

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATÓLICA DEL PERÚ**

ESCUELA DE POSGRADO



Síntesis y caracterización de tres chalconas hidroxiladas y
evaluación de su actividad antibacteriana contra *Escherichia
coli* y *Staphylococcus aureus*

Tesis para obtener el grado académico de Maestra en Química que
presenta:

Cynthia Mariel Florez Silva

Asesora:

Dra. Juana Rosa María Robles Caycho

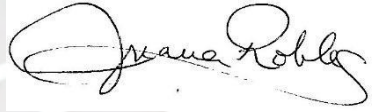
Lima, 2024

Informe de Similitud

Yo, Juana Rosa María Robles Caycho, docente de la Escuela de Posgrado de la Pontificia Universidad Católica del Perú, asesora de la tesis/el trabajo de investigación titulado “Síntesis y caracterización de tres chalconas hidroxiladas y evaluación de su actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*”, de la autora Cynthia Mariel Florez Silva,dejo constancia de lo siguiente:

- El mencionado documento tiene un índice de puntuación de similitud de 13 %. Así lo consigna el reporte de similitud emitido por el software *Turnitin* el 17/12/2024.
- He revisado con detalle dicho reporte y la Tesis y, no se advierte indicios de plagio.
- Las citas a otros autores y sus respectivas referencias cumplen con las pautas académicas.

San Miguel, 18 de diciembre de 2024

Robles Caycho, Juana Rosa María	
DNI: 07330821	Firma
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3130-4077	

“No sólo de números y de cálculos vive la ciencia. Un poquito de fe, ¿no? Un poquito de amor también.”

- Palermo, La casa de papel -



AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme dado la vida y un cuerpo sano para poder caminar por ella.

A mis padres, Rossana y Guillermo, por sus constantes palabras de ánimo y todo el apoyo recibido durante mi formación en la maestría y en el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos del laboratorio de control de calidad Dr. Ricardo, Rodrigo y Tiffany, por haber contribuido cada uno de una manera tan única al desarrollo de esta tesis y de mi persona.

A los internos del laboratorio de control de calidad Yeymi, Milagros, María Rosa, Suguey, Milett, José, Alexandra, Mary Carmen, Karina y Mario; por todo su apoyo, su curiosidad, su compañía y sus constantes ánimos.

A mis docentes de la Maestría en Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú, y en especial a la Dra. Juanita Robles, asesora de esta tesis, por haberme impartido sus amplios conocimientos en sus áreas de especialidad, permitirme desarrollarme profesionalmente y siempre estar prestos a absolver dudas y brindar su ayuda.

A Jessica y a Xiomara, por decirme que nunca veían avances y que me iba a graduar en el 2040. Ya terminé.

A mis amigas del colegio Solange y Catherine, y a mi amigo de la universidad Conde, por haber recibido todas las quejas y frustraciones personales y profesionales en estos años, y siempre estar ahí para mí. Los quiero mucho.

A mi amigo D., por haber sido un maestro y mentor para mí en este camino de la química orgánica, y por todo su apoyo en el desarrollo y redacción de este trabajo.

A Linkin Park y a mi pequeño Chatito, por haberme acompañado durante todas esas horas de redacción.

Y finalmente, a mí misma, por haber sido capaz de demostrarme cada día que si algo me propongo, lo puedo lograr, aunque muchas veces ni yo misma lo creía.

RESUMEN

Las chalconas son moléculas que poseen una amplia gama de actividades biológicas, entre las cuales se encuentra la actividad antibacteriana. Entonces, el presente trabajo tuvo como objetivo sintetizar y caracterizar tres chalconas hidroxiladas y evaluar su actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Para ello, se sintetizaron las chalconas mediante condensación de Claisen-Schmidt y se compararon tres tratamientos para la síntesis (KOH 10 %, KOH 20 % y KOH sólido). Las moléculas se caracterizaron mediante espectroscopía IR y RMN y también se evaluó su actividad antibacteriana mediante el método de difusión en disco.

Se obtuvieron los espectros de IR y RMN ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HMBC y HMQC para las tres chalconas sintetizadas y además se observó que el tratamiento con mejores resultados en cuanto al rendimiento fue el que utilizó KOH sólido. Finalmente, la evaluación de la actividad antibacteriana arrojó que la chalcona 1 posee actividad bactericida en contra de *S. aureus* a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo comparable a esa concentración con el efecto del antibiótico cloranfenicol 30 μg .

Palabras clave: Chalconas hidroxiladas, condensación de Claisen-Schmidt, IR,

RMN, actividad antibacteriana.

ABSTRACT

Chalcones are molecules that have a wide range of biological activities, among which is antibacterial activity. Therefore, the present work aimed to synthesize and characterize three hydroxylated chalcones and to evaluate their antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. To this end, chalcones were synthesized by Claisen-Schmidt condensation and three treatments for the synthesis were compared (KOH 10 %, KOH 20 % and solid KOH). The molecules were characterized by IR and NMR spectroscopy and their antibacterial activity was also evaluated by the disk diffusion method.

The IR and ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HMBC and HMQC NMR spectra were obtained for the three synthesized chalcones and it was also observed that the treatment with the best results in terms of yield was the one that used solid KOH. Finally, the evaluation of the antibacterial activity showed that chalcone 1 has bactericidal activity against *S. aureus* at a concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, being comparable at that concentration to the effect of the antibiotic chloramphenicol 30 μg .

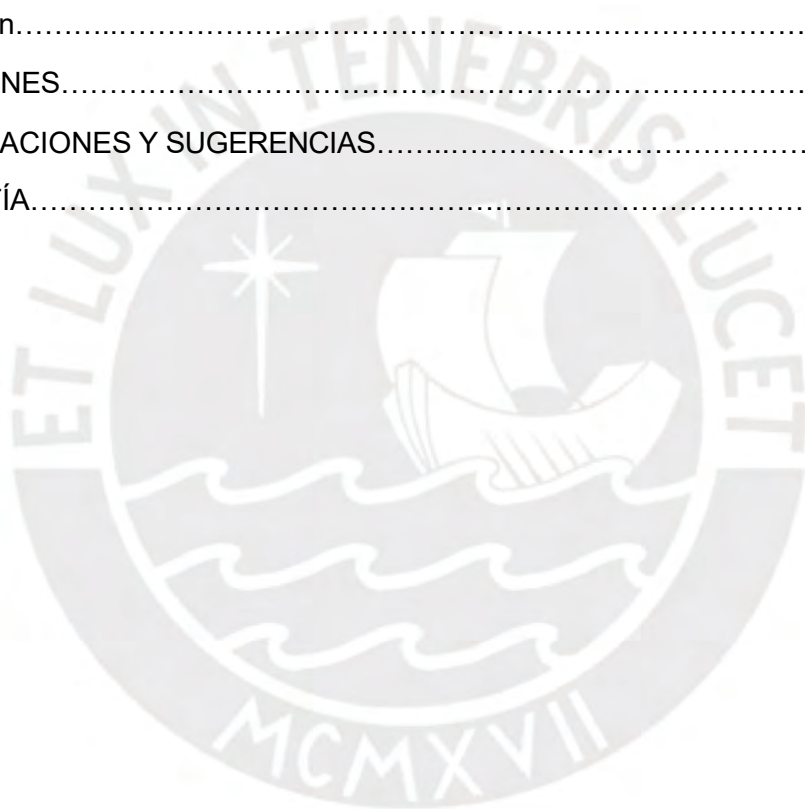
Keywords: *Hydroxylated chalcones, Claisen-Schmidt condensation, IR, NMR, antibacterial activity.*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	2
HIPÓTESIS.....	3
PRIMERA PARTE: MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Chalconas.....	4
1.1.1. Estructura y características de las chalconas.....	4
1.1.2. Importancia de las chalconas en la naturaleza.....	8
1.1.3. Importancia de la chalconas en la industria química y farmacéutica.....	11
1.2. Relación estructura-actividad de los grupos sustituyentes en las chalconas.....	15
1.2.1. Chalconas homocíclicas.....	16
1.2.1.1. Actividad antifúngica.....	16
1.2.1.2. Actividad anticancerígena.....	16
1.2.1.3. Actividad antimalaria y antileishmania.....	17
1.2.1.4. Actividad antioxidante.....	18
1.2.1.5. Actividad antiinflamatoria.....	18
1.2.1.6. Actividad antibacteriana.....	18
1.2.2. Chalconas heterocíclicas.....	20
1.3. Síntesis química de chalconas.....	23
1.3.1. Reacción de Claisen-Schmidt.....	24
1.4. Problemática en la síntesis de chalconas hidroxiladas.....	27
1.5. Técnicas de análisis y caracterización estructural.....	29
1.5.1. Espectroscopía Infrarroja (IR).....	31
1.5.2. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	33
1.6. Análisis de actividad antibacteriana: Método de difusión en disco.....	37
SEGUNDA PARTE: METODOLOGÍA.....	40
2.1. Materiales.....	40

2.1.1. Material de vidrio.....	40
2.1.2. Reactivos.....	40
2.1.3. Insumos.....	41
2.1.4. Equipos.....	42
2.1.5. Material biológico.....	42
2.1.6. Herramientas informáticas.....	42
2.2. Metodología.....	43
2.2.1. Síntesis de chalconas.....	43
2.2.2. Caracterización y elucidación estructural de las chalconas sintetizadas.....	45
2.2.2.1. Caracterización y elucidación estructural por IR.....	45
2.2.2.2. Caracterización y elucidación estructural por RMN.....	45
2.2.3. Evaluación de la capacidad antibacteriana de las chalconas sintetizadas.....	45
2.2.4. Métodos estadísticos.....	49
TERCERA PARTE: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
3.1. Síntesis de chalconas.....	50
3.1.1. Chalcona 1: (E)-1-(4'-hidroxifenil)-3-(4-isopropilfenil)-prop-2-en-1-ona.....	50
3.1.2. Chalcona 2: (E)-1-(4'-hidroxifenil)-4-(metoxifenil)-prop-2-en-1-ona.....	52
3.1.3. Chalcona 3: (E)-1-(4'-metoxifenil)-3-(4-hidroxifenil)-prop-2-en-1-ona.....	54
3.1.4. Análisis de resultados.....	56
3.2. Caracterización y elucidación estructural de las chalconas sintetizadas.....	60
3.2.1. Caracterización y elucidación estructural por IR.....	60
3.2.1.1. Espectro IR de la chalcona 1: (E)-1-(4'-hidroxifenil)-3-(4-isopropilfenil)-prop-2-en-1-ona.....	60
3.2.1.2. Espectro IR de la chalcona 2: (E)-1-(4'-hidroxifenil)-4-(metoxifenil)-prop-2-en-1-ona.....	61
3.2.1.3. Espectro IR de la chalcona 3: (E)-1-(4'-metoxifenil)-3-(4-hidroxifenil)-prop-2-en-1-ona.....	62
3.2.2. Caracterización y elucidación estructural por RMN.....	63
3.2.2.1. Espectros RMN de la chalcona 1: (E)-1-(4'-hidroxifenil)-3-(4-isopropilfenil)-prop-2-en-1-ona.....	63

3.2.2.2. Espectros RMN de la chalcona 2: (E)-1-(4'-hidroxifenil)-4-(metoxifenil)-prop-2-en-1-ona.....	69
3.2.2.3. Espectros RMN de la chalcona 3: (E)-1-(4'-metoxifenil)-3-(4-hidroxifenil)-prop-2-en-1-ona.....	75
3.3. Evaluación de la capacidad antibacteriana de las chalconas sintetizadas.....	81
3.3.1. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 1.....	81
3.3.2. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 2.....	85
3.3.3. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 3.....	88
3.4. Discusión.....	91
CONCLUSIONES.....	95
RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS.....	96
BIBLIOGRAFÍA.....	97



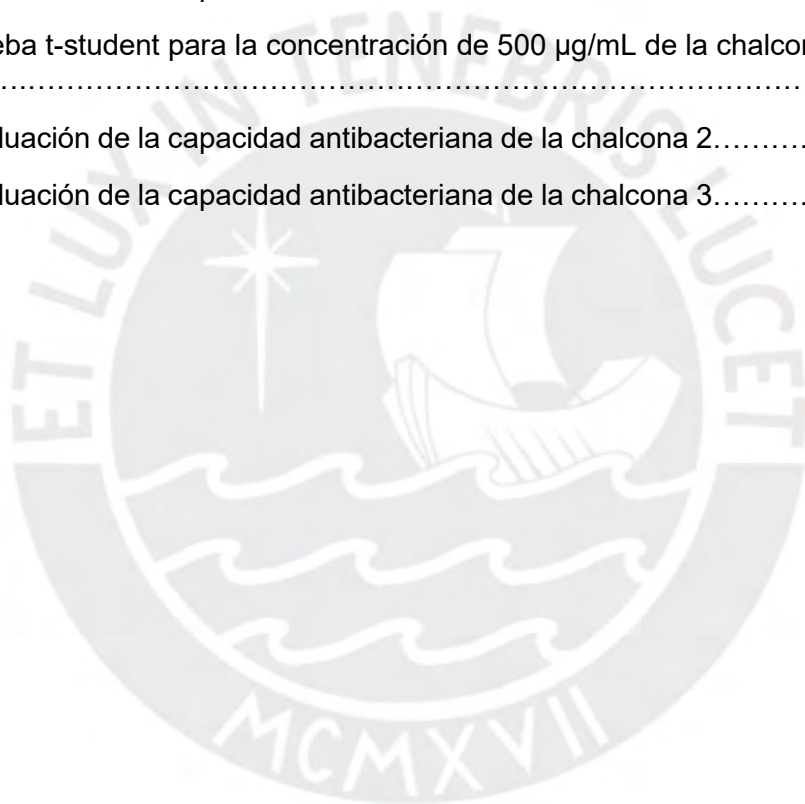
ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de una chalcona.....	5
Figura 2. a) Estructura del isómero <i>trans</i> de una chalcona. b) Estructura del isómero <i>cis</i> de una chalcona.....	5
Figura 3. a) Nomenclatura según Chemical Abstracts y ACS. b) Nomenclatura según British Chemical Abstracts y Journal of the Chemical Society.....	6
Figura 4. Ejemplos de chalconas presentes en la naturaleza.....	10
Figura 5. Ejemplos de chalconas utilizadas en ensayos clínicos y en el mercado farmacéutico.....	13
Figura 6. Tipos de anillos heteroatómicos comúnmente encontrados en las chalconas.....	21
Figura 7. Mecanismo de reacción propuesto para la condensación de Claisen-Schmidt en medio básico.....	25
Figura 8. Deslocalización de la carga del 4-hidroxi-benzaldehído en medio básico.....	28
Figura 9. Espectro electromagnético.....	30
Figura 10. Esquema de síntesis de chalconas hidroxiladas.....	43
Figura 11. Síntesis de la chalcona 1 bajo los tres tratamientos.....	50
Figura 12. Cristales de la chalcona 1.....	51
Figura 13. Cristales de la chalcona 1 vistos en el estereoscopio.....	51
Figura 14. Síntesis de la chalcona 2 bajo los tres tratamientos.....	52
Figura 15. Cristales de la chalcona 2.....	53
Figura 16. Cristales de la chalcona 2 vistos en el estereoscopio.....	53
Figura 17. Síntesis de la chalcona 3 bajo los tres tratamientos.....	54
Figura 18. Cristales de la chalcona 3.....	55
Figura 19. Cristales de la chalcona 3 vistos en el estereoscopio.....	55
Figura 20. Espectro IR de la chalcona 1.....	60
Figura 21. Espectro IR de la chalcona 2.....	61
Figura 22. Espectro IR de la chalcona 3.....	62
Figura 23. Espectro ¹ H de la chalcona 1.....	63
Figura 24. Espectro ¹³ C de la chalcona 1.....	64

Figura 25. Espectros DEPT 45 - 90 - 135 de la chalcona 1.	65
Figura 26. Espectro COSY de la chalcona 1.....	66
Figura 27. Espectro HMQC de la chalcona 1.....	67
Figura 28. Espectro HMBC de la chalcona 1.....	68
Figura 29. Espectro ¹ H de la chalcona 2.....	69
Figura 30. Espectro ¹³ C de la chalcona 2.....	70
Figura 31. Espectros DEPT 45 - 90 - 135 de la chalcona 2.....	71
Figura 32. Espectro COSY de la chalcona 2.....	72
Figura 33. Espectro HMQC de la chalcona 2.....	73
Figura 34. Espectro HMBC de la chalcona 2.....	74
Figura 35. Espectro ¹ H de la chalcona 3.....	75
Figura 36. Espectro ¹³ C de la chalcona 3.....	76
Figura 37. Espectros DEPT 45 - 90 - 135 de la chalcona 3.....	77
Figura 38. Espectro COSY de la chalcona 3.....	78
Figura 39. Espectro HMQC de la chalcona 3.....	79
Figura 40. Espectro HMBC de la chalcona 3.....	80
Figura 41. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 1 en contra de <i>Escherichia coli</i>	83
Figura 42. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 1 en contra de <i>Staphylococcus aureus</i>	83
Figura 43. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 2 en contra de <i>Escherichia coli</i>	87
Figura 44. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 2 en contra de <i>Staphylococcus aureus</i>	87
Figura 45. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 2 en contra de <i>Escherichia coli</i>	90
Figura 46. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 3 en contra de <i>Staphylococcus aureus</i>	90
Figura 47. Estructura de las membranas de las bacterias Gram negativas y Gram positivas.....	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de chalconas presentes en la naturaleza.....	9
Tabla 2. Resultados de las síntesis de chalconas por cada tratamiento.....	56
Tabla 3. ANOVA Multifactorial para el porcentaje de rendimiento.....	59
Tabla 4. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de rendimiento por tratamiento..	59
Tabla 5. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de rendimiento por tipo de chalcona.....	59
Tabla 6. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 1.....	82
Tabla 7. Prueba t-student para la concentración de 500 µg/mL de la chalcona 1 vs cloranfenicol.....	84
Tabla 8. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 2.....	86
Tabla 9. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 3.....	89



ABREVIATURAS

ACS	American Chemical Society
CAS	Chemical Abstracts Service
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (Ampliación sin distorsión por transferencia de polarización)
DMSO	Dimetilsulfóxido
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation (Correlación heteronuclear de enlace múltiple)
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation (Correlación heteronuclear múltiple cuántica)
IR	Infrarrojo
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
OMS	Organización Mundial de la Salud
UV	Ultravioleta

INTRODUCCIÓN

La naturaleza es la principal maestra de los químicos. Es en ella donde se generaron por primera vez la mayoría de compuestos químicos que utilizamos en nuestro día a día y que la química moderna pretende emular y sintetizar en los laboratorios.

Las plantas y los hongos han sido estudiados durante mucho tiempo para identificar los compuestos antibacterianos que puedan ayudar a tratar algunas enfermedades del ser humano y sus animales, especialmente en los últimos años, ya que se ha incrementado la resistencia bacteriana a los antibióticos conocidos y el tiempo de investigación para lanzar un nuevo medicamento al mercado es muy largo, por lo que es imperativo descubrir más fármacos y en un tiempo corto.

Entre estos compuestos se han logrado identificar a las chalconas, que son sustancias de origen vegetal con una amplia cantidad de actividades biológicas y que se sabe que tienen capacidad antibacteriana, especialmente las chalconas hidroxiladas. Lamentablemente, las chalconas hidroxiladas tienden a tener bajos rendimientos (< 30 %) cuando se sintetizan mediante condensación de Claisen-Schmidt, lo cual es una desventaja al momento de analizarlas como una alternativa para la industria farmacéutica. Además, es posible que este bajo rendimiento tenga relación con la cantidad de agua presente en la reacción.

Es así que los objetivos del trabajo fueron comparar tres métodos para optimizar la síntesis de las chalconas, obtener los espectros IR y RMN de cada una de las chalconas y, finalmente, evaluar su actividad antibacteriana mediante el método de difusión en disco en contra de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.


OBJETIVOS

a) Objetivo General:

- Sintetizar y caracterizar tres chalconas hidroxiladas y evaluar su actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

b) Objetivos Específicos:

- Sintetizar y caracterizar las tres chalconas hidroxiladas propuestas.
- Comparar tres métodos para la optimización de la síntesis de cada una de las 3 chalconas propuestas.
- Analizar la actividad antibacteriana de las chalconas sintetizadas contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



HIPÓTESIS

Sabiendo que las chalconas hidroxiladas sintetizadas mediante la condensación de Claisen-Schmidt suelen tener bajos rendimientos y, que el agua es un producto de esta reacción, es posible que la disminución de la cantidad de agua al inicio de la reacción conduzca al aumento de sus rendimientos.

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE TRES CHALCONAS HIDROXILADAS Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA *ESCHERICHIA COLI* Y *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

PRIMERA PARTE: MARCO TEÓRICO

1.1. Chalconas

La palabra “chalcona” proviene de la palabra griega “χαλκός” o “chalkós” (Zhuang *et al*, 2017), que se traduce como “cobre”. Esta nomenclatura fue escogida debido a la similitud entre el color del metal y los colores de la mayoría de chalconas encontradas en la naturaleza, las cuales pueden presentarse en diferentes tonos de amarillo, naranja (Elkanzi *et al*, 2022), rojo (Rani *et al* 2019) y blanco (Kostanecki & Tambor, 1899).

El término “chalcona” aparece en la literatura científica por primera vez en 1899, acuñado por el químico polaco Stanisław Kostanecki y el químico suizo Joseph Tambor durante la realización de sus trabajos pioneros acerca de pigmentos naturales (Kostanecki & Tambor, 1899).

1.1.1. Estructura y características de las chalconas

Las chalconas químicamente son conocidas como 1,3-diaril-2-propen-1-onas, benzalacetofenonas y bencilidenacetofenonas (Gaonkar & Vignesh, 2017). Estas moléculas tienen un esqueleto característico, que contiene dos anillos aromáticos unidos por una cadena de 3 carbonos, la cual posee un grupo carbonilo, y donde los otros dos carbonos están unidos mediante un doble enlace (Figura 1). Este puente puede referirse como un grupo alquenona (Jasim *et al*, 2021) o un grupo ceto-etilénico (Gaonkar & Vignesh, 2017).

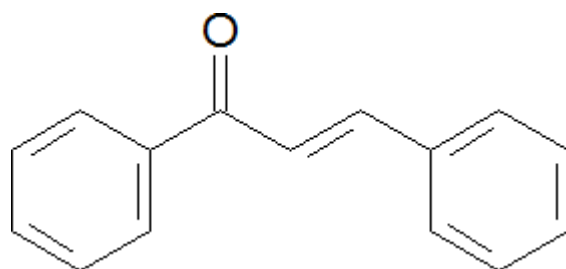


Figura 1. Esquema general de una chalcona.

Por otra parte, el doble enlace presente en las chalconas ocasiona que pueda presentar isomería *trans* (Figura 2a) o *cis* (Figura 2b); siendo el isómero *trans* el más abundante debido a su mayor estabilidad termodinámica (Zhuang *et al*, 2017).

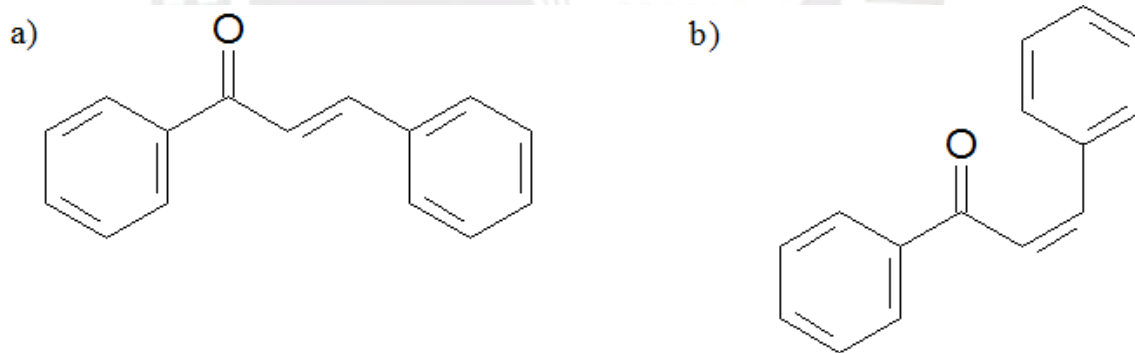


Figura 2. a) Estructura del isómero *trans* de una chalcona. b) Estructura del isómero *cis* de una chalcona.

Como se puede observar en las figuras 1 y 2, los anillos aromáticos de las chalconas tienen muchas posiciones libres y posibilidades de sustitución, lo cual ha

originado una gran diversidad de moléculas naturales y sintéticas. Por consiguiente, para poder caracterizar estas moléculas, se debe iniciar por la asignación de la nomenclatura correspondiente.

Actualmente existen dos tipos de nomenclatura para las chalconas y ambos pueden encontrarse en la literatura científica reciente. El primer tipo es aceptado por Chemical Abstracts Service - CAS, que es una división de la American Chemical Society – ACS (Figura 3a), mientras que el segundo tipo es aceptado por British Chemical Abstracts y el Journal of the Chemical Society (Figura 3b) (Gaonkar & Vignesh, 2017). Para efectos del desarrollo de este trabajo de investigación, se utilizará la nomenclatura de la ACS, tomando el anillo de la posición 1 de la cadena alifática como el anillo A, y el anillo de la posición 3 de la cadena como el anillo B.

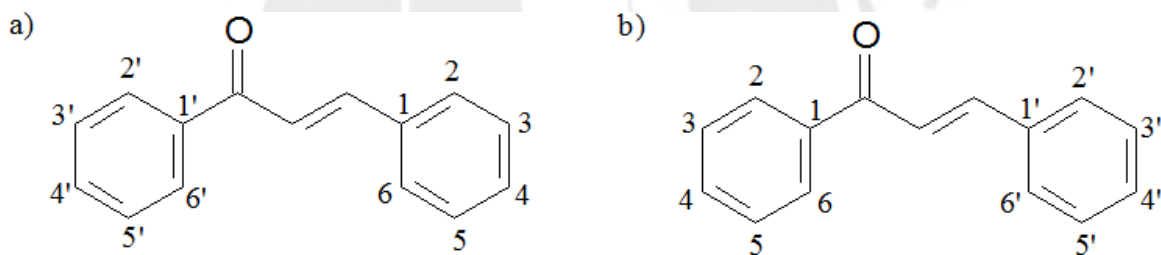


Figura 3. a) Nomenclatura según Chemical Abstracts y ACS. b) Nomenclatura según British Chemical Abstracts y Journal of the Chemical Society.

Otra característica de las chalconas es que tienen un sistema altamente conjugado y electrones π deslocalizados en prácticamente toda la extensión de la molécula (Goyal *et al*, 2021), en consecuencia, estas moléculas presentan cierta fluorescencia ante la incidencia de luz UV, cuya intensidad puede ser alterada de acuerdo a los grupos aceptores y donadores de electrones que existan en los anillos

aromáticos (Zhuang *et al*, 2017). La deslocalización de electrones también favorece las reacciones que involucren transferencia de electrones (Gaonkar & Vignesh, 2017), como, por ejemplo, la sustitución aromática electrofílica y otras reacciones de derivatización, con las cuales se pueden adicionar más grupos funcionales al anillo aromático.

Adicionalmente, el grupo cromóforo de las chalconas es el grupo alquenona o grupo ceto-etilénico (López, 2020), el cual les da mayormente su característico color amarillo. Sin embargo, este grupo tiene una particularidad, ya que en presencia de álcalis o bases, hace que el pigmento amarillo se vuelva rojo o al menos, aumente la saturación e intensidad de su color. Es debido a ello que a las chalconas se les puede considerar como pigmentos antoclorícos (Chopra, 2016).

Las chalconas son, sobre todo, un tipo de productos naturales que se pueden encontrar en organismos vegetales; estas moléculas son sintetizadas por la vía del shikimato y son, además, precursores de los flavonoides. Este es el motivo por el que las chalconas se consideran flavonoides de cadena abierta, y es por la acción de la enzima chalcona isomerasa que se realiza la ciclación de las chalconas para generar los flavonoides (Jasim *et al*, 2021).

Los flavonoides han sido ampliamente estudiados en los últimos años, y es prácticamente un consenso en la comunidad científica que estos tienen una gran capacidad antioxidante. Esto se cree que es debido a los grupos hidroxilo que poseen sus anillos aromáticos, por lo cual no es de extrañar que la mayoría de chalconas naturales también tengan uno o más grupos hidroxilo como sustituyentes de sus anillos aromáticos (Aksöz & Ertan, 2011; Jasim *et al*, 2021).

1.1.2. Importancia de las chalconas en la naturaleza

Las chalconas son metabolitos secundarios de las plantas, las cuales se pueden encontrar en flores, frutos, hojas, corteza, semillas, raíces y otros tejidos (Cazarolli *et al*, 2013). Estos compuestos se encuentran en una extensa variedad de especies vegetales, algunas de las cuales se mencionan junto a su chalcona correspondiente en la Tabla 1 y en la Figura 4.

Su presencia es muchas veces responsable del color amarillo de estos órganos vegetales y, también son intermediarios en la síntesis de flavonoides que, a su vez, son importantes por ser moléculas señalizadoras en el metabolismo de la flora, son estimulantes del crecimiento y germinación de esporas y semillas, brindan protección ante la luz UV y son moléculas fundamentales para la resistencia ante sequías y temperaturas fluctuantes. Adicionalmente, sirven como moléculas señalizadoras al tener la facultad de atraer agentes polinizadores; y son agentes desintoxicantes, por poseer la capacidad de captar radicales libres (Samanta *et al*, 2011).

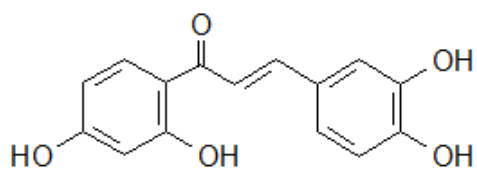
Por su similitud estructural, las chalconas y los flavonoides tienen algunas funciones biológicas en común. Por ejemplo, las chalconas también cumplen la función de proteger a la planta de la luz UV, de atraer polinizadores y también son moléculas clave para la adaptación ambiental de la planta debido a que regulan diversos procesos metabólicos; se conoce que las chalconas pueden regular el crecimiento vegetal, puesto que son capaces de regular el consumo de glucosa. Por otro lado, la diferencia más importante con los flavonoides es que las chalconas tienen la función de proteger a la planta de organismos patógenos como hongos y bacterias, a causa de sus propiedades bactericidas y fungicidas (Cazarolli *et al*, 2013).

Además de lo ya mencionado, las chalconas cumplen un rol nutracéutico en la

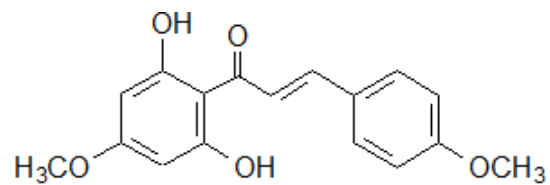
cadena trófica, aportando beneficios a la salud de la fauna que consume la planta en la que se encuentran. Para ilustrar esta mención, existen estudios en los cuales se ha investigado las propiedades antialérgicas del tomate, que se le atribuyen a la naringenina-chalcona en su composición, y que, aunque no son concluyentes, han observado indicios de que los extractos de tomate y soluciones de naringenina-chalcona podrían ser utilizados como coadyuvantes en el tratamiento de la rinitis alérgica. Otro ejemplo es el uso del regaliz en diversas medicinas tradicionales a base de hierbas, el cual se utiliza en virtud de sus propiedades antiinflamatorias (Mah, 2021).

Tabla 1. Ejemplos de chalconas presentes en la naturaleza.

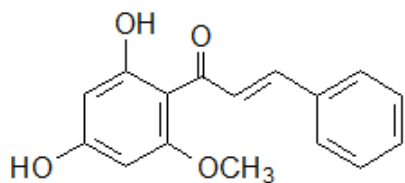
Nombre de la chalcona	Especie vegetal	Fuente
Buteína	<i>Rhus verniciflua</i> (Árbol de la laca) <i>Butea dahlia</i> (Dalia)	Zhuang <i>et al</i> , 2017
Calomelanona	<i>Stevia lucida</i> (Jarilla)	Jasim <i>et al</i> , 2021
Cardamonina	<i>Boesenbergia rotunda</i> (Jengibre chino) <i>Piper aduncum</i> L. (Matico)	Mah, 2021 Zhuang <i>et al</i> , 2017
Equinantina	<i>Piper methysticum</i> (Kava) <i>Alpinia pricei</i> (Familia del jengibre)	Jasim <i>et al</i> , 2021
Floretina	<i>Malus domestica</i> (Manzana) <i>Stevia lucida</i> (Jarilla)	Mah, 2021
Florizina	<i>Malus domestica</i> (Manzana)	Mah, 2021
Isoliquiritigenina	<i>Glycyrrhiza sp.</i> (Regaliz) <i>Nepalese propolis</i> (Propóleo nepalés de abeja) <i>Piper methysticum</i> (Kava)	Mah, 2021 Zhuang <i>et al</i> , 2017 Jasim <i>et al</i> , 2021
Licochalcona A, B, C, D	<i>Glycyrrhiza sp.</i> (Regaliz)	Jasim <i>et al</i> , 2021
Naringerina-chalcona	<i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate) <i>Acacia cyanophylla</i> (Acacia azul)	Mah, 2021 Jasim <i>et al</i> , 2021
Panduratina A	<i>Boesenbergia rotunda</i> (Jengibre chino)	Mah, 2021
Pinocembrina-chalcona	<i>Boesenbergia rotunda</i> (Jengibre chino)	Mah, 2021
Pinostrobinachalcona	<i>Alpinia mutica</i> (Familia del jengibre)	Zhuang <i>et al</i> , 2017



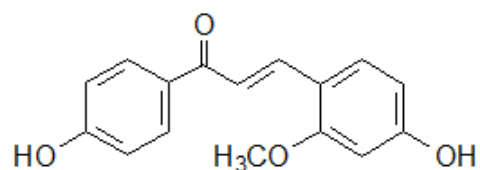
Buteína



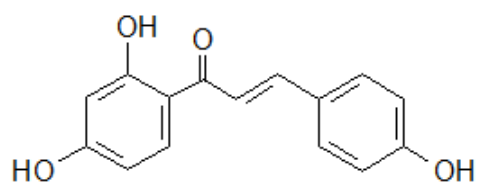
Calomelanona



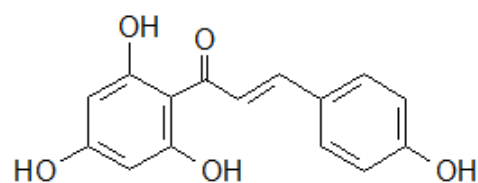
Cardamonina



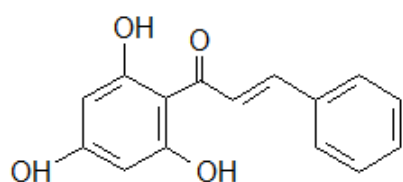
Equinatina



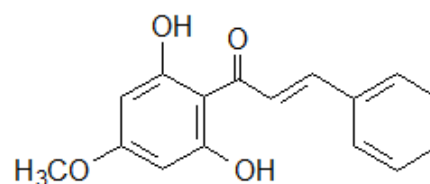
Isoliquiritigenina



Naringerina-chalcona



Pinocebrina-chalcona



Pinostrobina-chalcona

Figura 4. Ejemplos de chalconas presentes en la naturaleza.

