

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

**“EVALUACIÓN CITOTÓXICA Y ANTIOXIDANTE DE NUEVOS
AMINOALCOHOLES DERIVADOS DEL ÁCIDO
DEHIDROABIÉTICO.”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGO PRESENTA:

CAROLINA SANDOVAL ACOSTA

A DE NOVIEMBRE DEL 2014

DR. IVÁN CÓRDOVA GUERRERO CERTIFICA:

ESTA TESIS SE LLEVÓ A CABO BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. IVÁN CÓRDOVA GUERRERO.

AGRADECIMIENTOS:

Quiero agradecer profundamente al Dr. Iván Córdova Guerrero, por creer en mí sin tener antecedente alguno de mi forma de trabajar, de mi capacidad, tan solo con una sola experiencia, me dejó entrar a su laboratorio de química medicinal y productos naturales, le estaré eternamente agradecida por darme la oportunidad de demostrarle mi capacidad de trabajo e investigación, la cual desarrollé durante esta tesis.

Aunque no es por jerarquías, quiero agradecer a todos mis compañeros de laboratorio, Laura, Lupita, Lucía, Nancy, a Eduardo en especial por explicarme todo lo que él sabía y yo no, a Arturo, por ser mi compañero fiel en cuanto a lo profesional y en la amistad, por mostrarme siempre el otro lado de las cosas, el lado paciente.

A la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, por ser la sede de todo mi desarrollo profesional, al director Luis Enrique Palafox Maestre, por su atención a las diversas situaciones que consulté con él. A mis sinodales por aceptar evaluar mi desempeño en la presentación de mi examen de tesis.

También agradezco al centro de graduados del Instituto Tecnológico de Tijuana, por dejarme hacer uso de sus equipos de resonancia magnética nuclear y de espectrometría de masas.

Al Dr. Padrón, del Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González, en España, por proporcionarme los resultados de los estudios citotóxicos de mis compuestos.

La base de todo esto, mi familia, quiero agradecer a todos los integrantes de mi gran familia por estar presentes en el momento del inicio y de la conclusión de mi carrera. Son y serán siempre un ejemplo para mí. A mi madre por apoyarme sin importar de qué le estuviera hablando, a mi hermana por tenerme paciencia, a mi padre por esperar tanto tiempo impacientemente pero aun así confiar, tiempo que al final estoy segura de que le llenará de felicidad.

A MIS PADRES Y HERMANAS

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ÍNDICE DE ANEXOS

ABREVIATURAS

LISTADO DE COMPUESTOS

INTRODUCCIÓN

HIPÓTESIS

OBJETIVO

GENERALIDADES

ANTECEDENTES DEL ÁCIDO DEHIDROABIÉTICO

METODOLOGÍA

RESULTADOS Y DISCUSIONES

DERIVADOS DEL ÁCIDO DEHIDROABIÉTICO Y SUS SÍNTESIS

DERIVADOS DEL ÁCIDO DEHIDROABIÉTICO Y SUS ACTIVIDADES CITOTÓXICAS

DERIVADOS DEL ÁCIDO DEHIDROABIÉTICO Y SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

CONCLUSIONES

APÉNDICES:

-ANEXOS:

ESPECTROS DE INFRARROJO, RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS

-TÉCNICAS EXPERIMENTALES:

MATERIALES Y EQUIPO UTILIZADO

LISTADO DE COMPUES

- (1).- Ácido dehidroabiético.
- (2).- Dehidroabietato de metilo.
- (3).- 12-Acetildehidroabietato de metilo.
- (4).- 12-Hidroxidehidroabietato de metilo.
- (5).-Metil (1R,4aS)-7-isopropil-1,4a-dimetil-6-(oxiran-2-ilmetoxi)-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidrofenantren-1-carboxilato.
- (6).- Metil (1R,4aS)-6-(2-hydroxy-3-(feniletilamino)propoxi)-7-isopropil-1,4a-dimetil-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidrofenantren-1-carboxilato.
- (7).- Metil (1R,4aS)-6-(2-hidroxi-3-(fenilamino)propoxi)-7-isopropil-1,4a-dimetil-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidrofenantreno-1-carboxilato.
- (8).- Metil (1R,4aS)-6-(3-((4-(4-aminobencill)fenill)amino)-2-hidroxipropoxi)-7-isopropil-1,4a-dimetil-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidrofenantren-1-carboxilato.
- (9).-Metil (1R,4aS)-6-(2-hidroxi-3-(piperidin-1-yl)propoxi)-7-isopropil-1,4a-dimetil-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidrofenantren-1-carboxilato.
- (10).-Metil (1R,4aS)-6-(2-hidroxi-3-(pirrolidin-1-yl)propoxi)-7-isopropil-1,4a-dimetil-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidrofenantren-1-carboxilato.

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de agentes medicinales es tan antigua como la misma civilización humana, no se limita a plantas, también animales e incluso minerales se incluyen en ella.

Por eso mismo, es importante definir cuál de los anteriores sectores se pretende investigar, en este caso hablaremos de los productos naturales que se utilizaron y se utilizan como agentes medicinales, provenientes del reino *Plantae*.

Los productos naturales y el descubrimiento de fármacos:

Durante miles de años, la medicina y los productos naturales han estado ligados por el uso de medicina tradicional y plantas, ya sea como prevención y tratamiento de enfermedades, beneficio de la salud e incluso para perjudicarla (envenenamientos). A lo largo de la historia se han suscitado diferentes acontecimientos muy importantes que nos han llevado a indagar más y más en lo que consta a los productos naturales y su uso como medicamentos en distintos lugares del mundo.

El uso de productos naturales, especialmente plantas para curar ciertas enfermedades o malestares, nos lleva a los somerianos y acadianos, en tiempos de Hipócrates (460-377 a.c.), quien fue uno de los primeros autores que describieron los productos naturales de origen animal o vegetal que tenían efectos terapéuticos, enlistó aproximadamente 400 diferentes especies de plantas que servían para diferentes propósitos medicinales [Sarker and Lutfun, 2007:284].

Los registros más antiguos de prácticas terapéuticas, datan del siglo 16 a.c. en el “Ebers Papyrus”, una compilación de recetas y prescripciones en la que varias plantas fueron mencionadas, incluidas el opio, cannabis, mirra, henna, aloe, aceite de castor y ajo, entre muchas otras [Wermuth, 2003:4,5]

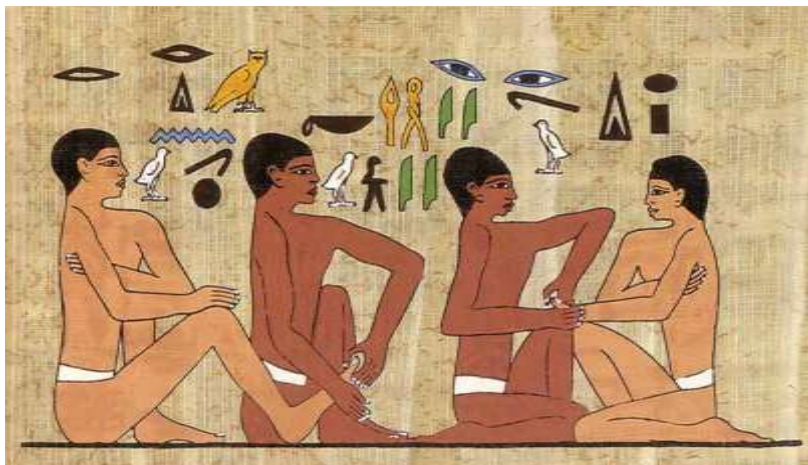


Figura 1.-Mitrídates VI, 132 a.C.



En tiempos pasados, la creación de antidotos se vió incrementada, por los envenenamientos, cuando antes del año 4500 d.c. se utilizaron como armas para cazar presas o para derrotar enemigos en las tribus antiguas. En la europa medieval, los envenenamientos se volvieron una forma común para asesinar. Como consecuencia, aparecieron antidotos como el “Mitridatum” (contenía *opopanax*, hojas de *Malabathrum*, entre otras cosas), utilizado por Mitrídates VI en su búsqueda incansable por un antidoto universal [Muñoz, 2012].

Los fármacos de origen natural, son clasificados como productos naturales originales, los cuales pueden derivarse semisintéticamente de productos naturales, o ser productos sintéticos basados en productos naturales.

Existen en la actualidad diferentes fármacos que provienen de productos naturales, por ejemplo:

Alcaloides de la vinca:

Fueron descubiertos en la década de 1950 por los científicos canadienses Robert Noble y Charles Beer. Proviene de una planta llamada *Vinca rosea*, nativa de Madagascar.

Estos alcaloides han sido utilizados para tratar la diabetes, presión alta e incluso como desinfectantes pero después se descubrió su utilidad en el tratamiento del cáncer (quimioterapias).

Figura 2.-

Algunos de los alcaloides de *Vinca rosea* más destacados son:

Vinblastina, vinorelbina, vincristina y vindesina [The Chemoth.com Website, 2014]

Vinca Rosea

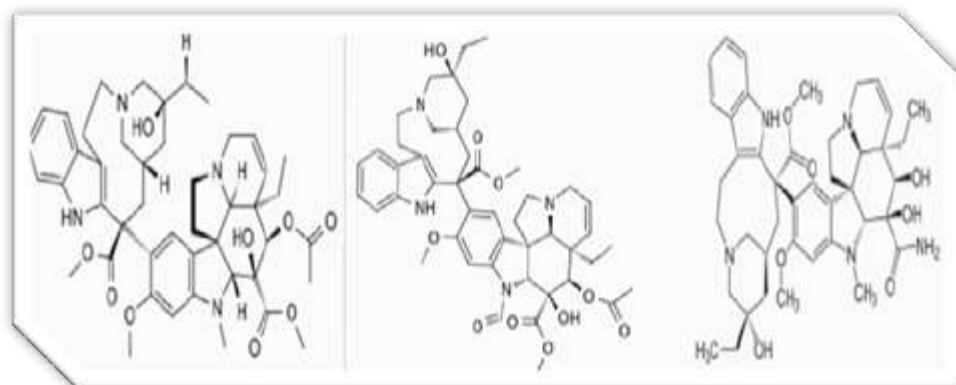


Figura 3.- Vinblastina, Vincristina y Vindesine

Morfina:

La morfina proviene del Opio; planta que ha sido mencionada desde los egipcios y sus propiedades han sido conocidas desde el siglo XVIII d. c.. En 1803, Derosne, un farmacéutico de París, realizó un ensayo del Opio, en el que logró aislar una sal cristalina. Después Sertürner, un farmacéutico austríaco, continuó con el trabajo de Derosne y demostró que el principio activo del Opio tenía características básicas y después logró aislar lo que ahora es conocido como “morfina” [Williams and Thomas, 2008].

Sus usos son principalmente para lograr anestesia y analgesia.



