



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Escuela de Graduados

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA Y REACTIVIDAD CON
ANIÓN SUPERÓXIDO DE NUEVAS CUMARINAS HÍBRIDAS

Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al Grado de Doctor en Química por:

KARINA ANGÉLICA PÉREZ CRUZ

Directores de Tesis:

Prof. Dr. Luis J. Núñez Vergara†
Prof. Dr. J. Arturo Squella Serrano
Prof. Patricio A. Navarrete Encina

Santiago-Chile
2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la Candidata:

KARINA ANGÉLICA PÉREZ CRUZ

ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para obtener el grado de Doctora en Química, en el examen de defensa de Tesis rendido elde Diciembre de 2016.

Directores de Tesis:

Prof. Dr. Luis J. Núñez Vergara†

Prof. Dr. Juan Arturo Squella S.

Prof. Patricio A. Navarrete E.

Comisión Evaluadora de Tesis:

Prof. Dr. Antonio Zanocco Loyola (Presidente)

Prof. Dr. Claudio Olea Azar

Prof. Dra. María Soledad Ureta Zañartu

Prof. Dr. David Pessoa Mahanna

*... "Pues dando se recibe,
Perdonando se es perdonado,
Muriendo se resucita a la vida eterna."
San Francisco de Asís*

Se agradece en forma especial a las siguientes Instituciones por los aportes financieros recibidos para el desarrollo y término de esta Tesis:

- Conicyt, Beca de Doctorado Nacional (2010), Beca de Apoyo de Tesis (2011) y Beca de Asistencia a Congresos (2013).
- Universidad de Chile por las Becas: Mecsup UCh061 (2011), Beca de la Vicerrectoría de Asuntos Académicos (Estadías cortas de Investigación, 2013) y a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas por Beca de Rebaja Arancelaria (2015-2016).
- Fondecyt, Proyecto n° 1110039, Profesor Luis J. Núñez V.†

A G R A D E C I M I E N T O S

Al culminar esta etapa académica, sólo tengo expresiones de profundo agradecimiento.

A Dios -en el cual somos, nos movemos y existimos- agradezco la hermosa Familia que me ha acogido siempre, pilar que ha sostenido mi carrera en los días alegres y en aquellos aciagos. Gracias a mis Padres José María y Elsa por su amor, su sabiduría, el apoyo incondicional, comprensión y valores entregados desde mi más tierna infancia, gracias por la disciplina y prestancia que me entregaron como legado, fruto de una educación esmerada empapada de Fe y convicción, tesoros que van en mi espíritu siempre. A mi hermana Andrea y mi cuñado Juan, gracias por su cariño, todo su apoyo y comprensión. Tías Mary, Florita y Carmen, gracias por estos años de amor, alegría y entrega.

Agradezco a mis Profesores Tutores. Al Dr. Luis Núñez V. vaya mi más sentido reconocimiento por invitarme a ser parte de su Investigación y entregarme herramientas valiosas en mi formación de pre y posgrado, gracias por la confianza que depositó en mí, por la acogida y comprensión que me brindó en tiempos complejos, instancias que siempre conservaré en mi memoria.

A los Profesores Dr. J. Arturo Squella S. y Patricio Navarrete E. expreso mi sincero agradecimiento por su guía y orientación en este proceso, gracias por su acogida y todos sus aportes para que este trabajo llegase a feliz término.

Expreso mi gratitud a los Profesores Dr. Domingo González A. y Manuel Domínguez P. de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla, por recibirme en su grupo de trabajo y compartir parte de esta Investigación. Tener la oportunidad de viajar y haber conocido y compartido ese corto tiempo de estadía con el Profesor Domingo ha sido una de las experiencias más valiosas, educativas y formativas que conservo de este período como doctorando. Gracias por su amistad.

Deseo expresar mi agradecimiento a los Profesores de la Comisión Examinadora, a la Dra. Soledad Ureta Z. por su tiempo, buena disposición y valiosos aportes a este trabajo, al Dr. Antonio Zanocco L. por sus aportes realizados a este trabajo y su buena voluntad, al Dr. David Pessoa M. gracias por sus ideas y aportes realizados en cada instancia. En forma especial quiero agradecer al Dr. Claudio Olea A., quien junto con ser parte de esta Comisión me abrió generosamente las puertas de su Laboratorio para aprender y desarrollar diversas técnicas aplicadas en esta Tesis, lo cual fue un hermoso aporte. Muchas gracias por su confianza, por integrarme como una alumna más, por su tiempo, paciencia y por todos los momentos alegres que compartí con su grupo. Muchas gracias a sus alumnos, ex-alumnos y miembros del Laboratorio, al Dr.(c) Mauricio Moncada por su dedicación, cariño y enseñanza en este proceso, gracias por la amistad y el apoyo que me ha brindado.

Al Dr. Germán Barriga por los aportes en el tema de estudios teóricos, al Dr. Michel Lapier por su colaboración con los estudios en células, al Dr. Francisco Mura por su generosidad y colaboración, al Dr. Benjamín Aguilera por su simpatía y ayuda con temas espectroscópicos, a la Dra. María Carolina Zúñiga y los MC boys: Jorge, Beatriz, Manuel, Camilo, Gabriela, Estefanía, gracias por sus aportes a este trabajo y los momentos agradables que compartimos. Al Profesor Dr. Javier Morales vaya mi agradecimiento por su ayuda en el estudio y caracterización de mis compuestos.

Gracias a la Profesora Dra. María Baéz C. por su colaboración y disposición en la caracterización de mis compuestos.

Agradezco a todos los compañeros de laboratorio que he conocido en diversas instancias. A la Dra. Paulina Sierra, a Viviana, Claudio, Julio, la Dra. Paola Salgado, Camila, Daniela, Constanza, Dr. David Vásquez. Gracias por los momentos gratos y su compañerismo.

Deseo destacar la valiosa contribución de los funcionarios de la Biblioteca César Leyton de nuestra Facultad. Muchas gracias por la prontitud y agilidad en su servicio que siempre ha sido de muy buen nivel.

Agradezco además la valiosa colaboración de las Secretarías de Decanato, Sra. Cecilia Pinchetti y Ximena Berríos. Gracias por su siempre buena disposición, gentileza y voluntad con cada detalle de todo este proceso.

Mi agradecimiento para todo el personal de Secretaría de Posgrado, por su gestión y colaboración en todo el proceso académico.

INDICE

Informe de aprobación.....	i
Agradecimientos.....	iii
Índice.....	vi
Índice de figuras y tablas.....	x
Glosario.....	xvi
Resumen.....	xviii
Summary.....	xx
1. Introducción.....	1
1.1. Cumarinas.....	1
1.1.1. Origen vegetal.....	1
1.1.2. Rutas de síntesis.....	2
1.1.3. Principales aplicaciones.....	4
1.2. Compuestos polifenólicos.....	9
1.2.1. Origen vegetal.....	9
1.2.2. Actividad biológica.....	10
1.2.3. Polifenoles como antioxidantes.....	11
1.3. Compuestos híbridos.....	13

1.3.1. Cumarinas como estructuras híbridas.....	15
2. Hipótesis.....	21
3. Objetivos.....	21
3.1. Objetivos generales.....	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
4. Materiales y métodos.....	23
4.1. Materiales.....	24
4.1.1 Reactivos y equipamiento utilizado en síntesis.....	24
4.1.2. Reactivos y equipamiento utilizados en electroquímica.....	25
4.1.3. Reactivos y equipamiento utilizados en ensayos frente a especies radicalarias.....	27
4.2. Métodos.....	28
4.2.1. Procedimientos de síntesis.....	28
4.2.2. Procedimientos en electroquímica.....	37
4.2.3. Estudio de generación de especies radicalarias mediante espectroscopia de resonancia de espín electrónico (REE).....	38
4.2.4. Procedimiento experimental en el estudio de reactividad frente a especies radicalarias.....	39
4.2.4.1. Metodología de capacidad antioxidante frente a radicales de oxígeno (ORAC-FL).....	39
4.2.4.2. Metodología de capacidad reductora de hierro en plasma (FRAP).....	42

4.2.4.3.	Capacidad de apagamiento del radical hidroxilo (OH^\cdot) mediante la técnica spin trap.....	44
4.2.4.4.	Estudio de reactividad frente al anión radical superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$	45
4.2.4.5.	Estudio de la capacidad antioxidante celular (CAC).....	47
4.2.4.6.	Estudio de hidrofobicidad relativa	48
4.2.4.7.	Estudio teórico: cálculo del Índice de Fukui f_k	49
5.	Resultados y discusión.	50
5.1.	Síntesis de los compuestos.....	50
5.2.	Estudios electroquímicos.....	54
5.3.	Estudio de generación de especies radicalarias mediante espectroscopia de resonancia de espín electrónico (REE).....	70
5.4.	Resultados y discusión de los estudios de reactividad frente a especies radicalarias.....	74
5.4.1	Metodología de capacidad antioxidante frente a radicales oxígeno-fluoresceína (ORAC-FL).....	74
5.4.2.	Metodología de capacidad reductora de hierro en plasma (FRAP).....	82
5.4.3.	Determinación de capacidad de apagamiento del radical OH^\cdot , técnica spin trapping.....	86
5.4.4.	Estudio de reactividad frente al anión radical superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$	94
5.4.5.	Determinación de capacidad antioxidante celular (CAC).....	100
5.4.6	Estudio de hidrofobicidad relativa	102

5.4.7.	Estudio teórico: cálculo del Índice de Fukui f_k	108
6.	Discusión general.....	113
7.	Conclusiones.	124
8.	Bibliografía.....	126

Índice de figuras y tablas

Figuras

Figura 1. Esquema de los compuestos estudiados.

Figure 1. Scheme of studied compounds.

Figura 1.1. Estructura de la 2H-1-benzopirán-2-ona (cumarina).

Figura 1.2. Esquema general de la reacción de Pechmann.

Figura 1.3. Estructura de la 3,3'-metilénbis(4-hidroxicumarina) o dicumarol

Figura 1.4. Estructura de la suksdorfina.

Figura 1.5. Estructura del híbrido cumarina-flavona, aislado de su fuente vegetal *Gnidia socotrana*.

Figura 1.6. Estructura del antibiótico híbrido novobiocina, metabolitos secundarios en la especie *Streptomyces*.

Figura 1.7. Híbridos chalcona-cumarina con capacidad antioxidante.

Figura 4.1. Ácidos empleados en la sustitución de la 4-clorometil-7,8-dihidroxicumarina.

Figura 4.2. Síntesis del derivado clorado **1**.

Figura 4.3. Síntesis del derivado clorado acetilado **5**.

Figura 4.4. Síntesis del ácido cafeico acetilado **6**.

Figura 4.5. Síntesis del ácido gálico acetilado **7**.

Figura 4.6. Síntesis del ácido 3,4-dihidroxibenzoico acetilado **8**.

Figura 4.7. Síntesis del intermediario híbrido derivado del ácido cafeico.

Figura 4.8. Síntesis del compuesto híbrido final **9**

Figura 4.9A. Ruta de síntesis de los compuestos cumarínicos. i) H_2SO_4 , 1 h, baño de hielo; ii) NaOH , Ac_2O , 30 min., baño de hielo (ácido cafeico **6**); H_2SO_4 , Ac_2O , 30 min. (cumarina y ácidos benzoicos).

Figura 4.9B. Ruta de síntesis de los compuestos cumarínicos. iii) DBU, DMF (seca), 3,5 h., 50 °C. iv) NaHCO_3 , MeOH, acetona, t° amb., 3 h, N_2 .

Figura 4.10. A: Sonda fluoresceína. B: 2,2'-azobis (2-metilpropionamidina) dihidrocloridrato (ABAP) C: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-ácido carboxílico (Trolox).

Figura 4.11. Actividad antioxidante ORAC para un compuesto en estudio.

Figura 4.12. Reactivo 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ).

Figura 4.13. Voltamograma cíclico de la generación de anión radical superóxido, DMF+ HFFTBA 0,2 M en electrodo de carbono vítreo.

Figura 5.1.A. Voltamogramas de pulso diferencial para los precursores **1**, **2**, **3** y **4**. 2 mM en DMF + HFFTBA 0,2 M.

Figura 5.1.B. Voltamogramas de pulso diferencial para los derivados **9**, **10** y **11**. 2 mM en DMF + HFFTBA 0,2 M.

Figura 5.2.A. VC para el derivado **9** a distintas velocidades de barrido: 0,05 V/s - 3 V/s. **B:** VC por segmentos a 0,1 V/s. 2 mM en DMF + HFFTBA 0,2 M.

Figura 5.3.A. VC para el derivado **10** a distintas velocidades de barrido: 0,05 V/s - 3 V/s. **B:** VC por segmentos a 0,1 V/s. 2 mM en DMF + HFFTBA 0,2 M.

Figura 5.4.A. VC para el derivado **1a** a distintas velocidades de barrido: 0,05 V/s - 3 V/s. **B:** VC por segmentos a 0,1 V/s. 2 mM en DMF + HFFTBA 0,2 M.

Figura 5.5. Esquema del proceso electro-oxidativo propuesto para el catecol.

Figura 5.6. Relación E_{pa} vs $\log v$ para el derivado de ácido cafeico **9**. 2 mM en DMF + HFFTBA 0,2 M.

Figura 5.7. Gráfica para la corriente de pico I_{p_a} vs la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. Ejemplo de correlación lineal en el ácido protocatéquico **4**. 2 mM en DMF + HFFTBA 0,2 M.

Figura 5.8. Determinación gráfica del valor de E_{onset} . VC del precursor **1**. 0,1 V/s, 2 mM en DMF + HFFTBA 0,2 M.

Figura 5.9. Relación E_{onset} vs $\log v$ para los compuestos estudiados.

Figura 5.10. Correlación $I_{p_a} / v^{1/2}$ vs $v^{1/2}$ para el precursor ácido protocatéquico **4**. 2 mM en DMF + HFFTBA 0,2 M.

Figura 5.11.A. Espectro REE de la especie radicalaria generada en la electro-oxidación del derivado de ácido cafeico **9** estabilizado con Zn^{2+} , en DMF+HFFTBA (izq). Espectro simulado utilizando el programa EPR-WINSIM 2002 (der. en color rojo).

Figura 5.11.B. Espectro REE de la especie radicalaria generada en la electro-oxidación del derivado de ácido gálico **10**, estabilizado con Zn^{2+} , en DMF+HFFTBA (izq). Espectro simulado utilizando el programa EPR-WINSIM 2002 (der. en color rojo).

Figura 5.11.C. Espectro REE de la especie radicalaria generada en la electro-oxidación del derivado de ácido **11**, estabilizado con Zn^{2+} , en DMF+HFFTBA (izq). Espectro simulado utilizando el programa EPR-WINSIM 2002 (der. en color rojo).

Figura 5.12. Curvas para el consumo de la sonda Fluoresceína para un set de concentraciones del compuesto **11**.

Figura 5.13. Gráfica de área neta bajo la curva ABC vs concentración del derivado **11**.

Figura 5.14. Esquema para la reacción entre el complejo de Fe^{3+} y el compuesto antioxidante reductor.

Figura 5.15. Espin aducto generado por la inactivación del radical $OH\cdot$ y su espectro simulado (derecha).

Figura 5.16A. Espectro REE de inactivación del radical hidroxilo con adición del compuesto 4-clorometil-7,8-dihidroxicumarina **1**. **B.** Espectro REE de inactivación del radical hidroxilo con adición del compuesto ácido cafeico **2**.

Figura 5.16C. Espectro REE de inactivación del radical hidroxilo con adición del compuesto ácido gálico **3**. **D.** Espectro REE de inactivación del radical hidroxilo con adición del compuesto ácido 3,4-dihidroxi benzoico **4**.

Figura 5.16E. Espectro REE de inactivación del radical hidroxilo con adición del compuesto híbrido **9**. **F.** Espectro REE de inactivación del radical hidroxilo con adición del compuesto híbrido **10**.

Figura 5.16G. Espectro REE de inactivación del radical hidroxilo con adición del compuesto híbrido **11**.

Figura 5.17. Espectro REE, se destaca en rojo el triplete de integración 1:2:1 formado después de la reacción de Fenton no-catalítico (izq). Espectro simulado utilizando el programa EPR-WINSIM (der).

Figura 5.18. Espectro simulado para la formación del spin aducto [cumarina-DMPO], utilizando el programa EPR-WINSIM.

Figura 5.19. Voltamogramas cíclicos del par redox correspondiente al anión superóxido tras añadir alícuotas del compuesto **1**. DMF + HFFTBA 0,2 M; 0,1 V/s.

Figura 5.20. Gráfica del parámetro adimensional $(I_{p_a}^0 - I_{p_a}^S / I_{p_a}^0)$ vs concentración de sustrato para el compuesto **1**. (Destacado en verde el valor de IA_{50}).

Figura 5.21. Hidrofobicidad relativa de los derivados y la cumarina precursora.

Figura 5.22. Correlación entre el valor de logD teórico y CAC experimental a 10 μ M de cada compuesto. El valor logD se obtuvo a través de la herramienta Marvin Sketch del software ChemAxon.¹⁶⁴

Figura 5.23. Estructura optimizada en 3D para el precursor **1** utilizando DFT.

Figura 5.24. Estructura optimizada en 3D para el derivado **9** utilizando DFT.

Figura 5.25. Estructura optimizada en 3D para el derivado **10** utilizando DFT.

Figura 5.26. Estructura optimizada en 3D para el derivado **11** utilizando DFT.

Figura 6.1. Esquema de reacción para un mecanismo concertado de electro-oxidación fenólica. Adaptación referencia 118.

Figura 6.2. Esquema de reacción para estructuras fenólicas, mecanismo electro-oxidativo en etapas.

Figura 6.3. Correlación entre el potencial de oxidación E_{onset} y los ensayos frente a anión superóxido.

Tablas

Tabla 5.1. Parámetros experimentales para los compuestos. Determinaciones en VC. 2 mM, DMF + HFFTBA 0,2 M.

Tabla 5.2. Constantes de acoplamiento hiperfino para los derivados polifenólicos. Valores en Gauss.

Tabla 5.3. Valores experimentales de Índice ORAC para los compuestos estudiados.

Tabla 5.4. Valores calculados para el factor estequiométrico n .

Tabla 5.5. Valores experimentales obtenidos para los compuestos en estudio, ensayo FRAP en equivalentes de Trolox/10 μM de muestra.

Tabla 5.6. Porcentajes de inactivación del radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$)

Tabla 5.7. Valores de IA_{50} obtenidos para los compuestos estudiados.

Tabla 5.8. Valores obtenidos para la capacidad antioxidante celular (CAC), concentraciones 1 μM y 10 μM de cada compuesto.

Tabla 5.9. Valores obtenidos para el tiempo de retención experimental de los compuestos.

Tabla 5.10. Valores de Índice de Fukui f_k para los compuestos en estudio.

Tabla 6.1. Cuadro comparativo de los resultados en la determinación de capacidad antioxidante para la cumarina y sus derivados.

Glosario de abreviaturas

ABAP: 2,2'-azo-bis(2-amidinopropan)diclorhidrato.

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

ATCC: American Type Culture Collection

HFFTBA: Hexafluorofosfato de tetrabutyl amonio.

CAC: Capacidad antioxidante celular.

CYP450: Citocromo P450.

DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ano.

DCFH-DA: 2-(6-oxido-3-oxo-3H-xanten-9-il)benzoato disódico (fluoresceína, sal disódica).

DMF: N,N-dimetilformamida.

DMPO: 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

DPPH•: Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.

Ep_a: Potencial de pico anódico.

EPR: Electron paramagnetic resonance.

ERNs: Especies reactivas de nitrógeno.

EROs: Especies reactivas de oxígeno.

f_k : Índice de Fukui.

FRAP: Ferric reducing antioxidant in plasma.

HO•: Radical hidroxilo.

IA₅₀: Índice antioxidante 50.

Ip_a: Corriente de pico anódica.

O₂^{•-}: Anión radical superóxido.

ONOO•: Radical peroxinitrito.

ORAC-FL: Oxygen radical antioxidant capacity-fluorescein.

PBS: Buffer fosfato salino.

REE: Resonancia de espín electrónico.

RO•: Radical alcoxilo.

ROO•: Radical peroxilo

TPTZ: 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina.

Trolox: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico.

VC: Voltametría cíclica.

VPD: Voltametría de pulso diferencial.

RESUMEN

Las cumarinas (2H-1-benzopirán-2-ona) son estructuras químicas presentes en especies vegetales ampliamente distribuidas en la naturaleza con una reconocida actividad biológica, entre las que destacan sus propiedades antioxidantes.

En el presente trabajo de Tesis se describe la síntesis de derivados polifenólicos. La cumarina dihidroxilada como estructura de partida fue esterificada con distintos ácidos orgánicos polifenólicos (Figura 1). Se estudió su electro-oxidación y se evaluó su actividad antioxidante frente a especies reactivas de oxígeno por medio de diversas metodologías *in vitro*.

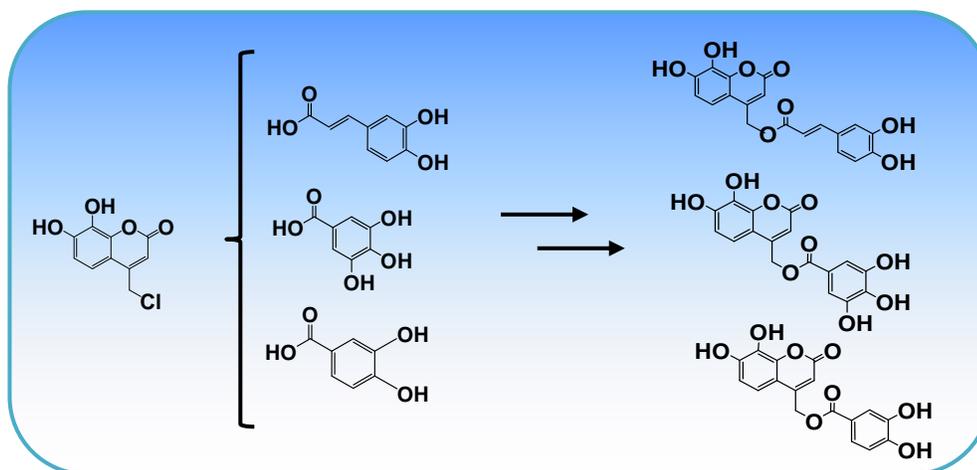


Figura 1. Esquema de los compuestos estudiados

Se estudió el comportamiento anódico de los compuestos mediante voltametría cíclica (VC) y voltametría de pulso diferencial (VPD) en medio aprótico, como una aproximación a los procesos redox que ocurren en membranas biológicas.

Se determinó la presencia de especies radicalarias en el proceso electro-oxidativo a través de la técnica de resonancia de espín electrónico (REE). Las constantes de

acoplamiento hiperfino junto con cálculos teóricos (índice de Fukui) permitieron discriminar distintos sitios reactivos en las nuevas moléculas donde se desarrolla el proceso oxidativo.

Además, se evaluó la capacidad antioxidante de los compuestos a través de los ensayos capacidad antioxidante frente a radicales de oxígeno-fluoresceína (ORAC-FL), capacidad antioxidante reductora de hierro (FRAP), apagamiento del radical hidroxilo mediante spin trapping, inactivación de anión superóxido y capacidad antioxidante celular (CAC) en un modelo biológico *in vitro* simple.

Para los ensayos antioxidantes no biológicos, la introducción de las distintas estructuras fenólicas en el anillo cumarínico permite obtener derivados que presentan una capacidad antioxidante mejor que el precursor cumarínico inicial. Se estableció la respectiva correlación entre el potencial de inicio del proceso electroquímico (potencial onset) y los resultados encontrados en el ensayo en medio aprótico frente a anión superóxido.

Considerando el ensayo biológico de capacidad antioxidante celular, éste sugiere que la actividad antioxidante de los nuevos derivados está circunscrita a medios de naturaleza lipofílica.

SUMMARY

Coumarins (2H-1-benzopyran-2-one) are chemical structures from vegetal sources widely distributed in vegetable species with recognized biological activities, among which their antioxidant capacity.

In this Thesis work the syntheses of coumarin polyphenolic derivatives is described. Coumarin was the starter scaffold and it was sterified with different organic phenolic acids. The electro-oxidation of polyphenolic derivatives is studied and their antioxidant capacity towards ROS through methodologies *in vitro* is evaluated.

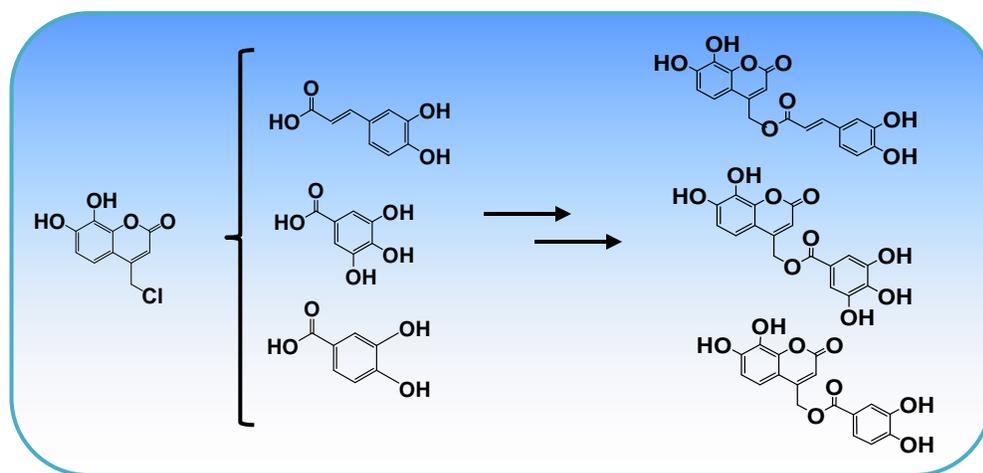


Figure 1. Scheme of studied compounds.

The anodic behavior of the compounds by cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (VPD) was studied in aprotic medium as an approximation to the redox processes in biological membranes.

The presence of radical species is determined in the electro-oxidation process through the technique electron spin resonance (ESR). The hyperfine coupling constants and theoretical calculations (Fukui index values) allow to discriminate between the

different reactive sites in the new molecules where the oxidative process is taking place.

Moreover, antioxidant capacity of derivatives was evaluated through oxygen radical antioxidant assay-fluorescein (ORAC-FL), ferric reducing ability of plasma (FRAP), spin trapping, superoxide scavenging assays and cellular antioxidant (CAC) in a simple biological model *in vitro*.

In the non-biological antioxidant assays, the addition of various phenolic structures to the coumarin scaffold yielded derivatives with improved antioxidant capacity related to initial coumarin. We studied the correlations between the starting potential of the electrochemical process (onset potential) and the antioxidant results obtained in aprotic media against superoxide anion.

In regard to the biological cellular antioxidant capacity assay, it suggests that the antioxidant activity of new derivatives could be limited to lipophilic media.

1. Introducción

1.1 Cumarinas

1.1.1. Origen vegetal.

Las cumarinas son una familia de compuestos cuya estructura básica corresponde a la lactona heterocíclica 2H-1-benzopiran-2-ona (Figura 1.1). En el reino vegetal están ampliamente distribuidas, habiéndose identificado en la actualidad más de 1800 cumarinas de origen natural¹, éstas se encuentran principalmente como metabolitos secundarios en diversas plantas tanto en sus semillas como en hojas y raíces². Su biosíntesis es descrita por distintos autores como una serie de procesos catalizados por enzimas presentes en la estructura CYP450 (citocromo P450), en algunos casos estos compuestos son generados en la célula vegetal como una vía de defensa (fitoalexinas como la escopoletina) frente a estímulos de estrés y la presencia de fitopatógenos.^{3,4}

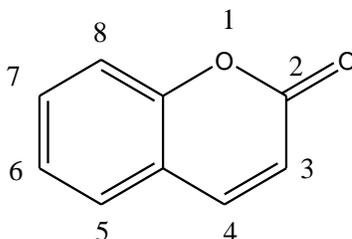


Figura 1.1. Estructura de la 2H-1-benzopiran-2-ona (cumarina).

El nombre de estos compuestos se deriva de la palabra “coumarou”, vocablo caribeño que hace referencia al árbol de *Tonka* originario de Sudamérica de cuya semilla A. Vogel logra aislar el compuesto y publicar su hallazgo en 1820^{5b}. A partir de entonces el interés por su caracterización⁶, la obtención tanto desde fuentes naturales⁷ como por rutas sintéticas de la cumarina y sus derivados ha ido en aumento, encontrando su primera aplicación en la fabricación de perfumes. En 1868 W. H. Perkin propuso la síntesis de una fragancia vegetal a partir de la sal sódica del orto-hidroxibenzaldehído y anhídrido acético, obteniendo el mismo producto aislado de la semilla de Tonka.^{5, 8(a,c)}

Se han estudiado los aspectos taxonómicos en cuanto a la clasificación de las especies vegetales que contienen compuestos cumarínicos, se estima que las principales familias donde se encuentran estos derivados son: *Umbelliferae*, *Rutaceae*, *Leguminosae*, *Compositae*, *Caryopgillaceae*, *Euphorbiaceae*, *Hipocastanaceae*, *Oleaceae*, *Thymelaeaceae*.^{8b}

1.1.2. Rutas de síntesis.

Los autores Sethna y Narsinh⁹ presentaron en 1944 una de las primeras revisiones del estado del arte con respecto a la síntesis de cumarinas. En ella se encuentran las principales metodologías clásicas de obtención como la síntesis de Perkin, Pechmann¹⁰ y Pechmann-Duisberg¹¹ (Figura 1.2) en la que se obtiene la cumarina al

condensar un fenol con un β -cetoéster en medio ácido. Diversas publicaciones plantean modificaciones a esta ruta con catalizadores^{12 (a,b)}, libre de solventes^{13 (a,b)}, con promotores ácidos¹⁴, asistida por microondas¹⁵ entre otras.

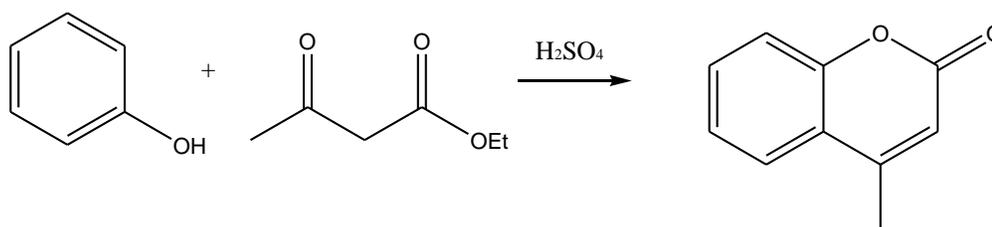


Figura 1.2. Esquema general de la reacción de Pechmann.

Otra metodología empleada es la de Knoevenagel¹⁶ propuesta en 1898. Consiste en una reacción de condensación entre *o*-hidroxialdehídos con malonato de etilo, acetoacetato de etilo o cianoacetato de etilo en medio básico (piridina o piperidina). Los autores Bigi y colaboradores¹⁷ describen el uso de un catalizador en base a montmorillonita para la obtención de cumarinas sustituidas en posición 3 con un grupo ácido. Posteriormente otro grupo de trabajo (Shaabani, 2009) llevó a cabo esta condensación empleando radiación de microondas, lo que les permitió obtener buenos rendimientos en un medio “amigable” con el ambiente.¹⁸

Se han descrito otras metodologías sintéticas en las cuales se utilizan las reacciones clásicas de Wittig^{19 a,b} y Reformatsky²⁰ además de otras rutas con variantes tanto en los reactivos como en el medio de reacción que permiten la obtención de derivados

cumarínicos, como la síntesis en presencia de bases fuertes²¹, reacciones libres de solventes²² y la obtención de cumarinas policíclicas utilizando compuestos organometálicos descrita por Harvey y cols.²³

1.1.3. Principales aplicaciones.

Tras ser aisladas desde su fuente vegetal y como resultado de investigaciones posteriores dirigidas a generar rutas sintéticas viables, las cumarinas han sido objeto de numerosos estudios enfocados en la búsqueda de sus aplicaciones. Es así como en la literatura se pueden encontrar las más diversas investigaciones para este tipo de compuestos, provenientes tanto de productos de síntesis o como extractos de vegetales y plantas con reconocidas propiedades en la medicina tradicional, esto da origen al estudio de sus bio-aplicaciones entre las que se destaca su capacidad como antioxidante.

A. Actividad biológica.

La primera aplicación en bio-medicina descrita para las cumarinas fue como anticoagulante desde que se aislara y caracterizara el dicumarol 3,3'-metilenbis(4-hidroxycumarina) (Figura 1.3). Posteriormente aparece en el mercado su derivado

sintético conocido como Warfarina, que hasta la década pasada era considerado uno de los fármacos anticoagulantes más vendidos en Estados Unidos.^{24 a-c}

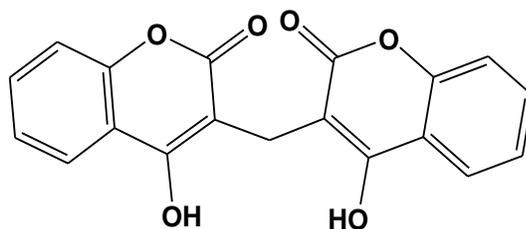


Figura 1.3. Estructura de la 3,3'-metilenbis(4-hidroxycumarina) o dicumarol.

Con posterioridad, el uso de las cumarinas se ha diversificado hacia innumerables blancos terapéuticos. En la literatura se describen variados estudios con respecto a sus propiedades farmacológicas.^{25a,b} Su capacidad como agente antitumoral^{26a,b} se ha estudiado en compuestos provenientes tanto de fuentes vegetales como sintéticas; Riveiro M.E. y cols. estudiaron el efecto de la 7,8-OH-4-metilcumarina en células humanas afectadas por leucemia, evidenciando el potencial que presentó este derivado dihidroxilado.²⁷ En otra investigación realizada por C. Ito y colaboradores aislaron tres derivados cumarínicos de la especie vegetal *Murraya siamensis*, cuyos ensayos frente a células tumorales resultaron promisorios.²⁸

Con respecto a las propiedades antiinflamatorias de las cumarinas, en la naturaleza se encuentran especies como la *Chamomilla recutita* (manzanilla) que contiene un tipo

de umbeliferona con tales propiedades. En la literatura se encuentran derivados sintéticos desarrollados en cuya estructura está presente el esqueleto cumarínico,²⁹ Lin y cols., presentan los resultados de su estudio de la capacidad antiinflamatoria de un conjunto de cumarinas, los cuales fueron además correlacionados con los obtenidos para el apagamiento del radical hidroxilo.³⁰

H.A. El-Wahab y cols., sintetizaron distintas tiazolo-cumarinas híbridas y estudiaron una de sus propiedades farmacológicas: como agente antimicrobiano. Estos compuestos posteriormente fueron aplicados como aditivos en recubrimientos de poliuretano, confiriéndoles también esta propiedad microbicida a las superficies en las que se utilizó³¹.

