

TESIS DOCTORAL

2017

The seal of the University of Zaragoza is a circular emblem. It features a central shield with a blue and gold design, surrounded by a golden border containing the Latin motto "OMNIBUS MOBILIBVS" at the top and "SAPIENTIA" at the bottom. The shield is flanked by two figures, likely saints or scholars, in blue and red.

**NUEVOS DERIVADOS CURCUMINOIDES:
SÍNTESIS, PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS
Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

**Carla Isabel Nieto Gómez
(Licenciada en Química)**

Programa de Doctorado en Ciencias

Directora: Rosa María Claramunt Vallespí

Programa de Doctorado en Ciencias

Madrid, septiembre de 2017

**NUEVOS DERIVADOS CURCUMINOIDES:
SÍNTESIS, PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS
Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

CARLA ISABEL NIETO GÓMEZ

Memoria para optar al grado de

Doctor en Ciencias

Dirigida por:

Dra. Rosa María Claramunt Vallespí

Catedrática de Universidad

Dpto. de Química Orgánica y Bio-Orgánica

Facultad de Ciencias

UNED

*"Existen, en efecto, dos cosas: saber y creer que uno sabe.
El saber es la ciencia. Creer que uno sabe es ignorancia".*

Hipócrates

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado en el Grupo de Sistemas Supramoleculares Bioorgánicos del Departamento de Química Orgánica y Bio-Orgánica de la Facultad de Ciencias de la UNED, gracias a la concesión de la ayuda para la Formación de Personal Investigador adscrito a Grupos de Investigación de la UNED y a la financiación económica de los proyectos MINECO-CTQ2014-56833-R y MICINN-CTQ2010-1612.

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Rosa María Claramunt Vallespí, directora de esta Tesis Doctoral, el que me brindase la oportunidad de embarcarme en este viaje. Rosa, eres a todas luces un ejemplo de perseverancia y de amor a la ciencia; gracias por contagiarme tu entusiasmo. Del tiempo que he trabajado junto a ti me llevo lo más importante: tu ejemplo.

A todas aquellas personas que forman o han formado parte del Departamento de Química Orgánica y Bio-Orgánica de la Facultad de Ciencias de la UNED. A la Dra. Dionisia Sanz, por su inestimable ayuda y disponibilidad en todo momento. Dioni, gracias por cederme una silla en tu despacho siempre que lo he necesitado y por compartir conmigo tu sabiduría en el campo de la RMN. Todo el tiempo pasado a tu lado no ha hecho más que confirmarme que eres una persona de gran corazón. A la Dra. Pilar Cabildo, por sus consejos en el laboratorio. Pilar, gracias por confiar en mí en algunos de los momentos más difíciles en el desarrollo de esta tesis, pero sobre todo gracias por tu sentido del humor. A la Dra. Consuelo Escolástico, por ser mi madrina en esta aventura. Consuelo, gracias por tu apoyo y por ser mi consejera en tantas ocasiones. A la Dra. Pilar Cornago, por los ratos compartidos dentro y fuera del laboratorio. A las Dras. M^a Ángeles Farrán, M^a Ángeles García y Marta Pérez, por ser más que unas compañeras unas amigas. Gracias Marta, por tu positividad y por tu sonrisa. Ángeles García, gracias no solo por tu ayuda en todo lo referente a la RMN, sino por enseñarme la importancia de creer en uno mismo. A mi querida Ángeles Farrán, le tengo mucho que agradecer. Los cientos de cafés que he tomado contigo intentando arreglar las "inmundicias planetarias" formarán parte de mis mejores recuerdos durante esta época. A la Dra. Concepción López, por ilustrarme tantas veces en los temas burocráticos y por su compañerismo. A la Dra. M^a Dolores Santa María, por su "orgánica" ayuda y por su cariño. A la Dra. Soledad Esteban, por ser un ejemplo de amor a la ciencia y especialmente a su historia. A M^a Antonia Castilla, M^a José Returce y M^a Luz Alía, gracias por vuestra ayuda siempre que lo he necesitado. A todas las personas que han

realizado el Trabajo Fin de Máster en el departamento y en especial a la más curcuminoide. Ana, ha sido un placer trabajar contigo.

Durante estos cuatro años he tenido la suerte de rodearme de excelentes investigadores gracias a las colaboraciones establecidas. A los Dres. Ibón Alkorta y José Elguero del Instituto de Química Médica del CSIC, por la realización de los cálculos teóricos. Al Dr. José Elguero debo agradecerle su total disposición en todo momento, su valioso consejo y especialmente su trato siempre tan cercano. Al Dr. José Luis Lavandera y a su equipo del Instituto de Medicina Molecular Aplicada de la Facultad de Medicina de la Universidad CEU San Pablo, por los ensayos realizados y por transmitirme en cada una de sus exposiciones un entusiasmo difícil de superar. Al Dr. Miguel Carda y a su equipo del Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universidad Jaume I de Castellón, por los experimentos realizados y por su profesionalidad. A las Dras. M^a Carmen Torralba y Rosario Torres del Laboratorio de Difracción de Rayos X del Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Químicas de la Universidad Complutense, por la resolución de las estructuras cristalinas.

Al Dr. Darío Acuña-Castroviejo, del Centro de Investigación Biomédica del Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud de la Universidad de Granada, y a todo su equipo, por acogerme en su grupo de investigación y por descubrirme el fascinante mundo de la biología molecular. De mi estancia en Granada me llevo infinidad de recuerdos; gracias a todos los que formáis parte de ellos. A Santos, por ser mi maestro en los ensayos de la NOS. A Iryna, por ser más que una compañera una madre. A Carol, a las Elenas y a Marta, por acogerme como a una más desde el primer momento. A mi vecino Huayqui y a Roberto por su optimismo. A Jose y a Erika, por tantas risas.

A la Dra. Isabel Rozas, del Instituto de Ciencias Biomédicas del Trinity College de Dublín por darme la oportunidad de realizar una estancia de tres meses en su equipo. Durante ese tiempo conocí a unos científicos brillantes, pero mejores personas. Gracias Cristina y Goar por hacerme sentir parte de vuestra familia. María, gracias por ser mi compañera en esta aventura. A Viola tengo que agradecerle su disposición en todo momento, siempre con la mejor sonrisa. A Paddy a Aaron y al resto del equipo por ser tan amables desde el primer día y por permitirme aprender tanto de todos vosotros. Al resto de personas que formaron parte de mi familia dublina: María, Arancha, Roberto; gracias.

A mi familia, sin la cual no sería la persona que soy hoy en día. Gracias a mis padres y a mi hermano por su apoyo. A mi padre, por ser un ejemplo de amor al trabajo. A mi madre no solo le agradezco su confianza ciega en mis posibilidades, sino su cariño y generosidad sin límites. Gracias de corazón por todo lo que haces por nosotros. A mi hermano Pablo le agradezco que, pese a estar ocupado, haya sacado siempre un minuto para interesarse por mí. A María, la nueva incorporación a la familia, el cariño mostrado en estos últimos momentos. A mis tíos, a mis primos, a mi abuela, y al resto de familiares que desgraciadamente nos han abandonado, les doy las gracias por estar ahí cuando les necesito. Gracias también a Nieves y Epi, a María, a Cris y Felix, a Pili y Jose, y al resto de miembros de la que considero mi familia desde hace ya mucho tiempo.

A mis amigas, mi otra familia. Soy consciente de la suerte que tengo de teneros cerca. A Ana, Laura, Natalia, Tere, Isa, Maripi, Pati B. y Pati M, María R. y María M., Cristina... Y a la representación masculina: Jorge, Miguel, Pablo... Gracias por ser como sois y por llenar mi vida de risas y buenos recuerdos. Perdonad que no os dedique unas palabras a cada uno de vosotros tal y como merecéis, necesitaría varias páginas.

Por último, es a ti, Dani, al que más tengo que agradecerle. Gracias por acompañarme en todas mis aventuras, por levantarme cada vez que me he caído, por tu paciencia y bondad sin límites, por recordarme siempre quién soy, y sobre todo por estar a mi lado. Sin ninguna duda, sin tu apoyo este trabajo no habría llegado a buen puerto. A ti, en especial, va dedicada esta tesis.

RESUMEN

El espectacular aumento de la esperanza de vida durante el pasado siglo XX ha traído como consecuencia el envejecimiento progresivo de la población y por tanto el aumento de la prevalencia de enfermedades como el cáncer o las enfermedades neurodegenerativas. Por todo ello, uno de los principales objetivos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es el potenciar su investigación tanto básica como clínica. En este sentido es necesario abordar nuevas estrategias desde el punto de vista de la química médica y de la biología molecular, que permitan identificar nuevas entidades químicas con potencial terapéutico real.

Entre los denominados productos naturales, la curcumina destaca por su potencial terapéutico debido a la diversidad de moléculas diana sobre las que puede actuar en diferentes patologías. Sin embargo, por su baja biodisponibilidad presenta limitaciones en cuanto a sus propiedades ideales para ser considerada un fármaco por lo que es necesario diseñar y desarrollar nuevos quimiotipos similares a ella, pero con funcionalidad estructural diferente, que sean más atractivos desde el punto de vista de las propiedades *drug-like*.

En la presente tesis doctoral se muestran los resultados obtenidos de la síntesis, estudio estructural y propiedades biológicas de tres familias de análogos curcuminoides: β -dicetonas, pirazoles y 1,4-diazepinas hemicurcuminoides. La introducción de uno o varios átomos de flúor en los compuestos sintetizados ha supuesto en muchos casos una mejora de su actividad biológica. Las β -dicetonas hemicurcuminoides sintetizadas han demostrado tener propiedades antioxidantes y neuroprotectoras en ocasiones superiores a las de la curcumina; y los pirazoles curcuminoides preparados han demostrado su capacidad como inhibidores de la sintasa del óxido nítrico o bien como inhibidores de la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc* relacionados con la telomerasa. En base a estos resultados, se abre una nueva vía para un estudio más profundo de la actividad biológica de estos compuestos, así como para la síntesis de nuevos candidatos.

ABSTRACT

The dramatic increase in life expectancy during the last century has brought about the progressive aging of the population and therefore the increase in the prevalence of diseases such as cancer or neurodegenerative diseases. Therefore, one of the main objectives of the World Health Organization (WHO) is to enhance both basic and clinical research. In this sense, it is necessary to approach new strategies from the point of view of medicinal chemistry and molecular biology, to identify new chemical entities with real therapeutic potential.

Among the natural products, curcumin stands out for its therapeutic potential due to the diversity of target molecules on which it can act in different pathologies. However, its low bioavailability has limitations in terms of its ideal properties to be considered as a drug, so it is necessary to design and develop new chemotypes similar to it, but with different structural functionality, which are more attractive, from the point of view of drug-like properties.

This doctoral thesis presents the results obtained from the synthesis, structural study and biological properties of three families of curcuminoid analogues: β -diketones, pyrazoles and 1,4-diazepines hemicurcuminoids. The introduction of one or more fluorine atoms into the structures of the compounds has in many cases resulted in an improvement in their biological activity. The synthesized hemicurcuminoid β -diketones have been shown to have antioxidant and neuroprotective properties superior to those of curcumin. The prepared curcuminoid pyrazoles have demonstrated their capacity as inhibitors of nitric oxide synthase or as inhibitors of the expression of *hTERT* and *c-Myc* genes related to telomerase. Based on these results, a new avenue is opened for a deeper study of the therapeutic properties of these compounds, as well as for the synthesis of new candidates.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

El trabajo descrito en esta memoria ha dado lugar hasta el momento a las siguientes publicaciones:

1. Nieto, C. I.; Cabildo, M. P.; Cornago, M. P.; Sanz, D.; Claramunt, R. M.; Torralba, M. C.; Torres M. R.; Elguero J.; García J. A.; López A.; Acuña-Castroviejo, D. Fluorination Effects on NOS Inhibitory Activity of Pyrazoles Related to Curcumin. *Molecules*, **2015**, *20*, 15643-15665.
2. Nieto, C. I.; Cabildo, M. P.; Cornago, M. P.; Sanz, D.; Claramunt, R. M.; Alkorta, I.; Elguero, J.; García, J. A.; Lopez, A.; Acuña-Castroviejo, D. Synthesis, structure and biological activity of 3(5)-trifluoromethyl-1*H*-pyrazoles derived from hemicurcuminoids. *J. Mol. Struc.* **2015**, *1100*, 518-529.
3. Sanz, D.; Nieto, C.; Claramunt, R. M.; Alkorta, I.; Elguero, J. A multinuclear magnetic resonance study of fluoro derivatives of hydroxybenzaldehydes. *Magn. Reson. Chem.* **2015**, *53*, 624-631.
4. Nieto, C. I.; Cabildo, P.; Claramunt, R. M.; Cornago, P.; Sanz, D.; Torralba, M. C.; Torres, M. R.; Ferraro, M. B.; Alkorta, I.; Marín-Luna, M. The structure of β -diketones related to curcumin determined by X-ray crystallography, NMR (solution and solid state) and theoretical calculations. *Struct. Chem.* **2016**, *27*, 705-730.
5. Martí-Centelles, R.; Falomir, E.; Carda, M.; Nieto, C. I.; Cornago, M. P.; Claramunt, R. M. Effects of Curcuminoid Pyrazoles on Cancer Cells and on the Expression of Telomerase Related Genes. *Arch. Pharm.* **2016**, *349*, 532-538.
6. Claramunt, R. M.; Nieto, C. I.; Sanz, D.; Elguero, J. Curcumin derived pyrazoles and related compounds. *Afinidad*. **2016**, *576*, 259-268.
7. Nieto, C. I.; Andrade, A.; Sanz, D.; Claramunt, R. M.; Torralba, M. C.; Torres, M. R.; Alkorta I.; Elguero, J. Curcumin Related 1,4-Diazepines: Regioselective Synthesis, Structure Analysis, Tautomerism, NMR Spectroscopy, X-ray Crystallography, Density Functional Theory and GIAO Calculations. *ChemistrySelect*. **2017**, *2*, 3732-3738.
8. Nieto, C. I.; Sanz, D.; Claramunt, R. M.; Torralba, M. C.; Torres, M. R.; Alkorta I.; Elguero, J. Molecular structure in the solid state by X-ray crystallography and SSNMR and in solution by NMR of two 1,4-diazepines. Enviado para su publicación en *J. Mol. Struc.*

9. Nieto, C. I.; Cornago, P.; Cabildo, P.; Claramunt, R. M.; Torralba M. C.; Torres M. R.; Martínez Casanova D.; Escudero E.; Lavandera J. L. Evaluation of the antioxidant and cytotoxicity activities of new curcuminoids. Enviado para su publicación en *Org. Biomol. Chem.*

Comunicaciones en congresos:

1. Sanz D.; Nieto C. I.; Cornago M. P.; Cabildo M. P.; Claramunt R. M.; Elguero J. "¹⁹F-NMR in solution of fluorinated hemi-curcuminoids". VII GERMN Biennial Meeting. Alcalá de Henares. Madrid (España), **2014**. (Póster)

2. Nieto, C. I.; Cabildo M. P.; Cornago M. P.; Sanz D.; Claramunt R. M.; García J. A.; López A.; Acuña-Castroviejo D. "Fluorinated curcuminoid pyrazoles as nitric oxide synthase (NOS) inhibitors". EFMC-ISMIC XXIII International Symposium on Medicinal Chemistry. Lisbon (Portugal), **2014**. (Póster)

3. Nieto, C. I.; Cabildo M. P.; Cornago M. P.; Sanz D.; Claramunt R. M.; Alkorta I.; Elguero J. "Synthesis and structural studies on trifluoromethylpyrazoles derived from hemicurcuminoids" XXXV Bienal RSEQ. A Coruña (España), **2015**. (Póster)

4. Nieto, C. I.; Andrade, A.; Sanz, D.; Claramunt, "Reactivity of fluorinated hemicurcuminoids with 1,2-ethylenediamine". 6th EuCheMS Chemistry Congress. Sevilla (España), **2016**. (Póster)

5. Cornago P.; Nieto C. I.; Cabildo P.; Claramunt R. M.; Martínez Casanova D.; Escudero E.; Lavandera J. L. "Synthesis and biological evaluation of difluorinated hemicurcuminoid derivatives". XXXVI Bienal RSEQ. Sitges, Barcelona (España), **2017**. (Póster)

6. Nieto C. I.; Sanz D.; Claramunt R. M.; Torralba M. C.; Torres M. R.; X-ray crystallography and SSNMR spectroscopy of 1,4-diazepines related to Clobazam. XXXVI Bienal RSEQ. Sitges, Barcelona (España), **2017**. (Póster)

A Dani

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE ESQUEMAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	xiii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 LA CURCUMINA	1
1.2 DERIVADOS Y ANÁLOGOS DE LA CURCUMINA	6
<i>1.2.1 Derivados de la curcumina</i>	<i>6</i>
<i>1.2.2 Análogos de la curcumina</i>	<i>6</i>
1.3 ANTECEDENTES.....	9
2 OBJETIVOS.....	11
3 SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE β-DICETONAS HEMICURCUMINOIDES.....	13
3.1 INTRODUCCIÓN	13
3.2 SÍNTESIS	15
<i>3.2.1 Métodos sintéticos para la obtención de curcumina y análogos curcuminoides.....</i>	<i>15</i>
<i>3.2.2 Síntesis de β-dicetonas hemicurcuminoides</i>	<i>17</i>
3.3 DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL.....	20
3.3.1 Caracterización de los aldehídos fluorados empleados	20
3.3.1.1 Determinación estructural por RMN.....	20
3.3.1.2 Cálculos teóricos	25
3.3.2 Caracterización de β-dicetonas hemicurcuminoides	30
3.3.2.1 Determinación estructural por RMN.....	30
3.3.2.2 Cálculos teóricos	42
3.3.2.3 Determinación de la estructura cristalina mediante difracción de rayos X	45
3.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	48
3.4.1 Determinación del carácter antioxidante de las β-dicetonas hemicurcuminodes sintetizadas	50

3.4.2	<i>Estudio del carácter neuroprotector de las β-dicetonas hemicurcuminoides sintetizadas</i>	57
3.4.2.1	<i>Determinación de la citotoxicidad</i>	57
3.4.2.2	<i>Ensayos de protección</i>	60
3.5	RESUMEN Y CONCLUSIONES	63
3.6	PARTE EXPERIMENTAL	65
3.6.1	<i>Materiales y métodos</i>	65
3.6.2	<i>Síntesis de β-dicetonas hemicurcuminoides</i>	68
3.6.3	<i>Actividad biológica</i>	77
3.6.3.1	<i>Determinación del carácter antioxidante</i>	77
3.6.3.2	<i>Determinación de la citotoxicidad</i>	78
3.6.3.3	<i>Ensayos de protección</i>	78
4	SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PIRAZOLES HEMICURCUMINOIDES	79
4.1	INTRODUCCIÓN	79
4.2	SÍNTESIS	80
4.2.1	<i>Síntesis de pirazoles hemicurcuminoides</i>	80
4.3	DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL	82
4.3.1	<i>Determinación estructural por RMN</i>	82
4.3.2	<i>Cálculos teóricos</i>	95
4.3.3	<i>Determinación de la estructura cristalina mediante difracción de rayos X</i>	99
4.4	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	103
4.4.1	<i>Determinación in vitro del efecto de los pirazoles curcuminoides sintetizados en la actividad de la NOS</i>	104
4.4.2	<i>Efectos de los pirazoles curcuminoides en células cancerosas y en la expresión de genes relacionados con la telomerasa</i>	110
4.4.2.1	<i>Determinación de la citotoxicidad</i>	113
4.4.2.2	<i>Efecto de pirazoles curcuminoides seleccionados sobre la inhibición de la expresión de los genes hTERT y c-Myc</i>	115
4.5	RESUMEN Y CONCLUSIONES	119
4.6	PARTE EXPERIMENTAL	121
4.6.1	<i>Materiales y métodos</i>	121
4.6.2	<i>Síntesis de pirazoles hemicurcuminoides</i>	121
4.6.3	<i>Actividad biológica de pirazoles curcuminoides</i>	134

4.6.3.1	<i>Determinación de la actividad de las distintas isoformas de la NOS</i>	134
4.6.3.2	<i>Determinación de la inhibición de la expresión de los genes hTERT y c-Myc</i>	136
5	SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE 1,4-DIAZEPINAS HEMICURCUMINOIDES	139
5.1	INTRODUCCIÓN	139
5.2	SÍNTESIS	141
5.2.1	<i>Síntesis de 1,4-diazepinas hemicurcuminoides</i>	141
5.3	DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL	143
5.3.1	<i>Determinación estructural por RMN</i>	143
5.3.2	<i>Cálculos teóricos</i>	158
5.3.3	<i>Determinación de la estructura cristalina mediante difracción de rayos X</i>	163
5.4	RESUMEN Y CONCLUSIONES	167
5.5	PARTE EXPERIMENTAL	169
5.5.1	<i>Materiales y métodos</i>	169
5.5.2	<i>Síntesis de 1,4-diazepinas hemicurcuminoides</i>	169
6	CONCLUSIONES FINALES/FINAL CONCLUSIONS	183
7	ANEXO	187
8	BIBLIOGRAFÍA	213

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Curcuma longa</i> (izquierda y centro) y curcumina (derecha).	1
Figura 2. Componentes de la cúrcuma.	2
Figura 3. Relación estructural entre la curcumina y el ácido ferúlico.	2
Figura 4. Tautómeros de la curcumina.	3
Figura 5. Formas cerrada y abierta del ceto-enol; siendo B un disolvente aceptor de enlaces de hidrógeno.	3
Figura 6. Productos de degradación de la curcumina.	4
Figura 7. Derivado bis-glicosilado de la curcumina.	6
Figura 8. Ejemplos de análogos naturales de la curcumina.	6
Figura 9. Partes susceptibles de modificación estructural en la curcumina.	7
Figura 10. Ejemplos de análogos sintéticos de la curcumina.	7
Figura 11. Heterociclos relacionados con la curcumina.	8
Figura 12. β -Dicetonas análogas de la curcumina sintetizadas previamente.	9
Figura 13. Pirazoles curcuminoideos y hemicurcuminoideos sintetizados previamente. ...	9
Figura 14. Aldehídos de partida (numeración empleada para caracterización por RMN en azul).	17
Figura 15. β -Dicetonas hemicurcuminoideos sintetizadas (numeración empleada para caracterización por RMN en azul y rendimientos entre paréntesis).	18
Figura 16. Desplazamientos químicos en ppm del espectro ^1H RMN en disolución (CDCl_3) de la enamina formada por reacción de 58 con butilamina. Los valores pertenecientes a 58 se señalan en azul.	19
Figura 17. Espectro (^1H - ^{13}C) gs-HMBC donde se muestra la correlación entre C2 y H-formilo en el 2,4-difluoro-3-hidroxibenzaldehído 50	21
Figura 18. Diferentes conformaciones estudiadas de los aldehídos 47-51	25
Figura 19. Contornos de densidad electrónica de los confórmers 50a (izquierda) y 50c (derecha). Los puntos anulares y verdes indican la posición de los puntos críticos de enlace y anillo, respectivamente.	26
Figura 20. Descomposición en fragmentos de la constante de acoplamiento $^4J_{\text{FF}}$ calculada.	29
Figura 21. Constantes de acoplamiento a larga distancia para los aldehídos 48-51	29
Figura 22. Posibles tautómeros de las β -dicetonas hemicurcuminoideos sintetizadas. ...	30
Figura 23. Espectro ^1H RMN de 26 en CDCl_3 y DMSO-d_6 [26].	31
Figura 24. Ampliación del espectro ^{19}F MAS de (3Z,5E)-1,1,1-trifluoro-4-hidroxi-6-(4-hidroxi-3-metoxifenil)hexa-3,5-dien-2-ona (26).	32
Figura 25. Espectros ^{19}F (izquierda) y $^{19}\text{F}\{\text{H}\}$ -RMN (derecha) de 53 en DMSO-d_6	32
Figura 26. Ampliación del espectro (^1H - ^{19}F) gs-HOESY de 53 en DMSO-d_6	33
Figura 27. Espectro ^{13}C RMN CPMAS (izquierda) y ^{19}F MAS (derecha) de la mezcla de rotámeros 52a y 52a' . Rotámero mayoritario (negro) y minoritario (azul).	33
Figura 28. Rotámeros que implican al átomo de F en el compuesto 52a y el grupo 3'-OH en los compuestos 53a y 58a	42

Figura 29. Diagramas ORTEP de 24 (izquierda, 30% de probabilidad de los elipsoides) y 26 (derecha, 20% de probabilidad de los elipsoides) [26].	47
Figura 30. Diagramas ORTEP de 31 (izquierda, 30% de probabilidad de los elipsoides) [26] y de 52 (derecha, 20% de probabilidad de los elipsoides) [38]. En el compuesto 52 , el átomo de F está desordenado, 70% sobre C6 y 30% sobre C2.	47
Figura 31. Diagramas ORTEP de 54 (izquierda) [38] y de 27 (derecha) [26] (30% de probabilidad de los elipsoides).	47
Figura 32. Diagramas ORTEP de 30 (izquierda, 30% de probabilidad de los elipsoides)[26] y de 55 (derecha, 30% de probabilidad de los elipsoides) [38].	47
Figura 33. Antioxidantes de naturaleza fenólica.	48
Figura 34. Mecanismos de oxidación de la curcumina.	49
Figura 35. Estructura de las β -dicetonas hemicurcuminoides cuyo potencial antioxidante, citotóxico y neuroprotector ha sido determinado.	50
Figura 36. Reacción de reducción de TPTZ.	51
Figura 37. Representación de la absorbancia a 593 nm frente a la concentración (μM) en el ensayo FRAP de los compuestos control.	51
Figura 38. Representación de la absorbancia a 593 nm frente a la concentración (μM) en el ensayo FRAP de los compuestos 27 , 30 , 31 y 52-54 .	52
Figura 39. Reacción de óxido-reducción producida en el método ABTS.	53
Figura 40. Capacidad de captación de radicales $\text{ABTS}^{\bullet+}$ expresada como el porcentaje de reducción de dichos radicales en presencia de los compuestos control.	54
Figura 41. Capacidad de captación de radicales $\text{ABTS}^{\bullet+}$ expresada como el porcentaje de reducción de dichos radicales en presencia de 27 , 30 , 31 y 52-54 .	54
Figura 42. Estructura del 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH^{\bullet}).	55
Figura 43. Capacidad de captación de radicales DPPH^{\bullet} (expresados en % de reducción) de los compuestos control.	55
Figura 44. Captación de radicales DPPH^{\bullet} (expresada en % de reducción) del compuesto 27 .	56
Figura 45. Representación de la capacidad captadora de radicales DPPH^{\bullet} (expresada en % de reducción) de Trolox, curcumina, resveratrol y el compuesto 27 .	57
Figura 46. Compuestos más destacados en el ensayo DPPH^{\bullet} en azul se señalan los grupos electrón-donadores en orto al grupo hidroxilo.	57
Figura 47. Imagen de las células SH-SY5Y obtenida con un microscopio óptico.	58
Figura 48. Reacción de reducción del MTT a formazán.	58
Figura 49. Citotoxicidad de los compuestos control a distintas concentraciones (μM) en las células SH-SY5Y, expresada como porcentaje de viabilidad celular.	59
Figura 50. Citotoxicidad de los compuestos 27 , 30 y 31 a distintas concentraciones (μM), en las células SH-SY5Y, expresada como porcentaje de viabilidad celular.	59
Figura 51. Citotoxicidad de los compuestos 52 , 53 y 54 a distintas concentraciones (μM), en las células SH-SY5Y, expresada como porcentaje de viabilidad celular.	60
Figura 52. Viabilidad celular de SH-SY5Y en presencia de H_2O_2 .	60
Figura 53. Porcentaje de viabilidad celular frente a la concentración de tratamiento AOX con curcumina y resveratrol (μM), en presencia de H_2O_2 100 μM (izquierda) y 200 μM (derecha).	61

Figura 54. Porcentaje de viabilidad celular frente a la concentración de tratamiento AOX 27 o 54 (μM), en presencia de H_2O_2 100 μM (izquierda) y 200 μM (derecha). ...	61
Figura 55. Estructuras del pirazol derivado de la curcumina 32, y de otros derivados sintetizados previamente por este grupo (33-37) o por otros autores (62-63).	79
Figura 56. Pirazoles hemicurcuminoideos sintetizados (numeración empleada para caracterización por RMN en azul y rendimientos entre paréntesis).	81
Figura 57. Posibles tautómeros de los pirazoles hemicurcuminoideos sintetizados.	82
Figura 58. Espectro ^1H RMN en $\text{DMSO}-d_6$ y $\text{HMPA}-d_{18}$ a 295 K de 65.	83
Figura 59. Espectro ^{19}F RMN (izquierda) y ^1H RMN (derecha) del compuesto 65 en $\text{DMSO}-d_6$ en el rango de temperaturas de 290-360 K.	83
Figura 60. Espectro ($^1\text{H}-^{13}\text{C}$) gs-HMBC en $\text{DMSO}-d_6$ del compuesto 73.	89
Figura 61. Espectro ^{15}N RMN CPMAS de los compuestos 70-72.	90
Figura 62. Diferentes tautómeros (a y b) y confórmers de los pirazoles 69 y 70 con los valores de E_{rel} entre paréntesis. En rojo y en azul se señalan los valores de mínima E_{rel}	95
Figura 63. Diferentes tautómeros (a y b) y confórmers de los pirazoles 71-74 con los valores de E_{rel} entre paréntesis. En rojo y en azul se señalan los valores de mínima E_{rel}	96
Figura 64. Diagrama ORTEP de 32 (izquierda, 35% de probabilidad de los elipsoides) y de 33 (derecha, 35% de probabilidad de los elipsoides) [28].	100
Figura 65. Diagrama ORTEP de 34 (40% de probabilidad de los elipsoides) [28]. ...	101
Figura 66. Diagrama ORTEP de 37 (35% de probabilidad de los elipsoides). A la derecha la vista a lo largo del eje a de 37, que muestra la formación de dímeros [28].	101
Figura 67. Diagrama ORTEP de 65 (izquierda) y 66 (derecha) (40% de probabilidad de los elipsoides)[88a].	102
Figura 68. Diagrama ORTEP de 64 (40% de probabilidad de los elipsoides). A la derecha, vista del dímero formado en 64 [88a].	102
Figura 69. Pirazoles cuya actividad anti-NOS (cuadro verde) y/o anti-telomerasa (cuadro azul) ha sido determinada.	103
Figura 70. Representación esquemática de la estructura de la NOS.	105
Figura 71. Porcentaje de inhibición de la actividad de nNOS, iNOS y eNOS en presencia de los pirazoles curcuminoideos 32-37 (1 mM en EtOH) comparados con el control (0% de inhibición). $P < 0.001$ vs control.	108
Figura 72. Porcentaje de inhibición de la actividad de nNOS, iNOS y eNOS en presencia de los pirazoles hemicurcuminoideos 64-68 (50 μM en DMSO) comparados con el control (0% de inhibición). $P < 0.01$ (para iNOS de 64, 65 y 68) y $P < 0.001$ (resto) vs control.	109
Figura 73. Porcentaje de inhibición de la actividad de nNOS, iNOS y eNOS en presencia de los pirazoles hemicurcuminoideos 69-74 (50 μM in DMSO) comparados con el control (0% de inhibición). $P < 0.001$ vs control.	109
Figura 74. Compuestos que han mostrado mejores resultados como inhibidores de NOS (en azul los porcentajes de inhibición más destacables).	110

Figura 75. Ubicación de los telómeros en los cromosomas donde se aprecia la secuencia TTAGGG repetida en los telómeros humanos.....	110
Figura 76. Acortamiento de los telómeros tras la replicación celular.....	111
Figura 77. Modo de acción de la telomerasa.....	112
Figura 78. Compuestos que muestran alta citotoxicidad ante las líneas celulares tumorales estudiadas.....	114
Figura 79. Porcentaje de expresión del gen hTERT en células HeLa. La concentración de todos los compuestos es de 10 μ M excepto 1 μ M para 32 y 2 μ M para 35 . Datos expresados como la media de tres experimentos realizados por duplicado \pm SEM; $P < 0.001$ vs control.....	115
Figura 80. Porcentaje de expresión del gen c-Myc en células HeLa. La concentración de todos los compuestos es de 10 μ M excepto 1 μ M para 32 y 2 μ M para 35 . Datos expresados como la media de tres experimentos realizados por duplicado \pm SEM; $P < 0.001$ vs control.....	116
Figura 81. Porcentaje de la expresión génica de hTERT vs c-Myc.....	117
Figura 82. Compuestos que presentan mayor actividad inhibitoria, expresados como porcentaje de inhibición de la expresión de los genes hTERT (azul) y c-Myc (rojo).....	117
Figura 83. Ejemplos de 1,4-diazepinas monocíclicas con actividad biológica.....	139
Figura 84. 1,4-Diazepinas derivadas de la curcumina con actividad biológica.....	140
Figura 85. 1,4-Diazepinas hemicurcuminoides sintetizadas (numeración empleada para caracterización por RMN en azul y rendimientos entre paréntesis).....	142
Figura 86. Tautómeros posibles en las 1,4-diazepinas (83-88), junto con las formas zwitterionicas d1 y d2 y la forma protonada aH^+/cH^+	143
Figura 87. Espectro (1H - ^{15}N) gs-HMBC de 88 en DMSO- d_6 + gota de AcOH.....	144
Figura 88. Espectro 1H RMN del compuesto 83 en HMPA- d_{18} a temperatura variable.....	145
Figura 89. Espectro 1H - ^{13}C gs-HMQC RMN del compuesto 83 en HMPA- d_{18} a 340 K.....	145
Figura 90. Espectro ^{15}N RMN CPMAS de (4E,6Z)-7-((E)-2-fluoro-4-hidroxiestiril)-5-fenil-2,3-dihidro-1H-1,4-diazepina (86).....	146
Figura 91. Tautómeros posibles en las 1,4-diazepinas (89-94).....	146
Figura 92. Espectro 1H RMN de (Z)-1-fenil-2-(7-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-1,4-diazepan-5-iliden)etanona (89) en $CDCl_3$	147
Figura 93. Espectro 1H - 1H gs-COSY RMN de 89 en $CDCl_3$	148
Figura 94. Espectro 1H - ^{15}N gs-HMBC RMN de 89 en $CDCl_3$	148
Figura 95. Espectro 1H - ^{13}C gs-HMQC RMN de 92 en DMSO- d_6	149
Figura 96. Compuestos modelo empleados en los cálculos teóricos.....	158
Figura 97. Sistema utilizado para identificar las estructuras de 86 y 92	159
Figura 98. Representación de las cuatro estructuras de 86dT	159
Figura 99. Diferencia entre desplazamientos químicos $\delta H5'$ - $\delta H3'$ en ppm.....	162
Figura 100. Diagrama ORTEP de 86 (20% de probabilidad de los elipsoides).....	164
Figura 101. Diagrama ORTEP de 92 (30% de probabilidad de los elipsoides).....	165
Figura 102. Diagrama ORTEP de 91 (30% de probabilidad de los elipsoides).....	165
Figura 103. Diagrama ORTEP de 94 (20% de probabilidad de los elipsoides).....	165

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^1H RMN y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los aldehídos 47-51.	22
Tabla 2. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{13}C RMN en disolución y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los aldehídos 47-51. Cuando no están especificadas son J_{CH}	23
Tabla 3. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{19}F RMN en disolución y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los aldehídos 47-51.	24
Tabla 4. Energías absolutas (Hartrees) y relativas ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) incluyendo ZPE (zero-point energy), y momentos dipolares (D) de los diferentes conformeros de los aldehídos 47-50.	26
Tabla 5. Desplazamientos químicos experimentales y calculados de los aldehídos 47-51.	27
Tabla 6. Constantes de acoplamiento J_{FF} (Hz) experimentales y calculadas para los conformeros a y c de 50 y 51.	29
Tabla 7. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^1H RMN y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos 27, 30, 31, 52-54.	34
Tabla 8. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^1H RMN y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos 26, 55-59.	35
Tabla 9. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{13}C RMN en disolución y en estado sólido (CPMAS), y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos 27, 30, 31, 52-54. Cuando no se especifica son J_{CH}	36
Tabla 10. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{13}C RMN en disolución y en estado sólido (CPMAS), y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos 26, 55-59. Cuando no se especifica son J_{CH}	38
Tabla 11. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{19}F RMN en disolución y en estado sólido (MAS), y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos 30, 31, 52-54.	40
Tabla 12. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{19}F RMN en disolución y en estado sólido (MAS), y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos 26, 55-59.	41
Tabla 13. Energías absolutas (Hartrees) y relativas ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) incluyendo ZPE, y momentos dipolares en D de las β -dicetonas hemicurcuminoides (24-31 y 52-59).	43
Tabla 14. Poblaciones de los tautómeros a y b , constantes de equilibrio K y ΔG , obtenidas a partir de los desplazamientos químicos experimentales y calculados de las β -dicetonas hemicurcuminoides (24-31 y 52-59).	44
Tabla 15. Enlaces de hidrógeno para los compuestos 24, 26, 27, 30, 31, 52, 54 y 55 distancias en Å y ángulos en $^\circ$	46
Tabla 16. Valores de capacidad reductora del complejo $[\text{Fe}^{3+}-(\text{TPTZ})_2]$ de Fe^{+3} a Fe^{+2} obtenidos por el método FRAP expresados en %.	52
Tabla 17. Capacidad captadora de radicales DPPH \cdot de los compuestos estudiados. ...	56
Tabla 18. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^1H RMN y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos 35 y 64-68.	85

Tabla 19. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{13}C y ^{15}N RMN en disolución y en estado sólido (CPMAS), y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos 35 y 64 a 68	86
Tabla 20. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{19}F RMN en disolución y en estado sólido (MAS), y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos 64-68	88
Tabla 21. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^1H RMN y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos 69 a 74 a 300 K	91
Tabla 22. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{13}C y ^{15}N RMN en disolución y en estado sólido (CPMAS), y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos 69 a 74 (a 300 K) . Cuando no se especifica son J_{CH}	92
Tabla 23. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{19}F RMN en disolución y en estado sólido (MAS) y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos 69 a 74	94
Tabla 24. Resultados de las regresiones múltiples ($n = 22$ o 23 , $R^2 = 0.999$) para 69-74 ; la última columna representa las diferencias de las energías calculadas.	97
Tabla 25. Relación entre los desplazamientos químicos en estado sólido CPMAS y MAS, experimentales y calculados de los pirazoles 70, 72, 73 y 74	98
Tabla 26. Enlaces de hidrógeno para los compuestos 32-34, 37 y 64-66 , distancias en Å y ángulos en $^\circ$	100
Tabla 27. Principales características de las tres isoformas de la NOS.	106
Tabla 28. Citotoxicidad expresada en valores de IC_{50} (μM) y coeficientes de selectividad para los compuestos 1, 32, 35 y 64-74	114
Tabla 29. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^1H RMN y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos 83-88	150
Tabla 30. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{13}C y ^{15}N RMN en disolución y en estado sólido (86), y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos 83 a 88 . Cuando no se especifica son J_{CH}	151
Tabla 31. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{19}F RMN en disolución y en estado sólido (MAS) y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos 84 a 88	153
Tabla 32. Desplazamientos químicos ^1H RMN (δ en ppm) y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos 89-94	154
Tabla 33. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{13}C y ^{15}N RMN en disolución y en estado sólido (CPMAS), y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos 89 a 94 . Cuando no se especifica son J_{CH}	155
Tabla 34. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{19}F RMN en disolución y en estado sólido (MAS) y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos 90 a 94	157
Tabla 35. Energías relativas en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ correspondientes a los cálculos en $\text{DMSO}-d_6$. Estructuras con los códigos mostrados en la Figura 97 (el tautómero d no posee OH).	160
Tabla 36. Enlaces de hidrógeno para los compuestos 86, 91, 92 y 94 , distancias en Å y ángulos en $^\circ$	163
Tabla 37. Matriz de Free-Wilson con la diferencia de E_{rel} ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) de las formas tautoméricas b-a de las β -dicetonas hemicurcuminoides 24-31 y 52-59	187
Tabla 38. Desplazamientos químicos (δ en ppm) experimentales y calculados (GIAO) para las β -dicetonas hemicurcuminoides 24-31 y 52-59	188

Tabla 39. Energías absolutas en Hartrees y energías relativas en kJ/mol calculadas para los diferentes tautómeros y confórmers de los pirazoles hemicurcuminodes 69-74.	198
Tabla 40. Matriz de Free-Wilson para la energía relativa de los diferentes confórmers de los pirazoles hemicurcuminoides 69-74.	199
Tabla 41. Desplazamientos químicos experimentales y calculados de ^1H , ^{13}C , ^{15}N y ^{19}F RMN para los pirazoles hemicurcuminoides 69-74.	200
Tabla 42. Desplazamientos químicos de ^1H , ^{13}C , ^{15}N y ^{19}F de RMN en estado sólido de los pirazoles hemicurcuminoides 69-74 frente a los calculados para los diferentes tautómeros y confórmers.	204
Tabla 43. Desplazamientos químicos experimentales de ^{13}C , ^{15}N y ^{19}F RMN en estado sólido, frente a los calculados para los diferentes tautómeros y confórmers del pirazol 73.	209
Tabla 44. Energías absolutas en Hartrees, relativas en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ y momentos dipolares (D) correspondientes a los compuestos modelo 95-97 (tautómeros a , b , c , d) y 98-100 (tautómeros e , f , g , h , i) en fase gas y en algunos casos en DMSO- d_6	210
Tabla 45. Energías relativas ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) y momentos dipolares (D) correspondientes a los compuestos 83-88 (tautómeros a , c , d) y 89-94 (tautómeros e , f) en fase gas y en DMSO- d_6	211
Tabla 46. Energías absolutas en Hartrees, relativas en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ y momentos dipolares (D) calculados para los compuestos 86 y 92. En todos los casos el número de frecuencias imaginarias es = 0.	212

ÍNDICE DE ESQUEMAS

<i>Esquema 1. Modificaciones estructurales realizadas en la molécula de curcumina (1) en la síntesis de β-dicetonas hemicurcuminoideas.</i>	13
<i>Esquema 2. Síntesis de la curcumina según el método descrito por Lampe.</i>	15
<i>Esquema 3. Síntesis de Pabon de la curcumina.</i>	16
<i>Esquema 4. Procedimiento sintético para la preparación de β-dicetonas hemicurcuminoideas.</i>	17
<i>Esquema 5. Principales productos obtenidos en la síntesis de las β-dicetonas hemicurcuminoideas trifluorosustituidas 26 y 55-59.</i>	19
<i>Esquema 6. Modificaciones estructurales realizadas en la molécula de curcumina (1) y en el pirazol derivado de ésta (32) en la síntesis de pirazoles hemicurcuminoideas.</i>	80
<i>Esquema 7. Procedimiento sintético empleado en la preparación de pirazoles hemicurcuminoideas (tautómeros a y b).</i>	81
<i>Esquema 8. Estructura de los pirazoles hemicurcuminoideas cuya estructura de rayos X ha sido determinada.</i>	99
<i>Esquema 9. Reacción de formación del óxido nítrico.</i>	104
<i>Esquema 10. Modificaciones estructurales realizadas en la molécula de curcumina (1) y en las 1,4-diazepinas derivadas de ésta (81 y 82) en la síntesis de 1,4-diazepinas hemicurcuminoideas.</i>	140
<i>Esquema 11. Procedimiento sintético empleado en la preparación de 1,4-diazepinas hemicurcuminoideas.</i>	141
<i>Esquema 12. Mecanismo de formación de las 1,4-diazepinas hemicurcuminoideas 83-88 y 89-94.</i>	143

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABTS	Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALT	Alargamiento alternativo de los telómeros (Alternative lengthening of telomeres)
AOX	Antioxidante
BHE	Barrera hematoencefálica
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
CaM	Calmodulina
COX	Ciclooxigenasa
CP	Polarización cruzada (Cross polarization)
CPMAS	Polarización cruzada con giro al ángulo mágico (Cross polarization magic angle spinning)
d	Doblete
dd	Doblete de dobletes
ddd	Doblete de doblete de dobletes
DFT	Teoría del funcional de la densidad (Density functional theory)
DL ₅₀	Dosis letal 50
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato (Deoxynucleoside triphosphate)
DPPH	1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (Differential scanning calorimetry)
DTT	DL-ditiotreitol
EA	Enfermedad de Alzheimer
EP	Enfermedad de Parkinson
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol- <i>bis</i> -(2-aminoetil éter)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacético
ETC	Cadena transportadora de electrones
FAD	Dinucleótido de flavina
FDA	Food and drug administration
FID	Caída libre de la inducción (Free induction decay)
FMN	Mononucleótido de flavina
FRAP	Ferric ion reducing antioxidant power
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GARP	Globally optimized alternating phase rectangular pulse
GIAO	Gauge independent atomic orbital
GSH	Enzima glutatión reducida
HEPES	Ácido <i>N</i> -(2-hidroximetil)piperazin- <i>N'</i> -2-hidroxiopropanosulfónico
HBs	Enlaces de hidrógeno (Hydrogen bonds)

HMBC	Espectroscopía de correlación heteronuclear a través de enlaces múltiples (Heteronuclear multiple bond correlation)
HMPA- <i>d</i> ₁₈	Hexametilfosforamida deuterada
HMQC	Correlación heteronuclear de múltiple cuanto (Heteronuclear multiple quantum correlation)
HOESY	Espectroscopía de efecto heteronuclear Overhauser (Heteronuclear Overhauser effect spectroscopy)
hTR o TERC	Human telomerase RNA
hTERT	Human telomeric end reverse transcriptase
IBD	Enfermedad inflamatoria intestinal (Inflammatory bowel disease)
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50%
IL	Interleuquina
IMHB	Enlace de hidrógeno intramolecular (Intramolecular hydrogen bond)
LOX	Lipoxigenasa
m	Multiplete
MAS	Magic Angle Spinning
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NADPH	Fosfato dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
n.o.	No observado
NOS	Sintasa del óxido nítrico (Nitric oxide synthase)
eNOS	Isoforma constitutiva endotelio (Endothelial nitric oxide synthase)
iNOS	Isoforma inducible (Inducible nitric oxide synthase)
mtNOS	Isoforma mitocondrial (Mitochondrial nitric oxide synthase)
nNOS	Isoforma constitutiva neuronal (Neuronal nitric oxide synthase)
NQS	Secuencia de supresión de los carbonos no cuaternarios (Non-quaternary Suppression)
NFκB	Factor nuclear κB
NOESY	Espectroscopía de efecto nuclear Overhauser heteronuclear (Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón fosfato salino (Phosphate-buffered saline)
Pf	Punto de fusión
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Phenylmethylsulfonyl fluoride)
PT	Transferencia protónica (Proton transfer)
ROS	Especies reactivas de oxígeno
s	Singlete
sa	Señal ancha
SCF	Campo autoconsistente (Self-consistent field)
SD	Desviación estándar (Standard deviation)
SEM	Error estándar de la media (Standard error of the mean)
SFC	Cromatografía de fluidos supercríticos (Supercritical fluid chromatography)
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SSCC	Spin-spin coupling constants
t	Triplete

TNF	Factor de necrosis tumoral (Tumor necrosis factor)
TPTZ	2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
ZPE	Energía del punto cero (Zero-point energy)

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LA CURCUMINA

Pocos compuestos de origen natural han originado tan amplia difusión de patentes, publicaciones originales y reseñas como la curcumina (**1**). El interés por este compuesto no deja de crecer como lo atestiguan las numerosas revisiones bibliográficas [1]. Una búsqueda en la base de datos ScienceDirect conduce a 16.864 artículos (29/08/2017). El número de ensayos clínicos que investigan el potencial terapéutico de la curcumina también ha aumentado exponencialmente durante la última década. Con más de 100 dianas terapéuticas descritas, el registro clinicaltrials.gov listó 241 ensayos en 2017 en comparación con solo 4 en 2004 para el término de búsqueda "curcumina". A continuación se describen algunos de los aspectos más destacables de esta fascinante molécula en cuanto a su origen y estructura.

La cúrcuma (*Curcuma longa* L, *Zingiberaceae*), conocida también como turmérico o haldi, es una planta tropical nativa del sur y del sudeste de Asia que presenta en sus rizomas o tallos subterráneos unos pigmentos polifenólicos pertenecientes a la familia de los curcuminoides entre los que se encuentra la curcumina (Figura 1).



Figura 1. *Curcuma longa* (izquierda y centro) y curcumina (derecha).

Desde hace miles de años, los habitantes del Sudeste Asiático y de la India emplean cúrcuma en su dieta habitual, como colorante y también como remedio para aliviar diferentes trastornos de la salud. Así, la medicina ayurvédica o medicina tradicional hindú se sirve de la cúrcuma en el tratamiento de problemas digestivos, fiebres, infecciones, disentería, artritis y problemas hepáticos. La curcumina (**1**), aislada

por primera vez en 1815 por Vogel y Pelletier [2], es el principal polifenol curcuminoide encontrado en la cúrcuma y el principal responsable de las propiedades farmacológicas de la misma. Junto con la demetoxicurcumina (**2**), la bisdemetoxicurcumina (**3**) y la más recientemente descubierta ciclocurcumina (**4**) (Figura 2) forman el complejo conocido como azafrán indio.

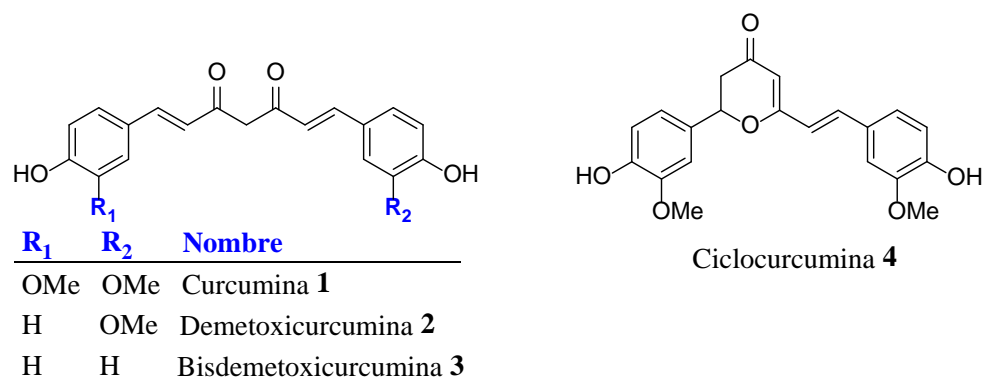


Figura 2. Componentes de la cúrcuma.

Los componentes **1-3** de la cúrcuma han sido separados con éxito empleando técnicas como la cromatografía en capa fina [3] o la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC, del inglés supercritical fluid chromatography) [4].

La curcumina, 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona (**1**), se clasifica dentro de la familia de los diarilheptanoides, productos naturales cuyas estructuras poseen dos restos arilo, hidroxi u oxo sustituidos, unidos entre sí a través de una cadena carbonada de 7 átomos que posee una función 1,3-dicarbonílica y diversas insaturaciones. Dado que se pueden identificar dos residuos de ácido ferúlico (**5**) unidos por un puente metilénico (Figura 3), ciertos autores se refieren a la curcumina con el nombre de diferuloilmetano.

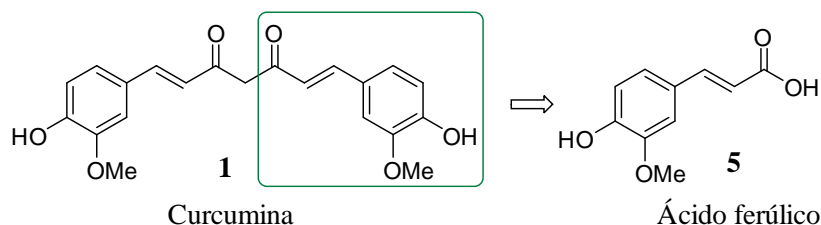


Figura 3. Relación estructural entre la curcumina y el ácido ferúlico.

Debido a que es una β -dicetona simétrica, sólo presenta dos tautómeros, el ceto-enol **1a** y la dicetona **1c**; siendo el tercero, **1b**, idéntico a **1a** (Figura 4). El ceto-enol **1a/1b** es el tautómero predominante, tanto en disoluciones acuosas como en disolventes

orgánicos, en especial en aquellos polares ya sean próticos o apróticos. En disolventes apolares la forma ceto-enol sigue siendo mayoritaria, pero el equilibrio ya no está tan desplazado hacia ese tautómero.

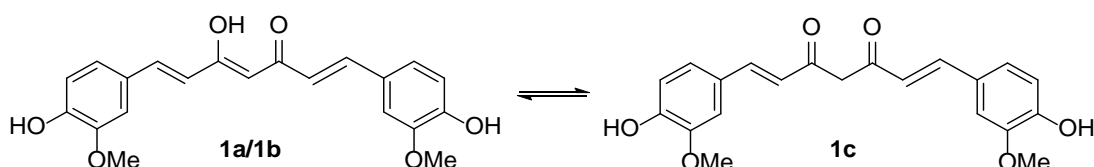


Figura 4. Tautómeros de la curcumina.

En entornos no polares existe como un tautómero *cis*-ceto-enol de conformación cerrada con un enlace de hidrógeno intramolecular (IMHB, del inglés intramolecular hydrogen bond), mientras que en disolventes polares adopta una conformación abierta con un enlace de hidrógeno intermolecular (Figura 5).

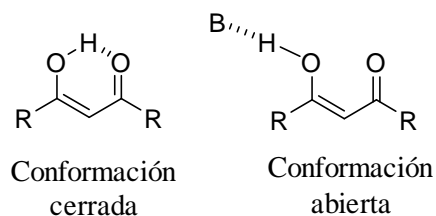


Figura 5. Formas cerrada y abierta del ceto-enol; siendo *B* un disolvente aceptor de enlaces de hidrógeno.

La curcumina presenta una baja solubilidad en agua, siendo su coeficiente de reparto en octanol/agua aproximadamente de 3.3, por ello la molécula posee más carácter lipófilo, aunque no en su totalidad. Gracias a este carácter anfipático, puede interactuar no solo con las membranas de origen biológico sino también con los residuos proteicos transmembranosos polares debido a la presencia del grupo dicetónico, los hidroxilos fenólicos y el grupo metoxilo. Es estable a pH ácido pero inestable a pH básico y neutro [5]. En cuanto a la temperatura, es estable a temperaturas bajas y moderadas (< 80-100 °C), descomponiendo a altas temperaturas. Su degradación puede ser tanto química como fotoquímica. Sin embargo, los productos resultantes han mostrado en ocasiones ser también bioactivos y contribuir a sus efectos farmacológicos [6,7]. La degradación química se produce fundamentalmente por la acción de peróxidos, radicales libres e iones oxígeno (las llamadas especies reactivas de oxígeno, ROS, del inglés reactive oxygen species) y está relacionada con la energía de disociación de sus grupos funcionales. Así, los OH fenólicos poseen en torno a 80 kcal·mol⁻¹ de energía de disociación, 90 kcal·mol⁻¹ para el H central y 98 kcal·mol⁻¹

para el H enólico. Estos datos permiten anticipar que los primeros grupos en ser atacados en la degradación química serán los OH fenólicos. Schneider *et al.* han discutido la relación entre degradación y metabolismo y sugieren que la polifarmacología de la curcumina puede estar ligada a sus numerosos productos de degradación [8]. Los principales productos de degradación, que se muestran en la Figura 6, son: (2Z,5E)-2-hidroxi-6-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-4-oxohexa-2,5-dienal **6**, el feruloilmetano **7**, el ácido ferúlico **5** y la vainillina **8** [5,9].

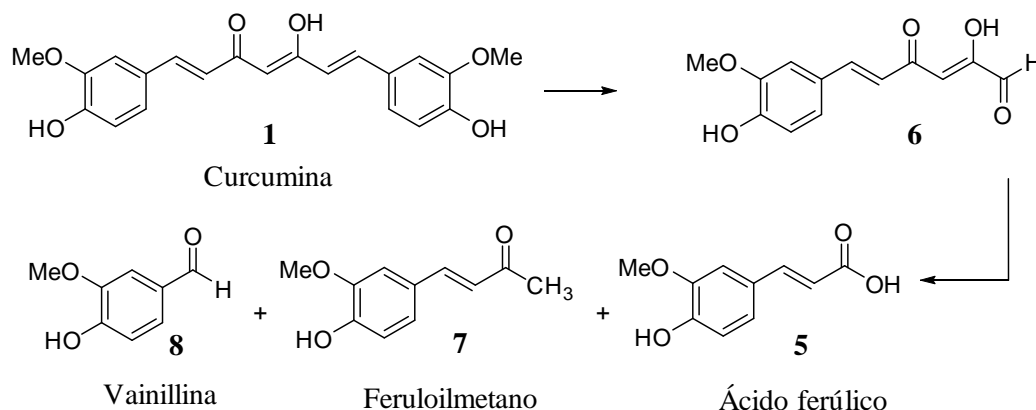


Figura 6. Productos de degradación de la curcumina.

Actividad biológica y biodisponibilidad

La curcumina presenta un importante potencial terapéutico debido a la diversidad de moléculas diana sobre las que puede actuar en diferentes patologías. Se han encontrado más de treinta proteínas diferentes que interactúan directamente con ella, incluyendo la ADN polimerasa, lipoxigenasa (LOX), tubulina, o el factor nuclear-kappa B (NF-κB) [10]. Los complejos formados mediante su unión a iones metálicos divalentes de Fe, Cu, Mn y Zn han mostrado también un alto potencial farmacológico.

La inducción de mecanismos de defensa antioxidantes, así como los efectos antiinflamatorios de la curcumina, juegan un papel importante en sus propiedades neuroprotectoras, quimiopreventivas y anticarcinogénicas. La curcumina y sus derivados carbocíclicos (análogos de **4**) son buenos agentes antioxidantes mostrando una importante actividad frente a los radicales libres [11,12]. Los efectos antiinflamatorios de la curcumina [13] están parcialmente mediados por la inhibición de la unión del factor de transcripción NF-κB al ADN, por lo que se reducen los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, tales como TNF-α (factor de necrosis tumoral 1α), IL1β (interleuquina 1β), IL6 (interleuquina 6) e IL8 (interleuquina 8); o mediante la unión directa a determinadas enzimas como las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2 o a la

isoforma inducible de la sintasa del óxido nítrico (iNOS). Diversos estudios han descrito los efectos anticancerígenos y quimioprotectores de la curcumina que actúa sobre el ciclo celular induciendo la apoptosis de las células cancerígenas [14]. En el caso de su actividad frente al virus de inmunodeficiencia humana (VIH), actúa directamente sobre las proteínas VIH-1 IN y VIH-1 PR, responsables de propagar el ciclo de vida de virus, uniéndose a ellas y provocando su inhibición [15]. Respecto a las enfermedades neurodegenerativas, cabe destacar que gracias a su lipofilia es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), siendo numerosas las publicaciones que la relacionan con el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer [16].

A pesar de su potencial en diversas aplicaciones terapéuticas, la biodisponibilidad de la curcumina es limitada debido fundamentalmente a su baja solubilidad en medio acuoso, y a su rápido metabolismo mediante glucuronidación hepática y sulfatación [17]. Este problema puede ser solventado mediante la modificación estructural de la molécula, teniendo en cuenta siempre la relación estructura-actividad de la misma, o su empaquetamiento en sistemas liposomales o nanopartículas. Por ello son numerosos los ejemplos de derivados y análogos curcuminoides sintetizados en los últimos años con el fin de encontrar compuestos que, manteniendo una baja toxicidad, sean capaces de superar los inconvenientes que resultan de la baja biodisponibilidad y el rápido metabolismo de la curcumina.

1.2 DERIVADOS Y ANÁLOGOS DE LA CURCUMINA

1.2.1 Derivados de la curcumina

Los derivados de la curcumina son los compuestos que mantienen el puente dicetónico α,β -insaturado de siete carbonos con anillos bencénicos sustituidos, enlazados a ambos lados de este puente. Se sintetizan generalmente partiendo de la curcumina donde el carbono situado entre el carbonilo y el enol podrá ser halogenado [18] y los grupos fenólicos podrán ser acilados, alquilados, glicosilados o aminoacilados, entre otros ejemplos. En la Figura 7 se muestra la estructura de un derivado bis-glicosilado de la curcumina (**9**) con excelentes propiedades como quelante de Fe(III) [19,20].

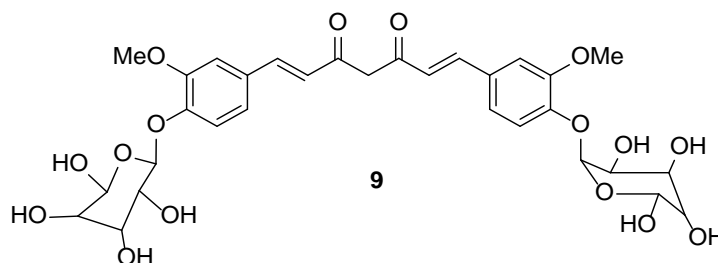


Figura 7. Derivado bis-glicosilado de la curcumina.

1.2.2 Análogos de la curcumina

Los análogos de la curcumina, denominados también curcuminoides, son aquellos compuestos que presentan variaciones estructurales respecto a ella. Se clasifican en naturales (Figura 8) y sintéticos (Figuras 9 y 10).

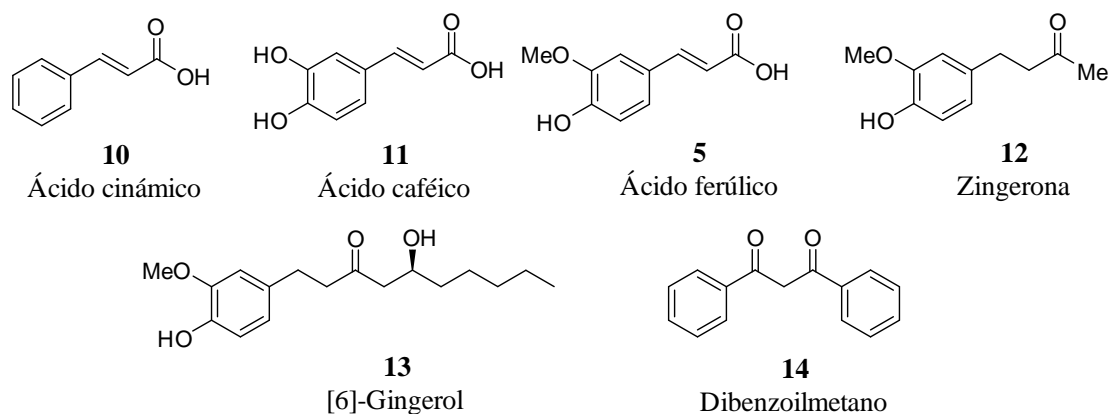


Figura 8. Ejemplos de análogos naturales de la curcumina.

El estudio de la relación existente entre la estructura de la curcumina y la actividad biológica de la misma ha permitido el desarrollo de varios análogos sintéticos en los que se potencia una u otra actividad.

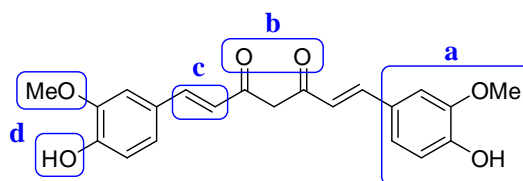


Figura 9. Partes susceptibles de modificación estructural en la curcumina.

Las principales modificaciones estructurales de la curcumina que se recogen en la Figura 9 son:

- a.** Modificación de la cadena lateral arilo mediante la inserción o eliminación de átomos en el anillo aromático o la sustitución de éste por un heterociclo.
- b.** Modificación del grupo 1,3-dicarbonilo variando el número de unidades enona, convirtiéndolo en estructuras cíclicas como los pirazoles o formando complejos con metales.
- c.** Modificación del doble enlace, ya sea por reducción o mediante reacciones de adición a éste.
- d.** Modificación del grupo hidroxilo o metoxilo como vimos anteriormente en los derivados de la curcumina.

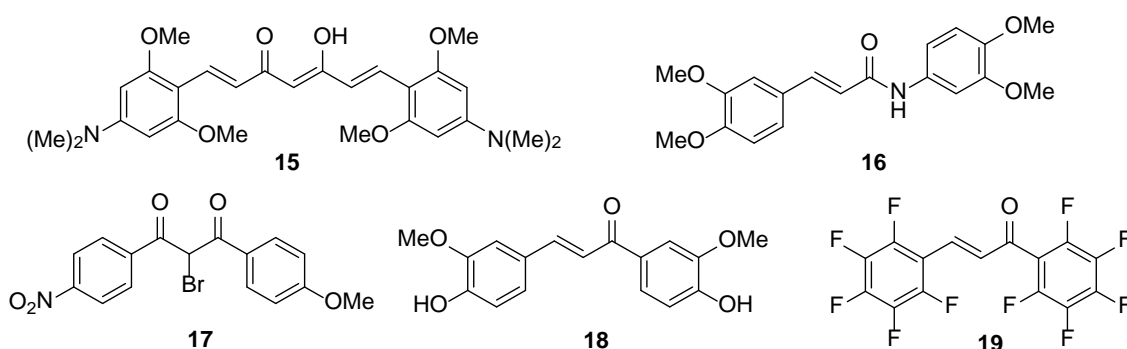


Figura 10. Ejemplos de análogos sintéticos de la curcumina.

Los heterociclos análogos de la curcumina son posiblemente una de las familias más ampliamente estudiadas. El heterociclo podrá encontrarse en una posición distal (**20**) [21], intermedia (**21**) [22], central (**22**) [23] o sustituir al fenilo (**23**) [24] como se aprecia en la Figura 11.

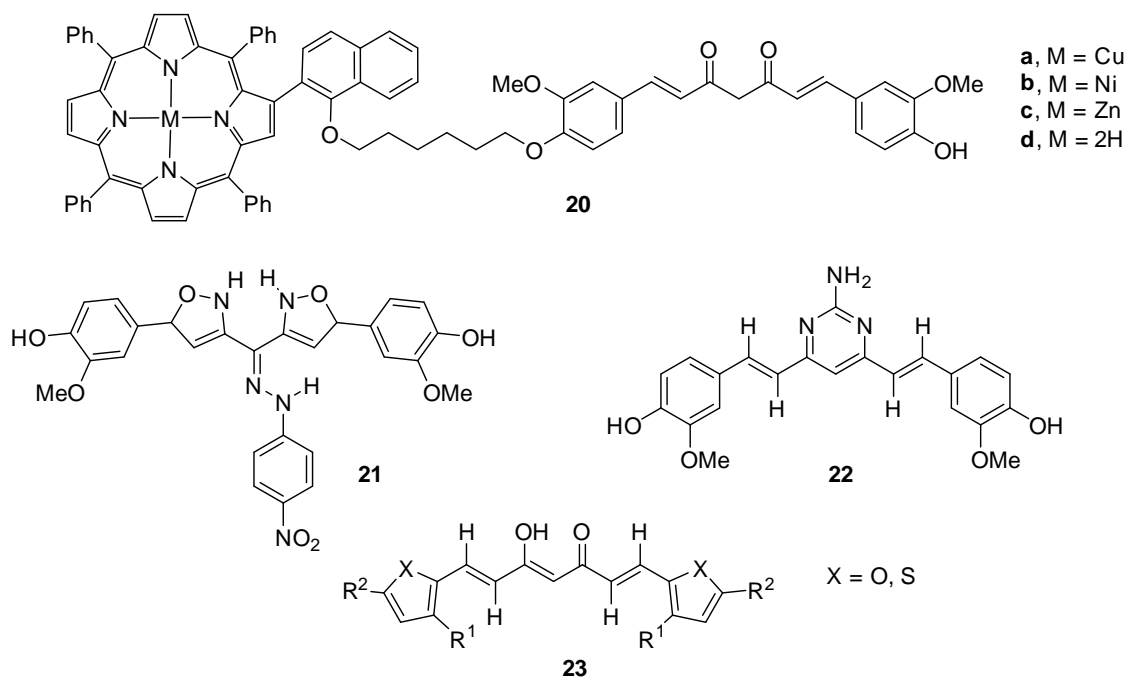


Figura 11. Heterociclos relacionados con la curcumina.

1.3 ANTECEDENTES

En el Grupo de Sistemas Supramoleculares Bioorgánicos del Departamento de Química Orgánica y Bio-Orgánica de la UNED, marco en el que el proyecto de esta Tesis se desarrolla, se investigan desde hace varios años las propiedades analgésicas y antiinflamatorias de análogos de la curcumina. Así, se prepararon y estudiaron la serie de β -dicetonas, que se indican en la Figura 12 [25,26,27].

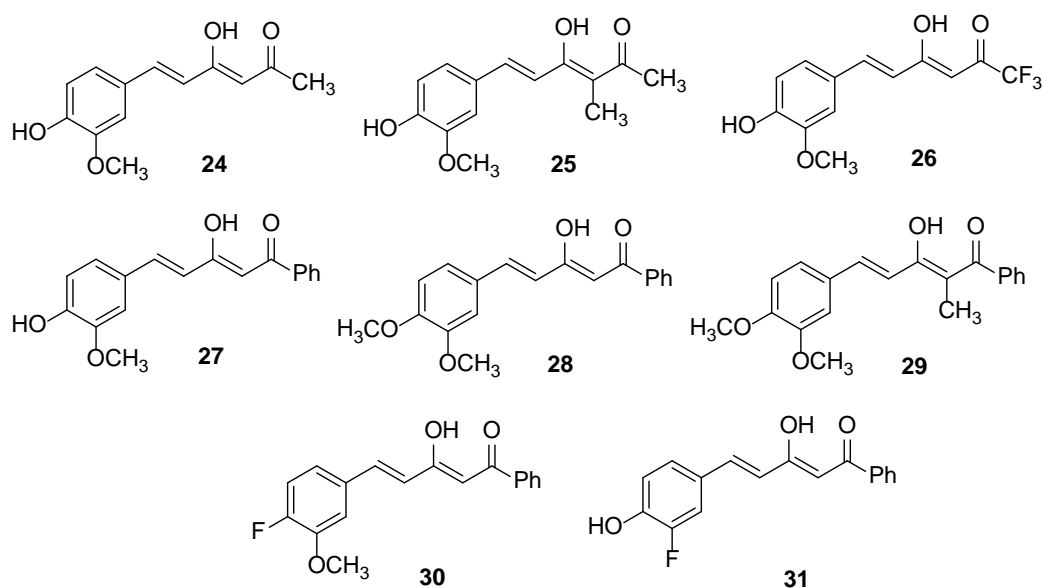


Figura 12. β -Dicetonas análogas de la curcumina sintetizadas previamente.

Posteriormente, se sintetizaron los correspondientes pirazoles (Figura 13) para ser ensayados como antiinflamatorios, con excelentes resultados frente a la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, del inglés inflammatory bowel disease) que ocurre cuando existe inflamación en el tracto gastrointestinal y una respuesta inmunológica de por vida [27,28].

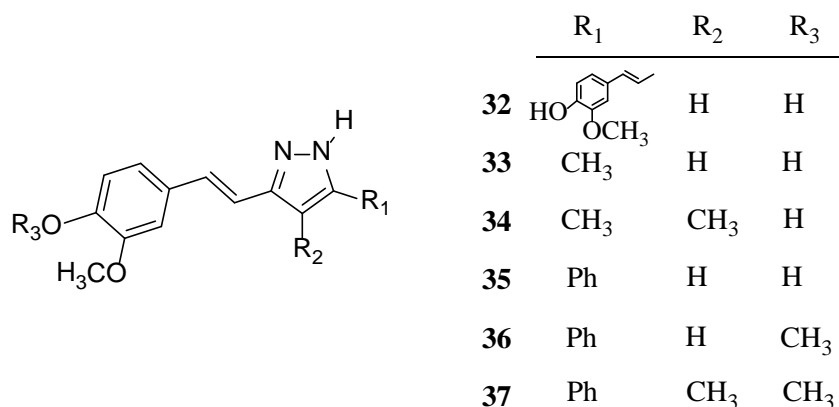


Figura 13. Pirazoles curcuminoides y hemicurcuminoides sintetizados previamente.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral constituye una contribución al conocimiento de las propiedades físico-químicas y de la actividad biológica de nuevos análogos curcuminoides.

Entre los objetivos específicos se encuentran:

1. Síntesis de nuevas β -dicetonas hemicurcuminoides, que incorporen uno o varios átomos de flúor en su estructura, a partir de los aldehídos fluorados correspondientes.
2. Estudio de la reactividad de las β -dicetonas hemicurcuminoides sintetizadas con hidrazina para acceder a nuevos pirazoles.
3. Estudio de la reactividad de las β -dicetonas hemicurcuminoides sintetizadas con etilendiamina para la preparación de nuevas 1,4-diazepinas.
4. Caracterización estructural en disolución de los compuestos sintetizados mediante experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , ^{15}N y ^{19}F con especial énfasis en el estudio de las diferentes formas tautoméricas que puedan presentar.
5. Estudio estructural de los compuestos sintetizados en estado sólido mediante experimentos de ^{13}C y ^{15}N RMN CPMAS y de ^{19}F RMN MAS, y resolución de sus estructuras cristalinas mediante difracción de rayos X.
6. Análisis mediante cálculos computacionales, por métodos *ab initio* Hartree-Fock y de la teoría del funcional de densidad, de los mínimos energéticos de los diferentes tautómeros de los compuestos sintetizados, así como los valores de apantallamiento absolutos GIAO en determinados casos, gracias a la colaboración con los profesores Ibón Alkorta y José Elguero del Instituto de Química Médica del CSIC.
7. Evaluación de la actividad biológica de los compuestos sintetizados gracias a las colaboraciones establecidas con otros grupos de investigación:

7.1 Evaluación de la capacidad antioxidante y neuroprotectora de las β -dicetonas sintetizadas, en condiciones de estrés oxidativo, frente a la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, en colaboración con el profesor José Luis Lavandera del Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA), Facultad de Medicina, Universidad CEU San Pablo.

7.2 Estudio de las propiedades que presentan los pirazoles curcuminoides sintetizados como inhibidores selectivos de las distintas isoformas de la sintasa

del óxido nítrico (NOS) durante la estancia realizada en Centro de Investigación Biomédica del Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud de la Universidad de Granada, a través de la colaboración existente con el profesor Darío Acuña-Castroviejo (Fundación General UGR-Empresa).

7.3 Evaluación de la acción citotóxica de los pirazoles curcuminoides sintetizados en tres líneas celulares tumorales (HT-29, MCF-7 y HeLa) y una no tumoral (HEK-293); y de la actividad de estos compuestos como inhibidores de la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc* relacionados con la telomerasa. Estudios realizados en colaboración con el profesor Miguel Carda del Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universidad Jaume I de Castellón.

CAPÍTULO 3

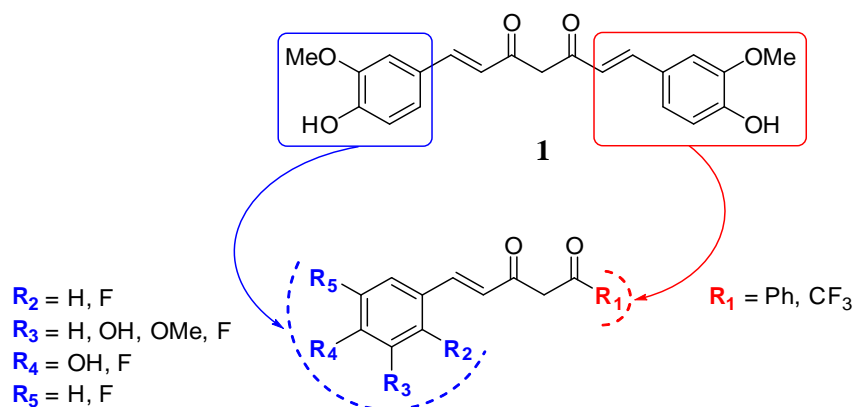
**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
BIOLÓGICA DE β -DICETONAS
HEMICURCUMINOIDES**

3 SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE β -DICETONAS HEMICURCUMINOIDES

3.1 INTRODUCCIÓN

En base a los resultados alentadores obtenidos en trabajos anteriores respecto a la síntesis y evaluación de la actividad biológica de análogos curcuminoides, se decidió continuar con esta línea de investigación. En una primera aproximación se propuso la modificación estructural de la molécula de curcumina (**1**) (Esquema 1) a través de dos estrategias:

- Mediante la sustitución de uno de los grupos estirilo por un grupo fenilo o trifluorometilo (rojo).
- Con la introducción de uno o varios átomos de flúor en distintas posiciones en el otro anillo bencénico (azul).



Esquema 1. Modificaciones estructurales realizadas en la molécula de curcumina (1) en la síntesis de β -dicetonas hemicurcuminoides.

El papel protagonista que juega hoy en día la introducción de flúor en el diseño y desarrollo de fármacos es indiscutible [29]. Actualmente, cada programa de desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos contempla los derivados fluorados [30]. El número de principios activos farmacéuticos en todo el mundo que contienen al menos un átomo de flúor en su estructura aumenta cada año a medida que se tiene más conocimiento acerca de las propiedades de este elemento. La introducción de flúor en una molécula puede influir de forma productiva en su conformación, pK_a , permeabilidad de la membrana celular, metabolismo y en las propiedades farmacocinéticas. A menudo se introduce para mejorar la estabilidad metabólica y otras veces se utiliza para alterar la

lipofilia, la basicidad o con el fin de modificar la conformación de la molécula y mejorar su unión con la proteína diana.

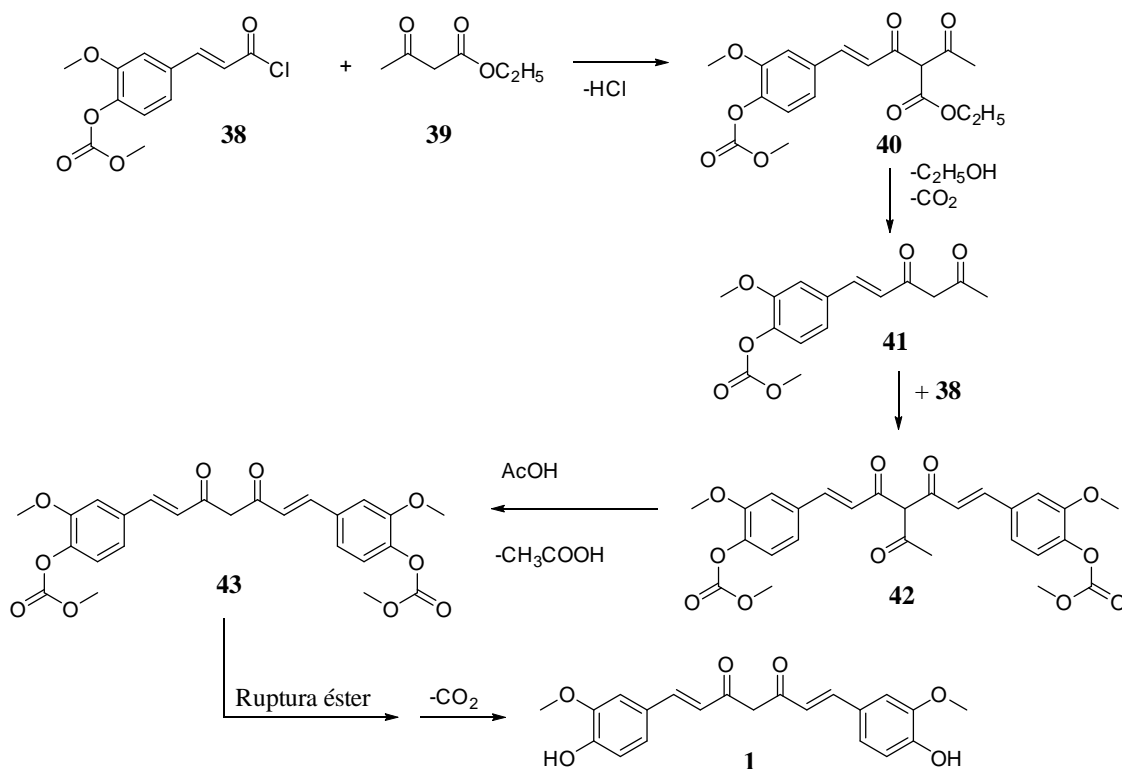
Las principales ventajas que aporta la introducción de átomos de flúor en el diseño de fármacos son [31]:

- *Puede sustituir al grupo hidroxilo y al hidrógeno.* Actúa como isómero del grupo hidroxilo y, por su pequeño tamaño, es también capaz de reemplazar al hidrógeno sin apenas distorsionar la geometría de la molécula. En ocasiones, esta sustitución puede llegar a bloquear o activar una reacción bioquímica.
- *Aumenta la estabilidad metabólica.* La sustitución de un C-H por un C-F aumenta considerablemente la estabilidad metabólica de la molécula, ya que la fortaleza del enlace del carbono con el flúor es mayor. El rápido metabolismo oxidativo por las enzimas del hígado (citocromos P450) limita la biodisponibilidad de algunos compuestos ya que, tras la oxidación, la lipofilia disminuye lo que permite una rápida eliminación. Para evitar este problema, una estrategia es bloquear el sitio metabólicamente lábil con un átomo de flúor [32].
- *Aumenta la lipofilia.* Debido a que el enlace carbono-flúor es más hidrófobo que el enlace carbono-hidrógeno y debido a la baja polarizabilidad del flúor. Por ejemplo, el grupo trifluorometilo (CF_3) y los grupos fluoro-aril sustituidos, aumentan notablemente la solubilidad lipídica de las moléculas que los contienen. Al elevar la lipofilia se facilita el transporte a través de la membrana celular y por tanto aumenta la biodisponibilidad [33]. Sin embargo, un aumento elevado de la lipofilia puede conducir también a una baja solubilidad, dando lugar a una absorción errática e incompleta. Una de las reglas de Lipinski para la selección de moléculas con potencial terapéutico, es que el coeficiente de reparto octanol/agua sea inferior o igual a 5, es decir, un $\log P > 5$ implicará una mala absorción.
- *Modifica el pK_a .* Ello tiene un fuerte efecto en las propiedades farmacocinéticas de las moléculas y en la afinidad de unión con el receptor. La accesibilidad de los fármacos orales al torrente sanguíneo se ve afectada por el pK_a de la molécula [32], el cual puede ser optimizado con la adecuada incorporación de flúor, ya que la acidez o basicidad de los grupos funcionales próximos al flúor resulta modificada por la fuerte electronegatividad del mismo.

3.2 SÍNTESIS

3.2.1 Métodos sintéticos para la obtención de curcumina y análogos curcuminoides

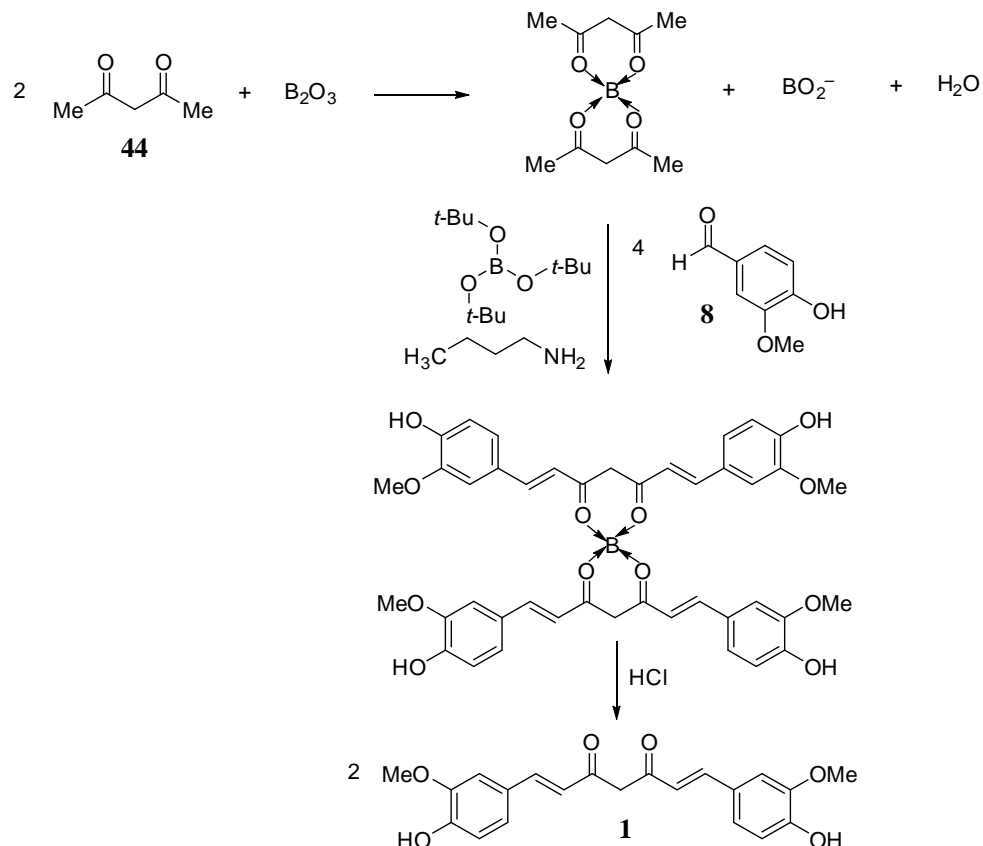
La curcumina fue sintetizada por primera vez en el año 1913 por Lampe [34] a partir de cloruro de carbometoxiferuloilo (**38**) y acetoacetato de etilo (**39**) en cinco etapas y con bajo rendimiento (Esquema 2). En la primera etapa se obtuvo el compuesto **40** que, tras saponificación y descarboxilación, dio lugar al intermedio **41** que fue tratado de nuevo con cloruro de carbometoxiferuloilo (**38**). El producto de condensación resultante, un derivado de carbometoxi-diferuloilacetona **42**, se escindió entonces bajo tratamiento con medio ácido en caliente. Finalmente, la curcumina fue obtenida por saponificación y posterior descarboxilación.



Esquema 2. Síntesis de la curcumina según el método descrito por Lampe.

El método más empleado actualmente es el descrito por Pabon [35] y consiste en la reacción de la vainillina (**8**) con acetilacetona (**44**) y óxido de boro. En un primer momento condujo a un rendimiento de tan solo el 10%, pero fue mejorado tras el uso de tri-*t*-butilborato y 1-butilamina (Esquema 3). El complejo formado con el óxido de boro previene que los hidrógenos del metileno de la acetilacetona, que presentan una elevada acidez, experimenten la condensación de Knoevenagel con la vainillina, haciendo que

ésta ocurra en los grupos metilo terminales de la dicetona. El agua formada como resultado de la condensación de la vainillina (**8**) y el complejo de boro se elimina gracias a la adición de tri-*t*-butilborato. Tras la adición de ácido clorhídrico el complejo de boro se disocia obteniéndose dos equivalentes de curcumina.

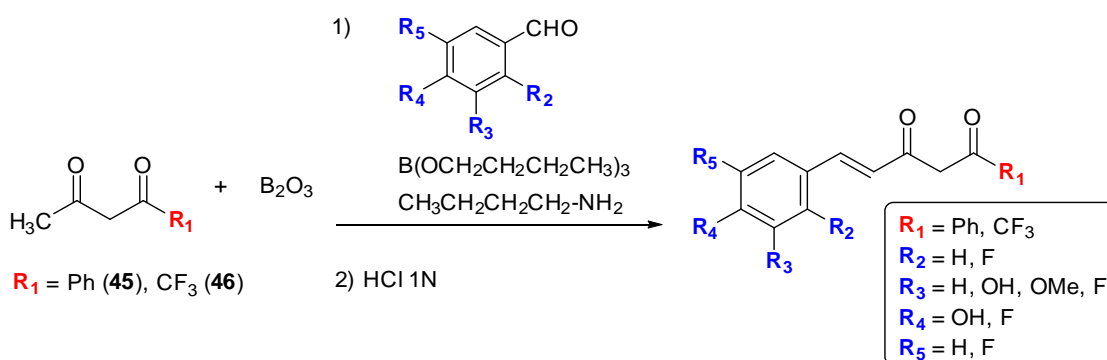


Esquema 3. Síntesis de Pabon de la curcumina.

Los intentos de algunos autores de reemplazar el óxido de boro por ácido bórico, no fueron exitosos. Rao y Sudheer [36] propusieron el uso de trifluoroboronita, obteniendo complejos que se pueden hidrolizar en metanol acuoso a pH 5.8 para la obtención de curcumina. Más recientemente, se ha descrito la síntesis, tanto de curcumina como de otros curcuminoides, mediante el uso de óxido de calcio como catalizador y microondas [37]. Sin embargo, los intentos de preparación de nuestros análogos curcuminoides por este método no dieron resultado, recuperándose los productos de partida.

3.2.2 Síntesis de β -dicetonas hemicurcuminoides

La síntesis de las β -dicetonas **52-59**, se llevó a cabo, a partir de los correspondientes aldehídos (Figura 14), según el método descrito por Pabon [35] (Esquema 4). Como dicetonas de partida se emplearon benzoilacetona (**45**) o 1,1,1-trifluoropentano-2,4-diona (**46**) dando lugar a dos nuevas series: una de β -dicetonas hemicurcuminoides fenil sustituidas y otra serie de β -dicetonas curcuminoides trifluorometil sustituidas (Figura 15).



Esquema 4. Procedimiento sintético para la preparación de β -dicetonas hemicurcuminoides.

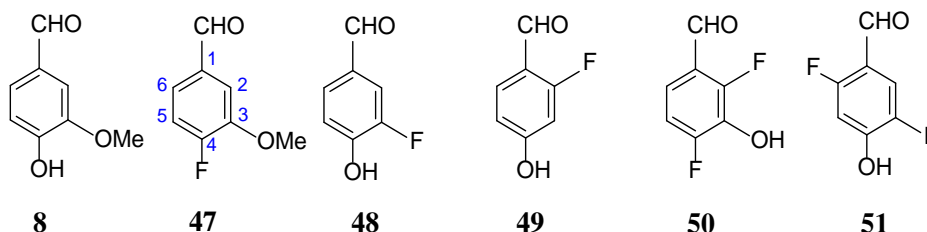


Figura 14. Aldehídos de partida (numeración empleada para caracterización por RMN en azul).

En la Figura 15 se recogen las estructuras de las β -dicetonas hemicurcuminoides sintetizadas. La síntesis de los compuestos **24-31** había sido descrita previamente [25,26], mientras que los compuestos **52-59** se han preparado por primera vez en la presente Tesis [38].

