



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“SÍNTESIS DE NUEVOS
ANTIOXIDANTES A PARTIR DE LA
AMINA DEL ÁCIDO DEHIDROABIÉTICO
Y EL ÁCIDO FERÚLICO”

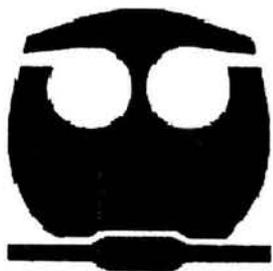
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

**LEONARDO JESÚS RIVERA
TRUEBA**



MÉXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

JURADO ASIGNADO

Presidente *AGUILAR CABALLERO RAÚL*
Vocal *FLORES PÉREZ BLAS*
Secretario *NAVARRO OCAÑA ARTURO*
1er SUPLENTE *LEAL LARA HERMILO*
2do SUPLENTE *SÁNCHEZ DEL ÁNGEL LUZ SANDRA*

SITIO DONDE SE REALIZÓ EL TEMA:

*ESTA TESIS SE REALIZÓ BAJO LA DIRECCIÓN DEL
DR. ARTURO NAVARRO OCAÑA,
EN EL LABORATORIO 321, CONJUNTO E, FACULTAD DE
QUÍMICA, UNAM.*

Tutor: Dr. ARTURO NAVARRO OCAÑA



Sustentante: LEONARDO JESÚS RIVERA TRUEBA



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Leonardo Jesús

Rivera Trucba

FECHA: 09 Feb. 104

FIRMA: [Firma]

ESTE PROYECTO FUE APOYADO POR CONACYT (34328-N).
DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTÁ TESIS, GOCE DE UNA BECA
OTORGADA POR ESTE PROYECTO DE CONACYT.

GRACIAS AL Dr. ARTURO NAVARRO OCAÑA, POR SER MAS QUE MI
ASESOR, POR SER UN AMIGO Y HABERME TENIDO CONFIANZA PARA
BRINDARME SU APOYO Y AYUDA EN TODOS LOS ASPECTOS PARA LA
REALIZACION DE ESTA TESIS.

LA IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS SE LLEVÓ A CABO EN
LA UNIDAD DE SERVICIOS DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN.

SE AGRADECE A:

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR: QFB. DEL VILAR R. Y M en C. YÁNEZ O.
ESPECTROSCOPIA DE MASAS: Q. DUARTE G., QFB GUZMÁN M., QFB LÓPEZ N. Y
QFB ISLAS Y.
ESPECTROSCOPIA DE ULTRAVIOLETA E INFRARROJO: Q. GUTIÉRREZ M.

DEDICATORIAS

A MI MAMÁ, MA. DE LA LUZ TRUEBA TOLEDANO, POR SU AMOR Y APOYO INCONDICIONAL EN TODOS ESTOS AÑOS PORQUE GRACIAS A SUS DESVELOS SACRIFICIOS Y CUIDADOS HE LOGRADO CONCLUIR ESTA ETAPA DE MI VIDA. TE QUIERO MUCHO. ESTE LOGRO ES TUYO. DIOS TE BENDIGA SIEMPRE.

A MI PAPÁ, SALVADOR RIVERA GARCÍA (CHARLY), PORQUE SIEMPRE ME HA APOYADO Y POR TODAS LAS DESMAÑANADAS QUE PASÓ CUANDO ME LLEVÓ A LA ESCUELA. GRACIAS Y QUE DIOS TE BENDIGA.

A MIS HERMANOS RICARDO, TANIA Y ROCÍO PORQUE AUNQUE SIEMPRE ESTAMOS MOLESTANDONOS, SABEN QUE LOS QUIERO. LES DESEO LO MEJOR DEL MUNDO Y QUE DIOS LOS BENDIGA SIEMPRE.

A MI ABUELO, RICARDO TRUEBA VEGA†, POR TODO LO QUE ME ENSEÑÓ Y PORQUE SIEMPRE FUE UN EJEMPLO PARA MI. SIEMPRE TE LLEVO CONMIGO, DIOS TE BENDIGA DONDE QUIERA QUE ESTES.

A MI ABUELA, AMPARO TOLEDANO CRUZ QUE SIEMPRE ME MOSTRÓ SU AMOR Y SU APOYO EN TODOS MOMENTOS.

A MIS TÍOS Y TÍAS QUE SIEMPRE VELARON POR MI Y ME APOYARON EN TODO MOMENTO.

A TODOS MIS PRIMOS.

Y ESPECIALMENTE A TODAS LAS PERSONAS PARA LAS QUE EN ALGUN MOMENTO DE SUS VIDAS HE SIDO IMPORTANTE Y ME HAN BRINDADO UN POCO DE SU CONFIANZA, A LAS PERSONAS QUE HAN CREIDO EN MI Y QUE ME HAN AYUDADO Y APOYADO DURANTE MI VIDA, LAS PERSONAS A LAS QUE MAS QUIERO Y QUE SABEN QUE NO LAS PODRÍA DEFRAUDAR, A LOS QUE NO ESTARAN EN MI EXAMEN Y QUE SÉ ESTARÁN APOYANDOME INCONDICIONALMENTE COMO HASTA AHORA DONDE QUIERA QUE SE ENCUENTREN.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS POR DEJARME LLEGAR HASTA AQUÍ Y PERMITIRME TERMINAR UNA ETAPA MAS EN MI VIDA, A LA S.V.J Y A S.J.T P.F.R.

A MI FAMILIA POR TODO EL APOYO Y EL CARIÑO QUE SIEMPRE ME HAN DEMOSTRADO.

A MIS COMPAÑEROS DEL LAB 321: SAIR, DULCE, PONCHO, ADRIANA, CARMEN, TERE, CHECO, DANIEL, CARLOS, FRANCISCO (EL PEPITO), RICARDIN Y EL NUEVITO.
Y A LOS DEL LAB 322: RADA, GABO, NACHO, ERNESTO, ISRA Y A TODAS LAS CHAVAS.

A TODOS MIS CUATES DEL PRIMER SEMESTRE, A TODOS LOS QUE CONOCI DURANTE LA CARRERA.

A MI AMIGO MANUEL MÁRQUEZ ORTEGA, POR QUE MAS QUE AMIGOS SIEMPRE HEMOS SIDO COMO LOS HERMANOS QUE NO TUVIMOS DURANTE ESTE TIEMPO. POR TODO LO QUE APRENDIMOS Y DISFRUTAMOS EN LA PREPA 2, SIN DUDA ALGUNA, DE LAS MEJORES ÉPOCAS DE MI VIDA. POR LAS COSAS QUE PASAMOS BUENAS Y MALAS, POR TODAS LAS TARDES QUE PASAMOS TOCANDO Y CANTANDO ROLAS POR LOS PATIOS DE LA P2 Y PORQUE SIEMPRE ME HA DEMOSTRADO SU APOYO INCONDICIONAL.

A PERLA (QUECHA) POR QUE SIN DUDA MUCHO DE SU ESFUERZO ESTARÁ SIEMPRE REFLEJADO EN ESTE TRABAJO. POR TODO LO QUE ME AYUDÓ Y APOYÓ EN TODO MOMENTO, POR TODOS LOS RATOS AGRADABLES QUE PASAMOS JUNTOS, POR TODOS LOS LUGARES QUE CONOCIMOS Y PORQUE GRACIAS A ELLA PUDE CUMPLIR UNO DE MIS MAYORES DESEOS (CONOCER CANADA), PORQUE SIEMPRE ESTUVO ATRÁS DE MI PARA VER ESTE PROYECTO FINALIZADO Y PORQUE ES UNA DE LAS PERSONAS QUE SIEMPRE HAN CREIDO EN MI; POR SER COMO MI ANGEL DE LA GUARDA, GRACIAS.

A TODOS LOS DEL LAB 209 POR SU APOYO.

A NESTOR POR TODO LO QUE PASAMOS DURANTE LOS PRIMEROS SEMESTRES JUNTOS Y PORQUE SIEMPRE ME HA DEMOSTRADO SU AMISTAD Y SU APOYO POR TODAS LAS BROMAS Y LOS PLANES, LAS DESVELADAS Y LAS CHELAS EN EL BREVE.

A GABY POR SEGUIRME SOPORTANDO DESPUÉS DE TANTO TIEMPO POR TODO LO QUE ME AYUDÓ Y ME ENSEÑÓ, POR SUS DESVELO, SUS ATENCIONES Y TODO SU APOYO.

A EVE POR HABERME HECHO VER LAS COSAS DESDE UN DIFERENTE PUNTO DE VISTA Y POR LOS LIBROS QUE ME LEYÓ.

A MIS AMIGAS LAS Q.F.B 's MARIANA, JAZ, LAURIS, LETY (LA VIBO).

A LOS CHE 'S

AL CHE BETO QUE ENMENDO SU CAMINO A TIEMPO, SINO NO PODRÍA DECIR POR LOS RATOS CHIDO QUE PASAMOS ENTRE CHELAS Y MUSICA, ENTRE LA ESCUELA Y LAS CASCARITAS POR SER UNO DE LOS QA 'S CON QUIEN MAS CONVIVI. Y EL CHE FERMIN POR HACERME REIR AUNQUE A VECES ME DESESPERABA Y PORQUE A TODO EL MUNDO SE LE OLVIDABA, GRACIAS

A CLAUDIA POR TODOS LOS RATOS AGRADABLES QUE PASAMOS EN LA FACU, POR HABER SIDO MI AMIGA, POR HABERME ESCUCHADO MAS DE UNA VEZ, POR TODAS LAS BROMAS QUE SOPORTO, POR LOS LIBROS QUE ME CONTO, POR ESTAR CONMIGO, AYUDARME Y APOYARME INCONDICIONALMENTE Y POR HABERME DADO LA DICHA DE TENER A MI HIJO KENNETH EN MIS BRAZOS. GRACIAS

A KENNETH POR DEVOLVERME LA ILUSIÓN EN CADA UNA DE SUS RISAS.

GRACIAS AL Dr. FRANCISCO RUÍZ TERÁN POR SUS COMENTARIOS ACERTADOS Y LAS BROMAS.

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. ANTECEDENTES	2
1. Oxidación de lípidos	2
1.1 Autooxidación	3
1.2 Oxidación por fotosensibilización	4
1.3 Oxidación enzimática	4
1.4 Descomposición de hidroperóxidos	4
2. Antioxidantes	5
2.1 Mecanismo de acción antioxidante	5
2.2 Antioxidantes naturales	6
2.3 Antioxidantes sintéticos	9
2.4 Desventajas de los antioxidantes	11
3. Ácido abiético	11
3.1 Estructura	12
3.2 Actividad biológica y usos de los ácidos abietanos	13
3.3 Toxicidad	15
3.4 Modificaciones químicas del ácido abiético y sus derivados	15
4. Biotransformaciones	18
4.1 Biocatalizadores	20
4.1.1 Bioconversiones con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
4.1.2 Lipasas	23
A. Usos de las lipasas	24
4.2 Biotransformaciones del ácido abiético y sus derivados	24
5. Ácido ferúlico	26
5.1 Características químico-biológicas	26
5.2 Importancia y utilización en la industria	27
5.3 Fuentes	28
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS	30
IV. OBJETIVOS	31
1. General	31
2. Particulares	32
V. MATERIAL Y MÉTODOS	33
1. Reactivos y equipo	33
1.1 Reactivos	33
1.2 Reactivos biológicos	33
1.3 Equipo	34
1.4 Análisis espectroscópicos de los compuestos obtenidos	34
2. Diagrama general de investigación	35
2.1 Diagrama de obtención del metil 12-amino,14-nitrodehidroabietato	36
2.2 Diagrama de obtención de la amida	37
3. Obtención del ácido dehidroabiético	37
3.1 Obtención de la sal sódica del ácido hidroxabiético	37
3.2 Recristalización de la sal sódica del ácido hidroxabiético	38
3.3 Obtención del ácido dehidroabiético a partir de la sal sódica del ácido hidroxabiético	38
3.4 Recristalización del ácido dehidroabiético	39
3.5 Obtención del metil dehidroabietato a partir de ácido dehidroabiético	39
3.6 Purificación del metil dehidroabietato	40
3.7 Obtención del metil 12,14-dinitrodehidroabietato por nitración del metil dehidroabietato	40
3.8 Recristalización del metil 12,14-dinitrodehidroabietato	41
3.9 Obtención del metil 12-amino,14-nitrodehidroabietato por reducción del metil 12,14-dinitrodehidroabietato	41

3.10 Purificación del metil 12-amino,14-nitrodehidroabietato (amina)	42
3.11 Obtención de la amida a través de la reacción entre el metil 12-amino,14-nitrodehidroabietato (amina) y el cloruro del ácido ferúlico	42
4. Reacciones alternas	43
4.1 Diagrama de obtención del metil deisopropildehidroabietato y su nitración	43
4.2 Diagrama de hidroxilación del ácido dehidroabiético empleando <i>Bacillus sp</i>	44
4.3 Obtención del metil deisopropildehidroabietato a partir de ácido dehidroabiético	45
4.4 Nitración	45
4.5 Hidroxilación del ácido dehidroabiético con <i>Bacillus sp</i>	46
5. Ácido ferúlico y sus derivados	47
5.1 Diagrama de obtención	47
5.2 Recuperación del ácido ferúlico a partir del nejayote	48
5.3 Detección por cromatografía en capa fina y recristalización del ácido ferúlico	48
5.4 Obtención del ácido ferúlico acetilado	49
5.5 Obtención del cloruro del ácido ferúlico	49
VI. RESULTADOS	50
1. Ácido abiético	51
2. Ácido hidroxabiético	52
3. Ácido dehidroabiético	54
4. Metil dehidroabietato	56
4.1 Reacción con sulfato de dimetilo	57
4.2 Reacción con lipasas en metanol	57
4.3 Esterificación de Fischer	57
5. Metil 12,14-dinitrodehidroabietato	59
5.1 Óxidos de nitrógeno (NO _x)	60
5.2 NaNO ₂ /peroxidasa	60
5.3 Mezcla HNO ₃ /H ₂ SO ₄	61
6. Metil 12-amino,14-nitrodehidroabietato	62
6.1 Reducción con levadura	62
6.2 Reducción con SnCl ₂ ·2H ₂ O en DMF	63
7. Amida acetilada	64
8. Amida	65
9. Reacciones alternas	67
9.1 Metil deisopropildehidroabietato	68
9.2 Hidroxilación del ácido dehidroabiético con <i>Bacillus sp</i> .	71
10. Ácido ferúlico y sus derivados	71
10.1 Ácido ferúlico	72
10.2 Ácido ferúlico acetilado	73
10.3 Cloruro del ácido ferúlico	74
VII. DISCUSIÓN	75
1. Ácido abiético	75
2. Ácido hidroxabiético	76
3. Ácido dehidroabiético	77
4. Metil dehidroabietato	79
4.1 Reacción con sulfato de dimetilo	79
4.2 Reacción con lipasas en metanol	79
4.3 Esterificación de Fischer	80
5. Metil 12,14-dinitrodehidroabietato	82
5.1 Óxidos de nitrógeno (NO _x)	82
5.2 NaNO ₂ /peroxidasa	82
5.3 Mezcla HNO ₃ /H ₂ SO ₄	83
6. Metil 12-amino,14-nitrodehidroabietato	85
6.1 Reducción con levadura	85
6.2 Reducción con SnCl ₂ ·2H ₂ O en DMF	85
7. Amida acetilada	87

8. Amida	88
9. Reacciones alternas	89
9.1 Metil deisopropilaldehidroabietato	89
9.2 Hidroxilación del ácido dehidroabiético con <i>Bacillus sp.</i>	91
10. Ácido ferúlico y sus derivados	92
10.1 Ácido ferúlico	92
10.2 Ácido ferúlico acetilado	93
10.3 Cloruro del ácido ferúlico	94
VIII. CONCLUSIONES	95
IX. BIBLIOGRAFÍA	96
X. APÉNDICE	100



I. RESUMEN

La resina de pino, constituye una fuente de ácido abiético, a partir del cual muchos compuestos se han sintetizado. Uno de estos compuestos es el ácido dehidroabiético, el cual debido a la presencia de un grupo isopropilo en su anillo aromático, podría ser un material de partida prometedor para la obtención de antioxidantes, con la introducción de sustituyentes apropiados en su molécula, conduciría a compuestos de peso molecular mayor y con propiedades físicas diferentes a las de los antioxidantes naturales y sintéticos actuales, con esto se estaría buscando incrementar su uso en la industria de los alimentos. Partimos del hecho de que algunas aminas ariladas del ácido dehidroabiético muestran actividad antioxidante, por lo que es posible que la obtención de nuevos compuestos (amidas) a través de la reacción entre el ácido ferúlico (un antioxidante) y las aminas del ácido dehidroabiético, presenten mejor actividad antioxidante que la que muestra el ácido ferúlico; así como, mejor solubilidad y menor volatilidad.

Para lograr lo anterior, en este trabajo se obtuvieron los diferentes derivados del ácido abiético (*I*) [el ácido hidroxabiético (*II*), el ácido dehidroabiético (*III*), el dehidroabietato de metilo (*IV*), el 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo (*V*), el 12-amino,14-nitro dehidroabietato de metilo (*VI*), la amida acetilada (*VII*) y la amida (*VIII*)]; así como el ácido ferúlico (*A*) y sus derivados [el ácido ferúlico acetilado (*B*) y el cloruro del ácido ferúlico (*C*)]. Finalmente, se llevó a cabo la condensación del 12-amino-14-nitro dehidroabietato de metilo (*VI*) con el cloruro del ácido ferúlico (*C*) y se obtuvo la amida (*VIII*) correspondiente, a la cual se le evaluó su actividad secuestrante.

La amida finalmente obtenida, presentó actividad secuestrante al ser revelada con radical DPPH; sin embargo, su empleo como antioxidante en la industria de los alimentos aún debe evaluarse. Por otro lado, la ruta de síntesis propuesta en este trabajo, generó compuestos que pueden ser empleados como material de partida para la obtención de nuevos derivados.



II. ANTECEDENTES

En algunos alimentos la rancidez oxidativa (oxidación de lípidos) es uno de los tipos más importantes de degradación. Este proceso puede ocurrir por la reacción del oxígeno con los ácidos grasos insaturados del alimento, o por acción enzimática; la cual es importante en alimentos de origen vegetal (Love, 1992).

1. OXIDACIÓN DE LÍPIDOS

La oxidación de lípidos puede ser un problema, tanto en alimentos que contienen pequeñas cantidades, como en alimentos ricos en grasas, ya que muchos de los cambios que acompañan la oxidación son perjudiciales. Por ello, se han estudiado las reacciones involucradas y se han buscado vías que controlen este proceso (Love, 1992).

La oxidación de los lípidos es la principal alteración que sufren las grasas y por lo tanto los alimentos a base de ellas. Los cambios oxidativos en los alimentos modifican: el sabor, el color, el olor (ya que los olores resultantes son fuertes y penetrantes, a pesar de que la cantidad de grasa sea pequeña) y en ocasiones la textura (por ejemplo, la viscosidad). Además, a menudo los aromas y sabores deseables se pierden o se desarrollan sabores indeseables (rancidez) y en algunos casos pueden ocurrir ambas cosas (Babayán & Morse, 1997; Love, 1992).

La descomposición de las grasas puede ocurrir por alguna de las siguientes vías:

- 1) Autooxidación, en el doble enlace de los ácidos grasos produciendo olores desagradables (rancidez),
- 2) Hidrólisis, de los ácidos grasos que se desprenden del glicerol, produciendo el sabor a jabón,
- 3) Reversión, produciendo un sabor a pintura o herbal,
- 4) Polimerización, de los ácidos grasos insaturados, casi siempre en grasas que se han sometido durante periodos prolongados a temperaturas elevadas,
- 5) Fotosensibilización y
- 6) Oxidación enzimática (Babayán & Morse, 1997; Love, 1992).

A continuación, se revisarán algunas de estas vías con más detalle:



1.1 Autooxidación

La oxidación de los ácidos grasos insaturados ocurre a través de una reacción en cadena, que involucra radicales libres y se puede describir en el siguiente esquema de reacciones simplificadas:

<u>ETAPA</u>	<u>REACCIÓN</u>		<u># Reacción</u>
INICIACIÓN	$LH \xrightarrow{\text{INICIADOR}} L\cdot$	Radical lipídico	(1)
PROPAGACIÓN	$L\cdot + O_2 \rightleftharpoons LOO\cdot$	Radical peróxido	(2)
	$LOO\cdot + LH \longrightarrow LOOH + L\cdot$	Hidroperóxido + Radical lipídico	(3)
TERMINACIÓN	$L\cdot + L\cdot \longrightarrow L-L$	Productos no radicales	(4)
	$L\cdot + LOO\cdot \longrightarrow LOOL$		(5)
	$LOO\cdot + LOO\cdot \longrightarrow LOOOL$		(6)

En la iniciación (reacción 1), un hidrógeno radical es abstraído de una molécula de lípido (LH), resultando en la formación de un radical lipídico (L·). La naturaleza exacta de esta reacción no está totalmente entendida; sin embargo, la exposición a la luz o al calor, la producción de oxígeno singulete, la catálisis por metales y otros mecanismos pueden resultar en la iniciación.

El radical libre lipídico (L·) puede reaccionar con el oxígeno (O₂) para formar un radical peróxido (LOO·) (reacción 2), el cual puede abstraer un hidrógeno radical de otro lípido, generando un hidroperóxido (LOOH) y otro radical lipídico (L·) que puede reaccionar con O₂ y propagar de esta manera la reacción en cadena (reacción 3). La reacción en cadena termina cuando dos radicales libres reaccionan para generar productos no radicales (reacciones 4, 5 y 6).

En presencia de O₂, la reacción 2 es rápida y la reacción 3 es el paso limitante de la autooxidación de lípidos. La reacción de terminación más importante, cuando la concentración de O₂ es alta, es la reacción de dos radicales peróxido (reacción 6), mientras que las otras reacciones de terminación son importantes cuando la concentración de O₂ es baja (por ejemplo, en áreas alejadas de la superficie).



Los lípidos son muy susceptibles a la autooxidación cuando contienen ácidos grasos insaturados; ya que, el hidrógeno que se encuentre unido débilmente será abstraído; de esta manera, los hidrógenos alílicos (aquellos que están unidos a un átomo de C adyacente a un doble enlace) son más fáciles de abstraer que los hidrógenos vinílicos (aquellos que están unidos a C involucrados en un doble enlace); sin embargo, los hidrógenos unidos a átomos de C localizados entre dobles enlaces son aún más fáciles de extraer (Love, 1992).

1.2 Oxidación por fotosensibilización

Los hidroperóxidos pueden formarse cuando las grasas insaturadas, se exponen a la luz en presencia de O_2 y de compuestos como la clorofila u otros pigmentos tetrapirrólicos. En este tipo de oxidación, posiblemente la luz se transfiere de un sistema de electrones (clorofila u otro pigmento) al O_2 para formar oxígeno singulete, el cual reacciona con un carbono del ácido graso para formar un doble enlace que se transforma finalmente en un hidroperóxido alílico. Ya que los radicales libres no están involucrados, la oxidación por luz no se propaga por si misma. Sin embargo, una vez que se forman los hidroperóxidos, se pueden generar radicales de su descomposición que pueden iniciar la autooxidación (Love, 1992).

1.3 Oxidación enzimática

Lipooxigenasa es el nombre que se le da a un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en las plantas, que contienen hierro y que catalizan la oxidación de los ácidos grasos. Esta enzima puede modificar el sabor en los vegetales escaldados, ya que al cortar los hidroperóxidos y modificar después sus productos de degradación se obtienen características deseables en el sabor de ciertas frutas y vegetales. Para algunos compuestos volátiles la concentración de esta enzima, puede determinar si el sabor es deseable o indeseable (Love, 1992).

1.4 Descomposición de hidroperóxidos

Los hidroperóxidos formados en las reacciones de oxidación, no son la causa de los olores y los sabores característicos de los lípidos oxidados, ya que los radicales



alcóxido producidos de los hidroperóxidos, se pueden degradar y formar compuestos volátiles como: aldehídos, cetonas y alcoholes, que causan estos olores y sabores característicos (Love, 1992).

2. ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes comunes son útiles para detener la oxidación de los lípidos (rancidez) y en menor grado la polimerización, pero no son útiles en la reversión y en la hidrólisis, la cual frecuentemente es enzimática (Babayan & Morse, 1997).

Históricamente, el uso de antioxidantes se debe básicamente a evitar la degradación del sabor de los alimentos durante el almacenamiento. Sin embargo, actualmente se considera además, la importancia de los ácidos grasos esenciales en la dieta humana, al manufacturar los alimentos (Löliker, 1991).

Los antioxidantes son sustancias que pueden retardar el inicio o disminuir la velocidad de oxidación. Muchos compuestos tanto de origen natural como sintéticos, se sabe poseen actividad antioxidante; sin embargo, un limitado número de estos se aprovecha para su uso en los alimentos, por diferentes razones que se mencionan más adelante (Love, 1992).

2.1 Mecanismo de acción antioxidante

Actualmente se sabe que los antioxidantes trabajan de diversas maneras, dependiendo del sustrato y de las condiciones del medio, agrupándose en cuatro categorías: 1) los que donan un hidrógeno radical, 2) los que donan electrones, 3) los que reaccionan con lípidos y los adicionan a su molécula y (4) los que forman un complejo lípido-antioxidante. Es probable que para producir el efecto antioxidante, se lleve a cabo una mezcla de todos los factores mencionados anteriormente. Una teoría postula que la autooxidación se inicia por un mecanismo que aún no se ha elucidado y que es previo a la formación de un hidroperóxido estable; además, se sabe que los antioxidantes no inhiben esta reacción (Babayan & Morse, 1997).



Los antioxidantes son compuestos que tienen la capacidad de donar un hidrógeno radical. Estos al ser una especie química no radical, pueden reducir radicales primarios y de esta manera transformarse en un radical antioxidante oxidado. Un antioxidante, además de ser un donador de hidrógeno, también debe formar un radical de baja reactividad que posteriormente no reaccione con otros lípidos. Este tipo de antioxidantes se conocen como antioxidantes donadores de hidrógenos o electrones.

Las reacciones posteriores de los radicales antioxidantes son más complejas y generan diferentes productos, muchos de los cuales se han identificado y a menudo son de naturaleza dimérica. Es importante resaltar que muchas de las sustancias que poseen actividad antioxidante, son fenólicas. En estas sustancias, la función vital de donar hidrógenos es regulada por el tipo y por el número de sustituyentes unidos directamente al anillo aromático (como en el HBT) o bien si están unidos a la parte más alejada sobre la estructura del compuesto (como en el ácido carnósico).

Los antioxidantes pueden ser clasificados de diferentes maneras. Por ejemplo, se pueden dividir en naturales y sintéticos.

Así, compuestos que se encuentran en animales o en plantas, aunque actualmente algunos puedan ser sintetizados (como el α -tocoferol), son considerados como compuestos de origen natural. Esta separación es arbitraria; sin embargo, refleja la tendencia actual en el uso de estos compuestos, para la estabilización o el aumento de la vida media de los alimentos, ya que existe el creciente interés por el empleo de compuestos de origen natural (Lölig, 1991).

2.2 Antioxidantes naturales

Muchos compuestos derivados principalmente de plantas poseen actividad antioxidante.

Los *tocoferoles* (Figura 1), son antioxidantes importantes que se encuentran de manera natural en aceites vegetales. Son efectivos en muchos alimentos, cuando se



emplean concentraciones relativamente bajas (100-300 ppm), ya que su efectividad disminuye con concentraciones elevadas. Los tocoferoles pueden atrapar oxígeno singulete o bien en la etapa de terminación reaccionar con radicales libres.

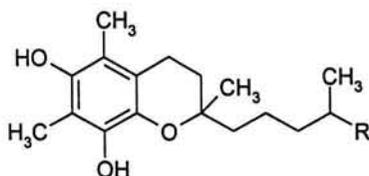


Figura 1. Estructura base de los tocoferoles.

Los *flavonoides* (Figura 2), son compuestos naturales que se encuentran en una gran variedad de plantas y químicamente están formados por anillos aromáticos hidroxi- y alcoxi- sustituidos. Varios isoflavonoides con actividad antioxidante (como la genisteína, la diadzeína y la gliciteína), se han identificado en la soya. Estos compuestos se encuentran básicamente como 7-O-monoglucósidos, siendo la genisteína y de diadzeína cerca del 90% de los flavonoides de la soya.

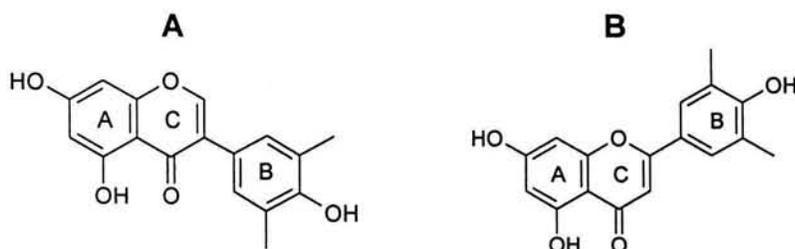
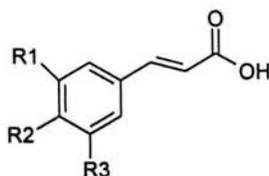


Figura 2. Algunas clases de flavonoides (A) isoflavonas y (B) flavonas.

Algunos *ácidos hidroxicinámicos* (Figura 3) como el clorogénico, el isoclorogénico, el caféico, el ferúlico, el p-coumárico, el siringico, el vainílico y los ácidos p-hidroxibenzoicos, están presentes en la soya y poseen actividad antioxidante. El ácido clorogénico o su producto de hidrólisis, el ácido caféico, podrían ser los mayores antioxidantes naturales de la soya. La avena al igual que la soya, contiene los ácidos caféico y ferúlico, así como otros compuestos fenólicos más complejos que poseen actividad antioxidante.



R1=R2=R3=H	Ácido Cinámico
R1=H, R2=OH, R3=OMe	Ácido ferúlico
R1=H, R2=OH, R3=H	Ácido Cumárico
R1= OMe, R2=OH, R3=OMe	Ácido Sinápico
R1=H, R2=R3=OH	Acido Caféico

Figura 3. Estructura base de los ácidos hidroxicinámicos.

Los *aminoácidos* (como la glicina o la β,β -dimetilcisteína), pueden actuar como antioxidantes reaccionando directamente con radicales libres o por efecto sinérgico (como ocurre con la mayoría). El efecto sinérgico de los aminoácidos con algunos antioxidantes fenólicos puede deberse en parte a la quelación de metales, aunque es posible que otros mecanismos, no conocidos aún, estén involucrados.

Los productos de las reacciones de oscurecimiento tipo Maillard (reductonas) muestran actividad antioxidante, la cual es atribuida a su capacidad reductora y a su capacidad para atrapar metales, aunque el mecanismo preciso aún no está claro.

En la carne, la oxidación de los lípidos se puede disminuir con antioxidantes como el nitrito de sodio, el cual es usado para curar. Además, cuando los ascorbatos y los fosfatos se emplean en los productos curados, estos también pueden ofrecer protección adicional. Algunos antioxidantes fenólicos, así como los polifosfatos y los ascorbatos, se pueden usar solos o en combinación para prevenir la oxidación de los lípidos en la carne cocinada libre de nitritos.

La mayor aplicación de los antioxidantes naturales es: en productos cárnicos, en extractos vegetales, en concentrados de jugos cítricos, en pulpas y jugos, así como en productos de semillas, hierbas y especias (Love, 1992).



2.3 Antioxidantes sintéticos

Los principales antioxidantes sintéticos empleados en los alimentos son el hidroxianisol butilado (HAB), el hidroxitolueno butilado (HTB), el galato de propilo (GP) y la ter-butil hidroquinona (TBHQ). Estos antioxidantes son mono- o poli- fenoles sustituidos (Figura 4).

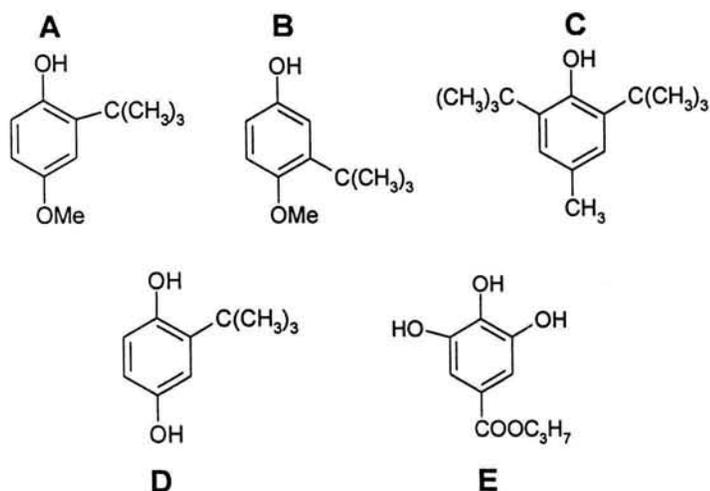
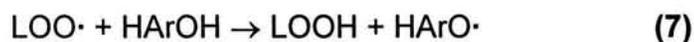


Figura 4. Antioxidantes sintéticos. (A y B) Hidroxianisol butilado, 2-HAB y 3-HAB; (C) Hidroxitolueno butilado, HTB; (D) ter-butil hidroquinona, TBHQ y (E) Galato de propilo, GP.

Se cree que los antioxidantes fenólicos donan el hidrógeno del grupo hidroxilo a un radical peróxido y el radical antioxidante producido de esta reacción no inicia o propaga la autooxidación de las grasas (reacción 7).



La efectividad de los antioxidantes fenólicos, depende del tipo y de la posición de los grupos unidos al anillo aromático. A menudo, los antioxidantes fenólicos se emplean en combinación con otros antioxidantes y/o con agentes atrapadores de metales (como el ácido cítrico, los polifosfatos o el EDTA). Estas combinaciones generan una actividad antioxidante mayor (fenómeno conocido como sinergismo), comparada con la que se obtendría si se emplearan los compuestos por separado.



El ácido ascórbico retarda la oxidación de los lípidos por diferentes vías, puede donar hidrógenos para regenerar antioxidantes fenólicos o puede ser oxidado en lugar de un lípido insaturado (atrapando en este caso oxígeno).

Los antioxidantes sintéticos se emplean normalmente como formulaciones líquidas, para aprovechar algunas características de los antioxidantes y satisfacer así las necesidades específicas del sistema. Algunos factores que se consideran para elegir un antioxidante son: 1) el tipo de grasa o aceite en que se usará, 2) si el alimento será cocinado en grasa (alcance directo), 3) su solubilidad, 4) su potencial de decoloración, debido a interacciones antioxidante-metal, 5) su facilidad de dispersión en la fase grasa y 6) su legalidad para una aplicación específica.

De los antioxidantes sintéticos, el HAB es más efectivo para prevenir la oxidación en las grasas animales, ofreciendo protección a alimentos destinados a procesos de cocción o de freído. En general, el HTB es muy similar al HAB, pero tiene menos alcance directo que HAB. Tanto HAB como HTB pueden ser usados en combinación con otros antioxidantes fenólicos y ambos son altamente solubles en grasas y aceites.

El GP es efectivo en la estabilización de grasas animales, aceites vegetales, productos cárnicos, especies y otros alimentos. Debido a que atrapa metales como el hierro y forma complejos coloridos indeseables, el GP se usa en combinación con el ácido cítrico para evitar esta coloración. Además, el GP no es el antioxidante de elección, si el producto se someterá a temperaturas elevadas, ya que es lábil al calor. El GP es ligeramente soluble en agua.

TBHQ es ligeramente soluble en agua y moderadamente soluble en grasas y aceites. Ofrece buen alcance directo en alimentos fritos pero no es efectivo en alimentos cocinados. Es un antioxidante efectivo para aceites con alto grado de insaturación y puede ser usado con HBA y/o HTB, pero no puede ser usado con GP. A menudo se emplean combinaciones de TBHQ con ácido cítrico en aceites vegetales (Love, 1992).



2.4 Desventajas de los antioxidantes

A pesar de que actualmente existen varios antioxidantes, tanto naturales como sintéticos, no existe un antioxidante que reúna todas las características deseables para su uso en alimentos, ya que estos presentan ciertas limitaciones o desventajas en algunas de sus propiedades (Cuadro 1).

Cuadro 1. Propiedades limitantes de los antioxidantes

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">➤ Solubilidad (incorporación al alimento)➤ Disponibilidad➤ Actividad antioxidante <i>per se</i>➤ Sensibilidad al pH➤ Sensibilidad a la temperatura➤ Sensibilidad a la luz➤ Tendencia a alterar el olor y el color de los alimentos |
|--|

Además, en el caso específico de los antioxidantes sintéticos debido a su asociación con efectos tóxicos, así como a su posible asociación con la inducción de cáncer, existe una gran tendencia al uso de antioxidantes naturales (Lölinger, 1991).

Debido a esto, recientemente ha surgido un gran interés por la obtención de nuevos compuestos con propiedades antioxidantes provenientes de fuentes naturales. En este sentido, recientemente se ha reportado que algunas arilaminas derivadas del ácido dehidroabiético poseen actividad antioxidante superior a la del BHT y similar a la que muestra la isopropildifenilamina (IPPD), ambos antioxidantes sintéticos disponibles comercialmente (Esteves *et al.*, 2001).

3. ÁCIDO ABIÉTICO

Los ácidos abietanos son un grupo de diterpenoides fenantrenos que no han sido considerados en las revisiones farmacológicas recientes. Sin embargo, ameritan atención debido a: la gran variedad de actividades biológicas y al uso medicinal que muestran los extractos que los contienen, así como por sus bajos efectos tóxicos.

La fuente principal de ácidos abietanos es la colofonia, que es el producto de destilación de las resinas de pino. La colofonia ya sea directamente o después de su



estabilización a través de polimerización parcial o deshidrogenación, se emplea principalmente en pinturas, barnices y recubrimientos industriales. La parte ácida de este residuo de destilación está compuesta básicamente por ácido abiético y sus isómeros levopimárico y palústrico, además de otros ácidos como el neoabiético, dehidroabiético y otros compuestos no abietanos.

Los ácidos abietanos son componentes de extractos de resinas de coníferas pertenecientes a las familias Araucariaceae, Cupressaceae, Podocarpaceae y Pinaceae, aunque también se encuentran en varias especies de angiospermas, particularmente en las familias Asteraceae, Celastraceae, Hydrocharitaceae y Lamiaceae (San Feliciano *et al.*, 1993).

3.1 Estructura

El esqueleto estructural y la numeración de los ácidos abietanos se ejemplifica en el ácido abiético; el cual está formado por los anillos A, B y C, muestra un grupo carboxilo ecuatorial en C-4 y dos dobles enlaces conjugados en las posiciones 7 y 13 (Figura 5).

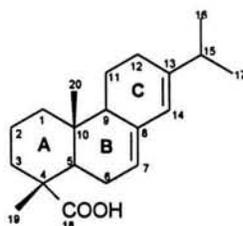


Figura 5. Numeración del ácido abiético.

En otros compuestos de esta familia, el grupo carboxilo adopta una configuración axial en la posición C-4, mientras que el número y la posición de los dobles enlaces varía de 1 a 4 y están localizados predominantemente en el anillo C, dando lugar a un tipo particular de diterpenoides aromáticos comúnmente conocidos como derivados del ácido dehidroabiético (Figura 6) (San Feliciano *et al.*, 1993).

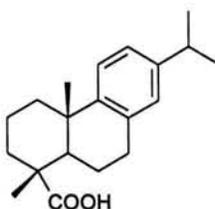


Figura 6. Ácido dehidroabiético.

3.2 Actividad biológica y usos de los ácidos abietanos

La resina de pino completa y sus derivados (esencias y colofonia) se han usado como expectorantes, modificadores de secreciones bronquiales y antisépticos de vías urinarias, así como en pomadas o cremas de uso veterinario. Estos usos, se describen en varios tratados de farmacognosia y plantas medicinales. En años recientes se han desarrollado estudios sobre la actividad biológica de los ácidos abietanos, empleándolos como componentes puros y estos han mostrado actividad como: antibacterianos y antifúngicos (Fonseca *et al.*, 2001), antiulcerales, cardiovasculares, alergénicos y antialérgicos; además, se han usado en cosméticos y en preparaciones dermatológicas (San Feliciano *et al.*, 1993).

Los derivados hidroxilados del ácido dehidroabiético (Figura 6) y del ácido isopimárico (Figura 7), son compuestos naturales disponibles e interesantes, ya que son intermediarios en la síntesis de agentes antivirales (Vorob'ev *et al.*, 2001).

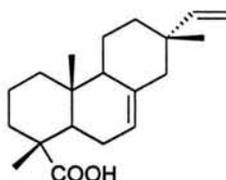


Figura 7. Ácido isopimárico.

El ácido isopimárico (Figura 7) muestra actividad antibacteriana contra *Serratia sp.* y *Bacillus subtilis*; mientras que el ácido dehidroabiético muestra actividad contra *S. aureus*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *Salmonella sp.*, *E.coli* y *B. subtilis* (Tapia *et al.*, 1997).



Algunos productos de oxidación de las resinas como: el ácido 7-oxodehidroabiético, el ácido 7-hidroxidehidroabiético y el ácido 13-hidroxi-podocarpa-8,11,13-trien-18-oico, muestran actividad fungistática e inhiben, *in vitro* el crecimiento de micelio, así como la germinación de esporas de *Dothistroma pini*. Además, estudios empleando *Fomes annosus* muestran que el ácido 7-oxodehidroabiético inhibe completamente el crecimiento fúngico, exhibiendo mayor actividad que los ácidos levopimárico, dehidroabiético, palústrico y abiético (Feio *et al.*, 1999).

Por otro lado, estudios obtenidos del análisis de *Sphacele salviae* muestran que esta especie acumula altas concentraciones de abietanos fenólicos como carnosol, rosmanol, ácido carnósico y 20-deoxocarnosol y de ácido ursólico (Figura 8). Escuder *et al.* (2002) encontraron que estos abietanos atrapan radicales libres y atribuyen esta reactividad a su anillo C, similar a la de un catecol; el cual los provee con un mecanismo eficiente para la oxidación de radicales libres fenólicos, ya que la acetilación de los grupos fenólicos inhibe este mecanismo. Además sugieren que debido a sus propiedades antioxidantes, estos compuestos podrían ser explotados con fines industriales (como aditivos en alimentos) y terapéuticos (como compuestos bioactivos).