También se han descrito derivados cumarínicos con propiedades anti-fúngicas^{32a,b}. Un trabajo reciente presenta el estudio de complejos en base a Ni(II), Cu(II) y Co(II) frente a distintas especies de hongos (*Candida*, *A. niger*, *Rhizopus*).^{32c} También se han encontrado estructuras cumarina-glucósidos provenientes de especies vegetales (*Hydrangea paniculata*) que presentan propiedades hepatoprotectoras.³³

Otros estudios señalan también la importancia de las estructuras cumarínicas como compuesto antiviral, analgésico, anti-trombótico, ulcerogénico,^{25, 34-36} inclusive con potencial para ser usadas en terapias frente al VIH como lo señala la investigación sobre especies vegetales que contienen dipiranocumarin - calanolideos como

principio activo,^{25a} estudios que también se han realizado con derivados de síntesis diseñados a partir de la estructura de origen vegetal (*Lomatium suksdorfii*) conocida como suksdorfina (Figura 1.4), a partir de la cual se han generado compuestos análogos con el objeto de estudiar su modo de acción y obtener sustratos cada vez más potentes frente a la enfermedad. (Yu D. y cols., 2003)³⁷

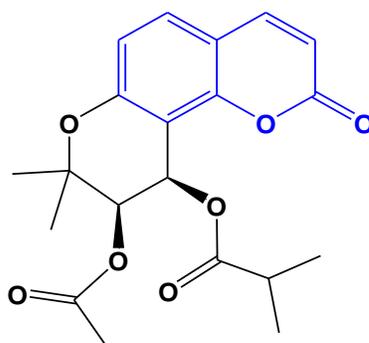


Figura 1.4. Estructura de la suksdorfina.

B. Propiedades antioxidantes.

El equilibrio en los organismos vivos es función de diversos factores, entre ellos cabe mencionar el balance de las especies que generan estrés oxidativo dentro del medio celular, estas especies pueden ser de origen endógeno como las provenientes de la cadena transportadora de electrones, enzimas oxidantes, células fagocíticas o de origen exógeno como sustancias reductoras, oxidación de drogas, tabaquismo, ultrasonido, luz solar, etc. Entre los compuestos que generan estrés conocidos como

EROs y ERNs (especies reactivas de oxígeno/nitrógeno) se pueden mencionar el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical peroxilo ($ROO\bullet$) y alcoxilo ($RO\bullet$), radical hidroxilo ($HO\bullet$), óxido nítrico ($NO\bullet$), peroxinitrito ($ONOO\bullet$), entre otras.

Dentro de este contexto, en la literatura se ha descrito el potencial que poseen las cumarinas y sus derivados como compuestos capaces de interaccionar con especies reactivas de oxígeno y nitrógeno lo que da cuenta de su capacidad antioxidante, tema relevante si se considera que parte importante de las patologías conocidas y estudiadas en la actualidad a nivel mundial están íntimamente ligadas a cuadros de estrés oxidativo presentes en el organismo.^{38,39}

Payá y colaboradores presentaron un trabajo en el cual se estudia la reactividad de un conjunto de dieciséis cumarinas (naturales y sintéticas) frente al radical hidroxilo, ácido hipocloroso y anión superóxido; encontrando que los derivados di-hidroxilados poseían mejores propiedades que aquellos mono-hidroxilados o sin sustitución.⁴⁰ Estos resultados se complementan con una publicación posterior del mismo grupo, en que se profundiza el estudio anterior, señalando las propiedades terapéuticas de los derivados cumarínicos.³⁴

El derivado conocido como esculetina (6,7-dihidroxycumarina) fue ensayado frente al radical DPPH junto con ensayos de estrés oxidativo en medios de cultivo celular,

estos autores señalan la importancia de los grupos catecol en su capacidad de atrapar especies radicales (Kim y cols. 2008).⁴¹ Otro estudio en el que se ensaya un extracto vegetal (*Cortex Fraxini*) relaciona además la capacidad antioxidante de las *o*-dihidroxi cumarinas con su capacidad reductora.⁴²

Zhang y cols. presentan un estudio reciente en el cual cumarinas dihidroxiladas en posición 7 y 8 entre otros derivados poseen importante bio-actividad *in vitro*, los compuestos fueron ensayados frente a especies radicales, en células tumorales, presentaron además actividad como antiinflamatorios y baja toxicidad tanto en células sanguíneas de vertebrado como de invertebrado. Junto con lo anterior, se realizó un análisis de estructura-reactividad, correlacionando la capacidad de apagamiento de radicales con las propiedades antiinflamatorias y antitumorales de los derivados cumarínicos encontradas en esta investigación.⁴³

1.2. Compuestos polifenólicos.

1.2.1. Origen vegetal

Los polifenoles al igual que las cumarinas son una amplia familia de compuestos (se han encontrado más de 8000 de ellos) presentes en estructuras vegetales como metabolitos secundarios, cumpliendo roles tales como: protector frente a radiación UV, reguladores de los ciclos de crecimiento, pigmentación y defensa frente a

depredadores. Su estructura básica es el anillo bencénico con sustituyentes hidroxilo (-OH) en distintas posiciones. Se clasifican en flavonoides, ácidos fenólicos (hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos), taninos, estilbenos. Debido a sus interesantes propiedades y bio-aplicaciones estos fitoquímicos han sido objeto de diversos estudios, investigación y caracterización.⁴⁴⁻⁴⁶

Estos compuestos son un constituyente importante de la dieta diaria, se encuentran en forma abundante en diversos frutos como por ejemplo berries, manzana, mango, uva, pera, granada y cítricos; en bebidas como el vino, té y café⁴⁷, en vegetales, cereales y semillas. Junto con lo anterior, se ha descrito la utilización de ácidos polifenólicos provenientes de extractos vegetales y aceites esenciales como aditivos en la industria alimentaria aplicados como preservantes naturales en reemplazo de aquellos de origen sintético, debido a las propiedades antimicrobianas que exhiben.⁴⁸

1.2.2. Actividad biológica.

Estos compuestos se conocen también como “biofenoles” (Romeo y Uccella, 1996) haciendo referencia a aquellos provenientes de fuentes naturales. Las primeras publicaciones sobre los polifenoles en general comenzaron en la década de 1950 con la investigación de D. Harman y su teoría del envejecimiento y los radicales libres, estudios en los que se planteó prolongar la sobrevida en especies roedores enfermos a través de la ingesta de biofenoles presentes en su dieta. Es así, que el número de publicaciones concernientes al tema se incrementó de una treintena (entre 1900 y

1950) hasta superar las 35.000 publicaciones entre los años 2000-2010, lo que da cuenta del creciente interés en este tópico.⁴⁹

La bio-actividad de los compuestos polifenólicos es amplia, se encuentran diversos estudios como el citado anteriormente con respecto a las capacidades antimicrobianas de los polifenoles y su uso en la industria alimentaria.^{50,51} Compuestos como la curcumina, resveratrol, quercetina y derivados del ácido gálico se enumeran dentro de las investigaciones realizadas tanto *in vitro* e *in vivo* en la prevención del cáncer (Cimino y cols. 2012).⁵²

Otras propiedades descritas para estos compuestos son como cardio-protectores, anti-cancerígenos, antiinflamatorios, vaso-relajantes, entre otras como lo resume el artículo de Xia y cols. (2010). En él además se presenta una revisión en cuanto a los métodos de extracción, purificación y caracterización del contenido y tipos de polifenoles, específicamente en el caso de la uva; fruto reconocido por su alto contenido de fitoquímicos y nutrientes.⁵³

1.2.3. Polifenoles como antioxidantes.

Los polifenoles como micronutrientes presentes en los alimentos y otras estructuras vegetales han sido un foco de interés, ya que sus aplicaciones terapéuticas están relacionadas con su reconocida e investigada capacidad antioxidante y quelante de metales. Con respecto a esta última, cabe mencionar la revisión del estado del arte

realizada por Kozłowski y cols. con respecto al desbalance de Cu, Zn y Fe en el organismo, en ella se indica que la presencia libre y en exceso de estos metales está directamente relacionada con patologías neurodegenerativas y cáncer entre otras, ya que su actividad redox genera especies reactivas capaces de atacar sustratos orgánicos como la membrana lipídica, proteínas y ácido desoxiribonucleico (ADN).⁵⁴

Ribeiro y colaboradores presentan un estudio en el que se determina el contenido polifenólico de la especie *Fistulina hepática*. Los extractos se ensayaron frente a DPPH, anión superóxido, radical hidroxilo y ácido hipocloroso. Los autores plantean que considerando los resultados obtenidos esta especie fúngica podría tener aplicación como suplemento o como antioxidante en la industria alimentaria.⁵⁵

Estudios realizados con ácido tánico comercial señalan que su capacidad como antioxidante y como quelante de hierro da cuenta del potencial que tiene este ácido además como anti-mutagénico y anti-carcinogénico. Los autores indican posibilidad de que este ácido, el cual presenta baja toxicidad, contribuye en el apagamiento de especies reactivas de oxígeno dañinas a nivel de ADN (Andrade y cols. 2006),⁵⁶ trabajo que se complementa con una publicación anterior del mismo grupo donde se estudió el apagamiento del radical OH• mediante complejos de ácido tánico-Cu (Andrade y cols. 2005).⁵⁷

Los ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos han sido también objeto de estudio debido a su capacidad antioxidante.⁵⁸⁻⁶¹ Jeong y colaboradores estudiaron el extracto de la especie vegetal *Erigeron annuus*, el cual contiene ácido cafeico en su fracción

butanólica, este extracto fue ensayado como agente neuro-protector y antioxidante en células nerviosas. Frente a los resultados obtenidos los autores concluyen que este extracto podría ser utilizado en terapias frente a patologías neurodegenerativas como el Alzheimer.⁶² Otro estudio de capacidad antioxidante realizado a un grupo de compuestos polifenólicos presentes en el propóleo (ácido cafeico, ácido ferúlico, ferulato de etilo, éster fenílico del ácido cafeico) señala que los grupos catecol presentes en las estructuras ensayadas incrementan la capacidad antioxidante, mientras que en estudios relacionados con bio-membranas se debe tener en cuenta además la hidrofobicidad que presenten los compuestos.⁶³

1.3. Compuestos híbridos.

Al considerar que las diversas enfermedades que afectan al ser humano (cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, artritis, entre otras) involucran diferentes factores patogénicos, se han desarrollado estrategias sintéticas que permiten obtener nuevos fármacos de naturaleza híbrida, los cuales incorporan en su estructura distintos ingredientes activos.⁶⁴ Este diseño “multi-blanco” ha permitido que los nuevos fármacos actúen en distintos blancos terapéuticos; este tipo de terapias implica una disminución en los problemas asociados a una multi-dosificación: las interacciones entre distintos medicamentos, una disminución en la resistencia a los fármacos (en el caso de enfermedades de origen microbiano), disminución en los efectos adversos derivados de la dosificación múltiple, por mencionar algunos.

Diversas investigaciones sobre el tema dan cuenta de la relevancia que ha tenido esta estrategia y el diseño racional de nuevos medicamentos.⁶⁵⁻⁶⁸ La revisión realizada por los autores Mehta y Singh (2002) menciona algunos de los esqueletos que han dado origen a estructuras híbridas, entre ellas esteroides, antraciclinas, β -lactamas, fullerenos, carbohidratos-péptidos. En esta revisión se indica el uso de este tipo de compuestos en terapias contra el cáncer y como neuro-protectores.⁶⁹

En el caso de la malaria, una de las enfermedades infecciosas más complejas a nivel mundial, la resistencia del parásito del género *Plasmodium* frente a los fármacos empleados (cloroquina principalmente) ha sido un tema de estudio durante años. Una reseña de este desafío se presenta en el artículo de Kouznetsov y Gómez-Barrio (2009), en el que se señala la síntesis de derivados de aminoquinolina como las trioxaquinas,⁷⁰ las cuales se presentan posteriormente en una revisión realizada por Chauhan y colaboradores, en ella se destaca a estos híbridos como candidatos promisorios para la formulación de nuevas drogas antimaláricas.⁷¹

Otra patología en la que se ha utilizado fármacos de naturaleza híbrida, que en algunos casos provienen de productos naturales, es el cáncer.⁷² Allen y colaboradores⁷³ mencionan en una reciente revisión de tecnologías avanzadas en las que, además de utilizar la estrategia de compuestos híbridos con dos estructuras de propiedades anticancerígenas, éstos se combinan con nano-estructuras orientadas a

blancos específicos para así disminuir el riesgo de efectos colaterales en el tratamiento de esta compleja patología.

Este concepto y diseño de fármacos multi-blanco se ha aplicado además en distintas terapias frente a enfermedades como el Alzheimer,⁷⁴ en vacunas de amplio espectro frente al cólera,⁷⁵ en la síntesis de compuestos antiparasitarios⁷⁶ y de dihidropiridinas las cuales poseen actividad vasodilatadora,⁷⁷ por mencionar algunos ejemplos.

1.3.1. Cumarinas como estructuras híbridas.

Al considerar el estado del arte con respecto a la amplia y variada actividad biológica que presentan los derivados cumarínicos se encuentra que otra de las aplicaciones que se ha estudiado para esta familia de compuestos es su capacidad para formar parte de estructuras híbridas complejas, compuestos orientados a la obtención fármacos multi-blanco que den respuesta a los interrogantes y desafíos actuales con respecto a importantes patologías y sus terapias.⁷⁸

En la literatura se describen ejemplos de estructuras cumarínicas híbridas no sólo de origen sintético, sino que también se pueden extraer desde su fuente natural. Un estudio realizado en hojas y ramas de la especie *Gnidia socotrana* (originaria de Yemen) da cuenta de la presencia de estructuras flavona-cumarina, las que fueron extraídas, purificadas y caracterizadas.⁷⁹ (Figura 1.5).

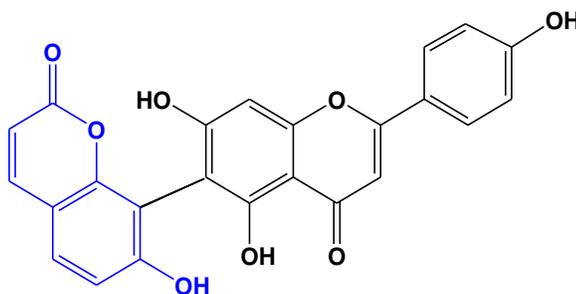


Figura 1.5. Estructura del híbrido cumarina-flavona, aislado de su fuente vegetal *Gnidia socotrana*.

Entre los compuestos antibióticos de origen natural que poseen el esqueleto cumarínico en su estructura se encuentran la novobiocina (Figura 1.6), clorobiocina y cumermicina. Presentes como metabolitos secundarios en la especie *Streptomyces*, estos derivados deben su actividad antibiótica a que actúan inhibiendo la enzima ADN girasa presente en bacterias impidiendo su replicación y además genera su muerte celular.⁸⁰

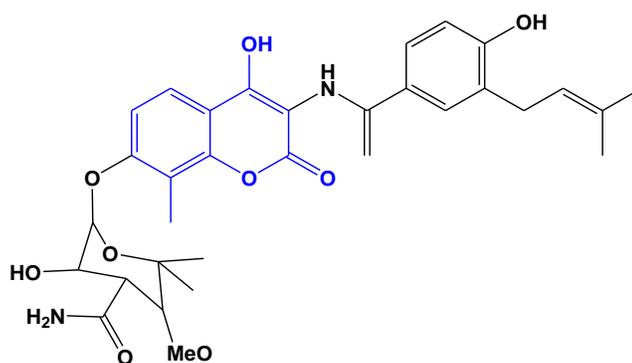


Figura 1.6. Estructura del antibiótico híbrido novobiocina, metabolitos secundarios en la especie *Streptomyces*.

Se ha descrito también la capacidad antitumoral de derivados cumarina-resveratrol, a partir del precursor 7-hidroxycumarina. En la publicación de Belluti y colaboradores se presentan los ensayos realizados para 10 compuestos, los cuales tuvieron como objeto células tumorales de pulmón humano, dos de los híbridos presentaron resultados promisorios como antitumorales y pro-apoptóticos, comportamiento que los autores concluyen tiene relación con la posición de los sustituyentes en la molécula.⁸¹

La revisión bibliográfica de Longhin y colaboradores describe diversas estructuras híbridas desarrolladas que cuentan con capacidad antiinflamatoria, tópico de interés si se considera que los cuadros inflamatorios están relacionados a dolencias como el Alzheimer, asma, arterioesclerosis, artritis reumatoide, cáncer, etc. En este trabajo se señala al híbrido cumarina-ácido lipoico, donde ambas estructuras poseen además reconocida capacidad antioxidante y el ácido unido a la cumarina en posición 3 mediante un espaciador es la estructura que se describe con una actividad superior al conocido y utilizado fármaco indometacina.⁸²

Junto con los estudios descritos, otra importante área de investigación ha sido el desarrollo de estructuras híbridas con capacidad antioxidante (Koufaki, 2006)⁸³, actividad que permite en muchos casos restablecer el equilibrio en organismos vivos frente al exceso de especies generadoras de estrés oxidativo, cuadro que como ya se

mencionó está con frecuencia asociado las patologías conocidas y estudiadas en la actualidad.

El reciente estudio desarrollado por Matos, Olea-Azar y colaboradores presenta la estructura cumarina-resveratrol y diferentes derivados sintéticos los cuales fueron estudiados mediante diversas técnicas *in vitro* como resonancia de espín electrónico (REE), capacidad antioxidante frente a radicales de oxígeno (ORAC-FL) y voltametría cíclica (VC). En esta investigación se encontró que los compuestos propuestos poseen una buena capacidad antioxidante.⁸⁴

Una investigación que da cuenta del potencial que posee esta estrategia es la desarrollada por Kenchappa y colaboradores, quienes sintetizaron derivados cumarínicos unidos a pirazol e indenona, posteriormente mediante estudios *in vitro* e *in vivo* obtuvieron resultados de su capacidad antioxidante y además como agentes anti-hiperglicémicos en un modelo animal, proyectándolos como posibles fármacos frente a la diabetes.⁸⁵ Dentro del mismo esquema, Krishan y colaboradores desarrollaron una serie de cumarinas unidas al benzoimidazol, el cual es a su vez una estructura con múltiple y reconocida actividad biológica; proponen a dos compuestos de la serie como derivados con una buena capacidad antioxidante y anti-inflamatoria a nivel de mucosa gástrica.⁸⁶

Un tipo de derivado híbrido que ha sido estudiado es la cumarina-chalcona. El trabajo realizado por Xi y Liu presenta la síntesis de una serie de compuestos (Figura 1.7), los que posteriormente son ensayados por distintas metodologías de determinación de capacidad antioxidante, concluyendo que estos híbridos son estructuras promisorias en los que el grupo catecol presente en el esqueleto cumarínico o en la chalcona es capaz de inhibir distintos procesos oxidativos a nivel de ADN.⁸⁷

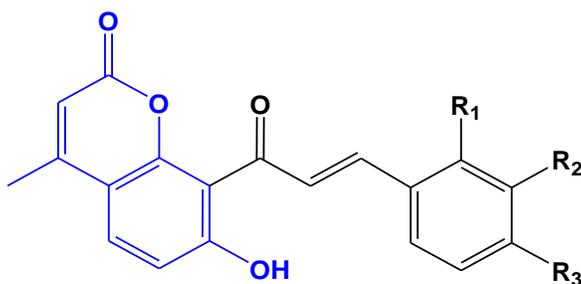


Figura 1.7. Híbridos chalcona-cumarina con capacidad antioxidante.

Pérez-Cruz y colaboradores describen el diseño, síntesis y estudio de la capacidad antioxidante de derivados cumarina-chalcona, los que presentaron buena reactividad frente a distintas especies radicales y capacidad cito-protectora en un modelo celular animal.⁸⁸

En los estudios mencionados se evidencia el continuo desarrollo que ha tenido el diseño y síntesis de compuestos híbridos como nuevos fármacos frente a complejas

enfermedades multifactoriales. Esta tendencia vigente en la actualidad se extiende a los más variados núcleos estructurales, entre ellos la cumarina. Este heterociclo clasificado por algunos autores como “estructura privilegiada” debido a la amplia gama de compuestos que se originan a partir de él, es el punto de partida para diversas propuestas sintéticas enfocadas a generar un producto que posea múltiples actividades biológicas de interés terapéutico.

2. Hipótesis

Los compuestos hidroxycumarínicos exhiben conocidas e interesantes propiedades antioxidantes.

Al sustituir la cumarina con los compuestos: ácido cafeico, ácido gálico y ácido protocatéuico se obtienen derivados de naturaleza híbrida, aumentando la actividad de la cumarina frente a las especies reactivas de oxígeno: anión superóxido, radical hidroxilo, radical peroxilo y su capacidad reductora.

3. Objetivos.

3.1. Objetivos generales

- Evaluar el comportamiento electroquímico oxidativo de los derivados cumarínicos, previamente sintetizados y caracterizados físicamente.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los nuevos compuestos derivados de cumarina y ácidos benzoicos frente a distintas especies radicales mediante diversas técnicas *in vitro*.

3.2. Objetivos específicos

- **Objetivos en síntesis**

- Sintetizar y caracterizar el compuesto precursor 4-clorometil-7,8-dihydroxicumarina y los correspondientes derivados de la sustitución en posición-4 con: ácido cafeico, ácido gálico y ácido 3,4-dihydroxibenzoico.

- **Objetivos en electroquímica**

- Realizar la caracterización anódica en medio aprótico (N,N-dimetilformamida, DMF) de los compuestos por voltametría cíclica (VC), voltametría de pulso diferencial (VPD).

- **Objetivos en la determinación de capacidad antioxidante**

- Estudiar la reactividad de los compuestos frente al anión radical superóxido $O_2^{\cdot-}$, utilizando como técnica voltametría cíclica.
- Determinar la reactividad de los compuestos frente al radical peroxilo ($ROO\cdot$) obteniendo su índice ORAC-FL.
- Determinar la capacidad reductora de hierro (Fe^{3+}) de los compuestos a través de la técnica FRAP.
- Estudiar la reactividad frente al radical $OH\cdot$ mediante la técnica *spin trapping*, utilizando espectroscopía de resonancia de espín electrónica (REE).

- Evaluar la capacidad antioxidante celular de los compuestos.
- Establecer la existencia de correlación entre parámetros fisicoquímicos de los compuestos y su actividad antioxidante.

4. Materiales y métodos

4.1 Materiales

4.1.1 Reactivos y equipamiento utilizado en síntesis

- **Reactivos**

- Ácido 3,4-dihidroxicinámico. Merck.
- Ácido 3,4- dihidroxibenzoico. Sigma-Aldrich.
- Ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico. Sigma-Aldrich.
- Pirogalol. Merck.
- 4-cloro acetoacetato de etilo. Sigma-Aldrich.
- N,N-dimetilformamida , P.A. J. T. Baker.
- 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ano (DBU). Sigma-Aldrich
- Carbonato ácido de sodio, Merck.
- Metanol P.A. J.T. Baker.
- Acetona P.A. Merck.
- Etanol P.A. Merck.
- Cloroformo P.A. Merck.
- Ácido sulfúrico 98%. Merck.
- Ácido clorhídrico 37% J.T.Baker
- Anhídrido acético. Merck.
- Hidróxido de sodio P.A. Merck.
- Solución etanólica de FeCl₃.

- Acetona d_6 , Sigma-Aldrich.
- Dimetilsulfóxido d_6 , Sigma-Aldrich.
- Cloroformo d_6 , Sigma-Aldrich.
- Nitrógeno extra puro 99,995%. Linde Gas Chile S.A.

- **Equipamiento**

Todo el material de vidrio utilizado fue clase A.

- Balanza analítica Precisa 125 A.
- Rotavapor Heidolph VV 2000.
- Sonicador Elme Transsonic Digital, tipo T480/H-2
- Agitador magnético / placa calefactora Heidolph MR 3002
- Estufa de secado al vacío Heraeus.

4.1.2. Reactivos y equipamiento utilizados en electroquímica

- **Reactivos**

- N,N-dimetilformamida (DMF) P.A. Merck.
- Hexafluorofosfato de tetrabutil amonio (HFFTBA) Sigma-Aldrich.
- Ácido 3,4-dihidroxicinámico. Merck.
- Ácido 3,4- dihidroxibenzoico. Sigma-Aldrich.
- Ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico. Sigma-Aldrich.
- Nitrógeno extra puro 99,995%. Linde Gas Chile S.A.

- Agua purificada (MilliQ). Millipore Merck.

- **Equipamiento**

- Estación de trabajo electroquímica CH Instruments CHI 760c.
- Electrodo de carbono vítreo. CH Instruments, d = 3 mm.
- Alambre de platino
- Electrodo de referencia Ag/AgCl (KCl 3 M). CH Instruments.
- Alúmina 0,3 μM y 0,05 μM , Buheler.
- Balanza analítica Precisa 40SM-200^a

4.1.3 Reactivos y equipamiento utilizados en ensayos frente a especies radicalarias.

- **Reactivos**

- 2-(6-óxido-3-oxo-3H-xanten-9-il)benzoato disódico (fluoresceína, sal disódica), Sigma-Aldrich.
- 2,2'-azo-bis(2-amidinopropan)diclorhidrato (ABAP), Sigma-Aldrich.
- 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), Sigma Aldrich.
- 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico, (Trolox). Sigma-Aldrich
- Peróxido de hidrógeno al 30%.
- N,N-dimetilformamida , P.A. Sigma-Aldrich.
- 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO)
- Acetato de sodio. Merck.

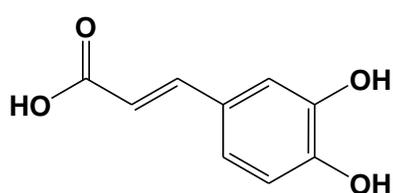
- Tricloruro de hierro (FeCl_3), Sigma Aldrich.
- Hidróxido de sodio, Merck.
- Fosfato diácido de potasio, Merck
- Etanol grado HPLC, Merck
- Ácido acético glacial, Merck.
- N-octanol, Merck.
- Cloruro de zinc, Merck.

- **Equipamiento**
 - Balanza Precisa 40SM-200^a
 - Lector de microplacas con detector múltiple, Synergy™ HT. Bio-Tek Instruments, Inc. (Winooski, VT, USA)
 - Espectrómetro ECS 106 de banda X (9.85 GHz) equipado con cavidad rectangular y 50 KHz de modulación de campo. (Bruker, Coventry, UK).
 - WINSIM Software EPR Spectral Simulation for MS-Windows 9x, NT, Version 0.98. © P.E.S.T. Public EPR Simulation Tools, NIEHS, USA.
 - Alambre de platino
 - Espectrofotómetro UV-Visible Specord S600, Analytik Jena.
 - Equipo generación agua ultrapura NanoPure, Barnstead.

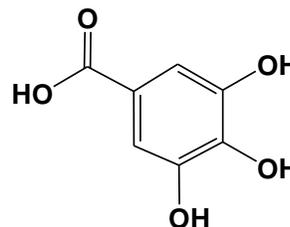
4.2. Método

4.2.1. Procedimientos de síntesis

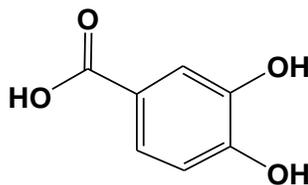
En un primer paso se obtuvo el precursor 4-clorometil-7,8-dihidroxicumarina mediante la síntesis de Pechmann, posteriormente se realizó la esterificación entre el compuesto halogenado y diferentes ácidos orgánicos comerciales (Figura 4.1). Los ácidos comerciales utilizados en el proceso de síntesis fueron los siguientes:



ácido 3,4-dihidroxicinámico
(ácido cafeico)



ácido 3,4,5- trihidroxibenzoico
(ácido gálico)



ácido 3,4-dihidroxibenzoico
(ácido protocatéquico)

Figura 4.1. Ácidos empleados en la sustitución de la 4-clorometil-7,8-dihidroxicumarina.

Todos los compuestos fueron previamente acetilados para proteger los grupos hidroxilo presentes en sus estructuras para evitar reacciones entre sí.

A. Síntesis de la 4-clorometil-7,8-dihidroxicumarina **1**.

Se mezclaron en proporciones equimolares el pirogalol (31 mmoles) junto con el 4-cloroacetoacetato de etilo con agitación constante en un baño de agua-hielo, sobre la mezcla se añadieron lentamente 25 mL de H₂SO₄ (también frío), esta solución se tornó de color rojizo oscuro. Se dejó reaccionar 1 h.

La mezcla de reacción se agregó lentamente sobre un baño de agua-hielo-etanol con vigorosa agitación y se obtuvo el producto como un precipitado fino que fue lavado con abundante agua (a fin de eliminar restos ácidos) y purificado por re-cristalización en una mezcla etanol: agua, obteniéndose un sólido marfil brillante **1**. La ruta sintética se presenta a continuación:

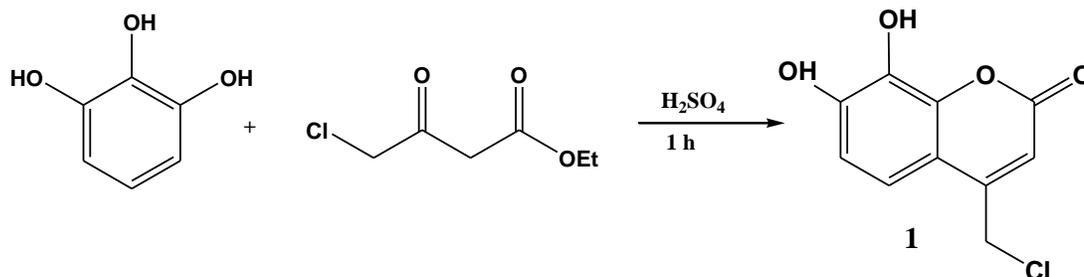


Figura 4.2. Síntesis del derivado clorado **1**.

B. Procedimientos de acetilación.

a) Acetilación de 4-clorometil-7,8-dihidroxi-cumarina **2**.

Se suspendió la cumarina clorada (3 g) en 6 mL anhídrido acético y se añadió 1 gota de ácido sulfúrico. La solución fue agitada con calentamiento (45 °C) por 30 min y se observó el progreso de la reacción mediante el test de FeCl_3 el que indica la presencia o ausencia de grupos $-\text{OH}$ fenólicos en solución. El precipitado obtenido **5** se recristalizó en etanol, su ruta sintética se muestra en la Figura 4.3.

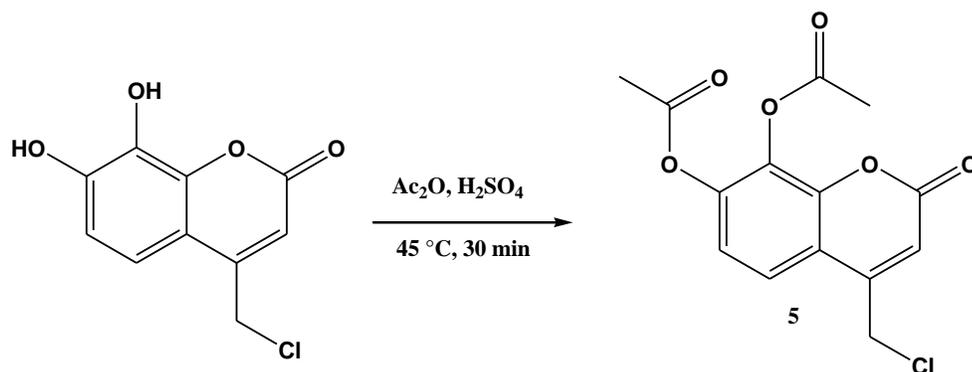


Figura 4.3. Síntesis del derivado clorado acetilado **5**.

b) Acetilación del ácido 3,4-dihidroxicinámico **6**.

Según lo descrito en la literatura⁸⁹ se disolvió el ácido 3,4-dihidroxicinámico (ácido cafeico) en solución 1 M de NaOH sobre un baño de hielo, se agregó anhídrido

acético y de inmediato se apreció la aparición de un precipitado amarillo claro que con el paso del tiempo se tornó de color marfil. Se dejó en estas condiciones con agitación vigorosa por 30 min. El producto **6** fue filtrado y lavado prolijamente con agua, posteriormente se recristalizó en etanol obteniéndose un sólido blanco brillante. La reacción global se presenta en la Figura 4.4.

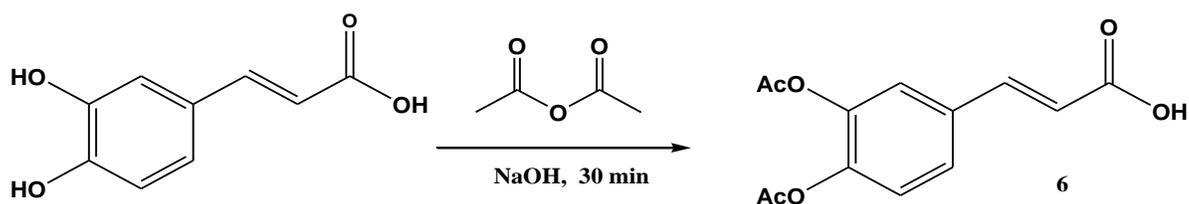


Figura 4.4. Síntesis del ácido cafeico acetilado **6**.

c) Acetilación del ácido gálico **7**.

Se mezclaron 3 g de ácido con 7 mL de anhídrido acético, se añadió 1 gota de H_2SO_4 . Se agitó durante 30 min a 47 °C. Posteriormente la mezcla fue enfriada y filtrada al vacío. El producto **7**, sólido de color blanco se recristalizó en etanol. La reacción global se presenta en la Figura 4.5.

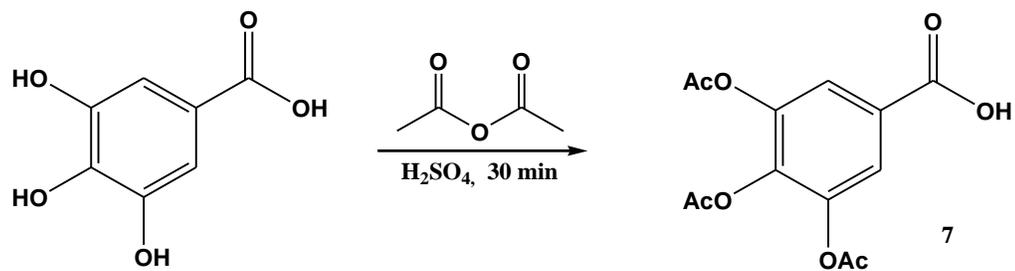


Figura 4.5. Síntesis del ácido gálico acetilado **7**.

d) Acetilación del ácido 3,4-dihidroxibenzoico **8**.

Se mezclaron 3 g de ácido con 6 mL de anhídrido acético, se añadió 1 gota de H_2SO_4 . Se agitó por 30 min a $50\text{ }^\circ\text{C}$. Luego se enfrió y filtró al vacío. El producto **8** sólido de color blanco fue recrystalizado en etanol, la reacción global se muestra en la Figura 4.6.