1.1.3. Importancia de las chalconas en la industria química y farmacéutica

Diversas investigaciones han estudiado a las chalconas y a sus propiedades, concluyendo que tienen una vasta gama de propiedades, como: antibacteriana (Chopra, 2016; Elkanzi *et al*, 2022), fungicida (Elkanzi *et al*, 2022; Díaz-Tielas *et al*, 2016), antiinflamatoria (Bhale *et al*, 2021; Chopra, 2016), anticancerígena (Bhale *et al*, 2021; Goyal *et al*, 2021), antimaláricas y antileishmania (Bhale *et al*, 2021; Chopra, 2016), antiviral (Bhale *et al*, 2021; Díaz-Tielas *et al*, 2016), antioxidante y analgésica (Elkanzi *et al*, 2022; Goyal *et al*, 2021), inmunomoduladora, antiulcerativa y antituberculosis (Chopra, 2016), antidiabética y estrogénica (Elkanzi *et al*, 2022), antigota, antihistamínica, antiprotozoaria, antiespasmódica y antiobesidad (Gomes *et al*, 2017), nematocida e insecticida (Díaz-Tielas *et al*, 2016), herbicida (Chotsaeng *et al*, 2019; Díaz-Tielas *et al*, 2016) y otras más.

Es a raíz de estos hallazgos y, al descubrimiento de chalconas en plantas que se han utilizado en la medicina tradicional de diferentes culturas milenarias, que se comenzaron a utilizar en ensayos clínicos (Figura 5) luego de haber superado las pruebas *in vitro* e *in vivo* y de haber demostrado su inocuidad en dosis moderadas. Es así como algunas chalconas como la metochalcona y la sofalcona (Dan & Dai, 2019) lograron ser introducidas en el mercado farmacéutico y fueron comercializadas como medicamentos.

La metochalcona es una chalcona aislada de la madera del árbol *Pterocarpus marsupium* y es un principio activo aprobado para tratar enfermedades del tracto biliar y como un agente diurético (Inxight Drugs, 2023). Por otra parte, la sofalcona es una chalcona que se vende en Japón en diferentes formulaciones, como un medicamento para tratar infecciones por la bacteria *Helicobacter pylori*, gastritis y úlceras estomacales

debido a sus propiedades antibacterianas y a su efecto protector de la mucosa gástrica (Inxight Drugs, 2023).

Adicionalmente, la hesperidina metilchalcona y la hesperidina trimetilchalcona son chalconas que se han probado en ensayos clínicos y que han demostrado el alivio de los síntomas causados por la insuficiencia linfática venosa crónica y para las várices, respectivamente (Gomes *et al*, 2017). Hasta el momento de la realización de este trabajo de investigación, la hesperidina metilchalcona es comercializada como un suplemento dietario de venta libre, que brinda apoyo a las venas y capilares.

Finalmente, otros compuestos que se han estudiado extensamente y que han ingresado a ensayos clínicos, son la licochalcona A y el derivado de chalcona, la panduratina A. En el caso de la licochalcona A, esta fue utilizada en formulaciones tópicas para el tratamiento de enfermedades de la piel como rosácea, acné y cuero cabelludo seco en pacientes femeninos. Las pacientes presentaron una mejora evidente, al disminuir las lesiones epiteliales y la picazón asociada. Y, en el caso de la panduratina A, esta fue utilizada en una formulación de ingesta oral, que mejoró significativamente la hidratación y el brillo de la piel, así como la aparición de arrugas, las cuales disminuyeron su notoriedad (Salehi *et al*, 2021).

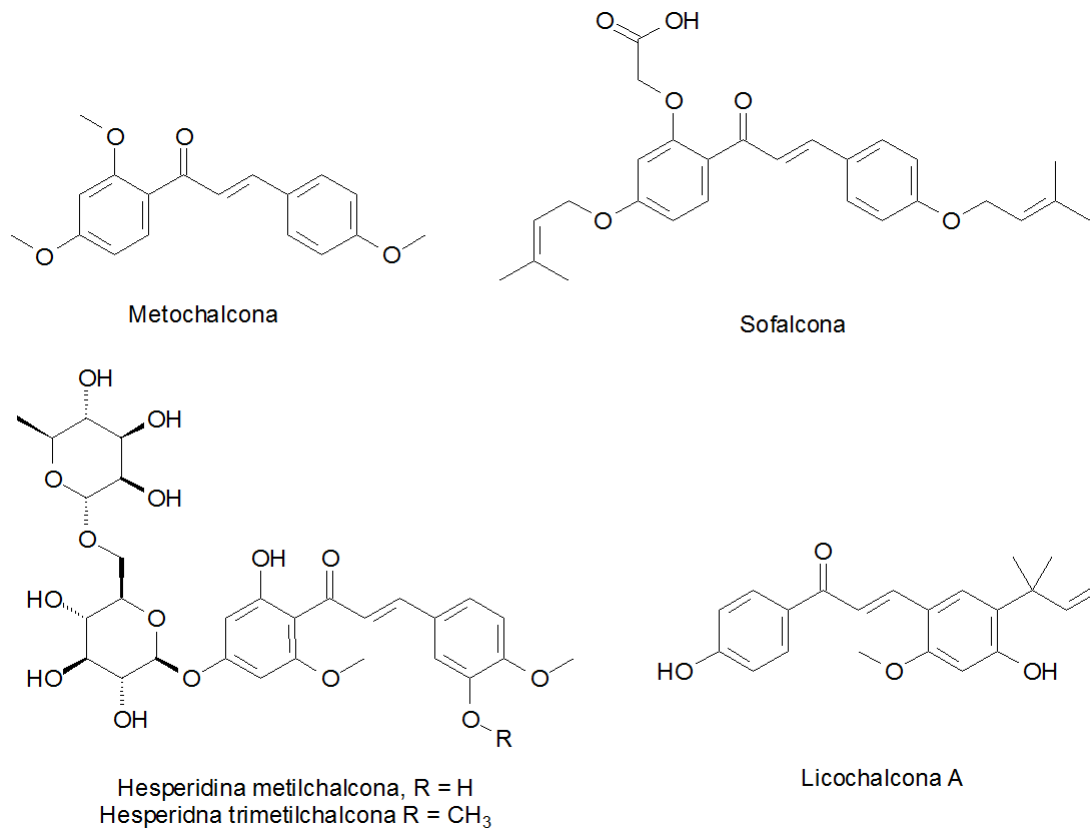


Figura 5. Ejemplos de chalconas utilizadas en ensayos clínicos y en el mercado farmacéutico.

Debido a su capacidad biológicamente activa, a su facilidad de preparación y derivatización, las chalconas también son consideradas bloques de construcción para generar otros compuestos de mayor potencial terapéutico. Por ejemplo, a través de reacciones de cierre de anillo intramoleculares en las chalconas, se pueden obtener anillos heterocíclicos y policíclicos (Gaonkar & Vignesh, 2017).

Es posible que en un futuro, las chalconas actúen como sintones en la producción de híbridos entre chalconas y otros grupos farmacóforos (Rani *et al*, 2019), tales como los compuestos heterocíclicos con nitrógeno (pirroles, piridinas, pirimidinas, etc.) y otros

compuestos bicíclicos (índoles, quinolinas, cumarinas, etc.), los cuales también tienen propiedades activas (Marotta *et al*, 2022). Estos híbridos podrían superar algunas desventajas de los fármacos vigentes, como la resistencia al medicamento o la inespecificidad de su acción (Ouyang *et al*, 2021).

No obstante, a pesar del gran potencial que tienen las chalconas en la industria farmacéutica, aún es necesario realizar más ensayos clínicos y pruebas de laboratorio para poder conocer la extensión de su mecanismo de acción a nivel de órganos, tejidos y células, y también es necesario conocer su interacción con biomoléculas estructurales como glúcidos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, para poder identificar las moléculas objetivo de su acción (Salehi *et al*, 2021).

En la industria química, las chalconas poseen un gran potencial como quimiosensores, debido a que su sistema altamente conjugado absorbe fuertemente la luz en el espectro UV, lo que resulta en una capacidad fluorescente. Esta propiedad se ve afectada por factores internos, como el nivel de conjugación del sistema y la presencia y la posición de distintos grupos funcionales; así como por factores externos, como la polaridad del solvente, el pH del medio y la presencia de otras moléculas en el medio, como proteínas o detergentes (Zhuang *et al*, 2017).

Algunas aplicaciones de quimiosensores derivados de chalconas son:

- Para detectar el contenido de agua en solventes orgánicos (Niu *et al*, 2006).
- Como moléculas señalizadoras para la verificación de la transformación celular, por ejemplo, al generar el reconocimiento de los receptores humanos H3 de histamina en células transformadas de riñón HEK-293 (Tomash *et al*, 2012).

- Para detectar ciertas enfermedades debido a alteraciones en la concentración de un biomarcador y la consecuente alteración de la emisión de luz, como la visualización de la enzima fosfatasa alcalina en células vivas (Song *et al*, 2014).
- Para visualizar células madre (Yun *et al*, 2014).
- Como quimiosensores de distintos iones en solución, como Ag^+ , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , F^- , CN^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} (Gupta *et al*, 2020), Zn^{2+} (Mahesha *et al*, 2022), Cd^{2+} y Co^{2+} (Karaca & Kazanci, 2022).

1.2. Relación estructura-actividad de los grupos sustituyentes en las chalconas

La relación estructura-actividad es estudiada por la farmacología, que Litter (1970) define como “la ciencia que estudia las drogas, entendiéndose por droga o fármaco en su acepción más general todo agente químico que tiene acción sobre los seres vivos”.

Se sabe además que existen moléculas que pueden alterar las funciones celulares mediante la producción de reacciones entre las moléculas y ciertos componentes de las células, con la consecuente formación de enlaces químicos. Al tener en cuenta estas definiciones y argumentos, entonces la relación estructura-actividad comprende las relaciones entre la estructura y su acción farmacológica, por lo cual se podría decir que sustancias de composición similar van a tener acciones similares. Por ejemplo, los fenoles, en general, tienen actividad como germicidas, irritantes locales y tóxicos del sistema nervioso central (Litter, 1970).

La importancia del análisis de la relación estructura-actividad radica en encontrar el grupo farmacóforo de la sustancia en estudio y en determinar la combinación de

sustituyentes que, sobre el grupo farmacóforo, potencian su actividad (Avendaño, 1993).

Diversos autores coinciden en que la estructura principal responsable de la actividad biológica y, que es común a todas las chalconas, es el grupo alquenona o sistema carbonílico α,β -insaturado. El hecho que una chalcona pierda este importante grupo implicaría que se vuelva biológicamente inactiva (Díaz-Tielas *et al*, 2016; Gaonkar & Vignesh, 2017), por ello es que se podría decir que este es el grupo farmacóforo.

1.2.1. Chalconas homocíclicas

Las chalconas homocíclicas son aquellas cuyos anillos aromáticos están constituidos únicamente por átomos de carbono.

1.2.1.1. Actividad antifúngica

Sahu *et al* (2012) determinaron que el mecanismo de la acción antifúngica de las chalconas posiblemente se deba a la inhibición de la síntesis de pared celular de los hongos y es atribuido al grupo alquenona.

Por su parte, Prasad *et al* (2008) identificaron que las chalconas que poseían grupos sustituyentes como cloro, dicloro y fluoro, exhibían una mejor actividad antifúngica.

1.2.1.2. Actividad anticancerígena

Lawrence *et al* (2006) postularon que las chalconas sustituidas en α con un

grupo metilo o un grupo fluoro presentan una mayor actividad anticancerígena y citotóxica que las chalconas no sustituidas, mientras que aquellas que poseen un grupo etil en la misma posición tienen una actividad menor. Adicionalmente, enunciaron que los sustituyentes clave para este tipo de actividad son el 3-hidroxi y el 4-metoxi en el anillo B.

En otro estudio, Rajendran *et al* (2022) mencionaron que las chalconas con grupos hidroxilo como sustituyentes poseen una mayor actividad anticancerígena en células de cáncer de mama. Indican también que las chalconas con sustituyentes del grupo de los halógenos y con grupos metoxi han resultado ser bastante efectivos contra células de cáncer de hígado, próstata y pulmón. Es importante recalcar que los autores señalan que las chalconas con tres grupos hidroxilo o metoxi tienen una mayor actividad que aquellas con dos o uno solo de estos grupos.

Además, Do *et al* (2016) describieron que tres grupos metoxi en las posiciones 3, 4 y 5 del anillo B, parecían ser determinantes para la actividad citotóxica de la molécula.

1.2.1.3. Actividad antimalaria y antileishmania

En su investigación, Liu *et al* (2003) encontraron que las chalconas con una buena actividad antimalaria presentan grupos alcoxi en el anillo A y poseen anillos B polares, estando estos últimos sustituidos con grupos aceptores de electrones o que el mismo anillo fuese tipo quinolina. En la misma investigación, reportaron también que la actividad antileishmania es más favorecida por chalconas hidrofílicas, en específico, aquellas que cuentan con un grupo 4'-hidroxilo.

1.2.1.4. Actividad antioxidante

Sahu *et al* (2012) hallaron que las chalconas con grupos hidroxilo y sustituyentes isoprenil tienen un gran potencial antioxidante. La actividad atrapadora de radicales libres es favorecida por un grupo 2'-hidroxi en el anillo A y de un grupo catecol en el anillo B, mientras que la eliminación del doble enlace del sistema α,β -insaturado disminuye su efectividad.

Sivakumar *et al* (2011) reportaron que las chalconas con grupos metoxi y $-\text{SCH}_3$ en la posición C-4 del anillo B y grupos hidroxilo en el anillo A tenían una mejor actividad antioxidante.

1.2.1.5. Actividad antiinflamatoria

Sahu *et al* (2012) indicaron que un grupo hidrofóbico como el benziloxi o ciclohexilmetoxi en la posición 6' del anillo A y grupos atrectores de electrones en la posición 4 del anillo B, mejoran la actividad antiinflamatoria.

1.2.1.6. Actividad antibacteriana

Ávila *et al* (2008) señalan la importancia de los grupos prenil y geranil en los anillos aromáticos, debido a que aumentan la afinidad de la molécula a las membranas biológicas y ejerce así, un mejor efecto antibacteriano. Esta afirmación es compartida por Dan & Dai (2019), quienes hallaron que los grupos prenil y geranil en la posición 3' del anillo A son favorables para su actividad y, por Sahu *et al* (2012), quienes descubrieron que cuando se removía el grupo prenil, la molécula perdía completamente su actividad en contra de la bacteria *Staphylococcus aureus*. También

aseveraron que la introducción de grupos alifáticos de cadena larga, como el grupo hexil, aumentaba considerablemente la actividad antibacteriana, lo cual sugiere que una molécula lipofílica tendría una mejor capacidad antibacteriana.

De igual forma, Ávila *et al* (2008) mencionan que la actividad antibacteriana está ligada a un grupo hidroxilo en el C-4, a un grupo oxigenado en el C-4' o a una cadena isoprenoide en el C-3', mientras que Sahu *et al* (2012) postulan que un grupo hidroxilo en el C-4' es vital para el rol bactericida de la chalcona. Asimismo, Feng *et al* (2014) comentan que los grupos hidroxilo en las posiciones C-2' y C-4' y, un grupo alcoxi en el C-2 favorecen la actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas.

Por otro lado, Rajendra *et al* (2008) identificaron que las chalconas que poseían sustituyentes donadores de electrones, como los grupos metoxi e hidroxilo, tenían mejor actividad antibacteriana que las moléculas que no los tenían. Sin embargo, Sahu *et al* (2012) reportaron que eran los grupos atractores de electrones los que mejoraban la capacidad antibacteriana, y cuyo argumento es también apoyado por Xu *et al* (2019), quienes alegan que los grupos donadores de electrones (como los grupos metilo y metoxi) disminuyen la actividad antibacteriana, mientras que los grupos atractores de electrones (como el grupo nitro y los halógenos) exhibían una mejor actividad antibacteriana, especialmente en las posiciones C-2 y C-4.

Xu *et al* (2019) reportaron que los grupos hidroxilo en las posiciones C-2, C-4 y/o C-2' parecían ser muy importantes para tener una buena actividad bactericida en contra del *Staphylococcus aureus*, y que la actividad antibacteriana aumenta con la presencia de grupos metoxi en el C-4', así como con la cantidad de grupos metoxi en el anillo A. Por ejemplo, una chalcona con tres grupos metoxi en las posiciones C-3', C-4' y C-5', demuestra una actividad antibacteriana bastante superior.

Sahu *et al* (2012) descubrieron también que el intercambiar un sustituyente hidroxilo por un grupo carboxilo, resultaba en una chalcona más efectiva y que, además, poseía una buena solubilidad en agua. De igual manera, establecieron que el grupo carboxilo era necesario para lograr una buena actividad en contra de bacterias Gram positivas.

Finalmente, Dan & Dai (2019) postularon que los grupos metoxi e hidroxilo en la posición C-2' son perjudiciales para la actividad antibacteriana, mientras que las sustituciones con halógenos son beneficiosas. Adicionalmente, mencionan que varios grupos metoxi en el anillo A son perjudiciales, mientras que los grupos tert-butilo y nitro son beneficiosos en la posición C-4'. Además de ello, identificaron que la presencia de un grupo hidroxilo es perjudicial en las posiciones C-2 y C-6'.

1.2.2. Chalconas heterocíclicas

Las chalconas heterocíclicas son aquellas cuyos anillos aromáticos están constituidos por uno o más átomos distintos al carbono (Figura 6). Algunos heteroátomos que suelen encontrarse en este tipo de chalconas son el nitrógeno, el oxígeno y el azufre y, menos frecuentemente, se pueden encontrar heteroátomos inorgánicos como el hierro y el rutenio.

La relación estructura-actividad de las chalconas heterocíclicas ha tomado importancia en los últimos años, debido a que una gran cantidad de fármacos comerciales poseen heteroátomos, así como sus grupos farmacóforos. A continuación se enunciarán algunos ejemplos de los hallazgos hasta la fecha de realización de este trabajo.

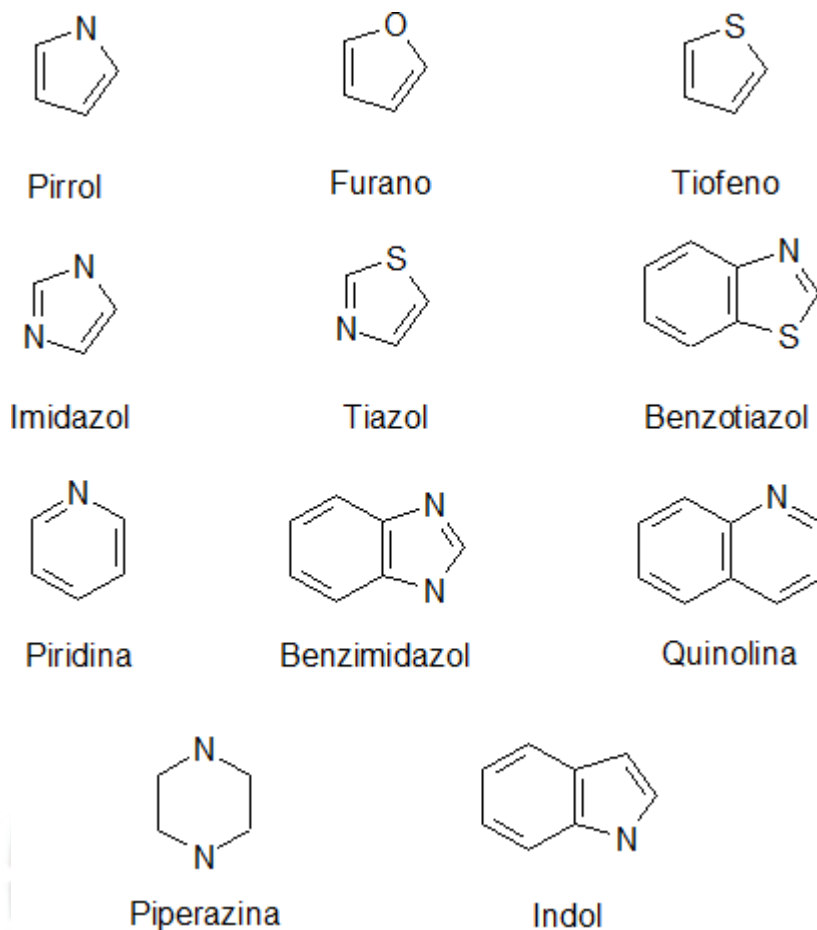


Figura 6. Tipos de anillos heteroatómicos comúnmente encontrados en las chalconas.

Rajendran *et al* (2022) mencionan que tanto las chalconas heterocíclicas como las chalconas con grupos sustituyentes que contengan heteroátomos, tienen una fuerte actividad inhibitoria de enfermedades infecciosas y no infecciosas.

En su investigación, Chotsaeng *et al* (2019) afirmaron que un anillo tiofenil en la chalcona produce una interferencia en el crecimiento de tallos y raíces de plantas, actuando como un herbicida.

Por su lado, en su artículo de revisión, Mezgebe *et al* (2023) determinaron que las chalconas heterocíclicas que exhiben una actividad antibacteriana poseen un anillo tipo pirrol, imidazol o benzotiazol. Asimismo, manifiestan que la actividad anticancerígena se debe a la presencia de anillos tipo pirrol, tiazol, piridina, benzimidazol y quinolina, mientras que los anillos tipo piridina y piperazina producen un efecto antitumoral, y el anillo tipo indol, un efecto antiproliferativo.

Finalmente, Do *et al* (2016) encontró que una chalcona con una estructura tipo fenotiazina en el anillo A y un anillo tipo tiofeno en el anillo B fue la más efectiva en contra de células de cáncer muscular, concluyendo que las chalconas más efectivas eran aquellas que tenían una estructura tipo fenotiazina y tipo piridina.

Como se ha podido evidenciar, las chalconas tienen una gran variedad de actividades biológicas y distintos grupos funcionales son asociados a estas. Sin embargo, la información existente es aún insuficiente. Esto se demuestra especialmente en la recopilación de información acerca de la actividad antibacteriana, donde se observa que aún existe confusión entre el rol positivo o negativo que poseen los grupos hidroxilo y metoxi para esta actividad.

A pesar de ello, no se puede negar que los grupos hidroxilo y metoxi están relacionados con una gran variedad de actividades biológicas, motivo por el cual estos grupos serán estudiados en el presente trabajo.

1.3. Síntesis química de chalconas

Las chalconas se pueden obtener mediante una gran variedad de métodos de síntesis, reactivos de partida, condiciones de reacción y catalizadores. Normalmente son

preparadas mediante condensación de Claisen-Schmidt utilizando catalizadores ácidos o básicos, pero también se pueden sintetizar a través de la reacción de Suzuki, de Heck, de Julia-Kocienski, de Wittig, acilación de Friedel-Crafts (Zhuang *et al*, 2017), reacción de Sonogashira (Goyal *et al*, 2021), etc.

En la condensación de Claisen-Schmidt, los reactivos de partida son aldehídos y cetonas, pero por medio de otras reacciones, se puede partir de alcoholes, bases de Schiff, alquinos, alquenos, haluros de acilo, haluros, entre otros (Goyal *et al*, 2021).

Entre las condiciones de reacción se encuentran el tratamiento con ultrasonido (Goyal *et al*, 2021), la irradiación con microondas, la catálisis por transferencia de fase, el uso de líquidos iónicos y la síntesis sin solvente mediante molienda. Algunos de estos métodos han resultado presentar numerosas ventajas frente a la condensación clásica de Claisen-Schmidt, por ejemplo, la irradiación con microondas elimina la influencia del solvente en la reacción, reduce el tiempo de reacción y mejora el rendimiento (Zhuang *et al*, 2017).

Los catalizadores que se han utilizado para la síntesis de chalconas dependen mucho del mecanismo de síntesis que se haya utilizado. En general, se pueden utilizar catalizadores tanto ácidos como básicos, y tanto en forma líquida como en forma sólida. Sin embargo, al ser la reacción de Claisen-Schmidt la forma tradicional de síntesis, no es de extrañar que las investigaciones se hayan enfocado en diversificar los catalizadores para dicha reacción. Estos catalizadores serán detallados en la siguiente sección.

1.3.1. Reacción de Claisen-Schmidt

La reacción de Claisen-Schmidt, también llamada condensación de Claisen-

Schmidt, fue reportada por primera vez en el año 1881. Esta reacción es un tipo de condensación aldólica cruzada que puede darse en medio ácido o básico y en la cual se hacen reaccionar un aldehído aromático con una cetona alifática o aromática para formar un producto α,β -insaturado (Wang, 2010).

A pesar de que la reacción puede darse en medio ácido o básico, generalmente se utiliza un medio básico (Zhuang *et al*, 2017). Uno de los motivos puede ser que el mecanismo de formación del enol/enolato es distinto. En el medio básico, el nucleófilo es el ion hidroxilo mientras que en el medio ácido el nucleófilo es el agua, y se sabe que el ion hidroxilo es un mejor donador de electrones que el agua. Esto se traduce en una menor velocidad de reacción para el medio ácido y, por otra parte, la posibilidad de que ocurran reacciones no deseadas es mayor.

En la Figura 7 se esquematiza el mecanismo de reacción de Claisen-Schmidt entre una cetona aromática y un aldehído aromático en medio básico. La reacción inicia con el ataque nucleofílico del ión hidroxilo hacia uno de los hidrógenos α de la cetona. El ion hidroxilo abstrae uno de los protones α y se genera un carbanión, que posteriormente ataca al carbono del grupo carbonílico del aldehído (el cual tiene una densidad electrónica positiva debido a la naturaleza de este grupo funcional) y forma un enlace. En este paso se forma un alcóxido, que abstrae un protón del medio para estabilizar su carga. Seguidamente, un ión hidroxilo del medio abstrae otro de los protones α de la molécula, generando otro carbanión y promoviendo la deshidratación de la molécula. Es así que quedan una molécula α,β -insaturada y agua como productos de la reacción.

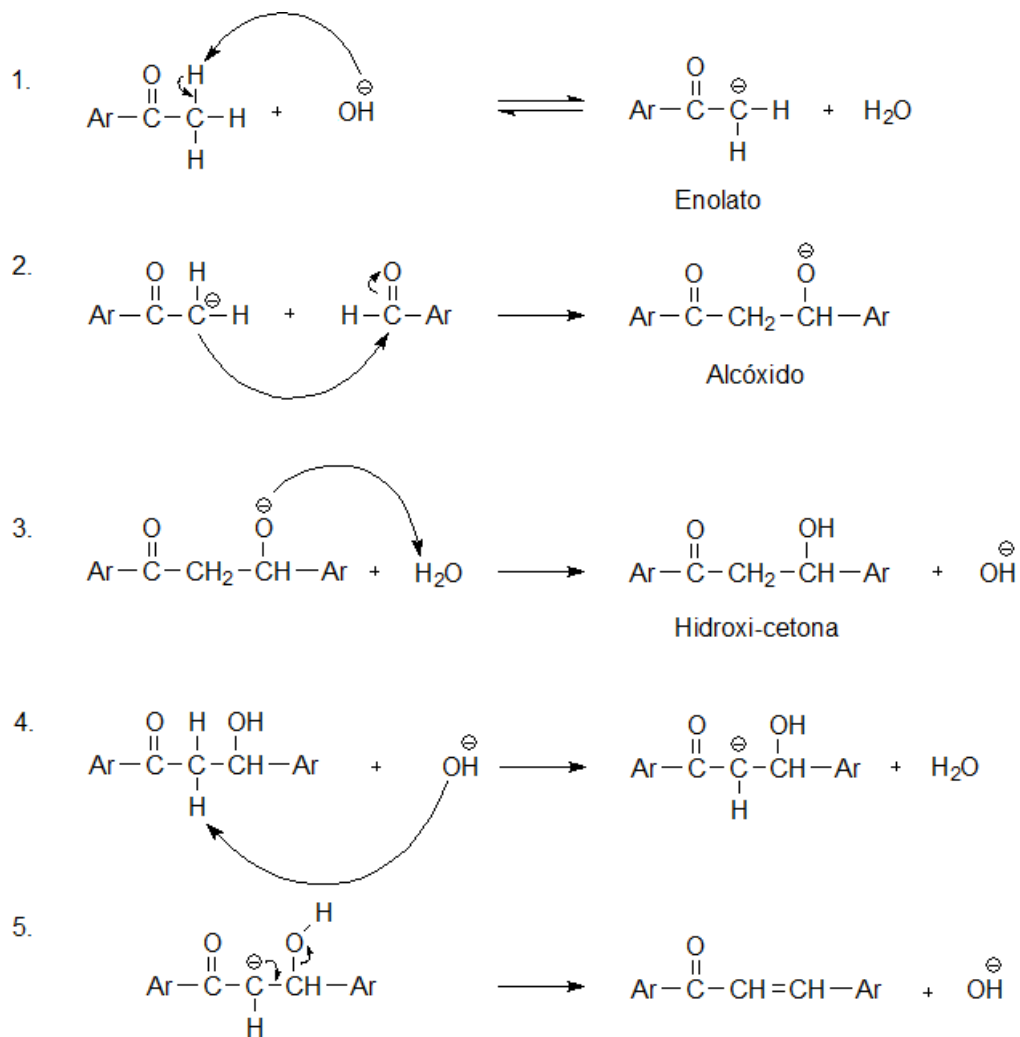
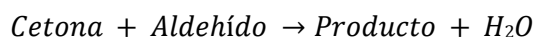


Figura 7. Mecanismo de reacción propuesto para la condensación de Claisen-Schmidt en medio básico.

Adaptado de: Labmonk. (s.f.). Synthesis of Dibenzal Acetone from Benzaldehyde by Claisen Schmidt Reaction. Recuperado el 15 de junio de 2024, de https://labmonk.com/synthesis-of-dibenzal-acetone-from-benzaldehyde-by-claisen-schmidt-reaction#google_vignette

Zhuang *et al* (2017) mencionan que retirar el agua es favorable para la reacción. Asumiendo que se tiene una reacción en medio básico, la reacción global y la ecuación de equilibrio químico es como siguen:



$$K = \frac{[\text{Producto}][\text{H}_2\text{O}]}{[\text{Cetona}][\text{Aldehído}]}$$

Se puede afirmar entonces, que la presencia de agua desplaza el equilibrio químico hacia los productos. Es importante tener esto en cuenta si es que se va a utilizar un catalizador en solución acuosa, ya que podría tener un efecto negativo en el rendimiento y en la velocidad de la reacción.

Algunos catalizadores que se han utilizado para la condensación de Claisen-Schmidt en medio básico son tert-butóxido de potasio, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{Sr}(\text{OH})_2$, NaNO_3 o LiNO_3 con fosfato natural (Zhuang *et al*, 2017), NaOH , KOH , LiOH , $\text{Ba}(\text{OH})_2$, bases orgánicas como piperidina y piridina (Rajendran *et al*, 2022), Na_2CO_3 , K_2CO_3 , K_3PO_4 (Khanapure *et al*, 2018), entre otros.

Por otro lado, algunos catalizadores ácidos que se han utilizado para llevar a cabo esta reacción son HCl , AlCl_3 , SOCl_2 , BF_3 , TiCl_4 , RuCl_3 y algunos ácidos sólidos como el ácido sulfónico sólido (Zhuang *et al*, 2017), así como la amberlita y la zeolita (Jasim *et al*, 2021).

Finalmente, los solventes más utilizados son acetonitrilo, metanol, etanol, 1,2-dicloroetano, dimetilformamida, diclorometano, tetrahidrofurano, dimetilsulfóxido, tetracloruro de carbono y tolueno (Khanapure *et al*, 2018).

En la investigación que realizaron Khanapure *et al* (2018), se probaron diferentes

catalizadores y solventes para la síntesis de una misma chalcona mediante condensación de Claisen-Schmidt. El resultado fue que el catalizador KOH y el solvente etanol fueron los más eficientes entre todos los utilizados, los cuales lograron un mejor rendimiento en menos tiempo.