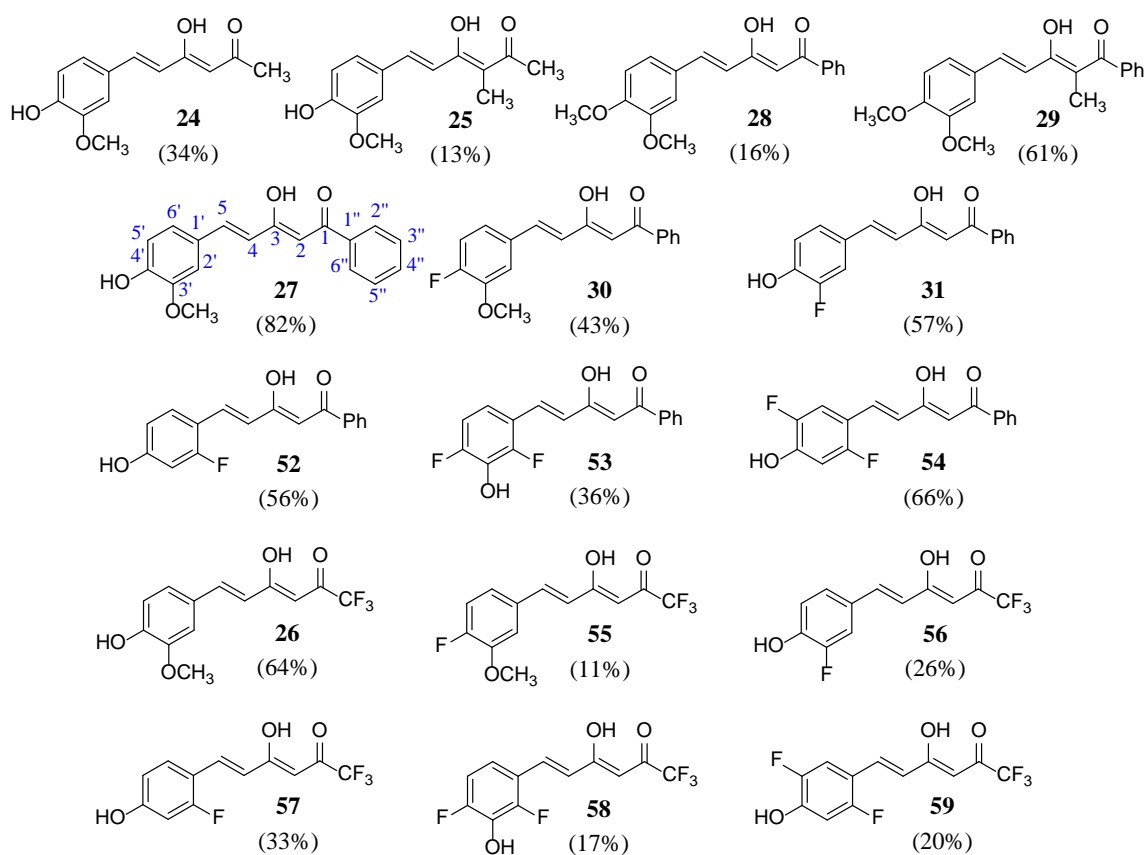
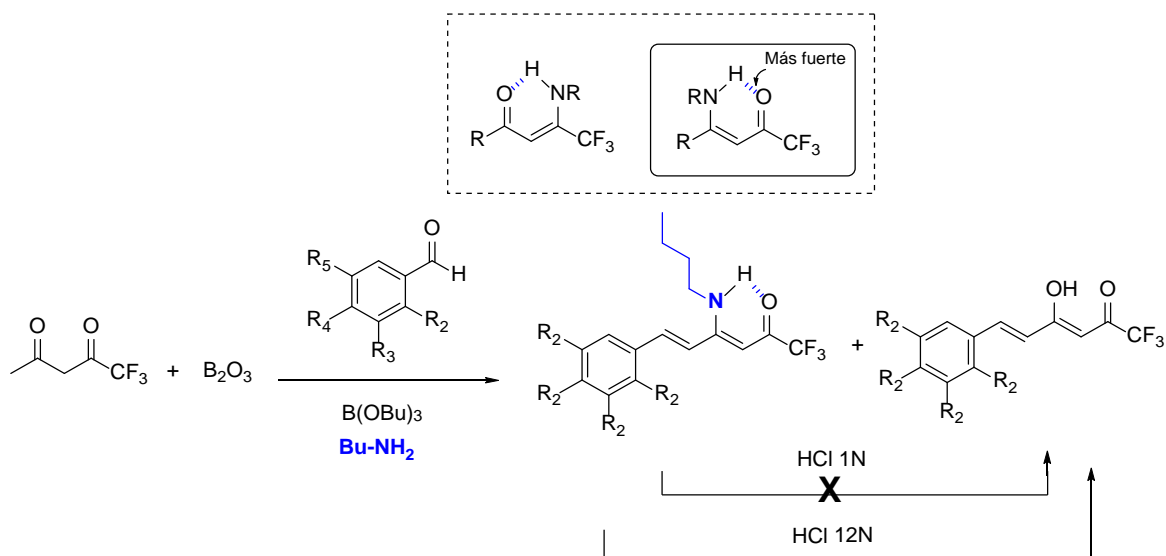


Figura 15. β -Dicetonas hemicurcuminoideas sintetizadas (numeración empleada para caracterización por RMN en azul y rendimientos entre paréntesis).

Respecto a los rendimientos obtenidos en la síntesis de β -dicetonas hemicurcuminoideas, vale la pena comentar algunos aspectos. La obtención de los derivados fenil sustituidos transcurrió con buenos rendimientos salvo en aquellos casos en los que el aldehído de partida no poseía un grupo hidroxilo en la posición 4': **28** (16%), **30** (43%) y **53** (36%); a excepción de **29** (61%) que posee un metilo en la posición 2. Hay que destacar también que el empleo de aldehídos fluorados se tradujo en todos los casos en una disminución del rendimiento frente al compuesto no fluorado **27** (82%). En cuanto a los derivados metil sustituidos, presentan rendimientos del 34% para **24** y del 13% para **25**, siendo inferiores a los de los fenil derivados.

En la serie de las β -dicetonas trifluorometil sustituidas, se observa de nuevo que el mayor rendimiento es para el compuesto que no posee flúor en el anillo bencénico **26** (64%); viéndose éste disminuido en aquellos derivados que no poseen un grupo hidroxilo en la posición 4', como ocurría con la serie fenil sustituida. Sin embargo, en esta serie ninguno de los otros derivados fluorados presentó buenos rendimientos: **56** (26%), **57** (33%) y **59** (20%). Los bajos rendimientos obtenidos se deben la formación

de la enamina resultante de la adición de la base (butilamina) a uno de los carbonos carbonílicos; concretamente al carbono 3 (Esquema 5).



Esquema 5. Principales productos obtenidos en la síntesis de las β -dicetonas hemicurcuminoides trifluorosustituidas **26** y **55-59**.

La estructura de dicha enamina fue establecida por RMN de ^1H y de ^{13}C en CDCl_3 (Figura 16).

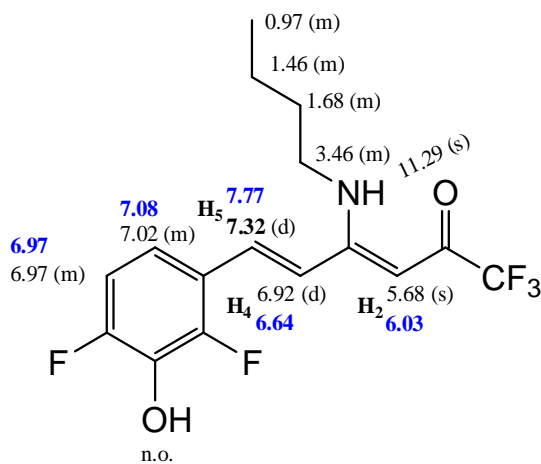


Figura 16. Desplazamientos químicos en ppm del espectro ^1H RMN en disolución (CDCl_3) de la enamina formada por reacción de **58** con butilamina. Los valores pertenecientes a **58** se señalan en azul.

En la Figura 16, se observan las principales variaciones en las señales de ^1H de la enamina derivada de la β -dicetona **58** (valores pertenecientes a **58** en azul): H2 ($\Delta\delta = 0.55$ ppm), H4 ($\Delta\delta = 0.28$ ppm) y H5 ($\Delta\delta = 0.45$ ppm); además de la aparición de cinco nuevas señales correspondientes al resto alquílico de la butilamina y al protón

perteneciente al NH (11.29 ppm). Por último, el acoplamiento de la señal de ^{13}C a 175.0 ppm (C1) con los átomos de flúor del grupo CF_3 ($^2J_{\text{CF}_3} = 32.0$ Hz) confirmó que se trataba de la estructura de dicho compuesto.

La hidrólisis llevada a cabo con HCl 1N, para la ruptura de complejo de boro, no consiguió hidrolizar la enamina formada con lo que en el crudo de reacción se observó el mismo porcentaje de enamina que de la β -dicetona deseada. Un aumento en la temperatura o en los tiempos de reacción solo condujo, o bien a la enamina sin hidrolizar, o a productos de descomposición como el correspondiente aldehído de partida. Con el fin de optimizar las condiciones de hidrólisis de la enamina formada, se realizó una búsqueda bibliográfica encontrando que Fustero *et al.* [39] describen que la fortaleza del enlace de hidrógeno intramolecular $(\text{CF}_3\text{R})\text{O}\cdots\text{HN}$ es mayor que la del enlace de hidrógeno $(\text{CF}_3\text{R})\text{N}\cdots\text{HO}$, por lo que las condiciones de hidrólisis deben ser más vigorosas. Así, la adición de HCl 12 N a temperatura ambiente con agitación magnética durante 30 minutos, condujo a la β -dicetona deseada (Esquema 5).

3.3 DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL

3.3.1 Caracterización de los aldehídos fluorados empleados

Entre los aldehídos empleados en la síntesis de β -dicetonas hemicurcuminoides, se ha llevado a cabo la caracterización de cinco de ellos, **47-51** que contienen uno o dos átomos de flúor, mediante el uso de experimentos de RMN mono y bidimensionales junto con cálculos teóricos GIAO de los desplazamientos químicos. La información estructural obtenida nos será de gran utilidad en la caracterización de los correspondientes análogos curcuminoides preparados a partir de dichos aldehídos fluorados.

3.3.1.1 Determinación estructural por RMN

Antes de la obtención de los resultados que a continuación se detallan [40], solo habían sido publicados los datos de la información espectroscópica de RMN de ^1H y ^{19}F de **50** [41]. Particularmente en el caso de este compuesto (**50**), el alto valor de $^4J_{\text{FF}}$ arrojaba dudas sobre su estructura.

En las Tablas 1-3 se recogen los resultados de los experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C y ^{19}F en disolución. La atribución de los desplazamientos químicos se basó en la

multiplicidad de las señales así como en las correlaciones observadas en los espectros de (^1H - ^{13}C) gs-HMQC y (^1H - ^{13}C) gs-HMBC.

La asignación de las constantes de acoplamiento nJ (HF) es inequívoca ya que los valores se determinaron tanto en los espectros de ^1H como en los de ^{19}F (Tablas 1 y 3). Las constantes de acoplamiento 1J (CF) a través de un enlace en los aldehídos monofluorados **47-49** siguen el orden: $^1J_{\text{C2F2}} > ^1J_{\text{C4F4}} > ^1J_{\text{C3F3}} \sim ^1J_{\text{C5F5}}$. Este patrón se mantiene en los derivados difluorados **50** y **51** (Tabla 2). Con respecto a las constantes de acoplamiento 2J (CF) a través de dos enlaces, varían desde $^2J_{\text{C1F2}} = 6.2$ Hz en el compuesto **50** hasta $^2J_{\text{C3F2}} = 25.0$ Hz en el compuesto **51**. Obsérvese que la magnitud de J disminuye al pasar de CH-F a CR-F (R = OH y CHO). Las constantes de acoplamiento 3J (CF) dependen también de la estructura, con valores comprendidos entre $^3J_{\text{C4F2}} = 13.1$ y 13.0 Hz para los aldehídos **49** y **51** (C-CH-F) respectivamente, y $^3J_{\text{C5F3}} = 1.6$ Hz en **48** (C-C(OH)-F).

En el compuesto **50** para asignar los desplazamientos químicos de C2 y C4 se utilizó la correlación entre 154.0 ppm (C2) y el protón del grupo formilo a 10.10 ppm que está ausente en la señal de 156.4 ppm (Figura 17). La señal de 119.0 ppm perteneciente a C6 también presenta una correlación con el protón del grupo formilo.

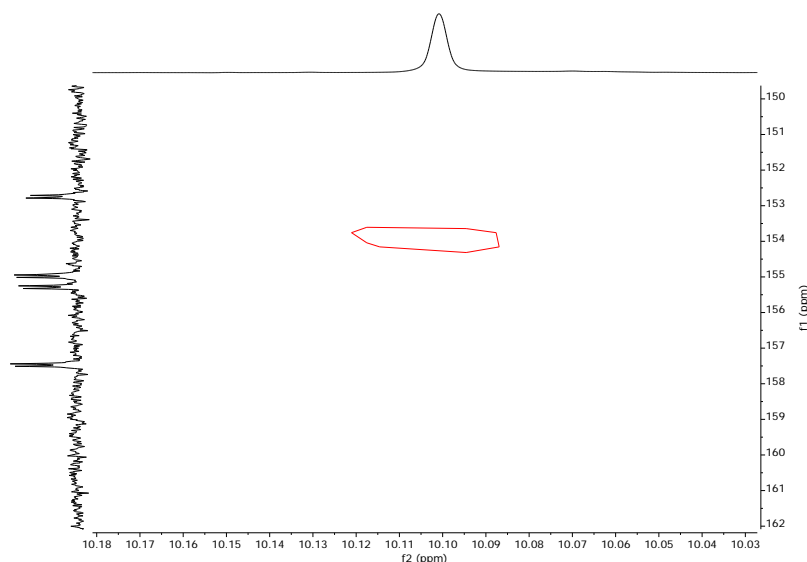


Figura 17. Espectro (^1H - ^{13}C) gs-HMBC donde se muestra la correlación entre C2 y H-formilo en el 2,4-difluoro-3-hidroxibenzaldehído **50**.

Los desplazamientos químicos de flúor se basaron en las constantes de acoplamiento ^{13}C - ^{19}F . Habiendo asignado inequívocamente los carbonos C2 y C4, el valor de la señal a -121.7 ppm corresponde a F4 dado que posee una constante de

acoplamiento $^1J_{FC} = 251.1$ Hz y por tanto la señal a -139.3 corresponde a F2 pese a tener un desplazamiento químico mayor (en valor absoluto) que las señales de correspondientes a F2 en los compuestos **49** y **51** (-119.1 y -123.5 Hz, respectivamente).

Tabla 1. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de 1H RMN y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los aldehídos **47-51**.

Aldehído	Disolv.	CHO	H2	H3	H5	H6	OH
47	$CDCl_3$	9.91 (s)	7.51 (dd) $^4J_{F4}=8.1$ $^4J_{H6}=1.8$	---	7.23 (dd) $^3J_{F4}=10.5$ $^3J_{H6}=8.2$	7.45 (ddd) $^3J_{H5}=8.2$ $^4J_{F4}=4.4$ $^4J_{H2}=1.8$	3.96 (s) (OMe)
	$DMSO-d_6$	9.93 (s)	7.63 (dd) $^4J_{H6}=1.9$ $^4J_{F4}=8.4$	---	7.45 (dd) $^3J_{F4}=11.1$ $^3J_{H6}=8.2$	7.57 (ddd) $^3J_{H5}=8.2$ $^4J_{F4}=4.6$ $^4J_{H2}=1.9$	3.91(s) (OMe)
48	$CDCl_3$	9.85 (d) $^5J_{F3}=2.2$	7.64 (dd) $^3J_{F3}=11.0$ $^4J_{H6}=1.9$	---	7.15 (dd) $^3J_{H6}=8.2$ $^4J_{F3}=8.2$	7.62 (ddd) $^3J_{H5}=8.2$ $^4J_{H2}=1.9$ $^5J_{F3}=0.8$	6.13 (sa)
	$DMSO-d_6$	9.78 (d) $^5J_{F3}=1.9$	7.63 (dd) $^3J_{F3}=11.4$ $^4J_{H6}=1.9$	---	7.11(dd) $^3J_{H6}=8.5$ $^4J_{F3}=8.5$	7.61 (ddd) $^3J_{H5}=8.5$ $^4J_{H2}=1.9$ $^5J_{F3}=0.6$	11.09 (s)
49	$DMSO-d_6$	10.00 (d) $^5J_{H5}=0.5$	---	6.66 (dd) $^3J_{F2}=12.9$ $^4J_{H5}=2.3$	6.74 (ddd) $^3J_{H6}=8.6$ $^4J_{H3}=2.3$ $^5J_{CHO}=0.5$	7.68 (dd) $^3J_{H5}=8.6$ $^4J_{F2}=8.6$	11.90 (s)
50	$DMSO-d_6$	10.10 (d) $^5J_{H5}=0.6$	---	---	7.21(m) $^3J_{F4}=10.0$ $^3J_{H6}=8.8$ $^5J_{F2}=1.9$ $^5J_{CHO}=0.6$ $^5J_{OH}=0.6$	7.31(ddd) $^3J_{H5}=8.8$ $^4J_{F2}=7.1$ $^4J_{F4}=6.1$	10.73 (s)
51	$DMSO-d_6$	9.98 (d) $^5J_{F5}=2.6$	---	6.86 (dd) $^3J_{F2}=11.8$ $^4J_{F5}=6.7$	---	7.54 (dd) $^3J_{F5}=10.8$ $^4J_{F2}=6.6$	11.5 (sa)

Tabla 2. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{13}C RMN en disolución y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los aldehídos **47-51**. Cuando no están especificadas son J_{CH} .

Ald.	Disolv.	CHO	C1	C2	C3	C4	C5	C6
47 ^a	CDCl ₃	190.8	133.3 ⁴ $J_{\text{F4}}=2.5$	111.8 ³ $J_{\text{F4}}=3.8$	148.6 ² $J_{\text{F4}}=11.4$	156.5 ¹ $J_{\text{F4}}=257.5$	116.5 ² $J_{\text{F4}}=20.1$	125.3 ³ $J_{\text{F4}}=8.8$
	DMSO- <i>d</i> ₆	191.6 ¹ $J=178.5$ ³ $J=^3J=4.9$	133.3 ⁴ $J_{\text{F4}}=3.1$ ² $J_{\text{CHO}}=25.0$ ³ $J=6.5$	112.9 ¹ $J=167.1$ ³ $J_{\text{F4}}=3.7$	147.9 ² $J_{\text{F4}}=11.2$	155.3 ¹ $J_{\text{F4}}=254.3$	116.6 ¹ $J=166.4$ ² $J_{\text{F4}}=19.3$	124.3 ¹ $J=166.6$ ³ $J_{\text{F4}}=8.5$ ³ $J=^3J=8.0$
48	CDCl ₃	190.6 ⁴ $J_{\text{F3}}=1.9$	130.3 ³ $J_{\text{F3}}=4.7$	115.7 ² $J_{\text{F3}}=18.4$	151.2 ¹ $J_{\text{F3}}=241.2$	149.5 ² $J_{\text{F3}}=14.9$	117.6 ³ $J_{\text{F3}}=1.6$	128.5 ⁴ $J_{\text{F3}}=2.8$
49	DMSO- <i>d</i> ₆	185.8 ³ $J_{\text{F2}}=5.0$	116.2 ² $J_{\text{F2}}=8.7$	165.2 ¹ $J_{\text{F2}}=256.7$	102.8 ² $J_{\text{F2}}=23.0$	165.1 ³ $J_{\text{F2}}=13.0$	112.7 ⁴ $J_{\text{F2}}=2.6$	131.0 ³ $J_{\text{F2}}=4.3$
50	DMSO- <i>d</i> ₆	187.2 ¹ $J=184.0$ ³ $J_{\text{F2}}=5.0$ ³ $J=4.9$	121.3 ² $J_{\text{F2}}=6.2$ ⁴ $J_{\text{F4}}=3.0$	154.0 ¹ $J_{\text{F2}}=255.6$ ³ $J_{\text{F4}}=7.4$	134.4 ² $J_{\text{F2}}=15.4$ ² $J_{\text{F4}}=15.4$	156.4 ¹ $J_{\text{F4}}=251.1$ ³ $J_{\text{F2}}=6.8$	112.4 ¹ $J=168.2$ ² $J_{\text{F4}}=19.8$ ⁴ $J_{\text{F2}}=3.1$	119.0 ¹ $J=169.5$ ³ $J_{\text{F4}}=9.7$ ³ $J_{\text{F2}}=2.3$
51	DMSO- <i>d</i> ₆	185.4 ³ $J_{\text{F2}}=4.9$ ⁴ $J_{\text{F5}}=1.6$	115.2 ² $J_{\text{F2}}=10.6$ ³ $J_{\text{F5}}=4.8$	160.7 ¹ $J_{\text{F2}}=254.1$ ⁴ $J_{\text{F5}}=1.5$	105.1 ² $J_{\text{F2}}=25.0$ ³ $J_{\text{F5}}=2.9$	152.8 ² $J_{\text{F5}}=14.7$ ³ $J_{\text{F2}}=13.1$	148.0 ¹ $J_{\text{F5}}=241.1$ ⁴ $J_{\text{F2}}=2.1$	114.8 ² $J_{\text{F5}}=20.5$ ³ $J_{\text{F2}}=4.6$

^a OCH₃: 56.3 ppm (CDCl₃) y 56.1, ¹ $J = 145.7$ Hz (DMSO-*d*₆).

Tabla 3. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{19}F RMN en disolución y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los aldehídos 47-51.

Aldehído	Disolv.	F2	F3	F4	F5
47	CDCl_3	---	---	-124.3 $^1J_{\text{FC}}=257.5$ $^3J_{\text{H5}}=10.5$ $^4J_{\text{H2}}=8.1$ $^4J_{\text{H6}}=4.4$	---
	$\text{DMSO}-d_6$	---	---	-125.3 $^1J_{\text{FC}}=254.3$ $^3J_{\text{H5}}=11.0$ $^4J_{\text{H2}}=8.4$ $^4J_{\text{H6}}=4.6$	---
48	CDCl_3	---	-139.9 $^1J_{\text{FC}}=241.2$ $^3J_{\text{H2}}=11.0$ $^5J_{\text{CHO}}=2.2$ $^5J_{\text{H6}}=0.8$ $^4J_{\text{H5}}=8.2$	---	---
	$\text{DMSO}-d_6$	---	-135.5 $^1J_{\text{FC}}=244.7$ $^3J_{\text{H2}}=11.4$ $^4J_{\text{H5}}=8.5$ $^5J_{\text{CHO}}=1.9$ $^5J_{\text{H6}}=0.6$	---	---
49	$\text{DMSO}-d_6$	-119.1 $^1J_{\text{FC}}=256.7$ $^3J_{\text{H3}}=12.9$ $^4J_{\text{H6}}=8.6$	---	---	---
50	$\text{DMSO}-d_6$	-139.3 $^1J_{\text{FC}}=255.6$ $^4J_{\text{FF}}=18.5$ $^4J_{\text{H6}}=7.1$ $^5J_{\text{H5}}=1.9$	---	-121.7 $^1J_{\text{FC}}=251.1$ $^4J_{\text{FF}}=18.5$ $^3J_{\text{H5}}=10.0$ $^4J_{\text{H6}}=6.1$	---
51	$\text{DMSO}-d_6$	-123.5 $^1J_{\text{FC}}=254.1$ $^5J_{\text{FF}}=15.2$ $^3J_{\text{H3}}=11.8$ $^4J_{\text{H6}}=6.6$	---	---	-139.9 $^1J_{\text{FC}}=241.1$ $^5J_{\text{FF}}=15.2$ $^3J_{\text{H6}}=10.8$ $^4J_{\text{H3}}=6.7$ $^5J_{\text{CHO}}=2.6$

3.3.1.2 Cálculos teóricos

Los cálculos teóricos DFT (density functional theory) se realizaron utilizando la función B3LYP [42], junto con el conjunto de bases 6-311++G(d, p) [43]. Los desplazamientos absolutos se calcularon dentro de la aproximación GIAO (Gauge independent atomic orbital) [44]. Todos los cálculos, incluyendo las constantes de acoplamiento espín-espín (SSCC, del inglés spin-spin coupling constants), se llevaron a cabo utilizando el programa Gaussian 09 [45]. Se utilizaron ecuaciones empíricas para transformar los desplazamientos absolutos ^1H , ^{13}C y ^{19}F en desplazamientos químicos [46]. La metodología de los átomos en moléculas (AIM, del inglés atoms in molecules) [47] se utilizó para analizar la densidad electrónica de algunas moléculas empleando el programa AIMAll [48].

Geometrías, energías y enlaces de hidrógeno intramoleculares

Las conformaciones estudiadas se encuentran en la Figura 18. Partiendo de la conformación **a**, se realizó un giro de 180° en el grupo 1-formilo cuando no hay átomos de F en la posición 2 para dar el conformero **b** (en un caso **d**) y se realizó un giro de 180° en el grupo OH para producir el conformero **c**.

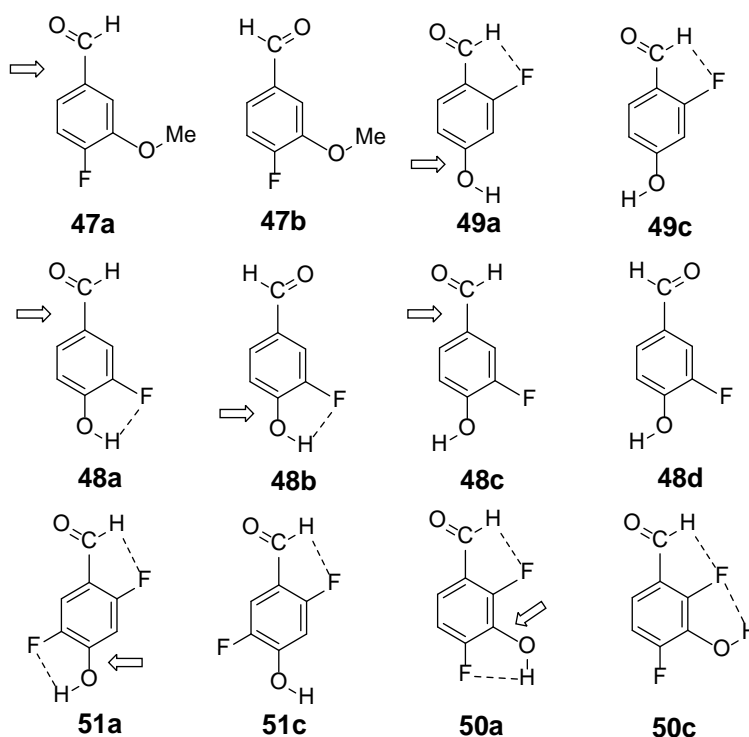


Figura 18. Diferentes conformaciones estudiadas de los aldehídos 47-51.

En cuanto al enlace de hidrógeno intramolecular C-F...H-O, el 2-fluorofenol es considerado como uno de los ejemplos clásicos de enlace de hidrógeno intramolecular (IMHB) [49], por ello, en el caso de los compuestos **48**, **50** y **51**, las líneas discontinuas corresponden a interacciones atractivas que podrían ser IMHBs. Sin embargo, pese a que un análisis AIM muestra una falta de puntos críticos de enlace (Figura 19), podría ser debido a que éstos están en el límite de detección.

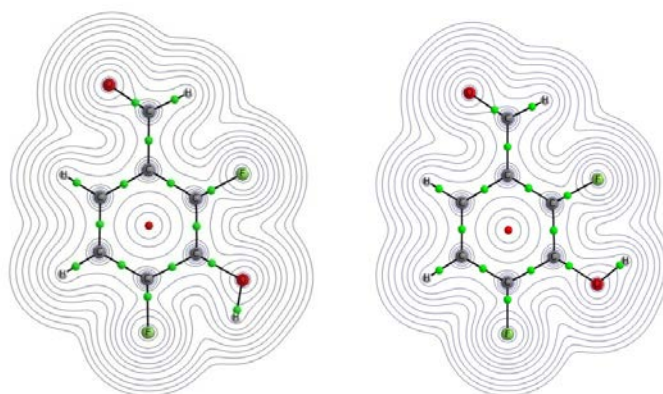


Figura 19. Contornos de densidad electrónica de los conformeros **50a** (izquierda) y **50c** (derecha). Los puntos anulares y verdes indican la posición de los puntos críticos de enlace y anillo, respectivamente.

Las energías correspondientes a las conformaciones de la Figura 18 se presentan en la Tabla 4:

Tabla 4. Energías absolutas (Hartrees) y relativas ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) incluyendo ZPE (zero-point energy), y momentos dipolares (D) de los diferentes conformeros de los aldehídos **47-51**.

	Energía SCF	ZPE	Energía Total	D	E_{rel} ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
47a	-559.48913	0.13339	-559.35574	3.24	4.2
47b	-559.49073	0.13354	-559.35718	0.92	0.0
49a	-520.18415	0.10533	-520.07883	4.50	0.9
49c	-520.18451	0.10525	-520.07926	4.10	0.0
48a	-520.18505	0.10546	-520.07959	2.97	1.6
48b	-520.18567	0.10546	-520.08021	3.06	0.0
48c	-520.18056	0.10520	-520.07536	2.75	13.4
48d	-520.18075	0.10526	-520.07549	5.31	12.9
51a	-619.44943	0.09726	-619.35217	3.08	0.0
51c	-619.44430	0.09709	-619.34720	4.68	13.5
50a	-619.44257	0.09725	-619.34532	3.11	0.0
50c	-619.44246	0.09721	-619.34524	1.50	0.3

En dicha tabla se observa que la rotación alrededor del grupo formilo (de **a** a **b**) modifica ligeramente la energía relativa de 1.6 a 4.2 kJ·mol⁻¹. La ruptura de la interacción O-H···F (de **a** a **c**) disminuye la estabilidad del compuesto en aproximadamente 13 kJ·mol⁻¹ en **48** y **51**; pero en el caso de los compuestos **49** y **50** ambas conformaciones poseen una energía similar.

Desplazamientos químicos

En la Tabla 5 se recogen los valores de los desplazamientos químicos experimentales y calculados. En general, el acuerdo entre los datos experimentales y teóricos es bastante bueno. Hay una diferencia sistemática en la señal de ¹³C del grupo CHO que aparece a ~191 ppm cuando no hay un átomo de flúor adyacente, F2 (**47** y **48**), y a ~186 ppm cuando está presente (**49**, **50** y **51**).

El enlace de hidrógeno intramolecular entre el OH y un átomo de flúor adyacente tiene un efecto sobre los desplazamientos químicos. Esto significa que en DMSO-*d*₆ el porcentaje de la conformaciones con O-H···F es menor debido a que el DMSO es un buen aceptor de HBs (hydrogen bonds) y destruye el enlace de hidrógeno intramolecular.

Tabla 5. *Desplazamientos químicos experimentales y calculados de los aldehídos 47-51.*

Aldehído	Átomo	Exp. CDCl ₃	Exp. DMSO- <i>d</i> ₆	a	b	c	d
47	CHO	9.91	9.93	9.87	9.82	---	---
	H2	7.51	7.63	6.84	7.43	---	---
	H5	7.23	7.45	7.08	7.05	---	---
	H6	7.45	7.57	7.71	7.04	---	---
	OCH ₃	3.96	3.91	3.80	3.80	---	---
	CHO	190.8	191.6	185.6	186.0	---	---
	C1	133.3	133.3	133.0	133.6	---	---
	C2	111.8	112.9	115.0	108.2	---	---
	C3	148.6	147.9	148.9	149.6	---	---
	C4	156.5	155.3	158.9	159.2	---	---
	C5	116.5	116.6	116.8	115.7	---	---
	C6	125.3	124.3	119.7	126.2	---	---
	OCH ₃	56.3	56.1	52.9	53.3	---	---
	F4	-124.3	-125.3	-121.3	-119.4	---	---
	48	CHO	9.85	9.78	9.75	9.78	9.75
H2		7.64	7.63	7.20	7.82	7.23	7.82
H5		7.15	7.11	7.04	7.03	6.51	6.50
H6		7.62	7.61	7.90	7.25	7.77	7.10
CHO		190.6	---	184.2	184.8	184.5	184.4
C1		130.3	---	130.0	130.6	130.8	131.5
C2		115.7	---	119.8	113.6	122.3	116.2
C3		151.2	---	152.0	153.1	152.6	153.6
C4		149.5	---	150.5	150.4	150.4	150.5

	C5	117.6	---	117.2	115.8	115.0	113.4
	C6	128.5	---	125.0	131.1	123.6	129.7
	F3	-139.9	-135.5	-150.9	-148.9	-134.2	-131.7
49	CHO	---	10.00	10.28	---	10.27	---
	H3	---	6.66	6.07	---	6.57	---
	H5	---	6.74	6.70	---	6.18	---
	H6	---	7.68	7.96	---	7.89	---
	CHO	---	185.8	180.2	---	180.5	---
	C1	---	116.2	118.5	---	118.8	---
	C2	---	165.2	169.0	---	169.7	---
	C3	---	102.8	99.6	---	102.4	---
	C4	---	165.1	162.6	---	162.7	---
	C5	---	112.7	111.7	---	108.7	---
	C6	---	131.0	131.6	---	130.8	---
	F2	---	-119.1	-123.3	---	-121.8	---
50	CHO	---	10.10	10.38	---	10.34	---
	H5	---	7.21	6.81	---	6.84	---
	H6	---	7.31	7.48	---	7.48	---
	CHO	---	187.2	181.6	---	180.6	---
	C1	---	121.3	122.6	---	120.5	---
	C2	---	154.0	157.0	---	156.8	---
	C3	---	134.4	135.0	---	134.7	---
	C4	---	156.4	157.0	---	157.5	---
	C5	---	112.4	110.3	---	113.1	---
	C6	---	119.0	118.3	---	118.6	---
	F2	---	-139.3	-142.4	---	-158.6	---
	F4	---	-121.7	-135.3	---	-116.9	---
51	CHO	---	9.98	10.23	---	10.21	---
	H3	---	6.86	6.64	---	6.14	---
	H6	---	7.54	7.67	---	7.66	---
	CHO	---	185.4	180.2	---	179.9	---
	C1	---	115.2	117.9	---	118.4	---
	C2	---	160.7	165.2	---	163.9	---
	C3	---	105.1	103.9	---	101.6	---
	C4	---	152.8	151.2	---	150.9	---
	C5	---	148.0	149.1	---	149.7	---
	C6	---	114.8	114.4	---	116.9	---
	F2	---	-123.5	-126.0	---	-128.8	---
	F5	---	-139.9	-154.3	---	-137.8	---

Constantes de acoplamiento F-F

La Tabla 6 recoge los datos de las constantes de acoplamiento J_{FF} experimentales y calculadas de **50a**, **50c**, **51a** y **51c**. Los valores experimentales son absolutos (sin signo), pero están de acuerdo con los descritos en la literatura para $^5J_{FF}$ (Tabla 6). En cuanto a los valores calculados, están de acuerdo con los experimentales en el caso de $^4J_{FF}$, donde el gran aumento de $^4J_{FF}$ en **50** es atribuible a la presencia de un grupo OH entre ambos átomos de F. El modelo aditivo descrito en [46] (un incremento de +2.81 Hz sobre +6.95) predice un valor de 9.76 Hz.

Tabla 6. Constantes de acoplamiento J_{FF} (Hz) experimentales y calculadas para los conformeros **a** y **c** de **50** y **51**.

Comp.	J_{FF}	Media en la lit. [50,51]	Exp. DMSO- d_6	Calculado
50a	$^4J_{FF}$	+6.95	18.5	+16.3
50c				+16.4
51a	$^5J_{FF}$	+18.30	15.2	+18.9
51c				+19.2

Se calculó $^4J_{FF}$ para el 2,6-difluorofenol (Figura 20) encontrándose un valor de 8.9 Hz, en buen acuerdo con el modelo aditivo, pero lejos del valor experimental de 18.5 Hz. Luego se calculó también para el 2,4-difluorobenzaldehído, encontrando una $^4J_{FF} = 10.6$ Hz. Utilizando el valor del 1,3-difluorobenceno ($^4J_{FF} \sim 7.0$ Hz), resulta una suma de 12.5 Hz, todavía 6.0 Hz inferior al valor experimental para **50**.

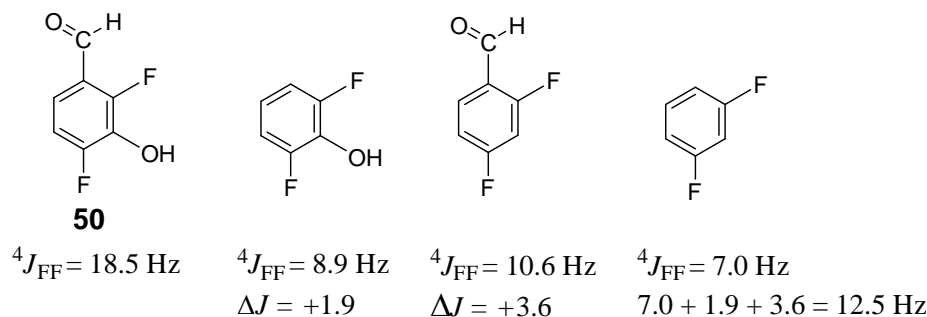


Figura 20. Descomposición en fragmentos de la constante de acoplamiento $^4J_{FF}$ calculada.

Otro aspecto que merece un breve comentario es la constante de acoplamiento a larga distancia que implica el H del grupo formilo porque es estereoespecífica. Así, $^5J_{HH}$ y $^5J_{HF}$ se observan sólo cuando los átomos están conectados en una disposición en zigzag [52,53]. Estos resultados (Tablas 1 y 3) se resumen en la Figura 21. En el caso de **48**, indican que las conformaciones **48b** y **48d** deben ser predominantes sobre **48a** y **48c**, respectivamente, lo que concuerda con sus energías relativas (Tabla 4).

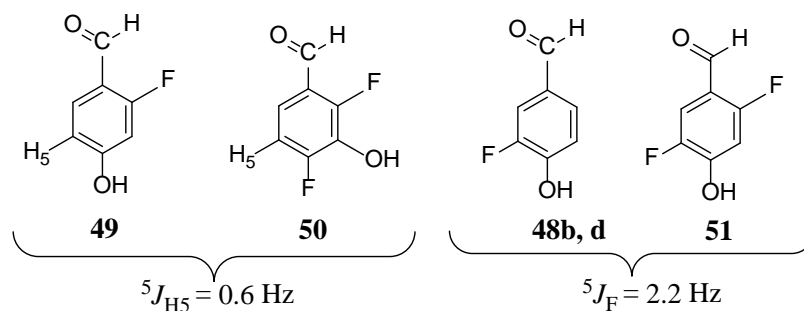


Figura 21. Constantes de acoplamiento a larga distancia para los aldehídos **48-51**.

3.3.2 Caracterización de β -dicetonas hemicurcuminoideas

3.3.2.1 Determinación estructural por RMN

En el equilibrio ceto-enol de la curcumina (**1**), una molécula simétrica, las dos formas tautómeras enólicas presentan la misma energía. En el caso de nuestros análogos curcuminoideas asimétricos, de los tres tautómeros posibles (Figura 22), se han observado las formas enólicas **a** y **b**.

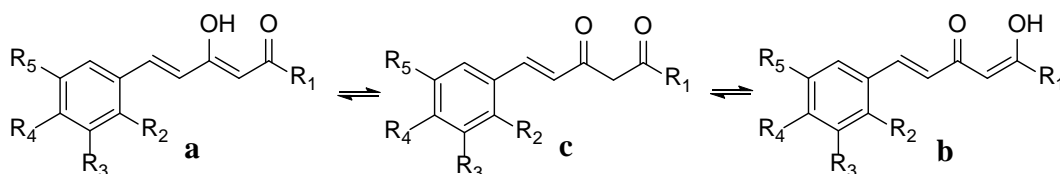


Figura 22. Posibles tautómeros de las β -dicetonas hemicurcuminoideas sintetizadas.

En el estudio del fenómeno de la tautomería por RMN pueden darse tres situaciones:

- *Transferencia protónica rápida:* se observan señales finas. El desplazamiento químico observado corresponde al valor promedio de los desplazamientos químicos de los diferentes tautómeros en equilibrio, según su proporción.
- *Transferencia protónica intermedia:* se observan señales anchas, por lo que para afinarlas, se calienta de forma que se aumenta la velocidad de transferencia. Por el contrario, si lo que se desea es bloquear esta transferencia, el experimento debe realizarse a baja temperatura.
- *Transferencia protónica lenta:* se observan las señales de los diferentes tautómeros separadas entre sí, siendo posible calcular su proporción por integración de las señales de cada uno.

En el presente apartado se discutirán los resultados experimentales de RMN de doce compuestos, seis de la serie $R_1 = \text{Ph}$ y seis de la serie $R_1 = \text{CF}_3$, representados en su forma tautomérica **a** en la Figura 15. Los valores necesarios para la discusión se presentan en las Tablas 7-12.

En el estudio del equilibrio ceto-enólico se ha observado que predomina el tautómero **a**, tanto en disolución como en estado sólido, para $R_1 = \text{Ph}$ (**27**, **30**, **31**, **52-54**). Sin embargo, en el caso de los trifluoro derivados $R_1 = \text{CF}_3$ (**26**, **55-59**), en el experimento de ^1H RMN en CDCl_3 se observa la presencia del tautómero **a**; mientras

que en el espectro de ^1H RMN en $\text{DMSO-}d_6$ se observan señales anchas, especialmente las que corresponden al ceto-enol H2 y a los protones cercanos H4 y H5, como consecuencia de la transferencia de protones de velocidad intermedia (PT, del inglés proton transfer) en la interconversión de los dos tautómeros enólicos **a** y **b** (Figura 23) [26]. Muy probablemente, el $\text{DMSO-}d_6$ rompe el enlace de hidrógeno intramolecular $\text{O-H}\cdots\text{O}$ para formar HBs intermoleculares con el disolvente, disminuyendo la tasa de transferencia protónica PT, una velocidad que es más rápida en cloroformo ya que implica PT entre dos átomos de O muy cercanos en el enlace de hidrógeno intramolecular. Esto conduce a la observación única de ambos tautómeros enol (Figura 23). Se debe tener en cuenta que este comportamiento no se observó para los otros hemicurcuminoides, por lo que el grupo CF_3 tiene un papel determinante en la velocidad con la que se produce esta prototropía.

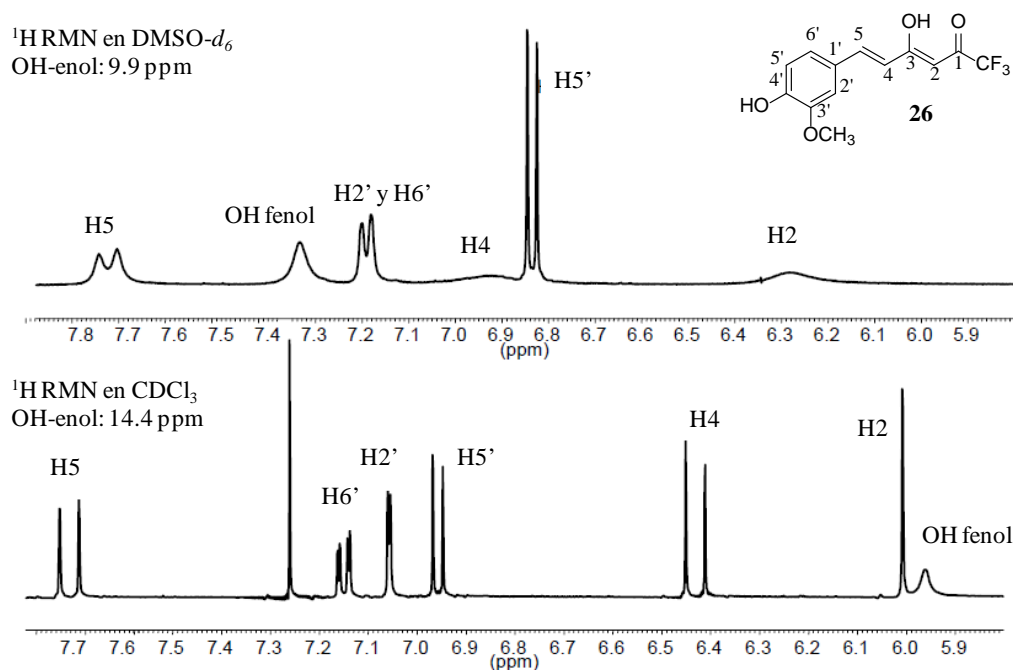


Figura 23. Espectro ^1H RMN de **26** en CDCl_3 y $\text{DMSO-}d_6$ [26].

Los desplazamientos químicos de ^{19}F , tanto en disolución como en estado sólido, de los grupos trifluorometilo en los compuestos **26** y **55-59**, aparecen entre -72.1 y -77.7 ppm (Tabla 12), siendo éstos valores típicos de los tautómeros ceto-enólicos (el del tautómero diceto aparece a -80/-83 ppm [54]). Por otro lado, el carbono carbonílico (C1) posee desplazamientos químicos de entre 178.8 y 180.2 ppm, observándose en todos ellos acoplamiento con los átomos de flúor del grupo trifluorometilo con $^2J_{\text{CF}}$ de valores comprendidos entre 36.2 y 34.3 Hz, lo que confirma la presencia del tautómero **a** en todos ellos.

En la Figura 24 hemos representado la señal perteneciente al grupo CF_3 del espectro de $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ MAS del compuesto **26**. En todos los demás compuestos (**55-59**), el grupo trifluorometilo aparece también como un singlete. En la bibliografía se encuentran espectros con esta señal en forma de multipletes complejos [55], si bien es cierto que se emplean condiciones diferentes.

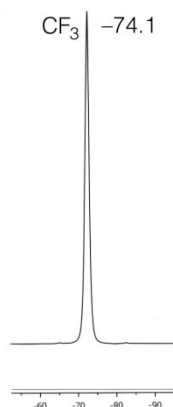


Figura 24. Ampliación del espectro ^{19}F MAS de (3Z,5E)-1,1,1-trifluoro-4-hidroxi-6-(4-hidroxi-3-metoxifenil)hexa-3,5-dien-2-ona (**26**).

En el compuesto **53**, la asignación de los dos átomos de flúor se llevó a cabo teniendo en cuenta el valor de las constantes de acoplamiento carbono-flúor medida en el espectro RMN de ^{19}F (Figura 25) y confirmada con el experimento heteronuclear (^1H - ^{19}F) gs-HOESY (Figura 26) en el que se observan correlaciones a través del espacio [56]. Podemos observar la correlación de las señales de H5 (7.64 ppm) y H4 (6.97 ppm) con F2 (-134.1 ppm) y la de H5' (7.12 ppm) con F4 (-128.2 ppm).

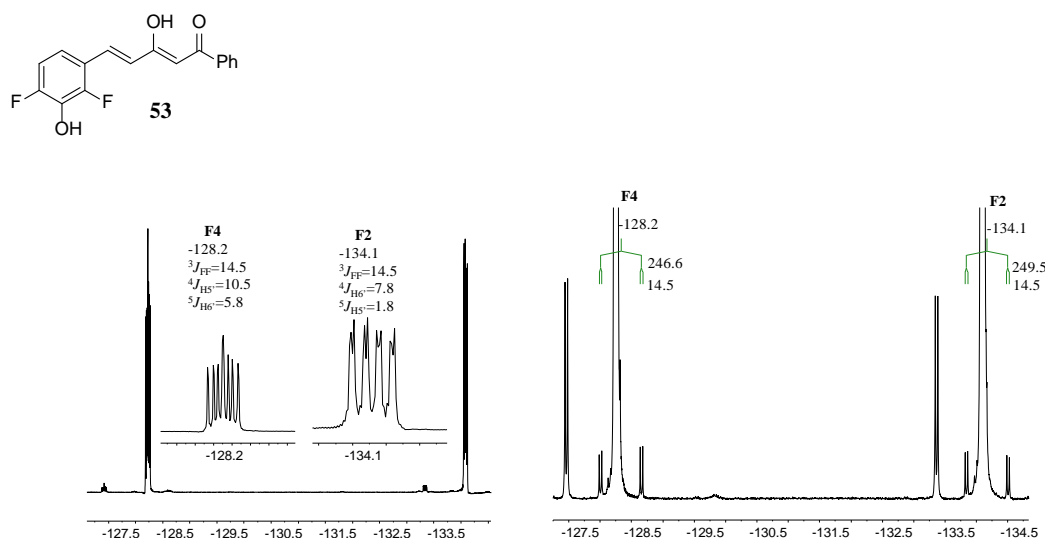


Figura 25. Espectros ^{19}F (izquierda) y $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ -RMN (derecha) de **53** en $\text{DMSO}-d_6$.

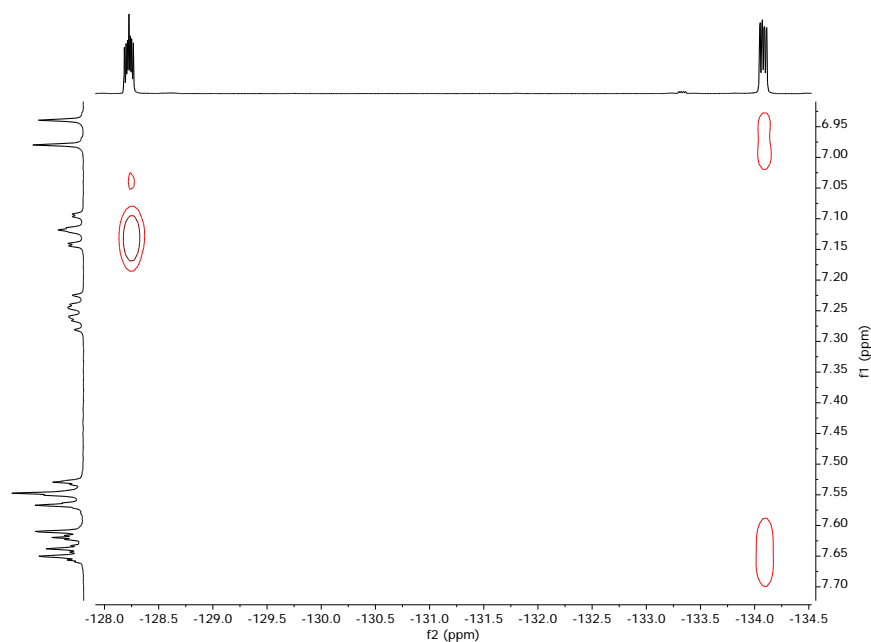


Figura 26. Ampliación del espectro (^1H - ^{19}F) *gs*-HOESY de **53** en $\text{DMSO-}d_6$.

El compuesto **52** en estado sólido es una mezcla de dos rotámeros **52a** y **52a'** (véase la Figura 27 para el espectro de ^{13}C CPMAS y ^{19}F MAS) debido a la rotación del enlace $\text{C5-C1}'$, como se observa en las señales de C4 y $\text{F2}'$ en proporción 74/26%. La asignación de las señales se realizó utilizando los datos en disolución (Tablas 9 y 11).

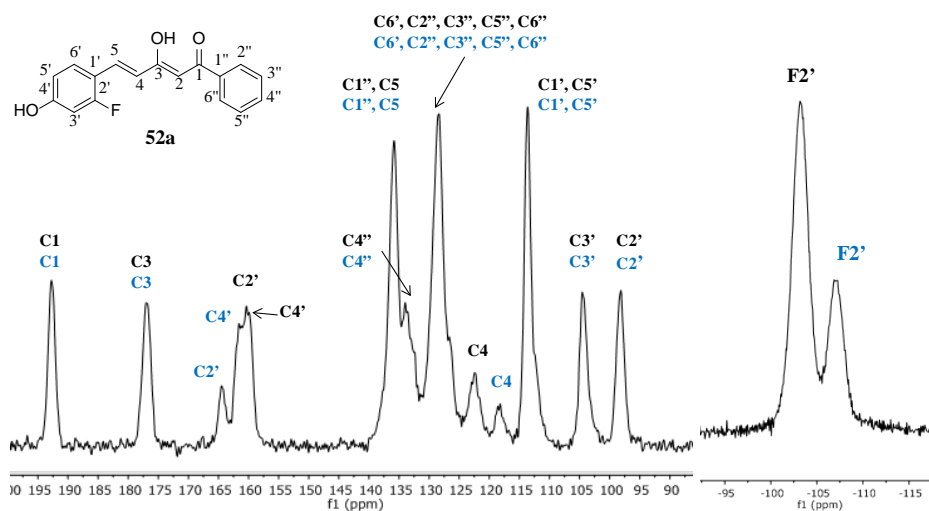


Figura 27. Espectro ^{13}C RMN CPMAS (izquierda) y ^{19}F MAS (derecha) de la mezcla de rotámeros **52a** y **52a'**. Rotámero mayoritario (negro) y minoritario (azul).

Tabla 7. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^1H RMN y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos **27**, **30**, **31**, **52-54**.

	27 CDCl ₃	30 CDCl ₃	31 CDCl ₃	52 DMSO- <i>d</i> ₆	53 DMSO- <i>d</i> ₆	54 DMSO- <i>d</i> ₆	
H2	6.33 (s)	6.34 (s)	6.32 (s)	6.71 (s)	6.75 (s)	6.72 (s)	
OH-enol	16.26 (s)	16.1 (sa)	16.14 (sa)	16.37 (sa)	16.30 (sa)	16.10 (sa)	16.25 (sa)
H4	6.52 (d) $^3J_{\text{H5}}=15.8$	6.55 (d) $^3J_{\text{H5}}=15.8$	6.50 (d) $^3J_{\text{H5}}=15.9$	6.82 (d) $^3J_{\text{H5}}=15.9$	6.82 (d) $^3J_{\text{H5}}=16.1$	6.97 (d) $^3J_{\text{H5}}=16.1$	6.89 (d) $^3J_{\text{H5}}=16.0$
H5	7.63 (d) $^3J_{\text{H4}}=15.8$	7.55 (d) $^3J_{\text{H4}}=15.8$	7.58 (d) $^3J_{\text{H4}}=15.9$	7.65-7.53 $^3J_{\text{H4}}=15.9$	7.65 (d) $^3J_{\text{H4}}=16.1$	7.64 (d) $^3J_{\text{H4}}=16.1$	7.59 (dd) $^3J_{\text{H4}}=16.0$ $^5J_{\text{F5}}=1.1$
H2'	7.07 (d) $^4J_{\text{H6}}=1.9$	7.06-7.15	7.58-7.53	7.65-7.53	---	---	---
H3'	3.95 (s) (OCH ₃)	3.94 (s) (OCH ₃)	---	---	6.65 (dd) $^3J_{\text{F2}}=12.8$ $^4J_{\text{H5}}=2.3$	---	6.83 (dd) $^3J_{\text{F2}}=12.8$ $^4J_{\text{F5}}=7.4$
OH	5.86 (s)	---	5.39 (s)	10.48 (s)	10.55 (s)	10.46 (s)	11.05 (s)
H5'	6.94 (d) $^3J_{\text{H6}}=8.3$	7.06-7.15	7.03 (t) $^3J_{\text{H6}}=8.8$ $^4J_{\text{F3}}=8.8$	7.00 (t) $^3J_{\text{H6}}=8.7$ $^4J_{\text{F3}}=8.7$	6.65 (dd) $^3J_{\text{H6}}=8.6$ $^4J_{\text{H3}}=2.3$	7.12 (ddd) $^3J_{\text{F4}}=10.5$ $^3J_{\text{H6}}=8.9$ $^5J_{\text{F2}}=1.8$	---
H6'	7.14 (dd)	7.06-7.15	7.32 (dd) $^3J_{\text{H5}}=8.8$ $^4J_{\text{H2}}=1.6$	7.37 (dd) $^3J_{\text{H5}}=8.7$ $^4J_{\text{H2}}=1.6$	7.64 (m)	7.26 (ddd) $^3J_{\text{H5}}=8.9$ $^4J_{\text{F2}}=7.8$ $^4J_{\text{F4}}=5.8$	7.67 (dd) $^3J_{\text{F5}}=11.9$ $^4J_{\text{F2}}=7.9$
H2''/H6''	7.95 (m)	7.95 (m)	7.95 (m)	7.99 (m)	8.01 (m)	8.02 (m)	8.00 (m)
H3''/H5''	7.47 (m)	7.47 (m)	7.48 (m)	7.65-7.53	7.54 (m)	7.55 (m)	7.55 (m)
H4''	7.53 (m)	7.55 (m)	7.58-7.53	7.65-7.53	7.63 (m)	7.65 (m)	7.63 (m)

Tabla 8. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^1H RMN y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos **26**, **55-59**.

	26 CDCl ₃	55 CDCl ₃	56 CDCl ₃	57 CDCl ₃	58 CDCl ₃	85% CDCl ₃ + 15% DMSO- <i>d</i> ₆	59 CDCl ₃	85% CDCl ₃ + 15% DMSO- <i>d</i> ₆
H2	6.01 (s)	6.03 (s)	6.00 (s)	6.01 (s)	6.03 (s)	5.95 (s)	6.01 (s)	5.81 (s)
OH-enol	14.36	14.15	14.21	14.29	14.20	9.60	14.2	10.30
H4	6.43 (d) ³ J _{H5} =15.7	6.49 (d) ³ J _{H5} =15.8	6.42 (d) ³ J _{H5} =15.7	6.57 (d) ³ J _{H5} =15.9	6.64 (d) ³ J _{H5} =16.0	6.56 (d) ³ J _{H5} =16.0	6.52 (d) ³ J _{H5} =15.9	6.30 (d) ³ J _{H5} =15.9
H5	7.71 (d) ³ J _{H4} =15.7	7.70 (d) ³ J _{H4} =15.8	7.66 (dd) ³ J _{H4} =15.7 ⁵ J _{F3} =0.9	7.81 (d) ³ J _{H5} =15.9	7.77 (d) ³ J _{H4} =16.0	7.72 (d) ³ J _{H4} =16.0	7.75 (dd) ³ J _{H4} =15.9 ⁵ J _{F5} =1.1	7.53 (dd) ³ J _{H4} =15.9 ⁵ J _{F5} =1.1
H2'	7.06 (d) ⁴ J _{H6} =1.9	7.16-7.08	7.32 (dd) ³ J _{F3} =11.2 ⁴ J _{H6} =2.1	---	---	---	---	---
H3'	3.96 (s) (OMe)	3.94 (s) (OMe)	---	6.64 (dd) ³ J _{F2} =11.8 ⁴ J _{H5} =2.5	---	---	7.29 (dd) ³ J _{F2} =10.3 ⁴ J _{F5} =6.4	6.52 (dd) ³ J _{F2} =11.6 ⁴ J _{F5} =7.2
OH	5.95	---	5.49	5.36	5.40	9.60	n.o.	10.30
H5'	6.96 (d) ³ J _{H6} =8.3	7.16-7.08	7.05 (dd) ³ J _{H6} =8.4 ⁴ J _{F3} =8.8	6.68 (dd) ³ J _{H6} = 8.5 ⁴ J _{H3} =2.5	6.97 (ddd) ³ J _{H6} =9.1 ³ J _{F4} =9.1 ⁵ J _{F2} =1.9	6.82 (ddd) ³ J _{F4} =9.9 ³ J _{H6} =8.8 ⁵ J _{F2} =1.8	---	---
H6'	7.15 (dd) ³ J _{H5} =8.3 ⁴ J _{H2} =1.9	7.16-7.08	7.27 (dd) ³ J _{H5} =8.4 ⁴ J _{H2} =2.1	7.45 (dd) ³ J _{H5} = 8.5 ⁴ J _{F2} =8.5	7.08 (ddd) ³ J _{H5} =9.1 ⁴ J _{F2} =7.5 ⁴ J _{F4} =5.9	6.92 (ddd) ³ J _{H5} =8.8 ⁴ J _{F2} =7.4 ⁴ J _{F4} =5.7	6.81 (dd) ³ J _{F5} =11.0 ⁴ J _{F2} =7.2	7.05 (dd) ³ J _{F5} =11.3 ⁴ J _{F2} =6.8

Tabla 9. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{13}C RMN en disolución y en estado sólido (CPMAS), y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos **27**, **30**, **31**, **52-54**. Cuando no se especifica son J_{CH} .

	27		30		31		52		53		54	
	CDCl_3	CPMAS	CDCl_3	CPMAS	$\text{DMSO}-d_6$	CPMAS	$\text{DMSO}-d_6$	CPMAS	$\text{DMSO}-d_6$	CPMAS	$\text{DMSO}-d_6$	CPMAS
C1	188.4	187.2	189.3 ^a	187.1	187.5 ^a	191.6	188.0 ^a	192.8	189.1 ^a	193.8	188.5 ^a	194.9
									² $J=^3J=$ ³ $J=3.8$		² $J=^3J=$ ³ $J=3.9$	
C2	97.2	97.8	97.6	98.1	97.1	97.4	97.5	98.1	98.1	103.0	97.7	100.4
	¹ $J=163.4$		¹ $J=163.7$		¹ $J=166.0$		¹ $J=166.3$ ³ $J=2.3$		¹ $J=166.9$ ³ $J=2.0$		¹ $J=166.2$ ³ $J=2.4$	
C3	180.5	180.2	179.2 ^b	180.7	180.6 ^b	176.2	180.1 ^b	177.0	178.6 ^b	174.9	179.9 ^b	174.8
	² $J_{\text{H2,H4,OH}} =$ ³ $J_{\text{H5}}=4.4$						² $J=^2J=6.0$ ³ $J=3.5$		³ $J=4.0$ ² $J=^2J=6.3$		² $J=^2J=6.1$ ³ $J=3.8$	
C4	121.0	119.8	123.2	123.5	121.6	119.7	122.2	122.5/ 117.4	125.5	124.2	123.6	121.2
	¹ $J=156.9$		¹ $J=157.4$ ⁶ $J_{\text{F4}}=1.3$		¹ $J=159.8$		¹ $J=161.2$ ² $J=^3J=4.1$ ⁴ $J_{\text{F2}}=6.2$		¹ $J=161.6$ ⁴ $J_{\text{F2}}=6.3$ ⁶ $J_{\text{F4}}=2.4$		¹ $J=161.3$ ⁴ $J_{\text{F2}}=5.7$	
C5	140.4	142.4	139.0	138.7	139.3	139.8	132.3	135.8	131.2	134.3	131.0	129.3
	¹ $J=155.2$ ³ $J=^3J=4.4$		¹ $J=156.8$ ⁵ $J_{\text{F4}}=1.2$		¹ $J=154.2$		¹ $J=156.7$ ³ $J_{\text{F2}}=2.5$		¹ $J=159.7$ ³ $J_{\text{F2}}=^5J_{\text{F4}}=2.3$		¹ $J=157.9$ ³ $J_{\text{F2}}=^4J_{\text{F5}}=1.9$	
C1'	127.7	127.8	131.7	131.3	126.6	129.9	113.4	113.6	119.5	119.6	113.1	114.4
			⁴ $J_{\text{F4}}=3.9$		³ $J_{\text{F3}}=6.8$		² $J_{\text{F2}}=11.5$		² $J_{\text{F2}}=6.8$ ⁴ $J_{\text{F4}}=2.4$		² $J_{\text{F2}}=14.0$ ³ $J_{\text{F5}}=6.7$	
C2'	109.6	105.8	112.4	114.8	115.4	112.3	161.9	164.5/ 160.4	151.2 ^c	151.9 (sa)	157.1	158.1
	¹ $J=156.6$ ³ $J=^3J=6.5$		¹ $J=158.3$ ³ $J_{\text{F4}}=1.9$ ³ $J=^3J=6.0$		¹ $J=160.9$ ² $J_{\text{F3}}=18.7$		¹ $J_{\text{F2}}=251.4$ ³ $J=11$ ³ $J=^2J=5.0$		¹ $J_{\text{F2}}=249.1$ ³ $J_{\text{F4}}=6.5$		¹ $J_{\text{F2}}=248.3$ ⁴ $J_{\text{F5}}=1.5$	
C3'	146.9	147.0	148.0	148.5	151.1	152.2	103.0	104.6	134.2	134.3	105.1	106.9
			² $J_{\text{F}}=11.4$		¹ $J_{\text{F3}}=242.2$	149.5	¹ $J=162.7$ ² $J_{\text{F2}}=23.8$ ³ $J=5.2$		² $J_{\text{F2}}=^2J_{\text{F4}}=16.1$ ³ $J=7.0$		¹ $J=164.4$ ² $J_{\text{F2}}=26.6$ ³ $J_{\text{F5}}=3.3$	

C4'	147.8	149.8	153.5 ¹ J _{F4} =251.4 ³ J= ³ J=8.6 ² J=3.2	153.1	147.12 ² J _{F3} =12.4	146.2	161.3 ³ J _{F2} =12.6 ² J=12.0	161.6/ 159.9	152.3 ^c ¹ J _{F4} =246.6 ³ J _{F2} =6.2	151.9 (s.a)	148.3 ² J _{F5} =14.6 ³ J _{F2} =12.6	147.3
C5'	114.9 ¹ J=163.2	115.8	116.5 ¹ J=163.4 ² J _{F4} =18.7	116.4	118.0 ¹ J=159.8 ³ J _{F3} =2.6	118.6	112.7 ¹ J=162.6 ⁴ J _{F2} =2.5 ³ J=5.1	113.6	112.2 ¹ J=166.8 ² J _{F4} =19.2 ⁴ J _{F2} =3.7	112.3	148.0 ¹ J _{F5} =238.7 ⁴ J _{F2} =2.2	149.7 147.3
C6'	122.9 ¹ J=160.9 ³ J= ³ J=6.2	126.5	121.3 ¹ J=162.8 ³ J _{F4} =7.4 ³ J= ³ J=6.3	119.5	125.7 ¹ J=163.8 ⁴ J _{F3} =2.1	127.9	130.3 ¹ J=161.1 ³ J _{F2} =5.1 ² J= ³ J=5.2	128.4	117.9 ¹ J=167.7 ³ J _{F4} =8.8 ³ J _{F2} =3.3	112.3	116.0 ¹ J=163.3 ² J _{F5} =21.0 ³ J _{F2} =5.0	111.4
C1''	136.3 ³ J= ³ J=7.3	136.2	136.2 ¹ J=160.8 ³ J= ³ J=7.2	137.2	135.4 ³ J= ³ J=7.0	136.2	135.4 ³ J= ³ J=7.3	135.8	135.4 ³ J= ³ J=7.3	136.2	135.4 ³ J= ³ J=7.3	134.4
C2''/C6''	127.3 ¹ J=160.4 ³ J= ³ J=6.6	126.5	127.3 ³ J= ³ J=6.7	127.5	127.1 ¹ J=161.2 ³ J= ³ J=6.5	127.9	127.2 ¹ J=162.2 ³ J= ³ J=6.7	128.4	127.4 ¹ J=161.9 ³ J= ³ J=6.5	128.6	127.2 ¹ J=161.5 ³ J= ³ J=6.5	126.2 127.6
C3''/C5''	128.6 ¹ J=161.4 ³ J=7.5	126.5	128.6 ¹ J=161.5 ³ J=7.6	128.4	128.8 ¹ J=162.3 ³ J=7.5	128.8	128.9 ¹ J=161.8 ³ J=7.6	128.4	128.9 ¹ J=162.4 ³ J=7.5	128.6	128.9 ¹ J=162.3 ³ J=7.4	129.3
C4''	132.4 ¹ J=161.0 ³ J= ³ J=7.6	132.1	132.6 ¹ J=161.5 ³ J= ³ J=7.6	130.0	132.8 ¹ J=161.8 ³ J= ³ J=7.3	133.9	132.9 ¹ J=162.0 ³ J= ³ J=7.8	134.0	133.8 ¹ J=162.5 ³ J= ³ J=7.3	134.3	133.0 ¹ J=161.9 ³ J= ³ J=7.3	132.9

^a Muestra correlación HMBC con H2''/H6'' y H2.

^b Muestra correlación HMBC con H4 y H2, y en algunos casos también con H5.

^c Para la asignación de C2' en el compuesto **53** se empleó la correlación HMBC con H5 que está ausente en C4' así como la relación entre las constantes de acoplamiento ¹J_{C2F2} > ¹J_{C4F4}.

Otras señales: OCH₃: **27**: 56.0, ¹J = 145.1(CDCl₃), 56.2 (CPMAS); **30**: 56.2, ¹J = 144.9 (CDCl₃); 54.5 (CPMAS).

Tabla 10. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{13}C RMN en disolución y en estado sólido (CPMAS), y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos **26**, **55-59**. Cuando no se especifica son J_{CH} .

	26		55		56		57		58		59	
	CDCl_3	CPMAS	CDCl_3	CPMAS	CDCl_3	CPMAS	CDCl_3	CPMAS	$\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-}d_6$	CPMAS	$\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-}d_6$	CPMAS
CF_3	116.9 $^1J_{\text{F}}=285.2$	115.6	116.7 $^1J_{\text{F}}=286.0$	117.3 (sa)	116.7 $^1J_{\text{F}}=286.5$	116.5 (sa)	116.3 $^1J_{\text{F}}=285.2$	115.8 (sa)	116.4 $^1J_{\text{F}}=285.5$	120.0	115.9 $^1J_{\text{F}}=286.5$	117.8
C1	179.5 $^2J_{\text{F}}=35.9$ $^2J=2.7$	178.2	180.4 $^2J_{\text{F}}=35.8$	180.1	180.2 $^2J_{\text{F}}=36.1$ $^2J=2.6$	179.3	179.7 $^2J_{\text{F}}=36.2$	181.2	180.2 $^2J_{\text{F}}=35.8$	183.0	178.8 $^2J_{\text{F}}=34.3$	160.5
C2	95.1 $^1J=165.8$	94.8	95.6 $^3J_{\text{F}}=1.7$	95.2	95.5 $^1J=168.9$ $^3J_{\text{F}}=1.6$	95.1	95.1 $^1J=169.0$	95.3	95.6 $^1J=168.8$	96.6	94.7	96.3
C3	181.9 $^2J=^2J=^3J=5.1$	181.6	180.8	181.4	181.0 $^2J=^2J=6.3$ $^3J=3.9$	180.1	181.0	182.2	180.5	183.0	180.4	181.9
C4	118.5 $^1J=158.6$	115.6	120.8 $^6J_{\text{F4}}=2.5$	118.0	120.0 $^1J=159.7$ $^3J=^2J=2.6$	117.7	120.6 $^1J=163.5$ $^4J_{\text{F2}}=7.3$	116.3	122.4 $^1J=162.6$ $^4J_{\text{F2}}=7.7$	125.0	119.8	118.6
C5	144.1 $^1J=155.6$ $^3J=^3J=4.2$	142.5	142.6 $^5J_{\text{F4}}=1.9$	143.2/146.3	142.3 $^1J=156.8$ $^4J_{\text{F3}}=2.7$	142.7	136.0 $^1J=160.3$	136.2	135.9 $^1J=159.0$	143.6	134.8	135.3
C1'	126.8	126.4	130.9 $^4J_{\text{F4}}=4.3$	130.9/132.1	127.7 $^3J_{\text{F3}}=6.4$	124.9	115.0 $^2J_{\text{F2}}=11.2$	112.3	118.9 $^2J_{\text{F2}}=9.2$ $^4J_{\text{F4}}=2.6$	118.5	112.2	112.8
C2'	109.8 $^1J=162.3$ $^3J=^3J=6.6$	106.4	112.7 $^3J_{\text{F4}}=3.1$	114.1	114.9 $^1J=161.4$ $^2J_{\text{F3}}=18.7$ $^3J=6.5$ $^3J=8.6$	110.4	162.36 $^1J_{\text{F2}}=256.2$	161.2 (sa)	151.8 $^1J_{\text{F2}}=251.5$ $^3J_{\text{F4}}=6.3$	153.1 151.0	157.4 $^1J_{\text{F2}}=251.0$	157.9

C3'	147.0	149.1	148.3 $^2J_{F4'}=11.4$	146.9	151.1 $^1J_{F3'}=239.3$	150.5(sa)	103.5 $^1J=163.0$ $^2J_{F2'}=25.2$ $^3J=4.8$	101.3	134.7 $^2J_{F2'}=^2J_{F4'}=16.0$	132.6	104.7 $^2J_{F2'}=27.1$ $^3J_{F5'}=2.6$	103.5
R ₃	56.0 $^1J=145.2$	54.8	56.3	55.7/54.6	---	---	---	---	---	---	---	--
C4'	149.0	150.6	154.3 $^1J_{F4'}=253.5$	151.7/154.0	146.2 $^2J_{F3'}=14.6$	148.3	158.9 $^3J_{F2'}=13.4$	163.3	154.1 $^1J_{F4'}=249.6$ $^3J_{F2'}=6.3$	155.0 153.1	148.8 $^2J_{F5'}=^3J_{F2'}=12.5$	151.1
C5'	115.1 $^1J=163.3$	115.6	116.8 $^2J_{F4'}=19.2$	116.0/118.0		115.0	111.9 $^1J=162.6$ $^4J_{F2'}=2.4$	111.3	111.8 $^1J=165.9$ $^2J_{F4'}=19.5$ $^4J_{F2'}=3.1$	111.9	147.5 $^1J_{F5'}=240.0$ $^4J_{F2'}=2.5$	147.3
C6'	124.0 $^1J=162.3$	126.4	122.2 $^3J_{F4'}=6.9$	118.0	126.3 $^4J_{F3'}=3.0$ $^1J=156.8$	130.8	130.5 $^1J=162.8$ $^3J_{F2'}=4.8$ $^3J=4.8$	126.9	118.1 $^1J=163.3$ $^3J_{F4'}=8.6$	120.9	114.0 $^2J_{F5'}=20.7$ $^3J_{F2'}=4.9$	110.8

Tabla 11. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{19}F RMN en disolución y en estado sólido (MAS), y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos **30**, **31**, **52-54**.

	30			31			52		53		54	
	CDCl_3	$\text{DMSO-}d_6$	MAS	CDCl_3	$\text{DMSO-}d_6$	MAS	$\text{DMSO-}d_6$	MAS ^a	$\text{DMSO-}d_6$	MAS	$\text{DMSO-}d_6$	MAS
F2'	---	---	---	---	---	---	-113.5 ³ $J_{\text{H}3}=12.8$ ⁴ $J_{\text{H}6}=9.2^{\text{b}}$	-103.2 (74%) -107.3 (26%)	-134.1 ⁴ $J_{\text{FF}}=14.5$ ⁴ $J_{\text{H}6}=7.8$ ⁵ $J_{\text{H}5}=1.8$	-129.4	-118.6 ⁵ $J_{\text{FF}}=15.0$ ³ $J_{\text{H}3}=12.8$ ⁴ $J_{\text{H}6}=7.9$	-115.4
F3'	---	---	---	-140.6 ³ $J_{\text{H}2}=11.3^{\text{b}}$ ⁴ $J_{\text{H}5}=8.8$	-135.7 ³ $J_{\text{H}2}=12.0^{\text{b}}$ ⁴ $J_{\text{H}5}=8.7$	-126.3	---	---	---	---	---	---
F4'	-132.0 ³ $J_{\text{H}5}=\text{}^4J_{\text{H}2}=9.3^{\text{b}}$ ⁴ $J_{\text{H}6}=5.2^{\text{b}}$	-131.8 ³ $J_{\text{H}5'}=\text{}^4J_{\text{H}2'}=\text{}^4J_{\text{H}6'}=8.3^{\text{b}}$	-126.1	---	---	---	---	---	-128.2 ⁴ $J_{\text{FF}}=14.5$ ³ $J_{\text{H}5'}=10.5$ ⁴ $J_{\text{H}6'}=5.8$	-129.4	---	---
F5'	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-140.1 ⁵ $J_{\text{FF}}=15.0$ ³ $J_{\text{H}6}=11.9$ ⁴ $J_{\text{H}3}=7.4$	-138.2

^a El átomo de F se encuentra desordenado en dos posiciones, 2' (~70%) y 6' (~30%) (ver determinación estructural por cristalografía de rayos X, Figura 30).

^b Determinada solo en el espectro de ^{19}F RMN.

Tabla 12. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{19}F RMN en disolución y en estado sólido (MAS), y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos **26**, **55-59**.

	26				55		56		57		58			59		
	CDCl_3	$\text{DMSO-}d_6$	$\text{HMPA-}d_{18}$	MAS	CDCl_3	MAS	CDCl_3	MAS	CDCl_3	MAS	CDCl_3+	$\text{DMSO-}d_6$	MAS	CDCl_3+	$\text{DMSO-}d_6$	MAS
CF_3	-77.5	-75.8 (+) -76.6 (-)	-76.8 (-) -77.7 (+)	-74.1	-77.6	-74.1	-77.6	-72.1	-77.6	-73.4	-77.6		-73.8	-77.6		-74.2
$\text{F2}'$	---	---	---	---	---	---	---	---	-111.0 $^3J_{\text{H}3}=11.8$ $^4J_{\text{H}6}=8.5$	-113.9	-133.5 $^3J_{\text{FF}}=16.4$ $^4J_{\text{H}6'}=7.4$ $^5J_{\text{H}5'}=1.8$		-126.7	-117.7 $^5J_{\text{FF}}=14.3$ $^3J_{\text{H}3'}=11.6$ $^4J_{\text{H}6'}=6.8$		-119.1
$\text{F3}'$	---	---	---	---	---	---	-140.1 $^3J_{\text{H}2}=11.2$ $^4J_{\text{H}5}=8.8$	-134.0	---	---	---		---	---		---
$\text{F4}'$	---	---	---	---	-129.8 $^3J_{\text{H}5'}=9.1^a$ $^4J_{\text{H}2'}=8.0^a$ $^4J_{\text{H}6'}=5.7^a$	-129.3 -130.6	---	---	---	---	-127.5 $^3J_{\text{FF}}=16.4$ $^3J_{\text{H}5'}=9.9$ $^4J_{\text{H}6'}=5.7$		-130.2	---		---
$\text{F5}'$	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		---	-141.2 $^5J_{\text{FF}}=14.3$ $^3J_{\text{H}6'}=11.3$ $^4J_{\text{H}3'}=7.2$ $^5J_{\text{H}5'}=1.1$		-138.4

^a Determinada solo en el espectro de ^{19}F RMN.

3.3.2.2 Cálculos teóricos

Los resultados de los cálculos energéticos de los tautómeros **a** y **b** de los ceto-enoles **24-31**, **52-59** se presentan en la Tabla 13. En el compuesto **52**, en estado sólido, se ha observado la existencia de dos rotámeros (**52a** y **52a'**) por rotación alrededor del enlace C5-C1', quedando el flúor próximo a H4 en **52a** y en posición 6' en **52a'**. También se han calculado las energías de los rotámeros correspondientes a los otros tautómeros, **52b/52b'** y **52c/52c'**. Para los compuestos **53** y **58**, se consideró también la posibilidad de que el H del OH apunte hacia F2' o hacia F4' (Figura 28).

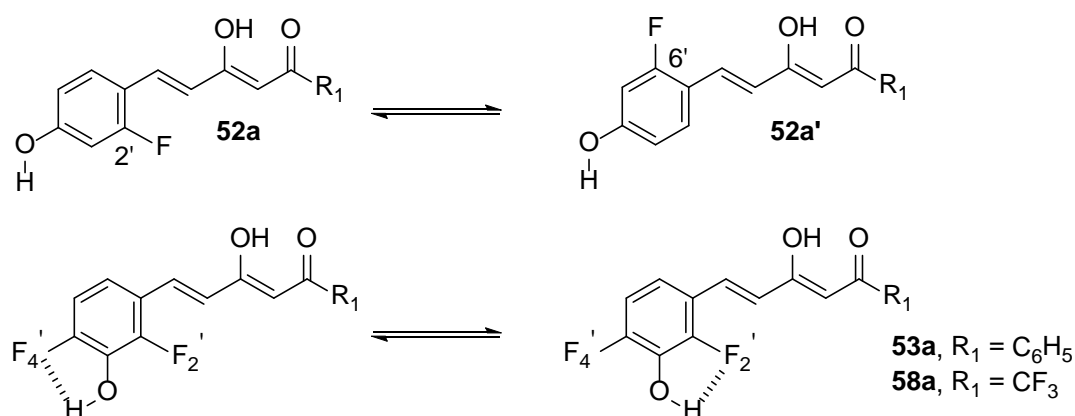


Figura 28. Rotámeros que implican al átomo de F en el compuesto **52a** y el grupo 3'-OH en los compuestos **53a** y **58a**.

Al realizar los cálculos para los tautómeros diceto **c**, se observó que éstos son mucho menos estables (por ejemplo, **52c**, +27.8 kJ·mol⁻¹; **26c**, +38.2 kJ·mol⁻¹), por lo que no se extendieron dichos cálculos a los restantes compuestos. Entre **a** y **a'** existe una diferencia de 1.7 kJ·mol⁻¹ a 298.15 K lo cual corresponde a un 66.5% de **52a** y un 33.5% de **52a'**.

Con el fin de cuantificar los efectos de los sustituyentes según su posición se realizó un análisis de los valores de E_{rel} (kJ·mol⁻¹) (Tabla 37 del Anexo) utilizando una matriz de Free-Wilson (o presencia-ausencia) [57,58,59]. Gracias al análisis estadístico en lo que respecta a los valores de la energía de **b-a** se observa que se producen efectos significativos siendo todos ellos positivos (n = 16, R² = 0.992), es decir, todos desestabilizan el tautómero **b**: R₁ = Ph, + 1.2, R₁ = CF₃, + 5.7 (ambos con respecto a R₁ = Me, 0.0 por definición), 2'-F + 1.8, 3'-OMe + 1.8, 3'-F + 1.8, 4'-F + 1.0 y 4'-OH + 1.0 kJ·mol⁻¹ (ambos con respecto a R_{4'} = OMe, 0.0 por definición).

Tabla 13. Energías absolutas (Hartrees) y relativas ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) incluyendo ZPE, y momentos dipolares en D de las β -dicetonas hemicurcuminoides (24-31 y 52-59).

Comp.	C	Energía SCF	ZPE	Energía Total	Dipolo	E _{rel} ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
24a	C_1	-804.92773	0.24559	-804.68214	3.16	0.0
24b	C_1	-804.92710	0.24583	-804.68127	2.04	1.7
25a	C_1	-844.24719	0.27332	-843.97388	2.51	0.0
25b	C_1	-844.24571	0.27302	-843.97269	2.01	3.9
26a	C_1	-1102.73993	0.22313	-1102.51680	7.48	0.0
26b	C_s	-1102.73658	0.22279	-1102.51379	6.70	8.8
26c	C_1	-1102.72539	0.22205	-1102.50334	4.50	38.2
27a	C_1	-996.71071	0.29919	-996.41152	2.56	0.0
27b	C_1	-996.70926	0.29901	-996.41025	1.67	3.8
28a	C_1	-1036.00972	0.32665	-1035.68307	2.64	0.0
28b	C_1	-1036.00820	0.32643	-1035.68177	2.07	4.0
29a	C_1	-1075.32487	0.35421	-1074.97077	2.72	0.0
29b	C_1	-1075.32412	0.35420	-1074.96992	2.44	2.0
30a	C_1	-1020.72331	0.28652	-1020.43678	1.27	0.0
30b	C_1	-1020.72180	0.28632	-1020.43548	1.81	3.9
31a	C_1	-981.41884	0.25851	-981.16033	3.18	0.0
31b	C_1	-981.41737	0.25829	-981.15908	3.21	3.9
52a	C_1	-981.41938	0.25855	-981.16084	4.42	0.0
52a'	C_1	-981.41785	0.25827	-981.16047	6.31	1.7
52b	C_1	-981.41785	0.25830	-981.15955	4.08	4.0
52b'	C_1	-981.41706	0.25800	-981.15907	6.27	6.1
52c	C_1	-981.40878	0.25792	-981.15086	2.53	27.8
52c'	C_1	-981.40937	0.25780	-981.15157	3.25	26.3
53a OH/F4'	C_1	-1080.67926	0.25058	-1080.42868	2.27	0.0 ^a
53b OH/F4'	C_1	-1080.67772	0.25034	-1080.42738	1.81	4.1
53a OH/F2'	C_1	-1080.67928	0.25062	-1080.42866	2.18	0.0 ^a
53b OH/F2'	C_1	-1080.67778	0.25038	-1080.42739	2.75	3.9
54a	C_1	-1080.68475	0.25049	-1080.43426	2.58	0.0
54b	C_1	-1080.68326	0.25027	-1080.43299	2.29	3.9
55a	C_1	-1126.74883	0.21003	-1126.53879	6.52	0.0
55b	C_1	-1126.74557	0.20967	-1126.53590	5.57	8.5
56a	C_1	-1087.44711	0.18246	-1087.26465	6.28	0.0
56b	C_1	-1087.44389	0.18210	-1087.26178	5.32	8.5
57a	C_1	-1087.44755	0.18252	-1087.26503	8.02	0.0
57b	C_1	-1087.44428	0.18211	-1087.26217	7.09	8.6
58a OH/F4	C_1	-1186.70645	0.17452	-1186.53194	6.84	0.0
58b OH/F4	C_1	-1186.70326	0.17416	-1186.52910	5.86	8.4
58a OH/F2	C_1	-1186.70642	0.17455	-1186.53187	4.32	0.0 ^b
58b OH/F2	C_1	-1186.70332	0.17415	-1186.52917	3.39	8.2
59a	C_1	-1186.71224	0.17441	-1186.53783	6.76	0.0
59b	C_1	-1186.70913	0.17394	-1186.53519	5.78	8.2

^a OH/F2' es $0.04 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ menos estable que OH/F4'.

^b $0.08 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

A partir de los desplazamientos químicos experimentales en disolución (Tablas 7-12) y de los calculados con GIAO (Tabla 38 del Anexo) se han determinado las poblaciones de los tautómeros **a** y **b** que se indican en la Tabla 14: $\delta_{\text{exp}} = \delta_{\text{a}} \cdot \text{población a} + \delta_{\text{b}} \cdot \text{población b}$. Aunque no se aplicó ninguna restricción, vale la pena señalar que la población **a** + población **b** ~ 1 . A su vez, estas poblaciones han permitido obtener primero la constante de equilibrio K , definida como $\mathbf{b/a}$, y por lo tanto ΔG (298.15 K) ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$). Como se observa en la Tabla 14, predomina siempre el tautómero **a** aunque su porcentaje varía del 86% al 53%. Apenas existe correlación entre ΔG y E_{rel} : $\Delta G = (2.1 \pm 0.6) + (0.2 \pm 0.1) E_{\text{rel}}$, $n = 16$, $R^2 = 0.31$. Debe señalarse que la E_{rel} corresponde a moléculas aisladas en fase gas mientras que ΔG corresponde a valores determinados en disolución en diferentes disolventes. No se mejoraron los resultados añadiendo variables para representar los distintos disolventes.

Tabla 14. Poblaciones de los tautómeros **a** y **b**, constantes de equilibrio K y ΔG , obtenidas a partir de los desplazamientos químicos experimentales y calculados de las β -dicetonas hemicurcuminoides (**24-31** y **52-59**).

Comp.	R	Disolv.	Tautom. a	Tautom. b	K (b/a)	ΔG (298.15 K) ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	E_{rel} (b-a) ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
24	CH ₃	CDCl ₃	0.83	0.18	0.217	3.8	1.7
25	CH ₃	CDCl ₃	0.84	0.17	0.202	4.0	3.9
26^c	CF ₃	CDCl ₃	0.82	0.18	0.220	3.8	8.8
27	C ₆ H ₅	CDCl ₃	0.74	0.26	0.351	2.6	3.8
28	C ₆ H ₅	CDCl ₃	0.75	0.24	0.320	2.8	4.0
29	C ₆ H ₅	CDCl ₃	0.53	0.47	0.887	0.3	2.0
30	C ₆ H ₅	CDCl ₃	0.78	0.22	0.282	3.1	3.9
31	C ₆ H ₅	DMSO- <i>d</i> ₆	0.68	0.32	0.471	1.9	3.9
52	C ₆ H ₅	DMSO- <i>d</i> ₆	0.84	0.16	0.190	4.1	4.0
53	C ₆ H ₅	DMSO- <i>d</i> ₆	0.82	0.18	0.220	3.8 ^a	4.0 ^b
54	C ₆ H ₅	DMSO- <i>d</i> ₆	0.83	0.17	0.205	3.9	3.9
55	CF ₃	CDCl ₃	0.85	0.15	0.176	4.3	8.5
56	CF ₃	CDCl ₃	0.82	0.17	0.207	3.9	8.5
57	CF ₃	CDCl ₃	0.86	0.13	0.151	4.7	8.6
58	CF ₃	DMSO- <i>d</i> ₆	0.81	0.19	0.235	3.6 ^a	8.3 ^b
59	CF ₃	DMSO- <i>d</i> ₆	0.85	0.14	0.165	4.5	8.2

^a Valores del rotámero OH/F2'; ^b Valores medios de los dos rotámeros OH; ^c En DMSO-*d*₆ por integración directa en ¹⁹F RMN 85% **a**-15% **b** [26].

El análisis de regresión entre los desplazamientos químicos experimentales y los calculados muestra que el acuerdo es mayor para el tautómero **a** que para el tautómero **b** (Tabla 38 del Anexo). En cuanto a los rotámeros de los compuestos **53a** y **58a**, las mejores correlaciones se obtienen para el OH/F2'. Otro aspecto experimental que está de acuerdo con los cálculos teóricos es que para un grupo CF₃ sin rotación, las señales de

los tres átomos de flúor son muy diferentes, por ejemplo, CF₃ **26a**: -84.9, -77.3, -72.2 ppm → media -78.1, $\Delta\delta = 12.7$ ppm; CF₃ **55a**: -85.2, -76.6, -72.7 → media -78.2, $\Delta\delta = 12.5$ ppm. Dado que sólo se observa una señal situada cerca del desplazamiento químico promedio, esto significa que el grupo CF₃ está girando libremente o, al menos, oscilando alrededor de su geometría de equilibrio.

3.3.2.3 Determinación de la estructura cristalina mediante difracción de rayos X

Las estructuras cristalinas de los compuestos **52** (CH₂Cl₂/EtOH), **54** (CH₂Cl₂/EtOH) y **55** (AcOEt/hexano) han sido resueltas gracias a la obtención de monocristales adecuados para su análisis por difracción de rayos X [38]. Las de los compuestos **24** (CH₂Cl₂/EtOH/hexano), **26** (CHCl₃), **27** (CH₂Cl₂/EtOH/hexano), **30** (CHCl₃/MeOH) y **31** (CH₂Cl₂/EtOH) fueron publicadas con anterioridad en un trabajo realizado por este grupo de investigación [26]. A continuación se comentan algunos de los aspectos más significativos de las estructuras de esta familia de compuestos.

Los compuestos **24**, **26**, **30** cristalizan en el grupo espacial monoclinico $P2_1/c$, **55** cristaliza en el grupo espacial monoclinico $P2_1/n$, mientras que **27**, **31**, **52** y **54** lo hacen en el ortorrómbico $Pna2_1$. Las Figuras 29-32 muestran los diagramas ORTEP de los compuestos **24**, **26**, **27**, **30**, **31**, **52**, **54** y **55** con la numeración cristalográfica utilizada para los diferentes átomos en la unidad asimétrica. En dichas figuras se observa que todos los compuestos salvo **55** presentan una sola molécula por unidad asimétrica que es, como cabe esperar, casi plana. El ángulo diedro máximo entre el anillo de fenilo y el resto de la molécula es de 5.0(1)° en **30** (Figura 32), de 4.7(4)° para **52** (Figura 30) y de 6.6(4)° para **54** (Figura 31). La planaridad observada concuerda con la deslocalización electrónica apoyada por las distancias de enlace experimentales. En contraste, el compuesto **55** (Figura 32) contiene dos moléculas cristalográficamente diferentes e independientes por unidad asimétrica, denominadas A y B, debido a las diversas interacciones que cada tipo de molécula presenta. Ambas moléculas están ligeramente más desviadas de la planaridad que el resto, siendo sus ángulos diedro máximos de 9.1(3)° y 11.6(3)° en A y B, respectivamente.

De acuerdo con los resultados de experimentales de RMN y los cálculos teóricos, en todas las moléculas la forma tautomérica ceto-enol **a** predomina sobre la **b**. A partir de los datos cristalográficos, se deduce que en estado sólido también predomina el tautómero **a** (O3-H3) ya que las distancias C11-O4, que se encuentran en el rango

1.240-1.282(5) Å, indican un orden de enlace más alto, mientras que las distancias C9-O3, 1.315-1.333(5) Å, son más largas (las distancias y ángulos de enlace de hidrógeno se recogen en la Tabla 15). Además, se observa un enlace de hidrógeno intramolecular entre los átomos O3H3...O4 en todos los derivados. El grado de simetrización en este fragmento varía según la molécula, observándose la interacción intramolecular más fuerte para **27** y las más débiles para los compuestos **52**, **54** y **55** (Tabla 15). El OH fenólico forma en cada caso un enlace de hidrógeno intramolecular con el sustituyente en *orto* (metoxilo o flúor). Junto con los enlaces de hidrógeno intramoleculares ya descritos, todos los derivados, salvo **30** y **55** que no poseen un grupo OH en el anillo bencénico, presentan enlaces de hidrógeno intermoleculares entre el OH fenólico y el oxígeno del carbonilo de una molécula adyacente (O2H2...O4#1; Tabla 15). En los compuestos **31** y **54** se observa además una interacción adicional de F1 o F5 con el hidrógeno tipo enol de una molécula vecina. Esta doble interacción puede estar relacionada con la distancia más larga de H3A...O4 en comparación con la de los compuestos **26**, **27** y **30** donde sólo existe la interacción con el OH fenólico.

Tabla 15. Enlaces de hidrógeno para los compuestos **24**, **26**, **27**, **30**, **31**, **52**, **54** y **55** distancias en Å y ángulos en °.

