

**SÍNTESIS DE 4-METILCUMARINAS POR ACTIVACIÓN MECANOQUÍMICA VÍA
REACCIÓN DE PECHMANN Y SUS ANÁLOGOS LAS DIHIDROCUMARINAS
VÍA HIDROARILACIÓN BAJO CONDICIONES LIBRES DE SOLVENTE**

SILVIA JULIANA BECERRA ANAYA



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

**SÍNTESIS DE 4-METILCUMARINAS POR ACTIVACIÓN MECANOQUÍMICA VÍA
REACCIÓN DE PECHMANN Y SUS ANÁLOGOS LAS DIHIDROCUMARINAS
VÍA HIDROARILACIÓN BAJO CONDICIONES LIBRES DE SOLVENTE**

SILVIA JULIANA BECERRA ANAYA

Trabajo de grado para optar el título de:

QUÍMICA

Co-director

DIEGO R. MERCHÁN ARENAS, MSc.

Director

VLADIMIR V. KOUZNETSOV, PhD., DSc.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2014

*“La humanidad también necesita soñadores,
para quienes el desarrollo de una tarea
sea tan cautivante que les resulte imposible
dedicar su atención a su propio beneficio”.*

Marie Curie.

A mi mami: Nelly Cecilia Anaya Anaya y en memoria de:

mi papi: Félix María Anaya Hernández,

mi nonita: Ernestina Anaya de Anaya y

mi padrastro: Antonio Reatequí.

*Este primer pedacito de mi vida profesional
indudablemente es dedicado a ustedes...
quienes con su infinito amor y protección,
han estado siempre ahí para mí...
cuidándome, guiándome y fortaleciéndome,
aun en los peores momentos...
cuando los sueños y anhelos
parecen inalcanzables.*

AGRADECIMIENTOS

Aprovecho esta oportunidad para expresar mis más sinceros agradecimientos a todos aquellos, que de alguna u otra forma, han contribuido no solo a la realización de este proyecto sino a mi formación profesional.

Al profesor Vladimir Kouznetsov, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme trabajar bajo su dirección. Por concederme la oportunidad de ser su auxiliar durante tres semestres consecutivos y por este proyecto; que se convirtió en un desafío y en una verdadera prueba de fuego para mí.

A Diego Rolando Merchán, co-director de esta investigación, por su ayuda incondicional e infinitas enseñanzas. Por el tiempo que le invirtió a mi formación, por su exigencia y por permitirme aprender a su lado. Mi más sincera y eterna gratitud por su acompañamiento desde mis primeros días en el laboratorio hasta la culminación de este proyecto. Siempre admiraré su disciplina y profundo compromiso hacia la Química Orgánica.

Al profesor José Carlos Gutierrez Gallego, por su apoyo incondicional y desinteresado. Gracias por hacer realidad este proyecto, porque definitivamente *Ball milling* nunca habría visto la luz sin su ayuda. Por dedicarme todo el tiempo que necesité y siempre estar disponible para resolver mis dudas y los múltiples problemas que se presentaron. Por su paciencia para reparar el amalgamador las mil y una veces en que fue necesario. Por su complicidad para conseguir los elementos de molienda, cápsulas y esferas, tal cual como los necesitaba. Por todas aquellas ocasiones en las que sólo usted estuvo ahí, escuchándome atento y diligente.

Al profesor Juan Manuel Urbina González, el principal responsable de todo esto, por ser precisamente él, quien me introdujo en el cruel pero fascinante mundo de la Química Orgánica. Cada clase suya fue para mí una verdadera cátedra magistral y de seguro de no haberlo conocido, otro hubiese sido el camino recorrido.

Al profesor Luis Javier López Giraldo, director del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos, por la confianza depositada al permitirme trabajar en su laboratorio. Fueron unos meses maravillosos, en los cuales siempre me sentí como una

más de su hermosa familia CICTA. Al ingeniero Luis Carlos Rodríguez y a mi colega Arley Villamizar, mi eterno agradecimiento por su colaboración, enseñanzas e incondicional apoyo aun después de mi partida.

A Carlos Andrés Martínez Bonilla, por creer en *Ball milling* cuando pocos lo hicieron. Por su ayuda, apoyo y consejos en los peores momentos de este proyecto. Mi profunda admiración...usted fácilmente se puede describir en una sola palabra: INTEGRIDAD, al ser no solamente un gran químico orgánico, sino además un ser humano extra-ordinario, virtud en la cual siempre coincidimos... es la más importante en la vida.

A todos los integrantes del Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, quienes compartieron estos inolvidables dos años de mi vida. Muy especialmente a Andrés León, el mejor compañero que pude haber tenido. Por todos esos sábados, domingos, festivos, semana santa y navidad en los trabajamos sin cesar, pese al cansancio y al hambre. Mi eterno agradecimiento por su infinita colaboración, amistad y compañía. A Carlos Puerto por su orientación, asesoría y enseñanzas hacia el final de este proyecto. A Aurora Carreño por sus valiosos consejos y palabras de ánimo cuando el amor hacia la Orgánica parecía no ser razón suficiente para continuar... mi admiración como mujer y como investigadora.

A Andrea Katherine González, mi gran amiga, cómplice y colega, por el apoyo incondicional en los peores momentos de mi vida y por su compañía en todas aquellas extenuantes noches de estudio, en las que paso a paso y semestre a semestre nos fuimos convirtiendo en profesionales. A Yeimy Mabel Martínez y Lady Johanna Sierra, por sus profundos consejos, tiempo y ayuda. Niñas, mil y mil gracias por todas esas grandes enseñanzas que le han dejado a mi vida... mi eterno cariño y admiración.

Y cómo no agradecer a las personas más importantes de mi vida: MI FAMILIA, especialmente a mi mami Nelly Anaya por su eterno amor, comprensión y apoyo. Por todos estos años llenos de esfuerzos y sacrificios, en los que siempre me ha dado lo mejor. A mi tía Alix Anaya, quien ha sido fundamental en mi formación... gracias por ser esa hada madrina que siempre hace hasta lo imposible para que mis sueños sean una realidad. Por el infinito apoyo económico y moral, sin el cual sencillamente nada en mi vida hubiese sido posible. Siempre admiraré su excelencia, disciplina y pulcritud con la enfrenta la vida, además de su inagotable generosidad con el prójimo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	25
1. ESTADO DEL ARTE	27
1.1. El esqueleto cumarínico	27
1.2. Ocurrencia natural de las cumarinas	28
1.3. Análogos sintéticos de la cumarina	30
1.4. Aspectos sintéticos en la obtención de cumarinas	43
1.5. Las dihidrocumarinas	53
1.6. <i>Ball milling</i> en Síntesis Orgánica	55
2. HIPÓTESIS	64
3. OBJETIVOS	65
4. SECCIÓN EXPERIMENTAL	66
4.1. Síntesis de tres etapas de la 7-amino-4-metilcumarina	69
4.2. Síntesis de 4-metilcumarinas mediante la implementación del protocolo <i>Ball milling</i> en la reacción de Pechmann	71
4.3. Síntesis de nuevas 4-aril-3,4-dihidrocumarinas a través de la condensación del timol con ácidos cinámicos	76
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS	79
5.1. Síntesis de tres etapas de la 7-amino-4-metilcumarina	85
5.2. Desarrollo del protocolo <i>Ball milling</i> en la reacción de Pechmann	106
5.3. Síntesis de nuevas 4-aril-3,4-dihidrocumarinas a través de la condensación del timol con ácidos cinámicos	121

CONCLUSIONES	134
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
BIBLIOGRAFÍA	149
ANEXOS	162

LISTA DE ESQUEMAS

		Pág.
Esquema 1.	Biosíntesis de cumarinas en plantas.	28
Esquema 2.	Mecanismos de captación de radicales libres.	37
Esquema 3.	Estabilización del nuevo radical cumarínico.	38
Esquema 4.	Métodos de síntesis de cumarinas.	44
Esquema 5.	Reacción de Pechmann	45
Esquema 6.	Mecanismo de la reacción de Pechmann: <i>trans</i> -esterificación, alquilación, y deshidratación.	46
Esquema 7.	Reacción de Pechmann catalizada por HClO ₄ /SiO ₂	47
Esquema 8.	Reacción de Pechmann catalizada por cloruro de sílice mesoporosa periódica, PMSCI.	48
Esquema 9.	Reacción de Pechmann catalizada por SBA-15-Ph-PrSO ₃ H.	49
Esquema 10.	Reacción de Pechmann catalizada por CMK-5-SO ₃ H.	50
Esquema 11.	Mecanismo propuesto en la reacción de Pechmann catalizada por NTDSS.	52
Esquema 12.	Posibles rutas que conducen a la formación del núcleo dihidrocumarínico.	53
Esquema 13.	Mecanismo propuesto para la formación de 4-aril-3,4-dihidrocumarinas vía hidroarilación seguida de <i>trans</i> -esterificación intramolecular.	54
Esquema 14.	Reacción general para la síntesis en molinos de bolas.	56
Esquema 15.	Oxidación selectiva del γ -terpineno utilizando un molino de bolas planetario.	60

Esquema 16.	Síntesis de derivados 2,3,6,7-tetrahidro-4(5 <i>H</i>)-benzofuranona mediante la metodología <i>Ball milling</i> .	62
Esquema 17	Síntesis de dos etapas de 3 <i>H</i> -benzo[<i>f</i>]furanos mediada por <i>Ball milling</i> .	63
Esquema 18.	Síntesis mecanoquímica de pirano [2,3- <i>d</i>] pirimidin-6-carbonitrilos mediante la condensación de tres componentes en un molino de bolas.	63
Esquema 19.	Síntesis de la 7-amino-4-metilcumarina, mediante un procedimiento de tres etapas: I. Protección del grupo NH ₂ , II. Formación del núcleo cumarínico, III. Desprotección del grupo NH ₂ .	69
Esquema 20.	Protocolo <i>Ball milling</i> en la reacción de Pechmann.	72
Esquema 21.	Reacción de hidroarilación entre el timol y ácidos cinámicos.	77
Esquema 22.	Metodología convencional empleada en la síntesis de la 7-amino-4-metilcumarina.	79
Esquema 23.	Hipótesis de Pechmann en la condensación del <i>m</i> -aminofenol con acetoacetato de etilo.	83
Esquema 24.	Compuestos aislados en la condensación del <i>m</i> -aminofenol y el acetoacetato de etilo catalizada mediante ZnCl ₂ anhidro.	84
Esquema 25.	Conversión del grupo amino en amida.	86
Esquema 26.	Conversión del grupo amino en uretano.	86
Esquema 27.	I. Protección del grupo NH ₂ .	87
Esquema 28.	Formación del carbetoxiaminofenol mediante una sustitución nucleofílica bimolecular, S _N 2.	87
Esquema 29.	II. Formación del núcleo cumarínico.	93
Esquema 30.	III. Desprotección del grupo amino.	100

Esquema 31.	Mecanismo de la hidrólisis ácida de <u>5</u> .	100
Esquema 32.	Reacción modelo y los parámetros de reacción evaluados.	107
Esquema 33.	Protocolo <i>Ball milling</i> en la Reacción de Pechmann.	114
Esquema 34.	Etapa de alquilación intramolecular en la reacción de Pechmann.	115
Esquema 35.	Estabilización el catión aromático.	116
Esquema 36.	Regioselectividad de la reacción de Pechmann empleado el β -naftol como precursor.	121
Esquema 37.	4-aril-3,4-dihidrocumarinas sintetizadas a partir del timol y ácidos cinámicos.	122
Esquema 38.	Ruta de fragmentación propuesta para el compuesto <u>9a</u> .	126

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Semilla de la especie <i>Coumarouna odorata</i> Aube (<i>Dipteryx odorata</i>) y el esqueleto de la cumarina.	27
Figura 2.	Diversidad estructural del anillo cumarínico en el reino vegetal.	29
Figura 3.	Estructura del dicumarol, aislado por primera del trébol de olor.	30
Figura 4.	Estructuras de derivados cumarínicos de uso clínico.	32
Figura 5.	Modificación estructural del Novobiocin.	34
Figura 6.	Híbridos Cumarin-estilbenos.	34
Figura 7.	Esqueleto cumarínico hibridado con bencimidazol y triazina.	36
Figura 8.	Híbridos de la cumarina con chalcona, cromona, benzofurano y 4-hidroxycumarina.	39
Figura 9.	Híbridos de la cumarina con el <i>trans</i> -resveratrol y la tacrina.	42
Figura 10.	Híbridos de la cumarina con la julolidina y la alquilamina.	43
Figura 11.	Representación de la formación de las partículas coloidales sobre la superficie de la nanopartícula de TiO ₂ (nano-TiO ₂) inmovilizada sobre dodecil sulfato-sílica, NTDSS, en presencia de reactivos orgánicos en el agua.	51
Figura 12.	Especie <i>Thymus vulgaris</i> y estructura química del timol.	55
Figura 13.	Correlación entre la frecuencia de rotación v_{rot} y el tiempo de molienda t en el rendimiento de la síntesis	58

de la nopinona vía oxidación seca del β -pineno con KMnO_4 en un molino de bolas planetario.

Figura 14.	Montaje experimental empleado en la reacción de Pechmann, mediante el protocolo <i>Ball milling</i> .	72
Figura 15.	Espectros experimentales de los sólidos aislados, (a, b). Espectro reportado de la 7-amino-4-metilcumarina (c).	81
Figura 16.	Características de la Reacción de Pechmann.	83
Figura 17.	Espectro IR experimental de <u>3</u> .	88
Figura 18.	Espectro RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de <u>3</u> .	90
Figura 19.	Espectro RMN ^{13}C (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de <u>3</u> .	90
Figura 20.	Superposición de los espectros DEPT-135 y ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$) de <u>3</u> .	91
Figura 21.	Espectro COSY $^1\text{H-}^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de <u>3</u> .	92
Figura 22.	Espectro heteronuclear HSQC (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de <u>3</u> .	92
Figura 23.	Espectro IR de <u>5</u> .	94
Figura 24.	Espectro RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de <u>5</u> .	95
Figura 25.	Espectro COSY $^1\text{H-}^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de <u>5</u> .	97
Figura 26.	Espectro RMN ^{13}C de (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) <u>5</u> .	97
Figura 27.	Superposición de los espectros DEPT-135 y ^{13}C (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de <u>5</u> .	98
Figura 28.	Espectro HSQC de (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) <u>5</u> .	99
Figura 29.	Espectro IR de <u>6a</u> .	101
Figura 30.	Espectro RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de <u>6a</u> .	103
Figura 31.	Espectro COSY $^1\text{H-}^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de <u>6a</u> .	104

Figura 32.	Espectro RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6) de <u>6a</u> .	105
Figura 33.	Espectro HSQC (400 MHz, DMSO- d_6) de <u>6a</u> .	105
Figura 34.	Superposición de los espectros DEPT-135 y ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6) ^{13}C de <u>6a</u> .	106
Figura 35.	Espectro IR de <u>9a</u> .	123
Figura 36.	Perfil cromatográfico del compuesto <u>9a</u> .	125
Figura 37.	Espectro de masas del compuesto <u>9a</u> .	125
Figura 38.	Espectro RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de <u>9a</u> .	127
Figura 39.	Conformación del núcleo dihidroumarínico y las interacciones de sus protones con sus respectivas constantes de acoplamiento.	128
Figura 40.	Expansión de la región alifática en el espectro de RMN ^1H - ^1H para <u>9a</u> .	129
Figura 41.	Espectro RMN COSY ^1H - ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de <u>9a</u> .	129
Figura 42.	Espectro RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6) de <u>9a</u> .	130
Figura 43.	Espectro RMN HSQC (400 MHz, DMSO- d_6) de <u>9a</u> .	131
Figura 44.	Superposición de los espectros DEPT-135 y ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6) <u>9a</u> .	132

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Características estructurales de los híbridos cumarínicos bioactivos.	40
Tabla 2.	Efecto del diámetro (d_{MB}) y el número de bolas de molienda (n_{MB}) sobre la obtención del <i>p</i> -cimeno en un molino de bolas planetario.	61
Tabla 3.	Herramientas de molienda empleadas en <i>Ball milling</i> .	66
Tabla 4.	Especificaciones técnicas de los amalgamadores empleados.	67
Tabla 5.	Catalizadores empleados en la síntesis de la 7-amino-4-metilcumarina 6a .	79
Tabla 6.	Desplazamiento químico y constantes de acoplamiento en el espectro RMN 1H - de 3 .	89
Tabla 7.	Desplazamiento químico y constantes de acoplamiento en el espectro RMN 1H - de 5 .	96
Tabla 8.	Desplazamiento químico y constantes de acoplamiento en el espectro RMN 1H de 6a .	102
Tabla 9.	Catalizadores empleados en la reacción de Pechmann mediante <i>Ball milling</i> .	108
Tabla 10.	Reactores empleados en la reacción de Pechmann mediante <i>Ball milling</i> .	109
Tabla 11.	Frecuencias de vibración estudiadas en la reacción de Pechmann mediante <i>Ball milling</i> .	111
Tabla 12.	Relación entre los movimientos del reactor y los equipos empleados.	112
Tabla 13.	Efecto del tamaño del cuerpo molidor y el catalizador en la Reacción de Pechmann.	113

Tabla 14.	4-metilcumarinas sustituidas obtenidas mediante <i>Ball milling</i> .	117
Tabla 15.	Bandas de absorci3n en el IR caracteristicas de <u>6a-g</u> .	117
Tabla 16.	Datos espectrosc3picos RMN ¹ H de <u>6a-e</u> .	118
Tabla 17.	Datos espectrosc3picos RMN ¹ H de <u>6f-g</u> .	119
Tabla 18.	Datos espectrosc3picos RMN ¹³ C de <u>6a-e</u> .	120
Tabla 19.	Datos espectrosc3picos RMN ¹³ C de <u>6f-g</u> .	120
Tabla 20.	Resultados obtenidos en la condensaci3n del timol con 3cidos cin3micos.	122
Tabla 21.	Bandas de absorci3n en el IR para los compuestos <u>9a-b</u> .	124
Tabla 22.	Datos espectrosc3picos RMN ¹ H de <u>9a-b</u> .	132
Tabla 23	Datos espectrosc3picos RMN ¹³ C de <u>9a-b</u> .	132

LISTA DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 1.	Espectro IR de la 7-amino-4-metilcumarina <u>6a.</u>	162
Anexo 2.	Espectro IR de la 7-hidroxi-4-metilcumarina <u>6b.</u>	162
Anexo 3.	Espectro IR de la 7-metoxi-4-metilcumarina <u>6c.</u>	163
Anexo 4.	Espectro IR de la 4-metilcumarina <u>6d.</u>	163
Anexo 5.	Espectro IR de la 4,7,8-trimetilcumarina <u>6e.</u>	164
Anexo 6.	Espectro IR de la 4-metil-2 <i>H</i> -benzo[<i>h</i>]cromon-2-ona <u>6f.</u>	164
Anexo 7.	Espectro IR de la 1-metil-3 <i>H</i> -benzo[<i>f</i>]cromon-3-ona <u>6g.</u>	165
Anexo 8.	Espectro RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de la 7-hidroxi-4-metilcumarina <u>6b.</u>	165
Anexo 9.	Espectro RMN ¹³ C (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de la 7-hidroxi-4-metilcumarina <u>6b.</u>	166
Anexo 10.	Espectro RMN DEPT-135 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de la 7-hidroxi-4-metilcumarina <u>6b.</u>	166
Anexo 11.	Espectro RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de la 7-metoxi-4-metilcumarina <u>6c.</u>	167
Anexo 12.	Espectro RMN ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃) de la 7-metoxi-4-metilcumarina <u>6c.</u>	167
Anexo 13.	Espectro RMN DEPT-135 (400 MHz, CDCl ₃) de la 7-metoxi-4-metilcumarina <u>6c.</u>	168
Anexo 14.	Espectro RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de la 4-metilcumarina <u>6d.</u>	168
Anexo 15.	Espectro RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de la 4,7,8-trimetilcumarina <u>6e.</u>	169
Anexo 16.	Espectro RMN ¹³ C (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de la 4,7,8-trimetilcumarina <u>6e.</u>	169

Anexo 17.	Espectro RMN DEPT-135 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de la 4,7,8-trimetilcumarina <u>6e.</u>	170
Anexo 18.	Espectro RMN DEPT-135 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de la 4,7,8-trimetilcumarina <u>6e.</u>	170
Anexo 19.	Espectro RMN ¹³ C (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de la 4-metil-2 <i>H</i> -benzo[<i>h</i>]cromon-2-ona <u>6f.</u>	171
Anexo 20.	Espectro RMN DEPT-135 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de la 4-metil-2 <i>H</i> -benzo[<i>h</i>]cromon-2-ona <u>6f.</u>	171
Anexo 21.	Espectro RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de la 1-metil-3 <i>H</i> -benzo[<i>f</i>]cromon-3-ona <u>6g.</u>	172
Anexo 22.	Espectro RMN ¹³ C (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de la 1-metil-3 <i>H</i> -benzo[<i>f</i>]cromon-3-ona <u>6g.</u>	172
Anexo 23.	Espectro RMN DEPT-135 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de la 1-metil-3 <i>H</i> -benzo[<i>f</i>]cromon-3-ona <u>6g.</u>	173
Anexo 24.	Espectro IR de la 8-isopropil-5-metil-4-fenilcromon-2-ona <u>9b.</u>	173
Anexo 25.	Perfil cromatográfico de la 8-isopropil-5-metil-4-fenilcromon-2-ona <u>9b.</u>	174
Anexo 26.	Espectro de masas de la 8-isopropil-5-metil-4-fenilcromon-2-ona <u>9b.</u>	174
Anexo 27.	Espectro RMN ¹ H de la 8-isopropil-5-metil-4-fenilcromon-2-ona <u>9b.</u>	175
Anexo 28.	Espectro RMN ¹³ C de la 8-isopropil-5-metil-4-fenilcromon-2-ona <u>9b.</u>	175
Anexo 29.	Espectro RMN DEPT-135 de la 8-isopropil-5-metil-4-fenilcromon-2-ona <u>9b.</u>	176
Anexo 30.	Espectro RMN COSY ¹ H- ¹ H de la 8-isopropil-5-metil-4-fenilcromon-2-ona <u>9b.</u>	176
Anexo 31.	Espectro RMN HSQC de la 8-isopropil-5-metil-4-fenilcromon-2-ona <u>9b.</u>	177

LISTA DE ABREVIATURAS

AB: ácidos de Brønsted.

AChE: enzima acetilcolinesterasa.

AL: ácidos de Lewis.

Ar: Arilo.

CCF: cromatografía en capa fina.

CG-MS: Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

COSY: Correlated Spectroscopy H-H.

d: doblete.

dd: doblete de dobletes.

DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.

g: gramo(s).

h: horas.

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation.

Hz: Hertz.

IC₅₀: concentración efectiva media.

IR: Espectroscopía Infrarroja.

J: constante de acoplamiento.

m/z: relación masa/carga.

m: multiplete.

mL: mililitros.

mmol: milimoles.

P.M: peso molecular.

Pf: punto de fusión.

Ph: fenilo.

ppm: partes por millón.

p-TSA: ácido *para*-toluenosulfónico.

QSAR: Quantitative structure activity relationship.

R_f: Factor de retención.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

t.a: temperatura ambiente.

TFA: ácido trifluoroacético.

t_R: tiempo de retención.

VHC: virus de la Hepatitis C.

VIH: virus de inmunodeficiencia humana.

δ: desplazamiento químico.

Φ: diámetro.

μM: micromolar.

°C: grados Celsius.

RESUMEN

TÍTULO: SÍNTESIS DE 4-METILCUMARINAS POR ACTIVACIÓN MECANOQUÍMICA VÍA REACCIÓN DE PECHMANN Y SUS ANÁLOGOS LAS DIHIDROCUMARINAS VÍA HIDROARILACIÓN BAJO CONDICIONES LIBRES DE SOLVENTE.*

AUTOR: SILVIA JULIANA BECERRA ANAYA**

PALABRAS CLAVE: 4-metilcumarinas, reacción de Pechmann, Ball milling, 4-aril-3,4-dihidrocumarinas, hidroarilación, Química verde.

Las cumarinas y sus análogos las dihidrocumarinas forman una clase elite de productos naturales que poseen perspectivas terapéuticas prometedoras. El interés científico en sus aplicaciones biomédicas ha llevado al aislamiento y caracterización de gran cantidad de estos compuestos en por lo menos 100 familias diferentes de plantas. Así mismo, en los últimos años se han implementado diferentes estrategias de hibridación molecular hacia la síntesis de nuevas moléculas multifuncionales a partir del núcleo cumarínico, encaminándose hacia el desarrollo de nuevos fármacos, que exhiban un perfil de selectividad mejorado, distintos modos de acción y la reducción de efectos secundarios no deseados en el organismo.

Con este enfoque la presente investigación se dirigió hacia el estudio, diseño e implementación de nuevos protocolos eco-amigables, basados en los principios de la química verde, hacia la obtención de promisorias moléculas bioactivas. Por tanto, se llevó a cabo la síntesis de una serie de siete 4-metilcumarinas a partir de fenoles diversamente sustituidos, con grupos activantes como NH_2 , OH , CH_3O , α y β -naftol, al igual que grupos débilmente activados como el CH_3 o sin activar como el fenol y acetoacetato de etilo, vía reacción de Pechmann, catalizada por InCl_3 . Esta metodología fue adaptada por primera vez a la aplicación de energía mecano-química, empleando la técnica de Ball milling. Bajo estos parámetros los compuestos se obtuvieron en tiempos de 5-60 minutos, con rendimientos entre 52-95 %. Con esta estrategia se redujo el uso de sustancias auxiliares como solventes y extensas horas de calentamiento.

Por otra parte, se realizó la síntesis de nuevas 4-aril-3,4-dihidrocumarinas (DHC) a través de un proceso de hidroarilación, bajo condiciones libres de solvente. En esta oportunidad se emplearon reactivos comerciales que se encuentran presentes en la naturaleza como el timol, el ácido cinámico y el ácido *p*-cumárico, obteniendo dos nuevas DHC con rendimientos del 88 y 94 %.

*Proyecto de Grado

**Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular. Director: Vladimir V. Kouznetsov, *PhD*, *DSc*. Co-director: Diego R. Merchán Arenas, *MSc*.

ABSTRACT

TITLE: MECHANOCHEMICAL SYNTHESIS OF 4-METHYL COUMARINS BY PECHMANN REACTION AND NEW DIHYDROCOUMARINS BY HYDROARYLATION UNDER SOLVENT FREE CONDITIONS.*

AUTHOR: SILVIA JULIANA BECERRA ANAYA**

KEYWORDS: 4-methylcoumarins, Pechmann reaction, Ball milling, 4-aryl-3,4-dihydrocoumarins, hydroarylation, Green Chemistry.

Coumarin and its analogues the dihydrocoumarins are an elite class of natural products with promising therapeutic features. The coumarin research and scientific interest, especially in their biomedical applications, have led toward the isolation and characterization of large numbers of these compounds in at least 100 different plant families. On the other hand, in recent years there have been introduced different strategies of molecular hybridization towards the synthesis of new multifunctional molecules from coumarin nucleus, heading for the development of new drugs, which exhibit a selectivity profile improved, different modes of action and reducing unwanted side effects in the body.

With these approaches, the present research was directed toward the study, design and implementation of new eco-friendly protocols, based on the principles of green chemistry, towards obtaining promising bioactive molecules. Therefore we carried out the synthesis of seven 4-methylcoumarins serie from different substituted phenols with activating groups such as NH₂, OH, CH₃O, α and β -naphthol; weakly activated groups such as CH₃ or unactivated like a phenol and ethyl acetoacetate via Pechmann reaction InCl₃ catalyzed. This methodology was first time adapted to the mechano-chemical energy application using Ball milling technique. Under these parameters the compounds were obtained between 5-60 minutes and yield between 52-95 %. With this strategy, the use of auxiliary substances such as solvents and extensive hours of heating was reduced.

Moreover, the synthesis of new 4-aryl-3,4-dihydrocoumarins (DHC) was performed through a process hydroarylation under solvent free conditions. On this case, commercial reagents, which are present in nature like thymol, cinnamic acid and p-coumaric acid were used, obtaining two new DHC in yields of 88 and 94 %.

*Bachelor Thesis

**Industrial University of Santander. Faculty of Science. Chemistry department. Organic and Biomolecular Chemistry Laboratory. Director: Vladimir V. Kouznetsov, *PhD, DSc*. Co-director: Diego R. Merchán Arenas, *MSc*.

INTRODUCCIÓN

Las cumarinas forman una clase elite de productos naturales que poseen perspectivas terapéuticas prometedoras. Su importancia biológica ha atraído un interés significativo de los químicos medicinales en el desarrollo de nuevas moléculas biológicamente activas. Junto a las acciones antitrombóticas y anticoagulantes probadas clínicamente, los derivados cumarínicos exhiben un amplio rango de acciones farmacológicas, entre las que sobresalen; antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatoria, antituberculosis, entre otras más. Así como sus relevantes propiedades que combaten los desórdenes degenerativos del sistema nervioso central, responsables de enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson, o aquellas que incrementan actualmente la tasa de mortalidad mundial como el cáncer y el sida.

De los compuestos sintéticos obtenidos en los últimos años, capaces de contrarrestar todas éstas patologías, muchos son descartados debido a su alta citotoxicidad. Por otra parte, aquellos que llegan a convertirse en fármacos, son poco eficientes y generan devastadores efectos secundarios en el organismo, proporcionando solamente una leve mejoría a la sintomatología pero no la cura definitiva de la enfermedad. Es por esto que se hace necesario el diseño y la síntesis de nuevos andamios estructurales que permitan encontrar alternativas terapéuticas.

El éxito de la industria farmacéutica es, en gran parte, construido sobre los logros imponentes de la Química Orgánica, una ciencia madura, que surgió como una disciplina distinta hace más de 150 años. Desde entonces se ha encaminado, muy especialmente, en la síntesis de productos naturales y de nuevos andamios estructurales hacia el descubrimiento de nuevos fármacos. Sin embargo, pese a su altruista misión y visión, sus procedimientos han acarreado serias

consecuencias medioambientales, catalogándola hoy en día como una de las industrias más contaminantes.

En la época actual, los seres humanos no sólo se enfrentan a los problemas ocasionados por las enfermedades que padecen, sino además a una inminente crisis ambiental, debido al progresivo deterioro del planeta. Motivo por el cual los investigadores han centrado su atención en el desarrollo de nuevas metodologías sintéticas; basando su trabajo científico en la aplicación de la química verde y sostenible.

Las exigencias en los métodos sintéticos verdes y sostenibles en combinación con la presión para producir un gran número de compuestos biológicamente activos, con rapidez y de una manera ambientalmente benigna; plantean importantes desafíos para los químicos orgánicos sintéticos. Este objetivo puede lograrse, en parte, a través del uso de técnicas no clásicas para llevar a cabo las reacciones químicas. Por lo cual, el desarrollo e implementación de nuevas metodologías eco-amigables han sido objeto de especial interés en los últimos años. En esta dirección, la presente investigación se encaminó hacia el estudio, diseño e implementación de nuevos protocolos eco-amigables, basados en los principios de la química verde, hacia la obtención de promisorias moléculas bioactivas, las 4-metilcumarinas y sus análogos las dihidrocumarinas.

Los autores agradecen la financiación del Patrimonio Autónomo Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas, contrato RC-0572-2012.

1. ESTADO DEL ARTE

1.1. Esqueleto cumarínico

El esqueleto cumarínico **1** corresponde a benzo- α -pirona (2*H*-1-benzopiran-2-ona), cuya nomenclatura sistemática fue establecida por la IUPAC.¹ El nombre de esta familia química se deriva de la especie *Coumarouna odorata* Aube (*Dipteryx odorata*), de la cual se aisló, por primera vez, el miembro más simple de esta clase, la cumarina (Figura 1). En 1820 Vogel logró extraer la cumarina a partir de las semillas de esta leguminosa y desde entonces más de 800 cumarinas se han identificado y caracterizado principalmente a partir de plantas.²



Figura 1. Semilla de la especie *Coumarouna odorata* Aube (*Dipteryx odorata*) y el esqueleto de la cumarina. Imagen tomada de http://es.wikipedia.org/wiki/Dipteryx_odorata.

La cumarina y sus derivados son notablemente utilizados como aditivos en alimentos, perfumes, cosméticos y agroquímicos. De igual forma, en el campo farmacéutico y medicinal son objeto de constantes investigaciones, debido al amplio espectro de actividades biológicas y terapéuticas que estas exhiben.³

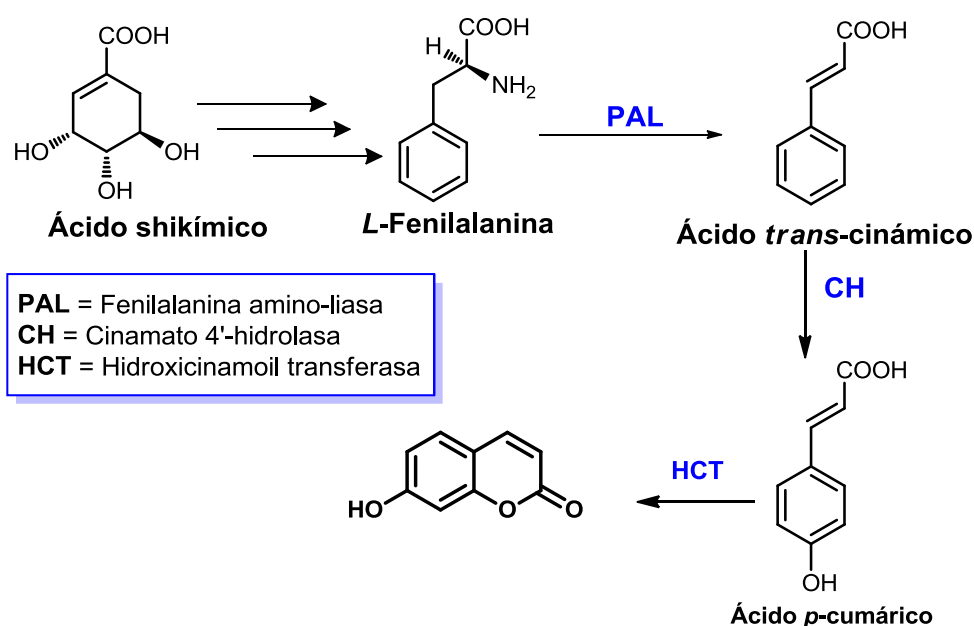
1.2. Ocurrencia natural de las cumarinas

1.2.1. Biosíntesis de la cumarina

La mayoría de las cumarinas en la naturaleza son biosintetizadas a partir del ácido shikímico, vía fenilalanina. Esta última es un aminoácido aromático, obtenido a

partir de un conjunto de reacciones metabólicas de gran relevancia, conocido como la ruta del ácido shikímico.⁴

La biosíntesis de las cumarinas empieza con la transformación de la fenilalanina a ácido *trans*-cinámico, reacción catalizada mediante la fenilalanina amonio liasa (PAL). Posteriormente, se produce la *p*-hidroxilación del ácido cinámico a través de la enzima cinamato 4'-hidrolasa (CH); el ácido *p*-cumárico formado en esta etapa da origen al núcleo cumarínico mediante su lactonización, llevada a cabo por la acción de la hidroxicinamoil transferasa (Esquema 1).⁵



Esquema 1. Biosíntesis de cumarinas en plantas.

1.2.2. Cumarinas naturales con propiedades farmacológicas

Las cumarinas son metabolitos secundarios de ocurrencia generalizada en todo el reino vegetal. Se han aislado y caracterizado gran cantidad de estos compuestos en por lo menos 100 familias diferentes de plantas. En estas se han encontrado diversas modificaciones en el núcleo benzopirano-2-ona y además un amplio espectro de actividades biológicas (Figura 2).⁶

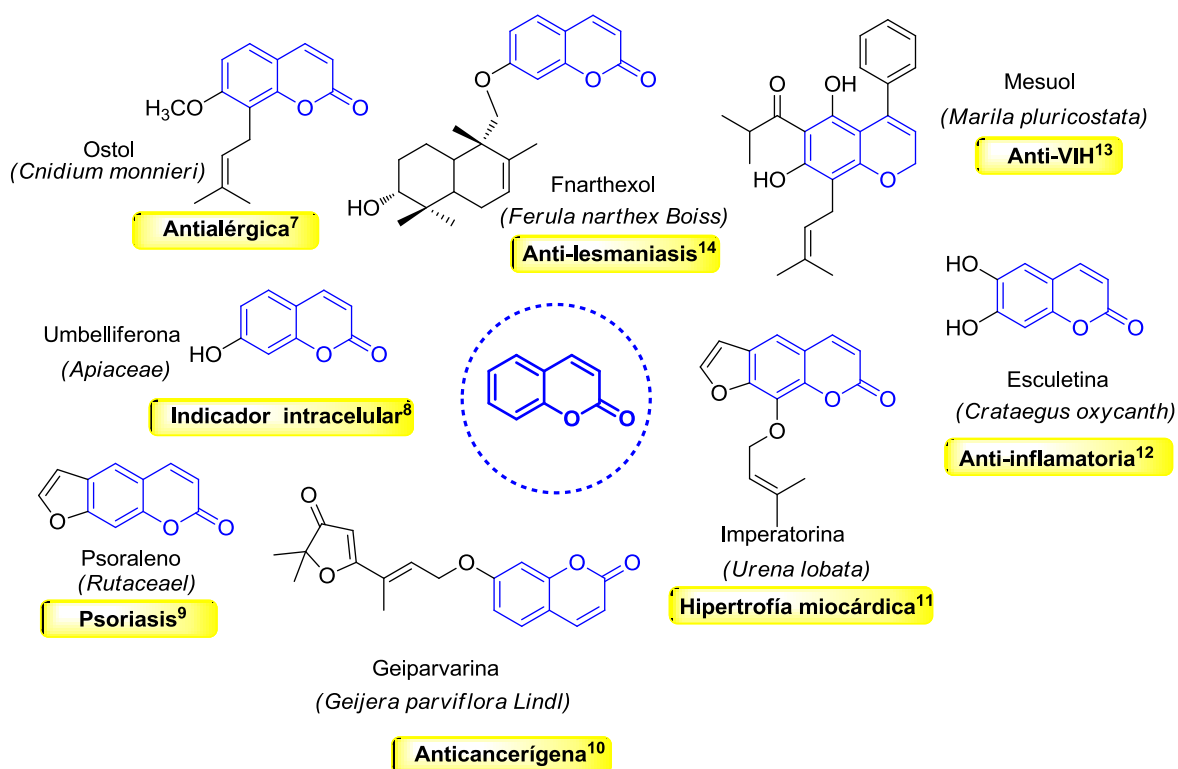


Figura 2. Cumarinas aisladas de la naturaleza y su importancia biológica.

Los derivados cumarínicos disponen sustituyentes de distinta naturaleza química, dando lugar a compuestos sencillos y complejos con un amplio rango de acciones farmacológicas, entre estas sobresalen; antioxidantes,¹⁵ anticoagulantes,¹⁶ antiinflamatorias,¹⁷ antimicrobianas,¹⁸ antifúngicas,¹⁹ y fotosensibilizantes.²⁰ De igual forma, se han reportado algunos efectos sobre el sistema nervioso central de tipo sedante,²¹ tranquilizante,²² analgésico,²³ antidepresivo²⁴ y neuroprotector.²⁵ Las investigaciones realizadas sobre las cumarinas naturales aisladas y la variedad de propiedades farmacológicas encontradas, revelaron un nivel de actividad prometedor en la química medicinal; razón por la cual, la síntesis orgánica se ha dirigido en los últimos años hacia la construcción de nuevos andamios moleculares a partir del núcleo cumarínico, en la búsqueda incesante de nuevos farmacóforos.⁶

1.3. Análogos sintéticos de la cumarina

1.3.1. Híbridos cumarínicos como nuevos agentes terapéuticos

El estudio y el interés científico en las aplicaciones biológicas de los derivados naturales y sintéticos de la cumarina, tienen sus inicios en la llamada enfermedad del trébol de olor que afecta al ganado y es provocada por el moho *Aspergillus*, cuyo metabolismo genera el principio activo conocido como dicumarol **2** (Figura 3). A principios de los años 20 en el norte de los Estados Unidos y Canadá se produjo el brote de una enfermedad en el ganado vacuno; la cual ocasionaba hemorragias incontrolables en estos bovinos y posteriormente su muerte.

En 1921 Frank Schofield, un veterinario canadiense, determinó que el ganado estaba ingiriendo una mezcla mohosa hecha de trébol dulce (*Melilotus officinalis*), que funcionaba como un potente anticoagulante. Sin embargo, la identidad de la sustancia siguió siendo un misterio hasta 1940, cuando Karl Paul Link y colaboradores de la Universidad de Wisconsin, aislaron y caracterizaron el agente anticoagulante, que un año más tarde patentaron con el nombre dicumarol.²⁶

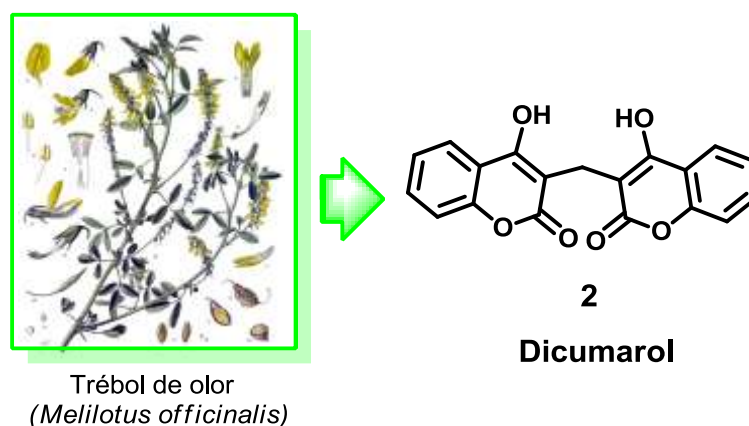


Figura 3. Estructura del dicumarol, aislado por primera del trébol de olor. Imagen tomada de http://es.wikipedia.org/wiki/Melilotus_officialis.

Link continuó su trabajo encaminado hacia el desarrollo de nuevos análogos estructurales del dicumarol, para su posterior utilización como venenos contra roedores; obteniendo así la Warfarina en 1948.

Después de un incidente en 1951, en el que un soldado del ejército americano intentó suicidarse sin éxito con Warfarina; iniciaron las investigaciones de esta como anticoagulante terapéutico.

Al cabo de rigurosos estudios, se encontró que el compuesto exhibía una actividad superior al dicumarol, y debido a su baja toxicidad, en 1954 se aprobó su uso médico en humanos. Hoy en día, la Warfarina (Coumadin[®]), es el anticoagulante oral más usado en el mundo.²⁷

Al igual que la Warfarina, existen otros compuestos cumarínicos, que han sido ampliamente explorados en ensayos clínicos. Tal es el caso de los análogos Scopoletin y Esculetin (antiproliferativos y antioxidantes), Cloricromene (anti-inflamatorio), Armillarisin (antibiótico) y Carbochromen (enfermedad coronaria).

Si los nuevos candidatos a fármacos, son aprobados por la *Food and Drug Administration (FDA)*, una vez culminado el desarrollo clínico, se convierten en medicamentos. Actualmente, se distribuyen fármacos para el tratamiento de diferentes patologías, que tienen como principio activo, una molécula en cuya estructura se encuentra el núcleo cumarínico; entre estos, Acenocoumarol (anticoagulante), Hymecromone (colerético y antiespasmódico), Phenprocoumon (anticoagulante) y Novobiocin (antibiótico) (Figura 4).⁶

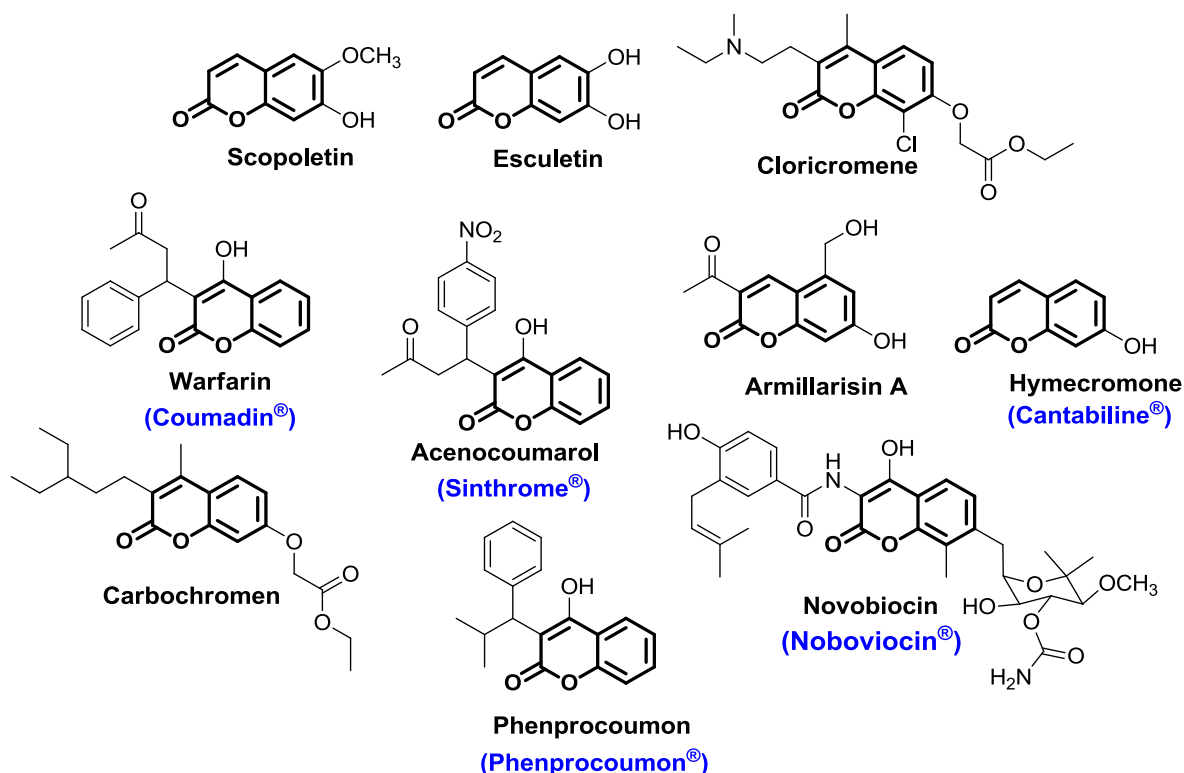


Figura 4. Estructuras de derivados cumarínicos de uso clínico.

1.3.2. Hibridación molecular del esqueleto cumarínico

En los últimos años, la estrategia de hibridación molecular se ha convertido en un nuevo enfoque que implica el conglomerado de dos o más farmacóforos en un andamio molecular para desarrollar nuevas estructuras híbridas multifuncionales; las cuales exhiben múltiples actividades biológicas, perfil de selectividad modificado, distintos modos de acción o la reducción de efectos secundarios no deseados debido a la mezcla de farmacóforos en una sola molécula.⁶

Usando este enfoque, varios grupos de investigación han diseñado y sintetizado muchas moléculas híbridas a partir de la cumarina. La hibridación o el acoplamiento de diferentes derivados de la cumarina con diversas moléculas bioactivas tales como el resveratrol, maleimidias, pirazolinas, chalconas, triazoles y ácido α -lipoico ha producido novedosas moléculas híbridas, dotadas de propiedades farmacológicas, entre las que se destacan, anticancerígenas,

vasodilatadoras, antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatorias, anti-agregantes plaquetarios e inhibidores de la monoaminoxidasa-*B* (MAO-B).^{6,28-30}

1.3.2.1. Modificación estructural del Novobiocin e híbridos cumarin-estilbenos con actividad anticancerígena

La combinación de la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía ofrece los mejores resultados para los pacientes con cáncer. Tales combinaciones se han utilizado con éxito en el tratamiento de determinados tipos de cáncer, por ejemplo, el linfoma de Hodgkin, cáncer testicular y diversas leucemias.

Actualmente, los investigadores han centrado su atención en los productos naturales que tienen el perfil para desarrollar fármacos contra el cáncer con menos efectos secundarios. Entre los diferentes fitoquímicos, las cumarinas han atraído un interés considerable en los últimos años, debido a que estas no solo tienen el potencial para contrarrestar el cáncer, sino también para disminuir los efectos secundarios asociados con la radioterapia.⁶

Dentro de las moléculas cumarínicas híbridas más estudiadas se encuentra el Novobiocin, un antibiótico que actúa a través de la inhibición de la ADN girasa. Este compuesto se ha modificado estructuralmente para desarrollar una serie de inhibidores selectivos de Hsp90 (Figura 5). De igual forma, la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) ha revelado que la sustitución del azúcar y el anillo de fenilo del fragmento benzamido con grupos apropiados, incrementa la actividad contra el cáncer en el rango nanomolar ($IC_{50} \sim 370$ nM) frente a un panel de líneas celulares cancerígenas. Varias modificaciones estructurales en el sustituyente glucósido, manifiestan que la piranosa, la piperidina y algunos azúcares alifáticos son fragmentos óptimos para el aumento de la actividad. Por otra parte, la sustitución del anillo aromático con biarilos e indoles, da origen a compuestos con los valores más bajos de IC_{50} (1.5-32.4 μ M) contra células cancerígenas.³¹

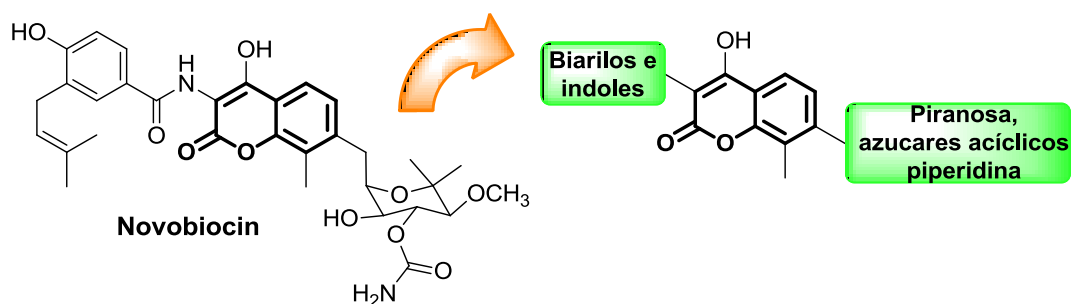


Figura 5. Modificación estructural del Novobiocin.

El anclaje de la cumarina con estilbeno llevó al desarrollo de moléculas con la presencia del sustituyente *trans*-vinilbenceno (*t*-VB) en posición 3 o 4 del núcleo cumarínico. En los híbridos 4-cumarinil-*t*VB (4-C-*t*VB) se encontró una potente actividad antiproliferativa contra líneas celulares de cáncer de pulmón (H460). Estudios QSAR muestran que el grupo metoxi en la posición C-7 de la cumarina y en el fragmento 3,5-disustituido del vinilbenceno (**3** y **4**) exhibe excelente actividad anticancerígena al inducir la capacidad de apoptosis (Figura 6).³²

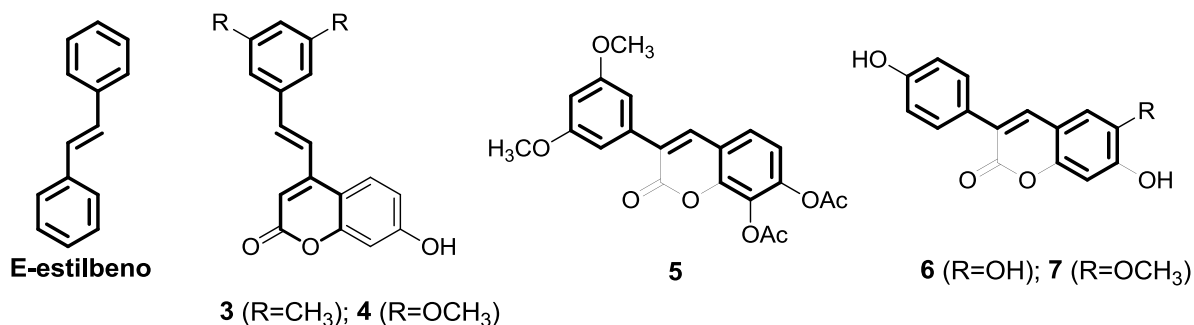


Figura 6. Híbridos Cumarin-estilbenos con actividad anticancerígena.

