

Síntesis de benzopiran-2-onas y estudio de su actividad antifúngica

Marvin Rentería Gómez*, Fabiola Irene López Vallejo*, Yolanda Alcaraz Contreras**, Alberto Flores Martínez***, J. Merced Martínez Rosales*, Miguel Vázquez Guevara*

RESUMEN

En este trabajo se presenta el estudio de síntesis, caracterización y aplicación catalítica de hidróxidos doble laminares y Iodo en la obtención de benzopiran-2-onas. En esta metodología de síntesis se analizó la ventaja de utilizar la radiación infrarroja como fuente de energía comparándola con el calentamiento convencional. Otro punto descrito, es el estudio de los derivados de benzopiran-2-onas como moléculas con actividad antifúngica utilizando como modelo el hongo fitopatógeno *Sclerotium cepivorum*. El hidróxido doble laminar con una proporción molar $X = 0.36$ ($X = \text{Al}/\text{Al}+\text{Mg}$) fue el más eficiente en la reacción de Knoevenagel, mientras que el Iodo (0.4 mmol) fue un catalizador eficiente en la reacción de Pechmann. Al comparar los análisis de las diferentes fuentes de calentamiento utilizadas, se observó que la radiación infrarroja requiere menor tiempo de reacción en comparación con el calentamiento convencional. Los derivados de benzopiran-2-onas **3a-d** presentaron efecto antifúngico a concentraciones mayores a 1.33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ hasta por 30 días.

ABSTRACT

The synthesis, characterization and catalytic effect of layered double hydroxides and iodine for the benzopyran-2-ones preparation were investigated. In this procedure the advantage was analyzed both the infrared irradiation as energy source and the conventional heating. Another important point described in this work, is the study of those derived of benzopyran-2-ones like molecules with antifungal activity using the plant pathogen fungi *Sclerotium cepivorum*. The layered double hydroxide with a molar proportion $X = 0.36$ ($X = \text{Al}/\text{Al}+\text{Mg}$) was the most efficient in the Knoevenagel reaction, on the other hand the Iodine (0.4 mmol) it was an efficient catalyst in the reaction of Pechmann. When comparing the different heating sources used, the infrared requires smaller time of reaction than the conventional method. Those derived of benzopyran-2-ones **3a-d** presented effect antifungal at concentrations higher than 1.33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ until for 30 days.

Recibido: 31 de mayo de 2011
Aceptado: 28 de julio de 2011

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, los productos de la Química fina y de especialidades se sintetizaban sin catalizador, siendo ésta una de las razones por la que se generaba un gran número de productos no deseados y para eliminarlos fue necesario implementar procedimientos de purificación tediosos. Los catalizadores son utilizados en la síntesis de productos químicos mejorando el proceso de producción y eliminando o reduciendo la generación de subproductos no deseados y/o tóxicos. En relación a la mejora del proceso, los catalizadores permiten una producción más limpia y a menudo más barata ya que evitan, en la mayoría de los casos, el uso de reactivos tóxicos.

Un intento por reemplazar a los catalizadores homogéneos comunes (NaOH, MeONa, H₂SO₄, HCl) que generan una gran carga contaminante, ha sido sin duda, el empleo de la catálisis heterogénea. Ésta área a pesar de ser conocida desde hace mucho tiempo, continúa con el estudio y desarrollo de catalizadores eficientes y de menor riesgo ambiental (Tang, 2008). La síntesis de catalizadores básicos ofrece ventajas como la posibilidad de recuperar el catalizador y el disolvente del medio de reacción, así como el uso de los subproductos con valor agregado en áreas como Agroquímica.

Palabras clave:

Hidróxidos doble laminar; Iodo; Benzopiran-2-onas; radiación infrarroja; Antifúngico.

Keywords:

Layered double hydroxides; Iodine; Benzopyran-2-ones; Infrared irradiation; Antifungal.

*Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas. Campus Guanajuato. Universidad de Guanajuato. Noria Alta s/n, Guanajuato, Gto., México. C.P. 36050, Teléfono (+52)473 732 0006 Ext. 1419, Correos electrónicos: mvazquez@ugto.mx, mercedj@ugto.mx.

**Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas. Campus Guanajuato. Universidad de Guanajuato. Noria Alta s/n, Guanajuato, Gto., México. C.P. 36050, Teléfono (+52)473 732 0006 Ext. 8123, Correo electrónico: yolaalca@ugto.mx.

***Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas. Campus Guanajuato. Universidad de Guanajuato. Noria Alta s/n, Guanajuato, Gto., México. C.P. 36050, Teléfono (+52)473 732 0006 Ext. 8149, Correo electrónico: floralb@ugto.mx.

Entre los catalizadores básicos conocidos, se encuentran las hidrotalcitas, o también denominadas arcillas aniónicas. Éstas se encuentran en la naturaleza pero también es posible sintetizarlas de una manera económica y sencilla. La hidrotalcita, $[\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}(\text{CO}_3)_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, pertenece a una clase de compuestos sintéticos llamados hidróxidos dobles laminares (HDL). La estructura de un HDL es similar a la de la brucita, en la cual el magnesio se encuentra coordinado octaédricamente a seis grupos hidroxilo (Chanda, 1999). Estos octaedros, al compartir sus orillas forman láminas bidimensionales. Cuando algunos cationes Mg^{2+} son reemplazados isomórficamente por Al^{3+} , se forma el HDL y el arreglo laminar adquiere carga residual positiva. Para compensar esta carga positiva se requiere de un anión que generalmente reside en la zona interlamina, junto con moléculas de agua (Chmielarz, 2003). La variedad de familias de materiales tipo HDL que se pueden preparar es vasta y la fórmula general que los representa es: $[\text{M}^{2+}_{1-x}\text{M}^{3+}_x(\text{OH})_2]^{x+}[\text{A}^{z-}_{x/z}\cdot n\text{H}_2\text{O}]^{x-}$ donde $\text{M}^{2+}=\text{Mg}, \text{Ni}, \text{Zn}, \text{Co}, \text{Fe}$; $\text{M}^{3+}=\text{Al}, \text{Fe}, \text{Cr}, \text{Mn}$; $\text{A}=\text{CO}_3^{2-}, \text{SO}_4^{2-}, \text{OH}^-, \text{Cl}^- \dots$ etc.; $x = 0.20-0.37$, $n=2-4$.

