

Síntesis y actividad antimalárica de nuevas isoflavonas.

Synthesis and anti-malaria activity of new isoflavones

José N. Domínguez

¹Universidad Central de Venezuela
jdomingu@cantv.net;

Caritza León

¹Universidad Central de Venezuela
Universidad Pedagógica Experimental Libertador Instituto Pedagógico de Caracas
caritzal@yahoo.com.mx

Juan Rodriguez

Neira Gamboa de Domínguez

gamboan@camelot.rect.ucv.ve;
Universidad Central de Venezuela. Facultad de Farmacia,

¹**Jaime Charris**

Universidad Central de Venezuela

⁴**Jiri Gut**

⁴**Philip J. Rosenthal**

⁴Department of Medicine, San Francisco General Hospital, University
of California, San Francisco rosntl@itsa.ucsf.edu

RESUMEN

Se presenta la síntesis de una nueva serie de isoflavonas y la evaluación de su actividad antimalárica in vitro como inhibidores del desarrollo de cepas de Plasmodium falciparum resistentes a la cloroquina, a través del ensayo de "Fluorescence Activated Cell Sorting" (FACS), así como también su efecto antimalárico in vivo sobre ratones infectados con Plasmodium berghei, utilizando el ensayo de supervivencia de cuatro días. El compuesto [3-estirilcarbonil-2-metil-5-metoxi]-isoflavona (38) resultó el más activo contra Plasmodium falciparum in vitro con un CI_{50} de 2.89 μM , y también tuvo un efecto importante en la disminución de la parasitemia de ratones infectados.

Palabras clave: Antimalárica; síntesis; isoflavones; plasmodium; plasmodium berghei

ABSTRACT

A series of new isoflavone derivatives were prepared and the compounds were investigated for their activity as antimalarial *in vitro* as inhibitors of the development of a chloroquine resistant strain of *Plasmodium falciparum* by using Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) assay and *in vivo* for their antimalarial effects in *Plasmodium berghei* infected mice using the four days suppressive test. The compound [3-styrylcarbonyl-2-methyl-5-methoxy]-isoflavone (38) was the most active against *Plasmodium falciparum* *in vitro* with an attractive antimalarial potency (IC_{50} 2.89 μ M) and also it caused an important effect on infected mice parasitemia.

Key words: Antimalarial; synthesis; isoflavones; *plasmodium falciparum*; *plasmodium berghei*

INTRODUCCIÓN

Reportes de la Organización Mundial de la Salud señalan que el *P. falciparum* infecta cerca de 200-500 millones de personas y mueren anualmente entre 1-2 millones (Giles, 2000). Esta situación se ha venido agravando, en parte debido al rápido desarrollo de resistencia por el parásito a las drogas convencionalmente utilizadas. Entre las cuatro especies que infectan al hombre, *Plasmodium falciparum* causa el mayor número de infecciones letales y con frecuencia es resistente a la cloroquina, hasta ahora la droga que ha sido más usada en el tratamiento de la malaria. La resistencia a otras drogas antimaláricas está aumentando (White, 2004). De este modo, se necesita la preparación de nuevas drogas antimaláricas (Domínguez, 2002; Riddle y otros, 1996; Madrid y otros, 2005). Se han concentrado esfuerzos en la búsqueda de una droga antimalárica alternativa que resulte efectiva y con pocos efectos secundarios. Sin embargo, el rápido desarrollo de resistencia del parásito a las drogas corrientemente utilizadas como antimaláricos señala claramente la urgencia del descubrimiento y desarrollo de nuevos compuestos y de la identificación de nuevos blancos quimioterapéuticos (Olliaro, 2001).

Las isoflavonas constituyen una importante clase de compuestos biológicamente activos ampliamente distribuidos en la naturaleza (Tsukayama, Wada, Kawamura, Yamashita y Nishiuchi, 2004). y que han mostrado una gran variedad de propiedades farmacológicas, entre las que se incluyen las actividades estrogénica (Kim, Hackett y Brueggemeier, 2004), anti-inflamatoria (Register y otros, 2005) y antimalárica (Kraft y otros, 2000). En este

trabajo reportamos la síntesis de nuevas isoflavonas y los resultados de la evaluación de su actividad antimalárica *in vivo* e *in vitro*, representando un aporte en la búsqueda de nuevas sustancias antimaláricas.

MÉTODO

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato "Thomas micro hot stage" y no están corregidos. Los espectros infrarrojos fueron determinados en pastillas de KBr en un espectrofotómetro Shimadzu modelo 470 y están expresados en cm^{-1} . Los espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN se realizaron en un espectrómetro JEOL GSX (270 MHz); los desplazamientos químicos están expresados en δ (ppm) respecto a tetrametilsilano. Los espectros de masas fueron obtenidos usando un aparato Varian modelo CP3800 acoplado con un cromatógrafo de gases Saturn 2000 energía de ionización 70eV, usando CIMS (Chemical Ionization Mass Spectrometry). Todos los solventes fueron secados y destilados bajo atmósfera de nitrógeno. Las cromatografías en columna se realizaron sobre sílica gel 60 (70-230 mesh, Merck), los TLC analíticos se desarrollaron sobre placas precubiertas (sílica gel 60, F254) y se visualizaron con una lámpara de luz UV.

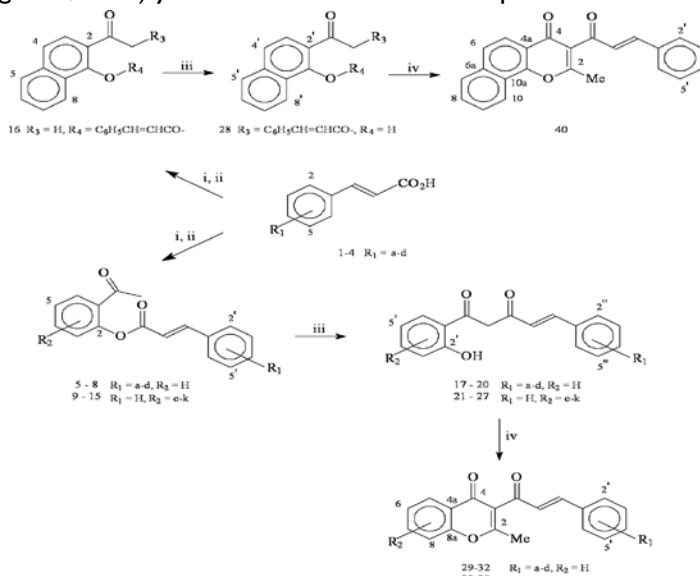


Figura I. Preparación de Isoflavonas sustituidas.