Las 3-arilcumarinas son otro tipo de híbridos, entre los que **5**, **6** y **7** son los compuestos más representativos. El primero de ellos (**5**) presenta una potente actividad contra líneas celulares del tipo KB con un valor de IC_{50} de 5.18 mM. Por otro lado, el compuesto **6** exhibe una actividad sobresaliente contra líneas celulares de leucemia (HL-60) y de adenocarcinoma de pulmón (A549). Se ha postulado que la actividad de dicha molécula se debe a la estabilización del radical

orto-hidroxifenoxil, mediante la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares. Reemplazando el grupo hidroxilo por el grupo metoxi en la cumarina se obtiene el compuesto **7**, el cual pese a que continúa siendo bioactivo, presenta valores de IC₅₀ superiores en comparación con su análogo. En general, fue posible determinar que la presencia del OH en posición C-4 del anillo cumarínico incide en la actividad anticancerígena (Figura 6).³³

1.3.2.2. Híbridos cumarínicos con actividad antiviral

Un reciente estudio realizado por Tsay y colaboradores reporta la articulación directa del núcleo de bencimidazol a la cumarina, ofreciendo un perfil antiviral destacado (**8-10**). Estos compuestos exhiben potente actividad contra el VHC con valores de IC₅₀ de 3.0, 5.5 y 20 μM, respectivamente. De acuerdo a los resultados revelados por QSAR, la presencia de los grupos metilo en el bencimidazol (**8** y **9**) conduce a un aumento notable en la actividad; a diferencia de los sustituyentes metilo, bromo o metoxi en la cumarina, los cuales reducen tanto la citotoxicidad como la actividad anti-HCV. Por otra parte, se cree que la fusión del anillo de benceno en el núcleo cumarínico (**9**) y la incorporación de la β-D-Ribofuranosa (**10**) da origen a compuestos potentes (Figura 7).³⁴

Una serie de híbridos cumarin-triazina, reportados como nuevos inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa (NNRTIs), ha sido explorado contra diferentes cepas de VIH, entre estas, VIH-1 (III-B), VIH-2 (ROD) y el doble mutante RT del VIH-1 (K103N y Y181C). El compuesto **11** resultó ser el más potente contra todas estas cepas con un valor de IC₅₀ de 1μg/mL, mientras que el resto (**12-15**) exhiben actividad selectiva contra el VIH-1 (Figura 7).³⁵

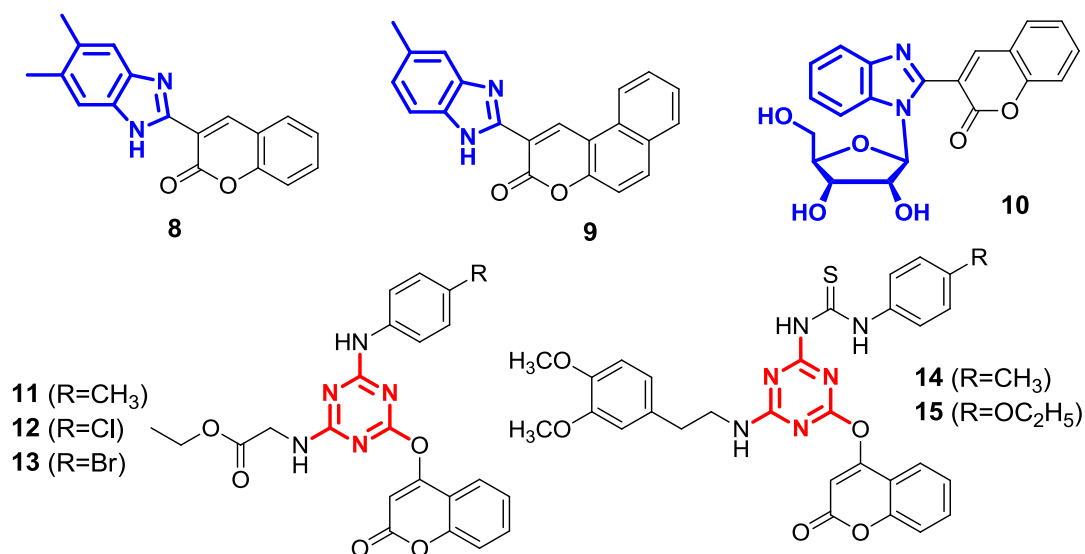


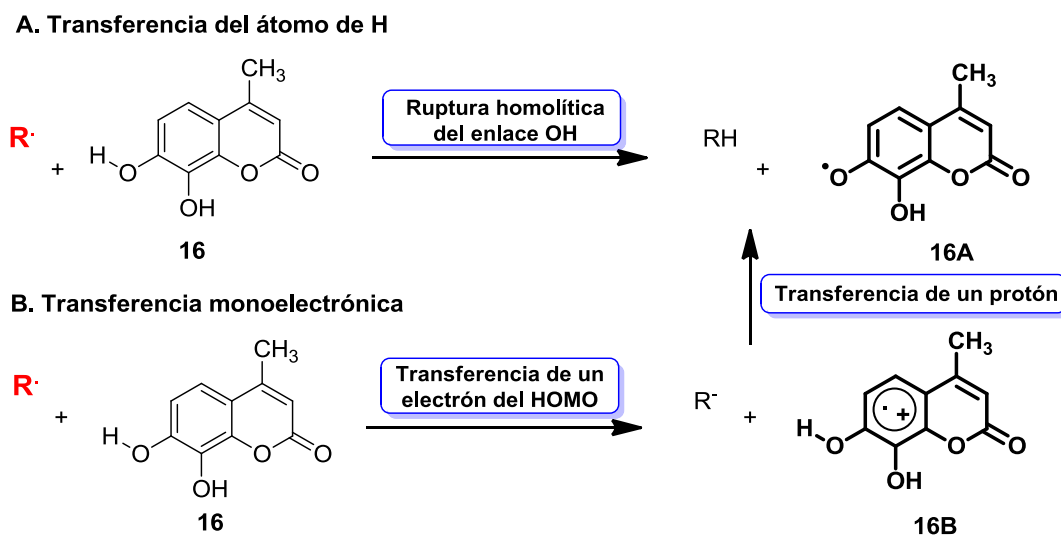
Figura 7. Esqueleto cumarínico hibridado con bencimidazol y triazina con potente actividad antiviral.

1.3.2.3. Actividad antioxidante y anti-inflamatoria

Un antioxidante es una sustancia que inhibe parcial o totalmente la oxidación de sustratos oxidables biológicos (lípidos, ADN, proteínas). Éste logra prevenir o reparar el daño generado debido a un desequilibrio entre la generación de especies oxidantes y su eliminación (estrés oxidativo). El daño oxidativo en las biomoléculas está asociado con afecciones de tipo carcinogénico, cardiovascular y neurodegenerativo, y se desencadena por la acción de especies reactivas de oxígeno (EROs); generadas durante el metabolismo celular o por contaminantes exteriores.

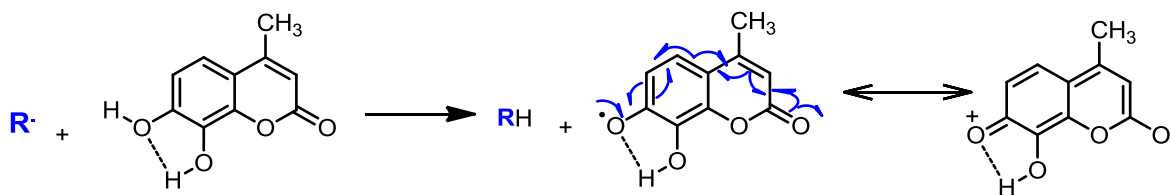
Los antioxidantes (AOs) pueden actuar de diversas formas, evitando la formación o captando EROs, rompiendo las cadenas de transporte de radicales libres, acomplejando iones metálicos, reparando el daño oxidativo, eliminando subproductos de oxidación, reconstruyendo las funciones enzimáticas perdidas y promoviendo la muerte de células con excesivas alteraciones de ADN.³⁶

Para la síntesis de nuevos fármacos con propiedades antioxidantes, es indispensable conocer las vías a través de las cuales, operan este tipo de moléculas; al respecto, Leopoldini y *col.* reportaron los mecanismos principales; surgidos de la reacción directa de un AO con los radiales (Esquema 2).³⁷



Esquema 2. Mecanismos de captación de radicales libres.

Como se ilustra en el esquema anterior, el mecanismo **A** se basa en la transferencia de un átomo de hidrógeno mediante la ruptura homolítica de un enlace O-H del AO **16**, dando como resultado productos menos reactivos entre los que se encuentra el radical derivado de la molécula de AO **16A**. Por otra parte, el mecanismo **B** se desarrolla vía donación de un electrón del agente AO **16**, formando inicialmente un anión y un catión radical derivado del AO **16B**. Una rápida transferencia protónica genera los mismos productos del mecanismo A. Cada uno de estos mecanismos genera un nuevo radical libre, derivado de la molécula AO; sin embargo, esta especie es mucho menos reactiva que el radical inicial, debido principalmente a que el electrón desapareado se deslocaliza sobre la molécula, haciéndola más estable (Esquema 3).³⁷



Esquema 3. Estabilización del nuevo radical cumarínico.

La inflamación es una respuesta de autoprotección del cuerpo, la cual induce adaptaciones fisiológicas para reducir el daño en los tejidos y eliminar el estímulo inflamatorio. Las especies reactivas del oxígeno (EROs) como el anión radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, producidos durante la inflamación, actúan indirectamente como mensajeros celulares y provocan una respuesta inflamatoria a través de diferentes mecanismos.³⁸

Dado que el estrés oxidativo se ha asociado con el proceso de inflamación, el descubrimiento de moléculas con función dual anti-inflamatoria y antioxidante puede conducir a fármacos con un índice terapéutico mejorado.

La cumarina y sus derivados poseen una buena actividad antioxidante, tal como se ha reportado en los últimos años. *Kostova y col.* han proporcionado una completa actualización sobre sus propiedades; resaltando entre otras, la umbeliferona, la fraxetin y la dafnetina, como tres ejemplos prominentes de derivados cumarínicos de origen natural que tienen potente actividad no sólo antioxidante sino anti-inflamatoria.³⁹

El acoplamiento de chalconas (buteina, licochalcones), farmacóforos antioxidantes, con la cumarina ha generado una serie de compuestos, **17-19** con actividad anti-inflamatoria del 29, 26 y 33% (200 $\mu\text{g/mL}$); así como 47, 43 y 21% de inhibición (400 $\mu\text{g/mL}$) del factor α de la necrosis tumoral (FNT- α), respectivamente (Figura 8). Sin embargo, no se encontró ninguna correlación entre la actividad anti-inflamatoria y el potencial de captación de radicales libres en las moléculas evaluadas; atribuyéndose esto a la variación en la transferencia de

protones-electrones por los derivados, debido a la diferencia en sus estructuras y estabilidad.⁴⁰

Adicionalmente, con el objetivo de explorar más a fondo el potencial de los híbridos cumarin-chalcona, Pérez-Cruz y *col.* han informado recientemente de la síntesis, caracterización electroquímica y evaluación de la actividad antioxidante de estos híbridos. Los estudios revelan que todas las moléculas poseen un alto potencial de captación de radicales; presentando el compuesto **20** la más alta capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) con un valor de 14.1, al igual que una buena capacidad de eliminación, baja citotoxicidad, y valores altos de citoprotección (casi el 100% de viabilidad celular a 20 μ M) (Figura 8).⁴¹

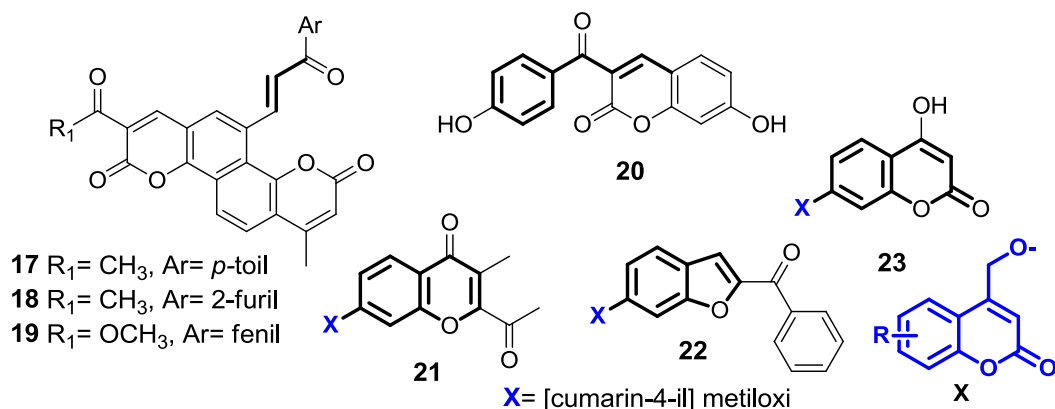
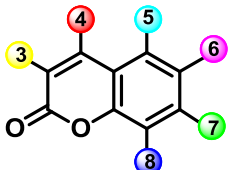


Figura 8. Híbridos de la cumarina con chalcona, cromona, benzofurano y 4-hidroxycumarina, con actividad anti-inflamatoria y antioxidante.

El acoplamiento de farmacóforos heterocíclicos como la cromona (**21**), el benzofurano (**22**) y la 4-hidroxycumarina (**23**), los cuales poseen actividad anti-inflamatoria, con un fragmento cumarínico en su posición C-4 a través de un enlace éter, ha revelado que los derivados del benzofuranilo incurren en mayor actividad que los demás heterociclos (Figura 8). De igual forma, los estudios QSAR realizados sobre el anillo de la cumarina muestran que los sustituyentes metoxi y cloro en la posición 6 conllevan a un aumento en la actividad anti-inflamatoria.⁴²

La hibridación molecular es una estrategia atractiva, a través de la cual, farmacóforos de la cumarina se pueden acoplar o fusionar con otros farmacóforos para desarrollar nuevos fármacos terapéuticos que se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades multifactoriales, incluso complejas. Un análisis crítico de diversos reportes sobre los híbridos cumarínicos con propiedades farmacológicas sobresalientes se resume en la Tabla 1. Se presentan los fragmentos explorados en las diferentes posiciones del núcleo de la cumarina para cada una de las actividades ya mencionadas, anticancerígena, antiviral, anti-inflamatoria y antioxidante.⁶

Tabla 1. Características estructurales de los híbridos cumarínicos bioactivos.⁶

		
Actividad Anticancerígena	Actividad antioxidante y anti-inflamatoria	Actividad antiviral
3 Bencimidazol, sulfonamidas, fenilos sustituidos y dihidropirazoles.	3 Ácido α -lipoico, pirazolinas sustituidas y pirazoles.	3 Imidazolpiridina, benzoxazoles, benzotriazoles, bencimidazol y purina.
4 <i>Trans</i> -vinil benceno.	4 Benzofurano, cromona y 4-hidroxicumarina.	4 Triazina.
6 Chalcona y grupos cinamoil.	6 Chalcona.	-
7 Grupos electrodonadores	-	-
8 Chalcona.	-	-

1.3.2.4. Otras actividades biológicas exhibidas por los híbridos cumarínicos

El *trans*-Resveratrol (*t*-RESV) **24** es un compuesto que se ha estudiado ampliamente y al cual se le atribuyen importantes propiedades farmacológicas. Entre estas sobresalen su actividad antioxidante y habilidad para modular el metabolismo de las lipoproteínas, además de ser considerado vasodilatador y antiagregante plaquetario.⁴³ En el año 2006 Vilar y *col.* reportaron el híbrido cumarin-resveratrol **25** como un potente vasorrelajante y con una actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria con un valor de IC₅₀ de 10.55 μM; mayor que la del *t*-RESV (IC₅₀ = 19.95 μM) (Figura 9).⁴⁴

Una serie de nuevos híbridos cumarin-tacrina (**26-27**) han sido sintetizados y evaluados como posibles agentes anticolinérgicos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Figura 9). En este estudio, el compuesto **26** mostró la máxima inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) (IC₅₀ = 0.092 μM), siendo 3 y 29 veces más eficiente que la tacrina (IC₅₀ = 0.3 μM) y la galantamina (IC₅₀ = 2.67 μM), respectivamente. Otro hallazgo importante es que está desprovisto de cualquier toxicidad, lo cual se corroboró en células de neuroblastoma (SH-SY5Y).

En contraste, el compuesto **27** exhibió la más fuerte inhibición de la enzima butirilcolinesterasa (BuChE) (IC₅₀ = 0.099 μM), 128 veces más alta que la galantamina (IC₅₀ = 12.7 μM). Los resultados sugieren que el aumento de la longitud del enlazador desvía la selectividad hacia la BuChE. Por otra parte, la presencia del grupo metilo en la posición 4 de la cumarina incrementa notablemente la actividad, a diferencia de su reemplazo por sustituyentes metoxi, fenilos o grupos voluminosos; los cuales causan una disminución significativa en las actividades inhibitorias tanto de la AChE como de la BuChE.

Estos compuestos además forman complejos con los iones Fe²⁺ y Cu²⁺, por lo tanto podrían servir como agentes quelantes. Estudios de acoplamiento

moleculares sugieren que estas moléculas pueden unirse al sitio catalítico activo y al sitio aniónico periférico (PAS) de la AChE, ya que poseen fragmentos específicos para tal fin (Figura 9).⁴⁵

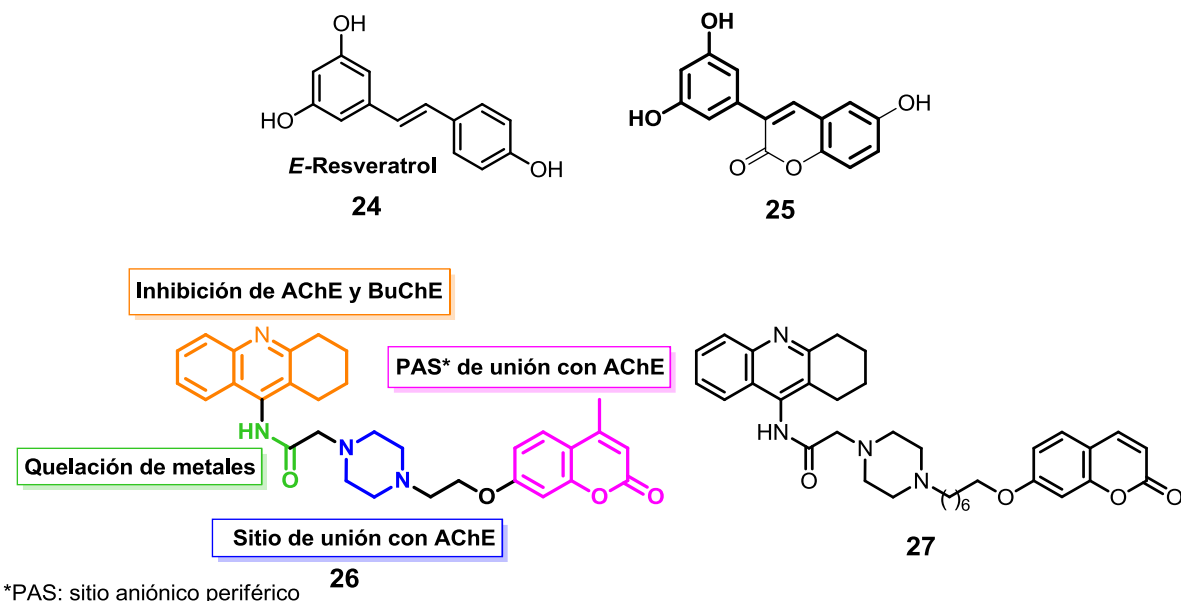


Figura 9. Híbridos de la cumarina con el *trans*-resveratrol y la tacrina con actividad inhibitoria de la AChE y BuChE.

En el año 2008, Fallarero y *col.* reportaron un compuesto líder en la inhibición de la AChE conocido desde entonces como la *cumarina-106* **28**. Su caracterización farmacológica la cataloga como un posible fármaco o sonda molecular en las aplicaciones biomédicas y su estructura pentacíclica corresponde al núcleo cumarínico hibridado con el alcaloide julolidina **29**, que a su vez contiene fragmentos tetrahydroquinolínicos (Figura 10).⁴⁶

Una alquilamina ubicada a una distancia apropiada de un fragmento heterocíclico puede interactuar con el sitio de unión de la AChE. Con base a esta característica estructural, Catto y *col.* han sintetizado dos series de híbridos cumarín-alquilamina, unidos a través de un enlace amida, como potenciales agentes anticolinérgicos. Estos compuestos poseen una elevada actividad inhibitoria de la

AChE, con valores bajos de IC_{50} no superiores a 30nM; siendo la molécula **28** la más potente y selectiva con un valor $IC_{50}=7,6$ nM (Figura 10). Estudios QSAR realizados en esa investigación, revelan además que la sustitución de un enlazador amida por un éter conlleva a un aumento en la actividad. Sin embargo, el alargamiento del fragmento éter disminuye la actividad.⁴⁷

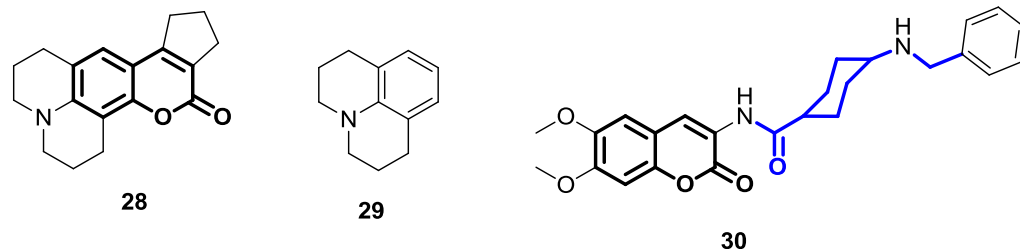
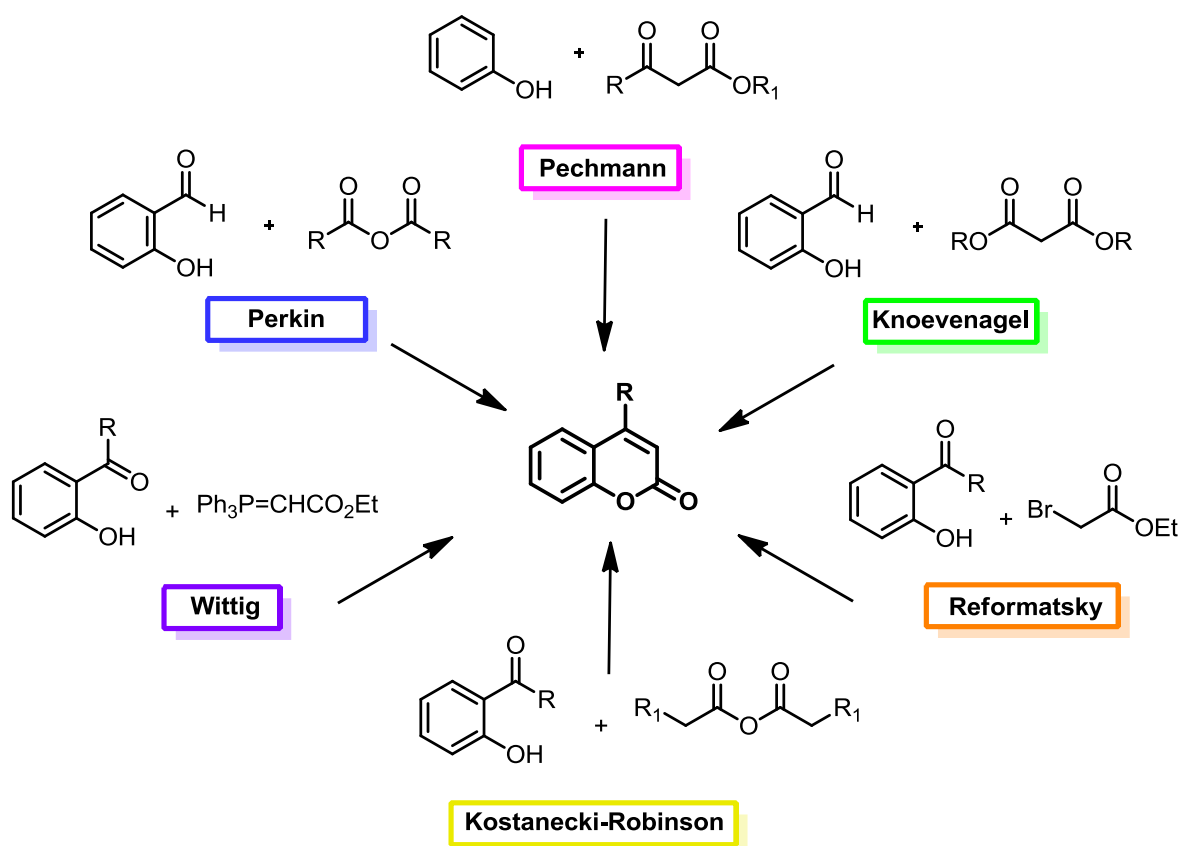


Figura 10. Híbridos de la cumarina con la julolidina y la alquilamina con potente actividad inhibitoria de la AChE.

Las interesantes propiedades farmacológicas que exhiben los derivados cumarínicos los hace muy atractivos para la síntesis orgánica; razón por la cual, varias estrategias sintéticas se han desarrollado.

1.4. Aspectos Sintéticos

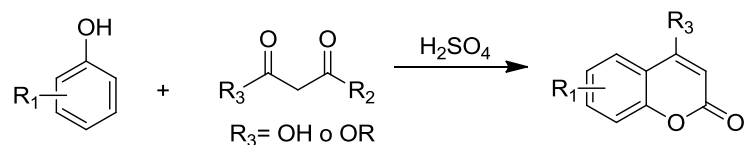
Las cumarinas se han sintetizado clásicamente mediante las reacciones de Pechmann, Perkin o Knoevenagel. Recientemente, las reacciones de Wittig, Kostanecki-Robinson y Reformatsky fueron también aplicadas convenientemente a la síntesis de este tipo de heterociclos (Esquema 4).² Sin embargo, la primera de ellas sobresale entre las demás por su sencillez, eficiencia y versatilidad.



Esquema 4. Métodos de síntesis de cumarinas.

1.4.1. Reacción de Pechmann

La reacción de Pechmann introduce uno de los métodos más importantes y simples en la síntesis de una variedad de compuestos heterocíclicos, en particular los derivados de la cumarina. En 1883, un químico alemán, Hans von Pechmann (Nurnberg 01 de abril 1850-Tubingen 19 de abril 1902), descubrió que una nueva condensación conducía a la síntesis de cumarinas; a través de la reacción de fenoles con un ácido carboxílico o un éster que contiene en su estructura un grupo β -carbonilo (Esquema 5).⁴⁹

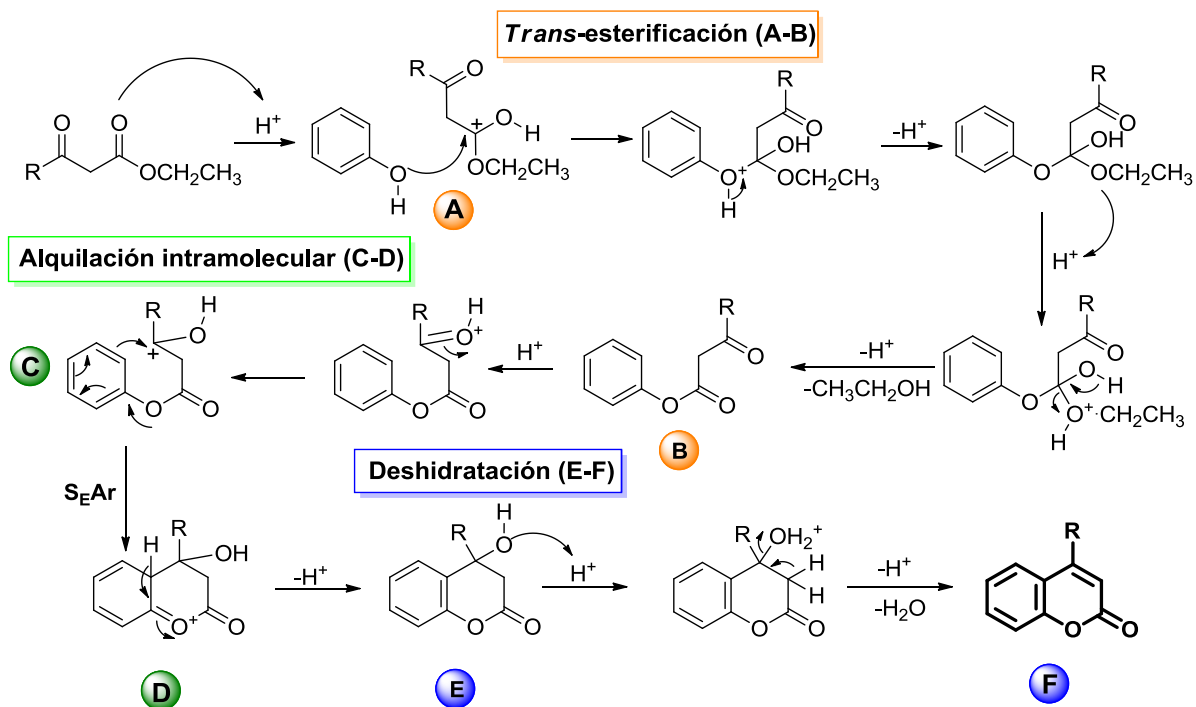


Esquema 5. Reacción de Pechmann.

Esta nueva metodología, versátil y útil, abrió las puertas a la síntesis de un sinnúmero de compuestos heterocíclicos que contienen oxígeno, en especial las benzopironas.

1.4.1.1. Mecanismo de la Reacción de Pechmann

La reacción de Pechmann se ha llevado a cabo mediante catálisis ácida y debido a su robustez pueden servir tanto los ácidos de Brønsted como de Lewis. El mecanismo general comprende tres etapas secuenciales: *trans*-esterificación, alquilación intramolecular y deshidratación (Esquema 6). En la primera etapa se produce la *trans*-esterificación, mediante el ataque del OH fenólico hacia el carbono electrofílico del β -cetoéster (formación del enlace O-C de la cumarina) (**A-B**). La etapa subsecuente involucra la alquilación, a través de un ataque electrofílico intramolecular, del anillo bencénico hacia el carbonilo cetónico protonado (sustitución electrofílica aromática, S_{EAr}) (**C-D**). Finalmente, se da la formación del anillo cumarínico por medio de la deshidratación (**E-F**).^{48, 49}



Esquema 6. Mecanismo de la reacción de Pechmann, empleando ácido de Brønsted como catalizador: *trans*-esterificación, alquilación, y deshidratación.

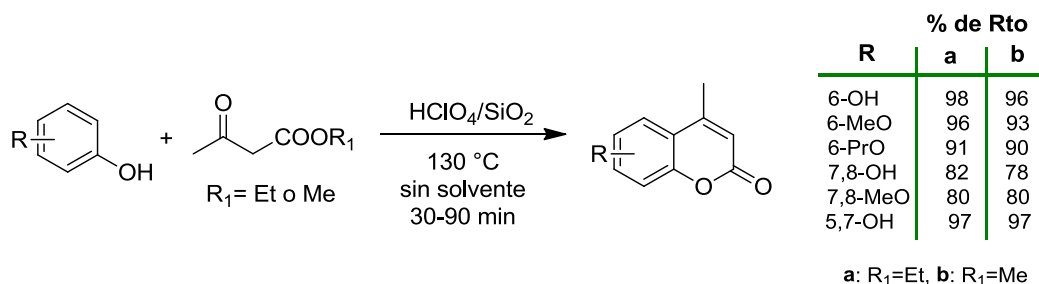
1.4.1.2. Variedad de catalizadores empleados en la Reacción de Pechmann

La reacción de Pechmann es un eficiente método en la obtención de cumarinas 4-sustituídas, por lo que ha sido ampliamente estudiada desde su descubrimiento. Se han empleado gran variedad de catalizadores, entre los que se incluyen tanto ácidos de Brønsted (AB) como de Lewis (AL). Entre los primeros se destacan, ácido sulfúrico (H_2SO_4),⁵⁰ trifluoroacético (TFA),⁵¹ *para*-toluenosulfónico (*p*-TSA),⁵² clorosulfónico (ClSO_3H),⁵³ entre otros. Por otra parte, algunos de los ácidos de Lewis explorados son, pentóxido de fósforo (P_2O_5),⁵⁴ tricloruro de aluminio (AlCl_3),⁵⁵ tetracloruro de circonio (ZrCl_4),⁵⁶ tricloruro de bismuto (BiCl_3),⁵⁷ tetracloruro de titanio (TiCl_4),⁵⁸ tricloruro de indio (InCl_3),⁵⁹ y trifluorometasulfonato de plata (AgOTf).⁶⁰

Pese a que las metodologías empleadas con estos catalizadores permiten la síntesis de los productos deseados, todos estos presentan una gran desventaja, deben utilizarse en exceso. A saber, se emplean de 10-12 equivalentes de H_2SO_4 , entre 3-4 de TFA y más de cinco equivalentes de P_2O_5 ; traduciéndose en una considerable cantidad de residuos corrosivos, cuyo impacto ambiental es irreversible.⁶¹

Debido al vertiginoso deterioro del medio ambiente, los químicos orgánicos han desarrollado con éxito varias metodologías eco-amigables para evitar, o al menos minimizar, los efectos negativos que conllevan la mayoría de sus procedimientos sintéticos.

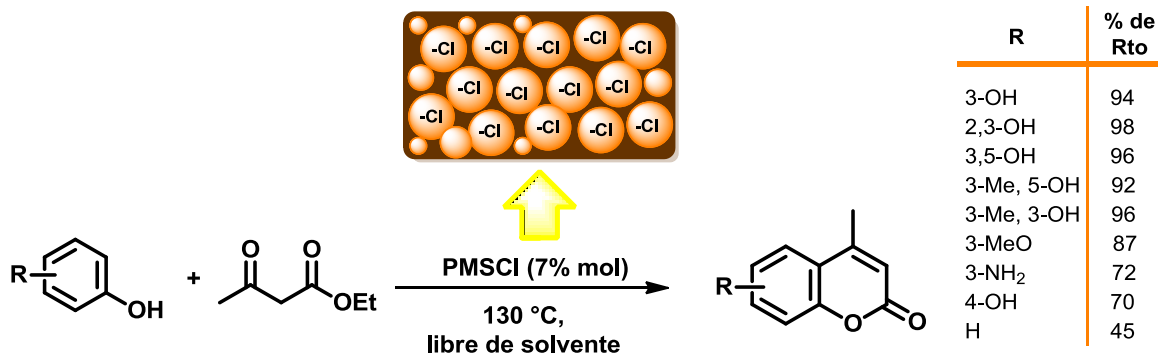
En la reacción de Pechmann el uso de ácidos soportados, es una de las estrategias empleadas para evitar el uso de los catalizadores convencionales. Maheswara y *col.* en el año 2006 reportan, por primera vez, la síntesis de una serie de cumarinas a partir de diversos fenoles sustituidos y acetoacetato de etilo o metilo, usando como catalizador ácido perclórico soportado en gel de sílice ($\text{HClO}_4/\text{SiO}_2$) en condiciones libre de solvente (Esquema 7).⁶²



Esquema 7. Reacción de Pechmann catalizada por $\text{HClO}_4/\text{SiO}_2$.

El uso de ácidos sólidos en síntesis orgánica y en la industrial de materiales es de creciente importancia, ya que estos proporcionan alternativas verdes a los catalizadores homogéneos. La resina de Nafion,⁶³ zeolitas del tipo H-Beta o Amberlyst-15,⁶⁴ arcilla de montmorillonita,⁶⁵ heteropoliácidos,⁶⁶ ácido sulfámico,⁶⁷ zirconia sulfatada,⁶⁸ fosfato de zirconio mesoporoso,⁶⁹ y cloruro de sílice

mesoporosa periódica (PMSCI, Esquema 8),⁷⁰ se han empleado para este fin en la condensación de Pechmann.

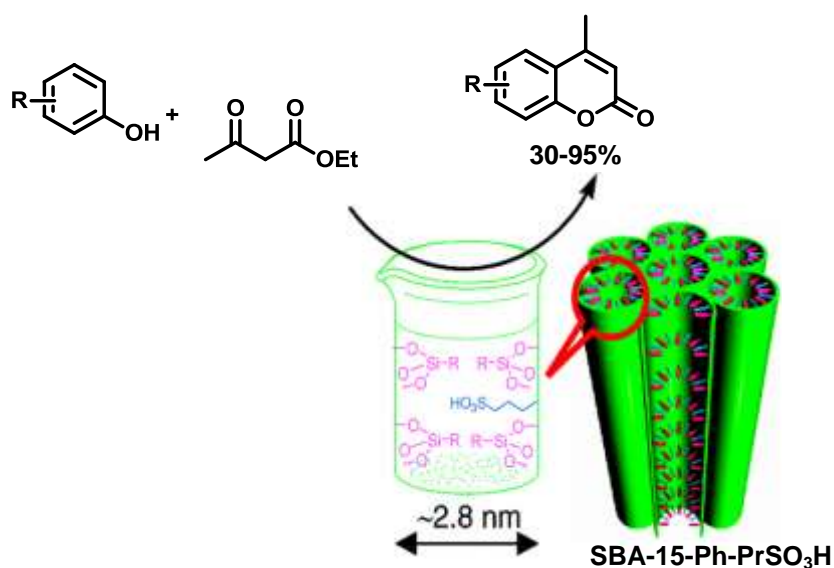


Esquema 8. Reacción de Pechmann catalizada por cloruro de sílice mesoporosa periódica, PMSCI.

Aunque estos catalizadores son adecuados para las condiciones de síntesis, sin embargo, algunos de estos están asociados con una o más desventajas, entre las que se encuentran; baja estabilidad térmica, falta de reproducibilidad, separación compleja, baja área superficial, menor capacidad de tolerancia al agua, gran cantidad de soporte sólido, y en ocasiones procesos de preparación tediosos, los cuales, eventualmente resultarán en la generación de nuevos residuos tóxicos.

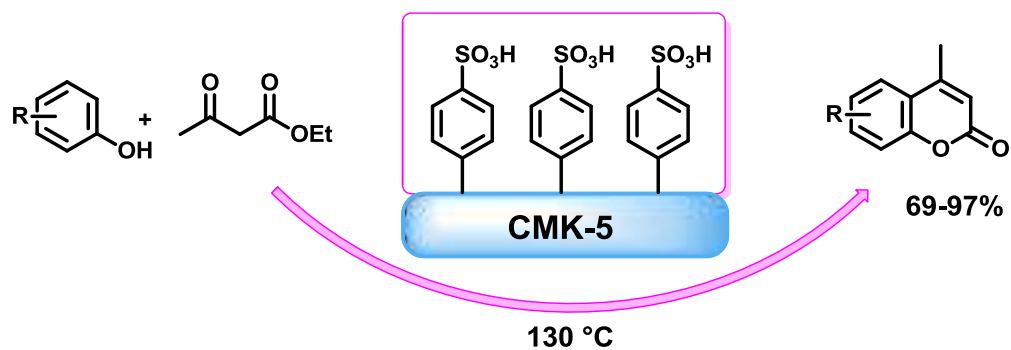
Para mejorar los problemas mencionados anteriormente, es importante investigar nuevos métodos usando reactivos y disolventes menos peligrosos o incluso libre de estos. A lo largo de esta línea, los grupos del ácido sulfónico inmovilizados sobre soportes sólidos han generado un interés considerable, ya que combinan en un solo sólido, tanto la reactividad química especial de los grupos funcionales orgánicos y propiedades atractivas estructura mecánica, alta área superficial y poros ordenados grandes.⁷¹ En este contexto, se han desarrollado recientemente variedad de ácidos sulfónicos tolerantes al agua, a través de nanorreactores a base de sílice nanoporosa ordenada para la reacción de Pechmann, satisfaciendo la reactividad y la reciclabilidad. En el año 2008 Karimi y Zareyee reportan un estudio detallado acerca del diseño del nanorreactor SBA-15-Ph-PrSO₃H, en el

cual tanto sitios ácidos como grupos fenilo se encuentran anclados covalentemente a los mesocanales, proporcionando el medio sinérgico para la reacción de Pechmann: un enfoque eficiente de los reactivos a los sitios ácidos, espacio suficiente para la posterior ciclación e hidrofobicidad adecuada para eliminar el agua generada como subproducto (Esquema 9).⁷²



Esquema 9. Reacción de Pechmann catalizada por SBA-15-Ph-PrSO₃H.

Otra de las más recientes aplicaciones del ácido sulfónico en la catálisis heterogénea es el CMK-5-SO₃H, reportada por Zareyee y Serehneh en el presente año. Este catalizador consiste en ácido sulfónico anclado al carbono nanoporoso estructuralmente modificado (CMK-5) y es obtenido a través de un procedimiento experimental verde y simple. El CMK-5-SO₃H constituye un aporte útil e importante para la condensación de Pechmann, debido a los excelentes rendimientos de los productos, la facilidad de elaboración y la reciclabilidad del mismo, ya que puede ser reutilizado en seis reacciones sucesivas sin una considerable pérdida de la actividad (Esquema 10).⁷²



Esquema 10. Reacción de Pechmann catalizada por CMK-5-SO₃H.

Uno de las características más atractivas de la condensación de Pechmann es que es una reacción libre de solvente. Sin embargo, los químicos orgánicos se enfrentan diariamente a diferentes reacciones en donde es indispensable el uso de estas sustancias auxiliares; la mayoría con efectos negativos sobre el medio ambiente. Para contrarrestar esta problemática se ha venido implementando el uso de solventes eco-amigables, como es el caso del agua. El agua es un solvente seguro, benigno, económico y verde, pese a esto, está restringida debido a dos limitaciones importantes, la insolubilidad de la mayoría de sustancias orgánicas y la desactivación de muchos sustratos reactivos y catalizadores. Con el objetivo de superar estas limitaciones, existen algunas estrategias que facilitan su uso como disolvente, en esta línea, el uso de co-solventes orgánicos, tensioactivos, ácidos de Lewis estables en agua y la combinación de ácidos de Brønsted/Lewis con surfactantes, son las más importantes estrategias hasta la fecha reportadas.^{73,74}

El anclaje de ácidos de Lewis con surfactantes (LASC) conlleva a la obtención de estructuras bifuncionales, al actuar tanto como catalizador, activando las moléculas de sustrato, y como agente tensoactivo, al formar partículas coloidales. En el año 2013 Khalafi y *col.* reportan, por primera vez, la obtención de derivados cumarínicos en medio acuoso, a través de un potente LASC, con excelentes rendimientos en sus productos (88-98 %). En este estudio, se llevó a cabo la

reacción de Pechmann catalizada mediante NTDSS, una nanopartícula de TiO_2 (nano- TiO_2) inmovilizada sobre dodecil sulfato-sílica (Figura 11).⁷⁵

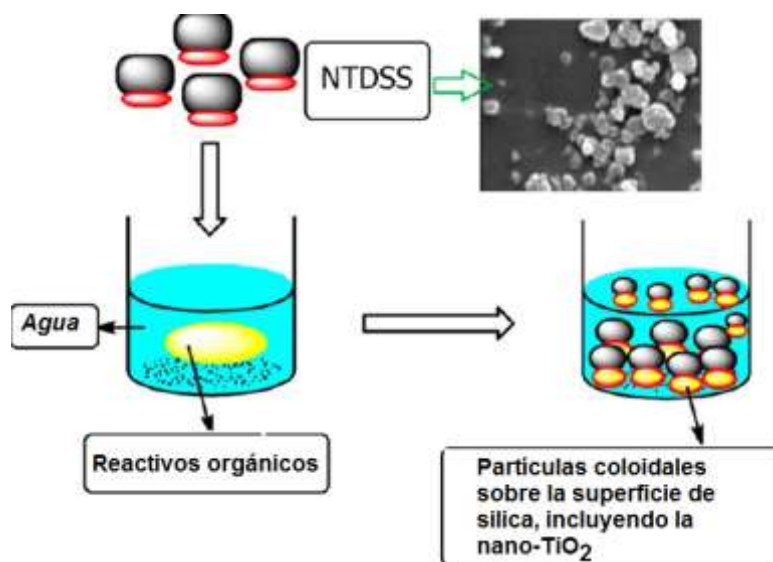
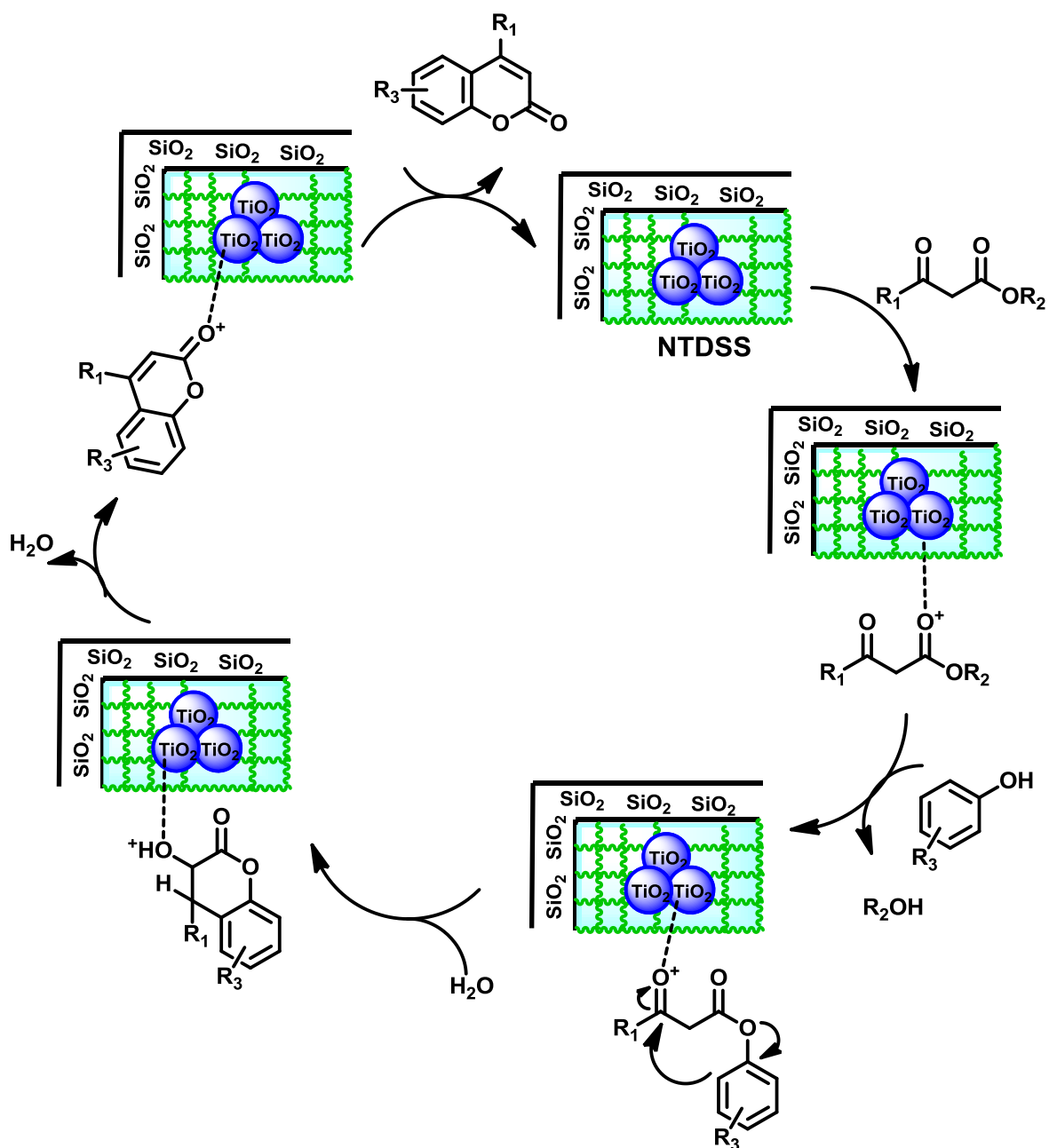


Figura 11. Representación de la formación de las partículas coloidales sobre la superficie del catalizador NTDSS en presencia de reactivos orgánicos en el agua.⁷⁵

La alta actividad catalítica del NTDSS en medio acuoso se debe a la formación de partículas coloidales en la superficie del catalizador, debido a los restos de dodecil sulfato insertados en la superficie de la sílice, que actúan como un agente tensoactivo. Al parecer la generación de emulsiones que contienen la nano- TiO_2 podría acelerar la velocidad de la reacción en este medio (Esquema 11).⁷⁵



Esquema 11. Mecanismo propuesto en la reacción de Pechmann catalizada por NTDS.

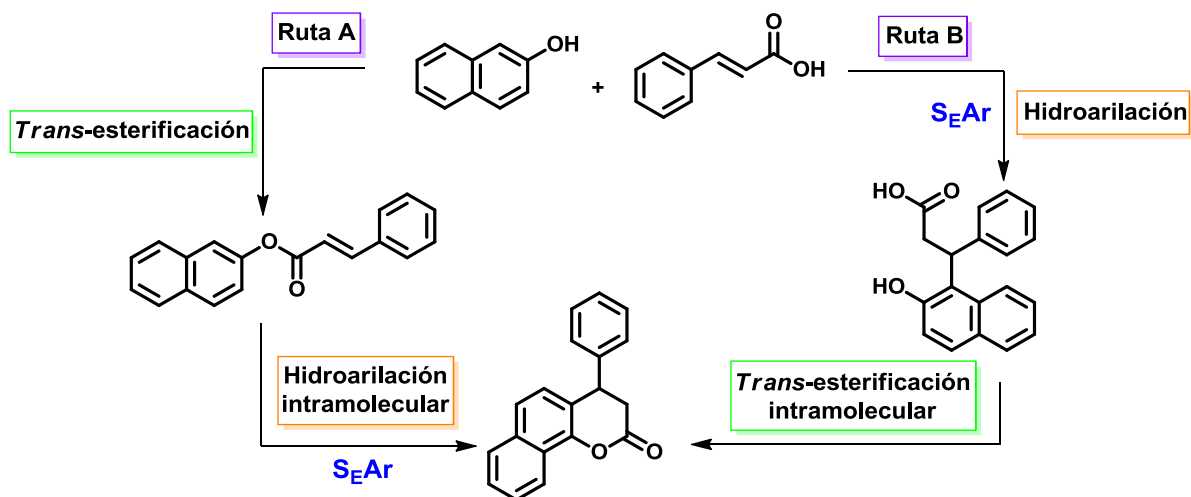
Por otra parte es fundamental señalar la importancia de los productos naturales como agentes terapéuticos. Su diversidad, junto con su complejidad estructural, les permite desempeñar un papel crítico como sondas químicas, dada su habilidad innata para interactuar con gran afinidad y selectividad con dianas biológicas.⁷⁶

Una clase especial de estos compuestos son las dihidrocumarinas, análogos saturados de las cumarinas.

1.5. Las dihidrocumarinas

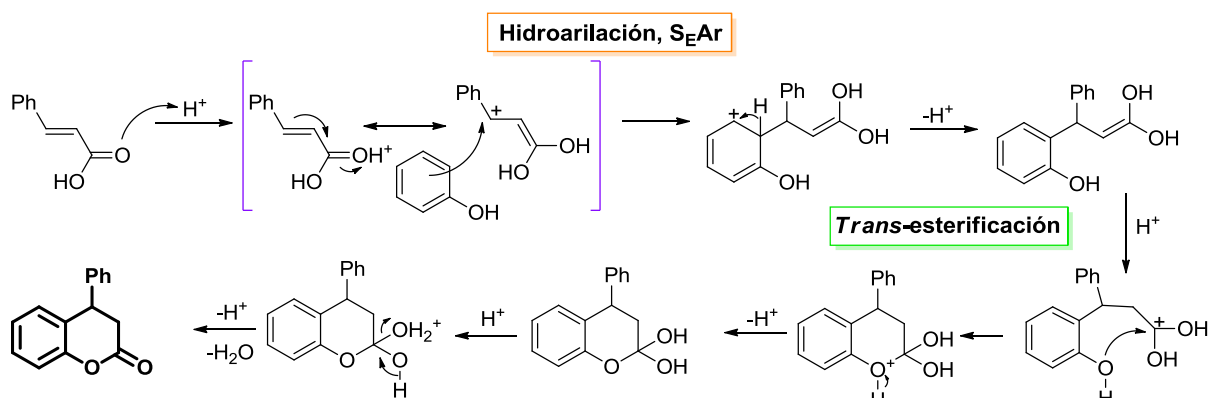
En particular las 4-aryl-3,4-dihidrocumarinas, objeto de estudio en esta investigación, son productos naturales que comparten similitudes estructurales con los flavonoides e isoflavonoides. Estos compuestos han sido poco estudiados y su síntesis sólo ha sido objeto de interés en los últimos años. Sin embargo, se han reportado algunas de sus principales propiedades biológicas; entre estas, inhibición de la aldosa reductasa, actividad antiherpética y estrogénica moderada y actividad antioxidante.⁷⁶⁻⁷⁸

El núcleo dihidrocumarínico se forma a través de un mecanismo que involucra las etapas de *trans*-esterificación e hidroarilación. Existen dos planteamientos basados en el orden en que ocurren estas reacciones, así en la Ruta A, se produce primero la *trans*-esterificación seguida de la hidroarilación, contrariamente a lo que sucede en la Ruta B, donde la hidroarilación precede la *trans*-esterificación (Esquema 12).⁷⁹



Esquema 12. Posibles rutas que conducen a la formación del núcleo dihidrocumarínico.⁷⁹

El mecanismo general de la Ruta B consiste en la protonación del ácido cinámico, generando un intermediario con un átomo de carbono bencílico altamente electrofílico, el cual promueve la hidroarilación a través de una sustitución electrofílica aromática en el anillo fenólico (S_{EAr}). La etapa posterior es la *trans*-esterificación intramolecular que conlleva a la formación del núcleo dihidroumarínico (Esquema 13).⁸⁰



Esquema 13. Mecanismo propuesto para la formación de 4-aril-3,4-dihidroumarinas vía hidroarilación seguida de *trans*-esterificación intramolecular.

Por otra parte, la Ruta A sigue el orden inverso al mecanismo anterior. En primer lugar se da la esterificación entre el fenol y el ácido cinámico y a continuación, se produce la hidroarilación intramolecular vía S_{EAr} , formando la correspondiente 4-aril-3,4-dihidroumarina.⁸⁰

Otro producto natural de gran relevancia es el timol, un monoterpene fenólico natural, encontrado en varios tipos de plantas, pero extraído mayoritariamente del *Thymus vulgaris* (tomillo común) (Figura 12). Es una sustancia cristalina de color blanco, de olor aromático agradable y con fuertes propiedades terapéuticas. El timol forma parte de una clase de compuestos de ocurrencia natural conocidos como biocidas, con fuertes atributos antimicrobianos cuando se usa solo o con otros biocidas, tales como el carvacrol, su isómero constitucional. Siendo además capaz de reducir la resistencia bacteriana a los medicamentos comunes, tales como la penicilina.⁸¹



Figura 12. Especie *Thymus vulgaris* y estructura química del timol. Imagen tomada de http://es.wikipedia.org/wiki/Thymus_vulgaris.

Numerosos estudios han revelado el amplio espectro de actividades biológicas del timol, que van desde inducir la susceptibilidad a antibióticos en los patógenos resistentes a los fármacos hasta poderosas propiedades antioxidantes.^{81, 82} Se ha demostrado que este monoterpeno logra reducir la resistencia bacteriana a los antibióticos a través de un efecto sinérgico,⁸¹ y que además es un fungicida efectivo, particularmente contra cepas resistentes al fluconazol.⁸³

Las atractivas propiedades farmacológicas del timol lo convierten en un interesante bloque de construcción de compuestos heterociclos complejos. Motivo por la cual, en esta investigación se empleó como precursor principal en la síntesis de nuevos derivados cumarínicos, las 4-aril-3,4-dihidrocumarinas.

1.6. *Ball milling* en Síntesis Orgánica

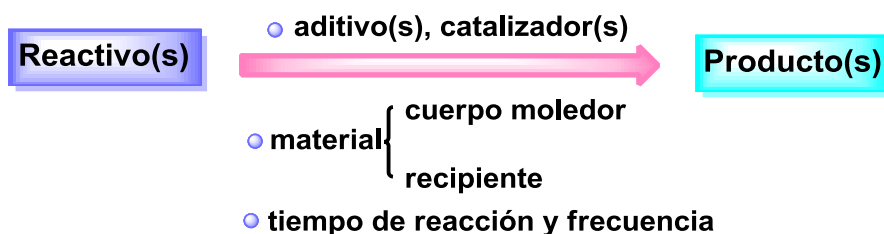
¿Qué métodos son aplicables para distribuir la energía eficientemente en los procesos químicos? Con respecto al espectro electromagnético la respuesta parece simple, casi todos los tipos de energía pueden ser aplicados para la iniciación de reacciones químicas o para el calentamiento de las mezclas de reacción. La manera más efectiva para asegurar la activación directa de los enlaces covalentes se realiza mediante luz. Sin embargo, el calentamiento térmico y calefacción inversa con microondas son las técnicas más comunes para la realización controlable de las reacciones químicas. Aparte de los mecanismos basados en la radiación, existen otros métodos aplicables: la electricidad

(electroquímica), los procesos de cavitación (acústica, hidrodinámica) y la energía mecánica (fricción, impacto, colisión), esta última llamada recientemente activación mecanoquímica.⁸⁴

De acuerdo con la IUPAC una reacción mecanoquímica se define como “una reacción química que es inducida por la absorción directa de energía mecánica”.⁸⁵ Sin embargo, la mecanoquímica se divide además en (i) la activación mecánica de sólidos, (ii) la aleación mecánica y (iii) la molienda reactiva de sólidos.⁸⁴

En el caso más simple, la energía mecánica puede ser generada y transferida a los reactivos trabajando con un mortero de mano. Esta técnica se define como molienda, *grinding*. En contraste, el término *milling* se emplea para describir los procesos llevados a cabo en molinos de bolas; los cuales será más reproducibles debido a la regulación técnica de sus parámetros, como el tiempo y la cantidad de energía suministrada.