La morfología y distribución en el tamaño de partícula depende de la supersaturación de las soluciones de síntesis. Por descomposición térmica de los HDL, se puede lograr una estructura de óxido mixto homogéneo, la cual muestra propiedades peculiares, como alta área específica y es posible delimitar la distribución del tamaño de poro. Estas características pueden influir en las propiedades catalíticas (Carja, 2001). Existen numerosos procedimientos reportados para la síntesis de estos materiales, aunque el más empleado es la coprecipitación (Ocaña, 2005). La aplicación de este tipo de catalizadores básicos se ha dado en las reacciones de esterificación (Tantirungrotechai, 2010), donde se observa que el efecto de la basicidad depende de los iones metálicos utilizados (Fraile, 2009), en la síntesis de piranos altamente funcionalizados (Babu, 2008), derivados de pirimidinas (Kidwai, 2004), glicoles (Zeng, 2010), y cumarinas, donde utilizan tolueno como solvente y la reacción se completa en un tiempo de 4 h con buenos rendimientos (Chanda, 1999). Por otro lado, en años recientes el uso de Iodo molecular (I_2) ha sido utilizado como un catalizador con características de ácido de Lewis, débil en varias transformaciones orgánicas. Su versatilidad radica en su estabilidad en solventes orgánicos y en medio acuoso (Yadav, 2002; Firouzabadi, 2001, 2002). En síntesis orgánica, existen diversas metodologías en las que se puede ver involucradas distintas fuentes de energía, que son empleadas como promotores de las transfor-

maciones químicas de interés. Algunas de ellas utilizan el calentamiento tradicional por conducción o convección, otras alternativas aplican diferentes tipos de radiaciones electromagnéticas tales como ultravioleta y microondas. Esta última ha incrementado su aplicación por la alta selectividad y menores tiempos en la transformación (de la Hoz, 2002). Esto en gran medida contribuye a llevar a cabo reacciones efectivas, limpias, económicas y ambientalmente seguras (Yi, 2005; Peng, 2007; Feng 2004). En este sentido, se ha documentado desde hace algunos años la aplicación de la radiación infrarroja (IR) (Delgado, 1995; Obrador, 1998; Alcerreca, 2000, Salmon, 2001; Vázquez, 2004) como promotora de transformaciones químicas, donde su estudio continúa para poder generalizar en qué tipo de reacciones puede ser aplicada.

Los núcleos de benzopiran-2-onas o cumarinas pertenecen a una clase de derivados fenólicos aislados en su mayoría de fuentes naturales, principalmente de plantas. Este tipo de compuestos han sido reconocidos como estructuras importantes desde el punto de vista sintético y biológico (Malhotra, 2008), ya que se les ha encontrado diversidad de propiedades farmacológicas dependiendo del patrón de sustitución en el anillo bencénico y/o en el heterociclo, por lo que cada compuesto cumarínico puede tener un efecto farmacológico distinto (Kostova, 2005). Por otro lado, uno de los problemas que impacta al agricultor de plantas del género *Allium* (ajos y/o derivados) es la contaminación de los suelos por el hongo *Sclerotium cepivorum*, el cual es el responsable de la enfermedad llamada pudrición blanca, causando una disminución importante en la producción de los cultivos y cuantiosas pérdidas económicas. Esta enfermedad fúngica es de las más difíciles de erradicar por ser destructivas y de rápida propagación (Coley-Smith, 1988; Pinto 1998). Hasta la fecha, existen varios métodos de control de la pudrición blanca, entre ellos están el uso de fungicidas, sin embargo, el control de *Sclerotium cepivorum* no ha sido del todo satisfactorio ya que en su forma de esclerocio es resistente a condiciones extremas como exposición a luz ultravioleta, peróxido de hidrógeno, etc. (Granado, 2005; Pérez, 2000) y pueden durar en el campo infectado hasta por más de 20 años. En este sentido, la investigación de nuevos compuestos con probable potencial fungistático y/o fungicida es necesaria, esperando encontrar un producto químico que brinde un adecuado control para esta enfermedad.

En este trabajo se aplicaron diferentes catalizadores con características básicas y ácidas, así como, la

radiación IR como fuente de energía en la síntesis de derivados cumarínicos con diferentes sustituyentes sobre el anillo carbocíclico y heterocíclico que permitieran analizar su potencial actividad antifúngica.

MÉTODOS.

Síntesis de Hidróxidos Dobles Laminares (HDL) tipo MgO/Al₂O₃

La secuencia metodológica aplicada en este trabajo es la descrita como coprecipitación. Este método consiste en la adición de dos disoluciones, una de ellas contiene los precursores catiónicos y la otra el agente precipitante (NaOH) junto con un compuesto que contenga el anión interlaminar. La fórmula específica de la reacción química estudiada es la que se presenta a continuación:



Los coeficientes estequiométricos dependen de la relación molar ($X = \text{Al}/(\text{Mg} + \text{Al})$), pero de forma general, la ecuación química anterior es la más representativa para describir la interacción que existe entre las sales de aluminio y magnesio con el carbonato de sodio. En la tabla 1, se anotan algunos intervalos de valores que se estudiaron.

