



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**OBTENCIÓN DE AMINO DERIVADOS A PARTIR DE PRODUCTOS NATURALES
CON ESTRUCTURAS AROMÁTICAS Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD
ANTICANCERÍGENA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. ROSARIO TAVERA HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., junio 2022



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

OBTENCIÓN DE AMINO DERIVADOS A PARTIR DE PRODUCTOS
NATURALES CON ESTRUCTURAS AROMÁTICAS Y EVALUACIÓN
DE SU ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. ROSARIO TAVERA HERNANDEZ

TUTOR:

Dr. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
INSTITUTO DE QUÍMICA



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., junio 2022

JURADO

Presidente: Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas

Vocal: Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Vocal: Dr. José Alfredo Vázquez Martínez

Vocal: Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Secretario: Dra. María Margarita Canales Martínez

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 2-10 del Departamento de Productos Naturales del
Instituto de Química
de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del
Dr. Manuel Jiménez Estrada y el comité tutor conformado por la Dra. Karina Martínez
Mayorga y el Dr. José Alfredo Vázquez Martínez

M. en C. Rosario Tavera Hernández

Sustentante

Dr. Manuel Jiménez Estrada

Tutor

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (No. Becario 662794)

Agradezco al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Coordinación del Posgrado.

Agradezco al Instituto de Química por brindarme la oportunidad de realizar el trabajo de investigación de doctorado y por los servicios analíticos y capacitaciones brindadas.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, por el apoyo brindado a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (Proyecto AG200321)

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

Agradezco a los miembros del comité tutor: Dr. José Alfredo Vázquez Martínez y Dra. Karina Martínez Mayorga por su apoyo brindándome la oportunidad de trabajar en sus laboratorios y por sus valiosas aportaciones realizadas acertadamente al presente trabajo de tesis.

Al Dr. José Luis Medina Franco y al Dr. Enrique Wenceslao Coronado Aceves por su buena disposición, aportaciones y revisión al presente trabajo.

A los miembros del jurado: Dr. Guillermo Delgado Lamas, Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar, Dr. José Alfredo Vázquez Martínez, Dr. Ricardo Reyes Chilpa y Dra. María Margarita Canales Martínez por las valiosas correcciones realizadas al presente trabajo.

Agradezco al Dr. José Pedraza Chaverri y al M. en C. Omar Noel Medina Campos del Laboratorio 315 de la Facultad de Química por el apoyo brindado en la realización del ensayo inhibitorio de la enzima Q9DC.

Agradezco al personal académico del Instituto de Química especialmente a la M. en C. Elizabeth Huerta Salazar, a la Q. María de los Ángeles Peña González, a la Dra. Ma. Isabel Chávez Uribe, a la Dra. Beatriz Quiroz García y al Dr. Rubén Luis Gaviño Ramírez del laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear; al Dr. Francisco Javier Pérez Flores y al I. Q. Luis Velasco Ibarra, del laboratorio de Espectrometría de Masas. Agradezco de manera muy especial al M. en C. Antonio Nieto Camacho y a la M. en C. María Teresa Ramírez Apan del laboratorio de Pruebas Biológicas. Agradezco a la M. en C. Virginia Gómez Vidales del laboratorio de Resonancia Paramagnética por su apoyo y asesoría brindada. Agradezco a la M. en C. Lucía del Carmen Márquez, a la M en C. Lucero Mayra Ríos Ruíz y a Eréndira García del laboratorio de Cromatografía. Agradezco al M. en C. Simón Hernández de laboratorio de difracción de rayos X.

A los Doctores Jesús Javier Alvarado Sansininea y Jorge Iván Castillo Arellano por sus comentarios y aportes realizados al presente trabajo.

Expreso un agradecimiento afectuoso a mi familia por su apoyo brindado y a las personas que ya no se encuentran presentes en mi vida, pero fueron una fuente de motivación para culminar este trabajo

PUBLICACIÓN

Tavera-Hernández, R.; Jiménez-Estrada, M.; Alvarado-Sansininea, J.J.; Nieto-Camacho, A.; López-Muñoz, H.; Sánchez-Sánchez, L.; Escobar, M.L. Synthesis of Chrysin, Quercetin and Naringin Nitroderivatives: Antiproliferative, Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity. *Letters in Drug Design & Discovery* 2021, 18, 1–1, doi:10.2174/1570180818666210122162313

PUBLICACIONES EN PROCESO

- Preparation of nitrogen-containing chrysin and umbelliferone compounds: antiproliferative evaluation and inhibitory activity of CDK9 enzyme.
- Antigiardiasis activity of nitroflavonoids

PRESENTACIÓN DEL TRABAJO

Obtención de amidas y sulfonamidas a partir de los productos naturales crisna y umbeliferona: efecto citotóxico en la línea de cáncer de mama MDA-MB-231. Tavera-Hernández R.; Jiménez-Estrada, M.; Vázquez-Martínez J. A.; Martínez-Mayorga K.; Alvarado-Sansininea J. J.; Medina-Franco J. L. presentado en el Simposio Interno del Instituto de Química, UNAM. Cd. Mx. 9 de diciembre de 2021.

RESUMEN

Los flavonoides y las cumarinas son productos naturales que han mostrado una amplia gama de actividades biológicas, como anticancerígena. Resultados preliminares de la actividad antiproliferativa de los compuestos 8-nitrocrisina, 5'-nitroquercetina y de la mezcla 2-*R,S* 3'-nitronaringina, mostraron que la estructura base flavona de la 8-nitrocrisina fue la más prometedora para realizar modificaciones alrededor del grupo nitro, en la posición C8, con el objetivo de mejorar su actividad antiproliferativa y como inhibidores de la enzima quinasa 9 dependiente de cilclina (Q9DC). En el presente trabajo de investigación se prepararon amidas y sulfonamidas a partir de la flavona crisina y la cumarina umbeliferona. Los resultados indicaron que los grupos funcionales nitro, propilamida, fenilsulfonamida, en la posición C8 de los compuestos 5,7-dimetoxi-8-nitro-2-fenil-4*H*-cromen-4-ona (**3**), *N*-butiril-*N*-(5,7-dimetoxi-4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-8-il)butiramida (**4c**) y *N*-(5,7-dimetoxi-4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-8-il)bencenosulfonamida (**4d**), mejoraron la actividad antiproliferativa en comparación con la flavona crisina. De esta manera, los compuestos **3** y **4c** presentaron valores de concentración inhibitoria media (CI₅₀) de 5.6±0.8 y 23.2±2.8 μM, respectivamente, en la línea celular de cáncer de próstata (PC3) y el compuesto **4d** presentó una CI₅₀= 26.1±2.1 μM en la línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231). Los compuestos **3**, **4c** y **4d** mostraron la capacidad de inhibir a la enzima Q9DC. Finalmente, estudios de modelado molecular mostraron que los compuestos **4c** y **4d** se unieron favorablemente en el sitio activo de la enzima Q9DC y adoptaron una posición similar a la del flavopiridol. Con estos resultados se concluye que los grupos nitrogenados en la posición C8 de la flavona mejoraron su actividad antiproliferativa e inhibidora de la enzima Q9DC, inspirando nuevas modificaciones en los grupos sustituyentes de amidas, sulfonamidas y en el anillo B de la flavona.

ABSTRACT

Flavonoids and coumarins are natural products that have shown a wide range of biological activities, including anticancer. Preliminary results of the antiproliferative activity of 8-nitrochrysin, 5'-nitroquercetin, and the mixture 2-*R,S* 3'-nitronaringin showed that the flavone-based structure of 8-nitrochrysin represented the most promising derivative to carry out modifications on the nitro group, at the C8 position, with the aim of improving its antiproliferative activity and as inhibitors of CDK9 enzyme. In the present research work, amides and sulfonamides were prepared from the flavone chrysin and the coumarin umbelliferone. The results indicated that the functional groups nitro, propylamine, and phenylsulfonamide, at the C8 position of compounds **3**, **4c**, and **4d**, improved the antiproliferative activity compared to the flavone chrysin. In this way, compounds **3** and **4c** presented CI_{50} values of 5.6 ± 0.8 and 23.2 ± 2.8 μ M, respectively, in the PC3 cell line and compound **4d** presented an $CI_{50} = 26.1 \pm 2.1$ μ M in MDA-MB-231 cell line. Compounds **3a**, **4c** and **4d** showed the ability to inhibit the CDK9 enzyme. Finally, a molecular docking study showed that compounds **4c** and **4d** interact favorably on the active site of the CDK9 enzyme and adopted a position similar to flavopiridol. With these results, it is concluded that the nitrogen-containing groups at the C8 position in the flavone, improved the antiproliferative and inhibitory activity of the CDK9 enzyme, inspiring new modifications in the substituent groups of amides, sulfonamides, and in the B ring of the flavone.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 FLAVONOIDES Y CUMARINAS COMO FUENTE DE AGENTES ANTICANCERÍGENOS	4
2.2 CÁNCER. GENERALIDADES Y ESTADÍSTICAS	5
2.3 CARCINOGENESIS.....	7
2.4 QUINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS (QDC´s) COMO DIANAS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER	9
2.5 CDK9 E INHIBIDORES	13
2.6 FLAVONOIDES Y CUMARINAS COMO FUENTES DE AGENTES ANTIPROLIFERATIVOS E INHIBIDORES DE LA ENZIMA CDK9	17
2.7 RELEVANCIA DE LOS GRUPOS NITROGENADOS EN LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y ALGUNOS MÉTODOS DE OBTENCIÓN	22
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVO GENERAL	28
6. OBJETIVOS PARTICULARES	28
7. CONSIDERACIONES PRELIMINARES	30
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
8.1 CONDICIONES DE REACCIÓN PARA LA FORMACIÓN DE AMIDAS Y SULFONAMIDAS A PARTIR DE LA FLAVONA CRISINA (1).....	34
8.1.1 <i>Condiciones de nitración de crisina (1)</i>	35
8.1.2 <i>Protección de los grupos hidroxilos de 8-nitrocrisina</i>	37
8.1.3 <i>Reducción de la 5,7-dimetoxi-8-nitroflavona (3)</i>	39
8.1.4 <i>Obtención de amidas a partir de la aminoflavona 4</i>	44
8.1.5 <i>Obtención de sulfonamidas a partir de la aminoflavona 4</i>	48
8.2 CONDICIONES DE REACCIÓN PARA LA FORMACIÓN DE AMIDAS Y SULFONAMIDAS A PARTIR DE LA CUMARINA UMBELIFERONA.....	52
8.2.1 <i>Nitración de 7-hidroxicumarina</i>	53
8.2.2 <i>Reducción de nitrocumarinas y obtención de amidas y sulfonamidas</i>	57
8.3 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	64
8.3.1 <i>Actividad antiproliferativa de crisina y los derivados nitrogenados</i>	64
8.3.2 <i>Actividad antiproliferativa de umbeliferona y los derivados nitrogenados</i>	69
8.4 ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ENZIMA CDK9 Y MODELADO MOLECULAR	71
9. CONCLUSIONES	80

10. SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	82
11. REFERENCIAS	96
12. ANEXOS.....	107

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Condiciones de reacción para obtener los nitroderivados 1a , IIa y IIIa :	31
Esquema 2. Primera aproximación de las condiciones de reacción para la formación de amidas a partir de la flavona crisina.....	35
Esquema 3. Metilación de 8-nitrocrisina.....	38
Esquema 4. Condiciones de reducción de compuesto 3 usando hidrogenación catalizada por Pd/C.....	39
Esquema 5. Condiciones de reducción de compuesto 3 usando SnCl ₂ ·H ₂ O/EtOH, calentamiento e irradiación microondas (MW)	42
Esquema 6. Condiciones de reacción para la formación de la amida 4a	45
Esquema 7. Condiciones de reacción de la formación de la amida 4b y 4c	46
Esquema 8. Condiciones de reacción en la obtención de sulfonamidas 4d-4f	49
Esquema 9. Productos obtenidos de la nitración de umbeliferona usando nitrato de bismuto (III) y sólidos ácidos	53
Esquema 10. Mecanismo propuesto de la nitración con el uso de nitrato de bismuto (III) y sólidos ácidos	55
Esquema 11. Obtención de 6-sulfonilamidocumarinas y 8-amidocumarinas.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de una cumarina y un flavonoide.....	4
Figura 2. Proceso de carcinogénesis y acciones para contrarrestar el avance (adaptada de Ramos [31]).....	8
Figura 3. Participación de diversas QDC's y ciclinas en el A) ciclo celular y B) transcripción (adaptada de Peyressatre et al. [39] y Shapiro [58])	10
Figura 4. Inhibidores de QDC's en ensayos clínicos fase I y II.....	12
Figura 5. Enzima Q9DC/T1 en complejo con el flavopiridol (Tomada de la base de datos de proteínas con código: 3BLR y editada en PyMOL).....	14
Figura 6. Interacciones del flavopiridol en el sitio catalítico de la enzima Q9DC	15
Figura 7. Modificaciones estructurales al flavopiridol para mejorar su selectividad hacia la enzima Q9DC	15
Figura 8. Regiones importantes de interacción en el sitio activo de la enzima Q9DC (adaptada de Wu et al. [12])	16
Figura 9. Modificaciones estructurales a la flavona wogonina que mejoraron su potencia sobre la enzima Q9DC	18
Figura 10. Modificaciones estructurales en la cumarina que mejoraron su selectividad hacia la enzima Q9DC	19
Figura 11. Modificaciones estructurales favorables para mejorar la actividad antiproliferativa de crisina	21
Figura 12. Modificaciones estructurales en la cumarina que han mejorado su actividad antiproliferativa.....	22
Figura 13. Correlaciones a dos y tres enlaces de distancia para los protones H3 y H6 de la nitroflavona 1a	37
Figura 14. Espectros apilados de RMN ¹ H de: A) nitroflavona 3 y B) aminoflavona 4	44
Figura 15. Estructuras resonantes de la umbeliferona que explican la distribución de carga para llevar a cabo una sustitución electrofílica aromática y obtener los isómeros 5a , 5b y 5c	55

Figura 16. Espectros de RMN ¹ H apilados de las nitrocumarinas 5a , 5b y 5c	57
Figura 17. Amidas y sulfonamidas obtenidas a partir de la flavona crisina y la cumarina umbeliferona	62
Figura 18. Estructura de crisina (1) y sus derivados a los que se evaluó su actividad antiproliferativa	65
Figura 19. Estructura de umbeliferona (5) y sus derivados evaluados en actividad antiproliferativa	65
Figura 20. Características estructurales en la flavona que favorecen su actividad antiproliferativa	71
Figura 21. Regiones de interacción de los compuestos 3 , 4c y 4d con la Q9DC.....	75
Figura 22. Interacciones A) compuesto 4c y B) compuesto 4d en el sitio activo de la Q9DC y en comparación con el flavopiridol	76
Figura 23. Sulfonamida A) 4d y B) 4c en el sitio activo de la Q9DC en representación de superficie	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad antiproliferativa de los flavonoides (1 , II y III) y sus nitroderivados (1a , IIa y IIIa)	32
Tabla 2. Actividad antioxidante de los flavonoides y sus nitroderivados mediante la captación del radical DFPH.....	32
Tabla 3. Actividad antiinflamatoria de flavonoides y los nitroderivados a través del ensayo de edema en oreja de ratón inducido por ATF	33
Tabla 4. Evaluación de diferentes cantidades de nitrato de bismuto para la reacción de nitración del compuesto 1	36
Tabla 5. Condiciones de reacción de metilación del compuesto 2	38
Tabla 6. Condiciones de reducción del compuesto 3 utilizando 8% mol de Pd/C y THF como disolvente	40
Tabla 7. Reducción del compuesto 3 usando SnCl ₂ ·H ₂ O y calentamiento (70 °C).....	41
Tabla 8. Reducción del compuesto 3 con SnCl ₂ ·H ₂ O/EtOH e irradiación con microondas (125 W) utilizando 10 equivalentes de SnCl ₂ ·H ₂ O	43
Tabla 9. Variación de la cantidad de cloruro de 4-nitrobenzoilo y rendimiento de la amida 4a	45
Tabla 10. Variación de la cantidad de cloruro de butirilo y rendimiento de los productos 4b y 4c	46
Tabla 11. Condiciones de reacción para la formación de las sulfonamidas 4d y 4g	50
Tabla 12. Rendimientos de reacción de nitración de 7-hidroxycumarina empleando diferentes sólidos ácidos.....	54
Tabla 13. Condiciones de reacción para la formación de las sulfonamidas 7a y 7b	59
Tabla 14. Condiciones de reacción para la formación de las amidocumarinas 7c y 7d	60
Tabla 15. Concentraciones inhibitorias medias (CI ₅₀ , μM) de los compuestos con mayor actividad antiproliferativa.....	68
Tabla 16. Energías de afinidad de los compuestos a y algunos derivados con la enzima Q9DC/T1.....	74

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1. RMN ¹ H del compuesto 1 (400 MHz DMSO- <i>d</i> ₆).....	107
Espectro 2. RMN ¹ H del compuesto 2 (500 MHz DMSO- <i>d</i> ₆).....	107
Espectro 3. RMN ¹³ C de 2 (125 MHz DMSO- <i>d</i> ₆).....	108
Espectro 4. Masas del compuesto 2 (IE+).....	108
Espectro 5. Masas de alta resolución del compuesto 2 (DART+).....	109
Espectro 6. RMN ¹ H del compuesto 2c (500 MHz CDCl ₃).....	109
Espectro 7. RMN ¹³ C del compuesto 2c (125 MHz CDCl ₃).....	110
Espectro 8. Masas del compuesto 2c (DART+).....	110
Espectro 9. RMN ¹ H del compuesto 3 (500 MHz CDCl ₃).....	111
Espectro 10. RMN ¹³ C del compuesto 3 (500 MHz CDCl ₃).....	111
Espectro 11. Masas del compuesto 3 (IE+).....	112
Espectro 12. Masas de alta resolución del compuesto 3 (ESI+).....	112
Espectro 13. RMN ¹ H del compuesto 3b (500 MHz CDCl ₃).....	113
Espectro 14. RMN ¹³ C del compuesto 3b (125 MHz CDCl ₃).....	113
Espectro 15. Masas del compuesto 3b (DART+).....	114
Espectro 16. RMN ¹ H del compuesto 4 (500 MHz CDCl ₃).....	114
Espectro 17. RMN ¹³ C del compuesto 4 (125 MHz CDCl ₃).....	115
Espectro 18. Masas del compuesto 4 (IE+).....	115
Espectro 19. Masas de alta resolución del compuesto 4 (IE+).....	116
Espectro 20. RMN ¹ H del compuesto 4a (500 MHz DMSO- <i>d</i> ₆).....	116
Espectro 21. RMN ¹³ C del compuesto 4a (125 MHz DMSO- <i>d</i> ₆).....	117
Espectro 22. Masas del compuesto 4a (IE+).....	117
Espectro 23. Masas de alta resolución del compuesto 4a (ESI+).....	118
Espectro 24. RMN ¹ H del compuesto 4b (500 MHz CDCl ₃).....	118
Espectro 25. RMN ¹³ C del compuesto 4b (125 MHz CDCl ₃).....	119
Espectro 26. Masas del compuesto 4b (DART+).....	119
Espectro 27. RMN ¹ H del compuesto 4c (700 MHz CDCl ₃).....	120
Espectro 28. RMN ¹³ C del compuesto 4c (175 MHz CDCl ₃).....	120
Espectro 29. Masas del compuesto 4c (DART+).....	121
Espectro 30. Masas de alta resolución del compuesto 4c (ESI+).....	121
Espectro 31. RMN ¹ H del compuesto 4d (400 MHz DMSO- <i>d</i> ₆).....	122
Espectro 32. RMN ¹³ C del compuesto 4d (100 MHz DMSO- <i>d</i> ₆).....	122
Espectro 33. Masas del compuesto 4d (DART+).....	123
Espectro 34. Masas de alta resolución del compuesto 4d (ESI+).....	123
Espectro 35. RMN ¹ H del compuesto 4g (400 MHz CDCl ₃).....	124

Espectro 36. RMN ¹³ C del compuesto 4g (100 MHz CDCl ₃)	124
Espectro 37. Masas del compuesto 4g (DART+).....	125
Espectro 38. Masas de alta resolución del compuesto 4g (ESI+)	125
Espectro 39. RMN ¹ H del compuesto 4e (500 MHz CDCl ₃).....	126
Espectro 40. RMN ¹³ C del compuesto 4e (125 MHz CDCl ₃)	126
Espectro 41. Masas de baja resolución del compuesto 4e (DART+).....	127
Espectro 42. Masas de alta resolución del compuesto 4e (ESI+).....	127
Espectro 43. RMN ¹ H del compuesto 4f (500 MHz CDCl ₃)	128
Espectro 44. RMN ¹³ C del compuesto 4f (125 MHz CDCl ₃).....	128
Espectro 45. Masas del compuesto 4f (DART+).....	129
Espectro 46. Masas de alta resolución del compuesto 4f (ESI+)	129
Espectro 47. RMN ¹ H del compuesto 5a (500 MHz DMSO- <i>d</i> ₆).....	130
Espectro 48. RMN ¹³ C del compuesto 5a (125 MHz DMSO- <i>d</i> ₆).....	130
Espectro 49. Masas del compuesto 5a (IE+)	131
Espectro 50. RMN ¹ H del compuesto 5b (500 MHz DMSO- <i>d</i> ₆)	131
Espectro 51. RMN ¹³ C del compuesto 5b (125 MHz DMSO- <i>d</i> ₆).....	132
Espectro 52. Masas del compuesto 5b (IE+).....	132
Espectro 53. RMN ¹ H del compuesto 5c (500 MHz MeOH- <i>d</i> ₄)	133
Espectro 54. RMN ¹³ C del compuesto 5c (125 MHz MeOH- <i>d</i> ₄)	133
Espectro 55. masas del compuesto 5c (IE+)	134
Espectro 56. RMN ¹ H del compuesto 6a (500 MHz MeOH- <i>d</i> ₄).....	134
Espectro 57. RMN ¹³ C del compuesto 6a (125 MHz MeOH- <i>d</i> ₆).....	135
Espectro 58. Masas del compuesto 6a (DART+)	135
Espectro 59. RMN ¹ H del compuesto 6b (500 MHz DMSO- <i>d</i> ₆)	136
Espectro 60. RMN ¹³ C del compuesto 6b (125 MHz DMSO- <i>d</i> ₆).....	136
Espectro 61. Masas del compuesto 6b (DART+).....	137
Espectro 62. Masas de alta resolución del compuesto 6b (ESI+).....	137
Espectro 63. RMN ¹ H del compuesto 7a (400 MHz DMSO- <i>d</i> ₆).....	138
Espectro 64. RMN ¹³ C del compuesto 7a (100 MHz DMSO- <i>d</i> ₆).....	138
Espectro 65. Masas del compuesto 7a (DART+)	139
Espectro 66. Masas de alta resolución del compuesto 7a (ESI+).....	139
Espectro 67. RMN ¹ H del compuesto 7b (400 MHz DMSO- <i>d</i> ₆)	140
Espectro 68. RMN ¹³ C del compuesto 7b (100 MHz DMSO- <i>d</i> ₆).....	140
Espectro 69. Masas del compuesto 7b (DART+).....	141
Espectro 70. Masas de alta resolución del compuesto 7b (ESI+)	141
Espectro 71. RMN ¹ H del compuesto 7c (700 MHz DMSO- <i>d</i> ₆).....	142
Espectro 72. RMN ¹³ C del compuesto 7c (175 MHz DMSO- <i>d</i> ₆)	142
Espectro 73. Masas del compuesto 7c (DART+).....	143

Espectro 74. Masas de alta resolución del compuesto 7c (ESI+).....	143
Espectro 75. RMN ¹ H del compuesto 7d (500 MHz CDCl ₃).....	144
Espectro 76. RMN ¹³ C del compuesto 7d (125 MHz CDCl ₃).....	144
Espectro 77. Masas del compuesto 7d (DART+).....	145
Espectro 78. Masas de alta resolución del compuesto 7d (ESI+).....	145

1. INTRODUCCIÓN

Los productos naturales son metabolitos secundarios que producen los organismos vivos (plantas, animales, algas, bacterias y hongos) [1]. Muchos productos naturales presentan actividad biológica importante y han sido utilizados para el tratamiento de diversas enfermedades y padecimientos como el cáncer [2,3].

El cáncer es una de las principales enfermedades causantes de muerte en el mundo y se caracteriza por el crecimiento descontrolado y propagación de células anormales a otras partes del cuerpo (metástasis) [4]. Debido a la complejidad de esta enfermedad, originada por la existencia de diversos tipos de tumores, la resistencia a fármacos y efectos secundarios que producen, promueven la búsqueda de nuevas dianas y compuestos con actividad anticancerígena.

Los flavonoides y las cumarinas son productos naturales que pertenecen al grupo de los fenil propanoides que se encuentran principalmente en las partes aéreas de las plantas, semillas, raíces y alimentos [5,6]. Los flavonoides y cumarinas han mostrado una amplia gama de actividades biológicas, entre ellas como anticancerígenos [7,8]. Diversas investigaciones demuestran que estos productos naturales pueden intervenir en diferentes etapas de carcinogénesis al detener el ciclo celular, inducir a muerte por apoptosis y suprimir la proliferación e invasividad de las células cancerosas [7,9–11].

El flavopiridol, algunas flavonas de origen natural como la luteolina, wogonina, crisina y algunos derivados sintéticos de cumarinas inhiben algunas quinasas dependientes de ciclinas, las cuales son consideradas dianas prometedoras en el desarrollo de compuestos con actividad anticancerígena [12–14]. En especial, la enzima quinasa 9 dependiente de la ciclina (Q9DC) es de interés debido a que se ha asociado al pronóstico de algunos tipos de

cáncer que tienen alta prevalencia y tasa de mortalidad en México y en el mundo, entre ellos se encuentran el cáncer de mama [15], próstata y pulmón [16].

En la búsqueda de nuevos inhibidores con mejor actividad y selectividad sobre la Q9DC, se han realizado diversas modificaciones estructurales en algunos flavonoides presentes en la naturaleza. En el diseño y en las modificaciones estructurales realizadas en flavonas y cumarinas, para mejorar su actividad inhibitoria y selectividad hacia la enzima Q9DC, han incorporado grupos funcionales que contienen nitrógeno en la posición C8 de la flavona [17] y C7 de la cumarina [18].

De manera preliminar, se establecieron condiciones de nitración suaves de los flavonoides crisina, quercetina y naringina y se evaluó el efecto del grupo nitro en la actividad antiproliferativa, antiinflamatoria y antioxidante de nitroflavonoides. Los compuestos obtenidos fueron 8-nitrocrisina, 5'-nitroquercetina y la mezcla de 2-*R,S* 3'-nitronaringina. A pesar de que la estructura base flavona de crisina presentó una mejor actividad antiproliferativa, en comparación con el flavonol quercetina y la flavanona glicosilada naringina, el grupo nitro no mejoró la actividad antiproliferativa de la flavona. En quercetina, el grupo nitro en la posición C5', condujo a una mejora de su actividad antiinflamatoria y antioxidante. Por otro lado, para 2-*R,S* naringina, el grupo nitro en la posición C3' mejoró su actividad antiinflamatoria.

Con estos datos y con el objetivo de mejorar la actividad antiproliferativa de la flavona 8-nitrocrisina y como inhibidor de la enzima Q9DC, se propusieron modificaciones alrededor del grupo nitro para obtener amidas y sulfonamidas. Adicionalmente, fue de interés incorporar otra estructura aromática tipo cumarina, la cual ha sido menos explorada en el desarrollo de agentes anticancerígenos y como inhibidores de la enzima Q9DC.

Posteriormente, se establecieron condiciones de reacción para incorporar grupos nitrogenados en la posición C8 de la flavona crisina y en las posiciones C6 y C8 de la

cumarina umbeliferona. La semisíntesis incluyó la incorporación de un grupo nitro. Posteriormente se redujo a la amina correspondiente y, a partir de la aminoflavona o aminocumarina se formaron amidas y sulfonamidas con grupos sustituyentes aromáticos y alifáticos. Los resultados de evaluación antiproliferativa de los compuestos obtenidos mostraron que la estructura base flavona presentó mayor actividad que la cumarina. Los grupos funcionales nitro, propilamida, fenilsulfonamida, en la posición C8 de los compuestos 5,7-dimetoxi-8-nitro-2-fenil-4*H*-cromen-4-ona (**3**), *N*-butiril-*N*-(5,7-dimetoxi-4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-8-il)butiramida (**4c**) y *N*-(5,7-dimetoxi-4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-8-il)benzenosulfonamida (**4d**), mejoraron la actividad antiproliferativa en comparación con la flavona crisina. De esta manera, los compuestos **3** y **4c** presentaron valores de CI_{50} de 5.6 ± 0.8 y 23.2 ± 2.8 μ M, respectivamente, en la línea celular de cáncer de próstata (PC3). El compuesto **4d** presentó una $CI_{50} = 26.1 \pm 2.1$ μ M en la línea de cáncer de mama (MDA-MB-231). Los compuestos **3**, **4c** y **4d** mostraron capacidad de inhibir a la enzima. Estudios de modelado molecular mostraron que los compuestos **4c** y **4d** se unieron favorablemente en el sitio activo de la enzima Q9DC y adoptaron una posición similar a la del flavopiridol. A diferencia de los compuestos **4c** y **4d**, la 8-nitroflavona **3** se unió favorablemente en una región cercana al final del dominio C-terminal de la enzima. Con estos resultados se concluye que los grupos nitrogenados en la posición C8 de la flavona mejoraron su actividad antiproliferativa e inhibidora de la enzima Q9DC, inspirando nuevas modificaciones en los grupos sustituyentes de amidas, sulfonamidas y en el anillo B de la flavona.

2. ANTECEDENTES

2.1 Flavonoides y cumarinas como fuente de agentes anticancerígenos

Los productos naturales son metabolitos secundarios que producen las plantas, animales, microorganismos y organismos marinos. Estos compuestos se caracterizan por presentar una gran diversidad y complejidad estructural [1]. Muchos productos naturales presentan actividad biológica importante y han sido utilizados para el tratamiento de diversas enfermedades y padecimientos como el cáncer [2,3], diabetes [19,20], infecciones e inflamación.

Los flavonoides y las cumarinas son productos naturales representativos del grupo de compuestos polifenólicos que se encuentran principalmente en las partes aéreas de las plantas, semillas, raíces y alimentos. Este grupo lo comprenden más de 8000 compuestos conocidos y este número sigue incrementando debido a que la gran diversidad estructural proviene de diversos patrones de hidroxilación, metoxilación, glicosilación y acilación [5,6].

Los flavonoides comparten una estructura base C₆-C₃-C₆ denominado fenilbenzopirano, formada por dos anillos aromáticos (A y B) unidos a través de un anillo de pirano (C). De acuerdo con el grado de oxidación y saturación en el anillo C, se derivan las estructuras: flavanona, flavona, favonol, dihidroflavonol, flaván-3-ol y flaván-4-ol [21]. Por su parte, la cumarina es una α -benzopirona con una estructura base C₆-C₃ y se clasifican como cumarinas simples, furanocumarinas y piranocumarinas [22]. En la **Figura 1** se muestran ejemplos de las estructuras de una cumarina y un flavonoide.

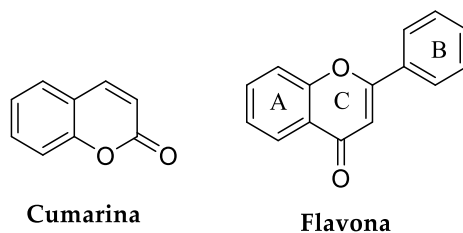


Figura 1. Estructuras de una cumarina y un flavonoide

Los flavonoides y cumarinas han mostrado una amplia gama de efectos biológicos, dentro de los cuales se incluyen: antibacteriales, antivirales, antiinflamatorias y anticancerígenas. Este hecho se atribuye a la capacidad que tienen estos productos naturales de eliminar radicales libres, inhibir e incluso inducir la expresión de diversas enzimas involucradas en diferentes vías; por ejemplo, en el ciclo celular, así como prevenir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo [7,8]. El cáncer es una de las enfermedades en donde los flavonoides y las cumarinas pueden intervenir en diferentes etapas de carcinogénesis al detener el ciclo celular, inducir la muerte por apoptosis y suprimir la proliferación e invasividad de las células cancerosas [7,9–11].

Flavonoides como la quercetina, apigenina, crisina, genisteína, catequina, kaempferol, luteonina y cumarinas como umbeliferona, 4-hidroxycumarina, 6,7-dihidroxycumarina, 7,8-dihidroxycumarina y 7-geraniloxycumarina han presentado actividad antiproliferativa en diferentes tipos de cáncer como, el de próstata, pulmón, mama, colon y leucemia [7,11]. La modificación estructural de estos productos naturales, atrae la atención, debido a que diferentes sustituyentes alrededor de las estructuras bases han conducido a una mejora de su actividad antiproliferativa, abriendo un campo de oportunidad en la búsqueda de nuevos agentes anticancerígenos [22].

2.2 Cáncer. Generalidades y estadísticas

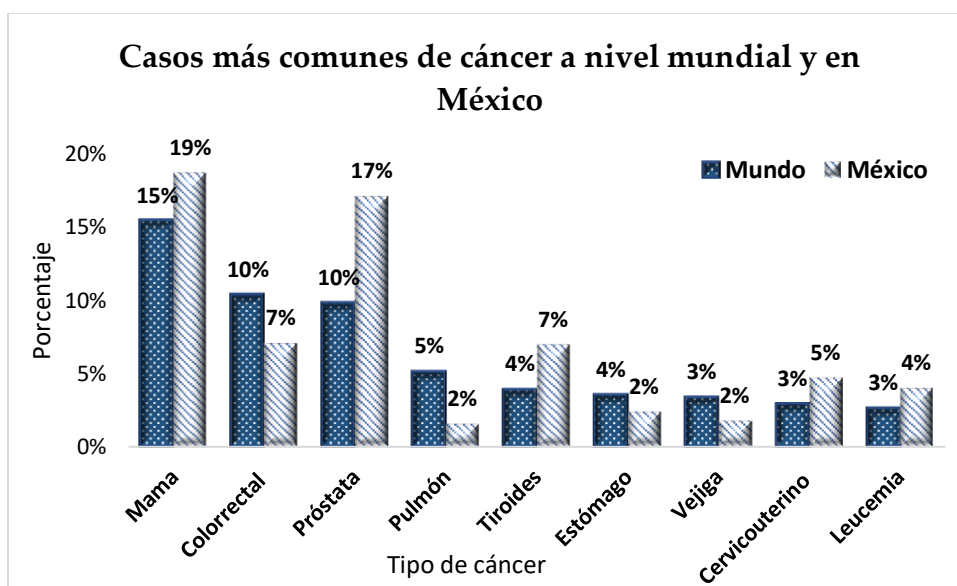
El cáncer está considerado como un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado y propagación de células anormales a partes adyacentes del cuerpo o a otros órganos en un proceso denominado metástasis. Existen más de 100 tipos diferentes de cánceres, distinguiéndose de acuerdo al tejido de origen [4].

El cáncer es una de las causas principales de muerte en todo el mundo y en México es la tercera causa de muerte. En el año 2020 se registraron 19.3 millones de nuevos casos de cáncer y aproximadamente 10 millones de fallecimientos a nivel mundial. Una de cada 5 personas en todo el mundo desarrolla algún tipo de cáncer durante su vida. Los 10 tipos de

cáncer más comunes representan más del 60% de los casos de cáncer recién diagnosticados y más del 70% de las muertes por cáncer. En la **Gráfica 1** se muestran los porcentajes de los 10 tipos de cáncer que se diagnostican con mayor frecuencia en México y en el mundo. Los más comunes son el de mama femenino, seguido del cáncer colorrectal y próstata. El cáncer de pulmón, tiroides, estómago, cervicouterino y leucemia se presentan con menor frecuencia [23].

En los hombres, el cáncer de pulmón es el cáncer que se diagnostica con más frecuencia y la principal causa de muerte por cáncer, seguido del cáncer de próstata. En las mujeres, el cáncer de mama es el cáncer más comúnmente diagnosticado y la principal causa de muerte por cáncer [24].

A pesar de los años de investigación en mecanismos y tratamientos para el cáncer, cada año se incrementan nuevos casos; de esta forma se predicen aproximadamente 30.2 millones de nuevos casos para el año 2040 a nivel mundial [25].



Gráfica 1. Panorama mundial y en México del cáncer (GLOBOCAN, 2020)

Se han detectado algunos factores de riesgo externos que conducen al cáncer. Entre ellos se encuentran fumar, consumir bebidas alcohólicas, una dieta poco saludable, inactividad física y contaminación [26]. Por otro lado, algunas infecciones crónicas han sido factores de riesgo que pueden desencadenar cáncer. Aproximadamente 13% de los casos de cáncer a nivel global se han desencadenado por infecciones por *Helicobacter pylori*, virus del papiloma humano, virus de hepatitis B y C y virus de Epstein Barr [27].

El tratamiento para muchos cánceres puede consistir en una combinación de resección quirúrgica, quimioterapia sistémica y radioterapia local [28]. Estos tratamientos son generalmente acompañados por efectos secundarios, afectando la calidad de vida del paciente. Además, es importante tener en cuenta que menos del 25% de los tratamientos alcanzan una respuesta completa, por lo que suele ser necesario para varios ciclos de estos tratamientos [29].

2.3 Carcinogénesis

La carcinogénesis es el proceso por el cual una célula normal se transforma en una célula maligna. Este proceso es complejo y se ha dividido en tres pasos generales en los que se producen distintas alteraciones moleculares y celulares: 1) iniciación, 2) promoción y 3) progresión (**Figura 2**) [30].

- (1) El inicio es una fase rápida, comprende la exposición o captación e interacción de las células, especialmente el ADN, con un agente carcinogénico.
- (2) La promoción es relativamente prolongada en comparación con la etapa anterior, las células anormales persisten, se replican y pueden originar un foco de células preneoplásicas.
- (3) La etapa de progresión es la etapa final y se caracteriza por un crecimiento descontrolado de las células (tumor), implica la conversión gradual de células premalignas en neoplásicas, con un aumento de la invasión que puede desencadenar el proceso de metástasis, y la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis).

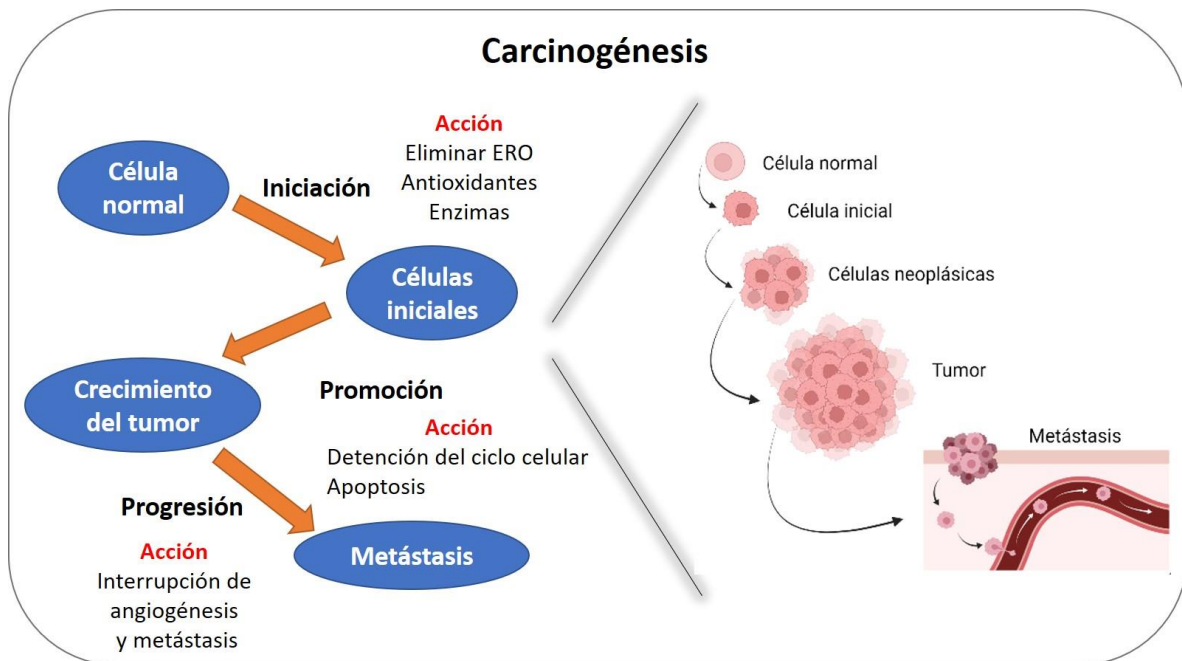


Figura 2. Proceso de carcinogénesis y acciones para contrarrestar el avance (adaptada de Ramos [31])

En la fase de inicio, el agente cancerígeno interactúa con el ADN de la célula diana y causa daño. El bloqueo del daño genotóxico en las primeras etapas de la carcinogénesis constituye la forma más eficaz de prevenir el cáncer y se puede lograr eliminando las especies reactivas del oxígeno (ERO) o induciendo las enzimas conjugadoras de fase II (glutación-S-transferasas (GST), glucuronidasas y sulfotransferasas) para promover la desintoxicación del agente cancerígeno.

En la etapa de promoción del tumor, los mecanismos que detienen o ralentizan la división celular podrían ser potencialmente beneficiosos (inducción de la detención del ciclo celular, apoptosis) para restablecer el equilibrio perdido entre la proliferación celular y la apoptosis. En la última fase de la carcinogénesis (progresión), la interrupción de la angiogénesis o la prevención de que las células malignas escapen de la ubicación original e invadan otros tejidos también podrían ser potencialmente útiles [30].

Durante todas las etapas del desarrollo del cáncer, muchas proteínas clave relacionadas con las defensas antioxidantes celulares, la proliferación celular y las vías de transducción de supervivencia están reguladas al alza; por ejemplo, proteínas antiapoptóticas, o regulada negativamente (caspasas, miembros proapoptóticos de genes de la familia bcl-2, etc.) [31]. Las vías de señalización y, propiamente las enzimas que regulan la progresión del ciclo celular y la transcripción (por ejemplo las quinasas dependientes de ciclinas), también se alteran con en el progreso del cáncer [32,33].

Cabe destacar que muchas de las enzimas, receptores de factores de crecimiento y transductores de señales involucrados en las diferentes vías de señalización, han sido investigados como blancos potenciales para el desarrollo de fármacos en el tratamiento del cáncer [34].

2.4 Quinasas dependientes de ciclinas (QDC's) como dianas para el tratamiento del cáncer

Las QDC's forman parte de la familia de las quinasas que transfieren un grupo fosfato del ATP (adenosín trifosfato) a un sustrato que contenga residuos de serina o treonina [35]. Estas enzimas juegan un papel integral en procesos celulares, particularmente su actividad se ha detectado en el ciclo celular y la transcripción [36,37].

Actualmente se han identificado 20 QDC's en células humanas. Entre éstas se han distinguido aquellas que participan en el ciclo celular (Q1-6DC, Q14-18DC) y en la transcripción (Q7-13DC, Q19DC y Q20DC). Una de las características principales de estas enzimas es que se activan al unirse a otras proteínas denominadas ciclinas, formando heterodímeros [36,38]. En la **Figura 3** se muestran algunas QDC's que participan en el ciclo celular y en la transcripción.

La división celular es un proceso que incluye cuatro fases: G1 (gap1, crecimiento celular), S (síntesis de ADN), G2 (gap 2, preparación para la división) y M (mitosis); mediante las cuales una célula madre se divide en dos células hijas. Este proceso está

controlado por las QDC's unidas a diversas ciclinas. De esta manera, el ciclo celular se regula por la Q1DC/ciclina B durante la mitosis, Q4DC y Q6DC/ciclina D en la fase G₁, Q2DC/ciclina E en la transición G₁/S, Q2DC/ciclina A en la fase S y QDC1/ciclina A en la progresión de la fase G₂ (**Figura 3A**) [39,40] .

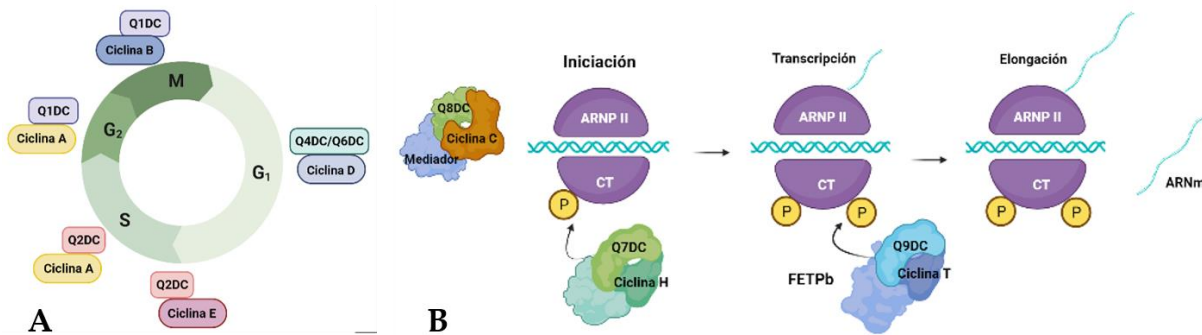


Figura 3. Participación de diversas QDC's y ciclinas en el **A)** ciclo celular y **B)** transcripción (adaptada de Peyressatre et al. [39] y Shapiro [58])

La transcripción es el proceso de síntesis de ARNm y se pueden distinguir cuatro fases: 1) formación del complejo de iniciación, 2) iniciación, 3) elongación y 4) terminación. De manera similar al ciclo celular, se ha determinado la participación de algunas QDC's y ciclinas, otras continúan en investigación. El proceso de transcripción implica la formación de diversos complejos formados por proteínas, como la ARN polimerasa II (ARNP II), QDC's/ciclinas, factores de transcripción, entre otras proteínas. En términos generales la transcripción comienza con la formación del complejo de pre iniciación, en el cual la ARNP II es asistida por factores de transcripción generales, en donde uno de ellos se une a la Q7DC/ciclina H para inducir la fosforilación de ARNP II en la serina 5 de las repeticiones Y₁S₂P₃T₄S₅P₆S₇ del carboxilo terminal (CT) lo cual permitirá la transcripción.

La Q7DC también activa otras QDC's por fosforilación, por ejemplo, fosforila a la Q9DC, la cual también participa en la transcripción. El complejo de la Q8DC/ciclina C forma parte de otro complejo encargado de activar o detener la transcripción, fosforilando diversos factores de transcripción y modula la actividad de la Q7DC por la fosforilación de la ciclina

H, lo que impide la actividad de Q7DC e inhibe el inicio de la transcripción [38]. El dímero Q9DC/ciclina T forma aparte de FETPb (Factor de Elongación de Transcripción Positivo b) que fosforila a la ARNP II en la Ser2, hecho fundamental para la elongación de la cadena de ARNm (**Figura 3B**) [37,41].

Las proteínas que participan en las vías de señalización involucradas en el crecimiento, división celular y transcripción se encuentran desreguladas en diversos tipos de cáncer. Por ejemplo, se ha observado una activación anómala de la enzima Q1DC en tumores de mamá, colon, próstata y pulmón; por su parte la Q2DC se encuentra desregulada en melanoma, leucemia, carcinoma de pulmón y de ovario. La quinasa transcripcional Q9DC se ha encontrado sobre-expresada en melanoma, cáncer de pulmón, próstata y mama [42].

Estos hallazgos sugieren a las QDC's como blancos potenciales en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, al limitar la progresión del desarrollo de un tumor y facilitar la inducción de apoptosis [42]. En la **Figura 4** se muestran diversos compuestos que inhiben a las QDC's y han trascendido a ensayos clínicos de fase I y II [42]. El compuesto AG-024322 es un indazol que inhibe diversas Q1DC, Q2DC y Q4DC, detiene el ciclo celular y actividad antitumoral, sin embargo, presenta toxicidad a dosis mayores a 6 mg/Kg [43,44]. El compuesto AT-7519 es un pirazol, un inhibidor preferencial de la enzima Q9DC y Q2DC, detiene el ciclo celular e induce a apoptosis a dosis < 1 μ M. La actividad de este compuesto sobre las QDC's se vinculó a la inhibición del crecimiento o regresión del tumor en carcinoma de colon [45].

El flavopiridol y P276-00 son compuestos que tienen una estructura base flavonas presente en los productos naturales denominados flavonoides. El flavopiridol tiene efecto citotóxico en diversas líneas celulares de cáncer humano, inhibe el crecimiento celular e induce a apoptosis en cáncer de próstata [46], cáncer de pulmón [47], glioblastoma [48] y en leucemia [49]. A pesar de que el flavopiridol inhibe diversas QDC's, sigue siendo de

interés al tener efecto sinérgico con otros agentes antiproliferativos [50] y se encuentra en ensayos clínicos fase II para el tratamiento de leucemia crónica linfocítica [51].

El compuesto denominado P276-00 es un análogo de flavopiridol, con un cambio de la piperidina por una pirrolidina en la posición C8. Este compuesto inhibe eficientemente a la Q9DC y a otras QDC's, como la Q1DC y Q4DC [52], sin embargo, su estudio se ha frenado en los ensayos clínicos fase II.

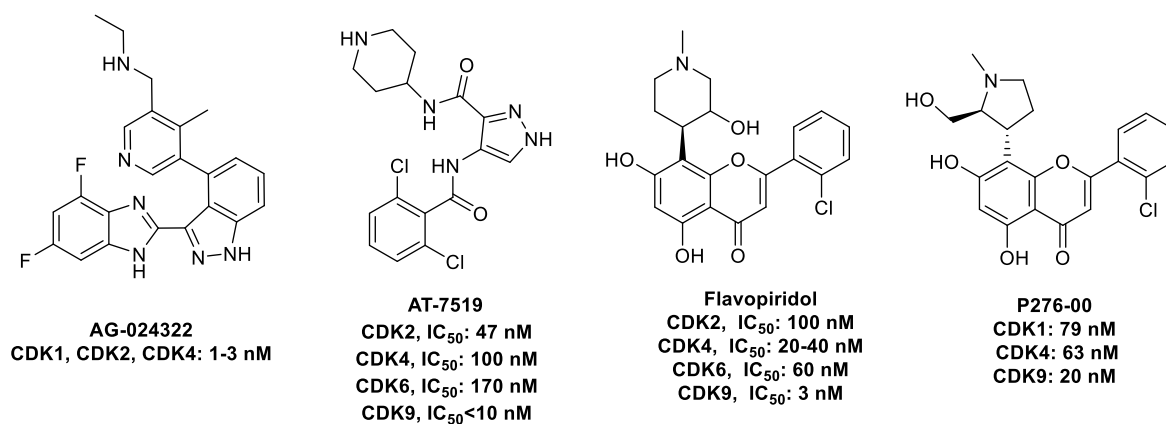


Figura 4. Inhibidores de QDC's en ensayos clínicos fase I y II

Las QDC's siguen siendo tema de interés de investigación en la búsqueda de nuevos inhibidores que muestren más selectividad. Inicialmente, las QDC's que participan en el ciclo celular, atrajeron mayor atención para ser investigadas. Actualmente se ha resaltado la importancia de las QDC's que participan en la transcripción y son consideradas blancos potenciales en cánceres donde la maquinaria transcripcional está desregulada [53].

Por ejemplo, la Q9DC ha sido implicada en el pronóstico del cáncer de mama (cáncer de mamá triple negativo) [15], glioblastoma [54], pulmón, próstata [16], endometrio, osteosarcoma [55], leucemia mieloide y sarcomas de tejido blando [56]. Además de que la actividad de la enzima Q9DC está relacionada con el pronóstico de diversos tipos de cánceres [54] y su sobreexpresión [57]. El hecho de que la enzima Q9DC sea propuesta como diana, también se basa en la observación de que esta enzima regula la transcripción de ARN

de proteínas antiapoptóticas, de esta manera se reporta que la inhibición de la fosforilación mediada por Q9DC/T1 de ARNP^{II} conduce a la disminución de los niveles de proteínas antiapoptóticas como Mcl-1 [58–61] y XIAP [62], lo que restablece la capacidad de las células cancerosas a inducir a una muerte por apoptosis.

2.5 Q9DC e inhibidores

Como se mencionó anteriormente, la enzima Q9DC se activa al formar un complejo heterodimérico con una ciclina (T1, T2, T2a, T2b y K), encontrándose en mayor proporción (80%) el complejo Q9DC/ciclina T1, ya que la ciclina T1 es la más abundante con respecto a las demás [63,64]. A su vez, el complejo Q9DC/ciclina, forma parte del FETPb cuya función es fosforilar la serina 2 de las secuencias YS²PT⁴S⁵PS⁷ ubicadas en el dominio del carboxilo terminal del ARNP II, acción clave para la transcripción y elongación del ARNm [65].

En las células, la Q9DC se expresa en dos isoformas una más ligera de 42 kDa y otra de 55 kDa. La isoforma de 55 kDa tiene 117 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal [66]. Ambas isoformas participan en la transcripción y en la maduración del ARNm, sin embargo, el significado funcional de la expresión de distintas isoformas y la especificidad de su asociación a diferentes ciclinas aún no ha sido completamente aclarado [64]. Pero, se ha observado que la asociación de una ciclina y la fosforilación del residuo Thr186 son necesarios para la activación de Q9DC [67].

Estructuralmente hablando, la enzima Q9DC comprende un amino terminal (N-terminal) con un plegamiento, principalmente lámina β con una α -hélice (residuos 16–108) y el carboxilo terminal (C-terminal) está formado principalmente por α -hélices (residuos 109–330). Los aminoácidos 59-66 (Pro60, Ile61, Thr62, Ala63, Leu64, Arg65, Glu66) son los que interaccionan con la ciclina T (Lys93, Leu101, Glu137, Phe146) y, por lo tanto, son de importancia para la activación de la Q9DC. La región denominada bisagra involucra el límite entre los dominios N-terminal y el C-terminal y alberga al sitio activo. La región bisagra está conformada por los aminoácidos Phe103, Asp104, Phe105, Cys106, Glu107,

His108, Asp109 y Leu110, los residuos 103-108 pertenecen al dominio N-terminal y los residuos 109 y 110 pertenecen al dominio C-terminal [67]. En la **Figura 5** se muestran la enzima Q9DC con la ciclina T1 en complejo con el flavopiridol en el sitio activo.

La estructura cristalográfica de la enzima Q9DC/T1 en complejo con el flavopiridol se encuentra reportada en la base de datos de proteínas (PDB), lo cual permite observar las interacciones importantes que se establecen en el sitio activo de esta enzima y el flavopiridol. Se establecen dos enlaces de hidrógeno entre los oxígenos de los grupos hidroxilos del flavopiridol y los residuos Cys106 y Asp104. Baumli y colaboradores consideran la protonación del nitrógeno de la piperidina del flavopiridol con lo cual forma un enlace de hidrógeno con el residuo Asp167 [67], **Figura 6**.

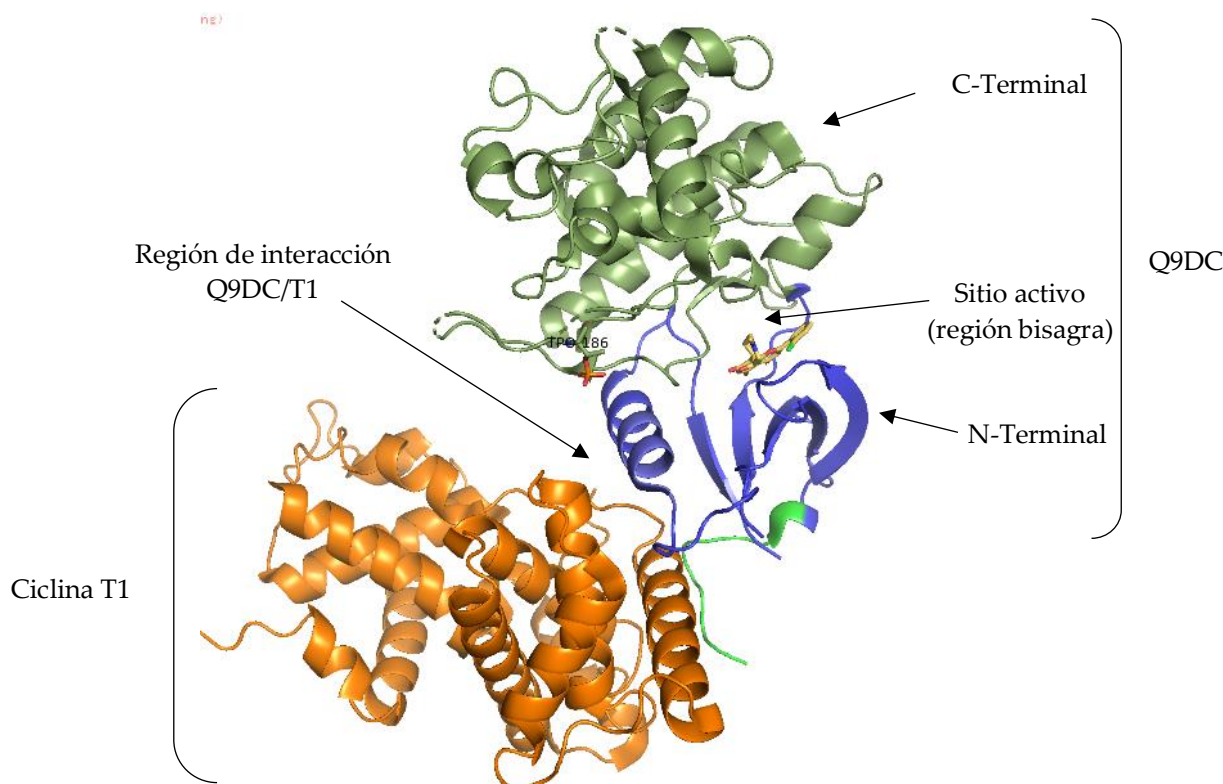


Figura 5. Enzima Q9DC/T1 en complejo con el flavopiridol (Tomada de la base de datos de proteínas con código: 3BLR y editada en PyMOL)

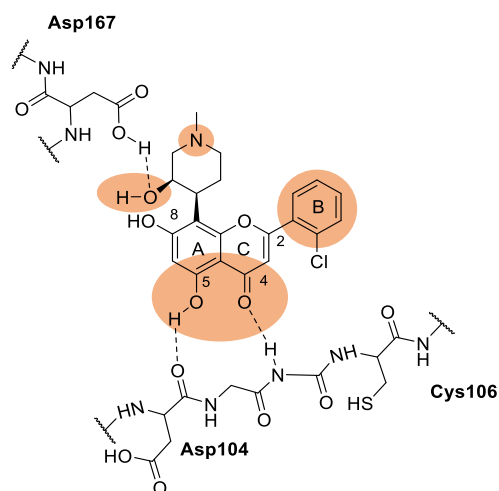


Figura 6. Interacciones del flavopiridol en el sitio catalítico de la enzima Q9DC

El flavopiridol es una flavona semisintética derivada del alcaloide rohitukina. Como se mencionó previamente, es un inhibidor de las enzimas Q2DC, Q6DC, Q4DC y con mayor potencia inhibe a la Q9DC [68]. Para generar un inhibidor con mayor selectividad se han realizado diferentes modificaciones en la posición C8 y en el anillo aromático B de la flavona. Por ejemplo, el cambio de una piperidina en C8 por tetrahidropirrol (Rivicielib) más la adición de un grupo trifluorometilo en C4' del anillo B (Vorucilib) aumentaron su selectividad hacia la enzima Q9DC, **Figura 7** [68,69].

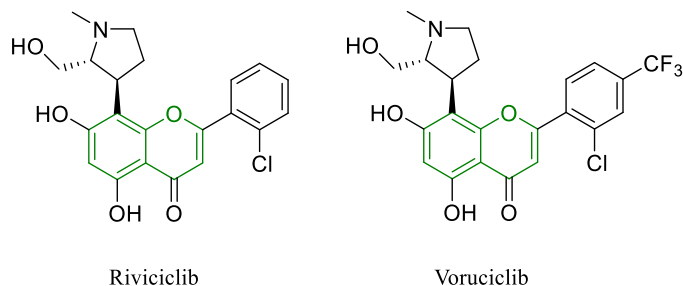


Figura 7. Modificaciones estructurales al flavopiridol para mejorar su selectividad hacia la enzima Q9DC

Los enlaces de hidrógeno entre los ligandos y los Asp104, así como Cys106, en la proteína Q9DC son esenciales para la actividad y potencia de los ligandos. Estas

interacciones se han observado para inhibidores de la enzima Q9DC que han sido evaluado en ensayos clínicos [12].

Estudios de relación estructura actividad de algunos compuestos con estructura base flavona indican que el grupo cromona el anillo B, el grupo carbonilo en la posición C4, un grupo donador de enlace de hidrógeno en C5, el nitrógeno y el donador de enlace de hidrógeno de la piperidina son importantes para la interacción en el sitio activo [68], **Figura 6**. Otros inhibidores que se pueden distinguir para la enzima Q9DC y han trascendido a fases clínicas son del tipo aminopirimidinas, aminotriazina, aminopiridina y heterociclos fusionados que contengan nitrógeno. Una característica en común que comparten estos compuestos es la presencia del nitrógeno, ya sea heterocíclico o fuera del ciclo, y se conservan los enlaces de hidrógeno con los residuos Asp104 y Cys106 [12].

Otras características del sitio activo que son de importancia para desarrollar inhibidores para la enzima Q9DC, son las regiones hidrofóbicas con las cuales se pueden establecer interacciones con el ligando [12]. Algunos residuos como Phe103, Phe105, His108, His108, Asp109, Ala111, Asn154, entre otros, pueden interaccionar favorablemente con el ligando, **Figura 8**.

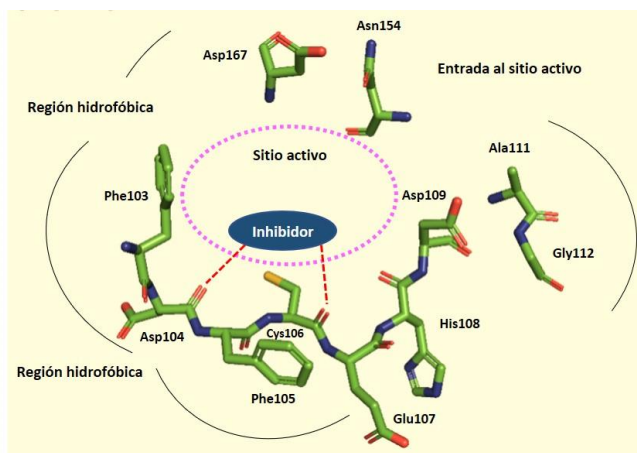


Figura 8. Regiones importantes de interacción en el sitio activo de la enzima Q9DC (adaptada de Wu et al. [12])

2.6 Flavonoides y cumarinas como fuentes de agentes antiproliferativos e inhibidores de la enzima Q9DC

Como se mencionó anteriormente, el flavopiridol es una flavona semisintética inspirada en el alcaloide rohitukina y fue uno de los primeros compuestos desarrollados como inhibidor de la QDC's, inhibiendo preferencialmente la Q9DC (**Figura 4**); por lo tanto, esta enzima es uno de sus principales blancos [12].

Algunas flavonas de origen natural como la luteolina, wogonina, crisina, [14,68] y algunos derivados sintéticos de cumarinas [18] y flavonas inhiben a la enzima Q9DC. Como es de esperarse, estas flavonas y otras como la apigenina y luteonina, inhiben otras QDC's. De esta manera, la flavona wogonina ha mostrado mayor selectividad sobre la enzima Q9DC ($CI_{50} = 190 \text{ nM}$) en comparación con las enzimas Q2DC ($CI_{50} = 1.46 \text{ }\mu\text{M}$) y Q7DC ($CI_{50} = 12.3 \text{ }\mu\text{M}$). La genisteína fue ineficaz cuando se evaluó contra Q2DC y Q4DC, mientras tanto, se detectó que la fisetina reducía las actividades de las enzimas Q1DC, Q5DC y Q6DC, con valores de CI_{50} por debajo de $1 \text{ }\mu\text{M}$.

Por su parte, el kaempferol mostró un efecto moderado frente a las enzimas Q1DC, Q5DC y Q6DC ($CI_{50} = 20\text{-}50 \text{ }\mu\text{M}$); de manera similar, la quercetina resultó ser un inhibidor moderado de las enzimas Q2DC y Q4DC ($CI_{50} = 20\text{-}60 \text{ }\mu\text{M}$). Luteolina, apigenina y crisina se identificaron como buenos inhibidores de las enzimas Q1DC, Q5DC y Q6DC, con valores por debajo de $10 \text{ }\mu\text{M}$, excepto luteonina en la enzima Q6DC ($CI_{50} > 300 \text{ }\mu\text{M}$) [70]. A pesar de estos datos, no existen más reportes en donde se investigue la inhibición de estos flavonoides de origen natural en las diversas QDC's que permitan establecer una posible relación de la estructura con la actividad inhibitoria.

En la búsqueda de nuevos inhibidores con mejor actividad y selectividad sobre las QDC's, se han realizado diversas modificaciones estructurales en algunos flavonoides presentes en la naturaleza. Cambios estructurales, principalmente en la posición C8 y en el

anillo B de la flavona, y en las posiciones C7 de la cumarina, tienen efectos en la actividad y selectividad en la enzima Q9DC.

Ejemplo de las modificaciones estructurales se reportan para la flavona wogonina, en donde se introdujo una piperazina en la posición C4' del anillo B para generar el compuesto I. Con este cambio se mejoró su selectividad en la enzima Q9DC en comparación con la Q2DC. Posteriormente, el cambio del metilo del metoxilo en C8 por un pirazol en la posición C8 (II) produjo una mejora en su potencia para inhibir a la enzima Q9DC y resultó ser 45 veces más selectivo sobre esta enzima en comparación con la Q2DC, **Figura 9**. La actividad antiproliferativa del compuesto II fue prometedora en especial para la línea celular de leucemia MV4-11 (CI₅₀ = 20 nM) [12,17].

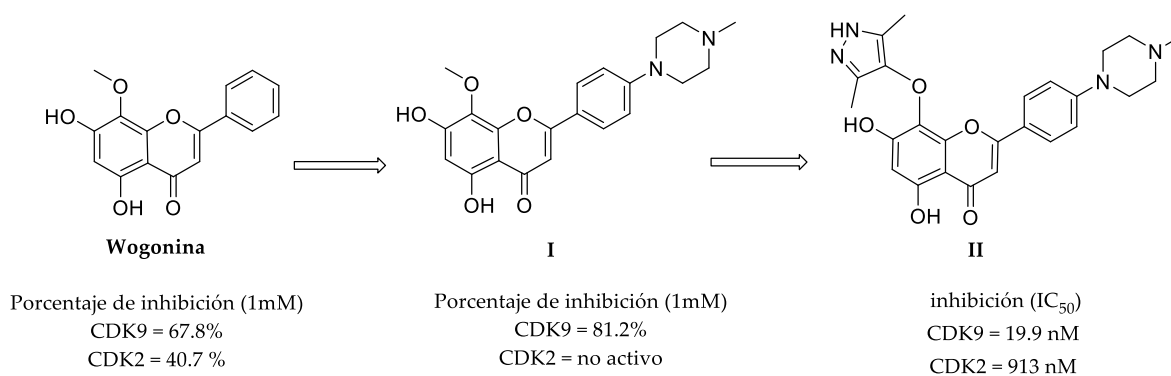


Figura 9. Modificaciones estructurales a la flavona wogonina que mejoraron su potencia sobre la enzima Q9DC

La modificación estructural en cumarinas, direccionada a la inhibición de la enzima Q9DC ha sido poco explorada. Recientemente, Xu y colaboradores [18] realizaron la síntesis de cumarinas sustituidas, partiendo de la 4-metilumbeliferona, para producir el compuesto I, caracterizado por tener un grupo acetilo en C3 y pirimidin-2-il-amino en la posición C7. Estos grupos mejoraron su selectividad hacia la enzima Q9DC en comparación con la Q2DC. El grupo carbonilo formó enlaces de hidrógeno con Asp109 y los nitrógenos de la pirimidina actuaron como aceptores y donadores de enlaces de hidrógeno con el aminoácido Cys106. Además, se presentaron otras interacciones de naturaleza hidrofóbicas con el residuo

Phe103. Modificaciones adicionales con un grupo morfolino en C4 y cambios de los grupos sustituyentes en la pirimidina generaron el compuesto **IV**. Con estas modificaciones se incrementó la selectividad hacia la enzima Q9DC ($CI_{50} = 2 \text{ nM}$) y su actividad antiproliferativa en una línea celular de leucemia (MV4-11, $CI_{50} = 0.09 \text{ }\mu\text{M}$) **Figura 10**.