Los principales campos de aplicación para los molinos de bolas en la industria son los procesos de refinamiento de partículas, la desaglomeración y el agrietamiento de las bacterias. Para aplicaciones a escala de laboratorio, estos son los reactores de elección utilizados para la síntesis de diversos productos químicos orgánicos, mediante la activación mecánica de reactivos sólidos o solidificados (Esquema 14). El esquema de reacción genérica refleja las principales influencias que han de tenerse en cuenta cuando se trabaja con los molinos de bolas. Además del aparato, el material del cuerpo molidor y el recipiente, influye en la reacción química al igual que el tiempo y la frecuencia de molienda.⁸⁴



Esquema 14. Reacción general para la síntesis en molinos de bolas.

1.6.1. Parámetros importantes en *Ball milling*

Las reacciones químicas en los molinos de bolas representan un verdadero desafío para los químicos orgánicos, ya que diferentes variables influyen en el éxito de la reacción individual. Además de los parámetros químicos como el tipo de catalizador, aditivos o sustratos; los parámetros técnicos del proceso también deben ser tenidos en cuenta. En esta instancia, estudios minuciosos han identificado variables técnicas importantes:⁸⁶⁻⁸⁸

- Rotación/frecuencia de oscilación (ν_{rot}/ν_{osc})
- Tiempo de reacción = tiempo de molienda (t)
- Tipo del material de molienda (densidad, ρ_{MB})
- Tamaño de bolas de molienda o cuerpo moledor (d_{MB})
- Cantidad de bolas de molienda (n_{MB})
- Modo de operación del molino de bolas (continuo, ciclado).

1.6.1.1. Frecuencia: ν

La ecuación física básica de la energía cinética de rotación y oscilación indica una fuerte correlación con la frecuencia ν del molino de bolas (Ecuación 1):

$$E_{cinética}(rot\ u\ osc) = 0.5I\omega^2 = 2\pi^2I\nu^2$$

I = momento de inercia ω = velocidad angular ν = frecuencia de oscilación
--

(1)

De la anterior ecuación cinemática, se deduce que la rotación ν_{rot} o la frecuencia de oscilación ν_{osc} constituyen unos de los parámetros más importantes a considerar, ya que se relacionan directamente con la energía cinética del sistema; influyendo por lo tanto, en el rendimiento, la selectividad o propiedades similares durante la molienda. Sin embargo, estas observaciones están fuertemente relacionadas con el tipo de reacción, la reactividad de los reactivos y la cinética de las reacciones. Por ejemplo, si se producen reacciones secundarias debido a la

alta energía, inducida por un aumento de la frecuencia, podría influir negativamente en el rendimiento del producto deseado.⁸⁷

1.6.1.2. Tiempo de reacción o tiempo de molienda: t

Una reacción química progresa con el tiempo de reacción t , aumentando normalmente el rendimiento con su transcurso, a menos que reacciones secundarias y consecutivas eviten la formación del producto (s). Sin embargo, en la mayoría de los casos de la síntesis orgánica en los molinos de bolas, un aumento de t conduce a rendimientos más altos.

En el año 2010, Szuppa y *col.* estudiaron los parámetros ν y t en la oxidación del β -pineno hacia la síntesis de la Nopinona. Luego de una rigurosa evaluación estadística basada en un plano factorial, lograron encontrar la influencia de la frecuencia de oscilación y el tiempo de reacción en la optimización del proceso sintético; obteniendo una relación de proporcionalidad directa entre las variables evaluadas y el rendimiento del mismo (Figura 13).⁸⁹

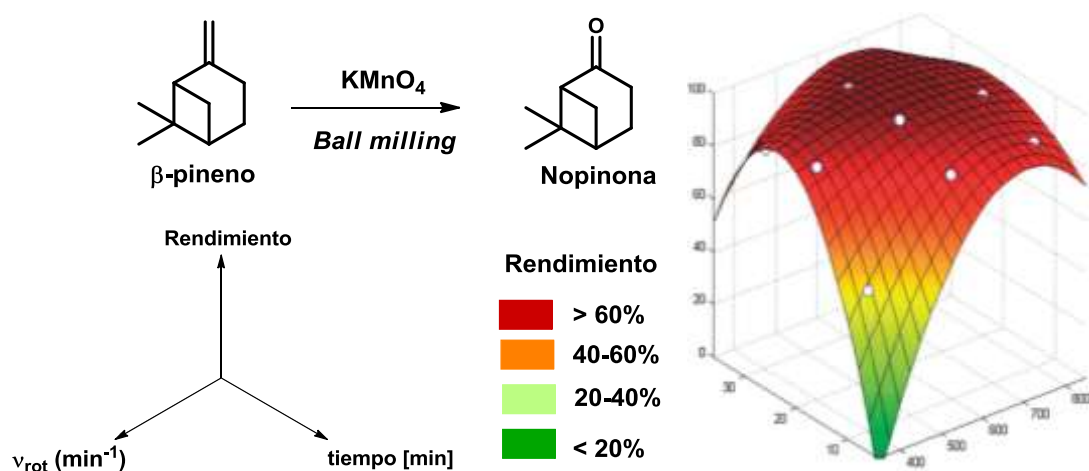


Figura 13. Correlación entre la frecuencia de rotación ν_{rot} y el tiempo de molienda t en el rendimiento de la síntesis de la nopinona vía oxidación seca del β -pineno con KMnO_4 en un molino de bolas planetario.⁸⁹

Por otra parte, también se ha reportado una disminución en el rendimiento del producto al ser expuesto a tiempos de reacción prolongados. En este caso, el funcionamiento del molino de bolas en modo de ciclado es una alternativa que a menudo se aplica; debido a que durante las pausas entre ciclos de molienda, la mezcla de reacción se enfría y el estrés térmico se puede reducir.⁹⁰⁻⁹¹

1.6.1.3. Material de molienda: ρ_{MB}

El material empleado en los utensilios de molienda (cuerpo molidor y recipiente) determina el momento de inercia I (Ecuación 1), a través de la densidad ρ_{MB} (Ecuación 2):

$$I = \int \rho r^2 dV \quad \begin{array}{l} \rho = \text{densidad} \\ r = \text{distancia al eje de giro} \end{array} \quad (2)$$

La elección del material de molienda es crucial para la reacción, sin embargo, pese a la relación anterior, no es válido afirmar que cuanto mayor es la densidad del material, mayor es la energía transferida y por lo tanto el rendimiento del producto; esto dependerá del tipo de reacción.

Algunas reacciones muestran un significativo aumento en los rendimientos, al cambiar de un material ligero a un material de molienda más pesado. Este efecto está determinado por la energía de activación de la reacción y el mecanismo de la misma. Mientras que en el primer caso (material ligero), la energía de activación es baja o las reacciones son impulsadas hacia la formación de productos termodinámicamente estables, el último (material pesado) necesita mayor energía para alcanzar niveles similares de rendimiento del producto.⁹²⁻⁹⁴

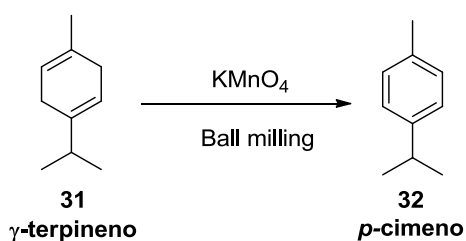
Especialmente para reacciones catalíticas en molinos de bolas, la aplicación de materiales de molienda con una densidad más alta puede ser útil, debido al efecto promotor de los procesos de refinamiento de partículas que conduce a superficies activas; capaces de aumentar la reactividad global de los reactivos y catalizadores.⁹³

Los materiales de molienda más utilizados son carburo de tungsteno, acero, zirconia, corindón y ágata (ordenados de mayor a menor ρ). Algunos de estos son minerales de origen natural que tienen una alta porosidad.

Por otra parte, el material de los utensilios de molienda puede verse afectado a menos que sea totalmente inerte frente a los reactivos empleados (por ejemplo, el acero inoxidable). Además de la inestabilidad química, el material de abrasión puede ser crucial desde el punto de vista económico y sintético, ya que las partículas desgastadas a menudo permanecen en el producto obtenido y por lo tanto, deberán aplicarse complejas estrategias de purificación.⁹²

1.6.1.4. Tamaño y número de bolas de molienda: d_{MB} , n_{MB}

El diámetro de las bolas de molienda d_{MB} en la síntesis química en un molino de bolas, es crucial si la masa total no es constante. Szuppa y *col.* realizaron el ajuste de una masa constante de bolas de molienda m_{MB} , cambiando el d_{MB} y el número de bolas n_{MB} ; utilizando como reacción modelo la síntesis del *p*-cimeno **32** a partir de la deshidrogenación del γ -terpineno **31** (Esquema 15). En este caso ningún efecto sobre el rendimiento del producto es observable (Tabla 2).⁸⁸



Esquema 15. Oxidación selectiva del γ -terpineno utilizando un molino de bolas planetario.

Tabla 2. Efecto del diámetro (d_{MB}) y el número de bolas de molienda (n_{MB}) sobre el rendimiento del *p*-cimeno en un molino de bolas planetario.

d_{MB} (mm)	n_{MB}	M_{bolas} (g)	% Rto
2	120	45.8	72
10	15	45.4	79
15	5	46.3	75

3.8 g de arena de cuarzo, 2 mmol *p*-cimeno, 6mmol $KMnO_4$, 0.1 g H_2O , material de los utensilios de molienda: ZrO_2 -MgO, $v_{rot} = 13.3$ Hz, $t = 5$ min.

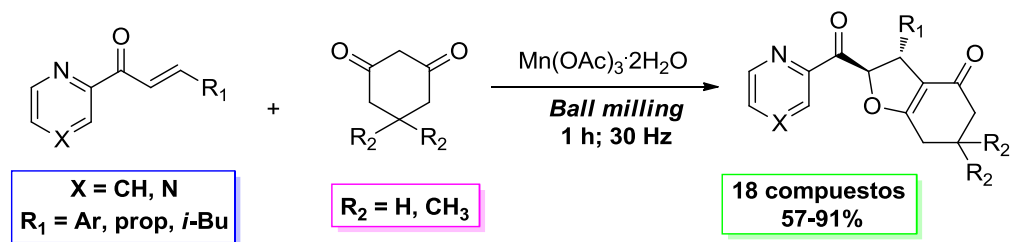
Si la densidad de material ρ_{MB} y el diámetro de las bolas d_{MB} se mantienen constantes, el número de bolas de molienda n_{MB} influye significativamente en el rendimiento de la reacción.^{86-89,93}

La correlación entre el rendimiento y n_{MB} es casi lineal debido a la correlación lineal entre la masa m , el momento de inercia I y la energía cinética del sistema $E_{cinética}$ (Ecuación (1)).⁸⁴

1.6.2. Síntesis de heterociclos mediante la metodología *Ball milling*

La síntesis de heterociclos en los molinos de bolas son reacciones problemáticas, ya que la mayoría de estas incluyen una etapa de condensación, con desprendimiento de agua, que no puede ser eliminada fácilmente del sistema al emplear recipientes cerrados como reactores. Sin embargo, se han reportado ejemplos de tales síntesis que toman ventaja de la estabilidad termodinámica de los productos formados.^{95,96}

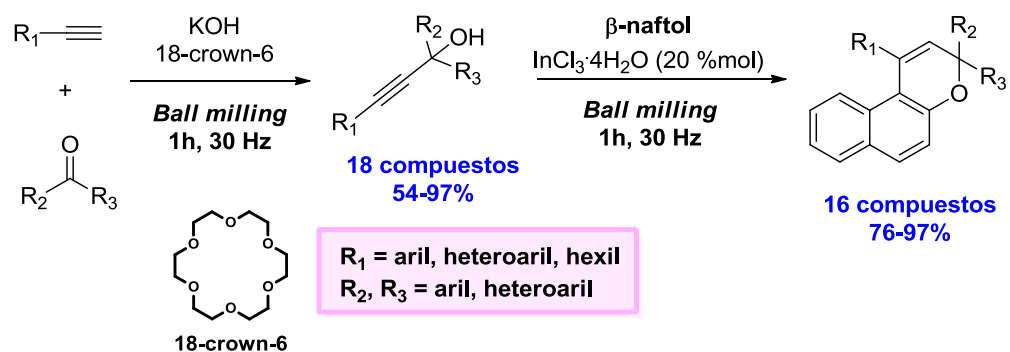
En el año 2008, Wang *y col.* reportan la síntesis directa y altamente diastereoselectiva de derivados de la 2,3,6,7-tetrahidro-4(5*H*)-benzofuranona, catalizada por $Mn(OAc)_3 \cdot 2H_2O$, bajo condiciones libres de solvente y mediante la metodología *Ball milling*; la cual a partir de compuestos 1,3-dicarbonilos (dimedona, ciclohexan-1,3-diona) y (aza)chalconas proporcionó los productos después de 1h de reacción, con rendimientos moderados a altos (Esquema 16).⁹⁷



Esquema 16. Síntesis de derivados 2,3,6,7-tetrahidro-4(5*H*)-benzofuranona mediante la metodología *Ball milling*.

El método del esquema anterior ha demostrado ser aplicable a una amplia gama de sustratos tipo chalcona, que a su vez son asequibles a través de síntesis libre de disolvente. Además, el mecanismo a través del cual se lleva a cabo la reacción es radicalario y se inicia por la abstracción del hidrógeno del átomo de carbono centrado en el compuesto dicarbonilo y no necesita ninguna base adicional para su finalización.⁹⁷

Por otra parte, la incorporación de alquinos terminales como bloques de construcción en la síntesis de dos etapas de 3*H*-benzo [*f*] furanos se ha evaluado recientemente. El primer paso de la secuencia proporcionó alcoholes propargílicos a través de la inserción de cetonas en el enlace terminal C-H de los alquinos en presencia de KOH y cantidades estequiométricas de 18-crown-6 (éter corona) (Esquema 15). La aplicación de otras bases inorgánicas y orgánicas, así como el uso de otras cantidades catalíticas del éter corona produjo rendimientos inferiores. El posterior acoplamiento de los alcoholes propargílicos con β-naftol fue catalizada exitosamente por $\text{InCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Es interesante observar que la formación final de los derivados 3*H*-benzo[*f*]furano fue exitosa para los sustituyentes *S*-heterocíclicos, mientras que la presencia de 2-piridil o pirazin-2-il en R_1 y R_2 , respectivamente, conduce a mezclas que no reaccionan; incluso pese al aumento del catalizador, probablemente debido a la coordinación no deseada de estos ligandos con el indio metálico. (Esquema 17).⁹⁸



Esquema 17. Síntesis de dos etapas de 3H-benzo[f]furanos mediada por *Ball milling*.

De igual forma, los compuestos pirano [2,3-*d*] pirimidin-6-carbonitrilos **36** pueden ser obtenidos a través de la condensación de benzaldehídos **34**, malononitrilo **35** y ácido barbitúrico **33** usando la metodología *Ball milling*. Los heterociclos se obtiene en un proceso one-pot, libre de solventes y catalizadores. Este método ofrece varias ventajas, además de los altos rendimientos en la reacción, es eco-amigable debido a que evita el uso de sustancias auxiliares y los productos no requieren procesos de purificación extensos (Esquema 18).⁹⁹



Esquema 18. Síntesis mecanoquímica de pirano [2,3-*d*] pirimidin-6-carbonitrilos mediante la condensación de tres componentes en un molino de bolas.

Cabe resaltar que la síntesis de cumarinas bajo activación mecanoquímica no ha sido aún reportada, razón por la cual, uno de los objetivos trazados en la presente investigación es el desarrollo de un protocolo *Ball milling* aplicable eficientemente a la reacción de Pechmann, que permita la obtención de estos valiosos heterociclos oxigenados.

2. HIPÓTESIS

De acuerdo con la revisión bibliográfica, la reacción de Pechmann presenta una robustez tal que permite el uso de las diferentes condiciones de reacción y el empleo de la metodología DOS (Diversity Oriented Synthesis). Así mismo, la energía proporcionada a través de un proceso mecanoquímico puede presumiblemente activar la obtención de 4-metilcumarinas a partir de fenoles sustituidos y acetoacetato de etilo, empleando el InCl_3 como catalizador.

Por otra parte, se considera viable emplear el timol, precursor de origen natural, en la obtención de nuevas 4-aril-3,4-dihidrocumarinas vía reacción de hidroarilación, bajo condiciones libre de solvente.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Sintetizar 4-metilcumarinas sustituidas y 4-aril-3,4-dihidrocumarinas vía reacción de Pechmann e hidroarilación, respectivamente; empleando protocolos ajustados a la química verde.

3.2. Objetivos Específicos

- Evaluar los principales parámetros técnicos y químicos de un proceso mecanoquímico, aplicado convenientemente a la reacción de Pechmann.
- Obtener una serie de 4-metilcumarinas vía reacción de Pechmann bajo los protocolos de activación mecanoquímica, acordes con los principios de la química verde.
- Emplear el timol como precursor natural en la síntesis de nuevas 4-aril-3,4-dihidrocumarinas a través de la reacción de hidroarilación en condiciones libres de solvente.
- Caracterizar las estructuras de los compuestos sintetizados utilizando las técnicas espectroscópicas de Infrarrojo (IR), Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-MS) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN).




4. SECCIÓN EXPERIMENTAL

Reactivos y materiales

Los reactivos, grado síntesis, fueron empleados directamente y sin purificación adicional; adquiriéndose de las compañías comerciales Merck, Aldrich y Carlo Erba.

En la síntesis llevada a cabo mediante *Ball milling* se utilizaron, como cuerpos demolidores, esferas de acero inoxidable (diámetro 5 y 8 mm), y como reactores, se emplearon cápsulas cilíndricas (volumen de 1.5-2 mL) de duralón, teflón y acero inoxidable (Tabla 3).

Tabla 3. Herramientas de molienda empleadas en *Ball milling*.

Cuerpo moledor	Material de los reactores		
	Duralón	Acero inoxidable	Teflón
 Ø= 8 mm, 2.1031 g Ø= 5 mm, 0.6401 g	 3.4471 g, 1.5 mL	 26.3185 g, 1.5 mL	 8.1573 g, 2 mL

Monitoreo y purificación

El monitoreo de las reacciones se realizó mediante cromatografía en capa fina (CCF) sobre cromatoplasmas de Silufol UV₂₅₄ de 0.25 mm de espesor, reveladas en yodo o en una cámara de luz UV (SPECTROLINE MODEL ENF-260C) a longitudes de onda de 254 y 365 nm.



La purificación de los productos sintetizados se efectuó mediante técnicas de recristalización en etanol. De igual forma, para los compuestos que lo requirieron, se empleó cromatografía en columna (CC), utilizando como fase estacionaria (soporte sólido) gel de sílice 60 Mesh y como fase móvil mezclas pertinentes de éter de petróleo/acetato de etilo, mediante el aumento gradual de la polaridad.

Equipos

- *Amalgamadores empleados en la metodología Ball milling*

En el estudio de la metodología *Ball milling* en la reacción de Pechmann se emplearon los siguientes amalgamadores:

Tabla 4. Especificaciones técnicas de los amalgamadores.

Zenith, Modelo Z-1 ^a	Dentsply Rinn, Modelo MSD
 <p>Frecuencia: 60Hz Voltaje: 120 voltios Máxima potencia: 144 vatios</p>	 <p>Frecuencia: 38-48 Hz Voltaje: 120 voltios Máxima potencia: 250 vatios</p>

- *Caracterización estructural de los compuestos*

Los puntos de fusión no corregidos de los productos fueron determinados en un fusiómetro Fisher-Johns y su caracterización estructural se realizó mediante las técnicas espectroscópicas Infrarrojo (IR), Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-MS) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

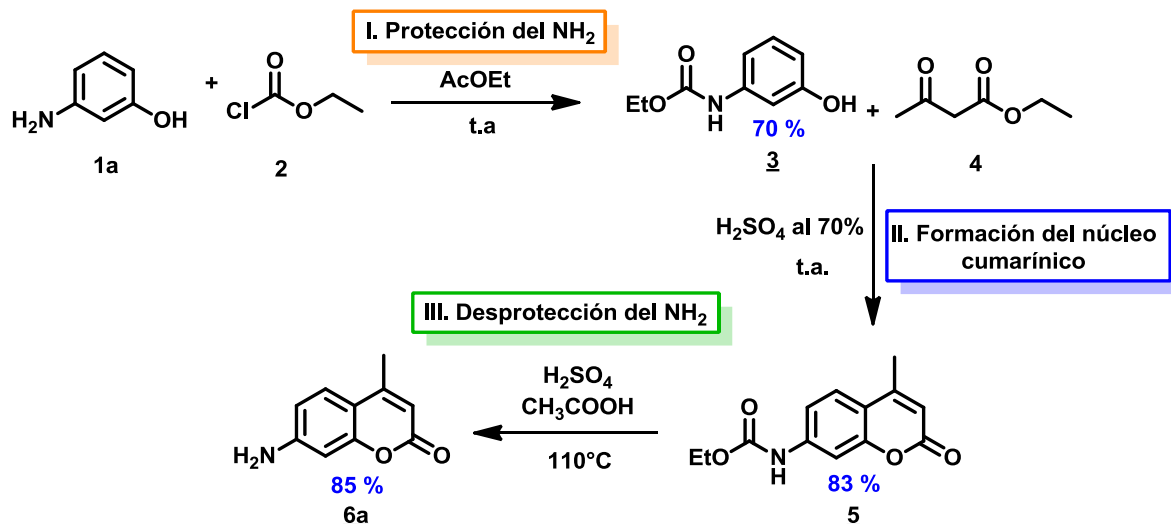
Los espectros de infrarrojo fueron tomados en un espectrofotómetro Bruker modelo tensor 27 con celda de reflectancia atenuada (ATR) a 31 scans y 2 cm^{-1} de resolución.

Los perfiles cromatográficos y los espectros de masas se obtuvieron en un cromatógrafo de gases HP 5890A Serie II (columna HP-5MS, $30\text{m} \times 0.25\text{mm} \times 0.25\mu\text{m}$) acoplado a un detector selectivo de masas HP 5972 (analizador cuadrupolar operado en full scan , rango de adquisición de datos m/z 40-350) con ionización por impacto de electrones (70 eV, modo positivo), la interface CG/EM a $285\text{ }^\circ\text{C}$, utilizando la siguiente programación de temperatura en la columna: $100\text{ }^\circ\text{C}$ (3 min) hasta $200\text{ }^\circ\text{C}$ (5 min) a $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, luego hasta $280\text{ }^\circ\text{C}$ a $15\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$; teniendo como gas portador He (99.9995 %, $35\text{ cm}/\text{s}$). Inyector tipo Split/splitless, modo de inyección automático siendo el volumen de inyección y temperatura del puerto de inyección de $1\text{ }\mu\text{L}$ y $250\text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente.

La toma de los espectros de RMN unidimensional (^1H , ^{13}C) y bidimensional (COSY H-H y HSQC) se realizó en un espectrómetro Bruker Avance-400; utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3 , estándar interno TMS 0.03 % v/v) o dimetil sulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) como disolventes.

4.1. Síntesis de tres etapas de la 7-amino-4-metilcumarina

La obtención de la 7-amino-4-metilcumarina se llevó a cabo mediante la síntesis en tres etapas ilustrada a continuación:



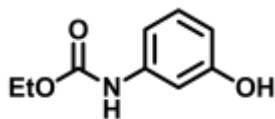
Esquema 19. Síntesis de la 7-amino-4-metilcumarina, mediante un procedimiento de tres etapas: I. Protección del grupo NH₂, II. Formación del núcleo cumarínico, III. Desprotección del grupo NH₂.

La metodología empleada en cada una de las etapas se realizó de acuerdo al procedimiento experimental reportado por Reddy *y col.*¹⁰⁰

I. Protección del grupo amino:

El cloroformiato de etilo (0.9 mL, 9.17 mmol) **2** fue añadido a una suspensión de *m*-aminofenol **1** (1.0 g, 9.17 mmol) en acetato de etilo (25 mL). La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 3 horas y monitoreada por CCF. Una vez finalizada, se procedió a remover, mediante filtración, el precipitado formado (hidrocloruro de amina). Posteriormente, el solvente fue eliminado bajo presión reducida para obtener 1.16 g de **3** (8.94 mmol, 70 %) como cristales incoloros.

3-carbetoxiaminofenol (**3**)

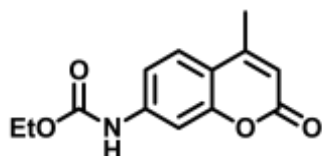


$C_9H_{11}NO_3$ (181.19 g/mol), Pf. 90-95 °C, *Rf*: 0.37 (3:1, éter de petróleo: acetato de etilo). IR (cm^{-1}): 3297, 2987, 1684, 1622, 1554. RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.23 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, CH_3), 4.10 (2H, q, $J = 7.1$ Hz, CH_2), 6.38 (1H, dd, $J = 8.0, 2.4$ Hz, 2-H), 6.85 (1H, dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, 5-H), 7.02 (2H, m, 4,6-H), 9.31 (1H, s, N-H), 9.45 (1H, s, OH). RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 14.6, 60.0, 105.4, 109.1, 109.5, 129.4, 140.3, 153.5, 157.7. Análisis calculado: C, 59.66; H, 6.12; N, 7.73; O, 26.49.

II. Formación del núcleo cumarínico

Una mezcla de 3-carbetoxifenol **3** (1.0 g, 5.52 mmol) y acetoacetato de etilo **4** (0.70 g, 5.38 mmol), fue suspendida en 15 mL de ácido sulfúrico (70 %) y agitada a temperatura ambiente durante 4 h. Una vez culminada la reacción, se procedió a realizar extracción líquido-líquido en acetato de etilo-agua (3 veces). La fase orgánica fue recolectada sobre Na_2SO_4 anhidro, para luego ser filtrada en una pre-columna de sílica y concentrada finalmente a vacío. El sólido obtenido fue recristalizado en etanol, obteniéndose 1.13 g de **5** (4.58 mmol, 83 %), como cristales color salmón.

7-carbetoxi-4-metilcumarina (**5**)



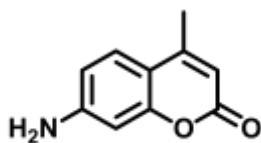
$C_{13}H_{13}NO_4$ (247,25 g/mol), Pf.: 185-190, *Rf*: 0.36 (3:1, éter de petróleo: acetato de etilo). IR (cm^{-1}): 3335, 2981, 1719, 1684, 1618, 1571. RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.24 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, CH_3), 2.34 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, 4- CH_3), 4.14 (2H, q, $J = 7.1$ Hz, CH_2), 6.16 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, 3-H), 7.34 (1H, dd, $J = 8.7, 2.1$ Hz, 6-H), 7.48 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, 8-H), 7.61 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, 5-H), 10.07 (1H, s, NH). RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 14.6,

18.2, 60.9, 104.5, 111.9, 114.4, 126.1, 143.0, 153.5, 153.6, 153.9, 160.40, 160.4.
Análisis calculado: C, 63.15; H, 5.30; N, 5.67; O, 25.88.

III. Desprotección del grupo amino

La 7-carboxi-4-metilcumarina **5** (1.0 g, 3.42 mmol) se sometió a calentamiento a 110°C en una solución de ácido sulfúrico concentrado (1.7 mL) y ácido acético (2,7 mL). Después de 4 horas de reacción, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y a continuación se le adicionaron 50 mL de agua; dejándose reposar durante toda la noche. A la suspensión resultante se le agregó solución de NaOH al 50% hasta obtener un pH= 8. El producto obtenido fue filtrado, lavado con agua helada y posteriormente recristalizado en etanol; obteniendo finalmente 0.60 g de **6a** (3.43 mmol, 85%) como cristales de color amarillo.

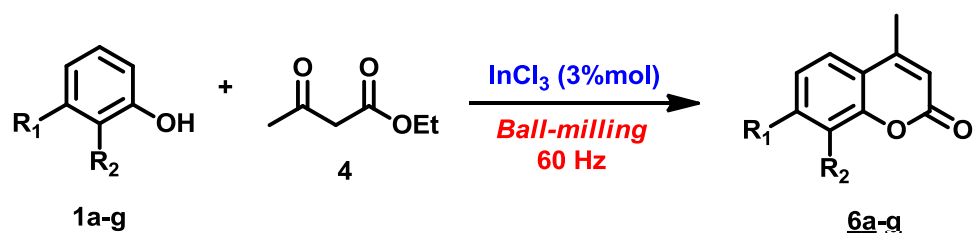
7-amino-4-metilcumarina (**6a**)



$C_{10}H_9NO_2$ (175.17 g/mol), Pf. 220-224 °C, *Rf*: 0.5 (1:1, éter de petróleo: acetato de etilo). IR (cm^{-1}): 3337-3245, 3072, 2984, 1680, 1542. RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2.29 (3H, s, 4- CH_3), 5.90 (1H, s, 3-H), 6.09 (2H, s, NH_2), 6.40 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, 8-H), 6.56 (1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, 6-H), 7.40 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, 5-H). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 18.4, 98.94, 107.9, 109.3, 111.6, 126.6, 153.5, 154.2, 155.9, 161.2. Análisis calculado: C, 68.56; H, 5.18; N, 8.00; O, 18.27.

4.2. Síntesis de 4-metilcumarinas mediante la implementación del protocolo *Ball milling* en la reacción de Pechmann.

Una serie de 4-metilcumarinas sustituidas se obtuvo mediante la aplicación del protocolo *Ball milling* desarrollado en la reacción de Pechmann (Esquema 20).



	1a	1b	1c	1d	1e	1f	1g
R ₁	NH ₂	OH	OCH ₃	H	CH ₃	α-naftol	β-naftol
R ₂	H	H	H	H	CH ₃		

Esquema 20. Protocolo *Ball milling* en la reacción de Pechmann.

Metodología general: En una cápsula cilíndrica de teflón se adicionó el respectivo fenol **1a-g**, acetoacetato de etilo **4** y InCl₃ (3% mol). Posteriormente, una esfera de 0.8 mm de diámetro se incorporó a la mezcla de reacción. Una vez sellado cuidadosamente el reactor, se sometió a una vibración de 60 Hz a un tiempo determinado en un amalgamador Zenith, Modelo Z-1A (Figura 14). La reacción fue monitoreada por CCF y una vez culminada, el crudo se vertió sobre hielo triturado, obteniéndose los sólidos correspondientes a los productos **6a-g**, los cuales fueron recristalizados posteriormente en etanol.

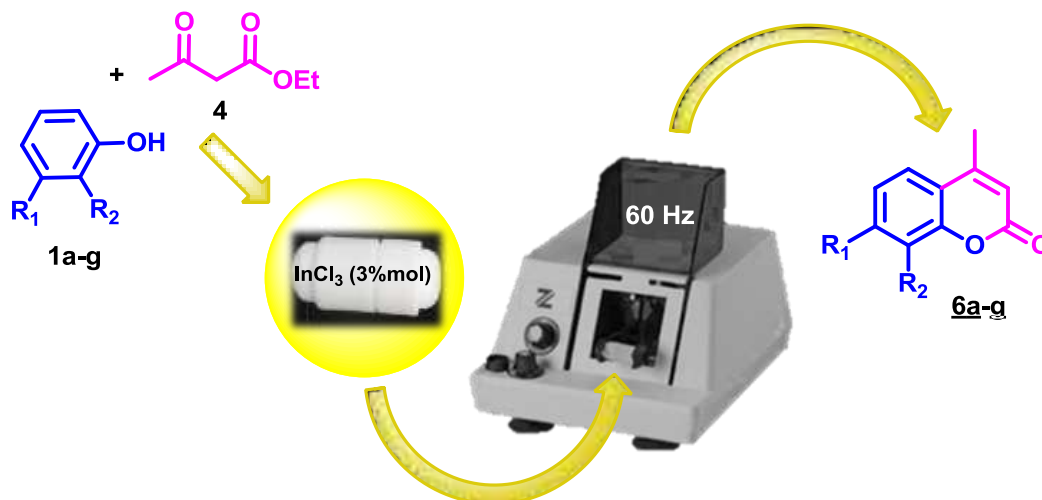
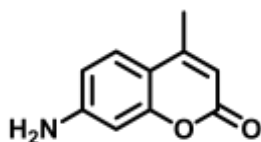


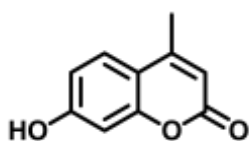
Figura 14. Montaje experimental empleado en la reacción de Pechmann, mediante el protocolo *Ball milling*.

7-amino-4-metilcumarina (**6a**)



Una mezcla de 0.31 g de *m*-aminofenol (2.85 mmol), 0.37 g de acetoacetato de etilo (2.84 mol) y 19 mg de InCl_3 (3% mol), se sometió a vibración a 60 Hz durante 10 minutos. Al cabo de este tiempo se vertió sobre hielo triturado, induciéndose la cristalización de un sólido color amarillo, que posteriormente fue recristalizado en etanol para obtener finalmente 0.46 g de **6a** (2.63 mmol, 92%). $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$ (175.17 g/mol), Pf. 220-224 °C, *Rf*: 0.5 (1:1, éter de petróleo: acetato de etilo). $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$ (175.17 g/mol), Pf.: 220-224 °C, *Rf*: 0.5 (1:1, éter de petróleo: acetato de etilo). IR (cm^{-1}): 3337-3245, 3072, 2984, 1680, 1542. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 2.29 (3H, s, 4- CH_3), 5.90 (1H, s, 3-H), 6.09 (2H, s, NH_2), 6.40 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, 8-H), 6.56 (1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, 6-H), 7.40 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, 5-H). RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 18.4, 98.94, 107.9, 109.3, 111.6, 126.6, 153.5, 154.2, 155.9, 161.2. Análisis calculado: C, 68.56; H, 5.18; N, 8.00; O, 18.27.

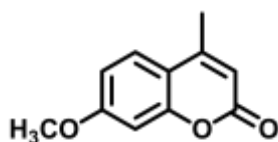
7-hidroxi-4-metilcumarina (**6b**)



Una mezcla de 0.31 g de *m*-hidroxifenol (2.82 mmol), 0.37 g de acetoacetato de etilo (2.84 mol) y 19 mg de InCl_3 (3% mol), se sometió a vibración a 60 Hz durante 5 minutos. Al cabo de este tiempo se vertió sobre hielo triturado, induciéndose la cristalización de un sólido color blanco marfil, que posteriormente fue recristalizado en etanol para obtener finalmente 0.48 g de **6b** (2.72 mmol, 95%). $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$ (176.17 g/mol), Pf. 184-186 °C, *Rf*: 0.33 (2:1, éter de petróleo: acetato de etilo). IR (cm^{-1}): 3493, 3117, 2994, 1669, 1517. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 2.35 (3H, d, $J = 1.1$ Hz, 4- CH_3), 6.11 (1H, d, $J = 1.1$ Hz, 3-H), 6.69 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, 8-H), 6.79 (1H, dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 6-H), 7.58 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, 5-H), 10.56 (1H, s, OH). RMN ^{13}C (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 18.1,

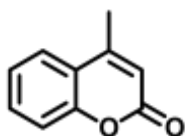
102.2, 110.3, 112.0, 112.9, 126.6, 153.6, 154.9, 160.3, 161.2. Análisis calculado: C, 68.18; H, 4.58; O, 27.25.

7-metoxi-4-metilcumarina (**6c**)



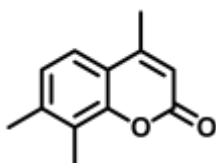
Una mezcla de 0.10 g de *m*-metoxifenol (0.81 mmol), 0.10 g de acetoacetato de etilo (0.77 mol) y 6 mg de InCl_3 (3% mol), se sometió a vibración a 60 Hz durante 20 minutos. Al cabo de este tiempo se vertió sobre hielo triturado, induciéndose la cristalización de un sólido blanco, que posteriormente fue recristalizado en etanol para obtener finalmente 0.12 g de **6c** (0.63 mmol, 80%). $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_3$ (190.17 g/mol), Pf. 170-174 °C, *Rf*: 0.5 (3:1, éter de petróleo: acetato de etilo). IR (cm^{-1}): 2835, 3060, 2919, 1701, 1570. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.42 (3H, s, 4- CH_3), 3.87 (3H s, CH_3O), 6.29 (3H s, 3-H), 7.02 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, 8-H), 7.11 (1H, dd, $J = 9.0, 2.6$ Hz, 6-H), 7.26 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, 5-H). RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 18.8, 55.9, 107.7, 115.6, 118.1, 118.8, 120.5, 147.98, 152.1, 156.1, 161.1. Análisis calculado: C, 69.46; H, 5.30; O, 25.24.

4-metilcumarina (**6d**)



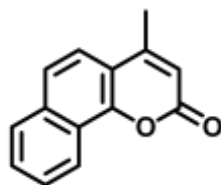
Una mezcla de 0.29 g de fenol (3.08 mmol), 0.5 g de acetoacetato de etilo (3.84 mol) y 20 mg de InCl_3 (3% mol), se sometió a vibración a 60 Hz durante 60 minutos. Al cabo de este tiempo se vertió sobre hielo triturado, induciéndose la cristalización de un sólido color blanco, que posteriormente fue recristalizado en etanol para obtener finalmente 0.26 g de **6d** (2.76 mmol, 52%). $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_2$ (160.17 g/mol), Pf. 74-76 °C, *Rf*: 0.33 (5:1, éter de petróleo: acetato de etilo). IR (cm^{-1}): 3034, 2952, 1668, 1503. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.75 (3H s, 4- CH_3), 5.71 (1H, s, 3-H), 6.75 (1H, dd, $J = 4.8, 1.8$ Hz, 8-H), 6.77 (2H, m, 6,7-H), 6.79 (1H, dd, $J = 4.8, 1.8$ Hz). Análisis calculado: C, 74.99; H, 5.03; O, 19.98.

4, 7, 8-trimetilcumarina (**6e**)



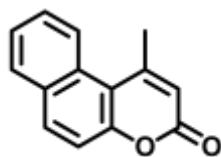
Una mezcla de 0.32 g de 2,3-dimetilfenol (2.66 mmol), 0.34 g de acetoacetato de etilo (2.62 mol) y 17 mg de InCl_3 (3% mol), se sometió a vibración a 60 Hz durante 45 minutos. Al cabo de este tiempo se vertió sobre hielo triturado, induciéndose la cristalización de un sólido color púrpura, que posteriormente fue recristalizado en etanol para obtener finalmente 0.28 g de **6e** (1.49 mmol, 56%). $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_2$ (188,22 g/mol), Pf. 140-144 °C, *Rf*: 0.40 (5:1, éter de petróleo: acetato de etilo). IR (cm^{-1}): 2923, 3052, 2979, 1691, 1600. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 2.24 (3H, s, 4- CH_3), 2.33 (3H, s, 8- CH_3), 2.38 (3H, s, 7- CH_3), 6.28 (1H, s, 3-H), 7.16 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, 6-H), 7.46 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, 5-H). RMN ^{13}C (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 11.6, 18.6, 20.3, 113.3, 117.8, 122.5, 123.9, 125.9, 141.7, 151.4, 154.0, 160.5. Análisis calculado: C, 76.57; H, 6.43; O, 17.00.

4-metil-2H-benzo[*h*]cromon-2-ona (**6f**)



Una mezcla de 0.34 g de α -naftol (2.36 mmol), 0.31 g de acetoacetato de etilo (2.38 mol) y 16 mg de InCl_3 (3% mol), se sometió a vibración a 60 Hz durante 12 minutos. Al cabo de este tiempo se vertió sobre hielo triturado, induciéndose la cristalización de un sólido color ocre, que posteriormente fue recristalizado en etanol para obtener finalmente 0.44 g de **6f** (2.09 mmol, 88%). $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_2$ (210.23 g/mol), Pf. 154-156 °C, *Rf*: 0.36 (5:1, éter de petróleo: acetato de etilo). IR (cm^{-1}): 3064, 3064, 2985, 1707, 1561. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.47 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, 4- CH_3), 6.32 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, 3-H), 7.53 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, 6-H), 7.59 (2H, m, 8,9-H), 7.64 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, 5-H), 7.83 (1H, m, 7-H), 8.50 (1H, m, 10-H). RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 19.3, 114.3, 115.2, 120.4, 122.7, 123.2, 124.2, 127.2, 127.7, 128.6, 134.8, 150.6, 153.5, 160.9. Análisis calculado: C, 79.98; H, 4.79; O, 15.22.

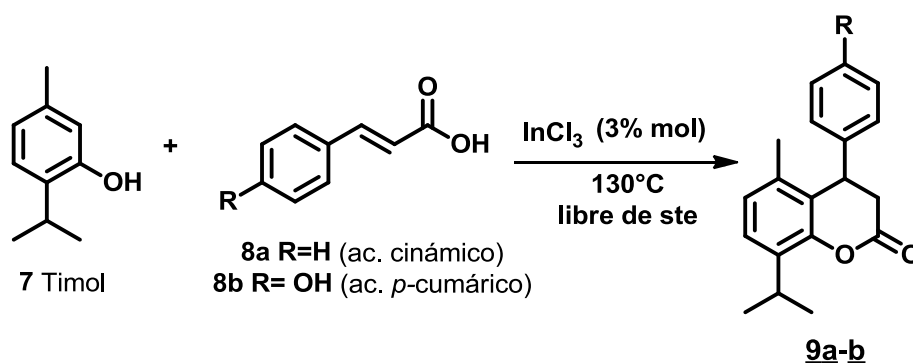
1-metil-3H-benzo[*f*]cromon-3-ona (**6g**)



Una mezcla de 0.34 g de β -naftol (2.36 mmol), 0.31 g de acetoacetato de etilo (2.38 mol) y 16 mg de InCl_3 (3% mol), se sometió a vibración a 60 Hz durante 15 minutos. Al cabo de este tiempo se vertió sobre hielo triturado, induciéndose la cristalización de un sólido color amarillo-verdoso, que posteriormente fue recristalizado en etanol para obtener finalmente 0.34 g de **6g** (1.62 mmol, 68%). $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_2$ (210.23 g/mol), Pf.: 176-178 °C, Rf: 0.43 (5:1, éter de petróleo: acetato de etilo). IR (cm^{-1}): 3054, 3054, 2922, 1705, 1599. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 2.91 (3H, s, 4- CH_3), 6.50 (1H, s, 3-H), 7.53 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, 8-H), 7.60 (1H, m, 6-H), 7.70 (1H, m, 7-H), 8.06 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, 9-H), 8.18 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, 10-H), 8.67 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 5-H). RMN ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 20.4, 111.2, 115.8, 117.4, 118.6, 125.8, 126.1, 128.4, 129.7, 131.1, 134.1, 154.1, 155.3, 164.2. Análisis calculado: C, 79.98; H, 4.79; O, 15.22.

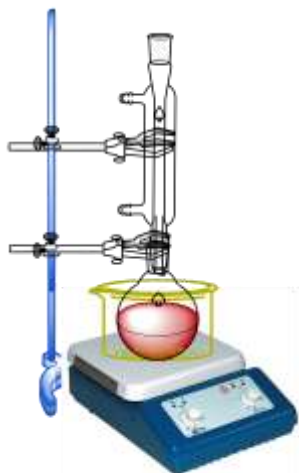
4.3. Síntesis de nuevas 4-aril-3,4-dihidrocumarinas a través de la condensación del timol con ácidos cinámicos.

La condensación del timol con ácidos cinámicos se realizó a través de la reacción de hidroarilación (Esquema 21), mediante el procedimiento experimental reportado por Jagdale y Sudalai.¹⁰¹



Esquema 21. Reacción de hidroarilación entre el timol y ácidos cinámicos.

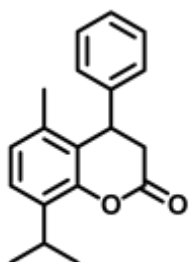
Metodología general: En un balón de fondo redondo de 25 mL equipado con un



condensador de reflujo, se adicionaron el timol **7**, el respectivo ácido cinámico **8a-b** y el InCl_3 (3% mol). La mezcla de reacción se calentó a 130°C durante 2-3 horas, siguiendo el transcurso de la misma mediante monitoreo por CCF. Una vez culminada, se agregaron 20 mL de agua y se procedió a realizar extracción líquido-líquido con acetato de etilo (3 veces). La fase orgánica fue lavada con salmuera, secada sobre Na_2SO_4 anhidro, filtrada a través de un pre-columna de sílica y concentrada a vacío. Posteriormente, se llevó a cabo la

purificación de los productos **9a** y **9b**, mediante cromatografía en columna sobre sílica y usando como eluyente mezclas pertinentes de acetato de etilo y éter de petróleo.

8-isopropil-5-metil-4-fenilcromon-2-ona (9a)

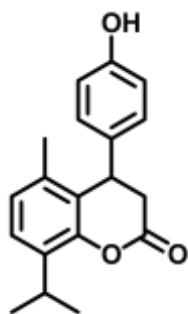


Compuesto preparado de acuerdo a la metodología general a partir de 0.27 g de timol (1.78 mmol), 0.27 g de ácido cinámico (1.82 mmol) y 12 mg de InCl_3 (3% mol). La mezcla de reacción se mantuvo en calentamiento a 130°C durante 2 horas. Posteriormente se llevó a cabo la extracción y purificación, obteniendo 0.47 g de **9a** (1.68 mmol, 94%) como un sólido color

blanco. $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_2$ (280.36 g/mol), Pf. $128\text{-}132^\circ\text{C}$, *Rf*: 0.45 (8:1, éter de petróleo: acetato de etilo). IR (cm^{-1}): 3027, 2963-2869, 1759, 1579, 1383. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1.19 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, 10b- CH_3), 1.22 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, 10a- CH_3), 2.08 (3H, s, 5- CH_3), 2.85 (1H, dd, $J = 15.9, 1.8$ Hz, 3-H_{ax}), 3.25 (1H, dd, $J = 16.0, 6.9$ Hz, 4-H), 3.26 (1H, m, 9H), 4.53 (1H, dd, $J = 6.9, 1.5$ Hz, 3-Heq), 7.00 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, 7-H),), 7.02 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, 6-H), 7.03 1H, (t, $J = 1.8$ Hz, 14-H), 7.22 (2H m, 13,15-H), 7.29 (2H m, 12,16-H). RMN ^{13}C (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 18.2, 22.8, 22.9, 26.4, 37.2, 37.5, 123.7, 125.4, 126.2, 127.0,

127.4, 129.2, 133.6, 134.1, 140.9, 149.2, 167.7. CG-MS (70 eV): $t_R = 19.30$ min, $M^+ = 280$ m/z. Análisis calculado: C, 81.40; H, 7.19; O, 11.41.

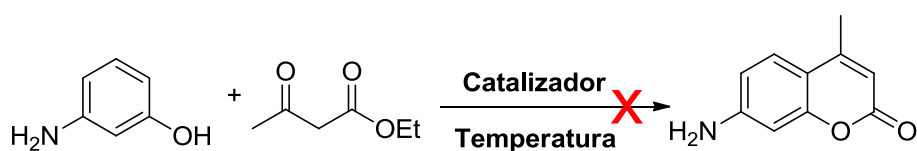
4-(4-hidroxifenil)-8-isopropil-5-metilcromon-2-ona (**9b**)



Compuesto preparado de acuerdo a la metodología general a partir de 0.25 g de timol (1.69 mmol), 0.27 g de ácido *p*-cumárico (1.64 mmol) y 11 mg de InCl_3 (3% mol). La mezcla de reacción se mantuvo en calentamiento a 130°C durante 3 horas. Posteriormente se llevó a cabo la extracción y purificación, obteniendo 0.44 g de **9b** (1.48 mmol, 88%) como un sólido color crema. $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_3$ (296.36 g/mol), Pf.: $145\text{-}150^\circ\text{C}$, *Rf*: 0.50 (3:1, éter de petróleo: acetato de etilo). IR (cm^{-1}): 3026, 2963, 1736, 1511, 1348. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1.18 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, 10b- CH_3), 1.21 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, 10a- CH_3), 2.08 (3H, s, 5- CH_3), 2.80 (1H, dd, $J = 15.7, 1.7$ Hz, 3-Hax), 3.16 (1H, dd, $J = 15.8, 6.7$ Hz, 4-H), 3.24 (1H, m, 4-H), 4.39 (1H, m, 3-Hax), 6.67 (2H, m, 12, 16-H), 6.81 (2H, m, 13, 15-H), 6.98 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, 7-H), 7.17 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, 6-H), 9.47 (1H, s, OH). RMN ^{13}C (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 18.2, 22.8, 22.9, 26.4, 36.7, 37.5, 115.9, 124.2, 125.2, 126.1, 128.1, 130.9, 133.5, 133.9, 149.1, 156.5, 167.9. CG-MS (70 eV): $t_R = 22.19$ min, $M^+ = 296$ m/z. Análisis calculado: C, 77.00; H, 6.80; O, 16.20.

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La 7-amino-4-metilcumarina constituye un precursor importante en la síntesis de heterociclos más complejos. Sin embargo, su aplicabilidad como bloque de construcción se ve reducida debido a su elevado costo en el mercado (100 mg: 61.0 USD, Sigma Aldrich). Esta investigación inicia con el estudio de las condiciones de reacción hacia su fácil obtención, partiendo del *m*-aminofenol y el acetoacetato de etilo (Esquema 22, Tabla 5).



Esquema 22. Metodología convencional empleada en la síntesis de la 7-amino-4-metilcumarina.

Tabla 5. Catalizadores empleados en la síntesis de la 7-amino-4-metilcumarina **6a**.

Ensayo	Catalizador (% mol)	Temperatura °C	Tiempo h
1	BiCl ₃ (10%) ⁵⁷	70	3
2	InCl ₃ (10%) ⁵⁹	70	2
3	AlCl ₃ (10%) ⁵⁵	70	3
4	SnCl ₂ ·H ₂ O (10%) ¹⁰²	70	2
5	H ₂ SO ₄ al 22% v/v ⁵⁰	t.a	72
6	H ₂ SO ₄ al 22% v/v	70	15
7	H ₂ SO ₄ /SiO ₂ (10%) ¹⁰³	70	18
8	AMCell-SO ₃ H (10%)	100	10

Cuando la reacción fue catalizada mediante los ácidos de Lewis BiCl_3 ,⁵⁷ InCl_3 ,⁵⁹ AlCl_3 ,⁵⁵ y $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,¹⁰² los resultados observados fueron muy parecidos. Cabe resaltar que la metodología empleada, de acuerdo a lo que reporta la literatura, es la misma en cada uno de ellos y consiste en someter a calentamiento a 70°C , una mezcla equimolar de los precursores con el respectivo catalizador. Una vez la reacción ha finalizado, se adicionan cubos de hielo o agua helada y se espera la cristalización del producto (Ensayos 1-4).

Pese a que se realizó el procedimiento experimental tal como el descrito por los autores, no se logró el aislamiento del compuesto. A diferencia, en todos los casos, se observó mediante CCF la formación de 4 productos, con *Rfs* muy cercanos. Posteriormente, en vista de no presentarse la precipitación de ninguno de ellos, se realizó extracción y purificación en columna, lográndose aislar dos sólidos amarillos. Estos compuestos fueron caracterizados mediante la determinación de su punto de fusión y la toma de su espectro IR.

El punto de fusión reportado para la 7-amino-4-metilcumarina es de $220\text{-}224^\circ\text{C}$,¹⁰⁴ en contraste, los sólidos aislados se descomponen a 160 y 180°C . Por otro lado, la comparación del espectro IR experimental con el teórico,¹⁰⁵ permitió corroborar que efectivamente estos compuestos no correspondían al esperado (Figura 15).

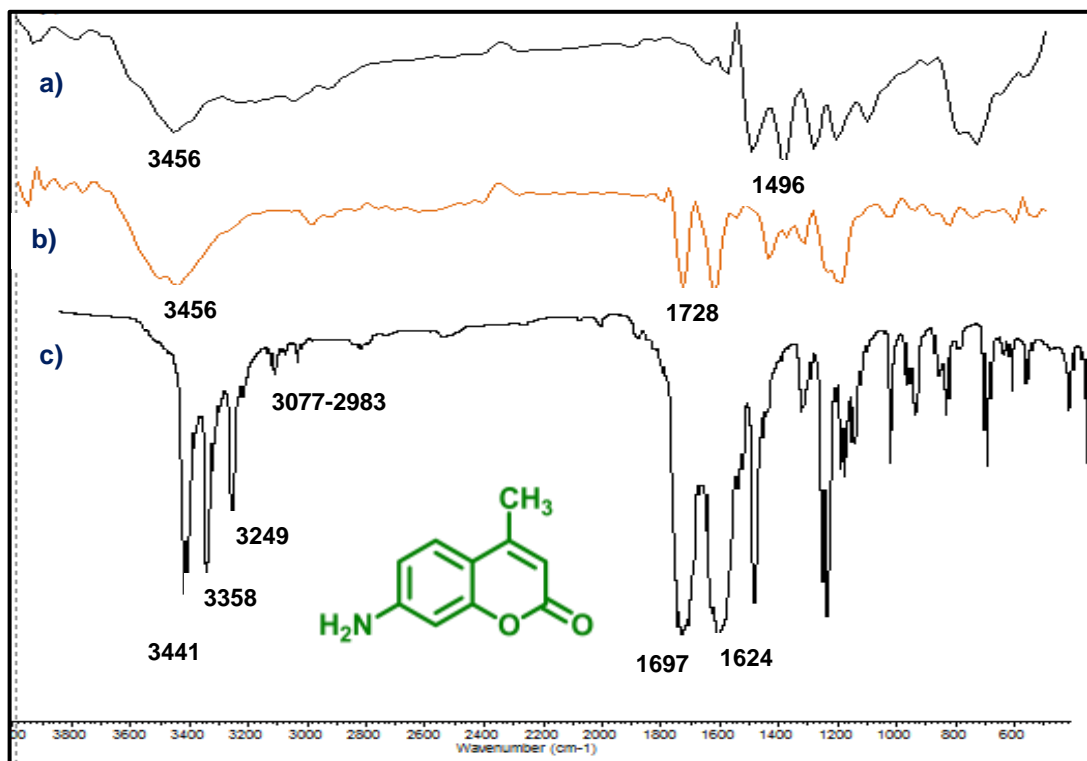


Figura 15. a, b) Espectros experimentales de los sólidos aislados, c) Espectro reportado de la 7-amino-4-metilcumarina.⁹⁷

En los espectros a, b) se observa una banda ancha a 3456 cm^{-1} , característica de los grupos OH, a diferencia del reportado en el que se aprecia claramente la vibración del -NH_2 entre $3441\text{-}3249\text{ cm}^{-1}$. De igual forma, en los espectros experimentales no se observa la señal del sustituyente CH_3 en posición 4 del núcleo cumarínico ($3077\text{-}2983\text{ cm}^{-1}$) y pese a que en la huella digital de b) se aprecian dos señales a 1728 cm^{-1} , que podrían corresponder a las vibraciones C=O , estas se encuentran poco definidas y de acuerdo a su longitud de onda podría pertenecer a un compuesto alifático ($1715\text{-}1745\text{ cm}^{-1}$) y no a uno aromático ($1650\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$).¹⁰⁶

Por otra parte, ácidos de Brønsted como el sulfúrico y el clorosulfónico fueron probados. Inicialmente, se empleó como catalizador una solución al 22% v/v de H_2SO_4 a temperatura ambiente, siguiendo el protocolo publicado por Pechmann (Ensayo 5).⁵¹ Al no observarse la formación de ningún producto al cabo de 72

horas y en vista de que los precursores permanecían en la mezcla de reacción, se sometió a calentamiento a 70°C durante 15 horas (Ensayo 6). Sin embargo, tanto el *m*-aminofenol como el acetoacetato de etilo continuaron sin reaccionar.

