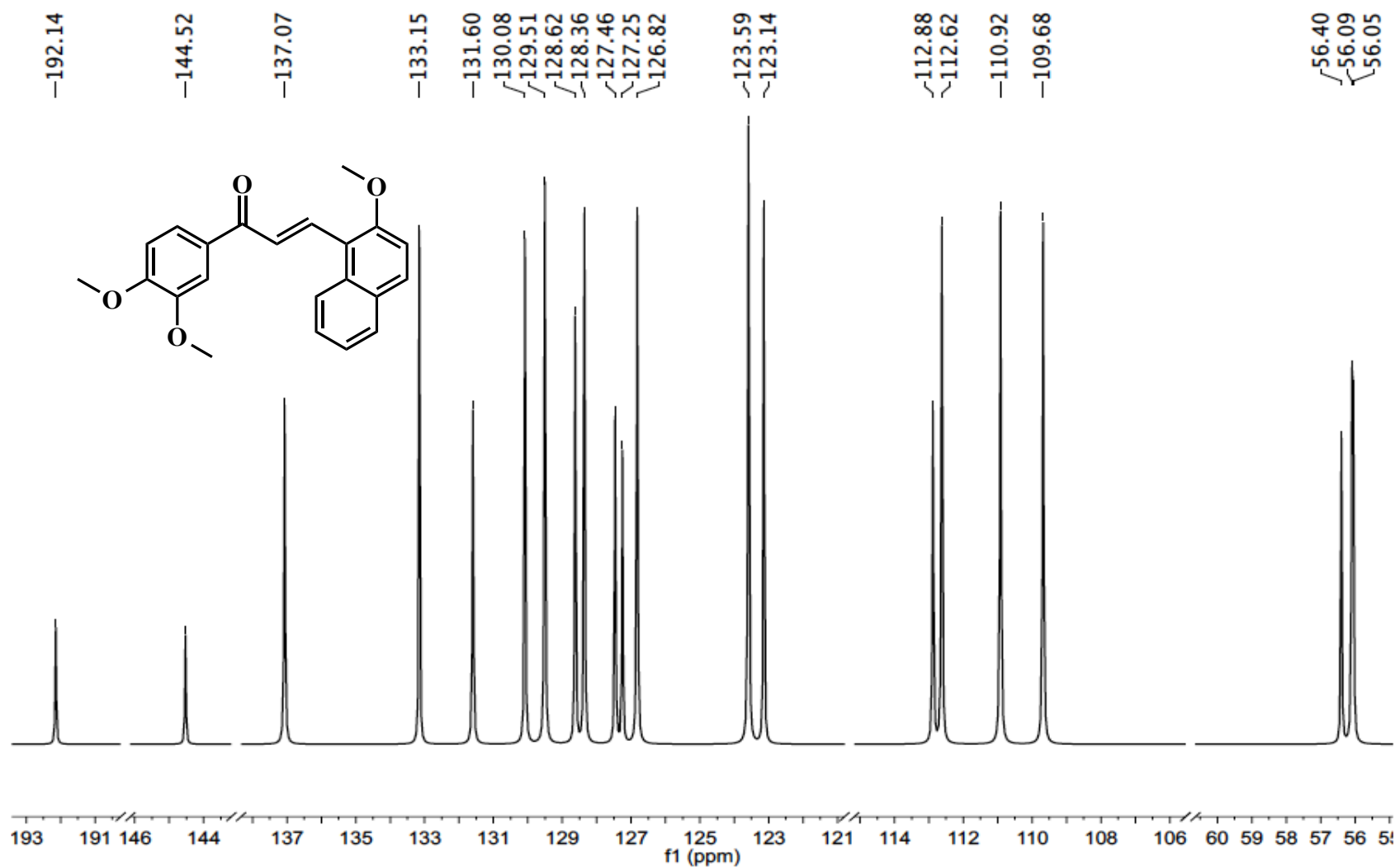


Figura A67. Espectro de RMN de ¹³C del compuesto 58.

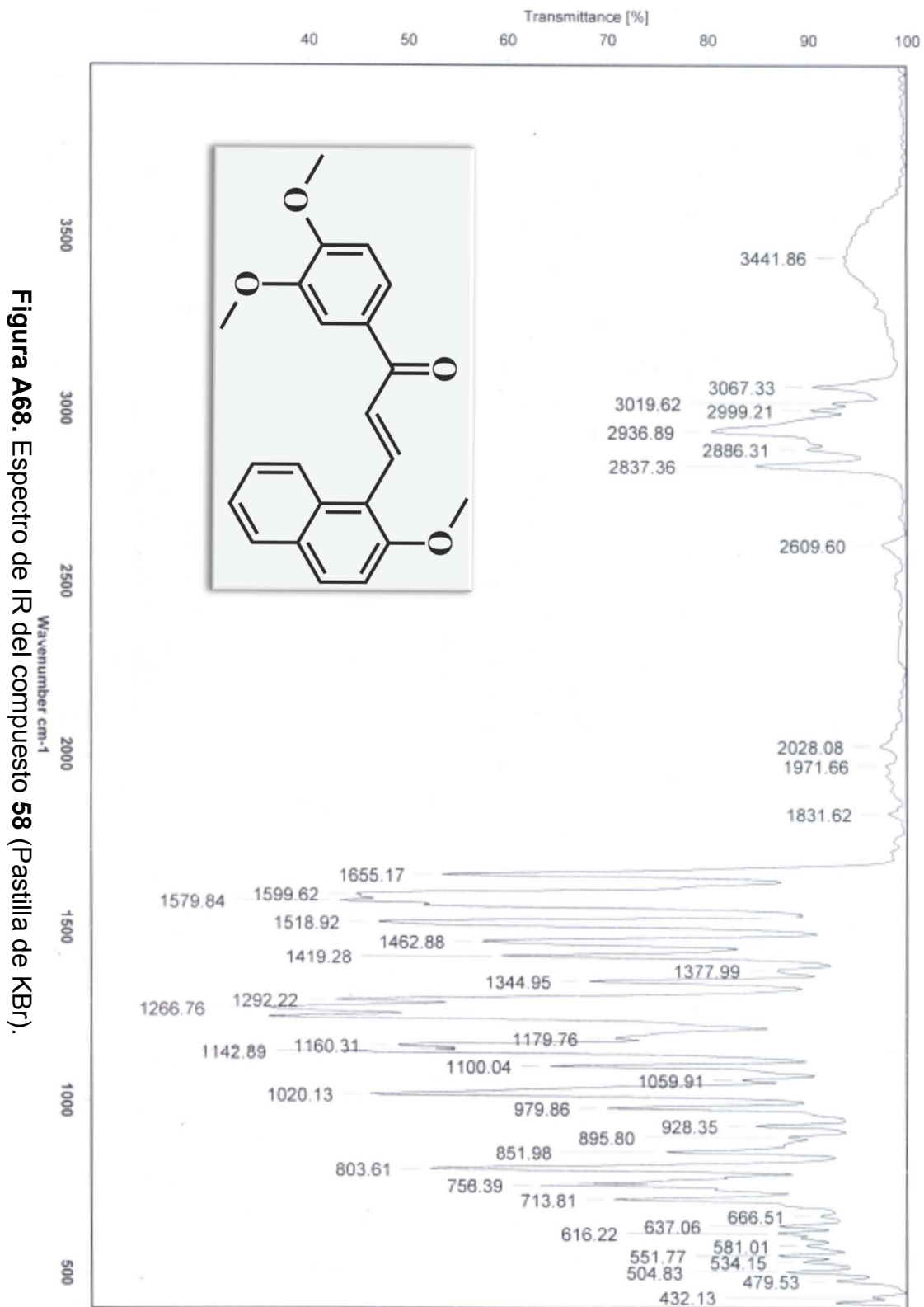


Figura A68. Espectro de IR del compuesto 58 (Pastilla de KBr).

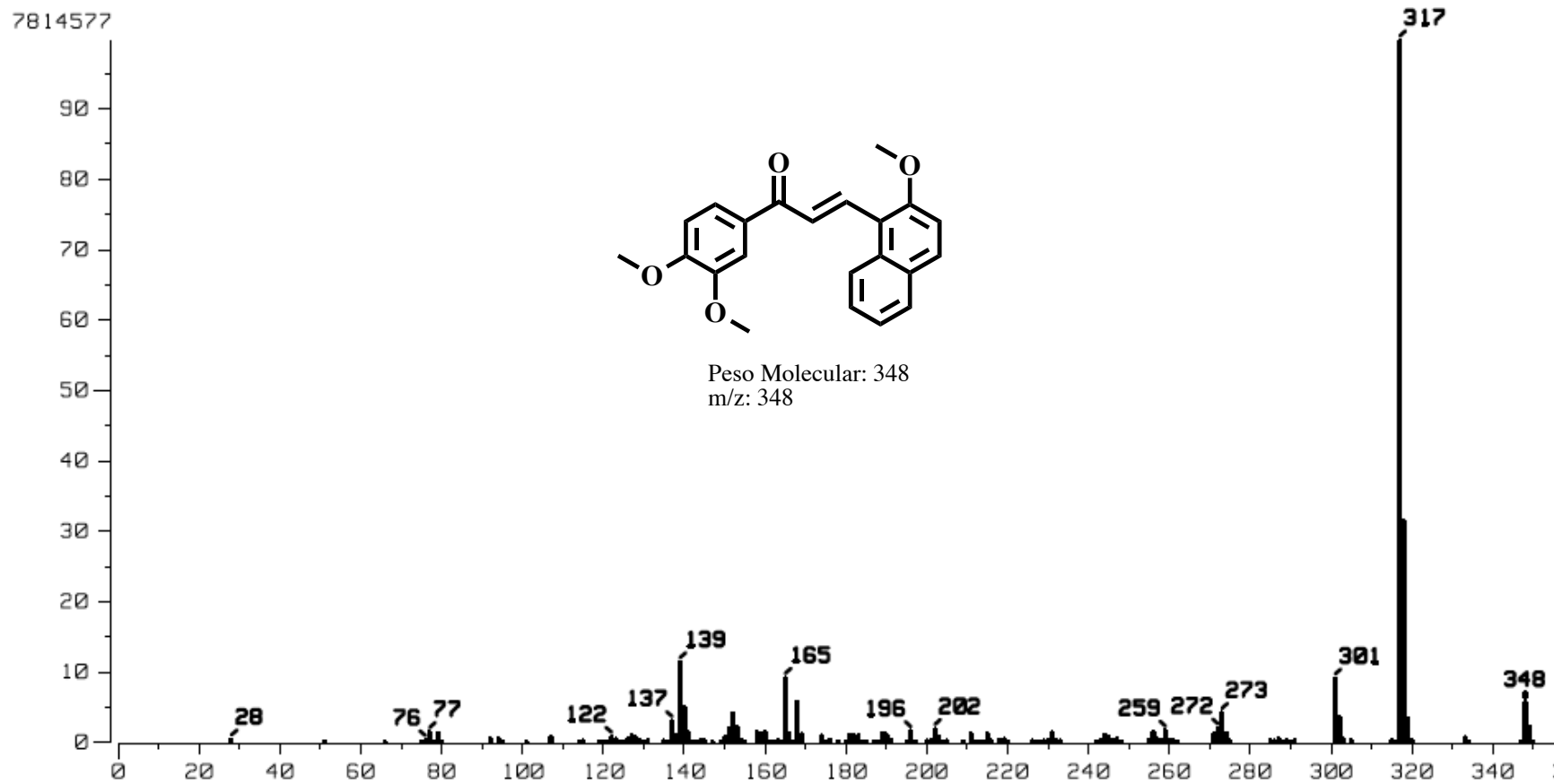


Figura A69. Espectro de Masas del compuesto 58 (IE⁺).

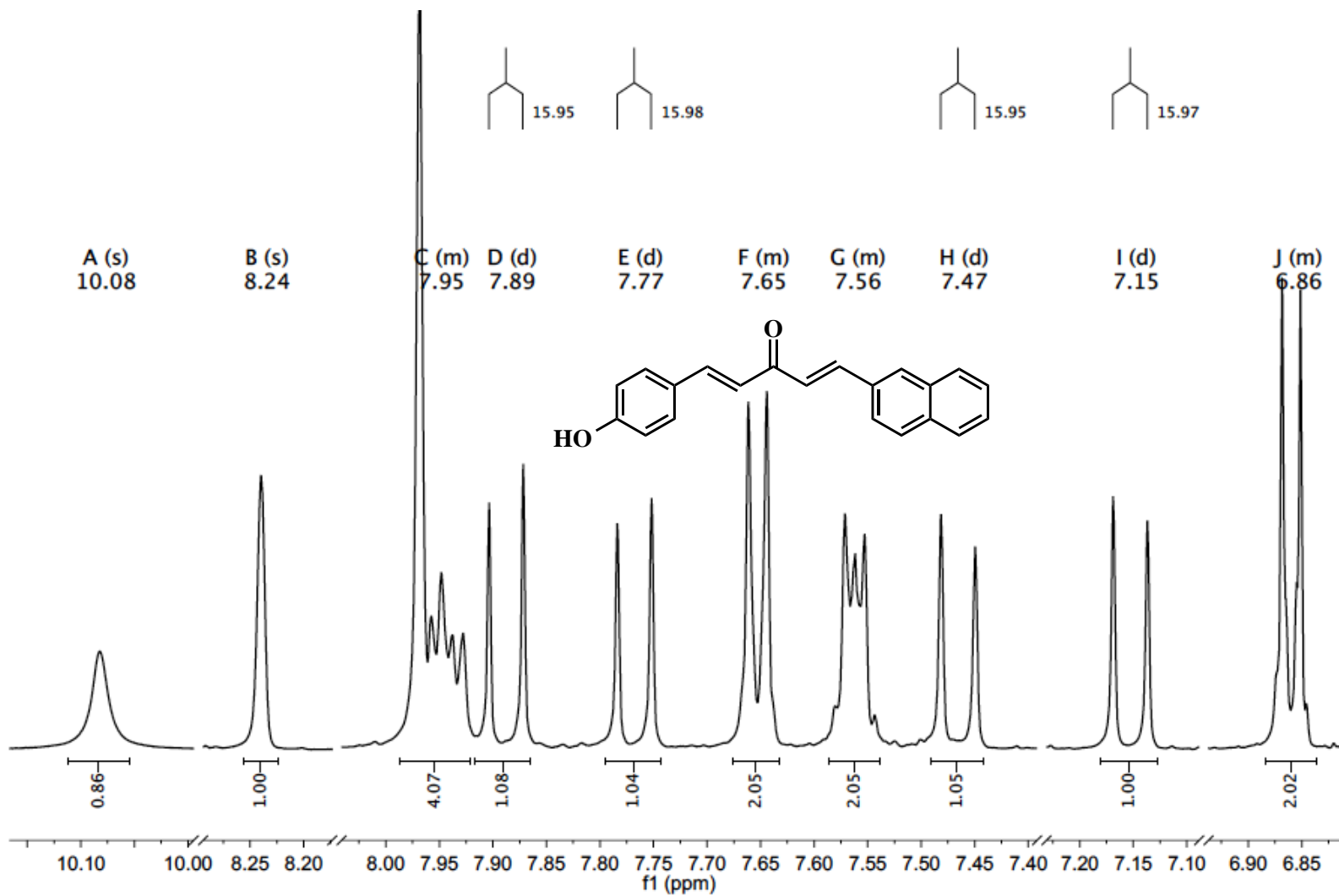


Figura A70. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 60.

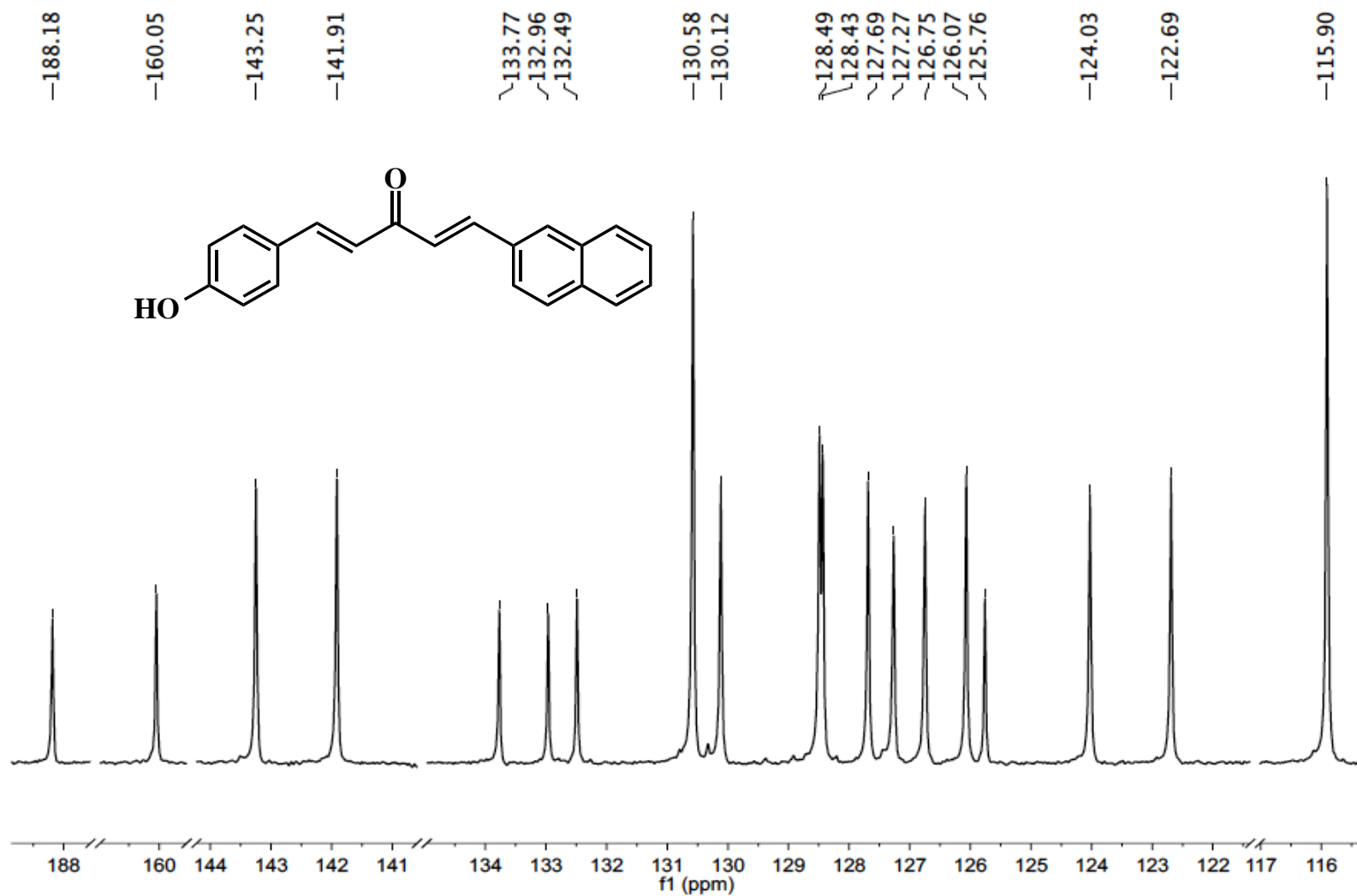


Figura A71. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 60.

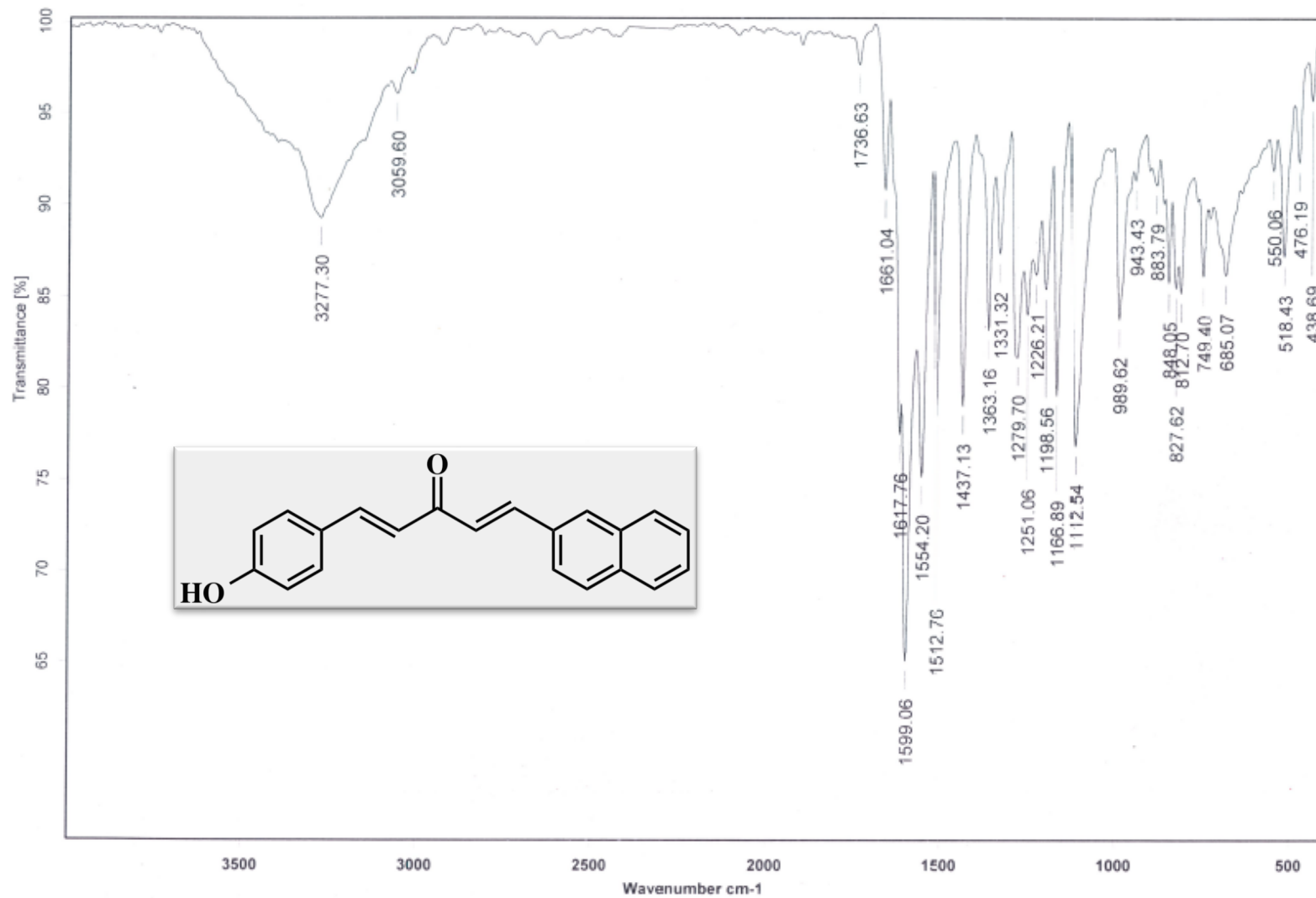


Figura A72. Espectro de IR del compuesto **60** (Pastilla de KBr).

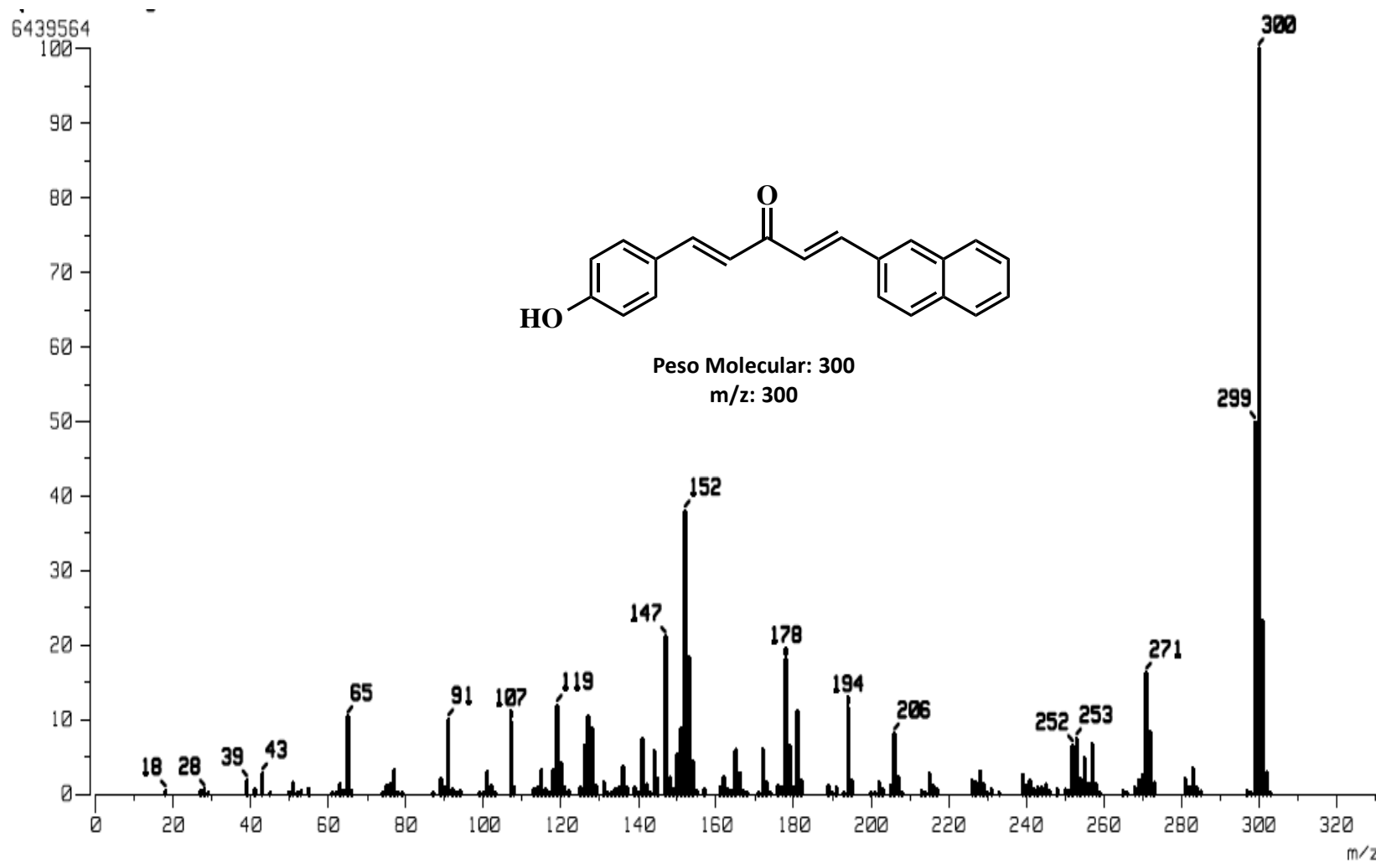


Figura A73. Espectro de Masas del compuesto 60 (IE⁺).

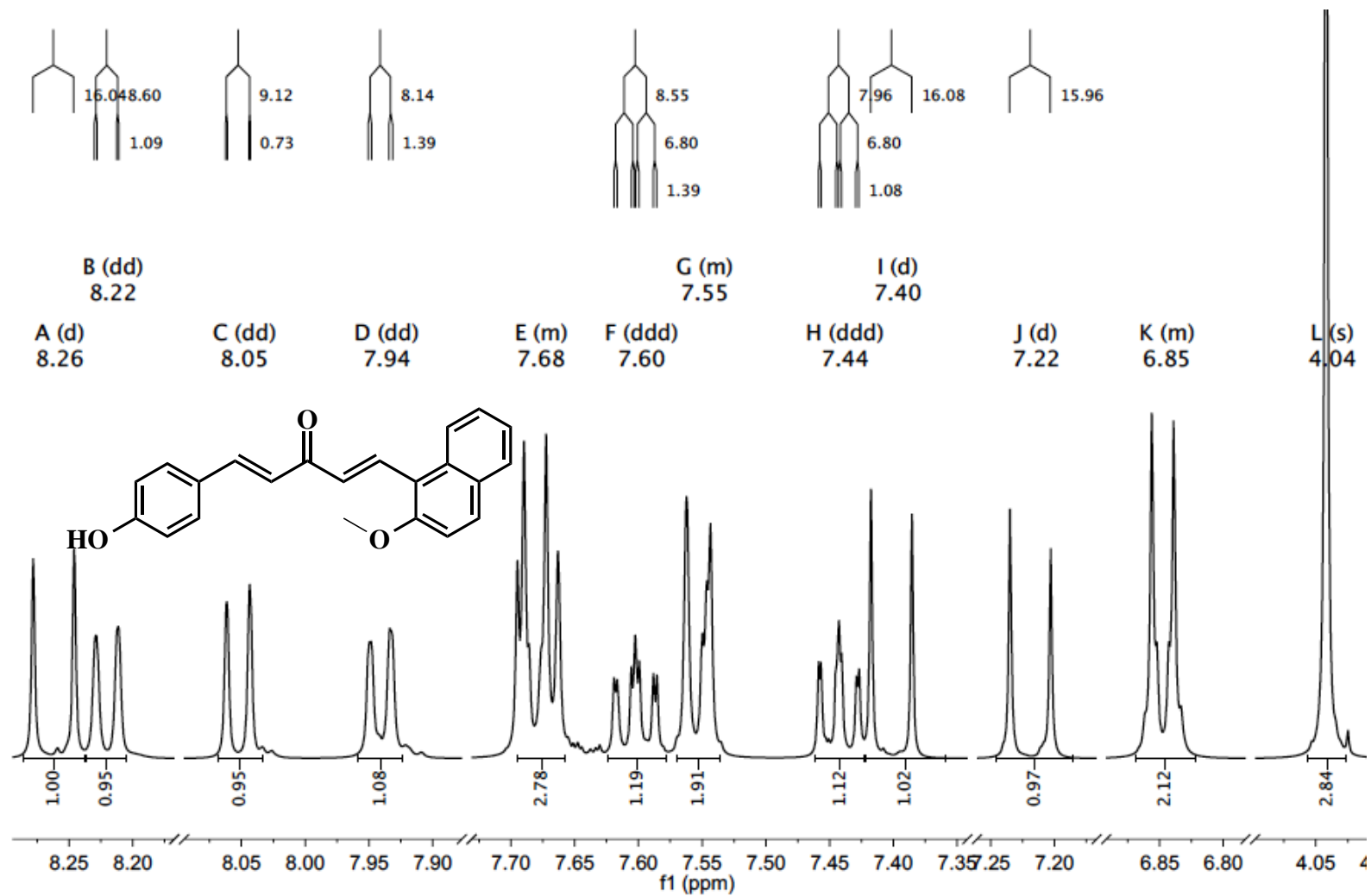


Figura A74. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 61.

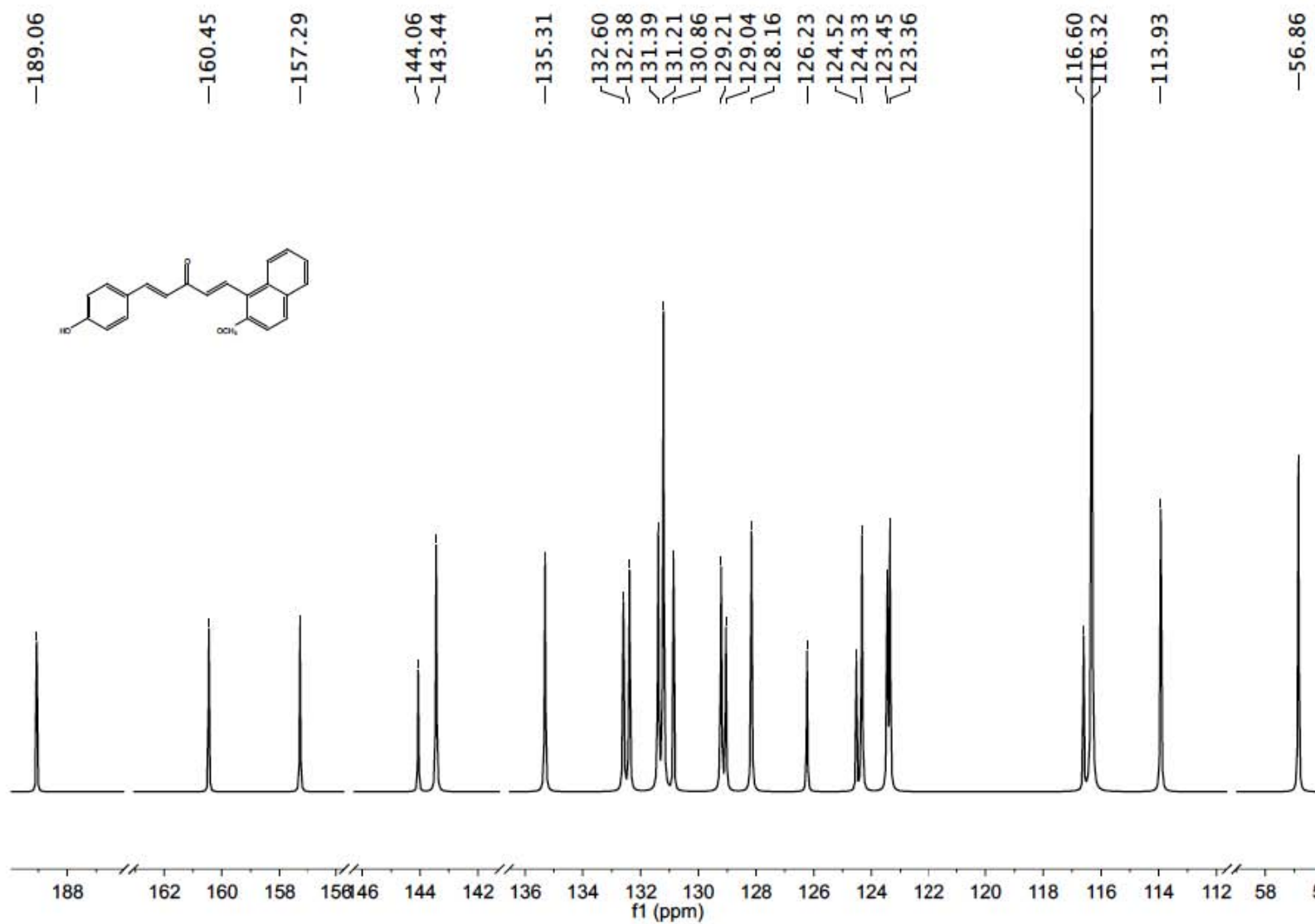


Figura A75. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **61**.

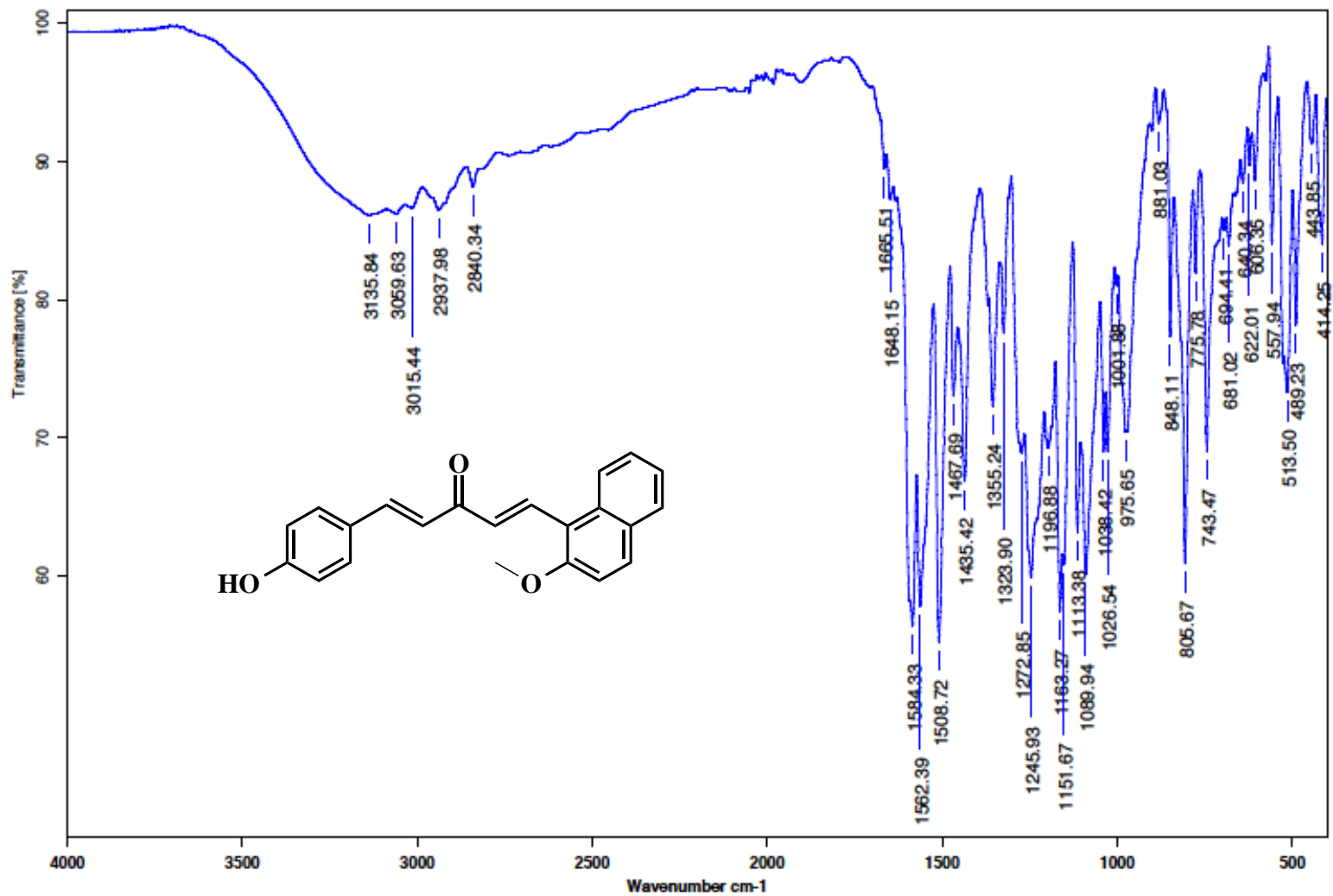


Figura A76. Espectro de IR del compuesto **61** (Pastilla de KBr).

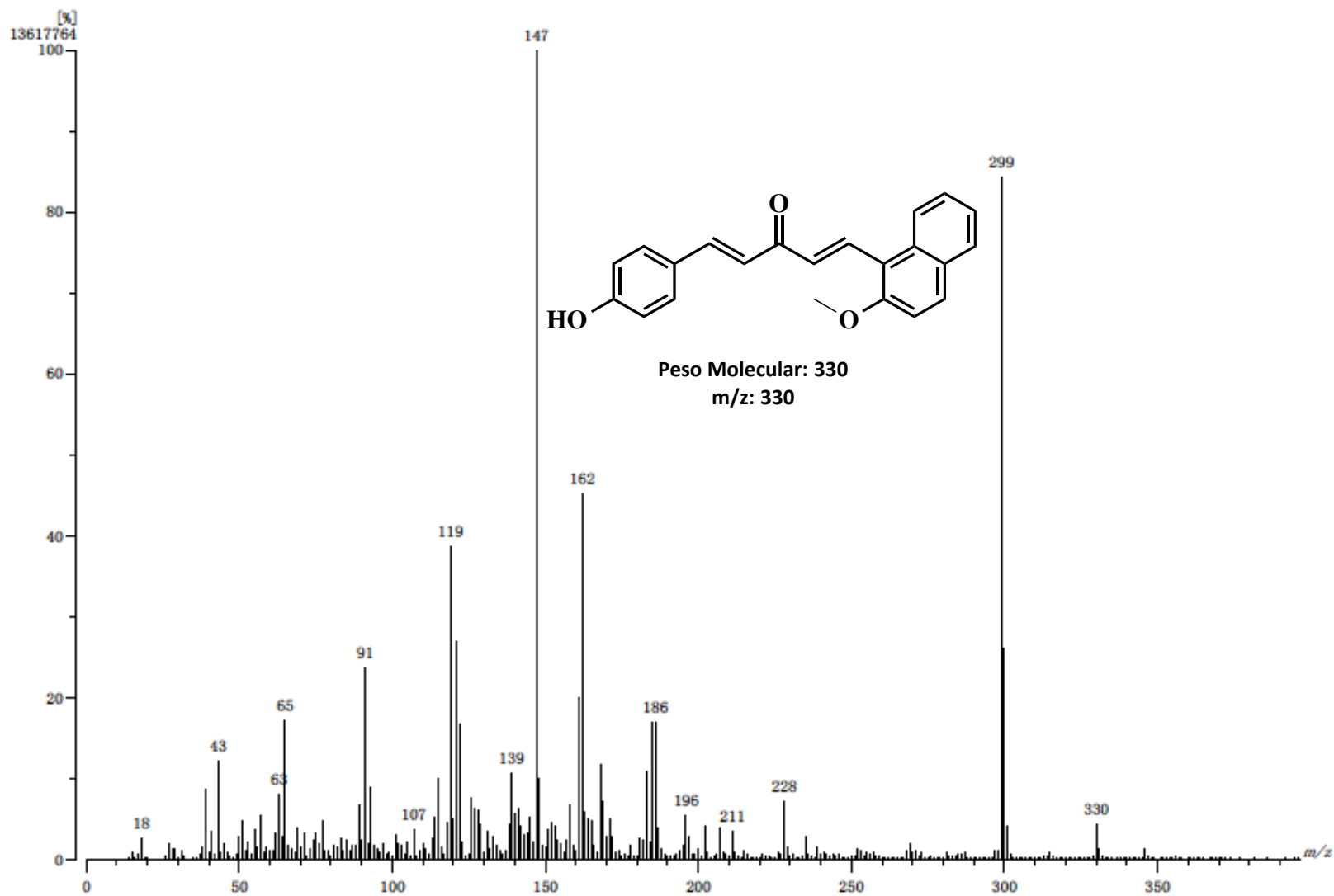


Figura A77. Espectro de Masas del compuesto 61 (IE⁺).

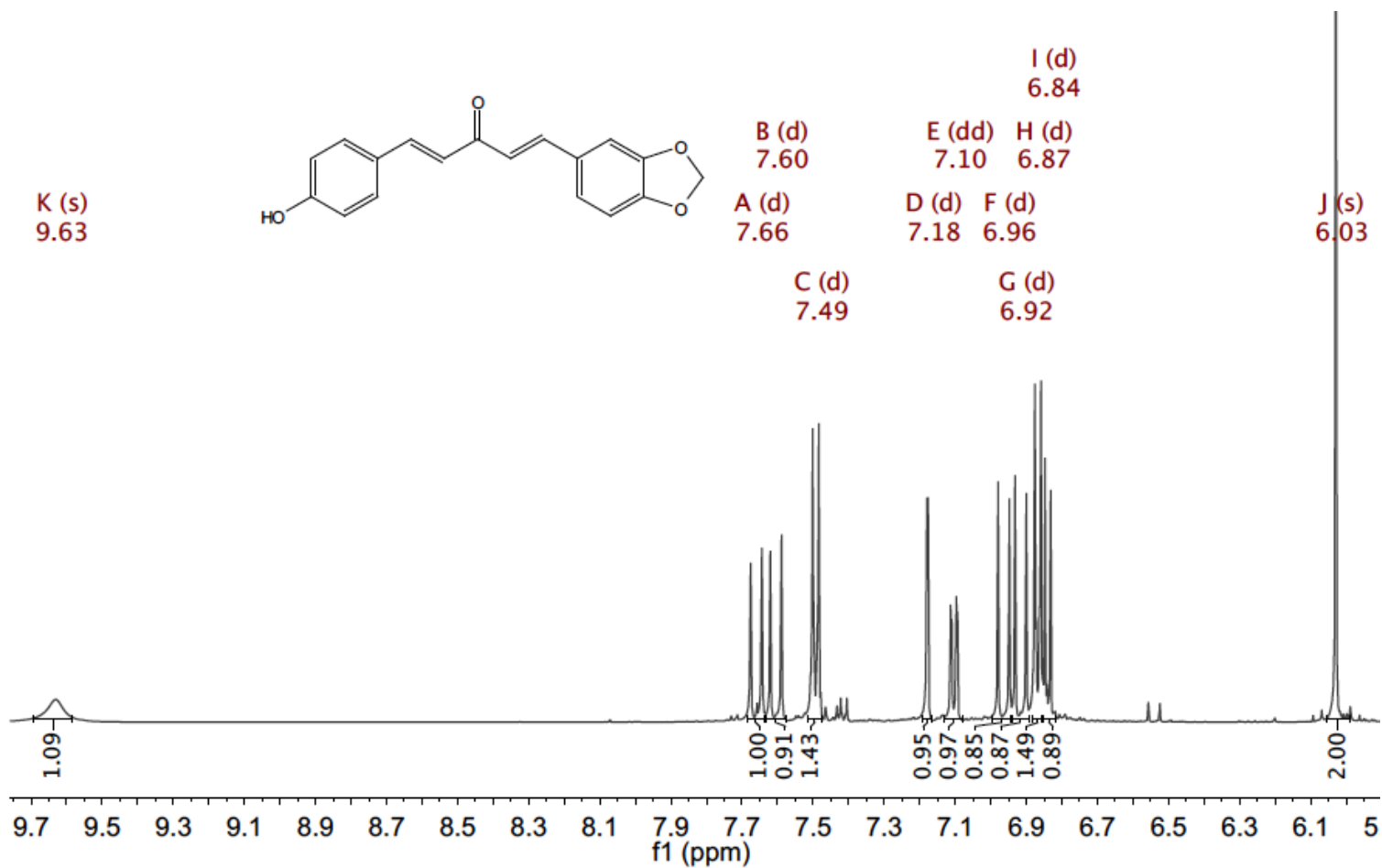


Figura A78. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 62.

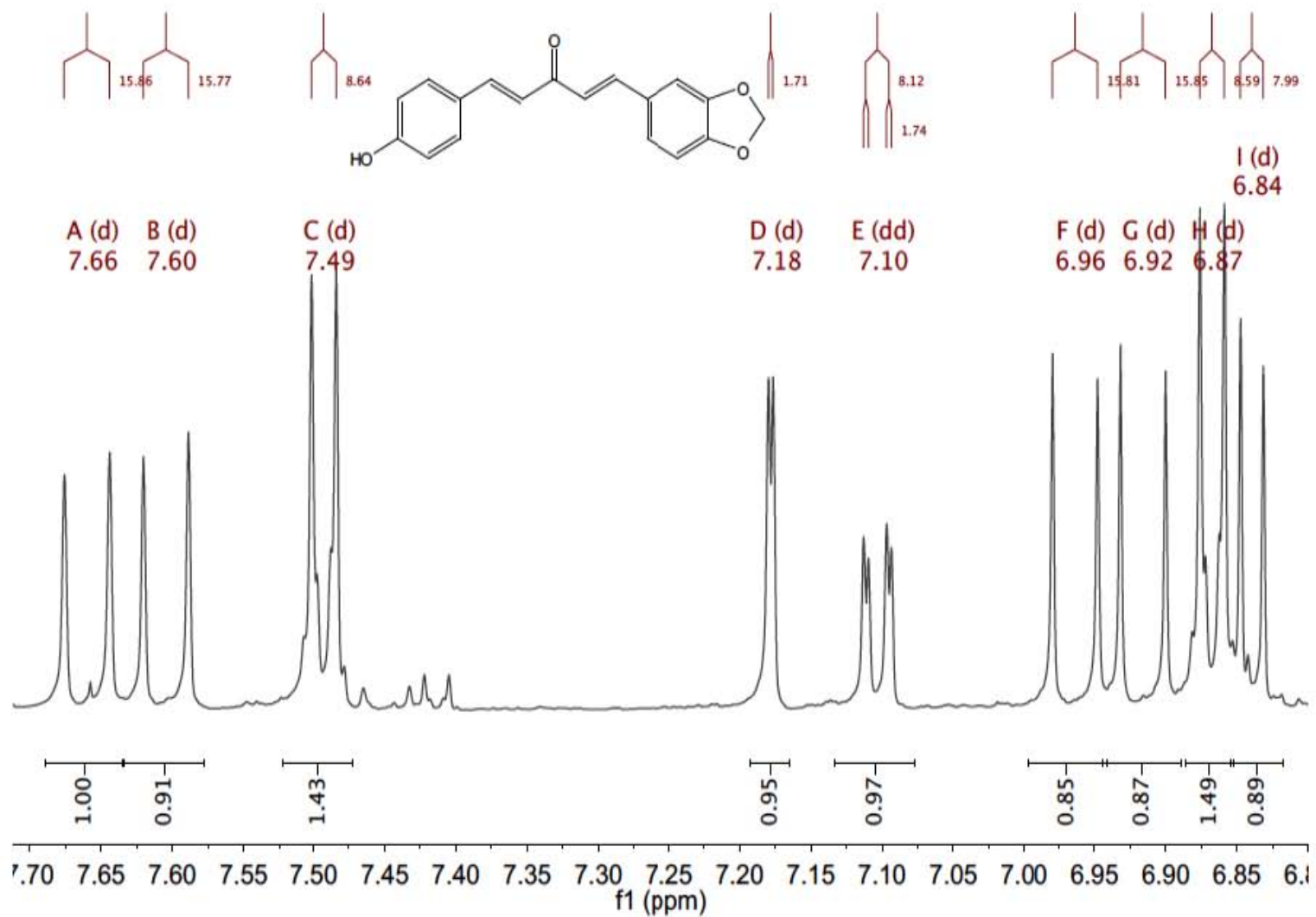


Figura A79. Espectro de RMN de ^1H (sección aromática) del compuesto **62**.

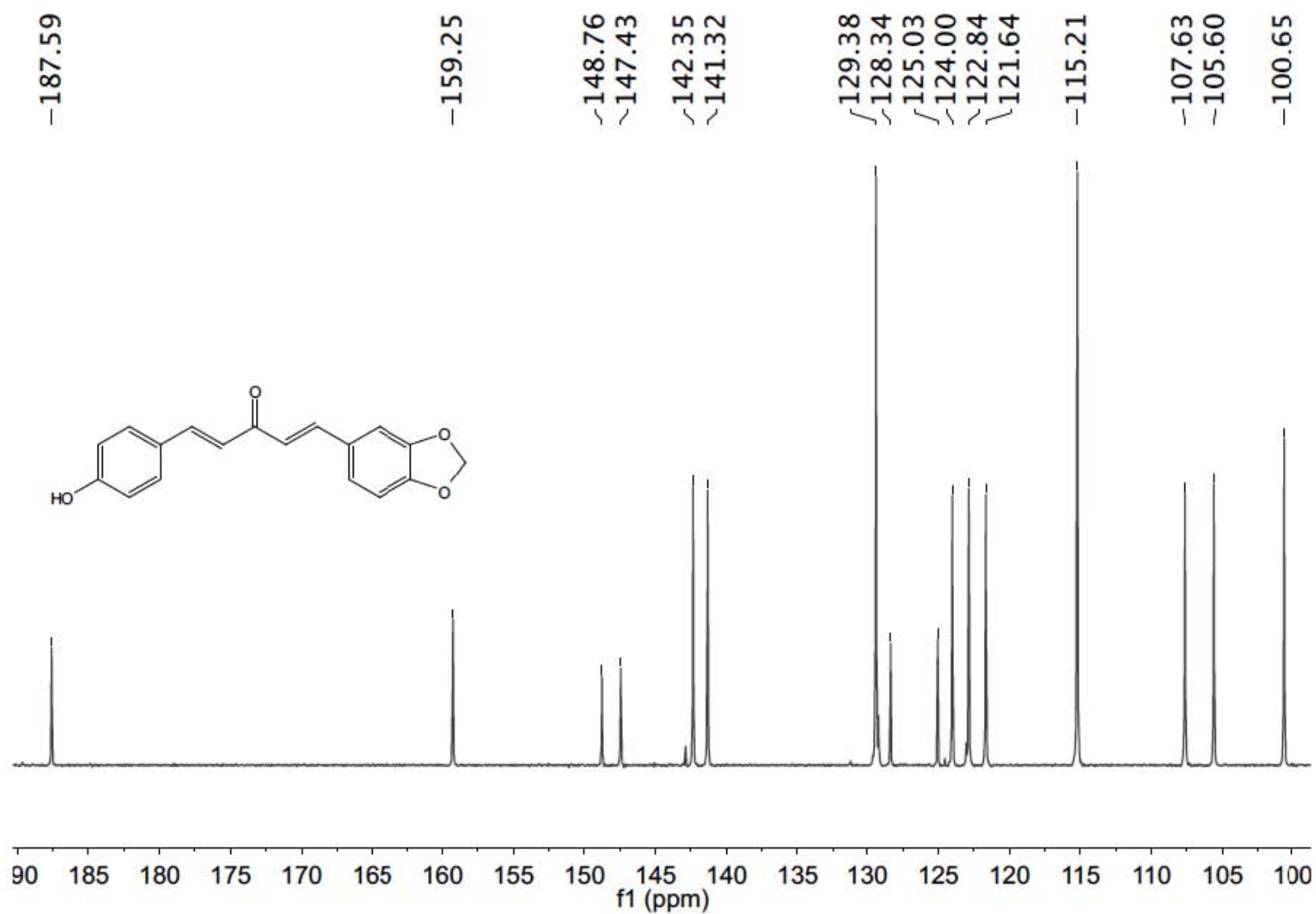


Figura A80. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **62**.

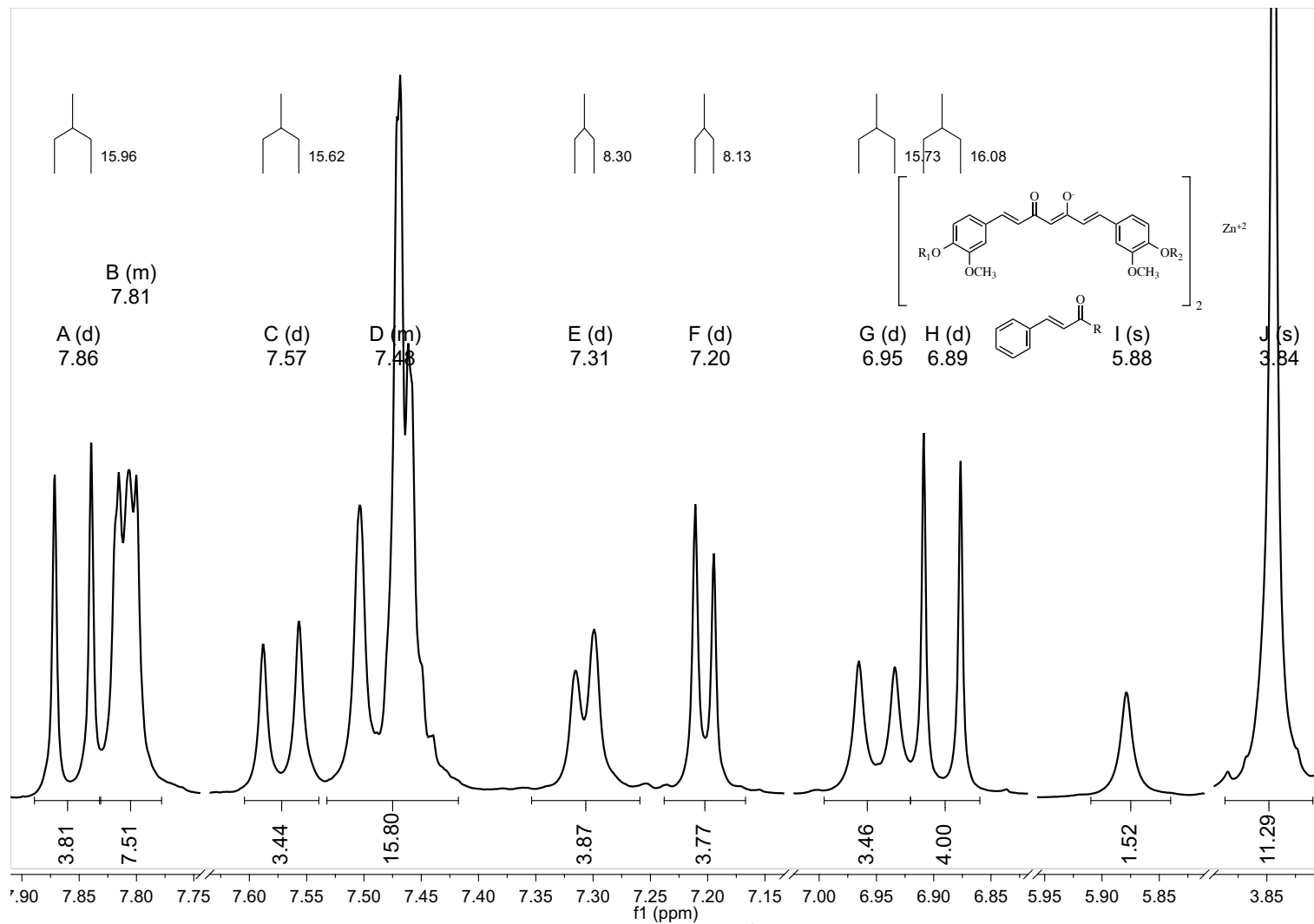


Figura A81. Espectro de RMN de ¹H del compuesto 70.

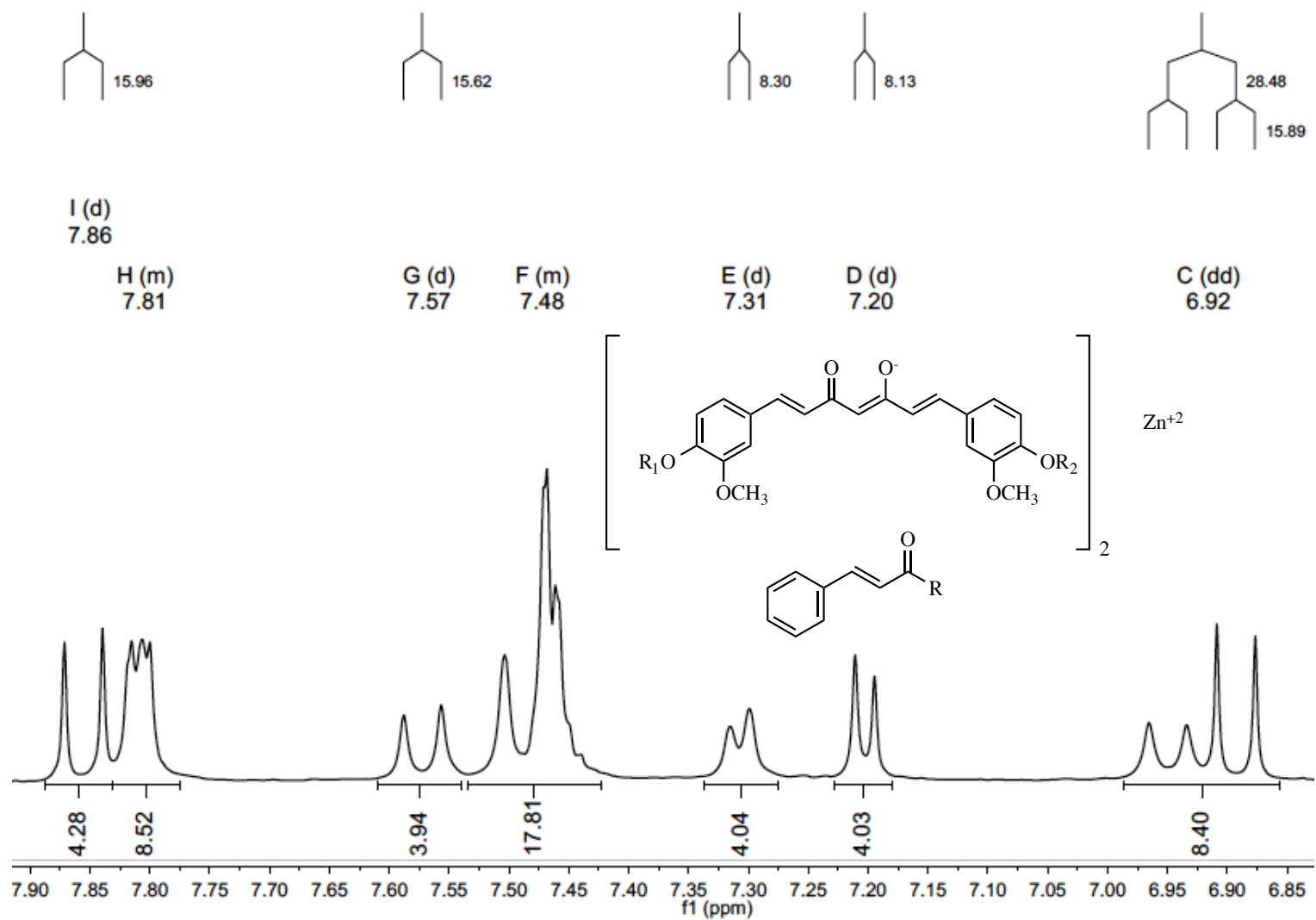


Figura A82. Espectro de RMN de 1H (sección aromática) del compuesto **70**.

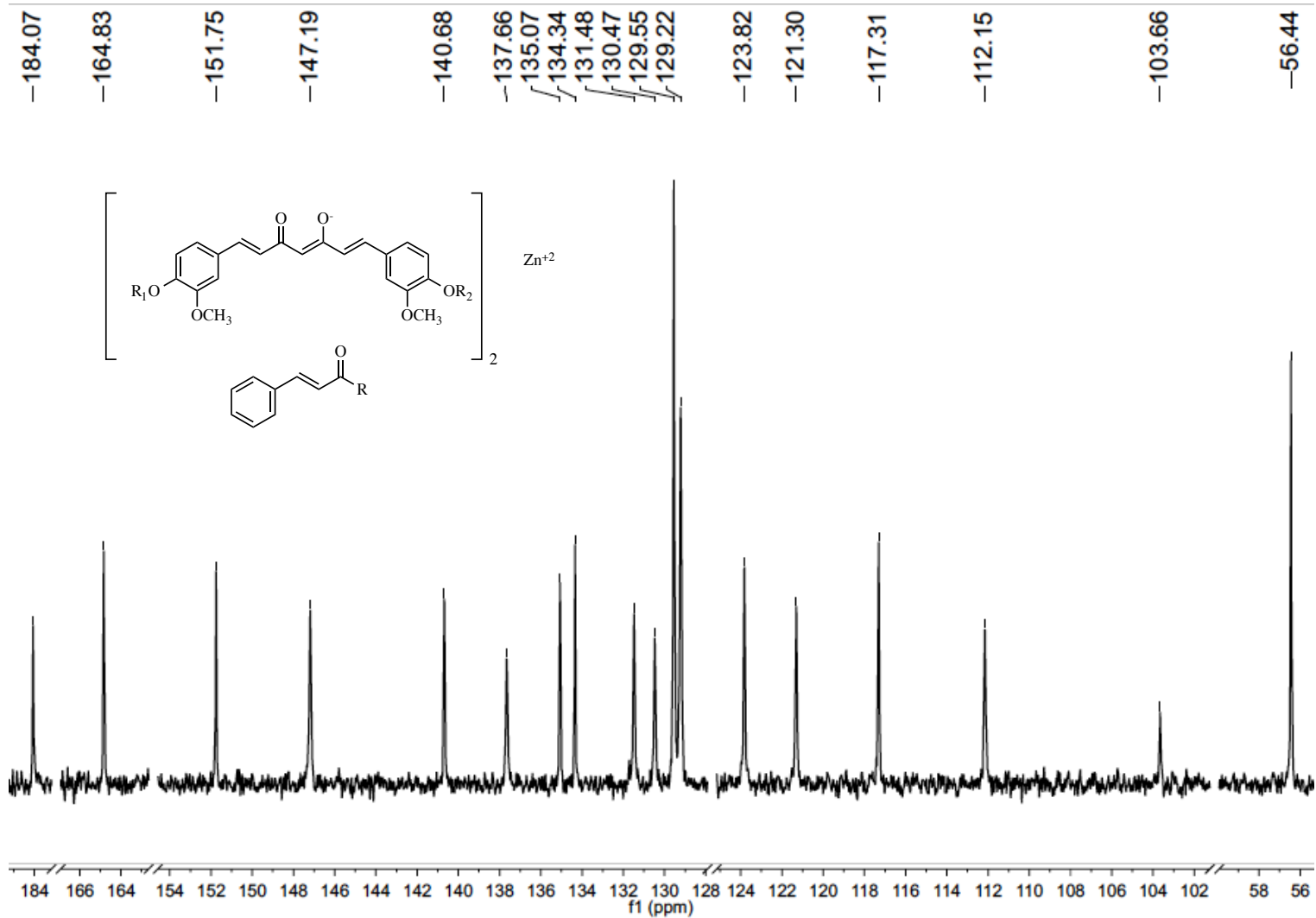


Figura A83. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 70.

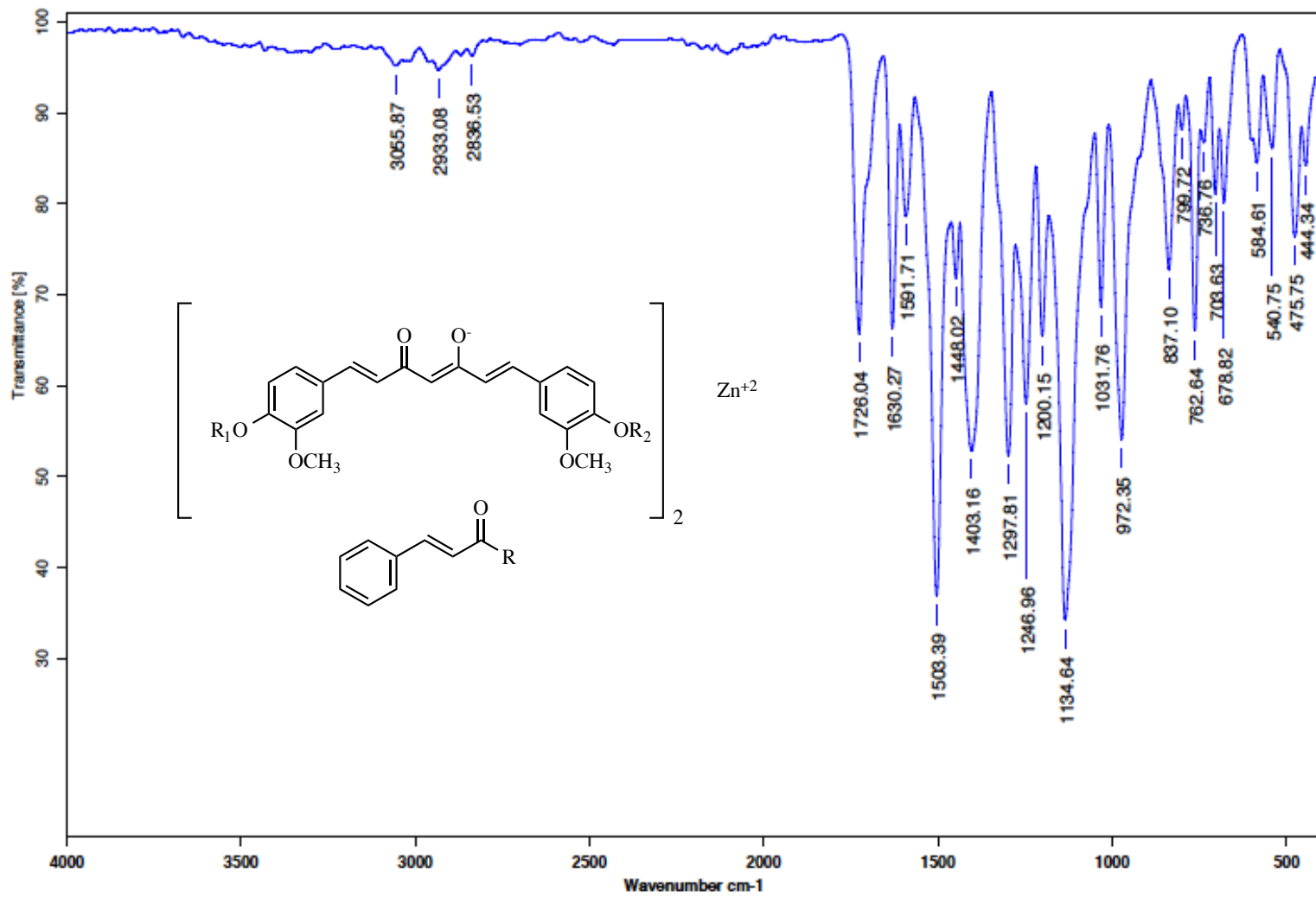


Figura A84. Espectro de IR del compuesto 70 (Pastilla de KBr).

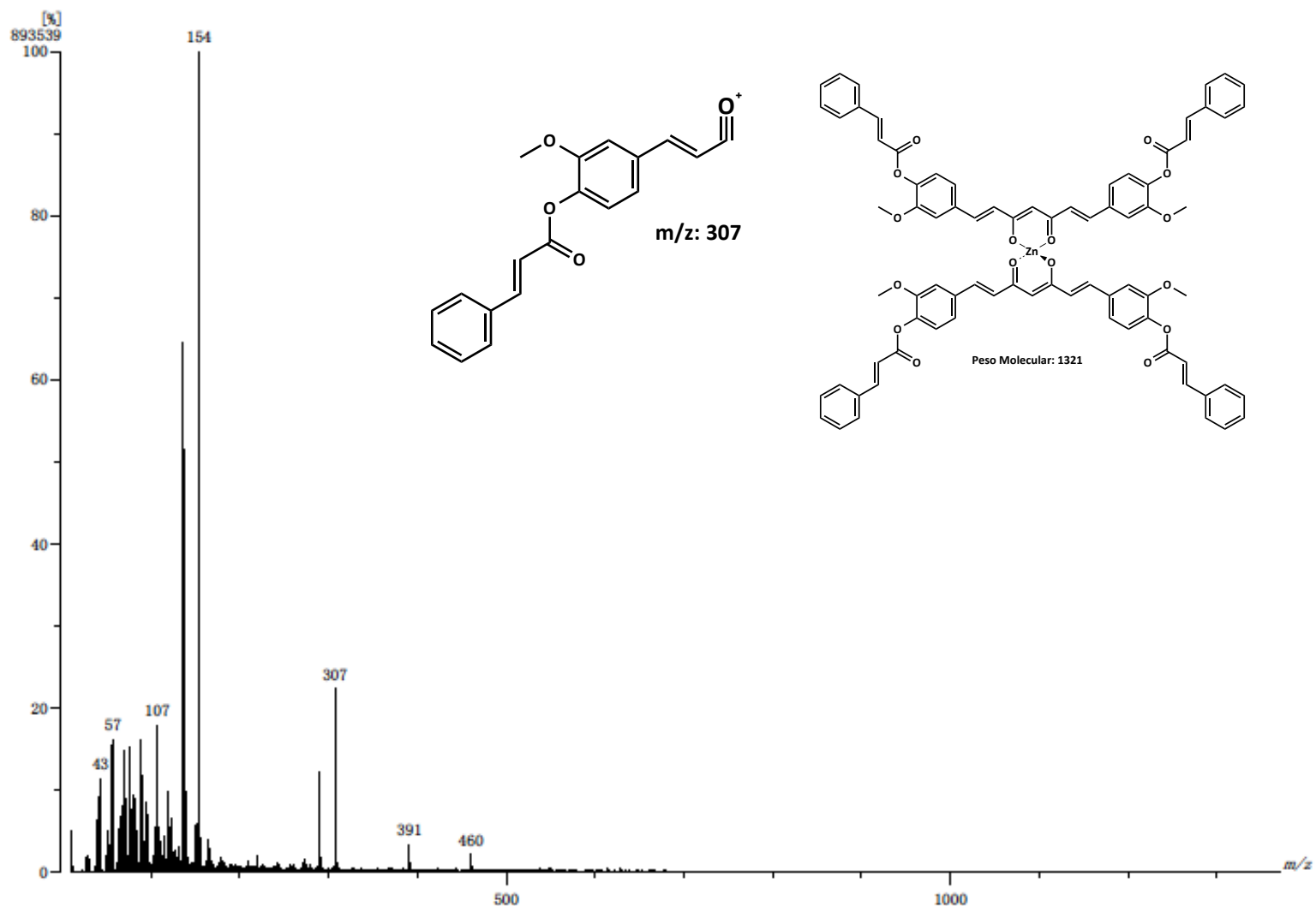


Figura A85. Espectro de Masas del compuesto 70 (FAB⁺, Ion molecular no observado).

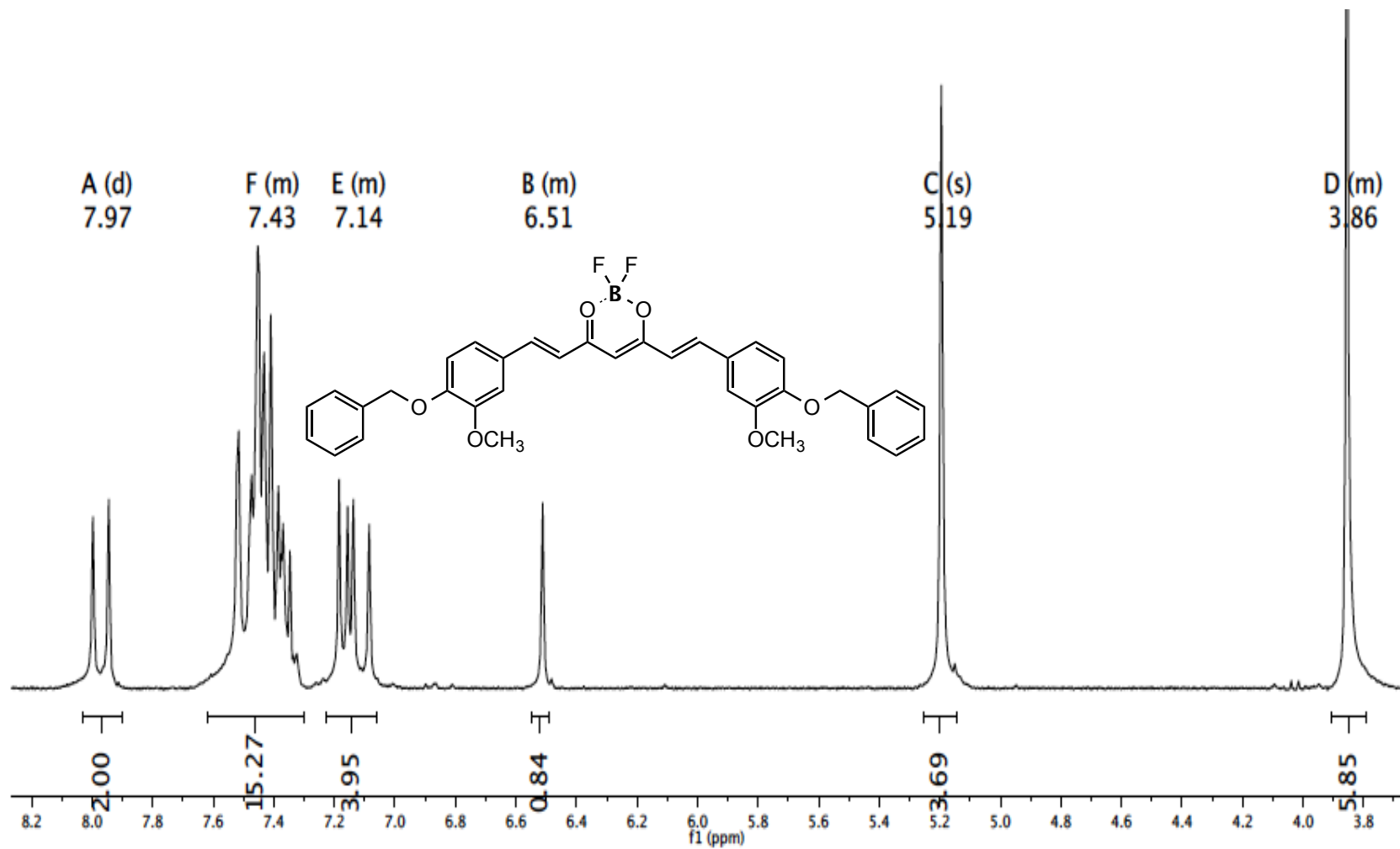


Figura A86. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 71.

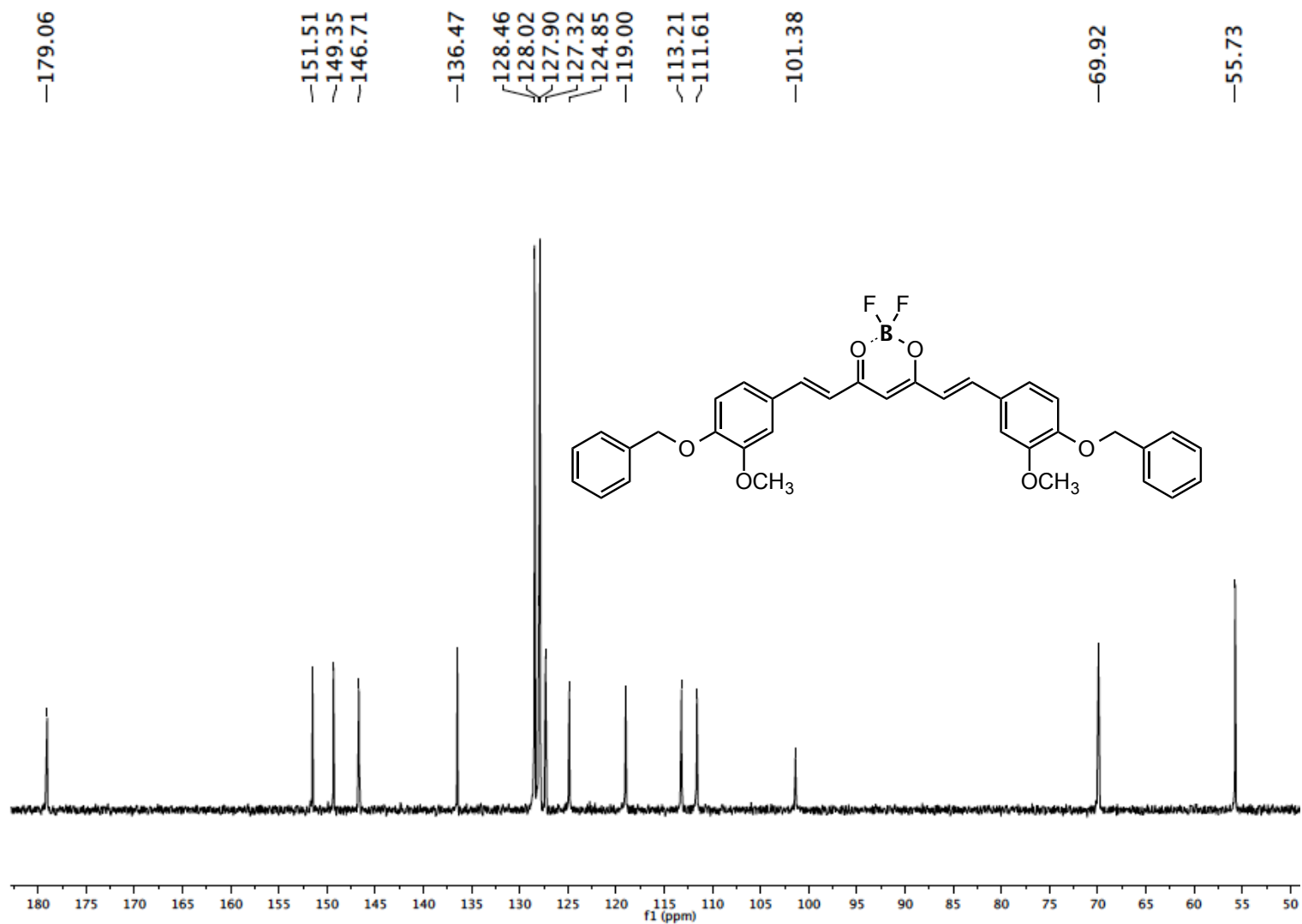


Figura A87. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 71.

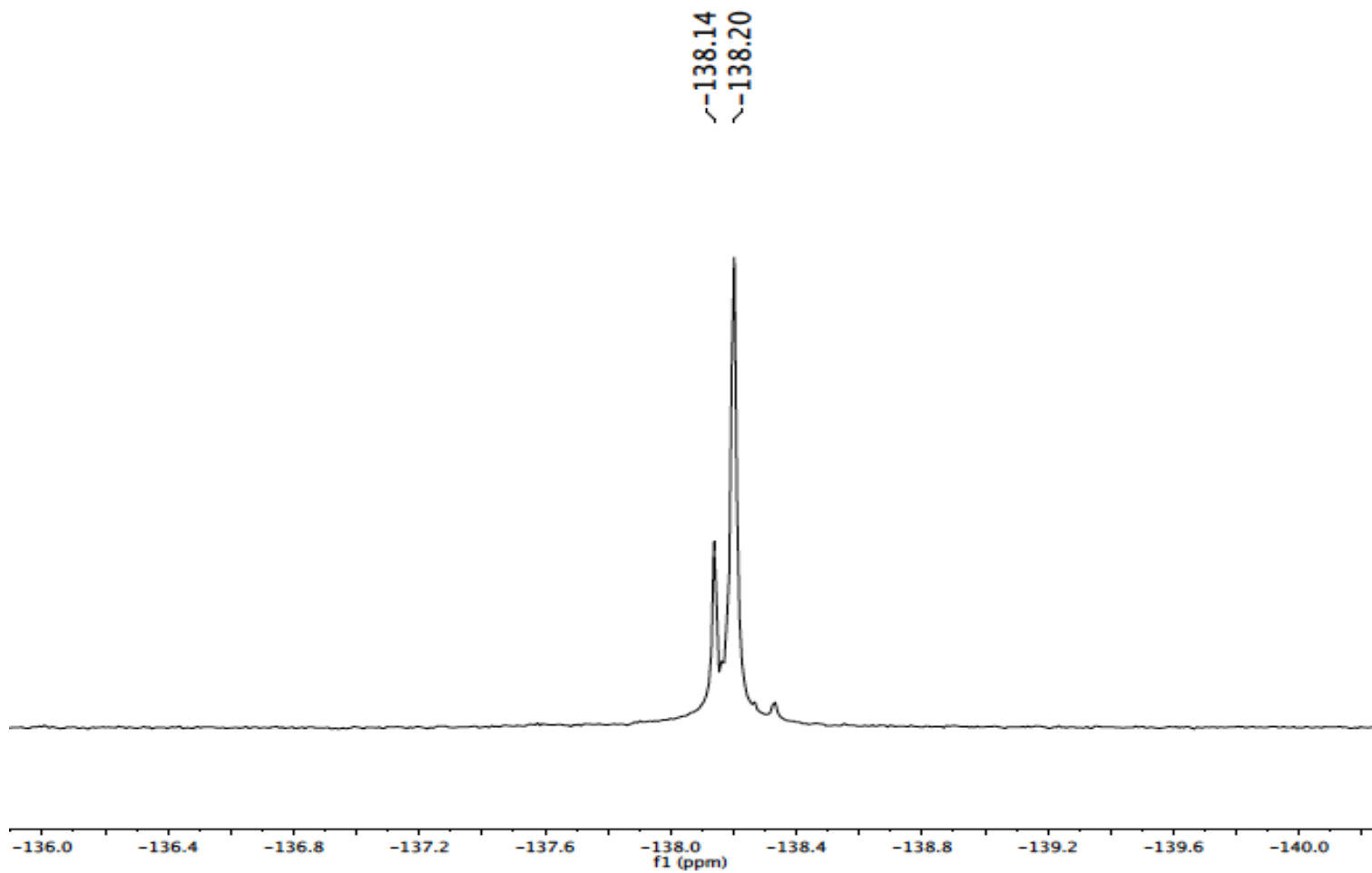


Figura A88. Espectro de Boro del compuesto **71** (DMSO-*d*₆-300MHz).

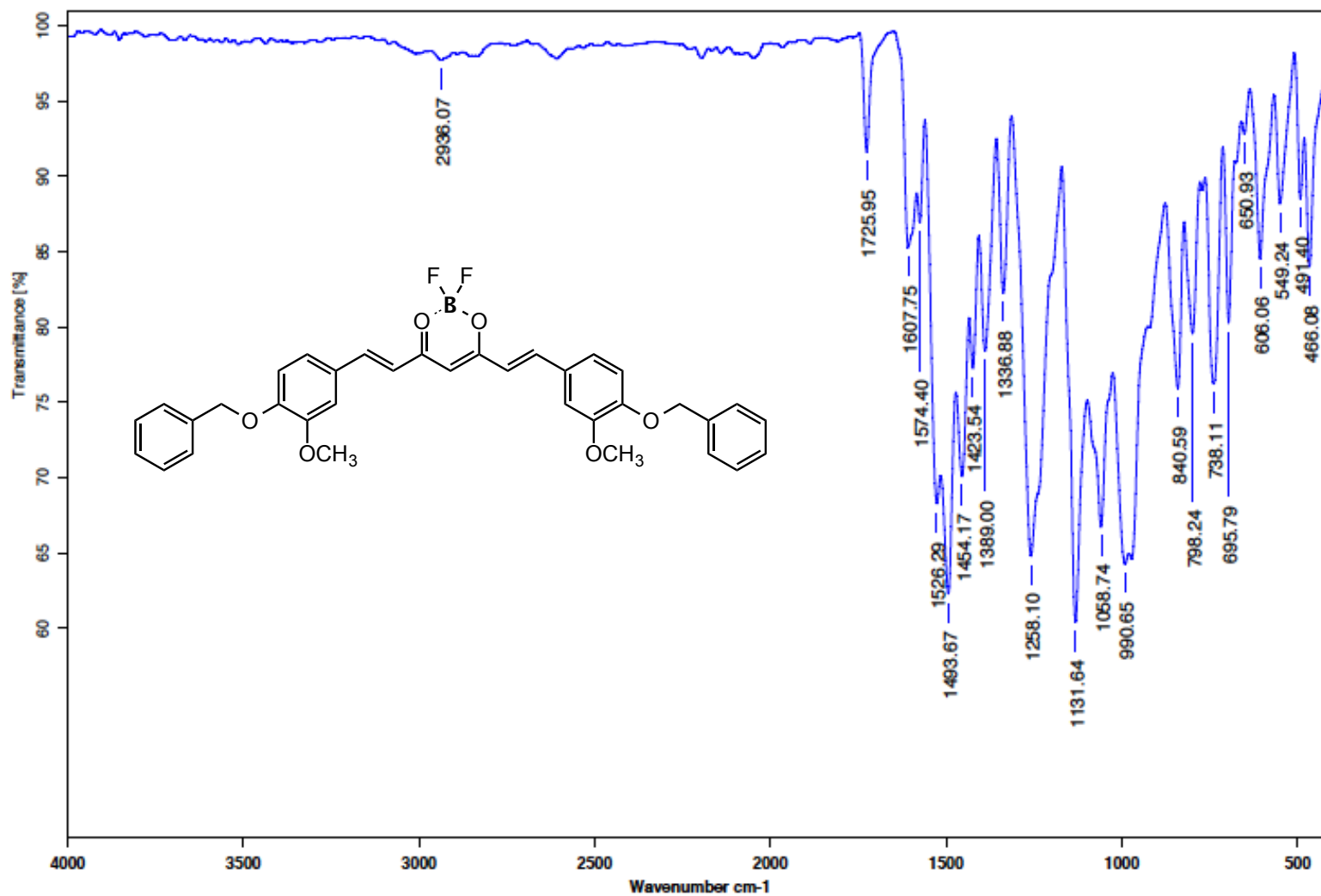
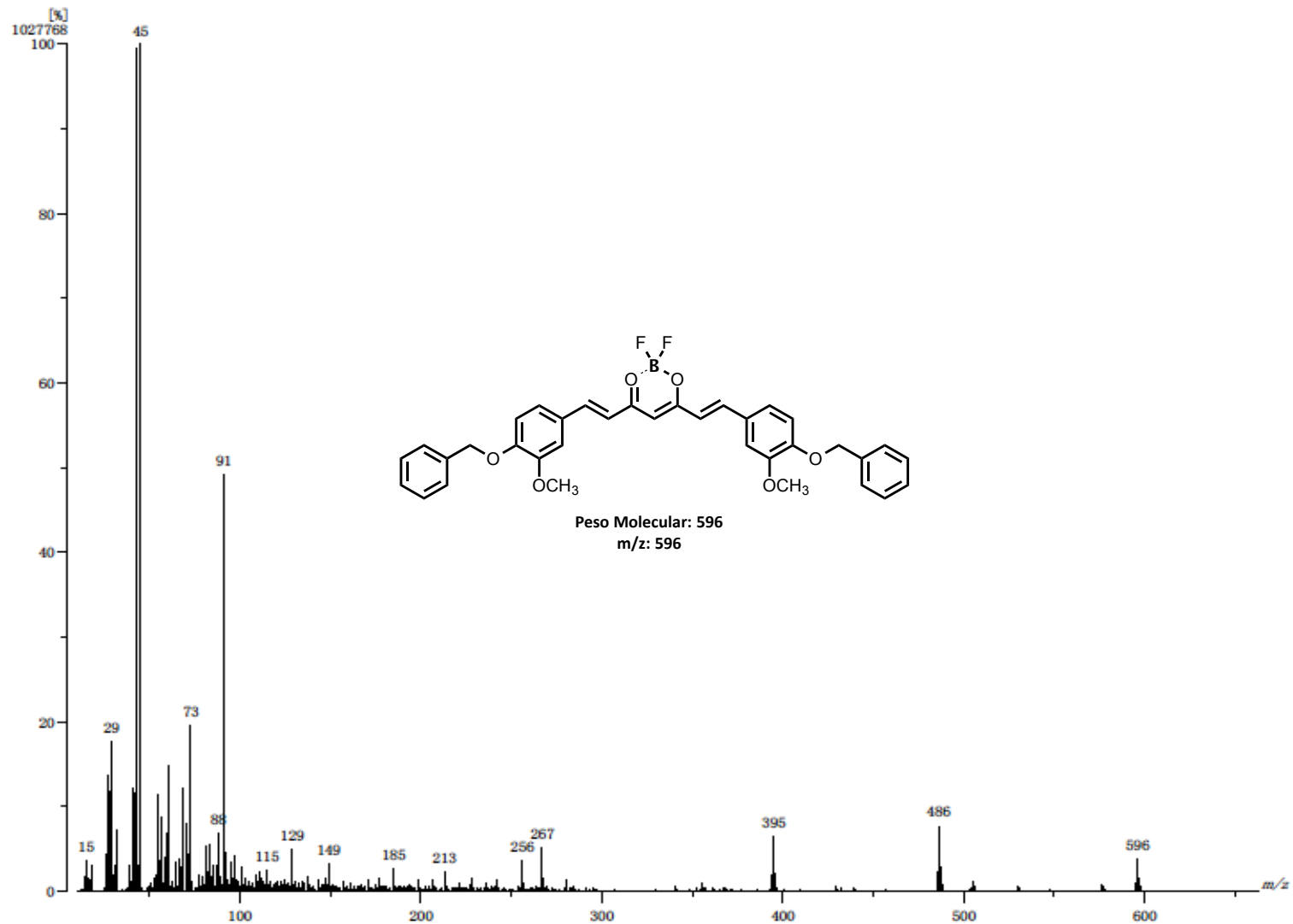


Figura A89. Espectro de IR del compuesto 71 (Pastilla de KBr).



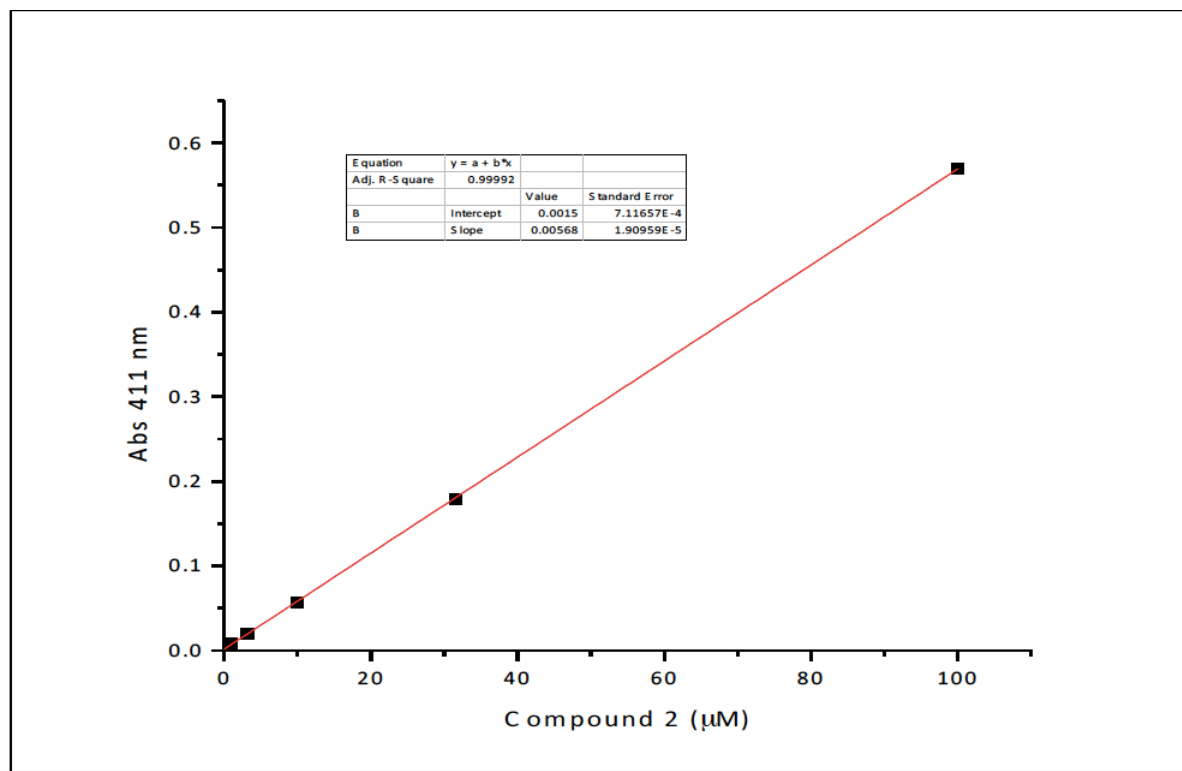


Figura A91. Curva estándar del compuesto **64**.

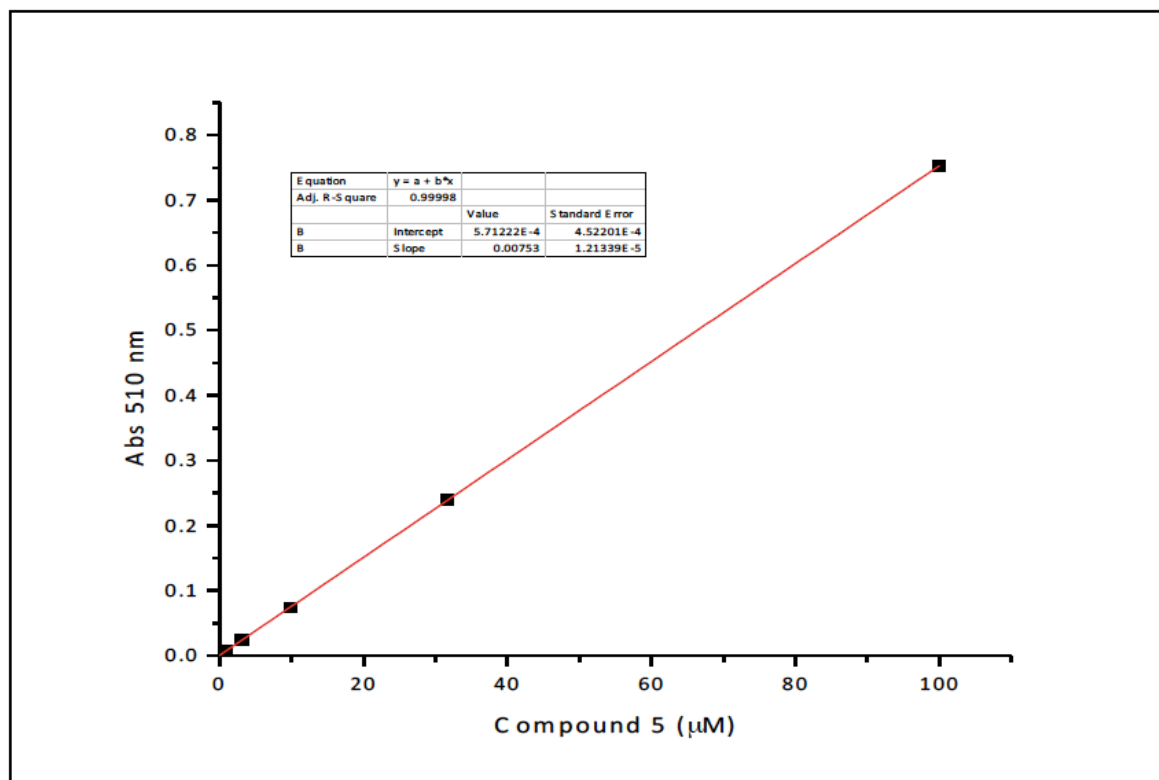
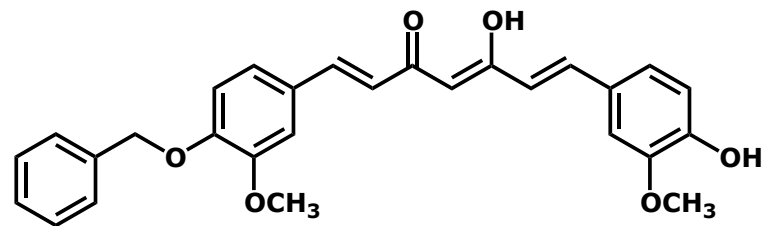
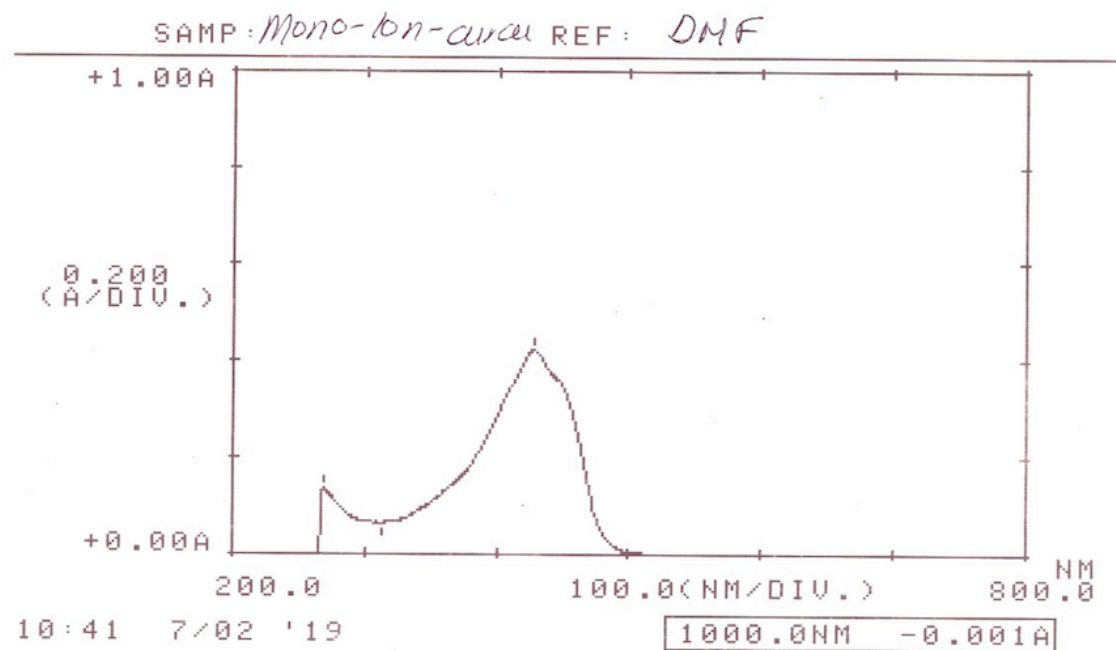


Figura A92. Curva estándar del compuesto 71.



*** PEAK-PICK ***

λ	ABS	λ	ABS
428.0	0.421	738.0	-0.001
269.0	0.135	312.0	0.065
		214.0	-0.677



no. 991

Figura A93. Espectro de UV del compuesto **63**.

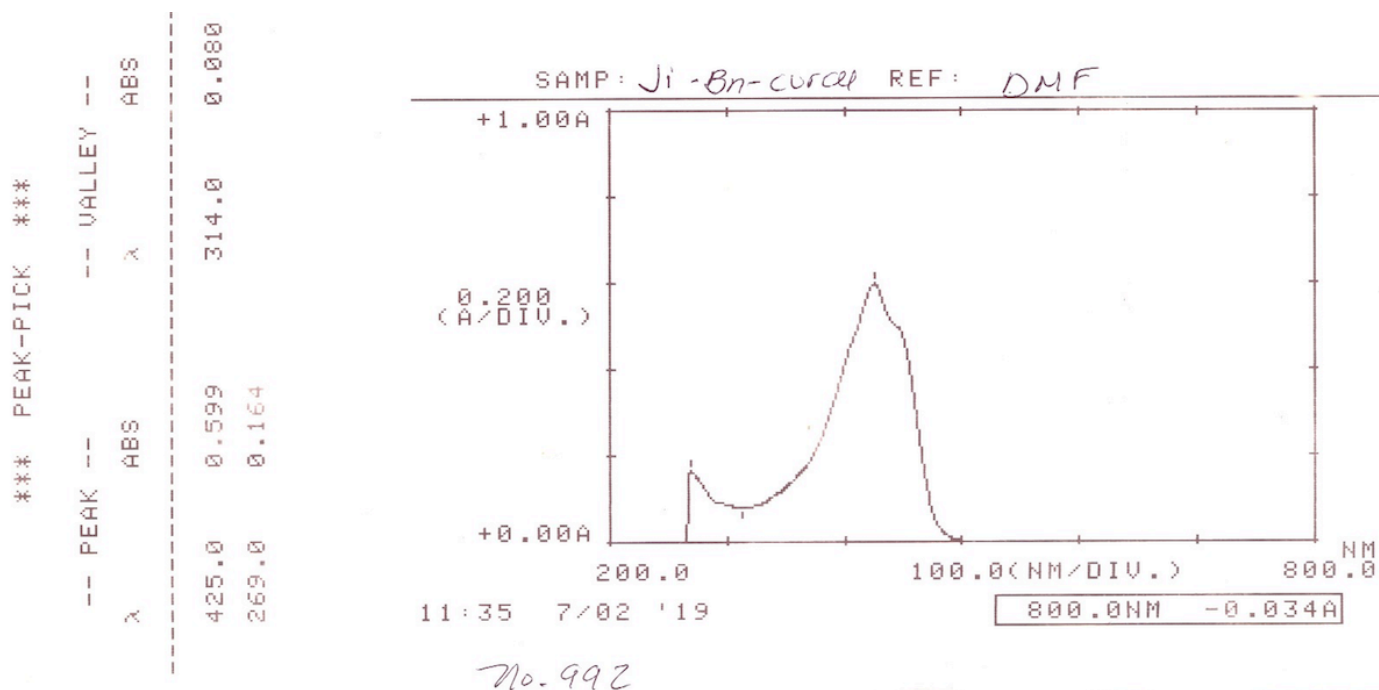
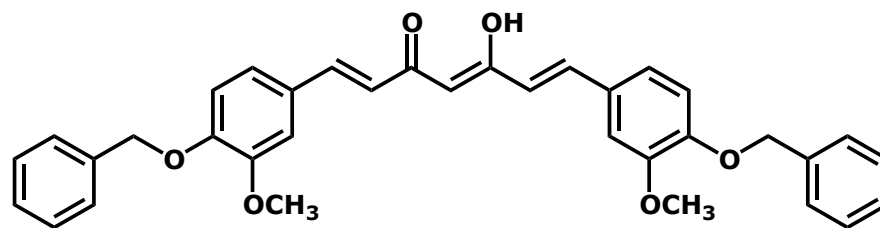
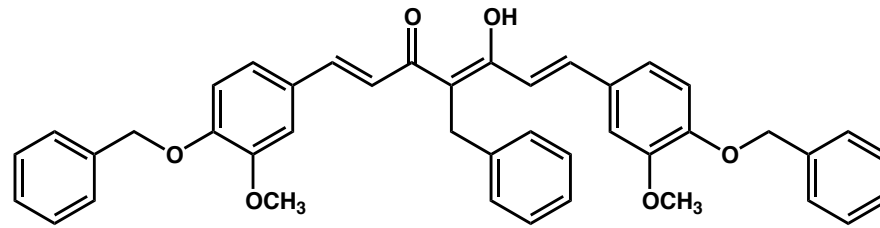
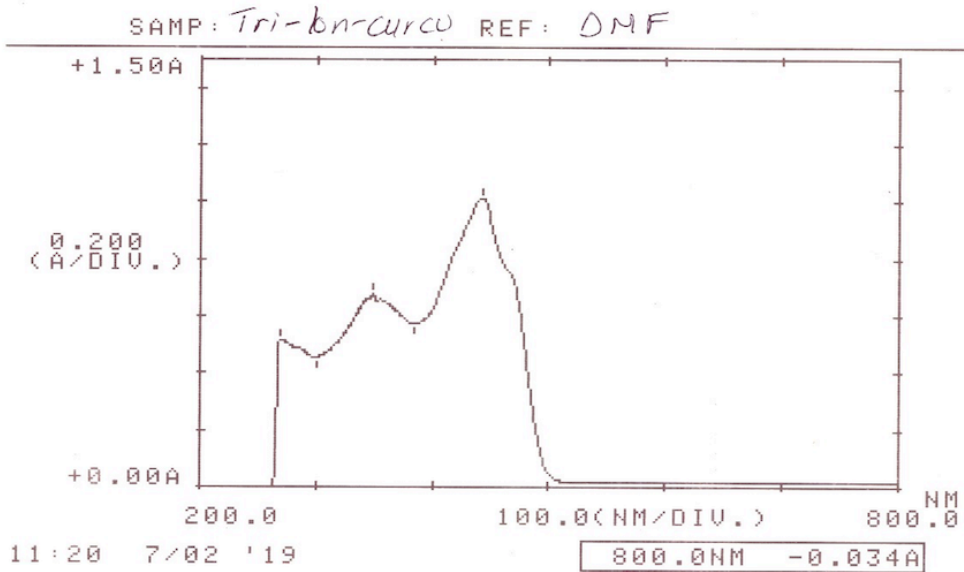


Figura A94. Espectro de UV del compuesto **64**.



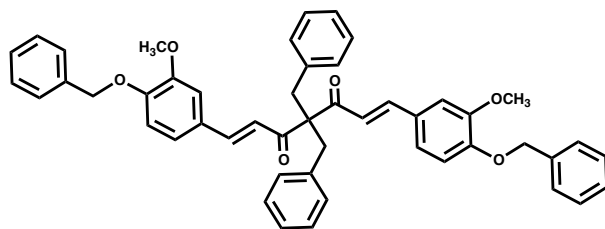
*** PEAK-PICK ***

λ	PEAK --	ABS	VALLEY --	λ	ABS
442.0	1.014	0.014	538.0	0.014	
348.0	0.674	0.571	384.0	0.571	
270.0	0.518	0.454	300.0	0.454	



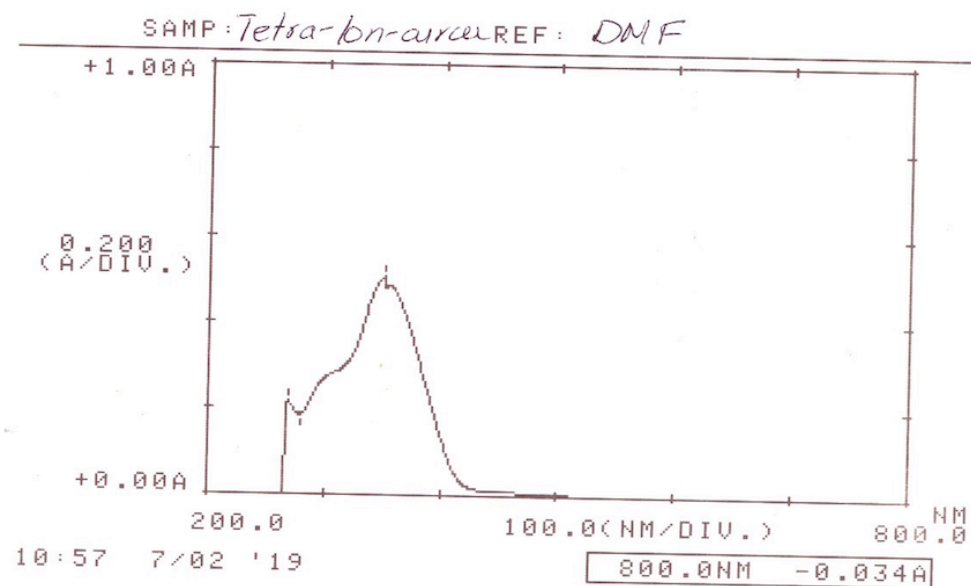
No. 993

Figura A95. Espectro de UV del compuesto 65.