Condiciones de la Reacción: **i.** SOCl_2 , Δ , 4-6 h.; **ii.** 2-OH-C₆H_n-COMe (n = 2-4) para los compuestos **5-15** y 1-OH-C₁₀H₆COMe para el compuesto **16**; CH_2Cl_2 , 7-9 h, rt; **iii.** NaH, THF, rt, 3h.; iv. MeCOCl, rt.

a. p-OMe; **b.** p-Me; **c.** p-Cl; **d.** 2,4-diF; **e.** H; **f.** -diCl; **g.** -Me; **h.** -Cl; **i-k.** -OMe.

Método Químico

Procedimiento general para la síntesis de β -dicetonas sustituidas 17-28

Estos compuestos fueron preparados a través del reagrupamiento de Venkataraman-Baker (Tsukayama y otros, 2004; Kim, Hackett y Bruegge-meier, 2004; Register y otros, 2005). A una solución de acetofenona **5-16** (0.65 g, 2.3 mmol) en THF seco (15 mL) se añadió hidruro de sodio (0.56 g, 24 mmol) en pequeñas porciones. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 3-7 h. Finalizada la reacción, se concentró bajo presión reducida, se colocó hielo, se neutralizó con ácido clorhídrico 0.1 N, se extrajo con acetato de etilo, se lavó con solución acuosa saturada de NaHCO_3 y luego con solución saturada de NaCl; se secó con (MgSO_4) , se filtró y se concentró bajo presión reducida. El producto fue separado por cromatografía en columna (SiO_2) y se eluyó con mezclas de acetato de etilo/hexano 1:9, 2:8 y 3:7 v/v.

[1(2'-hidroxifenil)-5-(4''-metoxifenil)]-4-penten-1,3-diona (17).

Rendimiento 79%, m.p. 110-111°C. IR (KBr) cm^{-1} : 1683; 1626; 1597. ^1H RMN CDCl_3 δ : 3.84 (s, 3H, 4''-OMe); 6.27 (s, 1H, Ha); 6.46 (d, 1H, H_{α} , J = 15.58 Hz); 6.87 (dd, 1H, H_3 , $J_{\text{H}_3-\text{H}_4} = 8.40$ Hz; $J_{\text{H}_3-\text{H}_5} = 1.46$ Hz); 6.92 (d, 2H, H_{3-5} , J = 8.88 Hz); 6.97 (dd, 1H, H_5 , $J_{\text{H}_5-\text{H}_4} = 8.40$ Hz; $J_{\text{H}_5-\text{H}_3} = 1.49$ Hz); 7.43 (td, 1H, H_4 , $J_{\text{H}_4-\text{H}_3-5} = 8.40$ Hz, $J_{\text{H}_4-\text{H}_6} = 1.46$ Hz); 7.50 (d, 2H, H_{2-6} , J = 8.88 Hz); 7.62 (d, 1H, H_β , J = 15.58 Hz); 7.68 (dd, 1H, H_6 , $J_{\text{H}_6-\text{H}_5} = 8.18$ Hz, $J_{\text{H}_6-\text{H}_4} = 1.49$ Hz); 12.26 (s, 1H, 2'-OH).

[1(2'-hidroxifenil)-5-(4''-metilfenil)]-4-penten-1,3-diona (18).

Rendimiento 79%, m.p. 98-100°C. IR (KBr) cm^{-1} : 1626; 1558. ^1H RMN CDCl_3 δ : 2.37 (s, 3H, 4''-Me); 6.29 (s, 1H, Ha); 6.54 (d, 1H, H_{α} , J =

15.82 Hz); 6.88 (td, 1H, H₄, J_{H4'-H3'-5'} = 8.24 Hz; J_{H4'-H6'} = 1.00 Hz); 6.97 (d, 1H, H₃, J = 8.24 Hz); 7.20 (d, 2H, H_{3'-5'}, J = 7.94 Hz); 7.44 (d, 2H, H_{2'-6'}, J = 7.91 Hz); 7.63 (d, 1H, H_β, J = 15.85 Hz); 7.68 (dd, 1H, H₆, J_{H6'-H5'} = 8.24 Hz, J_{H6'-H4'} = 1.00 Hz); 12.24 (s, 1H, 2'-OH); 14.67 (s, 1H, OH).

[5-(4''-clorofenil)-1(2'-hidroxifenil)]-4-penten-1,3-diona (19)

Rendimiento 38%, m.p. 156-158°C. IR (KBr) cm⁻¹: 1699; 1626; 1578. ¹H RMN CDCl₃ δ: 6.31 (s, 1H, Ha); 6.54 (d, 1H, H_α, J = 15.82 Hz); 6.89 (td, 1H, H₄, J_{H4'-H3'-5'} = 8.15 Hz; J_{H4'-H6'} = 2.00 Hz); 6.98 (dd, 1H, H₃, J_{H3'-H4'} = 8.15 Hz; J_{H3'-H5'} = 2.00 Hz); 7.36 (d, 2H, H_{3'-5'}, J = 8.42 Hz); 7.47 (d, 2H, H_{2'-6'}, J = 8.42 Hz); 7.58 (d, 1H, H_β, J = 15.82 Hz); 7.68 (dd, 1H, H₆, J_{H6'-H5'} = 8.42 Hz; J_{H6'-H4'} = 2.00 Hz); 12.19 (s, 1H, 2'-OH).

[1(2'-hidroxifenil)-5-(2'',4''-difluorofenil)]-4-penten-1,3-diona (20).

Rendimiento 49%, m.p. 146-148°C. IR (KBr) cm⁻¹: 1699; 1626. ¹H RMN CDCl₃ δ: 6.31 (s, 1H, Ha); 6.64 (d, 1H, H_α, J = 15.85 Hz); 6.83-6.99 (m, 3H, H₃; H₅; H₆); 7.42-7.57 (m, 3H, H₄; H₅; H₆); 7.67 (d, 1H, H_β, J = 15.85 Hz); 7.67 (d, 1H, H₃, J = 1.65 Hz); 12.17 (s, 1H, 2'-OH); 14.56 (s, 1H, OH).

[1(2'-hidroxifenil)-5-fenil]-4-penten-1,3-diona (21).