Comp.	D-H...A	Operaciones de simetría ^a	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
24	O3-H3...O4		1.29	1.55	2.535(3)	126.0(1)
	O2-H2...O4	x-1, -y+3/2, z-1/2	0.97	1.92	2.805(4)	151.0(1)
	O2-H2...O1		0.97	2.18	2.646(1)	108.3(1)
26	O3-H3...O4		1.09	1.49	2.513(2)	152.6(1)
	O2-H2...O4	-x+1, y+1/2, z+3/2	1.00	1.84	2.788(2)	157.4(1)
	O2-H2...O1		1.00	2.25	2.687(1)	104.6(1)
27	O3-H3...O4		1.25	1.34	2.493(3)	148.2(1)
	O2-H2...O4	-x+1/2, y+1/2, z+3/2	0.95	1.98	2.888(4)	161.5(2)
	O2-H2...O1		0.95	2.25	2.670(3)	106.0(1)
30	O3-H3...O4		1.09	1.46	2.510(2)	159.9(1)
31	O3-H3...O4		1.11	1.60	2.530(2)	136.9(1)
	O2-H2...O4	-x+1/2, y-1/2, z+3/2	1.18	1.61	2.739(3)	159.5(1)
	O3-H3...F1	-x+1/2, y+1/2, z-3/2	1.11	2.41	3.215(2)	128.2(1)
	O2-H2...F1		1.18	2.28	2.760(2)	101.3(1)
52	O3-H3A...O4		0.99	1.71	2.530(4)	137.0
	O2-H2...O4	-x+1/2, y+1/2, z+3/2	1.20	1.54	2.716(4)	166.9
54	O3-H3...O4		1.00	1.73	2.517(4)	132.9
	O2-H2...O4	-x+3/2, y-1/2, z+3/2	1.00	1.72	2.711(4)	169.0
55	O3A-H3A...O4A		1.02	1.73	2.582(3)	138.4
	O3B-H3B...O4B		1.06	1.70	2.560(3)	134.5

^a Operaciones de simetría utilizadas para generar átomos equivalentes.

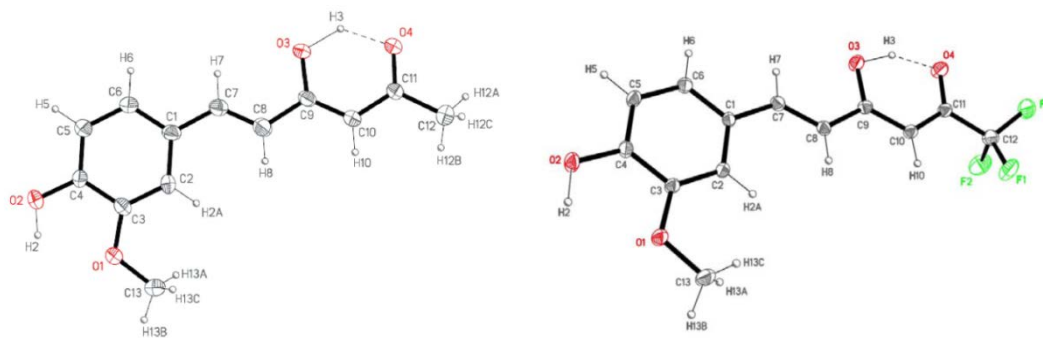


Figura 29. Diagramas ORTEP de **24** (izquierda, 30% de probabilidad de los elipsoides) y **26** (derecha, 20% de probabilidad de los elipsoides) [26].

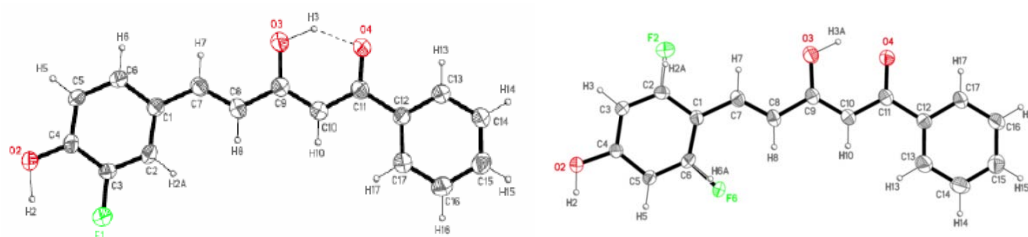


Figura 30. Diagramas ORTEP de **31** (izquierda, 30% de probabilidad de los elipsoides) [26] y de **52** (derecha, 20% de probabilidad de los elipsoides) [38]. En el compuesto **52**, el átomo de F está desordenado, 70% sobre C6 y 30% sobre C2.

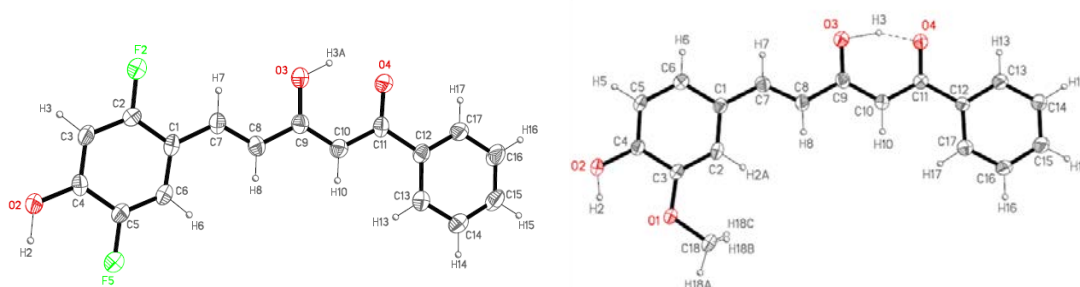


Figura 31. Diagramas ORTEP de **54** (izquierda) [38] y de **27** (derecha) [26] (30 % de probabilidad de los elipsoides).

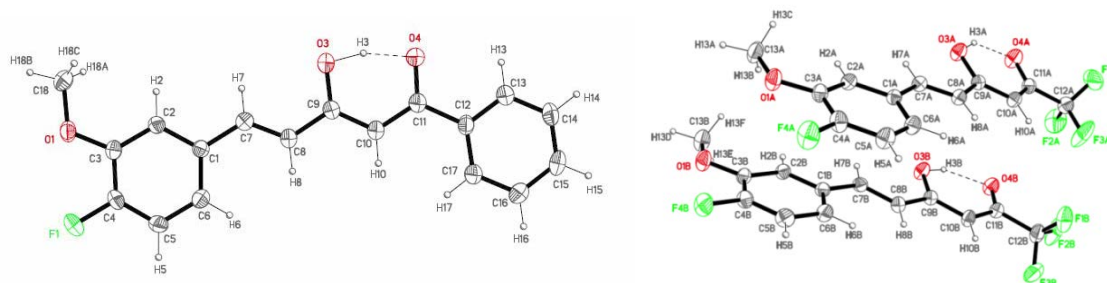


Figura 32. Diagramas ORTEP de **30** (izquierda, 30% de probabilidad de los elipsoides) [26] y de **55** (derecha, 30% de probabilidad de los elipsoides) [38].

3.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Entre las propiedades terapéuticas de la curcumina destacan sus asombrosas propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (AOX) por lo que no es de extrañar que sean numerosos los estudios que la emplean en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

La neurodegeneración se produce como consecuencia de un mal funcionamiento en el metabolismo y el balance energético en las neuronas, astrocitos, microglía o en las células del endotelio microvascular de la barrera hematoencefálica. Pese a que existen numerosas enfermedades neurodegenerativas de diferentes etiologías como son la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Alzheimer (EA) o la esclerosis múltiple, se ha conseguido encontrar un vínculo entre ellas: un desequilibrio en la concentración de hierro, un aumento de calcio, de la peroxidación lipídica, y de las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés reactive oxygen species). Por lo general las mitocondrias son la fuente más importante de producción de ROS celulares. La cadena transportadora de electrones (ETC, del inglés electron transport chain) genera radicales libres continuamente gracias a sus centros y transportadores redox, que pueden transferir electrones al oxígeno molecular y convertirlo en el anión superóxido; el progenitor más habitual de ROS [60]. Pese a que la mitocondria posee un sistema antioxidante muy eficaz en su matriz, un aumento en la producción de ROS y/o un desequilibrio en la concentración de antioxidantes dará lugar al aumento del estrés oxidativo y a la neurodegeneración. Los antioxidantes biológicos incluyen antioxidantes enzimáticos como la superóxido dismutasa y no enzimáticos como el glutatión (GSH), la vitamina E, o compuestos de naturaleza fenólica entre los que se encuentran la curcumina, el resveratrol y derivados sintéticos como el Trolox (Figura 33) [61].

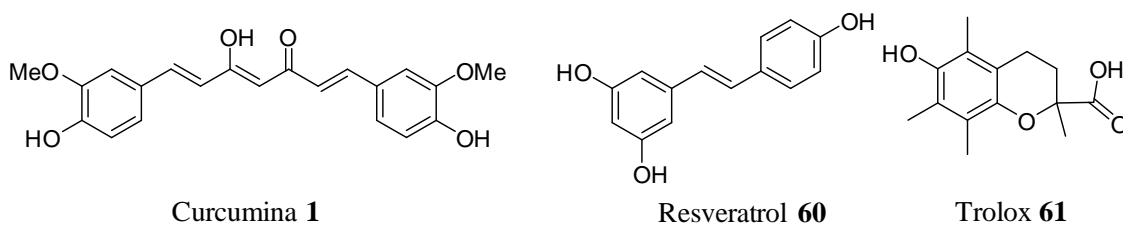


Figura 33. Antioxidantes de naturaleza fenólica.

El poder antioxidante de la curcumina se debe a su capacidad para captar radicales libres e inhibir la peroxidación lipídica de la membrana celular [62]. El mecanismo de oxidación de la curcumina puede seguir dos rutas como se aprecia en la Figura 34. En

una de ellas se forma un radical fenoxilo (FR1) y en la otra el grupo CH₂ de la heptanodiendiona pierde un H[•] para generar el radical (CR1). Mediante estudios teóricos de la teoría del funcional de la densidad (DFT), se calcularon las energías de disociación del OH fenólico y el grupo CH₂ metilénico determinándose que el OH fenólico posee menor energía de disociación lo que sugiere que es el grupo de mayor vulnerabilidad frente a los radicales libres [63].

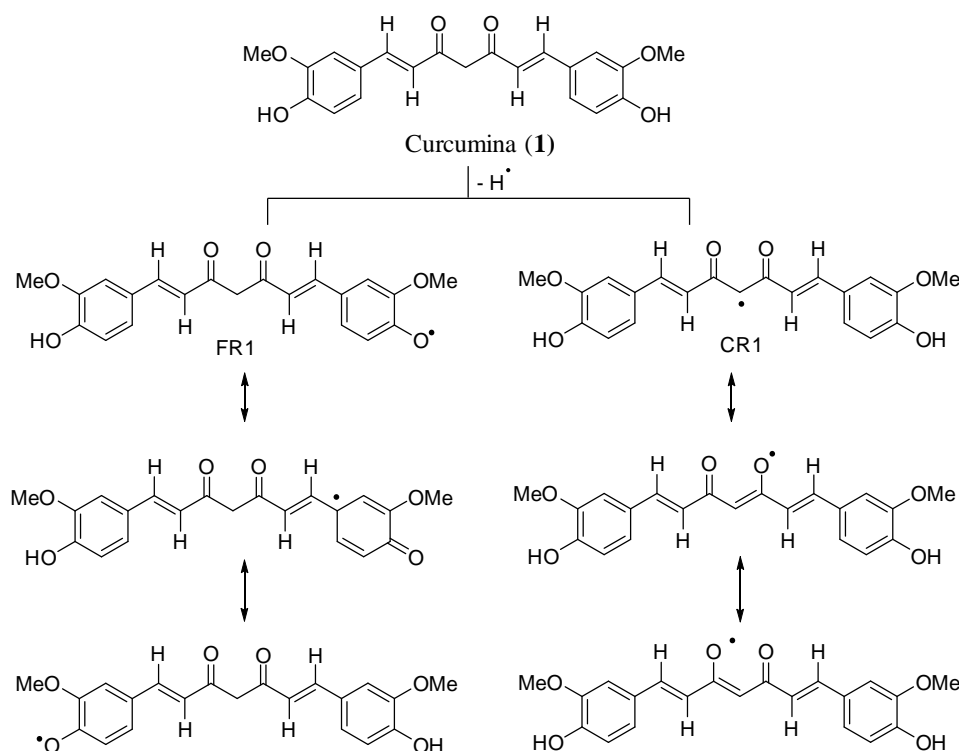


Figura 34. Mecanismos de oxidación de la curcumina.

Entre los estudios que emplean curcumina en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, los más numerosos son los destinados a tratar la enfermedad de Alzheimer que es en la actualidad la enfermedad neurodegenerativa más común. Neuropatológicamente se define por la acumulación extracelular de proteína β -amiloide que se deposita en forma de ovillos neurofibrilares en las placas seniles [64,65], o por la formación de microtúbulos de proteína τ fosforilada. La curcumina ha demostrado que puede inhibir tanto la formación de las placas de proteína β -amiloide como la hiperfosforilación de τ [66], con lo que la memoria es preservada y los síntomas de la enfermedad son minimizados. Sin embargo, como comentamos anteriormente, su baja biodisponibilidad sigue siendo su principal limitación desde el punto de vista de las propiedades *drug-like* por lo que es necesario el diseño y desarrollo de nuevos quimiotipos similares ella, pero con funcionalidad estructural diferente [67], que sean

más atractivos. En este sentido, se han descrito varios análogos y derivados curcuminoides que mejoran la inhibición de la auto-agregación *in vitro* del péptido β -amiloide, siendo éstos potentes neutralizantes de radicales libres [68].

En el presente apartado, se presentan los resultados de la evaluación del potencial AOX y neuroprotector de seis de las β -dicetonas hemicurcuminoides sintetizadas (**27**, **30**, **31**, **52-54**) (Figura 35). En primer lugar, se realizaron tres ensayos diferentes para determinar su capacidad AOX, y posteriormente se progresaron a estudios celulares *in vitro*, frente a células de la línea neuronal SH-SY5Y, a partir de cuyos resultados se evaluó su actividad citotóxica así como su potencial neuroprotector.

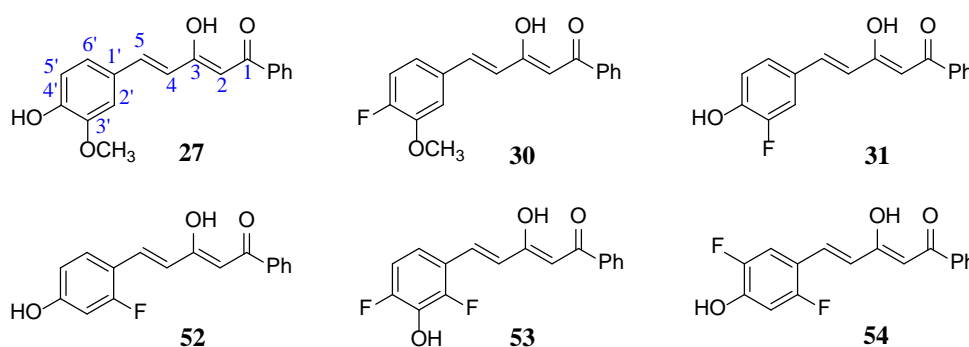


Figura 35. Estructura de las β -dicetonas hemicurcuminoides cuyo potencial antioxidante, citotóxico y neuroprotector ha sido determinado.

3.4.1 Determinación del carácter antioxidante de las β -dicetonas hemicurcuminoides sintetizadas

Los métodos de determinación del efecto antioxidante de un determinado compuesto se basan en la generación de radicales libres por distintos sistemas y en la inhibición de éstos por el compuesto antioxidante en cuestión. A la hora de determinar de forma completa el perfil antioxidante de una muestra, es recomendable emplear varios métodos con el fin de comparar resultados e interpretarlos de forma adecuada. Por ello, en la determinación del carácter antioxidante de las β -dicetonas hemicurcuminoides **27**, **30**, **31**, **52-54**, se emplearon tres de ellos: el método FRAP (del inglés ferric ion reducing antioxidant power), el método ABTS (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico) y el DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo). Los compuestos control utilizados fueron: curcumina (**1**), resveratrol (**60**) y Trolox (**61**) (Figura 33). Todos los experimentos se realizaron cuatro veces ($n = 4$) por triplicado, y todos los datos se representan como la media \pm la desviación estándar (SD).

Método FRAP

Consiste en un método de determinación de la capacidad antioxidante de forma indirecta basado en el poder que tiene una sustancia para reducir el Fe^{3+} del complejo incoloro con 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), a Fe^{2+} en el complejo coloreado (Figura 36). El complejo podrá ser reducido por productos con potenciales redox menores de 0.77 V. Se trata de un método espectrofotométrico en el que se mide la absorbancia del complejo de Fe^{2+} [69], cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor será la concentración del complejo de Fe^{2+} y su absorbancia.

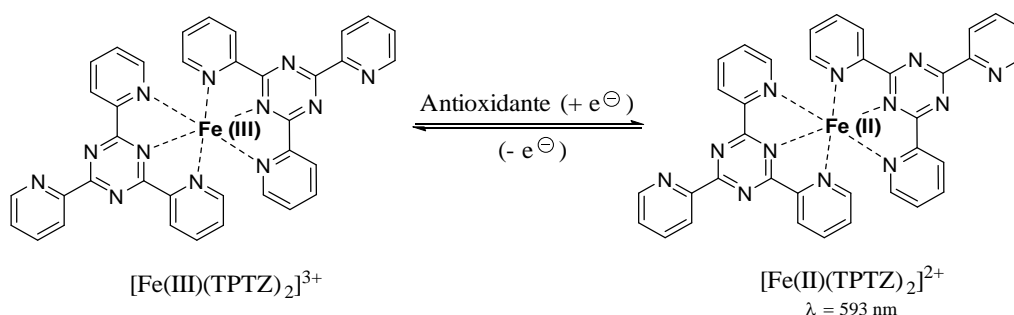


Figura 36. Reacción de reducción de TPTZ.

En primer lugar se realizó el ensayo FRAP de los tres compuestos antioxidantes control: curcumina (**1**), resveratrol (**60**) y Trolox (**61**) (Figura 37). El carácter AOX se determinó como la capacidad reductora de Fe^{+3} a Fe^{+2} , expresando dichos resultados como las absorbancias medidas a 593 nm tras la adición de cada uno de los tres compuestos a distintas concentraciones. En concordancia con los resultados descritos por Gülçin *et al.* [70], se observa que el resveratrol (**60**) y la curcumina (**1**) presentan un carácter reductor del Fe^{+3} similar y mayor que el mostrado por Trolox (**61**).

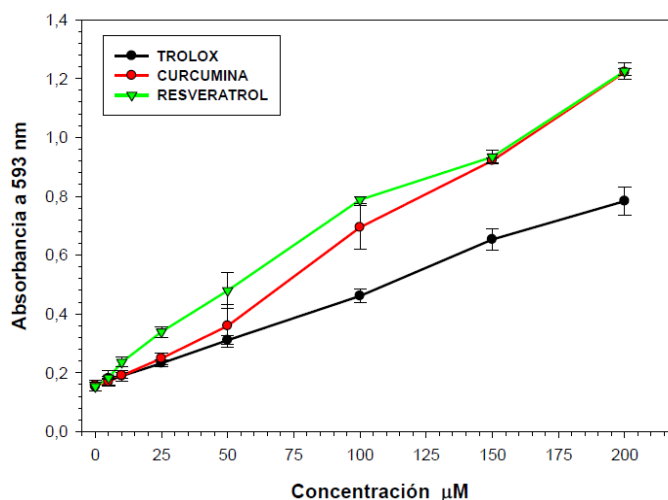


Figura 37. Representación de la absorbancia a 593 nm frente a la concentración (µM) en el ensayo FRAP de los compuestos control.

En el caso de los compuestos **27**, **30**, **31** y **52-54**, en la Figura 38 se observa que el compuesto con mayor capacidad AOX es **27**, siguiendo los seis compuestos el siguiente orden $27 > 31 \approx 54 > 52 > 53 \approx 30$.

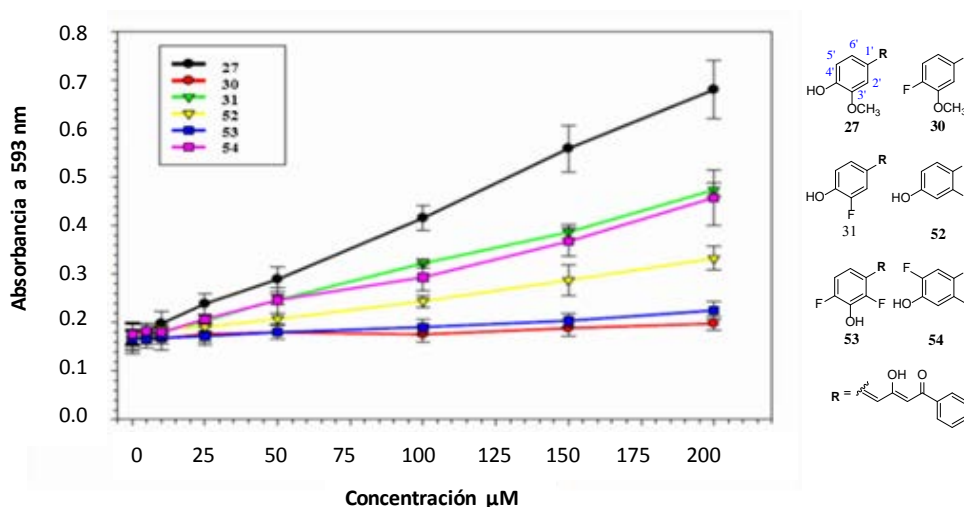


Figura 38. Representación de la absorbancia a 593 nm frente a la concentración (μM) en el ensayo FRAP de los compuestos **27**, **30**, **31** y **52-54**.

Posteriormente, se obtuvieron los valores de capacidad reductora del complejo $[\text{Fe}^{3+}-(\text{TPTZ})_2]$ de Fe^{+3} a Fe^{+2} en porcentaje, para cada derivado a la concentración de $100 \mu\text{M}$, tal y como se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Valores de capacidad reductora del complejo $[\text{Fe}^{3+}-(\text{TPTZ})_2]$ de Fe^{+3} a Fe^{+2} obtenidos por el método FRAP expresados en %.

Comp. AOX	100 μM
Resveratrol	100
Curcumina	87
Trolox	56
27	52
30	Sin actividad
31	42
52	30
53	Sin actividad
54	38

Se observa que el resveratrol tiene 100% de capacidad reductora a $100 \mu\text{M}$, seguido de curcumina, Trolox y el compuesto **27**. La menor actividad de **27** en comparación con la de curcumina, es debida a la ausencia de los grupos metoxilo en 3' e hidroxilo en 4', en uno de los anillos fenilo de **27**. Por otro lado, **31** y **54** con una

actividad reductora análoga entre sí, e inferior a la de **27**, reflejan que la introducción de flúor (fundamentalmente electrón-atrayente por efecto inductivo $-I$) en lugar del grupo metoxilo (principalmente electrón-donador por efecto mesómero $+M$), en posición *orto* al hidroxilo en 4' del anillo fenólico, podría reducir en ambos compuestos la densidad electrónica necesaria para reducir Fe^{+3} a Fe^{+2} . El compuesto **52** sin sustituyente en posición 3' (*orto* al OH) del anillo de fenol y con flúor en posición 2', presenta también menor actividad. La ausencia de OH en posición 4' del anillo en el caso de **30**, o su permutación a la posición 3' en **53**, da lugar a derivados totalmente carentes de capacidad reductora.

Estas observaciones parecen demostrar que el carácter AOX de compuestos con similitud estructural a la curcumina, es dependiente de la existencia del grupo hidroxilo en posición 4' y de su activación mediante la introducción de grupos electrón-donadores en *orto* (CH_3O), estando estos resultados de acuerdo con trabajos previamente descritos para otros derivados de curcumina [71].

Método ABTS

En este método, también espectrofotométrico, el radical monocatiónico del ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico ($\text{ABTS}^{\bullet+}$), de color verde azulado, es generado por oxidación del ABTS con persulfato potásico. Posteriormente, al ser reducido en presencia de compuestos antioxidantes, que tengan un potencial redox menor que el del ABTS (0.68 V), se observa una pérdida de esta coloración (Figura 39) realizándose la medida de absorbancia a una longitud de onda de 734 nm [72].

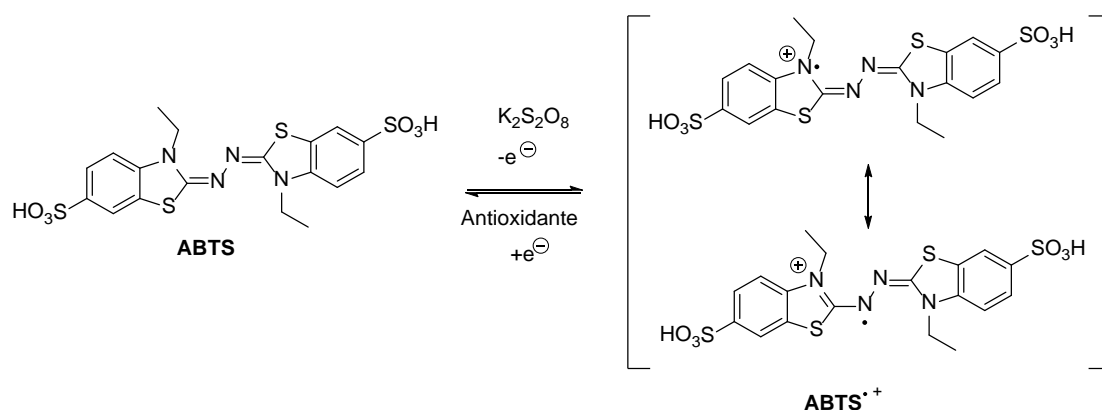


Figura 39. Reacción de óxido-reducción producida en el método ABTS.

Los resultados de los experimentos de determinación de la capacidad captadora de radicales $ABTS^{*+}$ (en porcentaje de reducción de dichos radicales) de los compuestos control se muestran en la Figura 40, y los resultados obtenidos para los compuestos (27, 30, 31 y 52-54) en la Figura 41. Nuevamente, de acuerdo con Gülcin *et al.* [71], el resveratrol presenta una capacidad captadora o secuestradora de radicales $ABTS^{*+}$ mayor, seguido de curcumina y Trolox.

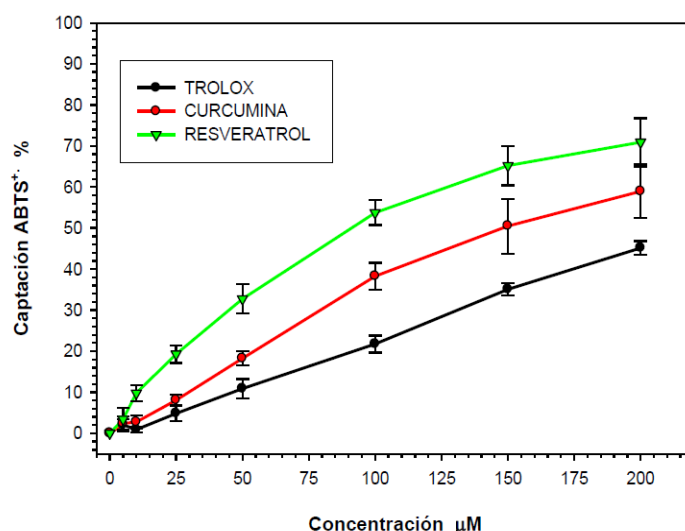


Figura 40. Capacidad de captación de radicales $ABTS^{*+}$ expresada como el porcentaje de reducción de dichos radicales en presencia de los compuestos control.

Tal y como se observa en la Figura 41, el compuesto 27 muestra la mayor eficacia como reductor de radicales $ABTS^{*+}$ seguido de 31, 54 y 52. Los compuestos que mostraron menor poder reductor han sido aquellos que no poseen un OH en 4': 53 y 30.

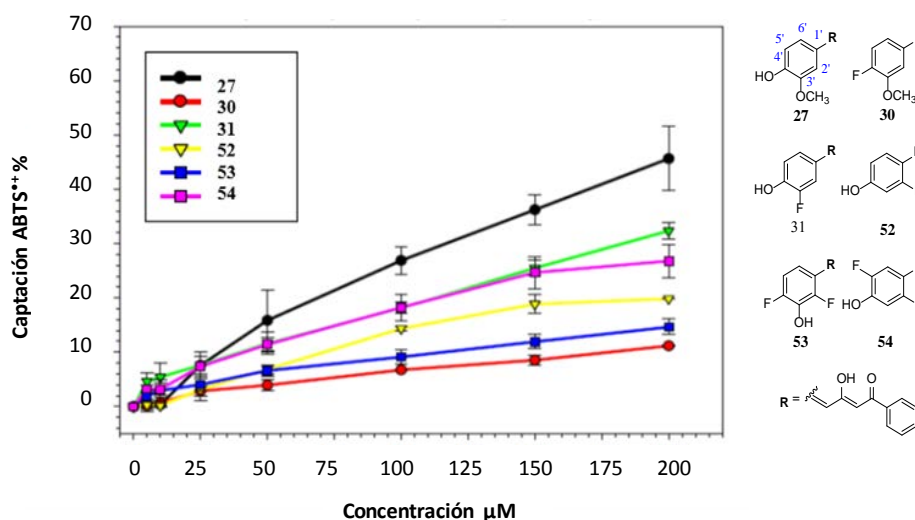


Figura 41. Capacidad de captación de radicales $ABTS^{*+}$ expresada como el porcentaje de reducción de dichos radicales en presencia de 27, 30, 31 y 52-54.

Método DPPH

Este ensayo espectrofotométrico utiliza el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH[•]), de color violeta, como reactivo (Figura 42) [73]. Dicho radical absorbe a la longitud de onda de 517 nm, disminuyendo esta señal a medida que se incrementa la capacidad antioxidante del compuesto y por lo tanto desapareciendo la coloración violeta.

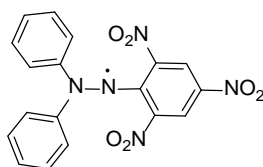


Figura 42. Estructura del 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH[•]).

En las Figuras 43 y 44 se aprecia la capacidad AOX, medida a través de la reducción de radicales DPPH[•] por los controles (Figura 43) y por el compuesto **27** (Figura 44). De los controles, Trolox es el derivado que muestra la mayor capacidad de transferencia de un átomo de hidrógeno al radical DPPH[•] disminuyendo así la presencia de dicho radical y apareciendo la nueva especie DPPH₂, con el consiguiente cambio de coloración medido espectrofotométricamente. La curcumina, muestra una capacidad AOX similar a la de Trolox a concentraciones mayores a 150 μM, pero es menos eficaz en el rango de concentraciones más bajas. El resveratrol es el menos eficaz a todas las concentraciones ensayadas.

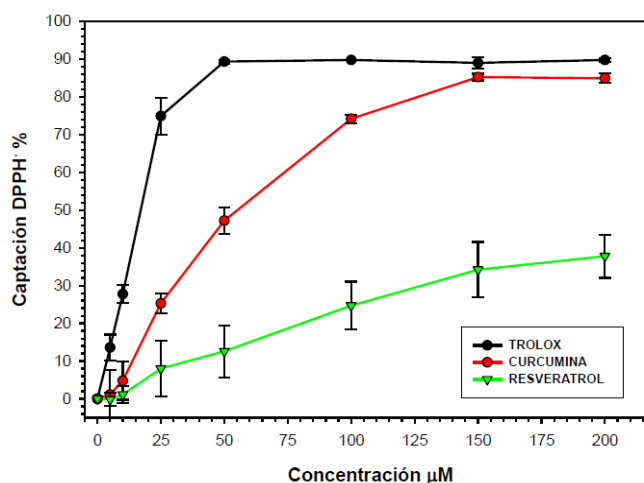


Figura 43. Capacidad de captación de radicales DPPH[•] (expresados en % de reducción) de los compuestos control.

En cuanto a los compuestos **27**, **30**, **31** y **52-54**, solo **27** muestra un perfil AOX similar al de curcumina (Figura 44), no destacando especialmente ninguno de los otros derivados.

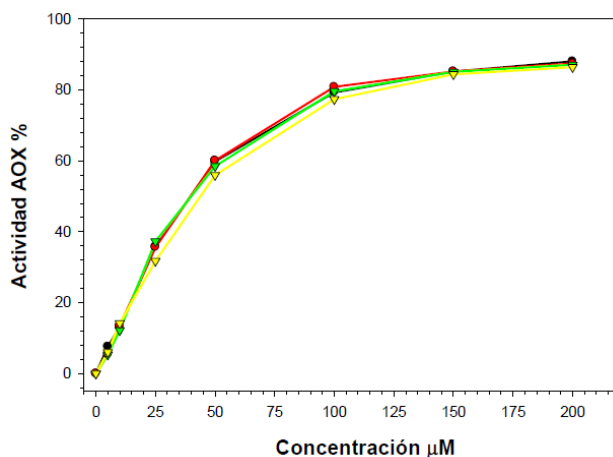


Figura 44. Captación de radicales DPPH[•] (expresada en % de reducción) del compuesto **27**.

En la Tabla 17 se muestra el análisis de los resultados del ensayo DPPH, expresados como IC₅₀ (concentración necesaria para inhibir en un 50% la captación de radicales DPPH[•]).

Tabla 17. Capacidad captadora de radicales DPPH[•] de los compuestos estudiados.

Comp. AOX	IC ₅₀ μM
Resveratrol	75
Curcumina	45
Trolox	15
27	32
30	Sin actividad
31	Sin actividad
52	Sin actividad
53	Sin actividad
54	Sin actividad

Únicamente Trolox, el compuesto **27**, curcumina y resveratrol han demostrado actividad, siendo Trolox el compuesto AOX con mayor capacidad de inhibición (menor IC₅₀) seguido del compuesto **27**. En la Figura 45 se visualiza el perfil de inhibición de estos compuestos.

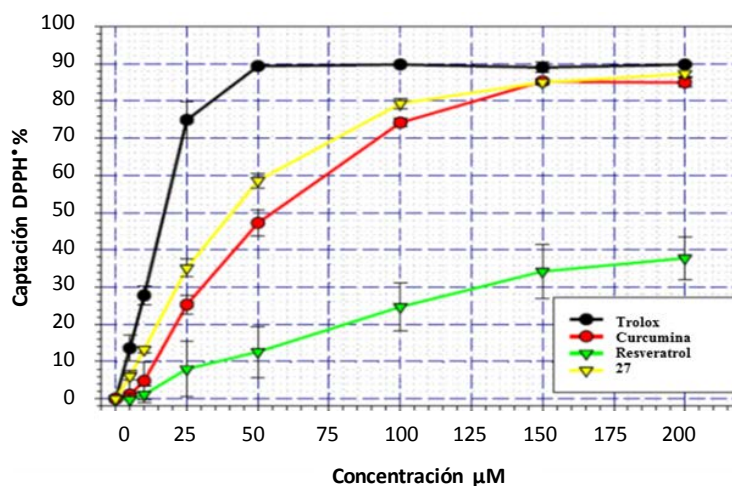


Figura 45. Representación de la capacidad captadora de radicales DPPH^{*} (expresada en % de reducción) de Trolox, curcumina, resveratrol y el compuesto 27.

Estos resultados demuestran de nuevo la importancia de que exista un grupo hidroxilo fenólico en posición 4' del anillo aromático, que esté a su vez activado por un sustituyente electrón-donador (CH₃, CH₃O) en posición *orto* a dicho grupo, como ocurre en Trolox, curcumina y el compuesto 27 (Figura 46), facilitándose la transferencia de un átomo de hidrógeno al radical DPPH^{*} y haciendo así más estable el radical fenoxi resultante.

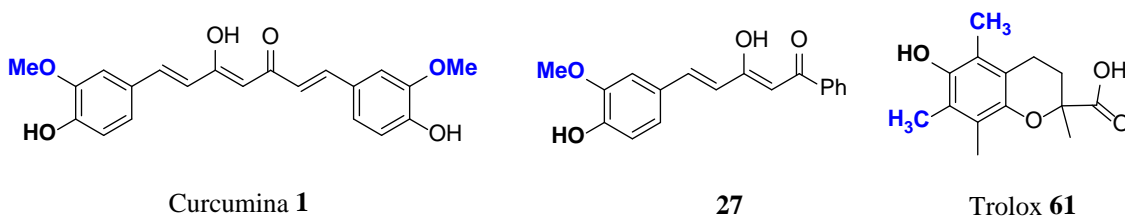


Figura 46. Compuestos más destacados en el ensayo DPPH^{*} en azul se señalan los grupos electrón-donadores en *orto* al grupo hidroxilo.

3.4.2 Estudio del carácter neuroprotector de las β-dicetonas hemicurcuminodes sintetizadas

3.4.2.1 Determinación de la citotoxicidad

Con el fin de determinar la dosis letal 50 (DL₅₀) de las β-dicetonas hemicurcuminoides objeto de estudio se realizaron ensayos de citotoxicidad *in vitro* sobre la línea celular SH-SY5Y.

La línea celular SH-SY5Y es una sublínea de células SK-N-SH clonadas por triplicado y extraídas originalmente de una biopsia de neuroblastoma de médula ósea de origen ganglionar adrenérgico simpático, aislado durante la década de los 70 (Figura 47) que contiene tres fenotipos diferentes: neuronal (tipo N), Schannian (tipo S) e intermediario (tipo I) [74]. Ha sido ampliamente utilizada desde principios de los años 80 ya que posee propiedades bioquímicas y funcionales de neuronas y, dado que deriva de células de la cresta neural neoplásica inmadura, también muestra propiedades de células madre. Por todo ello, esta línea celular es empleada en estudios experimentales de procesos relacionados con la neurotoxicidad y la neuroprotección [75].

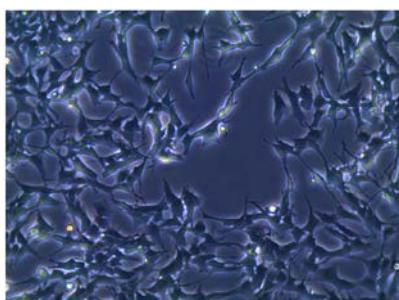


Figura 47. Imagen de las células SH-SY5Y obtenida con un microscopio óptico.

Método de Mosmann

En los estudios de citotoxicidad *in vitro* es común el empleo de métodos de tinción celular. El método más empleado y el utilizado en nuestros ensayos, es el desarrollado por Mosmann en 1983 [76]. Este método consiste en la reducción metabólica por componentes de la cadena respiratoria, fundamentalmente deshidrogenasas mitocondriales, del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (soluble en agua y de color amarillo pálido) a formazán (cristales violeta, insolubles en agua), que es intrínsecamente tóxico para las células (Figura 48) [77]. El (*E,Z*)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan, presenta una señal de absorbancia a 570 nm en un disolvente orgánico como el dimetilsulfóxido. La cantidad de formazán producido será proporcional a la cantidad de células vivas y a su grado de actividad, por lo que la técnica cuantitativa es muy sensible.

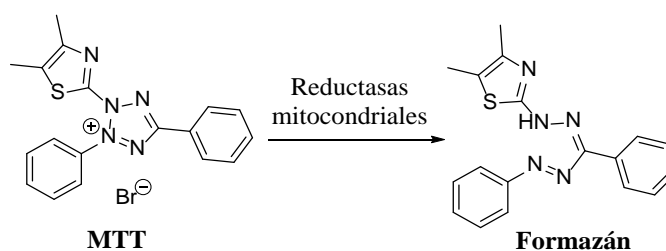


Figura 48. Reacción de reducción del MTT a formazán.

Los resultados de los estudios de citotoxicidad de las células de la línea neuronal SH-SY5Y, en presencia de los compuestos control, se muestran en la Figura 49. En las Figuras 50 y 51 se encuentran los resultados obtenidos para los compuestos **27**, **30**, **31** y **52-54**, que se expresan como porcentaje de supervivencia de las células cultivadas, a las 24 horas de ser tratadas con el compuesto objeto de estudio.

En la Figura 49 se aprecia como la curcumina ha mostrado mayor citotoxicidad a concentraciones mayores de 25 μM que resveratrol y Trolox, siendo este último el que parece mostrar un menor comportamiento citotóxico.

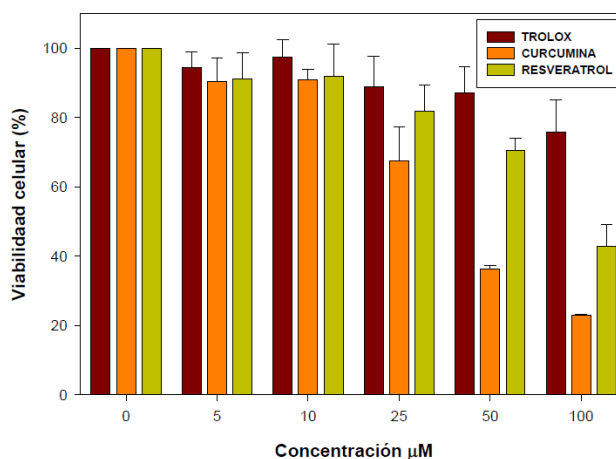


Figura 49. Citotoxicidad de los compuestos control a distintas concentraciones (μM), en las células SH-SY5Y, expresada como porcentaje de viabilidad celular.

Observando las Figuras 50 y 51 podemos afirmar que todos los derivados hemicurcuminoides ensayados presentan menor citotoxicidad que curcumina. A concentraciones mayores de 25 μM , los compuestos con un perfil más citotóxico son **52**, **53** y **54**, mientras que **27**, **30** y **31** presentan menor citotoxicidad en todo el rango de concentraciones utilizadas.

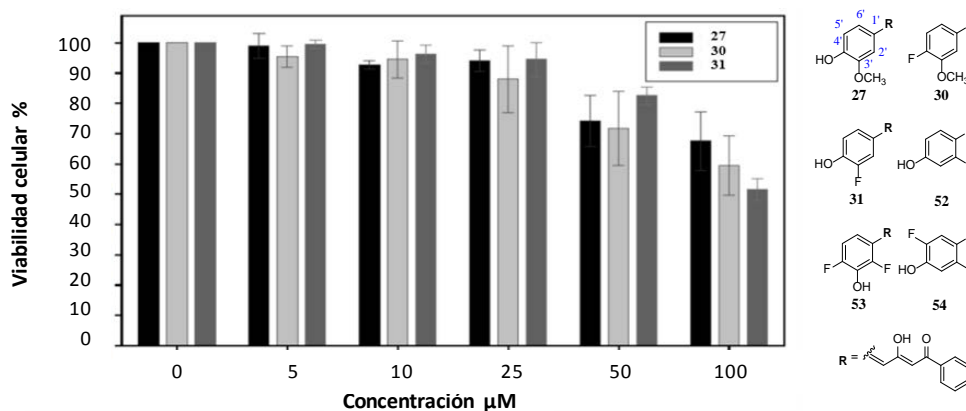


Figura 50. Citotoxicidad de los compuestos **27**, **30** y **31** a distintas concentraciones (μM), en las células SH-SY5Y, expresada como porcentaje de viabilidad celular.

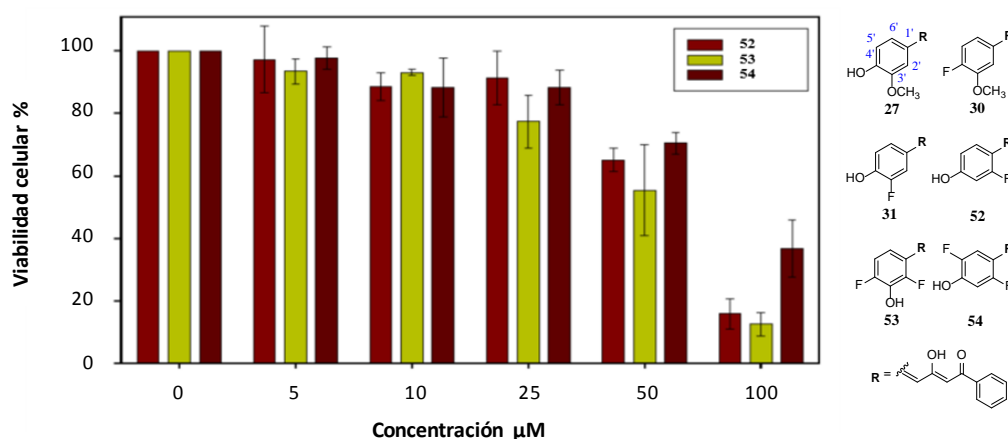


Figura 51. Citotoxicidad de los compuestos **52**, **53** y **54** a distintas concentraciones (μM), en las células SH-SY5Y, expresada como porcentaje de viabilidad celular.

3.4.2.2 Ensayos de protección

Teniendo en cuenta el perfil de citotoxicidad y las propiedades AOX descritas en apartados anteriores se decidió progresar a estudios de protección en condiciones de estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Para ello se determinó la viabilidad celular de SH-SY5Y en presencia de H_2O_2 (Figura 52).

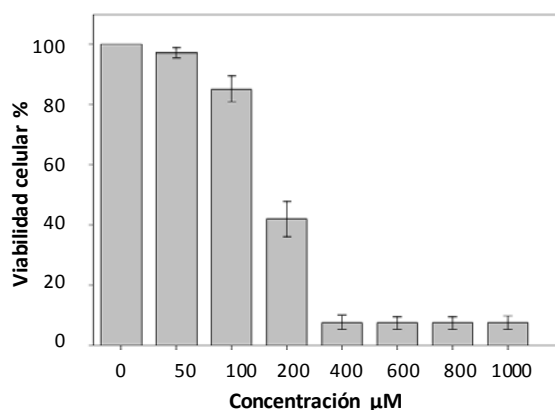


Figura 52. Viabilidad celular de SH-SY5Y en presencia de H_2O_2 .

A partir de los resultados mostrados en la Figura 52 se seleccionaron las concentraciones próximas a la IC_{50} (concentración a la que se obtiene una supervivencia celular del 50%) para los experimentos de protección celular en condiciones de estrés oxidativo (H_2O_2 100 y 200 μM), empleando curcumina y resveratrol a distintas concentraciones como AOX. En la Figura 53 se demuestra que la curcumina protege ligeramente a concentraciones de 5 y 10 μM , tanto frente a H_2O_2 100 μM como frente a una concentración de 200 μM . Sin embargo, a la concentración de 20 μM muestra cierta citotoxicidad. En el caso del resveratrol, no se observa protección significativa en

condiciones de H₂O₂ 100 μM, y se detecta menor supervivencia a una concentración de H₂O₂ de 200 μM.

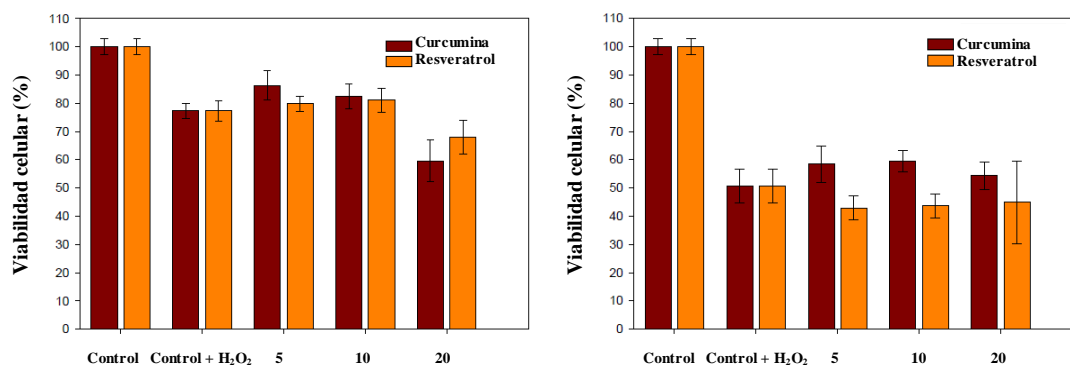


Figura 53. Porcentaje de viabilidad celular frente a la concentración de tratamiento AOX con curcumina y resveratrol (μM), en presencia de H₂O₂ 100 μM (izquierda) y 200 μM (derecha).

Los resultados de protección para los derivados **27** y **54** se muestran en la Figura 54. Frente a una concentración de H₂O₂ de 100 μM, ambos compuestos aumentan la supervivencia celular (10-20%) a concentraciones 5 y 10 μM, presentando citotoxicidad a 20 μM. Cuando la concentración de H₂O₂ es 200 μM, solo **54** muestra protección a las tres concentraciones con un aumento de la supervivencia celular (15-20%).

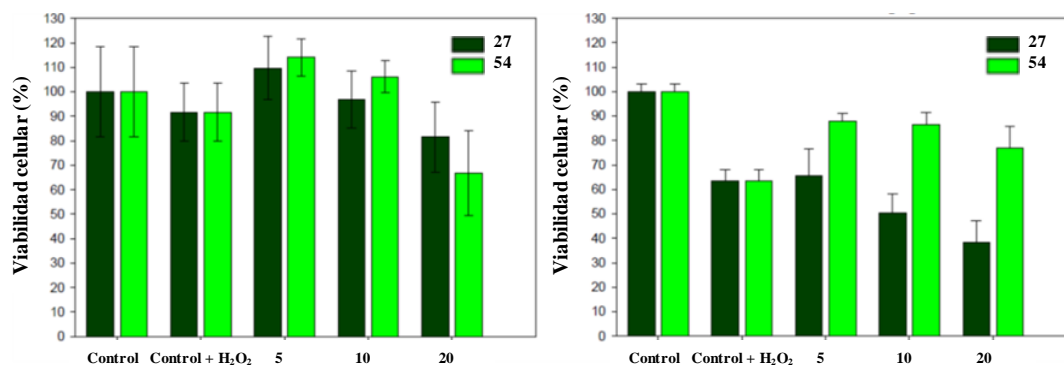


Figura 54. Porcentaje de viabilidad celular frente a la concentración de tratamiento AOX 27 o 54 (μM), en presencia de H₂O₂ 100 μM (izquierda) y 200 μM (derecha).

3.5 RESUMEN Y CONCLUSIONES

- Se han preparado dieciséis β -dicetonas hemicurcuminoides (**24-31** y **52-59**), de las cuales ocho han sido sintetizadas por primera vez (**52-59**) a partir de los aldehídos correspondientes (**8** y **47-51**). En términos generales, los rendimientos para la serie fenilo fueron superiores a los obtenidos para las series metilo y trifluorometilo. El empleo de aldehídos fluorados se ha traducido en un menor rendimiento frente a los no fluorados, disminuyendo también el rendimiento en aquellos derivados que no poseen un grupo hidroxilo en posición 4'.
- El estudio estructural, tanto de las β -dicetonas hemicurcuminoides sintetizadas como de los aldehídos fluorados de partida, se ha llevado a cabo mediante RMN en disolución y en estado sólido, y difracción de rayos X. Las estructuras de rayos X de los compuestos **52**, **54** y **55** han sido descritas por primera vez. En todos los casos existe un gran acuerdo entre los datos experimentales y los obtenidos mediante cálculos teóricos DFT; en todos los compuestos la forma tautomérica ceto-enol **a**, con el grupo enol en el carbono próximo al grupo estirilo, predomina sobre la **b**.
- Con el fin de determinar el potencial antioxidante y neuroprotector de seis de las β -dicetonas hemicurcuminoides sintetizadas (**27**, **30**, **31**, **52-54**), se han llevado a cabo tres ensayos diferentes (FRAP, ABTS y DPPH) para determinar su capacidad AOX. Posteriormente se han llevado a cabo estudios celulares (línea neuronal SH-SY5Y) *in vitro*, para evaluar la actividad citotóxica y el carácter neuroprotector de los dos candidatos con mejores resultados en los anteriores ensayos: **27** y **54**. Ambos mostraron capacidad neuroprotectora, si bien **54** presenta un mejor comportamiento a mayor concentración de agente oxidante.

3.6 PARTE EXPERIMENTAL

3.6.1 Materiales y métodos

El análisis estructural de los distintos compuestos sintetizados se realizó mediante el empleo de las técnicas e instrumentos que se indican a continuación.

Cromatografía. Para la cromatografía en capa fina se han utilizado cromatofolios de Merck kiesegel 60F254 con indicador de fluorescencia sobre aluminio y con espesor de capa de 0.2 mm. Para la cromatografía en columna se ha utilizado gel de sílice Merck 60 (70-230 mesh) con el eluyente indicado en cada caso.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC). El análisis por DSC se llevó a cabo en un calorímetro Seiko 220C, calibrado frente a la temperatura utilizando como patrones indio y zinc (156.60 y 419.47 °C, respectivamente). Las muestras de entre 3 y 5 mg se depositan en los contenedores de aluminio herméticamente sellados. La velocidad de calentamiento utilizada fue de 5 °C min⁻¹.

Análisis elemental. La determinación del contenido porcentual en carbono, hidrógeno y nitrógeno se llevó a cabo en un analizador Perkin Elmer 240 (CHN).

RMN en disolución. Los espectros de ¹H (400.13 MHz), ¹³C (100.62 MHz) y ¹⁹F (376.50 MHz) RMN se obtuvieron en un espectrómetro Bruker DRX-400 (9.4 T) provisto de una sonda de detección inversa de 5 mm equipada con una bobina de gradiente z (¹H, ¹³C) y una sonda QNP de 5 mm, en el caso del ¹⁹F, a 300K. Las constantes de acoplamiento (*J* en Hz) presentan una precisión de ± 0.2 Hz para ¹H, ± 0.8 Hz para ¹⁹F y ± 0.6 Hz para ¹³C. Para el control de temperatura se empleó una unidad de temperatura Bruker BVT 3000. Para los desplazamientos químicos (δ en ppm), se utilizó como referencia interna el disolvente empleado en cada caso, DMSO-*d*₆ 2.49 para ¹H y 39.5 para ¹³C; CDCl₃ 7.26 para ¹H y 77.0 para ¹³C; HMPA-*d*₁₈ 2.51 (señal más apantallada) para ¹H y 35.8 para ¹³C. Como referencia externa para ¹⁹F se empleó CFCl₃. Los parámetros de adquisición empleados fueron: anchura espectral de 7000 Hz, amplitud de pulso de 8.3 μ s, tiempo de repetición 1s para ¹H. Anchura espectral de 55 kHz, amplitud de pulso 13.75 μ s a un nivel de atenuación de -6 dB y tiempo de relajación de 1s para ¹⁹F. Anchura espectral 21 kHz, amplitud de pulso 10.6 μ s, con nivel de atenuación de -6 dB y un tiempo de repetición de 2 s para ¹³C. Se utilizó la secuencia WALTZ-16 para el desacoplamiento de protón. Las FID se multiplicaron por

una ponderación exponencial ($lb = 2$ Hz) antes de la transformada de Fourier para ^{13}C ; para aumentar la resolución en ^1H y ^{19}F se realizó una multiplicación gaussiana de la FID antes de hacer la transformada de Fourier. Los experimentos de espectroscopía de correlación heteronuclear por detección inversa, (^1H - ^{13}C) gs-HMQC y (^1H - ^{13}C) gs-HMBC, se realizaron y procesaron empleando el software estándar Bruker [78] en modo no sensible a la fase. Los parámetros de los pulsos de gradiente de campo fueron de tipo sinusoidal; duración 1 ms y tiempo de recuperación 0.1 ms. Los parámetros seleccionados para los experimentos han sido: anchura espectral 3500 Hz para ^1H y 20.5 kHz para ^{13}C ; tamaño de datos de adquisición 1024 puntos; acumulaciones 2 (^1H - ^{13}C) gs-HMQC o 4 (^1H - ^{13}C) gs-HMBC por incremento con un tiempo de repetición de 1s; número de experimentos 256 o 512; periodo de tiempo o *delay* para la evolución de la constante de acoplamiento ^1H - ^{13}C a un enlace, 3.45 ms (HMQC) y a larga distancia, 60 ms (HMBC). En los experimentos HMQC se ha utilizado la secuencia GARP para desacoplamiento de ^1H .

RMN en estado sólido. Los espectros de ^{13}C (100.73 MHz) CPMAS RMN se han llevado a cabo en un espectrómetro Bruker WB-400 a 300 K, empleando una sonda DVT de 4 mm. Las muestras fueron molidas y compactadas en rotores de óxido de zirconio de 4 mm de diámetro con tapas de KeI-F. Las condiciones operativas implican 2.9 μs , pulsos de ^1H de 90° y desacoplamiento con una secuencia SPINAL 64. Los desplazamientos químicos (δ en ppm) están referidos a la glicina calibrada a 176.1 ppm en los espectros de ^{13}C . Los parámetros de adquisición empleados para ^{13}C CPMAS han sido: anchura espectral 40 KHz, tiempo de repetición 5-25 s, tiempo de adquisición 30 ms, tiempo de contacto 2-5 ms, y velocidad de giro 12 KHz. Para poder distinguir los átomos de carbono cuaternarios de los protonados se han realizado experimentos NQS (Non-Quaternary Suppression), de manera que se han obtenido espectros en los que únicamente se observan carbonos cuaternarios. En la secuencia NQS también se aplica la polarización cruzada (CP), aunque antes de la adquisición el desacoplador se desconecta durante un periodo de tiempo muy corto, que en todos los casos fue de 25 μs [79]. Los espectros en estado sólido de ^{19}F (376.94 MHz) RMN han sido obtenidos en un espectrómetro Bruker WB-400 usando una sonda de doble resonancia MAS DVT BL2.5 X/F/H. Las muestras fueron cuidadosamente pulverizadas y compactadas en rotores de 2.5 mm de diámetro de óxido de zirconio cerrados con tapas de KeI-F. Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente, girando las muestras alrededor

del ángulo mágico (54.74 °) con una velocidad de giro de 25 y 30 kHz. Los espectros de ^{19}F están referenciados a una muestra de trifluoroacetato de amonio, por lo que los desplazamientos químicos (δ , ppm) fueron recalculados para el CFCl_3 (δ ($\text{CF}_3\text{COO}^- \text{NH}_4^+$) = -72.0 ppm). Los parámetros de adquisición típicos para ^{19}F { ^1H } MAS fueron: anchura espectral, 75 kHz; tiempo de repetición, 10 s; anchura de pulso, 2.5 μs y tiempo de contacto de 2ms, se ha utilizado la secuencia SPINAL-64 para el desacoplamiento de protón.

Cálculos teóricos. La geometría de las moléculas fue optimizada mediante el método híbrido HF/DFT B3LYP en el nivel B3LYP/6-311++G (d,p) [42,43]. Los cálculos de las frecuencias se realizaron al mismo nivel computacional para verificar que las estructuras obtenidas corresponden a los mínimos energéticos. Estas geometrías se emplearon para los cálculos de los desplazamientos químicos absolutos con el método GIAO [44]. Todos los cálculos se realizaron con el programa Gaussian-09 [45]. Los desplazamientos químicos se calcularon a partir de los desplazamientos absolutos mediante las siguientes ecuaciones:

$$\delta^1\text{H} = 31.0 - 0.97 \cdot \sigma^1\text{H}, \text{ (referencia TMS, 0.00 ppm)}$$

$$\delta^{13}\text{C} = 175.7 - 0.963 \cdot \sigma^{13}\text{C}, \text{ (referencia TMS, 0.00 ppm)}$$

$$\delta^{19}\text{F} = 162.1 - 0.959 \cdot \sigma^{19}\text{F}, \text{ (referencia CFCl}_3\text{, 0.00 ppm)}$$

La metodología de los átomos en moléculas (AIM, atoms in molecules) se utilizó para analizar la densidad electrónica de algunas moléculas empleando el programa AIMAll.

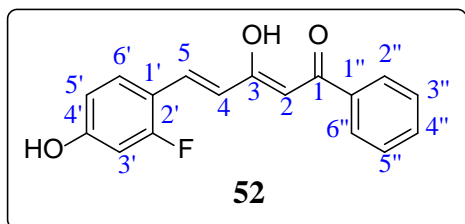
Difracción de rayos X. La recolección de datos para los compuestos **52** y **55** se llevó a cabo a temperatura ambiente en un difractómetro Bruker SMART CCD y en un difractómetro Xcalibur Atlas CCD para **54**, utilizando en todos los casos radiación Mo-K con un monocromador de grafito ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) funcionando a 50 kV y 35 mA para **52** y **55**, y a 50 kV y 40 mA para **54**. Los tiempos de exposición fueron 20 s para **52** y **55**, y de 35 s para **54**. Las estructuras fueron resueltas por métodos directos y refinadas por el método de mínimos cuadrados en F2 utilizando (SHELXL-97).

3.6.2 Síntesis de β -dicetonas hemicurcuminoides

(*E*)-6-(4-hidroxi-3-metoxifenil)hex-5-en-2,4-diona (**24**, pf: 141-143 °C) [27], (*E*)-6-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-metilhex-5-en-2,4-diona (**25**, pf: 138-140 °C) [27], (3*Z*,5*E*)-1,1,1-trifluoro-4-hidroxi-6-(4-hidroxi-3-metoxifenil)hexa-3,5-dien-2-ona (**26**, pf: 108.9 °C) [26], (2*Z*,4*E*)-3-hidroxi-5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (**27**, pf: 159.9 °C) [27], (2*Z*,4*E*)-5-(3,4-dimetoxifenil)-3-hidroxi-1-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (**28**, pf: 114-115 °C) [27], (2*Z*,4*E*)-5-(3,4-dimetoxifenil)-3-hidroxi-2-metil-1-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (**29**, pf: 112-113 °C) [27], (2*Z*,4*E*)-5-(4-fluoro-3-metoxifenil)-3-hidroxi-1-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (**30**, pf: 127.2 °C) [26] y (2*Z*,4*E*)-5-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-3-hidroxi-1-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (**31**, pf: 193.3 °C) [26], fueron preparadas según se describe en la literatura.

Procedimiento general de síntesis de β -dicetonas hemicurcuminoides:

A un matraz de fondo redondo de dos bocas, provisto de un refrigerante de reflujo y agitación magnética, se adicionan 15 mmol de la respectiva β -dicetona de partida: 1-fenilbutano-1,3-diona (para los compuestos **52-54**) o bien 1,1,1-trifluoropentano-2,4-diona (para los compuestos **55-59**), disueltos en 11.25 mL de acetato de etilo anhidro, agitando a 50 °C durante 30 minutos. Posteriormente, a través de una de las bocas mediante un embudo de adición, se añade una mezcla formada por 15 mmol del aldehído de partida correspondiente (**8**, **47-51**) y 22.5 mmoles de tributilborato disueltos en acetato de etilo anhidro (7.5 mL) calentando a 50 °C durante 30 minutos. Transcurrido dicho tiempo, gota a gota durante unos 15 minutos, se adicionan 15 mmol de butilamina en 7.5 mL de acetato de etilo anhidro. La mezcla resultante se calienta con agitación magnética a 50 °C durante 90 minutos y 16 h a temperatura ambiente (25 °C). Con el fin de hidrolizar el complejo de boro formado, se adicionan 30 mL de HCl 1M a la mezcla previamente calentada a 50 °C, continuando con la calefacción a dicha temperatura durante 1 h. Tras enfriar, la fase orgánica se separa de la acuosa. La fase acuosa es extraída con 3 x 15 mL de acetato de etilo y la fase orgánica se lava con agua 2 x 10 mL y se seca sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evapora a presión reducida y el crudo obtenido se purifica mediante columna cromatográfica y/o cristalización.

(2Z,4E)-5-(2-Fluoro-4-hidroxifenil)-3-hidroxi-1-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (**52**)

El producto deseado se obtiene empleando 1-fenilbutano-1,3-diona (**45**) y 2-fluoro-4-hidroxibenzaldehído (**49**). El crudo se purifica mediante el uso de una columna cromatográfica de gel de sílice empleando CH₂Cl₂/EtOH (95:5)

como eluyente y posterior cristalización en CH₂Cl₂/EtOH obteniéndose un sólido cristalino amarillo (2.39 g, 56%).

Pf: 164.5 °C.

Anal. Calc. para C₁₇H₁₃FO₃: C, 71.82; H, 4.61. Experimental: C, 71.69; H, 4.62.

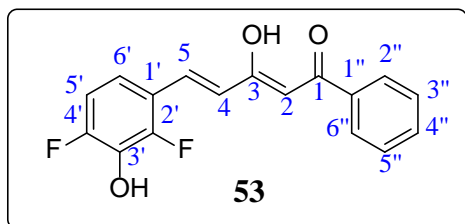
¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 16.30 (sa, 1H, OH-enol), 10.55 (s, 1H, OH), 8.01 (m, 2H, H2''/H6''), 7.65 (d, ³J_{H4}=16.1, 1H, H5), 7.64 (m, 1H, H6'), 7.63 (m, 1H, H4''), 7.54 (m, 2H, H3''/H5''), 6.82 (d, ³J_{H5}=16.1, 1H, H4), 6.75 (s, 1H, H2), 6.65 (dd, ³J_{F2'} = 12.8 Hz, ⁴J_{H5'} = 2.3 Hz, 1H, H3'), 6.65 (dd, ³J_{H6'} = 8.6 Hz, ⁴J_{H3'} = 2.3 Hz, 1H, H5').

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ 188.0 (C1), 180.1 (C3), 161.9 (¹J_{F2'} = 251.4, C2'), 161.3 (³J_{F2'} = 12.6 Hz, C4'), 135.4 (C1''), 132.9 (C4''), 132.3 (³J_{F2'} = 2.5 Hz, C5), 130.3 (³J_{F2'} = 5.1 Hz, C6'), 128.9 (³J = 7.6 Hz, C3'' y C5''), 127.2 (C2'' y C6''), 122.2 (⁴J_{F2'} = 6.2 Hz, C4), 113.4 (²J_{F2'} = 11.5 Hz, C1'), 112.7 (⁴J_{F2'} = 2.5 Hz, C5'), 103.0 (²J_{F2'} = 23.8 Hz, C3'), 97.5 (C2).

¹³C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 192.8 (C1), 177.0 (C3), 164.5 y 160.4 (C2'), 161.6 (C4'), 135.8 (C1''), 135.8 (C4''), 134.0 (sa, C5), 128.4 (C6'), 128.4 (C2'', C6'', C3'' y C5''), 122.5 (sa, C4), 113.6 (C1'), 113.6 (C5'), 104.6 (C3'), 98.1 (C2).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆): δ -113.5 (dd, ³J_{H3'} = 12.8 Hz, ⁴J_{H6'} = 9.2 Hz, F2').

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -103.2 (74%) (F2'), -107.3 (26%) (F2').

(2Z,4E)-5-(2,4-Difluoro-3-hidroxifenil)-3-hidroxi-1-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (53)

El producto deseado se obtiene empleando 1-fenilbutano-1,3-diona (**45**) y 2,4-difluoro-3-hidroxibenzaldehído (**50**). El crudo se purifica mediante el uso de una columna cromatográfica de gel de sílice empleando CH_2Cl_2 como

eluyente y posterior cristalización en $\text{CHCl}_2/\text{EtOH}$ obteniéndose un sólido cristalino naranja (1.64 g, 36%).

Pf: 195.0 °C

Anal. Calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{O}_3$: C, 67.55; H, 4.00. Experimental: C, 67.42; H, 3.94.

^1H RMN (400.13 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 16.10 (sa, 1H, OH-enol), 10.46 (s, 1H, OH), 8.02 (m, 2H, H2''/H6''), 7.65 (m, 1H, H4''), 7.64 (d, $^3J_{\text{H}4} = 16.1$ Hz, 1H, H5), 7.55 (m, 2H, H3''/H5''), 7.26 (ddd, $^3J_{\text{H}5'} = 8.9$ Hz, $^4J_{\text{F}2'} = 7.8$ Hz, $^4J_{\text{F}4'} = 5.8$ Hz, 1H, H6'), 7.12 (ddd, $^3J_{\text{F}4'} = 10.5$ Hz, $^3J_{\text{H}6'} = 8.9$ Hz, $^5J_{\text{F}2'} = 1.8$ Hz, 1H, H5'), 6.97 (d, $^3J_{\text{H}5} = 16.1$ Hz, 1H, H4), 6.82 (s, 1H, H2).

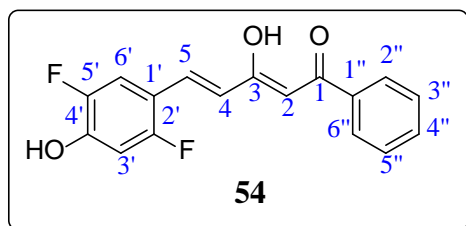
^{13}C RMN (100.62 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 189.1 (C1), 178.6 (C3), 152.3 ($^1J_{\text{F}4'} = 246.6$ Hz, $^3J_{\text{F}2'} = 6.2$ Hz, C4'), 151.2 ($^1J_{\text{F}2'} = 249.1$ Hz, $^3J_{\text{F}4'} = 6.5$ Hz, C2'), 135.4 (C1''), 134.2 ($^2J_{\text{F}2'} = ^2J_{\text{F}4'} = 16.1$ Hz, C3'), 133.8 (C4''), 131.2 ($^3J_{\text{F}2'} = ^5J_{\text{F}4'} = 2.3$ Hz, C5), 128.9 (C3'' y C5''), 127.4 (C2'' y C6''), 125.5 ($^4J_{\text{F}2'} = 6.3$ Hz, $^6J_{\text{F}4'} = 2.4$ Hz, C4), 119.5 ($^2J_{\text{F}2'} = 6.8$ Hz, $^4J_{\text{F}4'} = 2.4$ Hz, C1'), 117.9 ($^3J_{\text{F}4'} = 8.8$ Hz, $^3J_{\text{F}4'} = 8.8$ Hz, C6'), 112.2 ($^2J_{\text{F}4'} = 19.2$ Hz, $^4J_{\text{F}2'} = 3.7$ Hz, C5'), 98.1 (C2).

^{13}C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 193.8 (C1), 174.9 (C3), 151.9 (sa, C2'), 151.9 (sa, C4'), 136.2 (C1''), 134.3 (C5), 134.3 (C3'), 134.3 (C4''), 128.6 (C2'' y C6''), 128.6 (C3'' y C5''), 124.2 (C4), 119.6 (C1'), 112.3 (C5'), 112.3 (C6'), 103.0 (C2).

^{19}F RMN (376.50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ -128.2 (ddd, $^3J_{\text{FF}} = 14.5$ Hz, $^4J_{\text{H}5'} = 10.5$ Hz, $^5J_{\text{H}6'} = 5.8$ Hz, F4'), -134.1 (ddd, $^3J_{\text{FF}} = 14.5$ Hz, $^4J_{\text{H}6'} = 7.8$ Hz, $^5J_{\text{H}5'} = 1.8$ Hz, F2').

^{19}F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -129.4 (F2' y F4').

(2Z,4E)-5-(2,5-Difluoro-4-hidroxifenil)-3-hidroxi-1-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (**54**)



El producto deseado se obtiene empleando 1-fenilbutano-1,3-diona (**45**) y 2,5-difluoro-4-hidroxibenzaldehído (**51**). El crudo se purifica mediante el uso de una columna cromatográfica de gel de sílice empleando CH₂Cl₂/EtOH (95:5)

como eluyente y posterior cristalización en CH₂Cl₂/EtOH obteniéndose un sólido cristalino amarillo (2.99 g, 66%).

Pf: 189.8 °C.

Anal. Calc. para C₁₇H₁₂F₂O₃: C, 67.55; H, 4.00. Experimental: C, 67.64; H, 4.05.

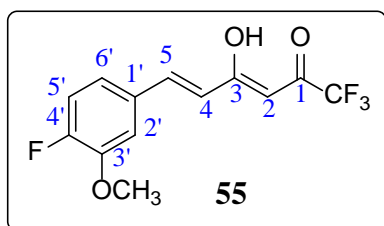
¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 16.25 (sa, 1H, OH-enol), 11.05 (s, 1H, OH), 8.00 (m, 2H, H2''/H6''), 7.67 (dd, ³J_{F5'} = 11.9 Hz, ⁴J_{F2'} = 7.9 Hz, 1H, H6'), 7.63 (m, 1H, H4''), 7.59 (dd, ³J_{H4} = 16.0 Hz, ⁵J_{F5'} = 1.1 Hz, 1H, H5), 7.55 (m, 2H, H3''/H5''), 6.89 (d, ³J_{H5} = 16.0 Hz, 1H, H4), 6.83 (dd, ³J_{F2'} = 12.8 Hz, ⁴J_{F5'} = 7.4 Hz, 1H, H3'), 6.72 (s, 1H, H2).

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ 188.5 (C1), 179.9 (C3), 157.1 (¹J_{F2'} = 248.3 Hz, ⁴J_{F5'} = 1.5 Hz, C2'), 148.3 (²J_{F5'} = 14.6 Hz, ³J_{F2'} = 12.6 Hz, C4'), 148.0 (¹J_{F5'} = 238.7 Hz, ⁴J_{F2'} = 2.2 Hz, C5'), 135.4 (C1''), 133.0 (C4''), 131.0 (³J_{F2'} = ⁴J_{F5'} = 1.9 Hz, C5), 128.9 (C3'' y C5''), 127.2 (C2'' y C6''), 123.6 (⁴J_{F2'} = 5.7 Hz, C4), 116.0 (²J_{F5'} = 21.0 Hz, ³J_{F2'} = 5.0 Hz, C6'), 113.1 (²J_{F2'} = 14.0 Hz, ³J_{F5'} = 6.7 Hz, C1'), 105.1 (²J_{F2'} = 26.6 Hz, ³J_{F5'} = 3.3 Hz, C3'), 97.7 (C2).

¹³C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 194.9 (C1), 174.8 (C3), 158.1 y 155.4 (C2'), 149.7 y 147.3 (C5'), 147.3 (C4'), 134.4 (C1''), 132.9 (C4''), 129.3 (C5, C3'' y C5''), 127.6 y 126.2 (C2'' y C6''), 121.2 (C4), 114.4 (C1'), 111.4 (C6'), 106.9 (C3'), 100.4 (C2).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆): δ -118.6 (⁵J_{FF} = 15.0 Hz, ³J_{H3'} = 12.8 Hz, ⁴J_{H6'} = 7.9 Hz, F2'), -140.1 (⁵J_{FF} = 15.0 Hz, ³J_{H6'} = 11.9 Hz, ⁴J_{H3'} = 7.4 Hz, F5').

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -115.4 (F2'), -138.2 (F5').

(3Z,5E)-1,1,1-Trifluoro-6-(4-fluoro-3-metoxifenil)-4-hidroxihexa-3,5-dien-2-ona (55)

El producto deseado se obtiene empleando 1,1,1-trifluoropentano-2,4-diona (**46**) y 4-fluoro-3-metoxibenzaldehído (**47**). El crudo se purifica mediante el uso de una columna cromatográfica de gel de sílice empleando hexano/AcOEt (70:30) como eluyente y

posterior cristalización en AcOEt/hexano obteniéndose un sólido amarillo (500 mg, 11%).

Pf: 110.8 °C.

Anal. Calc. para C₁₃H₁₀F₄O₃: C, 53.80; H, 3.47. Experimental: C, 53.75; H, 3.37.

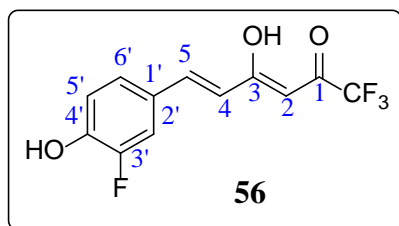
¹H RMN (400.13 MHz, CDCl₃): δ 14.15 (sa, 1H, OH-enol), 7.70 (d, ³J_{H4} = 15.8 Hz, 1H, H5), 7.1-7.08 (m, 3H, H2', H5' y H6'), 6.49 (d, ³J_{H5} = 15.8 Hz, 1H, H4), 6.03 (s, 1H, H2), 3.94 (s, 3H, OMe).

¹³C RMN (100.62 MHz, CDCl₃): δ 180.8 (C3), 180.4 (²J_F = 35.8 Hz, C1), 154.3 (¹J_{F4'} = 253.5 Hz, C4'), 148.3 (²J_{F4'} = 11.4 Hz, C3'), 142.6 (⁵J_{F4'} = 1.9 Hz, C5), 130.9 (⁴J_{F4'} = 4.3 Hz, C1'), 122.2 (³J_{F4'} = 6.9 Hz, C6'), 120.8 (⁶J_{F4'} = 2.5 Hz, C4), 116.8 (²J_{F4'} = 19.2 Hz, C5'), 116.7 (¹J_F = 286.0 Hz, CF₃), 112.7 (³J_{F4'} = 3.1 Hz, C2'), 95.6 (³J_F = 1.7 Hz, C2), 56.3 (OMe).

¹³C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 181.4 (C3), 180.1 (C1), 151.7 y 154.0 (C4'), 146.9 (C3'), 143.2 y 146.3 (C5), 130.9 y 132.1 (C1'), 118.0 (C4), 116.0 y 118.0 (C5'), 118.0 (C6'), 117.3 (sa, CF₃), 114.1 (C2'), 95.2 (C2), 55.7 y 54.6 (OMe).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, CDCl₃): δ -77.6 (CF₃), -129.8 (ddd, ³J_{H5'} = 9.1 Hz, ⁴J_{H2'} = 8.0 Hz, ⁴J_{H6'} = 5.7 Hz, F4').

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -74.1 (CF₃), -129.3 y -130.6 (F4').

(3Z,5E)-1,1,1-Trifluoro-6-(3-fluoro-4-hidroxyfenil)-4-hidroxihexa-3,5-dien-2-ona (56)

El producto deseado se obtiene empleando 1,1,1-trifluoropentano-2,4-diona (**46**) y 3-fluoro-4-hidroxi-benzaldehído (**48**). El crudo se purifica mediante el uso de una columna cromatográfica de gel de sílice empleando CH₂Cl₂/EtOH (95:5) como

eluyente y posterior cristalización en CH₂Cl₂/EtOH obteniéndose un sólido amarillo (1.10 g, 26%).

Pf: 134.4 °C.

Anal. Calc. para C₁₂H₈F₄O₃: C, 52.19; H, 2.92. Experimental: C, 52.14; H, 2.88.

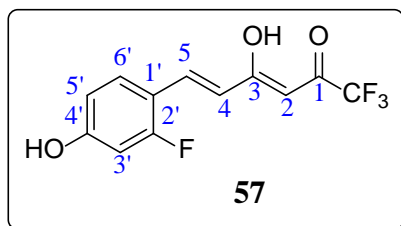
¹H RMN (400.13 MHz, CDCl₃): δ 14.21 (sa, 1H, OH-enol), 7.66 (dd, ³J_{H4} = 15.7 Hz, ⁵J_{F3'} = 0.9 Hz, 1H, H5), 7.32 (dd, ³J_{F3'} = 11.2 Hz, ⁴J_{H6'} = 2.1 Hz, 1H, H2'), 7.27 (dd, ³J_{H5'} = 8.4 Hz, ⁴J_{H2'} = 2.1 Hz, 1H, H6'), 7.05 (dd, ⁴J_{F3'} = 8.8 Hz, ³J_{H6'} = 8.4 Hz, 1H, H5'), 6.42 (d, ³J_{H5} = 15.7 Hz, 1H, H4), 6.00 (s, 1H, H2), 5.49 (s, 1H, 4'-OH)

¹³C RMN (100.62 MHz, CDCl₃): δ 181.0 (C3), 180.2 (²J_F = 36.1 Hz, C1), 151.1 (¹J_{F3'} = 239.3 Hz, C3'), 146.2 (²J_{F3'} = 14.6 Hz, C4'), 142.3 (⁴J_{F3'} = 2.7 Hz, C5), 127.7 (³J_{F3'} = 6.4 Hz, C1'), 126.3 (⁴J_{F3'} = 3.0 Hz, C6'), 120.0 (C4), 116.7 (¹J_F = 286.5 Hz, CF₃), 114.9 (²J_{F3'} = 18.7 Hz, C2'), 95.5 (³J_F = 1.6 Hz, C2).

¹³C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 180.1 (C3), 179.3 (C1), 150.5 (sa, C3'), 148.3 (C4'), 142.7 (C5), 130.8 (C6'), 124.9 (C1'), 117.7 (C4), 116.5 (sa, CF₃), 115.0 (C5'), 110.4 (C2'), 95.1 (C2).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, CDCl₃): δ -77.6 (CF₃), -140.1 (³J_{H2'} = 11.2 Hz, ⁴J_{H5'} = 8.5 Hz, F3').

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -72.1 (CF₃), -134.0 (F3').

(3Z,5E)-1,1,1-Trifluoro-6-(2-fluoro-4-hidroxifenil)-4-hidroxihexa-3,5-dien-2-ona (57)

El producto deseado se obtiene empleando 1,1,1-trifluoropentano-2,4-diona (**46**) y 2-fluoro-4-hidroxibenzaldehído (**49**). El crudo se purifica mediante el uso de una columna cromatográfica de gel de sílice empleando CH₂Cl₂/EtOH (95:5) como

eluyente y posterior cristalización en CH₂Cl₂/EtOH obteniéndose un sólido amarillo (1.35 g, 33%).

Pf: 151.2 °C.

Anal. Calc. para C₁₂H₈F₄O₃: C, 52.19; H, 2.92. Experimental: C, 52.08; H, 3.09.

¹H RMN (400.13 MHz, CDCl₃): δ 14.29 (OH-enol), 7.81 (d, ³J_{H4} = 15.9 Hz, 1H, H5), 7.45 (dd, ³J_{H5'} = 8.5 Hz, ⁴J_{F2'} = 8.5 Hz, 1H, H6'), 6.68 (dd, ³J_{H6'} = 8.5 Hz, ⁴J_{H3'} = 2.5 Hz, 1H, H5'), 6.64 (dd, ³J_{F2'} = 11.8 Hz, ⁴J_{H5'} = 2.5 Hz, 1H, H3'), 6.57 (d, ³J_{H5} = 15.9 Hz, 1H, H4), 6.01 (s, 1H, H2), 5.36 (s, 1H, 4'-OH).

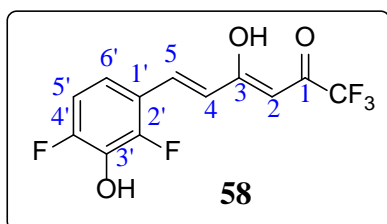
¹³C RMN (100.62 MHz, CDCl₃): δ 181.0 (C3), 179.7 (²J_F = 36.2 Hz, C1), 162.36 (¹J_{F2'} = 256.2 Hz, C2'), 158.9 (³J_{F2'} = 13.4 Hz, C4'), 136.0 (C5), 130.5 (³J_{F2'} = 4.8 Hz, C6'), 120.6 (⁴J_{F2'} = 7.3 Hz, C4), 116.3 (¹J_F = 285.2 Hz, CF₃), 115.0 (²J_{F2'} = 11.2 Hz, C1'), 111.9 (⁴J_{F2'} = 2.4 Hz, C5'), 103.5 (²J_{F2'} = 25.2 Hz, C3'), 95.1 (C2).

¹³C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 182.2 (C3), 181.2 (C1), 163.3 (C4'), 161.2 (sa, C2'), 136.2 (C5), 126.9 (C6'), 116.3 (C4), 115.8 (sa, CF₃), 112.3 (C1'), 111.3 (C5'), 101.3 (C3'), 95.3 (C2).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, CDCl₃): δ -77.6 (CF₃), -111.0 (dd, ³J_{H3'} = 11.8 Hz, ⁴J_{H6'} = 8.3 Hz, F2'),

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -73.4 (CF₃), -113.9 (F2').

(3*Z*,5*E*)-6-(2,4-Difluoro-3-hidroxifenil)-1,1,1-trifluoro-4-hidroxihexa-3,5-dien-2-ona
(58)



El producto deseado se obtiene empleando 1,1,1-trifluoropentano-2,4-diona (**46**) y 2,4-difluoro-3-hidroxibenzaldehído (**50**). El crudo se purifica mediante el uso de una columna cromatográfica de gel de sílice empleando $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (95:5) como

eluyente y posterior cristalización en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ obteniéndose un sólido amarillo (733 mg, 17%).

Pf: 129.1 °C.

Anal. Calc. para $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{F}_5\text{O}_3$: C, 48.99; H, 2.40. Experimental: C, 49.28; H, 2.66.

^1H RMN (400.13 MHz, CDCl_3): δ 14.2 (sa, 1H, OH-enol), 7.77 (d, $^3J_{\text{H}4} = 16.0$ Hz, 1H, H5), 7.08 (ddd, $^3J_{\text{H}5'} = 9.1$, $^4J_{\text{F}2'} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{F}4} = 5.9$ Hz, 1H, H6'), 6.97 (ddd, $^3J_{\text{H}6'} = 9.1$ Hz, $^3J_{\text{F}4'} = 9.1$ Hz, $^5J_{\text{F}2'} = 1.9$ Hz, 1H, H5'), 6.64 (d, $^3J_{\text{H}5} = 16.0$ Hz, 1H, H4), 6.03 (s, 1H, H2), 5.40 (s, 1H, OH).

^1H RMN (400.13 MHz, 85% CDCl_3 + 15% $\text{DMSO}-d_6$): δ 9.60 (sa, 2H, OH-enol y OH), 7.72 (d, $^3J_{\text{H}4} = 16.0$ Hz, 1H, H5), 6.92 (ddd, $^3J_{\text{H}5'} = 8.8$ Hz, $^4J_{\text{F}2'} = 7.4$ Hz, $^4J_{\text{F}4'} = 5.7$ Hz, 1H, H6'), 6.82 (ddd, $^3J_{\text{F}4'} = 9.9$ Hz, $^3J_{\text{H}6'} = 8.8$ Hz, $^5J_{\text{F}2'} = 1.8$ Hz, 1H, H5'), 6.56 (d, $^3J_{\text{H}5} = 16.0$ Hz, 1H, H4), 5.95 (s, 1H, H2).

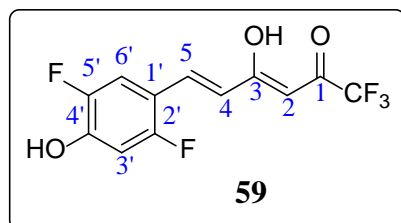
^{13}C RMN (100.62 MHz, 85% CDCl_3 + 15% $\text{DMSO}-d_6$): δ 180.5 (C3), 180.2 ($^2J_{\text{F}} = 35.8$ Hz, C1), 154.1 ($^1J_{\text{F}4'} = 249.6$ Hz, $^3J_{\text{F}2'} = 6.3$ Hz, C4'), 151.8 ($^1J_{\text{F}2'} = 251.5$ Hz, $^3J_{\text{F}4'} = 6.3$ Hz, C2'), 135.9 (C5), 134.7 ($^2J_{\text{F}2'} = ^2J_{\text{F}4'} = 16.0$ Hz, C3'), 122.4 ($^4J_{\text{F}2'} = 7.7$ Hz, C4), 118.9 ($^2J_{\text{F}2'} = 9.2$ Hz, $^4J_{\text{F}4'} = 2.6$ Hz, C1'), 118.1 ($^3J_{\text{F}4'} = 8.6$ Hz, C6'), 116.4 ($^1J_{\text{F}} = 285.5$ Hz, CF_3), 111.8 ($^2J_{\text{F}4'} = 19.5$ Hz, $^4J_{\text{F}2'} = 3.1$ Hz, C5'), 95.6 (C2).

^{13}C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 183.0 (C1 y C3), 155.0 y 153.1 (C4'), 153.1 y 151.0 (C2'), 143.6 (C5), 132.6 (C3'), 125.0 (C4), 120.9 (C6'), 120.0 (CF_3), 118.5 (C1'), 111.9 (C5'), 96.6 (C2).

^{19}F RMN (376.50 MHz, 85% CDCl_3 + 15% $\text{DMSO}-d_6$): δ -77.6 (CF_3), -127.5 ($^3J_{\text{FF}} = 16.4$ Hz, $^3J_{\text{H}5'} = 9.9$ Hz, $^4J_{\text{H}6'} = 5.7$ Hz, F4'), -133.5 (ddd, $^3J_{\text{FF}} = 16.4$ Hz, $^4J_{\text{H}6'} = 7.4$ Hz, $^5J_{\text{H}5'} = 1.8$ Hz, F2').

^{19}F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -73.8 (CF_3), -126.7 (F2'), -130.2 (F4').

(3*Z*,5*E*)-6-(2,5-Difluoro-4-hidroxifenil)-1,1,1-trifluoro-4-hidroxihexa-3,5-dien-2-ona
(59)



El producto deseado se obtiene empleando 1,1,1-trifluoropentano-2,4-diona (46) y 2,5-difluoro-4-hidroxibenzaldehído (51). El crudo se purifica mediante el uso de una columna cromatográfica de gel de sílice empleando hexano/AcOEt (20:80) como

eluyente y posterior cristalización en CH₂Cl₂/EtOH obteniéndose un sólido amarillo (900 mg, 20%).

Pf: 190.8 °C.

Anal. Calc. para C₁₂H₇F₅O₃: C, 48.99; H, 2.40. Experimental: C, 48.82; H, 2.36.

¹H RMN (400.13 MHz, CDCl₃): δ 14.2 (sa, 1H, OH-enol), 7.75 (dd, ³J_{H4} = 15.9 Hz, ⁵J_{F5'} = 1.1 Hz, 1H, H5), 7.29 (dd, ³J_{F2'} = 10.3 Hz, ⁴J_{F5'} = 6.4 Hz, 1H, H3'), 6.81 (dd, ³J_{F5'} = 11.0 Hz, ⁴J_{F2'} = 7.2 Hz, 1H, H6'), 6.52 (d, ³J_{H5} = 15.9 Hz, 1H, H4), 6.01 (s, 1H, H2).

¹H RMN (400.13 MHz, 85% CDCl₃ + 15% DMSO-*d*₆): δ 10.30 (sa, 2H, OH-enol y 4'-OH), 7.53 (dd, ⁵J_{F5'} = 1.1 Hz, H5), 7.05 (dd, ³J_{F5'} = 11.3 Hz, ⁴J_{F2'} = 6.8 Hz, H6'), 6.52 (dd, ³J_{F2'} = 11.6 Hz, ⁴J_{F5'} = 7.2 Hz, H3'), 6.30 (d, ³J_{H5} = 15.9 Hz, 1H, H4), 5.81 (s, H2).

¹³C RMN (100.62 MHz, 85% CDCl₃ + 15% DMSO-*d*₆): δ 180.4 (C3), 178.8 (²J_F = 34.3 Hz, C1), 157.4 (¹J_{F2'} = 251.0 Hz, C2'), 148.8 (²J_{F5'} = ³J_{F2'} = 12.5 Hz, C4'), 147.5 (¹J_{F5'} = 240.0 Hz, ⁴J_{F2'} = 2.5 Hz, C5'), 134.8 (C5), 119.8 (C4), 115.9 (¹J_F = 286.5 Hz, CF₃), 114.0 (²J_{F5'} = 20.7 Hz, ³J_{F2'} = 4.9 Hz, C6'), 112.2 (C1'), 104.7 (²J_{F2'} = 27.1 Hz, ³J_{F5'} = 2.6 Hz, C3'), 94.7 (C2).

¹³C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 181.9 (C3), 160.5 (C1), 157.9 (C2'), 151.1 (C4'), 147.3 (C5'), 135.3 (C5), 118.6 (C4), 117.8 (CF₃), 112.8 (C1'), 110.8 (C6'), 103.5 (C3'), 96.3 (C2).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, 85% CDCl₃ + 15% DMSO-*d*₆): δ -77.6 (CF₃), -117.7 (⁵J_{FF} = 14.3 Hz, ³J_{H3'} = 11.6 Hz, ⁴J_{H6'} = 6.8 Hz, F2'), -141.2 (dddd, ⁵J_{FF} = 14.3 Hz, ³J_{H6'} = 11.3 Hz, ⁴J_{H3'} = 7.2 Hz, ⁵J_{H5} = 1.1 Hz, F5').

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -74.2 (CF₃), -119.1 (F2'), -138.4 (F5').

3.6.3 Actividad biológica

3.6.3.1 Determinación del carácter antioxidante

Método FRAP

La disolución FRAP fue preparada a partir de la mezcla de proporciones 1:1:25 de las siguientes disoluciones: 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) 10 mM en HCl 40 mM, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM y tampón acetato 0.3 mM a pH 3.6. Se prepararon disoluciones a las concentraciones adecuadas de los compuestos antioxidantes (curcumina, resveratrol, Trolox, **27**, **30**, **31**, **52-54**) en etanol. A 80 μl de la correspondiente disolución de antioxidante se adicionaron 720 μl de FRAP (obteniéndose una proporción 9:1), agitándose la mezcla resultante durante 30 min, tras los cuales se procedió a su lectura a 593 nm en el espectrofotómetro. La capacidad antioxidante se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{FRAP (\%)} = (1 - A_s/A_c) \cdot 100$$

Donde: A_c es la absorbancia del control y A_s es la absorbancia del compuesto.