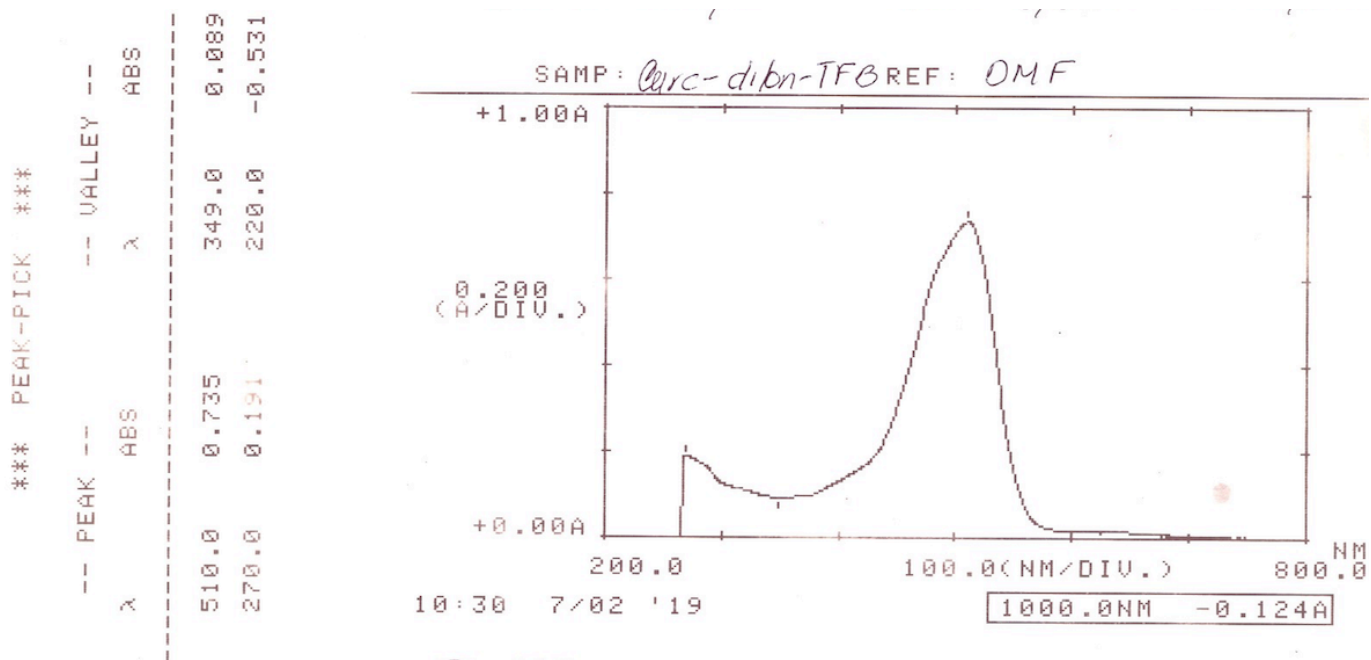
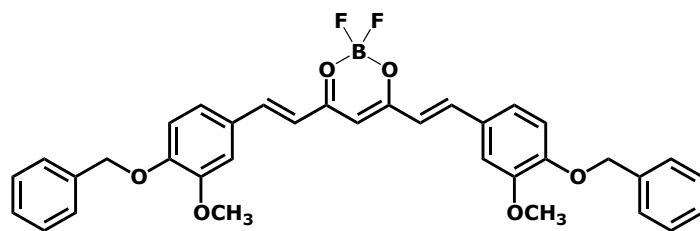
*** PEAK-PICK ***

--- PEAK ---	--- VALLEY ---
λ	λ
ABS	ABS
350.0	704.0
0.507	0.000
269.0	279.0
0.215	0.185
	210.0
	-0.911



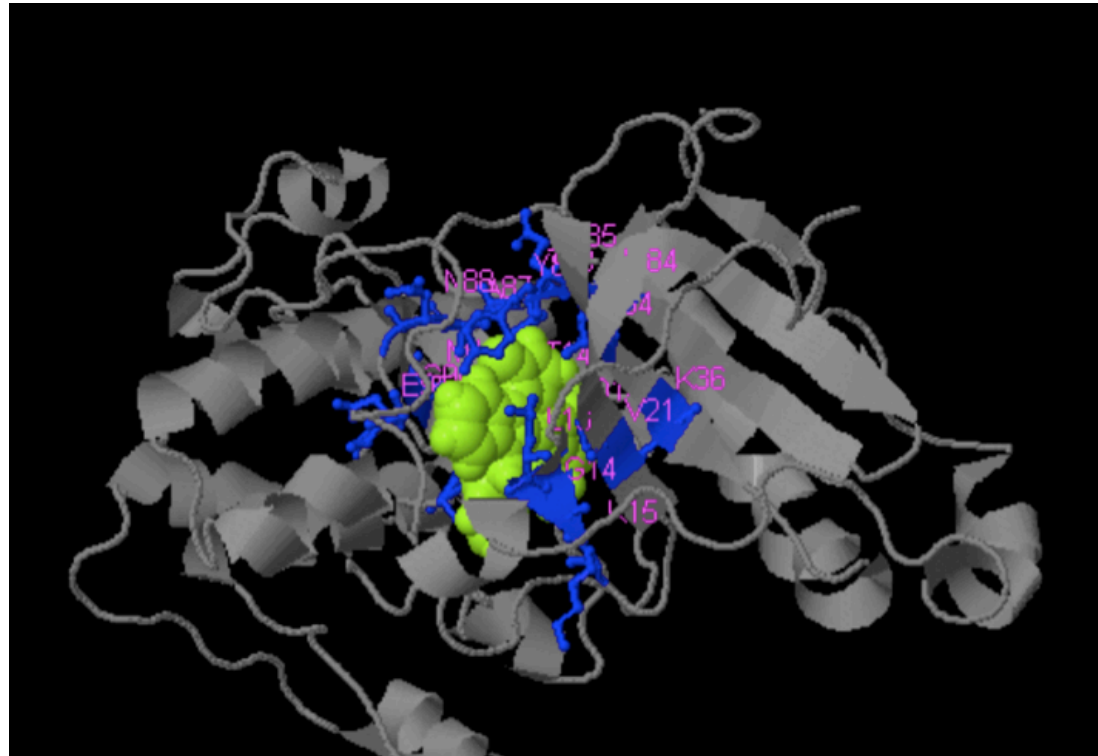
No. 994

Figura A96. Espectro de UV del compuesto 66.



No. 995

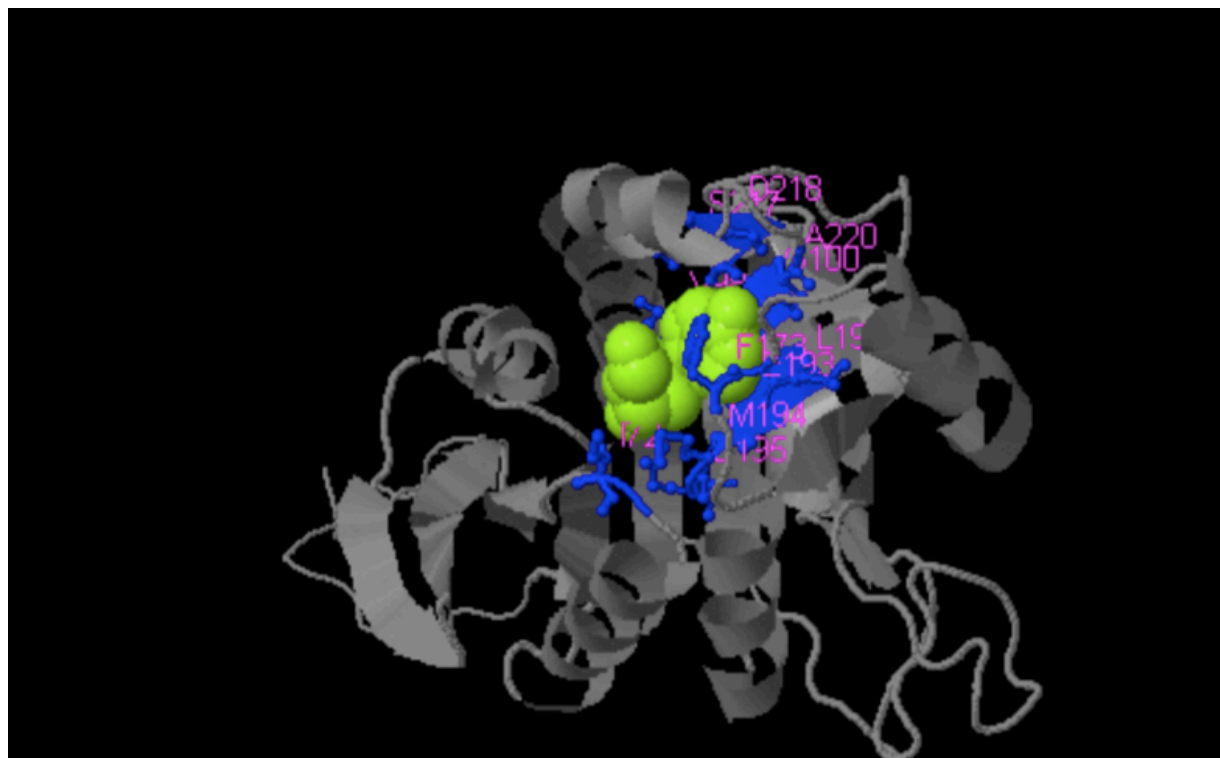
Figura A97. Espectro de UV del compuesto 71.



Aminoácidos del sitio de unión.

LEUCINA; n=13, GLICNA; n=14, LISINA; n=15, VALINA; n=21, ALANINA; n=34, LISINA; n=36, TREONINA; n=68, METIONINA; n=84, ÁCIDO GLUTAMICO; n=85, TIROSINA; n=86, ALANINA; n=87, ASPARAGINA; n=88, GLICINA; n=90, GLUTAMINA; n=91, GLUTAMINA; n=134, ASPARAGINA; n=135, METIONINA; n=137, TREONINA; n=147, ÁCIDO ASPARTICO; n=148.

Figura A98. Sitio de unión de la proteína **Akt-2**.



Aminoácidos del sitio de unión.

ISOLEUCINA; n=72, VALINA; n=98, ALANINA; n=99, GLICINA; n=100, FENILALANINA; n=173, LEUCINA; n=192, ÁCIDO GLUTAMICO; n=193, METIONINA; n=194, ÁCIDO GLUTAMICO; n=195, SERINA; n=217, ÁCIDO ASPARTICO; n=218, ALANINA; n=219.

Figura A99. Sitio de unión de la proteína NF- $\kappa\beta$ (A).



Aminoácidos del sitio de unión.

ARGININA; n=17, TIROSINA; n=20, CISTEINA; n=22, ÁCIDO GLUTAMICO; n=23, TREONINA; n=100, LISINA; n=101, LISINA; n=197, PROLINA; n=199, LISINA; n=228, GLUTAMINA; n=230, LISINA; n=231, FENILALANINA; n=262.

Figura A100. Sitio de unión de la proteína NF- κ β (B).

15. Publicaciones Internacionales.

Article

Retro-Curcuminoids as Mimics of Dehydrozingerone and Curcumin: Synthesis, NMR, X-ray, and Cytotoxic Activity

Marco A. Obregón-Mendoza ¹, María Mirian Estévez-Carmona ¹, Simón Hernández-Ortega ¹, Manuel Soriano-García ¹, María Teresa Ramírez-Apan ¹, Laura Orea ², Hugo Pilotzi ², Dino Gnecco ², Julia Cassani ^{3,*} and Raúl G. Enríquez ^{1,*}

¹ Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México, D.F. C.P. 04510, Mexico; obregonmendoza@yahoo.com.mx (M.A.O.-M.); mirianestevenc@gmail.com (M.M.E.-C.); shernandezortega@gmail.com (S.H.-O.); soriano@unam.mx (M.S.-G.); mtrapan@yahoo.com.mx (M.T.R.-A.)

² Centro de Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla C.P. 72570, Mexico; maria.orea@correo.buap.mx (L.O.); iken18@hotmail.com (H.P.); gneccod@yahoo.com.mx (D.G.)

³ Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, México, D.F. C.P. 04960, Mexico

* Correspondence: cassani@correo.xoc.uam.mx (J.C.); enriquezhabib@gmail.com (R.G.E.); Tel.: +52-55-5483-7255 (J.C.); +52-55-5622-4404 (R.G.E.)

Academic Editor: Derek J. McPhee

Received: 24 November 2016; Accepted: 16 December 2016; Published: 29 December 2016

Abstract: Curcumin and its derivatives have been extensively studied for their remarkable medicinal properties, and their chemical synthesis has been an important step in the optimization of well-controlled laboratory production. A family of new compounds that mimic the structure of curcumin and curcuminoids, here named *retro*-curcuminoids (**7–14**), was synthesized and characterized using 1D ¹H- and ¹³C-NMR, IR, and mass spectrometry; the X-ray structure of **7**, **8**, **9**, **10**, **12**, **13**, and **14** are reported here for the first time. The main structural feature of these compounds is the reverse linkage of the two aromatic moieties, where the acid chloride moiety is linked to the phenolic group while preserving α , β -unsaturated ketone functionality. The cytotoxic screening of **7**, **8**, **9**, and **10** at 50 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was carried out with human cancer cell lines K562, MCF-7, and SKLU-1. Lipid peroxidation on rat brain was also tested for compounds **7** and **10**. Compounds **7**, **8**, and **10** showed relevant cytotoxic activity against these cancer cell lines, and **10** showed a protective effect against lipid peroxidation. The molecular resemblance to curcuminoids and analogs with *ortho* substituents suggests a potential source of useful bioactive compounds.

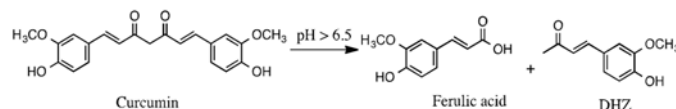
Keywords: *retro*-curcuminoids; curcuminoid; curcumin; α , β -unsaturated-ketone; dehydrozingerone

1. Introduction

Curcumin (diferuloylmethane), a natural product used in traditional medicine, has been extensively studied for its multiple pharmacological effects on biological systems, to understand its chemical properties, and to improve its poor bioavailability [1]. A large number of studies have described the multiple beneficial medicinal properties from different points of view [2]. Curcumin has been used as a naturally-occurring resource for the treatment of numerous inflammatory diseases, and studies have confirmed that it possesses antiproliferative activity against several tumor cells in vitro [3]. Previous reports have described curcumin as a potent antioxidant with free radical scavenging activity [4] and a well-described therapeutic agent against Alzheimer disease [5,6] or recently as a molecular probe in the diagnostic imaging technique near-infrared fluorescence (NIRF),

which is useful in the monitoring of amyloid beta species on Alzheimer patients [7]. Moreover, several chemical analogs, derivatives, and precursors of curcumin, both natural and synthetic, have shown such activity and also action against inflammatory diseases [8,9].

In 1973, Roughley and Whiting [10] reported the instability of curcumin in alkaline medium and explained its alkaline degradation. Later, Sardjiman and co-workers [11] reported that at pH higher than 6.5, curcumin decomposes into several molecular fragments, mainly ferulic acid and dehydrozingerone (DHZ), as shown in Scheme 1.



Scheme 1. Degradation products of curcumin.

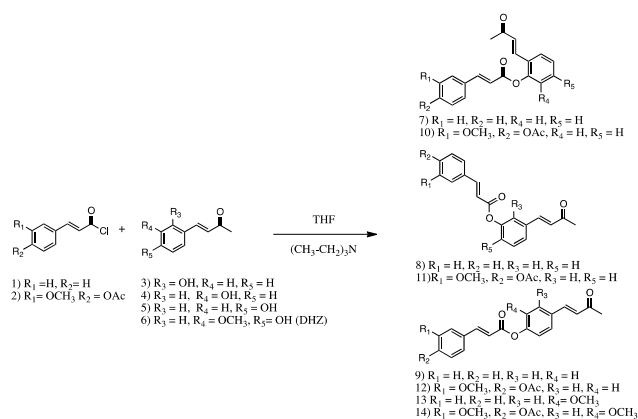
Ferulic acid, a precursor of the biosynthesis of curcumin, has been described as a compound with antitumoral, chemo-preventive, and photo-protective biological properties [12]. DHZ is a phenolic compound structurally related to biosynthesis or degradation of curcumin and is present as a minor component in the rhizomes of *Zingiber officinale* Roscoe (ginger). In numerous studies, DHZ has been shown to have radioprotective, antimicrobial, pro-healing, antioxidant, anti-Parkinson, anti-Alzheimer, antimutagenic, antitumor, anti-cancer, anti-depressant, anti-platelet, and antidiarrheal pharmacological activities [13–16].

Ferulic acid and DHZ are versatile chemical intermediates in organic synthesis with several bonding possibilities. We, therefore, decided to explore a modified linkage of such moieties involving the bond of the phenolic group of DHZ and related compounds, for example, acetylated ferulic acid [(*E*)-4-(3-chloro-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2-methoxyphenyl acetate], via the acid chloride derivative of the carboxylic functionalities and the corresponding phenolic group of the second moiety. The synthesis of what we call *retro*-curcuminoids was achieved by reaction of the corresponding acid chlorides with the appropriate phenolic moieties. We also explored the inhibition of lipoperoxidation and cytotoxic activity of the new compounds.

2. Results and Discussion

2.1. Structural Features

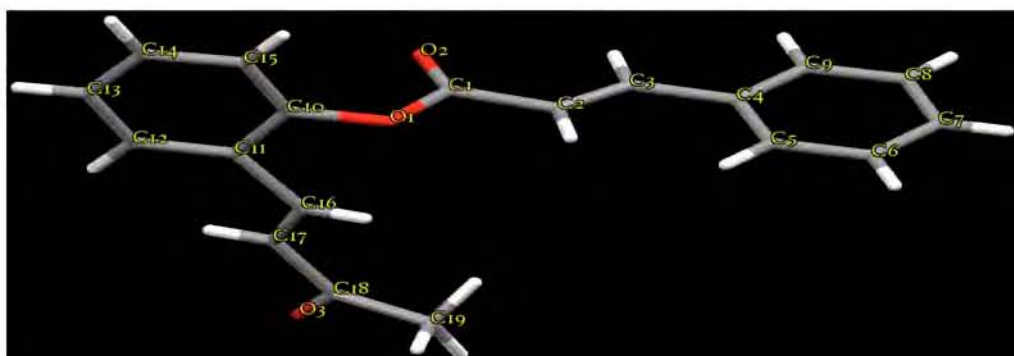
Retro-curcuminoids **7–14** were prepared by esterification of cinnamoyl chloride (**1**) or (*E*)-4-(3-chloro-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2-methoxyphenyl acetate (**2**) with DHZ [(*E*)-4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)but-3-en-2-one] (**6**), and DHZ analogs (*E*)-4-(2-hydroxyphenyl)but-3-en-2-one, (*E*)-4-(3-hydroxyphenyl)but-3-en-2-one, and (*E*)-4-(4-hydroxyphenyl)but-3-en-2-one (**3**, **4**, and **5**), with *ortho*, *meta* and *para* hydroxyl substituents, respectively, as shown in Scheme 2.



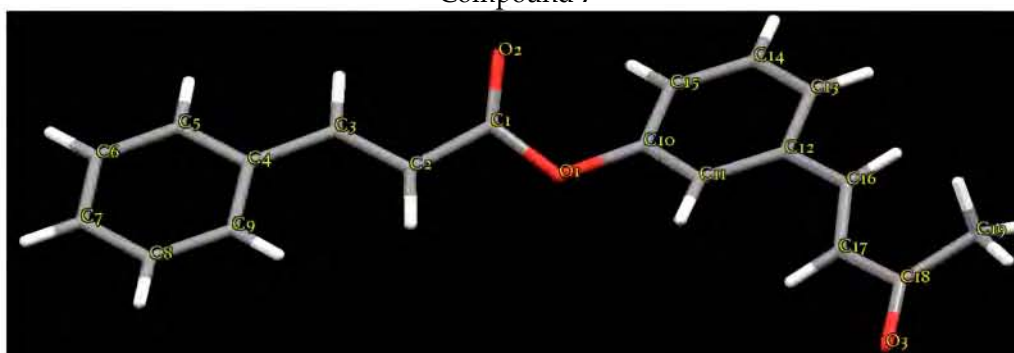
Scheme 2. General synthesis.

2.2: Crystallography

The molecular structures of all seven *retro*-curcuminoids are formed by two aromatic rings (phenyl-C; phenyl-O-) connected by a moiety C(sp²)-C(sp²)-C(sp²)-C(sp²)-O(sp³)-C(sp²) chain of atoms (Figure 1):



Compound 7



Compound 8

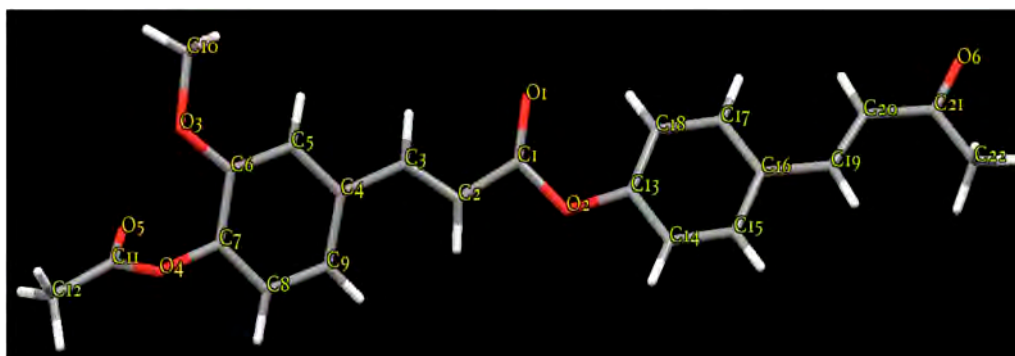


Compound 9

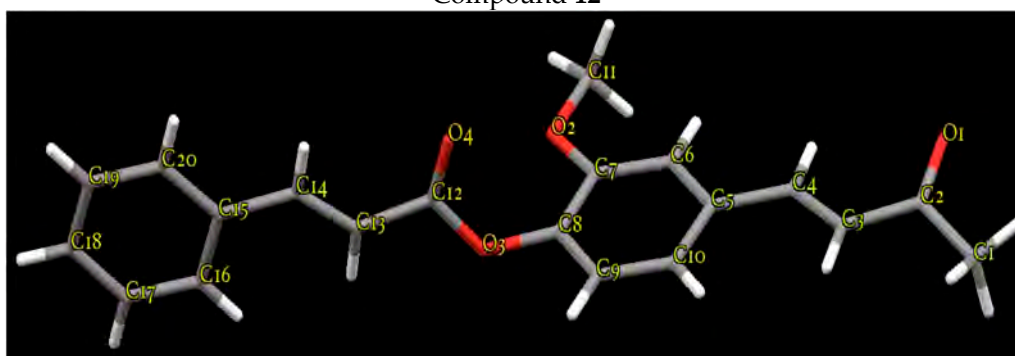


Compound 10

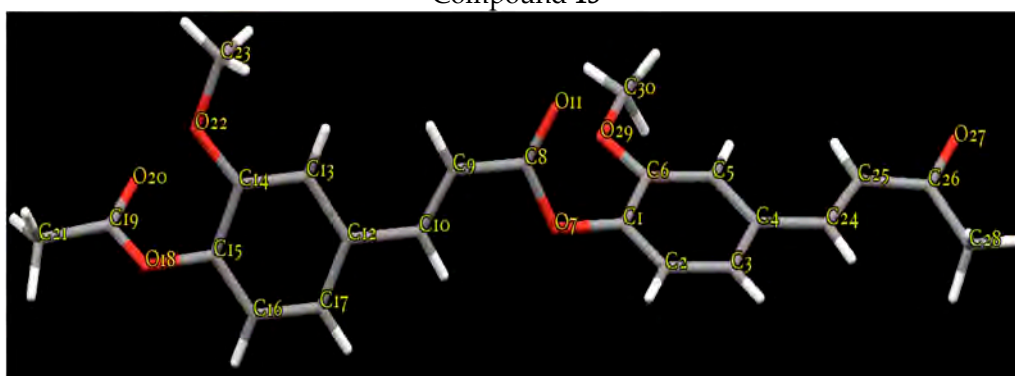
Figure 1. Cont.



Compound 12



Compound 13



Compound 14

Figure 1. View of the molecular structure of compounds 7, 8, 9, 10, 12, 13, and 14.

The distance between the centers of gravity of phenyl Cg rings in structures 7, 8, 9, 10, 12, 13, and 14 remain constant independent of the type and location of ring substituents. These values are 8.795 Å, 8.807 Å, 8.795 Å, 8.794 Å, 8.830 Å, 8.747 Å, and 8.400 Å. Table 1 shows the crystal data, collection parameters and refinements for compounds 7, 8, 9, 10, 12, 13 and 14.

The crystal packing of the molecules in the crystal structures is stabilized by van der Waals interactions and linked by intermolecular C-H...O hydrogen interactions. The adjacent molecules are interconnected by intermolecular weak C-H... π interactions (from different Cg centers of gravity), which give additional support to molecular packing stability. Table 2 shows the intermolecular C-H...O interactions in all seven crystal structures.

Table 1. Crystal data, collection parameters, and refinements for compounds 7–10 and 12–14.

Compound	7	8	9	10	12	13	14
CCDC deposit No.	1452007	1451557	1451621	1451555	1451617	1451556	1056387
Crystal size (mm)	0.37 × 0.05 × 0.03	0.30 × 0.20 × 0.09	0.39 × 0.19 × 0.13	0.37 × 0.11 × 0.11	0.31 × 0.12 × 0.05	0.35 × 0.21 × 0.15	Not determined
Color/shape	Light green/needles	Light yellow/needles	Colorless/prism	Light green/needles	Colorless/prism	Light yellow/needles	Colorless/prism
Empirical formula	C ₁₉ H ₁₆ O ₃	C ₁₉ H ₁₆ O ₃	C ₁₉ H ₁₆ O ₃	C ₂₂ H ₂₀ O ₆	C ₂₂ H ₂₀ O ₆	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	C ₂₃ H ₂₂ O ₇
Formula weight	292.32	292.32	292.32	380.38	380.38	322.34	410.40
Crystal system	Orthorhombic	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic	Triclinic	Monoclinic
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ /c	<i>P</i> 2 ₁ /c	<i>P</i> 2 ₁ /c	<i>P</i> 2 ₁ /c	<i>P</i> -1	<i>P</i> 2 ₁ /c
<i>Unit cell dimensions</i>							
<i>a</i> , Å	5.7012(2)	33.3788(14)	19.2677(6)	6.07840(10)	22.6222(13)	7.9343(10)	5.9945(4)
<i>b</i> , Å	15.1134	5.7488(2)	4.10240(10)	17.3377(4)	7.6843(4)	10.0440(14)	36.2260(19)
<i>c</i> , Å	18.1035	8.0128(4)	21.2526(6)	18.3150(5)	10.9077(7)	11.9990(16)	9.6239(8)
α, deg	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	70.652(4)	90.00
β, deg	90.00	95.736(2)	115.0910(10)	90.5980(10)	95.314(2)	71.023(4)	91.083(6)
γ, deg	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	89.865(5)	90.00
Volume, Å ³	1559.88(10)	1529.86(11)	1521.36	1930.03(8)	1888.00(19)	847.2(2)	2089.5(2)
<i>Z</i>	4	4	4	4	4	2	4
Density (calculated), Mg/m ³	1.245	1.269	1.276	1.309	1.338	1.264	1.305
Absorption coefficient, mm ⁻¹	0.084	0.085	0.086	0.095	0.098	0.088	0.806
<i>F</i> (000)	616	616	616	800	800	340	864
Θ range for data collection (°)	2.25 to 25.39	2.45 to 25.31	1.94 to 25.40	2.22 to 25.50	2.71 to 25.32	2.16 to 25.33	Not determined
Index ranges	−6 ≤ η ≤ 6, −17 ≤ κ ≤ 17, −21 ≤ λ ≤ 21, −39 ≤ η ≤ 39, −5 ≤ κ ≤ 5, −9 ≤ λ ≤ 9, −23 ≤ η ≤ 23, −4 ≤ κ ≤ 4, −25 ≤ λ ≤ 25, −7 ≤ h ≤ 7, −20 ≤ k ≤ 20, −22 ≤ l ≤ 22, −27 ≤ h ≤ 27, −9 ≤ k ≤ 9, −13 ≤ l ≤ 13, −9 ≤ h ≤ 9, −12 ≤ k ≤ 12, −14 ≤ l ≤ 14, −7 ≤ h ≤ 6, −44 ≤ k ≤ 44, −11 ≤ l ≤ 11						
Reflections collected	13,670	20,778	16,473	26,381	22,547	12,126	20,379
Independent reflections	2857 (<i>R</i> _{int} = 0.1503)	2764 (<i>R</i> _{int} = 0.1323)	2781 (<i>R</i> _{int} = 0.0559)	3585 (<i>R</i> _{int} = 0.0925)	3433 (<i>R</i> _{int} = 0.1724)	3065 (<i>R</i> _{int} = 0.0631)	4128
Data/restraints/parameters	2857/154/246	2764/0/200	2781/162/246	3585/0/257	3433/0/256	3065/0/219	4128/0/275
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	0.749	1.028	1.052	0.963	1.010	1.046	1.020
Final <i>R</i> indices [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	<i>R</i> 1 = 0.0472, <i>wR</i> 2 = 0.0486	<i>R</i> 1 = 0.0494, <i>wR</i> 2 = 0.1162	<i>R</i> 1 = 0.0489, <i>wR</i> 2 = 0.1271	<i>R</i> 1 = 0.0461, <i>wR</i> 2 = 0.1072	<i>R</i> 1 = 0.0606, <i>wR</i> 2 = 0.1255	<i>R</i> 1 = 0.0632, <i>wR</i> 2 = 0.1629	<i>R</i> 1 = 0.0620, <i>wR</i> 2 = 0.1162
<i>R</i> indices (all data)	<i>R</i> 1 = 0.2148, <i>wR</i> 2 = 0.0749	<i>R</i> 1 = 0.0816, <i>wR</i> 2 = 0.1361	<i>R</i> 1 = 0.0676, <i>wR</i> 2 = 0.1422	<i>R</i> 1 = 0.0851, <i>wR</i> 2 = 0.1267	<i>R</i> 1 = 0.1493, <i>wR</i> 2 = 0.11618	<i>R</i> 1 = 0.0888, <i>wR</i> 2 = 0.1831	<i>R</i> 1 = 0.1574, <i>wR</i> 2 = 0.1945
Largest diff. peak and hole (e/Å ⁻³)	0.168 and −0.141	0.140 and −0.171	0.156 and −0.227	0.279 and −0.258	0.195 and −0.185	0.435 and −0.190	0.305 and −0.160

Table 2. Geometry of the hydrogen bonding interactions (\AA , $^\circ$) for compounds **7**, **8**, **9**, **10**, **12**, **13**, and **14**.

Compound	D-H...A	D-H	H...A	D...A	D-H...A	Symmetry Code		
7	C3-H3...O3	0.930(5)	2.790(2)	3.486(2)	132.5(4)	$-x + 1$	$+y + 1/2$	$-z + 1/2$
	C9-H9...O3	0.930(5)	2.749(1)	3.463(2)	134.3(4)	$-x + 1$	$+y + 1/2$	$-z + 1/2$
	C14-H14...O2	0.930(5)	2.902(3)	3.571(6)	130.0(3)	$x - 1/2$	$-y + 1/2 + 1$	$-z$
	C17-H17...O1	0.931(11)	2.740(3)	3.356(12)	124.5(7)	$x + 1$	$+y$	$+z$
8	C2-H2...O2	0.930(2)	2.735(2)	3.665(2)	179.9(1)	x	$+y - 1$	$+z$
	C9-H9...O2	0.929(2)	2.957(2)	3.590(3)	126.7(2)	x	$-y + 1/2$	$+z + 1/2$
	C15-H15...O2	0.931(2)	2.761(2)	3.543(2)	142.1(1)	x	$-y + 1/2 + 1$	$+z - 1/2$
9	C5-H5...O3	0.930(2)	2.672(5)	3.539(5)	155.3(2)	$-x$	$+y - 1/2$	$-z + 1/2$
	C3-H3...O3	0.930(2)	2.719(4)	3.588(4)	155.8(1)	$-x$	$+y - 1/2$	$-z + 1/2$
	C12-H12...O2	0.930(2)	2.634(2)	3.554(3)	169.9(1)	$-x$	$+y - 1/2$	$-z + 1/2$
	C17-H17...O2	0.930(3)	2.605(1)	3.534(3)	177.2(2)	$-x$	$+y - 1/2$	$-z + 1/2$
10	C10-H10A...O2	0.981(2)	2.597(1)	3.124(2)	113.8(1)	$-x + 2$	$-y + 2$	$-z$
	C12-H12A...O6	0.980(2)	2.661(2)	3.414(3)	133.9(2)	$x - 1$	$-y + 1/2 + 1$	$z - 1/2$
	C17-H17...O6	0.951(2)	2.410(2)	3.183(3)	138.2(1)	$-x + 2$	$+y + 1/2$	$-z + 1/2$
	C20-H20...O5	0.951(2)	2.484(2)	3.246(3)	137.1(2)	$-x + 2$	$+y + 1/2$	$-z + 1/2$
12	C18-H18...O1	0.930(3)	2.358(2)	2.846(4)	112.5(2)	x	y	z
	C5-H5...O6	0.931(3)	2.376(2)	3.267(4)	160.2(2)	$-x + 1$	$-y$	$-z + 1$
	C20-H20...O1	0.929(3)	2.714(3)	3.431(4)	134.7(2)	$-x + 1$	$-y$	$-z + 1$
	C12-H12A...O3	0.961(3)	2.680(2)	3.531(4)	147.9(2)	$-x + 2$	$+y + 1/2$	$z + 1/2 + 2$
	C12-H12B...O5	0.959(3)	2.429(2)	3.372(4)	167.6(2)	$-x + 2$	$+y + 1/2$	$z + 1/2 + 2$
13	C6-H6...O1	0.930(3)	2.417(2)	3.328(4)	166.0(2)	$-x$	$-y + 1$	$-z$
	C11-H11B...O4	0.960(3)	2.825(2)	3.475(4)	125.8(2)	$x - 1$	$+y$	$+z$
	C18-H18...O2	0.929(2)	2.718(2)	3.332(3)	124.3(1)	$-x$	$-y$	$-z + 1$
	C19-H19...O2	0.930(4)	2.846(2)	3.397(4)	119.1(2)	$-x$	$-y$	$-z + 1$
14	C13-H13...O11	0.929(3)	2.496(3)	3.413(4)	169.2(2) 1	$-x + 1$	$-y + 1$	$-z$
	C5-H5...O20	0.930(3)	2.581(3)	3.504(4)	172.0(2) 2	$-x + 1$	$-y + 1$	$-z + 1$
	C25-H25...O20	0.931(3)	2.600(2)	3.499(4)	162.6(2) 2	$-x + 1$	$-y + 1$	$-z + 1$
	C2-H2...O22	0.930(3)	2.672(2)	3.485(4)	146.3(2) 4	$-x$	$-y + 1$	$-z$
	C23-H23C...O18	0.960(4)	2.550(2)	3.475(4)	161.9(2) 5	$-x + 1$	$+y$	$+z$

In the molecular structures of **7**, **8**, **9**, **10**, **12**, **13**, and **14**, the least-squares plane calculation shows that the dihedral angles between the two benzene rings are $80.7(1)^\circ$, $11.9(7)^\circ$, $61.6(5)^\circ$, $79.7(6)^\circ$, $38.7(1)^\circ$, $87.2(1)^\circ$, and $75.2(2)^\circ$, respectively. The dihedral angles between the C-phenyl-ring and -O-phenyl ring and the central moiety for structures **7**, **8**, **9**, **10**, **12**, **13**, and **14** are $3.2(1)^\circ$ and $77.6(1)^\circ$, $37.8(1)^\circ$ and $48.4(1)^\circ$, $2.2(1)^\circ$ and $63.3(1)^\circ$, $2.9(1)^\circ$ and $81.0(1)^\circ$, $13.2(1)^\circ$ and $25.8(2)^\circ$, $3.2(1)^\circ$ and $88.2(1)^\circ$, and $6.4(1)^\circ$, and $77.5(1)^\circ$, respectively. This clearly shows that in structures **7**, **9**, **10**, **13**, and **14**, the -C-phenyl is coplanar with the central moiety.

This result agrees with the dihedral angle of 8.2° between the two benzene rings in the structure of 1,7-bis(4-ethoxy-3-methoxy-phenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione [17]. In contrast, the dihedral angle between the -O-phenyl ring and the central moiety varies from 63.3° to 88.2° . These features are shown in previous reports with α,β -unsaturated aromatic ester compounds [18–22], where aromatic, double bond, and ester groups are in a planar configuration and the substituents bonded to ester groups show some deviation. For structures **8** and **12** the dihedral angles show no significant difference.

2.3. Cytotoxicity and Antioxidant Activity

Cytotoxic activity of all synthesized compounds was first measured in healthy and cancerous cell lines. None of the compounds injured healthy cells; however, only compounds **7**, **8**, **9**, and **10** showed potential cytotoxic activity. Compounds **7**, **8**, and **10** (*ortho*, *meta*, and *ortho* substituents, respectively) had IC_{50} values similar to curcumin and displayed better anticancer activity against K562, MCF-7, and SKLU-1 cells than compound **9** (Table 3). These results agree with a previous study of the cytotoxicity of dehydrozingerone derivatives, which reported that compounds with hydroxyl at the *ortho* position, and ketone and phenyl at the C-3 and C-4 positions, respectively, are necessary for optimal cytotoxic activity [8]. The presence of α,β unsaturated systems, which has previously been described as an enhancer of cytotoxic activity, may also account for the biological effect of *retro*-curcuminoids. The ketone form in particular enhances toxicity [23], and the molecules we

synthesized have double α,β unsaturated systems. The cytotoxic specificity of these new derivatives of curcumin and dehydrozingerone is related to precise differences in chemical structure, which could form the basis of future studies of the anticancer properties of *retro*-curcuminoids.

Table 3. Cytotoxicity screening of *retro*-curcuminoids 7, 8, 9, and 10.

<i>Retro</i> -Curcuminoid	IC ₅₀ (μM) on Cell Line		
	K562	MCF-7	SKLU-1
Curcumin	9.75 ± 0.6	10.43 ± 1.8	7.78 ± 0.64
7	10.74 ± 0.5	13.19 ± 1.4	11.59 ± 1.2
8	12.8 ± 1.9	18.68 ± 2.5	12.85 ± 0.9
9	28.15 ± 2.5 *	63.46 ± 10.8 *	63.81 ± 2.7 *
10	8.60 ± 0.44	12.01 ± 0.62	8.07 ± 0.55

Data are represented as mean ± standard error of mean (SEM). * $p < 0.01$ compared to curcumin. K562: leukemia adenocarcinoma cells, HCT-15: human colon cancer cells, MCF-7: human mammary adenocarcinoma cells, and SKLU-1: human lung adenocarcinoma cells.

The effect on lipid peroxidation by compounds 7, 8, 9, and 10 was tested on rat brain, but only *retro*-curcuminoid 7 showed a high degree of inhibition. The unique *retro*-curcuminoid with antioxidant activity in vitro was compound 10, as shown in Table 4. In contrast with the reported high antioxidant activity of curcumin and derivatives [1], the *retro*-curcuminoids described here had no important prophylactic effect on the oxidative process, probably because of the structural occupation of phenyl groups and the loss of free hydroxyls, chemical groups related to activity against free radicals. Preliminary analysis of antioxidant activity in vitro by DPPH assay did not show antioxidant properties of any of the *retro*-curcuminoids. These data suggest that changes in the chemical structure of these compounds decrease antioxidant activity, but enhance their anticancer properties.

Table 4. Inhibition of lipid peroxidation of *retro*-curcuminoids 7, 8, 9, and 10 in rat brain.

<i>Retro</i> -Curcuminoid	Concentration (μg/mL)	% Inhibition
7	50	4.33 ± 1.06 *
	5	1.97 ± 0.77 *
8	50	1.77 ± 0.22 *
	5	0.27 ± 0.06 *
9	50	3.30 ± 0.78 *
	5	3.19 ± 0.53 *
10	50	96.18 ± 6.53
	5	14.81 ± 2.33

Data are represented as mean ± standard error of mean (SEM). * $p < 0.01$ compared to α -tocopherol.

3. Experimental Section

3.1. General Information

All chemicals were reagent grade and were used as received. Solvents were purified by standard methods [24].

3.2. Physical Measurements

Melting points were determined on an Electrothermal IA9100 digital melting point apparatus (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK) and are uncorrected. IR absorption spectra were recorded in the 4000–400 cm^{-1} range as KBr pellets on a Perkin Elmer 283-B spectrophotometer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). ¹H- and ¹³C-NMR spectra were recorded in CDCl₃ on a Bruker 500 MHz (Billerica, MA, USA) or a 600 MHz NMR Agilent technologies spectrometer equipped with a DD2 Oneprobe (Agilent

Technology, Santa Clara, CA, USA), using tetramethylsilane (TMS) as internal reference. NMR spectra were processed with MESTRENOVA version 10.0.2 and can be found in the Supplementary Materials.

3.3. Synthetic Procedures

Compounds **1** and **2** were prepared in high yield from acetylated ferulic or cinnamic acid with thionyl chloride in CHCl_3 containing a catalytic amount of dimethylformamide (DMF), and refluxed for 4 h according to the synthetic route reported [25,26]. The precursors **3**, **4**, **5**, and **6** were obtained using a Claisen-Schmidt reaction with acetone and corresponding aldehyde in equimolar amounts, and sodium hydroxide as a powdered base, in accordance with a published synthetic method [27].

Retro-Curcuminoids 7–14

A solution of the corresponding acid chloride (**1** or **2**) (1.0 eq in anhydrous THF) was added to a solution of DHZ analog (**3–5**) or DHZ (**6**) (1.0 eq in anhydrous THF) at 0 °C containing triethylamine (1.2 eq). The reaction mixture was stirred at 30 °C until the disappearance of the starting material was observed by TLC. The reaction was quenched by the addition of aqueous NH_4Cl , and the mixture was extracted with EtOAc (3 × 15 mL). The combined extracts were dried over anhydrous Na_2SO_4 and filtered, and the solvent was removed in vacuo. The resulting precipitate was treated with adequate solvents to give the corresponding crystalline product.

2-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-yl)phenyl cinnamate (**7**). Obtained as light green needles From ethyl ether/*n*-hexane (90%), m.p. 138.9 °C. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 7.93 (dd, $J = 16.1, 0.5$ Hz, 1H), 7.72–7.58 (m, 4H), 7.49–7.41 (m, 4H), 7.30 (dddd, $J = 7.9, 7.4, 1.2, 0.6$ Hz, 1H), 7.22 (ddd, $J = 8.2, 1.3, 0.4$ Hz, 1H), 6.72 (dd, $J = 18.8, 16.2$ Hz, 2H), 2.34 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 198.03, 165.02, 151.61, 149.65, 147.59, 136.58, 133.92, 131.31, 130.99, 129.04, 128.87, 128.45, 127.53, 127.34, 126.35, 123.19, 116.38, 27.62. IR; 3060.72 cm^{-1} , 3030.22 cm^{-1} , 1728.16 cm^{-1} , 1634.69 cm^{-1} , 1600.59 cm^{-1} , 1133.75 cm^{-1} , 984.56 cm^{-1} . m/z [293⁺].

3-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-yl)phenyl cinnamate (**8**). Light yellow needles from CH_2Cl_2 /*n*-hexane (90%), m.p. 100 °C. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 7.89 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.60 (dd, $J = 16.0, 3.0$ Hz, 2H), 7.53–7.35 (m, 7H), 7.22 (dt, $J = 6.9, 2.3$ Hz, 1H), 6.72 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.64 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 2.38 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 198.10, 165.16, 151.25, 147.04, 142.25, 136.05, 134.02, 130.84, 130.59, 129.95, 129.06, 129.02, 128.34, 128.26, 127.92, 125.75, 123.66, 121.06, 116.90, 27.67. IR; 3052.19 cm^{-1} , 2923.64 cm^{-1} , 1717.09 cm^{-1} , 1663.80 cm^{-1} , 1631.63 cm^{-1} , 1310.01 cm^{-1} , 1257.60 cm^{-1} , 1150.97 cm^{-1} , 977.46 cm^{-1} . m/z [293⁺].

4-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-yl)phenyl cinnamate (**9**). Colorless needles from EtOAc/*n*-hexane (90%), m.p. 139.15 °C. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 7.87 (dd, $J = 16.0, 15.9$ Hz, 2H), 7.63–7.47 (m, 4H), 7.48–7.37 (m, 3H), 7.29–7.20 (m, 2H), 6.66 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.53 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 2.38 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 198.17, 164.96, 162.43, 152.44, 148.60, 147.08, 142.29, 133.98, 133.69, 132.03, 131.23, 130.84, 129.37, 129.03, 128.99, 128.54, 128.31, 127.13, 122.25, 116.84, 116.73, 27.56. IR; 3062.07 cm^{-1} , 3027.85 cm^{-1} , 2926.10 cm^{-1} , 1726.81 cm^{-1} , 1662.5 cm^{-1} , 1629.55 cm^{-1} , 1214.85 cm^{-1} , 1140.63 cm^{-1} , 978.60 cm^{-1} . m/z [293⁺].

2-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-yl)phenyl(*E*)-3-(4-acetoxy-3-methoxyphenyl) acrylate (**10**). Light green needles from ethyl ether/*n*-hexane (90%), m.p. 160 °C. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 7.88 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.66 (dd, 2H), 7.49–7.41 (m, 1H), 7.33–7.17 (m, 4H), 7.10 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.74 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 6.64 (d, $J = 16$ Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.34 (s, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 198.02, 168.65, 164.89, 151.54, 149.58, 146.81, 142.04, 136.49, 132.80, 131.32, 128.82, 127.52, 127.30, 126.39, 123.41, 123.15, 121.69, 116.55, 111.53, 55.97, 27.69, 20.61. IR; 3072.19 cm^{-1} , 3011.55 cm^{-1} , 2956.45 cm^{-1} , 1759.78 cm^{-1} , 1733.54 cm^{-1} , 1604.83 cm^{-1} , 1258.74 cm^{-1} , 1201.97 cm^{-1} , 1120.02 cm^{-1} , 984.99 cm^{-1} . m/z [381⁺].

3-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-yl)phenyl(*E*)-3-(4-acetoxy-3-methoxyphenyl) acrylate (**11**). Colorless needles from CH_2Cl_2 /ethyl ether/*n*-hexane (90%), m.p. 101.6 °C. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.84

(d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 7.47–7.36 (m, 3H), 7.25–7.15 (m, 3H), 7.10 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.72 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 6.58 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 2.34 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 198.07, 168.67, 164.98, 151.50, 151.17, 146.24, 142.18, 141.89, 136.06, 132.93, 129.94, 127.91, 125.77, 123.60, 123.38, 121.50, 121.00, 117.07, 111.48, 55.92, 27.64, 20.60. IR; 3070.16 cm^{-1} , 2945.64 cm^{-1} , 1762.35 cm^{-1} , 1720.60 cm^{-1} , 1611.18 cm^{-1} , 1237.04 cm^{-1} , 1191.03 cm^{-1} , 1150.22 cm^{-1} , 975.91 cm^{-1} . m/z [381⁺].

4-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-yl)phenyl(*E*)-3-(4-acetoxy-3-methoxyphenyl) acrylate (**12**). Colorless needles from EtOAc/*n*-hexane (88%), m.p. 172 °C. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 7.84 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.52 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 7.26–7.15 (m, 4H), 7.10 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.70 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 6.58 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.34 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 198.11, 168.64, 164.78, 152.34, 151.47, 146.29, 142.21, 141.89, 132.89, 132.08, 129.37, 127.16, 123.38, 122.21, 121.50, 117.02, 111.46, 55.93, 27.58, 20.61. IR; 3066.07 cm^{-1} , 2982.16 cm^{-1} , 1757.33 cm^{-1} , 1725.80 cm^{-1} , 1632.44 cm^{-1} , 1585.39 cm^{-1} , 1256.04 cm^{-1} , 1203.46 cm^{-1} , 1166.33 cm^{-1} , 1119.10 cm^{-1} , 1012.64 cm^{-1} , 974.26 cm^{-1} . m/z [381⁺].

2-Methoxy-4-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-yl)phenyl cinnamate (**13**). Obtained as yellow needles from EtOAc/*n*-hexane (80%), m.p. 132 °C. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 7.88 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.59 (dd, $J = 6.6, 2.9$ Hz, 2H), 7.49 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 7.42 (dd, $J = 4.9, 1.9$ Hz, 3H), 7.16 (d, $J = 3.7$ Hz, 3H), 6.67 (dd, $J = 16.1, 9.1$ Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 2.39 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 198.10, 164.59, 151.59, 146.95, 145.68, 143.71, 142.67, 141.69, 134.06, 133.29, 130.71, 128.92, 128.29, 127.23, 123.40, 121.49, 116.57, 111.30, 55.92, 27.46. IR; 3069.35 cm^{-1} , 3012.15 cm^{-1} , 2933.29 cm^{-1} , 1733.69 cm^{-1} , 1254.52 cm^{-1} , 1122.37 cm^{-1} , 1030.06 cm^{-1} , 971.39 cm^{-1} . Calculated mass 322 (not observed).

2-Methoxy-4-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-yl)phenyl(*E*)-3-(4-acetoxy-3-methoxyphenyl) acrylate (**14**). Colorless needles from ethyl ether/*n*-hexane (80%), m.p. 181 °C. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 7.84 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 7.3$ Hz, 5H), 7.09 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.68 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 6.61 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 3.89 (s, 6H), 2.40 (s, 3H), 2.34 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ = 20.63, 27.30, 27.60, 55.90, 111.35, 116.70, 121.50, 123.40, 133.4, 141.70, 142.76, 146.29, 151.56, 164.60, 168.6, 198.3. IR; 3079.23 cm^{-1} , 3010.78 cm^{-1} , 1758.89 cm^{-1} , 1722.39 cm^{-1} , 1196.83 cm^{-1} , 1152.87 cm^{-1} , 1120.88 cm^{-1} , 1027.43 cm^{-1} , 978.07 cm^{-1} . m/z [411⁺].

3.4. Crystallography

The X-ray data for **14** was collected by using an Agilent-Gemini-Atlas area-detector diffractometer with $\text{CuK}\alpha$ (1.54184 Å) radiation at room temperature (293 K). The data reduction was carried out using CrysAlisPro (v38.43), and the absorption corrections were applied using the CrysAlisPro analytical method [28]. Crystallographic data, together with refinement details for compound **14**, are deposited at the Cambridge Crystallographic Data Center (CCDC) (No. 1056387). The X-ray data for compounds **7**, **8**, **9**, **10**, **12**, and **13** were collected using a Bruker Smart APEX AXS CCD area detector with a graphite monochromator and $\text{Mo K}\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71073$ Å) at room temperature in scan mode. Collected data were reduced using SAINT [29] and empirical absorption corrections were performed using SADABS software [29,30]. Crystallographic data together with refinement details are summarized in Table 1.

All reflections were defined based on F^2 . The weighted R -factor wR and goodness of fit S are based on F^2 , and conventional R -factors R are based on F , with F set to zero for negative F^2 . The threshold expression of $F^2 > \sigma(F^2)$ is used only for calculating R -factors (gt), etc., and is not relevant to the choice of reflections for refinement. R -factors based on F^2 are statistically about twice as large as those based on F , and R -factors based on all data will be even larger. The crystallographic formulas for R_{int} , R_1 , wR_2 and S were used for refinement of structures.

$$R_{\text{int}} = \frac{\sum |F_o^2 - (F_o^2)|}{\sum F_o^2}, R_1 = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}$$

$$wR_2 = \sqrt{\frac{\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2}{\sum w(F_o^2)^2}}, S = \sqrt{\frac{\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2}{m - n}}$$

The hydrogen atoms attached to the carbon atoms were placed in their calculated positions and included in the isotropic refinement using the riding model with C–H = 0.93 Å (–CH) or 0.96 Å (–CH₃) Å with U_{iso} (H) = 1.2 U_{eq} (C–H) and 1.5 U_{eq} (C–H₃).

Figure 1 shows the molecular structures and atom-labeling scheme for compounds 7, 8, 9, 10, 12, 13, and 14. All structures were drawn with 50% displacements using Mercury 3.7 software for Windows [31]. The geometry of the molecules was calculated using PARST software [32].

Atomic coordinates and displacement parameters, and bond distances and bond angles for all seven *retro*-curcuminoids are given as Supplementary Materials.

3.5. Cell Lines, Culture Medium, and Cytotoxicity Assay

All synthesized compounds and precursors DHZ and ferulic acid, were initially screened in vitro at doses of 10 µg/mL and 50 µg/mL against human polymorphonuclear and cancer cell lines: K562 (human chronic myelogenous leukemia), MCF-7 (human mammary adenocarcinoma), and SKLU-1 (human lung adenocarcinoma). No cytotoxic activity was detected for DHZ and ferulic acid, although some activity has been reported for these compounds with other cell lines. [12–16]. After selection by preliminary screening, the IC₅₀ values of compounds 7, 8, 9, and 10 were calculated in triplicate following standard protocols. Clearly, the ester groups in the *retro*-curcuminoids play an important role in the exertion of cytotoxic activity in vitro. Cell lines were supplied by U.S. National Cancer Institute (NCI). The human tumor cytotoxicity was determined using the protein-binding dye sulforhodamine B (SRB) in microculture assay to measure cell growth, as described in the protocols established by the NCI [33]. The cell lines were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 10,000 units/mL penicillin G sodium, 10,000 µg/mL streptomycin sulfate, 25 µg/mL amphotericin B (Invitrogen/Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and 1% non-essential amino acids (Gibco). They were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. The viability of the cells used in the experiments exceeded 95% as determined with trypan blue.

Cytotoxicity after treatment with the test compounds of the normal and tumor cells was determined using the protein-binding dye sulforhodamine B (SRB) in microculture assay to measure cell growth, as described in a previous study [34]. The cells were removed from the tissue culture flasks by treatment with trypsin and diluted with fresh media. From these cell suspensions, 100 µL, containing 5000–10,000 cells per well, was pipetted into 96-well microtiter plates (Costar, Cambridge, MA, USA) and the material was incubated at 37 °C for 24 h in a 5% CO₂ atmosphere. Subsequently, 100 µL of a solution of the compound obtained by diluting the stocks was added to each well. The cultures were exposed for 48 h to the compound at concentrations of 50 µg/mL and 10 µg/mL. After the incubation period, cells were fixed to the plastic substratum by the addition of 50 µL of cold 50% aqueous trichloroacetic acid. The plates were incubated at 4 °C for 1 h, washed with tap H₂O, and air-dried. The trichloroacetic-acid-fixed cells were stained by the addition of 0.4% SRB. Free SRB solution was removed by washing with 1% aqueous acetic acid. The plates were air-dried, and the bound dye was solubilized by the addition of 10 mM unbuffered Tris base (100 µL). The plates were placed on a shaker for 10 min, and the absorption was determined at 515 nm using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

3.6. Inhibition of Lipid Peroxidation on Rat Brain

Animals. Adult male Wistar rats (200–250 g) were provided by the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Procedures and care of animals were conducted

in conformity with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling NOM-062-ZOO-1999. They were maintained at 23 ± 2 °C on a 12/12 h light-dark cycle with free access to food and water.

Rat Brain Homogenate Preparation. Animal sacrifice was carried out avoiding unnecessary pain. Rats were sacrificed with CO₂. The cerebral tissue (whole brain), was rapidly dissected and homogenized in phosphate-buffered saline (PBS) solution (0.2 g of KCl, 0.2 g of KH₂PO₄, 8 g of NaCl, and 2.16 g of NaHPO₄·7H₂O/L, pH adjusted to 7.4) as described elsewhere [35,36] to produce a 1/10 (*w/v*) homogenate. The homogenate was then centrifuged for 10 min at 800 rcf (relative centrifugal field) to yield a pellet that was discarded. The supernatant protein content was measured using Folin and Ciocalteu's phenol reagent [37] and adjusted with PBS at 2.666 mg of protein/mL.

Induction of lipid peroxidation and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) quantification. As an index of lipid peroxidation, TBARS levels were measured using rat brain homogenates according to the method described by Ng and co-workers [38], with some modifications. Supernatant (375 µL) was added with 50 µL of 20 µM EDTA and 50 µL of each sample concentration dissolved in DMSO (50 µL of DMSO for control group) and incubated at 37 °C for 30 min. Lipid peroxidation was started adding 50 µL of freshly prepared 100 µM FeSO₄ solution (final concentration 10 µM), and incubated at 37 °C for 1 h. The TBARS content was determined as described by Ohkawa and co-workers [39], with some modifications. 500 µL of TBA reagent (1% 2-thiobarbituric acid in 0.05 N NaOH and 30% trichloroacetic acid, in 1:1 proportion) was added to each tube and the final suspension was cooled on ice for 10 min, centrifuged at 13,400 rcf for 5 min and heated at 80 °C in a water bath for 30 min. After cooling at room temperature, the absorbance of 200 µL of supernatant was measured at $\lambda = 540$ nm in a UltraMicroplate (Synergy/HT BIOTEK Instrument, Inc., Winooski, VT, USA). The concentration of TBARS was calculated by interpolation on a standard curve of tetra-methoxypropane (TMP) as a precursor of MDA [40]. Results were expressed as nmoles of TBARS per mg of protein. The inhibition ratio (IR [%]) was calculated using the formula $IR = (C - E) \times 100 / C$, where C is the control absorbance and E is the sample absorbance. Butylated hydroxytoluene (BHT) and α -tocopherol were used as positive standards. All data were represented as mean \pm standard error (SEM). Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test for comparison against control. Values of $p \leq 0.05$ (*) and $p \leq 0.01$ (**) were considered statistically significant.

4. Conclusions

Seven new *retro*-curcuminoids were synthesized with a chemical modification strategy in good yield, and NMR data confirmed the formation of the ester in *ortho*, *meta*, and *para* phenol positions. The crystalline descriptions indicate that the compounds are formed by two aromatic rings (phenyl-C-; phenyl-O-) connected by a moiety C(sp²)-C(sp²)-C(sp²)-C(sp²)-O(sp³)-C(sp²) chain of atoms, and -C-phenyl is coplanar with the central moiety. *Retro*-curcuminoids with *ortho* substituents had the highest cytotoxic activity. Only 2-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-yl)phenyl(*E*)-3-(4-acetoxy-3-methoxyphenyl) acrylate showed relevant antioxidant activity. Comparison of the cytotoxicity of *retro*-curcuminoids with their synthetic precursors allows us to postulate that the ester function plays an important role in biological activity *in vitro*. The results of this study suggest DHZ-based derivatives in the *ortho* position as a new template for future anticancer and antioxidant studies of this family of compounds.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be accessed at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/1/33/s1>.

Acknowledgments: Raúl G. Enríquez acknowledges support from DGAPA, UNAM (IN208516) and CONACyT (CB-252524). Marco A. Obregón-Mendoza acknowledges CONACyT CVU 599367. Dino Gnecco acknowledges support from DGI-VIEP, BUAP (00139).

Author Contributions: Raúl G. Enríquez and Dino Gnecco designed and planned the research; Marco A. Obregón-Mendoza, María Mirian Estévez-Carmona, Laura Orea and Hugo Pilotzi assisted in synthetic work. Julia Cassani carried out special NMR determinations. Simón Hernández-Ortega performed X-ray determinations, Manuel Soriano-García contributed with crystallographic discussions, and María Teresa Ramírez-Apan performed biological evaluations. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

DHZ	Dehydrozingerone
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
IC ₅₀	Inhibitory Concentration 50

Appendix A

CCDC 1451617, 1451555, 1451556, 1451621, 1451557, and 1452007 contain the supplementary crystallographic data for C₁₉H₁₆O₃ (**7**), C₁₉H₁₆O₃ (**8**), C₁₉H₁₆O₃ (**9**), C₂₂H₂₀O₆ (**10**), C₂₂H₂₀O₆ (**12**), and C₂₀H₁₈O₄ (**13**). These data can be obtained free of charge via http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; Fax: +44-1223-336-033; or E-Mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk.

References

1. Basnet, P.; Skalko-Basnet, N. Curcumin: An anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules* **2011**, *16*, 4567–4598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Esatbeyoglu, T.; Huebbe, P.; Ernst, I.M.A.; Chin, D.; Wagner, A.E.; Rimbach, G. Curcumin—From molecule to biological function. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5308–5332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kunnumakkara, A.B.; Preetha, A.; Aggarwal, B.B. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett.* **2008**, *269*, 199–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ak, T.; Gülçin, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *174*, 27–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Mishra, S.; Palanivelu, K. The effect of curcumin (turmeric) on Alzheimer disease: An overview. *Ann. Indian Acad. Neurol.* **2008**, *11*, 13–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Patel, V.; Zhang, X.; Tautiva, N.A.; Nyabera, A.N.; Owa, O.O.; Baidya, M.H.C.; Taunk, P.S.; Abdollahi, S.; Charles, S.; Gonnella, R.G.; et al. Small molecules and Alzheimer's disease: Misfolding, metabolism and imaging. *Curr. Alzheimer Res.* **2016**, *12*, 445–461. [[CrossRef](#)]
7. Zhang, X.; Tian, Y.; Zhang, C.; Tian, X.; Ross, A.W.; Moir, R.D.; Sun, H.; Tanzi, R.E.; Moore, A.; Ran, C. Near-infrared fluorescence molecular imaging of amyloid beta species and monitoring therapy in animal models of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 9734–9739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Tatsuzaki, J.; Nakagawa-Goto, K.; Tokuda, H.; Lee, K.H. Cancer preventive agents 10. Prenylated dehydrozingerone analogs as potent chemopreventive agents. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2010**, *12*, 227–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Anand, P.; Thomas, S.G.; Kunnumakkara, A.B.; Sundaram, C.; Harikumar, K.B.; Sung, B.; Tharakan, S.T.; Misra, K.; Priyadarsini, I.K.; Rajasekharan, K.N.; et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *76*, 1590–1611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Roughley, P.J.; Whiting, D.A. Experiments in the biosynthesis of curcumin. *J. Chem. Soc.* **1973**, 2379–2388. [[CrossRef](#)]
11. Sardjiman, S.S.; Reksodiprodjo, M.S.; Hakim, L.; Van der Goot, H.; Timmerman, H. 1,5-Diphenyl-1,4-pentadiene-3-ones and cyclic analogues as antioxidative agents. Synthesis and structure-activity relationship. *Eur. J. Med. Chem.* **1997**, *32*, 625–630. [[CrossRef](#)]
12. Muthusamy, G.; Balupillai, A.; Ramasamy, K.; Shanmugam, M.; Gunaseelan, S.; Mary, B.; Prasad, N.R. Ferulic acid reverses ABCB1-mediated paclitaxel resistance in MDR cell lines. *Eur. J. Pharmacol.* **2016**, *786*, 194–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Yogosawa, S.; Yamada, S.; Yasuda, S.; Sun, Q.; Takizawa, K.; Sakai, T. Dehydrozingerone, a structural analogue of curcumin, induces cell-cycle arrest at the G2/M phase and accumulates intracellular ROS in HT-29 human colon cancer cells. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 2088–2093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Hampannavar, G.A.; Karpoomath, R.; Palkar, M.B.; Shaikh, M.S. An appraisal on recent medicinal perspective of curcumin degradant: Dehydrozingerone (DZG). *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 501–520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Ratković, Z.; Muškinja, J.; Burmudžija, A.; Ranković, B.; Kosanić, M.; Bogdanović, G.A.; Simović Marković, B.; Nikolić, A.; Arsenijević, N.; Dorđević, S.; et al. Dehydrozingerone based 1-acetyl-5-aryl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles: Synthesis, characterization and anticancer activity. *J. Mol. Struct.* **2016**, *1109*, 82–88. [[CrossRef](#)]
16. Marchiani, A.; Mammi, S.; Siligardi, G.; Hussain, R.; Tessari, I.; Bubacco, L.; Delogu, G.; Fabbri, D.; Dettori, M.A.; Sanna, D.; et al. Small molecules interacting with α -synuclein: Antiaggregating and cytoprotective properties. *Amino Acids* **2013**, *45*, 327–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Xu, G.; Wei, D.; Wang, J.; Jiang, B.; Wang, M.; Xue, X.; Zhou, S.; Wu, B.; Jiang, M. Crystal structure, optical properties and biological imaging of two curcumin derivatives. *Dyes Pigments* **2014**, *101*, 312–317. [[CrossRef](#)]
18. Kumar, C.S.; Jagadeesan, G.; Dhamodaran, S.; Ananth, K.; Aravindhan, S. 2,6-Dibromo-4-formylphenyl 3-phenylprop-2-enoate. *Acta Cryst.* **2012**, *E68*, o2873.
19. Sachitanand, M.M.; Anupam, B.; Sandip, V.J.; Mothukuri, G.K.; Hosahudya, N.G. Synthesis of α,β -unsaturated γ -amino esters with unprecedented high (*E*)-stereoselectivity and their conformational analysis in peptides. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 6566–6574.
20. Nissa, M.N.; Aravindan, P.G.; Kasinath, V.; Gopalakrishnan, G.; Merazig, H.; Velmurugan, D. Crystal structures of 2-chloro cinnamoyl phenolate (I) and 3-chloro cinnamanilide (II). *Cryst. Res. Technol.* **2004**, *39*, 643–649. [[CrossRef](#)]
21. Sharmila, P.; Kumar, C.S.; Ananth, K.; Narasimhan, S.; Aravindhan, S. Diethyl 2,6-dimethyl-4-[4-(3-phenyl-acryloyloxy)phenyl]-1,4-dihydropyridine-3,5-di carboxylate hemihydrate. *Acta Cryst.* **2013**, *E69*, o389.
22. Momin, M.I.K.; Pawar, S.; Koorbanally, N.A.; Su, H.; Ramjugernath, D. 2-Acetylphenyl (2*E*)-3-(4-fluorophenyl)acrylate. *Acta Cryst.* **2012**, *E68*, o3049. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Schultz, T.W.; Yarbrough, J.W. Trends in structure-toxicity relationships for carbonyl-containing α,β -unsaturated compounds. *SAR QSAR Environ. Res.* **2004**, *15*, 139–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Armarego, W.L.F.; Perrin, D.D. *Purification of Laboratory Chemicals*, 4th ed.; Butterworth Heinemann: Oxford, UK, 1997.
25. Hosoda, A.; Nomura, E.; Mizuno, K.; Taniguchi, H. Preparation of a (\pm)-1,6-di-*O*-feruloyl-myo-inositol derivative: An efficient method for introduction of ferulic acid to 1,6-vicinal hydroxyl groups of myo-inositol. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7199–7201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Huang, G.Y.; Cui, C.; Wang, Z.P.; Li, Y.Q.; Xiong, L.Z.; Wang, L.Z.; Yu, S.J.; Li, Z.M.; Zhao, W.G. Synthesis and characteristics of (Hydrogenated) ferulic acid derivatives as potential antiviral agents with insecticidal activity. *Chem. Cent. J.* **2013**, *7*, 33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Vashchenko, V.; Kutulya, L.; Krivoshey, A. Simple and effective protocol for Claisen–Schmidt condensation of hindered cyclic ketones with aromatic aldehydes. *Synthesis* **2007**, *14*, 2125–2134. [[CrossRef](#)]
28. *CrysAlis PRO*, v. 1.171.36.28; Agilent Technologies: Yarnton, UK, 2014.
29. Bruker. *APEX2, SAINT and SADABS*; Bruker AXS Inc.: Madison, WI, USA, 2009.
30. Sheldrick, G.M. A short history of SHELX. *Acta Cryst.* **2008**, *A64*, 112–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Macrae, C.F.; Bruno, I.J.; Chisholm, J.A.; Edgington, P.R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Rodriguez-Monge, L.; Taylor, R.; van de Streek, J.; Wood, P.A. Mercury CSD 2.0—New features for the visualization and investigation of crystal structures. *J. Appl. Cryst.* **2008**, *41*, 466–470. [[CrossRef](#)]
32. Nardelli, M. PARST95. An update to PARST: A system of Fortran routines for calculating molecular structure parameters from the results of crystal structure analyses. *J. Appl. Cryst.* **1995**, *28*, 659. [[CrossRef](#)]
33. Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paul, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *38*, 757–766. [[CrossRef](#)]
34. Sumantran, V.N. Cellular chemosensitivity assays: An overview. In *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, 2nd ed.; Cree, I.A., Ed.; Humana Press: New York, NY, USA, 2011; Chapter 19; pp. 219–236.
35. Domínguez, M.; Nieto, A.; Marín, J.C.; Keck, A.S.; Jeffery, E.; Céspedes, C.L. Antioxidant activities of extracts from *Barkleyanthus salicifolius* (Asteraceae) and *Penstemon gentianoides* (Scrophulariaceae). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5889–5895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Rossato, J.I.; Ketzler, L.A.; Centuriao, F.B.; Silva, S.J.; Lüdtke, D.S.; Zeni, G.; Braga, A.L.; Rubin, M.A.; Rocha, B.T. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem. Res.* **2002**, *27*, 297–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275. [[PubMed](#)]

38. Ng, T.B.; Liu, F.; Wang, Z.T. Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sci.* **2000**, *66*, 709–723. [[CrossRef](#)]
39. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **1979**, *95*, 351–358. [[CrossRef](#)]
40. Esterbauer, H.; Cheeseman, K.H. Determination of aldehyde lipid peroxidation products. *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 407–421. [[PubMed](#)]

Sample Availability: Some samples of the compounds are available from the authors.

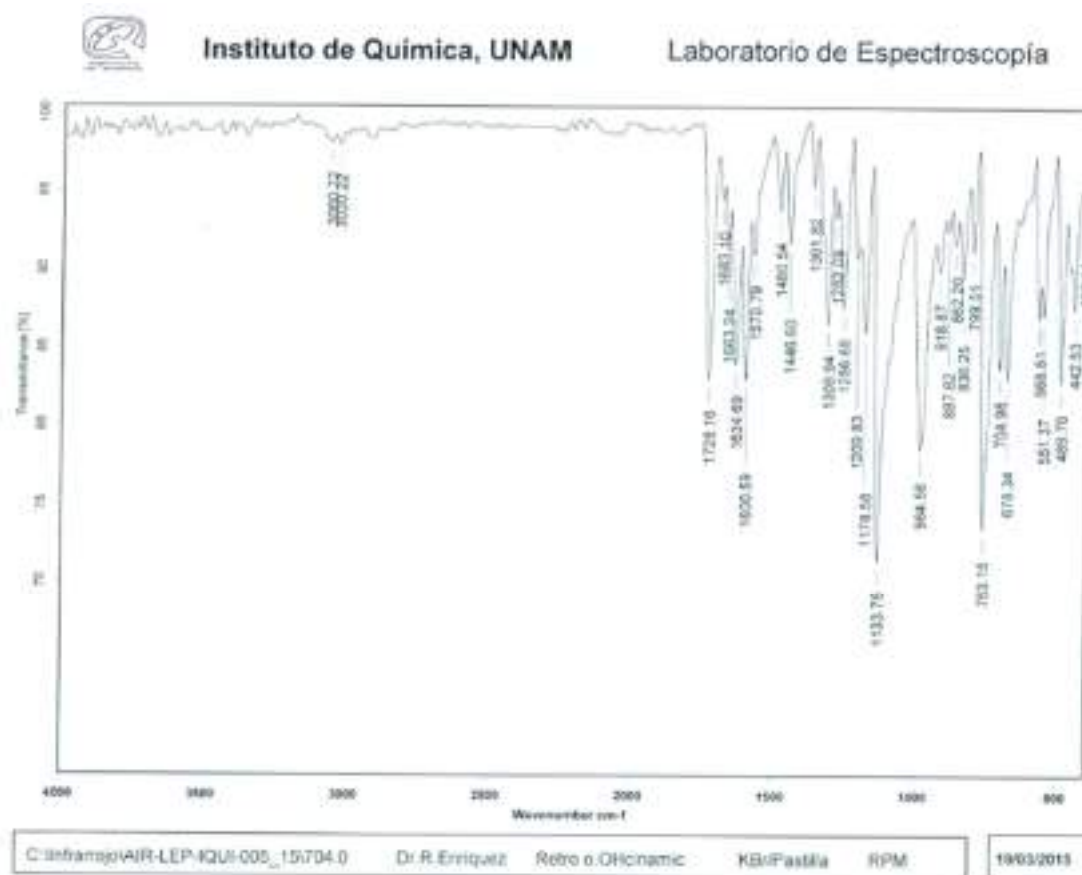


© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Materials: *Retro-Curcuminoids* as Mimics of Dehydrozingerone and Curcumin: Synthesis, NMR, X-ray, and Cytotoxic Activity

Marco A. Obregón-Mendoza, María Mirian Estévez-Carmona, Simón Hernández-Ortega, Manuel Soriano-García, María Teresa Ramírez-Apan, Laura Orea, Hugo Pilotzi, Dino Gnecco, Julia Cassani and Raúl G. Enríquez

IR *Retro-Curcuminoid* 7

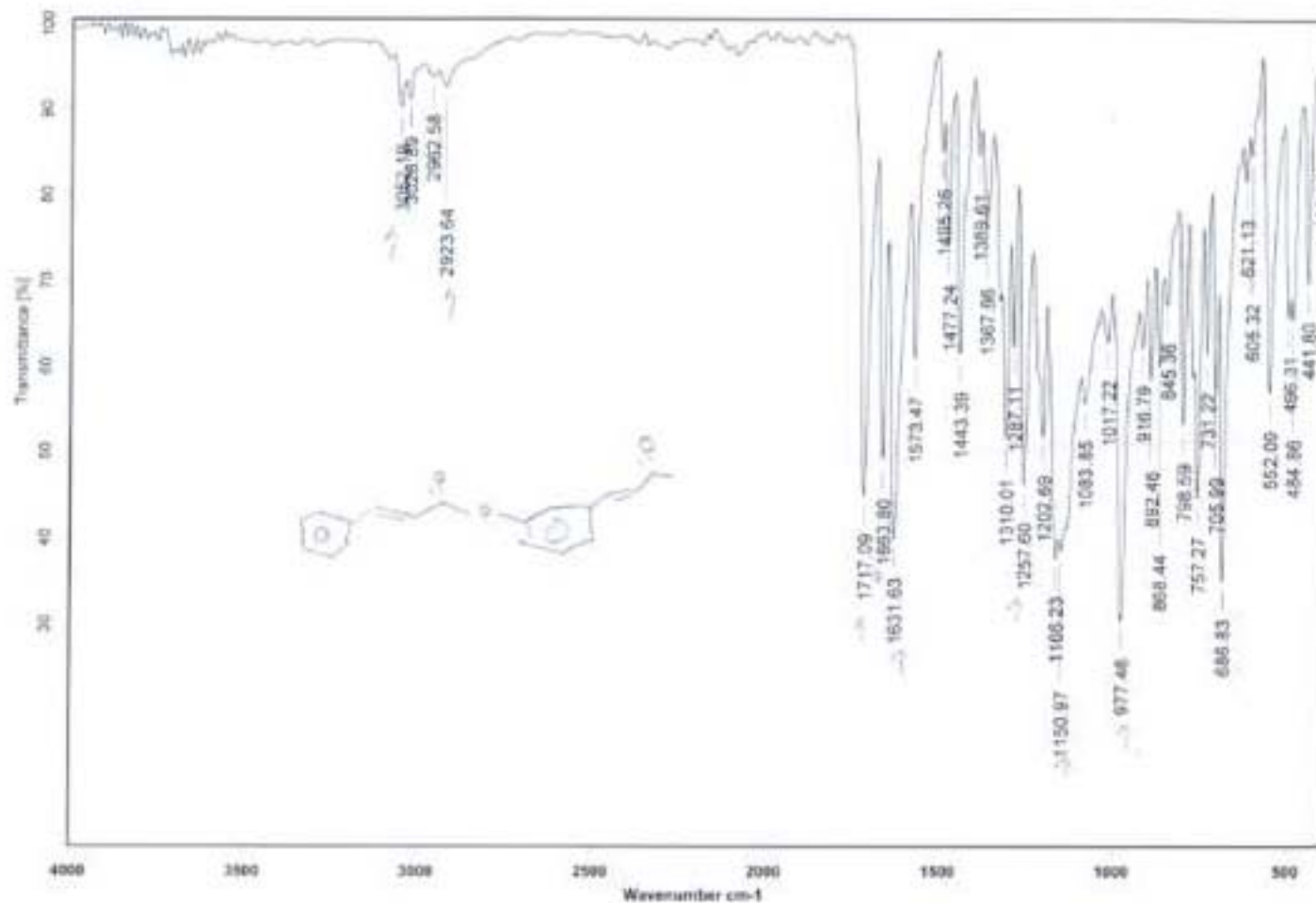


IR Retro-Curcuminoid 8



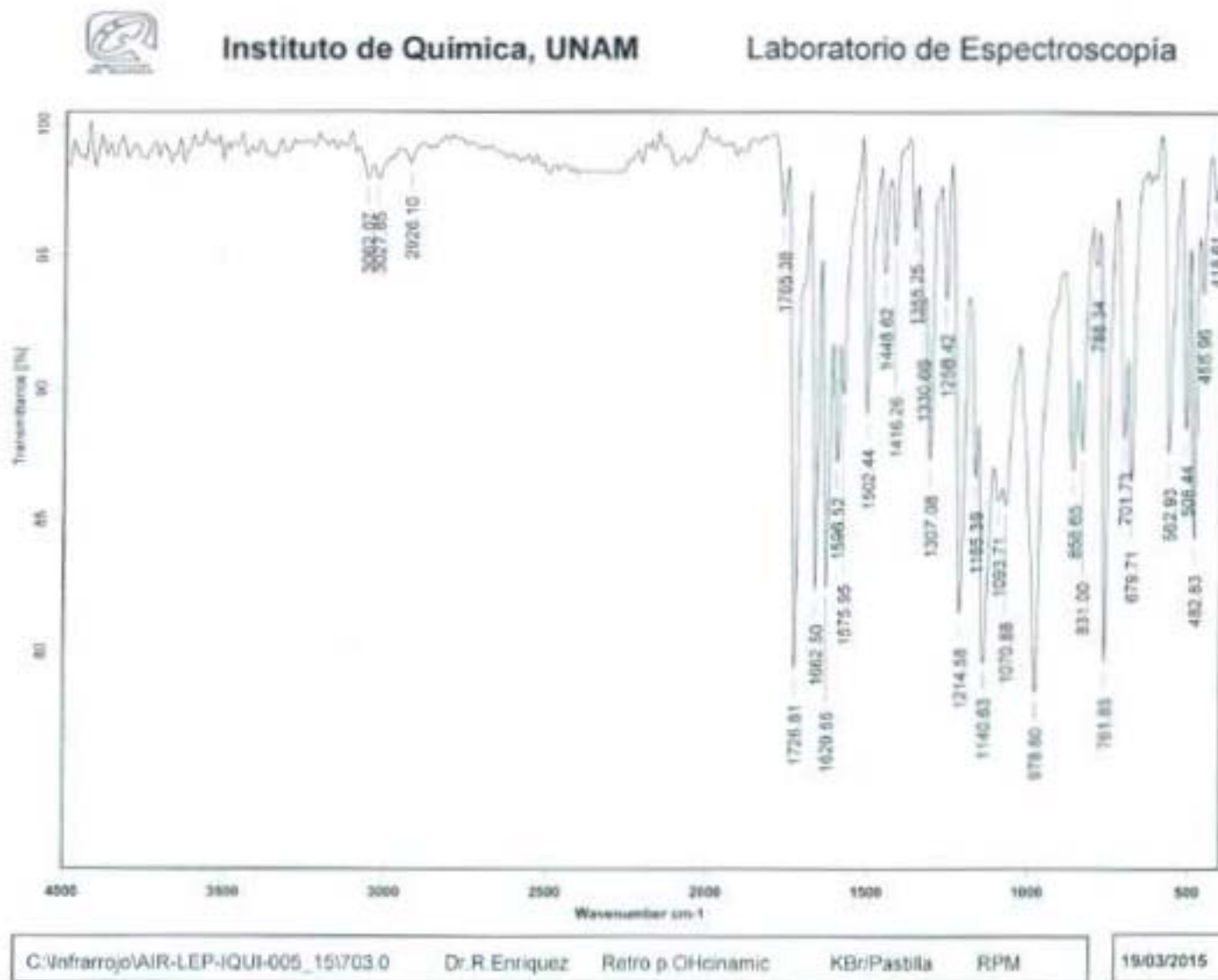
Instituto de Química, UNAM

Laboratorio de Espectroscopia

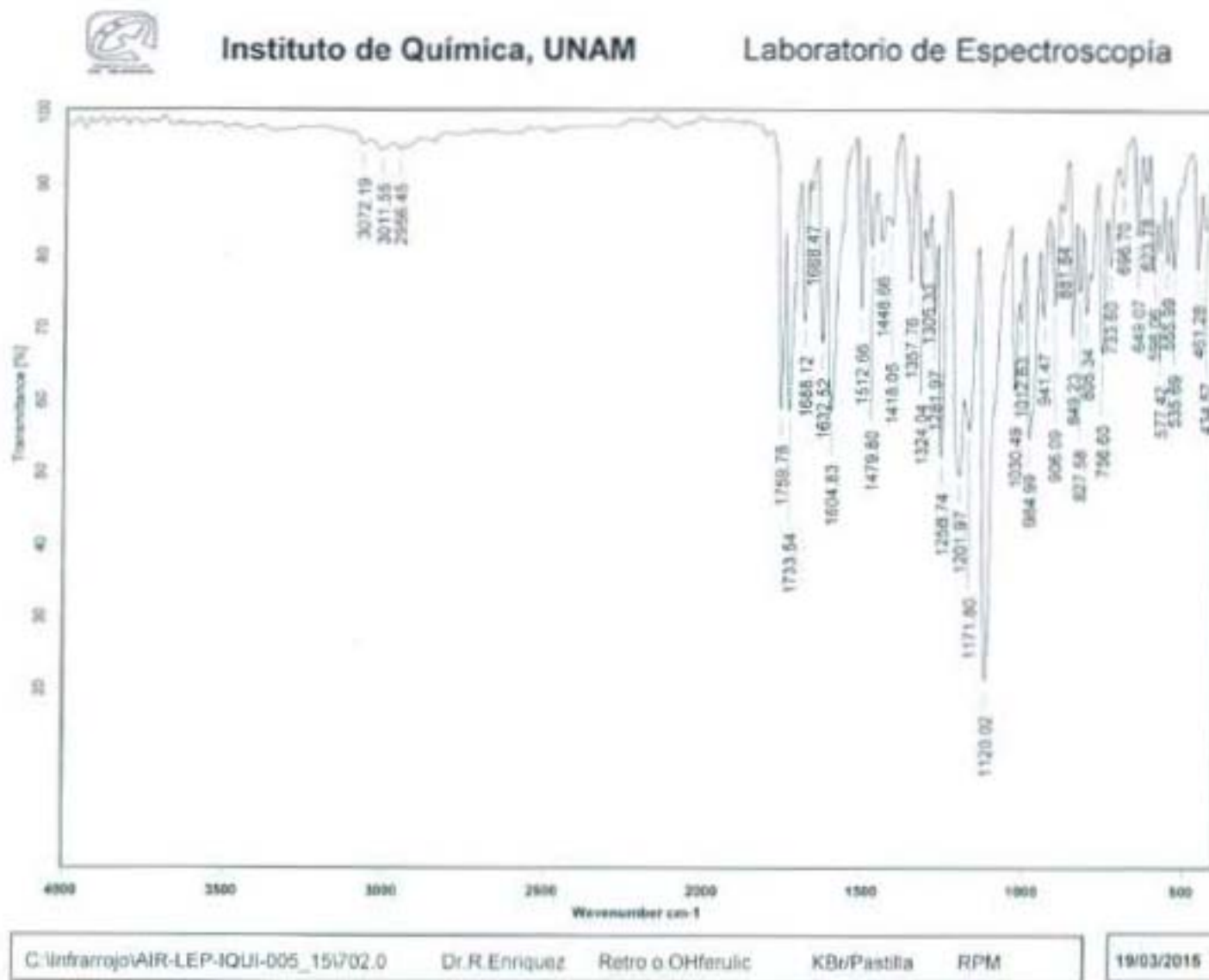


C:\Infrarojo\AIR-LEP-IQUI-005_15\2155.D Dr.R Enriquez Met-OH-Cinamico KBr/Pastilla RPM 01/10/2015

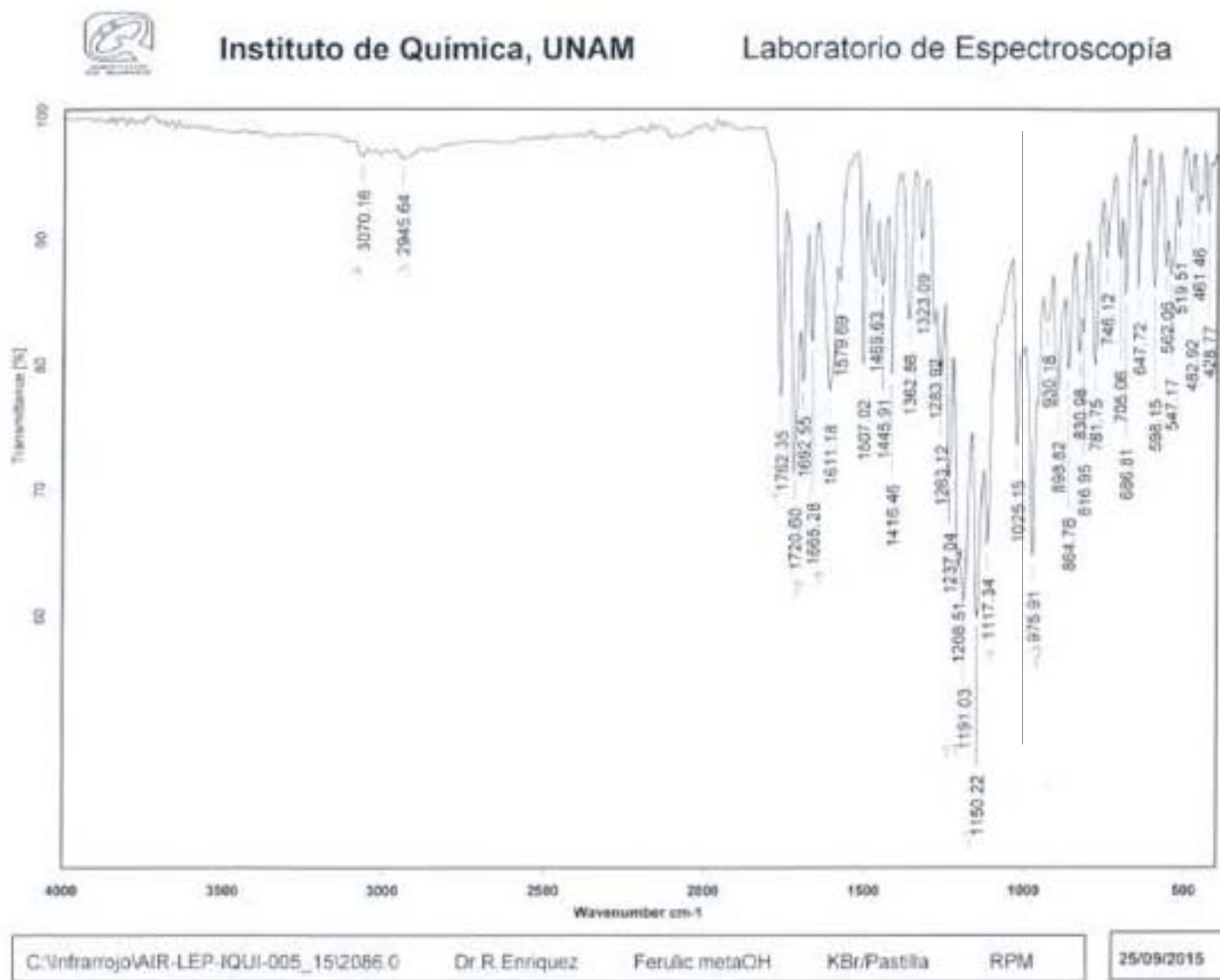
IR Retro-Curcuminoid 9



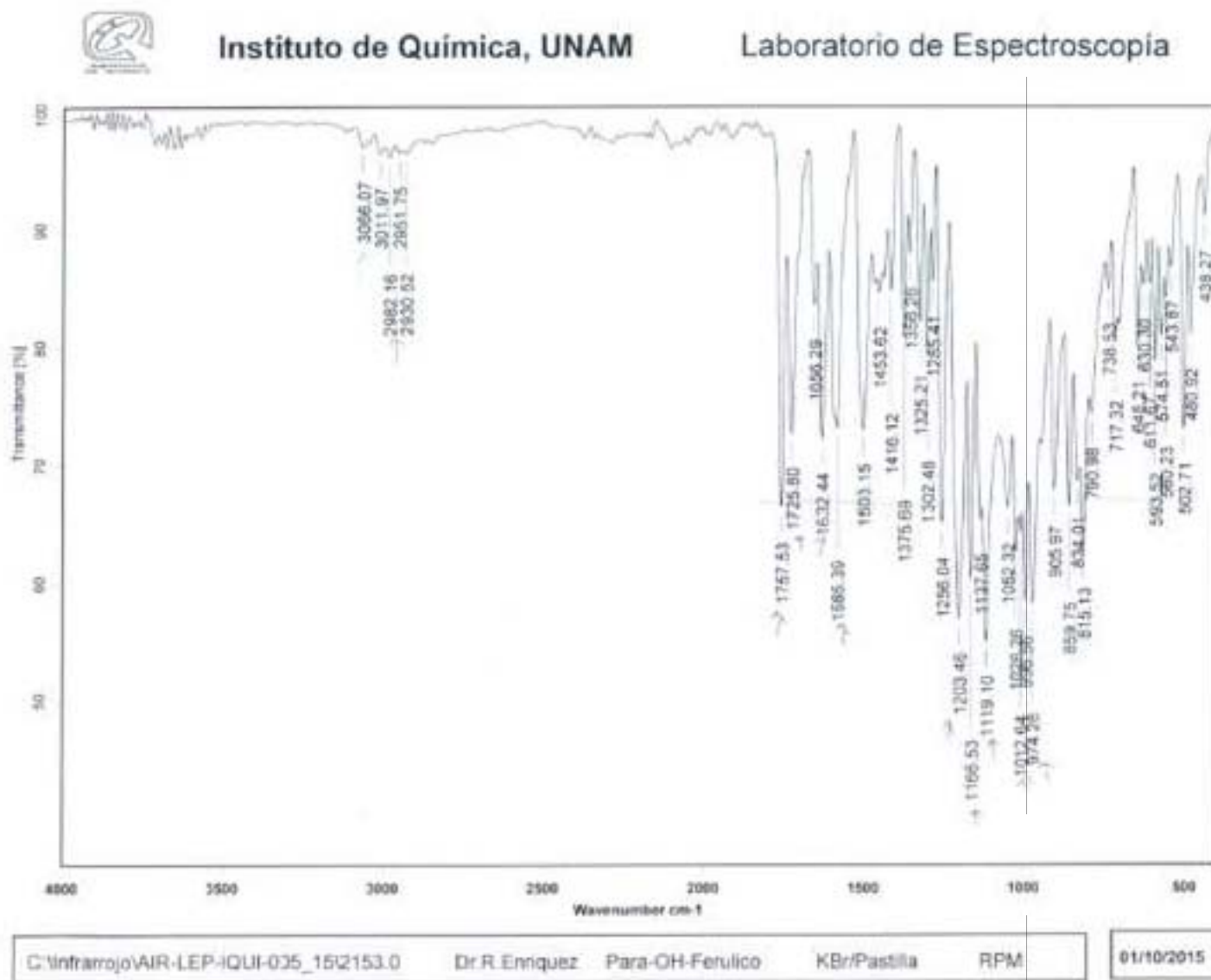
IR Retro-Curcuminoid 10



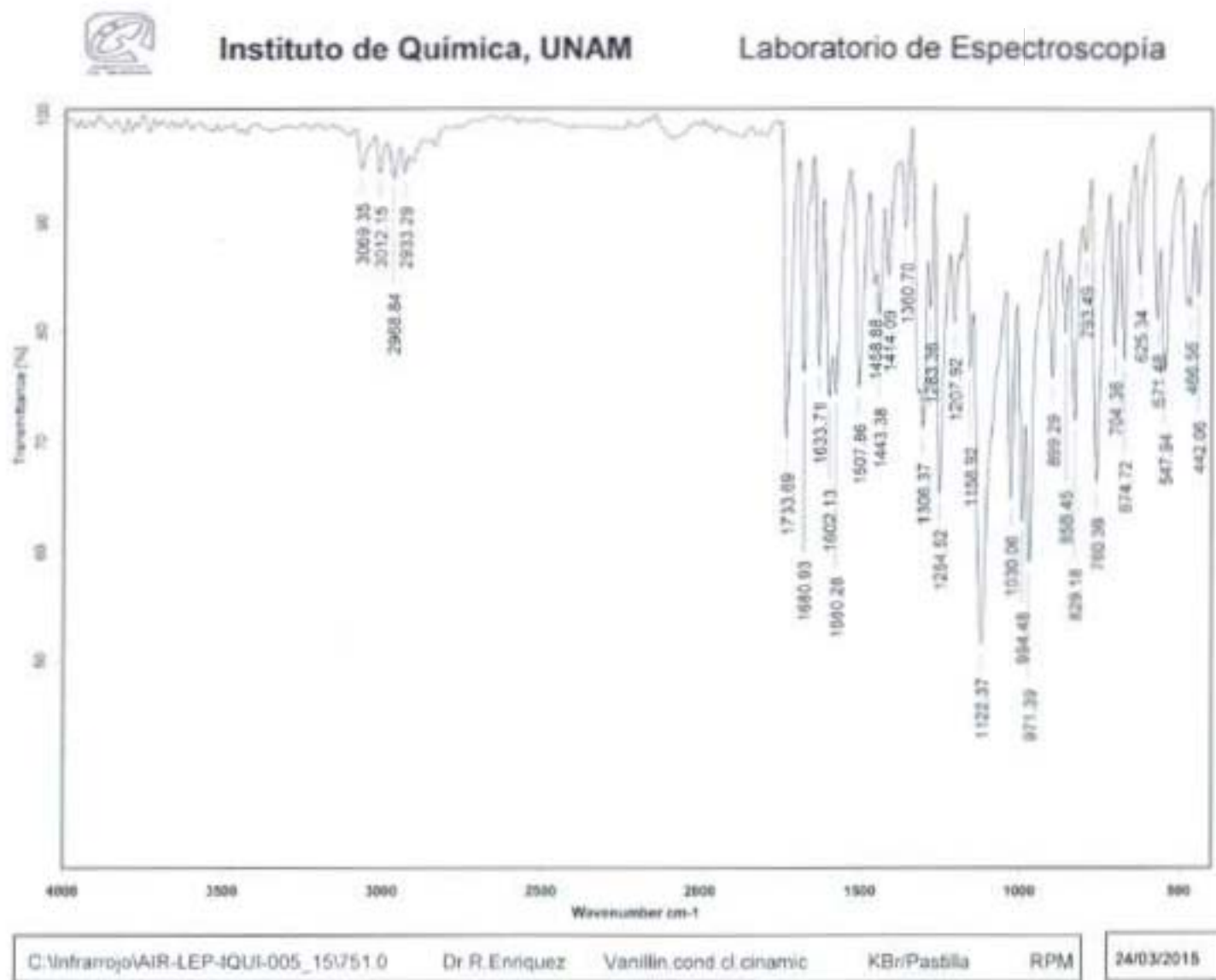
IR Retro-Curcuminoid 11



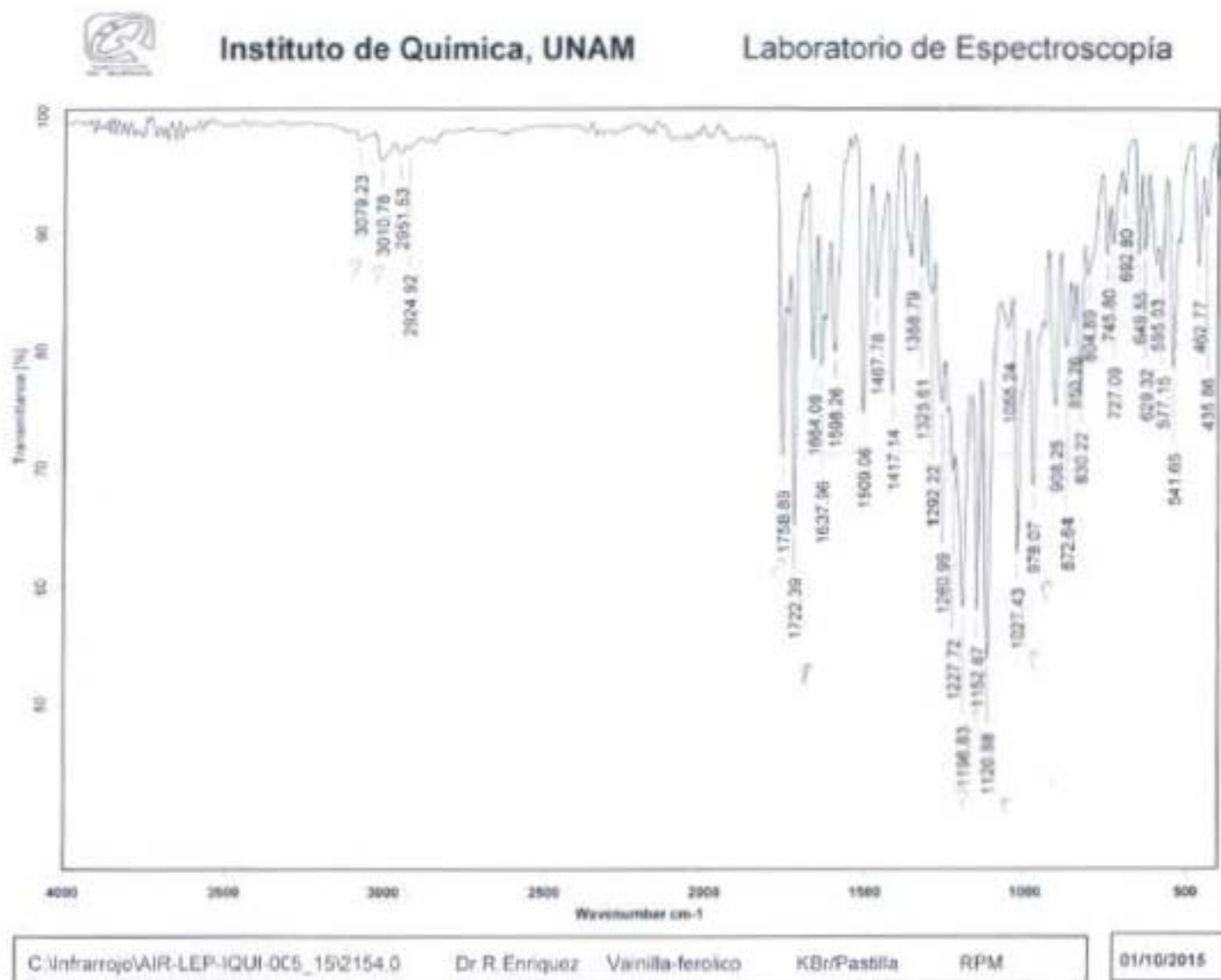
IR Retro-Curcuminoid 12



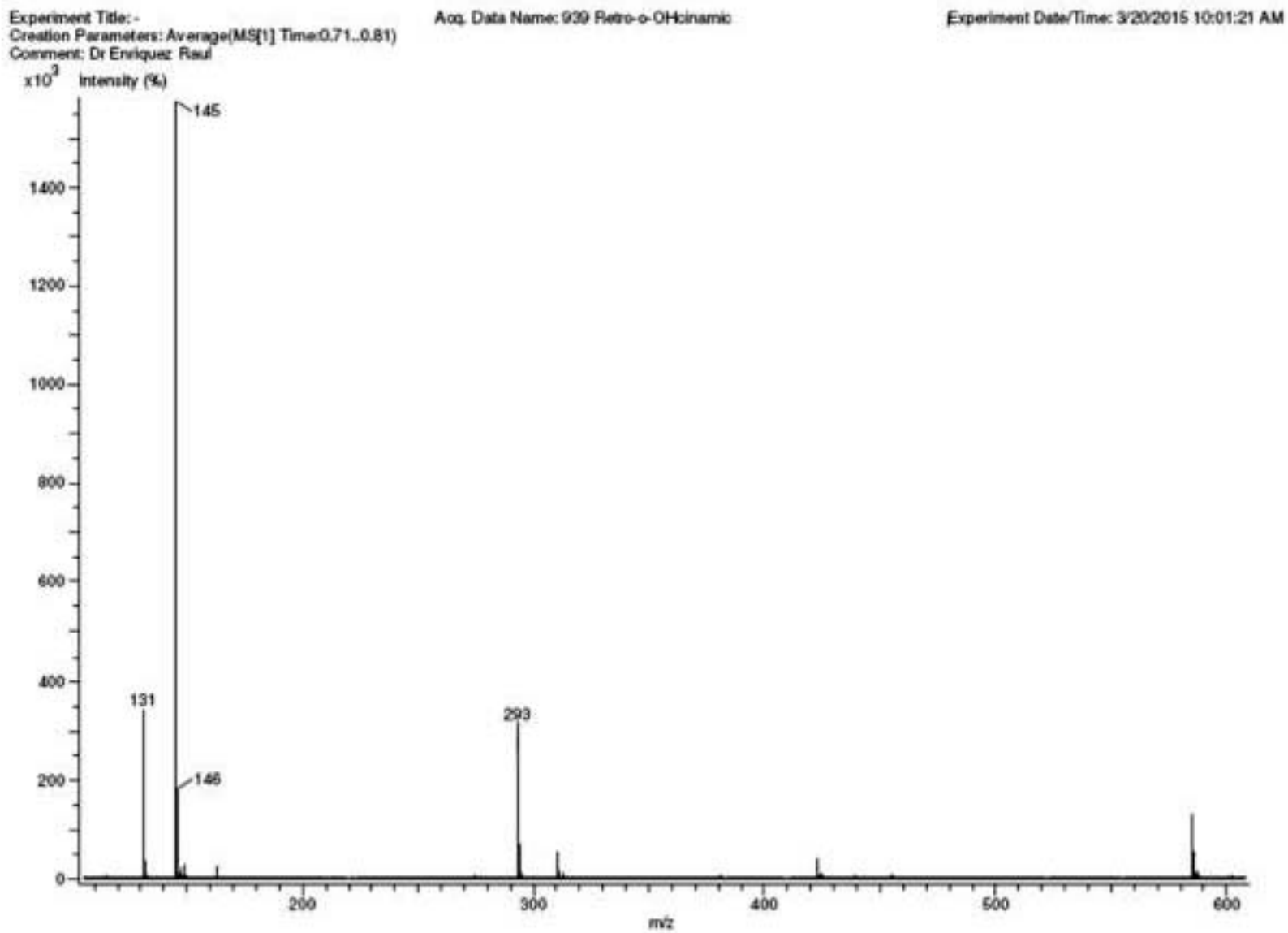
IR Retro-Curcuminoid 13



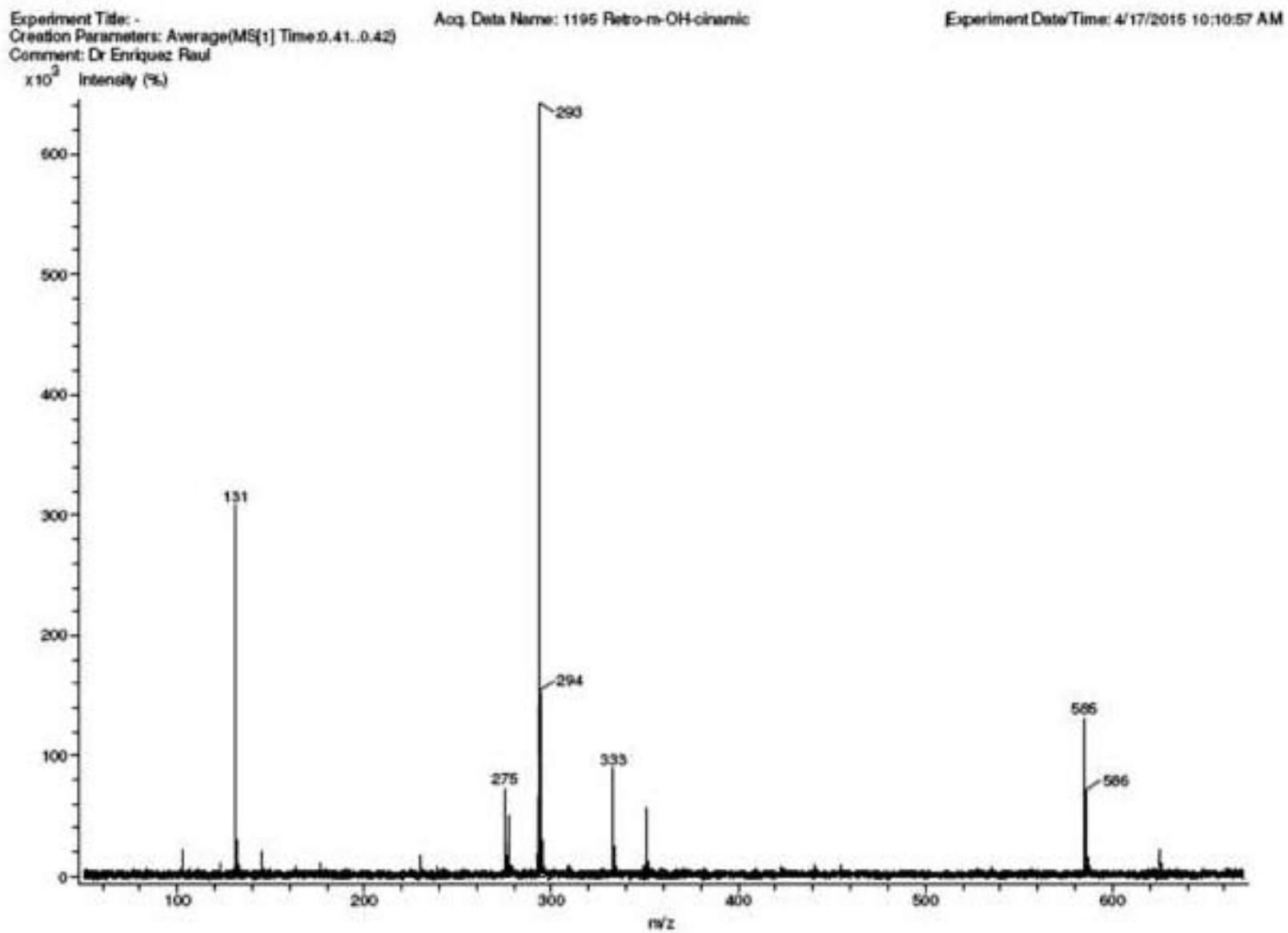
IR Retro-Curcuminoid 14



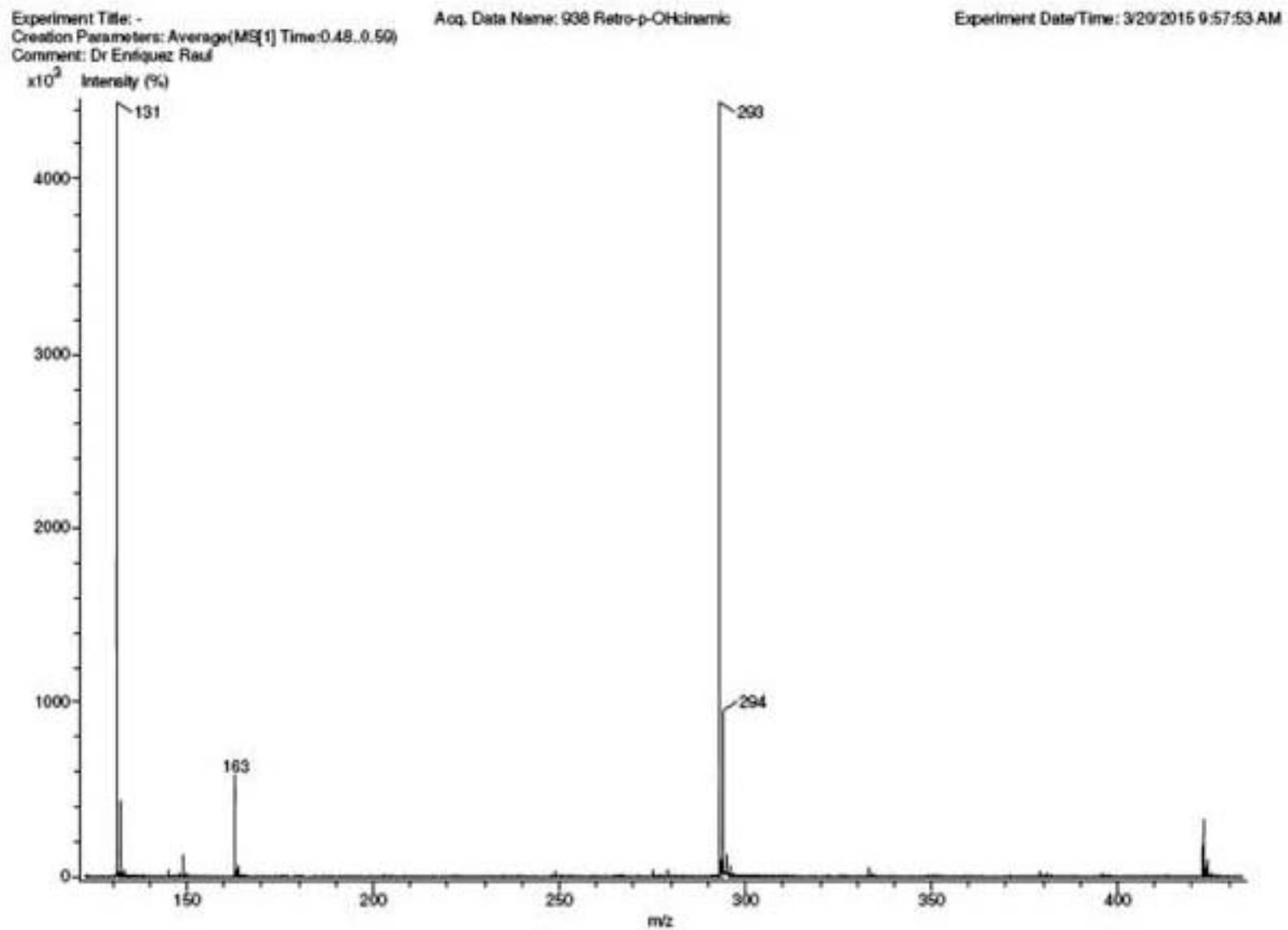
MS Retro-Curcuminoid 7



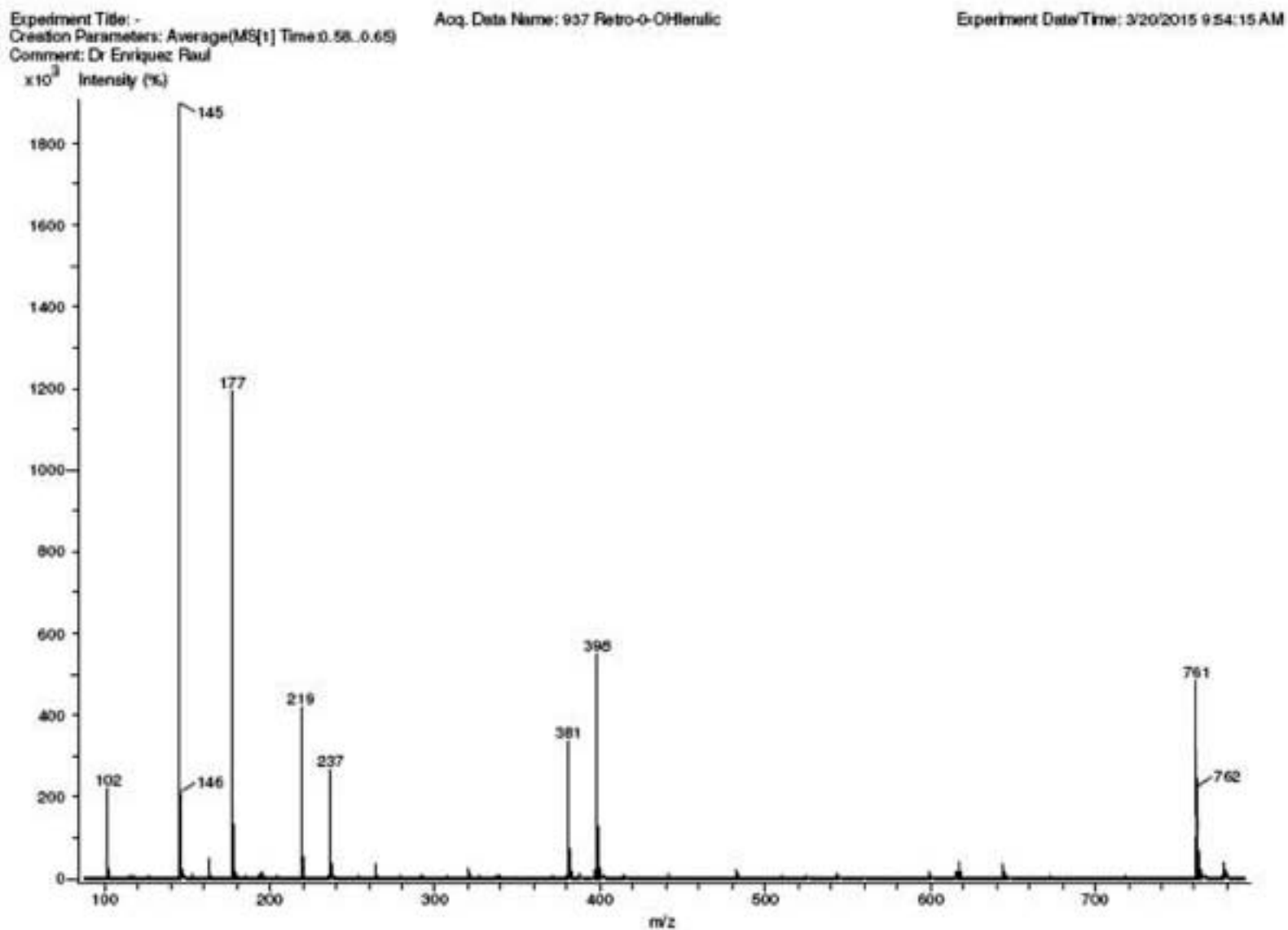
MS Retro-Curcuminoid 8



MS Retro-Curcuminoid 9



MS Retro-Curcuminoid 10

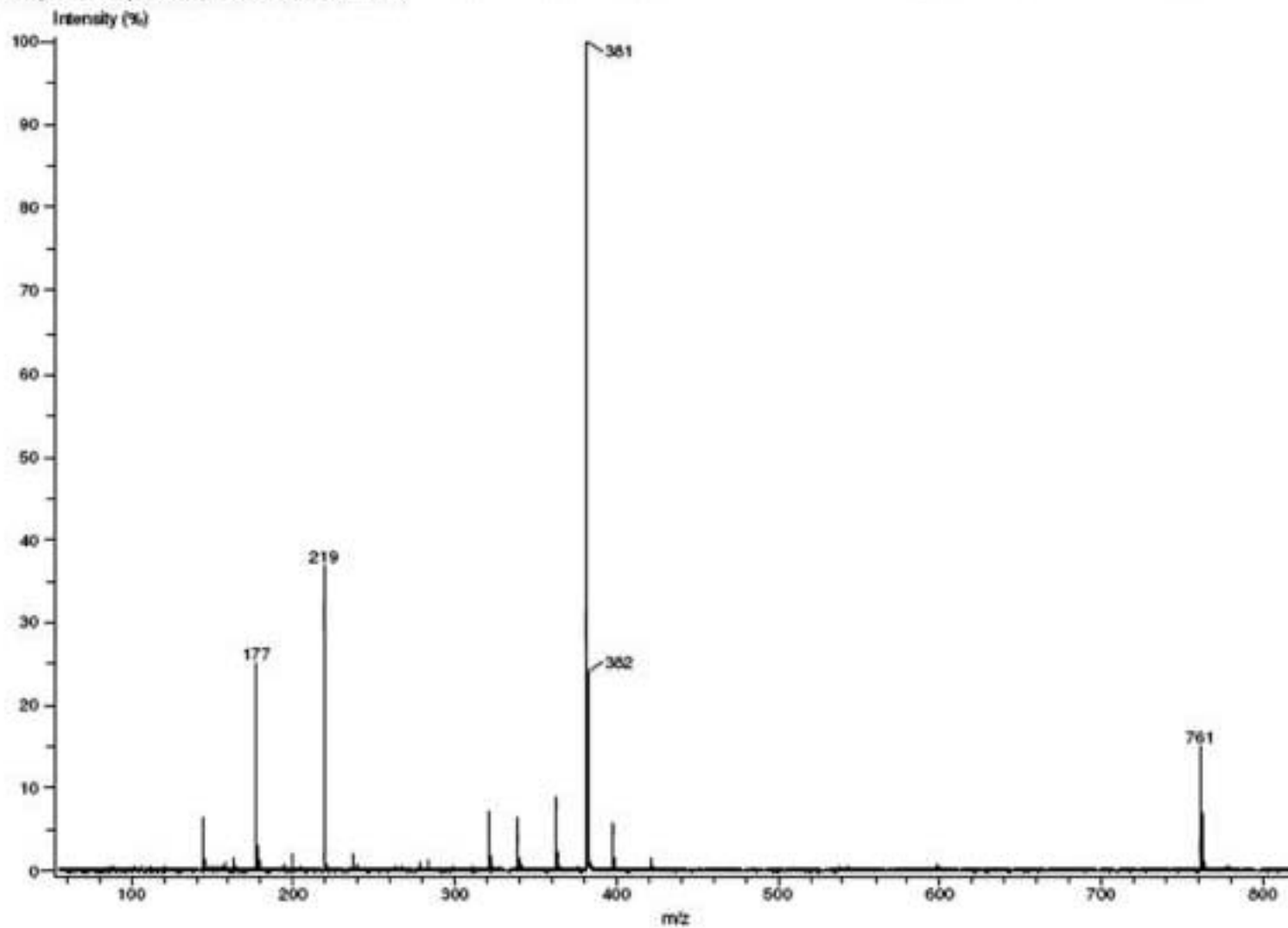


MS Retro-Curcuminoid 11

Experiment Date/Time: 9/22/2015 11:10:56 AM
Creation Parameters: Average(MS[1] Time:0.52..0.63)
Dr Enriquez Raul Operator: Carmen Garcia/Javier Perez

Acq. Data Name: 2574 Ferulic.methOH
MS Tune Method Name: DART.