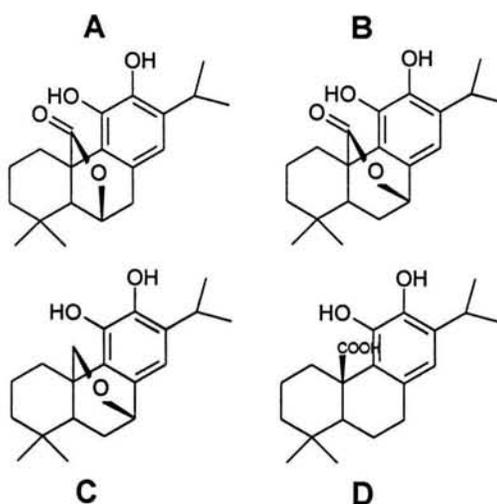


Figura 8. Estructuras de algunos abietanos fenólicos. (A) Rosmarol, (B) Carnosol, (C) 20-deoxocarnosol y (D) Ácido carnósico.



3.3 Toxicidad

Debido al extenso uso de las resinas ácidas en varios productos de la vida diaria como: papel, tinta, adhesivos, pegamentos, resinas, caucho sintético, cosméticos y productos de odontología, un gran número de personas sufren de dermatitis y asma. Sin embargo, varios estudios han demostrado que las resinas ácidas por si mismas no son las que causan las reacciones alérgicas, sino sus productos de oxidación. Ya que se ha encontrado que compuestos como: el 7-oxodehidroabietato de metilo y el 7-hidroxiabietato de metilo (Figura 9), dos productos de oxidación del ácido abiético, son potentes alérgenos (Prinz *et al.*, 2002).

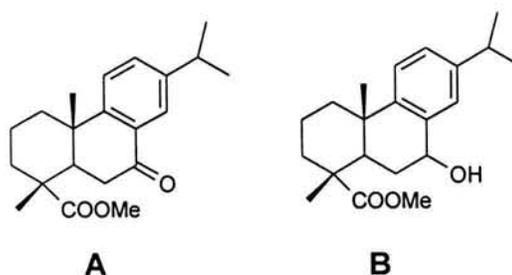


Figura 9. Productos de oxidación de algunas resinas ácidas. (A) 7-oxodehidroabietato de metilo y (B) 7-hidroxiabietato de metilo.

Además, el ácido abiético es tóxico de manera dosis y tiempo dependiente para el epitelio pulmonar y causa lisis de las células del epitelio alveolar, posiblemente causando asma y enfermedades pulmonares crónicas. Sin embargo, el mejor estudio de sus efectos tóxicos, deriva de él como contaminante del agua en la industria del papel (San Feliciano *et al.*, 1993), ya que no existen otro tipo de estudios que aporten mayor información.

3.4 Modificaciones químicas del ácido abiético y sus derivados

A pesar de que existen pocos trabajos sobre las modificaciones químicas realizadas sobre el ácido abiético, se ha encontrado que este compuesto y su metil éster muestran una alta sensibilidad a la oxidación en sus anillos B y C, mientras que el anillo A no se ve afectado, siendo las posiciones C-7 y C-13, las más susceptibles a la oxidación. En la figura 10 se muestran los compuestos obtenidos de esta oxidación, los cuales corresponden a derivados hidroxilados del esqueleto del ácido abiético (con



la pérdida de un doble enlace) y a derivados oxo- e hidroxidehidroabietatos (Prinz *et al.*, 2002).

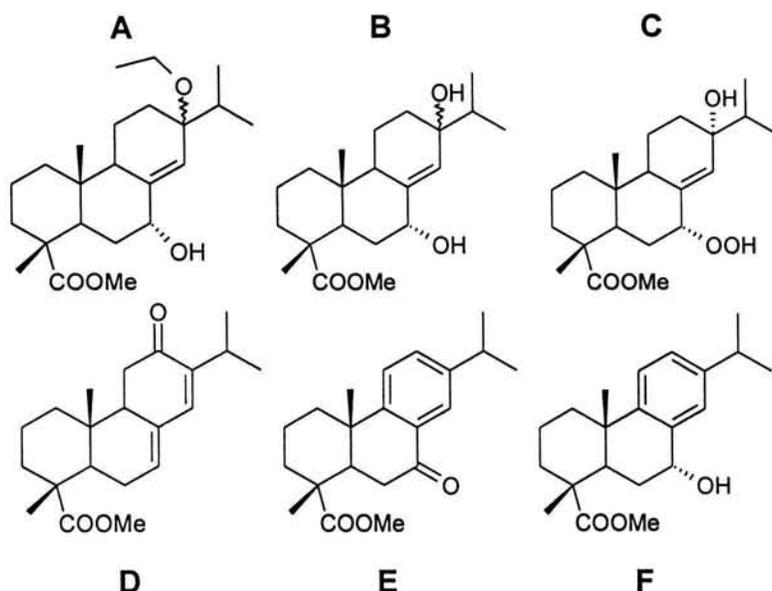


Figura 10. Productos de oxidación del ácido abiético. (A) 13-etoxi,7-hidroxiabiet,-8(14)enoato de metilo, (B) 7,13-dihidroxiabiet-8(14)enoato de metilo, (C) 7-hidroperoxiabiet,13-hidroxiabiet-8(14)enoato de metilo, (D) 12-oxoabietato de metilo, (E) 7-oxodehidroabietato de metilo y (F) 7-hidroxidehidroabietato de metilo..

Recientemente, Presser *et al.* (2002) obtuvieron otros derivados hidroxilados (trioles) del esqueleto del ácido abiético, diferentes de los obtenidos por Prinz *et al.* (2002), en los cuales por ozonólisis ocurre la apertura oxidativa en el doble enlace del anillo C obteniendo así un aldehído (Figura 11).

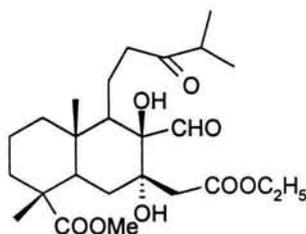


Figura 11. Producto de oxidación (diol) obtenido por ozonólisis.

Por otro lado, el ácido abiético (Figura 5) es un compuesto a partir del cual muchos derivados se han sintetizado. Su derivado aromático, el ácido dehidroabiético (Figura 6), puede ser obtenido por deshidrogenación del ácido abiético o puede aislarse de la parte ácida de las resinas, en las cuales este es el principal componente (Esteves *et al.*, 2001).



Del ácido dehidroabiético y sus derivados pocos estudios se han realizado. Esteves *et al.* (2001) obtuvieron algunos compuestos, arilaminas y diarilaminas (Figura 12), que poseen capacidad para atrapar radicales libres (antioxidantes) y sugirieron que debido a la presencia del grupo isopropilo en el anillo aromático del ácido dehidroabiético, este podría ser un material de partida para la obtención de antioxidantes, con la introducción apropiada de sustituyentes en su molécula.

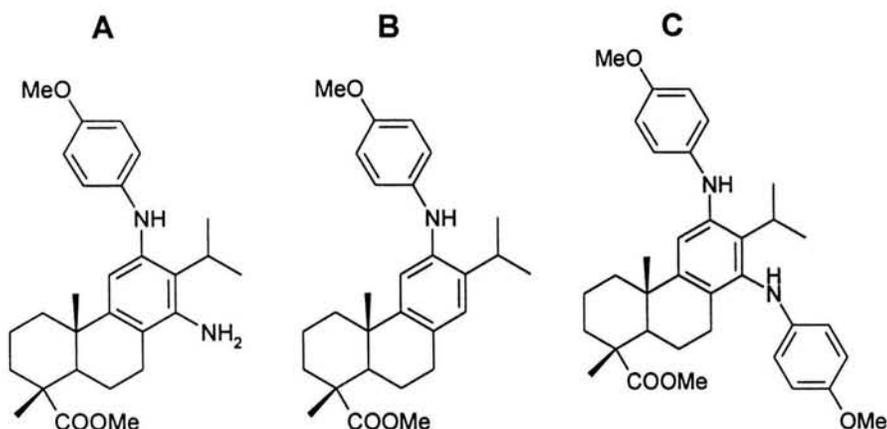


Figura 12. Arilaminas y diarilaminas derivadas del ácido dehidroabiético. (A) 12-(4-metoxifenil) amino-14-aminodehidroabietato de metilo, (B) 12-(4-metoxifenil) aminodehidroabietato de metilo y (C) 12,14 bis [(4-metoxifenil)amino] dehidroabietato de metilo.

Por otro lado, Fonseca *et al.* (2001) encontraron que el dehidroabietato de metilo es transformado rápidamente en el *cis*-deisopropilidehidroabietato de metilo con AlCl₃ y proponen que este compuesto podría ser un buen material de partida para la construcción de otros derivados. En este trabajo obtuvieron diferentes bencimidazoles a partir del esqueleto del ácido dehidroabiético, gracias a la nitración selectiva de su anillo aromático, empleando el reactivo "claycop" (arcilla impregnada de Cu-[II] nitrato).

Muftic (1970), encontró que en varios derivados abietanos, el grupo isopropilo no es esencial para la actividad antibacteriana contra grampositivas y gramnegativas, aunque menciona que este es necesario para inhibir el crecimiento de micobacterias. Schröder *et al.* (1970) concluyeron que el grupo isopropilo en la posición 13, es un requerimiento estructural para la actividad antibacteriana de varias dehidroabietaminas sustituidas en las posiciones 3, 4, 7 y 14. Mientras que Fukui *et al.*



(1978) encontraron que el grupo isopropilo en el anillo C del ácido dehidroabiético, juega un papel importante en la actividad inhibitoria, mientras que la presencia de un grupo hidroxilo en posición *orto*- al grupo isopropilo aumenta la actividad.

En otro trabajo, Feio *et al.* (1999) encontraron que el *cis* y el *trans* 7-oxodeisopropildehidroabietato de metilo y una mezcla de ambos isómeros poseen actividad antifúngica sobre *C. cucumerinum*, mientras que el 7-oxodehidroabietato de metilo mostró una débil actividad. Finalmente, sugirieron que el grupo isopropilo no es una característica estructural que se requiera para la actividad contra hongos. Además, la oxigenación en la posición 7 y la ausencia del grupo isopropilo son requerimientos estructurales para la expresión de propiedades antifúngicas. Estos datos indican que hay gran actividad antimicrobiana asociada con los derivados oxigenados. De hecho, la estereoquímica de la unión de los anillos A/B de la molécula no afectan el grado de actividad de los compuestos isoméricos del 7-oxodeisopropil dehidroabietato de metilo (Figura 13). Sin embargo, el mecanismo por el cual los derivados de resinas ácidas ejercen su actividad sobre hongos y bacterias no esta aún totalmente claro.

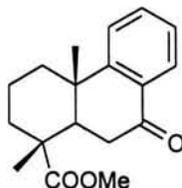


Figura 13. 7-oxodeisopropildehidroabietato de metilo.

4. BIOTRANSFORMACIONES

El potencial químico y biotecnológico de los sistemas bioquímicos, ha sido reconocido por el hombre desde la antigüedad, siendo la producción fermentativa del alcohol etílico y del vinagre dos ejemplos clásicos. Una vasta cantidad de productos naturales biológicamente activos, como los fármacos, se producen y se modifican mediante transformaciones enzimáticas o a través de fermentaciones.

Los científicos que trabajan en la frontera entre la química y la biología, han usado



transformaciones bioquímicas en sus investigaciones, aplicando microorganismos y/o enzimas para la solución de problemas mecanísticos y estereoquímicos (Cuadro 2) o bien estudiando las reacciones químicas catalizadas por dichas enzimas y su posterior implementación en procesos biotecnológicos (Valerio, 2001).

Cuadro 2. Biotransformaciones

PRODUCTOS: Fármacos Bebidas fermentadas Alimentos Productos de la química fina Tratamiento de residuos	BIOTRANSFORMACIONES	PROFESIONALES: Microbiólogos Bioquímicos Químicos Técnicos en informática Ingenieros Químicos Ingenieros Bioquímicos
INVESTIGACIÓN QUÍMICA	Mecanismo y estereoquímica Biotransformaciones	

Es en este contexto, reside el interés de presentar este trabajo; ya que uno de los desarrollos más significativos en el campo de la química orgánica sintética, ha sido la aplicación de sistemas biológicos; ya sean enzimas, extractos celulares o microorganismos viables, a las reacciones químicas orgánicas.

Así entonces, las biotransformaciones o bioconversiones, son las reacciones químicas catalizadas por enzimas o sistemas enzimáticos, que exhiben altos niveles de especificidad y selectividad quimio-, regio- y estereoquímica y que tienen como ventajas, trabajar en condiciones suaves como las siguientes:

- *Temperaturas moderadas*
- *pH's cercanos a la neutralidad*
- *Presión atmosférica*

Las reacciones químicas catalizadas por enzimas, son esencialmente las mismas que se llevan a cabo en la química orgánica convencional; es decir, las enzimas incrementan la velocidad de una reacción disminuyendo la energía de activación (E_a) del estado de transición, del mismo modo como lo hacen los catalizadores comunes. La diferencia fundamental entre estos y aquellas reside en la especificidad del sustrato, así como en los niveles de selectividad (quimio-, regio- y estereo-) que se



logra con las enzimas aisladas.

De este modo, es posible que la principal aportación de las enzimas a los procesos químicos, particularmente los orgánicos, sea su capacidad para ejercer diversos niveles de especificidad y selectividad (Cuadro 3), que no se logran tan fácilmente en la química orgánica tradicional (Valerio, 2001):

Cuadro 3. Selectividad de las enzimas

- Quimioselectividad
- Regioselectividad
- Estereoselectividad (*Enantio* y *Diastero*)
- Selectividad Pro quiral

4.1 Biocatalizadores

Las enzimas por ser macromoléculas quirales, catalizan reacciones que generan productos quirales y la interconversión de grupos funcionales. Estas propiedades catalíticas, han sido reconocidas por los químicos sintéticos; los cuales cada vez más, recurren a éstas para llevar a cabo la síntesis de compuestos. Prueba de esto, es el creciente número de trabajos publicados. Las enzimas representan un recurso potencial para la producción de moléculas de interés en campos tales como: productos naturales, agroquímicos, química medicinal y de alimentos, entre otros; debido a la capacidad que tienen de conducir reacciones quimio- y estereoespecífica y porque en general funcionan a temperatura y pH fisiológicos. Un método para aprovechar el poder de las enzimas es mediante las biotransformaciones o bioconversiones, que consisten en la modificación estructural de un sustrato en un bioproducto. Los biocatalizadores pueden ser: enzimas puras o extractos de éstas, cultivos de microorganismos (hongos, bacterias o levaduras), complejos enzimáticos, "enzimas artificiales" (sinzimas), células vegetales completas o extractos de ellas, anticuerpos catalíticos (abzimas) o ARNs (ribozimas). Aunque las biotransformaciones se conocen desde hace muchos años, no fue sino hasta 1976 cuando apareció la primera revisión sobre bioconversiones. También se han publicado libros y artículos que dan información de la transformación de sustratos específicos (esteroides,



alcaloides, azúcares y compuestos bioactivos) con un microorganismo en particular (Navarro-Ocaña, 1998).

4.1.1 Bioconversiones con *Saccharomyces cerevisiae*

Los microorganismos producen todos los catalizadores que necesitan para acelerar y coordinar las múltiples reacciones que necesitan para vivir; por eso los químicos sintéticos recurren con más frecuencia a ellos, por ser la fuente actual más importante de enzimas. Sin embargo, en muchas ocasiones los procesos de separación y purificación de enzimas son en general largos y costosos. En estos casos resulta más barato y conveniente utilizar toda la maquinaria enzimática de los microorganismos para llevar a cabo una transformación. Esto ha motivado que las células completas sean los biocatalizadores que más se usen en la preparación de una amplia gama de especialidades químicas.

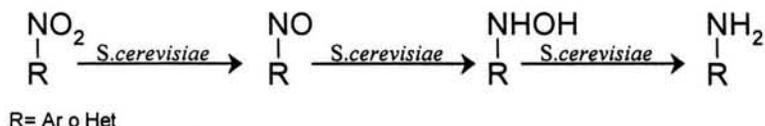
El uso de microorganismos para realizar reacciones de reducción se ha concentrado en gran parte en *S. cerevisiae* para substratos tanto orgánicos, como inorgánicos.

En química preparativa uno de los retos es la introducción de un centro quiral para preparar compuestos homo y poliquirales. La reducción microbiana de compuestos proquirales (carbonilos, oximas, etc) es la operación sintética a la cual se ha recurrido con más frecuencia y el microorganismo que más se ha empleado es *S. cerevisiae*. Otras reacciones sintéticas en que se han usado levaduras son: 1) interconversión de un grupo funcional a otro (por ejemplo compuestos nitrados a aminas, tioéteres a sulfóxidos, oximas a aminas, entre otros), 2) reacciones de formación de enlaces carbono-carbono y 3) reacciones de cicloadición y condensación.

A continuación, se mencionan algunas de las reacciones, en las que se ha empleado *S. cerevisiae*:



La hidrogenación del grupo nitro o de sus productos intermedios de reducción, es una reacción de interés biocatalizada por *S. cerevisiae* y siguiente a la reducción de carbonilos en términos de importancia (Figura 14).

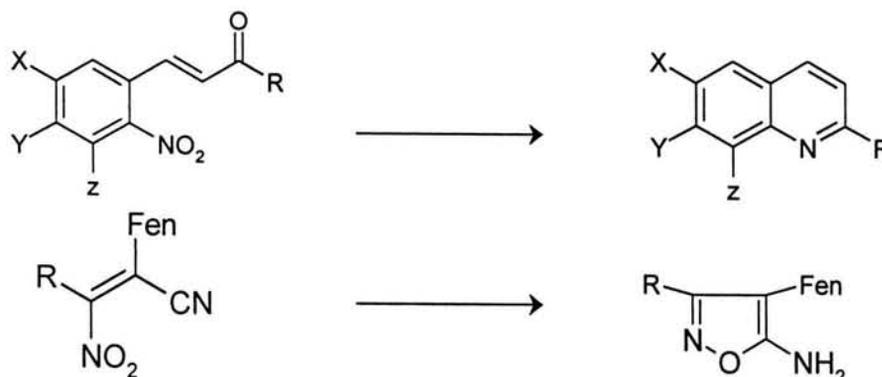


R= Ar o Het

Figura 14. Intermediarios de la reducción del grupo nitro con *S. cerevisiae*.

La figura 15 muestra las hidrogenaciones, de los trabajos que abordan la transformación de compuestos nitrados. Cuatro son de ciclización, donde dos se refieren a la ciclización de los 2-nitrocinnamaldehydos y los 1,2-nitrocianoarenos substituidos a las quinolinas y benzamidas correspondientes; mientras que los otros dos, se refieren a los 3-nitropropenonitrilos y al colorante o-nitrofenilazo para formar los 5-aminoisoxazoles y los 2-aryl-2H-benzotriazoles y sus óxidos respectivamente. Otros dos trabajos son sobre la biorreducción de los compuestos nitrosos y de los N-óxidos, para formar las anilinas y las piridinas correspondientes (Navarro-Ocaña, 1998).

Los trabajos anteriores se refieren a la reducción de un grupo nitro aromático, a excepción del segundo, que es sobre la biohidrogenación del grupo nitro de un compuesto nitrado α,β -no saturado (los (Z)-3-nitro-2-fenil-3-alkil o aril propeno nitrilos); siendo ésta, la primera publicación acerca de la reducción de un grupo nitro en un nitroalqueno (Navarro-Ocaña *et al.*, 1998).



R= H, Me, Arilo, Heterociclo

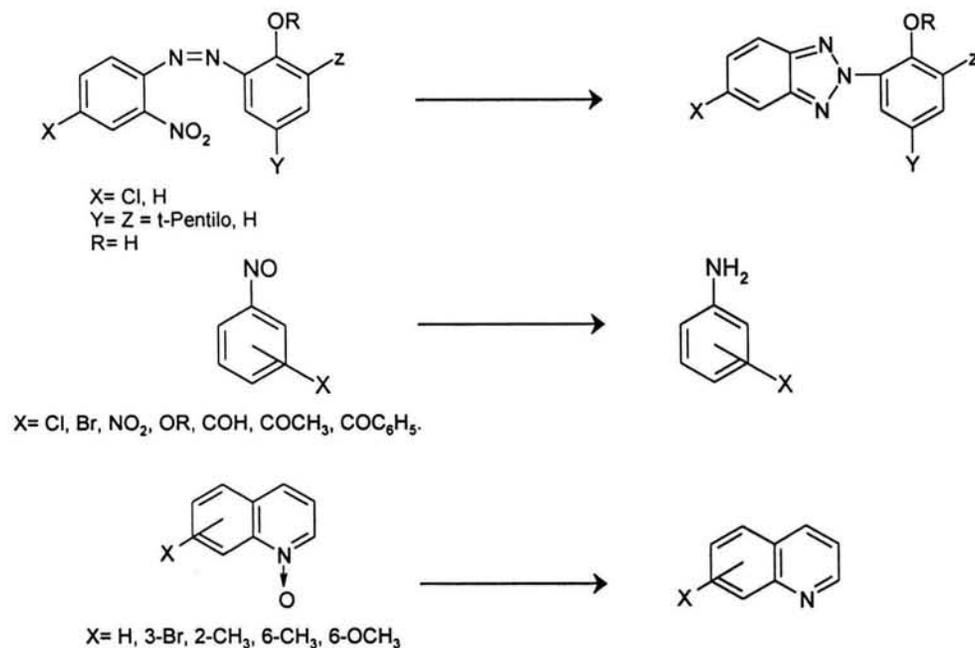


Figura 15. Biohidrogenación de compuestos nitrados con *S. cerevisiae*.

Otros grupos funcionales que se han transformado usando la capacidad reductora u oxidante de *S. cerevisiae* son: las biorreducciones de las azidas arílicas a aminas arílicas, la biooxidación de cetonas a lactonas, mejor conocida como reacción de Baeyer-Villiger, la oxidación de ditioles alicíclicos y cíclicos a sulfóxidos y sulfonas y la de sulfuros a sulfóxidos quirales (Navarro-Ocaña, 1998).

4.1.2 Lipasas

Dentro del grupo de las hidrolasas, las lipasas son las enzimas más utilizadas para llevar a cabo transformaciones de compuestos orgánicos, debido a que se dispone de una gran variedad de ellas, a su costo relativamente bajo y a su flexibilidad para aceptar sustratos de diferentes estructuras.

Las lipasas son triacilglicerolhidrolasas (EC 3.1.1.3) y su función natural es la hidrólisis de triglicéridos. Se han caracterizado un gran número de ellas y se ha visto que presentan amplia variedad, tanto en eficiencia como en especificidad. La estructura primaria de varias lipasas se ha obtenido mediante secuenciación de sus aminoácidos o de sus ácidos nucleicos. Su tamaño varía entre los 270 y los 641



aminoácidos. Todas las lipasas estudiadas hasta el momento comparten secuencias homólogas, incluyendo la serina en el entorno del sitio activo, Gly-Y-Ser-Z-Gly, donde Y y Z denotan residuos de aminoácidos que pueden variar (Valerio, 2001).

Algunas lipasas catalizan diferentes reacciones (transesterificación, esterificación, aminolisis, intercambio de grupos acilo, tiotransesterificación, entre otras), en diferentes solventes como: hexano, acetona, éter, piridina, tolueno (Silverman, 2002).

A. Usos de las lipasas

Las lipasas son enzimas que hidrolizan los ácidos grasos de los ésteres de glicerol. Se diferencian en base a su capacidad de actuar sobre sustratos solubles (esterasas) o sobre sustratos insolubles (lipasas). En la industria de los alimentos, las lipasas son importantes en la manufactura del queso, ya que se emplean para obtener el aroma y el sabor de algunos quesos (Berry & Paterson, 1990). Las lipasas también se emplean para mejorar las propiedades de espumado del huevo (Badui, 1988).

4.2 Biotransformaciones del ácido abiético y sus derivados

La oxidación microbiana de varios compuestos incluyendo los diterpenoides, es de considerable interés como una etapa clave en la síntesis de compuestos importantes, debido a la alta estereoselectividad de las biotransformaciones y a la capacidad de los microorganismos para modificar químicamente fragmentos moleculares no activados (Vorob'ev *et al.*, 2001).

Las biotransformaciones son métodos útiles para producir compuestos químicos de uso en la medicina y en la agricultura a partir de productos naturales activos o inactivos. El ácido dehidroabiético, es un ejemplo de esto.

En algunos trabajos se ha empleado el ácido dehidroabiético y el isopimárico como fuentes de carbono en los cultivos bacterianos y se ha demostrado que muchas cepas de *Rhodococci* como: *R. erythropolis*, *R. fascinas*, *R. longus*, *R. opacus*, *R. rhodochrous* y *R. ruber*, exhiben poca actividad de transformación (no mayor a 5%),



mientras que otras cepas de *Rhodococci* fueron capaces de transformar de 35.3 a 95.4% de los diterpenoides iniciales. Además, *R. erythropoliys* IEGM 267, *R. ruber* IEGM 472 e IEGM 474 oxidaron selectivamente el ácido dehidroabiético y *R. erythropoliys* IEGM 192, *R. ruber* IEGM 457, IEGM 467 e IEGM 468 oxidaron el ácido isopimárico (Vorob'ev *et al.*, 2001).

Las biotransformaciones del ácido dehidroabiético por *R. ruber* IEGM 472 e IEGM 474 resultan en la aparición de un compuesto con $m/z=328$ (12.4 y 14.6%, respectivamente) en la mezcla de reacción, identificado como 7-oxodehidroabietato de metilo (Figura 16) (Vorob'ev *et al.*, 2001).

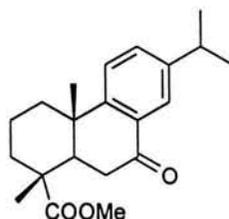


Figura 16. 7-oxodehidroabietato de metilo.

Al 70 % de conversión del ácido dehidroabiético por *R. erythropolis* IEGM 267, los productos de reacción metilados contienen 23.6% de 15-hidroxidehidroabietato de metilo (Figura 17a), como constituyente mayor en una mezcla con compuestos menores: 7-oxodehidroabietato de metilo (Figura 16), 7 β -hidroxidehidroabietato de metilo (Figura 17b) y 7-oxo-15-hidroxidehidroabietato de metilo (Figura 17c). La autooxidación del dehidroabietato de metilo resulta en la formación de 7 α -hidroxidehidroabietato de metilo (Vorob'ev *et al.*, 2001).

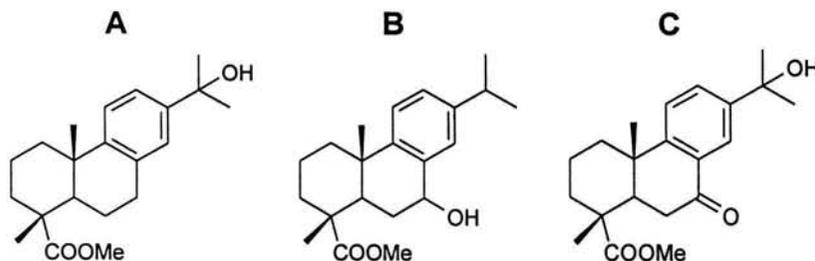


Figura 17. Productos metilados del ácido dehidroabiético por *R. erythropolis* IEGM 267. (A) 15-hidroxidehidroabietato de metilo, (B) 7 β -hidroxidehidroabietato de metilo y (C) 7-oxo-15-hidroxidehidroabietato de metilo.



Por otro lado, se sabe que el ácido dehidroabiético y su metil éster pueden ser transformados por diferentes microorganismos; ya que bacterias y hongos, proveen productos de hidroxilación, descarboxilación, oxidación e hidrólisis, entre otros. Para estas transformaciones se han usado: *Flavobacterium*, *Resinovorum*, *Arthrobacter sp.*, *Corticium sasakii*, *Alcaligenes eutrophus* y *Pseudomonas sp.* Sin embargo, no hay reportes usando otros microorganismos.

Tapia *et al.* (1997) reportaron la hidroxilación del ácido dehidroabiético por *Fusarium oxysporum* y *Fusarium Moniliforme* y determinaron que la estructura del nuevo metabolito obtenido de la biotransformación corresponde al ácido 1 β -hidroxidehidroabiético (Figura 18).

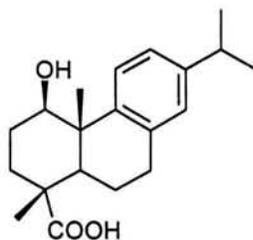


Figura 18. Producto hidroxilado del ácido dehidroabiético por *F. Oxysporum* y *F. Moniliforme*.

Este estudio indica que *F. oxysporum* y *F. moniliforme* pueden biotransformar el ácido dehidroabiético, para formar un metabolito mas polar que el material de partida. Además, encontraron que la hidroxilación del ácido dehidroabiético disminuye su actividad anti-bacterial.

5. ÁCIDO FERÚLICO

5.1 Características químico-biológicas

El ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxi-trans cinámico) fue descrito en 1866 como un componente de *Ferula foetida* (Rosazza *et al.*, 1995) y se sabe que es el ácido hidroxicinámico más abundante en las paredes celulares de las plantas (Liyama *et al.*, 1990). En el maíz, se encuentra unido covalentemente a polisacáridos por enlaces éster y a compuestos de la lignina por enlaces éter. Este modelo aplica a



todas las plantas, en especial a las gramíneas.

El ácido ferúlico (Figura 19) y el ácido cumárico son ácidos cinámicos que se liberan durante la extracción de la lignina.

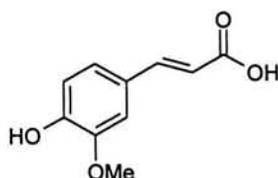


Figura 19. Ácido ferúlico.

5.2 Importancia y utilización en la industria

El ácido ferúlico se emplea como antioxidante natural en algunos alimentos y es un ingrediente activo en lociones y cremas protectoras contra rayos UV solares (Micard *et al.*, 1997); como fotoprotector, protege al cuerpo contra radicales libres y especies reactivas del oxígeno. También está asociado con actividades antitumorales, antihepatóxicas, antiestrogénicas y antimicóticas; además se utiliza en suplementos alimenticios, como los complejos vitamínicos y los productos naturistas (Kroon & Williamson, 1999).

Existe un sustancial interés en el ácido ferúlico, debido a la producción biotecnológica de la vainillina, uno de los principales saborizantes y componentes que proporcionan aroma en todo el mundo.

En las plantas, el ácido ferúlico es precursor de una gran variedad de compuestos: antimicrobianos, moléculas receptoras de señales y fitolexinas, las cuales juegan un papel importante en la respuesta de defensa de la planta (Gasson *et al.*, 1998).

El ácido ferúlico junto con el ácido p-cumárico retardan la captura de iones y la síntesis de proteínas en las plantas, inhiben la germinación de la semilla y los productos de degradación de éstos retardan el crecimiento de patógenos en las plantas. Además, se ha demostrado que los ácidos fenólicos retardan el crecimiento



de muchos organismos involucrados en el ciclo del nitrógeno, ya que si el ácido ferúlico se adiciona al suelo, se observa un incremento en el desprendimiento de CO₂ (Turner & Rice, 1995).

En algunos estudios que se han realizado con el maíz, la resistencia de algunas poblaciones ante las plagas, se ha relacionado con la concentración de ácidos fenólicos en el pericarpio; encontrándose una mayor cantidad de dichos ácidos en los maíces que son mas resistentes. Sugiriendo por tanto, que la cantidad de ácido ferúlico está relacionada con la susceptibilidad o la resistencia del maíz ante las plagas (Classen *et al.*, 1999).

Empleando microscopía fluorescente, Classen *et al.* (1999) reportaron que los ácidos fenólicos se encuentran en mayor cantidad en el pericarpio (parte externa de la cubierta del grano) que en el endospermo, lo que corrobora la función de estos ácidos en la resistencia del maíz ante las plagas.

5.3 Fuentes

La familia ***Gramineae*** (Poaceae, gramíneas), constituye un grupo cosmopolita de unos 500 géneros y unas 8,000 especies. Pertenecen al orden *Juncales* en la clase ***Commelinidae***. Probablemente es la familia individual más importante de plantas desde el punto de vista de consumo humano. El trigo, el arroz, el maíz, la avena, el centeno, la cebada, la caña de azúcar y el bambú son ejemplos de gramíneas que pertenecen a este grupo y que son importantes para el hombre.

El ácido ferúlico, se encuentra aproximadamente en un 2% en las cascarillas del grano de maíz. En 1990 cerca de 8 mil millones de bushels (1 bushel = 35.273 L) de maíz fueron cosechados en Estados Unidos, los cuales produjeron 1000 millones de libras de ácido ferúlico como materia prima para biotransformaciones (Huang *et al.*, 1993).



En monocotiledoneas como el maíz, el ácido ferúlico se encuentra esterificado al carbono 5 del grupo hidroxilo de algunos residuos de piranosas y de arabinosas (Hartley *et al.*, 1990). Mientras que en dicotiledoneas, se encuentra esterificado al carbono 2 del grupo hidroxilo de residuos de galactopiranosas de la pectina (Ralet *et al.*, 1994).

México produce una gran cantidad de maíz. Según los reportes de la SAGAR en el año 2000 se produjeron 19.2 millones de toneladas en un área equivalente a 80 millones de hectáreas. Debido a que la producción nacional no satisface las demandas nacionales de maíz, también se importa una gran cantidad de esta gramínea (alrededor de 4.7 millones de toneladas en 1998).

En México, el maíz se consume de diversas maneras entre las que se encuentran: 1) Harina para tortilla, que abarca el 18% de la producción nacional; 2) Maíz destinado a la elaboración de tortilla, alcanzando un 17%; 3) Como base de alimentos, lo que equivale al 40% y 4) Otras formas de consumo equivalentes al 13%.

Cabe señalar que la producción de maíz en nuestro país no es homogénea geográficamente, ya que la región Oeste produce el 12% de la producción nacional, la región Noreste aporta el 14%, la región Sureste aporta el 25% y finalmente el Centro de la República aporta el 49%. Por lo general, en el periodo primavera-verano se obtiene el 86% de la producción nacional y el 14% restante se obtiene durante otoño-invierno.



III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

La calidad organoléptica, es la primera y más obvia característica que se trata de conservar en los alimentos ya que se puede ver afectada por la oxidación de los lípidos (Hall & Lingnert, 1986). Los hidroperóxidos, productos de oxidación primaria, no afectan el sabor ni tampoco influyen en las propiedades reológicas de los alimentos; sin embargo, sus productos de degradación (aldehídos, cetonas o alcoholes) son potentes modificadores del sabor y algunas veces modifican la estructura del producto (Lölinger, 1991).

Diferentes vías se han empleado para evitar la oxidación de los lípidos, una de estas es: el uso de antioxidantes. Aunque muchos compuestos, tanto naturales como sintéticos poseen actividad antioxidante, solo un limitado número de estos, se aprovecha para su uso en los alimentos, debido a que algunas propiedades físicas (solubilidad, volatilidad, etc.), rigen su uso (Love, 1992; Esteves *et al.*, 2001). Por ello, la obtención de nuevos antioxidantes que no presenten estas limitaciones, incrementaría el uso de estos en la industria de los alimentos. Una solución a la pérdida y migración de los antioxidantes, es el desarrollo de compuestos como la obtención de nuevos derivados del ácido abiético, que podrían ser usados como aditivos de mejor calidad y más competitivos en materiales innovadores, por su alto peso molecular y la versatilidad funcional de su C-18.

Basándonos en lo anterior, se plantea la siguiente hipótesis:

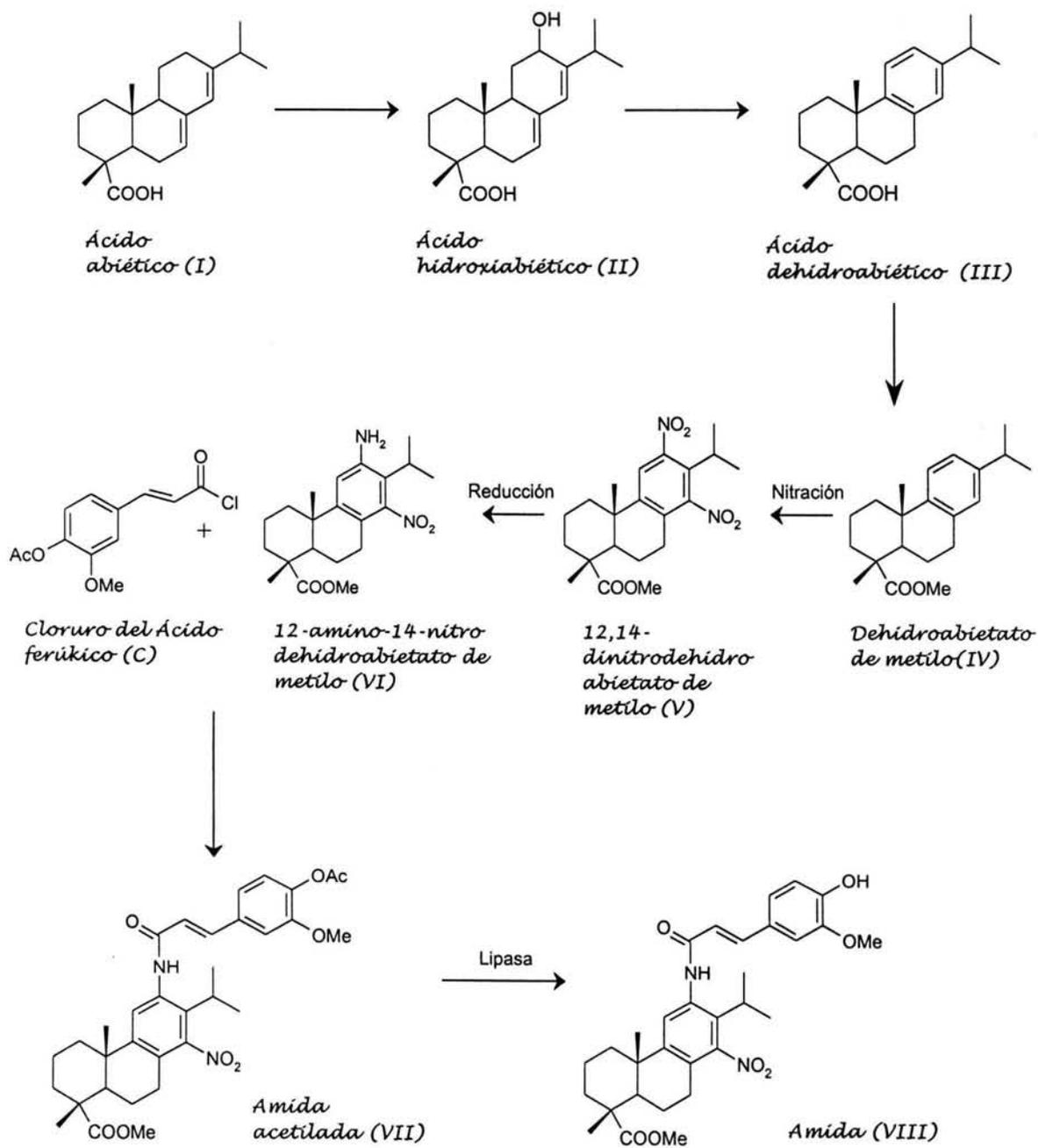
Debido a que algunas aminas ariladas del ácido dehidroabiético tienen actividad antioxidante, es posible que nuevos compuestos (amidas), obtenidos a través de la reacción entre el cloruro del ácido ferúlico y la amina del ácido dehidroabiético, presenten mejor actividad antioxidante que la que muestra el ácido ferúlico; así como mejor solubilidad y menor volatilidad debido al mayor tamaño en su estructura.



IV. OBJETIVOS

1. GENERAL

- Sintetizar una amida con actividad antioxidante a partir del cloruro del ácido ferúlico y del 12-amino,14-nitrodehidroabietato de metilo.





2. PARTICULARES

- Obtener el ácido hidroxiabiético (*II*) a partir de ácido abiético (*I*).
- Obtener ácido dehidroabiético (*III*) a partir del intermedio ácido hidroxiabiético (*II*).
- Caracterizar los ácidos obtenidos.
- Obtener y caracterizar el dehidroabietato de metilo (*IV*), a partir del ácido dehidroabiético (*III*).
- Obtener el compuesto dinitrado a partir del dehidroabietato de metilo para su posterior reducción y caracterizar los compuestos obtenidos (dinitrado, *V* y amina, *VI*).
- Aislar el ácido ferúlico (*A*), a partir de residuos orgánicos como es el nejayote.
- Obtener los derivados del ácido ferúlico (ácido ferúlico acetilado, *B* y cloruro del ácido ferúlico, *C*).
- Incorporar el cloruro del ácido ferúlico (*C*) a la amina obtenida (*VI*), mediante una reacción de condensación y caracterizar el compuesto obtenido (amida acetilada, *VII*).
- Obtener la amida desprotegida (*VIII*) y caracterizarla.
- Evaluar la actividad antioxidante del compuesto obtenido.



V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. RECTIVOS Y EQUIPO

1.1 Reactivos

El ácido clorhídrico concentrado (HCl conc.), el acetato de etilo (AcOEt), la acetona, el metanol (MeOH), el sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4 anh.), el hexano, el etanol (EtOH), el carbonato de sodio (Na_2CO_3), el éter etílico, el ácido acético glacial (CH_3COOH), el diclorometano (CH_2Cl_2), el tolueno y el éter de petróleo fueron de Reasol. El ácido ferúlico al 98%, empleado como estándar fue de Fluka. El ácido abiético al 70%, la malla molecular, el tricloruro de aluminio (AlCl_3) y la dimetilformamida al 99.8% (DMF) fueron de Sigma Aldrich. El dióxido de selenio sublimado (SeO_2) fue de Merck. El ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 conc.), el ácido nítrico concentrado (HNO_3 conc.) y el hidróxido de sodio (NaOH) fueron de JT Baker. El cloruro estanoso dihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y el carbón activado fue de Reactivos Químicos Monterrey. El 1,1-difenil,2-picrilhidrazil (DPPH), la vainillina, el cloruro férrico (FeCl_3) y el sulfato cérico fueron de Sigma. El nitrógeno ultra alta pureza al 99.9% fue de AGA. El oxígeno extra seco pureza al 99.5% fue de Infra.

Todos reactivos empleados fueron grado reactivo analítico. El agua empleada en todos los experimentos fue destilada.

El nejayote empleado para la extracción del ácido ferúlico, se obtuvo de un molino de nixtamal.

Las placas empleadas en cromatografía en capa fina (ccf) Alugram SIL G/UV₂₅₄ de 0.2 mm, las placas empleadas en cromatografía en capa fina preparativas DC-Fertigplatten SIL G-200 de 2 mm y la sílica gel MN-Kieselgel G fueron de Macherey-Nagel.