Tabla 1.
Proporciones estequiométricas de reactivos en la síntesis de HDL.

| X = Al / (Mg + Al) | MgSO ₄ (g) | Al ₂ (SO ₄) ₃ (g) | pH | T °C |
|--------------------|-----------------------|---|------|--------|
| 0.1-0.6 | 20-40 | 20-40 | 7-10 | 50-100 |

En la etapa de síntesis, se siguió el orden que a continuación se describe: se utilizaron sales grado técnico de sulfato de aluminio (Al₂(SO₄)₃), sulfato de magnesio (MgSO₄) y carbonato de sodio anhidro (Na₂CO₃) grado reactivo, marca JT Baker, que se disolvieron por separado en agua desionizada. Las disoluciones de Al₂(SO₄)₃ y MgSO₄ se filtraron para separar posibles impurezas y se mezclaron (solución A). Mediante el uso de dos bombas peristálticas se hicieron gotear la solución A y la solución de Na₂CO₃ anhidro (solución B), en un matraz conteniendo agua desionizada y a una temperatura constante entre el intervalo de 50 °C - 100 °C. La reacción se llevó a cabo manteniendo agitación continua, temperatura constante, y un pH entre 7 y 10. Finalizado el goteo, la mezcla se dejó en agitación continua y a la misma temperatura durante 18 h a 20 h. Después de este tiempo, el producto de la reacción se filtró y se lavó con una solución caliente de amoníaco-agua, hasta prueba negativa de sulfatos. El material recuperado se secó a temperatura ambiente durante 12 h, posteriormente a 110 °C durante 24 h. Para una relación molar $X = 0.36$, la composición molar del producto obtenido fue; 1 mol Al₂O₃, 1.825 mol MgO, 1.5 mol Na₂CO₃, 0.125 mol NaOH y 0.5 mol H₂O. Las muestras obtenidas fueron analizadas por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) mediante un equipo marca JEOL modelo FS-2200 (figura 1), donde se observó la apariencia del material con estructura tipo laminar, considerando que la distancia entre capas es del orden de aproximadamente 7 Å, que concuerda con la distancia interplanar determinada por difracción de rayos X.

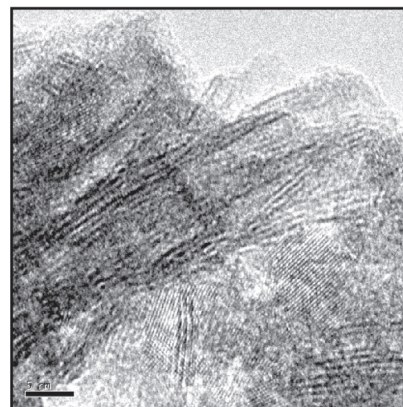


Figura 1: Micrografía (MET) para el HDL $X = 0.36$.

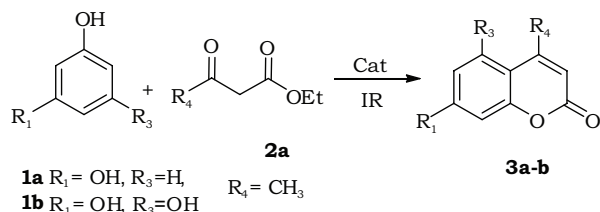
Una vez sintetizado el polvo del material tipo HDL se continuó con la etapa de aglomeración para darle forma de algún cuerpo geométrico con dimensiones y propiedades definidas, como resistencia mecánica. Se seleccionaron las muestras cuya composición varió entre los valores de $X = 0.2-0.36$, estos materiales fueron previamente evaluados considerando sus propiedades estructurales y texturales sobresalientes. Otro de los factores a considerar fue el tamaño de partícula, para lo cual se realizó una molienda preliminar en el mortero y posteriormente se pasó el polvo a través de una malla número 100. El tamaño de partícula obtenido fue de 0.1 micras a 10 micras, como se ha reportado anteriormente (Soriano, 2002). Después de obtener los materiales aglomerados se aplicó un tratamiento térmico de 450 °C con la finalidad de consolidar el cuerpo formado.

Síntesis de Benzopiran-2-onas

Para obtener los derivados de benzopiran-2-onas, se aplicaron dos procedimientos de síntesis: la reacción de Pechmann, utilizando I₂ (purificado por sublimación) como catalizador y por la reacción de condensación de

Knoevenagel utilizando los HDL como catalizadores. En ambas rutas se utilizó radiación IR como fuente de energía y catalizadores no tóxicos que pudieran recuperarse.

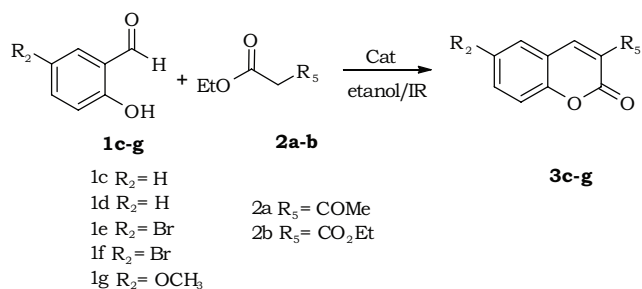
Síntesis aplicando la reacción de Pechmann



Esquema 1

Se colocaron los derivados fenólicos **1a-b** (1 mol) y el acetoacetato de etilo (**2**) (1.1 mol) en un matraz de 50 mL, se adicionó el I₂ (0.4 mmol) y se irradió con una lámpara de infrarrojo (120 V, 250 W) sin agitación por 1 h a 40 V (80 °C), esquema 1. El avance de la transformación química se realizó por cromatografía de capa fina (ccf) y la purificación se realizó por cristalización etanol-agua.