Friedrich Sertürner (1783-1841)

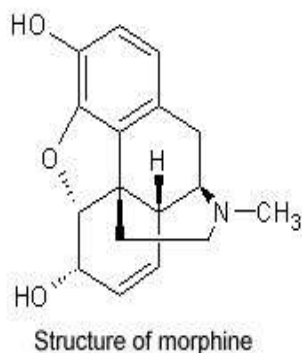


Figura 6.- Opio

Para probar que el producto aislado por Sertürner tenía los mismos efectos que el Opio, lo probó en él mismo y en otros tres jóvenes. Lo nombró “morfina” por el dios griego de los sueños “Morfeo”, por el efecto que describió tener durante el experimento, como de somnoliento [The Role of Chemistry in Hlstory, 2008].

Ácido Acetilsalicílico:

Este tiene propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias. Fue descubierto y sintetizado por primera vez en 1897 por el químico Dr. Felix Hoffmann, pero mucho antes de esto, ya existían registros del uso de la corteza del sauce (fuente de la salicina) para el alivio del dolor, por chinos, egipcios, griegos y romanos.

En 1763, el reverendo Dr. Edward Stone, comunicó el primer trabajo científico sobre el extracto del sauce para el alivio del dolor.

La Salicina es un glucósido alcohólico del que se obtiene el ácido salicílico, y ésta se encuentra en la corteza del sauce.

La corteza de sauce ha sido utilizada tradicionalmente para tratar fiebres (incluso malaria), aunque solo algunas cortezas son ricas en salicina (agente que produce el efecto terapéutico) como son: la especie *Salix* (*S. daphnoides*, *S. purpurea* y *S. fragilis*) [Meier, 2007].

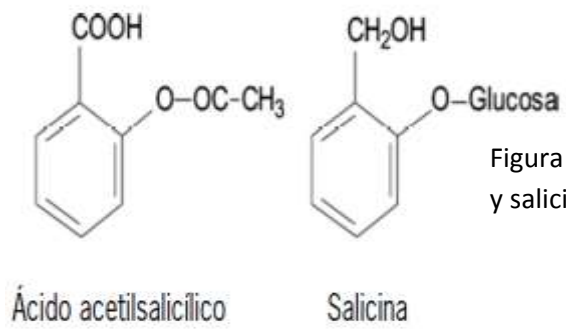


Figura 8.- Estructura del ácido acetilsalicílico y salicina.



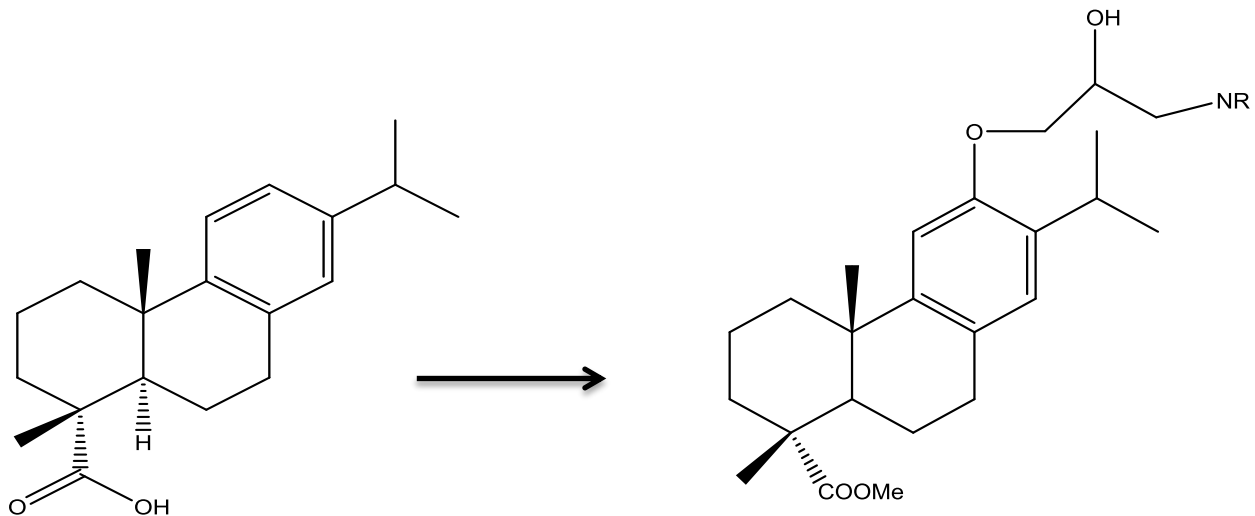
Figura 7.- *Salix daphnoides*

REFERENCIAS

- Wermuth, C. G. *"A Brief History of Drugs: From Plant Extracts to Dna Technology."* *The Practice of Medicinal Chemistry*. 2nd ed. Amsterdam: Academic, 2003.
- Muñoz Páez. A., *"Hélade y Roma" Historia del veneno: De la circuta al Polonio*. España, 2012.
- Sarker, Satyajit D., and Lutfun Nahar. *"Natural Products in Chemistry."* *Chemistry for Pharmacy Students: General, Organic and Natural Product Chemistry*. Chichester, England: John Wiley & Sons, 2007.
- The Chemoth.com Website, <http://chemoth.com/>, [5 Nov 2014]
- Williams, David A., and Thomas L. Lemke. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
- The Role of Chemistry in History, <http://itech.dickinson.edu/chemistry/?p=696>, 2008, [5 Nov 2014]
- Beat Meier, *"La corteza de sauce como analgésico y antirreumático"*, *Revista de Fitoterapia* 2002, 2 (2): 141-149.

HIPÓTESIS

La actividad citotóxica de los derivados de tipo aminoalcohol provenientes del ácido dehidroabiético es destacada así como su actividad antioxidante.



Esquema 1.- Ácido dehidroabiético a aminoalcoholes derivados.

OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICO

OBJETIVO GENERAL:

-Sintetizar una serie de aminoalcoholes derivados del diterpeno ácido dehidroabiético y probar su citotoxicidad mediante un bioensayo invitro así como su actividad antioxidante.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar una ruta de síntesis a partir del ADHA a un epóxido derivado del mismo.
- Llevar a cabo aminólisis del epóxido con diferentes aminas y así sintetizar aminoalcoholes.
- Caracterización de compuestos mediante RMN, espectrometría de masas e infrarrojo.
- Realizar un ensayo citotóxico para medir la actividad de los aminoalcoholes sintetizados.
- Realizar un ensayo antioxidante, específicamente ABTS y probar la actividad de los aminoalcoholes.

GENERALIDADES

GENERALIDADES DE LOS TERPENOS

Los terpenos son compuestos orgánicos que se encuentran en una variedad de plantas, particularmente en coníferas e incluso en algunos insectos que los producen. Las plantas los producen para protegerse de los herbívoros al atraer a sus depredadores [Martin y colaboradores, 2002].

Derivan sintéticamente del isopreno, ya sea de una o varias unidades del mi

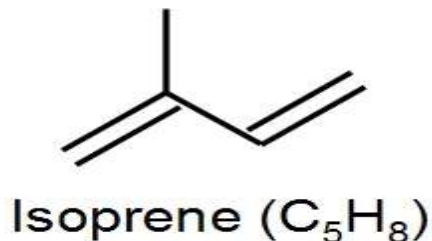


Figura 9.- Estructura del Isopreno.

Tipos de terpenos:

-Hemiterpenos: Contienen una sola unidad de isopreno.

-Monoterpenos: Contienen dos unidades de isopreno, son aceites volátiles como limoneno, mentol y pineno.

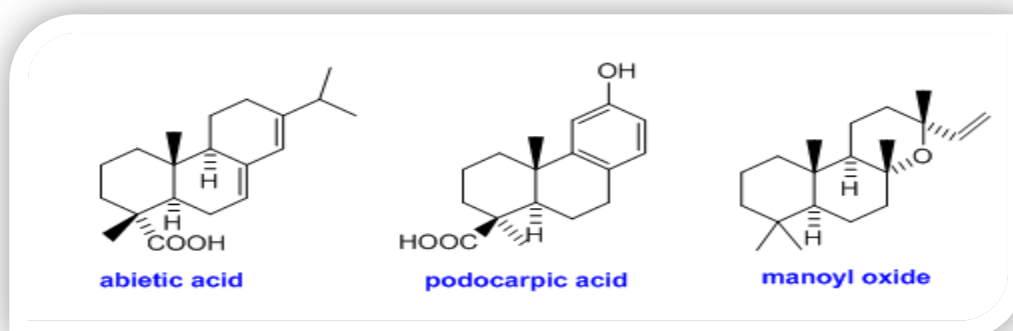
-Diterpenos: Se componen de cuatro unidades de isopreno, algunos ejemplos son taxadieno (que es un precursor del taxol).

-Triterpenos: Consisten en 6 unidades de isopreno.

-Tetraterpenos: Contienen 8 unidades de isopreno, un ejemplo de ellos es el licopeno y el beta caroteno.

-Politerpenos: Consisten en varias unidades de isopreno (más de ocho).

Figura 10.- Ejemplos de diterpenos



DITERPENOS DE TIPO ABIETANO Y SUS APLICACIONES

Entre los terpenos, los diterpenos son el grupo con mayor número de compuestos en su clasificación, el cual a su vez, se divide en subgrupos: abietanos, clerodanos, pimaranos, labdanos e icetaxanos. [Wu y colaboradores, 2012].

Los abietanos y abietanos reordenados conforman el grupo más grande de diterpenos provenientes de *Salvia* conocidos.

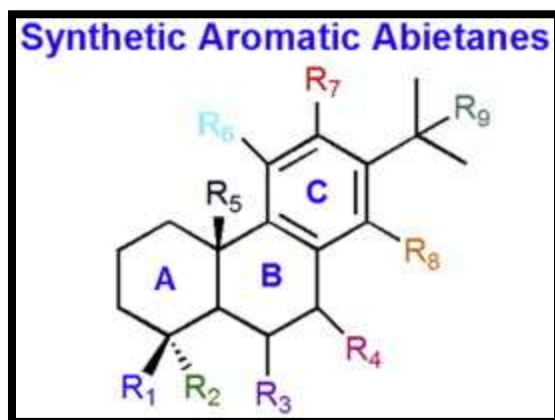


Figura 11.- Estructura de diterpenos aromáticos de tipo abietano.

Durante los últimos años, la investigación sobre síntesis y diferentes actividades de diterpenos de tipo abietano, en especial los del ácido dehidroabiético se ha visto intensamente incrementada. Las modificaciones en los anillos B y C y la manipulación del grupo carboxilo en el carbono-18, han sido las modificaciones que han sobresalido en las investigaciones. Los diterpenos abietanos han demostrado tener diferentes actividades como son: antimicrobiana, antiulcerosa, cardiovascular y antitumoral [Anpai y colaboradores 2003].

INVESTIGACIONES RECIENTES SOBRE DITERPENOS DE TIPO ABIETANO

El cáncer sigue ocupando los primeros puestos de causa de muerte a nivel mundial, debido a que es una enfermedad diversa, compleja y solo algunas certezas se tienen sobre la misma. Alrededor del 80% de los fármacos utilizados para el cáncer, son productos naturales o derivados de productos naturales. Por esta razón, se ha indagado más a fondo realizando investigaciones sobre la citotoxicidad que pueden causar los diterpenos de tipo abietano [M. Akaberi y colaboradores, 2014].