En los últimos años la catálisis heterogénea, mediante el uso de ácidos soportados, ha sido eficientemente aplicada a diferentes procedimientos sintéticos, entre los que se encuentran la reacción de Pechmann. En el año 2009, Reddy y *col.* reportan la síntesis de una serie de cumarinas sustituidas bajo condiciones libres de solvente y empleando ácido sulfúrico soportado sobre sílica gel (H₂SO₄/SiO₂) como catalizador.¹⁰³ Con el objetivo de probar esta metodología, se procedió a la preparación del H₂SO₄/SiO₂ siguiendo el protocolo descrito por ellos. Una vez disponible fue ensayado en la condensación del *m*-aminofenol con acetoacetato de etilo, sin embargo, al cabo de 18 horas no se observó avance en la reacción (Ensayo 7).

Finalmente, se empleó como catalizador el ácido clorosulfónico anclado a celulosa amorfa triturada, AMCell-SO₃H, preparada en el LQOBio de acuerdo al procedimiento reportado por Merchán y Kouznetsov.¹⁰⁷ Al cabo de 10 horas de calentamiento, la reacción se suspende debido a la formación de múltiples productos, posiblemente ocasionados por la descomposición de los precursores (Ensayo 8).

El método más empleado para la síntesis de cumarinas es la condensación de fenoles con compuestos β-dicarbonilo. La presencia de un sustituyente *meta* donante en la molécula de fenol facilita significativamente la reacción; sin embargo, es poco eficiente en la preparación de derivados cumarínicos amino sustituidos. Aunque la condensación Pechmann es regioespecífica con respecto al sitio de ciclación (la posición *orto* con respecto al grupo que reacciona y la posición *para* con respecto al sustituyente *meta*), no es selectiva con respecto a los grupos funcionales, por lo tanto, los grupos amino e hidroxilo, tienen las mismas posibilidades de reaccionar (Figura 16).¹⁰⁸

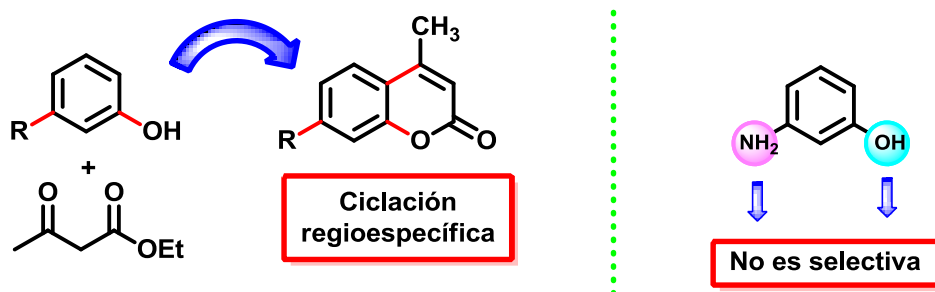
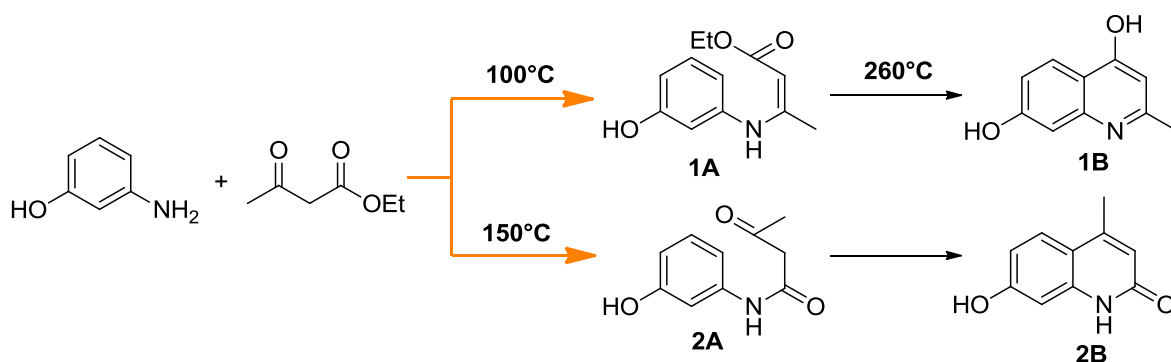


Figura 16. Características de la Reacción de Pechmann.

Sobre la base de los primeros estudios de Pechmann se podría haber llegado a la conclusión de que el grupo amino en el *m*-aminofenol, es el grupo más activo en la reacción con acetoacetato de etilo; dando lugar a la formación de los compuestos 4,7-dihidroxi-2-metilquinolina **1B** y 7-hidro-4-metilcarboestiril **2B**, mediante la formación de los intermediarios **1A** y **2A**, respectivamente (Esquema 23). Ésta hipótesis fue planteada por Pechmann con el objetivo de dar explicación a la no formación del núcleo cumarínico cuando se empleaba el *m*-aminofenol como precursor, a diferencia de lo que ocurre con los demás fenoles *m*-sustituídos.¹⁰⁹



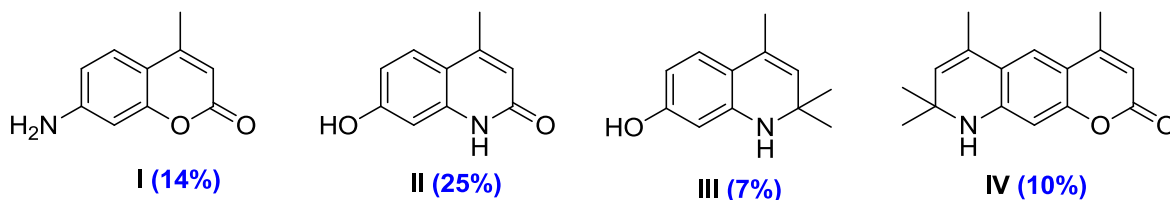
Esquema 23. Hipótesis de Pechmann en la condensación del *m*-aminofenol con acetoacetato de etilo.

Pasaron más de 60 años para corroborarse las observaciones realizadas por Pechmann, Wood en 1968 logró aislar la 7-hidro-4-metilcarboestiril **2B** como resultado de la condensación térmica del *m*-aminofenol con el acetoacetato de

etilo a 160°C, con un rendimiento del 96 %.¹¹⁰ Diez años más tarde, Atkins obtiene el mismo compuesto, reportando en esta ocasión un rendimiento del 60 %.¹¹⁴

Por otra parte, la naturaleza del β -cetoéster tiene un efecto pronunciado sobre la regioselectividad de la reacción: las correspondientes 7-aminocumarinas son los productos principales cuando el *m*-aminofenol se calienta con 2-metil-ésteres y 4,4,4-trifluoroacetato de etilo.¹¹⁴

En 1980 Prikl y Fisar, llevaron a cabo la reacción del *m*-aminofenol con acetoacetato de etilo, empleado el cloruro de zinc anhidro como catalizador. Los resultados obtenidos reflejan una mezcla de cuatro compuestos, los cuales una vez aislados y caracterizados fueron identificados como: 7-amino-4-metilcumarina **I**, 7-hidroxicarboestiril **II**, 7-hidroxidehidroquinolina **III**, y piranodihidroquinolina **IV** (Esquema 24).^{101, 105}

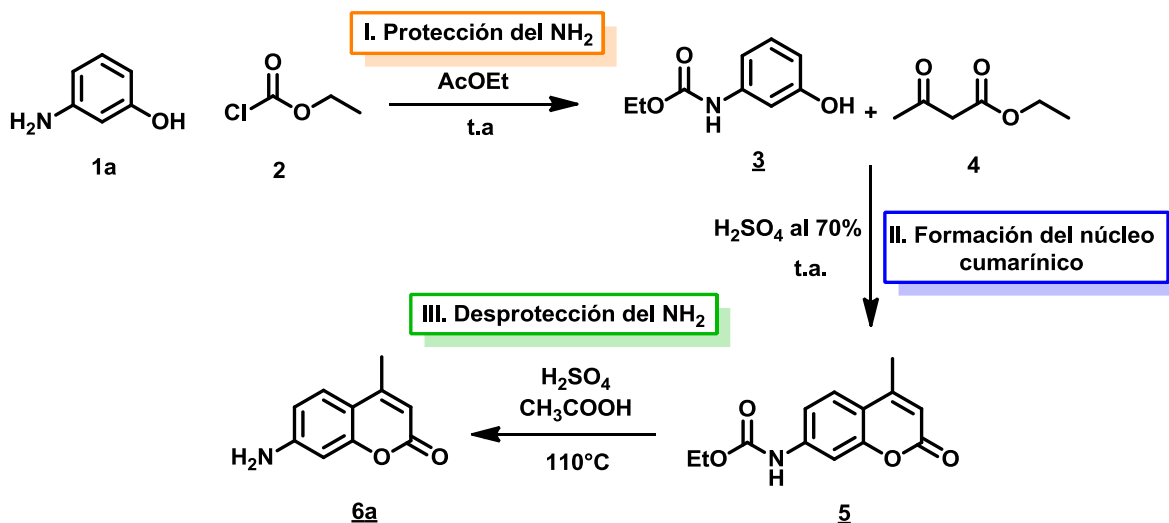


Esquema 24. Compuestos aislados en la condensación del *m*-aminofenol y el acetoacetato de etilo catalizada mediante ZnCl_2 anhidro.

La síntesis de la 7-amino-4-metilcumarina a través de la reacción directa del *m*-aminofenol con acetoacetato de etilo, conduce a la generación de varios productos secundarios, difíciles de purificar y aislar; tal como se reporta en la literatura y como se corroboró experimentalmente en esta investigación. Motivo por el cual, se buscó un procedimiento que fuera capaz de disminuir la reactividad del grupo amino, favoreciendo la condensación a través del hidroxilo y aumentando de esta forma las posibilidades de la formación del núcleo cumarínico.

5.1. Síntesis de tres etapas de la 7-amino-4-metilcumarina

La síntesis de la 7-amino-4-metilcumarina se realizó mediante una metodología que involucra tres etapas: la primera de ellas corresponde a la protección del grupo amino en el *m*-aminofenol (I), seguida de la formación del núcleo cumarínico (II) y finalmente la desprotección del grupo NH₂ de la cumarina previamente obtenida (III) (Esquema 25).



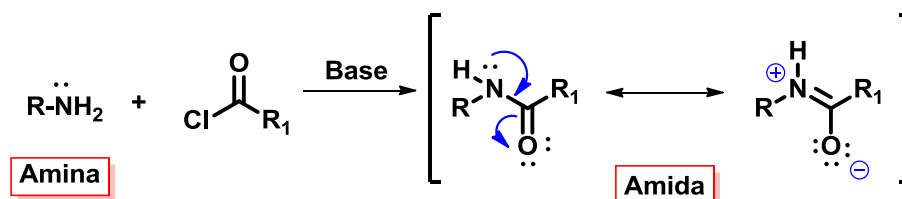
Esquema 19. Síntesis de la 7-amino-4-metilcumarina mediante una metodología de tres etapas.

5.1.1. Protección del *m*-aminofenol

En la síntesis de un compuesto a partir de un precursor dotado de varios grupos funcionales, es muy frecuente que un reactivo que transforme a uno de estos, también afecte a otro grupo presente en la molécula. En estas reacciones, donde no existe una adecuada quimioselectividad sobre el grupo funcional a transformarse, el grupo que debe permanecer inalterado se protege, haciéndolo inerte temporalmente a las condiciones de la reacción.

El par electrónico del átomo de nitrógeno es el responsable de la nucleofilicidad y basicidad de las aminas por lo tanto, uno de los métodos más empleados en la

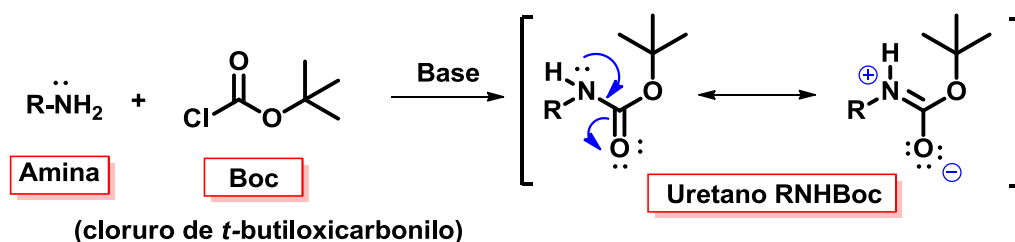
protección del grupo amino es su conversión a amidas; las cuales no son compuestos nucleofílicos, debido a que el par solitario del nitrógeno está atado en conjugación con un grupo electro-atrayente, el carbonilo (Esquema 25).¹¹³



Esquema 25. Conversión de la amina en amida.

Uno de los inconvenientes de la protección de aminas mediante su conversión a amidas es la etapa de desprotección, ya que éstas son poco reactivas y su hidrólisis debe efectuarse en condiciones de alta basicidad (o acidez) y a alta temperatura, la cual puede afectar a otros grupos funcionales presentes en la molécula.

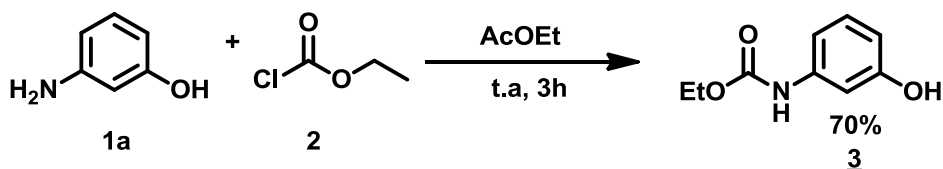
Con el fin de evitar mayores complicaciones en el proceso de síntesis, muy a menudo, las aminas se protegen en forma de uretanos, en los cuales la densidad electrónica del átomo de nitrógeno también está disminuida por conjugación con un grupo carbonilo (Esquema 26). La ventaja de estos grupos protectores es que pueden eliminarse en condiciones suaves y de manera quimioselectiva. Uno de los reactivos más usados en la protección de aminas a través de uretanos, es el cloruro de *t*-butiloxicarbonilo (Boc).¹¹³



Esquema 26. Conversión de la amina a uretano.

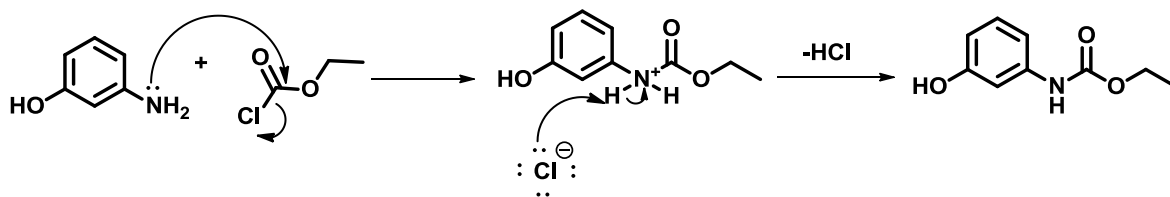
La primera etapa de la síntesis hacia la obtención de la 7-amino-4-metilcumarina es la protección de su precursor. El *m*-aminofenol **1a** fue eficientemente protegido

convirtiéndolo en el 3-carbetoxiaminofenol **3**, a través de la reacción con el cloroformiato de etilo **2** (Esquema 27).



Esquema 27. I. Protección del grupo NH₂.

El mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la reacción es una sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2). El par de electrones del *m*-aminofenol ataca al carbono carbonílico del cloroformiato de etilo, ocasionando la salida del cloruro. Posteriormente, se da la estabilización del carbetoxiaminofenol, mediante la pérdida de uno de sus protones (Esquema 28).¹¹⁴



Esquema 28. Formación del carbetoxiaminofenol mediante una sustitución nucleofílica bimolecular, S_N2.

La caracterización de **3a** se realizó mediante técnicas espectroscópicas, además de la determinación de su punto de fusión; el cual se encuentra entre 90-95 °C, tal como se reporta en la literatura.¹⁰⁰

En el espectro IR obtenido experimentalmente se observan unas bandas a 3297, 2987 y 1684 cm⁻¹, éstas hacen referencia a las tensiones en los enlaces N-H, CH₃ y -C=O, respectivamente. También se contemplan unas bandas a 1622 y 1554 cm⁻¹, las cuales indican las flexiones del grupo N-H y las vibraciones de tensión -C=C- del esqueleto aromático, respectivamente (Figura 17).¹⁰⁶

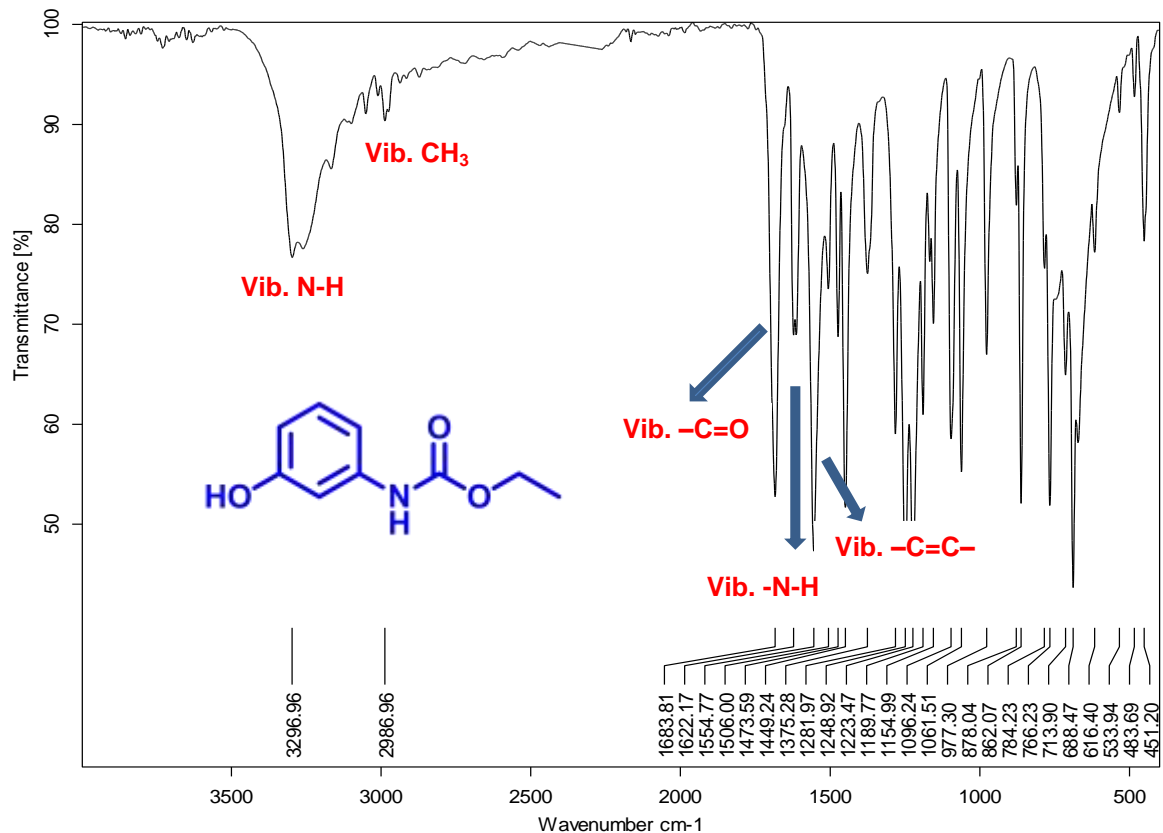


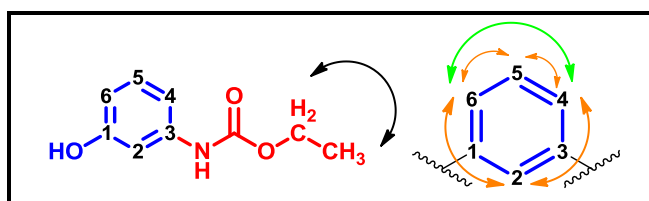
Figura 17. Espectro IR experimental del 3-carboxiaminofenol **3**.

La estructura de **3** fue confirmada a través de RMN (¹H, ¹³C, DEPT-135, COSY ¹H-¹H y HSQC).

En el espectro RMN ¹H se aprecian las señales correspondientes a los diferentes grupos de protones presentes en la molécula (Figura 18). Iniciando desde campo alto, a 1.23 y 4.10 ppm, se ubican los doblamientos ocasionados por la interacción de los protones CH₃ y CH₂ de la región alifática como un triplete y un cuartete, respectivamente. En la región comprendida entre 6.38 y 7.02 ppm, se perciben los protones aromáticos; el protón 2-H como un doblete de dobletes (*dd*) a 6.38 ppm, debido al acoplamiento a 4 enlaces de distancia con los protones 4-H y 6-H. De igual forma, debido a la interacción con estos protones, se observa un *dd* a 6.85 ppm correspondiente al protón 5-H. Los protones 4-H y 6-H se presentan a 7.02

ppm como un multiplete, a causa de las interacciones con los protones 5-H y 2-H, al igual que el acoplamiento entre ellos mismos. Finalmente, el protón amidínico se encuentra a 9.31 ppm como un singulete agudo e intenso, al igual que el protón del hidroxilo a 9.45 ppm (Tabla 6).¹¹⁵

Tabla 6. Desplazamiento químico y constantes de acoplamiento en el espectro RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) de 3.



Protones	δ ppm	J, Hz
CH ₃ (t)	1.23	7.09
CH ₂ (q)	4.10	7.09
2-H (dd)	6.38	2.37, 8.03
5-H (dd)	6.85	1.85, 8.05
4,6-H (m)	7.02	-
NH (s)	9.31	-
OH (s)	9.45	-

El espectro RMN ¹³C permitió corroborar el número de carbonos presentes en la molécula. La naturaleza de cada carbono es revelada de acuerdo al desplazamiento químico; por tanto, se observan los carbonos alifáticos CH₃ y CH₂ a 14.56 y 60.04 ppm, respectivamente. Los carbonos aromáticos C2-C6 se presentan en la región comprendida entre 105.38-140.33 ppm, el C1 y el carbono carbonílico se desplazan a campo bajo, 157.72 y 153.47 ppm, respectivamente; como consecuencia del efecto electro-atrayente del oxígeno (Figura 19).

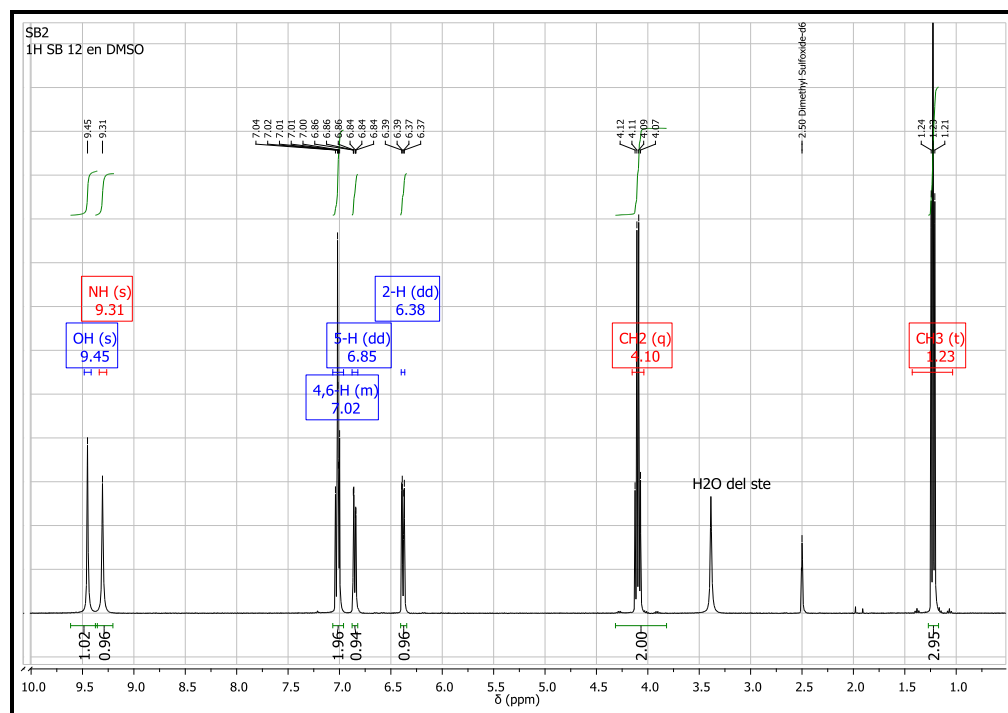


Figura 18. Espectro RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **3**.

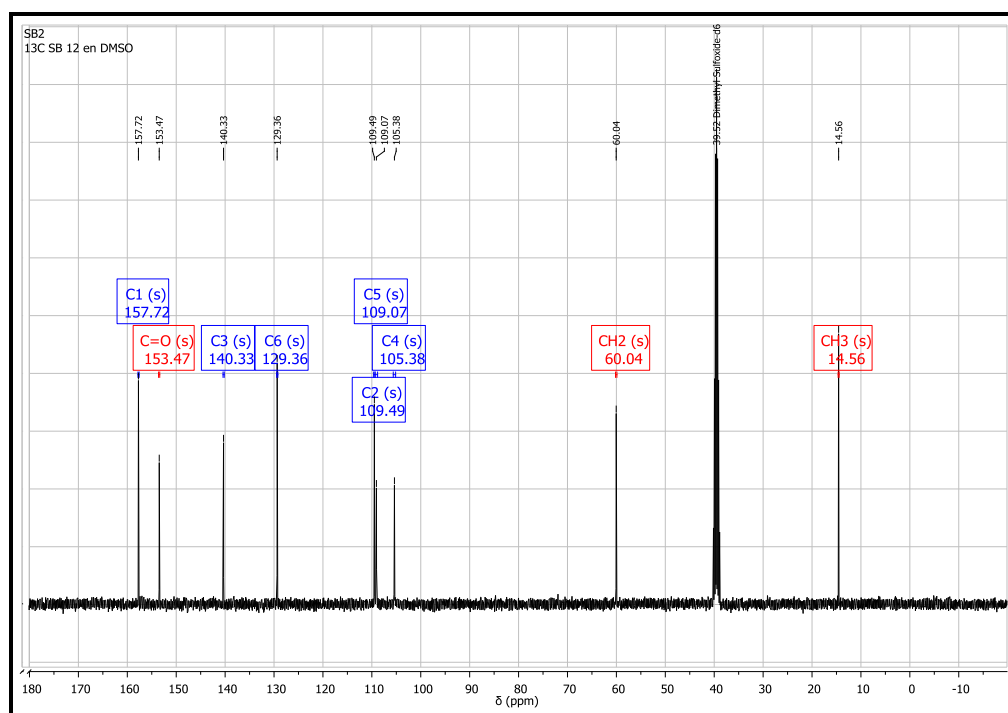


Figura 19. Espectro RMN ^{13}C (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **3**.

La superposición del espectro DEPT-135 sobre el de ^{13}C permitió corroborar la presencia del carbono metileno (CH_2), ya que la señal aparece con fase negativa, así mismo se identificaron los tres carbonos cuaternarios ($\text{C}=\text{O}$, C_2 y C_3), cuya señal desaparece en DEPT-135 (Figura 20).

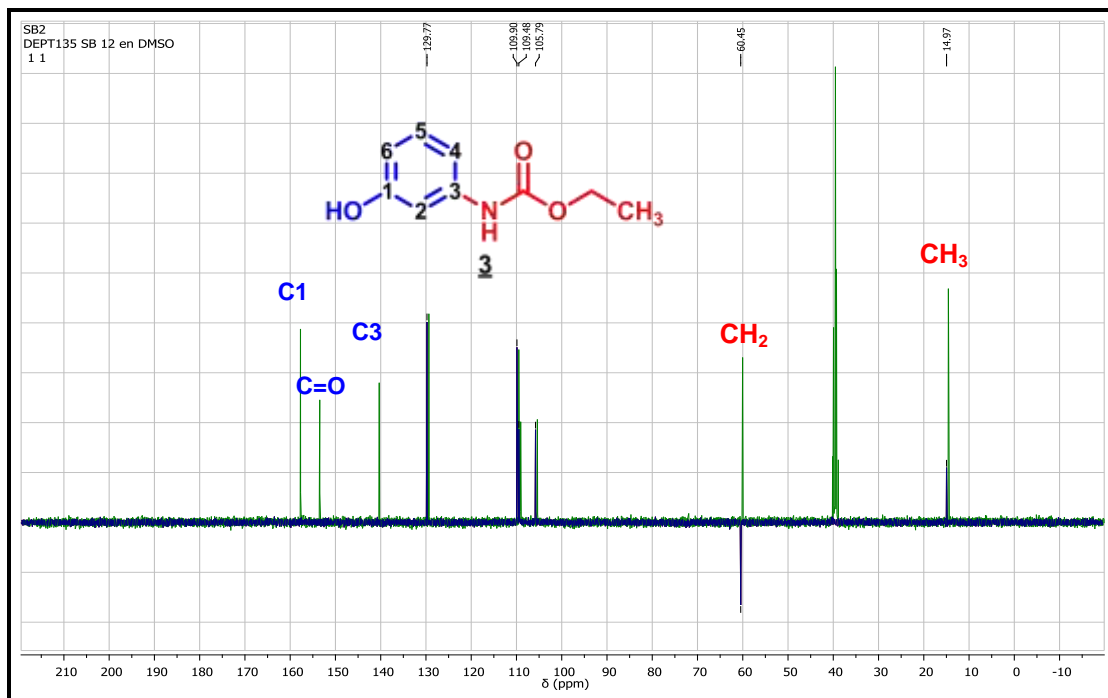


Figura 20. Superposición del espectro DEPT-135 sobre el de ^{13}C de **3**.

Mediante los experimentos RMN bidimensionales se ratificaron las asignaciones realizadas hasta el momento. En el espectro COSY ^1H - ^1H (correlated spectroscopy) se perciben los acoplamiento entre los diferentes grupos de protones presentes en la molécula, alifáticos (CH_2 y CH_3) y aromáticos (2-H, 5-H, 4,6-H) (Figura 21).

Finalmente, el experimento de acoplamiento heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation), confirmó la estructura de la molécula y la asignación de cada una de sus señales. En el espectro HSQC se observa claramente la conectividad entre los protones presentes y el carbono al cual están enlazados (Figura 22).

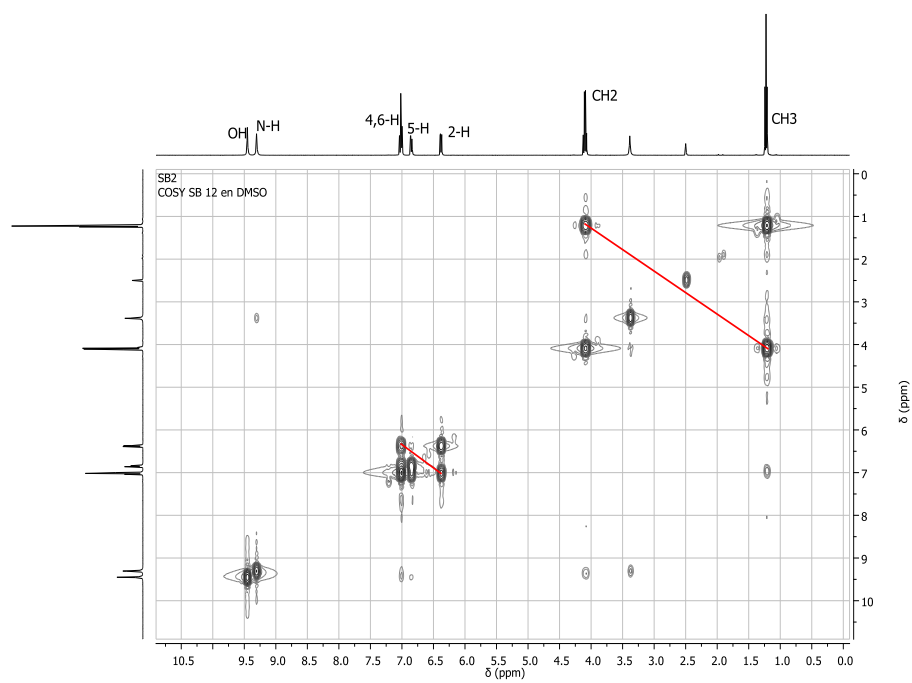


Figura 21. Espectro COSY ^1H - ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **3**.

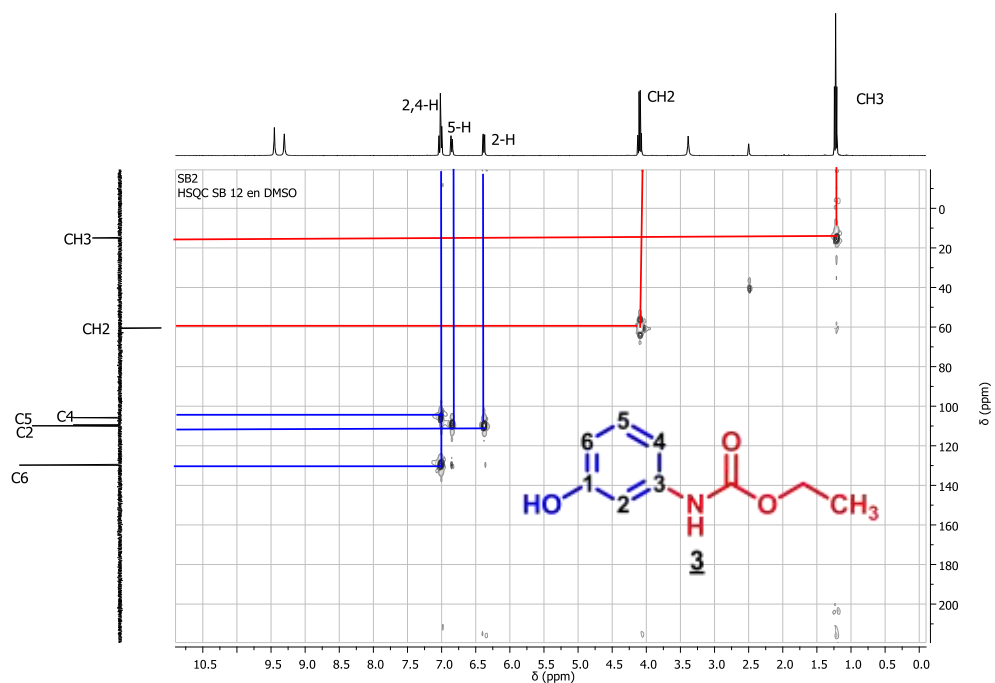
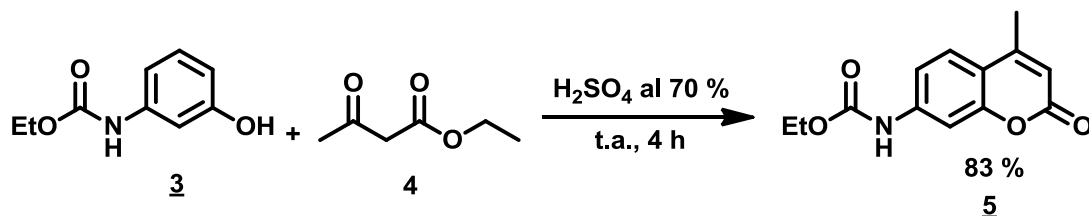


Figura 22. Espectro heteronuclear HSQC (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **3**.

5.1.2. Formación del núcleo cumarínico a partir del *m*-aminofenol protegido **3**.

La formación del núcleo cumarínico **5** se logró satisfactoriamente a partir de la condensación del 3-carbetoxiaminofenol **3** y el acetoacetato de etilo **4**, a través de la reacción de Pechmann (Esquema 29).



Esquema 29. II. Formación del núcleo cumarínico.

El punto de fusión determinado experimentalmente para la 7-carbetoxi-4-metilcumarina **5** es de 185-190°C, consistente con el reportado.¹⁰⁰

Por otro lado, en su espectro IR se aprecian las bandas características de los grupos funcionales presentes. Las tensiones del NH y CH_3 se presentan a 3335 y 2981 cm^{-1} , respectivamente. La vibración del carbonilo en el sustituyente alifático se aprecia a 1719 cm^{-1} , número de onda mayor que el del carbonilo en el anillo aromático, 1684 cm^{-1} . Este fenómeno es característico ya que el aumento de la carga positiva en el fragmento alifático desplaza estas vibraciones a mayores frecuencias, lo que no ocurre en el carbonilo aromático, debido a la conjugación del anillo. Finalmente, la flexión del -N-H y las vibraciones -C=C- del esqueleto cumarínico se observan a 1618 y a 1571 cm^{-1} , respectivamente (Figura 23).¹⁰⁶

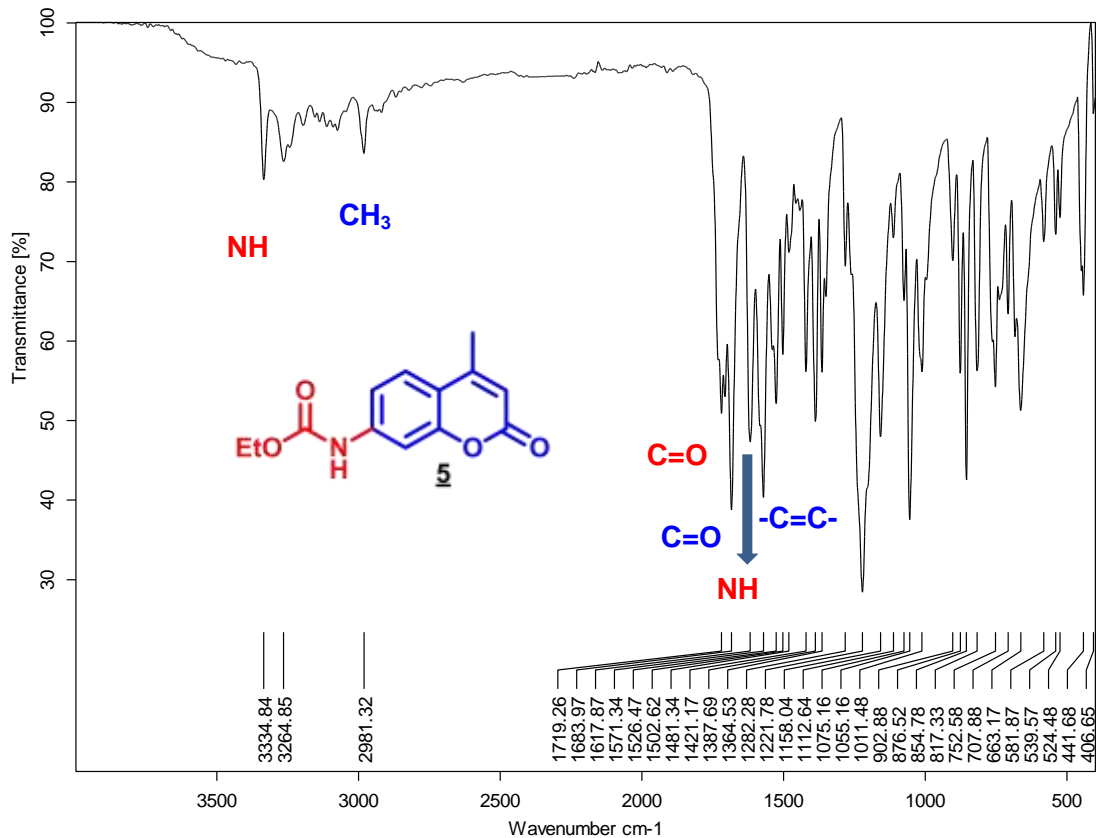


Figura 23. Espectro IR de 7-carbetoxi-4-metilcumarina **5**.

La formación del núcleo cumarínico fue corroborada mediante RMN. El análisis del espectro RMN ^1H permitió identificar los diferentes tipos de protones presentes en la molécula y sus acoplamientos (Figura 24). Así los protones alifáticos CH_2 y CH_3 se ubican a 4.14 y 1.24 ppm, respectivamente; presentándose las señales como un cuartete y un triplete debido a su interacción. De igual forma se ratifica la ciclación con la presencia del sustituyente CH_3 en posición 4 de la cumarina a 2.34 ppm, y su acoplamiento con el protón 3-H ($J=1.20$ Hz), el cual se observa a 6.16 ppm. Por otra parte, los protones 5-H y 8-H se aprecian a 7.61 y 7.48 ppm, respectivamente, con apariencia de doblete debido al acoplamiento con el protón 6-H; observándose éste último a 7.34 ppm, como un doble de dobletes que

corroborar su interacción con los protones anteriormente mencionados. Finalmente, la señal del NH se contempla a 10.07 ppm (Tabla 7).

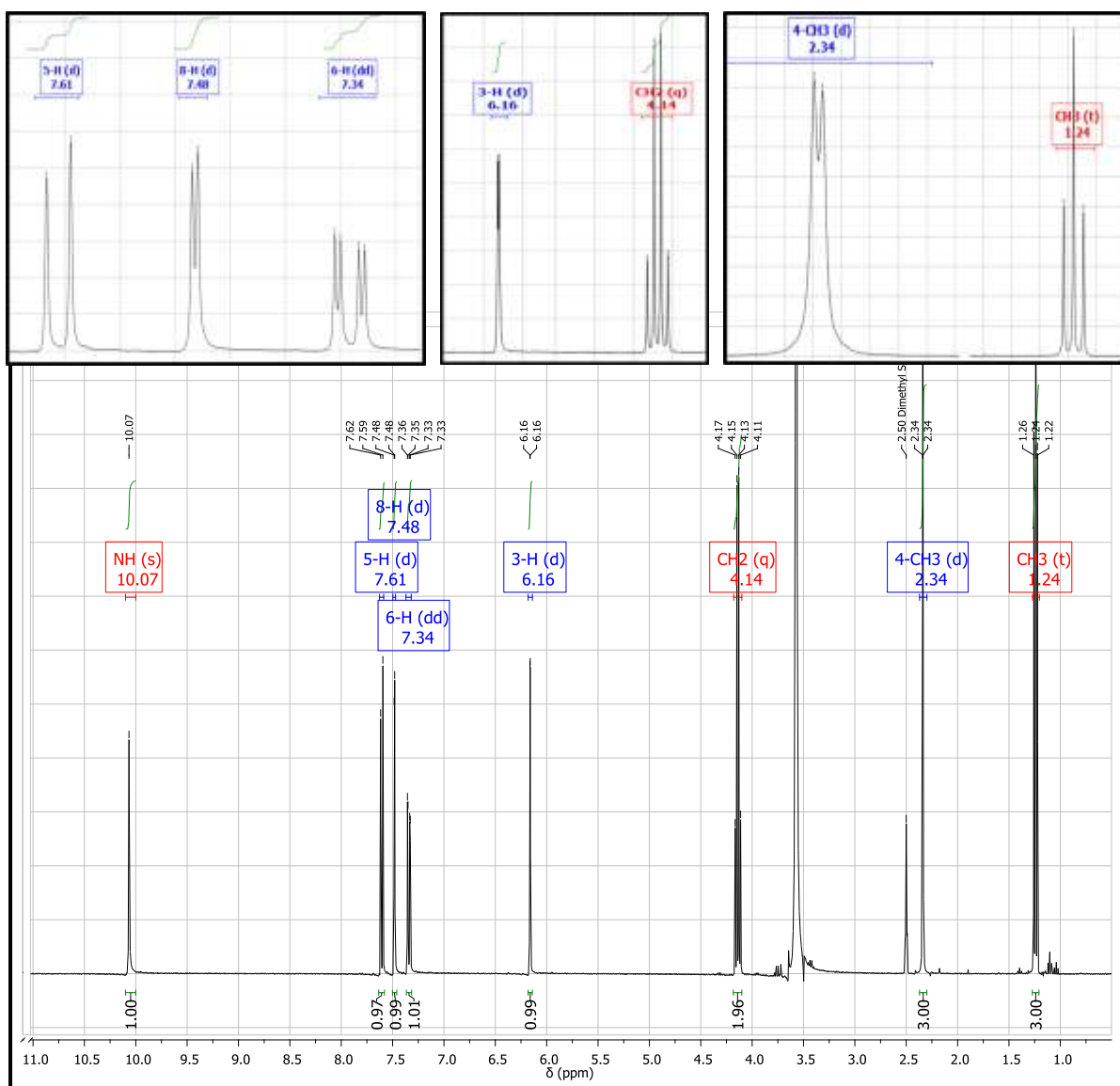
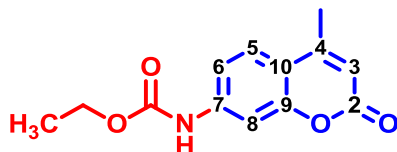


Figura 24. Espectro RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 5.

Tabla 7. Desplazamiento químico y constantes de acoplamiento en el espectro RMN ¹H- de **5**.

Protones	δ (ppm)	J (Hz)
CH ₃ (t)	1.24	7.1
4-CH ₃ (d)	2.34	1.2
CH ₂ (q)	4.14	7.1
3-H (d)	6.16	1.2
6-H (dd)	7.34	2.1, 8.7
8-H (d)	7.48	2.1
5-H (d)	7.61	8.7
NH (s)	10.07	-

El posterior análisis del espectro COSY ¹H-¹H permitió confirmar cada una de las anteriores asignaciones, debido a que se observan claramente las interacciones entre los diferentes grupos de protones presentes en la estructura (Figura 25).

En el espectro RMN ¹³C se ratifica la estructura de la molécula, al observarse las señales correspondientes al número de carbonos presentes; las cuales son asignadas de acuerdo al desplazamiento químico (Figura 26). De forma análoga al perfil observado en el análisis de RMN ¹H, existen dos clases de carbonos, alifáticos y aromáticos; los cuales se identifican claramente en el espectro. A campo alto se observan los grupos CH₃ del anillo cumarínico y de la cadena alifática a 18.38 y 14.81 ppm, respectivamente. A continuación se ubica el CH₂ a 61.19 ppm, asignación corroborada mediante DEPT-135 (Figura 27).

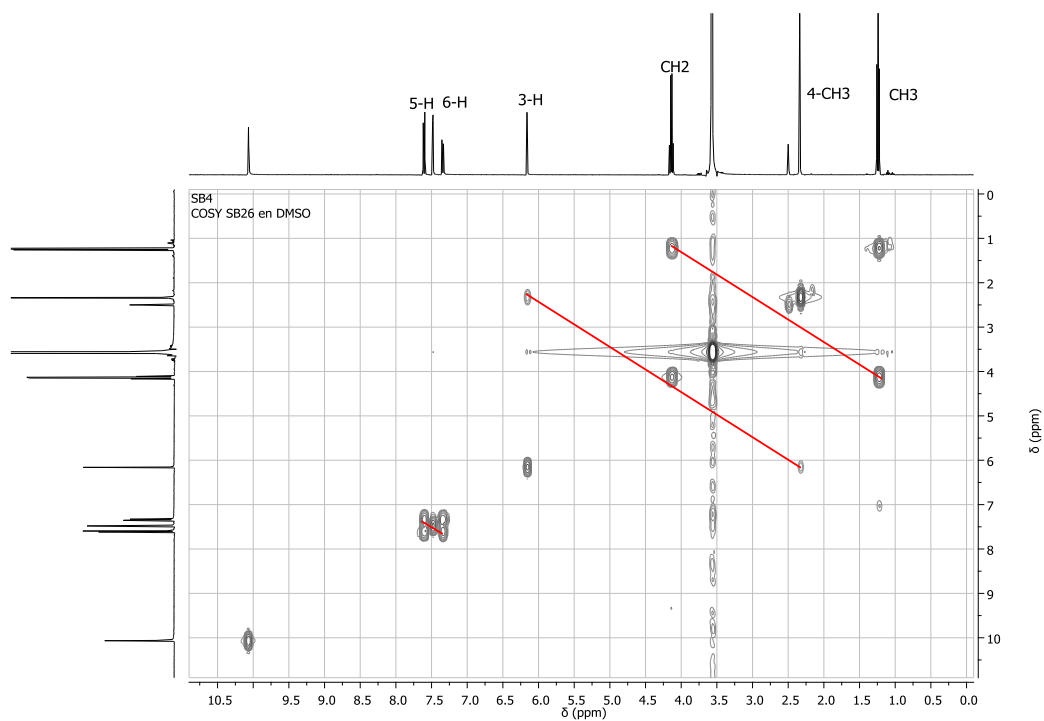


Figura 25. Espectro COSY ^1H - ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de 5.

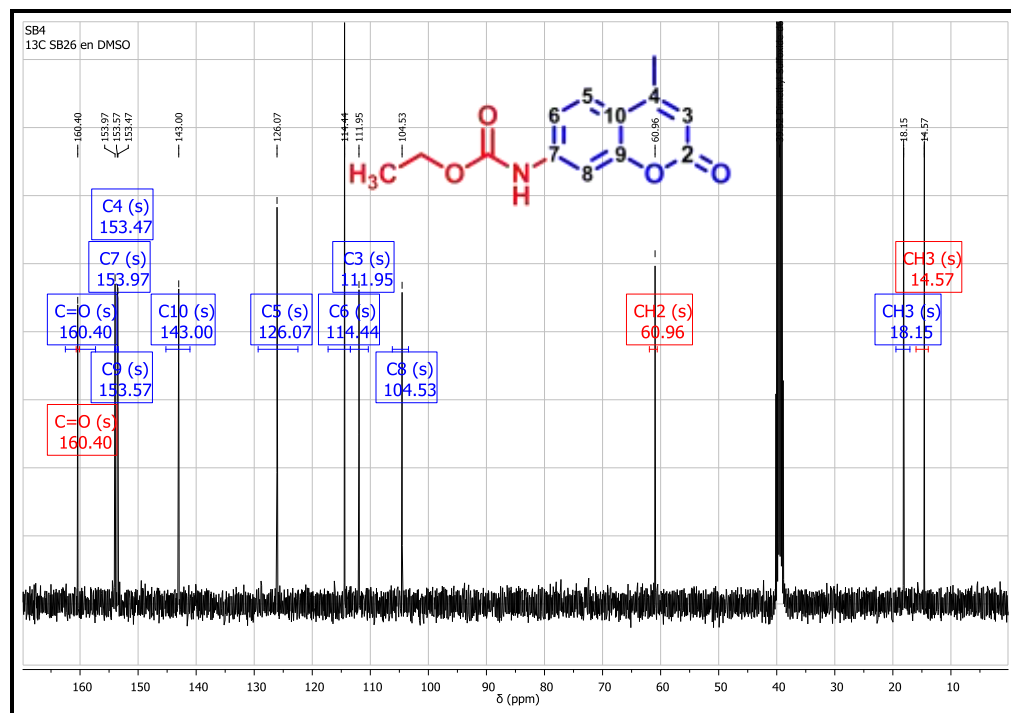


Figura 26. Espectro RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6) de 5.

Las señales comprendidas entre 104.53 y 126.07 ppm, corresponden a los carbonos terciarios del anillo aromático, asignados de acuerdo al acoplamiento heteronuclear revelado en el experimento HSQC (Figura 28). Los carbonos restantes se encuentran a campo bajo, debido a la desprotección que causa su entorno químico. Los carbonos carbonílicos C2, del anillo aromático, y el del sustituyente alifático se aprecian a 160 ppm, mientras que los carbonos C4 y C7 están a 153.47 y 153.97, respectivamente. Los desplazamientos de los carbonos C9 y C10, asignados de acuerdo a lo que reporta la literatura en este tipo de heterociclos, se observan a 153.57 y 143.0 ppm.¹⁰⁸

La superposición del espectro DEPT-135 sobre el de ^{13}C , permitió corroborar las anteriores asignaciones, debido a que corresponden a carbonos cuaternarios y por lo tanto, su señal no se registra en el experimento DEPT-135 (Figura 27).

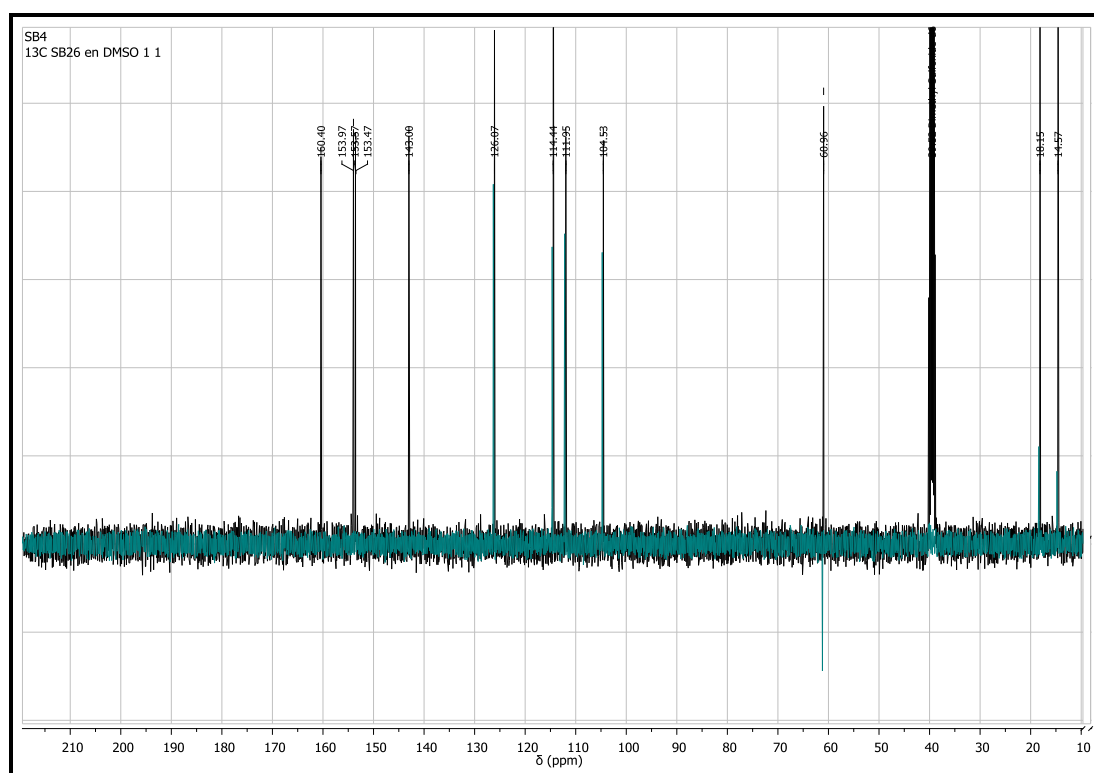


Figura 27. Superposición del espectro DEPT-135 sobre el de ^{13}C de 5.