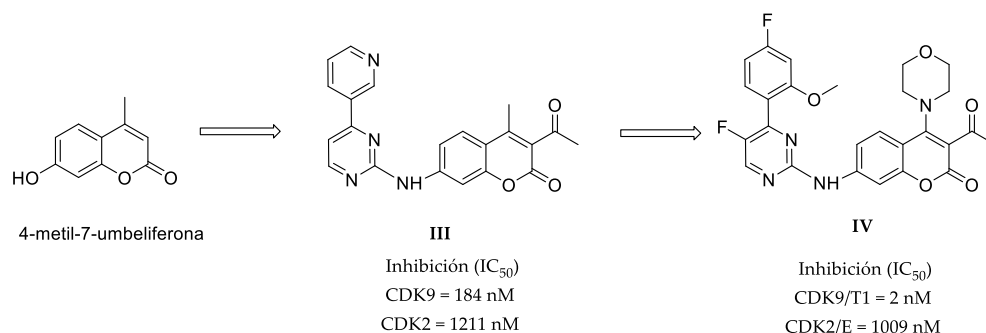


Figura 10. Modificaciones estructurales en la cumarina que mejoraron su selectividad hacia la enzima Q9DC

Existen un mayor número de investigaciones en donde se han realizado diversas modificaciones estructurales a flavonas y cumarinas para mejorar su actividad antiproliferativa. A continuación, se mencionan algunos compuestos inspirados en la flavona crisina y la cumarina umbeliferona, cuyas modificaciones estructurales mejoraron su actividad antiproliferativa.

Crisina es una de las flavonas presentes en la naturaleza, incluyendo el propóleo y la miel. Esta flavona tiene un gran potencial como agente anticancerígeno, que se ha demostrado que actúa en diversas etapas en el desarrollo de tumores sin presentar toxicidad en células normales [71]. Se han realizado diversas modificaciones estructurales para mejorar la actividad citotóxica del flavonoide crisina y los principales sitios de modificación son los grupos hidroxilos en las posiciones C5 y C7, que permiten hacer adiciones nucleofílicas para formar ésteres y éteres de alquilo. Hu y colaboradores prepararon una serie de derivados en los cuales el esqueleto de crisina se unió a diferentes aminas separadas por dos átomos de carbono a la posición C7-O. La mayoría de los productos presentaron actividad antiproliferativa mejorada en las líneas celulares de cáncer de colon (HCT-116), cervical (HeLa), de próstata (DU-145), leucemia (K562) y gástrico (SGC-7901), en

comparación con crisina; grupos sustituyentes como la pirrolidina y metilamina incrementaron la potencia del flavonoide crisina en todas la líneas celulares evaluadas [72]. Los ésteres de alquilo tuvieron menos relevancia para incrementar la potencia de crisina en la actividad antiproliferativa de la línea celular de cáncer de hígado (H22), a excepción del 5, 7-diacetil crisina, el cual presentó una mejora en su actividad antiproliferativa [73]. Los autores sugieren que grupos sustituyentes pequeños resultan más favorables para la actividad.

Otros sitios de modificación que mostraron potencial para mejorar la actividad antiproliferativa de crisina fueron en las posiciones C3', C4' y C8. Zheng y colaboradores sintetizaron una serie de derivados de crisina con grupos -CF₃, -NO₂, -Cl, -OMe en las posiciones C2', C3' y C4' en el anillo B. El compuesto con mayor actividad antiproliferativa fue el derivado 5,7-dimetoxi-3'-trifluorometil crisina, considerando al grupo -CF₃ importante para su efecto citotóxico en las líneas celulares SGC-7901, HT-29 y HL-60 [74,75].

En otra investigación, Zheng y su grupo realizaron sustituciones en el anillo A, en las posiciones C6 y C8 de crisina, incluyendo a los grupos -NO₂, -I, -CF₃ y metoxilando a los hidroxilos C5-OH y C7-OH. Los derivados 5, 7-dimetoxi-8-yodo crisina, 8-bromo-5-hidroxi-7-metoxicrisina y 5,7-dihidroxi-8-nitrocrisina fueron los que presentaron mayor actividad antiproliferativa en las líneas celulares de cáncer gástrico (SGC-7901) y colorrectal (HT-29) [76]. El grupo nitro en la posición C-8 fue importante para aumentar la actividad antiproliferativa de crisina y la halogenación en C-8, en combinación con la metilación de los grupos hidroxilo, resultaron en una mejora de la actividad antiproliferativa. En la **Figura 11** se muestra un resumen de algunas modificaciones estructurales en crisina para mejorar su actividad antiproliferativa en diversas líneas de cáncer humano.

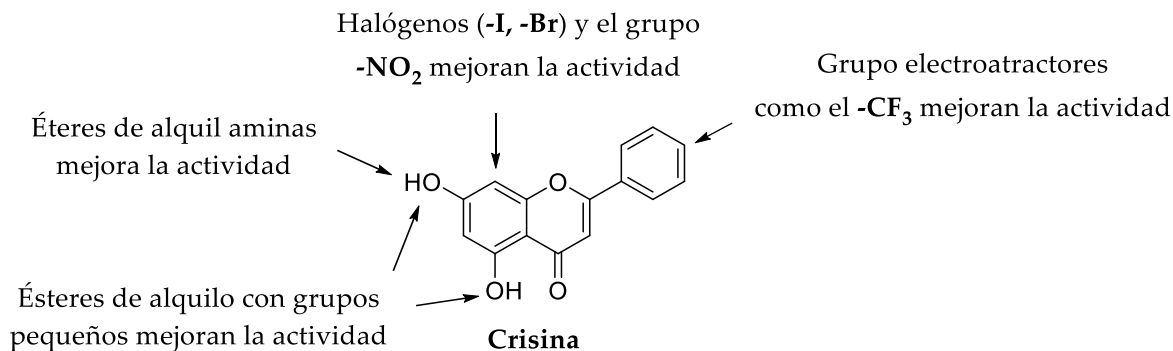


Figura 11. Modificaciones estructurales favorables para mejorar la actividad antiproliferativa de crisina

Para la cumarina umbeliferona, también se han realizado modificaciones estructurales con el objetivo de mejorar su actividad antiproliferativa. Las 4-metilcumarinas sustituidas en la posición C3 con grupos alquilo y bromo en la posición C6 incrementaron su capacidad antiproliferativa con respecto a la actividad de umbeliferona. En específico, los compuestos 3-decil-4metilumbeliferona (V) y el compuesto 6-bromo-4-bromometilumbeliferona (VI) (**Figura 12**) fueron los que presentaron mejor actividad antiproliferativa en las líneas de cáncer K562 (leucemia), LS180 (colon) y MCF-7 (mama) [77].

Otro derivado de cumarina, denominado RKS262 (**Figura 12**) y cuya estructura presenta un bromo en la posición C6 y una hidrazona en C3, ha mostrado una alta actividad citotóxica en líneas de cáncer de ovario (OVCAR-3) y de leucemia con valores de CI₅₀ de ~10 nM; uno de los mecanismos de acción por la que actúa este compuesto es a través de la inhibición de las enzimas ciclina D1 y QDC6 [78].

Sabt y colaboradores sintetizaron una serie de nuevas cumarinas con grupos sulfonamidas en C6 como agentes antiproliferativos y el compuesto VII indujo a apoptosis en las células HepG2 (CI₅₀ = 3.48 μM).

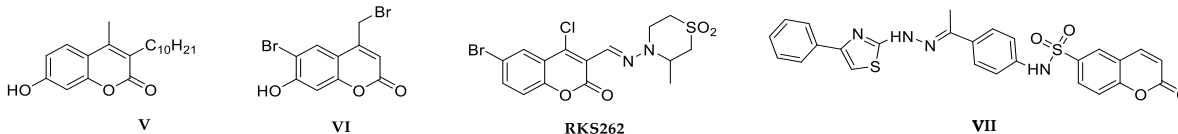


Figura 12. Modificaciones estructurales en la cumarina que han mejorado su actividad antiproliferativa.

2.7 Relevancia de los grupos nitrogenados en la actividad biológica y algunos métodos de obtención

Las investigaciones que se han realizado acerca de las modificaciones estructurales en flavonas y cumarinas muestran que la introducción de grupos funcionales con nitrógeno a las sustituciones en la posición C8 en flavonas [79,80] y en las posiciones C6-8 en la cumarina [18,81], han sido importantes para mejorar la selectividad y capacidad de inhibición a la enzima Q9DC, además de potenciar su capacidad antiproliferativa.

Dado el potencial anticancerígeno de los productos naturales crisina y umbeliferona, en el presente trabajo de investigación se contribuye con la búsqueda de agentes antiprolifeativos, proponiendo como diana potencial a la enzima Q9DC. Las modificaciones estructurales que se proponen son introducir grupos sustituyentes con nitrógeno en las posiciones C8 de crisina y C6,8 de la umbeliferona. Una de las maneras más sencillas para introducir un grupo nitrogenado a las estructuras fenólicas de la flavona crisina y la cumarina umbeliferona es a través de una nitración aromática.

El grupo nitro es un grupo especial que se incluye en muchos compuestos con actividad biológica; entre estos se encuentran agentes antiinflamatorios, anticancerígenos y antiparasitarios [82]. Este grupo químico es único porque tiene la capacidad de generar sitios deficientes en electrones en la estructura de la molécula. Además, la introducción de un átomo de nitrógeno provee la posibilidad de realizar otras modificaciones químicas en torno a este grupo.

La nitración de fenoles está bien documentada en la literatura; sin embargo, la nitración directa de productos naturales requiere condiciones especiales de reacción debido a la polifuncionalidad que presentan, tal es el caso de los flavonoides, los cuales son polifenoles susceptibles a oxidarse fácilmente, presentando una serie de reacciones colaterales que generan una mezcla compleja de productos no deseados. Es por ello que se requiere establecer condiciones de nitración más suaves para compuestos fenólicos que no afecten la estructura original de este tipo de moléculas [83]. Algunas condiciones suaves implican el uso de arcillas y nitratos metálicos [84], ácido acético glacial y un agente nitrante [85], mezcla de gases de óxidos de nitrógeno [86], entre otros reactivos.

El grupo nitro se pueden reducir a la amina correspondiente y posteriormente obtener amidas y sulfonamidas, que son grupos que se han identificado como importantes para mejorar la actividad biológica, ya que permiten potenciar la actividad anticancerígena y mejorar las interacciones con dianas moleculares [87–89]. Las amidas poseen mayor estabilidad que los ésteres en condiciones ácidas, básicas y enzimáticas y están relacionadas con las formas resonantes que se establecen gracias a la distribución de densidad electrónica entre el nitrógeno, el carbono y oxígeno del grupo carbonilo. A pesar de la existencia de sus formas resonantes, son capaces de formar enlaces de hidrógeno [90].

El grupo sulfonamida también confiere estabilidad enzimática. En específico, las sulfonamidas aromáticas son más estables a medios ácidos, básicos e hidrólisis enzimática. Las sulfonamidas aromáticas son ligeramente ácidas, ya que el grupo $-SO_2$ estabiliza el nitrógeno por resonancia [90]. Adicionalmente, las sulfonamidas confieren un donador de puente de hidrógeno extra y generalmente confieren mayor polaridad que las amidas [91].

Una de las formas sencillas para obtener amidas y sulfonamidas es a partir de una amina y un cloruro de formilo o de sulfonilo, respectivamente. La presencia de una base como la *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) o la trietilamina (TEA), resulta importante para neutralizar el HCl formado durante la reacción [92].

Ante las características químicas que pueden proveer los grupos nitrogenados, comenzando con el grupo nitro, amino, amidas y sulfonamidas, resulta de interés evaluar estos diferentes sustituyentes en posiciones C8 de crisina y C6, 8 de la umbeliferona, en la actividad antiproliferativa y como inhibidores de la enzima Q9DC.

Las investigaciones acerca del efecto de la introducción del grupo nitro en la estructura de flavonoides y cumarinas sobre su actividad antiproliferativa son escasas. Por lo tanto, se realizaron algunas consideraciones previas con los resultados obtenidos en la preparación de nitroflavonoides presentes en la naturaleza y la evaluación de su actividad antiinflamatoria, antioxidante y antiproliferativa. Los resultados se mostrarán en los siguientes capítulos.

3. JUSTIFICACIÓN

Los productos naturales son metabolitos secundarios que producen los seres vivos. Muchos productos naturales presentan actividad biológica importante y han sido utilizados para el tratamiento de diversas enfermedades y padecimientos como el cáncer.

El cáncer es una de las principales enfermedades causantes de muerte en el mundo. Debido a la complejidad de esta enfermedad originada por la existencia de diversos tipos de tumores, la resistencia a fármacos y efectos secundarios que éstos producen, promueven la búsqueda de nuevas dianas y compuestos con actividad anticancerígena. Las quinasas dependientes de ciclinas son proteínas que regulan la división celular y la transcripción y son consideradas dianas prometedoras en el desarrollo de compuestos con actividad anticancerígena. Una de las quinasas que ha cobrado interés en los últimos años es la Q9DC/ciclina T1, cuya función es fosforilar la ARN polimerasa II y activar la transcripción. Esta enzima se ha asociado al pronóstico de algunos tipos de cáncer que tienen alta prevalencia y tasa de mortalidad en México y en el mundo. Entre ellos se encuentran el cáncer de mama, próstata y pulmón.

Los productos naturales han sido la fuente de agentes con actividad anticancerígena. Dentro de este grupo se encuentran las flavonas y cumarinas, cuya actividad antiproliferativa e inhibidora de las enzimas QDC's ha sido reportada.

El flavopiridol, una flavona semisintética, inhibe de manera preferencial a la Q9DC. Algunas flavonas de origen natural, como la crisina, wogoninan y luteolina, han mostrado ser inhibidores de esta enzima; sin embargo, se buscan compuestos con mayor potencia y selectividad. En esta búsqueda se ha observado que la introducción de grupos funcionales nitrogenados en la posición C8 de flavonas y en el fenilo de la cumarina permiten mejorar su actividad antiproliferativa e inhibidora de la enzima Q9DC.

Ante las características químicas y biológicas que pueden proveer los grupos nitrogenados, comenzando con el grupo nitro, amino, amidas y sulfonamidas, resulta de interés evaluar el efecto de estos diferentes sustituyentes en las posiciones C8 de flavona crisina y C6 y C8 de la cumarina umbeliferona, sobre su potencial inhibidor de la enzima Q9DC y en su actividad antiproliferativa en líneas celulares de algunos tipos de cáncer, como el de mama, próstata y pulmón, en los cuales se ha reportado una sobreexpresión de la enzima Q9DC.

4. HIPÓTESIS

- Algunas flavonas de origen natural, como luteolina, wogonina, crisina y de origen semisintético como el flavopiridol, son compuestos con actividad anticancerígena e inhibidores de la enzima Q9DC. Una de las posiciones susceptibles a reflejar un cambio en la actividad antiproliferativa, en este tipo de compuestos, es la posición C8. Por lo tanto, la introducción de grupos funcionales nitrogenados como el nitro, amino, amida y sulfonamida en la posición C8 de la flavona crisina, modificará su actividad antiproliferativa y su capacidad de inhibir la enzima Q9DC.
- La umbelileferona es una de las cumarinas más simples, por lo que ha servido como base para realizar diversas modificaciones. Se han adicionado grupos funcionales en las posiciones C3, C4, C6 y C8 para mejorar su actividad antiproliferativa y como inhibidor de la enzima Q9DC. Por lo tanto, la introducción de grupos nitrogenados en las posiciones C6 y C8 permitirá modificar la actividad antiproliferativa y su potencial para inhibir la enzima Q9DC en comparación con la umbeliferona.
- Un gran número de residuos presentes en el sitio catalítico de la enzima Q9DC son de naturaleza hidrofóbica; por lo tanto, grupos aromáticos y alquílicos como sustituyentes de las amidas y sulfonamidas, podrán mejorar la interacción.

5. OBJETIVO GENERAL

Preparar *N*-derivados del flavonoide crisina y la cumarina umbeliferona con el objetivo de evaluar el efecto de los grupos sustituyentes en su actividad antiproliferativa y como inhibidores de la enzima Q9DC.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer las condiciones de nitración aromática de la flavona crisina y la cumarina umbeliferona.
- Establecer condiciones de reducción del grupo nitro en la nitroflavona y la nitrocumarina.
- Establecer las condiciones de reacción para la síntesis de amidas, carbamatos y sulfonamidas a partir de la aminoflavona y aminocumarina con diferentes cloruros de acilo y sulfonilo.
- Caracterizar los compuestos obtenidos mediante técnicas resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.
- Evaluar la actividad antiproliferativa de los compuestos obtenidos y determinar la concentración que inhibe el 50% de la proliferación celular (CI_{50}) en las líneas celulares de cáncer de pulmón (SK-LU-1), próstata (PC3), glía del sistema nervioso central (U251) y mama (MDA-MB-231).
- Evaluar la actividad inhibitoria de la enzima Q9DC/T1 de los compuestos con mayor actividad antiproliferativa.

- Establecer el posible modo de unión de los compuestos obtenidos en la enzima Q9DC a través de modelado molecular.
- Establecer una posible relación estructura-actividad.

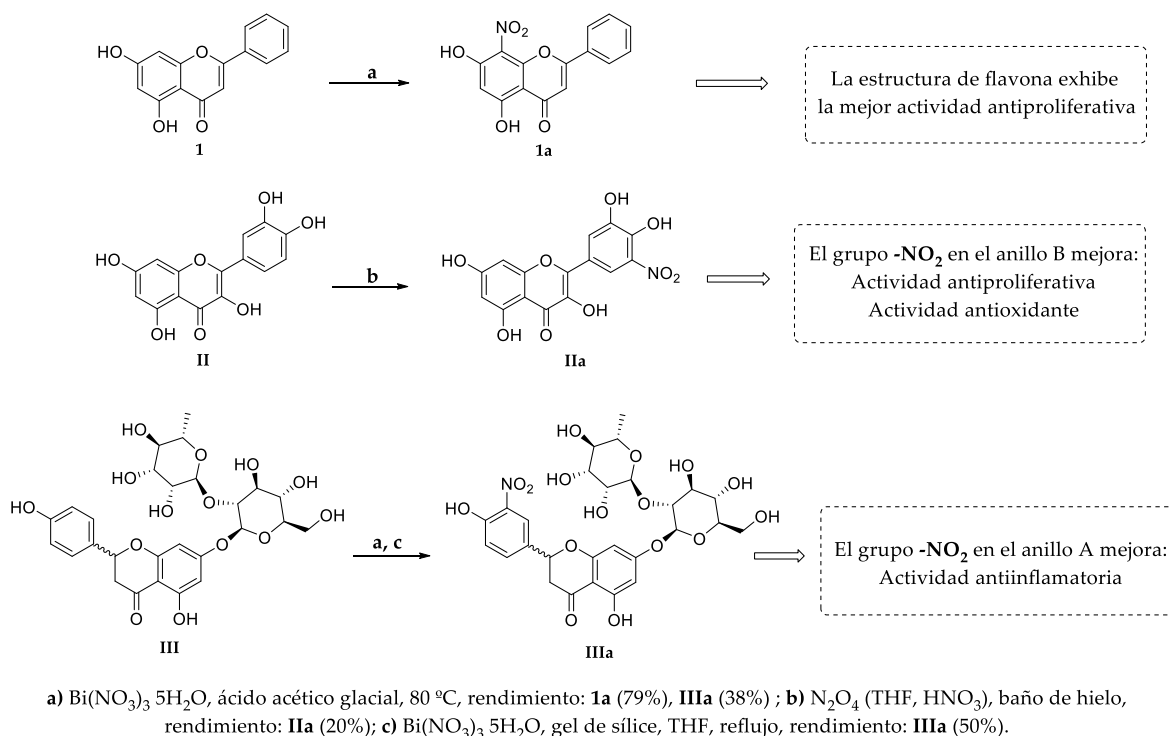
7. CONSIDERACIONES PRELIMINARES

En la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos con actividad biológica mejorada, los productos naturales han sido una fuente importante. Entre ellos, los flavonoides son un grupo que se ha caracterizados por presentar diversas actividades biológicas como antioxidantes [5,93], antiinflamatorios [94] y anticancerígenos [95,96]. La modificación estructural de este tipo de compuestos con la introducción de un grupo nitro representa una fuente de nuevos compuestos con una actividad biológica modificada y direccionada a incrementar su potencia, selectividad o al conferirles alguna actividad que antes no presentaba. Los compuestos nitro-aromáticos pueden ser utilizados como estructuras base para la obtención de otros derivados nitrogenados, cuya presencia es frecuente en algunos compuestos de uso terapéutico.

A pesar de los problemas asociados a la toxicidad del grupo nitro, la inclusión de nitroderivados en colecciones de moléculas, con posible actividad biológica, aumenta la probabilidad de encontrar la molécula que presente la mejor actividad [97,98]. En estudios previos se exploraron diversas condiciones de nitración suaves y convenientes para compuestos de naturaleza polifenólica como la crisina, naringina y quercetina. Posteriormente, se realizó una evaluación de la actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa de los flavonoides y sus nitroderivados. La actividad antioxidante se realizó por el ensayo de captación de radical DFPH (Difenil-Picril-Hidrazina); la actividad antiinflamatoria se evaluó en el modelo de edema en oreja de ratón inducido por el acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol (ATF) y finalmente la actividad antiproliferativa se determinó por el método de tinción con cristal violeta.

En el trabajo preliminar, se lograron establecer condiciones de nitración suaves que permitieron obtener: 8-nitrocrisina (**1a**) con 79% de rendimiento, 5'-nitroquercetina (**IIa**) con 20% de rendimiento y la mezcla 2-*R,S* 3'-nitronaringina (**IIIa**) con rendimientos entre el 38 y 50%. Las reacciones de nitración se llevaron a cabo utilizando ácido acético glacial o gel de sílice como medio ácido y nitrato de bismuto como agente nitrante o una mezcla de gases

de óxidos de nitrógeno (**Esquema 1**). El número y la posición del grupo hidroxilo en el flavonoide resultaron importantes para llevar a cabo la reacción de nitración en el anillo A o B del flavonoide. El mecanismo por el cual se podría llevar a cabo la nitración de crisina y naringina es a través de una sustitución electrofílica aromática mediante la formación de HNO_3 [85,99]. Mientras tanto, la nitración de la quercetina se infiere que se lleva a cabo por el N_2O_4 , formado durante la oxidación del THF con HNO_3 [86].



Esquema 1. Condiciones de reacción para obtener los nitroderivados **1a**, **IIa** y **IIIa**:

El efecto del grupo nitro se reflejó en la actividad biológica de los flavonoides; de esta manera, la introducción del grupo nitro en la posición C-5' en la estructura de la quercetina fue importante para mejorar su actividad antioxidante y antiproliferativa en líneas celulares de cáncer cervical (CaSki), pulmón (SK-LU-1) y mama (MDA-MB-231) **Tabla 1**.

Por otro lado, la estructura tipo flavona de crisina y 8-nitrocrisina mostraron la mejor actividad antiproliferativa, en comparación con la quercetina, la naringina y sus

nitroderivados, aunque la introducción del grupo nitro en la posición C-8 de crisina no mejoraron la actividad antiproliferativa, antioxidante y antiinflamatoria **Tabla 2** y **Tabla 3**.

Finalmente, la introducción del grupo nitro en C-3' en la 2-*R,S* naringina mejoró su actividad antiinflamatoria, pero no sus actividades antioxidante y antiproliferativa.

Tabla 1. Actividad antiproliferativa de los flavonoides (**I**, **II** y **III**) y sus nitroderivados (**1a**, **IIa** y **IIIa**)

Compuesto/línea celular	CI ₅₀ µg/mL (µM)		
	CaSki	MDA-MB-231	SK-LU-1
1	6 (23.6)	10 (39.4)	8 (31.5)
1a	8 (26.8)	9 (30.1)	6 (20.1)
II	39 (129.1)	55 (182.1)	39 (129.1)
IIa	32 (92.2)	20 (57.6)	25 (72.0)
III	-	-	-
IIIa	-	-	-
Cisplatino	1.67 (5.54)	2.37 (7.87)	1.36 (4.52)

- Sin actividad a 100 µg/mL

1: Crisina, **1a:** 8-nitocrisina, **II:** quercetina, **IIa:** 5'-nitroquercetina, **III:** 2-*R,S* naringina, **IIIa:** 2-*R,S* 3'-nitronaringina

Tabla 2. Actividad antioxidante de los flavonoides y sus nitroderivados mediante la captación del radical DPPH

Compuesto	CI ₅₀ (µM)
DPPH	-
1	-
1a	-
II	15.6±0.6*
IIa	10.7±0.1*
III	-
IIIa	-
α-tocoferol	41.15±0.14

* Los valores representan la media de tres experimentos diferentes (n = 3) ± desviación estándar. Se aplicó una prueba *t* y los compuestos **II** y **IIa** mostraron una diferencia estadísticamente significativa (*p*<0,05).

- Sin actividad a 100 µM

Tabla 3. Actividad antiinflamatoria de flavonoides y los nitroderivados a través del ensayo de edema en oreja de ratón inducido por ATF

Compuesto	Dosis (mg/oreja)	Edema ± DES (mg)	Inhibición (%)
Control (CH ₃ Cl)	1	15.77 ± 0.56	-
1	1	13.20 ± 0.71*	16.28
1a	1	11.43 ± 0.26*	27.48
Control (CH ₃ OH)	1	17.43 ± 0.30	
II	1	12.10 ± 0.46 ^{*a}	30.59
IIa	1	11.83 ± 0.38 ^{*a}	32.12
III	1	15.43 ± 0.62 ^a	11.47
IIIa	1	12.47 ± 0.44 ^{*a}	28.49
Indometacina	0.36	2.84 ± 1.28	94.97

Los valores representan la media ± desviación estándar (DES) de tres experimentos independientes. Se realizó ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Se presentó diferencia significativa * ($p < 0.05$) entre el grupo control y el ^acompuesto III con los compuestos IIIa, II y IIa.

La flavona crisina, 8-nitrocrisina y los flavonoles quercetina y 5'-nitroquercetina no mostraron un efecto necrótico en las células, por lo tanto, se infiere que la reducción de células cancerosas se debe a un mecanismo diferente. El hecho de que los compuestos no generen necrosis en las células es importante, debido a que los efectos colaterales relacionados con la citotoxicidad podrían ser mínimos.

Estos resultados y los reportes en la literatura convergen en la conclusión de que la estructura base tipo flavona es importante para la actividad antiproliferativa. Sin embargo, el grupo nitro en el anillo A de la 8'-nitrocrisina no mejoró su actividad, promoviendo otras modificaciones alrededor de este grupo. Tomando en consideración que los grupos funcionales que contienen nitrógeno son importantes en esta posición para mejorar la actividad antiproliferativa y como inhibidores de la enzima Q9DC, se propuso la preparación de amidas y sulfonamidas. Adicionalmente, fue de interés incorporar otra estructura aromática tipo cumarina que ha sido menos explorada en el desarrollo de agentes anticancerígenos y como inhibidores de la enzima Q9DC.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

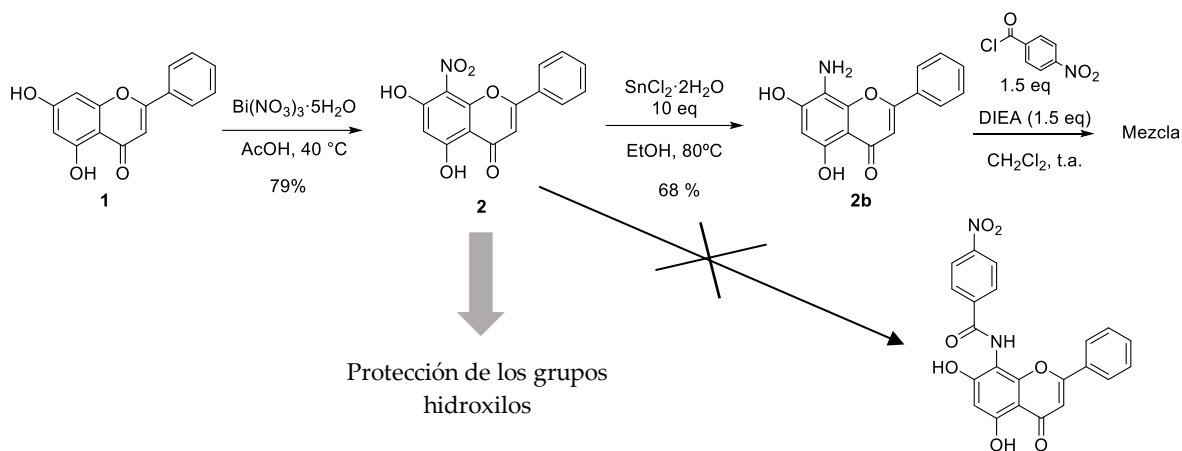
En esta sección se presentan las condiciones de reacción para la obtención de amidas y sulfonamidas partiendo de crisina (**1**) y umbeliferona (**5**). Como estrategia general se planteó la formación de amidas y sulfonamidas con diferentes grupos alifáticos y aromáticos, partiendo de la funcionalización del grupo amino aromático de los productos naturales previamente mencionados.

Adicionalmente, se presentan los resultados de la evaluación antiproliferativa y la capacidad de inhibición de la enzima Q9DC de los compuestos obtenidos.

8.1 Condiciones de reacción para la formación de amidas y sulfonamidas a partir de la flavona crisina

Originalmente, se planteó iniciar con la nitración de la flavona crisina y posteriormente, reducir el grupo nitro a la amina correspondiente. Y finalmente, colocar la aminoflavona en presencia de cloruros de acilo para obtener las amidas con grupos sustituyentes *p*-nitrofenilo y propilo.

En el **Esquema 2** se muestra, la nitración de crisina en presencia de nitrato de bismuto (III) pentahidratado y ácido acético glacial, para obtener el producto 8-nitrocrisina (**2**) con un rendimiento del 79%. Posteriormente, la nitroflavona **2** se sometió a condiciones de reducción empleando cloruro de estaño (II) dihidratado y etanol como disolvente, para obtener la aminoflavona correspondiente (**2b**), con un rendimiento de 68%. Finalmente, el compuesto **3** se colocó en presencia de una base como la *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA) y de cloruro de 4-nitrobenzoilo (1.5 equivalentes) en CH₂Cl₂ como disolvente para formar la amida correspondiente. Mediante cromatografía en capa fina se observó la presencia de al menos tres productos de reacción como resultado de la posible formación de ésteres, dificultando la purificación y disminuyendo el rendimiento. Ante el inconveniente mencionado anteriormente, se decidió realizar la protección de los grupos hidroxilos en forma de éteres de metilo, previa al paso de reducción del grupo nitro.



Esquema 2. Primera aproximación de las condiciones de reacción para la formación de amidas a partir de la flavona crisina

A continuación, se presentan los detalles de las condiciones de reacción empleadas para la formación de amidas y sulfonamidas a partir de la flavona crisina, incorporando la reacción de la protección de los grupos hidroxilos.

8.1.1 Condiciones de nitración de crisina (1)

Considerando la nitración como primer paso para introducir el nitrógeno a la estructura aromática del compuesto **1**, se propuso usar nitrato de bismuto (III) pentahidratado, ácido acético glacial en calentamiento como una alternativa al uso de ácido nítrico y ácido acético, ya que bajo estas condiciones se ha obtenido la mezcla de los productos de nitración en las posiciones C6 y C8 [100,101].

En la **Tabla 4** se muestran los rendimientos de reacción en función de la cantidad de nitrato de bismuto. Las mejores condiciones de nitración se alcanzaron al colocar cantidades equimolares del compuesto **1** y de nitrato de bismuto pentahidratado en 10 ml de ácido acético glacial para obtener el producto 5,7-dihidroxi-8-nitroflavona (**2**) con un 79% de rendimiento y sin detectar otros productos de nitración, **Esquema 2**.

En otras investigaciones, se ha reportado la síntesis de la 5,7-dihidroxi-8-nitroflavona empleando ácido nítrico y acético, con un rendimiento del 70% [101,102]. Con las condiciones de reacción que se utilizaron en este trabajo se generan rendimientos comparables con los obtenidos al utilizar ácido nítrico y sulfúrico. No se detectó la formación de otros compuestos de nitración, por lo que la reacción se puede considerar regioselectiva, procediendo la nitración en la posición C8. Esta regioselectividad se explica por la activación del anillo aromático promovida por los grupos hidroxilo en las posiciones C5 y C7.

Algunas reacciones de nitración de fenoles con ácido acético y nitratos metálicos, como el nitrato de calcio [99] o el nitrato de cobre (II) [85], sugieren la formación de pequeñas concentraciones de HNO₃ que generan iones nitronio, favoreciendo una reacción de nitración a través de una sustitución electrofílica aromática. Con estas condiciones de nitración, se contribuye con otra metodología para obtener nitroflavonas con un patrón de hidroxilación similar.

Tabla 4. Evaluación de diferentes cantidades de nitrato de bismuto para la reacción de nitración del compuesto 1

Compuesto 1 (mmol)	Bi(NO ₃) ₃ · 5H ₂ O (mmol)	Rendimiento compuesto 2 (%)
1	0.5	50
1	0.75	60
1	1	79

El sitio de nitración fue identificado mediante experimentos de RMN de una y dos dimensiones.

En el espectro de RMN ¹H del compuesto 2 se aprecia la desaparición de una señal de hidrógeno entre 6.21 y 6.50 ppm, al compararlo con el espectro de la materia prima (1). Este hecho confirmó, en primera instancia, la pérdida de un protón por una posible sustitución. Continuando con el análisis del espectro de RMN ¹H de la nitroflavona 2, se observó una señal simple en δ_H 13.21 ppm correspondiente al hidrógeno del hidroxilo en

C5, altamente desprotegido por el enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo; en δ_H 7.96 ppm se observa un multiplete que corresponde a H2' y H6'; a menor desplazamiento, en 7.6 ppm se encuentra un multiplete que integra para los tres hidrógenos aromáticos H3', H4' y H5' del anillo B. Finalmente, se pueden observar dos señales simples desplazadas a 6.35 y 7.16 ppm correspondientes a los hidrógenos H6 y H3, respectivamente. Las asignaciones de estos hidrógenos se realizaron de acuerdo con las correlaciones observadas a dos y tres enlaces de distancia en el experimento de HMBC, **Figura 13**. Los carbonos C6 y C4a correlacionan a tres enlaces de distancia con el hidrógeno del C5-OH y los carbonos C4a y C1' correlacionan a tres enlaces de distancia con H3. Estas correlaciones permitieron asignar al protón H6 y en consecuencia el grupo nitro se ubicó en la posición C8.

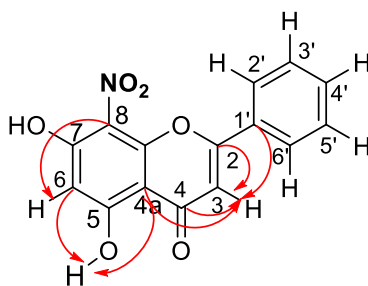


Figura 13. Correlaciones a dos y tres enlaces de distancia para los protones H3 y H6 de la nitroflavona **1a**

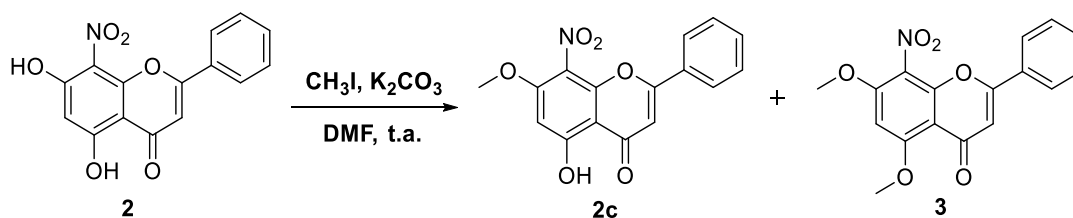
El espectro de masas de baja resolución indicó una relación masa carga de 299 para el ion molecular $[M]^+$ y, a través de espectroscopia de masas de alta resolución, se obtuvo una fórmula molecular de $C_{15}H_{10}NO_6$ para el ion $[M+H]^+$ con una relación masa carga de 300.05121, correspondiendo estos valores a los esperados para el producto **1a**.

8.1.2 Protección de los grupos hidroxilos de 8-nitrocrisina

La protección de grupos hidroxilos con yodometano y una base como K_2CO_3 son condiciones comunes para obtener éteres de metilo y estas condiciones han sido empleadas para proteger hidroxilos en flavonoides [103,104]. Cuando la molécula tiene más de un hidroxilo que proteger se suelen obtener mezclas de productos con diversos patrones de metilación. En consecuencia, las condiciones de metilación son variadas de acuerdo al número de hidroxilos.

Se establecieron condiciones de la reacción de metilación variando los equivalentes de yodometano, K_2CO_3 y el tiempo de reacción para obtener los productos 5-hidroxi-7-metoxi-8-nitroflavona (**2c**) y 5,7-dimetoxi-8-nitroflavona (**3**) (Esquema 3). En la **Tabla 5** se muestran los equivalentes de CH_3I , K_2CO_3 y el tiempo de reacción que se fueron variando. La reacción procedió a temperatura ambiente (t.a.) y se utilizó dimetilformamida (DMF) como disolvente. Conforme se aumentaron los equivalentes de CH_3I y el tiempo de reacción se aumentó el rendimiento de la nitroflavona doblemente protegida (**3**).

Gao y colaboradores [101] realizaron la protección de la misma flavona utilizando un exceso de yodometano y carbonato de potasio; a diferencia de las condiciones establecidas en este trabajo, utilizaron acetona como disolvente y se mantuvo en reflujo por 8 horas para obtener el 85% de rendimiento de la nitroflavona doblemente protegida. Estas condiciones ofrecen indicios de que un incremento de la temperatura de reacción de metilación podría disminuir el tiempo de reacción.



Esquema 3. Metilación de 8-nitrocrisina

Tabla 5. Condiciones de reacción de metilación del compuesto 2

Condiciones			Rendimiento (%)	
K_2CO_3 (eq)	CH_3I (eq)	Tiempo (h)	2c	3
1.5	2.5	15	10	22
1.5	4.6	24	10	54
2	4.6	65	-	95

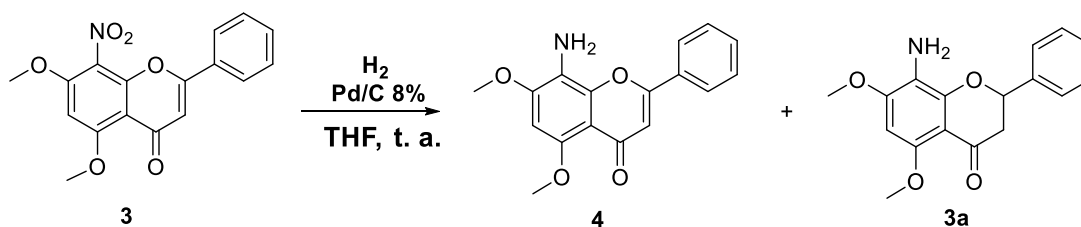
Para el compuesto **2c** se observa una señal simple base de oxígeno en 4.02 ppm, en espectro de RMN 1H , correspondiente al metilo $-OCH_3$ y por espectroscopia de masas se

observa una m/z de 314 para el ion molecular $[M+H]^+$. En el espectro de RMN 1H del producto **3** se observan dos señales simples bases de oxígeno en δ_H 4.06 y 4.07 ppm correspondientes a los dos metilos de los metoxilos. Para ambos compuestos se siguen observando las señales correspondientes a los hidrógenos de la flavona explicadas anteriormente para el compuesto **2**. El espectro de masas de baja resolución del compuesto **3** observa una m/z de 327 para el ion molecular $[M]^+$. Estos resultados confirman las estructuras y masas moleculares esperados para los compuestos **2c** y **3**.

8.1.3 Reducción de la 5,7-dimetoxi-8-nitroflavona (**3**)

La 8-amino-5,7-dimetoxi-flavona (**4**) se consideró el compuesto clave para preparar las amidas y sulfonamidas; por lo tanto, se evaluaron diversas condiciones de reducción del grupo nitro aromático, con el objetivo de obtener el mejor rendimiento posible. Entre las condiciones de reacción reportadas para reducir nitroflavonas se mencionan a la hidrogenación catalizada por Pd/C [101,105] y $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ /etanol [102].

La hidrogenación catalizada por Pd/C (8%) usando THF como disolvente, fue la primera elección para reducir el grupo nitro. El producto que se obtuvo entre el 80-88% de rendimiento se identificó como 8-amino-5,7-dimetoxi-flavona, **4**. También, se detectó la flavanona **3a** en cantidades menores al 5%, como producto de la reducción del doble enlace. En el **Esquema 4** se muestran los productos formados.



Esquema 4. Condiciones de reducción de compuesto **3** usando hidrogenación catalizada por Pd/C

La presión de H₂ y tiempo de reacción fueron las variables que influyeron en el rendimiento, de esta manera, en la **Tabla 6** se puede observar que las mejores condiciones de reducción fueron aplicando 100 psi de presión de H₂ durante 30 horas y, a presiones mayores a 120 psi se obtuvo una mezcla de productos, dentro de los cuales se identificó el producto de reducción del grupo nitro y de la doble ligadura entre C2=C3.

Tabla 6. Condiciones de reducción del compuesto **3** utilizando 8% mol de Pd/C y THF como disolvente

Tiempo (h)	Presión H ₂ (psi)	Rendimiento (%)
		4
48	200	-
40	140	-
43	120	80
30	100	88

Los resultados son consistentes con los resultados obtenidos por Gao y Kawabata, quienes obtuvieron el compuesto **4** con 92% de rendimiento utilizando condiciones de reducción similares a las establecidas en este trabajo [101]. Por otro lado, Wanich y Yenjai [105], también llevaron a cabo la reducción de la misma nitro flavona, pero utilizaron acetato de etilo como disolvente y no precisan la cantidad de Pd/C ni la presión de H₂ aplicada durante 24 horas. Ellos reportan el 16% de rendimiento para la aminoflavona **4** y obtienen otros productos, resultado de la sobre reducción, entre ellos el **3a** (14%).

La hidrogenación catalítica ofrece la ventaja de purificar fácilmente a la amina, sin embargo, pequeños cambios de presión disminuyen drásticamente la formación de la aminoflavona, debido a la formación de otros productos de reducción. Por lo anterior, se buscaron otras condiciones de reducción con cloruro de estaño y a continuación se describe.

Dentro de las condiciones de reducción del grupo nitro aromático el uso de cloruro de estaño (II) y etanol como disolvente a una temperatura de 70-80 °C, resulta ser selectiva para

grupos nitro [106–108] y ofrece una alternativa a la hidrogenación catalítica. Gamble y colaboradores [107] observaron que el uso de 10 equivalentes de SnCl₂·H₂O ofrecía los mejores rendimientos de la amina correspondiente. Tomando en cuenta estos datos, en las condiciones de reducción del compuesto **3** se mantuvo constante el uso de 10 equivalentes de SnCl₂·H₂O, como disolvente se utilizó EtOH y la temperatura de la reacción se mantuvo a 70 °C.

En la **Tabla 7** se pueden observar los rendimientos obtenidos de la reducción del compuesto **3**. Conforme aumentó la cantidad del compuesto **3**, se requirió mayor tiempo de calentamiento para lograr rendimientos de reacción similares. Estos rendimientos son los esperados y van de acuerdo a lo reportado en la literatura cuando se utilizan estas condiciones [102].

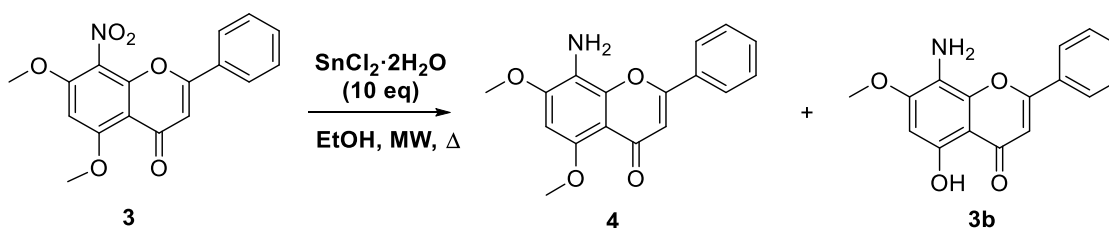
Tabla 7. Reducción del compuesto **3** usando SnCl₂·H₂O y calentamiento (70 °C)

Cantidad de 3 (mmol)	Tiempo de calentamiento (h)	Rendimiento de 4 (%)
0.122	5	78
0.338	5.5	71
0.618	7	79

Con el fin de disminuir el tiempo de reacción de reducción con SnCl₂·H₂O/EtOH se reemplazó el calentamiento convencional por calentamiento más irradiación microondas. Las condiciones de reducción, aplicando irradiación con microondas, se basaron en el trabajo del grupo de investigación de Van Vliet, en donde se realizó la síntesis de bencimidazoles en un paso a partir de 2-nitroanilinas, usando irradiación microondas a una temperatura de 130 °C y 125 W de potencia durante 5 minutos [109]. Considerando las condiciones previamente mencionadas, la reducción del compuesto **3** se inició a 70 °C, por 5 minutos y aplicando 125 W de potencia; posteriormente la temperatura se incrementó a 85 °C por 5 minutos. Con este tiempo de reacción se obtuvo 79% de rendimiento de la aminoflavona **4** y se detectó remanente del compuesto de partida.

Una segunda reacción de reducción se inició a 80 °C por 20 minutos; posteriormente se incrementó a 85 °C por 3 minutos y 125 W. Con estas condiciones se obtuvo el 57% de rendimiento de la amina **4**. No se detectó remanente del nitro compuesto, sin embargo, se formó el compuesto **3b**, en menos del 3%, por la desmetilación en C5-OCH₃, **Esquema 5**.

En la **Tabla 8** se muestran las condiciones evaluadas aplicando irradiación con microondas. Al sustituir el calentamiento convencional por calentamiento más irradiación con microondas se disminuyó el tiempo de reacción; sin embargo, a mayor tiempo de reacción aplicando irradiación con microondas ocurre una reacción de desmetilación, por lo que se podrían evaluar condiciones intermedias para que se consuma toda la materia prima y se genere la menor cantidad del producto de desmetilación **3b**.



Esquema 5. Condiciones de reducción de compuesto **3** usando $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$, calentamiento e irradiación microondas (MW)

La reducción del compuesto **3** con $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ para generar la amina correspondiente fue una reacción que ofreció un rendimiento aproximadamente 10% menor que los rendimientos obtenidos de la reducción con H_2 y Pd/C; sin embargo, con combinaciones de tiempo y temperatura mayor a 80 °C puede ocurrir la desprotección del grupo hidroxilo y formarse **3b**. Adicionalmente, la reducción con $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ presentó una mejor reproducibilidad y el tiempo de reacción se redujo notablemente aplicando temperatura e irradiación con microondas.

Tabla 8. Reducción del compuesto **3** con SnCl₂·H₂O/EtOH e irradiación con microondas (125 W) utilizando 10 equivalentes de SnCl₂·H₂O

Cantidad de 3 (mmol)	Temperatura (°C)/tiempo (min)	Rendimiento (%) 4
0.122	70/5	79
	85/5	
0.122	80/20	57
	85/3	

El espectro de RMN ¹H de la aminoflavona **4** es similar al espectro de la nitroflavona **3**, con la diferencia de que algunas señales se desplazaron a campo alto (H3 y -C5,7-OCH₃) por efecto donador de densidad electrónica del grupo amino sobre el sistema conjugado de la flavona. Las asignaciones de los hidrógenos de la aminoflavona **4** son las mismas que las explicadas para el compuesto **3** y se muestran en los espectros apilados en la **Figura 14**. El espectro de masas de baja resolución indica una *m/z* de 297 para el ion molecular [M]⁺. Adicionalmente, el espectro de masas de alta resolución arroja una fórmula molecular de C₁₇H₁₅NO₄, la cual es consistente con la masa y fórmula molecular esperada para la aminoflavona **4**.

En el espectro de RMN ¹H de la aminoflavona **3b** se puede observar una señal simple base de oxígeno en 4.02 ppm correspondiente al C7-OCH₃ y una señal en 13.29 ppm correspondiente al protón del hidroxilo unido al carbono C5. Estas señales ofrecen la evidencia de la desprotección del hidroxilo de la posición C5-OCH₃. En el espectro de masas se observa una *m/z* de 314 para el ion molecular [M+H]⁺ correspondiente a la masa esperada para el compuesto **3b**.

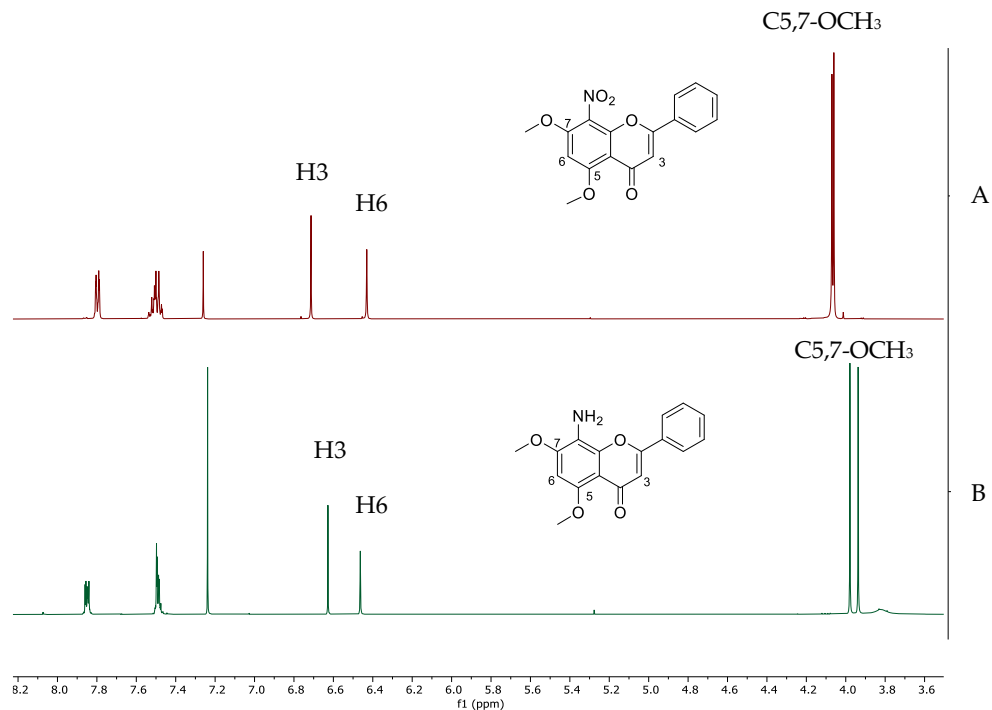


Figura 14. Espectros apilados de RMN ¹H de: A) nitroflavona 3 y B) aminoflavona 4

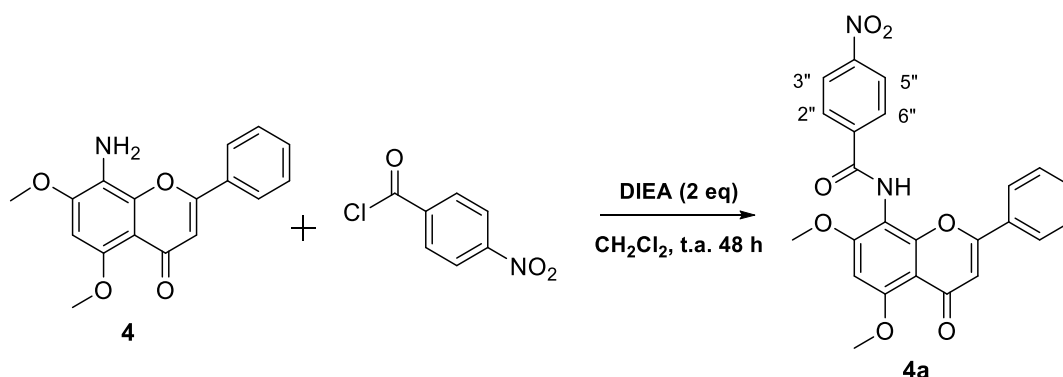
8.1.4 Obtención de amidas a partir de la aminoflavona 4

Las reacciones para la formación de amidas son muy relevantes, ya que este grupo funcional no sólo forma parte de los péptidos, sino también se encuentra presente en muchos fármacos y productos naturales [110]. La manera convencional para obtener amidas, es a partir de un ácido carboxílico y una amina. Esta reacción implica la activación del ácido carboxílico mediante la conversión a los correspondientes cloruros de ácido o por uso de un agente de acoplamiento. Posteriormente, una reacción de adición-eliminación, de la amina al cloruro de ácido, conduce a la amida correspondiente [111].

Una de las formas sencillas para obtener amidas es a partir de una amina y un cloruro de acilo. La presencia de una amina terciaria como DIEA o TEA resulta importante para neutralizar el HCl formado durante la reacción [92,111].

Se establecieron las condiciones de reacción para la formación de dos amidas a partir del compuesto **4** y el cloruro de 4-nitrobenzoilo o cloruro de butirilo en presencia de una base como DIEA, para generar las amidas **4a**, **4b** y **4c**. Las mejores condiciones de formación de estas amidas se muestran en los **Esquemas 6** y **7**.

Para la formación del compuesto *N*-(5,7-dimetoxi-4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-8-il)-4-nitrobenzamida (**4a**) se requirió emplear un exceso del cloruro de 4-nitrobenzoilo para obtener 63% de rendimiento de reacción y favorecer que el reactivo **4** se consumiera por completo. En la **Tabla 9** se muestran los equivalentes del cloruro de 4-nitrobenzoilo y el rendimiento de la reacción.



Esquema 6. Condiciones de reacción para la formación de la amida **4a**

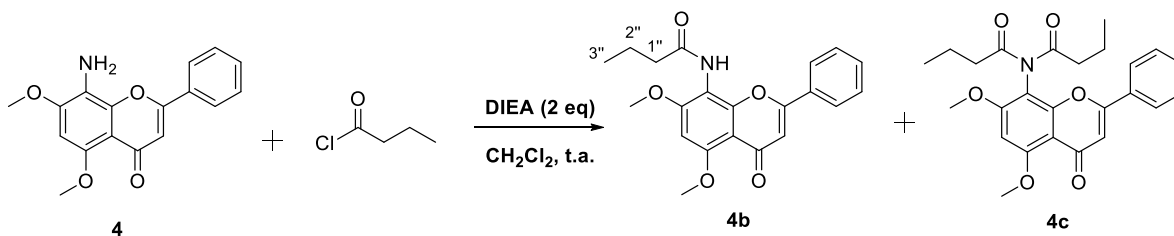
Tabla 9. Variación de la cantidad de cloruro de 4-nitrobenzoilo y rendimiento de la amida **4a**

Cloruro de 4-nitrobenzoilo (equivalentes)	Rendimiento 4a (%)
1.2	31
2	33
3	63

En el espectro de RMN ¹H del compuesto **4a**, se puede distinguir un sistema AA'BB' con dos señales, una correspondiente a los hidrógenos aromáticos H3'' y H5'' desplazada en 8.44 ppm y otra en 8.28 ppm para las señales de los hidrógenos H2'' y H6''. El efecto desprotector del grupo nitro produjo que estas señales dobles se desplazaran a mayores ppm que los multipletes correspondientes a los hidrógenos del anillo B. Adicionalmente, en 10.22 ppm se puede observar una señal simple correspondiente al hidrógeno unido al

nitrógeno de la amida. La caracterización de la amida **4a** se complementó con el espectro de masas, en donde se observó una m/z de 446 para el ion molecular $[M]^+$, que corresponde a la esperada para este compuesto.

Continuando con la preparación de amidas, se colocó la amina **4** en presencia de cloruro de butirilo, de acuerdo con las cantidades mostradas en la **Tabla 10**. Los productos de reacción obtenidos fueron las amidas *N*-(5,7-dimetoxi-4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-8-il)butiramida (**4b**) y *N*-butiril-*N*-(5,7-dimetoxi-4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-8-il)butiramida (**4c**). Se variaron las cantidades de cloruro de butirilo con el fin de obtener mayoritariamente la amida **4b**. Sin embargo, se favoreció la doble adición nucleofílica de la amina al cloruro de butirilo para formar la imida **4c**. A pesar de colocar 1.5 equivalentes del cloruro de acilo, la mancha del producto **4c** se detectó en la placa de cromatografía en capa fina, desde los primeros 10 minutos de reacción.



Esquema 7. Condiciones de reacción de la formación de la amida **4b** y **4c**

Tabla 10. Variación de la cantidad de cloruro de butirilo y rendimiento de los productos **4b** y **4c**

Cloruro de butirilo (equivalentes)	Rendimiento (%)	
	4b	4c
1.5	25	34
3	13	79

Las amidas **4b** y **4c** fueron identificadas por RMN. En el espectro de hidrógeno para el compuesto **4b**, se observan las señales de los hidrógenos aromáticos de la flavona, entre 6-8 ppm, y a desplazamientos menores se observaron un triplete (1.08 ppm), sextuplete (1.86

ppm) y triplete (2.49 ppm) correspondientes a las señales de los hidrógenos del metilo H3'' y de los metilenos H1'', H2'' del grupo sustituyente propilo. Cada una de las señales integró para 2, 2 y 3 hidrógenos, respectivamente.

El espectro de RMN ¹H del compuesto **4c** es similar al del compuesto **4b** y se observaron dos tripletes en 0.90 y en 2.60 ppm correspondientes a los hidrógenos H3'' y H1'' del metilo y metileno, respectivamente. En 1.66 ppm se observa un sextuplete para H2'' debido a un acoplamiento con los hidrógenos H3'' y H1'' con H2''. A diferencia del espectro del compuesto **4b**, estas señales integraron para el doble de hidrógenos debido a la presencia de los dos grupos sustituyentes propilo en la imida **4c**. En el espectro de RMN ¹³C se observa una señal desplazada en 175.7 ppm correspondiente a la señal del carbono del carbonilo de la amida, asignado por la correlación observada a dos enlaces de distancia con H1''. En el espectro de masas la *m/z* de 438 para un ion molecular [M+H]⁺ confirma la masa molecular esperada para el compuesto **4c**.

En otros trabajos de síntesis de amidas a partir de aminoflavonas, en donde el grupo sustituyente es aromático [100,112], se reportan rendimientos del 23-95% y productos de una sola adición del grupo amino al cloruro de acilo. No se menciona la formación de imidas, por lo tanto, se puede inferir que la formación del producto **4c** se ve influenciada por efectos estéricos, ya que el grupo butirilo es más pequeño que un fenilo.

El nitrógeno de la amida distribuye la densidad electrónica en el enlace C-N [113] y en el anillo A de la flavona lo cual disminuye su reactividad. Sin embargo, se puede apreciar un efecto del grupo sustituyente de la amida sobre la reactividad de la misma. De esta manera, en el caso de la amida **4a**, el grupo nitro genera deficiencia de densidad electrónica en el grupo fenilo que puede ser compensada por el nitrógeno de la amida, disminuyendo aún más su reactividad para efectuar una segunda adición al cloruro de 4-nitrobenzoilo. En el caso de la amida **4b**, el grupo propilo puede compensar la deficiencia de densidad electrónica generada en el carbono del carbonilo a través de efectos inductivos, permitiendo

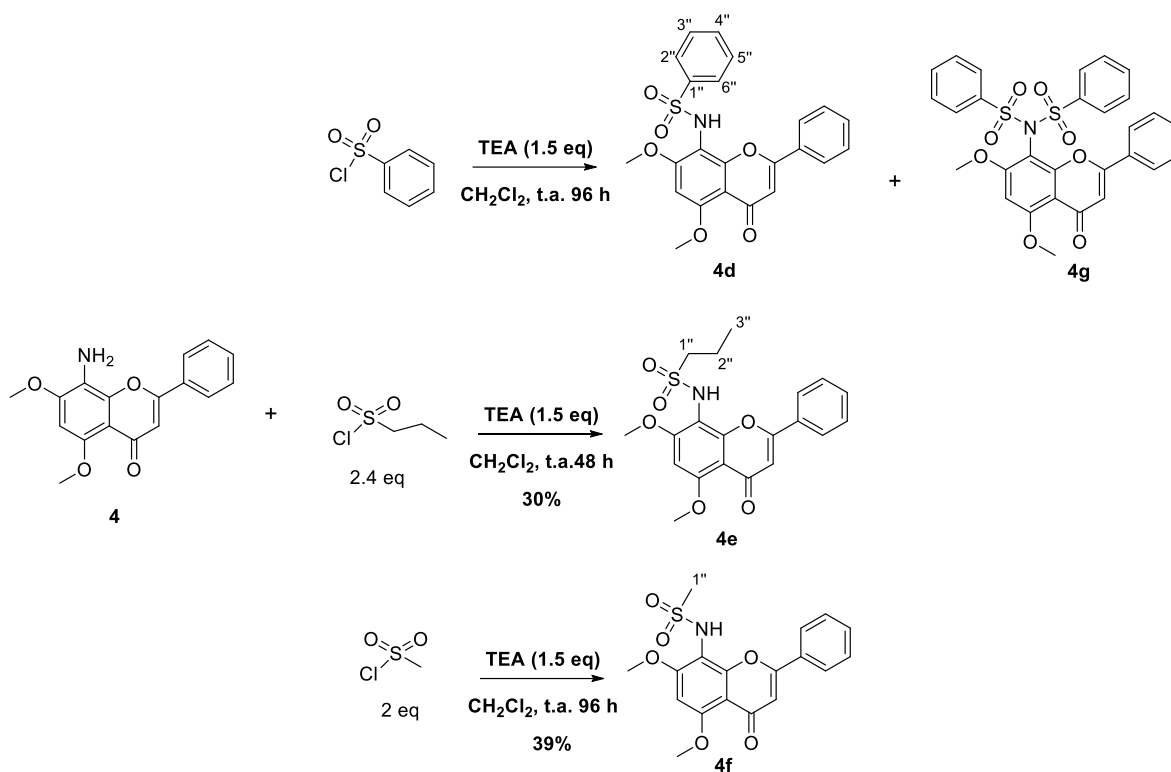
al nitrógeno mantener su reactividad para efectuar una segunda adición a otra molécula de cloruro de butirilo.

8.1.5 Obtención de sulfonamidas a partir de la aminoflavona 4

El grupo sulfonamida es de importancia sintética pues, exhibe una amplia gama de actividades biológicas, entre ellas la anticancerígena, antiinflamatoria y antiviral. Además, diversos fármacos tienen en su estructural un grupo sulfonamida [114]. La síntesis de sulfonamidas a partir de la amina y el cloruro de sulfonilo en presencia de una base sigue siendo un método de elección, debido a que conduce a las sulfonamidas de manera simple y con rendimientos de moderados a altos. El inconveniente de reacción es la formación de bis-sulfonamidas cuando la amina es primaria [115].

En el presente trabajo, las sulfonamidas se obtuvieron por la metodología convencional, en donde la amina aromática **4** se adiciona a los cloruros de bencenosulfonilo, propanosulfonilo y mesilo para obtener los productos *N*-(5,7-dimetoxi-4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-8-il)benzenosulfonamida (**4d**), *N*-(5,7-dimetoxi-4-oxo-2-fenyl-4*H*-crome-8-il)-*N*-(fenilsulfonil)benzenosulfonamida (**4g**), *N*-(5,7-dimetoxi-4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-8-il)propano-1-sulfonamida (**4e**) y *N*-(5,7-dimetoxi-4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-8-il)metanosulfonamida (**4f**) respectivamente, en presencia de 1.5 equivalentes de una base como TEA.

En el **Esquema 8** se muestran las condiciones en las que se obtuvieron las sulfonamidas; los equivalentes de los cloruros de sulfonilo variaron de 2 a 2.6 equivalentes y se agregó la mitad del cloruro de sulfonilo al inicio de la reacción y el resto después de 24 horas, con el fin de favorecer la reacción en el menor tiempo posible y aumentar el rendimiento de la sulfonamida correspondiente. Los rendimientos de reacción fueron menores al 40% y se observó la formación de la bis-sulfonamida **4d**.



Esquema 8. Condiciones de reacción en la obtención de sulfonamidas **4d-4f**

En la **Tabla 11** se muestran las condiciones de reacción que se aplicaron para obtener preferencialmente a la sulfonamida **4d** y disminuir el tiempo de reacción. Se inició colocando 1.3 equivalentes del cloruro de bencenosulfonilo por 24 horas a temperatura ambiente. Al seguir observando materia prima se agregaron 1.3 equivalentes y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 72 horas más. Bajo estas condiciones se obtuvieron las sulfonamidas **4d** y **4g** con rendimientos de 24 y 15 %, respectivamente. Como alternativa, se aumentó a 1.5 equivalentes del cloruro de bencenosulfonilo y se aplicó calentamiento a 40 °C durante ocho horas. Después de este tiempo se comenzaron a observar, en CCF, la formación de ambas sulfonamidas. La mancha principal fue de materia prima, por lo que se añadieron 1.5 equivalentes más de cloruro de bencenosulfonilo y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 48 horas más. Aunque se disminuyó el tiempo de reacción, se favoreció la formación de la bis-sulfonamida **4g**, debido a que se incrementó la cantidad del cloruro de bencenosulfonilo y la temperatura de reacción.

Tabla 11. Condiciones de reacción para la formación de las sulfonamidas **4d** y **4g**

Cantidad de 4 (mmol)	Cloruro de bencenosulfonilo (equivalentes)/tiempo	Temperatura (°C)/Tiempo (h)	Rendimiento (%)	
			4d	4g
0.208	1.3/24	t.a./96	24	15
	+1.3/72			
0.351	1.5/48	40 °C /8	-	42
	+1.5/48	t.a./48		

El rendimiento de la sulfonamida **4f** fue 9% mayor al rendimiento de la sulfonamida **4e** y en ninguna de las dos reacciones se logró purificar e identificar alguna bis-sulfonamida, aunque no se descarta su formación en menor cantidad.

Aunque el grupo fenilo en las sulfonamidas **4d** representa un impedimento estérico para una segunda adición de la amina a una segunda molécula de cloruro de bencenosulfonilo, la cantidad de este reactivo fue mayor que el cloruro de mesilo o propanosulfonilo en sus correspondientes condiciones de reacción. Por lo tanto, disminuir la cantidad de cloruro de bencenosulfonilo en la segunda adición podría favorecer la formación del producto **4d**, aunque podría ser mayor el tiempo de reacción.

Se reportó la preparación de sulfonamidas a partir de amino flavonas, en donde el grupo amino se encuentra en el anillo B [116]. Un exceso del cloruro de sulfonilo condujo a la *N,N*-disulfonamido flavona; posteriormente, se lleva a cabo una desulfonilación con el uso de fluoruro de tetrabutilamonio. Los rendimientos obtenidos fueron variables (17-85%). Esta estrategia representa una alternativa para obtener productos *N*-monosulfonil sustituidos.

En la búsqueda de condiciones de reacción para la síntesis de sulfonamidas a partir de la amina y cloruro de sulfonilo, se ha observado que uno de los principales problemas es la doble adición de la amina y la obtención de la mezcla de los productos *N*-monosulfonil

y *N,N*-disulfonil arilaminas, cuando la amina en la reacción se consume por completo [117]. En otras investigaciones se han utilizado catalizadores como óxido de zinc [118] o indio, [119] con los cuales se ha disminuido el tiempo de reacción y se ha obtenido, principalmente, el producto *N*-mono sustituido.