1.2 Reactivos biológicos

La lipasa "Lipozyme" fue de Novozymes.

La levadura *Sacharomyces cereviceae* fue de Safe-instant. El *Bacillus* sp. fue aislado de mucígalos de café, de una zona de la Sierra del Estado de Puebla.



El medio de cultivo mínimo empleado en los experimentos de hidroxilación con *Bacillus* sp. tenía la siguiente composición: NH_4Cl (JT Baker), MgSO_4 (Mallinckrodt), KH_2PO_4 (JT Baker), Na_2HPO_4 (Merck) y glucosa (Merck).

1.3 Equipo

Incubadora agitadora, modelo 3531 (THERMOLYNE); autoclave HA-240MII (HIRAYAMA); bomba de vacío, modelo WP-25 (OAKTON); Cámara de UV (CAMAG); Aparato para medir punto de fusión 1001D (MEL-TEMP); rotavapor waterbath R-200 (BÜCHI); Parrilla de calentamiento con agitación magnética, modelo SPA 1025P (THERMOLYNE); balanza AP 110S (OHAUS); baño de agua (OAKTON); recirculador de agua con control digital de temperatura 9101 (POLY SCIENCE) y Centrífuga 3000 (MISTRAL).

1.4 Análisis espectroscópicos de los compuestos obtenidos

Los compuestos obtenidos, fueron analizados por espectroscopia de ultravioleta (UV), espectroscopia de infrarrojo (IR), espectroscopia de masas (EM), resonancia magnética nuclear protónica (RMN- ^1H) y resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN- ^{13}C).

Los espectros de RMN- ^1H fueron determinados utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3) con tetrametilsilano (TMS) como referencia interna en los espectros Varian VXR (300 MHz), Varian Gemini (200 MHz) y Varian EM-390 (90 MHz), los desplazamientos químicos de las señales están dados en partes por millón (δ) y las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hertz (Hz). Los símbolos empleados en la descripción de las señales representan lo siguiente: s: singulete, d: doblete, dd: doble de dobletes, t: triplete y m: multiplete.

Los espectros de RMN- ^{13}C fueron determinados utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3), los desplazamientos químicos de las señales están dados en partes por millón (δ).

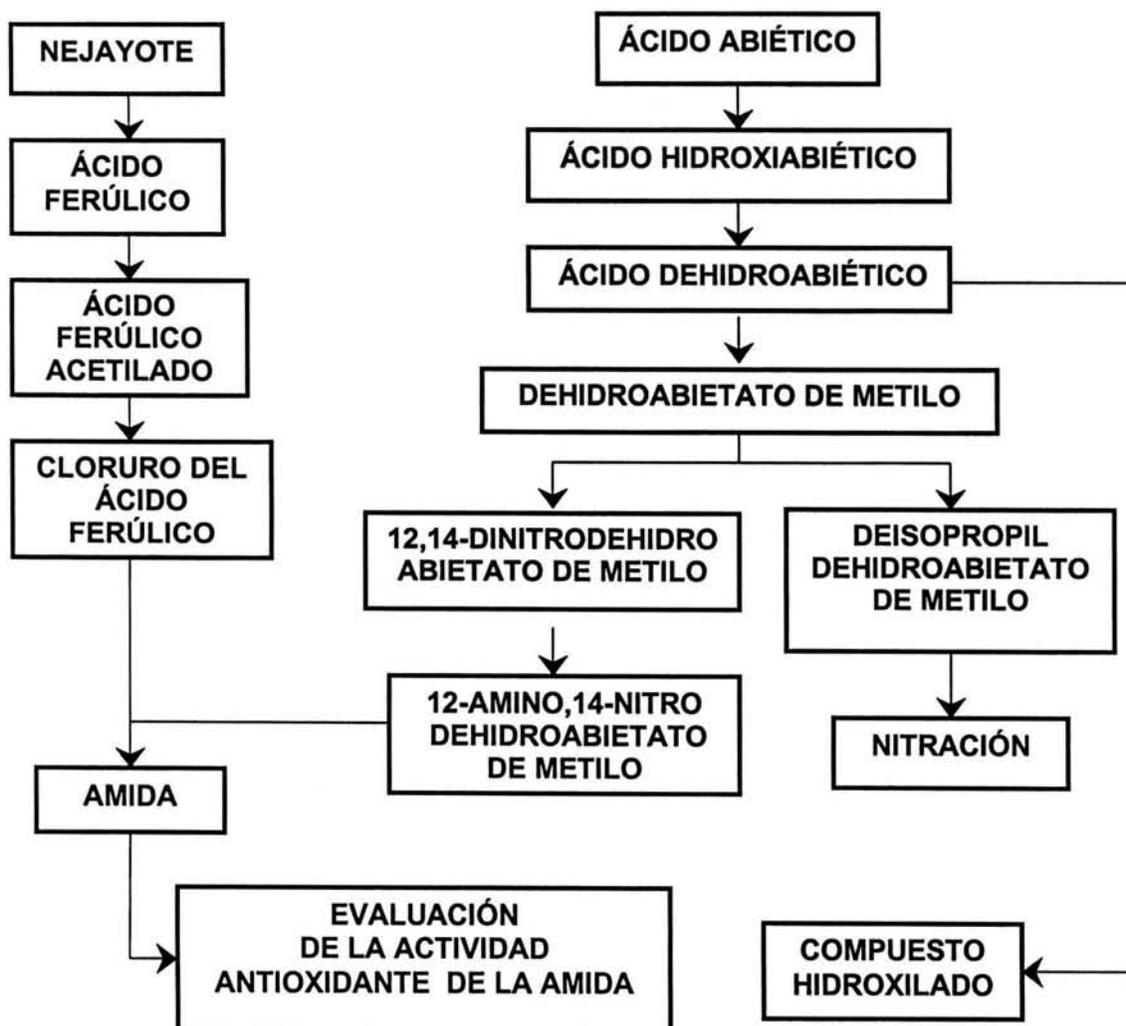


Los espectros de masas fueron registrados en un espectrómetro Hewlett.Pacard 5945^a mediante la técnica de impacto electrónico (70 eV), se da el valor de m/e del ión molecular M⁺ y entre paréntesis se indica la abundancia relativa.

Los espectros de IR, se determinaron en un espectrofotómetro FTIR Perkin Elmer 1600, las determinaciones se realizaron en pastilla de bromuro de potasio (KBr), las unidades se expresan en cm⁻¹.

2. DIAGRAMA GENERAL DE LA SÍNTESIS

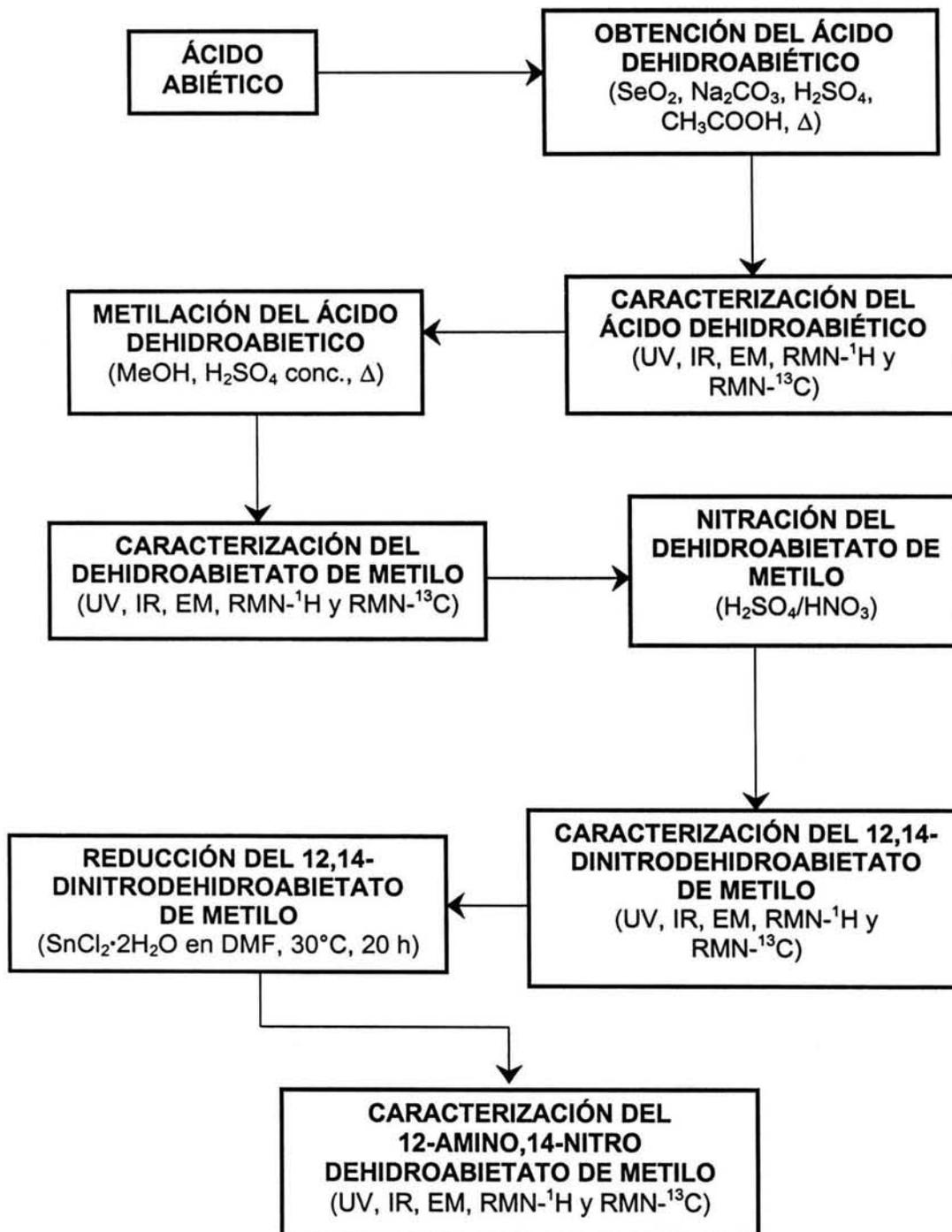
En el siguiente diagrama se muestra de manera general la metodología seguida, para llevar a cabo la síntesis de la amida a través de los diferentes derivados del ácido abiético y el ácido ferúlico, junto con algunas rutas alternas.





2.1 Diagrama de obtención del 12-amino,14-nitrodehidroabietato de metilo

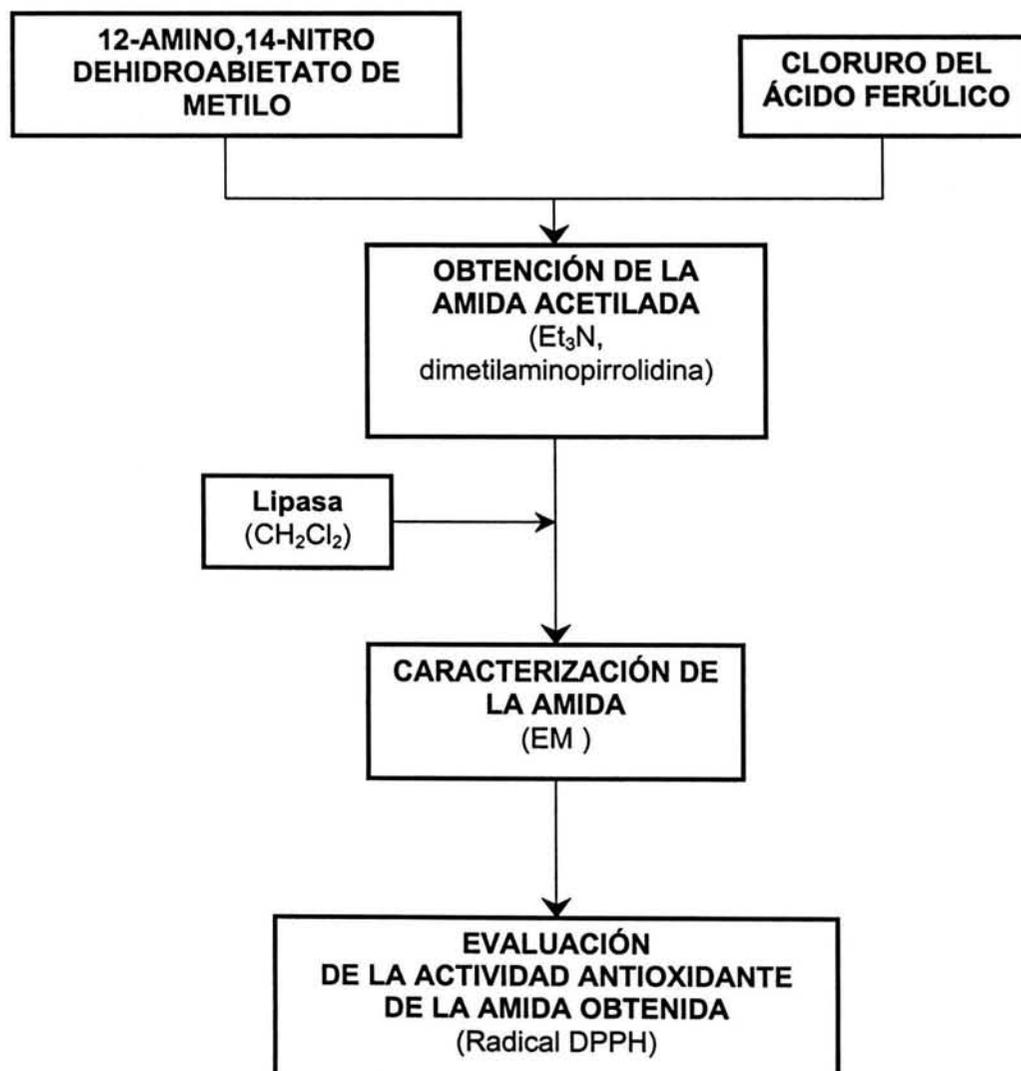
En el siguiente diagrama se muestra la metodología seguida, para la obtención del 12-amino,14-nitrodehidroabietato de metilo a partir del ácido abiético y sus derivados.





2.2 Diagrama de obtención de la amida

El siguiente diagrama muestra la metodología empleada, para la obtención de la amida; obtenida a partir del 12-amino,14-nitrodehidroabietato de metilo y el ácido ferúlico.



3. OBTENCIÓN DEL ÁCIDO DEHIDROABIÉTICO

3.1 Obtención de la sal sódica del ácido hidroabiético

A una solución fría de 35 g de ácido abiético en 406 mL de etanol, se le adicionaron 84 mL de SeO₂ (15 g de SeO₂ en 100 mL de etanol al 80%) y se dejó reposar durante 16 h (en este tiempo el selenio se separó). Posteriormente, esta



solución se colocó en una mezcla de 1347 mL de H₂O y 368 mL de una solución de Na₂CO₃ al 10% y por último se adicionaron 32 g de carbón activado.

Después de que la mezcla de reacción anterior estuvo en reposo durante 20 min, ésta se filtró a vacío en un embudo büchner, con una cama de celita y otra de carbón activado (el lavado se omitió ya que el selenio se puede pasar al filtrado). El filtrado se acidificó, con la adición lenta de 78 mL de H₂SO₄ 6N y agitación constante, fomándose lentamente un precipitado.

El producto obtenido fue recuperado y lavado con H₂O destilada, se filtró a vacío en un embudo büchner y se secó. Para obtener la sal libre de material resinoso, la sal se puso a reflujo durante 10 min, con 50 mL de éter etílico y el sólido no soluble se separó una vez que la solución se enfrió. Después, se filtró a vacío en un embudo büchner y se lavó con 10 mL de éter etílico frío (Fieser & Campbell, 1938).

3.2 Recristalización de la sal sódica del ácido hidroxiabiético

Se disolvieron 0.5 g la sal sódica del ácido hidroxiabiético en 5 mL de etanol; ya disuelto, se evaporó el disolvente hasta que el volumen final fue la mitad del volumen inicial (la evaporación fue lenta). Se dejó reposar durante 24 h para obtener los cristales de la sal sódica del ácido hidroxiabiético (Fieser & Campbell, 1938).

Finalmente, el producto aislado se analizó mediante métodos fisicoquímicos y espectroscópicos.

UV: λ_{\max} [240.08 - 0.64884].

IR: (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3446 y 1058 (OH), 2957 (C-H), 1706 y 1268 (C=O), 1604 (C=C-C=C), 1383 y 1147 (isopropilo).

EM: m/z 318(M⁺): 318 (10%), 303 (9%), 301 (80%), 149 (45%), 109 (22%).

RMN¹H: δ 0.89 (3H,s) C₂₀; 1.01 - 1.04 (6H,d) C₁₆ y C₁₇ J = 6.9 MHz; 1.28 (3H,s) C₁₉; 5.45 (1H,m) C₇; 5.72 (1H,s) C₁₄.

RMN¹³C: δ 183.8(C₁₈), 144.7(C₁₃), 136.3(C₈), 124.3(C₁₄), 120.4(C₇), 72.9(C₁₂), 46.2(C₉), 39.5(C₄), 37.3(C₅), 36.8(C₁), 34.7(C₃), 30.2(C₁₅), 26.5(C₁₀), 25.8(C₆), 23.2(C₁₁), 21.4(C₁₇), 20.9(C₁₆), 18.0(C₂), 17.0(C₁₉), 16.6, (C₂₀).

3.3 Obtención del ácido dehidroabiético a partir de la sal sódica del ácido hidroxiabiético

Se disolvieron 9 g de la sal sódica del ácido hidroxiabiético en 46 mL de ácido acético glacial y la solución fue puesta a ebullición por un período de 8 min con



agitación constante. Después de que la solución se enfrió, se le adicionaron 128.5 mL de etanol frío.

El producto se obtuvo como un precipitado, después de la lenta adición de H₂O fría. El compuesto obtenido fue recristalizado de hexano (Fieser & Campbell, 1938).

3.4 Recristalización del ácido dehidroabiético

Se disolvieron 2 g de ácido dehidroabiético en 15 mL de hexano y se evaporó el disolvente hasta que el volumen final fue la mitad del volumen inicial (la evaporación fue lenta y no sobrepasó de 30°C). Se dejó reposar durante 24 h, para obtener los cristales de ácido dehidroabiético (Fieser & Campbell, 1938).

Finalmente, el producto aislado se analizó mediante métodos fisicoquímicos y espectroscópicos.

UV: λ_{\max} [266.26 - 0.44075/ 274.36 - 0.41566].

IR: (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2957 (C-H), 1693 y 1280 (C=O), 1363 y 1387 (isopropilo), 1497 y 819 (aromático).

EM: m/z 300(M^+): 300 (25%), 285 (100%), 239 (80%), 197 (25%), 183 (5%), 141 (12%), 129 (7%).

RMN¹H: δ 1.20 - 1.21 (6H,d) C₁₆ y C₁₇ J = 2.1 MHz; 1.23 (3H,s) C₂₀; 1.27 (3H,s) C₁₉; 1.50 - 1.57 (2H,m) C₆; 1.72 - 1.89 (6H,m) C₁, C₂, C₃; 2.21 - 2.26 (1H,dd) C₅ J = 12.4 MHz; 2.77 - 2.88 (2H,m) bencilico-CH₂; 2.90 - 2.94 (1H,m) C₁₅; 6.88 (1H,d) aromático st. J= 1.5 MHz; 6.97 - 7.01 (1H,dd) aromático st. J=8.2 MHz; 7.16 (1H,d) aromático st. J= 8.1 MHz; 11.40 (1H,s) C₁₈.

RMN¹³C: δ 185.1(C₁₈), 146.7(C₁₃), 145.7(C₈), 134.7(C₉), 126.9(C₁₄), 124.1(C₁₂), 123.9(C₁₁), 47.4(C₄), 44.5(C₅), 37.9(C₁), 36.8(C₁₀), 36.7(C₃), 33.4(C₁₅), 30.9(C₇), 29.9(C₂₀), 25.1(C₁₉), 23.9(C₂), 21.7(C₆), 18.5(C₁₆), 16.2(C₁₇).

3.5 Obtención del dehidroabietato de metilo a partir de ácido dehidroabiético

Se disolvieron 0.9 g de ácido dehidroabiético en exceso de MeOH anh.; se agregó malla molecular en un 10% y 3 mL de H₂SO₄ conc. para llevar a cabo la reacción, durante 12 h a reflujo, con temperatura de 70°C y con agitación constante (Esterificación de Fisher).

Después de este período, se filtró a vacío en un embudo büchner y al filtrado se le adicionaron 25 mL de H₂O fría. La extracción del compuesto, se llevó a cabo con 2x20 mL de CH₂Cl₂ y 1x20 mL de tolueno. Las fracciones orgánicas se juntaron, se secaron con Na₂SO₄ anh. y posteriormente se concentraron en un rotavapor a sequedad con la ayuda de una bomba de alto vacío.



Adicionalmente, se emplearon dos métodos para obtener el dehidroabietato de metilo, en uno de ellos se empleo al sulfato de metilo como agente metilante y en el otro se empleo lipasas y MeOH. Los rendimientos obtenidos por estos métodos se mencionan en la sección de resultados.

3.6 Purificación del dehidroabietato de metilo

Para la purificación del éster, se montó una cromatografía en columna de sílica gel de 6 cm de alto por 5 cm de diámetro empacada con hexano y eluída con el par de disolventes hexano-AcOEt 9:1. La purificación del éster, se siguió por medio de ccf, a lo largo de todas las fracciones.

Finalmente, el producto aislado se analizó mediante métodos fisicoquímicos y espectroscópicos.

UV: λ_{\max} [266.84 - 0.60102/ 274.77 - 0.56450].

IR: (KBr) V_{\max}/cm^{-1} 2925 (C-H), 1721 (C=O), 1250 y 1039 (C-O), 1379 y 1363 (isopropilo), 1496 y 823 (aromático).

EM: m/z 314(M⁺): 314 (35%), 299 (40%), 255 (6%), 239 (100%), 197 (11%), 173 (8%), 141 (7%).

RMN¹H: δ 1.20 (3H,s) C₂₀; 1.23 (3H,s) C₁₉; 1.25 - 1.27 (6H,d) C₁₆ y C₁₇ J = 5.1 MHz; 1.41 - 1.44 (2H,m) C₆; 1.72 - 1.89 (6H,m) C₁, C₂, C₃; 2.21 - 2.26 (1H,dd) C₅ J = 12.6 MHz; 2.77 - 2.82 (2H,m) bencilico-CH₂; 2.84 - 2.90 (1H,m) C₁₅; 3.65 (3H,s) COOCH₃; 6.87 (1H,d) aromático st. J= 1.2 MHz; 6.97 - 7.01 (1H,dd) aromático st. J=8.2 MHz; 7.16 (1H,d) aromático st. J= 8.1 MHz.

RMN¹³C: δ 179.0(C₁₈), 146.8(C₁₃), 145.7(C₈), 134.6(C₉), 126.8(C₁₄), 124.1(C₁₂), 123.8(C₁₁), 51.8(C₂₁), 47.6(C₄), 44.8(C₅), 37.9(C₁), 36.9(C₁₀), 36.6(C₃), 33.4(C₁₅), 29.9(C₇), 29.6(C₂₀), 25.0(C₁₉), 23.9(C₂), 21.6(C₆), 18.5(C₁₆), 16.5(C₁₇).

3.7 Obtención del 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo por nitración del dehidroabietato de metilo

A una mezcla de 8.04 mL de H₂SO₄ conc. y 5.36 mL de HNO₃ conc. en baño de agua con hielo, se le adicionaron 1.3449 g del dehidroabietato de metilo en pequeñas porciones. La mezcla se agitó hasta la disolución total del éster y enseguida se puso a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, se le adicionaron 250 mL de H₂O fría, obteniendo de este modo un precipitado (Fieser & Campbell, 1938).

Adicionalmente, se emplearon dos métodos para obtener el 12,14-dinitro dehidroabietato de metilo; en uno de ellos se empleo óxidos de nitrógeno (NO_x) (Modificado de Jiménez-Estrada *et al.*, 1999) y en el otro se realizó una nitración enzimática empleando peroxidasa y nitrito de sodio (Modificado de Budde *et al.*, 2001). Los rendimientos obtenidos por estos métodos se mencionan en la sección de resultados.



3.8 Recristalización del 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo

Una vez que se obtuvo el compuesto dinitrado, este se disolvió en 10 mL de etanol. Ya disuelto, se evaporó el disolvente hasta que el volumen final fue la mitad del volumen inicial (la evaporación fue lenta). Se dejó reposar durante 24 h para obtener los cristales del compuesto dinitrado.

Finalmente, el producto aislado se analizó mediante métodos fisicoquímicos y espectroscópicos.

UV: λ_{\max} [212.65 - 0.575].

IR: (KBr) V_{\max}/cm^{-1} 2953 (C-H), 1722 (C=O), 1252 y 1050 (C-O), 1531 y 1363 (aromático-NO₂), 828 (aromático).

EM: m/z 404(M⁺): 404 (14%), 387 (100%), 329 (98%), 327 (28%), 263 (60%), 128 (7%), 43 (10%).

RMN¹H: δ 1.23 (3H,s) C₂₀; 1.27 (3H,s) C₁₉; 1.30 - 1.33 (6H,d) C₁₆ y C₁₇ J = 7.2 MHz; 1.46 - 1.57 (2H,m) C₆; 1.69 - 1.85 (6H,m) C₁, C₂, C₃; 2.16 - 2.21 (1H,dd) C₅ J = 12.6 MHz; 2.68 - 2.78 (2H,m) bencilic-CH₂; 2.95 - 3.09 (1H,sept) C₁₅; 3.67 (3H,s) COOCH₃; 7.53 (1H,s) aromático st.

RMN¹³C: δ 178.2(C₁₈), 152.0(C₁₃), 150.9(C₈), 149.4(C₉), 130.6(C₁₄), 128.5(C₁₂), 121.4(C₁₁), 52.2(C₂₁), 47.2(C₄), 43.5(C₅), 37.7(C₁), 37.6(C₁₀), 36.3(C₃), 28.9(C₁₅), 24.9(C₇), 24.6(C₂₀), 20.7(C₁₉), 20.5(C₂), 20.1(C₆), 18.2(C₁₆), 16.4(C₁₇).

3.9 Obtención del 12-amino,14-nitrodehidroabietato de metilo por reducción del 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo

Se disolvieron 0.1012 g del compuesto dinitrado en 2.75 mL de una solución de SnCl₂·2H₂O 1 M en DMF, manteniéndolo en agitación constante durante 20 h a 30°C. La reacción fue monitoreada mediante ccf eluídas en un sistema de hexano-AcOEt 7:3. Las placas obtenidas, fueron reveladas con ninhidrina. Después de este período, se adicionaron 20 mL de H₂O y 10 mL de AcOEt a la mezcla de reacción; la cual en seguida se filtró a vacío en un embudo büchner y se lavó el residuo sólido con 5 mL de AcOEt.

La extracción del filtrado se llevó a cabo con 2x10 mL de AcOEt. Se juntaron todas las fases orgánicas y se les adicionó Na₂SO₄ anh. para eliminar el agua, una vez seca la fase orgánica, esta se concentró en un rotavapor a 30°C empleando una bomba de alto vacío (Ermann *et al.*, 2002). Adicionalmente, se empleo otro método para obtener el 12-amino,14-nitro dehidroabietato de metilo, usando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para llevar a cabo la reducción (Navarro-Ocaña *et al.*, 2001), empleando el 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo como sustrato. El rendimiento obtenido por este método se menciona en la sección de resultados.



3.10 Purificación del 12-amino, 14-nitrodehidroabietato de metilo (amina)

Para la purificación de la amina, esta se corrió en una ccf preparativa de sílica gel de 2 mm de espesor, eluída con el par de disolventes éter de petróleo-AcOEt 95:5, después se cortó la fracción correspondiente a la amina y se pulverizó la sílica obtenida de esta fracción de la preparativa. La sílica se extrajo con 3x20 mL de AcOEt y posteriormente se concentró en un rotavapor a 35°C hasta sequedad.

Finalmente, el producto aislado se analizó mediante métodos fisicoquímicos y espectroscópicos.

UV: λ_{\max} [241.11 - 0.55134], [292.77 - 0.17924].

IR: (KBr) V_{\max}/cm^{-1} 3410 y 3497 (aromático-NH₂), 1622 (N-H), 2940 (C-H), 1715 (C=O), 1258 (C-O), 1519 y 1334 (aromático-NO₂), 863 (aromático), 1381 (isopropilo).

EM: m/z 374(M⁺): 374 (100%), 357 (57%), 299 (26%), 269 (15%), 233 (12%), 198 (7%), 175 (10%).

RMN¹H: δ 1.19 (3H,s) C₂₀; 1.24 (3H,s) C₁₉; 1.31 - 1.34 (6H,dd) C₁₆ y C₁₇ J = 7.2 MHz; 1.36 - 1.41 (2H,m) C₆; 1.62 - 1.81 (6H,m) C₁, C₂, C₃; 2.14 - 2.19 (1H,dd) C₅ J = 12.3 MHz; 2.51 - 2.69 (2H,m) bencilico-CH₂; 2.77 - 2.99 (1H,sept) C₁₅; 3.67 (3H,s) COOCH₃; 3.74 (2H,s) NH₂; 6.62 (1H,s) aromático st.

RMN¹³C: δ 178.7(C₁₈), 152.2(C₁₃), 149.5(C₈), 143.2(C₉), 119.7(C₁₄), 115.5(C₁₂), 113.9(C₁₁), 52.0(C₂₁), 47.5(C₄), 44.0(C₅), 37.9(C₁), 37.2(C₁₀), 36.4 (C₃), 28.1(C₁₅), 24.8(C₇), 23.9(C₂₀), 20.8(C₁₉), 19.9(C₂), 19.8(C₆), 18.5(C₁₆), 16.5(C₁₇).

3.11 Obtención de la amida a través de la reacción entre el 12-amino, 14-nitrodehidroabietato de metilo (amina) y el cloruro del ácido ferúlico

Una vez obtenido el cloruro del ácido ferúlico *in situ*, se incorporó el 12-amino, 14-nitrodehidroabietato de metilo (amina) al matraz de reacción. Para obtener la amida acetilada, se empleó trietilamina en exceso y dimetilaminopirrolidina en diclorometano (CH₂Cl₂). Se le dio seguimiento a la reacción mediante ccf, hasta la desaparición de los reactivos. Una vez terminada la reacción, se eliminó el disolvente a sequedad.

Para desproteger el grupo hidroxilo (-OH) del ácido ferúlico, el cual se encontraba acetilado, el compuesto obtenido se disolvió en CH₂Cl₂ y se adicionó la lipasa. Después de llevarse a cabo la reacción a 40°C durante 72 h, el compuesto se filtró a vacío y se concentró la fase orgánica a sequedad (Mastihubová *et al.*, 2001).

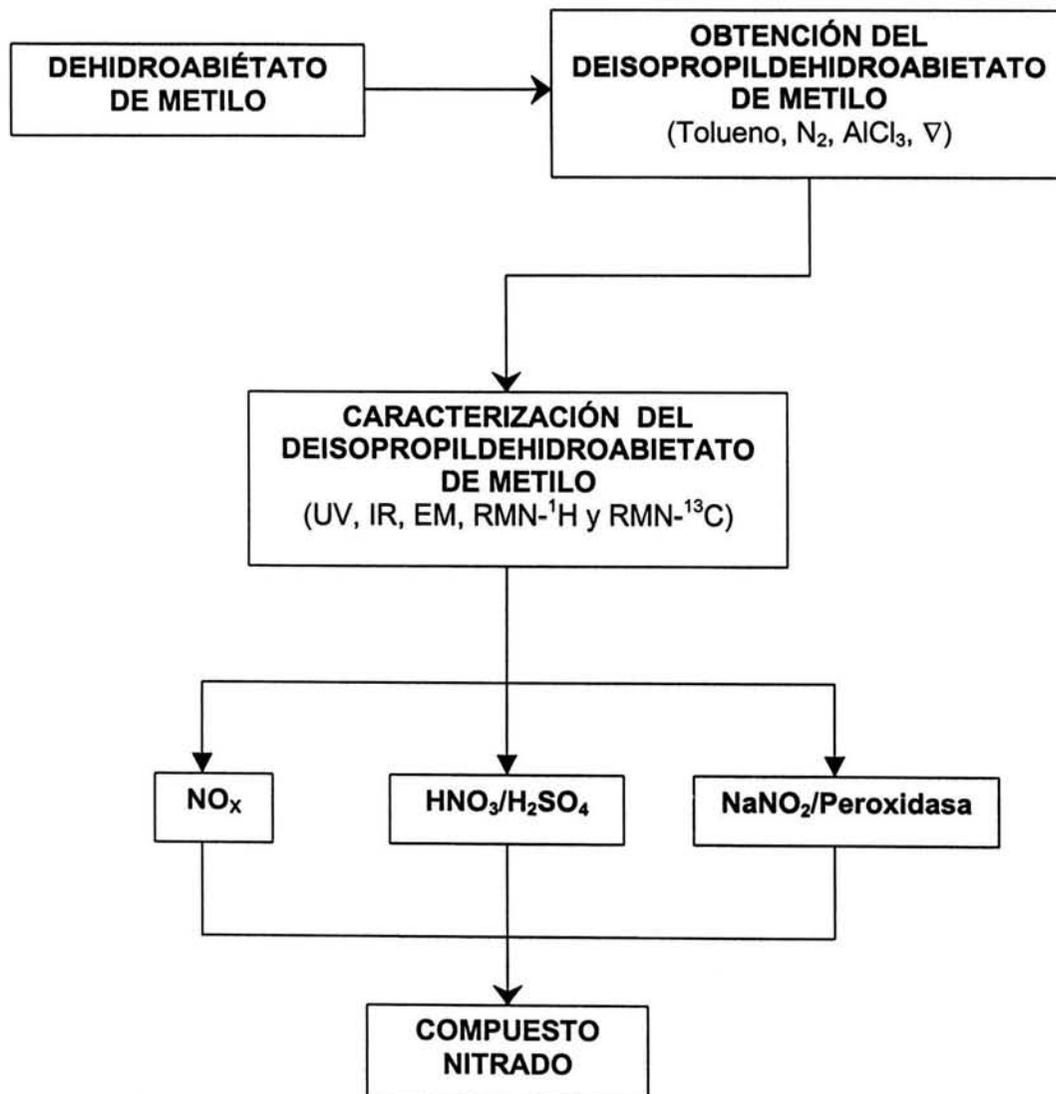
Finalmente, el producto aislado se analizó mediante métodos fisicoquímicos y espectroscópicos.



4. REACCIONES ALTERNAS

4.1 Diagrama de obtención del deisopropildehidroabietato de metilo y su nitración

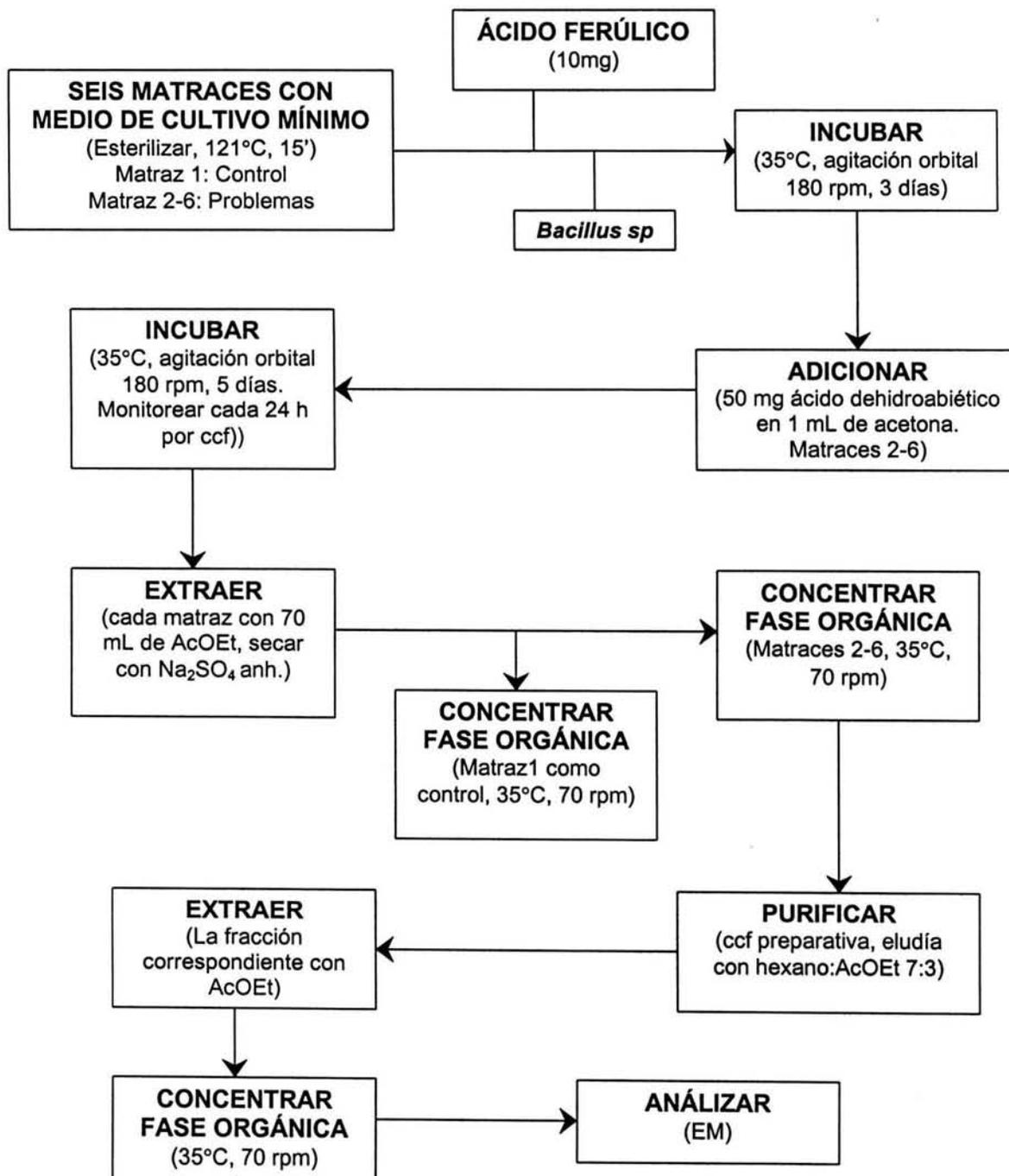
El diagrama siguiente muestra la ruta alterna propuesta para la obtención del deisopropildehidroabietato de metilo y su nitración.





4.2 Diagrama de hidroxilación del ácido dehidroabiético empleando *Bacillus sp*

Otra de las rutas alternas propuestas, fue la obtención de un derivado hidroxilado a partir de ácido dehidroabiético y la metodología seguida se resume en el diagrama siguiente.





4.3 Obtención del deisopropildehidroabietato de metilo a partir de ácido dehidroabiético

Se disolvieron 1.9 g del dehidroabietato de metilo en 20 mL de tolueno. El tolueno empleado, previamente se burbujeo con nitrógeno (N₂) y se mantuvo en un baño de hielo con sal y acetona. Cuando el dehidroabietato de metilo se disolvió, se le adicionaron 4 g de AlCl₃ y se dejó la reacción durante 4 h con agitación, en atmósfera de N₂ y en baño de hielo con sal y acetona. La reacción se monitoreó por ccf.

Cuando la reacción se completó, se adicionó a la mezcla de reacción 20 mL de H₂O y lentejas de NaOH hasta obtener un pH de 7. Se separó la fase orgánica y la fase acuosa se extrajo con 10 mL de tolueno y 2x10 mL de éter etílico. Se juntaron las fases orgánicas, se les adicionó Na₂SO₄ anh. y se concentraron en un rotavapor a sequedad.

El compuesto obtenido se recrystalizó en metanol y se analizó mediante métodos fisicoquímicos y espectroscópicos.

UV: λ_{\max} [264.25 - 0.52724/271.65 - 0.47694].

IR: (KBr) V_{\max}/cm^{-1} 2925 (C-H), 1727 (C=O), 1252 y 1135 (C-O), 3057, 1490 y 756 (aromático).

EM: m/z 272(M⁺): 272 (16%), 257 (27%), 240 (11%), 197 (100%), 143 (16%), 117 (8%).

RMN¹H: δ 1.09 (3H,s) C₂₀; 1.21 (3H,s) C₁₉; 1.45 - 1.54 (2H,m) C₆; 1.72 - 1.86 (6H,m) C₁,C₂,C₃; 1.96 - 2.06 (2H,m); 2.17 (2H,m); 2.31 - 2.36 (1H,dd) C₅ J = 10.9 MHz; 2.83 - 2.95 (2H,m) C₇; 3.68 (3H,s) COOCH₃; 7.04 - 7.07 (1H,dd) aromático st. J = 6.7 MHz; 7.09 - 7.11 (1H,dd) aromático st. J = 4.0 MHz; 7.13 - 7.16 (1H,dd) aromático st. J = 6.7 MHz; 7.26 - 7.28 (1H,dd) aromático st. J = 7.2 MHz.

RMN¹³C: δ 179.6(C₁₈), 146.3(C₉), 135.9(C₈), 128.6(C₁₄), 126.2(C₁₃), 125.8(C₁₂), 125.2(C₁₁), 51.6(COOCH₃), 45.9(C₅), 44.9(C₄), 38.5(C₁₀), 36.7(C₁), 31.9(C₃), 30.4(C₇), 27.3(C₂₀), 26.2(C₁₉), 20.0(C₆), 19.7(C₂).

4.4 Nitración

A una mezcla de 8.04 mL de H₂SO₄ conc. y 5.36 mL de HNO₃ conc. en baño de agua con hielo, se le adicionaron 1.3449 g del dehidroabietato de metilo en pequeñas porciones. La mezcla se agitó hasta la disolución total del éster y enseguida se puso a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, se le adicionaron 250 mL de H₂O fría, obteniendo de este modo un precipitado (Fieser & Campbell, 1938).

Adicionalmente, se emplearon dos métodos para obtener el 12,14-dinitro dehidroabietato de metilo; en uno de ellos se empleo óxidos de nitrógeno (NO_x) (Modificado de Jiménez-Estrada *et al.*, 1999) y en el otro se realizó una nitración



enzimática empleando peroxidasa y nitrito de sodio (Modificado de Budde *et al.*, 2001). Los rendimientos obtenidos por estos métodos se mencionan en la sección de resultados.

4.5 Hidroxilación del ácido dehidroabiético con *Bacillus sp*

En seis matraces de 500 mL, se preparó medio mínimo para el desarrollo de *Bacillus sp* con la siguiente composición para 250 mL: NH_4Cl (0.25 g), MgSO_4 (0.13 g), KH_2PO_4 (0.75 g) Na_2HPO_4 (1.5 g) y glucosa (2.5 g) para cada matraz.