Método ABTS

Para la preparación del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, se mezclaron en la misma proporción una disolución acuosa de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico (ABTS) 7 mM con una disolución acuosa de persulfato potásico ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 2.45 mM. Se incubó durante 16 h en la oscuridad. Se procedió de la misma manera que en el ensayo anterior pero esta vez la proporción $\text{ABTS}^{\bullet+}$ /disolución de AOX fue 3:1. Se incubó la placa 30 min en la oscuridad y se procedió a su lectura en el espectrofotómetro a 734 nm.

Método DPPH

A cada una de las disoluciones de diferentes concentraciones de los compuestos AOX mencionados en el ensayo FRAP, se adicionó el volumen correspondiente de una disolución de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) en etanol 0.2 mM de tal manera que la proporción final fue 1:3. Se dejó incubar la placa 30 min en oscuridad y se midió en el espectrofotómetro a 517 nm. Se realizaron dos medidas una a $t = 0$ h y otra a $t = 1$ h. La capacidad antioxidante según este método se determina según la fórmula:

$$\text{DPPH (\%)} = (1 - A_s/A_c) \cdot 100$$

Donde: A_c es la absorbancia del control y A_s es la absorbancia del compuesto.

3.6.3.2 Determinación de la citotoxicidad

Tras la incubación durante 24 h de las células SH-SY5Y (aproximadamente 20.000 células) a 37 °C con un 90% de humedad y un 5% de CO₂, se retiró el medio de cultivo y se adicionaron 300 µl de una disolución con DMEM F-12 y el volumen apropiado de la disolución de los compuestos a estudiar en DMSO (curcumina, resveratrol, Trolox, **27, 30, 31, 52-54**) obteniéndose una concentración final de 0, 5, 10, 25, 50 y 100 µM para cada uno de ellos.

Transcurridas 24 h, se añade un 10% (30 µL) de bromuro de dimetil tiazoliltetrazolio (MTT). Tras 2 h de incubación, se extrae el medio y se añaden 300 µl de DMSO. Finalmente se procedió a su lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

Curva de muerte del peróxido de hidrógeno

Las células SH-SY5Y (aproximadamente 20.000 células) fueron incubadas durante 24 h a 37 °C, con un 90 % de humedad relativa y un 5 % de CO₂. Tras retirar el medio de cultivo, se añadieron 300 µl de una disolución de DMEM F-12 con el volumen adecuado de peróxido de hidrógeno resultando unas concentraciones finales de 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 µM de H₂O₂. Tras 24 h de incubación, se añadieron 30 µl de MTT y se incubó de nuevo 2 h. Transcurridas las 2 h, se retiró el medio y se añadieron 300 µl por pocillo de DMSO. Inmediatamente después se procedió a su lectura en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 540 nm.

3.6.3.3 Ensayos de protección

De nuevo las células SH-SY5Y (aproximadamente 20.000 células) fueron incubadas durante 24 h bajo las condiciones mencionadas en los anteriores ensayos. Posteriormente, se retira el medio y se añaden 300 µl de una disolución de DMEM F-12 con el volumen correspondiente de peróxido de hidrógeno para obtener unas concentraciones finales de 100 y 200 µM de H₂O₂. Se deja incubar durante 24 h, y transcurrido ese tiempo se añade MTT (30 µl). Se incubó durante 2 h y posteriormente se retiró el medio y se añadieron 300 µl de DMSO y se procedió a su lectura en el espectrofotómetro a 540 nm.

CAPÍTULO 4

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
BIOLÓGICA DE PIRAZOLES
HEMICURCUMINOIDES**

4 SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PIRAZOLES HEMICURCUMINOIDES

4.1 INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de que el anillo pseudoaromático de seis miembros del enol de curcumina puede sustituirse por el anillo de cinco miembros heteroaromático del 1*H*-pirazol que mantiene, y en ocasiones mejora, las propiedades biológicas de la curcumina, ha dado como resultado numerosas publicaciones [80]. La primera síntesis del pirazol derivado de la curcumina (**32**) fue descrita por Flynn *et al.* en 1991, siendo éste un potente inhibidor de la 5-lipoxigenasa y ciclooxigenasa [81]. Posteriormente, se demostraron sus propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias [82] o su acción como inhibidor de la proliferación de células endoteliales [83]. Varios autores han modificado la estructura de **32** (Figura 55), lo cual se ha traducido en muchos casos en un aumento de su actividad biológica. Schubert *et al.* realizaron un avance importante en la preparación de derivados de pirazol *N*-sustituídos como **62a** (CNB001) [84] y **62b** (CNB023) [85] (destinados a tratar las enfermedades de Alzheimer y Parkinson), y otros autores el pirazol **62c** que se une al péptido β-amiloide [86]. El compuesto **63**, sin los grupos metoxilo presentes en **32**, actúa como un excelente antiplaquetario [87].

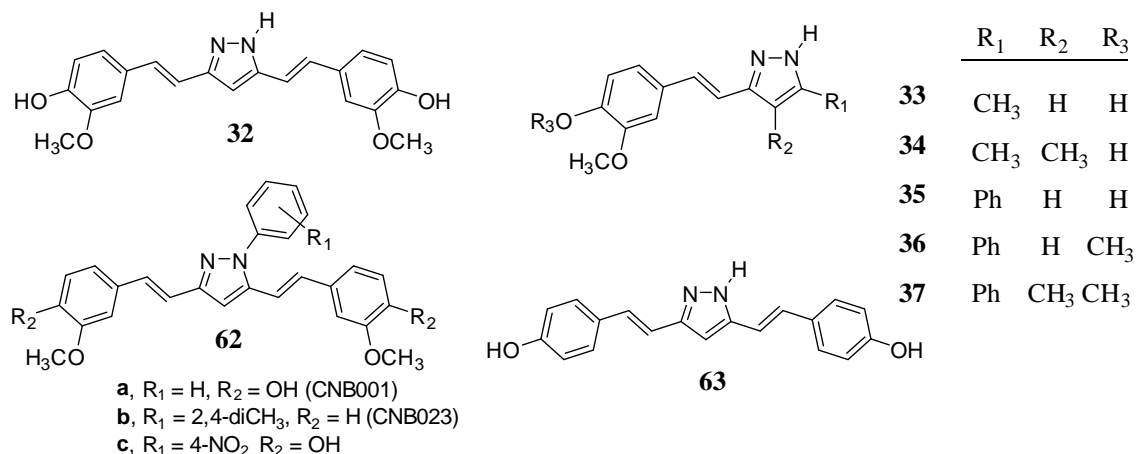
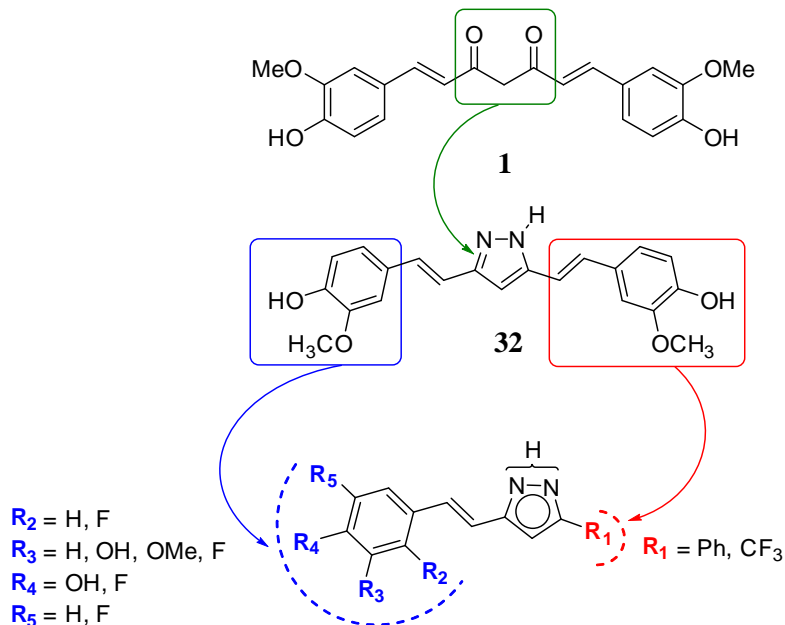


Figura 55. Estructuras del pirazol derivado de la curcumina **32**, y de otros derivados sintetizados previamente por este grupo (**33-37**) o por otros autores (**62-63**).

Dentro de la contribución realizada por este grupo se encuentran los compuestos **32-37** (Figura 55), cuyas propiedades antiinflamatorias fueron demostradas ofreciendo excelentes resultados frente a la IBD [27].

En base a estos estudios, y a los previamente descritos en esta memoria para las β -dicetonas hemicurcuminoides fluoradas, se decidió sintetizar dos nuevas series de derivados curcuminoides con un anillo de cinco miembros heteroaromático: los pirazoles hemicurcuminoides fluorados (Esquema 6).



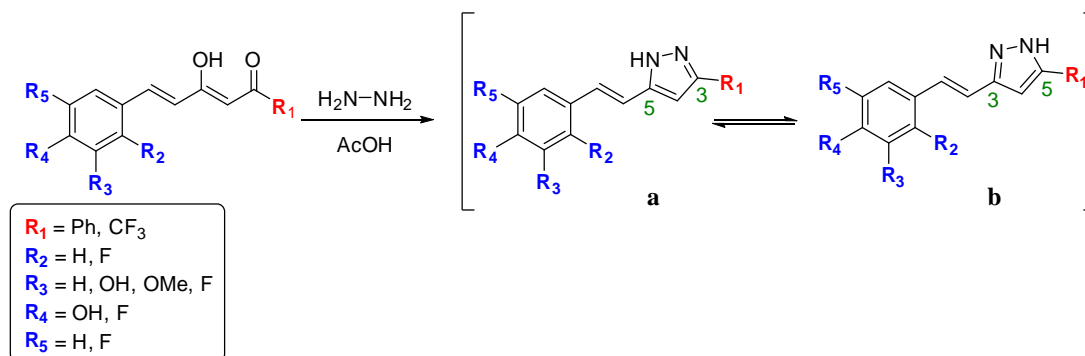
Esquema 6. Modificaciones estructurales realizadas en la molécula de curcumina (1) y en el pirazol derivado de ésta (32) en la síntesis de pirazoles hemicurcuminoides.

4.2 SÍNTESIS

4.2.1 Síntesis de pirazoles hemicurcuminoides

El método sintético más común para la preparación de pirazoles 3,5-disustituidos implica la ciclocondensación de hidrazina, que actúa como un nucleófilo bidentado, con una unidad estructural de tres carbonos, siendo dos de ellos electrofílicos, como es el caso de los compuestos 1,3-dicarbonílicos. Las condiciones de reacción descritas en la literatura son diversas. Por ejemplo, Narlawar *et al.* [86] obtuvieron pirazoles curcuminoides *N*-sustituidos tras el tratamiento de curcumina con las correspondientes hidrazinas o hidroclouros de hidrazina y ácido trifluoroacético catalítico, a reflujo en tolueno durante 18-48 h; o adicionando Et_3N y ácido acético como catalizador, a reflujo en MeOH durante 48 h. En nuestro caso, el empleo de ácido acético como disolvente se tradujo en la obtención de rendimientos cuantitativos en tiempos de reacción de tan solo 2 h. De este modo, la síntesis de los pirazoles **64-74**, se llevó a cabo a partir de la reacción de las correspondientes β -dicetonas hemicurcuminoides (Figura 15) disueltas en

ácido acético, con hidrazina (Esquema 7). Así se obtuvieron las dos series de pirazoles hemicurcuminodes, fenil sustituidos ($R_1 = \text{Ph}$) y trifluorometil sustituidos ($R_1 = \text{CF}_3$).



Esquema 7. Procedimiento sintético empleado en la preparación de pirazoles hemicurcuminoides (tautómeros **a** y **b**).

En la Figura 56 se recogen las estructuras de los pirazoles hemicurcuminoides cuya síntesis fue descrita previamente **33-37** [27,28] y la de los obtenidos en la presente Tesis **64-74** [88].

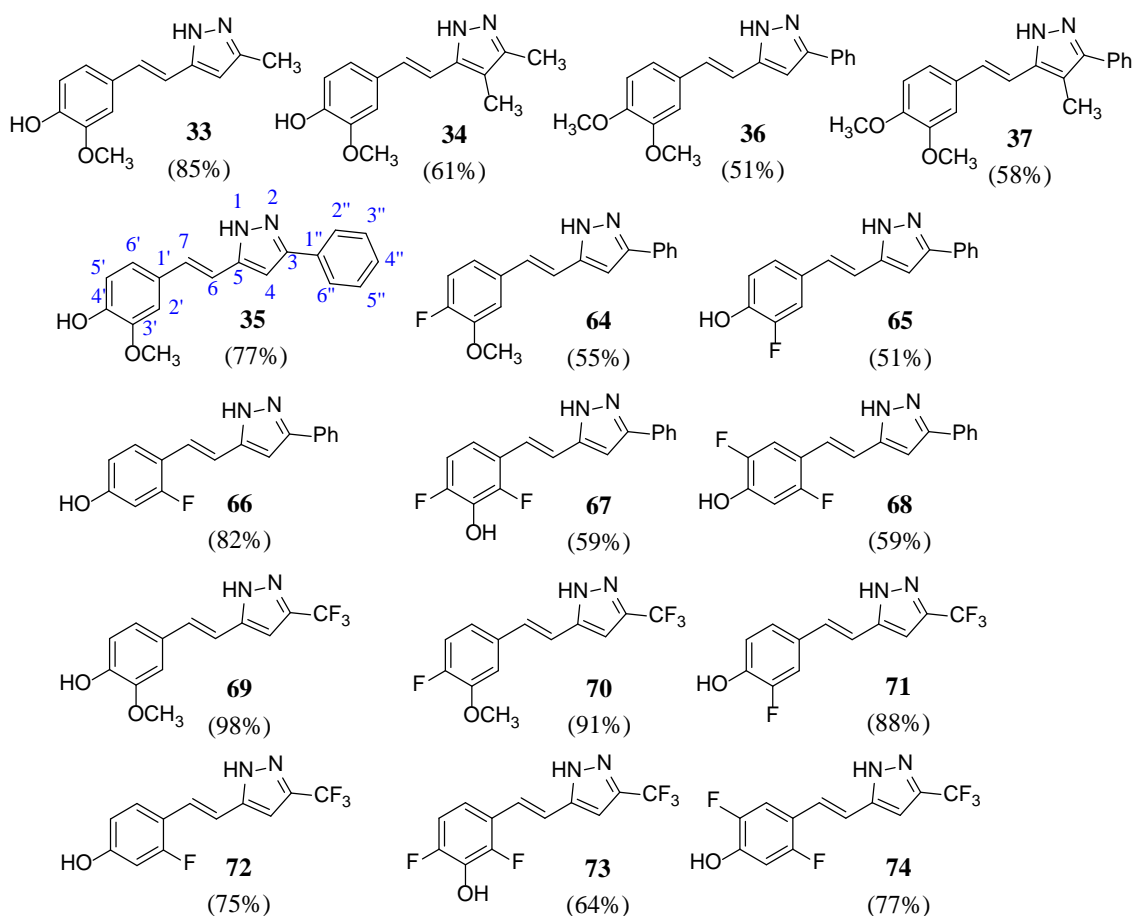


Figura 56. Pirazoles hemicurcuminoides sintetizados (numeración empleada para caracterización por RMN en azul y rendimientos entre paréntesis).

4.3 DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL

4.3.1 Determinación estructural por RMN

Debido a la tautomería anular, los pirazoles sintetizados pueden existir en dos formas tautoméricas (**a** y **b**) como se muestra en la Figura 57. En el caso del pirazol derivado de la curcumina (**32**) ambas formas son idénticas.

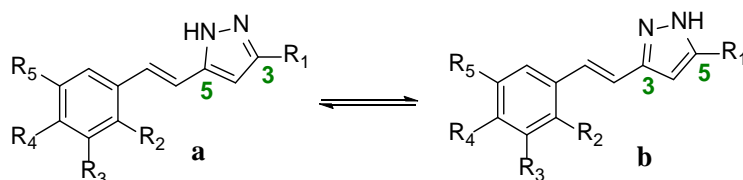


Figura 57. Posibles tautómeros de los pirazoles hemicurcuminoides sintetizados.

En el presente apartado se discutirán los resultados experimentales de RMN de doce compuestos, seis de la serie $R_1 = \text{Ph}$ y seis de la serie $R_1 = \text{CF}_3$, representados en su forma tautomérica **a** en la Figura 56. Los valores necesarios para la discusión se presentan en las Tablas 18-23. Las asignaciones de las señales de los diferentes núcleos se basan en experimentos 2D homo y heteronucleares, en los valores de las constantes de acoplamiento y en la comparación con otros NH-pirazoles donde la tautomería está bloqueada [89].

Centrándonos en primer lugar en la serie de los pirazoles fenil sustituidos (**35** y **64-68**), de los experimentos realizados en disolución ($\text{DMSO-}d_6$) podemos concluir que ambos tautómeros coexisten: **35a/35b**, 64:36; **64a/64b**, 57:43; **65a/65b**, 60:40; **66a/66b**, 67:33; **67a/67b**, 54:46; **68a/68b**, 60:40. Las proporciones de cada tautómero se determinaron no solo por integración de las intensidades de las señales de ^1H RMN (NH y OH-fenol) sino también mediante la integración de las señales de ^{19}F RMN. En dos casos (**64** y **65**), el empleo de $\text{HMPA-}d_{18}$ como disolvente dio como resultado un aumento del 8% en la población del tautómero **a** (Figura 58).

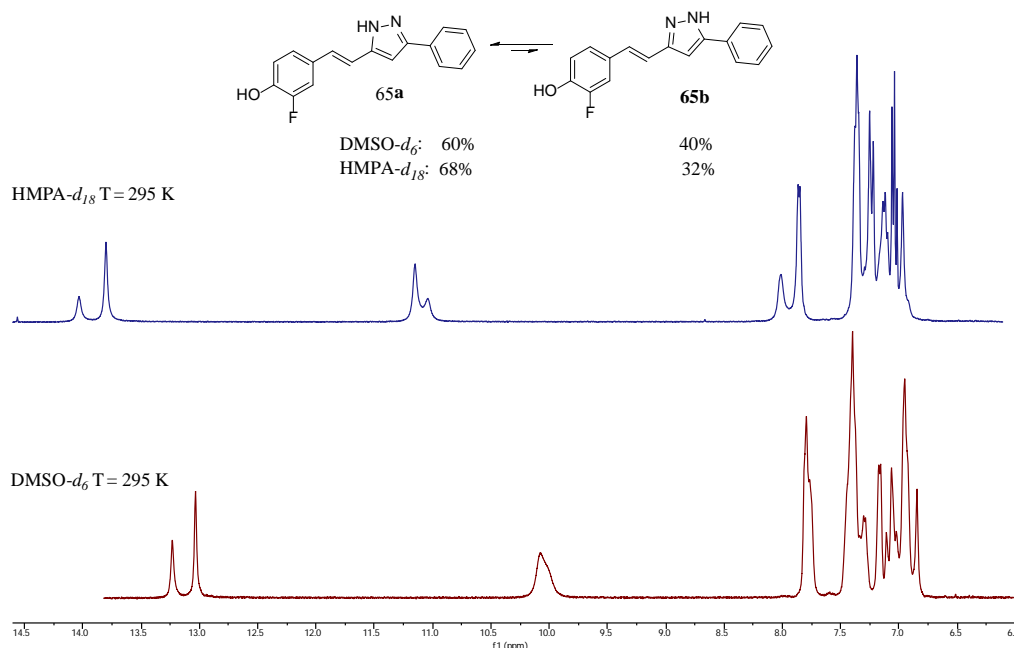


Figura 58. Espectro ^1H RMN en DMSO- d_6 y HMPA- d_{18} a 295 K de **65**.

En la Figura 59 se observan los espectros obtenidos de los experimentos de RMN dinámica de ^1H y ^{19}F realizados para el compuesto **65**. Gracias a dichos experimentos, empleando la ecuación de Eyring [90], se estimó que la barrera que separa ambos tautómeros es $71 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$: $\Delta\text{G}^\ddagger (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}) = 19.12 \cdot \text{Tc} (10.32 + \log\text{Tc}/\text{kc})$ ($\text{kc} = \Delta\nu_{\text{max}} \cdot \pi/\sqrt{2}$). Los datos empleados fueron: $\text{Tc} = 350 \text{ K}$, $\Delta\nu_{\text{max}} = 79.8$, relación **65a/65b** de 60:40 y $\text{kc} (\text{s}^{-1}) = 177$. En el caso del compuesto **64**, se encontró un valor de $69 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, similar al obtenido para **65**.

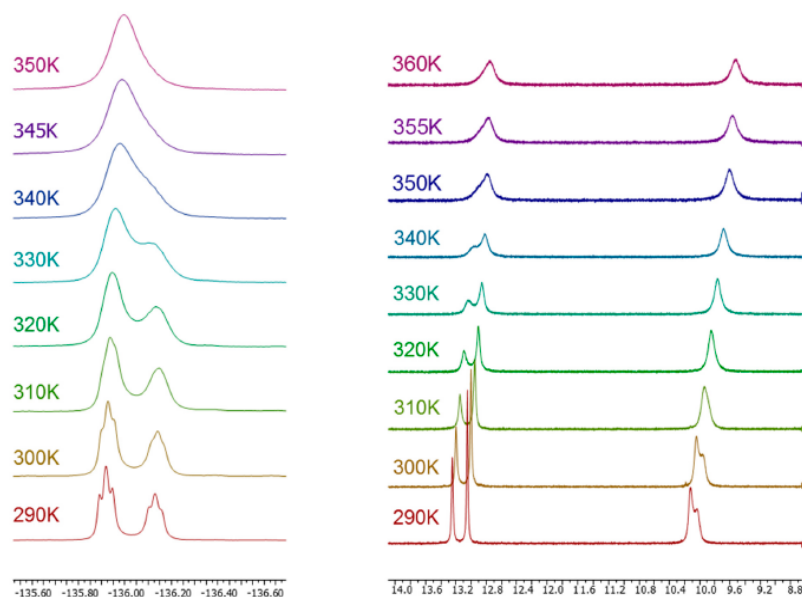


Figura 59. Espectro ^{19}F RMN (izquierda) y ^1H RMN (derecha) del compuesto **65** en DMSO- d_6 en el rango de temperaturas de 290-360 K.

Los datos de RMN en estado sólido indican la presencia de una única forma tautomérica para los pirazoles fenil sustituidos **35** y **64-68**, correspondiendo al tautómero mayoritario detectado en disolución (**a**), y de acuerdo con la determinación de la estructura de rayos X de **64**, **65** y **66** que se discutirá en el siguiente apartado.

Tabla 18. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^1H RMN y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos **35** y **64-68**.

	35		64		65		66		67		68
	DMSO- d_6 (300 K)	DMSO- d_6 (295 K)	DMSO- d_6 (360 K)	HMPA- d_{18} (295 K)	DMSO- d_6 (295 K)	DMSO- d_6 (360 K)	HMPA- d_{18} (295 K)	DMSO- d_6 (295 K)	DMSO- d_6 (295 K)	DMSO- d_6 (300 K)	
NH	13.18 (36%) 12.96 (64%)	13.29 (43%) 13.10 (57%)	12.84	14.06 (35%) 13.94 (65%)	13.25 (43%) 13.05 (57%)	12.75	14.03 (33%) 13.80 (67%)	13.23 (33%) 13.06 (67%)	13.33 (46%) 13.17 (54%)	13.28 (40%) 13.12 (60%)	
H4	6.88 (s)	7.00 (-) 6.90 (+)	6.84 (s)	6.92 (+) 7.62-6.98 (-)	6.85 (+) 6.90-7.24	6.80 (s)	6.97 (+) 7.08-7.19	6.91 (s)	6.98-7.23	6.99 (-) 6.91 (+)	
H6	6.95 (d) $^3J_{\text{H7}}=16.5$	7.26-7.06	7.07 (d) $^3J_{\text{H7}}=16.3$	7.62-6.98	6.90-7.24	6.93 (d) $^3J_{\text{H7}}=16.6$	7.08-7.19	6.99 (d) $^3J_{\text{H7}}=16.9$	6.98-7.23	7.06 (d) $^3J_{\text{H7}}=16.6$	
H7	7.10 (d) $^3J_{\text{H6}}=16.5$	7.26-7.06	7.16 (d) $^3J_{\text{H6}}=16.3$	7.62-6.98	6.90-7.24	7.08 (d) $^3J_{\text{H6}}=16.6$	7.02-7.04	7.17 (d) $^3J_{\text{H6}}=16.9$	6.98-7.23	7.15 (d) $^3J_{\text{H6}}=16.6$	
H2'	7.15 (d) $^4J_{\text{H6}}=1.8$	7.50-7.20	7.32 (dd) $^4J_{\text{F4}}\sim 8.1$ $^4J_{\text{H6}}=2.0$	7.62-6.98	7.24- 7.51	7.30 (dd) $^3J_{\text{F3}}=12.6$ $^4J_{\text{H6}}=2.1$	7.22-7.25	---	---	---	
H3'	3.84 (s) (OMe)	3.90 (s) (OMe)	3.92 (s) (OMe)	3.95 (s) (OMe)	---	---	---	6.60 (dd) $^3J_{\text{F2}}=12.8$ $^4J_{\text{H5}}=2.4$	---	6.78 (dd) $^3J_{\text{F2}}=11.6$ $^4J_{\text{F5}}=7.4$	
OH	9.21 (+) 9.10 (-)	---	---	---	10.12 (+) 10.03 (-)	9.53 (sa)	11.15 (+) 11.04 (-)	10.12 (sa)	10.30 (sa)	10.6 (sa)	
H5'	6.78 (d) $^3J_{\text{H6}}=8.1$	7.26-7.06	7.15 (dd) $^3J_{\text{F4}}=11.5$ $^3J_{\text{H6}}=8.5$	7.62-6.98	6.90-7.24	6.96 (dd) $^3J_{\text{H6}}=8.3$ $^4J_{\text{F3}}=9.2$	7.02-7.04	6.65 (dd) $^3J_{\text{H6}}=8.5$ $^4J_{\text{H3}}=2.4$	6.98-7.23	---	
H6'	6.96 (dd) $^3J_{\text{H5}}=8.1$ $^4J_{\text{H2}}=1.8$	7.26-7.06	7.10 (d) $^4J_{\text{F4}}=4.7$	7.62-6.98	6.90-7.24	7.16 (dd) $^3J_{\text{H5}}=8.2$ $^4J_{\text{H2}}=2.2$	7.08-7.19	7.53 (d) $^3J_{\text{H5}}=8.5$	6.98-7.23	7.58 (m)	
H2''/H6''	7.80 (m)	7.80 (+) 7.77 (-)	7.78 (m)	8.00 (-) 7.84 (+)	7.80 (+) 7.76 (-)	7.78 (m)	8.02 (-) 7.86 (+)	7.80 (m)	7.80 (m)	7.80 (m)	
H3''/H5''	7.43 (m)	7.50-7.20	7.42 (m)	7.62-6.98	7.24-7.51	7.41 (m)	7.36 (m)	7.41 (m)	7.42 (m)	7.42 (m)	
H4''	7.31 (m)	7.50-7.20	7.31 (m)	7.62-6.98	7.24-7.51	7.30 (m)	7.22-7.25	7.30 (m)	7.30 (m)	7.31 (m)	

Tabla 19. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{13}C y ^{15}N RMN en disolución y en estado sólido (CPMAS), y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos **35** y **64** a **68**.

	35		64			65			66		67		68	
	DMSO- d_6 (300 K)	CPMAS	DMSO- d_6 (295 K)	HMPA- d_{18} (295 K)	CPMAS	DMSO- d_6 (295 K)	HMPA- d_{18} (295 K)	CPMAS	DMSO- d_6 (295 K)	CPMAS	DMSO- d_6 (295 K)	CPMAS	DMSO- d_6 (300 K)	CPMAS
C3	151.0 (+) 151.4 (-)	152.6	150.9	151.0 (+) 151.3 (-)	152.1	150.9 (+) 151.1 (-)	151.0 (+) 151.5 (-)	151.8	151.0 (-) 150.9 (+)	152.2	151.0 (+) 153.3 (-)	153.7	151.0	148.9
C4	99.5 (+) 100.4 (-)	103.5	100.3 (+) 99.4 (-)	100.3 (+) 99.4 (-)	102.7	100.0 (+) 99.3 (-)	99.7 (+) 99.3 (-)	97.9	100.0 (+) 99.3 (-)	96.9	100.7 (+) 99.9 (-)	97.1	100.6 (+) 99.6 (-)	98.4
C5	142.6 (+) 140.3 (-)	144.0	142.0 (+) 142.9 (-)	142.6 (+) 143.2 (-)	142.1	142.2 (+) 142.8 (-)	143.0 (+) 143.1 (-)	143.1	142.3 (+) 142.9 (-)	144.0	141.8 (+) 143.0 (-)	142.5	143.0 (-) 142.0 (+)	143.9
C6	112.7 (+) 118.4 (-)	113.5	115.9 (+) 119.4 (-)	116.1 122.5	115.0	114.0 (+) 119.7 (-)	114.5 (+) 120.2 (-)	125.6	114.9 (sa)	117.9	117.8	121.7	116.2 (+) 120.1 (-)	116.8
C7	130.1	129.0	128.9 (+) 128.3 (-)	128.8 (+) 128.0 (-)	130.5	128.1 (+) 128.5(-)	129.0 (+) 129.3 (-)	130.4	122.0 (sa)	122.0	123.6	123.6	120.8 (+) 122.0 (-)	124.9/ 123.7
C1'	128.1	129.0	129.0	134.8 (+)	133.6	129.0 (+) 129.3 (-)	128.0 (+) 129.3 (-)	131.6	122.1 (sa)	117.9	121.3 (+) 120.7 (-)	121.7	114.9 (+) 115.3 (-)	119.8
C2'	109.5	112.3	110.9	111.6	113.8	113.4 $^2J_{F3}=18.6$	113.4 $^2J_{F3}=18.5$	109.1	160.5 $^1J_{F2}=247.3$	161.4 158.8 $^1J_{F2}=261.6$	150.2 $^1J_{F2}=245.6$ $^2J_{F4}=5.8$	150.1	155.7 $^1J_{F2}=244.6$	157.5 154.8 $^1J_{F2}=272.5$
C3'	147.9	148.3	147.4 $^2J_{F4}=10.9$	148.1 $^2J_{F4}=10.7$	148.2	151.2 $^1J_{F3}=240.8$	152.1 $^1J_{F3}=241.8$	156.9 154.6 $^1J_{F3}=247.0$	102.8 $^2J_{F2}=24.3$	108.0	134.0 $^2J_{F4}=16.1$ $^3J_{F4}=16.1$	153.1	105.0 $^2J_{F2}=26.6$	109.8
R ₃	55.6 (+) 55.5 (-)	54.0	56.0	56.3	56.7	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C4'	147.1 (+) 146.6 (-)	148.3	151.3 (+) $^1J_{F4}\sim 249.5$ 151.1 (-) $^1J_{F4}\sim 246.1$	151.9 (+) $^1J_{F4}\sim 244.7$ 151.7 (-) $^1J_{F4}\sim 242.5$	152.1	145.0 (+) $^2J_{F3}=12.3$ 144.5 (-) $^2J_{F3}=12.7$	146.7 (+) $^2J_{F3}=11.8$ 146.3 (-)	144.9	158.7	156.2	151.7 $^1J_{F4}=240.6$	135.5	145.7	148.0

C5'	115.6 (+) 115.3 (-)	116.0	115.9 (+) $^2J_{F4} \sim 18$ 116.0 (-) $^2J_{F4} \sim 23$	116.6 (+) $^2J_{F4} \sim 22$ 116.5 (-) $^2J_{F4} \sim 24$	114.2	117.9 (+) 119.7 (-)	118.0 $^3J_{F3} = 3.8$	114.7	112.3	113.6	111.9 $^3J_{F3} = 18.6$	111.2	148.1 $^1J_{F5} = 236.9$	153.5 150.9 $^1J_{F5} = 269.0$
C6'	120.2 (+) 122.1 (-)	119.5	119.4 (+) 121.5 (-)	119.2 $^3J_{F4} = 6.6$	118.4	123.4 (+) 123.1 (-)	122.7 (+) 122.4 (-)	122.9	128.2	128.5	115.9 $^3J_{F2} = 8.2$ $^4J_{F3} = 3.6$	119.4	113.4 $^2J_{F5} = 21.1$ $^3J_{F2} = 5.4$	110.6
C1''	133.6 (+) 132.0 (-)	133.2	133.5 (+) 134.1 (-)	135.1 (+) 135.2 (-)	133.6	133.6 (+) 129.0 (-)	135.2 (+) 130.8 (-)	132.3	133.6	130.2	133.5	126.8	133.5	129.3
C2''/C6''	125.1 (+) 125.0 (-)	126.4	125.1 125.5 (-)	125.3 (+) 127.2	124.3	125.1	125.4 (+) 125.5 (-)	126.3	125.1	124.3	125.1	126.8	125.1	128.1
C3''/C5''	128.7	129.0	128.7 (+) 129.0 (-)	128.6 (+) 128.8 (-)	128.3	128.6 (+) 128.8 (-)	128.5 (+) 128.7 (-)	128.1	128.7	126.5	128.8	132.3	128.7	128.9
C4''	127.5	129.0	127.4 (+) 128.1 (-)	127.1 (+) 127.7 (-)	128.3	127.4 (+) 128.5 (-)	127.1 (+) 127.7 (-)	128.1	127.4	126.5	127.6	129.0	127.5 (+) 128.3 (-)	130.9
N1	n.o.	-181.5	-177.6 (+) -179.2 (-)	-176.4 (+) (-) n.o.	-181.1	-177.3 (+) -179.7 (-)	-177.0 (+) -179.3 (-)	-168.5	n.o.	-177.2	-178.3	-191.7	-178.6	-152.2
N2	n.o.	-105.3	n.o.	n.o.	-94.7	n.o.	n.o.	-120.0	n.o.	-111.9	n.o.	-93.9	n.o.	-141.1

Tabla 20. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{19}F RMN en disolución y en estado sólido (MAS), y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos **64-68**.

	Disol.	F2'	F3'	F4'	F5'
64	DMSO- d_6			-135.4 (57%)	
	(295 K)			-136.3 (43%)	
	HMPA- d_{18}			-136.9 (65%)	
	(295 K)			-137.8 (35%)	
	CDCl ₃			-135.5	
	MAS			-132.6	
65	DMSO- d_6		-136.0 (57%)		
	(295 K)		$^3J = ^4J = 10.8$		
			-136.2 (43%)		
			$^3J = ^4J = 10.2$		
	DMSO- d_6		-136.0		
	(360 K)				
	HMPA- d_{18}		-137.3 (67%)		
	(295 K)		-137.6 (33%)		
	MAS		-129.2		
66	DMSO- d_6	-116.1 (67%)			
		-116.8 (33%)			
	MAS	-107.7			
67	DMSO- d_6	-136.4 (54%)		-132.1 (54%)	
		-137.0 (46%)		-132.8 (46%)	
	MAS	-130.7		-126.8	
68	DMSO- d_6	-121.3 (60%)			-140.6
		-122.1 (40%)			
	MAS	-114.2			-134.8

En el caso de los pirazoles trifluorometil sustituidos (**69-74**), los experimentos realizados en disolución no muestran señales desdobladas como ocurría en los fenil sustituidos (**35**, **64-68**). En estos compuestos, la asignación de los átomos de carbono del anillo de pirazol se realizó en base a la constante de acoplamiento existente ${}^2J_{\text{CF}_3} = 36.5$ Hz de los carbonos unidos al grupo CF_3 (C-CF₃) y a las correlaciones observadas entre C-estirilo/H7 observados en el experimento 2D (${}^1\text{H}$ - ${}^{13}\text{C}$) gs-HMBC (véase el ejemplo mostrado en la Figura 60).

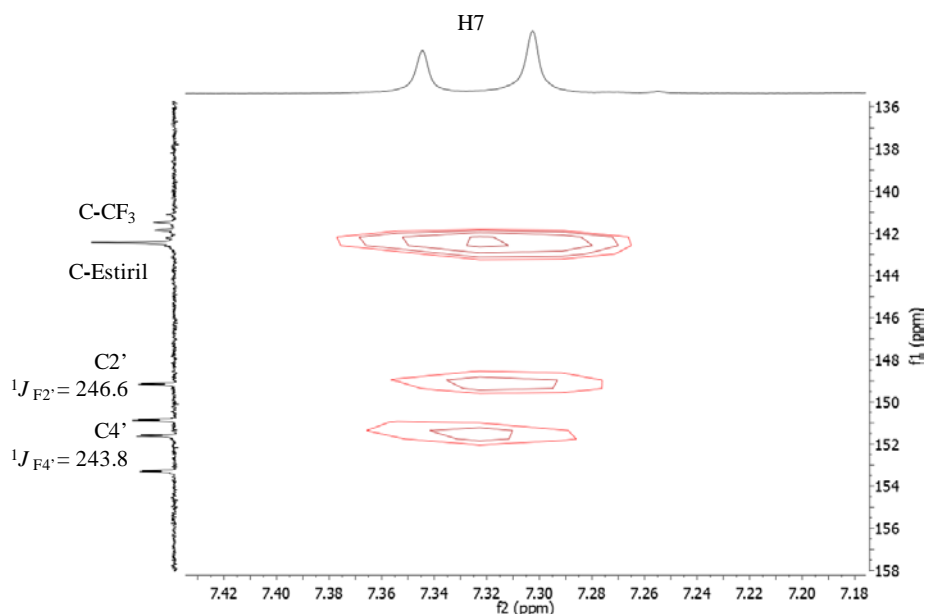


Figura 60. Espectro (${}^1\text{H}$ - ${}^{13}\text{C}$) gs-HMBC en $\text{DMSO-}d_6$ del compuesto **73**.

Las señales correspondientes al grupo CF_3 aparecen alrededor de 121 ppm, como cuartetos con una constante de acoplamiento de ~ 268 Hz. En lo que respecta a los núcleos del grupo estirilo, hay que señalar dos observaciones importantes: i) el desplazamiento químico de C7 está influenciado por la presencia de flúor en la posición 2', con valores que disminuyen de ~ 130 (compuestos **69**, **70**, **71**) a ~ 123 (compuestos **72**, **73**, **74**) como se indica en la Tabla 22; ii) en el compuesto **73**, la asignación de C2' (150.4, ${}^1J_{\text{F}2'} = 246.6$ Hz) y C4' (152.1, ${}^1J_{\text{F}4'} = 243.8$ Hz) es inequívoca debido a la correlación observada entre C2' y H7 (7.32 ppm) (Figura 60).

Las constantes de acoplamiento nJ (HF) del anillo aromático se determinaron tanto en los espectros de ${}^1\text{H}$ RMN como en los espectros ${}^{19}\text{F}$ RMN (Tablas 21 y 23). Las constantes de acoplamiento a través de un enlace, ${}^1J_{\text{CF}}$, en los pirazoles **69-74** siguen el siguiente orden: ${}^1J_{\text{C}2'\text{F}2'} > {}^1J_{\text{C}4'\text{F}4'} > {}^1J_{\text{C}3'\text{F}3'} \sim {}^1J_{\text{C}5'\text{F}5'}$, similar al observado en los aldehídos mono y difluorados de partida [40]. Con respecto a las constantes de acoplamiento a

través de dos enlaces, 2J (CF), varían desde 10.0 Hz en el compuesto **73** a 26.8 Hz en el compuesto **74**; la magnitud de J disminuye al pasar de un CH-CF a un CR-CF. Las constantes de acoplamiento 3J (CF) dependen también del patrón de sustitución, con valores entre 12.1 Hz para **72** y **74** (C-CH-CF) y 1.6 Hz para **70** (CC(OMe)-CF) (Tablas 22 y 23).

En cuanto al estado sólido, se deben diferenciar dos casos (Figura 61): i) compuestos cuyos espectros presentan señales sencillas (**69** y **71**); ii) compuestos en cuyos espectros la mayoría de las señales están desdobladas (**70**, **72-74**). En el siguiente apartado (4.3.2), basándonos en los cálculos teóricos realizados, discutiremos estas dos situaciones.

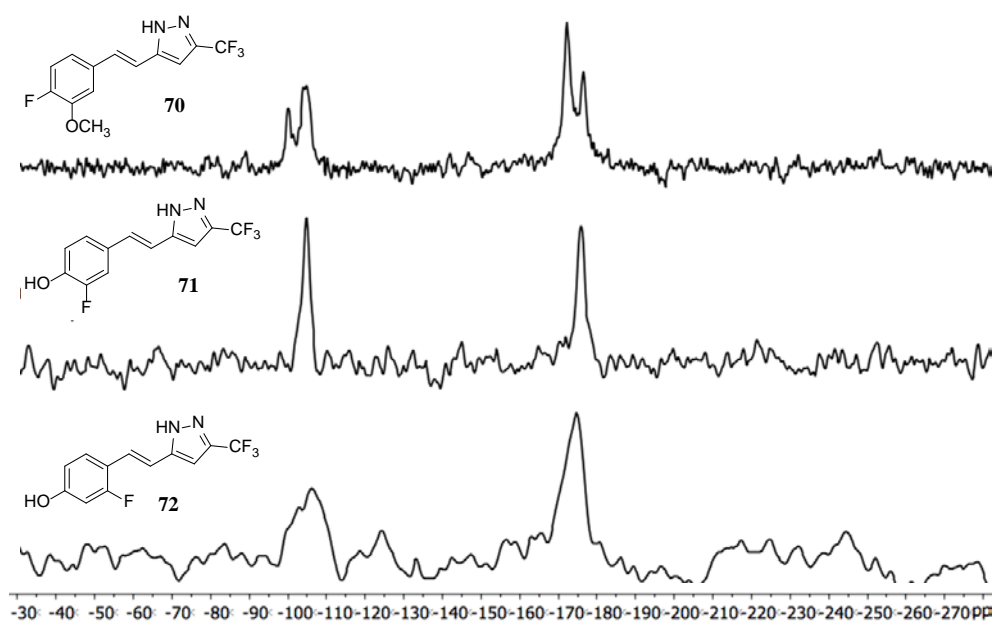


Figura 61. Espectro ^{15}N RMN CPMAS de los compuestos **70-72**.

Tabla 21. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^1H RMN y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos **69** a **74** a 300 K.

	69		70	71	72	73	74
	DMSO- d_6	HMPA- d_{18}	DMSO- d_6	DMSO- d_6	DMSO- d_6	DMSO- d_6	DMSO- d_6
NH	13.64 (s)	14.50 (s)	13.70 (s)	13.71 (s)	13.73 (s)	13.85 (s)	13.80 (s)
H4	6.81 (s)	6.85 (s)	6.88 (s)	6.83 (s)	6.89 (s)	6.96 (s)	6.88 (s)
H6	6.90 (d)	7.02 (d)	7.09 (d)	6.92 (d)	6.96 (d)	7.10 (d)	7.03 (d)
	$^3J_{\text{H7}}=16.6$	$^3J_{\text{H7}}=16.6$	$^3J_{\text{H7}}=16.6$	$^3J_{\text{H7}}=16.7$	$^3J_{\text{H7}}=16.8$	$^3J_{\text{H7}}=16.8$	$^3J_{\text{H7}}=16.7$
H7	7.18 (d)	7.50 (d)	7.27 (d)	7.18 (d)	7.26 (d)	7.32 (d)	7.25 (dd)
	$^3J_{\text{H6}}=16.6$	$^3J_{\text{H6}}=16.6$	$^3J_{\text{H6}}=16.6$	$^3J_{\text{H6}}=16.7$	$^3J_{\text{H6}}=16.8$	$^3J_{\text{H6}}=16.8$	$^3J_{\text{H6}}=16.7$
							$^5J_{\text{F5}}=1.2$
H2'	7.12 (d)	7.11 (d)	7.34 (dd)	7.36 (dd)	---	---	---
	$^4J_{\text{H6}}=2.0$	$^4J_{\text{H6}}=1.8$	$^4J_{\text{F4}}=8.4$	$^3J_{\text{F3}}=12.5$			
			$^4J_{\text{H6}}=2.2$	$^4J_{\text{H6}}=2.0$			
H3'	3.82 (s)	3.80 (s)	3.89 (s)	---	6.61 (dd)	---	6.79 (dd)
	(OMe)	(OMe)	(OMe)		$^3J_{\text{F2}}=12.9$		$^3J_{\text{F2}}=11.8$
					$^4J_{\text{H5}}=2.4$		$^4J_{\text{F5}}=7.4$
4'-OH	9.27 (s)	10.42 (s)	---	10.14 (s)	10.20 (s)	---	10.68 (s)
3'-OH		---	---	---	---	10.29 (s)	---
H5'	6.78 (d)	6.88 (d)	7.22 (dd)	6.95 (dd)	6.66 (dd)	7.15-7.04	---
	$^3J_{\text{H6}}=8.1$	$^3J_{\text{H6}}=8.3$	$^3J_{\text{H6}}=8.4$	$^4J_{\text{F3}}=9.3$	$^3J_{\text{H6}}=8.5$		
			$^3J_{\text{F4}}=11.4$	$^3J_{\text{H6}}=8.3$	$^4J_{\text{H3}}=2.4$		
H6'	6.95 (dd)	6.93 (dd)	7.08 (ddd)	7.16 (dd)	7.49 (dd)	7.15-7.04	7.53 (dd)
	$^3J_{\text{H5}}=8.1$	$^3J_{\text{H5}}=8.3$	$^3J_{\text{H5}}=8.4$	$^3J_{\text{H5}}=8.3$	$^4J_{\text{F2}}=9.2$		$^3J_{\text{F5}}=12.0$
	$^4J_{\text{H2}}=2.0$	$^4J_{\text{H2}}=1.8$	$^4J_{\text{H2}}=2.2$	$^4J_{\text{H2}}=2.0$	$^3J_{\text{H5}}=8.5$		$^4J_{\text{F2}}=7.3$
			$^4J_{\text{F4}}=4.5$				

Tabla 22. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{13}C y ^{15}N RMN en disolución y en estado sólido (CPMAS), y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos **69** a **74** (a 300 K). Cuando no se especifica son J_{CH} .

	69			70		71		72		73		74	
	DMSO- d_6	HMPA- d_{18}	CPMAS	DMSO- d_6	CPMAS	DMSO- d_6	CPMAS	DMSO- d_6	CPMAS	DMSO- d_6	CPMAS	DMSO- d_6	CPMAS
C-CF ₃	141.6 $^2J_{\text{CF}_3}=36.6$	141.9 $^2J_{\text{CF}_3}=36.5$	143.1	141.7 $^2J_{\text{CF}_3}=36.2$	142.6 141.4 140.6	141.6 $^2J_{\text{CF}_3}=36.9$	142.1	141.6 $^2J_{\text{CF}_3}=36.9$	141.7	141.7 $^2J_{\text{CF}_3}=36.7$	142.4	141.7 $^2J_{\text{CF}_3}=37.3$	142.3
C4	100.6 $^1J=179.5$	100.6	104.2	101.3 $^1J=181.0$	99.6 99.1 98.7	101.0 $^1J=180.4$	99.0	101.1 $^1J=179.8$	102.1 (+) 99.8 (-)	101.8 $^1J=180.7$	100.7 99.1	101.6	100.0
C-estiril	143.2	144.1	143.1	142.6	144.4	142.8	143.6	143.0	145.1 (-) 143.1 (+)	142.4	144.5 143.7	142.6	144.8
CF ₃	121.8 $^1J_{\text{F}}=268.1$	122.8 $^1J_{\text{F}}=267.6$	120.3	121.7 $^1J_{\text{F}}=268.1$	121.5	121.7 $^1J_{\text{F}}=268.0$	120.0	121.7 $^1J_{\text{F}}=268.3$	122.0	123.0 $^1J_{\text{F}}=268.1$	121.5	121.7 $^1J_{\text{F}}=268.1$	122.6
C6	111.3 $^1J=155.8$	111.6	112.9	114.6 $^1J=160$	113.9	112.7 $^1J=155.0$	110.3	113.6 $^1J=157.1$ $^4J_{\text{F}_2}=5.6$	113.8 (-) 111.9 (+)	116.6 $^1J=154.1$ $^4J_{\text{F}_2}=4.1$	115.4	115.0	110.2
C7	132.2 $^1J=148.9$	132.5	127.9	131.0 $^1J=155.4$	131.7	130.9 $^1J=151.1$ $^4J_{\text{F}_3}=1.8$	133.4	124.3 $^1J=154.8$ $^3J_{\text{F}_2}=1.8$	125.6 (+) 122.2 (-)	123.6 $^1J=153.1$	120.0	123.0	122.6
C1'	127.4	128.0	127.9	133.0 $^4J_{\text{F}_4}=3.7$	132.4	127.9 $^3J_{\text{F}_3}=6.4$	127.6	114.4 $^2J_{\text{F}_2}=12.4$	116.5 (+) 115.1 (-)	120.6 $^2J_{\text{F}_2}=10.0$ $^4J_{\text{F}_4}=3.3$	120.0	114.3 $^2J_{\text{F}_2}=14.4$ $^3J_{\text{F}_5}=6.7$	116.6 (-) 115.2 (+)
C2'	109.7 $^1J=156.0$	111.6	108.9	111.2 $^1J=159.9$ $^3J_{\text{H}_6} \sim 6.1$ $^3J_{\text{H}_7} \sim 6.1$ $^3J_{\text{F}_4}=1.6$	110.7 109.4 107.6	113.6 $^1J=159.6$ $^3J \sim ^3J \sim 5.5$ $^2J_{\text{F}_3}=18.7$	110.3	160.7 $^1J_{\text{F}_2}=248.5$	162.0 (-) 159.3 (+)	150.4 $^1J_{\text{F}_2}=246.6$ $^3J_{\text{F}_4}=6.0$	151.3 149.4	156.0 $^1J_{\text{F}_2}=245.3$ $^4J_{\text{F}_5}=1.5$	157.0 (+) 155.0 (-)
C3'	147.4	148.8	146.3	147.4 $^2J_{\text{F}_4'}=11.0$	147.9	151.2 $^1J_{\text{F}_3}=241.2$	153.4 151.0	102.8 $^1J=161.8$ $^3J=4.8$ $^2J_{\text{F}_2'}=24.3$	102.1 (+) 99.8 (-)	134.0 $^2J_{\text{F}_2}=^2J_{\text{F}_4'}=16.1$	133.0	105.0 $^2J_{\text{F}_2'}=26.8$ $^3J_{\text{F}_5'}=3.3$	104.9

OMe	55.6 ¹ J=144.3	56.1	55.2	56.0 ¹ J=145.4	55.1 54.4 53.9	---	---	---	---	---	---	---	---
C4'	147.9	149.7	146.3	151.1 ¹ J _{F4'} =246.5	153.1 150.6	145.4 ² J _{F3'} =12.4	145.2	159.3 ³ J _{F2'} =12.2	157.7 (+) 153.2 (-)	152.1 ¹ J _{F4'} =243.8 ³ J _{F2'} =5.9	152.5 151.3	146.3 ² J _{F5'} =14.7 ³ J _{F2'} =12.1	146.0
C5'	115.6 ¹ J=159.4	116.0	114.4	116.2 ¹ J=164.3 ² J _{F4'} =18.6	115.5 116.0	118.0 ¹ J=159.9 ³ J _{F3'} =3.1	117.0	112.3 ¹ J=161.8 ³ J=4.9 ⁴ J _{F2'} =2.6	111.9 (+) 110.2 (-)	111.9 ¹ J=165.7 ² J _{F4'} =19.1 ⁴ J _{F2'} =3.1	111.5	148.0 ¹ J _{F5'} =238.0 ⁴ J _{F2'} =2.1	150.3 (-) 147.8 (+)
C6'	120.6 ¹ J=159.6	120.3	115.9	119.8 ¹ J=164.5 ³ J _{H2'} ~6 ³ J _{H7'} ~6 ³ J _{F4'} =6.8	121.5	123.7 ¹ J=160.0 ⁴ J _{F3'} =2.9	129.7	128.6 ¹ J=160.0 ³ J=5.6 ³ J _{F2'} =5.6	132.5 (-) 130.2 (+)	116.3 ¹ J=166.2 ³ J _{F4'} =8.3 ³ J _{F2'} =3.5	111.5	113.6 ² J _{F5'} =21.3 ³ J _{F2'} =5.6	110.2
NH	n.o.	-170.2	-180.0	n.o.	-169.3 (+) -173.6 (-)	n.o.	-172.8	n.o.	-171.8	-171.8	-171.6	-172.7	-173.0
N	n.o.	-80.2	-96.3	n.o.	-97.4 (+) -102.0 (-)	n.o.	-102.0	n.o.	-103.0	n.o.	-100.3	n.o.	-98.3 (-) -103.5 (+)

Tabla 23. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{19}F RMN en disolución y en estado sólido (MAS) y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos **69** a **74**.

Comp.	Disol.	CF_3	F2'	F3'	F4'	F5'
69	DMSO- d_6	-60.5				
	HMPA- d_{18}	-61.6				
	MAS	-61.5				
70	DMSO- d_6	-60.5			-134.7	
					$^3J_{\text{H5}'}=11.4$	
					$^4J_{\text{H2}'}=8.4$	
					$^4J_{\text{H6}'}=4.5$	
	MAS	-57.3 (+)			-131.4	
		-59.4 (-)			-133.3	
					-134.7	
71	DMSO- d_6	-60.5		-135.9		
				$^3J_{\text{H2}'}=12.5$		
				$^4J_{\text{H5}'}=9.3$		
MAS	-57.6		-136.1			
72	DMSO- d_6	-61.0	-116.1			
			$^3J_{\text{H3}}=12.9$			
			$^4J_{\text{H6}}=9.2$			
	MAS	-57.8 (1.5)	-106.9 (+)			
		-59.6 (1)	-111.3 (-)			
			-108.0 (+)			
			-114.4 (-)			
73	DMSO- d_6	-60.5	-135.8		-131.3	
			$^4J_{\text{FF}}=13.3$		$^4J_{\text{FF}}=13.3$	
			$^4J_{\text{H6}}=7.5$		$^4J_{\text{H5}}=10.1$	
					$^5J_{\text{H6}}=6.0$	
	MAS	-59.1	-135.0		-128.9	
		-60.1	-137.4		-130.9	
	-61.0	-139.6		-132.4		
74	DMSO- d_6	-60.5	-120.8			-140.5
			$^5J_{\text{FF}}=15.1$			$^5J_{\text{FF}}=15.1$
			$^3J_{\text{H3}}=11.8$			$^3J_{\text{H6}}=12.0$
			$^4J_{\text{H6}}=7.3$			$^4J_{\text{H3}}=7.4$
						$^5J_{\text{H7}}=1.2$
	MAS	-57.7 (1)	-110.7 (-)			-135.9 (+)
		-59.8 (2)	-113.4 (-)			-138.7(+)
			-117.4 (+)			-141.7 (-)
			-120.8 (+)			-143.7 (-)

4.3.2 Cálculos teóricos

Cálculos teóricos para los pirazoles 69-74

Las formas tautoméricas representadas en la Figura 57 son en realidad una simplificación ya que, además de la tautomería anular (**a/b**), existen rotaciones conformacionales alrededor de los enlaces simples C5-C6 y C7-C1'. En las Figuras 62 y 63 se encuentran las energías relativas asociadas con esas geometrías (las energías absolutas correspondientes en Hartrees se encuentran en la Tabla 39 del Anexo). Una lectura de estas figuras muestra que los tautómeros **a** más estables tienen una conformación *sZ-7-1'* mientras que los tautómeros **b** más estables tienen una conformación *sE-7-1'*.

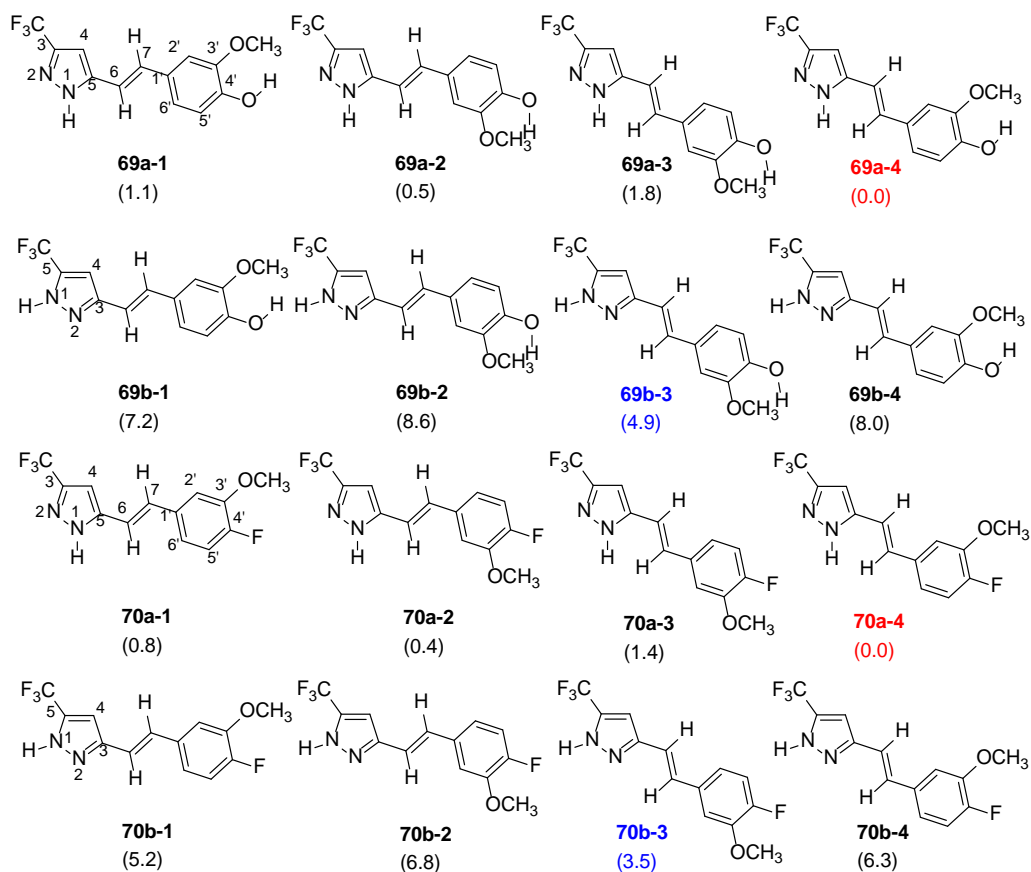


Figura 62. Diferentes tautómeros (**a** y **b**) y conformeros de los pirazoles **69** y **70** con los valores de E_{rel} entre paréntesis. En rojo y en azul se señalan los valores de mínima E_{rel} .

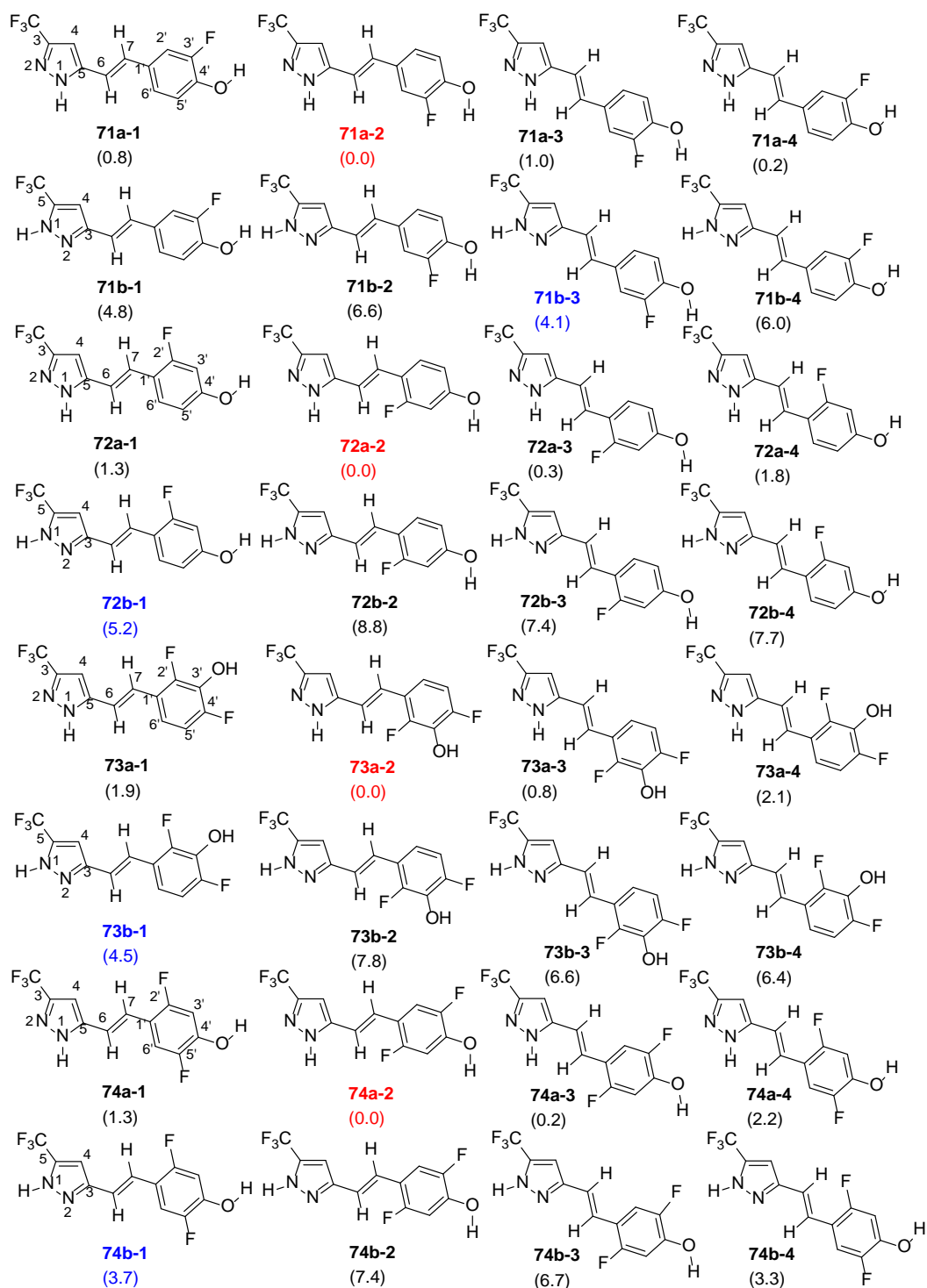


Figura 63. Diferentes tautómeros (*a* y *b*) y conformeros de los pirazoles 71-74 con los valores de E_{rel} entre paréntesis. En rojo y en azul se señalan los valores de mínima E_{rel} .

Con los valores de las energías relativas se construyó una matriz de Free-Wilson, (Tabla 40 del Anexo) que condujo a la siguiente ecuación (las variables no incluidas son no significativas): $E_{rel} \text{ (kJ}\cdot\text{mol}^{-1}) = - (5.1 \pm 0.4) \text{ tautomero } \mathbf{a} + (2.8 \pm 0.6) 2'\text{F} + (1.5 \pm 0.5) 3'\text{F} + (4.6 \pm 0.5) 3'\text{OMe} + (3.0 \pm 0.6) 4'\text{OH}$, $R^2 = 0.91$.

Esto significa que el tautómero **a** es, en promedio, $5.1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ más estable que el tautómero **b**. Todos los sustituyentes en el anillo de fenilo favorecen el tautómero **a**, es decir, aumentan la diferencia entre E_{rel} **b-a**. Si se analizan sólo los seis pares **a/b** donde la diferencia en E_{rel} es mínima (pares rojo/azul): $E_{\text{rel}} (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}) = (0.8 \pm 0.6) 2'\text{F} + (0.8 \pm 0.7) 3'\text{OMe} + (1.4 \pm 0.7) 4'\text{OH} - (1.2 \pm 0.6) 5'\text{F} + (2.7 \pm 0.9)$ conformación 7-1' (de *sZ* a *sE*), $R^2 = 0.998$.

Comparando las ecuaciones anteriores se observa que al reducir el número de pares **a/b** de 48 a 6, la mayoría de los coeficientes se hacen más pequeños (de 2.8 a 0.8; de 1.5 pasan a ser no significativos y de 4.6 a $0.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) aunque uno de ellos 5'F, pasa de ser no significativo a tener un valor de $-1.2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Se compararon los desplazamientos químicos ^1H , ^{13}C , ^{15}N y ^{19}F con los calculados para los pirazoles **69-74** (Tabla 41 del Anexo), para lo cual se seleccionaron los dos principales isómeros, el rojo y el azul. En el caso del compuesto **73**, el conformero con el 3'-OH apuntando hacia F2' se ajusta ligeramente mejor que el que posee el 3'-OH apuntando hacia F4', tal y como ocurriría con las β -dicetonas. Los resultados de las regresiones se indican en la Tabla 24, donde se han añadido dos columnas ficticias para los protones NH y OH para que sea posible la comparación con los cálculos realizados, así como una tercera para el desplazamiento químico de ^{15}N del NH del pirazol. Pese a que las diferencias de energía determinadas por RMN son inferiores a las calculadas directamente, se encuentran en el mismo rango. Además, si se excluye el compuesto **71**, son aproximadamente proporcionales [**b-a** = $(2.8 \pm 0.5) \Delta\text{G}$, $n = 5$, $R^2 = 0.90$]. Esto es bastante satisfactorio teniendo en cuenta que los valores de ΔG corresponden a experimentos llevados a cabo en DMSO mientras que las diferencias de **b-a** corresponden a cálculos en fase gaseosa.

Tabla 24. Resultados de las regresiones múltiples ($n = 22$ o 23 , $R^2 = 0.999$) para **69-74**; la última columna representa las diferencias de las energías calculadas.

	a-2	a-4	b-1	b-3	$\Delta\text{G}^{\text{a}}$	NH	OH	$^{15}\text{N}(\text{NH})$	b-a ^a
69		0.7 ± 0.1		0.3 ± 0.1	2.1	4.4 ± 2.7	3.8 ± 2.7		4.9
70		0.6 ± 0.1		0.4 ± 0.1	1.0	4.5 ± 2.9	---		3.5
71	0.9 ± 0.1			0.1 ± 0.1	5.5	5.0 ± 3.4	5.4 ± 3.4	---	4.1
72	0.7 ± 0.1		0.3 ± 0.1		2.1	4.9 ± 2.7	6.3 ± 2.7	---	5.2
73	0.6 ± 0.2		0.4 ± 0.2		1.0	5.0 ± 3.8	5.8 ± 3.8	13.0 ± 4.3	4.5
74	0.55 ± 0.15		0.45 ± 0.15		0.5	5.0 ± 3.5	6.0 ± 3.5	12.8 ± 4.0	3.7

^a $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

Como comentamos anteriormente, en estado sólido (Tabla 42 del Anexo), se dan dos situaciones: i) compuestos cuyos espectros presentan señales sencillas; ii) compuestos en cuyos espectros la mayoría de las señales están divididas (Figura 61).

El primer caso corresponde a los pirazoles **69** y **71**. El compuesto **69**, que se encuentra en disolución como **69-a4**, en estado sólido lo hace como el confórmero **69-a3** ($1.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ más energético) lo cual corresponde a una rotación alrededor del enlace 7-1'. En el caso de **71** la estructura presente en estado sólido, **71-a2**, es la misma que la presente en disolución.

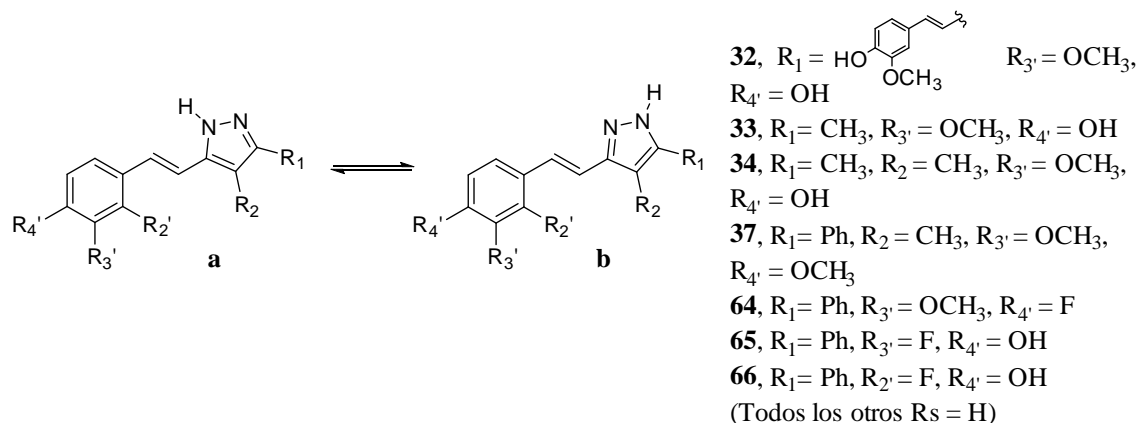
El segundo caso corresponde a los pirazoles restantes. En el pirazol **72** existe una clara diferencia de intensidad en torno a 60:40, lo cual permite separar las señales en dos grupos, las del compuesto mayoritario (+) **72-a2** y las del minoritario (-) **72-a1** ($1.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ más energética), siendo el caso del pirazol **74** casi idéntico. El pirazol **70** muestra varias señales que aparecen como tripletes de la misma intensidad (por ejemplo, el ^{13}C del grupo metoxi, el del C-CF₃, el del C4 y el ^{19}F del F4'). Hemos encontrado la mejor solución asumiendo que se trata de las formas **70-a1**, **70-a2** y **70-a4** presentes en disolución. El caso más complejo corresponde al pirazol **73** porque además de las conformaciones resultantes de las rotaciones alrededor de 5-6 y 7-1' hay dos conformaciones posibles del grupo OH (hacia F2' y hacia F4'). Esto resulta en 16 valores calculados que probablemente corresponden a tres moléculas independientes en la celda unitaria (Tabla 43 del Anexo) un problema demasiado complejo para ser resuelto. Tentativamente, hemos ajustado todos los datos a un modelo que involucra dos conformaciones de la clase O-H...F2' (Tabla 25).

Tabla 25. Relación entre los desplazamientos químicos en estado sólido CPMAS y MAS, experimentales y calculados de los pirazoles **70**, **72**, **73** y **74**.

Comp.	Confórmero	NH	N	n	R ²
70 (33%)	0.994±0.008 a-1	13.8±3.0	-23.1±2.7	19	0.999
70 (33%)	0.998±0.008 a-2	14.6±2.9	-22.6±2.6	19	0.999
70 (33%)	0.997±0.008 a-4	24.5±3.2	-26.6±2.8	19	0.999
72 (60%)	0.984±0.006 a-2	10.6±2.9	-27.0±2.7	16	1.000
72 (40%)	0.992±0.008 a-1	13.2±3.9	-26.1±3.7	16	0.999
73	(0.38±0.20) a-1 + (0.60±0.20) a-2	10.2±4.6	-26.7±4.6	27	0.999
74 (66%)	0.972±0.100 a-1	8.0±5.7	-29.5±5.4	19	0.999
74 (33%)	0.973±0.008 a-2	7.1±4.5	-24.7±4.3	19	0.999

4.3.3 Determinación de la estructura cristalina mediante difracción de rayos X

Las estructuras cristalinas de los compuestos **64** (CH₂Cl₂/hexano), **65** (CH₂Cl₂/EtOH/hexano) y **66** (AcOEt/hexano) fueron resueltas gracias a la obtención de monocristales adecuados para difracción de rayos X [88a]. Las estructuras de los compuestos **32** (H₂O/EtOH), **33** (CH₂Cl₂/EtOH/hexano), **34** (CH₂Cl₂/EtOH/hexano) y **37** (CH₂Cl₂/EtOH/hexano), fueron publicadas con anterioridad en un trabajo realizado por este grupo de investigación [28] (Esquema 8).



Esquema 8. Estructura de los pirazoles hemicurcuminoides cuya estructura de rayos X ha sido determinada.

Vale la pena recordar que una característica de la geometría de NH-pirazoles es que el ángulo centrado en N1 (NH) es siempre mayor que el centrado en N2, alrededor de 112 y 104°, respectivamente [91]. Otra característica típica de ellos es la formación de motivos cíclicos N-H...N (ciclámeros) [92], encontrándose fundamentalmente en compuestos que carecen de sustituyentes con grupos funcionales capaces de formar enlaces de hidrógeno, ya que participan en la red que determina la estructura secundaria de los cristales rompiendo dichos enlaces [93]. Debido a esto, como se describirá posteriormente, solo los compuestos **37** y **64**, que carecen del OH fenólico, cristalizan formando dímeros [89].

Las Figuras 64-68 muestran los diagramas ORTEP de los compuestos **32-34**, **37** y **64-66** con la numeración cristalográfica utilizada para los diferentes átomos en la unidad asimétrica. Los compuestos **32**, **34** y **64** cristalizan en el grupo espacial monoclinico *P2₁/c*, **33** y **37** lo hacen en el ortorrómbico *Pbca*, mientras que **65** y **66** cristalizan en el grupo espacial monoclinico *P2₁/n*. En la Tabla 26 se muestran las distancias y ángulos de los enlaces de hidrógeno.

Tabla 26. Enlaces de hidrógeno para los compuestos **32-34**, **37** y **64-66**, distancias en Å y ángulos en °.

Comp.	D-H...A	Operaciones de simetría ^a	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
32	O3-H3...O4		1.10	1.98	2.647(4)	115.1
	N1-H1B...O3	-x+2, y-1/2, -z+1/2	1.06	1.93	2.864(4)	144.7
	O1-H1A...N2	-x+1, y+1/2, z+3/2	1.17	1.79	2.811(4)	142.7
	O3-H3...O1	x+1, y, z-1	1.10	2.26	2.825(4)	108.7
33	O1-H1A...N2	-x+1, -y+2, -z+1	0.99	1.86	2.832(3)	167.5
	N1-H1B...O2	x, -y+3/2, z-1/2	1.07	2.17	2.962(3)	128.6
34	O13-H113...N21		1.16	1.81	2.782(5)	137.3
	N12-H12...N23		1.10	1.82	2.914(5)	175.6
	O11-H111...O13	-x+4, y-1/2, -z+3/2	0.92	2.03	2.813(4)	141.3
	O12-H112...N22	-x+1, y-1/2, -z+1/2	1.14	1.57	2.673(4)	159.4
	N11-H11...O11	-x+4, y+1/2, -z+3/2	1.08	2.01	2.951(5)	144.3
	N13-H13...O12	-x+1, y+1/2, -z+1/2	1.02	1.93	2.853(4)	148.6
37	N1-H1...N2	x+2, -y, -z+1	0.90(4)	2.07(4)	2.872(3)	147.4
64	N1-H1...N2	-x, -y+2, -z+1	1.02	1.92	2.852(2)	150.2
65	N1-H1...O1	-x+3/2, y+1/2, -z+1/2	1.02	1.86	2.871(3)	171.1
	N2...H1A-O1	x-1/2, -y+3/2, z+1/2	1.08	1.69	2.736(3)	161.8
66	N1-H1...O1	-x+1/2, y+1/2, -z+3/2	0.98	1.98	2.899(2)	154.1
	N2...H1A-O1	x+1/2, -y+1/2, z-1/2	1.01	1.72	2.711(2)	164.3

^a Operaciones de simetría utilizadas para generar átomos equivalentes

Como se observa en la Figura 64, en la determinación estructural de **32**, se identificó una molécula cristalográficamente independiente, donde los anillos de pirazol y fenilo son coplanares, con distancias de enlace y ángulos dentro de los rangos normales. Sin embargo, el compuesto **33**, posee un ángulo diedro de 19.0(1)° entre los anillos de pirazol y fenilo.

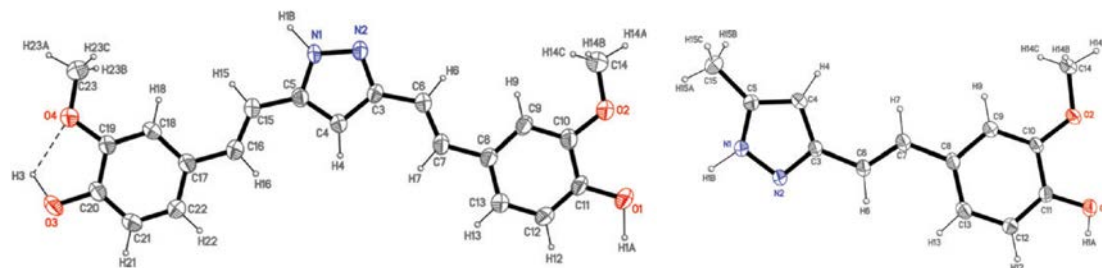


Figura 64. Diagrama ORTEP de **32** (izquierda, 35% de probabilidad de los elipsoides) y de **33** (derecha, 35% de probabilidad de los elipsoides) [28].

La unidad asimétrica del compuesto **34** se presenta en la Figura 65. El cristal consta de tres moléculas casi planas, cristalográficamente independientes, unidas entre sí por enlaces de hidrógeno que forman un trímero.

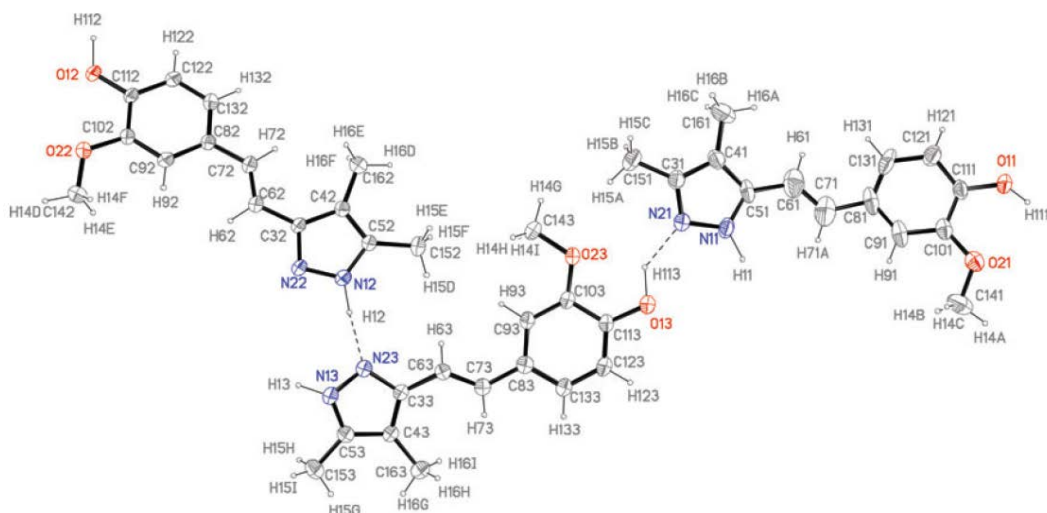


Figura 65. Diagrama ORTEP de **34** (40% de probabilidad de los elipsoides) [28].

La Figura 66 muestra como en el compuesto **37**, el ángulo diedro formado entre el pirazol y el anillo de fenilo en la posición 3 es de $15.7(1)^\circ$, y de $36.5(1)^\circ$ entre el pirazol y el anillo de fenilo grupo del estirilo en la posición 5. Las moléculas de **37** están centrosimétricamente unidas por enlaces de hidrógeno, dando lugar a dímeros, dentro de las distancias de van der Waals.

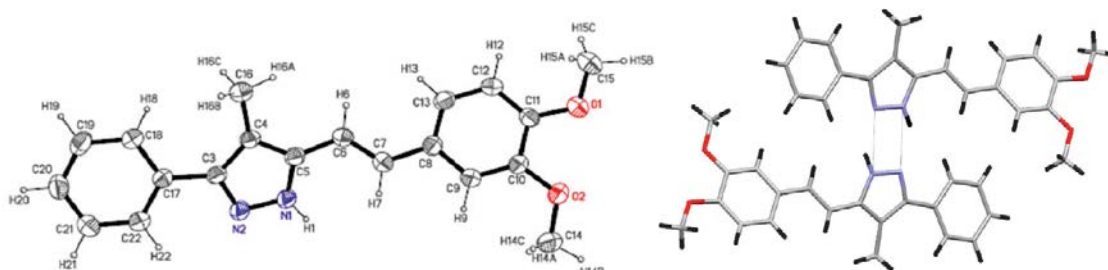


Figura 66. Diagrama ORTEP de **37** (35% de probabilidad de los elipsoides). A la derecha la vista a lo largo del eje *a* de **37**, que muestra la formación de dímeros [28].

Los compuestos **65** y **66** son isoestructurales y cristalizan en el grupo espacial monoclinico $P2_1/n$. Por esta razón, los resultados para las dos moléculas pueden describirse de forma conjunta. La Figura 67 muestra sus unidades asimétricas que corresponden, en ambos casos, a una sola molécula que no es completamente plana debido a la torsión del anillo de fenilo con respecto al anillo de pirazol, siendo el ángulo diedro entre ellos de $25.4(2)^\circ$. Excluyendo este anillo de fenilo, el resto de los átomos se desvían solo ligeramente del plano molecular medio lo que sugiere una deslocalización electrónica en esa parte de la molécula.

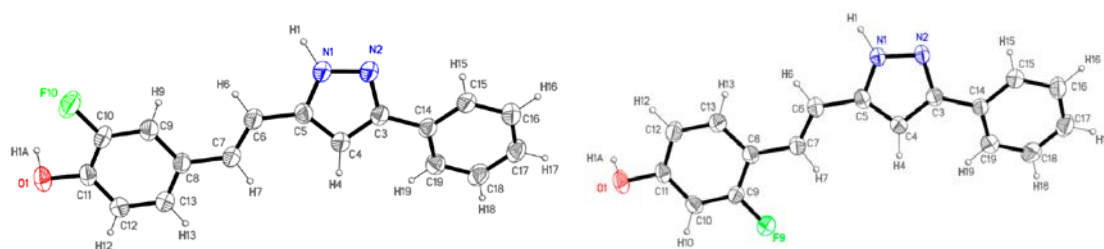


Figura 67. Diagrama ORTEP de **65** (izquierda) y **66** (derecha) (40% de probabilidad de los elipsoides)[88a].

En el compuesto **64** la unidad asimétrica también corresponde a una molécula de forma análoga a los compuestos **32**, **33**, **37**, **65** y **66**, pero ambos sustituyentes en el pirazol están girados en relación a este anillo, lo impide la deslocalización electrónica. Cada molécula interactúa con el centrosimétrico adyacente formando dímeros, como ocurría en el caso de **37**, unidos por enlaces de hidrógeno simétricos entre los átomos de nitrógeno del pirazol, $N1-H1 \cdots N2$, no observándose contactos adicionales significativos (Figura 68). La presencia del grupo metoxi en **64** limita las posibilidades de interacciones que conducen a la formación de dímeros aislados en lugar de la red extendida encontrada en los compuestos **65** y **66**.

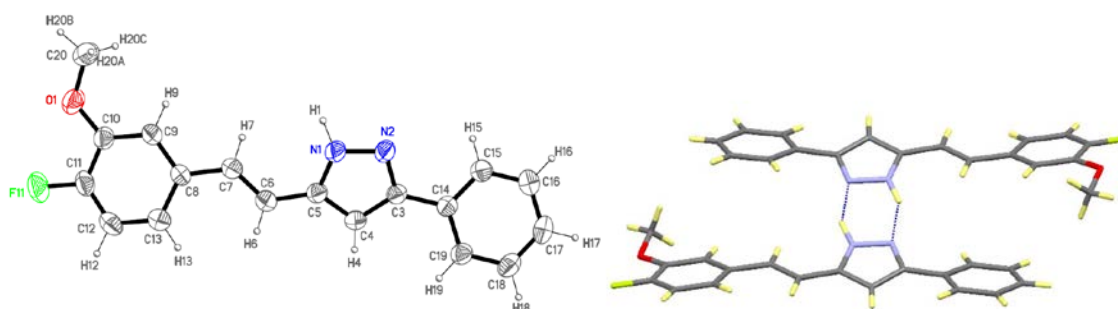


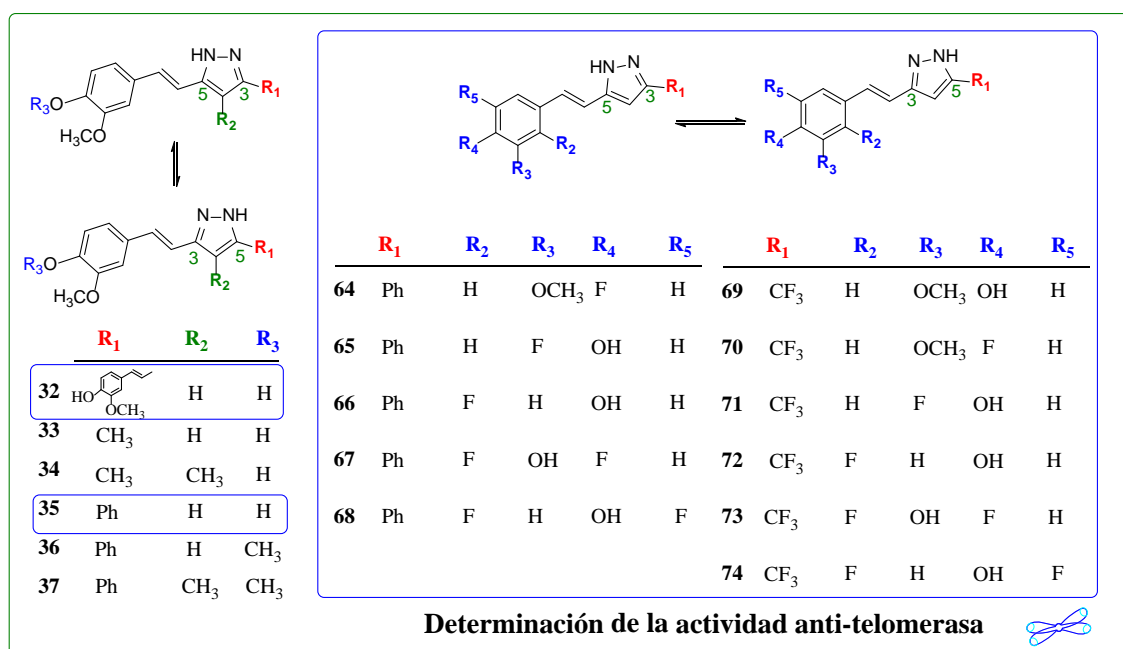
Figura 68. Diagrama ORTEP de **64** (40% de probabilidad de los elipsoides). A la derecha, vista del dímero formado en **64** [88a].

Respecto a la tautomería, hay que señalar que en el compuesto **32**, los tautómeros **32a** y **32b** son idénticos. En el caso del pirazol metil sustituido **33**, el único tautómero presente es 3-estiril (**33b**). En el pirazol **34**, hay una mezcla 2:1 de 3-estiril (**34b**) y 5-estiril (**34a**). Sin embargo, en los pirazoles fenil sustituidos **37** y **64-66** el único tautómero observado es el **a** (5-estiril), de acuerdo con los datos de RMN en estado sólido.

4.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

En el listado elaborado por la FDA de los 100 sistemas cíclicos empleados con más frecuencia en fármacos, el anillo de pirazol ocupa la 44ª posición [94]. Este anillo heteroaromático de cinco miembros ha sido considerado lo suficientemente importante como para dedicarle un capítulo en el libro "*Privileged Scaffolds in Medicinal Chemistry: Design, Synthesis, Evaluation*" [95]. En una revisión reciente realizada por este grupo de investigación se recogen 149 pirazoles relacionados con la curcumina correspondientes a 73 referencias para los años 2002-2015 [96].

Teniendo en cuenta que los compuestos **32-37** habían demostrado ya sus propiedades como posibles agentes terapéuticos en la enfermedad inflamatoria intestinal [27], se decidió realizar nuevos ensayos de determinación de actividad biológica de los compuestos previamente estudiados junto a los nuevos derivados fluorados **64-74**. Así, basándonos en las propiedades antiinflamatorias y anticarcinogénicas de la curcumina, se llevaron a cabo dos tipos de ensayos: la determinación de la capacidad inhibidora de la actividad de la sintasa del óxido nítrico (NOS) y la determinación de la capacidad inhibidora de la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc* relacionados con la telomerasa (Figura 69).



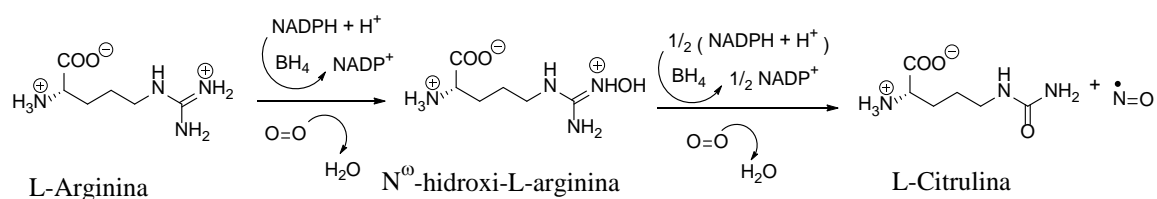
Determinación de la actividad anti-NOS

Figura 69. Pirazoles cuya actividad anti-NOS (cuadro verde) y/o anti-telomerasa (cuadro azul) ha sido determinada.

4.4.1 Determinación *in vitro* del efecto de los pirazoles curcuminoides sintetizados en la actividad de la NOS

El óxido nítrico (NO^\bullet) es un radical libre de gran importancia biológica al actuar como mediador de numerosos procesos fisiológicos y patológicos. Es capaz de difundir fácilmente a través de las membranas celulares y entre las células, actuando como señalizador en la comunicación celular y neuronal, regulando la presión sanguínea y participando en la activación del sistema inmune [97]. A grandes rasgos, podríamos resumir su reactividad en tres reacciones principales: reacción con metales de transición del grupo prostético de enzimas modulando su actividad, S-nitrosilación de ciertas proteínas y reacción con el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) para formar peroxinitrito (ONOO^-).

El NO^\bullet se produce en los organismos vivos a partir del aminoácido L-arginina y oxígeno molecular, en una reacción catalizada por una familia de isoenzimas denominadas sintasas del óxido nítrico (NOS) [98]. Además, es imprescindible la presencia de fosfato dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADPH), como cosustrato; de mononucleótido de flavina (FMN), dinucleótido de flavina (FAD) y tetrahidrobiopterina (BH_4) como cofactores, y de protoporfirina IX de hierro (grupo hemo) y calmodulina como grupos prostéticos. La reacción de formación del NO^\bullet transcurre en dos etapas (Esquema 9). En una primera etapa se oxida uno de los nitrógenos del grupo guanidinio de la L-arginina para dar N^ω -hidroxi-L-arginina [99] a través de una reacción que requiere oxígeno molecular, NADPH y BH_4 . La especie intermediaria así formada sufre un nuevo proceso de oxidación para originar L-citrulina y NO^\bullet . En total, por cada molécula producida se consumen 1.5 equivalentes de NADPH ya que son tres los electrones necesarios. El NADPH solo puede suministrar los electrones de dos en dos, mientras que las flavinas aportan sus electrones uno a uno. Esta característica las convierte en intermediarias entre el NADPH el grupo hemo, ya que éste, en las diferentes etapas de síntesis del NO^\bullet , requiere que el suministro de electrones se haga de uno en uno [100].



Esquema 9. Reacción de formación del óxido nítrico.

Estructura de las NOS

Las sintasas del óxido nítrico son activas como homodímeros, y cada monómero consiste en dos dominios bien definidos: el dominio oxigenasa y el dominio reductasa (Figura 70). En el dominio oxigenasa el N-terminal se une al grupo hemo, a la L-arginina, y a la BH₄. Mientras en el dominio reductasa, el C-terminal se une al FAD, FMN y al NADPH y proporciona los electrones del NADPH al dominio oxigenasa. Ambos dominios pueden ser expresados y purificados por separado, y conservar el sitio de unión al ligando y su reactividad. Entre los dominios oxigenasa y reductasa existe un sitio de unión para la calmodulina (CaM) consistente en una secuencia corta (30-40 aminoácidos) [101].