Instrument Configuration: JMS-T100LC

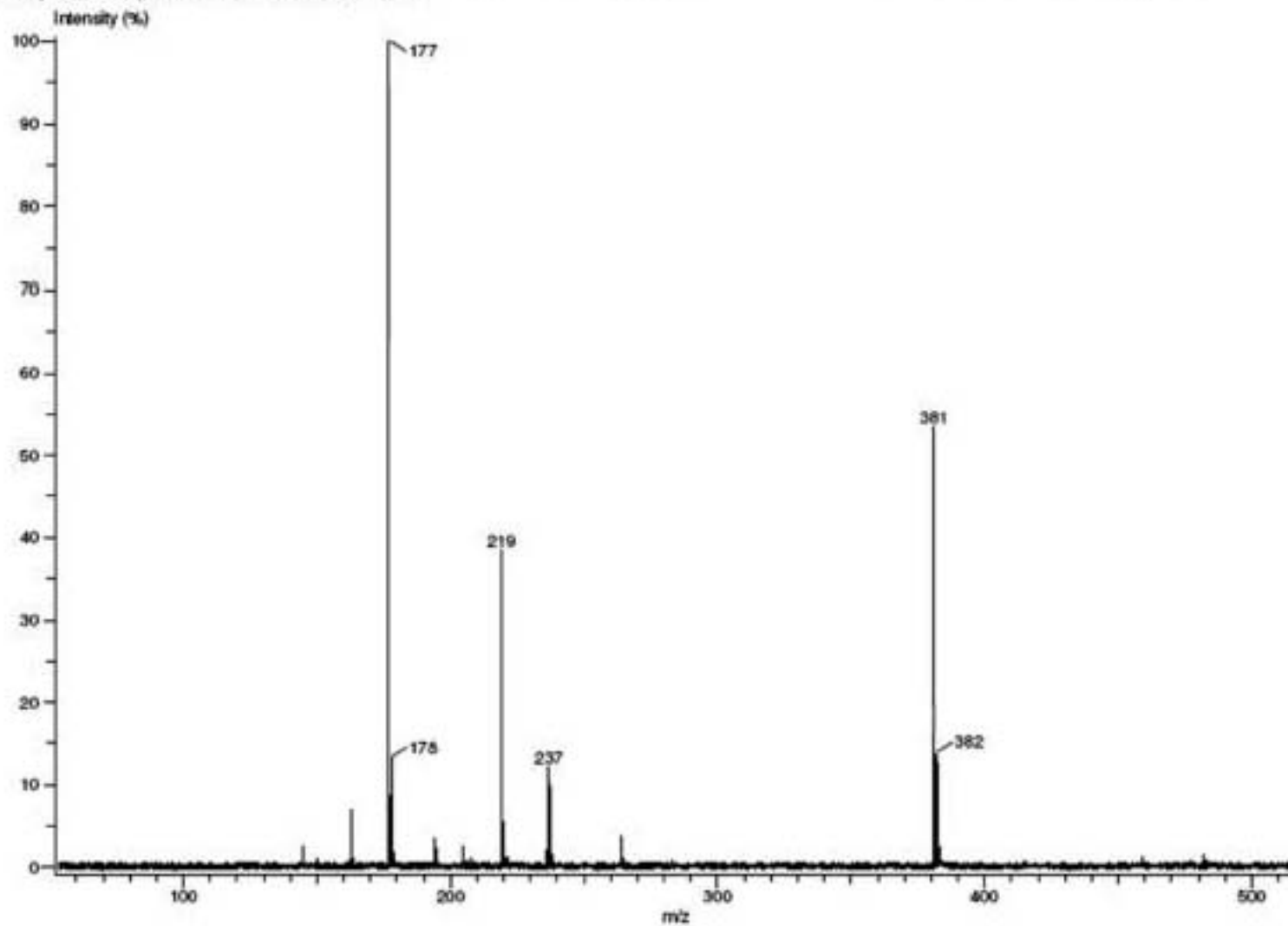


MS Retro-Curcuminoid 12

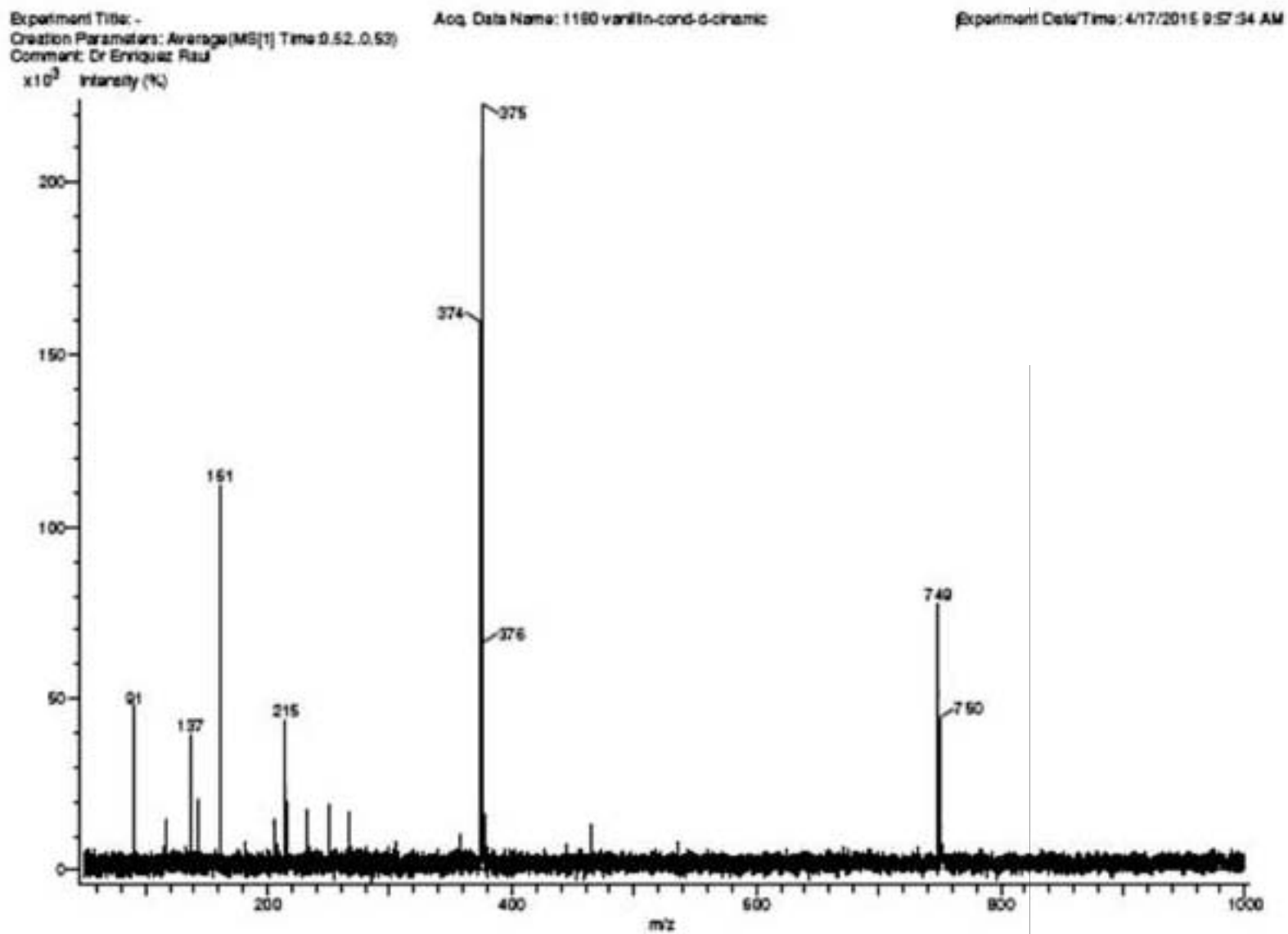
Experiment Date/Time: 9/24/2015 11:23:12 AM
Creation Parameters: Average(MS[1] Time:0.33-.0.36)
Dr Enriquez Raul Operator: Carmen Garcia/Javier Perez

Acq. Data Name: 2946 Para-OH-Felurico
MS Tune Method Name: DART.

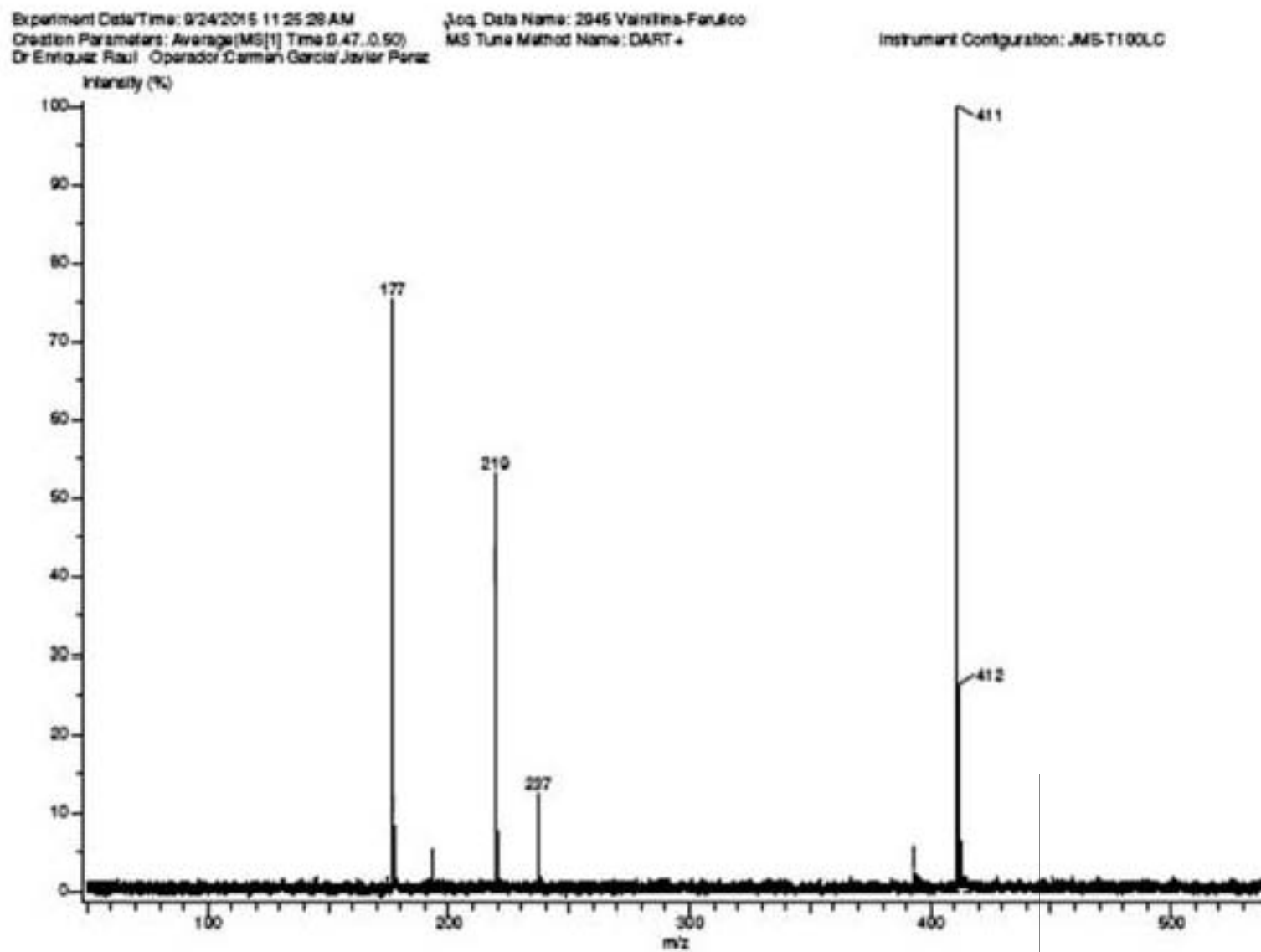
Instrument Configuration: JMS-T100LC



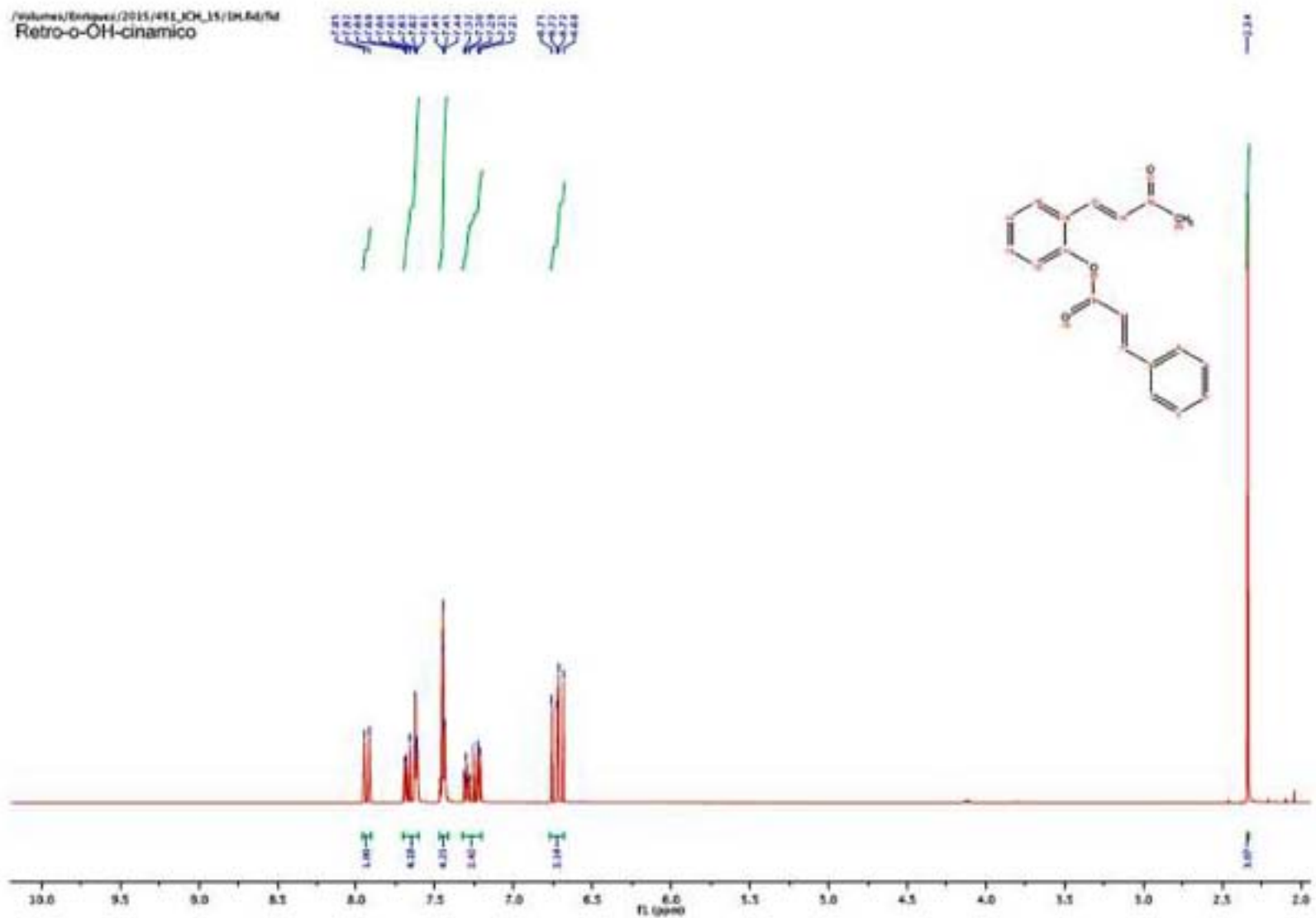
MS Retro-Curcuminoid 13



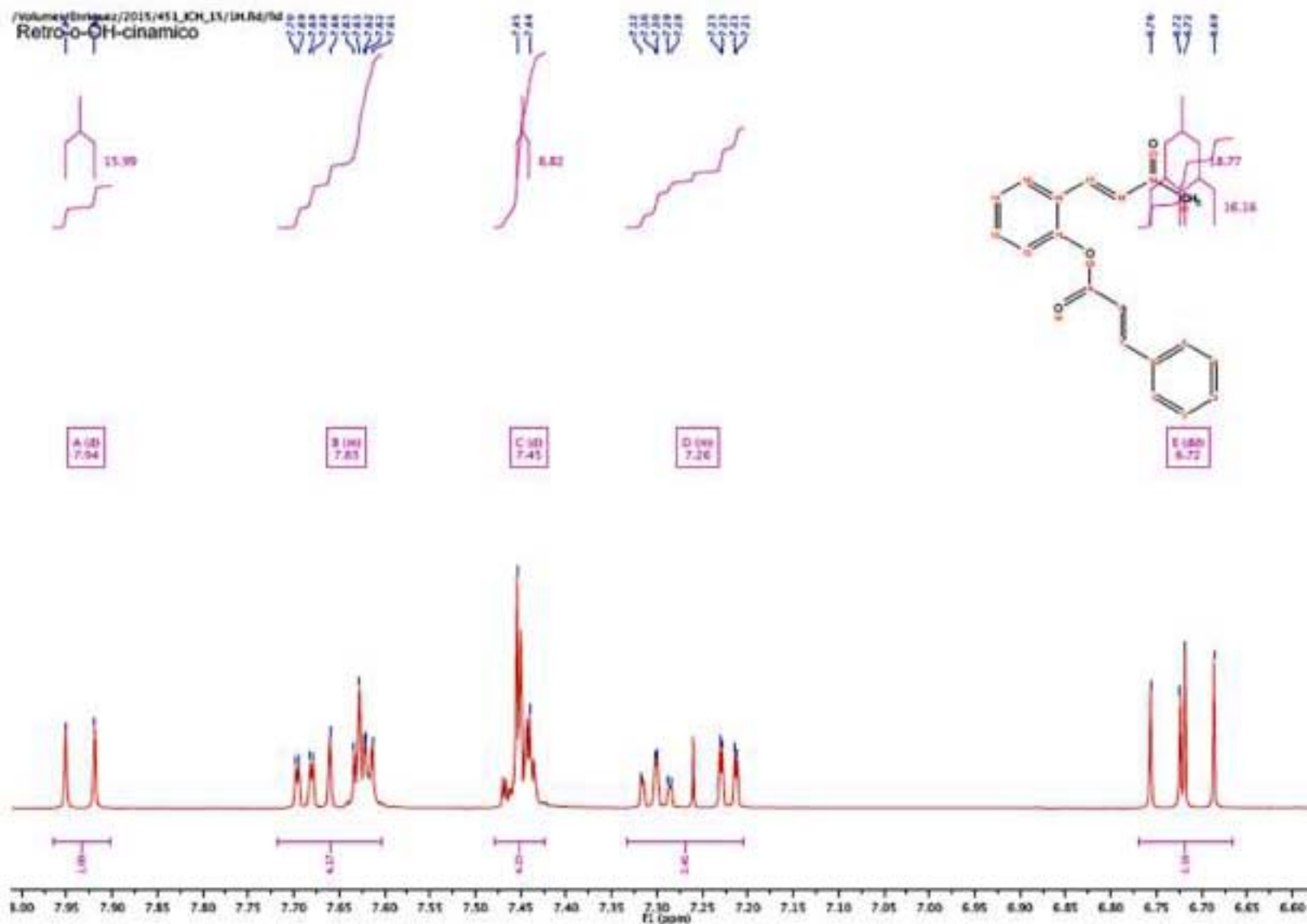
MS Retro-Curcuminoid 14



NMR Retro-Curcuminoid 7

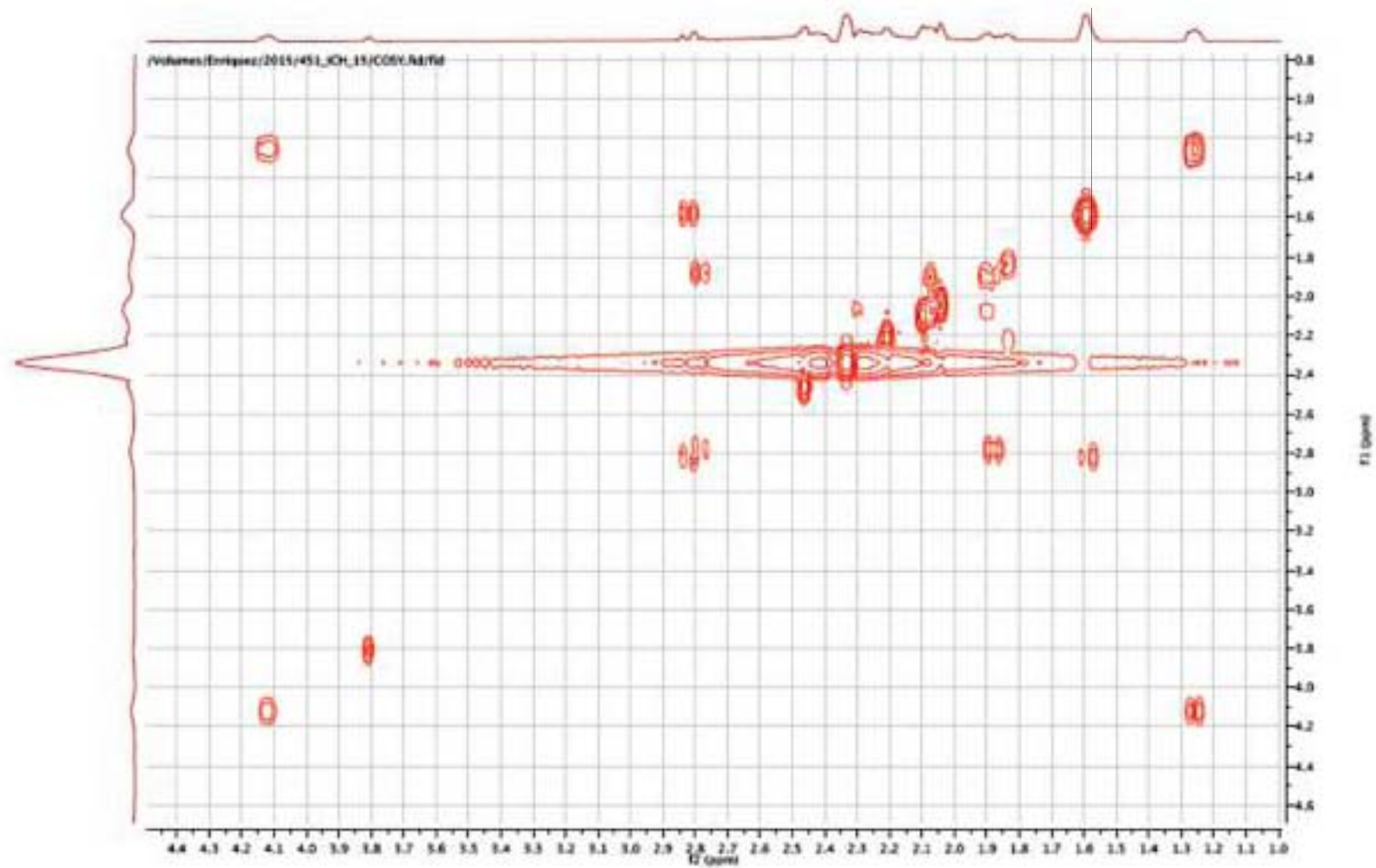


NMR Retro-Curcuminoid 7



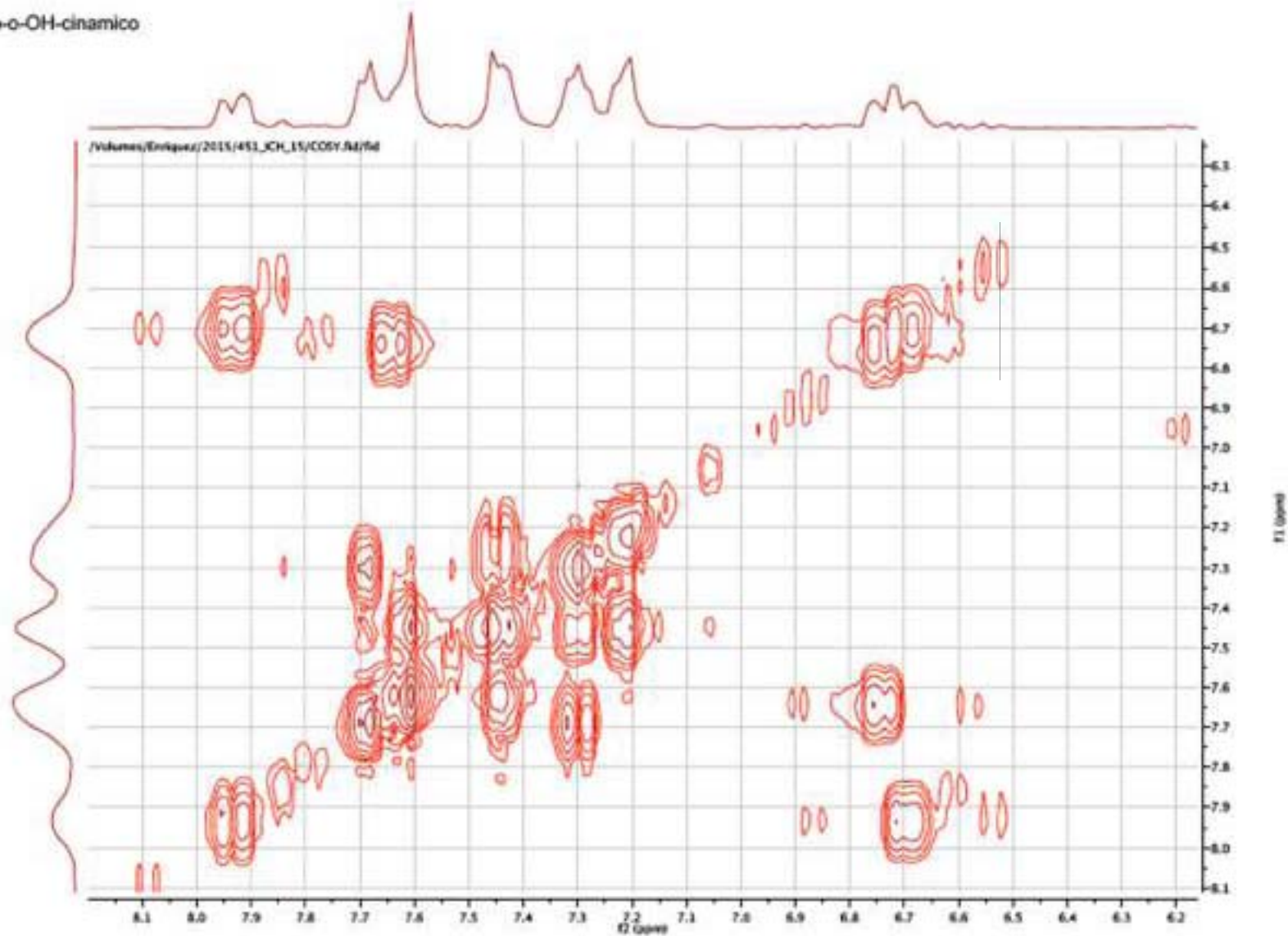
NMR Retro-Curcuminoid 7

Retro-o-OH-cinamico

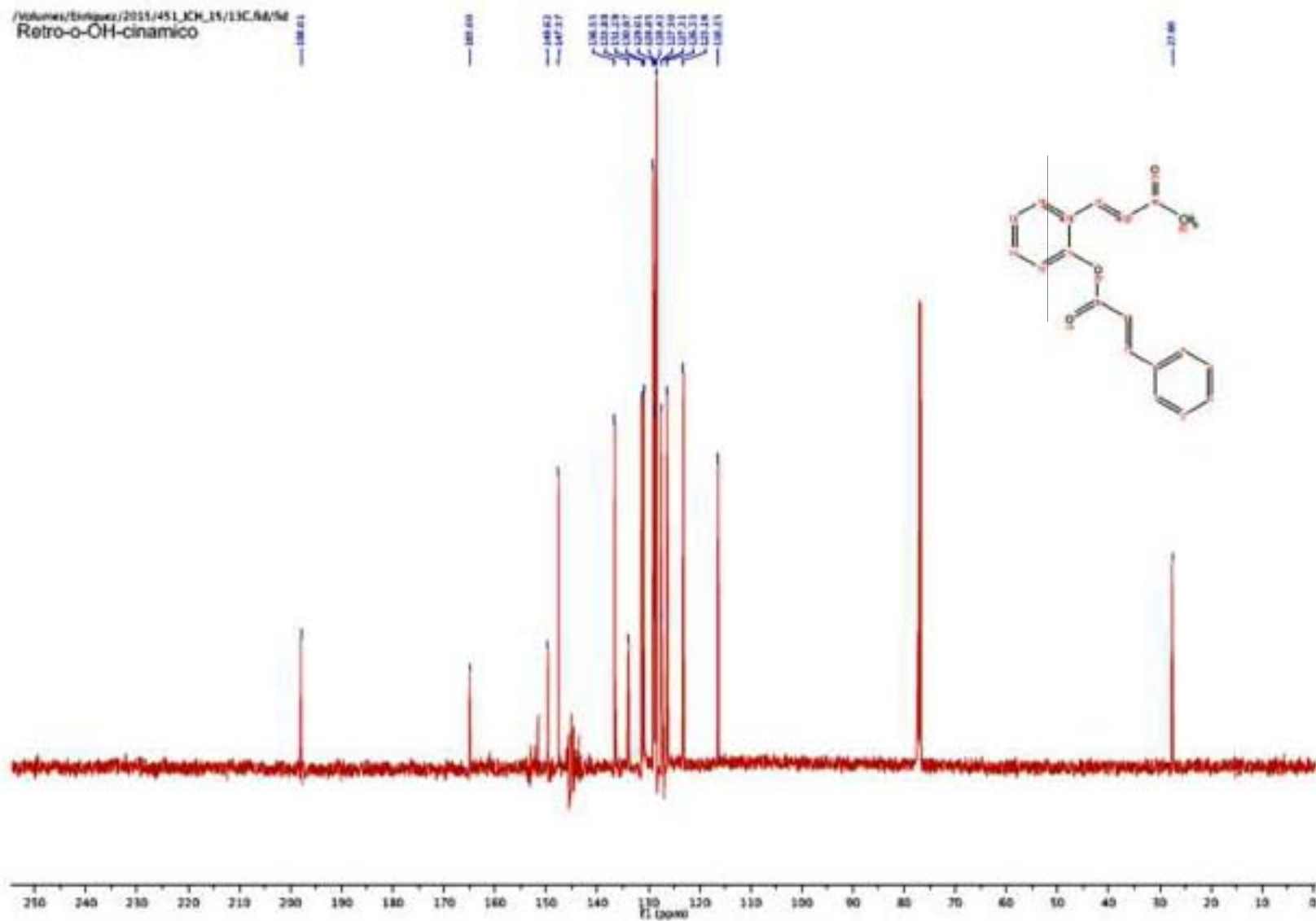


NMR Retro-Curcuminoid 7

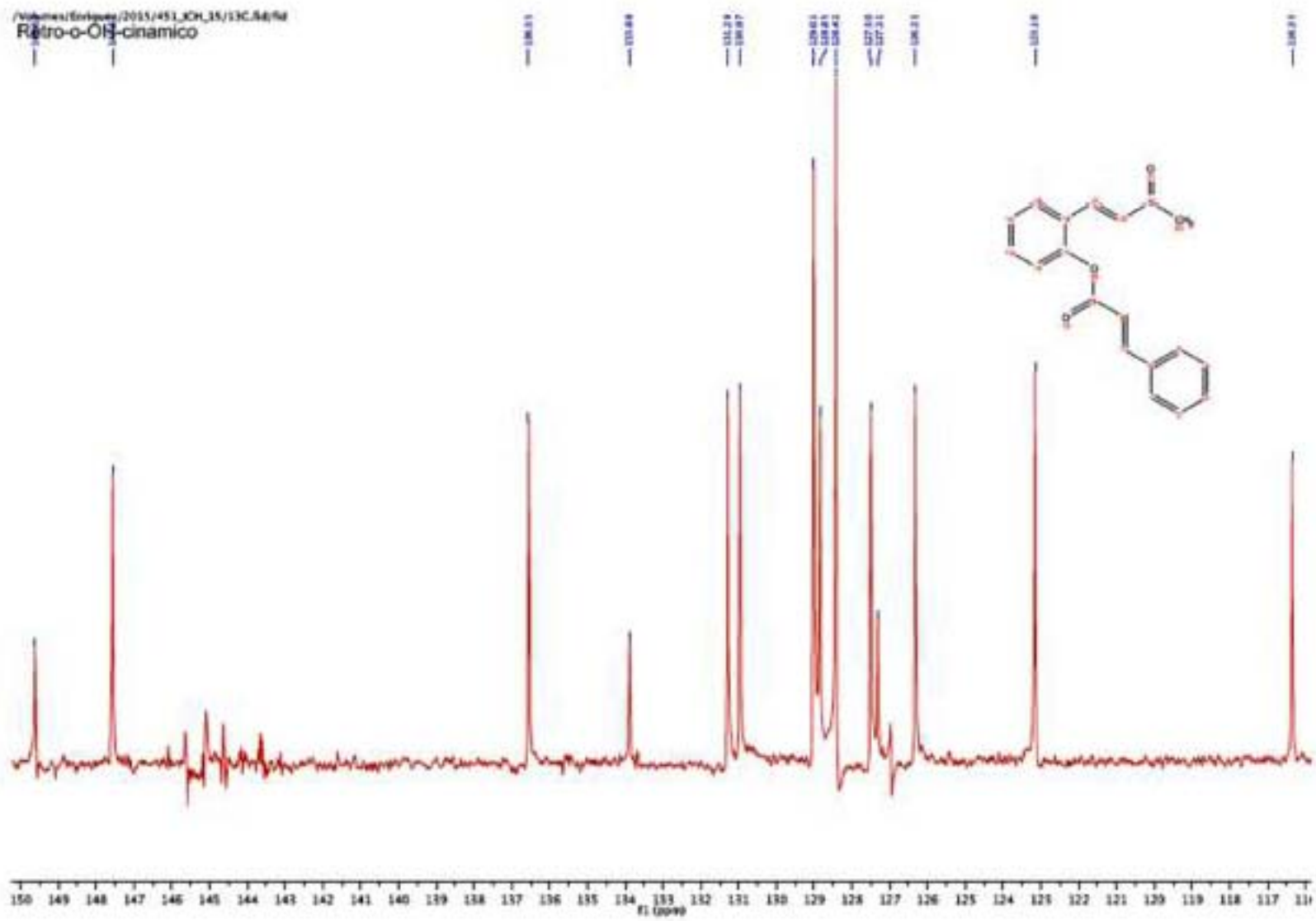
Retro-o-OH-cinamico



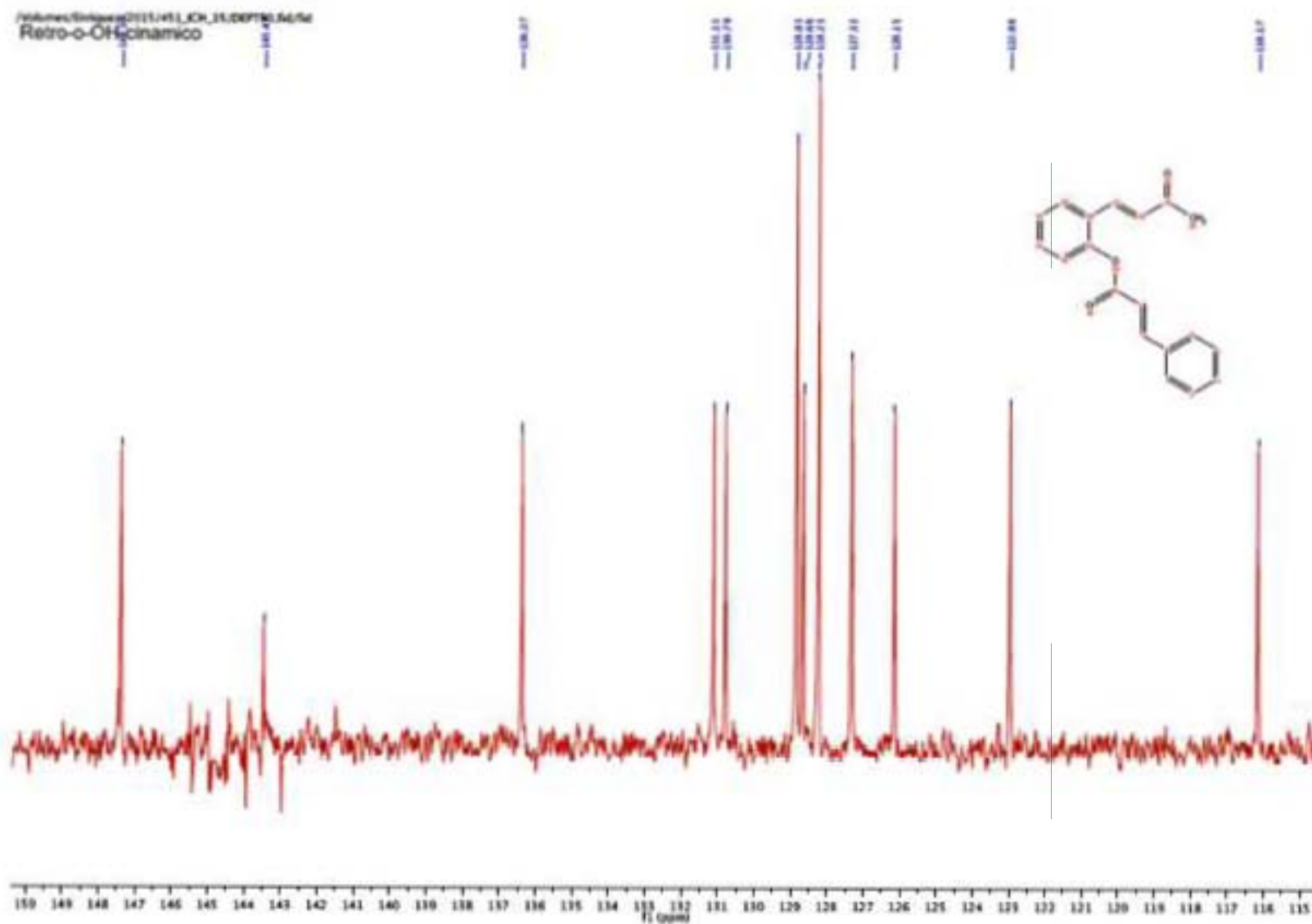
NMR Retro-Curcuminoid 7



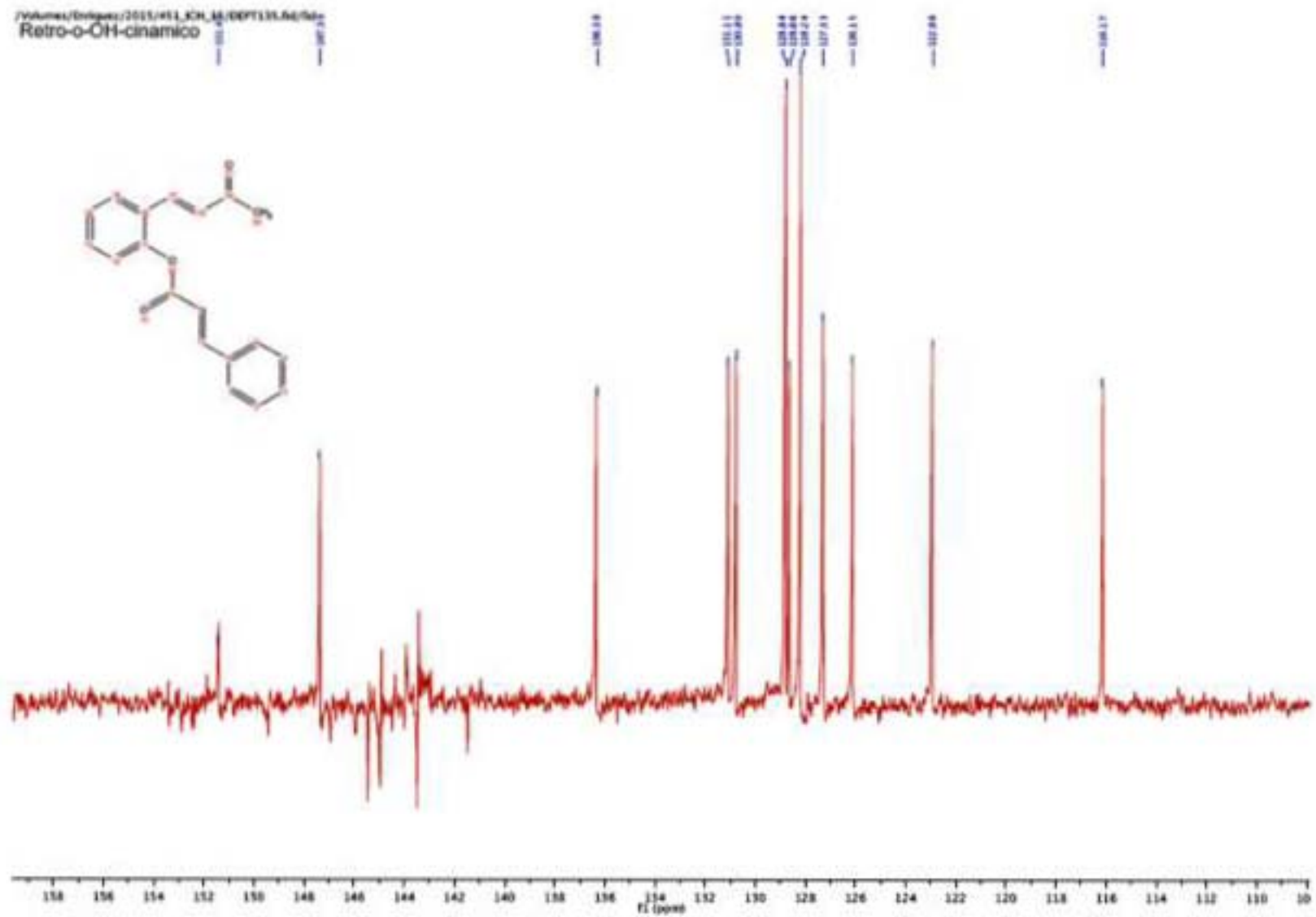
NMR Retro-Curcuminoid 7



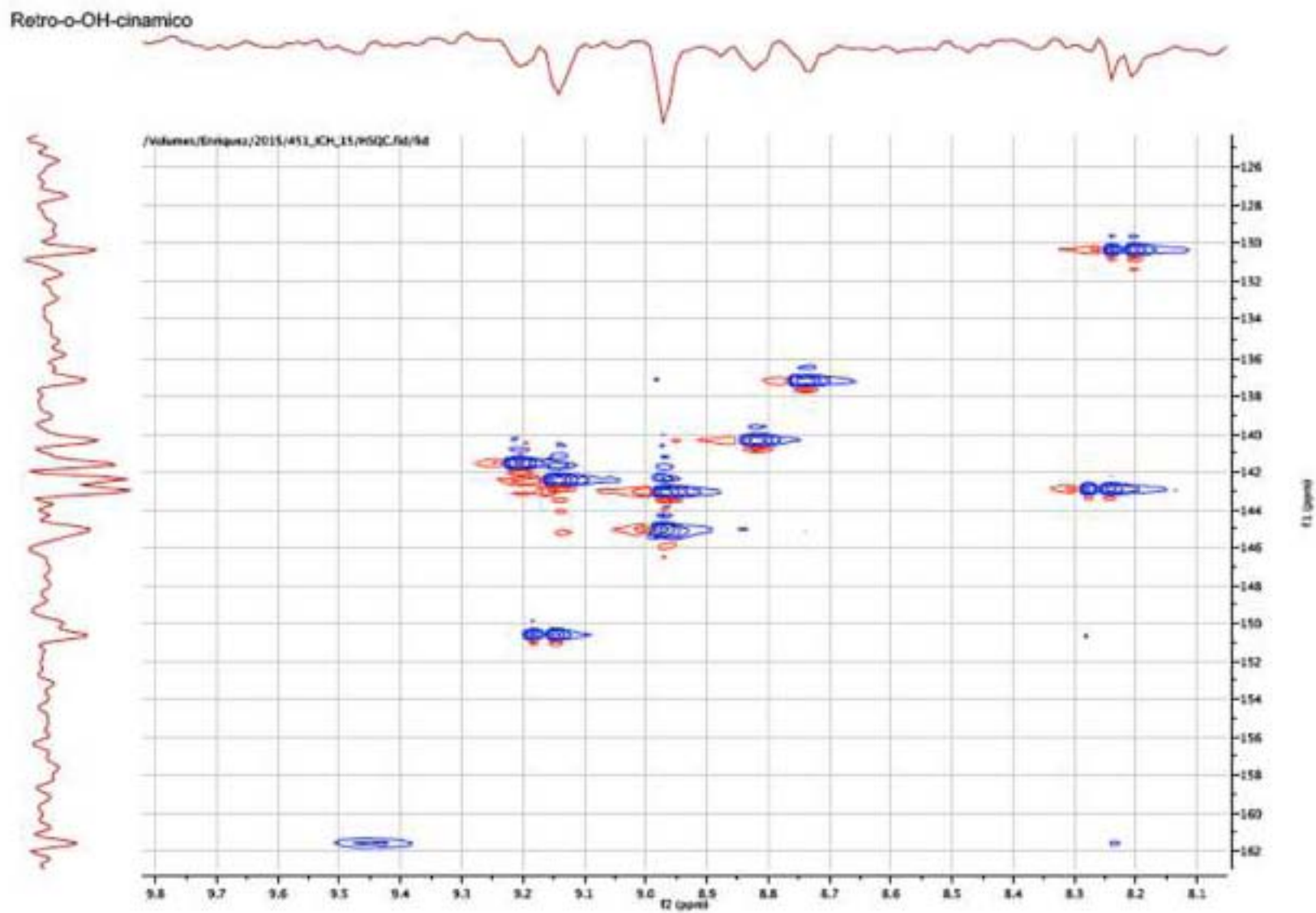
NMR Retro-Curcuminoid 7



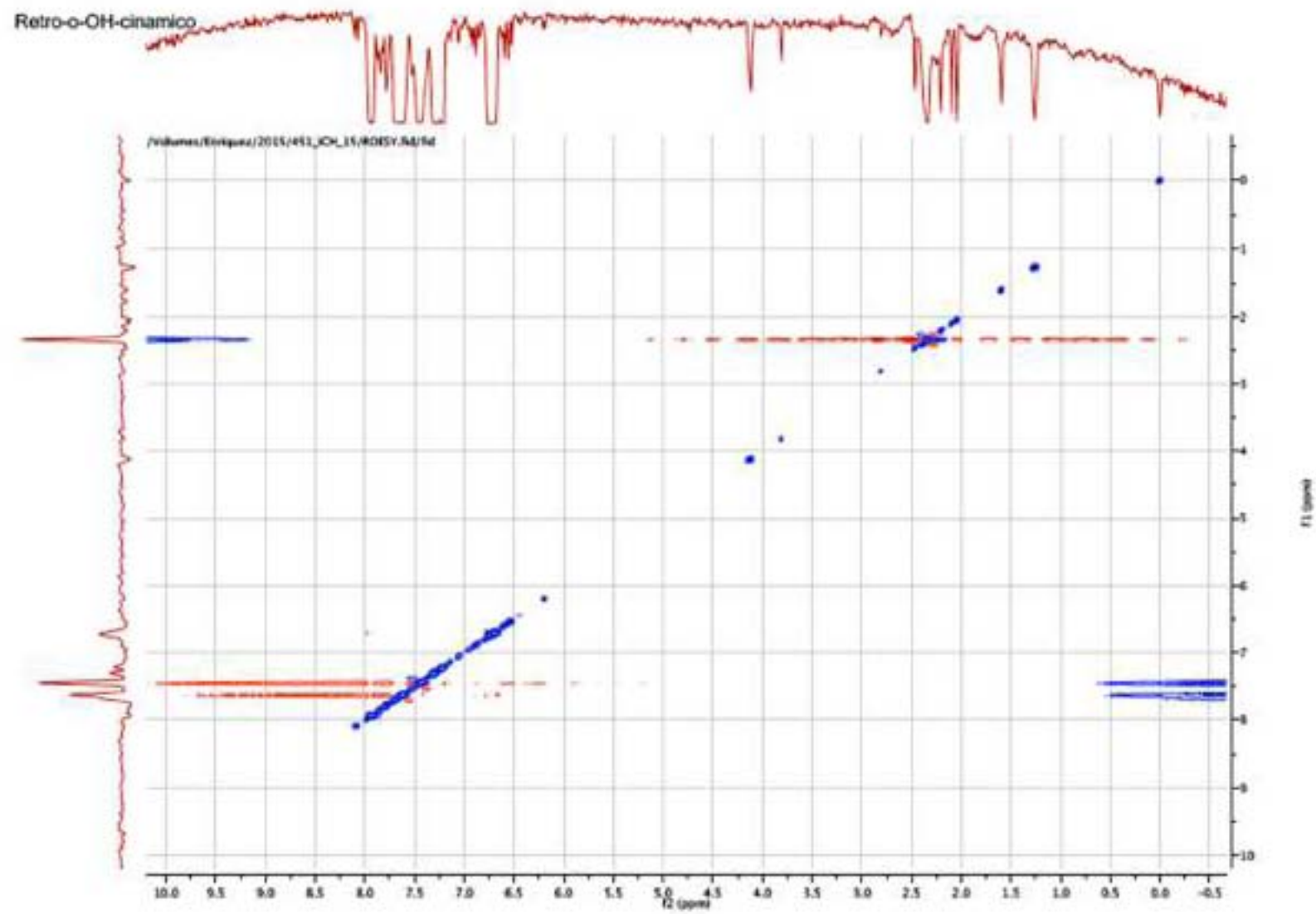
NMR Retro-Curcuminoid 7



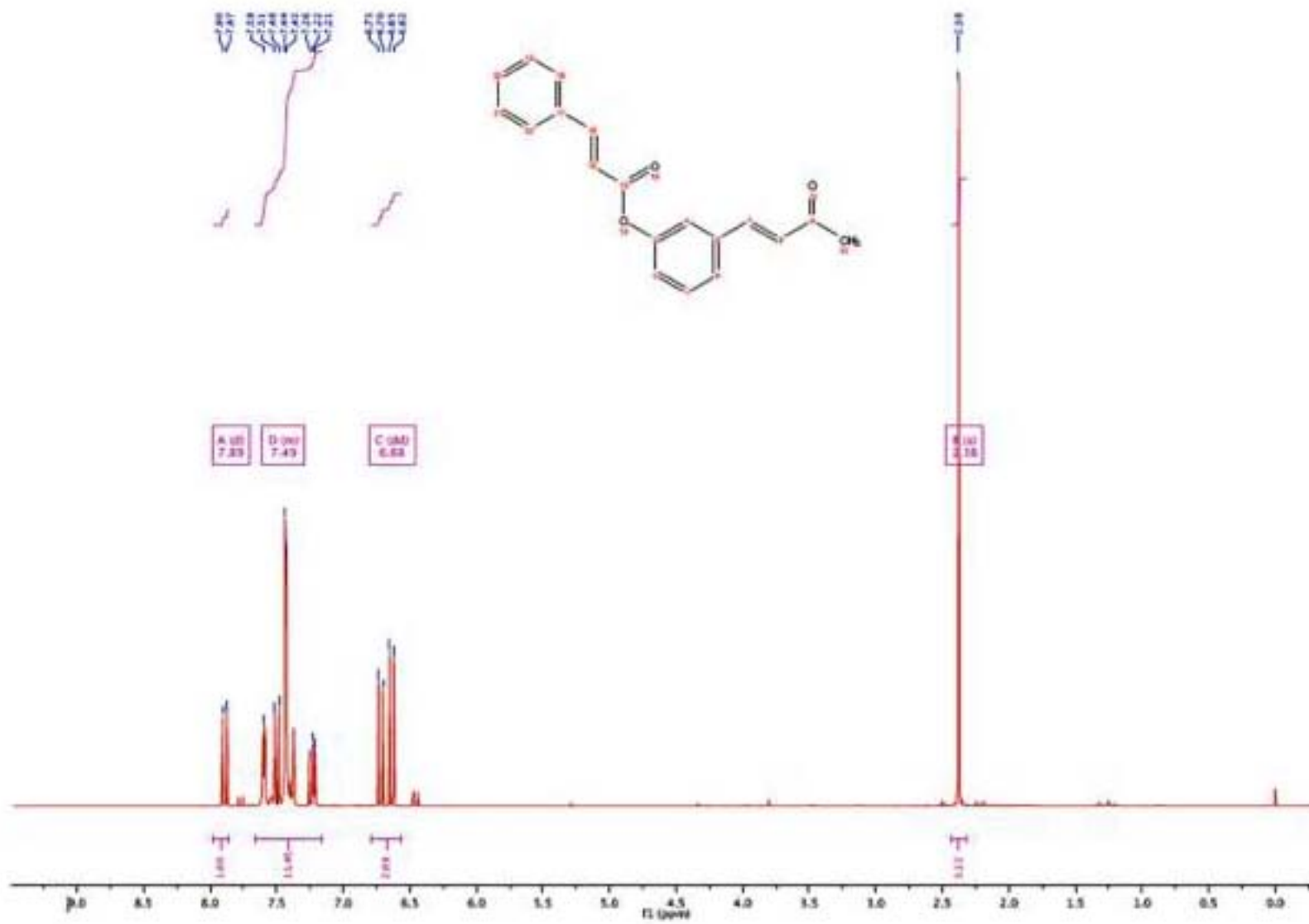
NMR Retro-Curcuminoid 7



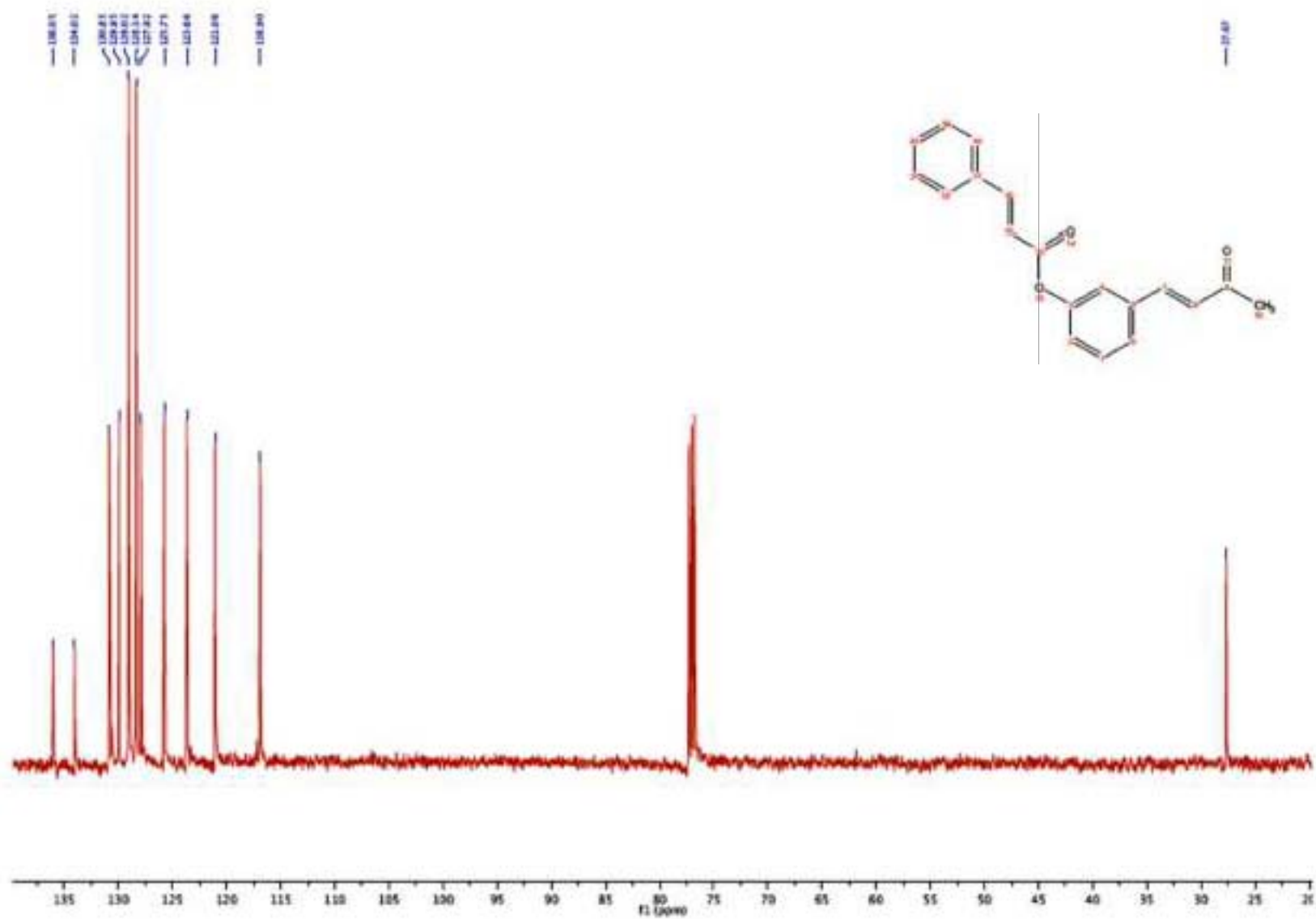
NMR Retro-Curcuminoid 7



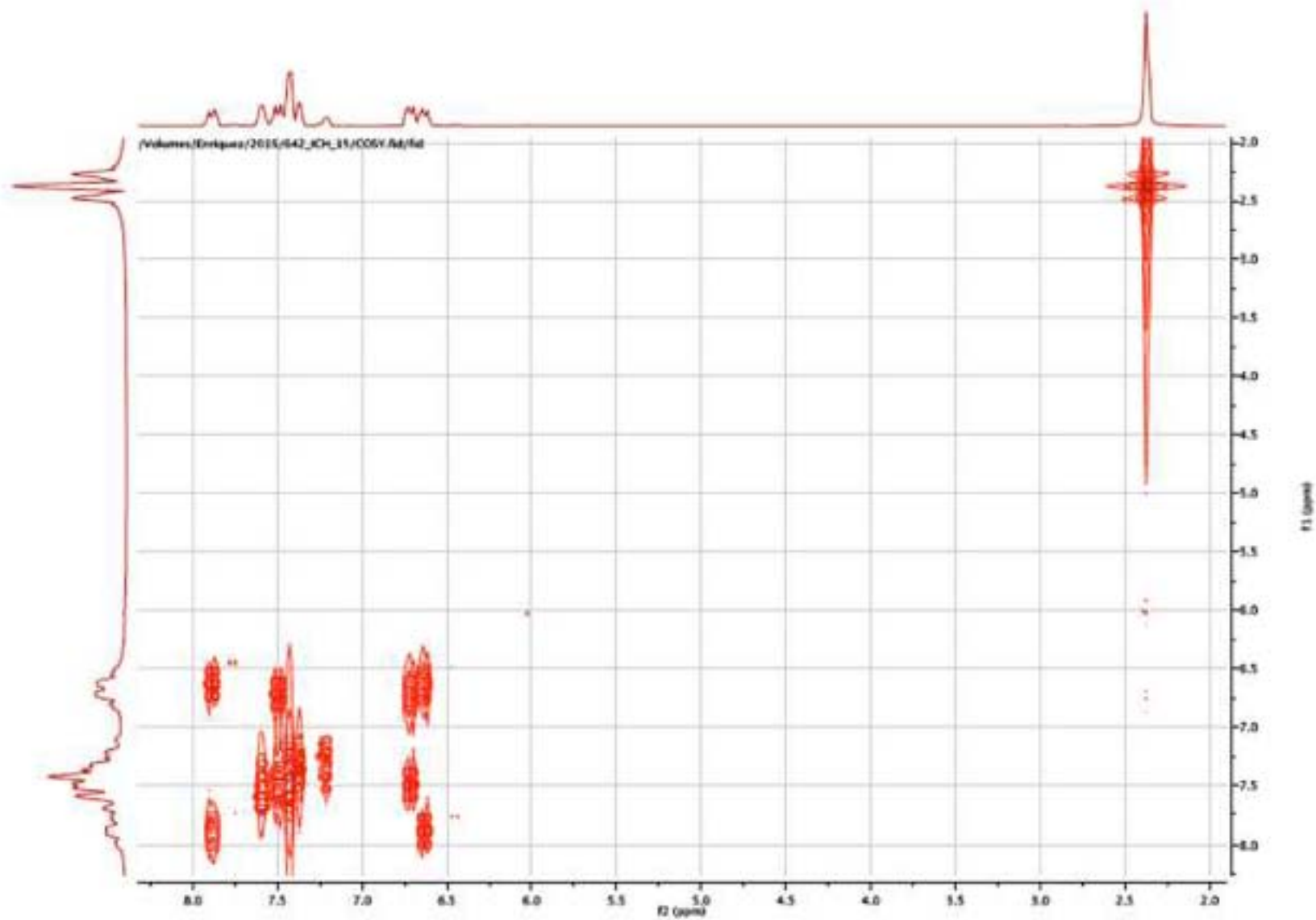
NMR Retro-Curcuminoid 8



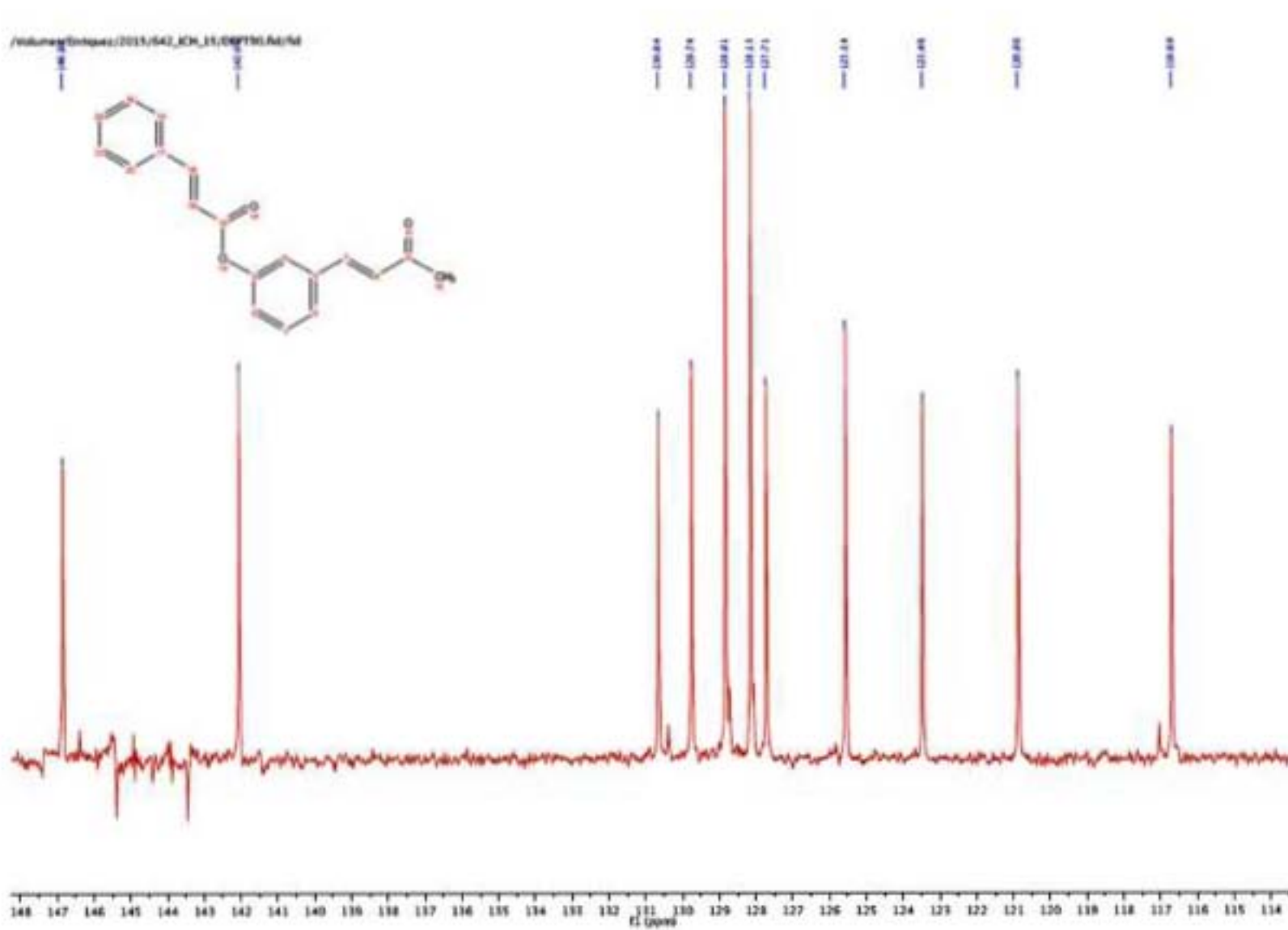
NMR Retro-Curcuminoid 8



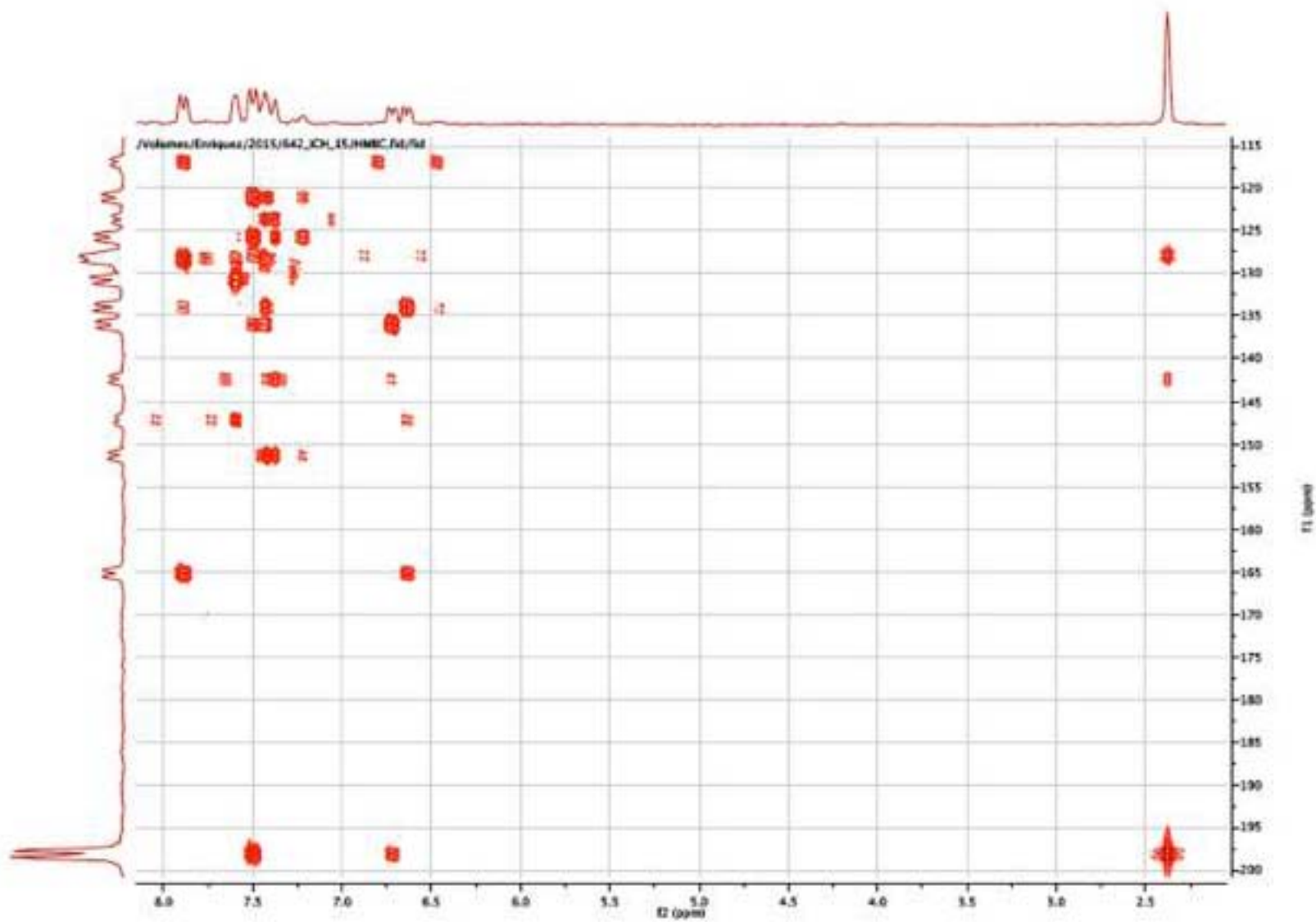
NMR Retro-Curcuminoid 8



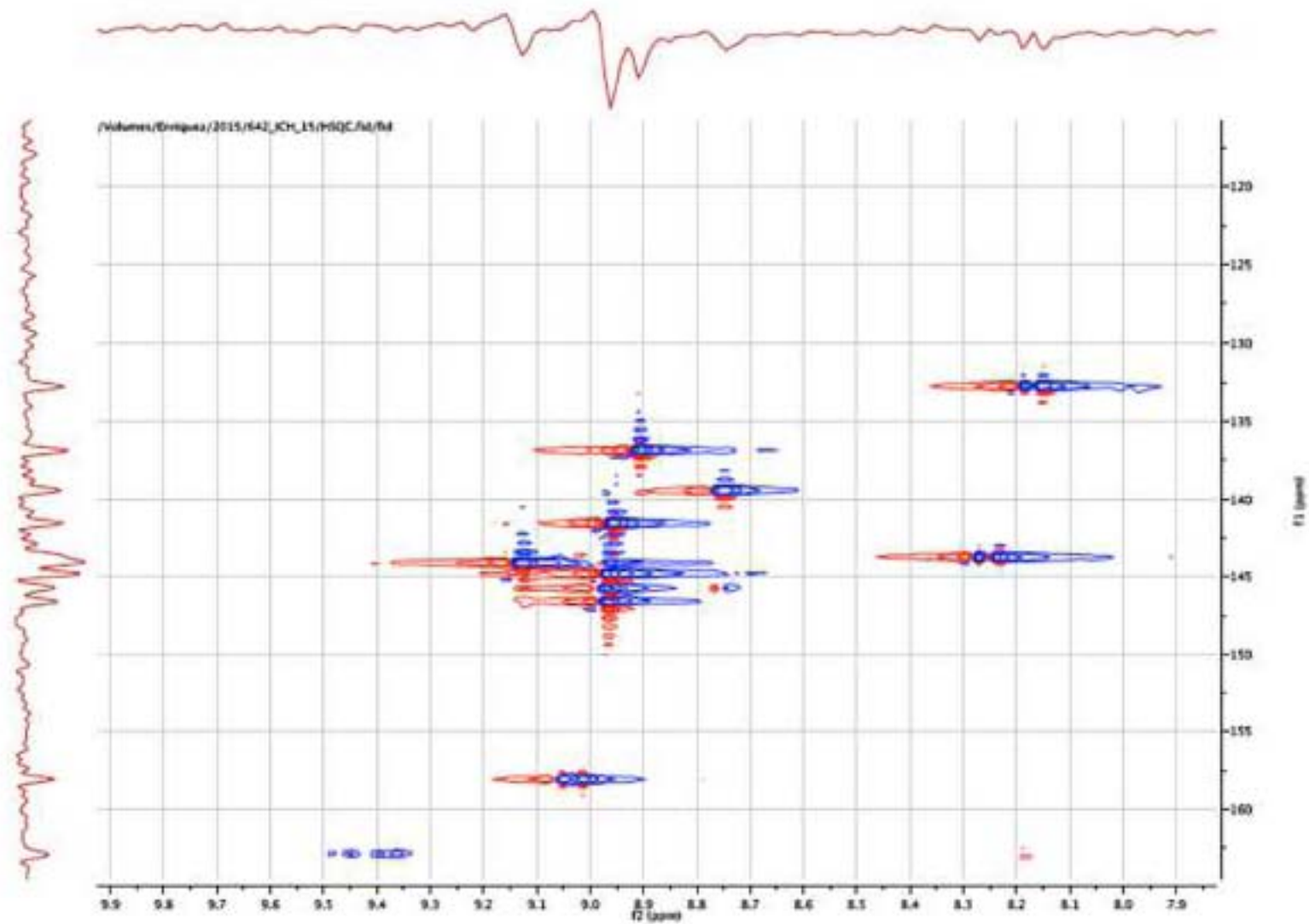
NMR Retro-Curcuminoid 8



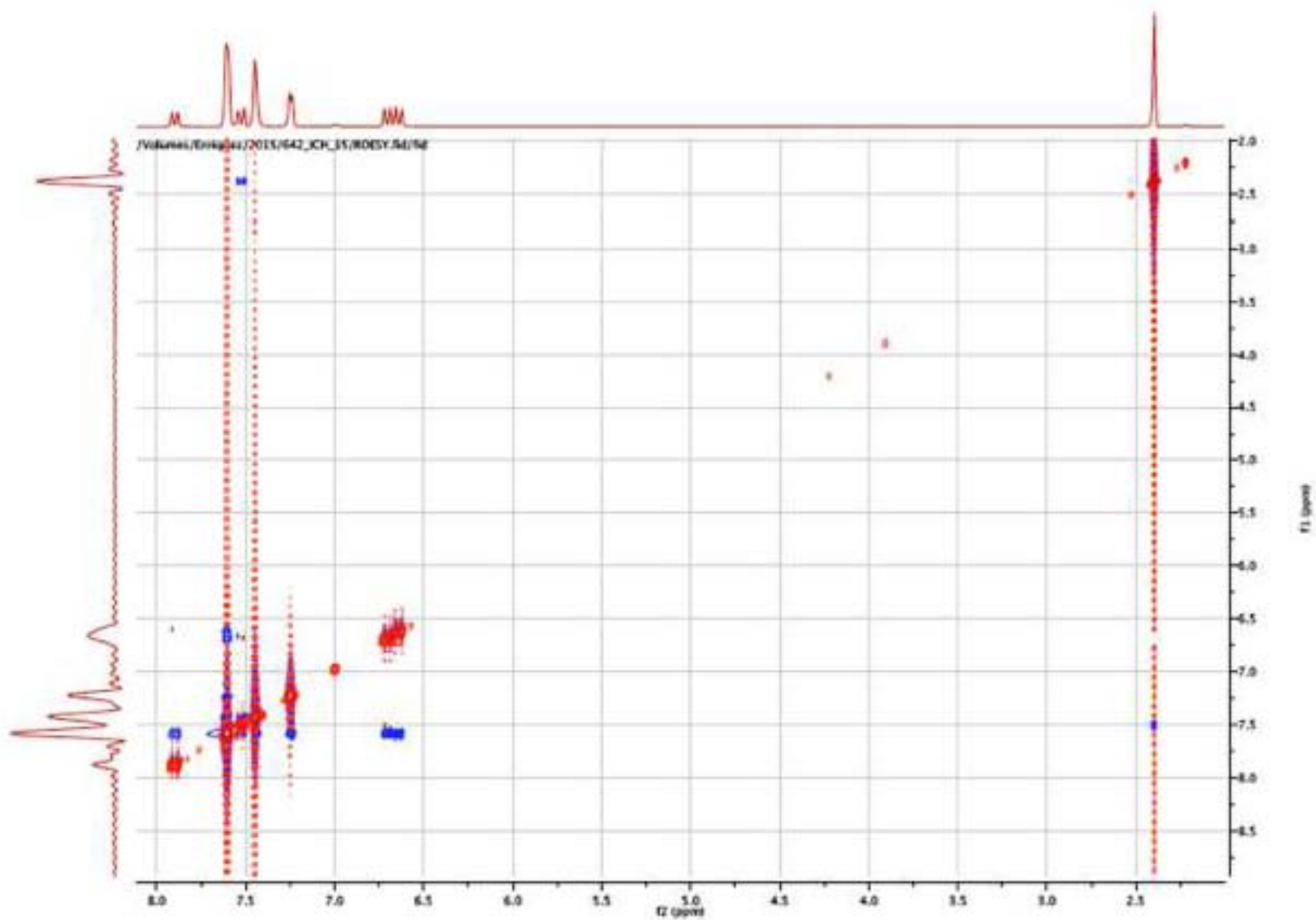
NMR Retro-Curcuminoid 8



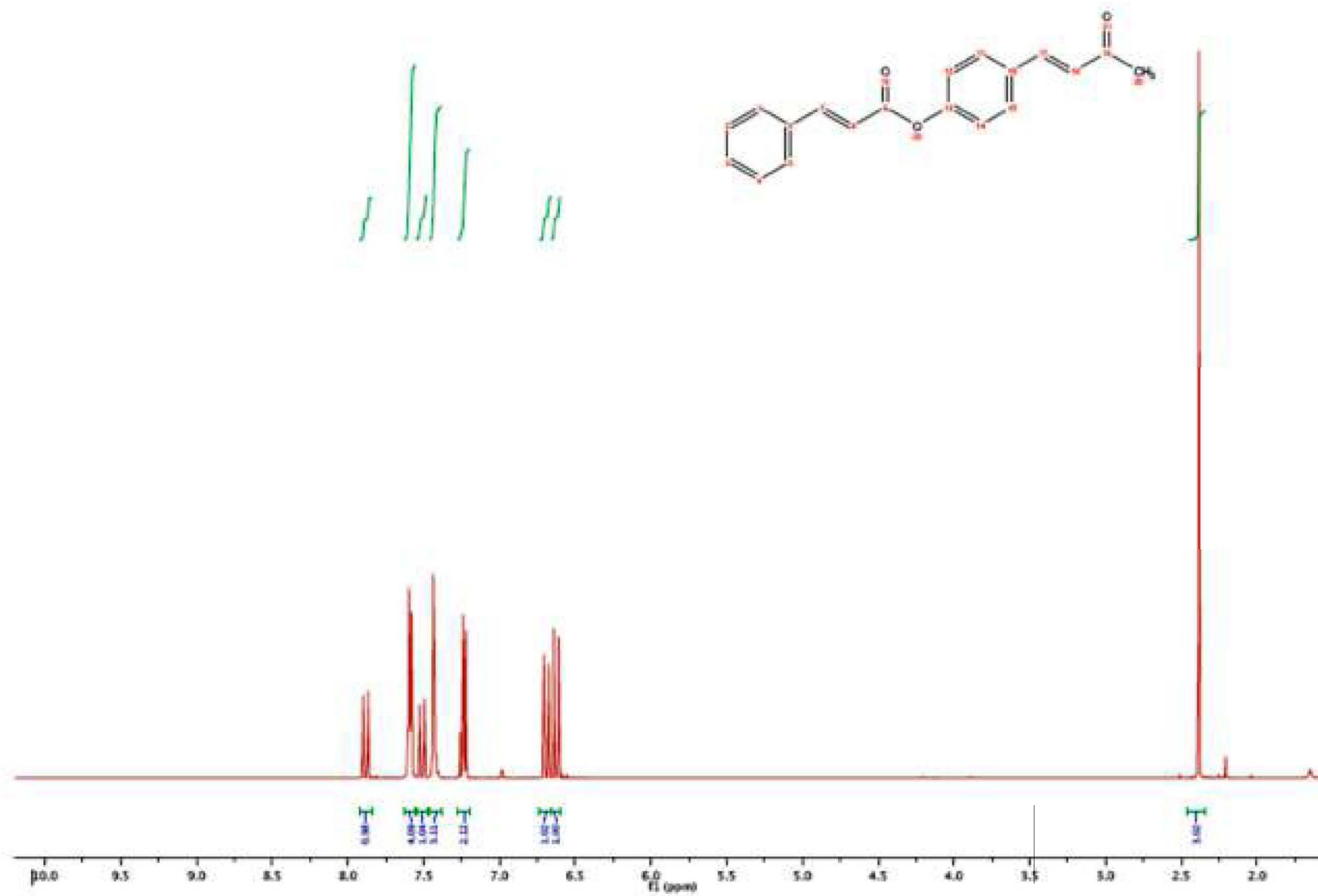
NMR Retro-Curcuminoid 8



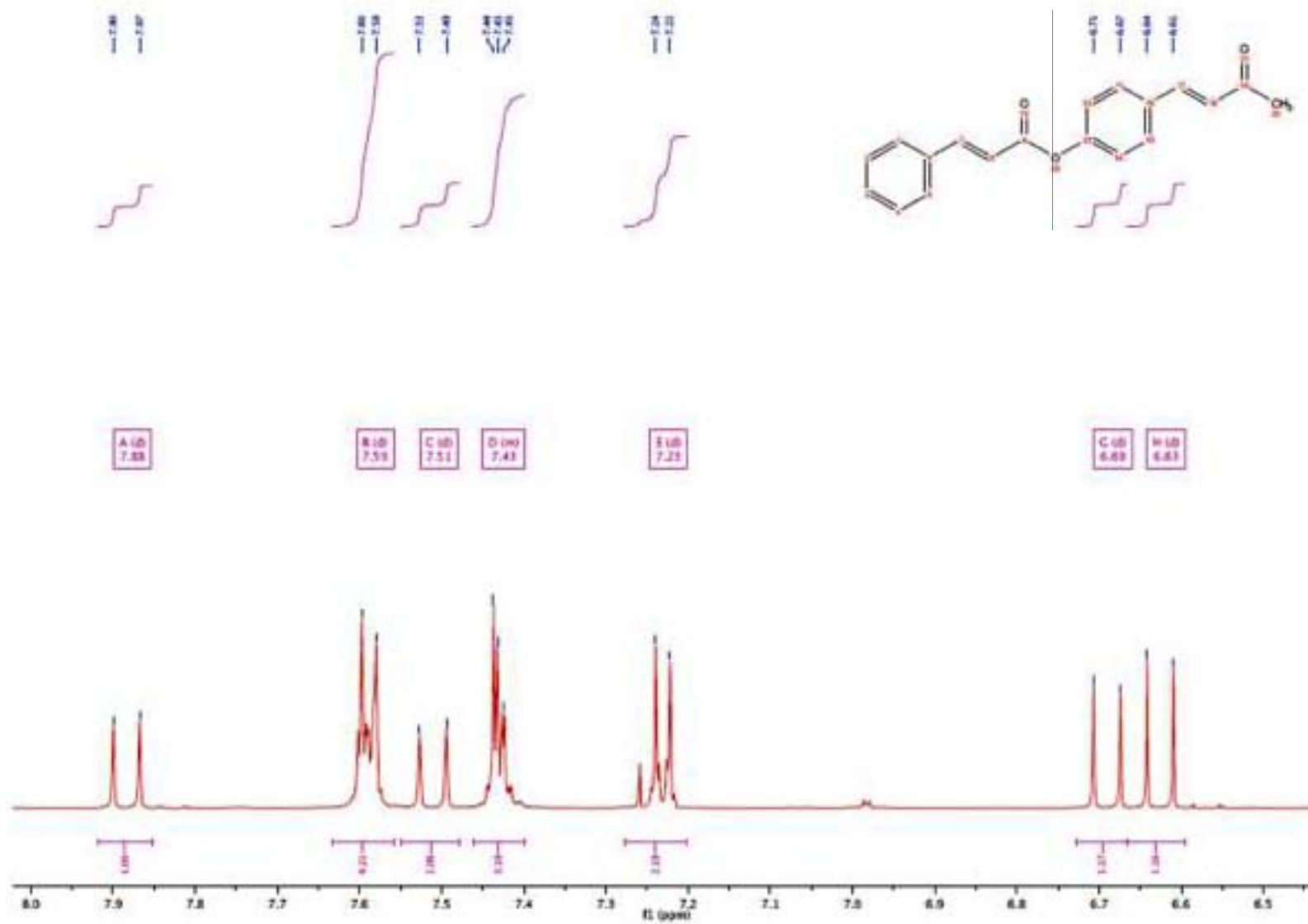
NMR Retro-Curcuminoid 8



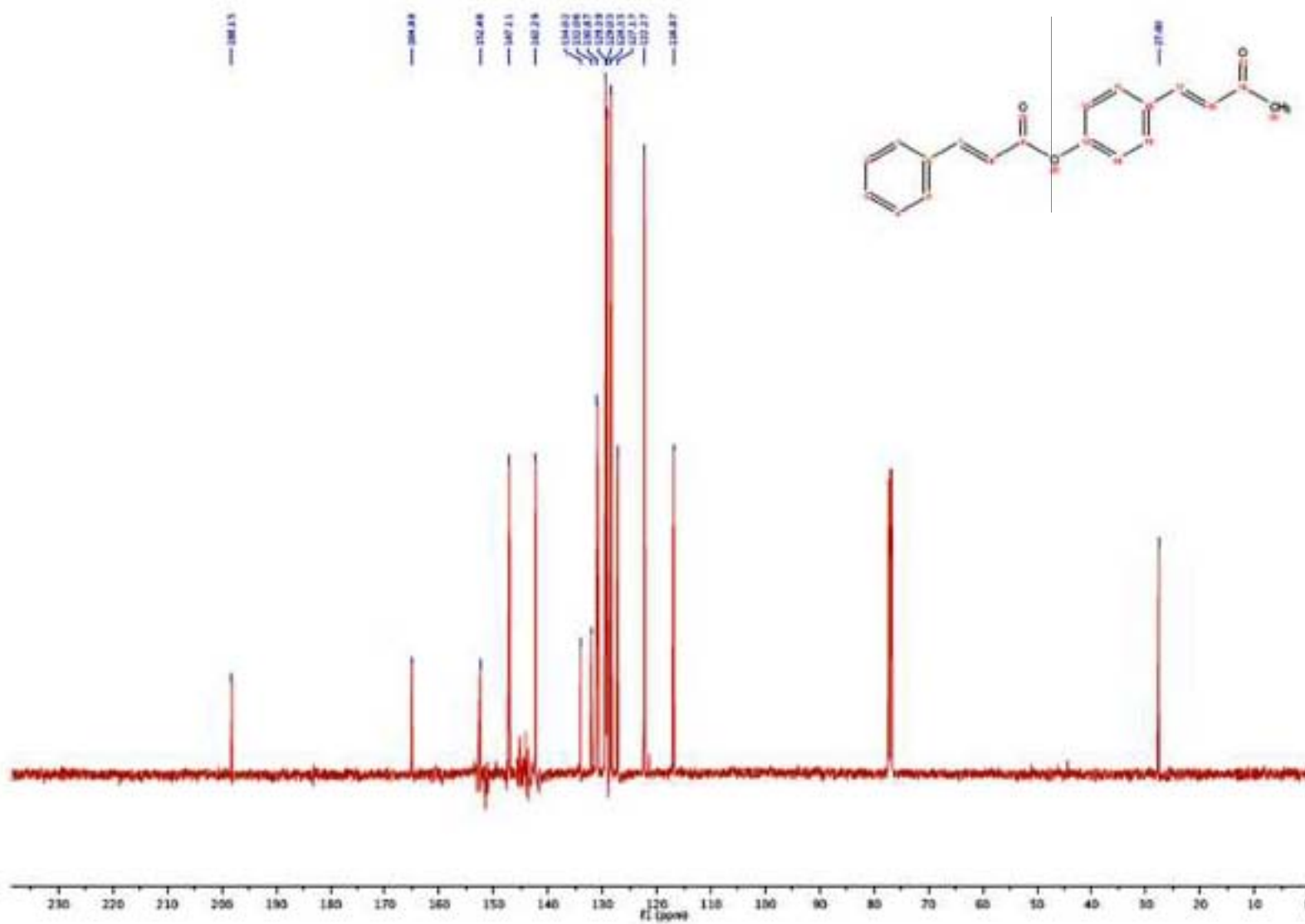
NMR Retro-Curcuminoid 9



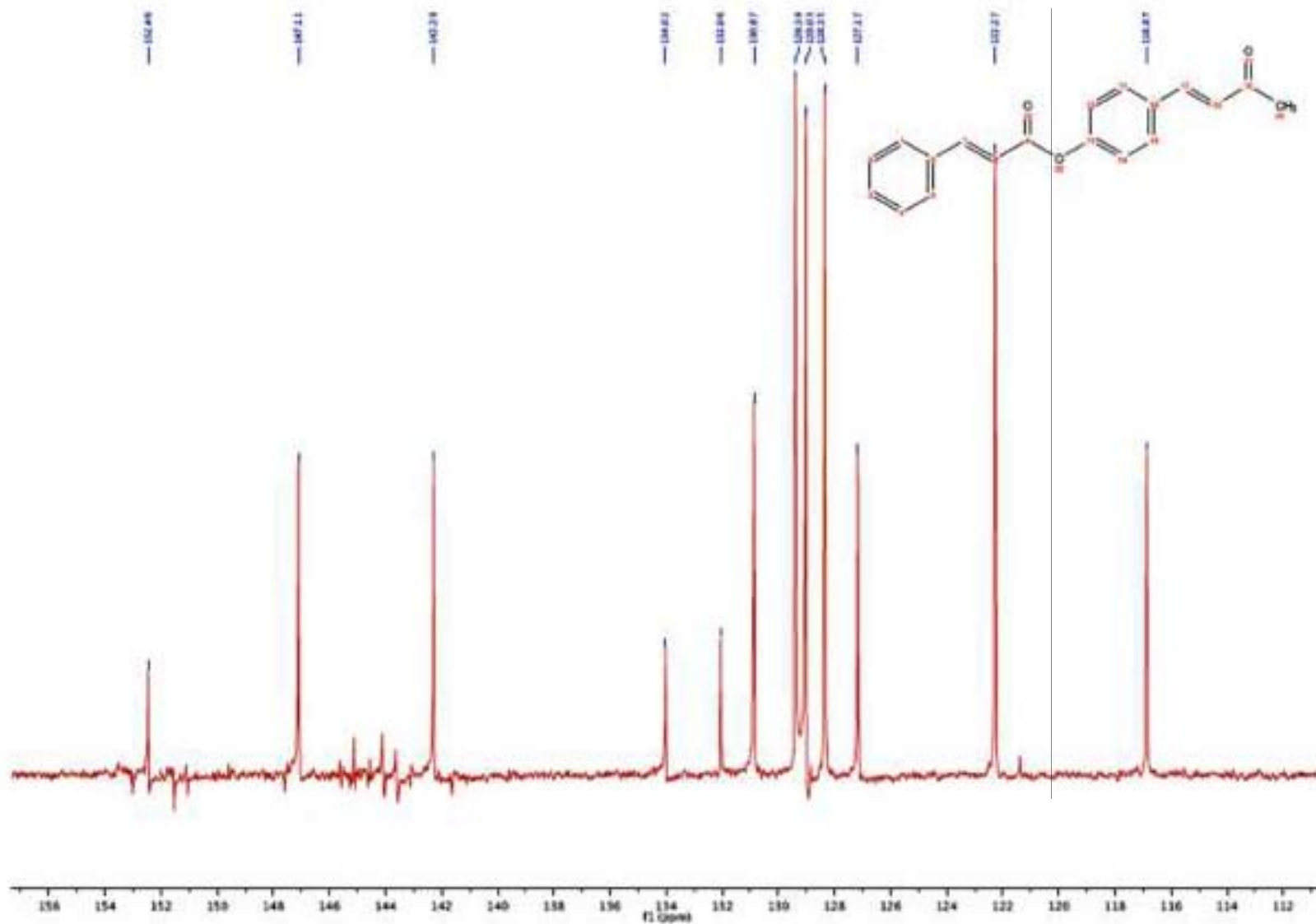
NMR Retro-Curcuminoid 9



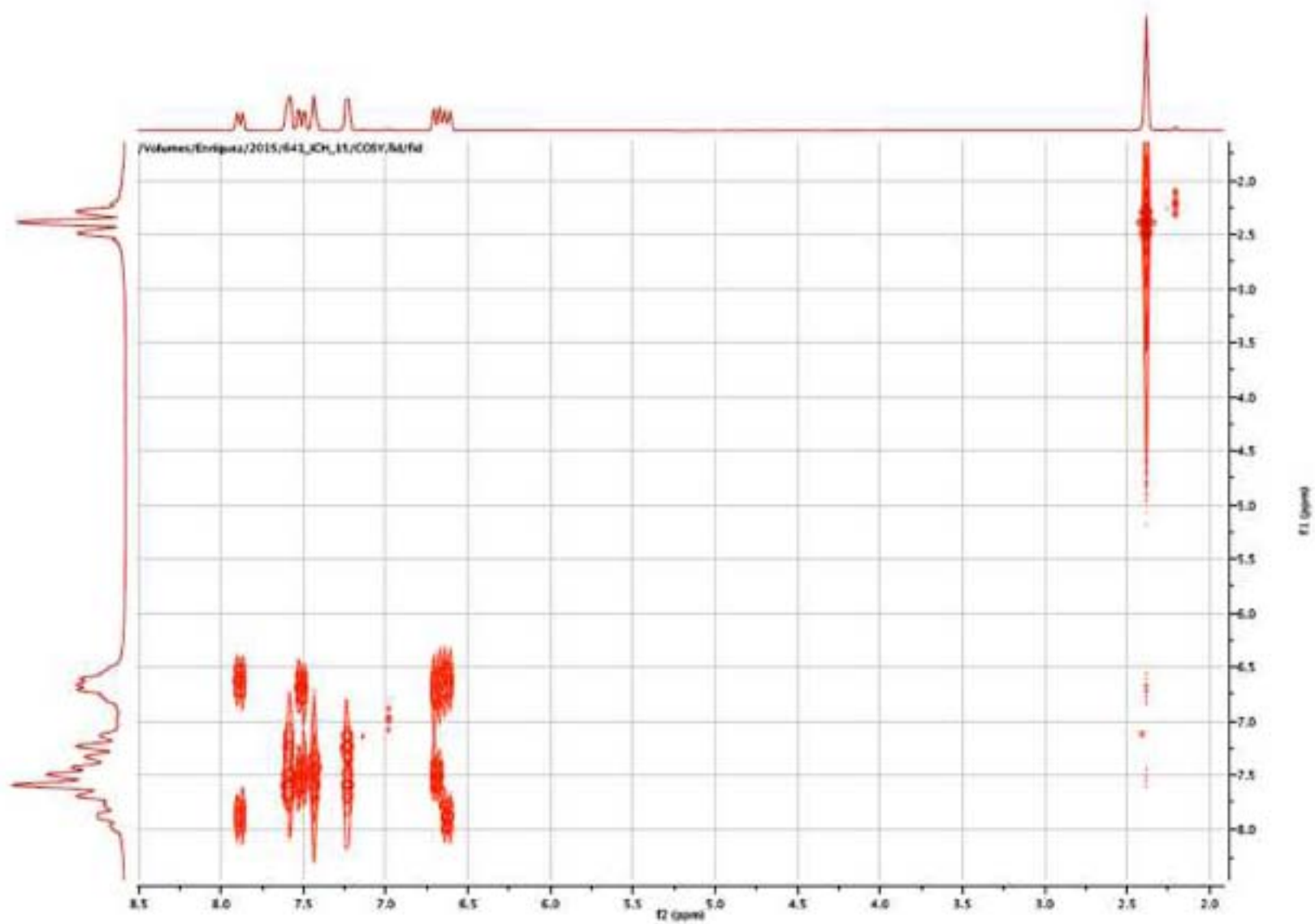
NMR Retro-Curcuminoid 9



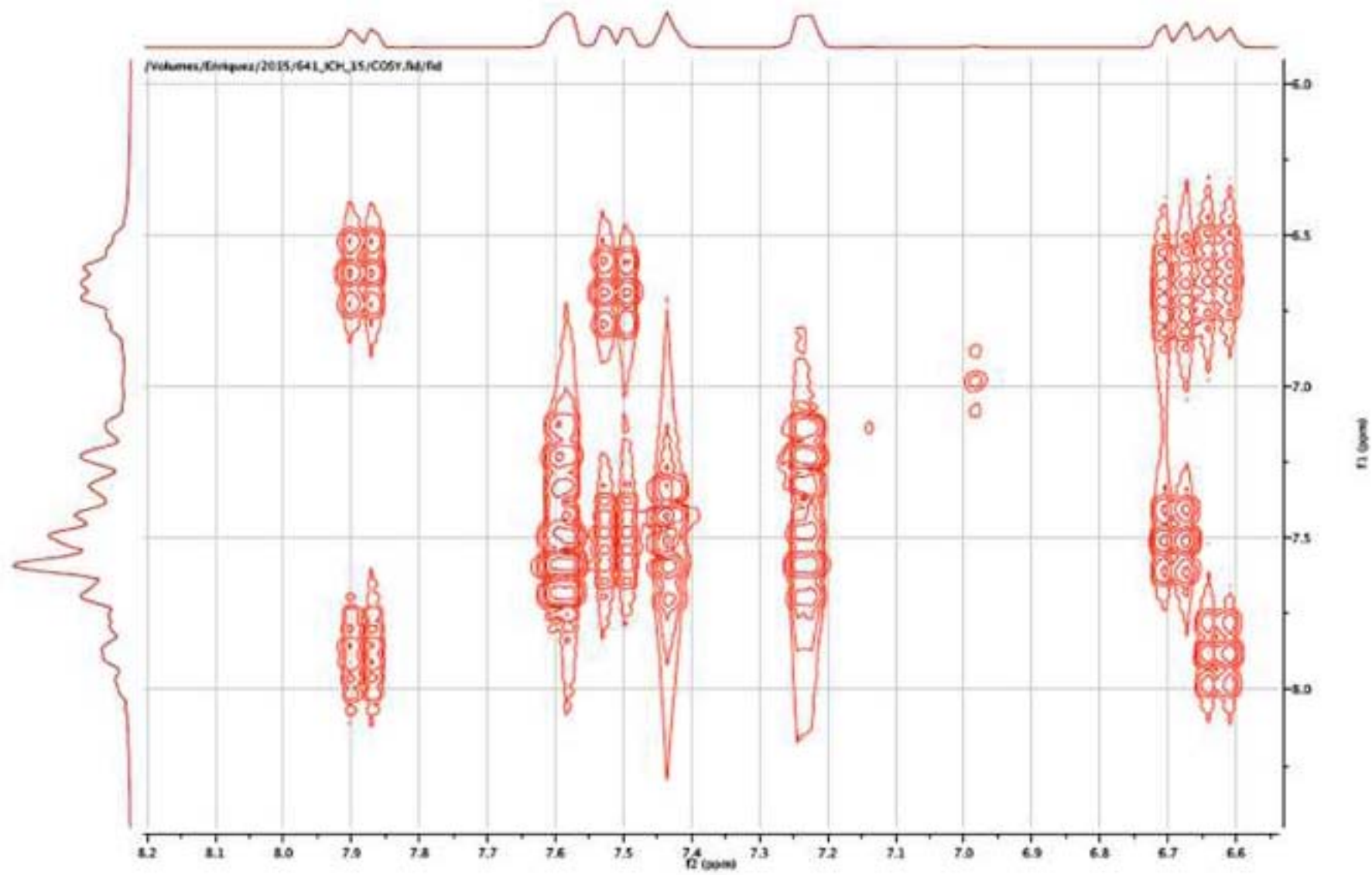
NMR Retro-Curcuminoid 9



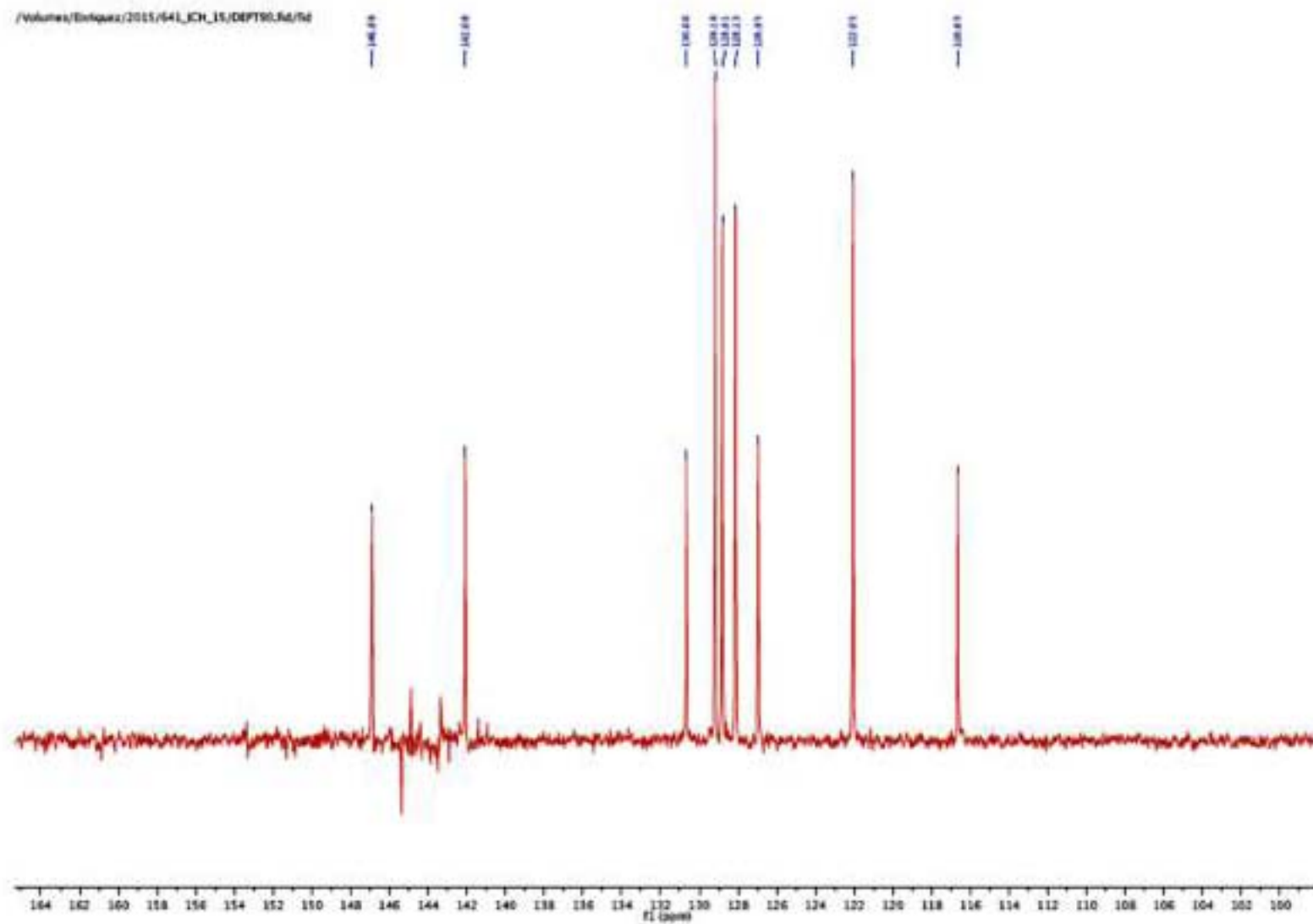
NMR Retro-Curcuminoid 9



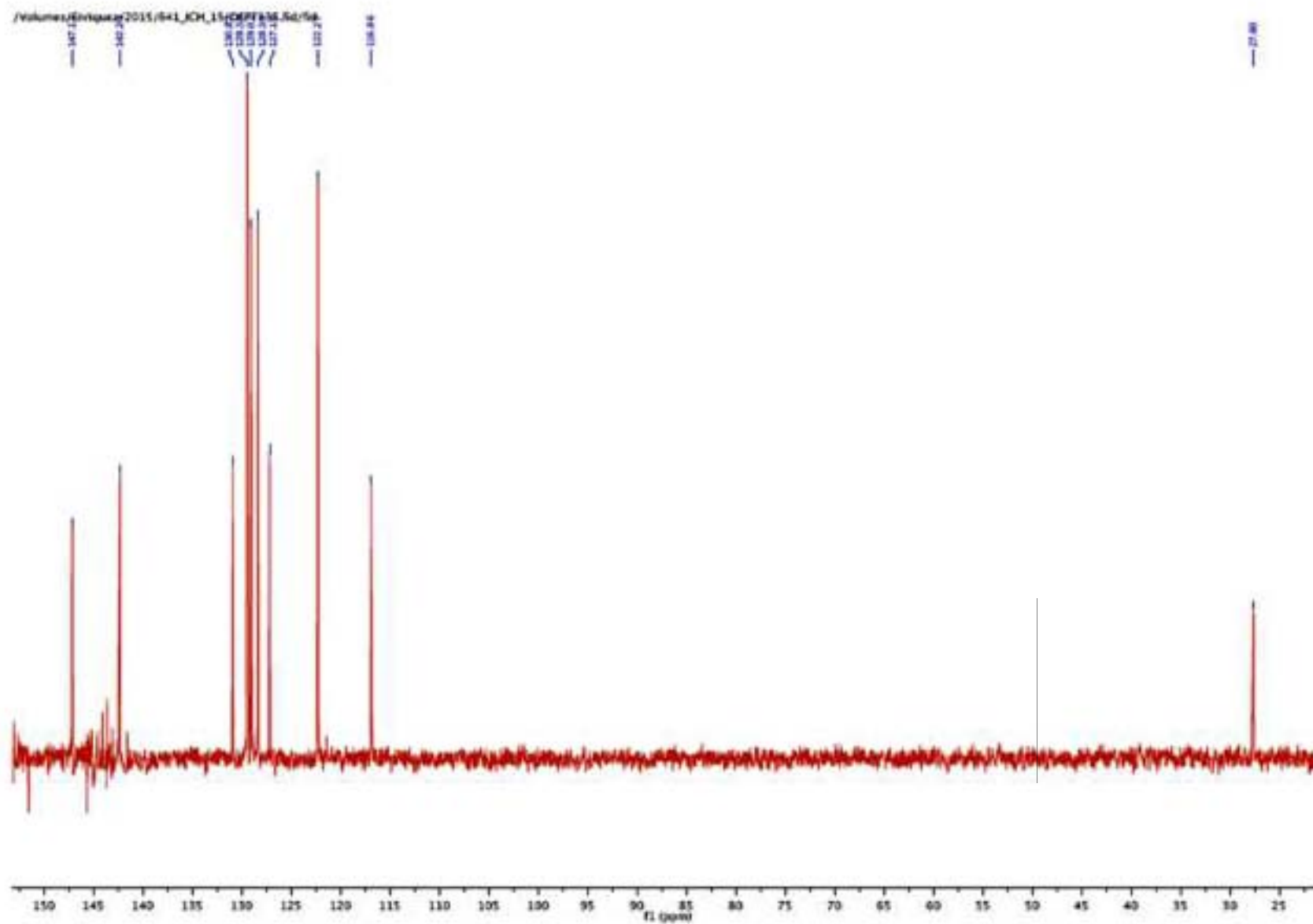
NMR Retro-Curcuminoid 9



NMR Retro-Curcuminoid 9

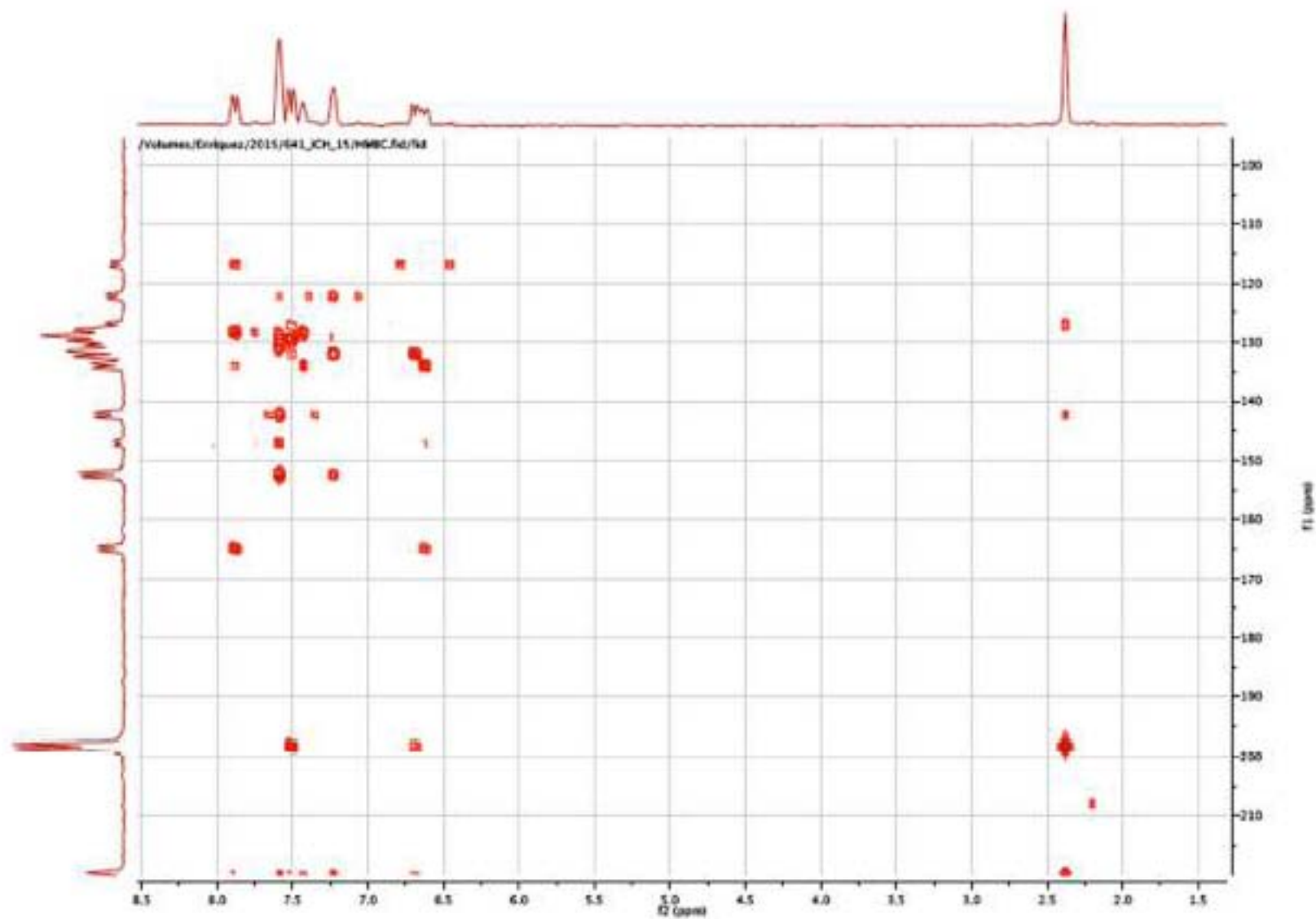


(a)