1.4. Problemática en la síntesis de chalconas hidroxiladas

Como se ha expuesto anteriormente, las chalconas hidroxiladas son aquellas que tienen una mayor variedad de actividades biológicas y, por ello, es que son de principal interés para el desarrollo de esta investigación. Sin embargo, su síntesis mediante condensación de Claisen-Schmidt en medio básico suele presentar bajos rendimientos en comparación con chalconas que tienen otros grupos funcionales. De encontrarse una molécula con una potente actividad biológica, esto representaría un obstáculo para realizar estudios a mayor escala.

El bajo rendimiento de las chalconas hidroxiladas suele responder a la ocurrencia de un fenómeno distinto según la posición en la que se encuentre el grupo hidroxilo y si se trata del aldehído o de la cetona. No obstante, inicialmente todos ocurren debido a la abstracción del protón del grupo hidroxilo por parte del catalizador básico.

En el caso de la posición *orto*-, se enuncia que luego de la formación del ión fenóxido, la chalcona se puede ciclar y formar una flavanona en una reacción intramolecular (Go *et al*, 2005). No existe mucha información acerca de lo que sucede en la posición *meta*-, pero se puede postular que luego de la formación del ión fenóxido, ocurre una deslocalización de la carga que dificulta la reacción. En el caso de la posición *para*-, se sostiene que el ion fenóxido se transforma en una estructura de tipo quinona (Figura 8), que también dificulta la condensación de Claisen-Schmidt (Kim *et al*, 2008; Rosa *et al*, 2019).

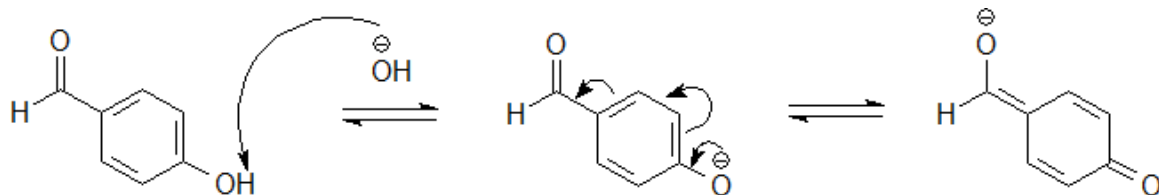


Figura 8. Deslocalización de la carga del 4-hidroxi-benzaldehído en medio básico.

Adaptado de: Patil, C. B., Mahajan, S. K., & Katti, S. A. (2009). Chalcone: A versatile molecule. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1(3), 11–22.

Una propuesta para solucionar esta problemática sería realizar la síntesis en medio ácido. No obstante, ya se han mencionado algunas desventajas de este método, como lo son una menor velocidad de reacción y la formación de productos no deseados. Por otro lado, se utilizan insumos bastante más contaminantes y peligrosos que en la síntesis básica. Por ejemplo, uno de los catalizadores ácidos que ha logrado mejores resultados en la síntesis de chalconas es el SOCl_2 , el cual es muy tóxico y corrosivo, puede generar reacciones muy violentas y además reacciona con el agua y la humedad del aire, formando SO_2 y HCl gaseosos.

Otra de las propuestas es seguir utilizando el medio básico, pero realizar una protección y desprotección del grupo hidroxilo.

Un grupo protector es aquel que tiene la función de bloquear un grupo funcional en una molécula para que este no sea un sitio reactivo durante una reacción química. Luego de la reacción, el grupo protector debe ser removido para generar la molécula deseada. En el caso de los fenoles, que son el grupo que se encuentra en las chalconas hidroxiladas, estos se pueden proteger como éteres, éteres silílicos, ésteres, carbonatos, carbamatos, fosfinatos y sulfonatos (Wuts, 2014).

Para la síntesis de chalconas, generalmente se protegen los grupos hidroxilo de los reactantes como ésteres, especialmente como ésteres de tetrahidropiranyl (THP), metoximetil (MOM) y metoxietoximetil (MEM) (Go *et al*, 2005; Hofmann *et al*, 2015); Kim *et al*, 2008). Sin embargo, realizar la protección conlleva diversas desventajas como: adicionar pasos a la síntesis, aumentar el tiempo necesario para sintetizar una sola molécula y aumentar los insumos necesarios así como los residuos generados. Adicionalmente, el riesgo de obtener reacciones secundarias y productos de degradación aumenta, por lo que es posible que los rendimientos también sean bajos.

Debido a la problemática expuesta, el tener una metodología de síntesis que evite las derivatizaciones sería ideal. Es por ello que el presente trabajo propone la disminución del agua en la catálisis básica como alternativa para elevar el rendimiento de la condensación de Claisen-Schmidt para la síntesis de chalconas hidroxiladas.

1.5. Técnicas de análisis y caracterización estructural

Las técnicas de análisis y caracterización estructural dentro de la química orgánica comprenden principalmente a los métodos espectroscópicos.

Para poder definir los métodos espectroscópicos, se debe establecer primero que la radiación electromagnética es la “energía transmitida en el espacio a través de ondas”. No obstante, existen diferentes tipos de radiación (Figura 9), donde cada una se distingue por su longitud de onda y por la cantidad de energía que poseen sus fotones (Fessenden & Fessenden, 1982).

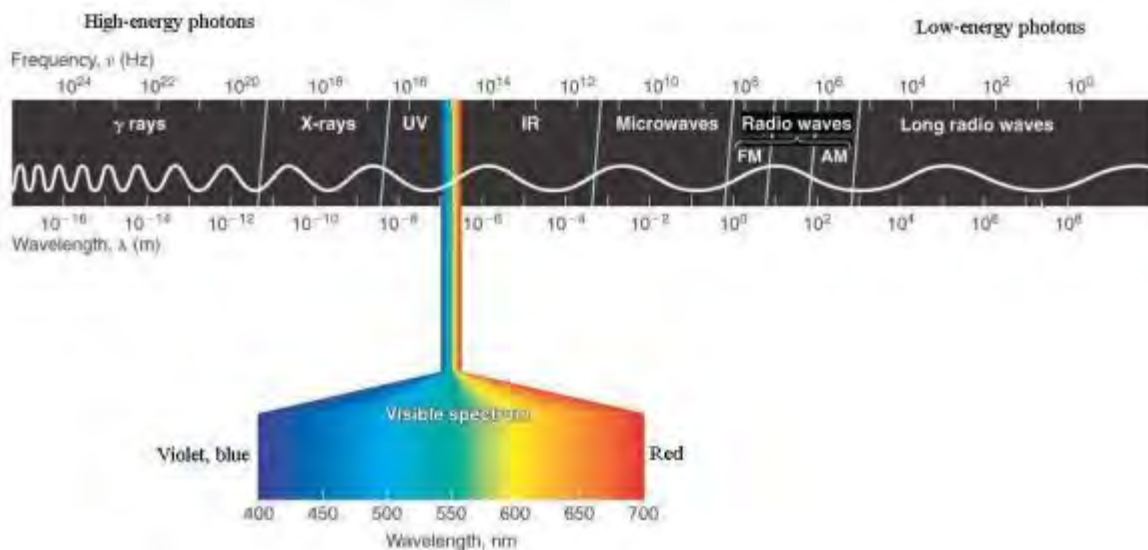


Figura 9. Espectro electromagnético.

Extraído de: Fusaro, R. M. (1968). *Sunlight sensitivity*. Minnesota Medicine, 51(7), 957–958.

Al tener en cuenta lo que significa la radiación electromagnética, la espectroscopía se puede definir como el “estudio de las interacciones entre la energía radiante y la materia”. En esa misma línea, se sabe que el tipo de radiación que absorben los compuestos químicos depende de los grupos funcionales en su estructura y del tipo de enlaces que poseen. Es por ello que los métodos espectroscópicos pueden ser usados para analizar compuestos desconocidos y determinar su estructura (Fessenden & Fessenden, 1982).

Asimismo, los métodos espectroscópicos tienen su fundamento en la medición de la cantidad de radiación producida o absorbida por una molécula o un átomo luego de hacer incidir radiación externa sobre estos y se pueden clasificar de acuerdo a la región del espectro electromagnético que utilice el método. Las regiones del espectro más utilizadas en química son aquellas que comprenden a los rayos X, la radiación UV, la luz del espectro visible y la radiación IR (Skoog *et al*, 2022).

Para el presente trabajo se contempló utilizar la espectroscopía IR y la espectroscopía RMN para la elucidación estructural de las chalconas sintetizadas, cuyos fundamentos se explicarán en las siguientes secciones.

1.5.1. Espectroscopía Infrarroja (IR)

La espectroscopía infrarroja es una gran herramienta para ayudar en la identificación de compuestos orgánicos puros, debido a que prácticamente todas las moléculas absorben radiación IR, salvo algunos pocos ejemplos. Además, con la excepción de algunas moléculas quirales, se sabe que cada molécula tiene un espectro de absorción IR único; por lo que si una muestra tiene exactamente el mismo espectro que otro compuesto, se puede decir que se trata de dicho compuesto (Skoog *et al*, 2022).

La radiación infrarroja, que está comprendida aproximadamente entre los 700 nm y los 1000 μm del espectro electromagnético, no tiene la cantidad de energía suficiente como para causar transiciones electrónicas, sin embargo, sí es capaz de causar transiciones vibracionales y rotacionales en las moléculas. Generalmente, las transiciones rotacionales se dificultan cuando se trabaja con muestras líquidas o sólidas, resultando en señales prácticamente indetectables. Es por ello que los espectros infrarrojos poseen mayoritariamente señales de transiciones vibracionales (Skoog *et al*, 2022).

Todo átomo que esté enlazado covalentemente experimenta vibraciones y, por otra parte, la incidencia de radiación IR se traduce en una transición a un estado donde aumenta la amplitud de vibración de dicho enlace. Es así que se pueden producir vibraciones de alargamiento, estiramiento o tensión y vibraciones de flexión. Finalmente, cuando la molécula regresa a su estado basal, la energía remanente se disipa en forma

de calor (Fessenden & Fessenden, 1982).

La longitud de onda a la cual un enlace absorbe radiación depende inherentemente del tipo de vibración de ese enlace. Es por ello que un enlace C-H absorberá radiación a una longitud de onda distinta que un enlace O-H. Por otro lado, un mismo enlace también puede experimentar tipos diferentes de vibración y puede absorber energía a más de una longitud de onda (Fessenden & Fessenden, 1982).

Los espectros IR se presentan con una gráfica de longitud de onda o número de onda vs porcentaje de transmitancia (Fessenden & Fessenden, 1982). El número de onda es el inverso de la longitud de onda, tal y como se detalla a continuación (McMurry, 2018):

$$\tilde{\nu} (cm^{-1}) = \frac{1}{\lambda (cm)}$$

En este tipo de gráfica se pueden detectar picos o bandas de absorción propias de cada enlace, lo cual los hace extremadamente útiles para la identificación de grupos funcionales. Para los compuestos orgánicos, se utiliza una escala que va desde 4000 cm^{-1} hasta 670 cm^{-1} o menos, donde se pueden identificar los grupos funcionales por vibraciones de alargamiento en la región entre 4000 cm^{-1} y 1400 cm^{-1} . Por otra parte, la región entre 1400 cm^{-1} y 700 cm^{-1} se conoce como la región de huella dactilar. En esta zona se encuentran vibraciones de alargamiento y flexión y, es donde se encuentra el patrón de picos único para cada molécula (Fessenden & Fessenden, 1982).

La interpretación de estos espectros se realiza con cartas de correlación (Fessenden & Fessenden, 1982). A lo largo de los años, los científicos han logrado identificar y asociar ciertos tipos de enlaces con sus correspondientes longitudes de onda. Al tener en cuenta estos datos, es que se puede relacionar un pico en el espectro

con la existencia de un determinado grupo funcional dentro de la estructura de la molécula que está analizando.

1.5.2. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear tiene el objetivo de establecer el esqueleto de carbono e hidrógeno de una molécula, complementando así la información de otras técnicas analíticas para la determinación estructural de dicha molécula (McMurry, 2018).

Para poder explicar el fundamento de la espectroscopía por RMN, se deben tener en cuenta algunas consideraciones:

- Primero, se conoce que diversos tipos de núcleos atómicos se encuentran girando alrededor de un eje y que estos pueden interactuar con un campo magnético externo. De no existir un campo electromagnético externo, los espines se orientan al azar, pero si existe su influencia, los espines se alinearán con el campo de forma paralela o contraria al campo. Entonces, si se aplica radiación electromagnética de una determinada frecuencia y los núcleos absorben esta energía, estos invertirán su espín de un estado basal a uno de mayor energía. En esta situación se puede decir que los núcleos están en resonancia con la radiación incidente (McMurry, 2018).
- Segundo, se sabe que los núcleos con un número impar de protones y los núcleos con un número impar de neutrones pueden manifestar el fenómeno de RMN debido a que poseen propiedades magnéticas. Algunos ejemplos son los núcleos de ^1H , ^2H , ^{13}C , ^{14}N , ^{19}F y ^{31}P (McMurry, 2018), siendo los núcleos

de ^1H y ^{13}C los más analizados, debido a que conforman el esqueleto de todas las moléculas orgánicas.

- Tercero, la frecuencia a la que cada núcleo de ^1H o ^{13}C absorbe energía no es la misma. Esto ocurre a causa de los electrones que orbitan los núcleos, los cuales poseen campos magnéticos locales que son opuestos al campo aplicado y hacen que el campo efectivo que afecte al núcleo sea ligeramente menor que el campo aplicado (McMurry, 2018 & Solomons, 2004). En otras palabras, la frecuencia a la que un núcleo absorbe energía depende de la naturaleza química de la muestra y del entorno (solvente, aditivos de la muestra, etc.) y; en consecuencia, se puede identificar diferentes tipos de enlaces químicos por sus frecuencias características.

Entonces, se puede decir que el fundamento de la espectroscopía de RMN radica en la irradiación de núcleos magnéticos con ondas de radiofrecuencia en el rango de los MHz, que varían según la instrumentación utilizada (McMurry, 2018). Estas ondas generan la excitación de los núcleos para que luego regresen a su estado basal, momento en el cual el detector del instrumento capta la diferencia de potencial y lo traduce en una señal que luego será convertida en un espectro visible (Solomons, 2004).

Los espectros de RMN pueden ser unidimensionales y bidimensionales. Los espectros unidimensionales son los más utilizados, ya que en ellos se puede analizar la cantidad de núcleos de H y C que tiene la molécula, así como la multiplicidad de las señales (proximidad), la cantidad de núcleos que corresponden a una señal (integración) y algunos grupos funcionales o tipos de enlaces que poseen (Solomons, 2004). Por otro

lado, los espectros bidimensionales son generalmente el producto de ensayos de correlación homonuclear y heteronuclear y, son utilizados para establecer proximidad entre núcleos, especialmente en moléculas más grandes y complejas.

En los espectros unidimensionales, el eje horizontal corresponde a la fuerza del campo efectivo que afecta a los núcleos, que está dado por el desplazamiento químico, mientras que el eje vertical corresponde a la intensidad de la absorción de la energía de radiofrecuencia aplicada. Es importante mencionar también que cada señal en el espectro pertenece a un núcleo químicamente distinto dentro de la molécula (McMurry, 2018).

El lugar en el espectro en el cual un núcleo absorbe radiación se denomina desplazamiento químico, que además corresponde al eje horizontal del espectro de RMN. Debido a que no todos los espectrómetros trabajan con la misma radiofrecuencia, la escala de este eje no es fija, por lo que es necesario calibrar cada equipo con una escala arbitraria que recibe el nombre de escala δ y que está dada en unidades ppm (McMurry, 2018).

$$\delta = \frac{\text{Desplazamiento químico del núcleo (Hz)}}{\text{Frecuencia del espectrómetro (MHz)}}$$

Mediante esta relación, se consigue que el desplazamiento químico de un núcleo se vuelva constante, independientemente de la radiofrecuencia a la que trabaje el espectrómetro (McMurry, 2018).

Adicionalmente, la gráfica de RMN siempre debe calibrarse para utilizar un punto de referencia. Para ello se utiliza una molécula llamada tetrametilsilano (TMS), la cual produce un pico de absorción en el equipo y se fija este punto como 0 ppm. El eje

horizontal del espectro de ^1H suele ir desde 0 hasta 20 ppm mientras que en el espectro de ^{13}C suele ir desde 0 hasta 220 ppm (McMurry, 2018).

Asimismo, existe un subtipo de ensayo de RMN de ^{13}C llamado DEPT (Ampliación sin distorsión por transferencia de polarización por sus siglas en inglés), cuyo objetivo es identificar el número de hidrógenos enlazados a cada carbono que posee una molécula. El DEPT-90 muestra sólo señales de carbonos terciarios (CH) y el DEPT-135 muestra señales de carbonos primarios y terciarios (CH_3 y CH) como positivos y señales de carbonos secundarios (CH_2) como señales negativas (McMurry, 2018). Utilizando toda esta información y la del espectro desacoplado de banda ancha de ^{13}C , es posible determinar cuántos y qué tipos de carbonos tiene una molécula.

Por otra parte, algunos de los ensayos bidimensionales más utilizados son el COSY (Espectroscopía de correlación homonuclear por sus siglas en inglés), el HMQC (Espectroscopía de correlación heteronuclear múltiple cuántica por sus siglas en inglés) y el HMBC (Espectroscopía de correlación heteronuclear de enlace múltiple por sus siglas en inglés).

El ensayo COSY permite identificar espines homonucleares acoplados y es utilizado generalmente para correlacionar protones acoplados hasta por 3 enlaces. Finalmente, el ensayo HMQC permite identificar correlaciones entre dos núcleos distintos acoplados o enlazados, tales como C con H, mientras que el ensayo HMBC permite identificar correlaciones entre dos núcleos diferentes acoplados hasta por 3 enlaces (Claridge, 2016).

La gráfica de los espectros bidimensionales también cuenta con dos ejes, que vienen a ser los espectros de los que se está estudiando su correlación. Por ejemplo, un ensayo HMQC producirá una gráfica del espectro de ^1H vs el espectro de ^{13}C . En medio

de esta gráfica se verán manchas o señales, que indicarán cuál señal de uno de los espectros se correlaciona con qué señal del otro espectro.

1.6. Análisis de actividad antibacteriana: Método de difusión en disco

Con el inicio del uso de antibióticos, los microorganismos empezaron a desarrollar resistencia contra ellos, disminuyendo su efectividad. Para estudiar la evolución de este fenómeno y prescribir mejores tratamientos, los médicos de la época de Fleming crearon pruebas en las que sometían a un agente infeccioso a varias concentraciones de un compuesto antimicrobiano para determinar si el patógeno era susceptible o resistente a dicha sustancia y en qué concentración (Hudzicki, 2012).

El “gold standard” de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana es el método de las diluciones seriadas, sin embargo, realizar este método demanda mucho tiempo y recursos. Es así que se creó el método de difusión en disco, que posee la ventaja de consumir menos recursos y dar resultados en un menor tiempo (Hudzicki, 2012).

A comienzos de la década de los años 1950, los laboratorios y los investigadores utilizaban sus propios procedimientos para ejecutar sus tareas, lo cual llevó a diversas variaciones del método en cuanto al tipo de medio de cultivo, concentración del inóculo, tiempo y temperatura de incubación, etc. (Hudzicki, 2012). Esto continuó hasta que Kirby *et al* (1966) realizaron una revisión exhaustiva de la literatura y contrastaron los protocolos existentes, seguido del desarrollo de múltiples experimentos para luego publicar un estudio actualizado que contenía lineamientos y recomendaciones para la realización del método de difusión en disco, así como una pequeña guía para la interpretación de algunos resultados (Kirby *et al*, 1966).

Sin embargo, Kirby *et al* (1966) mencionaron que la guía para interpretación de resultados que proponían era únicamente aplicable para el agar Mueller-Hinton como medio de cultivo, debido a que realizar cambios en el método que desarrollaron podía generar un margen de error considerable en los resultados. Dicho argumento fue comprobado también por Nassar *et al* (2019), quienes concluyeron en su investigación que el uso de agar nutritivo ocasionaba resultados discrepantes e irrepetibles, frente al uso de agar Mueller-Hinton que otorgaba una mejor precisión.

Con la finalidad de elaborar un procedimiento estandarizado para el método de difusión en disco, la OMS tomó de referencia la investigación de Kirby *et al* (1966) y, es en honor a sus contribuciones, que también se le denomina la “prueba de difusión en disco Kirby-Bauer” (Hudzicki, 2012).

Como se ha mencionado anteriormente, el objetivo del método de difusión en disco es determinar la sensibilidad o resistencia de un patógeno aerobio o anaerobio facultativo ante una sustancia con propiedades antimicrobianas (Hudzicki, 2012).

Esta evaluación se consigue colocando un disco de papel impregnado con una sustancia en la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton inoculada con el patógeno. Debido a que el agar es un medio semi-sólido y poroso, la sustancia antimicrobiana empezará a difundirse a través de él, de forma simultánea con el crecimiento del patógeno. En caso sea resistente, el patógeno se sobrepondrá al efecto inhibitorio de la sustancia y crecerá alrededor del disco, pero en el caso de que el patógeno sea susceptible, se formará un halo de inhibición alrededor del disco donde no crecerá el patógeno (Hudzicki, 2012).

La concentración del compuesto antimicrobiano en el borde del halo es aproximadamente igual a la concentración mínima inhibitoria de la prueba de diluciones seriadas, sin embargo, es dificultoso calcularla. Es debido a ello que se considera un

ensayo cualitativo o semi-cuantitativo en el mejor de los casos, ya que el diámetro del halo observado corresponde a muchos factores como el tipo de microorganismo, la profundidad del agar, el peso molecular y tamaño de la sustancia antibacteriana, etc. La única manera de determinar fehacientemente la resistencia y susceptibilidad a los antibióticos es con una prueba *in vivo* de sangre y orina (Hudzicki, 2012).



SEGUNDA PARTE: METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Material de vidrio

- Balones de fondo redondo 100 mL, 200 mL.
- Probetas 10 mL, 50 mL, 100 mL.
- Fiola 100 mL.
- Pipetas 5 mL, 10 mL.
- Beakers 100 mL, 250 mL, 500 mL.
- Matraces 125 mL, 150 mL.
- Matraz Kitasato 1 L.
- Embudo Büchner.
- Bagueta.
- Embudo de vidrio sin vástago.
- Tubos de vidrio para RMN (5 mm de diámetro x 18 cm de largo).
- Desecador.
- Tubos de ensayo.
- Placas Petri de 20 mL.

2.1.2. Reactivos

- 4-Metoxi-benzaldehído (Merck).
- 4-Hidroxi-acetofenona 99 % (Sigma-Aldrich).
- 4-Hidroxi-benzaldehído (Merck).
- 4-Metoxi-acetofenona 99 % (Sigma-Aldrich).
- Cuminaldehído 98 % (Sigma-Aldrich).
- Ácido Clorhídrico fumante 37 % (Merck).
- Hidróxido de potasio (Delta Química S.R.L.).

- Alcohol etílico absoluto >99 % (J.T. Baker).
- Dimetilsulfóxido-d₆ (Sigma-Aldrich).
- Cloroformo-d₆ (Sigma-Aldrich).
- Agar Mueller-Hinton (BD).

2.1.3. Insumos

- Papel toalla.
- Papel filtro Whatman N°1.
- Papel aluminio.
- Alcohol.
- Agua destilada.
- Frascos de vidrio.
- Espátulas.
- Guantes resistentes al calor.
- Agitadores magnéticos tipo A y B.
- Tapón de jebe.
- Papel indicador de pH.
- Soporte universal.
- Cubetas de cuarzo de 1 cm x 1 cm.
- Pinzas.
- Perforador.
- Solución salina estéril.
- Jeringa.
- Asa de kolle.
- Parafilm.
- Vernier.
- Discos de susceptibilidad antimicrobiana.
- Pinzas.

- Mechero.
- Hisopos estériles.
- Bolsas de polipropileno.
- Papel Kraft.

2.1.4. Equipos

- Refrigerador.
- Campana de extracción HNG.
- Agitador magnético con calefacción Velp Scientifica F20530162.
- Agitador magnético con calefacción BioSan Intelli-Stirrer MSH-300.
- Estufa Binder FD53.
- Bomba de vacío Merck Millipore WP6222050.
- Balanza analítica Kern ABS 220-4N.
- Estereoscopio Huvitz HHSZ-600.
- Equipo de espectroscopía IR Thermo Fisher.
- Equipo de espectroscopía benchtop NMR Magritek Spinsolve 80 MHz Carbon.
- Espectrofotómetro Shimadzu PharmaSpec UV-1700.
- Cámara de flujo clase II A2 Biobase.
- Vortex Barnstead International M37610-33.
- Incubadora Memmert.
- Autoclave Biobase.

2.1.5. Material biológico

- *Escherichia coli* WDCM 00013 Vitroids.
- *Staphylococcus aureus* WDCM 00034 Vitroids.

2.1.6. Herramientas informáticas

- Software Statgraphics

- Software MestReNova
- SciFinder-n

2.2. Metodología

2.2.1. Síntesis de chalconas

Se sintetizaron tres chalconas hidroxiladas mediante condensación de Claisen-Schmidt de acuerdo al esquema de la Figura 10. Cada molécula se sintetizó bajo tres condiciones de reacción para ser comparadas entre sí en cuanto a su rendimiento.

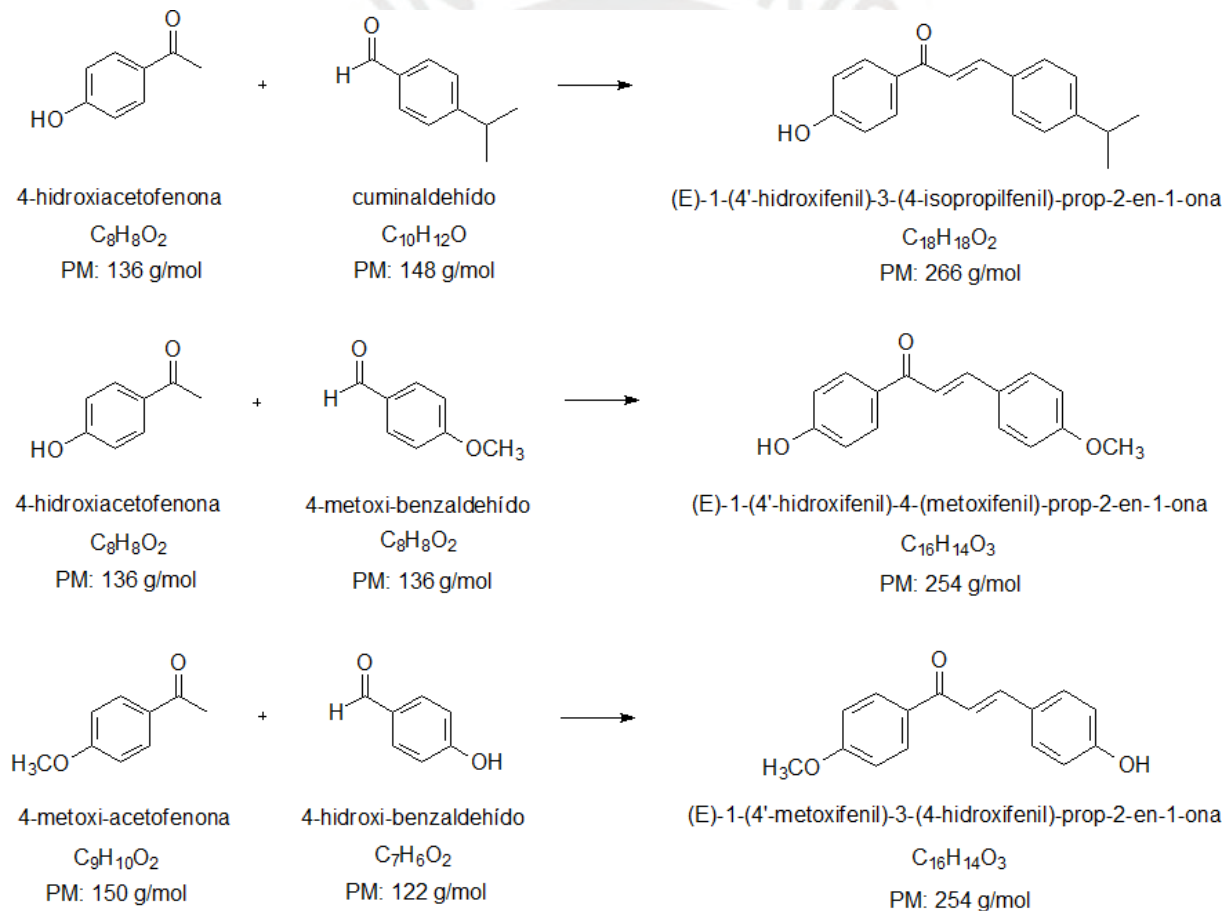


Figura 10. Esquema de síntesis de chalconas hidroxiladas.

Para el primer tratamiento, se colocaron 5 mmol de cada reactante en un balón de fondo redondo, 10 mL de etanol y 10 mL de solución de KOH 10 % (17,9 mmol de KOH). El sistema se dejó en un agitador magnético durante 24 horas a 300 rpm. Luego de la reacción, se precipitó la chalcona añadiendo una solución de HCl 2 M (Khanapure *et al*, 2018), se llevó a 4 °C durante 30 minutos y finalmente se filtró al vacío.

Únicamente para la tercera molécula es que, luego de la acidificación, en vez de llevarse a 4 °C durante 30 minutos, se tuvo que verter el contenido del balón en un beaker con hielo molido. Acto seguido, se filtró al vacío.

Para el segundo tratamiento, se colocaron 5 mmol de cada reactante en un balón de fondo redondo, 10 mL de etanol y 5 mL de solución de KOH 20 % (17,9 mmol de KOH). El sistema se dejó en un agitador magnético durante 24 horas a 300 rpm. Luego de la reacción, se precipitó la chalcona añadiendo una solución de HCl 2 M y acto seguido, se agregó 5 mL de agua destilada. Se llevó a 4 °C durante 30 minutos y finalmente se filtró al vacío.

Para el tercer tratamiento, se colocaron 5 mmol de cada reactante, 10 mL de etanol y 1 g de KOH (17,9 mmol de KOH). El sistema se dejó en un agitador magnético durante 24 horas a 300 rpm. Luego de la reacción, se precipitó la chalcona añadiendo una solución de HCl 2 M y acto seguido, se agregaron 10 mL de agua destilada. Se llevó a 4 °C durante 30 minutos y, finalmente se filtró al vacío.

En todos los tratamientos, luego de haber separado la chalcona por filtración, el sólido obtenido se llevó al desecador durante 24 horas antes de pesarse para calcular el rendimiento final. Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado.

Posteriormente, cada chalcona fue recristalizada para observar sus características organolépticas y aumentar su pureza para el ensayo de

susceptibilidad antimicrobiana.

2.2.2. Caracterización y elucidación estructural de las chalconas sintetizadas

2.2.2.1. Caracterización y elucidación estructural por IR

Las chalconas sólidas fueron colocadas dentro del cristal y luego fueron llevadas a lectura en el equipo de IR mediante 4 barridos en el rango de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} .

2.2.2.2. Caracterización y elucidación estructural por RMN

Las chalconas sintetizadas fueron disueltas en $500\text{ }\mu\text{L}$ de DMSO-d_6 y llevadas a lectura en el equipo de RMN. Se realizaron los análisis de RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT, RMN bidimensionales COSY, HMBC y HMQC.

2.2.3. Evaluación de la capacidad antibacteriana de las chalconas sintetizadas

Para realizar la evaluación de la actividad antimicrobiana, se modificó ligeramente el "Protocolo de la prueba de susceptibilidad de difusión en disco de Kirby-Bauer", aceptado por la Sociedad Americana de Microbiología (Hudzicki, 2012).

- **Preparación de las soluciones de chalcona:**

Se prepararon 7 soluciones por cada una de las tres chalconas, partiendo de una solución madre de $2000\text{ }\mu\text{g/mL}$ de la chalcona en DMSO (Khan & Asiri, 2017).

Esta solución se diluyó a 50 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL y 1000 µg/mL en frascos de vidrio.

- **Preparación de la escala de McFarland:**

Se pesaron 0,4992 g de BaCl₂ y se llevaron a 50 mL para preparar una solución de 0,048 M de BaCl₂. Por otro lado, 960 µL de H₂SO₄ cc se llevaron a 100 mL para obtener la solución 0,18 M de H₂SO₄ según el protocolo. Seguidamente, se colocó 0,5 mL de la solución 0,048 M de BaCl₂ junto con 99,5 mL de la solución 0,18 M de H₂SO₄ en un beaker con agitación. Finalmente, la solución resultante se midió en el espectrofotómetro a 625 nm para verificar su absorbancia.

- **Preparación del medio de cultivo:**

Antes de preparar el medio de cultivo, se esterilizaron las placas Petri mediante calor seco en la estufa a 170 °C durante 2 horas.

Se pesaron 8,5 g de agar Mueller-Hinton y se disolvieron en 500 mL de agua destilada. La solución se llevó a ebullición para facilitar su disolución y después fue llevada al autoclave a 121 °C y a 15 psi durante 30 minutos.

Posteriormente, el medio esterilizado se vertió en las placas Petri anteriormente esterilizadas, colocando aproximadamente 25 mL de medio en cada una. Finalmente, se dejó que el medio solidificara a temperatura ambiente y se guardaron las placas a 4 °C hasta su uso.