Después de disolver las sales en 250 mL de H_2O , el medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min. Una vez frío el medio, se le adicionó 15 mg de ácido ferúlico a cada uno de los matraces y se inoculó el *Bacillus sp*.

Los matraces se dejaron 3 días en agitación orbital a 30°C y a 180 rpm, al final de este tiempo, se obtuvo una cantidad de células considerable.

Se tomó un matraz como control y a los 5 matraces restantes se les adicionó a cada uno 50 mg de ácido dehidroabiético, disueltos en 1 mL de acetona. Los matraces se dejaron agitando a 180 rpm y a 30°C y se monitorearon durante 5 días, mediante ccf.

La extracción de los compuestos orgánicos se realizó con 70 mL de acetato de etilo para cada matraz. Al final, se juntaron las fases orgánicas, se secaron con sulfato de sodio anhidro y se concentraron en un rotavapor a 35°C a 70 rpm.

Purificación del producto: Una vez que se recuperaron los compuestos orgánicos, estos se purificaron en una ccf preparativa eluida con el par de disolventes hexano:AcOEt 7:3, extrayendo la fracción correspondiente al producto con AcOEt. La fase orgánica se concentró a sequedad en un rotavapor.

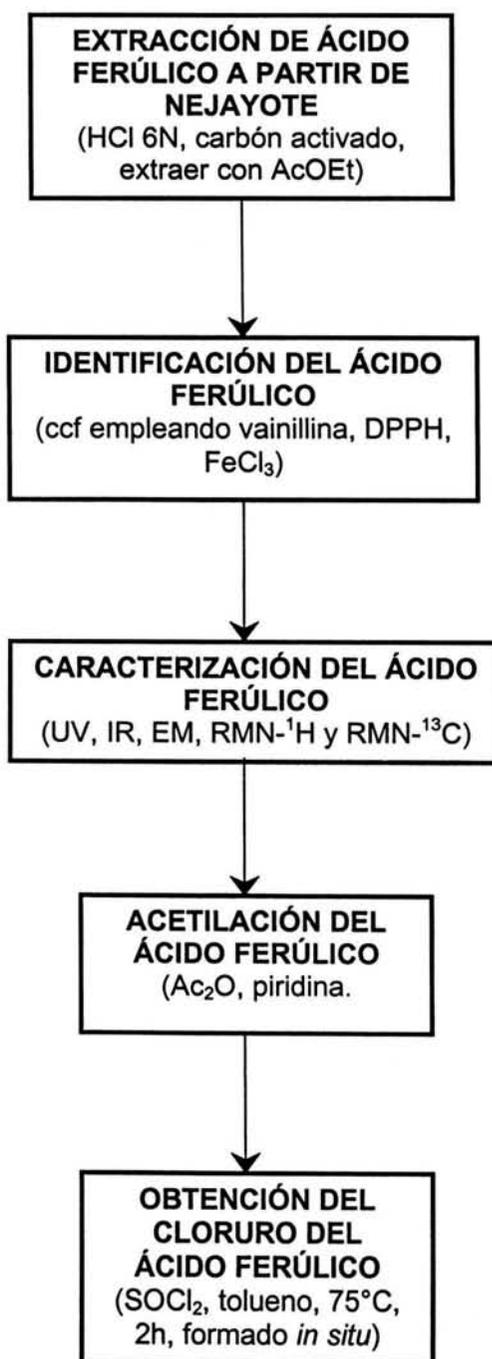
El compuesto obtenido se mandó a analizar por EM. M^+ : 316.



5. ÁCIDO FERÚLICO Y SUS DERIVADOS

5.1 Diagrama de obtención

El siguiente diagrama muestra la forma en que se obtuvo el ácido ferúlico y sus derivados (ácido ferúlico acetilado y cloruro del ácido ferúlico).





5.2 Recuperación del ácido ferúlico a partir del nejayote

Se colocaron 20 L de nejayote, procedente de un molino de nixtamal, en recipientes adecuados y se les adicionó HCl conc. hasta obtener un pH = 4 (6 mL/L nejayote) con el objetivo de acidificarlo y recuperar el ácido ferúlico. La mezcla anterior, se filtró para eliminar las cascarillas y la biomasa proveniente de la hidrólisis del maíz durante la nixtamalización. Se adicionó carbón activado (6 g/L nejayote) y se mantuvo en agitación constante, manteniéndose en reposo toda la noche. Después de esto, se centrifugó a 1500 rpm durante 15 min a 20°C para recuperar el carbón activado. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar el carbón activado recuperado a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocó el carbón activado en 4 matraces de 500 mL cada uno y se les adicionó 300 mL de AcOEt caliente, manteniéndolos en agitación constante.

Después de llevar a cabo la extracción, se filtró el AcOEt y se concentró en un rotavapor a 30°C (Tercero, 2001).

5.3 Detección por cromatografía en capa fina y recristalización del ácido ferúlico

Una vez que se concentraron los extractos orgánicos de cada una de las extracciones y/o recuperaciones, se obtuvo un sólido ligeramente amarillo, el cual se disolvió en AcOEt (0.5 g sólido/5 mL AcOEt). Por separado, se preparó un patrón de ácido ferúlico pesando 0.1 g y se disolvió en 3 mL de AcOEt. En una placa cromatográfica de sílica gel se aplicó 1 μ L de cada uno de los extractos, incluido el patrón. Se introdujo la placa en una cámara de elusión empleando como eluyente el par de disolventes AcOEt-hexano 8:2. Una vez completa la elusión de las muestras, se observó la placa en una cámara de UV-Visible.

Las placas se rosearon con DPPH, FeCl₃ y vainillina, para hacer visible la presencia del ácido ferúlico (Tercero, 2001).



Una vez que se purificó el ácido ferúlico, se disolvieron 0.5 g de este en 3 mL de acetona y 5 mL de H₂O; ya disuelto, se evaporó el disolvente hasta que el volumen final fue la mitad del volumen inicial (la evaporación fue lenta y no sobrepasó los 40°C). Se dejó reposar durante 24 h para obtener así, los cristales de ácido Ferúlico (Tercero, 2001).

Finalmente, el producto aislado se analizó mediante métodos fisicoquímicos y espectroscópicos.

IR: (KBr) V_{\max}/cm^{-1} 3432 (aromático-OH), 2968 (C-H), 1690 (C=O), 1431 (aromático-OH), 1273 (aromático-O-C), 1034 (C-O).

EM: m/z 194(M⁺): 194 (7%), 179 (100%), 132 (28%), 104 (24%), 91 (21%), 72 (52%), 45 (7%).

RMN¹H: δ 7.71 (1H,trans,d) J = 15.9 MHz; 7.12 (1H,d,aromático) J = 8.1 MHz; 7.07 (1H,dd,aromático) J = 4.3 MHz; 6.93 (1H,d,aromático) J = 1.9 MHz; 6.29 (1H,trans,d) J = 15.8 MHz; 3.94 (3H,s,CH₃-O).

5.4 Obtención del ácido ferúlico acetilado

Para la acetilación del ácido ferúlico, este se disolvió en anhídrido acético, en una relación mol a mol, en presencia de piridina en una relación 1:5 como medio de reacción (Mastihubová *et al.*, 2001).

Finalmente, se analizó el producto aislado por EM.

EM: m/z 236(M⁺): 192 (10%), 150 (100%), 135 (40%), 10 (12%), 91 (5%).

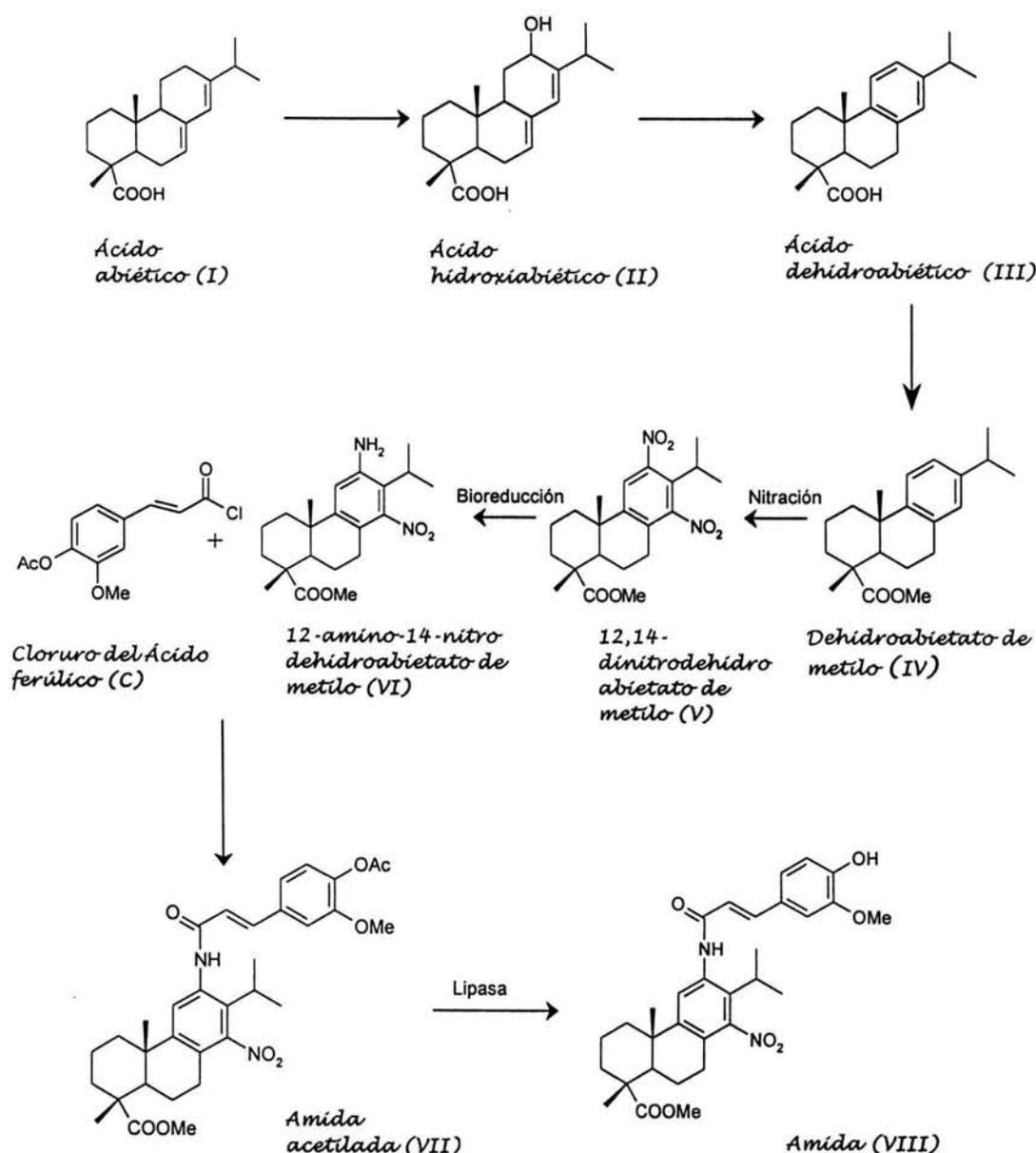
5.5 Obtención del cloruro de ácido ferúlico

El cloruro del ácido ferúlico se preparó a partir del ácido ferúlico acetilado, empleando cloruro de tionilo (SOCl₂) en tolueno a temperatura ambiente por 2 h. Durante este tiempo, se dio seguimiento a la reacción a través de ccf, posteriormente el disolvente se evaporó y el producto obtenido se empleó en la reacción para la obtención de la amida (Mastihubová *et al.*, 2001).



VI. RESULTADOS

El esquema siguiente, representa la ruta de síntesis propuesta en este trabajo para la obtención de la amida (VIII), a partir del 12-amino-14-nitro dehidroabietato de metilo (VI) y cloruro del ácido ferúlico (C). Para llegar al 12-amino,14-nitro dehidroabietato de metilo (VI), se obtuvieron ciertos derivados como: el ácido hidroxabiético (II), el ácido dehidroabiético (III), el dehidroabietato de metilo (IV) y el 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo (V) a partir de ácido abiético (I).

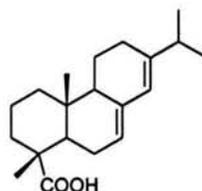




A continuación se presentan los resultados de cada uno de los compuestos obtenidos (ácido abiético *I*, ácido hidroxabiético *II*, ácido dehidroabiético *III*, dehidroabietato de metilo *IV*, 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo *V*, deisopropil dehidroabietato de metilo *Va*, 12-amino,14-nitrodehidroabietato de metilo *VI*, amida acetilada *VII*, amida *VIII*, así como el ácido ferúlico y sus derivados *A-C*) durante el desarrollo del presente trabajo.

Las propiedades fisicoquímicas y espectroscópicas para cada uno de los compuestos se presentan en tres tablas; en la primera de ellas, se mencionan las características físicas, en la segunda los resultados espectroscópicos y espectrométricos y en la tercera los resultados de resonancia. En algunos casos, se reportan los datos teóricos que se conocen de la literatura.

1. ÁCIDO ABIÉTICO



ÁCIDO ABIÉTICO (*I*)

Como se mencionó en el apartado de reactivos, el ácido abiético empleado en el desarrollo del presente trabajo fue de Sigma Co., con 70% de pureza. Las características físicas de este compuesto se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Características físicas del ácido abiético

Característica:	EXPERIMENTAL
Tipo de cristal:	Polvo amarillo
Punto de fusión:	140 - 142°C
R _f :	0.5 (Hexano-AcOEt 8:2)

El ácido abiético se mando a analizar por UV, IR, EM, RMN¹H y RMN¹³C, con el fin de tener los espectros correspondientes; esperando con esto, tener una referencia de los parámetros estandarizados para dicho compuesto, ya que en trabajos posteriores, se puede llevar a cabo la purificación del ácido abiético a partir de fuentes naturales, como lo es la resina de pino; en la cual, este compuesto



es el mayoritario. Los resultados obtenidos del análisis espectroscópico por UV, IR y EM del ácido abiético se reportan en la tabla 1a.

Tabla 1a. Identificación espectroscópica del ácido abiético

EXPERIMENTAL	
UV	(MeOH): λ_{\max} [234.06 - 0.63169/240.20 - 0.67010]
IR	(KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2933 (C-H), 1693 y 1280 (C=O), 1385 (isopropilo)
EM	m/z 302(M ⁺): 302 (100%), 287 (21%), 259 (35%), 241 (19%), 213 (20%), 136 (35%), 105 (23%), 91 (18%)

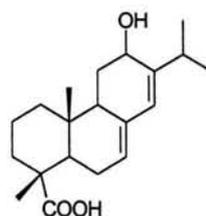
Los datos obtenidos de resonancia magnética nuclear de ¹H y ¹³C para el ácido abiético se muestran en la tabla 1b.

Tabla 1b. Identificación por resonancia magnética nuclear del ácido abiético

EXPERIMENTAL		REPORTADA
RMN ¹ H	CDCl ₃ TMS 300 MHz δ 0.82 (3H,s) C ₂₀ ; 0.99 - 1.02 (6H,dd) C ₁₆ y C ₁₇ J = 6.9 MHz; 1.25 (3H,s) C ₁₉ ; 5.37 (1H,m) C ₇ ; 5.70 (1H,s) C ₁₄	CDCl ₃ TMS 300 MHz δ 0.79 (3H,s) C ₂₀ ; 1.00 (6H,dd) C ₁₆ y C ₁₇ J = 7.0 MHz; 1.20 (3H,s) C ₁₉ ; 5.37 (1H,m) C ₇ ; 5.75 (1H,s) C ₁₄ (Smith, 1978)
RMN ¹³ C	CDCl ₃ 75.5 MHz δ 184.7(C ₁₈), 145.2(C ₁₃), 135.5(C ₈), 122.3(C ₁₄), 120.4(C ₇), 50.9(C ₉), 46.3(C ₄), 44.9(C ₅), 38.2(C ₁), 37.2(C ₃), 34.9(C ₁₅), 34.8(C ₁₀), 27.4(C ₁₂), 25.6(C ₆), 22.4(C ₁₁), 21.4(C ₁₇), 20.8(C ₁₆), 18.0(C ₂), 16.7(C ₁₉), 14.0(C ₂₀)	CDCl ₃ 75.5 MHz δ 185.4(C ₁₈), 145.1(C ₁₃), 135.5(C ₈), 122.5(C ₁₄), 120.5(C ₇), 51.0(C ₉), 46.3(C ₄), 44.9(C ₅), 38.3(C ₁), 37.2(C ₃), 34.8(C ₁₅), 34.5(C ₁₀), 27.5(C ₁₂), 25.6(C ₆), 22.5(C ₁₁), 21.4(C ₁₇), 20.9(C ₁₆), 18.1(C ₂), 16.7(C ₁₉), 14.0(C ₂₀) (Smith, 1978)

El ácido abiético sirvió como material de partida para la obtención de los derivados del ácido dehidroabiético y de la amida correspondiente.

2. ÁCIDO HIDROXIABIÉTICO



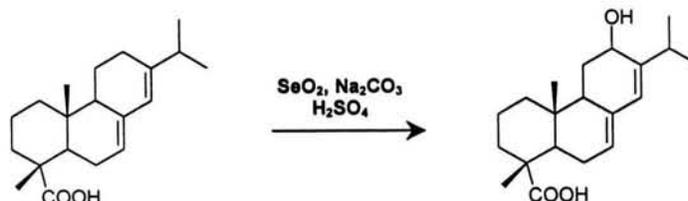
ÁCIDO HIDROXIABIÉTICO (II)

Para llegar al ácido dehidroabiético, el cual serviría como material de partida para la síntesis propuesta originalmente del derivado aminado planteado en el



objetivo, se tuvo que obtener primero un intermediario hidroxilado (ácido hidroxiabiético, *II*) a partir del ácido abiético (*I*).

Para la obtención del derivado hidroxilado, el ácido abiético (*I*) se sometió a un proceso de oxidación, mediante una reacción con dióxido de selenio (SeO_2), teniendo como medio de reacción etanol.



Una vez terminada la reacción de oxidación y después de la adición de carbonato de sodio (Na_2CO_3) y ácido sulfúrico (H_2SO_4), el compuesto es obtenido como la sal de sodio del ácido hidroxiabiético.

Debido a que el compuesto obtenido contiene residuos de resina, es necesario llevar a cabo la eliminación de ésta con éter etílico. Una vez que la sal de sodio del ácido hidroxiabiético se encuentra libre de resina, resulta fácil obtener el ácido hidroxiabiético (*II*), a partir de esta sal, disolviéndola en etanol caliente.

Después de haber cristalizado el ácido hidroxiabiético, se corrió una ccf del producto, pudiendo distinguir una sola mancha, la cual resulto ser muy polar. El compuesto obtenido mostró un punto de fusión de $149 - 153^\circ\text{C}$ y un rendimiento de 21.15% (Tabla 2).

Tabla 2. Características físicas del ácido hidroxiabiético

Característica:	EXPERIMENTAL
Tipo de cristal:	Incoloros
Punto de fusión:	$149 - 153^\circ\text{C}$
R_f :	0.34 (Hexano-AcOEt 7:3)
Rendimiento:	21.14%

En la tabla 2a, se muestran los resultados obtenidos de los parámetros obtenidos por UV, IR y EM para el ácido hidroxiabiético.



Tabla 2a. Identificación espectroscópica del ácido hidroxiabiético

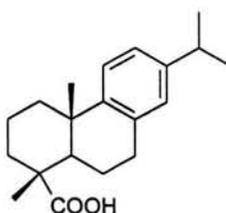
EXPERIMENTAL	
UV	(MeOH): λ_{\max} [240.08 - 0.64884]
IR	(KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3446 y 1058 (OH), 2957 (C-H), 1706 y 1268 (C=O), 1604 (C=C-C=C), 1383 y 1147 (isopropilo)
EM	FAB ⁺ , matriz: alcohol nitrobenílico. m/z 318(M ⁺): 318 (10%), 303 (9%), 301 (80%), 149 (45%), 109 (22%)

Los datos obtenidos por resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C para el ácido hidroxiabiético se muestran en la tabla 2b.

Tabla 2b. Identificación por resonancia magnética nuclear del ácido hidroxiabiético

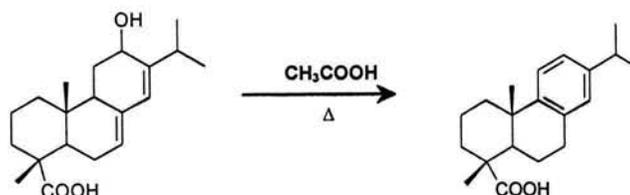
EXPERIMENTAL	
RMN ^1H	CDCl_3 TMS 300 MHz δ 0.89 (3H,s) C_{20} ; 1.01 - 1.04 (6H,d) C_{16} y C_{17} J = 6.9 MHz; 1.28 (3H,s) C_{19} ; 5.45 (1H,m) C_7 ; 5.72 (1H,s) C_{14}
RMN ^{13}C	CDCl_3 75.5 MHz δ 183.8(C_{18}), 144.7(C_{13}), 136.3(C_8), 124.3(C_{14}), 120.4(C_7), 72.9(C_{12}), 46.2(C_9), 39.5(C_4), 37.3(C_5), 36.8(C_1), 34.7(C_3), 30.2(C_{15}), 26.5(C_{10}), 25.8(C_6), 23.2(C_{11}), 21.4(C_{17}), 20.9(C_{16}), 18.0(C_2), 17.0(C_{19}), 16.6, (C_{20})

3. ÁCIDO DEHIDROABIÉTICO



ÁCIDO DEHIDROABIÉTICO (III)

Una vez obtenido el ácido hidroxiabiético (es importante señalar que no necesariamente se requiere como ácido, sino que puede estar como la sal de sodio), la obtención del ácido dehidroabiético (III) a partir de este intermediario, resultó sencilla; ya que en esta reacción, el ácido hidroxiabiético (II) es suavemente deshidratado con ácido acético glacial caliente.



El producto obtenido al final de la reacción, precipita después de la adición de agua. Este nuevo producto (ácido dehidroabiético, *III*) tiene ahora tres insaturaciones, dando con esto propiedades aromáticas al anillo C de la estructura.

Los cristales del ácido dehidroabiético (*III*), presentaron las siguientes características: forma de agujas, con punto de fusión de 169 - 171°C (Tabla 3).

Tabla 3. Características físicas del ácido dehidroabiético

Característica:	EXPERIMENTAL	REPORTADA
Tipo de cristal:	En forma de agujas	
Punto de fusión:	169 - 171°C	172 - 173°C (Ulubelen & Miski, 1981)
R _f :	0.46 (Hexano-AcOEt 8:2)	
Rendimiento:	88.3%	90% (Fieser & Campbell, 1938)

En la tabla 3a, se muestran los resultados de los parámetros obtenidos por UV, IR y EM para el ácido dehidroabiético.

Tabla 3a. Identificación espectroscópica del ácido dehidroabiético

	EXPERIMENTAL	REPORTADA
UV	(MeOH): λ_{\max} [266.26 - 0.44075/ 274.36 - 0.41566]	λ_{\max} [275 y 269] (Ulubelen & Miski, 1981)
IR	(KBr) V_{\max}/cm^{-1} 2957 (C-H), 1693 y 1280 (C=O), 1363 y 1387 (isopropilo), 1497 y 819 (aromático)	(KBr) V_{\max}/cm^{-1} 3500 - 2400, 1693, 1498, 1460 y 821 (Ayer & Migaj, 1989)
EM	m/z 300(M ⁺): 300 (25%), 285 (100%), 239 (80%), 197 (25%), 183 (5%), 141 (12%), 129 (7%)	m/z 300(M ⁺): 300 (28.9%), 285 (100%), 239 (77%), 197 (25.7%) (Ayer & Migaj, 1989)

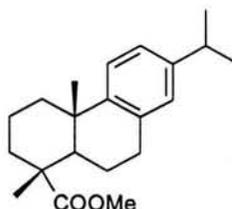
Los datos obtenidos de resonancia magnética de ¹H y ¹³C para el ácido dehidroabiético se muestran en la tabla 3b.



Tabla 3b. Identificación por resonancia magnética nuclear del ácido dehidroabiético

	EXPERIMENTAL	REPORTADA
RMN ¹ H	CDCl ₃ TMS 300 MHz δ 1.20 - 1.21 (6H,d) C ₁₆ y C ₁₇ J = 2.1 MHz; 1.23 (3H,s) C ₂₀ ; 1.27 (3H,s) C ₁₉ ; 1.50 - 1.57 (2H,m) C ₆ ; 1.72 - 1.89 (6H,m) C ₁ , C ₂ , C ₃ ; 2.21 - 2.26 (1H,dd) C ₅ J = 12.4 MHz; 2.77 - 2.88 (2H,m) bencílico-CH ₂ ; 2.90 - 2.94 (1H,m) C ₁₅ ; 6.88 (1H,d) aromático st. J= 1.5 MHz; 6.97 - 7.01 (1H,dd) aromático st. J=8.2 MHz; 7.16 (1H,d) aromático st. J= 8.1 MHz; 11.40 (1H,s) C ₁₈	CDCl ₃ TMS 300 MHz δ 1.18 (3H,s) C ₂₀ ; 1.23 (3H,s) C ₁₉ ; 1.3 (6H,d) C ₁₆ y C ₁₇ J = 2.0 MHz; 2.9 (2H,m) bencílico-CH ₂ ; 6.95 - 7.2 (3H) aromático st (Ulubelen & Miski, 1981)
RMN ¹³ C	CDCl ₃ 75.5 MHz δ 185.1(C ₁₈), 146.7(C ₁₃), 145.7(C ₈), 134.7(C ₉), 126.9(C ₁₄), 124.1(C ₁₂), 123.9(C ₁₁), 47.4(C ₄), 44.5(C ₅), 37.9(C ₁), 36.8(C ₁₀), 36.7(C ₃), 33.4(C ₁₅), 30.9(C ₇), 29.9(C ₂₀), 25.1(C ₁₉), 23.9(C ₂), 21.7(C ₆), 18.5(C ₁₆), 16.2(C ₁₇)	CDCl ₃ 75.5 MHz δ 183.8(C ₁₈), 146.8(C ₁₃), 145.8(C ₈), 134.7(C ₉), 127.0(C ₁₄), 124.2(C ₁₂), 124.0(C ₁₁), 47.4(C ₄), 44.7(C ₅), 37.9(C ₁), 6.9(C ₁₀), 36.7(C ₃), 33.5(C ₁₅), 30.0(C ₇), 25.2(C ₂₀), 24.0(C ₁₉), 21.6(C ₂), 18.6(C ₆), 16.3(C ₁₇) (Ayer & Migaj, 1989)

4. DEHIDROABIETATO DE METILO



DEHIDROABIETATO DE METILO (IV)

Para la obtención del dehidroabietato de metilo (IV), a partir del ácido dehidroabiético (III); se llevaron a cabo tres reacciones diferentes; las cuales, se montaron con el fin de encontrar, cual de estas resultaba ser una reacción más limpia y con mejores rendimientos.

De estas metodologías, la que dio mejores resultados fue la esterificación de Fischer (método 3), mientras que las otras dos metodologías consistieron en llevar a cabo la reacción de metilación empleando: sulfato de dimetilo (método 1) y lipasas en metanol (método 2).



Métodos empleados para obtener el dehidroabietato de metilo

Método 1: Sulfato de dimetilo	Método 2: MeOH y lipasas	Método 3: MeOH, H ₂ SO ₄ y Δ
No	No	Si

4.1 Reacción con sulfato de dimetilo

Esta reacción consistió en disolver el sustrato en acetona seca, con la adición de sulfato de dimetilo puesto a reflujo por 2 h.

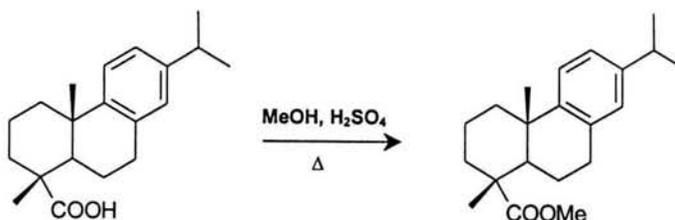
No resultó un buen método de metilación para este compuesto, puesto que al seguir el progreso de la reacción mediante ccf, nos percatamos de la presencia de varias manchas con diferentes R_f, es decir la presencia de compuestos con diferentes polaridades con respecto al sustrato. Debido a que la reacción no es limpia, ya que se observaba una mezcla compleja de compuestos, sin la presencia de un compuesto mayoritario, lo que hace difícil la purificación de alguno de estos; este método, no fue considerado apropiado para nuestros fines.

4.2 Reacción con lipasas en metanol

Después de obtener los resultados de la metodología anterior, se montó otro método para tratar de metilar al ácido dehidroabiético. Este método consistió en el empleo de lipasas en metanol como medio de reacción. Los resultados no fueron los esperados, ya que al monitorear la reacción mediante ccf, nos percatamos de la presencia de varias manchas.

Debido a que por estos dos métodos de síntesis no fue posible obtener el dehidroabietato de metilo, se montó un tercer método, el cual es muy empleado para llevar a acabo la metilación de muchos compuestos.

4.3 Esterificación de Fischer





Esta reacción es una de las más simples en síntesis y tan solo consiste en la disolución del ácido dehidroabiético en exceso de metanol y la adición de H_2SO_4 , manteniendo en reflujo por unas horas.

Durante el transcurso de la reacción, se dio seguimiento a la aparición del producto mediante ccf. Distinguiendo de esta forma tres manchas, la primera y mas pequeña, se encontraba en el frente de corrida. La segunda (dehidroabietato de metilo) se encontró muy bien definida y resultado menos polar que la tercera mancha, la cual corresponde al ácido dehidroabiético que no reaccionó, ya que mostró un R_f similar al del reactivo inicial.

El compuesto obtenido por la esterificación de Fisher mostró un punto de fusión de 41 - 43°C y un rendimiento del 54% (Tabla 4).

Tabla 4. Características físicas del dehidroabietato de metilo

Característica:	EXPERIMENTAL	REPORTADA
Tipo de cristal:	Incoloros en forma de agujas	Aceite semicristalino (Ulubelen & Miski, 1981)
Punto de fusión:	41 - 43°C	
R_f :	0.42 (Hexano-AcOEt 9:1)	
Rendimiento:	54.1%	

En la tabla 4a, se muestran los resultados de los parámetros obtenidos por UV, IR y EM para el dehidroabietato de metilo.

Tabla 4a. Identificación espectroscópica del dehidroabietato de metilo

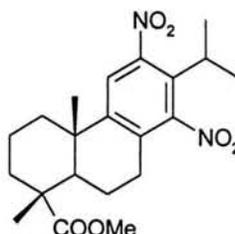
	EXPERIMENTAL	REPORTADA
UV	(MeOH): λ_{max} [266.84 - 0.60102/274.77 - 0.56450]	λ_{max} [275 y 269] (Ulubelen & Miski, 1981)
IR	(KBr) V_{max}/cm^{-1} 2925 (C-H), 1721 (C=O), 1250 y 1039 (C-O), 1379 y 1363 (isopropilo), 1496 y 823 (aromático)	(KBr) V_{max}/cm^{-1} 3020, 1725, 1496, 1245, 1230, 835 (De Pascual <i>et al.</i> , 1978)
EM	m/z 314(M^+): 314 (35%), 299 (40%), 255 (6%), 239 (100%), 197 (11%), 173 (8%), 141 (7%)	m/z 314(M^+): 314, 299, 267, 255, 239, 185, 183, 173, 159 (Ulubelen & Miski, 1981)

Los datos obtenidos de resonancia magnética de 1H y ^{13}C para el dehidroabietato de metilo se muestran en la tabla 4b.


Tabla 4b. Identificación por resonancia magnética nuclear del dehidroabietato de metilo

	EXPERIMENTAL	REPORTADA
RMN ¹H	CDCl ₃ TMS 300 MHz δ 1.20 (3H,s) C ₂₀ ; 1.23 (3H,s) C ₁₉ ; 1.25 - 1.27 (6H,d) C ₁₆ y C ₁₇ J = 5.1 MHz; 1.41 - 1.44 (2H,m) C ₆ ; 1.72 - 1.89 (6H,m) C ₁ , C ₂ ,C ₃ ; 2.21 - 2.26 (1H,dd) C ₅ J = 12.6 MHz; 2.77 - 2.82 (2H,m) bencílico-CH ₂ ; 2.84 - 2.90 (1H,m) C ₁₅ ; 3.65 (3H,s) COOCH ₃ ; 6.87 (1H,d) aromático st. J= 1.2 MHz; 6.97 - 7.01 (1H,dd) aromático st. J=8.2 MHz; 7.16 (1H,d) aromático st. J= 8.1 MHz	CDCl ₃ TMS 300 MHz δ 1.20 (3H,s) C ₂₀ ; 1.23 (3H,s) C ₁₉ ; 1.27 (6H,d) C ₁₆ y C ₁₇ ; 2.9 (2H,m) bencílico-CH ₂ ; 3.68 (3H,s) COOCH ₃ ; 6.85 - 7.20 (3H,d) aromático st (Ulubelen & Miski, 1981)
RMN ¹³C	CDCl ₃ 75.5 MHz δ 179.0(C ₁₈), 146.8(C ₁₃), 145.7(C ₈), 134.6(C ₉), 126.8(C ₁₄), 124.1(C ₁₂), 123.8(C ₁₁), 51.8(C ₂₁), 47.6(C ₄), 44.8(C ₅), 37.9(C ₁), 36.9(C ₁₀), 36.6(C ₃), 33.4(C ₁₅), 29.9(C ₇), 29.6(C ₂₀), 25.0(C ₁₉), 23.9(C ₂), 21.6(C ₆), 18.5(C ₁₆), 16.5(C ₁₇)	

5. 12,14-DINITRODEHIDROABIETATO DE METILO


12,14-DINITRODEHIDROABIETATO DE METILO (V)

En la nitración del dehidroabietato de metilo (IV), para obtener el 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo (V) de acuerdo a la síntesis original; al igual que en el caso de la metilación, se emplearon tres métodos diferentes, para determinar cual era el que nos proporcionaba un mejor rendimiento y una reacción más limpia, los tres métodos empleados fueron: 1) óxidos de nitrógeno (NO_x), 2) NaNO₂/peroxidasa y 3) mezcla HNO₃/H₂SO₄.

Métodos empleados para obtener el 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo

Método 1:	Método 2:	Método 3:
NO_x	NaNO₂/Peroxidasa	HNO₃, H₂SO₄, ∇
No	No	Si



5.1 Óxidos de Nitrógeno (NO_x)

La reacción empleando NO_x como agente nitrante, consiste en disolver el dehidroabietato de metilo en tetracloruro de carbono, haciéndole pasar los NO_x generados, mediante la reacción entre el HNO₃ y el THF. Cabe señalar que esta reacción es peligrosa, ya que se emplean óxidos de nitrógeno, los cuales son altamente tóxicos y por lo tanto debe de tenerse cuidado al llevar a cabo la reacción.

Una vez que se eliminaron los óxidos de nitrógeno del medio de reacción y se corrió una ccf para ver los compuestos formados mediante esta nitración, observamos la presencia de muchas manchas (alrededor de 15), casi todas de una coloración amarilla y las cuales presentaban diferentes polaridades. Además, como no se obtuvo un compuesto mayoritario, resulto difícil la purificación de un producto.

5.2 NaNO₂/Peroxidasa

Debido a que el método anterior no resultó como se esperaba, se montó un método enzimático; esperando de esta forma que la nitración resultara ser mas selectiva y obtener de esta manera un compuesto mayoritario ya fuera el derivado mono- o di nitrado bajo las siguientes condiciones:

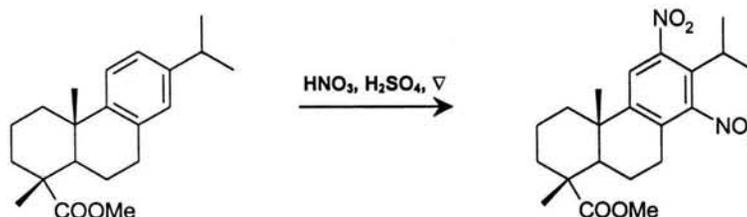
El dehidroabietato de metilo se disolvió en metanol y amortiguador de fosfatos, se le adicionó el NaNO₂ disuelto en amortiguador. Posteriormente, se adicionó el H₂O₂ y la peroxidasa disuelta en amortiguador de fosfatos.

Sin embargo, al dar seguimiento a la reacción mediante el empleo de ccf, observamos la presencia de múltiples manchas; sin encontrar un compuesto mayoritario, por esta razón y debido a que resultaba difícil la purificación de algún derivado nitrado y a que el rendimiento que se pudiera obtener de esta reacción era muy bajo, esta metodología se descartó.

El último método de nitración empleado y que fue el que mejores resultados proporcionó en cuanto a rendimiento y purificación del producto, corresponde a un método comúnmente utilizado para llevar a cabo reacciones de nitración.



5.3 Mezcla $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$



Esta consistió en preparar una mezcla de $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ en un baño de hielo e ir incorporando lentamente el dehidroabietato de metilo hasta su total disolución con agitación constante y la posterior adición de agua.

Una vez obtenido y seco el producto, este se solubilizó en etanol, se corrió una ccf y se encontró que presentaba una mancha abundante de mayor polaridad con respecto a la del dehidroabietato de metilo y otra mancha muy pequeña de coloración amarilla. Después de un tiempo, comenzó a cristalizar un compuesto en el matraz, el cual se filtró y se lavó con etanol frío; obteniendo por este medio un compuesto mayoritario, fácil de purificar y que presentó un punto de fusión de 183 - 185°C y un rendimiento del 54.9% (Tabla 5).

Tabla 5. Características físicas del 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo

Característica	EXPERIMENTAL
Tipo de cristal:	Blancos en forma de agujas
Punto de fusión:	183 - 185°C
R _f :	0.53 (Hexano-AcOEt 8:2)
Rendimiento:	54.9%

En la tabla 5a, se muestran los resultados de los parámetros obtenidos por UV, IR y EM para el 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo.

Tabla 5a. Identificación espectroscópica del 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo

	EXPERIMENTAL
UV	(MeOH): λ_{max} [212.65 - 0.575]
IR	(KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2953 (C-H), 1722 (C=O), 1252 y 1050 (C-O), 1531 y 1363 (aromático- NO_2), 828 (aromático)
EM	m/z 404(M^+): 404 (14%), 387 (100%), 329 (98%), 327 (28%), 263 (60%), 128 (7%), 43 (10%)

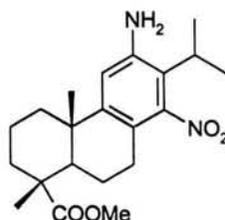
Los datos obtenidos de resonancia magnética de ^1H y ^{13}C para el 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo se muestran en la tabla 5b.



Tabla 5b. Identificación por resonancia magnética nuclear del 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo

EXPERIMENTAL	
RMN ¹ H	CDCl ₃ TMS 300 MHz δ 1.23 (3H,s) C ₂₀ ; 1.27 (3H,s) C ₁₉ ; 1.30 - 1.33 (6H,d) C ₁₆ y C ₁₇ J = 7.2 MHz; 1.46 - 1.57 (2H,m) C ₆ ; 1.69 - 1.85 (6H,m) C ₁ ,C ₂ ,C ₃ ; 2.16 - 2.21 (1H,dd) C ₅ J = 12.6 MHz; 2.68 - 2.78 (2H,m) bencilic-CH ₂ ; 2.95 - 3.09 (1H,sept) C ₁₅ ; 3.67 (3H,s) COOCH ₃ ; 7.53 (1H,s) aromático st
RMN ¹³ C	CDCl ₃ 75.5 MHz δ 178.2(C ₁₈), 152.0(C ₁₃), 150.9(C ₈), 149.4(C ₉), 130.6(C ₁₄), 128.5(C ₁₂), 121.4(C ₁₁), 52.2(C ₂₁), 47.2(C ₄), 43.5(C ₅), 37.7(C ₁), 37.6(C ₁₀), 36.3(C ₃), 28.9(C ₁₅), 24.9(C ₇), 24.6(C ₂₀), 20.7(C ₁₉), 20.5(C ₂), 20.1(C ₆), 18.2(C ₁₆), 16.4(C ₁₇)

6. 12-AMINO,14-NITRODEHIDROABIETATO DE METILO



12-AMINO,14-NITRODEHIDROABIETATO DE METILO (VI)

La obtención del 12-amino,14-nitrodehidroabietato de metilo (VI), se realizó por dos métodos: 1) *Saccharomyces cerevisiae* y 2) SnCl₂·2H₂O en DMF.

Métodos empleados para obtener el 12-amino,14-nitrodehidroabietato de metilo

Método 1: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Método 2: SnCl ₂ ·2H ₂ O en DMF, 30°C, 20 h
No	Si

6.1 Reducción con levadura

Este método consistió en el empleo de *S. cerevisiae* como reductor, de algunos de los grupos nitro del sustrato disuelto en acetona-etanol, adicionado a una suspensión prehidratada de levadura.

Una vez montada la biotransformación, esta se fue monitoreando mediante ccf, teniendo como controles a la levadura y al compuesto empleado como sustrato, para detectar la formación de algún producto diferente a estos. Sin embargo, no se pudo obtener el compuesto de interés (compuesto reducido). Por esta razón se montó un método químico, para la reducción del grupo nitro del compuesto V,



implementando así un método rápido y efectivo como resultó en la reducción del 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo con $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en DMF a 30°C durante 20 h.

6.2 Reducción con $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en DMF



Transcurrido el tiempo de reacción, se corrió una ccf observando una mancha de mayor tamaño que corresponde al 12-amino,14-nitrodehidroabietato de metilo (VI), el cual es más polar que el 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo (V) y que al revelarlo con ninhidrina presentó una coloración púrpura. Debido a que se presentaron otras manchas pequeñas, se decidió eliminar el DMF, obteniendo unos cristales amarillos, los cuales se resuspendieron en acetato de etilo para aislar y purificar por ccf preparativa el compuesto de interés. Después de eluir la ccf preparativa, se recuperó la fracción correspondiente al 12-amino,14-nitrodehidroabietato de metilo (VI), el cual presentó un punto de fusión de $225 - 228^\circ\text{C}$ y un rendimiento del 77.9% (Tabla 6).

Tabla 6. Características físicas del 12-amino,14-nitrodehidroabietato de metilo

Característica:	EXPERIMENTAL
Tipo de Cristal:	Amarillos en forma de agujas
Punto de fusión:	$225 - 228^\circ\text{C}$
R _f :	0.45 (Hexano-AcOEt 7:3)
Rendimiento:	77.9%

En la tabla 6a, se muestran los resultados de los parámetros obtenidos por UV, IR y EM para el 12-amino,14-nitrodehidroabietato de metilo.