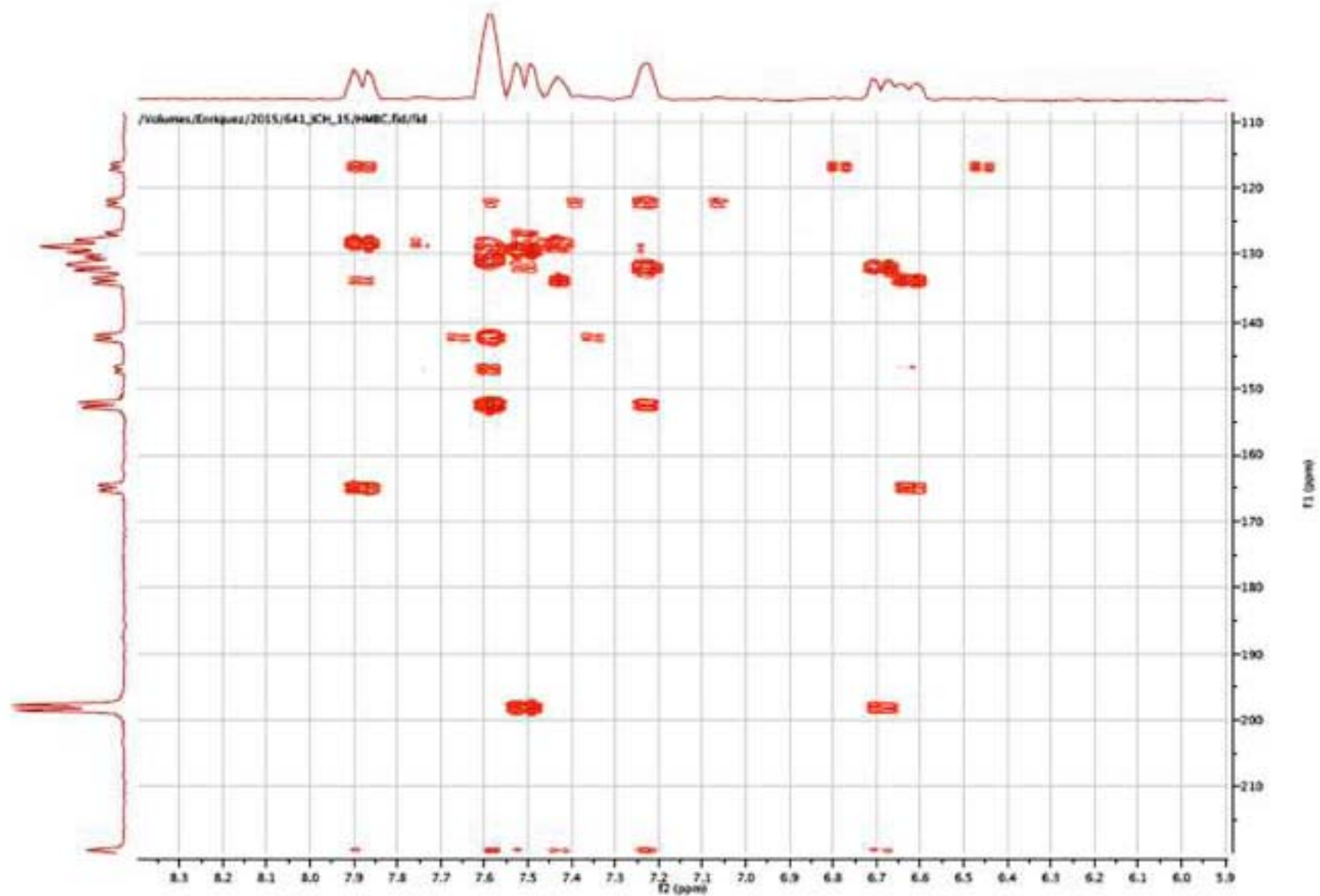


(b)

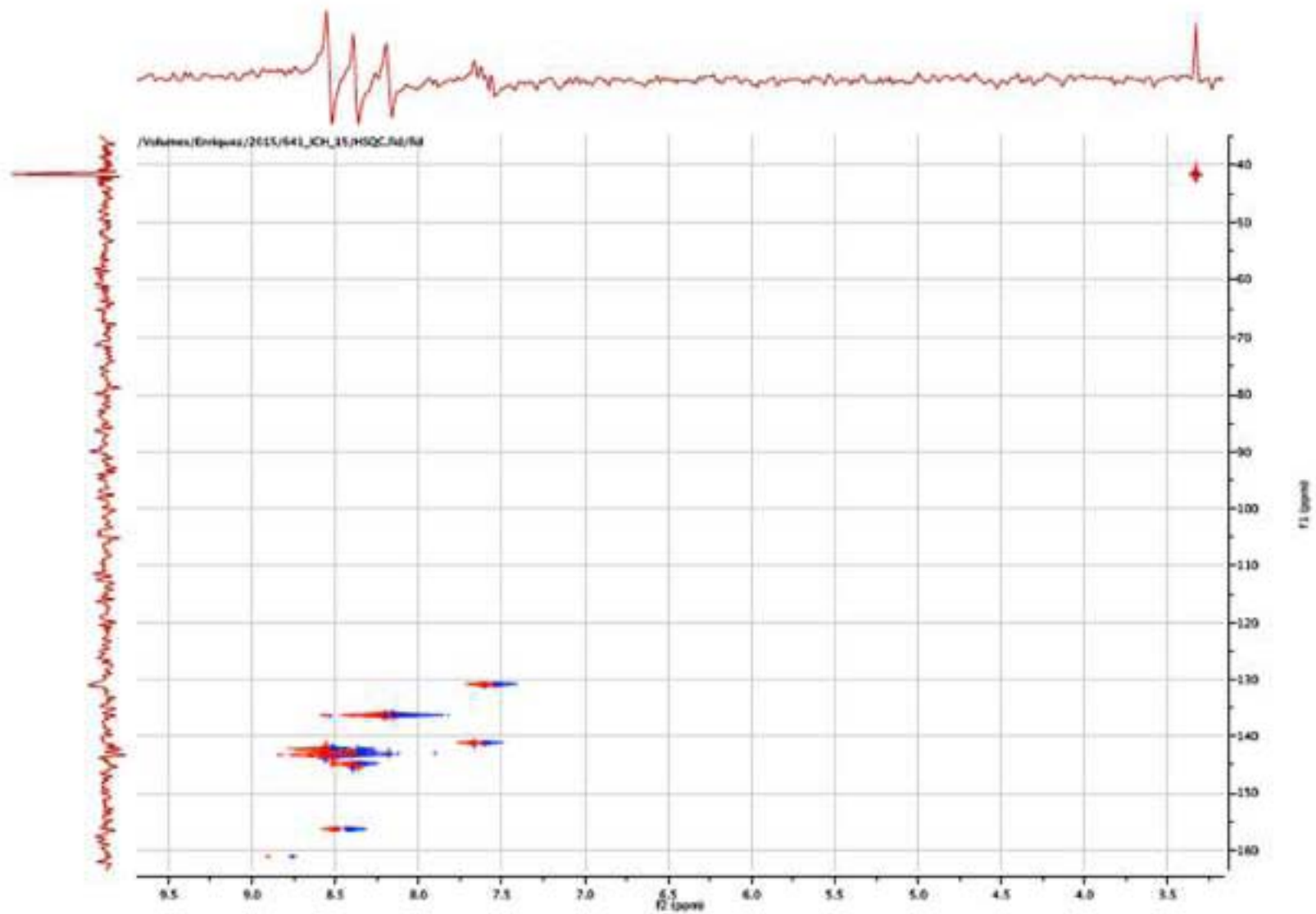
NMR Retro-Curcuminoid 9



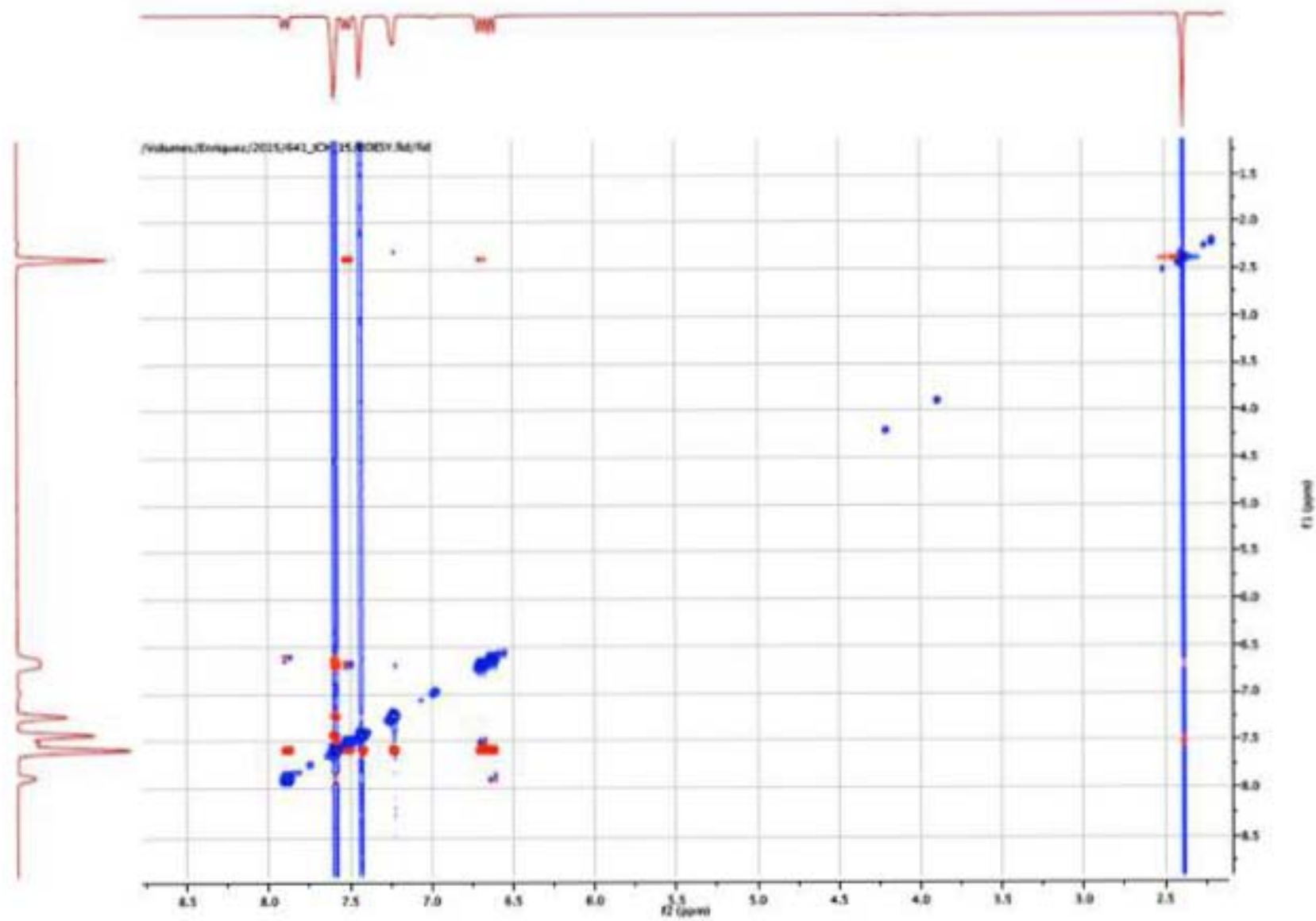
NMR Retro-Curcuminoid 9



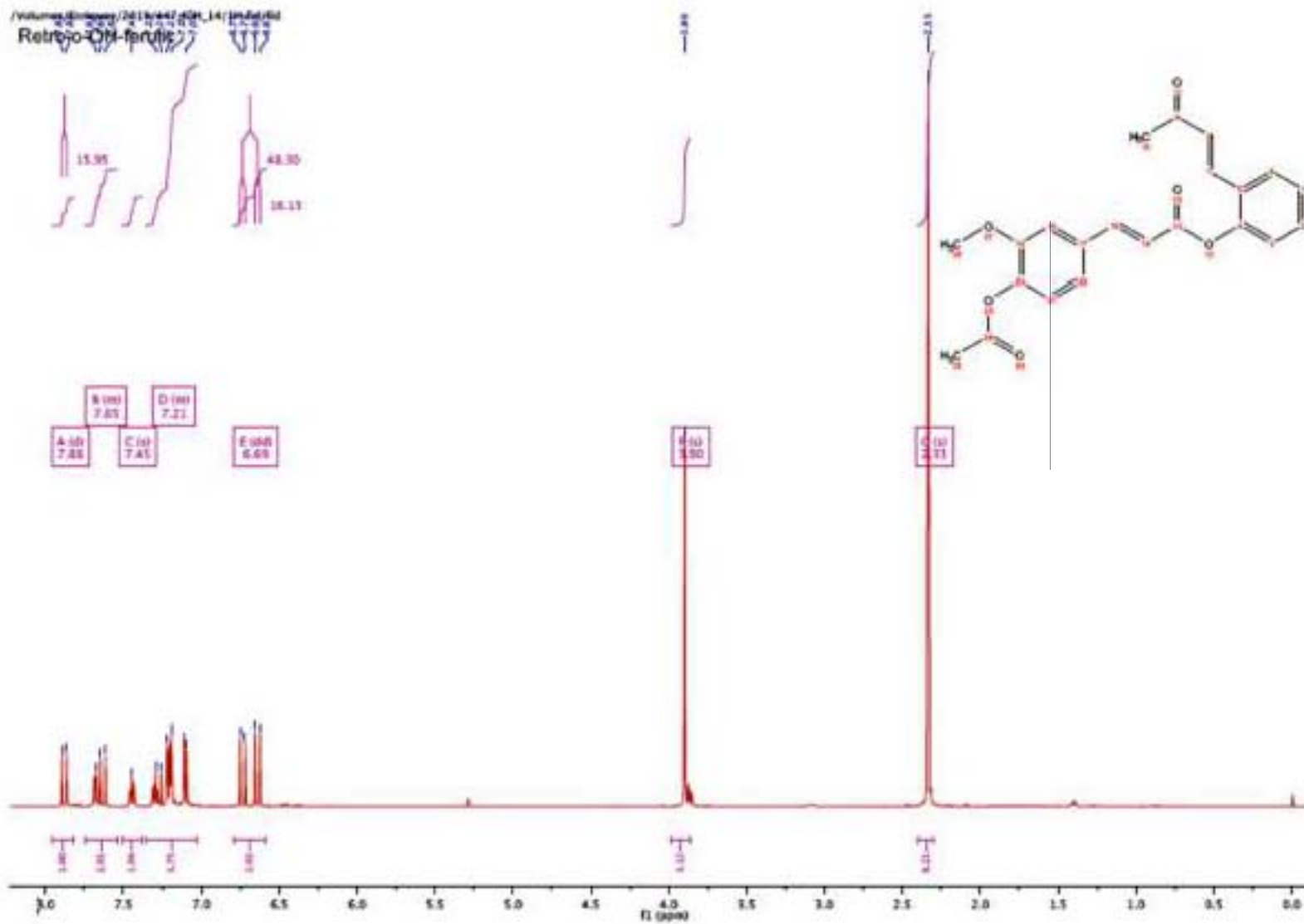
NMR Retro-Curcuminoid 9



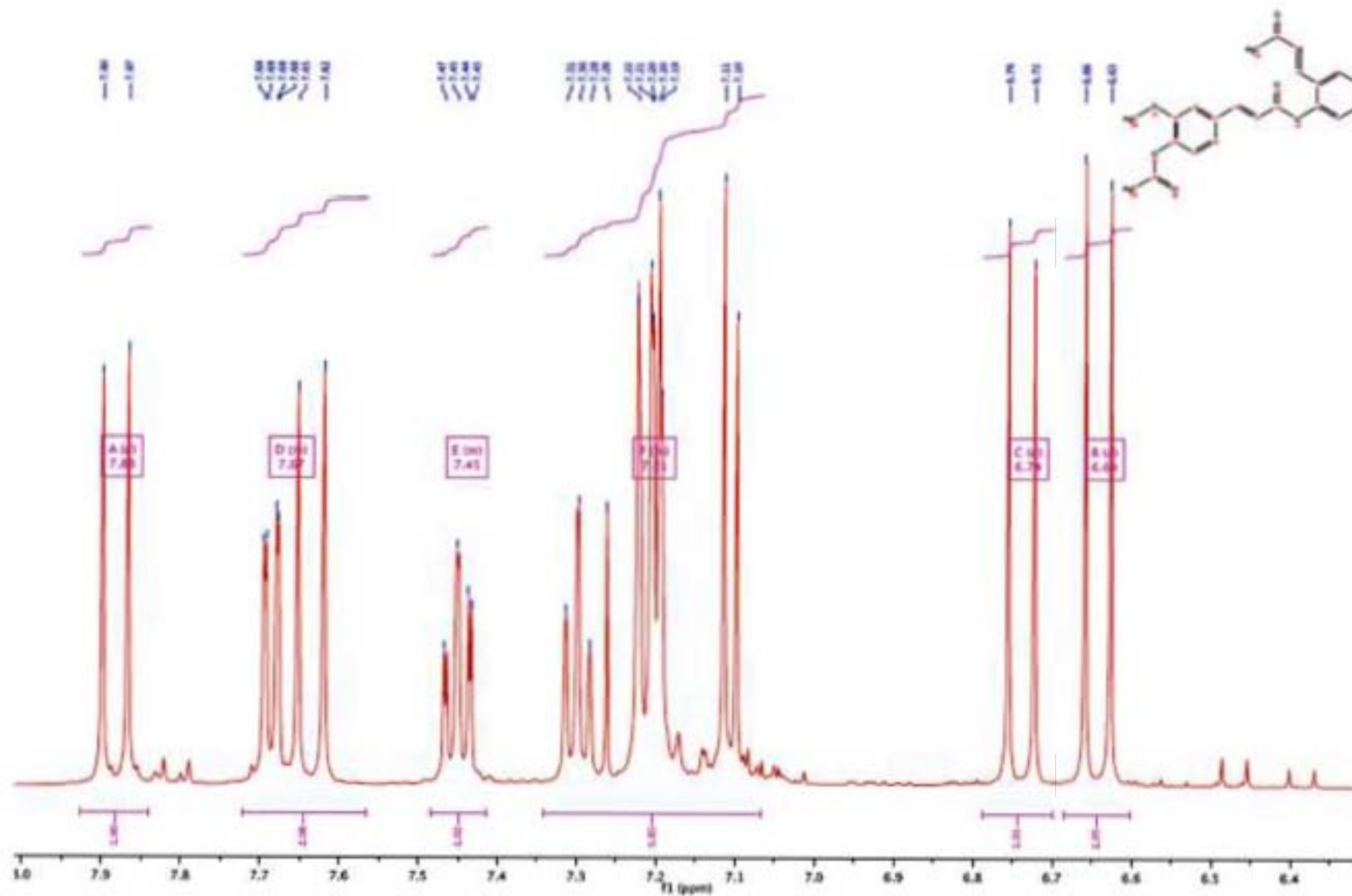
NMR Retro-Curcuminoid 9



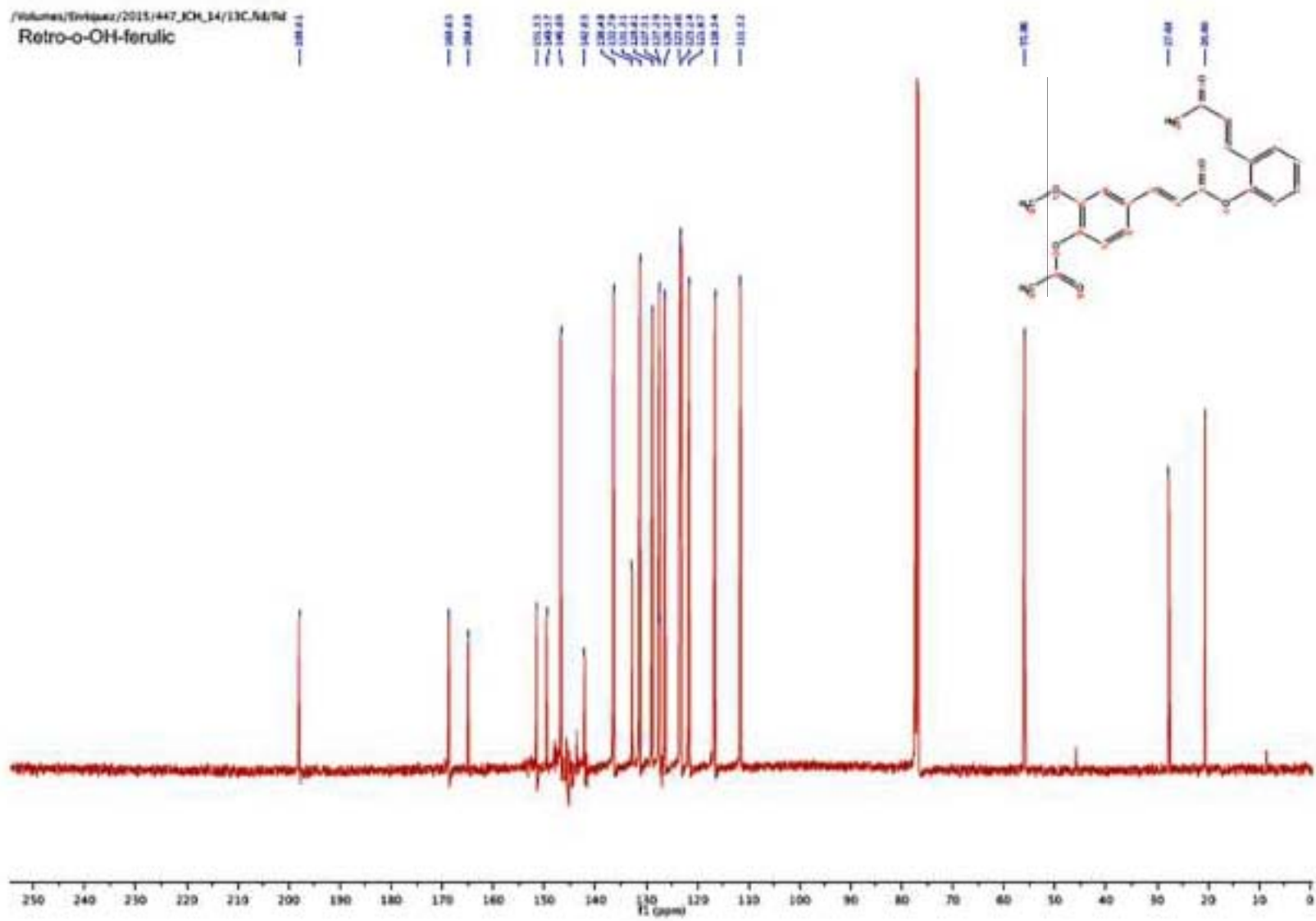
NMR Retro-Curcuminoid 10



NMR Retro-Curcuminoid 10

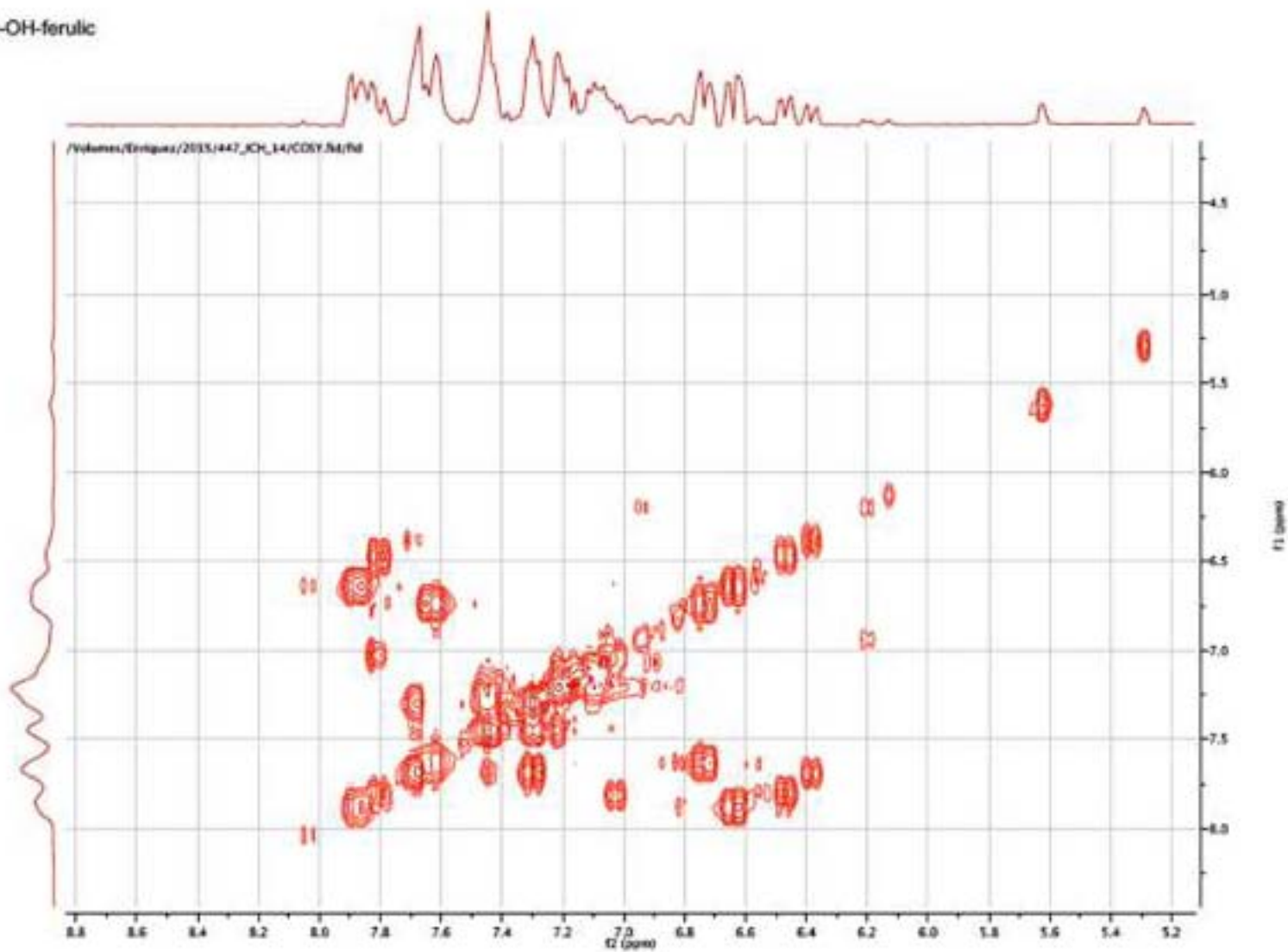


NMR Retro-Curcuminoid 10

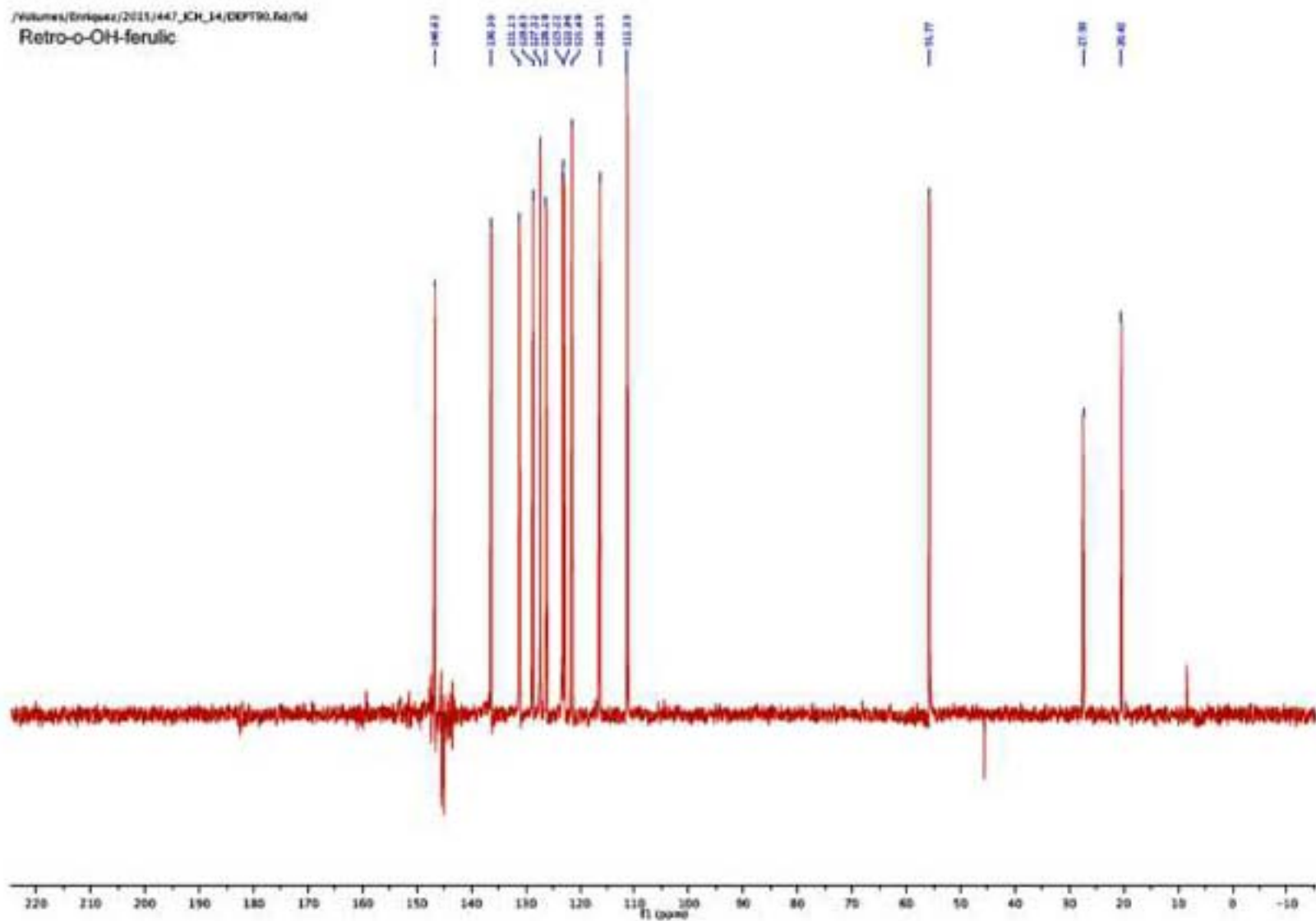


NMR Retro-Curcuminoid 10

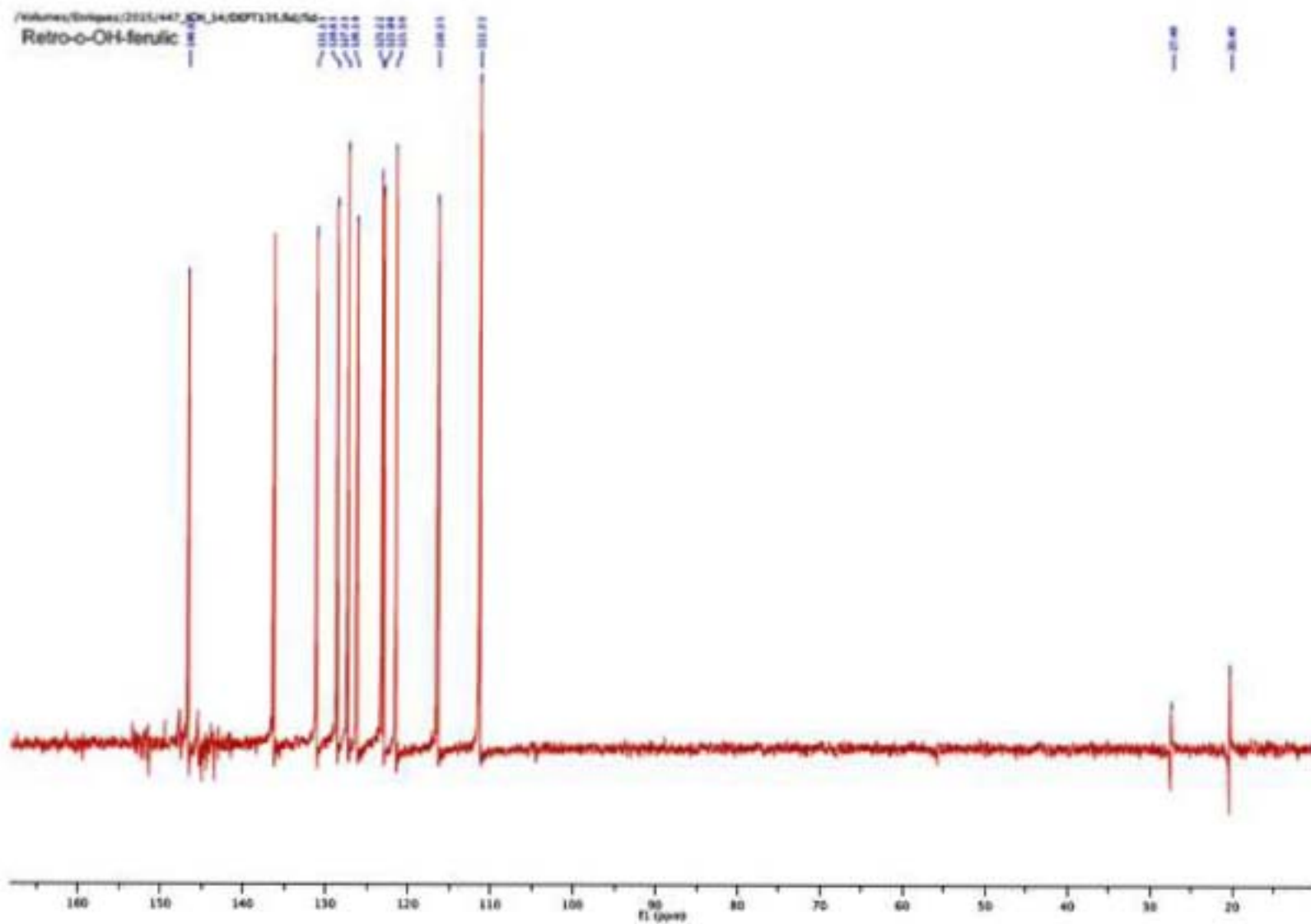
Retro-o-OH-ferulic



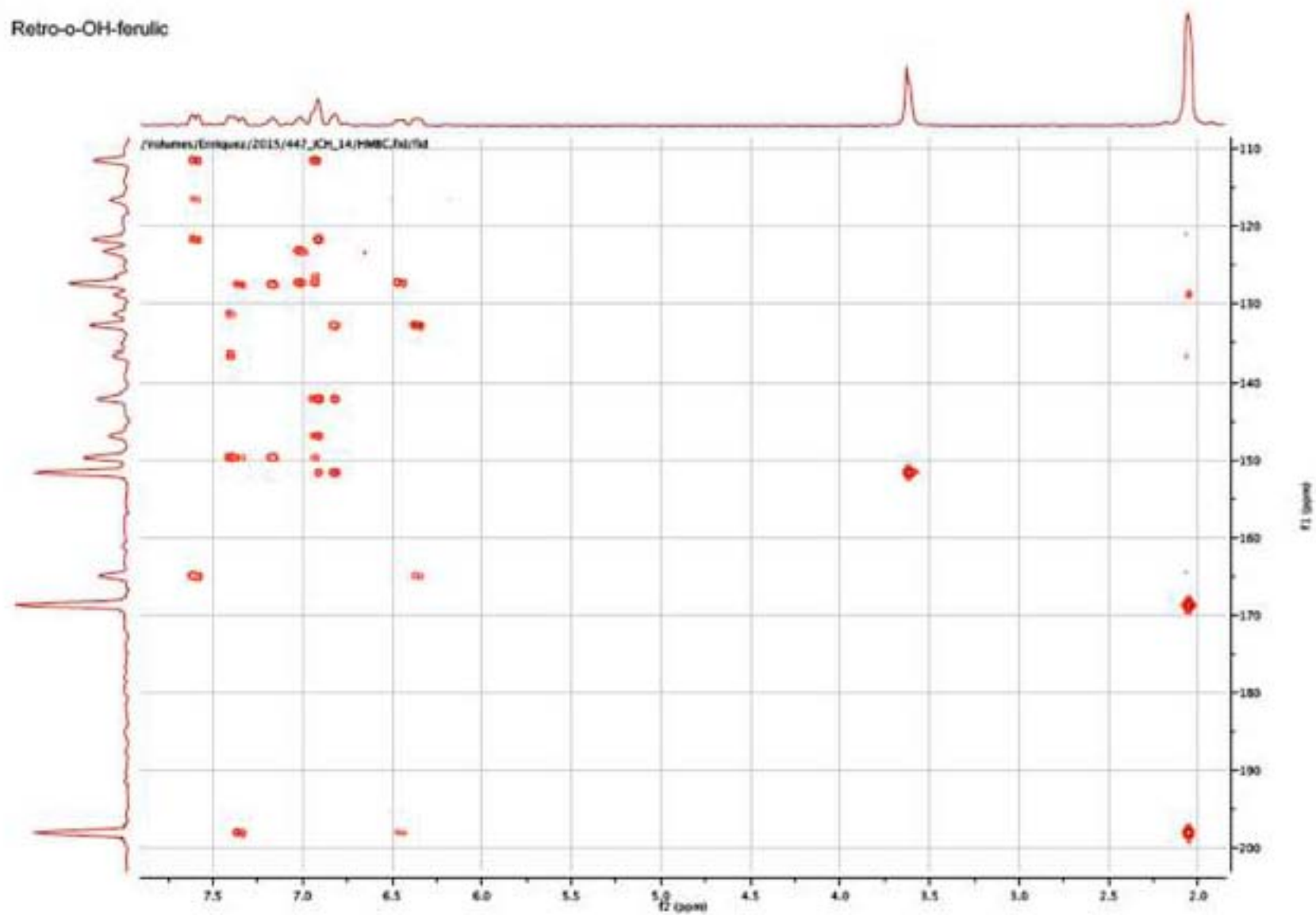
NMR Retro-Curcuminoid 10



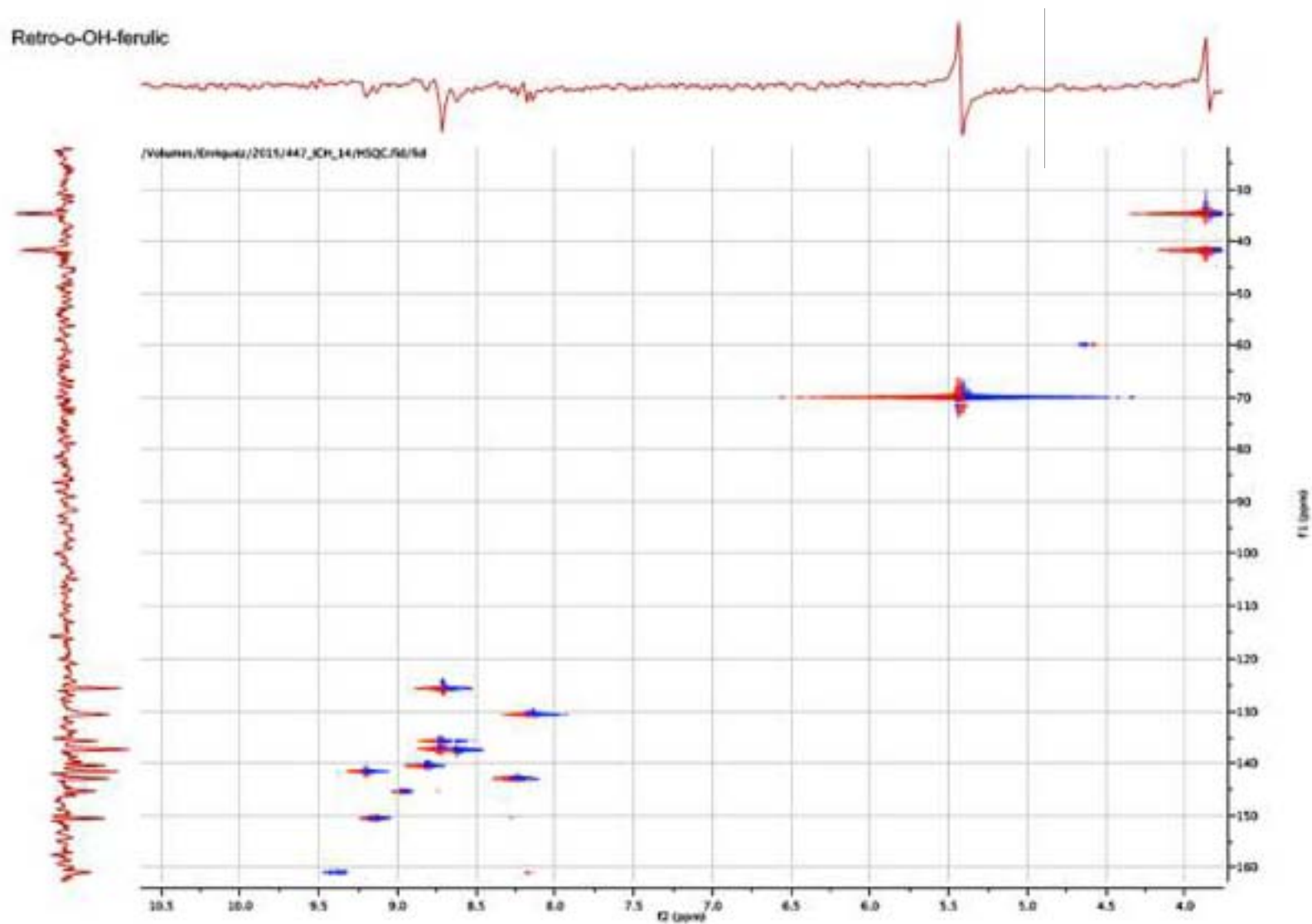
NMR Retro-Curcuminoid 10



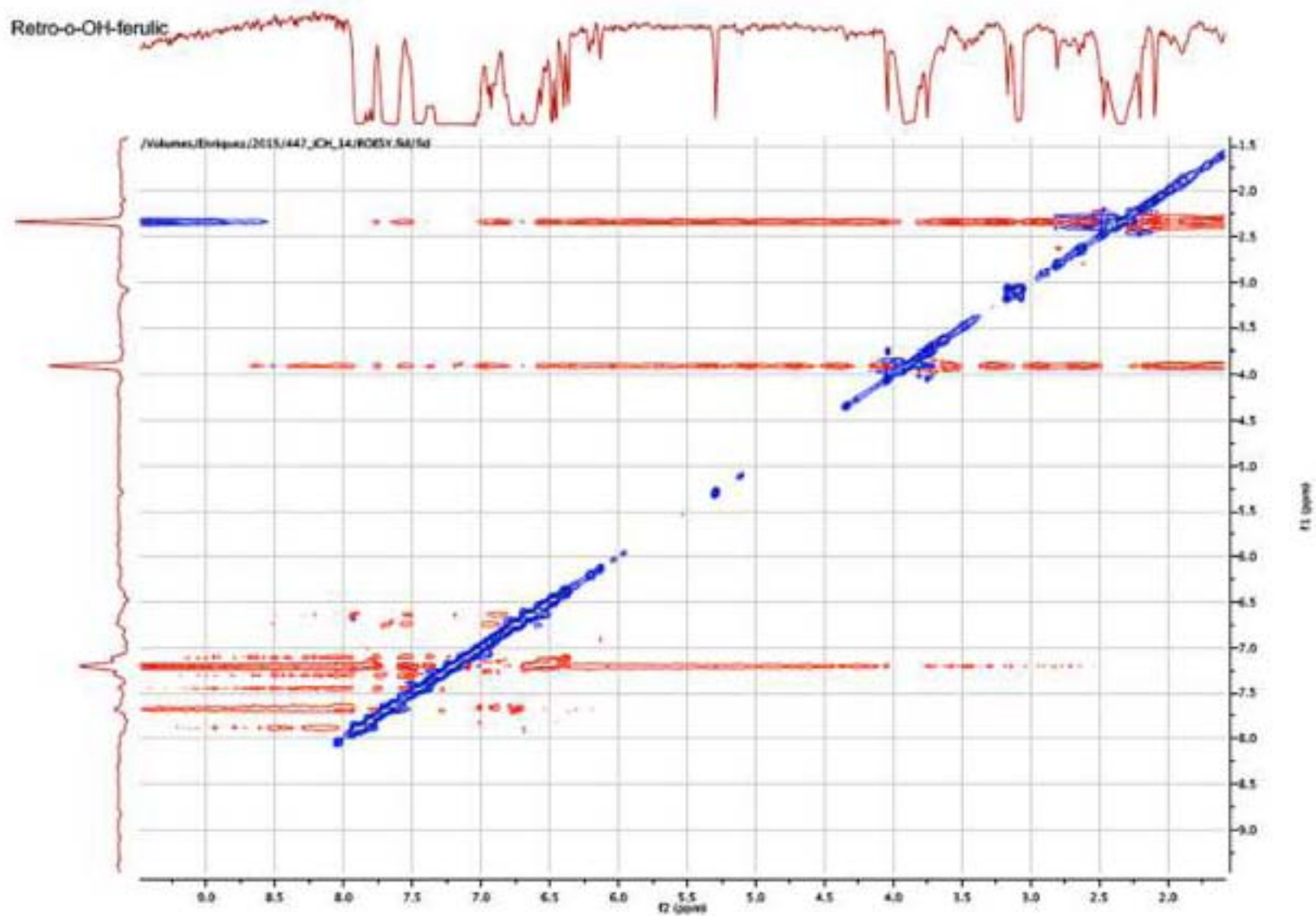
NMR Retro-Curcuminoid 10



NMR Retro-Curcuminoid 10

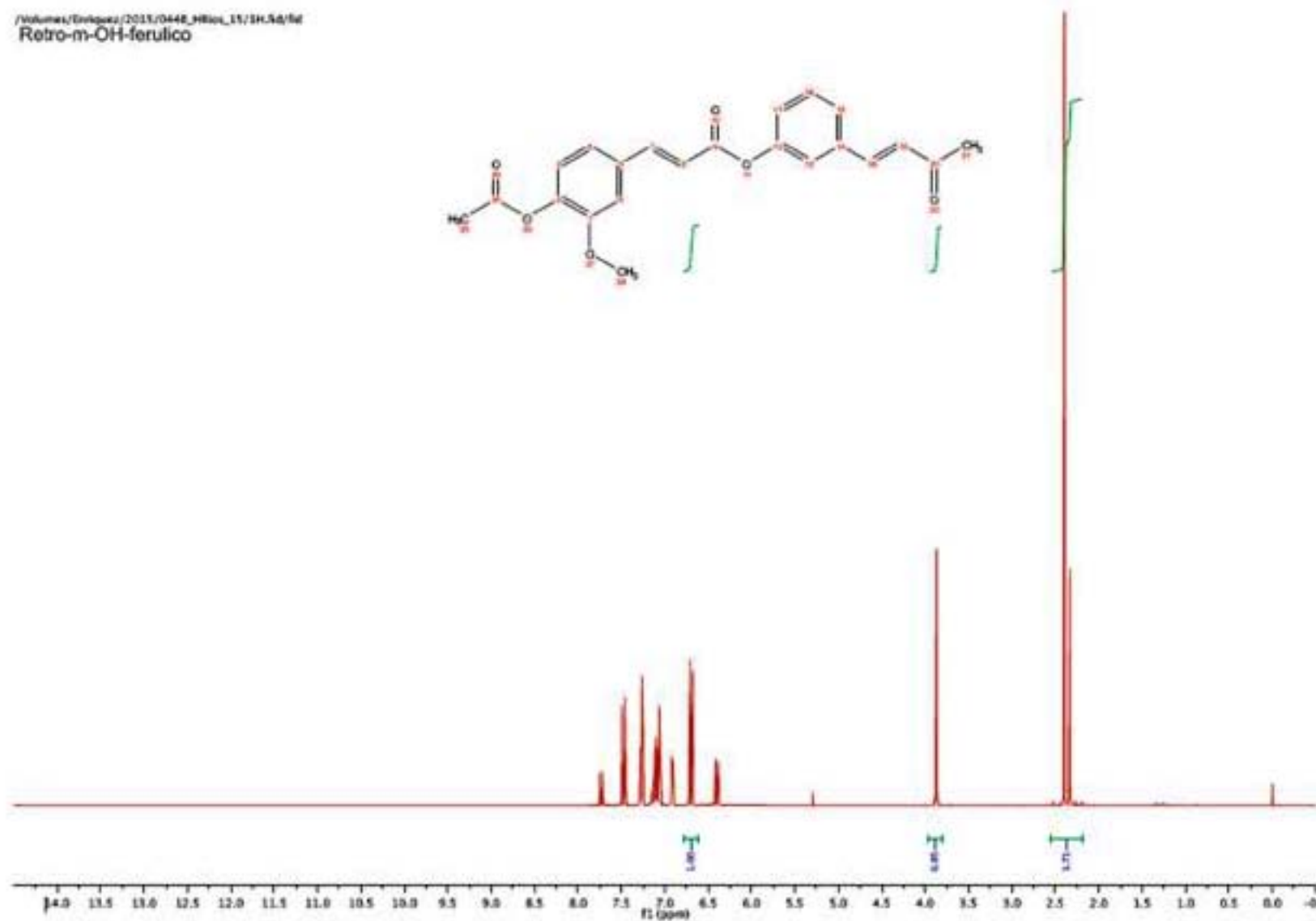


NMR Retro-Curcuminoid 10

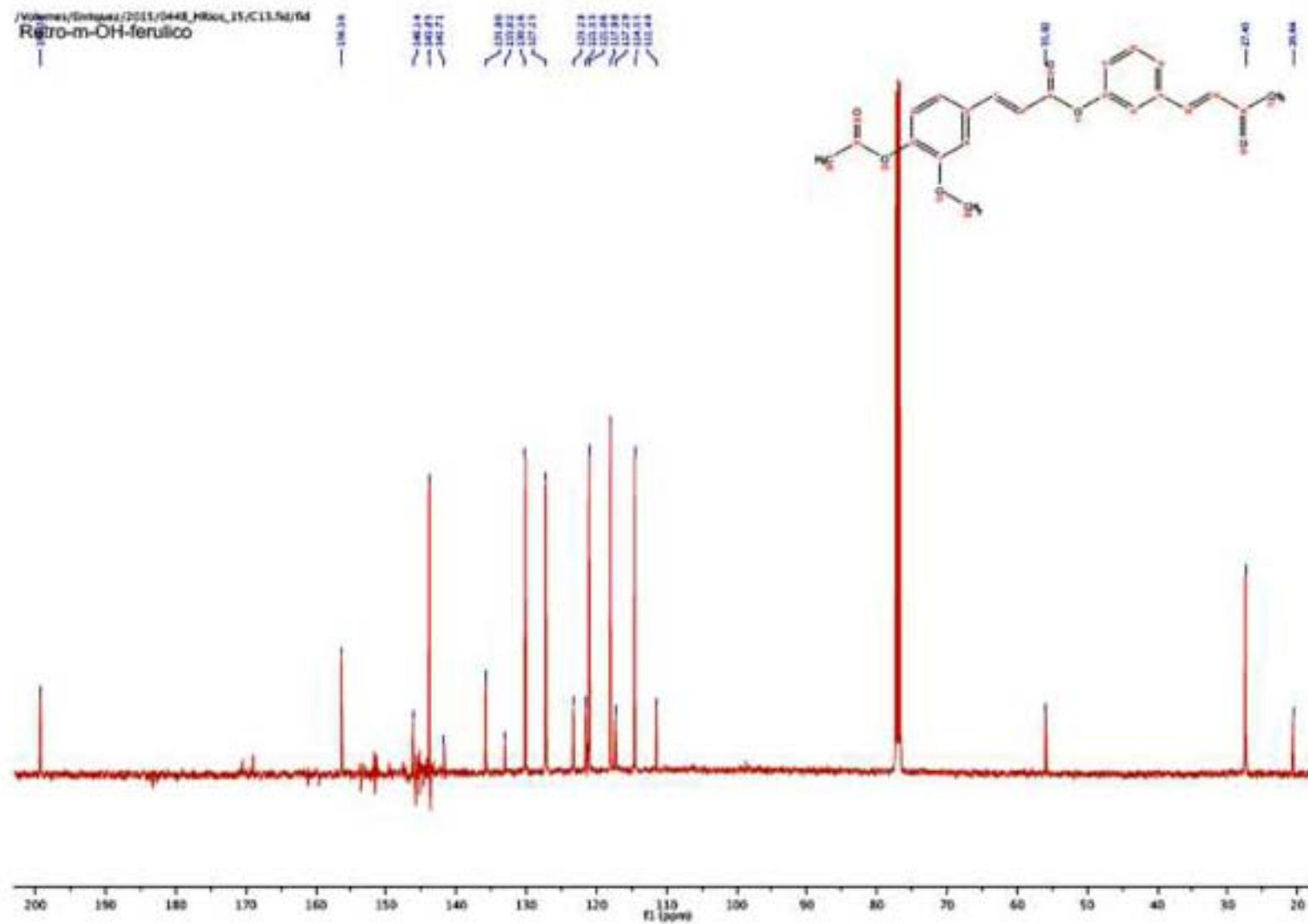


NMR Retro-Curcuminoid 11

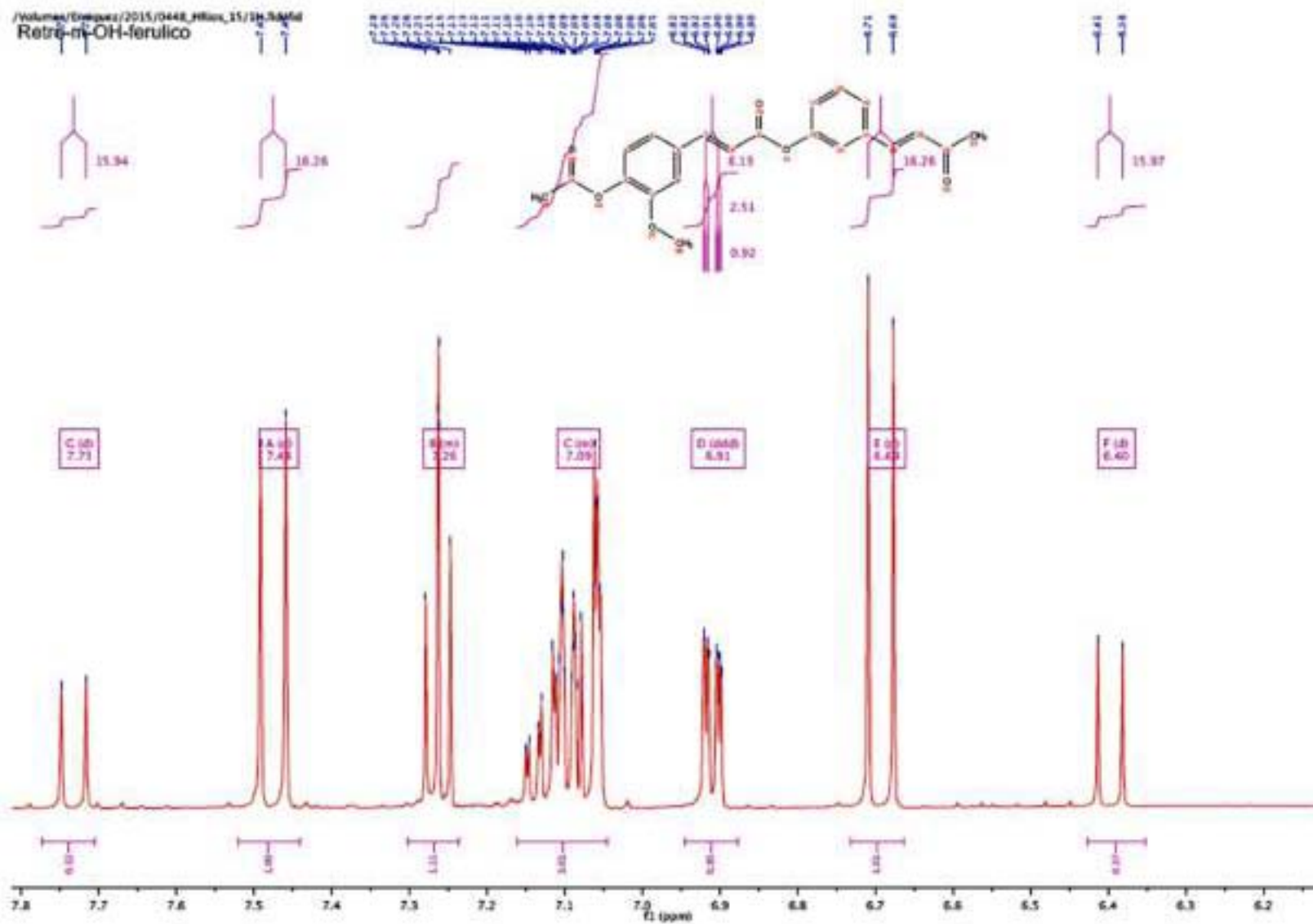
/Volumes/Environz/2017/0448_HR01_11/1H_NMR/Retrom-OH-ferulico