- **Preparación del inóculo:**

Previo a la preparación del inóculo, el día anterior del ensayo se sembró por estría dos placas con los microorganismos *Escherichia Coli* y *Staphylococcus aureus* respectivamente, de manera que los microorganismos a utilizar se encontraran en su fase logarítmica de crecimiento.

Para la preparación del inóculo de cada una de las bacterias, se tocaron las colonias bacterianas con un asa de Kolle, se suspendieron en un tubo de ensayo con 5 mL de solución salina estéril y luego se homogenizó con ayuda de un vortex. Se continuaron adicionando más colonias bacterianas hasta que la turbidez de la suspensión bacteriana fuera similar a la de la escala de McFarland 0,5 preparada.

- **Inoculación del medio de cultivo:**

Se introdujo un hisopo estéril dentro del inóculo y se removió el exceso de líquido escurriéndolo contra la pared del tubo. Seguidamente se pasó el hisopo por sobre la placa en un patrón de estría 3 veces, rotando cada vez la placa aproximadamente 60 grados para cubrir la totalidad de la superficie del agar.

- **Distribución de los discos de susceptibilidad antimicrobiana:**

Los frascos de vidrio y las pinzas también fueron esterilizados mediante calor seco en estufa a 170 °C durante 2 horas.

Con un perforador, se cortaron pequeños discos de papel filtro Whatman N°1, con un diámetro de aproximadamente 6 mm. Estos discos se colocaron dentro de una placa Petri y se esterilizaron en estufa a 170 °C durante 2 horas.

Los discos de papel filtro se sumergieron en las soluciones diluidas de las chalconas y luego se colocaron sobre la superficie del agar inoculado con ayuda de una pinza. Es importante mencionar que entre disco y disco, la pinza se sumergió en alcohol y luego se llevó a la llama de un mechero para esterilizarla.

Una vez que se distribuyeron todos los discos, se taparon las placas y se guardaron invertidas en la incubadora a 35 °C durante 18 horas. Este experimento se realizó por cuadruplicado, por cada bacteria y por cada chalcona.

- **Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana:**

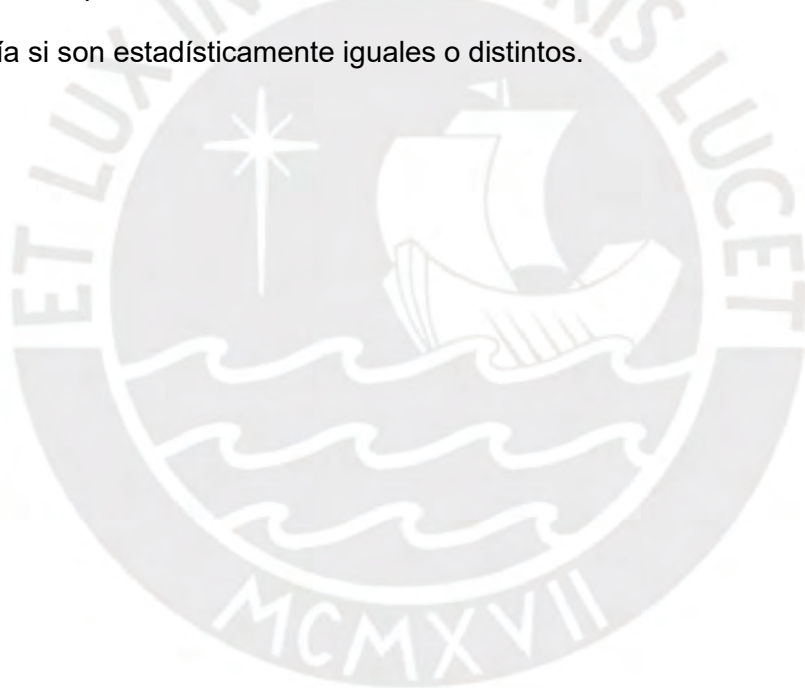
Una vez que finalizó la incubación de las placas durante 18 horas, éstas fueron evaluadas en busca de halos de inhibición. Se determinaron las concentraciones que presentaron inhibición microbiana y se midieron su radio y diámetro con un vernier.

2.2.4. Métodos estadísticos

Para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos de

síntesis, inicialmente se evaluaría la distribución de los datos. De tener una distribución normal, se procedería con un análisis ANOVA para analizar dicha diferencia y con una prueba de rangos múltiples, para establecer entre qué grupos existe esa diferencia. De no tener la distribución normal, se evaluaría realizar otro tipo de análisis estadístico.

Por otra parte, si alguna chalcona lograba presentar actividad antibacteriana, se compararía con los controles positivos y el tamaño de sus halos de inhibición. Si a una determinada concentración, los halos eran similares numéricamente, se aplicaría una prueba t-student para una muestra. En esta prueba se contrastarían los datos de los halos generados por la chalcona a dicha concentración con el halo del antibiótico y se determinaría si son estadísticamente iguales o distintos.



TERCERA PARTE: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Síntesis de chalconas

3.1.1. Chalcona 1: (E)-1-(4'-hidroxifenil)-3-(4-isopropilfenil)-prop-2-en-1-ona

En la Figura 11 se puede observar organolépticamente la evolución de la reacción de la chalcona 1 bajo los tres tratamientos aplicados. Se evidencia notoriamente una mayor intensidad de color en el tratamiento con el KOH sólido con respecto a los otros tratamientos, tanto a los 10 minutos como a las 24 horas de iniciada la reacción. Por ello y por los resultados del rendimiento de las síntesis (Tabla 2), se puede enunciar que, a pesar de que la reacción haya tenido un inicio lento en el tercer tratamiento, se ha generado una mayor cantidad de producto.

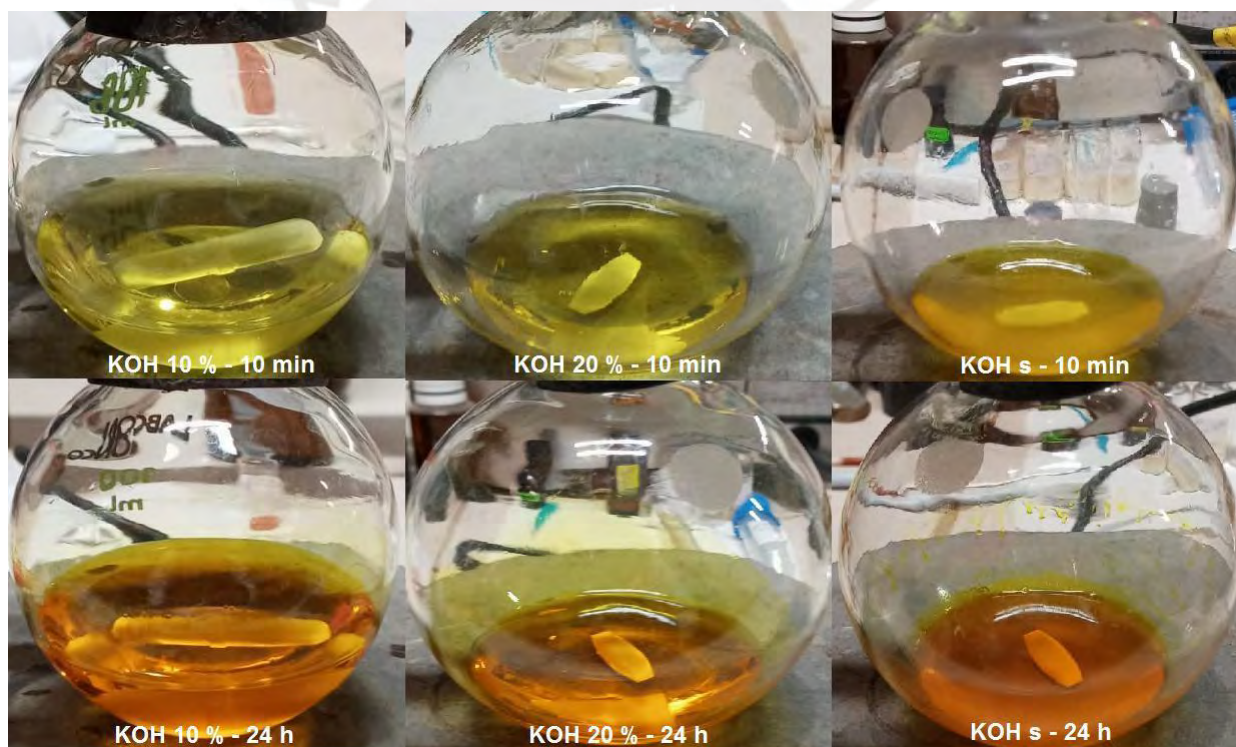


Figura 11. Síntesis de la chalcona 1 bajo los tres tratamientos.

En las figuras 12 y 13 se presenta la forma y color final de la chalcona obtenida luego de su recristalización. Se puede ver que la chalcona 1 adopta la forma de cristales en forma

de aguja, que son de color blanco-amarillentos.

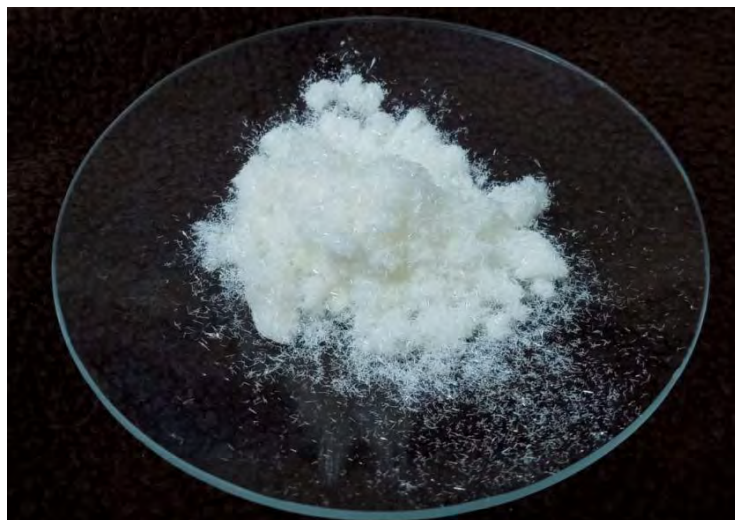


Figura 12. Cristales de la chalcona 1.



Figura 13. Cristales de la chalcona 1 vistos en el estereoscopio.

3.1.2. Chalcona 2: (E)-1-(4'-hidroxifenil)-4-(metoxifenil)-prop-2-en-1-ona

En la Figura 14 se puede observar la evolución de la reacción de la chalcona 2 bajo los tres tratamientos aplicados. De igual manera que con la chalcona 1, se evidencia una mayor intensidad de color en el tratamiento con el KOH sólido con respecto a los otros tratamientos.

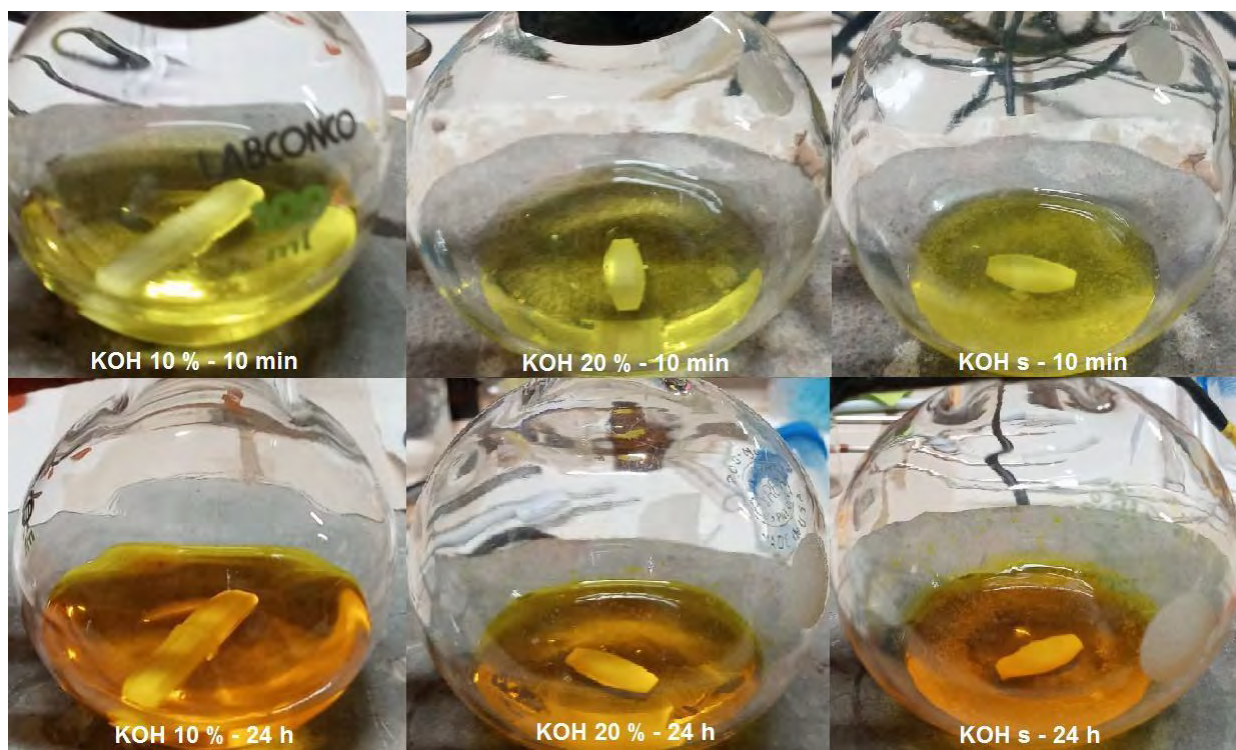


Figura 14. Síntesis de la chalcona 2 bajo los tres tratamientos.

La chalcona 2 obtiene la forma de cristales en forma de aguja de color amarillo pálido, tal y como se puede apreciar en las figuras 15 y 16.

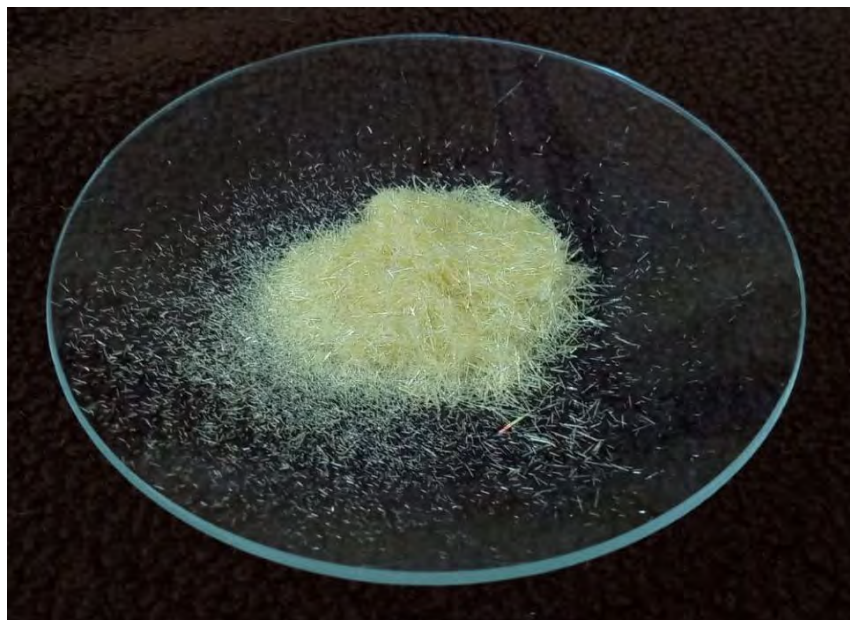


Figura 15. Cristales de la chalcona 2.



Figura 16. Cristales de la chalcona 2 vistos en el estereoscopio.

3.1.3. Chalcona 3: (E)-1-(4'-metoxifenil)-3-(4-hidroxifenil)-prop-2-en-1-ona

En la Figura 17 se puede observar la evolución de la reacción de la chalcona 3 bajo los tres tratamientos aplicados. En esta chalcona es donde se advierte la mayor diferencia en la intensidad de color del tratamiento con el KOH sólido con respecto a los otros tratamientos y, con los resultados de la Tabla 2, se sabe que es indicador de un aumento significativo en el rendimiento de esta reacción. Adicionalmente, se puede constatar que la chalcona 3 es la molécula que puede pigmentar con mayor intensidad frente a las demás chalconas estudiadas.

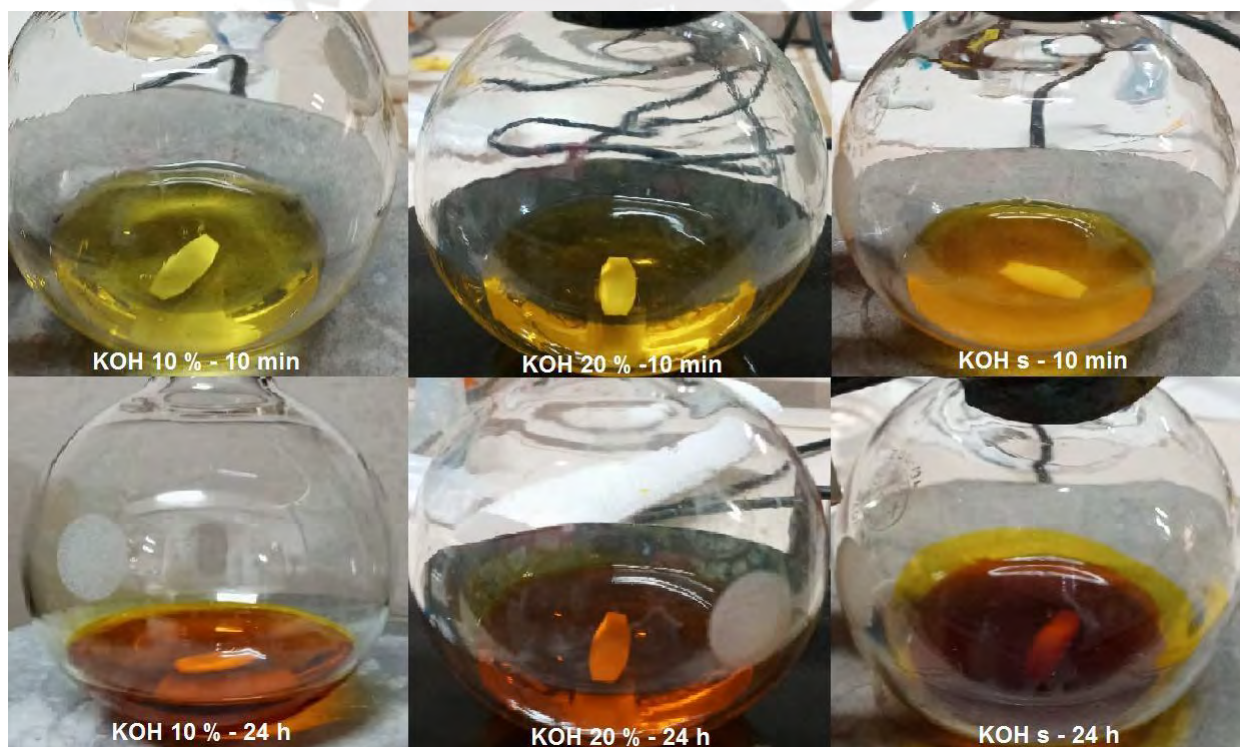


Figura 17. Síntesis de la chalcona 3 bajo los tres tratamientos.

La chalcona 3 adopta la forma de cristales con forma de aguja de color amarillo oscuro, tal y como se puede apreciar en las figuras 18 y 19.

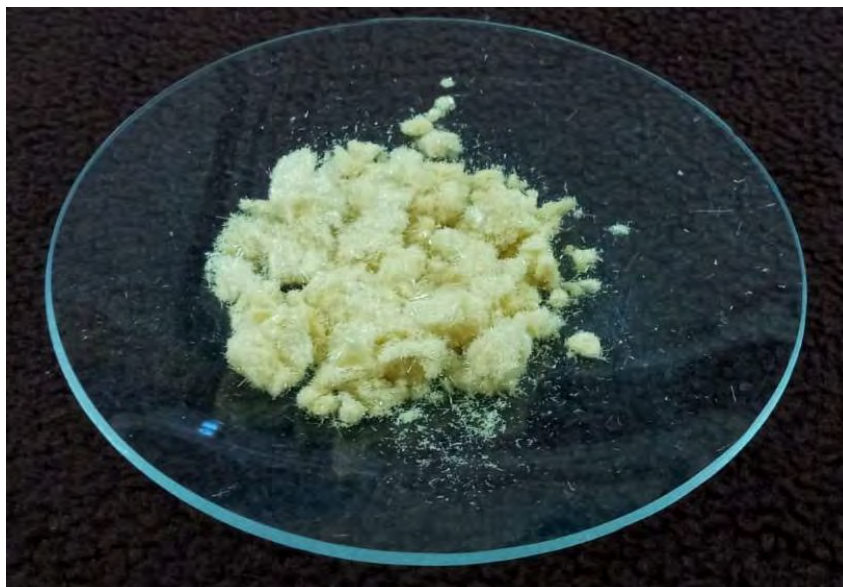


Figura 18. Cristales de la chalcona 3.



Figura 19. Cristales de la chalcona 3 vistos en el estereoscopio.

3.1.4. Análisis de resultados

En una primera instancia y previo al análisis estadístico, se puede observar en los resultados detallados en la Tabla 2, que el tratamiento 3 tiene mejores rendimientos que el tratamiento 2 y este, a su vez, es ligeramente mejor que el tratamiento 1.

Tabla 2. Resultados de las síntesis de chalconas por cada tratamiento.

		Rendimiento de la reacción					
		Tratamiento 1		Tratamiento 2		Tratamiento 3	
Chalcona 1	1	54,07 %	1	53,56 %	1	77,36 %	
	2	52,93 %	2	55,78 %	2	76,91 %	
	3	50,24 %	3	56,19 %	3	76,53 %	
	4	52,20 %	4	55,29 %	4	75,95 %	
Chalcona 2	1	19,43 %	1	22,20 %	1	47,37 %	
	2	20,59 %	2	22,39 %	2	46,04 %	
	3	19,30 %	3	21,95 %	3	48,06 %	
	4	19,48 %	4	24,38 %	4	47,25 %	
Chalcona 3	1	1,54 %	1	2,94 %	1	17,49 %	
	2	1,67 %	2	4,06 %	2	15,58 %	
	3	1,90 %	3	3,19 %	3	17,39 %	
	4	1,36 %	4	3,56 %	4	15,87 %	

Se postula que el tratamiento 3 dio mejores resultados a causa de una mayor concentración del catalizador y de la reducción de la concentración de agua en el inicio de la reacción. Además de ello, en el transcurso de la realización de los ensayos también se encontró diferencias entre los tratamientos que van más allá del rendimiento.

La primera observación fue en la etapa inicial de la reacción, luego de añadir el

catalizador. En el marco teórico se expuso que las chalconas generalmente ostentan colores entre el amarillo y el naranja, por lo que se puede inferir que la aparición de este color en la mezcla de reacción es un indicador visual del inicio de la reacción, dado que todos los reactantes utilizados han sido incoloros.

En el caso del tratamiento 1, el cambio de color fue instantáneo a la adición del catalizador y se logró observar un color amarillo vibrante en las 3 chalconas. En cambio, en el tratamiento 2, el cambio de color fue ralentizado en los 3 casos. La adición del catalizador generó un color amarillo pálido que fue aumentando su intensidad lentamente y que recién se asemejó al color logrado por el tratamiento 1 aproximadamente luego de 10 minutos. Por otro lado, el cambio de color en el tratamiento 3 fue aún más desacelerado. Al agregarse el hidróxido sólido, la reacción empezó a producirse en la superficie del catalizador mientras que este se disolvía, virando el color de las hojuelas de hidróxido antes que la mezcla de reacción. No obstante, al cabo de 10 minutos se consiguió un color más intenso en la mezcla que en los otros tratamientos.

La desaceleración del inicio de la reacción en el tratamiento 3 puede ser debido a la reducida superficie de contacto con el catalizador en el inicio de la reacción, ya que está en fase heterogénea, a diferencia de los otros tratamientos donde el catalizador está en fase homogénea. En los otros casos, la desaceleración parece corresponder a la concentración del catalizador. La relación solvente-catalizador para los tratamientos 1 y 2 es 1:1 y 2:1 respectivamente, por lo que en el primer caso hay más colisiones moleculares y la reacción se lleva a cabo rápidamente. A pesar de todo esto, un inicio lento de la reacción parece relacionarse con un mayor rendimiento.

La segunda diferencia corresponde a la formación de los cristales de chalcona

en la etapa de precipitación. Los cristales que se formaron luego del tratamiento 1 fueron toscos, impuros, bastante amorfos y opacos, por su parte, aquellos que se formaron luego del tratamiento 2 solo fueron ligeramente mejores. Mientras tanto, los cristales que se formaron a partir del tratamiento 3 tenían una forma más definida y un color más intenso y brillante. Esta particularidad hace probable que una mayor concentración de la chalcona (o una menor concentración de agua) en solución favorezca la formación de la estructura cristalina de la molécula y evite la introducción de impurezas en esa estructura. En resumen, el tratamiento 3 es el que produce cristales más definidos y puros.

Para el análisis estadístico se realizó un análisis de varianza multifactorial con los datos de la Tabla 2, donde se analizaron los efectos del tratamiento y del tipo de chalcona sobre el porcentaje de rendimiento de la reacción (Tabla 3). El análisis ANOVA determinó que existe evidencia de que tanto el tratamiento como el tipo de chalcona influyen significativamente en el porcentaje de rendimiento y, que existe además evidencia significativa de interacción entre ambos factores.

Por otra parte, se realizó una prueba de rangos múltiples tanto para los tratamientos (Tabla 4) como para los tipos de chalcona (Tabla 5), para determinar si existía diferencia entre los grupos. En el caso de los tratamientos, se determinó que todos son diferentes y que el mejor tratamiento es el que utiliza KOH sólido, seguido por el que usa KOH 20 % y 10 % respectivamente. Y en el caso de los tipos de chalconas, también se determinó que todos los grupos son distintos y existe evidencia estadística que la chalcona 1 es la que se obtiene en mayor cantidad, seguida por la chalcona 2 y la chalcona 3 respectivamente.

Tabla 3. ANOVA multifactorial para el porcentaje de rendimiento.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Efectos Principales					
A: Tratamiento	3559,08	2	1779,54	2033,86	0,0000
B: Tipo de chalcona	17787,2	2	8893,58	10164,61	0,0000
Interacciones					
AB	205,73	4	51,4324	58,78	0,0000
Residuos	23,6238	27	0,874956		
Total	21575,6	35			

Tabla 4. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de rendimiento por tratamiento

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
KOH 10 %	12	24,5592	0,270024	X
KOH 20 %	12	27,1242	0,270024	X
KOH (s)	12	46,8167	0,270024	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tabla 5. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de rendimiento por tipo de chalcona

Tipo de chalcona	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	12	61,4175	0,270024	X
2	12	29,87	0,270024	X
3	12	7,2125	0,270024	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

3.2. Caracterización y elucidación estructural de las chalconas sintetizadas

3.2.1. Caracterización y elucidación estructural por IR

3.2.1.1. Espectro IR de la chalcona 1: (E)-1-(4'-hidroxifenil)-3-(4-isopropilfenil)-prop-2-en-1-ona

En la Figura 20 se tiene el espectro IR de la chalcona 1, donde se pueden identificar algunos picos de sus grupos funcionales característicos. Por ejemplo, se observa un pico acampanado entre 3300 y 3000 cm^{-1} , característico de un alcohol. Entre 3000 y 2900 cm^{-1} se puede observar un pico característico de los alcanos y de enlaces C-H, mientras que los sobretonos encontrados entre 2200 y 1900 cm^{-1} son indicativos de alquenos y de anillos aromáticos. Finalmente, en 1650 cm^{-1} se observa el pico característico del grupo carbonilo.

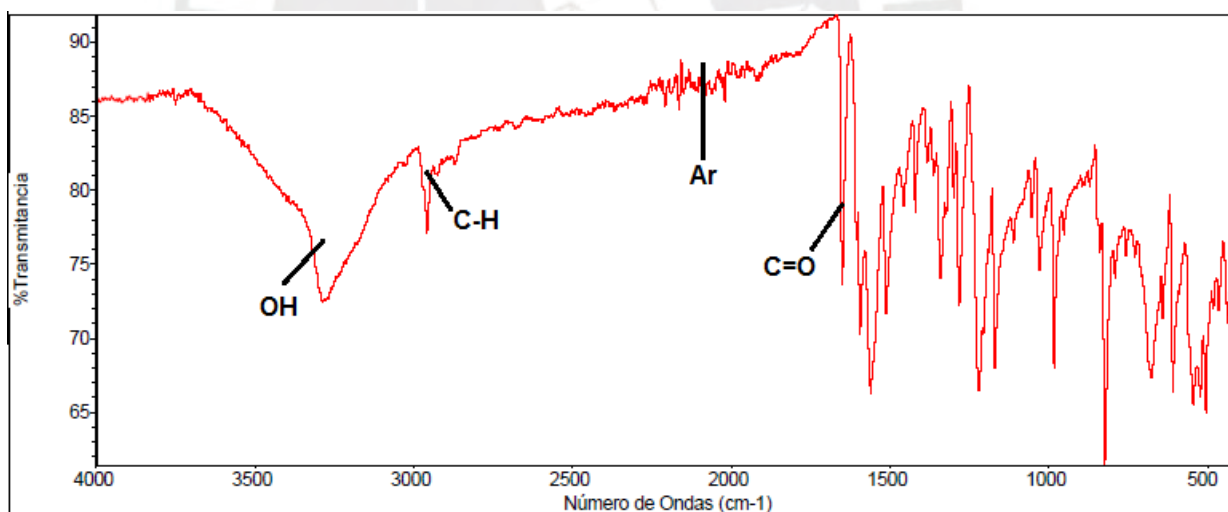


Figura 20. Espectro IR de la chalcona 1.

3.2.1.2. Espectro IR de la chalcona 2: (E)-1-(4'-hidroxifenil)-4-(metoxifenil)-prop-2-en-1-ona

En la Figura 21 se ilustra el espectro IR de la chalcona 2, donde se pueden identificar algunos picos de sus grupos funcionales característicos. Por ejemplo, se observa un gran pico acampanado entre 3300 y 3000 cm^{-1} , característico de un alcohol. Entre 3000 y 2900 cm^{-1} se pueden observar pequeños picos característicos de los alcanos y de enlaces C-H, aunque su intensidad es muy baja debido a que la molécula posee solo un grupo metilo. Por otro lado, se tienen sobretonos entre 2200 y 1800 cm^{-1} , los cuales son indicativos de alquenos y de anillos aromáticos. Finalmente, en 1600 cm^{-1} se observa el pico característico del grupo carbonilo y entre 1200 y 1100 cm^{-1} se ve el pico del enlace C-O, que pertenece al grupo éter.

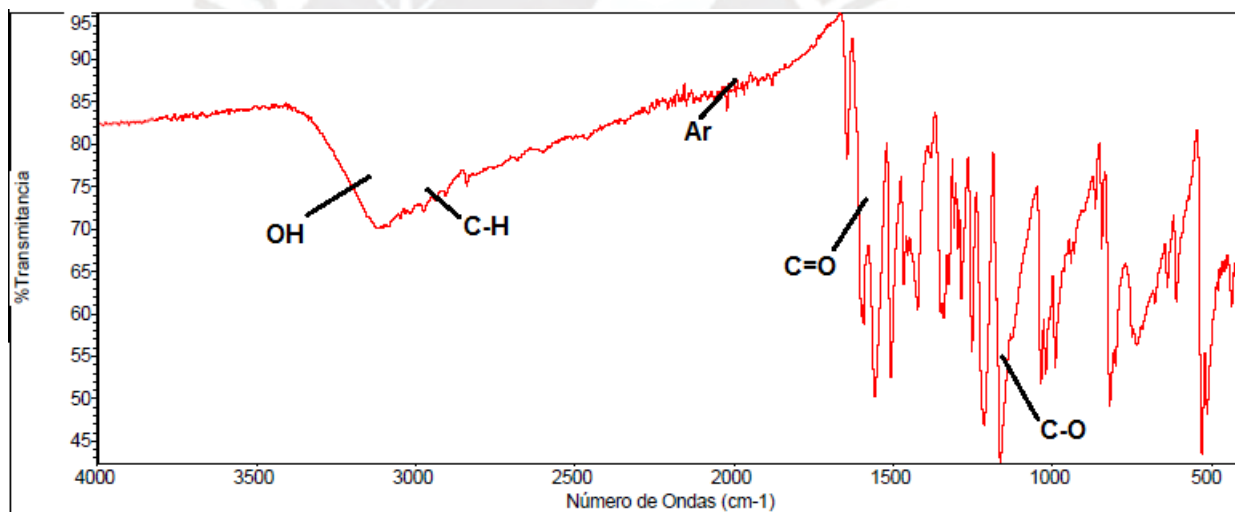


Figura 21. Espectro IR de la chalcona 2.

3.2.1.3. Espectro IR de la chalcona 3: (E)-1-(4'-metoxifenil)-3-(4-hidroxifenil)-prop-2-en-1-ona

En la Figura 22 se tiene el espectro IR de la chalcona 3, donde se pueden identificar algunos picos de sus grupos funcionales. En una primera instancia, se observa un gran pico acampanado entre 3300 y 3000 cm^{-1} , característico de un alcohol. Entre 3000 y 2900 cm^{-1} se pueden observar pequeños picos característicos de los alcanos y de enlaces C-H, aunque su intensidad es muy baja debido a que la molécula posee solo un grupo metilo. Por otra parte, se tienen sobretonos entre 2200 y 1800 cm^{-1} , los cuales son indicativos de alquenos y de anillos aromáticos. Finalmente, en 1650 cm^{-1} se observa el pico característico del grupo carbonilo y entre 1200 y 1100 cm^{-1} se ve el pico del enlace C-O, que pertenece al grupo éter.