Las sulfonamidas se caracterizaron por RMN y por espectrometría de masas. En el espectro de RMN ^1H de la sulfonamida **4d**; se observaron las señales de los hidrógenos aromáticos del grupo fenilo de la sulfonamida; de esta manera, se observó un multiplete en 8.01 ppm correspondiente a H2'' y H6''; un multiplete en 7.43 ppm corresponde a H3'' y H5''. La señal de H4'', desplazada a 7.52 ppm, se traslapa con el multiplete que genera las señales H3', H4', H5' del anillo B de la flavona. En 9.45 ppm se observa una señal simple correspondiente al hidrógeno de la amida.

El espectro de masas de alta resolución exhibe una m/z de 438.10100 y una fórmula de $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{NO}_6\text{S}$ para el ion molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$, correspondientes a los esperados para sulfonamida **4d**.

A diferencia de las señales de los hidrógenos aromáticos de la sulfonamida **4d**, para la bis-sulfonamida **4g**, en el espectro de RMN ^1H no se traslaparon las señales de los hidrógenos aromáticos de los dos grupos fenilos de la sulfonamida con las señales de los hidrógenos de la estructura flavona. Se observaron dos multipletes, uno desplazado a 7.97 ppm y que integra para los 4 hidrógenos, asignados como H2'' y H6''. En 7.32 ppm se desplazó el segundo multiplete, que integra para los 6 hidrógenos de los dos anillos aromáticos de la sulfonamida, asignados como H3'', H4'' y H5''. El espectro de masas de alta resolución del compuesto **4g** indicó una m/z de 578.09550 y una fórmula de $\text{C}_{29}\text{H}_{24}\text{NO}_8\text{S}_2$ para el ion molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$, con estos resultados se corroboró la estructura y masa esperada para el compuesto **4g**.

A diferencia de los espectros de RMN ^1H de las sulfonamidas aromáticas **4c** y **4g**, para la sulfonamida **4e** la aparición de señales debido al grupo propilo se observaron a

desplazamientos en menores ppm. De esta manera, se observó un triplete en 1.05 ppm, un sextuplete en 1.99 ppm y triplete en 3.19 ppm correspondientes a los hidrógenos del metilo H3'' y los metilenos H2'' y H1'' del grupo propilo de la sulfonamida.

En el caso de la sulfonamida **4f**, se observó una señal simple desplazada a 3.13 ppm y que integra para tres protones, esta señal corresponde al metilo de la sulfonamida. En todos los espectros de RMN ¹H de las sulfonamidas **4d**, **4e**, **4f** y **4g**, en la región entre 6 y 8 ppm, se observaron las señales características de los protones de la flavona anteriormente descritas.

El espectro de masas de alta resolución del compuesto **4e** muestra una *m/z* de 404.11530 y una fórmula de C₂₀H₂₂NO₆S para el ion molecular [M+H]⁺. Estos datos coinciden con los esperados para el compuesto **4e**. El espectro de masas de alta resolución para la sulfonamida **4f** muestra una *m/z* de 376.08494 y una fórmula de C₁₈H₁₈NO₆S para el ion molecular [M+H]⁺, estos datos corroboraron la masa y fórmula esperada para este compuesto.

8.2 Condiciones de reacción para la formación de amidas y sulfonamidas a partir de la cumarina umbeliferona.

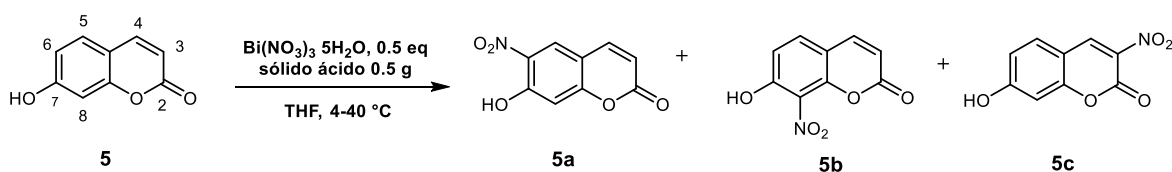
La preparación de las amidas y sulfonamidas a partir de la 7-hidroxycumarina, se realizaron de manera similar a las condiciones establecidas para la obtención de 8-amidoflavonas y 8-sulfonilamidoflavonas a partir de la flavona crisina. En el caso de la cumarina no se requirió una previa protección del grupo hidroxilo y con la adición adecuada del cloruro de acilo o de sulfonilo se obtuvieron, preferencialmente y en menor tiempo, las amidas y sulfonamidas. El primer paso de reacción implicó una nitración de la cumarina empleando condiciones suaves de reacción con nitrato de bismuto y sólidos ácidos para obtener la mezcla de los isómeros nitrados en las posiciones C3, C6 y C8, posteriormente se redujo el grupo nitro con SnCl₂·2H₂O para obtener las aminocumarinas correspondientes.

Finalmente, de acuerdo a la cantidad de aminocumarinas disponibles, se obtuvieron dos 6-sulfonilamidocumarinas y dos 8-amidocumarinas. A continuación, se presentan las condiciones de reacción de nitración, reducción y formación de amidas y sulfonamidas.

8.2.1 Nitración de 7-hidroxycumarina

El desarrollo de condiciones de nitración suaves para fenoles ha atraído la atención de diversas investigaciones, en las cuales se intenta mejorar el rendimiento, evitando las reacciones colaterales que conlleva la nitración con $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ [83,120]; dentro de estas condiciones se encuentra el uso de sólidos ácidos y nitratos metálicos [121]. En especial la combinación de nitrato de bismuto (III) con arcillas como montmorillonita KFS (MNT KFS), tonsil o gel de sílice han ofrecido buenos resultados para obtener productos mononitrados [122–124].

Para la nitración de la cumarina **5** se exploró el uso de nitrato de bismuto (III) como agente nitrante y arcillas ácidas (MNT KFS o tonsil) o gel de sílice como la fuente de medio ácido. Bajo estas condiciones se obtuvieron los isómeros 6-nitro-7-hidroxi cumarina (**5a**), 8-nitro-7-hidroxi cumarina (**5b**) y 3-nitro-7-hidroxi cumarina (**5c**) (**Esquema 9**).



Esquema 9. Productos obtenidos de la nitración de umbeliferona usando nitrato de bismuto (III) y sólidos ácidos

En la **Tabla 12** se muestran los rendimientos de reacción de nitración de umbeliferona usando diferentes sólidos ácidos y nitrato de bismuto. La reacción se mantuvo en agitación aplicando una temperatura de 4-40 °C durante 4 horas. Los rendimientos totales de reacción fueron bajos (26-50%) y dependieron del sólido ácido empleado. La MNT KFS condujo al rendimiento total mayor y con proporciones similares entre el compuesto **5a** y **5b**. Por otro lado, el uso de tonsil generó en mayor proporción al producto **5a**. El gel de sílice generó el menor rendimiento total.

Los sólidos ácidos tienen como característica brindar acidez de Brönsted y de Lewis, además de una gran superficie de contacto. En trabajos previos se determinó la acidez de Brönsted, resultando más ácido la MNT KFS, seguido del tonsil y el de menor acidez fue el gel de sílice [125].

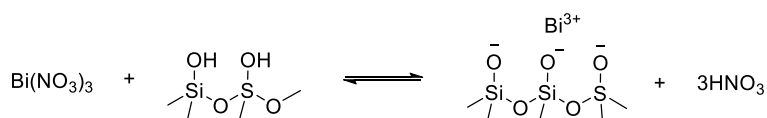
Tabla 12. Rendimientos de reacción de nitración de 7-hidroxycumarina empleando diferentes sólidos ácidos

Sólido ácido	Rendimiento (%)			Total (%)
	5a	5b	5c	
MNT KFS	19.4	21.7	9.2	50.3
Tonsil	25.6	5.3	4.2	35.1
Gel de sílice	12.4	3.4	10.7	26.5

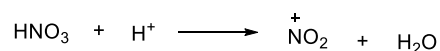
Algunas investigaciones, en donde han empleado sólidos ácidos en reacciones de nitración, sugieren que la formación del ion nitronio no se lleva a cabo principalmente, por efecto de la acidez de Brönsted que presentan los sólidos. La unión del nitrato de bismuto a los grupos hidroxilos libres ubicados en la estructura multi metálica del sólido también es importante para la formación de HNO₃ y la consecuente liberación del ion nitronio para llevar a cabo una sustitución electrofílica aromática [122,126]. Propuesta de este mecanismo se muestra en el **Esquema 10**.

La nitración ocurre por una sustitución electrofílica aromática en posiciones *orto* al grupo hidroxilo y en la posición C3 de la cumarina. En estas posiciones, existe una mayor densidad electrónica por efectos de resonancia. En la **Figura 15** se muestran las estructuras resonantes de la cumarina umbeliferona y se proponen aquellas que pueden seguir una sustitución electrofílica aromática para obtener los compuestos **5a**, **5b** y **5c**.

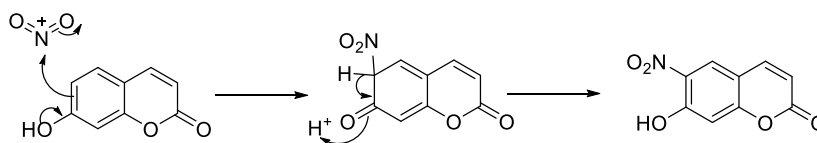
Generación de H⁺



Generación de NO₂⁺



Nitración



Esquema 10. Mecanismo propuesto de la nitración con el uso de nitrato de bismuto (III) y sólidos ácidos

Estructuras resonantes

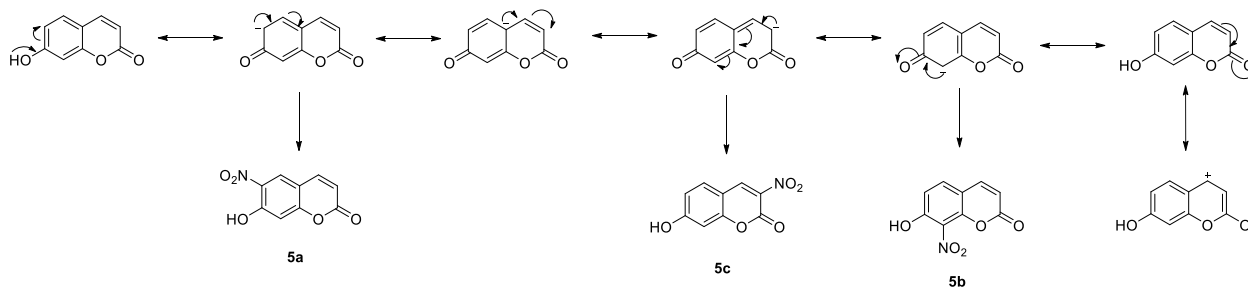


Figura 15. Estructuras resonantes de la umbeliferona que explican la distribución de carga para llevar a cabo una sustitución electrofílica aromática y obtener los isómeros **5a**, **5b** y **5c**.

Se ha reportado la obtención de los compuestos **5a** y **5b** usando como agente nitrante el nitrato de circonilo [127], amonio y cerio (IV) [128] y de cromo (III) [129]. Con el uso de los dos primeros nitratos, los autores reportan una reacción regioselectiva generando sólo el isómero **5a** con rendimientos entre el 80 y 84%. Con el uso de nitrato de cromo (III) se reporta la generación de los isómeros **5a** y **5b** en una proporción 1:1 y un rendimiento total de 85%.

Estos reportes indican que el uso de nitratos metálicos ofrece alternativas para aumentar los rendimientos de las nitrocumarinas. Con ninguna de las condiciones descritas se reporta la formación del compuesto **5c**.

Los isómeros fueron analizados por RMN, en donde en el espectro de protón se pueden distinguir diferentes señales que indican el sitio de nitración en la estructura de la cumarina. En la **Figura 16** se muestran los espectros de RMN ^1H de los compuestos **5a**, **5b** y **5c**. A continuación, se analizan las señales de cada uno.

En el espectro del compuesto **5a** se pueden observar dos señales simples en 8.42 y 6.98 ppm correspondientes a los protones H5 y H8, respectivamente. La sustitución electrofílica aromática se llevó a cabo en la posición C6 de la cumarina, en donde el grupo nitro desprotege de densidad electrónica el hidrógeno H5, provocando que su señal se desplace a mayores ppm. En 8.04 y 6.41 ppm se observan dos señales dobles con una $J=9.6$ Hz debido al acoplamiento fuerte entre los hidrógenos cis vinílicos H4 y H3.

En el espectro de RMN ^1H del compuesto **5b** se observaron tres señales dobles; dos de ellas desplazadas en 6.37 y 8.05 ppm con una $J = 9.6$ Hz, correspondientes a los hidrógenos vinílicos H3 y H4, respectivamente. Los dos dobletes en 7.03 y 7.74 ppm y una $J = 8.8$ Hz fueron asignados a los hidrógenos aromáticos H5 y H6. Estas señales ofrecieron la evidencia de que la nitración se llevó a cabo en la posición C8.

Finalmente, en el espectro de RMN ^1H para el compuesto **5c** se observa una señal simple en 8.99 ppm, correspondiente al protón vinílico H4, el cual se encuentra fuertemente desprotegido debido al efecto de resonancia de la cetona α,β insaturada y por el grupo nitro en la posición H3. En 7.73 ppm se observa un doblete correspondiente a H5 con una $J=8.7$ Hz por un acoplamiento con H6 en posición *orto*. En 6.78 ppm se observa un doblete con una $J=2.2$ Hz, perteneciente a H8 que se acopla con H6 en posición *meta*. En 6.92 ppm se

observa un doble de dobles con $J = 8.7, 2.2$ Hz, que corresponde a H6 y se acopla con H8 en posición *meta* y con H5 en posición *orto*.

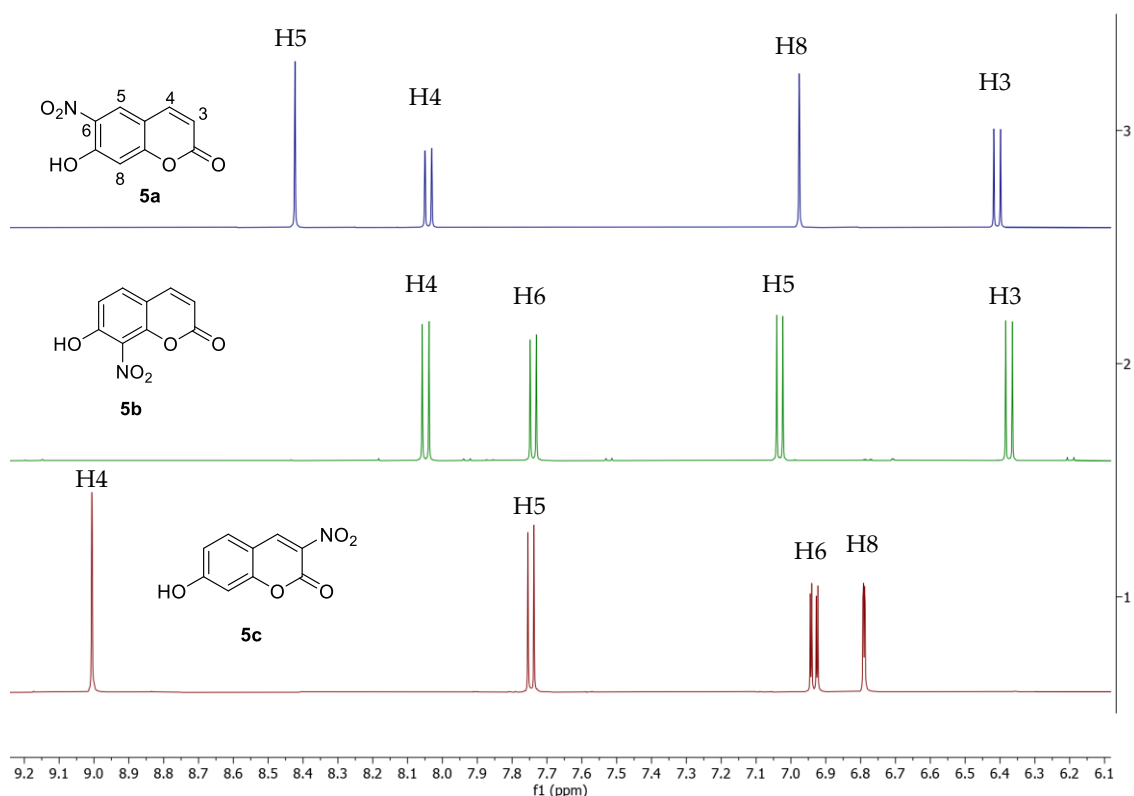


Figura 16. Espectros de RMN ^1H apilados de las nitrocumarinas **5a**, **5b** y **5c**

Los espectros de masas de los tres isómeros muestran relaciones masa carga de 207 para el ion molecular $[\text{M}]^+$, confirmando la masa molecular esperada para los compuestos **5a**, **5b** y **5c**.

8.2.2 Reducción de nitrocumarinas y obtención de amidas y sulfonamidas

Algunas modificaciones estructurales realizadas en la cumarina y que han resultado favorables para mejorar su actividad antiproliferativa y como inhibidores de la enzima Q9DC, se han llevado a cabo en el grupo fenilo. Por lo anterior, se eligieron las nitrocumarinas **5a** y **5b** para la obtener 8-amidocumarina y 6-sulfonilamidocumarinas. Seleccionadas las nitrocumarinas, se prosiguió a la reducción del grupo nitro y, de acuerdo con las condiciones de reducción establecidas para la nitroflavona, se utilizaron 10 equivalentes de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y EtOH como disolvente. Los productos de reacción fueron las

6-amino-7-hidroxicumarina (**6a**) y 8-amino-7-hidroxicumarina (**6b**) con rendimientos entre el 82-88%. Los rendimientos de reducción fueron mejores que los obtenidos al reducir la nitroflavona **3** bajo las mismas condiciones. Otras condiciones que han resultado favorables para reducir nitrocumarinas es con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4/\text{NH}_4\text{OH}$, reportando 93% de rendimiento [130].

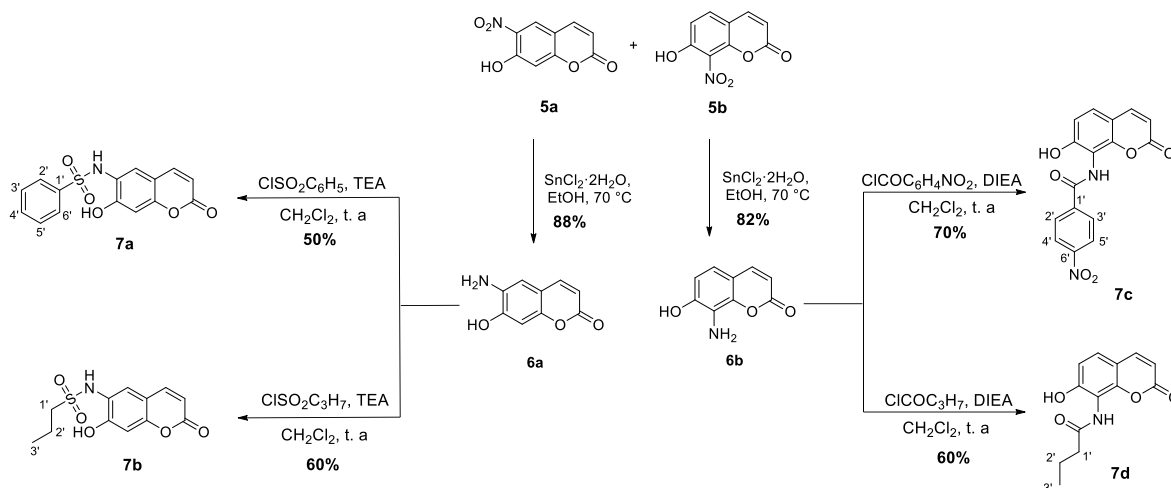
El mecanismo probable de reducción que proponen algunos autores es a través de la transferencia sucesiva de electrones del azufre o del estaño al grupo nitro para formar el grupo nitroso, posteriormente la hidroxilamina y finalmente el grupo amino [131,132].

En el **Esquema 11** se muestra las condiciones de reducción de las nitrocumarinas para obtener las aminas **6a** y **6b**.

El espectro de RMN ^1H de la 6-aminocumarina **6a** mostró dos señales simples desplazadas a 6.86 y 6.69 correspondientes a los hidrógenos aromáticos H5 y H8, respectivamente. En 7.75 y 6.15 ppm se desplazaron dos señales dobles con una $J = 9.40$ Hz, correspondientes a los protones vinílicos H4 y H3, respectivamente.

Por otra parte, el espectro de RMN ^1H del producto **6b** mostró dos señales dobles desplazadas a 7.86 y 6.15 ppm, correspondientes a los protones vinílicos H4 y H3, respectivamente, los cuales se encuentran acoplados fuertemente con una $J = 9.4$ Hz. Las señales dobles en 6.81 y 6.74 ppm corresponden a los protones aromáticos H5 y H6 respectivamente, que se acoplan fuertemente debido a la posición *orto* entre ellos, con una $J = 8.26$ Hz.

El espectro de masas de alta resolución exhibe una m/z de 178.04971 y una posible fórmula de $\text{C}_{29}\text{H}_{18}\text{NO}_3$ para el ion molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$. Estos valores son los esperados para el compuesto **6b**.



Esquema 11. Obtención de 6-sulfonamidocumarinas y 8-amidocumarinas

Inicialmente se planteó la preparación de dos amidas y tres sulfonamidas a partir de cada aminocumarina; sin embargo, por la disponibilidad de los compuestos **6a** y **6b** en ese momento, sólo se lograron preparar las 6-sulfonamidocumarinas **7a** y **7b** y las 8-amidocumarinas **7c** y **7d**. En el **Esquema 11** se muestran las condiciones de reacción para obtener las amidas y sulfonamidas a partir de la aminocumarinas **6a** y **6b**.

En la **Tabla 13** se muestran las condiciones de reacción para la formación de las sulfonamidas. A partir de 6-amino-7-hidroxycumarina y 1.4 equivalentes de los cloruros de bencenosulfonilo y propanobencenosulfonilo, en presencia de TEA, se obtuvieron las sulfonamidas **7a** y **7b** con rendimientos de 50 y 60%, respectivamente. Los tiempos de reacción fueron relativamente menores que los requeridos para la preparación de las sulfonamidoflavonas y con rendimientos ligeramente mayores. La presencia de otras manchas en la placa de cromatografía en capa fina no descarta la formación de productos de la doble adición de la amina al cloruro de sulfonilo.

Tabla 13. Condiciones de reacción para la formación de las sulfonamidas **7a** y **7b**

Cloruro de sulfonilo	Equivalentes	Tiempo (h)	Producto (rendimiento %)
Cloruro de bencenosulfonilo	1.4	20	7a (50%)
Cloruro de propanosulfonilo	1.4	48	7b (60%)

La formación de la amida se pudo corroborar mediante el análisis de los espectros de RMN de una y dos dimensiones. En el espectro de RMN ^1H del compuesto **7a** se observó la aparición de señales en la zona aromática. En 7.99 ppm se aprecia un doble de dobles, correspondiente a los protones aromáticos H2' y H6' que se acoplan con H3', H5' en posición *orto* y con H4' en posición *meta*. En 7.81 ppm aparece un multiplete correspondiente a H4' que se acopla con los protones H2' y H6' en posición *meta* y, con H3', 5' en posición *orto*. En 7.65 ppm se observa otro multiplete que integra para dos protones que corresponden a H3' y H5'. El espectro de masas de alta resolución del compuesto **7a** arroja una m/z de 318.04287 y una fórmula de $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{NO}_5\text{S}$ para el ion molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$, confirmando los valores esperados para este compuesto.

En el espectro de RMN ^1H del compuesto **7b** se pueden observar señales a menores ppm, correspondientes a los protones del grupo propilo de la sulfonamida. En 1.02 ppm se observa un triplete, en 1.85 ppm un sextuplete y en 3.64 un triplete correspondiente a los hidrógenos del grupo propilo asignados como H3', H2' y H1', respectivamente. El espectro de masas de alta resolución muestra una m/z 284.05906 y una fórmula $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{NO}_5\text{S}$, los cuales corresponden a los esperados para el compuesto **7b**.

La preparación de amidas se realizó, a partir de la 8-amino-7-hidroxycumarina (**6b**) en presencia de DIEA y cloruro de 4-nitrobenzoilo o pronosulfonilo para obtener las amidas **7c** y **7d** con rendimientos de 70 y 60%, respectivamente. Los rendimientos de las reacciones fueron similares a los obtenidos para las amidoflavonas, sin embargo, no se detectaron la presencia de imidas o ésteres, y las reacciones procedieron en menor tiempo. En la **Tabla 14** se muestran las condiciones.

Tabla 14. Condiciones de reacción para la formación de las amidocumarinas **7c** y **7d**

Cloruro de acilo	Equivalentes	Tiempo (h)	Producto (rendimiento %)
Cloruro de 4-nitrobenzoilo	1.2	2	7c (70%)
Cloruro de propanosulfonilo	1.2	1	7d (60%)

La estructura de las amidas **7c** y **7d** se corroboraron con el análisis de los espectros de RMN de una y dos dimensiones. En el espectro de RMN ^1H de la amidocumarina **7c** se aprecian señales para un sistema AA'BB', con dos señales dobles en 8.40 y 8.26 ppm, correspondientes al par de hidrógenos equivalentes magnéticamente H3', H5' y H2', H6', respectivamente, con una $J = 8.2$ Hz debido al acoplamiento entre ellos en posiciones *orto*. Entre 6 y 8 ppm se presentan las cuatro señales dobles que fueron observadas en el espectro de RMN ^1H de la aminocumarina **6b** y que pertenecen a los hidrógenos aromáticos y vinílicos de la estructura de la cumarina. En el espectro de RMN ^{13}C de la amidocumarina **7c** se observó una señal en 164.5 ppm, que corresponde al carbonilo del grupo amida. En el espectro de masas de alta resolución se observó una m/z de 327.06203 y una posible fórmula de $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_6$ para el ion molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$, los cuales coinciden con los esperados para la amida **7c**.

En el espectro de RMN ^1H para el compuesto **7d** se pueden observar las señales que identifican los protones del grupo propilo. En 1.06, 1.83 y 2.58 ppm se observó un triplete, sextuplete y triplete para los protones H3', H2' y H1', respectivamente. De manera similar que en el espectro de RMN ^1H de la amida **7c**, entre 6 y 8 ppm, en el espectro de RMN ^1H del compuesto **7d**, se observaron cuatro señales dobles correspondientes a los protones aromáticos y vinílicos de la estructura base de la cumarina. Una señal simple en 10.76 ppm en el espectro de RMN ^1H de la amida **7d** y una señal en 174.8 ppm en el espectro de RMN ^{13}C , corresponden al protón y carbono del carbonilo del grupo amida.

En el espectro de masas de alta resolución se muestra una m/z de 248.09208 y una posible fórmula de $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{NO}_4$ para el ion molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$, valores esperados para el compuesto **7d**.

En resumen, se lograron obtener amidas y sulfonamidas a partir de la flavona crisina y la cumarina umbeliferona con grupos sustituyentes propilo, metilo y fenilo. Estos compuestos se muestran en la **Figura 17**.

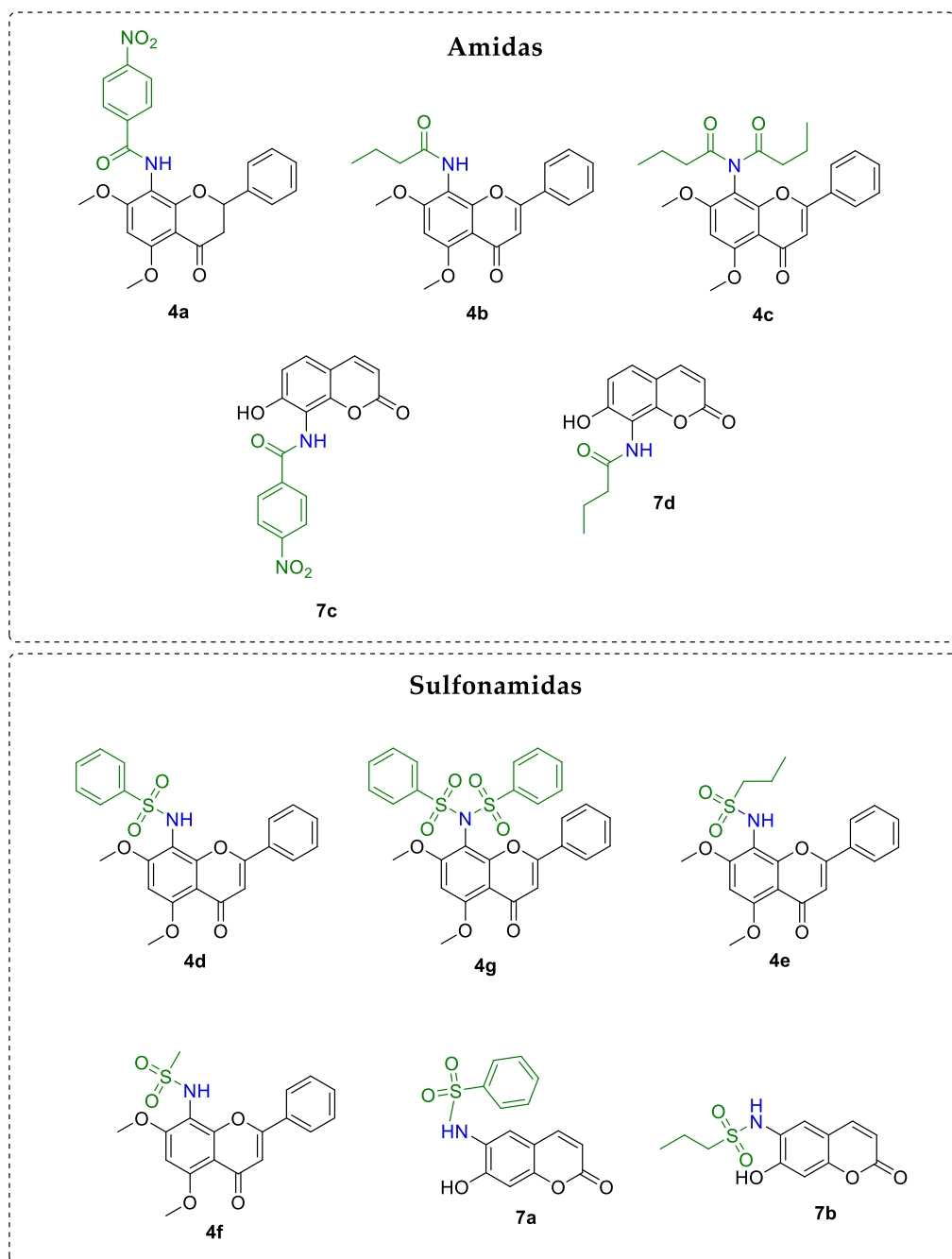


Figura 17. Amidas y sulfonamidas obtenidas a partir de la flavona crisina y la cumarina umbeliferona

Dentro de los factores que influyeron en la obtención de las amidas y sulfonamidas está la reactividad del grupo amino en los compuestos 8-amino-5,7-dimetoxiflavona (**4**), 8-amino-7-hidroxycumarina (**6b**) y en la 6-amino-5,7-dihidroxycumarina (**6a**). De esta manera, la aminoflavona presentó una reactividad menor que las aminocumarinas, al requerir

mayor tiempo para la formación de amidas y sulfonamidas y con un exceso del cloruro de bencenosulfonilo se condujo a la generación de la bisulfonamida **4g**. Un caso similar ocurrió con la formación de la amida **4b**, en donde un exceso del cloruro de butirilo condujo a la formación de la imida **4c**. El inconveniente de una adición más lenta de los cloruros de acilo o sulfonilo son los tiempos largos de reacción. Una de las estrategias que se reportan en la literatura es la formación de la bisulfonamida a partir de la amina y el cloruro de sulfonilo, para posteriormente llevar a cabo una desulfonilación con fluoruro de tetrabutil amonio [116] .

Otro factor a resaltar es la reactividad de los grupos hidroxilos ante cloruros de acilo y sulfonilo. En la flavona se recurrió a la protección de los grupos hidroxilos en las posiciones C5 y C7, ya que al reaccionar más lentamente el grupo amino se favorecía la formación de ésteres o sulfonatos. En el caso de la 7-hidroxicumarina no fue necesario proteger el grupo hidroxilo y, con una cantidad casi equimolar de los cloruros de acilo y sulfonilo, se logró obtener los productos deseados y en menores tiempos de reacción comparados con los requeridos para la flavona.

8.3 Evaluación de actividad biológica

Considerando la importancia de los grupos funcionales que contienen nitrógeno en compuestos con actividad biológica, en especial anticancerígena [79,80,133], se evaluó el efecto de los sustituyentes nitrogenados en la posición C8 de la flavona crisina y en las posiciones C6 y C8 de la cumarina umbeliferona, sobre su actividad antiproliferativa e inhibidora de la enzima Q9DC.

En esta sección se presentan los resultados de actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares de cáncer humano y la actividad inhibitoria en la enzima Q9DC de los compuestos con mayor actividad antiproliferativa.

8.3.1 Actividad antiproliferativa de crisina y los derivados nitrogenados

En la serie de modificaciones que se realizaron a la estructura de crisina en la posición C8 se introdujeron grupos nitrogenados con carácter electroattractor, como el grupo nitro y electrodonador, como el grupo amino. Posteriormente, el grupo amino se transformó a amidas y sulfonamidas con sustituyentes aromáticos y alifáticos de cadena corta. Otro cambio que se realizó fue la protección de los grupos hidroxilos en forma de éteres de metilo. De acuerdo con lo reportado en la literatura, las modificaciones en la posición C8 [17,79,80,100,133] y en los hidroxilos formando éteres o ésteres [72,134] han resultado favorables para mejorar la actividad antiproliferativa de la flavona. Por lo anterior, fue de interés evaluar el impacto de los cambios realizados a estructura de la flavona sobre su actividad antiproliferativa en diversas líneas de cáncer y su potencial como inhibidores de la enzima Q9DC.

Para conocer el potencial antiproliferativo de los compuestos mostrados en las **Figuras 18 y 19**, se realizó un ensayo preliminar por el método colorimétrico de sulforodamina B. En las **Gráficas 2 y 3** se muestran los porcentajes de inhibición del crecimiento celular de diferentes tipos de cáncer humano: U251 (glía de sistema nervioso central), PC-3 (próstata), SKLU-1 (pulmón), MDA-MB-231 (mama); mientras que la línea celular COS-7 (de riñón de

mono) se utilizó como control no canceroso. Los compuestos fueron evaluados a una concentración de 25 μM .

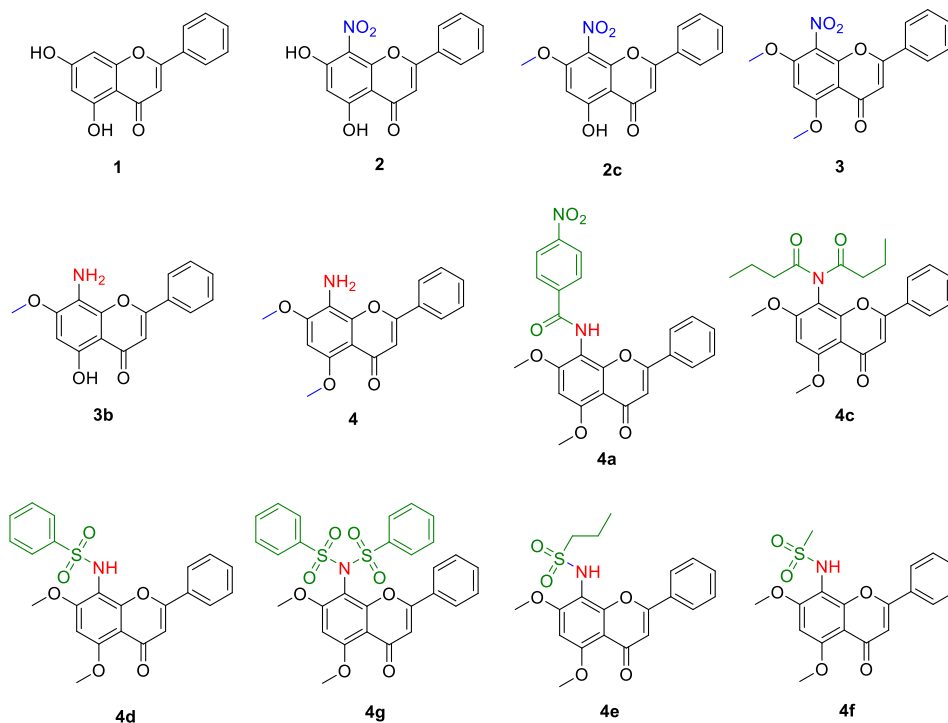


Figura 18. Estructura de crisina (1) y sus derivados a los que se evaluó su actividad antiproliferativa

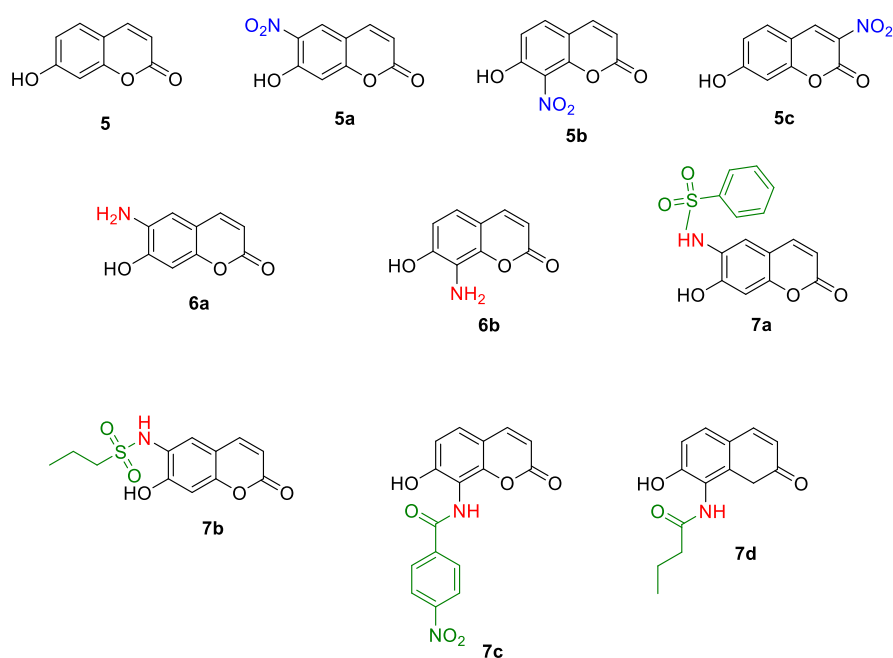
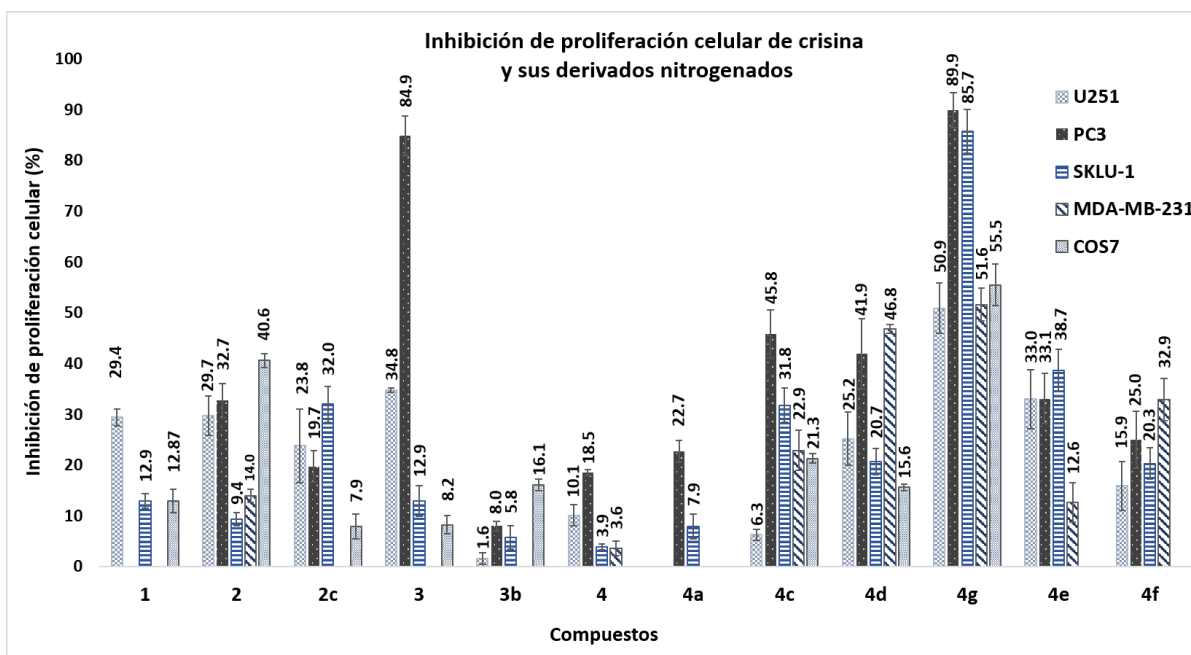


Figura 19. Estructura de umbeliferona (5) y sus derivados evaluados en actividad antiproliferativa

En la **Gráfica 2** se muestran la actividad antiproliferativa de crisina y sus derivados. Se puede observar que la introducción del grupo nitró en C8 resultó una modificación desfavorable para la flavona crisina, al incrementar su actividad antiproliferativa en células no cancerosas (COS-7); sin embargo, la metilación de los hidroxilos (C7-OH) en el compuesto 2c y C7-OH, C5-OH en el compuesto 3 fue favorable para disminuir la actividad antiproliferativa en la línea celular no cancerosa y promover una actividad antiproliferativa selectiva del compuesto 3 en la línea de cáncer de próstata, al inhibir el 84.9% de proliferación celular a una concentración de 25 μ M. A pesar de que los grupos hidroxilos se han considerado importantes para la interacción con dianas, como la QDC's [135], también se ha observado en otras investigaciones que la metilación de los grupos hidroxilo en flavonas mejoran la actividad antiproliferativa y estabilidad metabólica [136,137]. Adicionalmente, Gurung y colaboradores describieron al compuesto 3 con potencial antiinflamatorio [138], sumando una actividad biológica favorable en tratamientos para el cáncer [139].



Gráfica 2. Inhibición de la proliferación de crisina y sus derivados a una concentración de 25 μ M

El cambio del grupo nitro por un grupo amino en los compuestos **3b** y **4** produjo una disminución en su actividad antiproliferativa en las líneas celulares evaluadas. Wanich y Yenjai [105] reportaron la síntesis de 8-nitro, 8-amino y 6-aminoflavonas hidroxiladas y, caso contrario a los resultados obtenidos en este trabajo, ellos identificaron a las 6- y 8-aminoflavonas como las más activas en la línea celular de carcinoma epidermoide. Estos resultados indican que el cambio de un grupo nitro por un amino y su posición en el anillo A de la flavona puede determinar la selectividad en alguna línea celular de cáncer.

La presencia de un grupo 4-nitrofenilo en la amida **4a**, no resultó ser favorable al mostrar actividad antiproliferativa, prácticamente nula en las líneas celulares evaluadas. Caso contrario a la actividad de la imina **4c**, en donde los grupos propilo provocaron una ligera mejora en la actividad antiproliferativa, especialmente en la línea de cáncer de próstata al inhibir la proliferación celular en 45.8%. Sin embargo, el compuesto **4c** también presenta actividad antiproliferativa en la línea de células no cancerosas.

Hassan y colaboradores, sintetizaron flavonas con un grupo arilamida en posición *meta* del anillo B e hidroxiladas, que se unieron a través de los enlaces -CONH-. Aquellas con grupos sustituyentes 4-metilfenilo y 4-clorofenilo fueron las más activas al inhibir diversos tipos de líneas celulares de cáncer (leucemia, colon, pulmón y mama) de manera eficiente a una concentración de 10 μ M [112]. A pesar de que los autores describen el enlace amida como importante para la actividad, factores como la posición del grupo amida en el anillo A o B de la flavona y los sustituyentes en el grupo fenilo, son trascendentes en la actividad antiproliferativa.

Dentro de la serie de 8-sulfonamido flavonas, la **4d** y **4g** resultaron las más activas para inhibir la proliferación celular; de esta manera, la sulfonamida **4d** inhibió la proliferación celular de cáncer de próstata (PC3) y mama (MDA-MB-231) en 41.9 y 46.8%, respectivamente. La sulfonamida **4g** inhibe la proliferación celular de cáncer de próstata (PC3) y de pulmón (SKLU-1) en 89.9 y 85.7%, respectivamente. El inconveniente de estas

sulfonamidas, especialmente de la **4g**, es su actividad antiproliferativa de células no cancerosas, indicando una baja selectividad.

La característica que tienen en común las sulfonamidas **4d** y **4g** es el grupo sustituyente fenilo, mientras que los grupos propilo y metilo en las sulfonamidas **4e** y **4f** no fueron efectivos para mejorar la actividad antiproliferativa. En otras investigaciones se reporta que las flavonas sustituidas con arilsulfonamidas en el anillo B resultan ser las más prometedoras como antiproliferativas en comparación con las alquilsulfonamidas [116], por lo tanto, grupos sustituyentes aromáticos en las sulfonilamido flavonas podrían mejorar su potencia y selectividad.

Los compuestos **3**, **4c**, **4d** y **4g** fueron seleccionados para determinar el valor de la concentración inhibitoria media, debido a que presentaron la mejor capacidad para inhibir la proliferación celular en diferentes líneas de cáncer a 25 μM . En la **Tabla 15** se muestran las concentraciones correspondientes al valor de CI_{50} . Los compuestos **3**, **4c** y **4g** fueron los más activos en la línea celular de cáncer de próstata; dentro de estos compuestos, el **3** se considera el más selectivo y con mayor potencia al presentar un valor de CI_{50} de $5.6 \pm 0.8 \mu\text{M}$. El compuesto **4g** presentó actividad antiproliferativa en todas las líneas celulares evaluadas con valores de CI_{50} entre 7.9 ± 0.2 y $18.3 \pm 1.6 \mu\text{M}$, presentando la mejor actividad en la línea celular de cáncer de próstata. Este compuesto presentó menor selectividad al afectar la proliferación de células sanas. Los compuestos **4c** y **4d** presentaron valores de CI_{50} de 23.2 ± 2.8 y $26.1 \pm 2.1 \mu\text{M}$ en la línea celular de cáncer de próstata y mama, respectivamente.

Tabla 15. Concentraciones inhibitorias medias (CI_{50} , μM) de los compuestos con mayor actividad antiproliferativa

Compuesto	U251	PC3	SKLU-1	MDA-MB-231
3		5.6 ± 0.8		
4c		23.2 ± 2.8		
4d				26.1 ± 2.1
4g	14.4 ± 1.1	7.9 ± 0.2	10.9 ± 0.7	18.3 ± 1.6

De acuerdo con estos resultados, el compuesto **3** resulta ser el más prometedor al mostrar mayor selectividad y potencia en la línea de cáncer de próstata. La actividad antiproliferativa de las sulfonamidas aromáticas **4c** y **4g** promueve realizar modificaciones futuras variando los sustituyentes en el anillo aromático y la obtención de bis-sulfonamidas con el objetivo de mejorar su actividad.

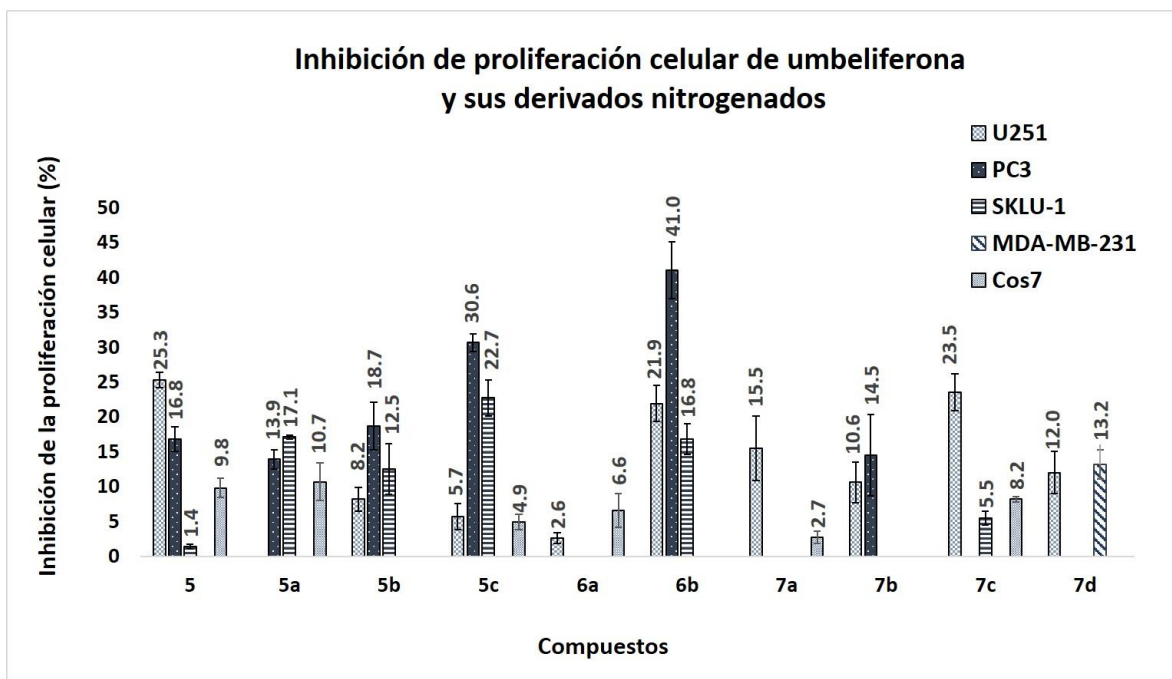
8.3.2 Actividad antiproliferativa de umbeliferona y los derivados nitrogenados

Las cumarinas han sido consideradas estructuras base para realizar diversas modificaciones estructurales con el fin de mejorar su actividad antiproliferativa [140]. En el presente trabajo de investigación se evaluó el cambio de grupos sustituyentes en las posiciones C6 y C8. En la **Figura 19** se muestran las estructuras de los compuestos evaluados.

En la **Grafica 3** se muestran los porcentajes de inhibición de proliferación celular de las líneas de cáncer U251 (glía del sistema nervioso central), PC3 (próstata), pulmón (SKLU-1) y mama (MDA-MB-231). Los resultados obtenidos indican que las modificaciones realizadas en la umbeliferona (**5**), en términos generales, no fueron favorables para mejorar su actividad antiproliferativa. Ningún compuesto, a una concentración de 25 μ M, logró inhibir la proliferación celular por encima del 41% en las líneas celulares de cáncer evaluadas.

Los compuestos 7-hidroxi-3-nitrocumarina y 8-amino-7-hidroxycumarina inhibieron la proliferación celular de la línea de cáncer de próstata en 30.6 y 40%, respectivamente. En la literatura no se encuentra reportada la actividad antiproliferativa de estos compuestos, sin embargo, Finn y colaboradores han resaltado la importancia del grupo nitro en la posición C6 para inhibir la proliferación de melanocitos malignos y carcinoma renal de manera dependiente de la concentración y el tiempo [141,142]. Estos hallazgos sugieren que se podría observar una actividad antiproliferativa mayor, si los compuestos mostrados en

la **Figura 19** se someten a ensayos antiproliferativos utilizando concentraciones mayores y por lapsos de tiempos de exposición más largos.



Gráfica 3. Inhibición de la proliferación de umbeliferona y sus derivados a una concentración de 25 μM

Los grupos sulfonamida y amida en los compuestos **7a-7d** resultaron desfavorables para la actividad antiproliferativa. En la literatura se reporta la actividad antiproliferativa de 3-sulfonilamidocumarinas y 3-cumarinas en la línea de cáncer de mama (MDA-MB-231). Los autores indican que el grupo sulfonamida en la posición C3 brinda una mejor actividad a la cumarina en comparación con la amida [143]. Estos hallazgos abren la posibilidad de incluir grupos sulfonamidas en la posición C3 de la cumarina en futuras modificaciones.

En resumen, los grupos nitrogenados propuestos, resultaron más favorables en la posición C8 de la flavona crisina que en las posiciones C6 y C8 de la cumarina umbeliferona. El grupo nitro y la metilación de los hidroxilos mejoró la selectividad de la flavona **3** en la línea de cáncer de próstata. El grupo sulfonamida en la posición C8 de la flavona puede considerarse prometedor, en especial al colocar grupos sustituyentes aromáticos o

generando la bis-sulfonamida. En la **Figura 20** se muestra un resumen de la relación entre la estructura y actividad antiproliferativa, de acuerdo con los resultados obtenidos.

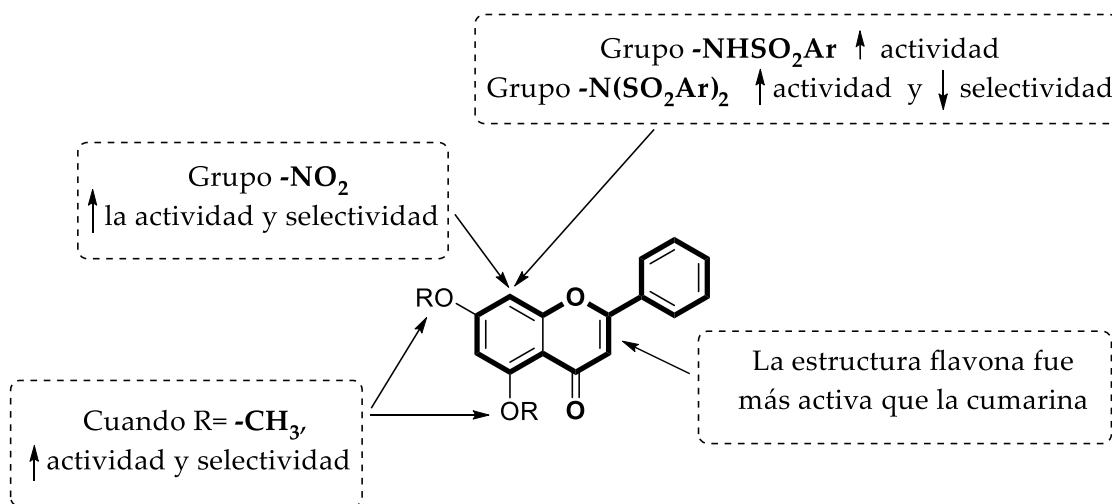


Figura 20. Características estructurales en la flavona que favorecen su actividad antiproliferativa

8.4 Actividad inhibidora de la enzima Q9DC y modelado molecular

La enzima Q9DC en complejo con la ciclina T1 regula el proceso de transcripción y elongación del ARN mensajero mediante la fosforilación de la ARNP II. La enzima Q9DC/T1 es considerada una diana para el tratamiento del cáncer, debido a que se ha asociado en el pronóstico de distintos tipos de cáncer, entre ellos el de mama triple negativo [144], glioblastoma [54], próstata [16] y pulmón [145]. Esta enzima se ha encontrado sobreexpresada en los cánceres antes mencionados y se ha observado que regula la transcripción de ARN de proteínas antiapoptóticas. De esta manera, se reporta que la inhibición la Q9DC/T1 conduce a la disminución de los niveles de proteínas antiapoptóticas [58–61], lo que restablece la capacidad de las células cancerosas a inducir a una muerte por apoptosis.

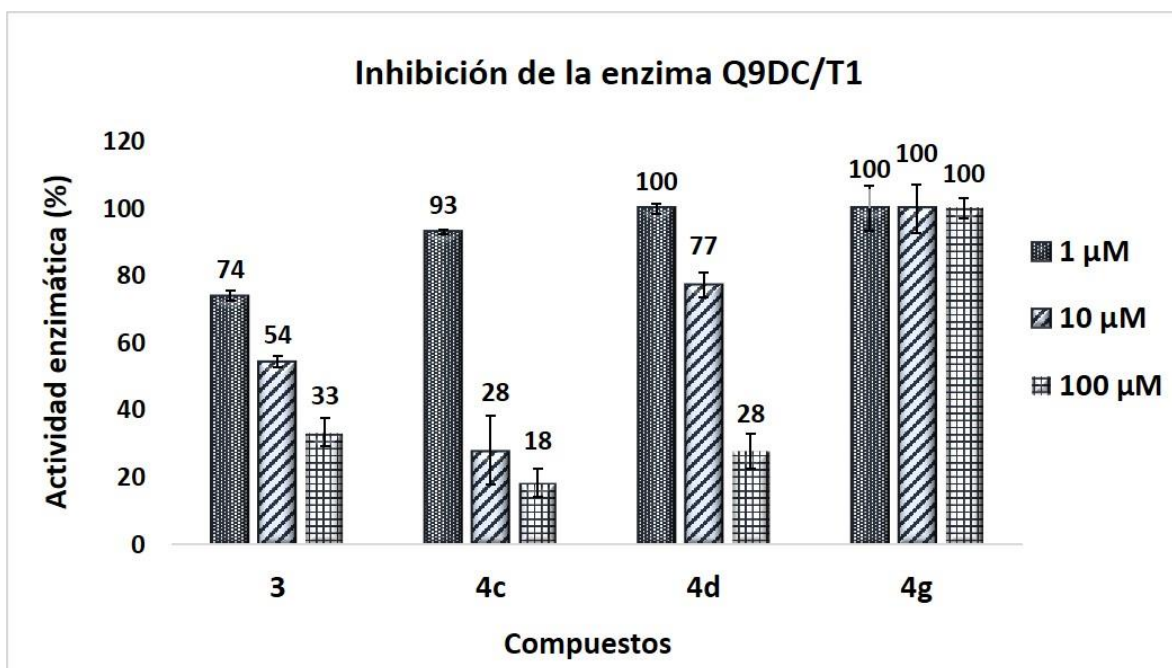
Algunas flavonas naturales y semisintéticas han resultado inhibitoras de la enzima Q9DC/T1 y en la actualidad se continúa el estudio de flavonas realizando diversas modificaciones para mejorar la actividad y selectividad [14,17,146].

Para determinar si las flavonas con mayor actividad antiproliferativa (**3**, **4c**, **4d** y **4g**) podrían tener como blanco a la enzima Q9DC/T1, se realizó un ensayo enzimático utilizando un kit de la marca BioScience. Los compuestos se evaluaron a las concentraciones de 1, 10 y 100 μM .

En la **Gráfica 3** se presentan los porcentajes de actividad de la enzima Q9DC/T1 para cada una de las concentraciones a las que se evaluaron los compuestos. Se puede observar que conforme aumenta la concentración de los compuestos **3**, **4c** y **4d**, la actividad de la enzima disminuye. El compuesto que se considera más prometedor como inhibidor de la enzima Q9DC/T1 es el **4c**, al disminuir la actividad enzimática a 28% cuando el compuesto se encuentra a una concentración de 10 μM .

La nitroflavona **3** y la sulfonilamidoflavona **4d**, también son capaces de inhibir la actividad de la enzima Q9DC/T1. Así, su actividad antiproliferativa en la línea de cáncer de próstata y mama podría efectuarse a través de la inhibición de esta enzima, aunque hasta el momento no se ha explorado si actúen en otras QDC's, debido a lo novedoso de las moléculas.

Wang y colaboradores realizaron gran cantidad de modificaciones estructurales a la flavona wogonina en la posición C8 y en el anillo B para mejorar la selectividad hacia la enzima Q9DC/T1 [17], con conocimientos previos que la flavona wogonina interactúa con el sitio activo o de unión del ATP [14]. Describen que grupos como la piperazina, en la posición C4' del anillo B, pueden proveer de selectividad hacia la enzima Q9DC en comparación con la Q2DC. Este tipo de hallazgos se pueden considerar para ser incluidos en los compuestos **3**, **4c** y **4d**, que han resultados prometedores en este trabajo.



Gráfica 3. Actividad de la enzima Q9DC/T1 en presencia de los compuestos 3, 4c, 4d y 4g

La bis-sulfonamida **4g** no presentó la capacidad de inhibir a la enzima Q9DC/T1 al permanecer la actividad enzimática al 100% por lo que su actividad antiproliferativa poco selectiva podría efectuarse a través de otros blancos moleculares.

Considerando el potencial de los compuestos **3**, **4c** y **4d** como inhibidores de la Q9DC/T1, se realizó un acoplamiento molecular ciego en Autodock 4.2.6, utilizando la estructura cristalográfica de la enzima Q9DC/T1 en complejo con el flavopiridol, con código en la base de datos de proteínas 3BLR. La validación del método se realizó con el ligando co-cristalizado y la energía obtenida fue de -10.75 kcal/mol y un RMSD aceptable de 1.310 Å.

En la **Tabla 16** se muestran las energías de unión y las principales interacciones que establecieron los compuestos **3**, **4c**, **4d** y el flavopiridol. Los compuestos **4c** y **4d** interaccionaron en el sitio catalítico de la enzima, no sucedió de esta manera para el compuesto **3**, el cual interaccionó con las cadenas α -hélices del carboxilo terminal de la enzima. En la **Figura 21** se muestra la enzima Q9DC/T1, la Q9DC en representación de superficie en interacción con los compuestos **3**, **4c** y **4d**.

Las energías libres de unión, mostradas en la **Tabla 16** indican que los compuestos **3**, **4c** y **4d** interaccionaron con la enzima Q9DC de manera favorable. Cabe destacar, que los compuestos **4c** y **4d**, dentro de todos los lugares posibles de interacción en la enzima Q9DC, el sitio activo fue en donde presentaron la interacción más favorable con energías de -9.34 y -9.64 kcal/mol, respectivamente. Con estos resultados se infiere que la capacidad, observada en la **Gráfica 3** para inhibir a la enzima Q9DC podría ser a través de la competencia con el ATP por el sitio activo. La afinidad de los compuestos **4c** y **4d** se puede explicar por las interacciones que establecen; ambos compuestos forman un enlace de hidrógeno con el aminoácido Cys 106 y establecen interacciones con la mayoría de residuos con los que el flavopiridol lo hace. En la **Tabla 16** se resaltan en negro los residuos con los que interaccionan en común los compuestos **4c**, **4d** y el flavopiridol.

Tabla 16. Energías de afinidad de los compuestos a y algunos derivados con la enzima Q9DC/T1

Compuesto	Energía kcal/mol	Residuos formadores de enlaces de hidrógeno	Otras interacciones
Flavopiridol	-10.75	Cys106, Asp104	Ile25, Gly26, Phe30, Val33, Ala46, Lys48, Phe103, His108, Asn154, Leu156, Ala166 Asp167
3	-8.39	Leu123, Arg284, Asp285	Phe121, Ile126, Met222, Trp223, Pro319
4c*	-9.34	Cys106	Ile25, Val33, Ala46, Lys48, Val79, Phe103, Glu107, His108, Asp109, Asn154, Leu156, Ala166, Asp167
4d*	-9.64	Cys106	Ile25, Phe30, Val33, Ala46, Val79, Phe103, Asp104, His108, Asp109, Leu156, Asp167

* Compuestos que interaccionaron en el sitio activo de la enzima Q9DC

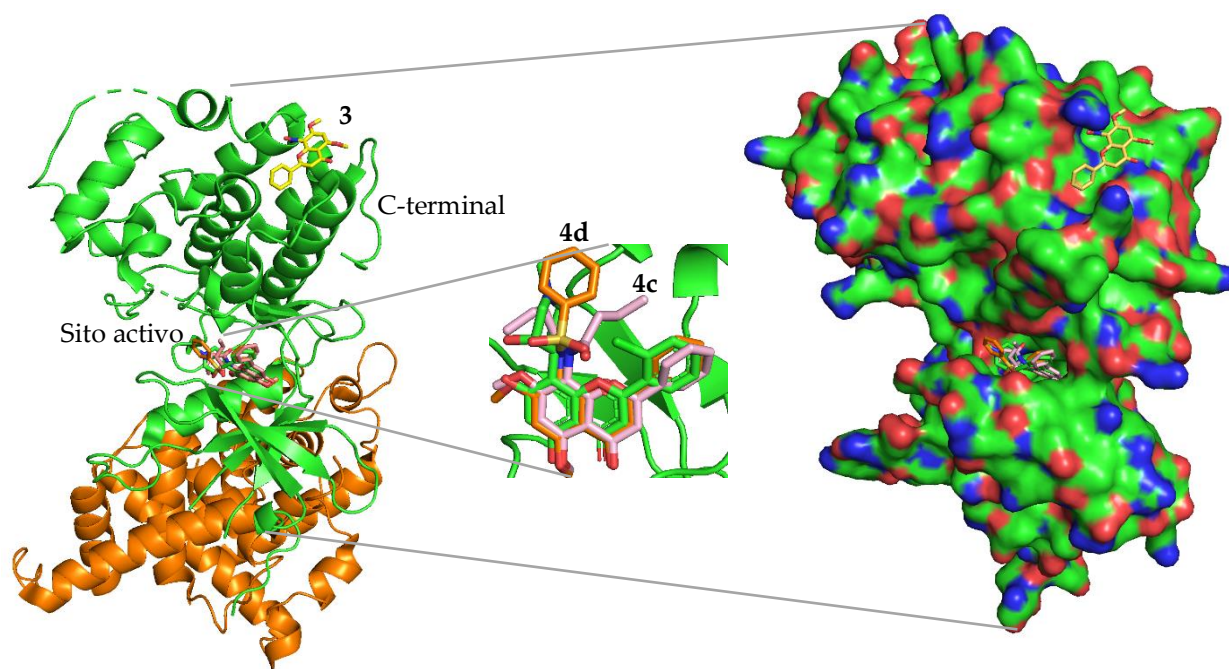


Figura 21. Regiones de interacción de los compuestos **3**, **4c** y **4d** con la Q9DC

A diferencia del flavopiridol, los compuestos **4c** y **4d** no forman un enlace de hidrógeno con el residuo Asp104 debido a la presencia del grupo metoxilo en lugar de un hidroxilo; en su lugar se forma una interacción más débil entre los hidrógenos del metilo de las flavonas y el oxígeno del carbonilo que forma el enlace peptídico del residuo Asp104.

Otras interacciones que establecen los compuestos **4c** y **4d** en el sitio activo, se pueden observar en la **Figura 22**; como de van der Waals en color verde; π -anión entre el ácido aspártico 109 y el anillo B de la flavona, en color anaranjado; π - π e interacciones entre las cadenas alquílicas y grupos aromáticos, en color rosa. Todas estas interacciones aportan a la energía de unión final, sin embargo, se puede inferir que la formación de más enlaces de hidrógeno podría mejorar la interacción y actividad inhibitoria de la enzima. Esta inferencia es considerada por Wang y colaboradores, quienes sintetizaron flavonas inspiradas en el producto natural wogonina como inhibidores de la enzima Q9DC [17]. Destacan que el grupo pirazol en la posición C8 de la flavona unido a través de enlace éter, forma un enlace de hidrógeno adicional con Ala153. Adicionalmente destacan la

Por otro lado, el compuesto **3** no interacciona con el sitio activo de la enzima Q9DC y, a pesar de que forma tres enlaces de hidrógeno con los residuos Leu123, Arg284 y Asp285, también establece menos interacciones hidrofóbicas. La disminución de interacciones hidrofóbicas del compuesto **3** dio como resultado la energía más alta, en comparación con los compuestos **4c** y **4d**. El compuesto **3** se une en una región cercana al final del dominio C-terminal de la enzima Q9DC. Baumli y colaboradores identificaron de importancia la región final del dominio C-terminal para la actividad de la enzima Q9DC, ya que los aminoácidos de esta región permiten a la enzima adoptar una conformación adecuada para catalizar la transferencia de un grupo fosforilo a la enzima ARNP II [147]. Por lo tanto, si el compuesto **3** se uniera a la región final del C-terminal, podría interferir con la conformación de la enzima e inactivarla.