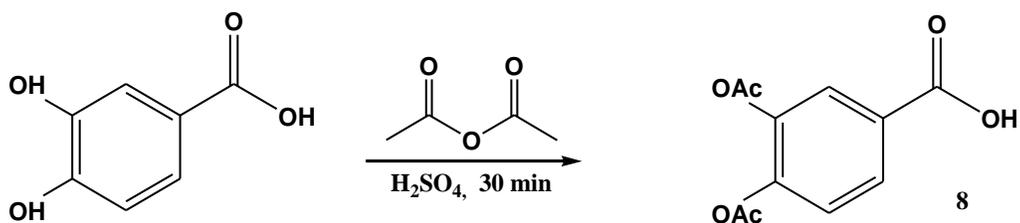


Figura 4.6. Síntesis del ácido 3,4-dihidroxibenzoico acetilado **8**.

C. Síntesis de los derivados híbridos. Procedimiento general.

En base a una variante del procedimiento descrito (Ono y colaboradores, 1978),⁹⁰ los derivados híbridos se obtuvieron mediante la esterificación de la cumarina acetilada **5** y el correspondiente ácido también previamente acetilado (**6**, **7**, **8**). Se disolvió el ácido (3,2 mmoles) en 10 mL de DMF (seca, recién destilada) a temperatura ambiente y se agregó el DBU en proporción equimolar; se dejó reaccionar por 30 min en un matraz provisto de codo de desecación (re lleno con CaCl₂) y agitación constante. Se agregó la cumarina (3,2 mmoles), y se apreció el fin de la reacción tras 3,5 h a 50 °C de temperatura. La solución se llevó a t° ambiente y se hizo precipitar cuidadosamente agregando agua destilada, el sólido (**9**, **10** y **11**) fue lavado prolijamente, se filtró y secó.

La Figura 4.7 muestra como ejemplo la ruta sintética llevada a cabo en la obtención del derivado de ácido cafeico.

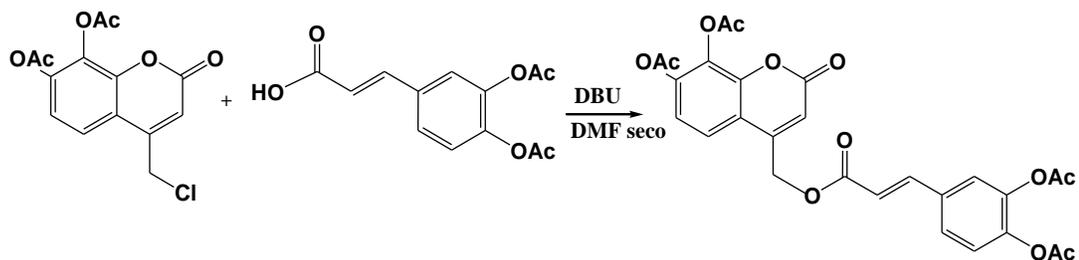


Figura4.7. Síntesis del intermediario híbrido derivado del ácido cafeico.

Posteriormente se procedió a desproteger los grupos fenólicos en el sólido mediante el procedimiento de desacetilación. El producto crudo fue suspendido en una mezcla de metanol (8 mL), acetona (12 mL) y solución saturada de NaHCO₃ (14 mL), se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno por 3 h.

Finalizada la reacción, la suspensión se concentró al vacío, se añadió HCl en frío formándose un precipitado claro que se filtró y lavó con abundante agua, posteriormente fue secado cuidadosamente. El sólido se lavó prolijamente con CHCl₃ a ebullición y fue secado al vacío, de esta forma se obtuvo el producto híbrido. La Figura 4.8 muestra la ruta de desprotección empleada.

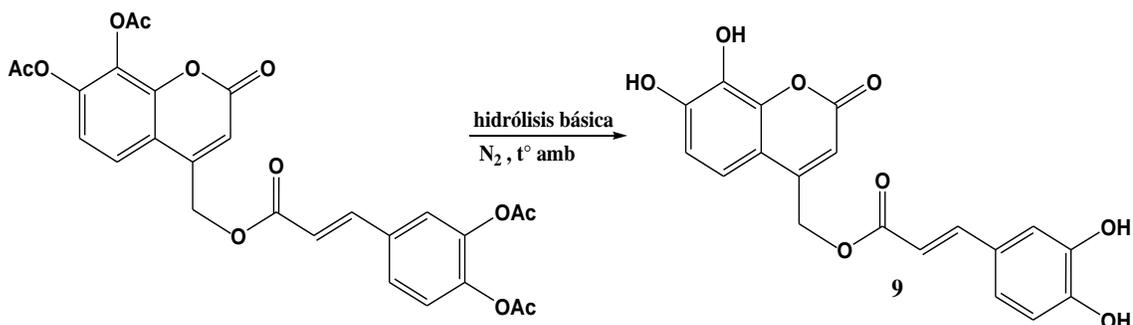


Figura4.8. Síntesis del compuesto híbrido final **9**.

En la Figura 4.9 se presenta un resumen de la ruta sintética para las cumarinas híbridas obtenidas.

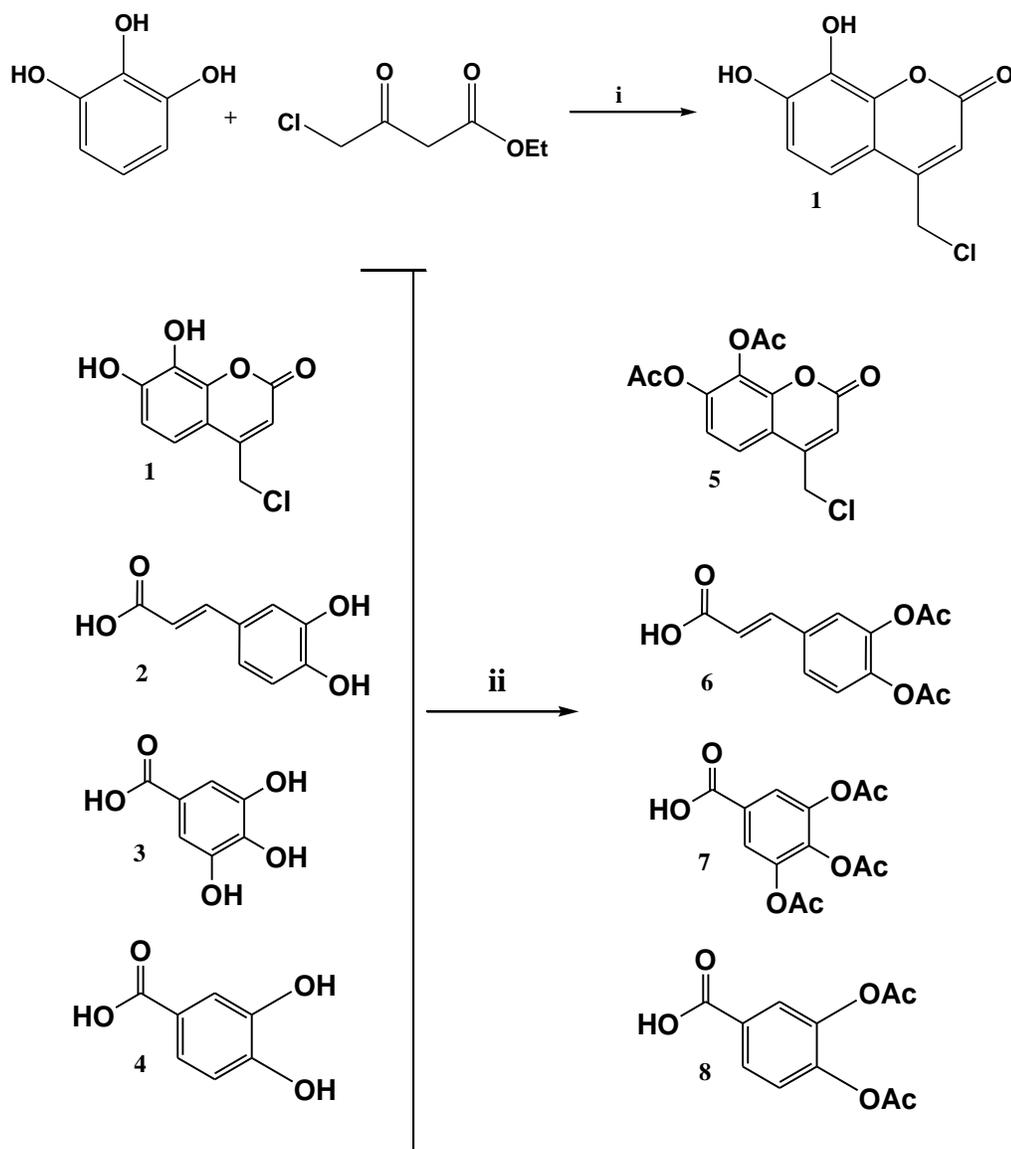


Figura 4.9A. Ruta de síntesis de los compuestos cumarínicos. i) H_2SO_4 , 1 h, baño de hielo; ii) NaOH , Ac_2O , 30 min., baño de hielo (ácido cafeico **6**); H_2SO_4 , Ac_2O , 30 min (cumarina y ácidos benzoicos).

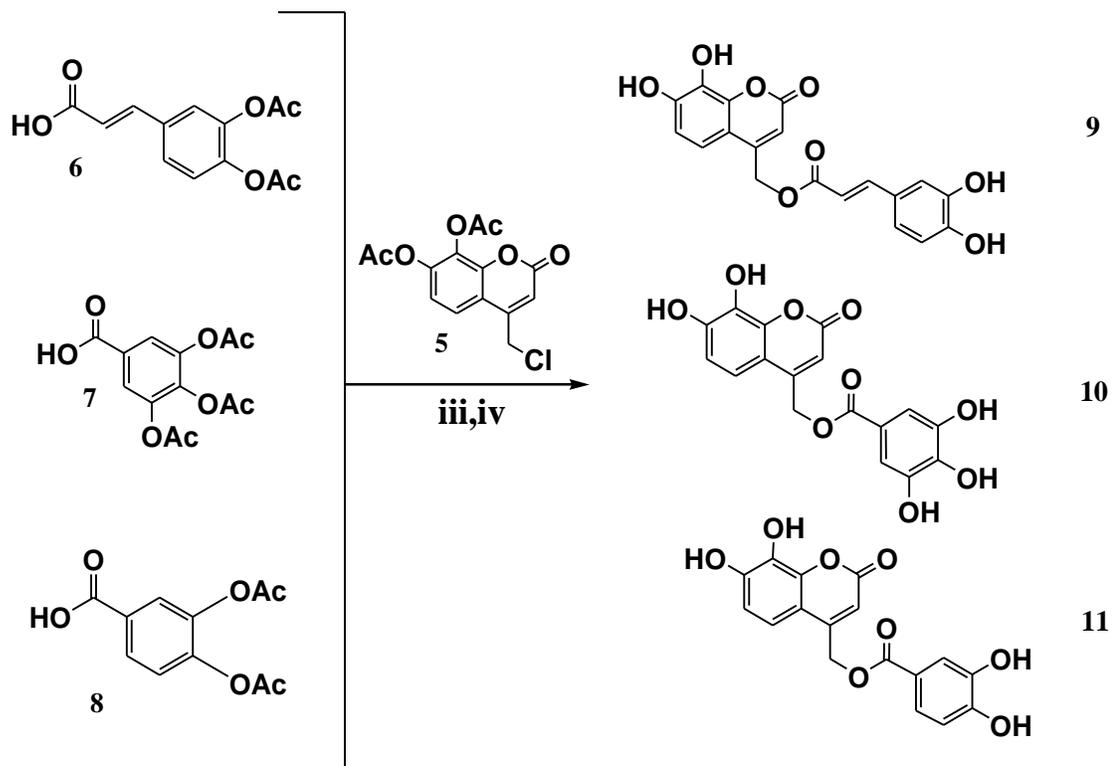


Figura 4.9B. Ruta de síntesis de los compuestos cumarínicos. iii) DBU, DMF (seca), 3,5 h., 50 °C. iv) NaHCO₃, MeOH, acetona, t° amb., 3 h, N₂.

4.2.2. Procedimiento experimental en electroquímica.

i) Celda electroquímica

La celda de trabajo estuvo compuesta por tres electrodos, el de trabajo de carbono vítreo y superficie $0,076 \text{ cm}^2$, electrodo de referencia Ag/AgCl (3 M KCl) inmerso en puente salino (DMF + HFFTBA 0,2 M) y alambre de platino como contra-electrodo.

ii) Condiciones de trabajo

Los experimentos se realizaron utilizando como solvente aprótico N,N-dimetilformamida (previamente destilada y guardada con tamiz molecular 3 \AA), las soluciones de trabajo en una concentración de 2 mM para todos los compuestos continuamente fueron purgadas con nitrógeno extra puro, el electrolito soporte utilizado fue HFFTBA (hexafluorofosfato de tetrabutil amonio) en una concentración dos órdenes de magnitud superior a la de la muestra.

iii) Técnicas empleadas

En el desarrollo de este trabajo se utilizó voltamperometría cíclica (VC) y voltamperometría de pulso diferencial (VPD).

iv) Cálculos

El proceso de deconvolución de las gráficas en VC se llevó a cabo utilizando el software Origin Pro 8 SR2 (Origin Lab Corporation, USA). Se aplicó la función Gaussiana (Ecuación 4.1)

$$y = y_0 + \frac{A}{w\sqrt{\pi}} e^{-\frac{2(x-xc)^2}{w^2}} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

4.2.3. Estudio de generación de especies radicalarias mediante espectroscopía de resonancia de espín electrónico

La oxidación electroquímica de los compuestos se realizó utilizando las mismas condiciones de potencial de voltametría cíclica, una celda compuesta de electrodo de trabajo de alambre de platino, el medio empleado fue DMF + HFFTBA, como contra-electrodo se utilizó alambre de platino. La estabilización del radical generado en la oxidación electroquímica se logró empleando el catión quelante Zn^{2+} el cual es silente a la técnica espectroscópica y forma complejos con el grupo catecol. Se utilizó $ZnCl_2$ en concentración final 3 mM.

4.2.4. Procedimiento experimental en el estudio de actividad frente a especies radicalarias.

4.2.4.1. Metodología de capacidad antioxidante frente a radicales de oxígeno (oxygen radical antioxidant capacity-fluorescein ORAC-FL)

Se prepararon soluciones stock en etanol para cada compuesto, de ellas se obtuvieron las soluciones de trabajo diluidas en solución buffer fosfato (pH 7,4). Se añadieron las alícuotas respectivas de concentraciones crecientes de cada compuesto en los pocillos de la placa (concentraciones finales entre 0,2 μ M y 10,9 μ M que permitieron obtener curvas de decaimiento apropiadamente separadas), posteriormente se adicionó la sonda fluoresceína (Figura 4.10 A) (solución preparada en buffer pH 7,4 y concentración final 40 nM) y se pre-incubó 15 min a 37 °C. Finalmente se adicionó la alícuota correspondiente de solución de 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) dihidrocloridrato (ABAP) la solución fue preparada en buffer pH 7,4 y concentración final 18 mM (Figura 4.10 B) y se llegó a un volumen final de 200 μ L.

La placa fue introducida en el lector y se midió el decaimiento de la sonda fluorescente cada 1 min con agitación previa a cada medición. Para cada set de medidas fue determinado el blanco correspondiente que contiene la sonda fluorescente y el generador de radicales peroxilo (ROO•). Se empleó el compuesto Trolox como antioxidante estándar de referencia (Figura 4.10 C), utilizándose un set

de concentraciones entre los 3 μM y 20 μM y el procedimiento anteriormente descrito para determinar el decaimiento de la fluorescencia de la sonda.

La capacidad de inhibición expresada como valor de índice ORAC se cuantificó utilizando el valor integrado de área bajo la curva (ABC) de fluorescencia (Figura 4.11, donde F_0 es el valor medido a tiempo 0 y F es el valor de fluorescencia al final de la medición cuando se apreció que el decaimiento es total). La ABC_{neta} se obtuvo de restar el valor del blanco al valor de cada compuesto (ver Ecuación 4.2).

$$ABC_{\text{neta}} = ABC_{\text{compuesto}} - ABC_{\text{blanco}} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

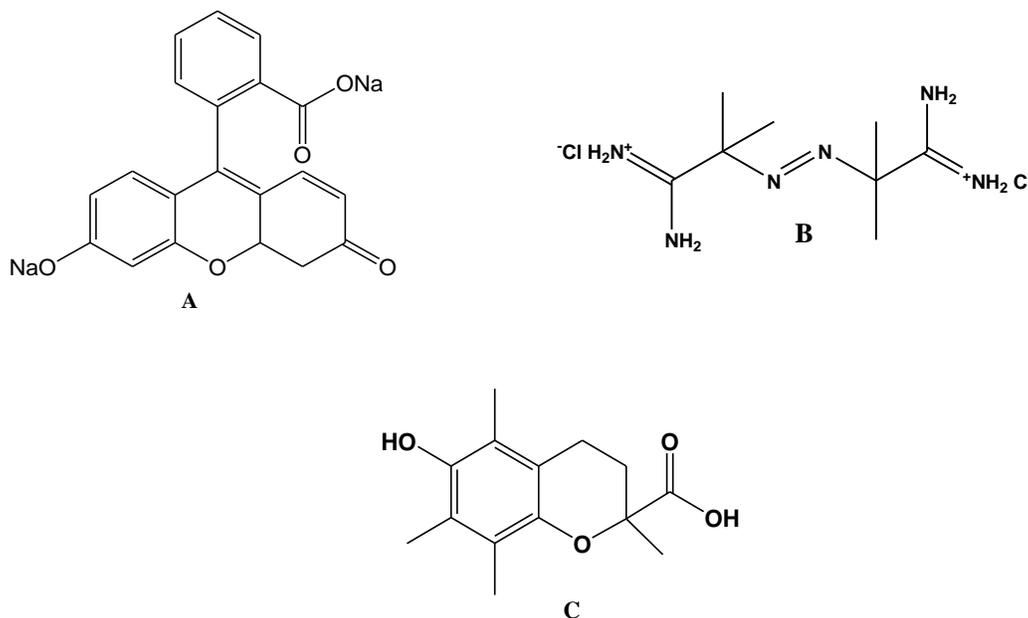


Figura 4.10 A: Sonda fluoresceína. B: 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) dihidrocloridrato (ABAP). C: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico (Trolox).

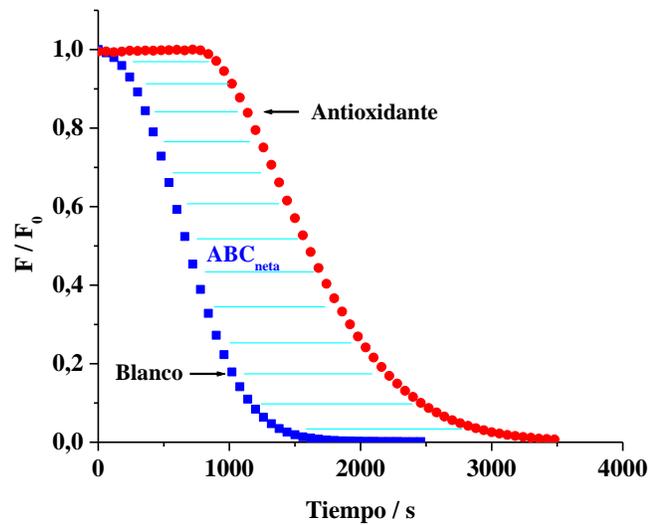


Figura 4.11. Actividad antioxidante ORAC-FL para un compuesto en estudio.

Finalmente, este valor de ABC_{neto} para cada concentración se graficó con respecto a la concentración obteniéndose una relación lineal en el rango de estudio. La pendiente de la regresión de cada compuesto fue dividida por el valor de la pendiente del estándar Trolox (obtenido de la misma forma descrita para las muestras), este coeficiente es el mencionado *Índice ORAC*.

Los datos fueron procesados mediante el software Origin Pro 8 SR2 (Origin Lab Corporation, USA). Las mediciones se realizaron en triplicado.

4.2.4.2. Metodología de determinación de poder antioxidante de reducción de hierro (FRAP).

- Preparación de soluciones

- i) Preparación solución tampón acetato.

Se disolvieron 1,55 g de acetato de sodio trihidrato ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) en agua ultrapura, se agregaron 8 mL de CH_3COOH glacial con agitación constante y se aforó a 500 mL. El pH fue ajustado a 3,6 con NaOH concentrado.

- ii) Preparación de solución tampón fosfato pH 7,4.

Se mezclaron 80 mL de solución 0,1 M de NaOH con 100 mL de solución 0,1 M de KH_2PO_4 , se agitó para homogeneizar.

- iii) Preparación solución HCl 40 mM.

En un matraz aforado (50 mL) se mezclaron 167 μL de HCl 12 M (37%) con agua ultrapura y se agitó hasta homogeneizar.

- iv) Preparación de solución TPTZ.

Se pesaron 79,7 mg de reactivo TPTZ (Figura 4.12) y se aforó a 25 mL con solución HCl 40 mM, se agitó y conservó protegido de la luz.

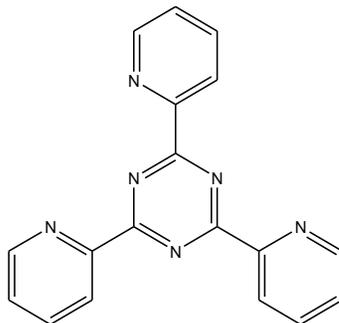


Figura 4.12. Reactivo 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina. (TPTZ)

v) Preparación solución de FeCl_3 (20 mM).

Se pesaron 0,054 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, se aforó a 10 mL con agua ultrapura y se agitó constantemente.

vi) Preparación del reactivo FRAP.

Se mezcló el tampón acetato con solución TPTZ y solución férrica en proporción 10:1:1, se agitó y conservó al abrigo de la luz.

vii) Preparación de soluciones en estudio.

Se mezclaron alícuotas de solución stock (en etanol) de cada compuesto con tampón fosfato, luego se agitaron y se obtuvieron soluciones en concentraciones entre 15 μM y 58 μM .

- Ensayo de capacidad reductora.

En un frasco ámbar se mezclaron 150 μL de solución de muestra con 450 μL de agua ultrapura y posteriormente 950 μL de reactivo FRAP. La solución se agitó e inmediatamente se tornó de color azul, lo que indicó la reacción de oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} en el complejo formado con el reactivo TPTZ. Se midió el espectro de absorbancia en el rango del UV-visible a temperatura ambiente, considerando el valor de $\lambda_{\text{máx}} = 599 \text{ nm}$. Los experimentos se realizaron en triplicado, los valores obtenidos para este ensayo se expresan como equivalentes de Trolox/ 10 μM de muestra.

4.2.4.3. Capacidad de apagamiento del radical hidroxilo (OH^\bullet) mediante la técnica spin trap.

Se realizó el ensayo mediante la metodología de Fenton no catalítico comparando las señales en el espectro mediante espectroscopia de resonancia de espín electrónico (REE) del aducto DMPO-OH como blanco frente a las señales obtenidas en las mismas condiciones tras añadir los compuestos en estudio. Para la generación del radical hidroxilo se utilizó peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y solución acuosa de NaOH, metodología que presenta la ventaja de que en ausencia de iones Fe^{2+} (como en la metodología Fenton) se evitó la reacción de quelación con los grupos catecol presentes en las estructuras propuestas.^{91a,b}

Se prepararon soluciones stock (20 mM en DMF) de cada compuesto en estudio, se tomaron alícuotas de 100 μL y se agregaron 50 μL de NaOH (25 mM), 50 μL de solución de 5,5-dimetil-1-pirrolino-N-óxido (DMPO) (30 mM) y finalmente 50 μL de agua oxigenada (30%), se agitó cuidadosamente, se incubó por 5 minutos y se midió su espectro. Los resultados se expresaron como el porcentaje de inactivación del radical hidroxilo

4.2.4.4. Estudio de reactividad frente a anión radical superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$

Se evaluó la reactividad de cada compuesto frente al radical anión superóxido, el que fue generado electroquímicamente en la superficie del electrodo a través de la reducción del oxígeno molecular disuelto en el medio (Figura 4.13).

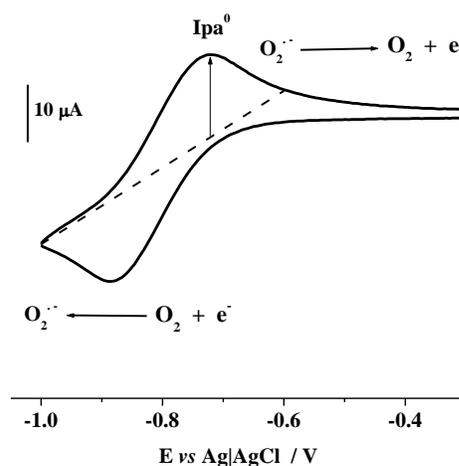


Figura 4.13. Voltamograma cíclico de la generación de anión radical superóxido, DMF + HFFTBA 0,2 M en electrodo de carbono vítreo.

i) Celda electroquímica

La celda estuvo compuesta de tres electrodos, el electrodo de trabajo fue carbono vítreo (área = 0,03 cm²), el electrodo auxiliar empleado fue Ag|AgCl (KCl 3 M, inmerso en DMF + HFFTBA 0,2 M como puente salino) y alambre de platino como contra-electrodo.

ii) Técnica empleada

La generación del radical se realizó mediante voltamperometría cíclica (VC), a velocidad de barrido de 0,1 V/s, en un rango de potencial entre 0 V (inicial) y -1 V como potencial de inversión de la dirección de barrido (switching)⁹².

iii) Experimento

Los experimentos se realizaron utilizando como solvente 10 mL de N,N-dimetilformamida (previamente destilada), el electrolito soporte utilizado fue HFFTBA (hexafluorofosfato de tetrabutil amonio) en concentración 0,2 M, las soluciones fueron saturadas con aire continuamente. Una vez estabilizada la corriente se añadieron a la celda alícuotas crecientes de solución stock de cada compuesto, observándose la disminución en la corriente de pico anódica $I_{p_a}^0$. Una vez obtenidos los voltamogramas, se determinó el parámetro adimensional $((I_{p_a}^0 - I_{p_a}^S) / I_{p_a}^0)$ el que expresó el consumo de la especie radical, este valor se graficó con respecto a la concentración del sustrato cuya relación fue una regresión lineal. De la gráfica se

obtuvo el valor de concentración de antioxidante en que la corriente de pico anódico disminuye en un 50% (IA₅₀).

4.2.4.5. Estudio de la capacidad antioxidante celular (CAC).

Para evaluar la actividad antioxidante de los compuestos estudiados en un medio celular se utilizó el método descrito en la literatura por Wolfe.⁹³ Se emplearon células EA.hy 926 (ATCC CRL-2922) las que fueron sembradas con una densidad de 50.000 células por pocillo en microplacas de 96 pocillos con medio de cultivo RPMI 1640. Después de 24 h fue removido el medio de cultivo y los pocillos fueron lavados con buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4. Los pocillos fueron tratados con 20 µM de la sonda DCFH-DA, disuelta en RPMI 1640 libre de suero fetal bobino. Posteriormente se agregaron los compuestos en dos concentraciones diferentes 1 µM y 10 µM. Luego de transcurrida 1 h de incubación a 37 °C los pocillos fueron lavados con PBS. Luego de esto se agregó ABAP en una concentración final de 600 µM y se midió la fluorescencia generada por la sonda en el multi-lector de placas a temperatura constante de 37 °C. La emisión a 538 nm fue medida con una excitación a 485 nm cada 1 min por 1 hora. El ensayo se realizó en triplicado. El valor de capacidad antioxidante se calcula determinando el área bajo la curva para la muestra y el control experimental utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ CAC} = 100 - (\text{ABC}_{\text{muestra}} / \text{ABC}_{\text{control}}) * 100$$

Ecuación 4.3

4.2.4.6. Estudio de hidrofobicidad relativa de los compuestos.

La hidrofobicidad de los compuestos se correlaciona con sus coeficientes de reparto y distribución (log P para el reparto octanol/agua y log D para la distribución octanol/solución tampón pH 7,4) los que se determinan utilizando técnicas espectrofotométricas y/o cromatográficas.

Para realizar estas experiencias, se determina la solubilidad del analito en octanol saturado con agua y en la solución tampón pH 7,4 saturado con octanol. Luego, se obtienen las respectivas curvas de calibración para la concentración del compuesto en estas soluciones en función de la absorbancia y/o área bajo la curva. Se espera que las curvas de calibración obtenidas cumplan con el requisito de una linealidad apropiada. Posteriormente, se debe evaluar el reparto midiendo la concentración analítica en la fase orgánica y acuosa. Para la determinación del reparto está descrita la siguiente ecuación:

$$\log P_{\text{oct/agua}} = \log \left(\frac{[\text{soluto}]_{\text{octanol}}}{[\text{soluto}]_{\text{agua}}} \right) \quad \text{Ecuación 4.4.}$$

Mientras que para la determinación de la distribución se utiliza la siguiente ecuación:

$$\log P_{\text{oct/agua(tampón)}} = \log \left(\frac{[\text{soluto}]_{\text{octanol}}}{[\text{soluto}]_{\text{tampón pH 7,4}}} \right) \quad \text{Ecuación 4.5.}$$

Para este estudio se realizó la determinación de tiempos de retención como medida de la hidrofobicidad relativa entre compuestos. Se utilizó una columna C₁₈ ODS Hypersil, una fase móvil compuesta de acetonitrilo/ solución H₃PO₄ (65:35 v/v), bajo condiciones isocráticas, con flujo 1 mL/min, volumen de inyección 50 µL.

4.2.4.7. Estudio teórico: cálculo del Índice de Fukui.

La optimización de estructuras de los compuestos neutros se realizó utilizando el método DFT/SP-DFT basado en la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT).⁹⁴⁻⁹⁶ Se utilizó el funcional híbrido B3LYP, el conjunto de bases empleado fue 6-31G(d). Los cálculos se realizaron mediante el software Gaussian'09. Los descriptores locales se evaluaron a través de la aproximación de orbitales condensados Orbitales Moleculares Frontera (Mulliken MOs).

5. Resultados y discusión.

5.1. Síntesis de los compuestos.

Se presentan a continuación los resultados de la caracterización física y espectroscópica de los compuestos sintetizados durante este trabajo.

4-clorometil-7,8-dihidroxicumarina (1)

^1H RMN (DMSO d_6 , δ ppm): 4,93 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$); 6,41 (s, 1H, $=\text{CH}-$ cumarina); 6,86 (d, 1 H_{arom} , J_{orto} 8,5); 7,17 (d, 1 H_{arom} , J_{orto} 8,5); 9,42 (s, 1H, OH); 10,22 (s, 1H, OH).

^{13}C RMN (DMSO d_6 , δ ppm): 41,87; 110,47; 111,29; 112,67; 115,85; 132,82; 143,58; 150,17; 151,81; 160,46. Rendimiento: 47%. Punto de fusión: 202-204 °C. Agujas color marfil. P.M: 226,5g/mol. Fórmula molecular: $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{O}_4\text{Cl}$.

4-clorometil-7,8-diacetilcumarina (5).

^1H RMN (DMSO d_6 , δ ppm): 2,35 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 2,41 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 5,06 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$); 6,74 (s, 1H, $=\text{CH}-$ cumarina); 7,39 (d, 1 H_{arom} , J_{orto} 8,78); 7,83 (d, 1 H_{arom} , J_{orto} 8,78). ^{13}C RMN (DMSO d_6 , δ ppm): 19,43; 19,85; 39,83; 40,73; 114,67; 115,49;

118,71; 122,38; 129,39; 144,59; 145,93; 149,99; 157,87; 167,51. Rendimiento: 68%. Punto de fusión: 157-159 °C. Sólido blanco. P.M.: 310,5 g/mol. Fórmula molecular: $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_6\text{Cl}$.

Ácido-3,4-diacetoxicinámico (6).

^1H RMN (acetona d_6 , δ ppm): 2,15 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 2,16 (s, 3H, CH_3); 6,38-6,43 (d, 1H, J_{trans} 15,9); 7,17-7,20 (d, 1H_{arom}, J_{orto} 8,78); 7,48-7,50-7,56 (s, H_{arom} y H_{trans}). ^{13}C RMN (acetona d_6 , δ ppm): 19,96; 20,04; 119,77; 123,33; 124,50; 126,82; 133,64; 143,23; 143,39; 144,39; 166,99; 168,09; 168,17. Rendimiento: 56 %. Punto de fusión: 158-161 °C. Sólido blanco. P.M: 264 g/mol. Fórmula molecular: $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_6$.

Ácido-3,4,5-triacetilbenzoico (7).

^1H RMN (acetona d_6 , δ ppm): 2,17 (s, 6H, $-\text{CH}_3$); 2,19 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 7,67 (s, 2H, H_{arom}). ^{13}C RMN (acetona d_6 , δ ppm): (2C, $-\text{CH}_3$, 18,65); (2C, $-\text{C}=\text{O}$, 19,10); (2C_{arom}, 121,60); 127,90; 138,57; (2C 143,37); 164,32; 165,99; 167,89. Rendimiento: 66%. Punto de fusión: 158-160 °C. Sólido blanco. P.M.: 296 g/mol. Fórmula molecular: $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_8$.

Ácido 3,4-diacetilbenzoico (8).

^1H RMN (acetona d_6 , δ ppm): 2,17 (s, 6H, CH_3); 7,24-7,27 (d, 1H_{arom}, J_{orto} 8,5); 7,74-7,75 (d, 1H_{arom}); 7,81-7,84 (dd, 1H_{arom}). ^{13}C RMN (acetona d_6 , δ ppm): 19,10; 19,13; (2C, 123,29); 124,53; 127,29; 128,38; 164,87; 166,99; 167,29. Rendimiento: 61%. Punto de fusión: 155-158 °C. Sólido blanco. P.M.: 238 g/mol. Fórmula molecular: $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_6$.

4-metil-(3,4-dihidroxicinamoato)-7,8-dihidroxicumarina (9)

^1H RMN (DMSO-d_6 , δ ppm): 5,41(s, 2H, $-\text{CH}_2-$); 6,21(s, 1H, $=\text{CH}-$ cumarina); 6,42-6,48 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 15,91$); 6,82-7,1 (H_{arom}); 7,58-7,63 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 15,91$); 9,1 (s, -OH); 9,4 (s, -OH); 9,7 (s, -OH); 10,2 (s, -OH). ^{13}C RMN (DMSO d_6 , δ ppm): 61,54; 108,20; 110,35; 112,90; 113,45; 115,26; 115,50; 116,20; 122,25; 125,66; 132,92; 143,91; 146,07; 146,86; 149,20; 150,26; 151,74; 160,55; 166,46. ESI-MS m/z: **371** $[\text{M}+\text{H}]^+$; **369** $[\text{M}-\text{H}]^-$; 181 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 163 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$; 145 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$; 135 $[\text{M}-\text{HCOOH}+\text{H}]^+$; 179 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 161 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$; 135 $[\text{M}-\text{CO}_2-\text{H}]^-$. Rendimiento: 37%. Punto de fusión: 246-249 °C. Sólido amarillo opaco. P.M.: 370,31 g/mol. Fórmula molecular: $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_8$.