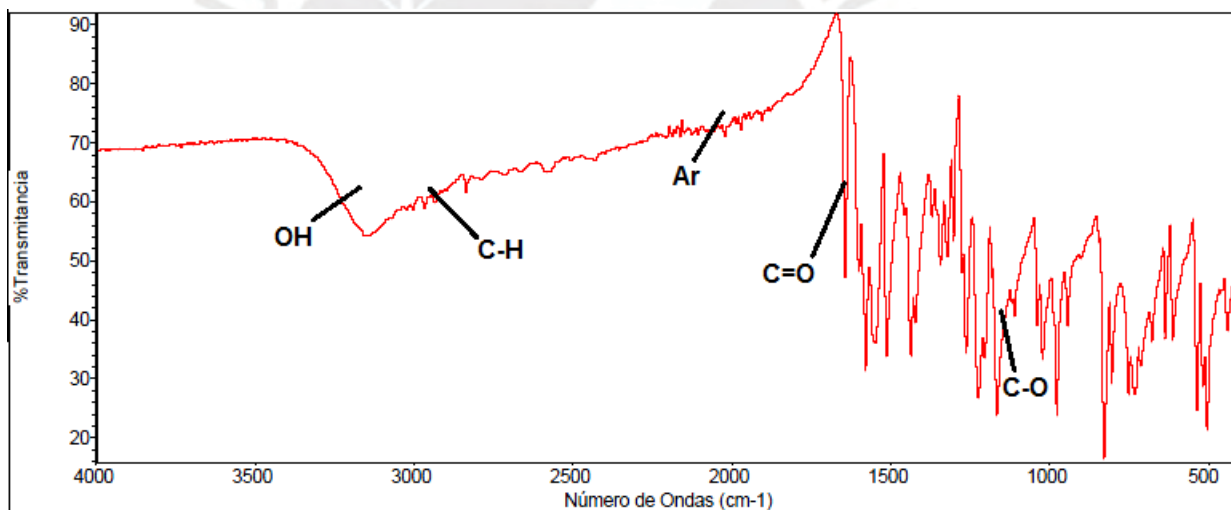


Figura 22. Espectro IR de la chalcona 3.

3.2.2. Caracterización y elucidación estructural por RMN

3.2.2.1. Espectros RMN de la chalcona 1: (E)-1-(4'-hidroxifenil)-3-(4-

isopropilfenil)-prop-2-en-1-ona

En la Figura 23 se puede observar el espectro de ^1H de la chalcona 1, donde se han logrado identificar 7 señales. Debido a la baja potencia del equipo, las señales de los protones 10 y 14, 16 y 17 salieron sobrelapadas, sin embargo, otras señales son bastante resaltantes, como las de los protones 1 y 8 en 1,03 ppm y del protón del hidroxilo 2 en 10,31 ppm.

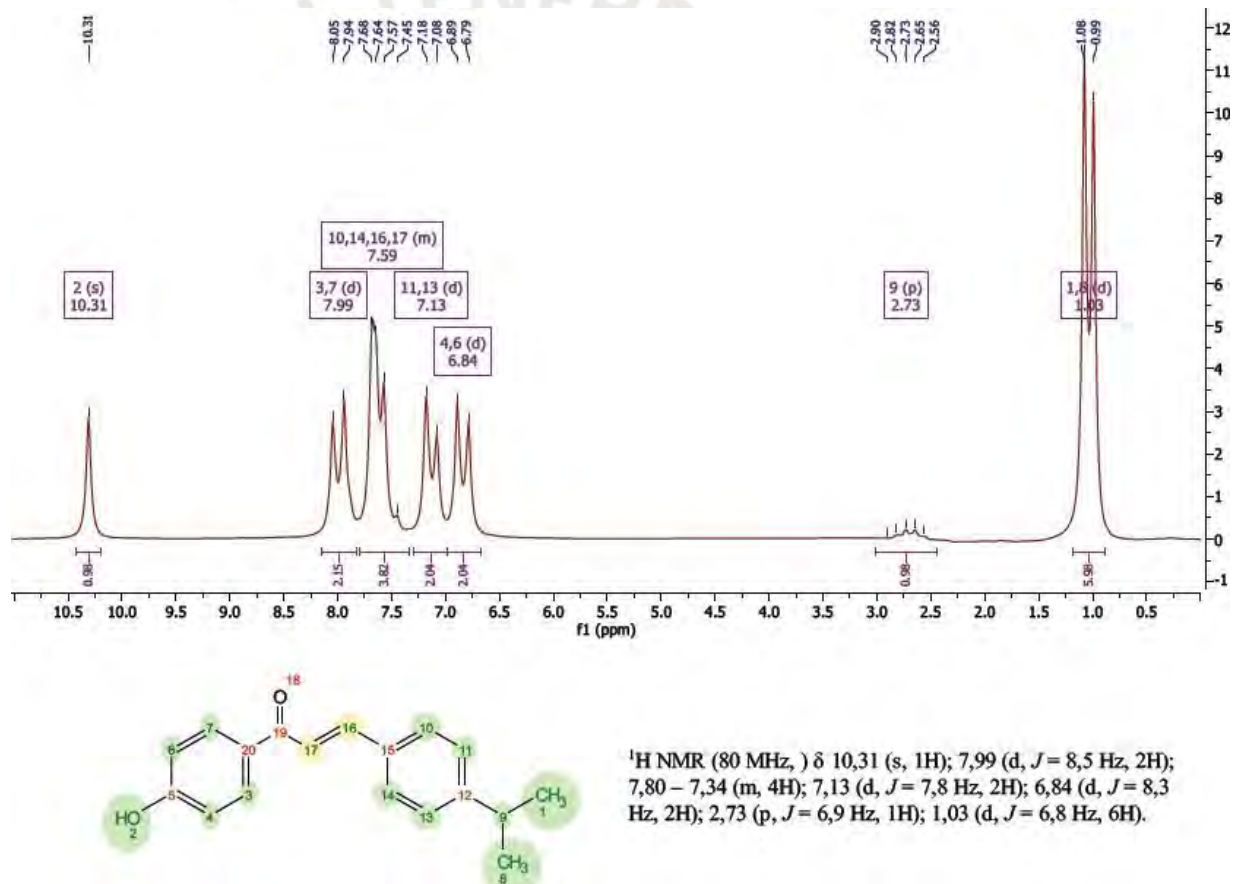


Figura 23. Espectro ^1H de la chalcona 1.

En la Figura 24 se tiene el espectro ^{13}C de la chalcona 1, donde se han logrado identificar 13 señales. Algunos picos resaltantes son los de los carbonos metilo 1 y 8

en 23,88 ppm, el carbono principal del grupo isopropilo 9 en 33,75 ppm y el carbono del grupo carbonilo 19 en 187,53 ppm. Es importante mencionar también que la señal que aparece en 40 ppm corresponde al solvente DMSO y no a la molécula en estudio.

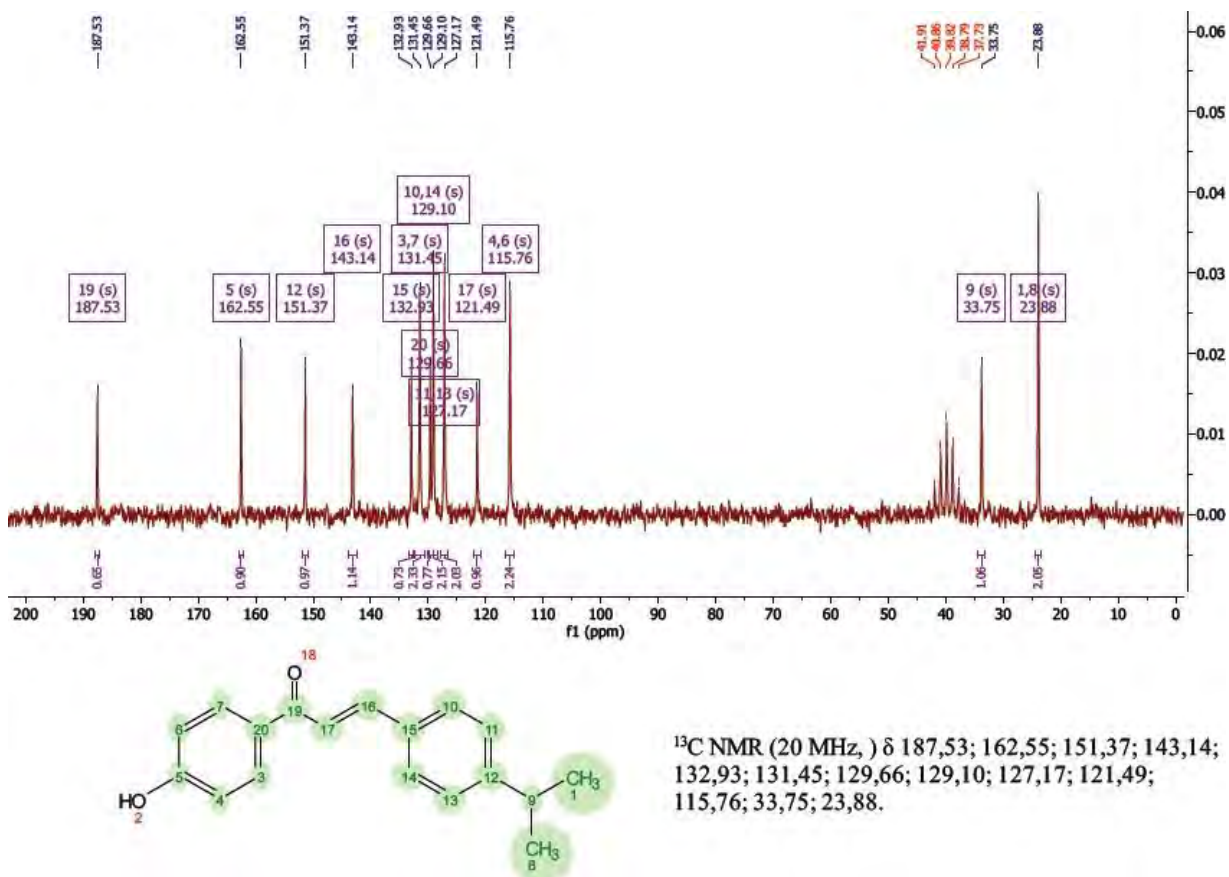


Figura 24. Espectro ^{13}C de la chalcona 1.

Los espectros DEPT se utilizan para determinar el número de carbonos primarios, secundarios y terciarios. En la Figura 25 se encuentran los espectros DEPT 45, 90 y 135 de la chalcona 1, donde se han encontrado 8 señales. Al tomar en cuenta que el espectro de ^{13}C arrojó 13 señales, se puede concluir que 5 de las señales pertenecen a carbonos cuaternarios. Por otra parte, también se puede determinar que todas las señales corresponden a carbonos terciarios (-CH), excepto por la señal en 23,86 ppm (C1 y C8), que corresponde a un carbono terciario debido a que su señal no aparece en el DEPT 90.

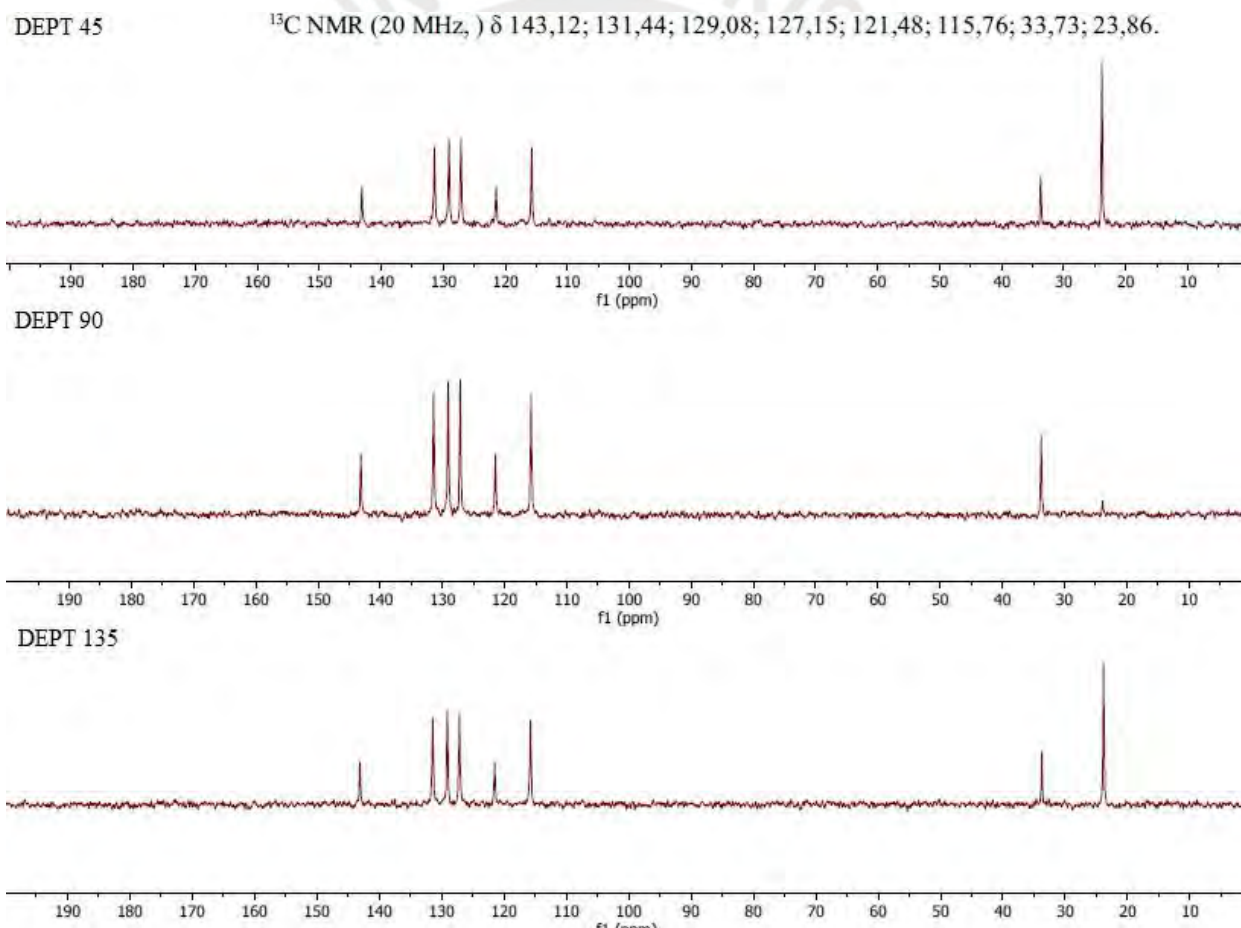
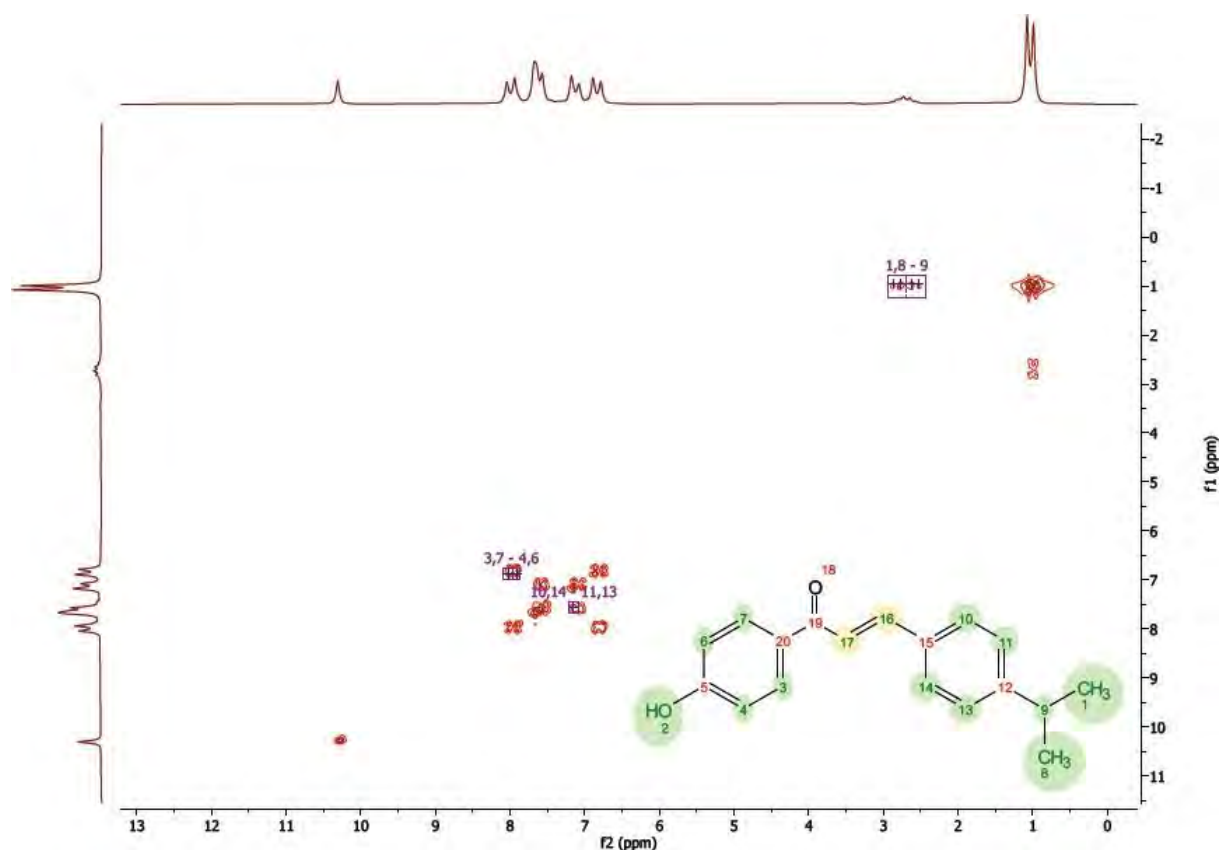


Figura 25. Espectros DEPT 45 - 90 - 135 de la chalcona 1.

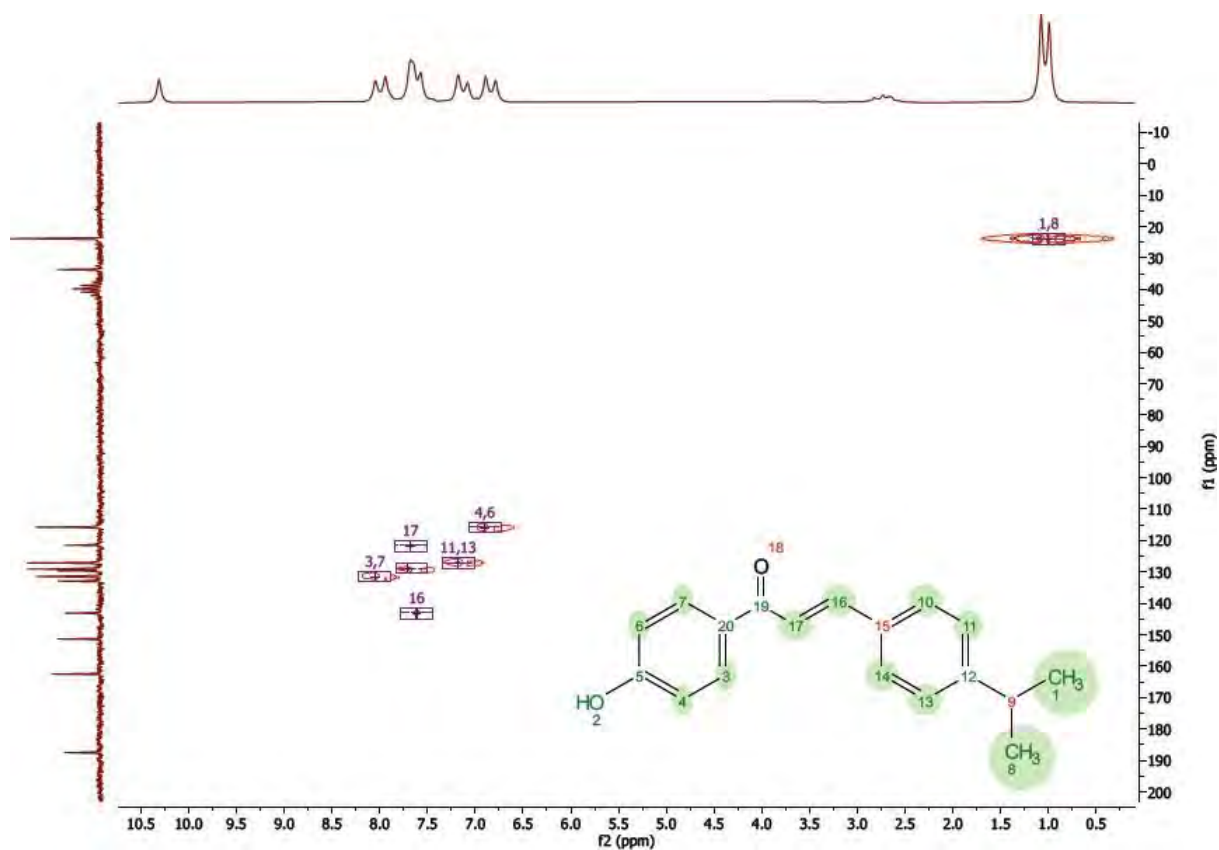
En la Figura 26 se tiene el espectro de correlación COSY de la chalcona 1, que ayuda a identificar los protones que se acoplan entre ellos. Al analizar el espectro, se puede concluir que todas las señales mostradas corresponden a la estructura planteada de la molécula. No obstante, no se evidenció la correlación entre los protones 16 y 17, lo cual es posible que haya sido a causa de la baja potencia del espectrómetro y que haya salido superpuesta con otra señal más fuerte.



Señal	Átomo	Desplazamiento Químico f1	Desplazamiento Químico f2
1.	1, 8 - 9	0,96	2,70
2.	10, 14 - 11, 13	7,56	7,15
3.	3, 7 - 4, 6	6,88	7,97

Figura 26. Espectro COSY de la chalcona 1.

En la Figura 27 se observa el espectro de correlación HMQC de la chalcona 1, que ayuda a identificar los protones y los átomos de carbono que se acoplan entre ellos. Al analizar el espectro, se puede concluir que todas las señales mostradas corresponden a la estructura planteada de la molécula. Naturalmente, los carbonos cuaternarios no mostrarán ninguna señal, sin embargo, no se logró encontrar la señal de la posición 9, posiblemente debido a una superposición con otra señal.



Señal	Átomo	Desplazamiento Químico f1	Desplazamiento Químico f2
1.	1, 8	23,88	1,00
2.	10, 14	129,09	7,71
3.	11, 13	127,16	7,18
4.	16	143,14	7,61
5.	17	121,49	7,68
6.	3, 7	132,93	8,05
7.	4, 6	115,76	6,90

Figura 27. Espectro HMQC de la chalcona 1.

En la Figura 28 se observa el espectro de correlación HMBC de la chalcona 1, que ayuda a identificar los protones y los átomos de carbono que se acoplan entre ellos a través de dos, tres o cuatro enlaces. Al analizar el espectro, se puede concluir que todas las señales mostradas corresponden a la estructura planteada de la molécula.

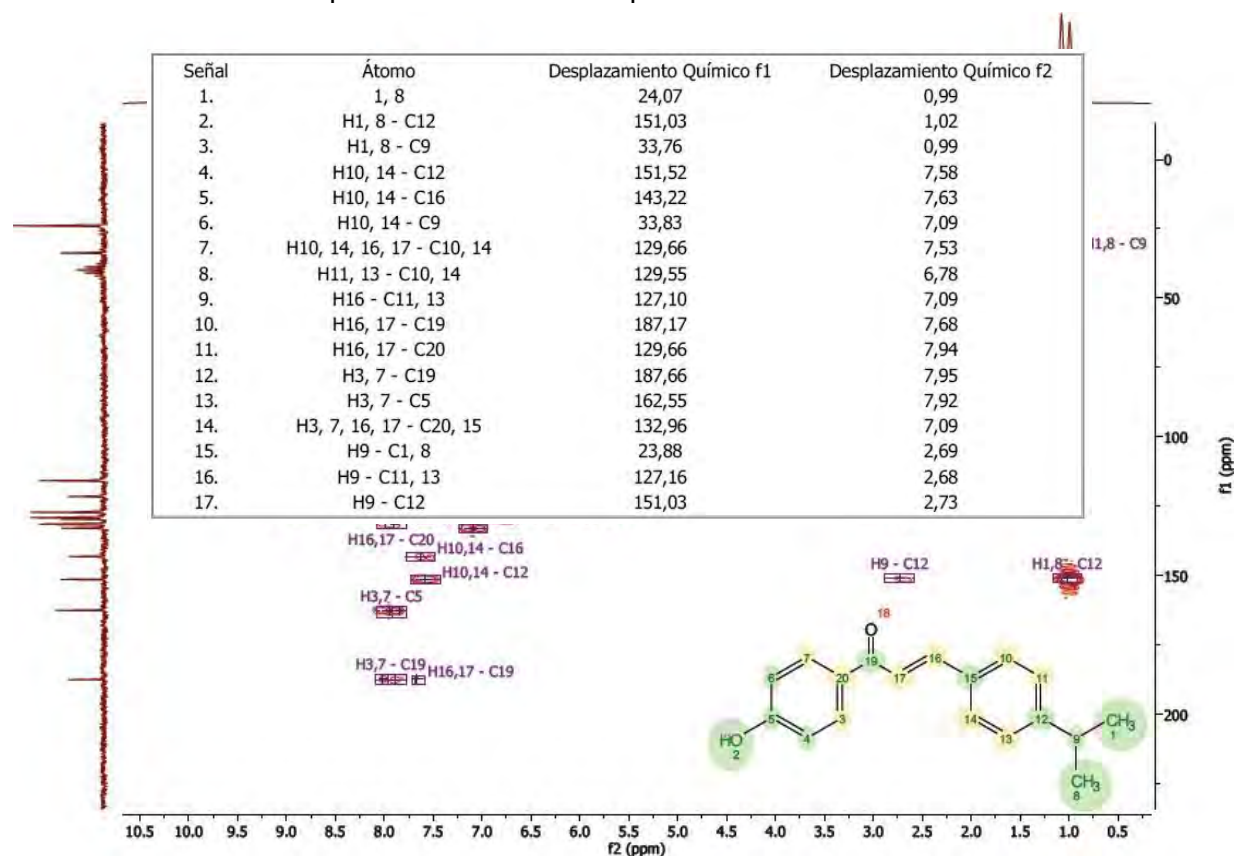


Figura 28. Espectro HMBC de la chalcona 1.

3.2.2.2. Espectros RMN de la chalcona 2: (E)-1-(4'-hidroxifenil)-4-(metoxifenil)-prop-2-en-1-ona

En la Figura 29 se ilustra el espectro de ^1H de la chalcona 2, donde se han logrado identificar 5 señales. Debido a la baja potencia del equipo, las señales de los protones 8 y 12, 14 y 15, así como los protones 3 y 5, 9 y 11 salieron sobrelapadas, sin embargo, otras señales son bastante resaltantes, como la del protón metilo 19 en 3,63 ppm y del protón del hidroxilo 1 en 10,26 ppm.

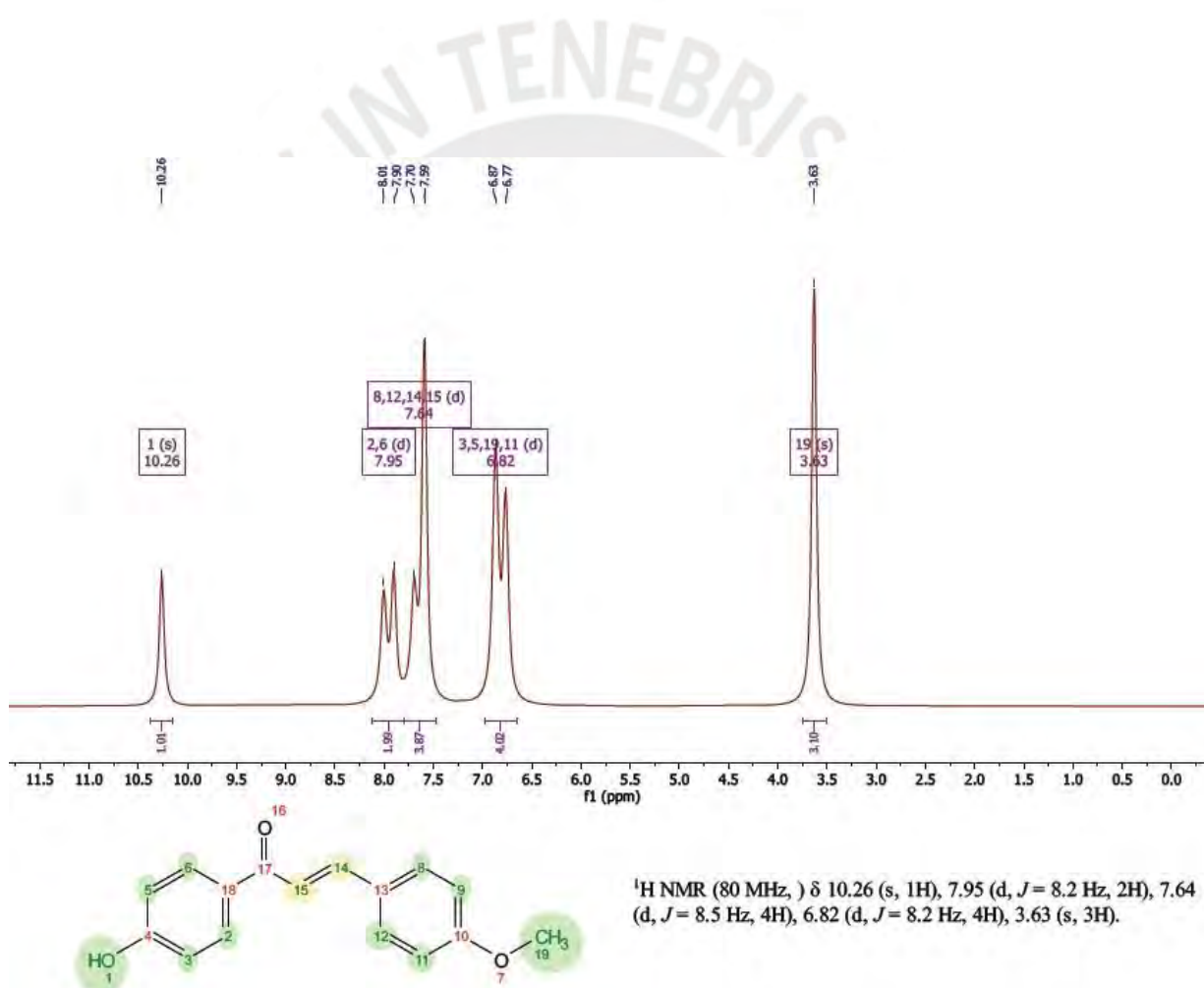


Figura 29. Espectro ^1H de la chalcona 2.

En la Figura 30 se encuentra el espectro ^{13}C de la chalcona 2, donde se han logrado identificar 12 señales. Algunos picos importantes corresponden a los carbonos 4 y 10, en 162,37 ppm y 161,42 respectivamente, al carbono metilo 19 en 55,53 ppm, y al carbono del grupo carbonilo 17 en 187,45 ppm. De igual manera que con la chalcona anterior, la señal en 40 ppm pertenece al solvente DMSO.

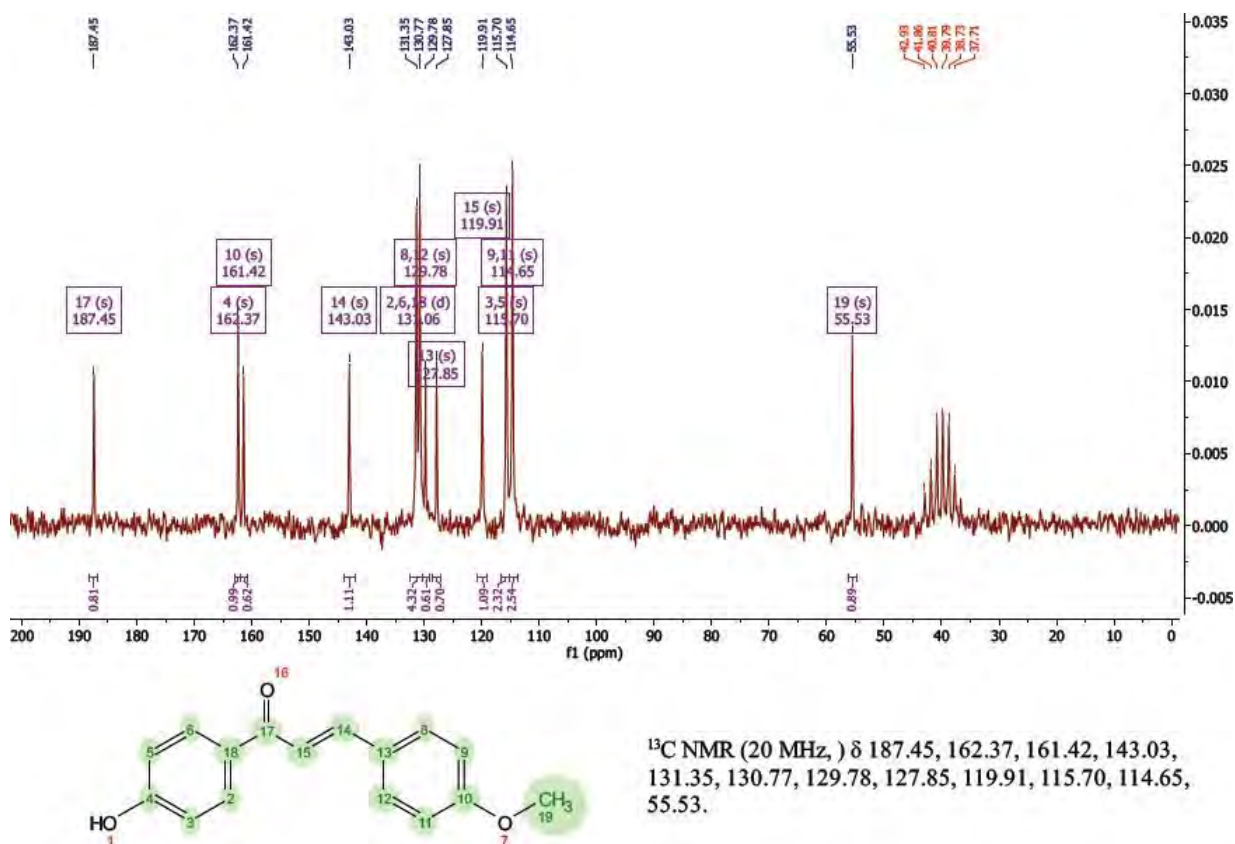


Figura 30. Espectro ^{13}C de la chalcona 2.