Síntesis aplicando la reacción de condensación de Knoevenagel



Esquema 2

Se colocaron los derivados 2-hidroxibenzaldehído **1c-g** (1 mol) y el acetoacetato de etilo (**2a**) (1.1 mol) en un matraz de 50 mL, se adicionó el HDL X = 0.36 (40 % wt), 5 mL de etanol y se irradió con una lámpara de infrarrojo (120 V, 250 W) por 1 h a 70 V (110 °C), esquema 2. El avance de la reacción fue monitoreado por ccf y el crudo de reacción se lavó con etanol caliente y se filtró. El HDL recuperado se colocó en matraz con etanol, se calentó y agitó por 3 h, se filtró y se lavó con etanol, después se activó por 12 h a 120 °C, para volver a utilizarlo. La purificación de los compuestos orgánicos se realizó por cristalización en etanol-agua (5/95 mL).

Evaluación biológica

Se evaluaron un total de 7 derivados benzopirano-2-onas (**3a-g**) (tabla 2). Para la evaluación de actividad

antifúngica se utilizó la cepa del hongo *Sclerotium cepivorum* cultivado en agar papa dextrosa y se empleó la metodología de Kirby Bauer (Bauer, 1966), utilizando las variantes de cilindros de vidrio y discos de papel filtro. El inóculo del micelio fresco del hongo se colocó al centro de una caja petri y a 2 cm el compuesto de prueba disuelto en DMSO. Las concentraciones evaluadas fueron 2.0 µg/µL, 0.666 µg/µL y 0.332 µg/µL. Como control se utilizaron 50 µL de DMSO al 98 %. Se empleó también la técnica de diluciones agregando los compuestos directamente al medio de cultivo. La concentración evaluada varió en un rango de 2 µg/µL a 0.03 µg/µL. Las cajas se inocularon por trasplante de micelio fresco del hongo en el centro de la caja y se incubaron a 18°C. Se realizaron mediciones del crecimiento radial a los 2 y 5 días. La evaluación de la formación de esclerocios se realizó a los 30 días de crecimiento.

Tabla 2.

Estructuras químicas de los compuestos evaluados.

| Compuesto | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ |
|-----------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| 3a | OH | H | H | CH ₃ | H |
| 3b | OH | H | OH | CH ₃ | H |
| 3c | H | H | H | H | COMe |
| 3d | H | H | H | H | COOEt |
| 3e | H | Br | H | H | COMe |
| 3f | H | Br | H | H | COOEt |
| 3g | H | OMe | H | H | COOEt |

RESULTADOS

HDL tipo MgO/Al₂O₃

En este trabajo se compararon dos métodos de síntesis, cuya diferencia consiste en la naturaleza del anión interlamilar, en un caso nitratos y en otro sulfatos. Su caracterización se realizó por difracción de Rayos X en un equipo modelo Equinox System programa XRG 3000 D y por espectrofotometría de infrarrojo en un equipo FTIR Perkin – Elmer modelo Spectrum 100.

Difracción de Rayos X del HDL

En la figura 2, los dos difractogramas muestran un patrón de difracción típico de los HDL con reflexiones agudas y simétricas en (003), (006), (110) y (113), y picos anchos asimétricos para los planos (012), (015) y (018) (Zavoianu, 2005). La diferencia existente en ambos difractogramas es que a una relación HDL X = 0.36 posee un mejor ordenamiento lo cual se ve reflejado en picos más agudos en comparación de la relación HDL X = 0.2.

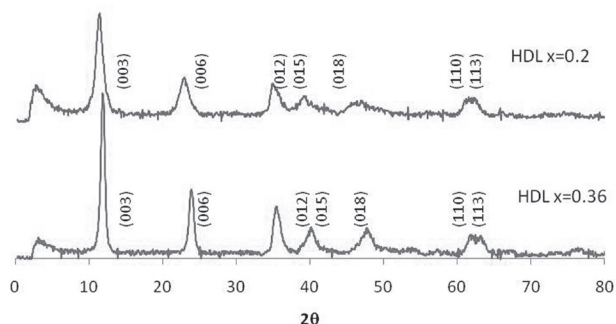


Figura 2: Difracción de rayos X de los HDL.

Espectrofotometría de Infrarrojo del HDL

En la figura 3 se muestra el espectro infrarrojo de un HDL a dos diferentes fracciones molares, donde las bandas situadas a 3468 cm^{-1} corresponden con el agua interlaminar del material. El hombro a 2928 cm^{-1} está relacionado con la formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua y los carbonatos en el espacio interlaminar. La banda que aparece a 1639 cm^{-1} es característica de la deformación del ángulo (HOH) de la molécula de agua δ_{HOH} , relativa a puentes de hidrógeno en el agua. Las señales de 500 cm^{-1} - 1000 cm^{-1} son características de los octaedros que forman la lámina, a 1053 cm^{-1} Al-OH y 619 cm^{-1} para el enlace Mg-OH, es en ésta región donde se observa la diferencia entre ambas fracciones molares ya que en $X = 0.36$ tiene mayor cantidad de aluminio. El anión carbonato que aparece en la estructura presenta una banda de vibración cercanas a las del anión libre y es la de 1384 cm^{-1} (Carja 2001).