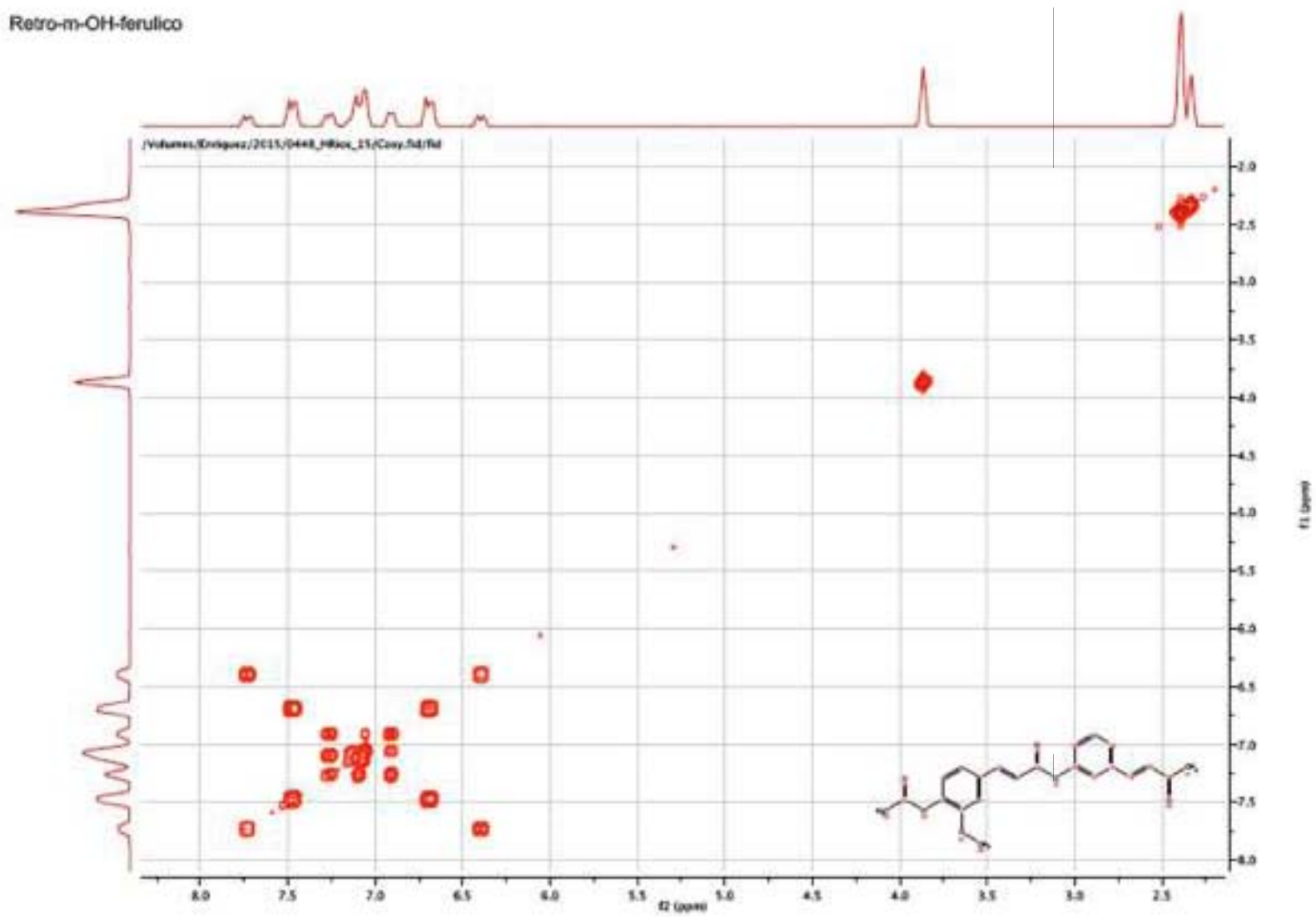
NMR Retro-Curcuminoid 11



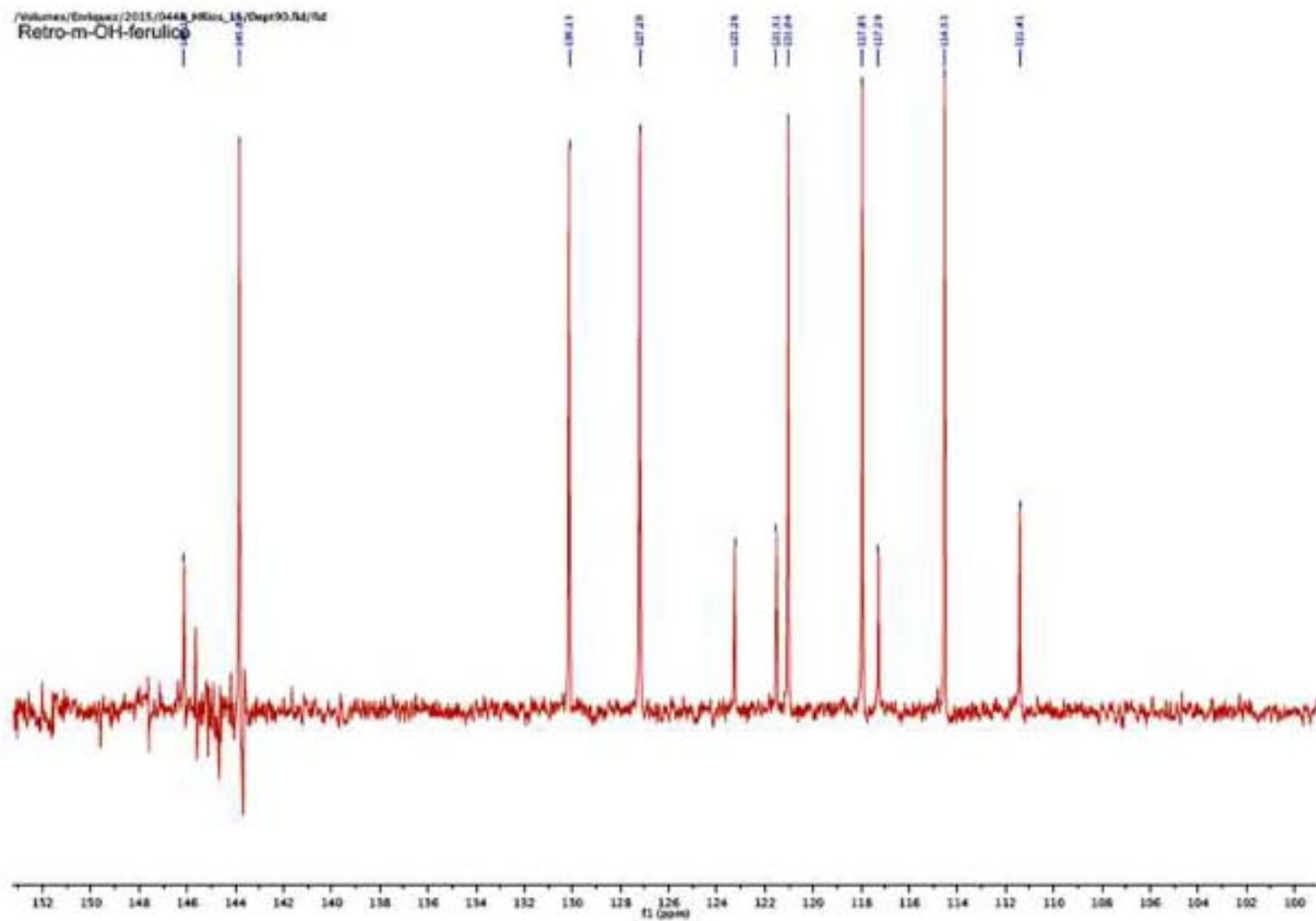
NMR Retro-Curcuminoid 11



NMR Retro-Curcuminoid 11

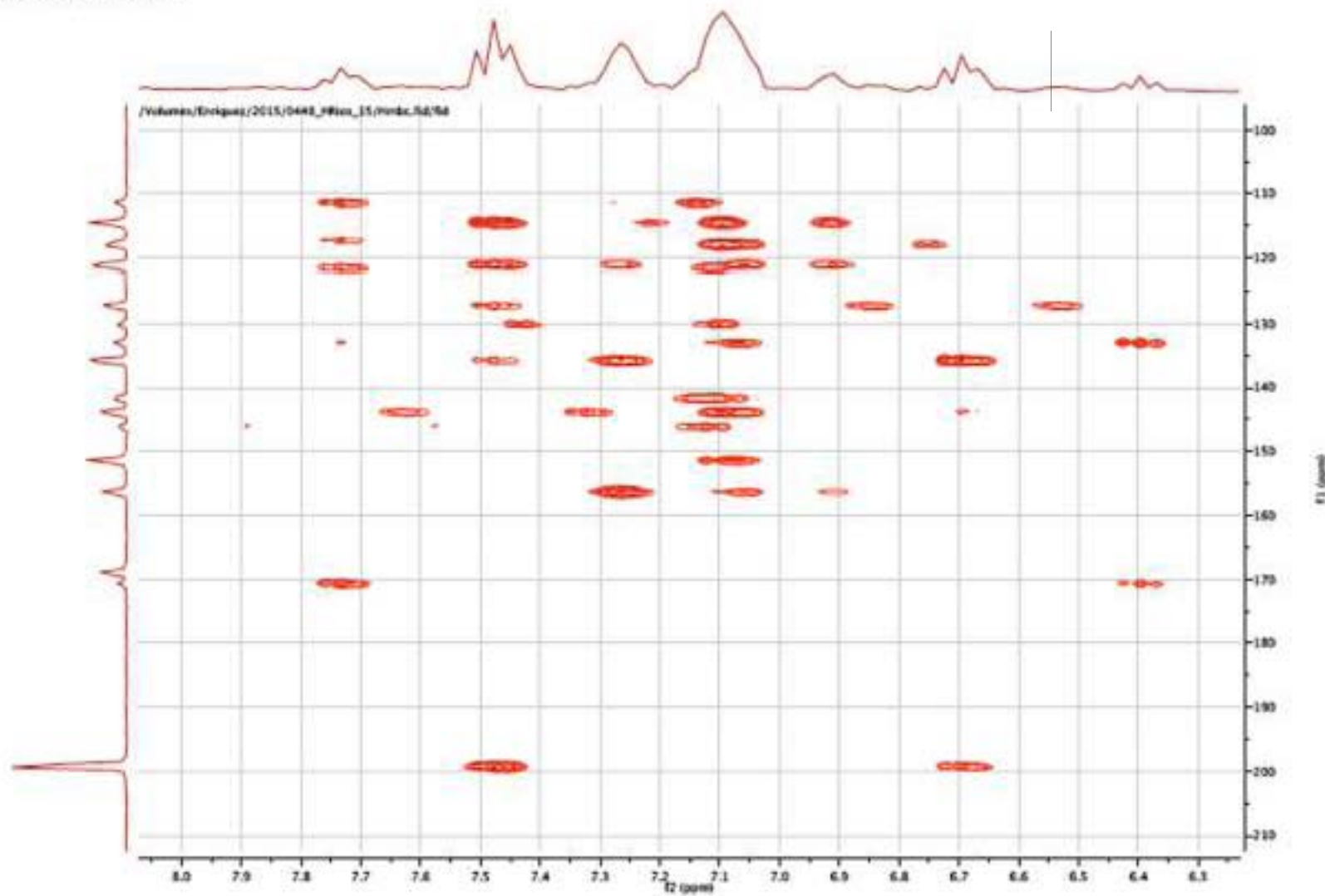


NMR Retro-Curcuminoid 11

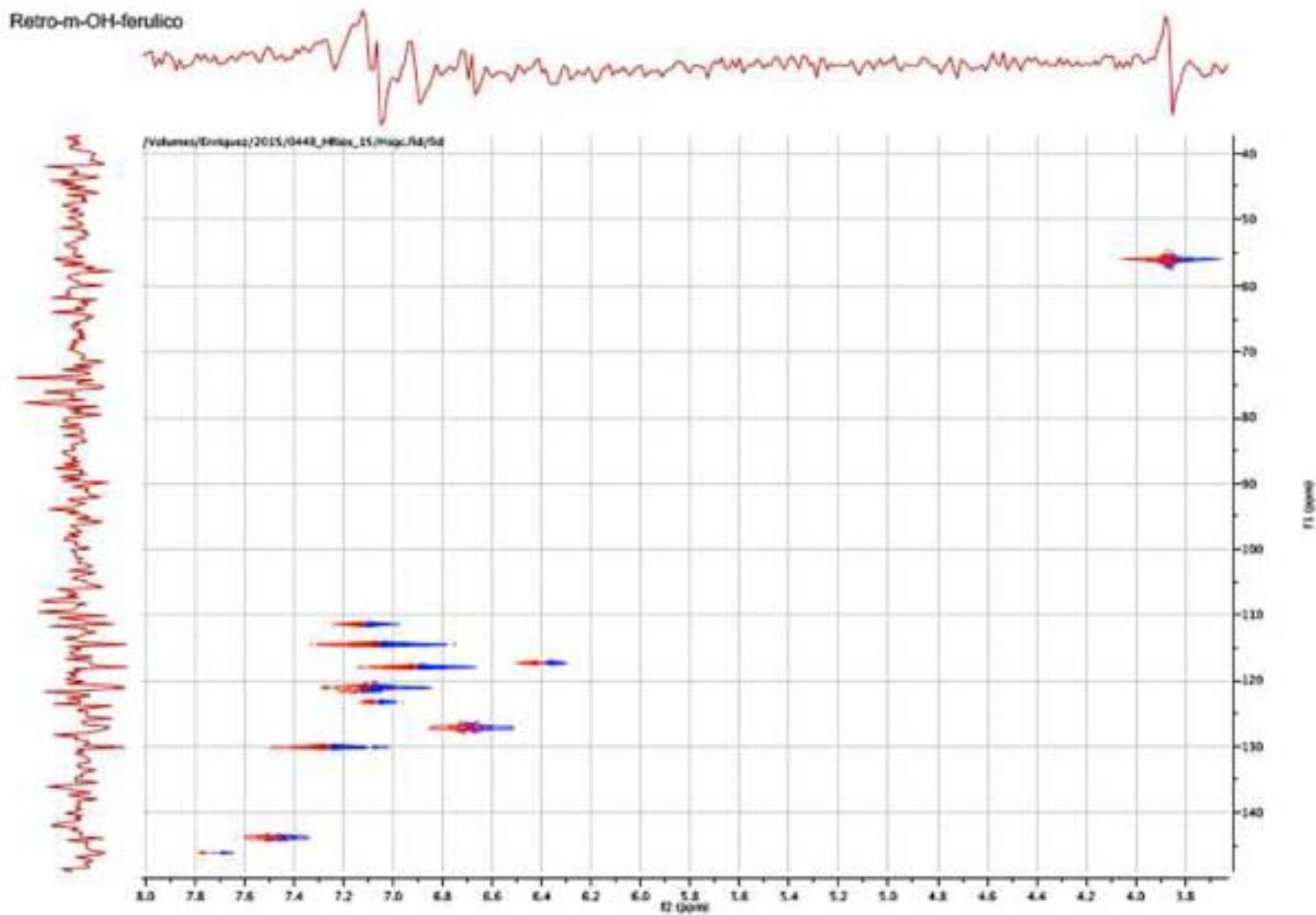


NMR Retro-Curcuminoid 11

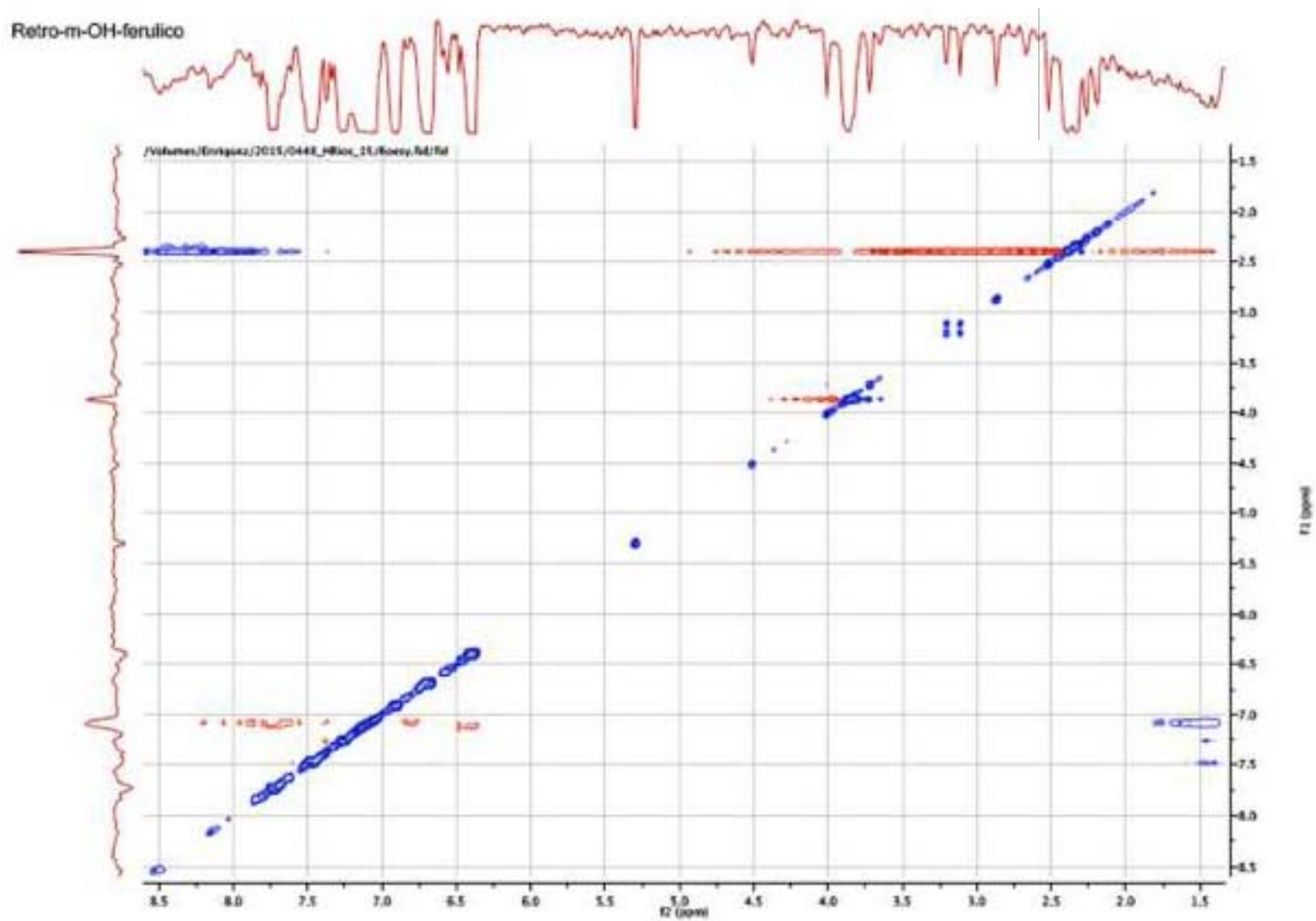
Retro-m-OH-ferulico



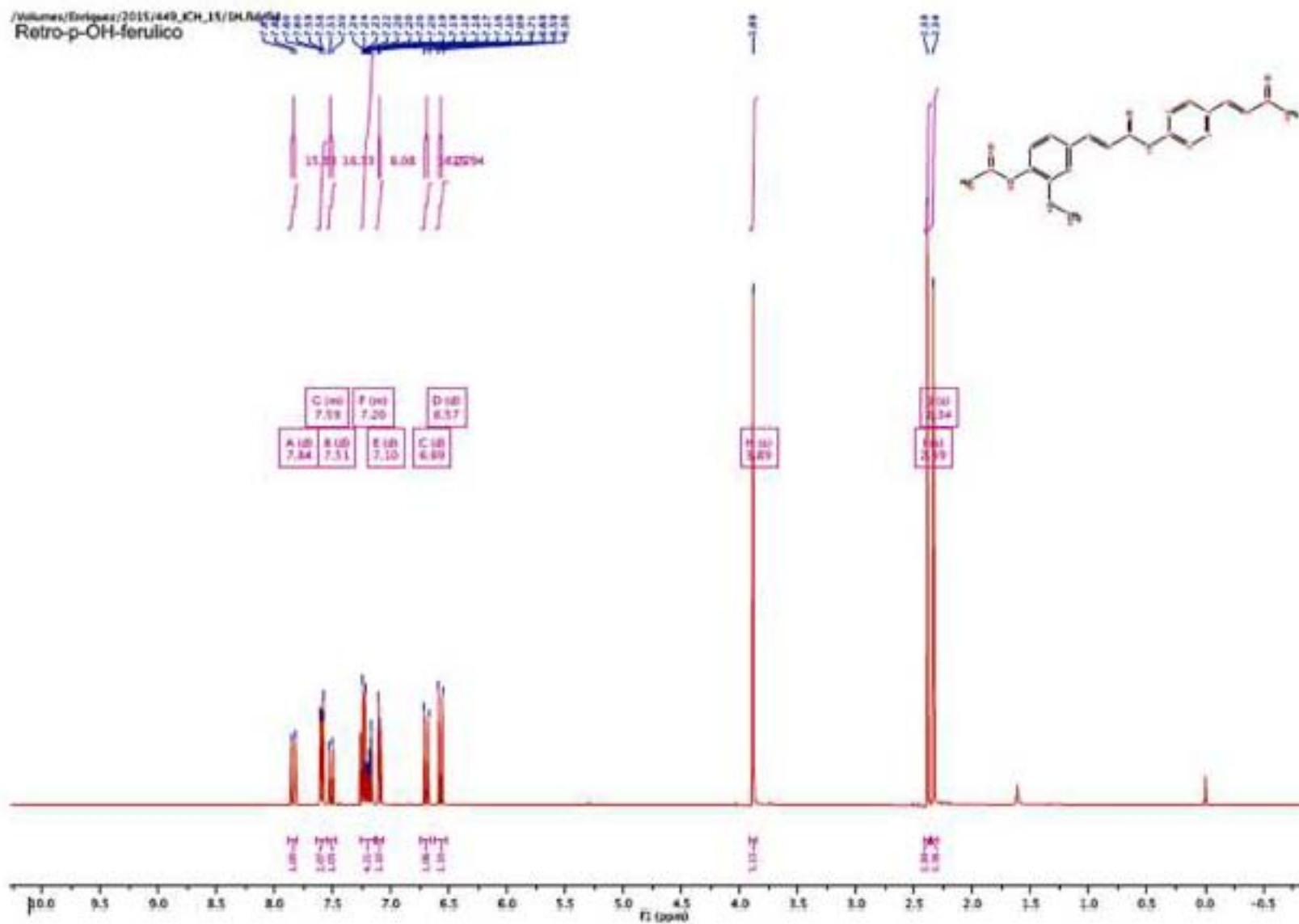
NMR Retro-Curcuminoid 11



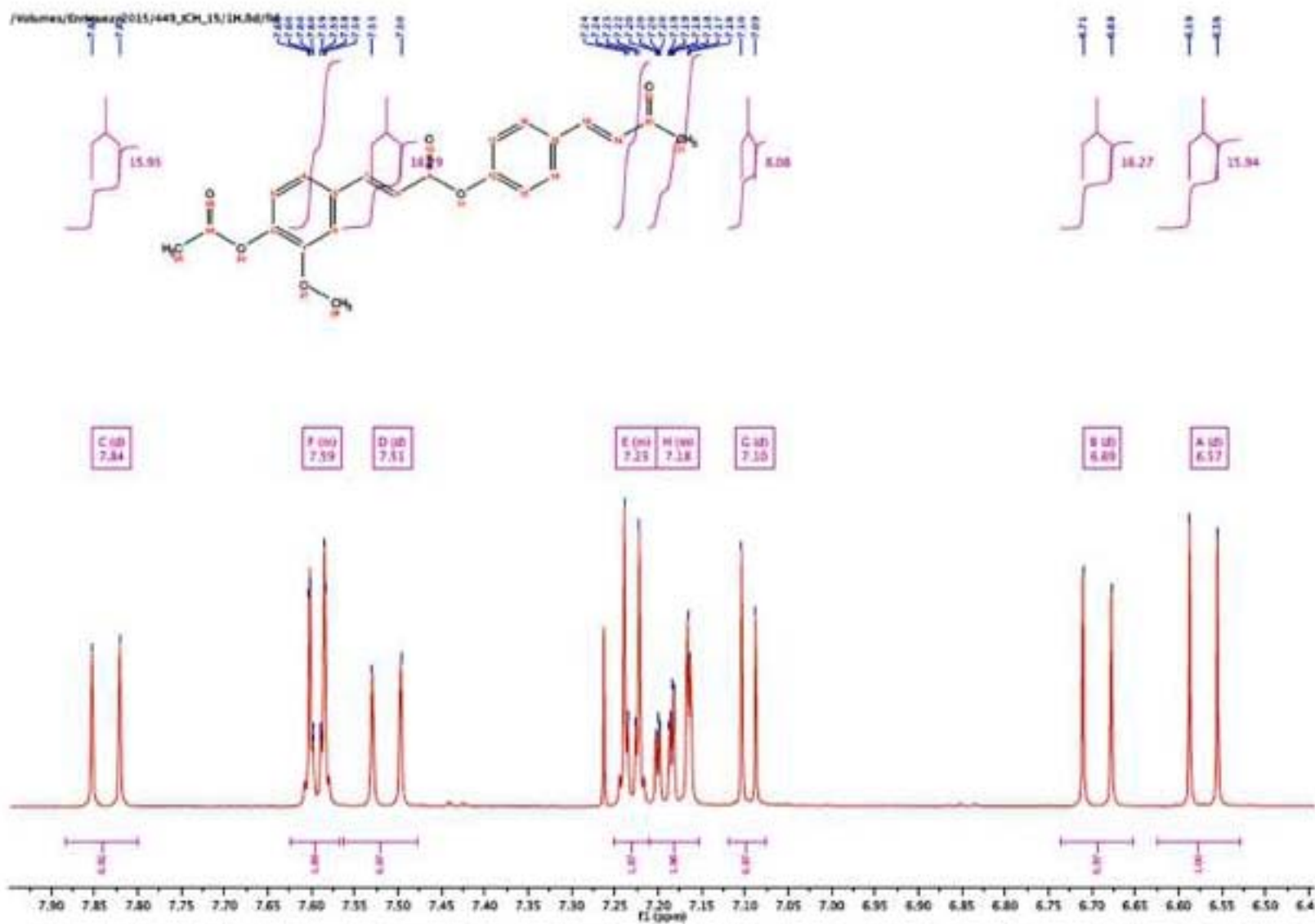
NMR Retro-Curcuminoid 11



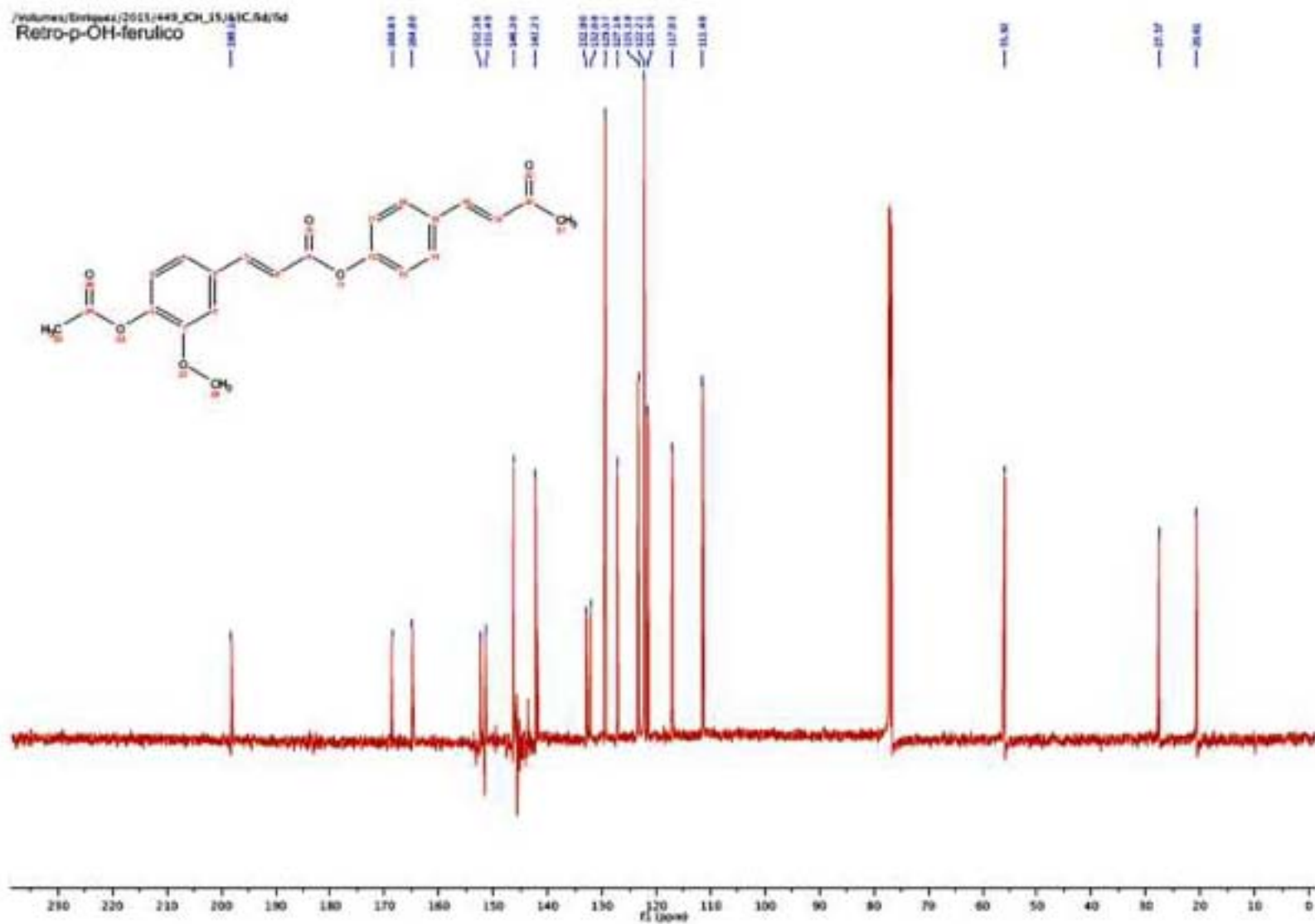
NMR Retro-Curcuminoid 12



NMR Retro-Curcuminoid 12

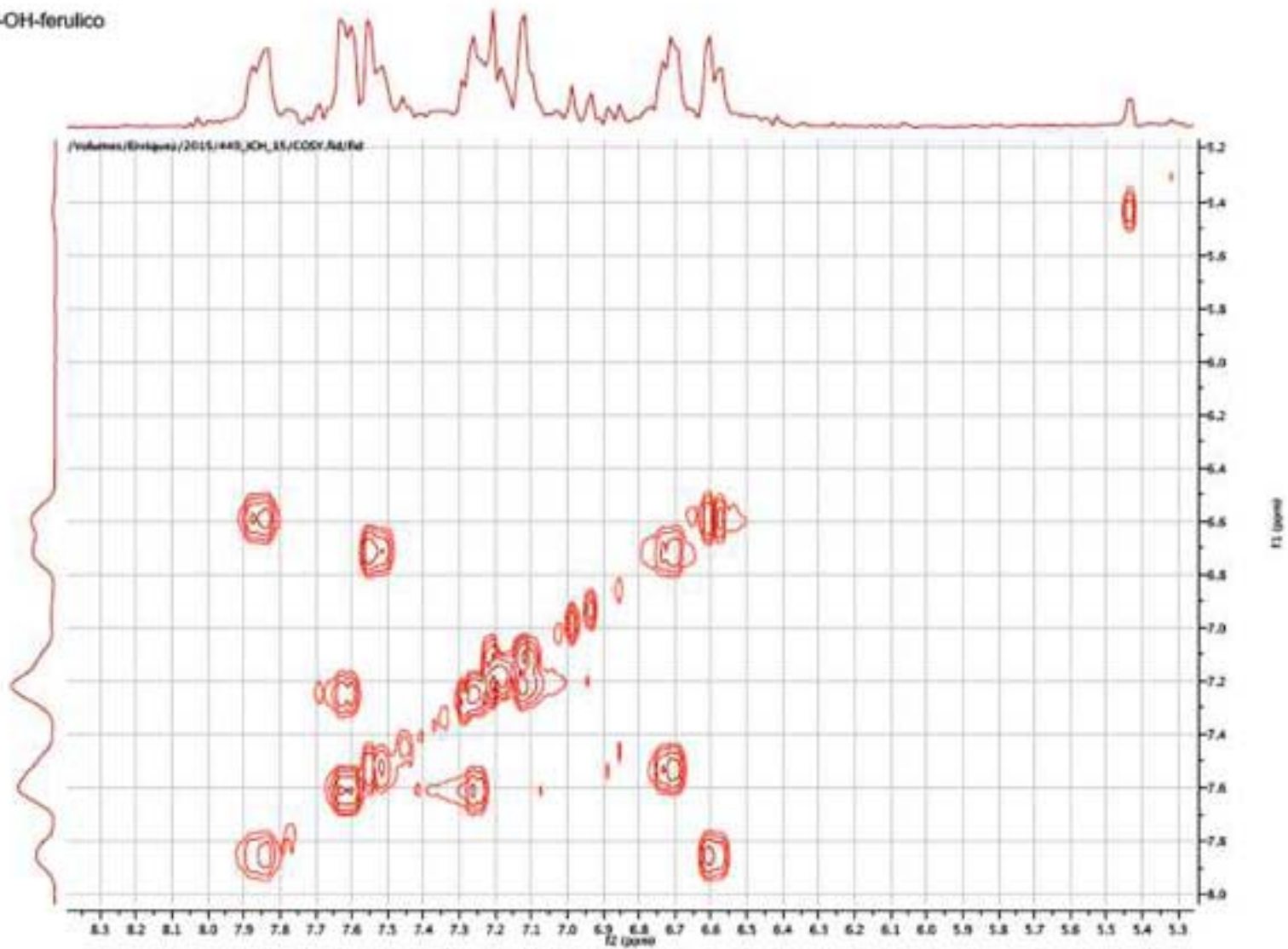


NMR Retro-Curcuminoid 12

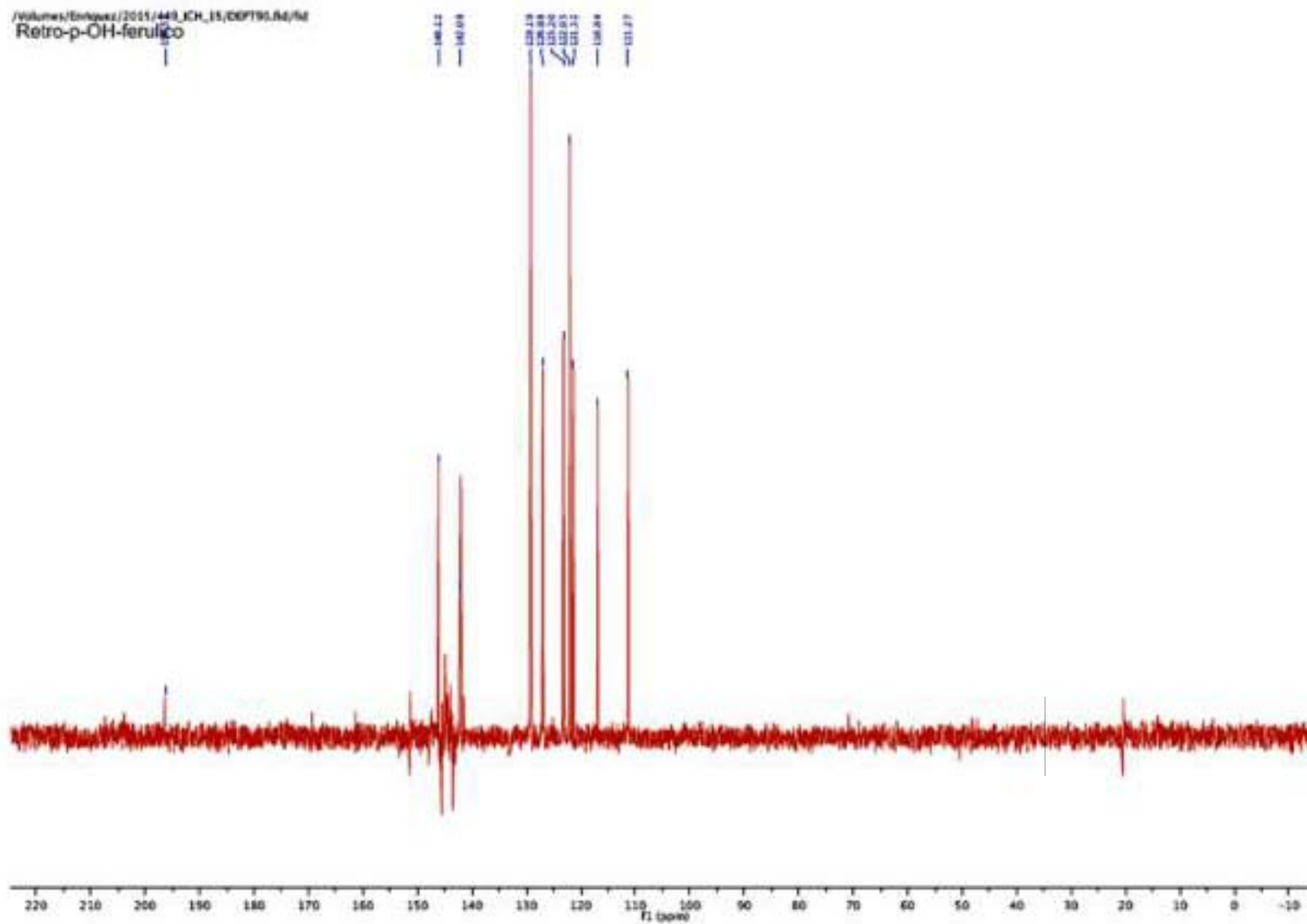


NMR Retro-Curcuminoid 12

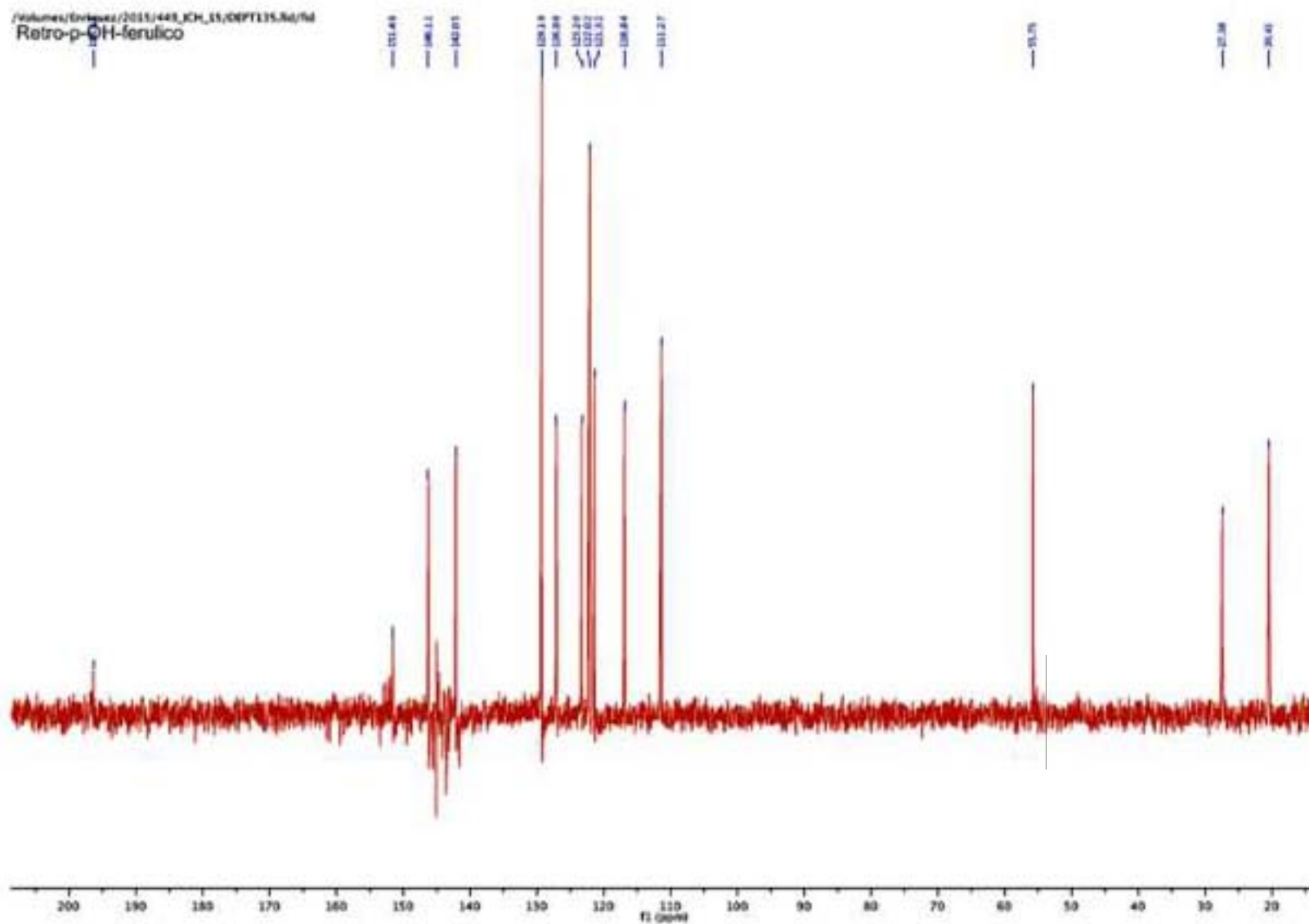
Retro-p-OH-ferulico



NMR Retro-Curcuminoid 12

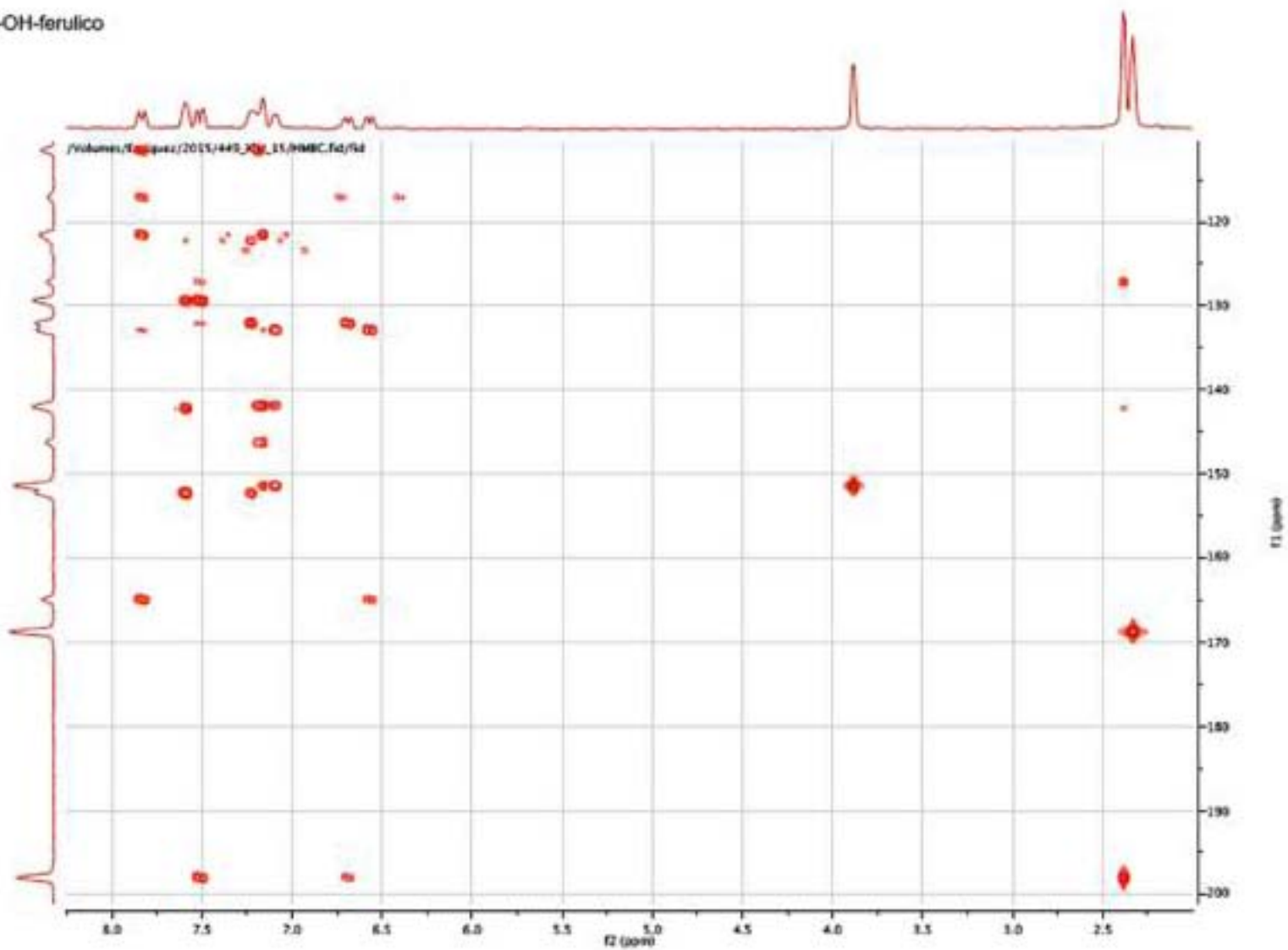


NMR Retro-Curcuminoid 12

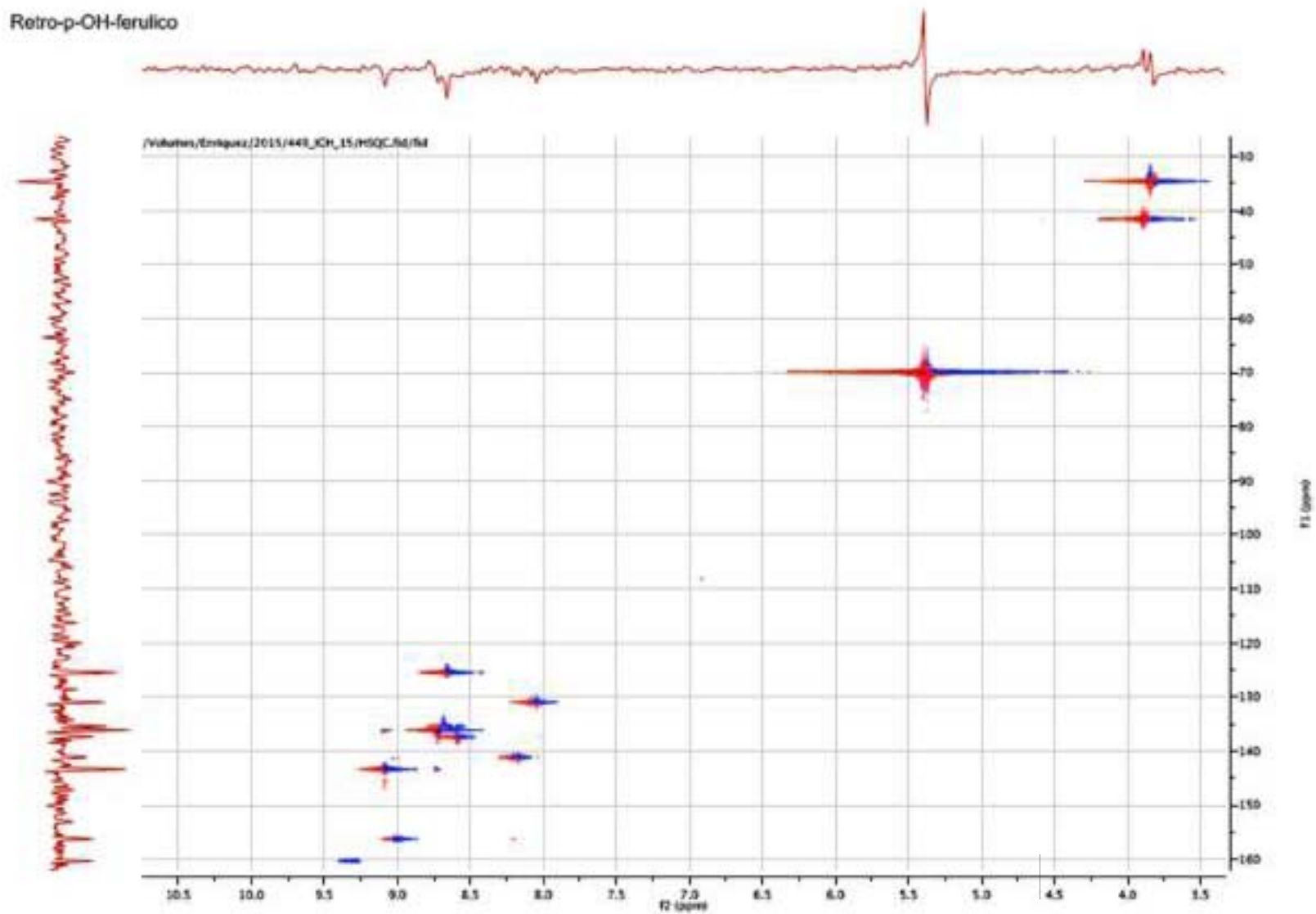


NMR Retro-Curcuminoid 12

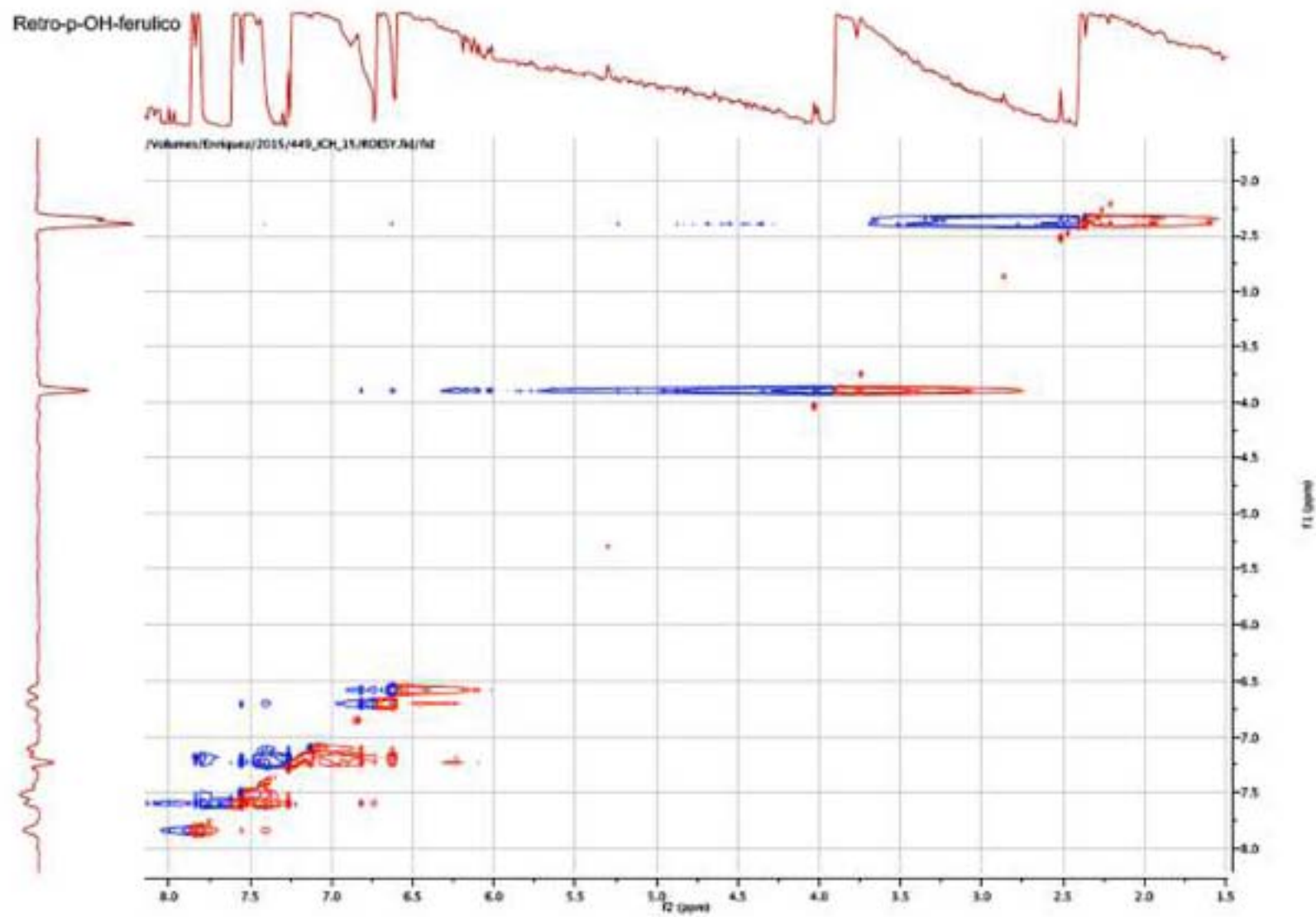
Retro-p-OH-ferulico



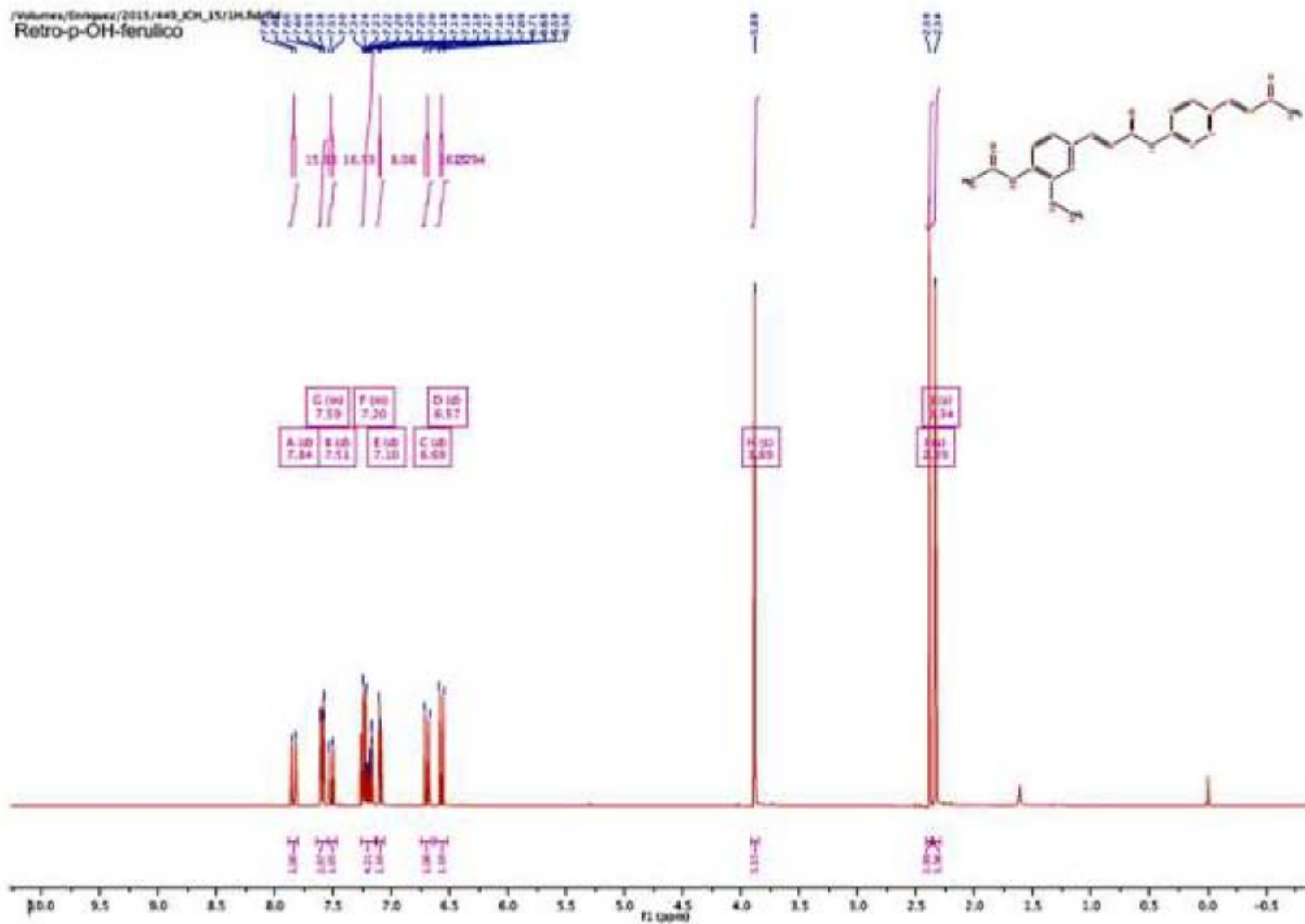
NMR Retro-Curcuminoid 12



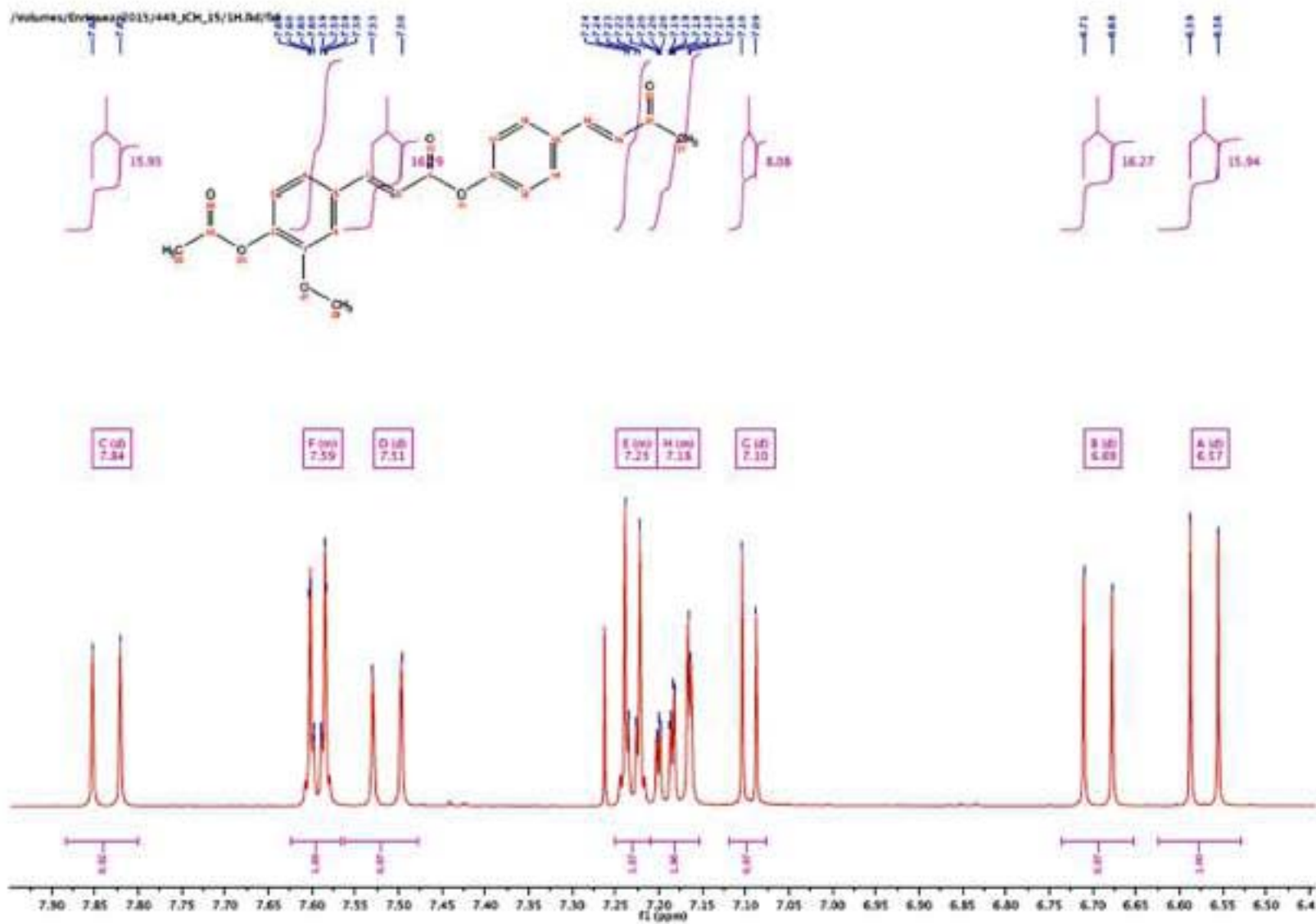
NMR Retro-Curcuminoid 12



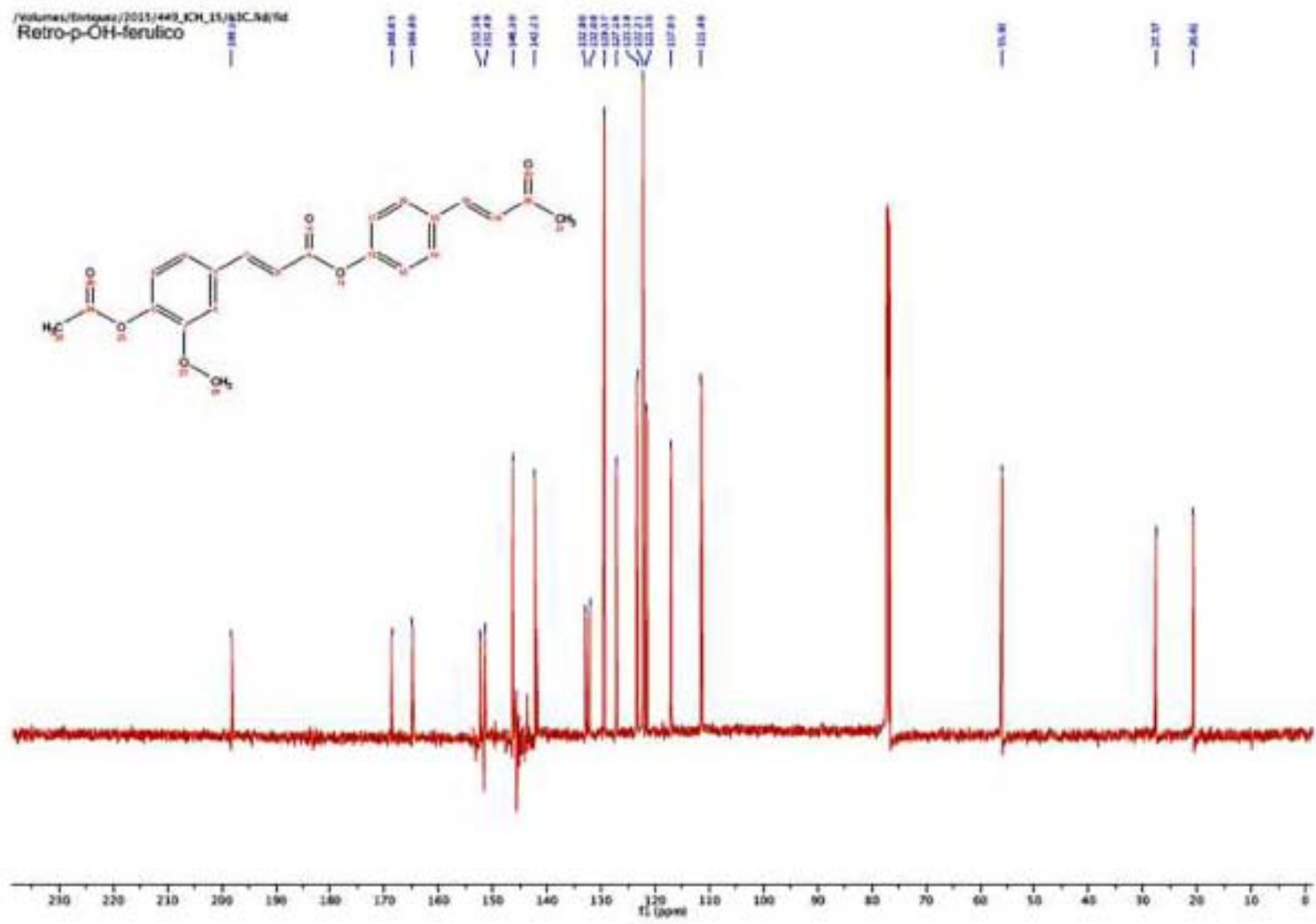
NMR Retro-Curcuminoid 13



NMR Retro-Curcuminoid 13

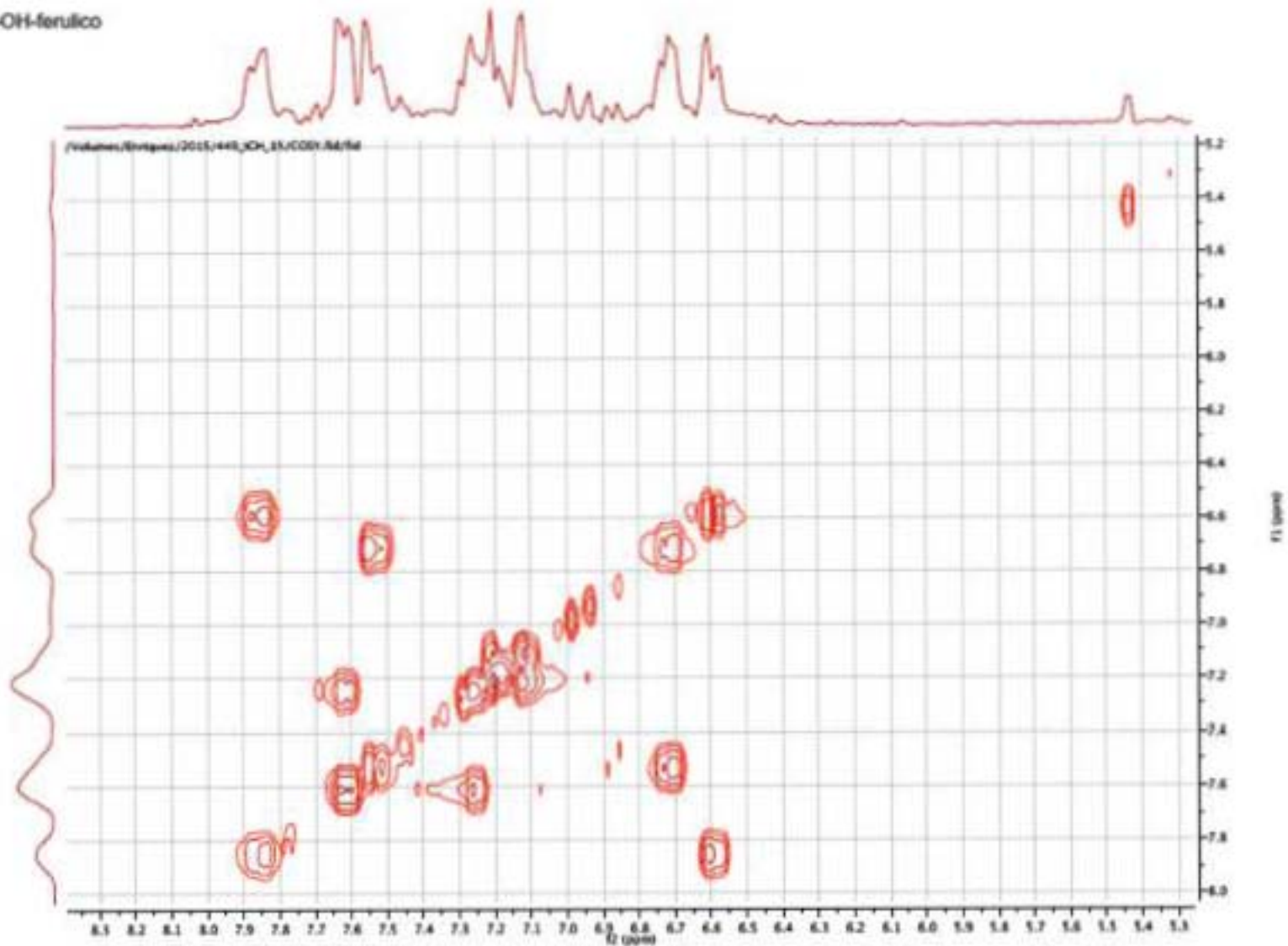


NMR Retro-Curcuminoid 13

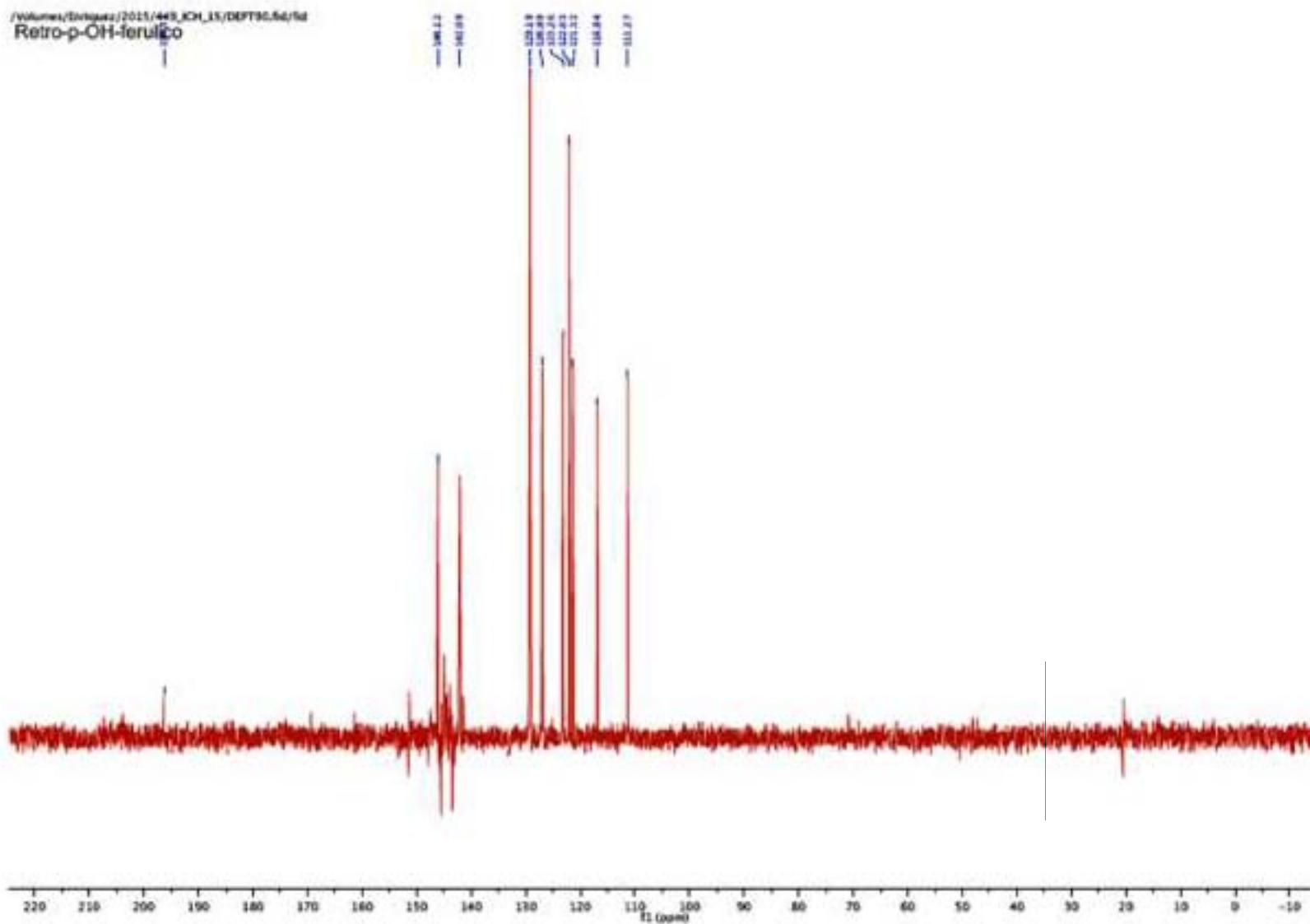


NMR Retro-Curcuminoid 13

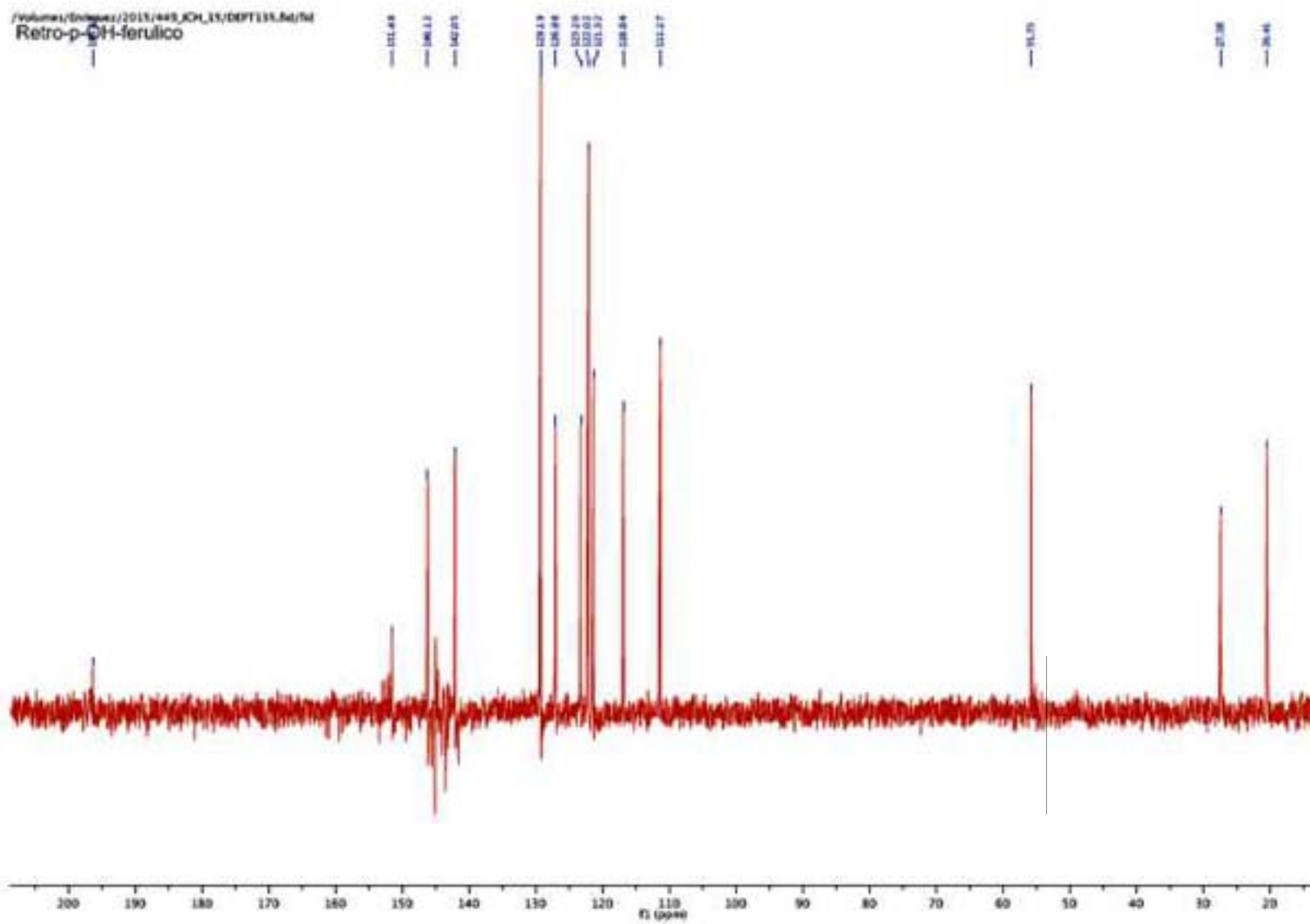
Retro-p-OH-ferulico



NMR Retro-Curcuminoid 13

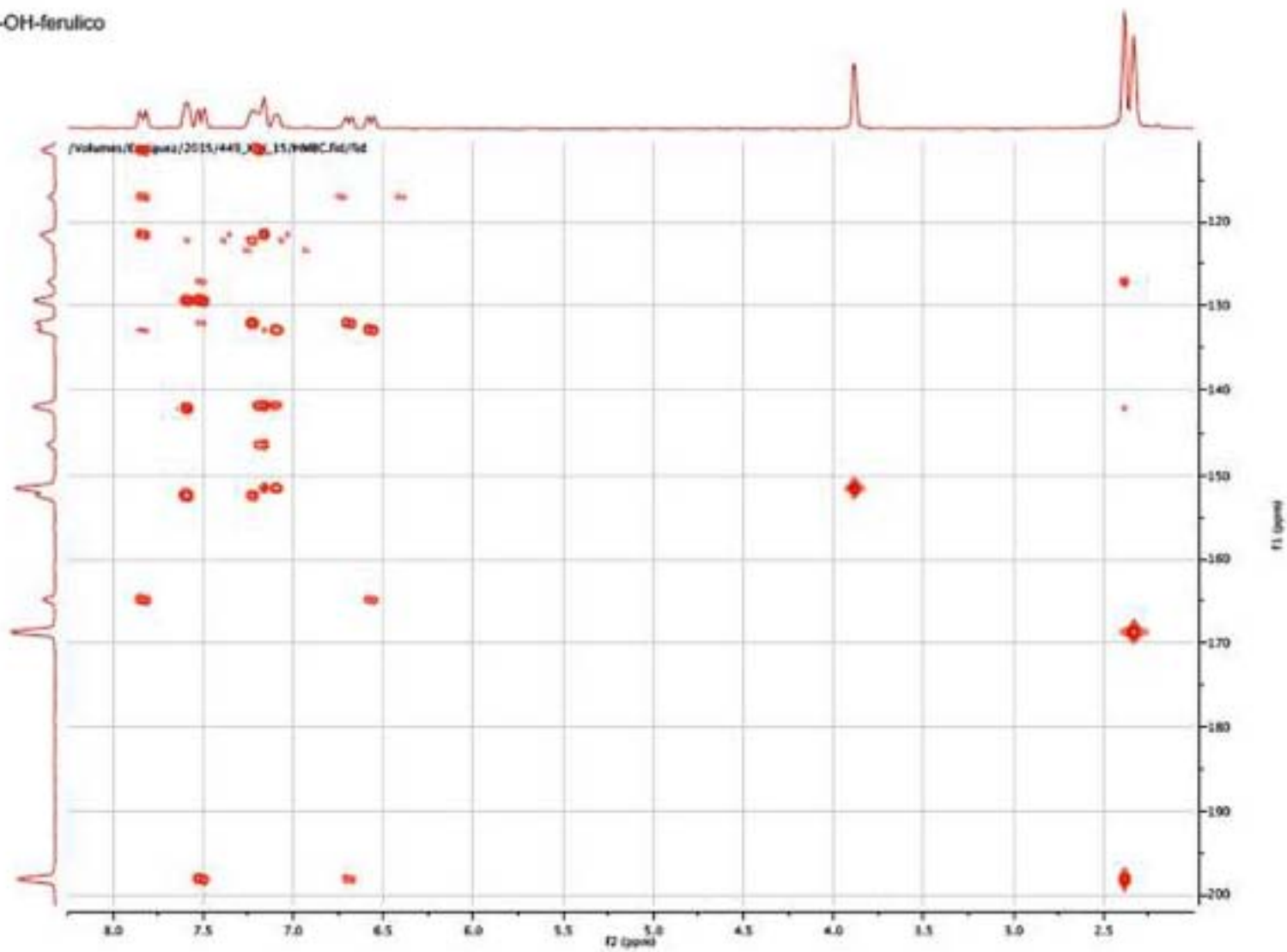


NMR Retro-Curcuminoid 13



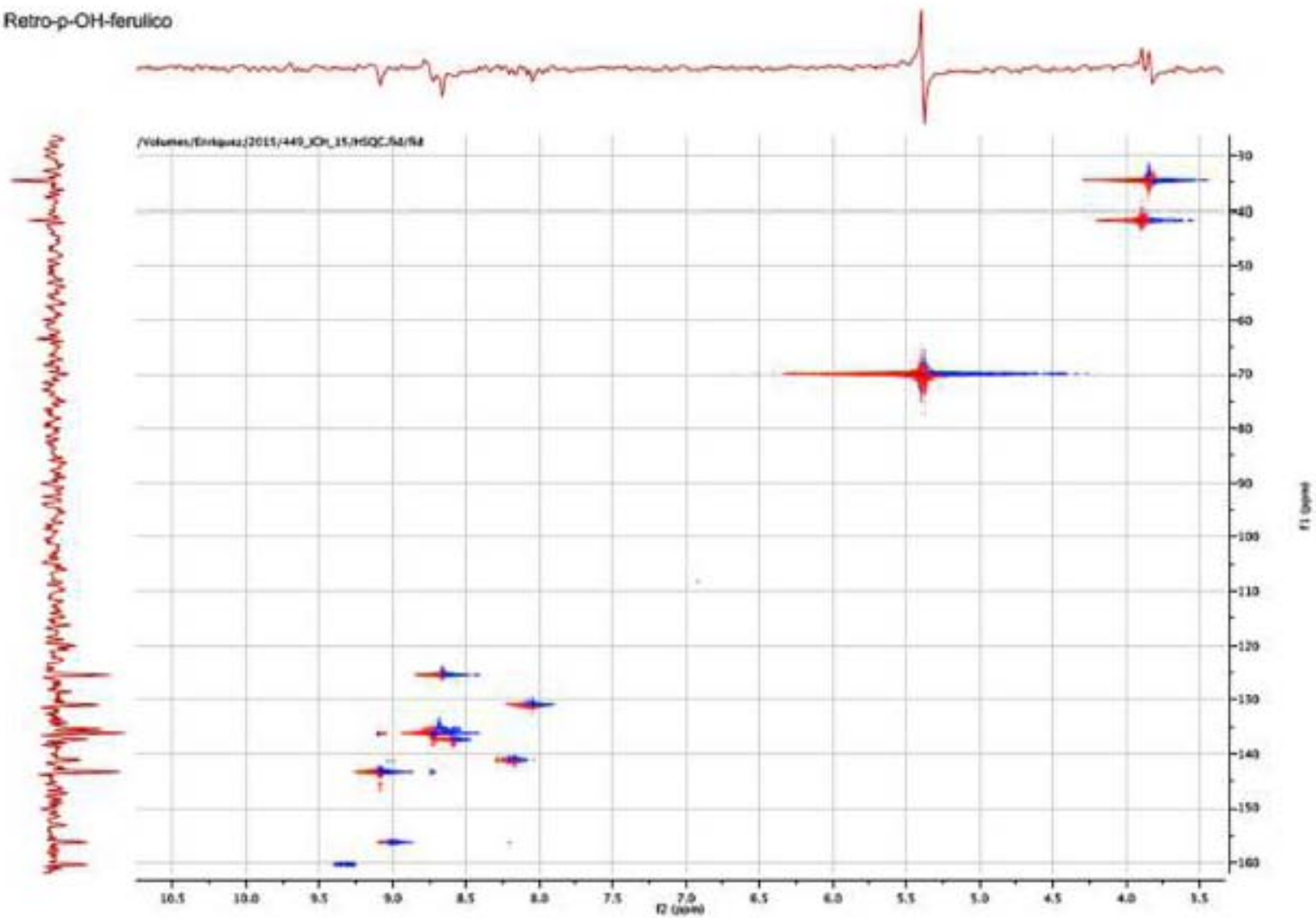
NMR Retro-Curcuminoid 13

Retro-p-OH-ferulico

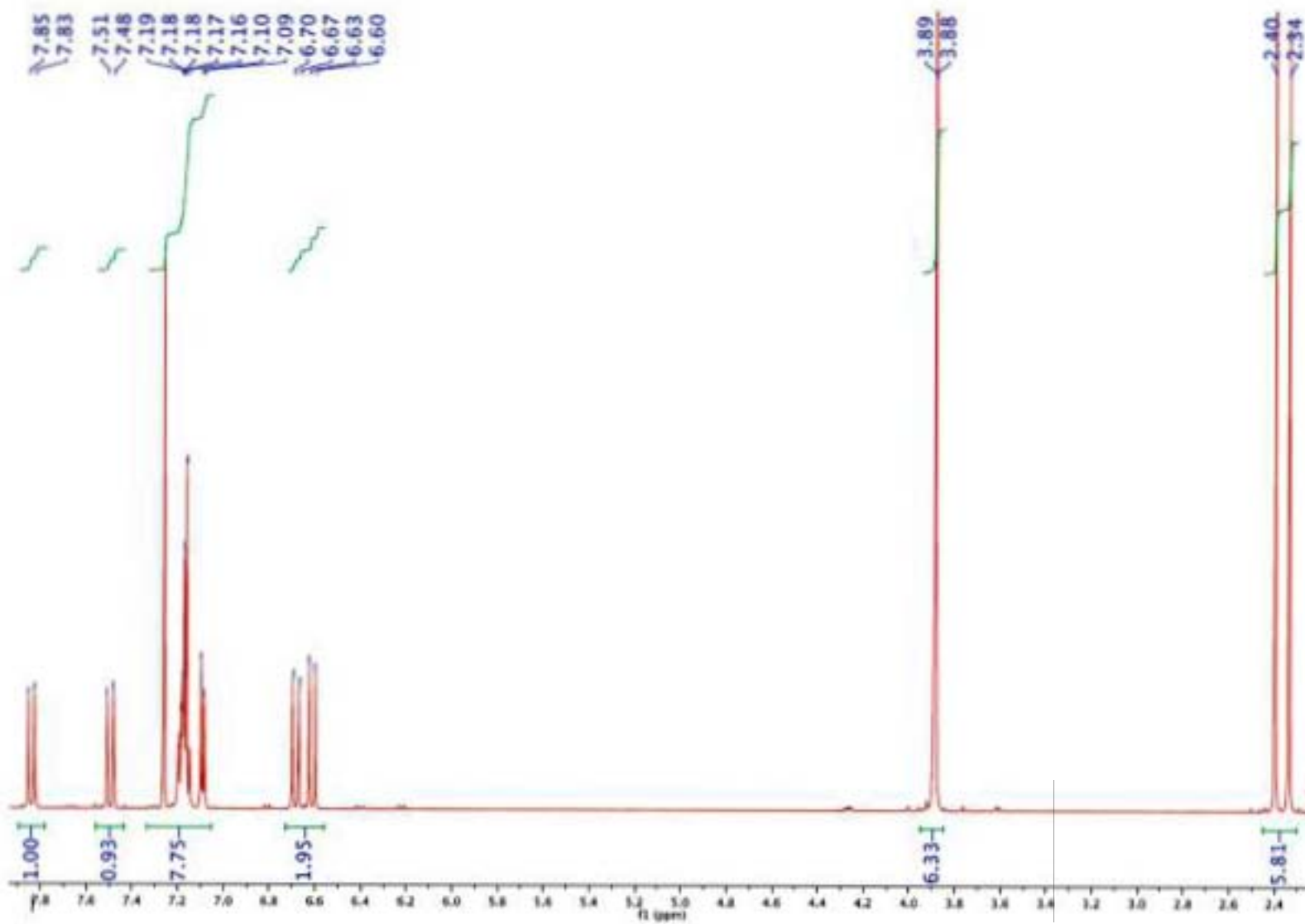


NMR Retro-Curcuminoid 13

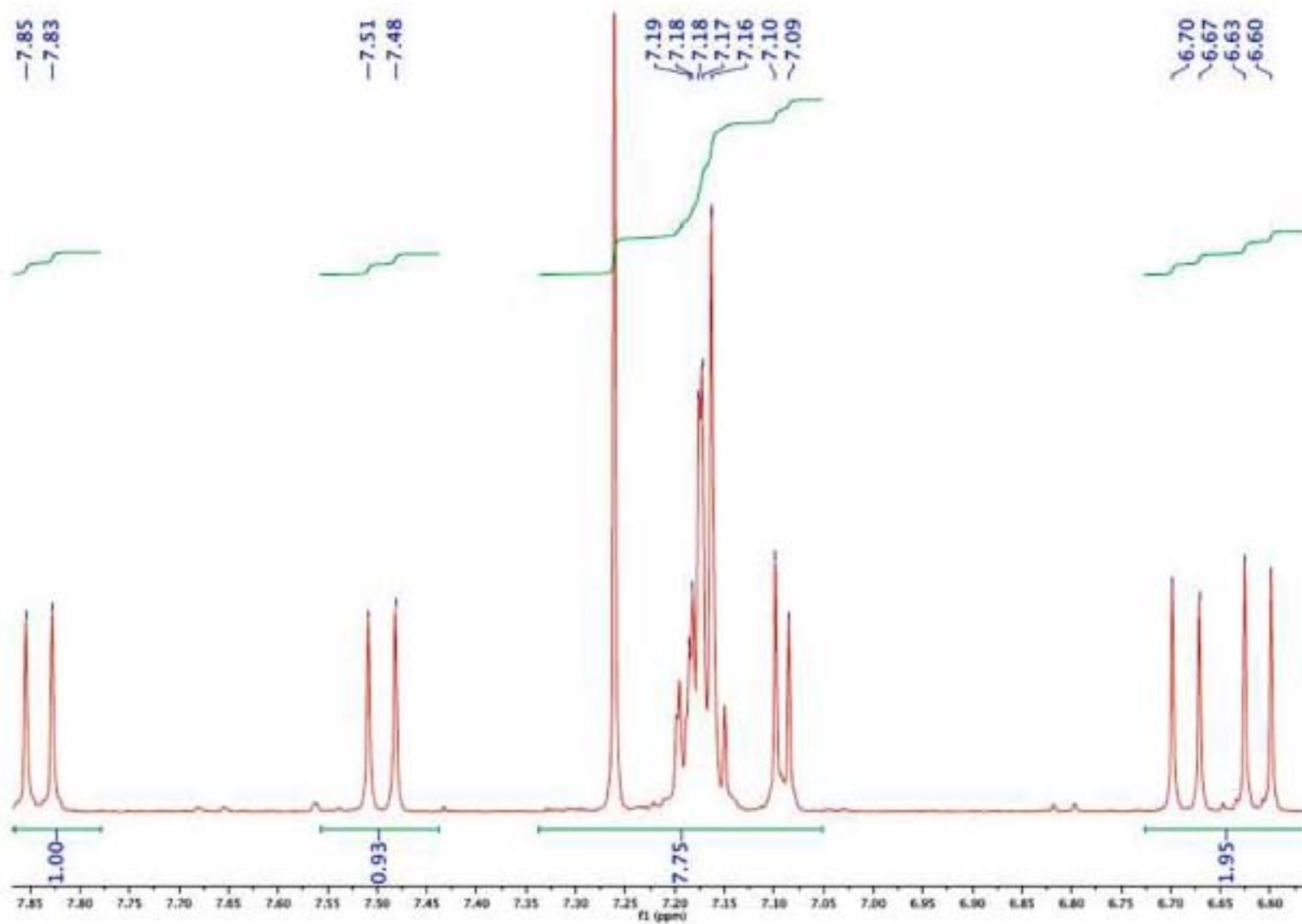
Retro-p-OH-ferulico



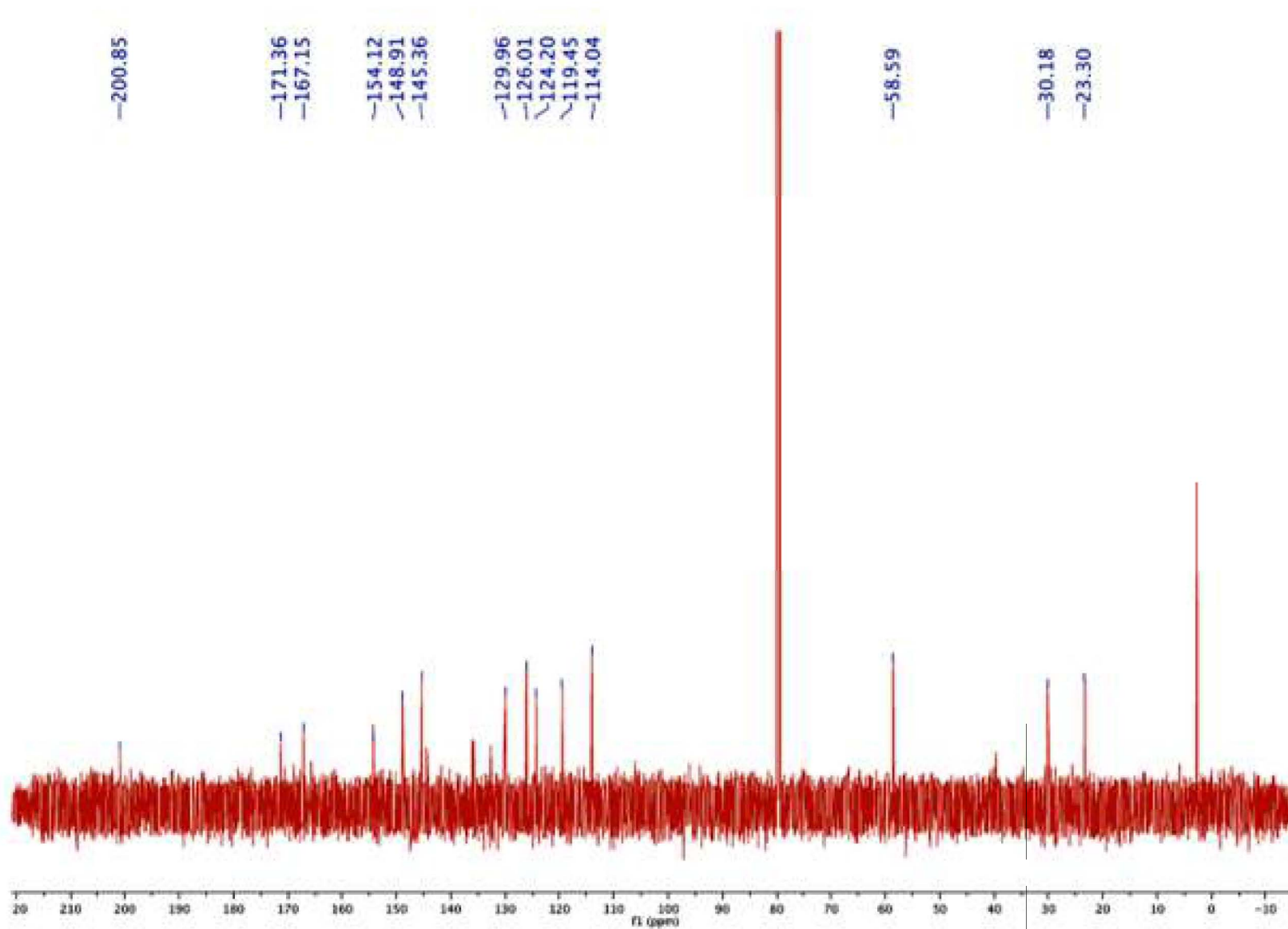
NMR Retro-Curcuminoid 14



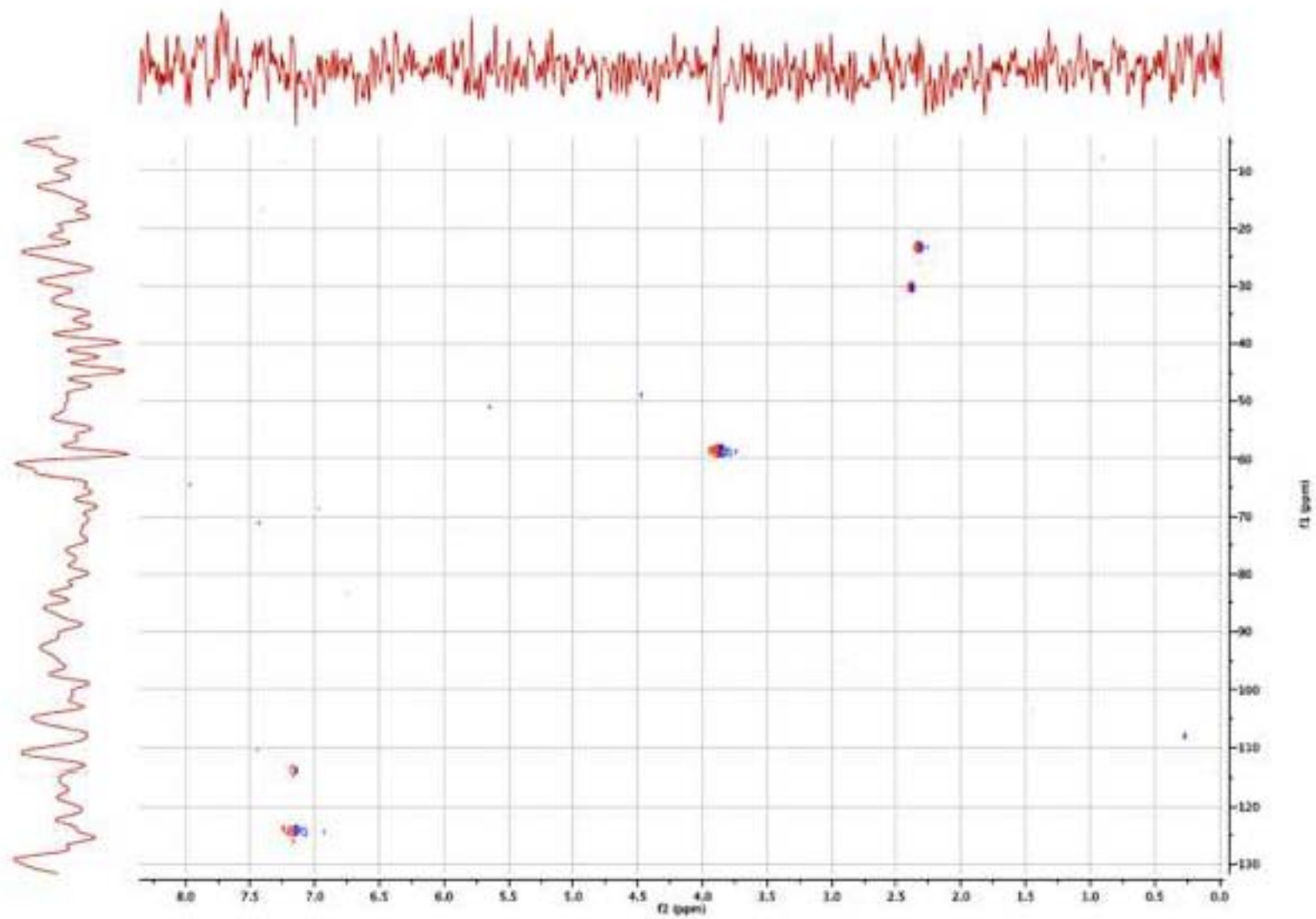
NMR Retro-Curcuminoid 14



NMR Retro-Curcuminoid 14



NMR Retro-Curcuminoid 14



X-ray Data

Table S1. Bond distances (Å) and angles (deg) for 4-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-yl)phenyl(*E*)-3-(4-acetoxy-3-methoxyphenyl)acrylate. Compound 4.

O1–C1	1.187(4)	O2–C1	1.363(4)
O2–C13	1.405(3)	O3–C6	1.370(3)
O3–C10	1.426(4)	O4–C11	1.353(4)
O4–C7	1.405(3)	O5–C11	1.195(4)
O6–C21	1.214(4)	C1–C2	1.446(4)
C2–C3	1.323(4)	C3–C4	1.463(4)
C4–C9	1.385(4)	C4–C5	1.399(4)
C5–C6	1.377(4)	C6–C7	1.387(4)
C7–C8	1.367(4)	C8–C9	1.382(4)
C11–C12	1.482(4)	C13–C14	1.368(4)
C13–C18	1.372(4)	C14–C15	1.379(4)
C15–C16	1.371(4)	C16–C17	1.390(4)
C16–C19	1.480(4)	C17–C18	1.387(4)
C19–C20	1.310(4)	C20–C21	1.476(4)
C21–C22	1.489(5)		
C1–O2–C13	123.7(2)	C6–O3–C10	117.6(2)
C11–O4–C7	117.1(2)	O1–C1–O2	123.3(3)
O1–C1–C2	126.9(3)	O2–C1–C2	109.8(3)
C3–C2–C1	121.0(3)	C2–C3–C4	128.0(3)
C9–C4–C5	118.6(3)	C9–C4–C3	123.2(3)
C5–C4–C3	118.2(3)	C6–C5–C4	121.5(3)
O3–C6–C5	125.5(3)	O3–C6–C7	116.1(2)
C5–C6–C7	118.3(3)	C8–C7–C6	121.1(3)
C8–C7–O4	118.4(3)	C6–C7–O4	120.4(3)
C7–C8–C9	120.3(3)	C8–C9–C4	120.1(3)
O5–C11–O4	122.0(3)	O5–C11–C12	126.9(3)
O4–C11–C12	111.1(3)	C14–C13–C18	120.7(3)
C14–C13–O2	113.6(3)	C18–C13–O2	125.6(3)
C13–C14–C15	119.9(3)	C16–C15–C14	121.3(3)
C15–C16–C17	117.9(3)	C15–C16–C19	119.5(3)
C17–C16–C19	122.5(3)	C18–C17–C16	121.4(3)
C13–C18–C17	118.8(3)	C20–C19–C16	127.1(3)
C19–C20–C21	126.1(3)	O6–C21–C20	118.6(3)
O6–C21–C22	120.7(3)	C20–C21–C22	120.7(3)

Table S2. Bond distances (Å) and angles (deg) for 2-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-yl)phenyl(*E*)-3-(4-acetoxy-3-methoxyphenyl)acrylate. Compound 6.

O1–C1	1.370(2)	O1–C13	1.412(2)
O2–C1	1.200(2)	O3–C6	1.359(2)
O3–C10	1.427(2)	O4–C11	1.361(3)
O4–C7	1.400(2)	O5–C11	1.194(2)
O6–C21	1.219(3)	C1–C2	1.458(3)
C2–C3	1.320(3)	C3–C4	1.472(2)
C4–C9	1.394(3)	C4–C5	1.400(3)
C5–C6	1.386(3)	C6–C7	1.388(3)
C7–C8	1.371(3)	C8–C9	1.383(3)
C11–C12	1.488(3)	C13–C18	1.371(3)
C13–C14	1.392(3)	C14–C15	1.412(3)
C14–C19	1.455(3)	C15–C16	1.372(3)
C16–C17	1.387(3)	C17–C18	1.389(3)
C19–C20	1.325(3)	C20–C21	1.460(3)
C21–C22	1.473(3)		
C1–O1–C13	117.08(15)	C6–O3–C10	116.79(15)
C11–O4–C7	116.86(15)	O2–C1–O1	122.41(18)
O2–C1–C2	126.9(2)	O1–C1–C2	110.67(18)
C3–C2–C1	120.54(19)	C2–C3–C4	127.39(19)
C9–C4–C5	119.47(17)	C9–C4–C3	122.02(18)
C5–C4–C3	118.51(17)	C6–C5–C4	120.51(18)
O3–C6–C5	125.87(18)	O3–C6–C7	115.51(17)
C5–C6–C7	118.62(19)	C8–C7–C6	121.54(18)
C8–C7–O4	119.13(17)	C6–C7–O4	119.12(18)
C7–C8–C9	120.06(19)	C8–C9–C4	119.74(19)
O5–C11–O4	122.75(19)	O5–C11–C12	126.6(2)
O4–C11–C12	110.63(18)	C18–C13–C14	122.88(19)
C18–C13–O1	117.89(18)	C14–C13–O1	119.15(19)
C13–C14–C15	116.9(2)	C13–C14–C19	120.83(18)
C15–C14–C19	122.2(2)	C16–C15–C14	120.8(2)
C15–C16–C17	120.4(2)	C16–C17–C18	120.1(2)
C13–C18–C17	118.8(2)	C20–C19–C14	126.8(2)
C19–C20–C21	122.5(2)	O6–C21–C20	121.7(2)
O6–C21–C22	119.6(3)	C20–C21–C22	118.6(2)

Table S3. Bond distances (Å) and angles (deg) for 2-methoxy-4-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-yl)phenyl cinnamate. Compound 7.

O1–C2	1.227(3)	O2–C7	1.361(3)
O2–C11	1.424(4)	O3–C12	1.348(3)
O3–C8	1.402(3)	O4–C12	1.185(3)
C1–C2	1.498(4)	C2–C3	1.457(4)
C3–C4	1.319(4)	C4–C5	1.484(4)
C5–C10	1.389(4)	C5–C6	1.390(3)
C6–C7	1.388(3)	C7–C8	1.381(4)
C8–C9	1.371(4)	C9–C10	1.393(4)
C12–C13	1.474(3)	C13–C14	1.310(3)
C14–C15	1.467(3)	C15–C16	1.378(3)
C15–C20	1.385(3)	C16–C17	1.383(4)
C17–C18	1.366(4)	C18–C19	1.363(4)
C19–C20	1.375(4)		
C7–O2–C11	117.3(2)	C12–O3–C8	118.5(2)
O1–C2–C3	122.2(3)	O1–C2–C1	120.9(2)
C3–C2–C1	116.8(3)	C4–C3–C2	120.7(3)
C3–C4–C5	127.9(3)	C10–C5–C6	118.5(2)
C10–C5–C4	124.2(2)	C6–C5–C4	117.3(2)
C7–C6–C5	121.2(2)	O2–C7–C8	116.2(2)
O2–C7–C6	124.6(2)	C8–C7–C6	119.2(2)
C9–C8–C7	120.7(2)	C9–C8–O3	120.0(2)
C7–C8–O3	119.1(2)	C8–C9–C10	120.0(3)
C5–C10–C9	120.5(2)	O4–C12–O3	122.7(2)
O4–C12–C13	127.6(2)	O3–C12–C13	109.7(2)
C14–C13–C12	122.2(3)	C13–C14–C15	127.1(2)
C16–C15–C20	117.8(2)	C16–C15–C14	122.8(2)
C20–C15–C14	119.3(2)	C15–C16–C17	120.8(2)
C18–C17–C16	120.3(3)	C19–C18–C17	119.6(2)
C18–C19–C20	120.4(2)	C19–C20–C15	121.0(2)

Table S4. Bond distances (Å) and angles (deg) for 4-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-yl)phenyl cinnamate. Compound 8.

O1–C1	1.3587(19)	O1–C10	1.3988(18)
O2–C1	1.1963(19)	C1–C2	1.460(2)
C2–C3	1.319(2)	C3–C4	1.460(2)
C4–C5	1.386(2)	C4–C9	1.387(2)
C5–C6	1.370(2)	C6–C7	1.360(3)
C7–C8	1.377(3)	C8–C9	1.371(2)
C10–C15	1.366(2)	C10–C11	1.374(2)
C11–C12	1.378(3)	C12–C13	1.388(3)
C13–C14	1.383(3)	C13–C16A	1.446(6)
C13–C16	1.519(4)	C14–C15	1.371(2)
C16–C17	1.326(4)	C17–C18	1.456(4)
C18–O3	1.209(4)	C18–C19	1.455(7)
C16A–C17A	1.338(6)	C17A–C18A	1.443(6)
C18A–O3A	1.245(7)	C18A–C19A	1.428(8)
C1–O1–C10	118.87(12)	O2–C1–O1	122.75(15)
O2–C1–C2	126.98(15)	O1–C1–C2	110.25(14)
C3–C2–C1	121.47(16)	C2–C3–C4	127.83(16)
C5–C4–C9	117.78(16)	C5–C4–C3	119.48(15)
C9–C4–C3	122.73(15)	C6–C5–C4	121.23(18)
C7–C6–C5	120.34(18)	C6–C7–C8	119.61(17)
C9–C8–C7	120.41(18)	C8–C9–C4	120.64(17)
C15–C10–C11	121.17(15)	C15–C10–O1	117.20(14)
C11–C10–O1	121.51(15)	C10–C11–C12	118.72(18)
C11–C12–C13	121.46(16)	C14–C13–C12	117.77(16)
C14–C13–C16A	137.7(3)	C12–C13–C16A	104.5(3)
C14–C13–C16	111.4(2)	C12–C13–C16	130.8(2)
C15–C14–C13	121.37(17)	C10–C15–C14	119.49(15)
C17–C16–C13	123.3(4)	C16–C17–C18	124.8(3)
O3–C18–C19	119.3(4)	O3–C18–C17	118.3(4)
C19–C18–C17	122.2(4)	C17A–C16A–C13	117.7(6)
C16A–C17A–C18A	125.4(5)	O3A–C18A–C19A	120.0(6)
O3A–C18A–C17A	118.4(6)	C19A–C18A–C17A	121.5(6)

Table S5. Bond distances (Å) and angles (deg) for 3-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-yl)phenyl cinnamate. Compound **9**.

O1–C1	1.360(2)	O1–C10	1.415(2)
O2–C1	1.195(2)	O3–C18	1.209(3)
C1–C2	1.461(3)	C2–C3	1.323(3)
C3–C4	1.465(3)	C4–C9	1.385(3)
C4–C5	1.388(3)	C5–C6	1.381(3)
C6–C7	1.368(3)	C7–C8	1.377(3)
C8–C9	1.377(3)	C10–C15	1.368(3)
C10–C11	1.377(3)	C11–C12	1.399(3)
C12–C13	1.386(3)	C12–C16	1.466(3)
C13–C14	1.378(3)	C14–C15	1.380(3)
C16–C17	1.310(3)	C17–C18	1.475(3)
C18–C19	1.486(3)		
C1–O1–C10	118.89(15)	O2–C1–O1	123.75(18)
O2–C1–C2	125.65(19)	O1–C1–C2	110.60(17)
C3–C2–C1	119.79(19)	C2–C3–C4	127.37(19)
C9–C4–C5	118.36(19)	C9–C4–C3	121.85(18)
C5–C4–C3	119.78(18)	C6–C5–C4	120.7(2)
C7–C6–C5	120.0(2)	C6–C7–C8	120.1(2)
C9–C8–C7	120.0(2)	C8–C9–C4	120.8(2)
C15–C10–C11	122.46(18)	C15–C10–O1	122.05(17)
C11–C10–O1	115.45(17)	C10–C11–C12	119.37(18)
C13–C12–C11	118.19(18)	C13–C12–C16	119.58(18)
C11–C12–C16	122.21(18)	C14–C13–C12	121.08(19)
C13–C14–C15	120.7(2)	C10–C15–C14	118.15(19)
C17–C16–C12	126.32(19)	C16–C17–C18	126.1(2)
O3–C18–C17	118.8(2)	O3–C18–C19	121.2(2)
C17–C18–C19	119.9(2)		

Table S6. Bond distances (Å) and angles (deg) for 2-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-yl)phenyl cinnamate. Compound 10.

O1–C1	1.352(6)	O1–C10	1.394(4)
O2–C1	1.188(5)	C1–C2	1.528(6)
C2–C3	1.252(5)	C3–C4	1.481(6)
C4–C9	1.372(5)	C4–C5	1.384(6)
C5–C6	1.381(5)	C6–C7	1.372(6)
C7–C8	1.372(6)	C8–C9	1.363(6)
C10–C15	1.361(5)	C10–C11	1.386(6)
C11–C12	1.385(6)	C11–C16A	1.467(19)
C11–C16	1.535(15)	C12–C13	1.380(6)
C13–C14	1.356(5)	C14–C15	1.378(5)
C16–C17	1.32(2)	C17–C18	1.495(12)
C18–O3	1.209(11)	C18–C19	1.510(13)
C16A–C17A	1.27(3)	C17A–C18A	1.496(13)
C18A–O3A	1.196(12)	C18A–C19A	1.517(13)
C1–O1–C10	117.3(4)	O2–C1–O1	124.8(6)
O2–C1–C2	126.9(6)	O1–C1–C2	108.2(5)
C3–C2–C1	122.8(5)	C2–C3–C4	127.1(5)
C9–C4–C5	118.3(5)	C9–C4–C3	118.6(5)
C5–C4–C3	123.0(5)	C6–C5–C4	120.6(5)
C7–C6–C5	119.7(5)	C8–C7–C6	120.1(5)
C9–C8–C7	119.8(5)	C8–C9–C4	121.6(5)
C15–C10–C11	123.8(5)	C15–C10–O1	116.7(5)
C11–C10–O1	119.4(5)	C10–C11–C12	115.5(5)
C10–C11–C16A	138.5(8)	C12–C11–C16A	105.8(8)
C10–C11–C16	112.0(7)	C12–C11–C16	132.2(8)
C16A–C11–C16	27.6(6)	C13–C12–C11	121.8(5)
C14–C13–C12	120.0(6)	C13–C14–C15	120.4(5)
C10–C15–C14	118.4(5)	C17–C16–C11	121.6(12)
C16–C17–C18	126.1(13)	O3–C18–C17	117.7(11)
O3–C18–C19	122.7(13)	C17–C18–C19	119.5(11)
C17A–C16A–C11	121.8(16)	C16A–C17A–C18A	118.1(16)
O3A–C18A–C17A	122.6(13)	O3A–C18A–C19A	122.2(15)
C17A–C18A–C19A	115.1(12)		

Table S7. Atomic coordinates and displacement parameters (\AA^2) for 4-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-yl)phenyl(*E*)-3-(4-acetoxy-3-methoxy phenyl)acrylate. Compound 4.

	x	y	z	U11	U22	U33	U23	U13	U12
O1	0.60250(10)	0.0651(4)	0.7022(2)	0.0479(15)	0.153(3)	0.0590(18)	-0.0314(17)	-0.0074(13)	0.0223(15)
O2	0.54118(9)	0.1386(3)	0.84428(18)	0.0337(13)	0.0884(19)	0.0492(14)	-0.0062(12)	-0.0045(11)	0.0003(11)
O3	0.90397(9)	-0.0559(3)	1.0289(2)	0.0420(14)	0.0757(19)	0.0542(15)	-0.0079(12)	-0.0037(11)	0.0159(11)
O4	0.89138(9)	0.0710(3)	1.25598(18)	0.0456(13)	0.0682(17)	0.0440(13)	0.0090(11)	-0.0112(10)	-0.0084(11)
O5	0.93925(10)	0.2830(3)	1.1666(2)	0.0607(16)	0.076(2)	0.0738(18)	0.0109(15)	-0.0091(13)	-0.0173(13)
O6	0.22473(10)	0.1608(4)	0.3101(2)	0.0649(16)	0.102(2)	0.0498(16)	-0.0077(14)	-0.0082(12)	0.0068(14)
C1	0.59558(14)	0.1080(4)	0.8044(3)	0.036(2)	0.066(3)	0.052(2)	-0.0026(18)	-0.0053(17)	0.0054(16)
C2	0.64131(13)	0.1338(4)	0.9045(3)	0.041(2)	0.058(2)	0.0424(19)	0.0001(16)	-0.0008(15)	-0.0013(16)
C3	0.69624(13)	0.0790(4)	0.8962(3)	0.0388(19)	0.051(2)	0.0446(19)	0.0009(15)	-0.0004(15)	-0.0041(15)
C4	0.74681(12)	0.0876(4)	0.9899(3)	0.0381(18)	0.041(2)	0.0406(19)	0.0065(15)	0.0006(14)	-0.0014(14)
C5	0.80078(12)	0.0156(4)	0.9622(3)	0.0432(19)	0.044(2)	0.0393(18)	0.0007(15)	-0.0015(15)	-0.0009(15)
C6	0.84973(13)	0.0136(4)	1.0472(3)	0.0377(19)	0.048(2)	0.044(2)	0.0000(15)	-0.0022(15)	0.0011(15)
C7	0.84424(13)	0.0832(4)	1.1630(3)	0.0383(19)	0.045(2)	0.044(2)	0.0065(15)	-0.0104(15)	-0.0044(15)
C8	0.79223(13)	0.1570(4)	1.1913(3)	0.047(2)	0.050(2)	0.0402(18)	-0.0036(15)	-0.0002(16)	-0.0046(16)
C9	0.74338(13)	0.1598(4)	1.1054(3)	0.0377(18)	0.047(2)	0.050(2)	-0.0016(16)	0.0032(15)	-0.0018(15)
C10	0.91421(14)	-0.1036(5)	0.9062(3)	0.052(2)	0.082(3)	0.064(3)	0.007(2)	0.0133(18)	0.0093(19)
C11	0.93775(14)	0.1805(5)	1.2486(3)	0.044(2)	0.053(3)	0.055(2)	-0.0092(19)	-0.0040(17)	0.0018(18)
C12	0.98328(14)	0.1552(5)	1.3538(3)	0.059(2)	0.087(3)	0.062(2)	-0.017(2)	-0.0236(19)	0.009(2)
C13	0.48748(13)	0.1179(4)	0.7701(3)	0.0314(18)	0.057(2)	0.045(2)	-0.0011(16)	-0.0095(15)	0.0000(15)
C14	0.44018(13)	0.0811(4)	0.8353(3)	0.041(2)	0.078(3)	0.044(2)	0.0011(17)	0.0028(16)	0.0015(17)
C15	0.38385(14)	0.0719(5)	0.7754(3)	0.041(2)	0.078(3)	0.052(2)	0.0018(18)	0.0060(17)	-0.0024(17)
C16	0.37415(13)	0.0955(4)	0.6506(3)	0.0352(18)	0.047(2)	0.053(2)	-0.0024(16)	-0.0029(16)	0.0004(14)
C17	0.42307(14)	0.1266(5)	0.5855(3)	0.048(2)	0.087(3)	0.042(2)	0.0055(18)	-0.0021(17)	-0.0009(18)
C18	0.47984(14)	0.1398(5)	0.6448(3)	0.036(2)	0.099(3)	0.052(2)	0.011(2)	-0.0007(17)	-0.0079(18)
C19	0.31273(13)	0.0915(4)	0.5908(3)	0.042(2)	0.054(2)	0.055(2)	-0.0037(17)	0.0010(16)	-0.0029(16)
C20	0.29584(14)	0.1175(4)	0.4741(3)	0.045(2)	0.065(3)	0.052(2)	-0.0024(17)	0.0021(17)	0.0035(16)
C21	0.23411(13)	0.1164(4)	0.4170(3)	0.044(2)	0.056(2)	0.048(2)	-0.0095(17)	-0.0057(17)	0.0085(16)
C22	0.18461(14)	0.0576(5)	0.4879(3)	0.046(2)	0.067(3)	0.074(3)	-0.0063(19)	-0.0012(19)	0.0053(17)

Table S8. Atomic coordinates and displacement parameters (\AA^2) for 2-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-yl)phenyl(*E*)-3-(4-acetoxy-3-methoxyphenyl)acrylate Compound 6.

	x	y	z	U11	U22	U33	U23	U13	U12
O1	0.8087(2)	1.14704(8)	0.21564(8)	0.0337(8)	0.0428(9)	0.0381(9)	-0.0123(7)	-0.0022(7)	-0.0081(6)
O2	1.0179(2)	1.10146(8)	0.12438(9)	0.0414(9)	0.0458(10)	0.0548(11)	-0.0166(8)	0.0099(8)	-0.0136(7)
O3	0.4285(2)	0.76878(8)	-0.04855(8)	0.0396(8)	0.0480(9)	0.0365(9)	-0.0138(8)	0.0064(7)	-0.0144(7)
O4	0.0599(2)	0.75979(8)	0.02750(8)	0.0302(7)	0.0364(9)	0.0405(9)	0.0019(7)	-0.0048(7)	-0.0099(6)
O5	0.2711(3)	0.66795(9)	0.07869(10)	0.0668(10)	0.0440(10)	0.0697(13)	0.0152(9)	-0.0306(10)	-0.0112(8)
O6	1.1927(3)	0.95602(12)	0.36514(13)	0.0908(14)	0.0686(14)	0.122(2)	0.0332(13)	-0.0379(14)	-0.0169(12)
C1	0.8521(3)	1.09764(12)	0.15923(12)	0.0328(11)	0.0332(12)	0.0317(13)	-0.0009(10)	-0.0054(10)	-0.0011(9)
C2	0.6731(3)	1.04253(11)	0.14947(11)	0.0303(10)	0.0346(12)	0.0311(13)	0.0019(10)	-0.0017(9)	-0.0048(9)
C3	0.5117(3)	0.93235(11)	0.07856(11)	0.0294(10)	0.0306(11)	0.0334(13)	0.0054(10)	-0.0029(9)	-0.0003(9)
C4	0.5117(3)	0.93235(11)	0.07856(11)	0.0269(10)	0.0282(11)	0.0277(12)	0.0045(9)	-0.0048(9)	-0.0020(8)
C5	0.5553(3)	0.87992(11)	0.02240(11)	0.0248(10)	0.0350(12)	0.0280(12)	0.0027(10)	-0.0008(9)	-0.0030(8)
C6	0.4067(3)	0.82178(11)	0.00555(11)	0.0313(10)	0.0334(12)	0.0242(12)	-0.0009(10)	-0.0026(9)	-0.0029(9)
C7	0.2159(3)	0.81603(11)	0.04618(11)	0.0241(10)	0.0328(12)	0.0304(12)	0.0025(10)	-0.0056(9)	-0.0054(8)
C8	0.1687(3)	0.86785(12)	0.10033(12)	0.0247(10)	0.0421(13)	0.0374(13)	-0.0006(11)	0.0038(9)	-0.0013(9)
C9	0.3152(3)	0.92658(11)	0.11677(12)	0.0296(10)	0.0359(12)	0.0354(13)	-0.0041(10)	0.0005(9)	-0.0002(9)
C10	0.6137(3)	0.77711(13)	-0.09509(12)	0.0341(11)	0.0506(14)	0.0364(13)	-0.0112(11)	0.0022(10)	-0.0011(10)
C11	0.1124(3)	0.68530(13)	0.04338(12)	0.0455(13)	0.0418(14)	0.0331(13)	0.0068(11)	-0.0036(11)	-0.0104(11)
C12	-0.0514(4)	0.63159(13)	0.01024(14)	0.0626(15)	0.0463(15)	0.0495(16)	0.0039(12)	-0.0105(13)	-0.0222(12)
C13	0.9700(3)	1.20315(12)	0.23232(11)	0.0339(11)	0.0387(13)	0.0310(13)	-0.0114(10)	0.0023(9)	-0.0074(9)
C14	1.1500(3)	1.18261(13)	0.27571(12)	0.0372(11)	0.0456(14)	0.0285(12)	-0.0061(11)	0.0008(10)	-0.0069(10)
C15	1.3007(3)	1.24172(14)	0.29390(12)	0.0406(12)	0.0546(15)	0.0292(13)	-0.0109(12)	-0.0021(10)	-0.0068(11)
C16	1.2691(4)	1.31562(13)	0.26917(12)	0.0456(13)	0.0457(15)	0.0390(14)	-0.0168(12)	0.0025(11)	-0.0108(11)
C17	1.0865(3)	1.33378(13)	0.22653(13)	0.0508(13)	0.0384(13)	0.0450(15)	-0.0112(11)	0.0068(12)	-0.0041(11)
C18	0.9357(3)	1.27684(12)	0.20760(13)	0.0391(12)	0.0435(14)	0.0401(14)	-0.0096(12)	0.0008(10)	-0.0011(10)
C19	1.1749(3)	1.10422(13)	0.30289(12)	0.0423(12)	0.0520(15)	0.0352(14)	-0.0034(12)	-0.0046(11)	-0.0101(11)
C20	1.3557(4)	1.07276(14)	0.33088(13)	0.0405(12)	0.0527(15)	0.0467(15)	-0.0085(12)	-0.0050(11)	-0.0014(11)
C21	1.3586(4)	0.99539(15)	0.36229(15)	0.0619(16)	0.0517(16)	0.0623(18)	-0.0091(14)	-0.0154(14)	0.0012(14)
C22	1.5648(5)	0.96676(18)	0.3955(2)	0.083(2)	0.070(2)	0.130(3)	-0.007(2)	-0.036(2)	0.0279(17)

Table S9. Atomic coordinates and displacement parameters (\AA^2) for 2-methoxy-4-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-yl)phenyl cinnamate. Compound 7.

	x	y	z	U11	U22	U33	U23	U13	U12
O1	0.2323(3)	0.5569(2)	-0.17913(18)	0.0728(13)	0.1141(16)	0.0735(13)	-0.0331(11)	-0.0242(10)	0.0197(12)
O2	-0.0736(3)	0.2035(2)	0.50660(15)	0.0700(12)	0.1016(14)	0.0464(10)	-0.0216(9)	-0.0124(8)	0.0164(10)
O3	0.1935(3)	0.05867(18)	0.55160(15)	0.0945(14)	0.0678(11)	0.0549(10)	-0.0132(8)	-0.0341(10)	0.0060(9)
O4	0.3093(3)	0.2342(2)	0.58885(18)	0.1180(18)	0.0912(15)	0.0639(12)	-0.0161(10)	-0.0306(12)	-0.0233(13)
C1	0.4913(4)	0.4753(3)	-0.2915(3)	0.087(2)	0.095(2)	0.0656(17)	-0.0306(15)	-0.0171(15)	0.0176(17)
C2	0.3551(4)	0.4832(3)	-0.1741(2)	0.0703(18)	0.0622(15)	0.0617(15)	-0.0192(12)	-0.0245(13)	-0.0006(13)
C3	0.3750(4)	0.3988(3)	-0.0553(2)	0.0716(18)	0.0733(17)	0.0649(16)	-0.0244(13)	-0.0200(14)	0.0115(13)
C4	0.2467(4)	0.3818(3)	0.0526(2)	0.0630(16)	0.0687(15)	0.0630(15)	-0.0270(12)	-0.0188(12)	0.0023(12)
C5	0.2440(4)	0.2996(3)	0.1813(2)	0.0699(17)	0.0596(14)	0.0511(13)	-0.0182(11)	-0.0162(12)	0.0070(12)
C6	0.0893(4)	0.2927(3)	0.2810(2)	0.0676(16)	0.0638(14)	0.0516(14)	-0.0202(11)	-0.0178(12)	0.0143(12)
C7	0.0741(3)	0.2166(3)	0.4044(2)	0.0640(15)	0.0629(14)	0.0457(13)	-0.0186(11)	-0.0131(11)	0.0060(12)
C8	0.2153(4)	0.1461(3)	0.4282(2)	0.0709(17)	0.0592(14)	0.0484(13)	-0.0154(11)	-0.0220(12)	0.0060(12)
C9	0.3696(4)	0.1521(3)	0.3316(2)	0.0705(17)	0.0731(16)	0.0688(17)	-0.0258(13)	-0.0242(14)	0.0170(13)
C10	0.3849(4)	0.2293(3)	0.2079(2)	0.0670(17)	0.0755(17)	0.0571(15)	-0.0255(13)	-0.0083(12)	0.0086(13)
C11	-0.2245(4)	0.2692(4)	0.4842(3)	0.076(2)	0.140(3)	0.0686(18)	-0.0384(19)	-0.0179(15)	0.036(2)
C12	0.2436(3)	0.1150(3)	0.6251(2)	0.0535(15)	0.0755(17)	0.0576(15)	-0.0227(13)	-0.0173(12)	0.0092(13)
C13	0.2046(3)	0.0069(3)	0.7512(2)	0.0600(16)	0.0700(16)	0.0577(15)	-0.0191(12)	-0.0215(12)	0.0104(12)
C14	0.2474(3)	0.0320(3)	0.8396(2)	0.0566(15)	0.0699(16)	0.0588(15)	-0.0196(12)	-0.0183(12)	0.0069(12)
C15	0.2126(3)	-0.0657(3)	0.9686(2)	0.0475(13)	0.0631(14)	0.0552(14)	-0.0198(11)	-0.0150(10)	0.0114(11)
C16	0.1307(4)	-0.2030(3)	1.0122(2)	0.0760(18)	0.0673(16)	0.0644(16)	-0.0274(13)	-0.0273(13)	0.0091(13)
C17	0.0947(4)	-0.2897(3)	1.1360(3)	0.086(2)	0.0576(15)	0.0698(17)	-0.0142(13)	-0.0263(15)	0.0081(13)
C18	0.1407(4)	-0.2406(3)	1.2169(2)	0.0781(19)	0.0759(18)	0.0568(15)	-0.0179(13)	-0.0265(13)	0.0190(14)
C19	0.2228(4)	-0.1056(3)	1.1750(3)	0.084(2)	0.086(2)	0.0639(17)	-0.0300(15)	-0.0348(15)	0.0114(15)
C20	0.2588(4)	-0.0186(3)	1.0522(2)	0.0680(17)	0.0693(16)	0.0659(16)	-0.0244(13)	-0.0253(13)	0.0021(13)

Table S10. Atomic coordinates and displacement parameters (\AA^2) for 4-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-yl)phenyl cinnamate. Compound 8.

	x	y	z	U11	U22	U33	U23	U13	U12
O1	0.05200(6)	0.8672(3)	0.09397(5)	0.0483(6)	0.0916(9)	0.0582(7)	0.0147(6)	0.0230(5)	0.0029(6)
O2	0.12666(7)	0.5815(4)	0.18862(7)	0.0635(8)	0.1317(12)	0.0810(8)	0.0430(9)	0.0344(7)	0.0164(7)
C1	0.12022(9)	0.7433(4)	0.13961(9)	0.0529(9)	0.0744(11)	0.0535(9)	0.0016(8)	0.0212(8)	-0.0012(8)
C2	0.18077(9)	0.8307(4)	0.11857(8)	0.0534(9)	0.0679(11)	0.0580(9)	0.0038(8)	0.0231(8)	-0.0024(8)
C3	0.25127(9)	0.7194(4)	0.15217(9)	0.0552(10)	0.0682(10)	0.0578(9)	0.0020(8)	0.0216(8)	-0.0018(8)
C4	0.31704(9)	0.7787(4)	0.13661(8)	0.0515(9)	0.0569(9)	0.0592(9)	0.0075(8)	0.0214(8)	-0.0047(7)
C5	0.38830(9)	0.6579(5)	0.18087(9)	0.0556(10)	0.0825(12)	0.0689(11)	0.0020(9)	0.0228(8)	0.0020(9)
C6	0.45123(10)	0.7052(5)	0.16764(11)	0.0520(10)	0.0909(14)	0.0900(13)	0.0074(11)	0.0256(10)	0.0018(9)
C7	0.44483(11)	0.8719(5)	0.11012(11)	0.0633(12)	0.0863(14)	0.1055(15)	0.0110(12)	0.0484(11)	-0.0095(10)
C8	0.37465(12)	0.9943(5)	0.06524(11)	0.0814(13)	0.0872(14)	0.0880(13)	0.0055(11)	0.0472(11)	-0.0064(11)
C9	0.31144(10)	0.9488(4)	0.07823(9)	0.0562(9)	0.0688(11)	0.0726(11)	0.0032(9)	0.0257(8)	-0.0007(8)
C10	0.01369(9)	0.8028(4)	0.10433(8)	0.0510(9)	0.0654(10)	0.0527(9)	0.0095(8)	0.0260(7)	0.0077(7)
C11	0.02211(10)	0.9222(4)	0.16110(9)	0.0701(11)	0.0770(12)	0.0579(10)	0.0024(9)	0.0264(8)	0.0076(9)
C12	0.09008(12)	0.8665(5)	0.16624(10)	0.0882(13)	0.0876(13)	0.0670(11)	0.0154(10)	0.0492(11)	0.0317(11)
C13	0.14920(10)	0.6911(5)	0.11594(10)	0.0605(11)	0.0764(12)	0.0804(12)	0.0245(10)	0.0401(10)	0.0213(9)
C14	0.13847(10)	0.5790(5)	0.05933(9)	0.0520(9)	0.0800(12)	0.0754(11)	0.0035(9)	0.0276(8)	0.0025(8)
C15	0.07130(9)	0.6337(4)	0.05342(8)	0.0540(9)	0.0762(11)	0.0551(9)	0.0004(8)	0.0248(8)	0.0057(8)
C16	0.2277(2)	0.5980(11)	0.1108(2)	0.057(2)	0.074(2)	0.064(2)	0.0050(19)	0.028(2)	0.0077(18)
C17	0.25181(17)	0.6739(8)	0.15888(16)	0.0595(16)	0.094(2)	0.0694(18)	0.0042(15)	0.0322(14)	0.0081(14)
C18	0.3275(2)	0.5985(12)	0.1546(2)	0.0650(18)	0.102(3)	0.076(3)	0.011(2)	0.043(2)	0.0050(17)
C19	0.3852(4)	0.428(3)	0.0955(4)	0.079(3)	0.125(4)	0.127(5)	0.030(4)	0.063(3)	-0.021(3)
O3	0.3440(2)	0.6979(11)	0.20009(18)	0.0830(19)	0.162(4)	0.102(2)	0.0204(19)	0.0562(15)	-0.002(2)
C16A	0.2078(3)	0.6756(19)	0.1415(3)	0.059(3)	0.084(4)	0.059(3)	0.010(3)	0.031(3)	0.013(2)
C17	0.2735(3)	0.5249(14)	0.1018(3)	0.065(3)	0.092(3)	0.077(3)	0.006(2)	0.036(2)	0.006(2)
C18A	0.3382(3)	0.4873(19)	0.1185(3)	0.064(3)	0.105(4)	0.088(4)	0.008(3)	0.040(3)	0.002(3)
C19A	0.3335(5)	0.572(3)	0.1854(4)	0.087(4)	0.115(6)	0.089(4)	0.008(4)	0.048(3)	0.026(4)
O3A	0.3981(5)	0.366(4)	0.0741(5)	0.098(4)	0.171(7)	0.115(5)	0.020(4)	0.047(3)	0.039(4)

Table S11. Atomic coordinates and displacement parameters (\AA^2) for 3-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-yl)phenyl cinnamate. Compound 9.

	x	y	z	U11	U22	U33	U23	U13	U12
O1	0.24020(4)	0.2592(2)	0.12000(18)	0.0432(8)	0.0481(8)	0.0817(10)	-0.0014(7)	0.0044(7)	-0.0022(6)
O2	0.20497(5)	0.5635(3)	0.2063(2)	0.0684(11)	0.0481(10)	0.1150(14)	-0.0111(9)	0.0264(9)	-0.0057(7)
O3	0.44225(5)	-0.0922(3)	0.3741(3)	0.0667(11)	0.0723(12)	0.1323(16)	0.0165(11)	-0.0035(10)	0.0103(9)
C1	0.20817(6)	0.3590(4)	0.1845(3)	0.0454(12)	0.0499(13)	0.0638(13)	-0.0015(10)	-0.0012(9)	0.0012(10)
C2	0.17908(6)	0.1821(3)	0.2234(2)	0.0471(12)	0.0452(11)	0.0658(13)	0.0008(10)	-0.0036(10)	-0.0007(9)
C3	0.14329(6)	0.2458(3)	0.2648(2)	0.0531(13)	0.0460(12)	0.0604(13)	0.0005(9)	0.0023(10)	-0.0001(9)
C4	0.11156(6)	0.0952(3)	0.3183(2)	0.0509(12)	0.0467(11)	0.0489(11)	-0.0031(9)	0.0004(9)	-0.0010(9)
C5	0.07164(6)	0.1659(4)	0.2934(3)	0.0534(13)	0.0578(13)	0.0704(14)	-0.0033(11)	0.0075(10)	0.0045(10)
C6	0.04126(7)	0.0268(4)	0.3432(3)	0.0519(14)	0.0806(18)	0.0847(17)	-0.0098(14)	0.0144(12)	-0.0016(12)
C7	0.05044(8)	-0.1810(5)	0.4210(3)	0.0707(17)	0.0783(18)	0.0712(15)	-0.0070(13)	0.0209(12)	-0.0206(14)
C8	0.08988(7)	-0.2536(4)	0.4473(3)	0.0794(17)	0.0617(14)	0.0587(14)	0.0065(11)	0.0043(12)	-0.0125(12)
C9	0.12017(7)	-0.1168(4)	0.3958(3)	0.0569(13)	0.0556(13)	0.0590(13)	0.0012(10)	-0.0023(10)	-0.0017(10)
C10	0.27320(6)	0.4008(3)	0.0875(2)	0.0465(12)	0.0477(12)	0.0532(12)	-0.0027(9)	0.0042(9)	-0.0025(9)
C11	0.31041(6)	0.3225(3)	0.1538(2)	0.0484(11)	0.0433(11)	0.0510(11)	0.0014(9)	0.0067(9)	0.0037(9)
C12	0.34479(6)	0.4513(3)	0.1275(2)	0.0491(12)	0.0492(12)	0.0464(11)	-0.0026(9)	0.0087(9)	0.0007(9)
C13	0.33992(6)	0.6535(4)	0.0335(2)	0.0565(13)	0.0557(13)	0.0569(12)	0.0005(10)	0.0122(10)	-0.0057(10)
C14	0.30235(7)	0.7247(4)	-0.0343(3)	0.0687(15)	0.0576(13)	0.0587(13)	0.0127(10)	0.0081(11)	0.0028(11)
C15	0.26843(6)	0.5982(4)	-0.0077(2)	0.0541(13)	0.0593(14)	0.0567(13)	0.0076(10)	-0.0019(10)	0.0058(10)
C16	0.38518(6)	0.3818(4)	0.1988(2)	0.0452(11)	0.0589(13)	0.0574(12)	-0.0006(10)	0.0093(9)	-0.0042(10)
C17	0.39593(6)	0.1753(4)	0.2561(3)	0.0479(12)	0.0607(14)	0.0629(13)	0.0006(11)	0.0054(10)	-0.0038(10)
C18	0.43642(6)	0.1074(4)	0.3308(3)	0.0481(13)	0.0693(16)	0.0638(13)	0.0021(11)	0.0055(10)	0.0062(11)
C19	0.46898(7)	0.2843(5)	0.3540(3)	0.0524(14)	0.0879(18)	0.0980(19)	0.0023(15)	-0.0030(12)	-0.00

Table S12. Atomic coordinates and displacement parameters (\AA^2) for 2-((*E*)-3-oxobut-1-en-1-yl)phenyl cinnamate. Compound 10.

	x	y	z	U11	U22	U33	U23	U13	U12
O1	0.0677(6)	0.6038(2)	0.08252(19)	0.078(3)	0.084(3)	0.057(2)	-0.002(2)	0.000(2)	-0.020(2)
O2	0.3081(6)	0.6869(2)	0.15277(19)	0.093(3)	0.095(3)	0.059(2)	-0.018(2)	0.001(2)	-0.018(2)
C1	0.1339(11)	0.6447(4)	0.1456(3)	0.090(5)	0.060(4)	0.064(4)	0.014(4)	0.014(4)	0.013(4)
C2	-0.0532(10)	0.6271(3)	0.2042(3)	0.093(5)	0.080(4)	0.064(4)	0.001(3)	-0.017(4)	-0.013(4)
C3	-0.0420(9)	0.6584(3)	0.2682(3)	0.082(4)	0.060(4)	0.070(4)	-0.003(3)	-0.029(4)	0.005(3)
C4	-0.2119(9)	0.6451(3)	0.3291(3)	0.060(4)	0.063(4)	0.053(4)	0.014(3)	0.011(3)	0.001(3)
C5	-0.4105(10)	0.5931(3)	0.3222(3)	0.074(4)	0.078(4)	0.060(4)	0.002(3)	0.003(3)	0.000(3)
C6	-0.5619(9)	0.5824(3)	0.3811(3)	0.074(4)	0.085(4)	0.074(4)	0.013(4)	0.003(4)	-0.011(4)
C7	-0.5167(9)	0.6247(3)	0.4466(3)	0.071(5)	0.090(5)	0.078(4)	0.013(4)	0.028(4)	0.003(4)
C8	-0.3214(10)	0.6772(3)	0.4536(3)	0.101(5)	0.095(5)	0.062(4)	-0.005(3)	0.019(4)	-0.003(4)
C9	-0.1723(9)	0.6869(3)	0.3952(3)	0.075(4)	0.081(4)	0.072(4)	-0.003(4)	0.007(4)	-0.014(3)
C10	0.2159(9)	0.6119(3)	0.0217(2)	0.065(4)	0.071(4)	0.034(3)	-0.003(3)	-0.001(3)	-0.018(3)
C11	0.4146(10)	0.5594(3)	0.0173(3)	0.067(4)	0.058(4)	0.062(4)	-0.008(3)	-0.014(3)	-0.001(3)
C12	0.5458(9)	0.5686(3)	-0.0466(3)	0.064(4)	0.079(4)	0.099(5)	-0.030(4)	-0.011(4)	0.017(4)
C13	0.4796(10)	0.6256(4)	-0.1024(3)	0.081(5)	0.086(5)	0.066(4)	-0.010(4)	0.011(4)	-0.009(4)
C14	0.2826(10)	0.6751(3)	-0.0952(3)	0.092(5)	0.067(4)	0.056(3)	0.009(3)	-0.013(4)	-0.013(4)
C15	0.1474(8)	0.6690(3)	-0.0323(3)	0.056(4)	0.066(4)	0.056(3)	0.004(3)	0.002(3)	-0.003(3)
C16	0.435(3)	0.4959(10)	0.0832(7)	0.065(6)	0.060(6)	0.052(7)	-0.011(5)	-0.004(5)	0.005(6)
C17	0.633(2)	0.4554(7)	0.0991(6)	0.078(6)	0.065(5)	0.060(5)	-0.006(3)	-0.009(5)	0.012(5)
C18	0.674(3)	0.3944(16)	0.1628(11)	0.093(6)	0.075(5)	0.067(5)	-0.001(4)	-0.013(6)	0.014(6)
C19	0.468(3)	0.3627(16)	0.2081(9)	0.114(6)	0.074(7)	0.057(10)	-0.009(7)	-0.012(7)	-0.006(7)
O3	0.872(2)	0.3685(10)	0.1731(7)	0.102(6)	0.126(6)	0.105(8)	0.042(6)	-0.020(6)	0.024(6)
C16A	0.545(3)	0.4971(12)	0.0640(9)	0.077(7)	0.066(6)	0.048(6)	-0.012(4)	-0.006(6)	0.003(7)
C17A	0.449(3)	0.4577(8)	0.1182(7)	0.078(6)	0.068(6)	0.054(6)	-0.005(4)	-0.005(5)	0.006(6)
C18A	0.596(3)	0.3955(17)	0.1628(12)	0.091(6)	0.075(5)	0.064(5)	-0.003(4)	-0.014(5)	0.010(6)
C19A	0.481(4)	0.3615(19)	0.2329(11)	0.118(8)	0.086(8)	0.056(10)	0.006(8)	-0.024(7)	0.008(7)
O3A	0.794(2)	0.3776(13)	0.1469(9)	0.095(8)	0.130(8)	0.091(8)	0.021(7)	-0.020(6)	0.027(7)

Crystal Structure, Synthesis and Biological Activity of Ether and Ester *Trans*-Ferulic Acid Derivatives

Marco A. Obregón-Mendoza¹, M. Mirian Estévez-Carmona², Yair Alvarez-Ricardo¹, William Meza-Morales¹, Carolina Escobedo-Martínez³, Manuel Soriano-García¹, Raúl G. Enríquez^{1*}

¹Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

²Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México City, México

³Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México

Email: *enriquezhabib@gmail.com

How to cite this paper: Obregón-Mendoza, M.A., Estévez-Carmona, M.M., Alvarez-Ricardo, Y., Meza-Morales, W., Escobedo-Martínez, C., Soriano-García, M. and Enríquez, R.G. (2018) Crystal Structure, Synthesis and Biological Activity of Ether and Ester *Trans*-Ferulic Acid Derivatives. *International Journal of Organic Chemistry*, 8, 359-377.

<https://doi.org/10.4236/ijoc.2018.84028>

Received: October 26, 2018

Accepted: December 11, 2018

Published: December 14, 2018

Copyright © 2018 by authors and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

The structures of methoxymethyl (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylate, **2**; (E)-3-(3-methoxy-4-(methoxymethoxy)phenyl)acrylic acid, **3**; methyl (E)-3-(4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl)acrylate, **4**; benzyl (E)-3-(4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl)acrylate, **6**; and (E)-3-(4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl)acrylic acid, **7**; were established by spectroscopic and X-ray diffraction studies. Structure **2** is a new compound. Compounds with free phenolic hydroxyls *v.gr.* methyl (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylate **1**, **2** and benzyl(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylate **5**, showed scavenging free-radical and antioxidant activity while moderate scavenging free-radical was observed in compound **3**. Moderate inhibition of lipid peroxidation was observed for **7**. Compound **5** exerted significant inhibition of cell growth in PC-3, K562 tumor cell lines and **4** exhibited the largest cytotoxic effect upon the K562 cell line.

Keywords

Trans-Ferulic Acid, Crystal Structures, Antioxidant Activity, Antitumor, Scavenging Free-Radicals

1. Introduction

Ferulic acid (FA) is a phenolic derivative of cinnamic acid, which exhibits a wide spectrum of biomedical activities [1]. Many staple foods such as grain bran,

whole-grain foods, citrus fruits, banana, coffee, orange juice, eggplant, bamboo shoots, beetroot, cabbage, spinach and broccoli are among the richest sources of FA [2]. This compound is present in seeds and leaves, both in its free form and in its covalent-conjugated form, in plant cell-wall polysaccharides, glycoproteins, polyamides, lignin and hydroxy fatty acids. FA confers rigidity to the cell-wall and it is a precursor to other important organic compounds such as diferulic acid and curcumin [3]. Several reports have described the biological effects of FA, for example, as an antioxidant [4], anti-inflammatory and anticarcinogenic [5].

The well-known antioxidant activity of FA has been related to its phenolic nucleus and extensive chain conjugation that forms a resonance-stabilized phenoxy radical ion [4]. Since the hydroxyl and phenoxy groups of FA donate electrons to quench free radicals [6], FA can be used as a renewable, aromatic scaffold for conversion into novel, and useful products in the food, pharmaceutical and cosmetic industries. The ability of FA to inhibit peroxidation of fatty acids finds uses such as preservative for oranges or to inhibit the autoxidation of linseed oil. It is also employed in the industry of cosmetic skin lotions [4]. FA is used during oxidative-reductive depolymerization (ORD) of polysaccharides to protect both guar gum and cassava starch from thermal degradation [7].

The synthesis of new derivatives of FA in general has been aimed to improve its chemical, physicochemical and biological properties, in particular in its esterified form at the acidic moiety, which increases both radical scavenging activity and partition coefficient [8]. However, it is known that the blockade of the phenolic groups of FA can limit its antioxidant potential.

In the present report, the synthesis, spectroscopic characterization, X-ray analysis and biological activity of ether and ester derivatives of FA is described and it is depicted in **Scheme 1**. We also highlight the importance of the free hydroxyl and phenolic group in relation to the antioxidant and cytotoxic activity of FA and how the protection of these functional groups reduces their biological activity.

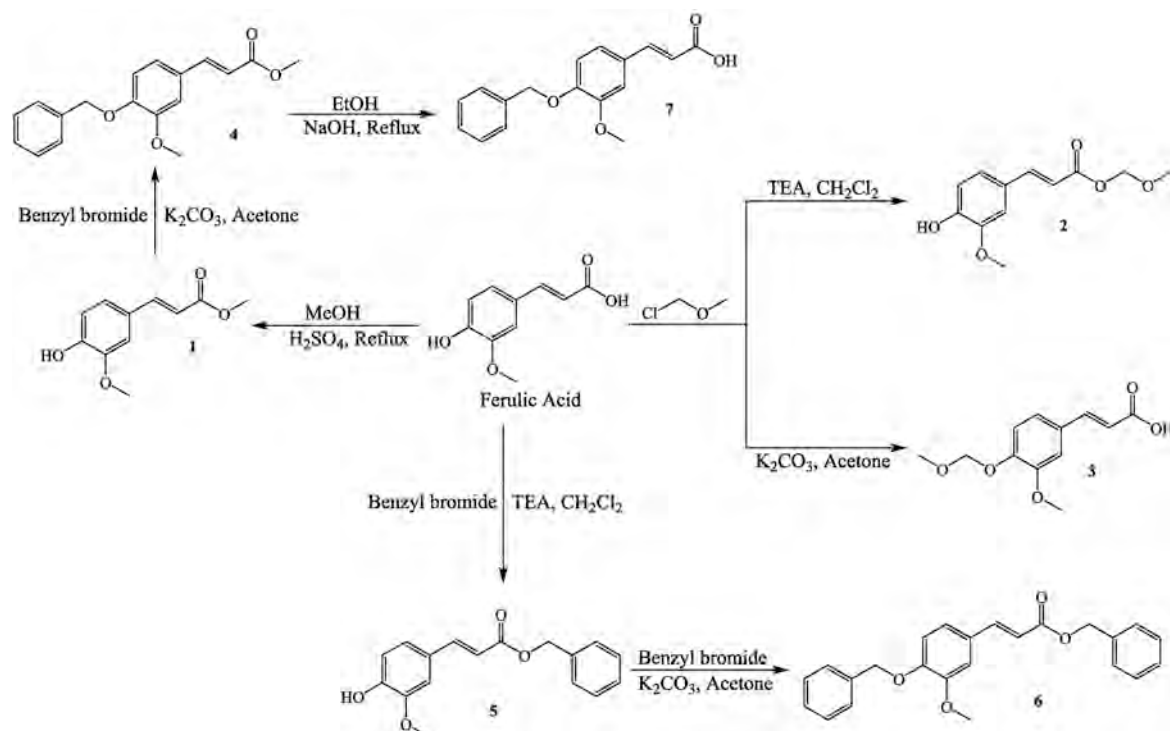
Compounds **1**, **3**, **4**, **5**, **6** and **7** have been previously reported while **2** is a new compound [9] [10] [11] [12] [13].

2. Experimental

2.1. Physical Measurements

All chemicals were reagent grade and were used as purchased. Solvents were purified by standard methods [14].

Melting points were determined on an Electrothermal IA9100 digital melting point apparatus and are uncorrected. IR absorption spectra were recorded in the 4000 - 400 cm^{-1} range as KBr pellets on a Perkin Elmer 283-B spectrophotometer. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded in CDCl_3 on a Bruker 500 MHz spectrometer using TMS as an internal reference. NMR spectra were processed with MestReNOVA 12.0.0 software.



Scheme 1. Synthetic pathway for FA derivatives.

The mass spectrometry spectra were recorded in equipment MStation JMS-700 or Jeol, SX 102A using electron ionization impact or fast atom bombardment (FAB) mode.

X-ray data were collected on a Bruker APEX2 CCD area detector with a graphite monochromator and Mo $K\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) at room temperature with ω scan mode. All collected data were reduced using SAINTV8.27B [15]. These data are shown in **Table 1**.

2.2. Synthesis of Compounds

Methyl (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylate (**1**). 5 meq of FA were dissolved in 20 mL of anhydrous methanol and 0.2 mL of H_2SO_4 were added and the mixture was refluxed for 6 hours. The reaction was quenched by the addition of NaHCO_3 until it reached pH 6 and the mixture was extracted with ethyl acetate ($3 \times 20 \text{ mL}$). The combined extracts were dried over anhydrous Na_2SO_4 , then filtered and the solvent removed *in vacuo*, 82% yield, yellowish liquid. ^1H NMR (500 MHz, chloroform- d); δ 7.62 (d, $J = 15.9 \text{ Hz}$, 1H), 7.07 (ddd, $J = 8.2, 2.0, 0.5 \text{ Hz}$, 1H), 7.02 (d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, 1H), 6.92 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 1H), 6.29 (d, $J = 15.9 \text{ Hz}$, 1H), 5.96 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.80 (s, 3H) spectrum is shown in **Figure 1**. ^{13}C NMR (125 MHz, chloroform- d) δ 167.70, 147.98, 146.76, 144.93, 126.92, 122.99, 115.12, 114.72, 109.38, 55.90, 51.56, IR; 3379.82, 2942.22, 1705.06, 1510.97, 1429.46, 1236.41 cm^{-1} , MS [208 $^+$].

Methoxymethyl (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylate (**2**). To a solution of 1.0 meq of FA (0.1940 g) in 30 mL of CH_2Cl_2 , 1.1 meq of triethylamine

and 1.1 meq of chloromethyl methyl ether (Cl-MOM) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature until the disappearance of the starting material was observed by TLC (Hexane:EtOAc: 70:30). The reaction was quenched by evaporation of the solvents of reaction and the mixture was extracted with EtOAc (3 × 20 mL), yield 68%, mp 80 °C. ¹H NMR (500 MHz, chloroform-d); δ 7.68 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.08 (m, 1H), 7.04 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.31 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.00 (s, 1H), 5.37 (s, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.52 (s, 3H) spectrum is shown in **Figure 2**. ¹³C NMR (125 MHz, chloroform-d) δ 166.59, 148.18, 146.80, 145.78, 126.76, 123.19, 114.86, 114.76, 109.44, 90.35, 57.55, 55.90. IR; 3266.48, 2944.22, 1716.75, 1627.83, 1508.79 cm⁻¹. MS [238⁺].

(E)-3-(3-methoxy-4-(methoxymethoxy)phenyl)acrylic acid (**3**). To a solution of the 1.0 meq of FA (0.1940 g) in 10 ml of acetone 1.0 meq of K₂CO₃ anhydrous and 1.1 meq of chloromethyl methyl ether (Cl-MOM) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature until the disappearance of the starting material was observed by TLC (Hexane:EtOAc: 70:30). The reaction was quenched by filtration of the potassium salts and the solvent was removed in vacuum, yield 92%, mp 134.8 °C. ¹H NMR (500 MHz, chloroform-d); δ 7.74 (d, *J* = 15.99 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 8.28 Hz, 1H), 7.10 (m, 2H), 6.34 (d, *J* = 15.99 Hz, 1H), 5.28 (s, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.52 (s, 3H) spectrum is shown in **Figure 3**. ¹³C NMR (125 MHz, chloroform-d) δ 172.56, 149.89, 148.97, 146.86, 128.43, 122.74, 115.82, 115.54, 110.57, 95.19, 56.37, 55.97, IR; 3438.01, 1688.78, 1622.87, 1506.04 cm⁻¹, MS [239⁺].

Table 1. Data collection and handling for compounds **2**, **3**, **4**, **6**, and **7**.

Compound	2	3	4	6	7
Empirical formula	C ₁₂ H ₁₄ O ₅	C ₁₂ H ₁₄ O ₅	C ₁₈ H ₁₈ O ₄	C ₂₄ H ₂₂ O ₄	C ₁₇ H ₁₆ O ₄
Formula weight	238.23	238.23	298.32	374.41	284.30
Crystal external appearance	Colorless prism	Colorless prism	Colorless prism	Colorless prism	Colorless prism
Diffractometer	Bruker APEX2 CCD	Bruker APEX2 CCD	Bruker APEX2 CCD	Bruker APEX2 CCD	Bruker APEX2 CCD
Scanmode	Omega scans	Omega scans	Omega scans	Omega scans	Omega scans
Theta range for data collection	2.89 to 25.40 deg	2.73 to 25.37 deg	2.37 to 25.29 deg	2.30 to 25.41 deg	2.48 to 25.32 deg
Wavelength	Mo Kα (0.71073 Å)	Mo Kα (0.71073 Å)	Mo Kα (0.71073 Å)	Mo Kα (0.71073 Å)	Mo Kα (0.71073 Å)
Program system	SHELXTL	SHELXTL	SHELXTL	SHELXTL	SHELXTL
Structure determination	Direct methods (SHELXS-2014/7)	Direct methods (SHELXS-2014/7)	Direct methods (SHELXS-2014/7)	Direct methods (SHELXS-2014/7)	Direct methods (SHELXS-2014/7)
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ² (SHELXL-2014/7)	Full-matrix least-squares on F ² (SHELXL-2014/7)	Full-matrix least-squares on F ² (SHELXL-2014/7)	Full-matrix least-squares on F ² (SHELXL-2014/7)	Full-matrix least-squares on F ² (SHELXL-2014/7)

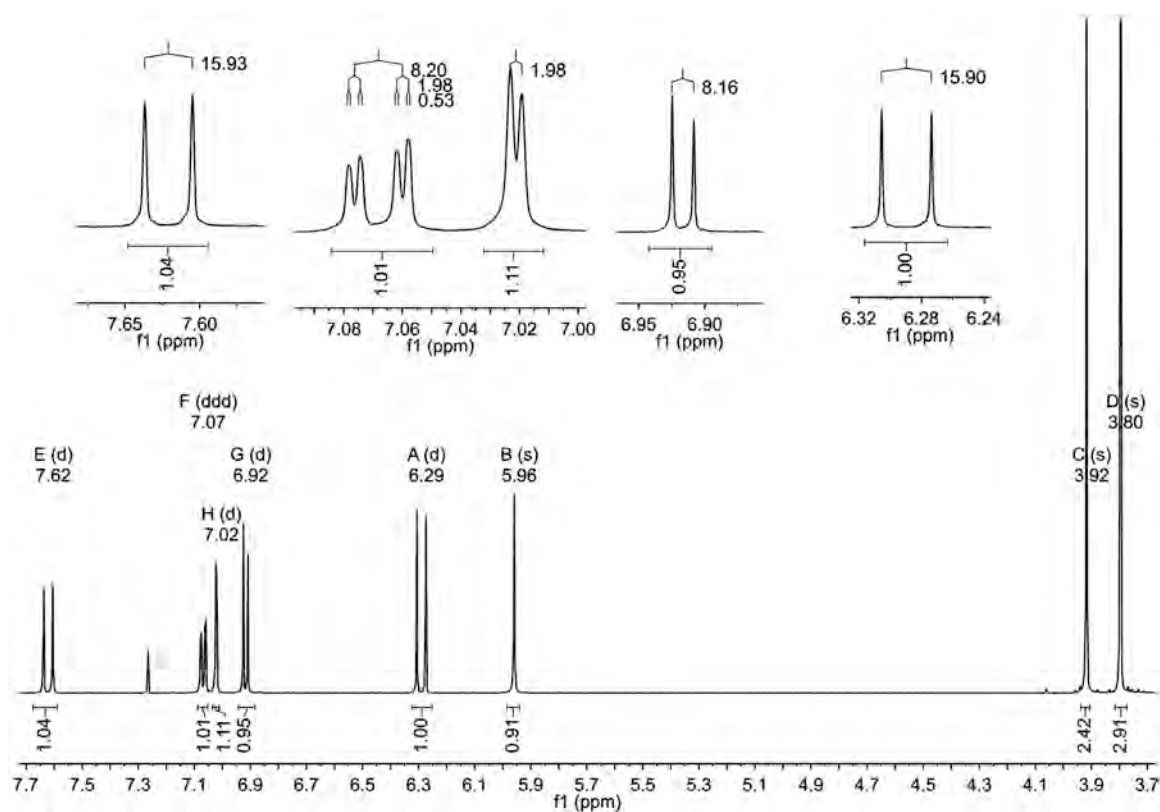


Figure 1. ¹H NMR spectrum of compound 1.

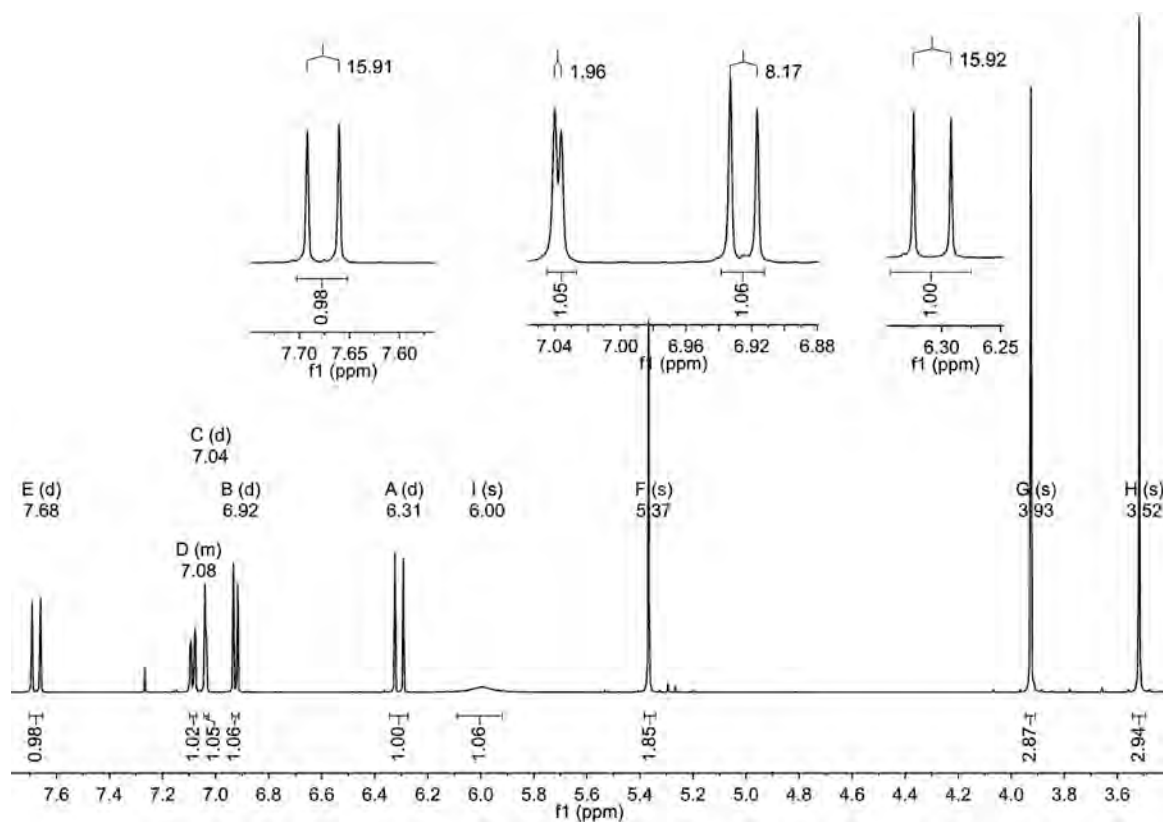


Figure 2. ¹H NMR spectrum of compound 2.

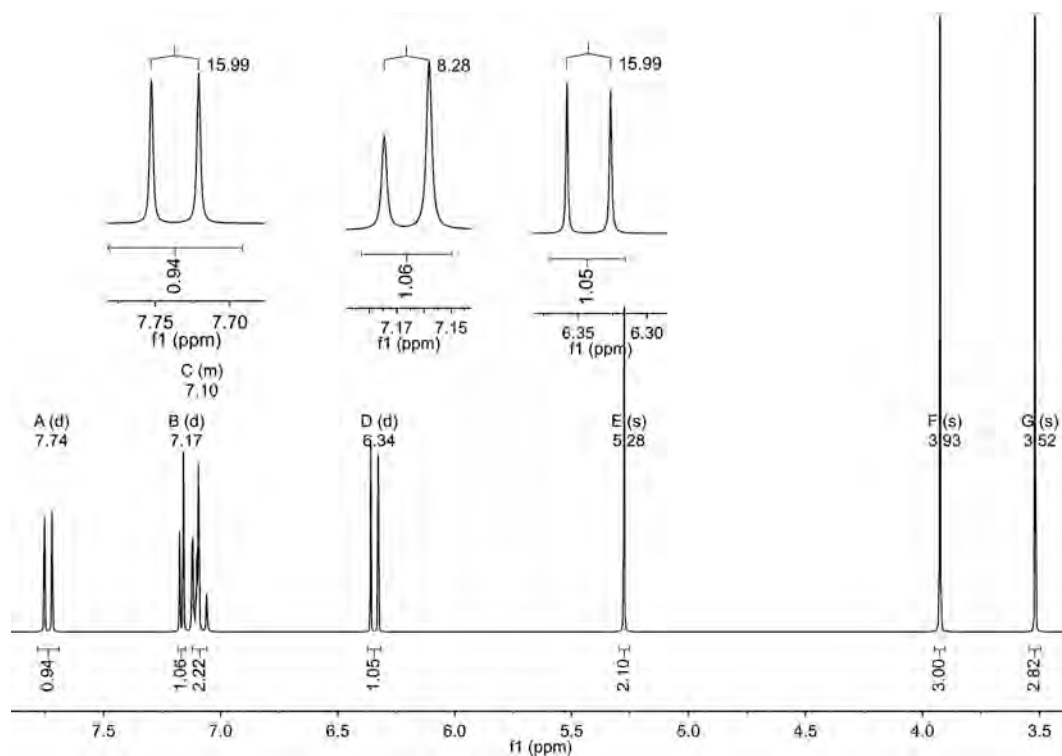


Figure 3. ^1H NMR spectrum of compound **3**.