Rendimiento 41%, m.p. 121-123°C. IR (KBr) cm⁻¹: 1632; 1578. ¹H RMN CDCl₃ δ: 6.32 (s, 1H, Ha); 6.59 (d, 1H, H_α, J = 15.82 Hz); 6.89 (t, 1H, H₄, J = 8.40 Hz); 6.98 (d, 1H, H₃, J = 8.40 Hz); 7.37-7.47 (m, 5H, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆); 7.54-7.57 (m, 1H, H₅); 7.65 (d, 1H, H_β, J = 15.82 Hz); 7.70 (d, 1H, H₆, J = 1.81 Hz); 12.22 (s, 1H, 2'-OH).

[1(3',5'-dicloro-2'-hidroxifenil)-5-fenil]-4-penten-1,3-diona (22).

Rendimiento 76%, m.p. 122-123°C. IR (KBr) cm⁻¹: 1632; 1581. ¹H RMN CDCl₃ δ: 6.25 (s, 1H, Ha); 6.60 (d, 1H, H_α, J = 15.82 Hz); 7.40 (d, 1H, H₄, J = 2.21 Hz); 7.52-7.59 (m, 5H, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆); 7.42 (d, 1H, H₆, J = 2.21 Hz); 7.71 (d, 1H, H_β, J = 15.85 Hz).

[1(2'-hidroxi-5'-metilfenil)-5-fenil]-4-penten-1,3-diona (23).

Rendimiento 76%, m.p. 100-101°C. IR (KBr) cm⁻¹: 1635; 1578. ¹H RMN CDCl₃ δ: 2.31 (s, 3H, 5'-Me); 6.32 (s, 1H, Ha); 6.60 (d, 1H, H_α, J = 15.82

Hz); 6.88 (d, 1H, H₃, J = 8.40 Hz); 7.36-7.47 (m, 4H, H₆, H₄, H_{2'-6'}); 7.53-7.57 (m, 3H, H_{3'-5'}, H_{4'}); 7.64 (d, 1H, H_β, J = 15.85 Hz); 12.03 (s, 1H, 2'-OH).

[1(5'-cloro-2'-hidroxifenil)-5-fenil]-4-penten-1,3-diona (24).

Rendimiento 73%, m.p. 104-106°C. IR (KBr) cm⁻¹: 1635; 1565. ¹H RMN CDCl₃ δ: 6.25 (s, 1H, Ha); 6.60 (d, 1H, H_α, J = 15.58 Hz); 6.93 (d, 1H, H₃, J = 8.88 Hz); 7.35-7.45 (m, 4H, H₆, H_{2'-6'}, H_{4'}); 7.54-7.57 (m, 3H, H₄, H_{3'-5'}); 7.68 (d, 1H, H_β, J = 15.58 Hz); 12.15 (s, 1H, 2'-OH).

[1(2'-hidroxi-5'-metoxifenil)-5-fenil]-4-penten-1,3-diona (25).

Rendimiento 94%, m.p. 48-50°C. IR (KBr) cm⁻¹: 1683; 1632; 1568. ¹H RMN CDCl₃ δ: 3.81 (s, 3H, 5'-OMe); 6.25 (s, 1H, Ha); 6.71 (d, 1H, H_α, J = 15.80 Hz); 6.92 (d, 1H, H₄, J = 8.09 Hz); 7.10-7.56 (m, 7H, H₃, H₆, H_{2'}, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'}, H_{6'}); 7.65 (d, 1H, H_β, J = 15.80 Hz); 11.82 (s, 1H, 2'-OH).

[1(2'-hidroxi-6'-metoxifenil)-5-fenil]-4-penten-1,3-diona (26).

Rendimiento 90%, m.p. 68-70°C. IR (KBr) cm⁻¹: 1626; 1578. ¹H RMN CDCl₃ δ: 3.92 (s, 3H, 6'-OMe); 6.41 (d, 1H, H₅, J = 8.42 Hz); 6.58 (dd, 1H, H₃, J_{H3'-H4'} = 8.40 Hz, J_{H3'-H5'} = 1.00 Hz); 6.58 (d, 1H, H_α, J = 15.82 Hz); 6.78 (s, 1H, Ha); 7.30 (t, 1H, H₄, J = 8.42 Hz); 7.35-7.57 (m, 5H, H_{2'}, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'}, H_{6'}); 7.62 (d, 1H, H_β, J = 15.82 Hz).

[1(2'-hidroxi-4'-metoxifenil)-5-fenil]-4-penten-1,3-diona (27).

Rendimiento 54%, m.p. 182-184°C. IR (KBr) cm⁻¹: 1667; 1626. ¹H RMN CDCl₃ δ: 3.96 (s, 3H, 4'-OMe); 6.97 (s, 1H, Ha); 7.01 (d, 1H, H₃, J = 2.21 Hz); 7.16 (d, 1H, H_α, J = 15.82 Hz); 7.35-7.42 (m, 3H, H₅, H_{2'-6'}); 7.55-7.61 (m, 3H, H₄, H_{3'-5'}); 7.74 (d, 1H, H_β, J = 15.85 Hz); 8.13 (d, 1H, H₆, J = 8.88 Hz).

[1(1'-hidroxi-2'-naftil)-5-fenil]-4-penten-1,3-diona (28).

Rendimiento 12%, m.p. 128-130°C. IR (KBr) cm⁻¹: 1626; 1568. ¹H RMN CDCl₃ δ: 6.38 (s, 1H, Ha); 6.63 (d, 1H, H_α, J = 15.58 Hz); 7.26-7.41 (m, 5H, H_{2'}, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'}, H_{6'}); 7.52-7.63 (m, 4H, H₃, H₄, H₆, H₇); 7.65 (d, 1H, H_β, J = 15.58 Hz); 7.75 (d, 1H, H₅, J = 7.91 Hz); 8.45 (d, 1H, H₈, J = 8.15 Hz).

Procedimiento general para la síntesis de 3-estirilcarbonil-isoflavonas 29-40

Las 3-estirilcarbonil-isoflavonas **29-40** fueron obtenidas a través de la ciclación de las correspondientes β -dicetonas sustituidas **17-28**. La mezcla de la dicetona y cloruro de acetilo recién destilado (1:1.2 mmol respectivamente) se agitó a temperatura ambiente por 8-12 horas. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida; el producto se extrajo con diclorometano, se lavó con soluciones acuosas saturadas de NaHCO_3 y NaCl , se secó con MgSO_4 , se filtró y concentró bajo presión reducida. El producto crudo se purificó a través de cromatografía de columna (SiO_2) empleando la mezcla acetato de etilo/hexano 3:7 v/v como eluyente.

[3(4'-metoxiestirilcarbonil)-2-metil]-isoflavona (29).