Tabla 6a. Identificación espectroscópica del 12-amino,14-nitrodehidroabietato de metilo

	EXPERIMENTAL
UV	(MeOH): λ_{max} [241.11 - 0.55134], [292.77 - 0.17924]
IR	(KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3410 y 3497 (aromático-NH ₂), 1622 (N-H), 2940 (C-H), 1715 (C=O), 1258 (C-O), 1519 y 1334 (aromático-NO ₂), 863 (aromático), 1381 (isopropilo)
EM	m/z 374(M ⁺): 374 (100%), 357 (57%), 299 (26%), 269 (15%), 233 (12%), 198 (7%), 175 (10%)

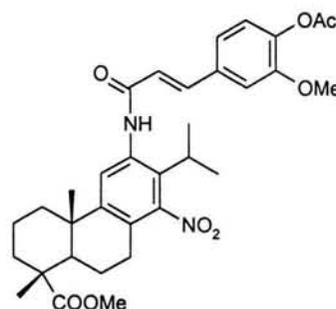


Los datos obtenidos de resonancia magnética de ^1H y ^{13}C para el 12-amino,14-nitrodehidroabietato de metilo se muestran en la tabla 6b.

Tabla 6b. Identificación por resonancia magnética nuclear del 12-amino,14-nitrodehidroabietato de metilo

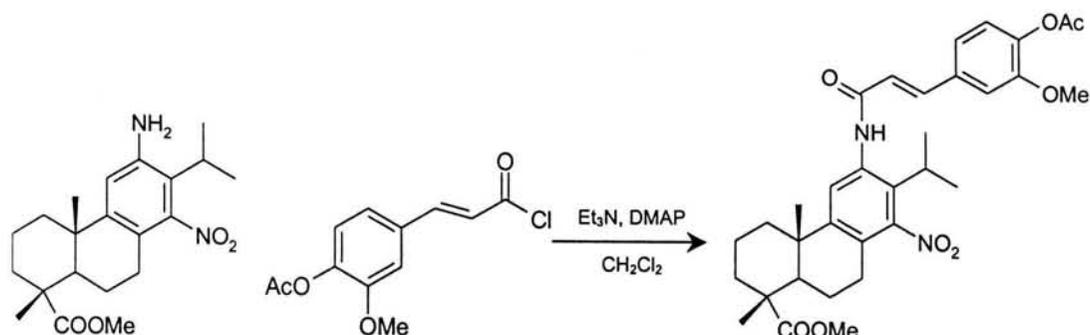
EXPERIMENTAL	
RMN ^1H	CDCl_3 TMS 300 MHz δ 1.19 (3H,s) C_{20} ; 1.24 (3H,s) C_{19} ; 1.31 - 1.34 (6H,dd) C_{16} y C_{17} $J = 7.2$ MHz; 1.36 - 1.41 (2H,m) C_6 ; 1.62 - 1.81 (6H,m) $\text{C}_1, \text{C}_2, \text{C}_3$; 2.14 - 2.19 (1H,dd) C_5 $J = 12.3$ MHz; 2.51 - 2.69 (2H,m) bencílico- CH_2 ; 2.77 - 2.99 (1H,sept) C_{15} ; 3.67 (3H,s) COOCH_3 ; 3.74 (2H,s) NH_2 ; 6.62 (1H,s) aromático st.
RMN ^{13}C	CDCl_3 75.5 MHz δ 178.7(C_{18}), 152.2(C_{13}), 149.5(C_8), 143.2(C_9), 119.7(C_{14}), 115.5(C_{12}), 113.9(C_{11}), 52.0(C_{21}), 47.5(C_4), 44.0(C_5), 37.9(C_1), 37.2(C_{10}), 36.4 (C_3), 28.1(C_{15}), 24.8(C_7), 23.9(C_{20}), 20.8(C_{19}), 19.9(C_2), 19.8(C_6), 18.5(C_{16}), 16.5(C_{17})

7. AMIDA ACETILADA



AMIDA ACETILADA (VII)

La condensación del 12-amino,14-nitrodehidroabietato de metilo (VI) y del cloruro del ácido ferúlico (C) para obtener la amida acetilada resultó fácil y se logró en poco tiempo.



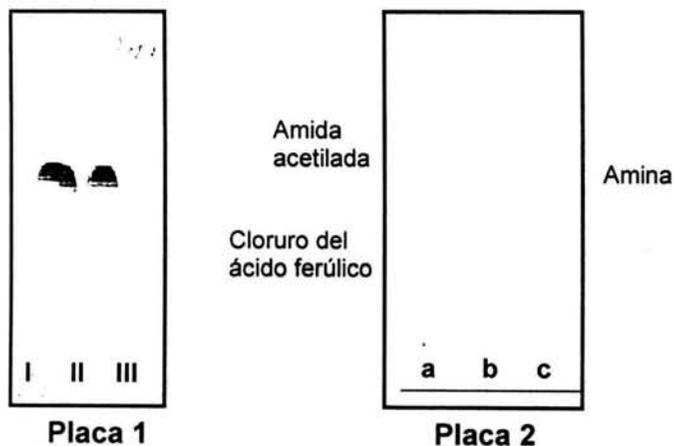


El producto obtenido al final de la reacción y después de la evaporación de los disolventes, corresponde a la amida acetilada (VII), la cual presentó cristales amarillos con un punto de fusión de 96 - 100°C (Tabla 7).

Tabla 7. Características físicas de la amida acetilada

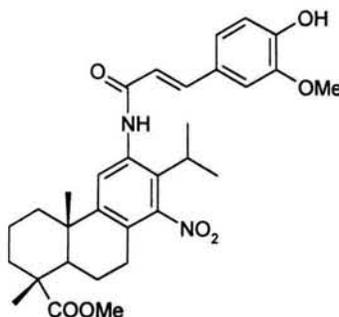
Característica:	EXPERIMENTAL
Tipo de Cristal:	Amarillos de forma no definida
Punto de fusión:	96 - 100°C
R _f :	0.6 (Hexano-AcOEt 7:3)
Rendimiento:	19.9%

La amida acetilada (VII), mostró un valor de M⁺ de 592 por EM. Su síntesis se monitoreó a través de ccfc como se muestra en las siguientes placas:



La placa 1 muestra el cloruro del ácido ferúlico (I, II) y el ácido ferúlico acetilado (III) y en la placa 2 se observa la producción de la amida acetilada a partir de la amina y el cloruro de ácido ferúlico (b), como control se muestra a la amina (c).

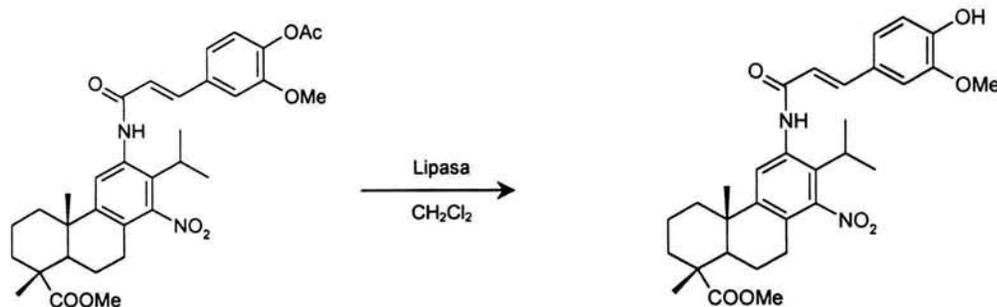
8. AMIDA



AMIDA (VIII)



Después de que se obtuvo la amida acetilada (VII), el siguiente paso fue la desprotección del grupo hidroxilo (-OH), presente en la estructura de este compuesto, para de esta forma obtener la amida (VIII) correspondiente.



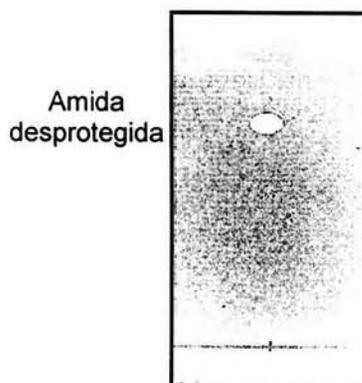
El producto obtenido al final de la reacción y después de la evaporación del disolvente, es la amida (VIII); la cual mostró ser un polvo amarillo con un punto de fusión de 180 - 181°C (Tabla 8).

Tabla 8 . Características físicas de la amida

Característica:	EXPERIMENTAL
Tipo de Cristal:	Polvo amarillo (cristales no definidos)
Punto de fusión:	180 - 181°C
R _f :	0.7 (Hexano-AcOEt 7:3)
Rendimiento:	15%

La amida (VIII), mostró un valor de M⁺ de 550 en el espectro de masas.

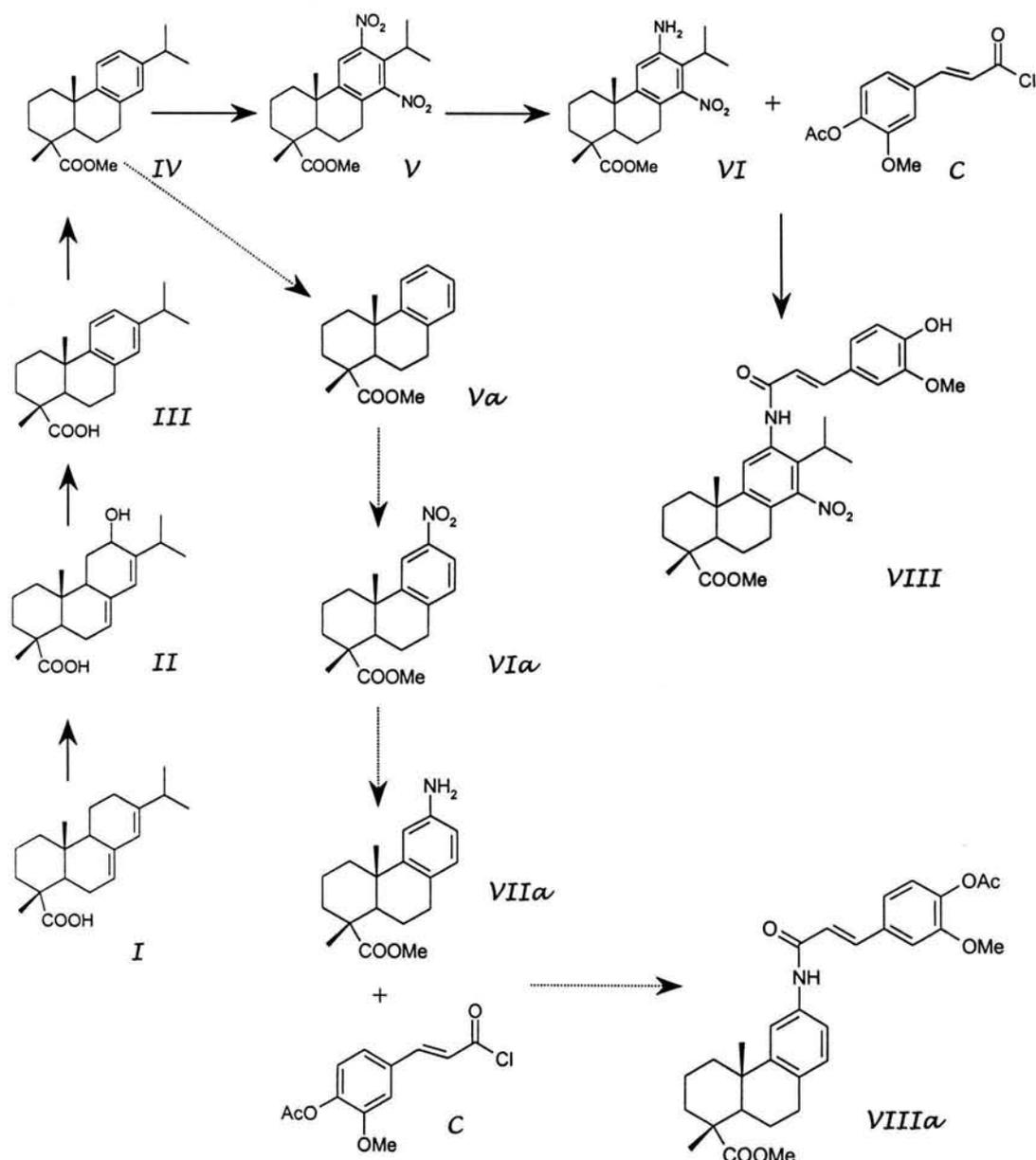
Finalmente, la amida desprotegida (VIII), al ser revelada con radical DPPH presentó una mancha de color amarillo, lo que indica la capacidad secuestrante del compuesto (esto se observa en la placa siguiente):





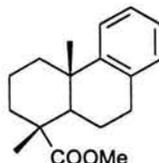
9. REACCIONES ALTERNAS

La ruta de síntesis original comprendía la obtención de los compuestos *I-VII* (flechas continuas); sin embargo, a partir del compuesto *IV* nos dimos cuenta de que era posible la obtención de otro tipo de compuestos, por lo que se propuso una vía alterna (flechas punteadas); de la cual, se generarían los compuestos deisopropilhidroabietato de metilo (*Va*), su derivado nitrado (*VIa*), la correspondiente amina (*VIIa*) y la amida (*VIIIa*).





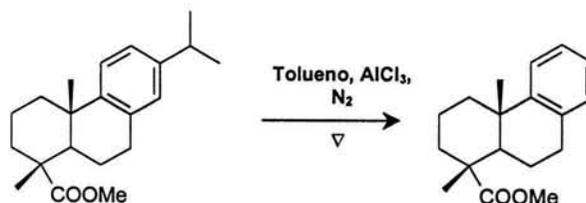
9.1 Deisopropildehidroabietato de metilo



DEISOPROPILDEHIDROABIETATO DE METILO (*Va*)

Una vez que se purificó y caracterizó el dehidroabietato de metilo (*IV*), vimos que era posible la obtención de otro derivado a partir de este, el deisopropildehidroabietato de metilo (*Va*). Por esta razón se sugirió una ruta de síntesis alterna, con el fin de obtener otro tipo de compuestos a partir de la amina o aminas que se pudieran obtener de este nuevo derivado.

De los compuestos propuestos en la ruta alterna el compuesto *Va* (deisopropildehidroabietato de metilo) se obtuvo mediante el empleo de un ácido de Lewis (AlCl_3), en tolueno y atmósfera de nitrógeno, con agitación constante y a temperatura ambiente.



Desafortunadamente al realizar la reacción por primera vez y monitorearla mediante el empleo de ccf, observamos una mezcla compleja, difícil de purificar.

Para tratar de resolver el problema (disminuir el número de subproductos), se decidió disminuir la temperatura a la cual se estaba llevando a cabo la reacción; esperando así, que se llevara esta en condiciones más suaves y poder eliminar de esta forma el grupo isopropil que nos interesaba. Al disminuir la temperatura, disminuyó el número de subproductos formados, ya que por ccf, observamos solo la presencia de tres manchas.



La mancha más abundante, que corresponde al deisopropilhidroabietato de metilo (*Va*), fue ligeramente más polar con respecto al compuesto de partida, el dehidroabietato de metilo (*VI*), el cual mostró una pequeña mancha. La tercera mancha que se observó fue pequeña y se encontró cerca del frente de corrida.

Una vez que se recuperó el producto de reacción decidimos recristalizarlo en etanol, percatándonos después de algún tiempo de la presencia de cristales, los cuales fueron filtrados y lavados con etanol frío. El compuesto finalmente obtenido, deisopropilhidroabietato de metilo (*Va*), mostró un punto de fusión de 83 - 85°C y un rendimiento del 68.7% (Tabla 9).

Tabla 9. Características físicas del deisopropilhidroabietato de metilo

Característica	EXPERIMENTAL	REPORTADA
Tipo de cristal:	Incoloros, agujas pequeñas	Incoloros
Punto de fusión:	83 - 85°C	90 - 92°C (Fonseca <i>et al.</i> , 2001)
R _f :	0.4 (Hexano-AcOEt 9:1)	
Rendimiento:	68.7%	

En la tabla 9a, se muestran los resultados de los parámetros obtenidos por UV, IR y EM para el deisopropilhidroabietato de metilo.

Tabla 9a. Identificación espectroscópica del deisopropilhidroabietato de metilo

	EXPERIMENTAL	REPORTADA
UV	(MeOH): λ_{\max} [264.25 - 0.52724/271.65 - 0.47694]	
IR	(KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2925 (C-H), 1727 (C=O), 1252 y 1135 (C-O), 3057, 1490 y 756 (aromático)	(nujol) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1721 y 1176 (Fonseca <i>et al.</i> , 2001)
EM	m/z 272(M ⁺): 272 (16%), 257 (27%), 240 (11%), 197 (100%), 143 (16%), 117 (8%)	m/z 272(M ⁺): 272 (12%), 257 (17%), 197 (100%) (Fonseca <i>et al.</i> , 2001)

Los datos obtenidos de resonancia magnética de ¹H y ¹³C para el deisopropilhidroabietato de metilo (*Va*) se muestran en la tabla 9b.



Tabla 9b. Identificación por resonancia magnética nuclear del deisopropilhidroabietato de metilo

	EXPERIMENTAL	REPORTADA
RMN ¹ H	CDCl ₃ TMS 300 MHz δ 1.09 (3H,s) C ₂₀ ; 1.21 (3H,s) C ₁₉ ; 1.45 - 1.54 (2H,m) C ₆ ; 1.72 - 1.86 (6H,m) C ₁ ,C ₂ ,C ₃ ; 1.96 - 2.06 (2H,m); 2.17 (2H,m); 2.31 - 2.36 (1H,dd) C ₅ J = 10.9 MHz; 2.83 - 2.95 (2H,m) C ₇ ; 3.68 (3H,s) COOCH ₃ ; 7.04 - 7.07 (1H,dd) aromático st. J = 6.7 MHz; 7.09 - 7.11 (1H,dd) aromático st. J = 4.0 MHz; 7.13 - 7.16 (1H,dd) aromático st. J = 6.7 MHz; 7.26 - 7.28 (1H,dd) aromático st. J = 7.2 MHz	CDCl ₃ TMS 300 MHz δ 1.09 (3H,s) C ₂₀ ; 1.21 (3H,s) C ₁₉ ; 1.20 - 1.22 (1H,m) C ₃ ; 1.50 - 1.66 (3H,m) C ₁ ,C ₂ ,C ₆ ; 1.75 - 1.82 (2H,m) C ₁ ,C ₂ ; 1.99 - 2.04 (2H,m) C ₃ ,C ₆ ; 2.35 (1H,dd) C ₅ J = 11.1 MHz; 2.84 - 2.89 (2H,m) C ₇ ; 3.68 (3H,s) COOCH ₃ ; 7.02 - 7.16 (3H,m) C ₁₂ ,C ₁₃ ,C ₁₄ ; 7.27 (1H,dd) C ₁₁ J = 7.2 MHz (Fonseca <i>et al.</i> , 2001)
RMN ¹³ C	CDCl ₃ 75.5 MHz δ 179.6(C ₁₈), 146.3(C ₉), 135.9(C ₈), 128.6(C ₁₄), 126.2(C ₁₃), 125.8(C ₁₂), 125.2(C ₁₁), 51.6(COOCH ₃), 45.9(C ₅), 44.9(C ₄), 38.5(C ₁₀), 36.7(C ₁), 31.9(C ₃), 30.4(C ₇), 27.3(C ₂₀), 26.2(C ₁₉), 20.0(C ₆), 19.7(C ₂)	CDCl ₃ 75.5 MHz δ 179.5(C ₁₈), 146.3(C ₉), 136.1(C ₈), 128.7(C ₁₄), 126.2(C ₁₃), 125.9(C ₁₂), 125.3(C ₁₁), 51.6(COOCH ₃), 46.0(C ₅), 45.4(C ₄), 38.6(C ₁₀), 36.8(C ₁), 32.2(C ₃), 30.3(C ₇), 27.5(C ₂₀), 26.0(C ₁₉), 20.1(C ₆), 19.7(C ₂) (Fonseca <i>et al.</i> , 2001)

Una vez obtenido y caracterizado el deisopropilhidroabietato de metilo (*Va*), el cual serviría como material de partida para la obtención de nuevos derivados nitrados (diferentes a los propuestos en la síntesis original) y la posterior reducción de estos; nos encontramos con un problema, ya que al intentar nitrar el anillo aromático de este compuesto, no se pudo obtener un derivado nitrado. Es importante señalar, que la nitración de este compuesto, se realizó mediante las técnicas de nitración descritas anteriormente.

Métodos empleados para la nitración del deisopropilhidroabietato de metilo

Método 3: NO _x	Método 2: NaNO ₂ /Peroxidasa	Método 1: HNO ₃ , H ₂ SO ₄ , ▽
No	No	No

Sin embargo, en todos los casos se obtuvieron mezclas complejas de compuestos y de haber sido posible la purificación de algún compuesto, el rendimiento hubiera sido muy bajo. Debido a esto, no fue posible seguir por esta ruta propuesta.



9.2 Hidroxilación del ácido dehidroabiético empleando *Bacillus sp*

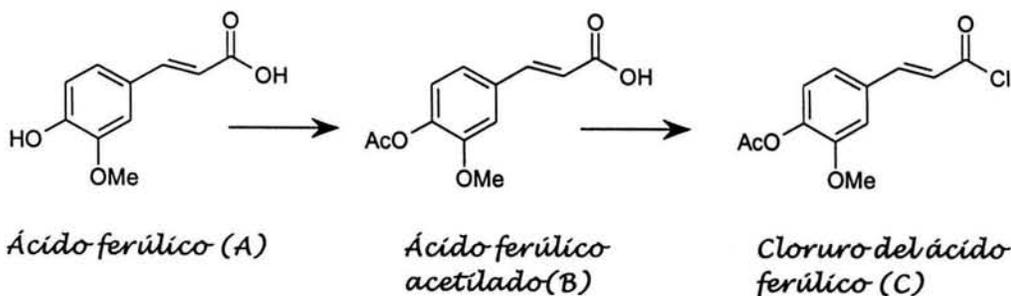
Una de las rutas alternas para llevar a cabo la funcionalización del anillo aromático del ácido dehidroabiético, fue hidroxilarlo mediante el empleo de *Bacillus sp*; para lo cual, se adicionó el ácido dehidroabiético como sustrato en el medio de cultivo donde previamente se había crecido el microorganismo.

Después de 2 días de haber adicionado el ácido dehidroabiético al cultivo, nos percatamos mediante ccf, de la presencia de algunas manchas; las cuales, correspondían con las del control (cultivo sin ácido dehidroabiético). Sin embargo, había otra mancha mucho mas abundante, que presentaba características mas polares que las del ácido dehidroabiético. Debido a que supusimos que se podía tratar de algún derivado hidroxilado, decidimos dejar mas tiempo la reacción, hasta que se consumiera todo el sustrato (ácido dehidroabiético), pero esto no sucedió.

Posteriormente, llevamos a cabo la extracción y purificación del compuesto correspondiente a la mancha mas abundante; para lo cual, se corrió una ccf preparativa y una vez que se obtuvo la fracción correspondiente a la mancha (la cual pensamos que se trataba del derivado hidroxilado de interés), el compuesto purificado se mandó a analizar por espectroscopía de masas para obtener su valor de M^+ , el cual se esperaba fuera de 316.

Los resultados obtenidos del análisis mostraron la presencia de varios compuestos; sin embargo, dentro de estos, se encontró un compuesto con un valor de M^+ , similar al que se esperaba (316).

10. ÁCIDO FERÚLICO Y SUS DERIVADOS

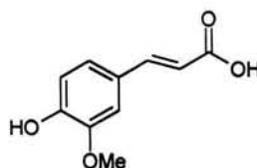




10.1 Ácido ferúlico

El ácido ferúlico (A) empleado en este trabajo, se extrajo a partir de nejayote y consistió en la acidificación del nejayote y una serie de extracciones, para su posterior purificación mediante una columna cromatográfica empacada de sílica gel. Después de esto, se realizó una cristalización del compuesto purificado. Cabe mencionar que esta metodología ya se tenía implementada en el laboratorio. Por esta razón, resultó sencilla la obtención del ácido ferúlico, el cual sirvió como reactivo para la formación de la amida, durante la síntesis de antioxidantes.

El ácido ferúlico obtenido, presentó las características físicas que se indican en la tabla 10.



ÁCIDO FERÚLICO (A)

Tabla 10. Características físicas del ácido ferúlico

Característica:	EXPERIMENTAL	REPORTADA
Tipo de cristal:	Blancos en forma de agujas	Polvo blanco (Sigma Co.)
Punto de fusión:	170 - 171°C	168 - 171°C
R _f :	0.45 (Hexano-AcOEt 6:4)	
Rendimiento:	1.5 g/L nejayote	

El ácido ferúlico (A) obtenido a partir del nejayote, se identificó por ccf empleando DPPH y FeCl₃ (Figura 20). Se observó una coloración amarilla con DPPH y anaranjada con el FeCl₃, las cuales son típicas de este compuesto al emplear dichos reveladores, como lo demuestra en ambos casos el estándar de ácido ferúlico (St).

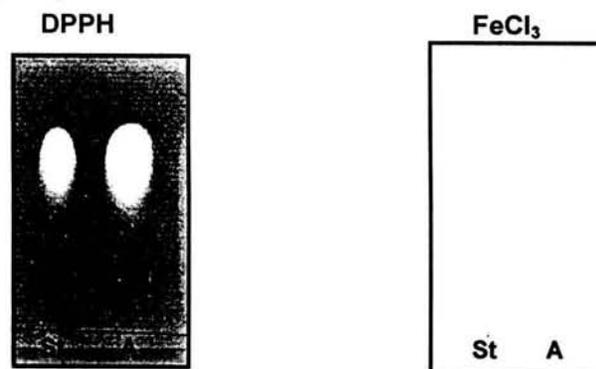


Figura 20. Cromatografía en capa fina del ácido ferúlico



El compuesto obtenido se analizó espectroscópicamente por UV e IR y espectrométricamente por EM. Los resultados se muestran en la tabla 10a.

Tabla 10a. Identificación espectroscópica del ácido ferúlico

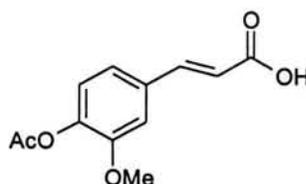
	EXPERIMENTAL	REPORTADA
IR	(KBr) V_{\max}/cm^{-1} 3432 (aromático-OH), 2968 (C-H), 1690 (C=O), 1431 (aromático-OH), 1273 (aromático-O-C), 1034 (C-O)	
EM	m/z 194(M^+): 194 (7%), 179 (100%), 132 (28%), 104 (24%), 91 (21%), 72 (52%), 45 (7%)	m/z 194(M^+)

Los datos obtenidos de resonancia magnética de ^1H para el ácido ferúlico se muestran en la tabla 10b.

Tabla 10b. Identificación por resonancia magnética nuclear del ácido ferúlico

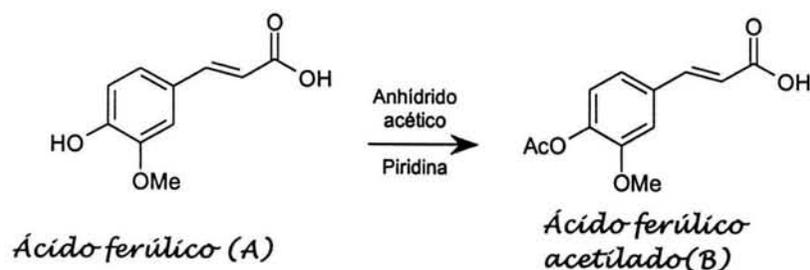
	EXPERIMENTAL
RMN ^1H	CDCl_3 TMS 300 MHz δ 7.71 (1H,trans,d) J = 15.9 MHz; 7.12 (1H,d,aromático) J = 8.1 MHz; 7.07 (1H,dd,aromático) J = 4.3 MHz; 6.93 (1H,d,aromático) J = 1.9 MHz; 6.29 (1H,trans,d) J = 15.8 MHz; 3.94 (3H,s, $\text{CH}_3\text{-O}$)

10.2 Ácido ferúlico acetilado



ÁCIDO FERÚLICO ACETILADO (B)

En el ácido ferúlico (A) se protegió el grupo hidroxilo (-OH) presente en la estructura de la molécula, con el fin de obtener el cloruro del ácido correspondiente. La reacción de protección del grupo -OH del ácido ferúlico, se logró mediante el empleo de anhídrido acético y piridina.





El ácido ferúlico acetilado (**B**), presentó las características físicas que se indican en la tabla 11.

Tabla 11. Características físicas del ácido ferúlico acetilado

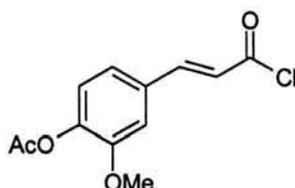
Característica:	EXPERIMENTAL
Tipo de cristal:	Polvo blanco
Punto de fusión:	190 - 192°C
R _f :	0.3 (Hexano-AcOEt 6:4)
Rendimiento:	90%

El compuesto obtenido se analizó por EM. Los resultados se muestran en la tabla 11a.

Tabla 11a. Identificación por EM del ácido ferúlico acetilado

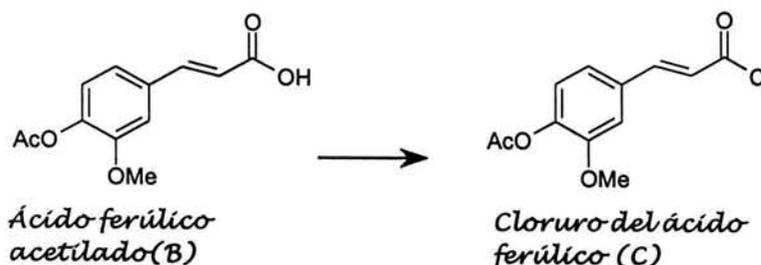
EXPERIMENTAL	
EM	m/z 236(M ⁺): 192 (10%), 150 (100%), 135 (40%), 10 (12%), 91 (5%)

10.3 Cloruro del ácido ferúlico



CLORURO DEL ÁCIDO FERÚLICO (C)

El cloruro del ácido ferúlico (**C**) se obtuvo a partir del ácido ferúlico acetilado (**B**), a través de la reacción con cloruro de tionilo (SOCl₂) en tolueno.



Debido a que el cloruro del ácido ferúlico (**C**) se preparó *in situ* y se utilizó inmediatamente para la obtención de la amida acetilada, este compuesto tampoco se pudo mandar a analizar por ningún método espectroscópico para su identificación.



VII. DISCUSIÓN

1. ÁCIDO ABIÉTICO

Debido a que el ácido abiético (*I*) era el material de partida para llevar a cabo la síntesis propuesta en este trabajo y a que no se contaba en la literatura con algunos datos tanto físicos como espectroscópicos para este compuesto, el ácido abiético se mandó a analizar por UV, IR, EM, RMN¹H y RMN¹³C, con el fin de obtener los espectros correspondientes. Debe recordarse que la pureza de este compuesto es de 70%, lo que podría interferir con los análisis realizados.

Al ver el espectro de UV, éste muestra la presencia de 2 picos de absorción máxima a 234 y 240 nm. Se podría suponer que estos valores son los característicos para este compuesto; sin embargo, después de haber obtenido el espectro de UV del ácido hidroxibiético (*II*), éste muestra una λ_{max} de 240 nm, y pensando que los dobles enlaces en ambas estructuras son iguales, consideramos que el valor de 234 nm puede deberse a las impurezas.

Con respecto al espectro de IR, debido a que en la estructura no se observa la sustitución de algún grupo funcional diferente al grupo carbonilo, la interpretación de este espectro no es de gran ayuda para la identificación del ácido abiético.

En el espectro de masas el valor de M^+ (302) obtenido, corresponde con el valor calculado para este compuesto.

En los espectros de RMN¹H y RMN¹³C resulta fácil distinguir las señales que le corresponden al ácido abiético, concordando los desplazamientos de RMN¹H y RMN¹³C obtenidos, con los reportados por Smith (1978).

Debido a que es complicada la purificación del ácido abiético a partir de la resina de pino, consideramos que el hecho de contar con los resultados obtenidos a partir de



estos análisis pueden servir como una referencia para el ácido abiético que se puede obtener de la resina de pino.

2. ÁCIDO HIDROXIABIÉTICO

La obtención del primer intermediario, el ácido hidroxibiético (*II*), bajo las condiciones descritas anteriormente, originan que el dióxido de selenio se convierta en ácido selenoso $(HO)_2SeO$, donde el selenio (Se^{VI}) se reduce a selenio metálico (Se^0), durante el proceso de oxidación. Al parecer, durante la reacción se da un ataque por parte del ácido selenoso, sobre el doble enlace del ciclohexeno, obteniendo el compuesto hidroxilado y la conservación del doble enlace en su posición original.

El ácido hidroxibiético, presenta algunas diferencias físicas y espectroscópicas con respecto al material de partida (ácido abiético), entre ellas se encuentran: que los cristales de este derivado son incoloros, mientras que los del material de partida eran amarillos, el punto de fusión aumento cerca de $10^\circ C$ (ácido hidroxibiético: $149 - 153^\circ C$, mientras que el del ácido abiético fue de $140 - 142^\circ C$); además de que el nuevo derivado resultó ser mas polar que el ácido abiético, debido al grupo $-OH$, que ahora tiene en el C_{12} .

Los espectros de UV del ácido abiético y del ácido hidroxibiético, presentan un pico de absorción máxima a la misma longitud de onda (λ_{max}), lo cual era esperado, ya que la introducción del grupo $-OH$ en la molécula del ácido abiético no afecta a la parte de la molécula que absorbe a esta λ .

Entre otras cosas, la presencia de un grupo $-OH$ se denota en el espectro de IR a valores de 3446 y 1058, siendo una de las variantes entre el espectro de IR del ácido hidroxibiético y el del material de partida, donde no aparecen dichas bandas.

En cuanto al valor obtenido del espectro de masas para el ácido hidroxibiético, este presenta un valor de M^+ de 318, el cual corresponde con el valor teórico



esperado para este intermediario (Fieser & Campbell, 1938) y que denota la presencia de un grupo -OH en la estructura de partida.

En el espectro de RMN¹³C, se observa con mayor claridad el efecto del grupo -OH cuando se introduce en la molécula del ácido abiético, ya que este grupo genera un desplazamiento de la señal del C₁₂, hacia campo bajo (δ 72.9 ppm) una diferencia de 45.5 ppm, con respecto a la señal que muestra el C₁₂ en el espectro de RMN¹³C del ácido abiético (δ 27.4 ppm)

Por otro lado, consideramos que el rendimiento obtenido (21.14%) es muy bajo, ya que como se mencionó anteriormente el ácido hidroxibiético es solo un intermediario para la obtención de ácido dehidroabiético. Cabe señalar, que la metodología para la obtención del ácido hidroxibiético ya se encuentra reportada (Fieser & Campbell, 1938); sin embargo, no se encuentran reportados los resultados espectroscópicos, solo se reporta el PM de 318 y el punto de fusión de 153 - 155°C; los cuales, prácticamente corresponden con los obtenidos del producto mandado a analizar.

3. ÁCIDO DEHIDROABIÉTICO

El ácido dehidroabiético (*III*), se obtuvo a partir del ácido hidroxibiético (*II*), mediante una reacción en la cual el ácido hidroxibiético es suavemente deshidratado con lo que este nuevo producto (ácido dehidroabiético) tiene ahora tres insaturaciones, dando con esto propiedades aromáticas al anillo C de la estructura. Este compuesto presenta características menos polares que el material de donde se obtuvo (ácido hidroxibiético), debido a la pérdida del grupo -OH que se tenía anteriormente en la estructura, además de la aromaticidad que ahora presenta en el anillo C el ácido dehidroabiético.

Los resultados obtenidos, corresponden con los reportados en la literatura ya que el punto de fusión (169 - 171°C), resultó muy parecido al reportado por Ulubelen & Miski (1981) quienes obtuvieron un punto de fusión de 172 - 173°C; por otro lado, el



rendimiento obtenido (88.3%), se considera alto y es similar al reportado en la bibliografía el cual es de 90% (Fieser & Campbell, 1938).

El espectro de UV del ácido dehidroabiético muestra dos picos máximos de absorción a 266 y 274 nm, los cuales son similares a los reportados en la literatura y que son 269 y 275 nm (Ulubelen & Miski, 1981) para el ácido dehidroabiético. Además estos picos máximos de absorción fueron diferentes al que presenta el ácido abiético y ácido hidroxabiético, el cual fue de 240 nm.

Podemos ver algunas diferencias en los espectros obtenidos del ácido dehidroabiético, con respecto a su precursor el ácido hidroxabiético, como puede ser el caso de IR, donde no se encuentra la banda que corresponde al -OH, indicándonos con esto, la pérdida de este grupo. Además ahora se encuentran bandas características de grupo aromático en 1497 y 819, los cuales corresponden con los valores reportados en la literatura, 1498 y 821 respectivamente (Ayer & Migaj, 1989).

El valor obtenido de M^+ en el espectro de masas para este compuesto, ahora es de 300, habiendo perdido 18 UMA respecto al ácido hidroxabiético. Esta diferencia se debe a la pérdida del grupo -OH y un protón. El valor de M^+ (300) se ajusta a la estructura del ácido dehidroabiético, además de que todos los picos obtenidos en este espectro corresponden con los reportados por Ayer & Migaj (1989).

La aromaticidad del ácido dehidroabiético se aprecia mejor en el espectro de RMN¹H, donde se pueden distinguir tres señales de protones típicos del anillo aromático, correspondientes a C₁₁, C₁₂ y C₁₄, los cuales muestran señales entre 6.87 y 7.1 ppm. Estos valores son similares a los publicados en la literatura (Ulubelen & Miski, 1981; Ayer & Migaj, 1989).



4. DEHIDROABIETATO DE METILO

4.1 Reacción con sulfato de dimetilo

El sulfato de dimetilo, al igual que el diazometano se han empleado como agentes de alquilación; así como para proteger a ciertos grupos funcionales (-COOH, -OH, etc.), susceptibles de interferir bajo las condiciones de reacción empleadas, formando los respectivos ésteres o éteres. A pesar de esto, no se pudo obtener el dehidroabietato de metilo empleando sulfato de dimetilo, ya que al parecer la reacción se lleva a través de un ataque nucleofílico hacia uno de los grupos -CH₃ del sulfato de dimetilo.

En este método se obtiene una mezcla compleja sin un compuesto mayoritario y esto se puede deber a la descomposición del ácido dehidroabiético (*III*), debido a las condiciones drásticas que se manejan; así como a la inespecificidad de la reacción, razones por las cuales se pueden estar obteniendo varios derivados.

4.2 Reacción con lipasas en metanol

Con el fin de obtener el dehidroabietato de metilo (*IV*) a partir del ácido dehidroabiético (*III*), se decidió montar una técnica enzimática mediante el empleo de lipasas, basada en la actividad de hidrolasa que tiene dicha enzima y en la capacidad que presenta al catalizar diferentes reacciones como: esterificación, transesterificación, aminólisis, amonólisis, tiotransesterificación, hidrazinólisis, oximólisis y síntesis de péptidos para el desarrollo de la bioreacción.

Sin embargo, a pesar de que se ha comprobado la efectividad que tienen las lipasas para llevar a cabo dichas reacciones, no fue posible obtener el dehidroabietato de metilo por este método; lo cual puede deberse al grupo -R unido al ácido carboxílico que presenta el ácido dehidroabiético; ya que se trata de un grupo muy grande, el cual puede estar originando impedimento estérico para que se pueda llevar a cabo la esterificación, comparado dicho sustituyente -R con el de los ácidos grasos, en los cuales -R es una cadena lineal.



Aunque cabe la posibilidad que la bioreacción no se lleve a cabo debido a que la enzima puede tener poca afinidad hacia dicho sustrato.

4.3 Esterificación de Fischer

El cuarto compuesto obtenido a partir del ácido dehidroabiético (*III*), en el desarrollo de la síntesis original fue el dehidroabietato de metilo (*IV*). Este compuesto se obtuvo mediante una esterificación de Fisher, en la que se llevó a cabo una reacción de sustitución nucleofílica en el acilo, efectuada en condiciones ácidas.

Aún cuando se sabe que los ácidos carboxílicos no son lo suficientemente fuertes para ser atacados por la mayoría de los nucleófilos, estos se hacen mucho más reactivos en presencia de un ácido mineral, como en este caso el H_2SO_4 que actúa protonando al átomo de oxígeno del grupo carbonilo, con lo que le imparte carga positiva al ácido carboxílico y hace a este mucho más susceptible al ataque nucleofílico por parte del metanol. La pérdida posterior de agua forma el éster como producto.

El dehidroabietato de metilo presenta características menos polares con respecto a su material de partida, el ácido dehidroabiético.

El espectro de UV presenta prácticamente los mismos valores de λ_{max} (266 y 274) que los del material de partida (el ácido dehidroabiético), ya que el anillo aromático no se afecta por la reacción de formación del éster. Estas λ_{max} fueron similares a las obtenidas por Ulubelen & Miski (1981), quienes obtuvieron valores de 269 y 275.

En cuanto al espectro de IR, los valores del dehidroabietato de metilo corresponden con los del ácido dehidroabiético; debido a que prácticamente no hay diferencias en la estructura de estos dos compuestos, solo se detecta la presencia del grupo carbonilo del éster a 1721; cabe señalar, que algunos de los valores obtenidos corresponden con los que se reportan en la literatura (De Pascual *et al.*, 1978).



Por espectroscopia de masas, se obtuvo un valor de 314 de M^+ para el dehidroabietato de metilo, este valor es 14 UMA mayor que el que presentó el ácido dehidroabiético, lo que confirma la presencia de un grupo metilo en la molécula, al llevarse a cabo la sustitución del protón del grupo $-COOH$ por un $-CH_3$, obteniendo así el valor de M^+ esperado; el cual concuerda con el reportado por Ulubelen & Miski (1981). Cabe señalar, que las otras señales son iguales a las obtenidas por Ulubelen & Miski (1981).

La presencia del metil éster es mas notoria en los espectros de resonancia, en los cuales el grupo $-COOCH_3$, genera desplazamientos característicos; como en el caso del espectro de RMN^1H , donde los 3 protones del grupo $-COOCH_3$, se localizan en 3.6 ppm, siendo este desplazamiento típico del grupo éster, el cual no se presenta en el espectro de RMN^1H del ácido dehidroabiético. Además la señal de 11.4 ppm que correspondía al $-COOH$ del ácido dehidroabiético, ya no se encuentra en el espectro del dehidroabietato de metilo. Cabe señalar, que los otros desplazamientos siguen conservando los mismos valores que los del ácido dehidroabiético (excepto los que ya se mencionaron) y que estos a su vez corresponden con los reportados por Ulubelen & Miski (1981).