Methyl (E)-3-(4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl)acrylate (**4**). 1 meq of compound **1** was dissolved in 30 mL of anhydrous acetone and 1 meq of K_2CO_3 and 1.1 meq of benzyl bromide were stirred at room temperature. The reaction was followed by TLC (Hexane:EtOAc: 70:30). The solvent was removed *in vacuo*, yield 78%, mp 97.1°C. ^1H NMR (500 MHz, chloroform- d); δ 7.61 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.42 (ddt, $J = 7.6, 1.4, 0.7$ Hz, 2H), 7.36 (tt, $J = 6.6, 0.8$ Hz, 2H), 7.30 (m, 1H), 7.06 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.02 (ddd, $J = 8.2, 2.1, 0.5$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.30 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 5.18 (s, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.79 (s, 3H) spectrum is shown in **Figure 4**. ^{13}C NMR (125 MHz, chloroform- d) δ 167.58, 150.24, 149.74, 145.12, 144.69, 143.62, 136.55, 128.58, 127.96, 127.71, 127.16, 122.30, 115.59, 113.44, 110.27, 70.82, 55.95, 51.54, IR; 2942.82, 1700.03, 1627.76, 1592.64, 1508.58, 1255.42 cm^{-1} , MS [300 $^+$].

Benzyl (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylate (**5**). To a solution of 1.0 meq of FA (0.1940 g) in 30 ml of CH_2Cl_2 1.1 meq of triethylamine 1.1 meq of benzyl bromide were added. The reaction mixture was stirred at room temperature and followed by TLC (Hexane:EtOAc: 70:30). After removal of solvent reaction was partitioned with EtOAc (3 \times 20 mL) and H_2O , the combined extracts were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and the solvent was removed in vacuum, yield 73%, mp 57.3°C. ^1H NMR (500 MHz, chloroform- d) δ 7.65 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.38 (m, 5H), 7.06(ddd, $J = 8.1, 2.0, 0.5$ Hz, 1H), 7.02 (d, $J = 2$ Hz, 1H) 6.91 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.34 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 5.90 (s, 1H), 5.24 (s, 2H), 3.90 (s, 3H) spectrum is shown in **Figure 5**. ^{13}C NMR (125 MHz, chloroform- d) δ 167.05, 148.03, 146.75, 145.23, 136.17, 128.56, 128.24, 128.19, 126.93, 123.13,

115.22, 114.71, 109.33, 66.22, 55.91, IR; 3404.3, 2941.23, 1703.49, 1632.44, 1593.13, 1514.53 cm^{-1} , MS [286⁺].

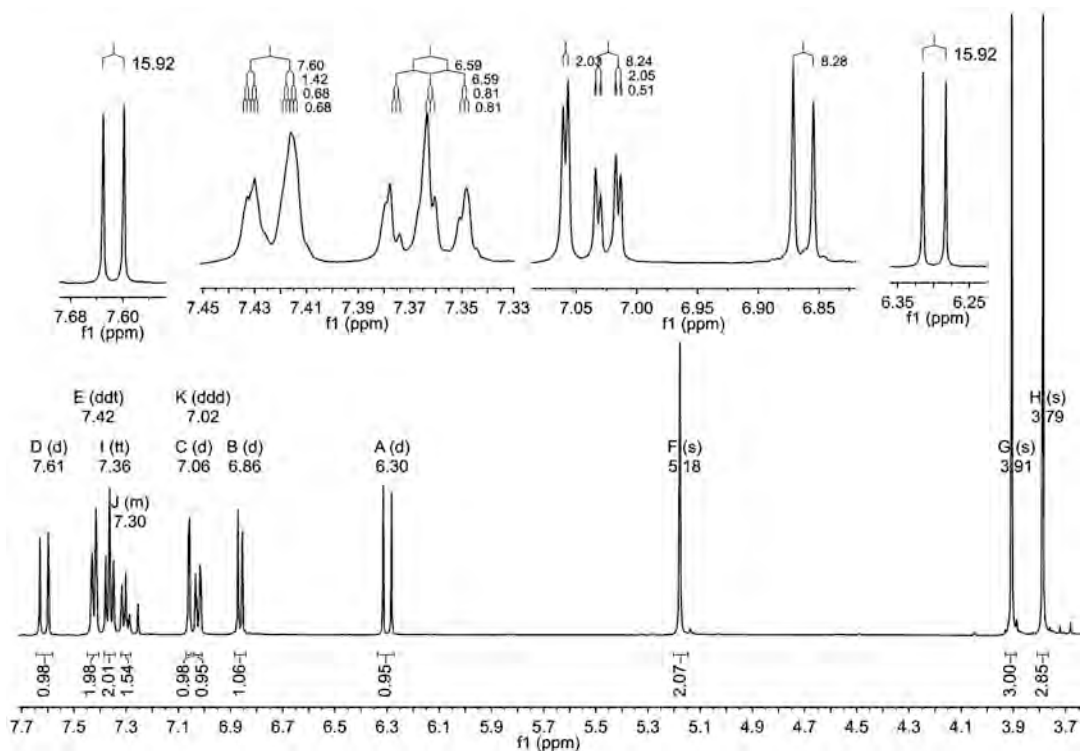


Figure 4. ¹H NMR spectrum of compound 4.

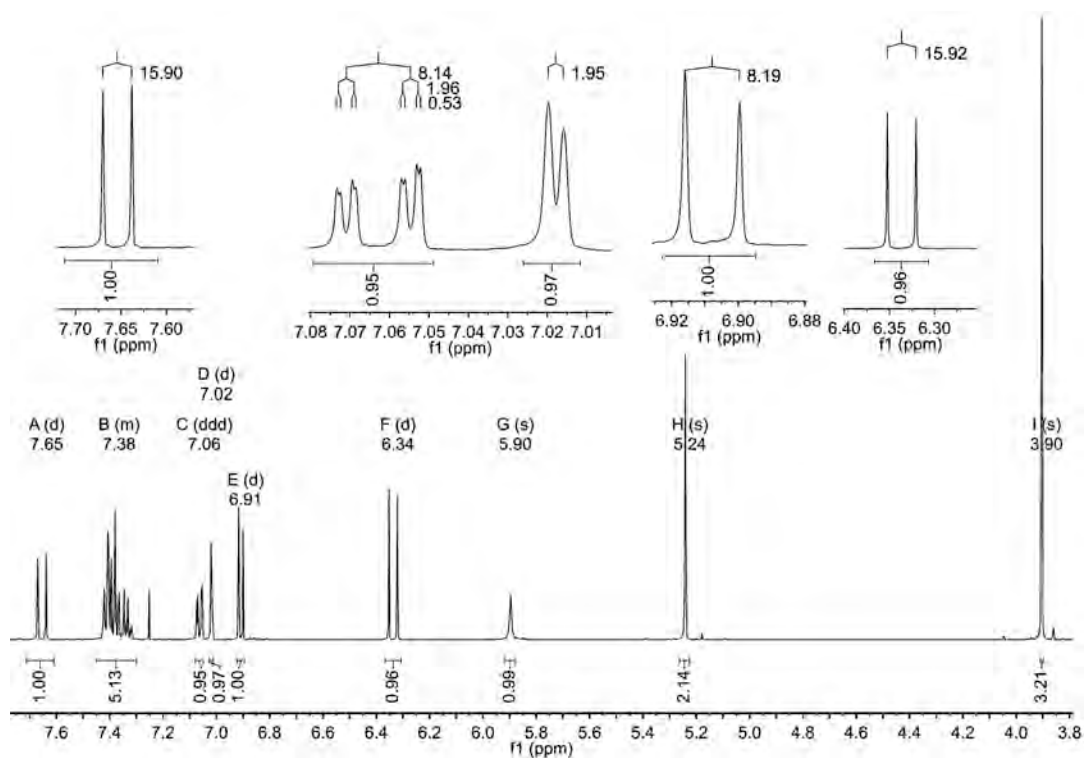


Figure 5. ¹H NMR spectrum of compound 5.

Benzyl (E)-3-(4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl)acrylate (**6**). 1 meq of compound **5** was solved in 30 mL of acetone anhydrous and was added 1 meq of K_2CO_3 and finally was added 1.1 meq of benzyl bromide. The reaction mixture was stirred at room temperature until the disappearance of the starting material was observed by TLC (Hexane:EtOAc: 70:30). The reaction was quenched by filtration of potassium salts and the solvent was removed in vacuum, yield 84%, mp 86.3°C. 1H NMR (500 MHz, chloroform-d); δ 7.65 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.45 - 7.27 (m, 10H), 7.06 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.02 (ddd, $J = 8.3, 2.1, 0.5$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.35 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 5.24 (s, 2H), 5.18 (s, 2H), 3.90 (s, 3H) spectrum is shown in **Figure 6**. ^{13}C NMR (125 MHz, chloroform-d) δ 166.97, 150.32, 149.76, 145.62, 145.03, 136.56, 136.16, 128.61, 128.57, 128.24, 128.19, 128.00, 127.70, 127.18, 122.44, 115.67, 113.43, 110.22, 70.85, 66.23, 55.96, IR; 2937.39, 1697.95, 1628.78, 1505.19, 1255.53, 1157.91, 1135.79 cm^{-1} , MS [molecular ion not observed].

(E)-3-(4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl)acrylic acid (**7**). To 1 meq of compound **4** was solved in 20 mL of ethanol and 10 mL of one solution 1M of NaOH were added the mixture refluxed for 40 minutes. The reaction was terminated by addition of HCl 1N until pH 6 and the mixture partitioned with ethyl acetate (3 \times 20 mL) and H_2O . The combined extracts were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and the solvent was removed in vacuum; yield 74%. mp 192.9°C. 1H NMR (500 MHz, chloroform-d); δ 7.58 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.43 (m, 2H), 7.37 (m, 2H), 7.31 (m, 1H), 7.08 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.03 (m, 1H), 6.89 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.29 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 5.17 (s, 2H), 3.91 (s, 3H) spectrum is shown in **Figure 7**. ^{13}C NMR (125 MHz, chloroform-d) δ 168.86, 150.03, 149.70, 144.38, 136.58, 128.56, 127.96, 127.92, 127.24, 122.23, 116.74, 113.50, 110.30, 70.78, 55.95, IR; 2968.68, 1669.68, 1592.66, 1423.76, 1265.73 cm^{-1} , MS [285 $^+$].

2.3. Scavenging Activity of DPPH Free Radicals

The free radical scavenging activity was measured using a modified method from Mellors and Tappel [16]. The test was carried out on 96-well microplates. A 50 μ L aliquot of the solution of the test compound was mixed with 150 μ L of an ethanol solution of DPPH (final concentration 100 μ M). This mixture was incubated at 37°C for 30 min, and the absorbance was then measured at 515 nm using a BioTek microplate reader SYNERGY HT. The inhibition percent for each compound was determined by comparison with a 100 μ M DPPH ethanol blank solution.

2.4. Inhibition of Lipid Peroxidation on Rat Brain

Inhibition of lipid peroxidation of FA derivatives was assayed following previous described method [17] [18].

2.5. Cytotoxicity Assay

All synthesized compounds were screened *in vitro* at doses of 50 μ g/mL against

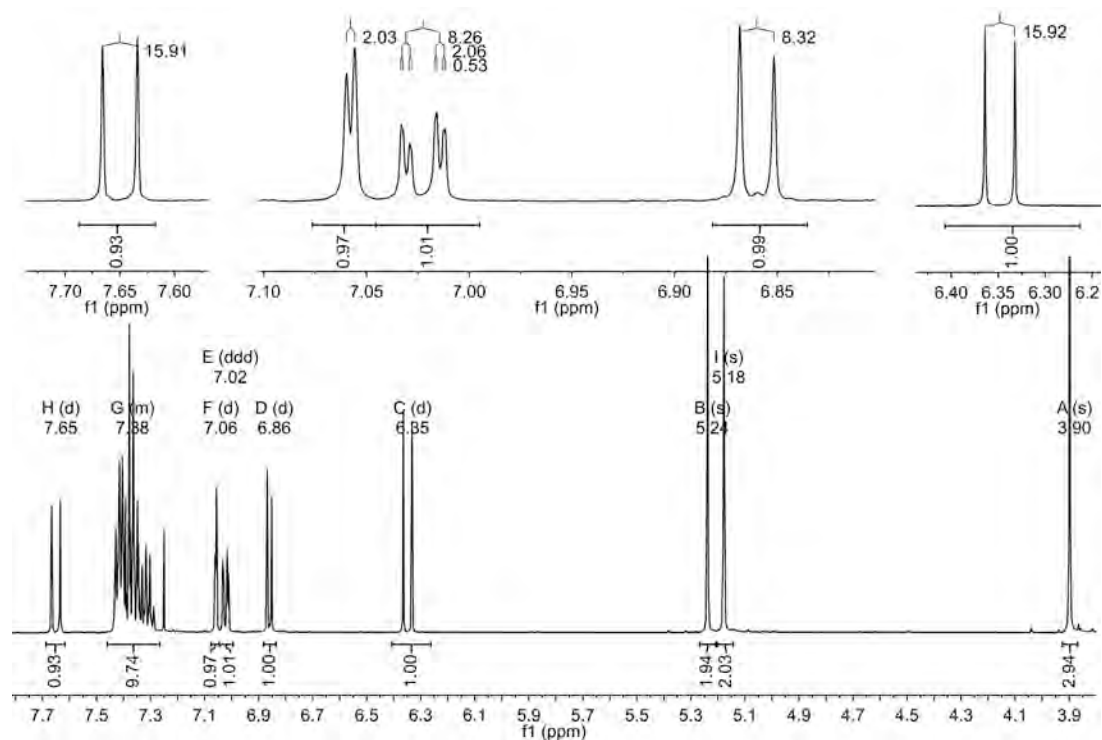


Figure 6. ^1H NMR spectrum of compound 6.

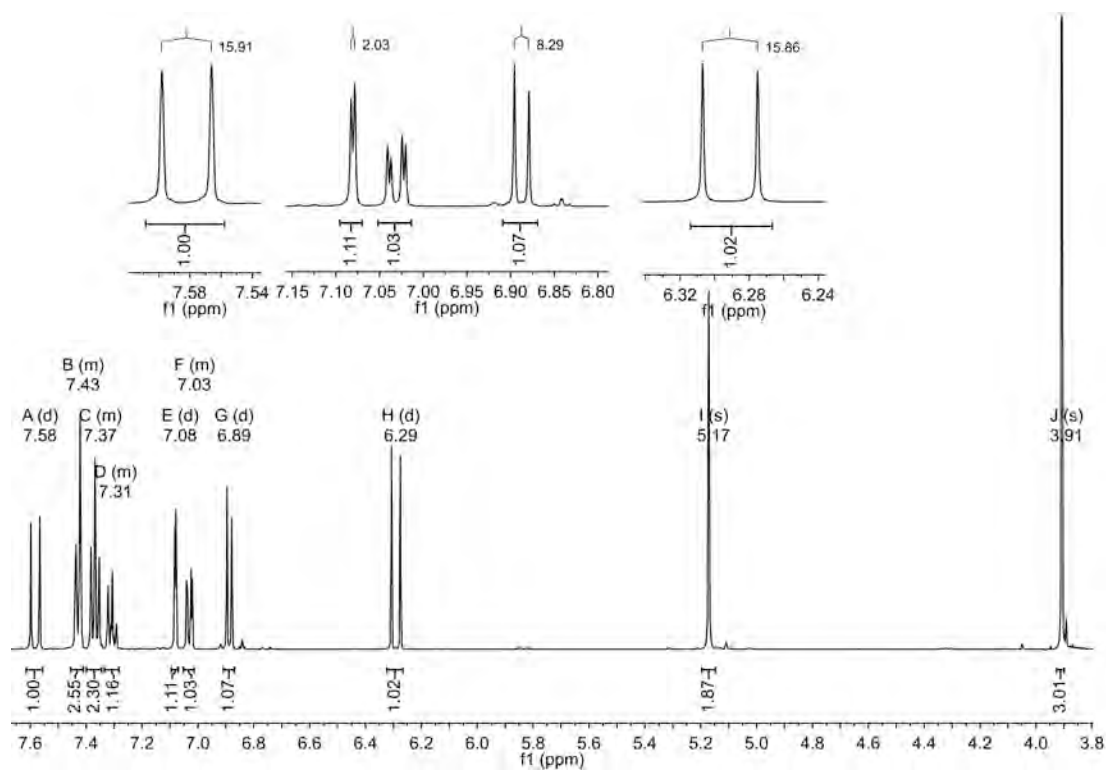


Figure 7. ^1H NMR spectrum of compound 7.

monkey kidney cells and cancer cell lines: U251 (central nervous system glioma cancer), PC-3 (prostate adenocarcinoma), K562 (human chronic myelogenous

leukemia), HCT-15 (colon adenocarcinoma), MCF-7 (human mammary adenocarcinoma) and SKLU-1 (human lung adenocarcinoma). Cell lines were supplied by U.S. National Cancer Institute (NCI). The human tumor cytotoxicity was determined using the protein-binding dye sulforhodamine B (SRB) in microculture assay to measure cell growth, as described in the protocols established by the NCI [19].

3. Results and Discussion

3.1. Refinement Details

All reflections were defined based on F^2 . The weighted R-factor wR and goodness of fit S are based on F^2 , conventional R-factors R are based on F , with F set to zero for negative F^2 . The threshold expression of $F^2 > \sigma(F^2)$ is used only for calculating R-factors (gt) etc., and is not relevant to the choice of reflections for refinement. R-factors based on F^2 are statistically about twice as large as those based on F , and R-factors based on all data will be even larger.

There is an intramolecular hydrogen bond and one intermolecular hydrogen bond between the hydroxyl group at C7 and O5 with a symmetry-related molecule forming sheets along the a -axis. In structure **3**, the bond lengths and angles are similar to those found in 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid (ferulic acid). Molecular packing of molecules in the crystal shows an intermolecular O-H...O hydrogen-bonded carboxylic acid dimers that together with several C-H...O interactions form a sheet-like structure. In structure **4** is a new benzoyloxy and acrylate derivative of FA. The molecules in the crystal are linked by one C-H...O intermolecular interaction involving H atom of the phenyl ring C4-C9 and carbonyl oxygen of the acrylate group. This interaction links crystal and packed molecules at normal van der Waals distances. In structure **6**, there are two independent molecules in the crystal. Structure **6** contains three substituents mainly at C4 a methoxyphenylacrylate moiety; at C6 a methoxy group and C7 a benzoyloxy moiety. The dihedral angle between phenyl rings C4-C9 and C28-C33 is only $4.76(12)^\circ$. There are seven C-H...O interactions that link two independent molecules in the crystal and packed structures at normal van der Waals distances. Structure **7** contains three substituents mainly at C4 an acrylic acid group; at C6 a methoxy group and C7 a benzoyloxy moiety. There is one intermolecular hydrogen bond O-H...O with a symmetry related molecule $(+2 - x, +2 - y, +2 - z)$ forming sheets along the b -axis and two C-H...O interactions linked the molecules in the crystal and packed at normal van der Waals distances.

3.2. Geometric Details

All estimation of standard deviation (esd's) (except the esd in the dihedral angle between two least square planes) are estimated using the full covariance matrix. The cell esds are taken into account individually in the estimation of esds in distances, angles and torsion angles; correlations between esds in cell parameters

are only used when they are defined by crystal symmetry. An approximate (isotropic) treatment of cell esds was used for estimating esds involving least square planes.

3.3. Structural X-Ray Data

All structures were solved by direct methods [20], and then refined by full-matrix least-squares technique; the position and anisotropic parameters of all non-hydrogen atoms were obtained. **Table 1** shows the data collection and handling for compounds **2**, **3**, **4**, **6**, and **7**. **Table 2** shows the crystal and refinement parameters for compounds **2**, **3**, **4**, **6** and **7**. **Figure 8** contains the molecular structures of **2**, **3**, **4**, **6** and **7**. This figure was drawn with 50% displacement ellipsoids using ORTEP-3 for Windows [21]. The geometry of the molecule was calculated using PARST [22] [23] software. In all structures, the bond distances and bond angles are in good agreement with the corresponding values and are within normal ranges.

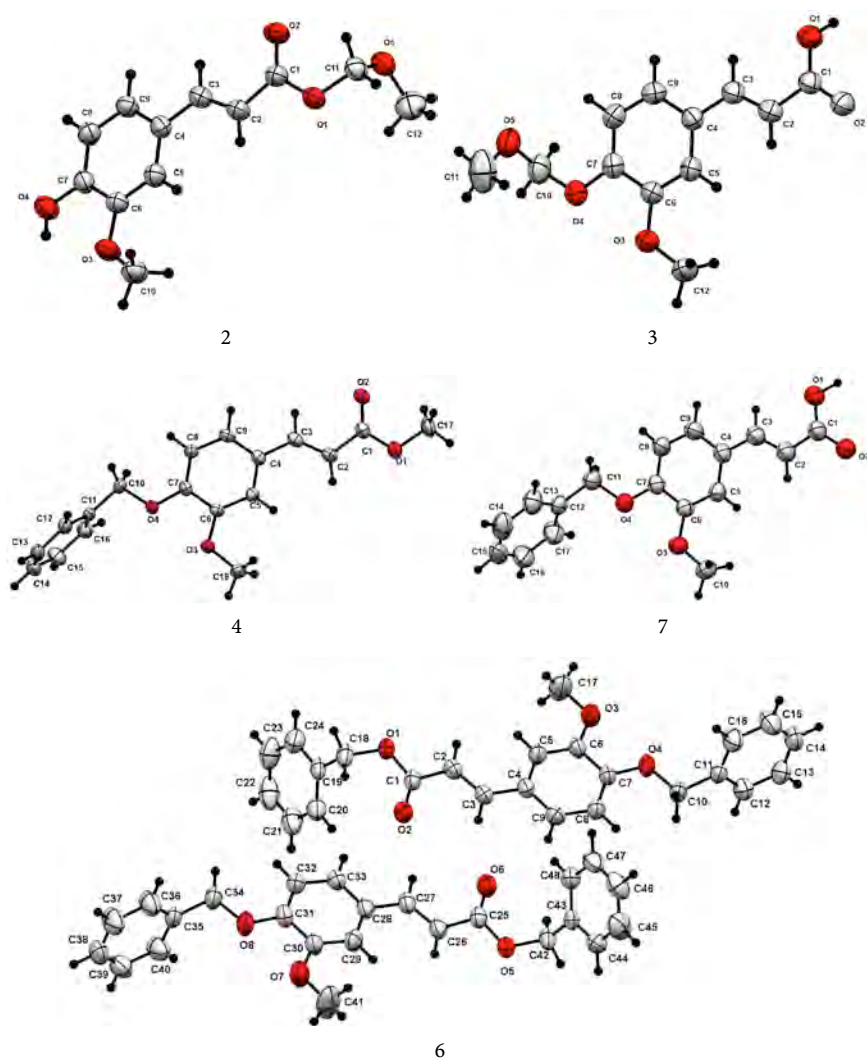


Figure 8. The molecular structures of **2**, **3**, **4**, **6** and **7**.

Table 2. Crystal and refinement parameters for compounds **2**, **3**, **4**, **6** and **7**.

Compound	2	3	4	6	7
Crystal system	Monoclinic	Triclinic	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic
Unitcell dimensions	$a = 12.2068$ (11) Å	$a = 6.8359$ (6) Å	$a = 9.5021$ (3) Å	$a = 5.6645$ (3) Å	$a = 5.3864$ (2) Å
	$\alpha = 90.00$ deg	$\alpha = 93.459$ (3) deg	$\alpha = 90.00$ deg	$\alpha = 90.00$ deg	$\alpha = 90.00$ deg
	$b = 9.0967$ (8) Å	$b = 7.8261$ (6) Å	$b = 20.2456$ (6) Å	$b = 34.863$ (2) Å	$b = 8.5106$ (3) Å
	$\beta = 113.431$ (5) deg	$\beta = 101.485$ (3) deg	$\beta = 93.783$ (2) deg	$\beta = 96.742$ (2) deg	$\beta = 94.1040$ (10) deg
	$c = 11.9634$ (10) Å	$c = 11.9252$ (10) Å	$c = 8.1203$ (2) Å	$c = 20.7049$ (14) Å	$c = 31.6002$ (10) Å
	$\gamma = 90.00$ deg	$\gamma = 106.323$ deg	$\gamma = 90.00$ deg	$\gamma = 90.00$ deg	$\gamma = 90.00$ deg
Volume	1218.89 (19) Å ³	595.40 (9) Å ³	1558.75 (8) Å ³	595.40 (9) Å ³	1444.89 (9) Å ³
Z/Calculated density	4/1.298 mg/m ³	2/1.329 mg/m ³	4/1.271 mg/m ³	8/1.225 mg/m ³	4/1.307 mg/m ³
Absorption Coefficient	0.101 mm ⁻¹	0.104 mm ⁻¹	0.089 mm ⁻¹	0.083 mm ⁻¹	0.093 mm ⁻¹
Space group/F (000)	$P2_1/c/504$	$P-1/252$	$P2_1/c/632$	$Cc/1584$	$P2_1/c/600$
Limiting indices	$-14 \leq h \leq 14$	$-8 \leq h \leq 8$	$-9 \leq h \leq 11$	$-6 \leq h \leq 6$	$-6 \leq h \leq 6$
	$-10 \leq k \leq 10$	$-9 \leq k \leq 9$	$-24 \leq k \leq 20$	$-42 \leq k \leq 41$	$-10 \leq k \leq 10$
	$-14 \leq l \leq 14$	$-14 \leq l \leq 14$	$-9 \leq l \leq 9$	$-24 \leq l \leq 24$	$-37 \leq l \leq 37$
Reflection collected unique/R (int)	9089/2224/0.0367	9223/2181/0.0622	8788/2835/0.0528	32,474/6927/0.1218	16172 /2654/0.0702
Completeness to $\theta = 25.10$	99.9%	99.9%	99.9%	99.8%	99.9%
Max/min Transmission	0.961/0.990	0.958/0.984	0.965/0.994	0.976/0.995	0.970/0.983
Data/restraints/parameters	2224/0/160	2181/1/159	2835/0/201	6927/2/507	2654/1/194
Final R indices	R1 = 0.0403	R1 = 0.0441	R1 = 0.0414	R1 = 0.0484	R1 = 0.0458
$I > 2\sigma(I)$	wR2 = 0.1182	wR2 = 0.1228	wR2 = 0.0880	wR2 = 0.1137	wR2 = 0.1111
R indices (all data)	R1 = 0.0553	R1 = 0.0517	R1 = 0.0717	R1 = 0.0773	R1 = 0.0790
	wR2 = 0.1260	wR2 = 0.1297	wR2 = 0.1045	wR2 = 0.1286	wR2 = 0.128
Goodness-of-fit on F ²	1.059	1.070	0.998	1.030	1.019
Largest diff. peak/hole	0.211/−0.185 e.Å ⁻³	0.178/−0.162 e.Å ⁻³	0.208/−0.241 e.Å ⁻³	0.150/−0.138 e.Å ⁻³	0.189/−0.178 e.Å ⁻³
CCDC deposition number	1,825,526	1,825,528	1,825,527	1,825,529	1,825,523

Compound **2** crystallizes in the monoclinic space group $P2_1/c$ with unit cell parameters $a = 12.2068$ (11), $b = 9.0967$ (8), $c = 11.963421$ (10) Å, $\beta = 113.431$ (5), $Z = 4$. Compound **3** crystallizes in the triclinic space group $P-1$ with unit cell parameters $a = 6.8359$ (6), $b = 7.8261$ (6), $c = 11.9252$ (10) Å, $\alpha = 93.459$ (3), $\beta = 101.485$ (3), $\gamma = 106.323$ (2)°, $Z = 2$. Compound **4** crystallizes in the monoclinic space group $P2_1/c$ with unit cell parameters $a = 9.5021$ (3), $b = 20.2456$ (6), $c = 8.1203$ (2) Å, $\beta = 93.783$ (2), $Z = 4$. Compound **6** crystallizes in the monoclinic space group Cc with unit cell parameters $a = 5.6645$ (3), $b = 34.863$ (2), $c = 20.7049$ (14) Å, $\beta = 96.742$ (2), $Z = 8$. Compound **7** crystallizes in the monoclinic space group $P2_1/c$ with unit cell parameters $a = 5.3864$ (2), $b = 8.5106$ (3), $c = 31.6002$ (10) Å, $\beta = 94.1040$ (10), $Z = 4$.

The molecular structure of **2** is not planar, with a fully extended methoxymethyl group of the acrylate residue as shown in **Figure 8**. The dihedral angle between the side chain at C4 and the phenyl ring is 32.7(2)°. The hydroxyl group at C7 has an intramolecular hydrogen with O3 and one intermolecular hydrogen bond between the hydroxyl group at C7 and O5 with a symmetry related molecule ($-x - 1, +y, +z$) forming sheets along the a -axis. There are no stacking interactions between phenyl rings. The crystal packing diagram is shown in **Figure 9**.

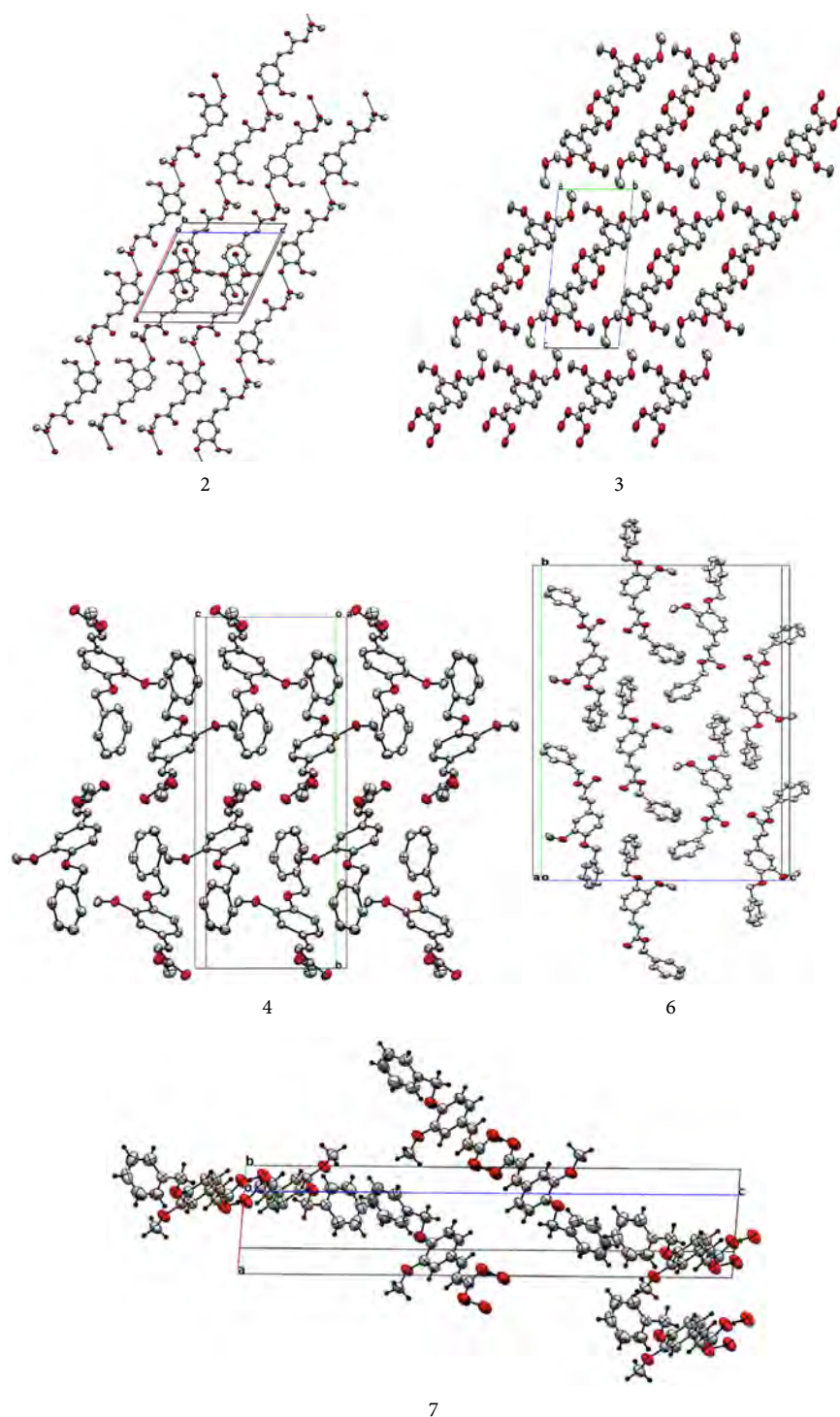


Figure 9. The molecular packing of structures **2**, **3**, **4**, **6** and **7**.

Figure 8 shows the molecular structure of **3**. Bond lengths and angles are similar to those found in 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid (FA) [24]. The dihedral angles between the side chain at C4, the acrylate and the phenyl ring are 48.31 (5) and 9.32 (5)°, respectively. The molecular packing of **3** in the crystal shows an intermolecular O-H...O hydrogen-bonded carboxylic

acid dimers that together with several C-H...O interactions form a sheet-like structure (**Figure 9**).

The molecular structure of **4** corresponds to a new benzoyloxy and acrylate derivative of ferulic acid. There are no significant molecular distortions in terms of bond lengths and angles. The dihedral angles between benzene ring C4 to C9 and the side chains at C4 and C7 are 21.25 (5) and 8.84 (5)°, respectively. However, the benzene ring C4 to C9 makes an angle of 86.00 (5)° with the benzene ring C11 to C16. The molecule **4** in the crystal are linked by one C-H...O intermolecular interaction involving an H atom of the phenyl ring C4-C9 and carbonyl oxygen of the acrylate group. This interaction linked the molecules in the crystal and packed at normal van der Waals distances (**Figure 9**).

Figure 8 shows the molecular structure of compound **6**. There are two independent molecules **4** in the crystal. Molecule **6** contains three substituents mainly at C4 a methoxyphenyl acrylate moiety; at C6 a methoxy group and C7 a benzoyloxy moiety. The dihedral angles between phenyl rings C11-C16 and C19-C24 with the central phenyl ring C4-C9 are 70.50 (12) and 69.61 (14), respectively. The dihedral angles between phenyl rings C35-C40 and C43-C48 with the central phenyl ring C28-C33 are 77.00 (14) and 73.92 (16), respectively. The dihedral angle between the phenyl rings C4-C9 and C28-C33 is only 4.76 (12)°. There are seven C-H...O interactions linked the two independent molecules in the crystal packed at normal van der Waals distances (**Figure 9**).

The molecular structure of **7** is shown in **Figure 8**. The molecule contains three substituents mainly at C4 an acrylic acid group; at C6, a methoxy group and at C7 a benzoyloxy moiety. The dihedral angles between phenyl ring C12-C17; the linker C7-O4-C11-C12 and acrylic acid group at C4 with the central phenyl ring C4-C9 are 74.62 (6), 12.17 (9) and 7.37 (5)°, respectively. There is one intermolecular hydrogen bond O-H...O with a symmetry related molecule (+2 - x, +2 - y, +2 - z) forming sheets along the *b*-axis and two C-H...O interactions linked the molecules in the crystal and packed at normal van der Waals distances (**Figure 9**).

For geometrical details and notations of all of these hydrogen bonds and intermolecular interactions are given in **Table 3**.

3.4. Biological Assay

Interestingly, compounds **1**, **2** and **5**, with free hydroxyl group, showed to have DPPH free radicals scavenging activity *in vitro* in moderate to high level (see **Table 4**). These results are consistent with a previous report, where it is postulated that antioxidant property of FA and its derivatives is associated with the number of free hydroxyl groups on the benzene ring and *ortho* substitution with the electron donor methoxy group, due to stabilization of the phenoxy radical [25]. FA derivatives, especially those with etherified phenolic groups, did not show effect upon the free radical essay.

Table 3. Geometry of the hydrogen bonds and hydrogen bonding interactions (Å, °) for compounds 2,3,4, 6 and 7.

Compound	D-H...A	D-H	H...A	D...A	D-H...A	Symmetrycode
2	O4-H4...O3	0.82 (2)	2.25 (3)	2.661 (2)	111 (2)	<i>x, y, z</i>
	O4-H4...O5	0.82 (2)	1.97 (2)	2.731 (2)	156 (2)	<i>x, y, z</i>
	C8-H8...O2	0.930 (2)	2.920 (1)	3.431 (2)	116.1 (1)	$2 - x, -y, 2 - z$
3	C8-H8...O5	0.930 (1)	2.553 (1)	3.081 (2)	116.4 (1)	<i>x, y, z</i>
	O1-H1...O2	0.86 (2)	1.77 (2)	2.635 (2)	179 (2)	$+3 - x, +1 - y, +1 - z$
	C8-H8...O2	0.930 (1)	2.612 (1)	3.294 (2)	130.7 (1)	$-1 + x, -1 + y, z$
	C9-H9...O2	0.930 (2)	2.889 (1)	3.434 (2)	118.7 (1)	$-1 + x, -1 + y, z$
	C12-H12...O3	0.960 (3)	2.720 (1)	3.348 (3)	123.61 (1)	$+1 - x, +1 - y, +2 - z$
4	C9-H9...O2	0.950 (2)	2.394 (1)	3.324 (2)	165.8 (1)	$-x, +1 - y, +1 - z$
	C3-H3...O6	0.930 (4)	2.516 (3)	3.411 (5)	161.7 (3)	<i>x, y, z</i>
6	C20-H20...O2	0.930 (5)	2.686 (3)	3.294 (5)	123.7 (3)	<i>x, y, z</i>
	C27-H27...O2	0.931 (4)	2.526 (3)	3.425 (5)	162.5 (3)	<i>x, y, z</i>
	C48-H48...O6	0.930 (4)	2.612 (3)	3.216 (5)	123.1 (3)	<i>x, y, z</i>
	C3-H3...O1	0.930 (4)	2.958 (3)	3.410 (5)	111.5 (3)	$+1 + x, y, z$
	C17-H17...O3	0.959 (6)	2.685 (3)	3.370 (7)	128.8 (4)	$+1 - x, +1 - y, +2 - z$
	C18-H18A...O2	0.970 (5)	2.560 (3)	3.489 (5)	160.6 (3)	$-1 + x, y, z$
	O1-H1...O2	1.01 (3)	1.62 (3)	2.6213 (2)	175 (2)	$+2 - x, +2 - y, +2 - z$
7	C8-H8...O2	0.930 (2)	2.509 (2)	3.433 (3)	172.3 (1)	$-1 + x, -1 + y, z$
	C9-H9...O1	0.930 (2)	2.701 (2)	3.437 (3)	136.7 (1)	$+1 + x, +1 - y, +2 - z$

Table 4. Preliminary antioxidant and cytotoxic activity of FA derivatives.

Compound	Scavenging activity DPPH		Inhibition of lipid peroxidation TBARS		Cytotoxic activity Percentage of inhibition of cell lines at 50 µM						
	10 µM	100 µM	10 µM	100 µM	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS-7
FA	19.90 ± 0.26	76.81 ± 0.26*	-4.07 ± 3.82	4.06 ± 1.36	NC	NC	NC	NC	NC	NC	ND
1	11.76 ± 0.31	60.39 ± 0.13*	10.51 ± 4.03	34.52 ± 3.05*	NC	4.8	26.6	NC	NC	18.6	1.2
2	9.95 ± 0.38	56.76 ± 0.29*	12.24 ± 2.37	30.19 ± 2.13*	NC	NC	7.7	NC	NC	NC	NC
3	5.39 ± 0.32	30.10 ± 0.39*	2.02 ± 2.20	1.45 ± 3.14	NC	8	20.3	NC	6.5	12	7.0
4	0.49 ± 0.38	0.39 ± 0.05	4.31 ± 1.45	7.48 ± 2.80	NC	24.8	72.5	16.3	NC	20.9	17.7
5	12.84 ± 0.24	59.95 ± 0.25*	40.61 ± 1.60*	96.68 ± 0.65*	25.5	59.4	48.0	26.9	25.4	20.2	52.6
6	1.03 ± 0.31	0.83 ± 0.13	6.08 ± 0.98	9.16 ± 2.71	NC	15.3	32.4	15.5	14.6	27.4	31.3
7	1.27 ± 0.19	3.19 ± 0.47	7.46 ± 12.71	13.8 ± 25.14	5.8	16.6	17	5.7	7.8	18.1	22.2

Data represent media and standard error. * $P \leq 0.05$ compared to FeSO_4 control. * $P \leq 0.05$ compared to DPPH control. FA: ferulic acid. Cell lines: U251: central nervous system glia cancer, PC-3: prostate adenocarcinoma, K562: human chronic myelogenous leukemia, HCT-15: colon adenocarcinoma, MCF-7: human mammary adenocarcinoma, SKLU: human lung adenocarcinoma, COS7: non-cancerous monkey kidney cell line. NC: non-cytotoxic, ND: non determined.

Moreover, compounds **1**, **2** and **5** also inhibited lipoperoxidation induced by ferric sulphate in the rat brain, mainly due to preservation of phenolic group and a similar mechanism of action of antioxidant effect described above. Remarkably, compound **7** showed moderate inhibition of lipid peroxidation, despite the fact of it has the phenol group blocked probably due to higher lipophilicity, which aids to penetrate the cell membrane where lipid peroxidation takes place

[26].

The FA derivatives showed low cytotoxic activity in the preliminary screening in different cancer cell lines (all compounds were tested at 50 μ M). As seen in **Table 4**, only compound **5** inhibited cancer cell lines PC-3 and K562 by 59% and 48% respectively, while to healthy cell line COS-7 it did so by 53%. Compounds **4** and **6** also inhibited the growth of K562 cell line by 72% and 32% respectively. Since there were not relevant cytotoxic agents, it is remarkable that addition of benzyl groups to the FA improved cytotoxic activity *in vitro*, possibly by the increment of lipophilicity of compounds and a more efficient molecular action within the cell, as it has been reported previously [27] [28]. Our findings do not coincide with Jayaprakasam *et al.* (2006), who reported anti-inflammatory, anti-cancer and antioxidant activity of FA esters at low concentrations [29]. New refined analyses are required in order to elucidate molecular effects of FA and its derivatives.

4. Conclusion

The synthesis with moderate to good yields and unambiguous assignment of chemical structures of methoxymethyl (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylate ($C_{12}H_{14}O_5$) **2**; (E)-3-(3-methoxy-4-(methoxy methoxy)phenyl)acrylic acid ($C_{12}H_{14}O_5$) **3**; methyl (E)-3-(4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl)acrylate ($C_{18}H_{18}O_4$) **4**; benzyl (E)-3-(4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl)acrylate ($C_{24}H_{22}O_5$) **6** and (E)-3-(4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl) acrylic acid ($C_{17}H_{16}O_4$) **7** was achieved using $^1H/^{13}C$ NMR and X-ray techniques of compounds **2**, **3**, **4**, **6** and **7** were successfully grown single crystals. Compounds containing free phenolic hydroxyls e.g. **1**, **2** and **5** exhibited scavenging free radical and antioxidant activity. Compound **5** induced significant inhibition of cell growth in PC-3, K562 and COS-7 cell lines by 59.4%, 52.6% and 48% respectively while **4** exhibited the largest cytotoxic effect upon K562 cell line *i.e.* 72.5%.

Supplementary Materials

CCDC-1825526, CCDC-1825528, CCDC-1825527, CCDC-1825529 and CCDC-1852523 contain the supplementary crystallographic data for compound **2**, **3**, **4**, **6** and **7**, respectively. These data can be obtained free of charge via <https://www.ccdc.cam.ac.uk/structures/> by e-mailing data_request@ccdc.cam.ac.uk, or by contacting The Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK, fax; +44(0)1223-336033.

Acknowledgements

Financial support from projects DGAPA (PAPIIT) UNAM (IN208516) and CONACyT (CB-252524) is gratefully acknowledged. Technical assistance is acknowledged from Simón Hernández-Ortega X-ray, Rocio Patiño and María de la Paz Orta for IR spectra; Isabel Chávez, Hector Ríos and Rubén Gaviño for NMR spectra, Luis Velasco for MS spectra, Maria Teresa Ramírez-Apan and Antonio

Nieto for biological assays. Support from CONACYT scholarships to Marco A. Obregón-Mendoza (603692), William Meza-Morales (576707) and Yair Alvarez-Ricardo (576706) is acknowledged.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

References

- [1] Kumar, N., Kumar, S., Abbat, S. Nikhil, K., Sondhi, S., Bharatam, P., Roy, P. and Pruthi, V. (2016) Ferulic Acid Amide Derivatives as Anticancer and Antioxidant Agents: Synthesis, Thermal, Biological and Computational Studies. *Medicinal Chemistry Research*, **25**, 1175-1192. <https://doi.org/10.1007/s00044-016-1562-6>
- [2] Zhao, Z.H. and Moghadasian, M.H. (2008) Chemistry, Natural Sources, Dietary Intake and Pharmacokinetic Properties of Ferulic Acid: A Review. *Food Chemistry*, **109**, 691-702. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.039>
- [3] Kumar, N. and Pruthi, V. (2014) Potential Applications of Ferulic Acid from Natural Sources. *Biotechnology Reports*, **4**, 86-93. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.09.002>
- [4] Graf, E. (1992) Antioxidant Potential of Ferulic Acid. *Free Radical Biology & Medicine*, **13**, 435-448. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(92\)90184-I](https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90184-I)
- [5] Mori, H., Kawabata, K., Yoshimi, N., Tanaka, T., Murakami, T., Okada, T. and Murai, H. (1999) Chemopreventive Effects of Ferulic Acid on Oral and Rice Germ on Large Bowel Carcinogenesis. *Anticancer Research*, **19**, 3775-3783.
- [6] Srinivasan, M., Sudheer, A.R. and Menon, V.P. (2007) Ferulic Acid: Therapeutic Potential through Its Antioxidant Property. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, **40**, 92-100. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.40.92>
- [7] Mathew, S. and Abraham, T.E. (2004) Ferulic Acid: An Antioxidant Found Naturally in Plant Cell Walls and Feruloyl Esterases Involved in Its Release and Their Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, **24**, 59-83. <https://doi.org/10.1080/07388550490491467>
- [8] Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K. and Taniguchi, H. (2002) Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **50**, 2161-2168. <https://doi.org/10.1021/jf011348w>
- [9] Li, W.X., Li, N.G., Tang, Y.P., Li, B.Q., Liu, L., Zhang, X., Fu, H.A. and Duan, J.-A. (2012) Biological Activity Evaluation and Structure-Activity Relationships Analysis of Ferulic Acid and Caffeic Acid Derivatives for Anticancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **22**, 6085-6088. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.08.038>
- [10] Han, Y., Wu, C.L., Lv, H.F., Liu, N. and Deng, H.Y. (2015) Novel Tranyl-cypromine/Hydroxycinnamic Acid Hybrids as Lysine-Specific Demethylase 1 Inhibitors with Potent Antitumor Activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **63**, 882-889. <https://doi.org/10.1248/cpb.c15-00476>
- [11] Barma, D.K., Kundu, A., Bandyopadhyay, A., Kundu, A., Sangras, B., Briot, A., Mioskowski, C. and Falck, J.R. (2004) Highly Stereospecific Synthesis of (E)- α,β -Unsaturated Esters. *Tetrahedron Letters*, **45**, 5917-5920. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.05.113>
- [12] Lee, I.-K., Han, M.-S., Kim, D.-W. and Yun, B.-S. (2014) Phenylpropanoid Acid Es-

- ters from Korean Propolis and Their Antioxidant Activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **24**, 3503-3505. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.05.065>
- [13] Das, K., Anantha Reddy, S. and Mukkanti, K. (2007) Total Synthesis of Phenylpropanoid Glycosides, Grayanoside A and Syringalide B, through a Common Intermediate. *Carbohydrate Research*, **342**, 2309-2315. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.06.022>
- [14] Armarego, W.L.F. and Perrin, D.D. (1997) Purification of Laboratory Chemicals. 4th Edition, Butterworth Heinemann, Oxford.
- [15] Bruker (2009) APEX2, SAINT and SADABS. Bruker AXS Inc., Madison.
- [16] Mellors, A. and Tappel, A.L. (1966) The Inhibition of Mitochondrial Peroxidation by Ubiquinone and Ubiquinol. *Journal of Biological Chemistry*, **241**, 4353-4356. <http://www.jbc.org/content/241/19/4353.full.html#ref-list-1>
- [17] Obregón-Mendoza, M.A., Estévez-Carmona, M.M., Hernández-Ortega, S., Soriano-García, M., Ramírez-Apán, M.T., Orea, L., Pilotzi, H., Gnecco, D., Cassani, J. and Enríquez, R. (2017) Retro-Curcuminoids as Mimics of Dehydrozingerone and Curcumin: Synthesis, NMR, X-Ray, and Cytotoxic Activity. *Molecules*, **22**, 33-47. <https://doi.org/10.3390/molecules22010033>
- [18] Lozada, M.C., Soria-Arteche, O., Ramírez-Apán, M.T., Nieto-Camacho, A., Enríquez, R.G., Izquierdo, T. and Jiménez-Corona, A. (2012) Synthesis, Cytotoxic and Antioxidant Evaluations of Amino Derivatives from Perezone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **20**, 5077-5084. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.07.027>
- [19] Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paul, K., *et al.* (1991) Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *Journal of the National Cancer Institute*, **83**, 757-766. <https://doi.org/10.1093/jnci/83.11.757>
- [20] Sheldrick, G.M. (2007) A Short History of SHELX. *Acta Crystallographica A*, **64**, 112-122. <https://doi.org/10.1107/S0108767307043930>
- [21] Farrugia, L.J. (2012) WinGX and ORTEP for Windows: An Update. *Journal of Applied Crystallography*, **45**, 849-854. <https://doi.org/10.1107/S0021889812029111>
- [22] Nardelli, M. (1983) PARST: A System of Fortran Routines for Calculating Molecular Structure Parameters from Results of Crystal Structure Analyses. *Computers & Chemistry*, **7**, 95-98. [https://doi.org/10.1016/0097-8485\(83\)85001-3](https://doi.org/10.1016/0097-8485(83)85001-3)
- [23] Nardelli, M. (1995) PARST95—An Update to PARST: A System of Fortran Routines for Calculating Molecular Structure Parameters from the Results of Crystal Structure Analyses. *Journal of Applied Crystallography*, **28**, 659. <https://doi.org/10.1107/S0021889895007138>
- [24] Nethaji, M., Pattabhi, V. and Desiraju, G.R. (1988) Structure of 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic Acid (Ferulic Acid). *Acta Crystallographica C*, **44**, 275-277. <https://doi.org/10.1107/S0108270187009211>
- [25] Chen, J.H. and Ho, C.T. (1997) Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 2374-2378. <https://doi.org/10.1021/jf970055t>
- [26] Zhang, L., Al-Swayeh, S.A., Hsieh, P. and Fang, J. (2010) A Comparison of Skin Delivery of Ferulic Acid and Its Derivatives: Evaluation of Their Efficacy and Safety. *International Journal of Pharmaceutics*, **399**, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.07.054>
- [27] Janicke, B., Hegardt, C., Krogh, M., Onning, G., Akesson, B., Cirenajwis, H.M. and Oredsson, S.M. (2011) The Antiproliferative Effect of Dietary Fiber Phenolic Com-

- pounds Ferulic Acid and *p*-Coumaric Acid on the Cell Cycle of Caco-2 Cells. *Nutrition and Cancer*, **63**, 611-622. <https://doi.org/10.1080/01635581.2011.538486>
- [28] Mancuso, C. and Santangelo, R. (2014) Ferulic Acid: Pharmacological and Toxicological Aspects. *Food and Chemical Toxicology*, **65**, 185-195. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.024>
- [29] Jayaprakasam, B., Vanisree, M., Zhang, Y., Dewitt, D.L. and Nair, M.G. (2006) Impact of Alkyl Esters of Caffeic and Ferulic Acids on Tumor Cell Proliferation, Cyclooxygenase Enzyme, and Lipid Peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 5375-5381. <https://doi.org/10.1021/jf060899p>

Article

Non-Cytotoxic Dibenzyl and Difluoroborate Curcuminoid Fluorophores Allow Visualization of Nucleus or Cytoplasm in Bioimaging

Marco A. Obregón-Mendoza ¹, Imilla I. Arias-Olguín ¹, M. Mirian Estévez-Carmona ², William Meza-Morales ¹, Yair Alvarez-Ricardo ¹, Rubén A. Toscano ¹, Francisco Arenas-Huertero ³, Julia Cassani ⁴ and Raúl G. Enríquez ^{1,*}

¹ Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, Mexico; obregonmendoza@yahoo.com.mx (M.A.O.-M.); arolima@hotmail.com (I.I.A.-O.); willy_meza_morales@hotmail.com (W.M.-M.); yfar30@hotmail.com (Y.A.-R.); toscano@unam.mx (R.A.T.)

² Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Wilfrido Massieu SN, Ciudad de México 07738, Mexico; mirianestevez@gmail.com

³ Laboratorio de Investigación en Patología Experimental, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México 06720, Mexico; farenashuertero@yahoo.com.mx

⁴ Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México 04960, Mexico; cassani@correo.xoc.uam.mx

* Correspondence: enriquezhabib@gmail.com; Tel.: +52-55-5622-4404

Academic Editors: Halina Ekiert and Agnieszka Szopa

Received: 27 May 2020; Accepted: 11 July 2020; Published: 14 July 2020



Abstract: Curcumin, the most important secondary metabolite isolated from *Curcuma longa*, is known for its numerous purported therapeutic properties and as a natural dye. Herein, based on curcumin's intrinsic fluorescence, a search for improved curcumin-based fluorophores was conducted. Within the set of semi-synthetic curcumin derivatives i.e. mono (1), di (2), tri (3), tetra (4) benzylated and dibenzyl-fluoroborate (5), the fluorescence properties of 2 and 5 in solution outstood with a two-fold quantum yield compared to curcumin. Furthermore, all benzylated derivatives showed a favorable minimal cytotoxic activity upon screening at 25 μ M against human cancer and non-tumoral COS-7 cell lines, with a reduction of its cytotoxic effect related to the degree of substitution. Fluorophores 2 and 5 are versatile bioimaging tools, as revealed by Confocal Fluorescence Microscopy (CFM), and showed permeation of living cell membranes of astrocytes and astrocytomas. When 2 is excited with a 405- (blue) or 543-nm (green) laser, it is possible to exclusively and intensively visualize the nucleus. However, the fluorescence emission fades as the laser wavelength moves towards the red region. In comparison, 5 allows selective visualization of cytoplasm when a 560-nm laser is used, showing emission in the NIR region, while it is possible to exclusively observe the nucleus at the blue region with a 405-nm laser.

Keywords: curcumin-based fluorescent probes; fluorescent probes; staining live cells; curcuminoid fluorophores

1. Introduction

Curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) is the main active ingredient of turmeric, an Asian spice isolated from the plant *Curcuma longa*. This fascinating bioactive molecule receives at present a great deal of attention due to its extensive pharmacological attributes for treating a large variety of human illnesses of modern times [1].

The purported medicinal benefits of curcumin are concerned with the treatment of conditions such as Alzheimer's disease, arthritis, cancer, metabolic and inflammatory diseases [2,3], explaining the worldwide scientific interest in curcumin derivatives and analogs.

Curcumin has a long historical record as a natural dye due to its beautiful intense yellow-orange color. Even though it emits strong fluorescence [4], its use as a fluorescent tool is impeded by its low quantum yield ($\Phi = 0.01$) [5] and considerable cytotoxic activity against several human cancer cell lines [1,6–8], as has been widely reported and confirmed herein.

An ideal fluorophore should have some or all of the following features: a strong fluorescence [9], a highly delocalized π -electron cloud with symmetric structure [10], preferably exhibit emission at >600 nm, significant Stokes shift, high quantum yield [11] and, ideally, low cytotoxicity [9,10]. Therefore, if the curcuminoid *motif* is the desired scaffold for this purpose, those derivatives should meet these mentioned features.

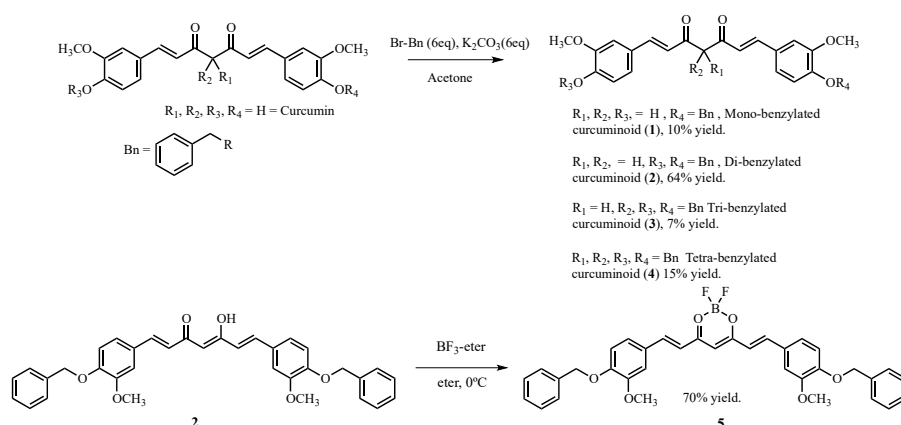
In general, the synthesis of new curcumin derivatives is directed to improve its biological activity [12–16] through the enhancement of lipophilicity and bioavailability, using strategies such as the synthesis of metal complexes [14–17], the use of nanoparticles [18], formation of co-crystals [19] and modification of its chemical structure [20]. In the past, several of these compounds might have been overlooked as potential fluorophores after their biological activity does not give rise to further interest.

The preliminary examination of the benzylated derivatives (1–5) obtained in our research showed little or no cytotoxic effects and their strong fluorescence under UV light suggested that a more detailed study of their fluorescence properties was necessary, which makes the core of the present report.

Compounds 2 and 5 emerged from all derivatives after fulfilling the following criteria: (i) the improvement of the fluorescent properties preserving the conjugated system D– π –D [21–23] without modifying the coplanarity of curcumin's heptanoid chain; (ii) the improvement of lipophilicity [24]; (iii) straightforward synthesis under mild reaction conditions [25]; and (iv) a substantial reduction of cytotoxicity and good reaction yield. The derivatization of phenolic functions with benzyl bromide proved to be adequate to add different properties to the curcumin scaffold.

Furthermore, to achieve the synthesis of the whole family of benzylated curcuminoids (Scheme 1, Compounds 1–4), advantage was taken from the acidic nature of phenolic groups which become highly reactive under alkaline conditions [26].

Compound 5 was prepared after treatment of Compound 2 with BF_3 (Et_2O) [27] (Scheme 1), yielding a very stable cyclic 2,2-difluoro-1,3,2-dioxaboron derivative. However, it is known that fluorinated drugs often improve metabolic and chemical stability as well as binding affinity [28].



Scheme 1. Synthesis of mono-, di-, tri- and tetra-benzylated curcuminoids (1–4) and curcumin difluoroborate derivative (5).

The synthesis of Compound 5 involved the substitution of phenolic groups by a weak donor (D), i.e., the benzyl groups, and the inclusion of BF_2 as an acceptor (A) preserving the symmetry

of curcumin rendering a D- π -A- π -D architecture. The use of BF₃·(Et₂O) was advantageous due to its well-known red shift effect [25,29], moving the fluorescence emission towards the NIR region (650–900 nm), i.e., 662 nm.

After the favorable improvement of fluorescence properties of Compounds 2 and 5 was observed in solution, the staining was tested on astrocyte and astrocytoma cell lines and the permeation of the cell membrane for both compounds was followed by fluorescence confocal microscopy.

Compound 2 in solution, allowed the observation of the nucleus exclusively using a 543-nm laser (green region). Also, due to the emission spectra of 5 in solution, a 560-nm laser was chosen for excitation and only cytoplasm was visualized in the NIR region. Surprisingly, when a laser of 405 nm was used (blue region), the nucleus was exclusively observed. This unique property is a rather favorable advantage, since the same compound allows a selective visualization of nucleus or cytoplasm. However, when using a 405-nm laser (blue region), the nucleus was also brightly observed, and when a longer wavelength laser towards the NIR region was used, the emission signal faded significantly.

The selection of astrocytes (typical star-shaped glial cells) and astrocytomas (tumors that arise from astrocytes) human cell lines was made based on their relevance in brain-related diseases to gather a better understanding of their etiology. Such ailments include dementia, degenerative diseases (Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease), developmental diseases, brain and spinal cord tumors (caused by astrocytomas) and psychiatric disorders (e.g., schizophrenia), among others. Nowadays, around 50 million people have dementia, and it is predicted that 150 million people will experience this ailment by 2050 [30]. This forecast explains the considerable interest in brain-related diseases and their dramatic impact on brain health.

The properties described above for the benzylated curcumin derivatives 2 and 5 make them suitable fluorescent probes. The applicability of these live-cell membrane-permeable curcumin-based derivatives may reach other cell types when studying physiological or pathological events in live-cell imaging and biomedical research.

2. Results and Discussion

Single crystal X-ray diffraction. The chemical and molecular structures of Compounds 2 and 5 are shown in Figure 1. The experimental and crystal data are shown in the Supplementary Materials.

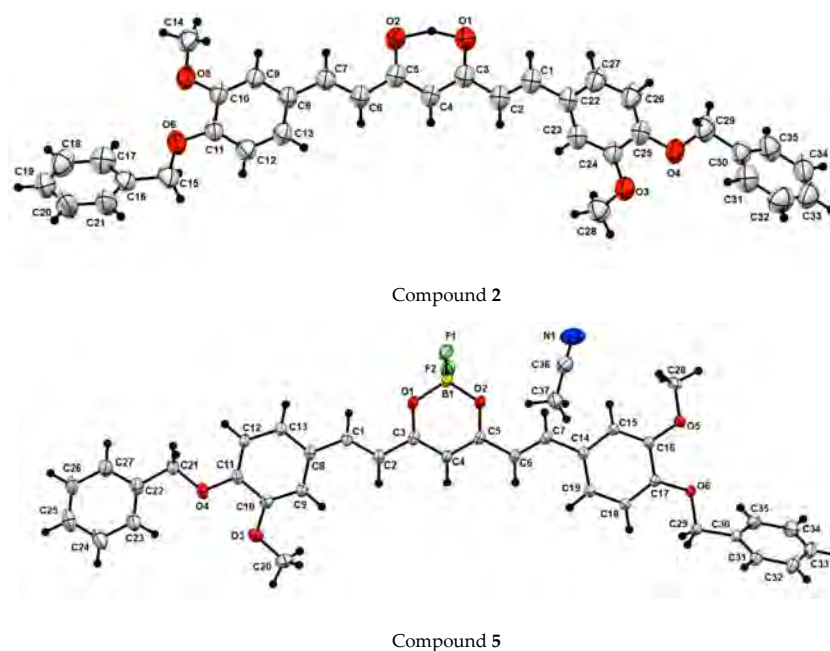


Figure 1. Crystal structures of curcumin derivatives 2 and 5. Thermal ellipsoids are drawn at 50% probability. A detailed description of crystal structures of 2–5, can be found in the Supplementary Materials.

Cytotoxic activity. Most of the benzylated curcuminoids had a lower cytotoxic activity compared to curcumin, as shown in Table 1. The percentage of inhibition found for the five compounds follows a pattern: as a benzyl group is added to the curcumin *motif*, a progressive decrease in the cytotoxic activity is observed (see Table 1 and Figure 2). These results become very relevant because they highlight that the presence of the two phenols and as well of the keto-enol moiety are an essential feature in the well-known cytotoxic effect of curcumin.

Table 1. Biological screening of curcumin derivatives 1–5 compared with curcumin.

Compound	Cytotoxic Activity Percentage of Inhibition at 25 μM , after 48 h of Incubation ^a						
	U-251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS-7
Curcumin	96.55	66.9	78.57	91.7	100	100	71.6
1	85.4	88.8	96.1	90.7	93.0	71.9	66.4
2	16.0	12.9	NC	17.4	64.8	20.6	NC
3	8.5	12.7	10.9	18.3	58.3	15.5	NC
4	9.4	12.8	7.8	12.5	37.4	9.3	NC
5	2.4	NC	NC	6.7	19.6	13.8	NC

U-251, central nervous system glia cancer; PC-3, prostate adenocarcinoma; K562, human chronic myelogenous leukemia; HCT-15, colon adenocarcinoma; MCF-7, human mammary adenocarcinoma; SKLU-1, human lung adenocarcinoma cell line; COS-7 monkey kidney cell line (non-tumoral); NC, non-cytotoxic. ^a Data are presented as the mean of three independent measures.

Compound 1 showed the highest cytotoxic activity among all other compounds and preserves a free phenol group. This agrees well with previous reports [31], where it is demonstrated that phenols play a crucial role in the antioxidant and anticancer activity of curcumin (see results of TBARS and radical scavenging DPPH in Table S5). Compounds 2 and 3 (di- and tri-benzylated curcuminoids) did not show a relevant cytotoxic effect against five cancer cell lines tested with inhibition percentage falling below 50%.

Compound 4 without phenolic groups or conjugation with the 1,3-diketone system had the lowest cytotoxicity activity against three (HCT-15, MCF-7 and SKLU-1) of the six cancer cell lines tested. It should be emphasized that Compounds 2–5 did not show cytotoxic activity against non-tumoral COS-7 cells. Besides, Compound 5 exerts minimal cytotoxic effect against all cancer cell lines at 25 μM (which quadruples the concentration normally used for imaging [32]). Therefore, Compounds 2 and 5 stand out as promising fluorescent probes for bioimaging with clinical applications.

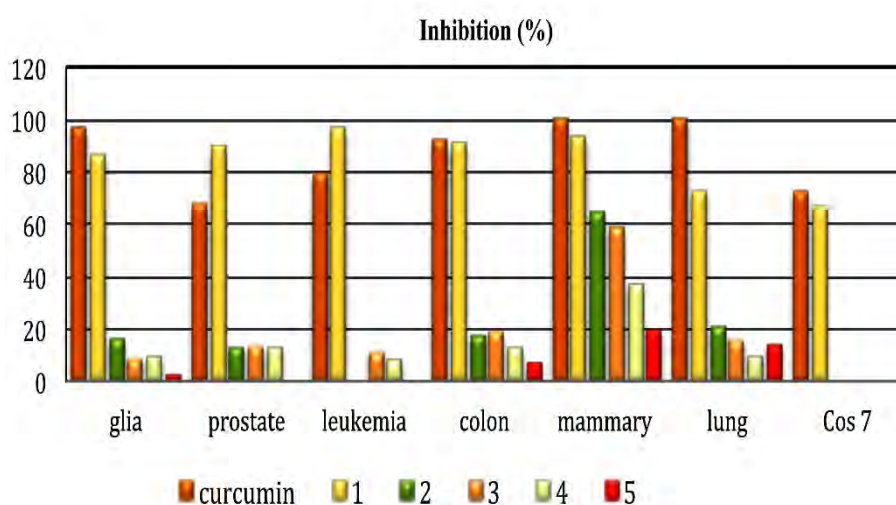


Figure 2. Cytotoxic activity of curcumin derivatives 1–5.

The present results agree with the reported importance in curcumin derivatives of phenolic groups [33–35] and the 1,3-diketone system [13] in the cytotoxic activity. A significant quenching of cytotoxic activity of the curcumin derivatives was observed in the present case after derivatization with benzyl groups.

Fluorescence properties. All benzylated curcumin derivatives including Curcumin (dissolved in DMF) were exposed to visible and ultraviolet light. The maximum absorbance was measured for Compounds 1–5 (see Figures S7–S11) at 1.0×10^{-5} mol/L (Table 2), and π – π^* transitions [32,36] were observed at 428, 425, 442, 350 and 510 nm. The brightest emissions under ultraviolet light resulted from Compounds 2 and 5, as shown in Figure 3.

Table 2. Fluorescence properties of Compounds 1–5 and curcumin.

Compound	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}/\text{nm}$	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ^a	$\lambda_{\max}^{\text{lf}}/\text{nm}$	Φ ^b
Curcumin	420 *	—	520 *	0.01 *
1	428	76,900	556	0.0016
2	425	28,200	560	0.023
3	442	29,500	534	0.025
4	350	37,900	450	0.01
5	510	76,500	662	0.021

$\lambda_{\max}^{\text{abs}}/\text{nm}$ is the maximum wavelength of linear absorption determined in DMF (dimethylformamide), and $\lambda_{\max}^{\text{lf}}/\text{nm}$ is the single-photon fluorescence measured in DMF and diluted with buffer tris (50 mM, pH 7.5). ^a Molar extinction coefficient (ϵ) and ^b quantum yield (Φ) were determined at room temperature. Quinine sulfate is reference ($\Phi_r = 0.55$ in H_2SO_4 1N) [37], * taken from reference [5].

The maximum fluorescence emission of 1–3 in solution with buffer tris (50 mM, pH 7.5) improved in comparison with curcumin and shifted towards the NIR region with bathochromic shifts of 556, 560 and 534 nm, respectively (Table 2). However, Compound 1 showed a low quantum yield (0.0016), and the maximum emission fluorescence of Compound 3 was observed at 534 nm, out of the NIR region and was put aside due to its low yield (7%). Compound 4 did not exhibit any improvement in fluorescent properties.

These results indicate that there is a strong correlation between fluorescent properties and the degree of substitution of each member of the benzylated-curcumin derivatives set. The introduction of terminal benzyl groups in Compounds 2 and 3 is reflected in a significant Stokes shift (more than 90 nm) and a two-fold quantum yield increase in comparison with curcumin.

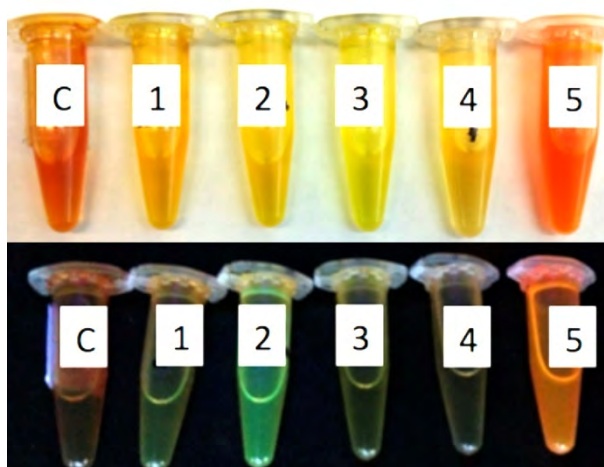


Figure 3. Emission observed for curcumin derivatives under visible light (top) and ultraviolet light (bottom). The figure illustrates the bright emission of 2 and 5 under ultraviolet light. C, curcumin.

The maximum fluorescence of **2** was detected at 560 nm (see Figure 4), which is close to the NIR region (600–1000 nm) [32]. Furthermore, **2** showed the higher yield of all products synthesized (64%), from which Compound **5** is prepared.

The maximum fluorescence of Compound **5** was observed within the NIR range at 662 nm, with a significant Stokes shift of 152 nm. These findings are in agreement with a previous report [25,29] since it is known that the binding of a boron atom to the β -diketone function, promotes the π - π^* transition from oxygen to the empty orbital of boron. In addition, the D- π -A- π -D architecture type favors the fluorescence properties of Compound **5** (see Table 2 and Figure 4).

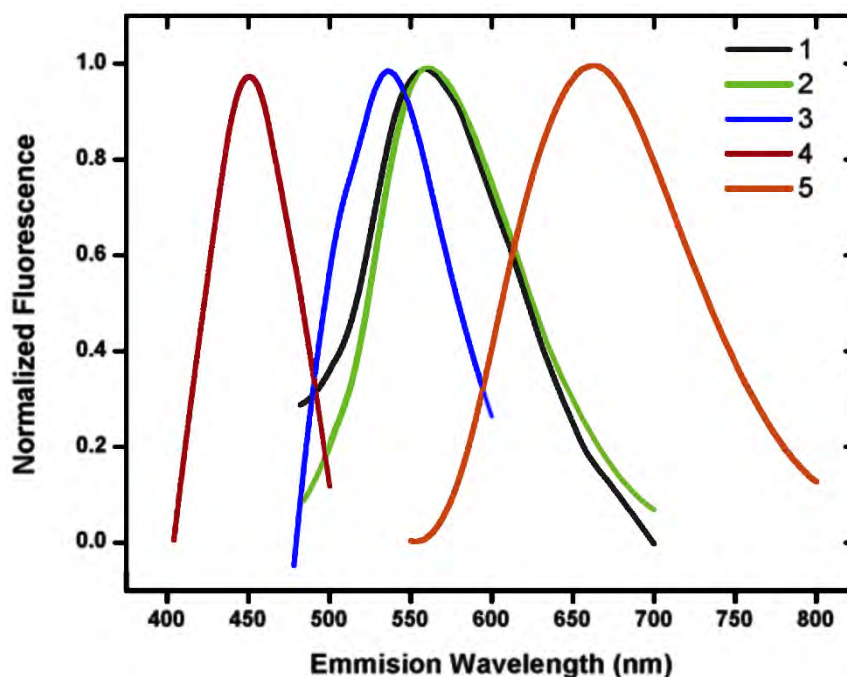


Figure 4. Normalized fluorescence emission spectra for Compounds 1–5.

Based on these results, it can be proposed that the curcumin-based fluorescent probes must preserve the symmetry and molecular co-planarity of the heptanoid chain as shown in the X-ray structure of Compound **5** since this property allows a high conjugation of the π -electrons system.

Because **2** and **5** showed the best fluorescence properties among all derivatives and they are non-cytotoxic curcumin derivatives (Table 1), we decided to investigate the function of these compounds as fluorophores in human astrocytes.

The human astrocyte cell line SVG (non-tumoral) and human astrocytoma cell lines (tumoral) U-87 and U-251 were selected based on the following: (a) astrocytes are one of the brain cells that play different vital roles to maintain proper brain function; (b) astrocytes together with other brain cells are often used to understand the basis of neurological diseases that along with cancer, representing one of the leading human health issues; and (c) Compounds **2** and **5** show minimal cytotoxic activity against cell line U-251 and other cancer cell lines (Table 1).

After these considerations, curcumin derivatives **2** and **5** were applied to astrocyte and astrocytoma cell lines for 24 h. Confocal fluorescence microscopy showed that both **2** and **5** are sub-cellular curcumin-based fluorophores that selectively reveal nucleus or cytoplasm depending on the laser source used (see Figures 5 and 6).

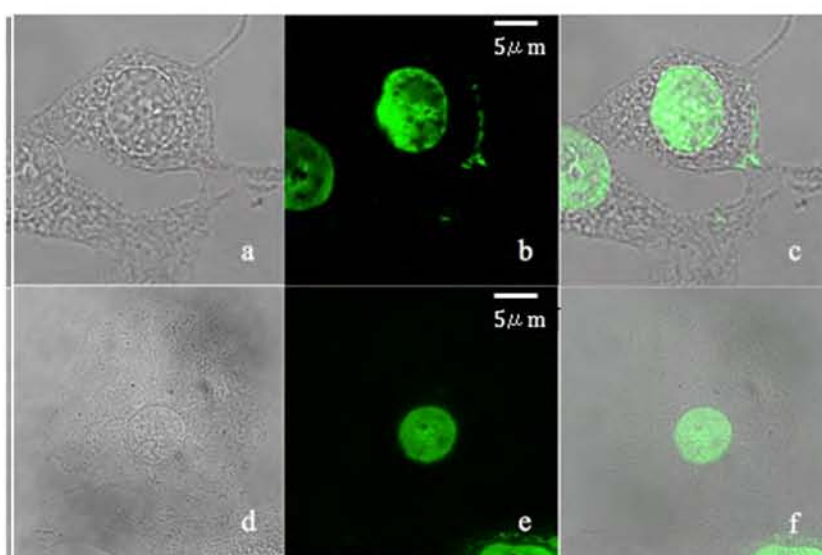


Figure 5. Visualization of the nucleus of SVC (non-tumoral) (a–c) and U-87 (tumoral) (d–f) cell lines with Compound 2 using confocal microscopy. Images are labeled as follows: (a,d) bright field; (b,e) fluorescence; and (c,f) merged images. Laser used 543 nm (green).

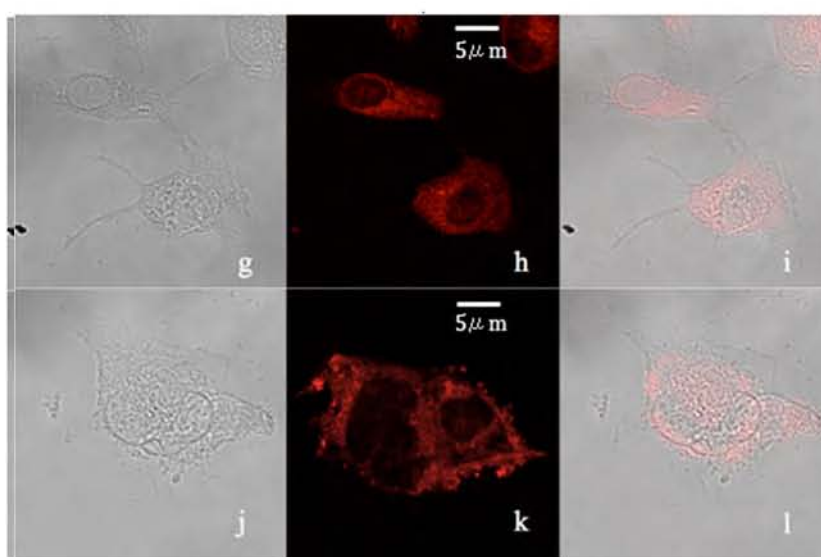


Figure 6. Visualization of the cytoplasm of SVC (non-tumoral) (g–i) and U-251 (tumoral) (j–l) cell lines with Compound 5 using confocal microscopy. Images are labeled as follows: (g,j) bright field; (h,k) fluorescence; and (i,l) merged images. Laser used 560 nm (red).

Figure 5 shows that curcumin derivative 2 permeates the cell membrane allowing visualization of the nucleus of SVC cells (Figure 5a–c) and U-87 cells (Figure 5d–f) using a 543 nm (green) laser as well as with a 405 nm laser (blue, see Figures S57 and S58). In addition, difluoroboronate 5 (Figure 6) allows visualization of cytoplasm of SVC cells (Figure 6g–i) and U-251 cell line (Figure 6j–l) using a 560 nm (red) laser.

Surprisingly, Compound 5 also allows the neat visualization of the nucleus using a 405 nm laser (blue), although with lesser fluorescence intensity (see Figure 7). In all cases, no quenching was observed with the order of lasers used.

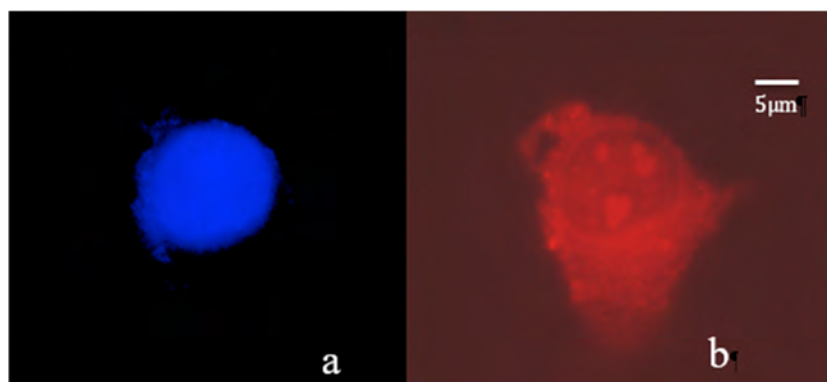


Figure 7. Confocal microscopy visualization of nucleus and cytoplasm of the same cell with Compound 5 of tumoral U-251 cell line using lasers at: 405 nm (a); and 560 nm (b).

This feature possibly allows the simultaneous use of **2** and **5** or other fluorophores that can be detected at other ranges of the visible wavelength towards the green, blue, or even further shifted at the right of the NIR region (600–1000 nm) [32,38].

It is worth mentioning that near-infrared fluorescence imaging has become a powerful tool to improve the diagnosis of diseases and also for monitoring biological activities as it represents a non-invasive imaging tool [39]. Therefore, both compounds resemble the set of fluorescent tools or dyes with imaging application reported in the literature [5,9,11,32,36].

Our findings gain relevance as it is well known that the development of fluorophores that selectively reveal subcellular compartments depending from the laser source, as the curcumin derivatives described here, may provide crucial information of organelle's function [38,40]. An additional feature of the fluorophores reported here is the permeation of the human cell membrane preserving its integrity, which is essential to understand intracellular functions [41]. Furthermore, the high permeability of **2** and **5** can be attributed to their excellent lipophilicity, as demonstrated by their partition coefficients with $\log P$ values of 2.16 ± 0.069 and 1.82 ± 0.222 , respectively. Both fluorophores permeate the cell membrane, although a differential distribution in organelles is expected based on these related properties. These results are in agreement with the proposed statement that a proper fluorescent probe must have a $\log P$ value in the range 1–3 [25].

Fluorophores become more useful for biosensing and bioimaging when they possess high photostability, specificity, low cytotoxicity and near-infrared (NIR) emission, which are essential characteristics for monitoring biological processes [38].

Benzylated curcumin derivatives **2** and **5** are useful fluorophores since they show the following properties: minimal cytotoxic activity, derivative **5** falls within the NIR region, both can be detected in defined wavelength ranges, preserve morphological integrity of cells and, depending on the laser source used, selectively reveal subcellular structures. Therefore, **2** and **5** can be classified as imaging tools for studying and monitoring living cells or tissues, e.g., cancer cell lines or amyloid- β ($A\beta$) deposits, as indicated in the literature [25,42].

3. Materials and Methods

Chemicals and reagents. All solvents used were HPLC grade. Benzyl bromide was 98% reagent grade; anhydrous potassium carbonate, dry acetone, $BF_3(Et_2O)$ and ethyl ether were purchased from Sigma-Aldrich. Curcumin was obtained from natural source by usual extractive procedures and purified by crystallization [43].

Synthesis of Compounds 1–4. Chemical reactions were conducted under mild experimental conditions similar to those previously reported [44–46]. Thus, in a 250 mL round-bottom flask, 1 g of curcumin was dissolved in dry acetone and an excess of anhydrous potassium carbonate (6 Eq, 1.12 g) and benzyl bromide (6 Eq, 1.9 mL) pre-dissolved in acetone were added dropwise to the curcumin

solution under stirring. The reaction was left 48 h until the TLC (mobile phases Hexane/EtOAc::7:3) showed almost all curcumin had reacted. Mono- and di-benylation of phenolic groups proceeded firstly while C1 (α -carbon) reacted at a later stage. Compound **2** was obtained as the major product while tri- and tetra-benzylated derivatives were obtained as minor products (7% and 15%, respectively). Acetone was evaporated under vacuum, and the resulting crude orange solid was dissolved in ethyl acetate and submitted to liquid–liquid extraction with water. Column chromatography in SiO₂ eluting with hexane/EtAcO (7:3) afforded the four title compounds.

Synthesis of Compound 5. In a 250 mL round-bottom flask, Compound **2** (150 mg (0.27 meq)) was dissolved in ethyl ether under inert atmosphere and placed on a super cooler at 0 °C. Then, a solution of boron trifluoride etherate (0.4 meq) was added (extreme precaution!) dropwise and left for overnight at 0 °C. The reaction was monitored by TLC (mobile phases Hexane:EtOAc of 7:3). Later, the ethyl ether was evaporated under vacuum, and the resulting red solid crude was dissolved in ethyl acetate and submitted to liquid–liquid extraction with distilled water and add NaHCO₃, the reaction product was recrystallized using acetonitrile. Compound **5** was characterized satisfactory by NMR spectroscopy, IR, MS and X-Ray.

Single crystals. Di- and tri-benzylated curcuminoids (**2** and **3**, respectively) were obtained by slow evaporation in ethyl acetate at room temperature and were characterized by X-ray diffraction. The crystal structure of Compound **3** can be found in the Supplementary Materials. Derivative **1** failed to crystallize while **4** afforded crystals that could not be refined to the required level of accuracy. Compound **1** and **4** were fully characterized by NMR spectroscopy, IR and MS. A suitable single crystal of Compound **5** was obtained in acetonitrile at 0 °C.

(1*E*,6*E*)-1-(4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione (**1**), yellow powder, 10% yield, m.p. 91.6 °C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 16.02 (s, 1H), 7.59 (dd, J = 15.8, 2.8 Hz, 2H), 7.44 (m, 2H), 7.38 (ddd, J = 7.54 Hz, 6.83 Hz, 1.28 Hz, 2H), 7.32 (m, 1H), 6.93 (d, J = 8.17 Hz, 2H), 6.89 (d, J = 8.25 Hz, 2H), 6.48 (dd, J = 15.8, 2.8 Hz, 2H), 5.86 (s, 1H), 5.80 (s, 1H), 5.20 (s, 2H), 3.95 (s, 3H) 3.94 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 183.42, 183.04, 146.79, 145.70, 144.59, 143.71, 140.57, 140.27, 128.61, 128.44, 127.99, 127.66, 127.20, 122.86, 122.33, 122.14, 121.77, 114.82, 113.55, 110.46, 109.64, 101.21, 70.87, 56.02, 55.93. MS: calc. for C₂₈H₂₆O₆ 458.17 m/z ; found 459 m/z .

(1*E*,4*Z*,6*E*)-1,7-bis(4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl)-5-hydroxyhepta-1,4,6-trien-3-one (**2**), yellow powder, 64% yield, m.p. 160 °C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 16.01 (s, 1H), 7.58 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 7.43 (m, 4H), 7.37(m, 4H), 7.31 (ddt, J = 8.30 Hz, 6.28 Hz, 1.47 Hz, 2H), 7.08 (m, 4H), 6.88 (d, J = 8.29 Hz, 2H), 6.48 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 5.80 (s, 1H), 5.20 (s, 4H), 3.94 (s, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 183.20, 150.17, 149.78, 140.31, 136.58, 128.60, 128.42, 127.98, 127.19, 122.33, 122.15, 113.54, 110.44, 101.27, 70.85, 55.99 MS: calc. for C₃₅H₃₆O₆ 548.22 m/z ; found 549.19 m/z .

(1*E*,4*Z*,6*E*)-4-benzyl-1,7-bis(4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl)-5-hydroxyhepta-1,4,6-trien-3-one (**3**), yellow powder, 7% yield, m.p.152 °C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 17.67 (s, 1H), 7.68 (d, J = 15.4 Hz, 2H), 7.40 (m, 5H), 7.34 (m, 5H), 7.30 (m, 5H), 6.98 (dd, J = 8.93 Hz, 1.48 Hz, 2H), 6.93 (d, J = 2.02 Hz, 2H), 6.83 (d, J = 15.4 Hz, 2H), 6.82 (d, J = 8.32 Hz, 2H) 5.15 (s, 4H), 3.95 (s, 2H), 3.85 (s, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 194.50, 183.50, 150.12, 149.76, 149.67, 144.82, 141.62, 141.06, 136.57, 136.38, 128.89, 128.77, 128.58, 128.02, 127.96, 127.84, 127.42, 126.50, 123.41, 122.31, 121.97, 118.95, 113.49, 113.33, 110.62, 108.98, 70.81, 55.95, 31.80. MS: calc. for C₄₂H₃₈O₆, 638.26 m/z ; found 638 m/z .

(1*E*,6*E*)-4,4-dibenzyl-1,7-bis(4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione (**4**), yellow powder, 15% yield, m.p. 147.4 °C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 17.67 (s, 1H), 7.66 (d, J = 15.4 Hz, 2H), 7.39 (m, 4H), 7.35 (m, 4H), 7.29 (m, 2H), 7.18 (m, 6H), 6.99 (dd, J = 8.38 Hz, 2.03 Hz, 2H), 6.88 (d, J = 2 Hz, 2H), 6.81 (d, J = 8.37 Hz, 2H), 6.52 (d, J = 15.4 Hz, 2H), 5.16 (s, 4H), 3.86 (s, 6H), 3.37 (s, 4H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 196.74, 150.81, 149.68, 143.72, 136.59, 136.40, 130.42, 128.61, 128.10, 128.01, 127.51, 127.12, 126.62, 123.50, 121.18, 113.26, 110.68, 70.77, 70.08, 56.11, 37.67. MS: calc. for C₄₉H₄₄O₆, 728.31 m/z ; found 728 m/z .

BF₂ complex of (1*E*,4*Z*,6*E*)-1,7-bis(4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl)-5-hydroxyhepta-1,4,6-trien-3-one (**5**), red powder, 70% yield, m.p. 180 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.97 (d, *J* = 15.6 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 7.47–7.43 (m, 6H), 7.43–7.39 (m, 4H), 7.37–7.33 (m, 2H), 7.17 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.12 (d, *J* = 15.6 Hz, 2H), 6.51 (s, 1H), 5.19 (s, 4H), 3.85 (s, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 179.06, 151.52, 149.34, 146.75, 136.48, 128.49, 128.06, 127.95, 127.33, 124.91, 119.00, 113.18, 111.57, 101.44, 69.92, 55.73. ¹⁹F NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ –138.14 (s, ¹⁰B-F), –138.20 (s, ¹¹B-F). MS: calc. for C₃₅H₃₁BF₂O₆, 596.21 *m/z*; found 596 *m/z*.

Physical Measurements. Melting points were determined on an Electrothermal Engineering IA9100 digital melting point apparatus in open capillary tubes and are uncorrected.

Spectroscopic measurements. IR absorption spectra were recorded using a FT-IR Bruker Tensor 27 spectrophotometer in the range of 4000–400 cm^{–1} as KBr pellets. ¹H and ¹³C NMR spectra were analyzed with a Bruker Fourier 500 MHz spectrometer using TMS as an internal reference and CDCl₃ or DMSO-*d*₆ as solvents, ¹⁹F NMR spectrum for Compound **5** was recorded with a Varian 300-MHz spectrometer. NMR spectra were processed with MestreNova version 12.0.0 and can be found in the Supplementary Materials.

Mass Spectrometry was recorded using JEOL, SX 102A equipment with Electron Ionization Impact mode (spectra are shown).

Single-crystal X-ray diffraction (DXR) was carried out using Bruker diffractometer, model Smart Apex, equipped with Cu K_α (λ = 1.54178 Å) or Mo K_α (λ = 0.71073 Å) for Compound **5**, CCD two-dimensional detector and low temperature device. The data collections and reduction were performed using the APEX and SAINT-Plus programs [47]. The X-ray for structures **2**, **3** (data shown in the Supplementary Materials) and **5** were solved using SHELX-2014 by means of direct methods [48]. Data were refined by full-matrix least-squares procedure on F² with anisotropic temperature factors for the non-hydrogen atoms. The positions of all H atoms were calculated geometrically, and a riding model was used in the refinement, with C–H distances in the range of 0.93–0.97 Å and U_{iso}(H) = 1.2U_{eq}(C). The software used to prepare material for publication was PARST97 [49] and Mercury 3.7 [50].

UV–Visible. The maxima absorption measurements were recorded with an UV–Visible Shimadzu, U160 spectrophotometer; Compounds **1–5** were dissolved in DMF.

Fluorescence properties. Fluorescence measurements were carried out using an ISS–PC1 spectrofluorometer (ISS, Champaign, IL, USA) at 20 °C, in a 1-cm path length quartz cuvette. The fluorescence quantum yields (Φ) of the target compounds were measured by comparison with quinine sulfate as fluorescence spectroscopy standard (Φ_{st} = 0.55 in H₂SO₄ 1N). Compounds **1–5** were dissolved in DMF and diluted with buffer tris 50 mM, pH 7.5 solutions (1.0 × 10^{–5} mol/L) to avoid possible self-absorption. The quantum yield (is the ratio of the number of photons emitted to the number photons absorbed) was calculated as follow [51]:

$$\Phi_x = \Phi_{st} \frac{F_x (OD_{st})}{F_{st} (OD_x)}$$

where Φ is the quantum yield, *F* is the fluorescence intensity (determined by cutting out and weighing the area underneath the corrected emission curve) of the solution at the exciting wavelength λ_{exc}, *OD* is the optical density at the exciting wavelength λ_{exc} and subscripts *x* and *st* refer to problem and standard (quinine sulfate) solutions, respectively.

The data of cytotoxic activity in human cancer cell lines, inhibition of lipid peroxidation on rat brain. and radical scavenging (DPPH) activity can be consulted in the Supplementary material section.

Immunofluorescence staining and microscopy. Human fetal glial cell line SVG and human glioblastoma cell lines U-251 and U-87 were obtained from 90% confluence cultures, detached and 2 × 10⁴ were cultured in 1 mL of DMEM-10% fetal bovine medium onto poly-l-lysine-precoated glass coverslips. Cells were exposed to Compound **2** or **5** at 20 μM (dissolved in DMF [52] and diluted with PBS medium rendering an appropriate concentration lower than 0.1% DMF) for 24 h. After exposure, cells were washed with 1 mL of PBS and fixed with absolute methanol at –20 °C for 5 min. Then,

cells were washed twice with PBS and incubated for 5 min. Then, cells were fixed, mounted and observed in a Laser confocal Microscope Leica TCS SP8x (Wetzlar, Germany). Images were analyzed with Leica LAS X software (Wetzlar, Germany).

Partition coefficient was measured according to the shake-flask method previously reported [53,54]. Compound **2** or **5** (100 μ M) was dissolved in 1-octanol (600 μ L) presaturated with water (600 μ L). The solution was vortexed for 3 min and then centrifuged at 2000 rpm for 5 min. The 1-octanol layer separated and an aliquot (100 μ L) of each layer was used for quantitation by ultraviolet (UV) spectrophotometry. The experiments were conducted in triplicate. A standard curve is found in the Supplementary Materials (Figures S12 and S13).

4. Conclusions

Two outstanding benzylated curcumin fluorophores, namely **2** and fluoroborate **5**, along with their crystal structures, are reported. The cytotoxic activity of all derivatives **1–5** was assessed, finding that the fluorophores **2** and **5** exert minimal cytotoxic effect against cancer cell lines and selectively reveal the nucleus or cytoplasm of living cells. Furthermore, **2** allows nucleus visualization through detection of fluorescence using 405- (blue), 543- (green) and 560-nm (NIR region) lasers. The former two lasers allow enhanced visualization of the nucleus, while detection with the latter laser shows slightly faded images. In contrast, **5** emits fluorescence in the NIR allowing visualization of cytoplasm and, additionally, when 405- and 543-nm lasers are used, the nucleus is clearly visualized without observation of cytoplasm. Compounds **2** and **5** are, therefore, attractive alternatives to known fluorescent dyes. The properties described above for the benzylated curcumin derivatives **2** and **5** make them suitable fluorescent probes. The applicability of these live-cell membrane-permeable curcumin-based derivatives may reach other cell types when studying physiological or pathological events in live-cell imaging and biomedical research.

Supplementary Materials: The following are available online, CCDC-1861655 Compound **2**, CCDC-1861656 Compound **3** and CCDC-1964443 Compound **5** contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via <https://www.ccdc.cam.ac.uk/structures/>, The Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK, fax; +44(0) 1223-336033.

Author Contributions: R.G.E. designed and directed the study; M.A.O.-M. synthesized compounds; M.A.O.-M., M.M.E.-C. and W.M.-M. obtained single-crystals; R.G.E., M.A.O.-M., I.I.A.-O., M.M.E.-C. and Y.A.-R. discussed biological studies; I.I.A.-O. and F.A.-H. performed and analyzed in vitro assays and confocal fluorescence microscopy studies; R.A.T. refined the X-ray; R.G.E., I.I.A.-O. and M.A.O.-M. reviewed and edited the manuscript; and R.G.E. and J.C. performed multinuclear NMR and funding acquisition. Tasks from all co-authors are gratefully acknowledged. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Financial support from projects DGAPA (PAPIIT and IT200720), UNAM and CONACyT (FOINS-307152) awarded to RGE. Support (SNI, 43468) from CONACYT awarded to IIAO is acknowledged. CONACYT Scholarships MAOM (No. 603692), WMM (No. 576707) and YAR (No. 576706) are gratefully acknowledged. Acknowledgements are extended to María Teresa Apán and Antonio Nieto (biological tests), María de la Paz Orta (IR), María del Rocío Patiño (IR and UV), Rubén Gaviño (NMR), Hector Ríos (NMR) and Lucero Ríos Ruíz (EM), Institute of Chemistry, UNAM; Marina Ramírez-García and Genaro Patino-Lopez, Children's Hospital of Mexico Federico Gómez, México; Martin González-Andrade Facultad de Medicina, UNAM (optical measurements); and María Isabel Chávez (NMR spectra), Manuel Soriano-García (X-rays previous examination) and Ruth Rincón Heredia, Imaging Laboratory, IFC, UNAM.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

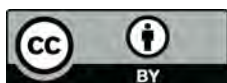
1. Goel, A.; Kunnumakkara, A.B.; Aggarwal, B.B. Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75*, 787–809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Sanphui, P.; Bolla, G. Curcumin, a Biological Wonder Molecule: A Crystal Engineering Point of View. *Cryst. Growth Des.* **2018**, *18*, 5690–5711. [[CrossRef](#)]
3. Wanninger, S.; Lorenz, V.; Subhan, A.; Edelmann, F.T. Metal complexes of curcumin—Synthetic strategies, structures and medicinal applications. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4986–5002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Wu, F.-Y.; Sun, M.-Z.; Xiang, Y.-L.; Wu, Y.-M.; Tong, D.-Q. Curcumin as a colorimetric and fluorescent chemosensor for selective recognition of fluoride ion. *J. Luminiscence* **2010**, *130*, 304–308.
5. Park, K.S.; Seo, Y.; Kim, M.K.; Kim, K.; Kim, Y.K.; Choo, H.; Chong, Y. A curcumin-based molecular probe for near-infrared fluorescence imaging of tau fibrils in Alzheimer's disease. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 11194–11199. [[CrossRef](#)]
6. Kunwar, A.; Barik, A.; Mishra, B.; Rathinasamy, K.; Pandey, R.; Priyadarsini, K.I. Quantitative cellular uptake, localization and cytotoxicity of curcumin in normal and tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2008**, *1780*, 673–679. [[CrossRef](#)]
7. Ravindran, J.; Prasad, S.; Aggarwal, B.B. Curcumin and cancer cells: How many ways can curry kill tumor cells selectively? *AAPS J.* **2009**, *11*, 495–510. [[CrossRef](#)]
8. Bandyopadhyay, D. Farmer to pharmacist: Curcumin as an anti-invasive and antimetastatic agent for the treatment of cancer. *Front. Chem.* **2014**, *2*, 1–11. [[CrossRef](#)]
9. Xu, G.; Wei, D.; Wang, J.; Jiang, B.; Wang, M.; Xue, X.; Zhou, S.; Wu, B.; Jiang, M. Crystal structure, optical properties and biological imaging of two curcumin derivatives. *Dye. Pigment.* **2014**, *101*, 312–317. [[CrossRef](#)]
10. Xu, G.; Wang, J.; Si, G.; Mahong, W.; Hualin, C.; Bin, C.; Zhou, S. Preparation, photoluminescence properties and application for in vivo tumor imaging of curcumin derivative-functionalized graphene oxide composite. *Dye. Pigment.* **2017**, *141*, 470–478. [[CrossRef](#)]
11. Si, G.; Zhou, S.; Xu, G.; Wang, J.; Wu, B.; Zhou, S. A curcumin-based NIR fluorescence probe for detection of amyloid-beta ($A\beta$) plaques in Alzheimer's disease. *Dye. Pigment.* **2019**, *163*, 509–515. [[CrossRef](#)]
12. Naksuriya, O.; Okonogi, S.; Schiffelers, R.M.; Hennink, W.E. Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials* **2014**, *35*, 3365–3383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ghosh, S.; Banerjee, S.; Sil, P.C. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *83*, 111–124. [[CrossRef](#)]
14. Zhang, W.; Chen, C.; Shi, H.; Yang, M.; Liu, Y.; Ji, P.; Chen, H.; Tan, R.X.; Li, E. Curcumin is a biologically active copper chelator with antitumor activity. *Phytomedicine* **2016**, *23*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Sumanont, Y.; Murakami, Y.; Tohda, M.; Vajragupta, O.; Watanabe, H.; Matsumoto, K. Effects of manganese complexes of curcumin and diacetylcurcumin on kainic acid-induced neurotoxic responses in the rat hippocampus. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 1732–1739. [[CrossRef](#)]
16. Asti, M.; Ferrari, E.; Croci, S.; Atti, G.; Rubagotti, S.; Iori, M.; Capponi, P.C.; Zerbini, A.; Saladini, M.; Versari, A. Synthesis and characterization of ^{68}Ga -labeled curcumin and curcuminoid complexes as potential radiotracers for imaging of cancer and Alzheimer's disease. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 4922–4933. [[CrossRef](#)]
17. Meza-Morales, W.; Mirian Estévez-Carmona, M.; Alvarez-Ricardo, Y.; Obregón-Mendoza, M.A.; Cassani, J.; Ramírez-Apan, M.T.; Escobedo-Martínez, C.; Soriano-García, M.; Reynolds, W.F.; Enríquez, R.G. Full structural characterization of homoleptic complexes of diacetylcurcumin with Mg, Zn, Cu, and Mn: Cisplatin-level Cytotoxicity in Vitro with Minimal Acute Toxicity in Vivo. *Molecules* **2019**, *24*, 1598. [[CrossRef](#)]
18. He, Y.; Huang, Y.; Cheng, Y. Structure evolution of curcumin nanoprecipitation from a micromixer. *Cryst. Growth Des.* **2010**, *10*, 1021–1024. [[CrossRef](#)]
19. Sanphui, P.; Goud, N.R.; Khandavilli, U.B.R.; Nangia, A. Fast dissolving curcumin cocrystals. *Cryst. Growth Des.* **2011**, *11*, 4135–4145. [[CrossRef](#)]
20. Anand, P.; Thomas, S.G.; Kunnumakkara, A.B.; Sundaram, C.; Harikumar, K.B.; Sung, B.; Tharakan, S.T.; Misra, K.; Priyadarsini, I.K.; Rajasekharan, K.N.; et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *76*, 1590–1611. [[CrossRef](#)]
21. Rumi, M.; Ehrlich, J.E.; Heikal, A.A.; Perry, J.W.; Barlow, S.; Hu, Z.; McCord-Maughon, D.; Parker, T.C.; Röckel, H.; Thayumanavan, S.; et al. Structure—Property relationships for two-photon absorbing chromophores: Bis-donor diphenylpolyene and bis(styryl)benzene derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9500–9510. [[CrossRef](#)]
22. Albota, M.; Beljonne, D.; Brédas, J.L.; Ehrlich, J.E.; Fu, J.Y.; Heikal, A.A.; Hess, S.E.; Kogej, T.; Levin, M.D.; Marder, S.R.; et al. Design of organic molecules with large two-photon absorption cross sections. *Science* **1998**, *281*, 1653–1656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Zhu, S.; Tian, R.; Antaris, A.L.; Chen, X.; Dai, H. Near-Infrared-II Molecular Dyes for Cancer Imaging and Surgery. *Adv. Mater.* **2019**, *31*, 1–25. [[CrossRef](#)]

24. Obregón-Mendoza, M.A.; Estévez-Carmona, M.M.; Alvarez-Ricardo, Y.; Meza-Morales, W.; Escobedo-Martínez, C.; Soriano-García, M.; Enríquez, R.G. Crystal Structure, Synthesis and Biological Activity of Ether and Ester Trans-Ferulic Acid Derivatives. *Int. J. Org. Chem.* **2018**, *8*, 359–377. [[CrossRef](#)]
25. Chongzhao, R.; Xiaoyin, X.; Raymond, S.B.; Ferrara, B.J.; Neal, K.; Bacskai, B.J.; Medarova, Z.; Moore, A. Design, synthesis, and testing of difluoroboron-derivatized curcumins as near-infrared probes for in vivo detection of amyloid- β deposits. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15257–15261.
26. Yuyang, Z.; Ren-Cheng, T. Modification of curcumin with a reactive UV absorber and its dyeing and functional properties for silk. *Dye. Pigment.* **2016**, *134*, 203–211.
27. Lozada, M.C.; Lobato, C.E.; Enríquez, R.G.; Ortíz, B.; Gnecco, D.; Reynolds, W.F.; Soriano-García, M. Crystal Structure of {Acetic acid 4-[7-(4-acetoxy-3-methoxyphenyl)-3,5-dioxoheptyl]-2-methoxy ester-03.05}-boron difluoride: A Boron Complex of Acetylated Tetrahydrocurcumin Derivative. *Anal. Sci.* **2004**, *20*, 167–168. [[CrossRef](#)]
28. Laali, K.K.; Greves, W.J.; Correa-Smits, S.J.; Zwarycz, A.T.; Bunge, S.D.; Borosky, G.L.; Manna, A.; Paulus, A.; Chanan-Khan, A. Novel fluorinated curcuminoids and their pyrazole and isoxazole derivatives: Synthesis, structural studies, Computational/Docking and in-vitro bioassay. *J. Fluor. Chem.* **2018**, *206*, 82–98. [[CrossRef](#)]
29. Kamada, K.; Namikawa, T.; Senatore, S.; Matthews, C.; Lenne, P.F.; Maury, O.; Andraud, C.; Ponce-Vargas, M.; Le Guennic, B.; Jacquemin, D.; et al. Boron Difluoride Curcuminoid Fluorophores with Enhanced Two-Photon Excited Fluorescence Emission and Versatile Living-Cell Imaging Properties. *Chem. A Eur. J.* **2016**, *22*, 5219–5232. [[CrossRef](#)]
30. Editors Dementia: A Situation for Concern. *World Health Popul.* **2019**, *18*, 3–5. [[CrossRef](#)]
31. Roy, M.; Chakraborty, S.; Siddiqi, M.; Bhattacharya, R.K. Induction of apoptosis in tumor cells by natural phenolic compounds. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2012**, *3*, 61–67.
32. Xu, G.; Wang, J.; Si, G.; Mahong, W.; Wu, B.; Zhou, S. Two-photon absorption and cell imaging of two multi-branched dyes based on curcumin. *Dye. Pigment.* **2015**, *123*, 267–273. [[CrossRef](#)]
33. Chen, J.H.; Ho, C.T. Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2374–2378. [[CrossRef](#)]
34. Janicke, B.; Hegardt, C.; Krogh, M.; Onning, G.; Åkesson, B.; Cirenajwis, H.M.; Oredsson, S.M. The antiproliferative effect of dietary fiber phenolic compounds ferulic acid and p-coumaric acid on the cell cycle of Caco-2 cells. *Nutr. Cancer* **2011**, *63*, 611–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mancuso, C.; Santangelo, R. Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *65*, 185–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lorenz, V.; Liebing, P.; Suta, M.; Felix, E.; Liane, H.; Busse, S.; Wang, S.; Wickleder, C.; Edelman, F.T. Synthesis, structure, complexation, and luminescence properties of the first metal-organic curcumin compound Bis(4-triphenylsiloxy)curcumin. *J. Luminiscence* **2019**, *211*, 243–250. [[CrossRef](#)]
37. Brouwer, A.M. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 2213–2228. [[CrossRef](#)]
38. Zhu, H.; Fan, J.; Du, J.; Peng, X. Fluorescent Probes for Sensing and Imaging within Specific Cellular Organelles. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 2115–2126. [[CrossRef](#)]
39. Hong, G.; Antaris, A.L.; Dai, H. Near-infrared fluorophores for biomedical imaging. *Nat. Biomed. Eng.* **2017**, *1*. [[CrossRef](#)]
40. Gao, P.; Pan, W.; Li, N.; Tang, B. Fluorescent probes for organelle-targeted bioactive species imaging. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 6035–6071. [[CrossRef](#)]
41. Alamudi, S.H.; Chang, Y.T. Advances in the design of cell-permeable fluorescent probes for applications in live cell imaging. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 13641–13653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Kim, H.; Im, Y.H.; Ahn, J.; Yang, J.; Choi, J.Y.; Lee, K.H.; Kim, B.T.; Choe, Y.S. Synthesis and in vivo characterization of 18 F-labeled difluoroboron-curcumin derivative for β -amyloid plaque imaging. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–13.
43. Escobedo-Martínez, C.; Guzmán-Gutiérrez, S.L.; Carrillo-López, M.I.; Deveze-Álvarez, M.A.; Trujillo-Valdivia, A.; Meza-Morales, W.; Enríquez, R.G. Diacetylcurcumin: Its Potential Antiarthritic Effect on a Freund's Complete Adjuvant-Induced Murine Model. *Molecules* **2019**, *24*, 2643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Mondal, R.; Mallik, A.K. Recent Applications of Potassium Carbonate in Organic Synthesis. *Org. Prep. Proced. Int.* **2014**, *46*, 391–434. [[CrossRef](#)]

45. Bong, P.H. Spectral and photophysical behaviors of curcumin and curcuminoids. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2000**, *21*, 81–86.
46. Meza-Morales, W.; Machado-Rodriguez, J.C.; Alvarez-Ricardo, Y.; Obregón-Mendoza, M.A.; Nieto-Camacho, A.; Toscano, R.A.; Soriano-García, M.; Cassani, J.; Enríquez, R.G. A new family of homoleptic copper complexes of curcuminoids: Synthesis, characterization and biological properties. *Molecules* **2019**, *24*, 910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Bruker AXS Inc. *APEX2 and SAINT-Plus*; Bruker AXS Inc.: Madison, WI, USA, 2013.
48. Sheldrick, G.M. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* **2008**, *64*, 112–122. [[CrossRef](#)]
49. Nardelli, M. PARST: A system of fortran routines for calculating molecular structure parameters from results of crystal structure analyses. *J. Appl. Crystallogr.* **1995**, *28*, 659. [[CrossRef](#)]
50. Macrae, C.F.; Edgington, P.R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Shields, G.P.; Taylor, R.; Towler, M.; Van De Streek, J. Mercury: Visualization and analysis of crystal structures. *J. Appl. Crystallogr.* **2006**, *39*, 453–457. [[CrossRef](#)]
51. Chen, R.F. Fluorescence Quantum Yield Measurements: Vitamin B6 Compounds. *Science* **1965**, *150*, 1593–1595. [[CrossRef](#)]
52. Jamalzadeh, L.; Ghafoori, H.; Sariri, R.; Rabuti, H.; Nasirzade, J.; Hasani, H.; Aghamaali, M.R. Cytotoxic Effects of Some Common Organic Solvents on MCF-7, RAW-264.7 and Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Avicenna J. Med. Biochem* **2016**, *1*, 1–6. [[CrossRef](#)]
53. Andrés, A.; Rosés, M.; Ràfols, C.; Bosch, E.; Espinosa, S.; Segarra, V.; Huerta, J.M. Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (log D) from low drug amounts. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *76*, 181–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Sangster, J. Octanol-Water Partition Coefficients of Simple Organic Compounds Octanol-Water Partition Coefficients of Simple Organic Compounds. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1989**, *18*, 1111. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Samples of the compounds 1–5 are available from the authors.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary material

Non-cytotoxic Dibenzylated and Difluoroborate Curcuminoid Fluorophores Allow Visualization of Nucleus or Cytoplasm in Bioimaging.