Rendimiento 13%, m.p. 100-102°C. IR (KBr) cm^{-1} : 1763; 1683; 1597. ^1H RMN CDCl_3 δ : 2.32 (s, 3H, 2-Me); 3.84 (s, 3H, 4'-OMe); 6.44 (d, 1H, H_{α} , $J = 15.82$ Hz); 6.91 (d, 2H, H_{3-5} , $J = 8.67$ Hz); 7.12 (dd, 1H, H_8 , $J_{\text{H8-H7}} = 8.15$ Hz; $J_{\text{H8-H6}} = 1.00$ Hz); 7.32 (td, 1H, H_6 , $J_{\text{H6,H5-H7}} = 7.67$ Hz; $J_{\text{H6-H8}} = 1.00$ Hz); 7.48-7.52 (m, 1H, H_7); 7.50 (d, 2H, H_{2-6} , $J = 8.67$ Hz); 7.64 (d, 1H, H_{β} , $J = 15.82$ Hz); 7.73 (dd, 1H, H_5 , $J_{\text{H5-H6}} = 7.67$ Hz; $J_{\text{H5-H7}} = 1.00$ Hz). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 21.21 (2-Me); 55.49 (4'-OMe); 114.50 (C_{3-5}); 120.64 (C_8); 123.72 (C_3); 126.25 (C_{4a}); 127.74 (C_5); 129.59 (C_6); 129.85 (C_{2-6}); 130.15 (C_1); 130.54 (C_7); 132.54 (C_{α}); 140.41 (C_{β}); 148.74 (C_{8a}); 161.44 (C_4); 169.52 (C_2); 180.01 (CO); 188.84 (CO); (m/z): 321 [M+1].

[3(4'-metilestirilcarbonil)-2-metil]-isoflavona (30).

Rendimiento 53%, m.p. 92-94°C. IR (KBr) cm^{-1} : 1750; 1677; 1603. ^1H RMN CDCl_3 δ : 2.32 (s, 3H, 4'-Me); 2.37 (s, 3H, 2-Me); 6.52 (d, 1H, H_{α} , $J = 15.85$ Hz); 7.20 (d, 2H, H_{3-5} , $J = 8.15$ Hz); 7.33 (td, 1H, H_6 , $J_{\text{H6,H5-H7}} = 7.67$ Hz; $J_{\text{H6-H8}} = 1.00$ Hz); 7.44 (d, 2H, H_{2-6} , $J = 8.15$ Hz); 7.47-7.54 (m, 2H, H_7 ; H_8); 7.65 (d, 1H, H_{β} , $J = 15.82$ Hz); 8.22 (dd, 1H, H_5 , $J_{\text{H5-H6}} = 7.67$ Hz; $J_{\text{H5-H7}} = 1.76$ Hz). ^{13}C -RMN (CDCl_3) δ : 21.22 (2-Me); 21.59 (4'-Me); 116.12 (C_8); 121.95 (C_3); 123.75 (C_{4a}); 126.28 (C_5); 128.16 (C_{3-5}); 128.44 (C_{2-6}); 129.62 (C_6); 129.77 (C_1); 132.64 (C_7); 140.64 (C_{α}); 140.73 (C_4); 147.10 (C_{β}); 169.57 (C_2); 179.46 (CO); 189.42 (CO); (m/z): 305 [M+1].

[3(4'-cloroestirilcarbonil)-2-metil]-isoflavona (31).

Rendimiento 17%, m.p. 72-76°C. IR (KBr) cm^{-1} : 1754; 1584. ^1H RMN CDCl_3 δ : 2.32 (s, 3H, 2-Me); 6.52 (d, 1H, H_{α} , $J = 15.82$ Hz); 7.36 (d, 2H, H_{3-5} , $J = 8.40$ Hz); 7.32-7.37 (m, 1H, H_6); 7.47 (d, 2H, H_{2-6} , $J = 8.40$

H_z); 7.48-7.52 (m, 2H, H₇; H₈); 7.60 (d, 1H, H_β, J = 15.82 Hz); 7.73 (dd, 1H, H₅, J_{H5-H6} = 7.67 Hz; J_{H5-H7} = 1.73 Hz). ¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 21.20 (2-Me); 123.44 (C₃); 123.79 (C_{4a}); 126.28 (C₆); 129.23 (C_{3'-5'}); 129.61 (C_{2'-6'}); 132.82 (C₇); 133.52 (C₁); 136.03 (C₄); 138.89 (C_α); 148.79 (C_β); 169.48 (C₂); 178.22 (CO); 190.15 (CO); (m/z): 326 [M+1].

[3(2',4'-difluoroestirilcarbonil)-2-metil]-isoflavona (32).

Rendimiento 17%, m.p. 128-130°C. IR (KBr) cm⁻¹: 1699; 1687. ¹H RMN CDCl₃ δ: 2.32 (s, 3H, 2-Me); 6.48 (d, 1H, H_α, J = 16.31 Hz); 6.83-6.92 (m, 1H, H₅); 7.40-7.75 (m, 5H, H₃; H₆; H₆; H₇; H₈); 7.83 (d, 1H, H_β, J = 16.34 Hz); 8.21 (dd, 1H, H₅, J_{H5-H6} = 8.15 Hz; J_{H5-H7} = 1.73 Hz). ¹³C-RMN (CDCl₃) δ : 19.76 (2-Me); 104.52 (C₃); 112.31 (C₅); 117.92 (C₈); 123.75 (C₁); 125.73 (C₅); 126.08 (C₆); 128.67 (C₆); 134.22 (C₇); 155.23 (C_{8a}); 168.42 (C₂); 169.26 (C₄); 173.89 (CO); 191.79 (CO); (m/z): 326 [M+1].

[3-estirilcarbonil-2-metil]-isoflavona (33).

Rendimiento 32%, m.p. 148-150°C. IR (KBr) cm⁻¹: 1648. ¹H RMN CDCl₃ δ: 2.50 (s, 3H, 2-Me); 7.36-7.47 (m, 5H, H_{3'-5'}; H_{2'-6'}; H_α); 7.56-7.60 (m, 2H, H₄; H₆; H₈); 7.67 (d, 1H, H_β, J = 15.09 Hz); 7.70 (td, 1H, H₇, J_{H7,H6-H8} = 8.45 Hz; J_{H7-H5} = 1.73 Hz); 8.22 (dd, 1H, H₅, J_{H5-H6} = 7.91 Hz; J_{H5-H7} = 1.73 Hz). ¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 19.61 (2-Me); 117.90 (C₈); 123.80 (C₃); 125.62 (C_{4a}); 126.08 (C₅); 127.18 (C₆); 128.76 (C_{3'-5'}); 128.91 (C_{2'-6'}); 130.66 (C₄); 134.12 (C₇); 134.72 (C₁); 144.02 (C_α); 155.62 (C_β); 167.89 (C₂); 179.66 (CO); 192.19 (CO); (m/z): 291 [M+1].