En la Figura 31 se encuentran los espectros DEPT 45, 90 y 135 de la chalcona 2, donde se han encontrado 7 señales. Al tomar en cuenta que el espectro de ^{13}C arrojó 12 señales, se puede concluir que 5 de las señales pertenecen a carbonos cuaternarios. Por otro lado, también se puede determinar que todas las señales corresponden a carbonos terciarios (-CH), excepto por la señal en 55,51 ppm (C19), que corresponde a un carbono terciario debido a que su señal no aparece en el DEPT 90.

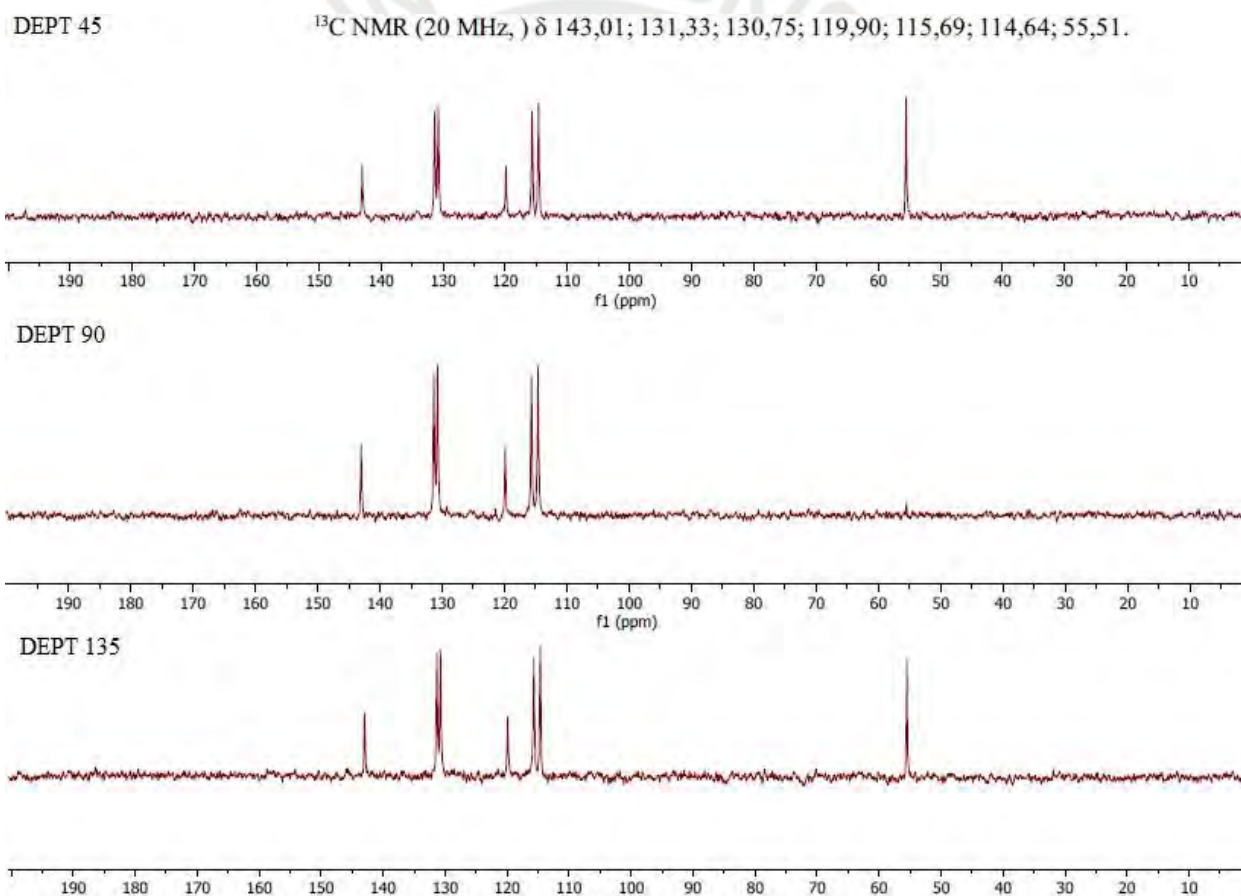
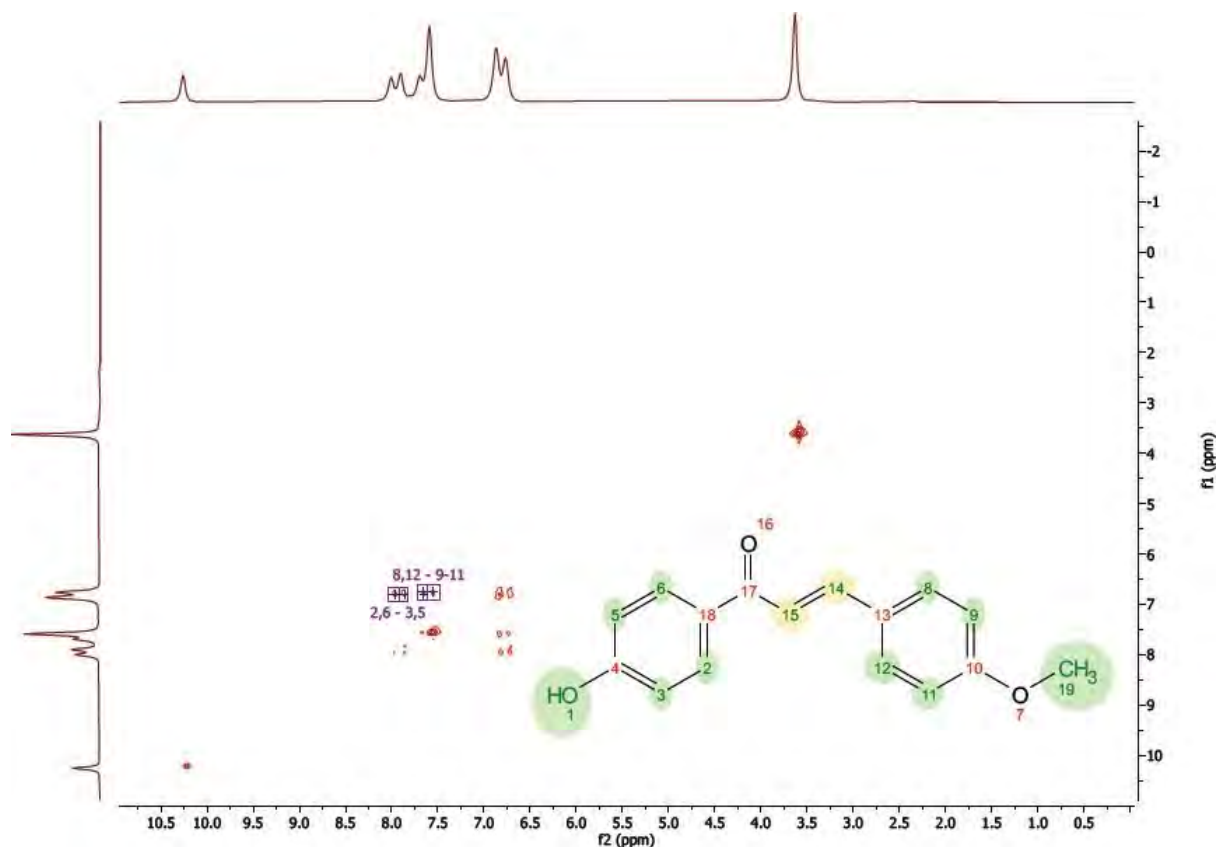


Figura 31. Espectros DEPT 45 - 90 - 135 de la chalcona 2.

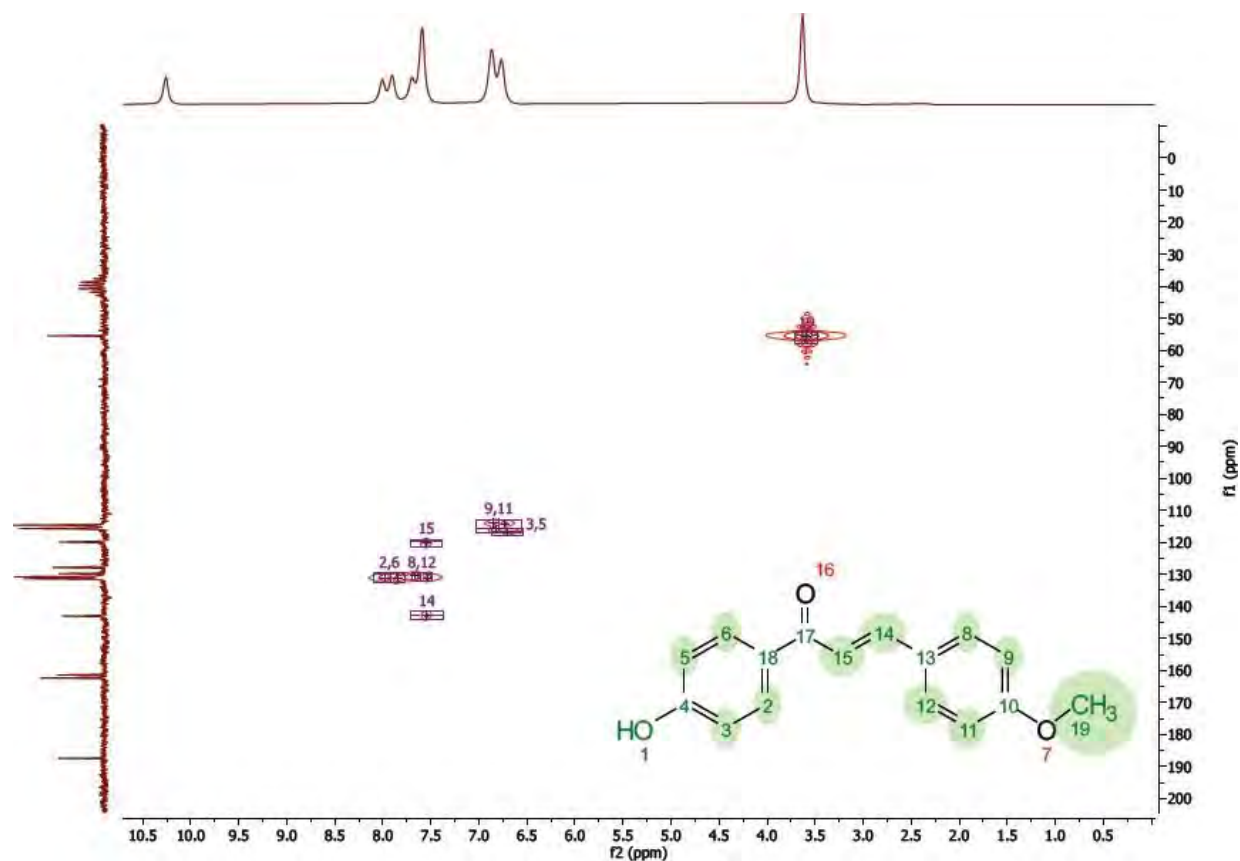
En la Figura 32 se tiene el espectro de correlación COSY de la chalcona 2. Al analizar el espectro, se puede concluir que todas las señales mostradas corresponden a la estructura planteada de la molécula. No obstante, no se evidenció la correlación entre los protones 14 y 15, cuya causa probable fue de la baja potencia del espectrómetro y cuya señal haya salido superpuesta con otra señal más fuerte.



Señal	Átomo	Desplazamiento Químico f1	Desplazamiento Químico f2
1.	2, 6 - 3, 5	6,81	7,92
2.	8, 12 - 9,11	6,76	7,62

Figura 32. Espectro COSY de la chalcona 2.

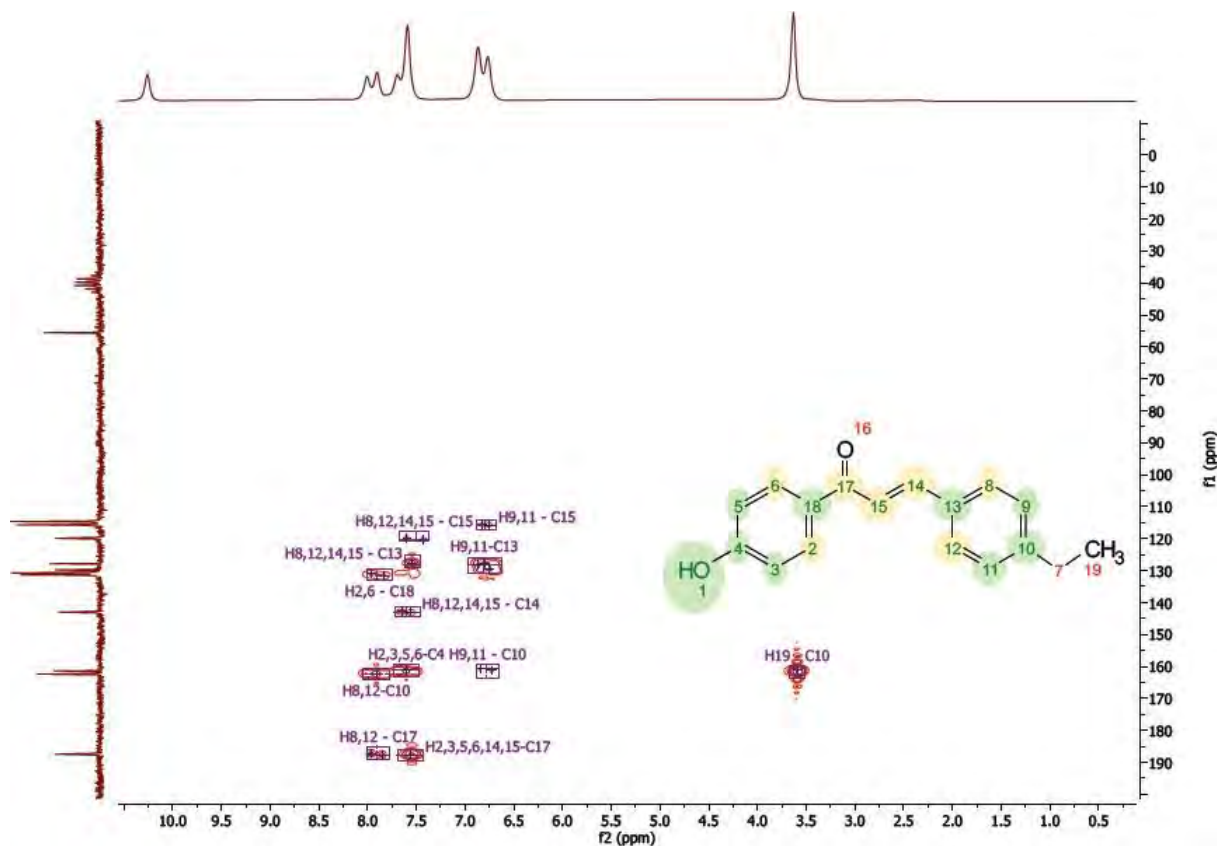
En la Figura 33 se observa el espectro de correlación HMQC de la chalcona 2. Al analizar el espectro, se puede concluir que todas las señales mostradas corresponden a la estructura planteada de la molécula.



Señal	Átomo	Desplazamiento Químico f1	Desplazamiento Químico f2
1.	9, 11	115,70	6,79
2.	15	119,91	7,55
3.	14	142,60	7,55
4.	3, 5	116,85	6,70
5.	2, 6	129,78	7,91
6.	8, 12	129,78	7,61
7.	19	55,54	3,59

Figura 33. Espectro HMQC de la chalcona 2.

En la Figura 34 se tiene el espectro de correlación HMBC de la chalcona 2. Al analizar el espectro, también se puede concluir que todas las señales mostradas corresponden a la estructura planteada de la molécula.



Señal	Átomo	Desplazamiento Químico f1	Desplazamiento Químico f2
1.	H19 - C10	160,80	3,59
2.	H2, 6 - C18	129,78	7,90
3.	H8, 12 - C17	187,66	7,91
4.	H8, 12 - C4	162,26	7,91
5.	H8, 12, 14, 15 - C10	161,29	7,60
6.	H8, 12, 14, 15 - C13	128,39	7,54
7.	H8, 12, 14, 15 - C14	143,22	7,60
8.	H8, 12, 14, 15 - C15	120,27	7,51
9.	H8, 12, 14, 15 - C17	187,66	7,56
10.	H9, 11 - C10	160,80	6,78
11.	H9, 11 - C15	115,87	6,79
12.	H9, 11-C13	128,39	6,80

Figura 34. Espectro HMBC de la chalcona 2.

3.2.2.3. Espectros RMN de la chalcona 3: (E)-1-(4'-metoxifenil)-3-(4-hidroxifenil)-prop-2-en-1-ona

En la Figura 35 se puede encontrar el espectro de ^1H de la chalcona 3, donde se han logrado identificar 5 señales. Debido a la baja potencia del equipo, las señales de los protones 9 y 13, 15 y 16, así como de los protones 3 y 5, 10 y 12 salieron sobrelapadas, sin embargo, otras señales son bastante resaltantes, como las del protón metilo 20 en 3,77 ppm y del protón del hidroxilo 8 en 10,04 ppm.

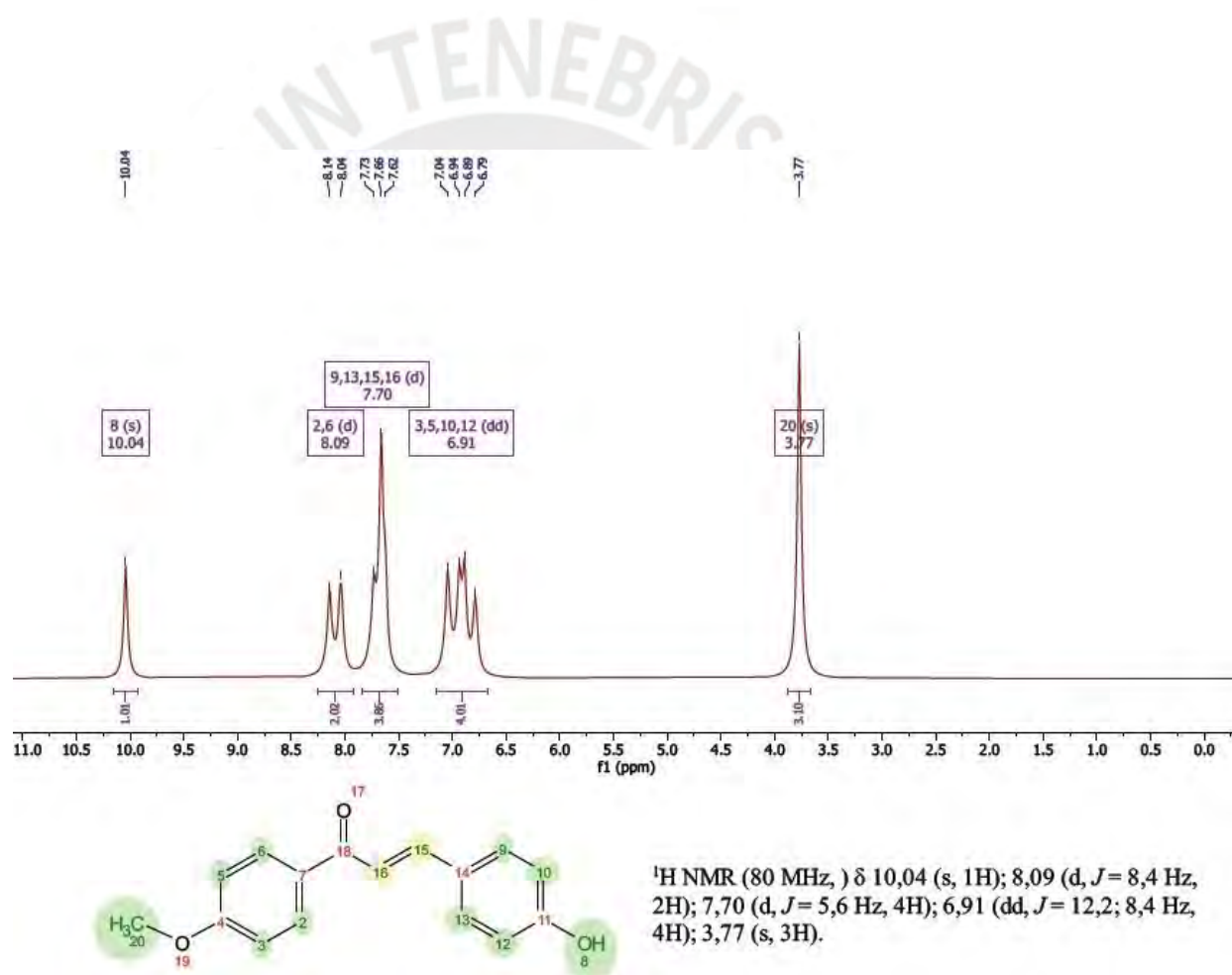


Figura 35. Espectro ^1H de la chalcona 3.

En la Figura 36 se ilustra el espectro ^{13}C de la chalcona 3, donde se han logrado identificar 11 señales ya que la señal del carbono 7 se encuentra sobrelapada con la señal de los carbonos 2 y 6. Algunos picos resaltantes corresponden al del carbono metilo 20 en 55,79 ppm y al carbono del grupo carbonilo 18 en 187,71 ppm. Asimismo, la señal que aparece en 40 ppm corresponde al solvente DMSO.

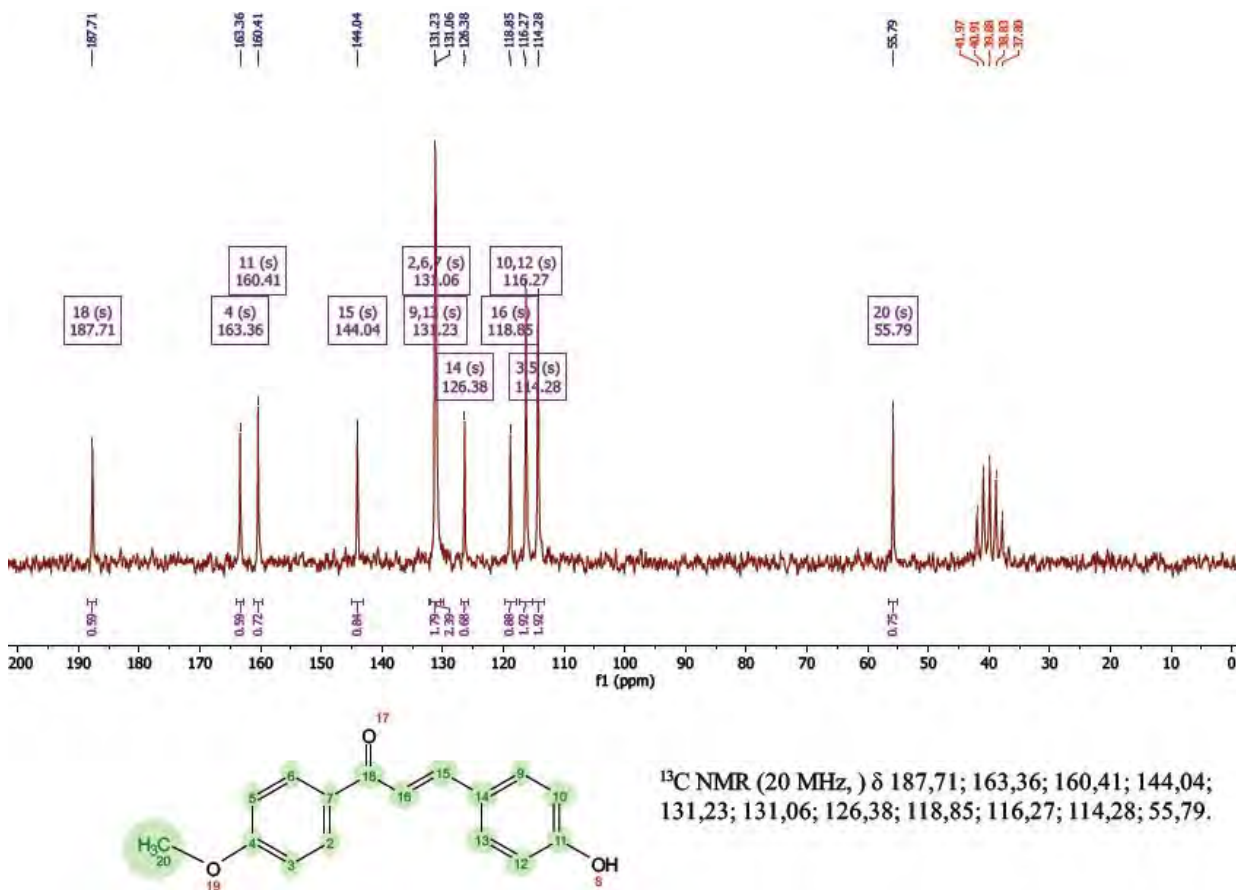


Figura 36. Espectro ^{13}C de la chalcona 3.

En la Figura 37 se encuentran los espectros DEPT 45, 90 y 135 de la chalcona 3, donde se han encontrado 7 señales. Al tomar en cuenta que el espectro de ^{13}C arrojó 12 señales (C7 sobrelapado), se puede concluir que 5 de las señales pertenecen a carbonos cuaternarios. Por otra parte, también se puede determinar que todas las señales corresponden a carbonos terciarios (-CH), excepto por la señal en 55,78 ppm (C20), que corresponde a un carbono terciario debido a que su señal no aparece en el DEPT 90.

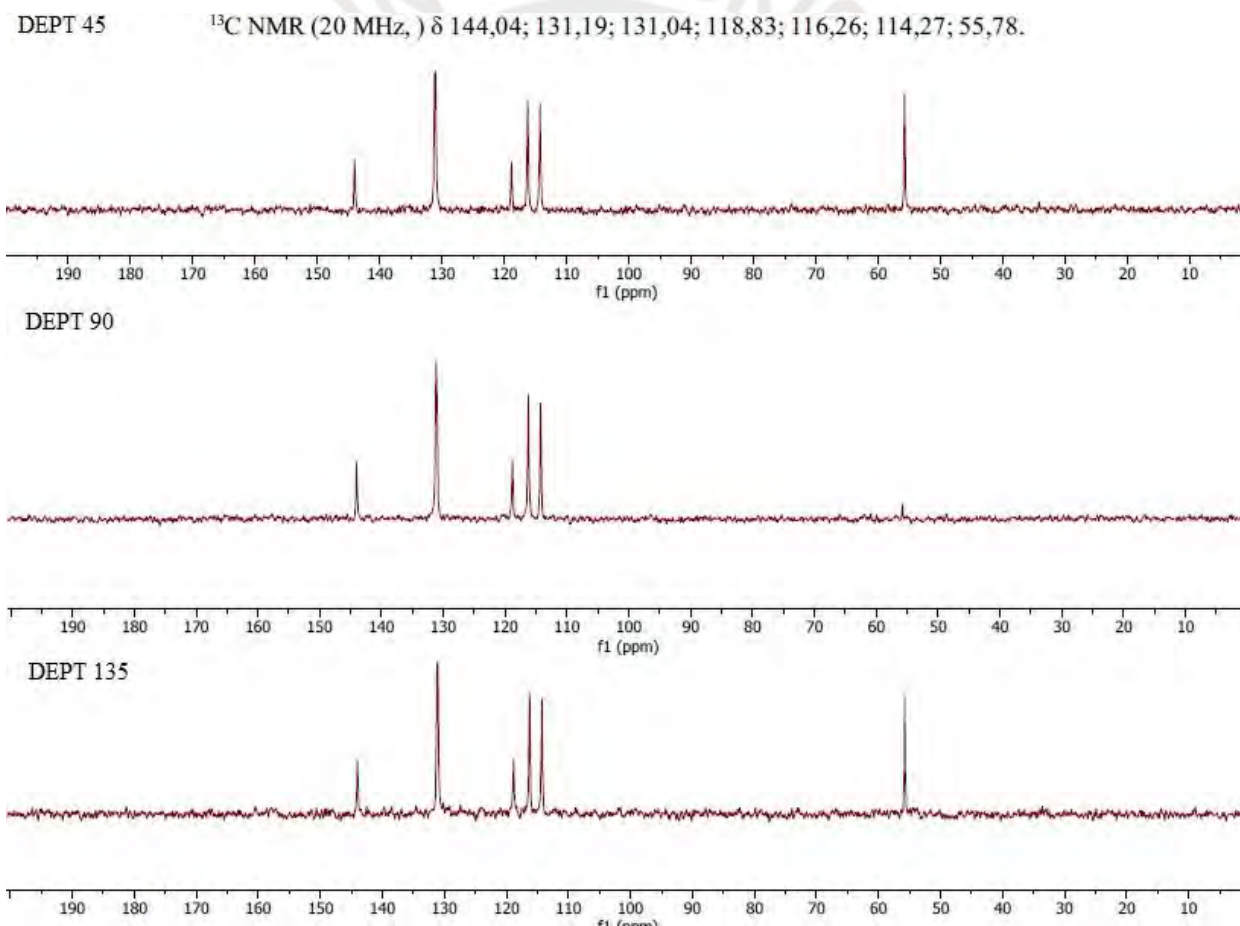
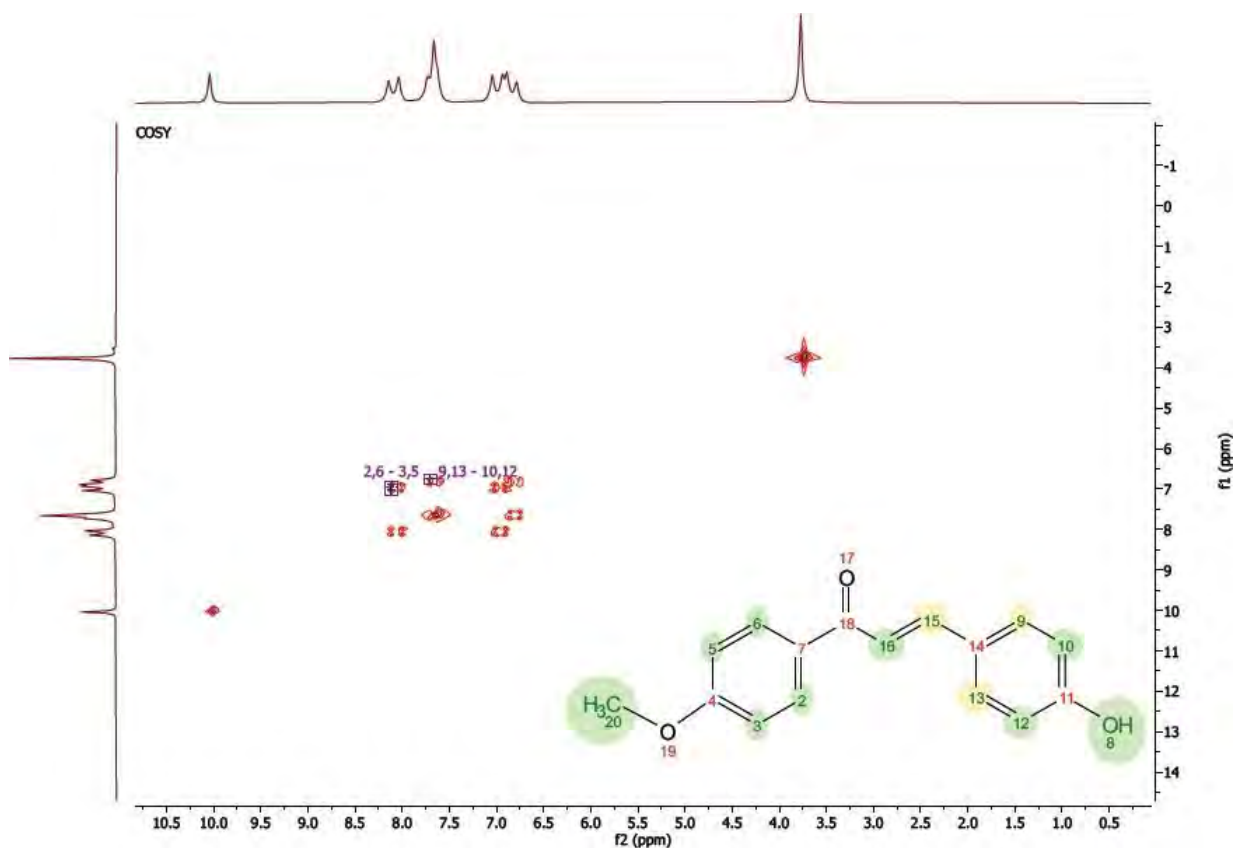


Figura 37. Espectros DEPT 45 - 90 - 135 de la chalcona 3.