Marco A. Obregón-Mendoza¹, Imilla I. Arias-Olguín¹, M. Mirian Estévez Carmona², William Meza-Morales¹, Yair Alvarez-Ricardo¹, Rubén A. Toscano¹, Francisco Arenas-Huertero³, Julia Cassani⁴ and Raúl G. Enríquez^{1*}

¹ Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, CDMX 04510, México; obregonmendoza@yahoo.com.mx (M.A.O.-M.); arolima@hotmail.com (I.I.A.-O.); willy_meza_morales@hotmail.com (W.M.M.); yfar30@hotmail.com (Y.A.-R.); toscano@unam.mx (R.A.T.)

² Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Wilfrido Massieu SN, CDMX 07738, México; mirianestevezc@gmail.com

³ Laboratorio de Investigación en Patología Experimental. Hospital Infantil de México Federico Gómez, CDMX 06720, México; farenashuertero@yahoo.com.mx

⁴ Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, CDMX 04960, México; cassani@correo.xoc.uam.mx

* Correspondence: enriquezhabib@gmail.com; Tel.: +52-55-5622-4404

Table of Contents

	Page
Single-crystal X-ray diffraction (DXR).	3
checkCIF of compound 2	5
checkCIF of compound 3	7
checkCIF of compound 4	9
checkCIF of compound 5	11
Cytotoxic activity in cell lines (assay).	12
Inhibition of lipid peroxidation on rat brain (TBARS).	13
Radical scavenging (DPPH) activity.	13
Table S5. TBARS and DPPH activity of compounds 1-5 compared with curcumi	14
UV Spectra of compounds 1-5	14
Standard curves of compounds 2 and 5 (Log P).	17
Infrared spectra of compounds 1-5	18
Mass spectra of compounds 1-5	20
Figure S24. ¹H NMR spectrum of compound 1 (CDCl₃- 500MHz)	23
Figure S26. ¹³C NMR spectrum of compound 1 (CDCl₃- 125MHz)	25
Figure S27. DEPT-135 spectrum of compound 1 (CDCl₃)	26
Figure S28. COSY spectrum of compound 1 (CDCl₃-500MHz)	27
Figure S29. HSQC spectrum of compound 1 (CDCl₃-500MHz)	28
Figure S30. HMBC spectrum of compound 1 (CDCl₃-500MHz)	29
Figure S31. ¹H NMR spectrum of compound 2 (CDCl₃- 500MHz)	30
Figure S33. ¹³C NMR spectrum of compound 2 (CDCl₃- 125MHz)	32
Figure S34. DEPT-135 spectrum of compound 2 (CDCl₃)	33
Figure S35. COSY spectrum of compound 2 (CDCl₃-500MHz)	34
Figure S36. HSQC spectrum of compound 2 (CDCl₃-500MHz)	35
Figure S37. HMBC spectrum of compound 2 (CDCl₃-500MHz)	36
Figure S38. ¹H NMR spectrum of compound 3 (CDCl₃- 500MHz)	37
Figure S40. ¹³C NMR spectrum of compound 3 (CDCl₃- 125MHz)	39
Figure S41. COSY spectrum of compound 3 (CDCl₃-500MHz)	40
Figure S42. HSQC spectrum of compound 3 (CDCl₃-500MHz)	41
Figure S43. HMBC spectrum of compound 3 (CDCl₃-500MHz)	42
Figure S44. ¹H NMR spectrum of compound 4 (CDCl₃- 500MHz)	43
Figure S46. ¹³C NMR spectrum of compound 4 (CDCl₃- 125MHz)	45
Figure S47. DEPT-135 spectrum of compound 4 (CDCl₃)	46
Figure S48. COSY spectrum of compound 4 (CDCl₃-500MHz)	47
Figure S49. HSQC spectrum of compound 4 (CDCl₃-500MHz)	48
Figure S50. HMBC spectrum of compound 4 (CDCl₃-500MHz)	49
Figure S51. ¹H NMR spectrum of compound 5 (DMSO-<i>d</i>₆- 500MHz)	50
Figure S52. ¹³C NMR spectrum of compound 5 (DMSO-<i>d</i>₆- 125MHz)	51
Figure S53. COSY spectrum of compound 5 (DMSO-<i>d</i>₆-500MHz)	52
Figure S54. HSQC spectrum of compound 5 (DMSO-<i>d</i>₆-500MHz)	53
Figure S55. HMBC spectrum of compound 5 (DMSO-<i>d</i>₆-500MHz)	54
Figure S56. Boron spectrum of compound 5 (DMSO-<i>d</i>₆-300MHz)	55
Confocal microscopy analysis of curcumin derivative (compound 2)	56
References	57

Single-crystal X-ray diffraction (DXR).

$C_{35}H_{32}O_6$ (**2**) is monoclinic, $P2_1/c$. The unit-cell dimensions at 298(2) K are $a = 25.6927(6)$, $b = 5.3062(1)$, $c = 21.2649(5)$ Å, $\beta = 95.305(1)^\circ$, $V = 2886.64(11)$ Å³, $D_x = 1.262$ g/cm³, and $Z = 4$. $R = 0.0484$ for 5910 reflections.

$C_{42}H_{38}O_6$ (**3**) is monoclinic, $P2_1/c$. The unit-cell dimensions at 298(2) K are $a = 5.1310(2)$, $b = 39.3890(17)$, $c = 16.7129(7)$ Å, $\beta = 92.505(3)^\circ$, $V = 3374.5(2)$ Å³, $D_x = 1.257$ g/cm³, and $Z = 4$. $R = 0.0552$ for 6917 reflections.

$C_{35}H_{31}BF_2O_6$, C_2H_3N (**5**) is triclinic, $P-1$. The unit-cell dimensions at 150K are $a = 10.3764(5)$, $b = 11.1704(5)$, $c = 15.1531(7)$ Å, $\alpha = 101.153(1)^\circ$, $V = 1595.18(13)$ Å³, $D_x = 1.327$ g/cm³, and $Z = 2$. $R = 0.0604$ for 9355 reflections.

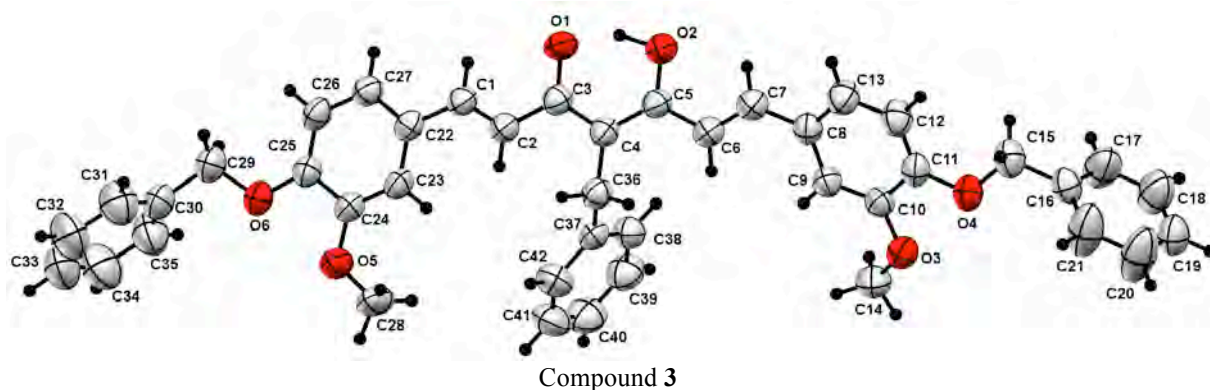


Figure S1. Crystal structure of compound **3**. Thermal ellipsoids are drawn at 50 % probability.

Molecular structures of compound **2** and compound **3** (Figure S1) are formed by two benzyloxy-methoxyphenyl side chains interconnected by a hepta-1,6-diene-3,5-dione moiety and the chain is highly conjugated among the 7 carbon atoms and are almost coplanar. Dihedral angle of compound **2** between planes C1-C5 and C6-C7 is 15.31° and the total twist of the molecule is indicated by the angle of 27.93° between ring plane C8-C13 and ring C22-C27. In compound **3** an additional benzyl side chain is connected to the moiety at C4 atom and dihedral angle between planes C1-C3 and C4-C7 is 14.29° . Besides the molecular structures are in agreement with ¹H NMR and IR spectroscopy that both exist as the enol tautomer in the asymmetric unit and are stabilized by resonance assisted hydrogen bonding (RAHB)[1].

The structure of compound **4** was determined using its diffraction pattern at low resolution (Figure S2). Its structure has been already determined although it has an unsatisfactory R-value of 12. The crystals obtained were small and did not diffract well (see CheckCIF). In order to solve this situation the structure of this compound was characterized by NMR and spectroscopic methods. The results obtained indicated that the carbonyl groups are in anti positions and also point out that the feature of this compound is its non-coplanarity, which is in agreement with the findings reported previously [2–4].

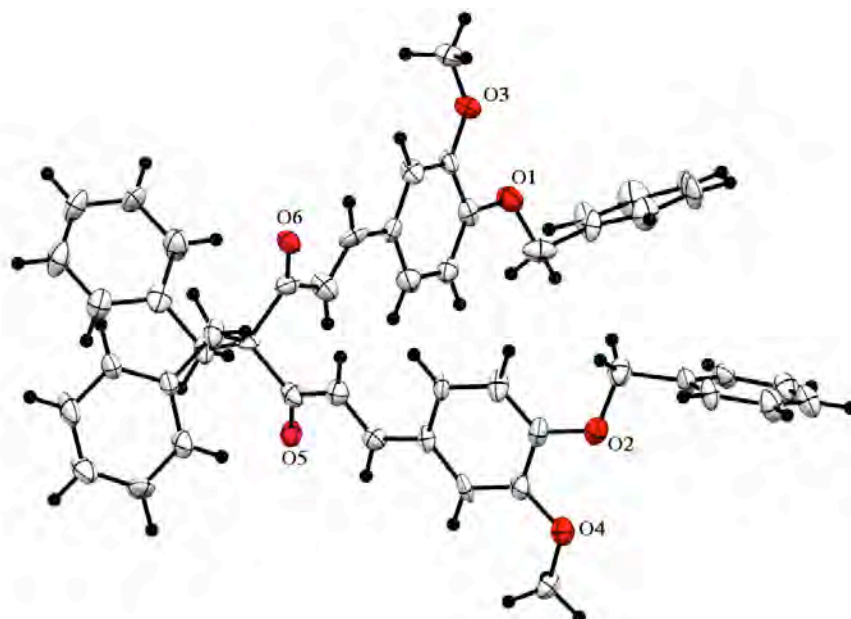


Figure S2. Crystal structure of compound 4. Thermal ellipsoids are drawn at 50 % probability.

The structure of compound 5 confirm the complex BF_2 in the keto-enol system and the coordination is almost symmetric between two oxygen atoms the distances B-O are 1.307 Å and 1.313 Å respectively, each molecule interact with two molecules adjacent via H-F contact at 2.508 Å and 2.369 Å (**Figure S3**) as was reported[5] in other CUR- BF_2 adducts, one acetonitrile molecule is present in the asymmetric unit. In addition, the coplanarity in the heptanoid chain (C1-C7) is preserved.

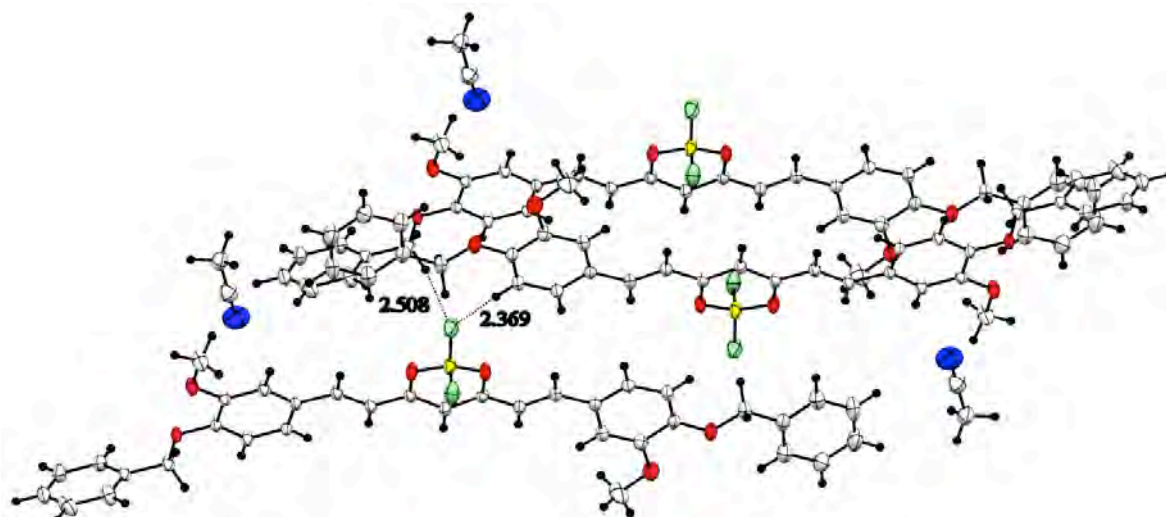


Figure S3. Interactions H-F of compound 5.

checkCIF of compound 2

Table S1. Structure factors of Compound 2

Datablock: 025EHR15

Bond precision:	C-C = 0.0033 A	Wavelength=1.54178	
Cell:	a=25.6927(6)	b=5.3062(1)	c=21.2649(5)
	alpha=90	beta=95.305(1)	gamma=90
Temperature:	298 K		
	Calculated	Reported	
Volume	2886.64(11)	2886.64(11)	
Space group	P 21/c	P 21/c	
Hall group	-P 2ybc	-P 2ybc	
Moiety formula	C35 H32 O6	C35 H32 O6	
Sum formula	C35 H32 O6	C35 H32 O6	
Mr	548.61	548.60	
Dx, g cm ⁻³	1.262	1.262	
Z	4	4	
Mu (mm ⁻¹)	0.692	0.692	
F000	1160.0	1160.0	
F000'	1163.58		
h, k, lmax	32, 6, 26	32, 6, 26	
Nref	5947	5910	
Tmin, Tmax	0.904, 0.981	0.762, 0.981	
Tmin'	0.750		
Correction method= # Reported T Limits: Tmin=0.762 Tmax=0.981			
AbsCorr = MULTI-SCAN			
Data completeness=	0.994	Theta(max)= 74.799	
R(reflections)=	0.0484(3265)	wR2(reflections)= 0.1376(5910)	
S =	1.008	Npar= 375	

The following ALERTS were generated. Each ALERT has the format

test-name_ALERT_alert-type_alert-level.

Click on the hyperlinks for more details of the test.

Alert level C

PLAT241_ALERT_2_C High Ueq as Compared to Neighbors for C20 Check

PLAT242_ALERT_2_C Low Ueq as Compared to Neighbors for C16 Check

PLAT303_ALERT_2_C Full Occupancy H-Atom H1A with # Connections 2.00 Check

PLAT331_ALERT_2_C Small Average Phenyl C-C Dist. C16 -C21 1.37 Ang.

PLAT480_ALERT_4_C Long H...A H-Bond Reported H14A .. O6 .. 2.65 Ang.

PLAT772_ALERT_2_C Suspect O-H Bond in CIF: O2 -- H1A .. 1.32 Ang.

PLAT906_ALERT_3_C Large K value in the Analysis of Variance 7.046 Check

PLAT911_ALERT_3_C Missing # FCF Refl Between THmin & STh/L= 0.600 15 Report

Alert level G

PLAT910_ALERT_3_G Missing # of FCF Reflection(s) Below Th(Min) ... 1 Report

PLAT912_ALERT_4_G Missing # of FCF Reflections Above STh/L= 0.600 21 Note

0 ALERT level A = Most likely a serious problem - resolve or explain

0 ALERT level B = A potentially serious problem, consider carefully

8 ALERT level C = Check. Ensure it is not caused by an omission or oversight

2 ALERT level G = General information/check it is not something unexpected

0 ALERT type 1 CIF construction/syntax error, inconsistent or missing data

5 ALERT type 2 Indicator that the structure model may be wrong or deficient

3 ALERT type 3 Indicator that the structure quality may be low

2 ALERT type 4 Improvement, methodology, query or suggestion
0 ALERT type 5 Informative message, check

Datablock: 025EHR15 - ellipsoid plot

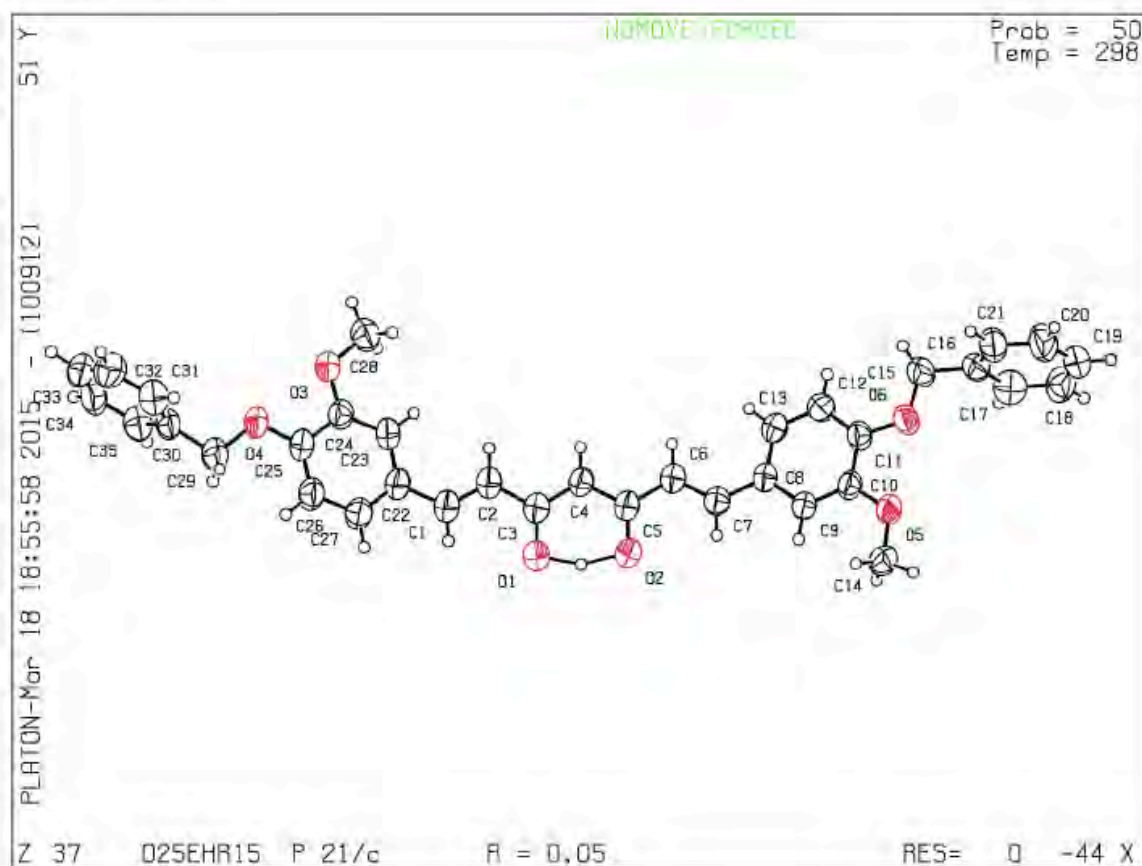


Figure S4. Ellipsoid Plot of Compound 2

checkCIF of compound 3

Table S2. Structure factors of Compound 3

Datablock: 437EHR14

Bond precision	C-C = 0.0042 A	Wavelength=1.54178	
Cell	a=5.1310(2)	b=3-.38-0(17)	c=16.712-(7)
	alpha=-0	beta=-2.505(3)	gamma=-0
Temperature	2-8 K		
	Calculated	Reported	
Volume	3374.5(2)	3374.5(2)	
Space group	P 21/c	P 21/c	
Hall group	-P 2ybc	-P 2ybc	
Moiety formula	C42 H38 O6	C42 H38 O6	
Sum formula	C42 H38 O6	C42 H38 O6	
Mr	638.72	638.72	
Dx, g cm-3	1.257	1.257	
Z	4	4	
Mu (mm-1)	0.667	0.667	
F000	1352.0	1352.0	
F000'	1356.07		
h, k, lmax	6, 4, 20	6, 4, 20	
Nref	6-50	6-17	
Tmin, Tmax	0.-51, 0.-72	0.714, 0.-71	
Tmin'	0.807		
Correction method=	# Reported T Limits	Tmin=0.714 Tmax=0.-71	
AbsCorr =	MULTI-SCAN		
Data completeness=	0.-5	Theta(max)= 74.836	
R(reflections)=	0.0552(3465)	wR2(reflections)= 0.1486(6-17)	
S =	0.-6	Npar= 438	

The following ALERTS were generated. Each ALERT has the format test-name_ALERT_alert-type_alert-level.

Click on the hyperlinks for more details of the test.

Alert level B

PLAT331_ALERT_2_B Small Aver Phenyl C-C Dist C16 -C21 . 1.35 Ang.

PLAT355_ALERT_3_B Long O-H (X0.82,N0.-8A) O2 - H2A . 1.08 Ang.

PLAT772_ALERT_2_B Suspect O-H Bond in CIF O1 -H2A .. 1.45 Ang.

Alert level C

PLAT241_ALERT_2_C High 'MainMol' Ueq as Compared to Neighbors of C17 Check
And 4 other PLAT241 Alerts

PLAT241_ALERT_2_C High 'MainMol' Ueq as Compared to Neighbors of C18 Check

PLAT241_ALERT_2_C High 'MainMol' Ueq as Compared to Neighbors of C20 Check

PLAT241_ALERT_2_C High 'MainMol' Ueq as Compared to Neighbors of C21 Check

PLAT241_ALERT_2_C High 'MainMol' Ueq as Compared to Neighbors of C32 Check

PLAT242_ALERT_2_C Low 'MainMol' Ueq as Compared to Neighbors of C16 Check

And 2 other PLAT242 Alerts

PLAT242_ALERT_2_C Low 'MainMol' Ueq as Compared to Neighbors of C1- Check

PLAT242_ALERT_2_C Low 'MainMol' Ueq as Compared to Neighbors of C30 Check

PLAT340_ALERT_3_C Low Bond Precision on C-C Bonds 0.0041- Ang.

PLAT480_ALERT_4_C Long H...A H-Bond Reported H28B ..O2 . 2.62 Ang.
 PLAT-06_ALERT_3_C Large K Value in the Analysis of Variance 10.-35 Check
 PLAT-06_ALERT_3_C Large K Value in the Analysis of Variance 3.228 Check
 PLAT-11_ALERT_3_C Missing FCF Refl Between Thmin & STh/L= 0.600 7 Report
 Alert level G
 PLAT-12_ALERT_4_G Missing # of FCF Reflections Above STh/L= 0.600 27 Note
 PLAT-33_ALERT_2_G Number of OMIT Records in Embedded .res File ... 1 Note
 PLAT-78_ALERT_2_G Number C-C Bonds with Positive Residual Density. 1 Info
 0 ALERT level A = Most likely a serious problem - resolve or explain
 3 ALERT level B = A potentially serious problem, consider carefully
 13 ALERT level C = Check. Ensure it is not caused by an omission or oversight
 3 ALERT level G = General information/check it is not something unexpected
 0 ALERT type 1 CIF construction/syntax error, inconsistent or missing data
 12 ALERT type 2 Indicator that the structure model may be wrong or deficient
 5 ALERT type 3 Indicator that the structure quality may be low
 2 ALERT type 4 Improvement, methodology, query or suggestion
 0 ALERT type 5 Informative message, check

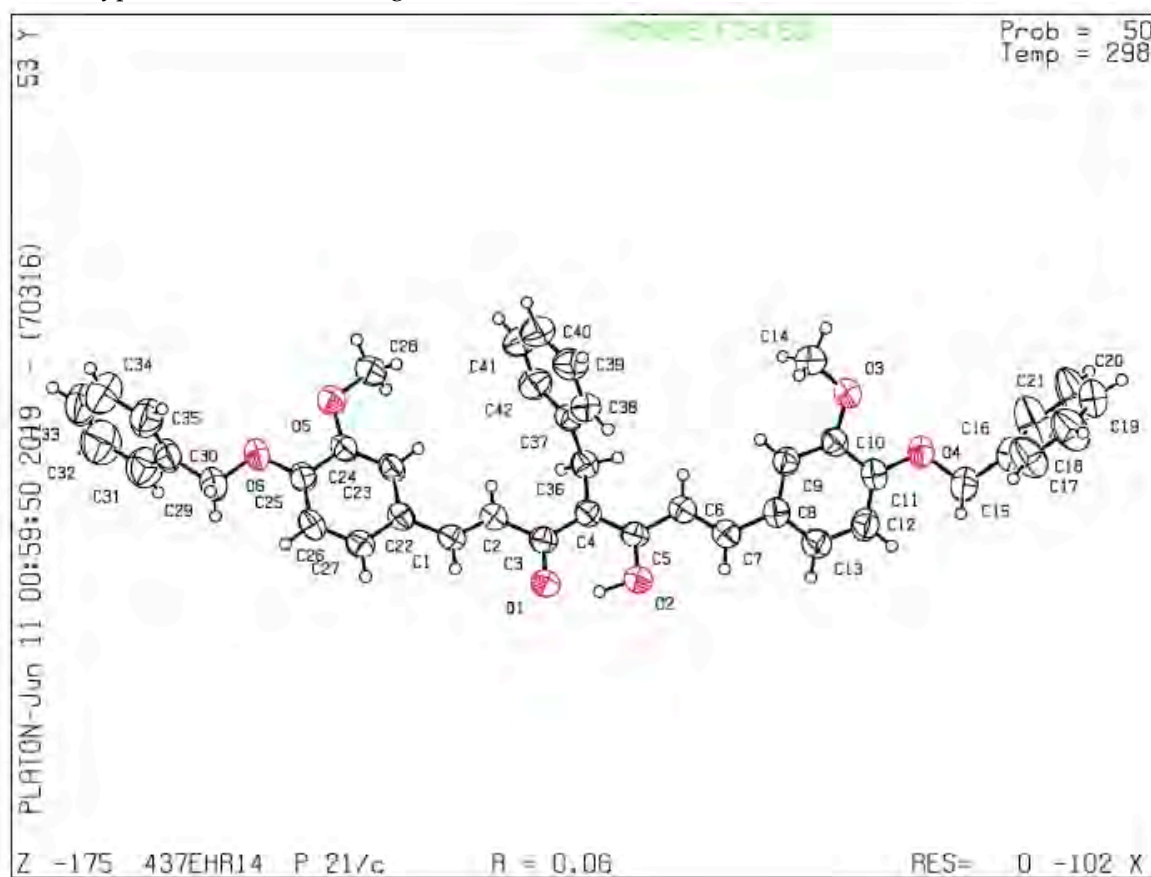


Figure S4. Ellipsoid Plot of Compound 3

checkCIF of compound 4

Table S3. Structure factors of Compound 4

Datablock: 403EHR18

Bond precision:	C-C = 0.0110 A	Wavelength=0.71073	
Cell:	a=21.380(3)	b=5.6520(9)	c=31.432(5)
	alpha=90	beta=92.993(4)	gamma=90
Temperature:	100 K		
	Calculated	Reported	
Volume	3793.1(10)	3793.1(10)	
Space group	P 21/n	P 21/n	
Hall group	: -P 2yn	-P 2yn	
Moiety formula	C49 H44 O6	?	
Sum formula	C49 H44 O6	C49 H44 O6	
Mr	728.84	728.84	
Dx,g cm-3	1.276	1.276	
Z	4	4	
Mu (mm-1)	0.083	0.083	
F000	1544.0	1544.0	
F000'	1544.72		
h,k,lmax	26,6,38	26,6,38	
Nref	7191	7085	
Tmin,Tmax	0.993,0.996		
Tmin'	0.964		
Correction method= Not given			
Data completeness=	0.985	Theta(max)=	25.694
R(reflections)=	0.1199(1755)	wR2(reflections)=	0.1855(7085)
S =	0.918	Npar=	498

The following ALERTS were generated. Each ALERT has the format test-name_ALERT_alert-type_alert-level.

Click on the hyperlinks for more details of the test.

Alert level A

EXPT005_ALERT_1_A _exptl_crystal_description is missing

Crystal habit description.

The following tests will not be performed.

CRYSR_01

DIFF003_ALERT_1_A _diffrn_measurement_device_type is missing

Diffractometer make and type. Replaces _diffrn_measurement_type.

RINTA01_ALERT_3_A The value of Rint is greater than 0.25

Rint given 0.372

PLAT020_ALERT_3_A The Value of Rint is Greater Than 0.12 0.372 Report

PLAT026_ALERT_3_A Ratio Observed / Unique Reflections (too) Low .. 25% Check

PLAT183_ALERT_1_A Missing _cell_measurement_reflns_used Value Please Do !

PLAT184_ALERT_1_A Missing _cell_measurement_theta_min Value Please Do !

PLAT185_ALERT_1_A Missing _cell_measurement_theta_max Value Please Do !

Alert level B

PLAT340_ALERT_3_B Low Bond Precision on C-C Bonds 0.011 Ang.
 Alert level C
 PLAT052_ALERT_1_C Info on Absorption Correction Method Not Given Please Do !
 PLAT082_ALERT_2_C High R1 Value 0.12 Report
 PLAT234_ALERT_4_C Large Hirshfeld Difference C2 --C3 . 0.16 Ang.
 PLAT480_ALERT_4_C Long H...A H-Bond Reported H4 ..O1 . 2.64 Ang.
 PLAT480_ALERT_4_C Long H...A H-Bond Reported H18 ..O5 . 2.61 Ang.
 PLAT906_ALERT_3_C Large K Value in the Analysis of Variance 66.565 Check
 PLAT906_ALERT_3_C Large K Value in the Analysis of Variance 2.140 Check
 PLAT906_ALERT_3_C Large K Value in the Analysis of Variance 13.199 Check
 PLAT906_ALERT_3_C Large K Value in the Analysis of Variance 4.642 Check
 PLAT906_ALERT_3_C Large K Value in the Analysis of Variance 2.810 Check
 PLAT910_ALERT_3_C Missing # of FCF Reflection(s) Below Theta(Min). 5 Note
 PLAT911_ALERT_3_C Missing FCF Refl Between Thmin & STh/L= 0.600 88 Report
 PLAT978_ALERT_2_C Number C-C Bonds with Positive Residual Density. 0 Info
 Alert level G
 PLAT912_ALERT_4_G Missing # of FCF Reflections Above STh/L= 0.600 15 Note
 PLAT933_ALERT_2_G Number of OMIT Records in Embedded .res File ... 3 Note
 8 ALERT level A = Most likely a serious problem - resolve or explain
 1 ALERT level B = A potentially serious problem, consider carefully
 13 ALERT level C = Check. Ensure it is not caused by an omission or oversight
 2 ALERT level G = General information/check it is not something unexpected
 6 ALERT type 1 CIF construction/syntax error, inconsistent or missing data
 3 ALERT type 2 Indicator that the structure model may be wrong or deficient
 11 ALERT type 3 Indicator that the structure quality may be low
 4 ALERT type 4 Improvement, methodology, query or suggestion
 0 ALERT type 5 Informative message, check

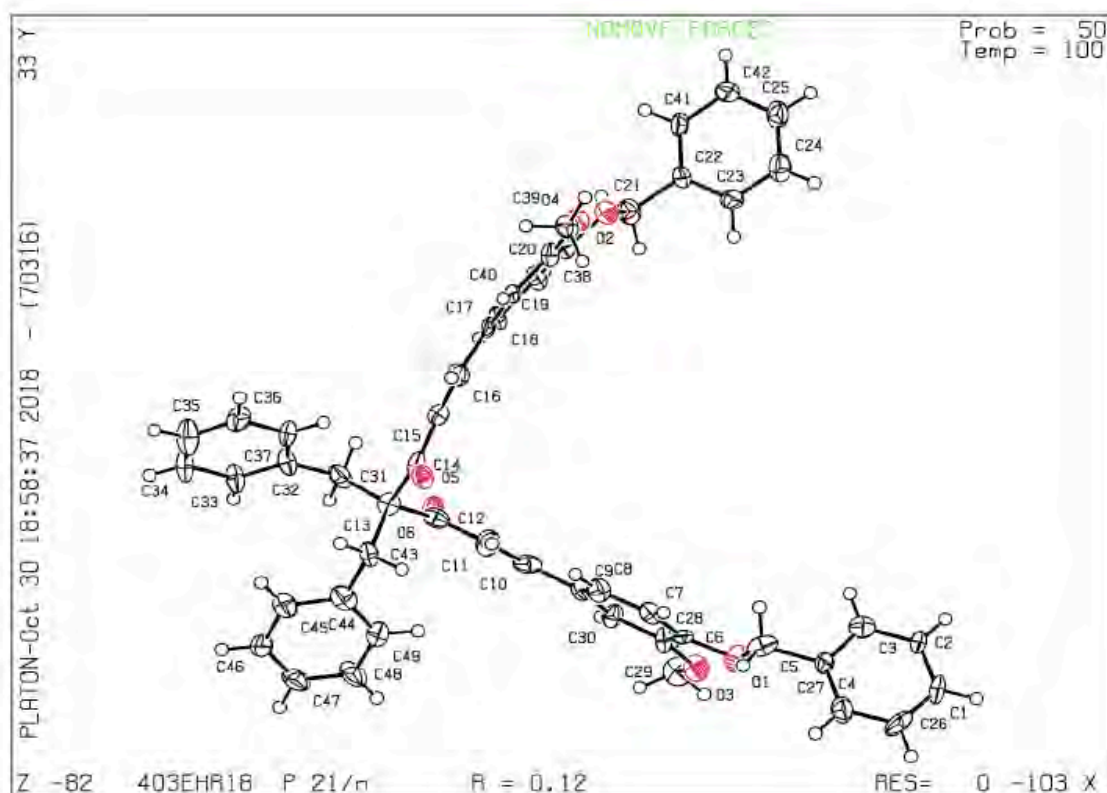


Figure S5. Ellipsoid Plot of Compound 4

PLAT912_ALERT_4_G Missing # of FCF Reflections Above STh/L= 0.600 20 Note
 PLAT933_ALERT_2_G Number of OMIT Records in Embedded .res File ... 12 Note
 PLAT978_ALERT_2_G Number C-C Bonds with Positive Residual Density. 18 Info
 0 ALERT level A = Most likely a serious problem - resolve or explain
 0 ALERT level B = A potentially serious problem, consider carefully
 5 ALERT level C = Check. Ensure it is not caused by an omission or oversight
 8 ALERT level G = General information/check it is not something unexpected
 2 ALERT type 1 CIF construction/syntax error, inconsistent or missing data
 5 ALERT type 2 Indicator that the structure model may be wrong or deficient
 4 ALERT type 3 Indicator that the structure quality may be low
 2 ALERT type 4 Improvement, methodology, query or suggestion
 0 ALERT type 5 Informative message, check

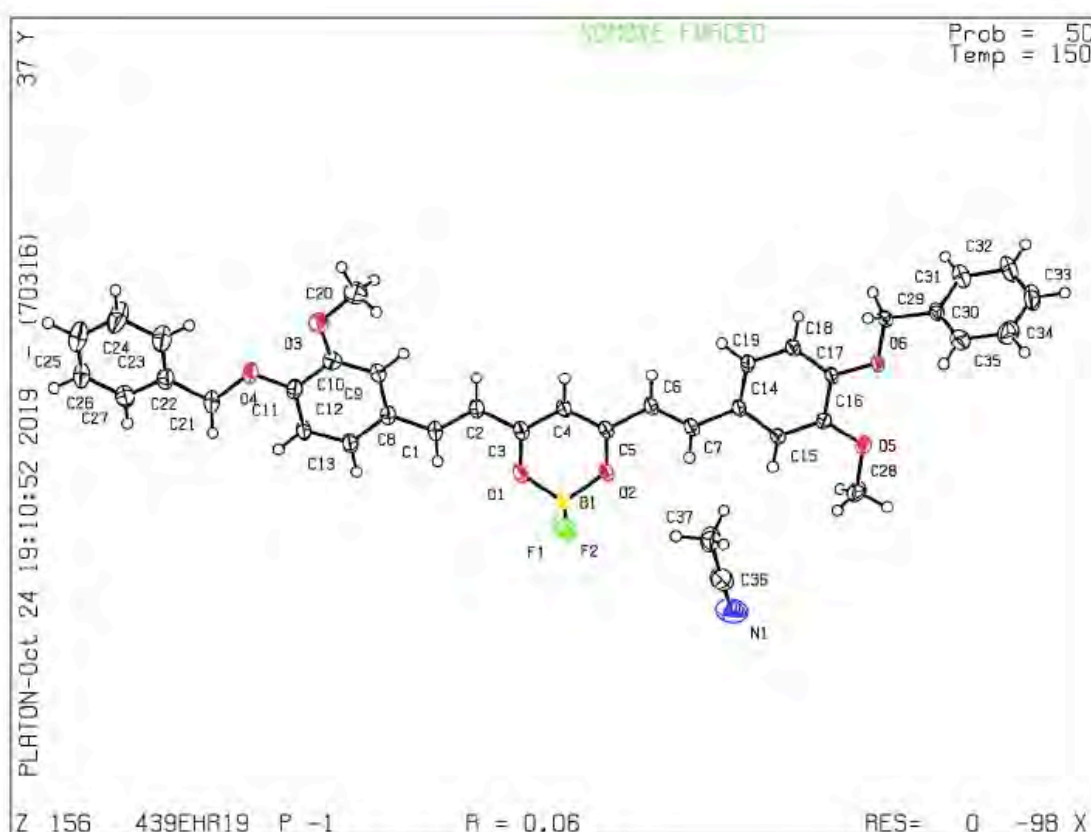


Figure S6. Ellipsoid Plot of Compound 5

Cytotoxic activity in cell lines (assay).

Curcumin and derivatives **1-5**, were screened in vitro at 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against human cancer cell lines: U-251: central nervous system glia cancer, PC-3: prostate adenocarcinoma, K562: human chronic myelogenous leukemia, HCT-15: colon adenocarcinoma, MCF-7: human mammary adenocarcinoma, SKLU-1: human lung adenocarcinoma and COS-7 monkey kidney cell line (non-tumoral). Cell lines were supplied by U.S. National Cancer Institute (NCI). The human tumor cytotoxicity was determined using the protein-binding dye sulforhodamine B (SRB) in microculture assay to measure cell growth, as described in the protocols established by the NCI [6]. The cell lines were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM l-glutamine, 10,000 units/mL penicillin G sodium, 10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin sulfate, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amphotericin B (Invitrogen/Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and 1% non-essential amino acids (Gibco). They were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. The viability of the cells used in the experiments exceeded 95% as determined with trypan blue.

Cytotoxicity after treatment with the test compounds of the normal and tumor cells was determined using the protein-binding dye sulforhodamine B (SRB) in microculture assay to measure cell growth, as described in a previous study [7,8]. The cells were removed from the tissue culture flasks by treatment with trypsin and diluted with fresh media. From these cell suspensions, 100 μL , containing 5000–10,000 cells per well, was pipetted into 96-well microtiter plates (Costar, Cambridge, MA, USA) and the material was incubated at 37 °C for 24 h in a 5% CO_2 atmosphere. Subsequently, 100 μL of a solution of the compound obtained by diluting the stocks was added to each well. The cultures were exposed for 48 h to the compound at concentrations of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. After the incubation period, cells were fixed to the plastic substratum by the addition of 50 μL of cold 50% aqueous trichloroacetic acid. The plates were incubated at 4 °C for 1 h, washed with tap H_2O , and air-dried. The trichloroacetic-acid-fixed cells were stained by the addition of 0.4% SRB. Free SRB solution was removed by washing with 1% aqueous acetic acid. The plates were air-dried, and the bound dye was solubilized by the addition of 10 mM unbuffered Tris base (100 μL). The plates were placed on a shaker for 10 min, and the absorption was determined at 515 nm using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) and the mean of three independent measurements was obtained.

Inhibition of lipid peroxidation on rat brain (TBARS).

Adult male Wistar rats (200–250g) were provided by the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Procedures and care of animals were conducted in conformity with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling NOM-062-ZOO-1999. They were maintained at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ on a 12/12 h light-dark cycle with free access to food and water.

Animal sacrifices were carried out avoiding unnecessary pain. Rats were sacrificed with CO_2 . The cerebral tissue (whole brain), was rapidly dissected and homogenized in phosphate-buffered saline (PBS) solution (0.2 g of KCl, 0.2 g of KH_2PO_4 , 8 g of NaCl, and 2.16 g of $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{L}$, pH adjusted to 7.4) as described elsewhere [9,10] to produce a 1/10 (w/v) homogenate. The homogenate was then centrifuged for 10 min at 800 rcf (relative centrifugal field) to yield a pellet that was discarded. The supernatant protein content was measured using Folin and Ciocalteu's phenol reagent [11] and adjusted with PBS at 2.666 mg of protein/mL.

As an index of lipid peroxidation, TBARS levels were measured using rat brain homogenates according to the method described by Ng and co-workers [12], with some modifications. Supernatant (375 μL) was added with 50 μL of 20 μM EDTA and 50 μL of each sample concentration dissolved in DMSO (50 μL of DMSO for control group) and incubated at 37 °C for 30 min. Lipid peroxidation was started adding 50 μL of freshly prepared 100 μM FeSO_4 solution (final concentrations 10 μM and 100 μM), and incubated at 37 °C for 1h. The TBARS content was determined as described by Ohkawa and co-workers [13].

Radical scavenging (DPPH) activity.

The free radical scavenging activity was measured using a modified method from Mellors and Tappel [14]. The tests were carried out on 96-well microplates. A 50 μL aliquot of the solution of the test compounds were mixed with 150 μL of an ethanol solution of DPPH (final concentrations 10 μM and 100 μM). This mixture was incubated at 37°C for 30 min, and the absorbance was then measured at 515 nm using a BioTek microplate reader SYNERGY HT. The inhibition percent for each compound was determined by comparison with a 100 μM DPPH ethanol blank solution.

Table S5. TBARS and DPPH activity of compounds 1-5 compared with curcumin.

Compound	TBARS (% of Inhibition)		DPPH (% of Inhibition)	
	10 μ M	100 μ M	10 μ M	100 μ M
CURCUMIN	94.55	96.64	25.49	94.21
1	56.26	96.37	11.72	77.51
2	10.78	36.74	1.15	8.28
3	6.29	13.83	9.58	26.53
4	6.89	9.13	-0.65	2.24
5	8.19	21.0	0.71	11.3

UV Spectra of compounds 1-5

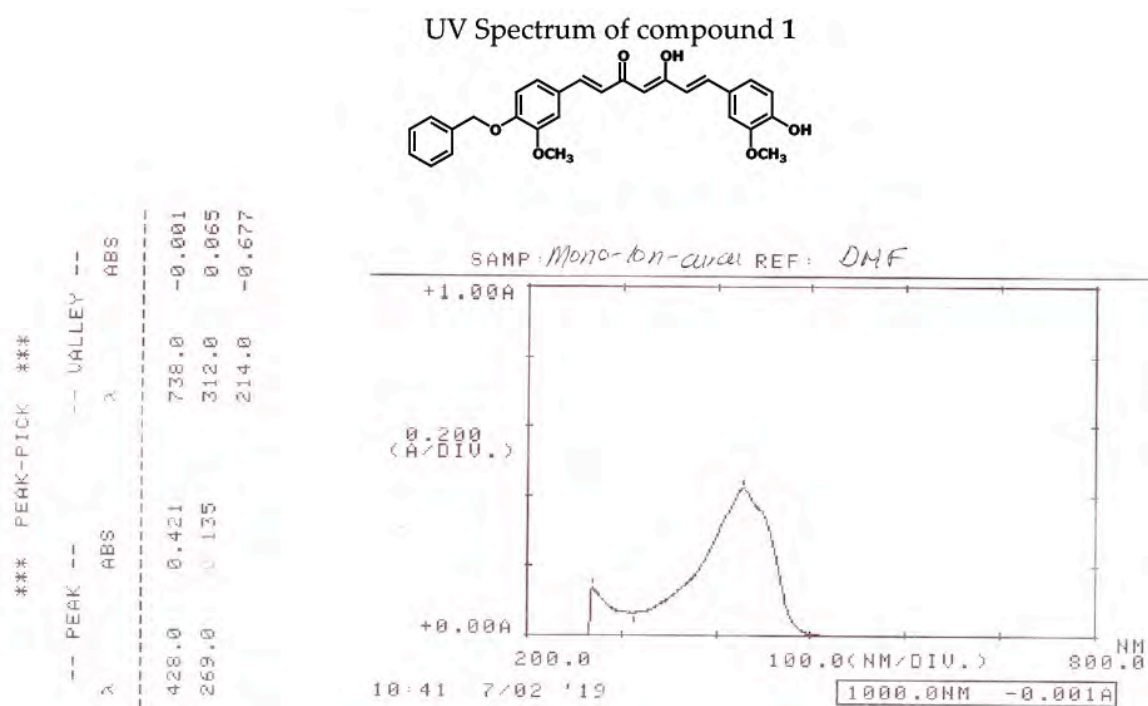


Figure S7. UV spectrum of compound 1

UV Spectrum of compound 2

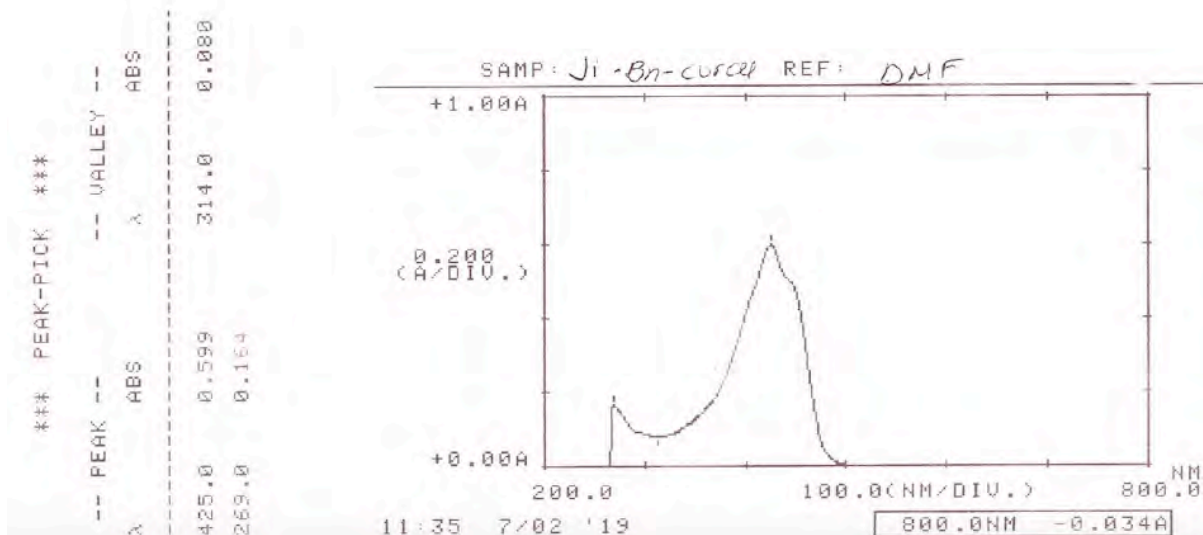
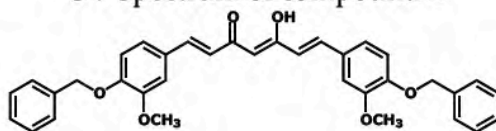


Figure S8. UV spectrum of compound 2

UV Spectrum of compound 3

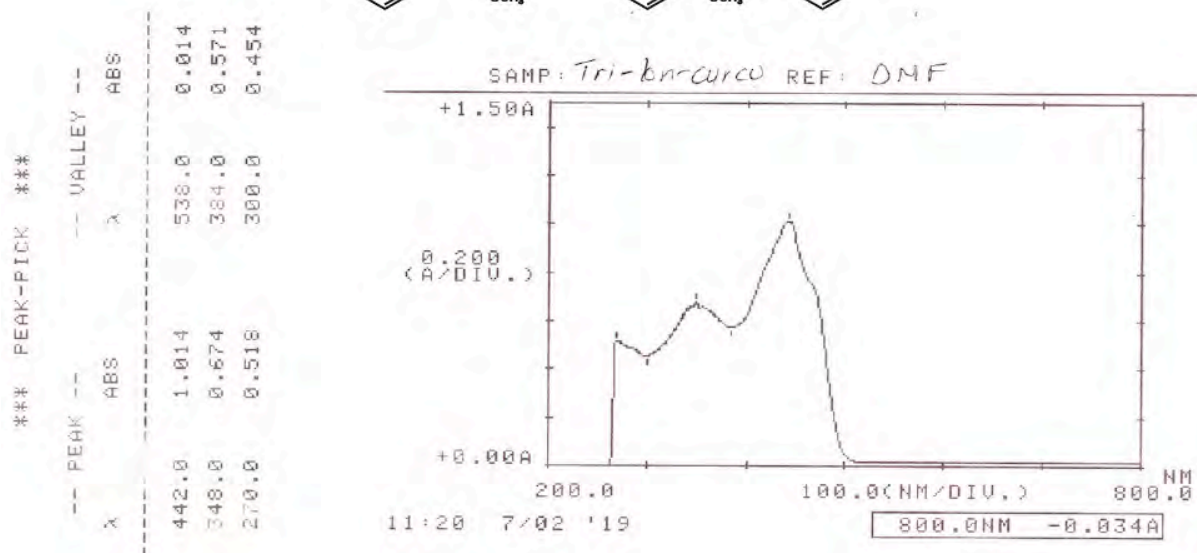
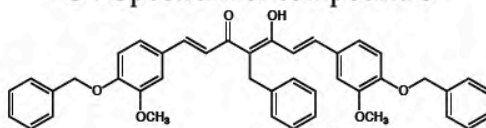
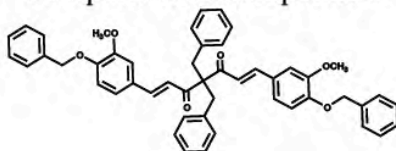


Figure S9. UV spectrum of compound 3

UV Spectrum of compound 4



```

*** PEAK-PICK ***
-- PEAK -- -- VALLEY --
  λ      ABS      λ      ABS
  ---    ---    ---    ---
350.0   0.507   704.0   0.000
269.0   0.215   279.0   0.185
210.0   -0.911
    
```

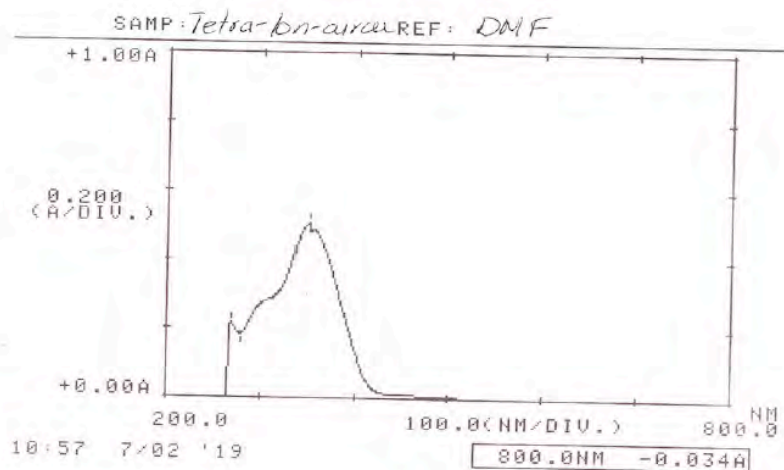
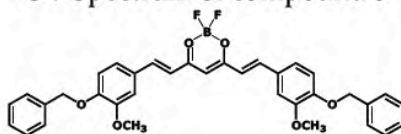


Figure S10. UV spectrum of compound 4

UV Spectrum of compound 5



```

*** PEAK-PICK ***
-- PEAK -- -- VALLEY --
  λ      ABS      λ      ABS
  ---    ---    ---    ---
510.0   0.735   349.0   0.089
270.0   0.151   220.0   -0.531
    
```

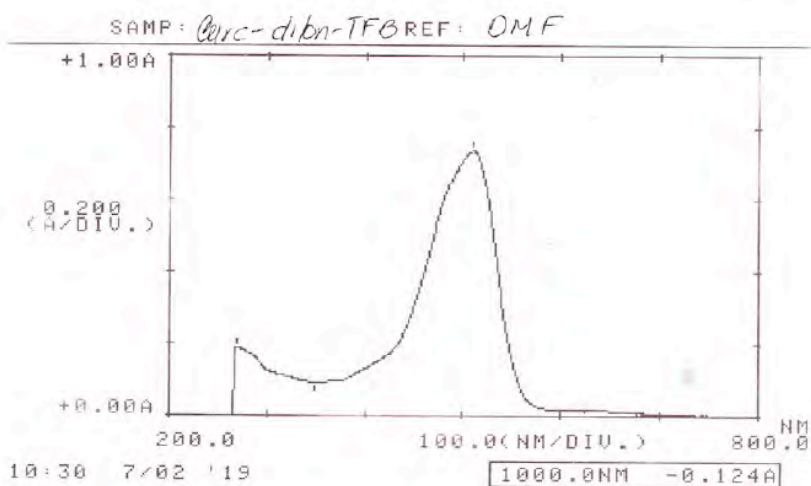


Figure S11. UV spectrum of compound 5

Standard curves of compounds 2 and 5 (*Log P*).

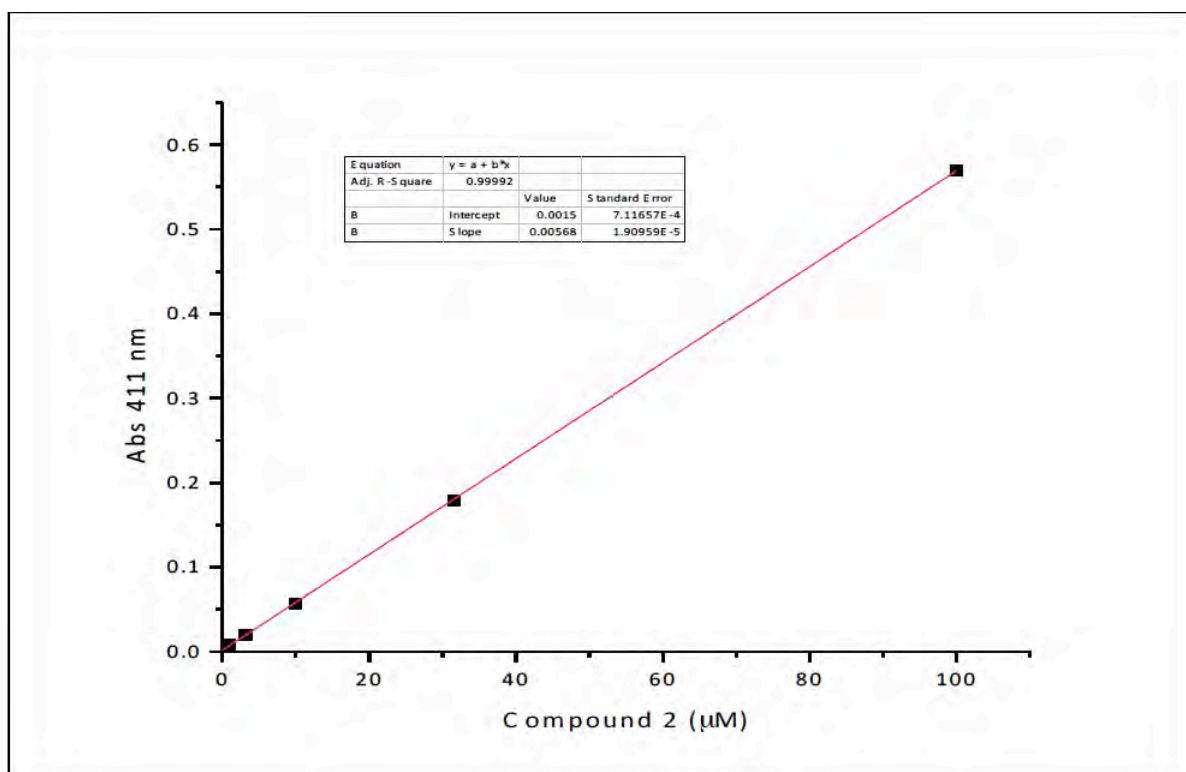


Figure S12. Standard curve of compound 2

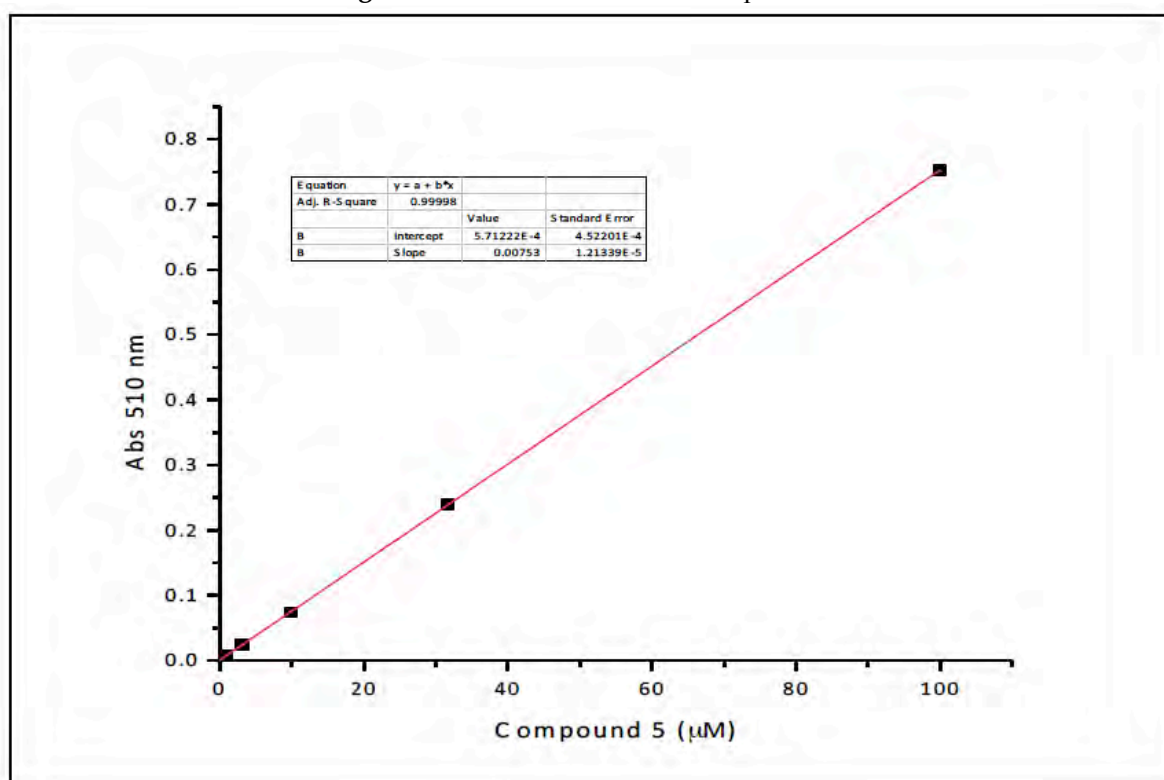


Figure S13. Standard curve of compound 5

Infrared spectra of compounds 1-5

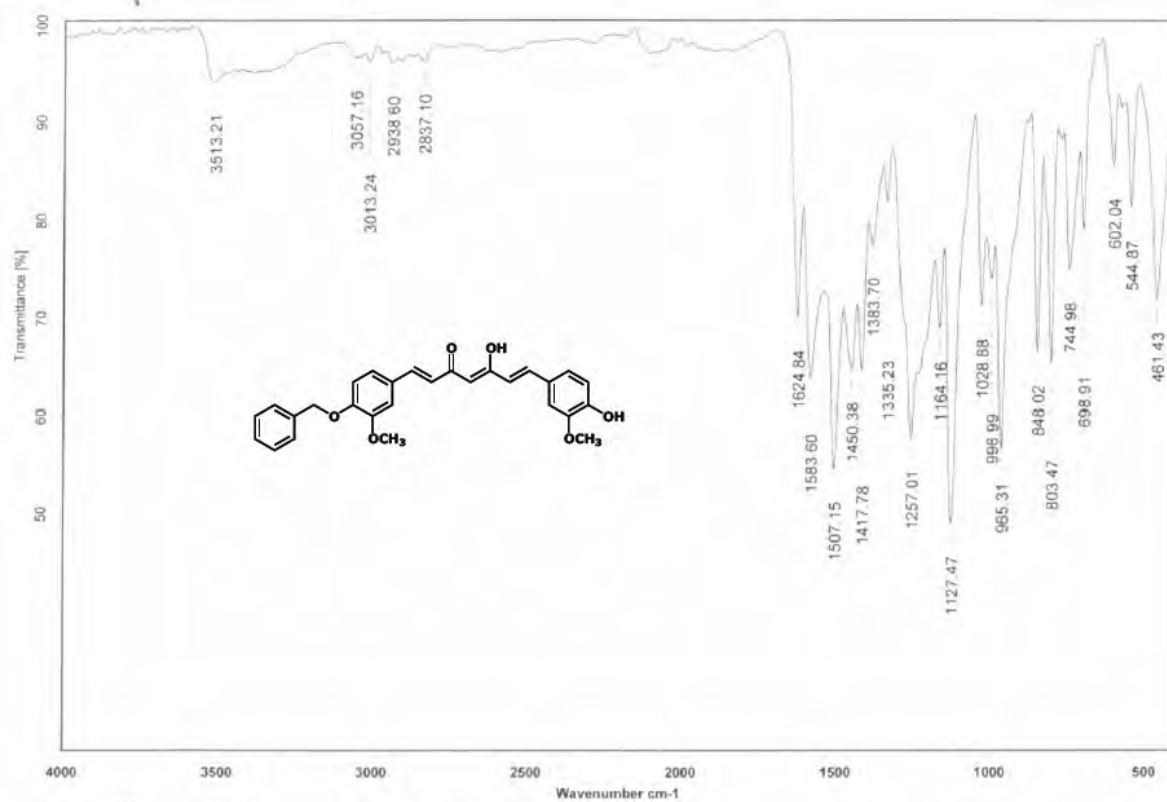


Figure S14. IR spectrum of compound 1

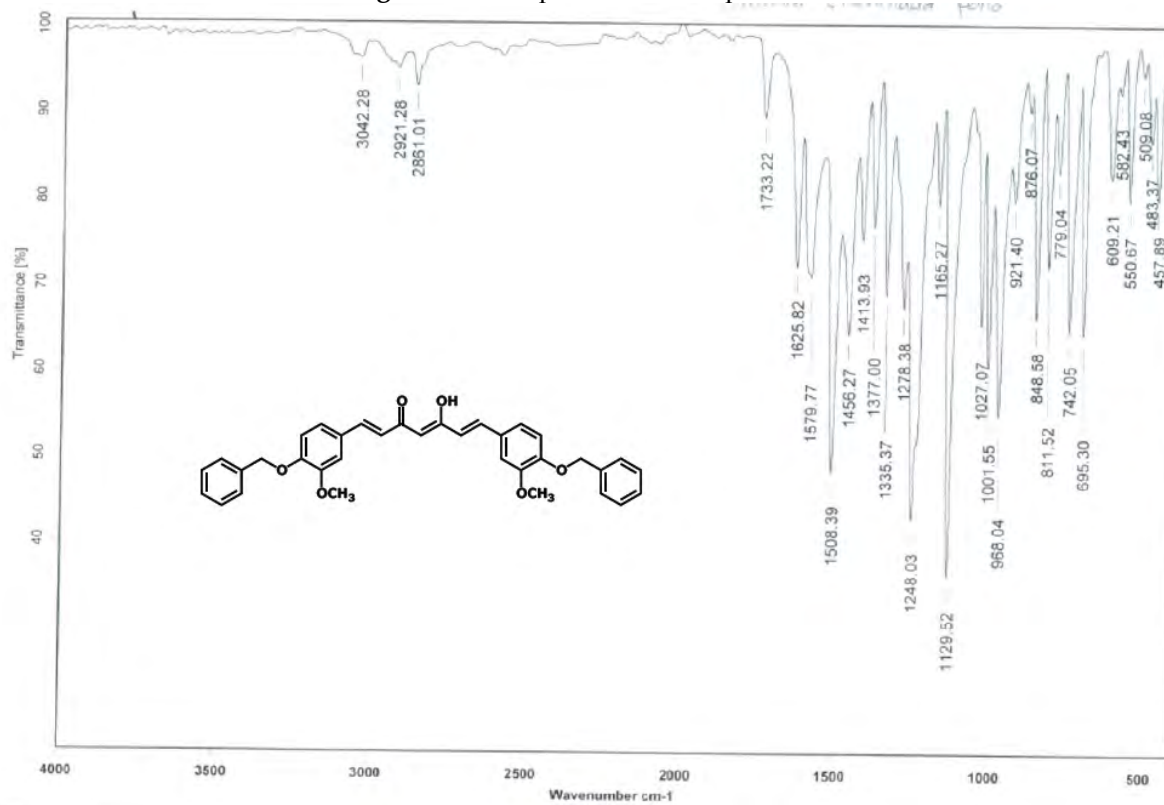


Figure S15. IR spectrum of compound 2

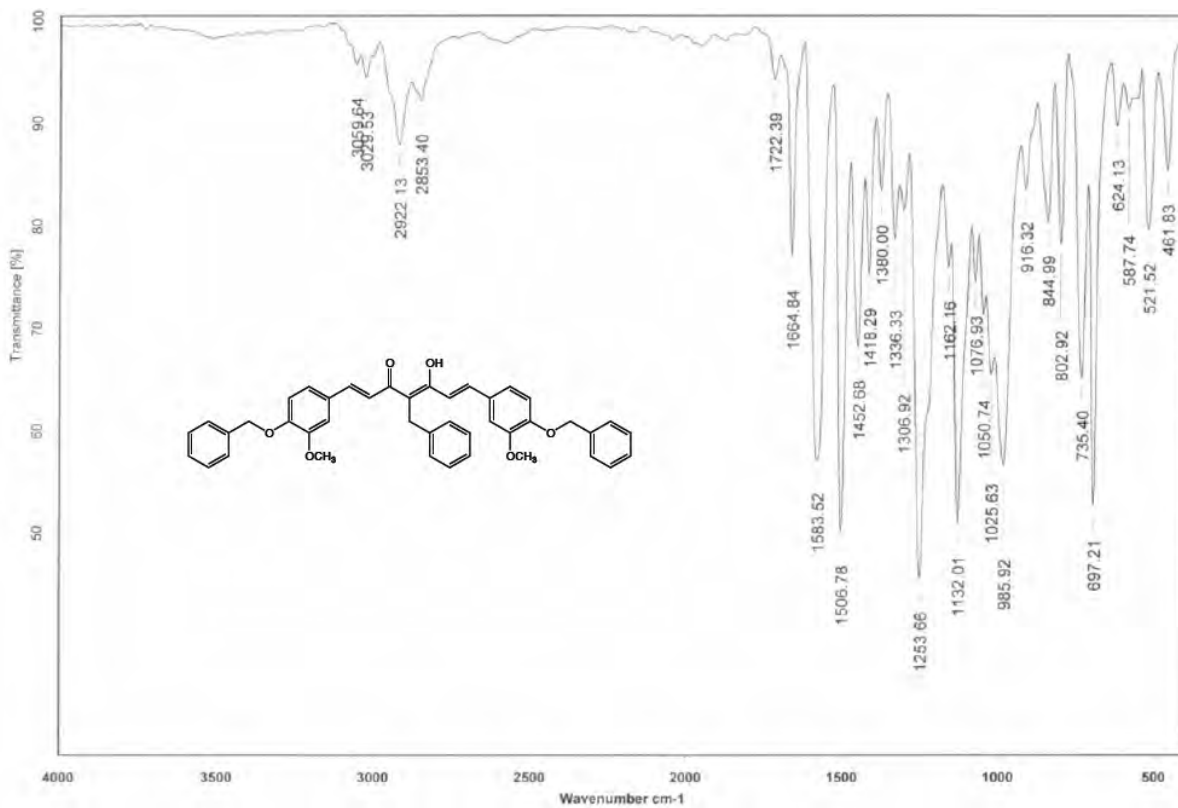


Figure S16. IR spectrum of compound 3

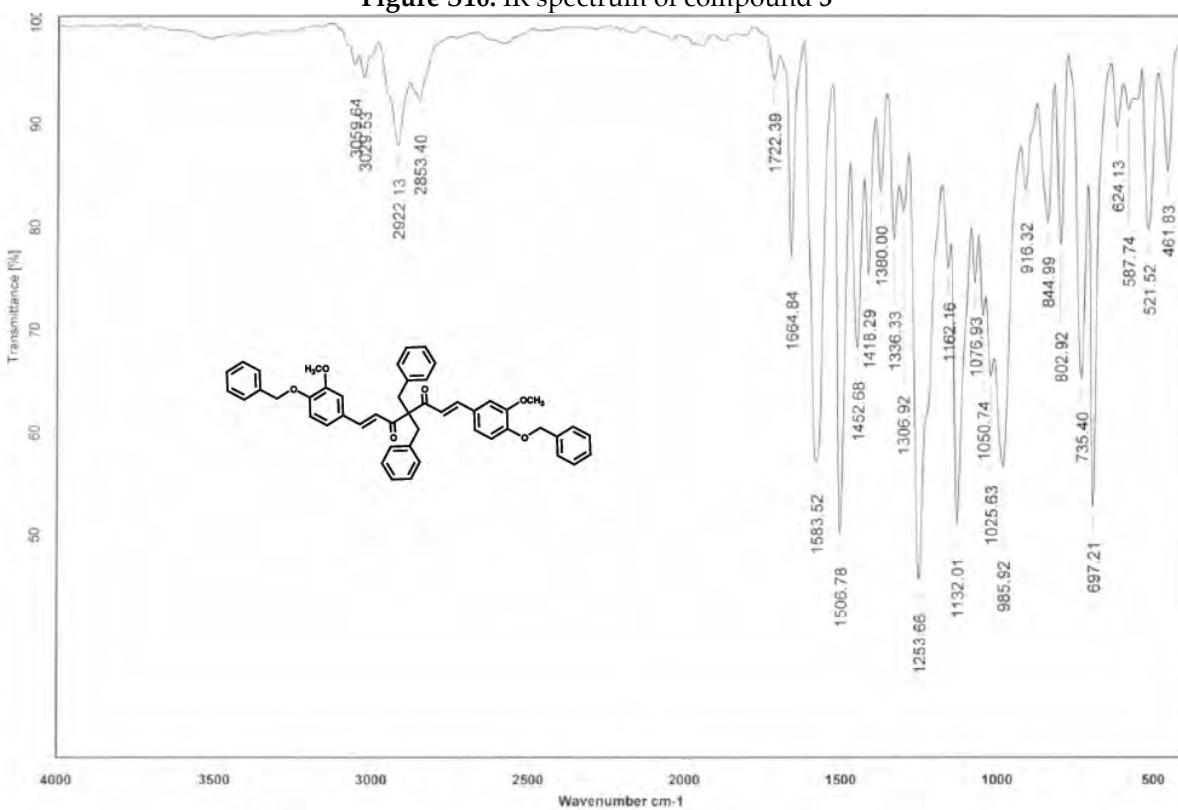


Figure S17. IR spectrum of compound 4

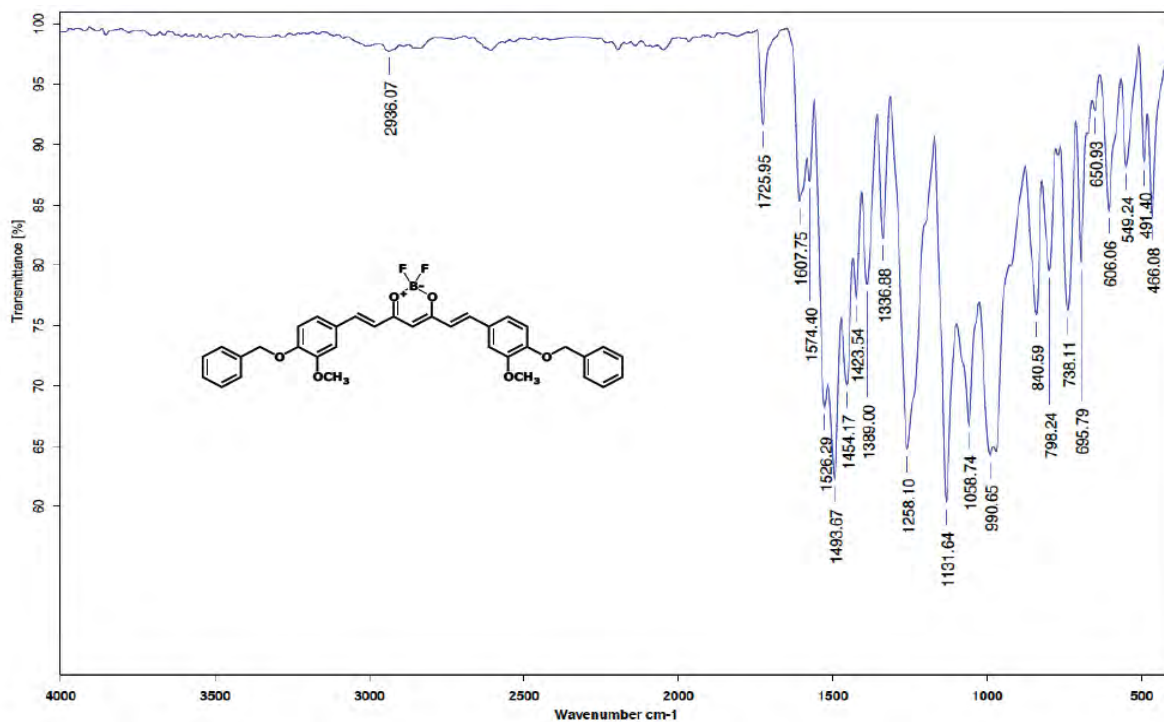


Figure S18. IR spectrum of compound 5

Mass spectra of compounds 1-5

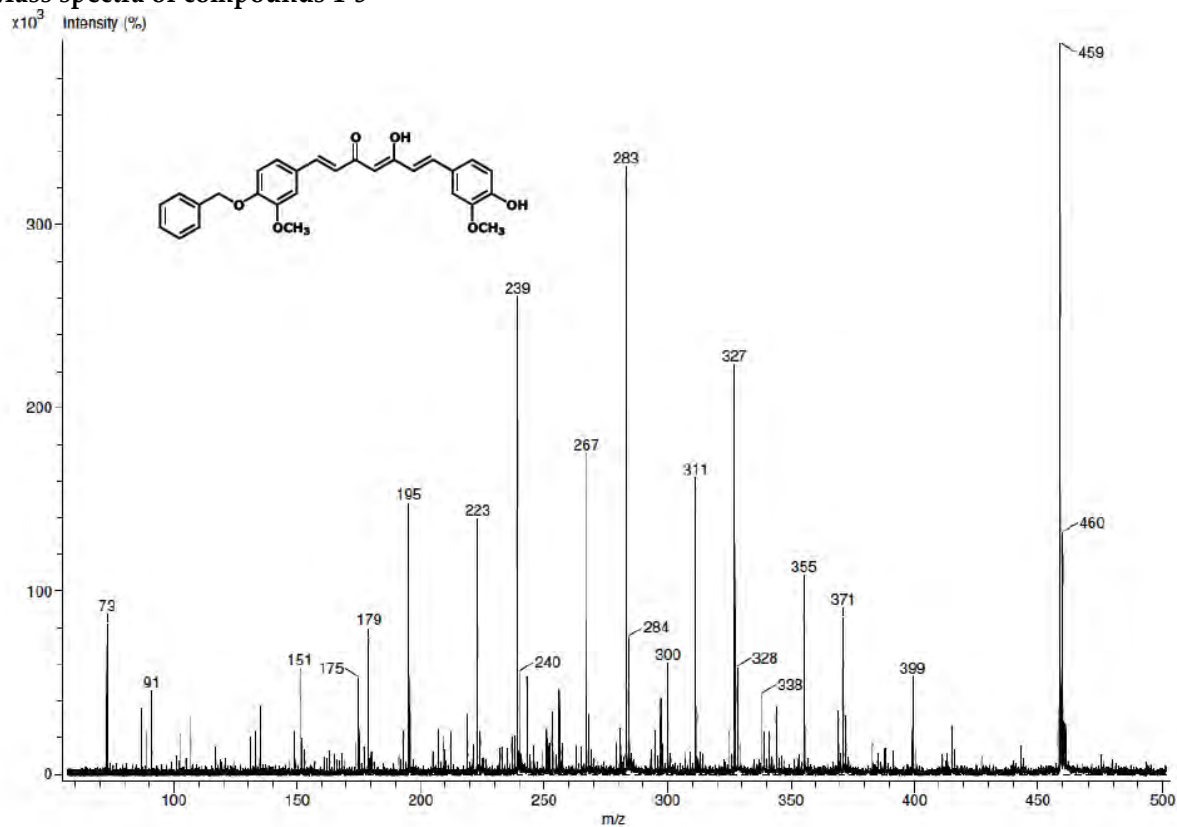


Figure S19. Mass spectrum of compound 1

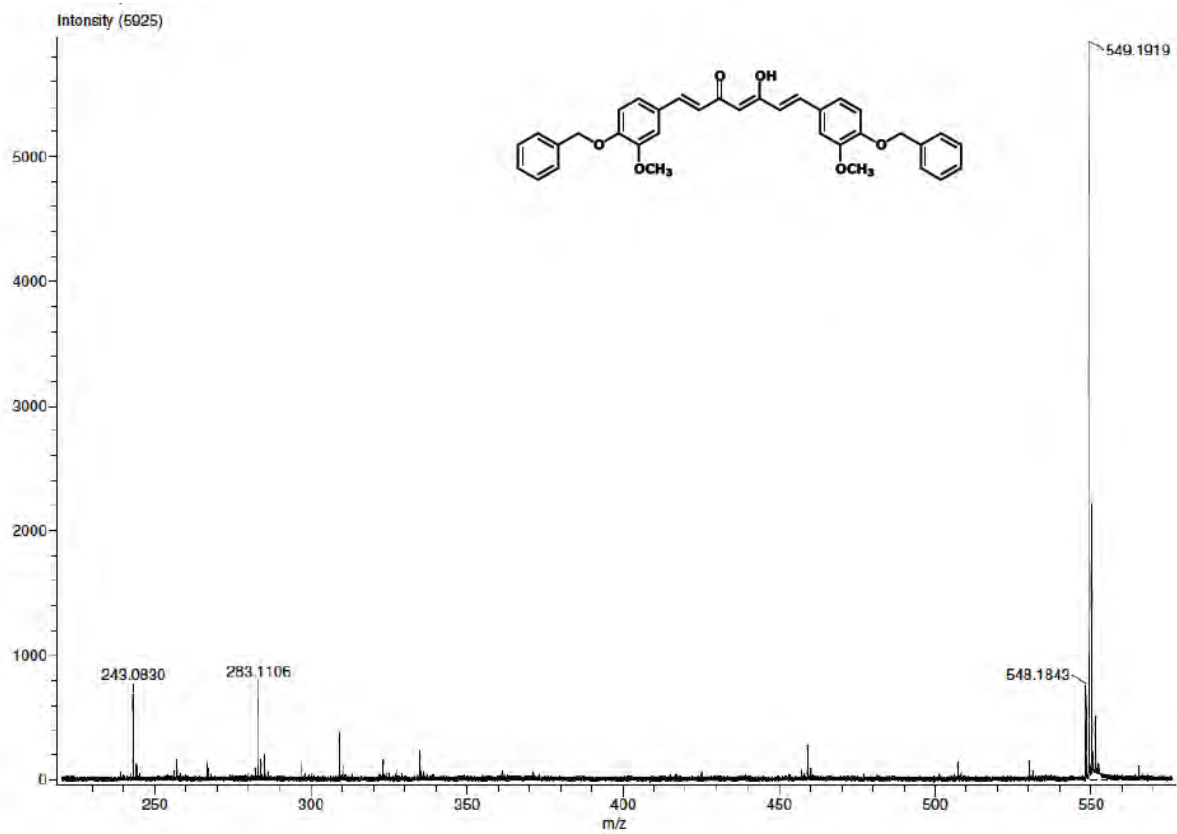


Figure S20. Mass spectrum of compound 2

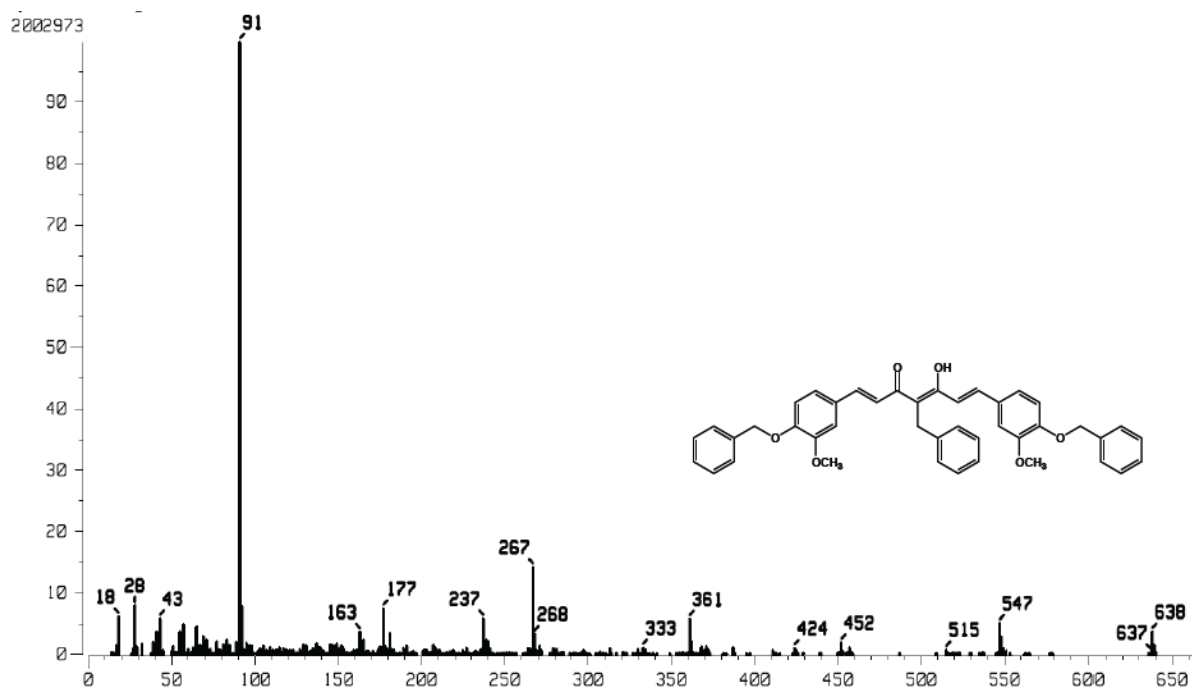


Figure S21. Mass spectrum of compound 3

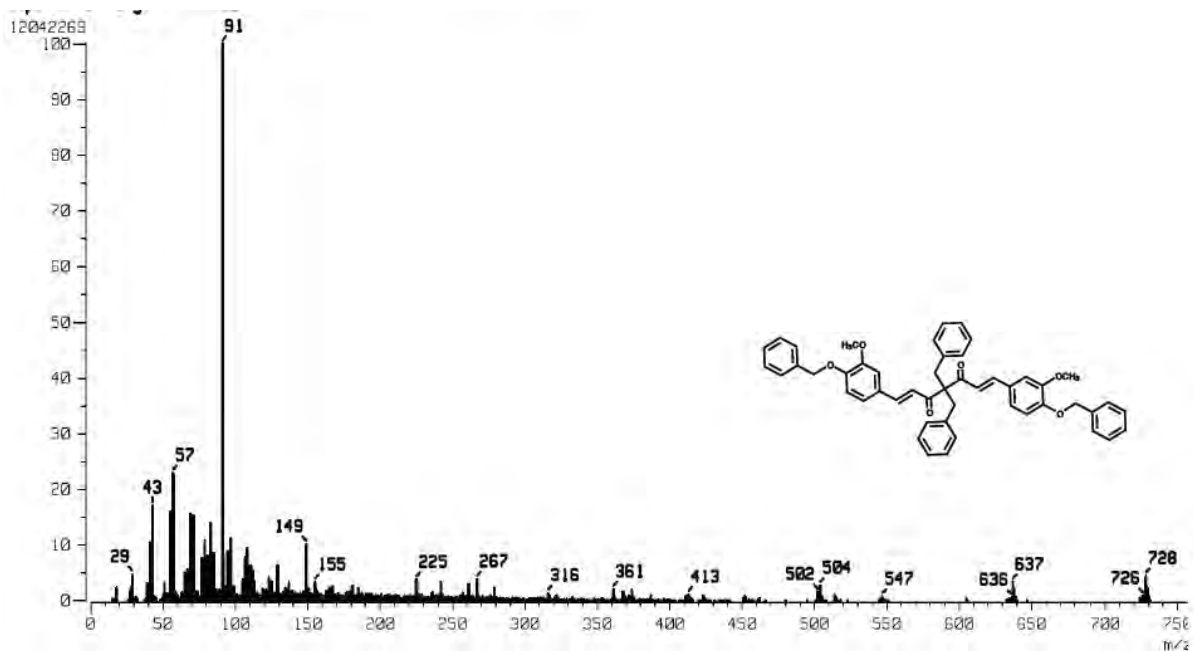


Figure S22. Mass spectrum of compound 4

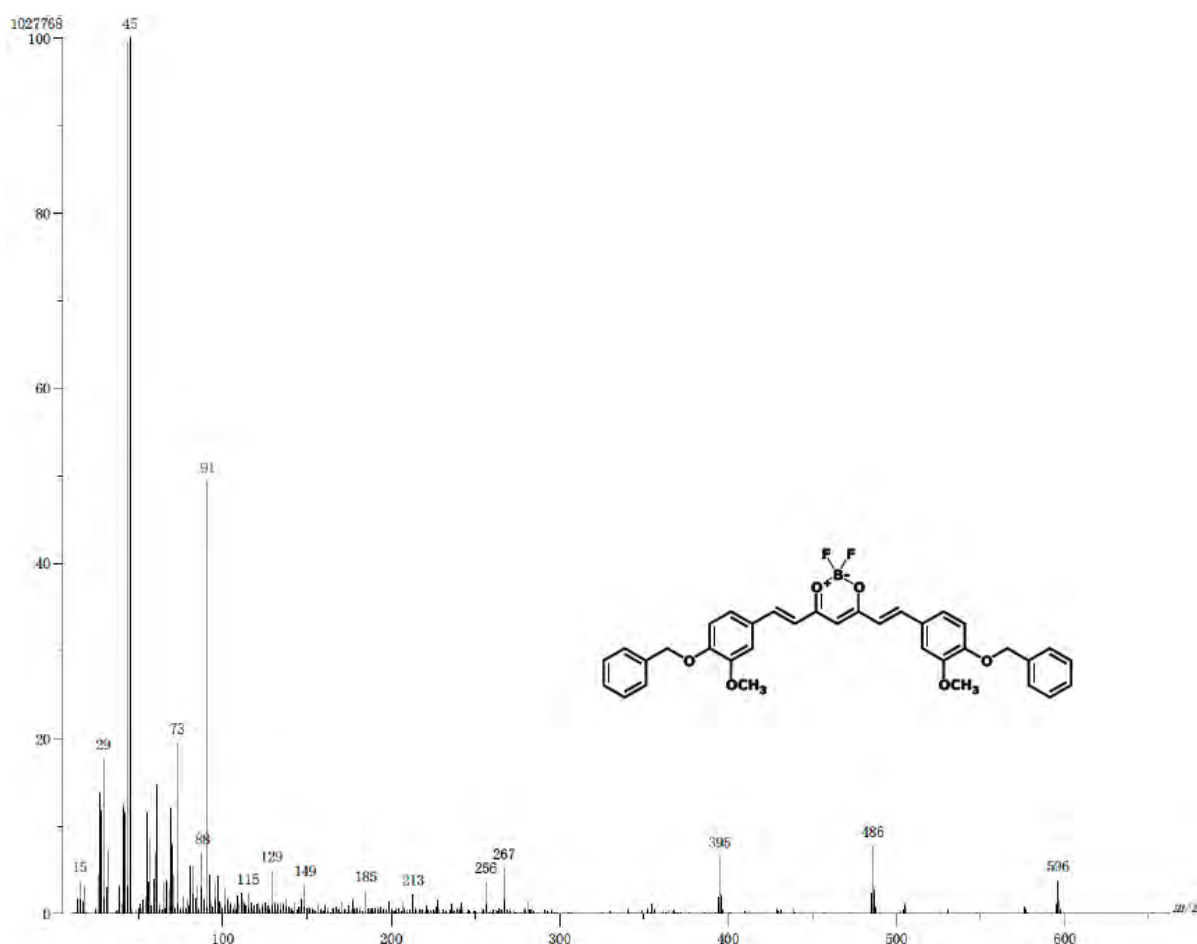


Figure S23. Mass spectrum of compound 5

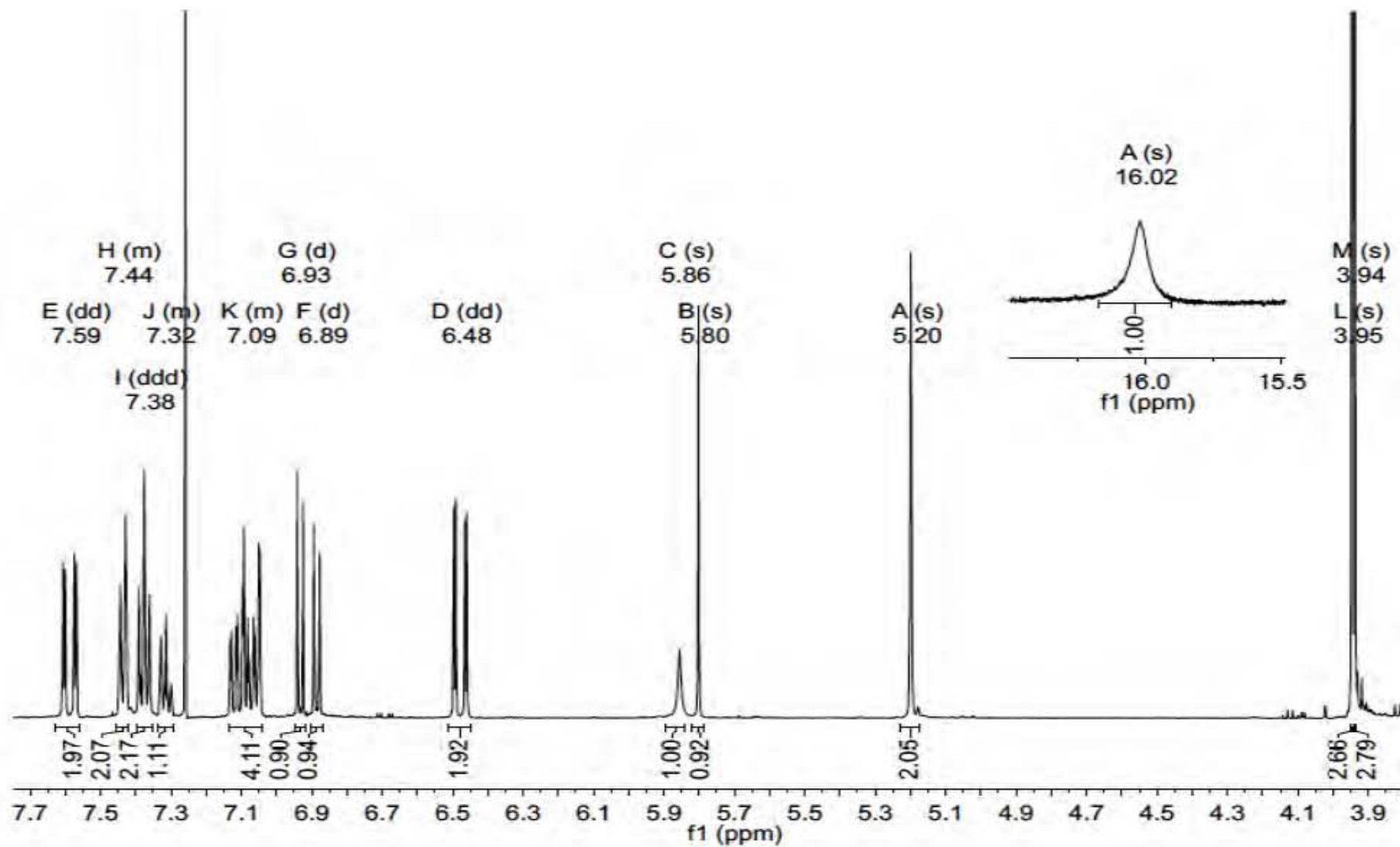


Figure S24. ^1H NMR spectrum of compound 1 (CDCl_3 - 500MHz)

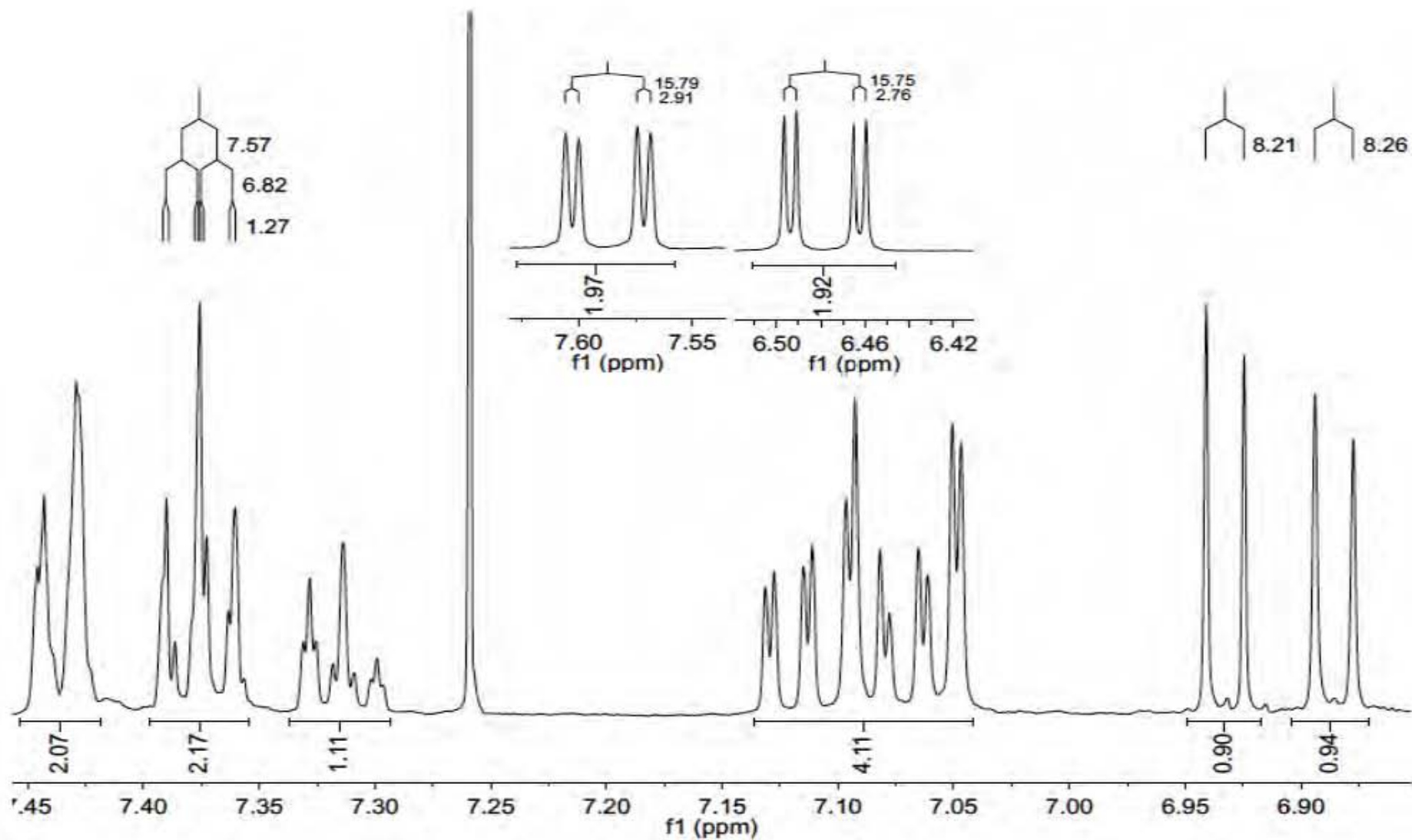


Figure S25. ^1H NMR spectrum of compound 1 aromatic section (CDCl_3 - 500MHz)

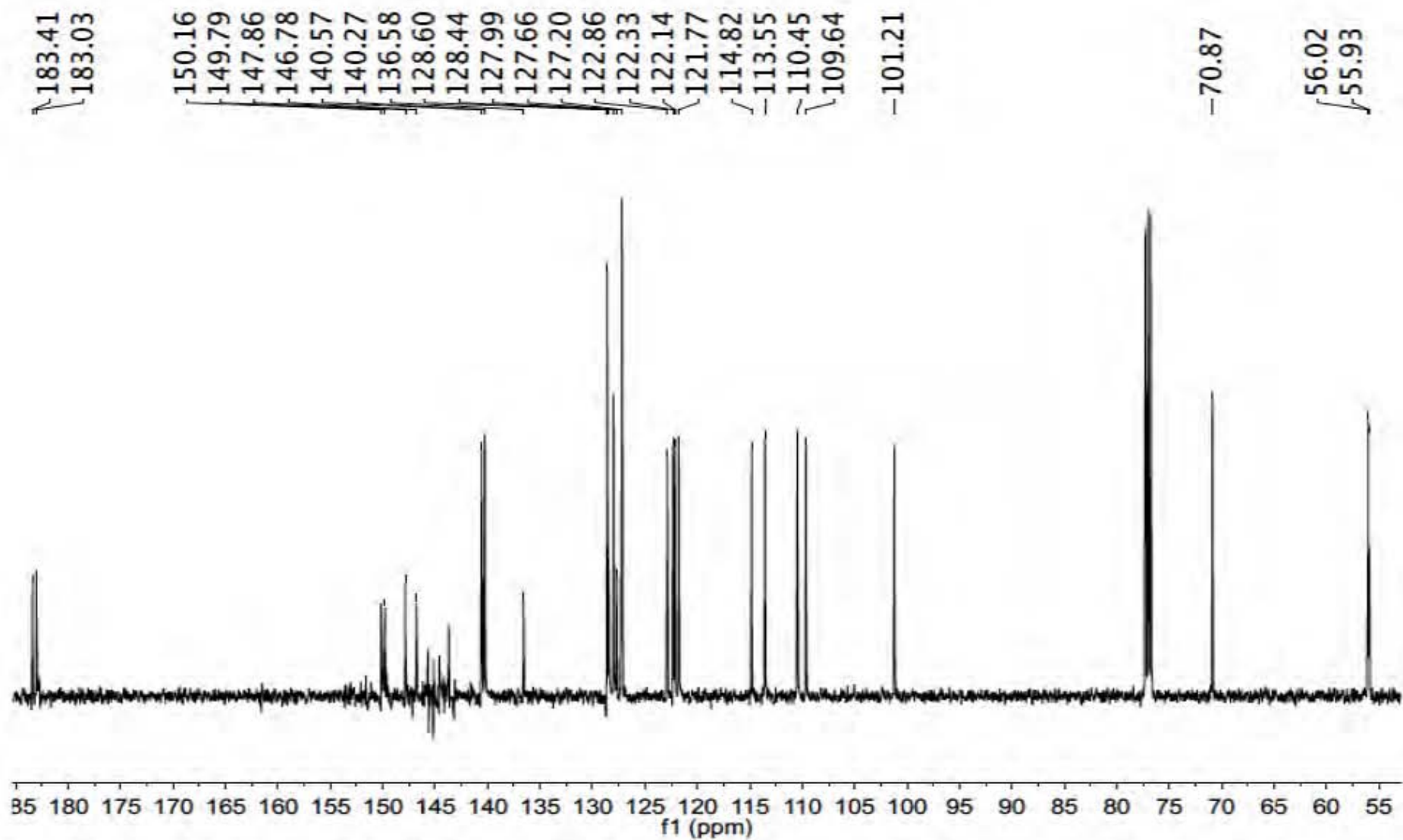


Figure S26. ¹³C NMR spectrum of compound 1 (CDCl₃- 125MHz)

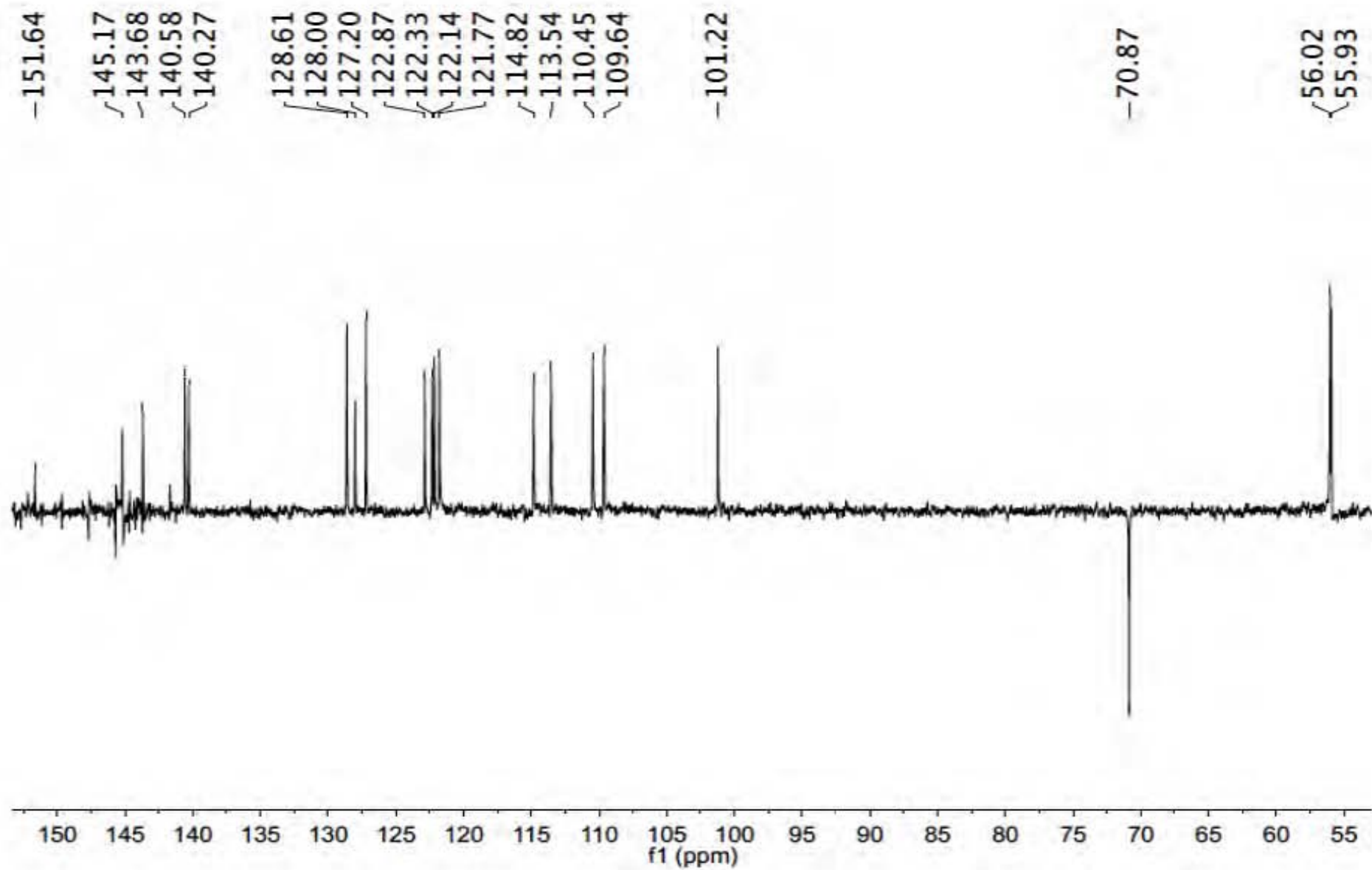


Figure S27. DEPT-135 spectrum of compound 1 (CDCl₃)

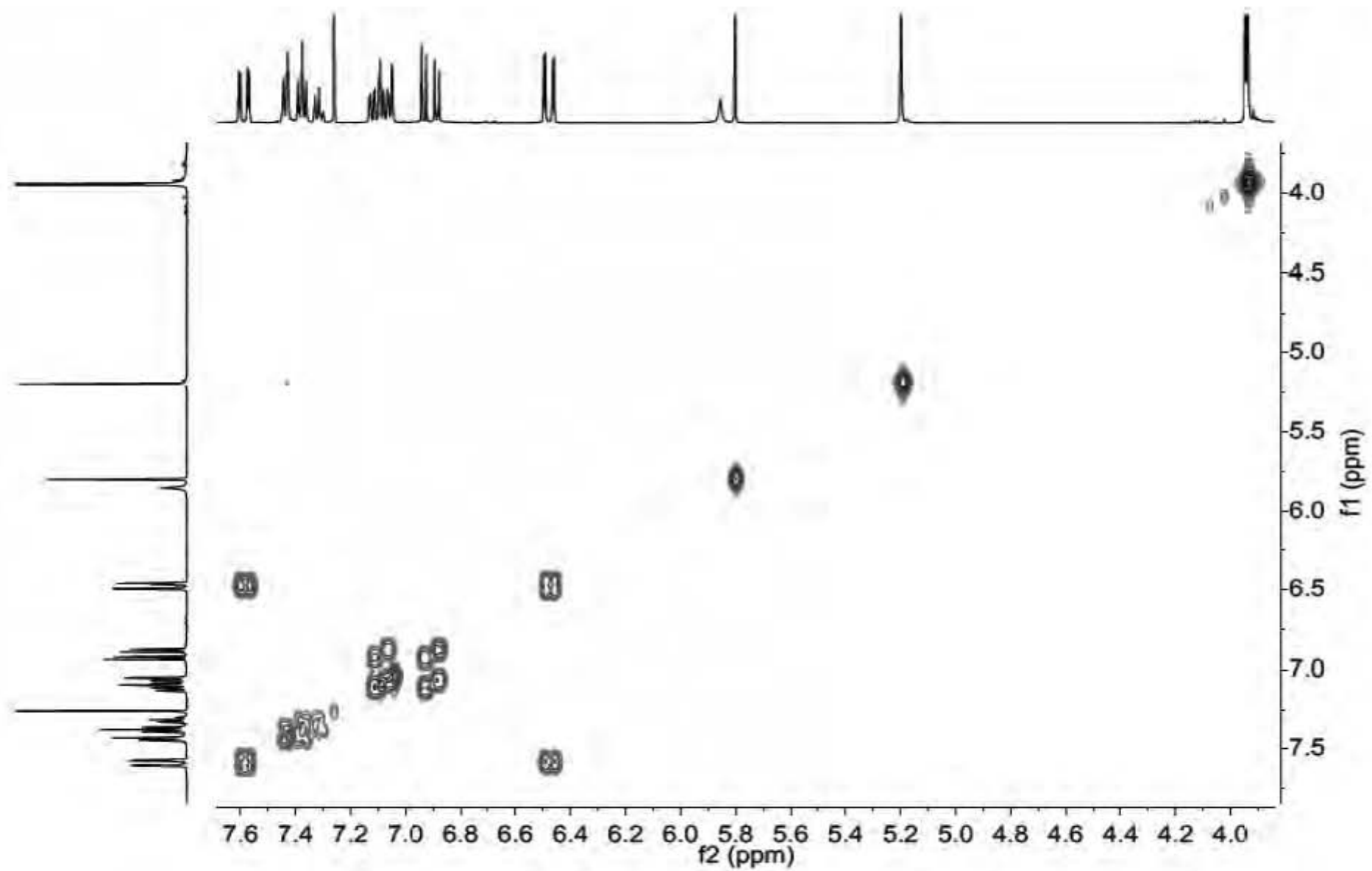


Figure S28. COSY spectrum of compound 1 (CDCl₃-500MHz)

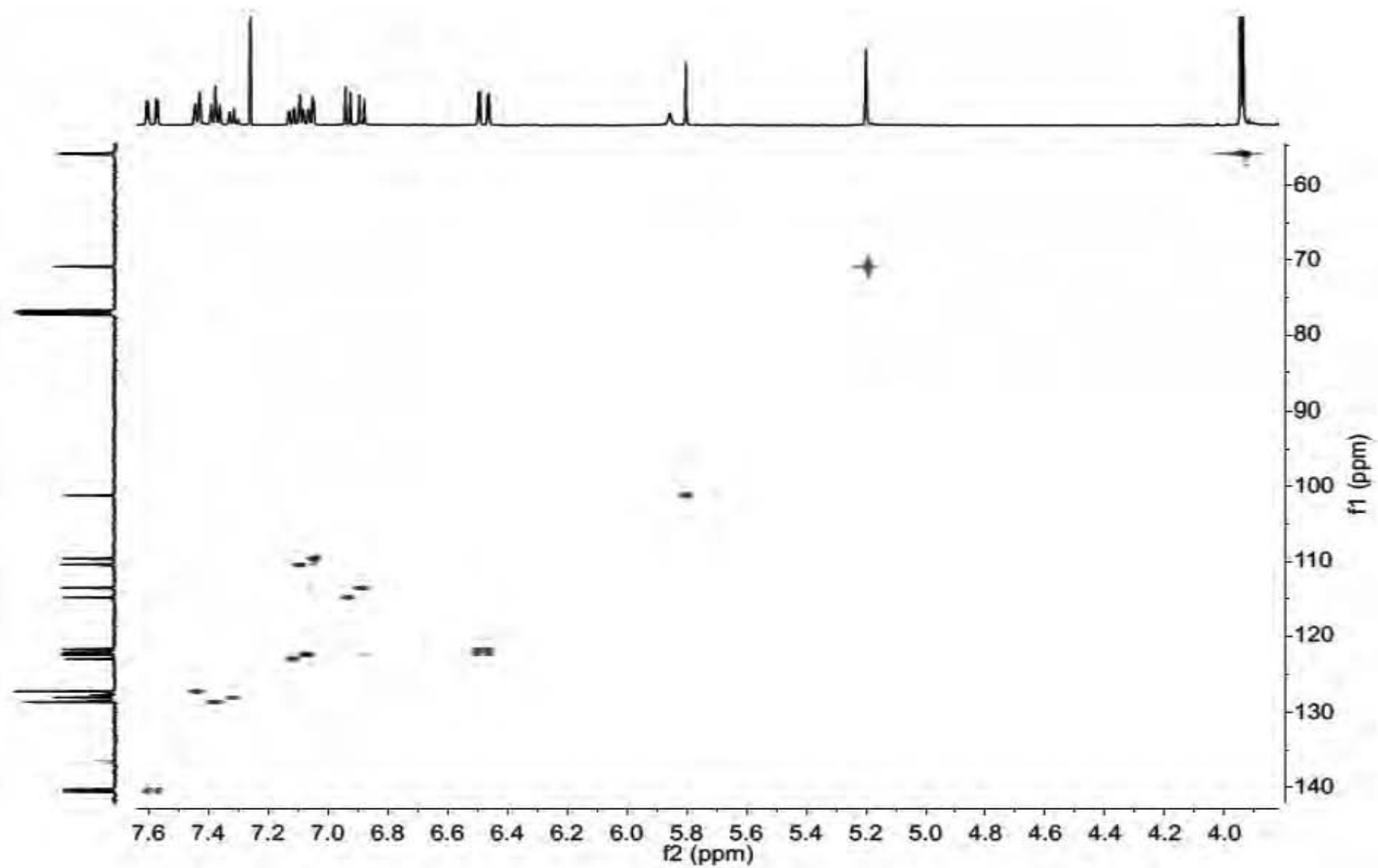


Figure S29. HSQC spectrum of compound 1 (CDCl₃-500MHz)