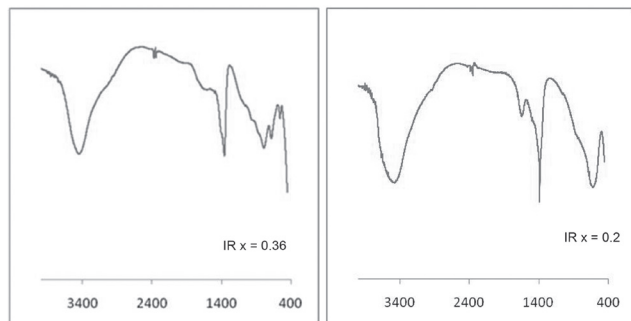


Figura 3: Espectro de Infrarrojo de los HDL.

Después de la determinación de las principales propiedades de los sólidos sintetizados, se seleccionó el método que utiliza sulfatos como precursores de los cationes correspondientes. El estudio de la influencia de las variables más significativas en la síntesis de estos sólidos (velocidad de agitación, tiempo de envejecimiento y orden de adición de las disoluciones

de precipitación), permitió establecer las condiciones más adecuadas para la síntesis. Las condiciones seleccionadas para el desarrollo de estos catalizadores, fueron una velocidad de 300 revoluciones por minuto, 4 h de envejecimiento y la adición de la disolución de cationes sobre la disolución del agente precipitante.

Condiciones de reacción óptimas y caracterización de benzopiran-2-onas

Síntesis aplicando la reacción de Pechmann

Para examinar las condiciones de reacción en el procedimiento de Pechmann, se realizaron diferentes pruebas utilizando resorcinol (**1a**) y acetoacetato de etilo (**2**), en relación molar de 1/1.1, en ausencia de disolventes y aplicando radiación IR como promotor de la reacción ($40\text{ V} = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$), la variable en este procedimiento fue el catalizador (0.4 mmol). En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en la síntesis de la benzopiran-2-ona **3a**, el rendimiento y tiempo de reacción.

Tabla 3.
Efecto del tipo de catalizador en la reacción.

| Catalizador | Tiempo (h) | %R* |
|-------------------------|------------|-----|
| H_2SO_4 | 1.0 | 68 |
| HCl | 2.0 | 63 |
| p-TsOH | 2.0 | 50 |
| I_2 | 1.0 | 92 |

*Rendimiento del producto puro.

Los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó I_2 , el cual presenta características de ácido de Lewis (Jereb, 2011). Una vez que se determinó el catalizador más adecuado para esta reacción, se llevó a cabo un segundo estudio donde se cambió la relación molar de catalizador utilizado. Los datos obtenidos son similares a otros estudios donde la cantidad de catalizador afecta el rendimiento (tabla 4).

Tabla 4.
Influencia de la relación molar de catalizador en la reacción.

| Catalizador | Relación molar | Tiempo (h) | %R* |
|--------------|----------------|------------|-----|
| I_2 | 0.2 mmol | 2.0 | 83 |
| I_2 | 0.4 mmol | 1.0 | 92 |
| I_2 | 0.7 mmol | 50 min | 85 |

*Rendimiento del producto puro.

Por otro lado, se evaluó la eficiencia de las reacciones utilizando radiación IR respecto a las reacciones bajo calentamiento convencional (manta térmica), a temperatura de 80 °C (Salih, 2006). Se observó una mayor eficiencia de la radiación IR en cuanto a rendimiento y tiempo de reacción (tabla 5). Sin embargo, Gohain (2007), reportó un rendimiento similar pero en tiempos más cortos cuando utilizó microondas como promotor de la reacción.

Tabla 5.
Estudio comparativo de fuente de energía.

| Fuente de energía | Tiempo (h) | %R* | Condiciones de reacción |
|-------------------|------------|------|--|
| Convencional | 18.0 | 8.0 | H ₂ SO ₄ , H ₂ O y temp <10 °C. |
| Convencional | 3.0 | 42.0 | I ₂ , EtOH |
| IR | 1.0 | 92.0 | I ₂ |

*Rendimiento del producto puro.

Síntesis aplicando la reacción de Knoevenagel

Se hizo reaccionar salicilaldehído (**1c**) con acetoacetato de etilo (**2**) en una relación molar de 1/1.1, 5 mL de etanol y utilizando radiación IR como promotor de la reacción (70 V, 110 °C). Esta prueba se realizó con 4 catalizadores básicos y se encontró que el HDL es comparable en tiempos de reacción y rendimiento a la morfolina. La cantidad requerida de HDL fue del 40 % en peso respecto a las materias primas, sin embargo a pesar de ser una cantidad alta, tiene la ventaja de utilizarse por 5 ciclos más, después de lavarlo con etanol y activarlo a 120 °C por 12 h. Los resultados obtenidos en la síntesis de la benzopiran-2-ona **3c** se muestran en la tabla 6.

Tabla 6.
Efecto del tipo de catalizador en la reacción.

| Catalizador | Tiempo (h) | % R* |
|-------------------------------|-------------|------------------------|
| NH ₄ OH (5 % peso) | 5 | 15 |
| Morfolina (5 % peso) | 1.1 | 83 |
| MgO (5 % peso) | 5 | No hubo transformación |
| HDL Mg y Al (40 % peso) | 45 - 50 min | 87 |

*Rendimiento del producto puro.