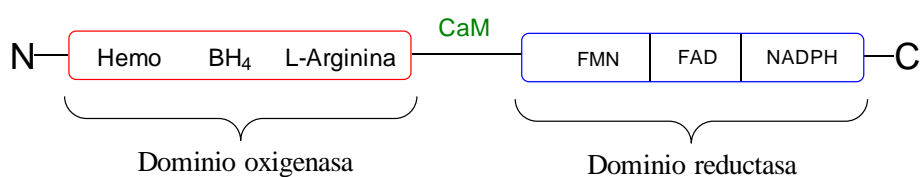


Figura 70. Representación esquemática de la estructura de la NOS

Tradicionalmente se han diferenciado tres isoformas de la NOS en función de los genes que las codifican, de su localización, regulación, propiedades catalíticas y sensibilidad a inhibidores [102]. La gran analogía existente en su estructura genómica, sugiere la existencia de un gen ancestral común para la NOS. En un principio se distinguió entre NOS constitutiva e inducible. Las isoformas constitutivas se encontraron en las células del endotelio (eNOS, con un tamaño de 134 kDa) y en determinadas poblaciones de neuronas (nNOS, con un tamaño de 160 kDa), mientras que la encontrada en macrófagos solo es expresada una vez ha sido inducida por determinados agentes; de ahí que se la denominara inducible (130 kDa) [103]. Actualmente, podemos hablar de una cuarta isoforma de localización mitocondrial (NOS mitocondrial o mtNOS), cuya principal diferencia radica en la ausencia de un gen específico que la codifique, así que debe proceder del gen que codifique alguna de las tres isoformas citosólicas [104].

Cabe destacar el papel de la calmodulina en la actividad de la NOS. Para que la nNOS y eNOS sean activas es esencial que se unan al complejo de calcio-calmodulina; dicho complejo se forma cuando la concentración de calcio es superior a 400 nM. Por el contrario, en el caso de la iNOS el complejo calcio-calmodulina está fuertemente unido incluso en condiciones de reposo celular de manera que su actividad no se ve afectada por esta circunstancia. La iNOS, es activa desde que se sintetiza de novo al inducirse su

expresión, mientras que las dos isoformas constitutivas dependen de algún estímulo que provoque un aumento de la concentración de calcio intracelular. En la Tabla 27 se recogen las principales características de las tres isoformas de la NOS que serán objeto de estudio.

Tabla 27. Principales características de las tres isoformas de la NOS.

	Neuronal (nNOS)	Inducible (iNOS)	Endotelial (eNOS)
Tamaño (kDa)	160	130	134
Lugar de Expresión	SNC y SNP	Macrófagos Neutrófilos Hepatocitos Fibroblastos	Endotelio Plaquetas
Expresión	Constitutiva	Inducible	Constitutiva
Dependencia Ca²⁺	Sí	No	Sí
Función	Neurotransmisor central y periférico	Mediador de la respuesta inmunitaria	Regulación tono vascular y función plaquetaria

Inhibición de la NOS como objetivo terapéutico

Debido al gran número de procesos tanto fisiológicos como fisiopatológicos en los que el NO[•] está implicado, son numerosas las investigaciones con fines terapéuticos que lo sitúan en el punto de mira. Pese a que los tratamientos con sustancias generadoras de NOS *in vivo* son bien conocidos para el tratamiento de distintas cardiopatías, muchos de los efectos más desastrosos se producen cuando la generación de NO[•] es excesiva [105]. En el sistema nervioso central (SNC), el NO[•] actúa como un neurotransmisor de características únicas, ya que no es almacenado en vesículas y liberado por exocitosis, sino que simplemente difunde entre los terminales nerviosos. Parece clara su intermediación en enfermedades neurodegenerativas, y es uno de los principales responsables del daño neuronal en los accidentes cerebro-vasculares. En el caso de la enfermedad de Alzheimer existen evidencias de una elevada expresión de la eNOS y se sabe que la proteína β-amiloide presenta componentes capaces de inducir la expresión de la iNOS en la microglía [106]. Por el contrario, el NO[•] producido por la eNOS en las células endoteliales juega un papel fundamental en la regulación de la presión arterial [107] y su inhibición podría llevar a efectos indeseados como el aumento de la activación de los glóbulos blancos y plaquetas, hipertensión y aumento de la aterogénesis [108]. En el sistema inmune, las citoquinas o las endotoxinas inducen la expresión iNOS siendo capaz de generar una cantidad de NO[•] mayor al de los otros dos

tipos de NOS en la lucha contra agentes patógenos. En la respuesta inflamatoria, en condiciones de inflamación aguda, el NO[•] responsable de la modulación de la formación del edema es liberado por la isoforma constitutiva eNOS, cuya función es la de inhibir la activación de los glóbulos blancos, la agregación plaquetaria, e inducir la vasodilatación. Por el contrario, si el proceso progresa y se convierte en crónico, el NO[•] es generado por la iNOS, siendo responsable de muchos de los aspectos que caracterizan la inflamación. Por todo ello, la inhibición selectiva de las distintas isoformas de la NOS es desde hace años un objetivo terapéutico primordial. Sin embargo, esta selectividad no es fácil de conseguir debido principalmente al alto grado de conservación que existe en la estructura cuaternaria del dímero así como en el centro activo.

Determinación de la inhibición de la actividad enzimática de las isoformas de la NOS

Con objeto de medir la capacidad inhibidora de los compuestos sintetizados se llevaron a cabo ensayos *in vitro* de medida de la actividad enzimática de la sintasa del óxido nítrico. La medida de la actividad de la nNOS se realizó en homogenado de cerebro de ratón, la de eNOS empleando eNOS recombinante bovina y para iNOS se utilizó iNOS recombinante de ratón. Dado que las isoformas constitutivas son Ca²⁺-CaM dependientes, mientras que las isoformas inducibles son Ca²⁺-CaM independientes, se podrá diferenciar entre NOS constitutiva e inducible, utilizando un quelante de Ca²⁺ como el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). La actividad de la enzima se expresa como la cantidad de producto formado (NO[•] o citrulina ya que su relación de síntesis es 1:1, ver Esquema 9) a lo largo del tiempo de la reacción, dividido por la cantidad de proteínas totales. Así, la cuantificación de la actividad NOS puede llevarse a cabo por la monitorización de la conversión de L-(³H)-arginina en L-(³H)-citrulina durante un tiempo determinado según el protocolo descrito por Bredt *et al.* [109].

Para simplificar la discusión de los resultados, éstos se agrupan en tres gráficos. En la Figura 71 se recogen los resultados obtenidos para los pirazoles **32-37**, en la Figura 72 los de los pirazoles hemicurcuminoides fluorados **64-68** y por último, en la Figura 73 los de los pirazoles hemicurcuminoides fluorados **69-74**. En todos los casos se presentan como la media del porcentaje de inhibición, en presencia del inhibidor, de tres experimentos independientes (n = 3) realizados por triplicado ± el error estándar de la media (SEM).

De los resultados obtenidos para los pirazoles curcuminoides **32-37** (Figura 71) se observa que la sustitución del grupo OH en 4' por un metoxi en los compuestos **36** y **37** no parece suponer una mejora respecto a la capacidad inhibidora de ninguna isoforma, observándose una notable disminución de la inhibición de nNOS y de eNOS. La introducción de un metilo en posición 4 del anillo pirazólico en **34** se traduce en un aumento de la selectividad por la isoforma inducible respecto a su análogo sin metilar (**33**). El fenil derivado **35** junto con **32** y **33**, son los únicos compuestos que presentan porcentajes de inhibición superiores o en torno al 50% para las tres isoformas.

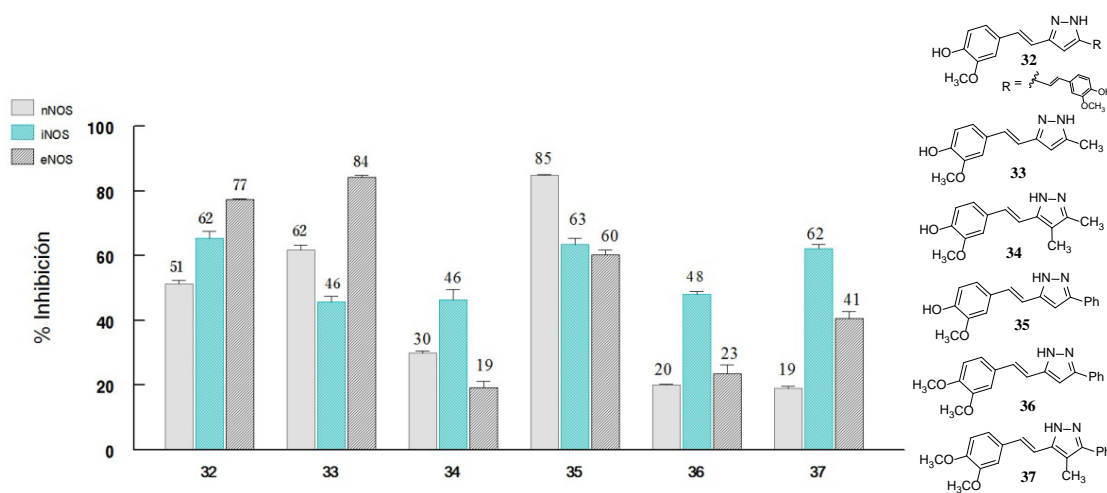


Figura 71. Porcentaje de inhibición de la actividad de nNOS, iNOS y eNOS en presencia de los pirazoles curcuminoides **32-37** (1 mM en EtOH) comparados con el control (0% de inhibición). $P < 0.001$ vs control.

En el caso de los pirazoles hemicurcuminoides fluorados **64-68** (Figura 72), los compuestos monofluorados son más inhibidores que los difluorados. La sustitución del OH en 4' por un átomo de F en **64** no supuso mejoras respecto a la inhibición de ninguna isoforma. El compuesto **65** que posee un átomo de flúor en posición 3' no solo inhibe cuantitativamente iNOS (84%), sino que además es un inhibidor selectivo de esta isoforma frente a las otras dos nNOS (37%) e iNOS (37%).

Si analizamos los resultados obtenidos para los pirazoles hemicurcuminoides fluorados **69-74** (Figura 73), podemos afirmar que presentan ligeramente mayor inhibición de la isoforma inducible frente a las isoformas constitutivas. Entre ellos **72**, es más selectivo de iNOS y eNOS frente a nNOS.

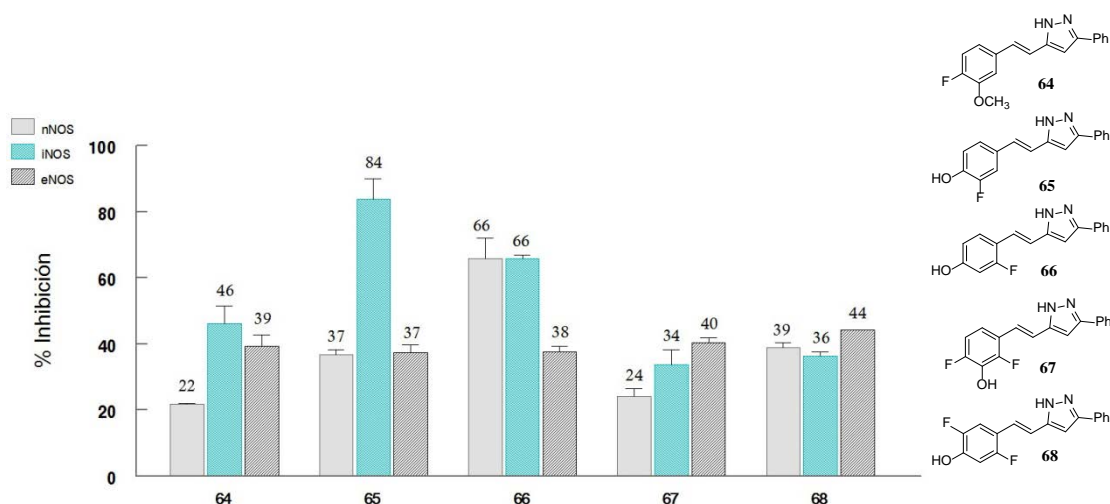


Figura 72. Porcentaje de inhibición de la actividad de nNOS, iNOS y eNOS en presencia de los pirazoles hemicurcuminoides **64-68** ($50 \mu\text{M}$ en DMSO) comparados con el control (0% de inhibición). $P < 0.01$ (para iNOS de **64**, **65** y **68**) y $P < 0.001$ (resto) vs control.

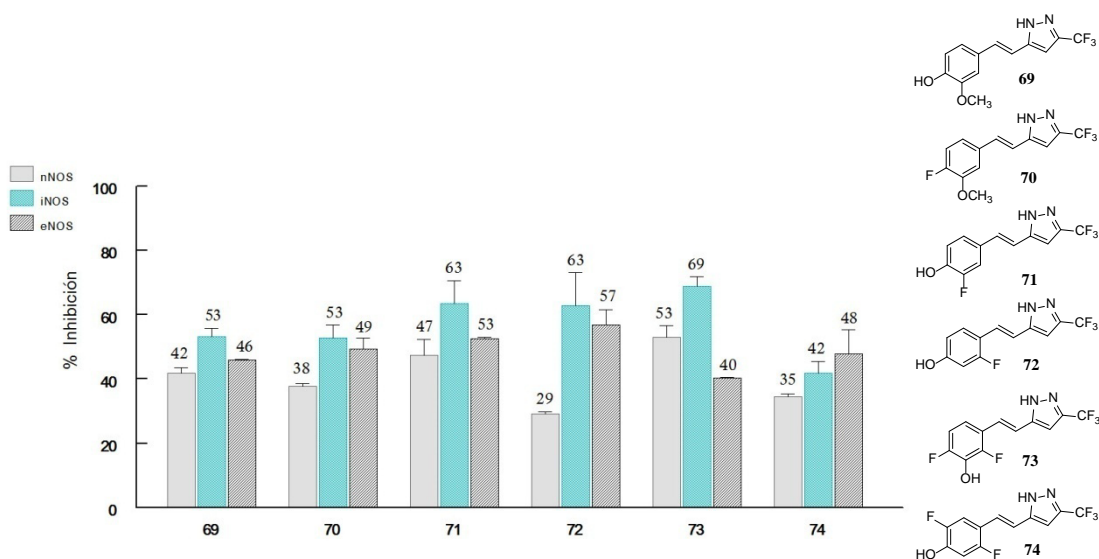


Figura 73. Porcentaje de inhibición de la actividad de nNOS, iNOS y eNOS en presencia de los pirazoles hemicurcuminoides **69-74** ($50 \mu\text{M}$ en DMSO) comparados con el control (0% de inhibición). $P < 0.001$ vs control.

Si analizamos todos los resultados obtenidos podemos concluir que los pirazoles CF_3 sustituidos (**69-74**) presentan en general menores porcentajes de inhibición para las tres isoformas siendo también poco selectivos. Entre los pirazoles de la primera serie (**32-37**) podemos destacar al derivado de curcumina **32**, al metil sustituido **33** y al fenil sustituido **35** siendo buenos inhibidores aunque poco selectivos. Entre los pirazoles fenil sustituidos de la segunda serie (**64-68**) destaca **66** como buen inhibidor de nNOS e

iNOS, aunque el pirazol que mejor resultados ofrece es **65** dado que no solo es un excelente inhibidor de iNOS (84%) sino que es selectivo frente a las otras dos isoformas (37%) (Figura 74).

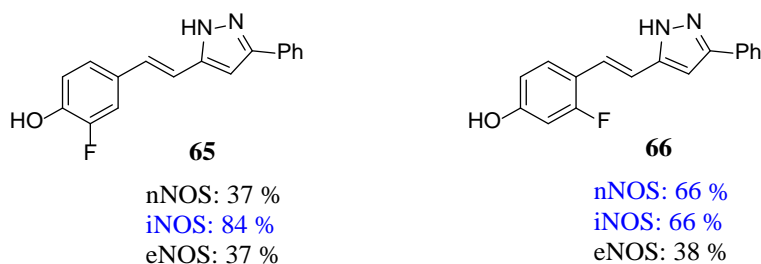


Figura 74. Compuestos que han mostrado mejores resultados como inhibidores de NOS (en azul los porcentajes de inhibición más destacables).

4.4.2 Efectos de los pirazoles curcuminoides en células cancerosas y en la expresión de genes relacionados con la telomerasa

Los telómeros, identificados por primera vez en 1938 por H. J. Muller [110], son estructuras nucleoproteicas no codificantes que constituyen las extremidades de los cromosomas y cuya longitud predice la capacidad replicativa de las células. Protegen los extremos de los cromosomas de los mecanismos de reparación y degradación del ADN y mantienen su integridad estructural impidiendo la fusión entre sus extremos [111]. Los telómeros humanos contienen aproximadamente de 500 a 2.000 repeticiones de la secuencia TTAGGG (Figura 75), es decir de 3.000 a 12.000 pares de bases [112].

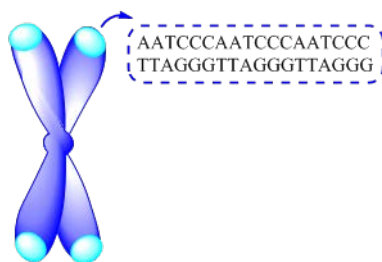


Figura 75. Ubicación de los telómeros en los cromosomas donde se aprecia la secuencia TTAGGG repetida en los telómeros humanos.

En 1973 Olovnikov describió por primera vez la correlación directa existente entre la longitud de los telómeros y la longevidad de los humanos [113]. Durante el proceso de replicación celular, la ADN polimerasa requiere de un cebador de ARN de unos 8-12 nucleótidos que proporcione el extremo 5' de la nueva hebra y siempre lee el ADN en sentido 3'→5', sintetizando las nuevas hebras en sentido 5'→3'. Esto provoca que el extremo 5' de la nueva hebra se vaya acortando progresivamente en cada replicación,

por lo que los telómeros sufren una pérdida neta de 50-100 pares de bases en cada ciclo celular [114]. En la Figura 76 se esquematiza el acortamiento telomérico después de una replicación celular. La acción de ciertos oncogenes u otros factores, como el estrés [115], la obesidad y el tabaquismo [116], también pueden provocar el acortamiento telomérico.

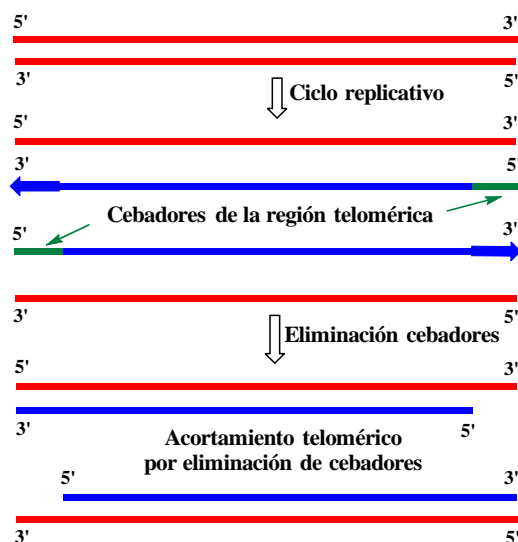


Figura 76. Acortamiento de los telómeros tras la replicación celular.

Pese a que el acortamiento del telómero no implica necesariamente ninguna patología, ya que esta región del ADN no es codificante, cuando la longitud telomérica no es lo suficientemente larga como para preservar la integridad del cromosoma, la célula entra en fase crítica lo que provoca la senescencia o apoptosis [117]. Sin embargo, la activación de la telomerasa en las células tumorales permite sobrepasar esta fase crítica [118].

La telomerasa es una enzima que impide que las células envejecan, provocando el alargamiento telomérico. Fue identificada por primera vez por Greider y Blackburn en 1985 [119] y cuatro años después Morin describió la actividad de la telomerasa en células humanas [120]. Además de encargarse del alargamiento telomérico, la telomerasa también tiene otras funciones, como las de mejorar la capacidad de reparación del ADN, suprimir genes que controlan el daño ocasionado en el ADN, promocionar el crecimiento y la proliferación celular e inhibir la apoptosis. Está formada por una subunidad de ARN, que sirve como molde para la síntesis del ADN telomérico, llamada hTR o TERC (human telomerase RNA), otra subunidad proteica catalítica con actividad transcriptasa reversa, conocida como hTERT (human telomeric end reverse transcriptase) y una proteína asociada denominada TEP1 [121]. Un cuarto

componente, denominado DKC1, está implicado en la estabilidad y plegamiento de hTR [122]. La telomerasa utiliza su componente ARN como molde para alargar los extremos 3' de las cadenas sencillas teloméricas, añadiendo ADN en la dirección 5'→3' [123]. Luego, una ADN polimerasa sintetiza las nuevas secuencias complementarias, impidiendo así el acortamiento telomérico (Figura 77).

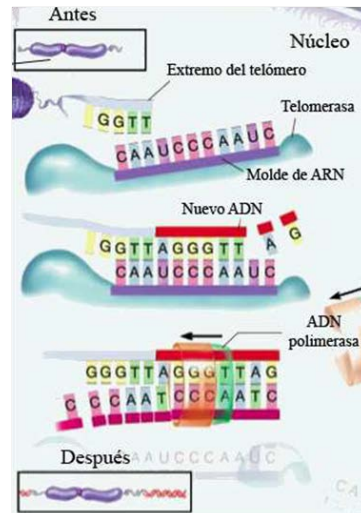


Figura 77. Modo de acción de la telomerasa.

En células somáticas la telomerasa se encuentra en niveles muy bajos, por lo que no es capaz de alargar los telómeros, debido a ello la mayoría de las células humanas tienen un tiempo de vida de tan solo unas 100 divisiones [124]. Sin embargo, alrededor del 90% de los tumores malignos presentan actividad telomerasa [125], la cual va agregando nucleótidos en cada ciclo celular lo que permite la regeneración de los telómeros y dota de inmortalidad a las células tumorales [126]. Algunos tumores son capaces de mantener la longitud de sus telómeros en ausencia de actividad de la telomerasa por un mecanismo denominado alargamiento alternativo de los telómeros ALT (alternative lengthening of telomeres) [127], posibilitando la proliferación celular a largo plazo. Por otro lado, las células proliferantes de cáncer presentan menor longitud telomérica que las células somáticas normales. Los telómeros cortos permanecen más tiempo en estado lineal, por lo que el acceso de la telomerasa al extremo cromosómico, durante la fase S del ciclo celular (duplicación del ADN y de las proteínas asociadas), se ve facilitado [128].

La subunidad hTR de la telomerasa se encuentra expresada en todas las células del organismo humano, mientras que la parte proteica hTERT únicamente se encuentra expresada en las células tumorales [129], por lo que la regulación transcripcional de la expresión génica de hTERT representa, según diversos estudios, la etapa limitante en el

proceso de activación de la telomerasa [130]. También se ha visto que hTERT únicamente se expresa en la fase S del ciclo celular y se ha comprobado que la habilidad para expresar la telomerasa y mantener el ADN telomérico es un paso crucial en la carcinogénesis [131]. Existen una serie de factores transcripcionales que participan en la expresión génica de *hTERT*, entre los que se encuentra el protooncogen *c-Myc*. Varios estudios sugieren que *c-Myc* activa a la telomerasa induciendo expresión de hTERT [132]. Otros estudios han demostrado que el gen *hTERT* contiene numerosos sitios de unión para *c-Myc*, que pueden mediar la activación transcripcional del gen [133]. El gen *c-Myc* también se encuentra sobreexpresado en multitud de tumores humanos y, al ser un factor transcripcional de *hTERT*, aumenta indirectamente la actividad de la telomerasa, provocando consecuentemente la inmortalidad de las células tumorales.

En base a lo descrito anteriormente, y como un estudio inicial de la potencial actividad de nuestros pirazoles curcuminoides **32**, **35** y **64-74** como inhibidores de la activación de la telomerasa, hemos investigado su capacidad para inhibir la proliferación de células tumorales, así como su efecto sobre la expresión génica de *hTERT* y *c-Myc* [134].

4.4.2.1 Determinación de la citotoxicidad

La actividad citotóxica de los pirazoles **32**, **35** y **64-74** y de curcumina (**1**), fue determinada en tres líneas celulares tumorales: la de adenocarcinoma de colon humano (HT-29), la de adenocarcinoma de mama (MCF-7) y la de adenocarcinoma de cuello uterino (HeLa); así como en una línea celular no tumoral: la línea de células de riñón embrionario humano (HEK-293). La Tabla 28 muestra los valores de citotoxicidad para los compuestos **32**, **35** y **64-74**, expresados como la concentración del compuesto (μM) que causa un 50% de inhibición del crecimiento celular (IC_{50}). La curcumina se incluyó con fines comparativos. La Tabla 28 muestra además los coeficientes α , β y γ , obtenidos dividiendo los valores IC_{50} de la línea celular no tumoral por los de la HT-29, la MCF-7 o la línea celular HeLa, respectivamente. Cuanto mayor sea el valor de cualquiera de los coeficientes, mayor será el margen de seguridad terapéutica del compuesto en la línea celular correspondiente.

Tabla 28. Citotoxicidad expresada en valores de IC_{50} (μM) y coeficientes de selectividad para los compuestos **1**, **32**, **35** y **64-74** ^a.

Comp.	HT-29	MCF-7	HeLa	HEK-293	α^b	β^c	γ^d
1	13.6 ± 2.5	18.3 ± 1.8	11.0 ± 4.0	10.8 ± 0.7	0.8	0.6	1.0
32	4.6 ± 1.4	11.1 ± 0.4	1.7 ± 0.6	0.72 ± 0.35	0.2	0.1	0.4
35	22.4 ± 1.2	13.8 ± 1.4	3.8 ± 0.5	5.3 ± 1.9	0.2	0.4	1.4
64	19.0 ± 7.0	26.0 ± 6.0	18.0 ± 0.6	28.0 ± 5.0	1.5	1.1	1.6
65	>100	>100	32.0 ± 3.0	53.1 ± 0.5	0.5	<0.5	1.7
66	21.7 ± 4.4	27.2 ± 1.5	36.1 ± 3.4	32.6 ± 3.4	1.5	1.2	0.9
67	33.0 ± 6.0	36.3 ± 1.1	16.0 ± 0.6	47.0 ± 5.0	1.4	1.3	2.9
68	39.0 ± 7.0	94.4 ± 2.4	34.82 ± 0.19	43.0 ± 9.0	1.1	0.5	1.2
69	23.8 ± 2.7	75.0 ± 5	7.9 ± 2.9	31.0 ± 0.7	1.3	0.4	3.9
70	4.6 ± 1.0	13.7 ± 2.5	9.5 ± 2.2	2.9 ± 0.6	0.6	0.2	0.3
71	6.7 ± 0.4	90.6 ± 2.7	33.0 ± 5.0	48.2 ± 2.4	7.2	0.5	1.5
72	13.0 ± 2.2	32.2 ± 0.6	11.4 ± 0.3	26.0 ± 3.0	2.0	0.8	2.3
73	>100	>100	26.0 ± 3.0	50.0 ± 7.0	<0.5	<0.5	1.9
74	27.7 ± 2.6	87.5 ± 0.9	15.8 ± 1.8	13.69 ± 0.17	0.5	0.2	0.9

a) Valores representados como la media (\pm SD) de tres medidas distintas llevadas a cabo como se describe en la sección experimental. b) $\alpha = IC_{50}$ (HEK-293) / IC_{50} (HT-29). c) $\beta = IC_{50}$ (HEK-293) / IC_{50} (MCF-7). d) $\gamma = IC_{50}$ (HEK-293) / IC_{50} (HeLa).

La citotoxicidad de los derivados curcuminoides **1**, **32**, **35**, **64-74** está en un rango micromolar bajo. En cuanto a la línea HT-29, los compuestos **32**, **70** y **71** muestran valores de IC_{50} inferiores a los de la curcumina; lo mismo sucede para los compuestos **32**, **35** y **70** para las células MCF-7 y en el caso de **32**, **35**, **69** y **70** respecto a la línea celular HeLa. Entre éstos, los compuestos **32** y **70** son los que combinan alta citotoxicidad hacia todas las líneas celulares tumorales estudiadas (Figura 78) presentando ambos valores similares de coeficientes de selectividad, si bien es cierto que son inferiores a la unidad en todos los casos.

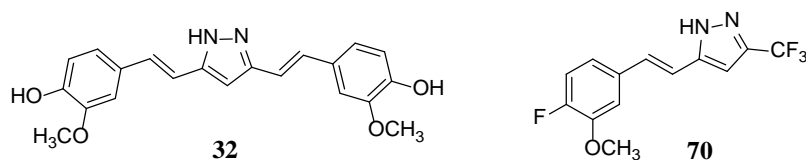


Figura 78. Compuestos que muestran alta citotoxicidad ante las líneas celulares tumorales estudiadas.

4.4.2.2 Efecto de pirazoles curcuminoides seleccionados sobre la inhibición de la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc*

Con el fin de determinar si los pirazoles curcuminoides objeto de estudio son capaces de inhibir la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc* se realizó un análisis de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR, del inglés reverse transcription polymerase chain reaction) empleando células tumorales HeLa [135]. El grado de expresión génica se cuantificó usando el programa *Image J*, utilizando como gen de referencia o endógeno la β -actina. Los valores se normalizaron en base a los datos recogidos a partir de la muestra de células tratadas únicamente con DMSO. Los compuestos seleccionados fueron **1**, **32**, **35**, **64**, **67**, **69**, **70** y **72-74** porque exhibían una citotoxicidad razonablemente buena hacia las células HeLa (valores de IC_{50} por debajo de $30 \mu M$). Para estos ensayos, se emplearon concentraciones inferiores a los valores de IC_{50} hacia dicha línea celular. Por lo tanto, las concentraciones fueron siempre $10 \mu M$ excepto para el compuesto **32**, que se utilizó a una concentración de $1 \mu M$, y el compuesto **35**, que se empleó una concentración de $2 \mu M$, debido a su mayor citotoxicidad frente a las células HeLa.

Los resultados para los compuestos seleccionados se representan en la Figura 79, mostrándose el porcentaje de expresión del gen *hTERT* tras 48 h de incubación en presencia de DMSO (experimento control) y en presencia de cada uno de los compuestos investigados.

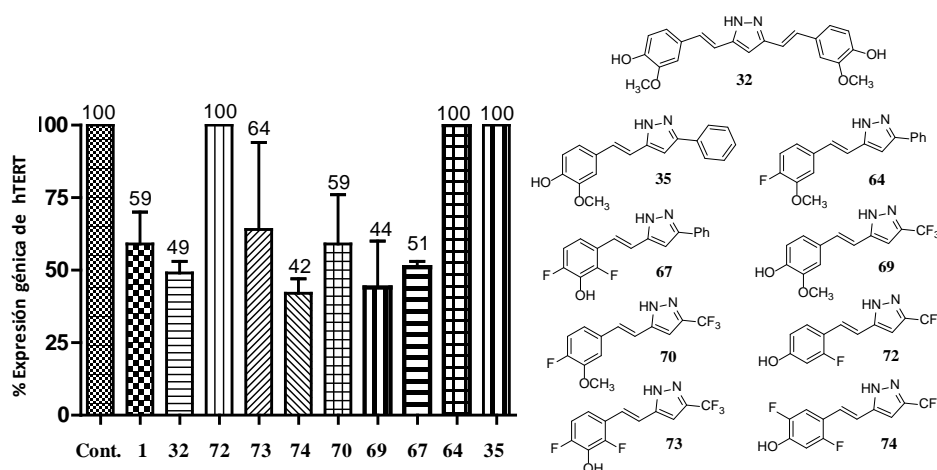


Figura 79. Porcentaje de expresión del gen *hTERT* en células HeLa. La concentración de todos los compuestos es de $10 \mu M$ excepto $1 \mu M$ para **32** y $2 \mu M$ para **35**. Datos expresados como la media de tres experimentos realizados por duplicado $\pm SEM$; $P < 0.001$ vs control.

Los compuestos **32** y **67** son capaces de reducir la expresión del gen *hTERT* al 49% y 51%, respectivamente, un valor mayor que el mostrado por la curcumina (**1**) (59%). Sin embargo, los compuestos más notables son el **74** y el **69**, que muestran la mayor actividad inhibitoria en la expresión del gen *hTERT* (42% y 44% de expresión respectivamente).

Con el fin de determinar si los compuestos estudiados eran capaces de regular la expresión del gen *c-Myc*, se realizó de nuevo un análisis RT-qPCR en células tumorales HeLa. Las células se incubaron durante 48 h en presencia de DMSO (control) y 10 μM de cada uno de los compuestos estudiados, excepto 1 μM para **32** y 2 μM para **35**. Los compuestos **32**, **69**, **70** y **74** muestran valores de inhibición de la expresión del gen *c-Myc* del 76%, 69%, 82% y 79% respectivamente, una inhibición mucho mayor que la mostrada por la curcumina (**1**), que inhibe un 59%. Una vez más, los compuestos **72**, **64** y **35** no muestran disminución significativa en la expresión del gen *c-Myc* (Figura 80).

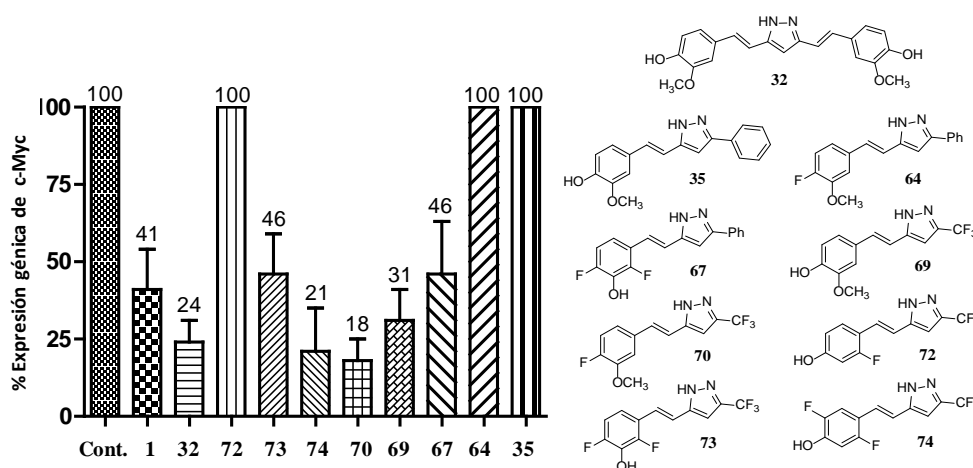


Figura 80. Porcentaje de expresión del gen *c-Myc* en células HeLa. La concentración de todos los compuestos es de 10 μM excepto 1 μM para **32** y 2 μM para **35**. Datos expresados como la media de tres experimentos realizados por duplicado \pm SEM; $P < 0.001$ vs control.

El porcentaje de expresión del gen *hTERT* frente al porcentaje de expresión del gen *c-Myc* se representa gráficamente en la Figura 81. Los compuestos **32**, **69** y **74**, con niveles de inhibición relativamente altos en la expresión de ambos genes, se localizan en el cuadrante inferior izquierdo. Esta correlación podría deberse a que estos compuestos son capaces de disminuir la expresión del gen *hTERT* al interferir en la expresión del gen *c-Myc*, ya que éste codifica un factor de transcripción que controla la expresión de

hTERT. Es decir, que controlan la producción génica de *hTERT* a través del control de la producción del factor de transcripción *c-Myc*.

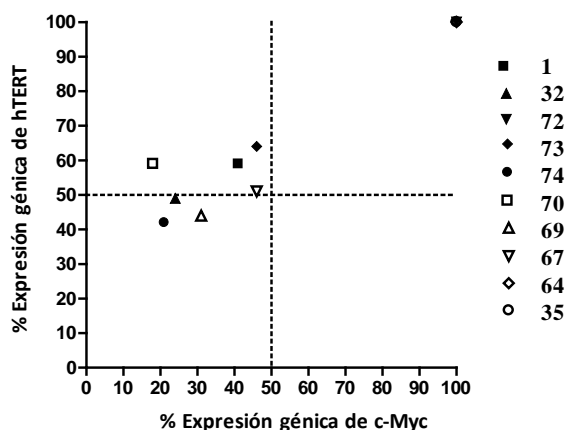


Figura 81. Porcentaje de la expresión génica de *hTERT* vs *c-Myc*.

El compuesto **32**, a una concentración de 1 μM , y los compuestos **69** y **74**, ambos a una concentración de 10 μM , son capaces de disminuir ambas expresiones de genes por debajo del cincuenta por ciento. Además, estos compuestos presentan mejores características que la curcumina a una concentración de 10 μM .

En resumen, si comparamos los pirazoles estudiados frente a curcumina (**1**), se puede afirmar que la presencia del anillo de pirazol en las estructuras curcuminoides mejora las propiedades biológicas estudiadas en este apartado. Además, los compuestos **74**, **70** y **69**, que contienen un grupo trifluorometilo, tienen un mejor comportamiento que los pirazoles **35**, **64** y **68** que llevan un sustituyente fenilo. De todos los compuestos ensayados, destacan **32**, **69** y **74** mostrando mejores porcentajes de inhibición de la expresión de *hTERT* y *c-Myc* que curcumina (**1**).

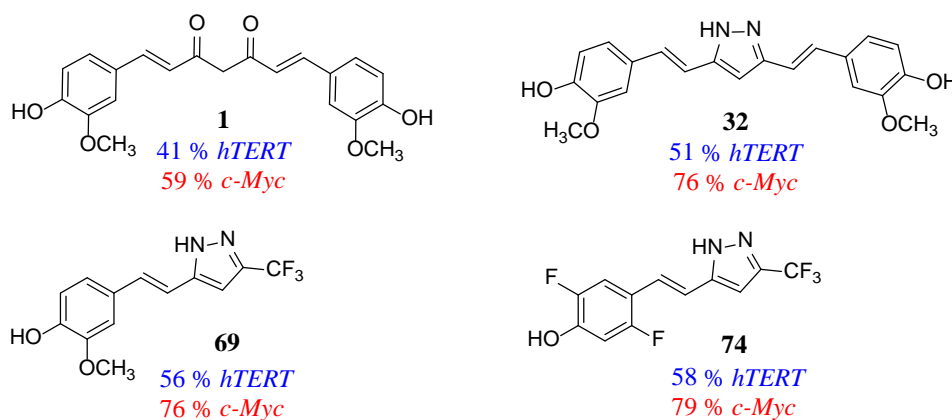


Figura 82. Compuestos que presentan mayor actividad inhibitoria, expresados como porcentaje de inhibición de la expresión de los genes *hTERT* (azul) y *c-Myc* (rojo).

4.5 RESUMEN Y CONCLUSIONES

- Se han preparado dieciséis pirazoles hemicurcuminoideos (**36-37** y **64-74**), junto con el pirazol derivado de la curcumina **32**, de ellos, once han sido sintetizados por primera vez (**64-74**) a partir de las β -dicetonas hemicurcuminoideas correspondientes. En términos generales los rendimientos son buenos, siendo superiores para la serie de derivados trifluorometilo que para los de las series fenilo y metilo.
- El estudio estructural de los pirazoles hemicurcuminoideos sintetizados se ha llevado a cabo mediante RMN en disolución y en estado sólido, así como difracción de rayos X. Las estructuras de rayos X de los compuestos **64**, **65** y **66** han sido descritas por primera vez. Los datos de RMN en estado sólido indican la presencia de una única forma tautomérica para los pirazoles fenil sustituidos **35** y **64-68**, correspondiendo al tautómero mayoritario detectado en disolución, y también de acuerdo con la determinación de la estructura de rayos X de **64**, **65** y **66**: el tautómero **a** con el grupo estirilo en posición 5. Pese a que no se obtuvieron cristales adecuados para difracción de rayos X de los trifluorometil pirazoles **69-74**, los cálculos teóricos realizados sugieren que para esta serie la forma tautomérica mayoritaria es de nuevo el tautómero **a**.
- Con el fin de determinar las propiedades antiinflamatorias y anticarcinogénicas de los pirazoles hemicurcuminoideos sintetizados, se han llevado a cabo dos ensayos: la determinación de la capacidad inhibidora de la actividad de la sintasa del óxido nítrico (NOS) y la determinación de la capacidad inhibidora de la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc* relacionados con la telomerasa.

Respecto a la inhibición de las distintas isoformas de la NOS, entre los pirazoles de la primera serie (**32-37**) destacan los compuestos **32**, **33** y **35** como buenos inhibidores aunque poco selectivos. Los compuestos de la serie fenil sustituida (**64-68**) presentan mayor inhibición que los pirazoles trifluorometil sustituidos. El pirazol hemicurcuminoide que mejores resultados ofrece es **65** mostrando no solo que es un excelente inhibidor de iNOS (84%), sino que es además selectivo frente a las otras dos isoformas (37%).

En cuanto a la citotoxicidad de los pirazoles **32**, **35** y **64-74** frente a las líneas de células tumorales estudiadas (HT-29, MCF-7 y HeLa) destacan los compuestos **32** y **70** dado que poseen alta citotoxicidad frente a las tres líneas celulares. Los

compuestos **32**, **69** y **74** han mostrando mejores porcentajes de inhibición de la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc* que curcumina (**1**).

4.6 PARTE EXPERIMENTAL

4.6.1 Materiales y métodos

El análisis estructural de los distintos compuestos sintetizados se realizó mediante el empleo de las técnicas e instrumentos que se indican en el apartado 3.6.

¹⁵N RMN en disolución y en estado sólido. Los espectros de ¹⁵N (40.56 MHz) RMN se obtuvieron en un espectrómetro Bruker DRX-400 (9.4 T). Para referenciar el ¹⁵N se utilizó CH₃NO₂ externo disuelto en el disolvente adecuado. Los espectros de ¹⁵N (40.60 MHz) CPMAS RMN se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker WB-400 a 300K, usando una sonda DVT de 4 mm. Las muestras han sido cuidadosamente molidas y compactadas en rotores de óxido de zirconio de 4 mm de diámetro con tapas de KeI-F. Las condiciones operativas implican 2.9 μs, pulsos de ¹H de 90° y desacoplamiento de campo de 86.2 kHz con una secuencia TPPM. Los desplazamientos químicos (δ en ppm) están referidos al ¹⁵NH₄Cl, los cuáles fueron transformados a la escala de nitrometano mediante la relación: δ ¹⁵N (CH₃NO₂) = δ ¹⁵N (NH₄Cl) -338.1 ppm. Para ¹⁵N CPMAS los parámetros de adquisición fueron: anchura espectral, 40 kHz; tiempo de repetición, 5-100 s; tiempo de adquisición, 35 ms; tiempo de contacto, 9 ms; y velocidad de giro 6 kHz.

Difracción de rayos X. La recolección de datos para los compuestos **64** y **65** se llevó a cabo a temperatura ambiente en un difractómetro Bruker SMART CCD y en un difractómetro Xcalibur Atlas CCD para **66**, utilizando en todos los casos radiación Mo-K con un monocromador de grafito (λ = 0.71073 Å) funcionando a 50 kV y 30 mA para **64** y **65**, y a 50 kV y 40 mA para **66**. Los tiempos de exposición fueron 20 s para **64** y **65**, y de 3.37 s para **66**. Las estructuras fueron resueltas por métodos directos y refinadas por el método de mínimos cuadrados en F2 utilizando (SHELXL-97).

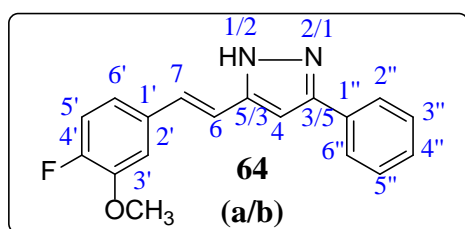
4.6.2 Síntesis de pirazoles hemicurcuminoídes

De acuerdo con la nomenclatura IUPAC en todos los compuestos con grupos hidroxilo fenólicos, el grupo fenol es el de mayor prioridad. Sin embargo, al objeto de facilitar la comparación entre las estructuras de los diferentes pirazoles, en la memoria todos los compuestos aparecen nombrados como derivados de pirazol. Así, por ejemplo, el compuesto **65** que se denomina (*E*)-3-fluoro-4-(2-(3-fenil-1*H*-pirazol-5-il)vinil)fenol según las normas IUPAC, aparece como (*E*)-3(5)-[β-(2-fluoro-4-hidroxifenil)-etenil]-5(3)-fenil-1*H*-pirazol.

Los pirazoles (*E*)-3,5-bis[β -(4-hidroxi-3-metioxfenil)-etenil]-1*H*-pirazol (**32**, pf: 217.1 °C), (*E*)-3(5)-[β -(4-hidroxi-3-metoxifenil)-etenil]-5(3)-metil-1*H*-pirazol (**33**, pf: 141.6 °C), (*E*)-3(5)-[β -(4-hidroxi-3-metoxifenil)-etenil]-4,5(3)-dimetil-1*H*-pirazol (**34**, pf: 176.1 °C), (*E*)-3(5)-[β -(4-hidroxi-3-metioxfenil)-etenil]-5(3)-fenil-1*H*-pirazol (**35**, pf: 142.9 °C), (*E*)-3(5)-[β -(3,4-dimetoxifenil)-etenil]-5(3)-fenil-1*H*-pirazol (**36**, pf: 173.4 °C), (*E*)-3(5)-[β -(3,4-dimetoxifenil)-etenil]-4-metil-5(3)-fenil-1*H*-pirazol (**37**, pf: 182.0 °C), fueron sintetizados según se describe en la literatura [27].

Procedimiento general de síntesis de pirazoles hemicurcuminoides

En un matraz de fondo redondo, provisto de un refrigerante de reflujo, se disponen la β -dicetona (**27**, **30-31**, **52-54**) (1 mmol), hidrato de hidrazina 98% (1.5 mmol) y ácido acético (5 mL). Tras calentar a reflujo durante 2 h, la mezcla resultante se vierte sobre agua. El precipitado formado se filtra, se lava con agua y se seca. El sólido obtenido se purifica mediante una columna cromatográfica de gel de sílice utilizando acetato de etilo/hexano como eluyente o mediante cristalización en el disolvente apropiado.

(E)-3(5)-[β -(4-Fluoro-3-metoxifenil)-etenil]-5(3)-fenil-1*H*-pirazol (**64**)

El compuesto **64**, preparado a partir de (2*Z*,4*E*)-5-(4-fluoro-3-metoxifenil)-3-hidroxi-1-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (**30**), se aísla tras su purificación mediante cristalización en CH₂Cl₂/hexano como cristales amarillos (499 mg, 55%).

Pf: 150.3 °C.

Anal. Calc. para C₁₈H₁₅FN₂O: C, 73.45; H, 5.14; N, 9.52. Experimental: C, 73.13; H, 5.13; N, 9.60.

¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.29 (sa, 1H, 43% NH), 13.10 (sa, 1H, 57% NH), 7.80 (m, 2H, 57% H2''/H6''), 7.77 (m, 2H, 43% H2''/H6''), 7.20-7.50 (m, 4H, H2', H3''/H5'' y H4''), 7.06-7.26 (m, 4H, H6, H7, H5', H6'), 6.90 (s, 1H, 57% H4), ~7.0 (sa, 1H, 43% H4), 3.90 (s, 3H, OCH₃).

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ 151.3 (¹*J*_F \approx 249.5 Hz, 57%, C4'), 150.9 (C3), 151.1 (¹*J*_F \approx 246.1 Hz, 43%, C4'), 147.4 (²*J*_F = 10.9 Hz, C3'), 142.9 (43%, C5), 142.0 (57%, C5), 134.1 (43%, C1''), 133.5 (57%, C1''), 129.0 (C1', 43% C3''/C5''), 128.9 (57%, C7), 128.7 (57% C3''/C5''), 128.3 (43%, C7), 128.1 (43%, C4''), 127.4 (57%, C4''), 125.1 (C2''/C6''), 121.5 (43%, C6'), 119.4 (57% C₆, 43% C6), 116.0 (²*J*_F \approx 23, 43%, C5'), 115.9 (²*J*_F \approx 18, 57% C₅, 57% C6), 110.9 (C2'), 100.3 (57%, C4), 99.4 (43%, C4), 56.0 (OCH₃).

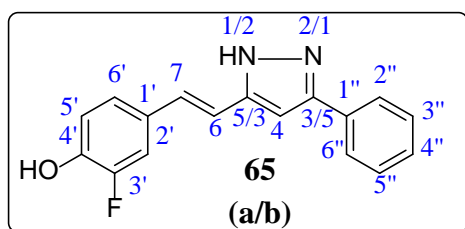
¹³C RMN (100.76 MHz, CPMAS): δ 152.1 (C3, C4'), 148.2 (C3'), 142.1 (C5), 133.6 (C1', C1''), 130.5 (C7), 128.3 (C3''/C5'', C4''), 124.3/127.2 (C2''/C6''), 118.4 (C6'), 115.0 (C6), 114.2 (C5'), 113.8 (C2'), 102.7 (C4), 56.7 (OCH₃).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆): δ -135.4 (57%), -136.3 (43%).

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -132.6.

¹⁵N RMN (40.54 MHz, DMSO-*d*₆): δ -177.6 (57%, N1), -179.2 (43%, N1).

¹⁵N RMN (40.60 MHz, CPMAS): δ -94.7 (N2), -181.1 (N1).

(E)-3(5)-[β-(3-Fluoro-4-hidroxifenil)-etenil]-5(3)-fenil-1*H*-pirazol (**65**)

El compuesto **65**, preparado a partir de (2*Z*,4*E*)-5-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-3-hidroxi-1-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (**31**), se aísla tras su purificación mediante cristalización en EtOH/CH₂Cl₂/hexano como un sólido amarillo (500 mg, 51%).

Pf: 231.3 °C.

Anal. Calc. para C₁₇H₁₃FN₂O: C, 72.85; H, 4.67; N, 9.99. Experimental: C, 72.54; H, 4.70; N, 9.89.

¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.25 (40%, NH), 13.05 (60%, NH), 10.12 (60%, OH), 10.03 (40%, OH), 7.80 (60%, H2"/H6"), 7.76 (40%, H2"/H6"), 7.24-7.51 (H2', H3"/H5", H4"), 6.90-7.24 (40%, H4, H6, H7, H5', H6'), 6.85 (sa, 60% H4).

¹³C NMR (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ 151.2 (¹J_{F3'} = 240.8 Hz, C3'), 151.1 (40%, C3), 150.9 (60% C3), 145.0 (²J_{F3'} = 12.3 Hz, 60% C4'), 144.5 (²J_{F3'} = 12.7 Hz, 40% C4'), 142.8 (40% C5), 142.2 (60% C5), 133.6 (60% C1"), 129.3 (40% C1'), 129.0 (60% C1' y 40% C1"), 128.8 (40% C3"/C5"), 128.6 (60% C3"/C5"), 128.5 (40% C7 y 40% C4"), 128.1 (60% C7), 127.4 (60% C4"), 125.1 (C2"/C6"), 123.4 (60% C6'), 123.1 (40% C6'), 119.7 (40% C6 y 40% C5'), 117.9 (60% C5'), 114.0 (60% C6), 113.4 (²J_F = 18.6, C2'), 100.0 (60% C4), 99.3 (40% C4).

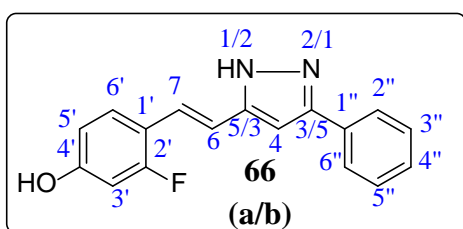
¹³C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 156.9/154.6 (C3'), 151.8 (C3), 144.9 (C4'), 143.1 (C5), 132.3 (C1"), 131.6 (C1'), 130.4 (C7), 128.1 (C3"/C5", C4"), 126.3 (C2"/C6"), 125.6 (C6), 122.9 (C6'), 114.7 (C5'), 109.1 (C2'), 97.9 (C4).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆): δ -136.2 (³J_{H2'} = ⁴J_{H5'} = 10.2 Hz, 40% F3'), -136.0 (³J_{H2'} = ⁴J_{H5'} = 10.8 Hz, 60% F3').

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -129.2.

¹⁵N RMN (40.54 MHz, DMSO-*d*₆): δ -177.3 (60% N1), -179.7 (40% N1).

¹⁵N RMN (40.60 MHz, CPMAS): δ -120.0 (N2), -168.5 (N1).

(E)-3(5)-[β -(2-Fluoro-4-hidroxifenil)-etenil]-5(3)-fenil-1H-pirazol (**66**)

El compuesto **66**, preparado a partir de (2*Z*,4*E*)-5-(2-fluoro-4-hidroxifenil)-3-hidroxi-1-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (**52**), se aísla mediante una columna cromatográfica de gel de sílice utilizando la mezcla de acetato de etilo/hexano

(7:3) como eluyente. Tras la cristalización en EtOH/H₂O del sólido obtenido, se obtienen cristales amarillos (290 mg, 82%).

Pf: 217.3 °C.

Anal. Calc. para C₁₇H₁₃FN₂O: C, 72.85; H, 4.67; N, 9.99. Experimental: C, 72.31; H, 4.70; N, 9.89.

¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.23 (s, 33%, 1H, NH), 13.06 (s, 67%, 1H, NH), 10.12 (sa, 1H, OH), 7.80 (m, 2H, H2''/H4''), 7.53 (m, 1H, H6'), 7.41 (m, 2H, H3''/H5''), 7.17 (d, ³*J*_{H6} = 16.9 Hz, 1H, H7), 6.99 (d, ³*J*_{H7} = 16.9 Hz, 1H, H6), 7.30 (m, 1H, H4''), 6.91 (s, 1H, H4), 6.65 (dd, ³*J*_{H6'} = 8.5 Hz, ⁴*J*_{H3'} = 2.4 Hz, 1H, H5'), 6.60 (dd, ³*J*_{F2'} = 12.8 Hz, ⁴*J*_{H5'} = 2.4 Hz, 1H, H3').

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ 160.5 (¹*J*_{F2'} = 247.3 Hz, C2'), 151.0 (33%, C3), 158.7 (C4'), 150.9 (67%, C3), 142.9 (33% C5), 142.3 (67% C5), 133.6 (C1''), 128.7 (C3''/C5''), 128.2 (C6'), 127.4 (C4''), 125.1 (C2''/C4''), 122.1 (C1'), 122.0 (C7), 114.9 (C6), 112.3 (C5'), 102.8 (²*J*_{F2'} = 24.3 Hz, C3'), 100.0 (67 % C4), 99.3 (33% C4).

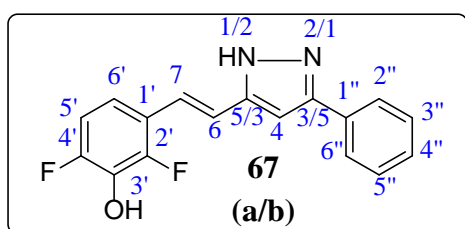
¹³C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 161.4 /158.8 (C2'), 156.2 (C4'), 152.2 (C3), 144.0 (C5), 130.2 (C1''), 128.5 (C6'), 126.5 (C3''/C5'', C4''), 124.3 (C2''/C4''), 122.0 (C7), 117.9 (C6, C1'), 113.6 (C5'), 108.0 (C3'), 96.9 (C4).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆): -116.1 (67% F2'), -116.8 (33% F2').

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -107.7.

¹⁵N RMN (40.54 MHz, DMSO-*d*₆): no observado.

¹⁵N RMN (40.60 MHz, CPMAS): δ -111.9 (N2), -177.2 (N1).

(E)-3(5)-[β -(2,4-Difluoro-3-hidroxifenil)-etenil]-5(3)-fenil-1*H*-pirazol (**67**)

El compuesto **67**, preparado a partir de (2*Z*,4*E*)-5-(2,4-difluoro-3-hidroxifenil)-3-hidroxi-1-fenil penta-2,4-dien-1-ona (**53**), se aísla mediante una columna cromatográfica de gel de sílice empleando acetato de etilo/hexano (7:3) como

eluyente, obteniéndose un sólido amarillo pálido (319 mg, 59%).

Pf: 195.9 °C.

Anal. Calc. para C₁₇H₁₂F₂N₂O: C, 68.45; H, 4.05; N, 9.39. Experimental: C, 68.57; H, 4.09; N, 9.22.

¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.33 (46% NH), 13.17 (54% NH), 10.30 (OH), 7.80 (H_{2''}/H_{6''}), 7.42 (H_{3''}/H_{5''}), 7.30 (H_{4''}), 6.98-7.23 (H₄, H₆, H₇, H_{5'}, H_{6'}).

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ 153.3 (46% C₃), 151.7 (¹*J*_{F4'} = 240.6 Hz, C_{4'}), 99.9 (46 % C₄), 150.2 (¹*J*_{F2'} = 245.6 Hz, ³*J*_{F4'} = 5.8 Hz, C_{2'}), 151.0 (54% C₃), 141.8 (54% C₅), 143.0 (46% C₅), 134.0 (²*J*_{F2'} = ²*J*_{F4'} = 16.1 Hz, C_{3'}), 133.5 (C_{1''}), 128.8 (C_{3''}/C_{5''}), 127.6 (C_{4''}), 125.1 (C_{2''}/C_{4''}), 123.6 (C₇), 121.3 (54% C_{1'}), 120.7 (46% C_{1'}), 117.8 (C₆), 115.9 (³*J*_{F2'} = 8.2 Hz, ³*J*_{F4'} = 3.6 Hz, C_{6'}), 111.9 (²*J*_{F4'} = 18.6 Hz, C_{5'}), 100.7 (54% C₄).

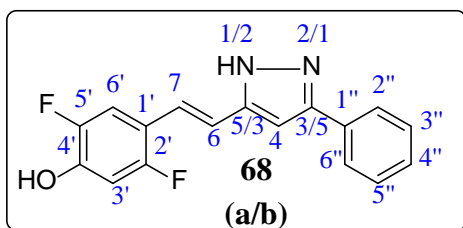
¹³C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 153.7 (C₃), 153.1 (C_{4'}), 150.1 (C_{2'}), 142.5 (C₅), 135.5 (C_{3'}), 132.3 (C_{3''}/C_{5''}), 129.0 (C_{4''}), 126.8 (C_{1''}, C_{2''}/C_{4''}), 123.6 (C₇), 121.7 (C₆, C_{1'}), 119.4 (C_{6'}), 111.2 (C_{5'}), 97.1 (C₄).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆): δ -132.1 (54% F_{4'}), -132.8 (46% F_{4'}), -136.4 (54% F_{2'}), -137.0 (46% F_{2'}).

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -126.8 (F_{4'}), -130.7 (F_{2'}).

¹⁵N RMN (40.54 MHz, DMSO-*d*₆): δ -178.3 (54%, N₁).

¹⁵N RMN (40.60 MHz, CPMAS): δ -93.9 (N₂), -191.7 (N₁).

(E)-3(5)-[β -(2,5-Difluoro-4-hidroxifenil)-etenil]-5(3)-fenil-1*H*-pirazol (**68**)

El compuesto **68**, preparado a partir de (2*Z*,4*E*)-5-(2,5-difluoro-4-hidroxifenil)-3-hidroxi-1-fenil penta-2,4-dien-1-ona (**54**), se aísla mediante una columna cromatográfica de gel de sílice utilizando acetato de etilo/hexano como eluyente

obteniéndose un sólido amarillo pálido (319 mg, 59%).

Pf: 232.6 °C.

Anal. Calc. para C₁₇H₁₂F₂N₂O: C, 68.45; H, 4.05; N, 9.39. Experimental: C, 68.14; H, 4.16; N, 9.20.

¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.28 (sa, 1H, 40% NH), 13.12 (sa, 1H, 60% NH), 10.60 (sa, 1H, OH), 7.80 (m, 2H, H2''/H4''), 7.58 (s, 1H, H6'), 7.42 (m, 2H, H3''/H5''), 7.31 (m, 1H, H4''), 7.15 (d, ³J_{H6} = 16.6 Hz, 1H, H7), 7.06 (d, ³J_{H7} = 16.6 Hz, 1H, H6), 6.99 (s, 1H, 40% H4), 6.91 (s, 1H, 60% H4), 6.78 (dd, ³J_{F2'} = 11.6 Hz, ⁴J_{F5'} = 7.4 Hz, 1H, H3').

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ 155.7 (¹J_{F2'} = 244.6 Hz, C2'), 151.0 (C3), 148.1 (¹J_{F5'} = 236.9 Hz, C5'), 145.7 (C4'), 143.0 (40% C5), 142.0 (60% C5), 133.5 (C1''), 128.7 (C3''/C5''), 128.3 (40% C4''), 127.5 (60% C4''), 125.1 (C2''/C6''), 122.0 (40% C7), 120.8 (60% C7), 120.1 (40% C6), 116.2 (60% C6), 115.3 (40% C1'), 114.9 (60% C1'), 113.4 (²J_{F5'} = 21.1 Hz, ³J_{F2'} = 5.4 Hz, C6'), 105.0 (²J_{F2'} = 26.6 Hz, C3'), 100.6 (60% C4), 99.6 (40% C4).

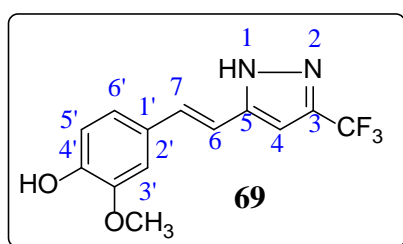
¹³C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 157.5/154.8 (C2'), 153.5/150.9 (C5'), 148.9 (C3), 148.0 (C4'), 143.9 (C5), 130.9 (C4''), 129.3 (C1''), 128.9 (C3''/C5''), 128.1 (C2''/C4''), 124.9/123.7 (C7), 119.8 (C1'), 116.8 (C6), 110.6 (C6'), 109.8 (C3'), 98.4 (C4).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆): δ -122.1 (40% F2'), -121.3 (60% F2'), -140.6 (F5').

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -114.2 (F2'), -134.8 (F5').

¹⁵N RMN (40.54 MHz, DMSO-*d*₆): δ -178.6 (60% N1).

¹⁵N RMN (40.60 MHz, CPMAS): δ -141.1 (N2), -152.2 (N1).

(E)-3(5)-[β -(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-etenil]-5(3)-trifluorometil-1*H*-pirazol (**69**)

El compuesto **69**, preparado a partir de (3*Z*,5*E*)-1,1,1-trifluoro-4-hidroxi-6-(4-hidroxi-3-metoxifenil)hexa-3,5-dien-2-ona (**26**), se aísla mediante cristalización en EtOH/H₂O obteniéndose un sólido blanco (278 mg, 98%).

Pf: 165.0 °C.

Anal. Calc. para C₁₃H₁₁F₃N₂O₂: C, 54.93; H, 3.90; N, 9.86. Experimental: C, 54.63; H, 3.76; N, 9.60.

¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.27 (s, 1H, 4'-OH), 7.18 (d, ³*J*_{H6} = 16.6 Hz, 1H, H7), 7.12 (d, ⁴*J*_{H6'} = 2.0 Hz, 1H, H2'), 6.95 (dd, ³*J*_{H5'} = 8.1 Hz, ⁴*J*_{H2'} = 2.0 Hz, 1H, H6'), 6.78 (d, ³*J*_{H6'} = 8.1 Hz, 1H, H5'), 3.82 (s, 3H, OMe). HMPA-*d*₁₈: δ 14.50 (s, 1H, NH), 10.42 (s, 1H, 4'-OH), 7.50 (d, ³*J*_{H6} = 16.6 Hz, 1H, H7), 7.11 (d, ⁴*J*_{H6'} = 1.8 Hz, 1H, H2'), 7.02 (d, ³*J*_{H7} = 16.6 Hz, 1H, H6), 6.93 (dd, ³*J*_{H5'} = 8.3 Hz, ⁴*J*_{H2'} = 1.8 Hz, 1H, H6'), 6.88 (d, ³*J*_{H6'} = 8.3 Hz, 1H, H5'), 6.85 (s, 1H, H4), 3.80 (s, 3H, OMe).

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ 147.9 (C4'), 147.4 (C3'), 143.2 (C-estirilo), 141.6 (²*J*_{CF₃} = 36.6 Hz, C-CF₃), 132.2 (C7), 127.4 (C1'), 121.8 (¹*J*_F = 268.1 Hz, CF₃), 120.6 (C6'), 115.6 (C5'), 111.3 (C6), 109.7 (C2'), 100.6 (C4), 55.6 (OMe). HMPA-*d*₁₈: δ 149.7 (C4'), 148.8 (C3'), 144.1 (C-estirilo), 141.9 (²*J*_{CF₃} = 36.5 Hz, C-CF₃), 132.5 (C7), 128.0 (C1'), 122.8 (¹*J*_F = 267.6 Hz, CF₃), 120.3 (C6'), 116.0 (C5'), 111.6 (C6 y C2'), 100.6 (C4), 56.1 (OMe).

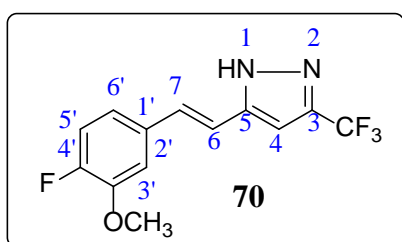
¹³C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 146.3 (C3' y C4'), 143.1 (C-estirilo y C-CF₃), 127.9 (C7 y C1'), 120.3 (CF₃), 115.9 (C6'), 114.4 (C5'), 112.9 (C6), 108.9 (C2'), 104.2 (C4), 55.2 (OMe).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆): δ -60.5 (CF₃). HMPA-*d*₁₈: δ -61.6 (CF₃).

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -61.5 (CF₃).

¹⁵N RMN (40.54 MHz, DMSO-*d*₆): δ No observado. HMPA-*d*₁₈: δ -80.2 (N2), -170.2 (N1).

¹⁵N RMN (40.60 MHz, CPMAS): δ -96.3 (N2), -180.0 (N1).

(E)-3(5)-[β -(4-Fluoro-3-metoxifenil)-etenil]-5(3)-trifluorometil-1*H*-pirazol (**70**)

El compuesto **70**, preparado a partir de (3*Z*,5*E*)-1,1,1-trifluoro-6-(4-fluoro-3-metoxifenil)-4-hidroxihexa-3,5-dien-2-ona (**55**), se aísla mediante cristalización en EtOH/H₂O obteniéndose un sólido blanco (260 mg, 91%).

Pf: 168.0 °C.

Anal. Calc. para C₁₃H₁₀F₄N₂O: C, 54.55; H, 3.52; N, 9.79. Experimental: C, 54.32; H, 3.59; N, 9.85.

¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.34 (dd, ⁴*J*_{H6'} = 2.2 Hz, ⁴*J*_{F4'} = 8.4 Hz, 1H, H2'), 7.27 (d, ³*J*_{H6} = 16.6 Hz, 1H, H7), 7.22 (dd, ³*J*_{F4'} = 11.4 Hz, ³*J*_{H6'} = 8.4 Hz, 1H, H5'), 7.09 (d, ³*J*_{H7} = 16.6 Hz, 1H, H6), 7.08 (ddd, ³*J*_{H5'} = 8.4 Hz, ⁴*J*_{F4'} = 4.5 Hz, ⁴*J*_{H2'} = 2.2, 1H, H6'), 6.88 (s, 1H, H4), 3.89 (s, 3H, OMe).

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ 151.1 (¹*J*_{F4'} = 246.5 Hz, C4'), 147.4 (²*J*_{F4'} = 11.0 Hz, C3'), 142.6 (C-estirilo), 141.7 (²*J*_{CF3} = 36.2 Hz, C-CF₃), 133.0 (⁴*J*_{F4'} = 3.7 Hz, C1'), 131.0 (C7), 121.7 (¹*J*_F = 268.1 Hz, CF₃), 119.8 (³*J*_{H2'} ~ 6, ³*J*_{H7} ~ 6, ³*J*_{F4'} = 6.8 Hz, C6'), 116.2 (²*J*_{F4'} = 18.6 Hz, C5'), 114.6 (C6), 111.2 (³*J*_{H6'} ~ 6.1 Hz, ³*J*_{H7} ~ 6.1 Hz, ³*J*_{F4'} = 1.6 Hz, C2'), 101.3 (C4), 56.0 (OCH₃).

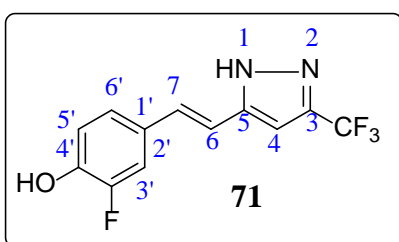
¹³C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 153.1 y 150.6 (C4'), 147.9 (C3'), 144.4 (C-estirilo), 142.6, 141.4, 140.6 (C-CF₃), 132.4 (C1'), 131.7 (C7), 121.5 (CF₃), 121.5 y 116.0 (C6'), 115.5 (C5'), 113.9 (C6), 110.7, 109.4 y 107.6 (C2'), 99.6, 99.1 y 98.7 (C4), 55.1, 54.4 y 53.9 (OCH₃).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆): δ -60.5 (CF₃), -134.7 (ddd, ³*J*_{H5'} = 11.4 Hz, ⁴*J*_{H2'} = 8.4 Hz, ⁴*J*_{H6'} = 4.5 Hz, F4').

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -57.3 (+) (CF₃), -59.4 (-) (CF₃), -131.4, -133.3 y -134.7 (F4').

¹⁵N RMN (40.54 MHz, DMSO-*d*₆): no observado.

¹⁵N RMN (40.60 MHz, CPMAS): δ -97.4 (-) (N2), -102.0 (+) (N2), -169.3 (+) (N1), -173.6 (-) (N1).

(E)-3(5)-[β -(3-Fluoro-4-hidroxifenil)-etenil]-5(3)-trifluorometil-1*H*-pirazol (71)

El compuesto **71**, preparado a partir de (3*Z*,5*E*)-1,1,1-trifluoro-6-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-4-hidroxihexa-3,5-dien-2-ona (**56**), se aísla mediante cristalización en EtOH/H₂O obteniéndose un sólido blanco (239 mg, 88%).

Pf: 204.5 °C.

Anal. Calc. para C₁₂H₈F₄N₂O: C, 52.95; H, 2.96; N, 10.29. Experimental: C, 52.98; H, 3.12; N, 10.41.

¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.71 (s, 1H, NH), 10.14 (s, 1H, 4'-OH), 7.36 (dd, ⁴*J*_{H6'} = 2.0 Hz, ³*J*_{F3'} = 12.5 Hz, 1H, H2'), 7.18 (d, ³*J*_{H6} = 16.7 Hz, 1H, H7), 7.16 (dd, ³*J*_{H5'} = 8.3 Hz, ⁴*J*_{H2'} = 2.0 Hz, 1H, H6'), 6.95 (dd, ³*J*_{H6'} = 8.3 Hz, ⁴*J*_{F3'} = 9.3 Hz, 1H, H5'), 6.83 (s, 1H, H4), 6.92 (d, ³*J*_{H7} = 16.7 Hz, 1H, H6).

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ 151.2 (¹*J*_{F3'} = 241.2 Hz, C3'), 145.4 (²*J*_{F3'} = 12.4 Hz, C4'), 142.8 (C-estirilo), 141.6 (²*J*_{CF3} = 36.9 Hz, C-CF₃), 130.9 (⁴*J*_{F3'} = 1.8 Hz, C7), 127.9 (³*J*_{F3'} = 6.4 Hz, C1'), 123.7 (⁴*J*_{F3'} = 2.9 Hz, C6'), 121.7 (¹*J*_{F3'} = 268.0 Hz, CF₃), 118.0 (³*J*_{F3'} = 3.1 Hz, C5'), 113.6 (³*J*~³*J*~5.5 Hz, ²*J*_{F3'} = 18.7 Hz, C2'), 112.7 (C6), 101.0 (C4).

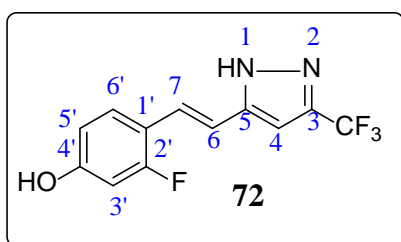
¹³C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 153.4 y 151.0 (C3'), 145.2 (C4'), 143.6 (C-estirilo), 142.1 (C-CF₃), 133.4 (C7), 129.7 (C6'), 127.6 (C1'), 120.0 (CF₃), 117.0 (C5'), 110.3 (C6), 110.3 (C2'), 99.0 (C4).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆): δ -60.5 (CF₃), -135.9 (³*J*_{H2'} = 12.5 Hz, ⁴*J*_{H5'} = 9.3 Hz, F3').

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -57.6 (CF₃), -136.1 (F3').

¹⁵N RMN (40.54 MHz, DMSO-*d*₆): no observado.

¹⁵N RMN (40.60 MHz, CPMAS): δ -102.0 (N2), -172.8 (N1).

(E)-3(5)-[β -(2-Fluoro-4-hidroxifenil)-etenil]-5(3)-trifluorometil-1*H*-pirazol (**72**)

El compuesto **72**, preparado a partir de (3*Z*,5*E*)-1,1,1-trifluoro-6-(2-fluoro-4-hidroxifenil)-4-hidroxi-hexa-3,5-dien-2-ona (**57**), se aísla mediante cristalización en EtOH/H₂O obteniéndose un sólido blanco (204 mg, 75%).

Pf: 223.1 °C.

Anal. Calc. para C₁₂H₈F₄N₂O: C, 52.95; H, 2.96; N, 10.29. Experimental: C, 52.83; H, 2.96; N, 10.26.

¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.73 (s, 1H, NH), 10.20 (s, 1H, 4'-OH), 7.49 (dd, ⁴*J*_{F2'} = 9.2 Hz, ³*J*_{H5'} = 8.5 Hz, H6'), 7.26 (d, ³*J*_{H6} = 16.8 Hz, 1H, H7), 6.96 (d, ³*J*_{H7} = 16.8 Hz, 1H, H6), 6.89 (s, 1H, H4), 6.66 (dd, ³*J*_{H6'} = 8.5 Hz, ⁴*J*_{H3'} = 2.4 Hz, 1H, H5'), 6.61 (dd, ³*J*_{F2'} = 12.9 Hz, ⁴*J*_{H5'} = 2.4 Hz, 1H, H3').

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ 160.7 (¹*J*_{F2'} = 248.5 Hz, C2'), 159.3 (³*J*_{F2'} = 12.2 Hz, C4'), 143.0 (C-estirilo), 141.6 (²*J*_{CF3} = 36.9 Hz, C-CF₃), 128.6 (³*J*_{F2'} = 5.6 Hz, C6'), 124.3 (³*J*_{F2'} = 1.8 Hz, C7), 121.7 (¹*J*_F = 268.3 Hz, CF₃), 114.4 (²*J*_{F2'} = 12.4 Hz, C1'), 113.6 (⁴*J*_{F2'} = 5.6 Hz, C6), 112.3 (⁴*J*_{F2'} = 2.6 Hz, C5'), 102.8 (²*J*_{F2'} = 24.3 Hz, C3'), 101.1 (C4).

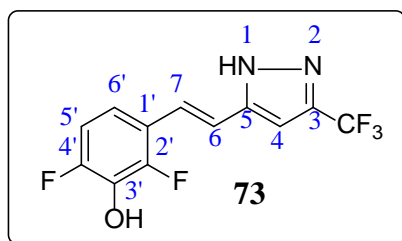
¹³C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 162.0 (-) (C2'), 159.3 (+) (C2'), 157.7 (+) (C4'), 153.2 (-) (C4'), 145.1 (-) (C-estirilo), 143.1 (+) (C-estirilo), 141.7 (C-CF₃), 132.5 (-) (C6'), 130.2 (+) (C6'), 125.6 (+) (C7), 122.2 (-) (C7), 122.0 (CF₃), 116.5 (+) (C1'), 115.1 (-) (C1'), 113.8 (-) (C6), 111.9 (+) (C5'), 111.9 (+) (C6), 110.2 (-) (C5'), 102.1 (+) (C4), 102.1 (+) (C3'), 99.8 (-) (C4), 99.8 (-) (C3').

¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆): δ -61.0 (s, CF₃), -116.1 (dd, ³*J*_{H3'} = 12.9 Hz, ⁴*J*_{H6'} = 9.2 Hz, F2').

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -57.8 (+) (CF₃), -59.6 (-) (CF₃), -106.9 y -108.0 (+) (F2'), -111.3 y -114.4 (-) (F2').

¹⁵N RMN (40.54 MHz, DMSO-*d*₆): no observado.

¹⁵N RMN (40.60 MHz, CPMAS): δ -103.0 (N2), -171.8 (N1).

(E)-3(5)-[β -(2,4-Difluoro-3-hidroxifenil)-etenil]-5(3)-trifluorometil-1*H*-pirazol (**73**)

El compuesto **73**, preparado a partir de (3*Z*,5*E*)-6-(2,4-difluoro-3-hidroxifenil)-1,1,1-trifluoro-4-hidroxihexa-3,5-dien-2-ona (**58**), se aísla mediante cristalización en EtOH/H₂O obteniéndose un sólido blanco (186 mg, 64%).

Pf: 212.6 °C.

Anal. Calc. para C₁₂H₇F₅N₂O: C, 49.67; H, 2.43; N, 9.65. Experimental: C, 49.87; H, 2.63; N, 9.72.

¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.85 (s, 1H, NH), 10.29 (s, 1H, 3-OH), 7.32 (d, ³*J*_{H6} = 16.8 Hz, 1H, H7), 7.15-7.04 (m, 2H, H5' y H6'), 7.10 (d, ³*J*_{H7} = 16.8 Hz, 1H, H6), 6.96 (s, 1H, H4).

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ 152.1 (¹*J*_{F4'} = 243.8 Hz, ³*J*_{F2'} = 5.9 Hz, C4'), 150.4 (¹*J*_{F2'} = 246.6 Hz, ³*J*_{F4'} = 6.0 Hz, C2'), 142.4 (C-estirilo), 141.7 (²*J*_{CF3} = 36.7 Hz, C-CF₃), 134.0 (²*J*_{F2'} = ²*J*_{F4'} = 16.1 Hz, C3'), 123.6 (C7), 123.0 (¹*J*_F = 268.1 Hz, CF₃), 120.6 (²*J*_{F2'} = 10.0 Hz, ⁴*J*_{F4'} = 3.3 Hz, C1'), 116.6 (⁴*J*_{F2'} = 4.1, C6), 116.3 (³*J*_{F4} = 8.3 Hz, ³*J*_{F2} = 3.5 Hz, C6'), 111.9 (²*J*_{F4'} = 19.1 Hz, ⁴*J*_{F2'} = 3.1 Hz, C5'), 101.8 (C4).

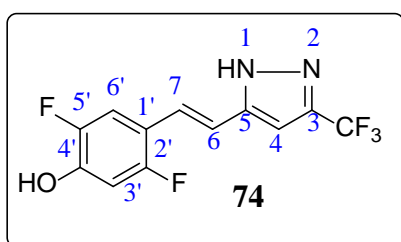
¹³C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 152.5 (C4'), 151.3 y 149.4 (C2'), 144.5 y 143.7 (C-estirilo), 142.4 (C-CF₃), 133.0 (C3'), 121.5 (CF₃), 120.0 (C7 y C1'), 115.4 (C6), 111.5 (C5' y C6'), 100.7 y 99.1 (C4).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆): δ -60.5 (CF₃), -131.3 (ddd, ⁴*J*_{FF} = 13.3 Hz, ⁴*J*_{H5'} = 10.1 Hz, ⁵*J*_{H6'} = 6.0 Hz, F4'), -135.8 (ddd, ⁴*J*_{FF} = 13.3 Hz, ⁴*J*_{H6'} = 7.5 Hz, F2')

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -59.1, -60.1 y -61.0 (CF₃), -128.9, -130.9 y -132.4 (F4'), -135.0, -137.4 y -139.6 (F2').

¹⁵N RMN (40.54 MHz, DMSO-*d*₆): δ -171.8 (N1).

¹⁵N RMN (40.60 MHz, CPMAS): δ -100.3 (N2), -171.6 (N1).

(E)-3(5)-[β -(2,5-Difluoro-4-hidroxifenil)-etenil]-5(3)-trifluorometil-1H-pirazol (**74**)

El compuesto **74**, preparado a partir de (3Z,5E)-6-(2,5-difluoro-4-hidroxifenil)-1,1,1-trifluoro-4-hidroxihexa-3,5-dien-2-ona, se aísla mediante cristalización en EtOH/H₂O obteniéndose un sólido blanco (223 mg, 77%).

Pf: 227.1 °C.

Anal. Calc. para C₁₂H₇F₅N₂O: C, 49.67; H, 2.43; N, 9.65; Experimental: C, 49.32; H, 2.50; N, 9.81.

¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.8 (s, 1H, NH), 10.68 (s, 1H, 4'-OH), 7.53 (dd, ³*J*_{F5'} = 12.0 Hz, ⁴*J*_{F2'} = 7.3 Hz, 1H, H6'), 7.25 (dd, ³*J*_{H6'} = 16.7 Hz, ⁵*J*_{F5'} = 1.2 Hz, 1H, H7), 7.03 (d, ³*J*_{H7} = 16.7 Hz, 1H, H6), 6.88 (s, 1H, H4), 6.79 (dd, ³*J*_{F2'} = 11.8 Hz, ⁴*J*_{F5'} = 7.4 Hz, 1H, H3').

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ 156.0 (¹*J*_{F2'} = 245.3 Hz, ⁴*J*_{F5'} = 1.5 Hz, C2'), 148.0 (¹*J*_{F5'} = 238.0 Hz, ⁴*J*_{F2'} = 2.1 Hz, C5'), 146.3 (²*J*_{F5'} = 14.7 Hz, ³*J*_{F2'} = 12.1 Hz, C4'), 142.6 (C-estirilo), 141.7 (²*J*_{CF3} = 37.3 Hz, C-CF₃), 123.0 (C7), 121.7 (¹*J*_F = 268.1 Hz, CF₃), 115.0 (C6), 114.3 (²*J*_{F2'} = 14.4 Hz, ³*J*_{F5'} = 6.7 Hz, C1'), 113.6 (²*J*_{F5'} = 21.3 Hz, ³*J*_{F2'} = 5.6 Hz, C6'), 105.0 (²*J*_{F2'} = 26.8 Hz, ³*J*_{F5'} = 3.3 Hz, C3'), 101.6 (C4).

¹³C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 142.3 (C-CF₃), 100.0 (C4), 157.0 (+) (C2'), 155.0 (-) (C2'), 150.3 (-) (C5'), 147.8 (+) (C4'), 146 (-) (C4'), 144.8 (C-estirilo), 122.6 (CF₃), 122.6 (C7), 116.6 (-) (C1'), 115.2 (+) (C1'), 110.2 (C6 y C6'), 104.9 (C3').

¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆): δ -60.5 (CF₃), -120.8 (ddd, ⁵*J*_{FF} = 15.1 Hz, ³*J*_{H3'} = 11.8 Hz, ⁴*J*_{H6'} = 7.3 Hz, F2'), -140.5 (dddd, ⁵*J*_{FF} = 15.1 Hz, ³*J*_{H6'} = 12.0 Hz, ⁴*J*_{H3'} = 7.4 Hz, ⁵*J*_{H7} = 1.2 Hz, F5').

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -57.7 (-) (CF₃), -59.8 (+) (CF₃), -110.7 y -113.4 (-) (F2'), -117.4 y -120.8 (+) (F2'), -135.9 y -138.7 (+) (F5'), -141.7 y -143.7 (-) (F5').

¹⁵N RMN (40.54 MHz, DMSO-*d*₆): δ -172.7 (N1).

¹⁵N RMN (40.60 MHz, CPMAS): δ -103.5 (N2), -173.0 (N1).

4.6.3 Actividad biológica de pirazoles curcuminoides

4.6.3.1 Determinación de la actividad de las distintas isoformas de la NOS

La medida de la actividad de la nNOS se realizó en homogenado de cerebro de ratón C57BL/6. Para la medida de la actividad de la isoforma eNOS se empleó eNOS (Bovine Recombinant) de Cayman Chemical y para la medida de la isoforma inducible iNOS se empleó iNOS (Mouse recombinant) de Cayman Chemical.

Para el estudio *in vitro* de la actividad anti nNOS de los compuestos estudiados, se utilizaron ratones C57BL/6 estabulados en el animalario del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada, en condiciones estériles, bajo un ambiente de fotoperiodo (ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas) y temperatura (22 ± 1 °C) controlados y con acceso libre a agua y comida (dieta estándar de laboratorio). Los ratones utilizados tienen una edad aproximada de tres-cuatro meses y un peso entre 25-30 g. Para la medida de la actividad de la nNOS, se sacrifica al animal por dislocación cervical e inmediatamente se extrae el cerebro, se pesa, se homogeniza y se congela a -80 °C hasta la determinación de la actividad de nNOS. Todos los experimentos se han realizado de acuerdo con las guías española y europea de cuidado de los animales.

Determinación de la concentración de proteínas

Para calcular la concentración de proteínas, en la determinación de la actividad de nNOS, se utiliza el método de Lowry [136] con modificaciones del método de Biuret [137]. El método empleado se adaptó a un método realizado en microplacas de 96 pocillos. Para hacer la curva patrón se utiliza albúmina sérica bovina como estándar (disuelta en Tris 20 mM) a concentraciones entre 0.05-0.6 mg/mL. En primer lugar, se adicionan a los pocillos 50 μ L de blanco, patrones o muestras. A continuación se añaden 200 μ L de reactivo de Lowry (carbonato disódico al 2% en NaOH 0.1 M, tartrato de sodio-potasio al 1% y sulfato cúprico al 0.5% (la proporción de estas soluciones es 98:1:1), se agita (agitador de microplacas: Brant Bio PMS 1000) y se deja reposar durante 10 minutos. Finalmente, la reacción se revela con 50 μ L de reactivo de Folin diluido 1:10 con agua destilada. Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 650 nm en un espectrofotómetro de placa (Bio-Tek PowerWave_x Microplate Scanning Spectrophotometer). Todas las determinaciones se realizan por triplicado.

Protocolo de la medida de la actividad de la NOS

Los reactivos L-arginina, L-citrulina, ácido *N*-(2-hidroximetil)piperazin-*N'*-(2-hidroxipropanosulfónico) (HEPES), DL-ditiotreitol (DTT), leupeptina, aprotinina, pepsantina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), hipoxantina-9- β -D-ribofuranósido (inosina), ácido etilenglicol-*bis*-(2-aminoetil éter)-*N,N,N',N'*-tetraacético (EGTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), albúmina sérica bovina (BSA), resina Dowex-50W (50 x 8-200), FAD, NADPH, dihidrocloruro de 5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterina fueron adquiridos a Sigma-Aldrich. L-[2,3,4,5-³H]-arginina monohidrocloruro (45-70 Ci/mmol, 1mCi/mL) fue obtenida de PerkinElmer. Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) y cloruro cálcico fueron adquiridos a Merck.

Una vez obtenidas las muestras de tejido (en el caso de la determinación de la actividad de nNOS) se resuspenden directamente (0.05 g/mL) en un tampón compuesto por Tris-HCl 51 mM, DTT 0.5 mM, leupeptina 10 μ g/mL (tomada de un disolución inicial de 1mg/mL en H₂O MiliQ), pepstatina 10 μ g/mL (tomada de un disolución inicial de 1mg/mL en DMSO), aprotinina 10 μ g/mL (tomada de un disolución inicial de 1mg/mL en H₂O MiliQ) y PMSF 1 mM (tomado de una disolución inicial 100 mM en etanol), pH 7.6 a 4 °C. Posteriormente, se homogenizan manualmente (homogenizador Stuart Scientific, SS2) y se centrifugan dos veces a 1000 g durante 3 min a 4 °C (centrífuga Beckman AvantiTM 30, rotor de ángulo fijo F3602) y se recogen alícuotas del sobrenadante que se usan inmediatamente para medir la actividad de la NOS o se congelan para la posterior determinación de la concentración de proteínas o futuras medidas de la NOS. Para eNOS e iNOS se toma la cantidad apropiada de enzima recombinante.

En tubos Eppendorf se añaden 10 μ L de estas alícuotas y se les añade (volumen final de reacción 100 μ L):

- 50 μ L de un tampón compuesto por Tris-HCl 51 mM, DTT 1 mM, tetrahidrobiopterina (BH₄) 30 μ M, FAD 10 μ M, inosina 0.5 mM, BSA 0.5 mg/mL, cloruro de Ca²⁺ 0.1 mM, L-arginina 10 μ M y L-(³H)-arginina 40 nM, pH 7.6 (como concentraciones finales en 100 μ L).
- 10 μ L de EDTA 10 mM (como concentración final en 100 μ L) para medir la isoforma inducible (iNOS).
- El volumen adecuado de la disolución del compuesto inhibidor y agua, hasta completar el volumen final.

Los tubos se calientan a 37 °C durante 30 minutos a partir de la incorporación de 10 µL de una disolución de NADPH cuya concentración final es 0.75 mM. Durante este tiempo la NOS transforma L-arginina, tanto normal como tritiada, en L-citrulina. Una vez transcurridos los 30 minutos se adiciona a cada tubo 400 µL de un tampón frío compuesto por HEPES 0.1 M, EGTA 100 mM y L-citrulina 0.175 mg/mL, pH 5.5, lo que provoca la parada de la reacción. De los 500 µL resultantes de todo el proceso, 400 µL se pasan a través de una columna con resina de intercambio iónico Dowex-50w en forma sódica, encargada de retener la L-(³H)-arginina que no se transforma en L-citrulina y, posteriormente, se eluyen con 1.2 mL de agua. La eficacia de retención de la L-(³H)-arginina por la columna es superior al 98%. Para cuantificar la cantidad de L-(³H)-citrulina formada se mide la radiación emitida en un contador β de centelleo líquido, mezclando 600 µL de eluato final con 4 mL de líquido de centelleo. El valor de actividad total es proporcionado por la medida de 50 µL de tampón de incubación. La actividad enzimática se expresa en picomoles de L-citrulina formada por minuto de reacción y dividida por los miligramos de proteínas presentes en la muestra (pmol cit/min·mg prot). En todos los casos se realizaron tres experimentos independientes (n = 3) por triplicado.

4.6.3.2 Determinación de la inhibición de la expresión de los genes hTERT y c-Myc

Determinación de citotoxicidad

Las diferentes líneas celulares (5 x 10³ células) se incubaron en sus respectivos medios de cultivo junto con diluciones seriadas de los compuestos en un volumen total de 100 mL. La incubación, en placas de 96 pocillos, se llevó a cabo durante 48 horas a 37 °C bajo atmosfera húmeda y 5% de CO₂. Transcurrido dicho tiempo se añadieron, a cada pocillo, 10 mL de MTT (5 mg/mL en PBS) y se incubó la microplaca durante 3 horas más (37 °C bajo atmosfera húmeda en 5% CO₂). Luego se eliminó el medio acuoso por decantación y el formazán generado se disolvió con 100 mL de DMSO. La microplaca fue leída a 550 nm con un lector de microplacas. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los datos de absorbancia obtenidos fueron tratados con el programa GraphPad Prism 4 dando lugar al valor indicado de IC₅₀.

Ensayos de proliferación celular

Las células HT-29 (100.000) fueron incubadas junto con los diferentes compuestos disueltos en DMSO durante 48 o 72 h en placas de 6 pocillos. Transcurrido dicho tiempo, las células se recogieron y se determinó el número de células vivas que había en cada uno de los pocillos utilizando azul de tripano para realizar el conteo celular mediante el uso de una cámara de Neubauer. El número de células vivas se normalizó respecto a un control positivo de DMSO. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Ensayos de qPCR

Las células HT-29 (100.000) fueron incubadas junto con los diferentes compuestos disueltos en DMSO a las concentraciones de trabajo durante 48 h en placas de 6 pocillos. Transcurrido dicho tiempo, las células se recogieron, se aisló el ARN, se retrotranscribió a ADN y finalmente se amplificaron los genes de interés usando la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real con sondas TaqMan, empleando la β -actina como control endógeno. Todos los experimentos fueron realizados usando un control positivo de DMSO como referencia. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

CAPÍTULO 5
SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE
1,4-DIAZEPINAS HEMICURCUMINOIDES

5 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE 1,4-DIAZEPINAS HEMICURCUMINOIDES

5.1 INTRODUCCIÓN

Dentro de la familia de heterociclos nitrogenados, las diazepinas destacan como compuestos de gran interés farmacológico que, al actuar como depresores del SNC, pueden emplearse como anestésicos, hipnótico-sedantes, ansiolíticos, relajantes musculares, anticonvulsivos o antipsicóticos [138]. Sin embargo, la versatilidad de estos compuestos no termina aquí ya que, durante las últimas décadas, son numerosas las publicaciones que demuestran también sus propiedades anticancerígenas [139], antibacterianas [140], analgésicas o antiinflamatorias [141], entre otras.