[3-estirilcarbonil-2-metil-6,8-dicloro]-isoflavon (34).

Rendimiento 41%, m.p. 100-102°C. IR (KBr) cm⁻¹: 1754. ¹H RMN CDCl₃ δ: 2.35 (s, 3H, 2-Me); 6.54 (d, 1H, H_α, J = 15.82 Hz); 7.24 (s, 1H, H₇); 7.38-7.40 (m, 3H, H_{3'-5'}, H₄); 7.52-7.58 (m, 2H, H_{2'-6'}); 7.69 (d, 1H, H_β, J = 15.82 Hz); 8.07 (d, 1H, H₅, J = 2.48 Hz). ¹³C-RMN (CDCl₃) δ : 20.67 (2-Me); 122.38 (C₃); 127.87 (C₅); 128.25 (C_{3'-5'}); 128.78 (C_{4a}); 129.08 (C_{2'-6'}); 129.86 (C₈); 130.50 (C₆); 132.10 (C₄); 132.49 (C₇); 133.64 (C₁); 134.76 (C_α); 141.49 (C_β); 144.11 (C_{8a}); 168.05 (C₂); 179.39 (CO); 187.53 (CO); (m/z): 360 [M+1].

[3-estirilcarbonil-2,6-dimetil]-isoflavona (35).

Rendimiento 18%, m.p. 144-146°C. IR (KBr) cm⁻¹: 1648. ¹H RMN CDCl₃ δ: 2.45 (s, 3H, 6-Me); 2.49 (s, 3H, 2-Me); 7.21 (d, 1H, H_α, J = 16.09 Hz);

7.33-7.38 (m, 4H, H_{3'-5'}; H_{4'}; H_{8'}); 7.48-7.60 (m, 3H, H_{2'-6'}; H_{7'}); 7.60 (d, 1H, H_{β'}, J = 16.07 Hz); 7.99 (d, 1H, H_{5'}, J = 1.76 Hz). ¹³C-RMN (CDCl₃) δ : 19.64 (2-Me); 21.05 (6-Me); 117.64 (C_{8'}); 123.50 (C_{3'}); 125.40 (C_{4a'}); 127.27 (C_{5'}); 128.74 (C_{3'-5'}); 128.90 (C_{2'-6'}); 130.61 (C_{4'}); 134.62 (C_{1'}); 135.32 (C_{6'}); 135.66 (C_{7'}); 143.88 (C_{β'}); 154.01 (C_{8a'}); 167.77 (C_{2'}); 176.25 (CO); 192.09 (CO); (m/z): 305 [M+1].

[6-cloro-3-estirilcarbonil-2-metil]-isoflavona (36).

Rendimiento 8%, m.p. 170-171°C. IR (KBr) cm⁻¹: 1680. ¹H RMN CDCl₃ δ: 2.50 (s, 3H, 2-Me); 7.18 (d, 1H, H_{α'}, J = 16.09 Hz); 7.36-7.44 (m, 3H, H_{3'-5'}; H_{4'}); 7.42 (d, 2H, H_{2'-6'}, J = 8.88 Hz); 7.60 (d, 1H, H_{β'}, J = 16.07 Hz); 7.63 (d, 1H, H_{7'}, J = 8.91 Hz); 7.64 (d, 1H, H_{8'}, J = 8.91 Hz); 8.17 (d, 1H, H_{5'}, J = 2.73 Hz). ¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 19.64 (2-Me); 119.66 (C_{3'}); 123.36 (C_{8'}); 124.79 (C_{4a'}); 125.53 (C_{5'}); 126.93 (C_{6'}); 128.79 (C_{3'-5'}); 128.96 (C_{2'-6'}); 130.81 (C_{4'}); 134.35 (C_{7'}); 134.56 (C_{1'}); 144.38 (C_{β'}); 154.06 (C_{8a'}); 168.12 (C_{2'}); 174.85 (CO); 191.53 (CO); (m/z): 326 [M+1].

[3-estirilcarbonil-2-metil-6-metoxi]-isoflavona (37).

Rendimiento 29%, m.p. 70-71°C. IR (KBr) cm⁻¹: 1747. ¹H RMN CDCl₃ δ: 2.30 (s, 3H, 2-Me); 3.84 (s, 3H, 6-OMe); 6.56 (d, 1H, H_{α'}, J = 15.82 Hz); 7.02 (d, 1H, H_{5'}, J = 1.49 Hz); 7.23-7.26 (m, 2H, H_{7'}; H_{8'}); 7.37-7.40 (m, 3H, H_{3'-5'}; H_{4'}); 7.53-7.59 (m, 2H, H_{2'-6'}); 7.67 (d, 1H, H_{β'}, J = 15.82 Hz). ¹³C-RMN (CDCl₃) δ : 21.16 (2-Me); 55.88 (6-OMe); 113.94 (C_{5'}); 118.39 (C_{3'}); 122.91 (C_{4a'}); 124.59 (C_{8'}); 128.13 (C_{3'-5'}); 129.03 (C_{2'-6'}); 130.22 (C_{4'}); 134.99 (C_{1'}); 140.56 (C_{α'}); 157.39 (C_{6'}); 169.94 (C_{2'}); 178.91 (CO); 189.47 (CO); (m/z): 321 [M+1].

[3-estirilcarbonil-2-metil-5-metoxi]-isoflavona (38).

Rendimiento 32%, m.p. 160-161°C. IR (KBr) cm⁻¹: 1760. ¹H RMN CDCl₃ δ: 2.41 (s, 3H, 2-Me); 3.97 (s, 3H, 5-OMe); 6.82 (d, 1H, H_{6'}, J = 7.67 Hz); 7.00 (dd, 1H, H_{8'}, J_{H8-H7} = 8.53 Hz; J_{H8-H6} = 1.00 Hz); 7.20 (d, 1H, H_{α'}, J = 15.85 Hz); 7.34-7.38 (m, 3H, H_{3'-5'}; H_{4'}); 7.53-7.59 (m, 3H, H_{2'-6'}; H_{7'}); 7.60 (d, 1H, H_{β'}, J = 15.85 Hz). ¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 18.88 (2-Me); 56.57 (5-OMe); 106.86 (C_{8'}); 109.91 (C_{6'}); 114.46 (C_{4a'}); 124.65 (C_{3'}); 128.79 (C_{2'-6'}); 130.48 (C_{4'}); 134.20 (C_{7'}); 134.79 (C_{1'}); 143.37 (C_{β'}); 160.09 (C_{5'}); 165.67 (C_{2'}); 176.05 (CO); 192.46 (CO); (m/z): 321 [M+1].