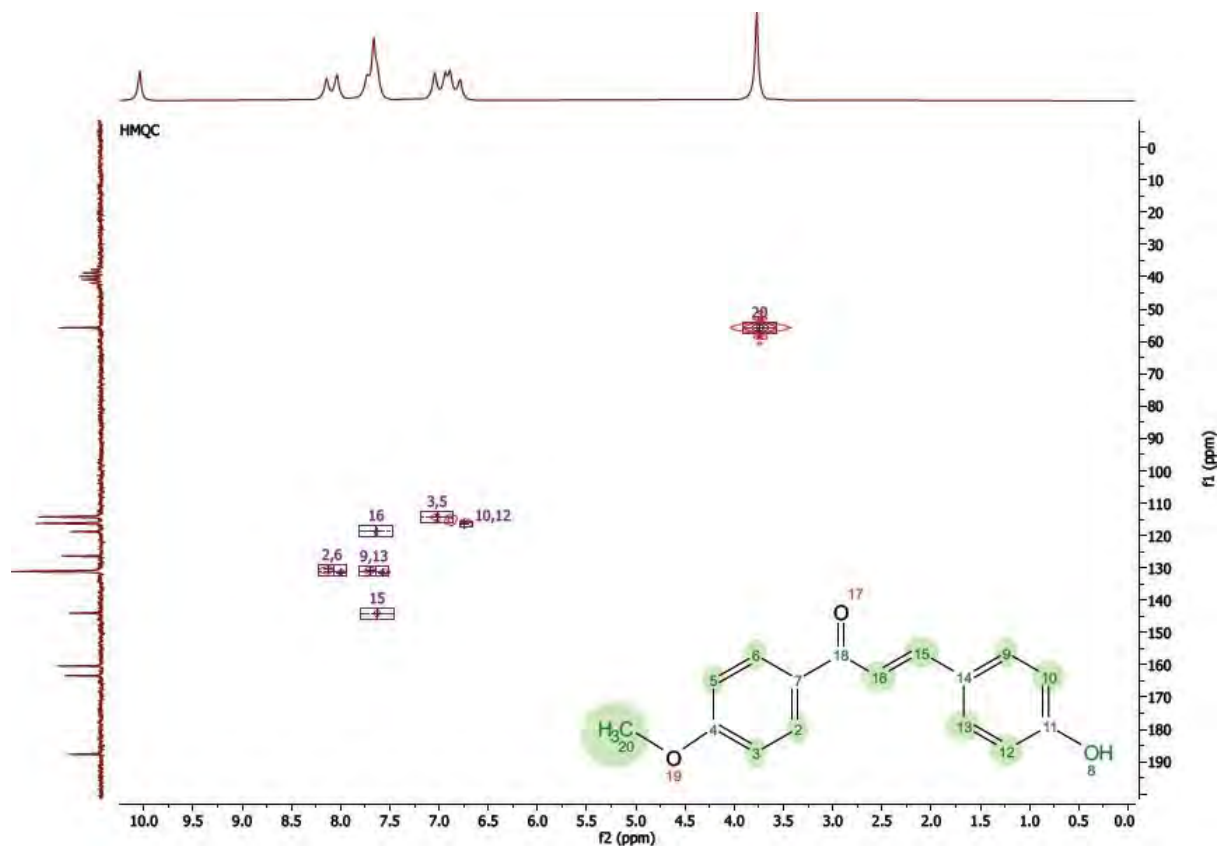
En la Figura 38 se tiene el espectro de correlación COSY de la chalcona 3. Al analizar el espectro, se puede concluir que todas las señales mostradas corresponden a la estructura planteada de la molécula. No obstante, no se evidenció la correlación entre los protones 15 y 16, posiblemente a causa de la baja potencia del espectrómetro y que haya resultado en que la señal haya salido superpuesta con otra señal.



Señal	Átomo	Desplazamiento Químico f1	Desplazamiento Químico f2
1.	2, 6 - 3, 5	6,97	8,11
2.	9, 13 - 10, 12	6,76	7,70

Figura 38. Espectro COSY de la chalcona 3.

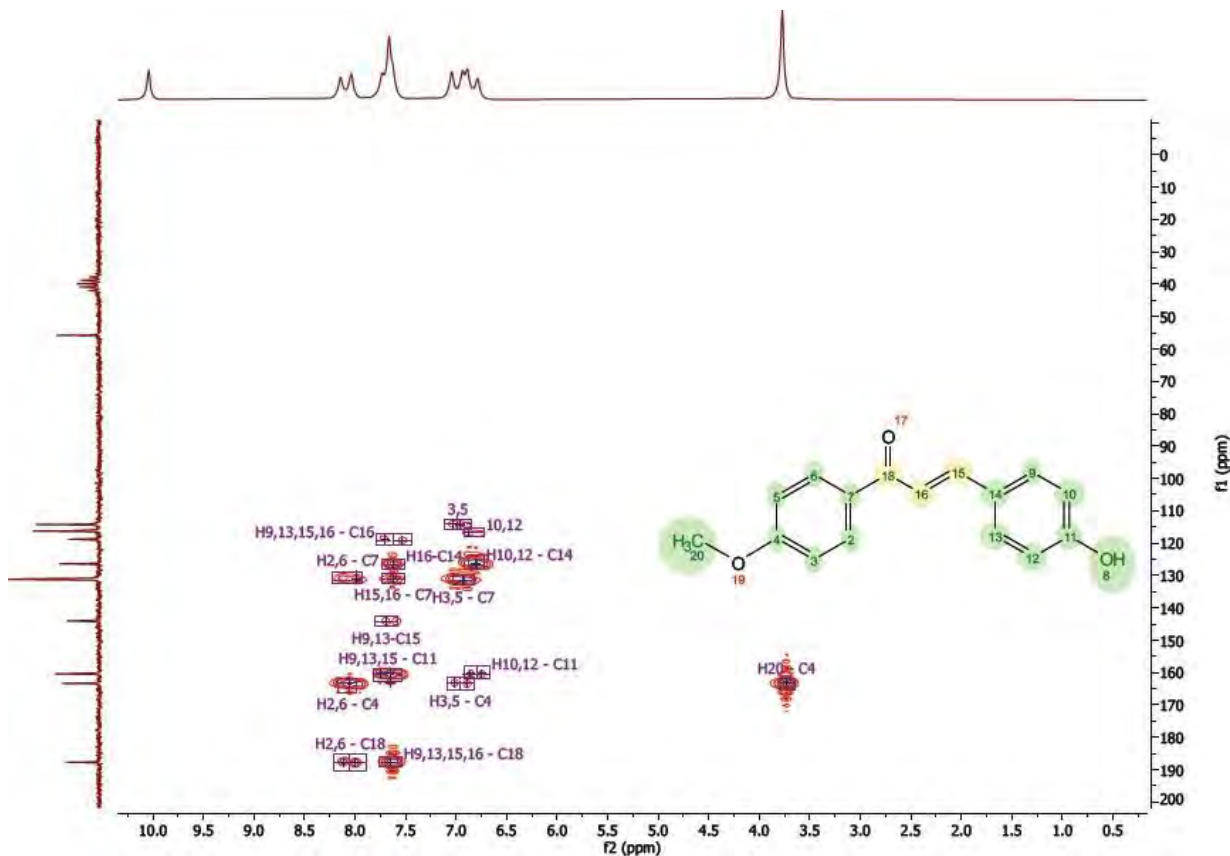
En la Figura 39 se observa el espectro de correlación HMQC de la chalcona 3. Al analizar el espectro, se puede concluir que todas las señales mostradas corresponden a la estructura planteada de la molécula.



Señal	Átomo	Desplazamiento Químico f1	Desplazamiento Químico f2
1.	10, 12	116,27	6,74
2.	15	144,20	7,63
3.	16	118,85	7,63
4.	2, 6	131,07	8,07
5.	20	55,80	3,77
6.	3, 5	114,41	7,02
7.	9, 13	131,07	7,65

Figura 39. Espectro HMQC de la chalcona 3.

En la Figura 40 se ilustra el espectro de correlación HMBC de la chalcona 3. Al analizar el espectro, se puede concluir que todas las señales encontradas corresponden a la estructura planteada de la molécula.



Señal	Átomo	Desplazamiento Químico f1	Desplazamiento Químico f2
1.	10, 12	116,85	6,88
2.	3, 5	114,17	6,99
3.	H10, 12 - C11	160,67	6,79
4.	H10, 12 - C14	126,62	6,80
5.	H15, 16 - C7	131,24	7,61
6.	H16-C14	126,62	7,63
7.	H2, 6 - C18	187,71	8,05
8.	H2, 6 - C4	163,36	8,05
9.	H2, 6 - C7	131,50	7,99
10.	H20 - C4	163,36	3,73
11.	H3, 5 - C4	163,36	6,95
12.	H3, 5 - C7	131,50	6,91
13.	H9, 13, 15 - C11	160,67	7,68
14.	H9, 13, 15, 16 - C16	119,29	7,62
15.	H9, 13, 15, 16 - C18	187,66	7,65
16.	H9, 13-C15	144,20	7,69

Figura 40. Espectro HMBC de la chalcona 3.

3.3. Evaluación de la capacidad antibacteriana de las chalconas sintetizadas

3.3.1. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 1

En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos de la prueba de difusión en disco de la chalcona 1. No se generó ningún halo de inhibición para la bacteria gran negativa *E. coli* en ninguna de las concentraciones de chalcona aplicadas, no obstante, en la Figura 41 se puede observar que la chalcona tuvo un efecto bacteriostático a la concentración de 2000 µg/mL en dos de las placas.

Por otra parte, la chalcona 1 sí presentó actividad antibacteriana en contra de la bacteria gran positiva *S. aureus* a partir de la concentración de 125 µg/mL, lo cual puede evidenciarse visualmente en la Figura 42.

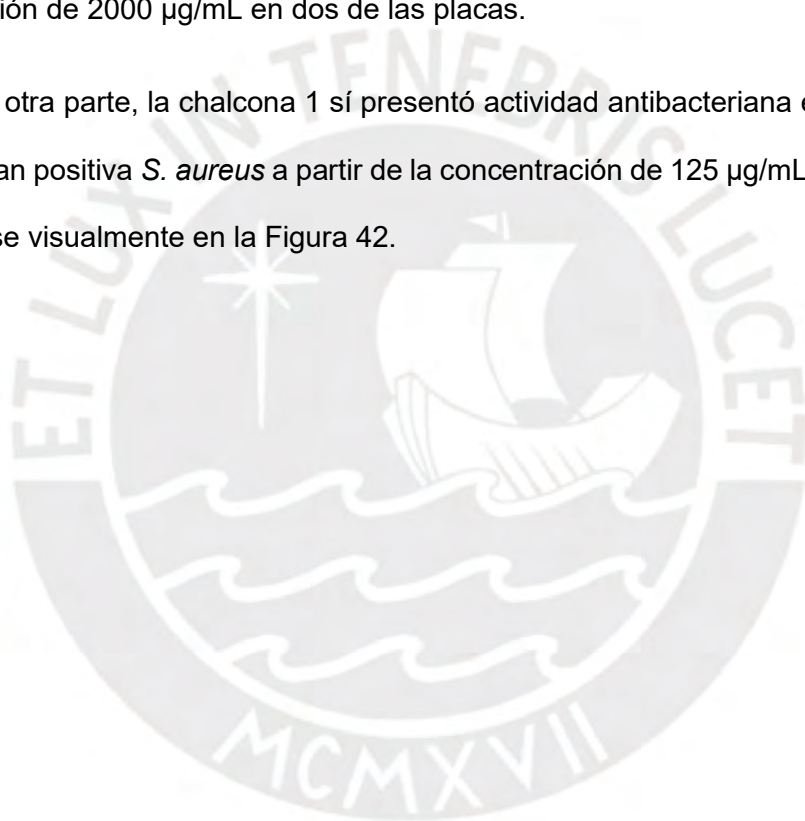


Tabla 6. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 1.

Concentración de la chalcona 1 ($\mu\text{g/mL}$)	Diámetro del halo			
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
1. 50	1	6 mm	1	6 mm
	2	6 mm	2	6 mm
	3	6 mm	3	6 mm
	4	6 mm	4	6 mm
2. 125	1	7 mm	1	8 mm
	2	7 mm	2	9 mm
	3	7 mm	3	8 mm
	4	7 mm	4	9 mm
3. 250	1	7 mm	1	11 mm
	2	7 mm	2	12 mm
	3	7 mm	3	13 mm
	4	7 mm	4	12 mm
4. 500	1	7 mm	1	15 mm
	2	8 mm	2	16 mm
	3	7 mm	3	17 mm
	4	7 mm	4	16 mm
5. 750	1	7 mm	1	17 mm
	2	7 mm	2	17 mm
	3	8 mm	3	16 mm
	4	7 mm	4	17 mm
6. 1000	1	7 mm	1	17 mm
	2	8 mm	2	19 mm
	3	7 mm	3	17 mm
	4	7 mm	4	17 mm
7. 2000	1	7 mm	1	17 mm
	2	8 mm	2	20 mm
	3	7 mm	3	19 mm
	4	8 mm	4	17 mm
Amoxicilina 25 μg	28 mm		37 mm	
Cloranfenicol 30 μg	18 mm		16 mm	
DMSO	6 mm		6 mm	

Nota: Se ha considerado 6 mm (diámetro del disco de papel) como ausencia del halo de inhibición.

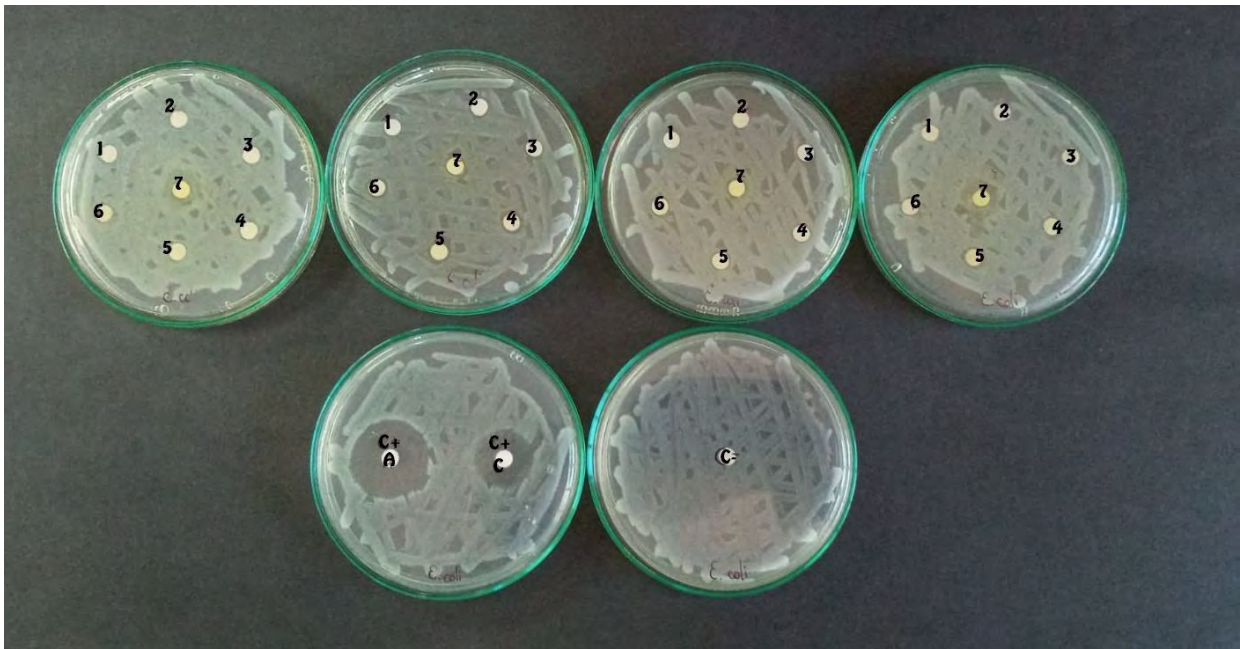


Figura 41. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 1 en contra de *Escherichia coli*.

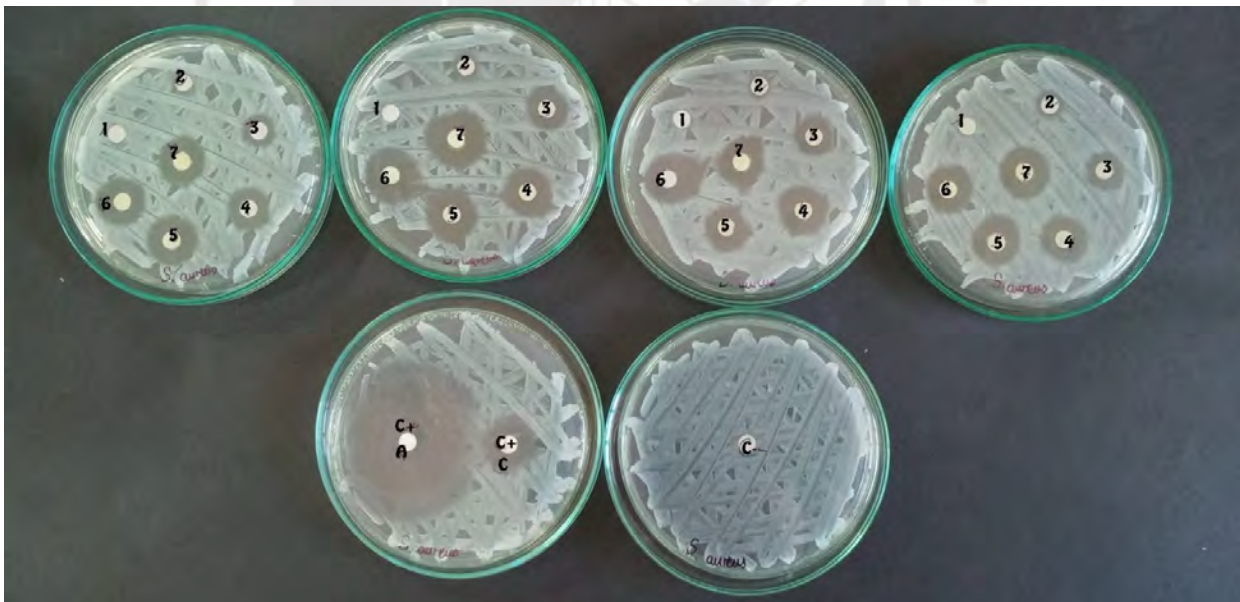


Figura 42. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 1 en contra de *Staphylococcus aureus*.

En la Tabla 6 se puede observar que el tamaño de los halos generados por la chalcona 1 frente a *S. aureus* es similar al halo generado por el antibiótico cloranfenicol. Por ello, se realizó una prueba t-student para evaluar si existe o no diferencia estadísticamente significativa entre los efectos.

En la Tabla 7 se encuentran los resultados de la prueba t de una muestra, donde se ha considerado que la hipótesis nula es que la media de los ensayos es igual al valor de referencia, es decir, que el efecto de la chalcona 1 es igual al efecto del cloranfenicol. El valor del estadístico t se encuentra entre los t críticos calculados y, además, el valor P calculado es mayor a 0,05; motivos por los cuales se debe aceptar la hipótesis nula. Entonces, se puede concluir que el efecto de la chalcona 1 es igual al del antibiótico cloranfenicol.

Tabla 7. Prueba t-student para la concentración de 500 µg/mL de la chalcona 1 vs cloranfenicol.

Variable	Obs	Media	Error estándar	Desviación Estándar	Intervalo de confianza al 95 %	
Tamaño de halos	4	16	0,4082	0,8165	14,7008	17,2992

H_0 = La media de los ensayos es igual al valor de referencia.

Estadístico t: 0

t crítico: $\pm 3,1824$

Valor P: 1

3.3.2. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 2

En la Tabla 8 se han colocado los resultados de los ensayos de difusión en disco de la chalcona 2. Desafortunadamente, la chalcona 2 solo generó pequeños halos de inhibición a la máxima concentración de 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en ambas bacterias. El tamaño de los halos está muy por debajo de los halos generados por los antibióticos utilizados como controles positivos, por lo que se considera que aunque esta chalcona sí posee actividad antibacteriana en contra de *E. coli* y *S. aureus*, esta no es significativa. Sin embargo, en la Figura 43 se puede ver que la chalcona 2 ha demostrado tener un efecto bacteriostático en contra de *E. coli* a la concentración de 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en dos de las placas y, en la Figura 44 se puede visualizar que también tiene un efecto bacteriostático en contra de *S. aureus* a las concentraciones de 750 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

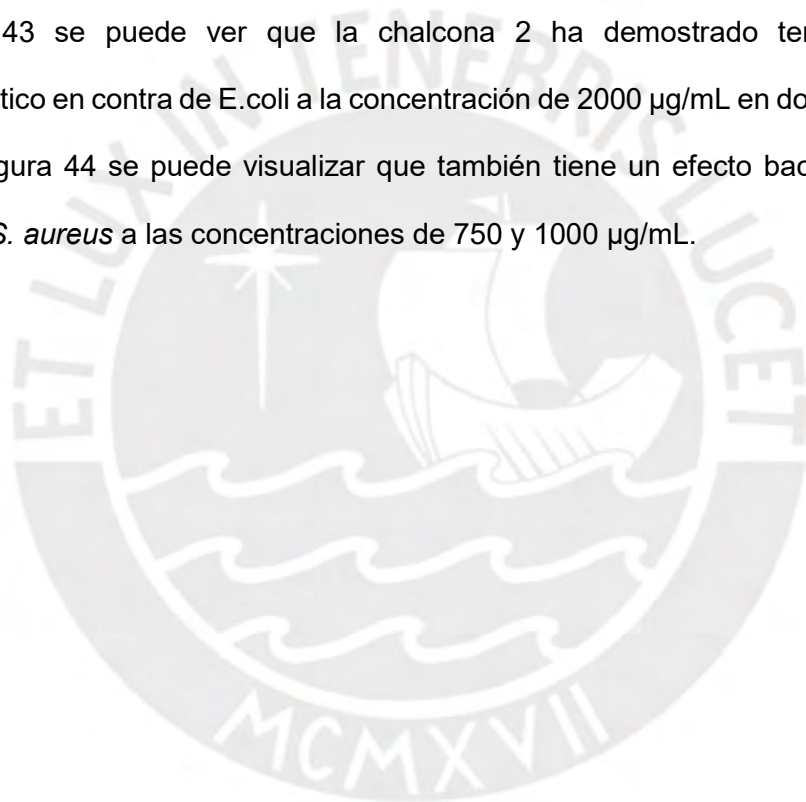


Tabla 8. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 2.

Concentración de la chalcona 2 ($\mu\text{g/mL}$)	Diámetro del halo			
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
1. 50	1	6 mm	1	6 mm
	2	6 mm	2	6 mm
	3	6 mm	3	6 mm
	4	6 mm	4	6 mm
2. 125	1	6 mm	1	6 mm
	2	6 mm	2	6 mm
	3	6 mm	3	6 mm
	4	6 mm	4	6 mm
3. 250	1	6 mm	1	6 mm
	2	6 mm	2	6 mm
	3	6 mm	3	6 mm
	4	6 mm	4	6 mm
4. 500	1	6 mm	1	6 mm
	2	6 mm	2	6 mm
	3	6 mm	3	6 mm
	4	6 mm	4	6 mm
5. 750	1	6 mm	1	6 mm
	2	6 mm	2	6 mm
	3	6 mm	3	6 mm
	4	6 mm	4	6 mm
6. 1000	1	6 mm	1	6 mm
	2	6 mm	2	6 mm
	3	6 mm	3	6 mm
	4	6 mm	4	6 mm
7. 2000	1	6 mm	1	11 mm
	2	9 mm	2	10 mm
	3	6 mm	3	9 mm
	4	10 mm	4	9 mm
Amoxicilina 25 μg	31 mm		38 mm	
Cloranfenicol 30 μg	25 mm		17 mm	
DMSO	6 mm		6 mm	

Nota: Se ha considerado 6 mm (diámetro del disco de papel) como ausencia del halo de inhibición.

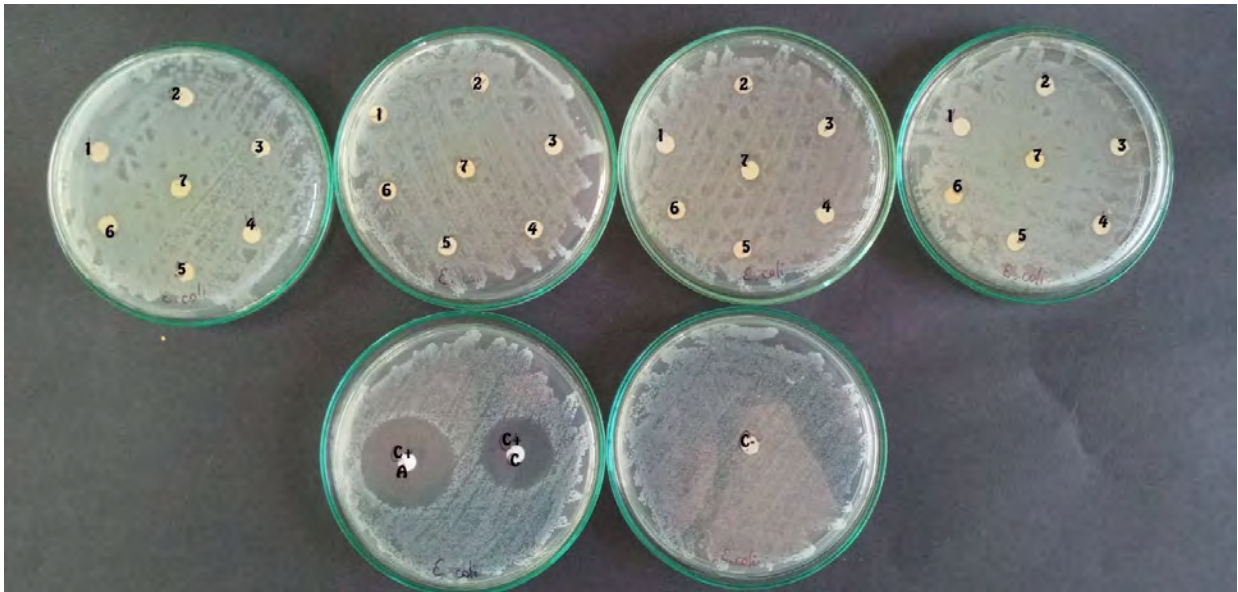


Figura 43. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 2 en contra de *Escherichia coli*.

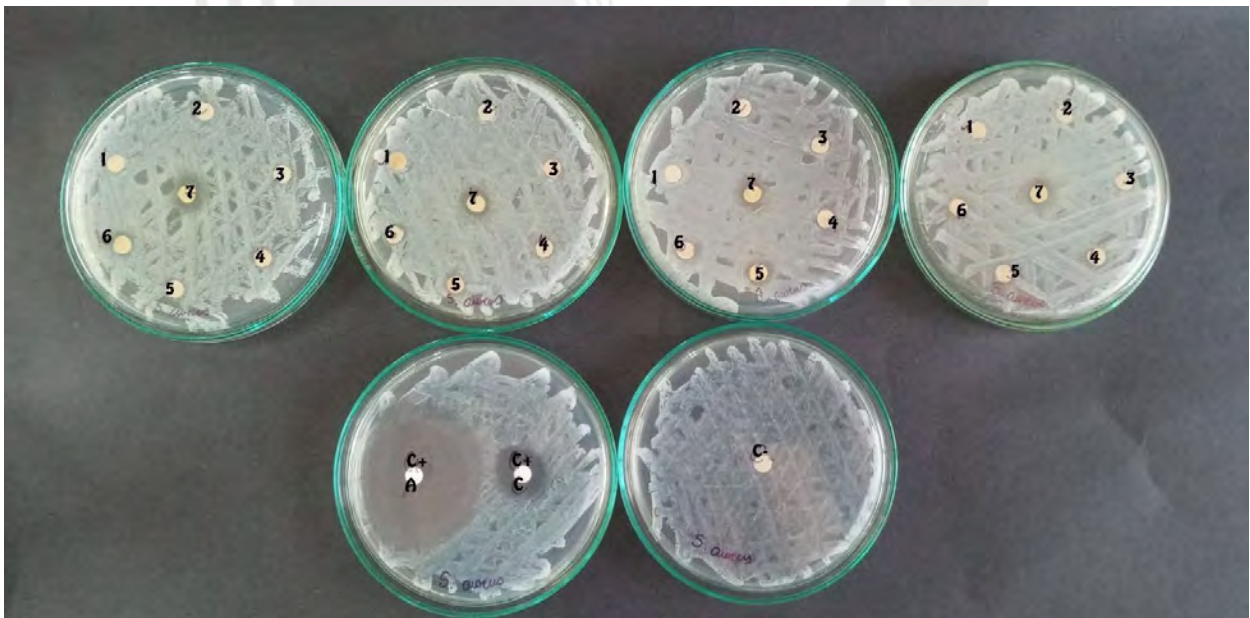


Figura 44. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 2 en contra de *Staphylococcus aureus*.

3.3.3. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 3

En la Tabla 9 se han detallado los resultados de los ensayos de difusión en disco de la chalcona 3. La chalcona 3 no tuvo actividad antibacteriana alguna en contra de *E. coli* (Figura 45) pero se observó un pequeño halo de inhibición a la concentración de 2000 µg/mL frente a *S. aureus*. Lamentablemente, el tamaño del halo está muy por debajo de los halos generados por los antibióticos utilizados como controles positivos, por lo que se considera que aunque esta chalcona sí posee actividad antibacteriana en contra de *S. aureus*, tampoco es significativa. Por otro lado, en la Figura 46 se puede observar que la chalcona 3 posee un efecto bacteriostático en contra de *S. aureus* a las concentraciones de 1000 y 2000 µg/mL .

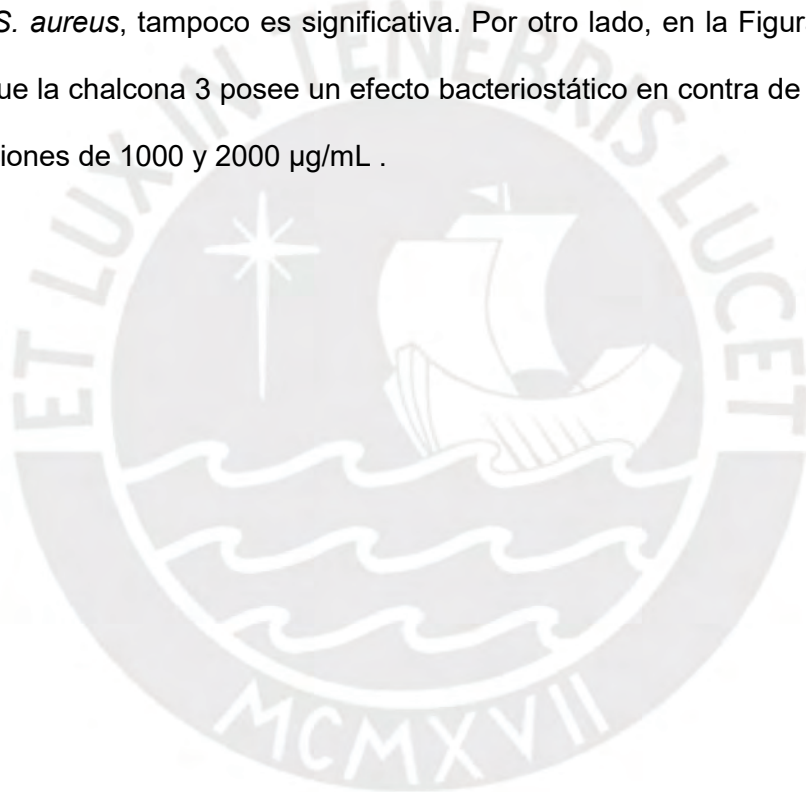


Tabla 9. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 3.

Concentración de la chalcona 3 ($\mu\text{g/mL}$)	Diámetro del halo			
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
1. 50	1	6 mm	1	6 mm
	2	6 mm	2	6 mm
	3	6 mm	3	6 mm
	4	6 mm	4	6 mm
2. 125	1	6 mm	1	6 mm
	2	6 mm	2	6 mm
	3	6 mm	3	6 mm
	4	6 mm	4	6 mm
3. 250	1	6 mm	1	6 mm
	2	6 mm	2	6 mm
	3	6 mm	3	6 mm
	4	6 mm	4	6 mm
4. 500	1	6 mm	1	6 mm
	2	6 mm	2	6 mm
	3	6 mm	3	6 mm
	4	6 mm	4	6 mm
5. 750	1	6 mm	1	6 mm
	2	6 mm	2	6 mm
	3	6 mm	3	6 mm
	4	6 mm	4	6 mm
6. 1000	1	6 mm	1	6 mm
	2	6 mm	2	6 mm
	3	6 mm	3	6 mm
	4	6 mm	4	11 mm
7. 2000	1	6 mm	1	14 mm
	2	6 mm	2	9 mm
	3	6 mm	3	10 mm
	4	6 mm	4	11 mm
Amoxicilina 25 μg	30 mm		39 mm	
Cloranfenicol 30 μg	19 mm		19 mm	
DMSO	6 mm		6 mm	

Nota: Se ha considerado 6 mm (diámetro del disco de papel) como ausencia del halo de inhibición.