Con respecto al espectro de $RMN^{13}C$, la señal del grupo $-CH_3$ del grupo $-COOCH_3$, también presenta un desplazamiento característico para este grupo, el cual esta en 51.8 ppm; siendo este, un valor que no se encuentra en el espectro del ácido dehidroabiético. En este caso, al igual que en el espectro de RMN^1H , los otros desplazamientos tienen prácticamente los mismos valores que los que muestra el ácido dehidroabiético. De manera general, los valores y características del dehidroabietato de metilo obtenido fueron similares a los obtenidos por Ulubelen & Miski (1981), quienes llevaron a cabo la esterificación del ácido dehidroabiético empleando diazometano.

Una diferencia entre el producto final obtenido por Ulubelen & Miski (1981) y nosotros, fue que ellos reportaron la obtención de un producto semicristalino y



nosotros la obtención de cristales con un punto de fusión de 41 - 43°C; sin embargo, al principio también obtuvimos un aceite, el cual después de algunos días cristalizó.

En cuanto al rendimiento que se obtuvo de esta reacción consideramos que es aceptable ya que fue de 54.1%.

5. 12,14-DINITRODEHIDROABIETATO DE METILO

5.1 Óxidos de nitrógeno (NO_x)

Se esperaba poder llevar a cabo la nitración de dehidroabietato de metilo (IV), mediante el empleo de NO_x, debido a que es una nitración suave que se ha empleado con algunos compuestos del tipo de los nitrilos α,β-insaturados, así como compuestos con anillos furánicos y benzofuránicos como el cacalol y la praecoxilina A.

En este método, se genera una mezcla de gases *in situ* (NO₂, NO, N₂O, N₂O₄, N₂ y CO₂), los cuales se generan a partir de la oxidación del tetrahidrofurano a ácido succínico, con ácido nítrico (Budde *et al.*, 2001). Se sabe que este tipo de nitración se lleva a cabo a través de radicales libres como el NO₂[·] y el N₂O₄[·]. Al parecer, esta nitración no resulta ser tan suave con el dehidroabietato de metilo (IV), ya que se obtiene una mezcla de compuestos, lo que puede estar indicando que el compuesto IV se puede estar descomponiendo o bien puede indicar la agresividad del método, ya que se forman muchos derivados.

5.2 NaNO₂/Peroxidasa

Se ha reportado la oxidación de muchos compuestos como: fenoles, aromático no fenólicos, aminas aromáticas e hidrocarburos aromáticos policíclicos; además de la nitración de 4-hidroxi-3-metilacetofenona, así como de algunos fenoles en presencia de NaNO₃ y H₂O₂ con peroxidasa. En esta reacción en algún momento se forma el peroxinitrito (ONOO⁻), a partir del H₂O₂ y del nitrito libre. Este ONOO⁻ se descompone en el radical NO₂[·], el cual actúa como agente nitrante. En este caso, la reacción



también se lleva a cabo a través de radicales libres y el producto obtenido de esta reacción es una mezcla compleja de compuestos.

La diferencia entre los dos métodos empleados (NO_x y Peroxidasa) con respecto al de la mezcla sulfonítrica (el cual resultó ser un método efectivo de nitración para el dehidroabietato de metilo), radica principalmente en el tipo de reacción que se está llevando a cabo. En los primeros dos métodos la reacción ocurre a través de radicales libres, con lo que se obtienen mezclas complejas de productos; pudiendo decir con esto, que se puede estar descomponiendo el dehidroabietato de metilo o bien que las reacciones son poco selectivas, generando con esto muchos derivados. Mientras que con el empleo de ácidos ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$), la reacción de nitración ocurre a través de un mecanismo de reacción de sustitución electrofílica aromática, obteniendo de este modo prácticamente un solo derivado nitrado.

5.3 Mezcla $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$

Siguiendo el orden de reacción de la síntesis original propuesta y después de haber obtenido el dehidroabietato de metilo (*IV*), el siguiente derivado a obtener fue el 12,14-dinitro dehidroabietato de metilo (*V*). Este compuesto se obtuvo mediante una nitración con la mezcla ácida ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$).

En esta reacción el electrófilo es el ión nitrónio, NO_2^+ , que se genera a partir del ácido nítrico por protonación y pérdida de agua. Dicho ión reacciona con el anillo aromático para formar un carbocatión intermediario. La pérdida de un protón a partir de este intermediario da el compuesto nitrado como producto neutro de sustitución.

El 12,14-dinitro dehidroabietato de metilo (*V*) presentó características más polares y un punto de fusión mucho mayor (183 - 185°C) con respecto a su precursor, el dehidroabietato de metilo (*IV*), ya que este es menos polar y su punto de fusión es 41 - 43°C. Un aspecto importante es la señal de UV que proporciona este nuevo compuesto el 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo (*V*); ya que solo se tiene un



único valor de absorción máxima y es a 212.6 nm; mientras que el ácido dehidroabiético y el dehidroabietato de metilo presentaban en ambos casos valores de 266 y 274 nm; lo que nos indica, el efecto que están teniendo los grupos nitro sobre el anillo aromático, en cuanto a la absorción en esta región del espectro.

En el espectro de IR, algunas señales se siguen conservando iguales a las de dehidroabietato de metilo; sin embargo, se encuentran unas nuevas señales en 1531 y 1363 que resultan características de los compuestos aromáticos nitrados; lo que nos indica la presencia de estos grupos en la estructura del dehidroabietato de metilo identificando con esto al nuevo derivado, el 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo (V).

El valor obtenido de M^+ de 404 corresponde con el esperado. Debido a que no se tenían valores reportados para este intermediario se tuvo que calcular este valor para poder tener alguna referencia del compuesto dinitrado.

En cuanto al espectro de RMN¹H a diferencia del espectro del dehidroabietato de metilo, este presenta ahora solo una señal característica de protón de anillo aromático, la cual corresponde al carbono de la posición 11.

En el espectro de RMN¹³C, al parecer la presencia de los grupos -NO₂, en los carbonos 12 y 14, da lugar a un ligero desplazamiento de las señales de estos carbonos hacia campo bajo; comparados dichos desplazamientos con los del dehidroabietato de metilo, ya que ahora se presentan las señales a 130.6 y 128.5 ppm respectivamente, comparado con los valores anteriores que eran de 126.8 y 124.1 ppm.

El rendimiento de esta reacción (54.9%) es aceptable, además de que resulta fácil la purificación de dicho compuesto, debido a que se presenta una reacción limpia. Sin embargo, cabe señalar que no podemos comparar el rendimiento obtenido con otros métodos de nitración; ya que no se cuenta con reportes bibliográficos, para la obtención de este compuesto.



6. 12-AMINO,14-NITRODEHIDROABIETATO DE METILO

6.1 Reducción con levadura

La primera metodología y la que en un principio nosotros supusimos que era posible para llevar a cabo la reducción de algún grupo nitro del 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo fue empleando *Saccharomyces cerevisiae*.

Sin embargo, aunque se sabe de las propiedades que tiene *S. cerevisiae* para llevar a cabo reacciones de reducción como: ciclizaciones de los 2-nitrocinaldehídos y los 1,2 nitrocianoarenos sustituidos con quinilinas y benzamidas respectivamente (Baik *et al.*, 1997; Blackie *et al.*, 1997); o bien de los 3-nitropropenonitrilos y o-nitrofenilazo, para formar los 5-aminoisoxazoles y los 2-aril-2H-benzotriazoles y sus óxidos respectivos (Navarro-Ocaña *et al.*, 1996). Además, también se ha reportado la bio-reducción de compuestos nitrosos y N-óxidos para formar las anilinas y piridinas correspondientes (Baik *et al.*, 1995; 1997). Con este sustrato (12,14-dinitrodehidroabietato de metilo) no fue capaz de llevarse a cabo la reducción de ninguno de los dos grupos -NO₂ presentes en este.

En primer lugar, pensamos que esto se debía principalmente al impedimento estérico que puede generar el grupo isopropilo presente en la posición 13 del 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo ya que se trata de un grupo grande que puede estar impidiendo la reacción en los grupos nitro- que pretendemos reducir, los cuales se encuentran en las posiciones 12 y 14 respectivamente. La segunda razón, está relacionada con la especificidad, ya que el sustrato empleado puede ser poco o nada específico para la enzima que lleva a cabo la reducción del grupo nitro y debido a esto no llevar a cabo la reacción.

6.2 Reducción con SnCl₂·2H₂O en DMF

Una vez obtenido el 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo (V) y siguiendo la secuencia de reacciones de la síntesis original; a partir de este compuesto se obtuvo el 12-amino-14-nitrodehidroabietato de metilo (VI), mediante una reacción de reducción en la que al parecer la efectividad de esta reducción se basa (al igual que la



reducción con metales en medio ácido) en la formación de compuestos nitrosos e hidroxilaminas intermediarios, conduciendo finalmente la amina correspondiente.

El 12-amino-14-nitrodehidroabietato de metilo (VI) presenta características más polares y un punto de fusión mayor (225 - 228°C), con respecto al material de partida (12,14-dinitrodehidroabietato de metilo), el cual presentó un punto de fusión de 183 - 185°C.

En cuanto a los picos de absorción máxima, los valores de λ_{\max} que presenta el 12-amino-14-nitrodehidroabietato de metilo de 241 y 292 nm son diferentes al que presenta el compuesto dinitrado (212 nm), con lo que podemos decir que la estructura original ha sufrido el cambio de un grupo $-\text{NO}_2$, y este cambio está modificando la absorción de esta molécula.

En relación con el espectro de IR obtenido del 12-amino-14-nitrodehidroabietato de metilo (VI), es notoria la presencia de un grupo $-\text{NH}_2$ con bandas características de este grupo unido a un anillo aromático en 3410 y 3497. También se tiene otra señal característica de un grupo $-\text{NO}_2$ unido a anillo aromático en 1519 y 1334, las cuales no aparecen en el espectro obtenido para el 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo (V); sin embargo, las señales restantes se conservan y son iguales en los espectros de ambos compuestos.

El valor de 374 de M^+ para el 12-amino-14-nitrodehidroabietato de metilo (VI), presenta 30 UMA menos que el valor de 404 correspondiente al 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo (V); esta diferencia se debe a la pérdida de los dos átomos de oxígeno del grupo nitro y la sustitución de estos por dos átomos de hidrógeno.

El grupo amino presente en el 12-amino-14-nitrodehidroabietato de metilo (VI), se puede ver claramente en los espectros de RMN tanto de ^1H como ^{13}C , donde los protones presentes en el grupo $-\text{NH}_2$ aparecen con un desplazamiento característico



para este grupo en 3.74 ppm, mientras que este desplazamiento no se ve en el espectro de RMN¹H de 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo (V). Además se observa un ligero desplazamiento del protón de aromático correspondiente al C₁₁ hacia campo alto ya que presenta un valor de 6.62, siendo que antes era de 7.53. Por otro lado, los restantes valores de desplazamiento, son iguales para ambos compuestos.

Con respecto al espectro de RMN¹³C se puede ver un ligero desplazamiento hacia campo alto por parte de los carbonos 11, 12 y 14 de la molécula del 12-amino-14-nitrodehidroabietato de metilo (VI), ya que aparecen en 119.7, 115.5 y 113.9 respectivamente; mientras que los valores que presentaron estos carbonos en el espectro del 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo (V) fueron 130.6, 128.5 y 121.4 respectivamente. Las demás señales se conservan con los mismos valores en los espectros de RMN¹³C, para el compuesto V y VI. Los desplazamientos que se observan, al parecer se deben a la presencia tanto del grupo -NH₂ como del grupo -NO₂ sustituidos en el anillo aromático.

Por otro lado, no es posible comparar ninguno de los valores obtenidos con datos de la literatura para este compuesto. El rendimiento obtenido de 77.9% resulta bueno, aunque tampoco existen datos reportados en la literatura.

7. AMIDA ACETILADA

Con el 12-amino-14-nitrodehidroabietato de metilo (VI) y el cloruro del ácido ferúlico (C), se llevó a cabo la reacción de condensación, para obtener la amida acetilada (VII) correspondiente, bajo las condiciones descritas en la metodología.

En esta reacción, se llevo a cabo una reacción de sustitución acilnucleofílica; en la que la amina (VI), que actúa como nucleófilo, se adiciona al grupo acilo del ácido ferúlico acetilado (B) y forma un intermediario tetraédrico, el cual se descompone para producir la amida acetilada (VII).



La amida acetilada (*VIII*) obtenida, presentó algunas diferencias con respecto a sus precursores, sobre todo el 12-amino-14-nitrodehidroabietato de metilo (*VI*), como la polaridad; además de un punto de fusión de 96 - 100°C, el cual es diferente al de la amina (225 - 228°C).

A pesar de que no se tienen resultados de IR, RMN¹H y RMN¹³C, consideramos que es suficiente el valor de M⁺ que presentó este compuesto, el cual fue de 592, para decir que se trata de la amida acetilada, ya que este valor de M⁺, era el esperado para la estructura de dicha amida.

El rendimiento obtenido para la reacción de obtención de la amida acetilada no se calculó, ya que este fue muy bajo.

8. AMIDA

A partir de la amida acetilada (*VII*) se obtuvo la amida (*VIII*), desprotegiendo el grupo hidroxilo (-OH) de la parte del ácido ferúlico, el cual se había protegido al momento de formar el cloruro del ácido ferúlico. Como ya se mencionó en la metodología, la reacción de desprotección, se llevó a cabo mediante el empleo de lipasas, esperando con esto eliminar el acetilo. La amida (*VIII*) presentó un punto de fusión de 180 - 181°C, el cual fue diferente del de su precursor, la amida acetilada (96 - 100°C).

Por otro lado, el valor de M⁺ obtenido para este compuesto (*VIII*) y que fue de 550, corresponde con el esperado. Este valor de M⁺ difiere del de la amida acetilada (*VII*), que era de 592 y dicha diferencia es debida al grupo acetilo, lo que indica que este grupo ya no está presente en la estructura.

El rendimiento que resultó de esta reacción fue muy bajo y por esta razón no fue posible enviar este compuesto a IR, UV, RMN¹H y RMN¹³C.



Finalmente, al revelar la ccf de la amida desprotegida con una solución de radical DPPH, se observó una coloración amarilla, lo que indica cualitativamente la actividad secuestrante de la amida. Sin embargo, sería importante evaluar la actividad antioxidante del compuesto obtenido, mediante otros métodos como el que emplea β -caroteno o el radical ABTS.

9. REACCIONES ALTERNAS

9.1 Deisopropilhidroabietato de metilo

De la ruta propuesta como alterna, el primer derivado obtenido fue el deisopropilhidroabietato de metilo ($V\alpha$) a partir del hidroabietato de metilo (V). Para esto, se llevó a cabo la eliminación del grupo isopropilo presente en el hidroabietato de metilo (V), mediante el empleo de un ácido de Lewis, aprovechando que se tiene en este grupo un carbono terciario, originando con esto la formación de cationes libres de alquilo.

El deisopropilhidroabietato de metilo ($V\alpha$), presenta prácticamente la misma polaridad que su precursor el hidroabietato de metilo (IV), sólo que el punto de fusión del primero es mayor (83 - 85°C), mientras que para el segundo, el punto de fusión fue de 41 - 43°C. Sin embargo, el punto de fusión obtenido para $V\alpha$, es un poco menor que el reportado por Fonseca *et al.* (2001), el cual es de 90 - 92°C. Consideramos que esta diferencia puede estar relacionada con la pureza del compuesto.

Con respecto al espectro de UV, los picos de absorción máxima del deisopropilhidroabietato de metilo ($V\alpha$), se presentan a una λ de 264 y 271 nm. Estos valores no pueden ser comparados con datos de la literatura, ya que no se cuenta con estos valores; sin embargo, estos valores son un poco menores con respecto a los obtenidos para el hidroabietato de metilo (IV), y que fueron de 266



y 274 nm. Esta ligera diferencia entre las λ_{\max} , podría estar relacionada con la pérdida del grupo isopropilo de la molécula.

Al comparar el espectro de IR del deisopropilaldehidroabietato de metilo ($V\alpha$), con el espectro del aldehidroabietato de metilo (IV), podemos observar que faltan algunas bandas en 1379 y 1363, correspondientes al grupo isopropilo, con lo que se confirma la eliminación de este grupo de la estructura del aldehidroabietato de metilo (IV), ya que prácticamente las bandas restantes son iguales para ambos compuestos. Cabe señalar, que a pesar de que se tienen datos bibliográficos reportados para el compuesto $V\alpha$; los valores obtenidos de IR, no se pueden comparar con los teóricos debido a que estos se obtuvieron en nujol y los nuestros en KBr.

El espectro de masas del deisopropilaldehidroabietato de metilo ($V\alpha$), presenta una M^+ de 272 y este valor es 42 UMA menor que el del material de partida (aldehidroabietato de metilo), lo que denota la pérdida del grupo isopropilo. El valor de M^+ y los demás picos obtenidos en el espectro, son similares a los reportados por Fonseca *et al.* (2001).

La pérdida del grupo isopropilo también resulta notoria en el espectro de RMN¹H, ya que comparando el espectro del deisopropilaldehidroabietato de metilo ($V\alpha$), con el del aldehidroabietato de metilo (IV), el espectro de $V\alpha$ no presenta desplazamientos para los protones de los -CH₃ correspondientes a C₁₆ y C₁₇. Tampoco se encuentra la señal correspondiente al protón de C₁₅. A diferencia de esto, ahora aparece una señal más, debida a un protón aromático. Además, todos los protones de aromático presentan un ligero desplazamiento hacia campo bajo ya que se encuentran en 7.04 - 7.07, 7.09 - 7.11, 7.13 - 7.16 y 7.26 - 7.28; mientras que en el espectro del compuesto IV , solo se encontraron tres señales en 6.87, 6.97 - 7.01 y 7.16. Cabe mencionar que las señales del espectro de RMN¹H del compuesto $V\alpha$ corresponden con los valores reportados por Fonseca *et al.* (2001).



En el espectro de RMN¹³C, se puede observar que faltan tres señales correspondientes a los carbonos 15, 16 y 17; así como un desplazamiento hacia campo alto, por parte de la señal del C₁₃, comparada con el espectro de RMN¹³C del compuesto IV. Todas las señales obtenidas para el deisopropildehidroabietato de metilo (Va), son similares a las reportadas por Fonseca *et al.* (2001).

9.2 Hidroxilación del ácido dehidroabiético con bacillus sp

Otra ruta alterna empleada fue la oxidación del ácido dehidroabiético empleando *Bacillus sp.*, esperando con esto llevar a cabo su hidroxilación. El microorganismo seleccionado para esta biotransformación fue aislado a partir de mucígal de café, de una zona de la Sierra del Estado de Puebla. Se ha visto que este microorganismo posee la capacidad para transformar ácido ferúlico en guayacol, mediante un proceso de oxidación.

Se tienen algunos datos reportados sobre la oxidación de algunos diterpenoides como el dehidroabietato de metilo y el ácido isopimárico, empleando *Rhodococci* (Vorob'eb *et al.*, 2001). Sin embargo, para la oxidación del ácido dehidroabiético se tiene reportado el empleo de *F. Moniliforme* y *F. Oxysporum* obteniendo en ambos casos un producto más polar que el ácido dehidroabiético, el cual se identificó como ácido 1-hidroxidehidroabiético con un valor de 316 M⁺ (Tapia *et al.*, 1997).

El compuesto obtenido, al igual que el reportado por Tapia *et al.* (1997), presentó características más polares que el ácido dehidroabiético.

Debido a que solo se pudo purificar una cantidad pequeña de este compuesto, solo se mando a analizar por espectroscopia de masas, obteniendo un valor de 316 de M⁺; lo cual, sugiere la presencia de un grupo -OH en la estructura. Además del valor de M⁺, los otros picos del espectro también corresponden con los reportados por Tapia *et al.* (1997). Al parecer puede tratarse del mismo compuesto, solo que al no contar con



los otros espectros para este compuesto, no podemos asegurar que se trate del mismo compuesto que obtuvo Tapia *et al.* (1997).

10. ÁCIDO FERÚLICO Y SUS DERIVADOS

10.1 Ácido ferúlico

Debido a que la parte final de la síntesis original propone la condensación del 12-amino-14-nitrodehidroabietato de metilo (VI) con el cloruro del ácido ferúlico (C) para obtener la amida acetilada (VII) y posteriormente la amida (VIII) correspondiente; el ácido ferúlico (A) empleado para esta reacción, se obtuvo mediante una extracción a partir de nejayote, debido a que se sabe que este compuesto es el ácido hidroxicinámico más abundante en la pared celular del maíz (Liyama *et al.*, 1990).

Cabe mencionar que esta metodología ya se tenía implementada en el laboratorio; por esta razón, resultó sencilla la obtención del ácido ferúlico

El ácido ferúlico (A) obtenido presentó un punto de fusión de 170 - 171°C, el cual resultó muy similar al punto de fusión (168 - 171°C) del ácido ferúlico comercial (Fluka).

En cuanto al espectro de IR podemos ver la presencia de dos bandas características del grupo -OH unido a un anillo aromático en 3432 y en 1431, la presencia del grupo carbonilo en 1690 y la banda característica perteneciente al grupo metoxi (-OCH₃) unido al anillo aromático en 1273. Estas bandas corresponden con la estructura del ácido ferúlico (A).

En el espectro de masas del ácido ferúlico, el valor de M⁺ (194), corresponde con el esperado para la estructura de dicho ácido.

Solo se cuenta con el de espectro de RMN¹H, en el cual se pueden distinguir claramente tres protones de aromático, dos protones correspondientes al doble enlace



y tres protones desplazados a 3.94 ppm, correspondientes al grupo $-CH_3$ presente en la estructura del ácido ferúlico (*A*).

10.2 Ácido ferúlico acetilado

La obtención de este intermediario (*B*), es con el fin de proteger el grupo hidroxilo ($-OH$) presente en la estructura del ácido ferúlico (*A*), ya que este puede interferir con la reacción de obtención del cloruro del ácido correspondiente (*C*).

Esta reacción de protección se llevó a cabo en tres pasos: 1) introducción del grupo protector para formar un derivado inerte, 2) la reacción deseada y 3) eliminación del grupo protector.

La reacción bajo las condiciones descritas anteriormente se basa en la capacidad nucleofílica del grupo hidroxilo ($-OH$) de la molécula, el cual reacciona con el anhídrido acético para romper la unión anhídrido. Tal reacción comprende la sustitución nucleofílica, con lo que se obtiene el ácido ferúlico acetilado (*B*), con la subsecuente formación de ácido acético.

El derivado acetilado (*B*), presenta algunas diferencias respecto a su precursor, el ácido ferúlico (*A*), como lo es el punto de fusión; ya que el del derivado acetilado es aproximadamente $20^{\circ}C$ mayor que el del ácido ferúlico.

En cuanto al espectro de masas del derivado acetilado, el valor de M^+ de 236 corresponde con el esperado para la estructura de este compuesto. El valor de 192 que se presenta en este espectro puede deberse a la pérdida del grupo acetilo, la cual resulta muy sencilla.

A pesar de que no se cuenta con otro tipo de espectros como RMN^1H , $RMN^{13}C$ o IR, los resultados obtenidos son suficientes para decir que se trata del derivado



acetilado del ácido ferúlico. Además, se puede decir que la reacción de obtención de este compuesto es adecuada, ya que presenta un buen rendimiento.

10.3 Cloruro del ácido ferúlico

Una vez obtenido el ácido ferúlico acetilado (B), a partir de este se obtuvo el cloruro del ácido ferúlico (C), bajo las condiciones descritas anteriormente.

Se sabe que los cloruros de ácido son los derivados más reactivos de los ácidos carboxílicos y en base a esto, se llevó a cabo la reacción entre este derivado y la amina (VI), para obtener la amida acetilada (VII) correspondiente.

Para obtener el cloruro del ácido ferúlico (C), se utilizó SOCl_2 . Al parecer la reacción ocurre por sustitución nucleofílica en el acilo, en el cual el ácido carboxílico se convierte en un derivado reactivo (cloro sulfito), el cual posteriormente es atacado por el ion cloruro.

El cloruro del ácido ferúlico (C) obtenido de esta manera, presentó algunas diferencias de polaridad con respecto a su precursor. Sin embargo, este compuesto no pudo analizarse por UV, IR, EM, RMN^1H o RMN^{13}C , debido a que se obtuvo *in situ*, al momento de obtener la amida, ya que se sabe que los cloruros de ácido son altamente reactivos.



VIII. CONCLUSIONES

1. La amida obtenida presentó actividad secuestrante; sin embargo, aún debe evaluarse el empleo de este compuesto como antioxidante en la industria de los alimentos.
2. La ruta de síntesis propuesta, genera compuestos como el ácido hidroxabiético *II*, ácido dehidroabiético *III*, dehidroabietato de metilo *IV*, 12,14-dinitrodehidroabietato de metilo *V*, deisopropildehidroabietato de metilo *Va*, 12-amino,14-nitrodehidroabietato de metilo *VI*, amida acetilada *VII*, amida *VIII* que pueden ser empleados como material de partida para la obtención de otros nuevos derivados.
3. Aún cuando se llevaron a cabo reacciones enzimáticas para la obtención de la amida, la mejor ruta para llegar a ésta fue a través de reacciones orgánicas tradicionales. Sin embargo, no podemos decir que ésta amida no se puede obtener a través de sistemas biológicos, ya que para poder concluir esto, deberían realizarse estudios donde se evalúen las condiciones ideales o bien que se empleen otros sistemas biológicos.



IX. BIBLIOGRAFÍA

- Ayer WA, Migaj BS. Acids from blue-stain diseased lodgepole pine. *Can. J. Bot.*,**1989**, 67,1426-1428.
- Babayán VK, Morse RE. Tecnología de grasas y aceites. In: Elementos de tecnología de alimentos. Avi Publishing Company, Desrosier NW (Ed), México,**1997**,67-75.
- Badui S. Diccionario de tecnología de los alimentos. Alhambra Mexicana, México,**1988**.
- Berry DR, Paterson A. Enzymes in the food industry. In: Enzyme chemistry. Impact and applications. Chapman & Hall, Suckling CJ (Ed), London,**1990**.
- Budde CL, Beyer A, Munir IZ, Dordick JS, Khmel'nitsky YL. Enzymatic nitration of phenols. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*,**2001**,15,55-64.
- Classen D, Arnaron JT, Serratos JA, Lambert JD, Nozzolillo C, Philogene BJ. Correlation of phenolic acid content of maize to resistance to *Sitophilus zeamais*, the maize weevil, in cimmyt's collections. *J. Chem. Ecol.*,**1999**,16,301-315.
- De Pascual J, San Feliciano A, Tabernero ML, Miguel del Corral JM, Barrero AF, Grande M. Componentes de las arceutidas de *Juniperus Phoenicea*. I. Fracción ácida. *Anales de Química*,**1978**,74,459-464.
- Ermann M, Simkovsky NM, Roberts SM, Parry DM, Baxter AD. Solid-phase synthesis of imidazo[4,5-*b*]pyridine-2-ones and related urea derivatives by cyclative cleavage of a carbamate linkage. *J. Comb. Chem.*,**2002**,4,352-358.
- Escuder B, Torres R, Lissi E, Labbé C, Faini F. Antioxidant capacity of abietanes from *Sphacele salviae*. *Nat. Prod. Lett.*,**2002**,16,277-281.
- Esteves MA, Narender N, Marcelo-Curto MJ, Gigante B. Synthetic derivatives of abietic acid with radical scavenging activity. *J. Nat. Prod.*,**2001**,64,761-766.
- Feio SS, Gigante B, Roseiro JC, Marcelo-Curto MJ. Antimicrobial activity of diterpene resin acid derivatives. *J. Microbiol. Methods*,**1999**,35,201-206.
- Fieser LF, Campbell WP. Concerning dehydroabietic acid and the structure of pine resin acids. *J. Am. Chem. Soc.*,**1938**,60,159-170.
- Fonseca T, Gigante B, Gilchrist TL. A short synthesis of phenanthro[2,3-*d*]imidazoles from dehydroabietic acid. Application of the methodology as a convenient route to benzimidazoles. *Tetrahedron*,**2001**,57,1793-1799.



- Fukui H, Koshimizu K, Egawa H. A new diterpene with antimicrobial activity from *Charnaecypris pisifera* Endle. *Agric. Biol. Chem.*, **1978**,*42*,1419-1423.
- Gasson MJ, Kitamura Y, McLauchlan WR, Narbad A, Parr AJ, Parsons EL, Payne J, Rhoades JC, Walton NJ. Metabolism of ferulic acid to vainillin. *J. Biol. Chem.*, **1998**,*273*,4163-4170.
- Hall G, Lingnert H. The shelf life of foods and beverages. In: Developments in food science. Elsevier, Charalambous G (Ed), Amsterdam, **1986**,735-743.
- Hartley RD, Morrison III WH, Himmelsbach DS, Borneman WS. Cross-linking of cell wall phenolic arabinoxylans in graminaceous plants. *Phytochemistry*, **1990**, *29*,3705-3709.
- Huang Z, Dostal L, Rosazza JP. Mechanism of ferulic acid conversions to vanillic acid and guaiacol by *Rhodotorula rubra*. *J. Biol. Chem.*, **1993**,*268*,23954-23958.
- Jiménez -Estrada M, Ayala J, Saad I, Reyes-Chilpa, Navarro O. Nitración de productos naturales con anillos furánicos y benzofuránicos. *Rev. Latinoamer. Quím.*, **1999**,*27*,81-88.
- Kroon PA, Williamson G. Hidroxicinnamates in plants and food: currents and future perspectives. *J. Sci. Food Agric.*, **1999**,*79*,355-361.
- Liyama K, Tuyet TB, Stone BA. Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internode. *Biochemistry*, **1990**,*29*,733-737.
- Löliger J. The Use of antioxidants in foods. In: Free radicals and food additives. Aruoma OI, Halliwell B (Ed), London, **1991**,121-149.
- Love J. Fats and oils in foods. In: Food theory and applications. Macmillan Publishing Company, Bowers J (Ed), New York, **1992**,221-238.
- Matihobová M, Mastihuba V, Kremnický L, Willet JL, Côté GL. Chemoenzymatic preparation of novel substrates for feruloyl esterases. *Synlett.*, **2001**,*10*,1559-1560.
- Micard V, Grabber JH, Ralph J, Renard CM, Thibault JF. Dehidrodiferulic acids from sugar-beet pulp. *Phytochemistry*, **1997**,*44*,135-138.
- Muftic M. Essay on antibiotic properties of abietyl compounds. *Q. J. Crude Drug Res.*, **1970**,*10*,1601-1607.
- Navarro-Ocaña A, Olguín LF, Luna H, Jiménez-Estrada M, Bárzana E. Reductive cyclization with baker's yeast of 4-alkyl-2-nitroacetanilides to 6-alkylbenzimidazoles and 1-hydroxy-2-methyl-6-alkylbenzimidazoles. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, **2001**,*1*,2754-2756.



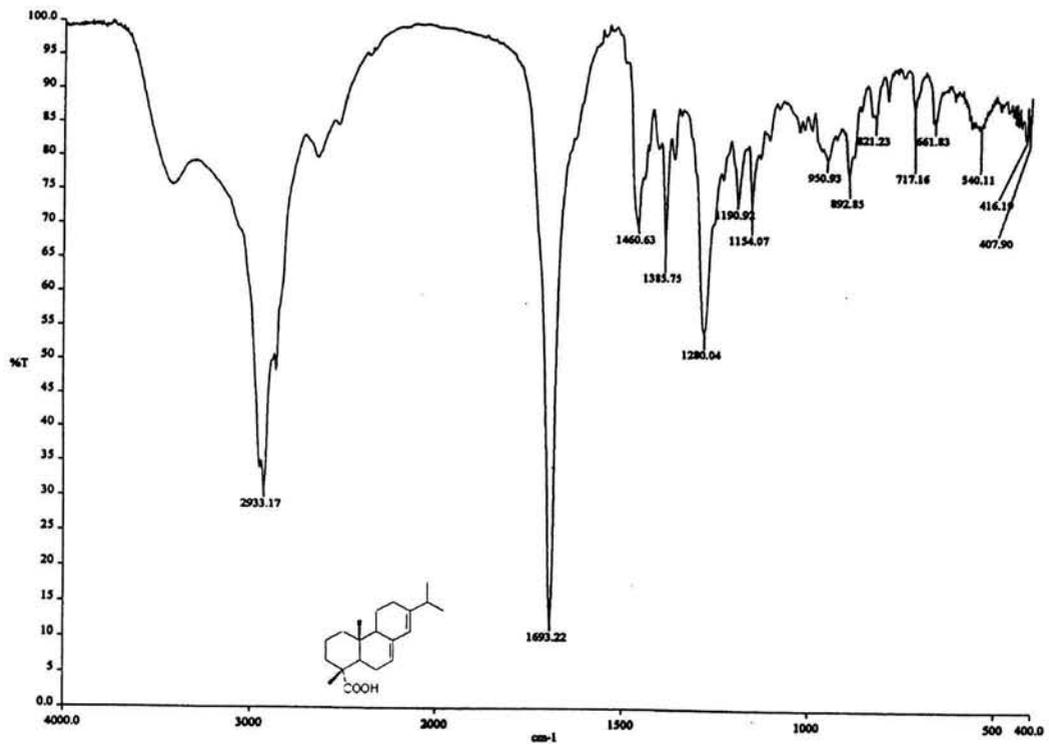
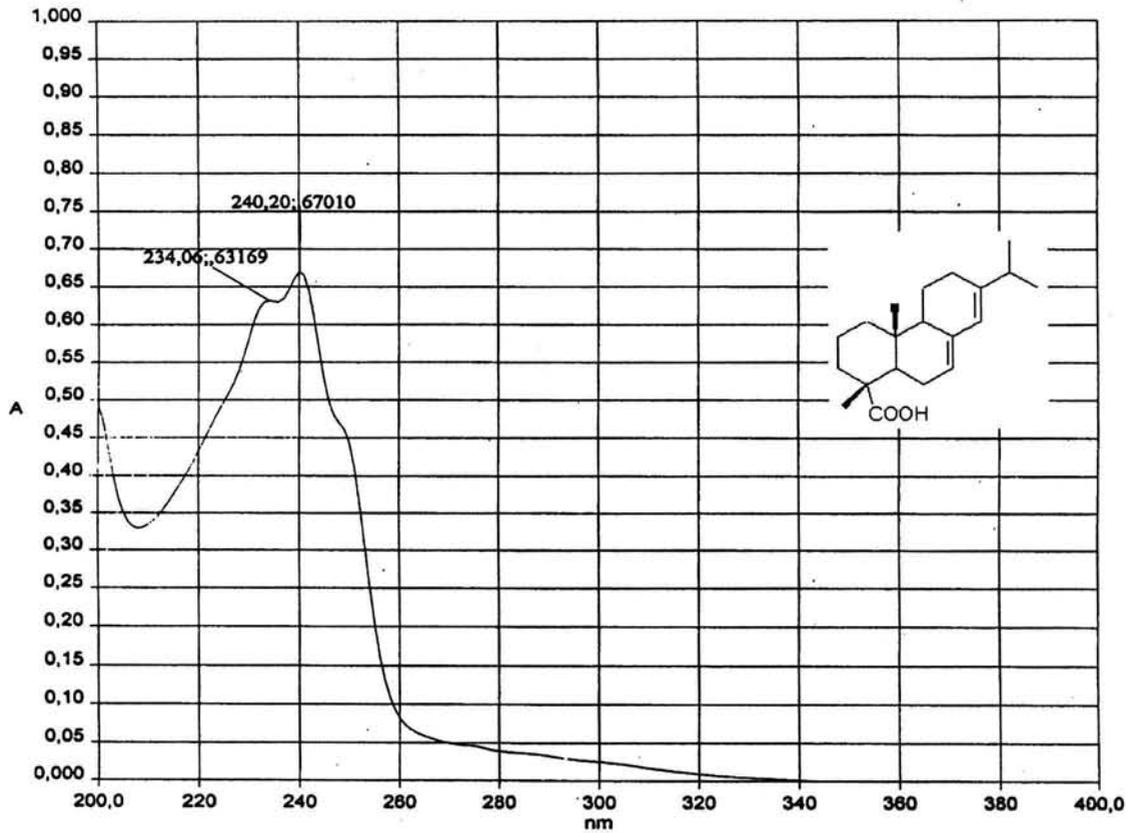
- Navarro-Ocaña A. Síntesis quimioenzimática de bloques de construcción con *Saccharomyces cerevisiae* a partir de nitroalquenos. Tesis de Doctorado en Biotecnología. UNAM, Colegio de Ciencias y Humanidades, Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado, Facultad de Química, México D.F., **1998**.
- Presser A, Pötschger I, Haslinger E, Hüfner A. Synthetic transformations of abietic acid V^a: structure modification and ozonization. *Monatshefte Für. Chemie.*, **2002**, *133*, 231-239.
- Prinz S, Müllner U, Heilmann J, Winkelmann K, Sticher O, Haslinger E, Hüfner A. Oxidation products of abietic acid and its methyl ester. *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 1530-1534.
- Ralet M-C, Thibault JF, Faulds CB, Williamson G. Isolation and purification of feruloylated oligocaccharides from cell walls of sugar-beet pulp. *Carbohydr. Res.*, **1994**, *263*, 227-241.
- Rosazza JN, Huang Z, Dostal L, Volm T, Rousseau B. Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product. *J. Ind. Microbiol.*, **1995**, *15*, 457-471.
- San Feliciano A, Gordaliza M, Salñinero MA, Del Corral JM. Abietane acids: sources, biological activities, and therapeutic uses. *Planta Med.*, **1993**, *59*, 485-490.
- Schröder F, Albrecht R, Rufer C. Dihydroabietylamin-derivatives und ihre antibakteriellen figenoschagten. *Arzneim-Forsch.*, **1970**, *20*, 737-743.
- Silverman RB. The organic chemistry of enzyme-catalized reactions. Academic Press, USA San Diego, **2002**.
- Smith WB. The ¹³C NMR spectrum of abietic acid and its methyl ester. *Org. Magn. Reson.*, **1978**, *11*, 427-428.
- Tapia AA, Vallejo MD, Gouiric SC, Feresin GE, Rossomando PC, Bustos DA. Hydroxylation of dehydroabietic acid by *Fusarium* species. *Phytochemistry*, **1997**, *46*, 131-133.
- Tercero NP. Recuperación y biotransformación del ácido Ferúlico. Tesis de Licenciatura. UNAM, Facultad de Química, México, **2001**, 26, 28, 30.
- Turner JA, Rice EL. Microbial decomposition of ferulic acid in soil. *J. Chem. Ecol.*, **1995**, *1*, 41-58.
- Ulubelen A, Miski M. A new diterpene acid from *Salvia Tormentosa*. *J. Nat. Prod.*, **1981**, *44*, 119-124.



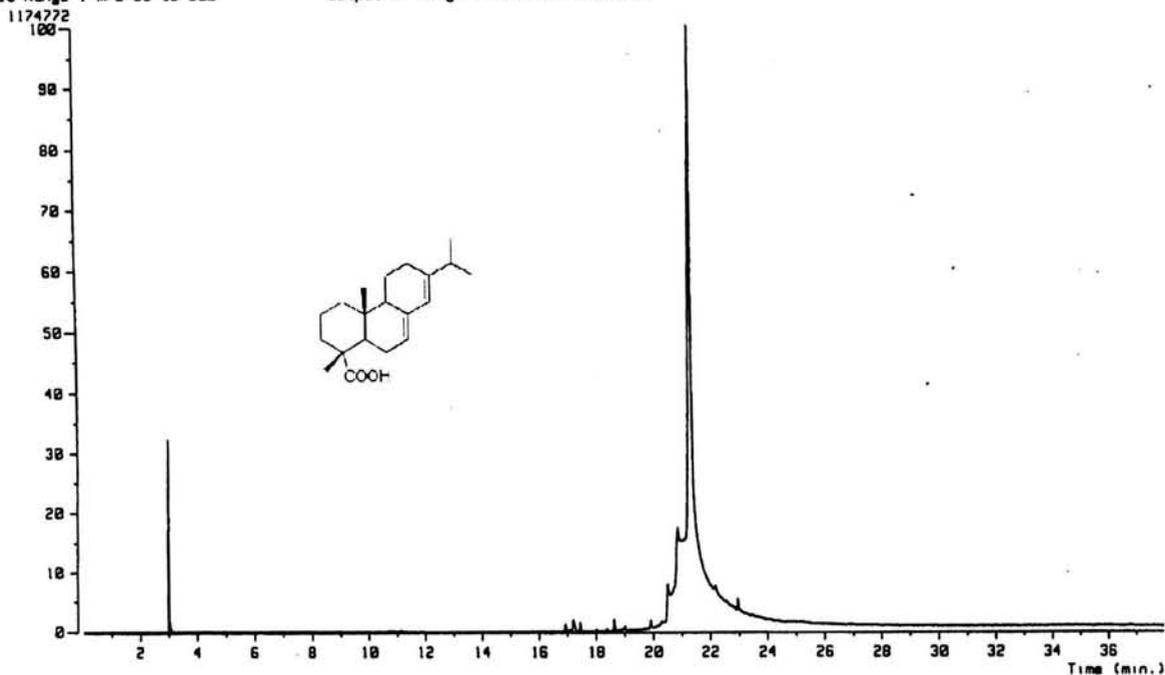
Valerio G. Estudio de las reacciones de aminolisis catalizadas por enzimas en disolventes orgánicos. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. UAM, México D.F.,2001.

Vorob'ev AV, Grishko VV, Ivshina IB, Shmidt EN, Pokrovskii LM, Kuyukina MS, Tolstikov GA. Microbial transformations of diterpene acids. *Mendeleev Communications*,2001,2,43-44.