[3-estirilcarbonil-2-metil-7-metoxi]-isoflavona (39).

Rendimiento 33%, m.p. 178-179°C. IR (KBr) cm^{-1} : 1766; 1667). ^1H RMN CDCl_3 δ : 2.50 (s, 3H, 2-Me); 3.96 (s, 3H, 7-OMe); 7.01 (d, 1H, H_8 , J = 2.48 Hz); 7.25 (d, 1H, H_α , J = 15.82 Hz); 7.35-7.39 (m, 2H, H_4 ; H_6); 7.55-7.61 (m, 4H, H_{2-6} ; H_{3-5}); 7.74 (d, 1H, H_β , J = 15.82 Hz); 8.13 (d, 1H, H_5 , J = 8.15 Hz). ^{13}C -RMN (CDCl_3) δ : 21.28 (2-Me); 56.02 (7-OMe); 100.29 (C_8); 114.67 (C_6); 118.22 (C_4); 122.27 (C_3); 127.2 (C_5); 128.81 (C_{3-5}); 128.89 (C_{2-6}); 129.02 (C_4); 134.74 (C_1); 139.19 (C_α); 144.20 (C_β); 161.20 (C_2); 164.74 (C_7); 175.95 (CO); 192.20 (CO); (m/z): 321 [M+1].

[3-estirilcarbonil-2-metil-4H-4-oxo]-nafto [1,2-b] pirano (40).

Rendimiento 36%, m.p. 160-162°C. IR (KBr) cm^{-1} : 1667. ^1H RMN CDCl_3 δ : 2.65 (s, 3H, 2-Me); 7.33 (d, 1H, H_α , J = 15.58 Hz); 7.58-7.62 (m, 5H, H_{2-6} ; H_{3-5} ; H_4); 7.65 (d, 1H, H_β , J = 15.58 Hz); 7.68-7.74 (m, 2H, H_8 ; H_9); 7.79 (d, 1H, H_6 , J = 8.67 Hz); 7.95 (dd, 1H, H_7 , $J_{\text{H}7-\text{H}8} = 8.18$ Hz; $J_{\text{H}7-\text{H}9} = 2.21$ Hz); 8.16 (d, 1H, H_5 , J = 8.67 Hz); 8.51 (dd, 1H, H_{10} , $J_{\text{H}10-\text{H}9} = 7.18$ Hz; $J_{\text{H}10-\text{H}8} = 2.21$ Hz). ^{13}C -RMN (CDCl_3) δ : 19.40 (2-Me); 120.28 (C_{10a}); 120.84 (C_{4a}); 122.18 (C_3); 123.69 (C_5); 124.50 (C_6); 125.64 (C_{10}); 127.27 (C_9); 128.25 (C_8); 128.74 (C_{3-5}); 128.87 (C_{2-6}); 129.50 (C_7); 130.58 (C_4); 134.81 (C_1); 136.12 (C_α); 143.97 (C_β); 153.19 (C_{10b}); 166.82 (C_2); 175.89 (CO); 191.86 (CO); (m/z): 341 [M+1].

Método Biológico

Inhibición in vitro del desarrollo de los parásitos.

Los cultivos de *Plasmodium falciparum* (cepa W2) fueron sincronizados al estadio de anillos mediante tratamiento con Sorbitol. Los anillos obtenidos fueron cultivados por 48 horas (0.1% parasitemia, 2% hematocrito) bajo atmósfera de O_2 , CO_2 y N_2 (3%, 6% 91%) en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero humano y en presencia de los compuestos a evaluar. Los compuestos fueron añadidos a partir de soluciones madres 1000X preparadas en DMSO. Se incluyeron controles de DMSO (0,1 %). Después de 48 horas de incubación, el medio de cultivo fue removido y se reemplazó con formaldehído 1% en PBS, pH 7.4 por 48 horas adicionales a temperatura ambiente para fijar las células. Los parásitos fijados fueron

transferidos a una solución Triton-X-100 0.1% en PBS que contenía 1 nM del colorante YOYO-1 (sonda molecular). La parasitemia se determinó graficando la fluorescencia obtenida por citometría de flujo utilizando el software CellQuest (Beckton Dickinson). Los valores de CI_{50} para la inhibición del crecimiento parasitario fueron determinados gráficamente a partir del porcentaje de parasitemia vs la concentración de los compuestos, usando el software GraphPad (Reinders, van Vianen, van der Keur, van Engen, Janse, Tanke, 1995).

Efectos antimaláricos in vivo

Se utilizó el modelo murino consistente en ratones NIH infectados con *Plasmodium berghei* (Peters, 1970). Ratones NIH de cuatro semanas de edad y peso entre 18-20g fueron inoculados intra-peritonealmente con 1×10^6 células rojas infectadas con *Plasmodium berghei*. Los compuestos sintetizados fueron disueltos en DMSO (0.1 M) y diluidos con Saline-Tween 20 (2%). Cada compuesto (20 mg/kg) se administró intra-peritonealmente una vez al día por 4 días, comenzando 2 horas después de la infección. La Cloroquina (25 mg/kg en agua) se utilizó como control positivo. Para los controles negativos, ratones infectados fueron inyectados con Saline-Tween 20 (2%). Después del cuarto día de la infección, se calculó la parasitemia examinando extendidos de sangre de los ratones tratados, extraída de la cola, coloreados con Giemsa. Los resultados (Gráfico 1) fueron expresados como parasitemia. Los resultados se analizaron estadísticamente por comparación de *one-way ANOVA* y prueba *t-student* para grupos específicos, asumiendo un 95 % de confianza de acuerdo a GraphPad Prism 3.02.

RESULTADOS

Químicos

En este trabajo se reporta el desarrollo de nuevas isoflavonas para el tratamiento de la malaria, mediante la generación de una cetona α,β -insaturada enlazada al núcleo de la isoflavona. Asimismo, se muestran los diferentes sustituyentes incorporados al anillo aromático del sistema α,β -insaturado y su posible efecto en el comportamiento químico (Figura

1) y la actividad antimalárica de los nuevos derivados. El primer paso de la secuencia fue la preparación de los ácidos cinámicos sustituidos 1-4, a partir de la condensación de aldehídos aromáticos sustituidos con ácido malónico, siguiendo los procedimientos conocidos (Winn y otros, 2001; Liu y otros, 2001). El acoplamiento de los ácidos cinámicos 1-4 con las respectivas 2-hidroxiacetofenonas sustituidas en cloruro de tionilo, permitió obtener las 2-estirilcarboniloxiacetofenonas sustituidas, siguiendo los procedimientos convencionales reportados en la literatura (Riva y otros, 1997; Zembower y Zhang, 1998), para obtenerse los compuestos 5-16 con buenos rendimientos.