Una vez encontradas las condiciones de reacción óptimas, se realizó la síntesis de otros derivados de benzopiran-2-onas (**3a-f**). Todos los productos fueron purificados por recristalización y caracterizados por diferentes técnicas espectroscópicas, las estructuras se corroboraron con los datos reportados en la bibliografía (Prajapati, 2007; Jereb, 2011; Chanda 1999;). En la tabla 7 se describen sus rendimientos y puntos de fusión.

Tabla 7.
Influencia de la relación molar de catalizador en la reacción.

| Compuesto | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | p.f (°C)* | % R* |
|-----------|----------------|------------------|----------------|-----------------|--------------------|-----------|------|
| 3a | OH | H | H | CH ₃ | H | 179-180 | 92.0 |
| 3b | OH | H | OH | CH ₃ | H | 227-229 | 82.0 |
| 3c | H | H | H | H | COMe | 115-117 | 87.0 |
| 3d | H | H | H | H | CO ₂ Et | 87-89 | 90.0 |
| 3e | H | Br | H | H | COMe | 214-216 | 92.0 |
| 3f | H | Br | H | H | CO ₂ Et | 159-161 | 80.0 |
| 3g | H | OCH ₃ | H | H | CO ₂ Et | 129-130 | 87.0 |

*Rendimiento del producto puro y punto de fusión comparados con los de la literatura (Prajapati, 2007; Jereb, 2011; Chanda 1999).

Análisis biológico de benzopiran-2-onas

Con el método de Kirby Bauer se encontró que los compuestos **3a**, **3b**, **3c** y **3d** mostraron actividad inhibitoria sobre el crecimiento del micelio de *Sclerotium cepivorum*. La mayor inhibición la presentó el compuesto **3d** donde se observó el efecto con las tres concentraciones evaluadas siendo éste dosis-dependiente. Con el método de diluciones se evaluaron únicamente los compuestos que por el método de Kirby Bauer mostraron resultados positivos. El micelio de la caja control (sin tratamiento) abarcó toda la superficie del medio de cultivo a los 5 días por lo que este tiempo se tomó como referencia para calcular el porcentaje (%) de inhibición. Los compuestos **3a** y **3b** mostraron un 100 % de inhibición de crecimiento micelial a las concentraciones de 2 µg/µL, 1.33 µg/µL y 0.67 µg/µL. Mientras que los compuestos **3b** y **3c** mostraron un 100 % de inhibición de crecimiento micelial a las concentraciones de 2 µg/µL y 1.33 µg/µL. En la figura 4 se muestra el aspecto del crecimiento micelial de *Sclerotium cepivorum* expuesto a diferentes concentraciones del derivado cumarínico **3d**.

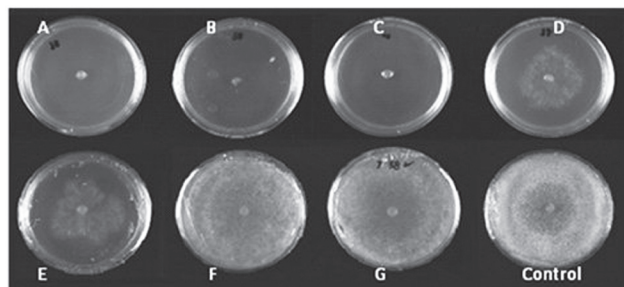


Figura 4: Efecto del compuesto cumarínico **3d** sobre el crecimiento micelial a 5 días. Las concentraciones evaluadas fueron 2 µg/µL, 1.33 µg/µL, 0.67 µg/µL, 0.33 µg/µL, 0.17 µg/µL, 0.07 µg/µL y 0.03 µg/µL y están representadas por las letras A, B, C, D, E, F y G respectivamente.

Los cultivos se incubaron por 30 días, se observaron las cajas donde hubo crecimiento para detectar cambios respecto a la morfología de la colonia y formación del esclerocio. Los hallazgos más representativos de los cultivos expuestos a los compuestos **3a** y **3b** fueron, ausencia de melanina en algunos esclerocios, lo que suponemos no permitió llegar a la madurez, disminución del tamaño normal de los esclerocios y formación anormal de cúmulos. El derivado cumarínico **3c** produjo una compactación del micelio y en algunos casos se observaron inclusiones del micelio en el medio de cultivo siendo ésta una característica poco observada en condiciones de cultivo normal. En observación al microscopio algunas muestras presentaron micelio hiperramificado. En los cultivos expuestos al compuesto **3d** se observó un crecimiento irregular y compacto del micelio y algunos esclerocios presentaron tamaño menor que el control. Mientras que con las dos concentraciones más bajas no hubo diferencias significativas respecto al control (figura 5). Con los datos obtenidos se calculó un valor aproximado de la concentración efectiva media (CE_{50}) encontrando que para el compuesto **3a** la CE_{50} fue de $0.3066 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, para el **3b** fue de $1.0847 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, para **3c** fue de $0.1896 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ y para el **3d** fue de $0.3353 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

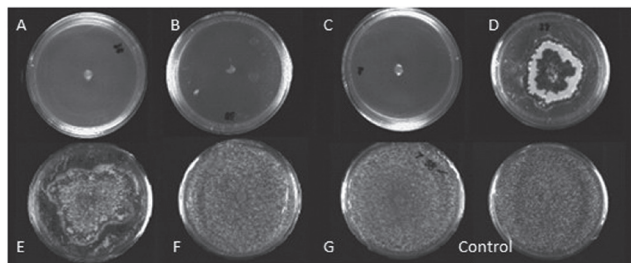


Figura 5: Efecto del compuesto cumarínico **3d** sobre el desarrollo del esclerocio. Crecimiento micelial de 30 días. Las concentraciones evaluadas fueron $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, $1.33 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, $0.67 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, $0.33 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, $0.17 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, $0.07 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ y $0.03 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ y están representadas por las letras A, B, C, D, E, F, G respectivamente.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La obtención de benzopirran-2-onas **3a-g**, aplicando I_2 como catalizador, en ausencia de disolventes y bajo radiación IR, resultó ser eficiente, con buenos rendimientos y menores tiempos de reacción. Sin embargo, al compararlo con los resultados descritos en la literatura donde se utiliza microondas, el rendimiento de los productos es similar, pero el tiempo de reacción es menor comparándolo con la radiación infrarroja.