Dado que el anillo diazepínico de siete miembros consta de cinco átomos de carbono y dos de nitrógeno, pueden clasificarse según la posición de estos últimos en: 1,2-diazepinas, 1,3-diazepinas y 1,4-diazepinas. Entre ellas, las 1,4-diazepinas son las que presentan mayor actividad siendo por ello las de mayor importancia clínica y éxito comercial [142]. Sin embargo, al contrario que en el caso de los derivados de 1,4-benzodiazepinas en los que se han realizado muchos estudios, se conocen muy pocos ejemplos de diazepinas monocíclicas, en general además dihidro, tetrahidro o perhidrogenadas. En la Figura 83 se recogen algunos ejemplos de este tipo de derivados monocíclicos que actúan como depresores del SNC (**75**) [143], inhibidores de la matriz de las metaloproteinasas (MMP) como **76** [144], analgésicos (**77**) [145], antiulcerosos (**78**) [146], inhibidores de Rho-kinasa (**79**) [147] o desnaturalizantes del DNA (**80**) [148].

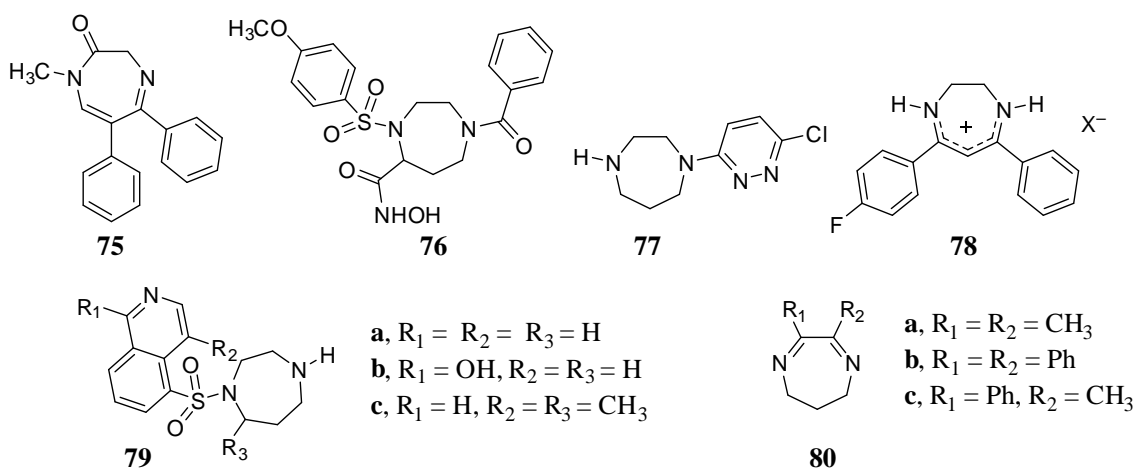


Figura 83. Ejemplos de 1,4-diazepinas monocíclicas con actividad biológica.

Dentro de los derivados curcuminoides, Hamed *et al.* sintetizaron varios derivados heterocíclicos de la curcumina con el fin de ensayar su capacidad de inhibición antimicrobiana, destacando entre ellos la diazepina **81** (Figura 84) que exhibió una actividad notable contra las bacterias Gram-positivas *S. aureus* (*Staphylococcus aureus*) [149]. Diez años antes, en 2003, Vajragupta *et al.* habían sintetizado complejos de manganeso entre los que se encuentra el de la diazepina derivada de la curcumina **82** [150] (Figura 84). Este compuesto mostró efectos neuroprotectores inhibiendo la peroxidación lipídica en estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*.

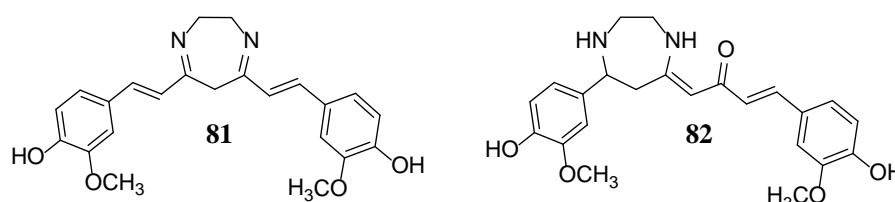
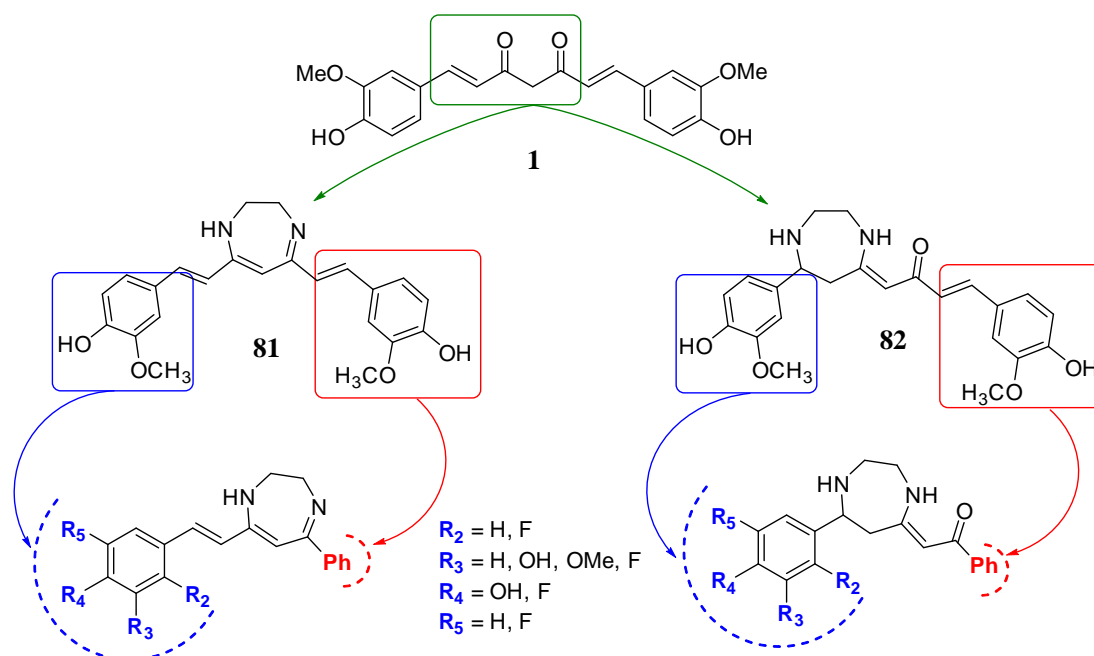


Figura 84. 1,4-Diazepinas derivadas de la curcumina con actividad biológica.

Inspirados por las propiedades de estos dos derivados, se decidió sintetizar dos nuevas series de 1,4-diazepinas curcuminoides fluoradas mediante el estudio de la reactividad de la etilendiamina con las β -dicetonas hemicurcuminoides **27**, **30**, **31**, **52-54** sintetizadas previamente tal y como se indica en el Esquema 10.



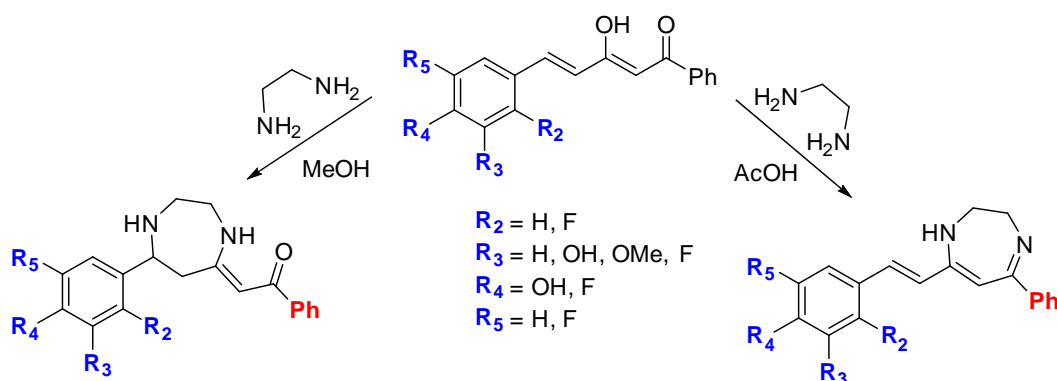
Esquema 10. Modificaciones estructurales realizadas en la molécula de curcumina (**1**) y en las 1,4-diazepinas derivadas de ésta (**81** y **82**) en la síntesis de 1,4-diazepinas hemicurcuminoides.

5.2 SÍNTESIS

5.2.1 Síntesis de 1,4-diazepinas hemicurcuminoideas

Tal y como ocurría en el caso de la síntesis de pirazoles, los métodos sintéticos más empleados para la preparación de 1,4-diazepinas consisten en la reacción de β -dicetonas, β -cetoésteres o α -dicetonas con 1,2 o 1,3-diaminas u otros derivados de ésta. En cuanto a las condiciones y tiempos de reacción descritos en la literatura, pese a que los ejemplos de síntesis de 1,4-benzodiazepinas son numerosos, no ocurre lo mismo en lo que a las 1,4-diazepinas respecta.

Kumar *et al.* sintetizaron derivados 1,4-diazepínicos de pirazolopirimidinonas empleando ácido *p*-toluenosulfónico y celita como catalizador, calentando a 60 °C en tiempos de reacción de tan solo 30 min [151]. Sin embargo, para la síntesis de nuestros derivados a partir de las dicetonas fenil sustituidas correspondientes, se precisan condiciones más vigorosas. Así, cuando se utiliza AcOH como disolvente, la reacción de la etilendiamina con los grupos 1,3-dicarbonilo de las β -dicetonas (**27**, **30**, **31**, **52-54**) dio lugar a las (4*E*,6*Z*)-7-(*E*)-(estirilo-sustituido)-5-fenil-2,3-dihidro-1*H*-1,4-diazepinas **83-88**, mientras que cuando la reacción de dichas dicetonas con etilendiamina se realiza en MeOH se obtienen las diazepinas resultantes de la adición 1,4-conjugada (adición de aza-Michael), es decir, las (*Z*)-1-fenil-2-aryl-1,4-diazepan-5-ilideno)etanonas **89-94** (Esquema 11).



Esquema 11. Procedimiento sintético empleado en la preparación de 1,4-diazepinas hemicurcuminoideas.

En la Figura 85 se recogen las estructuras de las diazepinas hemicurcuminoides sintetizadas [152]:

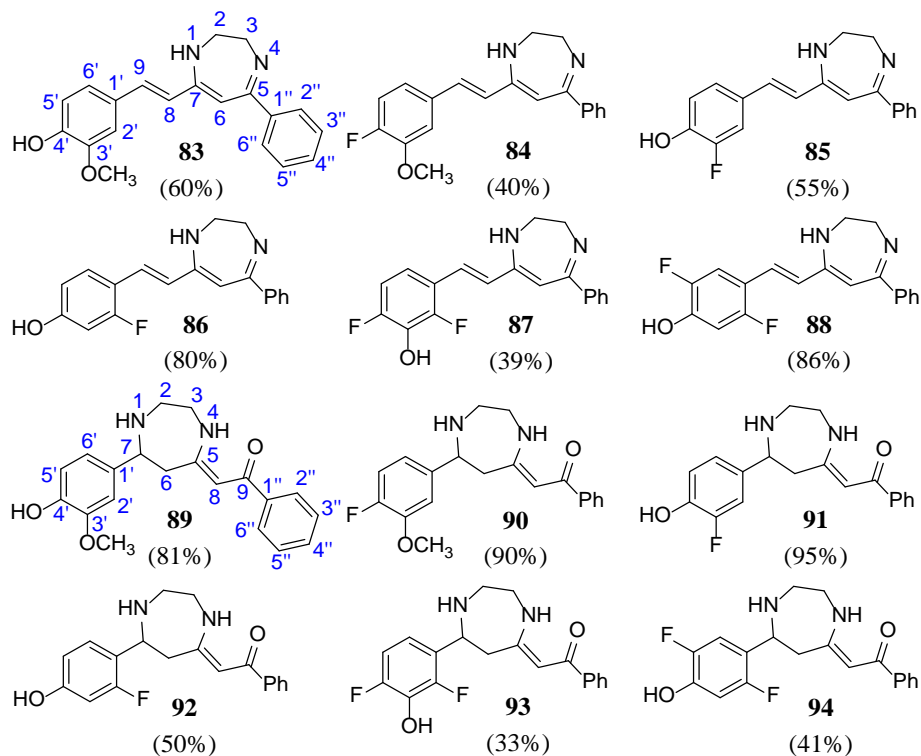
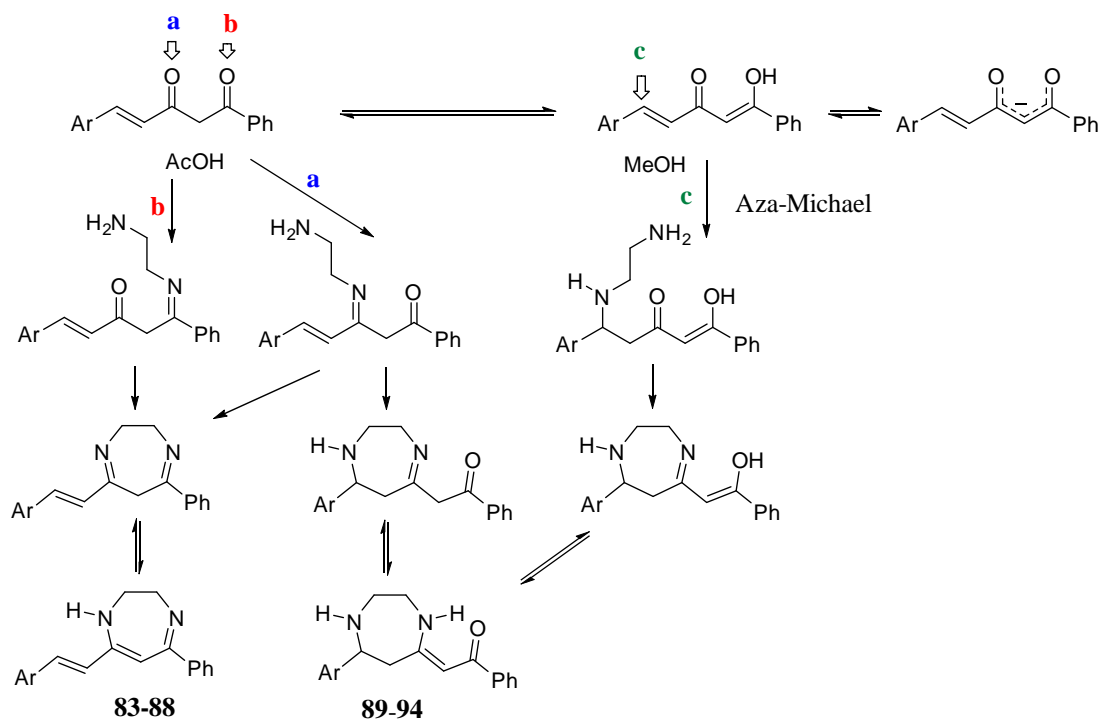


Figura 85. 1,4-Diazepinas hemicurcuminoides sintetizadas (numeración empleada para caracterización por RMN en azul y rendimientos entre paréntesis).

Tal y como se describe en la parte experimental, en la síntesis de las 2,3-dihidro-1H-1,4-diazepinas **83-88** donde el disolvente empleado es AcOH, se adicionan 2 mmoles de etilendiamina por cada mmol de β -dicetona siendo preciso calentar a reflujo durante varias horas. En el caso de la síntesis de las 1,4-diazepinas **89-94**, el disolvente empleado es MeOH y los mejores rendimientos se obtienen al adicionar un gran exceso de etilendiamina (12 mmoles) por cada mmol de β -dicetona, también calentado a reflujo durante un tiempo.

Pese a que no se aisló ningún intermedio de reacción, en el Esquema 13 se proponen los mecanismos para la formación de las dos series de 1,4-diazepinas. Los compuestos **83-88** se forman por el ataque nucleofílico de la etilendiamina sobre el carbonilo "a" o "b", mientras que los compuestos **89-94** pueden obtenerse ya sea por ataque nucleofílico sobre el carbonilo "a", o por la reacción de adición de Michael en el carbono "c" del ceto-enol. Cuando la reacción se produce en AcOH, la catálisis ácida favorece la adición nucleofílica a los carbonos carbonílicos, mientras que la adición aza-

Michael podría verse favorecida por la formación de la especie carbaniónica resultante de la abstracción de un protón por parte de la etilendiamina.



Esquema 12. Mecanismo de formación de las 1,4-diazepinas hemicurcuminoideas **83-88** y **89-94**.

5.3 DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL

5.3.1 Determinación estructural por RMN

Empezaremos por discutir la estructura de la serie de 1,4-diazepinas **83-88**, que pueden existir en tres formas tautoméricas **a**, **b** y **c**, junto con las formas zwitterónicas **d1** y **d2**, en los compuestos donde R_4 o R_3 es OH , y la forma protonada que da lugar a **a** o **c**, aH^+/cH^+ (Figura 86):

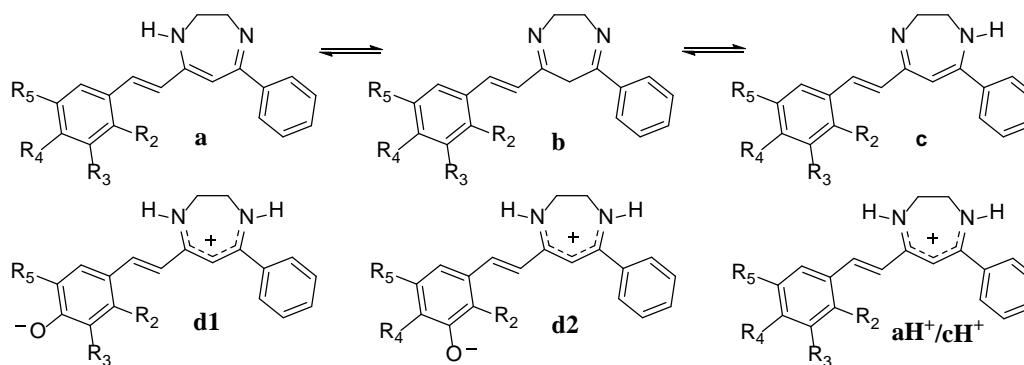


Figura 86. Tautómeros posibles en las 1,4-diazepinas (**83-88**), junto con las formas zwitterónicas **d1** y **d2** y la forma protonada aH^+/cH^+ .

Hamed *et al.* [149] describen que la diazepina derivada de la curcumina **81** se encuentra en la forma tautomérica **b**. Sin embargo, en el caso de nuestros derivados (**83-88**) (Tablas 29-31), los espectros realizados en disolución, tanto en DMSO- d_6 como en HMPA- d_{18} , muestran que estos compuestos presentan tautomería prototrópica existiendo un equilibrio rápido entre las formas **a** y **c** que impide detectar las señales de N1 y N4 por ^{15}N RMN. La adición de gotas de ácido produjo su protonación, observándose dos señales de tipo NH que aparecen entre -235.4 y -251.6 ppm correspondientes a la estructura aH^+/cH^+ [153], como se observa para **88** en la Figura 87.

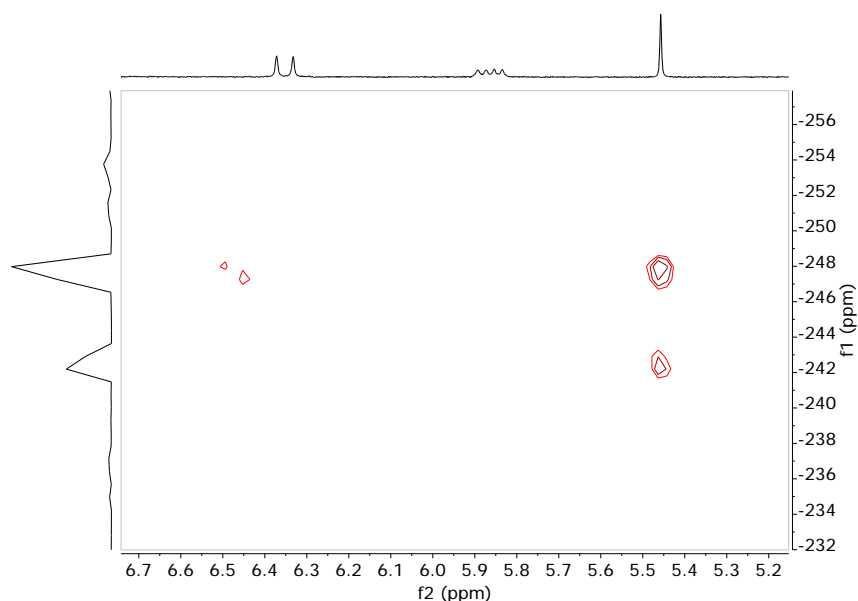


Figura 87. Espectro (^1H - ^{15}N) *gs*-HMBC de **88** en DMSO- d_6 + gota de AcOH.

En los espectros de ^1H y ^{13}C en DMSO- d_6 aparecen dos singletes anchos en los intervalos de 3.76-3.47 y 53.8-47.9 ppm respectivamente, correspondientes a las señales de dos metilenos; y un singlete a 5.4-5.6 y 89-93 ppm ($^1J \sim 162$ Hz) correspondiente a un grupo metino en la posición 6. Con el fin de afinar las señales anchas correspondientes a los pares de protones H2 y H3 para poder asignarlos correctamente, se realizó un experimento a temperatura variable para el compuesto **83**. En la Figura 88 se observa la variación de las señales del espectro de ^1H en HMPA- d_{18} , aumentando la temperatura desde 300 a 340 K.

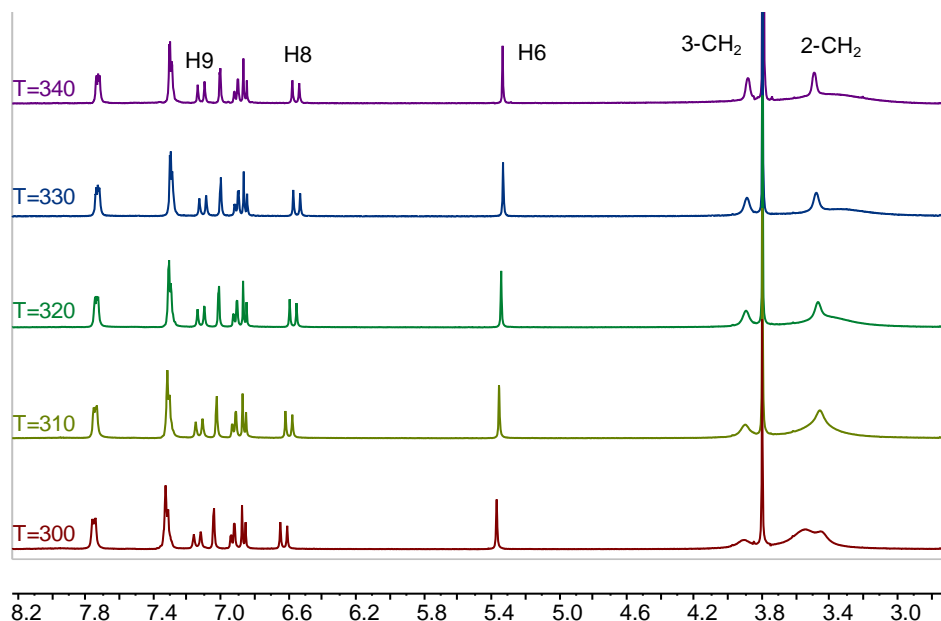


Figura 88. Espectro ^1H RMN del compuesto **83** en $\text{HMPA-}d_{18}$ a temperatura variable.

El espectro ($^1\text{H-}^{13}\text{C}$) gs-HMQC a 340 K permitió asociar las señales H2-C2 y H3-C3 (Figura 89), en ese compuesto y por analogía en los restantes (δC3 , $^1J \sim 145 \text{ Hz} > \delta\text{C2}$, $^1J \sim 144 \text{ Hz}$) ppm.

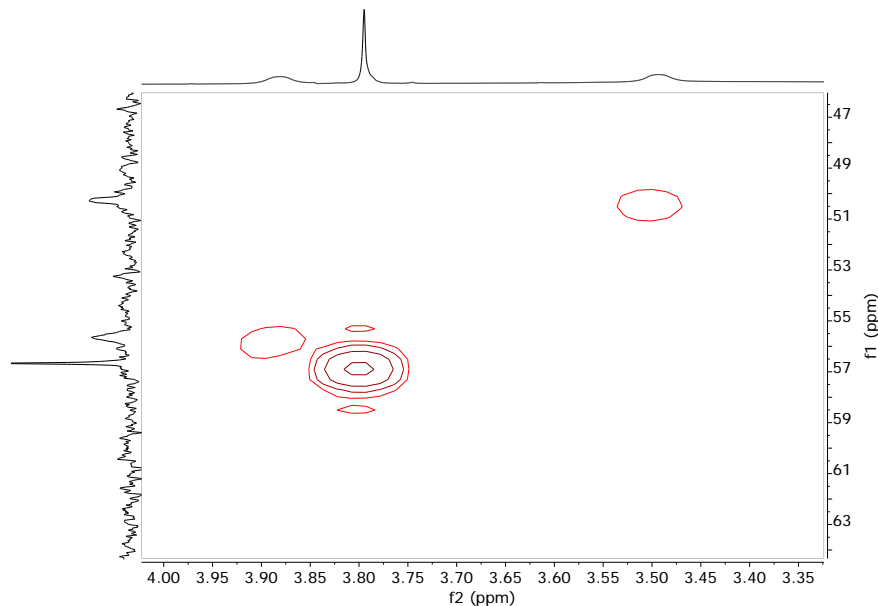


Figura 89. Espectro $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ gs-HMQC RMN del compuesto **83** en $\text{HMPA-}d_{18}$ a 340 K.

Los compuestos con un grupo OH en la posición 4 (**83**, **85**, **86**, **88**) o en la posición 3 (**87**) del estirilo sustituido, existen en las formas zwitteriónicas (**d1/d2**) como se confirmará más tarde gracias a los cálculos teóricos realizados y al análisis de la estructura de rayos X de **86** (ver Figura 100). En ^{15}N RMN de estado sólido, los

desplazamientos químicos de las señales de nitrógeno N1 y N4 registradas para el compuesto **86** (Figura 90), indican la presencia de un único tautómero **d1**.

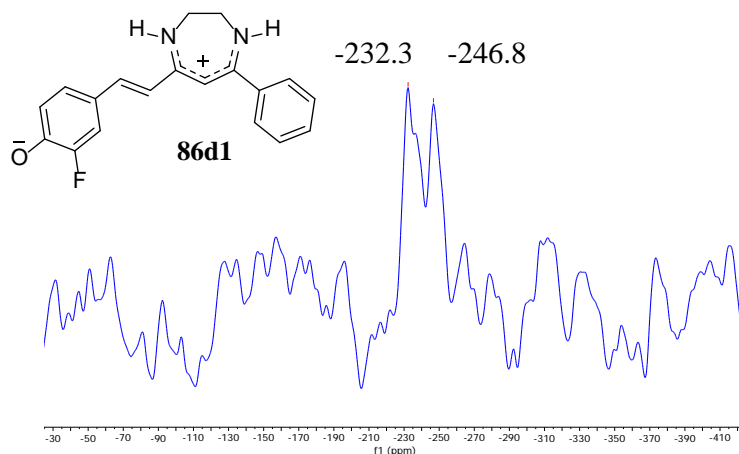


Figura 90. Espectro ^{15}N RMN CPMAS de (4*E*,6*Z*)-7-((*E*)-2-fluoro-4-hidroxiestiril)-5-fenil-2,3-dihidro-1*H*-1,4-diazepina (**86**).

Respecto a los compuestos **89-94** (Tablas 32-34), cabe destacar que, debido a que C7 es un centro estereogénico, se encuentran en todos los casos como una mezcla racémica de sus dos estereoisómeros. Estos compuestos pueden encontrarse en las formas tautoméricas **e**, **f**, **g**, **h**, **i** (Figura 91), existiendo todos ellos en la forma tautomérica **e** que presenta enlace de hidrógeno intramolecular.

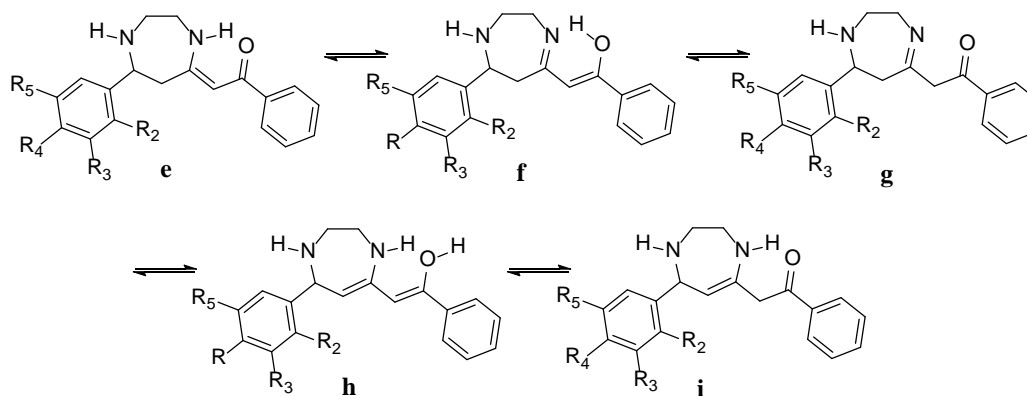


Figura 91. Tautómeros posibles en las 1,4-diazepinas (**89-94**).

En DMSO- d_6 la característica más significativa que prueba la existencia de este tautómero es la presencia de dos NHs, uno de amina secundaria en la posición 1 ($\delta\text{H1} \sim 2.80$ y $\delta\text{N1} \sim -322.3$ ppm) y otro tipo enamina en la posición 4 ($\delta\text{H4} \sim 11.40$ -enlace de hidrógeno- y $\delta\text{N4} \sim -262.2$ ppm). Los desplazamientos químicos de ^{15}N RMN en estado sólido del compuesto **92** aparecen a $-316.4/-317.9$ (N1) y $-257.4/-262.0$ (N4) ppm, confirmando que el tautómero predominante en disolución corresponde a la forma más

estable en estado sólido. Los tres grupos metileno en las posiciones 2, 3 y 6 del anillo de diazepina muestran protones que aparecen como multipletes no resueltos en el intervalo de 2.40-3.70 ppm. Los espectros de los dos únicos compuestos solubles en CDCl_3 , **89** y **90**, permitieron el análisis de los protones metileno y la determinación de las constantes de acoplamiento. Los carbonos correspondientes se observaron alrededor de 49.6, 46.4 y 45.7 ppm ($\delta\text{C}2$, $^1J \sim 133 \text{ Hz} > \delta\text{C}3$, $^1J \sim 137 \text{ Hz} > \delta\text{C}6$, $^1J \sim 131 \text{ Hz}$). Para la asignación inequívoca de C3/C6 que presentan desplazamientos químicos muy similares ($\sim 46 \text{ ppm}$) nos hemos basado en el espectro (^1H - ^{13}C) HMQC del compuesto **92**, ya que la presencia de flúor en posición 2 apantalla la señal de C6 (45.5 ppm) y permite diferenciarlo de C3 (46.4 ppm). Este efecto es más importante en el C7 que pasa de ~ 61 a $\sim 53.5 \text{ ppm}$. En las Figuras 92-95 se representan los espectros de RMN ^1H , ^1H - ^1H gs-COSY, ^1H - ^{15}N gs-HMBC del compuesto **89** y ^1H - ^{13}C gs-HMQC de **92** que muestran lo discutido anteriormente.

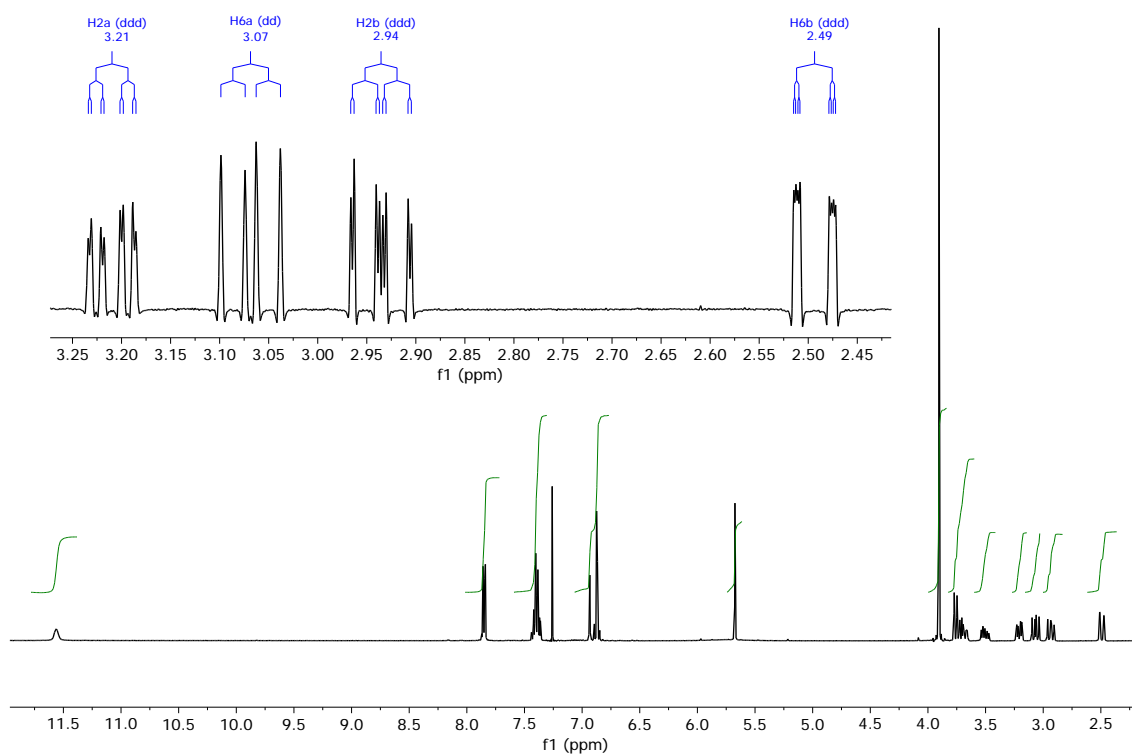


Figura 92. Espectro ^1H RMN de (Z)-1-fenil-2-(7-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-1,4-diazepan-5-iliden)etanona (**89**) en CDCl_3 .

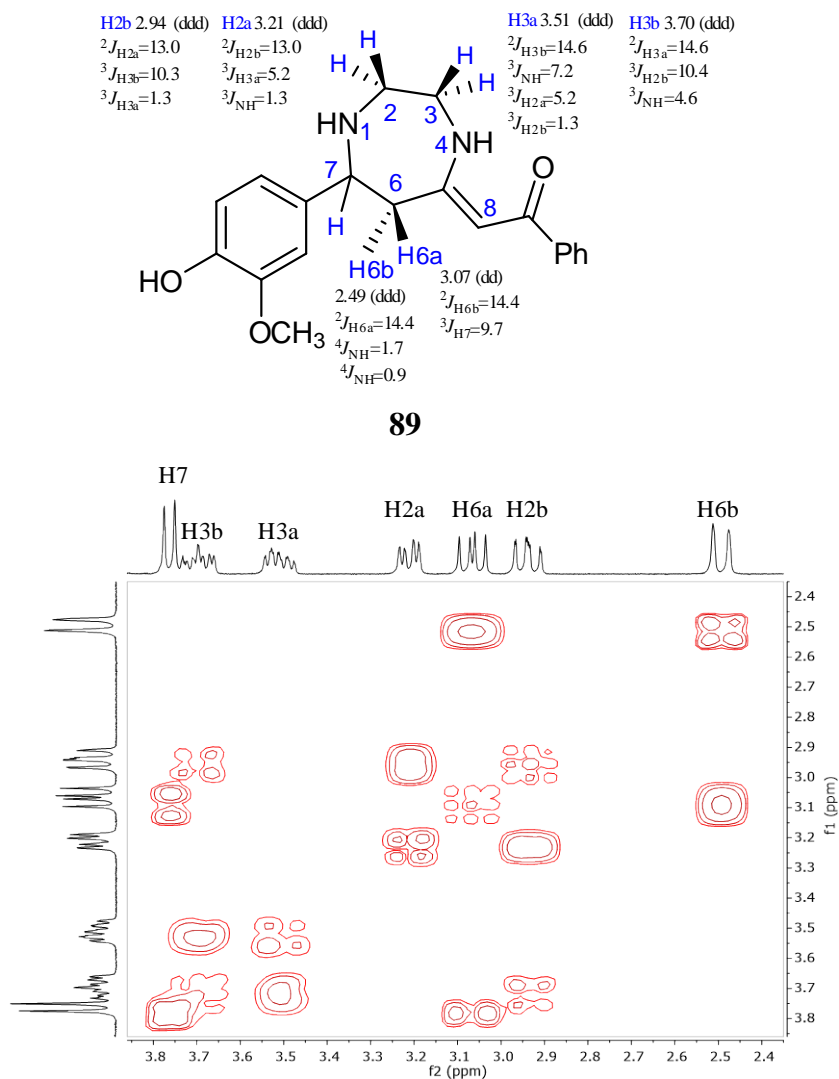


Figura 93. Espectro 1H - 1H gs-COSY RMN de **89** en $CDCl_3$.

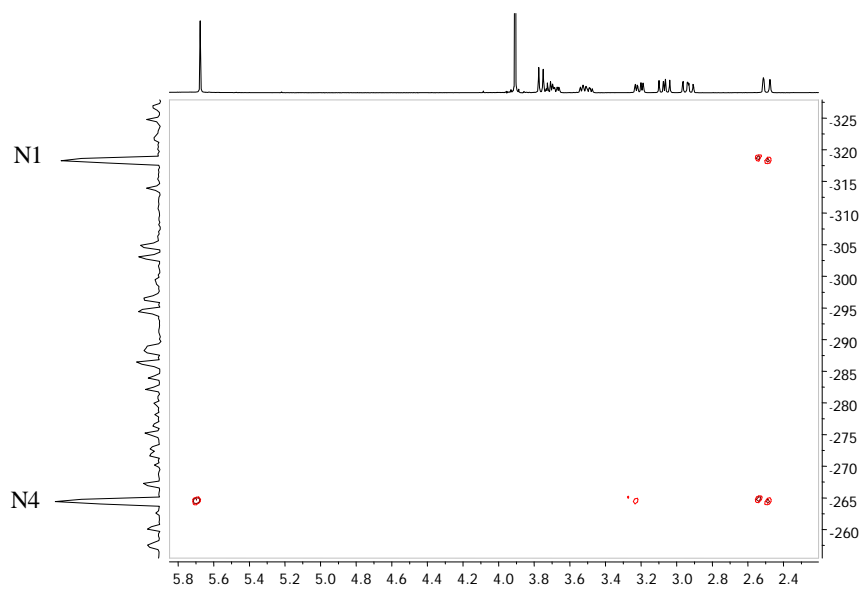


Figura 94. Espectro 1H - ^{15}N gs-HMBC RMN de **89** en $CDCl_3$.

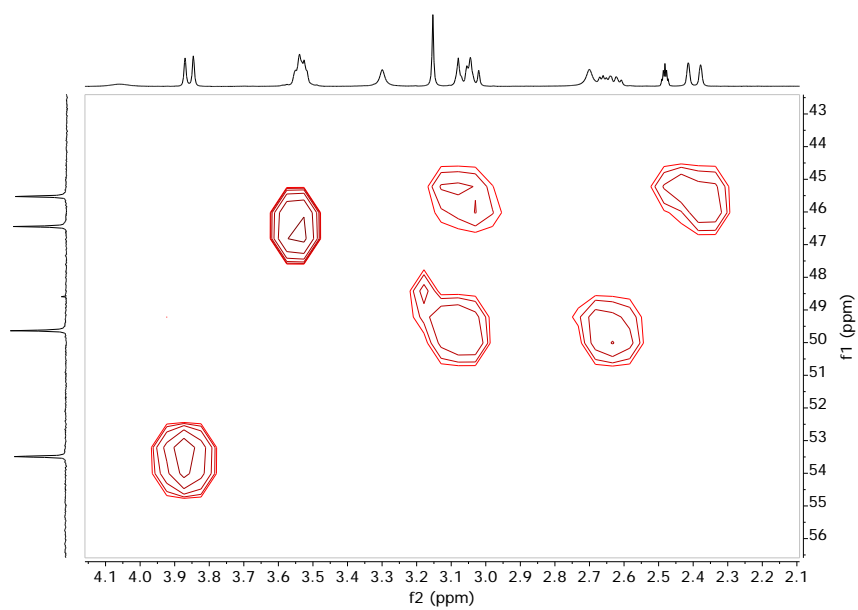


Figura 95. Espectro ^1H - ^{13}C *gs*-HMOC RMN de **92** en DMSO-d_6 .

Tabla 29. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^1H RMN y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos 83-88.

	83				84		85	86	87	88
	DMSO- d_6	HMPA- d_{18} (340 K)	CDCl_3 + TFA	TFA	DMSO- d_6	DMSO- d_6 + TFA	DMSO- d_6 + Gota AcOH	DMSO- d_6	DMSO- d_6 + Gota AcOH	DMSO- d_6 + Gota AcOH
1NH	n.o.	n.o.	9.86	7.86	10.43	10.09	9.19	n.o.	10.0	n.o.
2CH ₂	3.47	3.49	3.47	3.80	3.57	3.74	3.72	3.53	3.75	3.66
3CH ₂	3.47	3.88	3.47	3.85	3.77	3.74	3.72	3.74	3.75	3.66
4NH	n.o.	n.o.	9.32	7.59	10.17	9.98	9.19	n.o.	10.0	n.o.
H6	5.39	5.33	5.25	5.70	5.52	5.69 (t) $^4J_{\text{NH}}=^4J_{\text{NH}}=1.7$	5.65	5.42	5.65	5.50
H8	6.61 (d) $^3J_{\text{H9}}=16.2$	6.56 (d) $^3J_{\text{H9}}=16.2$	6.46 (d) $^3J_{\text{H9}}=16.2$	6.62 (d) $^3J_{\text{H9}}=16.0$	6.96 (d) $^3J_{\text{H9}}=16.3$	7.09 (d) $^3J_{\text{H9}}=16.3$	6.98 (d) $^3J_{\text{H9}}=16.3$	6.59 (d) $^3J_{\text{H9}}=16.2$	7.15 (d) $^3J_{\text{H9}}=16.5$	6.51 (d) $^3J_{\text{H9}}=15.9$
H9	7.00 (d) $^3J_{\text{H8}}=16.2$	7.12 (d) $^3J_{\text{H8}}=16.2$	7.10 (d) $^3J_{\text{H8}}=16.2$	7.29 (d) $^3J_{\text{H8}}=16.0$	7.27 (d) $^3J_{\text{H8}}=16.3$	7.60 (d) $^3J_{\text{H8}}=16.3$	7.63 (d) $^3J_{\text{H8}}=16.3$	7.25 (d) $^3J_{\text{H8}}=16.2$	7.68 (d) $^3J_{\text{H8}}=16.5$	7.46 (dd) $^3J_{\text{H8}}=15.9$ $^4J_{\text{F2}}=1.7$
H2'	7.10 (d) $^4J_{\text{H6}'}=2.0$	7.00 (d) $^4J_{\text{H6}'}=2.0$	6.79 (d) $^4J_{\text{H6}'}=2.0$	7.04 (d) $^4J_{\text{H6}'}=1.8$	7.41 (dd) $^4J_{\text{F4}}=8.4$ $^4J_{\text{H6}'}=1.8$	7.46 (dd) $^4J_{\text{F4}}=8.4$ $^4J_{\text{H6}'}=2.0$	7.46 (dd) $^3J_{\text{F3}}=12.5$ $^4J_{\text{H6}'}=2.0$	---	---	---
H3'	3.78 (s) (OMe)	3.80 (s) (OMe)	3.58 (s) (OMe)	3.85 (s) (OMe)	3.87 (s) (OMe)	3.87 (s) (OMe)	---	6.26 (dd) $^3J_{\text{F2}}=14.5$ $^4J_{\text{H5}'}=2.3$	10.0 (s) (OH)	6.07 (dd) $^3J_{\text{F2}}=14.9$ $^4J_{\text{F5}}=7.9$
4'OH	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	---	---	9.19	n.o.	---	9.40
H5'	6.68 (d) $^3J_{\text{H6}'}=8.2$	6.86 (d) $^3J_{\text{H6}'}=8.2$	6.57 (d) $^3J_{\text{H6}'}=8.3$	6.88 (d) $^3J_{\text{H6}'}=8.3$	7.23 (dd) $^3J_{\text{F4}}=11.3$ $^3J_{\text{H6}'}=8.4$	7.27 (dd) $^3J_{\text{F4}}=11.2$ $^3J_{\text{H6}'}=8.4$	7.05 (dd) $^4J_{\text{F3}}=8.7$ $^3J_{\text{H6}'}=8.7$	6.38 (dd) $^3J_{\text{H6}'}=8.7$ $^4J_{\text{H3}'}=2.3$	7.12 (ddd) $^3J_{\text{F4}}=10.4$ $^3J_{\text{H6}'}=8.9$ $^5J_{\text{F2}}=1.6$	---
H6'	6.89 (dd) $^3J_{\text{H5}'}=8.2$ $^4J_{\text{H2}'}=2.0$	6.91 (dd) $^3J_{\text{H5}'}=8.2$ $^4J_{\text{H2}'}=2.0$	6.71 (dd) $^3J_{\text{H5}'}=8.3$ $^4J_{\text{H2}'}=2.0$	7.02 (dd) $^3J_{\text{H5}'}=8.3$ $^4J_{\text{H2}'}=1.8$	7.10 (m)	7.18 (ddd) $^3J_{\text{H5}'}=8.5$ $^4J_{\text{F4}}=4.6$ $^4J_{\text{H2}'}=2.0$	7.26 (dd) $^3J_{\text{H5}'}=8.4$ $^4J_{\text{H2}'}=2.0$	7.38 (dd) $^4J_{\text{F2}}=10.0$ $^3J_{\text{H5}'}=8.7$	7.31 (ddd) $^3J_{\text{H5}'}=8.8$ $^4J_{\text{F2}}=7.6$ $^4J_{\text{F4}}=5.8$	7.17 (dd) $^3J_{\text{F5}}=13.1$ $^4J_{\text{F2}}=8.3$
H2''/H6''	7.69 (m)	7.73 (m)	7.34 (m)	7.50 (m)	7.70 (m)	7.71 (m)	7.73 (m)	7.68 (m)	7.75 (m)	7.68 (m)
H3''/H5''	7.38 (m)	7.29 (m)	7.20 (m)	7.40 (m)	7.44 (m)	7.56 (m)	7.55 (m)	7.45 (m)	7.56 (m)	7.53 (m)
H4''	7.38 (m)	7.29 (m)	7.27 (m)	7.50 (m)	7.44 (m)	7.62 (m)	7.62 (m)	7.45 (m)	7.63 (m)	7.57 (m)

Tabla 30. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{13}C y ^{15}N RMN en disolución y en estado sólido (**86**), y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos **83** a **88**. Cuando no se especifica son J_{CH} .

	83^a				84^b		85	86	87	88	
	DMSO- d_6	HMPA- d_{18} (340 K)	CDCl_3 + TFA	TFA	DMSO- d_6	DMSO- d_6 + TFA	DMSO- d_6 + Gota AcOH	DMSO- d_6	CPMAS	DMSO- d_6 + Gota AcOH	DMSO- d_6 + Gota AcOH
C2	49.6	48.9	48.8 $^1J=144.6$	47.7	50.0	48.5	48.1 $^1J=144.0$	48.9 $^1J=139.0$	48.7 (sa)	48.1 $^1J=144.2$	47.9 $^1J=146.0$
C3	53.8	57.0	49.2 $^1J=145.2$	48.0	53.4	48.7	48.4 $^1J=145.6$	51.8 $^1J=139.6$	49.7 (sa)	48.4 $^1J=144.5$	48.7 $^1J=143.7$
C5	162.3	165.3	165.8	166.8	n.o.	165.2	164.4	162.6	163.9	164.9	162.6
C6	92.9	93.9	89.7 $^1J=163.0$	88.8	93.3	89.6	89.1 $^1J=161.7$	91.7 $^1J=157.2$	85.7	89.7 $^1J=162.6$ $^3J=3.5$	89.7 $^1J=161.9$ $^3J=4.0$
C7	154.8	151.7	164.1	163.6	n.o.	162.1	162.1	157.8	162.6	161.3	162.8
C8	123.4	124.7	119.8 $^1J=158.8$	119.7	129.0	124.0 $^6J_{\text{F4}}=2.5$	121.6 $^1J=160.1$	121.0 $^1J=157.8$	119.4	126.0 $^1J=163.0$ $^4J_{\text{F2}}=6.1$ $^6J_{\text{F4}}=2.6$	114.5 $^1J=160.2$ $^4J_{\text{F2}}=4.6$
C9	132.6	131.4	142.0 $^1J=152.3$	140.5	130.8	138.5	138.5 $^1J=156.3$	128.2 $^1J=159.8$	128.7	130.9 $^1J=157.7$ $^3J_{\text{F2}}=2.4$ $^5J_{\text{F4}}=2.4$	133.3 $^1J=151.0$ $^3J_{\text{F2}}=3.8$ $^4J_{\text{F5}}=2.4$
C1'	125.9	128.3	126.7 $^3J=^3J=6.5$	127.5	133.2 $^4J_{\text{F4}}=3.5$	132.0 $^4J_{\text{F4}}=3.7$	126.4 $^3J_{\text{F3}}=6.8$	109.6 $^2J_{\text{F2}}=11.9$	109.0	119.6 $^2J_{\text{F2}}=9.8$ $^4J_{\text{F4}}=3.3$	102.1 $^2J_{\text{F2}}=14.7$ $^3J_{\text{F5}}=7.3$
C2'	109.9	111.8	109.4 $^1J=157.7$ $^3J=^3J=5.9$	109.9	111.4 $^3J_{\text{F4}}=2.1$	112.5 $^3J_{\text{F4}}=2.6$	114.8 $^1J=160.9$ $^2J_{\text{F3}}=18.3$	162.3 $^1J_{\text{F2}}=249.6$	165.2	151.1 $^1J_{\text{F2}}=249.0$ $^3J_{\text{F4}}=6.5$	160.3 $^1J_{\text{F5}}=249.0$

C3'	148.4	148.7	148.6	146.4	147.4 ² J _{F4} =10.8	147.7 ² J _{F4} =10.8	151.1 ¹ J _{F3} =241.8	103.1 ² J _{F2} =19.8 ¹ J=160.7	106.3	134.2 ² J _{F2} =16.2 ² J _{F4} =16.2	105.1 ¹ J=158.9 ² J _{F2} =17.9 ³ J _{F5} =7.2	
C4'	150.4	149.7	150.0	147.1	145.7	151.6 ¹ J _{F4} =246.8	152.7 ¹ J _{F4} =249.3	147.4 ² J _{F3} =12.5	167.5 ³ J _{F2} =12.0	174.1	153.2 ¹ J _{F4} =246.2 ³ J _{F2} =6.1	163.7 ² J _{F5} =15.0
C5'	116.0	115.9	116.4	115.0 ¹ J=162.4	114.4	116.1 ² J _{F4} =18.2	116.6 ² J _{F4} =17.2	118.1 ¹ J=160.2 ³ J _{F3} =3.2	114.7 ¹ J=159.6	116.4	112.1 ¹ J=166.1 ² J _{F4} =19.1 ⁴ J _{F2} =3.3	152.3 ¹ J _{F2} =237.0
C6'	121.9	120.7	121.0	123.6 ¹ J=160.7	122.3	120.2	121.5 ³ J _{F4} =7.2	125.4 ¹ J=161.7 ⁴ J _{F3} =2.8	128.7 ¹ J=159.2 ³ J _{F2} =6.2	128.7	117.4 ¹ J=166.4 ³ J _{F4} =8.9 ³ J _{F2} =3.3	111.6 ¹ J=156.6 ² J _{F5} =20.8 ³ J _{F2} =7.7
C1" ^c	141.4	143.7	143.4	136.2	135.1	140.9	136.3	136.2	139.7	137.0	135.9	137.1
	n.o.	n.o.	n.o.	-245.1	-251.6	n.o.	-241.0	-240.4	n.o.	-246.8	-239.9	-247.9
N1/N4	n.o.	n.o.	n.o.	-244.6	-249.5	n.o.	-237.4	-238.4	n.o.	-232.3	-235.4	-242.3

^a δOCH₃: 55.5.^b δOCH₃: 56.0.^c δC2"/C6" ~ 126.7, ¹J = 159.4, ³J = ³J = 6.8; δC3"/C5" ~ 128.2, ¹J = 161.2, ³J = 7.2; δC4" ~ 130.5, ¹J = 160.6, ³J = ³J = 7.5.

Tabla 31. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{19}F RMN en disolución y en estado sólido (MAS) y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos **84** a **88**.

	84	85	86	87	88	
	DMSO- d_6 +TFA	DMSO- d_6 + Gota AcOH	DMSO- d_6 MAS	DMSO- d_6 + Gota AcOH	DMSO- d_6 + Gota AcOH	
F2'			-115.7 $^3J_{\text{H}3'}=14.3$ $^4J_{\text{H}6'}=10.0$	-111.9	-133.6 $^4J_{\text{FF}}=14.9$ $^4J_{\text{H}6'}=7.7$ $^5J_{\text{H}5'}=1.9$	-120.0 $^5J_{\text{FF}}=12.8$ $^3J_{\text{H}3'}=13.1$ $^4J_{\text{H}6'}=8.7$
F3'		-135.6 $^3J_{\text{H}2'}=12.5$ $^4J_{\text{H}5'}=9.1$				
F4'	-132.1 $^3J_{\text{H}5'}=11.3$ $^4J_{\text{H}2'}=8.4$ $^4J_{\text{H}6'}=4.6$			-128.4 $^4J_{\text{FF}}=14.9$ $^3J_{\text{H}5'}=10.4$ $^4J_{\text{H}6'}=5.9$		
F5'					-141.3 $^5J_{\text{FF}}=12.8$ $^3J_{\text{H}6'}=12.6$ $^4J_{\text{H}3'}=7.9$	

Tabla 32. Desplazamientos químicos ^1H RMN (δ en ppm) y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos 89-94.

	89 CDCl ₃	90 CDCl ₃	91 DMSO- <i>d</i> ₆	92 DMSO- <i>d</i> ₆	93 DMSO- <i>d</i> ₆	94 DMSO- <i>d</i> ₆
1NH	~5.5 (sa)	~5.7(sa)	2.74 (sa)	2.71 (sa)	2.88(sa)	2.86 (sa)
H2a	3.21 (ddd) ² $J_{\text{H2b}}=13.0$ ³ $J_{\text{H3a}}=5.2$ ³ $J_{\text{NH}}=1.3$	3.22 (ddd) ² $J_{\text{H2b}}=13.0$ ³ $J_{\text{H3a}}=5.2$ ³ $J_{\text{NH}}=1.4$	3.05 (ddd) ² $J_{\text{H2b}}=13.3$ ³ $J_{\text{H3b}}=3.2$ ³ $J_{\text{H3a}}=3.2$	3.06 (m)	3.07(m)	3.05 (m)
H2b	2.94 (ddd) ² $J_{\text{H2a}}=13.0$ ³ $J_{\text{H3b}}=10.3$ ³ $J_{\text{H3a}}=1.3$	2.94 (ddd) ² $J_{\text{H2a}}=13.0$ ³ $J_{\text{H3b}}=10.3$ ³ $J_{\text{H3a}}=1.3$	2.65 (ddd) ² $J_{\text{H2a}}=13.3$ ³ $J_{\text{H3b}}=5.7$ ³ $J_{\text{NH}}=5.7$	2.65 (m)	2.66 (ddd) ² $J_{\text{H2a}}=13.6$ ³ $J_{\text{H3b}}=7.9$ ³ $J_{\text{NH}}=3.7$	2.65 (ddd) ² $J_{\text{H2a}}=13.5$ ³ $J_{\text{H3b}}=5.1$ ³ $J_{\text{NH}}=5.1$
H3a	3.51 (dddd) ² $J_{\text{H3b}}=14.6$ ³ $J_{\text{NH}}=7.2$ ³ $J_{\text{H2a}}=5.2$ ³ $J_{\text{H2b}}=1.3$	3.52 (dddd) ² $J_{\text{H3b}}=14.7$ ³ $J_{\text{NH}}=7.3$ ³ $J_{\text{H2a}}=5.2$ ³ $J_{\text{H2b}}=1.3$	3.53 (m)	3.55 (m)	3.55(m)	3.54 (m)
H3b	3.70 (ddd) ² $J_{\text{H3a}}=14.6$ ³ $J_{\text{H2b}}=10.4$ ³ $J_{\text{NH}}=4.6$	3.70 (dddd) ² $J_{\text{H3a}}=14.7$ ³ $J_{\text{H2b}}=10.3$ ³ $J_{\text{NH}}=4.3$ ³ $J_{\text{H2a}}=1.3$	3.53 (m)	3.55 (m)	3.55 (m)	3.54 (m)
4 NH	11.56 (sa)	11.54 (sa)	11.39 (t) ³ $J=^3J=5.8$	11.38 (t) ³ $J=^3J=5.7$	11.36 (t) ³ $J=^3J=5.7$	11.36 (t) ³ $J=^3J=5.0$
H6a	3.07 (dd) ² $J_{\text{H6b}}=14.4$ ³ $J_{\text{H7}}=9.7$	3.05 (dd) ² $J_{\text{H6b}}=14.4$ ³ $J_{\text{H7}}=9.8$	2.99 (dd) ² $J_{\text{H6b}}=14.3$ ³ $J_{\text{H7}}=9.7$	3.06 (m)	3.07(m)	3.05 (m)
H6b	2.49 (ddd) ² $J_{\text{H6a}}=14.4$ ⁴ $J_{\text{NH}}=1.7$ ⁴ $J_{\text{NH}}=0.9$	2.47 (ddd) ² $J_{\text{H6a}}=14.4$ ⁴ $J_{\text{NH}}=1.7$ ⁴ $J_{\text{NH}}=0.9$	2.44 (ddd) ² $J_{\text{H6a}}=14.3$ ⁴ $J_{\text{NH}}=1.7$ ⁴ $J_{\text{NH}}=0.9$	2.40 (d) ² $J_{\text{H6a}}=14.6$	2.43 (d) ² $J_{\text{H6a}}=14.6$	2.40 (d) ² $J_{\text{H6a}}=14.6$
H7	3.76 (d) ³ $J_{\text{H6a}}=9.7$	3.80 (d) ³ $J_{\text{H6a}}=9.8$	3.64 (d) ³ $J_{\text{H6a}}=9.7$	3.87 (d) ³ $J_{\text{H6a}}=9.6$	3.92 (d) ³ $J_{\text{H6a}}=9.6$	3.87 (d) ³ $J_{\text{H6a}}=9.6$
H2'	6.94 (d) ⁴ $J_{\text{H6}' }=1.6$	7.04 (dd) ⁴ $J_{\text{F4}}=8.2$ ⁴ $J_{\text{H6}' }=2.1$	7.18 (dd) ³ $J_{\text{F3}}=12.6$ ⁴ $J_{\text{H6}' }=2.1$	---	---	---
H3'	3.91(s) (OMe)	3.92 (s) (OMe)	---	6.52 (dd) ³ $J_{\text{F2}}=12.3$ ⁴ $J_{\text{H5}' }=2.4$	---	6.73 (dd) ³ $J_{\text{F2}}=11.2$ ⁴ $J_{\text{F5}}=7.4$
4'OH	n. o.	---	9.69 (s)	9.76 (s)	10.12 (s)	10.23 (s)
H5'	6.88 (d) ³ $J_{\text{H6}' }=7.8$	7.04 (dd) ³ $J_{\text{F4}}=11.5$ ³ $J_{\text{H6}' }=8.3$	6.88 (dd) ⁴ $J_{\text{F3}}=9.2$ ³ $J_{\text{H6}' }=8.3$	6.59 (dd) ³ $J_{\text{H6}' }=8.4$ ⁴ $J_{\text{H3}' }=2.4$	7.13 - 6.75	---
H6'	6.86 (dd) ³ $J_{\text{H5}' }=7.8$ ⁴ $J_{\text{H2}' }=1.6$	6.90 (ddd) ³ $J_{\text{H5}' }=8.3$ ⁴ $J_{\text{F4}}=4.3$ ⁴ $J_{\text{H2}' }=2.1$	7.02 (dd) ³ $J_{\text{H5}' }=8.3$ ⁴ $J_{\text{H2}' }=2.1$	7.32 (dd) ³ $J_{\text{H5}' }=8.4$ ⁴ $J_{\text{F2}}=8.8$	7.13 - 6.75	7.29 (dd) ³ $J_{\text{F5}}=12.0$ ⁴ $J_{\text{F2}}=6.9$
H8	5.68 (s)	5.68 (s)	5.81 (s)	5.76 (s)	5.78 (s)	5.75 (s)
H2''/H6''	7.85 (m)	7.85 (m)	7.84 (m)	7.82 (m)	7.82 (m)	7.82 (m)
H3''/H5''/ H4''	7.40 (m)	7.40 (m)	7.40 (m)	7.40 (m)	7.41 (m)	7.41(m)

Tabla 33. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{13}C y ^{15}N RMN en disolución y en estado sólido (CPMAS), y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos **89** a **94**. Cuando no se especifica son J_{CH} .

	89^a			90^b			91		92		93		94	
	CDCl_3	$\text{DMSO-}d_6$	CPMAS	CDCl_3	CPMAS	$\text{DMSO-}d_6$	CPMAS	$\text{DMSO-}d_6$	CPMAS	$\text{DMSO-}d_6$	CPMAS	$\text{DMSO-}d_6$	CPMAS	
C2	50.1 $^1J=133.1$	49.5 $^1J=133.4$	51.4	50.1 $^1J=134.1$	49.7	49.3 $^1J=132.4$	50.6	49.6 $^1J=133.0$	50.6	49.5 $^1J=134.2$	50.6	49.4 $^1J=132.4$	51.0	
C3	46.5 $^1J=136.0$	46.3 $^1J=138.1$	47.2	46.5 $^1J=136.5$	44.8	46.3 $^1J=136.3$	44.1	46.4 $^1J=136.9$	44.2	46.4 $^1J=137.5$	50.6	46.4 $^1J=136.9$	44.6	
C5	168.4	168.9	166.2	168.0	169.0	168.5	167.9	168.6	169.1	168.3	169.6	168.2	168.8	
C6	46.6 $^1J=132.1$	46.2 $^1J=131.6$	46.4	46.6 $^1J=131.5$	44.8	46.0 $^1J=132.5$	44.1	45.5 $^1J=129.6$	42.6	45.3 $^1J=131.5$	46.2	45.3 $^1J=130.0$	43.9	
C7	62.0 $^1J=137.1$	60.7 $^1J=134.5$	63.2	61.8 $^1J=136.2$	62.1	59.8 $^1J=133.5$	62.9	53.5 $^1J=136.3$	52.8	53.7 $^1J=136.7$ $^3J_{\text{F2}}=2.2$	52.5	53.0 $^1J=137.3$	53.0	
C8	92.0 $^1J=160.8$	91.0 $^1J=161.3$	91.5	92.0 $^1J=160.8$	96.0/ 95.0	91.0 $^1J=161.4$	92.3	90.8 $^1J=161.4$	93.0	90.9 $^1J=160.9$	88.8/ 91.9	90.9 $^1J=161.7$	94.3 92.7	
C9	188.5	186.0 $^3J=^3J=$ $^2J=3.9$	187.8	188.6	192.6	186.0	186.8	186.1	187.0	186.2 $^3J=^3J=$ $^2J=3.7$	184.4/ 189.1	186.2	188.6	
C1'	137.1	136.6 $^3J=10.1$ $^3J=5.3$ $^2J=2.2$	135.9	141.3 $^4J_{\text{F4}}=3.8$	140.2	137.0 $^3J_{\text{F3}}=5.3$	133.8	122.4 $^2J_{\text{F2}}=14.0$	121.1	128.8 $^2J_{\text{F2}}=11.9$ $^4J_{\text{F4}}=3.3$	126.8	122.4 $^2J_{\text{F2}}=16.6$ $^3J_{\text{F5}}=5.5$	119.8	
C2'	108.8 $^1J=156.5$ $^3J=^3J=5.4$	110.7 $^1J=156.3$	110.1	111.5 $^1J=160.1$ $^3J_{\text{F4}}=2.$	109.9	114.1 $^1J=160.2$ $^2J_{\text{F3}}=18.4$	112.7	159.3 $^1J_{\text{F2}}=243.4$	163.8 161.2	149.2 $^1J_{\text{F2}}=241.8$ $^3J_{\text{F4}}=6.1$	150.0 146.9	154.4 $^1J_{\text{F2}}=239.9$ $^4J_{\text{F5}}=1.9$	156.7 154.2	
C3'	146.7	147.3	149.2	147.8 $^2J_{\text{F4}}=10.7$	145.1(-) 144.0(+)	150.7 $^1J_{\text{F3}}=240.3$	151.7 154.2	102.2 $^2J_{\text{F2}}=25.0$ $^1J=160.9$	104.4 102.4	133.4 $^2J_{\text{F2}}=16.2$ $^2J_{\text{F4}}=16.2$	134.0	104.6 $^1J=162.0$ $^2J_{\text{F2}}=27.1$ $^3J_{\text{F5}}=3.1$	103.4	

C4'	145.2 ³ J= ³ J=6.5	145.2 ³ J=9.7 ³ J=6.9 ² J=2.7	146.3	151.8 ¹ J _{F4} =245.9	151.7(-) 149.2(+)	143.6 ² J _{F3} =12.8	146.5	157.6 ³ J _{F2} =11.9	158.7	151.2 ¹ J _{F4} =240.3 ³ J _{F2} =6.1	152.8 150.0	144.5 ² J _{F5} =14.4 ³ J _{F2} =12.1	147.1
C5'	114.4 ¹ J=159.6	115.1 ¹ J=157.8	115.2	116.1 ¹ J=162.8 ² J _{F4} =18.3	115.6	117.3 ¹ J=160.2 ³ J _{F3} =3.1	116.2	111.4 ¹ J=160.9 ⁴ J _{F2} =2.7	113.9 110.6	111.1 ¹ J=165.6 ² J _{F4} =18.5 ⁴ J _{F2} =3.3	111.5	147.4 ¹ J _{F5} =236.4 ⁴ J _{F2} =2.5	149.9 147.1
C6'	119.3 ¹ J=158.6 ³ J= ³ J=5.5	118.8 ¹ J=158.7 ³ J=7.5 ³ J=4.7	119.8	118.6 ¹ J=161.9 ³ J _{F4} =6.9	118.2	122.5 ¹ J=160.6 ⁴ J _{F3} =3.0	124.7	128.19 ¹ J=160.2 ³ J _{F2} =5.3	128.6	115.8 ¹ J=163.8 ³ J _{F4} =8.5 ³ J _{F2} =4.7	113.6	114.3 ² J _{F5} =21.2 ³ J _{F2} =6.7	113.6
C1" ^c	140.3 ³ J= ³ J=5.9	140.0 ³ J= ³ J=6.7	142.1	140.2 ³ J= ³ J=6.5	140.8	140.0 ³ J= ³ J=6.5	138.9(+) 139.8(-)	139.9 ³ J= ³ J=6.6	140.8 139.6	139.9 ³ J= ³ J=6.6	137.8	139.9 ³ J= ³ J=6.6	140.7
N1	-318.3	-319.9	-313.2	-319.6	-320.5	n.o.	-314.7	-322.6	-316.4 -317.9	-324.1	-320.3	-323.9	-316.7
N4	-264.6	-261.1	-259.1	-265.0	-255.8	-261.6	-259.1	-261.6	-257.4 -262.0	-261.8	-258.7	-261.9	-258.9 -261.8

^aδOCH₃ 56.0, ¹J = 144.8.

^bδOCH₃ 56.3, ¹J=145.0.

^cδC2"/C6" ~ 126.7, ¹J = 159.4, ³J = ³J = 6.8; δC4" ~ 128.2, ¹J = 161.2, ³J=7.2; δC3"/C5" ~ 130.5, ¹J = 160.6, ³J=³J=7.5.

Tabla 34. Desplazamientos químicos (δ en ppm) de ^{19}F RMN en disolución y en estado sólido (MAS) y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los compuestos **90** a **94**.

	90		91		92		93		94	
	CDCl_3	MAS	$\text{DMSO-}d_6$	MAS	$\text{DMSO-}d_6$	MAS	$\text{DMSO-}d_6$	MAS	$\text{DMSO-}d_6$	MAS
F2'					-117.7 $^3J_{\text{H}3}=12.3$ $^4J_{\text{H}6}=8.8$	-107.8 (47%) -112.6 (53%)	-137.1 $^4J_{\text{FF}}=12.1$ $^4J_{\text{H}6}=6.8$	-132.7	-122.7 $^5J_{\text{FF}}=16.7$ $^3J_{\text{H}3}=11.3$ $^4J_{\text{H}6}=7.0$	-116.9
F3'			-136.5 $^3J_{\text{H}2}=12.6$ $^4J_{\text{H}5}=9.2$	-126.9 (26%) -129.1 (74%)						
F4'	-136.9 $^3J_{\text{H}5}=11.5$ $^4J_{\text{H}2}=8.2$ $^4J_{\text{H}6}=4.3$	-137.4					-134.4 $^4J_{\text{FF}}=12.1$ $^3J_{\text{H}6}=10.1$ $^5J_{\text{H}5}=6.2$	-125.9		
F5'									-141.0 $^5J_{\text{FF}}=16.7$ $^3J_{\text{H}6}=12.0$ $^4J_{\text{H}3}=7.4$	-139.2

5.3.2 Cálculos teóricos

El hecho de que los compuestos de **83-88**, existan como zwitteriones nos decidió a llevar a cabo un estudio computacional en el nivel B3LYP/6-311++G(d,P) de las energías relativas de los diferentes tautómeros (Figuras 86 y 91). Con el fin de simplificar los cálculos y descartar los tautómeros menos estables se emplearon los compuestos **95**, **96** y **97** como modelos de **83-88** y los compuestos **98**, **99** y **100** para los derivados **89-94** Figura 96.

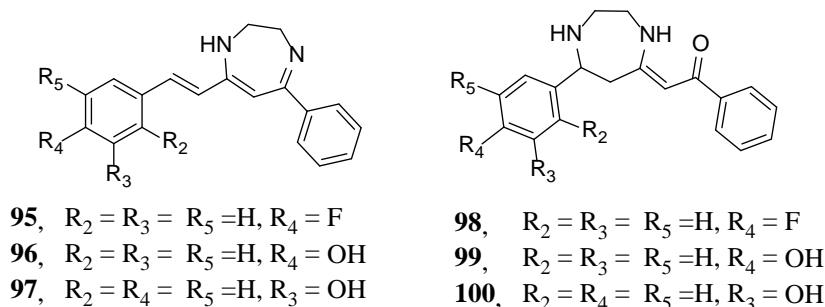


Figura 96. Compuestos modelo empleados en los cálculos teóricos.

De los resultados de los cálculos realizados (Tabla 44 del Anexo) se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Para los compuestos modelo **95-97**, en fase gaseosa predominan los tautómeros **a/c**.
2. Pese a que la forma zwitteriónica **d1** no es estable en fase gaseosa, al realizar los cálculos de los posibles tautómeros de **96** ($R_4 = \text{OH}$) mediante el modelo del continuo polarizable (PCM, del inglés polarizable continuum model) incluyendo el DMSO- d_6 , se observa que **d1** es claramente la forma tautomérica más estable.
3. Para los compuestos modelo **98-100**, el tautómero más estable es **e**.

En base a estos resultados se extendieron los cálculos a los compuestos sintetizados **83-88** y **89-94** (Tabla 45), pero solo considerando los tautómeros **a**, **c** y **d** para **83-88**, y **e** y **f** para **89-94**. De todos los compuestos se seleccionaron **86** y **92**, ya que se dispone de sus estructuras de rayos X para su futura comparación. En la Figura 97 se muestran las distintas posibilidades en cuanto a las conformaciones y formas tautoméricas para los dos compuestos seleccionados. Esto resulta en un total de 36 estructuras posibles. Los resultados de los cálculos de sus energías relativas se presentan en la Tabla 35 y en la Tabla 46 del Anexo. En la Figura 98 se representan los cuatro isómeros de **86dT**.

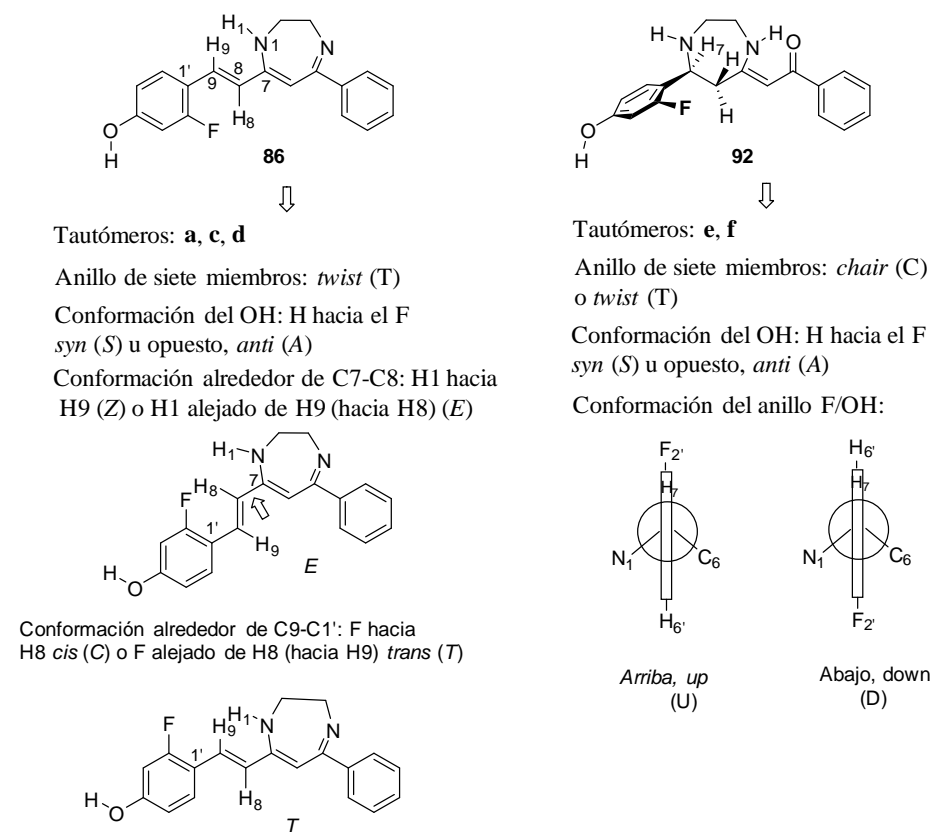


Figura 97. Sistema utilizado para identificar las estructuras de **86** y **92**.

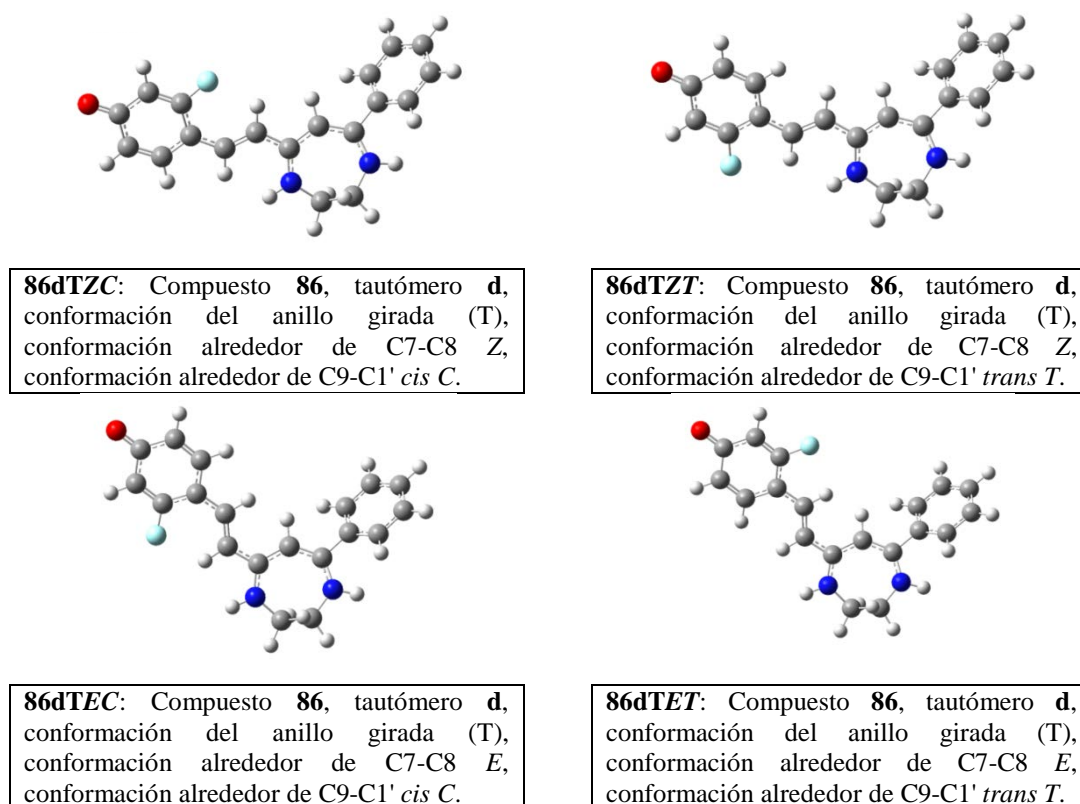


Figura 98. Representación de las cuatro estructuras de **86dT**.

Tabla 35. Energías relativas en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ correspondientes a los cálculos en DMSO-d_6 . Estructuras con los códigos mostrados en la Figura 97 (el tautómero **d** no posee OH).

	Comp.	Tautómero	Anillo	Conf. OH	C7-C8	C9-C1'	F2'/H7	E_{rel}
1	86	a	T	S	Z	C		36.6
2	86	a	T	S	Z	T		35.0
3	86	a	T	S	E	C		41.4
4	86	a	T	S	E	T		40.6
5	86	a	T	A	Z	C		35.8
6	86	a	T	A	Z	T		34.6
7	86	a	T	A	E	C		40.7
8	86	a	T	A	E	T		40.2
9	86	c	T	S	Z	C		40.0
10	86	c	T	S	Z	T		39.1
11	86	c	T	S	E	C		38.9
12	86	c	T	S	E	T		36.7
13	86	c	T	A	Z	C		39.2
14	86	c	T	A	Z	T		38.9
15	86	c	T	A	E	C		38.2
16	86	c	T	A	E	T		36.3
17	86	d	T		Z	C		1.8
18	86	d	T		Z	T		0.0
19	86	d	T		E	C		1.8
20^a	86	d	T		E	T		0.4
21^b	92	e	C	S			U	0.6
22^b	92	e	C	S			D	3.2
23	92	e	C	A			U	0.0
24	92	e	C	A			D	2.5
25	92	e	T	S			U	23.4
26	92	e	T	S			D	23.6
27	92	e	T	A			U	23.1
28	92	e	T	A			D	22.9
29	92	f	C	S			U	43.2
30	92	f	C	S			D	46.1
31	92	f	C	A			U	42.6
32	92	f	C	A			D	45.4
33	92	f	T	S			U	62.3
34	92	f	T	S			D	62.5
35	92	f	T	A			U	61.8
36	92	f	T	A			D	61.7

^aDe acuerdo con la estructura de rayos X, **86** corresponde a **20 (86dTET)** (Figura 100).

^bDe acuerdo con la estructura de rayos X, **92** está formado por un 75% de **21 (92eCSU)** y un 25% de **22 (92eCSD)** (Figura 101).

El análisis estadístico de los valores de E_{rel} del compuesto **86d**, empleando un modelo empírico donde las diferentes posibilidades de la Figura 98 están presentes o ausentes, muestra que los tautómeros **a** y **c** tienen aproximadamente las mismas energías relativas, por lo que se consideran equivalentes (Tabla 35). La ecuación que resulta de la regresión múltiple es:

$$E_{\text{rel}} = (38.0 \pm 0.7) \text{ tautómero} + (1.6 \pm 0.8) \text{ rotación C9-C1}' - (1.1 \pm 0.8) \text{ rotación C7-C8},$$

$n = 20, R^2 = 0.998, \text{ RMS residual} = 1.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}.$

Los tautómeros **a** y **c** son en promedio $38.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ menos estables que el tautómero **d**. La estructura *trans* es más estable que la *cis* ($1.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) y *Z* es mejor que *E* pese a que la diferencia es de solo $1.1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. La conformación del OH no tiene ningún efecto significativo. La estructura de rayos X de **86** (Figura 100), como se verá en el siguiente apartado, corresponde a 20, el mínimo absoluto (Tabla 46 del Anexo).

Para el compuesto **92** un análisis similar de la E_{rel} respecto a las cuatro características de la Tabla 35 conduce a la siguiente ecuación:

$$E_{\text{rel}} = (3.2 \pm 0.7) + (40.8 \pm 0.7) \text{ tautómero} + (19.8 \pm 0.7) \text{ conformación} - (1.3 \pm 0.7) \text{ F2'/H7}, n = 16, R^2 = 0.997, \text{ RMS residual} = 1.4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}.$$

El tautómero **f** es $40.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, en promedio, menos estable que el tautómero **e**. La conformación *twist* (T), es $19.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ menos estable que la conformación silla (C) y la disposición de F2' y H7 de forma eclipsada (U) es $1.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ más estable. La conformación del OH no posee ningún efecto significativo en la E_{rel} . Las estructuras encontradas en estado sólido, que corresponden a las entradas 21 y 22 de la Tabla 35, se encuentran entre las más estables (sus diferencias con 23 y 24 se refieren a la conformación del OH). Hay que destacar que 21 es más estable que 22 en concordancia con los resultados experimentales. La diferencia calculada a 300 K es de $2.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ y corresponde al 74% de la entrada 21 y al 26% de la entrada 22.

En lo que se refiere a los cálculos GIAO, para el compuesto **86** solo se consideró el tautómero **d** tanto en DMSO- d_6 como en estado sólido, los desplazamientos químicos calculados de los cuatro isómeros (17-20) junto con los datos experimentales se presentan en la Tabla S11 de la referencia [152]. $\delta_{\text{DMSO}} = (0.46 \pm 0.21) \text{ estructura 17} + (0.52 \pm 0.21) \text{ estructura 18}$, $n = 31$, $R^2 = 0.998$, $\text{RMS} = 3.9 \text{ ppm}$. Si eliminamos los protones para compararlos con los resultados de CPMAS: $\delta_{\text{DMSO}} = (0.46 \pm 0.28) \text{ estructura 17} + (0.52 \pm 0.28) \text{ estructura 18}$, $n = 18$, $R^2 = 0.998$, $\text{RMS} = 5.3 \text{ ppm}$. Utilizando el par 19/20, los resultados son un poco peores: $\delta_{\text{DMSO}} = (0.53 \pm 0.25) \text{ 19} + (0.45 \pm 0.26) \text{ 20}$, $n = 31$, $R^2 = 0.998$, $\text{RMS} = 4.5 \text{ ppm}$. Si eliminamos todos los protones entonces: $\delta_{\text{DMSO}} = (0.53 \pm 0.34) \text{ 19} + (0.46 \pm 0.34) \text{ 20}$, $n = 18$, $R^2 = 0.998$, $\text{RMS} = 6.0 \text{ ppm}$. Resumiendo, podemos afirmar que en DMSO- d_6 hay aproximadamente 50:50 de estructuras **86dT(Z/E)C** y **86dE(Z/E)C**.

En estado sólido la ecuación es: $\delta_{\text{CPMAS}} = (7.8 \pm 1.3) + (0.940 \pm 0.009) \text{ 20}$, $R^2 = 0.998$, $\text{RMS} = 5.1 \text{ ppm}$. El hecho de que el intercepto sea significativo puede ser debido

a la perturbación resultante del hecho de que haya moléculas de disolvente en el cristal. La peor correlación corresponde a C8 (exp. 119.4, ajustado 107.4 ppm).

Los cálculos de GIAO junto con los desplazamientos químicos experimentales para **92** se recogen también en la Tabla S11 de la referencia [152]. Las parejas 21-23 y 22-24, que corresponden a la rotación del OH, no pueden ser diferenciadas estadísticamente, por lo tanto se llevaron a cabo los cálculos usando las estructuras presentes en el cristal que corresponden a las entradas 21 y 22 (Figura 101). Obsérvese, sin embargo, que los desplazamientos químicos calculados en DMSO-*d*₆ para H5' y H3' (los que rodean al OH) se aproximan más al conjunto 23/24 (Figura 99).

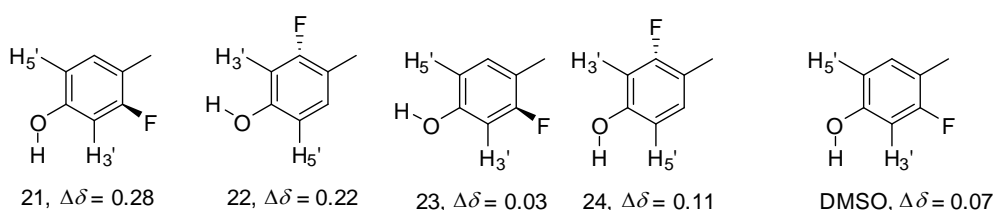


Figura 99. Diferencia entre desplazamientos químicos $\delta_{H5'} - \delta_{H3'}$ en ppm.

En DMSO-*d*₆, $\delta_{\text{DMSO}} = (0.89 \pm 0.10)$ estructura 21 + (0.11 ± 0.10) estructura 22, $n = 35$, $R^2 = 0.9998$, RMS = 1.5 ppm. Nótese que se han empleado ¹H, ¹³C, ¹⁵N y ¹⁹F pero se han omitido NH1 y OH por ser demasiado sensibles a los efectos del disolvente debido a los enlaces de hidrógeno intermoleculares; el caso de 4-NH es distinto al estar protegido de estos efectos debido a la formación del enlace de hidrógeno intramolecular. Si eliminamos todos los protones para compararlos con los resultados de CPMAS entonces: $\delta_{\text{DMSO}} (0.89 \pm 0.14)$ 21 + (0.11 ± 0.14) 22, $n = 20$, $R^2 = 0.9998$, RMS = 2.0 ppm. Por lo tanto, en DMSO-*d*₆ hay un 89% de la estructura 21 y un 11% de la estructura 22. Teniendo en cuenta que no se fijó a priori que la suma de los porcentajes debía ser 100, el resultado es una confirmación de la validez del modelo.

En los experimentos de CPMAS se observan señales desdobladas que deben corresponder a dos estructuras. El mejor acuerdo corresponde a: $\delta_{\text{CPMAS1}} = (0.993 \pm 0.005)$ estructura 22, $R^2 = 0.9994$, RMS = 3.6 ppm y $\delta_{\text{CPMAS2}} = (0.998 \pm 0.005)$ estructura 21, $R^2 = 0.9996$, RMS = 3.1 ppm. En el espectro de ¹⁹F RMN se han podido determinar los porcentajes de las señales a -107.8 ppm (47%, CPMAS1, estructura 22) y -112.6 ppm (53%, CPMAS2, estructura 21). Esto difiere de la conclusión de rayos X (75% 21/25% 22) (Tabla 34), pero debe tenerse en cuenta que la muestra empleada para RMN en estado sólido es un polvo microcristalino y puede contener diferentes

proporciones de ambas estructuras en comparación con el monocristal utilizado en cristalografía de rayos X.

5.3.3 Determinación de la estructura cristalina mediante difracción de rayos X

Se obtuvieron monocristales adecuados para análisis de difracción de rayos X, de las diazepinas hemicurcuminoideas **86**, **91**, **92** y **94**, en metanol. El compuesto **86** cristaliza en el grupo espacial monoclinico $P2_1/n$, **91** en el ortorrómbico $Pbca$, mientras que **92** y **94** lo hacen en el triclinico $P-1$. Las Figuras 100-103 muestran sus diagramas ORTEP con la numeración cristalográfica utilizada para los diferentes átomos en la unidad asimétrica. En la Tabla 36 se muestran las distancias y ángulos de los enlaces intermoleculares de hidrógeno.

Tabla 36. Enlaces de hidrógeno para los compuestos **86**, **91**, **92** y **94**, distancias en Å y ángulos en °.

Comp.	D-H...A	Operaciones de simetría ^a	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
86	O(2)–H(2B)···O(1)		0.94	1.94	2.858(3)	166.8
	N(2)–H(2)···O(3)		0.95	1.96	2.843(3)	153.0
	O(4)–H(4)···O(3)		0.82	2.08	2.869(8)	160.7
	N(1)–H(1)···O(1)	$-x-1/2, y-1/2, -z+1/2$	0.86	2.08	2.860(3)	150.3
	O(3)–H(3A)···O(1)	$x+1/2, -y+1/2, z+1/2$	0.95(2)	1.87(2)	2.808(3)	168(4)
	O(3)–H(3B)···O(4)	$x, y-1, z$	0.96(2)	1.90(2)	2.837(8)	163(4)
	O(2)–H(2C)···O(1)	$x, y+1, z$	0.94(2)	1.90(2)	2.813(3)	165(4)
91	N(2)–H(2)···O(2)		1.04	1.80	2.667(3)	137.5
	N(1)–H(1)···O(2)	$x+1/2, -y+1/2, -z+1$	1.05	1.97	3.018(3)	174.2
	O(1)–H(1A)···N(1)	$-x+3/2, y-1/2, z$	1.08	1.65	2.711(3)	166.2
92	N(11)–H(11)···O(22)	$x, y, z+1$	1.06	2.10	3.059(3)	149.5
	N(21)–H(21)···O(21)		0.93	1.90	2.666(3)	138.1
	N(12)–H(12)···O(21)		0.98	2.07	3.038(3)	170.2
	N(22)–H(22)···O(22)		0.93	1.97	2.698(3)	133.1
	O(11)–H(11A)···N(12)	$-x+2, -y, -z+2$	0.82	1.93	2.692(3)	154.5
	O(30)–H(30)···O(11)		0.82	2.16	2.962(4)	164.4
	O(12)–H(12A)···N(11)	$-x+1, -y+1, -z+2$	0.82	2.01	2.790(3)	159.1
94	N(11)–H(11)···O(22)	$-x, -y+1, -z+1$	0.76(3)	2.30(3)	3.038(4)	163(3)
	N(12)–H(12)···O(21)	$-x, -y+1, -z+2$	0.85	2.11	2.958(4)	170.0
	N(21)–H(21)···O(21)		0.85	1.99	2.669(3)	136.5
	N(22)–H(22)···O(22)		0.95	1.89	2.697(4)	140.3
	O(11)–H(11A)···N(12)		0.82	1.89	2.597(4)	143.2
	O(30)–H(30)···O(11)		0.82	2.17	2.836(4)	138.8
	O(12)–H(12A)···N(11)	$x-1, y+1, z$	0.82	1.94	2.707(4)	154.3

^a Operaciones de simetría utilizadas para generar átomos equivalentes.

En la Figura 100 se aprecia como la 1,4-diazepina hemicurcuminoide **86** contiene una molécula por unidad asimétrica con dos moléculas de cristalización de agua y media molécula de metanol. Las distancias y ángulos de enlace coinciden con una distribución electrónica de la forma tautomérica zwitteriónica **d1**. Como es de esperar, la presencia del anillo diazepínico de siete miembros conduce a una geometría que se desvía de la planaridad. El ángulo diedro entre los planos definidos por los dos anillos aromáticos es $62.2(3)^\circ$ estando todos los átomos del anillo de siete miembros fuera de ellos. En este sentido, debe mencionarse que la desviación del plano medio del fragmento N1C1C2C3N2, que presenta una deslocalización electrónica en la especie zwitteriónica, es de $20.8(3)^\circ$.

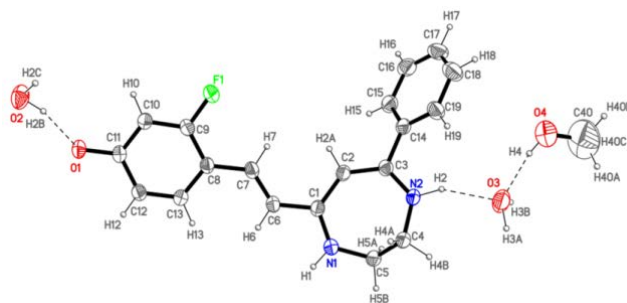


Figura 100. Diagrama ORTEP de **86** (20% de probabilidad de los elipsoides).