Los resultados de modelado molecular ofrecen un posible modo de unión de los compuestos **3**, **4c** y **4d** que explica su actividad inhibidora de la enzima Q9DC, a su vez permite proponer futuras modificaciones para mejorar su afinidad y selectividad. De acuerdo con las interacciones que establecen los compuestos **4c** y **4d** en el sitio activo, se propone variar los grupos aromáticos en la sulfonamida que permita establecer puentes de hidrógeno con Asp167, por ejemplo, el fenol, pirrol, fenilamina y aminopiridina contienen grupos donadores de puentes de hidrógeno. Desproteger el grupo C5-OH permitirá establecer interacciones con Asp104 y la adición de grupos donadores puentes de hidrógeno en el anillo B podrían interactuar con los aminoácidos Ile25, Gly112, Asp109 y Glu107. De acuerdo con la literatura, grupos sustituyentes en el anillo B cíclicos y heterocíclicos de cinco o seis miembros pueden mejorar la selectividad a la enzima Q9DC [12]. En el caso de la imina **4c**, se podrían integrar diferentes grupos alifáticos de cadena corta sustituidos con grupos donadores de puentes de hidrógeno y de manera similar, se sugieren las mismas modificaciones en el anillo B de la flavona propuestas para la sulfonamida **4d**.

En la **Figura 23** se muestra el compuesto **4c** y **4d** en el sitio activo de la Q9DC y se observa que ambos compuestos pueden adoptar diferentes ángulos, ya que el azufre

presenta una hibridación sp^3 y el carbono del carbonilo de la imida sp^2 , favoreciendo diferentes interacciones en el sitio activo.

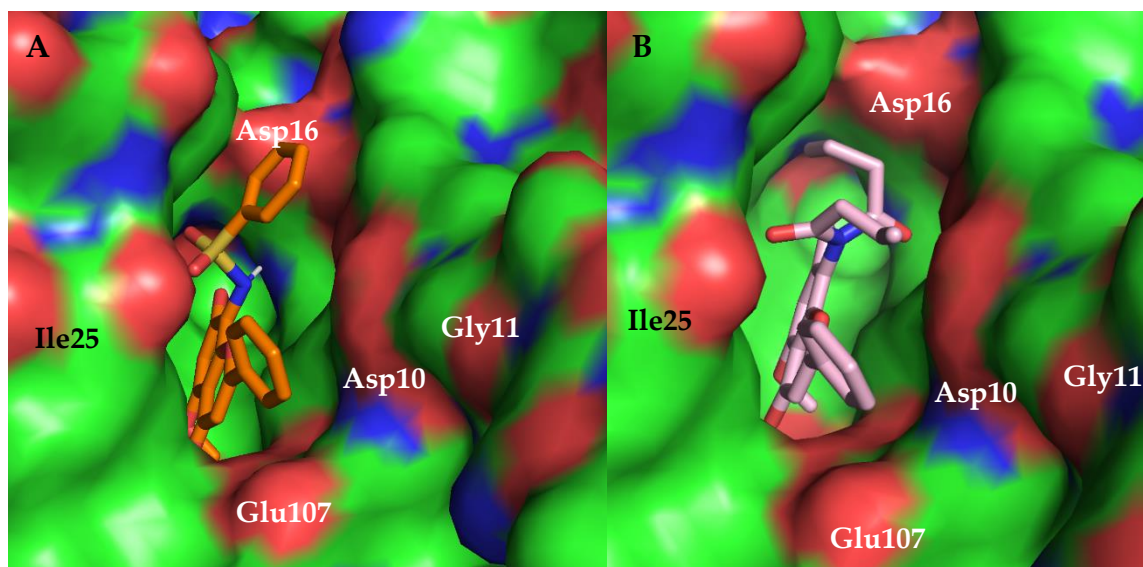


Figura 23. Sulfonamida A) **4d** y B) **4c** en el sitio activo de la Q9DC en representación de superficie

En términos generales, las modificaciones realizadas en la flavona crisina resultaron más prometedoras que en la cumarina umbeliferona. Con los resultados obtenidos en este trabajo se presenta una aproximación del efecto de los grupos nitrogenados en la posición C8, en donde el grupo nitro, amida y sulfonamida mejoraron su potencial antiproliferativo de las flavonas **3**, **4c** y **4d** en las líneas de cáncer de próstata y mama en comparación con crisina. Estos compuestos también presentaron actividad inhibitoria de la enzima Q9DC y su posible modo de unión en el sitio activo fue favorable para las flavonas **4c** y **4d**, en tanto, para la nitroflavona **3** su modo unión más probable fue en la región C-terminal de la enzima.

Con el análisis de los resultados de actividad antiproliferativa, inhibitoria de la enzima Q9DC y las interacciones observadas a través de modelado molecular se proponen nuevas modificaciones en los compuestos **4c** y **4d** para mejorar su afinidad al sitio activo y selectividad enzimática. Adicionalmente, el interés para continuar con la búsqueda de nuevos inhibidores para la enzima Q9DC no se limita a la búsqueda de nuevos agentes

anticancerígenos, sino también para detener la replicación viral y en enfermedades cardíacas [64].

9. CONCLUSIONES

- Se establecieron las condiciones de reacción para preparar *N*-derivados a partir de la flavona crisina y la cumarina umbeliferona. Se exploraron condiciones de nitración y reducción para, posteriormente, formar amidas y sulfonamidas con diferentes grupos sustituyentes.
- Los resultados de actividad antiproliferativa demostraron que la estructura base flavona fue más activa que la cumarina. Los grupos nitro, imina y fenilsulfonamida en la posición C8 en las flavonas **3**, **4c** y **4d** produjeron una mejora en la actividad antiproliferativa en la línea de cáncer de próstata (PC3) y de mama (MDA-MB-231).
- Con el análisis de la relación entre la estructura y la actividad antiproliferativa de las flavonas, se concluye que los grupos sulfonamida con sustituyentes aromáticos tiene mayor potencial para mejorar la actividad antiproliferativa en comparación con las sulfonamidas alquílicas o las amidas. El grupo nitro en la posición C8 y los grupos metoxilo en las posiciones C5 y C7 en la flavona **3** resultaron favorables para mejorar la selectividad y potencia en la línea de cáncer de próstata PC3 ($CI_{50} = 5.6 \pm 0.8 \mu M$).
- La enzima Q9DC podría representar un blanco molecular para los compuestos **3**, **4c** y **4d** al disminuir su actividad al 54, 28 y 77%, respectivamente, a una concentración de 10 μM .
- Estudios de modelado molecular mostraron que los compuestos **4c** y **4d** podrían ser inhibidores que compiten con el ATP por el sitio activo, al interaccionar favorablemente con la mayoría de los aminoácidos con los que el flavopiridol lo hace.

- Se contribuyó con la semisíntesis de algunas amidas y sulfonamidas novedosas a partir de los productos naturales crisina y umbeliferona con actividad antiproliferativa mejorada y como inhibidores potenciales de la enzima Q9DC.

10. SECCIÓN EXPERIMENTAL

Información general

Crisina y umbeliferona y demás reactivos fueron adquiridos grado analítico en Sigma-Aldrich; los disolventes se utilizaron directamente del envase. Los disolventes como metanol, acetato de etilo y diclorometano utilizados en la purificación de los compuestos fueron destilados previamente.

La purificación por cromatografía en columna abierta se llevó a cabo con gel de sílice malla 230-400 mesh. Las fracciones obtenidas de la columna y las reacciones fueron monitoreadas en cromatografía en capa fina (en cromatofolios ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254 de 0.2 mm de espesor).

Los espectros de RMN se realizaron en un espectrómetro Bruker Ascend de 500 MHz, usando MeOH-*d*₄, DMSO-*d*₆ y CDCl₃ como disolventes. Los picos del disolvente fueron considerados como referencia y los valores de desplazamiento se expresaron en ppm. Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de masas MStation JMS-700, empleando impacto electrónico en modo positivo y DART+. Los datos de EMAR-DART se obtuvieron del espectrómetro de masas Jeol AccuTOF JMS-T100LCNMR.

Preparación de amidas y sulfonamidas a partir de crisina (1)

5,7-dihidroxi-8-nitro-2-fenil-4H-cromen-4-ona (2)

Crisina (10 mmol) fue adicionada a una suspensión de nitrato de bismuto (III) pentahidratado (10 mmol) en 50 mL de ácido acético glacial. La mezcla se mantuvo en agitación a 80 °C por aproximadamente 25 minutos. Transcurrido este tiempo, se detuvo el calentamiento y se adicionaron 10 mL de agua y la mezcla de reacción se colocó en baño de hielo. El sólido se filtró y fue extraído con agua (2 X 100 mL) y metanol (1 X 100 mL). El crudo de reacción se purificó a través de cromatografía flash, utilizando un sistema de elución diclorometano: acetato de etilo (90:10).

El compuesto **1** se obtuvo como un sólido amarillo (79%); Pf: 215-216 °C. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 13.21 (s, 1H, C5-OH), 7.96 (m, 2H, H2', H6'), 7.60 (m, 3H, H3', H4', H5'), 7.16 (s, 1H, H3), 6.35 (s, 1H, H6); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ (ppm) 181.2 (C4), 163.1 (C2), 162.6 (C5), 158.4 (C7), 149.9 (8a), 132.5 (C4'), 129.9 (C1'), 129.3 (C3', C5'), 126.3 (C2', C6'), 121.7 (C8), 105.9 (C3), 102.9 (C4a), 99.1 (C6); EM [EI⁺]: (m/z) 299 [M⁺]; EMAR-DART⁺: m/z 300.05121 [M+H]⁺ (Calculado para C₁₅H₁₀N₁O₆: 300.05081)

5-hidroxi-7-methoxi-8-nitro-2-fenil-4H-cromen-4-ona (2c) y 5,7-dimetoxi-8-nitro-2-fenil-4H-cromen-4-ona (3)

El compuesto **2** (1.5 mmol) fue disuelto en 30 mL de dimetilformamida. Posteriormente se adicionaron carbonato de potasio (3 mmol) y yodometano (7 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 65 horas. La reacción se detuvo con la adición de agua (40 mL) y el precipitado formado se filtró al vacío y se lavó con una solución de NaCl al 5% (30 mL). El sólido se purificó en cromatografía flash, utilizando diclorometano: acetato de etilo (90:10) como sistema de elución.

El compuesto **2c** se obtuvo como un sólido amarillo (10% con las condiciones establecidas en la Tabla 5); Pf: 256-257 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 13.29 (s, 1H, C5-OH), 7.87 (m, 2H, H2', H6'), 7.54 (m, 3H, H3', H4', H5'), 6.77 (s, 1H, H3), 6.46 (s, 1H, H6), 4.02 (s, 3H, C5OCH₃). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 181.9 (C4), 164.6 (C2), 164.4 (C5), 158.3 (C7), 149.8 (C8a), 132.8 (C4'), 130.1 (C1'), 129.5 (C3', C5'), 126.8 (C2', C6'), 106.0 (C3), 104.3 (C4a), 95.8 (C6), 57.3 (C5OCH₃). EM (DART⁺) m/z 314 [M+H]⁺

El compuesto **3** se obtuvo como un sólido amarillo claro (95%); Pf: 258-260 °C; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.80 (m, 2H, H2', H6'), 7.50 (m, 3H, H3', H4', H5'), 6.71 (s, 1H, H3), 6.43 (s, 1H, H6), 4.07 (m, 6H, C5,7OCH₃). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 176.1 (C4), 162.5 (C5), 161.0 (C2), 156.1 (C7), 151.2 (C8a), 132.0 (C4'), 130.4 (C1'), 129.3 (C3', C5'), 126.3 (C2', C6'), 124.5 (C8), 109.1 (C3), 108.3 (C4a), 91.3 (C6), 57.0 (C5,7OCH₃). EM (IE⁺) m/z 327 [M]⁺; EMAR-ESI⁺: m/z 328.08194 [M+H]⁺ (Calculado para C₁₇H₁₄N₁O₆: 328.08211)

8-amino-5,7-dimetoxi-2-fenil-4H-chromen-4-ona (4)

Hidrogenación catalizada con Pd/C

Se disolvió el compuesto **3** (1.37 mmol) en 10 mL de THF en un reactor de hidrogenación, posteriormente se adicionó Pd/C (8% en mol). Se colocó hidrógeno a 100 psi y la reacción se mantuvo en agitación durante 30 horas. Se obtuvieron los compuestos **3a** y **4**.

El compuesto **4** se obtuvo como un sólido amarillo (80-88%); Pf: 215-217 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.87 (2H, m, H2', H6'), 7.51 (3H, m, H3', H4', H5'), 6.65 (1H, s, H3), 6.49 (1H, s, H6), 4.00 (3H, s, -C7OCH₃), 3.96 (3H, s, -C5OCH₃). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 178.3 (C4), 160.6 (C2), 152.6 (C5), 150.5 (C7), 146.3 (C8a), 132.1 (C4'), 131.3 (C1'), 129.2 (C3',C5'), 126.2 (C2', C6'), 118.3 (C8), 109.2 (C4a), 108.8 (C3), 93.1 (C6), 57.2 (-C5OCH₃), 56.7 (-C7OCH₃). EM-IE+ *m/z* 297 [M]⁺; EMAR-IE+: *m/z* 297.0998 [M]⁺ (Calculado para C₁₇H₁₅N₁O₄: 297.1001).

Calentamiento

A una solución de cloruro de estaño (II) dihidrato (6.18 mmol) en 15 mL de etanol se adicionó el compuesto **3** (0.618 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 70 °C durante 7 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se disolvió en acetato de etilo (50 mL), posteriormente, se agregó una disolución de NaHCO₃ al 5% (75 mL) y se realizaron extracciones con acetato de etilo (3 X 50 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó en el rotaevaporador. El crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna flash iniciando con diclorometano y aumentando la polaridad hasta llegar a la mezcla diclorometano: acetato de etilo 50:50. El compuesto **4** se obtuvo un sólido amarillo (79 %).

Microondas

En un matraz de fondo redondo conectado a un refrigerante y colocado en un equipo de microondas, se colocó el compuesto **3** (0.122 mmol), cloruro de estaño (II) dihidrato (1.22 mmol) y etanol (1.5 mL) y se calentó a 70 °C con una potencia de 125 W durante 5 minutos

y a 85 °C por 5 minutos más. El disolvente fue eliminado a presión reducida y el residuo fue disuelto en acetato de etilo (10 mL). Posteriormente se agregó una disolución de NaHCO₃ al 5% (10 mL) y se realizaron extracciones con acetato de etilo (3 X 10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó en el rotaevaporador. El crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna flash, iniciando con diclorometano y aumentando la polaridad hasta llegar a la mezcla diclorometano: acetato de etilo 50:50.

Se obtuvieron los compuestos **3b** (sólido anaranjado, rendimiento < 3%); Pf: 196-197 °C. El compuesto **4** se obtuvo como un sólido amarillo y con un rendimiento de 79%.

3b: RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 12.11 (s, 1H, C5-OH), 7.89 (m, 2H, (H2', H6')), 7.54 (m, 3H, (H3', H4', H5')), 6.63 (s, 1H, H3), 6.45 (s, 1H, H6), 3.96 (s, 3H, C7OCH₃). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 183.1 (C4), 163.8 (C2), 153.8 (C5), 153.1 (7), 143.9 (C8a), 131.9 (C4'), 129.3 (C3', C5'), 126.5 (C2', C6'), 116.1 (C8), 105.8 (C3), 105.1 (C4a), 95.4 (C6), 56.3 (C7OCH₃) EM-DART+ *m/z* 284 [M+H]⁺.

N-(5,7-dimetoxi-4-oxo-2-fenil-4H-cromen-8-il)-4-nitrobenzamida (**4a**)

A una disolución del compuesto **4** (0.362 mmol) en diclorometano (7 mL) se agregó DIEA (130 µL, 0.735 mmol) y cloruro de 4-nitrobenzoilo (1.1 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 2.5 horas; posteriormente se agregó agua (10 mL). La fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ y el disolvente fue evaporado en un rotaevaporador. El crudo de reacción fue purificado en cromatografía en columna abierta, iniciando con diclorometano hasta llegar a una proporción 1:1 diclorometano: acetato de etilo como sistema de elución de.

Se obtuvo el compuesto **4a** un sólido amarillo (63%); Pf: 295-296 °C. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.22 (s, 1H, -NH-), 8.44 (d, 2H, *J* = 8.77 Hz, H3'', H5''), 8.28 (d, 2H, *J* = 8.77 Hz, H2'', H6''), 7.84 (m, 2H, H2', H6'), 7.44 (m, 3H, H3', H4', H5'), 6.80 (s, 1H, H3), 6.78 (s, 1H, H6), 4.00 (s, 3H, -OCH₃), 3.97 (s, 3H, -OCH₃). RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 175.8 (C4), 164.3 (-CONH-), 159.6, 159.4, 159.3, 153.8 (C8), 149.4, 139.6, 131.47 (C4'), 130.9, 130.7,

129.1 (C2'', C6''), 129.0 (C3', C5'), 125.7 (C2', C6'), 123.9 (C3'', C5''), 108.1 (C4a) 107.8 (C3), 106.4, 92.9 (C6), 56.5 (-OCH₃), 56.38 (-OCH₃). EM-IE+ *m/z* 446 [M]⁺; EMAR-ESI+: *m/z* 447.12060 [M+H]⁺ (Calculado para C₂₄H₁₉N₂O₇: 447.11923).

N-butiril-N-(5,7-dimetoxi-4-oxo-2-fenil-4H-cromen-8-il)butiramida (4c)

A una disolución del compuesto **4** (0.176 mmol) en diclorometano (5 mL) se agregó DIEA (94 μL, 0.154 mmol) y cloruro de butirilo (55 μL, 0.529 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 40 minutos, posteriormente se agregó 10 mL de agua. La fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó en un rotaevaporador, el crudo de reacción se purificó en cromatografía en columna abierta, iniciando con diclorometano hasta llegar a una proporción 7.3:2.6 diclorometano: acetato de etilo como sistema de elución. Se obtuvieron los compuestos **4b** y **4c**.

El compuesto **4b** se obtuvo como un sólido blanco (12%). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.80 (m, 2H, H2', H6'), 7.56 (m, 3H, H3', H4', H5'), 6.62 (s, 1H, H3), 6.41 (s, 1H, H6), 3.99 (s, 3H, -COCH₃), 3.95 (s, 3H, -COCH₃), 2.49 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H1''), 1.86 (sext., *J* = 7.5 Hz, 2H, H2''), 1.08 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, H3''). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 177.9 (C4), 172.15 (-CONH-), 161.0 (C2), 160.0 (C5), 158.9 (C7), 154.4 (C8a), 131.9 (C1'), 131.3 (C4'), 129.0 (C3', C5'), 126.4 (C2', C6'), 109.1 (C8), 109.0 (C3), 106.8 (C4a), 91.64 (C6), 56.69 (-OCH₃), 56.3 (-OCH₃), 38.8 (C1''), 19.5 (C2''), 14.1 (C3'').

El compuesto **4c** se obtuvo como un sólido blanco (79%); Pf: 160-162 °C. RMN ¹H (700 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.70 (m, 2H, H2', H6'), 7.47 (m, 3H, H3', H4', H5'), 6.68 (s, 1H, H3), 6.48 (s, 1H, H6), 4.06 (s, 3H, -OCH₃), 3.97 (s, 3H, -OCH₃), 2.60 (t, *J* = 7.18, 4H, H1''), 1.66 (sext, *J* = 7.44, 4H, H2''), 0.90 (t, *J* = 7.40 Hz, 6H, H3''). RMN ¹³C (175 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 177.3 (C4), 175.7 (-CONH-), 161.6, 160.6 (C2), 159.64, 154.74, 131.65, 131.17, 129.23 (C3', 5'), 125.88 (C2', C6'), 109.30, 109.08 (C3), 108.90 (C4a), 91.86 (C6), 56.78 (-OCH₃), 56.48 (-OCH₃), 39.58 (C1''), 18.26 (C2''), 13.80 (C3''). EM-DART+ *m/z* 438 [M+H]⁺; EMAR-ESI+: *m/z* 438.19374 [M+H]⁺ (Calculado para C₂₅H₂₈N₁O₆: 438.19166).

N-(5,7-dimetoxi-4-oxo-2-fenil-4H-cromen-8-il)bencenosulfonamida (**4d**) y *N*-(5,7-dimetoxi-4-oxo-2-fenil-4H-cromen-8-il)-*N*-(fenilsulfonyl)bencenosulfonamida (**4g**)

A una disolución del compuesto **4** (0.208 mmol) en diclorometano (6 mL) se agregaron TEA (43 μ L, 0.312 mmol) y cloruro de bencenosulfonyl (70 μ L, 0.540 mmol). La mezcla se mantuvo en agitación por 96 horas y para detener la reacción se adicionó agua (10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó en un rotaevaporador; el crudo de reacción fue purificado en cromatografía en columna abierta, iniciando con hexano hasta llegar a una proporción 7:3 hexano: diclorometano como sistema de elución. Se obtuvieron los compuestos **4d** y **4g**.

El compuesto **4d** se obtuvo como un sólido amarillo claro (24%); Pf.: 274-275 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 9.45 (s, 1H, -SO₂NH-), 8.01 (m, 2H, H2', H6'), 7.68 (m, 2H, H2', H6'), 7.52 (m, 4H, H3', H4', H5', H4''), 7.43 (m, 2H, H3'', H5''), 6.74 (s, 1H, H3), 6.56 (s, 1H, H6), 3.90 (s, 3H, -C7OCH₃), 3.54 (s, 3H, -C5OCH₃). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 175.6 (C4), 160.8 (C5), 159.7, 159.6, 155.5, 141.7 (C1''), 132.1 (C4'), 131.4 (C4''), 130.8 (C1'), 128.8 (C3', C5'), 128.6 (C2', C6'), 126.5 (C2', C6'), 126.3 (C2'', C6''), 107.9, 107.8 (C3), 105.1 (4a), 92.7 (C6), 56.3 (-C7OCH₃), 55.9 (-C5OCH₃). EM-DART+ *m/z* 438 [M+H]⁺; EMAR-DART+: *m/z* 438.10100 [M+H]⁺ (Calculado para C₂₃H₂₀N₁O₆S₁: 300.10113)

El compuesto **4d** se obtuvo como un sólido blanco (15%); Pf.: 230-231 °C. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.97 (m, 4H, H2'', H6''), 7.53 (m, 2H, H2', H6'), 7.41 (m, 3H, H3', H4', -H5'), 7.32 (m, 6H, H3'', 4'', 5''), 6.56 (s, 1H, H3), 6.34 (s, 1H, H6), 4.05 (s, 3H, -COCH₃), 3.60 (s, 3H, -COCH₃). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 177.1 (C4), 162.9 (C5), 162.7 (C7), 161.2 (C2), 157.3 (C8a), 140.2 (C1'), 133.7 (C4''), 131.1 (C4'), 130.9 (C1'), 129.0 (C2'', C6''), 128.8 (C3', C5'), 128.6 (C3'', C5''), 126.62 (C2', C6'), 109.4 (C8), 109.1 (C3), 104.5 (C4a), 91.6 (C6), 56.8 (-COCH₃), 55.9 (-COCH₃). EM-DART+ *m/z* 578 [M+H]⁺; EMAR-ESI+: *m/z* 578.09550 [M+H]⁺ (Calculado para C₂₉H₂₄N₁O₆S₂: 578.09433).

N-(5,7-dimetoxi-4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-8-il)propano-1-sulfonamida (**4e**)

A una disolución del compuesto **4** (0.133 mmol) en diclorometano (6 mL) se agregó TEA (56 μ L, 0.402 mmol) y cloruro de propanosulfonilo (36 μ L, 0.319 mmol). La mezcla se mantuvo en agitación por 48 horas y para detener la reacción se adicionó agua (10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó en un rotaevaporador; el crudo de reacción se purificó en cromatografía en columna abierta, iniciando con diclorometano hasta llegar a una proporción 2:1 diclorometano: acetato de etilo como sistema de elución.

El compuesto **4e** se obtuvo como un sólido amarillo (30%); Pf: 240-243 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.97 (m, 2H, H2', H6'), 7.50 (m, 3H, H3', H4', H5'), 6.67 (s, 1H, H3), 6.43 (s, 1H, H6), 4.02 (d, 6H, -C5OCH₃, -C7OCH₃), 3.19 (t, J = 7.97, 2H, H1''), 1.99 (sext, J = 7.36 Hz, 2H, H2''), 1.05 (t, J = 7.42 Hz, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 177.5 (C4), 161.3 (C2), 160.6 (C5), 159.8 (C7), 155.9 (C8a), 131.6 (C4'), 131.4 (C1'), 129.2 (C3', C5'), 126.6 (C2', C6'), 109.4 (C8), 109.1 (C3), 105.9 (C4a), 91.4 (C6), 56.7 (-COCH₃), 56.4 (-COCH₃), 56.0 (C1'') 17.5 (C2''), 13.2 (C3''). EM-DART+ m/z 404 [M+H]⁺; EMAR-ESI+: m/z 404.11530 [M+H]⁺ (Calculado para C₂₀H₂₂N₁O₆S₁: 404.11678).

N-(5,7-dimetoxi-4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-8-il)metanosulfonamida (**4f**)

A una disolución del compuesto **4** (0.205 mmol) en diclorometano (6 mL) se agregó TEA (43 μ L, 0.307 mmol) y cloruro de metanosulfonilo (64 μ L, 0.820 mmol). La mezcla se mantuvo en agitación por 72 horas y para detener la reacción se adicionó agua (10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó en un rotaevaporador; el crudo de reacción se purificó en cromatografía en columna abierta, iniciando con diclorometano hasta llegar a una proporción 1:1 diclorometano: acetato de etilo como sistema de elución.

El compuesto **4f** se obtuvo como un sólido blanco (39%); Pf: 230-232 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.97 (m, 2H, H2', H6'), 7.50 (m, 3H, H3', H4', H5'), 6.68 (s, 1H, H3), 6.44 (s, 1H, H6), 4.03 (d, 6H, -COCH₃), 3.13 (s, 3H, -COCH₃). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 177.5 (C4), 161.3 (C2), 160.7 (C5), 159.8 (C7), 155.8 (C8a), 131.6 (C4'), 131.3 (C1'), 129.2 (C3',

C5'), 126.5 (C2', C6'), 109.4 (C8), 109.0 (C3), 105.7 (C4a), 91.4 (C6), 56.7 (-COCH₃), 56.5 (-COCH₃), 40.4 (C1''). EM-DART+ *m/z* 376 [M+H]⁺; EMAR-ESI+: *m/z* 376.08494 [M+H]⁺ (Calculado para C₁₈H₁₈N₁O₆Si: 376.08548).

7-hidroxi-6-nitro-2H-cromen-2-ona (5a), 7-hidroxi-8-nitro-2H-cromen-2-ona (5b) y 7-hidroxi-3-nitro-2H-cromen-2-ona (5c)

Umbeliferona (10 mmol) se disolvió en THF anhidro, posteriormente se adicionó nitrato de bismuto (III) pentahidratado (5mmol) y el sólido ácido (MNT KFS, tonsil o gel de sílice, 0.5 g). La mezcla de reacción se mantuvo a 40 °C por tres horas. Los sólidos fueron filtrados y el disolvente se conservó en un matraz a temperatura y el disolvente se eliminó en el rotaevaporador. El crudo de reacción se purificó por cromatografía flash, iniciando con diclorometano hasta llegar a la proporción 9:1 dicloro: acetato de etilo. Se obtuvieron sólidos amarillos correspondientes al compuesto **5a**, **5b** y **5c**. Los rendimientos colocados en esta sección corresponden a los obtenidos al utilizar MNT KFS; los rendimientos de los compuestos al utilizar los demás sólidos ácidos se muestran en la **Tabla 12**.

El compuesto **5a** se obtuvo como un sólido amarillo (19.4%); Pf: 200-203 °C; RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.42 (s, 1H, H5), 8.04 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H4), 6.98 (s, 1H, H8), 6.41 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H3). RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 159.2 (C2), 157.3 (C7), 155.1 (C8a), 143.5 (C4), 134.2 (C6), 126.4 (C5), 114.2 (C3), 111.2 (C4a), 105.1 (C8). EM-IE+ *m/z* 207 [M]⁺; EMAR-ESI+: *m/z* 208.02359 [M+H]⁺ (Calculado para C₉H₆N₁O₅: 208.02460).

El compuesto **5b** se obtuvo como un sólido amarillo claro (21.7%); Pf: 204-206 °C; RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 12.19 (s, 1H, C7OH), 8.05 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.37 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.3, 152.6, 146.2, 144.2, 131.1, 127.9, 113.4, 112.8, 111.2. EM-IE+ *m/z* 207 [M]⁺; EMAR-ESI+: *m/z* 208.02418 [M+H]⁺ (Calculado para C₉H₆N₁O₅: 208.02460).

El compuesto **5c** se obtuvo como un sólido amarillo (9.2%); RMN ^1H (500 MHz, MeOD- d_4) δ (ppm) 8.99 (s, 1H, H4), 7.73 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H5), 6.92 (dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 1H, H6), 6.78 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H8). RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD- d_4) δ 168.0 (C7), 166.3 (C2), 159.2 (C8a), 154.7 (C3), 145.2 (C4), 134.3 (C5), 116.6 (C6), 110.7 (C4a), 103.4 (C8). EM-IE+ m/z 207 [M] $^+$; EMAR-ESI+: m/z 208.02484 [M+H] $^+$ (Calculado para C₉H₆N₁O₅: 208.02460).

6-amino-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (6a)

A una solución de cloruro de estaño (II) dihidrato (12 mmol) en 19 mL de etanol se adicionó el compuesto **5a** (1.2 mmol), la mezcla de reacción se calentó a 70 °C durante 8 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se disolvió en acetato de etilo (70 mL). Posteriormente se agregó una disolución de NaHCO₃ al 5% (100 mL) y se realizaron extracciones con acetato de etilo (3 X 70 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó en el rotaevaporador. El crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna flash, utilizando diclorometano como eluyente.

El compuesto **6a** se obtuvo como un sólido amarillo (88 %); Pf.: 223-225 °C. RMN ^1H (500 MHz, MeOD- d_4) δ (ppm) 7.75 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, H4), 6.86 (s, 1H, H5), 6.69 (s, 1H, H8), 6.15 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, H3). RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD- d_4) δ (ppm) 164.5 (C2), 151.6 (7), 149.9 (C8a), 146.2 (C4), 135.3 (C4a), 113.2 (C6), 112.8 (C5), 112.1 (C3), 102.4 (C8). EM-DART+ m/z 178 [m+H] $^+$.

8-amino-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (6b)

A una solución de cloruro de estaño (II) dihidrato (5 mmol) en 10 mL de etanol se adicionó el compuesto **5b** (0.5 mmol), la mezcla de reacción se calentó a 70 °C durante 5 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se disolvió en acetato de etilo (30 mL). Posteriormente se agregó una disolución de NaHCO₃ al 5% (20 mL) y se realizaron extracciones con acetato de etilo (3 X 30 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó en el rotaevaporador. El crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna flash iniciando utilizando diclorometano como eluyente.

El compuesto **6b** se obtuvo un sólido amarillo (82 %); descomposición: 200-202 °C. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.86 (d, *J* = 9.43 Hz, 1H, H4), 6.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H5), 6.74 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H6), 6.15 (d, *J* = 9.41 Hz, 1H, H3). RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm) 160.5 (C2), 147.5 (C7), 145.3 (C4), 141.7 (8a), 123.5 (C8), 115.7 (C5), 111.8 (C4a), 111.4 (C6), 111.0 (C3). EM-DART+ *m/z* 178 [M+H]⁺; EMAR-ESI+: *m/z* 178.04971 [M+H]⁺ (Calculado para C₉H₈N₁O₃: 178.05042).

N-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-6-il)bencenosulfonamida (7a)

A una disolución del compuesto **6a** (0.484 mmol) en diclorometano (10 mL) se agregó TEA (100 μL, 0.774 mmol) y cloruro de bencenosulfonilo (86 μL, 0.677 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 20 horas, posteriormente se agregó 15 mL de agua. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó en un rotaevaporador.

El compuesto **7a** se obtuvo como un sólido amarillo (50%); Pf: 219-221 °C; RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.99 (dd, 2H, *J* = 8.54, 1.31 Hz, H2', H6'), 7.88 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H4), 7.81 (m, 1H, H4'), 7.65 (m, 2H, H3', H5'), 7.01 (s, 1H, H8), 6.89 (s, 1H, H5), 6.38 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H3). RMN ¹³C δ (ppm) (100 MHz, DMSO- *d*₆) 159.9 (C2), 143.9 (C7), 143.7 (C4), 138.1 (C8a), 137.4 (C4a), 135.3 (C4'), 134.4 (C1'), 129.7 (C3', C5'), 128.5 (C2', C6'), 118.2 (C6), 116.4 (C3), 112.8 (C5), 110.0 (C8). EM-DART+ *m/z* 318 [M+H]⁺; EMAR-ESI+: *m/z* 318.04287 [M+H]⁺ (Calculado para C₁₅H₁₂N₁O₅S₁: 318.04362).

N-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-6-il) propano-1-sulfonamida (7b)

A una disolución del compuesto **6b** (0.467 mmol) en diclorometano (10 mL) se agregó TEA (97 μL, 0.699 mmol) y cloruro de propanosulfonilo (73 μL, 0.649 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 48 horas, posteriormente se agregó 15 mL de agua. La fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó en un rotaevaporador.

El compuesto **7b** se obtuvo como un sólido café (60%); Pf.: 158-160 °C; RMN ¹H (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ (ppm) 7.94 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, H4), 7.23 (s, 1H, H8), 7.02 (s, 1H, H5), 6.40 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H3), 3.64 (t, *J* = 7.77, 2H, H1'), 1.85 (sext, *J* = 7.53, 2H, H2'), 1.02 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, H3'). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO- *d*₆) δ (ppm) 160.00 (C2), 144.2 (C7), 143.7 (C4), 138.3 (C6), 137.5 (C8a), 118.1 (C4a), 116.2 (C3), 112.7 (C5), 110.5 (C8), 52.3 (C1'), 16.8 (C2'), 12.5 (C3'). EM-DART+ *m/z* 284 [M+H]⁺; EMAR-ESI+: *m/z* 284.05906 [M+H]⁺ (Calculado para C₁₂H₁₄N₁O₅Si: 284.05927).

N-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-8-il)-4-nitrobenzamida (**7c**)

A una disolución del compuesto **6b** (0.508 mmol) en diclorometano (5 mL) se agregó DIEA (131 μL, 0.762 mmol) y cloruro de 4-nitrobenzoilo (3.048 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 2 horas, posteriormente se agregó agua (10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó en un rotaevaporador. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna abierta, iniciando con hexano hasta llegar a una proporción 7:3 hexano: acetato de etilo como sistema de elución.

El compuesto **7c** se obtuvo como un sólido amarillo (70%); Pf: 284-285 °C. RMN ¹H (700 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 10.12 (s, 1H), 8.40 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H3', H5'), 8.26 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H2', H6'), 8.01 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H4), 7.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H5), 6.96 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H6), 6.25 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, H3). RMN ¹³C (175 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 164.5 (-CONH-), 160.5 (C2), 158.0 (C7), 151.8 (C8a), 149.8 (C4'), 145.4 (C4), 140.0 (C1'), 129.8 (C2', C6'), 128.2 (C5), 124.1(C3', C5'), 113.6 (C8), 112.4 (C6), 112.0 (C3), 111.8 (C4a). EM-DART+ *m/z* 327 [M+H]⁺; EMAR-ESI+: *m/z* 327.06203 [M+H]⁺ (Calculado para C₁₆H₁₁N₂O₆: 327.06171)

N-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-8-il)butiramida (**7d**)

A una disolución del compuesto **6b** (0.274 mmol) en diclorometano (3 mL) se agregó DIEA (73 μL, 0.411 mmol) y cloruro de butirilo (34 μL, 0.328 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 1 hora, posteriormente se agregó agua (3 mL). La fase orgánica se

secó con Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó en un rotaevaporador. El crudo de reacción se purificó en cromatografía en columna abierta, iniciando con hexano hasta llegar a una proporción 3:1 hexano: diclorometano, como sistema de elución.

El compuesto **7d** se obtuvo como un sólido blanco (60%); Pf: 179-180 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 10.79 (s, 1H, -NH-), 8.07 (s, 1H, C7OH), 7.67 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H4), 7.23 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H5), 6.94 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H6), 6.25 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H3), 2.58 (t, *J* = 7.58 Hz, 2H, H1'), 1.83 (sext, *J* = 7.40 Hz, 2H, H2'), 1.06 (t, *J* = 7.40 Hz, 3H, H3'). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 174.8 (C1'), 160.1 (C2), 152.9 (C7), 146.3 (C8a), 144.4 (C4), 125.7 (C5), 117.0 (C6), 114.2 (C8), 112.3 (C3), 111.6 (C4a), 39.0 (C1'), 19.4 (C2'), 13.7 (C3'). EM-DART+ *m/z* 248 [M+H]⁺; EMAR-ESI+: *m/z* 248.09208 [M+H]⁺ (Calculado para C₁₃H₁₄N₁O₄: 248.09228)

Actividad antiproliferativa

Las líneas celulares de colón de cáncer (HCT-15), cáncer de mama (MCF-7), leucemia (K-262 CLM), glía del sistema nervioso central (U-251) y cáncer de próstata (PC-3) fueron adquiridas en el Instituto Nacional del Cáncer (Estados Unidos de América).

Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 100 IU/ml de penicilina G, 100 µg/ml de sulfato de esptreptomina y 0.25 µg/ml de anfotericina B. Se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad. Para el ensayo, las células fueron suspendidas en una solución al 0.1% de tripsina-EDTA; la viabilidad de las células fue contada usando un hematocitómetro y diluido con medio para tener las siguientes densidades: 5 × 10⁴ células/ml (SKLU-1, MDA-MB-231) y 7.5 × 10⁴ células/ml (U251, PC-3). Se sembraron 100 µl/pozo de las suspensiones celulares antes mencionadas en placas de 96 pozos y se incubaron a 37 °C para permitir la adhesión de las células. Adicionalmente se utilizó una placa como testigo (evaluación a tiempo cero) en la cual se colocaron los mismos volúmenes de cada línea celular y del blanco (medio de crecimiento RPMI-1640).

Después de 24 horas las células fueron tratadas con 100 µL de los compuestos a evaluar previamente disueltos en medio RPMI-1640 y DMSO al 1% para después incubarlas por 48

horas a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂. A la placa que se utilizó como testigo únicamente se le adicionó 100 µL del medio de cultivo RPMI-1640.

Después de 48 horas las células adheridas fueron fijadas agregando 50 µL de una solución fría al 50% (m/vol) de ácido trifluoroacético y se incubó a 4 °C por 60 minutos. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante, se realizaron tres lavados con agua y se dejaron secar a temperatura ambiente. Después, las células fijadas con ácido trifluoroacético fueron tratadas con 100 µL de una solución de sulforodamina B (SRB) (0.4% m/vol en 1% de ácido acético) por 30 minutos a temperatura ambiente. La SRB no unida fue removida con 4 lavados con una solución de ácido acético al 1% y la SRB unida fue extraída con 100 µL de una solución de base Tris 10 mM no amortiguada. Se determinó la densidad óptica de las muestras tratadas en un lector de microplacas Bio Kinetis a una longitud de onda de 515 nm. La intensidad del color es directamente proporcional al número de células vivas.

Evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima Q9DC/T1

La evaluación de la actividad inhibitoria de los compuestos con mayor actividad antiproliferativa (3, 4b, 4c y 4d) en la enzima Q9DC/T1, se realizó de acuerdo al protocolo indicado para el kit de ensayo Q9DC (Catálogo #79628, BPS Bioscience). Se preparó una solución madre con 6 µL de 5x Kinase assay buffer 1, 1 µL de ATP (500 µM), 10 µL de 5x CDK substrate peptide 2 y 8 µL de agua por pozo; se agregaron 25 µL de esta solución. Los compuestos se disolvieron en DMSO y se prepararon a las concentraciones de 1, 10 y 100 µM con una disolución de DMSO al 1 ó 2%. Se agregaron 5 µL de cada concentración a cada pozo y se realizó por duplicado. Al blanco y al control positivo se le agregaron 5 µL de una disolución de DMSO al 1 ó 2%. La enzima fue descongelada y se preparó a una concentración de 5 ng/µL utilizando 1x buffer 1. Se agregaron 20 µL a todos los pozos excepto al blanco. La placa fue incubada a 37 °C durante 45 minutos. Después de este tiempo se agregaron 50 µL del reactivo Kinase Glo Max a cada pozo y se incubó en oscuridad por 15 minutos. Finalmente se midió la luminiscencia un lector de placas Synergy H Biotech con un tiempo de integración de 1 segundo.

El porcentaje de actividad se calculó con la siguiente relación:

$$\% \text{ Actividad} = \frac{(Lu_b - Lu_i)}{(Lu_b - Lu_c)} \times 100$$

En donde:

Lu_b : intensidad de luminiscencia del blanco

Lu_i : intensidad de luminiscencia en presencia del inhibidor

Lu_c : intensidad de luminiscencia del control positivo

Modelado molecular

El modelado molecular fue realizado en el programa de Autodock 4.2.6 usando la estructura cristalizada de enzima Q9DC con el inhibidor Alvovicidib (flavopiridol) (PDB: 3BLR). Las moléculas de agua y la cadena B, fueron eliminadas. Posteriormente el ligando cocrystalizado se separó de la cadena A usando el programa Chimera 1.15. La cadena A fue preparada en Autodock Tools agregando átomos polares de hidrógeno y cargas de Kollman. Los ligandos fueron construidos en ChemDraw 13.0 y preparados en el programa Avogadro, realizando una minimización de energía empleando el campo de fuerza MMFF94. Para la validación, flavopiridol fue obtenido directamente de la estructura cristalográfica. Se realizó un acoplamiento ciego con una rejilla de 126 Å × 126 Å × 126 Å centrado la caja en la proteína con la herramienta de AutoGrid. Los parámetros usados fueron algoritmos genéticos con un número de 20 corridas. PyMOL y Discovery Studio fueron empleados para la visualización.

11. REFERENCIAS

1. Mushtaq, S.; Abbasi, B.H.; Uzair, B.; Abbasi, R. Natural Products as Reservoirs of Novel Therapeutic Agents. *EXCLI Journal*. **2018**, *17*, 420-451, doi:10.17179/EXCLI2018-1174.
2. Xiao, Z.; Morris-Natschke, S.L.; Lee, K.-H. Strategies for the Optimization of Natural Leads to Anticancer Drugs or Drug Candidates: Strategies for the Optimization of Natural Leads. *Med. Res. Rev.* **2016**, *36*, 32–91, doi:10.1002/med.21377.
3. Twilley, D.; Lall, N. The Role of Natural Products from Plants in the Development of Anticancer Agents. In *Natural Products and Drug Discovery*; Elsevier, 2018; pp. 139–178 ISBN 978-0-08-102081-4.
4. Pecorino, L. *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*; 3rd ed.; Oxford University Press: Oxford, United Kingdom, 2012; pp. 2-13. ISBN 978-0-19-957717-0.
5. Pietta, P.; Gardana, C. Flavonoids in Herbs. In *Flavonoids in Health and Disease*; 2nd ed.; Rice-Evans, C., Packer, L., Eds.; Marcel Dekker: New York, USA, 2003; pp. 43-45. ISBN 978-0-8247-4234-8.
6. Küpeli Akkol, E.; Genç, Y.; Karpuz, B.; Sobarzo-Sánchez, E.; Capasso, R. Coumarins and Coumarin-Related Compounds in Pharmacotherapy of Cancer. *Cancers* **2020**, *12*, 1959, doi:10.3390/cancers12071959.
7. Patil, V.M.; Masand, N. Anticancer Potential of Flavonoids: Chemistry, Biological Activities, and Future Perspectives. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Elsevier, 2018; Vol. 59, pp. 401–430. ISBN 978-0-444-64179-3.
8. Xu, L.; Zhao, X.-Y.; Wu, Y.-L.; Zhang, W. The Study on Biological and Pharmacological Activity of Coumarins; Asia-Pacific Energy Equipment Engineering Research Conference, Zhuai City, China, 2015; Atlantis Press; 135-138.
9. Abotaleb, M.; Samuel, S.; Varghese, E.; Varghese, S.; Kubatka, P.; Liskova, A.; Büsselberg, D. Flavonoids in Cancer and Apoptosis. *Cancers* **2018**, *11*, 28, doi:10.3390/cancers11010028.
10. Kopustinskiene, D.M.; Jakstas, V.; Savickas, A.; Bernatoniene, J. Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients* **2020**, *12*, 457, doi:10.3390/nu12020457.
11. Önder, A. Anticancer Activity of Natural Coumarins for Biological Targets. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Elsevier, 2020; Vol. 64, pp. 85–109. ISBN 978-0-12-817903-1.
12. Wu, T.; Qin, Z.; Tian, Y.; Wang, J.; Xu, C.; Li, Z.; Bian, J. Recent Developments in the Biology and Medicinal Chemistry of CDK9 Inhibitors: An Update. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 13228–13257, doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00744.
13. Zhao, L.; Yuan, X.; Wang, J.; Feng, Y.; Ji, F.; Li, Z.; Bian, J. A Review on Flavones Targeting Serine/Threonine Protein Kinases for Potential Anticancer Drugs. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 677–685, doi:10.1016/j.bmc.2019.01.027.
14. Polier, G.; Ding, J.; Konkimalla, B.V.; Eick, D.; Ribeiro, N.; Köhler, R.; Giaisi, M.; Efferth, T.; Desaubry, L.; Krammer, P.H.; et al. Wogonin and Related Natural Flavones Are Inhibitors of CDK9 That Induce Apoptosis in Cancer Cells by Transcriptional Suppression of Mcl-1. *Cell Death Dis* **2011**, *2*, e182, doi:10.1038/cddis.2011.66.

15. Cheng, S.; Yang, G.-J.; Wang, W.; Ma, D.-L.; Leung, C.-H. Discovery of a Tetrahydroisoquinoline-Based CDK9-Cyclin T1 Protein–Protein Interaction Inhibitor as an Anti-Proliferative and Anti-Migration Agent against Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Genes Dis.* **2021**, 1–15, doi:10.1016/j.gendis.2021.06.005.
16. Rahaman, M.H.; Kumarasiri, M.; Mekonnen, L.B.; Yu, M.; Diab, S.; Albrecht, H.; Milne, R.W.; Wang, S. Targeting CDK9: A Promising Therapeutic Opportunity in Prostate Cancer. *Endocr.-Relat. Cancer* **2016**, 23, T211–T226, doi:10.1530/ERC-16-0299.
17. Wang, J.; Li, T.; Zhao, T.; Wu, T.; Liu, C.; Ding, H.; Li, Z.; Bian, J. Design of Wogonin-Inspired Selective Cyclin-Dependent Kinase 9 (CDK9) Inhibitors with Potent *in vitro* and *in vivo* Antitumor Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 178, 782–801, doi:10.1016/j.ejmech.2019.06.024.
18. Xu, J.; Li, H.; Wang, X.; Huang, J.; Li, S.; Liu, C.; Dong, R.; Zhu, G.; Duan, C.; Jiang, F.; et al. Discovery of Coumarin Derivatives as Potent and Selective Cyclin-Dependent Kinase 9 (CDK9) Inhibitors with High Antitumour Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, 200, 112424, doi:10.1016/j.ejmech.2020.112424.
19. L. Harvey, A. Plant Natural Products in Anti-Diabetic Drug Discovery. *Curr. Org. Chem.* **2010**, 14, 1670–1677, doi:10.2174/138527210792927681.
20. Hung, H.-Y.; Qian, K.; Morris-Natschke, S.L.; Hsu, C.-S.; Lee, K.-H. Recent Discovery of Plant-Derived Anti-Diabetic Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29, 580, doi:10.1039/c2np00074a.
21. Cazarolli, L.; Zanatta, L.; Alberton, E.; Bonorino Figueiredo, M.S.; Folador, P.; Damazio, R.; Pizzolatti, M.; Barreto Silva, F.R. Flavonoids: Prospective Drug Candidates. *Mini Rev Med Chem* **2008**, 8, 1429–1440, doi:10.2174/138955708786369564.
22. Rawat, A.; Vijaya Bhaskar Reddy, A. Recent Advances on Anticancer Activity of Coumarin Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, 5, 100038, doi:10.1016/j.ejmcr.2022.100038.
23. Cancer Today Available online: <https://gco.iarc.fr/today/home> (accessed on 7 May 2022).
24. Ferlay, J.; Ervik, M.; Lam, F.; Colombet, M.; Piñeros, M. Global Cancer Observatory: Cancer Today Available online: <https://gco.iarc.fr/today> (accessed on 10 August 2021).
25. Cancer Tomorrow Available online: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?years=2040&single_unit=500000 (accessed on 11 August 2021).
26. Stein, C.J.; Colditz, G.A. Modifiable Risk Factors for Cancer. *Br J Cancer* **2004**, 90, 299–303, doi:10.1038/sj.bjc.6601509.
27. Cáncer Available online: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed on 10 August 2021).
28. Mansouri, V.; Beheshtizadeh, N.; Gharibshahian, M.; Sabouri, L.; Varzandeh, M.; Rezaei, N. Recent Advances in Regenerative Medicine Strategies for Cancer Treatment. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, 141, 111875, doi:10.1016/j.biopha.2021.111875.
29. Baba, A.; Cătoi, C. Principles of Anticancer Therapy. Comparative Oncology Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9546/> (accessed on 12 August 2021).

30. Abel, E.L.; Angel, J.M.; Kiguchi, K.; DiGiovanni, J. Multi-Stage Chemical Carcinogenesis in Mouse Skin: Fundamentals and Applications. *Nat Protoc* **2009**, *4*, 1350–1362, doi:10.1038/nprot.2009.120.
31. Ramos, S. Cancer Chemoprevention and Chemotherapy: Dietary Polyphenols and Signalling Pathways. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 507–526, doi:10.1002/mnfr.200700326.
32. Williams, G.H.; Stoeber, K. The Cell Cycle and Cancer. *J. Pathol.* **2012**, *226*, 352–364, doi:10.1002/path.3022.
33. Laham-Karam, N.; Pinto, G.P.; Poso, A.; Kokkonen, P. Transcription and Translation Inhibitors in Cancer Treatment. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 276, doi:10.3389/fchem.2020.00276.
34. Tsimberidou, A.-M. Targeted Therapy in Cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **2015**, *76*, 1113–1132, doi:10.1007/s00280-015-2861-1.
35. Walter, H.S.; Ahmed, S.I. Targeted Therapies in Cancer. *Surgery* **2021**, *39*, 202–207, doi:10.1016/j.mpsur.2021.01.010.
36. Whittaker, S.R.; Mallinger, A.; Workman, P.; Clarke, P.A. Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases as Cancer Therapeutics. *Pharmacol Ther* **2017**, *173*, 83–105, doi:10.1016/j.pharmthera.2017.02.008.
37. Klein, M.A. Cyclin-Dependent Kinase Inhibition: An Opportunity to Target Protein-Protein Interactions. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*; Doven, R ed. Elsevier, 2020; Vol. 121, pp. 115–141. ISBN 978-0-12-816846-2.
38. Malumbres, M. Cyclin-Dependent Kinases. *Genome Biol* **2014**, *15*, 122, doi:10.1186/gb4184.
39. Peyressatre, M.; Prével, C.; Pellerano, M.; Morris, M. Targeting Cyclin-Dependent Kinases in Human Cancers: From Small Molecules to Peptide Inhibitors. *Cancers* **2015**, *7*, 179–237, doi:10.3390/cancers7010179.
40. Duronio, R.J.; Xiong, Y. Signaling Pathways That Control Cell Proliferation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a008904, doi:10.1101/cshperspect.a008904.
41. Mandal, R.; Becker, S.; Strebhardt, K. Targeting CDK9 for Anti-Cancer Therapeutics. *Cancers* **2021**, *13*, 2181, doi:10.3390/cancers13092181.
42. Lapenna, S.; Giordano, A. Cell Cycle Kinases as Therapeutic Targets for Cancer. *Nat Rev Drug Discov* **2009**, *8*, 547–566, doi:10.1038/nrd2907.
43. Cao, Y.; Luo, C.; Yang, P.; Li, P.; Wu, C. Indazole Scaffold: A Generalist for Marketed and Clinical Drugs. *Med Chem Res* **2021**, *30*, 501–518, doi:10.1007/s00044-020-02665-7.
44. Brown, A.P.; Courtney, C.L.; Criswell, K.A.; Holliman, C.L.; Evering, W.; Jessen, B.A. Toxicity and Toxicokinetics of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor AG-024322 in Cynomolgus Monkeys Following Intravenous Infusion. *Cancer Chemother Pharmacol* **2008**, *62*, 1091–1101, doi:10.1007/s00280-008-0771-1.
45. Squires, M.S.; Feltell, R.E.; Wallis, N.G.; Lewis, E.J.; Smith, D.-M.; Cross, D.M.; Lyons, J.F.; Thompson, N.T. Biological Characterization of AT7519, a Small-Molecule Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases, in Human Tumor Cell Lines. *Mol Cancer Ther* **2009**, *8*, 324–332, doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0890.
46. Li, Y.; Chinni, S.R.; Senderowicz, A.M.; Sarkar, F.H. Induction of Growth Inhibition and Apoptosis in Prostate Cancer Cells by Flavopiridol. *Int J Oncol* **2000**, doi:10.3892/ijo.17.4.755.

47. Bible, K.C.; Kaufmann, S.H. Flavopiridol: a Cytotoxic Flavone that Induces Cell Death in Noncycling A549 Human Lung Carcinoma Cells. *Cancer Res* **1996**, *56*, 4856–4861.
48. Cobanoglu, G.; Turacli, I.; Ozkan, A.; Ekmekci, A. Flavopiridol's Antiproliferative Effects in Glioblastoma Multiforme. *J Can Res Ther* **2016**, *12*, 811, doi:10.4103/0973-1482.172132.
49. Christian, B.A.; Grever, M.R.; Byrd, J.C.; Lin, T.S. Flavopiridol in the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr. Opin. Oncol.* **2007**, *19*, 573–578, doi:10.1097/CCO.0b013e3282efb9da.
50. Hassan, M.S.; Cwidak, N.; Johnson, C.; Däster, S.; Eppenberger-Castori, S.; Awasthi, N.; Li, J.; Schwarz, M.A.; von Holzen, U. Therapeutic Potential of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Flavopiridol on c-Myc Overexpressing Esophageal Cancer. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 746385, doi:10.3389/fphar.2021.746385.
51. Wiernik, P.H. Alvocidib (Flavopiridol) for the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Expert Opin Investig Drugs* **2016**, *25*, 729–734, doi:10.1517/13543784.2016.1169273.
52. Mariaule, G.; Belmont, P. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors as Marketed Anticancer Drugs: Where Are We Now? A Short Survey. *Molecules* **2014**, *19*, 14366–14382, doi:10.3390/molecules190914366.
53. Chou, J.; Quigley, D.A.; Robinson, T.M.; Feng, F.Y.; Ashworth, A. Transcription-Associated Cyclin-Dependent Kinases as Targets and Biomarkers for Cancer Therapy. *Cancer Discov* **2020**, *10*, 351–370, doi:10.1158/2159-8290.CD-19-0528.
54. Ranjan, A.; Pang, Y.; Butler, M.; Merchant, M.; Kim, O.; Yu, G.; Su, Y.-T.; Gilbert, M.R.; Levens, D.; Wu, J. Targeting CDK9 for the Treatment of Glioblastoma. *Cancers* **2021**, *13*, 3039, doi:10.3390/cancers13123039.
55. Ma, H.; Seebacher, N.A.; Hornicek, F.J.; Duan, Z. Cyclin-Dependent Kinase 9 (CDK9) Is a Novel Prognostic Marker and Therapeutic Target in Osteosarcoma. *EBioMedicine* **2019**, *39*, 182–193, doi:10.1016/j.ebiom.2018.12.022.
56. Cassandri, M.; Fioravanti, R.; Pomella, S.; Valente, S.; Rotili, D.; Del Baldo, G.; De Angelis, B.; Rota, R.; Mai, A. CDK9 as a Valuable Target in Cancer: From Natural Compounds Inhibitors to Current Treatment in Pediatric Soft Tissue Sarcomas. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 1230, doi:10.3389/fphar.2020.01230.
57. Guo, T.; Liu, D.-F.; Peng, S.-H. CDK9 Is Up-Regulated and Associated with Prognosis in Patients with Papillary Thyroid Carcinoma. *Medicine* **2022**, *101*, e28309, doi:10.1097/MD.00000000000028309.
58. Shapiro, G.I. Cyclin-Dependent Kinase Pathways As Targets for Cancer Treatment. *J Clin Oncol* **2006**, *24*, 1770–1783, doi:10.1200/JCO.2005.03.7689.
59. Gregory, G.P.; Hogg, S.J.; Kats, L.M.; Vidacs, E.; Baker, A.J.; Gilan, O.; Lefebure, M.; Martin, B.P.; Dawson, M.A.; Johnstone, R.W.; et al. CDK9 Inhibition by Dinaciclib Potently Suppresses Mcl-1 to Induce Durable Apoptotic Responses in Aggressive MYC-Driven B-Cell Lymphoma in Vivo. *Leukemia* **2015**, *29*, 1437–1441, doi:10.1038/leu.2015.10.
60. Cidado, J.; Boiko, S.; Proia, T.; Ferguson, D.; Criscione, S.W.; San Martin, M.; Pop-Damkov, P.; Su, N.; Roamio Franklin, V.N.; Sekhar Reddy Chilamakuri, C.; et al. AZD4573 Is a Highly Selective CDK9 Inhibitor That Suppresses MCL-1 and Induces

- Apoptosis in Hematologic Cancer Cells. *Clin Cancer Res* **2020**, *26*, 922–934, doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-1853.
61. Chen, R.; Chen, Y.; Xiong, P.; Zheleva, D.; Blake, D.; Keating, M.J.; Wierda, W.G.; Plunkett, W. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Fadraciclib (CYC065) Depletes Anti-Apoptotic Protein and Synergizes with Venetoclax in Primary Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Leukemia* **2022**, *36*, 1596–1608 doi:10.1038/s41375-022-01553-w.
 62. Rosato, R.R.; Dai, Y.; Almenara, J.A.; Maggio, S.C.; Grant, S. Potent Antileukemic Interactions between Flavopiridol and TRAIL/Apo2L Involve Flavopiridol-Mediated XIAP Downregulation. *Leukemia* **2004**, *18*, 1780–1788, doi:10.1038/sj.leu.2403491.
 63. Peng, J.; Zhu, Y.; Milton, J.T.; Price, D.H. Identification of Multiple Cyclin Subunits of Human P-TEFb. *Genes Dev* **1998**, *12*, 755–762, doi:10.1101/gad.12.5.755.
 64. Franco, L.C.; Morales, F.; Boffo, S.; Giordano, A. CDK9: A Key Player in Cancer and Other Diseases. *J. Cell. Biochem.* **2018**, *119*, 1273–1284, doi:10.1002/jcb.26293.
 65. Sonawane, Y.A.; Taylor, M.A.; Napoleon, J.V.; Rana, S.; Contreras, J.I.; Natarajan, A. Cyclin Dependent Kinase 9 Inhibitors for Cancer Therapy: Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 8667–8684, doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00150.
 66. Shore, S.M.; Byers, S.A.; Dent, P.; Price, D.H. Characterization of Cdk955 and Differential Regulation of Two Cdk9 Isoforms. *Gene* **2005**, *350*, 51–58, doi:10.1016/j.gene.2005.01.015.
 67. Baumli, S.; Lolli, G.; Lowe, E.D.; Troiani, S.; Rusconi, L.; Bullock, A.N.; Debreczeni, J.É.; Knapp, S.; Johnson, L.N. The Structure of P-TEFb (CDK9/Cyclin T1), Its Complex with Flavopiridol and Regulation by Phosphorylation. *EMBO J* **2008**, *27*, 1907–1918, doi:10.1038/emboj.2008.121.
 68. Zhao, L.; Yuan, X.; Wang, J.; Feng, Y.; Ji, F.; Li, Z.; Bian, J. A Review on Flavones Targeting Serine/Threonine Protein Kinases for Potential Anticancer Drugs. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 677–685, doi:10.1016/j.bmc.2019.01.027.
 69. Dey, J.; Deckwerth, T.L.; Kerwin, W.S.; Casalini, J.R.; Merrell, A.J.; Grenley, M.O.; Burns, C.; Ditzler, S.H.; Dixon, C.P.; Beirne, E.; et al. Voruciclib, a Clinical Stage Oral CDK9 Inhibitor, Represses MCL-1 and Sensitizes High-Risk Diffuse Large B-Cell Lymphoma to BCL2 Inhibition. *Sci Rep* **2017**, *7*, 18007, doi:10.1038/s41598-017-18368-w.
 70. Jain, S.K.; Bharate, S.B.; Vishwakarma, R.A. Cyclin-Dependent Kinase Inhibition by Flavoalkaloids. *Mini Rev Med Chem* **2012**, *12*, 632–649, doi:10.2174/138955712800626683.
 71. Kasala, E.R.; Bodduluru, L.N.; Madana, R.M.; V, A.K.; Gogoi, R.; Barua, C.C. Chemopreventive and Therapeutic Potential of Chrysin in Cancer: Mechanistic Perspectives. *Toxicol. Lett.* **2015**, *233*, 214–225, doi:10.1016/j.toxlet.2015.01.008.
 72. Hu, K.; Wang, W.; Cheng, H.; Pan, S.; Ren, J. Synthesis and Cytotoxicity of Novel Chrysin Derivatives. *Med Chem Res* **2011**, *20*, 838–846, doi:10.1007/s00044-010-9395-1.
 73. Zhu, Z.-Y.; Wang, W.-X.; Wang, Z.; Chen, L.-J.; Zhang, J.-Y.; Liu, X.; Wu, S.; Zhang, Y. Synthesis and Antitumor Activity Evaluation of Chrysin Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *75*, 297–300, doi:10.1016/j.ejmech.2013.12.044.
 74. Zheng, X.; Zhao, F.F.; Mei Liu, Y.; Yao, X.; Zheng, Z.T.; Luo, X.; Liao, D.F. Synthesis and Preliminary Biological Evaluation of Chrysin Derivatives as Potential Anticancer Drugs. *Med Chem* **2010**, *6*, 6–8, doi:10.2174/157340610791208763.

75. Liu, Y.; Song, X.; He, J.; Zheng, X.; Wu, H. Synthetic Derivatives of Chrysin and Their Biological Activities. *Med Chem Res* **2014**, *23*, 555–563, doi:10.1007/s00044-013-0711-4.
76. Zheng, X.; Meng, W.-D.; Xu, Y.-Y.; Cao, J.-G.; Qing, F.-L. Synthesis and Anticancer Effect of Chrysin Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 881–884, doi:10.1016/S0960-894X(02)01081-8.
77. Miri, R.; Nejati, M.; Saso, L.; Khakdan, F.; Parshad, B.; Mathur, D.; Parmar, V.S.; Bracke, M.E.; Prasad, A.K.; Sharma, S.K.; et al. Structure–Activity Relationship Studies of 4-Methylcoumarin Derivatives as Anticancer Agents. *Pharm Biol* **2016**, *54*, 105–110, doi:10.3109/13880209.2015.1016183.
78. Singh, R.K.; Lange, T.S.; Kim, K.K.; Brard, L. A Coumarin Derivative (RKS262) Inhibits Cell-Cycle Progression, Causes pro-Apoptotic Signaling and Cytotoxicity in Ovarian Cancer Cells. *Invest New Drugs* **2011**, *29*, 63–72, doi:10.1007/s10637-009-9335-4.
79. Liu, T.; Xu, Z.; He, Q.; Chen, Y.; Yang, B.; Hu, Y. Nitrogen-Containing Flavonoids as CDK1/Cyclin B Inhibitors: Design, Synthesis, and Biological Evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 278–281, doi:10.1016/j.bmcl.2006.07.088.
80. Zhang, S.; Ma, J.; Bao, Y.; Yang, P.; Zou, L.; Li, K.; Sun, X. Nitrogen-Containing Flavonoid Analogues as CDK1/Cyclin B Inhibitors: Synthesis, SAR Analysis, and Biological Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 7127–7132, doi:10.1016/j.bmc.2008.06.055.
81. Gurrapu, S.; Jonnalagadda, S.K.; Alam, M.A.; Ronayne, C.T.; Nelson, G.L.; Solano, L.N.; Lueth, E.A.; Drewes, L.R.; Mereddy, V.R. Coumarin Carboxylic Acids as Monocarboxylate Transporter 1 Inhibitors: *in vitro* and *in vivo* Studies as Potential Anticancer Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 3282–3286, doi:10.1016/j.bmcl.2016.05.054.
82. Nepali, K.; Lee, H.-Y.; Liou, J.-P. Nitro-Group-Containing Drugs. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 2851–2893, doi:10.1021/acs.jmedchem.8b00147.
83. Vekariya, R.H.; Patel, H.D. Selective Nitration of Phenolic Compounds by Green Synthetic Approaches. *Synth Commun* **2014**, *44*, 2313–2335, doi:10.1080/00397911.2014.896925.
84. Samajdar, S.; Becker, F.F.; Banik, B.K. Surface-Mediated Highly Efficient Regioselective Nitration of Aromatic Compounds by Bismuth Nitrate. *Tetrahedron Lett* **2000**, *41*, 8017–8020, doi:10.1016/S0040-4039(00)01397-6.
85. Yadav, U.; Mande, H.; Ghalsasi, P. Nitration of Phenols Using $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$: Green Chemistry Laboratory Experiment. *J. Chem. Educ.* **2012**, *89*, 268–270, doi:10.1021/ed100957v.
86. Jiménez-Estrada, M.; Ayala, J.; Saad, I.; Reyes-Chilpa, R.; Navarro-Ocaña, A. Nitración de Productos Naturales Con Anillos Furánicos y Benzofuránicos. *Revista Latinoamericana de Química* **1999**, *27*, 81–88.
87. Krzywik, J.; Mozga, W.; Aminpour, M.; Janczak, J.; Maj, E.; Wietrzyk, J.; Tuszyński, J.A.; Huczyński, A. Synthesis, Antiproliferative Activity and Molecular Docking Studies of Novel Doubly Modified Colchicine Amides and Sulfonamides as Anticancer Agents. *Molecules* **2020**, *25*, 1789, doi:10.3390/molecules25081789.