Asimismo, al utilizar los HDL con $X = 0.36$, aplicando radiación IR, es necesario el uso de cantidades que no se pueden considerar catalíticas. En este sentido, el trabajo sigue en desarrollo con la síntesis de diversos HDL variando la cantidad molar con el objetivo de mejorar las pruebas de eficiencia.

Con estos datos, la radiación IR, resulta ser una fuente energética alternativa para la activación y transformación de moléculas importantes desde el punto de vista sintético y biológico. Al aplicar energía de esta región electromagnética, se observa que en las transformaciones químicas, aumenta la velocidad de reacción, generando el producto en tiempos menores al compararla con el calentamiento convencional. Este hecho contribuirá a incrementar el conocimiento para la aplicación de la radiación IR en síntesis orgánica. Los derivados cumarínicos sintetizados **3a-d** presentaron efecto antifúngico a concentraciones mayores a $1.33 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. A pesar de que la concentración es elevada comparada con antifúngicos convencionales como tebuconazol (Stewart, 1999), la finalidad de este estudio era identificar la posible actividad antifúngica de estos heterociclos para posteriormente funcionalizarlos con el objetivo de mejorar la actividad biológica. Por otro lado, los resultados de alteración en el crecimiento de *Sclerotium cepivorum* sugieren que los cambios morfológicos y de crecimiento del micelio son debidos a la alteración de algún proceso metabólico en la formación de esclerocio. Mientras que la inhibición del crecimiento del micelio observada hasta por 30 días, resultó ser un efecto relevante de los derivados cumarínicos sobre la formación de éstas estructuras puesto que son la forma de propagación del hongo. Este dato es importante, ya que no existe un reporte de aplicación de estos compuestos orgánicos contra este microorganismo, los cuales podrían utilizarse en el control de la pudrición del ajo. Finalmente, estos hallazgos permitirán continuar con la investigación sobre la funcionalización de este núcleo heterocíclico buscando mejorar su actividad biológica. Asimismo, se está realizando el estudio de las características de la lámpara utilizada para conocer la región específica del intervalo de emisión en la región del IR.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a DAIP de la Universidad de Guanajuato y CONCyTEG por el apoyo otorgado mediante los proyectos 000156/10 08-16-K662-127 A03, respectivamente.

REFERENCIAS.