4-metil-(3,4,5-dihidroxi benzoato)-7,8-dihidroxicumarina (10)

^1H RMN (DMSO d_6 , δ ppm): 5,46 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$); 6,19 (s, 1H, $=\text{CH}-$ cumarina); 6,82-6,85 (d, 1 H_{arom} , $J_{\text{orto}} 8,508$); 7,04 (s, 2 H_{arom}), 7,09-7,12 (d, 1 H_{arom} , $J_{\text{orto}} 7,78$). ^{13}C RMN (DMSO d_6 , δ ppm): 61,92; 108,21; 109,14; 110,41; 112,95; 115,33; 118,85; 132,92; 139,49; 143,94; (2 C_{arom}) 146,20; 150,24; 151,84; 160,55; 165,55; 167,93. ESI-MS m/z: **361** $[\text{M}+\text{H}]^+$; **359** $[\text{M}-\text{H}]^-$; 171 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 153 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$; 125 $[\text{M}-\text{CO}_2\text{H}+\text{H}]^+$; 169 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 125 $[\text{M}-\text{CO}_2-\text{H}]^-$. Rendimiento: 46 %. Punto de fusión: descomposición sobre 230 °C. Sólido amarillo opaco. P.M.: 360,27 g/mol. Fórmula molecular: $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_9$.

4-metil-(3,4-dihidroxibenzoato)-7,8-dihidroxicumarina (11)

^1H RMN (DMSO d_6 , δ ppm): 5,48 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$); 6,19 (s, 1H, $=\text{CH}$ - cumarina); 6,85 (m, 2H_{arom}); 7,1 (d, 1H_{arom}); 7,4 (d, 2H_{arom}). ^{13}C RMN (DMSO d_6 , δ ppm): 61,42; 107,74; 109,88; 112,42; 114,81; 115,51; 116,26; 119,57; 122,18; 132,40; 143,43; 145,20; 149,72; 150,96; 151,27; 160,01; 164,90. ESI-MS m/z: **345** $[\text{M}+\text{H}]^+$; **343** $[\text{M}-\text{H}]^-$; 137 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$; 109 $[\text{M}-\text{HCOOH}+\text{H}]^+$; 153 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 108 $[\text{M}-\text{CO}_2-\text{H}]^-$. Rendimiento: 73%. Punto de fusión: descomposición sobre 250 °C. Sólido amarillo opaco. P.M.: 344,27 g/mol. Fórmula molecular: $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_8$.

5.2. Estudios de voltametría cíclica y voltametría de pulso diferencial.

El proceso de oxidación electroquímica de los compuestos fue evaluado mediante voltamperometría de pulso diferencial VPD. Los resultados presentaron sólo un pico de oxidación para los compuestos **1**, **2**, **4** y **9**; por otra parte el ácido gálico **3** y los híbridos **10** y **11** mostraron dos o más señales poniendo de manifiesto las complejas reacciones de oxidación que presentan los grupos -OH en dichas estructuras (Figura 5.1 A y B).⁹⁷

Al analizar las señales tanto para los precursores y sus derivados híbridos, se encontró que la única señal anódica del compuesto **9** correspondería tanto a la oxidación del catecol presente en la cumarina **1** (E_{p_a} 0,83 V) como del ácido cafeico **2** (E_{p_a} 0,76 V) (Figura 5.2. A), ambos compuestos por separado tuvieron potenciales de pico anódico cercanos los que se solaparon para una dar una sola señal en el derivado **9** (E_{p_a} 0,82 V).

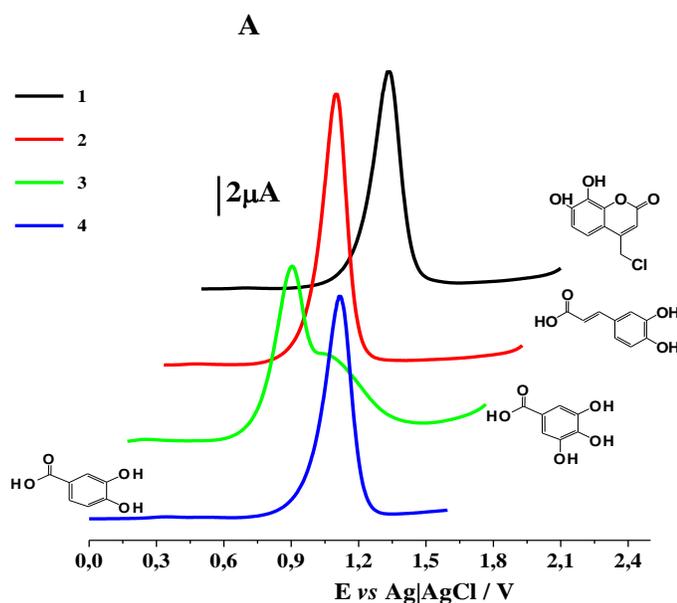


Figura 5.1. A. Voltamperogramas de pulso diferencial para los precursores **1**, **2**, **3** y **4**. 2 mM en DMF + HFFTBA 0,2 M.

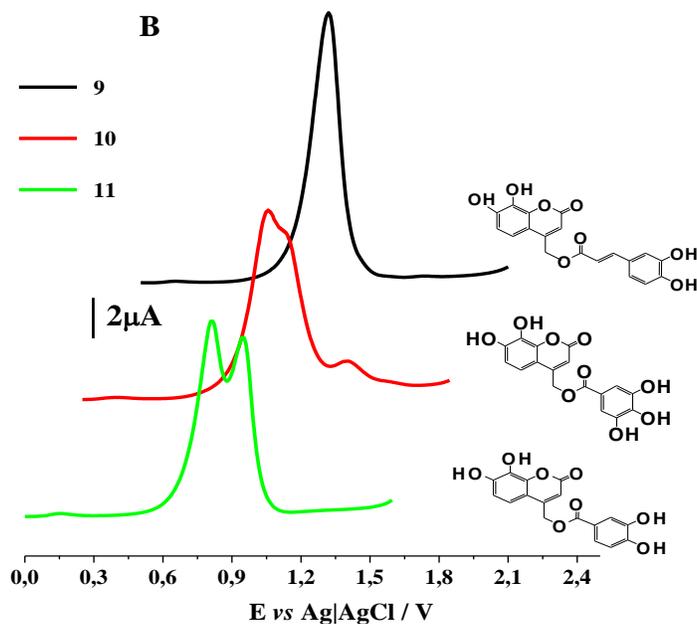


Figura 5.1. B. Voltamperogramas de pulso diferencial para los derivados **9**, **10** y **11**.
2 mM en DMF + HFFTBA 0,2 M.

En el caso del híbrido **11** derivado del ácido protocatéquico se observaron dos picos de oxidación que corresponderían a la oxidación del catecol cumarínico (E_{p_a} 0,83 V) y el catecol del ácido benzoico (E_{p_a} 1,11 V). A diferencia del caso anterior, se encontró que las señales anódicas de ambos precursores estuvieron lo suficientemente distantes como para solaparse como en el caso anterior. Considerando que los resultados se obtuvieron bajo las mismas condiciones experimentales, se podría asumir que la señal a potencial $E_{p_{a1}}$ 0,81 V corresponde a la oxidación en el anillo de la cumarina y la señal en $E_{p_{a2}}$ 0,94 V corresponde a la oxidación del catecol presente en el anillo bencénico. Para el compuesto **10** se observó un comportamiento semejante al descrito para **11**.

Los experimentos de voltamperometría cíclica se llevaron a cabo a distinta velocidad de barrido: 0,05 V/s – 3 V/s con el objeto de estudiar su influencia sobre la señal de oxidación. En forma gráfica para precursores y derivados se observaron pares redox de comportamiento irreversible debido al evidente desplazamiento del potencial de pico E_{p_a} con respecto al aumento de la velocidad de barrido. El valor de ΔE_p ($E_{p_a} - E_{p_c}$) se incrementó con el aumento en la velocidad, lo que indica una disminución en la velocidad de transferencia electrónica. Para los compuestos **1**, **2**, **4** y **9** a la velocidad de barrido estudiada se observó al igual que en VPD la aparición de una única señal de oxidación para todo el rango de velocidad (la que se desplaza a potenciales más positivos a medida que aumenta la velocidad de barrido), seguida de una señal de reducción en el barrido hacia potenciales negativos. Para los compuestos **3**, **10** y **11** se apreciaron dos señales de oxidación seguida de la correspondiente señal en el barrido de reducción.

Para cada par redox se realizaron estudios por segmentos encontrándose para los compuestos **9** y **10** que el pico I (de oxidación) está relacionado con el pico II (de reducción) y para el compuesto **11** las señales I y I' (de oxidación) están relacionadas con el pico II (de reducción). Esto es indicio de que en el primer barrido se observa el proceso de oxidación de los grupos fenoles en el cual se generan especies factibles de ser reducidas, como derivados de tipo quinónico (Figuras 5.2 a 5.4).

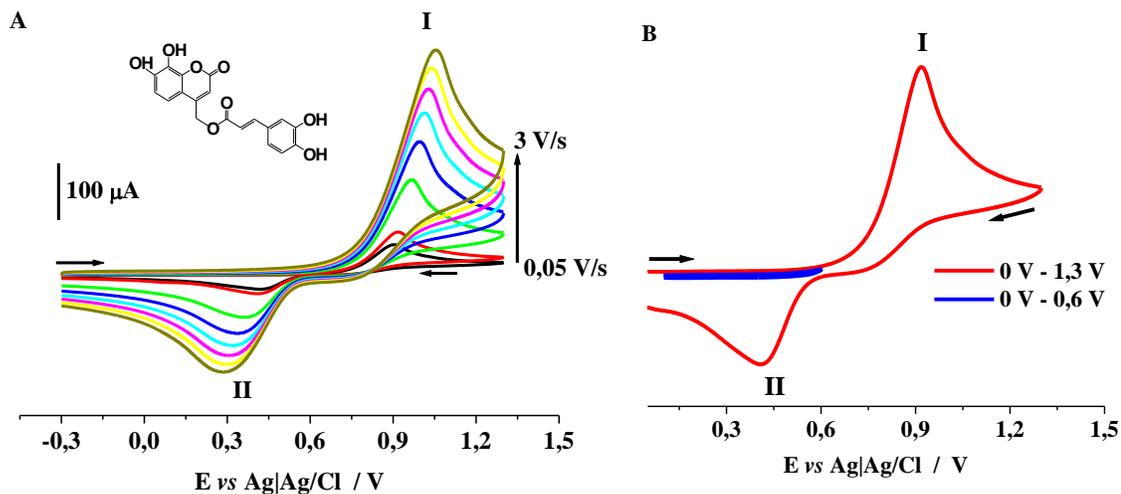


Figura 5.2.A. VC para el derivado **9** a distintas velocidades de barrido: 0,05 V/s - 3 V/s. **B:** VC por segmentos a 0,1 V/s. 2 mM en DMF + HFFTBA 0,2 M.

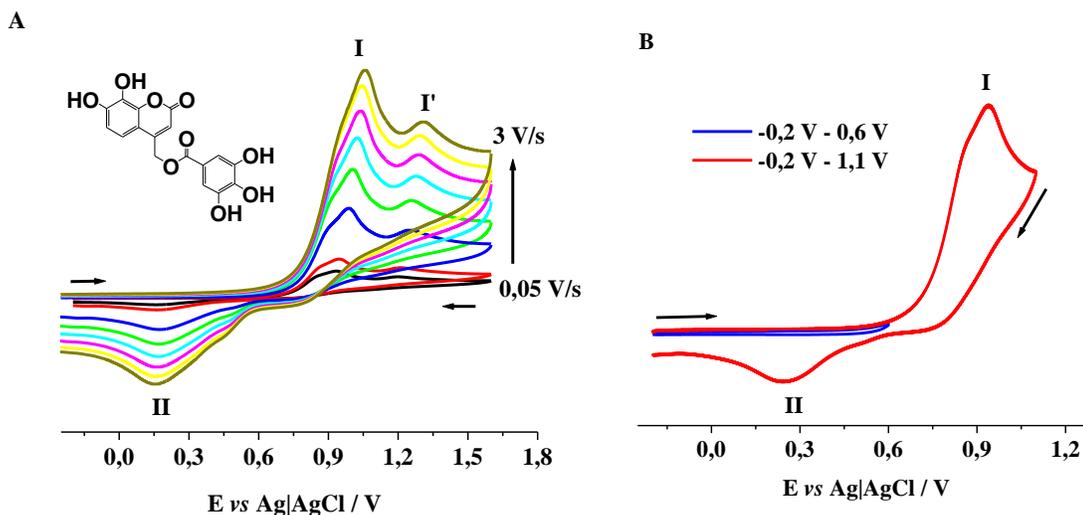


Figura 5.3.A. VC para el derivado **10** a distintas velocidades de barrido: 0,05 V/s - 3 V/s. **B:** VC por segmentos a 0,1 V/s. 2 mM en DMF + HFFTBA 0,2 M.

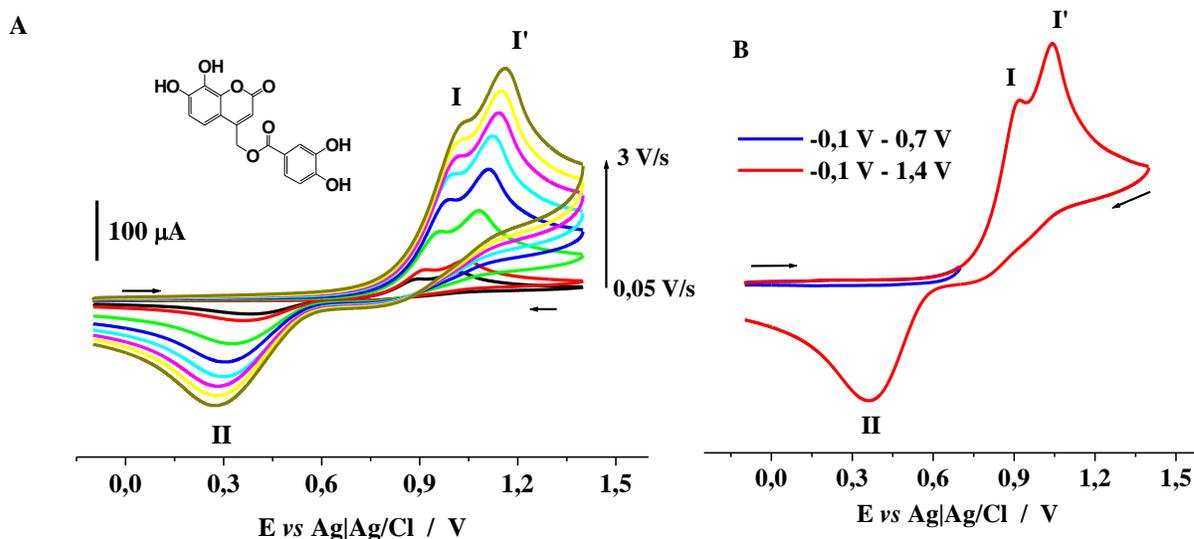


Figura 5.4. A. VC para el derivado **11** a distintas velocidades de barrido: 0,05 V/s - 3 V/s. B: VC por segmentos a 0,1 V/s. 2 mM en DMF + HFFTBA 0,2 M.

En sistemas fenólicos simples como es el caso del catecol o la hidroquinona se ha estudiado el proceso redox en distintos medios,⁹⁸⁻¹⁰¹ planteándose que la oxidación en medio aprótico deriva en la formación de la quinona correspondiente vía $2e^-/2H^+$ (Figura 5.5). En esta investigación se han estudiado estructuras de mayor complejidad y considerando que en este proceso de oxidación se ha descrito la presencia de especies radicales como intermediarios de reacción, es probable que ocurran procesos de dimerización o ataques nucleofílicos por parte de los radicales, dando como resultado la generación de compuestos diferentes a la molécula de partida (por ejemplo de mayor peso molecular). Este tipo de comportamiento se puede analizar en profundidad realizando barridos de potencial consecutivos en VC a baja velocidad de

barrido (0,05 V/s o menor para observar más detalladamente la reacción química en la escala de tiempo del experimento). Si fuese el caso, se esperaría observar la aparición de señales nuevas en el segundo barrido de oxidación que darían cuenta de la oxidación de las nuevas estructuras fenólicas generadas.

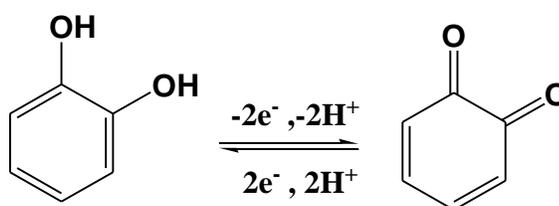


Figura 5.5. Esquema del proceso electro-oxidativo propuesto para el catecol.

Se realizó la deconvolución (mediante la función gaussiana) sobre las curvas de oxidación para los compuestos con el objeto de determinar los valores de corriente de pico anódica de forma independiente, con esto se obtienen valores de corriente y potencial (principalmente a alta velocidad de barrido) los cuales son más exactos que los entregados por defecto por el software electroquímico utilizado. Las gráficas y cálculos correspondientes a la relación entre los diferentes parámetros analizados se realizaron considerando los valores de I_{p_a} y E_{p_a} para el primer pico oxidativo debido a que esta señal entrega información con respecto a la energía del primer electrón cedido en el proceso de oxidación, etapa que generalmente es lenta y determinante de la velocidad de reacción.

La expresión indicada en la Ecuación 5.1¹⁰² da cuenta de la relación entre el potencial de pico y el logaritmo de la velocidad de barrido para una reacción electroquímica irreversible:

$$E_{p\text{ irrev}} = E_{1/2} + \frac{b}{2} \left[1,04 - \log\left(\frac{b}{D}\right) - 2\log k_f + \log v \right] \quad \text{Ecuación 5.1}$$

Por tanto de la gráfica E_p vs $\log v$ se puede obtener el valor de la pendiente de Tafel b , que es igual al doble de la pendiente de la recta obtenida:

$$E_{p\text{ irrev}} = Cte + \frac{b}{2} (\log v) \quad \text{Ecuación 5.2}$$

La gráfica de potencial de pico anódico (E_{p_a}) vs $\log v$ dio como resultado una relación de tipo lineal para todos los compuestos, el potencial de oxidación se desplazó hacia valores más positivos con el aumento de la velocidad de barrido lo que indica el carácter irreversible del proceso oxidativo en este medio. En la Figura 5.6 se presenta la gráfica obtenida para el derivado **9** como ejemplo representativo de los resultados obtenidos.

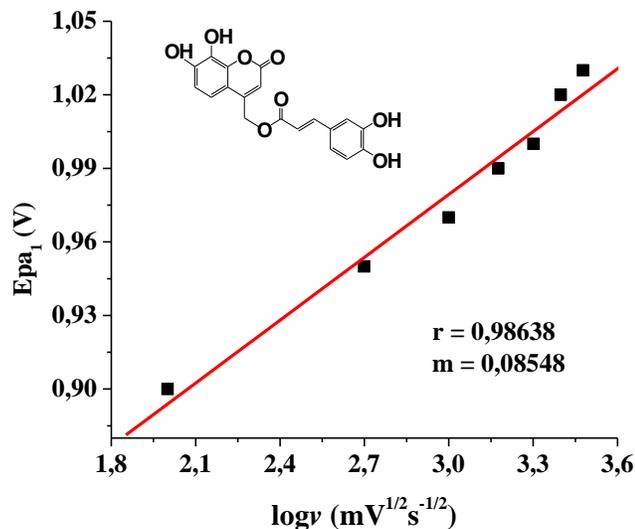


Figura 5.6. Relación E_{pa} vs $\log v$ para el derivado de ácido cafeico **9**. 2 mM en DMF + HFFTBA 0,2 M

Los valores obtenidos para la pendiente de Tafel se resumen en la Tabla 5.1. Los compuestos **1** y **3** poseen valores de la pendiente de Tafel cercanos al teórico (118 mV/dec)¹⁰³ para un proceso en que la primera transferencia electrónica es la etapa lenta del proceso (por tanto la etapa determinante de la reacción de electro-oxidación). El compuesto **4** presenta un valor de 88 mV/dec, lo que sugiere que el electrodo está contaminado^{103,104} o se produce un mecanismo de oxidación complejo (que implica una transición entre la etapa química y la transferencia electrónica como determinante de la velocidad).¹⁰⁵ De la misma forma, los valores encontrados para los derivados **9** (170 mV/dec), **10** (134 mV/dec) y **11** (140 mV/dec) y para el ácido cafeico (212 mV/dec) indican que en las condiciones experimentales utilizadas la superficie del

electrodo se contamina (pasiva)¹⁰⁶ con la generación de especies poliméricas, debido a la formación del radical fenoxilo (ArO•) el cual puede dimerizar y originar diversos productos de reacción los cuales se adhieren a la superficie del electrodo.

Para cada compuesto se estableció la existencia de una relación de tipo lineal entre el logaritmo de la corriente de pico anódico y el logaritmo de la velocidad de barrido ($\log I_{p_a}$ vs $\log v$). El valor para la pendiente de estas rectas estuvo entre 0,44 y 0,56 (Tabla 5.1) lo que sugiere que el proceso observado es de tipo difusivo.

La corriente de pico anódica se puede expresar en función de distintos parámetros experimentales como se indica en la Ecuación 5.3.¹⁰²

$$I_p = 3,01 \times 10^{-5} n \left(\frac{2,3 RT}{b F} \right)^{1/2} D^{1/2} C v^{1/2} \quad \text{Ecuación 5.3}$$

Donde n es el número de electrones transferidos, R es la constante de los gases (J/mol K), T es la temperatura (K), D es el coeficiente de difusión de la especie electro-activa (cm^2/s), F es la constante de Faraday (C/mol), b es la pendiente de la ecuación de Tafel¹⁰⁷ ($\eta = a + b \log i$), C es la concentración de la especie electro-activa (mol/L) y v es la velocidad de barrido (mV/s). Esta expresión indica que la correlación entre I_p y $v^{1/2}$ da como resultado una recta que será función del número de electrones n y la pendiente de Tafel b , valores que están presentes en la pendiente de esta recta.

Considerando lo anterior se procedió a graficar I_{p_a} vs $v^{1/2}$ encontrándose para todos los compuestos (Figura 5.7) una relación de tipo lineal con valores de r entre 0,99988 y 0,99448, se presenta además la regresión para el ácido protocatéutico **4** como muestra del comportamiento encontrado para todos los compuestos, con valores de intercepto que tienden a cero. Al observar la Tabla 5.1 se aprecia que todas las regresiones poseen una pendiente semejante, lo cual da un indicio con respecto al número de electrones y mecanismo involucrados en la reacción de oxidación estudiada.

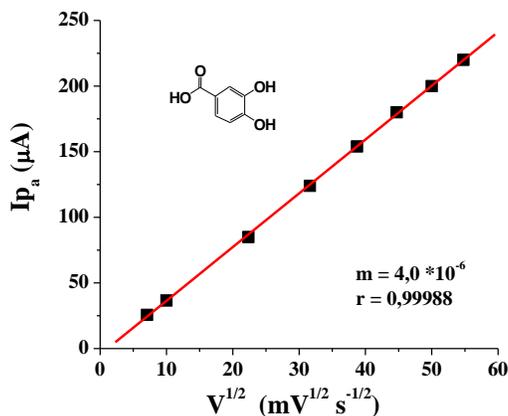


Figura 5.7. Gráfica para la corriente de pico I_{p_a} vs la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. Ejemplo de correlación lineal en el ácido protocatéutico **4**. 2 mM en DMF + HFFTBA 0,2 M.

Tomando en cuenta que los valores de C , R , T y F (Ecuación 5.3) son factores constantes y que los coeficientes de difusión D serán semejantes y del mismo orden para aquellos compuestos de estructura similar (precursores por una parte y derivados por otra) se obtiene que la pendiente de la recta obtenida en esta correlación es un

indicador respecto al número de electrones involucrados en la reacción y al valor de b (relacionado con el mecanismo de oxidación estudiado).

En el caso de los compuestos precursores se obtuvieron valores de pendientes entre $3,6 \cdot 10^{-6}$ y $4,1 \cdot 10^{-6}$ (Tabla 5.1), este rango cercano indica la transferencia del mismo número de electrones en el proceso oxidativo observado en que para la cumarina clorada **1**, el ácido cafeico **2** y el ácido protocatéquico **4** corresponde a la única señal de oxidación observada y en el caso del ácido gálico **3** es el proceso correspondiente a la primera señal del voltamograma. En la literatura se describen estudios en medio aprótico para compuestos fenólicos como por ejemplo derivados de la cumarina 7,8-dihidroxilada,^{100a,b} el ácido cafeico¹⁰¹ y la hidroquinona¹⁰⁵ que dan cuenta de una señal en el proceso oxidativo en medio aprótico que involucra 2 electrones, esto permite inferir que las señales observadas experimentalmente corresponden a un proceso di-electrónico.

Para los derivados **9**, **10** y **11** se observa que los valores para la pendiente I_{p_a} vs $v^{1/2}$ se encuentran entre $3,7 \cdot 10^{-6}$ y $4,2 \cdot 10^{-6}$ como se indica en la Tabla 5.1. Además, al comparar estos resultados con los obtenidos para el caso de los precursores, se deduce que estamos frente a un proceso oxidativo que involucra dos electrones. Se observa también que no hay cambios con respecto al mecanismo de reacción, si lo hubiese se esperaría encontrar diferencias del doble o superior en los valores encontrados para la pendiente de la recta ya que ésta contiene el factor b (pendiente de la ecuación de Tafel) antes mencionado.

Posteriormente se calculó el valor correspondiente al potencial de inicio del proceso electroquímico (E_{onset}).^{108,109} Este valor indica el potencial inicial con que el primer electrón es cedido en el proceso oxidativo que tiene lugar en la superficie del electrodo. Se determina como el valor de potencial de intersección entre las rectas tangentes a la línea base y la corriente de oxidación para cada velocidad de barrido aplicada en forma experimental (0,05 V/s a 3 V/s en este estudio) (Figura 5.8). Una vez obtenido este potencial se procede a graficar con respecto al logaritmo de la velocidad de barrido como se presenta en la Figura 5.9. Se considera el valor del intercepto de cada recta E_{onset}^i (por lo tanto a una baja velocidad de barrido) el cual incluye el error inherente a la medición y por tanto es más confiable (Tabla 5.1). Se observa que estos potenciales varían entre 0,50 V y 0,79 V para el ácido gálico **3** y el ácido protocatéquico **4** respectivamente, potencial que da indicio de la factibilidad de oxidación siendo el compuesto con un E_{onset}^i menor el que se oxida con mayor facilidad. Estos valores de potencial onset encontrados permitirán establecer una correlación entre el potencial de oxidación determinado de esta forma y los resultados obtenidos en los ensayos de actividad frente a especies radicales llevados a cabo en medio aprótico (sección 6).

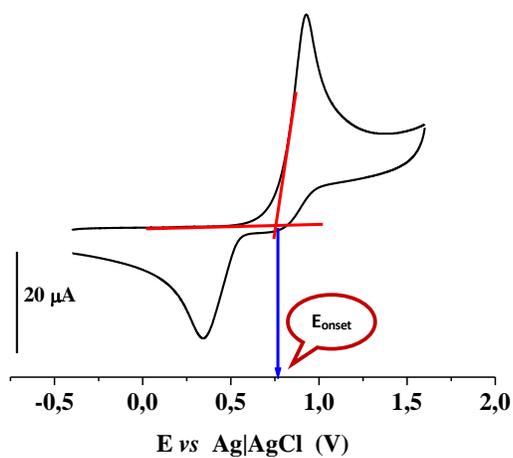


Figura 5.8. Determinación gráfica del valor de E_{onset} . VC del precursor **1**. 0,1 V/s, 2 mM en DMF + HFFTBTA 0,2 M.

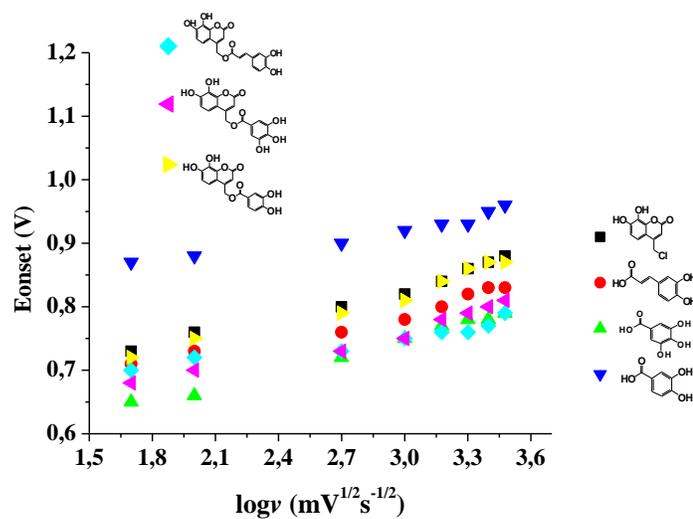
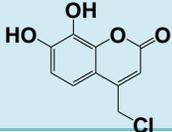
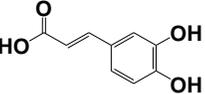
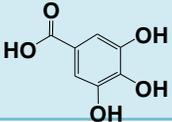
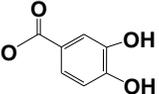
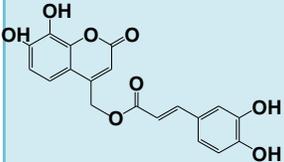
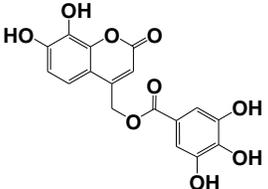
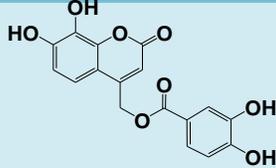


Figura 5.9. Relación E_{onset} vs $\log v$ para los compuestos estudiados.

Tabla 5.1. Parámetros experimentales para los compuestos. Determinaciones en VC. 2 mM, DMF + HFFTBA 0,2 M.

Compuesto	$\frac{d \log I_{pa1}}{d \log v}$ ($\mu A/mVs^{-1}$)	$\frac{d I_{pa1}}{dv^{1/2}}$ ($\mu A/mV^{1/2} s^{-1/2}$)	$\frac{dE_{pa1}}{d \log v}$ (mV/dec)	$b = 2 \frac{dE_{pa1}}{d \log v}$ (mV/dec)	E_{onset}^i (mV)
	0,56	$3,6 \cdot 10^{-6}$	61	122	0,59
	0,53	$4,1 \cdot 10^{-6}$	106	212	0,59
	0,48	$3,6 \cdot 10^{-6}$	55	110	0,50
	0,52	$4,1 \cdot 10^{-6}$	44	88	0,79
	0,47	$4,0 \cdot 10^{-6}$	85	170	0,64
	0,49	$3,7 \cdot 10^{-6}$	67	134	0,75
	0,44	$4,2 \cdot 10^{-6}$	70	140	0,58

Con el objeto de recabar mayor información con respecto al mecanismo de reacción involucrado en los procesos oxidativos en estudio, en base a los resultados obtenidos

en VC se realizó la gráfica ($I_{pa} / v^{1/2}$) vs $v^{1/2}$ para los compuestos precursores **1**, **2**, **3** y **4** (escogidos por poseer un grupo catecol y ser estructuras de menor complejidad que los derivados **9**, **10** y **11**). Estas gráficas, de las que se presenta el ejemplo del ácido como muestra (Figura 5.10) presentaron una relación de tipo lineal en la que la pendiente negativa obtenida sugiere que la reacción observada implica un mecanismo de tipo EC, considerando los estudios mencionados para compuestos fenólicos ampliamente descritos en la literatura^{100,101,105,109} y el criterio de diagnóstico mencionado por Pletcher y colaboradores.¹¹¹

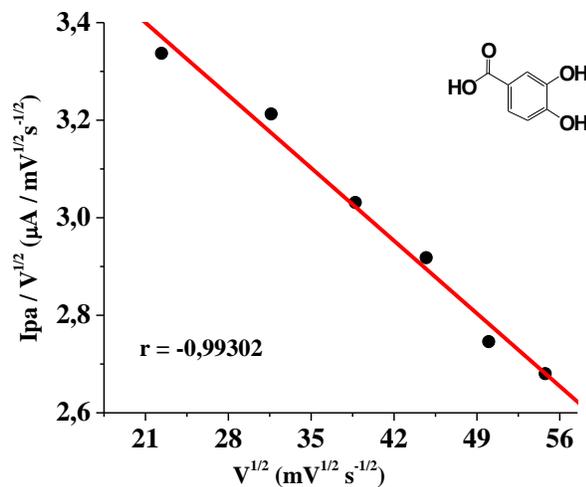


Figura 5.10. Correlación ($I_{pa} / v^{1/2}$) vs $v^{1/2}$ para el precursor ácido protocatéutico **4**. 2 mM en DMF + HFFTBA 0,2 M.

Diversos estudios proponen la presencia de mecanismos concertados para los procesos redox de compuestos de tipo fenólico, los cuales implican la presencia de intermediarios radicalarios y reacciones donde la transferencia de un protón y un electrón ocurren de forma acoplada dentro de un mismo paso. Este concepto nace en la década de 1990 a partir de los trabajos publicados por Biczók y colaboradores.^{112,113} El estudio de este tipo de reacciones principalmente en derivados fenólicos es de relevancia debido al rol que éstos desempeñan en diferentes sistemas biológicos tanto por su reconocida capacidad antioxidante como se evidencia en la investigación realizada por Nakayama y colaboradores con respecto a derivados polifenólicos y el mecanismo de reacción propuesto de tipo PCET (Proton Concerted Electron Transfer) frente al anión superóxido,¹¹⁴ o como en el caso de estudio de las reacciones de transferencia electrónica que involucran al aminoácido tirosina^{115a,b} y otros co-factores que forman parte esencial del proceso fotosintético que se lleva a cabo en estructuras vegetales (Fotosistema II).¹¹⁶

En la década pasada los aportes a la investigación sobre el tema se tornaron más profundos y sistemáticos, permitiendo el modelamiento teórico y análisis de este tipo de mecanismos. Debido al interés concerniente a la obtención de modelos racionales de sistemas biológicos, los estudios realizados en medio prótico son variados, como la serie de derivados fenol-imidazol sintetizados y caracterizados por Markle y colaboradores¹¹⁷ quienes, entre diversos factores, analizan el efecto del sustituyente sobre el enlace O-H. Otros autores como Savéant, Costentin y colaboradores han abordado este tópico en diferentes publicaciones, proponiendo distintos mecanismos

dependientes del pH y composición de la solución de trabajo (con buffer o sin él).¹¹⁸ En trabajos posteriores plantean un estudio teórico de modelamiento en sistemas de tipo amino-fenol enfocados en el mencionado Fotosistema II¹¹⁹ y frente al sistema enzimático superóxido dismutasa.¹²⁰ Rhile y colaboradores describen la síntesis, caracterización y estudios de oxidación tanto química como electroquímica (en medio aprótico acetonitrilo) de una serie de fenol-aminas junto con un análisis teórico del sistema evidenciándose la presencia de especies radicales intermediarias¹²¹ junto con valores entre 1,6 a 2,8 para la relación de efecto isotópico cinético ($KI = k_H/k_D$) que se estima como criterio para considerar un mecanismo concertado.¹²²

El estado del arte con respecto a los distintos mecanismos electro-oxidativos descritos para los derivados fenólicos indica que la determinación de una ruta en particular en este proceso se puede establecer mediante estudios de naturaleza tanto experimental como teórica. La obtención de parámetros termodinámicos como la energía libre de Gibbs, el estudio de efecto isotópico y la determinación de constantes de velocidad en electroquímica, entre otros, permiten discriminar entre las diferentes vías en que se puede llevar a cabo la electro-oxidación de fenoles.

