



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

## 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)	
	mediante la técnica spin trap.....	44
4.2.4.4.	Estudio de reactividad frente al anión radical superóxido $O_2^{\cdot-}$ .....	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 $O_2^{\cdot-}$ .....	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-hidroxycumarina) 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-dihidroxycumarina.

**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)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 1 h, baño de hielo; ii)  $\text{NaOH}$ ,  $\text{Ac}_2\text{O}$ , 30 min., baño de hielo (ácido cafeico 6);  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Ac}_2\text{O}$ , 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)  $\text{NaHCO}_3$ , MeOH, acetona, t° amb., 3 h,  $\text{N}_2$ .

**Figura 4.10.** A: Sonda fluoresceína. B: 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) dihidrocloridrato (ABAP) C: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-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 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 electrooxidación 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 electrooxidación 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 electrooxidación 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  $(I_{pa}^0 - I_{pa}^S) / I_{pa}^0$  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  $\mu$ M de cada compuesto. El valor logD se obtuvo a través de la herramienta Marvin Sketch del software ChemAxon.<sup>164</sup>

**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  $E_{\text{onset}}$  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  $\mu\text{M}$  de muestra.

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

**Tabla 5.7.** Valores de  $\text{IA}_{50}$  obtenidos para los compuestos estudiados.

**Tabla 5.8.** Valores obtenidos para la capacidad antioxidante celular (CAC), concentraciones 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  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.