El compuesto **92** contiene dos moléculas cristalográficamente independientes (denominadas 1 y 2) con una molécula de metanol de cristalización por unidad asimétrica (Figura 101). Las distancias y ángulos de enlace coinciden con la estructura del tautómero **e** que muestra una deslocalización electrónica a lo largo del fragmento N2C3C12C13O2. Como se ha descrito anteriormente, las moléculas no son planas debido a la geometría del anillo de siete miembros con un ángulo diedro entre los planos formados por los dos anillos aromáticos de $65.7(4)^\circ$ y $74.3(4)^\circ$ para las moléculas 1 y 2 respectivamente. El grupo acilo en ambas moléculas se desvía ligeramente de la planaridad debido a la deslocalización electrónica anteriormente mencionada y a la formación del enlace de hidrógeno intramoleculare N2H2...O2. También es importante señalar que, en las moléculas tipo 2, se observa una deslocalización respecto a la posición de los átomos de flúor en dos posiciones distintas, con ocupaciones del 50:50.

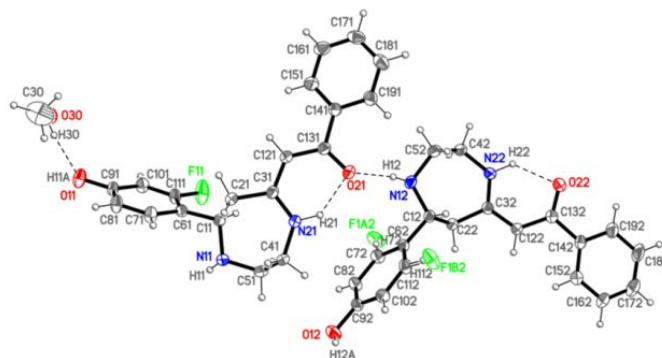


Figura 101. Diagrama ORTEP de **92** (30% de probabilidad de los elipsoides).

Los compuestos **91** y **94** guardan analogías con **92**. Mientras **94** (Figura 103) posee dos moléculas cristalográficamente diferentes, denominadas 1 y 2, y una molécula de metanol de cristalización, el compuesto **91** (Figura 102) contiene una molécula por unidad asimétrica. Debido al plegamiento del anillo de siete miembros ambos adoptan una conformación silla. El ángulo diedro formado por los dos planos de los anillos aromáticos es $71.1(2)^\circ$ para **91**, y de $60.3(4)^\circ$ y $67.9(4)^\circ$ para **94**, moléculas 1 y 2 respectivamente. Como ocurría en el caso de **92**, ambos compuestos se encuentran en la forma tautomérica e de acuerdo a los datos de sus distancias y ángulos de enlace, pero también se aprecia deslocalización electrónica a lo largo de $N2C3C12C13O2$. Este hecho, junto con el fuerte enlace de hidrógeno intramolecular existente entre $N2H2 \cdots O2$ (Tabla 36) podría estar relacionado con la planaridad observada para el grupo acilo. El anillo de fenilo se desvía de este plano con un ángulo diedro de $12.5(2)^\circ$ para **91** y de $27.9(4)^\circ$ y $17.7(4)^\circ$ para **94**, moléculas 1 y 2, respectivamente.

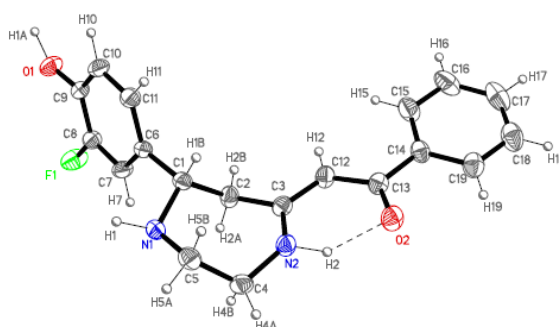


Figura 102. Diagrama ORTEP de **91** (30% de probabilidad de los elipsoides).

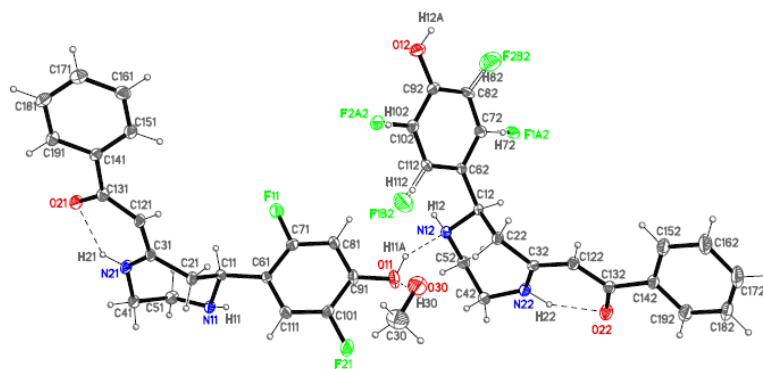


Figura 103. Diagrama ORTEP de 94 (20% de probabilidad de los elipsoides).

5.4 RESUMEN Y CONCLUSIONES

- Se han preparado doce 1,4-diazepinas hemicurcuminoides (**83-94**) a partir de las β -dicetonas correspondientes mediante el estudio de su reactividad con etilendiamina. Las diazepinas **83-88** se han obtenido al utilizar AcOH como disolvente favoreciéndose la adición nucleofílica a los carbonos carbonílicos, mientras que la adición aza-Michael dio lugar a las diazepinas **89-94** cuando el disolvente empleado fue MeOH.
- El estudio estructural de las 1,4-diazepinas hemicurcuminoides sintetizadas se ha llevado a cabo mediante RMN en disolución y en estado sólido, así como difracción de rayos X. Las estructuras de rayos X de los compuestos **86**, **91**, **92** y **94** han sido descritas por primera vez. El estudio detallado del compuesto **86** ha permitido determinar que los compuestos **83-88** existen predominantemente como zwitteriones (**d**), una estructura tautomérica bastante inusual y que el anillo diazepínico tiene una conformación *twist*. Los compuestos **89-94** existen en la forma tautomérica **e** con un enlace de hidrógeno intramolecular, presentando el anillo de siete miembros una conformación de silla. Los desplazamientos químicos calculados teóricamente coinciden con los datos experimentales y permitieron asignar correctamente señales como las de ^{19}F RMN MAS del compuesto **92**.

5.5 PARTE EXPERIMENTAL

5.5.1 Materiales y métodos

El análisis estructural de los distintos compuestos sintetizados se realizó mediante el empleo de las técnicas e instrumentos que se indican en los apartados 3.6 y 4.6.

Espectrometría de masas. El análisis de espectrometría de masas de alta resolución (HR-MS del inglés high-resolution mass spectrometry) se llevó a cabo utilizando un sistema LC Agilent 1200 Series, equipado con una bomba binaria, un muestreador automático y un horno de columna, acoplado a un espectrómetro de 6520 QTOF (quadrupole-time of flight). Se utilizó acetonitrilo: agua (75:25, v:v) como fase móvil a $0.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La fuente de ionización fue un interfaz ionización por electrospray (ESI del inglés electrospray ionization) funcionando en el modo ión positivo. El voltaje de electrospray se fijó en 4.5 kV, el del fragmentador a 150 V y la temperatura del gas de secado a 300 °C. Se utilizó nitrógeno (99.5% de pureza) como nebulizador (207 kPa) y gas de secado ($6 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$).

Difracción de rayos X. La recolección de datos para los compuestos **86**, **91**, **92** y **94** se llevó a cabo a temperatura ambiente en un difractómetro Bruker SMART CCD utilizando radiación Mo-K con un monocromador de grafito ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) funcionando a 50 kV y 35 mA. Los tiempos de exposición fueron 25 s para **86** y de 20 s para **91**, **92** y **94**. Las estructuras fueron resueltas por métodos directos y refinadas por el método de mínimos cuadrados en F2 utilizando (SHELXL-97).

5.5.2 Síntesis de 1,4-diazepinas hemicurcuminoides

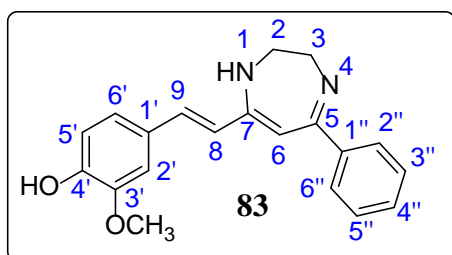
Procedimiento sintético empleado para la síntesis de las 1,4-diazepinas 83-88.

A un matraz de fondo redondo de dos bocas, provisto de un refrigerante de reflujo, se añade la correspondiente β -dicetona **27**, **30**, **31**, **52-54** (1 mmol) y ácido acético glacial (5.0 mL). Posteriormente, a través de una de las bocas, se adiciona etilendiamina (0.13 mL, 2 mmol) y la disolución resultante se calienta a reflujo durante 6 h manteniéndose la agitación magnética durante toda la noche a temperatura ambiente (25 °C). El disolvente se elimina a presión reducida obteniéndose un aceite de color rojo intenso al que se le adicionan 15 mL de una disolución saturada de bicarbonato sódico. El producto deseado se extrae con una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{iPrOH}$ (8:2) (4 x 10 mL), se lava con una disolución saturada de NaCl (2 x 5 mL), se seca con sulfato magnésico

anhidro y se concentra a vacío. El crudo obtenido se purifica mediante una columna cromatográfica de gel de sílice, empleando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (8:2:1) como eluyente, aislándose las correspondientes diazepinas **83-88**, como sólidos tras su cristalización en MeOH.

Procedimiento sintético empleado para la síntesis de las 1,4-diazepinas 89-94.

En un matraz de fondo redondo de dos bocas, provisto de un refrigerante de reflujo, se disolvió la cantidad correspondiente de dicetona **27, 30, 31, 52-54** (1 mmol) en metanol (5 mL) calentando a 65 °C. A través de una de las bocas, mediante un embudo de adición, se adicionó gota a gota una disolución de etilendiamina en exceso (0.8 mL, 12 mmol) en 5 mL de metanol. La mezcla resultante fue calentada a reflujo bajo agitación magnética durante 6 h. El disolvente fue evaporado a presión reducida haciendo pasar una corriente de nitrógeno gas para eliminar el exceso de etilendiamina. El crudo resultante fue purificado mediante una columna cromatográfica de gel de sílice empleando cloroformo/metanol (9:1) como eluyente, obteniéndose la correspondiente diazepina **89-94** como un sólido que fue cristalizado en metanol.

(4E,6Z)-7-((*E*)-3-Metoxi-4-hidroxiestiril)-5-fenil-2,3-dihidro-1*H*-1,4-diazepina (**83**)

El compuesto **83** fue obtenido a partir de (*2Z,4E*)-3-hidroxi-5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (**27**) como un sólido rojo (192 mg, 60%).

Pf: 164.8 °C (Descompone).

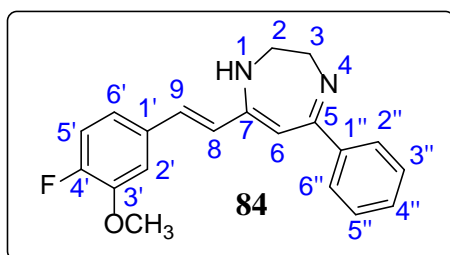
HRMS (ESI) [M+H]⁺ calculado para [C₂₀H₂₁N₂O₂]: 321.1598. Experimental: 321.1595.

¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.69 (m, 2H, H2"/H6"), 7.38 (m, 3H, H3"/H5" y H4"), 7.10 (d, ⁴J_{H6'} = 2.0 Hz, 1H, H2'), 7.00 (d, ³J_{H8} = 16.2 Hz, 1H, H9), 6.89 (dd, ³J_{H5'} = 8.2 Hz, ⁴J_{H2'} = 2.0 Hz, 1H, H6'), 6.68 (d, ³J_{H6'} = 8.2 Hz, 1H, H5'), 6.61 (d, ³J_{H9} = 16.2 Hz, 1H, H8), 5.39 (s, 1H, H6), 3.78 (s, 3H, OMe), 3.47 (sa, 4H, 2-CH₂ y 3-CH₂).

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ 162.3 (C5), 154.8 (C7), 150.4 (C4'), 148.4 (C3'), 141.4 (C1"), 132.6 (C9), 128.8 (C4"), 127.9 (C3"/C5"), 127.2 (C2"), 125.9 (C1'), 123.4 (C8), 121.9 (C6'), 116.0 (C5'), 109.9 (C2'), 92.9 (C6), 55.5 (OMe), 53.8 (C3), 49.6 (C2).

¹⁵N RMN (40.54 MHz, CDCl₃ + gota de TFA): δ -244.6, -245.1.

¹⁵N RMN (40.54 MHz, TFA): δ -249.5, -251.6.

(4E,6Z)-7-((*E*)-3-Metoxi-4-fluoroestiril)-5-fenil-2,3-dihidro-1*H*-1,4-diazepina (**84**)

El compuesto **84** fue obtenido a partir de (*2Z,4E*)-5-(4-fluoro-3-metoxifenil)-3-hidroxi-1-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (**30**) como un sólido rojo (129 mg; 40%).

Pf: > 150 °C (Descompone).

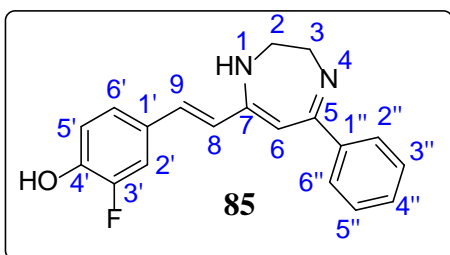
HRMS (ESI) [M+H]⁺ Calculado para [C₂₀H₂₀FN₂O]: 323.1554. Experimental: 323.1563.

¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.70 (m, 2H, H2"/H6"), 7.44 (m, 3H, H3"/H5" y H4"), 7.41 (dd, ⁴J_{F4'} = 8.2 Hz, ⁴J_{H6'} = 1.8 Hz, 1H, H2'), 7.27 (d, ³J_{H8} = 16.3 Hz, 1H, H9) 7.23 (dd, ³J_{F4'} = 11.3 Hz, ³J_{H6'} = 8.3 Hz, 1H, H5'), 7.10 (m, 1H, H6'), 6.96 (d, ³J_{H9} = 16.3 Hz, 1H, H8), 5.52 (s, 1H, H6), 3.87 (s, 3H, OMe), 3.77 (sa, 2H, 3-CH₂), 3.57 (sa, 2H, 2-CH₂).

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ 151.6 (d, ¹J_{F4'} = 246.8 Hz, C4'), 147.4 (d, ²J_{F4'} = 10.8 Hz, C3'), 130.8 (C9), 140.9 (C1"), 133.2 (d, ⁴J_{F4'} = 3.5 Hz, C1'), 129.0 (C8) 128.0 (C3"/C5 y C4"), 127.3 (C2"/C6"), 120.2 (C6'), 116.1 (d, ²J_{F4'} = 18.2 Hz, C5'), 111.4 (d, ³J_{F4'} = 2.1 Hz, C2'), 93.3 (C6), 56.0 (OMe), 53.3 (C3), 50.0 (C2).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆): δ -132.1 (ddd, ³J_{H5'} = 11.3 Hz, ⁴J_{H2'} = 8.4 Hz, ⁴J_{H6'} = 4.6 Hz, F4').

¹⁵N RMN (40.54 MHz, DMSO-*d*₆ + gota de TFA): δ -237.4, -241.0.

(4E,6Z)-7-((*E*)-3-Fluoro-4-hidroxiestiril)-5-fenil-2,3-dihidro-1*H*-1,4-diazepina (**85**)

El compuesto **85** fue obtenido a partir de (2*Z*,4*E*)-5-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-3-hidroxi-1-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (**31**) como un sólido rojo (170 mg, 55%).

Pf: > 150 °C (Descompone).

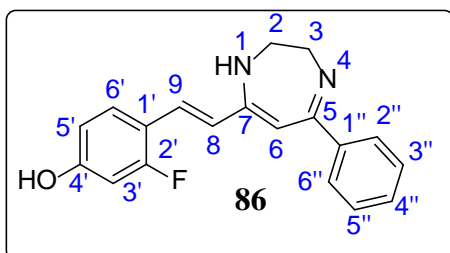
HRMS (ESI) [M+H]⁺ calculado para [C₁₉H₁₈FN₂O]: 309.1398. Experimental: 309.1407.

¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆ + gota de AcOH): δ 9.19 (sa, 3H, 1-NH, 4-NH, OH), 7.73 (m, 2H, H2"/H6"), 7.63 (d, ³J_{H8} = 16.3 Hz, 1H, H9), 7.62 (m, 1H, H4"), 7.55 (m, 2H, H3"/H5"), 7.46 (dd, ³J_{F3'} = 12.5 Hz, ⁴J_{H6'} = 2.0 Hz, 1H, H2'), 7.26 (dd, ³J_{H5'} = 8.4 Hz, ⁴J_{H2'} = 2.0 Hz, 1H, H6'), 7.05 (t, ⁴J_{F3'} = ³J_{H6'} = 8.7 Hz, 1H, H5'), 6.98 (d, ³J_{H9} = 16.3 Hz, 1H, H8), 5.65 (s, 1H, H6), 3.72 (sa, 4H, 2-CH₂ y 3-CH₂).

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆ + gota de AcOH): δ 164.4 (C5), 162.1 (C7), 151.1 (d, ¹J_{F3'} = 241.8 Hz, C3'), 147.4 (d, ²J_{F3'} = 12.5 Hz, C4'), 138.5 (C9), 136.2 (C1"), 131.6 (C4"), 128.8 (C3"/C5"), 128.2 (C2"/C6"), 126.4 (d, ³J_{F3} = 6.8 Hz, C1'), 125.4 (d, ⁴J_{F3'} = 2.8 Hz, C6'), 121.6 (C8), 118.1 (d, ³J_{F3'} = 3.2 Hz, C5'), 114.8 (d, ²J_{F3'} = 18.3 Hz, C2'), 89.1 (C6), 48.4 (C3), 48.1 (C2).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆ + gota de AcOH): δ -135.6 (dd, ³J_{H2'} = 12.5 Hz, ⁴J_{H5'} = 9.1 Hz, F3').

¹⁵N RMN (40.54 MHz, DMSO-*d*₆ + gota de AcOH): δ -238.4, -240.4.

(4E,6Z)-7-((*E*)-2-Fluoro-4-hidroxiestiril)-5-fenyl-2,3-dihidro-1*H*-1,4-diazepina (**86**)

El compuesto **86** fue obtenido a partir de (*2Z,4E*)-5-(2-fluoro-4-hidroxifenil)-3-hidroxi-1-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (**52**) como un sólido rojo (247 mg, 80%).

Pf: > 100 °C (Descompone).

HRMS (ESI) [M+H]⁺ calculado para [C₁₉H₁₈FN₂O]: 309.1398. Experimental 309.1394.

¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.68 (m, 2H, H2"/H6"), 7.45 (m, 3H, H3"/H5" y H4"), 7.38 (dd, ⁴J_{F2'} = 10.0 Hz, ³J_{H5'} = 8.7 Hz, 1H, H6'), 7.25 (d, ³J_{H8} = 16.2 Hz, 1H, H9), 6.59 (d, ³J_{H9} = 16.2 Hz, 1H, H8), 6.38 (dd, ³J_{H6'} = 8.7 Hz, ⁴J_{H3'} = 2.3 Hz, 1H, H5'), 6.26 (dd, ³J_{F2'} = 14.5 Hz, ⁴J_{H5'} = 2.3 Hz, 1H, H3'), 5.42 (s, 1H, H6), 3.74 (s, 2H, 3-CH₂), 3.53 (s, 2H, 2-CH₂).

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ 167.5 (d, ³J_{F2} = 12.0 Hz, C4'), 162.6 (C5), 162.3 (d, ¹J_{F2} = 249.6 Hz, C2'), 157.8 (C7), 139.7 (C1"), 129.7 (C4"), 128.7 (d, ³J_{F2'} = 6.2 Hz, C6'), 128.2 (C3"/C5" y C9), 127.5 (C2"/C6"), 121.0 (C8), 114.7 (C5'), 109.6 (d, ²J_{F2'} = 11.9 Hz, C1'), 103.1 (d, ²J_{F2'} = 19.8 Hz, C3'), 91.7 (C6), 51.8 (C3), 48.9 (C2).

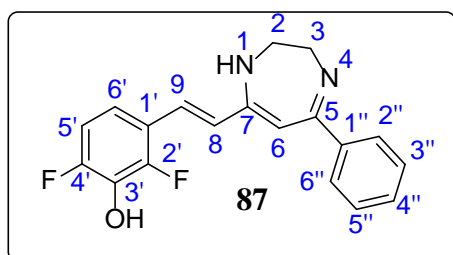
¹³C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 174.1 (C4'), 165.2 (C2'), 163.9 (C5), 162.6 (C7), 137.0 (C1"), 134.5 (C4"), 131.0 (C3"/C5"), 128.7 (C6', C9 y C2"/C6"), 119.4 (C8), 116.4 (C5'), 109.0 (C1'), 106.3 (C3'), 85.7 (C6), 49.7 (C3), 48.7 (C2).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆): δ -115.7 (dd, ³J_{H3'} = 14.3 Hz, ⁴J_{H6'} = 10.0 Hz, F2).

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -111.9 (F2').

¹⁵N RMN (40.60 MHz, CPMAS): δ -232.3, -246.8.

(4E,6Z)-7-((E)-2,4-Difluoro-3-hidroxiestiril)-5-fenil-2,3-dihidro-1H-1,4-diazepina (**87**)



El compuesto **87** fue obtenido a partir de (2Z,4E)-5-(2,4-difluoro-3-hidroxifenil)-3-hidroxi-1-fenil penta-2,4-dien-1-ona (**53**) como un sólido rojo (127 mg, 39%).

Pf: >150 °C (Descompone).

HRMS (ESI) [M+H]⁺ calculado para [C₁₉H₁₇F₂N₂O]: 327.1303. Experimental: 327.1327.

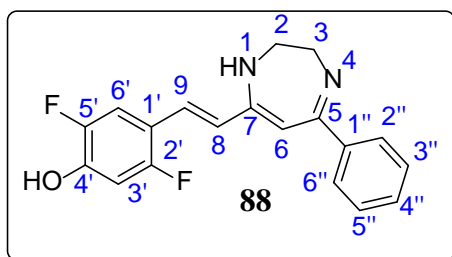
¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆ + gota de AcOH): δ 10.00 (sa, 3H, 1-NH, 4-NH y OH), 7.75 (m, 2H, H2''/H4''), 7.68 (d, ³J_{H8} = 16.5 Hz, 1H, H9), 7.63 (m, 1H, H4''), 7.56 (m, 2H, H3''/H5''), 7.31 (ddd, ³J_{H5'} = 8.8 Hz, ⁴J_{F2'} = 7.6 Hz, ⁴J_{F4'} = 5.8 Hz, 1H, H6'), 7.15 (d, ³J_{H9} = 16.5 Hz, 1H, H8), 7.12 (ddd, ³J_{F4'} = 10.4 Hz, ³J_{H6'} = 8.8 Hz, ⁵J_{F2'} = 1.6 Hz, 1H, H5'), 5.65 (s, 1H, H6), 3.75 (sa, 4H, 2-CH₂ y 3-CH₂).

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆ + gota de AcOH): δ 164.9 (C5), 161.3 (C7), 153.2 (dd, ¹J_{F4'} = 246.2 Hz, ³J_{F2'} = 6.1 Hz, C4'), 151.1 (dd, ¹J_{F2'} = 249.0 Hz, ³J_{F2'} = 6.5 Hz, C2'), 135.9 (C1''), 134.2 (t, ²J_{F2'} = ²J_{F4'} = 16.2 Hz, C3'), 131.7 (C4''), 130.9 (t, ³J_{F2'} = ⁵J_{F4'} = 2.4 Hz, C9), 128.7 (C3''/C5''), 128.2 (C2''/C6''), 126.0 (dd, ⁴J_{F2'} = 6.1 Hz, ⁶J_{F4'} = 2.6 Hz, C8), 119.6 (dd, ²J_{F2'} = 9.8 Hz, ⁴J_{F4'} = 3.3 Hz, C1'), 117.4 (dd, ³J_{F4'} = 8.9 Hz, ³J_{F2'} = 3.3 Hz, C6'), 112.1 (dd, ²J_{F4'} = 19.1 Hz, ⁴J_{F2'} = 3.3 Hz, C5'), 89.7 (C6), 48.4 (C3), 48.1 (C2).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆ + gota AcOH): δ -133.6 (ddd, ⁴J_{F2'F4'} = 14.9 Hz, ⁴J_{H6'} = 7.7 Hz, ⁵J_{H5'} = 1.9 Hz, F2'), -128.4 (ddd, ⁴J_{F4'F2'} = 14.9 Hz, ³J_{H5'} = 10.4 Hz, ⁴J_{H6'} = 5.9 Hz, F4').

¹⁵N RMN (40.54 MHz, DMSO-*d*₆ + gota AcOH): δ -235.4, -239.9.

(4*E*,6*Z*)-7-((*E*)-2,5-difluoro-4-hidroxiestiril)-5-fenil-2,3-dihidro-1*H*-1,4-diazepina (**88**)



El compuesto **88** fue obtenido a partir de (2*Z*,4*E*)-5-(2,5-difluoro-4-hidroxifenil)-3-hidroxi-1-fenil penta-2,4-dien-1-ona (**54**) como un sólido rojo (281 mg, 86%).

Pf: >150 °C (Descompone).

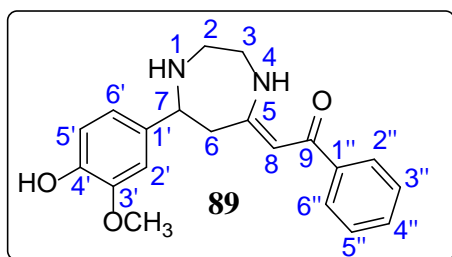
HRMS (ESI) [M+H]⁺ calculado para [C₁₉H₁₇F₂N₂O]: 327.1303. Experimental: 327.1304.

¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆ + gota de AcOH): δ 9.40 (sa, 1H, OH), 7.68 (m, 2H, H2''/H6''), 7.57 (m, 1H, H4''), 7.53 (m, 2H, H3''/H5''), 7.46 (dd, ³J_{H8} = 15.9 Hz, ⁴J_{F2'} = 1.7 Hz, 1H, H9), 7.17 (dd, ³J_{F5'} = 13.1 Hz, ⁴J_{F2'} = 8.3 Hz, 1H, H6'), 6.51 (d, ³J_{H9} = 15.9 Hz, 1H, H8), 6.07 (dd, ³J_{F2'} = 14.9 Hz, ⁴J_{F5'} = 7.9 Hz, 1H, H3'), 5.50 (s, 1H, H6), 3.66 (sa, 4H, 2-CH₂ y 3-CH₂).

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆ + gota de AcOH): δ 163.7 (d, ²J_{F5'} = 15.0 Hz, C4'), 162.8 (C7), 162.6 (C5), 160.3 (d, ¹J_{F5'} = 249.0 Hz, C2'), 152.3 (d, ¹J_{F2'} = 237.0 Hz, C5'), 137.1 (C1''), 133.3 (dd, ³J_{F2'} = 3.8 Hz, ⁴J_{F5} = 2.4 Hz, C9), 131.1 (C4''), 128.7 (C3''/C5''), 127.9 (C2''/C6''), 114.5 (d, ⁴J_{F2'} = 4.6 Hz, C8), 111.6 (dd, ²J_{F5'} = 20.8 Hz, ³J_{F2'} = 7.7 Hz, C6'), 105.1 (dd, ²J_{F2'} = 17.9 Hz, ³J_{F5'} = 7.2 Hz, C3'), 102.1 (dd, ²J_{F2'} = 14.7 Hz, ³J_{F5'} = 7.3 Hz, C1'), 89.7 (C6), 48.7 (C3), 47.9 (C2).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆ + gota de AcOH): δ -120.0 (ddd, ⁵J_{F2'F5'} = 12.8 Hz, ³J_{H3'} = 13.1 Hz, ⁴J_{H6'} = 8.7 Hz, F2'), -141.3 (ddd, ⁵J_{F5'F2'} = 12.8 Hz, ³J_{H6'} = 12.6 Hz, ⁴J_{H3'} = 7.9 Hz, F5').

¹⁵N RMN (40.54 MHz, DMSO-*d*₆ + gota de AcOH): δ -242.3, -247.9.

(Z)-1-Fenil-2-(7-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-1,4-diazepan-5-iliden)etanona (**89**)

El compuesto **89** fue obtenido a partir de (2*Z*,4*E*)-3-hidroxi-5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-fenilpent-2,4-dien-1-ona (**27**) como un sólido amarillo (274 mg, 81%).

Pf: 187.2 °C.

Anal. Calc. para C₂₀H₂₂N₂O₃: C, 70.99; H, 6.55; N, 8.28. Experimental: C, 70.81; H, 6.42; N, 8.38.

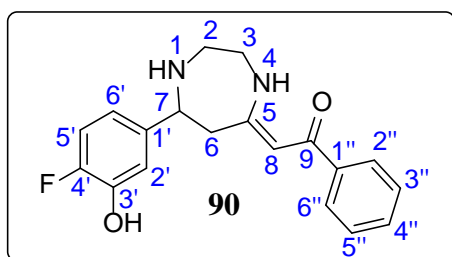
¹H RMN (400.13 MHz, CDCl₃): δ 11.56 (sa, 1H, 4-NH), 7.85 (m, 2H, H2''/H6''), 7.40 (m, 3H, H3''/H5'', H4''), 6.94 (d, ⁴J_{H6'} = 1.6 Hz, 1H, H2'), 6.88 (d, ³J_{H6'} = 7.8 Hz, 1H, H5'), 6.86 (dd, ³J_{H5'} = 7.8 Hz, ⁴J_{H2'} = 1.6, 1H, H6'), 5.68 (s, 1H, H8), 5.5 (sa, 1H, 1-NH), 3.91 (s, 3H, OMe), 3.76 (d, ³J_{H6a} = 9.7 Hz, 1H, H7), 3.70 (ddd, ²J_{H3a} = 14.6 Hz, ³J_{H2b} = 10.4 Hz, ³J_{NH} = 4.6 Hz, 1H, H3b), 3.51 (dddd, ²J_{H3b} = 14.6 Hz, ³J_{NH} = 7.2 Hz, ³J_{H2a} = 5.2 Hz, ³J_{H2b} = 1.3 Hz, 1H, H3a), 3.21 (ddd, ²J_{H2b} = 13.0 Hz, ³J_{H3a} = 5.2 Hz, ³J_{NH} = 1.3 Hz, 1H, H2a), 3.07 (dd, ²J_{H6b} = 14.4 Hz, ³J_{H7} = 9.7 Hz, 1H, H6a), 2.94 (ddd, ²J_{H2a} = 13.0 Hz, ³J_{H3b} = 10.3 Hz, ³J_{H3a} = 1.3 Hz, 1H, H2b), 2.49 (ddd, ²J_{H6a} = 14.4 Hz, ⁴J_{NH} = 1.7 Hz, ⁴J_{NH} = 0.9 Hz, 1H, H6b).

¹³C RMN (100.62 MHz, CDCl₃): δ 188.5 (C9), 168.4 (C5), 146.7 (C3'), 145.2 (C4'), 140.3 (C1''), 137.1 (C1'), 130.6 (C4''), 128.2 (C3''/C5''), 126.9 (C2''/C6''), 119.3 (C6'), 114.4 (C5'), 108.8 (C2'), 92.0 (C8), 62.0 (C7), 56.0 (OMe), 50.1 (C2), 46.6 (C6), 46.5 (C3).

¹³C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 187.8 (C9), 166.2 (C5), 149.2 (C3'), 146.3 (C4'), 142.1 (C1''), 135.9 (C1'), 128.5 (C4''), 127.0 (C3''/C5''), 126.7 (C2''/C6''), 119.8 (C6'), 115.2 (C5'), 110.1 (C2'), 91.5 (C8), 63.2 (C7), 54.8 (OMe), 51.4 (C2), 47.2 (C3), 46.4 (C6).

¹⁵N RMN (40.54 MHz, CDCl₃): δ -264.6 (N4), -318.3 (N1).

¹⁵N RMN (40.60 MHz, CPMAS): δ -259.1 (N4), -313.2 (N1).

(Z)-1-fenil-2-(7-(3-metoxi-4-fluorofenil)-1,4-diazepan-5-iliden)etanona (**90**)

El compuesto **90** fue obtenido a partir de (2*Z*,4*E*)-5-(4-fluoro-3-metoxifenil)-3-hidroxi-1-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (**30**) como un sólido blanco (276 mg, 81%).

Pf: 93.7 °C.

Anal. Calc. para C₂₀H₂₁FN₂O₂: C, 70.57; H, 6.22; N, 8.23. Experimental: C, 70.36; H, 6.00; N, 8.10.

¹H RMN (400.13 MHz, CDCl₃): δ 11.54 (sa, 1H, 4-NH), 7.85 (m, 2H, H2"/H6"), 7.40 (m, 3H, H3"/H5", H4"), 7.04 (dd, ⁴J_{F4'} = 8.2 Hz, ⁴J_{H6'} = 2.1 Hz, 1H, H2'), 7.04 (dd, ³J_{F4'} = 11.5 Hz, ³J_{H6'} = 8.3 Hz, 1H, H5'), 6.90 (ddd, ³J_{H5'} = 8.3 Hz, ⁴J_{F4'} = 4.3 Hz, ⁴J_{H2'} = 2.1 Hz, 1H, H6'), 5.70 (sa, 1H, 1-NH), 5.68 (s, 1H, H8), 3.92 (s, 3H, OMe), 3.80 (d, ³J_{H6a} = 9.8 Hz, 1H, H7), 3.70 (dddd, ²J_{H3a} = 14.7 Hz, ³J_{H2b} = 10.3 Hz, ³J_{NH} = 4.3 Hz, ³J_{H2a} = 1.3 Hz, 1H, H3b), 3.52 (dddd, ²J_{H3b} = 14.7 Hz, ³J_{NH} = 7.3 Hz, ³J_{H2a} = 5.2 Hz, ³J_{H2b} = 1.3 Hz, 1H, H3a), 3.22 (ddd, ²J_{H2b} = 13.0 Hz, ³J_{H3a} = 5.2 Hz, ³J_{NH} = 1.4 Hz, 1H, H2a), 3.05 (dd, ²J_{H6b} = 14.4 Hz, ³J_{H7} = 9.8 Hz, 1H, H6a), 2.94 (ddd, ²J_{H2a} = 13.0 Hz, ³J_{H3b} = 10.3 Hz, ³J_{H3a} = 1.3 Hz, 1H, H2b), 2.47 (ddd, ²J_{H6a} = 14.4 Hz, ⁴J_{NH} = 1.7 Hz, ⁴J_{NH} = 0.9 Hz, 1H, H6b).

¹³C RMN (100.62 MHz, CDCl₃): δ 188.6 (C9), 168.0 (C5), 151.8 (d, ¹J_{F4'} = 245.9 Hz, C4'), 147.8 (d, ²J_{F4'} = 10.7 Hz, C3'), 141.3 (d, ⁴J_{F4'} = 3.8 Hz, C1'), 140.2 (C1"), 130.6 (C4"), 128.2 (C3"/C5"), 126.9 (C2"/C6"), 118.6 (d, ³J_{F4'} = 6.9 Hz, C6'), 116.1 (d, ²J_{F4'} = 18.3 Hz, C5'), 111.5 (d, ³J_{F4'} = 2.0 Hz, C2'), 92.0 (C8), 61.8 (C7), 56.3 (OMe), 50.1 (C2), 46.6 (C6), 46.5 (C3).

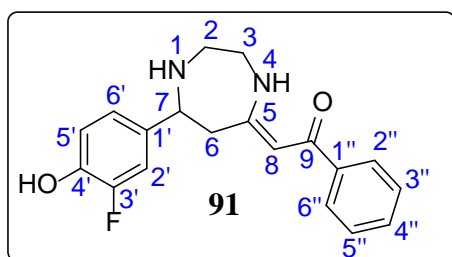
¹³C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 192.6 (C9), 169.0 (C5), 151.7(-) y 149.2(+) C4', 145.1(-) y 144.0(+) C3', 140.8 (C1"), 140.2 (C1'), 128.3 (C4"), 127.4 (C3"/C5"), 125.9 (C2"/C6"), 118.2 (C6'), 115.6 (C5'), 109.9 (C2'), 96.0/95.0 (C8), 62.1 (C7), 49.7 (C2), 44.8 (C3), 44.8 (C6).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, CDCl₃): δ -136.9 (ddd, ³J_{H5'} = 11.5 Hz, ⁴J_{H2'} = 8.2 Hz, ⁴J_{H6'} = 4.3 Hz, F4').

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -137.4 (F4').

¹⁵N RMN (40.54, CDCl₃): δ -265.0 (N4), -319.6 (N1).

¹⁵N RMN (40.60 MHz, CPMAS): δ -255.8 (N4), -320.5 (N1).

(Z)-1-Fenil-2-(7-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-1,4-diazepan-5-iliden)etanona (91)

El compuesto **91** fue obtenido a partir de (2*Z*,4*E*)-5-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-3-hidroxi-1fenilpenta-2,4-dien-1-ona (**31**) como cristales blancos (310 mg, 95%).

Pf: 186.6 °C.

Anal. Calc. para C₁₉H₁₉FN₂O₂: C, 69.92; H, 5.87; N, 8.58. Experimental: C, 69.52; H, 5.9; N, 8.54.

¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.39 (t, ³*J* = ³*J* = 5.8 Hz, 1H, 4-NH), 9.69 (sa, 1H, 4'OH), 7.84 (m, 2H, H2''/H6''), 7.40 (m, 3H, H3''/H5'' y H4''), 7.18 (dd, ³*J*_{F3'} = 12.6 Hz, ⁴*J*_{H6'} = 2.1 Hz, 1H, H2'), 7.02 (dd, ³*J*_{H5'} = 8.3 Hz, ⁴*J*_{H2'} = 2.1 Hz, 1H, H6'), 6.88 (dd, ⁴*J*_{F3'} = 9.2 Hz, ³*J*_{H6'} = 8.3 Hz, 1H, H5'), 5.81 (s, 1H, H8), 3.64 (d, ³*J*_{H6a} = 9.7 Hz, 1H, H7), 3.53 (m, 2H, H3a y H3b), 3.05 (ddd, ²*J*_{H2b} = 13.3 Hz, ³*J*_{H3b} = 3.2 Hz, ³*J*_{H3a} = 3.2 Hz, 1H, H2a), 2.99 (dd, ²*J*_{H6b} = 14.3 Hz, ³*J*_{H7} = 9.7 Hz, 1H, H6a), 2.74 (sa, 1H, 1-NH), 2.65 (ddd, ²*J*_{H2a} = 13.3 Hz, ³*J*_{H3b} = 5.7 Hz, ³*J*_{NH} = 5.7 Hz, 1H, H2b), 2.44 (ddd, ²*J*_{H6a} = 14.3 Hz, ⁴*J*_{NH} = 1.7 Hz, ⁴*J*_{NH} = 0.9 Hz, 1H, H6b).

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ 186.0 (C9), 168.5 (C5), 150.7 (d, ¹*J*_{F3'} = 240.3, C3'), 143.6 (d, ²*J*_{F3'} = 12.8 Hz, C4'), 140.0 (C1''), 137.0 (d, ³*J*_{F3'} = 5.3 Hz, C1'), 130.4 (C4''), 128.1 (C3''/C5''), 126.6 (C2''/C6''), 122.5 (d, ⁴*J*_{F3'} = 3.0 Hz, C6'), 117.3 (d, ³*J*_{F3'} = 3.1 Hz, C5'), 114.1 (d, ²*J*_{F3'} = 18.4 Hz, C2'), 91.0 (C8), 59.8 (C7), 49.3 (C2), 46.3 (C3), 46.0 (C6).

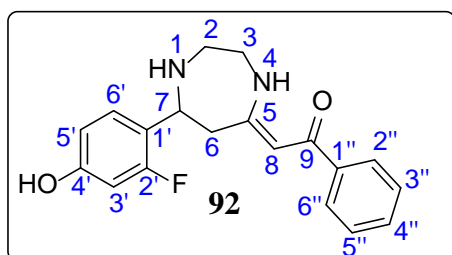
¹³C RMN (100.73, CPMAS): δ 186.8 (C9), 167.9 (C5), 151.7 y 154.2 (C3'), 146.5 (C4'), 138.9 (+) y 139.8 (-) (C1''), 133.8 (C1'), 130.7 (C4''), 129.0 (C3''/C5''), 126.9/125.7 (C2''/C6''), 124.7 (C6'), 116.2 (C5'), 112.7 (C2'), 92.3 (C8), 62.9 (C7), 50.6 (C2), 44.1 (C3), 44.1 (C6).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆): δ -136.5 (dd, ³*J*_{H2'} = 12.6 Hz, ⁴*J*_{H5'} = 9.2 Hz, F3').

¹⁹F RMN (376.94, MAS): δ -126.9 (26.5%)/-129.1 (73.5%) (F3').

¹⁵N RMN (40.54 MHz, DMSO-*d*₆): δ -261.6 (N4).

¹⁵N RMN(40.60, CPMAS): δ -259.1 (N4), -314.7 (N1).

(Z)-1-Fenil-2-(7-(2-Fluoro-4-hidroxifenil)-1,4-diazepan-5-iliden)etanona (**92**)

El compuesto **92** fue obtenido a partir de (2*Z*,4*E*)-5-(2-fluoro-4-hidroxifenil)-3-hidroxi-1-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (**52**) como cristales blancos (163 mg, 50%).

Pf: 178.9 °C.

Anal. Calc. para C₁₉H₁₉FN₂O₂ · 0.5 CH₃OH: C, 68.41; H, 6.18; N, 8.18.
Experimental: C, 68.37; H, 6.02; N, 8.38.

¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.38 (t, ³*J* = ³*J* = 5.7 Hz, 1H, 4-NH), 9.76 (sa, 1H, 4'OH), 7.82 (m, 2H, H2"/H6"), 7.40 (m, 3H, H3"/H5" y H4"), 7.32 (dd, ³*J*_{H5'} = 8.4 Hz, ⁴*J*_{F2'} = 8.8 Hz, 1H, H6'), 6.59 (dd, ³*J*_{H6'} = 8.4 Hz, ⁴*J*_{H3'} = 2.4 Hz, 1H, H5'), 6.52 (dd, ³*J*_{F2'} = 12.3 Hz, ⁴*J*_{H5'} = 2.4 Hz, 1H, H3'), 5.76 (s, 1H, H8), 3.87 (d, ³*J*_{H6a} = 9.6 Hz, 1H, H7), 3.55 (m, 2H, H3a y H3b), 3.06 (m, 2H, H2a y H6a), 2.71 (sa, 1H, 1-NH), 2.65 (m, 1H, H2b), 2.40 (d, ²*J*_{H6a} = 14.6 Hz, 1H, H6b).

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ 186.1 (C9), 168.6 (C5), 159.3 (d, ¹*J*_{F2'} = 243.4 Hz, C2'), 157.6 (d, ³*J*_{F2'} = 11.9 Hz, C4'), 139.9 (C1"), 130.5 (C4"), 128.19 (d, ³*J*_{F2'} = 5.3 Hz, C6'), 128.16 (C3"/C5"), 126.6 (C2"/C6"), 122.4 (d, ²*J*_{F2'} = 14.0 Hz, C1'), 111.4 (d, ⁴*J*_{F2'} = 2.7 Hz, C5'), 102.2 (d, ²*J*_{F2'} = 25.0 Hz, C3'), 90.8 (C8), 53.5 (C7), 49.6 (C2), 46.4 (C3), 45.5 (C6).

¹³C RMN (100.73, CPMAS): δ 187.0 (C9), 169.1 (C5), 163.8/161.2 (C2'), 158.7 (C4'), 140.8/139.6 (C1"), 132.2 (C4"), 128.6 (C6', C2"/C6" y C4"), 121.1 (C1'), 113.9/110.6 (C5'), 104.4/102.4 (C3'), 93.0 (C8), 52.8 (C7), 50.6 (C2), 44.2 (C3), 42.6 (C6).

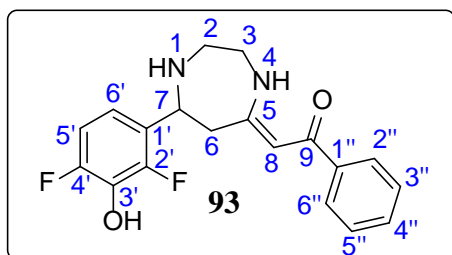
¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆): δ -117.7 (dd, ³*J*_{H3'} = 12.3 Hz, ⁴*J*_{H6'} = 8.8 Hz, F2').

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -107.8(47%)/-112.6(53%) (F2').

¹⁵N RMN (40.54 MHz, DMSO-*d*₆): δ -261.6 (N4), -322.6 (N1).

¹⁵N RMN (40.60 MHz, CPMAS): δ -257.4/-262.0 (N4), -316.4/-317.9 (N1).

(Z)-1-Fenil-2-(7-(2,4-difluoro-3-hidroxifenil)-1,4-diazepan-5-iliden)etanona (**93**).



El compuesto **93** fue obtenido a partir de (2Z,4E)-5-(2,4-difluoro-3-hidroxifenil)-3-hidroxi-1-fenil penta-2,4-dien-1-ona (**53**) como cristales blancos (114 mg, 33%).

Pf: 194.4 °C.

Anal. Calc. para C₁₉H₁₈F₂N₂O₂: C, 66.27; H, 5.27; F, 11.03; N, 8.14; O, 9.29.
Experimental: C, 65.87; H, 5.28; N, 8.16.

¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.36 (t, ³J = ³J = 5.7 Hz, 1H, 4-NH), 10.12 (sa, 1H, 4'OH), 7.82 (m, 2H, H2''/H6''), 7.41 (m, 3H, H3''/H5'' y H4''), 7.13-6.75 (m, 2H, H5' y H6'), 5.78 (s, 1H, H8) 3.92 (d, ³J_{H6a} = 9.6 Hz, 1H, H7), 3.55 (m, 2H, H3a y H3b), 3.07 (m, 2H, H2a y H6a), 2.88 (sa, 1H, 1NH), 2.66 (ddd, ²J_{H2a} = 13.6 Hz, ³J_{H3b} = 7.9 Hz, ³J_{NH} = 3.7 Hz, 1H, H2b), 2.43 (d, ²J_{H6a} = 14.6 Hz, 1H, H6b).

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ 186.2 (C9), 168.3 (C5), 151.2 (dd, ¹J_{F4} = 240.3 Hz, ³J_{F2} = 6.1 Hz, C4'), 149.2 (dd, ¹J_{F2} = 241.8 Hz, ³J_{F4'} = 6.1 Hz, C2'), 139.9 (C1''), 133.4 (t, ²J_{F2'} = ²J_{F4'} = 16.2 Hz, C3'), 130.5 (C4''), 128.8 (dd, ²J_{F2'} = 11.9 Hz, ⁴J_{F4'} = 3.3 Hz, C1'), 128.2 (C4''), 126.6 (C2''/C6''), 115.8 (dd, ³J_{F4'} = 8.5 Hz, ³J_{F2'} = 4.7 Hz, C6'), 111.1 (dd, ²J_{F4'} = 18.5 Hz, ⁴J_{F2'} = 3.3 Hz, C5'), 90.9 (C8), 53.7 (d, ³J_{F2'} = 2.2 Hz, C7), 49.5 (C2), 46.4 (C3), 45.3 (C6).

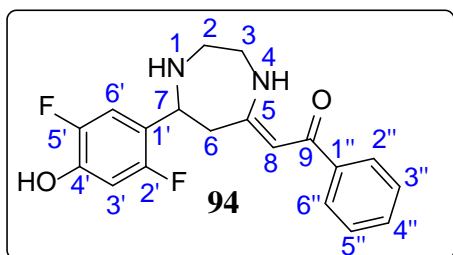
¹³C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 184.4/189.1 (C9), 169.6 (C5), 152.8/150.0 (C4'), 150/146.9 (C2'), 137.8 (C1''), 134 (C3'), 132.4 (C4''), 129.4 (C3''/C5''), 126.8 (C2''/C6'' y C1'), 113.6 (C6'), 111.5 (C5'), 88.8/91.9 (C8), 52.5 (C7), 50.6 (C2), 50.6 (C3), 46.2 (C6).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆): δ -137.1 (dd, ⁴J_{F2F4'} = 12.1 Hz, ⁴J_{H6'} = 6.8 Hz, F2'), -134.4 (ddd, ⁴J_{F4'F2'} = 12.1 Hz, ³J_{H5'} = 10.1 Hz, ⁴J_{H6'} = 6.2 Hz, F4').

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -125.9 (F4'), -132.7 (F2').

¹⁵N RMN (40.54 MHz, DMSO-*d*₆): δ -261.8 (N4), -324.1 (N1).

¹⁵N RMN (40.60 MHz, CPMAS): δ -258.7 (N4), -320.3 (N1).

(Z)-1-Fenil-2-(7-(2,5-difluoro-4-hidroxifenil)-1,4-diazepan-5-iliden)etanona (**94**)

El compuesto **94** fue obtenido a partir de (2*Z*,4*E*)-5-(2,5-difluoro-4-hidroxifenil)-3-hidroxi-1-fenil penta-2,4-dien-1-ona (**54**) como cristales blancos (141 mg, 41%).

Pf: 161.2 °C.

Anal. Calc. para C₁₉H₁₈F₂N₂O₂ · 0.5 CH₃OH: C, 64.99; H, 5.59; N, 7.77. Experimental: C, 64.83; H 5.48; N, 7.93.

¹H RMN (400.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.36 (t, ³*J* = ³*J* = 5.0, 1H, 4-NH), 10.23 (sa, 1H, 4'OH), 7.82 (m, 2H, H2''/H6''), 7.41 (m, 3H, H3''/H5'', H4''), 7.29 (dd, ³*J*_{F5'} = 12.0, ⁴*J*_{F2'} = 6.9 Hz, 1H, H6'), 6.73 (dd, ³*J*_{F2'} = 11.2 Hz, ⁴*J*_{F5'} = 7.4 Hz, 1H, H3'), 5.75 (s, 1H, H8), 3.87 (d, ³*J*_{H6a} = 9.6 Hz, 1H, H7), 3.54 (m, 2H, H3a y H3b), 3.05 (m, 2H, H2a y H6a), 2.86 (sa, 1H, 1-NH), 2.65 (ddd, ²*J*_{H2a} = 13.5 Hz, ³*J*_{H3b} = 5.1 Hz, ³*J*_{NH} = 5.1 Hz, 1H, H2b), 2.40 (d, ²*J*_{H6'a} = 14.6 Hz, 1H, H6b).

¹³C RMN (100.62 MHz, DMSO-*d*₆): δ 186.2 (C9), 168.2 (C5), 154.4 (dd, ¹*J*_{F2'} = 239.9 Hz, ⁴*J*_{F5'} = 1.9 Hz, C2'), 147.4 (dd, ¹*J*_{F5'} = 236.4 Hz, ⁴*J*_{F2} = 2.5 Hz, C5'), 144.5 (dd, ²*J*_{F5} = 14.4 Hz, ³*J*_{F2'} = 12.1 Hz, C4'), 139.9 (C1''), 130.5 (C4''), 128.2 (C3''/C5''), 126.6 (C2''/C5''), 122.4 (dd, ²*J*_{F2'} = 16.6 Hz, ³*J*_{F5'} = 5.5 Hz, C1'), 114.3 (dd, ²*J*_{F5'} = 21.2 Hz, ³*J*_{F2'} = 6.7 Hz, C6'), 104.6 (dd, ²*J*_{F2'} = 27.1 Hz, ³*J*_{F5'} = 3.1 Hz, C3'), 90.9 (C8), 53.0 (C7), 49.4 (C2), 46.4 (C3), 45.3 (C6).

¹³C RMN (100.73 MHz, CPMAS): δ 188.6 (C9), 168.8 (C5), 156.7/154.2 (C2'), 149.9/147.1 (C5'), 147.1 (C4'), 140.7 (C1''), 131.5 (C4''), 128.8 (C2''/C6'' y C3''/C5''), 119.8 (C1'), 113.6 (C6'), 103.4 (C3'), 94.3/92.7 (C8), 53 (C7), 51 (C2), 44.6 (C3), 43.9 (C6).

¹⁹F RMN (376.50 MHz, DMSO-*d*₆): δ -122.7 (ddd, ⁵*J*_{F2'F5'} = 16.7 Hz, ³*J*_{H3'} = 11.3 Hz, ⁴*J*_{H6'} = 7.0 Hz, F2'), -141.0 (ddd, ⁵*J*_{F5'F2'} = 16.7 Hz, ³*J*_{H6'} = 12.0 Hz, ⁴*J*_{H3'} = 7.4 Hz, F5').

¹⁹F RMN (376.94 MHz, MAS): δ -116.9 (F2'), -139.2 (F5').

¹⁵N RMN (40.54 MHz, DMSO-*d*₆): δ -261.9 (N4), -323.9 (N1).

¹⁵N RMN (40.60 MHz, CPMAS): δ -258.9/261.8 (N4), -316.7 (N1).

CAPÍTULO 6
CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES FINALES

- Se han sintetizado un total de 45 análogos curcuminoides de los cuales 31 han sido preparados por primera vez: las β -dicetonas hemicurcuminoides **52-59**, los pirazoles hemicurcuminoides **64-74** y las 1,4-diazepinas hemicurcuminoides **83-94**.
- El estudio estructural, de los compuestos sintetizados se ha llevado a cabo mediante RMN multinuclear (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F) en disolución y en estado sólido, y difracción de rayos X. Las estructuras de rayos X de los compuestos **52**, **54**, **55**, **64**, **65**, **66**, **86**, **91**, **92** y **94** han sido descritas por primera vez. En todos los casos existe un gran acuerdo entre los datos experimentales y los obtenidos mediante cálculos teóricos DFT, pudiéndose determinar la forma tautomérica en la que se encuentran los distintos compuestos.
- En las β -dicetonas hemicurcuminoides la forma tautomérica ceto-enol **a**, con el grupo enol en el carbono próximo al grupo estirilo, predomina sobre la **b**. En el caso de los pirazoles hemicurcuminoides, el tautómero **a** con el grupo estirilo en posición 5 es el mayoritario. El estudio estructural de las 1,4-diazepinas hemicurcuminoides preparadas permitió determinar que los compuestos **83-88** existen predominantemente como zwitteriones con el anillo diazepínico en una conformación *twist*, y que los compuestos **89-94** existen en la forma tautomérica **e** con un enlace de hidrógeno intramolecular, presentando el anillo de siete miembros una conformación de silla.
- El estudio del potencial antioxidante y neuroprotector de las β -dicetonas hemicurcuminoides **27**, **30**, **31**, **52-54**, se ha llevado a cabo mediante tres ensayos AOX diferentes (FRAP, ABTS y DPPH) y mediante estudios *in vitro* en la línea celular neuronal SH-SY5. Los compuestos **27** y **54** mostraron los mejores resultados en cuanto a su capacidad neuroprotectora, si bien **54** presenta un mejor comportamiento a mayor concentración de agente oxidante.
- Se han estudiado las propiedades antiinflamatorias y anticarcinogénicas de los pirazoles hemicurcuminoides sintetizados, mediante la determinación de la capacidad inhibidora de la actividad de la sintasa del óxido nítrico (NOS) y la determinación de la capacidad inhibidora de la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc* relacionados con la telomerasa.

Entre los compuestos estudiados los pirazoles de la serie fenil sustituida (**64-68**) presentan mayor inhibición que los pirazoles trifluorometil sustituidos, destacando entre todos ellos el pirazol hemicurcuminode fluorado **65** siendo un excelente inhibidor selectivo de iNOS.

Se ha determinado la citotoxicidad de 13 pirazoles curcuminoides (**32, 35 y 64-74**) y de curcumina (**1**) frente a tres líneas celulares tumorales (HT-29, MCF-7 y HeLa) y una no tumoral (HEK-293). Los compuestos más activos son **32 y 70**, que poseen alta citotoxicidad frente a todas las líneas celulares tumorales estudiadas. La capacidad de inhibición la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc* se ha determinado para 9 compuestos seleccionados (**32, 35, 64, 67, 69, 70 y 72-74**). Los compuestos más activos han sido **32, 69 y 74** al ser capaces de reducir simultáneamente la expresión de ambos genes.

FINAL CONCLUSIONS

- A total amount of 45 curcuminoid analogues have been synthesized, among them, 31 have been prepared for the first time: hemicurcuminoid β -diketones **52-59**, hemicurcuminoid pyrazoles **64-74** and hemicurcuminoid 1,4-diazepines **83-94**.
- The structural study of the synthesized compounds has been carried out by solution and solid state NMR (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F), and X ray diffraction analysis. The X ray structures of compounds **52**, **54**, **55**, **64**, **65**, **66**, **86**, **91**, **92** and **94** have been solved for the first time. In all cases, there is a good agreement between the experimental and the theoretical data obtained by DFT, allowing us to determine the most stable tautomeric form.
- In the hemicurcuminoid β -diketones the tautomeric form keto-enol **a**, with the enol group on the carbon near the styryl group, predominates over **b**. In the case of the hemicurcuminoid pyrazoles, the tautomer **a** with the 5-styryl group is the major one. For the hemicurcuminoid 1,4-diazepines, compounds **83-88** exist predominantly as zwitterions **d** with the diazepine ring in a twist conformation, and compounds **89-94** exist in the tautomeric form **e** with an intramolecular hydrogen bond and the seven-membered ring in a chair conformation.
- The antioxidant and neuroprotective properties of hemicurcuminoid β -diketones **27**, **30**, **31**, **52-54** has been studied using three different AOX assays (FRAP, ABTS and DPPH) and by *in vitro* studies in the SH-SY5 neuronal cell line. Compounds **27** and **54** showed the best results in terms of their neuroprotective capacity, although **54** presents better performance at a higher oxidant concentration.

The anti-inflammatory and anticarcinogenic properties of the synthesized hemicurcuminoid pyrazoles have been studied by determining their inhibitory capacity of nitric oxide synthase (NOS) activity and their properties as inhibitors of *hTERT* and *c-Myc* telomerase related genes expression.

Regarding anti-NOS assays, 17 pyrazols have been studied. Phenyl-substituted pyrazoles (**64-68**) have shown to be better NOS inhibitors than the trifluoromethyl and methyl substituted ones, among them, fluorinated hemicurcuminoid pyrazole **65** has proved to be an excellent iNOS selective inhibitor.

The cytotoxicity of a group of 13 curcuminoid pyrazoles and curcumin have been investigated on three tumoral cell lines (HT-29, MCF-7 and HeLa) and one non-tumoral human cell line (HEK-293). The most active compounds are **32** and **70**, showing high cytotoxicity against all tumoral cell lines studied.

The ability to inhibit the expression of *hTERT* and *c-Myc* genes, both involved in telomerase activity, has been determined for a subset of 9 selected derivatives (**32**, **35**, **64**, **67**, **69**, **70** and **72-74**). The most active compounds have been **32**, **69** and **74** being able to simultaneously reduce the expressions of *hTERT* and *c-Myc* genes.

CAPÍTULO 7
ANEXO

7 ANEXO

Tabla 37. Matriz de Free-Wilson con la diferencia de E_{rel} ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) de las formas tautoméricas **b-a** de las β -dicetonas hemicurcuminoideas **24-31** y **52-59**.

	$R_1 = \text{C}_6\text{H}_5$	$R_1 = \text{CF}_3$	$R_1 = \text{CH}_3$	$R_2 = \text{CH}_3$	2'-F	3'-OMe	3'-F	3'-OH	4'-OMe	4'-F	4'-OH	5'-F	b-a $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
27	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	3.8
30	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	3.9
31	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	3.9
52	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	4.0
53	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	4.0
54	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	3.9
26	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	8.8
55	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	8.5
56	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	8.5
57	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	8.6
58	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	8.3
59	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	8.2
24	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1.7
25	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	3.9
28	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	4.0
29	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	2.0

Tabla 38. Desplazamientos químicos (δ en ppm) experimentales y calculados (GIAO) para las β -dicetonas hemicurcuminoideas **24-31** y **52-59**.

Comp.	Átomos	a	b	Exp. CDCl ₃	Exp. DMSO- <i>d</i> ₆	CPMAS	CPMAS
27	H2	6.07	6.04	6.33			
27	H4	6.33	6.54	6.52			
27	H5	7.58	7.77	7.63			
27	OH-enol	15.13	16.03	16.26			
27	H2'	6.48	6.55	7.07			
27	3'-OMe	3.86	3.87	3.95			
27	4'-OH	5.46	5.47	5.86			
27	H5'	6.99	6.98	6.94			
27	H6'	7.48	7.54	7.14			
27	H2''/H6''	8.04	7.93	7.95			
27	H3''/H5''	7.38	7.39	7.47			
27	H4''	7.41	7.38	7.53			
27	C1	187.72	173.91	188.4		187.2	
27	C2	94.48	95.87	97.2		97.8	
27	C3	173.59	186.82	180.5		179.2	
27	C4	117.90	120.32	121.0		123.2	
27	C5	139.38	141.88	140.4		139.0	
27	C1'	127.94	127.92	127.7		131.7	
27	C2'	111.10	111.79	109.6		112.4	
27	C3'	145.89	145.89	146.9		148.0	
27	C3'-OMe	53.29	53.37	56.0		56.0	
27	C4'	149.68	149.87	147.8		153.5	
27	C5'	115.10	114.93	114.9		116.5	
27	C6'	118.74	119.15	122.9		121.3	
27	C1''	137.91	134.52	136.3		136.2	
27	C2''/C6''	128.13	126.97	127.3		126.5	
27	C3''/C5''	127.58	127.76	128.6		126.5	
27	C4''	131.61	131.24	132.4		132.1	
30	H2	6.11	6.07	6.34			
30	H4	6.37	6.60	6.55			
30	H5	7.56	7.77	7.55			
30	OH-enol	15.07	15.98	16.10			
30	H2'	6.53	6.61	7.06			
30	3'-OMe	3.84	3.86	3.94			
30	H5'	7.05	7.04	7.06			
30	H6'	7.36	7.42	7.15			
30	H2''/H6''	8.03	7.94	7.95			
30	H3''/H5''	7.39	7.40	7.47			
30	H4''	7.44	7.41	7.55			
30	C1	188.24	174.52	189.3		187.1	
30	C2	95.17	95.87	97.6		98.1	
30	C3	172.79	186.63	179.2		180.7	

30	C4	120.53	122.62	123.2		123.5
30	C5	137.92	141.10	139.0		138.7
30	C1'	132.30	132.24	131.7		131.3
30	C2'	113.33	114.29	112.4		114.8
30	C3'	148.95	148.95	148.0		148.5
30	C3'-OMe	53.46	53.54	56.2		54.5
30	C4'	156.12	156.22	153.5		153.1
30	C5'	117.04	116.72	116.5		116.4
30	C6'	115.98	116.21	121.3		119.5
30	C1''	137.62	134.11	136.2		137.2
30	C2''/C6''	128.25	127.05	127.3		127.5
30	C3''/C5''	127.68	127.87	128.6		128.4
30	C4''	132.02	131.64	132.6		130.0
30	4'-F	-127.24	-127.07	-132.0		-126.1
31	H2	6.10	6.02	6.32	6.71	
31	H4	6.38	6.60	6.50	6.82	
31	H5	7.53	7.73	7.58	7.65	
31	OH-enol	15.11	15.96	16.14	16.37	
31	H2'	7.03	7.10	7.53	7.53	
31	4'-OH	4.90	4.92	5.39	10.48	
31	H5'	7.04	7.03	7.03	7.00	
31	H6'	7.53	7.60	7.32	7.37	
31	H2''/H6''	8.08	7.97	7.95	7.99	
31	H3''/H5''	7.40	7.42	7.48	7.53	
31	H4''	7.41	7.41	7.58	7.65	
31	C1	187.97	174.51		187.5	191.6
31	C2	95.14	95.99		97.1	97.4
31	C3	173.11	186.45		180.6	176.2
31	C4	119.89	122.07		121.6	119.7
31	C5	137.56	140.16		139.3	139.8
31	C1'	129.00	129.00		126.6	129.9
31	C2'	118.63	119.41		115.4	112.3
31	C3'	152.90	152.86		151.1	152.2
31	C4'	147.10	147.34		147.1	146.2
31	C5'	117.48	117.29		118.0	118.6
31	C6'	121.63	122.07		125.7	127.9
31	C1''	137.58	134.24		135.4	136.2
31	C2''/C6''	128.08	126.99		127.1	127.9
31	C3''/C5''	127.78	127.95		128.8	128.8
31	C4''	131.94	131.64		132.8	133.9
31	3'-F	-150.42	-150.50	-140.6	-135.7	-126.3
52	H2	6.15	6.10		6.75	
52a	H4	6.91	7.04		6.82	
52a	H5	7.51	7.72		7.65	
52a	OH-enol	15.12	16.03		16.30	
52a	H3'	6.28	6.28		6.65	

52a	4'-OH	3.92	3.92	10.55		
52a	H5'	6.66	6.67	6.65		
52a	H6'	7.25	7.35	7.64		
52a	H2"/H6"	8.13	8.02	8.01		
52a	H3"/H5"	7.38	7.40	7.54		
52a	H4"	7.37	7.38	7.63		
52a	C1	187.72	174.16	188.0	177.0	
52a	C2	95.27	96.32	97.5	98.1	
52a	C3	173.74	187.50	180.1	192.8	
52a	C4	125.16	127.10	122.2	122.5	
52a	C5	134.39	136.71	132.3	134.0	
52a	C1'	117.52	117.59	113.4	113.6	
52a	C2'	165.54	165.83	161.9	164.5	161.6
52a	C3'	101.48	101.35	103.0	104.6	
52a	C4'	158.53	158.70	161.3	160.4	
52a	C5'	111.07	111.02	112.7	113.6	
52a	C6'	136.65	137.49	130.3	128.4	
52a	C1"	137.49	134.32	135.4	135.8	
52a	C2"/C6"	127.96	126.85	127.2	128.4	
52a	C3"/C5"	127.77	127.95	128.9	128.4	
52a	C4"	131.73	131.40	132.9	135.8	
52a	2'-F	-106.36	-104.67	-113.5	-103.2	
53 OH/F4	H2	6.22	6.18	6.82		
53 OH/F4	H4	7.11	7.22	6.97		
53 OH/F4	H5	7.47	7.69	7.64		
53 OH/F4	OH-enol	15.09	16.03	16.10		
53 OH/F4	3'-OH	4.52	4.50	10.46		
53 OH/F4	H5'	6.76	6.77	7.12		
53 OH/F4	H6'	6.74	6.84	7.26		
53 OH/F4	H2"/H6"	8.19	8.08	8.02		
53 OH/F4	H3"/H5"	7.39	7.41	7.55		
53 OH/F4	H4"	7.40	7.39	7.65		
53 OH/F4	C1	188.14	174.76	189.1	193.8	
53 OH/F4	C2	96.33	96.53	98.1	103.0	
53 OH/F4	C3	173.15	187.26	178.6	174.9	
53 OH/F4	C4	128.01	129.73	125.5	124.2	
53 OH/F4	C5	134.23	136.61	131.2	134.3	
53 OH/F4	C1'	122.94	123.01	119.5	119.6	
53 OH/F4	C2'	153.39	153.64	151.2	151.9	
53 OH/F4	C3'	135.74	135.65	134.2	134.3	
53 OH/F4	C4'	153.81	154.01	152.3	151.9	
53 OH/F4	C5'	109.98	109.93	112.2	112.3	
53 OH/F4	C6'	123.40	124.26	117.9	112.3	
53 OH/F4	C1"	137.15	133.98	135.4	136.2	
53 OH/F4	C2"/C6"	127.93	126.81	127.4	128.6	
53 OH/F4	C3"/C5"	127.92	128.12	128.9	128.6	

53 OH/F4	C4''	132.12	131.73	133.8	134.3
53 OH/F4	2'-F	-127.40	-125.52	-134.1	-129.4
53 OH/F4	4'-F	-142.34	-142.10	-128.2	-129.4
53 OH/F2	H2	6.19	6.14	6.82	
53 OH/F2	H4	6.99	7.10	6.97	
53 OH/F2	H5	7.48	7.69	7.64	
53 OH/F2	OH-enol	15.12	16.04	16.10	
53 OH/F2	3'-OH	4.70	4.69	10.46	
53 OH/F2	H5'	6.77	6.78	7.12	
53 OH/F2	H6'	6.74	6.84	7.26	
53 OH/F2	H2''/H6''	8.18	8.06	8.02	
53 OH/F2	H3''/H5''	7.38	7.41	7.55	
53 OH/F2	H4''	7.40	7.40	7.65	
53 OH/F2	C1	188.14	174.88	189.1	193.8
53 OH/F2	C2	96.14	96.35	98.1	103.0
53 OH/F2	C3	173.06	187.03	178.6	174.9
53 OH/F2	C4	127.28	129.94	125.5	124.2
53 OH/F2	C5	133.92	136.31	131.2	134.3
53 OH/F2	C1'	120.51	120.57	119.5	119.6
53 OH/F2	C2'	153.41	153.67	151.2	151.9
53 OH/F2	C3'	135.24	135.18	134.2	134.3
53 OH/F2	C4'	154.09	154.29	152.3	151.9
53 OH/F2	C5'	112.91	112.86	112.2	112.3
53 OH/F2	C6'	123.70	124.59	117.9	112.3
53 OH/F2	C1''	137.12	133.96	135.4	136.2
53 OH/F2	C2''/C6''	127.90	126.78	127.4	128.6
53 OH/F2	C3''/C5''	127.92	128.14	128.9	128.6
53 OH/F2	C4''	132.16	131.79 s	133.8	134.3
53 OH/F2	2'-F	-145.16	-143.52	-134.1	-129.4
53 OH/F2	4'-F	-126.05	-125.74	-128.2	-129.4
54	H2	6.16	6.10	6.72	
54	H4	6.94	7.07	6.89	
54	H5	7.38	7.60	7.59	
54	OH-enol	15.10	16.01	16.25	
54	H3'	6.79	6.78	6.83	
54	4'-OH	4.88	4.89	11.05	
54	H6'	7.00	7.09	7.67	
54	H2''/H6''	8.10	8.00	8.00	
54	H3''/H5''	7.40	7.42	7.55	
54	H4''	7.40	7.40	7.63	
54	C1	188.12	174.61	188.5	194.9
54	C2	95.91	96.28	97.7	100.4
54	C3	173.08	187.07	179.9	174.8
54	C4	126.48	128.44	123.6	121.2
54	C5	133.08	135.34	131.0	129.3
54	C1'	117.52	117.55	113.1	114.4

54	C2'	162.00	162.30		157.1	158.1	155.4
54	C3'	105.15	105.01		105.1	106.9	
54	C4'	146.40	146.63		148.3	147.3	
54	C5'	148.81	148.78		148.0	149.7	147.3
54	C6'	119.32	120.13		116.0	111.4	
54	C1''	137.31	133.98		135.4	134.4	
54	C2''/C6''	128.18	127.09		127.2	126.2	127.6
54	C3''/C5''	127.80	127.95		128.9	129.3	
54	C4''	132.05	131.73		133.0	132.9	
54	2'-F	-109.82	-108.10		-118.6	-115.4	
54	5'-F	-154.45	-154.55		-140.1	-138.2	
26	H2	5.70	5.78	6.01			
26	H4	6.08	6.34	6.43			
26	H5	7.83	8.02	7.71			
26	OH-enol	13.84	15.08	14.36			
26	H2'	6.92	7.01	7.06			
26	3'-OMe	3.83	3.83	3.96			
26	4'-OH	5.66	5.65	5.95			
26	H5'	6.95	6.94	6.96			
26	H6'	6.97	7.06	7.15			
26	C1	181.28	164.70	179.5		178.2	
26	C2	94.06	99.92	95.1		94.8	
26	C3	177.26	188.49	181.9		181.6	
26	C4	114.71	117.55	118.5		115.6	
26	C5	146.14	147.79	144.1		142.5	
26	C1'	126.58	126.31	126.8		126.4	
26	C2'	103.27	103.59	109.8		106.4	
26	C3'	146.34	146.06	147.0		149.1	
26	C3'-OMe	53.32	53.31	56.0		54.8	
26	C4'	151.52	151.58	149.0		150.6	
26	C5'	114.75	114.66	115.1		115.6	
26	C6'	130.10	130.87	124.0		126.4	
26	CF ₃	120.75	123.13	116.9		115.6	
26	F-CF ₃	-77.37	-75.21	-77.5		-74.1	
55	H2	5.78	5.84	6.03			
55	H4	6.28	6.54	6.49			
55	H5	7.81	7.97	7.70			
55	OH-enol	13.80	15.00	14.15			
55	H2'	7.51	7.57	7.16			
55	3'-OMe	4.00	3.99	3.94			
55	H5'	6.99	6.99	7.08			
55	H6'	6.94	7.02	7.08			
55	C1	182.39	165.70	180.4		180.1	
55	C2	95.01	99.88	95.6		95.2	
55	C3	176.84	189.03	180.8		181.4	
55	C4	118.68	121.29	120.8		118.0	

55	C5	144.60	146.78	142.6	143.2	
55	C1'	131.64	131.47	130.9	130.9	132.1
55	C2'	118.84	119.08	112.7	114.1	
55	C3'	149.19	149.04	148.3	146.3	146.9
55	C3'-OMe	59.17	59.07	56.3	55.7	54.6
55	C4'	159.36	159.58	154.3	151.7	154.0
55	C5'	117.88	117.76	116.8	116.0	
55	C6'	127.96	128.80	122.2	118.0	
55	CF ₃	120.54	122.98	116.7	117.3	
55	F-CF ₃	-77.37	-75.21	-77.6	-74.1	
55	4'-F	-121.80	-121.38	-129.8	-129.3	
56	H2	5.83	6.00	5.76		
56	H4	6.43	6.42	6.18		
56	H5	7.91	7.66	7.73		
56	OH-enol	14.89	14.21	13.74		
56	H2'	7.53	7.32	7.47		
56	4'-OH	5.03	5.49	5.02		
56	H5'	6.92	7.05	6.91		
56	H6'	7.16	7.27	7.09		
56	C1	165.48	180.2	182.00	179.3	
56	C2	99.98	95.5	94.77	95.1	
56	C3	188.53	181.0	176.49	180.1	
56	C4	120.12	120.0	117.50	117.7	
56	C5	145.23	142.3	142.97	142.7	
56	C1'	127.57	127.7	127.70	124.9	
56	C2'	111.31	114.9	111.20	110.4	
56	C3'	152.84	151.1	153.04	150.5	
56	C4'	148.66	146.2	148.53	148.3	
56	C5'	116.87	117.8	116.95	115.0	
56	C6'	132.46	126.3	131.75	130.8	
56	CF ₃	123.04	116.7	120.62	116.5	
56	F-CF ₃	-75.14	-77.6	-77.30	-72.1	
56	3'-F	-146.93	-140.1	-146.64	-134.0	
57	H2	5.77	5.86	6.01		
57	H4	6.79	6.95	6.57		
57	H5	7.59	7.78	7.81		
57	OH-enol	13.72	14.88	14.29		
57	H3'	6.29	6.71	6.64		
57	4'-OH	4.12	6.28	5.36		
57	H5'	6.70	4.12	6.68		
57	H6'	7.21	7.30	7.45		
57	C1	181.85	165.24	179.7	181.2	
57	C2	95.26	100.51	95.1	95.3	
57	C3	176.94	189.50	181.0	182.2	
57	C4	123.21	125.32	120.6	116.3	
57	C5	138.65	140.79	136.0	136.2	

57	C1'	116.58	116.63	115.0		112.3	
57	C2'	166.29	166.45	162.4		161.2	
57	C3'	101.75	101.62	103.5		101.3	
57	C4'	159.84	159.91	158.9		163.3	
57	C5'	111.80	111.74	111.9		111.3	
57	C6'	137.44	138.24	130.5		126.9	
57	CF ₃	120.65	123.12	116.3		115.8	
57	F-CF ₃	-77.22	-75.00	-77.6		-73.4	
57	2'-F	-103.60	-102.07	-111.0		-113.9	
58 OH/F4	H2	5.84	5.91	6.03	5.95		
58 OH/F4	H4	6.96	7.11	6.64	6.56		
58 OH/F4	H5	7.59	7.77	7.77	7.72		
58 OH/F4	OH-enol	13.81	14.83	14.20	9.60		
58 OH/F4	3'-OH	4.52	4.52	5.40	9.60		
58 OH/F4	H5'	6.82	6.82	6.97	6.82		
58 OH/F4	H6'	6.71	6.80	7.08	6.92		
58 OH/F4	C1	182.75	165.98		180.2	183.0	
58 OH/F4	C2	95.92	100.45		95.6	96.6	
58 OH/F4	C3	176.56	189.67		180.5	183.0	
58 OH/F4	C4	125.73	127.68		122.4	125.0	
58 OH/F4	C5	139.13	141.11		135.9	143.6	
58 OH/F4	C1'	121.89	121.89		118.9	118.5	
58 OH/F4	C2'	154.17	154.35		151.8	153.1	151.0
58 OH/F4	C3'	135.69	135.62		134.7	132.6	
58 OH/F4	C4'	154.64	154.73		154.1	155.0	153.1
58 OH/F4	C5'	110.60	110.50		111.8	111.9	
58 OH/F4	C6'	124.18	125.06		118.1	120.9	
58 OH/F4	CF ₃	120.52	122.98		116.4	120.0	
58 OH/F4	F-CF ₃	-77.27	-75.06		-77.6	-73.8	
58 OH/F4	2'-F	-124.07	-122.42		-133.5	-126.7	
58 OH/F4	4'-F	-139.01	-139.02		-127.5	-130.2	
58 OH/F2	H2	5.80	5.91	6.03	5.95		
58 OH/F2	H4	6.83	6.97	6.64	6.56		
58 OH/F2	H5	7.60	7.74	7.77	7.72		
58 OH/F2	OH-enol	13.70	14.83	14.20	9.60		
58 OH/F2	3'-OH	4.67	4.67	5.40	9.60		
58 OH/F2	H5'	6.84	6.87	6.97	6.82		
58 OH/F2	H6'	6.72	6.82	7.08	6.92		
58 OH/F2	C1	182.67	166.12		180.2	183.0	
58 OH/F2	C2	95.72	100.45		95.6	96.6	
58 OH/F2	C3	176.36	189.50		180.5	183.0	
58 OH/F2	C4	125.03	126.57		122.4	125.0	
58 OH/F2	C5	138.73	139.78		135.9	143.6	
58 OH/F2	C1'	119.64	119.67		118.9	118.5	
58 OH/F2	C2'	154.03	154.51		151.8	153.1	151.0
58 OH/F2	C3'	135.57	135.47		134.7	132.6	

58 OH/F2	C4'	155.14	155.21		154.1	155.0	153.1
58 OH/F2	C5'	113.40	113.36		111.8	111.9	
58 OH/F2	C6'	124.56	125.20		118.1	120.9	
58 OH/F2	CF ₃	120.52	120.54		116.4	120.0	
58 OH/F2	F-CF ₃	-77.31	-74.84		-77.6	-73.8	
58 OH/F2	2'-F	-142.02	-140.69		-133.5	-130.2	
58 OH/F2	4'-F	-121.28	-121.27		-127.5	-126.7	
59	H2	5.78	5.92	6.01	5.81		
59	H4	6.88	6.98	6.52	6.30		
59	H5	7.47	7.68	7.75	7.53		
59	OH-enol	13.74	14.85	14.20	10.30		
59	H3'	6.82	6.82	7.29	6.52		
59	4'-OH	4.99	4.99		10.30		
59	H6'	7.01	7.12	6.81	7.05		
59	C1	182.40	165.99		178.8	181.9	
59	C2	95.69	100.68		94.7	96.3	
59	C3	176.33	189.42		180.4	160.5	
59	C4	124.78	126.04		119.8	118.6	
59	C5	136.21	137.56		134.8	135.3	
59	C1'	116.43	116.58		112.2	112.8	
59	C2'	162.63	162.96		157.4	157.9	
59	C3'	105.43	105.30		104.7	103.9	
59	C4'	147.86	147.92		148.8	151.1	
59	C5'	148.29	148.29		147.5	147.3	
59	C6'	120.10	120.59		114.0	110.8	
59	CF ₃	120.52	122.94		115.9	117.8	
59	F-CF ₃	-77.17	-74.53		-77.6	-74.2	
59	2'-F	-107.66	-106.33		-117.7	-119.1	
59	5'-F	-153.19	-153.34		-141.2	-138.4	
24	1-Me	1.93	1.88	2.16			
24	H2	5.34	5.35	5.63			
24	H4	6.13	6.36	6.32			
24	H5	7.49	7.73	7.53			
24	OH-enol	14.90	15.28	15.5			
24	H2'	6.57	6.67	7.02			
24	3'-OMe	3.81	3.82	3.94			
24	4'-OH	5.51	5.52	5.83			
24	H5'	6.96	6.94	6.92			
24	H6'	7.39	7.46	7.09			
24	C1	197.62	180.31	196.9		201.6	
24	C1-Me	25.85	21.29	26.8		27.2	
24	C2	99.98	100.71	100.7		102.6	
24	C3	172.84	186.58	178.0		174.8	
24	C4	116.83	119.21	120.4		118.5	
24	C5	139.01	141.43	140.1		139.1	
24	C1'	127.33	127.38	127.7		126.1	

24	C2'	111.47	112.23	109.5	106.4
24	C3'	145.93	145.87	146.8	149.9
24	C3'-OMe	53.61	53.61	55.9	55.7
24	C4'	149.20	149.32	144.7	148.0
24	C5'	114.86	114.63	114.8	114.5
24	C6'	118.37	118.68	122.6	126.1
25	1-Me	2.11	2.02	2.24	
25	2-Me	1.94	1.82	2.01	
25	H4	6.76	6.89	6.78	
25	H5	7.50	7.82	7.58	
25	OH-enol	15.42	16.43	16.45	
25	H2'	6.57	6.66	7.02	
25	3'-OMe	3.81	3.84	3.94	
25	4'-OH	5.49	5.53	5.88	
25	H5'	6.95	6.92	6.92	
25	H6'	7.44	7.50	7.13	
25	C1	198.78	177.94	197.4	
25	C1-Me	27.50	21.00	26.20	
25	C2	104.11	104.64	105.1	
25	C2-Me	11.96	12.06	12.6	
25	C3	169.37	186.96	174.0	
25	C4	112.96	115.34	117.2	
25	C5	138.84	142.55	140.1	
25	C1'	128.15	127.98	128.3	
25	C2'	111.42	112.31	109.9	
25	C3'	145.87	145.72	146.8	
25	C3'-OMe	53.54	53.56	56.0	
25	C4'	149.02	149.28	147.5	
25	C5'	114.83	114.50	114.8	
25	C6'	117.95	118.88	122.2	
28	H2	6.12	6.10	6.33	
28	H4	6.39	6.61	6.53	
28	H5	7.62	7.80	7.64	
28	OH-enol	15.13	16.04	16.27	
28	H2'	6.55	6.62	7.09	
28	3'-OMe	3.85	3.86	3.93	
28	4'-OMe	3.94	3.95	3.91	
28	H5'	7.02	7.02	6.88	
28	H6'	7.39	7.47	7.15	
28	H2''/H6''	8.02	7.90	7.95	
28	H3''/H5''	7.38	7.38	7.46	
28	H4''	7.47	7.47	7.53	
28	C1	187.89	174.12	188.4	
28	C2	94.74	95.87	97.2	
28	C3	173.45	186.87	180.3	
28	C4	119.30	121.60	121.3	

28	C5	139.54	141.98	140.1
28	C1'	131.66	131.61	128.1
28	C2'	112.99	113.66	109.8
28	C3'	153.78	153.74	149.3
28	C3'-OMe	52.90	52.98	55.87
28	C4'	152.21	152.45	151.0
28	C4'-OMe	57.55	57.52	55.94
28	C5'	123.57	123.40	122.5
28	C6'	117.09	117.48	111.2
28	C1''	137.82	134.25	136.3
28	C2''/C6''	128.13	126.94	127.2
28	C3''/C5''	127.64	127.79	128.6
28	C4''	131.85	131.50	132.4
29	2-Me	2.04	2.05	1.54
29	H4	6.93	7.14	6.69
29	H5	7.73	7.94	7.60
29	OH-enol	15.99	16.73	
29	H2'	6.60	6.68	7.01
29	3'-OMe	3.84	3.85	3.89
29	4'-OMe	3.94	3.95	3.89
29	H5'	7.00	7.00	6.83
29	H6'	7.41	7.47	7.10
29	H2''/H6''	7.59	7.58	8.00
29	H3''/H5''	7.31	7.35	7.45
29	H4''	7.31	7.38	7.55
29	C1	196.33	177.99	190.9
29	C2	104.57	105.28	107.4
29	C2-Me	14.54	14.29	13.8
29	C3	172.61	188.73	182.1
29	C4	115.95	117.70	120.7
29	C5	140.58	143.64	144.6
29	C1'	132.02	131.76	127.1
29	C2'	113.42	114.12	110.0
29	C3'	153.68	153.64	149.2
29	C3'-OMe	52.75	52.86	55.4
29	C4'	152.15	152.41	151.7
29	C4'-OMe	57.56	57.55	55.9
29	C5'	123.36	123.20	123.6
29	C6'	117.08	117.57	111.0
29	C1''	142.35	138.31	136.3
29	C2''/C6''	128.87	129.95	128.7
29	C3''/C5''	127.09	127.11	128.7
29	C4''	129.47	129.61	133.4

Tabla 39. Energías absolutas en Hartrees y energías relativas en kJ/mol calculadas para los diferentes tautómeros y conformeros de los pirazoles hemicurcuminodes **69-74**.

Comp.	E _{rel} (kJ/mol)	Energía SCF	Comp.	E _{rel} (kJ/mol)	Energía SCF
69_a_1	1.1	-106.175.895	72_a_1	1.3	-104.646.790
69_a_2	0.5	-106.175.915	72_a_2	0.0	-104.646.840
69_a_3	1.8	-106.175.868	72_a_3	0.3	-104.646.827
69_a_4	0.0	-106.175.935	72_a_4	1.8	-104.646.770
69_b_1	7.2	-106.175.659	72_b_1	5.2	-104.646.641
69_b_2	8.6	-106.175.607	72_b_2	8.8	-104.646.505
69_b_3	4.9	-106.175.747	72_b_3	7.4	-104.646.559
69_b_4	8.0	-106.175.629	72_b_4	7.7	-104.646.547
70_a_1	0.8	-108.577.181	73_a_1	1.9	-114.572.731
70_a_2	0.4	-108.577.197	73_a_2	0.0	-114.572.803
70_a_3	1.4	-108.577.158	73_a_3	0.8	-114.572.773
70_a_4	0.0	-108.577.212	73_a_4	2.1	-114.572.725
70_b_1	5.2	-108.577.013	73_b_1	4.5	-114.572.630
70_b_2	6.8	-108.576.953	73_b_2	7.8	-114.572.506
70_b_3	3.5	-108.577.077	73_b_3	6.5	-114.572.555
70_b_4	6.3	-108.576.973	73_b_4	6.4	-114.572.560
71_a_1	0.8	-104.646.728	74_a_1	1.3	-114.573.334
71_a_2	0.0	-104.646.760	74_a_2	0.0	-114.573.382
71_a_3	1.0	-104.646.723	74_a_3	0.2	-114.573.373
71_a_4	0.2	-104.646.752	74_a_4	2.2	-114.573.299
71_b_1	4.8	-104.646.577	74_b_1	3.7	-114.573.242
71_b_2	6.6	-104.646.507	74_b_2	7.4	-114.573.102
71_b_3	4.1	-104.646.605	74_b_3	6.7	-114.573.128
71_b_4	6.0	-104.646.532	74_b_4	6.3	-114.573.140

Tabla 40. Matriz de Free-Wilson para la energía relativa de los diferentes conformeros de los pirazoles hemicurcuminoideos 69-74.

Comp.	Taut.	2'-F	3'-F	3'-OMe	4'-OH	5'-F	conf. 5-6	conf. 7-1'	E _{rel}
69a-1	1	0	0	1	1	0	1	1	1.1
69a-2	1	0	0	1	1	0	1	0	0.5
69a-3	1	0	0	1	1	0	0	1	1.8
69a-4	1	0	0	1	1	0	0	0	0.0
69b-1	0	0	0	1	1	0	1	1	7.2
69b-2	0	0	0	1	1	0	1	0	8.6
69b-3	0	0	0	1	1	0	0	1	4.9
69b-4	0	0	0	1	1	0	0	0	8.0
70a-1	1	0	0	1	0	0	1	1	0.8
70a-2	1	0	0	1	0	0	1	0	0.4
70a-3	1	0	0	1	0	0	0	1	1.4
70a-4	1	0	0	1	0	0	0	0	0.0
70b-1	0	0	0	1	0	0	1	1	5.2
70b-2	0	0	0	1	0	0	1	0	6.8
70b-3	0	0	0	1	0	0	0	1	3.5
70b-4	0	0	0	1	0	0	0	0	6.3
712a-1	1	0	1	0	1	0	1	1	0.8
71a-2	1	0	1	0	1	0	1	0	0.0
71a-3	1	0	1	0	1	0	0	1	1.0
71a-4	1	0	1	0	1	0	0	0	0.2
71b-1	0	0	1	0	1	0	1	1	4.8
71b-2	0	0	1	0	1	0	1	0	6.6
71b-3	0	0	1	0	1	0	0	1	4.1
71b-4	0	0	1	0	1	0	0	0	6.0
72a-1	1	1	0	0	1	0	1	1	1.3
72a-2	1	1	0	0	1	0	1	0	0.0
72a-3	1	1	0	0	1	0	0	1	0.3
72a-4	1	1	0	0	1	0	0	0	1.8
72b-1	0	1	0	0	1	0	1	1	5.2
72b-2	0	1	0	0	1	0	1	0	8.8
72b-3	0	1	0	0	1	0	0	1	7.4
72b-4	0	1	0	0	1	0	0	0	7.7
73a-1	1	1	1	0	1	0	1	1	1.9
73a-2	1	1	1	0	1	0	1	0	0.0
73a-3	1	1	1	0	1	0	0	1	0.8
73a-4	1	1	1	0	1	0	0	0	2.1
73b-1	0	1	1	0	1	0	1	1	4.5
73b-2	0	1	1	0	1	0	1	0	7.8
73b-3	0	1	1	0	1	0	0	1	6.5
73b-4	0	1	1	0	1	0	0	0	6.4
74a-1	1	1	0	0	1	1	1	1	1.3
74a-2	1	1	0	0	1	1	1	0	0.0

74a-3	1	1	0	0	1	1	0	1	0.2
74a-4	1	1	0	0	1	1	0	0	2.2
74b-1	0	1	0	0	1	1	1	1	3.7
74b-2	0	1	0	0	1	1	1	0	7.4
74b-3	0	1	0	0	1	1	0	1	6.7
74b-4	0	1	0	0	1	1	0	0	6.3

Tabla 41. Desplazamientos químicos experimentales y calculados de ^1H , ^{13}C , ^{15}N y ^{19}F RMN para los pirazoles hemicurcuminoideos **69-74**.