5.3. Estudio de generación de especies radicalarias mediante espectroscopia de resonancia de espín electrónico (REE).

A fin de evidenciar la existencia de posibles intermediarios radicalarios en el proceso electro-oxidativo de los fenoles previamente estudiados a través de las técnicas electroquímicas, se procedió a oxidar los derivados **9**, **10** y **11** y medir *in situ* su espectro REE. Se utilizó la técnica descrita por Le Nest y colaboradores⁹⁹ en que se describe el estudio de estructuras flavonoides polifenólicas, en él se utiliza la quelación con Zn^{2+} lo que permitió la estabilización del radical formado y su posterior estudio. En primer lugar, desde un punto de vista cualitativo se observó para cada compuesto un evidente cambio de color en las soluciones electrolizadas las que se tornaron de color amarillo intenso y más oscuro que las soluciones de trabajo originales, lo que sugiere que tras la electrólisis se forma un compuesto nuevo diferente al de partida como se esperaba. En la Figura 5.11A-C se presentan los espectros obtenidos junto con las respectivas simulaciones realizadas.

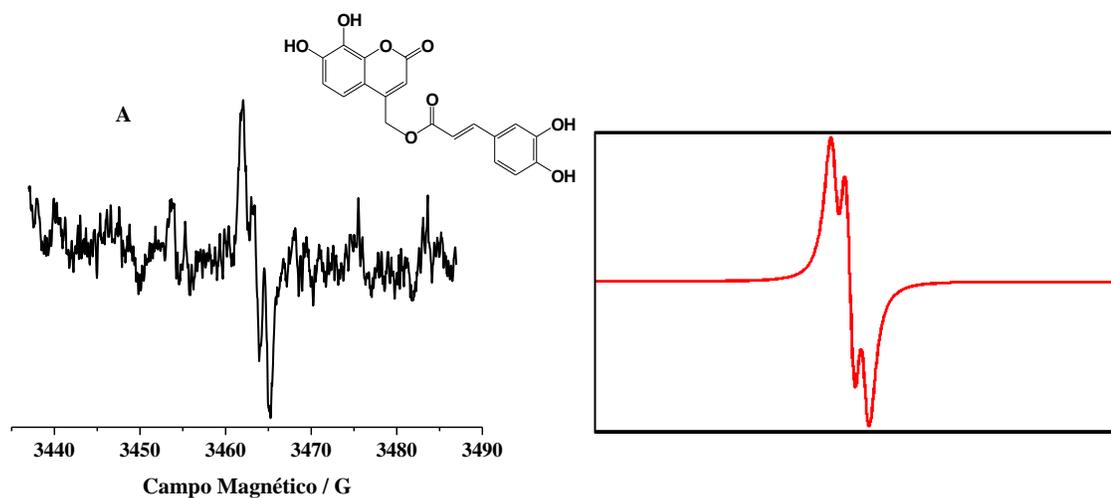


Figura 5.11.A. Espectro REE de la especie radicalaria generada en la electro-oxidación del derivado de ácido cafeico **9** estabilizado con Zn^{2+} , en DMF + HFFTBA (izq). Espectro simulado utilizando el programa EPR-WINSIM 2002 (der. en color rojo).

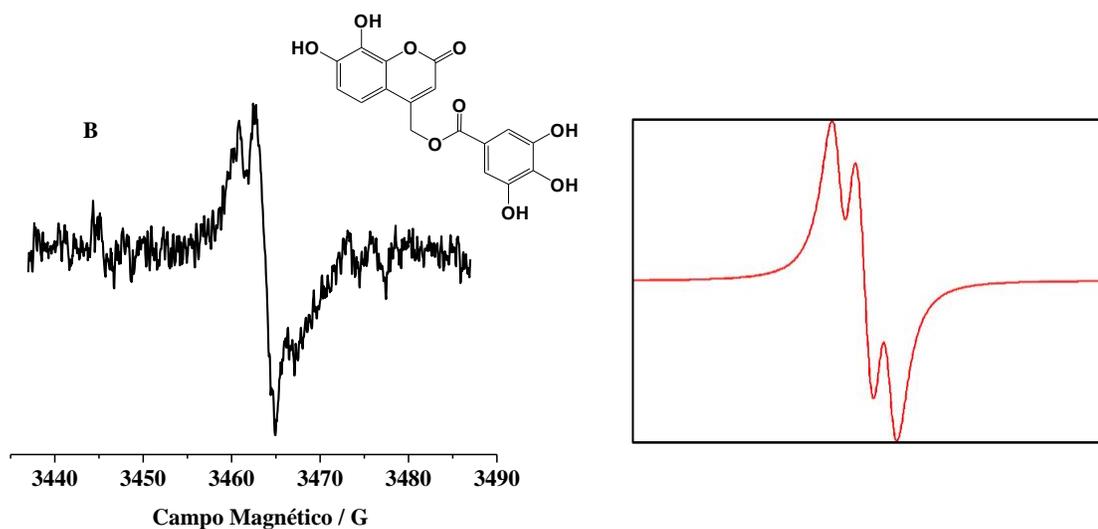


Figura 5.11.B. Espectro REE de la especie radicalaria generada en la electro-oxidación del derivado de ácido gálico **10**, estabilizado con Zn^{2+} , en DMF + HFFTBA (izq). Espectro simulado utilizando el programa EPR-WINSIM 2002 (der. en color rojo).

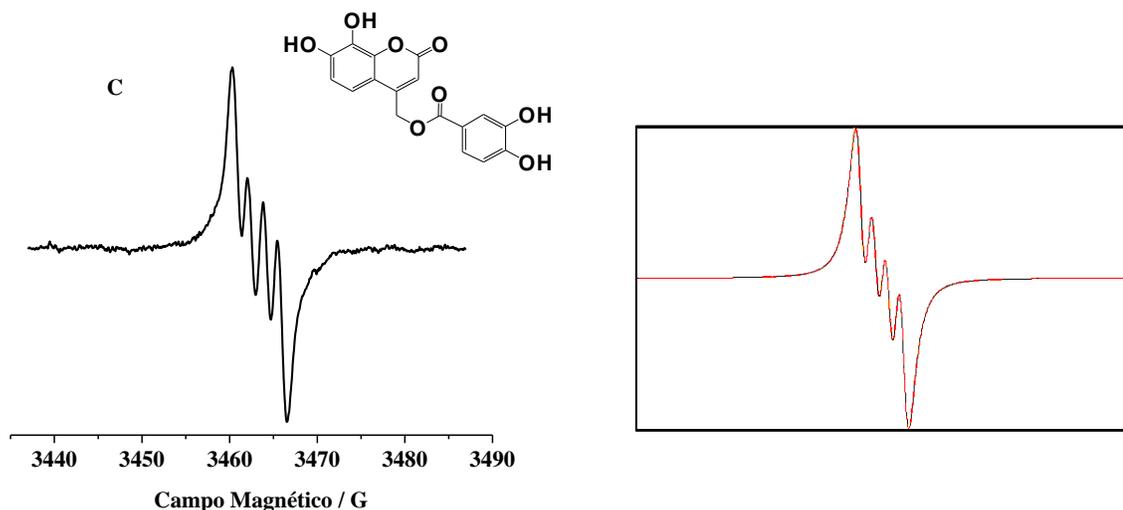


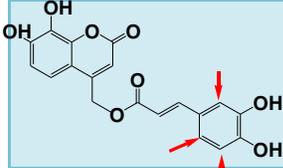
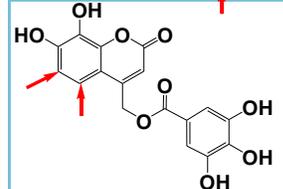
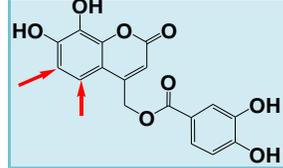
Figura 5.11.C. Espectro REE de la especie radicalaria generada en la electro-oxidación del derivado de ácido protocatéutico **11**, estabilizado con Zn^{2+} , en DMF + HFFTBA (izq). Espectro simulado utilizando el programa EPR-WINSIM 2002 (der. en color rojo).

Concordante con el resultado esperado, la señal espectral indica la presencia de una especie radicalaria como intermediario de la electro-oxidación de los grupos catecol presentes en los tres derivados en estudio.

En la simulación realizada para el derivado **9**, se observa el acoplamiento hiperfino de tres átomos de hidrógeno con los siguientes valores de constantes: 1,32 G, 0,98 G y 0,3 G que sería indicio del proceso oxidativo que ocurre en el catecol del anillo bencénico (Tabla 5.2) ya que estos valores coinciden con una interacción entre los tres protones del anillo bencénico en posición 2, 5 y 6. En el caso de los compuestos **10** y **11**, se encontraron dos constantes de acoplamiento hiperfino, lo que indica la

interacción entre dos protones que serían aquellos en posición 5 y 6 del anillo cumarínico.

Tabla 5.2. Constantes de acoplamiento hiperfino para los derivados polifenólicos. Valores en Gauss.

Compuesto	a_{H1} / G	a_{H2} / G	a_{H3} / G
	1,32	0,98	0,30
	2,15	1,56	-
	2,35	1,22	-

Estos resultados concuerdan además con lo descrito en la literatura con respecto a la oxidación de grupos fenólicos, lo que permite inferir un posible mecanismo electro-oxidativo para los derivados en estudio.

5.4. Resultados y discusión de los estudios de reactividad frente a especies radicalarias.

En este punto de la investigación, el objeto de estudio fue evaluar el comportamiento de las nuevas estructuras previamente sintetizadas frente a diferentes especies radicalarias de amplio interés biológico: radical peroxilo ($\text{ROO}\bullet$), radical hidroxilo ($\text{OH}\bullet$), anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), junto con determinar la capacidad reductora de los compuestos. Cada ensayo fue escogido con miras de abordar el tema de la capacidad antioxidante desde las posibilidades que permiten las experiencias de tipo *in vitro*.

5.4.1. Metodología de capacidad antioxidante frente a radicales de oxígeno (oxygen radical antioxidant capacity-fluorescein ORAC-FL).

El estudio de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno asociadas a los procesos oxidativos requiere en algunos casos del uso de compuestos denominados “sondas”. En la técnica de fluorescencia es posible implementar este tipo de metodología debido a sus características de sensibilidad, especificidad y simplicidad en la obtención de datos, convirtiéndose en una herramienta útil y ampliamente utilizada a la hora de obtener una buena aproximación en la determinación de actividad frente a especies EROs/ERNs.¹²³

En el caso de la metodología de capacidad antioxidante frente a radicales de oxígeno (ORAC) los primeros trabajos que dan cuenta de su uso fueron descritos en la década de 1990 a partir de la investigación de Cao y colaboradores.¹²⁴ En este trabajo los autores describen la técnica como un método simple y confiable para determinar capacidad antioxidante en serum humano en pequeñas cantidades de muestra (del orden de los μL), utilizando como sonda la β -ficoeritrina (proteína aislada del alga roja unicelular *Porphyridium cruentum*) debido a su fluorescencia sensible a los cambios conformacionales en su estructura en ensayos frente al radical peroxilo.¹²⁵ En el desarrollo posterior Ou y colaboradores¹²⁶ proponen una mejora a la técnica cambiando la sonda proteica por el compuesto fluoresceína debido a su mayor fotoestabilidad y para evitar interacciones proteína-polifenol (hidrofóbicas y puentes de hidrógeno), junto con ello realizaron la validación del método. Esta sonda es la utilizada actualmente para este ensayo, el cual es ampliamente utilizado en el estudio de polifenoles y sus derivados,^{127-128a,b} en diferentes alimentos y bebidas,^{129,130} muestras biológicas de distinta índole¹³¹ por mencionar algunos ejemplos.

Para efectos de esta investigación se espera obtener un perfil de comportamiento de cada uno de los compuestos frente al radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) que permita distinguir el aporte que significa cada sustitución realizada al anillo cumarina con diferentes grupos fenólicos. Cabe mencionar que las longitudes de onda máximas ($\lambda_{\text{máx}}$) de absorbancia en el rango UV-visible para los compuestos ensayados estuvieron en un rango entre los 203 nm y 329 nm. En este estudio se obtuvieron los perfiles cinéticos

de consumo de la sonda fluoresceína (con valores de 485/525 nm para su absorción y emisión respectivamente) por inducción de los radicales peroxilo (originados por efecto de la termólisis del azo-compuesto ABAP a 37 °C). A partir de estos perfiles de decaimiento de la sonda a distintas concentraciones de compuestos antioxidantes (5 en total) se obtuvieron curvas adecuadamente separadas como se muestra en la Figura 5.12 donde se muestran los resultados para el compuesto **11** como ejemplo representativo del ensayo. Posteriormente se determina para cada concentración el área neta bajo la curva la que es graficada con respecto a las concentraciones utilizadas. La Figura 5.13 presenta relación lineal entre el área neta bajo la curva con respecto a la concentración del compuesto **11** como ejemplo, la que fue determinada para cada derivado.

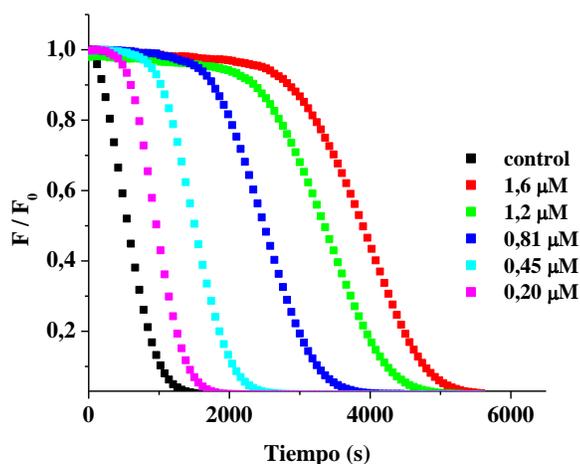


Figura 5.12. Curvas para el consumo de la sonda fluoresceína para un set de concentraciones del compuesto **11**.

Las curvas obtenidas en esta parte del experimento muestran la reacción de competencia entre el radical y el antioxidante (el cual protege a la fluoresceína del proceso de oxidación). Posterior al procedimiento anteriormente descrito, se obtuvo el índice ORAC para cada compuesto que se resume en la Tabla 5.4.

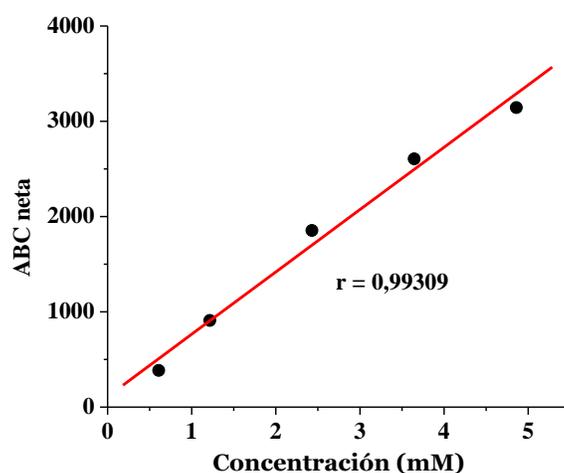


Figura 5.13. Gráfica de área neta bajo la curva ABC vs concentración del derivado **11**.

En este ensayo los compuestos híbridos propuestos superaron en cuanto al valor de índice ORAC a la cumarina precursora **1**. En los tres casos se pudo observar valores superiores de casi el doble para el compuesto **10** y bordeando un ORAC casi tres veces mayor en los compuestos **9** y **11** del valor obtenido para su precursor. Estos resultados evidenciaron un incremento en la capacidad antioxidante al que posee la cumarina de manera independiente debido a la inclusión de los derivados de ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámico en su estructura (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Valores experimentales de índice ORAC-FL para los compuestos estudiados.

Compuesto	índice ORAC-FL (\pm SD)
1	0,91 \pm 0,10
2	3,47 \pm 0,10
3	3,91 \pm 0,09
4	0,69 \pm 0,01
9	2,39 \pm 0,03
10	1,74 \pm 0,05
11	2,62 \pm 0,04
Trolox	1

Por otra parte, los valores del índice ORAC de la serie fueron superiores al estándar Trolox con excepción de los compuestos **1** (cumarina de partida) y **4** (ácido protocatéutico). Para el caso de la cumarina ésta tuvo un valor ORAC menor a 1. En el caso del compuesto **4** la ostensible diferencia (5 veces menor) con su homólogo ácido cafeico **2** deriva de la presencia del doble enlace en esta estructura, aunque ambos ácidos poseen igual cantidad de grupos $-OH$ y en igual posición en el anillo aromático, la insaturación le confiere más posibilidades de deslocalización electrónica debido a la mayor cantidad de estructuras resonantes posibles, y por lo tanto mayor

estabilidad al formarse la especie radicalaria correspondiente en la reacción frente el ABAP. Al observar el valor obtenido para el ácido gálico **3** se obtuvo un índice ORAC cercano al del ácido cafeico, y aunque carece de la insaturación presente en el derivado cinámico posee en su defecto un grupo –OH adicional en posición 5 del anillo aromático el cual aportó adicionalmente a su capacidad antioxidante (lo que no ocurrió en el caso del ácido protocatéquico **4**).

Se observa que el ácido dihidroxibenzoico **4** que arrojara un valor 0,69 presenta un incremento de 3,7 veces en su valor ORAC-FL al estar incorporado en el heterociclo cumarínico. En este caso se presentó un fenómeno de sinergia positiva, ya que ambos compuestos: cumarina **1** y ácido protocatéquico **4** aumentaron su valor de ORAC-FL pasando de un valor 0,91 y 0,69 de forma individual respectivamente a formar un derivado que presentó un valor de ORAC-FL igual a 2,62. Al observar los valores totales en los derivados **9** y **10** obtenidos no correspondieron a la sumatoria de los índices individuales de sus precursores, este resultado indica que estuvo ausente el fenómeno de sinergia.

Para los nuevos compuestos (**9**, **10** y **11**) se observó un incremento del valor de ORAC-FL con respecto a la cumarina precursora **1**. Por lo tanto la inclusión de las estructuras fenólicas en el heterociclo cumarínico generó la obtención de nuevos derivados con una mayor capacidad antioxidante en esta metodología, de esta forma se obtuvo un aporte a la reactividad de la cumarina **1**.

Los resultados obtenidos en este ensayo dan cuenta de la actividad que presentaron los compuestos tanto precursores como derivados frente a la especie radical ROO•. Un punto importante a considerar es que este experimento –independientemente de ser un ensayo *in vitro*- se lleva a cabo en un medio buffer a pH 7,4 y a una temperatura controlada de 37 °C, lo que permite obtener una primera aproximación con respecto a lo que será la actividad de los compuestos en un medio biológico. La sustitución en el anillo cumarínico generó nuevos compuestos que superaron su capacidad antioxidante, sin embargo desde el punto de vista de los precursores ácidos (cafeico y gálico) su actividad se vio mermada tras la sustitución, fenómeno que se discute en la sección 6. La secuencia de actividad obtenida para los derivados y sus precursores fue **3 > 2 > 11 > 9 > 10 > 1 > 4**.

Junto con el ensayo anteriormente detallado, se procedió a determinar la cantidad de radicales que reaccionan con el compuesto antioxidante relacionando la concentración de antioxidante aplicado, la estequiometría de la reacción y la velocidad de generación de radicales peroxilo a 37 °C como se expresa en la siguiente ecuación (Burton y colaboradores 1981)¹³²:

$$\tau = \frac{n [ArOH]}{R_i} \quad \text{Ecuación 5.4}$$

donde τ es el tiempo de inducción (tiempo en el que la sonda es protegida de los radicales peroxilo por el antioxidante), n es el valor asociado a la estequiometría de la reacción correspondiente a la cantidad de moléculas de radical ROO• inactivadas por molécula de compuesto antioxidante, $[ArOH]$ es la concentración de antioxidante y R_i es la velocidad de generación de radical peroxilo, la cual está directamente relacionada con la concentración de ABAP utilizada en el ensayo (18 mM) y se determina según la expresión¹³³:

$$R_i = 1,36 \cdot 10^{-6} [ABAP] \quad \text{Ecuación 5.5}$$

Dadas las condiciones experimentales empleadas, el valor de R_i es 1,47 $\mu\text{M}/\text{min}$. Los resultados obtenidos del valor de la pendiente (regresión lineal Ecuación 5.4) se resumen en la Tabla 5.4.

Todos los compuestos (precursores y derivados) presentan valores de n superiores a los esperados, donde en el caso extremo se tiene que una molécula de ácido gálico estaría consumiendo 14 moléculas de radical peroxilo, resultado que es mucho mayor al esperado. Los aparentes altos valores de n como estequiometría de la reacción ($n = 3$ hasta $n = 14$) sugieren la presencia de reacciones asociadas de mayor complejidad en las que estaría presente el radical alcoxilo (RO•),¹³⁴ el cual se forma por descomposición del radical peroxilo que posee una vida media del orden de los segundos en comparación con el radical alcoxilo con una vida media del orden de los 10^{-6} s (y es más reactivo) lo que explica esta diferencia en la estequiometría.

Tabla 5.4. Valores calculados para el factor estequiométrico n .

Compuesto	$n^a(\pm SD)$	n
1	$2,8 \pm 0,3$	3
2	$3,9 \pm 0,1$	4
3	$14,1 \pm 1,4$	14
4	$2,4 \pm 0,1$	3
9	$5,8 \pm 0,4$	6
10	$4,9 \pm 0,1$	5
11	$8,6 \pm 0,1$	9

^a Valores calculados en triplicado.

Este fenómeno se ha encontrado en investigaciones previas realizadas en derivados cumarínicos¹³⁵ y fue descrito por Lissi y colaboradores, el que se puede encontrar además en experimentos en los que se utiliza la sonda rojo de pirogalol (ORAC-PGR).^{136,137}

5.4.2. Metodología de capacidad reductora de hierro en plasma (FRAP).

Esta metodología desarrollada por Benzie y Strain (1996)¹³⁸ se propuso como una medida de la capacidad reductora (asociada a una buena capacidad antioxidante), enfocada a investigar procesos de estrés oxidativo en fluidos biológicos. Posteriormente se ha extendido al estudio de diversas matrices como extractos de plantas medicinales,¹³⁹ alimentos,¹⁴⁰ compuestos puros¹⁴¹ por mencionar algunos ejemplos.

En este ensayo se obtuvieron los valores de la capacidad reductora de los compuestos polifenólicos, la que se aprecia cualitativamente a través de la formación del complejo de Fe^{2+} de color azul (Figura 5.14). Esta metodología involucra la reacción redox entre el agente reductor (en este caso los derivados cumarínicos) y el oxidante (la sal férrica) es considerada como aproximación con respecto a la capacidad de mantener el estatus redox dentro de la célula.

En primer lugar se observó un comportamiento semejante al ensayo ORAC-FL en cuanto a la tendencia que presentaron los compuestos en su capacidad reductora de hierro, lo que indica una baja probabilidad de que en este ensayo ocurriese el fenómeno de quelación propio de los catecoles. La Tabla 5.5 presenta los datos experimentales obtenidos.

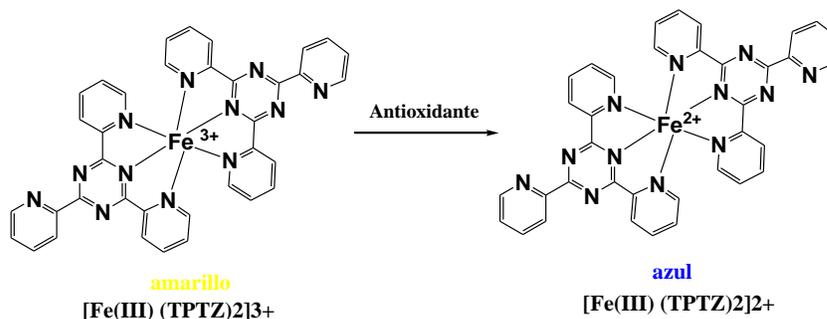


Figura 5.14. Esquema para la reacción entre el complejo de Fe^{3+} y el compuesto antioxidante reductor.

Los compuestos **9**, **10** y **11** presentaron una mejor capacidad reductora frente a su precursor cumarínico **1**. Esto se explica debido a la presencia de un mayor número de grupos $-\text{OH}$ presentes en las nuevas estructuras propuestas capaces de transferir electrones y reducir la sal férrica como se menciona en el trabajo de Pulido y colaboradores¹⁴² quienes estudian una serie de polifenoles mediante esta técnica, señalando que además del número de hidroxilos presentes la presencia de dobles enlaces conjugados en el esqueleto como parte de las características estructurales responsables de un aumento en la capacidad reductora en polifenoles.

Tabla 5.5. Valores experimentales obtenidos para los compuestos en estudio, ensayo FRAP en equivalentes de Trolox/10 μM de muestra.

Compuesto	equiv. Trolox /10 μM muestra ($\pm\text{SD}$)
1	130,2 \pm 19,7
2	272,7 \pm 32,1
3	476,8 \pm 21,5
4	86,8 \pm 9,3
9	205,2 \pm 18,6
10	318,2 \pm 68,1
11	262,4 \pm 33,5

En el derivado **11** se presenta una interacción de tipo sinérgica con respecto a los resultados individuales de cada precursor; habiéndose obtenido un valor FRAP de 130,2 y 86,8 equiv. Trolox /10 μM de muestra para **1** y **4** respectivamente, y para el derivado final un valor de 262,4 equiv. Trolox /10 μM de muestra.

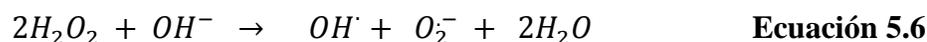
Del mismo modo que en el ensayo anterior, se observa que la sustitución en el anillo cumarínico con los distintos grupos ácidos incrementa su potencial como especie reductora, mientras que en el caso del ácido cafeico y gálico se aprecia una disminución de 1,3 y 1,5 veces respectivamente en su capacidad reductora tras la esterificación.

Los resultados obtenidos para esta técnica entregan información acerca de la capacidad reductora relativa para el conjunto de compuestos ensayados, capacidad que está relacionada con su actividad antioxidante. Se obtuvo un orden relativo para precursores y derivados como sigue: **3 > 10 > 2 > 11 > 9 > 1 > 4**. Con respecto a la disminución de actividad para los ácidos mencionados sugiere que esta capacidad además del número de -OH presentes estaría relacionada con el sustituyente -COOH que se transforma en un grupo éster (ver sección 6).

5.4.3. Capacidad de inactivación del radical OH·, técnica Spin Trapping.

Esta técnica no destructiva permite la detección e identificación de especies paramagnéticas (con electrones desapareados) en distintas matrices. El fenómeno de resonancia de espín electrónico fue descubierto y descrito en la década de 1940 por Zavoisky¹⁴³ en sus estudios basados en sales de manganeso en distintos medios. Su uso y aplicaciones se han diversificado a numerosas áreas como en la determinación de capacidad antioxidante en alimentos,¹⁴⁴ en el análisis del proceso oxidativo en lípidos,¹⁴⁵ en el estudio de enfermedades parasitarias.¹⁴⁶ El creciente interés de la técnica en ciencias biomédicas radica en el hecho de que esta espectroscopia permite discriminar diferentes especies radicales de interés biológico estrechamente relacionadas con el estatus redox de la célula¹⁴⁷ cuyo desbalance se traduce en cuadros de estrés oxidativo.¹⁴⁸

En este estudio se determinó la capacidad de los compuestos propuestos para inactivar la especie radicalaria OH^\cdot mediante la técnica *spin trapping*, metodología basada en establecer la competencia de reacción entre los antioxidantes propuestos y el spin trap DMPO. El radical se generó a través de la reacción de “Fenton no catalítico” (Ecuación 5.6), metodología que permite la generación del radical OH^\cdot en medio básico en ausencia del ión Fe como catalizador.^{91a,b}



En un primer set de experimentos se procedió a realizar la experiencia utilizando DMSO como solvente. Se descartó esta opción debido a que resultó complejo observar un patrón claro en el blanco y poder así discriminar las nuevas señales espectrales a partir de la adición de los compuestos en estudio.

En primer lugar se determinó el blanco experimental que indica la reacción de inactivación del radical mediante el compuesto spin trap DMPO. Posteriormente se ensayaron los derivados híbridos y sus precursores sintéticos en dos concentraciones: 0,33 mM y 3,3 mM. En el caso de los experimentos realizados a la menor concentración se apreció que la disminución de la señal del blanco fue mínima para los siete compuestos y no se observó un cambio significativo en el espectro como para obtener resultados concluyentes. Considerando lo anterior, los experimentos se

realizaron con concentración del orden de los 3 mM, obteniéndose así datos satisfactorios en cuanto a la inactivación del radical y la posibilidad de realizar cálculos sobre este valor. El valor de inactivación del radical hidroxilo se calcula a través de la disminución en la intensidad de las señales al adicionar cada derivado. En cada espectro se aprecia el perfil hiperfino compuesto por cuatro líneas características correspondientes al átomo de nitrógeno e hidrógeno del spin-aducto formado por [DMPO-OH] con valores de a_N y a_H alrededor de 15G, lo que concuerda con lo descrito en la literatura¹⁴⁹ para esta reacción y el espectro simulado que se presenta en la Figura 5.15. El cambio experimental tras la adición de los compuestos se presenta en color rojo (Figura 5.16 A-G).

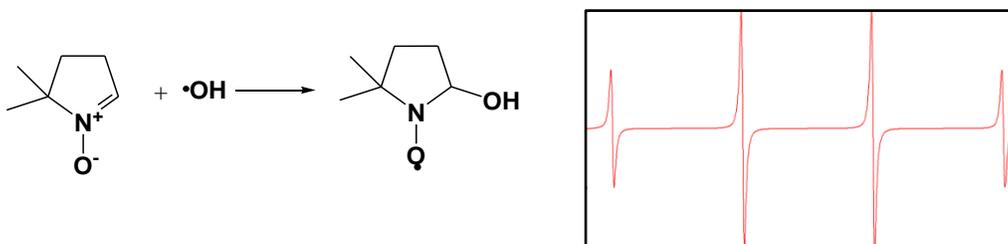


Figura 5.15. Espin aducto generado por la inactivación del radical $\text{OH}\cdot$ y su espectro simulado (derecha).

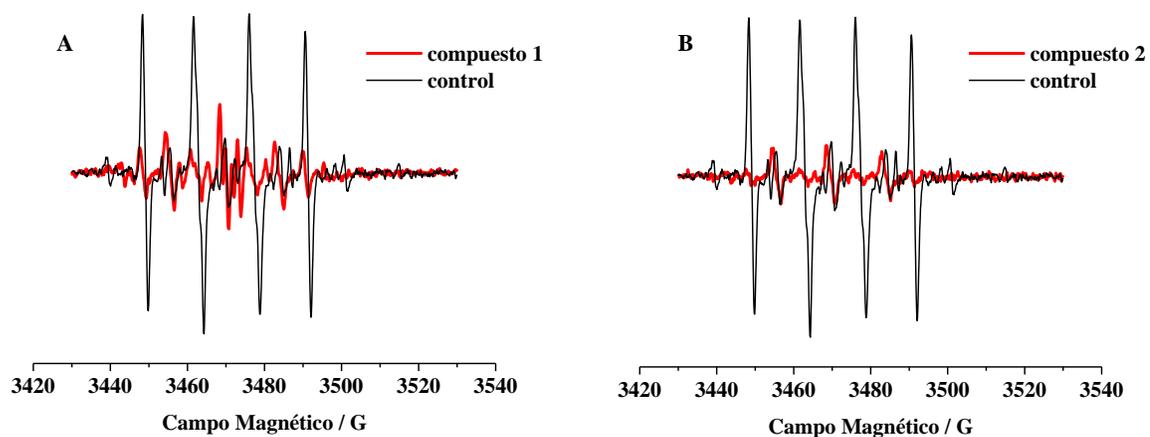


Figura 5.16 A. Espectro REE de inactivación del radical hidroxilo con adición del compuesto 4-clorometil-7,8-dihidroxicumarina **1**. **B.** Espectro REE de inactivación del radical hidroxilo con adición del compuesto ácido cafeico **2**.

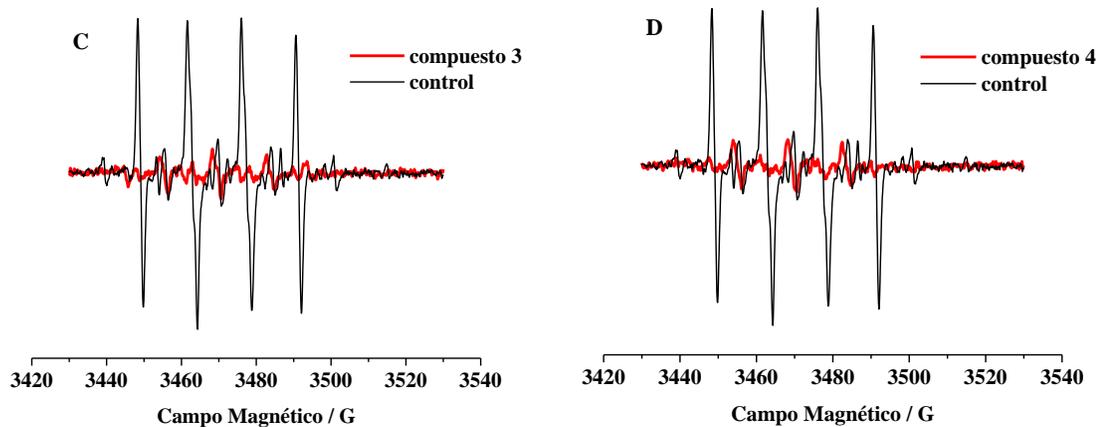


Figura 5.16 C. Espectro REE de inactivación del radical hidroxilo con adición del compuesto ácido gálico **3**. **D.** Espectro REE de inactivación del radical hidroxilo con adición del compuesto ácido 3,4-dihidroxi benzoico **4**.