88. Ashraf, Z.; Mahmood, T.; Hassan, M.; Afzal, S.; Rafique, H.; Afzal, K.; Latip, J. Dexibuprofen Amide Derivatives as Potential Anticancer Agents: Synthesis, in Silico Docking, Bioevaluation, and Molecular Dynamic Simulation. *Drug Des Devel Ther* **2019**, *Volume 13*, 1643–1657, doi:10.2147/DDDT.S178595.
89. Shoaib Ahmad Shah, S.; Rivera, G.; Ashfaq, M. Recent Advances in Medicinal Chemistry of Sulfonamides. Rational Design as Anti-Tumoral, Anti-Bacterial and Anti-Inflammatory Agents. *Mini Rev Med Chem* **2012**, *13*, 70–86, doi:10.2174/1389557511307010070.
90. Lemke, T.L. *Review of Organic Functional Groups: Introduction to Medicinal Organic Chemistry*; 5th ed.; Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health: Philadelphia, USA, 2012; pp. 59-66. ISBN 978-1-60831-016-6.
91. Kumari, S.; Carmona, A.V.; Tiwari, A.K.; Trippier, P.C. Amide Bond Bioisosteres: Strategies, Synthesis, and Successes. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 12290–12358, doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00530.
92. Mondal, S.; Malakar, S. Synthesis of Sulfonamide and their Synthetic and Therapeutic Applications: Recent Advances. *Tetrahedron* **2020**, *76*, 131662, doi:10.1016/j.tet.2020.131662.
93. Hernández-Rodríguez, P.; Baquero, L.P.; Larrota, H.R. Flavonoids. In *Bioactive Compounds*; Elsevier, 2019; pp. 265–288 ISBN 978-0-12-814774-0.
94. Pan, M.-H.; Lai, C.-S.; Ho, C.-T. Anti-Inflammatory Activity of Natural Dietary Flavonoids. *Food & Funct.* **2010**, *1*, 15, doi:10.1039/c0fo00103a.
95. Kandaswami, C.; Kanadaswami, C.; Lee, L.-T.; Lee, P.-P.H.; Hwang, J.-J.; Ke, F.-C.; Huang, Y.-T.; Lee, M.-T. The Antitumor Activities of Flavonoids. *In Vivo* **2005**, *19*, 895–909.
96. Chahar, M.K.; Sharma, N.; Dobhal, M.P.; Joshi, Y.C. Flavonoids: A Versatile Source of Anticancer Drugs. *Pharmacogn Rev* **2011**, *5*, 1–12, doi:10.4103/0973-7847.79093.
97. Lopes, M.S.; de Andrade Sena, C.F.; Silva, B.L.; de Souza, C.M.; Ramos, J.P.; Cassali, G.D.; de Souza-Fagundes, E.M.; Alves, R.J.; de Oliveira, M.C.; de Oliveira, R.B. Synthesis of Nitroaromatic Compounds as Potential Anticancer Agents. *Anticancer Agents Med Chem* **2015**, *15*, 206–216, doi:10.2174/1871520614666141114201749.
98. Xiao, Z.; Morris-Natschke, S.L.; Lee, K.-H. Strategies for the Optimization of Natural Leads to Anticancer Drugs or Drug Candidates. *Med Res Rev* **2016**, *36*, 32–91, doi:10.1002/med.21377.
99. Bose, A.K.; Ganguly, S.N.; Manhas, M.S.; Rao, S.; Speck, J.; Pekelny, U.; Pombo-Villars, E. Microwave Promoted Rapid Nitration of Phenolic Compounds with Calcium Nitrate. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1885–1888, doi:10.1016/j.tetlet.2006.01.094.
100. Ahn, Y.M.; Vogeti, L.; Liu, C.-J.; Santhapuram, H.K.R.; White, J.M.; Vasandani, V.; Mitscher, L.A.; Lushington, G.H.; Hanson, P.R.; Powell, D.R.; et al. Design, Synthesis, and Antiproliferative and CDK2-Cyclin a Inhibitory Activity of Novel Flavopiridol Analogues. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 702–713, doi:10.1016/j.bmc.2006.10.063.
101. Gao, H.; Kawabata, J. α -Glucosidase Inhibition of 6-Hydroxyflavones. Part 3: Synthesis and Evaluation of 2,3,4-Trihydroxybenzoyl-Containing Flavonoid Analogs and 6-

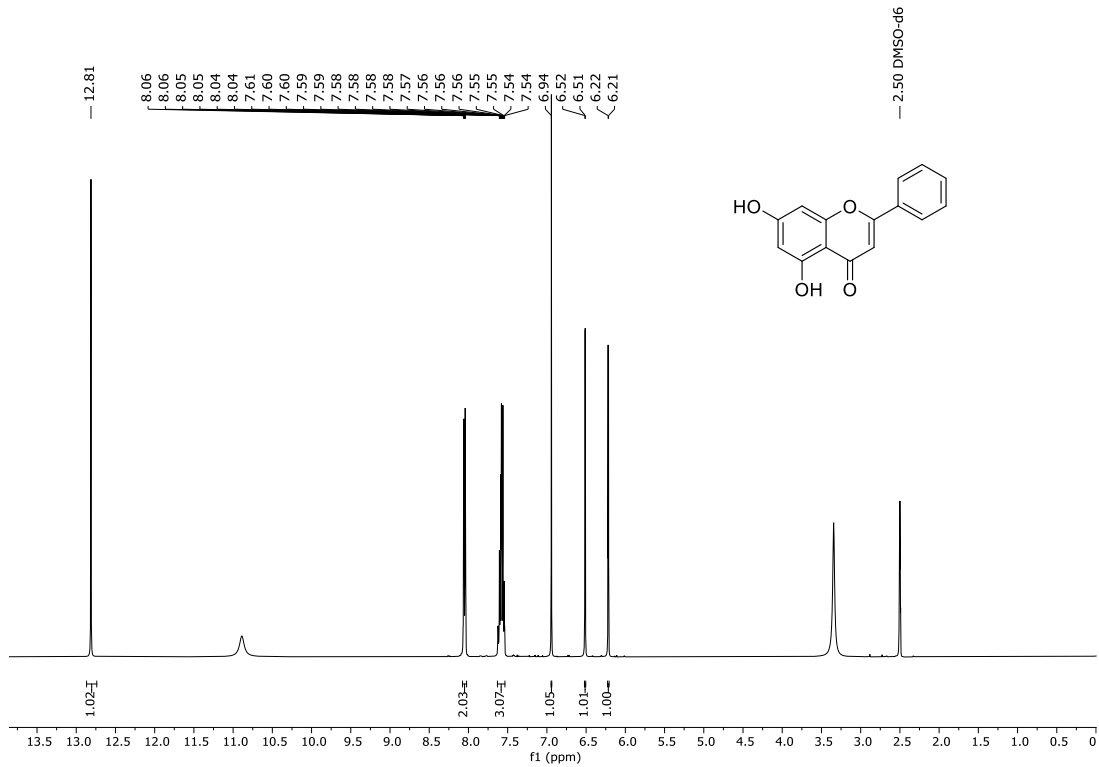
- Aminoflavones as α -Glucosidase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem* **2005**, *13*, 1661–1671, doi:10.1016/j.bmc.2004.12.010.
102. Larget, R.; Lockhart, B.; Renard, P.; Largeron, M. A Convenient Extension of the Wessely–Moser Rearrangement for the Synthesis of Substituted Alkylaminoflavones as Neuroprotective Agents in Vitro. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 835–838, doi:10.1016/S0960-894X(00)00110-4.
103. Lu, K.; Chu, J.; Wang, H.; Fu, X.; Quan, D.; Ding, H.; Yao, Q.; Yu, P. Regioselective Iodination of Flavonoids by *N*-Iodosuccinimide under Neutral Conditions. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 6345–6348, doi:10.1016/j.tetlet.2013.09.051.
104. de la Torre, M.D.L.; Tomé, A.C.; Silva, A.M.S.; Cavaleiro, J.A.S. Synthesis of [60]Fullerene–Quercetin Dyads. *Tetrahedron Lett* **2002**, *43*, 4617–4620, doi:10.1016/S0040-4039(02)00867-5.
105. Wanich, S.; Yenjai, C. Amino and Nitro Derivatives of 5,7-Dimethoxyflavone from *Kaempferia Parviflora* and Cytotoxicity against KB Cell Line. *Arch. Pharm. Res.* **2009**, *32*, 1185–1189, doi:10.1007/s12272-009-1901-y.
106. Bellamy, F.D.; Ou, K. Selective Reduction of Aromatic Nitro Compounds with Stannous Chloride in Non Acidic and Non Aqueous Medium. *Tetrahedron Lett* **1984**, *25*, 839–842, doi:10.1016/S0040-4039(01)80041-1.
107. Gamble, A.B.; Garner, J.; Gordon, C.P.; O’Conner, S.M.J.; Keller, P.A. Aryl Nitro Reduction with Iron Powder or Stannous Chloride under Ultrasonic Irradiation. *Synth Commun* **2007**, *37*, 2777–2786, doi:10.1080/00397910701481195.
108. Chicha, H.; Bouissane, L.; El Ammari, L.; Saadi, M.; Baltas, M.; El Mostapha, R. SnCl₂/EtOH-Mediated Synthesis of Novel 4-Ethoxy- and 4-Chloroindazoles Bearing Sulfonamide Moieties. *Synth. Commun.* **2015**, *45*, 2005–2013, doi:10.1080/00397911.2015.1061670.
109. VanVliet, D.S.; Gillespie, P.; Scicinski, J.J. Rapid One-Pot Preparation of 2-Substituted Benzimidazoles from 2-Nitroanilines Using Microwave Conditions. *Tetrahedron Lett* **2005**, *46*, 6741–6743, doi:10.1016/j.tetlet.2005.07.130.
110. Leggio, A.; Bagalà, J.; Belsito, E.L.; Comandè, A.; Greco, M.; Liguori, A. Formation of Amides: One-Pot Condensation of Carboxylic Acids and Amines Mediated by TiCl₄. *Chem Cent J* **2017**, *11*, 87, doi:10.1186/s13065-017-0318-9.
111. Montalbetti, C.A.G.N.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827–10852, doi:10.1016/j.tet.2005.08.031.
112. Hassan, A.H.E.; Lee, K.-T.; Lee, Y.S. Flavone-Based Arylamides as Potential Anticancers: Design, Synthesis and in Vitro Cell-Based/Cell-Free Evaluations. *Eur J Med Chem* **2020**, *187*, 111965, doi:10.1016/j.ejmech.2019.111965.
113. Pace, V.; Holzer, W.; Olofsson, B. Increasing the Reactivity of Amides towards Organometallic Reagents: An Overview. *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 3697–3736, doi:10.1002/adsc.201400630.
114. Supuran, C.T.; Casini, A.; Scozzafava, A. Protease Inhibitors of the Sulfonamide Type: Anticancer, Antiinflammatory, and Antiviral Agents. *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 535–558, doi:10.1002/med.10047.

115. Jafarpour, M.; Rezaeifard, A.; Golshani, T. A Green, Catalyst-Free Method for the Synthesis of Sulfonamides and Sulfonylazides. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2010**, *186*, 140–148, doi:10.1080/10426507.2010.488257.
116. Kim, Dong Han; Yun, Bo Hee; Choi, Eun Woo; Oh, Sang Min; Lee, Kyung-Tai; Synthesis and Cytotoxic Effects of Sulfonamide-Substituted 5,6,7-Trimethoxyflavones on Human Cancer Cell Lines. *Bull. Korean Chem. Soc* **2013**, *34*, 2507–2510, doi:10.5012/BKCS.2013.34.8.2507.
117. Yasuhara, A.; Kameda, M.; Sakamoto, T. Selective Monodesulfonylation of *N,N*-Disulfonylarylamines with Tetrabutylammonium Fluoride. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 809–812, doi:10.1248/cpb.47.809.
118. Meshram, G.A.; Patil, V.D. Zinc Oxide Catalyzed Efficient Synthesis of Sulfonamides under mild Conditions. *Int. J. Chem. Sci.* **2009**, *7*, 1948–1956.
119. Kim, J.-G.; Jang, D. Mild and Efficient Indium Metal Catalyzed Synthesis of Sulfonamides and Sulfonic Esters. *Synlett* **2007**, *2007*, 2501–2504, doi:10.1055/s-2007-986632.
120. Chaudhari, H.K.; Pahelkar, A.; Takale, B.S. Preparative-Scale Synthesis of Amino Coumarins through New Sequential Nitration and Reduction Protocol. *Tetrahedron Lett* **2017**, *58*, 4107–4110, doi:10.1016/j.tetlet.2017.09.040.
121. Bose, A.; Sanjoto, W.P.; Villarreal, S.; Aguilar, H.; Banik, B.K. Novel Nitration of Estrone by Metal Nitrates. *Tetrahedron Lett* **2007**, *48*, 3945–3947, doi:10.1016/j.tetlet.2007.04.050.
122. Samajdar, S.; Becker, F.F.; Banik, B.K. Surface-Mediated Highly Efficient Regioselective Nitration of Aromatic Compounds by Bismuth Nitrate. *Tetrahedron Lett* **2000**, *41*, 8017–8020, doi:10.1016/S0040-4039(00)01397-6.
123. Ravi, P.; Tewari, S.P. Facile and Environmentally Friendly Synthesis of Nitropyrazoles Using Montmorillonite K-10 Impregnated with Bismuth Nitrate. *Catal Commun* **2012**, *19*, 37–41, doi:10.1016/j.catcom.2011.12.016.
124. Bandyopadhyay, D.; Rivera, G.; Sanchez, J.L.; Rivera, J.; Granados, J.C.; Guerrero, A.M.; Chang, F.-M.; Dearth, R.K.; Short, J.D.; Banik, B.K. Bismuth Nitrate-Induced Novel Nitration of Estradiol: An Entry to New Anticancer Agents. *Eur J Med Chem* **2014**, *82*, 574–583, doi:10.1016/j.ejmech.2014.06.010.
125. Tavera-Hernández, R. Obtención de Nitroderivados a Partir de Compuestos Naturales Con Estructura Fenilbenzopirano y Evaluación de Su Actividad Biológica, Universidad Nacional Autónoma de México: Ciudad de México, 2017.
126. Matsumoto, T.; Yamauchi, A.; Ishikawa, J.; Jin, G.-H.; Matsumoto, J.; Fueda, Y.; Yasuda, M. Solid-Phase Aromatic Nitration with Mg(NO₃)₂ on Silica Gel. *Int J Org Chem* **2017**, *07*, 1–11, doi:10.4236/ijoc.2017.71001.
127. Selvam, J.J.P.; Suresh, V.; Rajesh, K.; Reddy, S.R.; Venkateswarlu, Y. Highly Efficient Nitration of Phenolic Compounds by Zirconyl Nitrate. *Tetrahedron Lett* **2006**, *47*, 2507–2509, doi:10.1016/j.tetlet.2006.02.057.
128. Ganguly, N.C.; Dutta, S.; Datta, M.; De, P. Solid-State Regioselective Nitration of Activated Hydroxyaromatics and Hydroxycoumarins with Cerium (IV) Ammonium Nitrate. *J Chem Res* **2005**, *2005*, 733–735, doi:10.3184/030823405774909342.

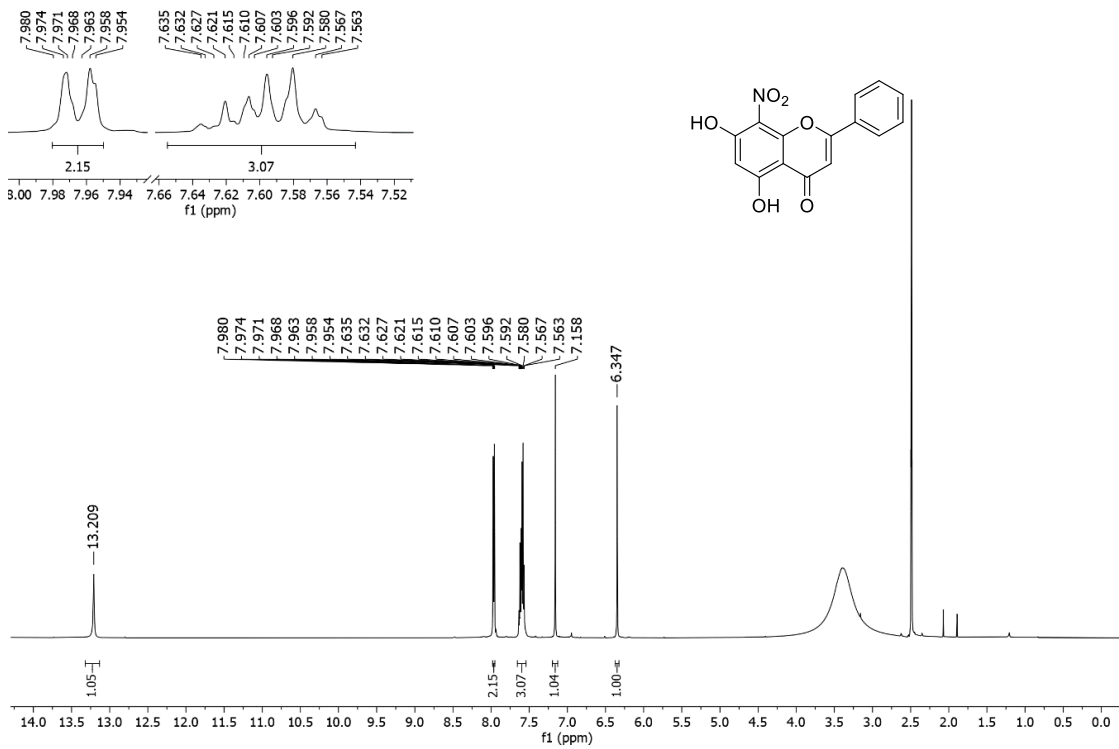
129. Bansal, V.; Khanna, R.N. Regioselective Mononitration of Coumarins Using Chromium Nitrate as Nitrating Agent. *Synth. Commun* **2002**, *32*, 1345–1350, doi:10.1081/SCC-120003630.
130. Wei, Y.; Miao, K.-L.; Hao, S.-H. Novel 4-Methylumbelliferone Amide Derivatives: Synthesis, Characterization and Pesticidal Activities. *Molecules* **2018**, *23*, 122, doi:10.3390/molecules23010122.
131. Park, K.K.; Oh, C.H.; Sim, W.-J. Chemoselective Reduction of Nitroarenes and Nitroalkanes by Sodium Dithionite Using Octylviologen as an Electron Transfer Catalyst. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6202–6204, doi:10.1021/jo00124a043.
132. Yamabe, S.; Yamazaki, S. A DFT Study of Reduction of Nitrobenzene to Aniline with SnCl₂ and Hydrochloric Acid: A DFT Study of Reduction of Nitrobenzene to Aniline. *J. Phys. Org. Chem.* **2016**, *29*, 361–367, doi:10.1002/poc.3543.
133. Liu, R.; Zhao, B.; Wang, D.-E.; Yao, T.; Pang, L.; Tu, Q.; Ahmed, S.; Liu, J.-J.; Wang, J. Nitrogen-Containing Apigenin Analogs: Preparation and Biological Activity. *Molecules* **2012**, *17*, 14748–14764, doi:10.3390/molecules171214748.
134. Debnath, S.; Kanakaraju, M.; Islam, M.; Yeeravalli, R.; Sen, D.; Das, A. In Silico Design, Synthesis and Activity of Potential Drug-like Chrysin Scaffold-Derived Selective EGFR Inhibitors as Anticancer Agents. *Comput Biol Chem* **2019**, *83*, 107156, doi:10.1016/j.compbiolchem.2019.107156.
135. Lu, H.; Chang, D.J.; Baratte, B.; Meijer, L.; Schulze-Gahmen, U. Crystal Structure of a Human Cyclin-Dependent Kinase 6 Complex with a Flavonol Inhibitor, Fisetin. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 737–743, doi:10.1021/jm049353p.
136. Li, H.; Zhang, X.; Wang, W. Anticancer Activity of 5,7-Dimethoxyflavone against Liver Cancer Cell Line Hepg2 Involves Apoptosis, ROS Generation and Cell Cycle Arrest. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2017**, *14*, 213–220, doi:10.21010/ajtcam.v14i4.24.
137. Sarhan, F.; Moheb, A.; Grondin, M.; Ibrahim, R.; Roy, R. Selective Anticancer Potential of Several Methylated Phenolic Compounds. *J Nat Pharm* **2013**, *4*, 75, doi:10.4103/2229-5119.110373.
138. Gurung, S.K.; Kim, H.P.; Park, H. Inhibition of Prostaglandin E₂ Production by Synthetic Wogonin Analogs. *Arch. Pharm. Res.* **2009**, *32*, 1503–1508, doi:10.1007/s12272-009-2101-5.
139. Zappavigna, S.; Cossu, A.M.; Grimaldi, A.; Bocchetti, M.; Ferraro, G.A.; Nicoletti, G.F.; Filosa, R.; Caraglia, M. Anti-Inflammatory Drugs as Anticancer Agents. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2605, doi:10.3390/ijms21072605.
140. Emami, S.; Dadashpour, S. Current Developments of Coumarin-Based Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *102*, 611–630, doi:10.1016/j.ejmech.2015.08.033.
141. Finn, G.J.; Creaven, B.; Egan, D.A. Study of the in Vitro Cytotoxic Potential of Natural and Synthetic Coumarin Derivatives Using Human Normal and Neoplastic Skin Cell Lines. *Melanoma Res.* **2001**, *11*, 461–467, doi:10.1097/00008390-200110000-00004.
142. Finn, G.J.; Kenealy, E.; Creaven, B.S.; Egan, D.A. In Vitro Cytotoxic Potential and Mechanism of Action of Selected Coumarins, Using Human Renal Cell Lines. *Cancer Lett* **2002**, *183*, 61–68, doi:10.1016/S0304-3835(02)00102-7.

143. Zhang, J.; Tan, Y.; Li, G.; Chen, L.; Nie, M.; Wang, Z.; Ji, H. Coumarin Sulfonamides and Amides Derivatives: Design, Synthesis, and Antitumor Activity In Vitro. *Molecules* **2021**, *26*, 786, doi:10.3390/molecules26040786.
144. Brisard, D.; Eckerdt, F.; Marsh, L.A.; Blyth, G.T.; Jain, S.; Cristofanilli, M.; Horiuchi, D.; Plataniias, L.C. Antineoplastic Effects of Selective CDK9 Inhibition with Atuveciclib on Cancer Stem-like Cells in Triple-Negative Breast Cancer. *Oncotarget* **2018**, *9*, 37305–37318, doi:10.18632/oncotarget.26468.
145. Wang, X.; Yu, C.; Wang, C.; Ma, Y.; Wang, T.; Li, Y.; Huang, Z.; Zhou, M.; Sun, P.; Zheng, J.; et al. Novel Cyclin-Dependent Kinase 9 (CDK9) Inhibitor with Suppression of Cancer Stemness Activity against Non-Small-Cell Lung Cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *181*, 111535, doi:10.1016/j.ejmech.2019.07.038.
146. Polier, G.; Giaisi, M.; Köhler, R.; Müller, W.W.; Lutz, C.; Buss, E.C.; Krammer, P.H.; Li-Weber, M. Targeting CDK9 by Wogonin and Related Natural Flavones Potentiates the Anti-Cancer Efficacy of the Bcl-2 Family Inhibitor ABT-263: Sensitization of ABT-263 Cancer Therapy by Flavones. *Int. J. Cancer* **2014**, 688–698, doi:10.1002/ijc.29009.
147. Baumli, S.; Hole, A.J.; Wang, L.-Z.; Noble, M.E.M.; Endicott, J.A. The CDK9 Tail Determines the Reaction Pathway of Positive Transcription Elongation Factor b. *Structure* **2012**, *20*, 1788–1795, doi:10.1016/j.str.2012.08.011.

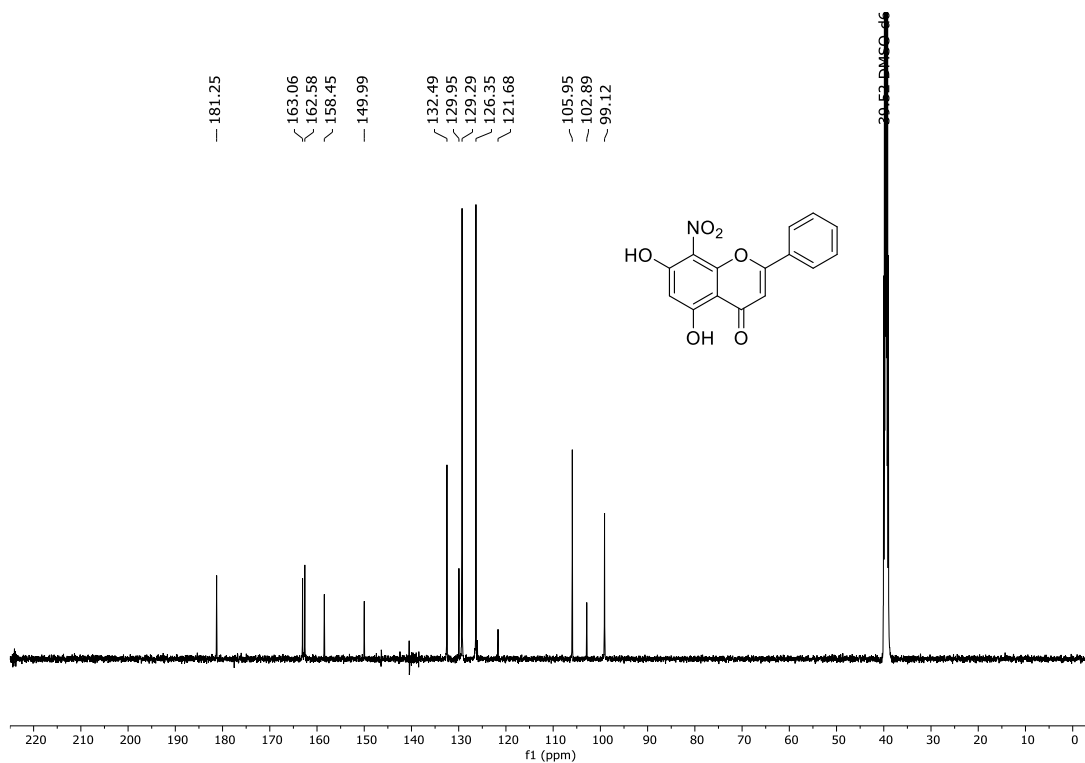
12. ANEXOS



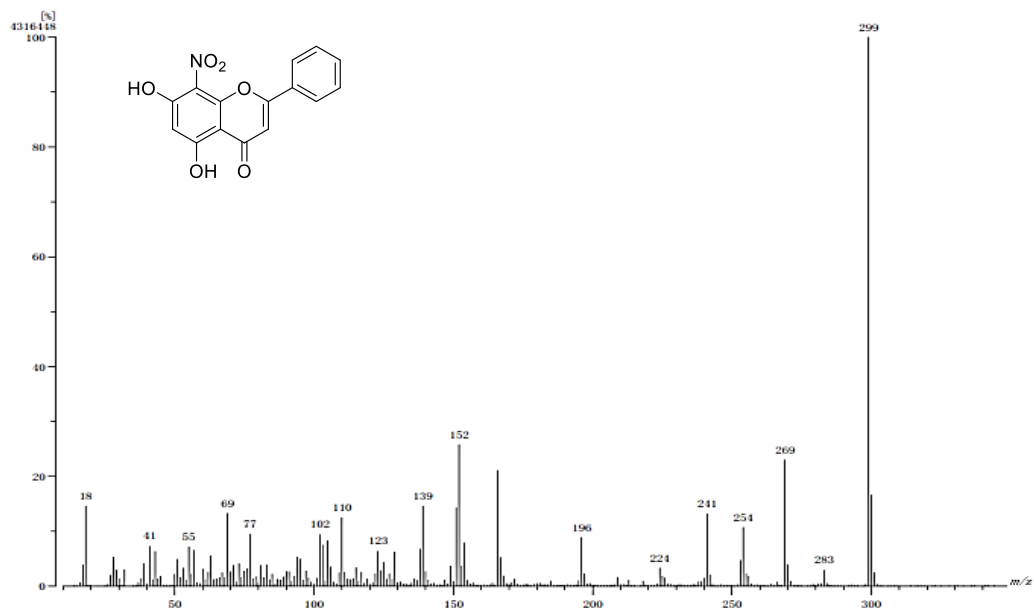
Espectro 1. RMN ^1H del compuesto 1 (400 MHz DMSO- d_6)



Espectro 2. RMN ^1H del compuesto 2 (500 MHz DMSO- d_6)



Espectro 3. RMN ^{13}C de 2 (125 MHz DMSO- d_6)

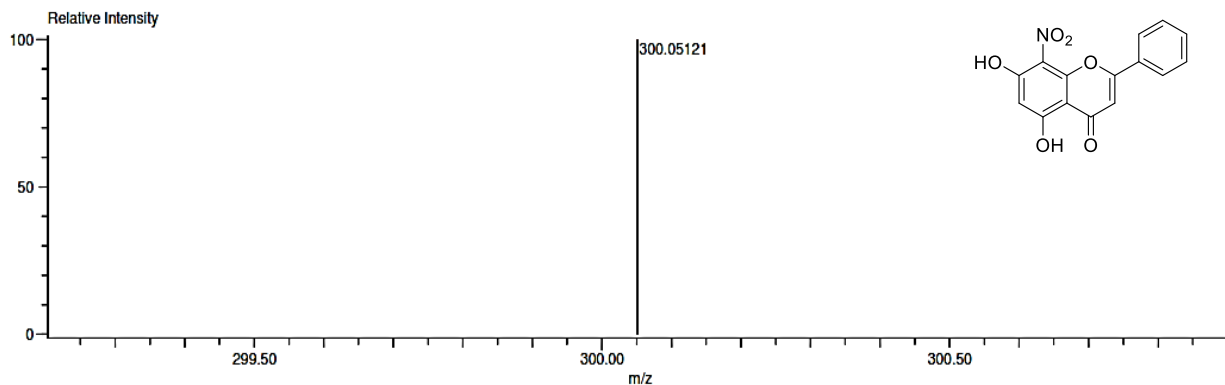


Espectro 4. Masas del compuesto 2 (IE+)

Charge number:1
Element:¹²C:0 .. 42, ¹H:0 .. 65, ¹⁴N:0 .. 1, ¹⁶O:0 .. 6

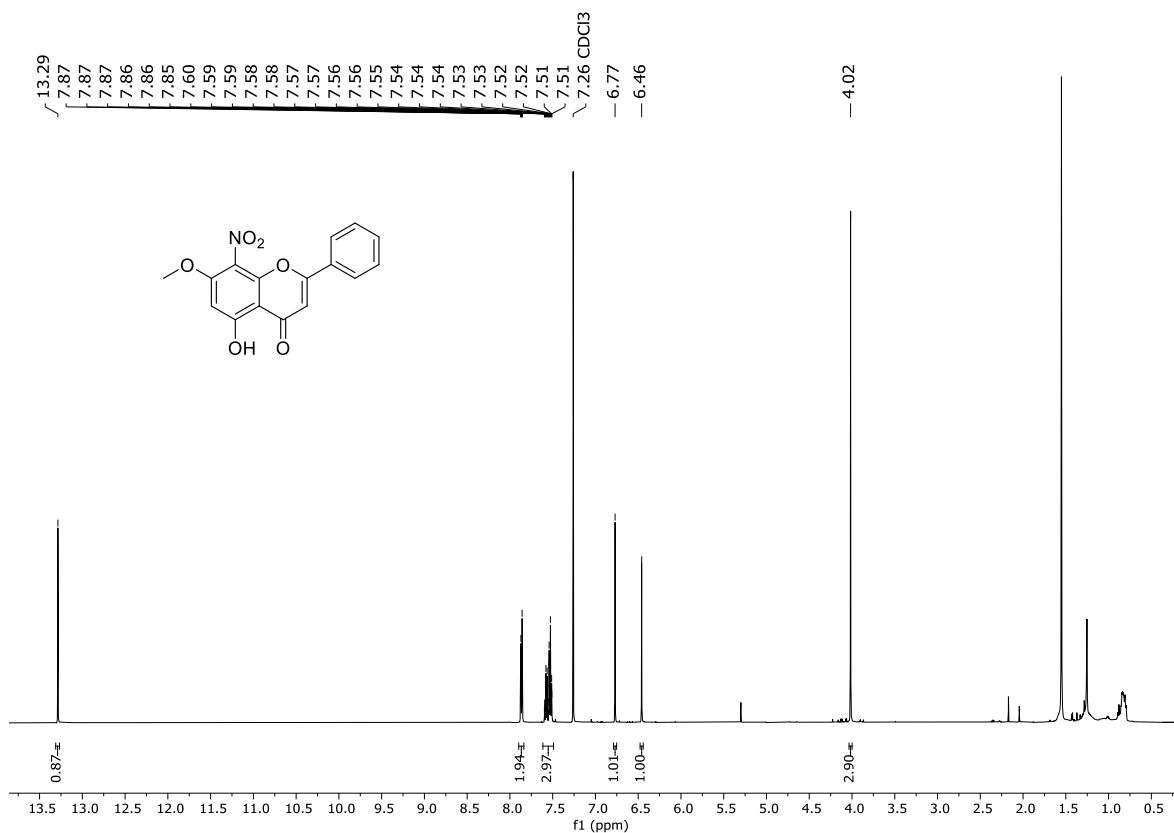
Tolerance:3.00(mmu)

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

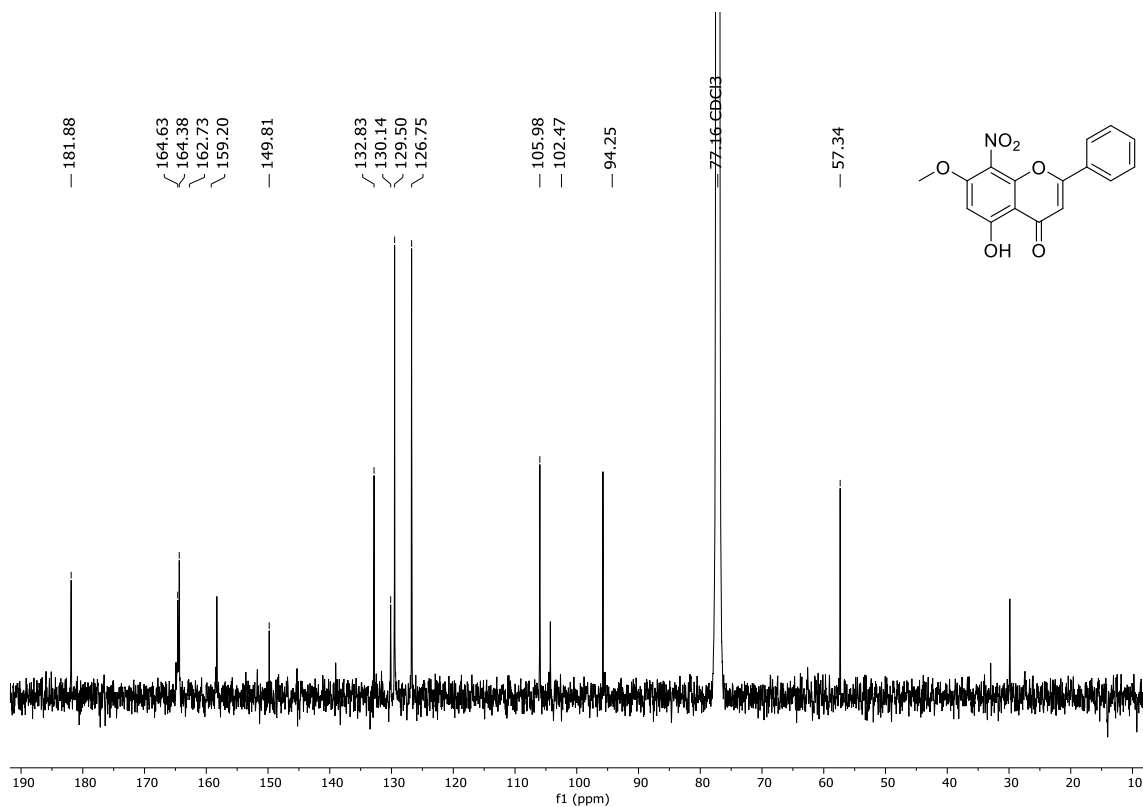


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
300.05121	50901.36	300.05081	0.40	1.34	¹² C ₁₅ ¹ H ₁₀ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₆	11.5

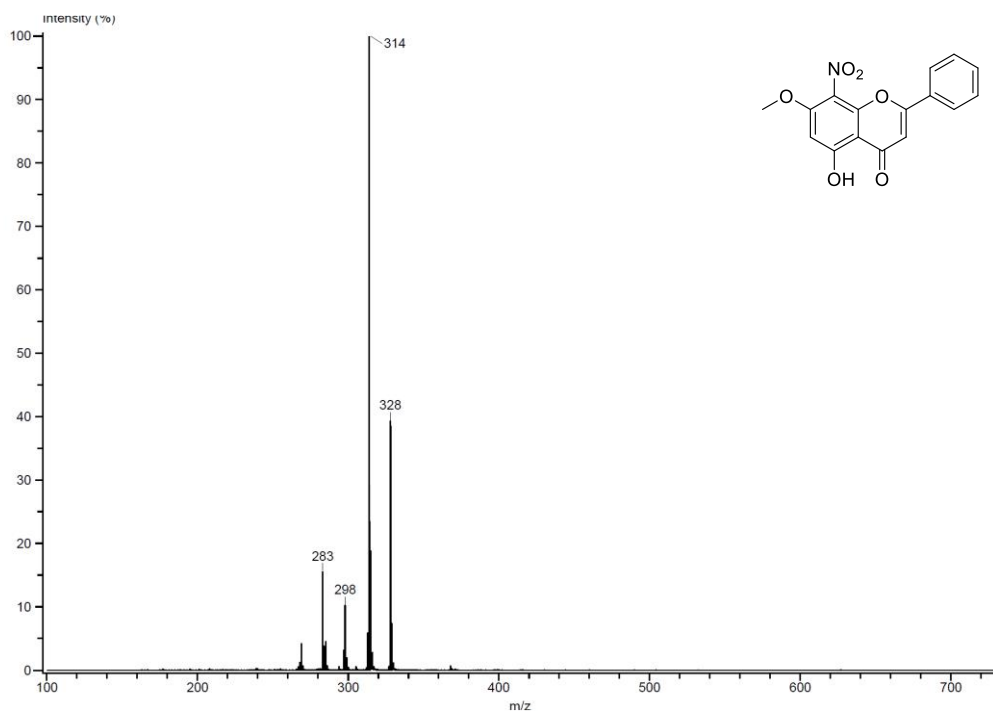
Espectro 5. Masas de alta resolución del compuesto 2 (DART+)



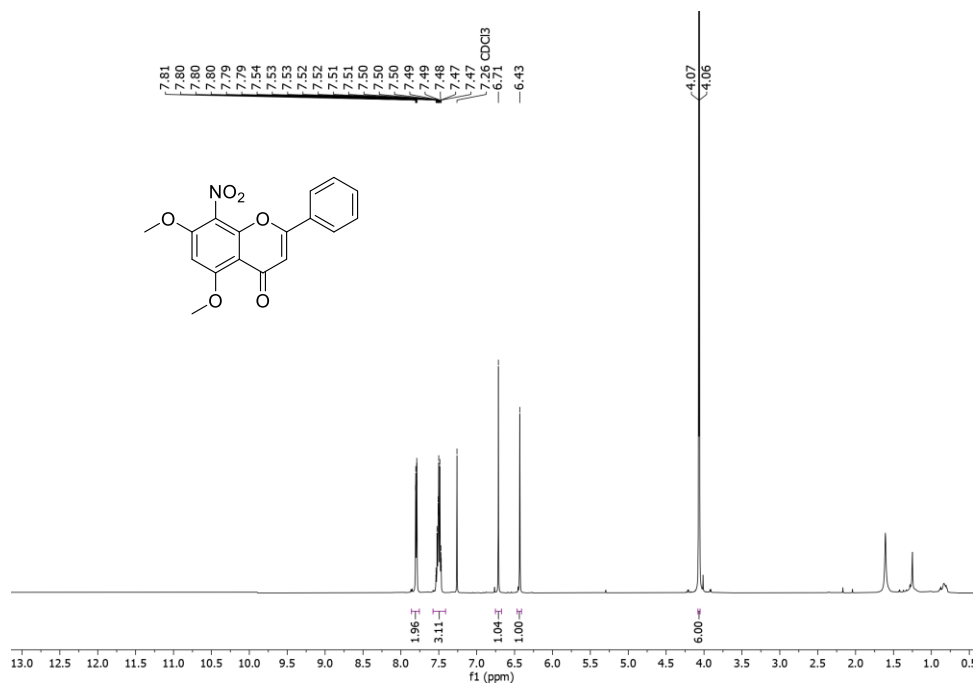
Espectro 6. RMN ¹H del compuesto 2c (500 MHz CDCl₃)



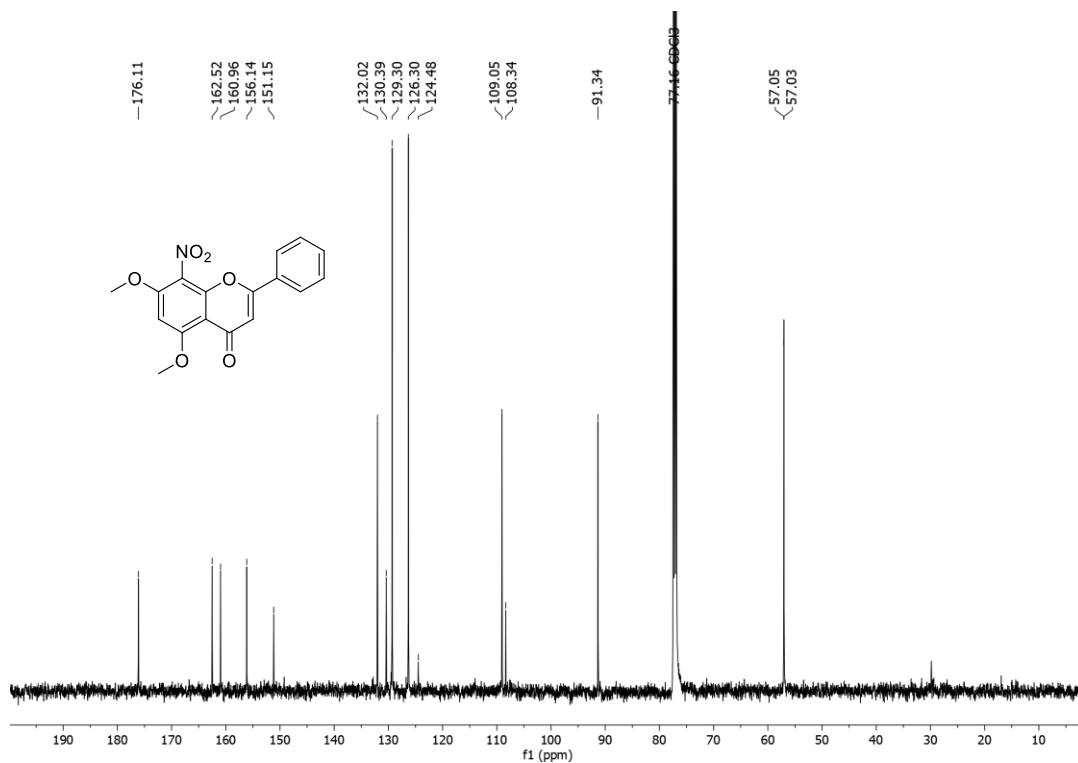
Espectro 7. RMN ¹³C del compuesto 2c (125 MHz CDCl₃)



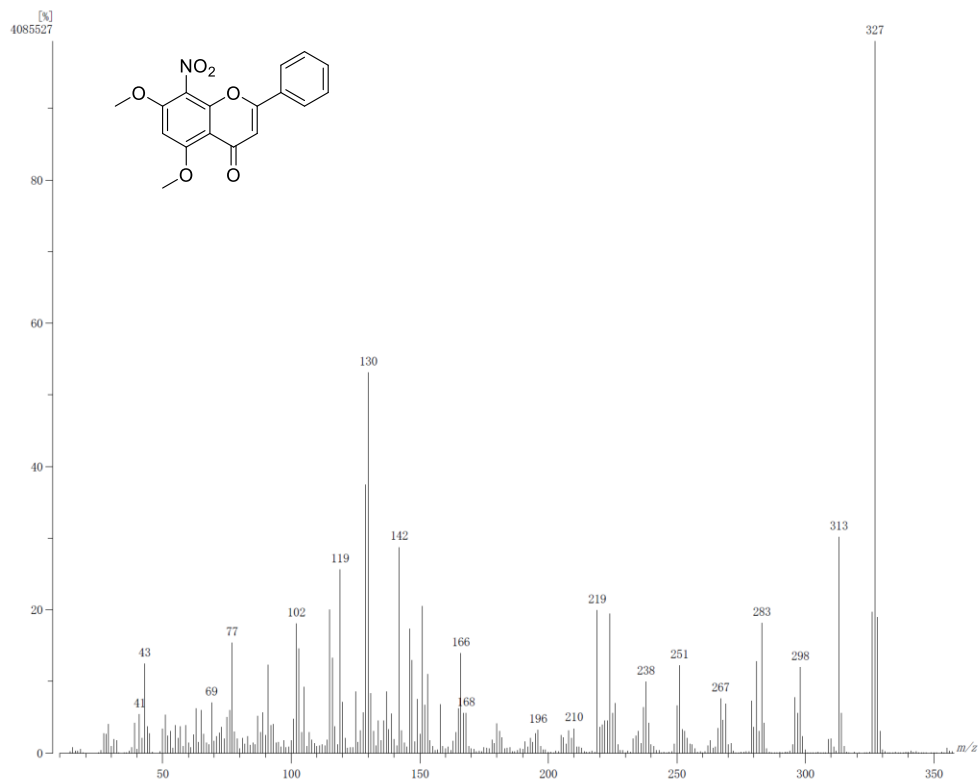
Espectro 8. Masas del compuesto 2c (DART+)



Espectro 9. RMN ¹H del compuesto 3 (500 MHz CDCl₃)

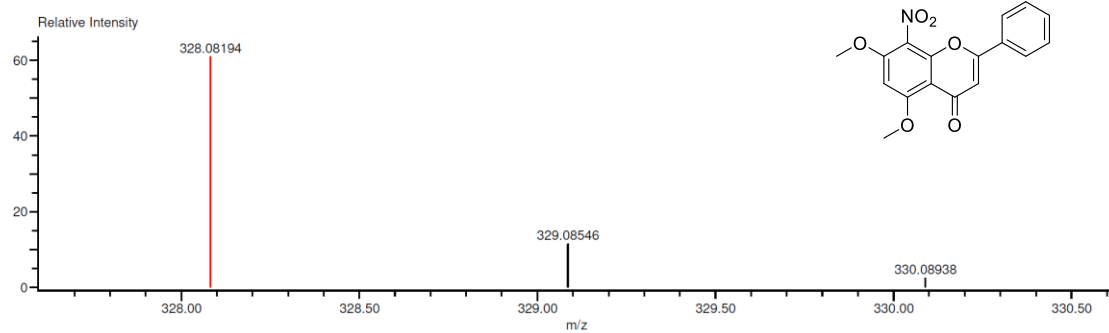


Espectro 10. RMN ¹³C del compuesto 3 (500 MHz CDCl₃)



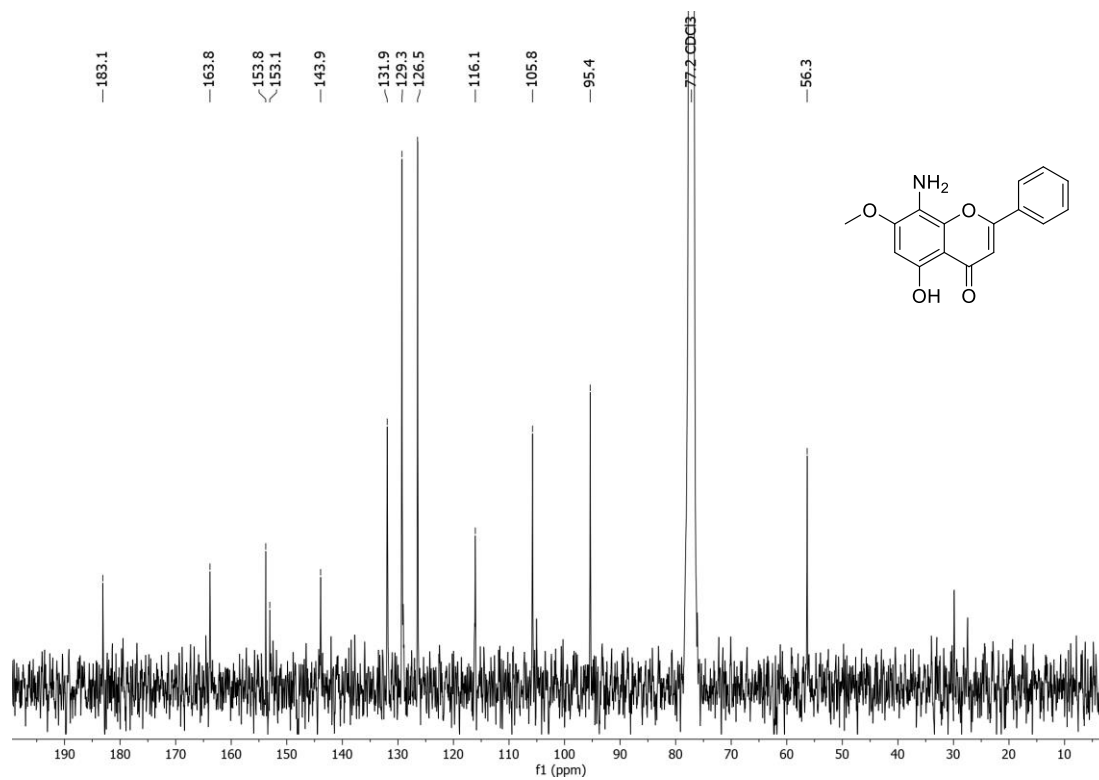
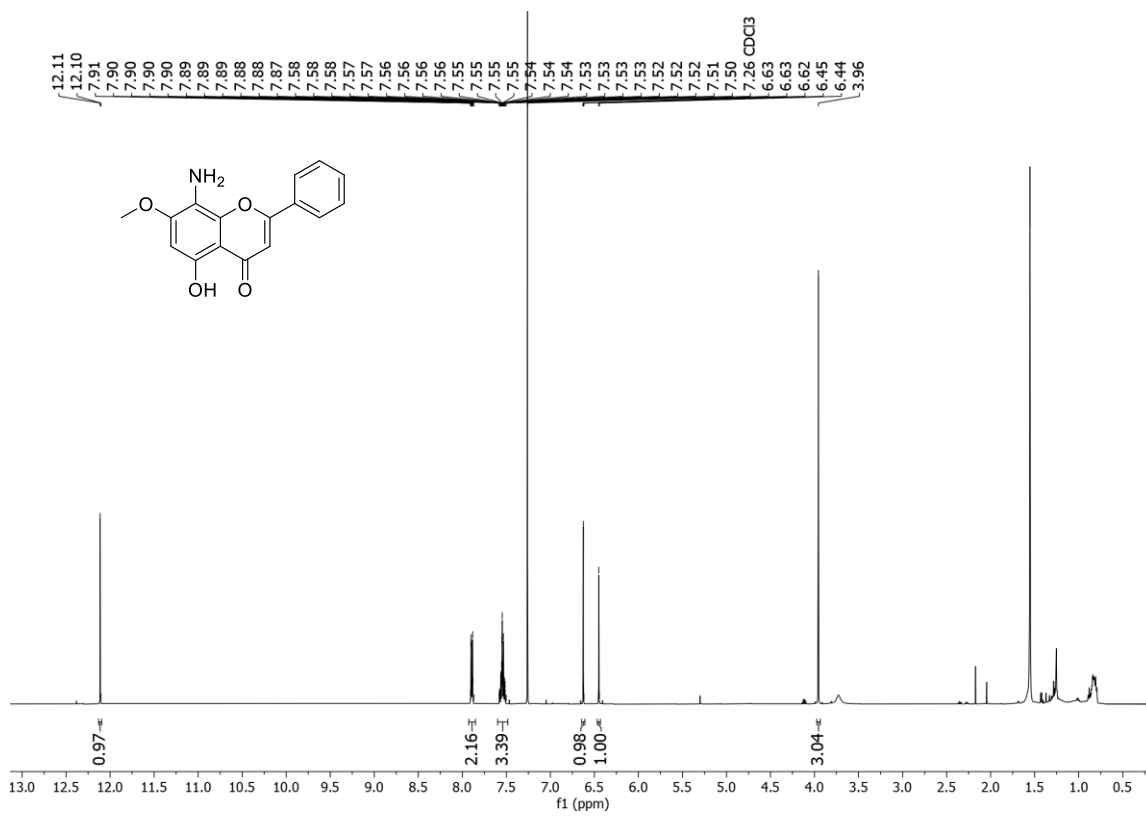
Espectro 11. Masas del compuesto 3 (IE+)

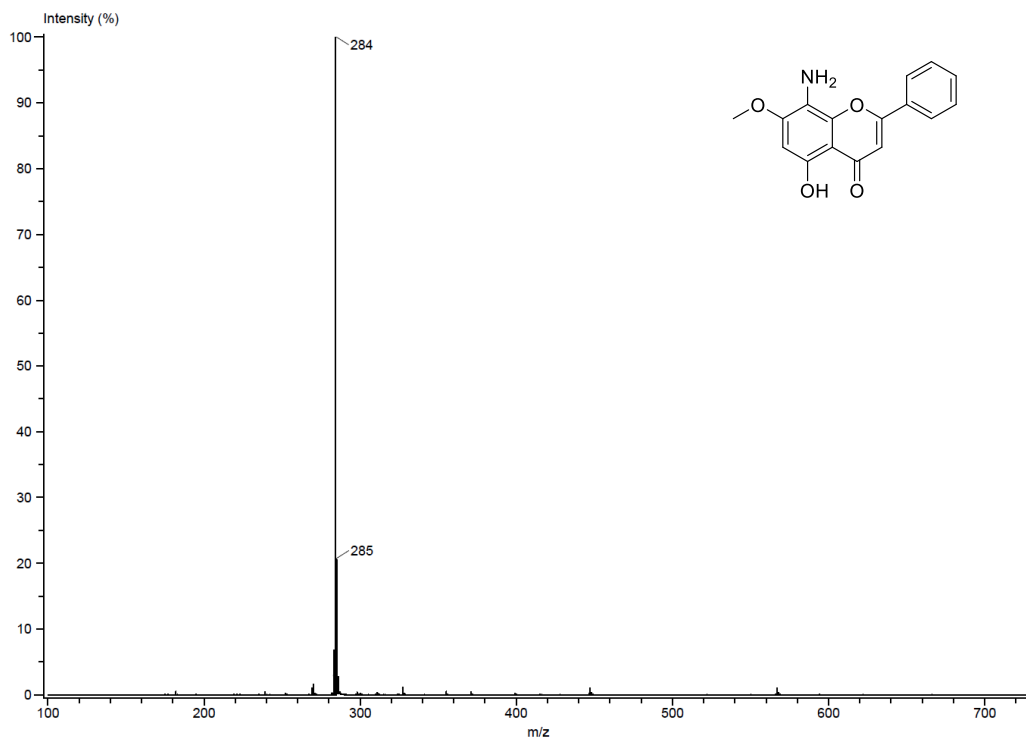
Charge number:1 Tolerance:10.00(mmu) Unsaturation Number:0.0 .. 30.0 (Fraction:Both)
 Element:¹²C:0 .. 20, ¹H:0 .. 50, ¹⁴N:0 .. 2, ¹⁶O:4 .. 7



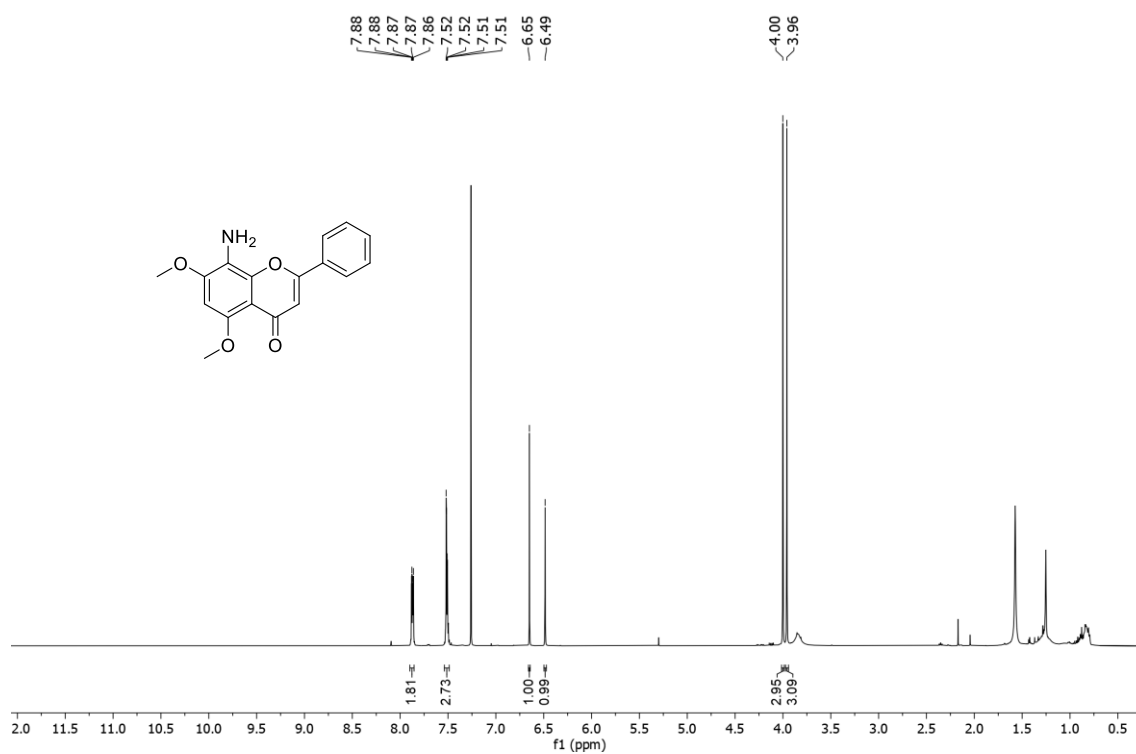
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
328.08194	16334.51	328.08211	-0.18	-0.54	¹² C ₁₇ ¹ H ₁₄ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₆	11.5

Espectro 12. Masas de alta resolución del compuesto 3 (ESI+)

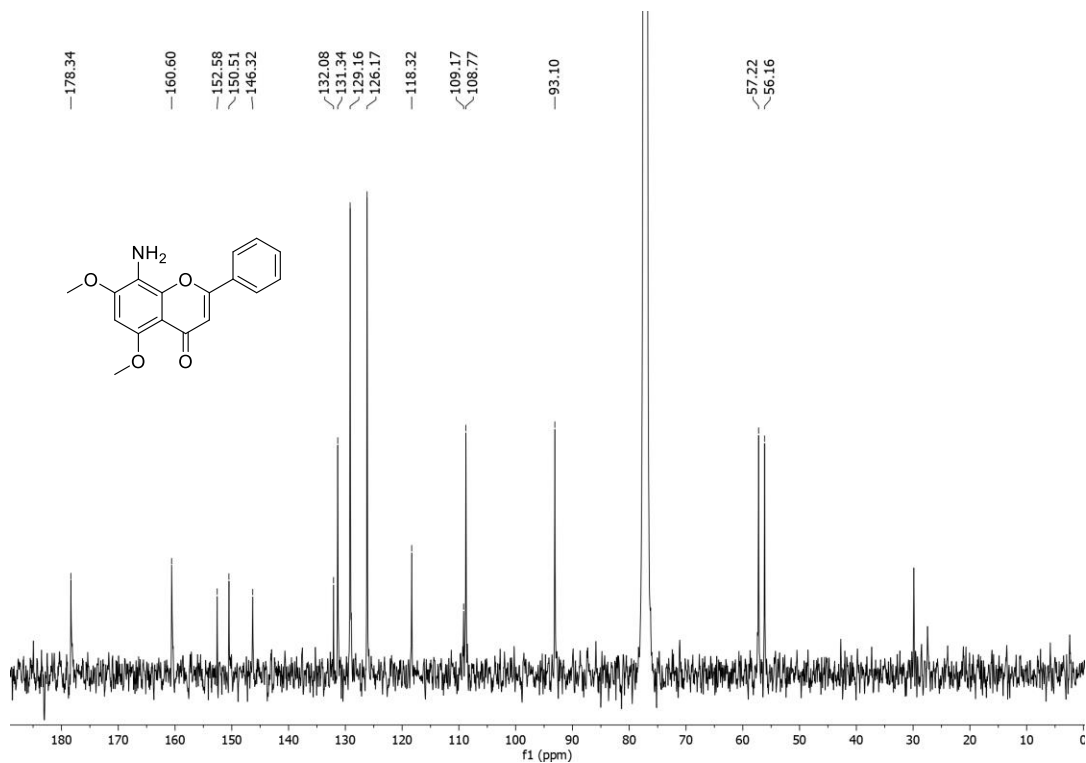




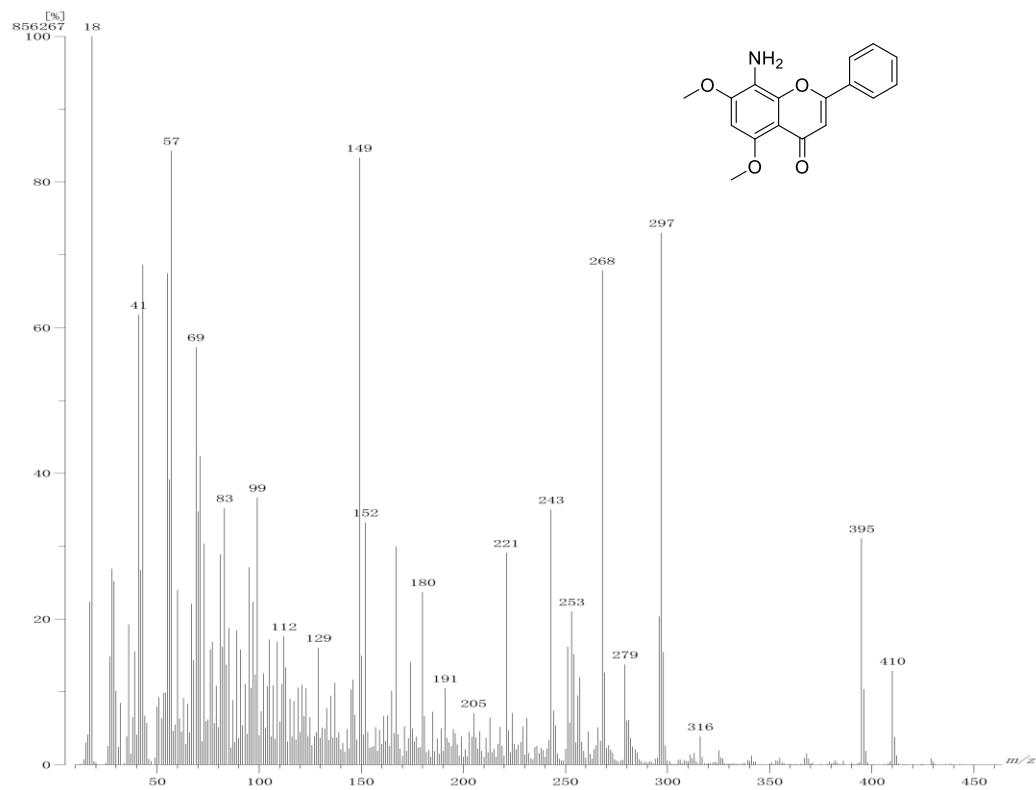
Espectro 15. Masas del compuesto 3b (DART+)



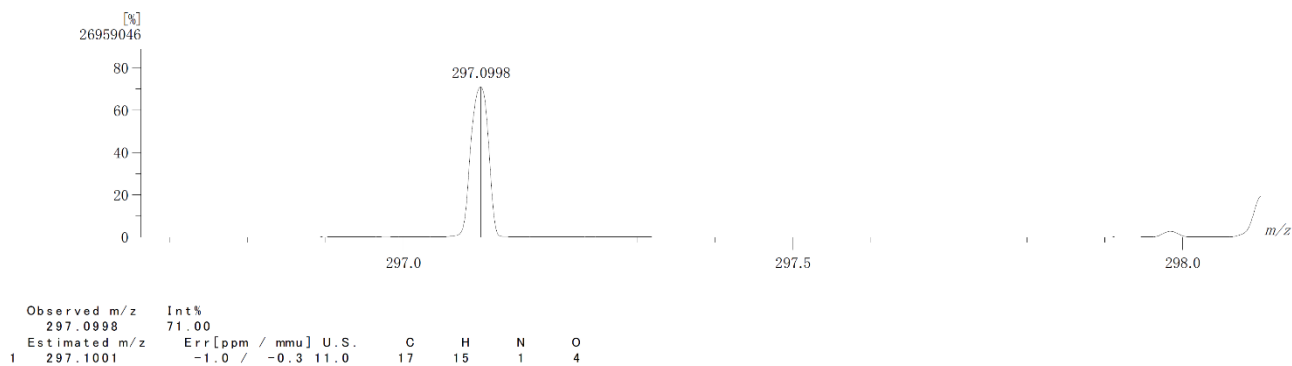
Espectro 16. RMN ¹H del compuesto 4 (500 MHz CDCl₃)



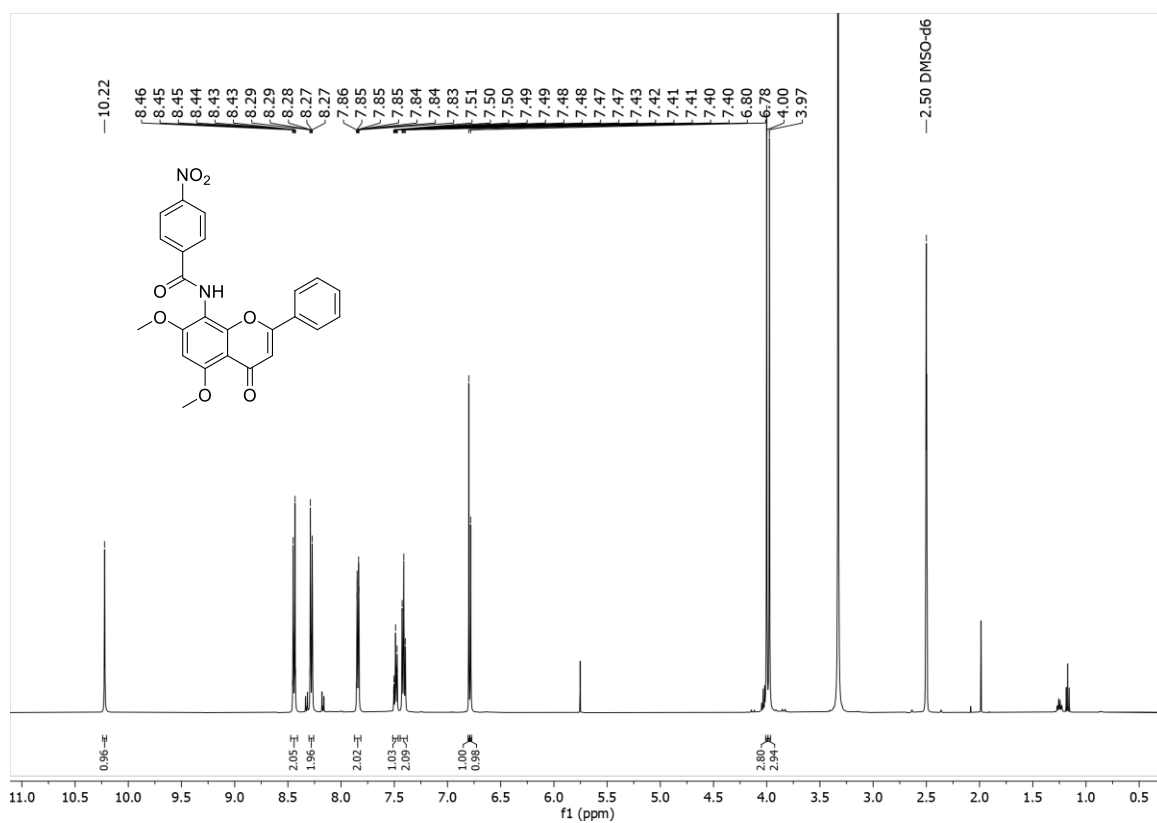
Espectro 17. RMN ^{13}C del compuesto 4 (125 MHz CDCl_3)