Los productos 17-28 fueron obtenidos mediante el reagrupamiento de Venkataraman-Baker, de los correspondientes derivados 5-16, con la transferencia inducida por base del grupo acilo ester hasta un fenol ortodicarbonilo, que condujo a las 1,3-dicetonas (Riva y otros, 1997; Zembower y Zhang, 1998; Baker, 1933; Kalinin, Da Silva, Lopes, Lopes y Snieckus, 1998). Esta reacción está relacionada a la Condensación de Claisen, y procede a través de la formación de un enolato, seguido por transferencia intramolecular del grupo acilo para dar 1,3-dicetonas (Figura 1). Todos los compuestos fueron purificados a través de la técnica de cromatografía de columna. Los datos espectroscópicos de ^1H RMN y ^{13}C RMN indicaron claramente que las -dicetonas obtenidas, se encontraban bajo la forma enólica característica, mostrando desplazamientos químicos del protón enólico enlazado intramolecularmente entre 14-15 ppm. La preparación de las nuevas 2-metil-3-estirilcarbonil-isoflavonas sustituidas se fundamentó en la simple condensación de cloruro de acetilo recién destilado con las correspondientes -dicetonas 17-28. La optimización de los parámetros de la reacción se logró empleando 1.2 equivalentes de cloruro de acetilo, el cual fue convertido después de la ciclación en las correspondientes isoflavonas sustituidas 29-40. Los rendimientos de estos compuestos fueron menores con respecto al de las correspondientes -dicetonas 17-28. La razón de estos bajos rendimientos podría estar relacionada al carácter electrónico de los sustituyentes en el anillo aromático del núcleo de la isoflavona, siendo importante destacar que los grupos alcoxi juegan un papel importante en la actividad antimalárica de estas estructuras (Liu, Wilairat, Croft, Lay-Choo y Go, 2003).

Biológicos

Las doce isoflavonas sustituidas **29-40** fueron probadas por su habilidad para inhibir el desarrollo de *Plasmodium falciparum* en cultivo, por incubación de los mismos con diferentes concentraciones de los compuestos durante 48 h, comenzando en la etapa de anillo. El conteo de las nuevas formas de anillo mediante el método de FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) (Noedl, Wongsrichanalai and Wernsdorfer, 2003; Sijwali y Rosenthal, 2004) se comparó con la parasitemia de los controles no tratados (Cuadro I). Cuatro compuestos inhibieron el desarrollo del parásito a concentraciones iguales o menores a 10 μM . Para los ocho compuestos restantes, la CI_{50} de inhibición del desarrollo del parásito fue $> 10 \mu\text{M}$. La actividad antimalárica de los compuestos **38** y **39** también se probó sobre ratones infectados con *Plasmodium berghei*. Se observó (Gráfico I) que el compuesto **38** fue poco efectivo para contrarrestar la parasitemia; sin embargo, el derivado **39** redujo significativamente ésta (7.3%).

CONCLUSIONES

La estrategia sintética desarrollada en esta investigación para la preparación de las 3-estirilcarbonilisoflavonas, representa un método alternativo eficiente, respecto a otros métodos tradicionalmente utilizados para la obtención de compuestos relacionados. Se sintetizó un total de 12 nuevas isoflavonas a través de una secuencia de cuatro pasos, con rendimientos generales para el último paso entre 8 y 53%.

A partir del método de FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) se encontró que cuatro compuestos (**29, 37-39**) inhibieron el desarrollo del parásito a concentraciones iguales o menores a 10 μM . Para los ocho compuestos restantes, la CI_{50} de inhibición del desarrollo del parásito fue $> 10 \mu\text{M}$. La actividad antimalárica de los compuestos **38** y **39** probada sobre ratones infectados con *Plasmodium berghei*, demostró que el compuesto **38** fue poco efectivo para contrarrestar la parasitemia; sin embargo, el derivado **39** redujo significativamente ésta (7.3%).

Los resultados encontrados en este trabajo no permiten establecer una correlación entre los efectos observados *in vitro* e *in vivo* para los

compuesto **38** y **39**. Sin embargo, estos datos pueden sugerir la sensibilidad diferencial de las dos especies de *Plasmodium* o las propiedades farmacocinéticas propias de los compuestos mencionados.

Finalmente, se encontró que los compuestos más activos poseen sustituyentes metoxi ubicados en posición 5- (**38**, CI_{50} 2.89 μ M) ó 7- (**39**, CI_{50} 3.23 μ M) en el anillo de la isoflavona

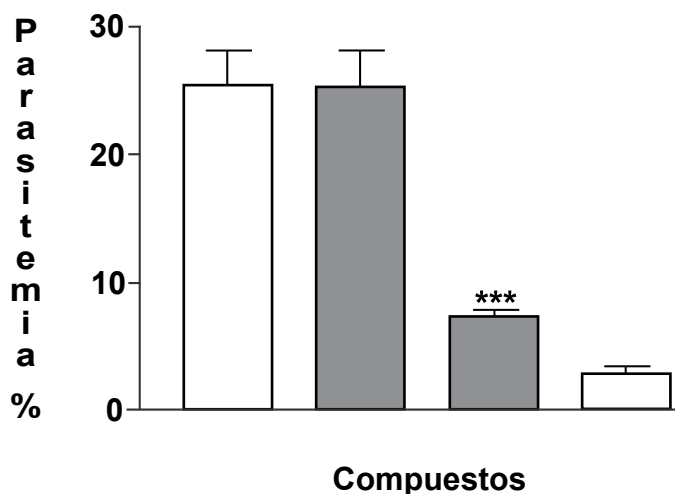


Gráfico 1. Actividad antimalárica in vivo de los compuestos seleccionados contra *P. berghei* en ratón.

Porcentaje de parasitemia al 4 día después de la infección (compuestos **38** y **39** [20 mg/kg] y CQ [25 mg/kg]). *** $p < 0,001$ comparados con ratones infectados en solución salina ($n = 5$).

Cuadro I. Inhibición del desarrollo de cultivos de *P. falciparum* y de la parasitemia de *P. berghei* en un modelo murino por los compuestos más efectivos.