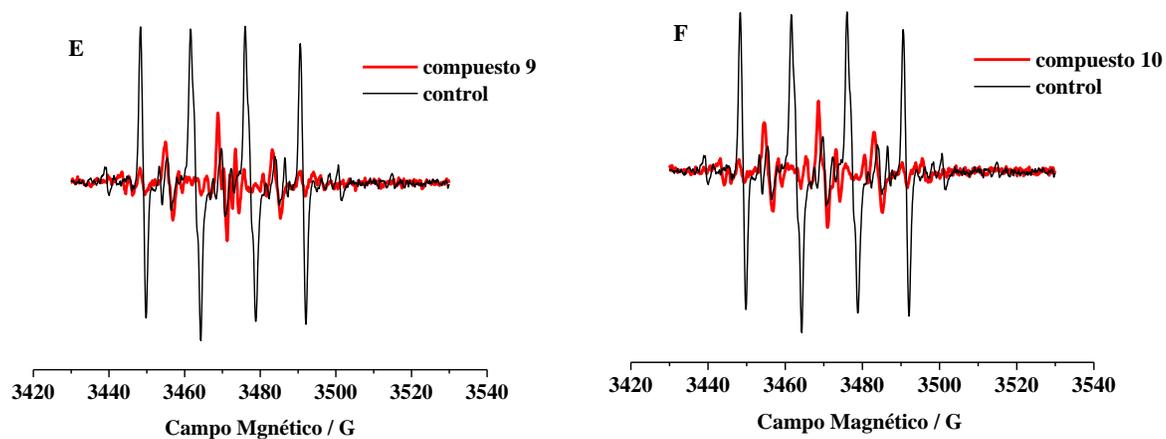


Figura 5.16. E. Espectro REE de inactivación del radical hidroxilo con adición del compuesto híbrido **9**. **F.** Espectro REE de inactivación del radical hidroxilo con adición del compuesto híbrido **10**.

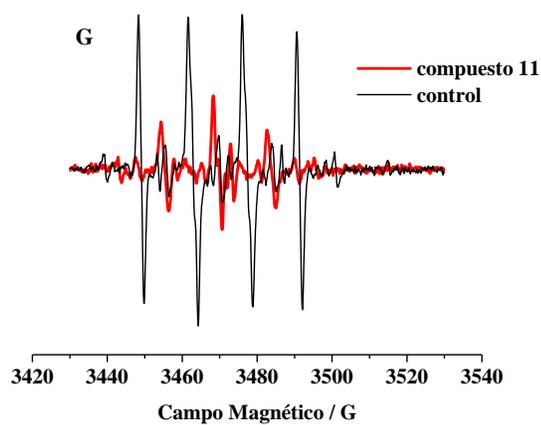


Figura 5.16. G. Espectro REE de inactivación del radical hidroxilo con adición del compuesto híbrido **11**.

Considerando los patrones espectrales obtenidos, para los compuestos **9**, **10** y **11** se observó que la señal de cuadruplete correspondiente al control (spin-aducto [DMPO-OH]) desapareció casi por completo lo cual indica la inactivación del radical hidroxilo. Se observa además un triplete con constantes de acoplamiento 13,98 G y 14,27 G que evidenció la reacción de oxidación del atrapador DMPO (Figura 5.17), ya que de haberse formado el aducto entre la cumarina y el spin trap DMPO, se habría obtenido el correspondiente espectro con un patrón de 6 líneas espectrales (Figura 5.18).

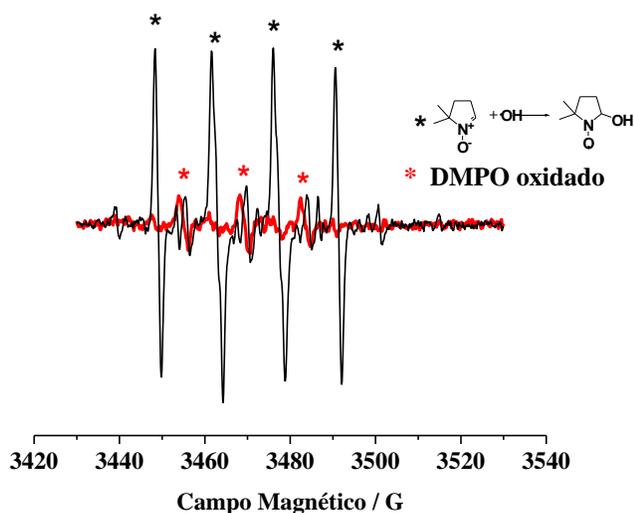


Figura 5.17. Espectro REE, se destaca en rojo el triplete de integración 1:2:1 formado después de la reacción de Fenton no-catalítico (izq). Espectro simulado utilizando el programa EPR-WINSIM. (der).

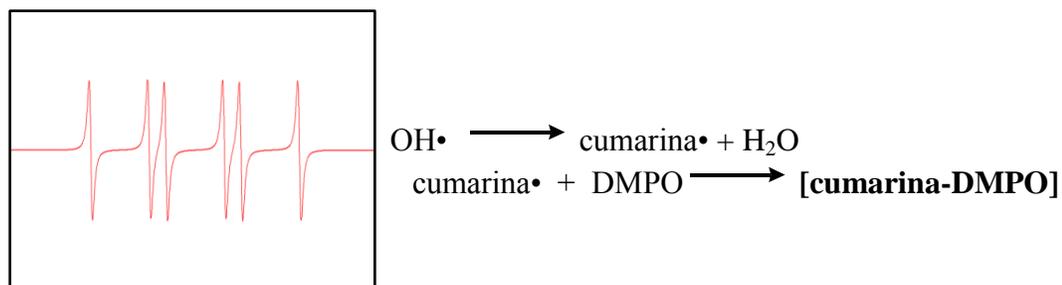


Figura 5.18. Espectro simulado para la formación del spin aducto [cumarina-DMPO], utilizando el programa EPR-WINSIM.

Como se presenta en la Tabla 5.6, tanto los ácidos orgánicos como la cumarina precursora y sus derivados presentaron reactividad muy semejante. En las condiciones de estudio para todos los compuestos se obtuvo un valor sobre el 90%, indicando su poder de inactivación del radical, resultado que superó al descrito en la literatura para el estándar Trolox.

Estudios previos realizados en estructuras cumarínicas simples, semejantes al precursor **1** de esta investigación permiten comparar algunos resultados. Pérez-Cruz y colaboradores¹⁵⁰ indican un 29% de inactivación para el derivado monohidroxilado de la cumarina **1**, diferencia que puede explicarse por la ausencia del –OH en posición 8 que aumenta su actividad. El compuesto con grupos –OH en posición 6 y 7 presentó un apagamiento del 51%. Figueroa y colaboradores presentan también un estudio en que las cumarinas monohidroxiladas presentan valores de 23% y 56% de la inactivación del radical OH•, corroborando lo encontrado anteriormente.¹⁵¹

Tabla 5.6. Porcentajes de inactivación del radical hidroxilo (OH•)

Compuesto	% de inactivación •OH (±SD)
1	92,3 ± 7,4
2	98,3 ± 2,7
3	99,5 ± 0,8
4	92,7 ± 2,9
9	98,1 ± 1,8
10	98,2 ± 2,5
11	98,0 ± 9,9
Trolox	31± 2,5 ^a

^aRef.149. Figueroa R. *et al. Future Med. Chem.* 2013.

Los resultados obtenidos con esta técnica indican la reactividad relativa que tienen los compuestos propuestos frente al radical OH•. Al considerar que el tiempo de vida del radical hidroxilo y del spin trap DMPO es del orden de 10⁻⁹s se observa que todos los compuestos ensayados tuvieron la capacidad de competir con el DMPO en el proceso de inactivación del radical evidenciado por la señal de control que disminuyó casi en su totalidad para todos los casos siendo menor en la cumarina precursora **1** y el ácido **4**, siguiendo ambos compuestos la misma tendencia que se observara en los ensayos

anteriores. Independientemente que el radical ensayado en este experimento es de una alta reactividad y escasa selectividad, el hecho de que se obtuvieran altos valores de actividad para los compuestos propuestos indica que éstos se presentan como buenos candidatos como inactivadores de la especie OH•.

Finalmente, se observa que los derivados **9**, **10** y **11** presentaron un valor de reactividad superior al de la cumarina precursora obteniéndose de esta forma un aporte a la reactividad en cada nueva estructura propuesta frente al heterociclo de partida **1** para este ensayo. En cuanto a la reactividad relativa de la serie, no se encontró una diferencia significativa entre los compuestos ensayados, precursores y derivados mostraron valores cercanos en cuanto al % de inactivación del radical, alrededor del 90%.

5.4.4. Estudio de reactividad frente al anión radical superóxido $O_2^{\cdot-}$

Dentro de las diversas aplicaciones desarrolladas para las técnicas electroquímicas se encuentran los ensayos de determinación de la capacidad antioxidante en distintos medios¹⁵² y en muestras como bebidas,¹⁵³ vegetales,¹⁵⁴ mediciones *in situ* sobre piel humana¹⁵⁵ por mencionar algunos ejemplos. Un reciente review (Pisoschi y colaboradores, 2015) describe las contribuciones realizadas con respecto a la determinación de actividad antioxidante empleando exitosamente la voltametría cíclica, voltametría de pulso diferencial, voltametría de onda cuadrada, amperometría y potenciometría,¹⁵⁶ las que además se complementan con otras técnicas en este tipo de estudios.^{157,158}

En esta parte de la investigación se determinó la reactividad de los compuestos frente al anión radical superóxido, cuya generación electroquímica en la superficie del electrodo por reducción de oxígeno disuelto mediante la técnica de voltametría cíclica ha sido ampliamente estudiada en nuestro grupo de trabajo^{159,160,110} y por otros autores.¹⁶¹

Como se esperaba, tras la adición sucesiva de alícuotas de todos los compuestos estudiados hubo un decaimiento en la corriente de pico anódica ($I_{p_a}^0$) (ejemplo del resultado para el precursor **1** en la Figura 5.19). Esto permitió calcular el valor del índice antioxidante 50 (IA_{50}), el cual se define como la concentración de sustrato necesaria para obtener una disminución del 50% en la corriente $I_{p_a}^0$. Esta corriente es

directamente proporcional a la concentración de anión superóxido presente, por lo que su disminución es un indicador de la capacidad del sustrato para inactivar la especie radical generada *in situ*.

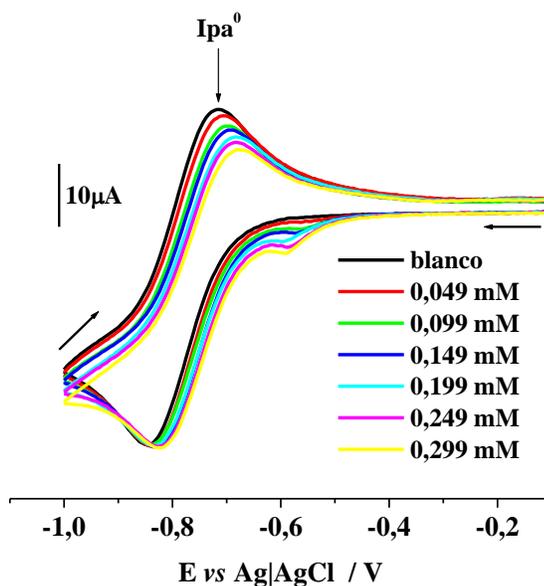


Figura 5.19. Voltamogramas cíclicos del par redox correspondiente al anión superóxido tras añadir alícuotas del compuesto **1**. DMF + HFFTBA 0,2 M. 0,1 V/s.

Tras obtener los voltamogramas cíclicos para cada compuesto, se procedió a determinar el parámetro adimensional ($I_{pa}^0 - I_{pa}^S / I_{pa}^0$) y se graficó con respecto a la concentración de sustrato en solución (Figura 5.20) obteniéndose relaciones de tipo lineal, en que los valores del coeficiente de correlación r estuvieron entre 0,99777 y 0,97267.

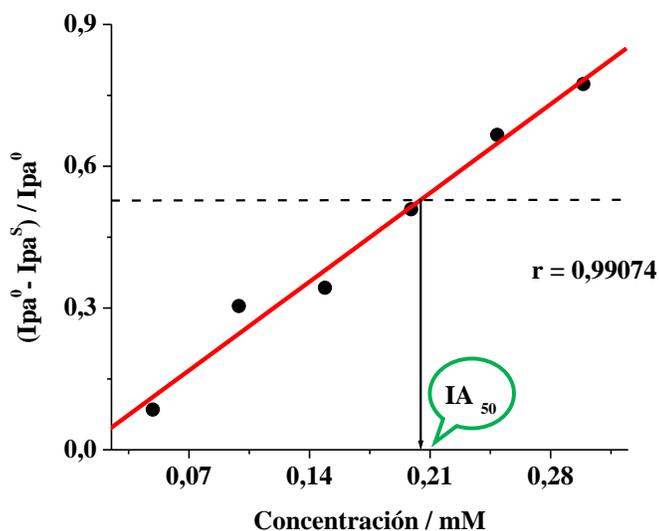


Figura 5.20. Gráfica del parámetro adimensional $(I_{p_a}^0 - I_{p_a}^S) / I_{p_a}^0$ vs concentración de sustrato para el compuesto **1**. (Destacado en verde el valor de IA_{50}).

Junto con el valor de concentración IA_{50} la pendiente de las rectas entrega también información con respecto a la reactividad de los compuestos frente al anión superóxido, donde un mayor valor de la pendiente indica que el compuesto posee una mayor actividad, no obstante los autores que desarrollaron el método hacen notar que se utiliza preferentemente el índice IA_{50} como valor para caracterizar de manera adecuada la actividad de los compuestos propuestos frente el radical de forma análoga al concepto de IC_{50} (concentración inhibitoria aplicada en sistemas biológicos en relación a la cantidad de compuesto necesario para inhibir en un 50% el crecimiento de una población de microorganismos).

Como se observa en los resultados (Tabla 5.7) la cumarina de partida **1** presenta un valor mayor de IA_{50} (0,187 mM) en comparación con los compuestos híbridos **9**, **10** y

11 por lo que la adición de los fenoles a la estructura cumarínica fue un aporte a su reactividad frente a la especie radical $O_2^{\cdot-}$.

Tabla 5.7. Valores de IA_{50} obtenidos para los compuestos estudiados.

Compuesto	IA_{50} / mM ($\pm SD$)
1	0,183 \pm 0,007
2	0,125 \pm 0,006
3	0,104 \pm 0,004
4	0,115 \pm 0,005
9	0,141 \pm 0,011
10	0,064 \pm 0,004
11	0,137 \pm 0,002
Trolox^a	1,97

^a Valor de estándar Trolox ref. 92.

El derivado de ácido gálico **10** presentó el menor valor de índice antioxidante y por consiguiente fue el mejor inactivador del anión superóxido formado en la superficie del electrodo puesto que se necesita una menor concentración de este derivado (0,064 mM) para apagar el 50% radical. Junto con esto fue el compuesto que presentó el fenómeno de sinergia dentro de la serie, con un valor de concentración menor

requerida para inactivar el radical con respecto a cada uno de sus precursores (**1** y **3**). El segundo mejor inactivador de $O_2^{\cdot-}$ fue el compuesto **11**, con un valor de IA_{50} de 0,137 mM y finalmente se tiene al derivado **9** con 0,141 mM. Este comportamiento puede deberse a fenómenos de difusión de las moléculas en el medio junto con su reactividad en la superficie del electrodo.

En este ensayo frente al radical $O_2^{\cdot-}$ al igual que el anterior (inactivación de la especie $OH\cdot$) se pudo obtener información con respecto al comportamiento de los compuestos en un medio aprótico, resultados que son de interés ya que se pueden considerar como una aproximación química de tipo *in vitro* de los conocidos fenómenos de estrés oxidativo que ocurren en estructuras como las bio-membranas donde participan especies reactivas oxigenadas.^{161,162}

Finalmente se puede establecer un orden estimativo para la actividad de los derivados y la cumarina: **10** > **3** > **4** > **2** > **11** > **9** > **1**. Todos los compuestos ensayados tuvieron una reactividad superior al estándar Trolox.

5.4.5. Determinación de capacidad antioxidante celular (CAC).

Con el objeto de abordar los fenómenos que involucran especies radicalarias presentes en sistemas vivos se procede a realizar el estudio de la capacidad antioxidante de los compuestos en un modelo biológico simple. En este experimento se utiliza la sonda DCFH-DA, la cual difunde pasivamente a través de la membrana celular, al ingresar al citosol se transforma en el compuesto DCFH (no fluorescente) que emite al entrar en contacto con especies oxidantes del tipo EROs y ERNs. En los experimentos realizados, las células fueron estresadas mediante el compuesto ABAP (generador de radical peroxilo) y se observó cómo los nuevos derivados en estudio podían contrarrestar este evento oxidativo al interior de la célula. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 5.8.

Los valores experimentales obtenidos en esta etapa indicaron una bio-disponibilidad baja con una CAC menor al 50% para los nuevos compuestos **9**, **10** y **11**, además en todos los casos se encontró un porcentaje menor de CAC de los derivados respecto a los precursores respectivos **1**, **2**, **3** y **4**. Para una concentración de 10 μM de compuesto, se obtuvieron valores muy semejantes (alrededor del 70%) para los precursores ensayados.

Tabla 5.8. Valores obtenidos para la capacidad antioxidante celular (CAC), concentraciones 1 μM y 10 μM de cada compuesto.

Compuesto	%CAC 1 μM	%CAC 10 μM
1	69,6 \pm 5,0	72,7 \pm 1,3
2	73,0 \pm 2,6	73,9 \pm 0,7
3	66,2 \pm 1,9	70,1 \pm 0,1
4	47,7 \pm 2,5	66,5 \pm 2,6
9	38,1 \pm 5,5	49,9 \pm 6,6
10	17,8 \pm 4,5	39,5 \pm 12,8
11	34,5 \pm 3,1	23,4 \pm 10,8

En los resultados anteriores llaman la atención los bajos valores obtenidos en el ensayo de CAC para los derivados polifenólicos en comparación con los ensayos realizados en sistemas no biológicos en que se obtuvieron buenos resultados: en ellos se pudo apreciar el fenómeno de sinergia (en algunos casos) y un incremento en la actividad de todos los derivados frente a la cumarina precursora de forma individual. Para explicar este comportamiento y complementar estos resultados se procedió a seleccionar de manera racional los tres derivados obtenidos **9**, **10** y **11** y se determinó su *Hidrofobicidad Relativa* en conjunto con el precursor cumarínico **1** (el cual presentó valores de CAC alrededor del 70%, cercano a lo obtenido en los precursores

ácidos), ensayo que entrega información con respecto a la lipofilia relativa de la serie (en función de tiempos de retención), pudiendo dar respuesta al fenómeno observado.

5.5.5. Estudio de hidrofobicidad relativa.

En el estudio de nuevos compuestos diseñados como potenciales fármacos una de las propiedades fisicoquímicas de interés es la lipofilia, valor que puede determinarse mediante distintos métodos: electroforesis capilar, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y determinando el coeficiente de partición agua/octanol, entre otras. Junto con la metodología empírica se han desarrollado diversas herramientas computacionales con softwares que permiten calcular el valor para logP y logD, obteniéndose buenas correlaciones entre compuestos de una familia de estructuras semejantes en los que se realizan variaciones a su esqueleto. Los valores así calculados y entregados por el programa se consideran de una confiabilidad razonable.¹⁶³

En el caso de este estudio se determinó la lipofilia relativa para los derivados **9**, **10** y **11** junto con el precursor **1** mediante HPLC en fase reversa donde se espera obtener una serie relativa de tiempos de retención entre los compuestos que dé cuenta de su lipofilia. Se utilizó esta técnica por tratarse de una medición simple, rápida y ampliamente descrita en la literatura para nuevos compuestos, en que la fase estacionaria de la columna C₁₈ simula la fase no polar y la fase móvil es la fase

acuosa, así a través de la columna se llevan a cabo múltiples equilibrios de partición entre la fase acuosa y orgánica. En la medida en que el compuesto analizado sea más afín a la fase estacionaria (relacionado con un mayor tiempo de retención) éste será más lipofílico y viceversa. Los resultados (Tabla 5.9) muestran que de acuerdo a los tiempos de retención obtenidos (5,138; 5,760; 4,031 y 4,695 minutos) el orden relativo de lipofilia fue el siguiente:

Tabla 5.9. Valores obtenidos para el tiempo de retención experimental de los compuestos

Compuesto	Tiempo de retención (min)
1	5,138
9	5,760
10	4,031
11	4,695

La Figura 5.21 indica el orden de lipofilia relativa encontrada para los derivados y su precursor cumarínico. En forma general, se observaron valores de tiempo de retención cercanos. Se apreció que el derivado de ácido cafeico **9** fue el compuesto que encabezó la serie, lo que se puede explicar debido a la presencia de un doble enlace en su estructura confiriéndole mayor apolaridad (por tanto hidrofobicidad) a

la molécula. El segundo en la serie fue el compuesto clorado **1**, en el cual el sustituyente halógeno es un aporte a la lipofilia del compuesto. En el caso de las estructuras **10** y **11**, se encontró que el derivado de ácido gálico presentó el menor valor relativo, debido a la presencia de un grupo –OH adicional en el anillo aromático que como se esperaba tuvo la mayor tendencia hidrofílica.

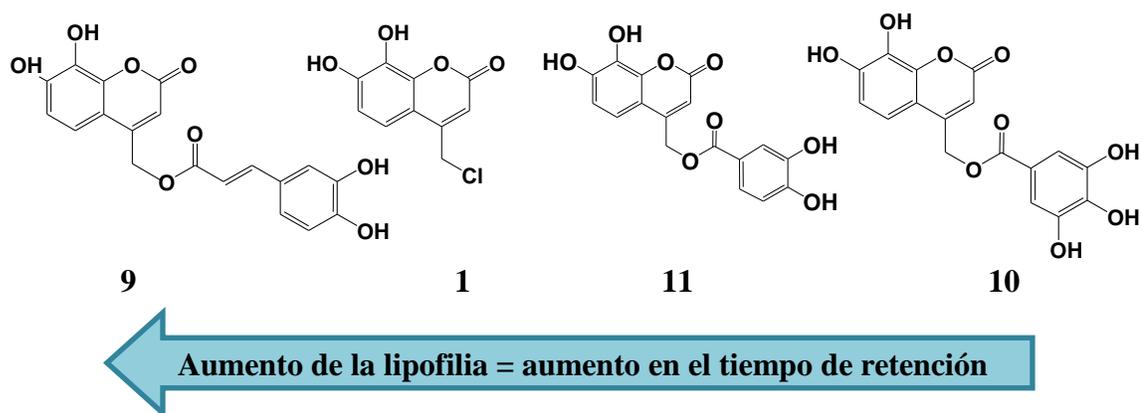


Figura 5.21. Hidrofobicidad relativa de los derivados y la cumarina precursora.

Para complementar este resultado experimental se realizó el cálculo teórico para el valor de logD mediante herramienta Marvin Sketch del software libre ChemAxon¹⁶⁴ y se estableció su correlación con el valor experimental obtenido para CAC en concentración 10 μ M. El resultado de esta correlación se presenta en la Figura 5.22.

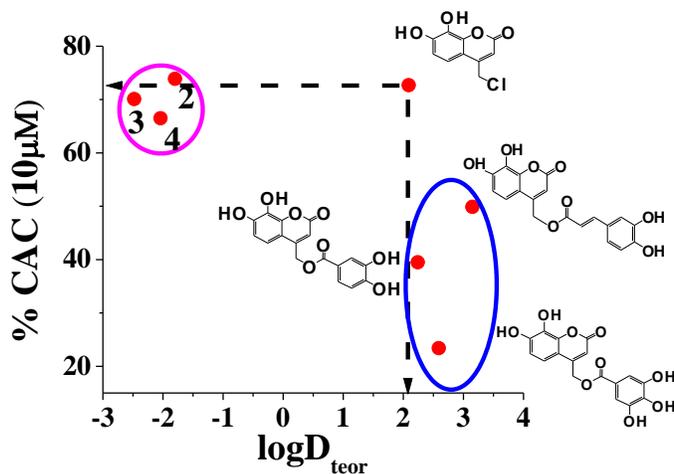


Figura 5.22. Correlación entre el valor de logD teórico y CAC experimental a 10 μ M de cada compuesto. El valor logD se obtuvo a través de la herramienta Marvin Sketch del software ChemAxon.¹⁶⁴

Considerando estos resultados, para este modelo experimental propuesto en el ensayo de CAC se observa que la lipofilia no sería el único factor relacionado con los bajos valores de capacidad antioxidante celular (CAC) obtenidos para los compuestos **9**, **10** y **11** ya que por ejemplo, la cumarina **1** presentó valores de CAC sobre el 70% y fue el segundo compuesto de la serie de hidrofobicidad relativa experimental con un valor cercano de tiempo de retención al derivado **9** (el cual tuvo valores de CAC bajo el 50%). De igual forma se aprecia la misma tendencia al correlacionar el valor de CAC con el logD teórico, donde el compuesto **1** independientemente de tener una lipofilia semejante a los derivados polifenólicos (al igual que en la serie de tiempos de retención) sí mostró una biodisponibilidad superior a los derivados y muy

semejante a los ácidos benzoicos (**2**, **3** y **4**) los cuales muestran valores negativos de logD debido a su menor lipofilia.

Por tratarse de un sistema biológico (células epiteliales) con múltiples variables que afectan la actividad de los compuestos estudiados, se pueden considerar diversos factores presentes en el medio ensayado que pueden dar respuesta al fenómeno observado. Uno de ellos es la estructura de la membrana celular que contiene diversas estructuras como por ejemplo el citocromo P (CYP), que es un complejo enzimático involucrado en el metabolismo de fármacos, síntesis de biomoléculas y diversas biotransformaciones de moléculas a nivel celular.¹⁶⁵ Otro factor presente es la existencia de enzimas hidrolíticas en el citosol celular, como es el caso específico de las carboxilesterasas (presentes en células epiteliales de intestino hiCE y otros órganos) las cuales son capaces de escindir diversos grupos funcionales tales como amidas, ésteres, carbamatos y convertirlos en sus respectivos precursores (alcohol y ácido)¹⁶⁶.

Considerando que para este experimento en un modelo biológico *in vitro* simple se emplearon células epiteliales de intestino (EA.hy 926 (ATCC CRL-2922)), es posible que el comportamiento observado se deba a la existencia de diversos fenómenos e interacciones posibles de los compuestos tanto a nivel de membrana como de citoplasma. Cabe destacar que al comparar las experiencias realizadas en un medio no biológico, los resultados en este caso se invierten al emplear una metodología que involucra un medio biológico. No necesariamente se encuentra un comportamiento

análogo en ambos medios de ensayo, debido a la mayor complejidad y variables asociadas a un sistema que involucra estructuras vivas, independientemente de la simplicidad o lo acotado del mismo.

5.5.6. Estudios Teóricos: optimización de estructuras y determinación del Índice de Fukui.

Con el objeto de racionalizar el estudio realizado y poder discriminar entre los distintos sitios reactivos de los derivados se determinó el índice de Fukui f_k^0 relacionado con un ataque de tipo radicalario. Básicamente es el promedio correspondiente a las reacciones de ataque nucleofílico f_k^- y electrofílico f_k^+ (Ecuación 5.7) como se describe en el trabajo de Aliaga y Lissi, donde se aborda el estudio teórico y experimental que compara la actividad anti-radicalaria de los polifenoles rutina y quercetina.¹⁶⁷

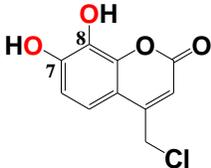
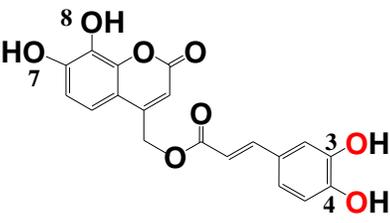
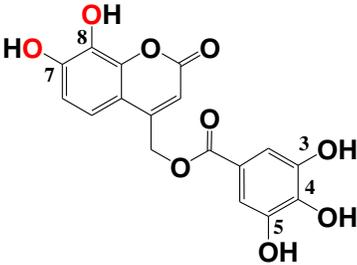
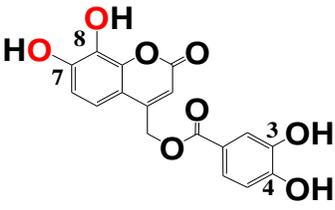
$$f_k^0 = \frac{f_k^- + f_k^+}{2} \quad \text{Ecuación 5.7}$$

Este índice es un descriptor de reactividad local en los átomos de oxígeno que participan en las reacciones de los grupos catecol presentes. Este tipo de análisis resulta adecuado para determinar los sitios de reacción preferentes en moléculas complejas con diversos centros reactivos.¹⁶⁸ Los resultados obtenidos indican que en

la cumarina precursora **1** el ataque radicalario ocurrirá primero en el oxígeno en posición 7 debido al mayor valor de f_k^0 (0,071), por otra parte no se observaron cambios significativos en los valores de f_k^0 al formar parte de los derivados **10** y **11** para los átomos de oxígeno en posición 7 y 8 (aquellos involucrados en la capacidad antioxidante de la molécula). Al formar parte del derivado **9** si se observa una disminución en su reactividad (f_k^0 O₇ = 0,0078 y f_k^0 O₈ = 0,0021) haciendo menos probables estos dos sitios a un ataque radicalario en la molécula (Tabla 5.10).

Los valores obtenidos para el índice de Fukui indican que en el derivado **9** el sitio más probable para un ataque radicalario será el catecol presente en el anillo bencénico (proveniente del ácido cafeico) de preferencia en el oxígeno en posición 4 (f_k^0 O₄ = 0,0489). A diferencia del derivado de ácido cafeico, en el caso de los compuestos **10** y **11** el sitio preferente de reacción será el anillo cumarínico conservándose el oxígeno en posición 7 del heterociclo como sitio más reactivo. En las Figuras 5.23 a 5.26 se presentan las estructuras optimizadas en 3D para el precursor **1** y sus derivados polifenólicos **9**, **10** y **11**.

Tabla 5.10. Valores de Índice de Fukui f_k para los compuestos en estudio.

Compuesto	Índice de Fukui f_k^0	Índice de Fukui f_k^-
	O ₇ 0,0771 O ₈ 0,0391	O ₇ 0,1373 O ₈ 0,0757
	O ₇ 0,0078 O ₈ 0,0021 O ₃ 0,0389 O ₄ 0,0489	O ₇ 0,0072 O ₈ 0,0036 O ₃ 0,0779 O ₄ 0,0890
	O ₇ 0,0719 O ₈ 0,0365 O ₃ 0,0025 O ₄ 0,0025 O ₅ 0,0002	O ₇ 0,1276 O ₈ 0,0716 O ₃ 0,0050 O ₄ 0,0049 O ₅ 0,0004
	O ₇ 0,0739 O ₈ 0,0378 O ₃ 0,0004 O ₄ 0,0003	O ₇ 0,1316 O ₈ 0,0742 O ₃ 0,0008 O ₄ 0,0005

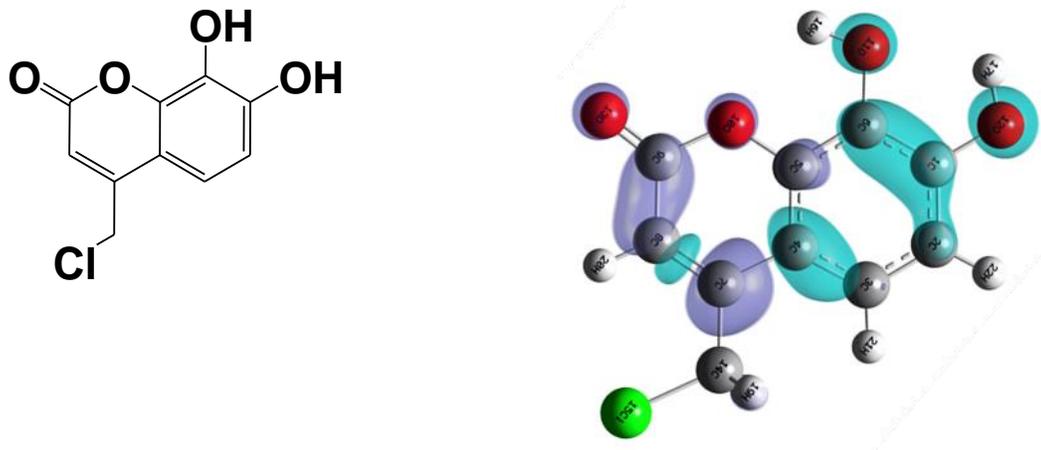


Figura 5.23. Estructura optimizada en 3D para el precursor **1** utilizando DFT.

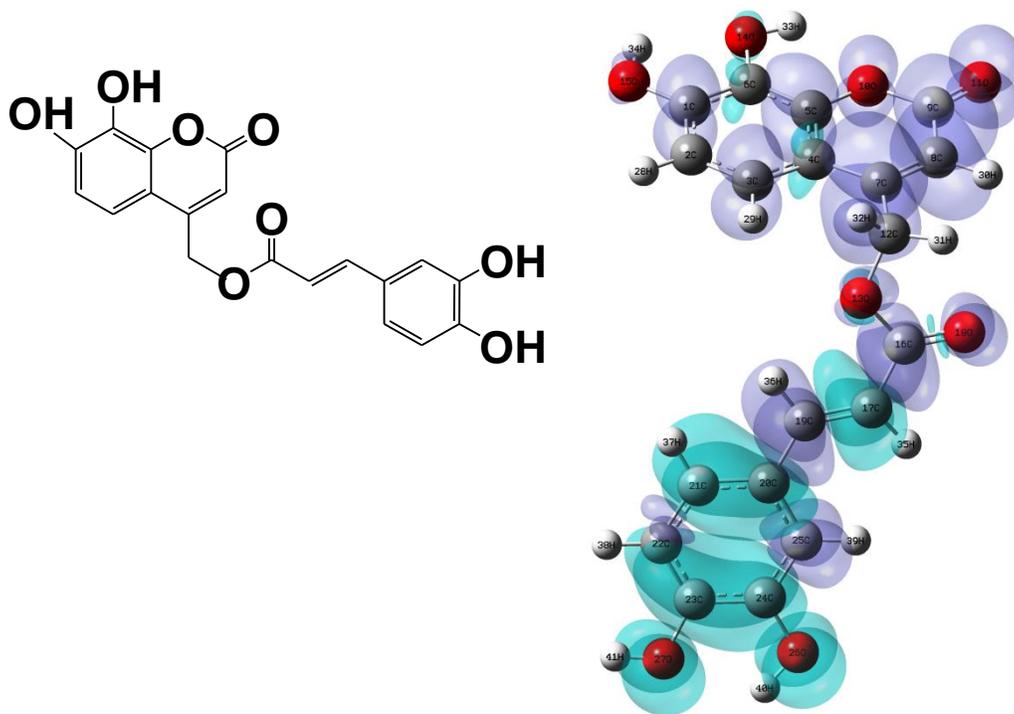


Figura 5.24. Estructura optimizada en 3D para el derivado **9** utilizando DFT.