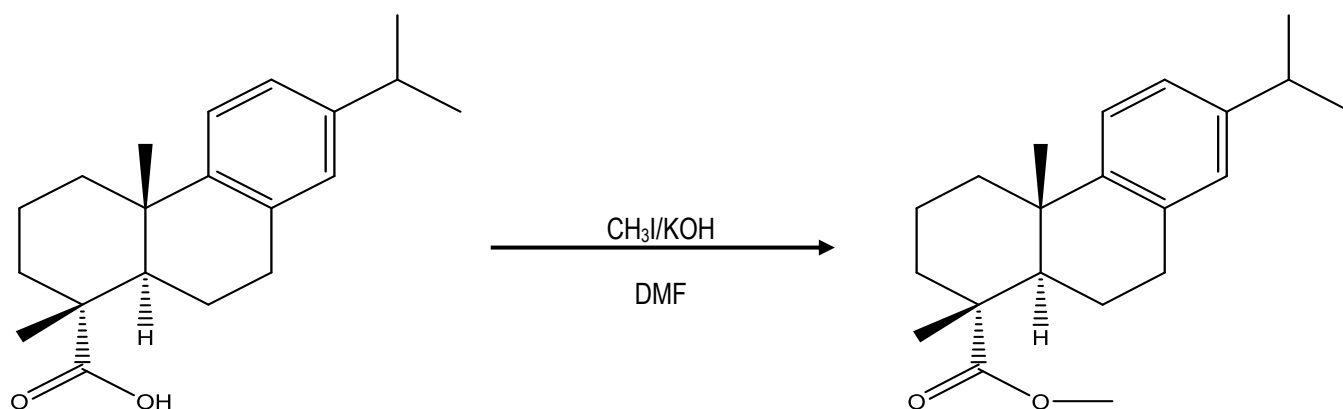
Por estas razones, científicos han hecho hincapié en sintetizar nuevos derivados de los diterpenos de tipo abietano, diferentes grupos funcionales: aldehídos, cetonas, iminas, aminas, alcoholes, entre otros. Por ejemplo, I. Córdova y colaboradores, propusieron sintetizar β -aminoalcoholes a partir del sugiol (diterpeno de tipo abietano)

REFERENCIAS

- D. Martin, D. Tholl, J. Gershenzon, J. Bohlmann, *Plant Physiol.* 129 (2002) 1003–1018.
- Wu, Y.-B., Ni, Z.-Y., Shi, Q.-W., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y.-C., Cong, B. "Constituents from *Salvia* species and their biological activities". *Chem. Rev.* 112, (2012) 5967–6026.
- M. González, "Synthetic derivatives of aromatic abietane diterpenoids and their biological activities" *European Journal of Medicinal Chemistry* 87 (2014) 834e842
- M. González, D. Pérez-Guaita, J. Correa-Royer, B. Zapata, L. Agudelo, A. Mesa-ArangO, L. Betancur-Galvis, "Synthesis and biological evaluation of dehydroabietic acid derivatives", *European Journal of Medicinal Chemistry* 45 (2010) 811–816.
- M. Akaberi, S. Mehri, M. Iranshahi, "Multiple pro-apoptotic targets of abietane diterpenoids from *Salvia* species", *Fitoterapia* (2014).

METODOLOGÍA:
PARTE EXPERIMENTAL

“ESQUEMA 2: METILACIÓN DEL ÁCIDO DEHIDROABIÉTICO (1)”



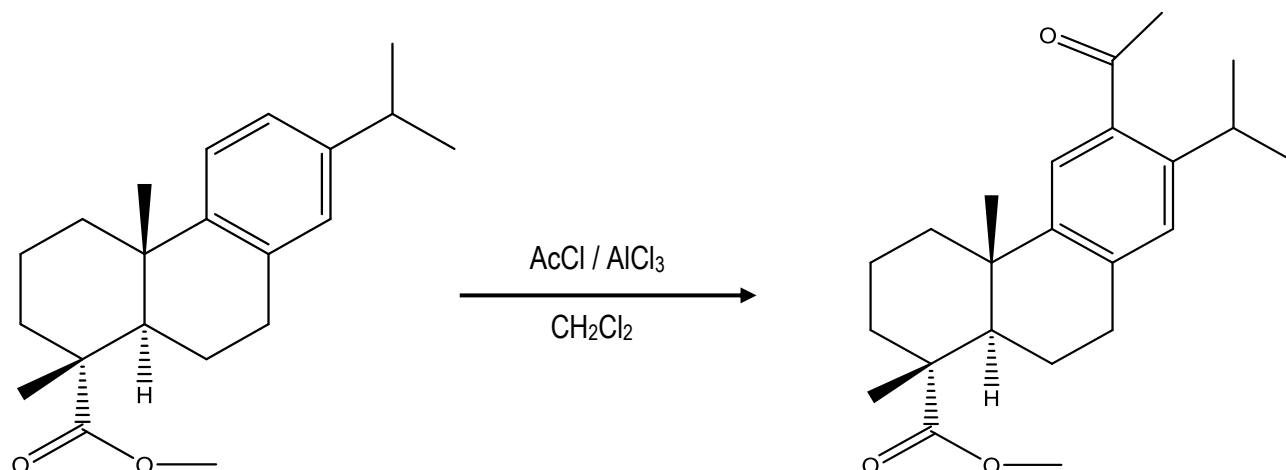
A una solución previamente agitada por 15 minutos de KOH (13.32 mmoles, 2 eq.) en 20 mL de DMF , se le agrega 2g de ADHA (6.66 mmoles) y se deja en agitación por 10 minutos, posteriormente se le adiciona lentamente 1.66 mL de CH_3I (26.64 mmoles, 4 eq.) y la reacción se deja en agitación durante 2 horas con atmósfera de nitrógeno. La reacción se paró agregando 100 mL de agua para. El producto se extrae con diclorometano, se seca con Na_2SO_4 anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida en el rotavapor. La purificación cromatográfica se lleva a cabo mediante una columna de gel de sílice eluida con n-Hexano/acetato de etilo al 2%, obteniendo 1.85 g del producto Dehidroabietato de metilo ($R=88\%$).

Dehidroabietato de metilo

Fórmula molecular: $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2$

Aspecto físico: Sólido blanco.

“ESQUEMA 3: ACILACIÓN DEL DEHIDROABIETATO DE METILO (2)”



1.85 g (5.88 mmoles) de dehidroabietato de metilo se mezclan con 20 mL de CH₂Cl₂ y 2.3 mL (32.36 mmoles, 5.5 eq.) de cloruro de acetilo. Enseguida se adiciona, lentamente, 3.76 g (28.24 mmoles, 4.8 eq.) de AlCl₃ y se deja en agitación, bajo atmósfera inerte durante 24 horas. La reacción se para colocándola en un baño de agua con hielo y acidulándola con 50 mL de una solución 6 N de HCl. Se extrae la fase orgánica con éter etílico, ésta se lava con disoluciones saturadas de NaHCO₃ y NaCl, posteriormente se seca con Na₂SO₄ anhidro. Se elimina el disolvente a presión reducida en el rotavapor. El crudo de reacción se purifica mediante una columna cromatográfica de gel de sílice, eluida con la fase n-Hexano/acetato de etilo al 4%, se obtienen 1.78 g del producto 12-acetildehidroabietato de metilo, con un rendimiento del 85%.

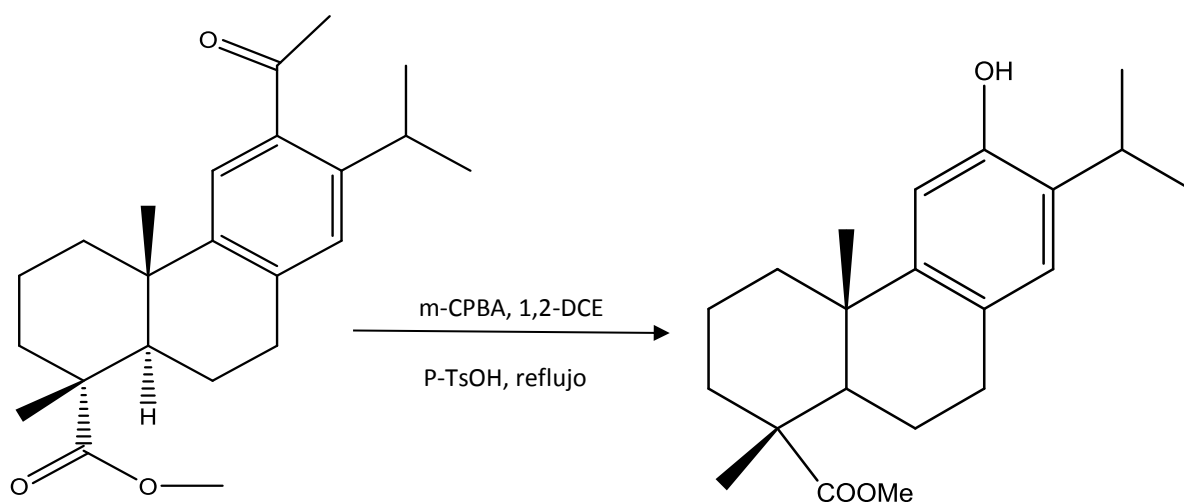
12-Acetildehidroabietato de metilo (3)

Fórmula molecular: C₂₃H₃₂O₃

Aspecto físico: Sólido amarillento.

PF: 132-133°C

“ESQUEMA 4: OXIDACIÓN E HIDRÓLISIS DEL 12-ACETILDEHIDROABIETATO DE METILO (3)”



Una mezcla de 1.78 g (5 mmol) de 12-acetildehidroabietato de metilo, 30 mL de 1,2-dicloroetano, 2.16 g (12.5 mmol, 2.5 eq) de m-CPBA y 0.95g (5 mmol, 1 eq) de ácido p-toluensulfónico, se calentó a reflujo durante 8 horas. La mezcla de reacción se enfrió y se extrajo con éter dietílico, la fase orgánica se lavó con disoluciones de NaHCO_3 al 5 %, NaHSO_3 al 5% y con una disolución saturada de NaCl ; se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se rotaevaporó el disolvente. El crudo de reacción se purificó utilizando una columna cromatográfica de gel de sílice eluída con la mezcla n-Hexano/éter dietílico al 8%. Se obtuvieron 1.32 g de producto puro con un rendimiento de 80%.