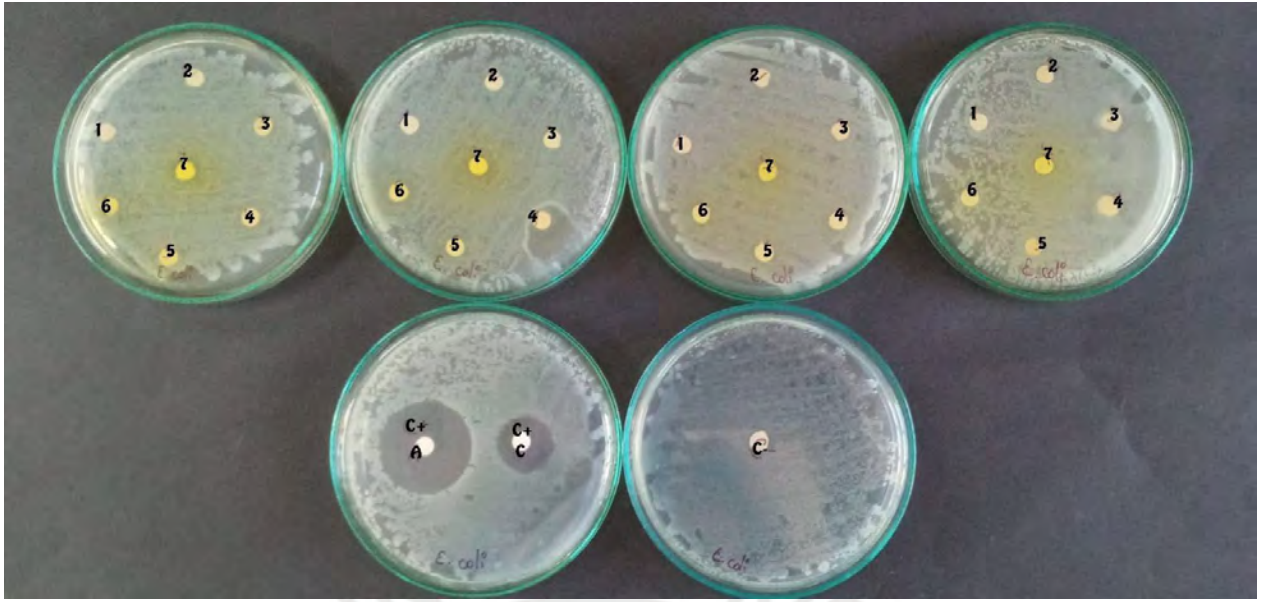


Figura 45. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 2 en contra de *Escherichia coli*.

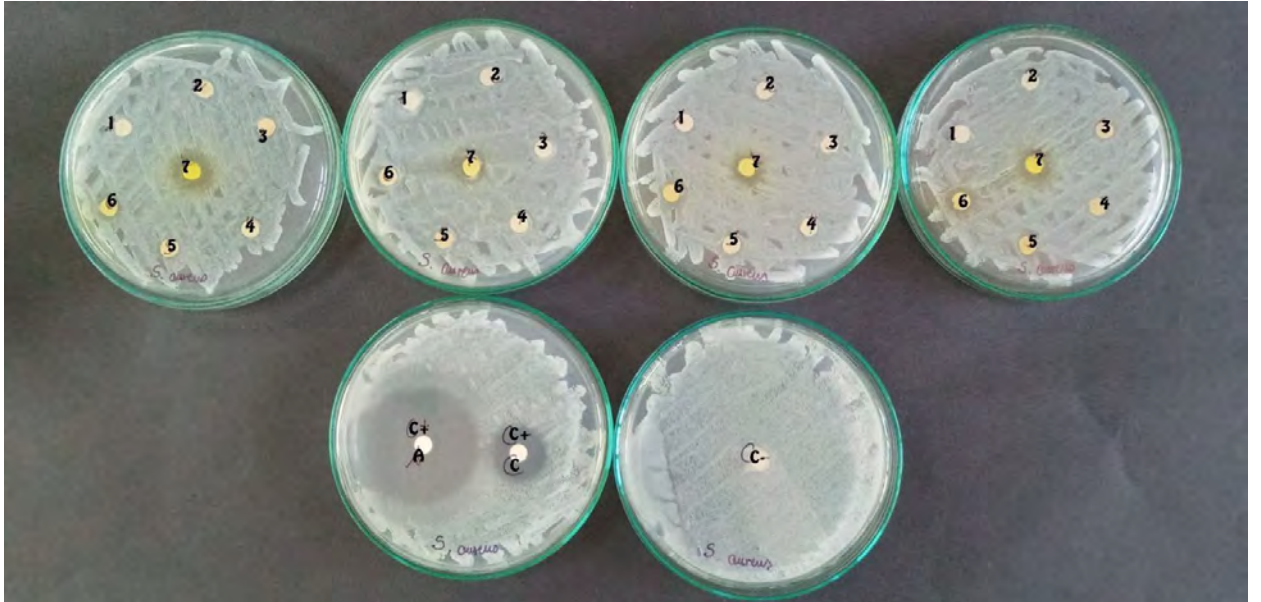


Figura 46. Evaluación de la capacidad antibacteriana de la chalcona 3 en contra de *Staphylococcus aureus*.

3.4. Discusión

Hasta la fecha en que se realizó el presente trabajo, solo existían 6 referencias en la base de datos SciFinder-n que habían trabajado con la chalcona 1, por lo que es una molécula relativamente novedosa. No se encontraron estudios de la actividad antibacteriana de esta sustancia pero Kumar *et al* (2023) desarrollaron una investigación donde encontraron que esta molécula posee actividad biológica como un inhibidor reversible de la enzima MAO-B y donde realizaron también la espectroscopía pertinente. Al hacer la comparación con la espectroscopía RMN ^1H y ^{13}C de este estudio, se determinó que los espectros de protón son muy similares y que los espectros de carbono también, difiriendo estos últimos tan solo entre 3 y 8 ppm entre los picos, por lo que se puede afirmar que se ha trabajado con la misma molécula en ambos estudios.

La actividad antibacteriana de las chalconas ha sido asociada a varios mecanismos de acción, como la adición conjugada del grupo carbonílico α,β -insaturado con un grupo nucleofílico en ciertas proteínas (Gaonkar & Vignesh, 2017), el acoplamiento a nivel molecular y la unión al ADN (Jasim *et al*, 2021).

La chalcona 1 tiene una actividad antibacteriana muy particular, ya que fue efectiva en contra de la bacteria Gram + pero no en contra de la bacteria Gram -. Esto puede ser explicado por la diferencia en la estructura de las membranas de ambos tipos de bacterias (Figura 47).

Se conoce que las bacterias Gram negativas suelen ser más resistentes a los antibióticos debido a que poseen una membrana externa y, que les confiere mayor protección (Zeinab *et al*, 2020). Asimismo, también cuentan con una capa de limo, que protege sus lipopolisacáridos (antígenos) y también tienen una mayor cantidad de proteínas transportadoras en su membrana, permitiéndoles eliminar sustancias exógenas con mayor

facilidad (Chaudhuri, A. & Chaudhuri, M., 2018).

En cambio, las bacterias Gram positivas no poseen esta segunda membrana y se encuentran más expuestas. Su capa externa consiste de una gruesa capa de peptidoglicano, el cual es un copolímero de polisacáridos con aminoácidos y, que es un fácil objetivo de sustancias exógenas.

Al tomar en cuenta que la chalcona 1 es efectiva contra las Gram positivas, es posible que su grupo isopropilo sea el responsable de que tenga una mejor fijación al peptidoglicano y que su mecanismo de acción tenga relación con la inhibición de la síntesis del peptidoglicano o directamente con su disrupción.

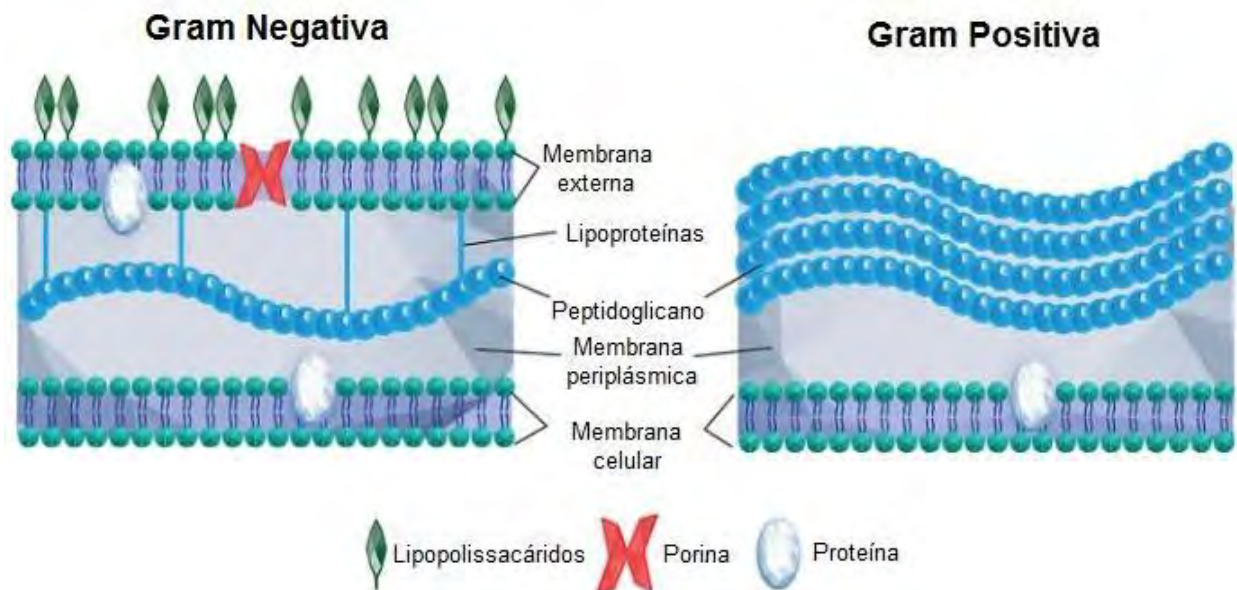


Figura 47. Estructura de las membranas de las bacterias Gram negativas y Gram positivas.

Adaptado de: Chaudhuri, A., & Chaudhuri, M. (2018). Why are Gram-negative bacteria resistant to antibiotics? Recuperado el 12 de octubre de 2024, de *Medium. The Biochemists*: <https://medium.com/the-biochemists/why-are-gram-negative-bacteria-resistant-to-antibiotics-c732fe9afd06>

Algunos ejemplos de otros investigadores que también sintetizaron la chalcona 2 fueron:

- Wang *et al* (2016), quienes realizaron la síntesis durante 72 horas con solvente metanol y utilizaron KOH 8 % como catalizador.
- Jiang *et al* (2014), quienes realizaron la síntesis durante 24 horas con solvente etanol y utilizaron NaOH 10 % como catalizador.
- Nurkenov *et al* (2019), quienes realizaron la síntesis entre 62- 85 horas con solvente etanol y utilizaron NaOH 40 % como catalizador.
- Montes-Avila *et al* (2009), quienes realizaron la síntesis durante la noche con solvente etanol y utilizaron KOH 50 % como catalizador.

Estos estudios reportaron rendimientos de 35,4 %; 53 %; 36 % y 50 % respectivamente. En el presente trabajo se obtuvieron rendimientos desde 19,30 % a 48,06 %, los cuales se encuentran en un rango similar al hallado en la literatura. Asimismo, Wang *et al* (2016) y Montes-Avila *et al* (2009) reportaron además que el producto tenía un color amarillo pálido, igual al obtenido en este trabajo.

Por otra parte, todos los estudios mencionados realizaron la correspondiente caracterización espectroscópica por RMN ^1H y ^{13}C . Al comparar los picos reportados por estos estudios con los de este trabajo, se puede concluir que se ha obtenido la misma molécula.

Choudhary & Juyal (2011) sintetizaron la chalcona 3 durante 4-5 horas en solvente etanólico y utilizaron NaOH 10 % como catalizador, así obtuvieron un rendimiento del 48 %. Por su lado, Zhao *et al* (2013) sintetizaron la chalcona 3 durante 12-24 horas en solvente etanólico y utilizaron NaOH 10 % como catalizador, así obtuvieron un sólido amarillo con un rendimiento del 27 %. En la presente investigación, se obtuvo rendimientos desde

1,36 % a 17,49 % para la chalcona 3, los cuales son un poco alejados de los reportados en la literatura. Uno de los motivos podría ser la diferencia entre los tiempos de reacción o en la relación solvente-catalizador.

Ambos estudios realizaron la espectroscopía RMN ^1H de la molécula, sin embargo, existen algunas diferencias entre los picos encontrados en los tres estudios. Por ejemplo, Choudhary & Juyal (2011) determinaron que el pico del grupo OH se encuentra en 8,03 ppm, mientras que Zhao *et al* (2013) lo determinaron en 5,30 ppm y este trabajo lo situó en 10,04 ppm. No obstante, también existieron similitudes como la del grupo metoxi, que Choudhary & Juyal (2011) situaron en 3,87 ppm, Zhao *et al* (2013) en 3,90 ppm y este estudio en 3,77 ppm; y de las señales de los anillos aromáticos, que Choudhary & Juyal (2011) determinaron entre 6,89 – 7,94 ppm, Zhao *et al* (2013) entre 6,88 – 8,03 ppm y este trabajo entre 6,91 – 8,09 ppm.

En cuanto a la actividad antibacteriana de la chalcona 3, Elfi & Mulyani (2022) determinaron que la molécula no tiene actividad en contra de *S. aureus* pero sí en contra de *E. coli*, al generar un halo de 7,88 mm en su estudio. Además, Choudhary & Juyal (2011) también evaluaron la actividad antibacteriana de la chalcona 3 en contra de *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Lamentablemente, la molécula no presentó actividad alguna en contra de ninguna de las bacterias.

Sus hallazgos se encuentran en concordancia con los resultados de este trabajo, ya que la chalcona 3 tampoco demostró tener actividad en contra de *S. aureus* ni *E. coli* y, aunque el estudio de Elfi & Mulyani (2022) concluyó que posee actividad en contra de *E. coli*, es necesario tomar en cuenta que el halo de inhibición fue de 7,88 mm y el método utilizado fue el de difusión en disco (donde sólo el disco corresponde a 6 mm), por lo que el halo de inhibición es muy pequeño y el efecto antibacteriano es mínimo.

CONCLUSIONES

1. Se logró sintetizar las tres chalconas hidroxiladas propuestas y se contrastó sus estructuras con sus respectivos espectros de IR y de RMN ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HMBC y HMQC.
2. Se determinó que el tratamiento que produjo un mayor incremento en el rendimiento de las chalconas sintetizadas fue el que utilizó KOH sólido como catalizador, seguido por los tratamientos con KOH 20 % y KOH 10 % respectivamente.
3. Se encontró que la chalcona 1 posee actividad bactericida en contra de *S. aureus* a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y cuyo efecto a dicha concentración es comparable con el del antibiótico cloranfenicol 30 μg . Adicionalmente, posee actividad bacteriostática en contra de *E.coli* a 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La chalcona 2 también tiene actividad bacteriostática en contra de *E. coli* a 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y en contra de *S. aureus* a 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$, además posee una ligera actividad bactericida en contra de ambas bacterias a 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Finalmente, la chalcona 3 no tuvo ninguna actividad en contra de *E. coli* pero tuvo un leve efecto bacteriostático y bactericida en contra de *S. aureus* a 1000 y 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente.

RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

1. Con sólo 3 chalconas analizadas, no se puede concluir que la presencia del grupo hidroxilo es causal de un bajo rendimiento mediante la síntesis de Claisen-Schmidt. Por ello, se recomienda realizar este análisis con una mayor cantidad y diversidad de chalconas hidroxiladas.
2. Otras condiciones que se podrían evaluar para elevar aún más el rendimiento de la síntesis pueden ser:
 - Llevar a cabo la reacción con una temperatura más elevada.
 - Llevar a cabo la reacción con la presencia de tamices moleculares absorbentes o adsorbentes, para que extraigan el agua del medio a la vez que se genera.
 - Precipitar la molécula con un ácido más concentrado como HCl 37 %.
 - Dar un tiempo adicional de agitación luego de la acidificación.
3. Evaluar la actividad antibacteriana de las chalconas sintetizadas en contra de una mayor cantidad de cepas bacterianas.
4. Sintetizar y evaluar la capacidad antibacteriana en contra de bacterias Gram + de diferentes chalconas que contengan un grupo isopropilo como sustituyente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aksöz, B., & Ertan, R. (2011). Chemical and structural properties of chalcones I. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36(4), 223–242.
2. Avendaño, M. (1993). *Introducción a la química farmacéutica*. McGrawHill.
3. Ávila, H. P., Smânia, E. de F. A., Monache, F. D., & Smânia, A. (2008). Structure–activity relationship of antibacterial chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(22), 9790–9794. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.09.064>
4. Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4_ts), 493–496. https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493
5. Bhale, P. S., Chavan, H. V., Endait, R. S., Kadam, A. T., Bopalkar, R. J., & Gaikwad, M. S. (2021). Synthesis and Biological Evaluation of Indolyl Bis-chalcones as Anti-Breast Cancer and Antioxidant Agents. *Croatica Chemica Acta*, 94(1), 35–41. <https://doi.org/10.5562/CCA3758>
6. Cazarolli, L. H., Kappel, V. D., Zanatta, A. P., Suzuki, D. O. H., Yunes, R. A., Nunes, R. J., Pizzolatti, M. G., & Silva, F. R. M. B. (2013). Natural and synthetic chalcones: Tools for the study of targets of action - Insulin secretagogue or insulin mimetic? In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 39, pp. 47–89). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62615-8.00002-3>
7. Chaudhuri, A., & Chaudhuri, M. (2018). Why are gram-negative bacteria resistant to antibiotics? Recuperado el 12 de octubre de 2024, de Medium. The Biochemists: <https://medium.com/the-biochemists/why-are-gram-negative-bacteria-resistant-to-antibiotics-c732fe9afd06>
8. Chopra, G., & Education, H. (2016). Chalcones : A Brief Review. *International Journal of Research in Engineering and Applied Sciences*, 6(5).
9. Chotsaeng, N., Laosinwattana, C., & Charoenying, P. (2019). Herbicidal Activity of Flavokawains and Related trans-Chalcones against *Amaranthus tricolor* L. And *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. *ACS Omega*, 4(24), 20748–20755. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03144>
10. Choudhary, A. L., & Juyal, V. (2011). Synthesis of chalcone and their derivatives as antimicrobial agents. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 125–128.
11. Claridge, T. D. W. (2016). High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry: Third Edition. In *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry: Third Edition* (Vol. 27). <https://doi.org/10.1016/C2015-0-04654-8>
12. Dan, W., & Dai, J. (2020). Recent developments of chalcones as potential antibacterial agents in medicinal chemistry. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 187). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111980>
13. Díaz-Tielas, C., Graña, E., Reigosa, M. J., & Sánchez-Moreiras, A. M. (2016). Biological Activities and Novel Applications of Chalcones. *Planta Daninha*, 34(3), 607–616. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582016340300022>

14. Do, T. H., Nguyen, D. M., Truong, V. D., Do, T. H. T., Le, M. T., Pham, T. Q., Thai, K. M., & Tran, T. D. (2016). Synthesis and selective cytotoxic activities on rhabdomyosarcoma and noncancerous cells of some heterocyclic chalcones. *Molecules*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/molecules21030329>
15. Elfi Susanti, V. H., & Mulyani, S. (2022). Green Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Methoxy Chalcones. *Rasayan Journal of Chemistry*, 15(4), 2459–2465. <https://doi.org/10.31788/RJC.2022.1546957>
16. Elkanzi, N. A. A., Hrichi, H., Alolayan, R. A., Derafa, W., Zahou, F. M., & Bakr, R. B. (2022). Synthesis of Chalcones Derivatives and Their Biological Activities: A Review. *ACS Omega*, 7(32), 27769–27786. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c01779>
17. Feng, L., Maddox, M. M., Alam, Z., Tsutsumi, L. S., Narula, G., Bruhn, D. F., Wu, X., Sandhaus, S., Lee, R. B., Simmons, C. J., Hurdle, J. G., Lee, R. E., & Sun, D. (2014). Synthesis, Structure–Activity Relationship Studies, and Antibacterial Evaluation of 4-Chromanones and Chalcones, as Well as Olympicin A and Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57, 8398–8420.
18. Fessenden, R. J. & Fessenden, J. S. (1982). *Organic Chemistry* (2nd ed.). PWS Publishers.
19. Fusaro, R. M. (1968). Sunlight sensitivity. *Minnesota Medicine*, 51(7), 957–958.
20. Gaonkar, S. L., & Vignesh, U. N. (2017). Synthesis and pharmacological properties of chalcones: a review. *Research on Chemical Intermediates*, 43(11), 6043–6077. <https://doi.org/10.1007/s11164-017-2977-5>
21. Go, M., Wu, X., & Liu, X. (2012). Chalcones: An Update on Cytotoxic and Chemoprotective Properties. *Current Medicinal Chemistry*, 12(4), 483–499. <https://doi.org/10.2174/0929867053363153>
22. Gomes, M. N., Muratov, E. N., Pereira, M., Peixoto, J. C., Rosseto, L. P., Cravo, P. V. L., Andrade, C. H., & Neves, B. J. (2017). Chalcone derivatives: Promising starting points for drug design. *Molecules*, 22(8). <https://doi.org/10.3390/molecules22081210>
23. Goyal, K., Kaur, R., Goyal, A., & Awasthi, R. (2021). Chalcones: A review on synthesis and pharmacological activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 11(Supplement 1), 1–14. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2021.11s101>
24. Gupta, A., Garg, S., & Singh, H. (2020). Development of chalcone-based derivatives for sensing applications. *Analytical Methods*, 12(42), 5022–5045. <https://doi.org/10.1039/d0ay01603a>
25. Hofmann, E., Webster, J., Do, T., Kline, R., Snider, L., Hauser, Q., Higginbottom, G., Campbell, A., Ma, L., & Paula, S. (2016). Hydroxylated chalcones with dual properties: Xanthine oxidase inhibitors and radical scavengers. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 24(4), 578–587. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.12.024>
26. Hudzicki, J. (2012). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol Author Information. *American Society For Microbiology*, December 2009, 1–13. <https://www.asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>
27. Inxight Drugs - U.S. National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS). (25 de noviembre de 2023). Sofalcone. Obtenido de <https://drugs.ncats.io/drug/2B668TJX8E>

28. Inxight Drugs - U.S. National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS). (s.f.). Metochalcone. Recuperado el 25 de noviembre de 2023, de <https://drugs.ncats.io/drug/1754ZE4075#names>
29. Jasim, H. A., Nahar, L., Jasim, M. A., Moore, S. A., Ritchie, K. J., & Sarker, S. D. (2021). Chalcones: Synthetic chemistry follows where nature leads. *Biomolecules*, *11*(8). <https://doi.org/10.3390/biom11081203>
30. Jiang, K., Dong, X. F., Lu, X. F., Wang, J. Z., Zou, K., & Huang, N. Y. (2014). Study on biological materials with facile synthesis and anti-breast cancer activities of hydroxylchalcones derivatives. *Advanced Materials Research*, *830*, 459–462. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.830.459>
31. Karaca, H., & Kazancı, S. (2022). The metal sensing applications of chalcones: The synthesis, characterization and theoretical calculations. *Journal of Molecular Structure*, *1248*. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131454>
32. Khan, S. A., & Asiri, A. M. (2017). Green synthesis, characterization and biological evaluation of novel chalcones as anti bacterial agents. *Arabian Journal of Chemistry*, *10*, S2890–S2895. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.11.018>
33. Khanpure, S., Jagadale, M., Bansode, P., Choudhari, P., & Rashinkar, G. (2018). Anticancer activity of ruthenocetyl chalcones and their molecular docking studies. *Journal of Molecular Structure*, *1173*, 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.06.091>
34. Kim, B. T., O, K. J., Chun, J. C., & Hwang, K. J. (2008). Synthesis of dihydroxylated chalcone derivatives with diverse substitution patterns and their radical scavenging ability toward DPPH free radicals. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, *29*(6), 1125–1130. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2008.29.6.1125>
35. Kostanecki, S. v., & Tambor, J. (1899). Ueber die sechs isomeren Monooxybenzalacetophenone (Monooxychalkone). *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, *32*(2), 1921–1926. <https://doi.org/10.1002/cber.18990320293>
36. Kumar, S., Oh, J. M., Abdelgawad, M. A., Abourehab, M. A. S., Tengli, A. K., Singh, A. K., Ahmad, I., Patel, H., Mathew, B., & Kim, H. (2023). Development of Isopropyl-Tailed Chalcones as a New Class of Selective MAO-B Inhibitors for the Treatment of Parkinson's Disorder. *ACS Omega*, *8*(7), 6908–6917. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07694>
37. Labmonk. (s.f.). Synthesis of Dibenzal Acetone from Benzaldehyde by Claisen Schmidt Reaction. Recuperado el 15 de junio de 2024, de https://labmonk.com/synthesis-of-dibenzal-acetone-from-benzaldehyde-by-claisen-schmidt-reaction#google_vignette
38. Lawrence, N. J., Patterson, R. P., Ooi, L. L., Cook, D., & Ducki, S. (2006). Effects of α -substitutions on structure and biological activity of anticancer chalcones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *16*(22), 5844–5848. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.08.065>
39. Litter, M. (1970). *Farmacología experimental y clínica* (4th ed.). Librería “El Ateneo” Editorial.
40. Liu, M., Wilairat, P., Croft, S. L., Tan, A. L. C., & Go, M. L. (2003). Structure-activity relationships of antileishmanial and antimalarial chalcones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *11*(13), 2729–2738. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(03\)00233-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(03)00233-5)

41. López Guerra, S. L. (2020). *Síntesis y caracterización de moléculas utilizadas en quimiopreención del cáncer derivadas de la 2-hidroxiacetofenona y acetofenona, implementando métodos de química verde*. Universidad de El Salvador.
42. Mah, S. H. (2021). Chalcones in Diets. In *Handbook of Dietary Phytochemicals* (pp. 273–324). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4148-3_10
43. Mahesha, P., Shetty, N. S., & Kulkarni, S. D. (2022). A Review on Metal Ion Sensors Derived from Chalcone Precursor. *Journal of Fluorescence*, 32(3), 835–862. <https://doi.org/10.1007/s10895-022-02900-x>
44. Marotta, L., Rossi, S., Ibba, R., Brogi, S., Calderone, V., Butini, S., Campiani, G., & Gemma, S. (2022). The green chemistry of chalcones: Valuable sources of privileged core structures for drug discovery. *Frontiers in Chemistry*, 10(September), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.988376>
45. McMurry, J. (2018). *Química Orgánica* (9th ed.). Cengage Learning.
46. Mezgebe, K., Melaku, Y., & Mulugeta, E. (2023). Synthesis and Pharmacological Activities of Chalcone and Its Derivatives Bearing N-Heterocyclic Scaffolds: A Review. *ACS Omega*, 8(22), 19194–19211. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c01035>
47. Montes-Avila, J., Díaz-Camacho, S. P., Sicairos-Félix, J., Delgado-Vargas, F., & Rivero, I. A. (2009). Solution-phase parallel synthesis of substituted chalcones and their antiparasitary activity against *Giardia lamblia*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17(18), 6780–6785. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.02.052>
48. Nassar, M. S. M., Hazzah, W. A., & Bakr, W. M. K. (2019). Evaluation of antibiotic susceptibility test results: How guilty a laboratory could be? *Journal of the Egyptian Public Health Association*, 94(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s42506-018-0006-1>
49. Niu, C. G., Guan, A. L., Zeng, G. M., Liu, Y. G., & Li, Z. W. (2006). Fluorescence water sensor based on covalent immobilization of chalcone derivative. *Analytica Chimica Acta*, 577(2), 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.06.046>
50. Nurkenov, O. A., Ibraev, M. K., Schepetkin, I. A., Khlebnikov, A. I., Seilkhanov, T. M., Arinova, A. E., & Isabaeva, M. B. (2019). Synthesis, Structure, and Anti-Inflammatory Activity of Functionally Substituted Chalcones and Their Derivatives. *Russian Journal of General Chemistry*, 89(7), 1360–1367. <https://doi.org/10.1134/S1070363219070028>
51. Ouyang, Y., Li, J., Chen, X., Fu, X., Sun, S., & Wu, Q. (2021). Chalcone derivatives: Role in anticancer therapy. *Biomolecules*, 11(6), 1–36. <https://doi.org/10.3390/biom11060894>
52. Patil, C. B., Mahajan, S. K., & Katti, S. A. (2009). Chalcone: A versatile molecule. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1(3), 11–22.
53. Rajendra Prasad, Y., Lakshmana Rao, A., & Rambabu, R. (2008). Synthesis and antimicrobial activity of some chalcone derivatives. *E-Journal of Chemistry*, 5(3), 461–466. <https://doi.org/10.1007/s11164-013-1076-5>
54. Rajendran, G., Bhanu, D., Aruchamy, B., Ramani, P., Pandurangan, N., Bobba, K. N., Oh, E. J., Chung, H. Y., Gangadaran, P., & Ahn, B. C. (2022). Chalcone: A Promising Bioactive Scaffold in Medicinal Chemistry. *Pharmaceuticals*, 15(10). <https://doi.org/10.3390/ph15101250>

55. Rani, A., Anand, A., Kumar, K., & Kumar, V. (2019). Recent developments in biological aspects of chalcones: the odyssey continues. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14(3), 249–288. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1573812>
56. Rosa, G. P., Seca, A. M. L., Barreto, M. do C., Silva, A. M. S., & Pinto, D. C. G. A. (2019). Chalcones and flavanones bearing hydroxyl and/or methoxyl groups: Synthesis and biological assessments. *Applied Sciences (Switzerland)*, 9(14). <https://doi.org/10.3390/app9142846>
57. Sahu, N. K., Balbhadra, S. S., Choudhary, J., & Kohli, D. V. (2012). Exploring Pharmacological Significance of Chalcone Scaffold: A Review. *Current Medicinal Chemistry*, 19(2), 209–225. <https://doi.org/10.2174/092986712803414132>
58. Salehi, B., Quispe, C., Chamkhi, I., El Omari, N., Balahbib, A., Sharifi-Rad, J., Bouyahya, A., Akram, M., Iqbal, M., Docea, A. O., Caruntu, C., Leyva-Gómez, G., Dey, A., Martorell, M., Calina, D., López, V., & Les, F. (2021). Pharmacological Properties of Chalcones: A Review of Preclinical Including Molecular Mechanisms and Clinical Evidence. *Frontiers in Pharmacology*, 11(January). <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.592654>
59. Samanta Amalesh, Das Gouranga, D. S. K. (2011). Roles of flavonoids in Plants. *Int J Pharm Sci Tech*, 6(1), 12–35.
60. Sivakumar, P. M., Prabhakar, P. K., & Doble, M. (2011). Synthesis, antioxidant evaluation, and quantitative structure–activity relationship studies of chalcones. *Medicinal Chemistry Research*, 20(4), 482–492. <https://doi.org/10.1007/s00044-010-9342-1>
61. Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2022). *Australia • Brazil • Canada • Mexico • Singapore • United Kingdom • United States Fundamentals of Analytical Chemistry Tenth Edition*. www.cengage.com/highered
62. Solomons, T. W. G. (2004). *Química Orgánica* (2nd ed.). Editorial Limusa Wiley.
63. Song, Z., Kwok, R. T. K., Zhao, E., He, Z., Hong, Y., Lam, J. W. Y., Liu, B., & Tang, B. Z. (2014). A ratiometric fluorescent probe based on ES IPT and AIE processes for alkaline phosphatase activity assay and visualization in living cells. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6(19), 17245–17254. <https://doi.org/10.1021/am505150d>
64. Tomasch, M., Schwed, J. S., Weizel, L., & Stark, H. (2012). Novel chalcone-based fluorescent human histamine H3 receptor ligands as pharmacological tools. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 6(March), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2012.00014>
65. Wang, L., Wang, Y., Tian, Y., Shang, J., Sun, X., Chen, H., Wang, H., & Tan, W. (2017). Design, synthesis, biological evaluation, and molecular modeling studies of chalcone-rivastigmine hybrids as cholinesterase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 25(1), 360–371. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.11.002>
66. Wang, Z. (2010). Claisen-Schmidt Condensation. *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, 660–664. <https://doi.org/10.1002/9780470638859.conrr145>
67. Wuts, P. G. M. (2014). *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis* (5th ed.). Wiley.
68. Xu, M., Wu, P., Shen, F., Ji, J., & Rakesh, K. P. (2019). Chalcone derivatives and their antibacterial activities: Current development. *Bioorganic Chemistry*, 91(April), 103133. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103133>
69. Yun, S. W., Kang, N. Y., Park, S. J., Ha, H. H., Kim, Y. K., Lee, J. S., & Chang, Y. T. (2014). Diversity oriented fluorescence library approach (DOFLA) for live cell imaging

probe development. *Accounts of Chemical Research*, 47(4), 1277–1286. <https://doi.org/10.1021/ar400285f>

70. Zeinab, B., Buthaina, J., & Rafik, K. (2023). Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*, 25(6), 1–23.
71. Zhao, F., Zhao, Q. J., Zhao, J. X., Zhang, D. Z., Wu, Q. Y., & Jin, Y. S. (2013). Synthesis and cdc25B inhibitory activity evaluation of chalcones. *Chemistry of Natural Compounds*, 49(2), 206–214. <https://doi.org/10.1007/s10600-013-0563-7>
72. Zhuang, C., Zhang, W., Sheng, C., Zhang, W., Xing, C., & Miao, Z. (2017). Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. *Chemical Reviews*, 117(12), 7762–7810. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00020>