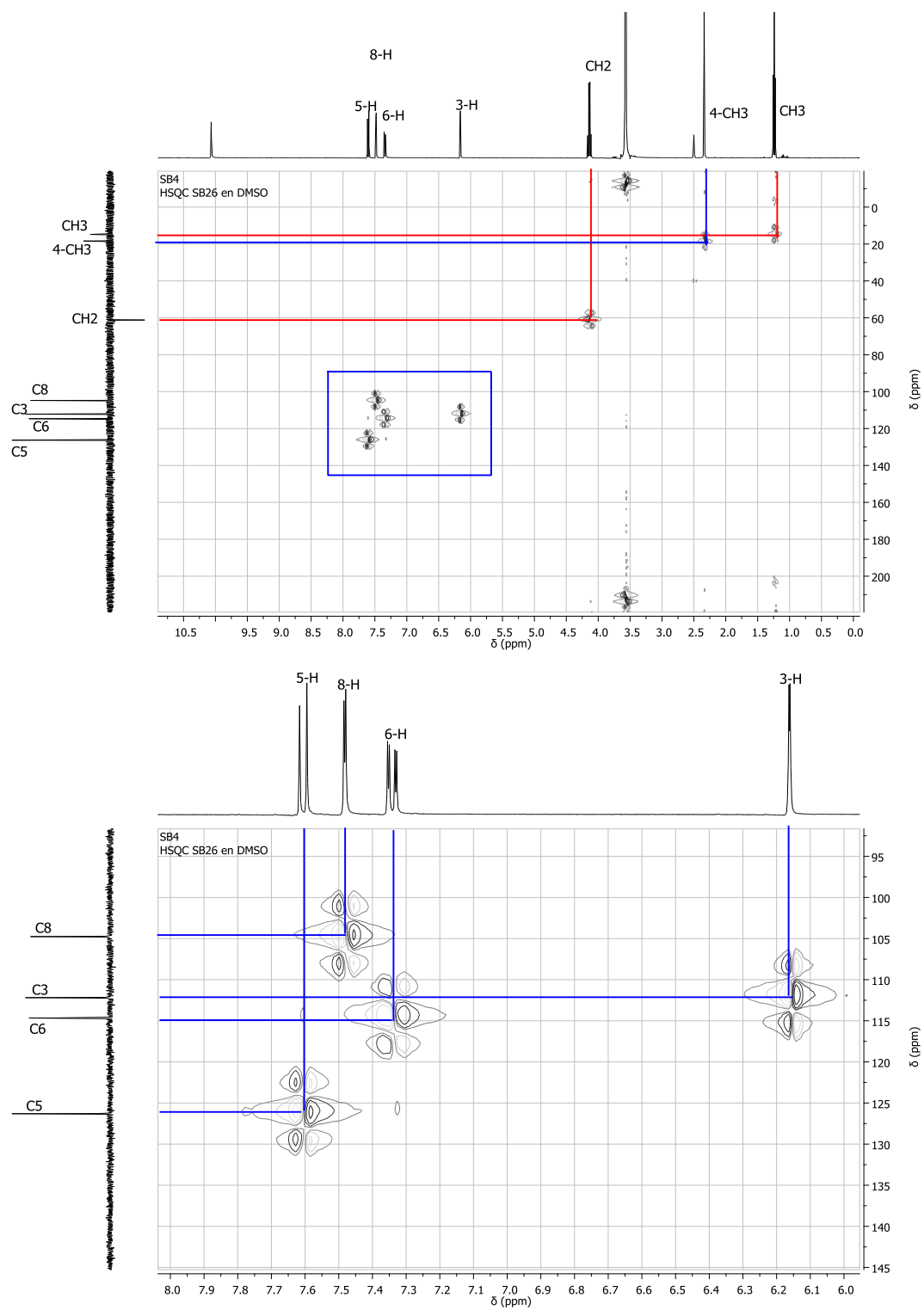
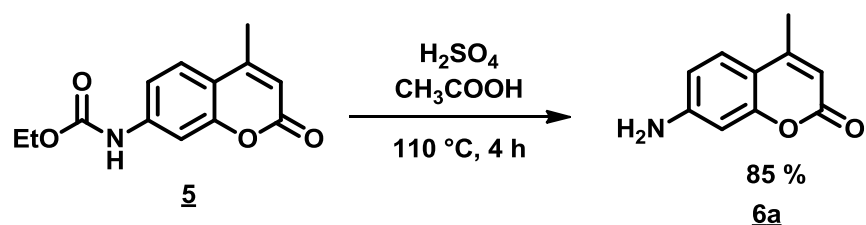


Figura 28. Espectro HSQC (400 MHz, DMSO-*d*₆) y su expansión para el compuesto **5**.

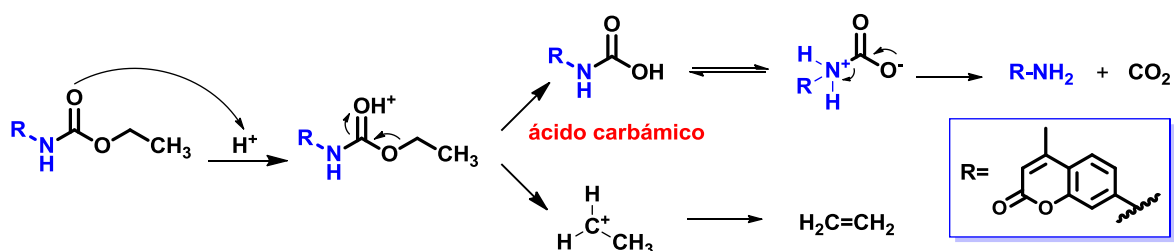
5.1.3. Desprotección del grupo NH₂ en la 7-carbetoxi-4-metilcumarina **5**

La desprotección del grupo amino en **5** se llevó a cabo eficientemente mediante hidrólisis ácida, dando origen finalmente a la 7-amino-4-metilcumarina **6a** (Esquema 30).



Esquema 30. III. Desprotección del grupo amino.

El mecanismo a través del cual se lleva a cabo la reacción, consiste en la formación del ácido carbámico y su posterior descarboxilación *in situ*, dando lugar a la amina libre (Esquema 31).^{113, 114}



Esquema 31. Mecanismo de la hidrólisis ácida de **5**.

El compuesto **6a** fue caracterizado mediante la toma de su punto de fusión, obteniéndose un valor de 220-224°C, tal como se reporta en la literatura. Su estructura además fue corroborada mediante las técnicas espectroscópicas ya mencionadas.

El análisis del espectro IR obtenido experimentalmente, permitió identificar las características estructurales del núcleo cumarínico y sus respectivos sustituyentes (Figura 29). A 3437 y 3351 cm⁻¹ se aprecian las vibraciones de tensión asimétrica y simétrica del grupo NH₂, respectivamente. Asimismo, la banda a 3245 cm⁻¹

ratifica la desprotección realizada sobre **5a**, ya que esta señal es propia de aminas primarias y corresponde al enlace de hidrógeno intermolecular de estos compuestos.¹⁰⁹ Las vibraciones de tensión C-H del anillo aromático y del metilo se presentan, en su orden, a 3071 y 2984 cm^{-1} , mientras que las señales observadas a 1680 y 1544 cm^{-1} , hacen referencia a las vibraciones de tensión de los enlaces C=O y -C=C- del esqueleto cumarínico. Finalmente, la vibración de flexión del N-H se percibe a 1604 cm^{-1} .^{106, 116}

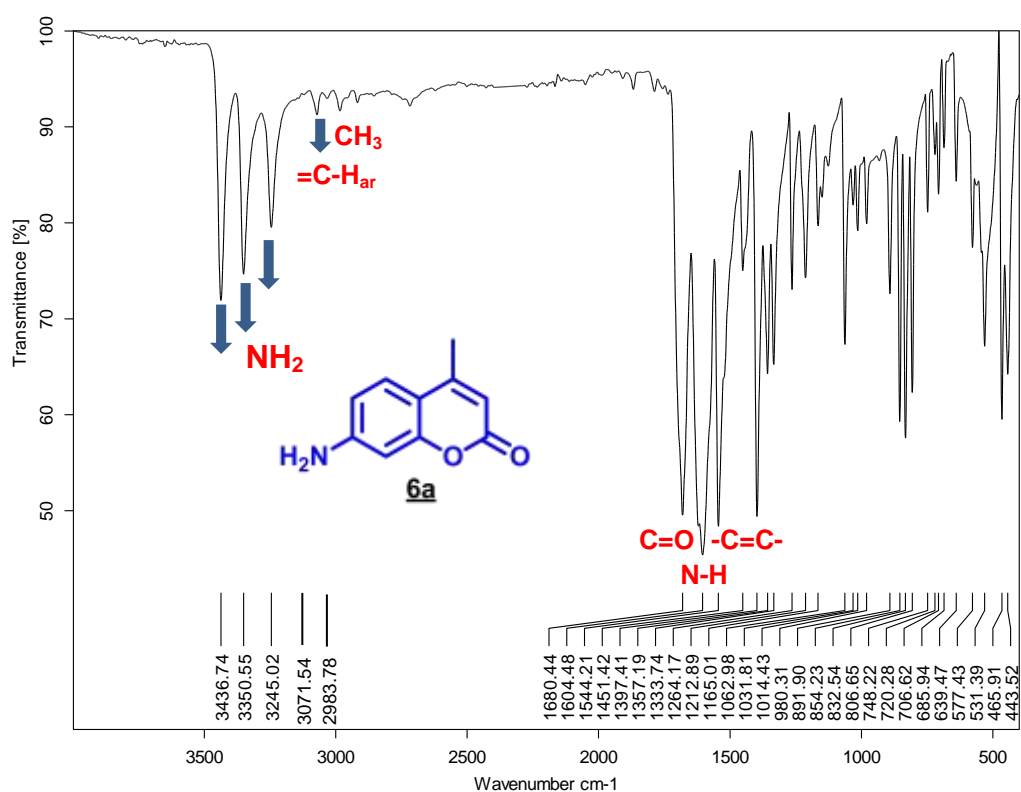
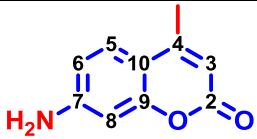


Figura 29. Espectro IR de 7-amino-4-metilcumarina **6a**.

En el espectro RMN ^1H (Figura 30) se verifican los protones existentes en la molécula, observándose los sustituyentes CH_3 y NH_2 a 2.29 y 6.09 ppm. Así mismo, los protones aromáticos 3-H, 8-H, 6-H y 5-H se aprecian a 5.90, 6.40, 6.56 y 7.40 ppm, respectivamente. De igual forma, se corrobora la interacción del

protón 6-H, al percibirse su señal como un doblete de dobletes a causa de su acoplamiento con 5-H y 8-H (Tabla 8).

Tabla 8. Desplazamiento químico y constantes de acoplamiento en el espectro RMN-¹H de **6a**.

		
Protones	δ (ppm)	J (Hz)
4-CH ₃ (s)	2.29	-
3-H (s)	5.90	-
NH ₂ (s)	6.09	-
8-H (d)	6.40	1.9
6-H (dd)	6.56	2.0, 8.5
5-H (d)	7.40	8.6

Cabe resaltar que en el espectro RMN ¹H para esta molécula, no se observa claramente el acoplamiento entre el protón 3-H y el sustituyente CH₃ en posición 4 de la cumarina, a diferencia de lo registrado para el compuesto **5** (Figura 30). Sin embargo, este acoplamiento se verifica mediante el experimento COSY H-H (Figura 31), el cual permite examinar las interacciones que tienen lugar entre núcleos cercanos a máximo tres enlaces de distancia. Así mismo, los demás protones aromáticos y sus respectivos acoplamientos se corroboran mediante el análisis de este espectro. Teniendo en cuenta que las características estructurales del compuesto **6a** están presentes en ambos espectros, se concluye que muy probablemente la poca definición observada en los picos 5.90 y 2.29 ppm, se debe al procesamiento de la señal adquirida por el equipo.

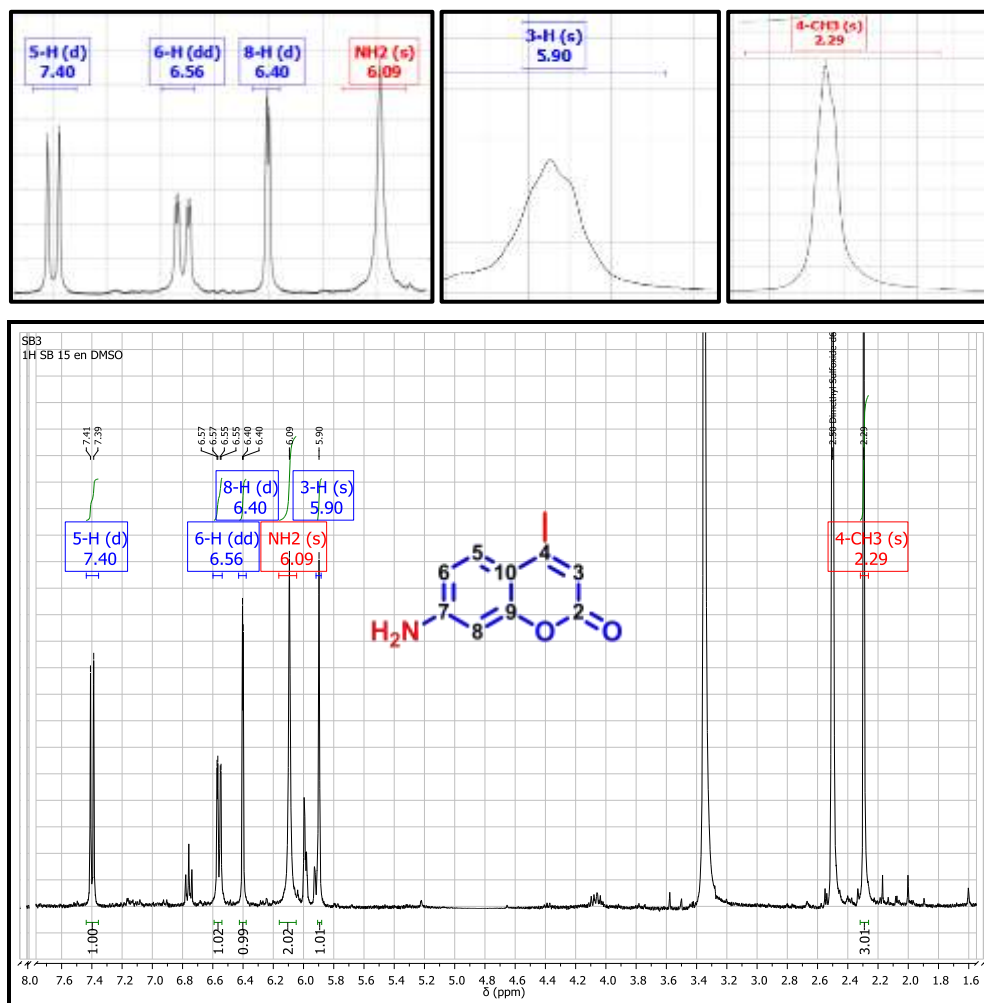


Figura 30. Espectro RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) y su expansión para el compuesto **6a**.

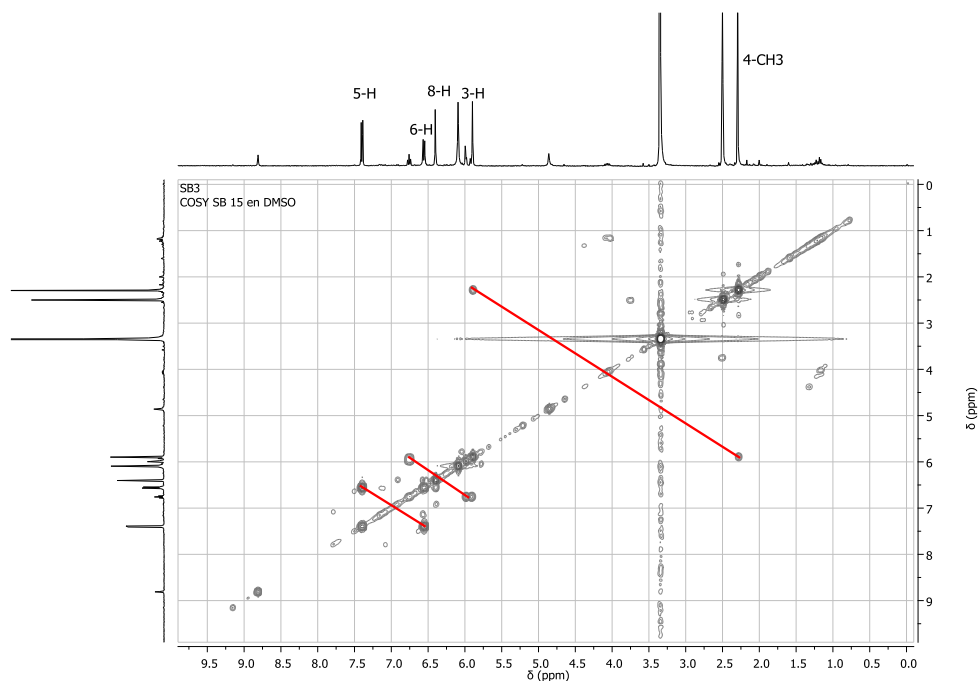


Figura 31. Espectro COSY ^1H - ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **6a**.

Por otra parte, mediante el análisis del espectro RMN ^{13}C se verificó el número de carbonos presentes en la molécula (Figura 32). La asignación de cada carbono se realizó teniendo en cuenta su desplazamiento y su entorno químico. Así, iniciando desde campo alto, se observa el carbono del grupo metilo a 18.44 ppm. Los carbonos aromáticos terciarios C3, C5, C6 y C8 se presentan en la región comprendida entre 98.94-126.64 ppm. Estas señales se corroboran a través del experimento HSQS (Figura 33), el cual determina directamente la conectividad entre el protón y carbono al cual está enlazado. En esta zona también se percibe el carbono C10 a 109.27 ppm. Las señales restantes pertenecientes a carbonos cuaternarios se aprecian a campo bajo; registrándose el carbono carbonilo a 161.18 ppm, seguido de los carbonos C7, C4 y C9 a 155.87, 154.20 y 153.50 ppm, respectivamente. Las anteriores asignaciones fueron comprobadas en el espectro DEPT-135, donde sólo es posible visualizar las señales del sustituyente CH_3 y de los carbonos terciarios (Figura 34).

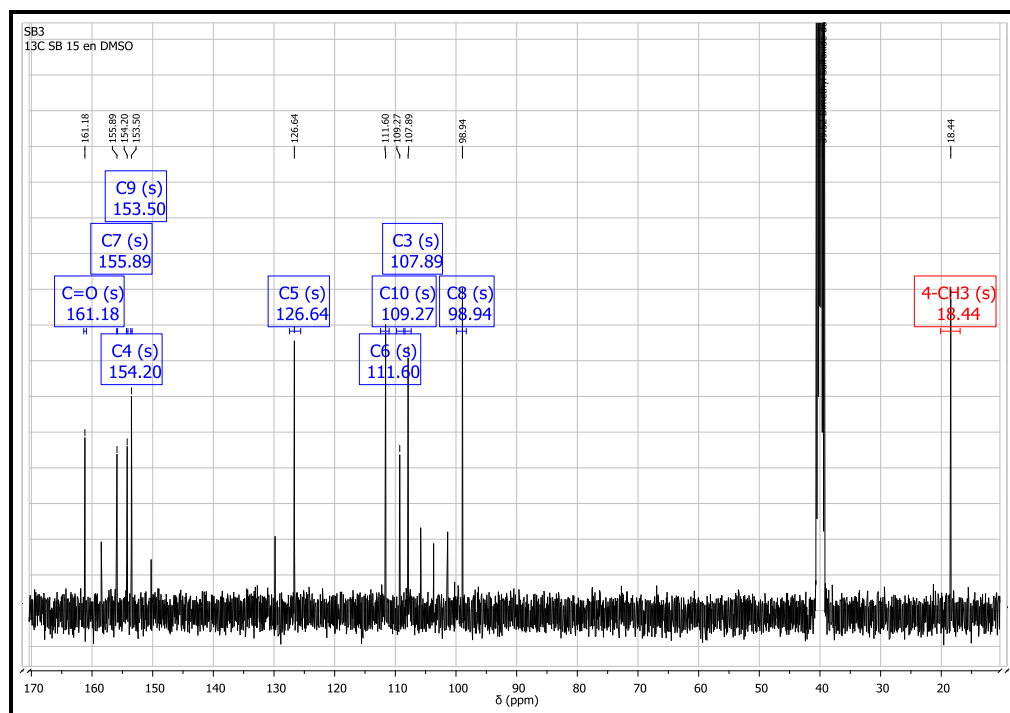


Figura 32. Espectro RMN ^{13}C (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **6a**.

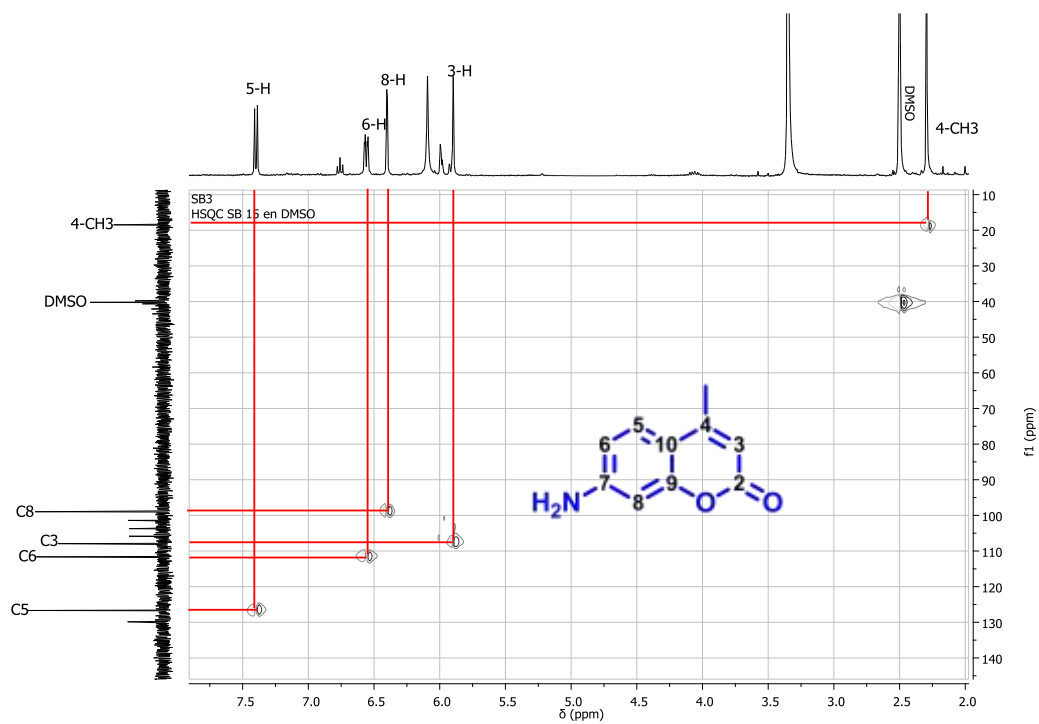


Figura 33. Espectro HSQC (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **6a**.

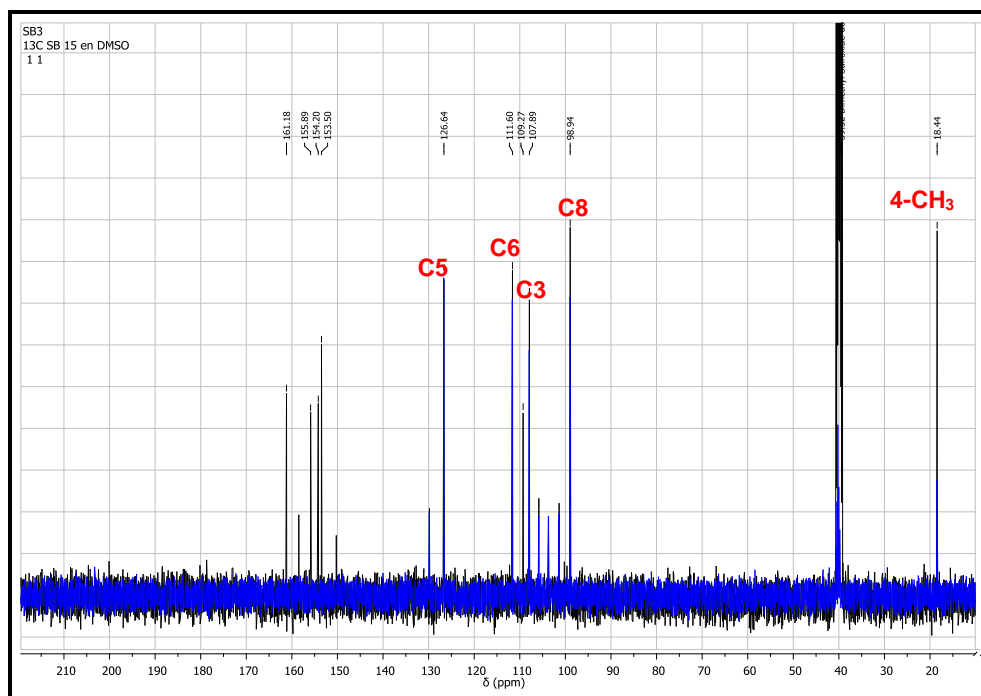


Figura 34. Superposición del espectro DEPT-135 sobre el de ^{13}C de **6a**.

5.2. Desarrollo del protocolo *Ball milling* en la reacción de Pechmann.

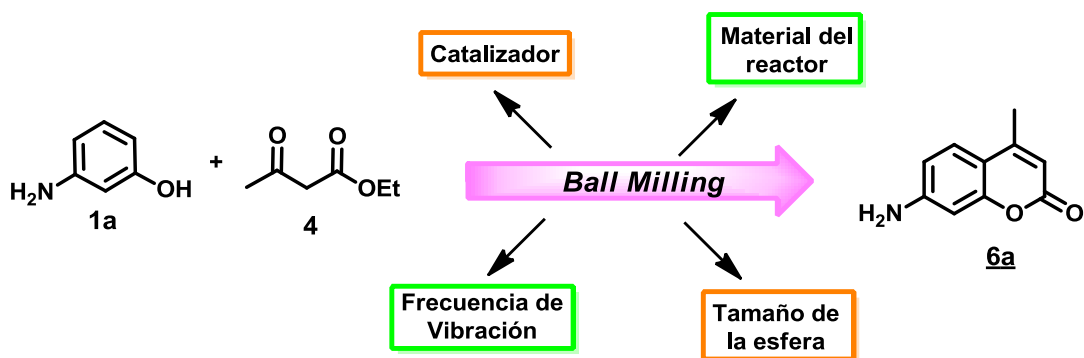
La síntesis de compuestos heterociclos siempre ha sido un objetivo primordial para los químicos orgánicos, principalmente por el amplio espectro de actividades farmacológicas que éstos exhiben. Sin embargo, acceder a su estructura puede llegar a ocasionar serias consecuencias medioambientales, debido a la generación de gran cantidad de desechos tóxicos y corrosivos. Por tanto, con la finalidad de contrarrestar estos efectos, los investigadores han centrado su atención en el desarrollo de nuevas metodologías sintéticas; basando su trabajo científico en la aplicación de la química verde y sostenible.

La herramienta *Ball milling* se ha constituido como una alternativa eficiente en energía, que evita el uso de solventes a granel y utiliza la molienda a alta frecuencia para conducir las reacciones, evitando de esta forma las extensas horas de calentamiento y su posterior desprendimiento de vapores contaminantes.

Pese a ser una técnica emergente, numerosas reacciones han sido llevadas a cabo eficientemente mediante su aplicación, entre estas, aquellas que implican el acoplamiento de enlaces carbono-carbono y carbono-heteroátomo, oxidación, hidrogenación, adiciones nucleofílicas y sustituciones aromáticas.¹¹⁷

El éxito de *Ball milling* en la síntesis orgánica depende principalmente de variables técnicas, tales como el material de los reactores, el tamaño y el número de bolas empleadas en la molienda y la frecuencia de vibración del equipo. Por lo cual, uno de los propósitos en esta investigación fue el desarrollo de un protocolo aplicable a la reacción de Pechmann, en el cual se evaluaran estos parámetros.

Empleando como precursores el *m*-aminofenol **1a** y el acetoacetato de etilo **4**, se procedió al estudio de los parámetros de reacción usando la mecanoquímica como energía promotora. Se determinó experimentalmente las mejores condiciones de reacción hacia la obtención en una sola etapa de la 7-amino-4-metilcumarina **6a** (Esquema 32).

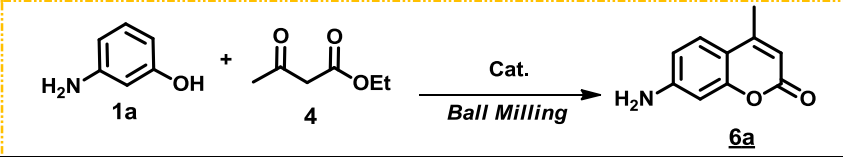


Esquema 32. Reacción modelo y los parámetros de reacción evaluados.

5.2.1. Estudio del catalizador

La etapa experimental se llevó a cabo en un amalgamador de 60 Hz, empleando como reactor una cápsula de duralón y como cuerpo molidor una esfera de 5 mm de diámetro. Tres catalizadores fueron estudiados y los resultados se presentan a continuación:

Tabla 9. Catalizadores empleados en la reacción de Pechmann, mediante *Ball milling*.



The reaction scheme shows the synthesis of 7-amino-4-methylcoumarin (6a) from 3-amino-4-hydroxybenzoic acid (1a) and ethyl acetoacrylate (4) using a catalyst (Cat.) and ball milling. The reaction is shown as:

Nc1ccc(O)cc1 + CCOC(=O)C(=O)C=C >> Nc1ccc2c(c1)c(O)c(=O)c2C

Ensayo	Catalizador	Tiempo (min.)	% Rto
1	AMCell-SO ₃ H (3%)	45	0
2	AMCell-SO ₃ H (6%)	45	0
3	AMCell-SO ₃ H (8%)	45	0
4	BiCl ₃ (10%)	15	29
5	InCl ₃ (10%)	20	70
6	InCl ₃ (5%)	20	65

Tal como se observa en la tabla anterior, inicialmente se emplearon cantidades estequiométricas de AMCell-SO₃H (3-8 % mol). Sin embargo, pese al aumento del catalizador y al extenso tiempo de molienda, no se observó progreso en la reacción (Ensayo 1-3); muy posiblemente debido a que este catalizador es muy voluminoso y no permite una eficiente incorporación de los precursores. De igual forma, cabe resaltar, que cuando éste fue empleado en la metodología tradicional de la reacción de Pechmann, tampoco condujo a la síntesis de **6a**.

Posteriormente, se procedió a utilizar el BiCl₃ y bajo estas nuevas condiciones se logró sintetizar la 7-amino-4-metilcumarina (Ensayo 4), con un rendimiento del 29 % y en un tiempo de molienda de 15 minutos. Pese a que el producto logró aislarse satisfactoriamente, su bajo rendimiento acarreo el cambio de catalizador.

En esta ocasión se empleó el InCl₃, lográndose con éste los mejores resultados hasta el momento; ya que el compuesto **6a** fue obtenido por primera vez en un alto rendimiento, en un proceso one-pot, libre de solvente y en sólo 20 minutos, mediante activación mecánica (Ensayo 5).

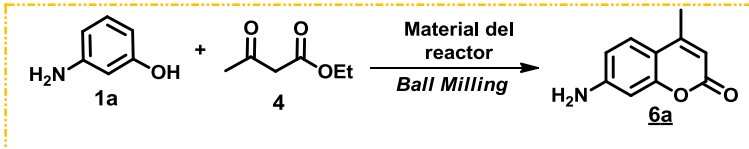
Así mismo, se decidió reducir el porcentaje de InCl_3 (del 10 al 5% mol) en la reacción, advirtiendo solamente un pequeño descenso en su rendimiento; el cual no se considera significativo, teniendo en cuenta que el tiempo de molienda no se aumenta y que sólo se dispuso de la mitad del catalizador originalmente empleado (Ensayo 6).

Por otra parte, pese a que la 7-amino-4-metilcumarina fue obtenida exitosamente, se observó cómo los precursores reaccionaban con el material de la cápsula, deteriorándola drásticamente. Por tanto, fue necesario cambiar los reactores por otros que fueran totalmente inertes a los reactivos.

5.2.2. Estudio de los diferentes materiales del reactor

Bajo las condiciones experimentales mencionadas en el inciso anterior y empleando InCl_3 (5% mol) se procedió a evaluar el material del reactor, utilizándose cápsulas cilíndricas de duralón, acero inoxidable y teflón (Tabla 10).

Tabla 10. Reactores empleados en la reacción de Pechmann, mediante *Ball milling*.



Material del Reactor	Tiempo (min.)	% Rto
Duralón	20	65
Acero inoxidable	45	24
Teflón	15	82

Cuando se empleó como reactor la cápsula de acero inoxidable se registró una gran disminución en el rendimiento de la reacción y un aumento en el tiempo de molienda, en comparación con el reactor de duralón. Se cree que este comportamiento es debido al peso de la cápsula (26.3185 g), ya que éste conlleva directamente al descenso en la frecuencia de vibración del equipo; observándose

experimentalmente un mayor esfuerzo en el amalgamador para trabajar normalmente.

Por otra parte, al emplear un reactor de teflón se obtuvieron mejores resultados, ya que la reacción fue completada en tan solo 15 minutos y su rendimiento aumentó al 82 %. Una de las mayores ventajas que ofrece esta cápsula es que el teflón es un material resistente a los reactivos y por tanto no reacciona con los precursores empleados, además de ser liviano, lo que permite conservar la vibración del equipo.

Los estudios realizados sobre este parámetro revelan que el efecto está determinado por la energía de activación de la reacción y el mecanismo de la misma. Al emplear reactores ligeros, la energía de activación es baja o las reacciones son impulsadas hacia la formación de productos termodinámicamente estables, a diferencia de lo que ocurre cuando los reservorios son pesados, necesitándose una mayor energía para alcanzar niveles similares de rendimiento del producto.⁸⁵⁻⁸⁷ Lo que daría una explicación preliminar al bajo rendimiento observado en la cápsula de acero inoxidable, donde pese al drástico aumento en el tiempo de molienda, los precursores permanecen sin consumirse totalmente y sólo es posible aislar la cumarina en un 24 %.

5.2.3. Evaluación de la frecuencia de vibración del amalgamador

La frecuencia de vibración del equipo es uno de los parámetros más importantes a considerar, ya que se relaciona directamente con la energía cinética del sistema; influyendo por lo tanto, en el rendimiento de la reacción.

Empleando la cápsula de teflón como reactor y una esfera de 5 mm de diámetro, se procedió a estudiar su influencia en la reacción de Pechmann (Tabla 11).

Tabla 11. Frecuencias de vibración estudiadas en la reacción de Pechmann, mediante *Ball milling*.

Equipo	Vibración (Hz)	Tiempo (min.)	% Rto
Dentsply Rinn, Modelo MSD	38	45	40
	48	45	52
Zenith, Modelo Z-1A	60	15	82

Los resultados revelan una fuerte dependencia del rendimiento en la reacción con la frecuencia de vibración del equipo. Cuando la mezcla de reacción se sometió a 38 y 48 Hz, fue necesario mantener la molienda durante 45 minutos. Sin embargo, al cabo de este tiempo, los precursores permanecían sin consumirse totalmente y sólo fue posible aislar el compuesto **6a** en un rendimiento no mayor al 52 %. Por otro lado, se observó una diferencia de lo ocurrido con el amalgamador de 60 Hz, donde se observó la culminación de la reacción en 15 minutos y se obtuvo la aminocumarina con un rendimiento del 82 %.

Tal como se esperaba, de acuerdo a la relación física que relaciona la energía cinética del sistema con la frecuencia vibracional (Ecuación 1), se puede concluir la proporcionalidad directa entre este parámetro y el rendimiento de la reacción; al obtener los mayores rendimientos a frecuencias de vibración superiores. Así mismo, la utilización del equipo de 60 Hz conlleva a la optimización del proceso sintético, debido a la considerable disminución en el tiempo de molienda.




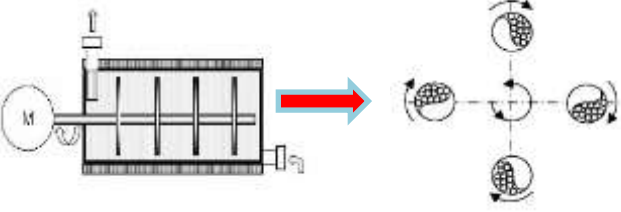
$$E_{\text{cinética}}(\text{rot u osc}) = 0.5I\omega^2 = 2\pi^2I\nu^2$$

I = momento de inercia
 ω = velocidad angular
 ν = frecuencia de oscilación

(1)

Por otra parte, cabe resaltar que los equipos empleados en este estudio, tienen diferentes sistemas vibraciones, el primero de ellos (Dentsply Rinn, Modelo MSD; 38-48 Hz) realiza movimientos oscilatorios; mientras que el segundo efectúa rotaciones (Zenith, Modelo Z-1a, 60 Hz) (Figura 33). Se estima que en este último, la incorporación de los precursores puede darse en un tiempo de molienda mucho más corto y de forma más eficiente (Tabla 12).¹¹⁸

Tabla 12. Relación entre los movimientos del reactor y los equipos empleados.

Amalgamador	Movimiento vibracional ¹¹⁸
 <p data-bbox="293 1024 781 1056">Dentsply Rinn, Modelo MSD (38-48 Hz)</p>	
 <p data-bbox="363 1314 716 1346">Zenith, Modelo Z-1A (60 Hz)</p>	

5.2.4. Influencia del tamaño y masa del cuerpo moledor

Con los parámetros hallados hasta el momento; frecuencia a 60 Hz, reactor de teflón y InCl_3 como catalizador, se procedió a estudiar el comportamiento de la reacción, variando el tamaño del cuerpo moledor. Para lo cual se emplearon esferas de acero inoxidable de 5 y 8 mm de diámetro (Tabla 13).

Tabla 13. Efecto del tamaño del cuerpo molidor y el catalizador en la reacción de Pechmann.



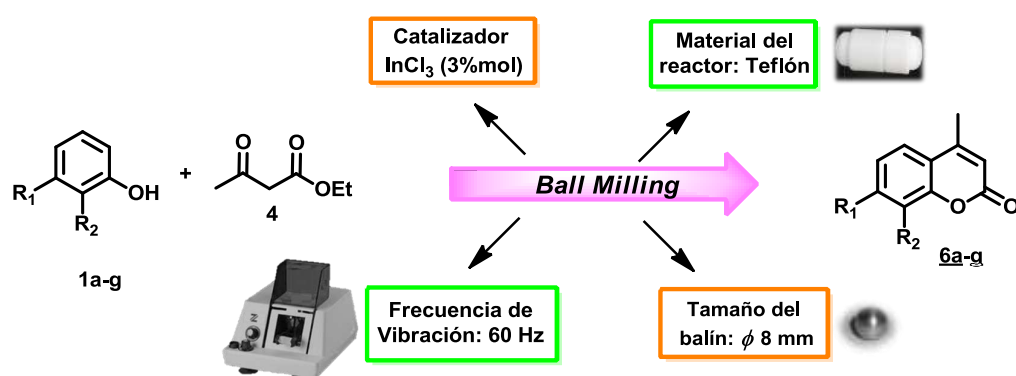
Ensayo	Diámetro (mm)	InCl ₃ (% mol)	Tiempo (min.)	% Rto
1	5	5	15	82
2	5	3	30	70
3	8	5	8	92
4	8	3	10	92
5	8	1.5	30	48
6	8	-	45	0

Como se puede apreciar en la tabla anterior, al disminuir el catalizador al 3 % mol y utilizando la esfera más pequeña, la reacción toma el doble de tiempo y su rendimiento disminuye (Ensayos 1-2). A diferencia de lo observado cuando se emplea la esfera de 8 mm de diámetro, el cual permite obtener la 7-amino-4-metilcumarina en tan sólo 8 minutos y en un 92 % de rendimiento. Así mismo, pese a la disminución del catalizador, fue posible aislar la cumarina en el mismo rendimiento, pasados 10 minutos de molienda (Ensayos 3-4). Estos resultados dan a entender que muy probablemente el aumento del tamaño del cuerpo molidor puede contrarrestar la disminución del catalizador, debido a que su superficie de contacto es mayor y facilita la trituration de los precursores.

Teniendo en cuenta estas observaciones, se procedió a disminuir el InCl₃ al 1.5 % mol. Sin embargo, pese a que se **6a** se logró aislar, el tiempo de molienda se triplicó y su rendimiento descendió excesivamente (Ensayo 5). Así mismo, se realizó la reacción en ausencia de catalizador, con el objetivo de indagar su comportamiento al suprimir el InCl₃; encontrándose que pasados 45 minutos no se

había presentado la formación de producto y por el contrario, los precursores se mantenían sin reaccionar (Ensayo 6).

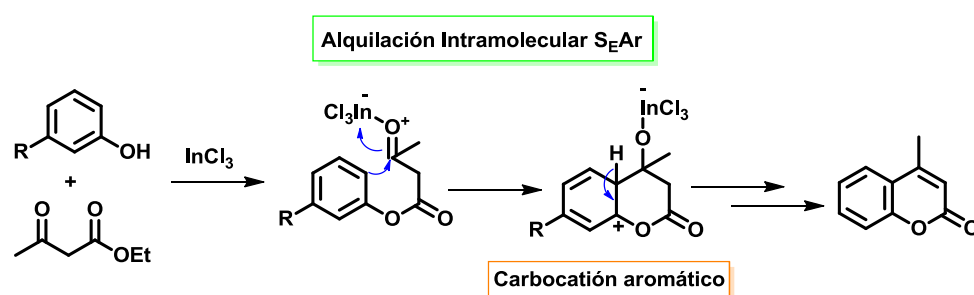
El estudio de todas estas variables condujo a la formulación de un protocolo *Ball milling* en la reacción de Pechmann. Con el objetivo de evaluar su aplicabilidad, se procedió a emplear otros fenoles sustituidos (**1a-g**) y acetoacetato de etilo (**4**), como precursores principales hacia la obtención de sus correspondientes 4-metilcumarinas (**6a-g**) (Esquema 33).



Esquema 33. Protocolo *Ball milling* en la Reacción de Pechmann.

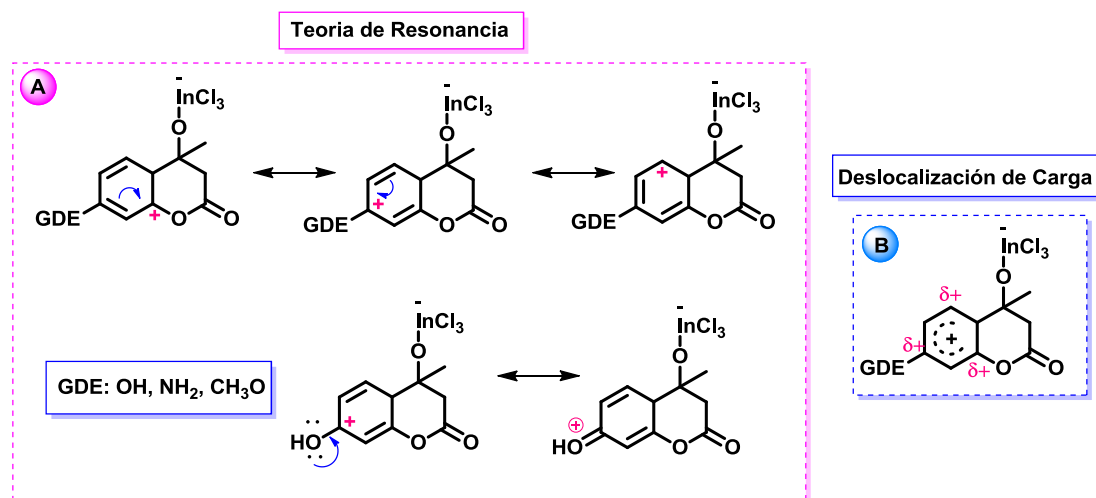
Los compuestos **6a-g** fueron obtenidos mediante el protocolo *Ball milling* establecido para la reacción de Pechmann (Tabla 15). Analizando estos resultados, se observa cómo la presencia de sustituyentes activantes favorece la reacción, permitiendo la obtención de las correspondientes cumarinas en un tiempo corto (5-20 minutos) y con excelentes rendimientos **6a-c**, **f-g**. A diferencia de lo que ocurre cuando el precursor está débilmente activado **6e** o por el contrario no tiene sustituyentes como el caso de **6d**, donde son necesarios mayores tiempos de molienda (45-60 minutos) y pese a ello no es posible aislar el producto en un alto porcentaje (52-56 %). Este comportamiento se debe al mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la reacción, el cual consiste en tres etapas: *trans*-esterificación, alquilación intramolecular y deshidratación; siendo la segunda de ellas el paso determinante en la reacción de Pechmann (Esquema 6).

La alquilación intramolecular es una sustitución electrofílica aromática (S_{EAr}) que involucra la destrucción temporal del sistema π aromático, conduciendo a la formación de un intermedio catiónico, el ión bencenonio. Debido a que esta especie es mucho menos estable que el benceno, su formación es lenta y requiere de una mayor energía de activación; siendo por lo tanto, este paso el determinante de la velocidad. La etapa subsecuente consiste en la pérdida de un protón y se lleva a cabo rápidamente, regenerando la aromaticidad del sistema (Esquema 34).¹²⁰



Esquema 34. Etapa de alquilación intramolecular en la reacción de Pechmann.

La presencia de grupos electrodonadores (GDE) en la molécula estabiliza mejor el ion bencenonio incipiente en el estado de transición, aumentando drásticamente la velocidad de la reacción. Esta estabilidad relativa del catión aromático se justifica mediante la deslocalización de carga y la teoría de resonancia (Esquema 35).¹¹⁹



Esquema 35. Estabilización el catión aromático.

En la teoría de resonancia se observa como la carga positiva está sobre los carbonos *orto* y *para* respecto al carbono con hibridación sp^3 que soporta al electrófilo. Tal como se ilustra en el esquema anterior (A), el sustituyente estabilizará mejor al intermedio si es electrodonador, como el caso del OH, NH₂ y CH₃O en los compuestos **6a-c**, y el anillo bencénico en **6f-g**. Estos grupos pueden donar sus electrones formando estructuras resonantes más estables (carga positiva está sobre el átomo más electronegativo).¹¹⁹

Por otra parte, la deslocalización de carga (B), ilustra como los carbonos restantes con hibridación sp^2 , tiene cada uno un orbital capaz de solaparse lateralmente para dar una estructura π deslocalizada (Esquema 37B).¹¹⁹

Los compuestos **6a-g** fueron caracterizados mediante la determinación experimental de su punto de fusión y a través de las técnicas instrumentales mencionadas hasta el momento (IR y RMN).

Tabla 14. 4-metilcumarinas sustituidas obtenidas mediante *Ball milling*.

Compuesto	R ₁	R ₂	P.f. exp. °C	P.f. rep. C ¹⁰⁴	Tiempo (min.)	% Rto
6a	NH ₂	H	220-224	185	10	92
6b	OH	H	184-186	223	5	95
6c	OCH ₃	H	170-174	172	20	80
6d	H	H	74-76	80	60	52
6e	CH ₃	CH ₃	140-144	145	45	56
6f	α-naftol		154-156	156	12	88
6g	β-naftol		176-178	179	15	68

El análisis de los espectros IR permitió corroborar en primera instancia la presencia de los grupos funcionales característicos en las 4-metilcumarinas sintetizadas. Se identificaron la bandas de absorción producto de los enlaces C-H_{ar}, C=O y -C=C-, así como la vibración del grupo CH₃. De igual forma, se localizaron las señales propias de los demás sustituyentes para cada compuesto en particular (Tabla 15, Anexos 1-7).

Tabla 15. Bandas de absorción en el IR características de los compuestos **6a-g**.

Compuesto	Bandas de absorción IR (cm ⁻¹)					
	Sustituyente		C-H _{ar}	CH ₃	C=O	-C=C-
6a	NH ₂	3337-3245	3072	2984	1680	1542
6b	OH	3493	3117	2994	1669	1517
6c	CH ₃ O	2835	3060	2919	1701	1570
6d	-	-	3034	2952	1668	1503
6e	CH ₃	2923	3052	2979	1691	1600
6f	-CH=CH-	3064	3064	2985	1707	1561

	CH=CH-					
6g	-CH=CH- CH=CH-	3054	3054	2922	1705	1599

La estructura de cada compuesto fue corroborada mediante el análisis de sus espectros RMN (^1H - ^1H , ^{13}C y DEPT-135). La elucidación se realizó de forma similar a la descrita en el capítulo anterior para el compuesto **6a**. Por lo cual, a continuación solamente se presentan los datos espectroscópicos (desplazamiento químico, multiplicidad y constantes de acoplamiento) para cada molécula sintetizada (Tabla 16-19). En los **Anexos 8-23** se encuentran los respectivos espectros RMN para cada compuesto.

Tabla 16. Datos espectroscópicos RMN ^1H de **6a-e**.

Comp.	R ₁	R ₂	Desplazamiento químico (ppm), multiplicidad, constante de acoplamiento (Hz)					
			3-H	4-CH ₃	5-H	6-H	7-H	8-H
6a	NH ₂	H	5.90 (s)	2.29 (s)	7.40 (d) <i>J</i> =8.6	6.56 (dd) <i>J</i> =2.0, 8.5	NH ₂ 6.09 (s)	6.40 (d) <i>J</i> =1.9
6b	OH	H	6.11 (d) <i>J</i> =1.1	2.35 (d) <i>J</i> =1.1	7.58 (d) <i>J</i> =8.7	6.79 (dd) <i>J</i> =2.4, 8.7	OH 10.56 (s)	6.69 (d) <i>J</i> =2.3
6c	CH ₃ O	H	6.29 (s)	2.42 (s)	7.26 (d) <i>J</i> =9.1	7.11 (dd) <i>J</i> =2.7, 9.0	CH ₃ O 3.87 (s)	7.02 (d) <i>J</i> =2.7
6d	H	H	5.71 (s)	3.75 (s)	6.79 (dd) <i>J</i> =1.7, 4.8	6.77 (m)	6.77 (m)	6.75 (dd) <i>J</i> =1.8, 4.8
6e	CH ₃	CH ₃	6.28 (s)	2.24 (s)	7.46 (d) <i>J</i> =8.0	7.16 (d) <i>J</i> =8.1	CH ₃ (s) 2.4	CH ₃ (s) 2.3

Tabla 17. Datos espectroscópicos RMN ¹H de **6f-g**.

Comp.	Desplazamiento químico (ppm), multiplicidad, constante de acoplamiento (Hz)							
	3-H	4-CH ₃	5-H	6-H	7-H	8-H	9-H	10-H
6f	6.32 (d) <i>J</i> =1.2	2.47 (d) <i>J</i> =1.2	7.64 (d) <i>J</i> =8.7	7.53 (d) <i>J</i> =8.7	7.83 (m)	7.59 (m)	7.59 (m)	8.50 (m)
6g	6.30 (s)	2.91 (s)	8.67 (d) <i>J</i> =8.8	7.60 (m)	7.70 (m)	7.53 (d) <i>J</i> =8.9	8.06 (d) <i>J</i> =9.1	8.18 (d) <i>J</i> =9.0

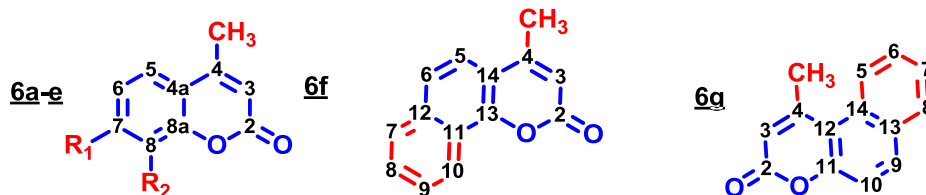
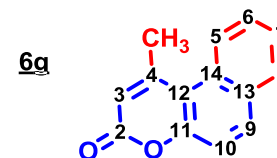
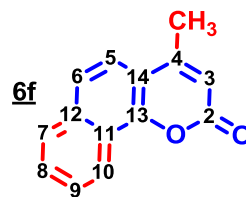
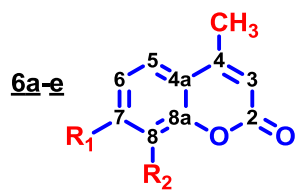


Tabla 18. Datos espectroscópicos RMN ^{13}C de 6a-e.

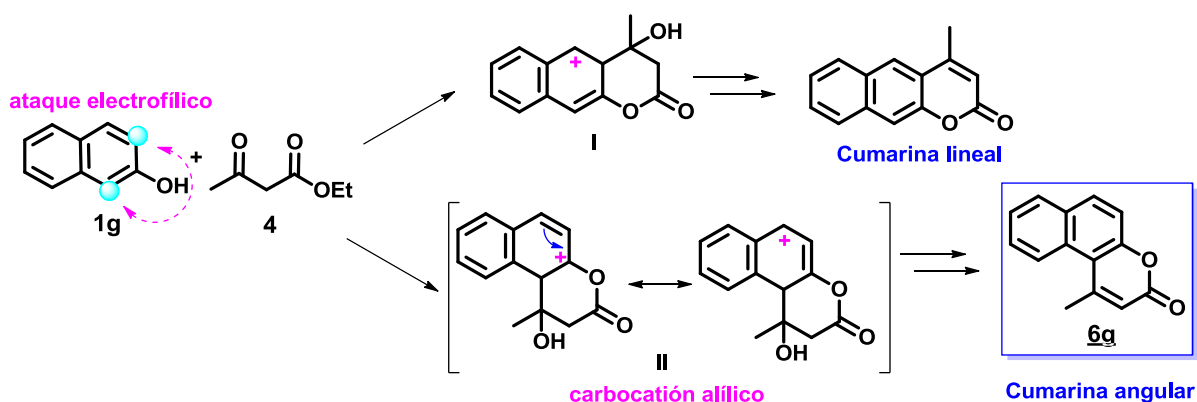
Comp.	R ₁	R ₂	Desplazamiento químico (ppm)											
			C2	C3	C4	4-CH ₃	C4a	C5	C6	C7	C8	C8a	Sustituyentes	
													C7	C8
<u>6a</u>	NH ₂	H	161.2	107.9	154.2	18.4	109.3	126.6	111.6	155.9	98.9	153.5	-	-
<u>6b</u>	OH	H	160.3	110.3	153.6	18.1	112.0	126.6	112.9	161.2	102.2	154.8	-	-
<u>6c</u>	CH ₃ O	H	161.2	115.6	147.9	18.8	120.5	118.8	118.1	156.1	107.7	152.1	55.9	-
<u>6e</u>	CH ₃	CH ₃	160.5	113.3	154.0	18.6	117.8	122.5	125.9	141.7	123.9	151.4	11.6	20.3

Tabla 19. Datos espectroscópicos RMN ^{13}C de 6f-g.