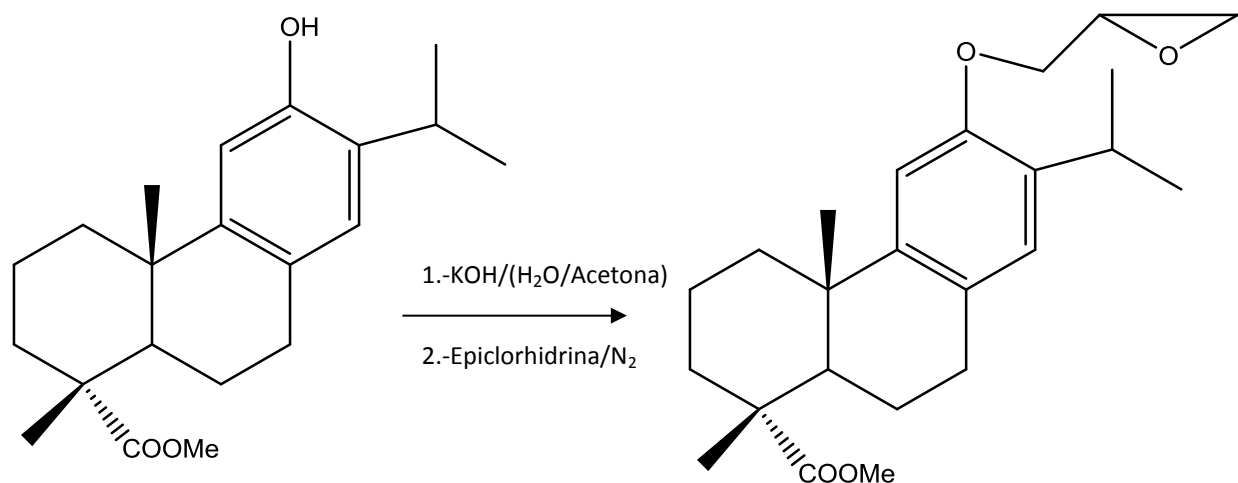
12-Hidroxidehidroabietato de metilo (4)

Fórmula molecular: $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_3$

Aspecto físico: Sólido blanco

PF: 160-162°C

“ESQUEMA 5: INCORPORACIÓN DE LA EPICLORHIDRINA AL 12-HIDROXIDEHIDROABIETATO DE METILO (4)”



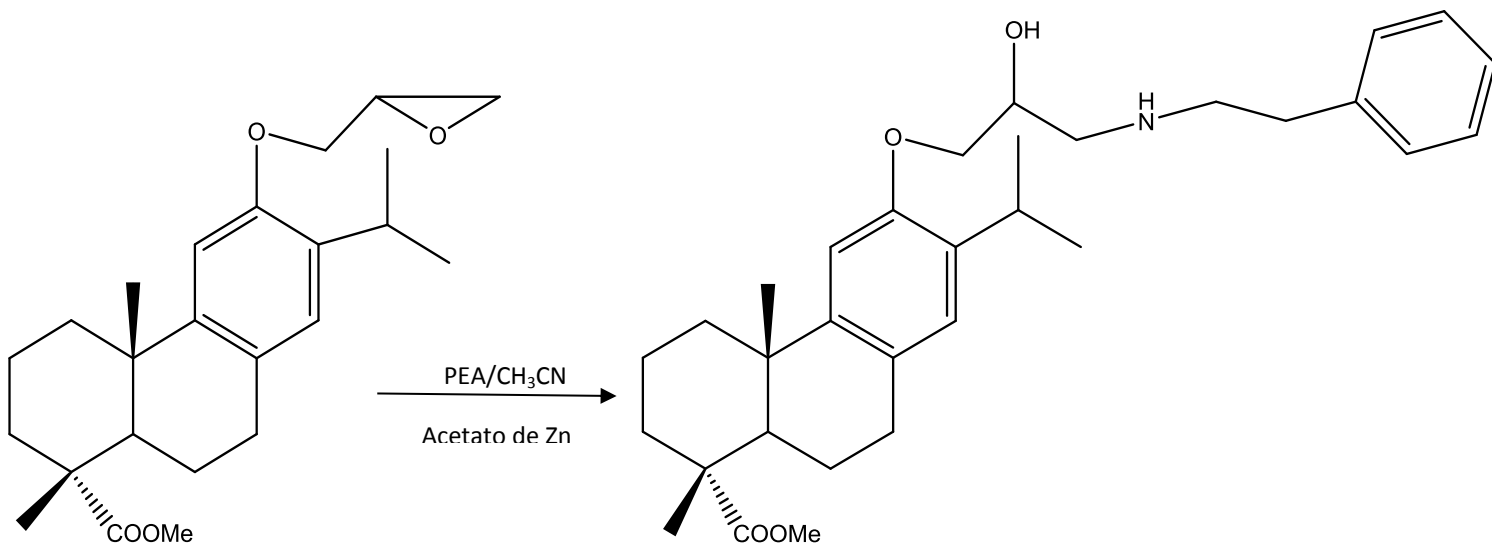
A una disolución de 1.3 g (3.94 mmol) de 12-hidroxi-hidroabietato de metilo en 15 mL de acetona/H₂O (9:1), se le agregó 0.22 g (3.94 mmol, 1 eq) de KOH y se puso en agitación con atmósfera de Nitrógeno durante 15 minutos. Después con una jeringa se adicionó a temperatura ambiente y por las paredes del matraz, 1.23 mL (15.75 mmol, 4 eq) de epichlorhidrina durante 5 minutos. Se dejó la mezcla en agitación durante 48 horas. La reacción se paró adicionando xx mL de agua destilada y la fase orgánica se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con 100 mL de solución saturada de NaCl y se secó con Na₂SO₄. El disolvente se eliminó a rotavapor. El crudo de reacción se purificó utilizando una columna cromatográfica de gel de sílice, eluída con una mezcla de hexano/acetato al 2%. Se obtuvieron 1.1g de producto con un rendimiento de 70%.

Metil (1R,4aS)-7-isopropil-1,4a-dimetil-6-(oxiran-2-ilmetoxi)-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidrofenantren-1-carboxilato. **(5)**

Fórmula molecular: C₂₄H₃₄O₄

Aspecto físico: Resina transparente.

“ESQUEMA 6: AMINÓLISIS DEL EPÓXIDO (5) CON FENILETILAMINA”



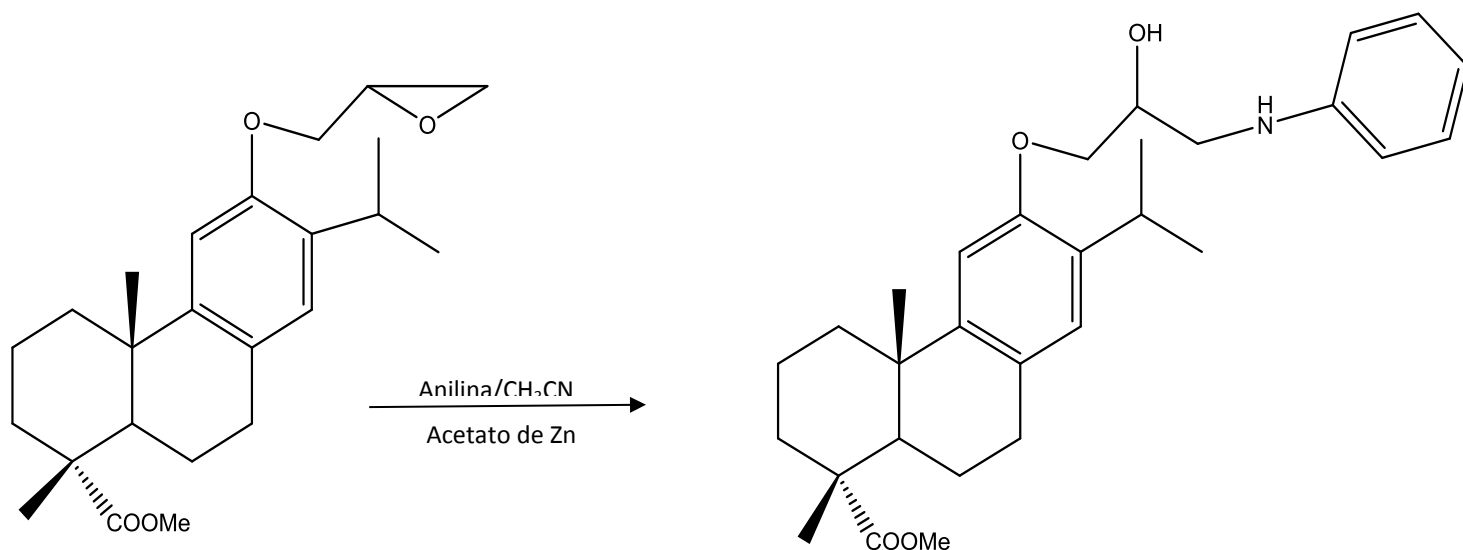
A una disolución de 62.5 mg (0.17 mmol) de epóxido (**5**) en 3 mL de acetonitrilo, se le agregaron 0.15 mg de acetato de zinc (8.5×10^{-4} , 0.005 eq) como catalizador y se dejó en agitación durante 15 minutos. Posteriormente se agregaron 37.6 mg de feniletilamina (0.34 mmol, 2 eq) previamente disuelta en 2 mL de acetato de nitrilo. Por último, la reacción se puso a reflujo (85-90 °C) durante 12 horas. La reacción se enfrió y se hicieron extracciones de la fase orgánica con acetato de etilo, a la fase orgánica se le hicieron lavados con brine y se secó con Na₂SO₄. El disolvente se rotaevaporó y el crudo de reacción se purificó utilizando una columna cromatográfica de gel de sílice, eluída con una mezcla de hexano/acetato al 20%, 40% y 70%. Se obtuvieron 56 mg de producto puro con un rendimiento de 68%.

Metil (1R,4aS)-6-(2-hydroxy-3-(feniletilamino)propoxi)-7-isopropil-1,4a-dimetil-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidrofenantren-1-carboxylate (**6**)

Fórmula molecular: C₃₂H₄₅NO₄

Aspecto físico: Sólido blanco.

“ESQUEMA 7: AMINÓLISIS DEL EPÓXIDO (5) CON ANILINA”



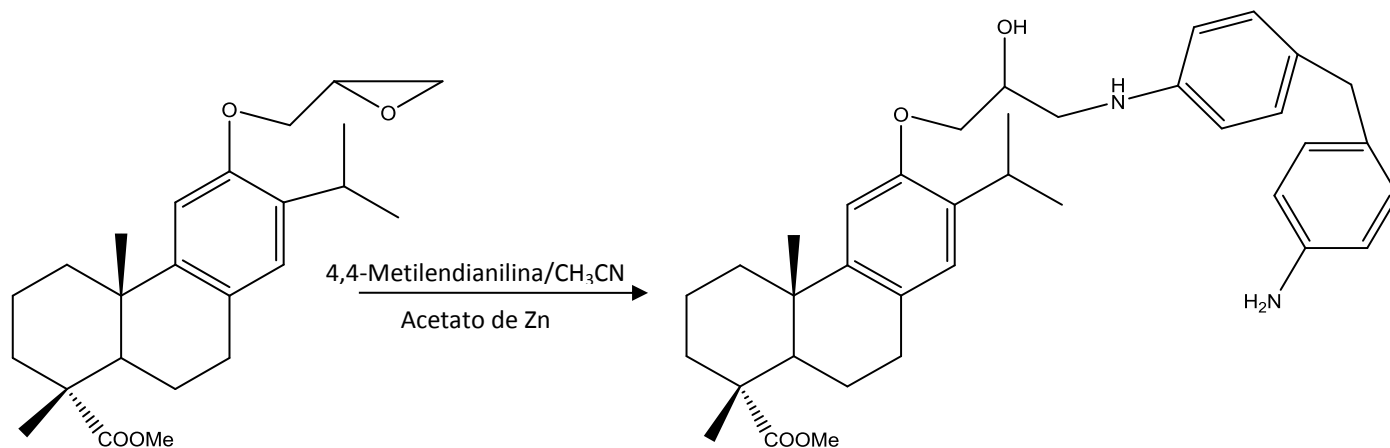
A una disolución de 80 mg (0.2 mmol) de epóxido (**5**) en 3 mL de acetonitrilo, se le agregaron 0.18 mg de acetato de zinc (0.001mmol, 0.005 eq) como catalizador y se dejó en agitación durante 15 minutos. Posteriormente se agregó 37.2 mg anilina (0.4 mmol, 2 eq) previamente disuelta en 2 mL de acetato de nitrilo. Por último, la reacción se puso a reflujo (85-90 °C) durante 12 horas. La reacción se enfrió y se hicieron extracciones de la fase orgánica con acetato de etilo, a la fase orgánica se le hicieron lavados con brine y se secó con Na₂SO₄. El disolvente se rotaevaporó y el crudo de reacción se purificó utilizando una columna cromatográfica de gel de sílice, eluída con una mezcla de hexano/acetato al 6%. El rendimiento obtenido fue de 60 %.