- Alcerreca, G., Sanabria, R., Miranda, R., Arroyo, G., Tamariz, J., Delgado F. (2000). Preparation of benzylidene barbituric acids promoted by infrared irradiation in absence of solvent. *Synth. Commun.*, 30(7) 1295-1301.
- Babu, N. S., Pasha, N., Venkateswara, K. T., Sai, P. S., Lingaiah, N. (2008). A heterogeneous strong basic Mg/La mixed oxide catalyst for efficient synthesis of polifunctionalized pyrans. *Tetrahedron Lett.*, 49, 2730-2733.
- Bauer A. W., Kirby W. M., Sherris J. C., Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 45(4) 493-496.
- Carja, G., Nakamura, R., Aida, T., Niyama, H. (2001). Textural properties of layered double hydroxides: effect of magnesium substitution by copper or iron. *Microporous and Mesoporous Materials*, 47, 275-284.
- Chanda, A. R., Velu, S., Sivasanker, S. (1999). One-pot synthesis of coumarins catalysis by the solid base, calcined Mg-Al hydrotalcite. *Green Chem.* 163-165.
- Chmielarz, L., Kustrowski, P., Rafalska-Lasocha A., Dziembaj, R. (2003). *Thermochemica Acta*, 395, 225-236.
- Coley-Smith, J. R. and Entwistle, A. R., (1988). Susceptibility of cultivars of garlic to *Sclerotium cepivorum*. *Plant Pathol.* 37:261-264.
- De la Hoz, A., Díaz-Ortiz, A., Moreno, A., (2005). Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chem. Soc. Rev.*, 34, 164-178.
- Delgado, F., Tamariz, J., Zepeda, G., Landa, M., Miranda, R., Garcia, J., (1995). Knoevenagel condensation catalyzed by a Mexican bentonite using infrared irradiation. *Synth Commun.*, 25(5), 753-759.
- Feng, Y.-J., Miao, C.-B., Gao, Y., Tu, S.-J., Fang, F., Shi, D.-Q. (2004). Dialdehyde in heterocyclic Synthesis: Synthesis of compounds containing two 4H-benzopyran building blocks under microwave irradiation. *Chinese Journal of Chemistry*, 22, 622-626.
- Firouzabadi, H., Iranpoor, N., Sobhani, S. (2002). A high yielding preparation of α -trimethylsilyloxyphosphonates by silylation of α -hydroxyphosphonates with HMDS catalyzed by Iodine. *Tetrahedron Lett.*, 43, 3653.
- Firouzabadi, H., Iranpoor, N., Hazarkhani, H. (2001). Iodine Catalyzes Efficient and Chemoselective Thiocetalization of carbonyl functions, transthiocetalization of O,O-and S,O-acetals and acylals. *J. Org. Chem.*, 66, 7527.
- Fraile, J. M., Garcia, N., Mayoral, J. A., Pires, E., Roldan, L. (2009). The influence of alkaline metal on the strong basicity of Mg-Al mixed oxides: The case of transesterification reactions. *Applied Catalysis A: General*, 364.
- Granados, M. M., (2005). Pudrición blanca de la cebolla: una enfermedad difícil de combatir. *Agronomía costarricense*, 29, 143-156.
- Jereb, M., Vrazic, D., Zupan, M. (2011). Iodine-catalyzed transformation of molecules containing oxygen functional groups. *Tetrahedron*, 67, 1355-1387.
- Kidwai, M., Mishra, A. D. (2004). An expeditious synthesis of 3,4-dihydrobenzo[2,3-d]pyrimidines using inorganic solid supports. *J. Serb. Chem. Soc.* 69(4), 247-254.
- Kostova I., (2005). Anti-Cancer Agents. *Current Medicinal Chemistry*, 5(1), 29-46.
- Kostova I., S. Raleva, P. Genova and R. Arginova. (2006). Structure-Activity Relationships of Synthetic Coumarins as HIV-1 Inhibitors. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 1-9.
- Malhotra S, Shakya G., Kumar A. (2008). Antioxidant, antiinflammatory y antiinvasive activities biopoliphenolics. *ARKIVOC*, VI, 119-139.
- Obrador, E., Castro, M., Tamariz, J., Zepeda, G., Miranda, R., Delgado F., (1998). Knoevenagel condensation in heterogeneous phase catalysed by IR radiation and tonsil actisil FF. *Synth. Commun.*, 28 (24), 4649-4663.
- Ocaña Z. (2005). *Síntesis de hidrotalcitas y materiales derivados: Aplicación en catálisis básica*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- Peng, Y., Song, G. (2007). Amino-functionalized ionic liquid as catalytically active solvent for microwave-assisted synthesis of 4H-pyrans. *Catal. Comm.*, 8, 111-114.
- Pérez M. L., Hernández, V. O., Cantú G. F., Romero R. A. (2000). Alternativas para el manejo integral de la pudrición blanca *Sclerotium cepivorum* en ajo en la zona del Bajío, México. *XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*. Puerto Vallarta, Jal. México, 67.
- Pinto, C. M., Maffia, L. A., Berguer, R. D., Mizobuti, E. S. and Casali, V. W. (1998). Progress of White Rot in garlic cultivars planted at different times. *Plant Dis*, 82, 1142-1146.
- Prajapati, D., Gohain, M. (2007). Iodine a simple effective and inexpensive catalyst for the synthesis of substituted Coumarins. *Catal Lett*. 119, 59-63.
- Salih, K. S. M.; Al-Zghoul, K. H. S. Ayoud, M. T. (2006). A convenient procedure for the synthesis of substituted 4-methylcoumarins. *Chem. Inform*, 37, 21.
- Salmon, M., Osnaya, R., Gómez, L., Arroyo, G., Delgado, F., Miranda, R. (2001). Contribution to the Biginelli reaction, using a bentonitic clay as catalyst and a solventless procedure. *Rev. Soc. Quim. Méx.* 45(4) 206-207.
- Soriano, G. E. M, Delgado G., Párraga J., Delgado R. (2002). A morphological study of talcs with scanning electron microscopy (sem). *Pharmaceutical applications. Ars Pharmaceutica*, 43:1-2; 173-185.
- Stewart, A.; Fullerton, R. A.; Tyson, J. L. (1999), Changes in the efficacy of fungicidal control of onion white rot, *Pathogens of Fruit and Vegetables*, 171-175
- Tang, S., Bourne, R., Smith, R., Poliakoff, M. (2008). The 24 principles of Green Engineering and Green Chemistry: "Improvements Productively". *Green Chem.* 10, 276-277.
- Tantirungrotechai, J., Chotmongkolsap, P. Pohmakotr, M. (2010). Synthesis, characterization, and activity in transesterification of mesoporous Mg-Al mixed-metal oxides. *Microporous and Mesoporous Material*, 128, 41-47.
- Vazquez, M. A., Landa, M., Reyes, L., Miranda, R., Tamariz, J., Delgado, R. (2004). Infrared Irradiation: Effective Promoter in the formation of N-Benzylideneanilines in the absence of solvent. *Synth. Commun.* 34(15), 2705-2718.
- Yadav, J.S., Chand, P. K., Anjaneyulu, S. (2002). Iodine-catalysed allylation of aldehydes with allyltrimethylsilane. *Tetrahedron Lett.* 43, 3783.
- Yi, F., Peng, Y., Song, G. (2005). Microwave-assisted liquid-phase of methyl 6-amino-5-cyano-4-aryl-2-methyl pyran-3-carboxilate using functional ionic liquid as soluble support. *Tetrahedron Lett.* 46, 3931-3933.
- Zavoianu, R., Birjega, R., Dumitru, O., Alifani, M. (2005). Hydrotalcite like compounds with low Mo-loading active catalysts for selective oxidation of cyclohexene with hydrogen peroxide. *Applied Catalysis A: General*, 286, 211-220.
- Zeng, H.-Y., Wang, Y.-J., Feng, Z., You, K.-Y., Zhao, C., Sun, J.-W, Liu, P.-L. (2010). Synthesis of propylene Glycol Monomethyl Ether Over Mg/Al Hydrotalcite Catalyst. *Catal. Lett*, 137, 94-103.