Comp.	Desplazamiento químico (ppm)													
	C2	C3	C4	4-CH ₃	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14
<u>6f</u>	169.9	114.4	150.6	19.3	120.4	127.2	128.7	127.7	124.2	122.7	134.8	123.2	153.5	115.2
<u>6g</u>	164.2	115.8	155.3	20.4	118.6	129.7	125.8	128.4	126.1	111.2	154.1	117.4	134.1	131.1



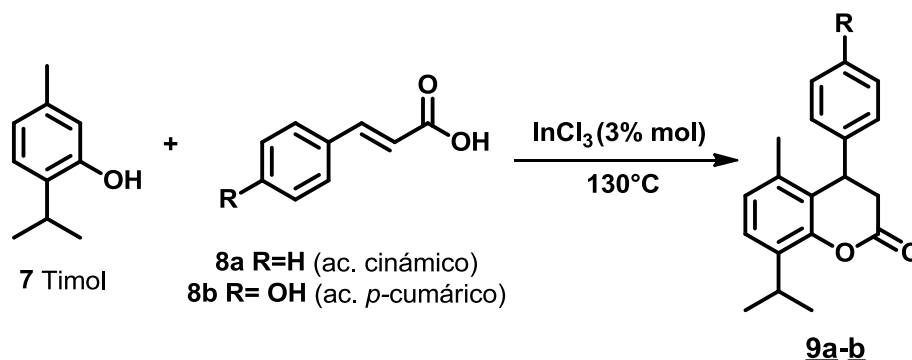
Cabe resaltar que cuando se empleó el β -naftol como precursor se observó regioselectividad en la reacción de Pechmann, al obtenerse solamente el compuesto angular **6g**. Sin embargo, su rendimiento fue menor en comparación con el α -naftol. Este comportamiento se debe a que el β -naftol tiene las dos posiciones *orto* al OH propensas al ataque electrofílico y cualquiera de ellas podría generar el núcleo cumarínico. El isómero lineal conllevaría a la formación de un estado intermedio (I) cuya carga positiva se encuentra aislada del doble enlace y por lo tanto no se podría deslocalizar la carga directamente. Su estabilización tendría una energía de activación mayor debido a la inminente destrucción del anillo bencénico. Por otra parte, en la obtención del isómero angular se generaría un carbocatión alílico (II) con un anillo bencénico intacto, lo que significaría una energía de activación mucho menor (Esquema 36).¹¹⁹ Justificándose así la fácil obtención de la cumarina **6g**.



Esquema 36. Regioselectividad de la reacción de Pechmann empleado el β -naftol como precursor.

5.3. Síntesis de nuevas 4-aril-3,4-dihidrocumarinas a partir de la condensación del timol con ácidos cinámicos

La obtención de las nuevas dihidrocumarinas **9a-b** se llevó a cabo mediante la condensación del timol **7** con los ácidos cinámicos **8a-b** (Esquema 37).



Esquema 37. 4-aryl-3,4-dihidrocumarinas sintetizadas a partir del timol y ácidos cinámicos.

Los compuestos **9a-b** fueron obtenidos satisfactoriamente, mediante la condensación del timol con el respectivo ácido cinámico, en tiempos de reacción cortos y en altos rendimientos, empleando por primera vez el InCl_3 (3%mol) como catalizador. Este ácido de Lewis se propone como un nuevo catalizador en la reacción de hidroarilación, al permitir un proceso libre de solvente, con tiempos de calentamiento cortos y con excelente rendimientos, además de evitar la generación de productos secundarios y el desprendimiento de vapores contaminantes, debido a que sólo es necesario una pequeña cantidad no mayor al 3 % mol para llevar a cabo eficientemente la reacción (Tabla 20).

Tabla 20. Resultados obtenidos en la condensación del timol con ácidos cinámicos.

Compuesto	R	P.f. exp. °C	Tiempo h	% Rto
9a	H	128-132	2	94
9b	OH	145-150	3	88

La caracterización estructural de los derivados **9a-b** se realizó a través de técnicas instrumentales, iniciándose con el análisis de sus espectros IR, donde se corroboró en primera instancia la presencia de los grupos funcionales característicos de cada uno.

En el espectro IR de **9a** (Figura 35) y de **9b** (Anexo 24) se localizaron las bandas de absorción inherentes a las vibraciones de los enlaces CH₃, C=O, -C=C-, -C-O-C-, -C-H_{ar}. Así mismo, se verifica la existencia del sustituyente OH en el compuesto **9b**

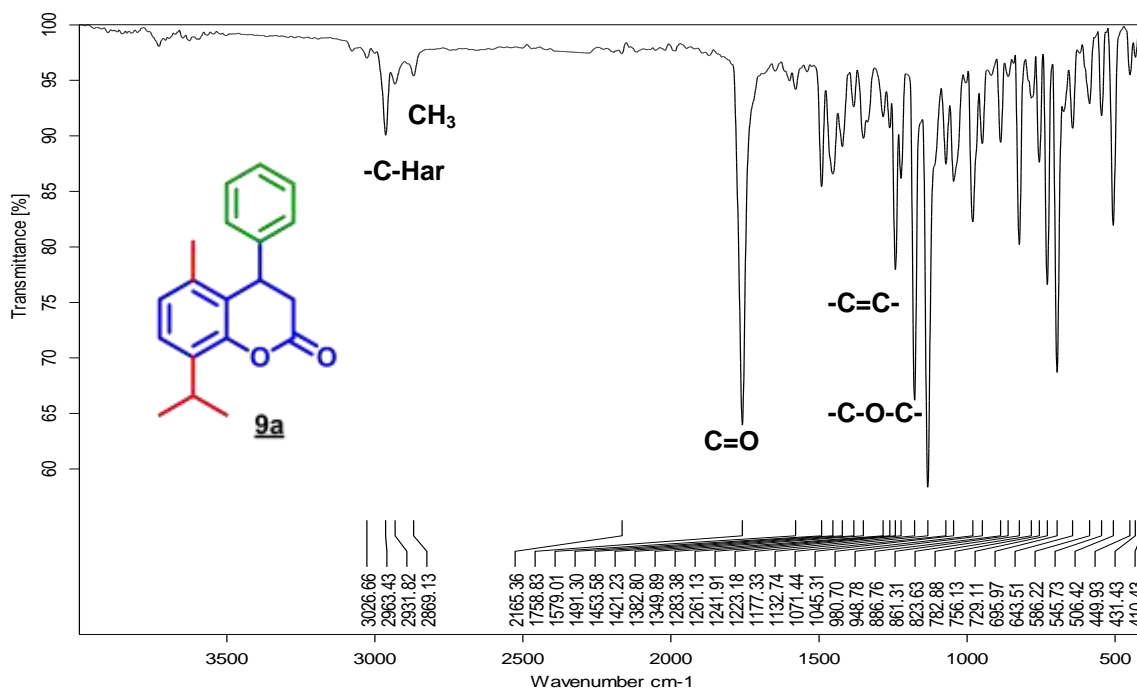


Figura 35. Espectro IR de **9a**.

Para el compuesto **9a** se observan unas bandas a 3027 y 2963-2869 cm⁻¹ que hacen referencia a las tensiones de los enlaces C-H de los anillos aromáticos y CH₃ de los sustituyentes en posición 5 y 8 del núcleo dihidrocumarínico, respectivamente. También se contemplan unas bandas a 1759, 1579, 1383 cm⁻¹ que indican las tensiones características de los enlaces -C=O, -C=C-, y -C-O-C- respectivamente (Tabla 21).^{106,116}

Así mismo, en el espectro IR del compuesto **9b** se aprecia una banda intensa 3324 cm⁻¹, propia de los grupos OH, que permitiría ratificar la presencia del hidroxilo en el sustituyente arilo. Las vibraciones de tensión de los enlaces C-Har,

CH₃ y C=O se presentan a 3026, 2963, 1736 cm⁻¹, respectivamente. Finalmente a 1511 y 1348 cm⁻¹ se ubican las bandas de los enlaces –C=C- y –C-O-C- (Tabla 21).^{106,116}

Tabla 21. Bandas de absorción en el IR para los compuestos **9a-b**.

Comp.	Bandas de absorción IR (cm ⁻¹)					
	OH	C-H _{ar}	CH ₃	C=O	-C=C-	-C-O-C-
9a	-	3027	2963-2869	1759	1579	1383
9b	3324	3026	2963	1736	1511	1348

Continuando con la caracterización de los compuestos obtenidos, se empleó Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-MS), utilizando el método de ionización por impacto de electrones (IE) y un detector selectivo de masas (MSD). La combinación de estas dos técnicas espectroscópicas permite la separación en fase gaseosa de los componentes de una mezcla en el tiempo, seguida de la confirmación de su identidad mediante la información estructural que esta suministra.

Los perfiles cromatográficos (TIC, corriente iónica total reconstruida) de los compuestos sintetizados muestran una sola señal, lo que corrobora su alto grado de pureza. Los tiempos de retención para **9a** y **9b** son 19.39 y 22.19 min, respectivamente (Figura 36, Anexo 25). Por otra parte, sus espectros de masas permiten confirmar su estructura, al observar en primera instancia las señales de los iones moleculares (M⁺), correspondientes a su respectiva masa nominal. Así para **9a** este pico se ubica a 280 m/z y para **9b** a 296 m/z (Figura 37, Anexo 26).

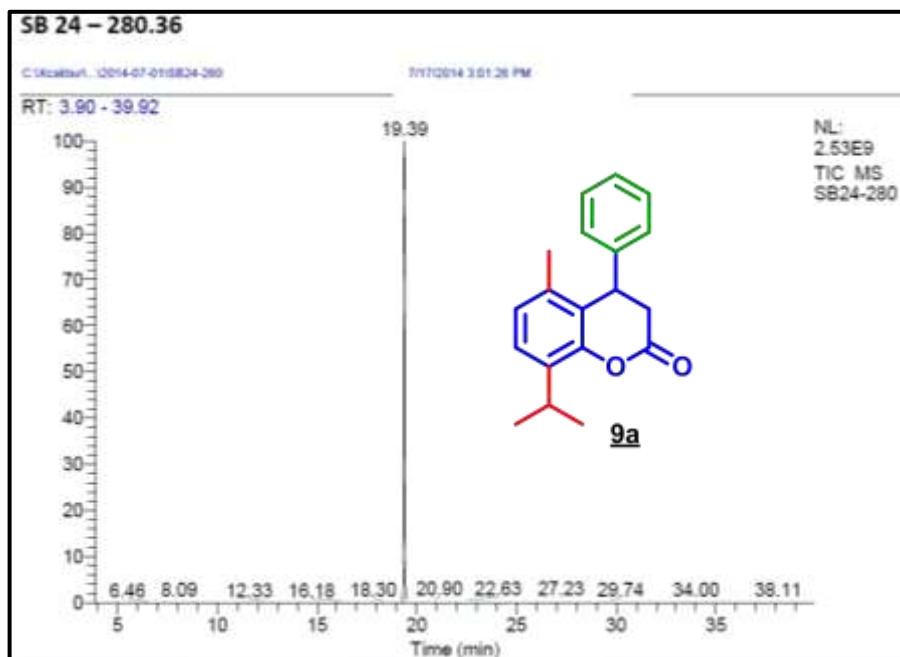


Figura 36. Perfil cromatográfico del compuesto **9a**.

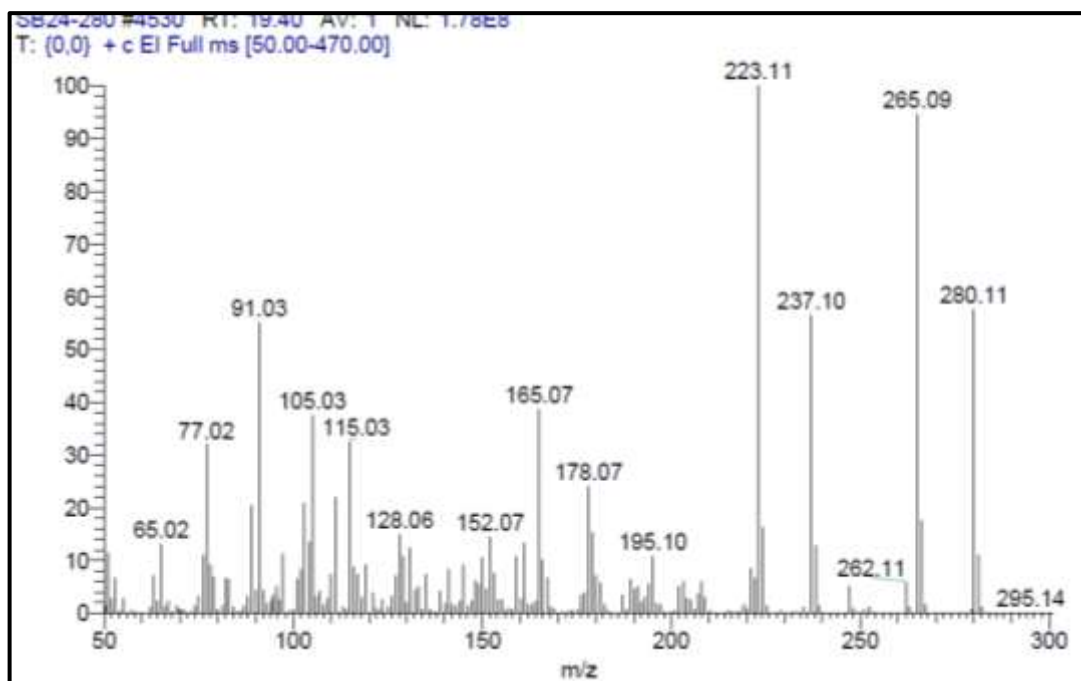
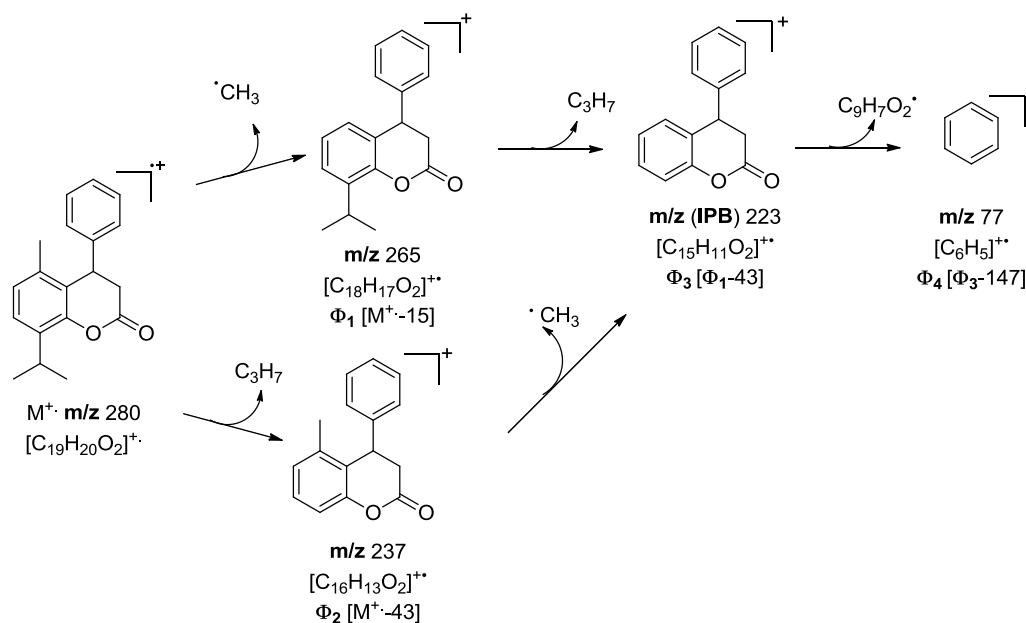


Figura 37. Espectro de masas del compuesto **9a**.

Por otra parte, se corrobora la condensación del timol identificando los patrones de fragmentación característicos de los compuestos sintetizados, especialmente la presencia de los sustituyentes en el núcleo dihidrocumarínico. Así para el compuesto **9a** se observa la pérdida del radical metilo ubicado en la posición 5, generando el catión fragmento Φ_1 con una relación m/z de 265. Su posterior pérdida del radical isopropilo origina el ion pico de base (IPB) a 223.11 m/z , Φ_3 . También se aprecian relaciones m/z que advierten el orden inverso en la pérdida de los fragmentos mencionados anteriormente, siendo la pérdida del sustituyente metilo antecedida por la del isopropilo, Φ_2 m/z 237. De igual forma, la presencia del grupo arilo en la posición 4 de la molécula se confirma con el catión fragmento Φ_4 con una relación m/z de 77 (Esquema 38).^{115,120} La formación del compuesto **9b** también fue verificada mediante las fragmentaciones propias de sus sustituyentes, manteniendo similitud con su análogo (Anexo 26).



Esquema 38. Ruta de fragmentación propuesta para el compuesto **9a**.

Finalmente, la estructura de los compuestos **9a-b** fue confirmada mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN 1H , RMN ^{13}C , DEPT-135, COSY 1H - 1H y HSQC).

En el espectro RMN ^1H de **9a** fue posible identificar las señales correspondientes a las diferentes clases de protones presentes en su estructura (Figura 38). Iniciando desde campo bajo, los protones aromáticos del sustituyente arilo se ubican en la región comprendida entre 7.29 y 7.03 ppm, seguidos de los protones 6-H y 7-H a 7.02 y 7.00 ppm. Posteriormente, a 4.53 ppm se observa el protón ecuatorial 3-Heq, como un doblete de dobletes, a causa del acoplamiento geminal con el protón axial 3-Hax y vecinal con el protón 4-H. Los protones 3-Hax y 4-H se registran a 2.85 y 3.25 ppm, respetivamente. Estas asignaciones se realizaron teniendo en cuenta el valor de las constantes de acoplamiento, cuyos valores son fundamentales para determinar en qué posición está ubicado el protón 4-H. Las constantes de acoplamiento entre los protones Hax/Hax tienen valores mayores que a las de las interacciones Hax/Heq y estas a su vez superiores que de los acoplamientos geminales ($^3J_{\text{Hax/Hax}} > ^3J_{\text{Hax/Heq}} > ^2J_{\text{3-Hax/3-Heq}}$) (Figura 39).¹²¹

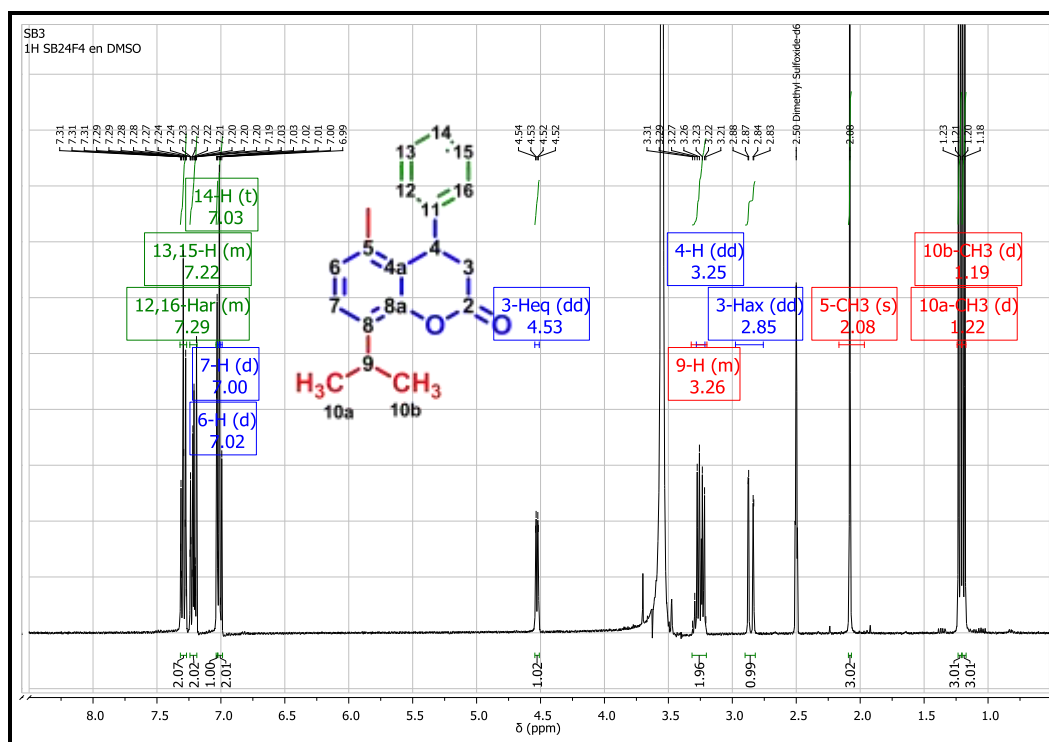


Figura 38. Espectro RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **9a**.

La dihidrocumarina está constituida básicamente por un benceno fusionado con un anillo de pirona, por lo que presenta una conformación especial de *semi-silla*, diferente a la de su análogo saturado el ciclohexano. Teniendo en cuenta estas interacciones es posible afirmar que el protón 4-H se encuentra en posición axial, dejando al sustituyente arilo en posición ecuatorial y ratificando la preferencia de los grupos voluminosos por ocupar las posiciones ecuatoriales (Figura 39).¹²²

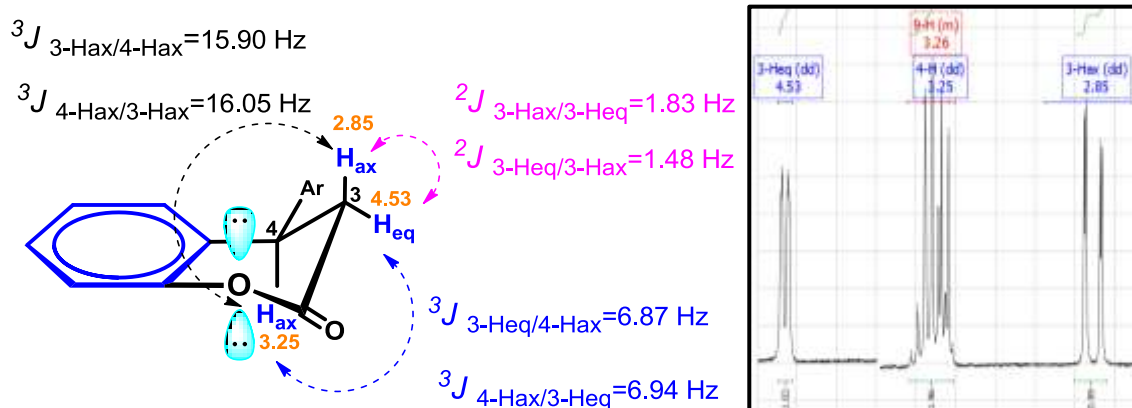


Figura 39. Conformación del núcleo dihidroumarínico y las interacciones de sus protones con sus respectivas constantes de acoplamiento.

Por otra parte, la señal de los protones de 5-CH₃ se registra a 2.08 ppm. Así mismo, la presencia del sustituyente isopropilo en el C8 se corrobora con los desplazamientos químicos a 1.22 y 1.19 ppm, producto de los grupos metilo diastereotópicos localizados sobre el C9 (10a-CH₃ y 10b-CH₃), apreciándose un dd en cada una de ellas, debido a la interacción con el protón 9-H, el cual tiene apariencia de multiplete a 3.26 ppm (Figura 40). Las asignaciones descritas anteriormente son verificadas mediante el experimento de correlación homonuclear COSY ¹H-¹H (Figura 41).

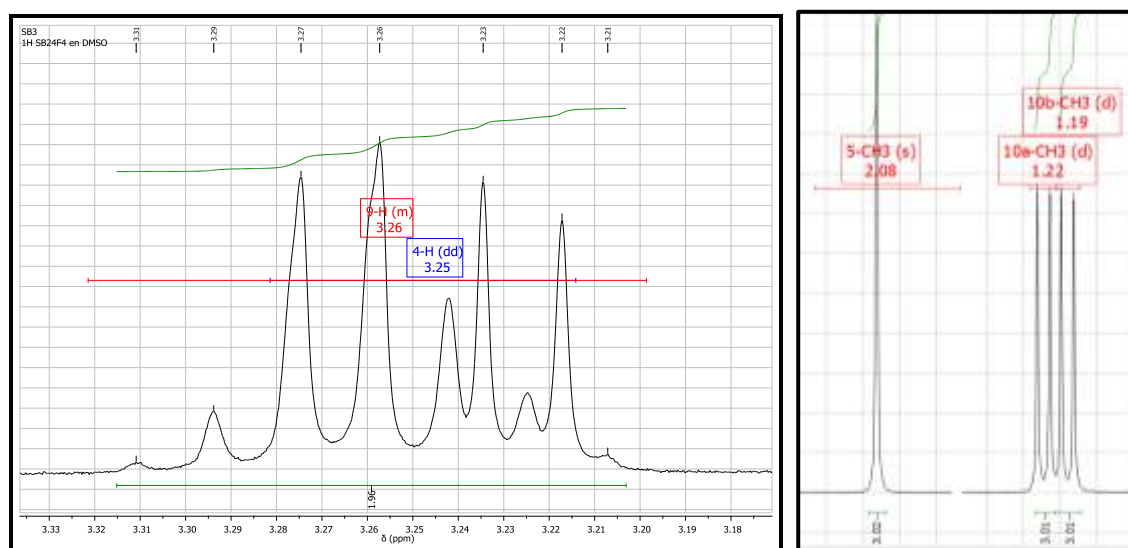


Figura 40. Expansión de la región alifática en el espectro de RMN ^1H - ^1H para 9a.

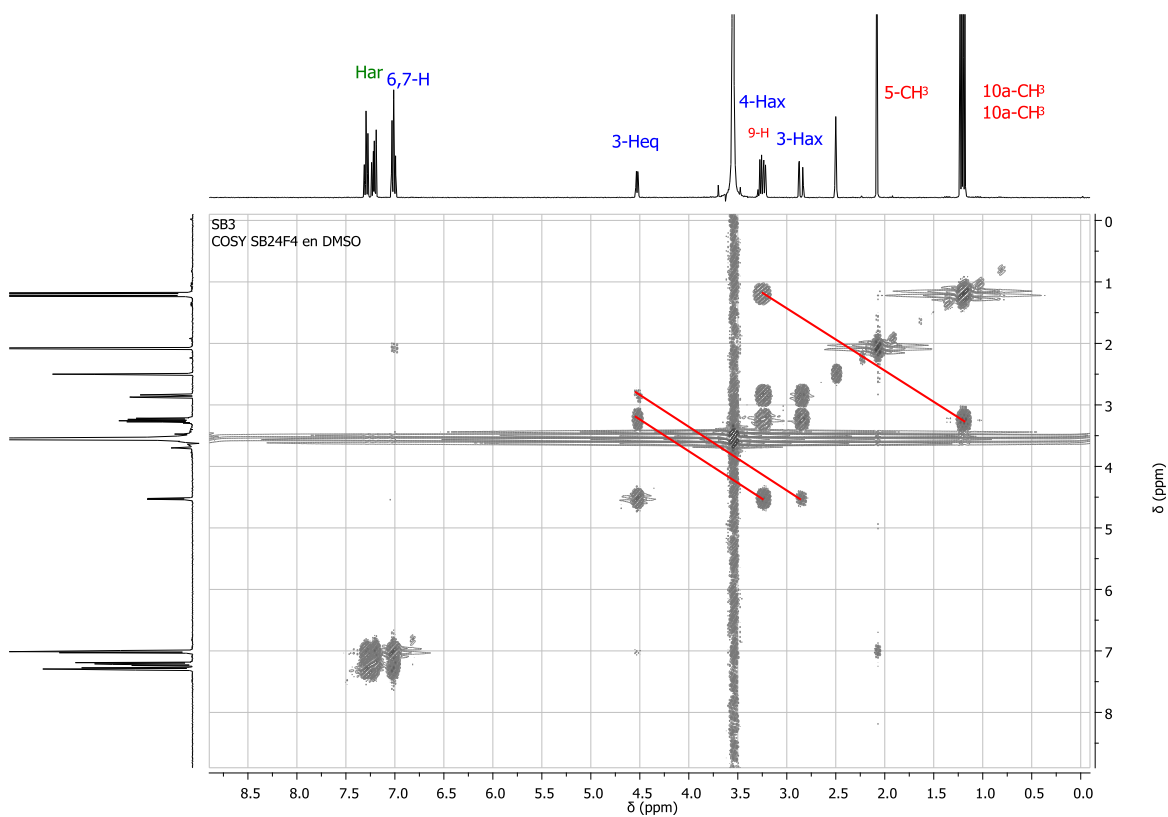


Figura 41. Espectro RMN COSY ^1H - ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 9a.

El análisis del espectro RMN ^{13}C permitió verificar el número de carbonos presentes en el compuesto **9a** (Figura 42). Iniciando desde campo alto, se registran las señales de los carbonos del sustituyente isopropilo 10a-CH₃, 10b-CH₃ y C9 a 22.9, 22.8 y 26.4 ppm, respectivamente. Así mismo en la misma región se aprecia el carbono del grupo metilo 5-CH₃ a 18.2 ppm. A continuación se aprecian las señales de los carbonos C3 y C4 a 37.2 y 47.5 ppm, corroborándose posteriormente el desplazamiento químico del carbono metilénico C3 con el experimento DEPT-135, al observarse su señal en fase negativa. Los carbonos sp² del sustituyente arilo y del núcleo dihidrocumarínico se asignaron empleando el experimento de acoplamiento heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC (Figura 43). Por tanto, se registran las señales en la región comprendida entre 125.4-129.1 ppm. Se resalta de igual forma la presencia del carbono carbonílico C2 a 167.70 ppm y de los demás carbonos cuaternarios C8a, C11, C8 y C5 a 149.20, 140.93, 134.06 y 133.58 ppm, respectivamente.

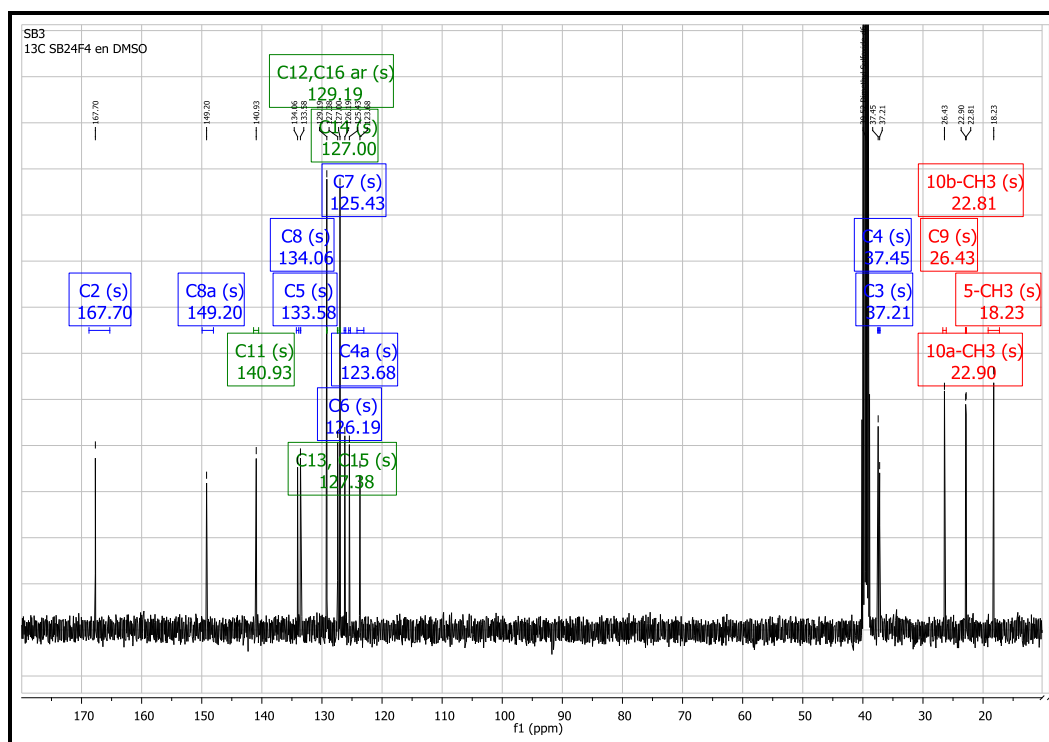


Figura 42. Espectro RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO-*d*₆) de **9a**.

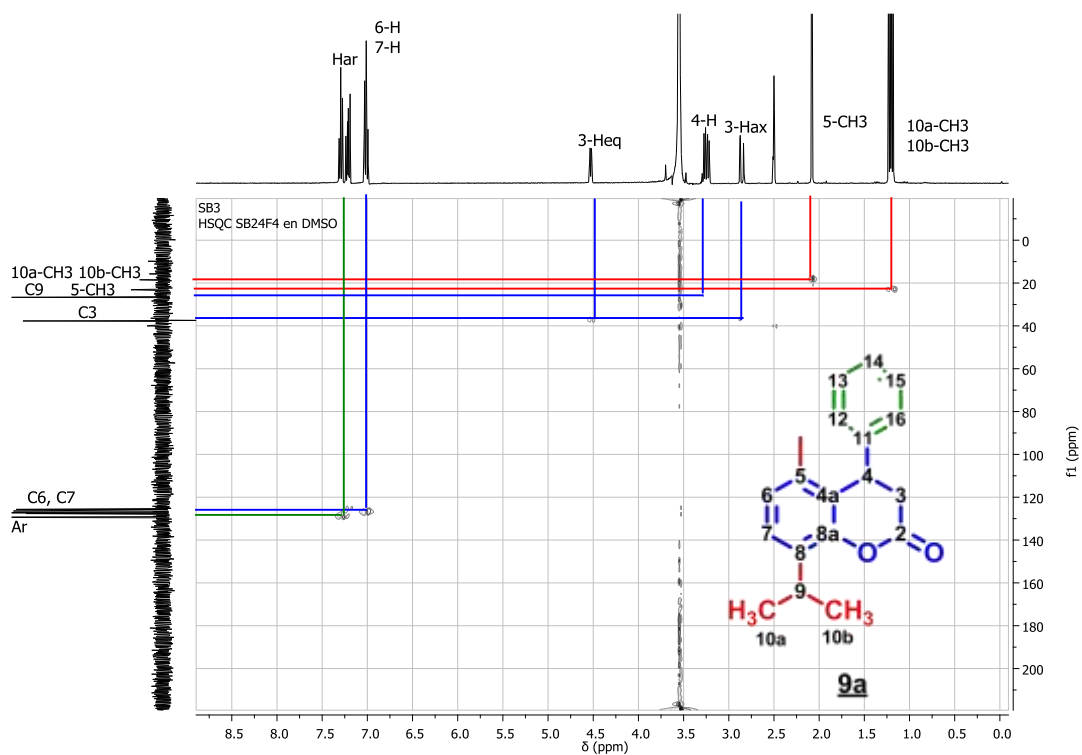


Figura 43. Espectro RMN HSQC (400 MHz, DMSO- d_6) de **9a**.

Finalmente, la superposición del espectro DEPT-135 sobre el de ^{13}C permitió confirmar las asignaciones realizadas, especialmente al apreciar la señal del carbono C3 con fase negativa, característica de los carbonos secundarios, y la desaparición de los carbonos cuaternarios, debido a que estos no registran señal alguna de DEPT-135 (Figura 44).

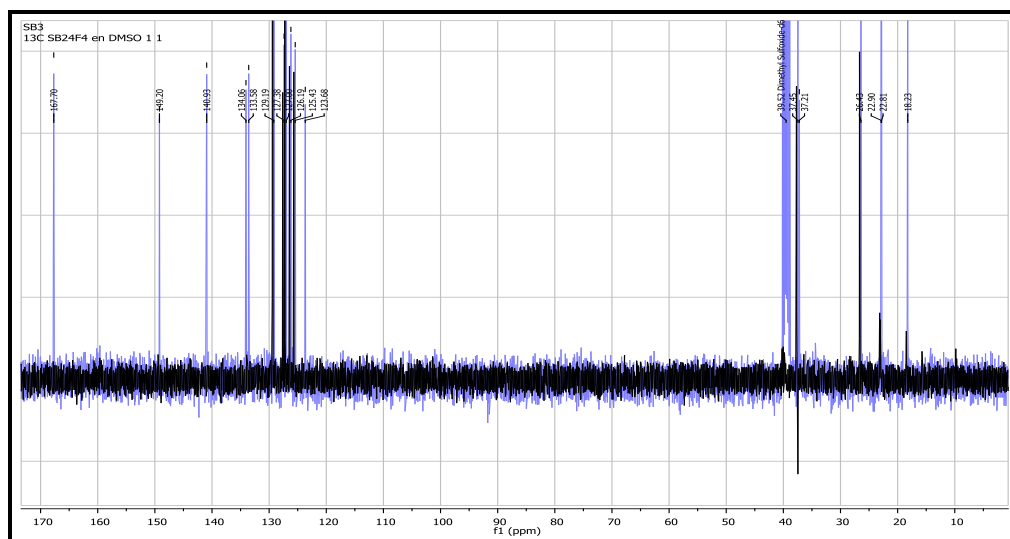


Figura 44. Superposición del espectro DEPT-135 sobre el de ^{13}C de **9a**.

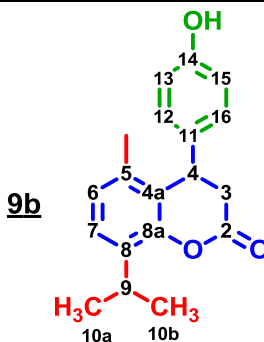
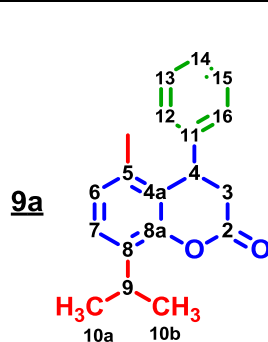
La caracterización del compuesto **9b** se llevó a cabo mediante el análisis de sus espectros RMN (Anexos 25-29). La elucidación estructural se realizó de forma similar a la escrita para su análogo **9a**. En las tablas 23 y 24, se consignan los datos espectroscópicos de las dos 4-aril-3,4-dihidrocumarinas.

Tabla 22. Datos espectroscópicos RMN ¹H de 9a-b.

Comp.	Desplazamiento químico (ppm), Multiplicidad y Constantes de acoplamiento (Hz)										
	3-Hax	3-Heq	4-H	5-CH ₃	6-H	7-H	9-H	10a-CH ₃	10b-CH ₃	H-arilo	OH
<u>9a</u>	2.85 (dd) <i>J</i> =1.8, 15.9	4.53 (dd) <i>J</i> =1.4, 6.8	3.25 (dd) <i>J</i> =6.9, 16.1	2.08 (s)	7.02 (d) <i>J</i> =4.8	7.00 (d) <i>J</i> =4.2	3.26 (m)	1.22 (d) <i>J</i> =6.9	1,19 (dd) <i>J</i> =6.9	7.03-7.29 (m)	-
<u>9b</u>	2.80 (dd) <i>J</i> =1.7, 15.8	4.39 (m)	3.16 (dd) <i>J</i> =6.7, 15.8	2.08 (s)	7.17 (d) <i>J</i> =7.9	6.98 (d) <i>J</i> =7.9	3.24 (m)	1.21 (d) <i>J</i> =6.9	1.18 (d) <i>J</i> =6.9	6.67-6.81 (m)	9.47 (s)

Tabla 23. Datos espectroscópicos RMN ¹³C de 9a-b.

Comp.	Desplazamiento químico (ppm)																
	C2	C3	C4	C4a	C5	5-CH ₃	C6	C7	C8	C8a	C9	10a-CH ₃	10b-CH ₃	C11	C12, C16	C13, C15	C14
<u>9a</u>	167.7	37.2	37.5	123.7	133.6	18.2	126.2	125.4	134.1	149.2	26.5	22.9	22.8	140.9	129.2	127.4	127.0
<u>9b</u>	167.9	37.5	36.7	124.2	130.99	18.2	126.1	125.2	133.5	149.1	26.4	22.9	22.8	133.9	128.1	115.9	156.5




CONCLUSIONES

En base a los objetivos planteados en la presente investigación se concluye que:

- Durante un estudio detallado de las condiciones de reacción, donde se evaluaron parámetros técnicos como la frecuencia de vibración del equipo, material y tamaño de los utensilios de molienda, así como los aspectos químicos, catalizadores y precursores; se logró establecer por primera vez establecer una metodología apropiada para la reacción de Pechmann, vía activación mecanoquímica y bajo principios de química verde.
- Se llevó a cabo la síntesis de una serie de 4-metilcumarias **6a-g** con excelentes rendimientos (52-95 %) y en tiempos cortos de reacción (5-60 minutos) a través de un proceso de molienda en un amalgamador de 60 Hz.
- La robustez y sencillez de la reacción de Pechmann permitió la conveniente implementación del protocolo *Ball milling*, una eficiente técnica mecanoquímica que emplea la molienda para conducir las reacciones, evitando el uso de sustancias auxiliares como solventes y extensas horas de calentamiento. Además su quimioselectividad permite el aislamiento de los productos con un altísimo grado de pureza, evitando así procesos de purificación adicionales que conllevan al gasto innecesario de más sustancias químicas.
- Se comparan dos métodos para la obtención de la 7-amino-4-metilcumarina **6a**, compuesto de un alto valor comercial. El primero consistió en una síntesis extensa de tres etapas (11 horas), donde fue necesario llevar a cabo la protección del *m*-aminofenol **3**, seguida de la formación del núcleo cumarínico **5** y posterior desprotección del grupo amino **6a**. Por otro parte, es posible la síntesis de **6a** en un proceso corto (10 minutos), y con excelente rendimiento (92 %) a través de activación mecanoquímica. Evitándose así la generación de los productos secundarios observados en las metodologías tradicionales y el empleo de grupos protectores que no

solo prolongan el proceso experimental sino que además acarrearán el uso de mayor cantidad de reactivos, solventes y catalizadores.

 Nuevas 4-aril-3,4-dihidrocumarinas fueron obtenidas con excelentes rendimientos (88-94 %) vía hidroarilación bajo condiciones libres de solvente. Lográndose exitosamente la condensación del timol, precursor de origen natural, con los ácidos cinámico y cumárico, empleando por primera vez un ácido de Lewis como catalizador, el InCl_3 (3 %mol), y en tiempos cortos de reacción (2-3 h).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. IUPAC, Nomenclature of Organic Chemistry, Pergamon Press, **1979**.
2. Borges, F.; Roleira, F.; Milhazes, N.; Santana, L and Uriarte, E. Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 887-916.
3. Murray, R. D. H.; Mendez, J.; Brown, S. A. *The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry*; Wiley: New York, **1982**.
4. Knaggs, A. The biosynthesis of shikimate metabolites." *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 119-136.
5. Kai, K.; Shimizu, B.; Mizutani, M.; Watanabe, K.; Sakata, K. Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry.* **2006**, *67*, 379-386.
6. Sandhu, S.; Bansal, Y.; Silakari, O.; Bansal, G. Coumarin hybrids as novel therapeutic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 3806-3814.
7. Hiroshi, K.; Koichi, H. Identification and structure-activity relationship studies of osthol, a cytotoxic principle from *Cnidium monnieri*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1791-1794.
8. Sundt, T.; Anderson, R. Intracellular brain pH and the pathway of a fat soluble pH indicator across the blood-brain barrier. *Brain Research.* **1980**, *186*, 355-364.
9. Morison, W. Recent advances in phototherapy and photochemotherapy of skin disease. *J. Dermatol. Sci.* **1990**, *1*, 141-147.
10. Bocca, C.; Ludovica, G.; Miglietta, A. Cytoskeleton-interacting activity of Geiparvarin, diethylstilbestrol and conjugates. *Chem.-Biol. Interact.* **2001**, *137*, 285-305.
11. Zhang, Y.; Yanjun, C. Imperatorin prevents cardiac hypertrophy and the transition to heart failure via NO-dependent mechanisms in mice. *Fitoterapia.* **2010**, *81*, 1188-1195.

12. Witaicenis, A.; Seito, L.; Stasi, L. Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Chem.-Biol. Interact.* **2010**, *186*, 211-218.
13. Bedoya, L.; Beltrán, M.; Olmedo, D. 4-Phenylcoumarins as HIV transcription inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4447-4450.
14. Bashir, S.; Alam, M.; Adhikari, B.; Shrestha, R.; Yousuf, S.; Ahmadd, B.; Parveen, S.; Amana, A.; Choudhary, I. New antileishmanial sesquiterpene coumarins from *Ferula narthex Boiss.* *Phytochem. Lett.* **2014**, *9*, 46-50.
15. Payá, M.; Halliwell, B.; Hoult, JR. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species: Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochem. Pharmacol.* **1992**; *44(2)*, 205-214.
16. Barker, N.; Hines, E.; Kvale, W.; Allen, E. Dicumarol: Its action, clinical use and effectiveness as an anticoagulant drug. *Am. J. Med.* **1947**, *3(5)*, 634-642.
17. Fylaktakidou, K. C.; Hadjipavlou-Litina, D. J.; Litinas, K. E.; Nicolaidis, D. N. Natural and Synthetic Coumarin Derivatives with Anti-Inflammatory/Antioxidant Activities. *Curr. Pharm. Design.* **2004**, *10(30)*, 3813-3833.
18. Smyth, T.; Ramachandran, V.; Smyth, W. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *Int J Antimicro Ag.* **2009**, *33*, 421-426.
19. Kumar, R.; Saha, A.; Saha, D. A new antifungal coumarin from *Clausena excavata.* *Fitoterapia.* **2012**, *83*, 230-233.
20. Holmes, O.; Pathak, Jr.; Fitzpatrick, T. The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. *J. Photobiol. B-Biol.* **1992**, *14(1-2)*, 3-22.
21. Apseloff, G.; Hilliard, J. B.; Gerber, N.; Mays, D. C. Inhibition and induction of drug metabolism by psoralens: Alterations in duration of sleep induced by hexobarbital and in clearance of caffeine and hexobarbital in mice. *Xenobiotica.* **1991**, *21(11)*, 1461-1471.

22. Barreiro-Arcos, M. L.; Cremaschi, G.; Werner, S.; Coussio, J.; Ferraro, G.; Anesini, C. *Tilia cordata* Mill. extracts and scopoletin (isolated compound): differential cell growth effects on lymphocytes. *Phytother. Res.* **2006**, *20*(1), 34-40.
23. Meotti, F. C.; Ardenghi, J. V.; Pretto, J. B.; Souza, M. Antinociceptive properties of coumarins, steroid and dihydrostyryl-2-pyrone from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **2006**, *58*(1), 107-112.
24. Chen, Y.; Kong, L. D.; Xia, X.; Kung, H. F.; Zhang, L. Behavioral and biochemical studies of total furocoumarins from seeds of *Psoralea corylifolia* in the forced swimming test in mice. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *96* (3), 451-459.
25. Howes, M.; Perry, N.; Houghton, P. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phytotherapy Res.* **2003**, *17*, 1-18.
26. Kresge, N.; Simoni, R.D.; Hill, R.L. Hemorrhagic sweet clover disease, Dicumarol and warfarin: the work of Karl Paul Link. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280-285.
27. Charles, E.; Copeland, MD.; Cheryl, K. Six, D.O. A tale of two anticoagulants: Warfarin and Heparin. *J. Surg. Educ.* **2009**, *66*(3), 116-181.
28. Vilar, S.; Quezada, E.; Santana, L.; Uriarte, E.; Yanez, M.; Fraiz, N.; Alcaide, C.; Cano, E.; Orallo, F. Design, synthesis, and vasorelaxant and platelet antiaggregatory activities of coumarin–resveratrol hybrids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 257-261.
29. Song, H. Y.; Ngai, M. H.; Song, Z. Y.; MacAry, P. A.; Hobbly, J.; Lear, M. Practical synthesis of maleimides and coumarin-linked probes for protein and antibody labelling via reduction of native disulfides. *J. Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3400-3406.
30. Melagraki, G.; Afantitis, A.; Igglessi, M. O.; Detsi, A.; Koufaki, M.; Kontogiorgis, C.; Hadjipavlou, L. D. Synthesis and evaluation of the

antioxidant and anti-inflammatory activity of novel coumarin-3-aminoamides and their alpha-lipoic acid adducts. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3020-3026.

- 31.** Zhao, H.; Donnelly, A. C.; Kusuma, B. R.; Brandt, G. E. L.; Brown, D.; Rajewski, R. A.; Vielhauer, G.; Holzbeierlein, J.; Cohen, M. S.; Blagg, B. S. Engineering an Antibiotic to Fight Cancer: Optimization of the Novobiocin Scaffold to Produce Anti-proliferative Agents. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3839-3853.
- 32.** Belluti, F.; Fontana, G.; Bo, L. D.; Carenini, N.; Giommarelli, C.; Zunino, F. Design, synthesis and anticancer activities of stilbene-coumarin hybrid compounds: Identification of novel proapoptotic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3543-3550.
- 33.** Yang, J.; Liu, G. Y.; Dai, F.; Cao, X. Y.; Kang, Y. F.; Hu, L. M.; Tang, J. J.; Li, X. Z.; Li, Y.; Jin, X. L.; Zhou, B. Synthesis and biological evaluation of hydroxylated 3-phenylcoumarins as antioxidants and antiproliferative agents *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6420-6425.
- 34.** Tsay, S.; Hwu, J. R.; Singha, R.; Huang, W.; Chang, Y. H.; Hsu, M.; Shieh, F.; Lin, C.; Hwang, K. C.; Horng, J.; Clercq, E. D.; Vlieghe, I.; Neyts, J. Coumarins hinged directly on benzimidazoles and their ribofuranosides to inhibit hepatitis C virus. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 290-298.
- 35.** Mahajan, D. H.; Pannecouque, C.; Clercq, E. D.; Chikhaliya, K. H. Synthesis and Studies of New 2-(Coumarin-4-yloxy)-4,6-(substituted)-s-Triazine Derivatives as Potential Anti-HIV Agents. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2009**, *342*, 281-290.
- 36.** Gilbert, D.; Colton, C. Reactive Oxygen Species in Biological Systems: an interdisciplinary approach. 1a. Ed. Kluwer Academic Publishers. USA, **2002**, 33-36.
- 37.** Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food. Chem.* **2011**, *125*, 288-306.

38. Winrow, V. R.; Winyard, P. G.; Morris, C. G.; Blake, D. R. Free radicals in inflammation: Second messengers and mediators of tissue destruction. *Br. Med. Bull.* **1993**, *49*, 506-522.
39. Kostova, I.; Bhatia, S.; Grigorov, P.; Balkansky, S.; Parmar, V. S.; Prasad, A. K.; Saso, L. Coumarins as Antioxidants. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 3929-3951.
40. Sashidhara, K. V.; Kumar, M.; Modukuri, R. K.; Sonkar, R.; Bhatia, G.; Khanna, A. K.; Rai, S.; Shukla, R. Synthesis and anti-inflammatory activity of novel biscoumarin–chalcone hybrids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4480-4484.
41. Perez-Cruz, F.; Vazquez-Rodriguez, S.; Matos, M. J.; Herrera-Morales, A.; Villamena, F. A.; Das, A.; Gopalakrishnan, V.; Olea-Azar, C.; Santana, L.; Uriarte, E. Synthesis and Electrochemical and Biological Studies of Novel Coumarin–Chalcone Hybrid Compounds. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6136-6145.
42. Ghate, M.; Kusanur, R. A.; Kulkarni, M. V. Synthesis and in vivo analgesic and anti-inflammatory activity of some bi heterocyclic coumarin derivative. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 882-887.
43. Wu, J. M.; Wang, Z. R.; Hseih, T. C.; Bruder, J. L.; Zou, J. G.; Huang, Y. Z. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2001**, *8*, 3-17.
44. Vilar, S.; Quezada, E.; Santana, L.; Uriarte, E.; Yanez, M.; Fraiz, N.; Alcaide, C.; Cano, E.; Orallo, F. Design, synthesis, and vasorelaxant and platelet antiaggregatory activities of coumarin–resveratrol hybrids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 257-261.
45. Xie, S.; Wang, X.; Li, J.; Yang, L.; Kong, L. Design, synthesis and evaluation of novel tacrine–coumarin hybrids as multifunctional cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *64*, 540-553.

46. Fallarero, A.; Oinonen, P.; Gupta, S.; Blom, P.; Galkin, A.; Mohan, C.; Vuorela, P. Inhibition of acetylcholinesterase by coumarins: The case of coumarin 106. *Pharmacol. Res.* **2008**, *58*, 215-221.
47. Catto, M.; Pisani, L.; Leonetti, F.; Nicolotti, O.; Pesce, P.; Stefanachi, A.; Cellamare, S.; Carotti, A. Design, synthesis and biological evaluation of coumarin alkylamines as potent and selective dual binding site inhibitors of acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 146-152.
48. Heravi, M.; Khaghaninejad, S.; Mostofi, M. Chapter One - Pechmann Reaction in the Synthesis of Coumarin Derivatives. *Adv. Heterocycl. Chem.*, **2014**, *112*, 1-50.
49. Jie, J. Name Reactions. A collection of detailed reaction mechanisms. 3a Ed. Alemania. Springer: **2006**. pp. 452-453.
50. Pechmann, H.; Duisberg, C. H. v. Pechmann: Neue Bildungsweise der Cumarine. Synthese des Daphnetins. I. *Chem. Ber.* **1884**, *17*, 929-936.
51. Woods, L.; Sapp, J. A new One-Step Synthesis of Substituted Coumarins. *J. Org. Chem.* **1962**, *27(10)*, 3703-3705.
52. Manhas, M.; Ganguly, N.; Mukherjee, S.; Jain, A.; Bose, A. Microwave initiated reactions: Pechmann coumarin synthesis, Biginelli reaction, and acylation. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2423-2425.
53. Kotharkar, S.; Bahekar, S.; Shinde, D. Chlorosulfonic acid-catalysed one-pot synthesis of coumarin. *Mendeleev Commun.* **2006**, *16*, 241-242.
54. Robertson, W.F.; Sandrocik, C.B.; Hendry, J. Hydroxy-carbonyl compounds. Part V. The preparation of coumarins and 1:4-pyrones from phenol, *p*-cresol, quinol, and α -naphthol. *J. Chem. Soc.* **1931**, 2426-2432.
55. Sethna, S. M.; Shah, N. M.; Shah, R. C. Aluminium chloride, a new reagent for the condensation of β -ketonic esters with phenols. Part I. The condensations of methyl β -resorcyate, β -resorcylic acid, and resacetophenone with ethyl acetoacetate. *J. Chem. Soc.* **1938**, 228-232.

56. Sharma, G.; Reddy, J.; Lakshmi, P.; Krishna, P. An efficient ZrCl₄ catalyzed one-pot solvent free protocol for the synthesis of 4-substituted coumarins. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6119-6121.
57. Gibbs, R.; De, S. An efficient and practical procedure for the synthesis of 4-substituted coumarins. *Synthesis*, **2005**, *8*, 1231-1233.
58. Valizadeh, H.; Shockravi, A. An efficient procedure for the synthesis of coumarin derivatives using TiCl₄ as catalyst under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3501-3503.
59. Bose, D.; Rudradas, A.; Babu, M. The indium(III) chloride-catalyzed von Pechmann reaction: a simple and effective procedure for the synthesis of 4-substituted coumarins. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 9195-9197.
60. Wua, J.; Diaoa, T.; Suna, W.; Lia, Y. Expeditious Approach to Coumarins via Pechmann Reaction Catalyzed by Molecular Iodine or AgOTf. *Synth. Commun.* **2006**, *36*, 2949-2956.
61. Potdar, M.; Mohile, S.; Salunkhe, M. Coumarin syntheses via Pechmann condensation in Lewis acidic chloroaluminate ionic liquid. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 9285-9287.
62. Muchchintala, M.; Vidavalur, S.; Guri, L.; Yerra, K. A solvent-free synthesis of coumarins via Pechmann condensation using heterogeneous catalyst. *J. Mol. Catal. A-Chem.* **2006**, *255*, 49-52.
63. Laufer, M.; Hausmann, H.; Hölderich, W. Synthesis of 7-hydroxycoumarins by Pechmann reaction using Nafion resin/silica nanocomposites as catalysts. *J. Catal.* **2003**, *218*, 315-320.
64. Gunnewegh, E.; Hoefnegal, A.; Bekkum, H. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1995**, *100*, 87-92.
65. Frere, S.; Thiery, V.; Besson, T. Microwave acceleration of the Pechmann reaction on graphite/montmorillonite K10: application to the preparation of 4-substituted 7-aminocoumarins. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2791-2794.
66. Romanelli, G.; Bennardi, D.; Ruiz, D.; Baronetti, G.; Thomas, H.; Autino, J.; *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 8935-8939.