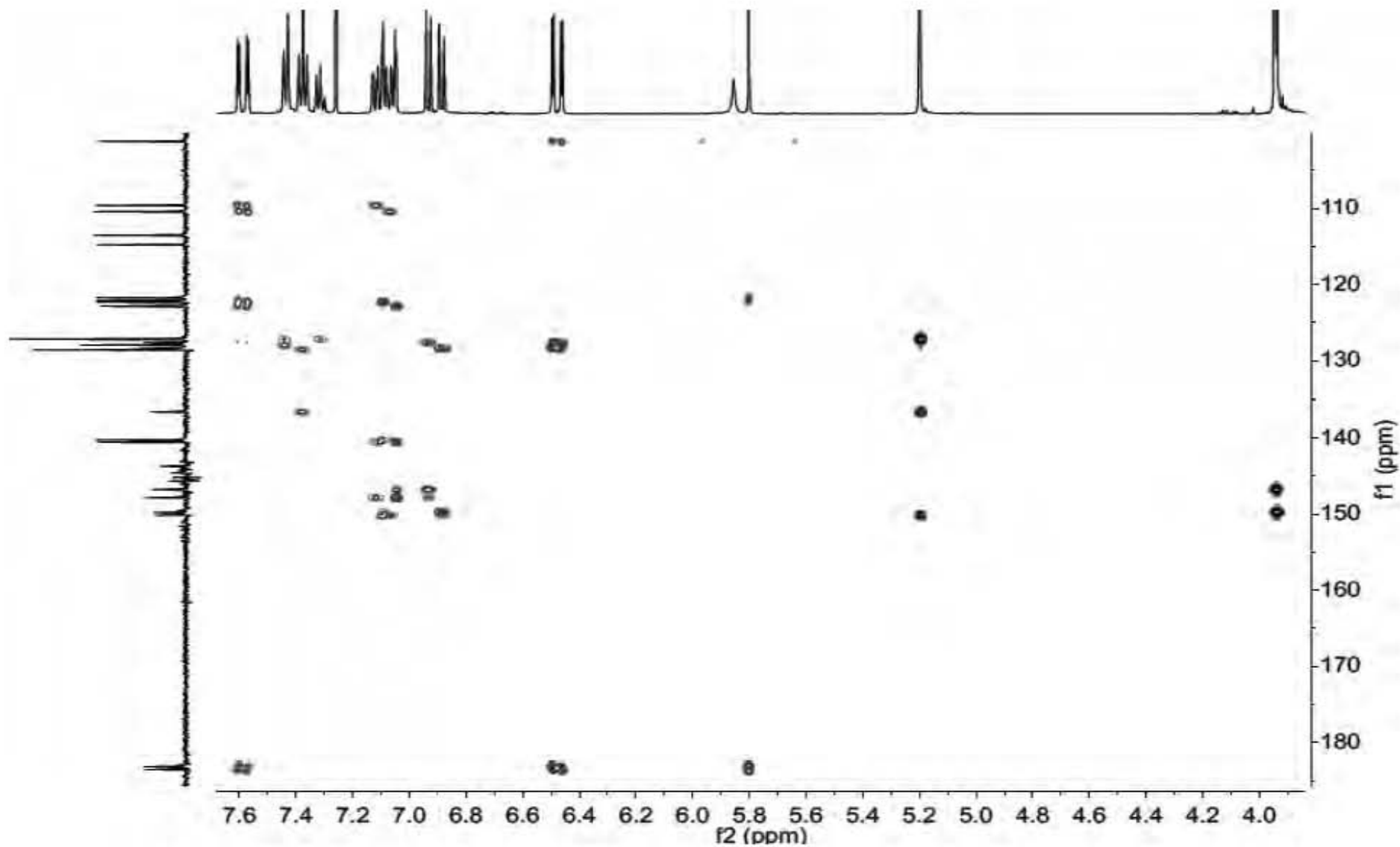


Figure S30. HMBC spectrum of compound 1 (CDCl₃-500MHz)

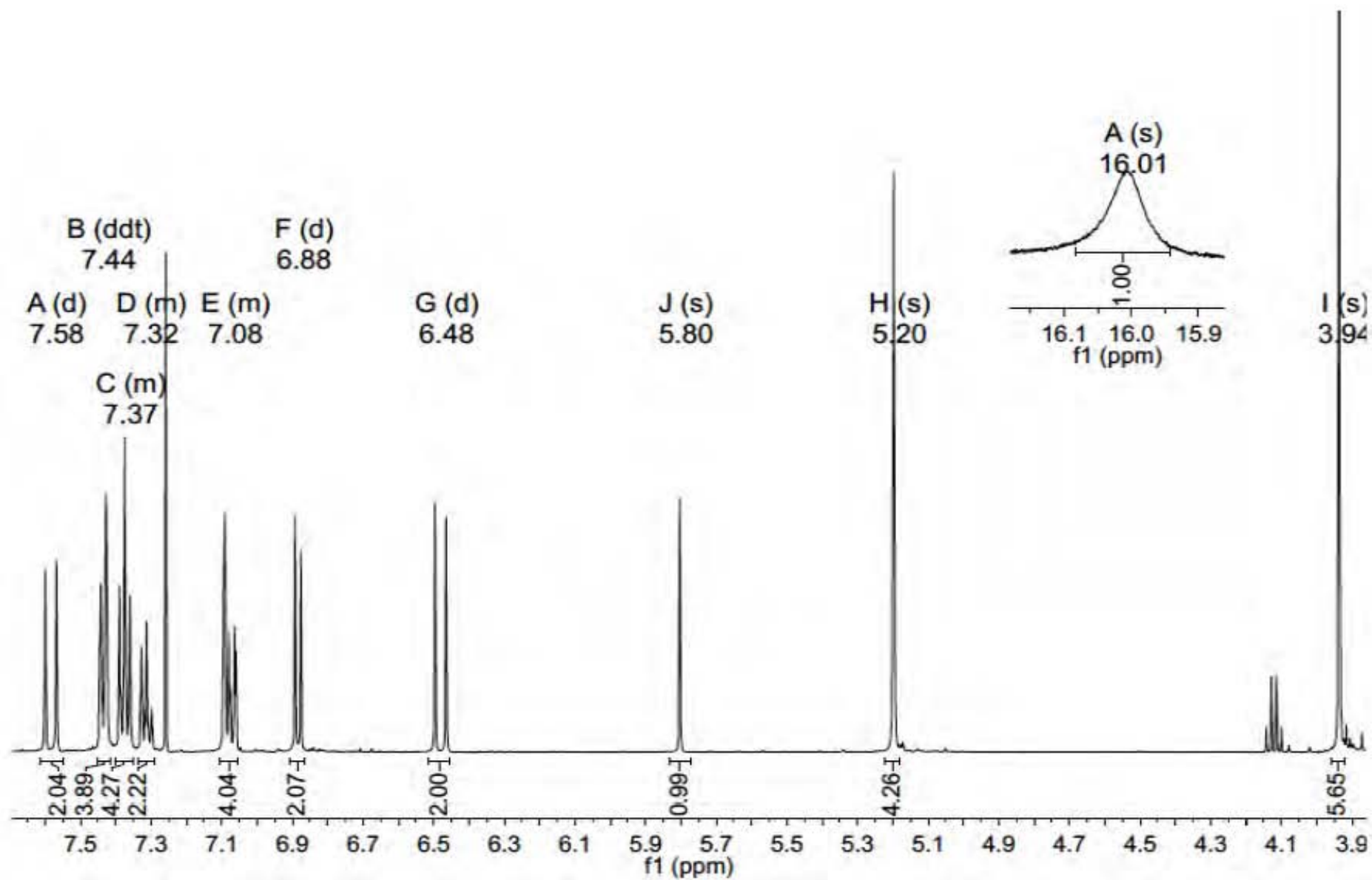


Figure S31. ¹H NMR spectrum of compound 2 (CDCl₃- 500MHz)

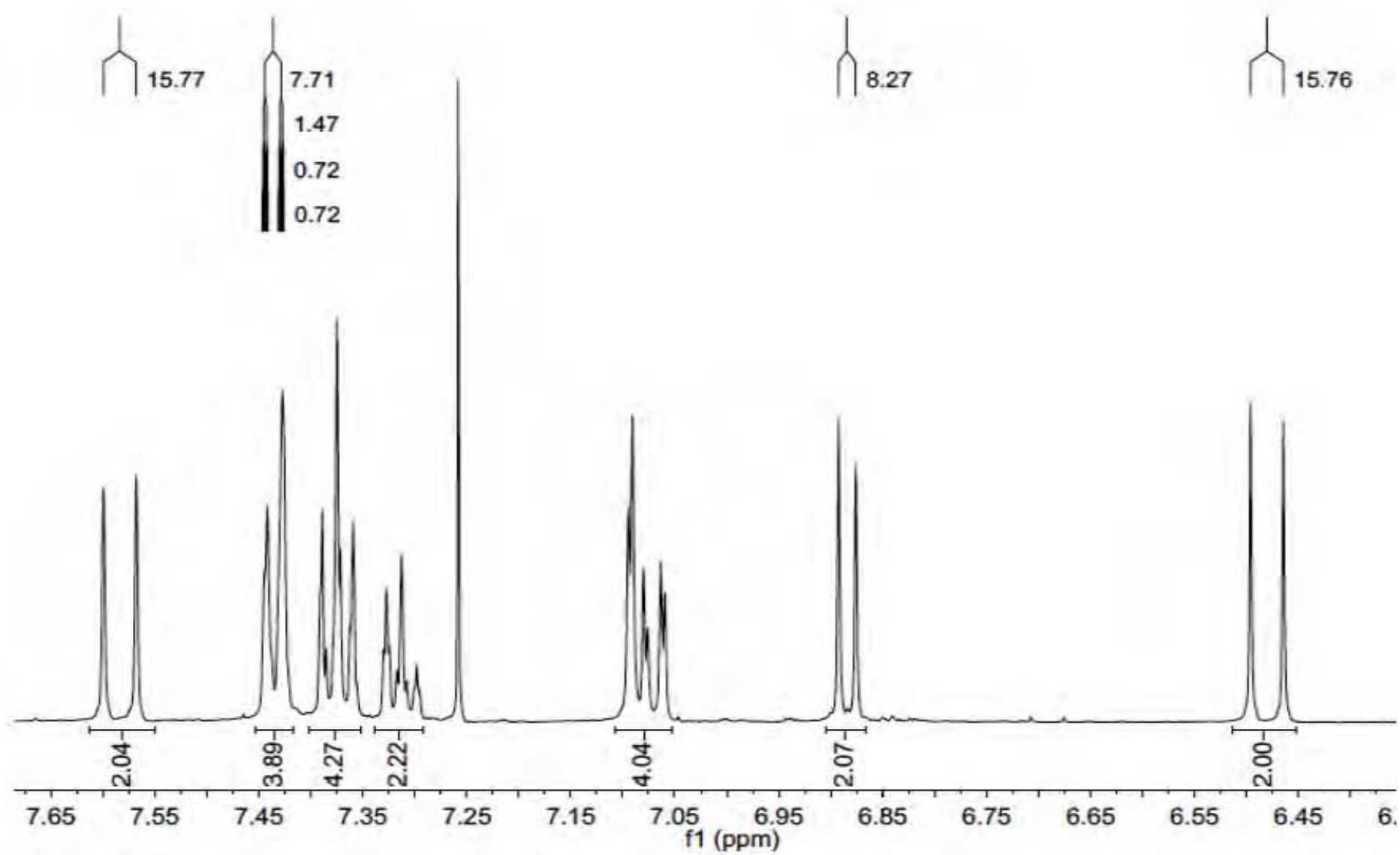


Figure S32. ¹H NMR spectrum of compound 2 aromatic section (CDCl₃- 500MHz)

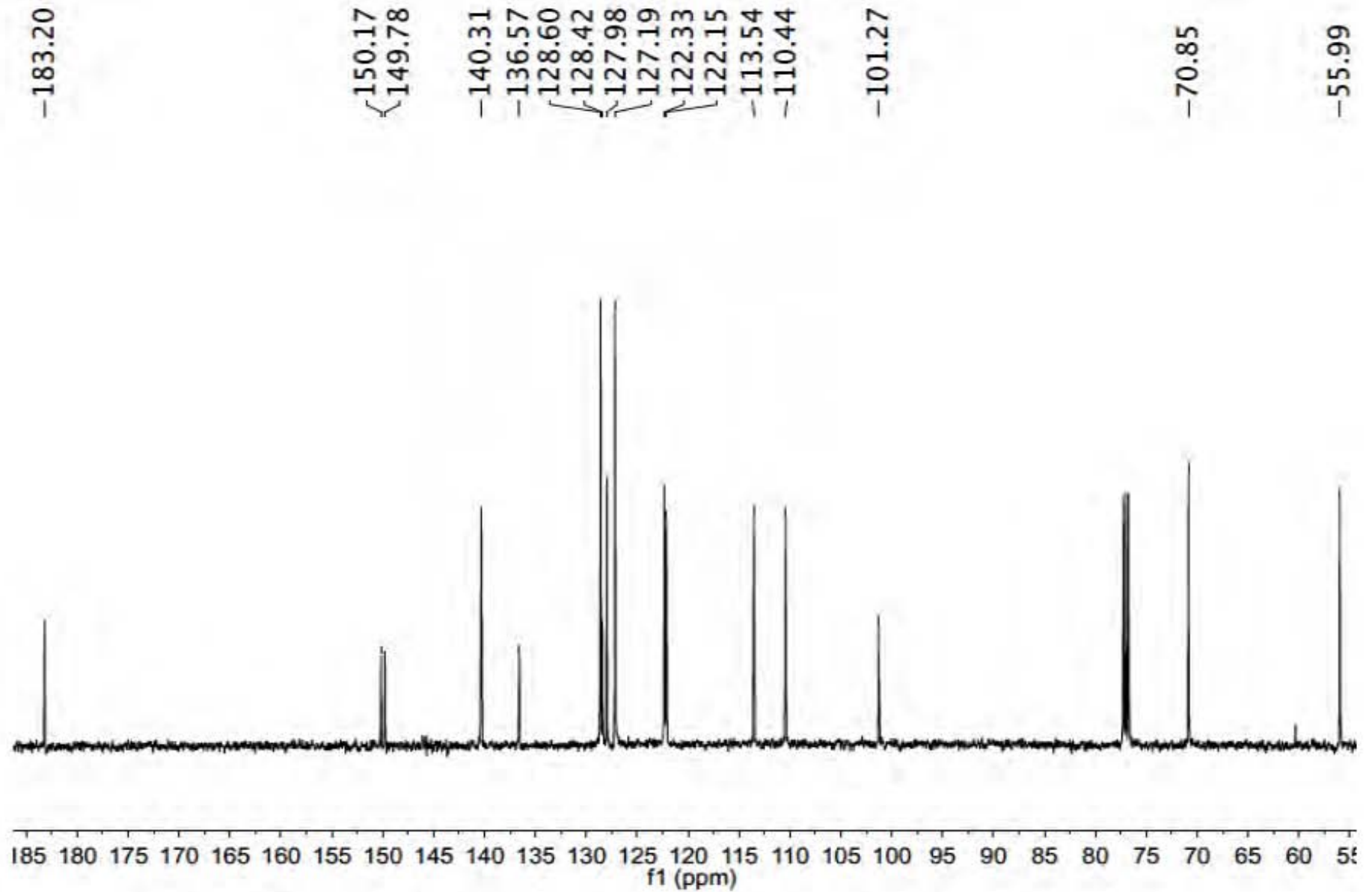


Figure S33. ¹³C NMR spectrum of compound 2 (CDCl₃- 125MHz)

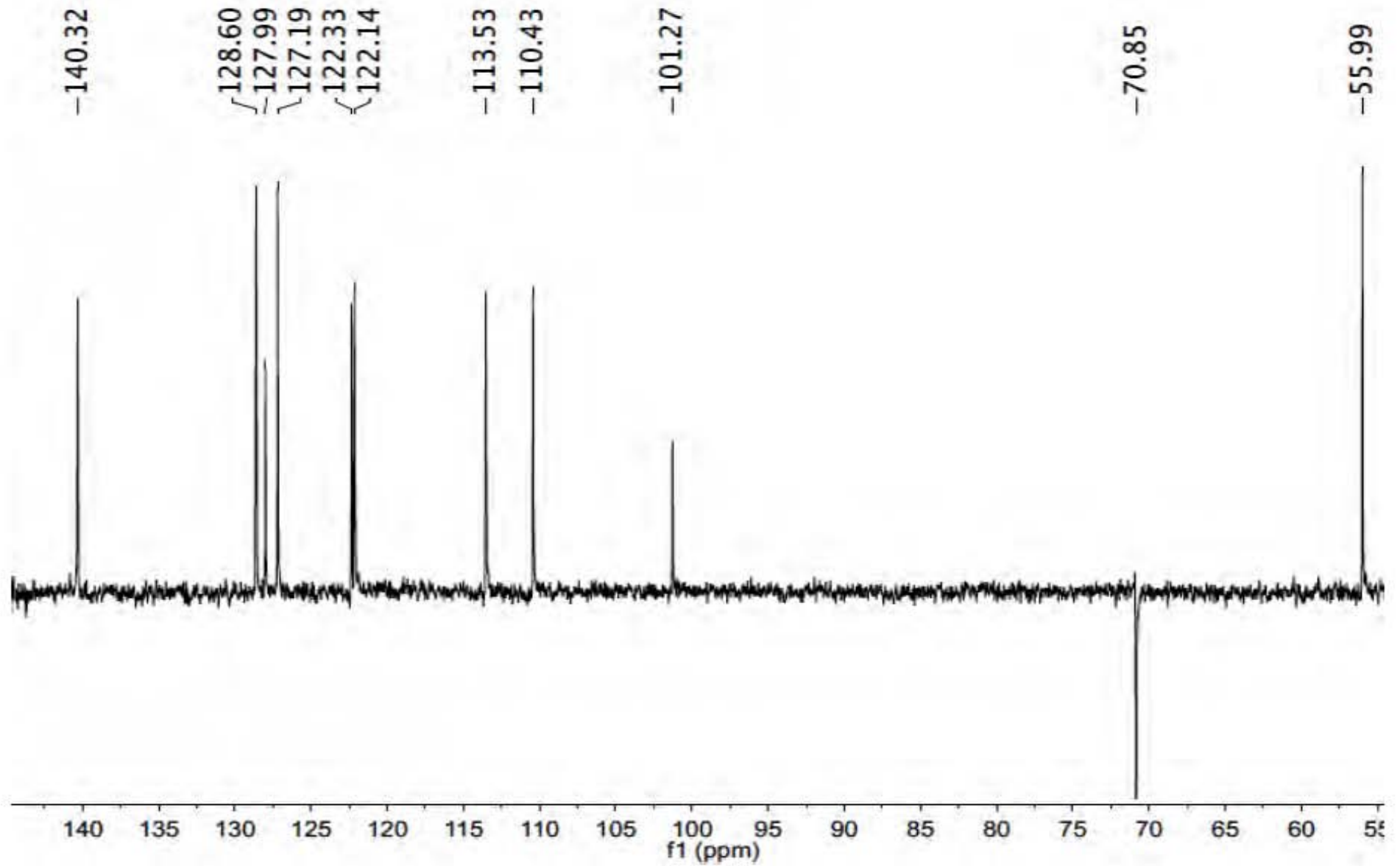
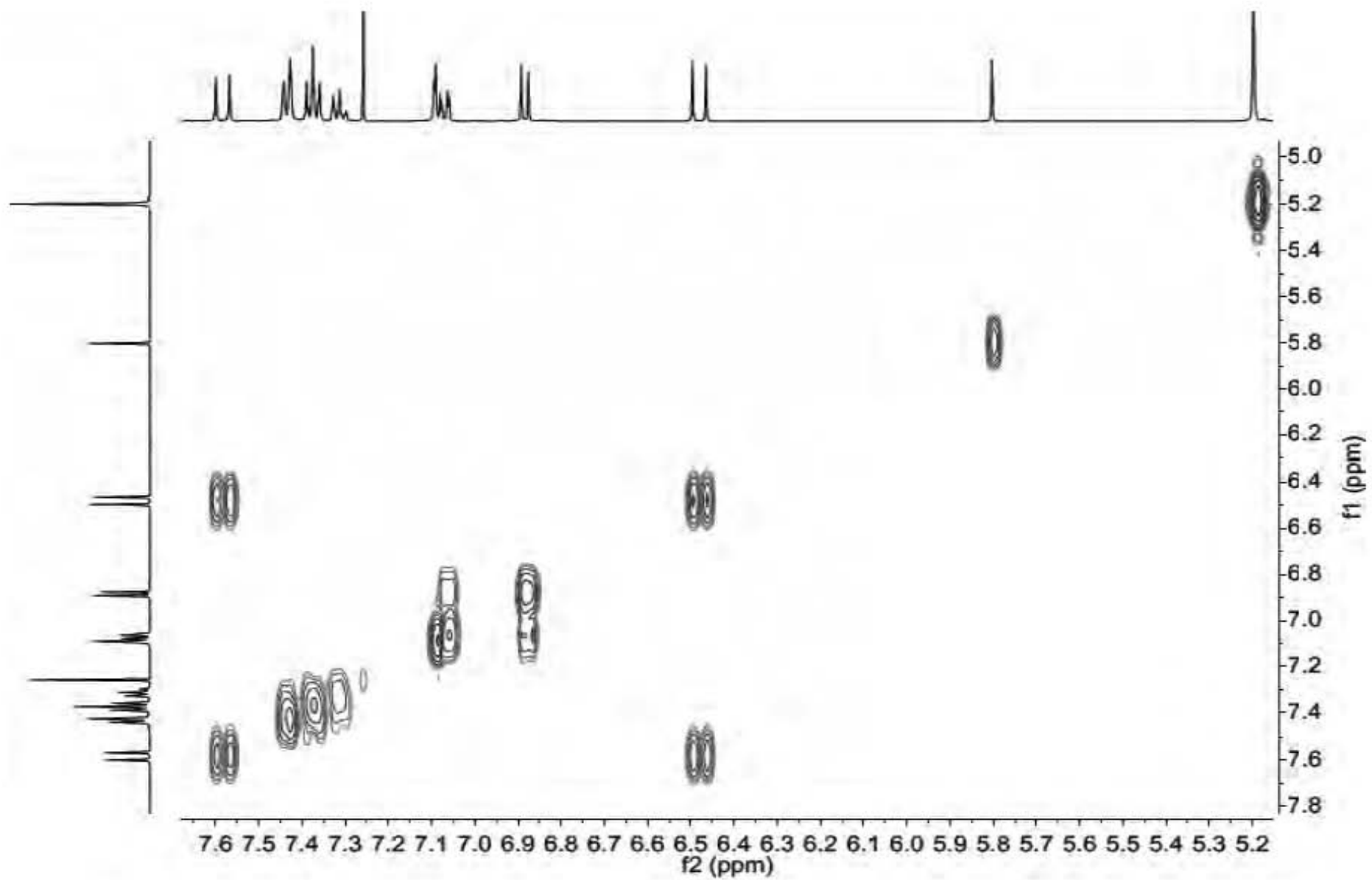


Figure S34. DEPT-135 spectrum of compound 2 (CDCl₃)



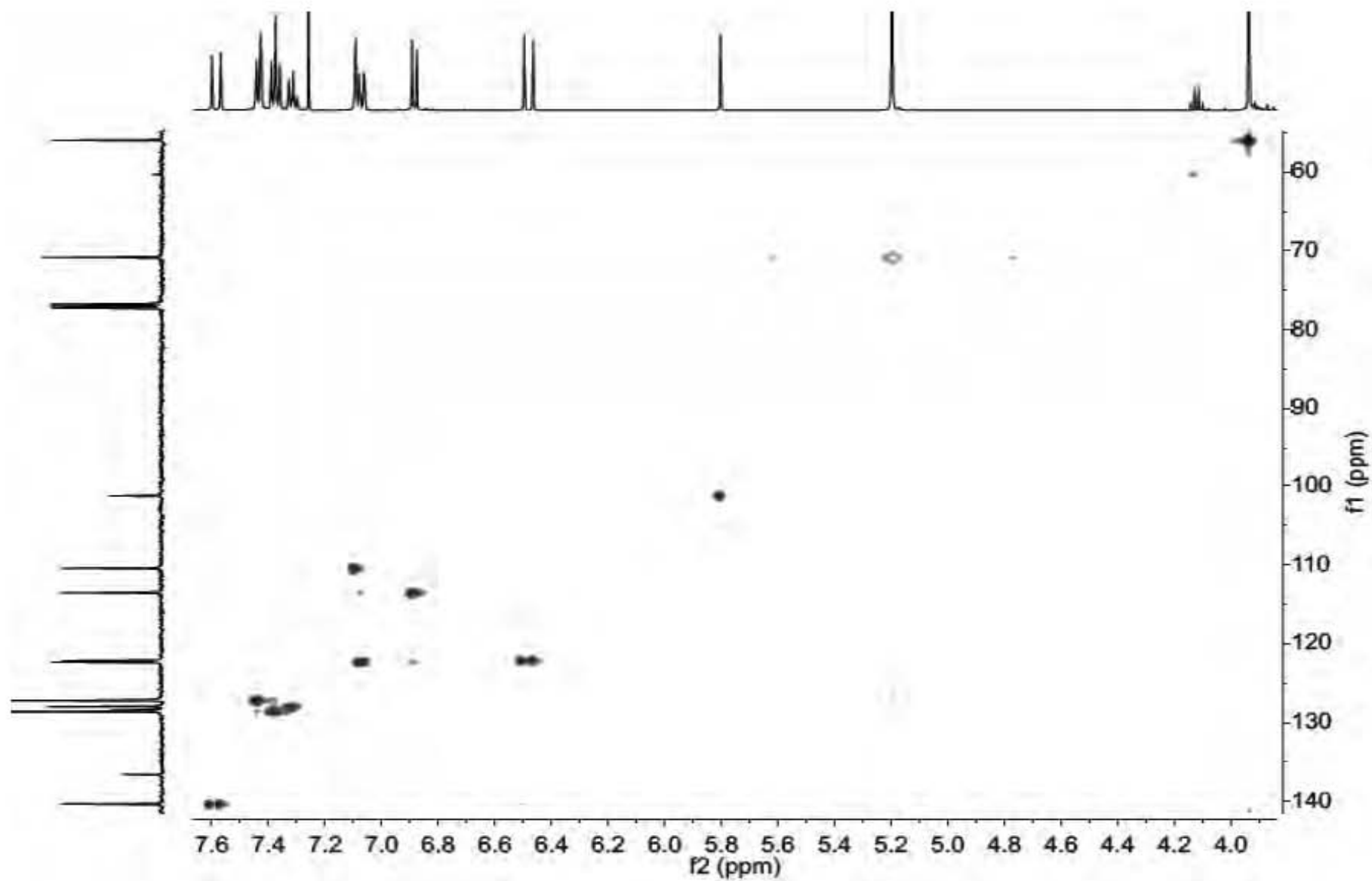


Figure S36. HSQC spectrum of compound 2 (CDCl₃-500MHz)

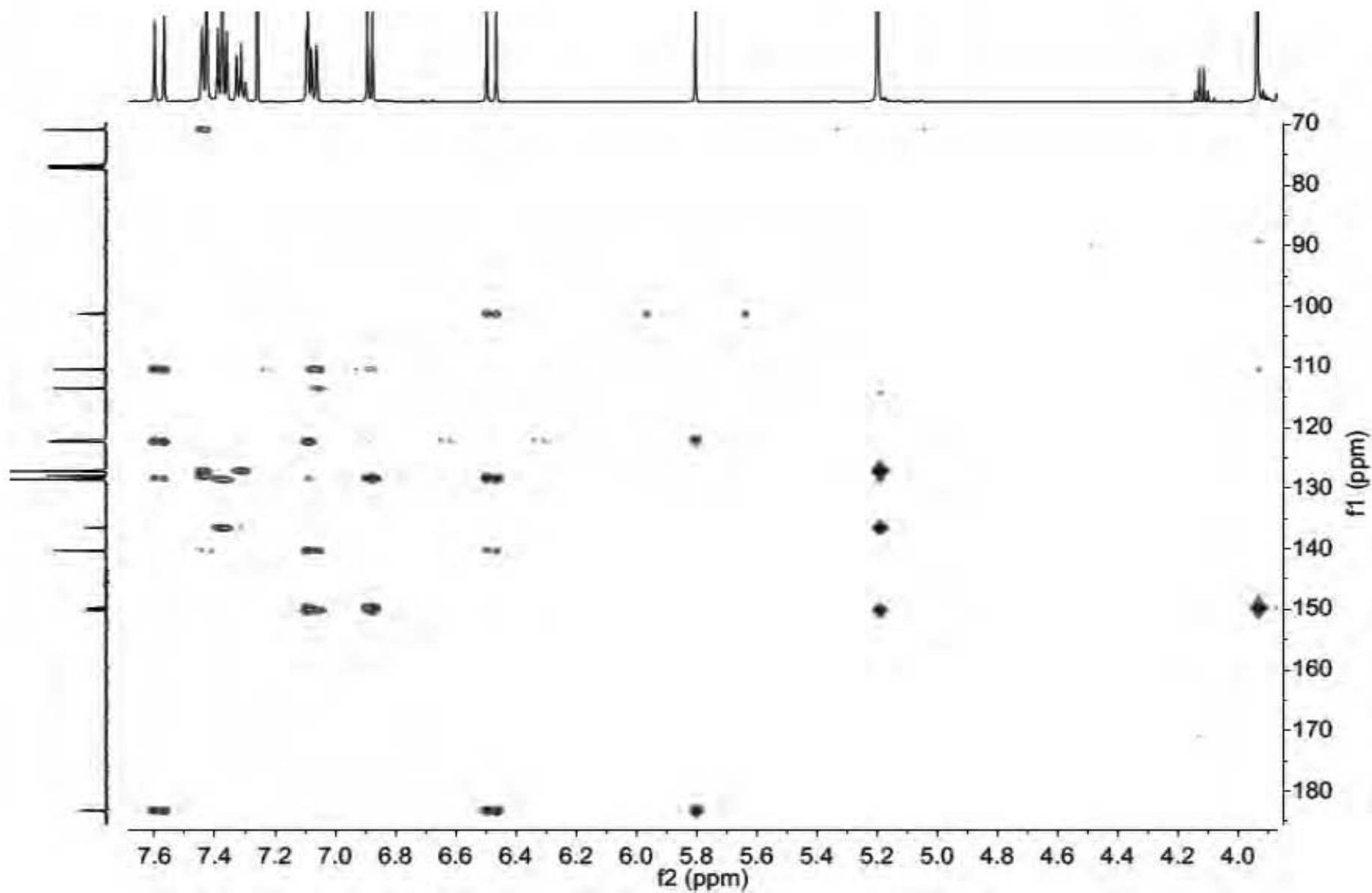


Figure S37. HMBC spectrum of compound 2 (CDCl₃-500MHz)

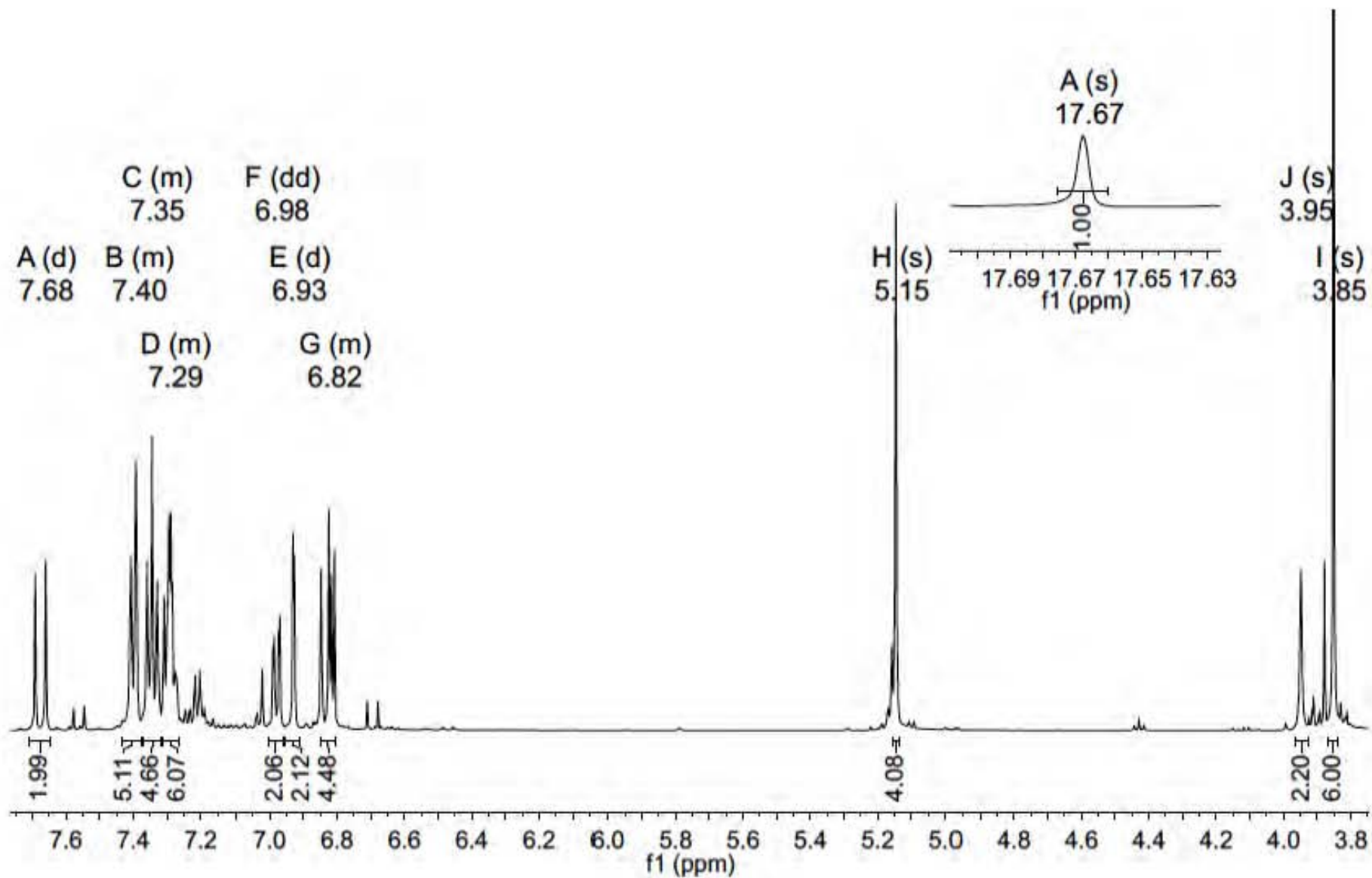


Figure S38. ^1H NMR spectrum of compound 3 (CDCl_3 - 500MHz)

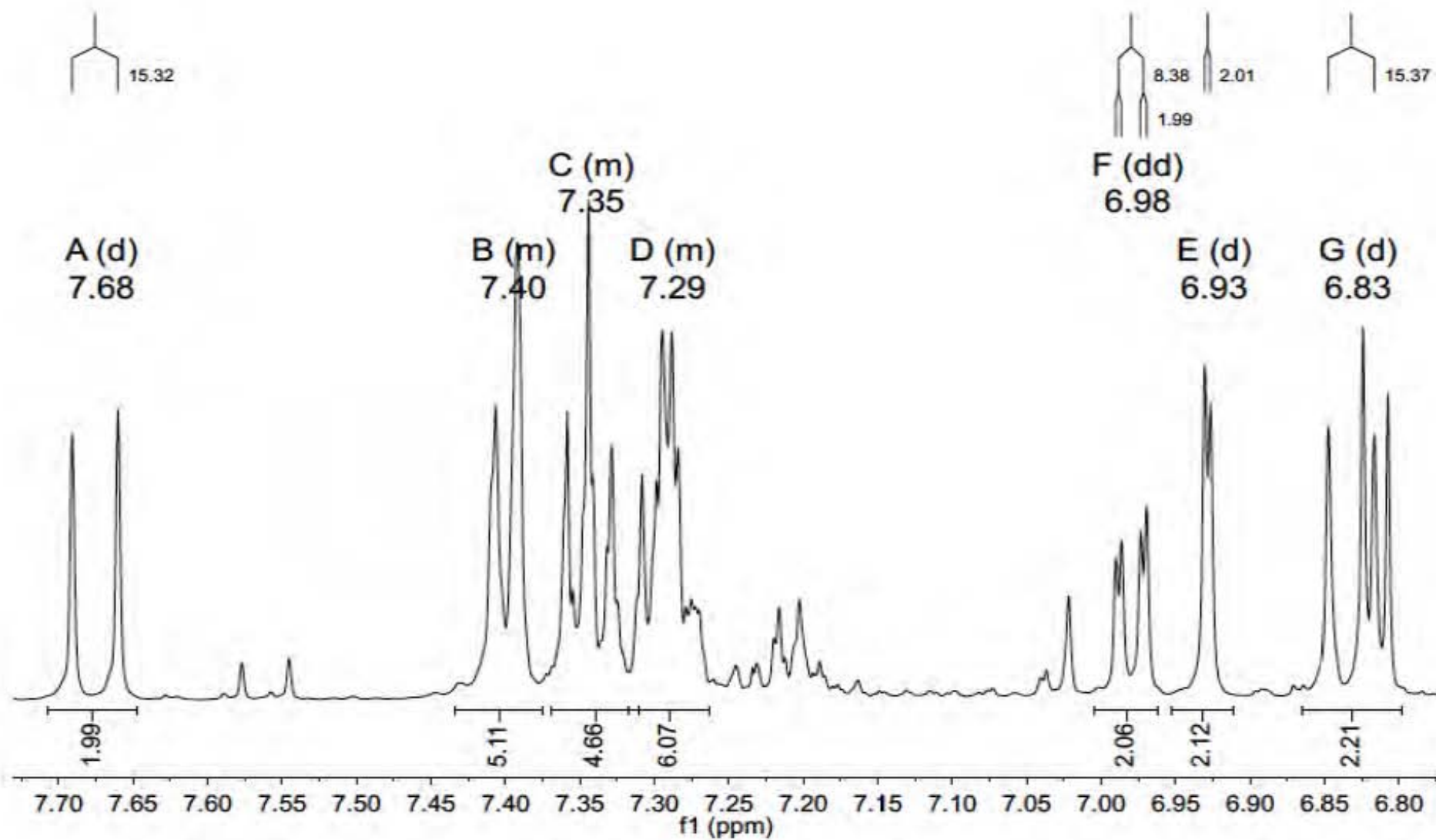


Figure S39. ^1H NMR spectrum of compound 3 aromatic section (CDCl_3 - 500MHz)

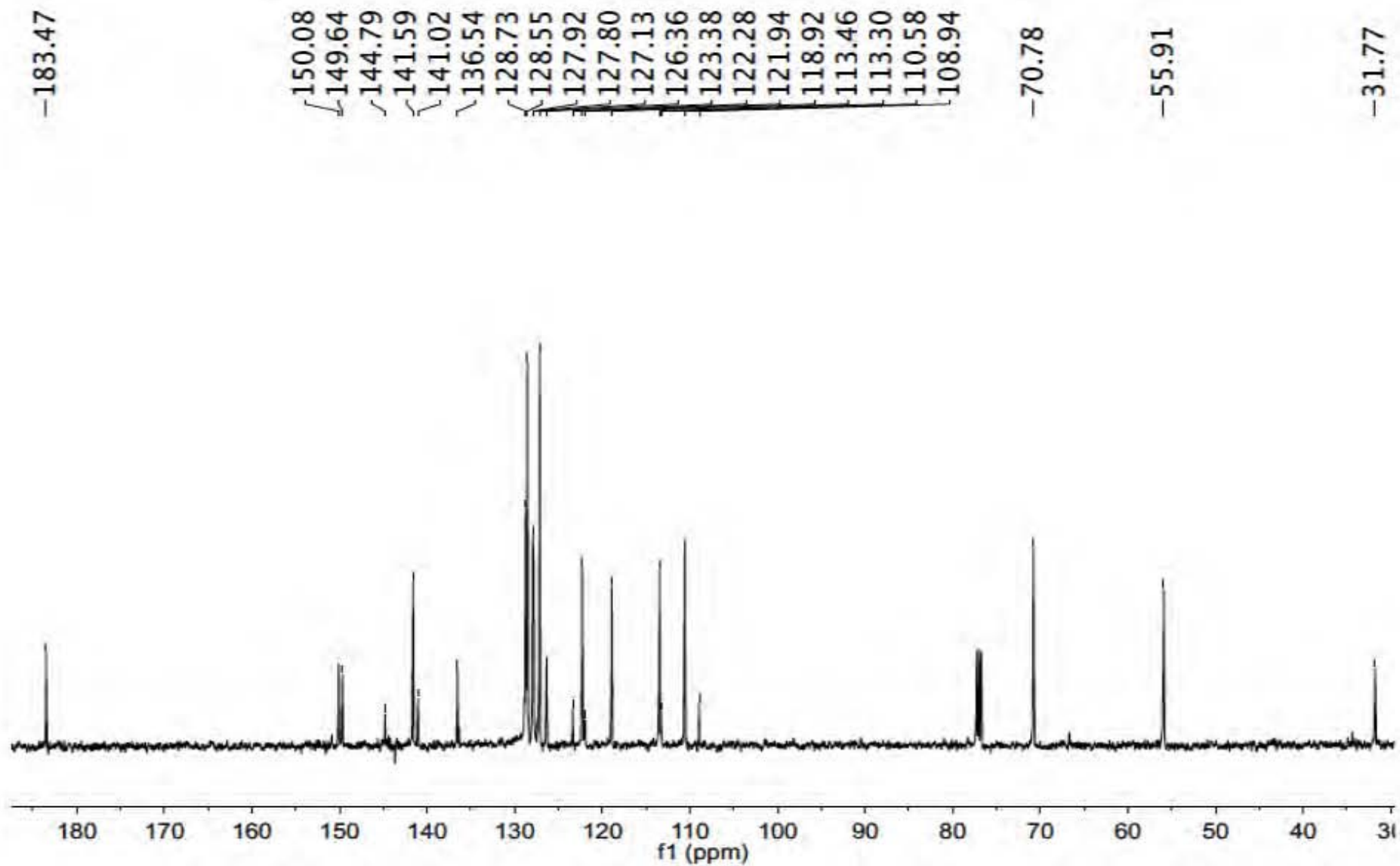


Figure S40. ^{13}C NMR spectrum of compound 3 (CDCl_3 - 125MHz)

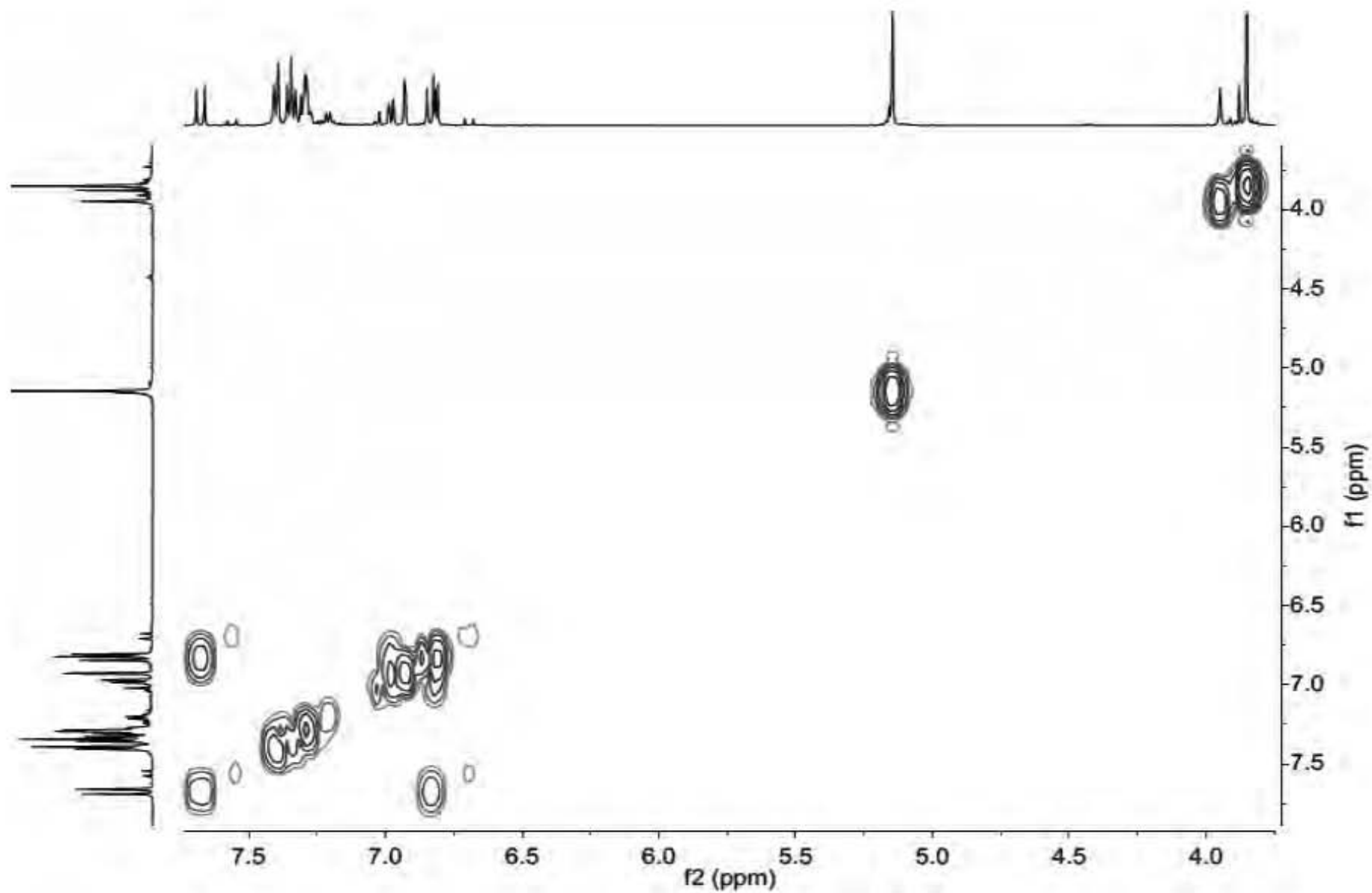


Figure S41. COSY spectrum of compound 3 (CDCl₃-500MHz)

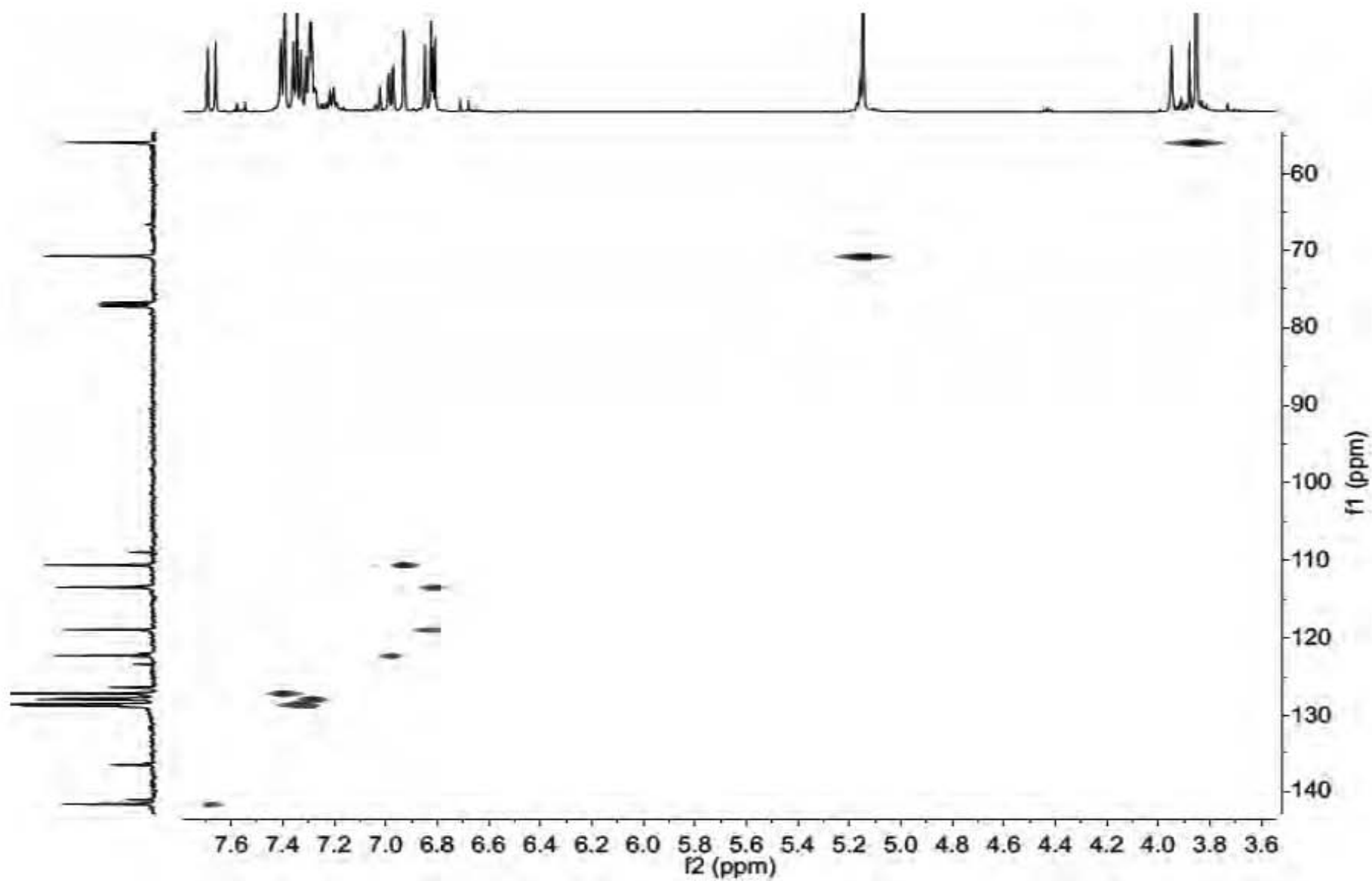


Figure S42. HSQC spectrum of compound 3 (CDCl_3 -500MHz)

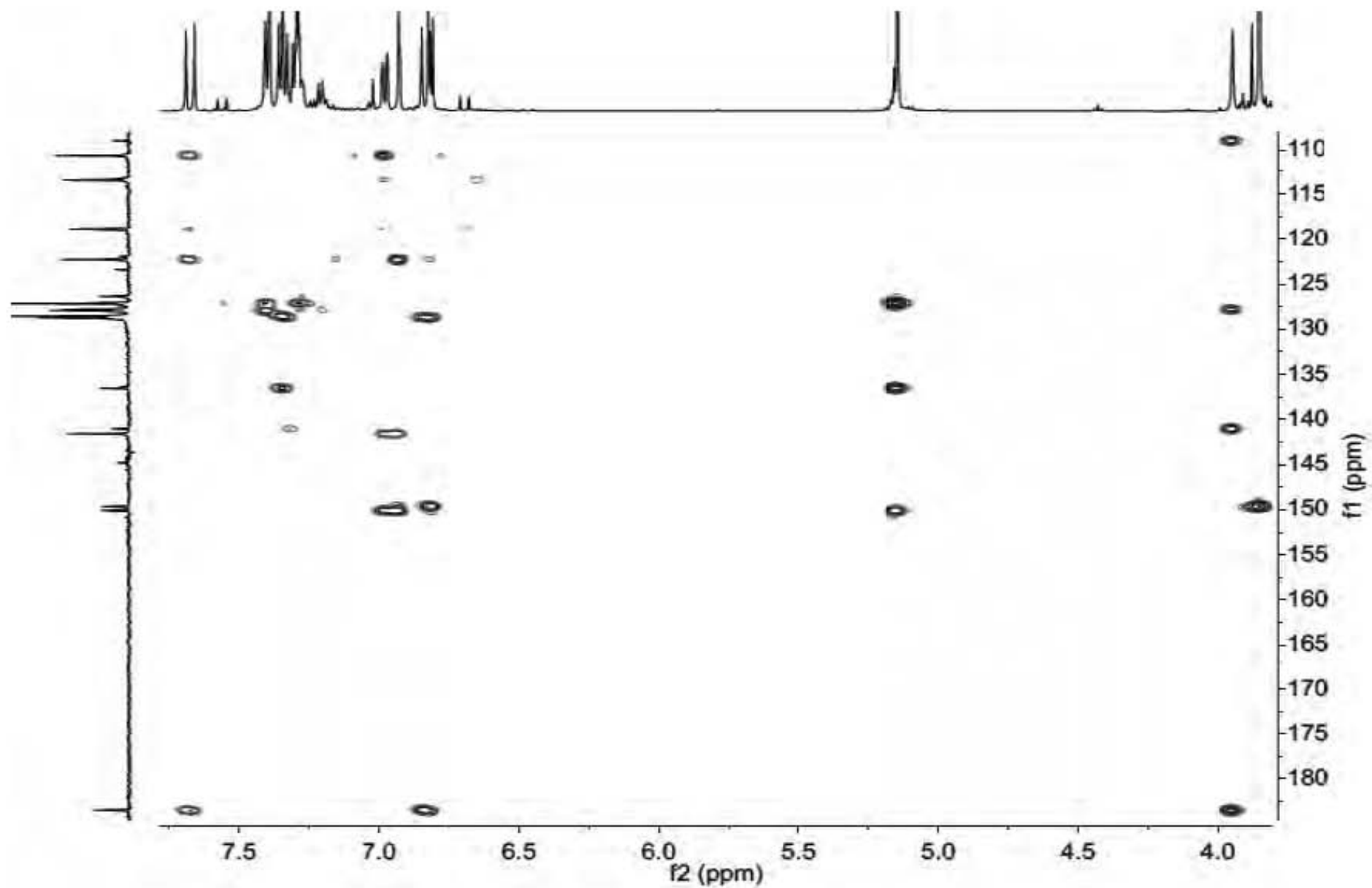


Figure S43. HMBC spectrum of compound 3 (CDCl₃-500MHz)

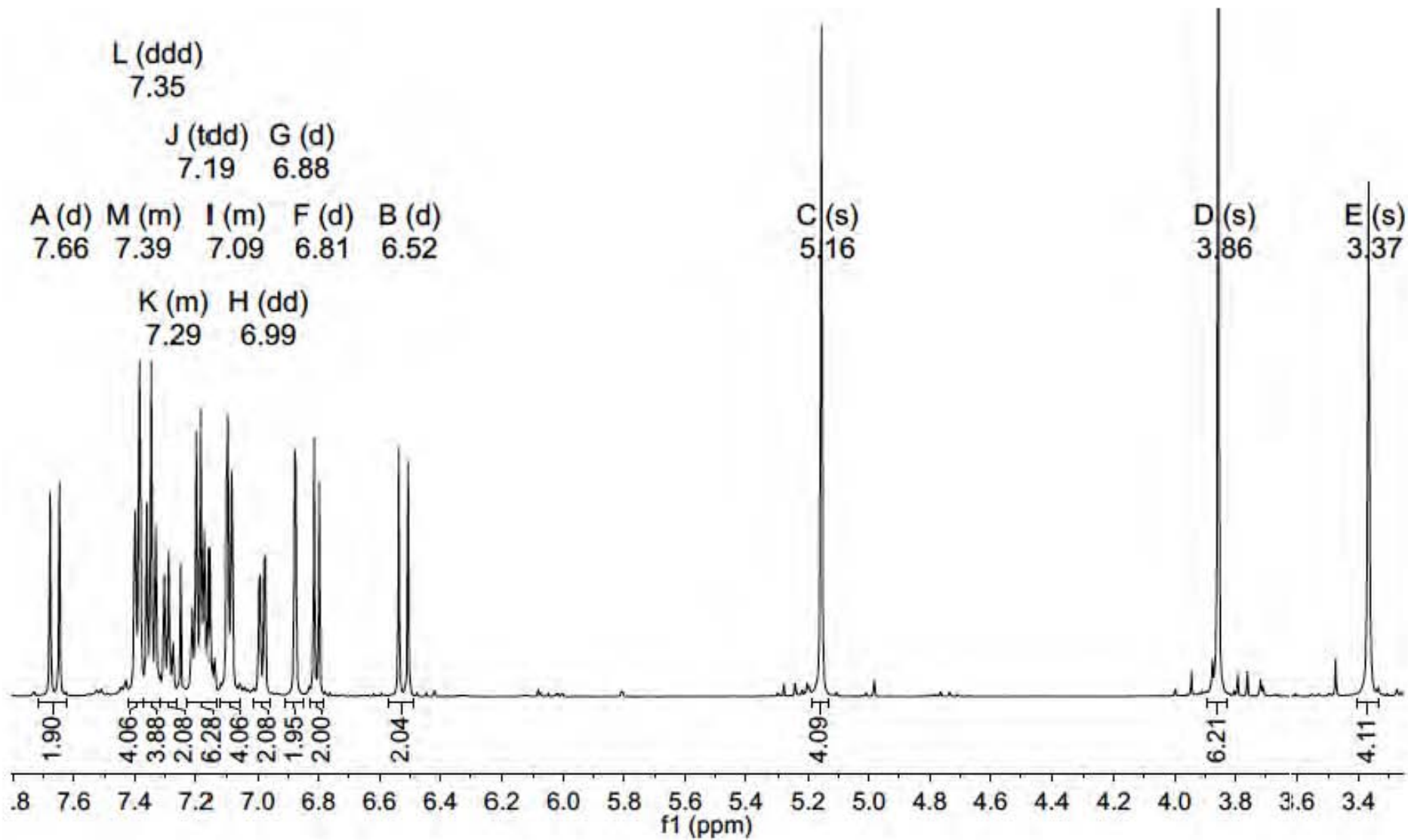


Figure S44. ¹H NMR spectrum of compound 4 (CDCl₃- 500MHz)

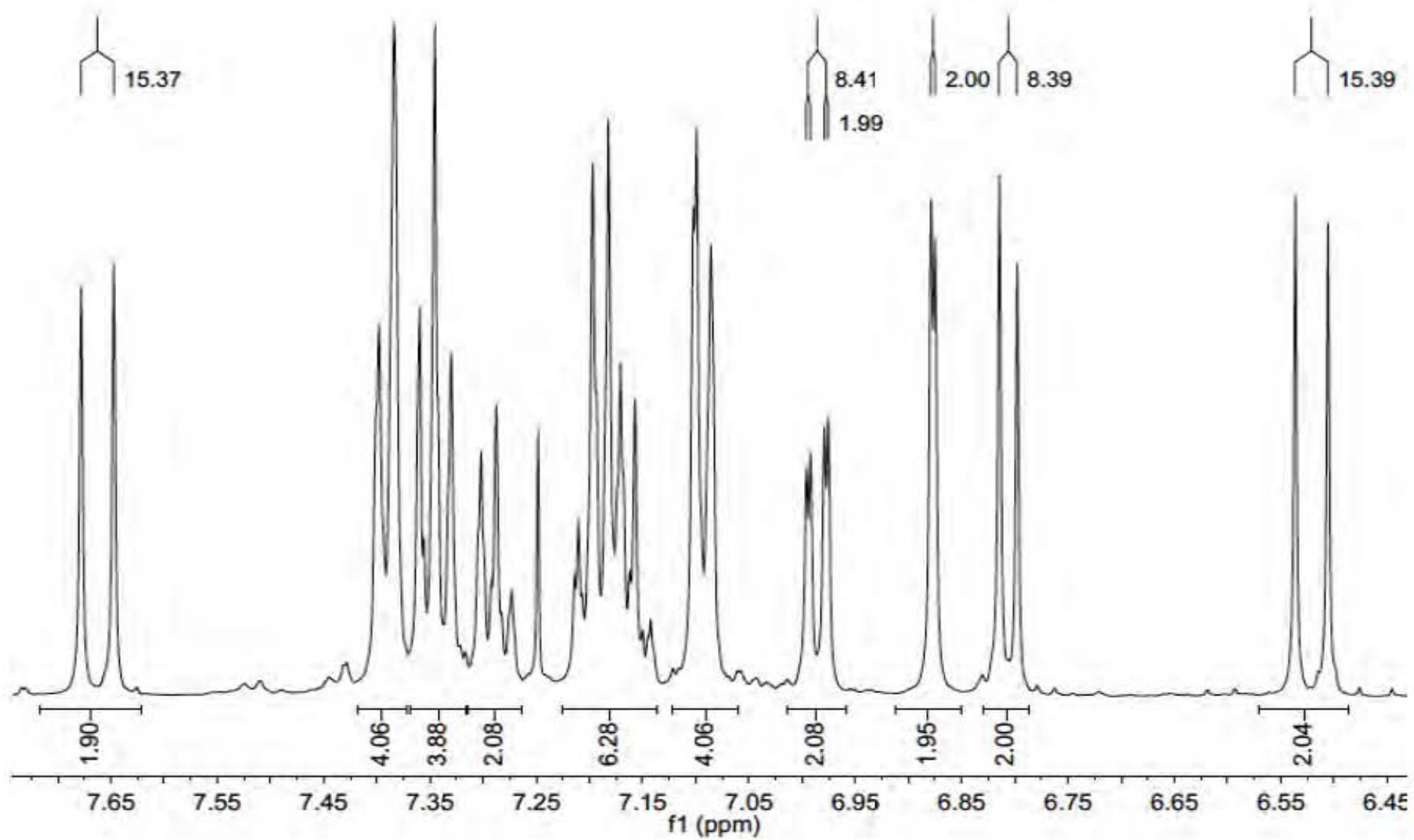


Figure S45. ¹H NMR spectrum of compound 4 aromatic section (CDCl₃- 500MHz)

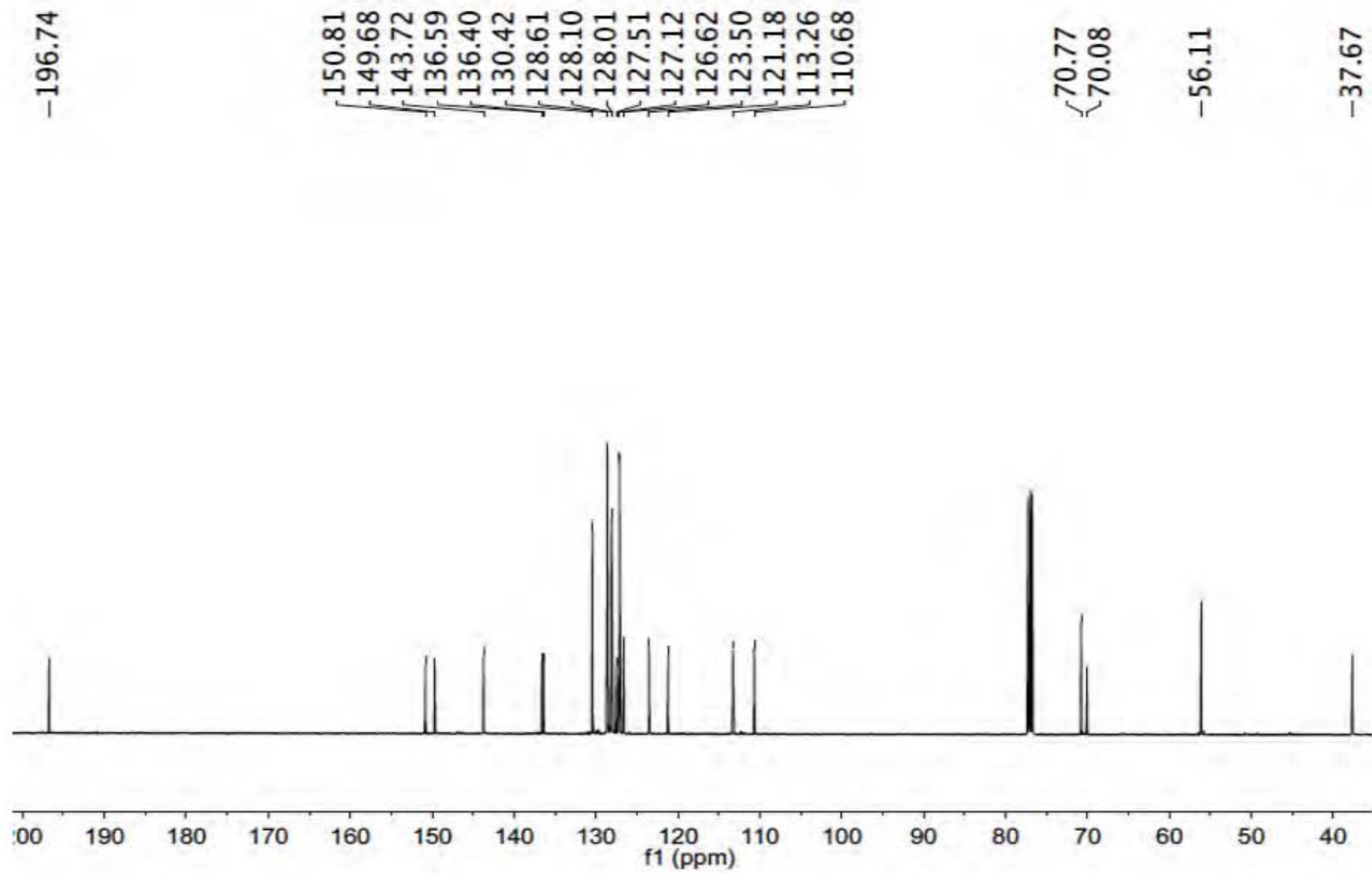


Figure S46. ¹³C NMR spectrum of compound 4 (CDCl₃- 125MHz)

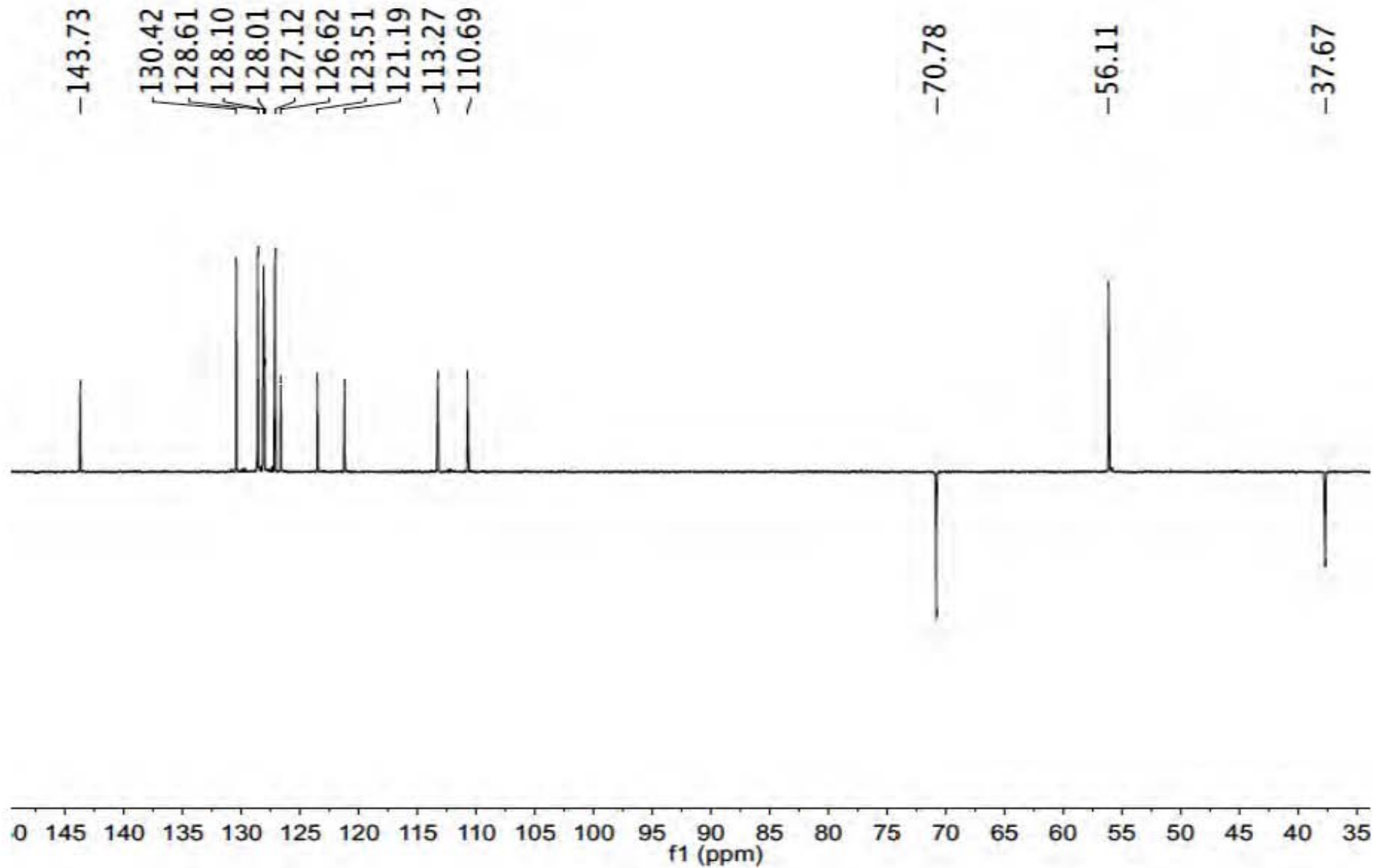


Figure S47. DEPT-135 spectrum of compound 4 (CDCl₃)

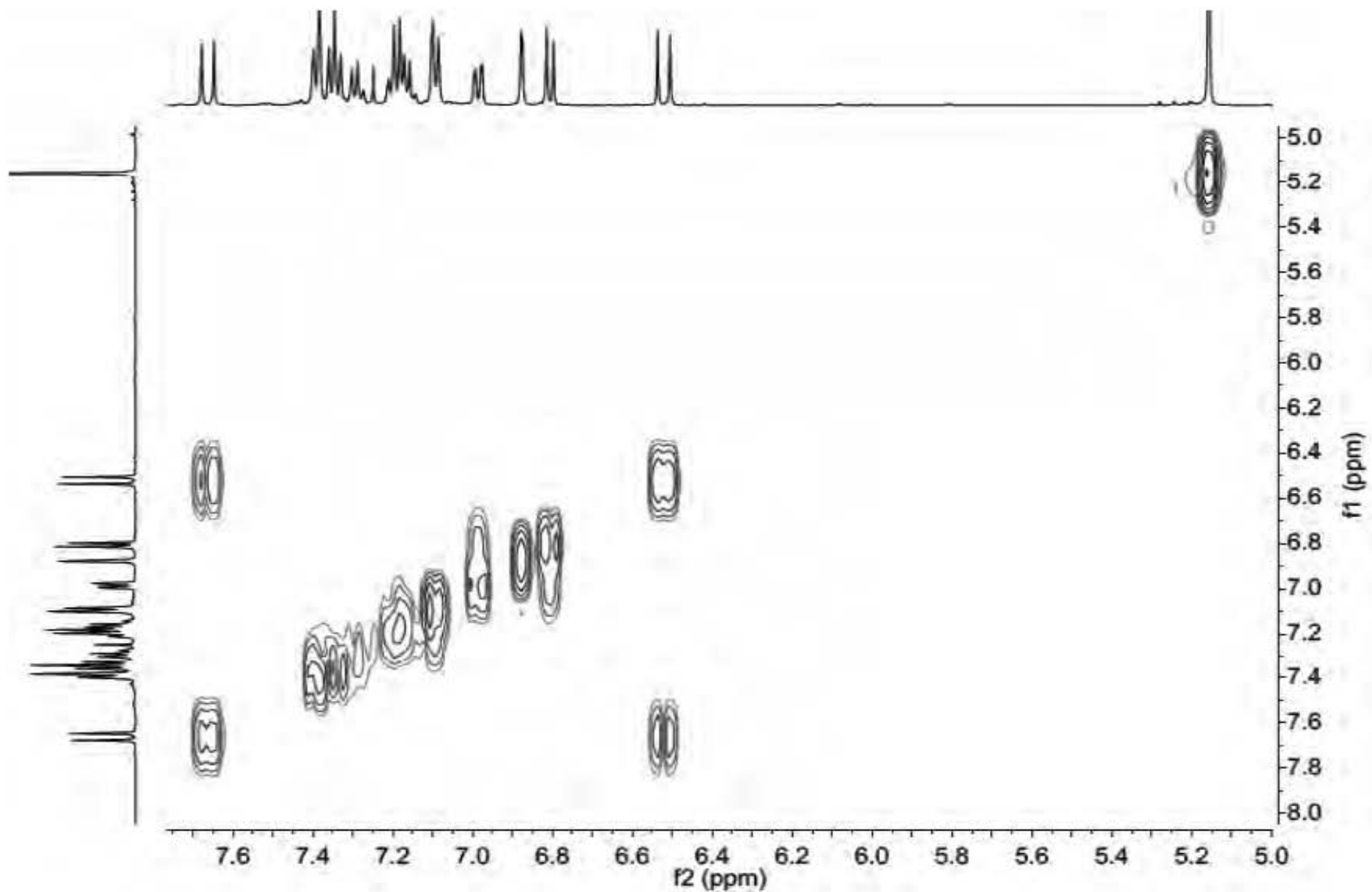


Figure S48. COSY spectrum of compound 4 (CDCl₃-500MHz)

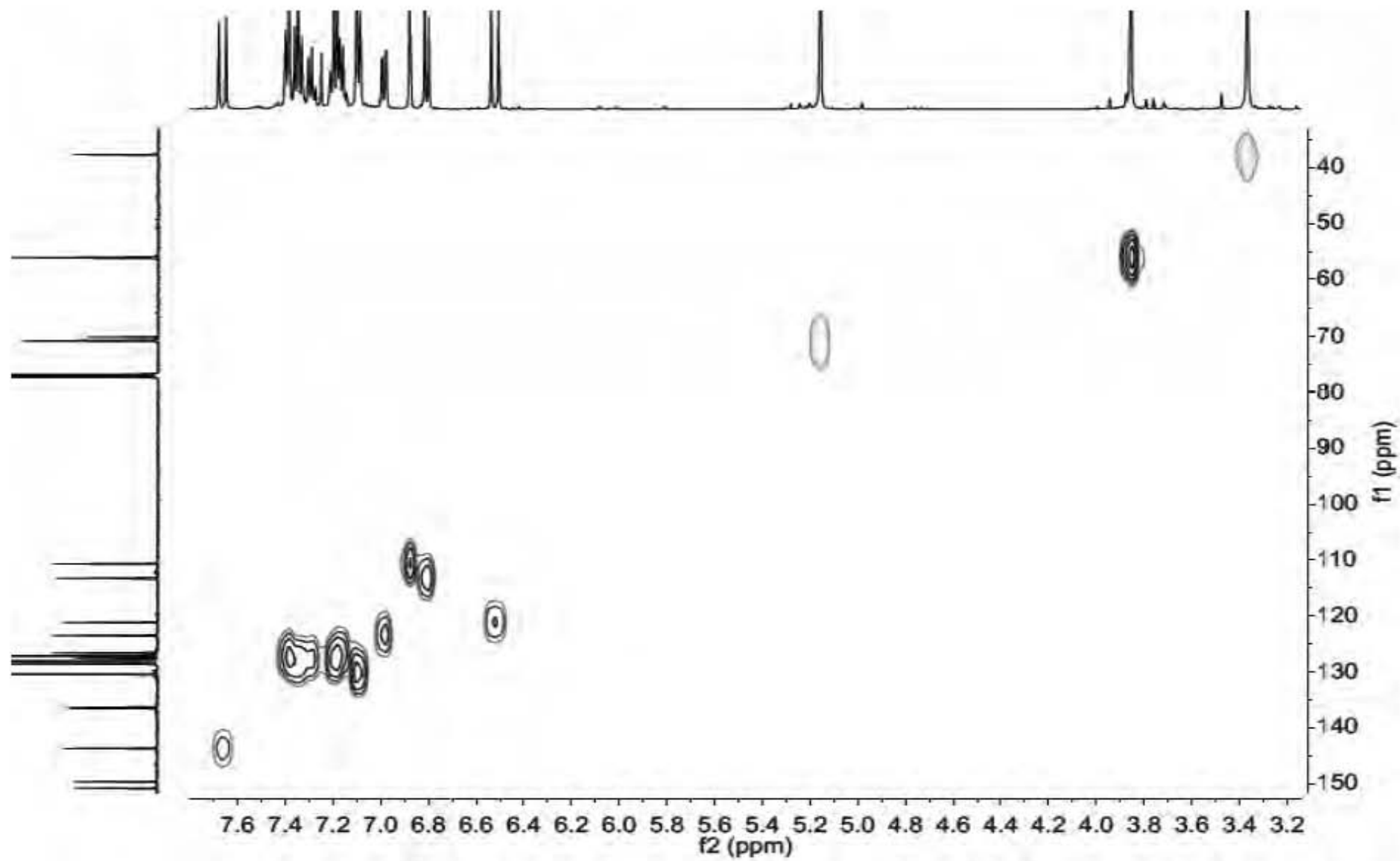


Figure S49. HSQC spectrum of compound 4 (CDCl₃-500MHz)

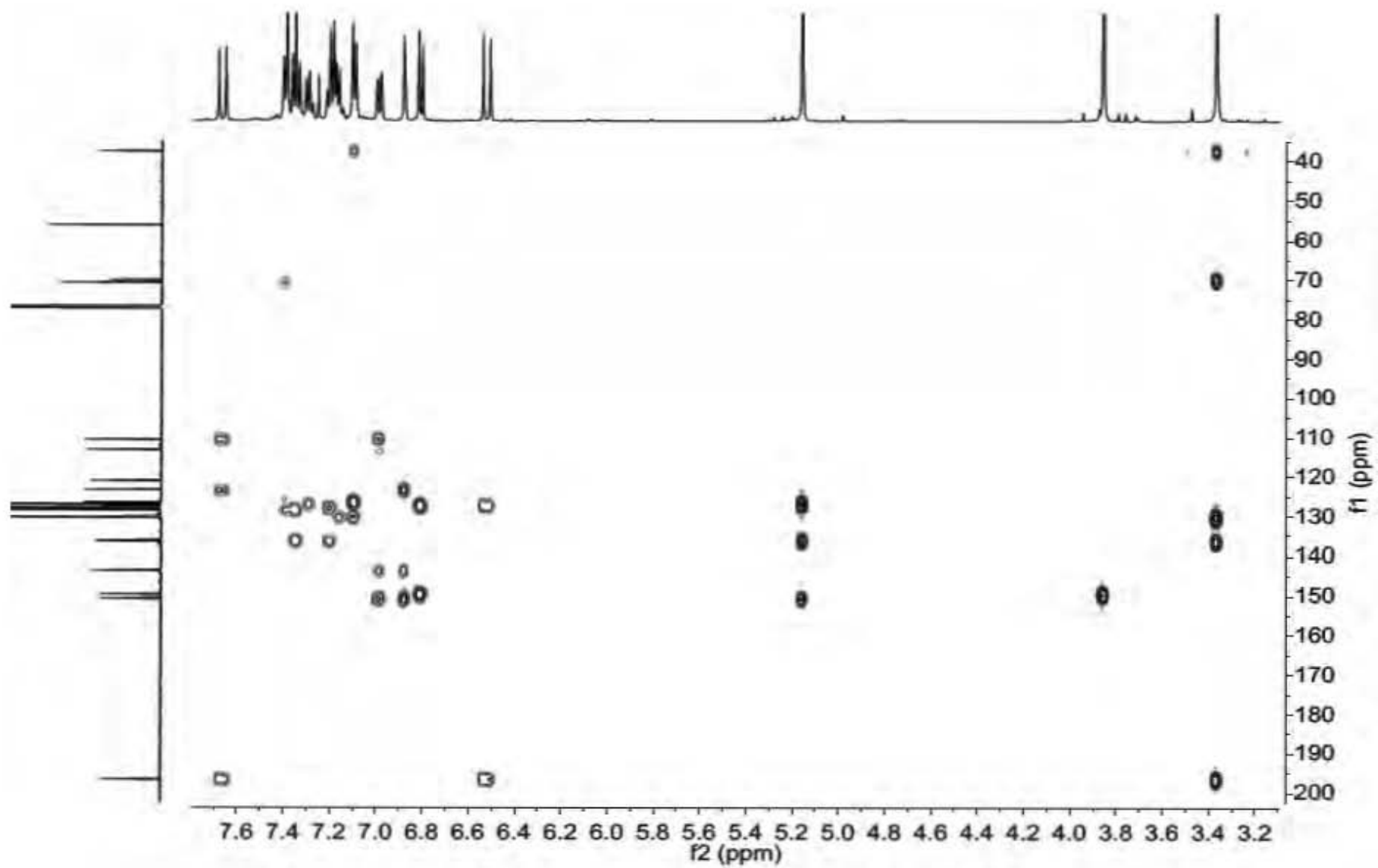


Figure S50. HMBC spectrum of compound 4 (CDCl₃-500MHz)

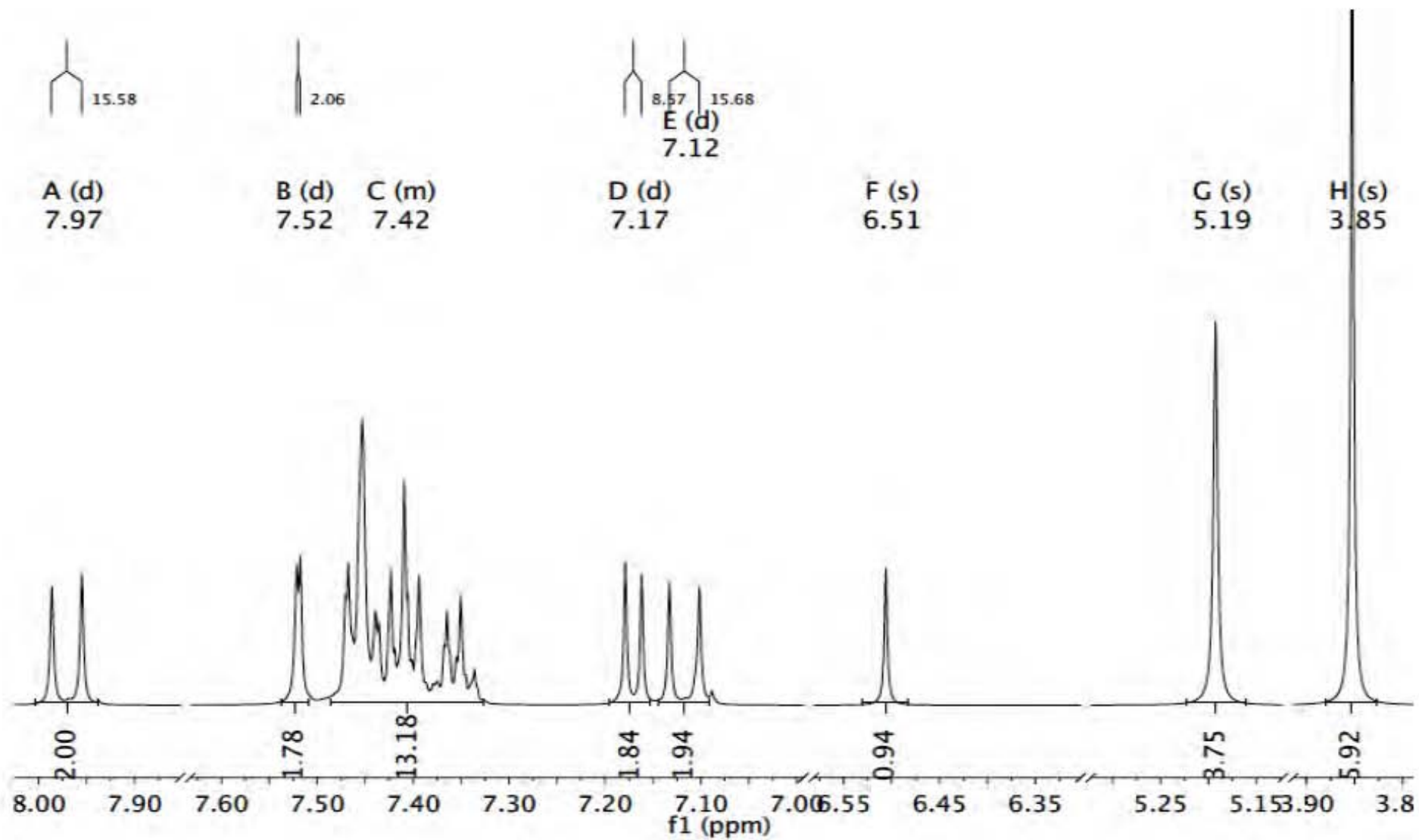


Figure S51. ^1H NMR spectrum of compound 5 (DMSO- d_6 - 500MHz)

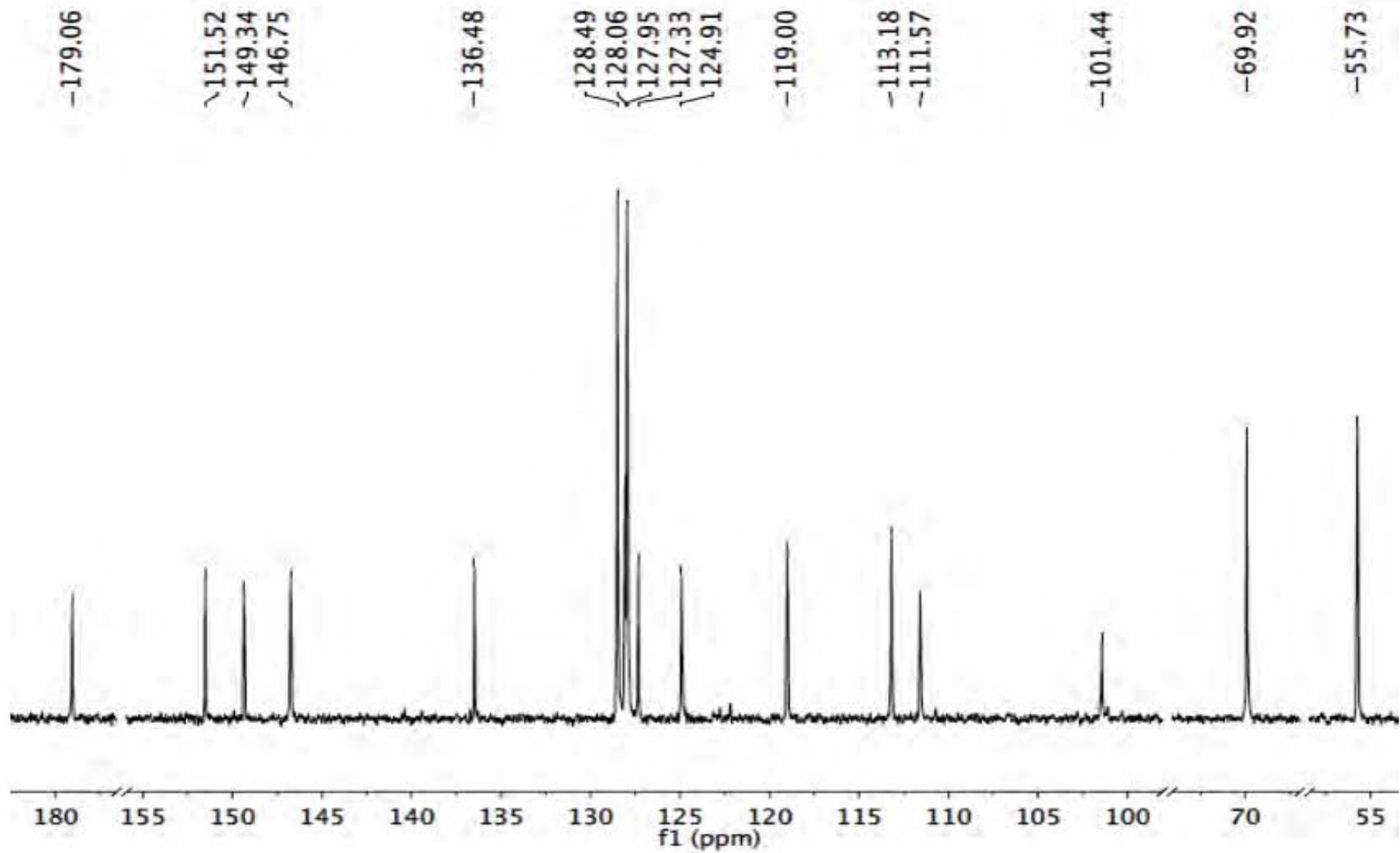


Figure S52. ^{13}C NMR spectrum of compound 5 (DMSO- d_6 - 125MHz)

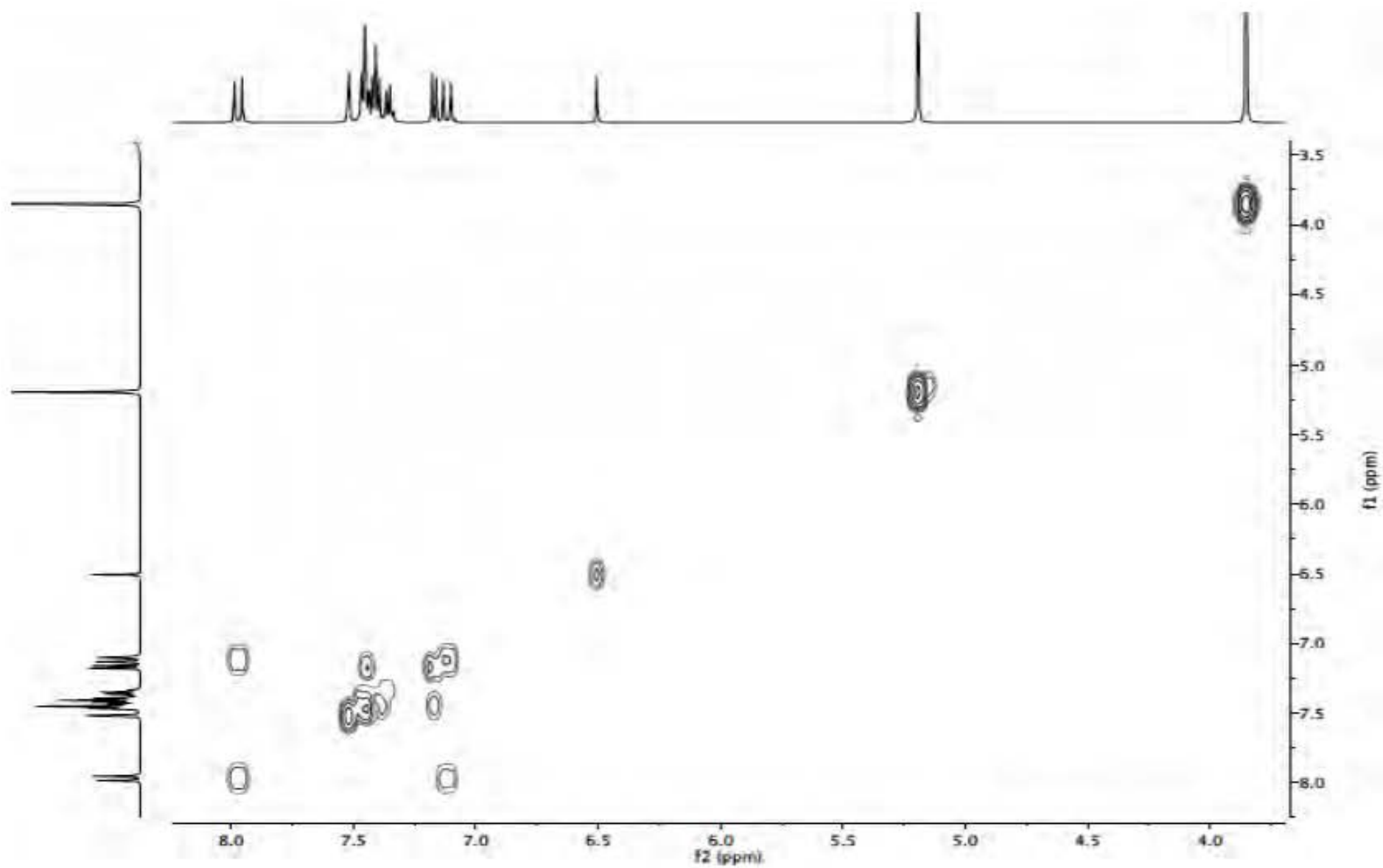


Figure S53. COSY spectrum of compound 5 (DMSO-*d*₆-500MHz)

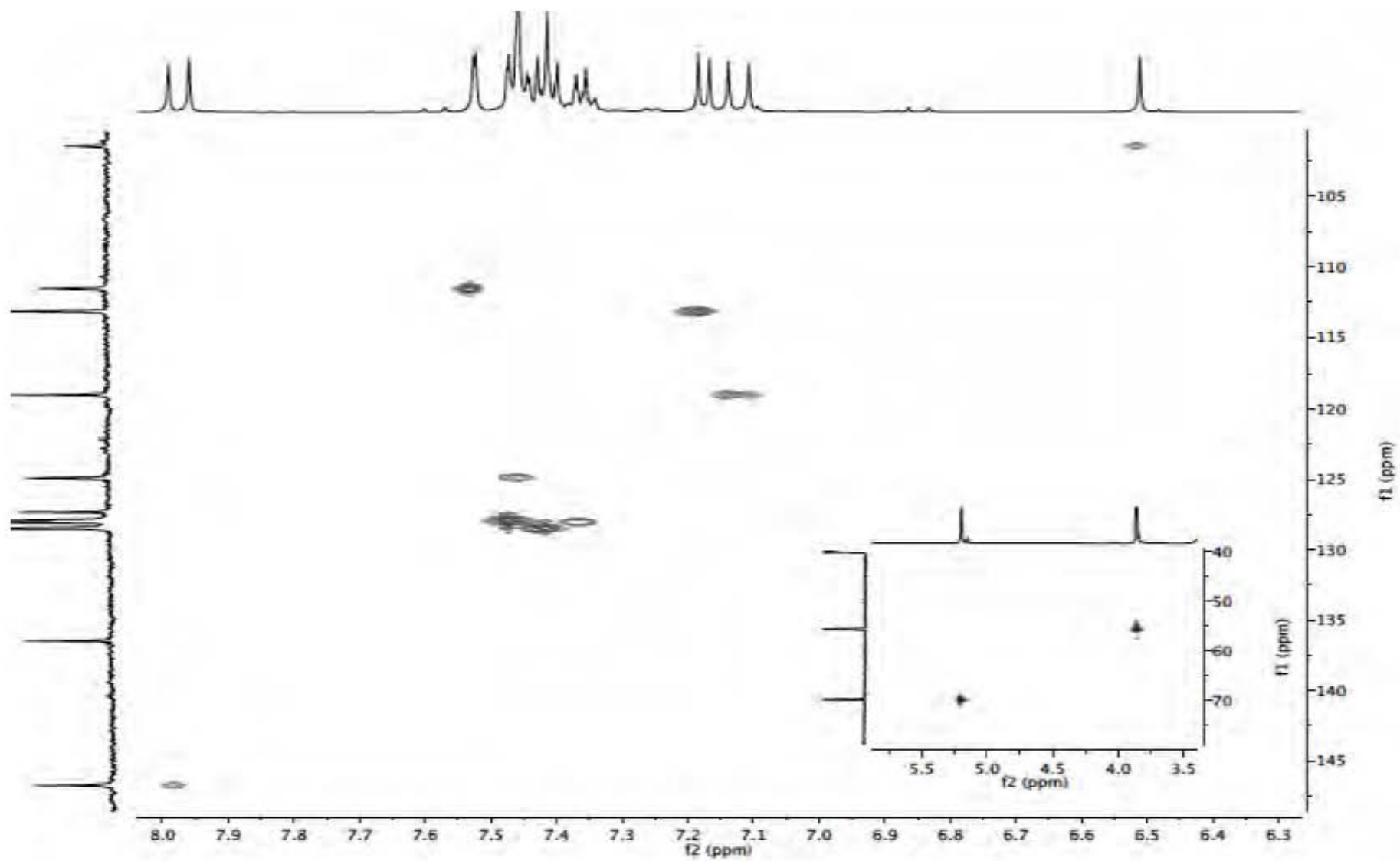


Figure S54. HSQC spectrum of compound 5 (DMSO- d_6 -500MHz)

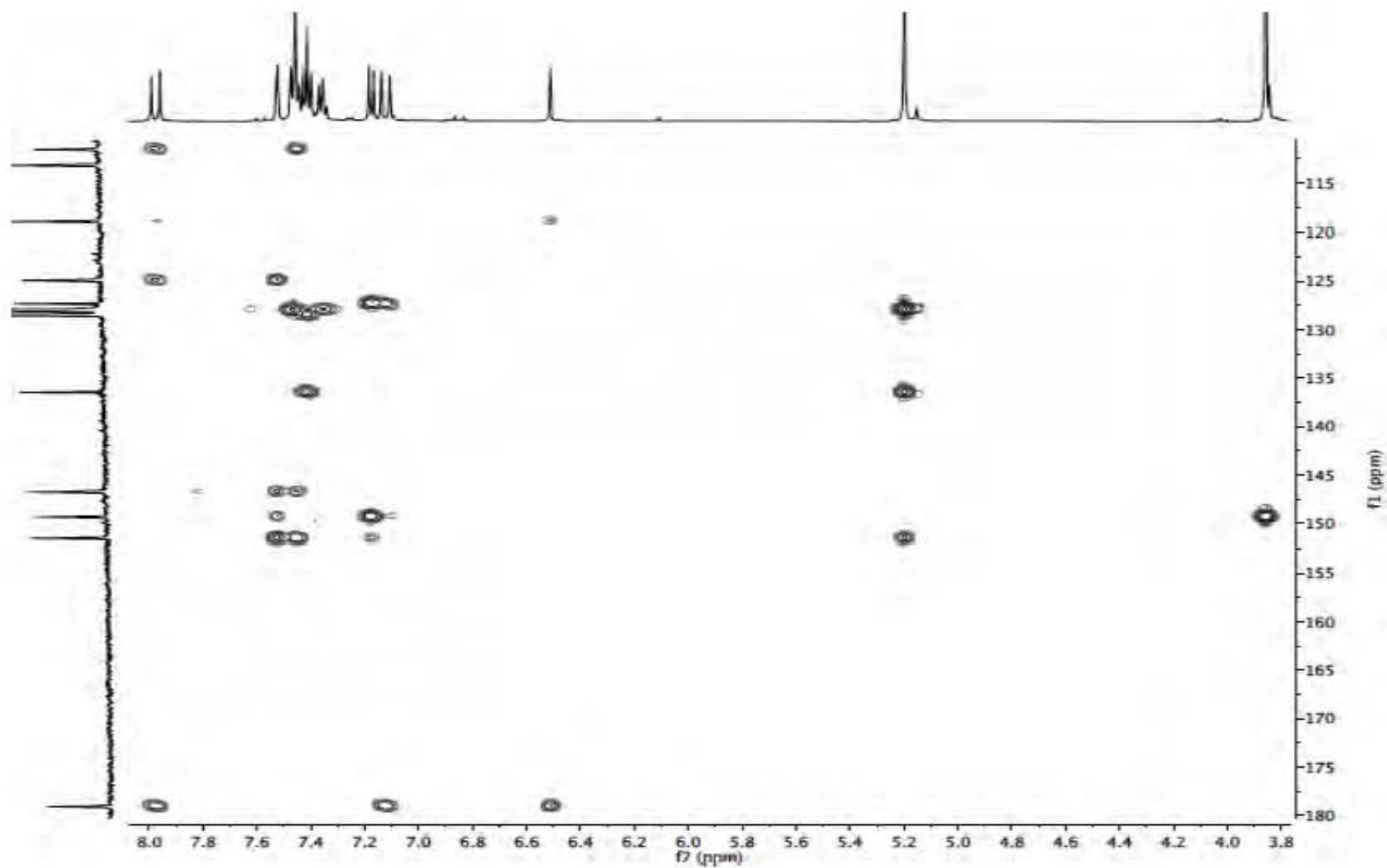


Figure S55. HMBC spectrum of compound 5 (DMSO-*d*₆500MHz)

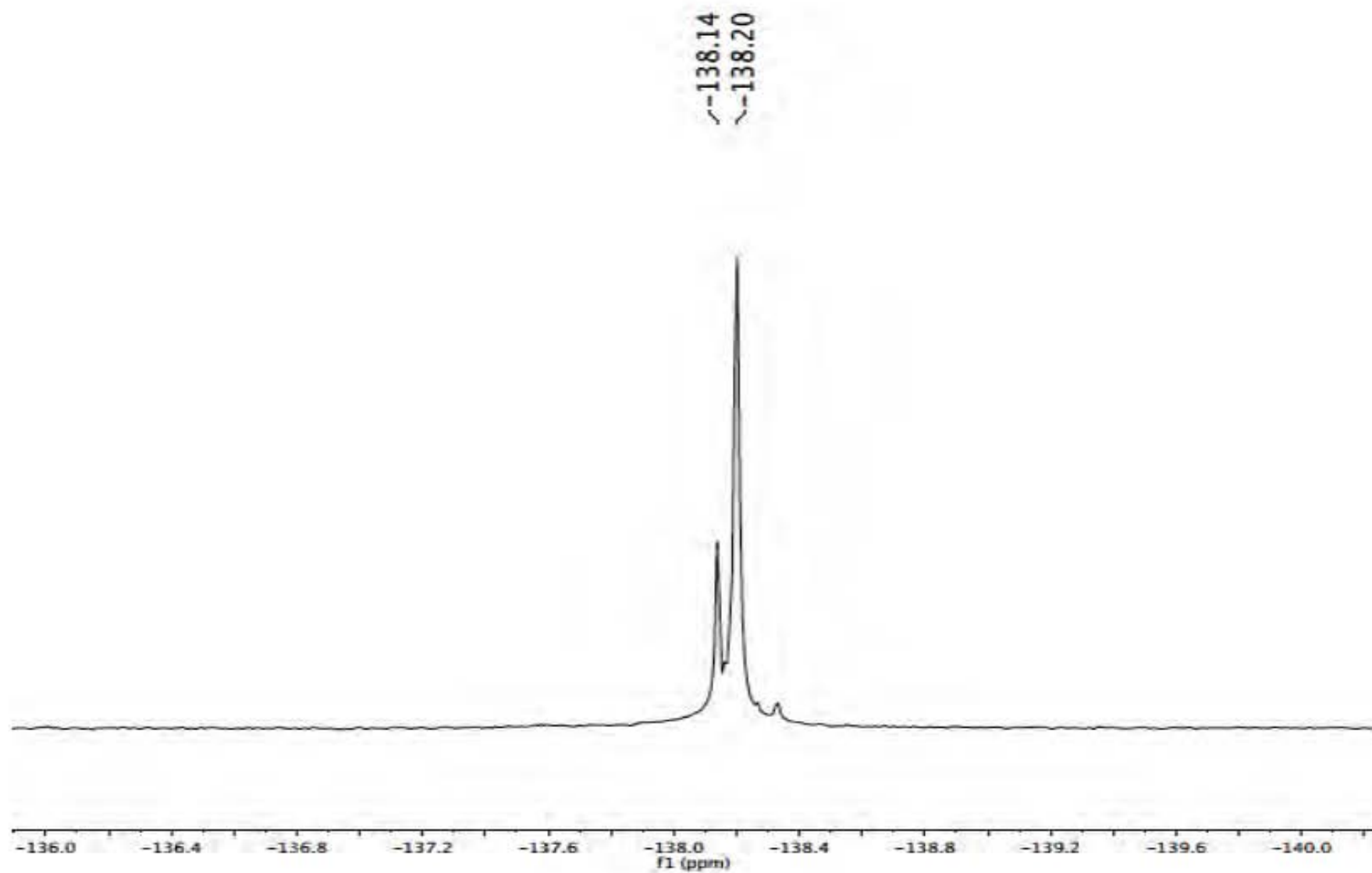


Figure S56. Boron spectrum of compound 5 (DMSO-*d*₆-300MHz)

Confocal microscopy analysis of curcumin derivative compound 2

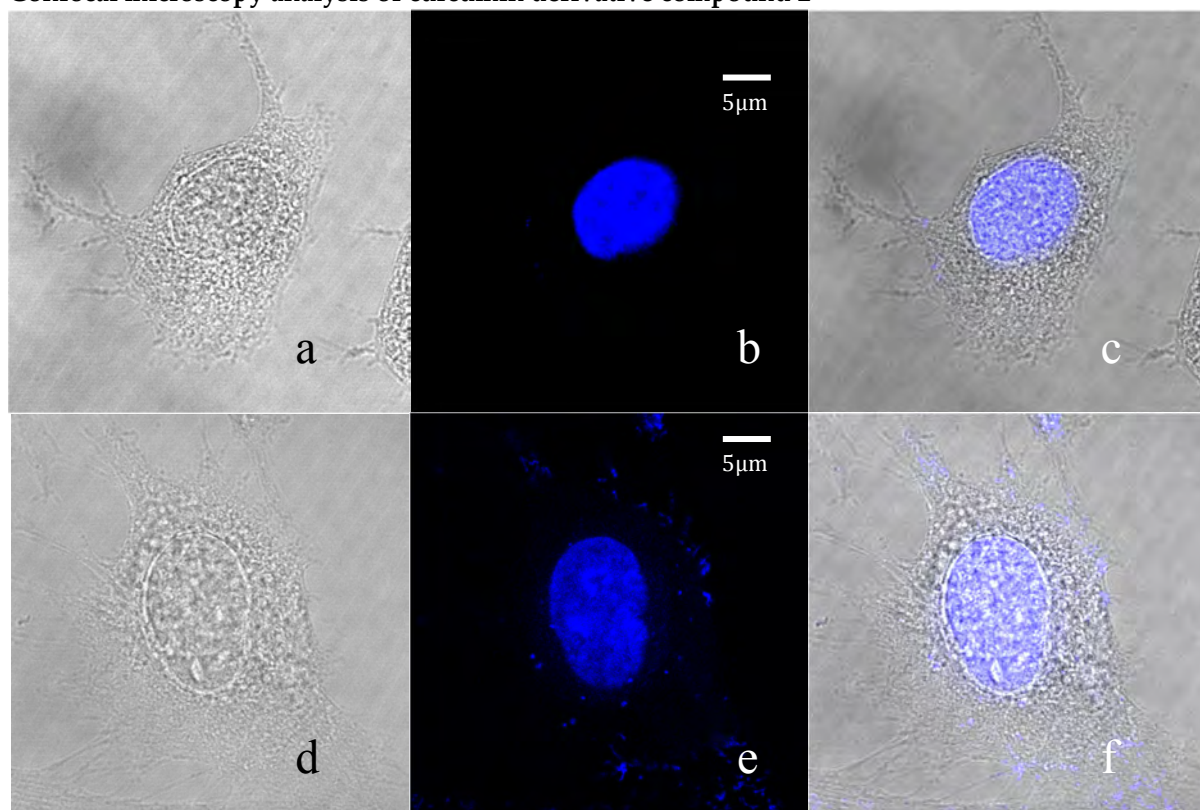


Figure S57. Confocal microscopy analysis of curcumin derivative Compound 2 at 20 μM, after 24 hrs of exposure with dye; a, d represent bright field, b,e, represent fluorescence and c, f merged images, a-c staining in SVG cell line, d-f staining in U-87 cell line. Laser used 405 nm.

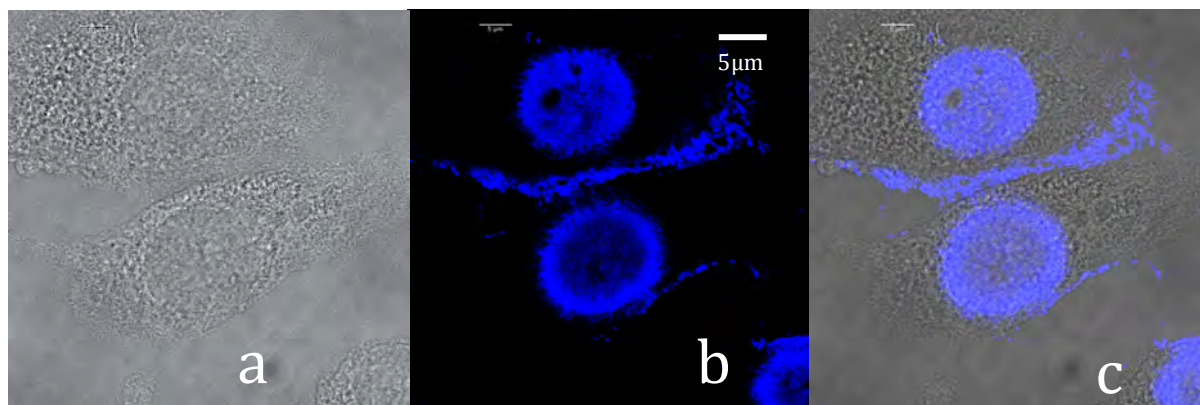


Figure S58. Confocal microscopy analysis of curcumin derivative Compound 2 at 20 μM, after 24 hrs of exposure with dye; a represents bright field, b represents fluorescence and c, merged images, a-c staining in SVG cell line. Laser used 405 nm.

References

1. Parimita, S.P.; Ramshankar, Y.V.; Suresh, S.; Row, T.N.G. Redetermination of curcumin: (1E,4Z,6E)-5-hydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)hepta-1,4,6-trien-3-one. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online* **2007**, *63*.
2. Judas, N.; Kaitner, B.; Mestrovic, E. 3,3-Dibenzylpentane-2,4-dione, C₁₉H₂₀O₂. *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* **1995**, *51*, 2123–2125.
3. Bing-Mi, L.; Chong-Liang, B.; Jun, Z.; Yang, L.; Bo-Yang, D.; Yi-Tong, Z.; Bin, L. In vitro study on the interaction of 4,4-dimethylcurcumin with calf thymus DNA. *J. Luminiscence* **2015**, *166*, 48–53.
4. Xu, G.; Wang, J.; Si, G.; Mahong Wang; Wu, B.; Zhou, S. Two-photon absorption and cell imaging of two multi-branched dyes based on curcumin. *Dye. Pigment.* **2015**, *123*, 267–273.
5. Laali, K.K.; M., R.B.; Bunge, S.D.; Xin, Q.; Borosky, G.L. Fluoro-curcuminoids and curcuminoid-BF₂ adducts_ Synthesis, X-ray structures, bioassay, and computational_docking study _ Elsevier Enhanced Reader.pdf. *J. Fluor. Chem.* **2016**, *191*, 29–41.
6. Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-wolff, A.; et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757–766.
7. Obregón-Mendoza, M.A.; Estévez-Carmona, M.M.; Hernández-Ortega, S.; Soriano-García, M.; Ramírez-Apan, M.T.; Orea, L.; Pilotzi, H.; Gnecco, D.; Cassani, J.; Enríquez, R.G. Retro-curcuminoids as mimics of dehydrozingerone and curcumin: Synthesis, NMR, X-ray, and cytotoxic activity. *Molecules* **2017**, *22*.
8. Sumantra Venil N. Cellular chemosensitivity assays: An Overview. In *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*; 2011; Vol. 731, pp. 219–236 ISBN 978-1-61779-079-9.
9. Domínguez, M.; Nieto, A.; Marin, J.C.; Keck, A.S.; Jeffery, E.; Céspedes, C.L. Antioxidant activities of extracts from *Barkleyanthus salicifolius* (Asteraceae) and *Penstemon gentianoides* (Scrophulariaceae). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5889–5895.
10. Rossato, J.I.; Ketzer, L.A.; Centurião, F.B.; Silva, S.J.N.; Lüdtke, D.S.; Zeni, G.; Braga, A.L.; Rubin, M.A.; Da Rocha, J.B.T. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem. Res.* **2002**, *27*, 297–303.
11. H., L.O.; J., R.R.N.; Lewis, F.A.; J., R.R.N. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *J. Biol. Chem* **1951**, *193*, 265–275.
12. Ng, T.B.; Liu, F.; Wang, Z.T. Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sci.* **2000**, *66*, 709–723.
13. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **1979**, *95*, 351–358.
14. Mellors, A.; Tappel, A.L. The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol. *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 4353–4356.