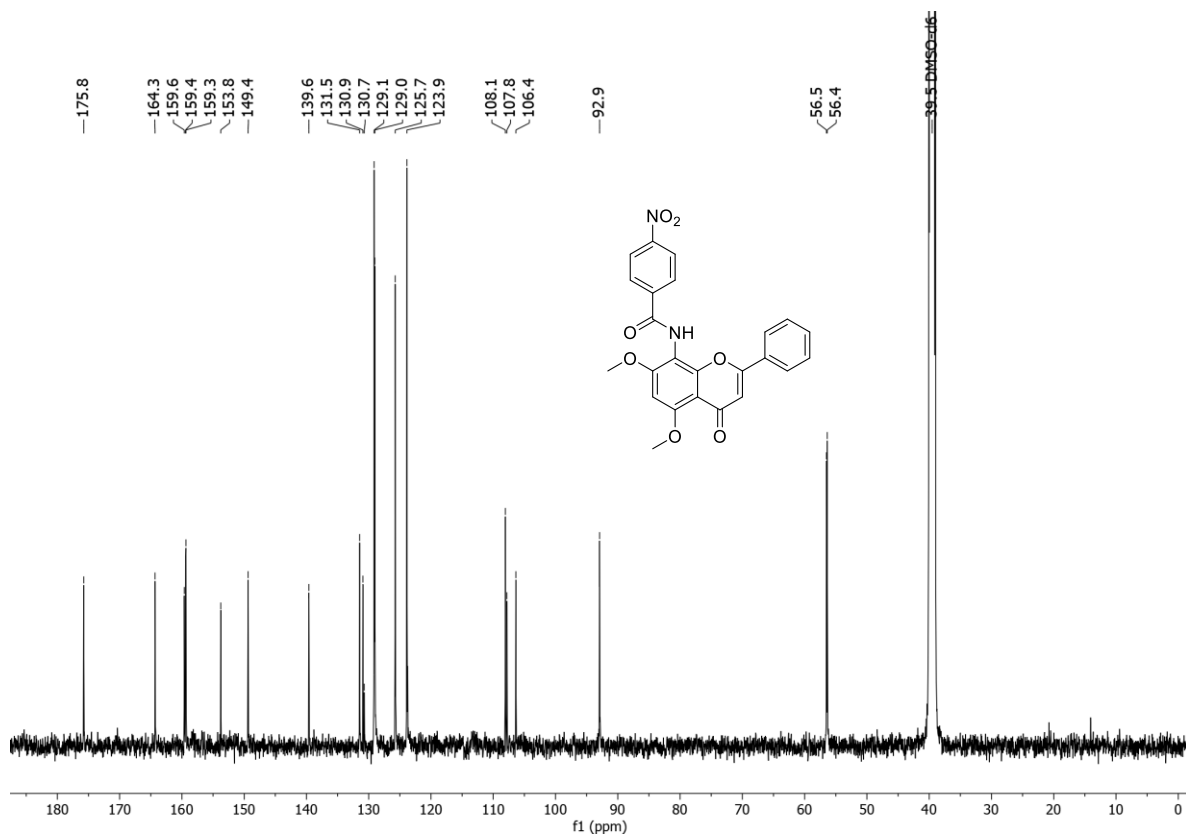
Espectro 18. Masas del compuesto 4 (IE+)



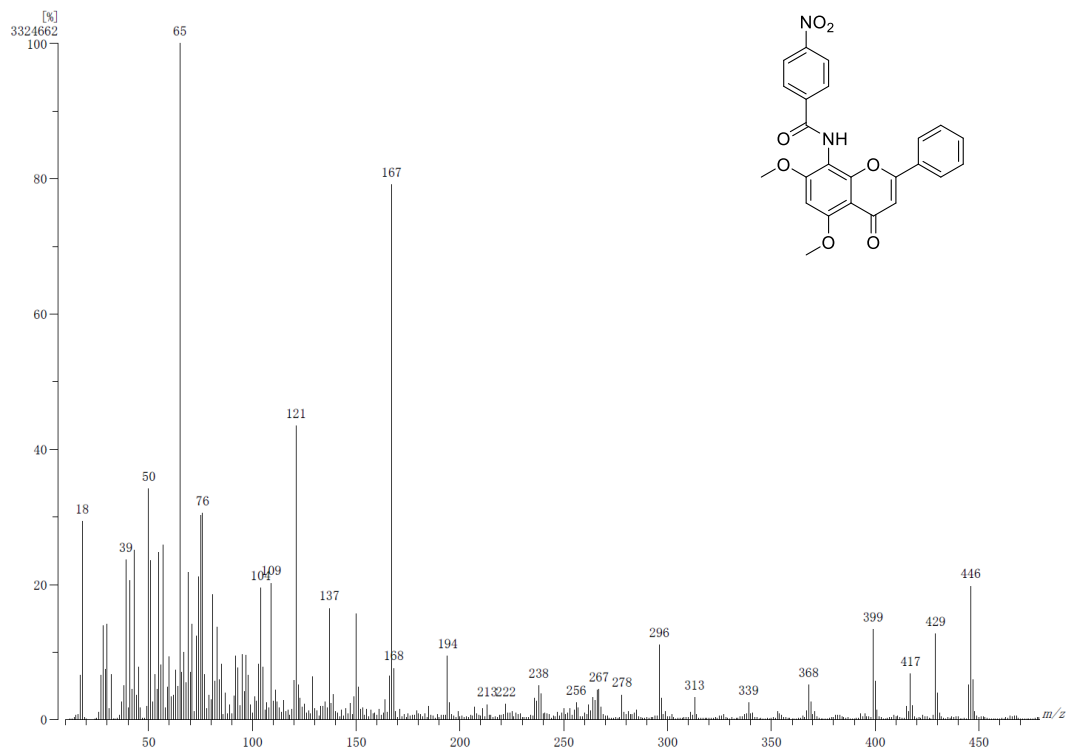
Espectro 19. Masas de alta resolución del compuesto **4** (IE+)



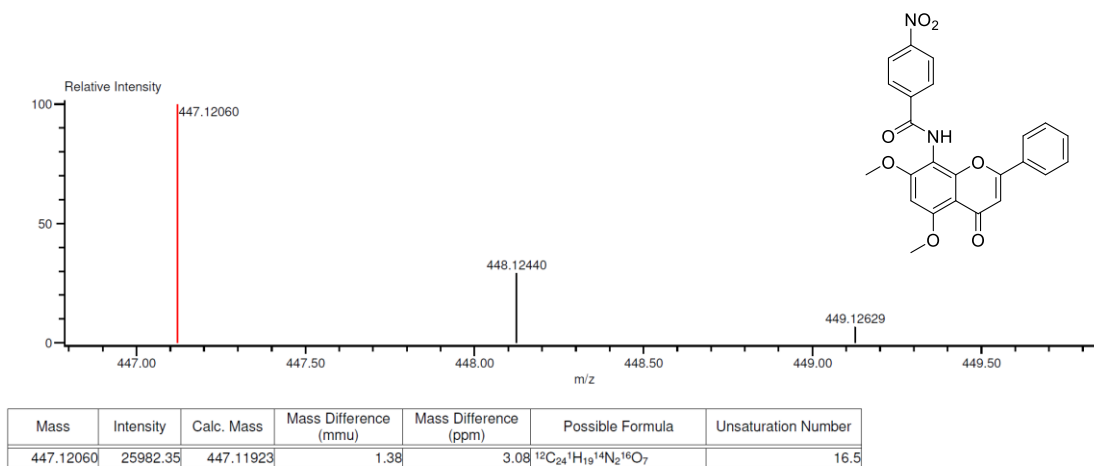
Espectro 20. RMN ^1H del compuesto **4a** (500 MHz DMSO- d_6)



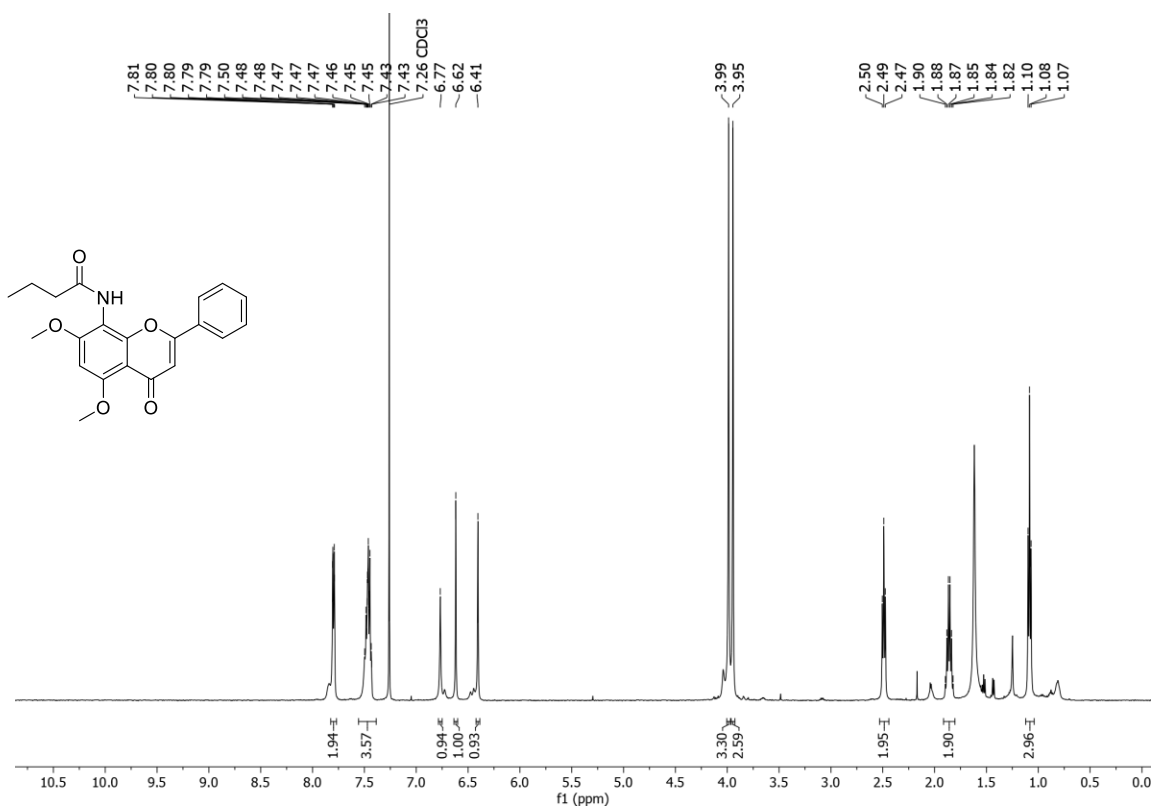
Espectro 21. RMN ¹³C del compuesto **4a** (125 MHz DMSO-*d*₆)



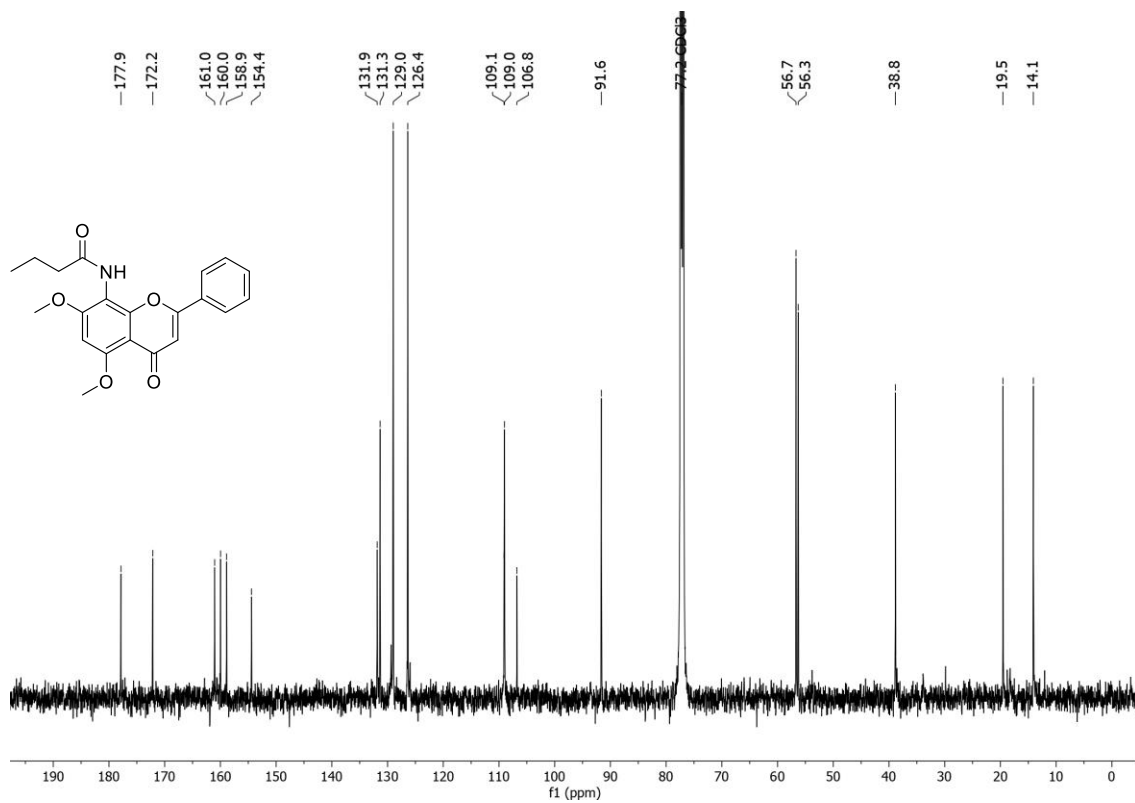
Espectro 22. Masas del compuesto **4a** (IE+)



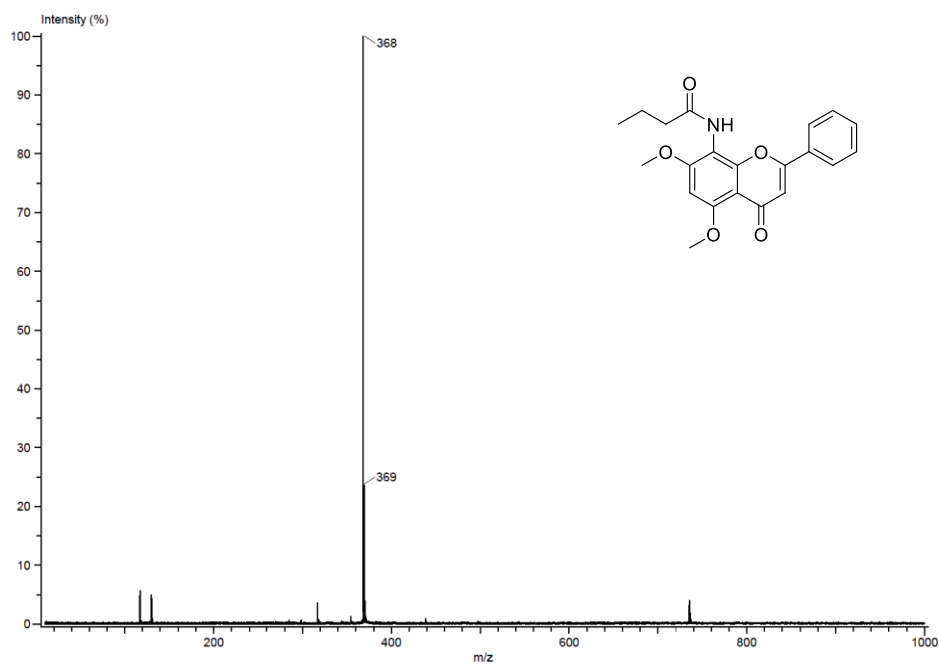
Espectro 23. Masas de alta resolución del compuesto **4a** (ESI+)



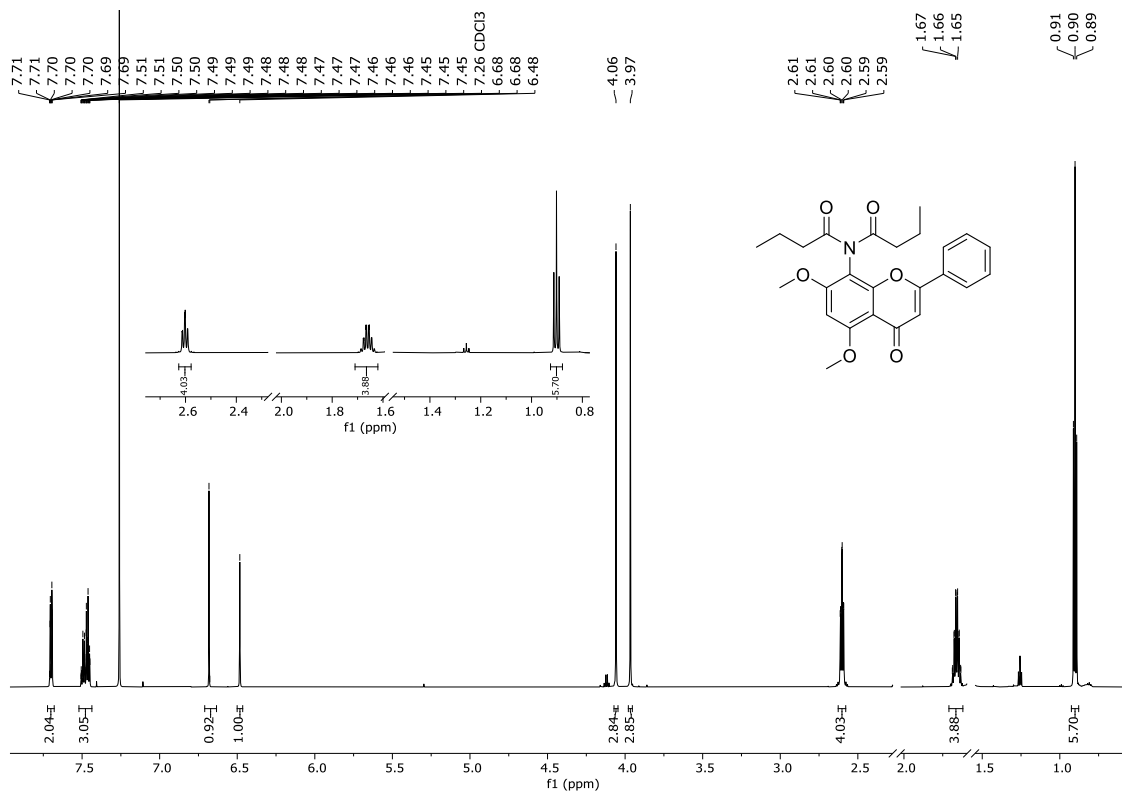
Espectro 24. RMN ^1H del compuesto **4b** (500 MHz CDCl₃)



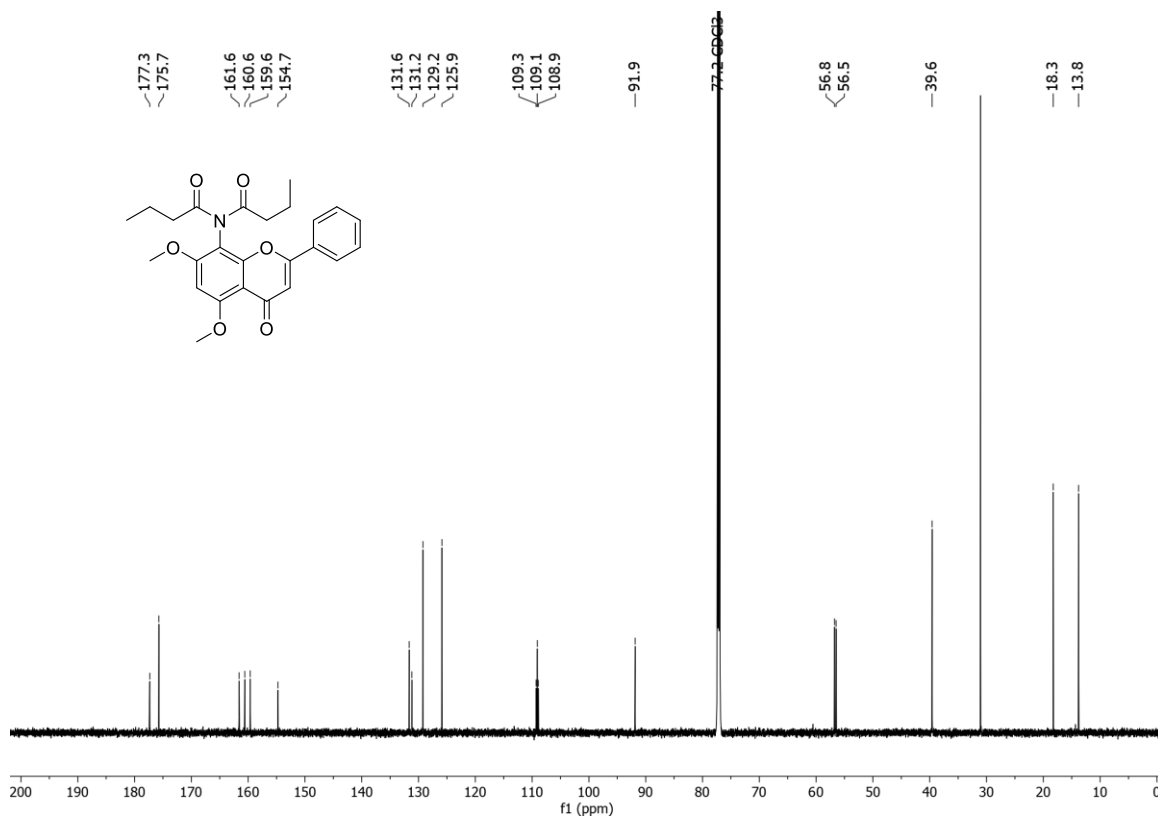
Espectro 25. RMN ¹³C del compuesto **4b** (125 MHz CDCl₃)



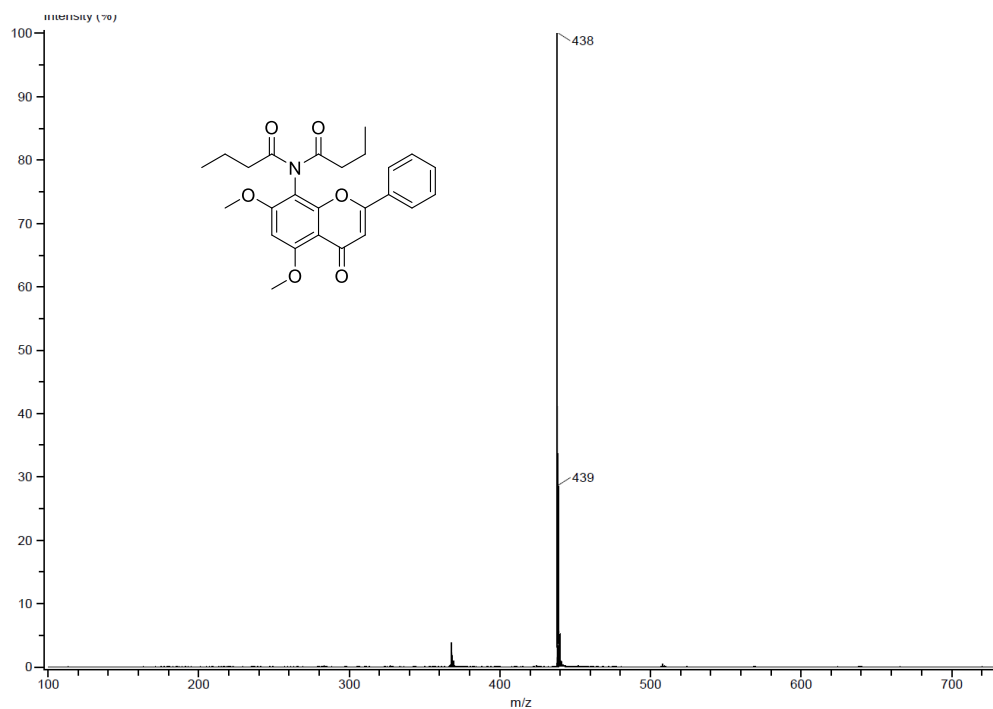
Espectro 26. Masas del compuesto **4b** (DART+)



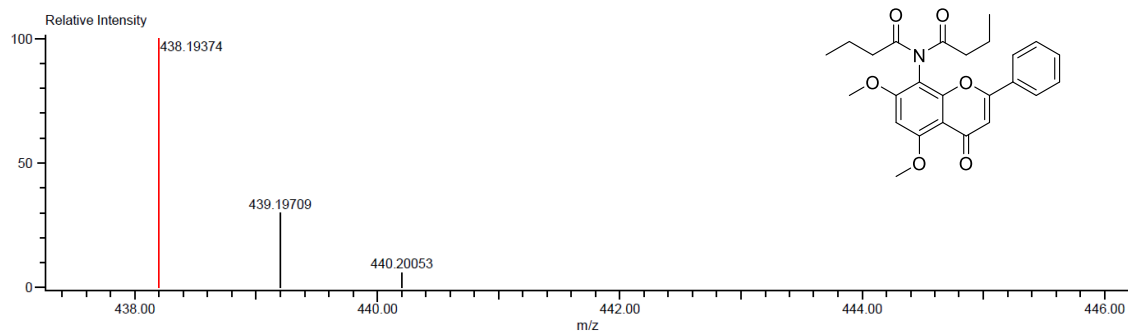
Espectro 27. RMN ^1H del compuesto **4c** (700 MHz CDCl_3)



Espectro 28. RMN ^{13}C del compuesto **4c** (175 MHz CDCl_3)

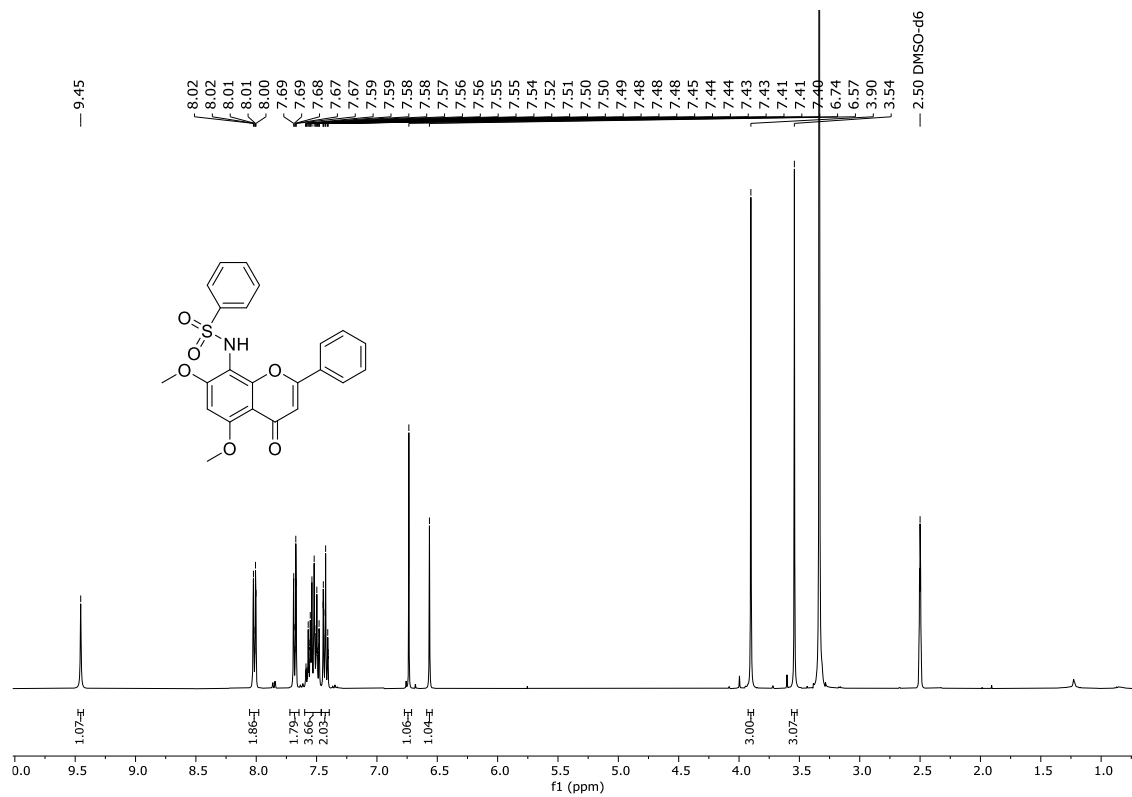


Espectro 29. Masas del compuesto **4c** (DART+)

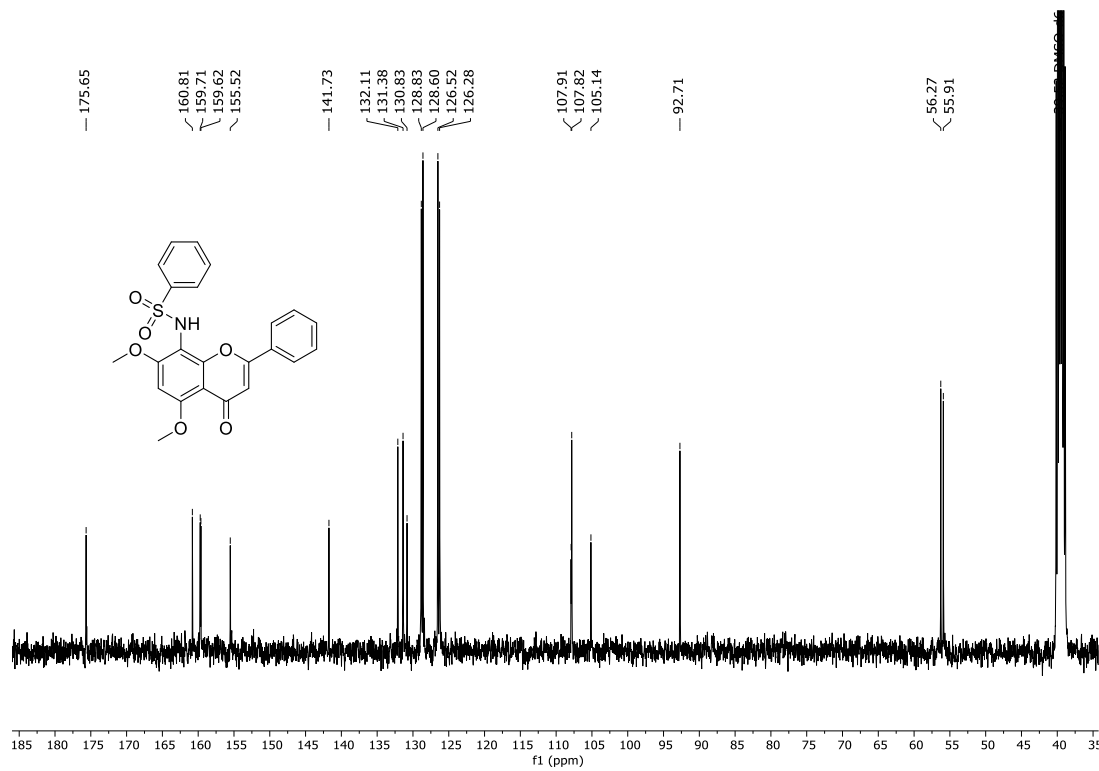


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
438.19374	247755.74	438.19166	2.08	4.75	$^{12}\text{C}_{25}^{1}\text{H}_{28}^{14}\text{N}_1^{16}\text{O}_6$	12.5

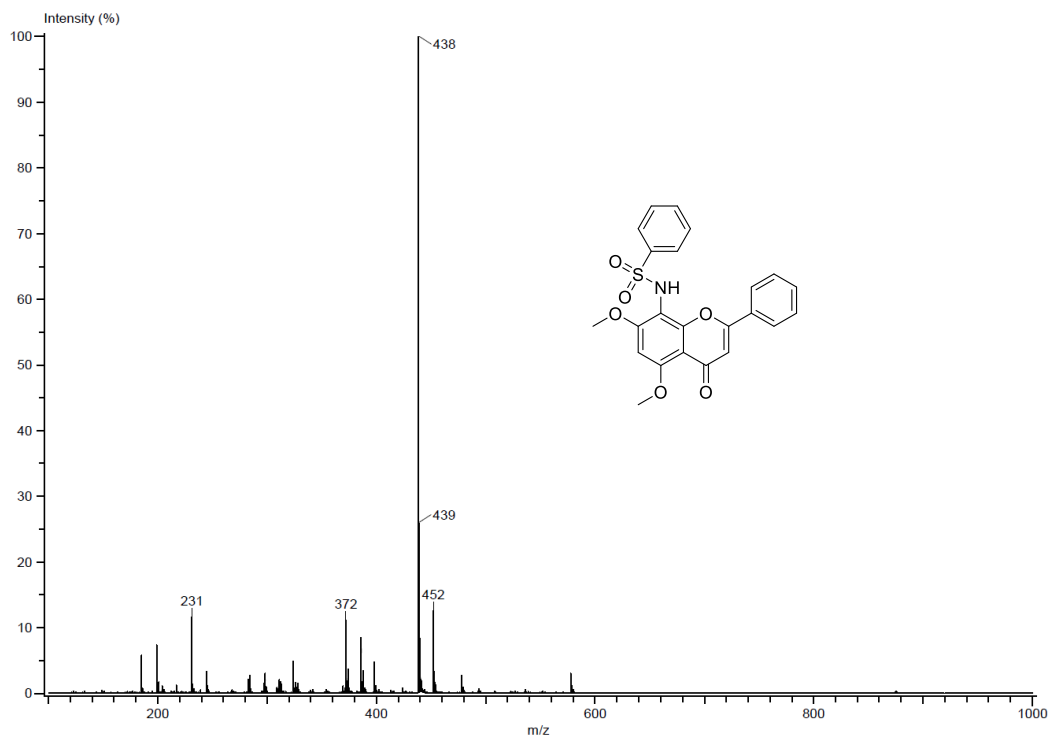
Espectro 30. Masas de alta resolución del compuesto **4c** (ESI+)



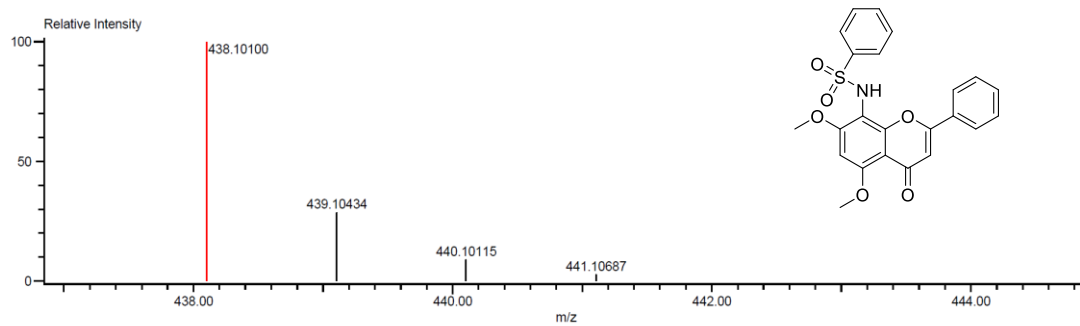
Espectro 31. RMN ¹H del compuesto 4d (400 MHz DMSO-d₆)



Espectro 32. RMN ¹³C del compuesto 4d (100 MHz DMSO-d₆)

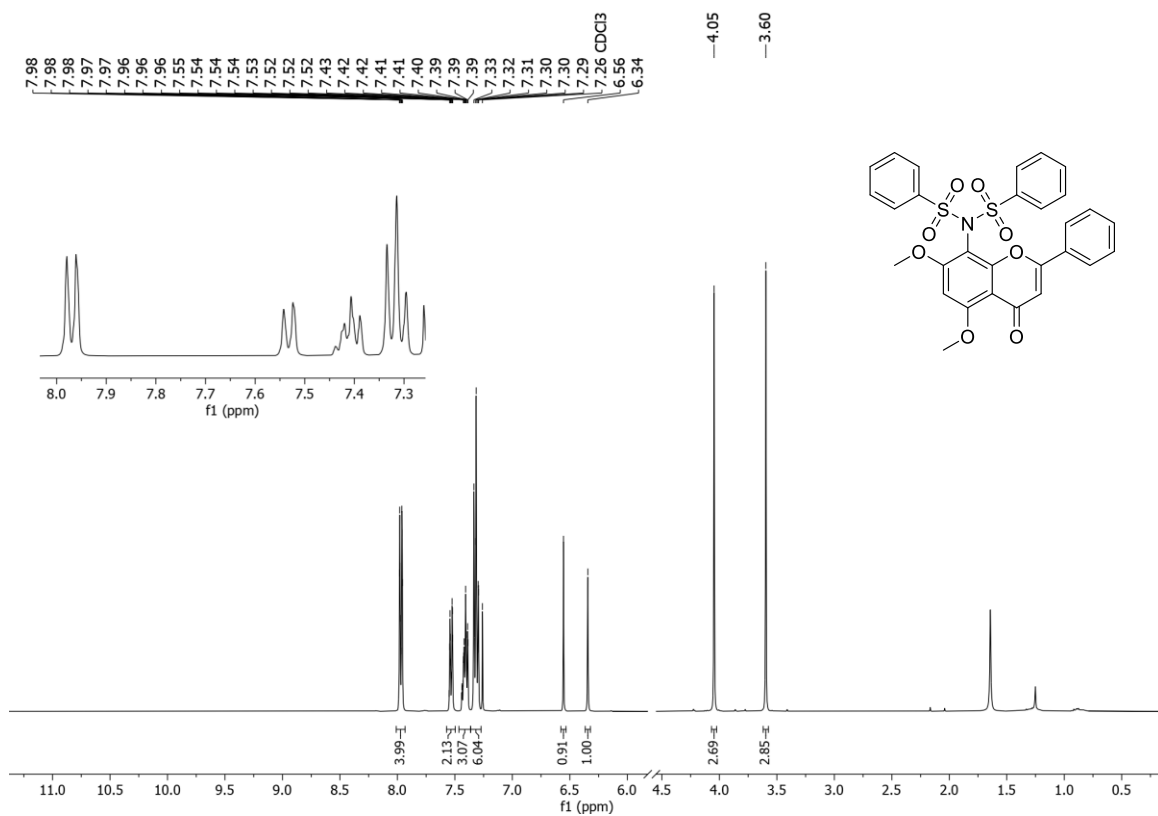


Espectro 33. Masas del compuesto **4d** (DART+)

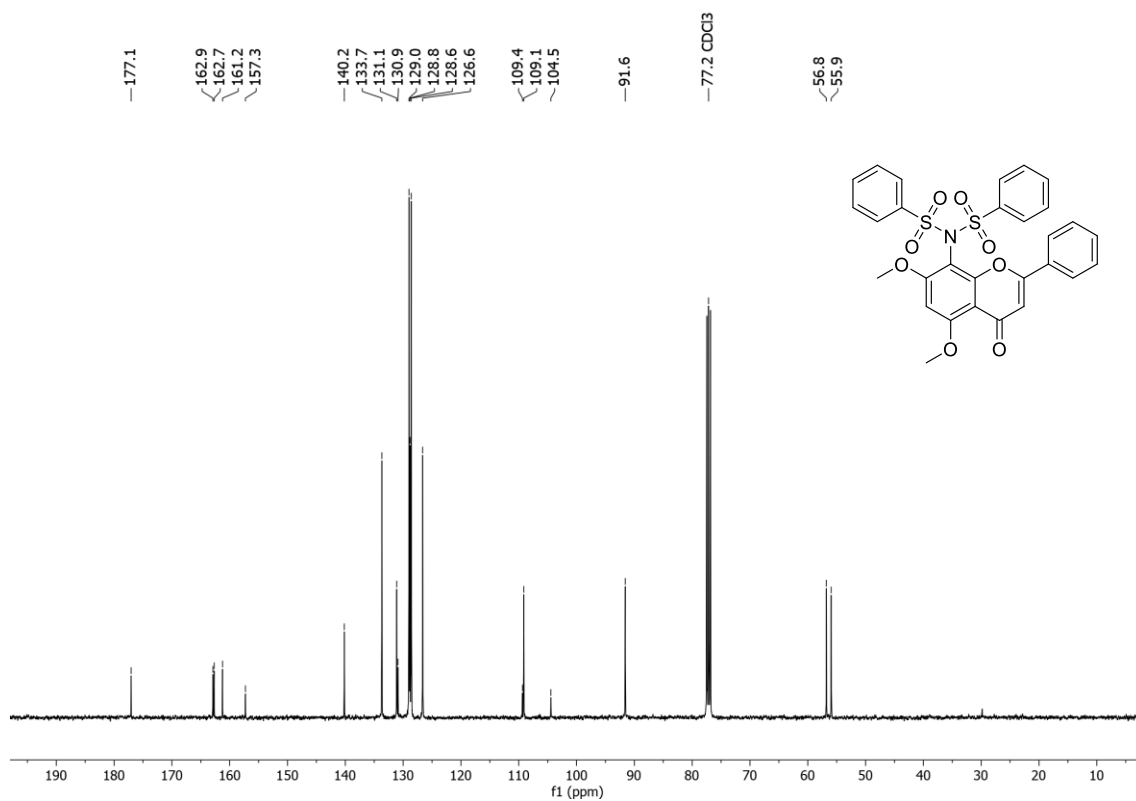


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
438.10100	251835.28	438.10113	-0.13	-0.30	$^{12}\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_1\text{O}_6\text{S}_1$	15.5

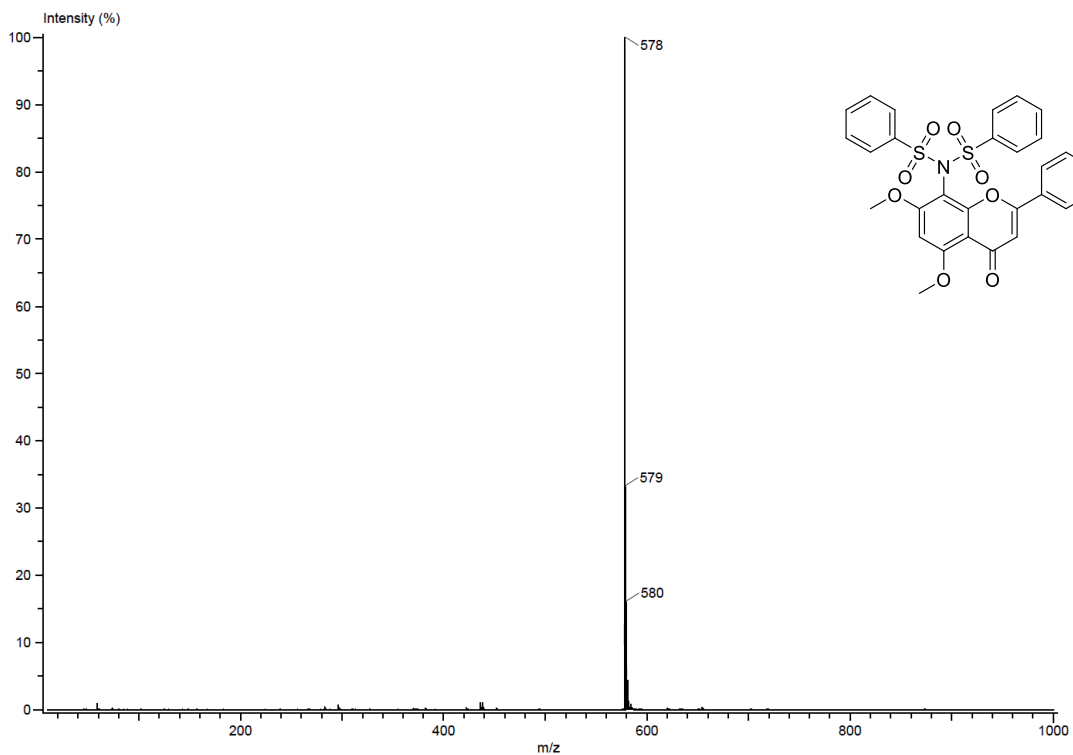
Espectro 34. Masas de alta resolución del compuesto **4d** (ESI+)



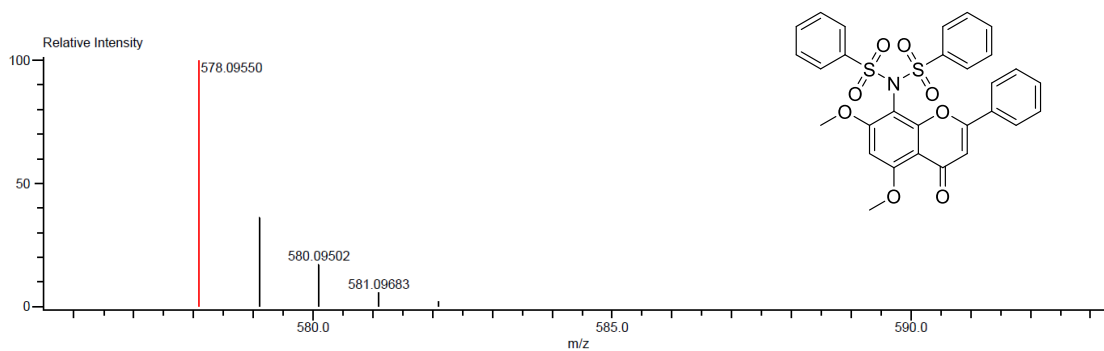
Espectro 35. RMN ¹H del compuesto **4g** (400 MHz CDCl₃)



Espectro 36. RMN ¹³C del compuesto **4g** (100 MHz CDCl₃)

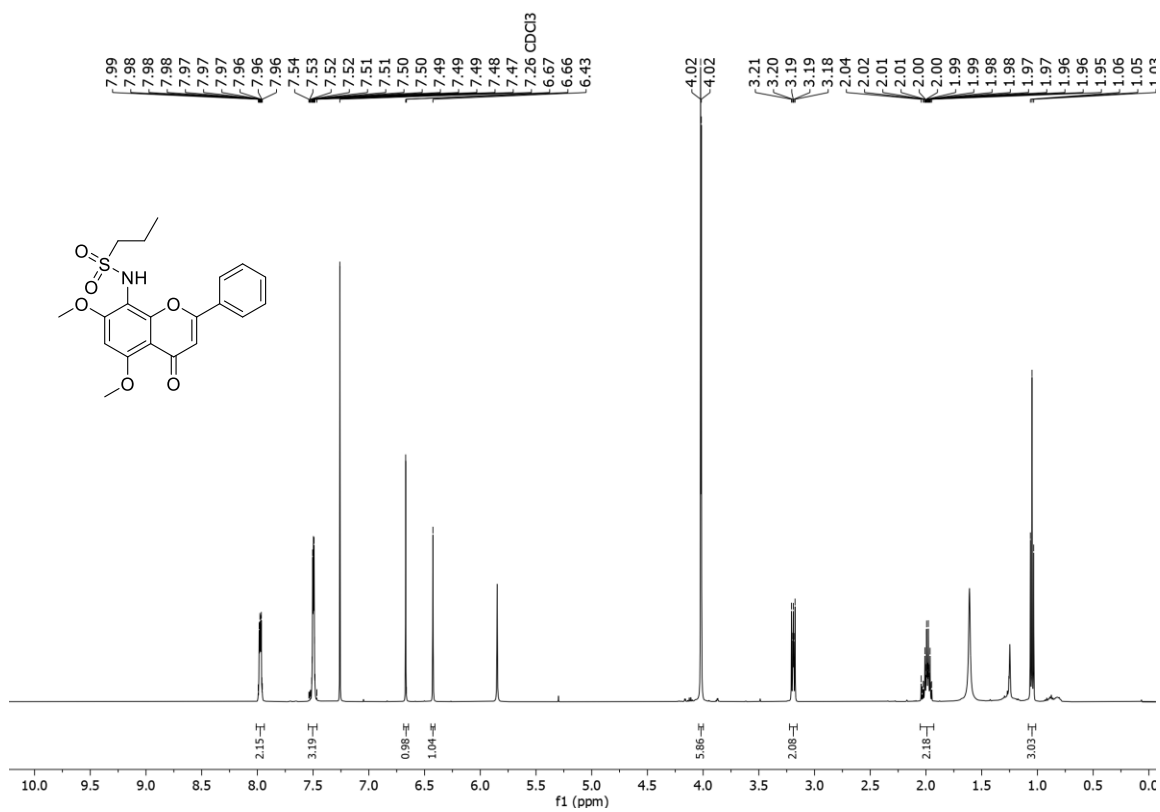


Espectro 37. Masas del compuesto **4g** (DART+)

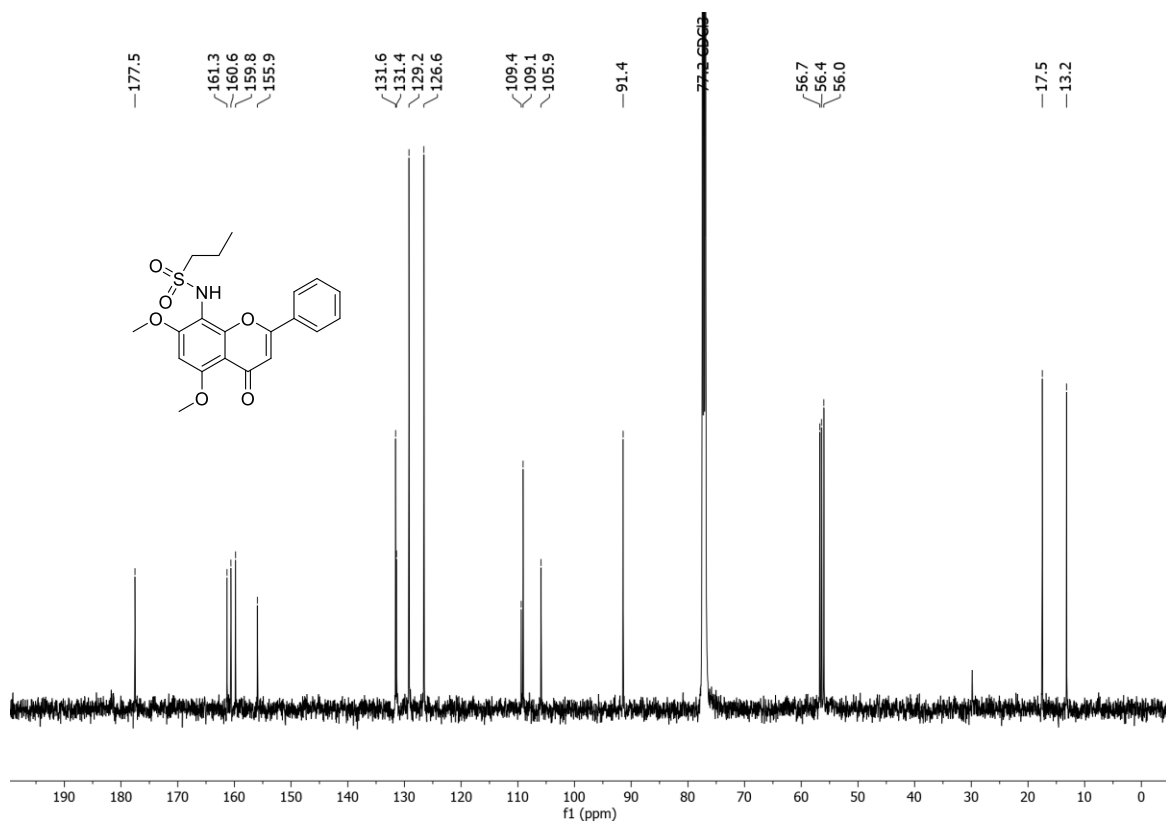


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
578.09550	1027089.05	578.09433	1.17	2.02	$^{12}\text{C}_{29}^{1}\text{H}_{24}^{14}\text{N}_1^{16}\text{O}_8^{32}\text{S}_2$	20.5

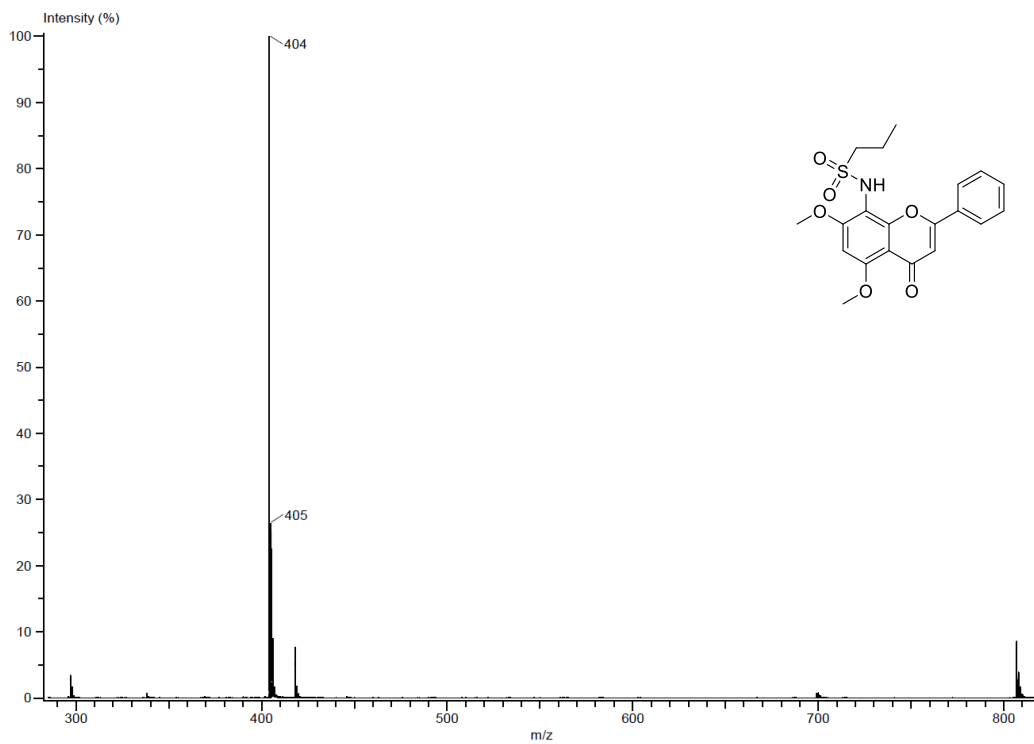
Espectro 38. Masas de alta resolución del compuesto **4g** (ESI+)



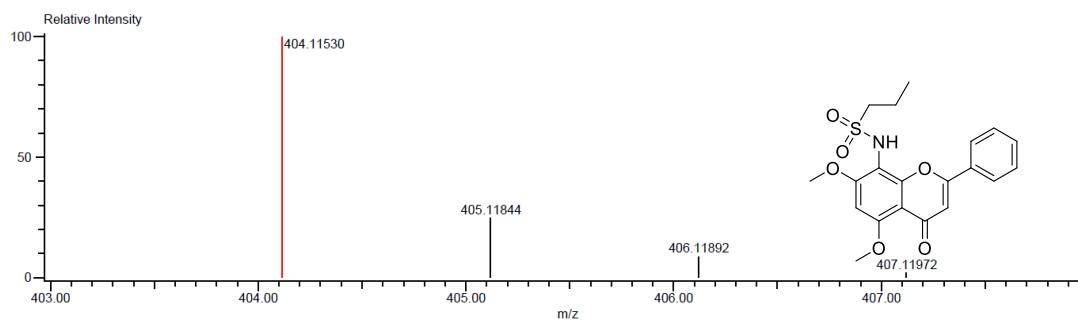
Espectro 39. RMN ¹H del compuesto **4e** (500 MHz CDCl₃)



Espectro 40. RMN ¹³C del compuesto **4e** (125 MHz CDCl₃)

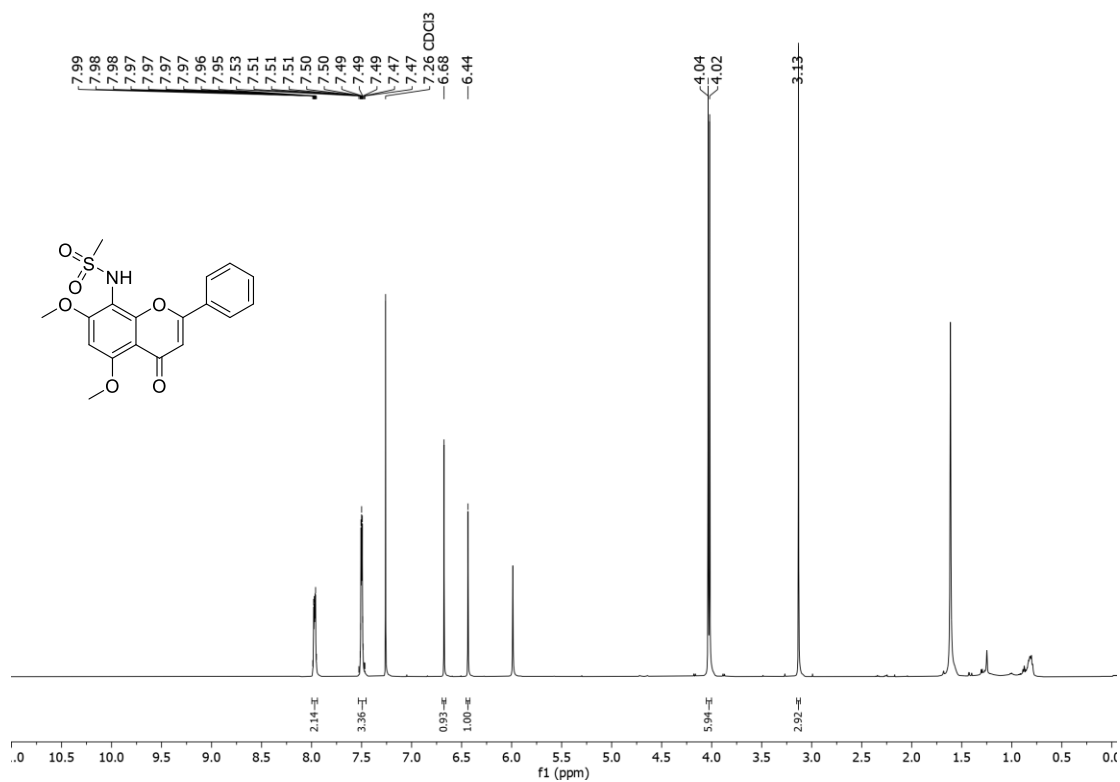


Espectro 41. Masas de baja resolución del compuesto **4e** (DART+)

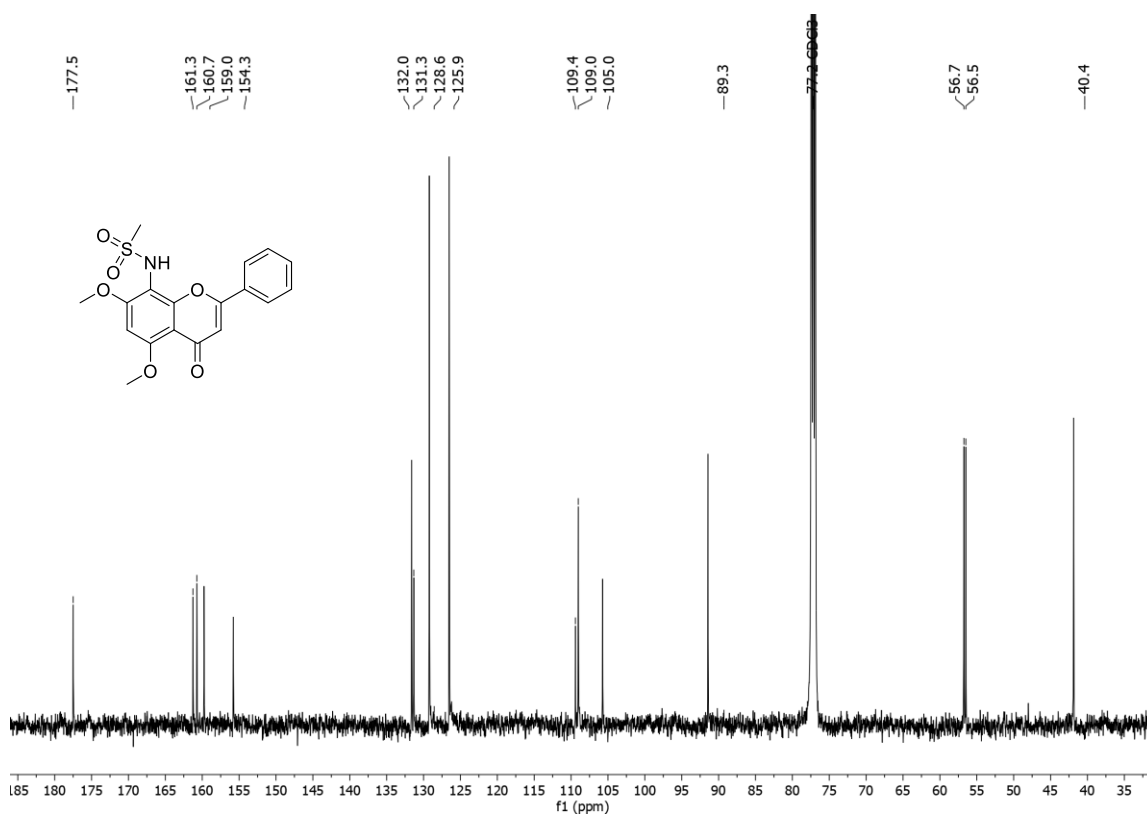


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
404.11530	364053.96	404.11678	-1.48	-3.67	$^{12}\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_1\text{O}_6\text{S}_1$	11.5

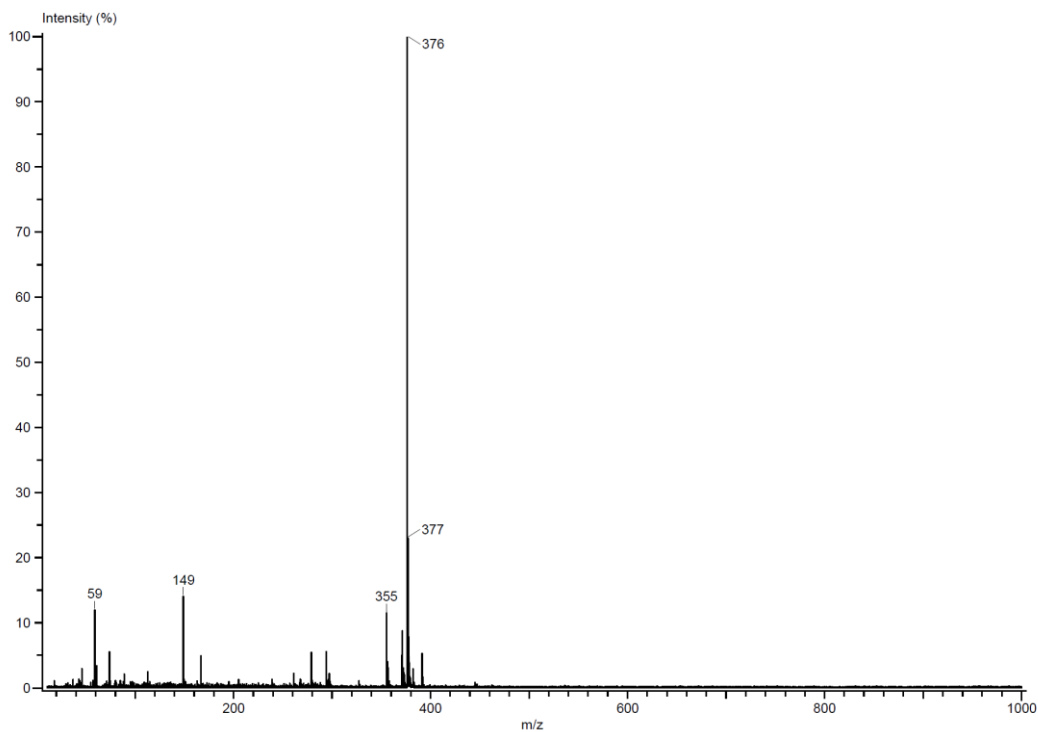
Espectro 42. Masas de alta resolución del compuesto **4e** (ESI+)



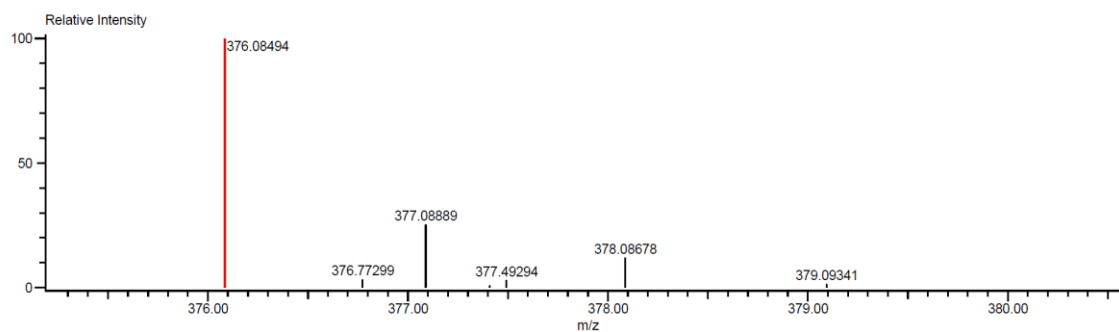
Espectro 43. RMN ¹H del compuesto 4f (500 MHz CDCl₃)



Espectro 44. RMN ¹³C del compuesto 4f (125 MHz CDCl₃)

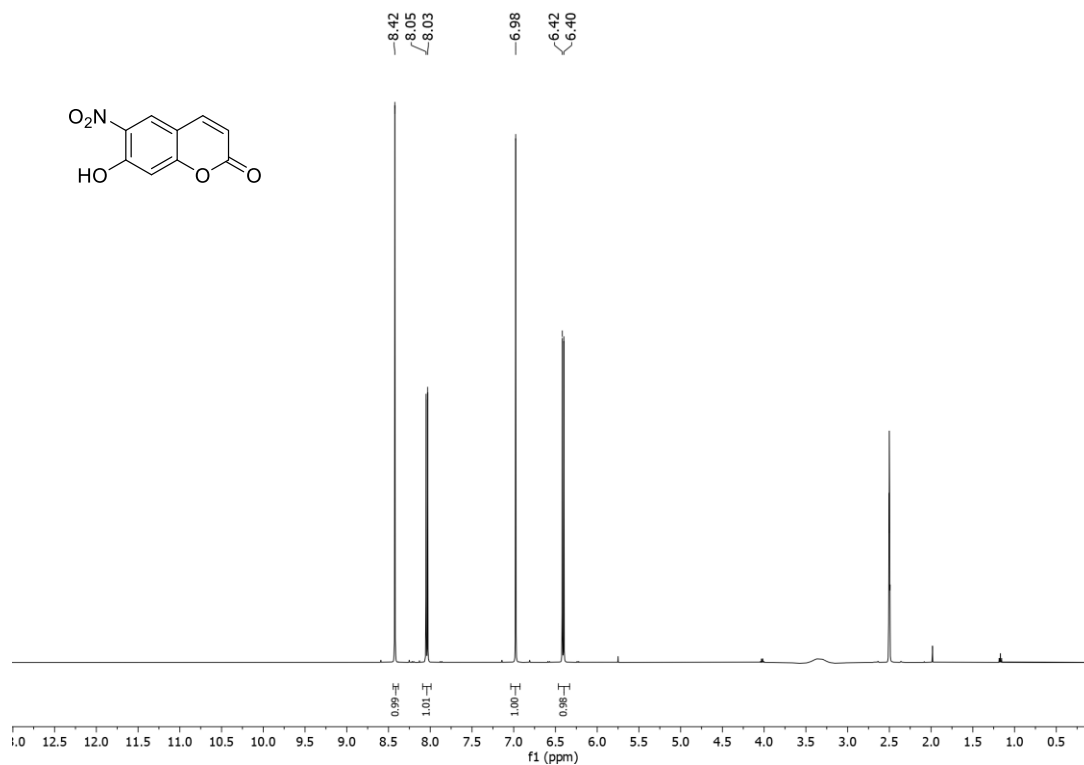


Espectro 45. Masas del compuesto **4f** (DART+)