67. Singh, P.; Singh, D.; Samant, S. Sulphamic acid - An efficient and cost-effective solid acid catalyst for the pechmann reaction. Sulphamic acid - An efficient and cost-effective solid acid catalyst for the pechmann reaction. *Synlett*, **2004**, 1909-1912.
68. Tyagi, B.; Mishra, M.; Jasra, R. Synthesis of 7-substituted 4-methyl coumarins by Pechmann reaction using nano-crystalline sulfated-zirconia. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2007**, *276*, 47-56.
69. Sinhamahapatra, A.; Sutradhar, N.; Pahari, S.; Bajaj, H.; Panda, A. *Appl. Catal. A: Gen.* **2011**, *394*, 93-100.
70. Karimi, B.; Behzadnia, H. Periodic mesoporous silica chloride (PMSCI) as an efficient and recyclable catalyst for the Pechmann reaction. *Catal. Commun.* **2011**, *12*, 1432-1436.
71. Zareyee, D.; Serehneh, M. Recyclable CMK-5 supported sulfonic acid as an environmentally benign catalyst for solvent-free one-pot construction of coumarin through Pechmann condensation. *J. Mol. Catal. A-Chem.* **2014**, *391*, 88-91.
72. Karimi, B.; Zareyee, D. Design of a Highly Efficient and Water-Tolerant Sulfonic Acid Nanoreactor Based on Tunable Ordered Porous Silica for the von Pechmann Reaction. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3989-3992.
73. Firouzabadi, H.; Iranpoor, N.; Khoshnood, A. Aluminum tris (dodecyl sulfate) trihydrate $\text{Al}(\text{DS})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ as an efficient Lewis acid-surfactant-combined catalyst for organic reactions in water: Efficient conversion of epoxides to thiiranes and to amino alcohols at room temperature. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2007**, *274* (1-2), 109-115.
74. Manabe, K.; Imura, S.; Sun, X.-M.; Kobayashi, S. Dehydration reactions in water. Brønsted acid-surfactant-combined catalyst for ester, ether, thioether, and dithioacetal formation in water. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (40), 11971-11978.
75. Khalafi, A.; Haghghi, S.; Panahi, F. Nano-TiO₂ on Dodecyl-Sulfated Silica: As an Efficient Heterogeneous Lewis Acid-Surfactant-Combined Catalyst

- (HLASC) for Reaction in Aqueous Media. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2013**, *1* (8), 1015-1023.
- 76.** Carlson, E. Natural Products as Chemical Probes. *ACS Chem. Biol.*, **2010**, *5* (7), 639-653.
- 77.** Rodriguez, C.; Echevarria, A. An efficient and fast synthesis of 4-aryl-3,4-dihydrocoumarins by $(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3\text{Y}$ catalysis under microwave irradiation. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 4505-4508.
- 78.** Zhang, K.; Ding, W.; Sunb, J.; Zhang, B.; Lu, F.; Lai, R.; Zou, Y.; Yedid, G. Antioxidant and antitumor activities of 4-arylcoumarins and 4-aryl-3,4-dihydrocoumarins. *Biochimie*, **2014**, 1-8.
- 79.** Kamat, D.; Tilve, S.; Kamat, P. Solvent-free synthesis of 4-aryl-3,4-dihydrobenzopyran-2-ones via [3+3] cyclocoupling of phenols with cinnamic acid catalyzed by molecular iodine. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 4469-4472.
- 80.** Aoki, S; Amamoto, C.; Oyamada, J.; Kitamura, J. A convenient synthesis of dihydrocoumarins from phenols and cinnamic acid derivatives. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 9291-9297.
- 81.** Palaniappan, K.; Holley, R. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *140* (2-3), 164-168.
- 82.** Ündeğer, Ü.; Başaranb, A.; Degenc, G.; Başarana, N. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47* (8), 2037-2043.
- 83.** Ahmad, A.; Khan, A.; Yousuf, S.; Khan, L.; Manzoor, N. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. *Fitoterapia*, **2010**, *81* (8), 1157-1162.
- 84.** Stolle, A.; Szuppa, T.; Leonhardt, S.; Ondruschka, B. Ball milling in organic synthesis: solutions and challenges. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2317-2329.

- 85.** IUPAC Compendium of Chemical Technology (the “Gold Book”), ed. A. D. McNaught and A. Wilkinson, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 2nd ed., **1997**.
- 86.** Gérard, E.; Sahin, H.; Encinas, A.; Bräse, S. Systematic Study of a Solvent-Free Mechanochemically Induced Domino Oxa-Michael-Aldol Reaction in a Ball Mill. *Synlett*, **2008**, *17*, 2702-2704.
- 87.** Schneider, F.; Szuppa, T.; Stolle, A.; Ondruschka, B.; Hopf, H. Energetic assessment of the Suzuki–Miyaura reaction: a curtate life cycle assessment as an easily understandable and applicable tool for reaction optimization. *Green Chem.* **2009**, *11*, 1894-1899.
- 88.** Szuppa, T.; Stolle, A.; Ondruschka, B.; Hopfe, W. Solvent-free dehydrogenation of γ -terpinene in a ball mill: investigation of reaction parameters. *Green Chem.* **2010**, *12*, 1288-1294.
- 89.** Szuppa, T.; Stolle, A.; Ondruschka, B.; Hopfe, W. An Alternative Solvent-Free Synthesis of Nopinone under Ball-Milling Conditions: Investigation of Reaction Parameters. *ChemSusChem*, **2010**, *3*, 1181-1191.
- 90.** Rodríguez, B.; Bruckmann, A.; Bolm, C. A Highly Efficient Asymmetric Organocatalytic Aldol Reaction in a Ball Mill. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4710-4722.
- 91.** Qiu, W.; Hirotsu, T. A New Method to Prepare Maleic Anhydride Grafted Poly(propylene). *Macromol. Chem. Phys.* **2005**, *206*, 2470-2482.
- 92.** Fulmer, D.; Shearhouse, W.; Mendonza, S.; Mack, J. Solvent-free Sonogashira coupling reaction via high speed ball milling. *Green Chem.* **2009**, *11*, 1821-1825.
- 93.** Thorwirth, R.; Bernhardt, F.; Stolle, A.; Ondruschka, B.; Asghari, J. Switchable Selectivity during Oxidation of Anilines in a Ball Mill. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 13236-13242.
- 94.** Naimi, M.; Mokhtari, J.; Dekamin, M.; Kaupp, G. Sodium Tetraalkoxyborates: Intermediates for the Quantitative Reduction of Aldehydes and Ketones to

Alcohols through Ball Milling with NaBH₄. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *21*, 3567-3572.

- 95.** Kaupp, G. Waste-free synthesis and production all across chemistry with the benefit of self-assembled crystal packings. *J. Phys. Org. Chem.* **2008**, *21*, 630-643.
- 96.** Martins, M.; Frizzo, C.; Moreira, D.; Buriol, L.; Machado, P. Solvent-Free Heterocyclic Synthesis. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4140-4182.
- 97.** Wang, G.; Dong, Y.; Wu, P.; Yuan, Y.; Shen, B. Unexpected Solvent-Free Cycloadditions of 1,3-Cyclohexanediones to 1-(Pyridin-2-yl)-enones Mediated by Manganese(III) Acetate in a Ball Mill. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 7088-7095.
- 98.** Dong, Y.; Wang, G.; Wang, L. Solvent-free synthesis of naphthopyrans under Ball-milling conditions. *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 10148-10154.
- 99.** Mashkouri, S.; Naimi, M. Mechanochemical Solvent-Free and Catalyst-Free One-Pot Synthesis of Pyrano[2,3-d]Pyrimidine-2,4(1H,3H)-Diones with Quantitative Yields. *Molecules*, **2009**, *14*, 474-479.
- 100.** Reddy, T.; Reddy, A. Synthesis and fluorescence study of 6,7-diaminocoumarin and its imidazolo derivatives. *Dyes Pigment.* **2013**, *96*, 525-534.
- 101.** Jagdale, A.; Sudalai, A. *p*-Toluenesulfonic acid mediated hydroarylation of cinnamic acids with anisoles and phenols under metal and solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 4895-4898.
- 102.** Upadhyay, K.; Mishra, R.; Kumar, A. A Convenient Synthesis of Some Coumarin Derivatives using SnCl₂·2H₂O as Catalyst. *Catal Lett.* **2008**, *121*, 118-120.
- 103.** Reddy, B.; Thirupathi, B.; Patil, M. One-Pot Synthesis of Substituted Coumarins Catalyzed by Silica Gel Supported Sulfuric Acid Under Solvent-Free Conditions. *The Open Catalysis Journal*, **2009**, *2*, 33-39.
- 104.** Goswami, P. Dually Activated Organo- and Nano-cocatalyzed Synthesis of Coumarin Derivatives. *Synth. Commun.* **2009**, *39*, 2271-2278.

- 105.** Spectral Data Base For Organic Compounds, SDBS. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan. (**SDBS No. 10668**). [On line] http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi <Septiembre 19 de 2014>.
- 106.** Ortega, J.; Blanco, M. Identificación de compuestos orgánicos por Espectroscopia Infrarroja. España. Laboratorio central de estructuras y materiales: **1982**. pp. 33, 50, 65.
- 107.** Merchán, D.; Kouznetsov, V. Diastereoselective Synthesis of Dihydroisoindolo[2,1-a]quinolin-11-ones by Solvent-Free AMCell-SO₃H catalyzed Imino Diels-Alder/Intramolecular Amide Cyclization Cascade Reactions. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 5327-5333.
- 108.** Grandberg, I.; Denisov, L.; Popova, O. 7-Aminocoumarins (Review). *Plenum Publishing Corporation*, **1987**, 117-142.
- 109.** Pechmann, H.; Schwarz, O. Studien über Cumarine. III. Ueber das p-Amido-β-methylcumarin. *Chem. Ber.* **1899**, *32*, 3696-3699.
- 110.** Woods, L.; Fooladi, M. Nitrogen analogs of coumarin: 7-amino-4-substituted carbostyrils. *J. Chem. Eng. Data.* **1968**, *13*(3), 440-442.
- 111.** Atkins, R.; Bliss, D. Substituted coumarins and azacoumarins. Synthesis and fluorescent properties. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*(10), 1975-1980.
- 112.** Prikl, Y.; Fisar, C. Czechoslovak Patent No. 180246; *Chem. Abstr.* **1980**, *93* (3), 26279.
- 113.** Escobar, G. Capítulo 4: Grupos Protectores. Curso de Síntesis Orgánica, Universidad de Antioquia. **2014**. pp. 93-96. [On line]: http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/file.php/465/Archivos_del_curso/CAPITULO_4._GRUPOS_PROTECTORES.pdf <Septiembre 24 de 2014>.
- 114.** Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. Organic Chemistry. Oxford University Press, 1a. Ed. New York: **2001**. p.p. 285
- 115.** Crews, P.; Rodríguez, J.; Jaspars, M. Organic Structure Analysis. Oxford University Press, 1a. Ed. New York: **1998**. p.p. 62, 242-246,

116. Calderón, J.; Avendaño, R. Espectroscopía Infrarroja. Ed. Alhambra, S.A. **1979**: España. pp. 140-141.
117. Wang, G. Mechanochemical Organic Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7668-7700.
118. Stolle, A. Ball milling for organic synthesis: A tool for process intensification with regard to energy efficiency and economy of scale. *Sustainable Coatings Conference*. Friedrich-Schiller-Universität Jena, Duesseldorf, Germany, June 18-19, **2013**.
119. Sykes, P. Mecanismos de reacción en Química Orgánica. Ed. Reverté, S.A. España: **1995**. pp. 148-154.
120. Stashenko, E. E. Espectrometría de Masas: interpretación de espectros de masas. CIBIMOL-CENIVAM UIS. Bucaramanga: **2010**.
121. Breitmaier, E. Structure elucidation by NMR in Organic Chemistry: a practical guide. John Wiley & Sons, England: **2002**, 48-50.
122. Nauwelaerts, K.; Lescrinier, E.; Sclap, G.; Herdewijn, P. Cyclohexenyl nucleic acids: conformationally flexible oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, **2005**, *33* (8), 2452-2463.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, A.; Khan, A.; Yousuf, S.; Khan, L.; Manzoor, N. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. *Fitoterapia*, **2010**, *81* (8), 1157-1162.
- Aoki, S; Amamoto, C.; Oyamada, J.; Kitamura, J. A convenient synthesis of dihydrocoumarins from phenols and cinnamic acid derivatives. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 9291-9297.
- Apseloff, G.; Hilliard, J. B.; Gerber, N.; Mays, D. C. Inhibition and induction of drug metabolism by psoralens: Alterations in duration of sleep induced by hexobarbital and in clearance of caffeine and hexobarbital in mice. *Xenobiotica*. **1991**, *21*(11), 1461-1471.
- Atkins, R.; Bliss, D. Substituted coumarins and azacoumarins. Synthesis and fluorescent properties. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*(10), 1975-1980.
- Barker, N.; Hines, E.; Kvale, W.; Allen, E. Dicumarol: Its action, clinical use and effectiveness as an anticoagulant drug. *Am. J. Med.* **1947**, *3*(5), 634-642.
- Barreiro-Arcos, M. L.; Cremaschi, G.; Werner, S.; Coussio, J.; Ferraro, G.; Anesini, C. *Tilia cordata* Mill. extracts and scopoletin (isolated compound): differential cell growth effects on lymphocytes. *Phytother. Res.* **2006**, *20*(1), 34-40.
- Bashir, S.; Alam, M.; Adhikari, B.; Shrestha, R.; Yousuf, S.; Ahmadd, B.; Parveen, S.; Amana, A.; Choudhary, I. New antileishmanial sesquiterpene coumarins from *Ferula narthex* Boiss. *Phytochem. Lett.* **2014**, *9*, 46-50.
- Bedoya, L.; Beltrán, M.; Olmedo, D. 4-Phenylcoumarins as HIV transcription inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4447-4450.
- Belluti, F.; Fontana, G.; Bo, L. D.; Carenini, N.; Giommarelli, C.; Zunino, F. Design, synthesis and anticancer activities of stilbene-coumarin hybrid compounds: Identification of novel proapoptotic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3543-3550.

- Bocca, C.; Ludovica, G.; Miglietta, A. Cytoskeleton-interacting activity of Geiparvarin, diethylstilbestrol and conjugates. *Chem.-Biol. Interact.* **2001**, *137*, 285-305.
- Borges, F.; Roleira, F.; Milhazes, N.; Santana, L and Uriarte, E. Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 887-916.
- Bose, D.; Rudradas, A.; Babu, M. The indium(III) chloride-catalyzed von Pechmann reaction: a simple and effective procedure for the synthesis of 4-substituted coumarins. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 9195-9197.
- Breitmaier, E. Structure elucidation by NMR in Organic Chemistry: a practical guide. John Wiley & Sons, England: **2002**, 48-50.
- Calderón, J.; Avendaño, R. Espectroscopía Infrarroja. Ed. Alhambra, S.A. **1979**: España. pp. 140-141.
- Carlson, E. Natural Products as Chemical Probes. *ACS Chem. Biol.*, **2010**, *5* (7), 639-653.
- Catto, M.; Pisani, L.; Leonetti, F.; Nicolotti, O.; Pesce, P.; Stefanachi, A.; Cellamare, S.; Carotti, A. Design, synthesis and biological evaluation of coumarin alkylamines as potent and selective dual binding site inhibitors of acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 146-152.
- Charles, E.; Copeland, MD.; Cheryl, K. Six, D.O. A tale of two anticoagulants: Warfarin and Heparin. *J. Surg. Educ.* **2009**, *66*(3), 116-181.
- Chen, Y.; Kong, L. D.; Xia, X.; Kung, H. F.; Zhang, L. Behavioral and biochemical studies of total furocoumarins from seeds of *Psoralea corylifolia* in the forced swimming test in mice. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *96* (3), 451-459.
- Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. Organic Chemistry. Oxford University Press, 1a. Ed. New York: **2001**. p.p. 285
- Crews, P.; Rodríguez, J.; Jaspars, M. Organic Structure Analysis. Oxford University Press, 1a. Ed. New York: **1998**. p.p. 62, 242-246,

- Dong, Y.; Wang, G.; Wang, L. Solvent-free synthesis of naphthopyrans under Ball-milling conditions. *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 10148-10154.
- Escobar, G. Capítulo 4: Grupos Protectores. Curso de Síntesis Orgánica, Universidad de Antioquia. **2014**. pp. 93-96. [On line]: http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/file.php/465/Archivos_del_curso/CAPITULO_4._GRUPOS_PROTECTORES.pdf <Septiembre 24 de 2014>.
- Fallarero, A.; Oinonen, P.; Gupta, S.; Blom, P.; Galkin, A.; Mohan, C.; Vuorela, P. Inhibition of acetylcholinesterase by coumarins: The case of coumarin 106. *Pharmacol. Res.* **2008**, *58*, 215-221.
- Firouzabadi, H.; Iranpoor, N.; Khoshnood, A. Aluminum tris (dodecyl sulfate) trihydrate Al(DS)₃·3H₂O as an efficient Lewis acid-surfactant-combined catalyst for organic reactions in water: Efficient conversion of epoxides to thiiranes and to amino alcohols at room temperature. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2007**, *274* (1-2), 109-115.
- Frere, S.; Thiery, V.; Besson, T. Microwave acceleration of the Pechmann reaction on graphite/montmorillonite K10: application to the preparation of 4-substituted 7-aminocoumarins. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2791-2794.
- Fulmer, D.; Shearhouse, W.; Mendonza, S.; Mack, J. Solvent-free Sonogashira coupling reaction via high speed ball milling. *Green Chem.* **2009**, *11*, 1821-1825.
- Fylaktakidou, K. C.; Hadjipavlou-Litina, D. J.; Litinas, K. E.; Nicolaidis, D. N. Natural and Synthetic Coumarin Derivatives with Anti-Inflammatory/Antioxidant Activities. *Curr. Pharm. Design.* **2004**, *10*(30), 3813-3833.
- Gérard, E.; Sahin, H.; Encinas, A.; Bräse, S. Systematic Study of a Solvent-Free Mechanochemically Induced Domino Oxa-Michael-Aldol Reaction in a Ball Mill. *Synlett*, **2008**, *17*, 2702-2704.
- Ghate, M.; Kusanur, R. A.; Kulkarni, M. V. Synthesis and in vivo analgesic and anti-inflammatory activity of some bi heterocyclic coumarin derivative. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 882-887.

- Gibbs, R.; De, S. An efficient and practical procedure for the synthesis of 4-substituted coumarins. *Synthesis*, **2005**, 8, 1231-1233.
- Gilbert, D.; Colton, C. Reactive Oxygen Species in Biological Systems: an interdisciplinary approach. 1a. Ed. Kluwer Academic Publishers. USA, **2002**, 33-36.
- Goswami, P. Dually Activated Organo- and Nano-cocatalyzed Synthesis of Coumarin Derivatives. *Synth. Commun.* **2009**, 39, 2271-2278.
- Grandberg, I.; Denisov, L.; Popova, O. 7-Aminocoumarins (Review). *Plenum Publishing Corporation*, **1987**, 117-142.
- Gunnewegh, E.; Hoefnagel, A.; Bekkum, H. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1995**, 100, 87-92.
- Heravi, M.; Khaghaninejad, S.; Mostofi, M. Chapter One - Pechmann Reaction in the Synthesis of Coumarin Derivatives. *Adv. Heterocycl. Chem.*, **2014**, 112, 1-50.
- Hiroshi, K.; Koichi, H. Identification and structure-activity relationship studies of osthol, a cytotoxic principle from *Cnidium monnieri*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 1791-1794.
- Holmes, O.; Pathak, Jr.; Fitzpatrick, T. The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. *J. Photobiol. B-Biol.* **1992**, 14(1-2), 3-22.
- Howes, M.; Perry, N.; Houghton, P. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phytotherapy Res.* **2003**, 17, 1-18.
- IUPAC Compendium of Chemical Technology (the "Gold Book"), ed. A. D. McNaught and A. Wilkinson, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 2nd ed., **1997**.
- IUPAC, Nomenclature of Organic Chemistry, Pergamon Press, **1979**.
- Jagdale, A.; Sudalai, A. *p*-Toluenesulfonic acid mediated hydroarylation of cinnamic acids with anisoles and phenols under metal and solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 4895-4898.

- Jie, J. Name Reactions. A collection of detailed reaction mechanisms. 3a Ed. Alemania. Springer: **2006**. pp. 452-453.
- Kai, K.; Shimizu, B.; Mizutani, M.; Watanabe, K.; Sakata, K. Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*. **2006**, *67*, 379-386.
- Kamat, D.; Tilve, S.; Kamat, P. Solvent-free synthesis of 4-aryl-3,4-dihydrobenzopyran-2-ones via [3+3] cyclocoupling of phenols with cinnamic acid catalyzed by molecular iodine. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 4469-4472.
- Karimi, B.; Behzadnia, H. Periodic mesoporous silica chloride (PMSCI) as an efficient and recyclable catalyst for the Pechmann reaction. *Catal. Commun.* **2011**, *12*, 1432-1436.
- Karimi, B.; Zareyee, D. Design of a Highly Efficient and Water-Tolerant Sulfonic Acid Nanoreactor Based on Tunable Ordered Porous Silica for the von Pechmann Reaction. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3989-3992.
- Kaupp, G. Waste-free synthesis and production all across chemistry with the benefit of self-assembled crystal packings. *J. Phys. Org. Chem.* **2008**, *21*, 630-643.
- Khalafi, A.; Haghghi, S.; Panahi, F. Nano-TiO₂ on Dodecyl-Sulfated Silica: As an Efficient Heterogeneous Lewis Acid-Surfactant-Combined Catalyst (HLASC) for Reaction in Aqueous Media. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2013**, *1* (8), 1015-1023.
- Knaggs, A. The biosynthesis of shikimate metabolites." *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 119-136.
- Kostova, I.; Bhatia, S.; Grigorov, P.; Balkansky, S.; Parmar, V. S.; Prasad, A. K.; Saso, L. Coumarins as Antioxidants. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 3929-3951.
- Kotharkar, S.; Bahekarb, S.; Shinde, D. Chlorosulfonic acid-catalysed one-pot synthesis of coumarin. *Mendeleev Commun.* **2006**, *16*, 241-242.
- Kresge, N.; Simoni, R.D.; Hill, R.L. Hemorrhagic sweet clover disease, Dicumarol and warfarin: the work of Karl Paul Link. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280-285.

- Kumar, R.; Saha, A.; Saha, D. A new antifungal coumarin from *Clausena excavata*. *Fitoterapia*. **2012**, *83*, 230-233.
- Laufer, M.; Hausmann, H.; Hölderich, W. Synthesis of 7-hydroxycoumarins by Pechmann reaction using Nafion resin/silica nanocomposites as catalysts. *J. Catal.* **2003**, *218*, 315-320.
- Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food. Chem.* **2011**, *125*, 288-306.
- Mahajan, D. H.; Pannecouque, C.; Clercq, E. D.; Chikhaliya, K. H. Synthesis and Studies of New 2-(Coumarin-4-yloxy)-4,6-(substituted)-s-Triazine Derivatives as Potential Anti-HIV Agents. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2009**, *342*, 281-290.
- Manabe, K.; Iimura, S.; Sun, X.-M.; Kobayashi, S. Dehydration reactions in water. Brønsted acid-surfactant-combined catalyst for ester, ether, thioether, and dithioacetal formation in water. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (40), 11971-11978.
- Manhas, M.; Ganguly, N.; Mukherjee, S.; Jain, A.; Bose, A. Microwave initiated reactions: Pechmann coumarin synthesis, Biginelli reaction, and acylation. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2423-2425.
- Martins, M.; Frizzo, C.; Moreira, D.; Buriol, L.; Machado, P. Solvent-Free Heterocyclic Synthesis. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4140-4182.
- Mashkouri, S.; Naimi, M. Mechanochemical Solvent-Free and Catalyst-Free One-Pot Synthesis of Pyrano[2,3-d]Pyrimidine-2,4(1H,3H)-Diones with Quantitative Yields. *Molecules*, **2009**, *14*, 474-479.
- Melagraki, G.; Afantitis, A.; Igglessi, M. O.; Detsi, A.; Koufaki, M.; Kontogiorgis, C.; Hadjipavlou, L. D. Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activity of novel coumarin-3-aminoamides and their alpha-lipoic acid adducts. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3020-3026.

- Meotti, F. C.; Ardenghi, J. V.; Pretto, J. B.; Souza, M. Antinociceptive properties of coumarins, steroid and dihydrostyryl-2-pyrone from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **2006**, *58*(1), 107-112.
- Merchán, D.; Kouznetsov, V. Diastereoselective Synthesis of Dihydroisoindolo[2,1-a]quinolin-11-ones by Solvent-Free AMCell-SO₃H catalyzed Imino Diels-Alder/Intramolecular Amide Cyclization Cascade Reactions. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 5327-5333.
- Morison, W. Recent advances in phototherapy and photochemotherapy of skin disease. *J. Dermatol. Sci.* **1990**, *1*, 141-147.
- Muchchintala, M.; Vidavalur, S.; Guri, L.; Yerra, K. A solvent-free synthesis of coumarins via Pechmann condensation using heterogeneous catalyst. *J. Mol. Catal. A-Chem.* **2006**, *255*, 49-52.
- Murray, R. D. H.; Mendez, J.; Brown, S. A. *The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry*; Wiley: New York, **1982**.
- Naimi, M.; Mokhtari, J.; Dekamin, M.; Kaupp, G. Sodium Tetraalkoxyborates: Intermediates for the Quantitative Reduction of Aldehydes and Ketones to Alcohols through Ball Milling with NaBH₄. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *21*, 3567-3572.
- Nauwelaerts, K.; Lescrier, E.; Sclep, G.; Herdewijn, P. Cyclohexenyl nucleic acids: conformationally flexible oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, **2005**, *33* (8), 2452-2463.
- Ortega, J.; Blanco, M. Identificación de compuestos orgánicos por Espectroscopia Infrarroja. España. Laboratorio central de estructuras y materiales: **1982**. pp. 33, 50, 65.
- Palaniappan, K.; Holley, R. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *140* (2-3), 164-168.

- Payá, M.; Halliwell, B.; Hoult, JR. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species: Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochem. Pharmacol.* **1992**; *44(2)*, 205-214.
- Pechmann, H.; Duisberg, C. H. v. Pechmann: Neue Bildungsweise der Cumarine. Synthese des Daphnetins. I. *Chem. Ber.* **1884**, *17*, 929-936.
- Pechmann, H.; Schwarz, O. Studien über Cumarine. III. Ueber das p -Amido- β -methylcumarin. *Chem. Ber.* **1899**, *32*, 3696-3699.
- Perez-Cruz, F.; Vazquez-Rodriguez, S.; Matos, M. J.; Herrera-Morales, A.; Villamena, F. A.; Das, A.; Gopalakrishnan, V.; Olea-Azar, C.; Santana, L.; Uriarte, E. Synthesis and Electrochemical and Biological Studies of Novel Coumarin–Chalcone Hybrid Compounds. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6136-6145.
- Potdar, M.; Mohile, S.; Salunkhe, M. Coumarin syntheses via Pechmann condensation in Lewis acidic chloroaluminate ionic liquid. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 9285-9287.
- Prikl, Y.; Fisar, C. Czechoslovak Patent No. 180246; Chem. Abstr. **1980**, *93(3)*, 26279.
- Qiu, W.; Hirotsu, T. A New Method to Prepare Maleic Anhydride Grafted Poly(propylene). *Macromol. Chem. Phys.* **2005**, *206*, 2470-2482.
- Reddy, B.; Thirupathi, B.; Patil, M. One-Pot Synthesis of Substituted Coumarins Catalyzed by Silica Gel Supported Sulfuric Acid Under Solvent-Free Conditions. *The Open Catalysis Journal*, **2009**, *2*, 33-39.
- Reddy, T.; Reddy, A. Synthesis and fluorescence study of 6,7-diaminocoumarin and its imidazolo derivatives. *Dyes Pigment.* **2013**, *96*, 525-534.
- Robertson, W.F.; Sandrocik, C.B.; Hendry, J. Hydroxy-carbonyl compounds. Part V. The preparation of coumarins and 1:4-pyrones from phenol, p -cresol, quinol, and α -naphthol. *J. Chem. Soc.* **1931**, 2426-2432.

- Rodriguez, C.; Echevarria, A. An efficient and fast synthesis of 4-aryl-3,4-dihydrocoumarins by $(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3\text{Y}$ catalysis under microwave irradiation. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 4505-4508.
- Rodríguez, B.; Bruckmann, A.; Bolm, C. A Highly Efficient Asymmetric Organocatalytic Aldol Reaction in a Ball Mill. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4710-4722.
- Romanelli, G.; Bennardi, D.; Ruiz, D.; Baronetti, G.; Thomas, H.; Autino, J.; *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 8935-8939.
- Sandhu, S.; Bansal, Y.; Silakari, O.; Bansal, G. Coumarin hybrids as novel therapeutic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 3806-3814.
- Sashidhara, K. V.; Kumar, M.; Modukuri, R. K.; Sonkar, R.; Bhatia, G.; Khanna, A. K.; Rai, S.; Shukla, R. Synthesis and anti-inflammatory activity of novel biscoumarin–chalcone hybrids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4480-4484.
- Schneider, F.; Szuppa, T.; Stolle, A.; Ondruschka, B.; Hopf, H. Energetic assessment of the Suzuki–Miyaura reaction: a curtate life cycle assessment as an easily understandable and applicable tool for reaction optimization. *Green Chem.* **2009**, *11*, 1894-1899.
- Sethna, S. M.; Shah, N. M.; Shah, R. C. Aluminium chloride, a new reagent for the condensation of β -ketonic esters with phenols. Part I. The condensations of methyl β -resorcyate, β -resorcylic acid, and resacetophenone with ethyl acetoacetate. *J. Chem. Soc.* **1938**, 228-232.
- Sharma, G.; Reddy, J.; Lakshmi, P.; Krishna, P. An efficient ZrCl_4 catalyzed one-pot solvent free protocol for the synthesis of 4-substituted coumarins. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6119-6121.
- Singh, P.; Singh, D.; Samant, S. Sulphamic acid - An efficient and cost-effective solid acid catalyst for the pechmann reaction. Sulphamic acid - An efficient and cost-effective solid acid catalyst for the pechmann reaction. *Synlett*, **2004**, 1909-1912.

- Sinhamahapatra, A.; Sutradhar, N.; Pahari, S.; Bajaj, H.; Panda, A. *Appl. Catal. A: Gen.* **2011**, *394*, 93-100.
- Smyth, T.; Ramachandran, V.; Smyth, W. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *Int J Antimicro Ag.* **2009**, *33*, 421-426.
- Song, H. Y.; Ngai, M. H.; Song, Z. Y.; MacAry, P. A.; Hopley, J.; Lear, M. Practical synthesis of maleimides and coumarin-linked probes for protein and antibody labelling via reduction of native disulfides. *J. Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3400-3406.
- Spectral Data Base For Organic Compounds, SDBS. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan. (**SDBS No. 10668**). [On line] http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi < Septiembre 19 de 2014 >.
- Stashenko, E. E. Espectrometría de Masas: interpretación de espectros de masas. CIBIMOL-CENIVAM UIS. Bucaramanga: **2010**.
- Stolle, A. Ball milling for organic synthesis: A tool for process intensification with regard to energy efficiency and economy of scale. *Sustainable Coatings Conference*. Friedrich-Schiller-Universität Jena, Duesseldorf, Germany, June 18-19, **2013**.
- Stolle, A.; Szuppa, T.; Leonhardt, S.; Ondruschka, B. Ball milling in organic synthesis: solutions and challenges. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2317-2329.
- Sundt, T.; Anderson, R. Intracellular brain pH and the pathway of a fat soluble pH indicator across the blood-brain barrier. *Brain Research.* **1980**, *186*, 355-364.
- Sykes, P. Mecanismos de reacción en Química Orgánica. Ed. Reverté, S.A. España: **1995**. pp. 148-154.
- Szuppa, T.; Stolle, A.; Ondruschka, B.; Hopfe, W. Solvent-free dehydrogenation of γ -terpinene in a ball mill: investigation of reaction parameters. *Green Chem.* **2010**, *12*, 1288-1294.

- Szuppa, T.; Stolle, A.; Ondruschka, B.; Hopfe, W. An Alternative Solvent-Free Synthesis of Nopinone under Ball-Milling Conditions: Investigation of Reaction Parameters. *ChemSusChem*, **2010**, 3, 1181-1191.
- Thorwirth, R.; Bernhardt, F.; Stolle, A.; Ondruschka, B.; Asghari, J. Switchable Selectivity during Oxidation of Anilines in a Ball Mill. *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 13236-13242.
- Tsay, S.; Hwu, J. R.; Singha, R.; Huang, W.; Chang, Y. H.; Hsu, M.; Shieh, F.; Lin, C.; Hwang, K. C.; Horng, J.; Clercq, E. D.; Vliegen, I.; Neyts, J. Coumarins hinged directly on benzimidazoles and their ribofuranosides to inhibit hepatitis C virus. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 63, 290-298.
- Tyagi, B.; Mishra, M.; Jasra, R. Synthesis of 7-substituted 4-methyl coumarins by Pechmann reaction using nano-crystalline sulfated-zirconia. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2007**, 276, 47-56.
- Ündeğer, Ü.; Başaranb, A.; Degenc, G.; Başarana, N. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, 47 (8), 2037-2043.
- Upadhyay, K.; Mishra, R.; Kumar, A. A Convenient Synthesis of Some Coumarin Derivatives using SnCl₂·2H₂O as Catalyst. *Catal Lett.* **2008**, 121, 118-120.
- Valizadeh, H.; Shockravi, A. An efficient procedure for the synthesis of coumarin derivatives using TiCl₄ as catalyst under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 3501-3503.
- Vilar, S.; Quezada, E.; Santana, L.; Uriarte, E.; Yanez, M.; Fraiz, N.; Alcaide, C.; Cano, E.; Orallo, F. Design, synthesis, and vasorelaxant and platelet antiaggregatory activities of coumarin–resveratrol hybrids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 257-261.
- Vilar, S.; Quezada, E.; Santana, L.; Uriarte, E.; Yanez, M.; Fraiz, N.; Alcaide, C.; Cano, E.; Orallo, F. Design, synthesis, and vasorelaxant and

platelet antiaggregatory activities of coumarin–resveratrol hybrids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 257-261.

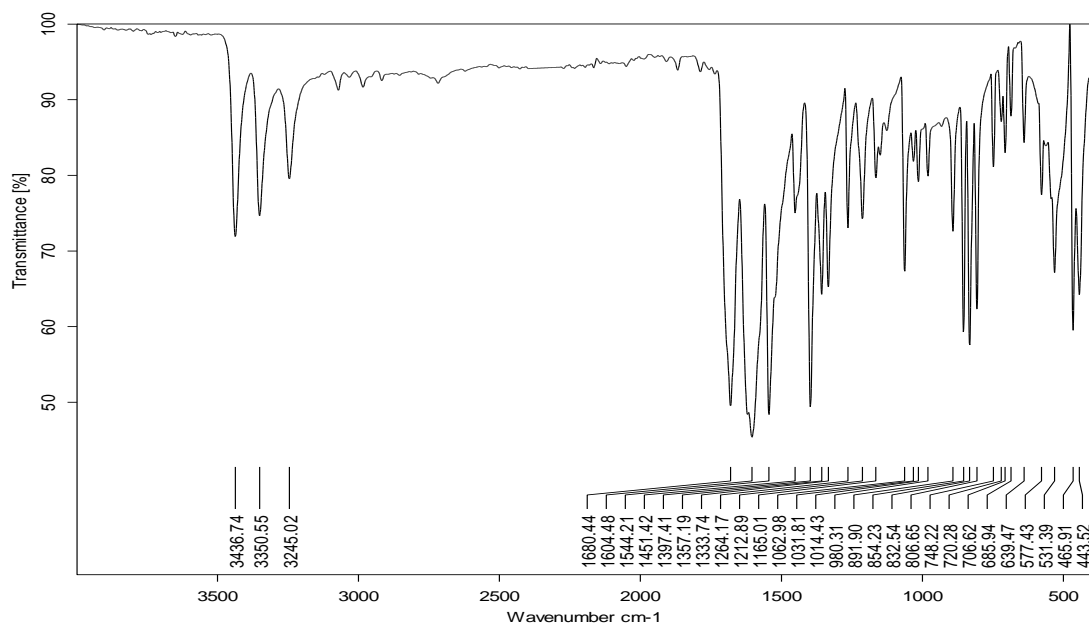
- Wang, G. Mechanochemical Organic Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7668-7700.
- Wang, G.; Dong, Y.; Wu, P.; Yuan, Y.; Shen, B. Unexpected Solvent-Free Cycloadditions of 1,3-Cyclohexanediones to 1-(Pyridin-2-yl)-enones Mediated by Manganese(III) Acetate in a Ball Mill. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 7088-7095.
- Winrow, V. R.; Winyard, P. G.; Morris, C. G.; Blake, D. R. Free radicals in inflammation: Second messengers and mediators of tissue destruction. *Br. Med. Bull.* **1993**, *49*, 506-522.
- Witaicenis, A.; Seito, L.; Stasi, L. Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Chem.-Biol. Interact.* **2010**, *186*, 211-218.
- Woods, L.; Fooladi, M. Nitrogen analogs of coumarin: 7-amino-4-substituted carbostyrils. *J. Chem. Eng. Data.* **1968**, *13*(3), 440-442.
- Woods, L.; Sapp, J. A new One-Step Synthesis of Substituted Coumarins *J. Org. Chem.* **1962**, *27*(10), 3703-3705.
- Wu, J. M.; Wang, Z. R.; Hseih, T. C.; Bruder, J. L.; Zou, J. G.; Huang, Y. Z. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2001**, *8*, 3-17.
- Wua, J.; Diaoa, T.; Suna, W.; Lia, Y. Expeditious Approach to Coumarins via Pechmann Reaction Catalyzed by Molecular Iodine or AgOTf. *Synth. Commun.* **2006**, *36*, 2949-2956.
- Xie, S.; Wang, X.; Li, J.; Yang, L.; Kong, L. Design, synthesis and evaluation of novel tacrine–coumarin hybrids as multifunctional cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *64*, 540-553.
- Yang, J.; Liu, G. Y.; Dai, F.; Cao, X. Y.; Kang, Y. F.; Hu, L. M.; Tang, J. J.; Li, X. Z.; Li, Y.; Jin, X. L.; Zhou, B. Synthesis and biological evaluation of

hydroxylated 3-phenylcoumarins as antioxidants and antiproliferative agents *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6420-6425.

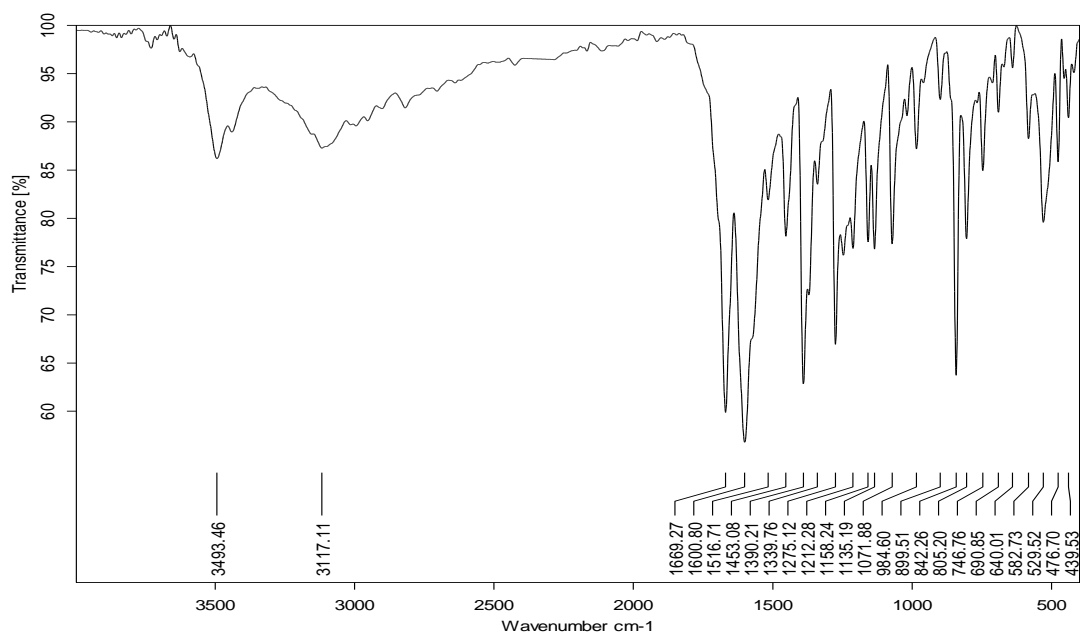
- Zareyee, D.; Serehneh, M. Recyclable CMK-5 supported sulfonic acid as an environmentally benign catalyst for solvent-free one-pot construction of coumarin through Pechmann condensation. *J. Mol. Catal. A-Chem.* **2014**, *391*, 88-91.
- Zhang, K.; Ding, W.; Sunb, J.; Zhang, B.; Lu, F.; Lai, R.; Zou, Y.; Yedid, G. Antioxidant and antitumor activities of 4-arylcoumarins and 4-aryl-3,4-dihydrocoumarins. *Biochimie*, **2014**, 1-8.
- Zhang, Y.; Yanjun, C. Imperatorin prevents cardiac hypertrophy and the transition to heart failure via NO-dependent mechanisms in mice. *Fitoterapia*. **2010**, *81*, 1188-1195.
- Zhao, H.; Donnelly, A. C.; Kusuma, B. R.; Brandt, G. E. L.; Brown, D.; Rajewski, R. A.; Vielhauer, G.; Holzbeierlein, J.; Cohen, M. S.; Blagg, B. S. Engineering an Antibiotic to Fight Cancer: Optimization of the Novobiocin Scaffold to Produce Anti-proliferative Agents. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3839-3853.

ANEXOS

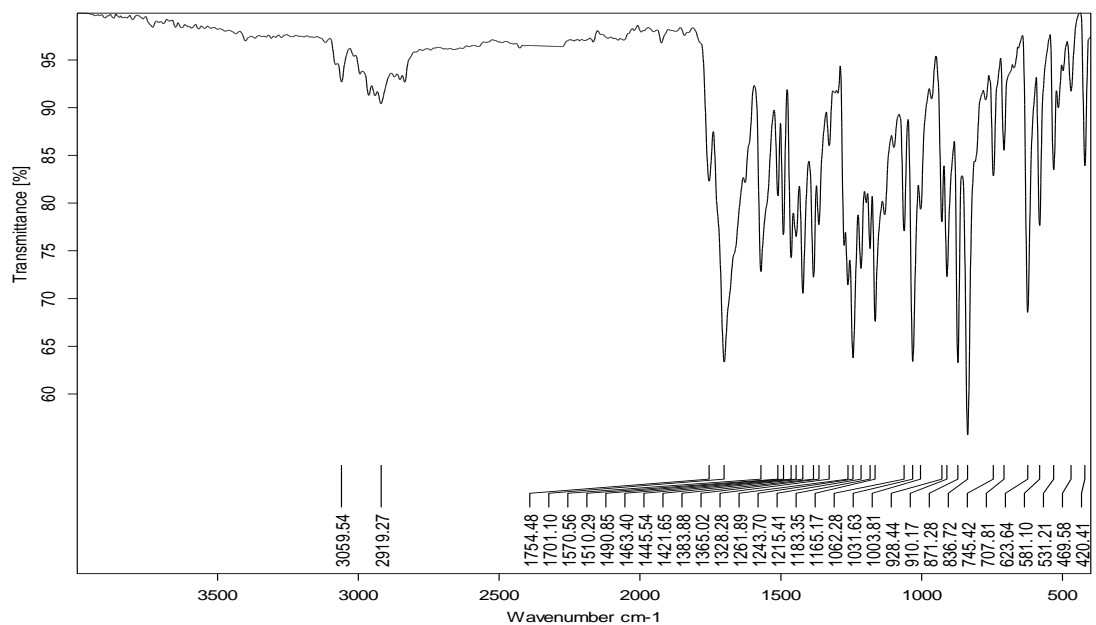
Anexo 1. Espectro IR de la 7-amino-4-metilcumarina **6a**.



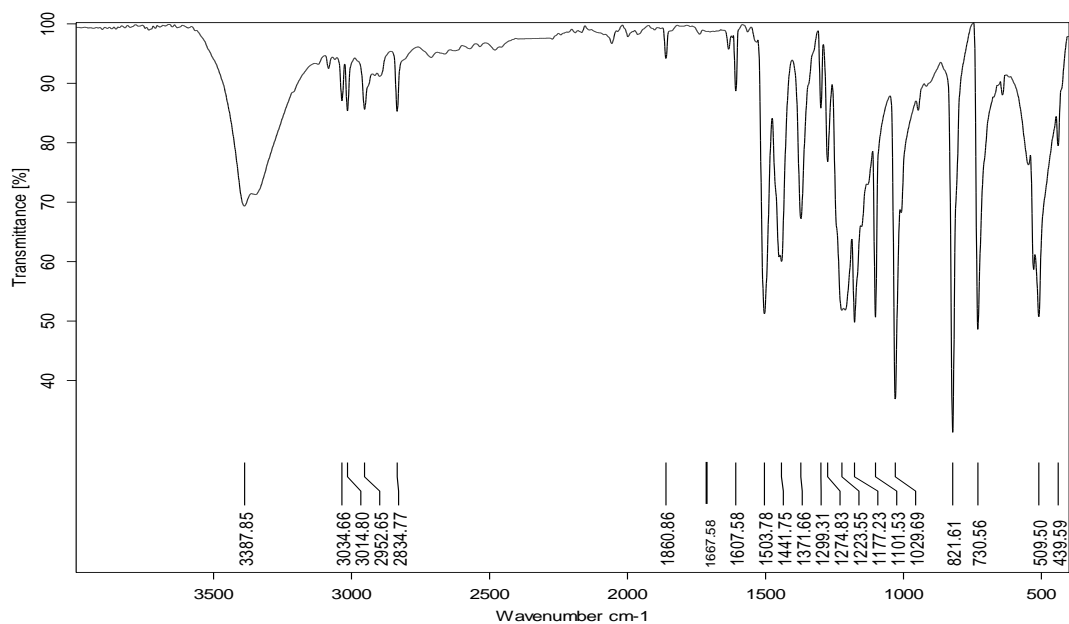
Anexo 2. Espectro IR de la 7-hidroxi-4-metilcumarina **6b**.



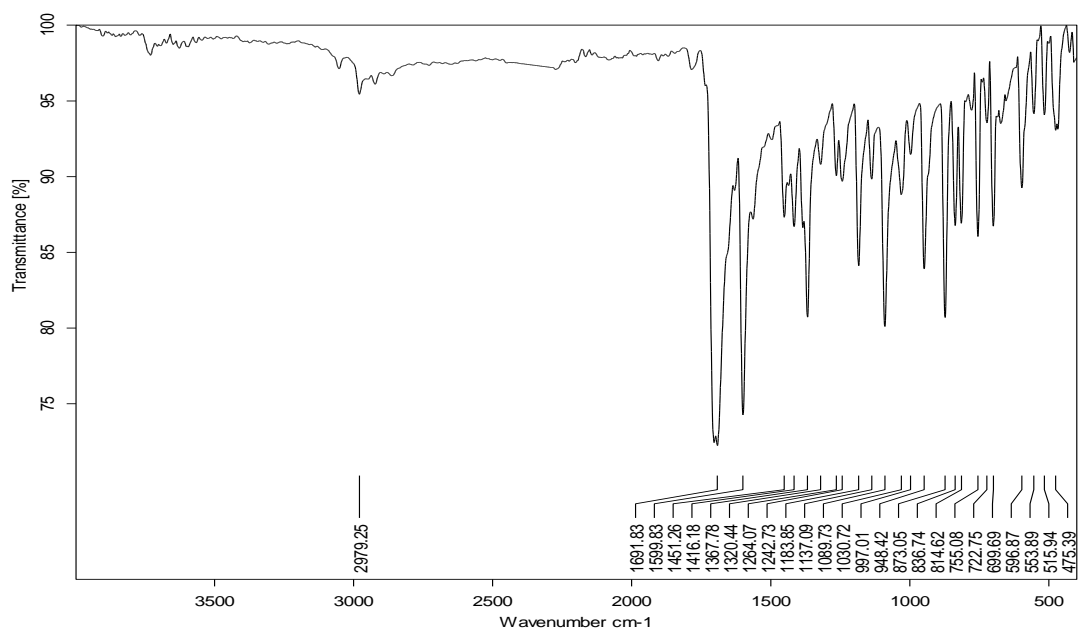
Anexo 3. Espectro IR de la 7-metoxi-4-metilcumarina **6c**.



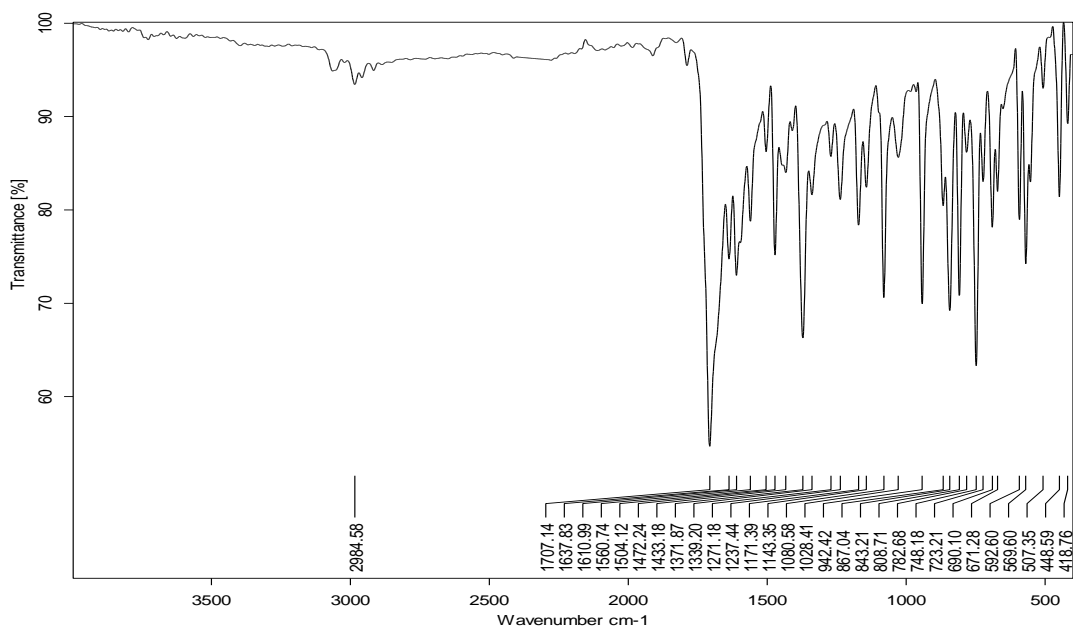
Anexo 4. Espectro IR de la 4-metilcumarina **6d**.



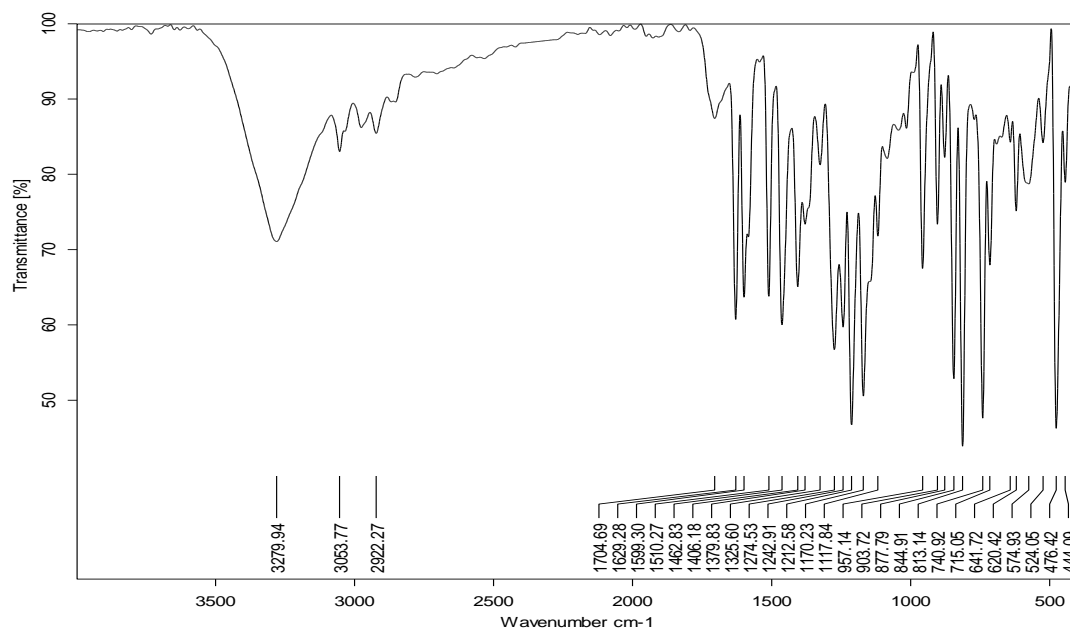
Anexo 5. Espectro IR de la 4,7,8-trimetilcumarina **6e**.