Metil (1R,4aS)-6-(2-hidroxi-3-(fenilamino)propoxi)-7-isopropil-1,4a-dimetil-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidrofenantreno-1-carboxilato. (**7**)

Fórmula molecular: C₃₀H₄₁NO₄

Aspecto físico: Resina amarilla.

“ESQUEMA 8: AMINÓLISIS DEL EPÓXIDO (5) CON 4,4-METILENDIANILINA”



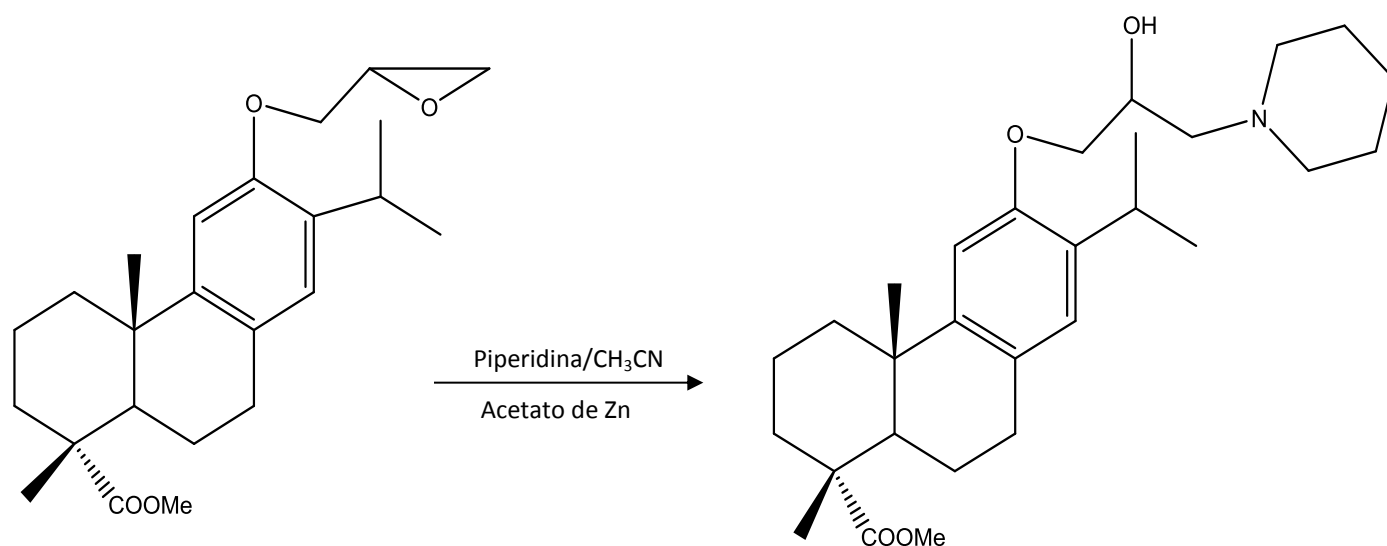
A una disolución de 62.5 mg (xxmmol) de epóxido (**5**) en 3 mL de acetonitrilo, se le agregó acetato de zinc (xxg, 0.005 eq) como catalizador y se dejó en agitación durante 15 minutos. Posteriormente se agregó 4,4-metilendianilina (xg, 2 eq) previamente disuelta en 2 mL de acetato de nitrilo. Por último, la reacción se puso a reflujo (85-90 °C) durante 12 horas. La reacción se enfrió y se hicieron extracciones de la fase orgánica con acetato de etilo, a la fase orgánica se le hicieron lavados con brine y se secó con Na₂SO₄. El disolvente se rotaevaporó y el crudo de reacción se purificó utilizando una columna cromatográfica de gel de sílice, eluída con una mezcla de hexano/acetato al 6%. El rendimiento obtenido fue de 70%.

Metil(1R,4aS)-6-(3-((4-(4-aminobencill)fenill)amino)-2-hidroxipropoxi)-7-isopropil-1,4a-dimetil-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidrofenantren-1-carboxilato. (**8**)

Fórmula molecular: C₃₇H₄₈N₂O₄

Aspecto físico: Sólido café.

“ESQUEMA 9: AMINÓLISIS DEL EPÓXIDO (5) CON PIPERIDINA”



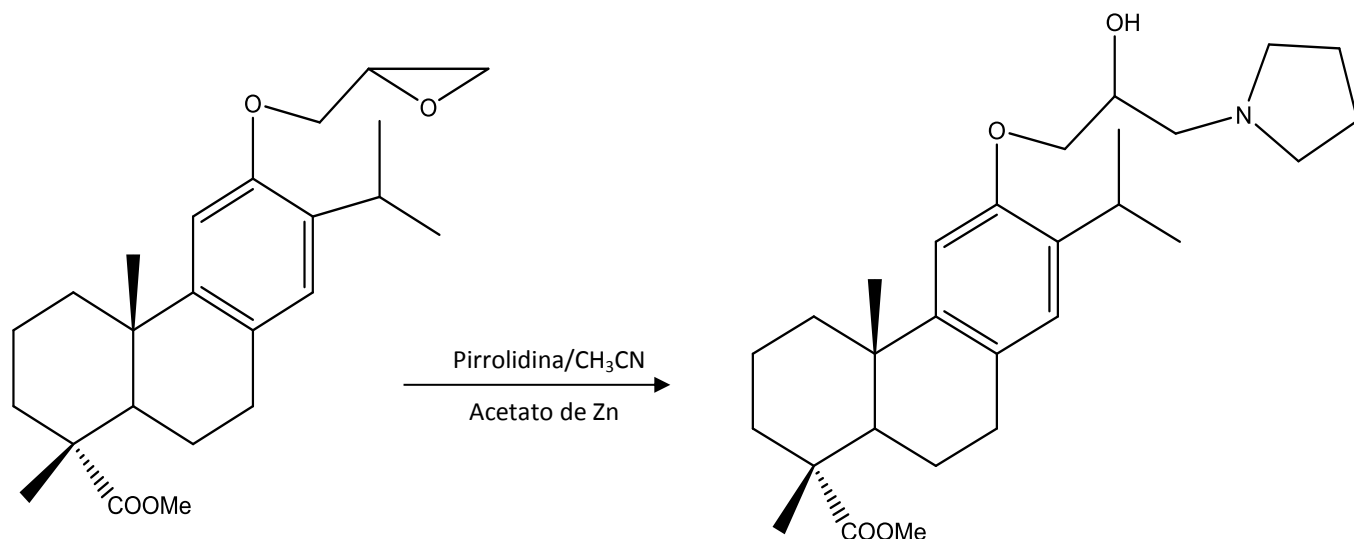
A una disolución de xxg (xxmmol) de epóxido (5) en 3 mL de acetonitrilo, se le agregó acetato de zinc (xxxg, 0.005 eq) como catalizador y se dejó en agitación durante 15 minutos. Posteriormente se agregó piperidina (xxg, 2 eq) previamente disuelta en 2 mL de acetato de nitrilo. Por último, la reacción se puso a reflujo (85-90 °C) durante 12 horas. La reacción se enfrió y se hicieron extracciones de la fase orgánica con acetato de etilo, a la fase orgánica se le hicieron lavados con brine y se secó con Na₂SO₄. El disolvente se rotaevaporó y el crudo de reacción se purificó utilizando una columna cromatográfica de gel de sílice, eluída con hexano/acetato de etilo al 10%, 20%, 30%, acetato de etilo y metanol. El rendimiento obtenido fue de xx%.

Metil (1R,4aS)-6-(2-hidroxi-3-(piperidin-1-yl)propoxi)-7-isopropil-1,4a-dimetil-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidrofenantren-1-carboxilato. (9)

Fórmula molecular: C₂₉H₄₅NO₄

Aspecto físico: Resina café

“ESQUEMA 10: AMINÓLISIS DEL EPÓXIDO (5) CON PIRROLIDINA”



A una disolución de xxg (xxmmol) de epóxido (**5**) en 3 mL de acetonitrilo, se le agregó acetato de zinc (xxxg, 0.005 eq) como catalizador y se dejó en agitación durante 15 minutos. Posteriormente se agregó pirrolidina (xxg, 2 eq) previamente disuelta en 2 mL de acetato de nitrilo. Por último, la reacción se puso a refluxo (85-90 °C) durante 12 horas. La reacción se enfrió y se hicieron extracciones de la fase orgánica con acetato de etilo, a la fase orgánica se le hicieron lavados con brine y se secó con Na₂SO₄. El disolvente se rotaevaporó y el crudo de reacción se purificó utilizando una columna cromatográfica de gel de sílice, eluída con mezclas de hexano/acetato de etilo al 10%, 20%, 30%, acetato de etilo y metanol. El rendimiento obtenido fue de 75%.

Metil (1R,4aS)-6-(2-hidroxi-3-(pirrolidin-1-yl)propoxi)-7-isopropil-1,4a-dimetil-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidrofenantren-1-carboxilato. (**10**)

Fórmula molecular: C₂₈H₄₃NO₄

Aspecto físico: Resina anaranjada oscura.

**CAPITULO II: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS DERIVADOS DE TIPO AMINOALCOHOL
PROVENIENTES DEL ÁCIDO DEHIDROABIÉTICO:**

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y RADICALES LIBRES

ROS (especies reactivas de oxígeno) incluyen a los radicales de oxígeno, como el superóxido, hidroxilo, peroxilo y a algunos agentes oxidantes no radicales como el peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso y ozono. A niveles fisiológicos normales, los ROS funcionan como mensajeros “redox” en la señalización y regulación intracelular, en donde el exceso de ROS causa daño celular a macromoléculas como son los lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, todo esto mediante la inducción de modificaciones oxidativas y promoviendo muerte celular.