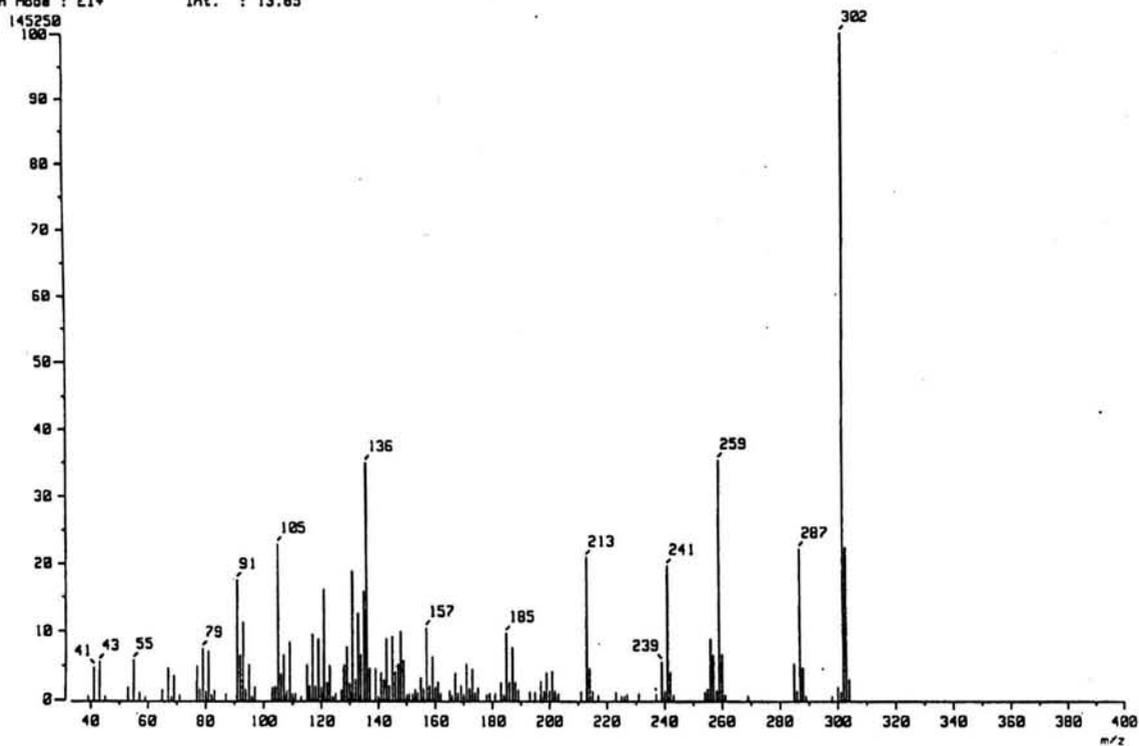
X. APENDICE



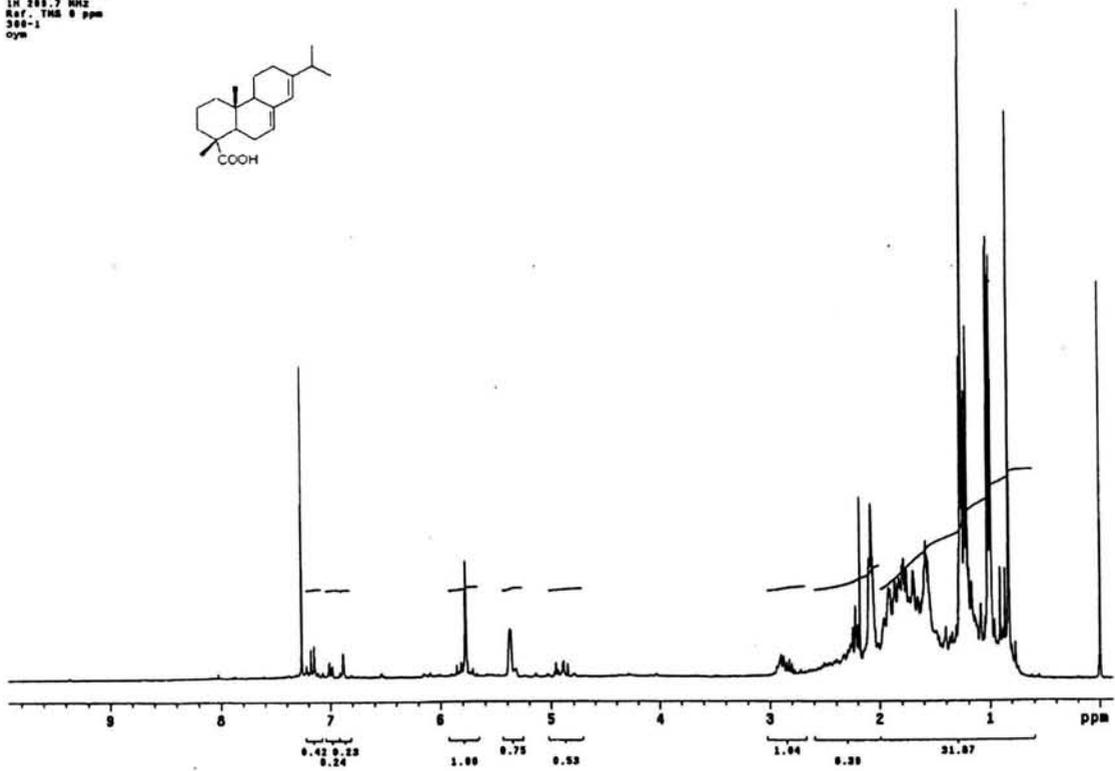
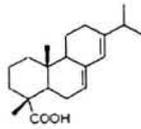
[TIC]
 Data : OTS773_RBIETICO_001 Date : 13-Jan-103 15:54
 Sample:
 Note : USRI, Fac. de Quimica, UNFM.
 Inlet : GC Ion Mode : EI+
 Ion Species : Normal Ion (MF-Linear)
 TIC Range : m/z 33 to 800 Output RT Range : 0.00 to 37.99 min



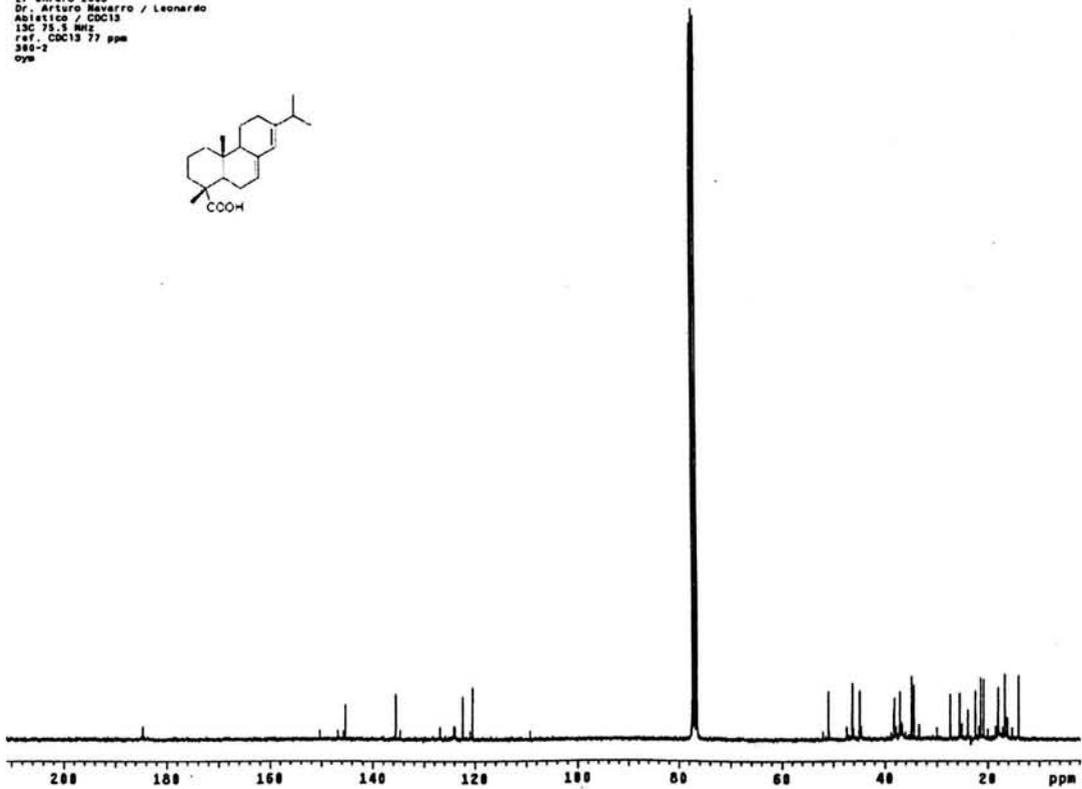
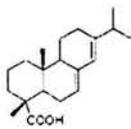
[Mass Spectrum]
 RT : 21.38 min Scan# : 777-(862,944) Temp : 29.2 deg.C
 Ion Mode : EI+ Int. : 13.85

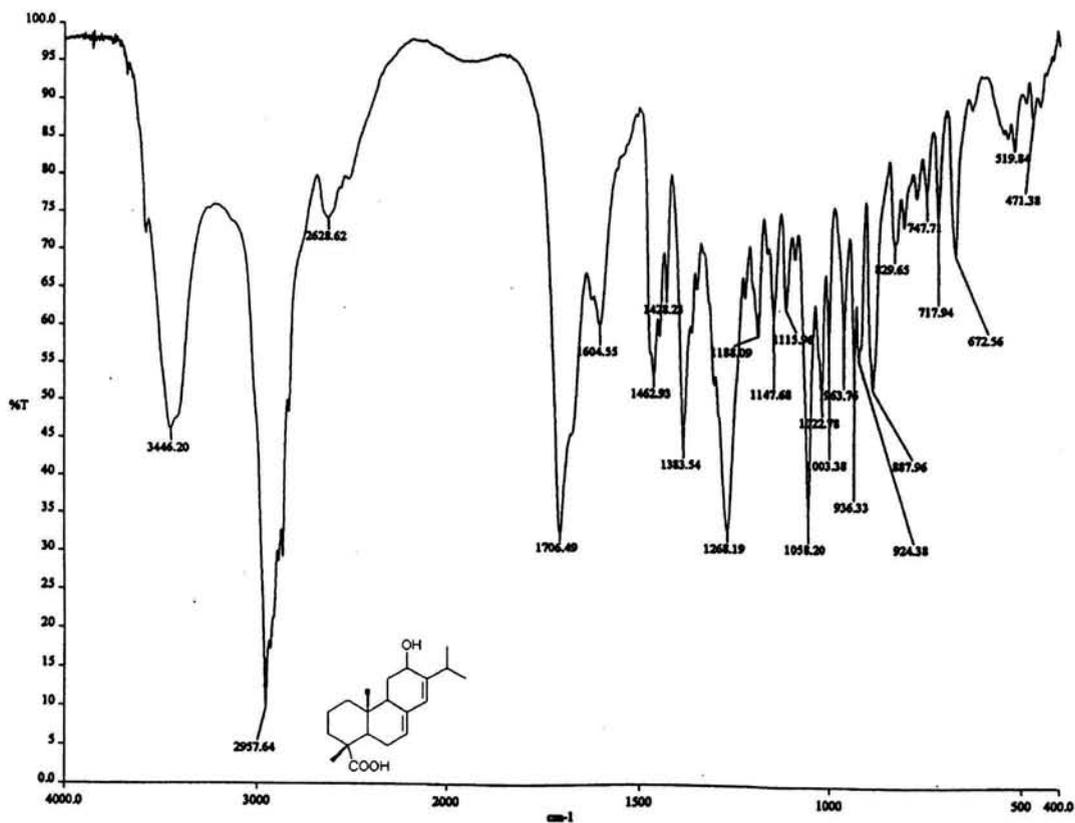
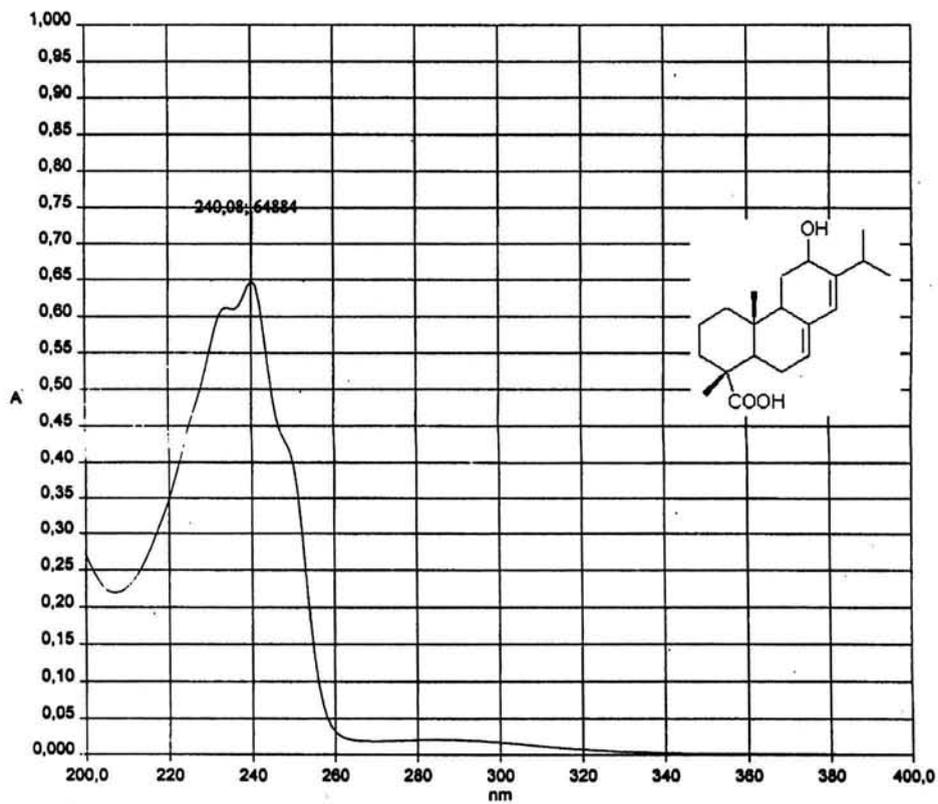


USA1
27 enero 2003
Dr. Arturo Navarro / Leonardo
Abietico / CDC13
1H 280.7 MHz
Ref. TMS 0 ppm
300-1
oyw



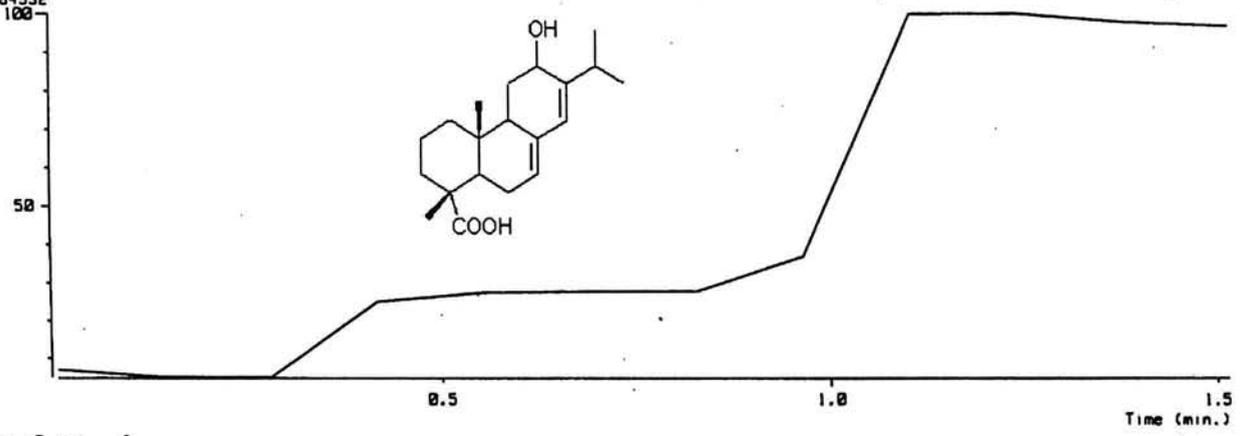
USA1
27 enero 2003
Dr. Arturo Navarro / Leonardo
Abietico / CDC13
13C 75.5 MHz
ref. CDCl3 77 ppm
300-2
oyw





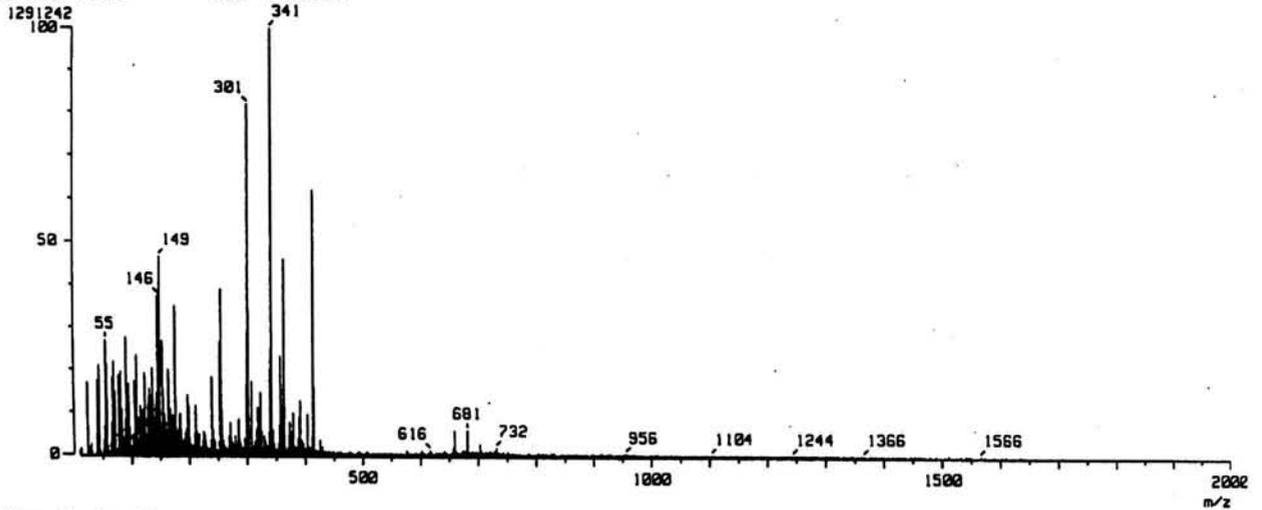
[TIC]

Date : 14-Mar-83 18:35
Sample: MATRIZ ALCOHOL NITROBENCILICO
Note : Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigacion (USAI), F.O. UNFM
Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
Ion Species : Normal Ion [MF-Linear]
TIC Range : m/z 10 to 2000 Output RT Range : 0.00 to 1.51 min
36084932

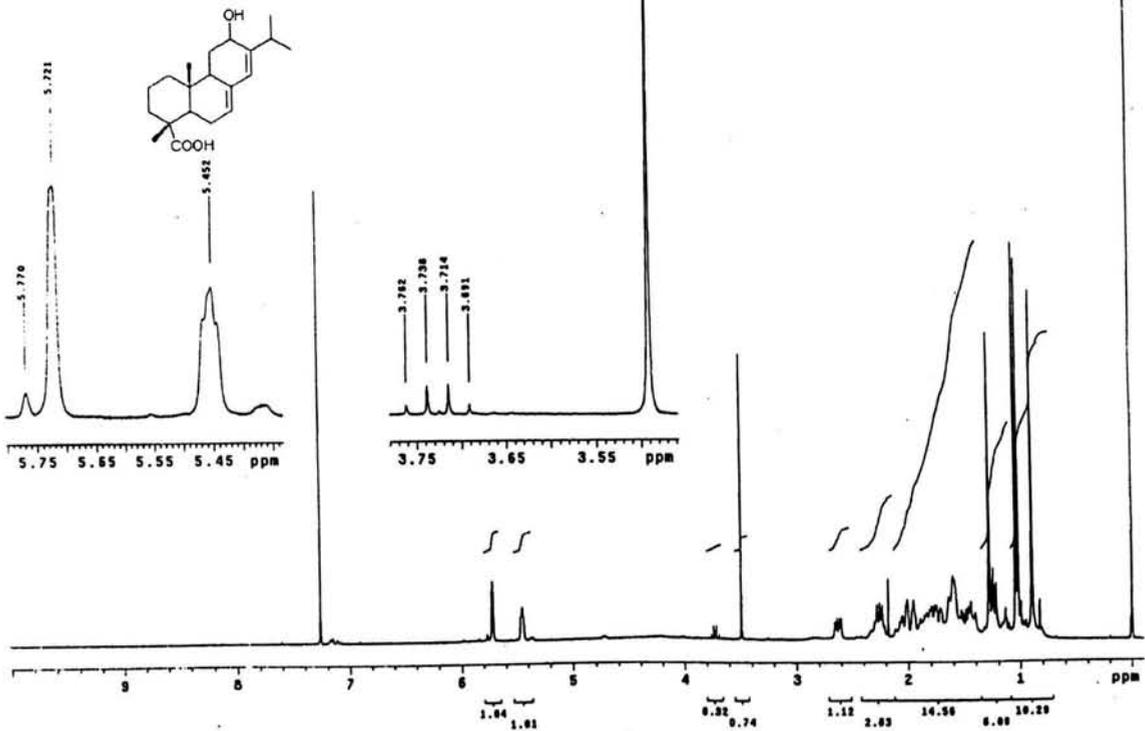


[Mass Spectrum]

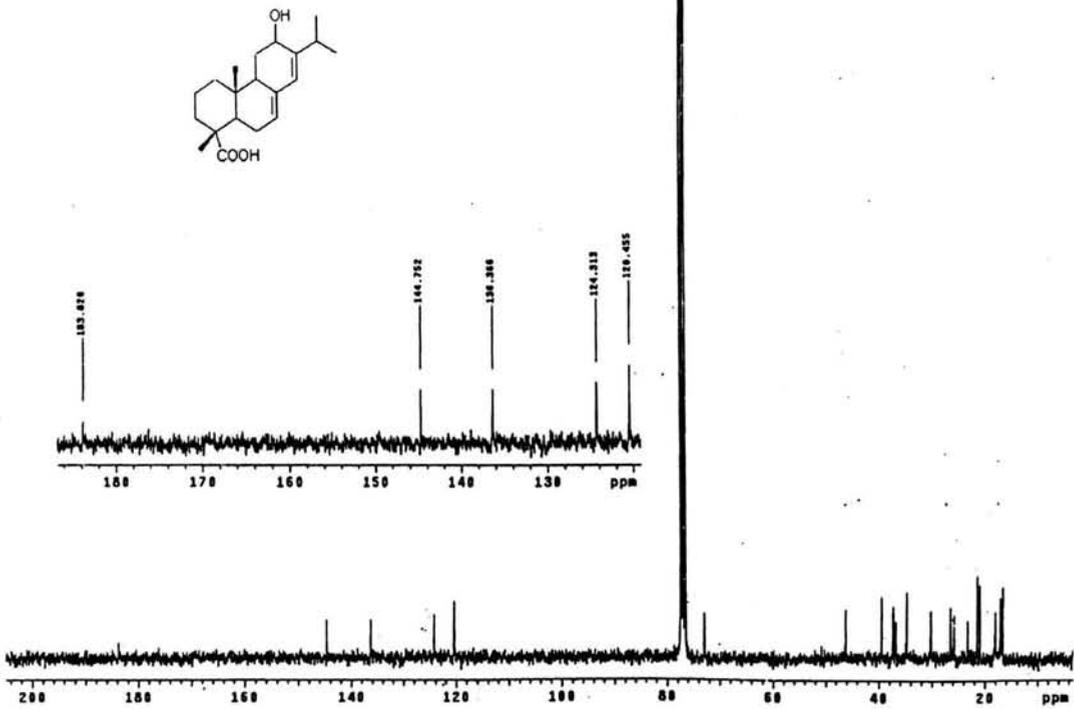
RT : 1.24 min Scan# : (9,11)
Ion Mode : FAB+ Int. : 123.14 Temp : 6.4 deg.C

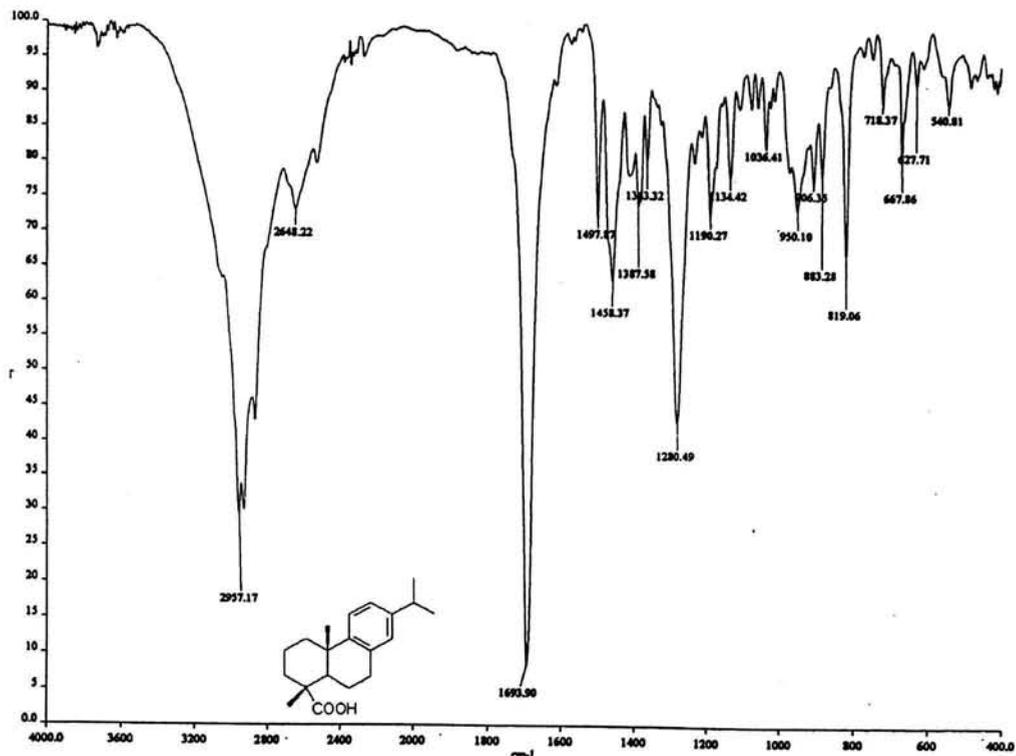
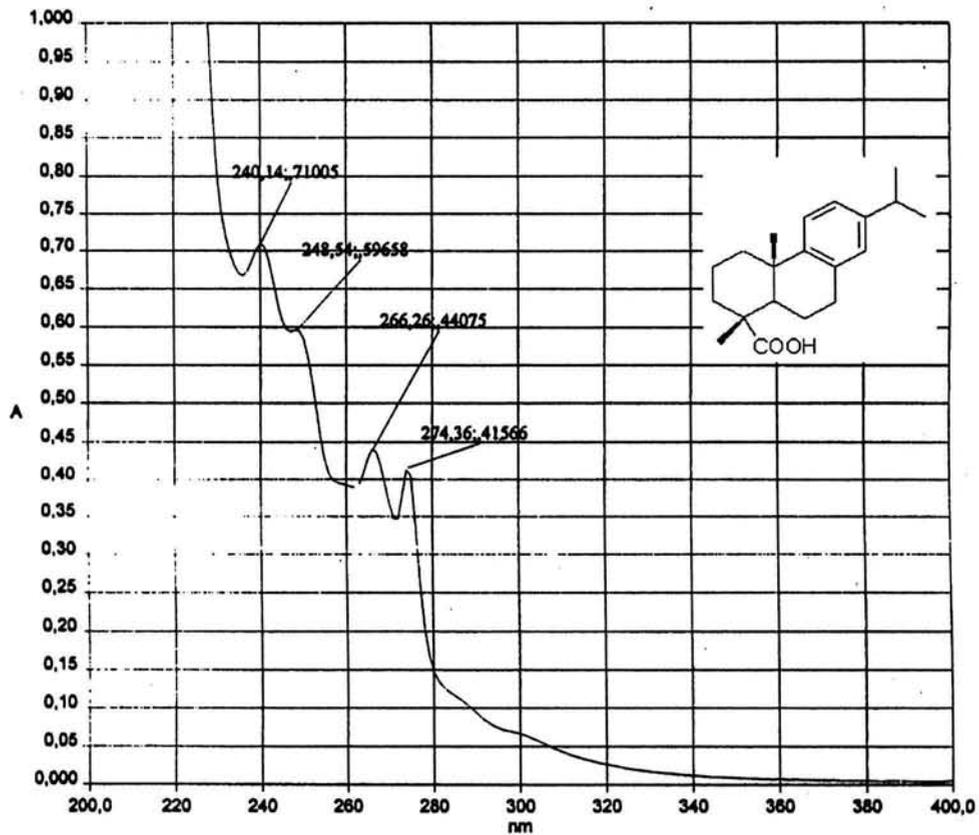


USA1
 16 enero 2003
 Dr. Arturo Navarro / Leonardo
 Hidroxil / CDCl3
 IN 282.7 MHz
 ref. TMS 0 ppm
 300-1
 oym

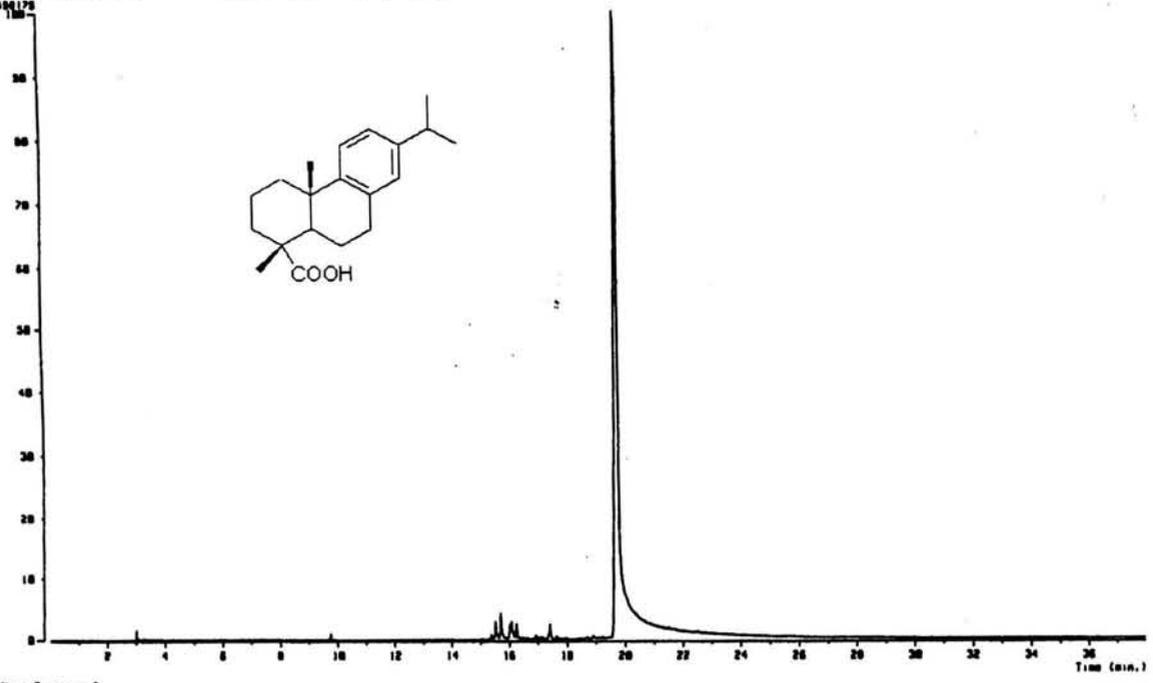


USA1
 16 enero 2003
 Dr. Arturo Navarro / Leonardo
 Hidroxil / CDCl3
 IN 75.5 MHz
 ref. CDCl3 77 ppm
 300-1
 oym

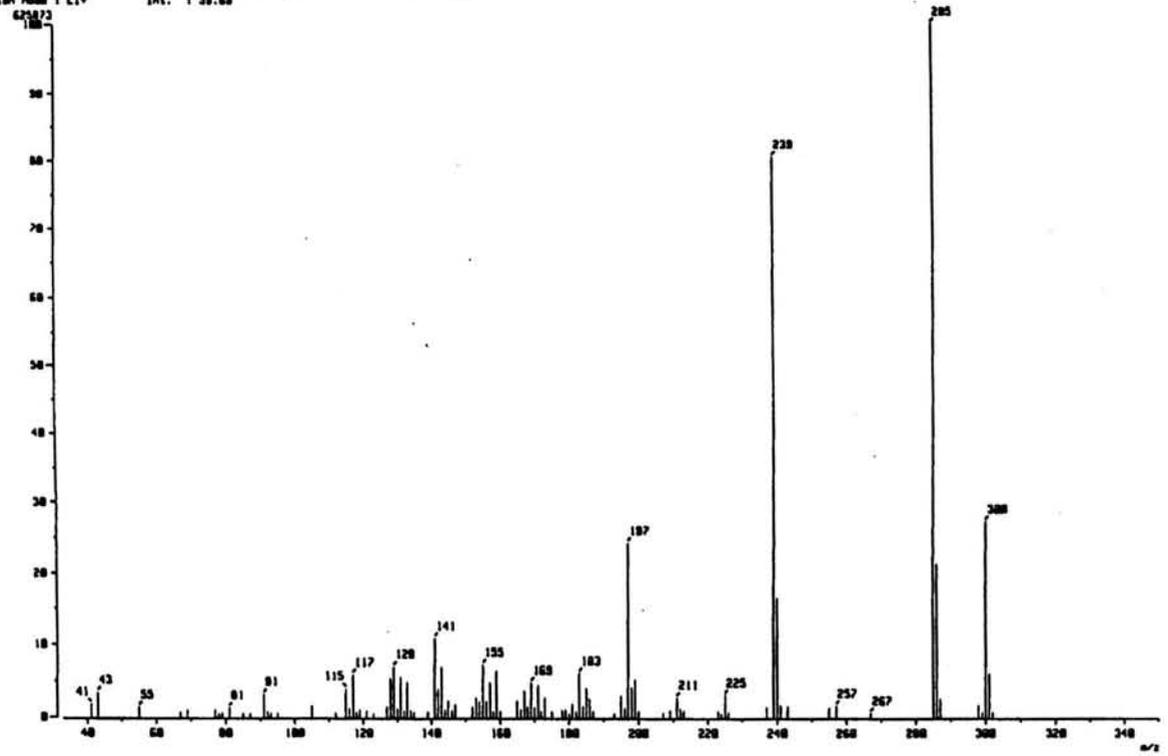




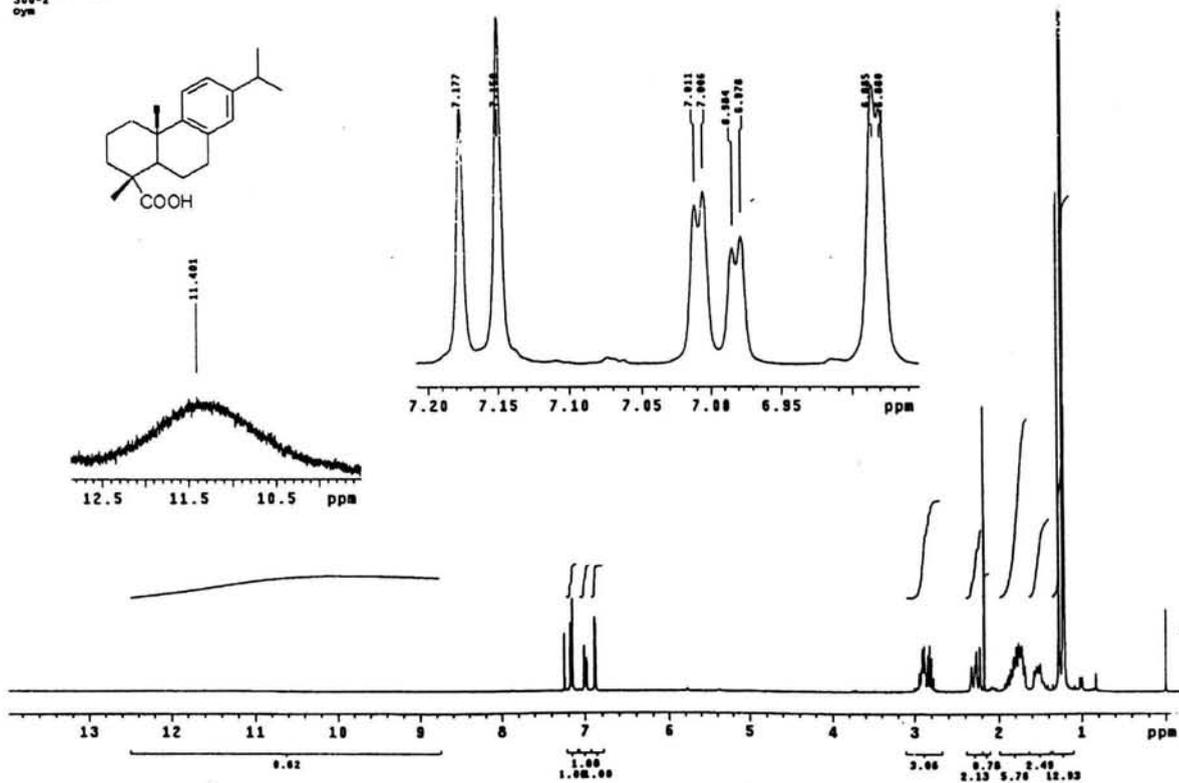
[TIC]
 Date : 24-Apr-1992 20:43
 Sample :
 Note : LBR1, Fm. de Guineas, LAPP.
 Inlet : GC Ion Mode : EI+
 Ion Species : Normal Ion [V⁺-Linear]
 TIC Range : m/z 33 to 300 Output RT Range : 0.00 to 37.00 min
 2450178



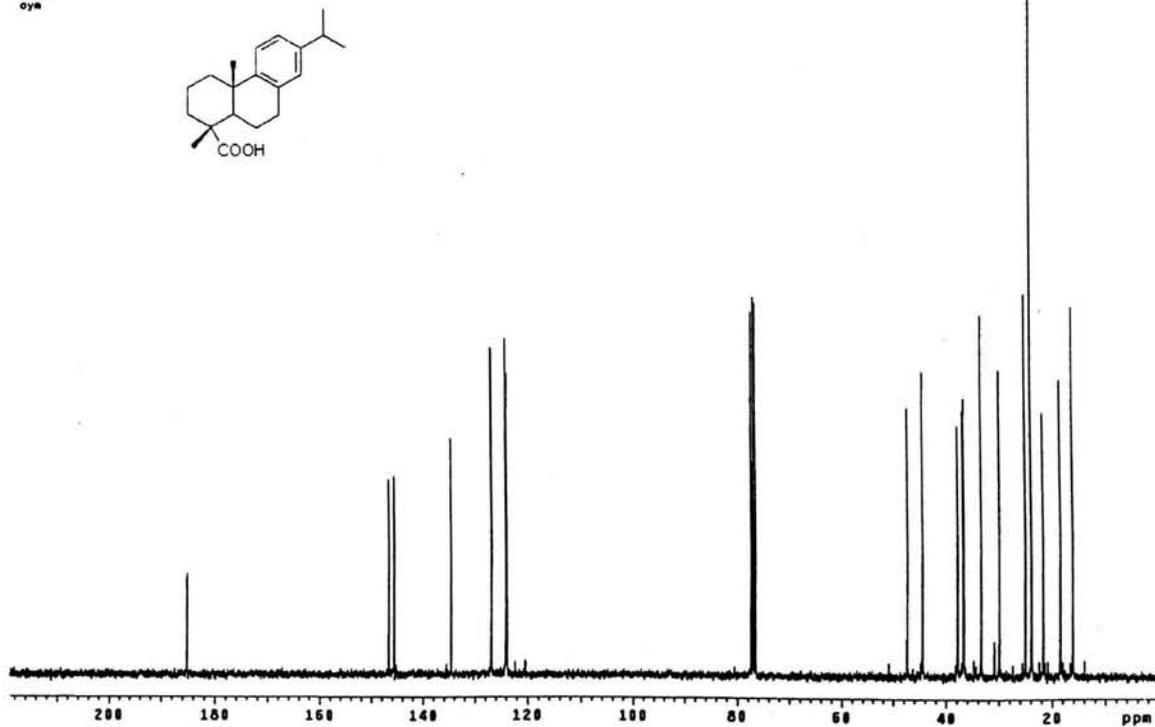
[Mass Spectrum]
 Scan# : (710,720)-(770,833) Temp : 20.3 deg.C
 RT : 19.78 min Int. : 50.60
 Ion Mode : EI+