^a Compuesto	^b Actividad contra cultivos de parásitos (IC ₅₀ ; μM)	^c Actividad en un modelo murino de malaria (% parasitemia)
37	10	---
38	2.89	24.85 ± 3.21
39	3.23	7.3 ± 0.61
29	10	---
Salina	---	25.28 ± 2.72
CQ	0.059	2.86 ± 0.60
LEU	6.26	
E-64	2.5	

^aSolo se presentan los compuestos que mostraron actividad contra parásitos *P. falciparum* (IC₅₀ ≤ 10 μM). ^bvalores de CI₅₀ (μM) de los compuestos probados contra cultivos del parásito, determinados por citometría de flujo. ^cparasitemia al 4 día después de iniciar la terapia de los ratones infectados con *P. berghei* ± SEM. CQ= Cloroquina; LEU= Leupeptina; E-64=trans-Epoxi-succinil-L-Leucilamido-(4-Guanidino) butano.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad Central de Venezuela (Proyectos PG 0630-5126-2.003 y PG 0630-5125-2.033), el Instituto Nacional de Higiene (Proyectos AI 35800 y AI 35707) y por la agencia internacional Medicines for Malaria Venture. Phillip J. Rosenthal is a Doris Duke Distinguished Clinical Scientist.

REFERENCIAS

- Baker, W. (1933). Molecular rearrangement of some o-acyloxyacetophenones and the mechanism of the production of 3-acylchromones. *J. Chem. Soc.* 1381-1389
- Domínguez J. (2002). Chemotherapeutic agents against malaria: what next after Chloroquine? *Curr. Top. Med. Chem.* 2, 1173-1185
- Giles, H. (2000). *Management of severe Malaria: A practical Handbook*. 2nd ed. World Health Organization: Geneva
- Kalinin, A., Da Silva, A., Lopes, C., Lopes, R. and Snieckus, V. (1998). Directed ortho metalation - cross coupling links. Carbamoyl rendition of the Baker-Venkataraman rearrangement. Regiospecific route to substituted 4-Hydroxycoumarins. *Tetrahedron. Lett.* 39, 4995-4998
- Kim, Y., Hackett, J. and Brueggemeier, R. (2004). Synthesis and aromatase inhibitory activity of novel pyridine-containing isoflavones. *J. Med. Chem.* 47, 4032-4040
- Kraft, C., Jenett-Siems, K., Siems, K., Gupta, M., Bienzle, U. and Eich, E. (2000). Antiplasmodial activity of isoflavone from *Andira inermis*. *J. Ethnopharmacol.* 73, 131-135
- Liu, G., Huth, J., Olejniczak, E., Mendoza, R., DeVries, P., Leitza, S., Reilly, E., Okasinski, G., Fesik, S. and von Geldern, T. (2001). Novel p-Arylthio Cinnamides as Antagonists of Leukocyte Function-Associated Antigen-1/Intracellular Adhesion Molecule-1 Interaction. 2. Mechanism of Inhibition and Structure-Based Improvement of Pharmaceutical Properties. *J. Med. Chem.* 44, 1202-1210
- Liu, M., Wilairat, P., Croft, S., Lay-Choo, A. and Go, Mei-Lin. (2003). Structure-activity relationships of antileishmanial and antimalarial chalcones. *Bioorg. Med. Chem.* 11, 2729-2738
- Madrid, P., Sherrill, J., Liou, A., Weisman, J., Derisi, J., Guy, R. (2005). Synthesis of ring-substituted 4-aminoquinolines and evaluation of their antimalarial activities. *Bioorg Med Chem Lett.* 15, 1015-1018
- Noedl, H., Wongsrichanalai, C. and Wernsdorfer, W. (2003). Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. *Trends Parasitol.* 19, 175-181
- Olliaro, P. (2001). Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. *Pharmacol Ther.* 89, 207-219
- Peters, W. (1970). The chemotherapy of rodent malaria. X. Dynamics of drug resistance. II. Acquisition and loss of Chloroquine resistance in *Plasmodium berghei* observed by continuous bioassay. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 64, 25-40
- Register, T., Cann, J., Kaplan, J., Williams, J., Adams, M., Morgan, T., Anthony, M., Blair, R., Wagner, J. and Clarkson, T. (2005). Effects of soy isoflavone and conjugated

- equine estrogens on inflammatory markers in atherosclerotic, ovariectomized monkeys. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 1734-1740
- Reinders, P., van Vianen, P., van der Keur, M., van Engen, A., Janse, C. and Tanke, H. (1995). Computer software for testing drug susceptibility of malaria parasites. *Cytometry.* 19, 273-281
- Ridley, R., Hofheinz, W., Matile, H., Jaquet, C., Dorn, A., Masciadri, R., Jolidon, S., Richter, W., Guenzi, A., Girometta, M., Urwyler, H., Huber, W., Thaithong, S. y Peter, W. (1996). 4-aminoquinoline analogs of Chloroquine with shortened side chains retain activity against Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 1846-1854
- Riva, C., De Toma, C., Donadel, L., Boi, C., Pennini, R., Motta, G. and Leonardi, (1997). New DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene) Assisted One-Pot Synthesis of 2,8-Disubstituted 4H-1-Benzopyran-4-ones. *Synthesis.* 195-201
- Sijwali, P. y Rosenthal, P. (2004). Gene disruption confirms a critical role for the cysteine protease falcipain-2 in hemoglobin hydrolysis by *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101, 4384-4389
- Tsukayama, M., Wada, H., Kawamura, Y., Yamashita, K. and Nishiuchi, M. (2004). Regioselective synthesis of 6-alkyl- and 6-prenylpolyhydroxy isoflavones and 6-alkylcoumarono- chromone derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 52, 1285-1289
- White, N. (2004). Antimalarial drug resistance. *J. Clin. Invest.* 113, 1084-1092
- Winn, M., Reilly, E., Liu, G., Huth, J., Jae, H., Freeman, J., Pei, Z., Xin, Z., Lynch, J., Kester, J., von Geldern, T., Leitza, S., DeVries, P., Dickinson, R., Ussatto, D. and Okasinski, G. (2001). Discovery of novel p-arylthio Cinnamides as antagonists of leukocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 interaction. 4. Structure-activity relationship of substituents on the benzene ring of the Cinnamide. *J. Med. Chem.* 25, 4393-4403
- Zembower, D. y Zhang, H. (1998). Total Synthesis of Robustaflavone, a Potential Anti-Hepatitis B Agent. *J. Org. Chem.* 63, 9300-9305