Como resultado, causan inflamación o lesiones en varios órganos y son asociados con enfermedades como arteriosclerosis, artritis y algunos tipos de cáncer.

Junto con los sistemas de defensa endógenos, los suplementos antioxidantes exógenos limitan o previenen los efectos causados por el exceso de ROS.

Debido a los efectos adversos de antioxidantes sintéticos como el Butilhidroxianisol (BHA), los antioxidantes naturales derivados de plantas medicinales son los que llaman la atención de los científicos, en la búsqueda de alternativas. [C. Balsano: 2009]

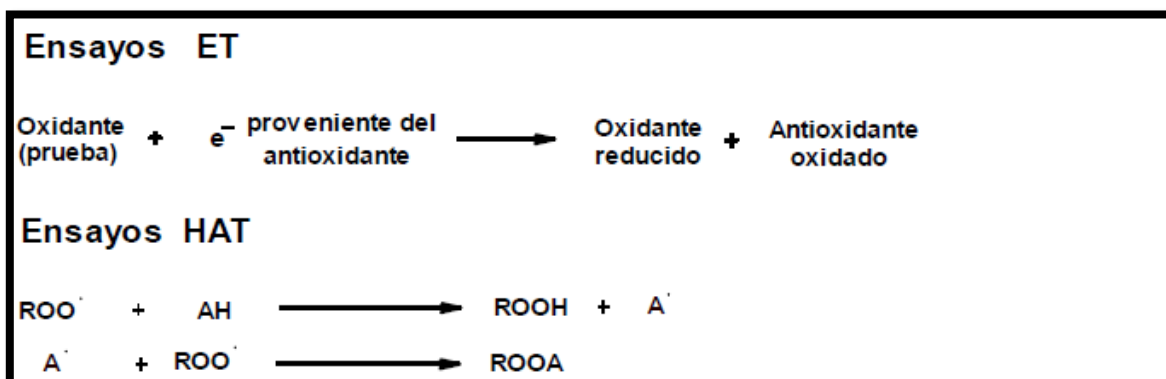
La actividad antioxidante no puede medirse directamente pero puede determinarse por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado. Para determinar la actividad antioxidante de compuestos puros, se han desarrollado varios métodos, entre ellos existe el de ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfónico). [M. L. Circu, T. Y. Aw: :2010]

Entre los diferentes ensayos para determinar la actividad antioxidante, existen:

ENSAYO	CATEGORÍA
Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico (ABTS)	Transferencia de electrones
1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH●)	Transferencia de electrones
Poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP)	Transferencia de electrones
N,N- dimetil-p-fenilendiamina (DMPD)	Transferencia de electrones
Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC)	Transferencia de electrones
Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC)	Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)
Parámetro antioxidante de captura de radicales (TRAP)	Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)
Inhibición de la oxidación del ácido linoleico	Ensayos basados en la transferencia de átomos de

Inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad (LDL)	hidrógeno (HAT) Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)
--	---

Los ensayos basados en la transferencia de electrones (ET) involucran una reacción redox con el oxidante como un indicador del punto final de reacción. La mayoría de los ensayos basados en HAT monitorean una reacción cinética competitiva, generalmente están compuestos de un generador de radical libre sintético, una prueba molecular oxidable y un antioxidante. Los ensayos basados en HAT y ET fueron desarrollados para medir la capacidad de atrapar radicales libres, en lugar de la capacidad preventiva antioxidante de una muestra (Huang y colaboradores, 2005).



ENSAYO ABTS

El ensayo original de ABTS estaba basado en la activación de la metilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir un radical catión, en presencia o ausencia de antioxidantes. Este fue criticado debido a que la reacción rápida de los antioxidantes, contribuye a la reducción del radical ferrilmioglobina.

Un formato más apropiado para el ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes (Re y colaboradores., 1999).

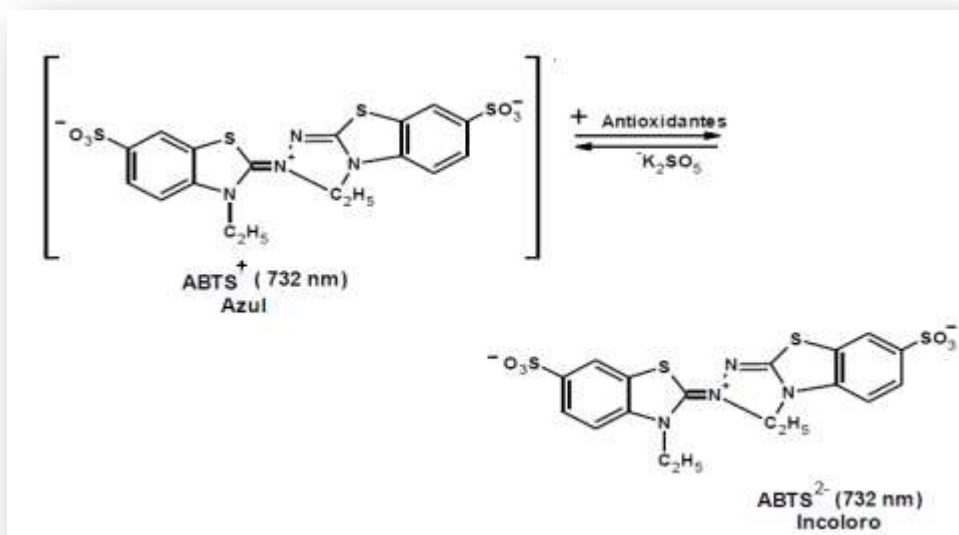


Figura 12: Ensayo de ABTS,

reacciones involucradas

Zuleta y col., 2009.

La técnica mejorada para la generación del radical catión ABTS, implica la producción directa del cromóforo ABTS verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio (K₂S₂O₈). Este presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión ABTS está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando la vitamina C como estándar, bajo las mismas condiciones.

PARTE EXPERIMENTAL

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE DITERPENOS

- Se prepara una disolución de 0.003 g de Persulfato de Potasio, 0.0194 g de ABTS y 5 mL de agua destilada, esta disolución se deja reposar por 16 horas en la oscuridad debido a que el ABTS es lábil a la luz.
- Después se toman 150 microlitros de la solución y se le agregan a 15 mL de EtOH.
- Se lee la absorbancia de la solución en un equipo de espectrometría UV, a 754 nm, ésta lectura será la absorbancia inicial.
- De la misma solución, se toma 1 mL y se le agrega a 20 μ L de la solución del compuesto (1 mg).
- Se deja reposar en total oscuridad, durante 7 minutos.
- Se mide la absorbancia de cada compuesto a evaluar y éstas serán las absorbancias finales.
- Se calcula el porcentaje de inhibición del radical ABTS con la siguiente fórmula:

$$\% \text{Inhibición} = (\text{ABS INICIAL} - \text{ABS FINAL} / \text{ABS INICIAL}) * 100$$

Figura 13: Fórmula para calcular % de inhibición del radical ABTS.

REFERENCIAS

-Huang D., Ou B., Prior R.L. (2005). "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 53: 1841–1856.

-Re R., Pellegrini Ni., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999), "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*" 26: 1231–1237.

-M. L. Circu, T. Y. Aw, "Free Radical Biol. Med". 48 (2010) 749

-C. Balsano, A. Alisi," *Curr. Pharm. Des*". 15 (2009) 3063

RESULTADOS Y DISCUSIONES

ENSAYO ABTS:

Los resultados fueron los siguientes:

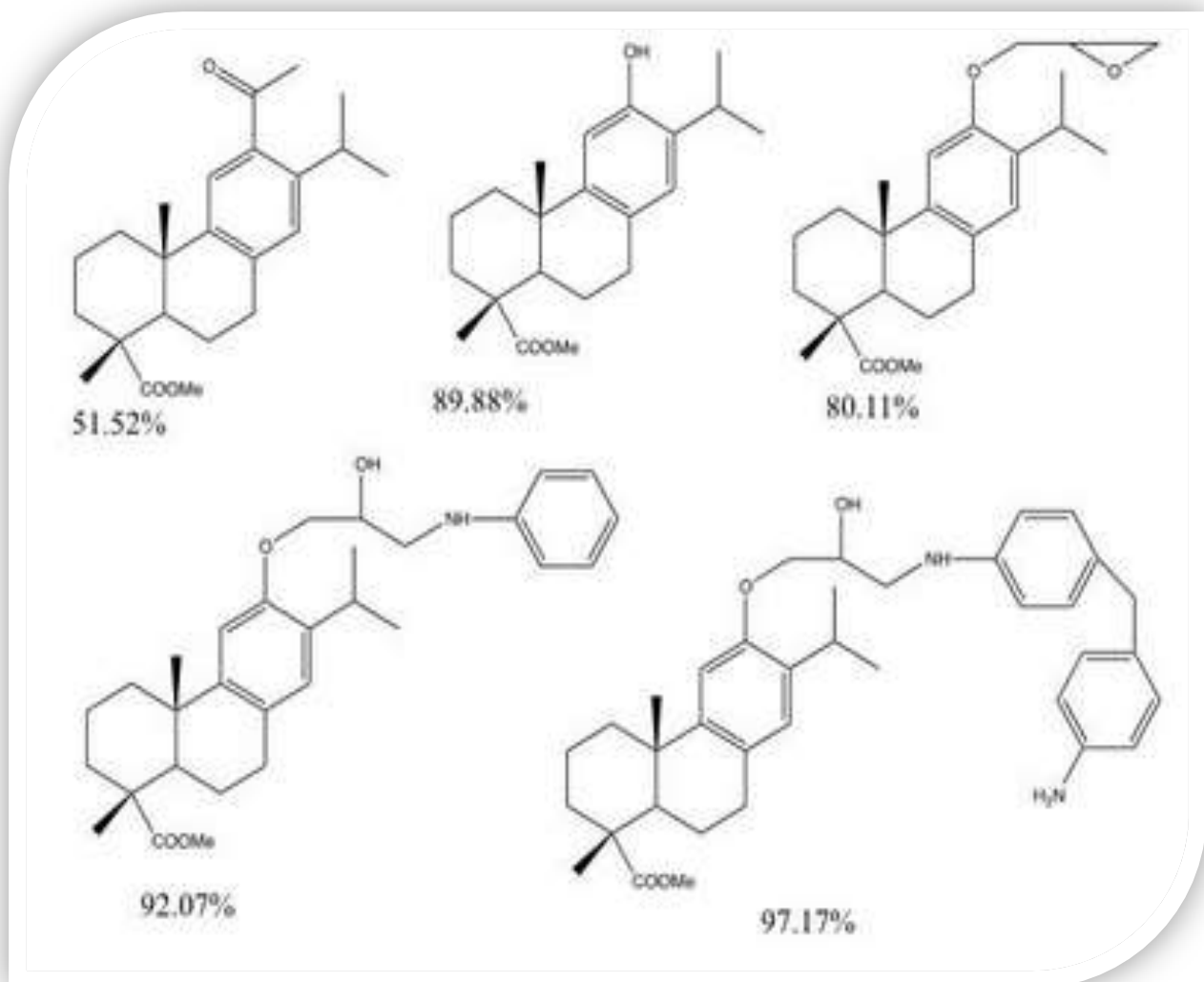
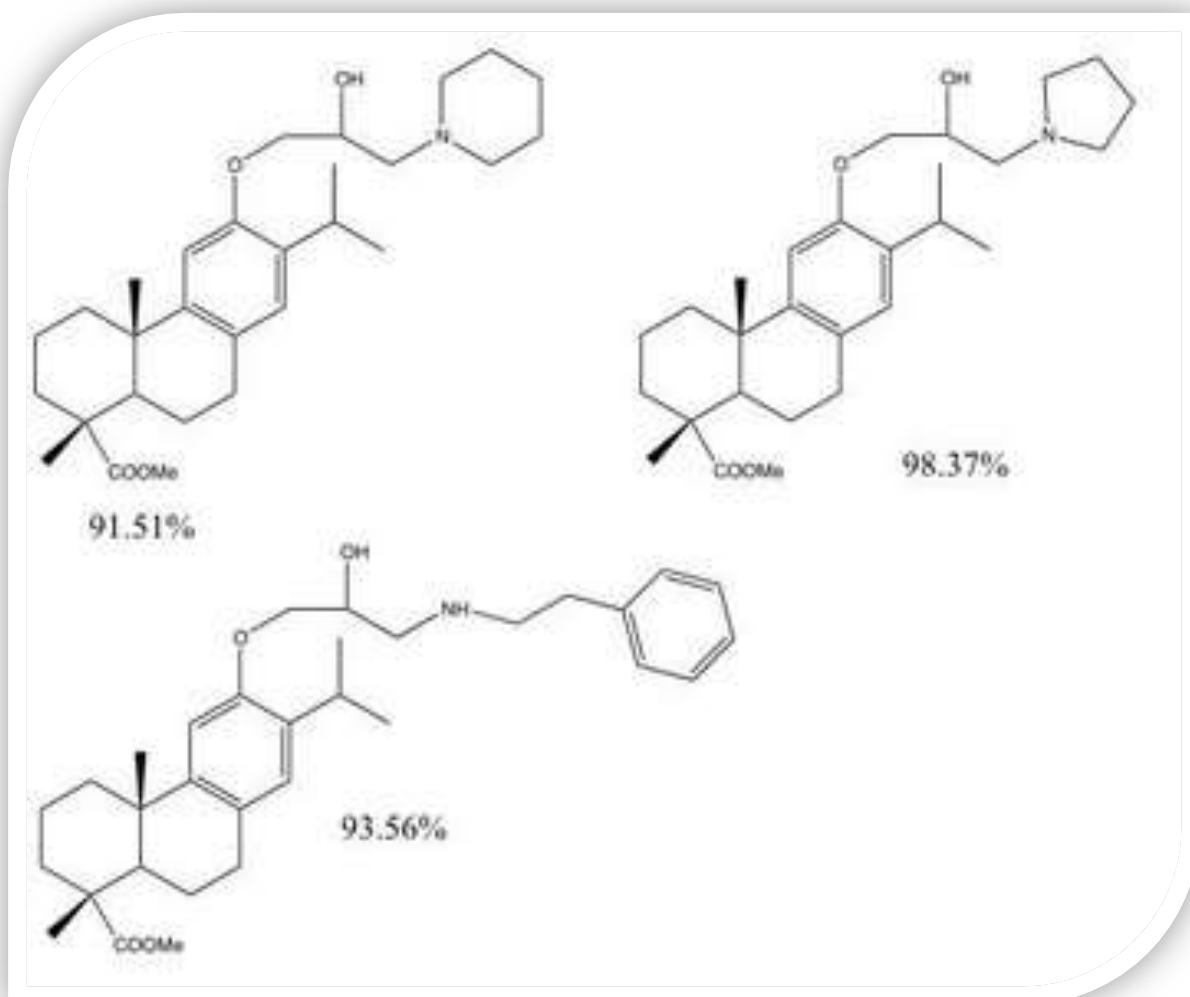


Figura 14.- Compuestos: 3, 4, 5, 7, 8

Figura 15.- Compuestos 9, 10 y 6.



Como podemos observar, el compuesto 10, presenta la mayor actividad antioxidante. Este compuesto está conformado por la pirrolidina, que comparado con el control positivo Vitamina C (98.6%), es casi igual de efectivo respecto a la actividad antioxidante.

En segundo lugar tenemos al compuesto 8, conformado por un aminoalcohol proveniente de la metilendianilina, sigue siendo alto su porcentaje de inhibición, comparado con Vitamina C.

En tercer lugar tenemos al compuesto 6, conformado por un aminoalcohol proveniente de la feniletilamina, el cual sigue como los anteriores, mostrando una actividad muy alta de 93.56 %.

En cuarto lugar tenemos al aminoalcohol proveniente de la anilina (8), el cual sigue dando una actividad antioxidante arriba de 90%.

En quinto lugar , se observa al aminoalcohol proveniente de la piperidina (9), con una actividad de 91.51 % inhibitoria de ABTS.

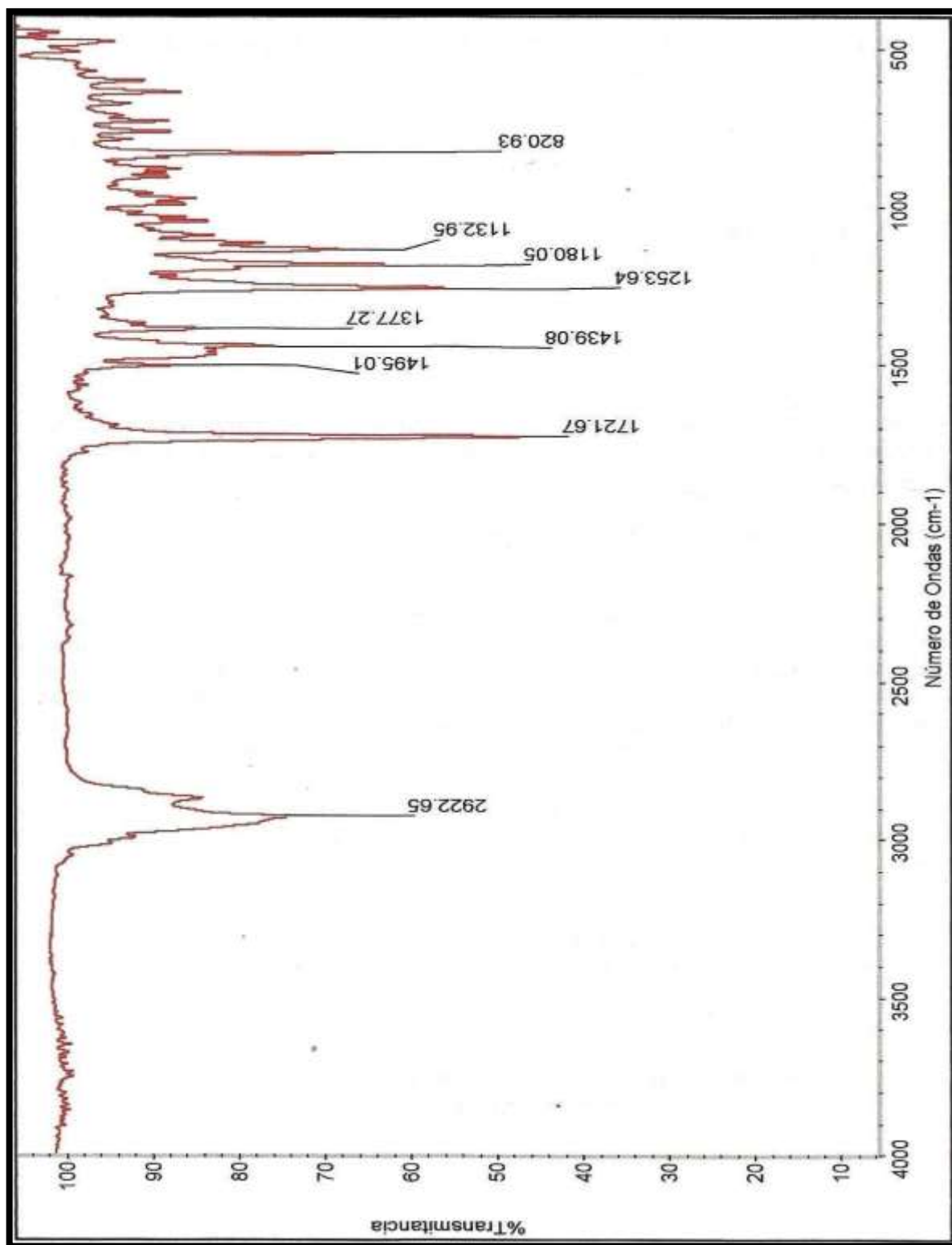
En sexto lugar, está el compuesto 4, el cual según datos de la literatura, su producto base “sugiol” tiene una actividad antioxidante alta, y el mismo caso se dio con este compuesto nuevo, con una actividad de 89.88%.

En séptimo lugar, se encuentra el epóxido (5), con una actividad más baja que su producto antecesor, pero sigue siendo destacable.