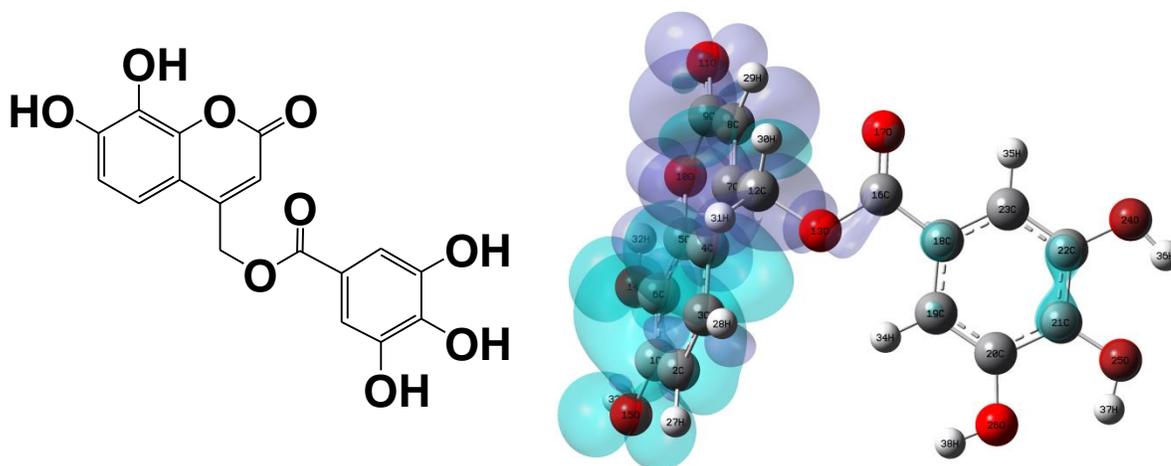


Figura 5.25. Estructura optimizada en 3D para el derivado **10** utilizando DFT.

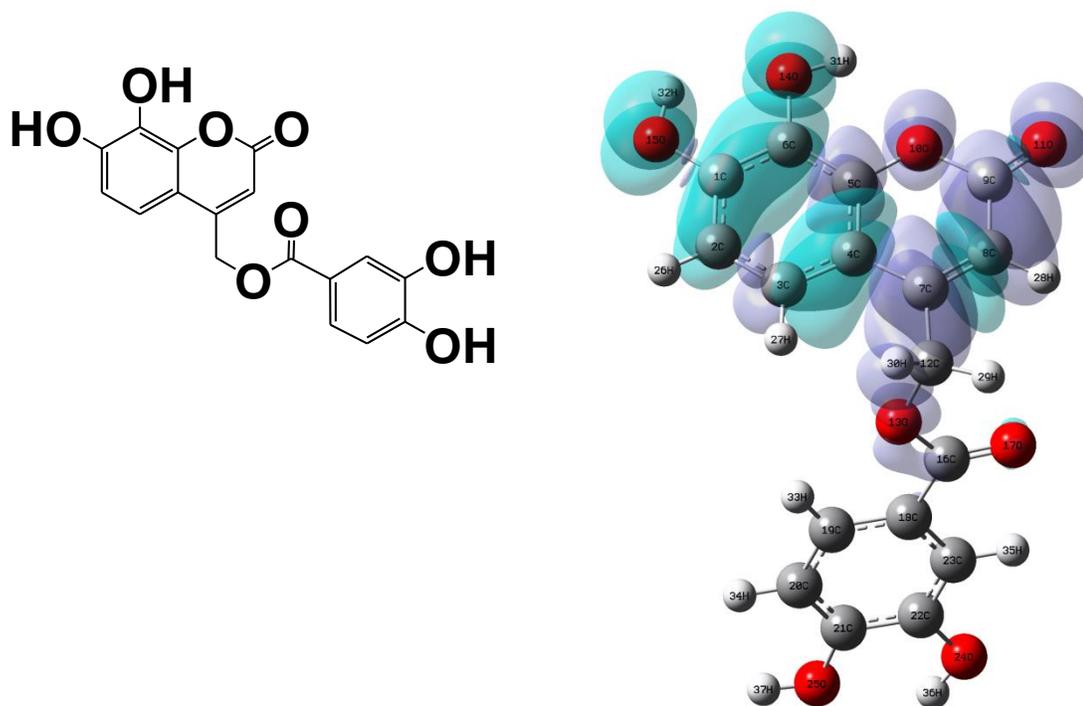


Figura 5.26. Estructura optimizada en 3D para el derivado **11** utilizando DFT.

6. Discusión General

Respecto del posible mecanismo de reacción electro-oxidativo, se consideran las siguientes evidencias teóricas y experimentales:

En primer lugar, como se esperaba, los experimentos electroquímicos de electro-oxidación de los compuestos mostraron las señales correspondientes a los grupos –OH presentes en todas las estructuras. Junto con esto, los resultados de la gráfica I_{pa} vs $v^{1/2}$ indican la existencia de un proceso di-electrónico en los precursores y los derivados (para la primera señal oxidativa) lo que implica que comparten el mismo mecanismo.

Posteriormente se comprobó la existencia de la especie radicalaria detectada mediante oxidación electroquímica seguida por resonancia de espín electrónico, con los respectivos resultados de las simulaciones espectrales realizadas.

En un siguiente punto se determinaron los valores teóricos de reactividad local encontrados mediante el cálculo del índice de Fukui. El valor de f_k^- permitió identificar los lugares con mayor reactividad frente a un ataque electrofílico, por tanto las zonas en la molécula puntuales con un alto valor para este índice tenderán a ceder electrones con mayor facilidad en un proceso oxidativo. Las estructuras optimizadas en 3D indican que las zonas en color celeste (Figuras 5.23-5.26) corresponden a aquellas con mayor densidad electrónica y por tanto están más propensas a ceder

electrones en un proceso oxidativo. Las zonas color lila representan los sitios con menor densidad electrónica. Para el compuesto **1** los -OH en el heterociclo presentan mayor densidad electrónica, lo que se aprecia de igual forma en los derivados **10** y **11** mientras que la zona del anillo bencénico se presenta con una baja densidad electrónica. Un fenómeno diferente se aprecia para el derivado **9**, donde la mayor densidad electrónica se aprecia en la estructura bencénica, cuyos grupos -OH presentan el mayor valor de f_k^- .

Este resultado teórico racional complementa lo observado en el experimento descrito con REE y electro-oxidación conjunta, ya que los valores para las constantes de acoplamiento hiperfino obtenidas en cada caso también señalaron en cuál de los dos catecoles presentes ocurre la formación de la especie radical y por ende dónde se inicia el proceso de oxidación, resultados corroboradas con el estudio teórico realizado. De esta forma para el derivado **9** el proceso oxidativo se inicia en los -OH ubicados en posición 3 y 4 que presentaron valores de f_k^- 0,0779 y 0,0890 respectivamente y cuyas constantes de acoplamiento hiperfino son coherentes con una interacción que involucra tres protones: aquellos ubicados en las posiciones 2, 5 y 6 del anillo bencénico. El mismo análisis realizado para las estructuras **10** y **11** indica que el proceso oxidativo ocurre primero en el anillo de la cumarina en los -OH en posición 7 y 8 con valores del descriptor de reactividad local f_k^- de 0,1276 y 0,0716 respectivamente para el derivado de ácido gálico y en el caso del derivado de ácido protocatéquico con f_k^- 0,1316 y 0,0742 para los oxígenos en posición 7 y 8. De igual forma los valores para las constantes de acoplamiento fueron consistentes con esta

información experimental evidenciando la interacción entre dos protones (aquellos en posición 5 y 6 del heterociclo cumarínico).

Esta diferencia encontrada para el proceso electro-oxidativo entre los derivados se puede explicar debido a la existencia de un doble enlace conjugado adicional presente sólo en el compuesto **9** derivado del ácido cafeico (ausente en **10** y **11**), el cual le confiere mayor deslocalización (estabilidad) al radical que se forma como intermediario en el proceso oxidativo.

Los estudios presentes en la literatura sobre la oxidación de estructuras polifenólicas en medio aprótico presentan evidencias tanto teóricas como empíricas que amplían la visión sobre la complejidad y posibilidades mecanísticas en la oxidación de estructuras polifenólicas. Basadas en modelos de naturaleza biológica como el Fotosistema II presente en estructuras vegetales y otros ejemplos se plantea que una vía de oxidación factible es a través de un mecanismo de tipo concertado, donde se obtiene el radical fenoxil ($\text{ArO}\bullet$) en un paso directo en que el protón y el electrón se transfieren de manera conjunta (Figura 6.1, destacado en rojo), planteamiento que considera factores de tipo energético a diferencia de los estudios clásicos con respecto a este proceso, según el cual la electro-oxidación se inicia con la pérdida de $1\bar{e}$ (etapa electroquímica) para formar el catión radical ($\text{ArO}\bullet+$) seguido de la pérdida de un H^+ (etapa química) para formar el radical fenoxil ($\text{ArO}\bullet$) (Figura 6.2).

En el caso de los compuestos estudiados en esta investigación, los valores de la pendiente de Tafel encontrados para los compuestos (sobre 88 mV/dec) sugieren que

el mecanismo de electro-oxidativo que más se ajusta a la evidencia experimental es por etapas.

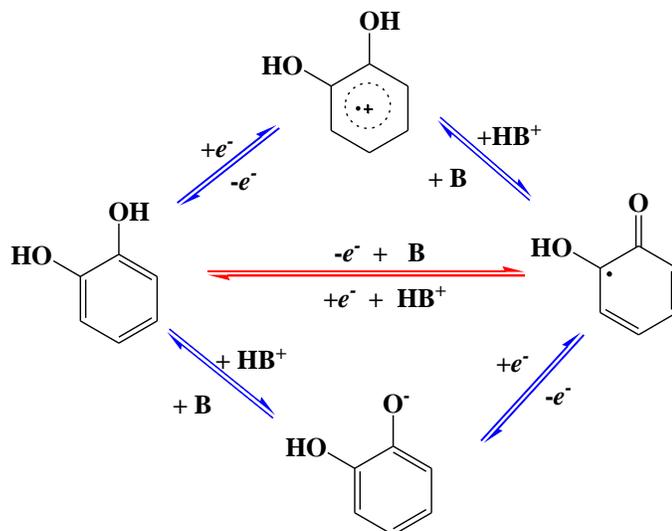


Figura 6.1. Esquema de reacción para un mecanismo concertado de electro-oxidación fenólica. Adaptación referencia 120.

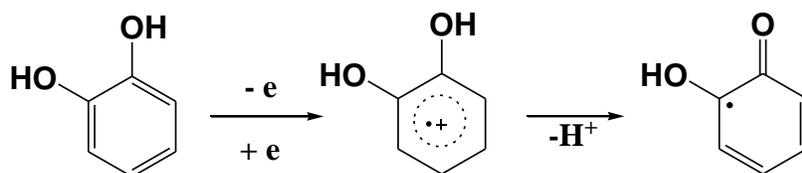


Figura 6.2. Esquema de reacción para estructuras fenólicas, mecanismo electro-oxidativo en etapas.

Con respecto a los ensayos de actividad antioxidante realizados, la Tabla 6.1 permite comparar y estimar en conjunto los resultados obtenidos a través de las diferentes metodologías empleadas.

En forma general, los resultados indican que la sustitución propuesta en esta investigación en la cumarina dihidroxilada (utilizada como esqueleto de partida) con distintas estructuras polifenólicas, entregó resultados positivos en cuanto al aporte que los nuevos derivados obtenidos presentaron frente a la inactivación de especies radicalarias tales como $O_2^{\cdot-}$, ROO^{\cdot} , OH^{\cdot} y su capacidad reductora (reflejada en el ensayo FRAP). Para los ensayos realizados en un modelo no biológico se obtuvieron valores de actividad en los derivados que superaron a los obtenidos para el precursor cumarínico de forma individual.

Cabe mencionar que en los diferentes ensayos y sus resultados se mencionan los conceptos de reactividad y actividad de los compuestos. En el caso de los ensayos ORAC-FL y FRAP se habla sólo de actividad antioxidante ya que con la información que entregan no se puede determinar cuál de los distintos grupos $-OH$ presente en la molécula es el que reacciona primero. Diferente es lo que ocurre en el ensayo frente al radical hidroxilo en que se establece una competencia entre el atrapador (DMPO) y el compuesto por inactivar al OH^{\cdot} debido a que ambos tienen una vida media corta (10^{-9} s), por tanto la reacción entre el antioxidante y el radical es rápida y el $-OH$ más reactivo de la molécula es el que inactiva a la especie y se puede mencionar como reactividad. Lo mismo ocurre para el ensayo frente al anión radical superóxido en que también se mencionan los resultados como reactividad frente al radical.

Tabla 6.1. Cuadro comparativo de los resultados en la determinación de capacidad antioxidante para la cumarina y sus derivados.

Compuesto	ORAC-FL	FRAP eq. Trolox /10 μM	% inactivación $\text{OH}\cdot$	CAC		$\text{O}_2^{\cdot-}$ IA 50 / mM
				1 μM	10 μM	
1	0,91 \pm 0,03	130,2 \pm 16,0	92,3 \pm 7,4	69,6 \pm 5,0	72,7 \pm 1,3	0,183 \pm 0,007
2	3,47 \pm 0,10	272,7 \pm 32,1	98,3 \pm 2,7	73,0 \pm 2,6	73,9 \pm 0,7	0,125 \pm 0,006
3	3,91 \pm 0,09	476,8 \pm 21,5	99,5 \pm 0,8	66,2 \pm 1,9	70,1 \pm 0,1	0,104 \pm 0,004
4	0,69 \pm 0,01	86,8 \pm 9,3	92,7 \pm 2,9	47,7 \pm 2,5	66,5 \pm 2,6	0,115 \pm 0,005
9	2,39 \pm 0,027	205,2 \pm 15,1	98,1 \pm 1,8	38,1 \pm 5,5	49,9 \pm 6,6	0,141 \pm 0,011
10	1,74 \pm 0,05	280,46 \pm 18,8	98,2 \pm 2,5	17,8 \pm 4,5	39,5 \pm 12,8	0,064 \pm 0,004
11	2,62 \pm 0,04	262,4 \pm 23,6	98,0 \pm 9,9	34,5 \pm 3,1	23,4 \pm 10,8	0,137 \pm 0,002

Por otra parte, en los ensayos ORAC-FL y FRAP se observó que los valores de actividad para los ácidos cafeico **2** y gálico **3** fueron superiores a los obtenidos para sus derivados híbridos **9** y **10** respectivamente. En el ensayo frente al anión superóxido se encontró que los ácidos cafeico **2** y protocatéquico **4** presentaron resultados superiores en cuanto a reactividad que sus respectivos derivados híbridos **9** y **11**.

En la literatura se encuentra la caracterización de los ácidos benzoicos y otros antioxidantes polifenólicos naturales como moléculas altamente polares lo que en algunos limita su uso en medios como bio-membranas, emulsiones y micelas por lo que la formación de sus derivados ésteres se utiliza como una estrategia para aumentar su lipofilia y por lo tanto la biodisponibilidad de estos compuestos en medios no acuosos^{169,170} investigación que ha dado origen a la formulación de los denominados “antioxidantes lipofílicos”^{171,172} los que han demostrado ser eficientes como antioxidantes en bio-membranas, resultados que se describen en el trabajo realizado por Tai y colaboradores donde se ensayaron ésteres de ácido vainillínico que, además de presentar buenos valores de índice ORAC-FL, inhibieron el proceso de hemólisis en eritrocitos de mamífero.¹⁷³

Junto con lo anterior, está descrita la relación existente entre la estructura de los ácidos benzoicos y su actividad antioxidante, la que es atribuida a diversas características presentes en su esqueleto tales como i) número y posición de grupos –OH en la molécula, ii) sustituyentes alcoxilo en posición orto al –OH, iii) presencia de grupos -COOH, -COOR, -CH=CH-CH₂-.¹⁷⁴ Al apreciar las estructuras de los derivados propuestos se infiere que las diferencias encontradas en la actividad de los ácidos antes y después de la unión a la cumarina están relacionadas con dicha sustitución. En el caso del ácido gálico que presenta un valor de ORAC de 3,91 frente a un valor de 1,74 para su derivado **10** y en el ensayo FRAP se encontró un valor de 476,8 vs un 318,2 para el híbrido, se puede señalar que no se apreció un aumento de

actividad antioxidante para los ésteres con respecto al ácido del que provienen según con lo descrito por algunos autores.^{175,176} Junto con lo anterior se forma un éster de ácido gálico con un sustituyente voluminoso (la estructura cumarínica) pudiendo disminuir la coplanaridad en el sistema aromático/carbonilo lo que implica una menor estabilización del radical formado en la reacción frente a la especie ROO• para el ensayo ORAC-FL y la capacidad reductora en el ensayo FRAP. Otro punto a considerar es que para este derivado se observa el fenómeno mencionado por Rice-Evans¹⁷⁵ y otros autores con respecto a que un número mayor de grupos –OH en el anillo bencénico no implica necesariamente un aumento en la actividad antioxidante de un derivado polifenólico.

Para el caso observado en el ácido cafeico y su derivado **9** se aprecia el mismo fenómeno de disminución de actividad del ácido **2** frente al éster como lo descrito para el ácido gálico y su derivado en los ensayos ORAC-FL y FRAP, con la diferencia que esta disminución no es tan drástica lo que se atribuye a la presencia del doble enlace en la estructura que confiere mayor estabilidad por resonancia al radical formado.

El valor de reactividad local del índice de Fukui f_k^0 -relacionado con los fenómenos de ataque radicalario- entregó información con respecto a los sitios de los derivados donde la actividad anti-radicalaria es más probable. Así, para el compuesto **9** esta actividad ocurre en el anillo bencénico en primer lugar y posteriormente en la cumarina. Para los derivados **10** y **11** la mayor probabilidad de que se produzca el

ataque radicalario es en el heterociclo cumarínico y posteriormente en el catecol del anillo bencénico. Estos resultados corroboran con los valores experimentales y las simulaciones realizadas en espectroscopia de resonancia electrónica de espín (REE) donde la actividad antioxidante del compuesto **9** ocurre con mayor probabilidad en el anillo bencénico proveniente de la fracción del ácido cafeico (donde se encuentra el doble enlace que le confiere mayor estabilidad al radical formado como intermediario de reacción), mientras que en los derivados **10** y **11** esta actividad ocurre en el heterociclo cumarínico.

Se observa que los resultados de capacidad antioxidante para los derivados polifenólicos variaron entre un método y otro, no hubo correlación entre los valores obtenidos en la capacidad antioxidante obtenidos en las distintas metodologías. Este resultado concuerda con lo esperado, ya que cada experiencia realizada implica una especie radicalaria diferente y cada una de ellas posee reactividades distintas ($t_{1/2} \text{O}_2^{\cdot -}$ del orden de los ms, $t_{1/2} \text{OH}^{\cdot} \sim 10^{-9}$ s, $t_{1/2} \text{ROO}^{\cdot} \sim 10$ ms). Para cada ensayo se obtuvo un distinto orden relativo de reactividad entre los derivados y sus precursores.

Se establece la relación entre el potencial E_{onset} y los resultados obtenidos en el ensayo de capacidad antioxidante frente a anión superóxido realizado en medio aprótico (Figura 6.3). Para el ensayo de reactividad frente a $\text{O}_2^{\cdot -}$ se puede establecer una correlación donde una disminución en el potencial de oxidación disminuye el valor de IA_{50} para 5 de los 7 compuestos estudiados. Por tanto a medida que el

potencial se hace menos positivo aumenta la reactividad de los compuestos frente al anión superóxido, presentándose una relación entre actividad antioxidante y E_{onset} para este ensayo.

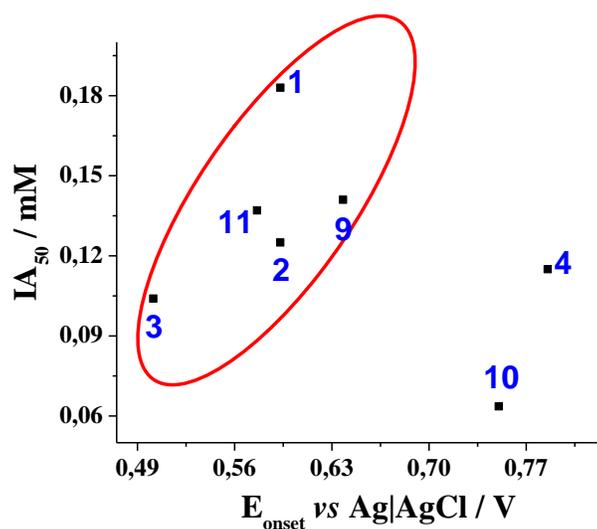


Figura 6.3. Correlación entre el potencial de oxidación E_{onset} y los ensayos frente a anión superóxido.

Un menor potencial de oxidación para los grupos $-OH$ presentes en los compuestos implica una mayor facilidad para oxidarse (por ende una mayor densidad de carga electrónica para ceder) y por tanto un incremento en la capacidad antioxidante para este ensayo.

Se puede observar que el compuesto **4** (ácido protocatéquico) posee un valor de IA_{50} de 0,115 mM el cual se encuentra entre los valores encontrados para el ácido cafeico y el ácido gálico, pero su valor de E_{onset} es mayor, diferenciándose de la tendencia

encontrada. Junto con lo anterior el compuesto **4** presentó el menor valor para la pendiente de Tafel ($b = 88 \text{ mV/dec}$) de toda la serie, lo que sugiere una relación entre el mecanismo de oxidación y la capacidad de reaccionar frente a la especie radicalaria. El compuesto **10** presentó el mejor valor para IA_{50} y también se diferencia de la serie de compuestos con respecto al E_{onset} (cercano al del compuesto **4**), a diferencia del ácido su pendiente de Tafel ($b = 134 \text{ mV/dec}$) indica la presencia de dimerizaciones posteriores a la formación del radical fenoxil (y generación de compuestos nuevos que también pueden reaccionar con el radical), sugiriendo que además del mecanismo de oxidación hay otros factores que pueden influir como por ejemplo la difusión de las especies en el medio empleado.

El estudio de los compuestos frente al radical hidroxilo reflejó que en las condiciones experimentales empleadas los resultados fueron semejantes, por cuanto los valores de inactivación del radical en todos los casos fue sobre el 90%. Debido a lo anterior se descarta realizar la correlación con el potencial E_{onset} ya que no encontró una diferencia significativa entre los compuestos.

Finalmente, al considerar los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante celular en un modelo biológico simple, un punto a tener en cuenta es el hecho de que esta metodología en particular adolece en cuanto a que es inespecífica con respecto a la cantidad de compuesto que ingresa en la célula, ya que por las distintas lipofilias observadas los compuestos tendrán una diferente capacidad de ingreso al medio y no se puede determinar la relación existente entre la cantidad que ingresa a la célula

versus la reactividad. Debido a lo anteriormente descrito estos resultados muestran principalmente un reflejo de la capacidad de penetración que tienen los compuestos hacia el interior de la célula.

Un modo de abordar temáticas de tipo multi-variable-donde se deben considerar numerosos factores involucrados en un comportamiento o fenómeno- es el empleo de modelos teórico-computacionales como QSAR (por su sigla en inglés Quantitative Structure-Activity Relationships), herramienta que se utiliza en la estimación de propiedades biológicas y fisicoquímicas de interés en diversas moléculas, entre ellas polifenoles.¹⁷⁷

El factor estérico tiene un papel importante en los estudios realizados en medios celulares siendo el tamaño molecular uno de los factores considerados en ensayos de permeabilidad en futuros fármacos, ya que un excesivo tamaño (entre otras cosas) dificulta la solubilidad en medio acuoso así como también la difusión pasiva de las moléculas.¹⁶³ Al observar el peso molecular de los compuestos derivados (entre 344,27 g/mol y 370,31 g/mol) se puede considerar que el efecto estérico en este caso no sería la causa principal para el fenómeno observado en el ensayo celular, ya que está descrito que los compuestos no deberían superar un peso de 500 g/mol¹⁶³ -que no es el caso de estos derivados-.

Los resultados obtenidos para este ensayo realizado en un modelo biológico simple sugieren que la actividad de los derivados para reaccionar frente a especies radicalarias podría estar circunscrita a medios lipofílicos como las membranas

biológicas, estudio que se podría profundizar empleando un modelo como el descrito¹⁷³ para estudiar procesos oxidativos en membranas de eritrocito.

7. Conclusiones.

- La técnica de electro-oxidación complementada con espectroscopia de resonancia de espín electrónico (REE) resulta útil para identificar especies radicalarias como intermediarios de la reacción en este trabajo.
- La determinación del índice de Fukui (f_k^-) en conjunto con los resultados de resonancia de espín electrónico permitieron discriminar los sitios de las moléculas donde se inicia el proceso oxidativo. En el derivado 9 la oxidación ocurre primero en el anillo bencénico y en los compuestos 10 y 11 el proceso oxidativo ocurre primero en el heterociclo cumarínico.
- La inclusión de las estructuras polifenólicas al heterociclo cumarínico generó un incremento en su capacidad antioxidante en los ensayos no biológicos.
- No se obtuvo correlación para los resultados de capacidad antioxidante entre las distintas metodologías empleadas.
- Se estableció la correlación entre el valor de potencial de inicio de la reacción electroquímica (onset) y los resultados para el ensayo frente al anión superóxido. A medida que el potencial se hace menos positivo aumenta la reactividad de los compuestos, lo que indica que la transferencia electrónica está involucrada en la etapa determinante de la velocidad.
- De acuerdo con los resultados de la técnica CAC y la correlación tanto con la hidrofobicidad relativa como con el $\log D_{\text{teórico}}$ la actividad de los derivados

propuestos está circunscrita a aquellos procesos oxidativos que tienen lugar en medios lipofílicos, como por ejemplo membranas biológicas.

8. Bibliografía.

1. Ajay K. K., Renuka N., Pavithra G., Vasanth G. K. "Comprehensive review on coumarins: Molecules of potential chemical and pharmacological interest". *Chem. Pharm. Res.*, vol.7, n°9, pp. 67-81, 2015.
2. Venugopala K. N., Rashmi V., Odhav B. "Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity". *BioMed Research International*, article ID 963248, vol.2013, pp. 1-14, 2013.
3. Kai K., Shimizu B., Mizutani M., Watanabe K., Sakata K. "Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*". *Phytochemistry*, vol.67, pp. 379–386, 2006.
4. Bourgaud F., Hehn A., Labat R., Doerper S., Gontier E., Kellner S., Matern U. "Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes". *Phytochem. Rev.*, vol.5, pp. 293–308, 2006.
5. a) Abernelhy J. L. "The Historical and current interest in coumarin". *J. of Chem. Ed.*, vol. 46, n° 9, pp. 561-568, 1969.
b) Vogel A. *Gilbert's Ann. Phy.*, vol.64, pp.161, 1820.
6. Franklin W., Ramachandran V.N., Hack C. J., Joyce C., O'Kane E. "A study of the analytical behavior of selected synthetic and naturally occurring coumarins using liquid chromatography, ion trap mass spectrometry, gas chromatography and polarography and the construction of an appropriate database for coumarin characterization". *Anal. Chim. Acta.* n°564, pp. 201-210, 2006.
7. Lozhkin A. V., Sakanyan E. I. "Natural coumarins: methods of isolation and analysis". *Pharm. Chem. Journal*, vol. 40, no. 6, pp. 337-346. 2006.
8. a) Murray R., Méndez J., Brown S. "The Natural Coumarins. Occurrence, Chemistry and Biochemistry". John Wiley and Sons, 1982. pp. 1.
b) Murray R., Méndez J., Brown S. "The Natural Coumarins. Occurrence, Chemistry and Biochemistry". John Wiley and Sons, 1982, pp. 100.
c) Perkin W.H. *J. Chem. Soc.*, 21, 53. 1868.

9. Sethna S., Narsinh S. "The Chemistry of Coumarin". *Chem. Rev.* pp.1-62, 1944.
10. Pechmann, H. von. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 17, 929. 1884.
11. Pechmann, H. von, Duisberg C. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 16, 2119. 1883.
12. a) Sunil B. K., Kumar P.S., Srinivasulu N., R. Ajitha B., Reddy Y. T., Reddy P. N., Udupi R. H. "Vanadium (III) chloride as an effective catalyst for the Pechmann reaction." *Chem. Het. Comp.*, vol.42, n°2, pp. 172-175.2006.
b) Sharma G. V. M., Janardhan J. R., Lakshmi P. S., Radha P. K. "An efficient ZnCl₄ catalyzed one-pot solvent free protocol for the synthesis of 4-substitued coumarins". *Tetrahedron Lett.*, vol.46, pp. 6119-6121. 2005.
13. a) Romanelli G. P., Bennardi D., Ruiz D. M., Baronetti G., Thomas H. J., Autino J. C. "A solvent-free synthesis of coumarins using a Wells-Dawson heteropolyacid catalyst." *Tetrahedron Lett.*, vol.45, pp.8935-8939.2004.
b) Joshi R., Chudasama U. "Synthesis of coumarins via Pechmann condensation using inorganic ion exangers as solid acid catalysts." *J. Sc. Ind. Res.*, vol.67, pp. 1092- 1097.2008
14. Stoyanov E. V., Mezger J. "Pechmann reaction promoted by boron trifluoride dehydrate." *Molecules.* Vol.10, pp.762-766.2005.
15. Manhas M.S., Gnguly S. N., Mukherjee S., Jain A. K., Bose A. K.. "Microwave initiated reactions: Pechmann coumarin synthesis, Biginelli reaction, and acylation". *Tetrahedron Lett.*, vol.47, pp. 2423-2425. 2006.
16. Knoevenagel E. *Ber.* Vol.31, 2585, 2596. 1898; vol. 37, 4461. 1904. et seq.
17. Bigi F., Chesini L., Maggi R., Sartori G. "Montmorillonite SKF as an inorganic water stable, and reusable catalyst for the Knoevenagel synthesis of coumarin-3-carboxylic acids". *J. Org. Chem.*, vol. 64, pp. 1033-1035. 1999.
18. Shaabani A., Ghadari A., Rahmati A., Rezayan A.H. "Coumarin synthesis via Knoevenagel condensation reaction in 1,1,3,3,-N,N,N',N'-tetramethylguanidinium trifluoroacetate ionic liquid". *J. Iran. Chem. Soc.*, vol. 6, n° 4, pp. 710-714. 2009.

19. a) Shaabani A., Ghadari R., Rezayan, A. H.” Synthesis of Functionalized Coumarins”. *Iran. J. Chem. Chem. Eng.*, vol. 30, n° 4, pp. 19-22. 2011.
b) Yeong-Jiunn J., Siang-en S., Yu-Jhang Ch., Mei-Chun Y., Wenwei L. “Syntheses of furo[3,4-c]coumarins and related furyl coumarin derivatives via intramolecular Wittig reactions”. *Org. Biomol. Chem.*, vol.10, pp. 843-847, 2010.
20. Dittmer D. C., Li Q., Avilov D. V. “Synthesis of Coumarins, 4-Hydroxycoumarins, and 4-Hydroxyquinolinones by Tellurium-Triggered Cyclizations”. *J. Org. Chem.*, vol. 70, pp.4682- 4686. 2005.
21. Chen N., Jain N., Xu J., Reuman M., Li X., Russell R., Sui Z. “Synthesis of novel chromenes through carbanion chemistry of 4-methyl coumarins.” *Tetrahedron Lett.*, vol. 47, pp. 5909-5913. 2006.
22. Rangappa S. K., Kallappa M. H., Seetharama H. R. “A solvent free synthesis of coumarins using phosphotungstic acid as a catalyst.” *Catal. Lett.*, vol. 131, pp. 321-327. 2009.
23. Harvey R., Cortez C., Ananthanarayan T.P., Schmolka S. “A new coumarin synthesis and its utilization for the synthesis of polycyclic coumarin compounds with anticarcinogenic properties”. *J. Org. Chem.*, vol. 53, pp. 3936-3943. 1988.
24. a) Murray R., Méndez J., Brown S. “The Natural Coumarins. Occurrence, Chemistry and Biochemistry”. John Wiley and Sons, pp. 271-271.1982.
b) Campbell H.A., Link K.P. *J. Biol. Chem.*, vol.138, n°21, 1941.
c) Holbrook A.M., Pereira J.A., Labiris R. "Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions". *Arch. Intern. Med.*, vol. 165, n°10, pp. 1095–1106. 2005.
25. a) Asif M. “Overview of Diverse Pharmacological Activities of Substituted Coumarins: Compounds with Therapeutic Potentials”. *American Journal of Current Organic Chemistry*, vol. 1, pp.1-16, 2014.
b) Patil P.O., Bari S. B., Firke S. D., Deshmukh P. K., Donda Sh. T., Patill D. A. “A comprehensive review on synthesis and designing aspects of coumarin derivatives as monoamine oxidase inhibitors for depression and Alzheimer’s disease.” *Bioorg. & Med. Chem.*, vol. 21, pp. 2434–2345, 2013.

-
26. a) Wu J., Peng T., Chen F., Leng Y., Tong L., Li M., Qu R., X. Hua, Ding J., Duan W. "Synthesis and Anticancer Activity of 7,8-dihydroxy-4-arylcoumarins". *Letters in Drug Design & Discovery*, vol.12, n°5, pp. 366-373. 2015.
- b) Irena Kostova. "Synthetic and Natural Coumarins as Cytotoxic Agents." *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*, vol. 5, pp. 29-46, 2005.
27. Riveiro M. E., Vazquez R., Moglioni A., Gomez N., Baldi A., Davio C., Carina Shayo. "Biochemical mechanisms underlying the pro-apoptotic activity of 7,8-dihydroxy-4-methylcoumarin in human leukemic cells". *Biochem. Pharm.*, vol.75, pp. 725–736, 2008.
28. Ito Ch., Itoigawa M., Onoda S., Hosokawa A., Ruangrunsi N., Okuda T., Tokuda H., Nishino H., Furukawa H. "Chemical constituents of *Murraya siamensis*: three coumarins and their anti-tumor promoting effect." *Phytochemistry*, vol. 66, pp. 567–572, 2005.
29. Kayal G., Jain K., Malviya S., Kharia A. "Comparative SAR of synthetic coumarin derivatives for their anti-inflammatory activity". *Int. J. of Pharm. Sci. and Res.*, vol. 5, n°9, pp. 3577-3583, 2014.
30. Lin Ch-M., Huang Sh.-T., Lee F.-W., Kuo H.-S., Lin M.-H. "6-Acyl-4-aryl/alkyl-5,7-dihydroxycoumarins as anti-inflammatory agents". *Bioorg. & Med. Chem.*, vol.14, pp. 4402–4409, 2006.
31. El-Wahab H.-A., El-Fattah M.-A., El-Khalik N.-A., Nassar H., Abdelal Mah M. M. "Synthesis and characterization of coumarin thiazole derivative 2-(2-amino-1,3-thiazol-4-yl)-3H-benzo[f]chromen-3-one with anti-microbial activity and its potential application in antimicrobial polyurethane coating". *Progress in Organic Coatings*, vol. 77, pp. 1506–1511, 2014.
32. a) Sardari S., Nishibe S., Daneshtalab M. "Coumarins, the bioactive structures with antifungal property", *Studies in Nat. Prod.Chem. Bioactive Natural Products (Part D)*, vol. 23, pp. 335-393, 2000.
- b) Patel D., Kumari P., Patel N." Synthesis and biological evaluation of coumarin based isoxazoles, pyrimidin-thiones and pyrimidin-2-ones". *Arabian*

- Journal of Chemistry*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.06.010>, pp. 1-12, 2015.
- c) Patil S.A., Prabhakara C.T., Halasangi B.M., Toragalmath S.S., Badami P.S. "DNA Cleavage, Antibacterial, Antifungal and Anthelmintic Studies of Co(II), Ni(II) and Cu(II) Complexes of Coumarin Schiff Bases: Synthesis and Spectral Approach", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 137, pp.641-651, 2015.
33. Shi J., Li Ch.-J., Yang J.-Z., Ma J., Wang Ch., Tang J., Li Y., Chena H., Zhang D.-M. "Hepatoprotective coumarins and secoiridoids from *Hydrangea paniculata*". *Fitoterapia*, vol. 96, pp. 138–145, 2014.
34. Hoult J. R. S., Payá M. "Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential". *General Pharmacology: The Vascular System.*, vol. 27, n° 4, pp. 713-717, 1996.
35. Poumale H. M., Hamm R., Zang Y., Shiono Y., Kuete V. "Coumarins and Related Compounds from the Medicinal Plants of Africa". *Med. Plant Res. in Africa*, cap. 8. pp.261-300, 2013.
36. Paramjeet M., Dipak Sh., A. Dubey. "Overview of synthesis and activity of coumarins". *E-International Sc. Res. Journal.*, vol. 4, n° 1, pp. 16-37, 2012.
37. Yu D., Suzuki M., Xie L., Morris-Natschke S. L., Lee K.-H. "Recent progress in the development of coumarin derivatives as potent Anti-HIV agents." *Med. Res. Rev.*, vol. 23, no. 3, pp. 322-345, 2003.
38. Valkoa M., Leibfritz D., Moncola J., Croninc M., Mazura M., Telser J. "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease". *The Int. J. of Biochem. & Cell Biol.*, vol. 39, pp. 44–84, 2007.
39. Kostova I. "Synthetic and Natural Coumarins as Antioxidants". *Mini-Reviews in Med. Chem.*, vol. 6, pp. 365-374. 2006.
40. Payá M., Halliwell B., Hoult J.R.S. "Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species: Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals." *Biochem. Pharmacol.*, vol. 44, n°2, pp. 205-214, 1992.