	Disol.	Átomo	Exp.	a1	a2	a3	a4	b1	b2	b3	b4
69	DMSO- d_6	NH	13.64	8.76	8.76	9.19	9.32	9.08	9.13	8.99	9.11
		H4	6.81	6.69	6.66	6.25	6.27	6.73	6.34	6.80	6.34
		H6	6.90	6.67	6.41	6.79	6.60	7.19	6.72	6.94	6.59
		H7	7.18	6.94	6.98	6.55	6.54	6.82	7.58	6.87	7.60
		H2'	7.12	6.30	6.73	6.44	6.83	6.28	6.55	6.90	6.86
		3'-OMe	3.82	3.78	3.78	3.81	3.82	3.77	3.81	3.80	3.81
		4'-OH	9.27	5.44	5.49	5.41	5.48	5.34	5.31	5.41	5.39
		H5'	6.78	6.90	6.83	6.93	6.89	6.90	6.88	6.80	6.86
70	DMSO- d_6	NH	13.70	8.85	8.81	9.24	9.34	9.10	9.19	9.06	9.18
		H4	6.88	6.71	6.69	6.30	6.28	6.73	7.37	6.81	6.35
		H6	7.09	6.72	6.50	6.87	6.63	7.25	6.80	7.04	6.59
		H7	7.27	6.91	6.97	6.57	6.62	6.82	7.61	6.85	7.67
		H2'	7.34	6.30	6.74	6.49	6.88	6.26	6.60	6.92	6.91
		3'-OMe	3.89	3.81	3.78	3.74	3.79	3.80	3.74	3.80	3.78
		H5'	7.22	6.89	6.84	7.06	6.98	6.89	7.00	6.81	6.94
		H6'	7.08	7.14	6.68	7.22	6.55	7.27	7.23	6.61	6.66
71	DMSO- d_6	NH	13.71	8.82	8.82	9.22	9.27	9.09	9.21	9.09	9.20
		H4	6.83	6.70	6.66	6.27	6.27	6.74	6.33	6.76	6.34
		H6	6.92	6.61	6.54	6.80	6.67	7.16	6.75	7.07	6.62
		H7	7.18	6.86	6.91	6.50	6.55	6.79	7.59	6.81	7.63
		H2'	7.36	6.80	7.31	6.79	7.37	6.80	6.91	7.45	7.37
		4'-OH	10.14	4.83	4.83	4.72	4.77	4.72	4.63	4.75	4.67
		H5'	6.95	6.90	6.86	7.04	6.94	6.88	6.97	6.83	6.91
		H6'	7.16	7.35	6.85	7.45	6.76	7.47	7.47	6.81	6.84
72	DMSO- d_6	NH	13.73	8.82	8.86	9.33	9.21	9.07	9.21	9.10	9.18
		H4	6.89	6.73	6.66	6.26	6.31	6.81	6.32	6.77	6.36
		H6	6.96	6.59	7.09	6.72	7.26	7.10	6.69	7.57	7.17
		H7	7.26	7.42	6.85	7.10	6.42	7.32	8.11	6.74	7.52
		H3'	6.61	6.13	6.17	6.15	6.21	6.11	6.12	6.16	6.15
		4'-OH	10.20	4.00	3.93	4.00	4.01	3.89	3.89	3.84	3.89
		H5'	6.66	6.13	6.67	6.70	6.73	6.65	6.64	6.63	6.71

		H6'	7.49	7.47	7.03	7.53	6.91	7.61	7.58	7.00	7.04
73	DMSO- <i>d</i> ₆	NH	13.85	8.86	8.93	9.36	9.28	9.15	9.28	9.15	9.22
	OH/F2'	H4	6.96	6.79	6.72	6.31	6.39	6.83	6.37	6.80	6.42
		H6	7.10	6.70	7.16	6.86	7.33	7.20	6.82	7.62	7.24
		H7	7.32	7.38	6.85	7.03	6.40	7.29	8.04	6.73	7.51
		3'-OH	10.29	4.56	4.63	4.39	4.55	4.49	4.40	4.66	4.47
		H5'	7.04	6.72	6.72	6.83	6.83	6.70	6.78	6.68	6.80
		H6'	7.15	6.98	6.56	7.03	6.41	7.09	7.07	6.52	6.54
73	DMSO- <i>d</i> ₆	NH	13.85	8.87	8.94	9.41	9.27	9.14	9.29	9.16	9.23
	OH/F4'	H4	6.96	6.83	6.72	6.31	6.42	6.87	6.36	6.80	6.46
		H6	7.10	6.68	7.31	6.83	7.47	7.19	6.80	7.76	7.37
		H7	7.32	7.52	6.84	7.13	6.40	7.42	8.12	6.74	7.51
		3'-OH	10.29	4.34	4.31	4.19	4.39	4.29	4.12	4.22	4.31
		H5'	7.04	6.71	6.71	6.79	6.80	6.70	6.74	6.67	6.77
		H6'	7.15	6.97	6.56	7.01	6.40	7.11	7.05	6.52	6.53
74	DMSO- <i>d</i> ₆	NH	13.80	8.83	8.89	9.36	9.21	9.11	9.25	9.16	9.22
		H4	6.88	6.75	6.71	6.31	6.35	6.84	6.34	6.76	6.40
		H6	7.03	6.52	7.17	6.65	7.36	7.04	6.62	7.63	7.28
		H7	7.25	7.39	6.74	7.06	6.31	7.26	8.09	6.63	7.43
		H3'	6.79	6.65	6.67	6.69	6.77	6.62	6.66	6.67	6.71
		4'-OH	10.68	4.87	4.85	4.76	4.71	4.78	4.65	4.75	4.63
		H6'	7.53	7.20	6.79	7.23	6.75	7.33	7.27	6.77	6.88
69	DMSO- <i>d</i> ₆	C-CF3	141.6	146.3	146.4	146.0	145.9	133.1	133.0	132.2	132.6
		C4	100.6	99.0	99.2	104.9	104.4	101.5	106.6	101.5	105.9
		C-estiril	143.2	142.6	142.2	140.9	140.8	153.8	152.5	153.9	152.3
		CF3	121.8	126.2	126.0	126.2	126.0	125.4	125.3	125.3	125.4
		C6	111.3	108.6	106.6	110.1	108.2	117.3	113.7	115.6	112.4
		C7	132.2	133.8	135.5	127.5	130.4	131.7	131.8	133.7	124.6
		C1'	127.4	127.5	127.9	127.1	127.3	128.6	128.5	129.0	128.5
		C2'	109.7	109.9	100.6	109.4	100.2	109.0	110.2	101.4	100.3
		C3'	147.4	145.8	146.5	145.9	146.7	145.4	145.7	146.5	146.5
		C4'	147.9	148.6	149.1	148.0	149.1	147.8	147.3	148.2	148.4
		C5'	115.6	115.2	114.5	114.9	114.3	115.2	114.3	114.0	114.2
		C6'	120.6	116.2	126.3	116.3	124.7	116.8	116.2	124.8	125.3
		R-3'	55.6	52.7	52.6	52.5	52.9	52.5	53.4	52.7	52.8
		NH		-187.1	-187.2	-197.4	-197.0	-195.7	-193.4	-195.9	-193.7
		N		-79.0	-79.2	-75.0	-75.1	-72.7	-84.8	-73.5	-84.6
70	DMSO- <i>d</i> ₆	C-CF3	141.7	146.5	146.6	146.2	146.1	133.6	133.4	133.5	133.0
		C4	101.3	100.4	99.8	105.7	105.6	102.3	106.8	101.8	106.5
		C-estiril	142.6	141.9	141.6	140.3	140.1	153.2	151.9	153.4	151.5
		CF3	121.7	126.0	125.9	126.0	125.8	125.3	125.1	125.1	125.2
		C6	114.6	109.8	109.1	112.6	110.7	119.4	116.2	118.1	114.3

	C7	131.0	134.4	134.2	126.8	129.6	132.1	131.0	132.4	133.9	
	C1'	133.0	132.1	132.4	131.6	132.1	133.1	132.9	133.4	133.3	
	C2'	111.2	112.3	102.7	111.7	102.8	111.3	112.5	103.6	102.7	
	C3'	147.4	148.9	149.5	149.1	149.6	148.7	148.8	149.4	149.2	
	C4'	151.1	155.4	156.1	155.2	155.7	155.0	154.7	155.4	155.4	
	C5'	116.2	116.8	116.3	116.9	116.3	116.6	116.3	115.9	116.0	
	C6'	119.8	113.4	123.6	113.5	122.0	114.3	113.4	122.1	122.7	
	R-3'	56.0	52.9	52.6	53.1	53.0	52.7	53.0	52.7	52.9	
	NH		-186.4	-186.4	-196.9	-196.5	-194.5	-192.4	-194.9	-193.0	
	N		-77.1	-77.2	-73.1	-73.3	-71.1	-83.5	-71.6	-83.8	
71	DMSO- <i>d</i> ₆	C-CF3	141.6	146.6	146.6	146.3	146.1	130.1	133.3	133.4	133.1
		C4	101.0	99.9	99.9	105.6	105.6	116.1	106.7	101.9	106.7
		C-estiril	142.8	141.7	141.5	140.1	140.1	152.8	151.6	153.1	151.4
		CF3	121.7	126.0	126.0	126.0	125.9	145.3	125.1	125.2	125.2
		C6	112.7	109.7	109.7	111.8	111.4	117.2	115.8	130.4	114.9
		C7	130.9	133.0	133.3	126.4	128.0	120.0	130.8	109.0	132.5
		C1'	127.9	128.7	129.2	128.4	128.8	132.1	130.0	153.6	130.1
		C2'	113.6	117.0	108.2	116.5	109.1	119.1	117.0	145.8	108.9
		C3'	151.2	152.7	153.5	152.3	153.5	153.2	152.4	116.5	153.5
		C4'	145.4	146.1	146.6	145.7	146.2	102.3	145.1	127.1	145.5
		C5'	118.0	117.4	117.0	117.5	116.8	133.4	116.8	118.8	116.5
		C6'	123.7	119.1	128.2	119.5	127.2	125.2	119.6	131.4	127.9
		NH		-186.6	-186.4	-196.5	-196.8	-194.7	-192.4	-194.8	-192.9
		N		-77.3	-77.1	-72.9	-73.6	-71.6	-83.1	-71.2	-83.7
72	DMSO- <i>d</i> ₆	C-CF3	141.6	146.6	146.3	146.1	146.1	153.5	151.9	154.0	152.2
		C4	101.1	100.5	99.4	105.4	105.9	102.6	106.6	101.6	107.0
		C-estiril	143.0	141.9	142.3	140.6	140.7	133.3	133.1	133.2	133.0
		CF3	121.7	126.0	126.1	126.1	126.1	125.3	125.2	125.3	125.3
		C6	113.6	109.2	115.6	111.1	117.0	118.4	115.1	125.0	121.1
		C7	124.3	125.3	129.8	118.8	124.3	123.4	123.2	128.4	128.4
		C1'	114.4	116.7	117.5	116.6	117.2	117.6	118.1	118.5	118.5
		C2'	160.7	163.3	165.5	162.7	165.2	162.8	163.1	165.3	165.5
		C3'	102.8	100.6	101.3	100.5	101.6	100.2	100.6	101.4	101.1
		C4'	159.3	158.8	157.9	158.1	157.5	158.0	157.5	157.2	156.9
		C5'	112.3	112.0	111.7	111.9	111.7	111.7	111.2	111.1	111.3
		C6'	128.6	125.1	134.4	125.4	133.5	126.0	125.6	133.8	134.4
		NH		-77.5	-77.3	-72.9	-74.0	-71.9	-82.1	-70.0	-84.1
		N		-186.6	-185.4	-196.2	-197.4	-195.1	-192.4	-194.7	-193.0
73	DMSO- <i>d</i> ₆	C-CF3	141.7	146.9	146.7	146.4	146.4	133.8	133.6	133.7	133.3
	OH/F2'	C4	101.8	101.3	100.4	106.3	106.7	102.9	107.0	101.7	107.2
		C-estiril	142.4	141.5	141.9	140.0	140.1	153.0	151.4	153.5	151.7
		CF3	123.0	125.8	125.8	125.9	125.8	125.1	125.0	125.1	125.1

	C6	116.6	112.2	129.4	114.1	118.3	121.3	118.2	126.9	122.6	
	C7	123.6	124.1	117.7	116.9	124.1	122.8	121.3	127.9	128.3	
	C1'	120.6	120.1	120.8	119.8	120.6	120.9	121.3	121.7	121.7	
	C2'	150.4	151.5	153.3	151.4	153.4	151.2	151.7	153.1	153.8	
	C3'	134.0	135.8	136.1	135.4	135.9	135.6	135.4	136.0	135.6	
	C4'	152.1	153.7	153.6	153.3	153.2	153.2	152.8	152.9	152.8	
	C5'	111.9	113.1	113.0	113.3	113.0	112.9	112.6	112.4	112.6	
	C6'	116.3	112.0	121.5	112.4	120.2	112.8	112.8	120.7	121.0	
	NH	-171.8	-186.1	-184.7	-195.8	-197.0	-193.9	-191.4	-193.6	-192.0	
	N		-75.4	-74.7	-70.7	-72.0	-70.0	-81.0	-68.2	-83.0	
73	DMSO- <i>d</i> ₆	C-CF3	141.7	146.8	146.5	146.3	146.3	123.3	133.5	133.5	133.3
	OH/F4'	C4	101.8	101.7	100.0	106.2	107.1	121.1	107.0	101.7	107.6
		C-estiril	142.4	141.5	141.9	140.1	140.2	153.1	151.4	153.6	151.8
		CF3	123.0	125.9	126.0	126.0	125.8	103.3	125.1	125.2	125.2
		C6	116.6	111.8	118.3	114.0	119.1	133.8	118.0	127.7	123.2
		C7	123.6	125.1	129.5	117.7	124.4	125.2	122.1	128.3	128.6
		C1'	120.6	122.4	123.1	122.3	122.9	123.2	123.6	124.1	124.1
		C2'	150.4	151.4	153.1	151.1	153.3	151.0	151.4	153.1	153.6
		C3'	134.0	135.8	135.8	135.8	135.8	135.5	135.8	135.7	135.5
		C4'	152.1	153.4	153.0	153.2	152.9	153.0	152.8	152.2	152.6
		C5'	111.9	110.2	110.1	110.3	110.2	110.0	109.6	109.4	109.7
		C6'	116.3	112.0	121.3	112.0	120.1	112.9	112.2	120.6	121.0
		NH	-171.8	-186.0	-184.1	-195.4	-196.9	-194.0	-191.2	-193.6	-192.2
		N		-75.7	-75.0	-70.6	-72.4	-70.3	-80.4	-67.5	-83.0
74	DMSO- <i>d</i> ₆	C-CF3	141.7	146.8	146.6	146.3	146.3	133.7	133.3	133.5	133.3
		C4	101.6	100.7	100.4	106.1	106.6	102.5	107.0	102.1	107.4
		C-estiril	142.6	141.2	142.2	140.1	140.4	153.1	151.4	153.6	152.0
		CF3	121.7	125.9	126.0	125.9	126.0	125.1	125.1	125.2	125.1
		C6	115.0	110.6	117.0	112.4	119.0	120.0	116.5	126.2	123.3
		C7	123.0	124.0	128.6	118.8	122.4	122.3	123.4	127.3	126.5
		C1'	114.3	116.8	117.3	116.5	117.2	117.8	118.0	118.3	118.6
		C2'	156.0	160.1	162.0	159.2	161.2	159.5	159.7	161.9	161.6
		C3'	105.0	105.1	105.5	104.6	105.6	104.6	104.5	105.4	105.0
		C4'	146.3	146.7	145.7	146.2	145.2	145.8	145.6	145.0	144.6
		C5'	148.0	149.8	149.1	149.7	148.2	149.7	149.5	149.0	148.2
		C6'	113.6	108.7	117.4	109.4	116.9	109.5	109.4	116.8	117.6
		NH	-172.7	-186.1	-185.2	-195.9	-197.1	-194.3	-192.0	-193.9	-192.1
		N		-76.1	-75.7	-71.7	-72.3	-70.6	-81.4	-68.8	-83.1
72	DMSO- <i>d</i> ₆	CF3	-61.0	-61.7	-61.9	-61.9	-62.0	-59.5	-60.0	-59.4	-60.0
		F2'	-116.1	-117.0	-108.4	-119.2	-106.9	-119.1	-117.0	-107.3	-107.5
71	DMSO- <i>d</i> ₆	CF3	-60.5	-61.9	-61.9	-62.0	-62.2	-59.5	-60.0	-59.9	-60.0
		F3'	-135.9	-150.1	-149.2	-149.4	-147.9	-151.4	-150.7	-149.5	-149.4

73	DMSO- <i>d</i> ₆	CF3	-60.5	-61.9	-61.5	-61.9	-62.0	-59.5	-60.0	-59.6	-60.0	
		OH/F2'	F2'	-135.8	-151.2	-146.0	-153.7	-144.6	-153.0	-151.8	-144.9	-145.1
		F4'	-131.3	-126.2	-126.7	-127.5	-127.8	-128.8	-130.1	-129.5	-130.2	
73	DMSO- <i>d</i> ₆	CF3	-60.5	-61.8	-61.8	-61.9	-62.0	-59.4	-60.0	-59.6	-60.0	
		OH/F4'	F2'	-135.8	-135.4	-129.2	-137.2	-127.4	-137.5	-135.0	-127.7	-128.0

Tabla 42. Desplazamientos químicos de ¹H, ¹³C, ¹⁵N y ¹⁹F de RMN en estado sólido de los pirazoles hemicurcuminoideos **69-74** frente a los calculados para los diferentes tautómeros y confórmeros.

	Átomo	Exp.	a1	a2	a3	a4	b1	b2	b3	b4	
72	CPMAS	C-CF3	141.7	146.6	146.3	146.1	146.1	153.5	151.9	154.0	152.2
		C4(+)	102.1	100.5	99.4	105.4	105.9	102.6	106.6	101.6	107.0
		C4(-)	99.8	100.5	99.4	105.4	105.9	102.6	106.6	101.6	107.0
		C-estiril(-)	145.1	141.9	142.3	140.6	140.7	133.3	133.1	133.2	133.0
		C-estiril(+)	143.1	141.9	142.3	140.6	140.7	133.3	133.1	133.2	133.0
		CF3	122	126.0	126.1	126.1	126.1	125.3	125.2	125.3	125.3
		C6-	113.8	109.2	115.6	111.1	117.0	118.4	115.1	125.0	121.1
		C6+	111.9	109.2	115.6	111.1	117.0	118.4	115.1	125.0	121.1
		C7+	125.6	125.3	129.8	118.8	124.3	123.4	123.2	128.4	128.4
		C7-	122.2	125.3	129.8	118.8	124.3	123.4	123.2	128.4	128.4
		C1'+	116.5	116.7	117.5	116.6	117.2	117.6	118.1	118.5	118.5
		C1'-	115.1	116.7	117.5	116.6	117.2	117.6	118.1	118.5	118.5
		C2'-	162.0	163.3	165.5	162.7	165.2	162.8	163.1	165.3	165.5
		C2'+	159.3	163.3	165.5	162.7	165.2	162.8	163.1	165.3	165.5
		C3'+	102.1	100.6	101.3	100.5	101.6	100.2	100.6	101.4	101.1
		C3'-	99.8	100.6	101.3	100.5	101.6	100.2	100.6	101.4	101.1
		C4'+	157.7	158.8	157.9	158.1	157.5	158.0	157.5	157.2	156.9
		C4'-	153.2	158.8	157.9	158.1	157.5	158.0	157.5	157.2	156.9
		C5'+	111.9	112.0	111.7	111.9	111.7	111.7	111.2	111.1	111.3
		C5'-	110.2	112.0	111.7	111.9	111.7	111.7	111.2	111.1	111.3
		C6'-	132.5	125.1	134.4	125.4	133.5	126.0	125.6	133.8	134.4
		C6'+	130.2	125.1	134.4	125.4	133.5	126.0	125.6	133.8	134.4
		NH	-171.8	-186.6	-185.4	-196.2	-197.4	-195.1	-192.4	-194.7	-193.0
	N	-103.0	-77.5	-77.3	-72.9	-74.0	-71.9	-82.1	-70.0	-84.1	
71	CPMAS	C-CF3	142.1	146.6	146.6	146.3	146.1	130.1	133.3	133.4	133.1
		C4	99.0	99.9	99.9	105.6	105.6	116.1	106.7	101.9	106.7
		C-estiril	143.6	141.7	141.5	140.1	140.1	152.8	151.6	153.1	151.4
		CF3	120.0	126.0	126.0	126.0	125.9	145.3	125.1	125.2	125.2
		C6	110.3	109.7	109.7	111.8	111.4	117.2	115.8	130.4	114.9
		C7	133.4	133.0	133.3	126.4	128.0	120.0	130.8	109.0	132.5
		C1'	127.6	128.7	129.2	128.4	128.8	132.1	130.0	153.6	130.1
		C2'	110.3	117.0	108.2	116.5	109.1	119.1	117.0	145.8	108.9
		C3'	153.4	152.7	153.5	152.3	153.5	153.2	152.4	116.5	153.5
		C3'	151.0	152.7	153.5	152.3	153.5	153.2	152.4	116.5	153.5

	C4'	145.2	146.1	146.6	145.7	146.2	102.3	145.1	127.1	145.5
	C5'	117.0	117.4	117.0	117.5	116.8	133.4	116.8	118.8	116.5
	C6'	129.7	119.1	128.2	119.5	127.2	125.2	119.6	131.4	127.9
	NH	-172.8	-186.6	-186.4	-196.5	-196.8	-194.7	-192.4	-194.8	-192.9
	N	-102.2	-77.3	-77.1	-72.9	-73.6	-71.6	-83.1	-71.2	-83.7
73	OH/F2'									
	C-CF3	142.4	146.9	146.7	146.4	146.4	133.8	133.6	133.7	133.3
CPMAS	C4	100.7	101.3	100.4	106.3	106.7	102.9	107.0	101.7	107.2
	C4	99.1	101.3	100.4	106.3	106.7	102.9	107.0	101.7	107.2
	C-estiril	144.5	141.5	141.9	140.0	140.1	153.0	151.4	153.5	151.7
	C-estiril	143.7	141.5	141.9	140.0	140.1	153.0	151.4	153.5	151.7
	CF3	121.5	125.8	125.8	125.9	125.8	125.1	125.0	125.1	125.1
	C6	115.4	112.2	129.4	114.1	118.3	121.3	118.2	126.9	122.6
	C7	120.0	124.1	117.7	116.9	124.1	122.8	121.3	127.9	128.3
	C1'	120.0	120.1	120.8	119.8	120.6	120.9	121.3	121.7	121.7
	C2'	151.3	151.5	153.3	151.4	153.4	151.2	151.7	153.1	153.8
	C2'	149.4	151.5	153.3	151.4	153.4	151.2	151.7	153.1	153.8
	C3'	133.0	135.8	136.1	135.4	135.9	135.6	135.4	136.0	135.6
	C4'	152.5	153.7	153.6	153.3	153.2	153.2	152.8	152.9	152.8
	C4'	151.3	153.7	153.6	153.3	153.2	153.2	152.8	152.9	152.8
	C5'	111.5	113.1	113.0	113.3	113.0	112.9	112.6	112.4	112.6
	C6'	111.5	112.0	121.5	112.4	120.2	112.8	112.8	120.7	121.0
	NH	-171.6	-186.1	-184.7	-195.8	-197.0	-193.9	-191.4	-193.6	-192.0
	N	-100.3	-75.4	-74.7	-70.7	-72.0	-70.0	-81.0	-68.2	-83.0
73	OH/F4'									
	C-CF3	142.4	146.8	146.5	146.3	146.3	123.3	133.5	133.5	133.3
CPMAS	C4	100.7	101.7	100.0	106.2	107.1	121.1	107.0	101.7	107.6
	C4	99.1	101.7	100.0	106.2	107.1	121.1	107.0	101.7	107.6
	C-estiril	144.5	141.5	141.9	140.1	140.2	153.1	151.4	153.6	151.8
	C-estiril	143.7	141.5	141.9	140.1	140.2	153.1	151.4	153.6	151.8
	CF3	121.5	125.9	126.0	126.0	125.8	103.3	125.1	125.2	125.2
	C6	115.4	111.8	118.3	114.0	119.1	133.8	118.0	127.7	123.2
	C7	120.0	125.1	129.5	117.7	124.4	125.2	122.1	128.3	128.6
	C1'	120.0	122.4	123.1	122.3	122.9	123.2	123.6	124.1	124.1
	C2'	151.3	151.4	153.1	151.1	153.3	151.0	151.4	153.1	153.6
	C2'	149.4	151.4	153.1	151.1	153.3	151.0	151.4	153.1	153.6
	C3'	133.0	135.8	135.8	135.8	135.8	135.5	135.8	135.7	135.5
	C4'	152.5	153.4	153.0	153.2	152.9	153.0	152.8	152.2	152.6
	C4'	151.3	153.4	153.0	153.2	152.9	153.0	152.8	152.2	152.6
	C5'	111.5	110.2	110.1	110.3	110.2	110.0	109.6	109.4	109.7
	C6'	111.5	112.0	121.3	112.0	120.1	112.9	112.2	120.6	121.0
	NH	-171.6	-186.0	-184.1	-195.4	-196.9	-194.0	-191.2	-193.6	-192.2
	N	-100.3	-75.7	-75.0	-70.6	-72.4	-70.3	-80.4	-67.5	-83.0
74	CPMAS									
	C-CF3	142.3	146.8	146.6	146.3	146.3	133.7	133.3	133.5	133.3
	C4	100.0	100.7	100.4	106.1	106.6	102.5	107.0	102.1	107.4
	C-estiril	144.8	141.2	142.2	140.1	140.4	153.1	151.4	153.6	152.0
	CF3	122.6	125.9	126.0	125.9	126.0	125.1	125.1	125.2	125.1
	C6	110.2	110.6	117.0	112.4	119.0	120.0	116.5	126.2	123.3

	C7	122.6	124.0	128.6	118.8	122.4	122.3	123.4	127.3	126.5
	C1'	116.6	116.8	117.3	116.5	117.2	117.8	118.0	118.3	118.6
	C1'	115.2	116.8	117.3	116.5	117.2	117.8	118.0	118.3	118.6
	C2'	157.0	160.1	162.0	159.2	161.2	159.5	159.7	161.9	161.6
	C2'	155.0	160.1	162.0	159.2	161.2	159.5	159.7	161.9	161.6
	C3'	104.9	105.1	105.5	104.6	105.6	104.6	104.5	105.4	105.0
	C4'	146.0	146.7	145.7	146.2	145.2	145.8	145.6	145.0	144.6
	C5'	150.3	149.8	149.1	149.7	148.2	149.7	149.5	149.0	148.2
	C5'	147.8	149.8	149.1	149.7	148.2	149.7	149.5	149.0	148.2
	C6'	110.2	108.7	117.4	109.4	116.9	109.5	109.4	116.8	117.6
	NH	-173.0	-186.1	-185.2	-195.9	-197.1	-194.3	-192.0	-193.9	-192.1
	N	-98.3	-76.1	-75.7	-71.7	-72.3	-70.6	-81.4	-68.8	-83.1
	N	-103.5	-76.1	-75.7	-71.7	-72.3	-70.6	-81.4	-68.8	-83.1
70	CPMAS C-CF3	142.6	146.5	146.6	146.2	146.1	133.6	133.4	133.5	133.0
	C-CF3	141.4	146.5	146.6	146.2	146.1	133.6	133.4	133.5	133.0
	C-CF3	140.6	146.5	146.6	146.2	146.1	133.6	133.4	133.5	133.0
	C4	99.6	100.4	99.8	105.7	105.6	102.3	106.8	101.8	106.5
	C4	99.1	100.4	99.8	105.7	105.6	102.3	106.8	101.8	106.5
	C4	98.7	100.4	99.8	105.7	105.6	102.3	106.8	101.8	106.5
	C-estiril	144.4	141.9	141.6	140.3	140.1	153.2	151.9	153.4	151.5
	CF3	121.0	126.0	125.9	126.0	125.8	125.3	125.1	125.1	125.2
	C6	113.9	109.8	109.1	112.6	110.7	119.4	116.2	118.1	114.3
	C7	131.7	134.4	134.2	126.8	129.6	132.1	131.0	132.4	133.9
	C1'	132.4	132.1	132.4	131.6	132.1	133.1	132.9	133.4	133.3
	C2'	110.7	112.3	102.7	111.7	102.8	111.3	112.5	103.6	102.7
	C2'	109.4	112.3	102.7	111.7	102.8	111.3	112.5	103.6	102.7
	C2'	107.6	112.3	102.7	111.7	102.8	111.3	112.5	103.6	102.7
	C3'	147.9	148.9	149.5	149.1	149.6	148.7	148.8	149.4	149.2
	C4'	153.1	155.4	156.1	155.2	155.7	155.0	154.7	155.4	155.4
	C4'	150.6	155.4	156.1	155.2	155.7	155.0	154.7	155.4	155.4
	C5'	115.5	116.8	116.3	116.9	116.3	116.6	116.3	115.9	116.0
	C6'	121.2	113.4	123.6	113.5	122.0	114.3	113.4	122.1	122.7
	R-3'	55.1	52.9	52.6	53.1	53.0	52.7	53.0	52.7	52.9
	R-3'	54.4	52.9	52.6	53.1	53.0	52.7	53.0	52.7	52.9
	R-3'	53.9	52.9	52.6	53.1	53.0	52.7	53.0	52.7	52.9
	NH(2)	-169.3	-186.4	-186.4	-196.9	-196.5	-194.5	-192.4	-194.9	-193.0
	NH(1)	-173.6	-186.4	-186.4	-196.9	-196.5	-194.5	-192.4	-194.9	-193.0
	N(1)	-97.4	-77.1	-77.2	-73.1	-73.3	-71.1	-83.5	-71.6	-83.8
	N(2)	-102.0	-77.1	-77.2	-73.1	-73.3	-71.1	-83.5	-71.6	-83.8
69	CPMAS C-CF3	143.1	146.3	146.4	146.0	145.9	133.1	133.0	132.2	132.6
	C4	104.2	99.0	99.2	104.9	104.4	101.5	106.6	101.5	105.9
	C-estiril	143.1	142.6	142.2	140.9	140.8	153.8	152.5	153.9	152.3
	CF3	120.3	126.2	126.0	126.2	126.0	125.4	125.3	125.3	125.4
	C6	112.9	108.6	106.6	110.1	108.2	117.3	113.7	115.6	112.4
	C7	127.9	133.8	135.5	127.5	130.4	131.7	131.8	133.7	124.6
	C1'	127.9	127.5	127.9	127.1	127.3	128.6	128.5	129.0	128.5

	C2'	108.9	109.9	100.6	109.4	100.2	109.0	110.2	101.4	100.3	
	C3'	146.3	145.8	146.5	145.9	146.7	145.4	145.7	146.5	146.5	
	C4'	146.3	148.6	149.1	148.0	149.1	147.8	147.3	148.2	148.4	
	C5'	114.4	115.2	114.5	114.9	114.3	115.2	114.3	114.0	114.2	
	C6'	115.9	116.2	126.3	116.3	124.7	116.8	116.2	124.8	125.3	
	R-3'	55.2	52.7	52.6	52.5	52.9	52.5	53.4	52.7	52.8	
	NH	-180.0	-187.1	-187.2	-197.4	-197.0	-195.7	-193.4	-195.9	-193.7	
	N	-96.3	-79.0	-79.2	-75.0	-75.1	-72.7	-84.8	-73.5	-84.6	
72	MAS	CF3(2)	-57.8	-61.7	-61.9	-61.9	-62.0	-59.5	-60.0	-59.4	-60.0
		CF3(1)	-59.6	-61.7	-61.9	-61.9	-62.0	-59.5	-60.0	-59.4	-60.0
		F2'	-106.9	-117.0	-108.4	-119.2	-106.9	-119.1	-117.0	-107.3	-107.5
		F2'	-111.3	-117.0	-108.4	-119.2	-106.9	-119.1	-117.0	-107.3	-107.5
		F2'	-114.4	-117.0	-108.4	-119.2	-106.9	-119.1	-117.0	-107.3	-107.5
71	MAS	CF3	-57.6	-61.9	-61.9	-62.0	-62.2	-59.5	-60.0	-59.9	-60.0
		F3'	-136.1	-150.1	-149.2	-149.4	-147.9	-151.4	-150.7	-149.5	-149.4
73	MAS	CF3	-59.1	-61.9	-61.5	-61.9	-62.0	-59.5	-60.0	-59.6	-60.0
		CF3	-60.1	-61.9	-61.5	-61.9	-62.0	-59.5	-60.0	-59.6	-60.0
		CF3	-61.0	-61.9	-61.5	-61.9	-62.0	-59.5	-60.0	-59.6	-60.0
	OH/F2'	F2'	-135.0	-151.2	-146.0	-153.7	-144.6	-153.0	-151.8	-144.9	-145.1
		F2'	-137.4	-151.2	-146.0	-153.7	-144.6	-153.0	-151.8	-144.9	-145.1
		F2'	-139.6	-151.2	-146.0	-153.7	-144.6	-153.0	-151.8	-144.9	-145.1
		F4'	-128.9	-126.2	-126.7	-127.5	-127.8	-128.8	-130.1	-129.5	-130.2
		F4'	-130.9	-126.2	-126.7	-127.5	-127.8	-128.8	-130.1	-129.5	-130.2
		F4'	-132.4	-126.2	-126.7	-127.5	-127.8	-128.8	-130.1	-129.5	-130.2
73	MAS	CF3	-59.1	-61.8	-61.8	-61.9	-62.0	-59.4	-60.0	-59.6	-60.0
		CF3	-60.1	-61.8	-61.8	-61.9	-62.0	-59.4	-60.0	-59.6	-60.0
		CF3	-61.0	-61.8	-61.8	-61.9	-62.0	-59.4	-60.0	-59.6	-60.0
		F2'	-135.0	-135.4	-129.2	-137.2	-127.4	-137.5	-135.0	-127.7	-128.0
		F2'	-137.4	-135.4	-129.2	-137.2	-127.4	-137.5	-135.0	-127.7	-128.0
	OH/F4'	F2'	-139.6	-135.4	-129.2	-137.2	-127.4	-137.5	-135.0	-127.7	-128.0
		F4'	-128.9	-144.3	-144.8	-144.7	-145.0	-146.6	-146.7	-146.9	-147.1
		F4'	-130.9	-144.3	-144.8	-144.7	-145.0	-146.6	-146.7	-146.9	-147.1
		F4'	-132.4	-144.3	-144.8	-144.7	-145.0	-146.6	-146.7	-146.9	-147.1
74	MAS	CF3(1)	-57.7	-61.9	-61.6	-61.9	-62.0	-59.8	-60.0	-59.3	-60.1
		CF3(2)	-59.8	-61.9	-61.6	-61.9	-62.0	-59.8	-60.0	-59.3	-60.1
		F2'	-110.7	-120.4	-111.8	-122.1	-111.2	-122.2	-119.9	-110.8	-111.6
		F2'	-113.4	-120.4	-111.8	-122.1	-111.2	-122.2	-119.9	-110.8	-111.6
		F2'	-117.4	-120.4	-111.8	-122.1	-111.2	-122.2	-119.9	-110.8	-111.6
		F2'	-120.8	-120.4	-111.8	-122.1	-111.2	-122.2	-119.9	-110.8	-111.6
		F5'	-135.9	-154.2	-154.6	-152.8	-154.1	-154.6	-154.4	-155.7	-155.3
		F5'	-138.7	-154.2	-154.6	-152.8	-154.1	-154.6	-154.4	-155.7	-155.3
		F5'	-141.7	-154.2	-154.6	-152.8	-154.1	-154.6	-154.4	-155.7	-155.3
		F5'	-143.7	-154.2	-154.6	-152.8	-154.1	-154.6	-154.4	-155.7	-155.3
70	MAS	CF3(2)	-57.3	-62.0	-61.8	-62.2	-62.1	-59.5	-59.9	-60.0	-59.9
		CF3(1)	-59.4	-62.0	-61.8	-62.2	-62.1	-59.5	-59.9	-60.0	-59.9
		F4'	-131.4	-128.6	-127.0	-130.0	-128.2	-131.3	-132.6	-129.8	-130.6

	F4'	-133.3	-128.6	-127.0	-130.0	-128.2	-131.3	-132.6	-129.8	-130.6	
	F4'	-134.7	-128.6	-127.0	-130.0	-128.2	-131.3	-132.6	-129.8	-130.6	
69	MAS	CF3	-61.5	-62.0	-61.7	-62.2	-62.1	-59.5	-59.8	-59.9	-60.0

Tabla 43. Desplazamientos químicos experimentales de ^{13}C , ^{15}N y ^{19}F RMN en estado sólido, frente a los calculados para los diferentes tautómeros y conformeros del pirazol 73.

Átomo	Exp	F2'								F4'							
		a1	a2	a3	a4	b1	b2	b3	b4	oa1	oa2	oa3	oa4	ob1	ob2	obe	ob4
C-CF ₃	142.4	146.9	146.7	146.4	146.4	133.8	133.6	133.7	133.3	146.8	146.5	146.3	146.3	123.3	133.5	133.5	133.3
C4	100.7	101.3	100.4	106.3	106.7	102.9	107.0	101.7	107.2	101.7	100.0	106.2	107.1	121.1	107.0	101.7	107.6
C4	99.1	101.3	100.4	106.3	106.7	102.9	107.0	101.7	107.2	101.7	100.0	106.2	107.1	121.1	107.0	101.7	107.6
C-estiril	144.5	141.5	141.9	140.0	140.1	153.0	151.4	153.5	151.7	141.5	141.9	140.1	140.2	153.1	151.4	153.6	151.8
C-estiril	143.7	141.5	141.9	140.0	140.1	153.0	151.4	153.5	151.7	141.5	141.9	140.1	140.2	153.1	151.4	153.6	151.8
CF ₃	121.5	125.8	125.8	125.9	125.8	125.1	125.0	125.1	125.1	125.9	126.0	126.0	125.8	103.3	125.1	125.2	125.2
C6	115.4	112.2	129.4	114.1	118.3	121.3	118.2	126.9	122.6	111.8	118.3	114.0	119.1	133.8	118.0	127.7	123.2
C7	120.0	124.1	117.7	116.9	124.1	122.8	121.3	127.9	128.3	125.1	129.5	117.7	124.4	125.2	122.1	128.3	128.6
C1'	120.0	120.1	120.8	119.8	120.6	120.9	121.3	121.7	121.7	122.4	123.1	122.3	122.9	123.2	123.6	124.1	124.1
C2'	151.3	151.5	153.3	151.4	153.4	151.2	151.7	153.1	153.8	151.4	153.1	151.1	153.3	151.0	151.4	153.1	153.6
C2'	149.4	151.5	153.3	151.4	153.4	151.2	151.7	153.1	153.8	151.4	153.1	151.1	153.3	151.0	151.4	153.1	153.6
C3'	133.0	135.8	136.1	135.4	135.9	135.6	135.4	136.0	135.6	135.8	135.8	135.8	135.8	135.5	135.8	135.7	135.5
C4'	152.5	153.7	153.6	153.3	153.2	153.2	152.8	152.9	152.8	153.4	153.0	153.2	152.9	153.0	152.8	152.2	152.6
C4'	151.3	153.7	153.6	153.3	153.2	153.2	152.8	152.9	152.8	153.4	153.0	153.2	152.9	153.0	152.8	152.2	152.6
C5'	111.5	113.1	113.0	113.3	113.0	112.9	112.6	112.4	112.6	110.2	110.1	110.3	110.2	110.0	109.6	109.4	109.7
C6'	111.5	112.0	121.5	112.4	120.2	112.8	112.8	120.7	121.0	112.0	121.3	112.0	120.1	112.9	112.2	120.6	121.0
NH	-	-186.1	-184.7	-195.8	-197.0	-193.9	-191.4	-193.6	-192.0	-75.7	-75.0	-70.6	-72.4	-70.3	-80.4	-67.5	-83.0
N	-	-75.4	-74.7	-70.7	-72.0	-70.0	-81.0	-68.2	-83.0	-186.0	-184.1	-195.4	-196.9	-194.0	-191.2	-193.6	-192.2
CF ₃	-59.1	-61.9	-61.5	-61.9	-62.0	-59.5	-60.0	-59.6	-60.0	-59.1	-61.8	-61.8	-61.9	-62.0	-59.4	-60.0	-59.6
CF ₃	-60.1	-61.9	-61.5	-61.9	-62.0	-59.5	-60.0	-59.6	-60.0	-60.1	-61.8	-61.8	-61.9	-62.0	-59.4	-60.0	-59.6
CF ₃	-61.0	-61.9	-61.5	-61.9	-62.0	-59.5	-60.0	-59.6	-60.0	-61.0	-61.8	-61.8	-61.9	-62.0	-59.4	-60.0	-59.6
F2'	-	-151.2	-146.0	-153.7	-144.6	-153.0	-151.8	-144.9	-145.1	-135.0	-135.4	-129.2	-137.2	-127.4	-137.5	-135.0	-127.7
F2'	-	-151.2	-146.0	-153.7	-144.6	-153.0	-151.8	-144.9	-145.1	-137.4	-135.4	-129.2	-137.2	-127.4	-137.5	-135.0	-127.7
F2'	-	-151.2	-146.0	-153.7	-144.6	-153.0	-151.8	-144.9	-145.1	-139.6	-135.4	-129.2	-137.2	-127.4	-137.5	-135.0	-127.7
F4'	-	-126.2	-126.7	-127.5	-127.8	-128.8	-130.1	-129.5	-130.2	-128.9	-144.3	-144.8	-144.7	-145.0	-146.6	-146.7	-146.9
F4'	-	-126.2	-126.7	-127.5	-127.8	-128.8	-130.1	-129.5	-130.2	-130.9	-144.3	-144.8	-144.7	-145.0	-146.6	-146.7	-146.9
F4'	-	-126.2	-126.7	-127.5	-127.8	-128.8	-130.1	-129.5	-130.2	-132.4	-144.3	-144.8	-144.7	-145.0	-146.6	-146.7	-146.9

Tabla 44. Energías absolutas en Hartrees, relativas en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ y momentos dipolares (D) correspondientes a los compuestos modelo **95-97** (tautómeros **a, b, c, d**) y **98-100** (tautómeros **e, f, g, h, i**) en fase gas y en algunos casos en DMSO- d_6 .

Comp.	Sust.	Fase	Energía SCF	ZPE	Energía Total	D	Erel
95a	4F	Gas	-943.8192699	0.314586	-943.504684	2.64	0.00
95b	4F	Gas	-943.8046985	0.313586	-943.491113	1.64	38.26
95c	4F	Gas	-943.8186150	0.314490	-943.504125	5.39	1.72
96a	4'OH	Gas	-919.7987757	0.32683	-919.471946	5.17	0.00
96b	4'OH	Gas	-919.7843378	0.325873	-919.458465	2.06	37.91
96c	4'OH	Gas	-919.7974961	0.326772	-919.470724	2.74	3.36
96d1	4'OH	Gas	-919.7922077	0.327106	-919.465102	15.86	17.24
96a	4'OH	DMSO- d_6	-919.8156163	0.326688	-919.488928	7.57	26.20
96b	4'OH	DMSO- d_6	-919.7997027	0.326081	-919.473621	2.97	67.98
96c	4'OH	DMSO- d_6	-919.8138848	0.326672	-919.487212	4.02	30.74
96d1	4'OH	DMSO- d_6	-919.8255937	0.327906	-919.497688	30.21	0.00
97a	3'OH	Gas	-919.7980703	0.326703	-919.471368	3.25	0.00
97b	3'OH	Gas	-919.7834829	0.325730	-919.457753	1.27	38.30
97c	3'OH	Gas	-919.7972288	0.326608	-919.470621	4.79	2.21
97d2	3'OH	Gas	-919.7568976	0.326371	-919.430527	21.70	108.10
97a	3'OH	DMSO- d_6	-919.8147328	0.326717	-919.488016	5.01	0.00
97b	3'OH	DMSO- d_6	-919.7984850	0.325856	-919.472629	2.28	42.66
97c	3'OH	DMSO- d_6	-919.8132638	0.326639	-919.486625	6.71	3.86
97d2	3'OH	DMSO- d_6	-919.8130250	0.328059	-919.484966	35.48	4.48
98e	4F	Gas	-1020.300033	0.343867	-1019.956166	2.40	0.00
98f	4F	Gas	-1020.288800	0.342318	-1019.946482	0.81	29.49
98g	4F	Gas	-1020.280762	0.342143	-1019.938619	3.00	50.60
98h	4F	Gas	-1020.262363	0.342953	-1019.919410	5.49	98.90
98i	4F	Gas	-1020.276831	0.343291	-1019.933540	2.45	60.92
99e	4'OH	Gas	-996.2786408	0.356049	-995.922592	3.15	0.00
99f	4'OH	Gas	-996.2672192	0.354481	-995.912738	2.01	29.99
99g	4'OH	Gas	-996.2589251	0.354362	-995.904563	3.76	51.76
99h	4'OH	Gas	-996.2401035	0.355136	-995.884968	3.83	101.18
99i	4'OH	Gas	-996.2547441	0.355442	-995.899302	0.81	62.74
100e	3'OH	Gas	-996.2786408	0.356049	-995.922592	3.152	0.00
100f	3'OH	Gas	-996.2672192	0.354481	-995.912738	2.0143	29.99
100g	3'OH	Gas	-996.2589251	0.354362	-995.904563	3.7653	51.76
100h	3'OH	Gas	-996.2401035	0.355136	-995.884968	3.8319	101.18
100i	3'OH	Gas	-996.2547441	0.355442	-995.899302	0.8096	62.74

Tabla 45. Energías relativas ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) y momentos dipolares (D) correspondientes a los compuestos **83-88** (tautómeros **a, c, d**) y **89-94** (tautómeros **e, f**) en fase gas y en $\text{DMSO-}d_6$.

Comp.	Gas			$\text{DMSO-}d_6$		
E_{rel}	a	c	d	a	c	d
83	0.0	3.0	31.5	18.5	23.1	0.0
84	0.0	1.7	----	0.0	3.7	----
85	0.0	1.8	20.1	35.4	39.2	0.0
86	0.0	1.3	10.2	34.0	37.4	0.0
87	0.0	2.1	82.3	25.1	28.0	0.0
88	0.3	0.0	11.8	44.4	47.1	0.0
D	a	c	d	a	c	d
83	5.61	3.60	14.99	8.02	5.19	30.11
84	3.48	5.67	----	5.08	7.96	----
85	3.17	4.60	17.39	5.05	6.32	32.65
86	6.27	2.43	16.41	9.26	3.27	30.45
87	1.78	6.55	23.34	2.89	8.82	37.39
88	4.23	3.72	17.77	6.71	4.92	32.55
E_{rel}	e	f		e	f	
89	0.0	30.2		0.0	39.4	
90	0.0	29.7		0.0	39.1	
91	0.0	29.7		0.0	39.2	
92	0.0	30.0		0.0	38.8	
93	0.0	29.6		0.0	38.6	
94	0.0	29.6		0.0	38.6	
D	e	f		e	f	
89	2.90	2.46		4.20	3.41	
90	2.15	1.56		3.13	2.04	
91	2.65	0.77		3.87	1.28	
92	4.54	3.33		6.11	4.59	
93	3.45	2.30		4.78	3.29	
94	3.20	1.88		4.44	2.79	

Tabla 46. Energías absolutas en Hartrees, relativas en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ y momentos dipolares (*D*) calculados para los compuestos **86** y **92**. En todos los casos el número de frecuencias imaginarias es = 0.

No	Comp.	Energía SCF	ZPE	Energía Total	D	E_{rel} ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
1	86aTSZC	-1019.082626	0.318649	-1018.763976	7.08	36.6
2	86aTSZT	-1019.083218	0.318649	-1018.764569	6.96	35.0
3	86aTSEC	-1019.080790	0.318606	-1018.762184	7.40	41.4
4	86aTSET	-1019.081085	0.318398	-1018.762687	7.35	40.6
5	86aTAZC	-1019.082930	0.318754	-1018.764176	9.26	35.8
6	86aTAZT	-1019.083394	0.318622	-1018.764772	6.15	34.6
7	86aTAEC	-1019.081064	0.318639	-1018.762425	6.47	40.7
8	86aTAET	-1019.081248	0.318452	-1018.762796	9.45	40.2
9	86aTSZC	-1019.081304	0.318665	-1018.762639	4.34	40.0
10	86aTSZT	-1019.081655	0.318492	-1018.763163	4.47	39.1
11	86aTSEC	-1019.081744	0.318776	-1018.762968	4.58	38.9
12	86cTSET	-1019.082560	0.318709	-1018.763851	4.54	36.7
13	86cTAZC	-1019.081617	0.318610	-1018.763007	3.27	39.2
14	86cTAZT	-1019.081753	0.318418	-1018.763335	7.58	38.9
15	86cTAEC	-1019.082013	0.318945	-1018.763068	7.91	38.2
16	86cTAET	-1019.082726	0.318578	-1018.764147	2.82	36.3
17	86dTZC	-1019.095876	0.319861	-1018.776015	30.4	1.8
18	86dTZT	-1019.096555	0.319757	-1018.776798	30.3	0.0
19	86dTEC	-1019.095884	0.319686	-1018.776197	30.4	1.8
20	86dTET	-1019.096413	0.319602	-1018.776811	30.2	0.4
21	92eCSU	-1095.571071	0.347832	-1095.223239	5.66	0.6
22	92eCSD	-1095.570079	0.347698	-1095.222381	5.83	3.2
23	92eCAU	-1095.571294	0.347729	-1095.223565	7.32	0.0
24	92eCAD	-1095.570341	0.347857	-1095.222483	6.73	2.5
25	92eTSU	-1095.562366	0.348059	-1095.214308	6.06	23.4
26	92eTSD	-1095.562302	0.347862	-1095.214440	6.11	23.6
27	92eTAU	-1095.562512	0.347948	-1095.214563	8.05	23.1
28	92eTAD	-1095.562589	0.347859	-1095.214730	5.56	22.9
29	92fCSU	-1095.554845	0.345560	-1095.209285	4.01	43.2
30	92fCSD	-1095.553736	0.345428	-1095.208308	4.19	46.1
31	92fCAU	-1095.555079	0.345562	-1095.209517	5.01	42.6
32	92fCAD	-1095.553995	0.345543	-1095.208451	5.97	45.4
33	92fTSU	-1095.547571	0.345705	-1095.201866	4.49	62.3
34	92fTSD	-1095.547507	0.345537	-1095.201970	4.59	62.5
35	92fTAU	-1095.547761	0.345679	-1095.202082	7.02	61.8
36	92fTAD	-1095.547784	0.345518	-1095.202266	4.25	61.7

CAPÍTULO 8
BIBLIOGRAFÍA

8 BIBLIOGRAFÍA

1. a) Aggarwal, B. B.; Kumar, A.; Aggarwal, M. S.; Shishodia, S. Curcumin derived from turmeric (*Curcuma longa*): a spice for all seasons. *Phytopharm.Cancer Chemoprev.* **2005**, *23*, 351-387. b) Aggarwal, B. B.; Bhatt, I. D.; Ichikawa, H.; Ahn, K. S.; Sethi, G.; Sandur, K. S.; Sundaram, C.; Seeram, N.; Shishodia, S. *Curcumin-Biological and Medicinal Properties*; CRC Press: New York, **2007**. c) Aggarwal, B. B.; Surh, Y.; Shishodia, S. *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease*; Springer Science & Business Media: New York, **2007**. d) Anand, P.; Thomas, S. G.; Kunnumakkara, A. B.; Sundaram, C.; Harikumar, K. B.; Sung, B.; Tharakan, S. T.; Misra, K.; Priyadarsini, I. K.; Rajasekharan, K. N. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *76*, 1590-1611. e) Itokawa, H.; Shi, Q.; Akiyama, T.; Morris-Natschke, S. L.; Lee, K. Recent advances in the investigation of curcuminoids. *Chin. Med.* **2008**, *3*, 11-24. f) Esatbeyoglu, T.; Huebbe, P.; Ernst, I.; Chin, D.; Wagner, A. E.; Rimbach, G. Curcumin, from molecule to biological function. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5308-5332. g) Gupta, S. C.; Patchva, S.; Koh, W.; Aggarwal, B. B. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2012**, *39*, 283-299. h) Bukhari, S. N. A.; Jantan, I. B.; Jasamai, M.; Ahmad, W.; Amjad, M. W. B. Synthesis and biological evaluation of curcumin analogues. *J. Med Sci.* **2013**, *13*, 501. i) Prasad, S.; Gupta, S. C.; Tyagi, A. K.; Aggarwal, B. B. Curcumin, a component of golden spice: from bedside to bench and back. *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32*, 1053-1064. j) Shanmugam, M. K.; Rane, G.; Kanchi, M. M.; Arfuso, F.; Chinnathambi, A.; Zayed, M.; Alharbi, S. A.; Tan, B. K.; Kumar, A. P.; Sethi, G. The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment. *Molecules.* **2015**, *20*, 2728-2769. k) González-Albadalejo, J.; Sanz, D.; Claramunt, R. M.; Lavandera, J. L.; Alkorta, I.; Elguero, J. Curcumina y curcuminoides: química, estudios estructurales y propiedades biológicas. *An. Real Acad. Farm.* **2015**, *81*, 278-310.
2. Vogel, H.; Pelletier, J. Curcumin-biological and medicinal properties. *J. Pharma.* **1815**, *2*, 24.
3. Péret-Almeida, L.; Cherubino, A.; Alves, R.; Dufosse, L.; Gloria, M. Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Res. Int.* **2005**, *38*, 1039-1044.

4. Song, W.; Qiao, X.; Liang, W.; Ji, S.; Yang, L.; Wang, Y.; Xu, Y.; Yang, Y.; Guo, D.; Ye, M. Efficient separation of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin from turmeric using supercritical fluid chromatography: From analytical to preparative scale. *J. Sep. Sci.* **2015**, *38*, 3450-3453.
5. Wang, Y.; Pan, M.; Cheng, A.; Lin, L.; Ho, Y.; Hsieh, C.; Lin, J. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *15*, 1867-1876.
6. Kumavat, S. D.; Chaudhari, Y. S.; Borole, P.; Mishra, P.; Shenghani, K.; Duvvuri, P. Degradation studies of curcumin. *Int. J. Pharm. Rev. Res.* **2013**, *3*, 50-55.
7. Shen, L.; Ji, H. The pharmacology of curcumin: is it the degradation products? *Trends Mol. Med.* **2012**, *18*, 138-144.
8. Schneider, C.; Gordon, O. N.; Edwards, R. L.; Luis, P. B. Degradation of curcumin: from mechanism to biological implications. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 7606-7614.
9. a) Gordon, O. N.; Schneider, C. Vanillin and ferulic acid: not the major degradation products of curcumin. *Trends Mol. Med.* **2012**, *18*, 361-363. b) Siddiqui, N. A. Evaluation of thermo sensitivity of curcumin and quantification of ferulic acid and vanillin as degradation products by a validated HPTLC method. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2015**, *28*, 299-305.
10. Dhar, G.; Chakravarty, D.; Hazra, J.; Dhar, J.; Poddar, A.; Pal, M.; Chakrabarti, P.; Surolia, A.; Bhattacharyya, B. Actin–Curcumin Interaction: Insights into the Mechanism of Actin Polymerization Inhibition. *Biochemistry.* **2015**, *54*, 1132-1143.
11. Bhullar, K. S.; Jha, A.; Youssef, D.; Rupasinghe, H. Curcumin and its carbocyclic analogs: structure-activity in relation to antioxidant and selected biological properties. *Molecules.* **2013**, *18*, 5389-5404.
12. Slavova-Kazakova, A. K.; Angelova, S. E.; Veprintsev, T. L.; Denev, P.; Fabbri, D.; Dettori, M. A.; Kratchanova, M.; Naumov, V. V.; Trofimov, A. V.; Vasil'ev, R. F. Antioxidant potential of curcumin-related compounds studied by chemiluminescence kinetics, chain-breaking efficiencies, scavenging activity (ORAC) and DFT calculations. *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 1398-1411.
13. Jakopin, Z. Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) inhibitors: a rational approach toward inhibition of NOD signaling pathway. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6897-6918.

14. a) Sa, G.; Das, T. Anticancer effects of curcumin: cycle of life and death. *Cell division*. **2008**, *3*, 14. b) Teiten, M.; Gaascht, F.; Eifes, S.; Dicato, M.; Diederich, M. Chemopreventive potential of curcumin in prostate cancer. *Genes Nutr*. **2010**, *5*, 61-74. c) Banerjee, S.; Prasad, P.; Hussain, A.; Khan, I.; Kondaiah, P.; Chakravarty, A. R. Remarkable photocytotoxicity of curcumin in HeLa cells in visible light and arresting its degradation on oxovanadium (IV) complex formation. *Chem. Commun*. **2012**, *48*, 7702-7704. d) Yang, C.; Wang, Z.; Ou, C.; Chen, M.; Wang, L.; Yang, Z. A supramolecular hydrogelator of curcumin. *Chem. Commun*. **2014**, *50*, 9413-9415. e) Fiala, M. Curcumin and omega-3 fatty acids enhance NK cell-induced apoptosis of pancreatic cancer cells but curcumin inhibits interferon- γ production: benefits of omega-3 with curcumin against cancer. *Molecules*. **2015**, *20*, 3020-3026.
15. Vajragupta, O.; Boonchoong, P.; Morris, G. M.; Olson, A. J. Active site binding modes of curcumin in HIV-1 protease and integrase. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2005**, *15*, 3364-3368.
16. Wolf, L. K. Turmeric-derived compound curcumin may treat Alzheimer. *Chem. Eng. News*. **2012**, *90*, 44-45.
17. Epstein, J.; Sanderson, I. R.; MacDonald, T. T. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br. J. Nutr*. **2010**, *103*, 1545-1557.
18. Galer, P.; Golobič, A.; Koller, J.; Košmrlj, B.; Šket, B. Structures in solid state and solution of dimethoxy curcuminoids: regioselective bromination and chlorination. *Chem. Cent. J*. **2013**, *7*, 1-20.
19. Gadad, B. S.; Subramanya, P. K.; Pullabhatla, S.; Shantharam, I. S.; Rao, K. S. Curcumin-glucoside, a novel synthetic derivative of curcumin, inhibits α -synuclein oligomer formation: relevance to Parkinson's disease. *Curr. Pharm. Des*. **2012**, *18*, 76-84.
20. Arezzini, B.; Ferrali, M.; Ferrari, E.; Grandi, R.; Monti, S.; Saladini, M. Glycosyl-Curcuminoids as Potential New Chelating Agents in Iron Overload Chelation Therapy. *Eur. J. Inorg. Chem*. **2004**, 646-652.
21. Huang, Q.; Wang, S.; Li, Q.; Pan, W.; Deng, P.; Zhou, H.; Pan, Z. Synthesis and characterization of curcumin bridged porphyrins as photosensitizers. *Chem. J. Chin. Univ*. **2012**, *33*, 732-737.
22. Fadda, A. A.; Badria, F. A.; El-Attar, K. M. Synthesis and evaluation of curcumin analogues as cytotoxic agents. *Med. Chem. Res*. **2010**, *19*, 413-430.

23. Ahsan, M. J.; Khalilullah, H.; Yasmin, S.; Jadav, S. S.; Govindasamy, J. Synthesis, characterisation, and in vitro anticancer activity of curcumin analogues bearing pyrazole/pyrimidine ring targeting EGFR tyrosine kinase. *Biomed. Res. Int.* **2013**, 239354.
24. Khan, M. A.; El-Khatib, R.; Rainsford, K.; Whitehouse, M. Synthesis and anti-inflammatory properties of some aromatic and heterocyclic aromatic curcuminoids. *Bioorg. Chem.* **2012**, 40, 30-38.
25. Cornago, P.; Claramunt, R. M.; Bouissane, L.; Alkorta, I.; Elguero, J. A study of the tautomerism of β -dicarbonyl compounds with special emphasis on curcuminoids. *Tetrahedron.* **2008**, 64, 8089-8094.
26. Cornago, P.; Cabildo, P.; Sanz, D.; Claramunt, R. M.; Torralba, M. C.; Torres, M. R.; Elguero, J. Structures of Hemi-Curcuminoids in the Solid State and in Solution. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 6043-6054.
27. Claramunt, R. M.; Bouissane, L.; Cabildo, M. P.; Cornago, M.; Elguero, J.; Radziwon, A.; Medina, C. Synthesis and biological evaluation of curcuminoid pyrazoles as new therapeutic agents in inflammatory bowel disease: effect on matrix metalloproteinases. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 1290-1296.
28. Cornago, P.; Cabildo, P.; Claramunt, R. M.; Bouissane, L.; Pinilla, E.; Torres, M. R.; Elguero, J. The annular tautomerism of the curcuminoid NH-pyrazoles. *New J. Chem.* **2009**, 33, 125-135.
29. Gillis, E. P.; Eastman, K. J.; Hill, M. D.; Donnelly, D. J.; Meanwell, N. A. Applications of fluorine in medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 8315-8359.
30. Ojima, I. *Fluorine in medicinal chemistry and chemical biology*; John Wiley & Sons: United Kingdom, **2009**.
31. Filler, R.; Saha, R. Fluorine in medicinal chemistry: a century of progress and a 60-year retrospective of selected highlights. *Future Med. Chem.* **2009**, 1, 777-791.
32. Purser, S.; Moore, P. R.; Swallow, S.; Gouverneur, V. Fluorine in medicinal chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 320-330.
33. Swinson, J. Fluorine, a vital element in the medicine chest. *Pharma. Chem.* **2005**, 4, 26-30.
34. Lampe, V.; Milobedzka, J. Studien über Curcumin. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1913**, 46, 2235-2240.

35. Pabon, H. A synthesis of curcumin and related compounds. *Rec. Trav. Chim. Pays Bas.* **1964**, *83*, 379-386.
36. Rao, E. V.; Sudheer, P. Revisiting curcumin chemistry part I: A new strategy for the synthesis of curcuminoids. *Indian J. Pharm. Sci.* **2011**, *73*, 262-270.
37. Elavarasan, S.; Bhakiaraj, D.; Chellakili, B.; Elavarasan, T.; Gopalakrishnan, M. One pot synthesis, structural and spectral analysis of some symmetrical curcumin analogues catalyzed by calcium oxide under microwave irradiation. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* **2012**, *97*, 717-721.
38. Nieto, C. I.; Cabildo, P.; Claramunt, R. M.; Cornago, P.; Sanz, D.; Torralba, M. C.; Torres, M. R.; Ferraro, M. B.; Alkorta, I.; Marín-Luna, M. The structure of β -diketones related to curcumin determined by X-ray crystallography, NMR (solution and solid state) and theoretical calculations. *Struct. Chem.* **2016**, *27*, 705-730.
39. Fustero, S.; Garcia de la Torre, M.; Pina, B.; Fuentes, A. S. New Strategies for the Synthesis of Fluorinated Vinylogous Amidines and β -Enamino Ketones. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5551-5556.
40. Sanz, D.; Nieto, C.; Claramunt, R. M.; Alkorta, I.; Elguero, J. A multinuclear magnetic resonance study of fluoro derivatives of hydroxybenzaldehydes. *Magn. Reson. Chem.* **2015**, *53*, 624-631.
41. Songca, S.; Bonnett, R.; Maes, C. A convenient route to new fluorinated photodynamic therapeutic photosensitizers based on meso-tetra (hydroxyphenyl) porphyrins. *S. Afr. J. Chem.* **1997**, *50*, 40-47.
42. a) Becke, A. D.; Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-5652. b) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B.* **1988**, *37*, 785. c) Miehlich, B.; Savin, A.; Stoll, H.; Preuss, H. Results obtained with the correlation energy density functionals of Becke and Lee, Yang and Parr. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *157*, 200-206.
43. a) Ditchfield, R.; Hehre, W. J.; Pople, J. A. Self-consistent molecular-orbital methods. IX. An extended Gaussian-type basis for molecular-orbital studies of organic molecules. *J. Chem. Phys.* **1971**, *54*, 724-728. b) Frisch, M. J.; Pople, J. A.; Binkley, J. S. Self-consistent molecular orbital methods. Supplementary functions for Gaussian basis sets. *J. Chem. Phys.* **1984**, *80*, 3265-3269.

44. a) London, F. Théorie quantique des courants interatomiques dans les combinaisons aromatiques. *J. Phys. Radium*. **1937**, 8, 397-409. b) Ditchfield, R. Self-consistent perturbation theory of diamagnetism: I. A gauge-invariant LCAO method for NMR chemical shifts. *Mol. Phys.* **1974**, 27, 789-807.
45. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalman, G. I.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R. J.; Normand, R. K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J. and Fox, D. J., Gaussian 09, Revision A.1, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.
46. a) Silva, A. M. S.; Sousa, R. M. S.; Jimeno, M. L.; Blanco, F.; Alkorta, I.; Elguero, J. *Magn. Reson. Chem.* **2008**, 46, 859-864. b) Blanco, F.; Alkorta, I.; Elguero, J. *Magn. Reson. Chem.* **2007**, 45, 797-800.
47. a) Bader, R. F. W. *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*, Clarendon Press, Oxford, **1990**. b) Popelier, P. L. A. *Atoms in Molecules: An Introduction*, Prentice Hall, Harlow, England, **2000**.
48. Keith, T. A. 11.10.16 edn, TK Gristmill Software, (aim.tkgristmill.com), **2011**.
49. Shivatare, V.; Tzeng, W. B. Spectroscopic Investigation of cis-2,4-Difluorophenol Cation by Mass-analyzed Threshold Ionization Spectroscopy. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2014**, 35, 815-820.
50. Berger, S.; Braun, S.; Kalinowski, H. *NMR Spectroscopy of the Non-Metallic Elements*, John Wiley & Sons: New York. **1997**, p. 653.
51. Alkorta, I.; Blanco, F.; Del Bene, J. E.; Elguero, J.; Hernández-Folgado, L.; Jimeno, M. L. Difluorobenzenes revisited: an experimental and theoretical study of spin-spin coupling constants for 1,2-, 1,3-, and 1,4-difluorobenzene. *Magn. Reson. Chem.* **2010**, 48, 68-73.

52. Peat, I. R.; Reynolds, W. F. An Investigation of σ and π Contributions to Long-range ^1H - ^1H Coupling Constants in Planar Aromatic Derivatives Using CNDO and INDO Molecular Orbital Calculations. *Can. J. Chem.* **1974**, *52*, 2403-2408.
53. Schaefer, T.; Sebastian, R.; McKinnon, D. M.; Spevack, P. W.; Cox, K. J.; Takeuchi, C. S. Large perturbations of long-range nJ (^1H , ^1H) and nJ (^1H , ^{19}F) by the intramolecular hydrogen bonds in 2-mercaptobenzaldehyde, salicylaldehyde, and some derivatives. Reference structures for intramolecular hydrogen bonds. *Can. J. Chem.* **1993**, *71*, 960-967.
54. Sloop, J. C. 19-Fluorine nuclear magnetic resonance chemical shift variability in trifluoroacetyl species. *Rep. Org. Chem.* **2013**, *3*, 1-12.
55. Grage, S. L.; Dürr, U. H.; Afonin, S.; Mikhailiuk, P. K.; Komarov, I. V.; Ulrich, A. S. Solid state ^{19}F NMR parameters of fluorine-labeled amino acids. Part II: Aliphatic substituents. *J. Magn. Reson.* **2008**, *191*, 16-23.
56. Yemloul, M.; Bouguet-Bonnet, S.; Ba, L. A.; Kirsch, G.; Canet, D. Selective HOESY experiments for stereochemical determinations. *Magn. Reson. Chem.* **2008**, *46*, 939-942.
57. Kubinyi, H. Free Wilson analysis. Theory, applications and its relationship to Hansch analysis. *Mol. Inform.* **1988**, *7*, 121-133.
58. Alkorta, I.; Blanco, F.; Elguero, J. Application of Free-Wilson matrices to the analysis of the tautomerism and aromaticity of azapentalenes: a DFT study. *Tetrahedron.* **2008**, *64*, 3826-3836.
59. Iglesias-Sánchez, J. C.; Santa María, D.; Claramunt, R. M.; Elguero, J. Molecular recognition studies on naphthyridine derivatives. *Molecules.* **2010**, *15*, 1213-1222.
60. Boticario, C.; Cascales, M. ¿Por qué Tenemos que Envejecer? Enfermedades asociadas a la edad. Ed: UNED-Centro de Plasencia. **2009**.
61. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1841-1856.
62. Maheshwari, R.; Singh, A.; Gaddipati, J.; Srimal, R. Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sci.* **2006**, *78*, 2081-2087.
63. Slavova-Kazakova, A. K.; Angelova, S. E.; Veprintsev, T. L.; Denev, P.; Fabbri, D.; Dettori, M. A.; Kratchanova, M.; Naumov, V. V.; Trofimov, A. V.; Vasil'ev, R. F.; Delogu, G. Antioxidant potential of curcumin-related compounds studied by

chemiluminescence kinetics, chain-breaking efficiencies, scavenging activity (ORAC) and DFT calculations. *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 1398–1411.

64. Simoncin, I. C.; Orsucci, D.; Caldarazzo, I. E.; Siciliano, G.; Bonucelli, U.; Mancuso, M. Alzheimer's Pathogenesis and Its Link to the Mitochondrion. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, 1-8.

65. Kovacic, P.; Samanathan, R. Redox in Neurodegenerative Disease Involving Reactive Oxygen Species. *Curr. Neuropharmacol.* **2012**, *10*, 289-302.

66. Begum, A. N.; Jones, M. R.; Lim, G. P.; Morihara, T.; Kim, P.; Heath, D. D.; Rock, C. L.; Pruitt, M. A.; Yang, F.; Hudspeth, B.; Hu, S.; Faull, K. F.; Teter, B.; Cole, G. M.; Frautschy, S. A. Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *326*, 196-208.

67. Weber, W. M.; Hunsaker, L. A.; Abcouwer, S. F.; Deck, L. M.; Vander Jagt, D. L. Anti-oxidant Activities of Curcumin and Related Enones. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3811-3820.

68. Fang, L.; Gou, S.; Liu, X.; Cao, F.; Cheng, L. Design, synthesis and anti-Alzheimer properties of dimethylaminomethyl-substituted curcumin derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 40-43.

69. Edmondson, D. E.; Binda, C.; Wang, J.; Upadhyay, A. K.; Mattevi, A. Molecular and Mechanistic Properties of the Membrane-Bound Mitochondrial Monoamine Oxidases. *Biochemistry.* **2009**, *48*, 4220-4230.

70. a) Ak, T.; Gülcin, I. Antioxidant and Radical Scavenging Properties of Curumin. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *174*, 27-37. b) Gülcin, I. Antioxidant Properties of Resveratrol: A structure-activity insight. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2010**, *11*, 210-218.

71. a) Venkateswarlu, S.; Ramachandra M. S.; Subbaraju G. V. Synthesis and Biological Evaluation of Polyhydroxycurcuminoids. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6374-6380. b) Venkatesan, P.; Rao M. N. Structure-Activity Relationships for the Inhibition of Lipid Peroxidation and the Scavenging of Free Radicals by Synthetic Symmetrical Curcumin Analogues. *J. Pharm. Pharmacol.* **2000**, *52*, 1123-1128.

72. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying An Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231-1237.
73. Villaño, D.; Fernández-Pachón, M.; Moyá, M.; Troncoso, A.; García-Parrilla, M. Radical Scavenging Ability of Polyphenolic Compounds Towards DPPH Free Radical. *Talanta*. **2007**, *71*, 230-235.
74. Ciccarone, V.; Spengler B. A.; Meyers, M. B.; Biedler, J. L.; Ross, R. A. Phenotypic Diversification in Human Neuroblastoma Cells: Expression of Distinct Neural Crest Lineages. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 219-225.
75. Hong-rong, X.; Lin-sen, H.; Guo-Yi, L. SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line: in Vitro Cell Model of Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease. *Chin. Med. Rev.* **2010**, *123*, 1086-1092.
76. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **1983**, *65*, 55-63.
77. Eisenbrand, G.; Pool-Zobel, B.; Baker, V.; Balls, M.; Blaauboer, B. J.; Boobis, A.; Carere, A.; Kevekordes, S.; Lhuguenot J. C.; Pieters, R.; Kleiner, J. Methods of in vitro toxicology. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40*, 193-236.
78. Berger, S.; Braun, S. *200 and More NMR Experiments*, Wiley-VCH: Weinheim. **2004**.
79. a) Murphy, P. D. Improvement in the cross-polarization NMR experiment for suppression of rigid protonated carbons. *J. Magn. Reson.* **1983**, *52*, 343-345. b) Murphy, P. D. Pulse sequences for the selective observations of nonprotonated and methyl carbon NMR resonances in solids, *J. Magn. Reson.* **1985**, *62*, 303-308. c) Alemany, L. B.; Grant, D. M; Alger, T. D.; Pugmire, R. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 669-6704.
80. a) Blanco, F.; Alkorta, I.; Zborowski, K.; Elguero, J. Substitution effects in N-pyrazole and N-imidazole derivatives along the periodic table. *Struct. Chem.* **2007**, *18*, 965-975. b) Lozada, M. C.; Enríquez R. G.; Lobato C. E.; Ortíz, B.; Soriano-García, M.; Gnecco, D.; Reynolds, W. F. Synthesis and structure of new heterocyclic derivatives of curcumin. *Heterocycles*, **2005**, *65*, 49-58. c) Jadhav, S. Y.; Bhosale, R. B.; Shirame, S. P.; Patil, S. B.; Kulkarni, S. D. Evaluation of Asymmetrical Pyrazole Curcumin

Analogues as Potential Analgesic, Anti-Inflammatory and Antioxidant Agents. *Chem. Biol. Drug Des.* **2015**, *85*, 377-384.

81. Flynn, D. L.; Belliotti, T. R.; Boctor, A. M.; Connor, D. T.; Kostlan, C. R.; Nies, D. E.; Ortwine, D. F.; Schrier, D. J.; Sircar, J. C. Styrylpyrazoles, styrylisoxazoles, and styrylisothiazoles. Novel 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 518-525.

82. Selvam, C.; Jachak, S. M.; Thilagavathia, R.; Chakraborti, A. K. Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking of curcumin analogues as antioxidant, cyclooxygenase inhibitory and anti-inflammatory agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1793-1797.

83. Shim, J. S.; Kim, D. H.; Jung, H. J.; Kim, J. H.; Lim, D.; Lee, S.-K.; Kim, K.-W.; Ahn, J. W.; Yoo, J.-S.; Rho, J.-R.; Shin, J.; Kwon, H. J. Hydrazinocurcumin, a novel synthetic curcumin derivative, is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2439-2444.

84. a) Liu, Y.; Dargush, R.; Maher, P.; Schubert, D. A broadly neuroprotective derivative of curcumin. *J. Neurochem.* **2008**, *105*, 1336-1345. b) Maher, P.; Akaishi, T.; Schubert, D.; Abe, K. A pyrazole derivative of curcumin enhances memory. *Neurobiol. Aging.* **2010**, *31*, 706-709. c) Lapchak, P. A.; McKim, J. M. CeeTox™ analysis of CNB-001 a novel curcumin-based neurotrophic/neuroprotective lead compound to treat stroke: comparison with NXY-059 and Radicut. *Transl. Stroke Res.* **2011**, *2*, 51-59.

85. Chen, Q.; Prior, M.; Dargush, R.; Roberts, A.; Riek, R.; Eichmann, C.; Chiruta, C.; Akaishi, T.; Abe, K.; Maher, P.; Schubert, D. A novel neurotrophic drug for cognitive enhancement and Alzheimer's disease. *Plos One.* **2011**, *6*, e27865.

86. Narlawar, R.; Pickhardt, M.; Leuchtenberger, S.; Baumann, K.; Krause, S.; Dyrks, T.; Weggen, S.; Mandelkow, E.; Schmidt, B. Curcumin-derived pyrazoles and isoxazoles: Swiss army knives or blunt tools for Alzheimer's disease? *ChemMedChem.* **2008**, *3*, 165-172.

87. Lee, D. W.; Park, J. H.; Yoon, S. S. Synthesis and Biological Evaluation of Curcumin Analogs as Antiplatelet Inhibitor. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2014**, *35*, 1537-1540.

88. a) Nieto, C. I., Cabildo, M. P., Cornago, M. P., Sanz, D., Claramunt, R. M., Torralba, M. C., Torres M. R.; Elguero J.; García J. A.; López A.; Acuña-Castroviejo, D. Fluorination Effects on NOS Inhibitory Activity of Pyrazoles Related to Curcumin.

- Molecules*. **2015**, *20*, 15643-15665. b) Nieto, C. I.; Cabildo, M. P.; Cornago, M. P.; Sanz, D.; Claramunt, R. M.; Alkorta, I.; Elguero, J.; García, J. A.; Lopez, A.; Acuña-Castroviejo, D. Synthesis, structure and biological activity of 3(5)-trifluoromethyl-1*H*-pyrazoles derived from hemicurcuminoids. *J. Mol. Struct.* **2015**, *1100*, 518-529.
89. Claramunt, R. M.; Cornago, P.; Torres, V.; Pinilla, E.; Torres, M. R.; Samat, A.; Lokshin, V.; Valés, M.; Elguero, J. The structure of pyrazoles in the solid state: A combined CPMAS, NMR, and crystallographic study. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 6881-6891.
90. Oki, M. *Applications of Dynamic NMR Spectroscopy to Organic Chemistry*; VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim, Germany, **1985**.
91. Alkorta, I., Elguero J.; Donnadiou, B., Etienne, M.; Jaffart, J., Schagen, D.; Limbach, H. The structure of 3, 5-bis (trifluoromethyl) pyrazole in the gas phase and in the solid state. *New J. Chem.* **1999**, *23*, 1231-1237.
92. Foces-Foces, C.; Alkorta, I.; Elguero, J. Supramolecular structure of 1*H*-pyrazoles in the solid state: a crystallographic and ab initio study. *Acta Crystallogr. Sect. B: Struct. Sci.* **2000**, *56*, 1018–1028.
93. Foces-Foces, C.; Cativiela, C.; Serrano, J. L.; Zurbano, M. M.; Jagerovic, N.; Elguero, J. Molecular structure of 4-*p*-hydroxyphenyl-3,5-dimethylpyrazole monohydrate. *J. Chem. Crystallogr.* **1996**, *26*, 127-131.
94. Taylor, R. D.; MacCoss, M.; Lawson, A. D. G. Rings in Drugs: Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 5845-5859.
95. Kramer, C. S. *Pyrazoles, Privileged Scaffolds in Medicinal Chemistry: Design, Synthesis, Evaluation*; The Royal Society of Chemistry: United Kingdom, **2015**.
96. Claramunt, R. M.; Nieto, C. I.; Sanz, D.; Elguero, J. Curcumin derived pyrazoles and related compounds. *Afinidad*. **2016**, *576*, 259-268.
97. Pfeiffer, S., Mayer, B., Hemmens, B. Nitric oxide: chemical puzzles posed by a biological messenger. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1714-1731.
98. Knowles, R. G., & Moncada, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* **1994**, *298*, 249-258.
99. Stuehr, D. J.; Kwon, N. S.; Nathan, C. F.; Griffith, O. W.; Feldman, P. L.; Wiseman, J. N^o-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 6259-6263.

100. Kerwin Jr, J. F.; Lancaster, J. R.; Feldman, P. L. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4343-4362.
101. Ghosh, D. K.; Holliday, M. A.; Thomas, C.; Weinberg, J. B.; Smith, S. M.; Salerno, J. C. Nitric-oxide Synthase Output State design and properties of nitric-oxide synthase oxygenase/FMN domain constructs. *J. Biol Chem.* **2006**, *281*, 14173-14183.
102. Förstermann, U.; Schmidt, H. H.; Pollock, J. S.; Sheng, H.; Mitchell, J. A.; Warner, T. D.; Nakane, M.; Murad, F. Isoforms of nitric oxide synthase characterization and purification from different cell types. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *42*, 1849-1857.
103. Lincoln, J.; Hoyle, C. H.; Burnstock, G. *Nitric oxide in health and disease*. Biochemical Research Topics. Cambridge University Press: United Kingdom, **1997**.
104. Giulivi, C. Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. *Biochem. J.* **1998**, *332*, 673-679.
105. Martin, I. N.; Woodward, J. J.; Winter, M. B. Design and synthesis of C5 methylated L-arginine analogues as active site probes for nitric oxide synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12563-12570.
106. Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **1991**, *43*, 109-142.
107. Braam, B.; Verhaar, M.C. Understanding eNOS for pharmacological modulation of endothelial function: a translational view. *Curr. Pharm.* **2007**, *13*, 1727-40.
108. Larson, A. A.; Kovacs, K. J.; Cooper, J. C.; Kitto, K. F. Transient changes in the synthesis of nitric oxide result in long-term as well as short-term changes in acetic acid-induced writhing in mice. *Pain.* **2000**, *86*, 103-111.
109. Bredt, D. S; Snyder, S. H. "Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1989**, *86*, 9030-3.
110. Muller, H. J. The remaking of chromosomes. *The Collect. Net-Woods Hole.* **1938**, *13*, 181-198.
111. McClintock, B.; Hill, H. E. The cytological identification of the chromosome associated with the RG linkage group in *Zea mays*. *Genetics.* **1931**, *16*, 175-190.
112. McElligott, R.; Wellinger, R. J. The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *J. EMBO.* **1997**, *16*, 3705-3714.

113. Olovnikov, A. M. A theory of marginotomy: the incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* **1973**, *41*, 181-190.
114. Watson, J. D. Origin of concatemeric T7DNA. *Nat. New Biol.* **1972**, *239*, 197-201.
115. Epel, E. S.; Blackburn, E. H.; Lin, J.; Dhabhar, F. S.; Adler, N. E.; Morrow, J. D.; Cawthon, R. M. P. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *P. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 17312-17315.
116. Valdes, A. M.; Andrew, T.; Gardner, J. P.; Kimura, M.; Oelsner, E.; Cherkas, L. F.; Aviv, A.; Spector, T. D. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet.* **2005**, *366*, 662-664.
117. Zou, Y.; Sfeir, A.; Gryaznov, S. M.; Shay, J. W.; Wright, W. E. Does a sentinel or a subset of short telomeres determine replicative senescence? *Mol. Biol. Cell.* **2004**, *15*, 3709-3718.
118. a) Wright, W. E.; Pereira-Smith, O. M.; Shay, J. W. Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* **1989**, *9*, 3088-3092. b) Wright, W. E.; Shay, J. W. Time, telomeres and tumours: is cellular senescence more than an anticancer mechanism? *Trends Cell Biol.* **1995**, *5*, 293-297.
119. Greider, C. W.; Blackburn, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell.* **1985**, *51*, 405-413.
120. Morin, G. B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell.* **1989**, *59*, 521-529.
121. Ebrahimnezhad, Z.; Zarghami, N.; Keyhani, M.; Amirsaadat, S.; Akbarzadeh, A.; Rahmat, M.; Taheri, Z. M.; Nejati-Koshki, K. Inhibition of hTERT gene expression by silibinin-loaded PLGA-PEG-Fe₃O₄ in T47D breast cancer cell line. *BioImpacts.* **2013**, *3*, 67-74.
122. Mitchell, J. R.; Wood, E.; Collins, K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature.* **1999**, *402*, 551-555.
123. Collins, K.; Mitchell, J. R. Telomerase in the human organism. *Oncogene.* **2002**, *21*, 564-579.
124. Blasco, M. A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6*, 611-622.

125. a) Kim, N. W.; Piatyszek, M. A.; Prowse, K. R.; Harley, C. B.; West, M. D.; Ho, P. L.; Coviello, G. M.; Wright, W. E.; Weinrich, S. L.; Shay, J. W. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. **1994**, *266*, 2011-2015. b) Shay, J. W. Aging and cancer: are telomeres and telomerase the connection? *Mol. Med. Today*. **1995**, *1*, 378-384. c) Shay, J. W.; Bacchetti, S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer*. **1997**, *33*, 787-791.
126. Karlseder, J. Telomere repeat binding factors: keeping the ends in check. *Cancer Lett*. **2003**, *194*, 189-197.
127. Cerone, M. A.; Londono-Vallejo, J. A.; Bacchetti, S. Telomere maintenance by telomerase and by recombination can coexist in human cells. *Hum. Mol. Genet*. **2001**, *10*, 1945-1952.
128. a) Bianchi, A.; Shore, D. How telomerase reaches its end: mechanism of telomerase regulation by the telomeric complex. *Mol. Cell*. **2008**, *31*, 153-165. b) Zhao, Y.; Sfeir, A. J.; Zou, Y.; Buseman, C. M.; Chow, T. T.; Shay, J. W.; Wright, W. E. Telomere extension occurs at most chromosome ends and is uncoupled from fill-in in human cancer cells. *Cell*. **2009**, *138*, 463-475.
129. a) Feng, J.; Funk, W. D.; Wang, S. S. Weinrich, S. L.; Avilion, A. A.; Chiu, C. P.; Adams, R. R.; Chang, E.; Allsopp, R. C.; Yu, J.; Le, S.; West, M. D.; Harley, C. B., Andrews, W. H.; Greider, C. W.; Villeponteau, B. The RNA component of human telomerase. *Science*. **1995**, *269*, 1236-1241. b) Avilion, A. A.; Piatyszek, M. A.; Gupta, J.; Shay, J. W.; Bacchetti, S.; Greider, C. W. Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res*. **1996**, *56*, 645-650. c) Yi, X.; Tesmer, V. M.; Savre-Train, I.; Shay, J. W.; Wright, W. E. Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels. *Mol. Cell Biol*. **1999**, *19*, 3989-3997.
130. a) Takakura, M.; Kyo, S.; Kanaya, T.; Tanaka, M.; Inoue, M. Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. *Cancer Res*. **1998**, *58*, 1558-1561. b) Kyo, S.; Kanaya, T.; Takakura, M.; Tanaka, M.; Inoue, M. Human telomerase reverse transcriptase as a critical determinant of telomerase activity in normal and malignant endometrial tissues. *Int. J. Cancer*. **1999**, *80*, 60-63. c) Cong, Y. S.; Wen, J.; Bacchetti, S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum. Mol. Genet*. **1999**, *8*, 137-142. d) Boldrini, L.; Faviana, P.; Gisfredi, S.; Zucconi, Y.; Di Quirico, D.;

- Donati, V. Evaluation of telomerase mRNA (hTERT) in colon cancer. *Int. J. Oncol.* **2002**, *21*, 493-497.
131. Philippi, C.; Loretz, B.; Schaefer, U. F.; Lehr, C. M. Telomerase as an emerging target to fight cancer: Opportunities and challenges for nanomedicine. *J. Control. Release.* **2010**, *146*, 228-240.
132. a) Nakamura, T. M.; Morin, G. B.; Chapman, K. B.; Weinrich, S. L.; Andrews, W. H.; Lingner, J.; Harley, C. B.; Cech, T. R. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science.* **1997**, *277*, 955-959. b) Wang, J.; Xie, L. Y.; Allan, S.; Beach, D.; Hannon, G. J. Myc activates telomerase. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 1769-1774.
133. Wu, K. J.; Grandori, C.; Amacker, M.; Simon-Vermot, N.; Polack, A.; Lingner, J.; Dalla-Favera, R. Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nature Genet.* **1999**, *21*, 220-224.
134. Martí-Centelles, R.; Falomir, E.; Carda, M.; Nieto, C. I.; Cornago, M. P.; Claramunt, R. M. Effects of Curcuminoid Pyrazoles on Cancer Cells and on the Expression of Telomerase Related Genes. *Arch. Pharm.* **2016**, *349*, 532-538.
135. Roberts, D. D. Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1. *FASEB J.* **1996**, *10*, 1183-1191.
136. Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr A. L.; Randall R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265-275.
137. Layne, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in enzymology.* **1957**, *3*, 447-454.
138. Griffin III, Ch. E.; Kaye, A. M.; Rivera Bueno, F.; Kaye, A. D. Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. *Ochsner J.* **2013**, *13*, 214-223.
139. Kaur Gill, R.; Om Kaushik, S.; Chugh, J.; Bansal, S.; Shah, A.; Bariwal, J. Recent Development in [1,4] Benzodiazepines as Potent Anticancer Agents: A Review. *Mini. Rev. Med. Chem.* **2014**, *14*, 229-256.
140. Kumar, R.; Joshi, Y. C. Synthesis, antimicrobial and antifungal activities of novel 1*H*-1,4-diazepines containing pyrazolopyrimidinone moiety. *J. Chem. Sci.*, **2009**, *121*, 497-502.
141. Roma, G.; Grossi, G. C.; Di Braccio, M.; Ghia, M.; Mattioli, F. 1,5-Benzodiazepines IX. A new route to substituted 4*H*-[1,2,4] triazolo [4,3-*a*][1,5]

- benzodiazepin-5-amines with analgesic and/or anti-inflammatory activities. *Eur. J. Med. Chem.* **1991**, *26*, 489-496.
142. a) Ramajayam, R.; Giridhar, R.; Yadav, M. R. Current scenario of 1,4-diazepines as potent biomolecules-A mini review. *Mini. Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 793-812. b) Meanwell, N. A.; Walker, M. A. *1,4-Diazepines in Comprehensive Heterocyclic Chemistry III*; Katritzky, A. R.; Ramsden, Ch. A.; Scriven, E. F.V.; Taylor, J.K., Eds. Elsevier: Amsterdam, **2008**, Vol. 13, pp. 183-235.
143. Hofmann, C. M.; Safir, Jr. S. R. 1,3-Dihydro-1-methyl-5, 6-(and 5,7-)diaryl-2H-1, 4-diazepin-2-ones. *J. Med. Chem.* **1969**, *12*, 914-917.
144. Levin, J. I.; DiJoseph, J. F.; Killar, L. M.; Sung, A.; Walter, Th.; Sharr, M. A.; Roth, C. E.; Skotnicki, J. S.; Albright, J. D. The synthesis and biological activity of a novel series of diazepine MMP inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2657-2662.
145. Toma, L.; Quadrelli, P.; Bunnelle, W. H.; Anderson, D. J.; Meyer, M. D.; Cignarella, G.; Barlocco, D. 6-Chloropyridazin-3-yl derivatives active as nicotinic agents: Synthesis, binding, and modeling studies. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4011-4017.
146. Pathak, V. N.; Joshi, R.; Tiwari, R.; Gupta, N. Synthesis and biological activities of some 2,3-dihydro-5-alkyl/aryl/trifluoromethyl/3-pyridyl/7-fluoroaryl-1H-1,4-diazepines. *Indian. J. Heterocycl. Chem.* **2002**, *11*, 211-216.
147. Mueller, B. K.; Mack, H.; Teusch, N. Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 387.
148. Mibu, N.; Yukawa, M.; Kashige, N.; Iwase, Y.; Goto, Y.; Miake, F.; Yamaguchi, T.; Ito, S.; Sumoto, K. Synthesis and DNA strand breakage activity of some 1,4-diazepines. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 27-31.
149. Hamed, O. A.; Mehdawi, N.; Taha, A. A.; Hamed, E. M.; Al-Nuri, M. A.; Hussein, A. S. Synthesis and antibacterial activity of novel curcumin derivatives containing heterocyclic moiety. *Iran J. Pharm. Res.* **2013**, *12*, 47.
150. Vajragupta, O.; Boonchoong, P.; Watanabe, H.; Tohda, M.; Kummasud, N.; Sumanont, Y. Manganese complexes of curcumin and its derivatives: evaluation for the radical scavenging ability and neuroprotective activity. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, *35*, 1632-1644.

151. Kumar, R., Joshi, Y. C. Synthesis, antimicrobial and antifungal activities of novel 1*H*-1,4-diazepines containing pyrazolopyrimidinone moiety. *J. Chem. Sci.* **2009**, *121*, 497-502.
152. Nieto, C. I.; Andrade, A.; Sanz, D.; Claramunt, R. M.; Torralba, M. C.; Torres, M. R.; Alkorta I.; Elguero, J. Curcumin Related 1,4-Diazepines: Regioselective Synthesis, Structure Analysis, Tautomerism, NMR Spectroscopy, X-ray Crystallography, Density Functional Theory and GIAO Calculations. *ChemistrySelect*, **2017**, *2*, 3732-3738
153. a) Lloyd, D.; Marshall, D. R. Diazepines. Part II. Some bromination experiments on dihydrodiazepines. *J. Chem. Soc.* **1958**, 118-120. b) Barnett, C.; Cleghorn, H. P.; Cross, G. E.; Lloyd, D.; Marshall, D. R. Diazepines. Part IV. Dihydrodiazepinium salts from the condensation reaction between N,N'-disubstituted ethylenediamines and β -dicarbonyl compounds. *J. Chem. Soc.* **1966**, 93-95. c) Lloyd, D.; Cleghorn, H. P.; Marshall, D. R. 2,3-Dihydro-1,4-diazepines. *Adv. Heterocycl. Chem.* **1974**, *17*, 1-26. d) Lloyd, D.; Mackie, R. K.; McNab, H.; Tucker, K. S.; Marshall, D.R. Diazepines-XXII: ^{13}C NMR spectra of 2,3-dihydro-1,4-diazepinium salts. *Tetrahedron.* **1976**, *32*, 2339-2342.