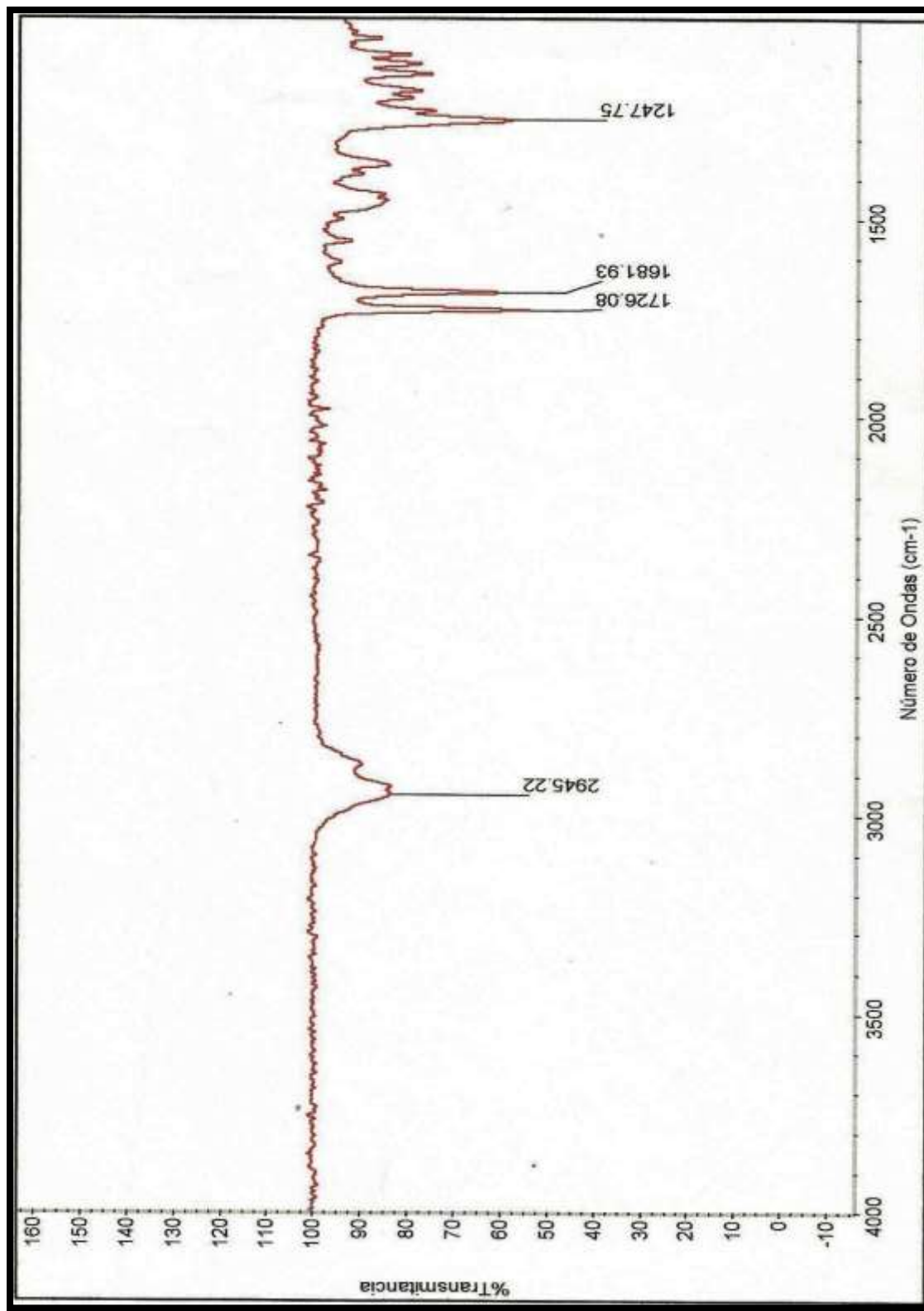
En último lugar se encuentra el producto 3, con la actividad menos sobresaliente de todos los compuestos.

APÉNDICES: ANEXOS

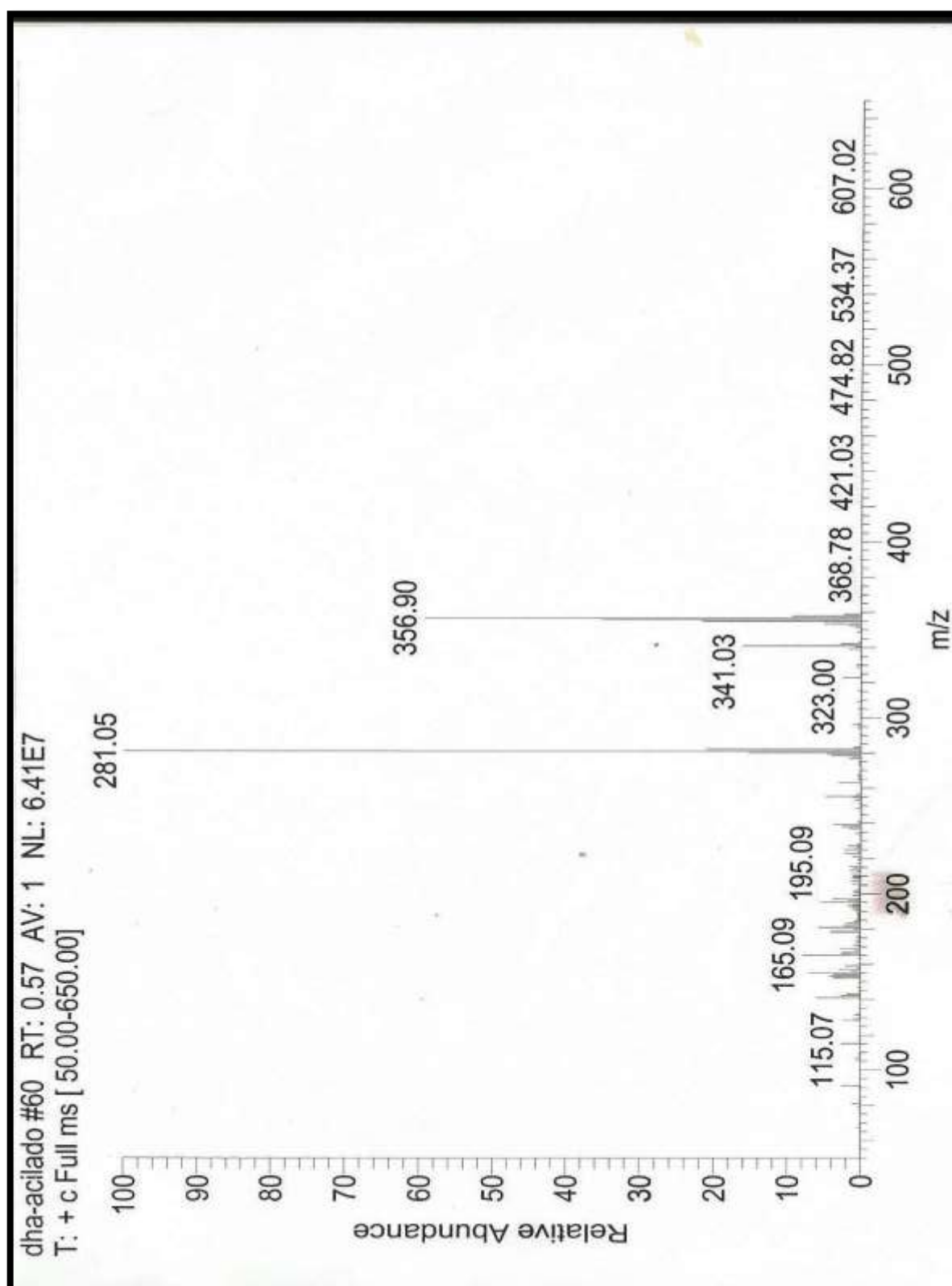
DHA-MET



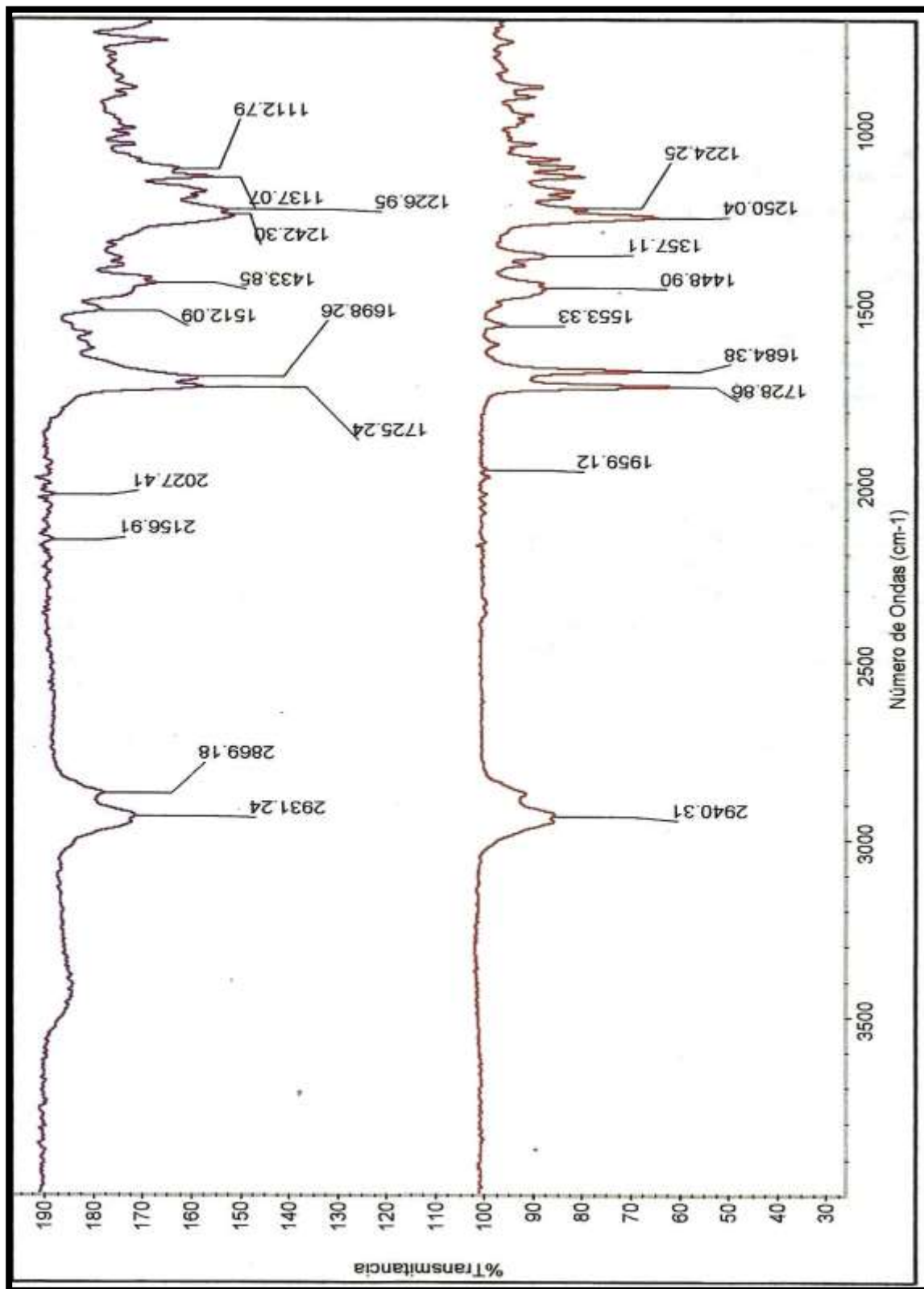
DHA-ACILADO IR



DHA-ACILADO MASAS



DHA-ACILADO VS DHA-FENOL



STANDARD IN OBSERVE

exp1 stdin

Sample
date Oct 25 2010
solvent CDCl3
file ACQUISITION
sfrq 200.000
tn H1
at 1.894
np 1.894
nw 1.894
bw 1.894
bs 1.894
dc 1.894
pw 4.8
dl 1.894
tc 1.894
at 1.894
ct 1.894
alock n
gain n
flags n

DEC. & VT
dfrq 200.000
dn H1
dswr 30
dof 0
dn min
dfrq 200.000
tn H1
at 1.894
np 1.894
nw 1.894
bw 1.894
bs 1.894
dc 1.894
pw 4.8
dl 1.894
tc 1.894
at 1.894
ct 1.894
alock n
gain n
flags n

PROC. & FT
proc not used
ft not used

DISPLAY
sp -111.0
wp 1783.0
vb 1045
ec 250
wzmn 7.13
ls 701.13
rfl 522.0
rfa 0
th 152
ins cdc ph 100.000

1.106
1.104
1.102

1.876

3.589

0 1 2 3 4 5 6 7 8

ppm

3.08 2.12 4.17
1.42 7.01 2.08 3.37 7.75 3.35 47.32 6.08

DHA-PIPERIDINA RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