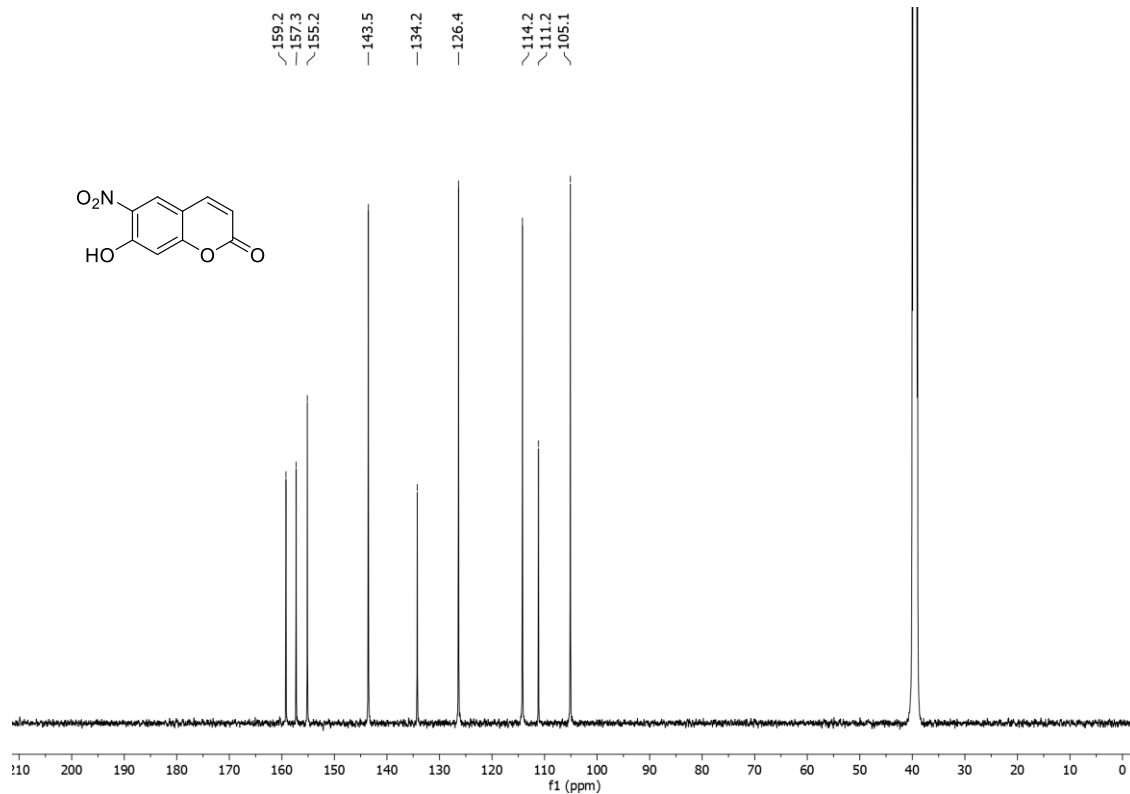


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
376.08494	72197.46	376.08548	-0.54	-1.44	$^{12}\text{C}_{18}^{1}\text{H}_{18}^{14}\text{N}_1^{16}\text{O}_6^{32}\text{S}_1$	11.5

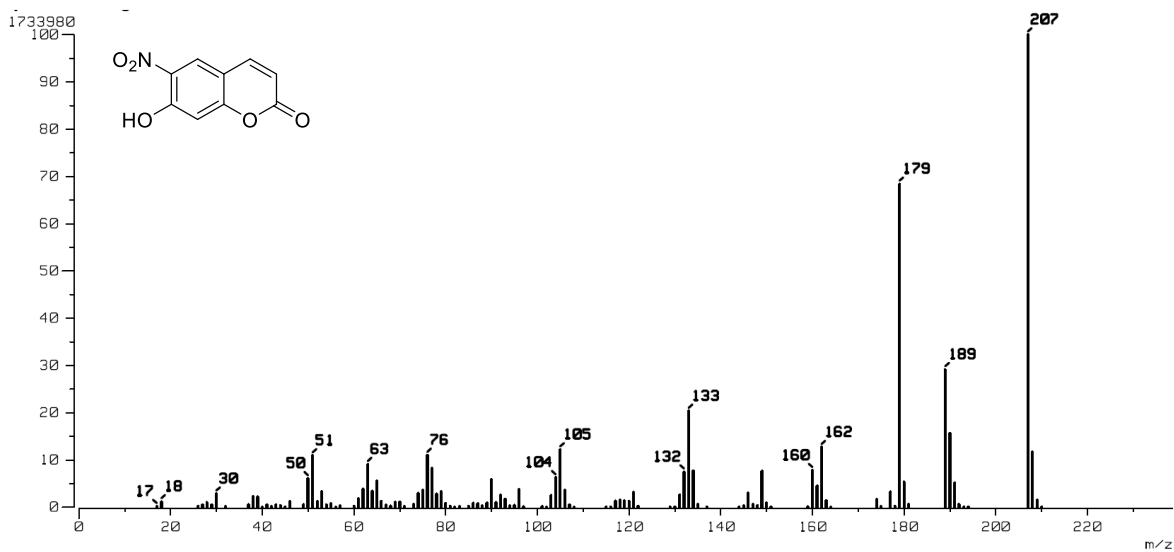
Espectro 46. Masas de alta resolución del compuesto **4f** (ESI+)



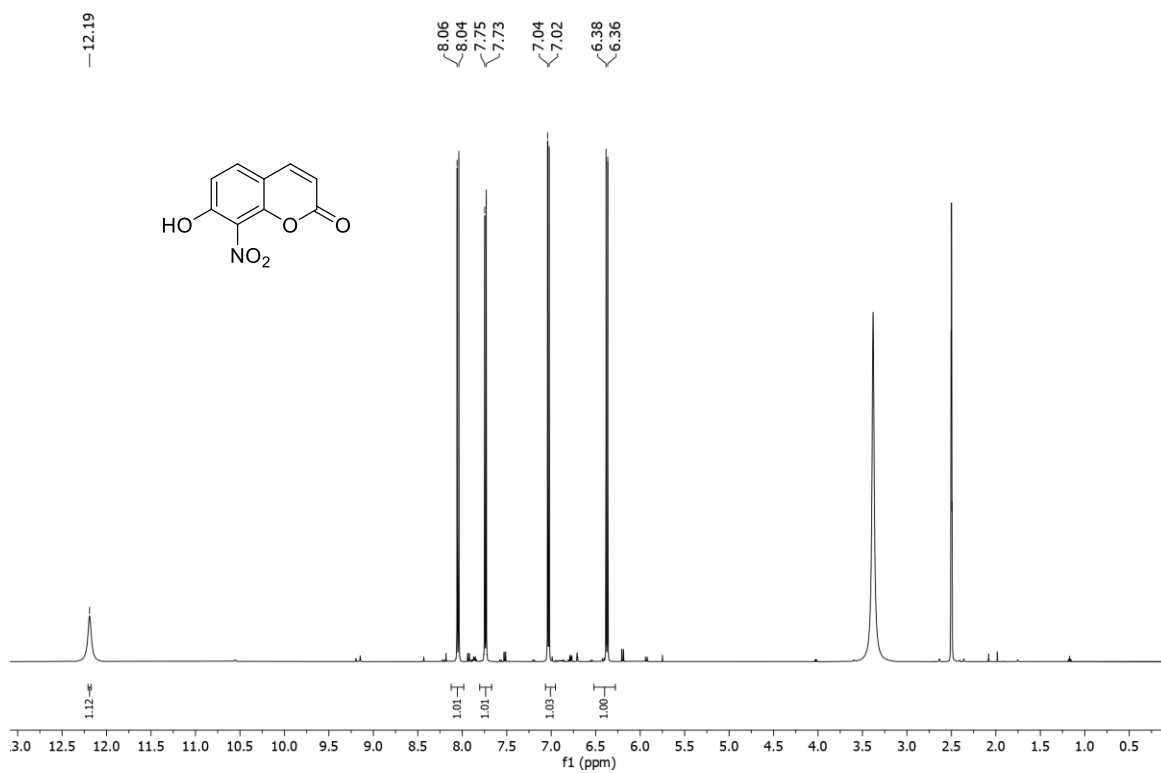
Espectro 47. RMN ¹H del compuesto **5a** (500 MHz DMSO-*d*₆)



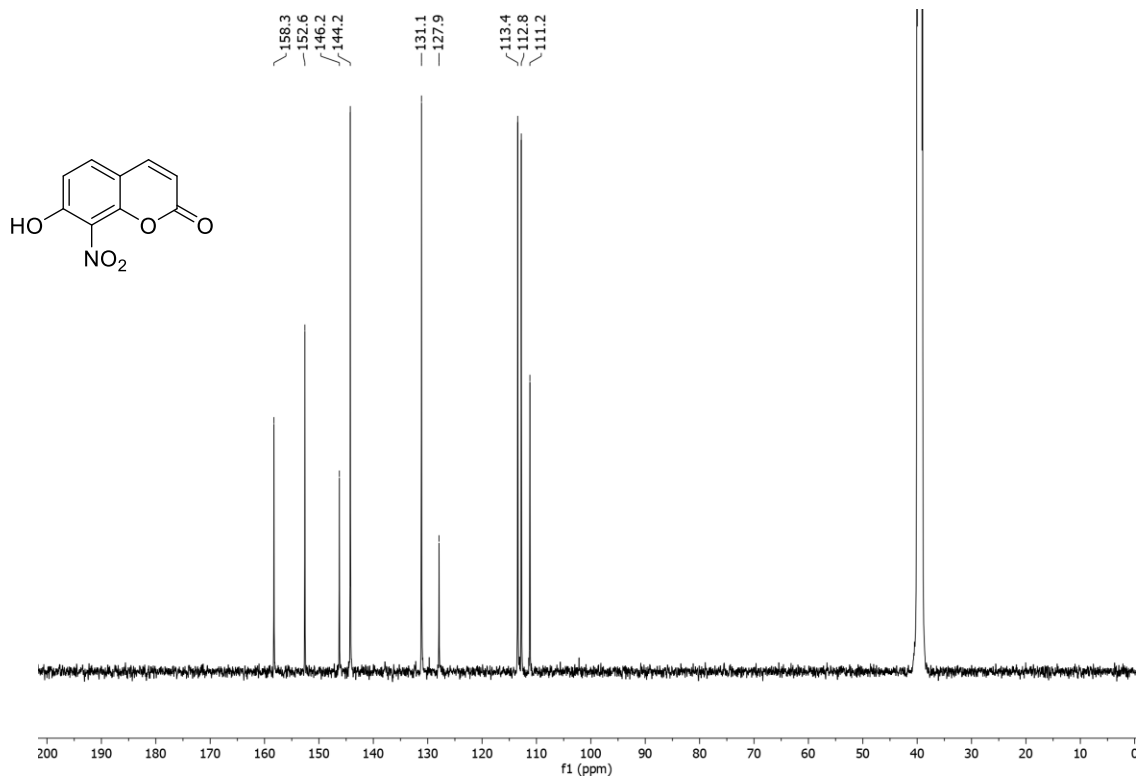
Espectro 48. RMN ¹³C del compuesto **5a** (125 MHz DMSO-*d*₆)



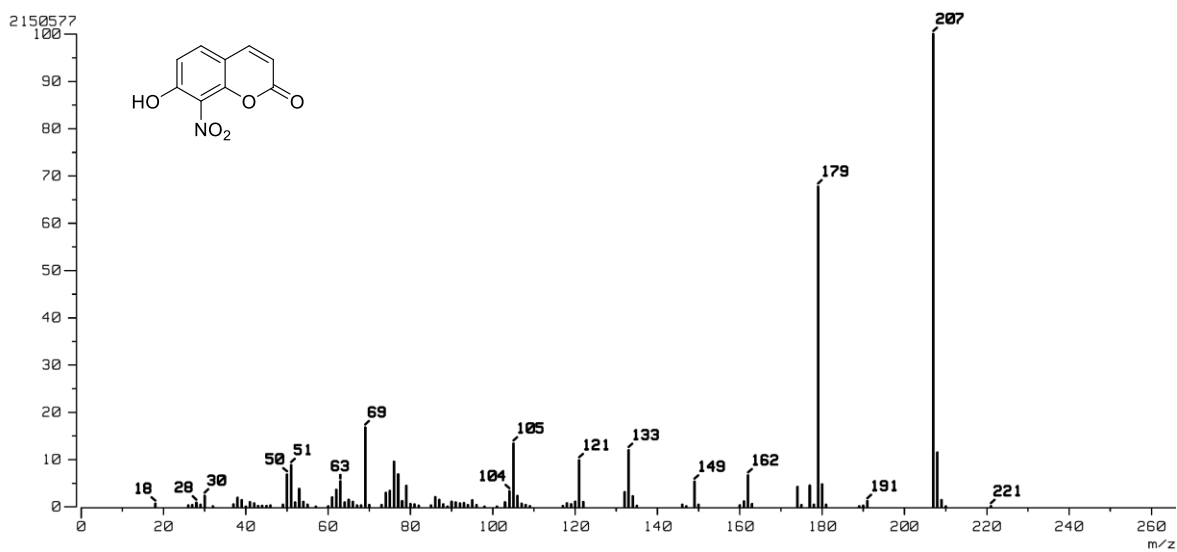
Espectro 49. Masas del compuesto 5a (IE+)



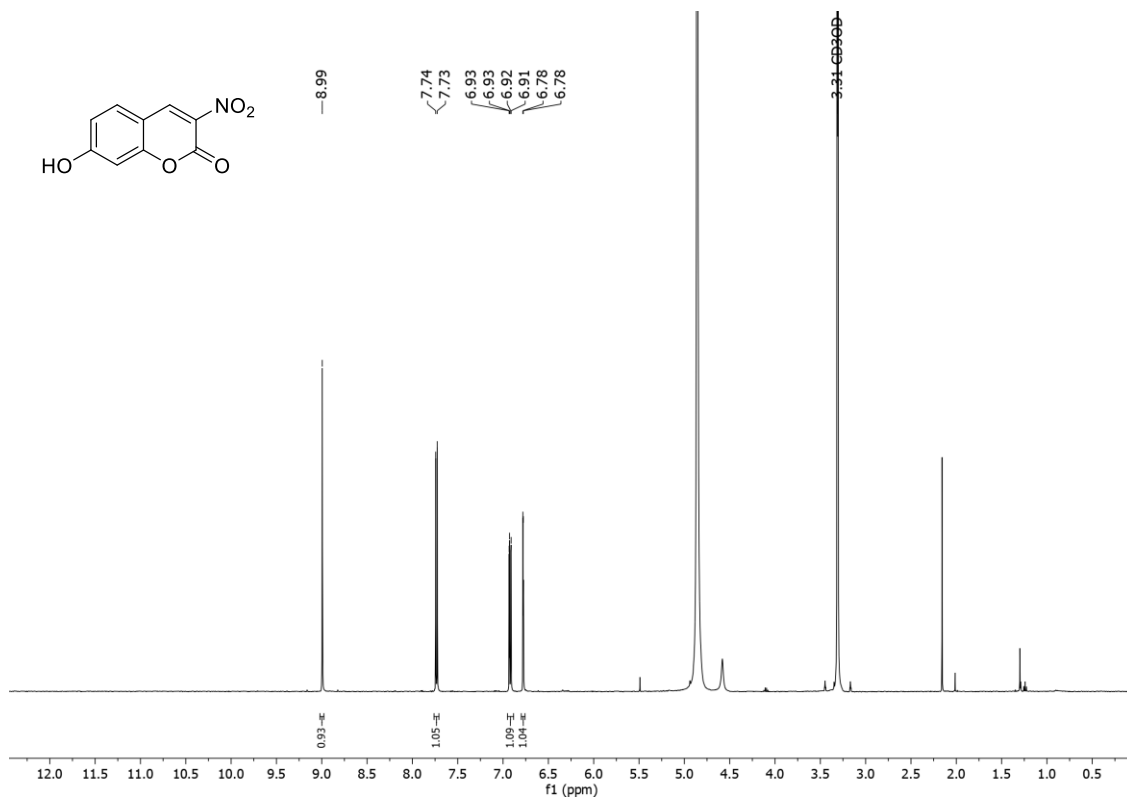
Espectro 50. RMN ¹H del compuesto 5b (500 MHz DMSO-*d*₆)



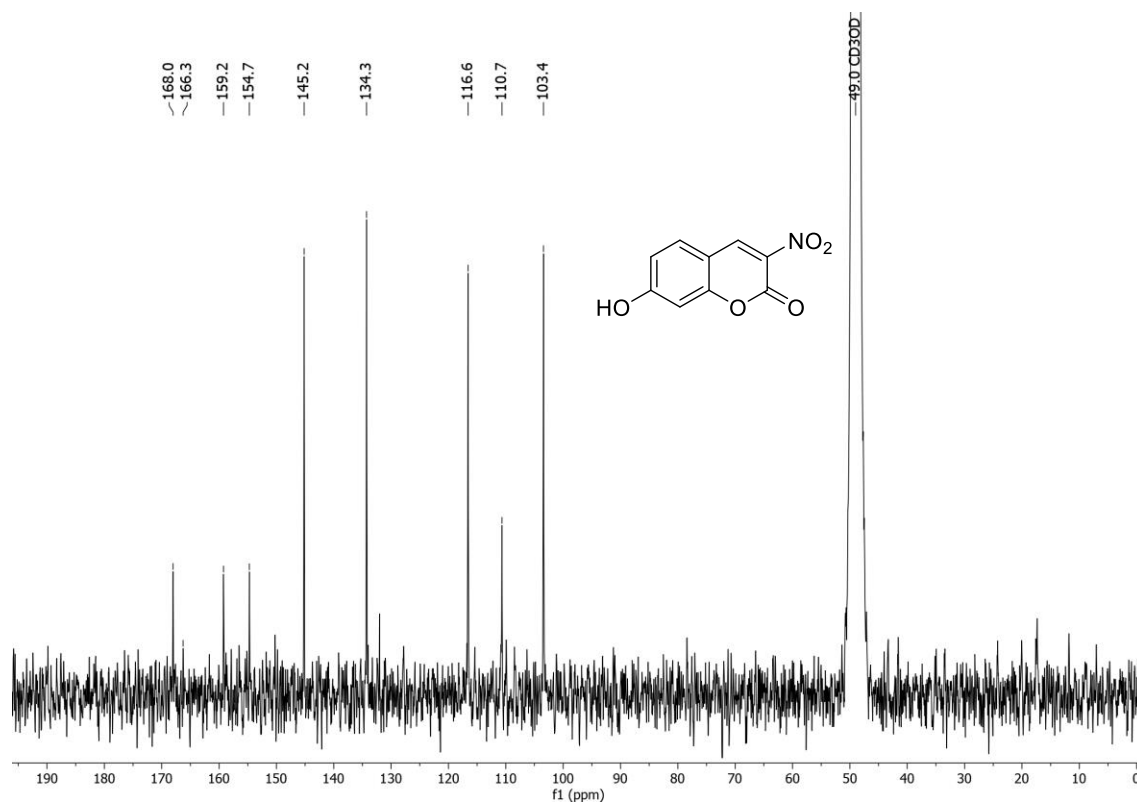
Espectro 51. RMN ^{13}C del compuesto **5b** (125 MHz DMSO- d_6)



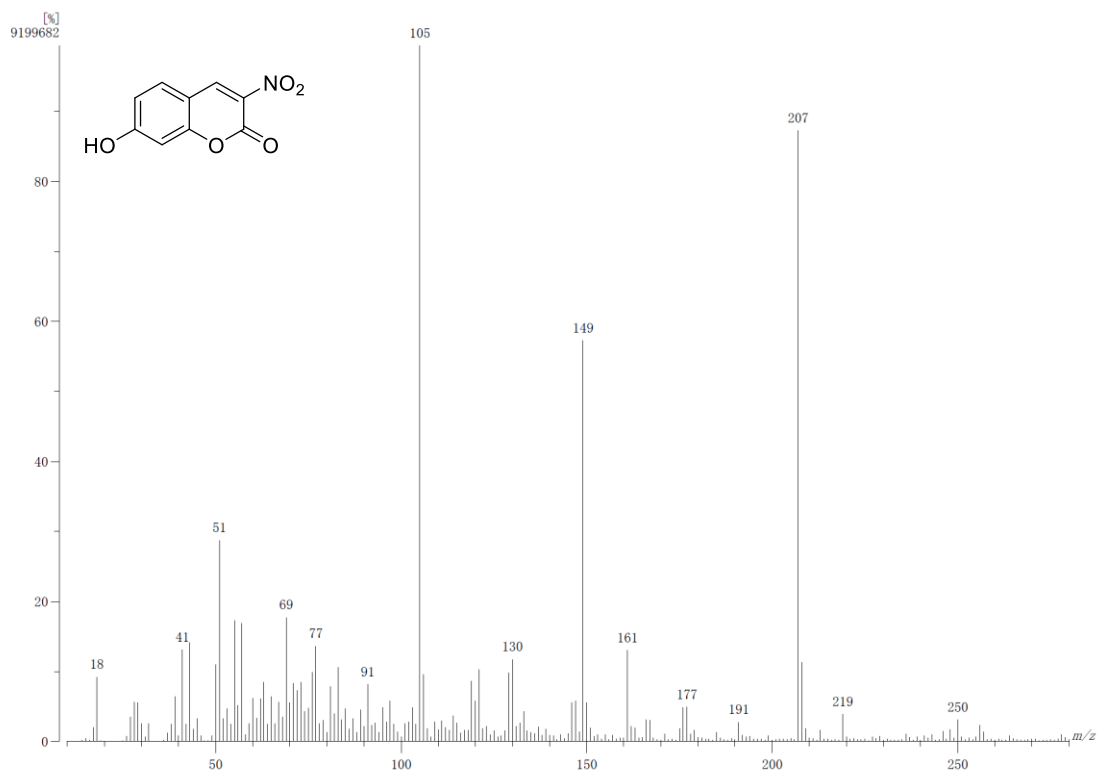
Espectro 52. Masas del compuesto **5b** (IE+)



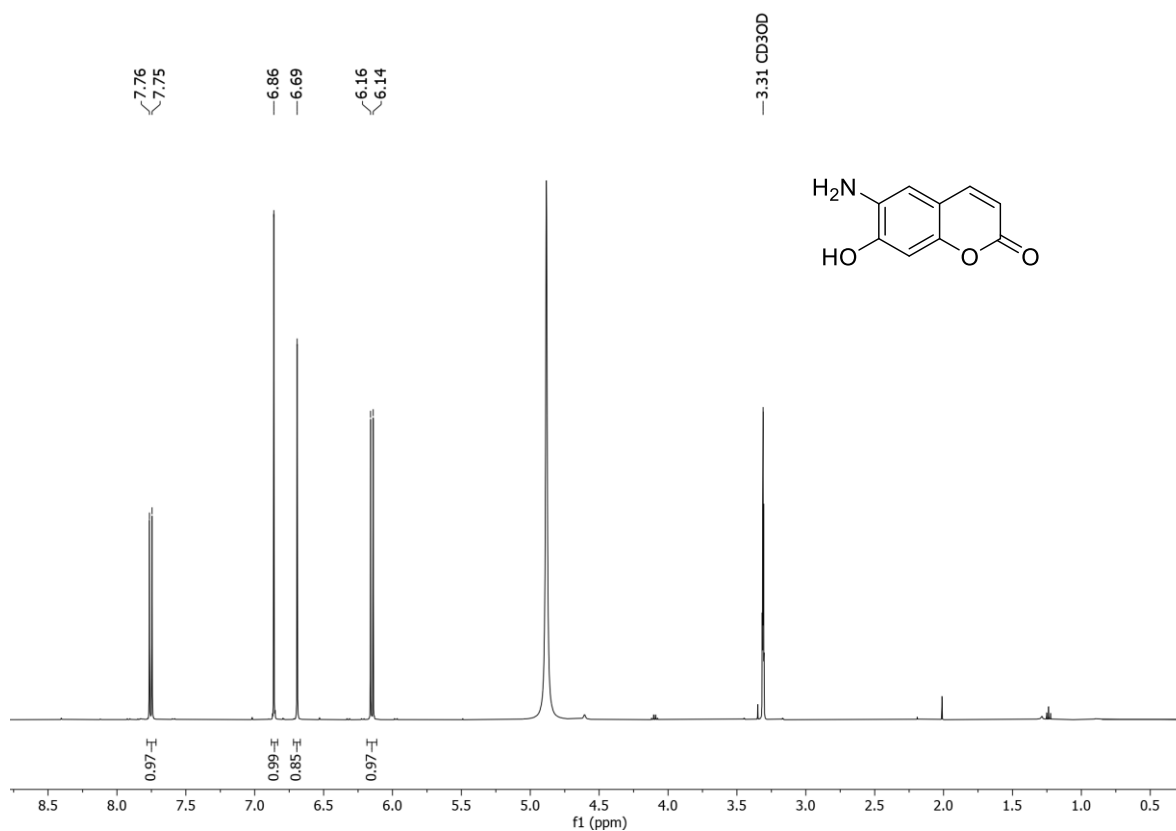
Espectro 53. RMN ¹H del compuesto **5c** (500 MHz MeOH-*d*₄)



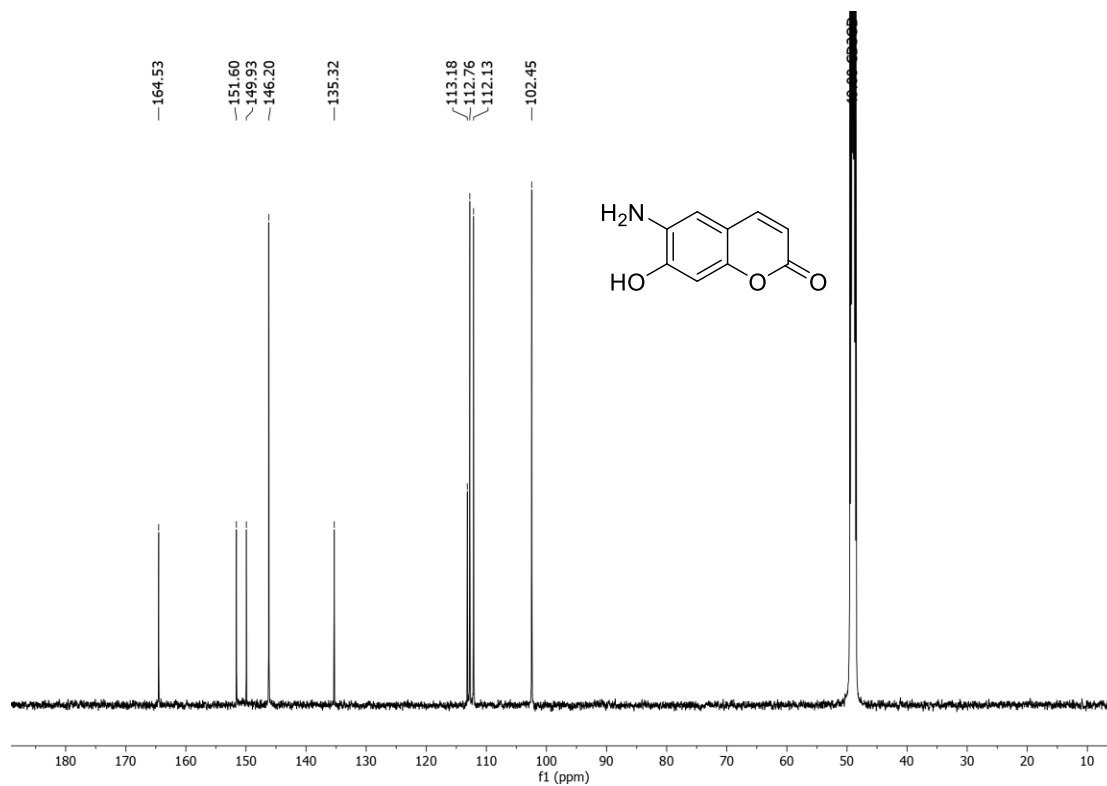
Espectro 54. RMN ¹³C del compuesto **5c** (125 MHz MeOH-*d*₄)



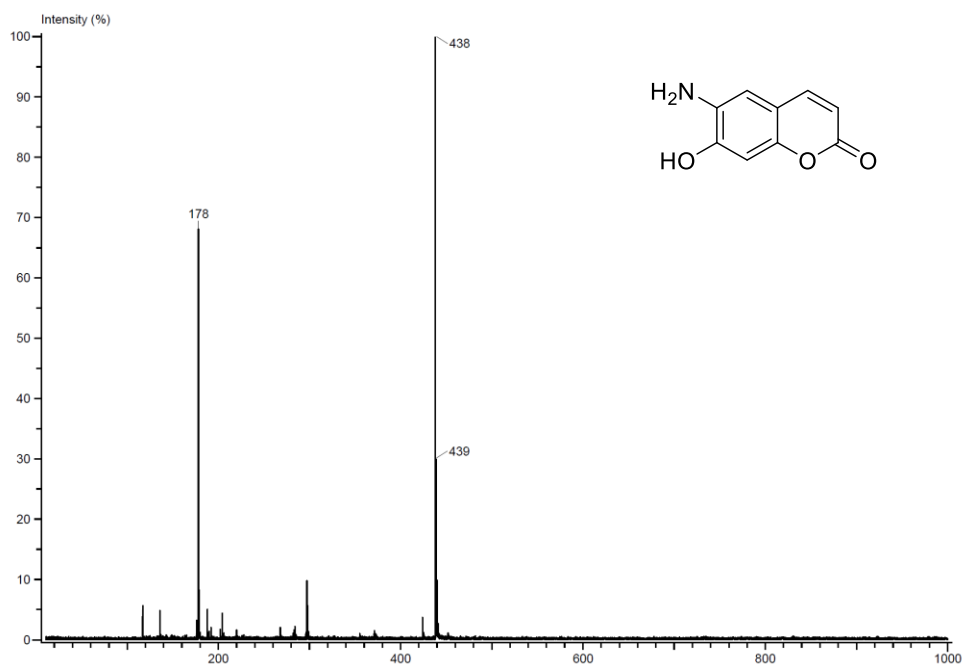
Espectro 55. masas del compuesto 5c (IE+)



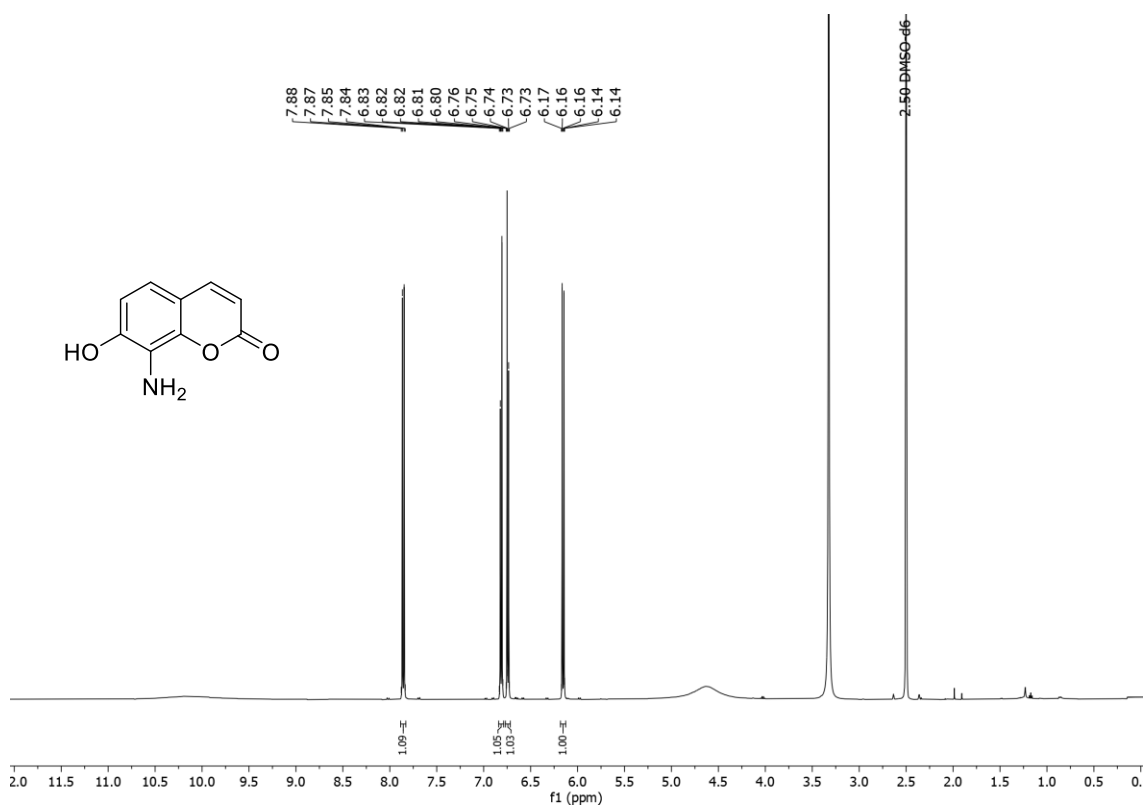
Espectro 56. RMN ^1H del compuesto 6a (500 MHz MeOH- d_4)



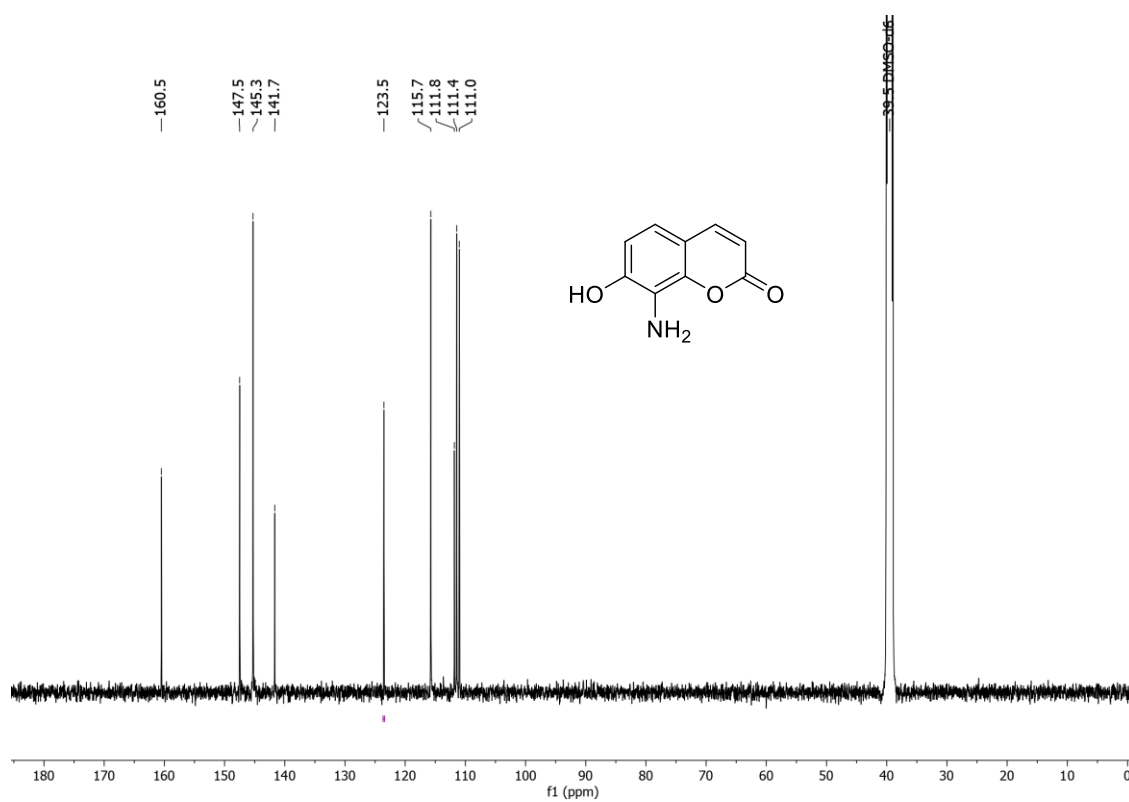
Espectro 57. RMN ^{13}C del compuesto **6a** (125 MHz MeOH- d_6)



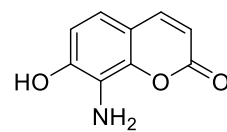
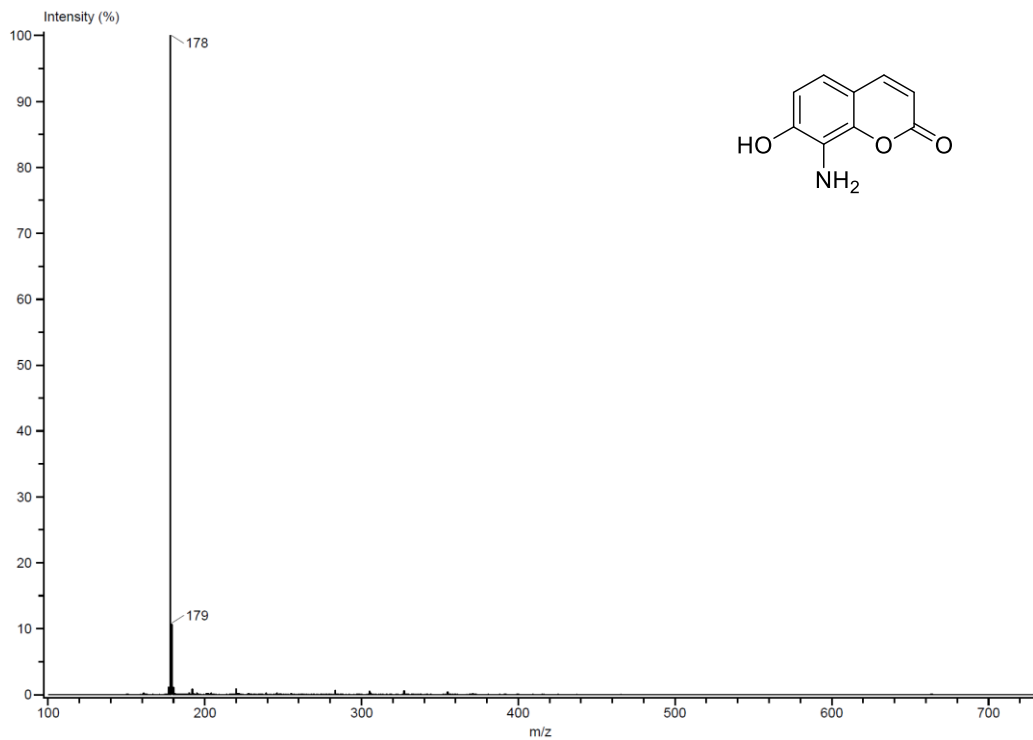
Espectro 58. Masas del compuesto **6a** (DART+)



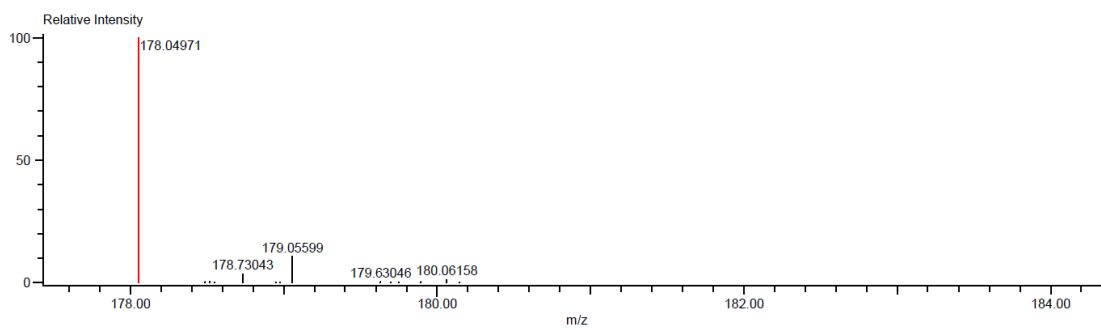
Espectro 59. RMN ¹H del compuesto **6b** (500 MHz DMSO-*d*₆)



Espectro 60. RMN ¹³C del compuesto **6b** (125 MHz DMSO-*d*₆)

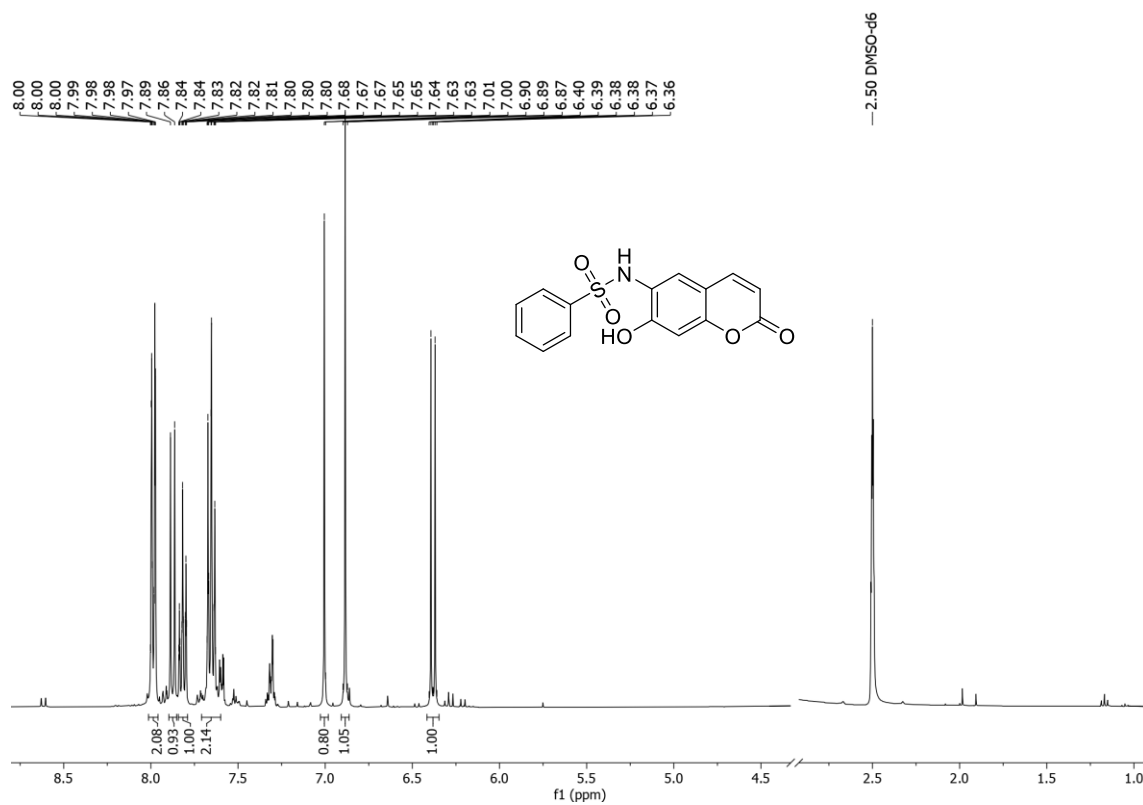


Espectro 61. Masas del compuesto **6b** (DART+)

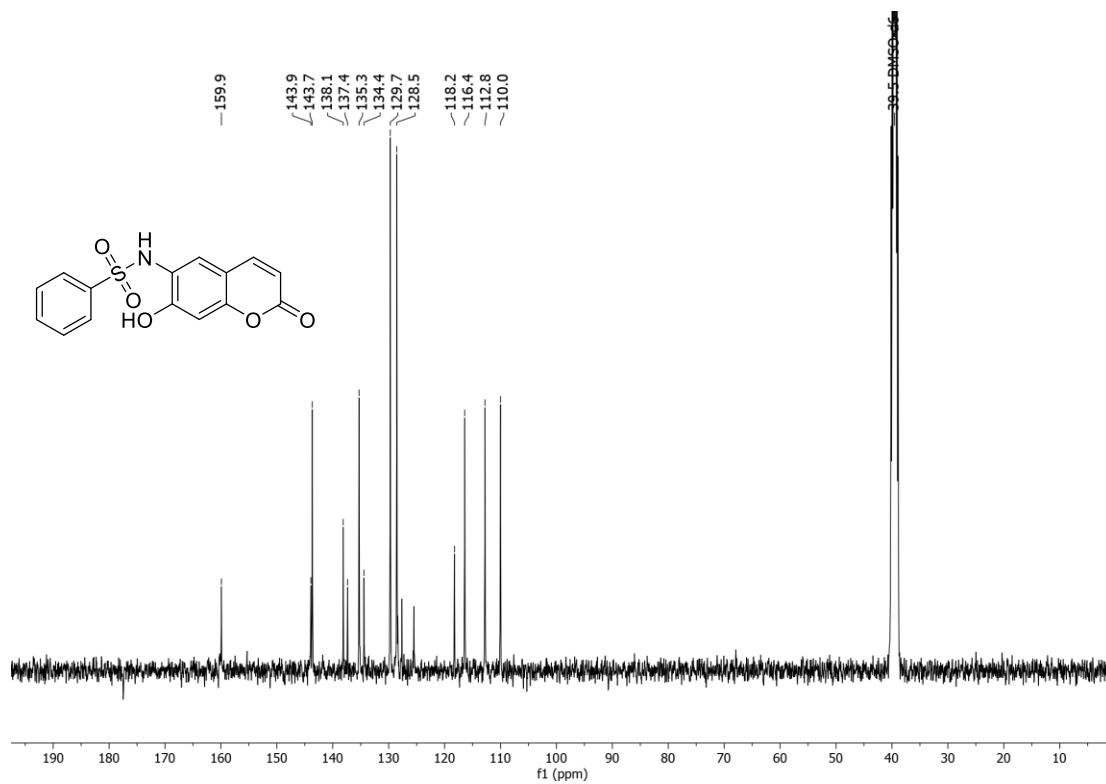


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
178.04971	9739.21	178.05042	-0.71	-3.99	$^{12}\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_1\text{O}_3$	6.5

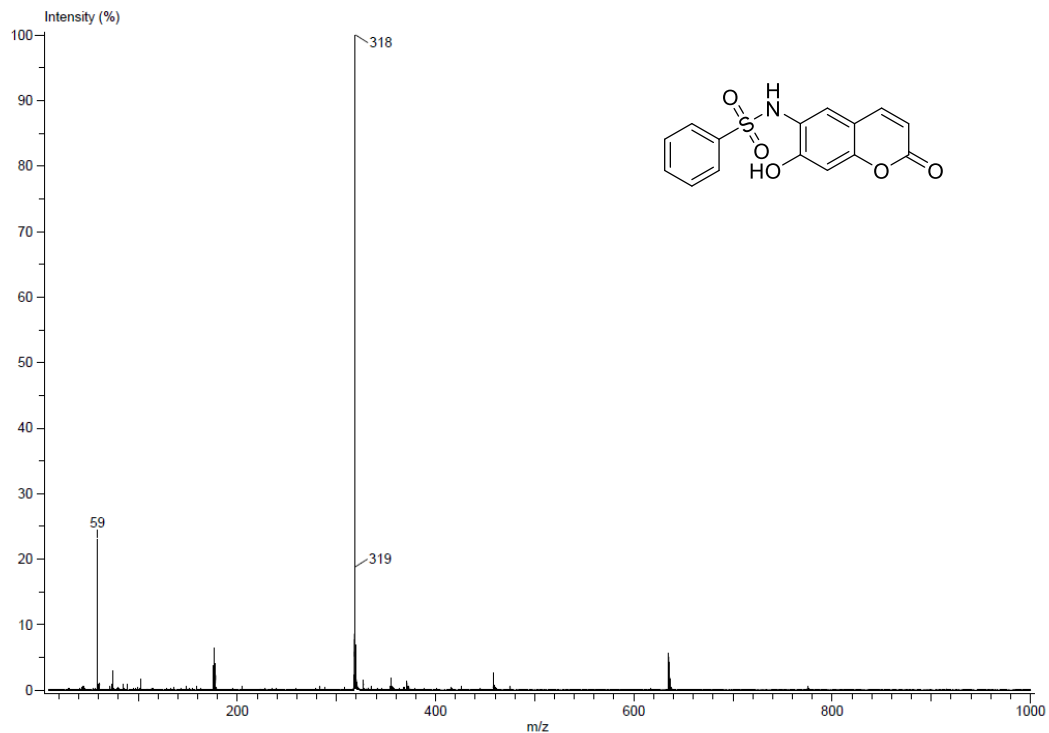
Espectro 62. Masas de alta resolución del compuesto **6b** (ESI+)



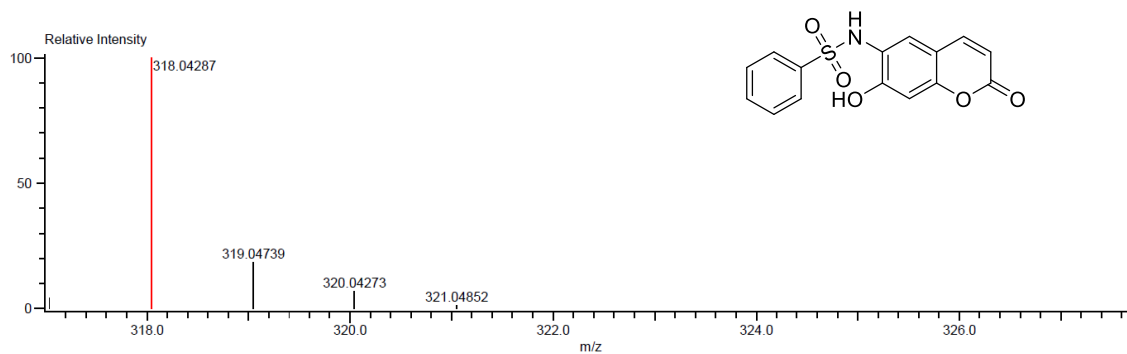
Espectro 63. RMN ^1H del compuesto **7a** (400 MHz DMSO- d_6)



Espectro 64. RMN ^{13}C del compuesto **7a** (100 MHz DMSO- d_6)

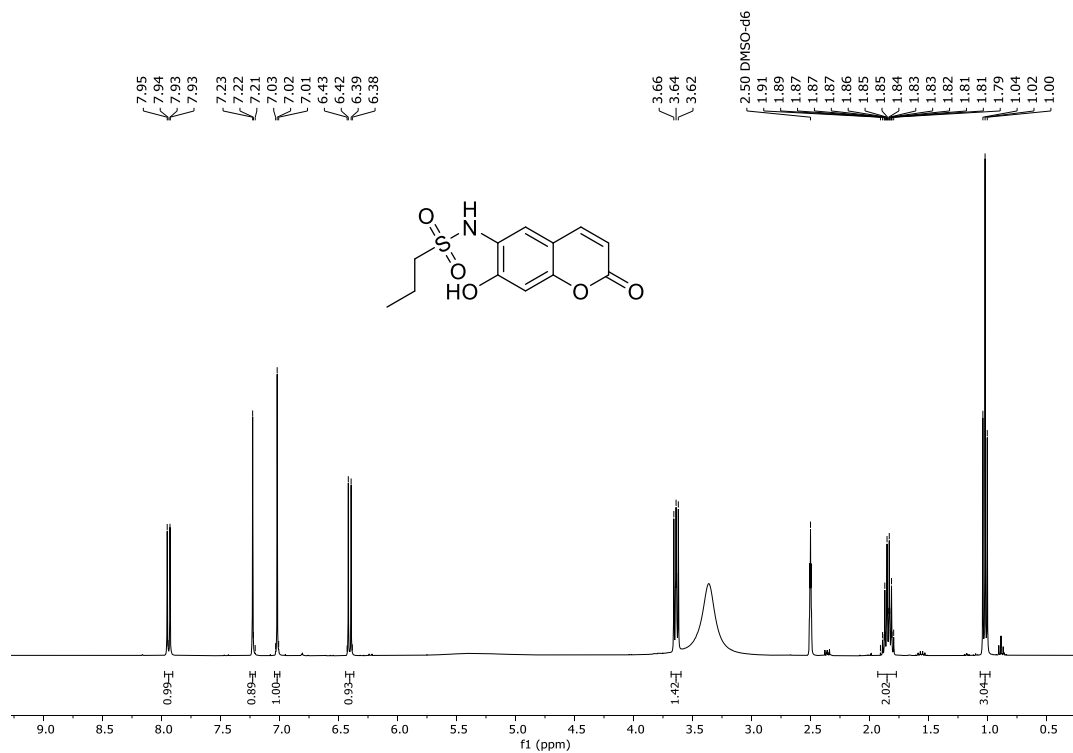


Spectro 65. Masas del compuesto 7a (DART+)

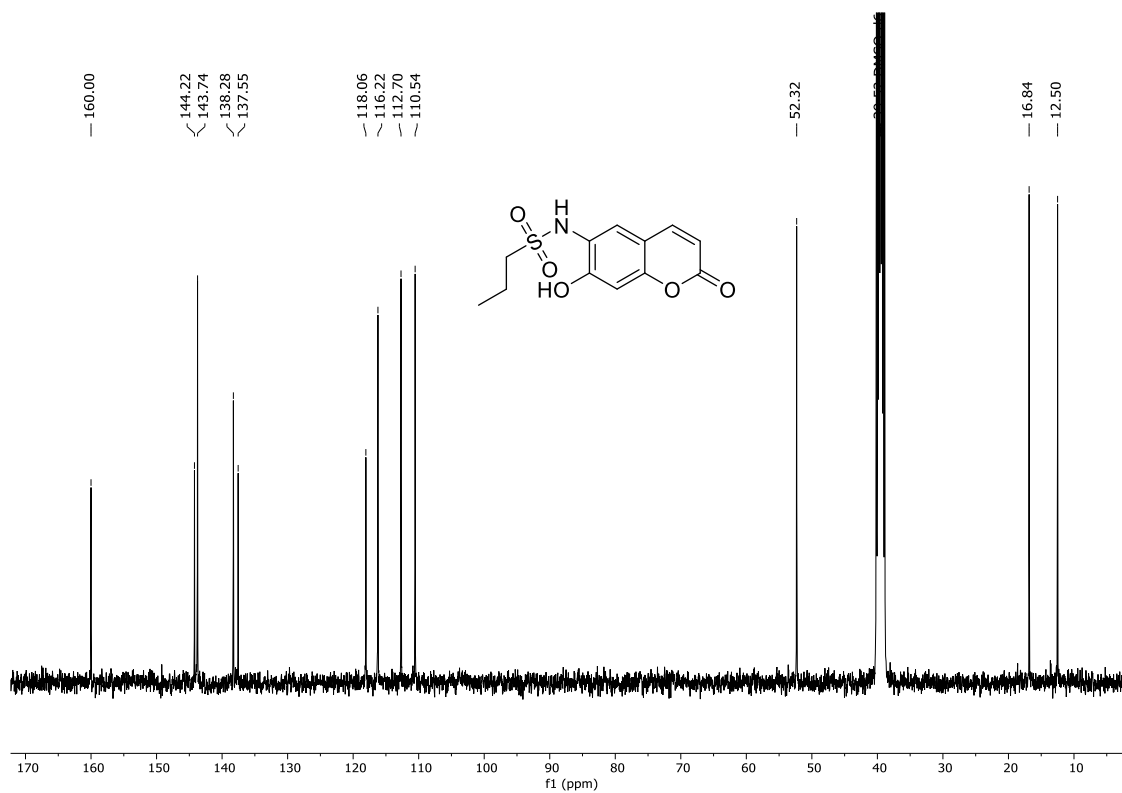


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
318.04287	197399.13	318.04362	-0.75	-2.36	$^{12}\text{C}_{15}^{1}\text{H}_{12}^{14}\text{N}_1^{16}\text{O}_5^{32}\text{S}_1$	11.5

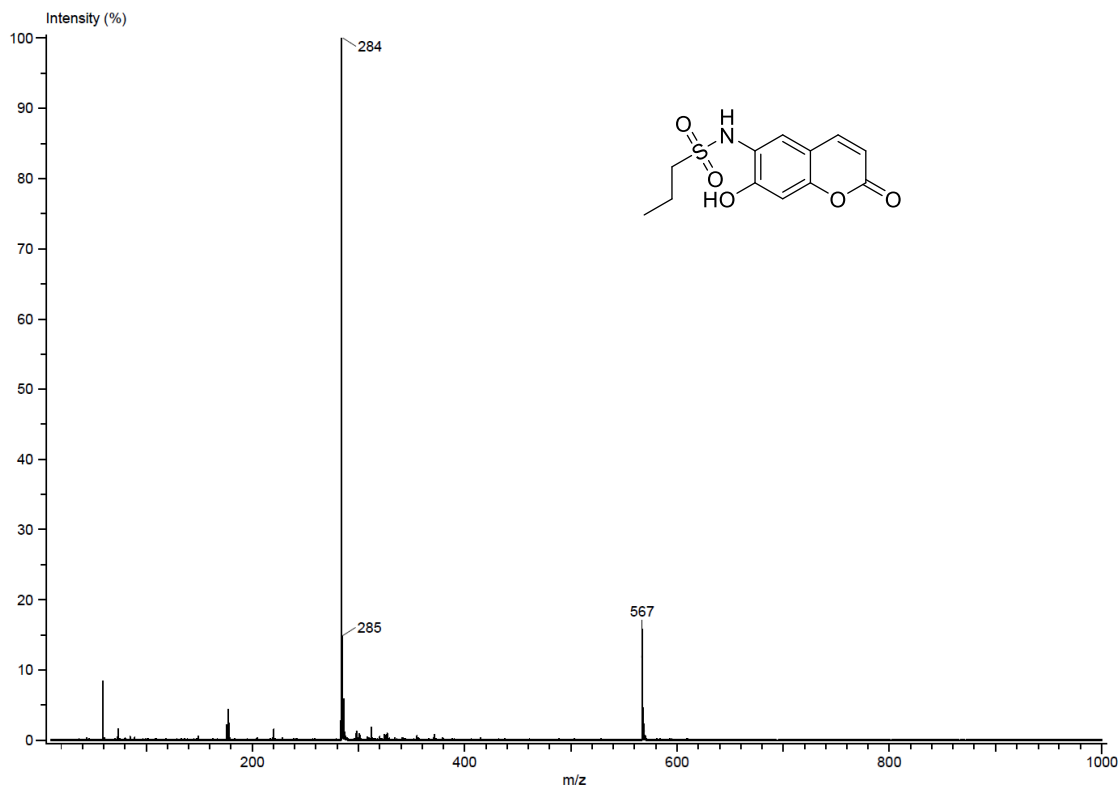
Spectro 66. Masas de alta resolución del compuesto 7a (ESI+)



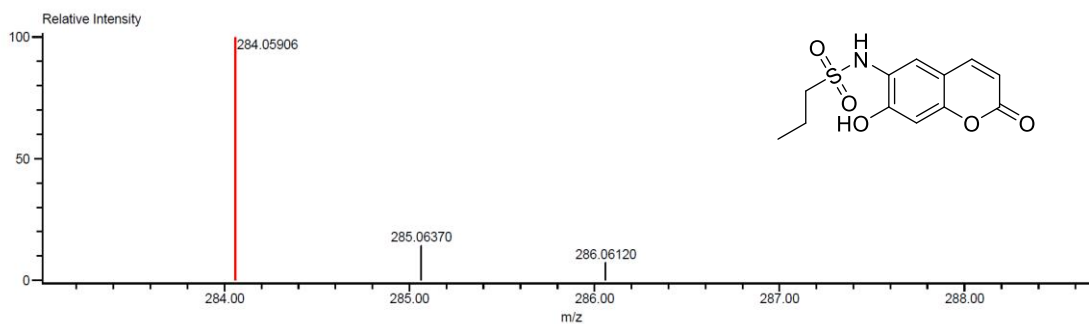
Espectro 67. RMN ¹H del compuesto **7b** (400 MHz DMSO-*d*₆)



Espectro 68. RMN ¹³C del compuesto **7b** (100 MHz DMSO-*d*₆)

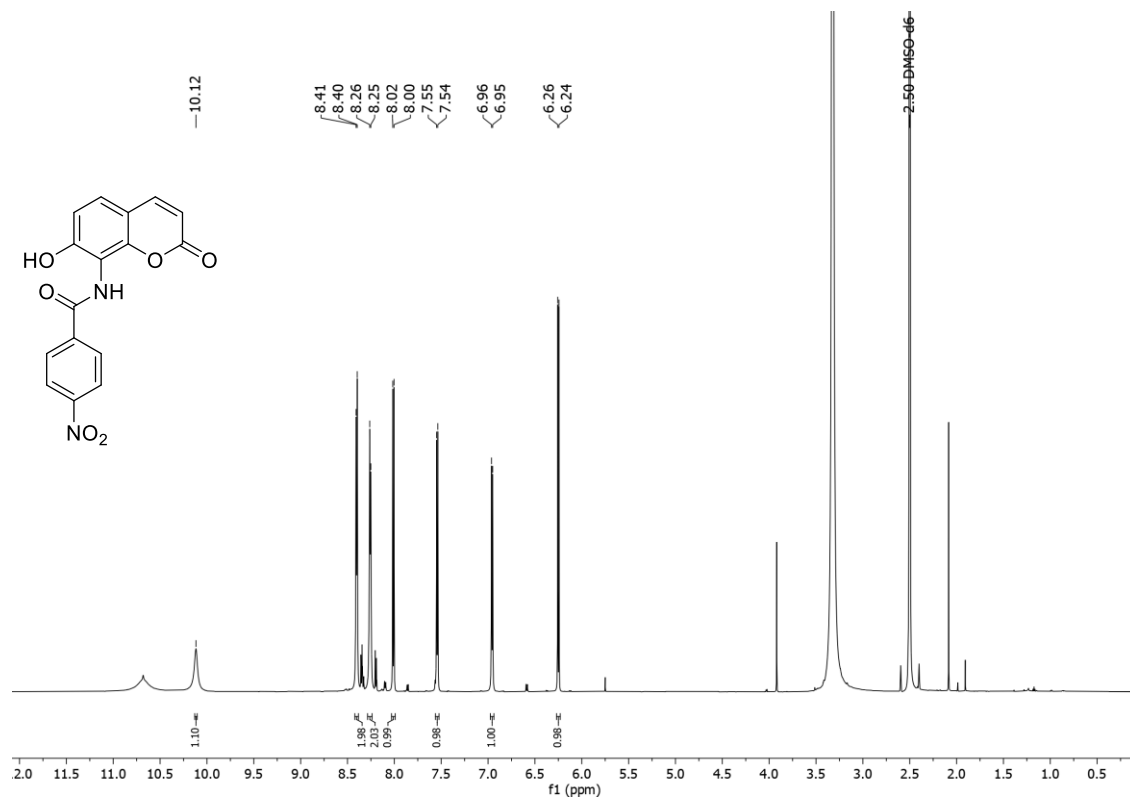


Espectro 69. Masas del compuesto **7b** (DART+)

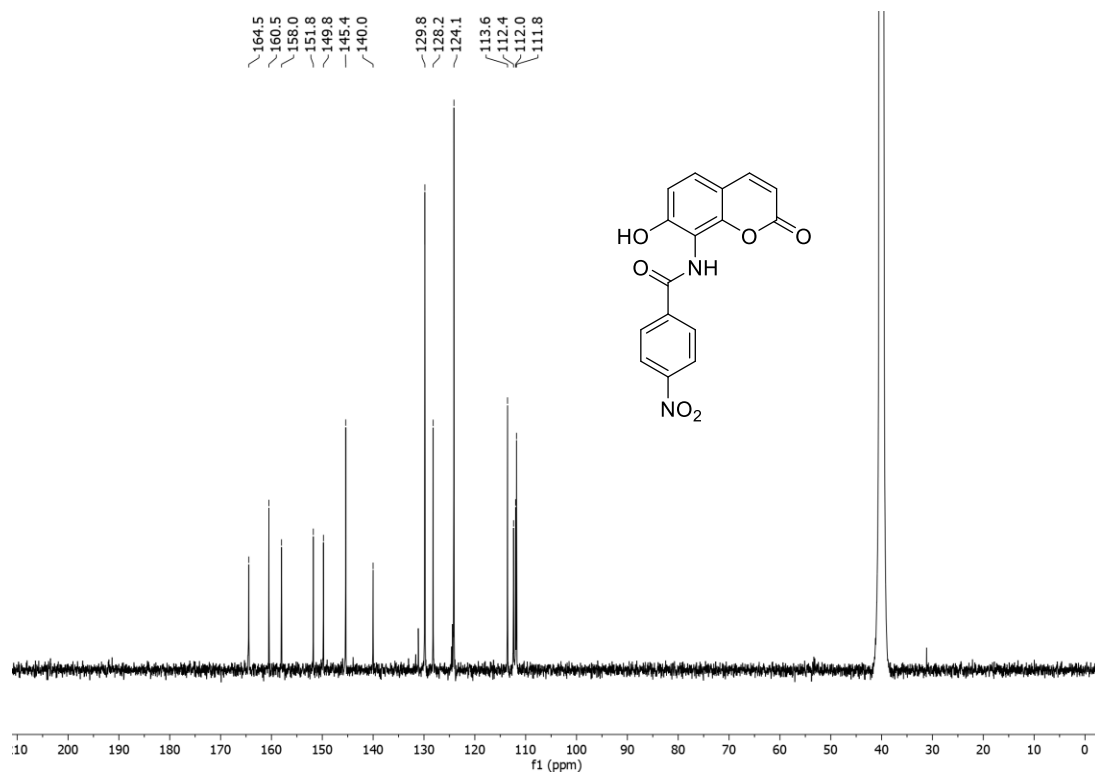


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
284.05906	68451.35	284.05927	-0.20	-0.72	$^{12}\text{C}_{12}^{1}\text{H}_{14}^{14}\text{N}_1^{16}\text{O}_5^{32}\text{S}_1$	7.5

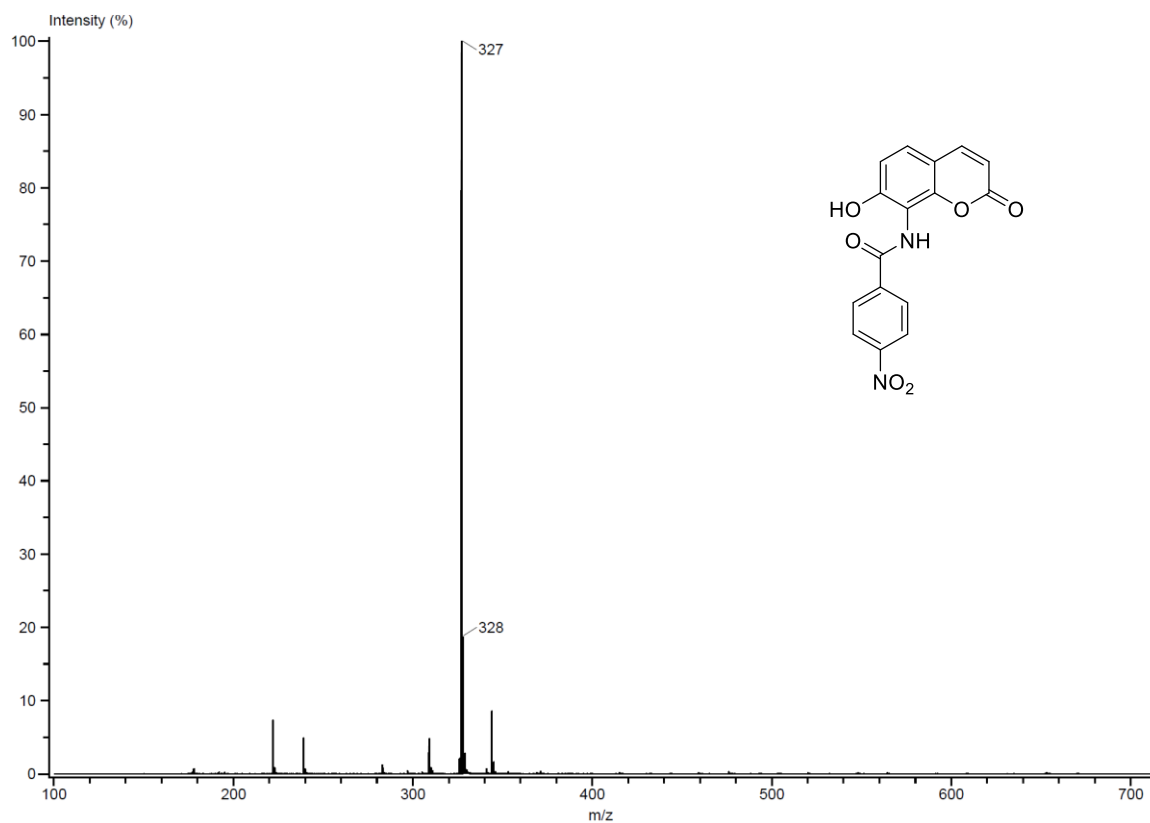
Espectro 70. Masas de alta resolución del compuesto **7b** (ESI+)