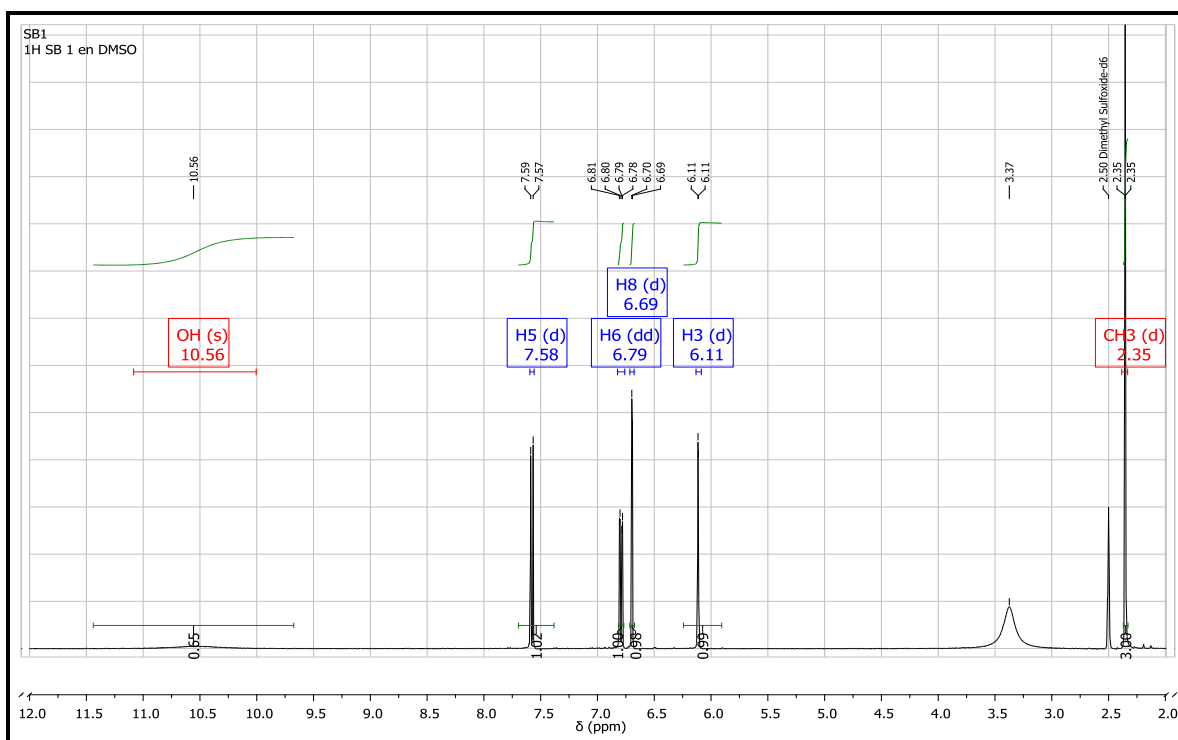
Anexo 6. Espectro IR de la 4-metil-2H-benzo[*h*]cromon-2-ona **6f**.



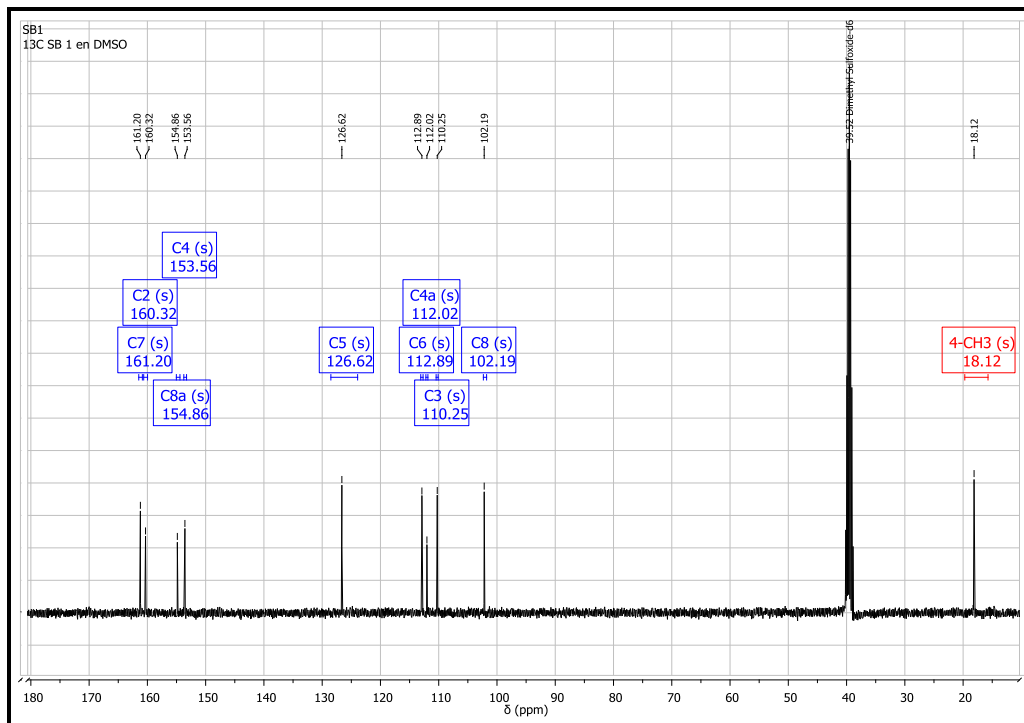
Anexo 7. Espectro IR de la 1-metil-3H-benzo[*f*]cromon-3-ona **6g**.



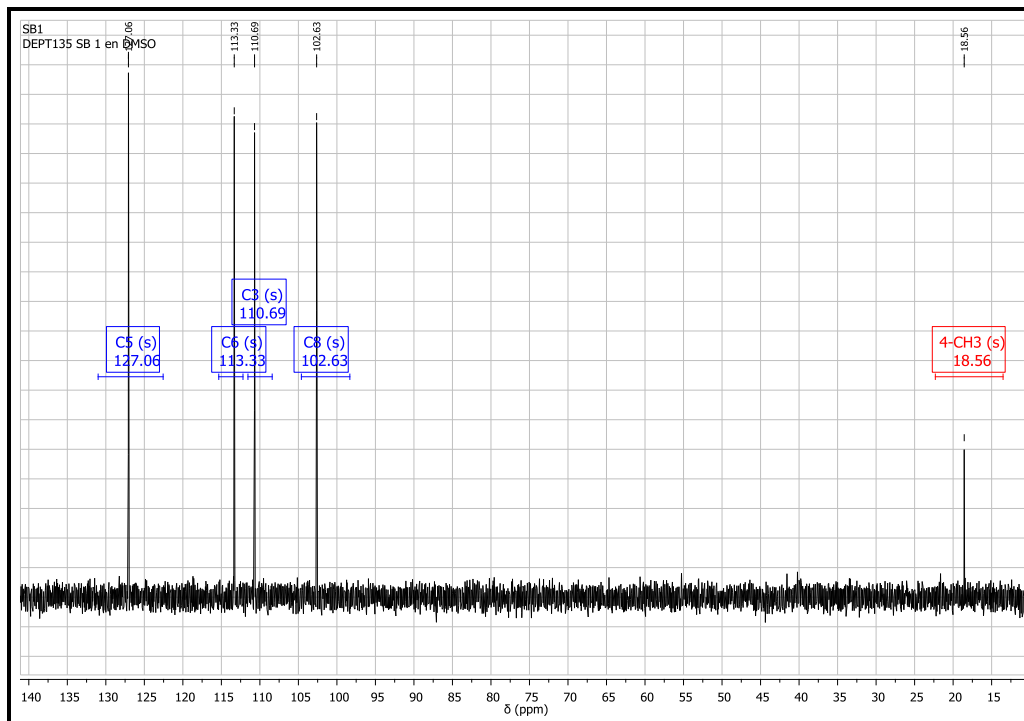
Anexo 8. Espectro RMN ¹H de la 7-hidroxi-4-metilcumarina **6b**.



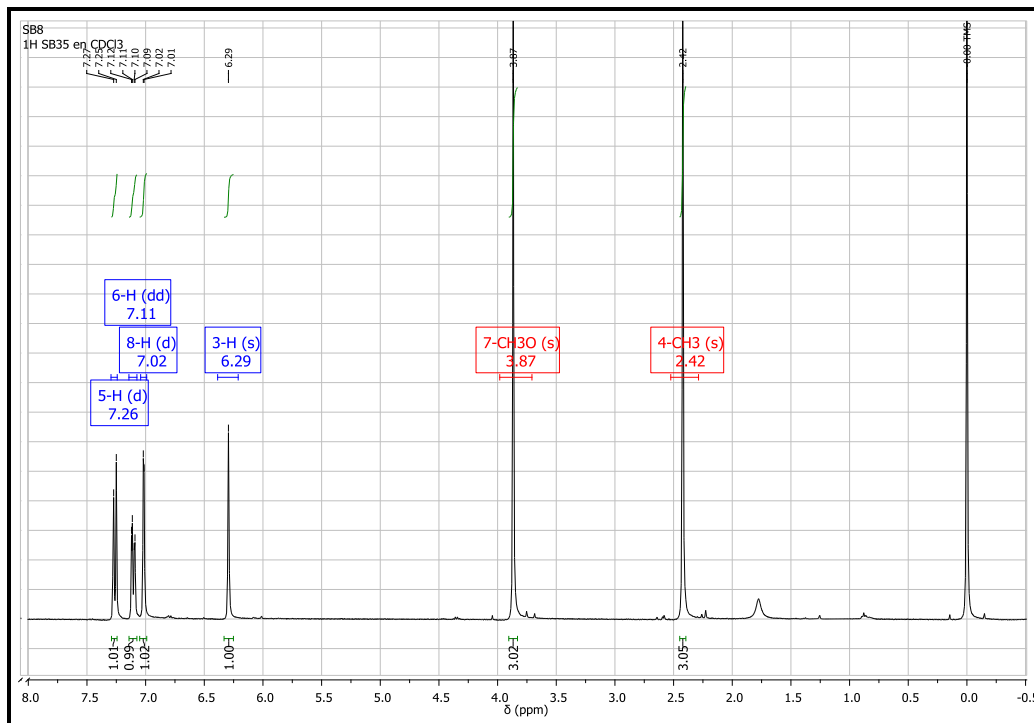
Anexo 9. Espectro RMN ^{13}C de la 7-hidroxi-4-metilcumarina **6b**.



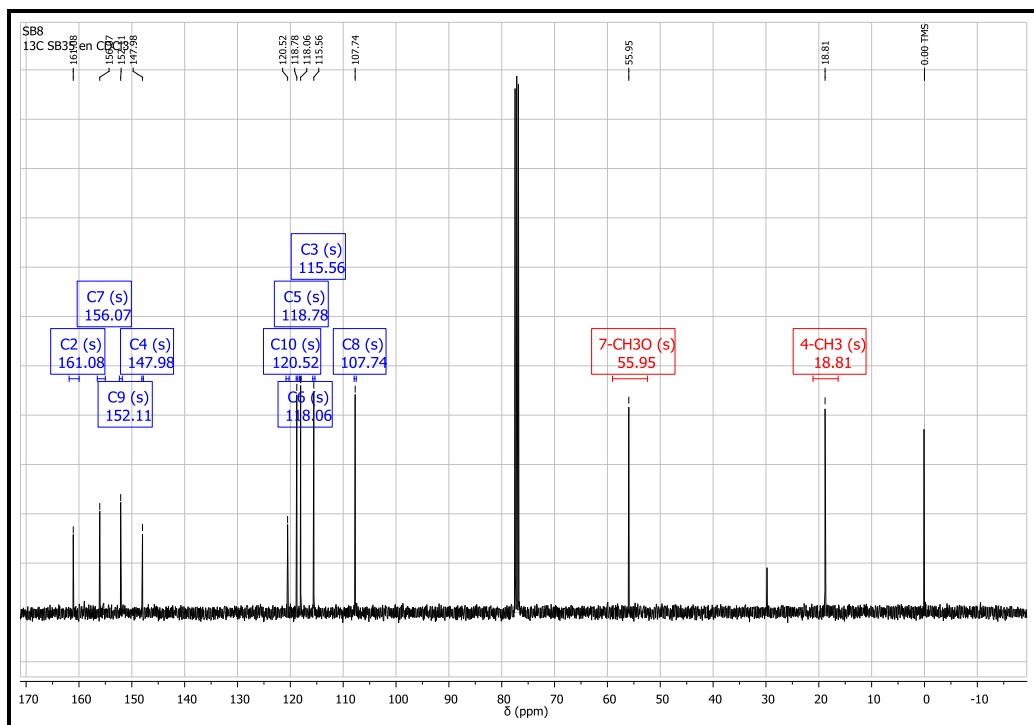
Anexo 10. Espectro RMN DEPT-135 de la 7-hidroxi-4-metilcumarina **6b**.



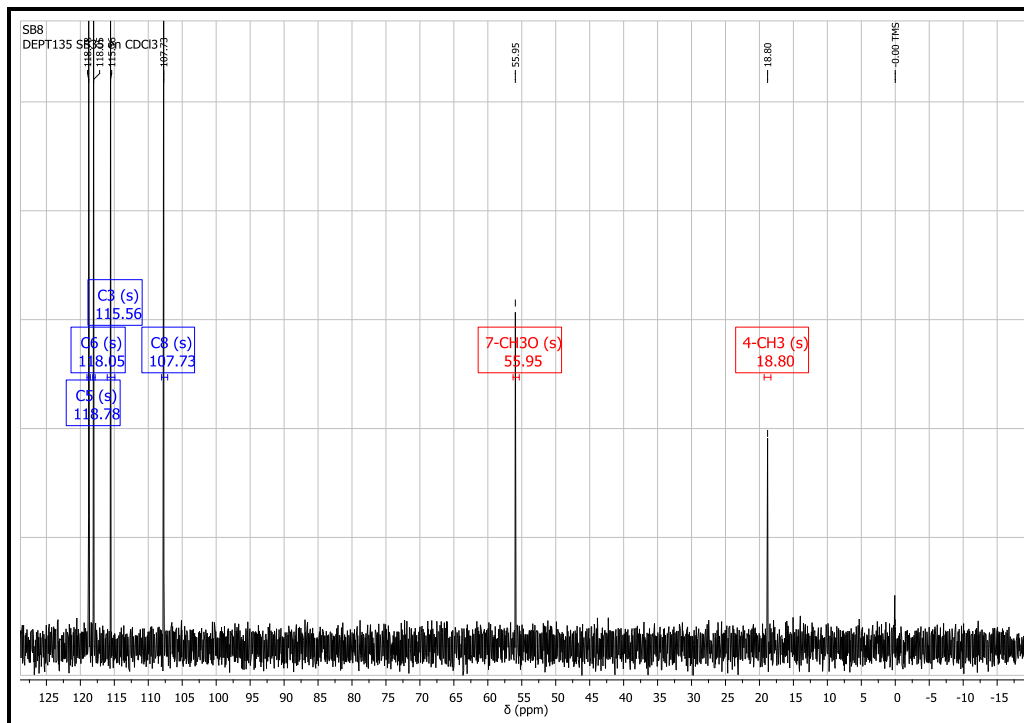
Anexo 11. Espectro RMN ^1H de la 7-metoxi-4-metilcumarina **6c**.



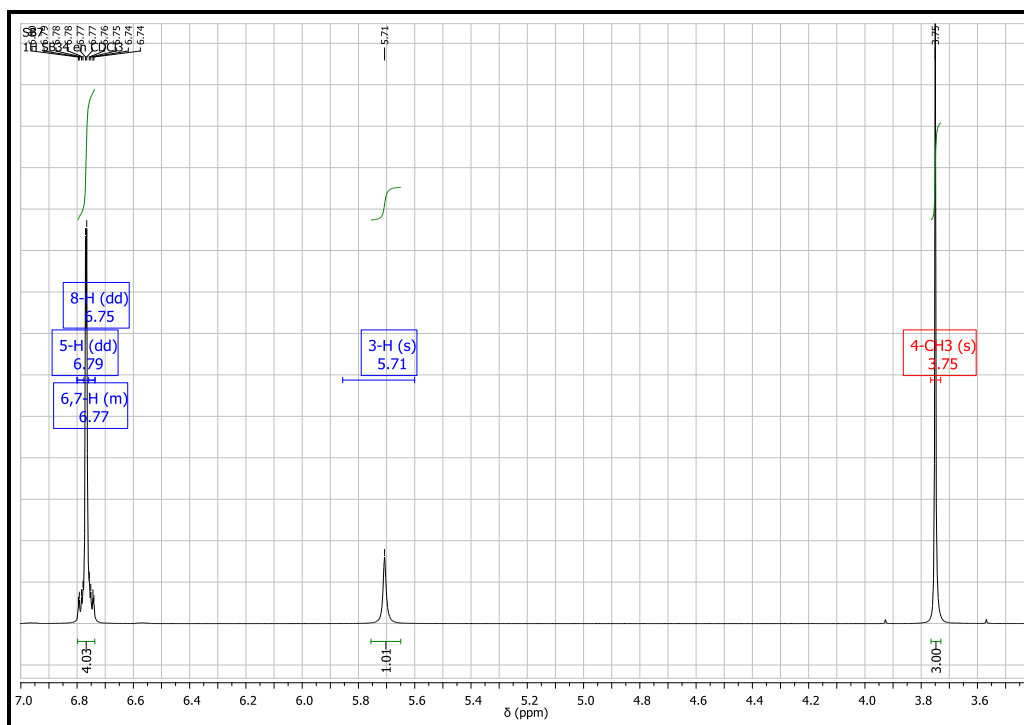
Anexo 12. Espectro RMN ^{13}C de la 7-metoxi-4-metilcumarina **6c**.



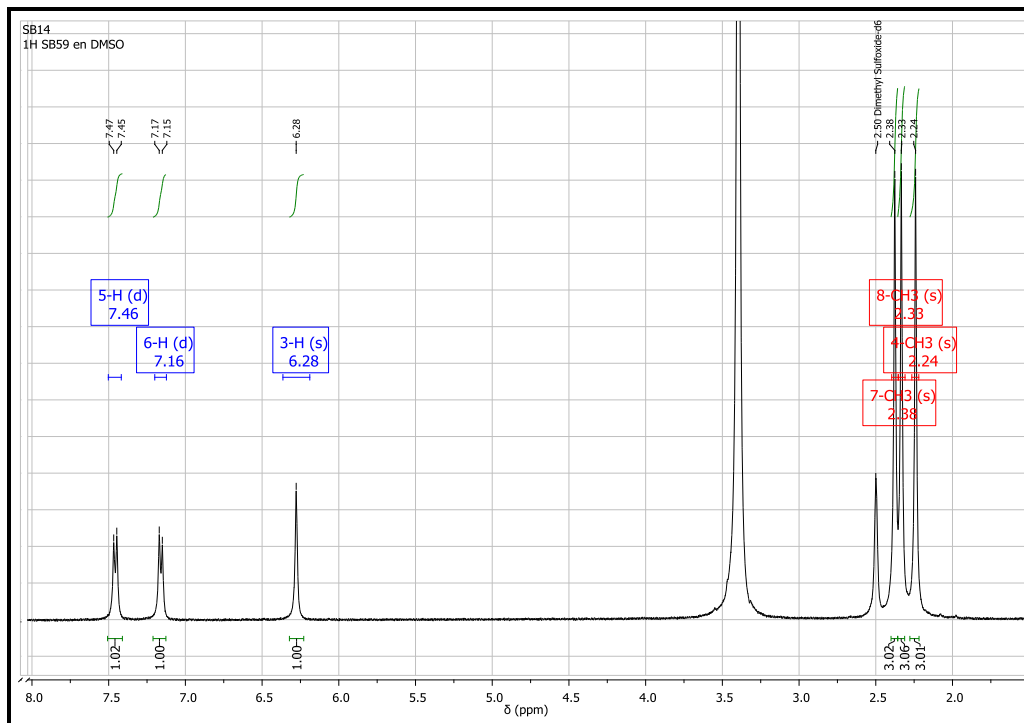
Anexo 13. Espectro RMN DEPT-135 de la 7-metoxi-4-metilcumarina **6c**.



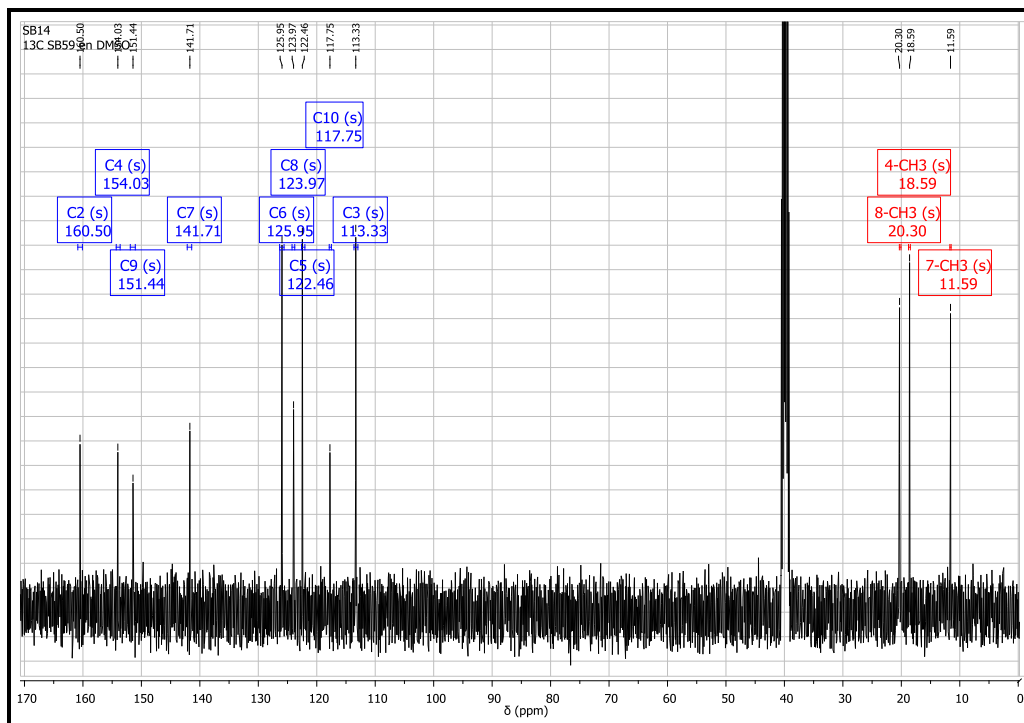
Anexo 14. Espectro RMN ^1H de la 4-metilcumarina **6d**.



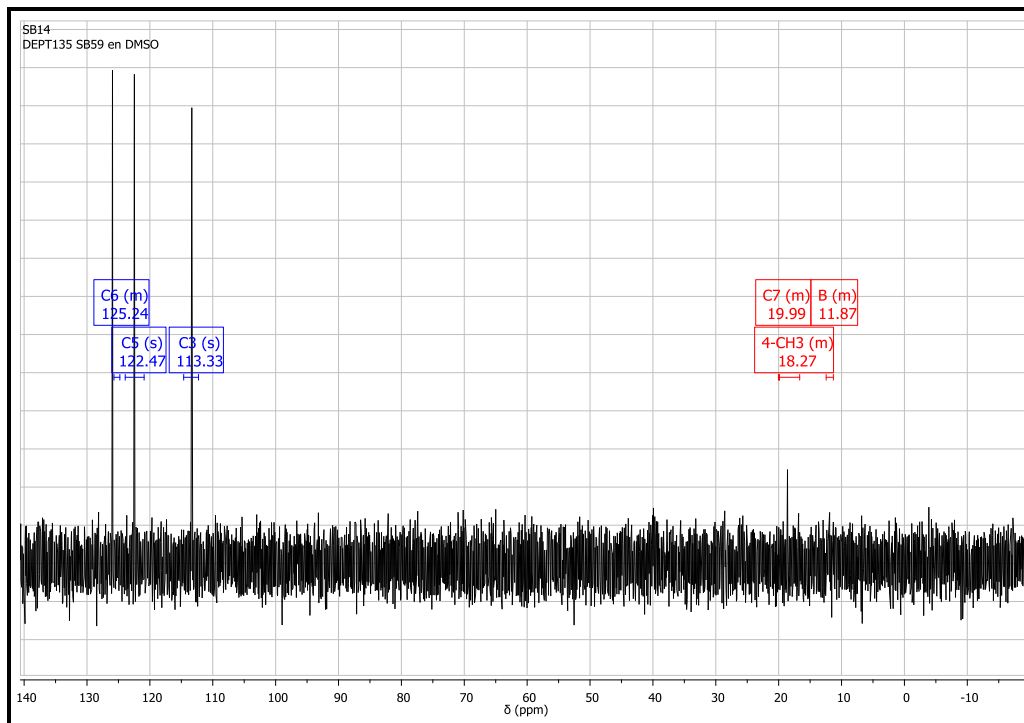
Anexo 15. Espectro RMN ^1H de la 4,7,8-trimetilcumarina **6e**.



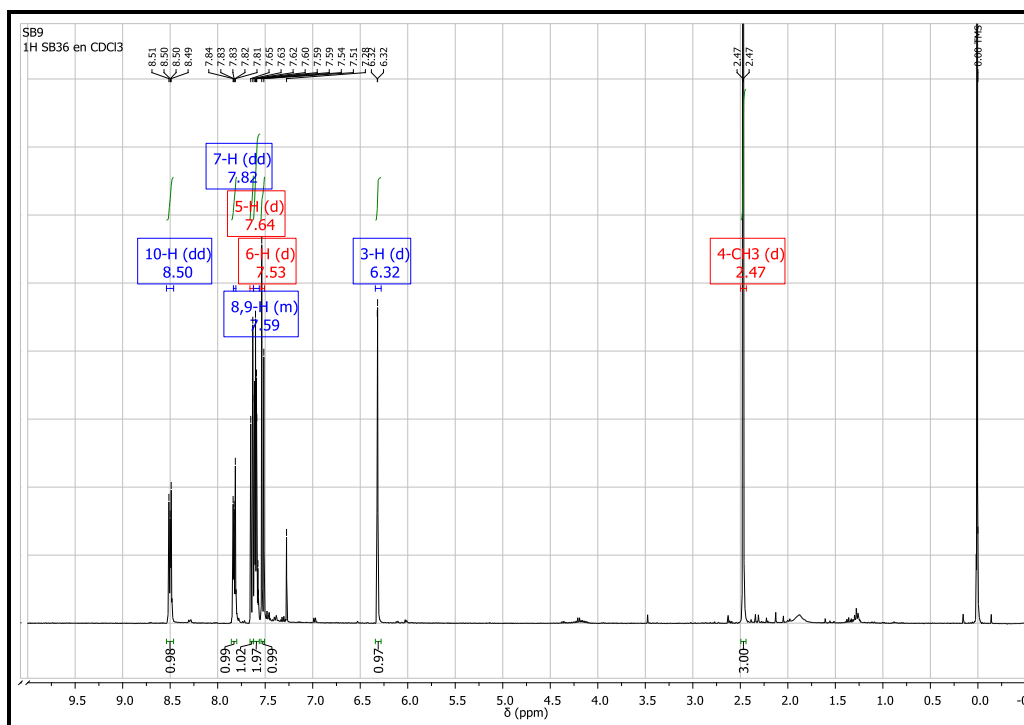
Anexo 16. Espectro RMN ^{13}C de la 4,7,8-trimetilcumarina **6e**.



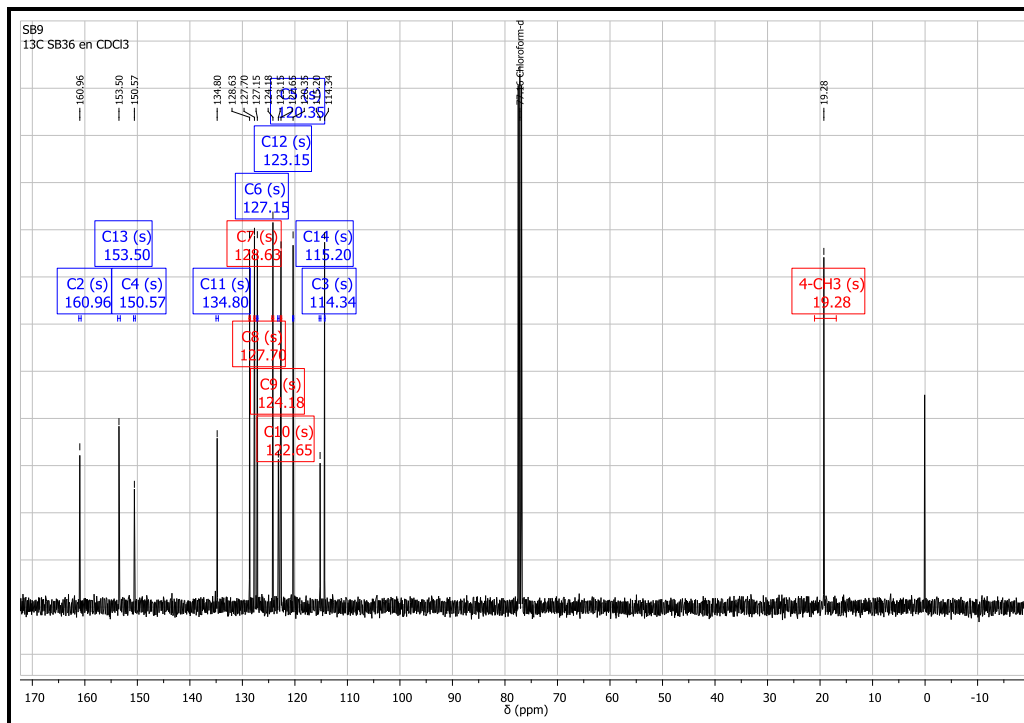
Anexo 17. Espectro RMN DEPT-135 de la 4,7,8-trimetilcumarina **6e**.



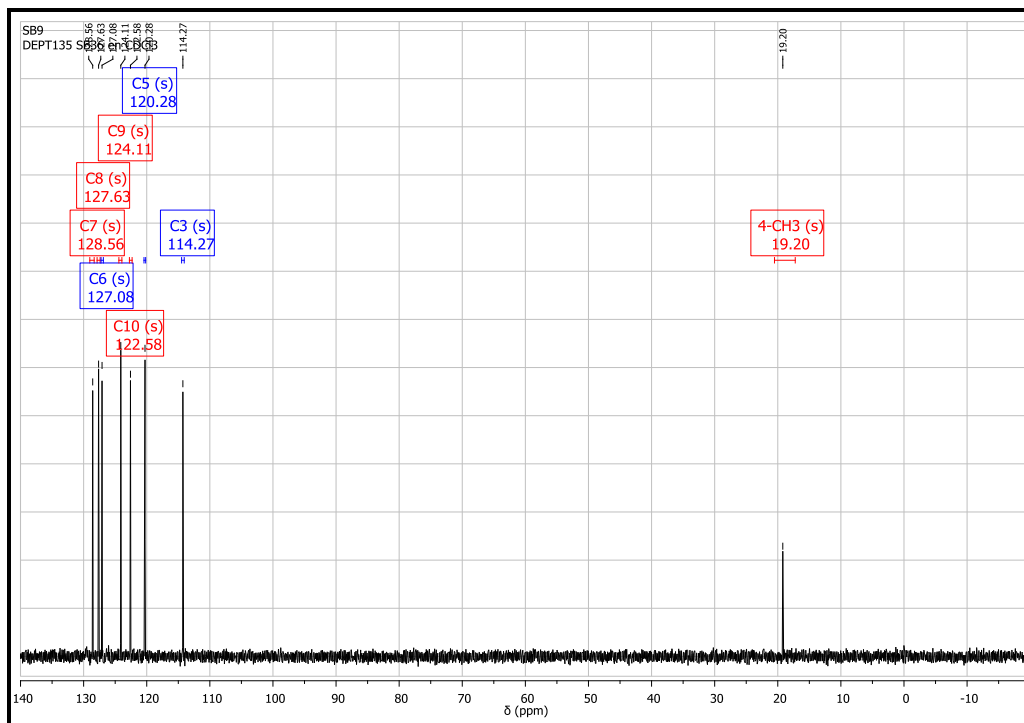
Anexo 18. Espectro RMN ¹H de la 4-metil-2H-benzo[h]cromon-2-ona **6f**.



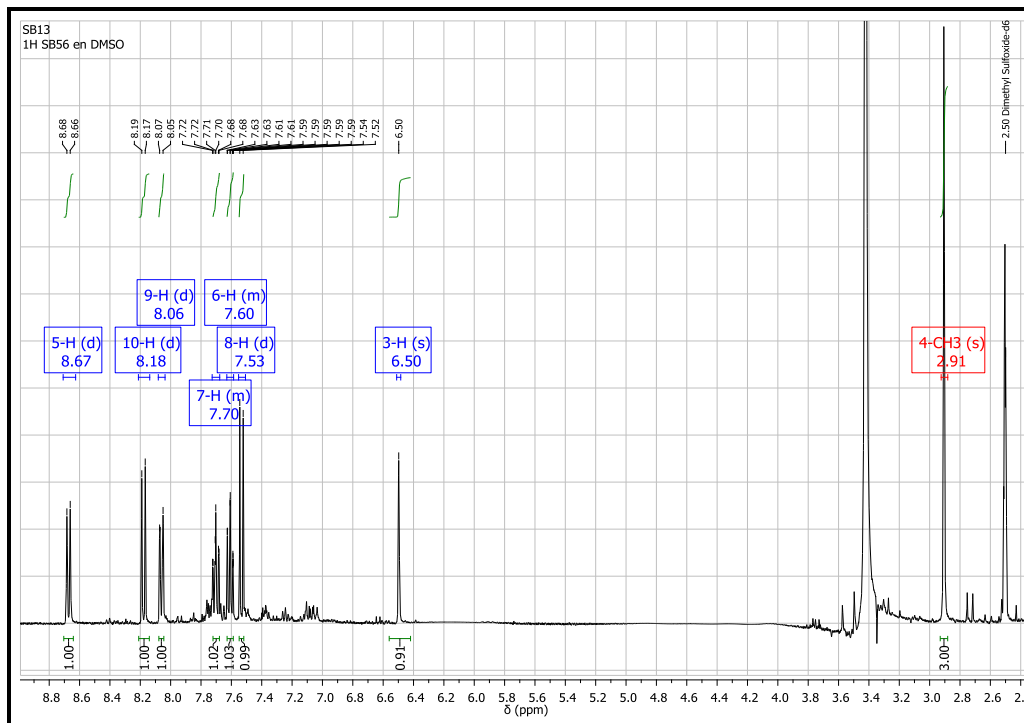
Anexo 19. Espectro RMN ^{13}C de la 4-metil-2*H*-benzo[*h*]cromon-2-ona **6f**.



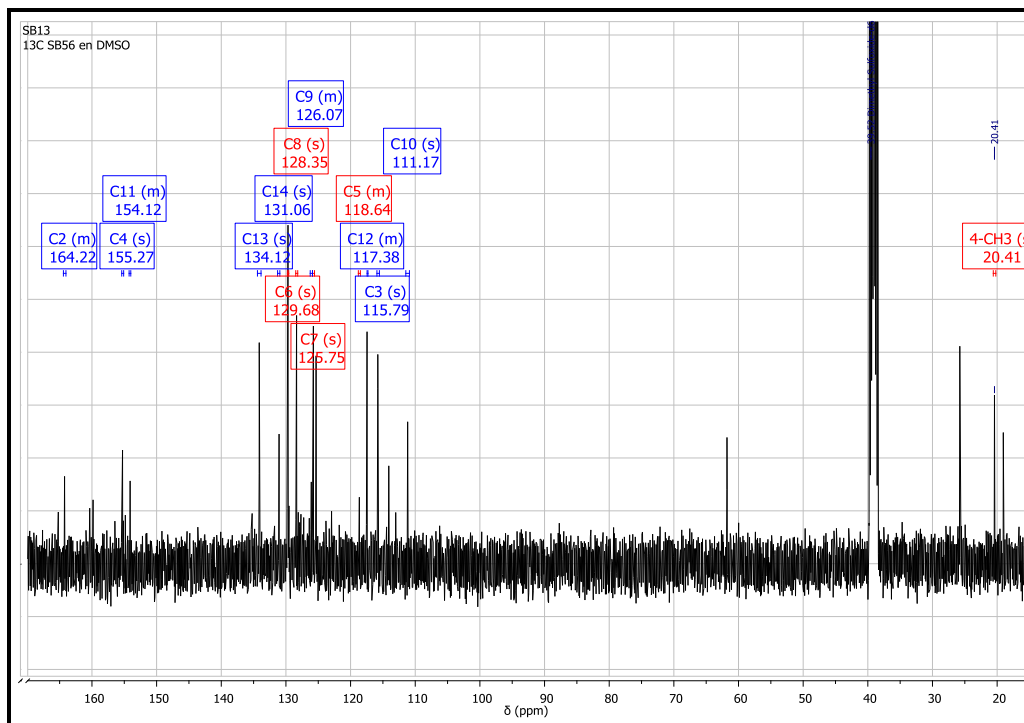
Anexo 20. Espectro RMN DEPT-135 de la 4-metil-2*H*-benzo[*h*]cromon-2-ona **6f**.



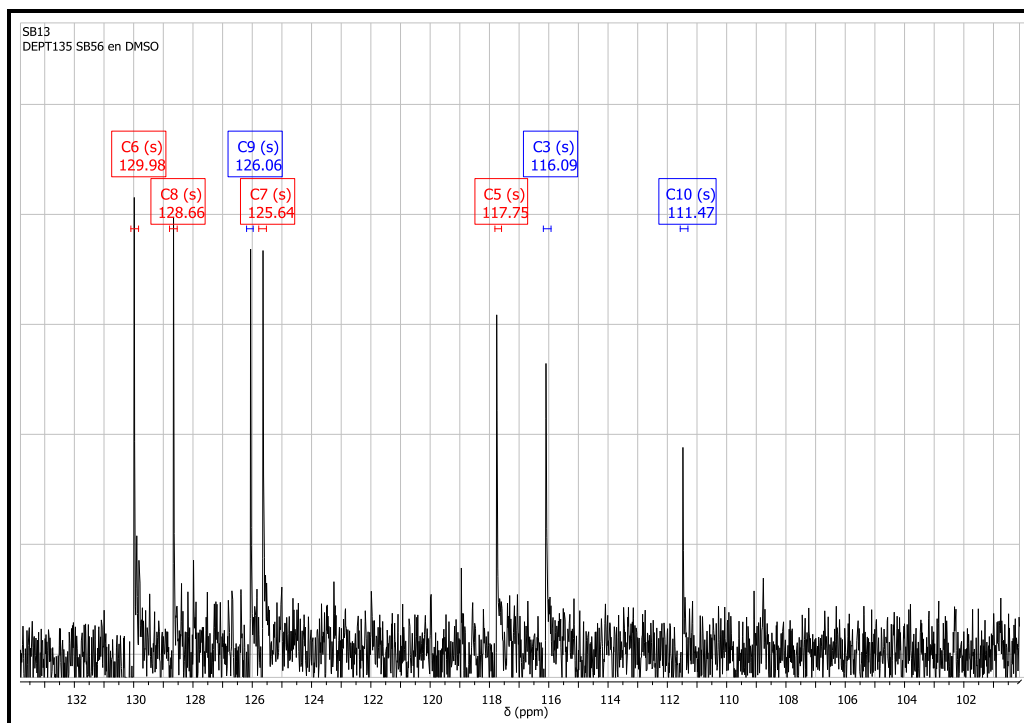
Anexo 21. Espectro RMN ^1H de la 1-metil-3H-benzo[*f*]cromon-3-ona **6g**.



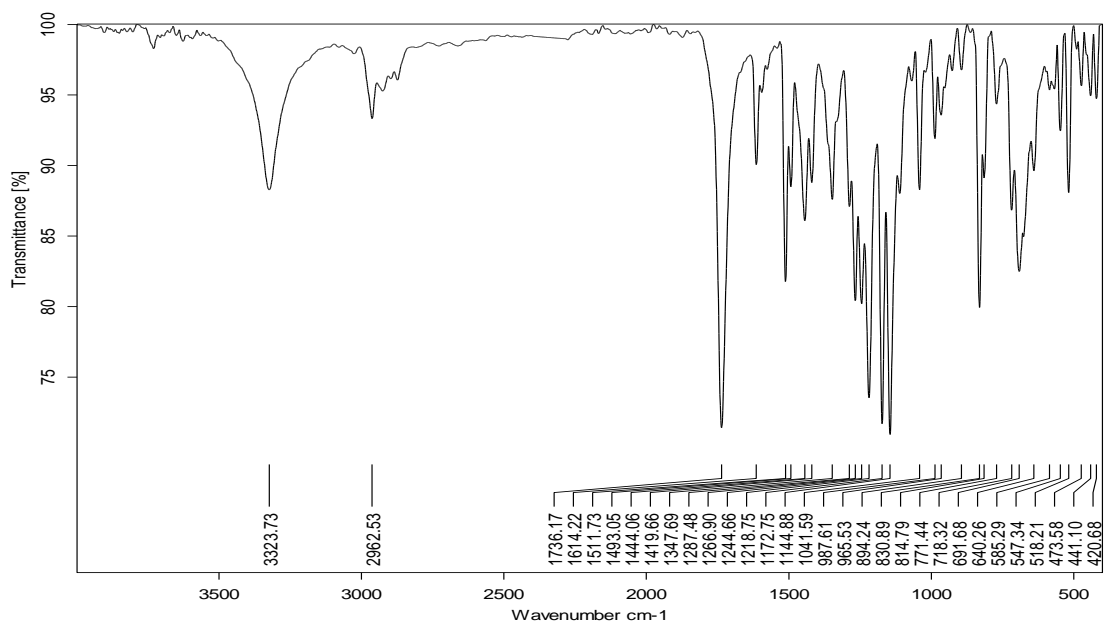
Anexo 22. Espectro RMN ^{13}C de la 1-metil-3H-benzo[*f*]cromon-3-ona **6g**.



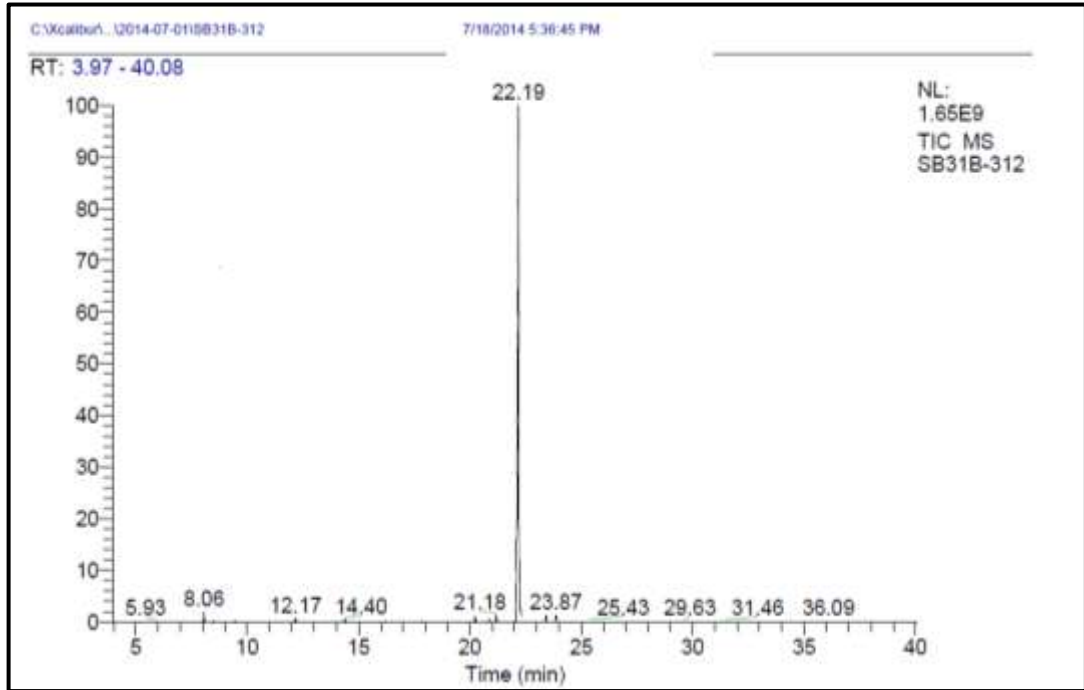
Anexo 23. Espectro RMN DEPT-135 de la 1-metil-3H-benzo[f]cromon-3-ona **6g**.



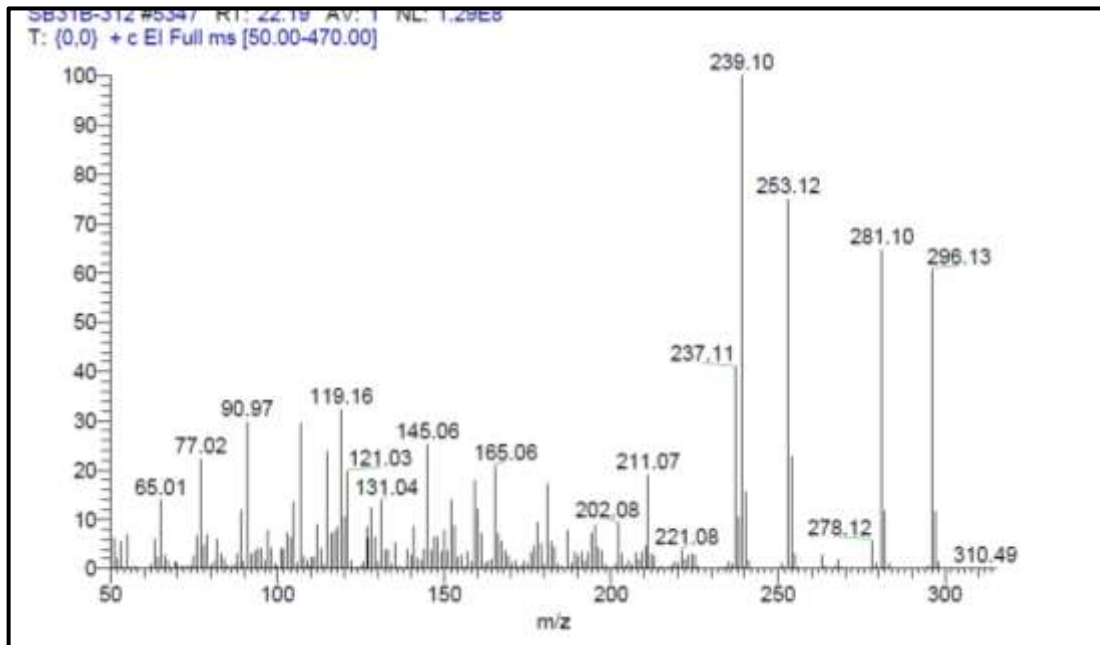
Anexo 24. Espectro IR de la 8-isopropil-5-metil-4-fenilcromon-2-ona **9b**.



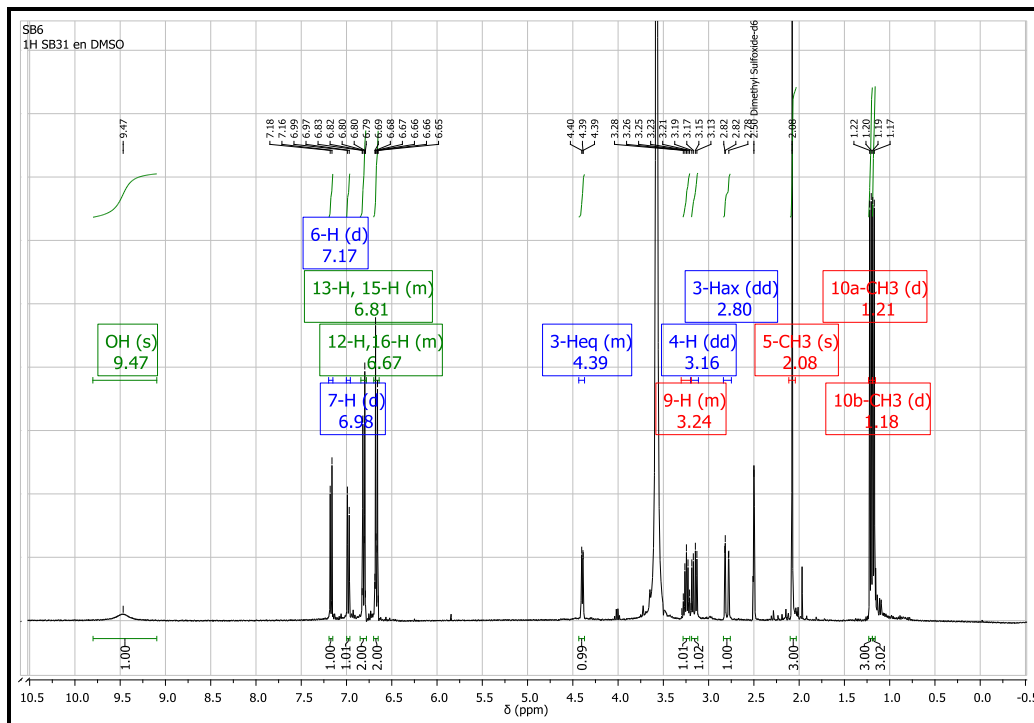
Anexo 25. Perfil cromatográfico de la 8-isopropil-5-metil-4-fenilcromon-2-ona **9b**.



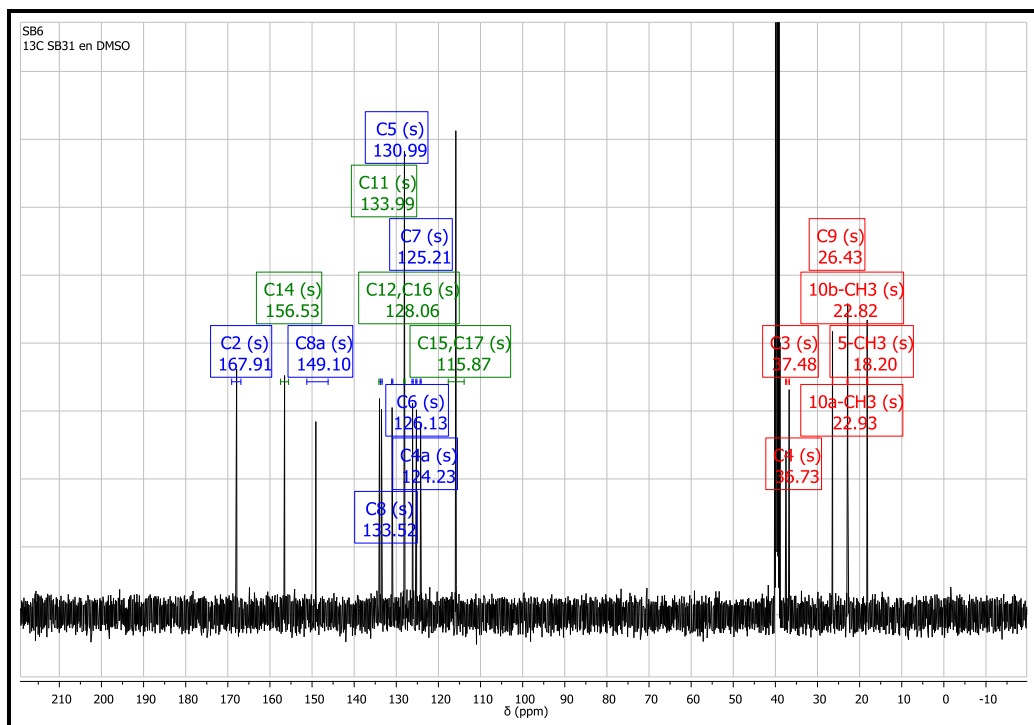
Anexo 26. Espectro de masas de la 8-isopropil-5-metil-4-fenilcromon-2-ona **9b**.



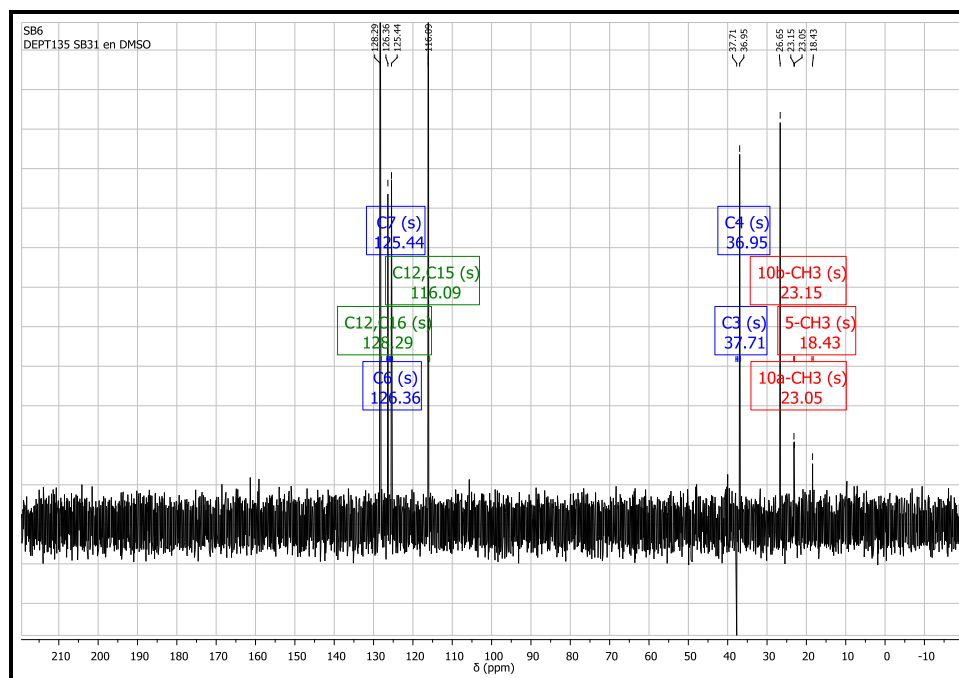
Anexo 27. Espectro RMN ¹H de la 8-isopropil-5-metil-4-fenilcromon-2-ona **9b**.



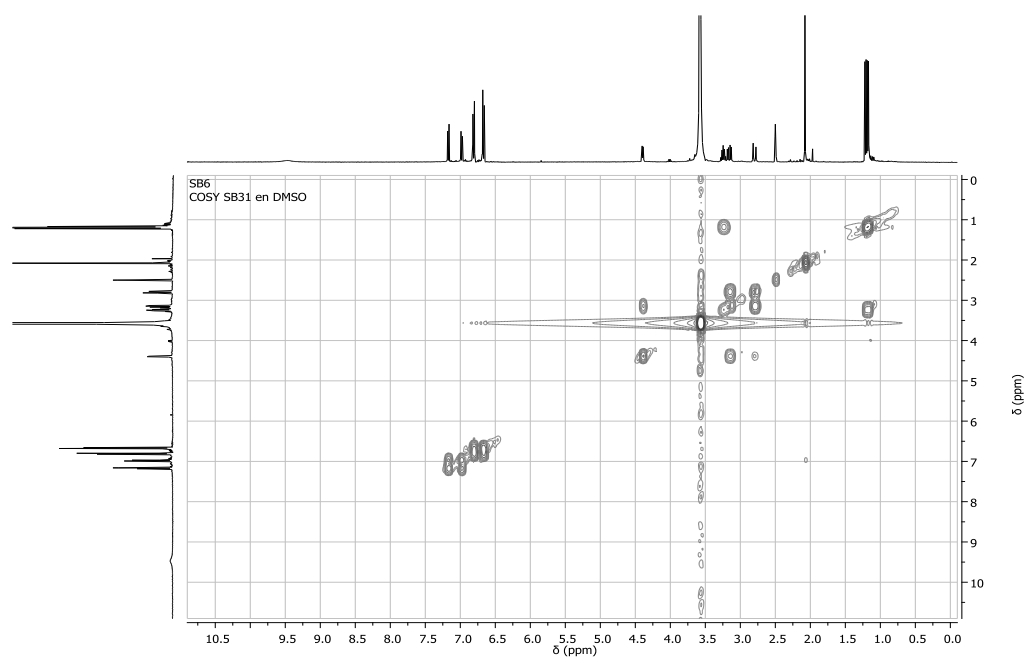
Anexo 28. Espectro RMN ¹³C de la 8-isopropil-5-metil-4-fenilcromon-2-ona **9b**.



Anexo 29. Espectro RMN DEPT-135 de la 8-isopropil-5-metil-4-fenilcromon-2-ona 9b.



Anexo 30. Espectro RMN COSY ^1H - ^1H de la 8-isopropil-5-metil-4-fenilcromon-2-ona 9b.



Anexo 31. Espectro RMN HSQC de la 8-isopropil-5-metil-4-fenilcromon-2-ona **9b**.