41. Kim S., Kang K., Zhang R., Piao M., Ko D., Wang Z., Chae S., Kang S., Lee K., Kang H., Kang H., Hyun J. "Protective effect of esculetin against oxidative stress-induced cell damage via scavenging reactive oxygen species." *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 29, n°11, pp. 1319–1326. 2008.
42. Wu Ch.-R., Huang M.-Y., Lin Y.-T., Ju H.-Y., Ching H. "Antioxidant properties of Cortex Fraxini and its simple coumarins". *Food Chem.*, vol.104, pp. 1464–1471, 2007.
43. Zhang K., Ding W., Sun J., Zhang B., Lu F., Lai R., Zou Y., Yedid G. "Antioxidant and antitumor activities of 4-arylcoumarins and 4-aryl-3,4-dihydrocoumarins". *Biochimie*, vol. 107, pp.2013-210. 2014.
44. Ignat I., Volf I., Popa V. I. "A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables". *Food Chem.*, vol.126, pp.1821-1835. 2011.
45. Lattanzio V., Kroon P. A., Quideau S., Treutter D. "Plant Phenolics – Secondary Metabolites with Diverse Function" *Recent Adv. in Polyphenol Res.*, vol.1, cap.1, pp.1-36, 2009.
46. Packer L. "Methods in Enzymology: Flavonoids and other Polyphenols". Ed. Academic Press, vol. 335, cap. 1, 2001.
47. Kilmartin P.A., Hsu Ch. F. "Characterization of polyphenols in green, oolong and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry". *Food Chem.*, vol. 82, pp.501–512, 2003.
48. Hintz T., Matthews K. K., Di R. "The Use of Plant Antimicrobial Compounds for Food Preservation". *BioMed Res. Inter.*, vol. 2015, ID 246264, pp. 1-12.
49. Obied H. K. "Biography of biophenols: past, present and future." *Functional Foods in Health and Disease*, vol 3, n° 6, pp. 230-241, 2013.
50. Dua A., Garg G., Mahajan R. "Polyphenols, flavonoids and antimicrobial properties of methanolic extract of fennel (*Foeniculum vulgare Miller*)." *Eur. J. of Exp. Biol.*, vol. 3, n°4, pp. 203-208. 2013.

-
51. Sasidharan S., Lai N., Jothy S.L., Chen Y., Vijayarathna S., Oon C.E., Amala R., Kavitha N., Aziah I., Shanmugapriya, Kanwar J.R. "Safe food Preparation with Natural Antimicrobial Polyphenol: a Preventing Strategy for Microbial Pathogens Infection during and after a Flood". *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*. Ed. A. Méndez-Vilas, pp. 1-12. 2015.
52. Cimino S., Sortino G., Favilla V., Castelli T., Madonia M., Sansalone S., G. Russo, G. Morgia. "Polyphenols: Key Issues Involved in Chemoprevention of Prostate Cancer". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2012, ID 632959, doi:10.1155/2012/632959.
53. Xia E.-Q., Deng G.-F., Guo Y.-J., H.-B. "Biological Activities of Polyphenols from Grapes." *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 11, pp. 622-646, 2010.
54. Kozłowski H., Janicka-Kłos A., Brasun J., Gaggelli E., Valensin D., Valensin G. "Copper, iron, and zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative Disorders (metal uptake, transport, distribution and regulation)". *Coord. Chem. Rev.*, vol. 253, pp. 2665–2685, 2009
55. Ribeiro B., Valentao P., Baptista P., Seabra R. M., Andrade P. "Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*)". *Food and Chem. Toxicol.* , vol. 45, pp. 1805–1813. 2007.
56. Andrade R. G.Jr., Ginani J. S., Lopes G., Dutra F., Alonso A., Hermes-Lima M. "Tannic acid inhibits in vitro iron-dependent free radical formation". *Biochimie*, vol. 88, pp. 1287–1296, 2006.
57. Andrade R. G., Dalvi L., Silva J.M.C. Jr., Lopes G., Alonso A., Hermes-Lima M. "The antioxidant effect of tannic acid on the in vitro copper-mediated formation of free radicals". *Arch. of Biochem. and Biophys.*, vol. 437, pp. 1–9, 2005.
58. Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F. "Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power

- Assay.” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, pp. 3396–3402, 2000.
59. Noguer M., Cerezo A. B., Moyá M. L., Troncoso A. M., García-Parrilla M. C. “Synergism Effect between Phenolic Metabolites and Endogenous Antioxidants in Terms of Antioxidant Activity.” *Adv.in Chem. Eng. and Science*, vol. 4, pp. 258-265. 2014.
60. Gülçin İ. “Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid)”. *Toxicology*. vol. 217, pp. 213–220, 2006.
61. Li X., Wang X., Chen D., Chen Sh. “Antioxidant Activity and Mechanism of Protocatechuic Acid in vitro”. *Functional Foods in Health and Disease*, vol. 7, pp. 232-244, 2011.
62. Jeong Ch.-H., Jeong H. R., Choi G. N., Kim D.-O., Lee U., Heo H. J. “Neuroprotective and anti-oxidant effects of caffeic acid isolated from *Erigeron annuus* leaf.” *Chinese Medicine*, vol 6, n°25, 2011.
63. Wu W.-M., Lu L., Long Y., Wang T., Lei L., Chen Q., Wang R. “Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes: A structure–activity insight.” *Food Chem.*, vol. 105, pp. 107–115, 2007.
64. Zhang H.-Y. “One-compound-multiple-targets strategy to combat Alzheimer’s disease”. *FEBS Letters*, vol. 579, pp. 5260–5264, 2005.
65. Meunier B. “Hybrid Molecules with a Dual Mode of Action: Dream or Reality?” *Acc. of Chem. Res.*, vol. 4, n°1, pp. 69-77, 2008.
66. Lazar C., Kluczyk A., Kiyota T., Konishi Y. “Drug Evolution Concept in Drug Design: 1. Hybridization Method”. *J. Med. Chem.*, vol. 47, pp. 6973-6982, 2004.
67. Morphy R., Kay C., Rankovic Z. “From magic bullets to designed multiple ligands.” *D.D.T.*, vol. 9, n°15, pp. 641-651, 2004.
68. Teiten M.-H., Dicato M., Diederich M. “Hybrid Curcumin Compounds: A New Strategy for Cancer Treatment”. *Molecules*, vol. 19, pp. 20839-20863, 2014.

69. Mehta G., Singh V. "Hybrid systems through natural product leads: An approach towards new molecular entities." *Chem. Soc. Rev.*, vol. 31, pp. 324–334, 2002.
70. Kouznetsov V., Gómez-Barrio A." Recent developments in the design and synthesis of hybrid molecules based on aminoquinoline ring and their antiplasmodial evaluation." *Eur. J. of Med. Chem.*, vol. 44, pp. 3091–3113, 2009.
71. Chauhan Sh. S., Sharma M., Prem. Chauhan M. S. "Trioxaquinones: hybrid molecules for the treatment of malaria." *Drug News & Perspective*, vol. 23, n° 10, pp. 632-646, 2010.
72. Xu Sh., Pei L., Wang Ch., Zhang Y.-K., Li D., Yao H., Wu X., Chen Z.-Sh., Sun Y., X. Jinyi. "Novel Hybrids of Natural Oridonin-Bearing Nitrogen Mustards as Potential Anticancer Drug Candidates". *Med. Chem. Lett.*, vol.5, pp. 97–802, 2014.
73. Allen T., M.N.V Giridhar, Razavi G. S. "A Review Article on Clinical Trials on Hybrid Drugs and Nanohybrid Technologies in Drug Development that Combat Cancer." *J. J. Cancer Sci. Res.*, vol.1, n°3, pp.1-8, 2015.
74. Tranches K. S., Viegas C, Jr. "Multi-Target Directed Drugs: A Modern Approach for Design of New Drugs for the treatment of Alzheimer's Disease." *Curr. Neuropharmacology*, vol. 12, pp. 239-255, 2014.
75. Lebens M., Shahabi V., Bäckström M., Houze T., Lindblad M., Holmgren J. "Synthesis of Hybrid Molecules between Heat-Labile Enterotoxin and Cholera Toxin B Subunits: Potential for Use in a Broad-Spectrum Vaccine." *Infection and Immunity*, vol.64, n°6, p. 2144–2150, 1996.
76. Saadeh H. A., Mosleh I. M., Mubarak M. S. "Synthesis of Novel Hybrid Molecules from Precursors With Known Antiparasitic Activity." *Molecules*, vol.14, pp. 1483-1494, 2009.
77. Boschi D., Caron G., Visentin S., Di Stilo A., Rolando B., Fruttero R., Gasco A. "Searching for Balanced Hybrid NO-Donor 1,4-Dihydropyridines with Basic Properties." *Pharm. Res.*, vol. 18, n°7, 2001.

78. Sandhu S., Bansal Y., Silakari O., Bansal G. "Coumarin hybrids as novel therapeutic agents." *Bioorg. & Med. Chem.*, vol. 22, pp. 3806–3814, 2014.
79. Franke K., Porzel A., Schmidt J. "Flavone-coumarin hybrids from *Gnidia socotrana*." *Phytochemistry*, vol. 61, pp. 873–878, 2002.
80. Chen H., Walsh Ch.T. "Coumarin formation in novobiocin biosynthesis: L-hydroxylation of the aminoacyl enzyme tyrosyl-S-NovH by a cytochrome P450 NovI." *Chemistry & Biology*, vol. 8, pp. 301-312, 2001.
81. Belluti F., Fontana G., Dal Bo L., Carenini N., Giommarelli Ch., Zunino F. "Design, synthesis and anticancer activities of stilbene-coumarin hybrid compounds: Identification of novel proapoptotic agents". *Bioorg. & Med. Chem.*, vol. 18, pp. 3543–3550, 2010.
82. Longhin P., Ferreira T. R., Oliveira E., dos Santos J. L. Chin M. "Anti-Inflammatory Drug Design Using a Molecular Hybridization Approach." *Pharmaceuticals*, vol. 4, pp. 1450-1474, 2011.
83. Koufaki M., Theodorou E., Galaris D., Nouis L., Katsanou E. S., Alexis M. N. "Chroman/Catechol Hybrids: Synthesis and Evaluation of Their Activity against Oxidative Stress Induced Cellular Damage." *J. Med. Chem.*, vol. 49, pp. 300-306, 2006.
84. Matos M. J., Mura F., Vazquez-Rodriguez S., Borges F., Santana L., Uriarte E., Olea-Azar C. "Study of Coumarin-Resveratrol Hybrids as Potent Antioxidant Compounds." *Molecules*, vol. 20, pp. 3290-3308, 2015.
85. Kenchappa R., Bodke Y. D., Chandrashekar A., Aruna M. "Synthesis of coumarin derivatives containing pyrazole and indenone rings as potent antioxidant and anti-hyperglycemic agents." *Arabian Journal of Chemistry*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.029>
86. Krishan R., Kaur N., Bansal Y., Bansal G. "Novel coumarin–benzimidazole derivatives as antioxidants and safer anti-inflammatory agents." *Acta Pharmaceutica Sinica B.*, vol. 4, n° 5, pp 368-375, 2014.

-
87. Xi G.-L., Liu Z.-Q. "Coumarin Moiety Can Enhance Abilities of Chalcones to Inhibit DNA Oxidation and to Scavenge Radicals." *Tetrahedron*, vol. 70, pp. 8397-8404, 2014.
88. Pérez-Cruz F., Vázquez-Rodríguez S., Matos M. J., Herrera-Morales A., Villamena F.A., Das A., Gopalakrishnan B., Olea-Azar C., Santana L., Uriarte E. "Synthesis and Electrochemical and Biological Studies of Novel Coumarin-Chalcone Hybrid Compounds." *J. Med. Chem.*, vol. 56, pp. 6136-6145. 2013
89. Touaibia M., Guay M. "Natural Product Total Synthesis in the Organic Laboratory: Total Synthesis of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), A Potent 5-Lipoxygenase Inhibitor from Honeybee Hives." *J. Chem. Ed.*, vol. 88, n°4, 2011.
90. Ono N., Yamada T., Saito T., Tanaka K., Kaji A. "A convenient procedure for esterification of carboxylic acids." *Bull. of Chem. Soc. of Japan.*, vol. 51, n° 8, pp. 2401-2404, 1978.
91. a) Yoshimura Y., Inomata T., Nakazawa H, Kubo H., Yamaguchi F., Ariga T. "Evaluation of free radical scavenging activities of antioxidants with an H₂O₂/NaOH/DMSO system by Electron Spin Resonance." *J. Food. Agric. Chem.*, vol. 47, pp. 4653-4356, 1999.
b) Roberts J. L., Morrison M. M., Sawyer D. T. "Base-Induced generation of superoxide ion and hydroxyl radical from hydrogen peroxide". *J. of the Am. Chem. Soc.*, vol. 100, n°1, pp. 329-330, 1978.
92. Le Bourvellec C., Hauchard D., Darchen A., Burgot J., Abasq M. "Validation of a new method using the reactivity of electro-generated superoxide radical in the antioxidant capacity determination of flavonoids ". *Talanta*, vol. 75, pp. 1098-1103, 2008.
93. Wolfe K., Liu R.H. "Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods and Dietary Supplements". *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, pp. 8896-8907. 2007.
94. Morell, C.; Grand, A., Toro-Labbé, A. "New Dual Descriptor for Chemical Reactivity." *J. Phys. Chem. A*, vol. 109, pp. 205-212, 2005.

-
95. Morell, C., Grand, A., Toro-Labbé, A. "Theoretical support for using the $\Delta f(r)$ descriptor." *Chem. Phys. Lett.*, vol. 425, pp. 342–346. 2006.
96. Toro-Labbé, A. (Editor), *Theoretical Aspects of Chemical Reactivity*, vol. 19, Elsevier B.V., Amsterdam, cap. 7. 2007.
97. H. Lund, O. Hammerich, *Organic Electrochemistry* 4th edition, Marcel Dekker, New York, 2001.
98. Hapiot P., Neudeck A., Pinson J., Fulcrand H., Neta P. Rolando C. "Oxidation of caffeic acid and related hydroxycinnamic acids." *J. of Electroanal. Chem.*, vol. 405, pp. 169-176. 1996.
99. Le Nest G., Caille O., Woudstra M., Roche S., Burlat B., Belle V., Guigliarelli B., Lexa D. "Zn–polyphenol chelation: complexes with quercetin, (+)-catechin, and derivatives: II Electrochemical and EPR studies". *Inorg. Chim. Acta*, vol. 357, pp. 2027–2037. 2004.
100. a) Petrucci R., Saso L., Kumar V., Prasad A. K., Malhotra S. V., Parmarc V. S., Marrosu G. "A spectroelectrochemical and chemical study on oxidation of 7,8-dihydroxy-4-methylcoumarin (DHMC) and some related compounds in aprotic medium". *Biochimie*, vol. 92, pp. 1123-1129. 2010.
b) Petrucci R., Astolfi P., Greci L., Firuzic O., Saso L., Marrosu G. "A spectroelectrochemical and chemical study on oxidation of hydroxycinnamic acids in aprotic medium". *Electrochimica Acta*, vol.52, pp. 2461–2470, 2007.
101. Salas-Reyes M., Hernández J., Domínguez Z., González F., Astudillo P.D., Navarro R.E., Martínez-Venavides E., Velázquez-Contreras C., Cruz-Sánchez S. "Electrochemical oxidation of caffeic acid and ferulic acid derivatives in aprotic medium". *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 22, n° 4, pp. 693-701. 2011.
102. Gileadi E. *Electrode Kinetics for Chemists, Chemical Engineers, and Material Scientists*. VCH Inc. Wiley & Sons. New York, 1993.
103. M.S. Ureta-Zañartu, P. Bustos, C. Berríos, M.C. Diez, M.L. Mora, C. Gutiérrez. "Electrooxidation of 2,4-dichlorophenol and other polychlorinated phenols at a glassy carbon electrode." *Electrochimica Acta*, vol. 47, pp. 2399-2406. 2002.

-
104. Panić V., Dekanski A., Vidaković T., Mišković-Stanković V., Javanović B., Nikolić B. "Oxidation of phenol on RuO₂-TiO₂/Ti anodes." *J. Solid State Electrochem.*, vol. 9, pp. 43–54, 2005.
105. Astudillo P. D., Tiburcio J., González F. J. "The role of acids and bases on the electrochemical oxidation of hydroquinone: Hydrogen bonding interactions in acetonitrile." *J. of Electroanal. Chem.*, vol. 604, pp. 57–64, 2007.
106. Edison A. Laurindo, Nerilso Bocchi and Romeu C. Rocha-Filho. "Production and Characterization of Ti/PbO₂ Electrodes by a Thermal-Electrochemical Method." *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 11, no. 4, 429-433, 2000.
107. C. Zoski. *Handbook of Electrochemistry*. Elsevier, 2007.
108. Hsu H., Shown I., Wei H., Chang Y., Du H., Lin Y., Tseng C., Wang C., Chen L., Lin Y., Chen K. "Graphene Oxide as a Promising Photocatalyst for CO₂ to Methanol Conversion." *Nanoscale*, DOI: 10.1039/c2nr31718d. 2012.
109. Alhalash W., Holze, R. "Electrochemical bandgaps of a series of poly-3-phenylthiophenes". *J. Solid State Electrochem.*, vol. 11, pp. 1605-1612, 2007.
110. Salazar-González R. "Preparación, caracterización electroquímica y reactividad de nuevas 1,4-dihidropiridinas-4r-sustituidas". Tesis para optar al grado de Doctor en Química. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 2008.
111. Pletcher D., Greff R., Peat R., Peter L.M., Robinson J. Southampton Electrochemistry Group. *Instrumental Methods in Electrochemistry*. Elsevier B.V. Woodhead Publishing Limited. pp. 195, 2001.
112. Biczók L., Linschitz H. "Concerted Electron and Proton Movement in Quenching of Triplet C₆₀ and Tetracene Fluorescence by Hydrogen-Bonded Phenol-Base Pairs." *J. Phys. Chem.*, vol. 99, pp. 1843-1845, 1995.
113. Biczók L., Gupta N., Linschitz H. "Coupled Electron-Proton Transfer in Interactions of Triplet C₆₀ with Hydrogen-Bonded Phenols: Effects of Solvation, Deuteration and Redox Potentials." *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, pp. 12601-12609, 1997.

-
114. Nakayama T., Uno B. "Importance of Proton-Coupled Electron Transfer from Natural Phenolic Compounds in Superoxide Scavenging." *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 63, n°12, pp. 967-973, 2015.
115. a) Minagawa Jun., Takahashi Y. "Structure, function and assembly of Photosystem II and its light-harvesting proteins." *Photosynthesis Research*, vol.82, pp. 241–263, 2004.
- b) Barry B.A., El-Deeh M. K., Sandusky P.O., Babcock G. T. "Tyrosine Radicals in Photosystem II and Related Model Compounds." *The J. of Biological Chem.*, vol.265, n°33, pp. 20139-20143. 1990.
116. Tommos C., Babcock G. T. "Proton and hydrogen currents in photosynthetic water oxidation." *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1458, pp. 199-219. 2000.
117. Markle, T. F., Rhile I. J., DiPasquale A. G., Mayer J. M. "Probing concerted proton–electron transfer in phenol–imidazoles." *PNAS*, vol. 105, n° 24, pp. 8185–8190, 2008.
118. Costentin C., Louault C., Robert M., Savéant J.M. "The electrochemical approach to concerted proton—electron transfers in the oxidation of phenols in water," *PNAS*, vol. 106, n° 43, pp. 18143–1814, 2009.
119. Costentin C., Robert M., Savéant J.M. "Concerted proton–electron transfers in the oxidation of phenols." *Phys .Chem. Chem. Phys.*, vol. 12, pp. 11179–11190, 2010.
120. Costentin C., Robert M., Savéant J.M. "Concerted Proton-Electron Transfers: Electrochemical and Related Approaches." *Accounts in Chemical Research*, vol. 43, n°7, pp. 1019, 2010.
121. Rhile I.J., Markle T.F., Nagao H., Di Pasquale A.G., Lam O.P., Lockwood M.A., Rotter K., Mayer J.M. "Concerted Proton-Electron Transfer in the Oxidation of Hydrogen-Bonded Phenols." *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, n°18, pp. 6075–6088, 2006.
122. Alligrant T. "Mechanistic studies on the electrochemistry of Proton Coupled Electron Transfer and the influence of hydrogen bonding." Ph.D. Thesis. Virginia Commonwealth University. USA. 2010.

123. Gomes A., Fernandes E., Lima J. "Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species". *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 65, pp. 45–80, 2005.
124. Cao G., Alessio H., Cutler R. "Oxygen-Radical absorbance capacity assay for antioxidants". *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 14, pp. 303-311. 1993.
125. Glazer A. "Phycoerythrin Fluorescence-Based Assay for Reactive Oxygen Species." *Methods in Enzymology*, vol. 186, pp. 161-168. 1990.
126. Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R. "Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe." *Agric. Food Chem.*, vol. 49, pp. 4619-4626. 2001.
127. Casettari L., Gennari L., Angelino D., Ninfali P., Castagnino E. "ORAC of chitosan and its derivatives." *Food Hydrocolloids*, vol. 28, pp. 243-247. 2012.
128. a) Spilioti E., Jaakkola M., Tolonen T., Lipponen M., Virtanen V., Chinou I., Kassi E., Karabournioti S., Moutsatsou P. "Phenolic Acid Composition, Antiatherogenic and Anticancer Potential of Honeys Derived from Various Regions in Greece." *PLOS One*, vol 9, n°4, pp. 1-10. 2014.

b) Pino E., Campos A. M., López-Alarcón C., Aspée A., Lissi E. "Free radical scavenging capacity of hydroxycinnamic acids and related compound." *J. of Phys. Org. Chem.*, vol. 19, pp. 759-764. 2006.
129. Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., Hawkins D. "Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts." *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 19, pp. 669–675. 2006.
130. Villaño D., Fernández-Pachón M., Troncoso A., M. García-Parrilla. "Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro." *Analytica Chimica Acta*, vol. 538, pp. 391–398. 2005.
131. Prior R., Hoang H., Gu L., Wu X., Bacchiocca M., Howard L., Hampsch-Woodill M., Huang D., Ou B., Jacob R. "Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC-FL)) of plasma and other biological and food samples". *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, pp. 3273–3279. 2003.

132. Burton G., Ingold K. "Autoxidation of Biological Molecules. 1. The Antioxidant Activity of Vitamin E and Related Chain-Breaking Phenolic Antioxidants in Vitro." *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 103, n° 6, pp. 6472-6477. 1981.
133. Niki E. "Free Radical Initiators as Source of Water- or Lipid-Soluble Peroxyl Radicals." *Methods in Enzymology*, vol. 186, pp.100-108. 1990.
134. Dorta E., Atala E., Aspee A., Speisky H., Lissi E., López-Alarcón C. "Role of alkoxy radicals on the fluorescein-based ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) assay." *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 75, S38. 2014.
135. Pérez Cruz Fernanda. "Estudio de la capacidad antioxidante de derivados de hidroxycumarina en sistemas homogéneos y en modelos de membrana lipídica." Tesis para optar al grado de Doctor en Química. Universidad de Chile 2014.
136. Atala E., Aspee A., Speisky H., Lissi E., López-Alarcón C. "Antioxidant capacity of phenolic compounds in acidic medium:A pyrogallol red-based ORAC (oxygen radical absorbance capacity) assay." *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 32, pp. 116–125. 2013.
137. Fuentes-Lemus E., Dorta E., Escobar E., Aspée A., Pino, E. Abasq M. L., Speisky H., Silva E., Lissi E., Davies M. J., López-Alarcón C. "Oxidation of free, peptide and protein tryptophan residues mediated by AAPH-derived free radicals: role of alkoxy and peroxy radicals." *RSC Adv.*, vol. 6, pp. 57948-57955. 2016.
138. Benzie I. F., Strain J. J. "The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay." *Analytical Biochemistry*, vol. 239, pp. 70–76. 1996.
139. Gohari A.R., Hajimehdipoor H., Saeidnia S., Ajani Y., Hadjiakhoondi A." Antioxidant activity of some medicinal species using FRAP Assay." *J. of Medicinal Plants*, vol. 10, n°37, pp. 54-60. 2011.
140. Bolanos de la Torre A., Henderson T., Nigam P., Owusu-Apenten R. "Universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey." *Food Chemistry*, vol. 174, n° 1, pp. 119-123. 2015.

141. Biskup I., Golonka I., Gamian A., Sroka Z. "Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods." *Postepy Hig Med Dosw*, vol. 67, pp. 958-963. 2013.
142. Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F. "Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified Ferric Reducing/Antioxidant Power assay." *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, pp.3396–3402. 2000.
143. Salikhov K., Zavoiskaya N. "Zavoisky and the Discovery of EPR." *Resonance*, pp. 963-968. 2015.
144. Polovka M. "EPR spectroscopy: A tool to characterize stability and antioxidant properties of foods." *J. of Food and Nutrition Res.*, vol. 45, n° 1, pp. 1-11, 2006.
145. Velasco J., Andersen M., Skibsted L. "Electron spin resonance spin trapping for analysis of lipid oxidation in oils: inhibiting effect on the spin trap α -phenyl-N-tertbutylnitron on lipid oxidation." *J. of Agric. and Food Chem.*, vol. 53, pp. 1328-1336. 2005.
146. Olea-Azar C., Rigol C., Mendizábal F., Briones R. "Applications of electron spin resonance and spin trapping in tropical parasitic diseases." *Mini Rev. Med. Chem.*, vol. 6, n°2, pp. 211-220. 2006.
147. Spasojević I., "Free radicals and antioxidants at a glance using EPR spectroscopy." *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, vol. 48, n°3 pp. 114–142. 2011.
148. Spasojević I., Mojović M., Ignjatović A., Bačić G. "The role of EPR spectroscopy in studies of the oxidative status of biological systems and the antioxidative properties of various compounds." *J. Serb. Chem. Soc.*, vol. 76, n°5, pp. 647–677. 2011.
149. Figueroa R. "Evaluación de la actividad tripanocida y capacidad antioxidante de nuevos compuestos derivados de chalconas y cumarinas". Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Doctor en Química. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. 2015.
150. Pérez-Cruz F., Villamena F. A., Zapata-Torres G., Das A., Headley C. A., Quezada E., López-Alarcón C., Olea-Azar C. "Selected hydroxycoumarins as

- antioxidants in cells: physicochemical and reactive oxygen species scavenging studies". *J. Phys. Org. Chem.*, vol. 26, pp. 773–783, 2013.
151. Figueroa Guíñez R., João Matos M., Vázquez-Rodríguez S., Santana L., Uriarte E., Olea-Azar C., Maya J. D. "Synthesis and evaluation of antioxidant and trypanocidal properties of a selected series of coumarin derivatives". *Future Med. Chem.*, vol.5, n°16, pp. 1911-1922. 2013.
152. Sochor J, Dobes J., Krystofova O., Ruttkay-Nedecky B., Babula P., Pohanka M., Jurikova T., Zitka O., Adam Vojtech, Klejdus B., Kizek R. "Electrochemistry as a tool for studying antioxidant properties." *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 8, pp. 8464 – 8489. 2013.
153. Piljac-Žegarac J., Valek L., Stipčević T., Martinez S. "Electrochemical determination of antioxidant capacity of fruit tea infusions" *Food Chemistry*, vol. 121, pp. 820–825. 2010.
154. Zielinska D., Wiczkowski W., Piskula M. "Determination of the relative contribution of quercetin and its glucosides to the antioxidant capacity of onion by cyclic voltammetry and spectrophotometric methods." *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, pp. 3524–3531. 2008.
155. Ruffien-Ciszak A., Gros P., Comtat M., Schmitt A., Questel E., Casas Ch., Redoules D. "Exploration of the global antioxidant capacity of the stratum corneum by cyclic voltammetry." *J. of Pharm. and Biomed. Analysis*, vol.40, pp. 162–167. 2006.
156. Pisoschi A., Cimpeanu C., Predoi G. "Electrochemical Methods for Total Antioxidant Capacity and its Main Contributors Determination: A review." *Open Chem.*, vol. 13, pp.824–856. 2015.
157. Samra M., Chedea V., Economou A., Calokerinos A., Kefalas P." Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic compounds: Part I. Studies on equimolar mixtures by chemiluminescence and cyclic voltammetry." *Food Chemistry*, vol. 125, pp. 622–629. 2011.
158. Güney S., Yildiz G., Capan A., Ozturk T. "Evaluation of the electrochemical properties of 3-hydroxyflavone using voltammetric methods." *Electrochimica Acta*, vol. 55, pp. 3295–3300. 2010.

-
159. Ortiz M.E., Núñez-Vergara L.J., Squella J.A. "Voltammetric determination of the heterogeneous charge transfer rate constant for superoxide formation at a glassy carbon electrode in aprotic medium." *J. of Electroanal. Chem*, vol. 549, pp.157-160. 2003.
160. Salazar R., Navarrete-Encina P.A., Squella J.A., Camargo C., Núñez-Vergara L.J. "Reactivity of C4-indolyl substituted 1,4-dihydropyridines toward superoxide anion (O₂⁻) in dimethylsulfoxide". *J. of Phys. Org. Chem.*, vol. 21, pp.1-9. 2008.
161. Maricle D.L., Hodgson W.G. "Reduction of oxygen to superoxide anion in aprotic solvents". *Anal. Chem.*, vol. 37, n°12, pp.15162-1565, 1965.
162. Sawyer D., Roberts J., Calderwood T., Suimoto H., McDowell M. "Reactivity and activation of dioxygen-derived species in aprotic media (a model matrix of biomembranes)." *Phil. Trans. R. Soc. London. B*, vol. 311, pp. 483-503. 1985.
163. Kerns E., Di L. Drug-like Properties Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization. 1st Edition, Elsevier, California. 2008.
164. Marvin Sketch, software ChemAxon version 6.3.1. www.chemaxon.com.
165. Nassar A., Hollenberg P., Scatina J. "Drug metabolism handbook: concepts and applications." John Wiley & Sons, Inc. U.S.A. 2009.
166. Yang Y., Aloysius H., Inoyama D., Chen Y., Hu L. "Enzyme-mediated hydrolytic activation of prodrugs." *Acta Pharmaceutica Sinica B*, vol. 1, pp. 143. 2011.
167. Aliaga C., Lissi E. "Comparison of the free radical scavenger activities of quercetin and rutin-An experimental and theoretical study." *Can. J. Chem.*, vol. 82, pp. 1668. 2004.
168. Amit Kumar. "Theoretical studies of the antioxidant properties of some flavonoid class of compounds." *Int. J. of Pharmacognosy*, vol. 2, n°7, pp. 351-361. 2015.
169. Alonso C., Lucas R., Barba C., Marti M., Rubio L., Comelles F., Morales J., Coderch L., Parra J. "Skin delivery of antioxidant surfactants based on gallic acid and hydroxytyrosol." *J. of Pharmacy and Pharmacology*, doi 10.1111/jphp.12382. 2014.

-
170. Cruz L., Fernandes I., Guimarães M., De Freitas V., Mateus N. “Enzymatic synthesis, structural characterization and antioxidant capacity assessment of a new lipophilic malvidin-3-glucoside-oleic acid conjugate.” *Food Funct.*, DOI: 10.1039/C6FO00466K. 2016.
171. Huang K., Li Y., Kuo Ch., Twu Y., Shieh Ch. “Highly efficient synthesis of an emerging lipophilic antioxidant: 2-ethylhexyl ferulate.” *Molecules*, vol. 21, pp. 478. 2016.
172. Kaki Sh., Kunduru K., Sanjit Kanjilal, Narayana R. “Synthesis and characterization of a novel phenolic lipid for use as potential lipophilic antioxidant and as a prodrug of butyric acid.” *J. Oleo Sci.*, vol. 64, n°8, pp. 845-852. 2015.
173. Tai A., Sawano Takeshi, Ito H. “Antioxidative properties of vanillic acid esters in multiple antioxidant assays.” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 76, n°2, pp. 314–318. 2012.
174. Materska M., Perucka I. “Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annum* L.)” *J. Agric. Food Chem.*, vol.53, pp.1750–1756. 2005.
175. Rice-Evans C., Miller N., Paganga G. “Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids.” *Free Rad. Biol. & Med.*, vol. 20, n° 7, pp. 933-956. 1996.
176. Mura F., Silva T., Castro C., Borges F., Zuñiga M.C., Morales J., Olea-Azar C. “New insights into the antioxidant activity of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic systems: Spectroscopic, electrochemistry, and cellular studies,” *Free Rad. Res.*, vol. 48, pp. 1473. 2014.
177. Lučić B., AmićD., Trinajstić N. “Antioxidant QSAR Modeling as Exemplified on Polyphenols.” *Methods in Molecular Biology*, vol. 477: Advanced Protocols in Oxidative Stress I, Humana Press, New York, U.S.A. DOI: 10.1007/978-1-60327-517-0_16.