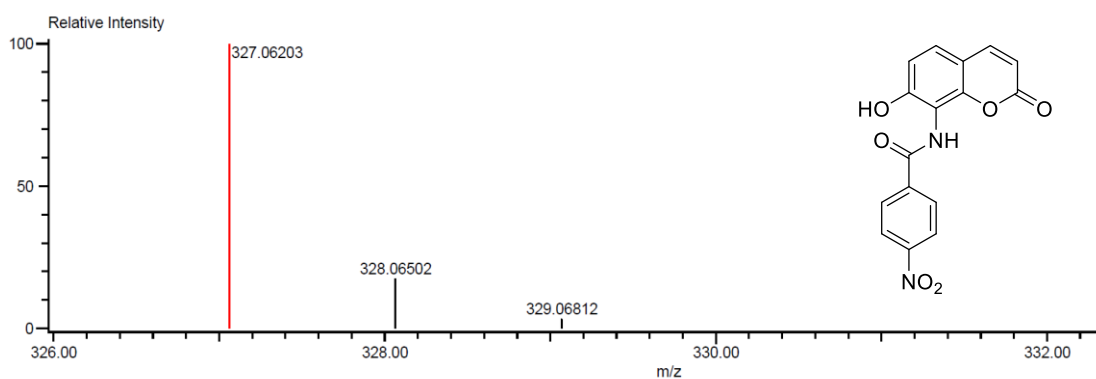
Espectro 71. RMN ¹H del compuesto 7c (700 MHz DMSO-*d*₆)



Espectro 72. RMN ¹³C del compuesto 7c (175 MHz DMSO-*d*₆)

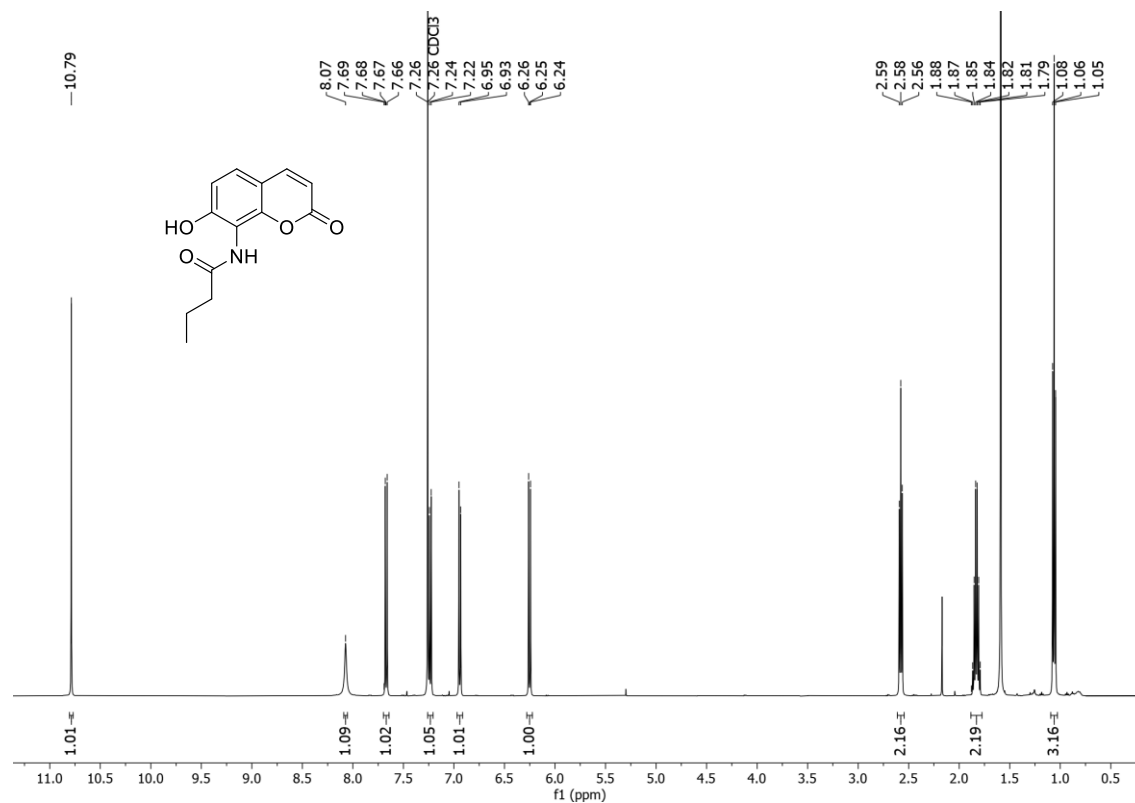


Espectro 73. Masas del compuesto **7c** (DART+)

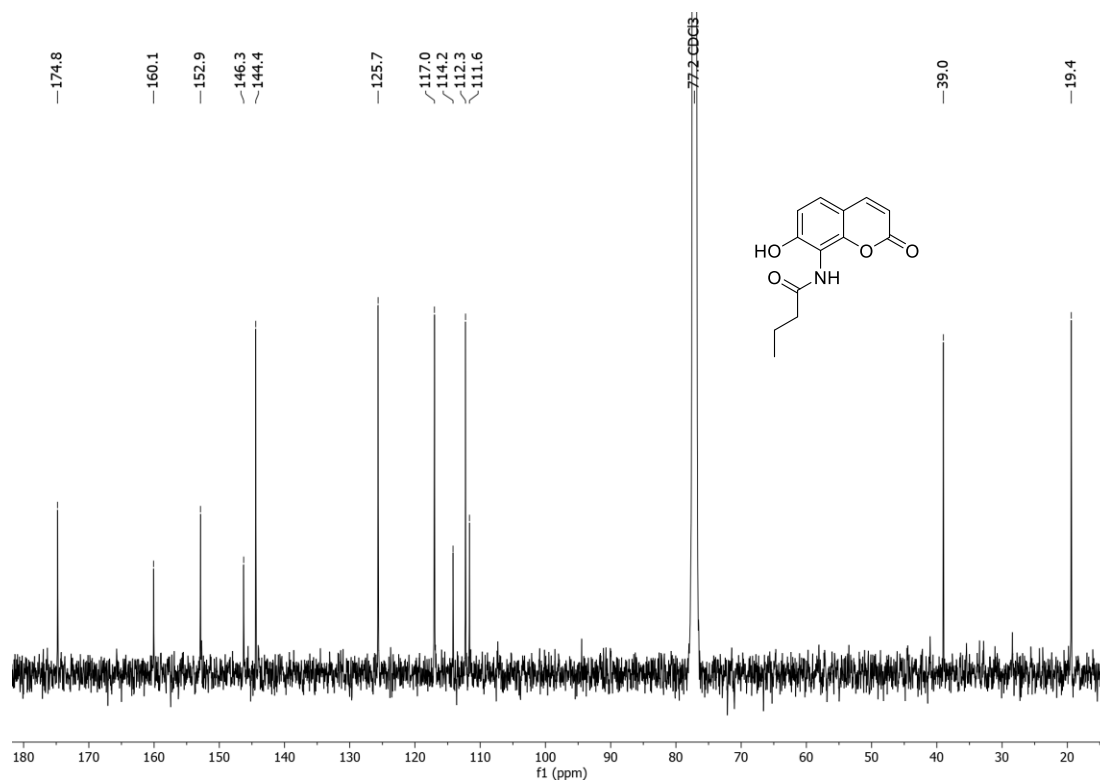


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
327.06203	1577146.31	327.06171	0.32	0.97	$^{12}\text{C}_{16}^{1}\text{H}_{11}^{14}\text{N}_2^{16}\text{O}_6$	12.5

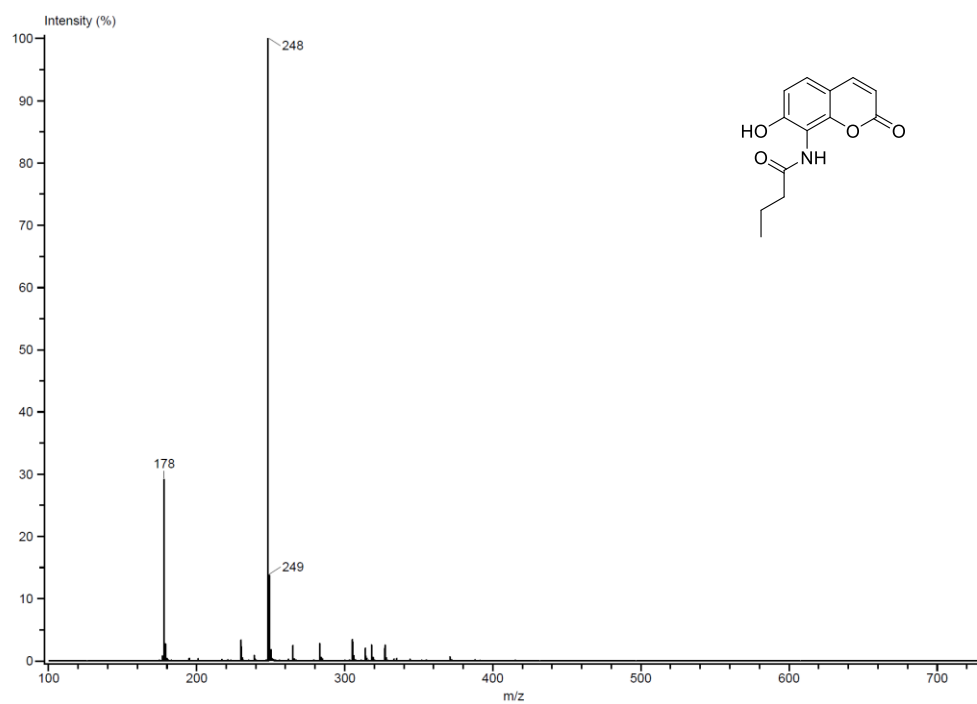
Espectro 74. Masas de alta resolución del compuesto **7c** (ESI+)



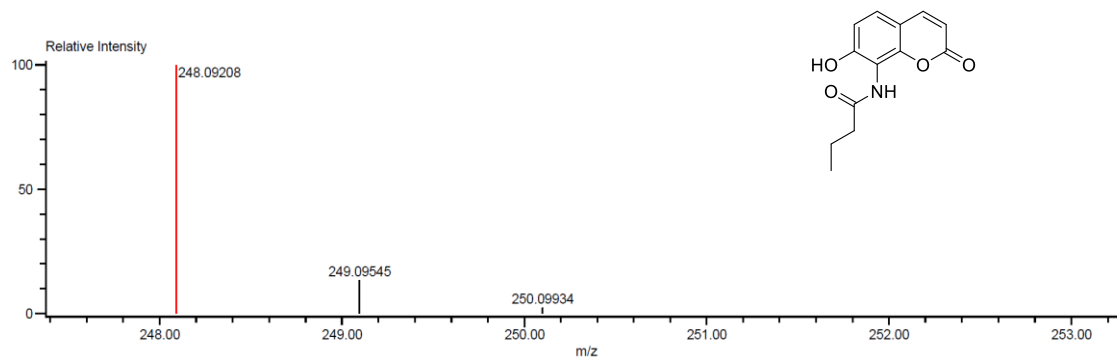
Espectro 75. RMN ^1H del compuesto **7d** (500 MHz CDCl_3)



Espectro 76. RMN ^{13}C del compuesto **7d** (125 MHz CDCl_3)



Espectro 77. Masas del compuesto 7d (DART+)



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
248.09208	681126.93	248.09228	-0.20	-0.80	$^{12}\text{C}_{13}^{1}\text{H}_{14}^{14}\text{N}_1^{16}\text{O}_4$	7.5

Espectro 78. Masas de alta resolución del compuesto 7d (ESI+)

RESEARCH ARTICLE

Synthesis of Chrysin, Quercetin and Naringin Nitroderivatives: Anti-proliferative, Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity

Rosario Tavera-Hernández¹, Manuel Jiménez-Estrada^{1,*}, Jesús J. Alvarado-Sansininea¹, Antonio Nieto-Camacho¹, Hugo López-Muñoz², Luis Sánchez-Sánchez² and María L. Escobar³

¹Laboratorio 2-10, Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México; ²Laboratorio 6, 2do piso, UMIEZ, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México; ³Laboratorio de Microscopía Electrónica, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

Abstract: Background: Flavonoids are an important group of natural products because they possess various biological activities such as antioxidant, anti-inflammatory, and anti-cancer. The modification of their structure could improve their biological activities. The nitro group is included in diverse pharmaceuticals with various biological activities, such as anti-cancer and anti-inflammatory agents.

Objective: The study aimed to introduce a nitro group into the structure of flavonoids in order to observe how their anti-proliferative, antioxidant, and anti-inflammatory activities change.

Methods: In this investigation, we established diverse conditions of aromatic nitration of chrysin (1), quercetin (2), and naringin (3) flavonoids using bismuth (III) nitrate, acetic acid or silica gel, and NO_x gases. The anti-proliferative activity in CaSki, MDA, and SK-LU-1 cancer cell lines and the anti-inflammatory activity and antioxidant activity of flavonoids and nitro derivatives were evaluated as well.

Results: As a result, mild nitration conditions were established, and 8-nitrochrysin, 5'-nitroquercetin, and 3'-nitronaringin were obtained. The number and hydroxyl group position in the flavonoid are important to carry out the nitration reaction. Although chrysin showed higher anti-proliferative activity than quercetin and naringin, the introduction of the nitro group at C-8 did not improve its anti-proliferative, antioxidant, and anti-inflammatory activities. On the other hand, the introduction of the nitro group at C-5' in quercetin structure was important to improve its antioxidant and anti-proliferative activities on cancer cell lines. The introduction of the nitro group at C-3' in naringin improved its anti-inflammatory activity, but not its antioxidant and anti-proliferative activities. Chrysin, 8-nitrochrysin, quercetin, and 5'-nitroquercetin did not show necrotic activity.

Conclusion: The introduction of a nitro group into flavonoids structure improved their anti-proliferative, antioxidant, and anti-inflammatory activities. These results promote future investigations of structural modification on 2-phenylbenzopyran skeleton to optimize their biological activity.

ARTICLE HISTORY

Received: June 24, 2020
Revised: August 24, 2020
Accepted: December 10, 2020

DOI:
10.2174/1570180818666210122162313

Keywords: aromatic nitration, quercetin, naringin, chrysin, anti-proliferative, antioxidant, anti-inflammatory.

1. INTRODUCTION

Some human diseases are attributed to oxidative stress, a process where an excessive production of free radicals and reactive molecules occurs, such as reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). The imbalance between the production of ROS and their elimination by protective mechanisms or antioxidants leads to biomolecule and cell damage [1]. In this way, cancer initiation and

progression have been linked to oxidative stress and ROS production because they increase DNA mutations or induce DNA damage, genome instability, and cell proliferation. There is a relationship between the production of ROS, chronic inflammation, and cancer [2]. This relation has been confirmed by anti-inflammatory therapies that show efficacy in cancer prevention and treatment [3].

Natural products are the main source of bioactive molecules used in disease treatment. Approximately 40% of developed therapeutic agents approved by the FDA are natural products, derivatives, or synthetic compounds inspired by natural products [4]. One important group of natural products is flavonoids because it has been demonstrated that

*Address correspondence to this author at the Laboratorio 2-10, Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México;
E-mail: manueljemex@gmail.com

these are antioxidant [5-7] and anti-inflammatory [8, 9] molecules; they are also considered to be one of the most promising anti-cancer agents [10-12]. Flavonoids are secondary metabolites and have a basic 2-phenylbenzopyran chemical structure formed by two aromatic rings (A and B) joined through a pyran ring (C). They can be classified according to the degree of oxidation and saturation of the C ring in flavanone, flavone, flavonol, among others (Fig. 1) [13]; also, in nature, flavonoids are present as *O*-glycosides or *C*-glycosides [14].

One of the aims of natural product optimization through structural modification is to enhance the compound's biological activity. The natural structure can be modified by derivation or substitution of the functional groups or alteration of the ring systems. The nitro group is a special group that is included in many drugs; among these are anti-inflammatory and anti-cancer agents [15]. This chemical group is unique because it can generate electron-deficient sites in the molecule's structure. Moreover, the introduction of a nitrogen atom helps in performing further chemical modifications around this group. Lopes Silva and coworkers reported the synthesis of nitro-aromatics compounds and evaluated their cytotoxic activity in cancer line cells, demonstrating that the nitro group is important for cytotoxic activity [16].

Aromatic nitration conditions, using nitric and sulfuric acid, are well documented in the literature [17]. However, as phenols are highly reactive, the traditional nitration method for phenolic compounds is generally associated with the formation of dinitro compounds, oxidized products, and unspecified resinous materials. This refers to harsh reaction conditions and low selectivity. Flavonoids are polyphenols, so these natural products need milder nitration conditions than other aromatic compounds. Some mild nitration conditions include organic acids, metallic nitrates, and acidic clays [18]. In this work, we used bismuth (III) nitrate as a nitrating agent and glacial acetic acid or silica gel as an acid catalyst. A mixture of NO_x gases was also generated, including N₂O₄, which acts as the nitrating agent. Nitration of phenols and other aromatic compounds with N₂O₄ has been described as mild conditions [19, 20]. So, the aim of the present investigation was to establish mild nitration conditions for chrysin, quercetin, and naringin, and to evaluate their anti-inflammatory, antioxidant and anti-proliferative activities.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. General Information

Melting points were determined using a Fisher Scientific apparatus. NMR spectra were run in DMSO-*d*₆ on Bruker

Ascend 500 MHz spectrometer with the residual solvent peak as a reference; the values are given in ppm (δ). Mass spectra were obtained in an MStation JMS-700 mass spectrometer on electronic impact positive ion mode. HR-DART-MS data were obtained with the Jeol AccuTOF JMS-T100LC mass spectrometry system. HPLC-MS chromatogram and mass spectra were obtained in an Agilent 1200 Series Binary SL liquid chromatograph and a Bruker Esquire 6000 mass spectrometer, respectively.

Compound synthesis was routinely checked by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel-G plates of 0.5 mm thickness, and spots visualization was made with UV light (254 and 365 nm). Chrysin, quercetin, and naringin were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2. Preparation of Nitro Compounds

2.2.1. 5,7-Dihydroxy-8-Nitro-2-Phenyl-4H-Chromen-4-One (1a)

Chrysin (10 mmol) was added to a solution of bismuth (III) nitrate pentahydrate (7.5 mmol) in glacial acetic acid (50 mL). The mixture was stirred for fifteen minutes at 80 °C; then, water (10 mL) was added and the mixture was poured into ice-cold water. The precipitate was filtered and washed with water (2X 100 mL), and then with methanol (100 mL). The solid was purified by silica gel column chromatography using dichloromethane-ethyl acetate (9:1) as the eluent to give **1a** as yellow powder, yield (79%); Mp: 215-216 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz), δ (ppm) 13.209 (s, 1H, C5-OH), 7.980-7.954 (m, 2H, H-2', 6'), 7.635-7.563 (m, 3H, H-3', 4', 5'), 7.158 (s, 1H, H-3), 6.347 (s, 1H, H-6); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ 181.25 (C-4), 163.06 (C-2), 162.58 (C-5), 158.45 (C-7), 149.99 (C-8a), 132.49 (C-4'), 129.95 (C-1'), 129.29 (C-3', 5'), 126.35 (C-2', 6'), 121.68 (C-8), 105.95 (C-3), 102.89 (C-4a), 99.12 (C-6); MS [EI+]: (m/z) 299 [M]; HR-DART-MS (positive ion mode): m/z 300.05121 [M+H]⁺ (Calcd. for C₁₅H₁₀N₁O₆: 300.05081)

2.2.2. 2-(3,4-Dihydroxy-5-Nitrophenyl)-3,5,7-Trihydroxy-4H-Chromen-4-One (2a)

This compound was prepared by bubbling NO_x gases formed in an Erlenmeyer flask when anhydrous tetrahydrofuran (0.4 mL) and nitric acid (0.8 mL, 66%) were added to a solution of quercetin (1 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (10 mL) collected in ice bath and stirred for five minutes. THF was evaporated under vacuum, and the precipitate was filtered and recrystallized in MeOH to give **2a** as orange powder, yield (20%); Mp: 290 °C (decomp.); ¹H NMR

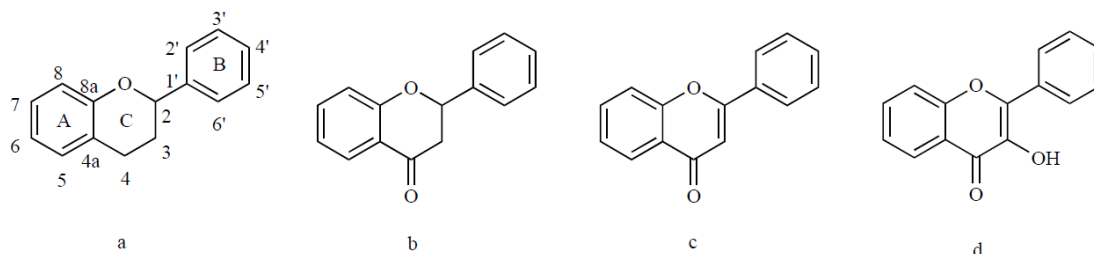


Fig. (1). Structure of a) 2-phenylbenzopyran, b) flavanone, c) flavone, and d) flavonol.

(DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ (ppm) 12.317 (C5-OH) 8.200 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H-6'), 7.913 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H2'), 6.426 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.197 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, H-6). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ 176.03 (C-4), 164.28 (C-7), 160.80 (C-5), 156.19 (C-8a), 147.63 (C-3'), 144.01 (C-4'), 143.03 (C-2), 137.37 (C-5'), 136.98 (C-3), 121.27 (C-1'), 117.54 (C-2'), 114.64 (C-6'), 103.18 (C-4a), 98.42 (C-6), 93.53 (C-8). MS (IE+) m/z 347 [M]; HR-DART-MS m/z 348.03577 [M+H]⁺ (Calcd. for C₁₅H₁₀N₁O₉ 348.03556).

2.2.3. 7-(((2S,3R,4S,5S,6R)-4,5-Dihydroxy-6-(Hydroxymethyl)-3-(((2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-Trihydroxy-6-Methyltetrahydro-2H-Pyran-2-yl)Oxy)Tetrahydro-2H-Pyran-2-yl)Oxy)-5-Hydroxy-2-(4-Hydroxy-3-Nitrophenyl)Chroman-4-One (3a)

This compound was prepared using silica gel as catalyst (0.5000 g) and with bismuth (III) nitrate pentahydrate (0.4080 g, 1 mmol) added to naringin (0.580 g, 1 mmol) and dissolved in THF (10 mL). The mixture was stirred under reflux until complete consumption of the starting material was achieved in approximately five hours. The reaction was monitored by thin layer chromatography using an ethyl acetate, methanol and water solution (7.7:1.3:1) as eluent. The reaction mixture was filtered and THF was removed under vacuum. The product was purified by column chromatography starting with ethyl acetate followed by ethyl acetate-methanol (90:10) as eluent, yielding **3a** as yellow powder, yield (50%); Mp 166-167 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 12.006 (s, 1H, C5-OH), 8.054 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-2'), 7.712 (dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 1H, H-6'), 7.193 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-5'), 6.163 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-8), 6.109 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H6), 5.662 (dd, $J = 13.2, 2.9$ Hz, 1H, H-2); Glucose 5.148 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-1''); Rhamnose 5.108 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-1'''), 1.155 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, H-6'''). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ (ppm) 41.92 (C-3), 77.41 (C-2), 95.16 (C-8), 96.63 (C-6), 103.26 (C-4a), 119.39 (C-5'), 123.67 (C-2'), 129.56 (C-1'), 133.58 (C-6'), 136.61 (C-3'), 152.20 (C-4'), 162.35 (C-8a), 162.91 (C-5), 164.91 (C-7), 196.56 (C-4); Glucose 60.45 (C-6''), 70.37 (C-4''), 76.89 (C-5''), 76.13 (C-3''), 77.41 (C-2''), 97.44 (C-1''), Rhamnose 18.02 (C-6'''), 68.27 (C-5'''), 69.59 (C-3'''), 70.48 (C-2'''), 71.82 (C-4'''), 100.39 (C-1'''). MS (ESI-) m/z 624.1 [M-H]⁺

2.3. Biological Activity

2.3.1. Antioxidant Activity

Free radical scavenging activity was measured using the Brand-Williams method [21] with modifications; 50 μ L of the different concentrations of flavonoids or nitro flavonoids were added to 150 μ L of a methanolic solution of DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, 133.33 μ M) placed in a 96-well microplate. The mixture was incubated at 37 °C for 30 minutes. After incubation, optical density (OD) was measured at 515 nm in a Bio-TeK ELX-808 absorbance microplate reader. Vehicle was used as a negative control and α -tocopherol as a positive control.

2.3.2. Anti-inflammatory Activity

2.3.2.1. Animals

CD-1 male mice (25–30 g) were provided by the Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Animals were housed in stan-

dard cages at a constant temperature of 24 °C with a photoperiod of 12 light/dark hours and water and food *ad libitum*. All experimental procedures were in accordance with the protocol approved by the local Animal Ethics Committee (S/N-902-03 and CICUAL-IQ-004-17) in compliance with national (NOM-062- ZOO-1999) and international regulations on the care and use of laboratory animals.

The anti-inflammatory activity was evaluated using the 12-O-tetradecanoyl-phorbol13-acetate (TPA)-induced ear edema *in vivo* murine model. CD-1 male mice groups (n = 3) were anesthetized with pentobarbital sodium (65.0 mg/kg). A TPA ethanolic solution (0.25 μ g/ μ L) was applied topically to the internal and external sides of the right ear of each mouse (10 μ L/side) to induce inflammation. After ten minutes, 1 μ mol of compounds **1-3a** and indomethacin dissolved in 20 μ L of the vehicle (methanol, dichloromethane, or acetone) were applied to the inner and outer surfaces of the ear. The left ear was treated with 10 μ L of ethanol and 20 μ L of the vehicle of each compound as a control. Four hours after the treatment application, the animals were euthanized with CO₂, and circular sections from both ears (7 mm of diameter) were taken and weighted to calculate the edema as weight difference between the treated and the non-treated ear.

2.3.3. Anti-Proliferative Activity

2.3.3.1. Cell Lines and Culture Conditions

The following cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC Rockville): CaSki, (cervical cancer), MDA-MB-231 (breast cancer), and SK-LU-1 (lung cancer). They were cultured in RPMI-1640 medium containing 5% Newborn Calf Serum with red phenol and supplemented with benzylpenicillin. All cultures were stored in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C. All cell-based assays were performed using cells in the exponential growth phase.

2.3.3.2. Cell Proliferation Assay

Assays were performed by seeding 7500 cells/well in 96-well tissue cultured plates in a volume of 100 μ L of RPMI-1640 medium supplemented with 5% NCS (normal calf serum) per well. Cells were allowed to grow for 24 h in the culture medium prior to exposure to the compounds. Also, 1% of the vehicle (EtOH) was added to the control cells. The anti-proliferative activity (IC₅₀) was determined after 24 h by crystal violet staining [22]. Cellular density was determined by measuring absorbance at 590 nm on an Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) plate reader. Cisplatin was used as a positive control and purchased from Sigma Aldrich.

2.3.4. Necrotic Activity

2.3.4.1. Determination of LDH

Necrotic activity was determined by means of the LDH Cytotoxicity Assay Kit (BioVision), following the manufacturer's instructions. LDH oxidizes lactate to pyruvate, which then reacts with the tetrazolium salt 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium (INT) to produce formazan. The increase in the amount of formazan generated in the culture supernatant directly correlates to the increase in the

number of lysed cells. Formazan dye is water-soluble and can be detected with a spectrophotometer at 500 nm [23].

2.4. Statistical Analysis

The statistical analysis was carried out by an analysis of variance (ANOVA) test using SPSS 10.0 for Windows (Microsoft, Redmond). A *p*-value <0.05 (Student's *t*-test) was considered significant. In all cases, the data represent three independent experiments performed in triplicate.

3. RESULTS

3.1. Chemistry

Different mild nitration conditions were established for flavonoids chrysin (**1**), quercetin (**2**), and naringin (**3**). Scheme 1 shows nitration conditions: for chrysin, the best nitration conditions involved bismuth (III) nitrate pentahydrate in glacial acetic acid; NO_x gases mix was the best reaction condition for quercetin; and naringin was nitrated with bismuth (III) nitrate pentahydrate and silica gel in THF as

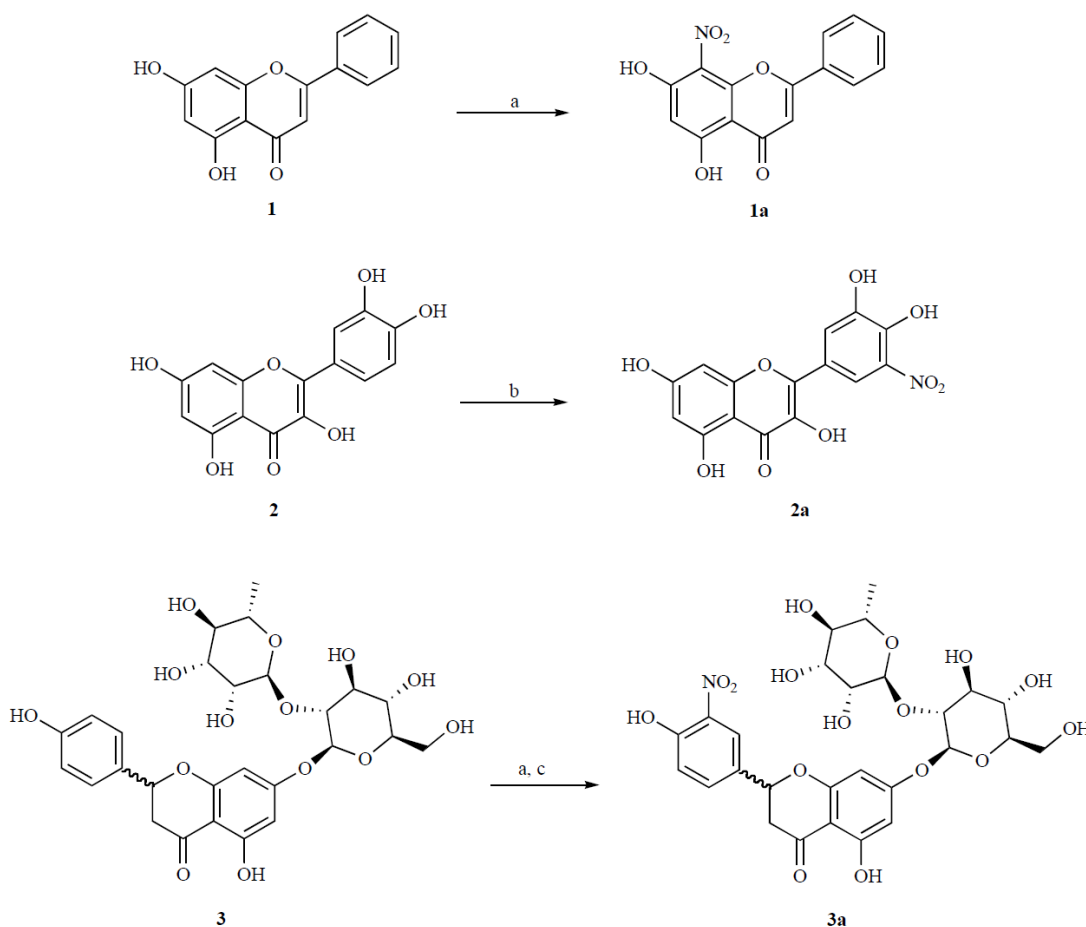
dissolvent. The products 8-nitrochrysin (**1a**, 79%), 5'-nitroquercetin (**2a**, 20%) and 3'-nitronaringin (**3a**, 50%) were obtained.

3.2. Antioxidant Activity

Antioxidant activity was evaluated by DPPH free radical scavenging assay. The results in Table 1 show that the activity of derivate **2a** was better than compound **2** and α -tocopherol, the positive control. These IC₅₀ values indicate that the incorporation of the nitro group in C-5' was important to improve the activity of quercetin. Compounds **1**, **3**, and their derivatives did not exhibit antioxidant activity at a concentration of 100 μ M; and the introduction of the nitro group did not improve this activity.

3.3. Anti-inflammatory Activity

The anti-inflammatory activity of flavonoids and their nitro derivatives was evaluated by *in vivo* TPA-induced ear edema at a dose of 1 mg/ear. Table 2 shows edema mean and inhibition rate, and indomethacin was used as a positive control.



a) Bi(NO₃)₃ · 5H₂O, glacial acetic acid, 80 °C, yield: **1a** (79%), **3a** (38%); b) NO_x (THF, HNO₃), ice bath, yield: **2a** (20%); c) Bi(NO₃)₃ · 5H₂O, silica gel, THF, reflux, yield: **3a** (50%).

Scheme 1. Reaction of nitration of chrysin (**1**), quercetin (**2**), and naringin (**3**).

Table 1. IC₅₀ values for inhibition of DPPH radical of flavonoids and nitro derivatives.

Compound	IC ₅₀ Values (μM) for Inhibition of DPPH Radical
DPPH	-
1	-
1a	-
2	15.6±0.6*
2a	10.7±0.1*
3	-
3a	-
α-tocoferol	41.15±0.14

*The values represent the mean of three different experiments (n = 3) ± SEM. T-test was applied, and compounds 2 and 2a exhibited a statistically significant difference (p<0.05).
-None was active at 100 μM.

3.4. Anti-Proliferative Activity

To determine the effect of the introduction of one nitro group in chrysin, quercetin, and naringin structures over anti-proliferative activity, the concentration required of chrysin, quercetin, and its nitro derivatives to inhibit the proliferation of CaSki, MDA-MB-231, and SK-Lu-1 was calculated by the half-life (IC₅₀). 7500 cells were cultured for 24 h with 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 45 and 65 μg/mL of compounds **1**, **1a**, **2**, and **2a**. Compound **3** and **3a** were evaluated at 0.75, 1.5, 3, 6, 12, 25, 50 and 100 μg/mL. After 24 h, the number of cells was evaluated using crystal violet staining, and cisplatin was used as the positive control. Table 3 shows IC₅₀ values in CaSki, MDA-MB-231, and SK-LU-1 cancer cell lines.

3.5. Necrotic Activity in Tumor Cells

In order to evaluate the amount of necrosis induced by different molecules, the necrotic activity of compounds **1-2a**

was evaluated to determine whether they induce necrosis. CaSki, MDA-MB-231, and SK-LU-1 cell cultures were exposed to the compounds at the IC₅₀ values shown in Table 3; compounds **3** and **3a** were not evaluated. The amount of LDH released into the culture supernatant after the treatment was used as a measure of the loss of plasma membrane integrity. The cancer cell lines were treated with Triton X-100 1% in independent experiments, and the LDH release was adjusted to 100% to serve as a positive control.

4. DISCUSSION

4.1. Chemistry

Each flavonoid presented a different kind of reactivity under the nitration conditions evaluated. In this manner, the best nitration conditions of chrysin were established with bismuth (III) nitrate in glacial acetic acid to obtain compound **1a** with a yield of 79%. Scheme 1 shows chrysin nitration conditions. Other investigations have reported the synthesis of 8-nitrochrysin using nitric and acetic acid, with a yield of 70% [24–26]. It was possible to obtain a similar yield with this reaction compared to the yields obtained when using nitric and sulfuric acid in other investigations. The formation of other nitration compounds was not detected, so the nitration was regioselective at the C-8, ortho C7-OH position in the A ring. This was the ring most activated by hydroxyl groups bound to the C5 and C7 positions. Some nitration reactions of phenols with acetic acid and metallic nitrates, such as calcium nitrate [27] or copper (II) nitrate [28], suggest the formation of small concentrations of HNO₃ that generate nitronium ions, which favor a nitration reaction through an electrophilic aromatic substitution mechanism. With these nitration conditions, we provided another method of obtaining nitro flavones with a similar hydroxylation pattern. The use of silica gel, bismuth (III) nitrate in THF, and heating did not generate nitrate compounds, and chrysin was recovered. The NO_x gas mixture was not applied to chrysin in the search for nitration conditions for this flavonoid. Comparing the degree of acidity in the nitration conditions of chrysin with silica gel and glacial

Table 2. Anti-inflammatory activity of flavonoids and nitro derivatives by TPA-induced ear edema assay.

Compound	Dose (mg/ear)	Edema Mean ± SEM (mg)	Inhibition Rate (%)
Control (CH ₃ Cl)	1	15.77 ± 0.56	-
1	1	13.20 ± 0.71 [†]	16.28
1a	1	11.43 ± 0.26 [†]	27.48
Control (CH ₃ OH)	1	17.43 ± 0.30	
2	1	12.10 ± 0.46 ^{†a}	30.59
2a	1	11.83 ± 0.38 ^{†a}	32.12
3	1	15.43 ± 0.62 [†]	11.47
3a	1	12.47 ± 0.44 ^{†a}	28.49
Indomethacin	0.36	2.84 ± 1.28	94.97

The values represent the mean ± SEM of three independent experiments. ANOVA was performed followed by Tukey's multiple comparison tests, and there existed statistical significance * (P<0.05) among the control group and ^a compound 3 with **3a**, **2**, and **2a** compounds.

Table 3. The IC₅₀ of compounds 1-2a in cancer cell lines CaSki, MDA-MB-231 and SK-LU-1.

Compound/Cell Line	IC ₅₀ µg/mL (µM)		
	CaSki	MDA-MB-231	SK-LU-1
1	6 (23.6)	10 (39.4)	8 (31.5)
1a	8 (26.8)	9 (30.1)	6 (20.1)
2	39 (129.1)	55 (182.1)	39 (129.1)
2a	32 (92.2)	20 (57.6)	25 (72.0)
3	-	-	-
3a	-	-	-
Cisplatin	1.67 (5.54)	2.37 (7.87)	1.36 (4.52)

- No activity at 100 µg/mL

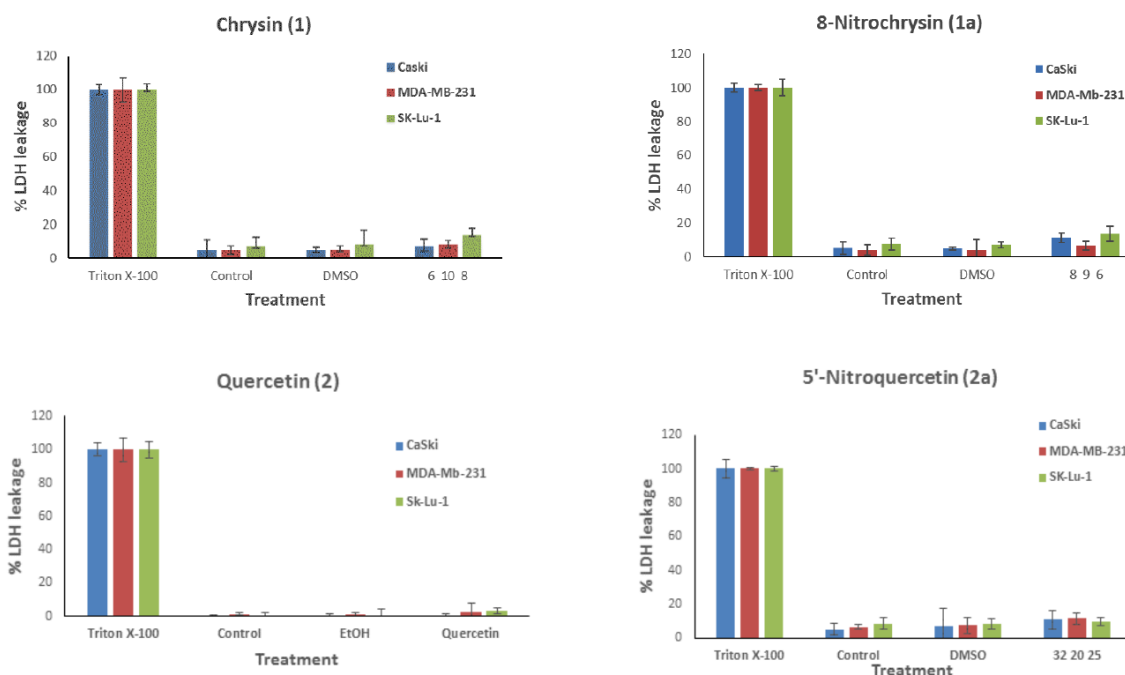


Fig. (2). Evaluation of the necrosis of compounds 1, 1a, 2, and 2a on CaSki, MDA-MB-231, and Sk-LU-1 cultures. Experimental data are presented as mean \pm S.D. for three independent experiments with three repetitions. * P 0.05 versus DMSO (ANOVA followed by Tukey's test). (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

acetic acid, this flavonoid required a condition of higher acidity to generate the nitration product.

The melting point of **1a** compound was 215-216 °C, closer to the melting point 224 °C, which was reported in other investigation [25]. The compound melted in a range of one degree, and the HR-DART-MS of 8-nitrochrysin showed an ion peak at m/z 300.05121 $[M + H]^+$ (calcd. for $C_{15}H_{10}N_1O_6$: 300.05081), indicating the presence of the nitro derivative.

Quercetin is a polyphenol that differs from chrysin in a catechol group in the B ring and a hydroxyl group at C-3.

These characteristics present in its structure favor its property to oxidize in acid medium or the presence of metals. This could be verified by placing quercetin in the presence of bismuth (III) nitrate, silica gel in THF, and heating where the reaction mixture was darkened and unstable compounds were generated, being difficult to separate and identify. On the other hand, applying other nitration conditions with glacial acetic acid and bismuth (III) nitrate under heating, a solid insoluble in organic solvents and water was formed; this solid was evaluated by EPR, and an organic radical was detected (Supplementary Material). Thus, side reactions were favored as a result of free radicals formation due to the

presence of bismuth (III) nitrate or an acid medium. Taking these considerations into account, quercetin was nitrated with a mix of NO_x gases formed by THF oxidation with HNO₃. Among the chemical species formed, N₂O₄ has been reported, which is considered as a nitrating agent [29]. Ortho C4'-OH nitration occurred and 5'-nitroquercetin was obtained under aforementioned conditions without any type of hydroxyl protective group. Despite this fact, the yield obtained was low, and no other product of the reaction was identified.

In the literature, there are no reports on the synthesis of 5'-nitroquercetin. In addition to the low reaction yield obtained in this work, the absence of reports in the literature on the synthesis of this compound can be attributed to the low redox potential of quercetin [30], making it difficult to obtain the nitro derivative under strong reaction conditions because of the side reactions generated.

The formation of 5'-nitroquercetin allowed us to propose the formation of the C4'-O' phenoxy radical since theoretical studies show that it is the most stable quercetin radical [31]. This radical reacted with N₂O₄, which was formed within the nitrogen oxide gas mixture by the oxidation of THF with HNO₃ [32].

The HR-DART-MS of 5'-nitroquercetin showed an ion peak at *m/z* 348.03577 [M + H]⁺ (calcd. for C₁₅H₁₀N₁O₉: 348.03556), indicating the presence of nitro group and the expected molecular ion.

The proton NMR spectrum displayed two doublets (*J* = 2,2 Hz) at δ 6.197 and 6.426 ppm corresponding to H6 and H8, respectively, and only two doublets with *J* = 2,2 Hz at δ 7.913 and 8.200 ppm corresponding to H2' and H6', respectively. Therefore the substitution occurred in ring B in C5 position because no signal was observed in the proton spectrum with ortho coupling constants. Some important ³*J*_{CH} correlations were observed between C2 and C4' with H2' and H6', and some ²*J*_{CH} correlations were displayed between C5' with C6' and C3' with H2'; these correlations are shown on the structure displayed in Fig. (3).

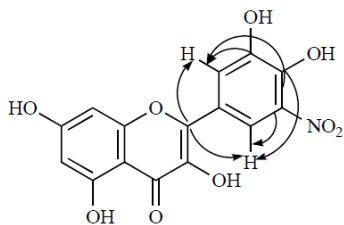


Fig. (3). Some important ³*J*_{CH} and ²*J*_{CH} correlations of 5'-nitroquercetin.

Naringin, a glycoside flavonoid, was commercially acquired as an enantiomeric mix. Nitration reaction conditions using glacial acetic acid and bismuth (III) nitrate were sufficient to yield 2-*R,S* 3'-nitronaringin (38%) with a change in the degree of acidity when using silica gel, bismuth (III) nitrate in THF and heating. 2-*R,S* 3'-nitronaringin was generated at 50% of yield, and other products were not detected. On the other hand, naringin with the gas mixture NO_x as a nitration condition generated a complex mixture of unidentified compounds.

Some authors suggest that the interaction of bismuth (III) nitrate with the free hydroxyl group located in the multi-metallic structure of the silica gel is important for the formation of the nitronium ion and to carry out an aromatic electrophilic substitution [33, 34]. The nitration occurred in the ortho position at C4'-OH in the B ring, and changes were observed in the signals of the protons in this ring of the product. The AA'BB' system of naringin (1) changed to the ABC system in 3'-nitronaringin because of the mono substitution. The proton NMR spectra of compounds 3a showed a set of additional signals, which were overlapped. Some signals were slightly distinguishable, and others were observed as multiplets. The presence of a side signal close to the other set of signals has been observed in enantiomeric mixtures of *O*-glycosylated flavanones, where *O*-glycosylation at C7-O is the reason that protons can be slightly distinguishable in ¹H NMR experiment [35].

Some important ³*J*_{CH} correlations in the HMBC experiment were observed between C1' with H5', C2' with H6', C3' with H5' and C4' with H2' and H6' for 3'-nitronaringin. These carbon-proton correlations showed that the substitution was carried out at C3' position, as shown in Fig. (4).

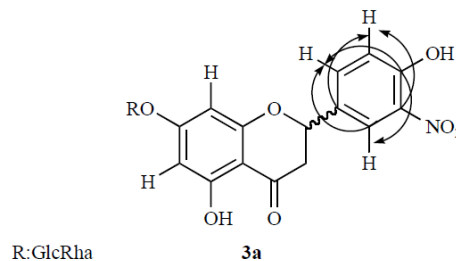


Fig. (4). Some important ³*J*_{CH} correlations in compound 3a.

The number and position of the hydroxyl groups were important in carrying out the nitration of the flavonoids. In this manner, nitration was favored in the B ring over ring A if the B ring had at least one hydroxyl group. However, the presence of the catechol group favored side reactions over the reaction of nitration.

4.2. Antioxidant Activity

The DPPH free radical scavenging method is the first approach to determine the antioxidant potential of a compound [36]. Many flavonoids are recognized for having a good antioxidant activity. The primary mechanism by which they act is attributed to the ability to donate a hydrogen atom or to electron transfer [37-39]. The results in Table 1 show that quercetin is the only flavonoid that exhibited DPPH radical trapping activity because this flavonoid possesses all the structural characteristics, such as the catechol group in ring B, a double bond between C2=C3 conjugated with the ketone at C4, a hydroxyl group at C3 and C5. It has been reported in other researches that it also acts as a good free radical scavenger [5, 40, 41].

The activity of derivate 5'-nitroquercetin was better than quercetin and α-tocopherol, the positive control. The IC₅₀ values of quercetin and 5'-nitroquercetin were 15.6±0.6 and 10.7±0.1 μM, respectively. There existed a significant dif-

ference; therefore, the introduction of the nitro group at position C5' improved its antioxidant capacity, being even better than the positive control.

Chrysin does not have hydroxyl groups in ring B and at C3, so it did not present DPPH radical scavenging activity at concentrations less than 100 μM . In the same way, naringin did not show DPPH radical scavenging activity at concentrations below 100 μM because C7-*O*-glycosylation reduced radical scavenging activity, possibly by a steric effect and the missing double bond between C2=C3. The C3 hydroxyl and catechol groups in ring B decreased the positions to delocalize electrons [40, 42]. The introduction of the nitro group was only important in the quercetin molecule at position C5', favoring an increase in the ability to donate a hydrogen atom to the DPPH radical.

4.3. Anti-Inflammatory Activity

The application of TPA produced an inflammatory response in mice ears, leading to massive edema formation and an influx of neutrophils [43]. Different investigations on the anti-inflammatory effects of flavonoids have been conducted. It has been observed that they can act as free radical scavengers or inhibit enzymes related to the inflammatory process [44]. In this work, the results shown in Table 2 indicate that chrysin (16.28%) and 8-nitrochrysin (27.48%) exhibited moderate anti-inflammatory activity. Still, the nitro group at position C8 did not generate a significant increase in the inhibition of edema. In other investigations, it has been reported that structural modifications at the C8 and C6 positions in the chrysin molecule change its anti-inflammatory properties [45]; for example, the presence of 4-pyridinyl group at position C8 improved its anti-inflammatory activity *via* inhibition of enzymes and mediators related to inflammatory processes [46, 47].

In the same manner as chrysin, quercetin (30.59%) and 5'-nitroquercetin (32.12%) exhibited moderate anti-inflammatory activity, but the introduction of the nitro group at position C5' did not generate any change in inhibition of edema. On the other hand, the introduction of the nitro group at position C3' in naringin, compound **3a** (28.49%), produced a significant decrease in inflammation compared to naringin (11.47%). Neither flavonoid nor its nitro derivative reduced edema like indomethacin (94.97%) did.

There are several quercetin studies at the preclinical level related to the decrease of an immuno-inflammatory response in various diseases [48, 49]. In the same way, naringin has been shown to be effective in reducing the expression of signaling factors associated with the inflammatory response [50]. However, no study on biological activity has been found in the literature for the 5'-nitroquercetin and 3'-nitronaringin compounds. In relation to the 3'-nitronaringin, an improvement in the reduction of edema was observed in comparison with the starting compound; this can be explained by the fact that naringin and 3'-nitronaringin were the molecules with the highest polarity in this study and the application of the compounds was carried out topically, so the reduction of edema may be influenced by the polarity of the molecules and the rate of absorption through the skin [51]. It could be interesting to explore the anti-inflammatory

activity of nitro derivatives in other models, which will allow us to precisely elucidate the effect of the nitro group.

4.4. Anti-Proliferative Activity

All the flavonoids had lower anti-proliferative activity than the positive control. Still, this work showed that the structure of the flavonoid and the introduction of the nitro group produced a change in its activity. In this way, the IC_{50} values of chrysin were the lowest in the three cell lines, but they did not show a significant difference with respect to 8-nitrochrysin, suggesting that the nitro group at the C-8 position is not important for the anti-proliferative activity improvement. However, an investigation report about 8-nitrochrysin showed anti-proliferative activity in the MDA-MB-453 cancer cell line and induced apoptosis [52]. This information is consistent with the results of this work.

The IC_{50} value of 5'-nitroquercetin in three cancer cell lines was lower than those obtained with the starting compounds, indicating an improvement in the anti-proliferative activity. In the literature, there are no reports on the anti-proliferative activity of 5'-nitroquercetin. These results show a first approximation of the effect of the nitro group on the B ring, ortho to C4'-OH. This relevance is due to the importance that quercetin has acquired in cancer treatments.

Naringin and 3'-nitronaringin did not inhibit cancer cell proliferation, so the nitro group did not improve the anti-proliferative activity of naringin. In addition, other research regarding the anti-proliferative activity of naringin indicates an IC_{50} value of 750 μM to inhibit the cell growth of human cervical cancer [53], supporting the absence of activity of this flavonoid in our results since the maximum concentration evaluated was 172 μM .

The flavone structure of chrysin and 8-nitrochrysin presented the lowest IC_{50} values in comparison with the flavonol structure of quercetin and 5'-nitroquercetin. This indicates that flavone could be an interesting base structure to be modified in the search for compounds with better anti-proliferative activity.

4.5. Necrotic Activity in Tumor Cells

Our results show that these flavonoids inhibit tumor cell proliferation without inducing necrotic cell death nor any significant activity of the LDH enzyme. This suggests that any compound can induce necrosis in CaSki, MDA-MB-231, and SK-LU-1 cancer cells. This is important when we consider that the side effects of some natural and synthetic molecules induce necrosis [54]. Fig. 2 shows that no IC_{50} value in the different cancer cell lines has a significant difference between the control and the vehicle. This confirms that compounds **1**, **1a**, **2**, and **2a** do not induce necrosis.

Quercetin, chrysin, and naringin are some of the most abundant flavonoids in nature and are recognized for having various biological effects. Small changes in their substitution patterns allow increasing or decreasing these activities. However, these compounds naturally do not have nitrogen in their structure. This work represents an opportunity to obtain new nitrogenous compounds. Still, the low redox potential of some of them makes them labile under harsh reaction condi-

tions, making it difficult to modify the structures of these molecules.

In this work, we obtained nitro flavonoids, implementing mild reaction conditions, and provided a first approximation of the effect of the nitro group in derivatives **1a**, **2a**, and **3a** on anti-inflammatory, antioxidant, and anti-proliferative responses. Therefore, we will implement future structural modifications on 2-phenylbenzopyran skeleton with the aim to improve the biological activities of these compounds.

CONCLUSION

The present findings show that flavonoid nitration conditions were established without the use of a hydroxyl protective group. The number and position of the hydroxyl group are important to carry out nitro aromatic substitution; the presence of catechol group makes the molecule labile under nitration conditions. 8-Nitrochrysin (**1a**), 5'-nitroquercetin (**2a**), 3'-nitronaringin (**3a**) as derivatives were obtained. The antioxidant, anti-inflammatory, and anti-proliferative activities of the starting compounds and nitro derivatives were evaluated. Although chrysin showed higher anti-proliferative activity than quercetin and naringin, the introduction of the nitro group at C-8 did not improve its anti-proliferative, antioxidant, and anti-inflammatory activities. On the other hand, the introduction of the nitro group at C-5' in quercetin structure was important to improve its antioxidant and anti-proliferative activities on cancer cell lines. The introduction of the nitro group at C-3' in naringin improved its anti-inflammatory activity, but not its antioxidant and anti-proliferative activities. Chrysin, 8-nitrochrysin, quercetin, and 5'-nitroquercetin did not show necrotic activity, which is essential in promoting future investigations of structural modification on 2-phenylbenzopyran skeleton to optimize the biological activity of these compounds.

LIST OF ABBREVIATIONS

Mp	=	Melting Point
THF	=	Tetrahydrofuran
LDH	=	Lactate Dehydrogenase
ppm	=	Parts Per Million
¹ H NMR	=	Proton Nuclear Magnetic Resonance
EPR	=	Electron Paramagnetic Resonance
<i>J</i>	=	Coupling Constant
³ <i>J</i> _{CH}	=	A Three-Bond Carbon Hydrogen Coupling
² <i>J</i> _{CH}	=	A Two-Bond Carbon Hydrogen Coupling
δ	=	Chemical Shift

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No Animals/Humans were used for studies that are the basis of this research.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

Not applicable.

FUNDING

This work was supported by SEP-CONACYT, Investigación Científica Básica (253979), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Scholarships 662794 awarded to R. T. H and 255881 awarded to H. L. M.), Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México (AG200418, IN216718, 227919).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

Rosario Tavera Hernández is thankful to Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México and Instituto de Química, UNAM. The authors are thankful to Beatriz Quiroz García, Isabel Chávez Uribe, Luis Velázco Ibarra, Francisco Javier Pérez López, María del Rocío Patiño Maya, Virginia Gómez Vidales, Lucía del Carmen Márquez, Lucero Mayra Ríos Ruiz and Eréndira García for technical assistance, and Professor Rafael Ibarra Contreras for reviewing the English language. Jesús J. Alvarado Sansininea is thankful to Conacyt for supporting his postdoctoral stay.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Spectral data of compounds and IC₅₀ values of the anti-proliferative activity are given in the Supplementary Material section.

REFERENCES

- [1] Duracková, Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol. Res.*, **2010**, *59*(4), 459-469. PMID: 19929132
- [2] Kundu, J.K.; Surh, Y-J. Emerging avenues linking inflammation and cancer. *Free Radic. Biol. Med.*, **2012**, *52*(9), 2013-2037. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.035> PMID: 22391222
- [3] Gonda, T.A.; Tu, S.; Wang, T.C. Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis. *Cell Cycle*, **2009**, *8*(13), 2005-2013. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.8.13.8985> PMID: 19550141
- [4] Chen, J.; Li, W.; Yao, H.; Xu, J. Insights into drug discovery from natural products through structural modification. *Fitoterapia*, **2015**, *103*, 231-241. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2015.04.012> PMID: 25917513
- [5] Rice-Evans, C. Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem.*, **2001**, *8*(7), 797-807. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867013373011> PMID: 11375750
- [6] Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, **2002**, *13*(10), 572-584.

- [http://dx.doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5) PMID: 12550068
- [7] Hernández-Rodríguez, P.; Baquero, L.P.; Larrota, H.R. Flavonoids: potential therapeutic agents by their antioxidant capacity. *Bioactive Compounds*; Elsevier, **2019**, pp. 265-288. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00014-1>
- [8] Candiracci, M.; Piatti, E.; Dominguez-Barragán, M.; García-Antrás, D.; Morgado, B.; Ruano, D.; Gutiérrez, J.F.; Parrado, J.; Castaño, A. Anti-inflammatory activity of a honey flavonoid extract on lipopolysaccharide-activated N13 microglial cells. *J. Agric. Food Chem.*, **2012**, 60(50), 12304-12311. <http://dx.doi.org/10.1021/jf302468h> PMID: 23176387
- [9] Pan, M-H.; Lai, C-S.; Ho, C-T. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food Funct.*, **2010**, 1(1), 15-31. <http://dx.doi.org/10.1039/c0fo00103a> PMID: 21776454
- [10] Kandaswami, C.; Lee, L-T.A.; Lee, P-P.H.; Hwang, J.J.; Ke, F.C.; Huang, Y.T.; Lee, M.T. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo*, **2005**, 19(5), 895-909. PMID: 16097445
- [11] Chahar, M.K.; Sharma, N.; Dobhal, M.P.; Joshi, Y.C. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn. Rev.*, **2011**, 5(9), 1-12. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-7847.79093> PMID: 22096313
- [12] Ravishankar, D.; Rajora, A.K.; Greco, F.; Osborn, H.M.T. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2013**, 45(12), 2821-2831. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2013.10.004> PMID: 24128857
- [13] Marais, J.P.J.; Deavours, B.; Dixon, R.A.; Ferreira, D. The Chemistry of Flavonoids. *The Science of Flavonoids*; Grotewold, E., Ed.; Springer: New York, **2006**, pp. 1-46. http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-28822-2_1
- [14] Cazarolli, L.H.; Zanatta, L.; Alberton, E.H.; Figueiredo, M.S.; Folador, P.; Damazio, R.G.; Pizzolatti, M.G.; Silva, F.R. Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini Rev. Med. Chem.*, **2008**, 8(13), 1429-1440. <http://dx.doi.org/10.2174/138955708786369564> PMID: 18991758
- [15] Xiao, Z.; Morris-Natschke, S.L.; Lee, K-H. Strategies for the optimization of natural leads to anticancer drugs or drug candidates. *Med. Res. Rev.*, **2016**, 36(1), 32-91. <http://dx.doi.org/10.1002/med.21377> PMID: 26359649
- [16] Lopes, M.S.; de Andrade Sena, C.F.; Silva, B.L.; de Souza, C.M.; Ramos, J.P.; Cassali, G.D.; de Souza-Fagundes, E.M.; Alves, R.J.; de Oliveira, M.C.; de Oliveira, R.B. Synthesis of nitroaromatic compounds as potential anticancer agents. *Anticancer. Agents Med. Chem.*, **2015**, 15(2), 206-216. <http://dx.doi.org/10.2174/1871520614666141114201749> PMID: 25403167
- [17] Reagents and methods of aromatic nitration. Olah, G.A.; Malhotra, R.; Narang, S.C., Eds.; *Nitration: Methods and Mechanisms*; Wiley-VCH, **1989**.
- [18] Vekariya, R.H.; Patel, H.D. Selective nitration of phenolic compounds by green synthetic approaches. *Synth. Commun.*, **2014**, 44, 2313-2335. <http://dx.doi.org/10.1080/00397911.2014.896925>
- [19] Zolfigol, M.A.; Madrakian, E.; Ghaemi, E.; Niknam, K. PEG-N₂O₄: An efficient nitrating agent for the selective mono- and dinitration of phenols under mild conditions. *Synth. Commun.*, **2008**, 38, 3366-3374. <http://dx.doi.org/10.1080/00397910802136706>
- [20] Shiri, M.; Zolfigol, M.A.; Kruger, H.G.; Tanbakouchian, Z. Advances in the application of N₂O₄/NO₂ in organic reactions. *Tetrahedron*, **2010**, 66, 9077-9106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2010.09.057>
- [21] Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **1995**, 28, 25-30. [http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- [22] Kueng, W.; Silber, E.; Eppenberger, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal. Biochem.*, **1989**, 182(1), 16-19. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90710-0](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(89)90710-0) PMID: 2604040
- [23] Fotakis, G.; Timbrell, J.A. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.*, **2006**, 160(2), 171-177. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.001> PMID: 16111842
- [24] Larget, R.; Lockhart, B.; Renard, P.; Langeron, M. A convenient extension of the Wessely-Moser rearrangement for the synthesis of substituted alkylaminoflavones as neuroprotective agents *in vitro*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, 10(8), 835-838. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-894X\(00\)00110-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-894X(00)00110-4) PMID: 10782697
- [25] Gao, H.; Kawabata, J. α -Glucosidase inhibition of 6-hydroxyflavones. Part 3: Synthesis and evaluation of 2,3,4-trihydroxybenzoyl-containing flavonoid analogs and 6-aminoflavones as α -glucosidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, 13(5), 1661-1671. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2004.12.010> PMID: 15698784
- [26] Zhang, W.; Ding, X.; Li, Z. Synthesis of 2-phenoxy-2-oxo-1,4,2-oxazaphosphinanes from a three components reaction. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*, **2020**, 195, 359-366. <http://dx.doi.org/10.1080/10426507.2019.1700417>
- [27] Bose, A.K.; Ganguly, S.N.; Manhas, M.S. Microwave promoted rapid nitration of phenolic compounds with calcium nitrate. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 1885-1888. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.01.094>
- [28] Yadav, U.; Mande, H.M.; Ghalsasi, P.S. Nitration of phenols using Cu(NO₃)₂: green chemistry laboratory experiment. *J. Chem. Educ.*, **2012**, 89, 268-270. <http://dx.doi.org/10.1021/ed100957v>
- [29] Jiménez-Estrada, M.; Ayala, J.; Reyes-Chilpa, R. Nitración de productos naturales con anillos furánicos y benzofuránicos. *Rev. Latinoam. Quím.*, **1999**, 27, 81-88.
- [30] Pietta, P-G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, **2000**, 63(7), 1035-1042. <http://dx.doi.org/10.1021/np9904509> PMID: 10924197
- [31] Rong, Y.; Wang, Z.; Wu, J.; Zhao, B. A theoretical study on cellular antioxidant activity of selected flavonoids. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **2012**, 93, 235-239. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2012.03.008> PMID: 22484257
- [32] Svetlakov, N.V.; Nikitin, V.G.; Orekhova, A.O. Oxidation of tetrahydrofuran and 1,4-butanediol with nitric acid. *Russ. J. Appl. Chem.*, **2002**, 75, 669-671. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1019550005170>
- [33] Matsumoto, T.; Yamauchi, A.; Ishikawa, J. Solid-phase aromatic nitration with Mg(NO₃)₂ on silica gel. *Int. J. Org. Chem. (Irvine)*, **2017**, 7, 1-11. <http://dx.doi.org/10.4236/ijoc.2017.71001>
- [34] Samajdar, S.; Becker, F.F.; Banik, B.K. Surface-mediated highly efficient regioselective nitration of aromatic compounds by bis-muth nitrate. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 8017-8020. [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)01397-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039(00)01397-6)
- [35] Maltese, F.; Erkelens, C.; van der Kooy, F.; Choi, Y.H. Identification of natural epimeric flavanone glycosides by NMR spectroscopy. *Food Chem.*, **2009**, 116, 575-579. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.023>
- [36] Kedare, S.B.; Singh, R.P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.*, **2011**, 48(4), 412-422. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1> PMID: 23572765
- [37] Amić, D.; Davidović-Amić, D.; Beslo, D.; Rastija, V.; Lucić, B.; Trinajstić, N. SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Curr. Med. Chem.*, **2007**, 14(7), 827-845. <http://dx.doi.org/10.2174/092986707780090954> PMID: 17346166
- [38] Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.*, **2011**, 125, 288-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.012>
- [39] Imai, K.; Nakanishi, I.; Ohkubo, K. Synthesis of methylated quercetin analogues for enhancement of radical-scavenging activity. *RSC Advances*, **2017**, 7, 17968-17979. <http://dx.doi.org/10.1039/C7RA02329D>
- [40] de Queiroz Ferreira, R.; Greco, S.J.; Delarmelina, M.; Weber, K.C. Electrochemical quantification of the structure/antioxidant activity relationship of flavonoids. *Electrochim. Acta*, **2015**, 163, 161-166. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2015.02.164>
- [41] Sekher Pannala, A.; Chan, T.S.; O'Brien, P.J.; Rice-Evans, C.A. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2001**, 282(5), 1161-1168. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2001.4705> PMID: 11302737
- [42] Xiao, J. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2017**, 57(9), 1874-1905.

- PMID: 26176651
- [43] Williams, M.R.; Azcutia, V.; Newton, G.; Alcaide, P.; Luscinskas, F.W. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends Immunol.*, **2011**, 32(10), 461-469.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2011.06.009> PMID: 21839681
- [44] Shukla, R.; Pandey, V.; Vadnere, G.P.; Lodhi, S. Chapter 18. Role of flavonoids in management of inflammatory disorders. *Watson RS, Preedy VR (eds) Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*, 2nd ed.; Elsevier Inc, **2019**, pp. 293-322.
- [45] Luo, J.; Park, H. Synthesis of 8-Triazolochrysin Analogs Through Click Reaction. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2014**, 35, 3645-3646.
<http://dx.doi.org/10.5012/bkcs.2014.35.12.3645>
- [46] Lim, H.; Jin, J.H.; Park, H.; Kim, H.P. New synthetic anti-inflammatory chrysin analog, 5,7-dihydroxy-8-(pyridine-4yl)flavone. *Eur. J. Pharmacol.*, **2011**, 670(2-3), 617-622.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.09.010> PMID: 21946106
- [47] Che, H.; Lim, H.; Kim, H.P.; Park, H. A chrysin analog exhibited strong inhibitory activities against both PGE₂ and NO production. *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, 46(9), 4657-4660.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.04.044> PMID: 21719163
- [48] Salehi, B.; Machin, L.; Monzote, L.; Sharifi-Rad, J.; Ezzat, S.M.; Salem, M.A.; Merghany, R.M.; El Mahdy, N.M.; Kılıç, C.S.; Sytar, O.; Sharifi-Rad, M.; Sharopov, F.; Martins, N.; Martorell, M.; Cho, W.C. Therapeutic potential of quercetin: new insights and perspectives for human health. *ACS Omega*, **2020**, 5(20), 11849-11872.
<http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.0c01818> PMID: 32478277
- [49] Chirumbolo, S. The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function. *Inflamm. Allergy Drug Targets*, **2010**, 9(4), 263-285.
<http://dx.doi.org/10.2174/187152810793358741> PMID: 20887269
- [50] Chen, R.; Qi, Q-L.; Wang, M-T.; Li, Q-Y. Therapeutic potential of naringin: an overview. *Pharm. Biol.*, **2016**, 54(12), 3203-3210.
<http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2016.1216131> PMID: 27564838
- [51] Beledo, J.F.; Simón, J.A.A.; Martínez, A.M. *Farmacologia humana*, 6a. ed; Barcelona: Elsevier Spain, **2014**.
- [52] Zhao, X-C.; Cao, X-C.; Liu, F.; Quan, M.F.; Ren, K.Q.; Cao, J.G. Regulation of the FOXO3a/Bim signaling pathway by 5,7-dihydroxy-8-nitrochrysin in MDA-MB-453 breast cancer cells. *Oncol. Lett.*, **2013**, 5(3), 929-934.
<http://dx.doi.org/10.3892/ol.2012.1077> PMID: 23425937
- [53] Ramesh, E.; Alshatwi, A.A. Naringin induces death receptor and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (SiHa) cells. *Food Chem. Toxicol.*, **2013**, 51, 97-105.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.033> PMID: 22847135
- [54] Wu, C-A.; Yang, Y-W. Induction of cell death by saponin and antigen delivery. *Pharm. Res.*, **2004**, 21(2), 271-277.
<http://dx.doi.org/10.1023/B:PHAM.0000016239.04067.66> PMID: 15032308