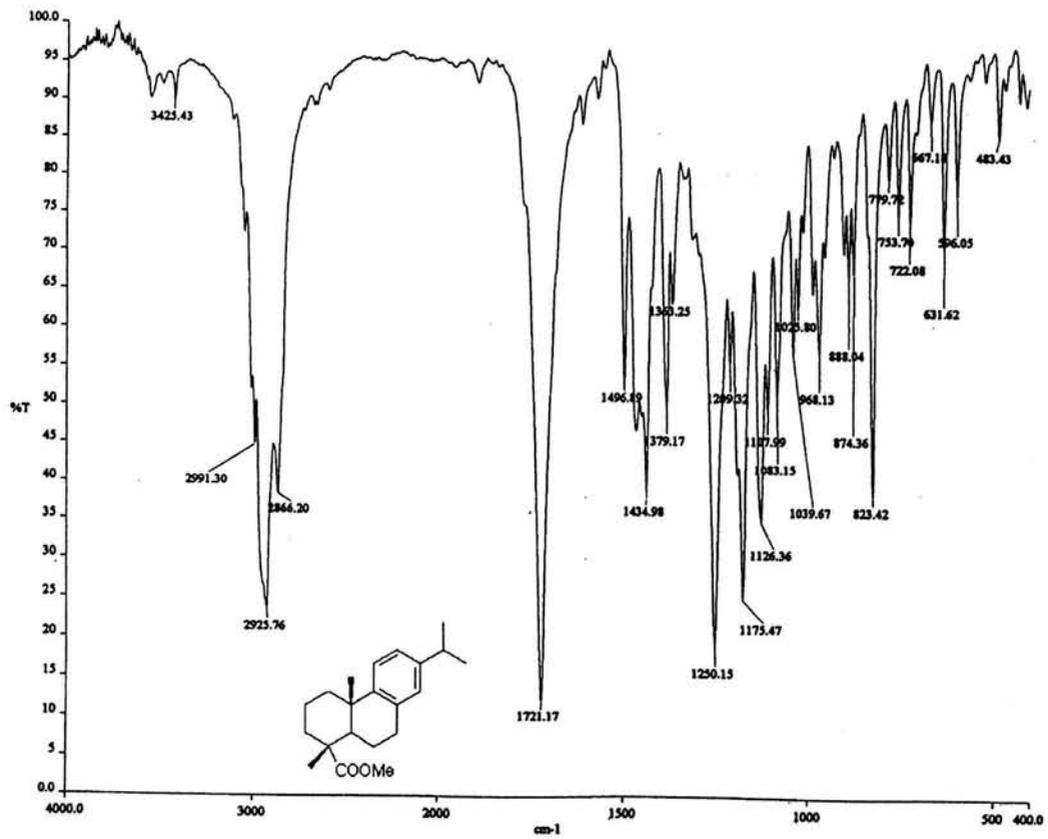
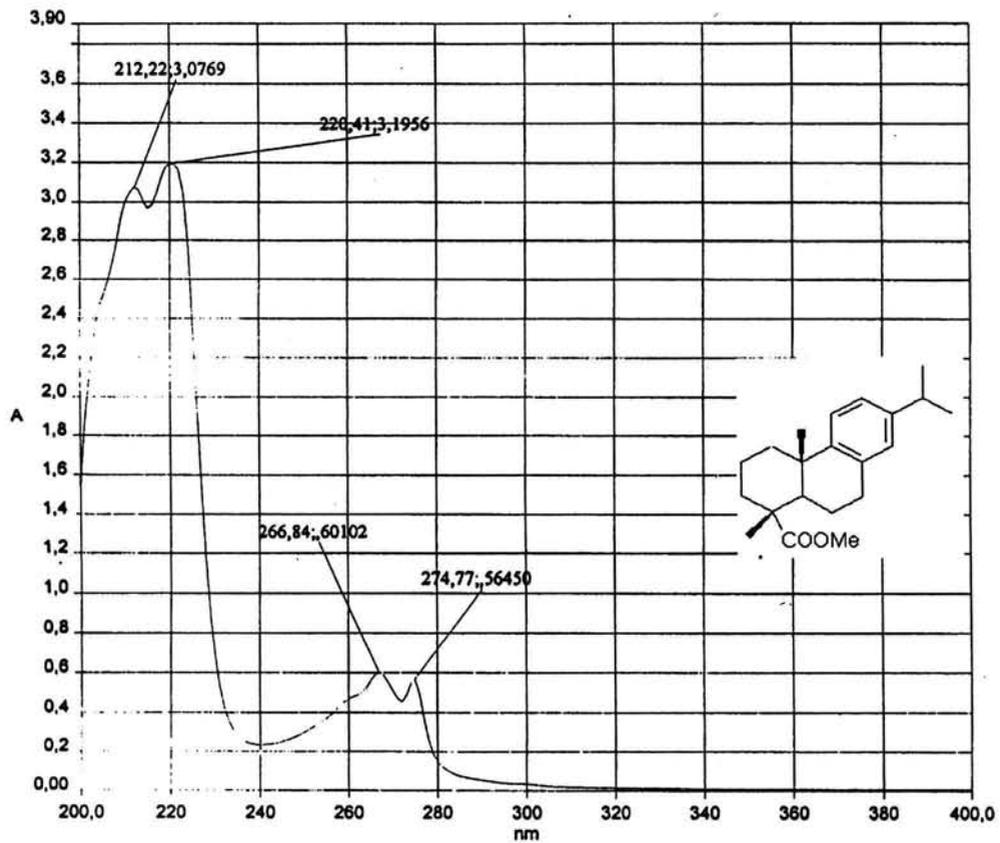


USA1
 24 mayo 2002
 Dr. Arturo Navarro / Leonardo Rivera
 Dohid / CDC13
 1H 289.7 MHz
 Ref. TMS 0 ppm
 300-2
 oym

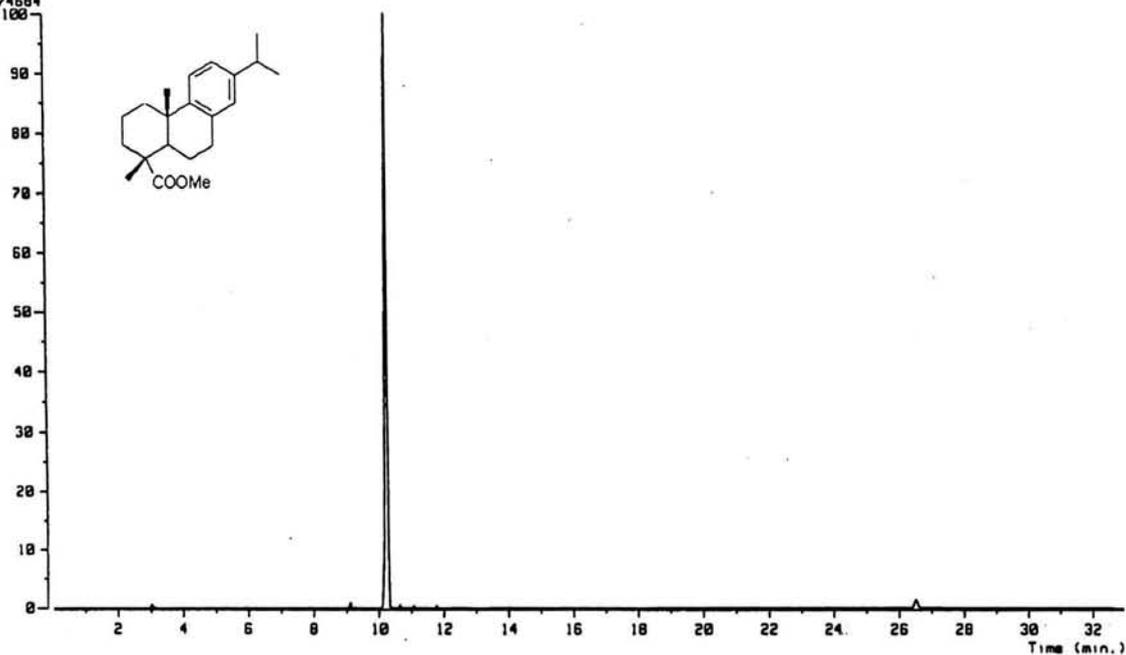


USA1
 24 mayo 2002
 Dr. Arturo Navarro / Leonardo Rivera
 Dohid / CDC13
 13C 75.3 MHz
 Ref. CDC13 77 ppm
 300-2
 oym

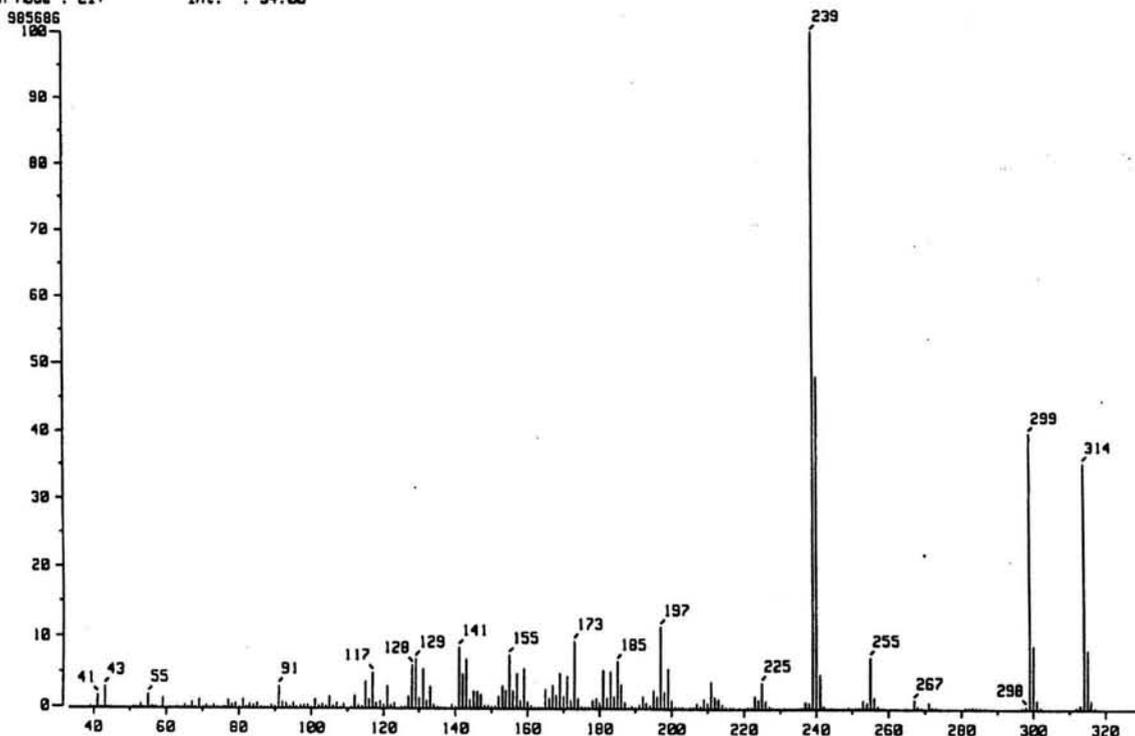




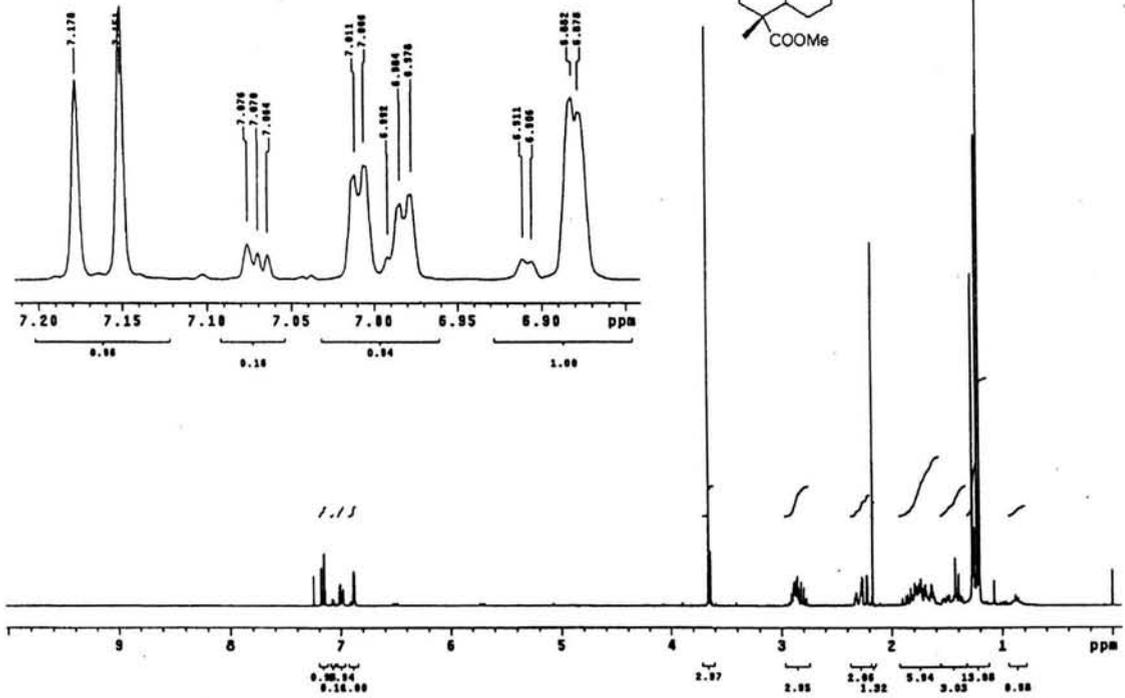
[TIC]
 Data : OTS140_DEHID-ME2_004 Date : 16-Jul-182 04:05
 Sample:
 Note : USRI, Fac. de Quimica, UNAM.
 Inlet : GC Ion Mode : EI+
 Ion Species : Normal Ion (MF-Linear)
 TIC Range : m/z 33 to 800 Output RT Range : 0.00 to 32.98 min
 5774584



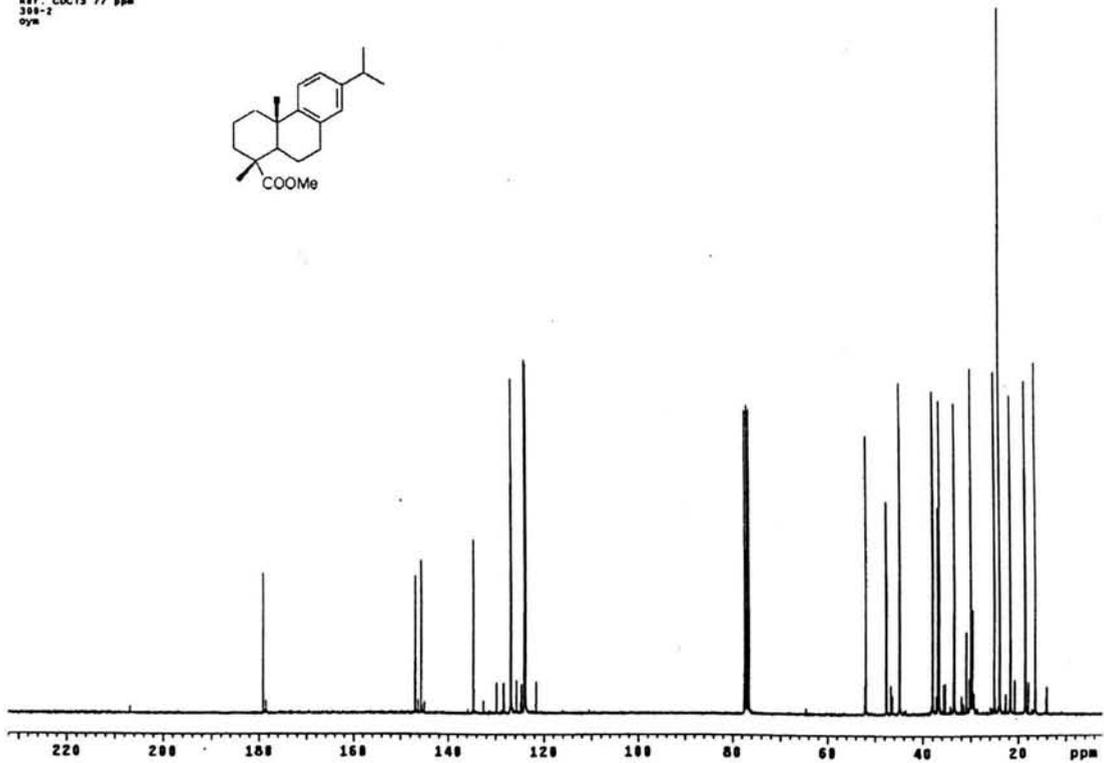
[Mass Spectrum]
 RT : 10.25 min Scan# : (373,374) Temp : 6.4 deg.C
 Ion Mode : EI+ Int. : 94.00

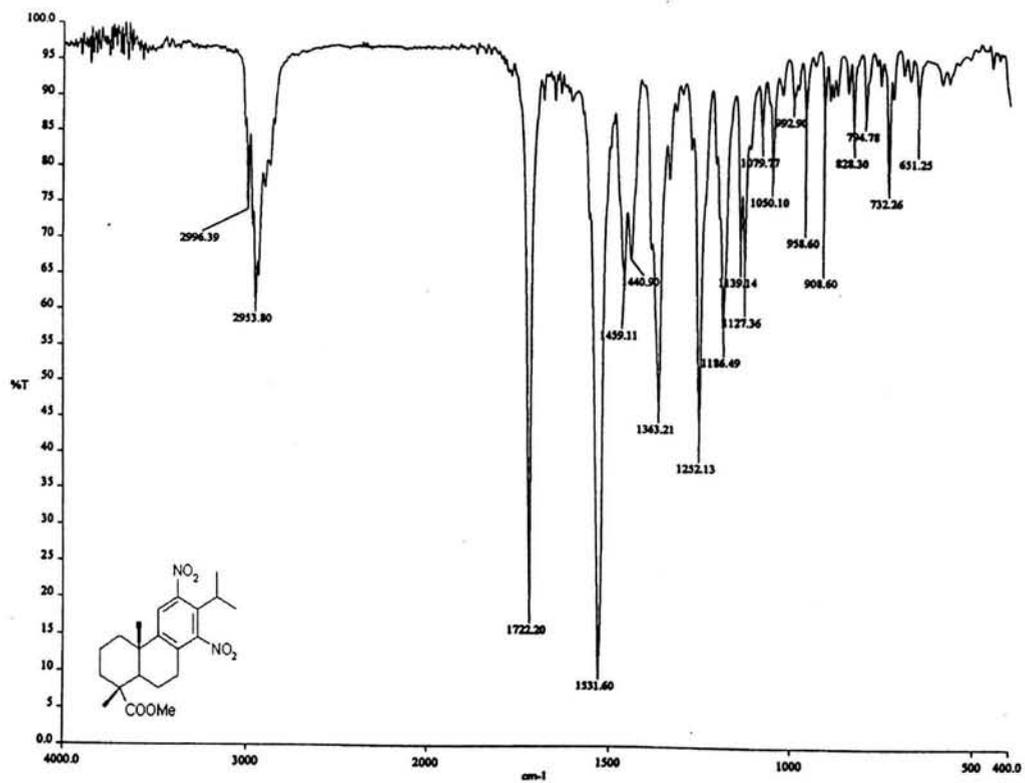
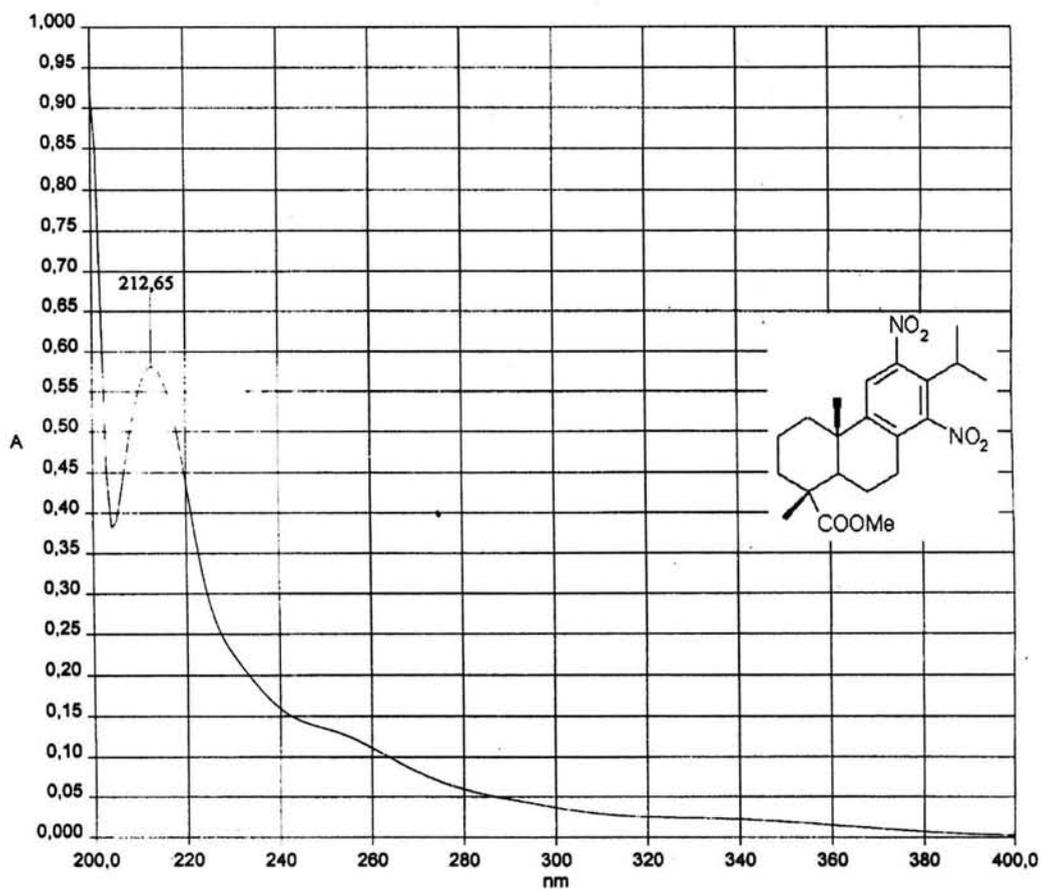


USA1
 26 Julio 2002
 Dr. Arturo Navarro / Leonardo Rivera
 Denis-Rez / CDC13
 1H 299.7 MHz
 ref. TMS 0 ppm
 300-2
 oym

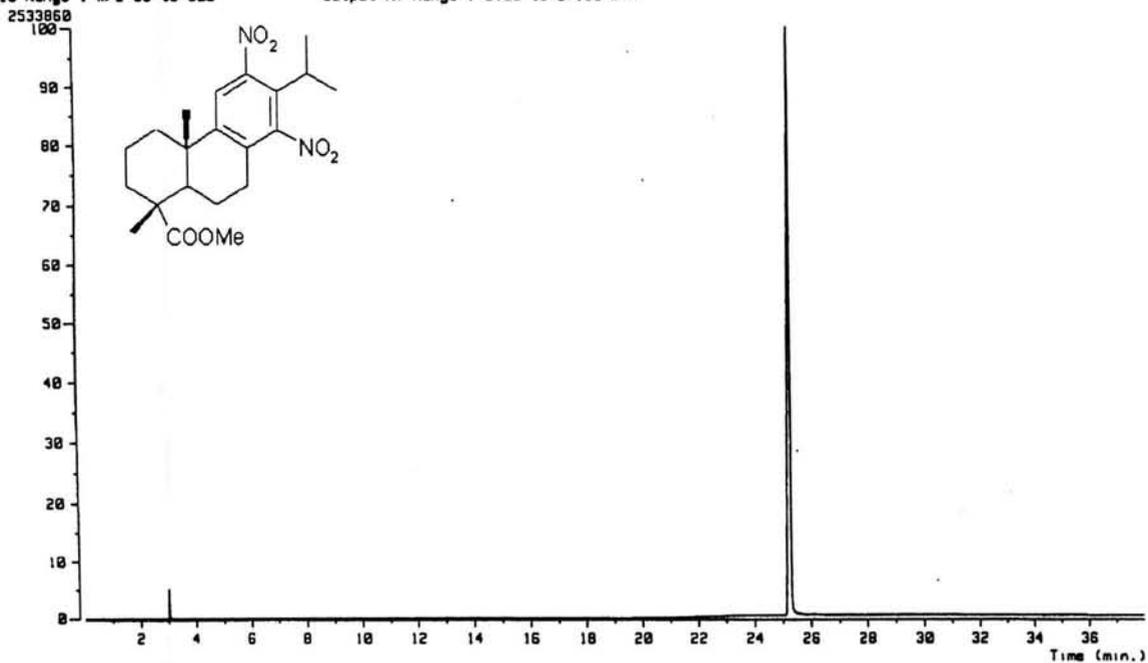


USA1
 26 Julio 2002
 Dr. Arturo Navarro / Leonardo Rivera
 Denis-Rez / CDC13
 13C 75.5 MHz
 Ref. CDCl3 77 ppm
 300-2
 oym

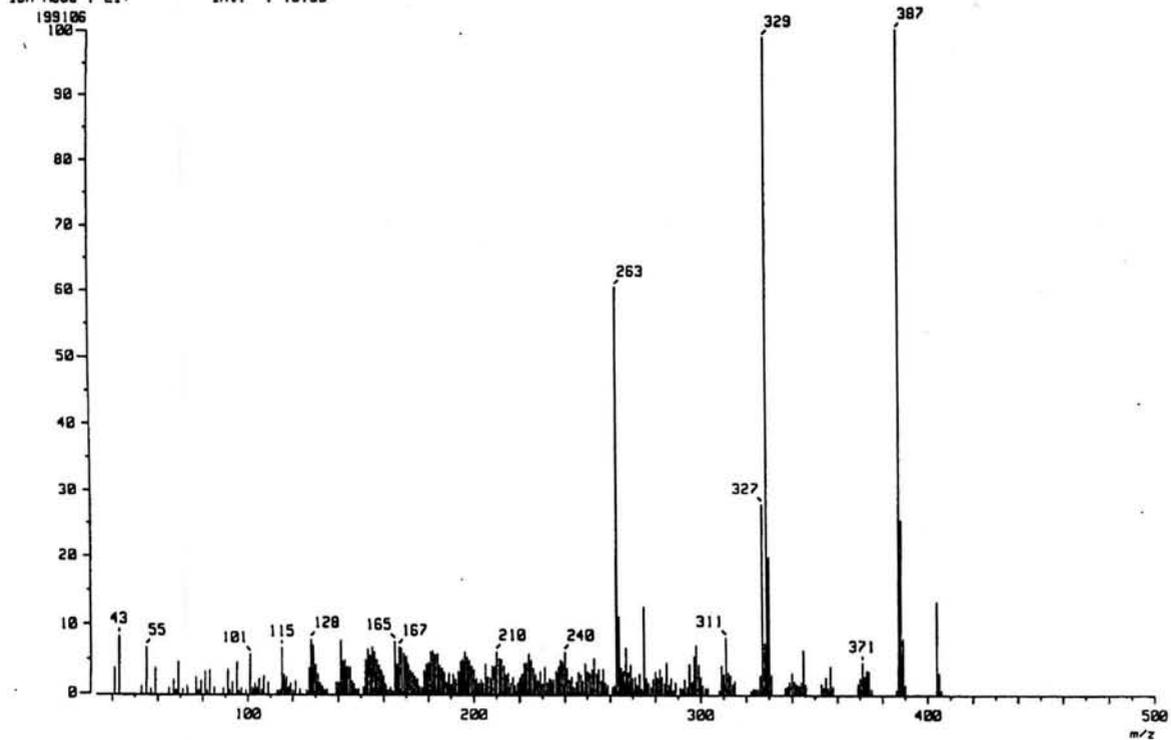




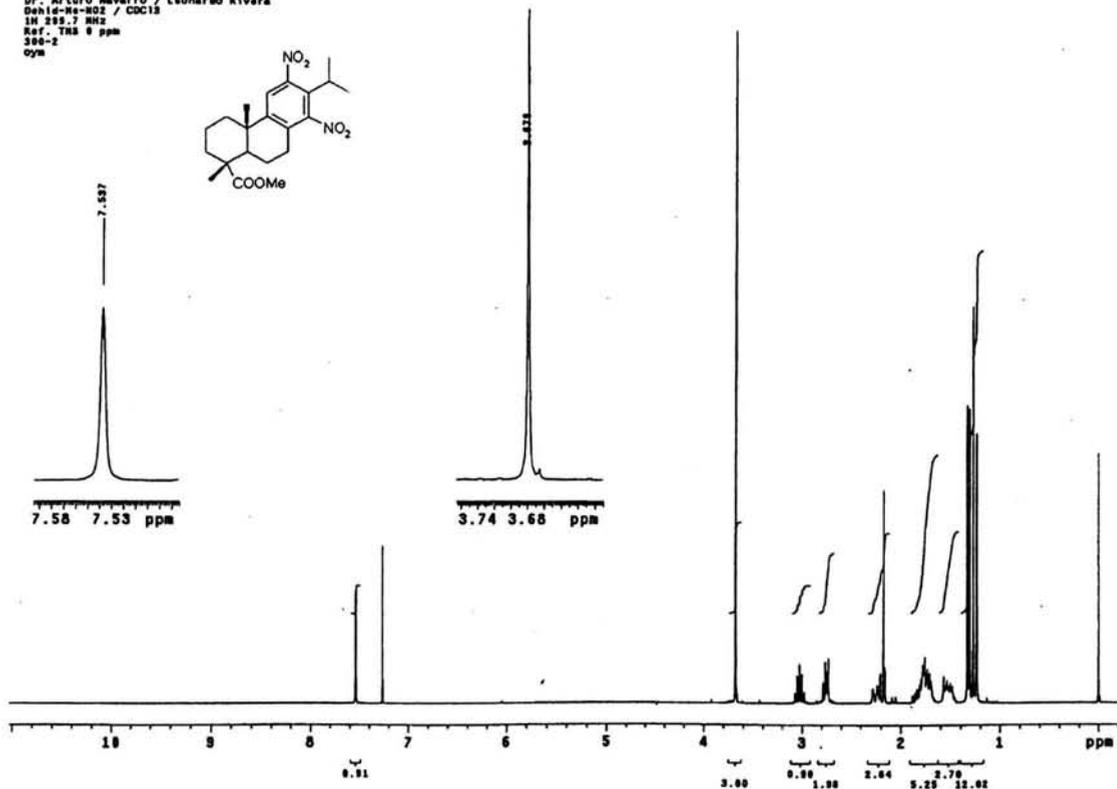
[TIC]
Data : OT5363_DEHID-ME-NO2_001 Date : 01-Nov-102 15:22
Sample:
Note : USRI, Fac. de Quimica, UNFM. Ion Mode : EI+
Inlet : GC
Ion Species : Normal Ion [MF-Linear]
TIC Range : m/z 33 to 800 Output RT Range : 0.00 to 37.99 min



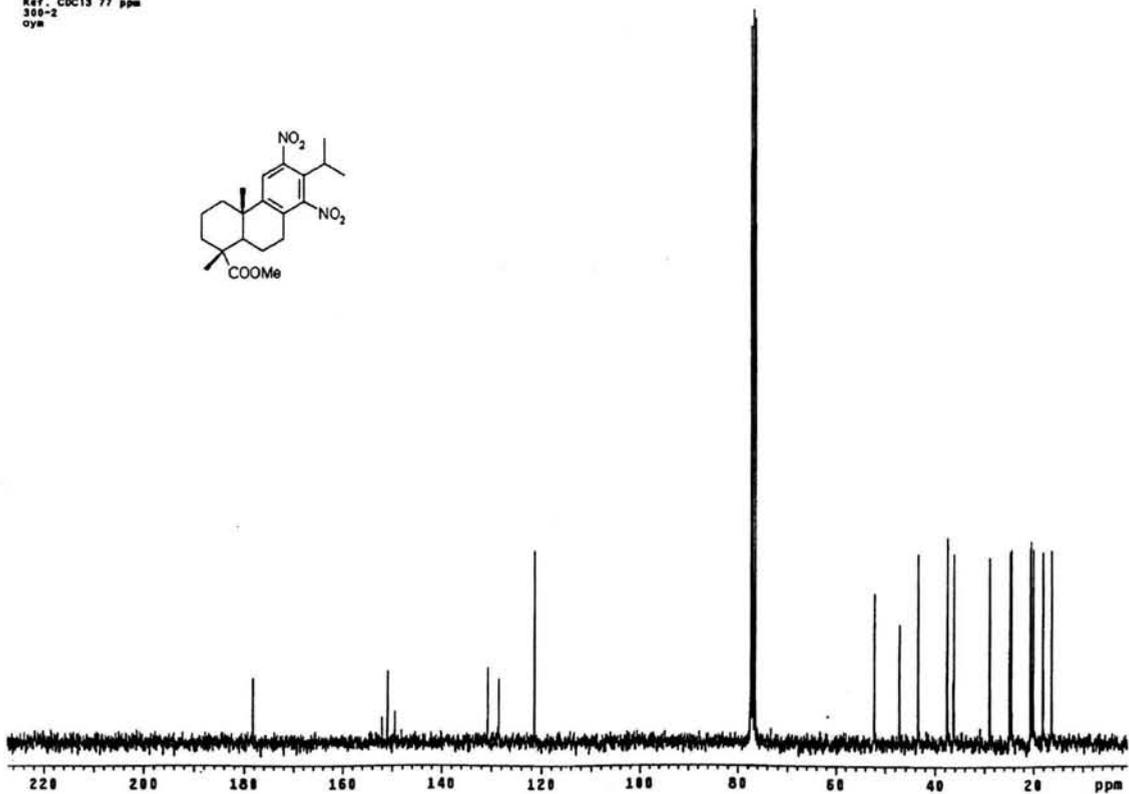
[Mass Spectrum]
RT : 25.27 min Scan# : (918,919)-(939,971) Temp : 29.3 deg.C
Ion Mode : EI+ Int. : 18.99

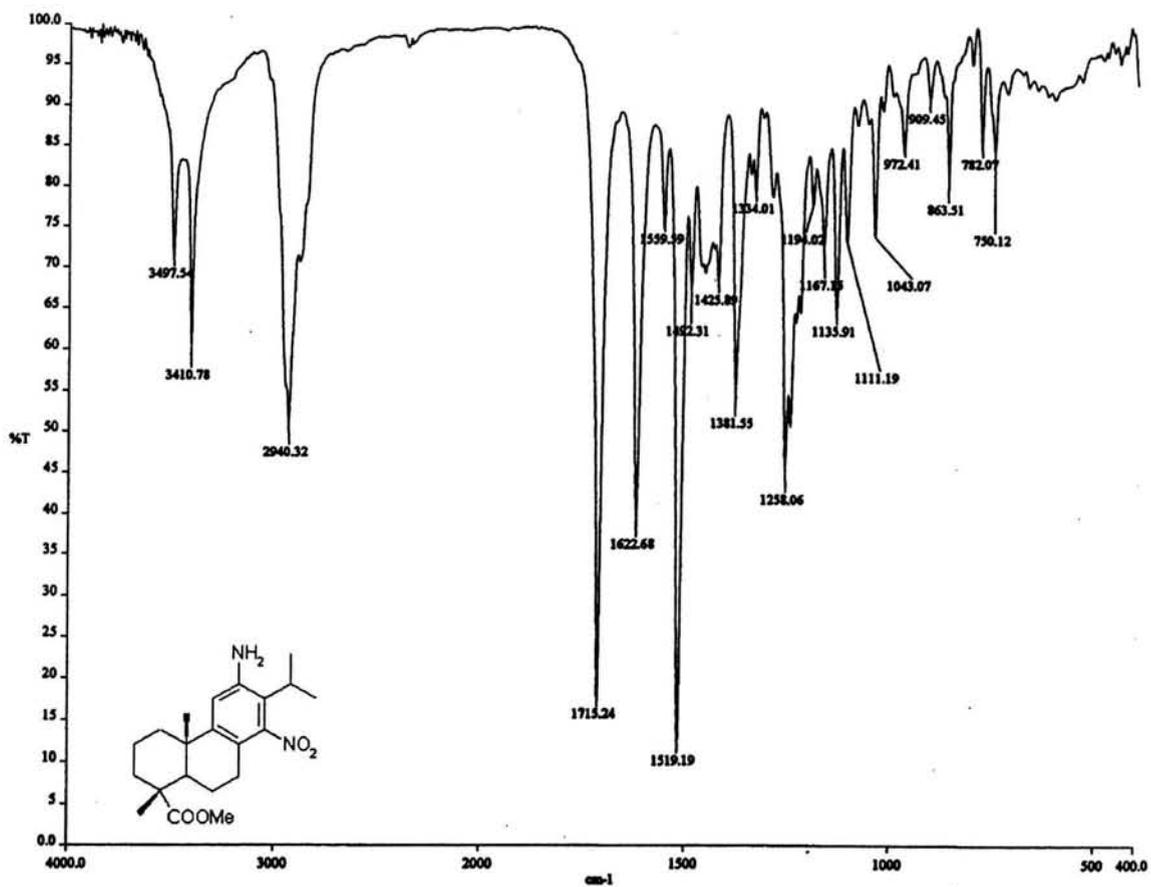
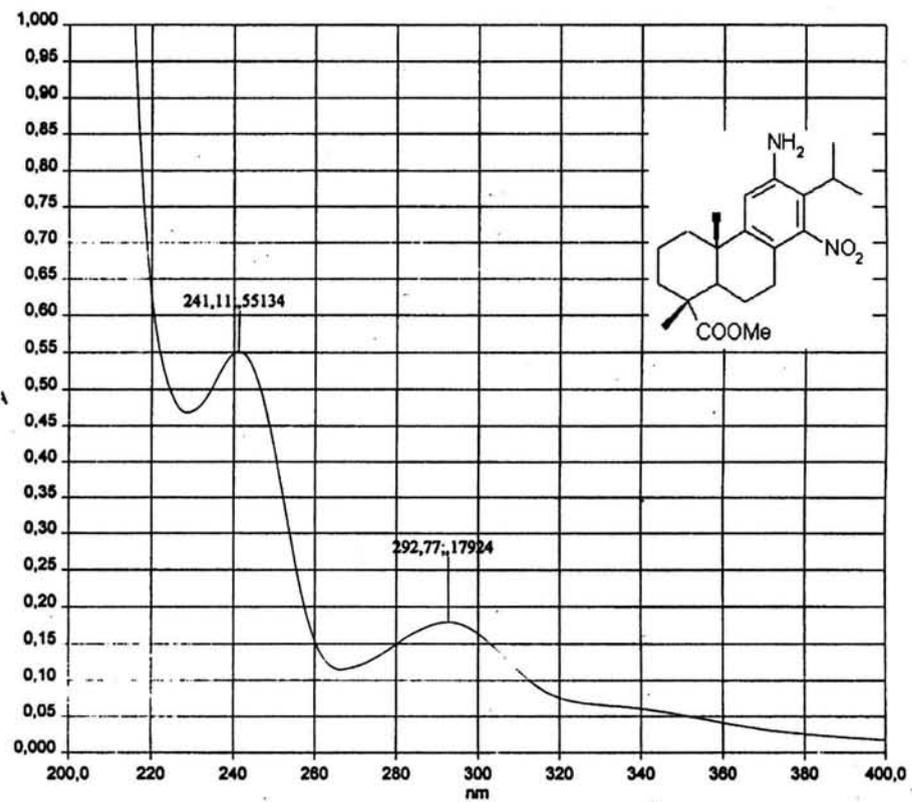


USAI
4 octubre 2002
Dr. Arturo Navarro / Leonardo Rivera
Dehid-Me-NO2 / CDC13
1H 295.7 MHz
Ref. TMS 0 ppm
300-2
oym

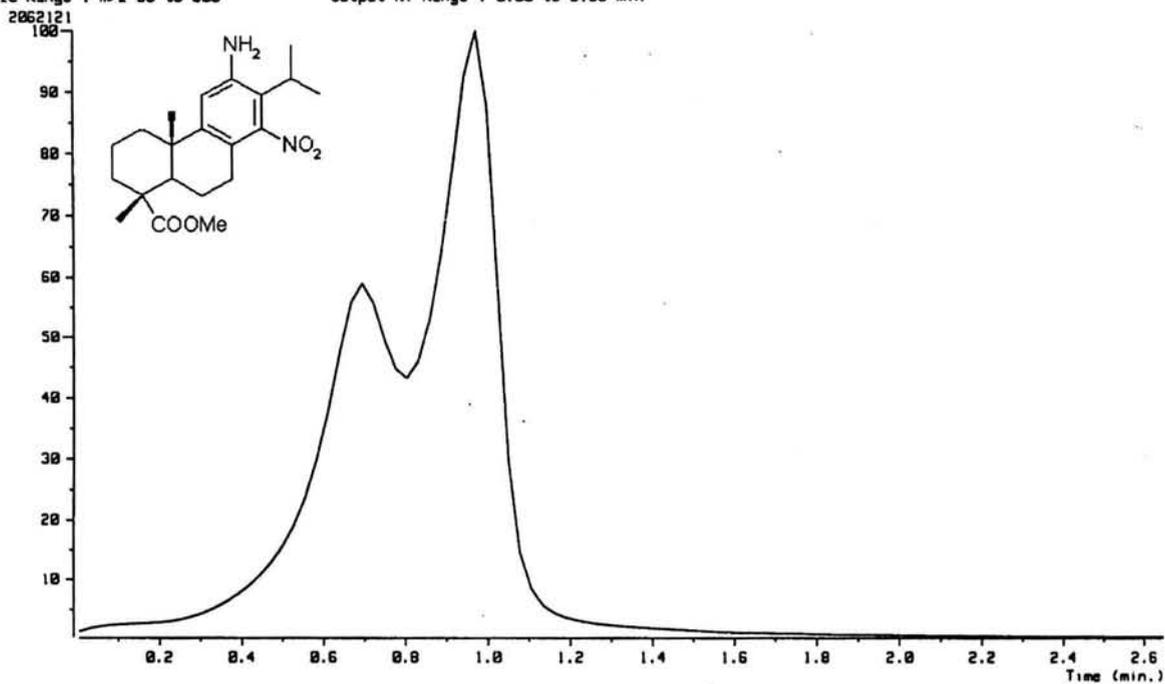


USAI
4 octubre 2002
Dr. Arturo Navarro / Leonardo Rivera
Dehid-Me-NO2 / CDC13
13C 75.5 MHz
Ref. CDCl3 77 ppm
300-2
oym

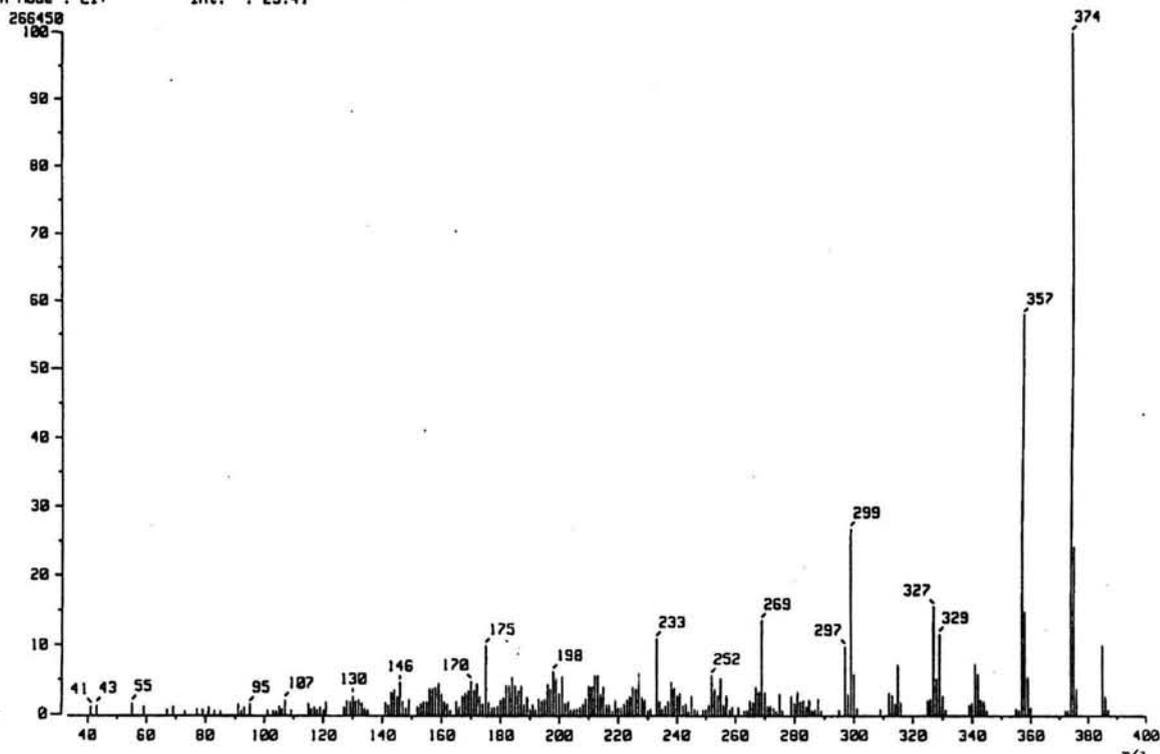




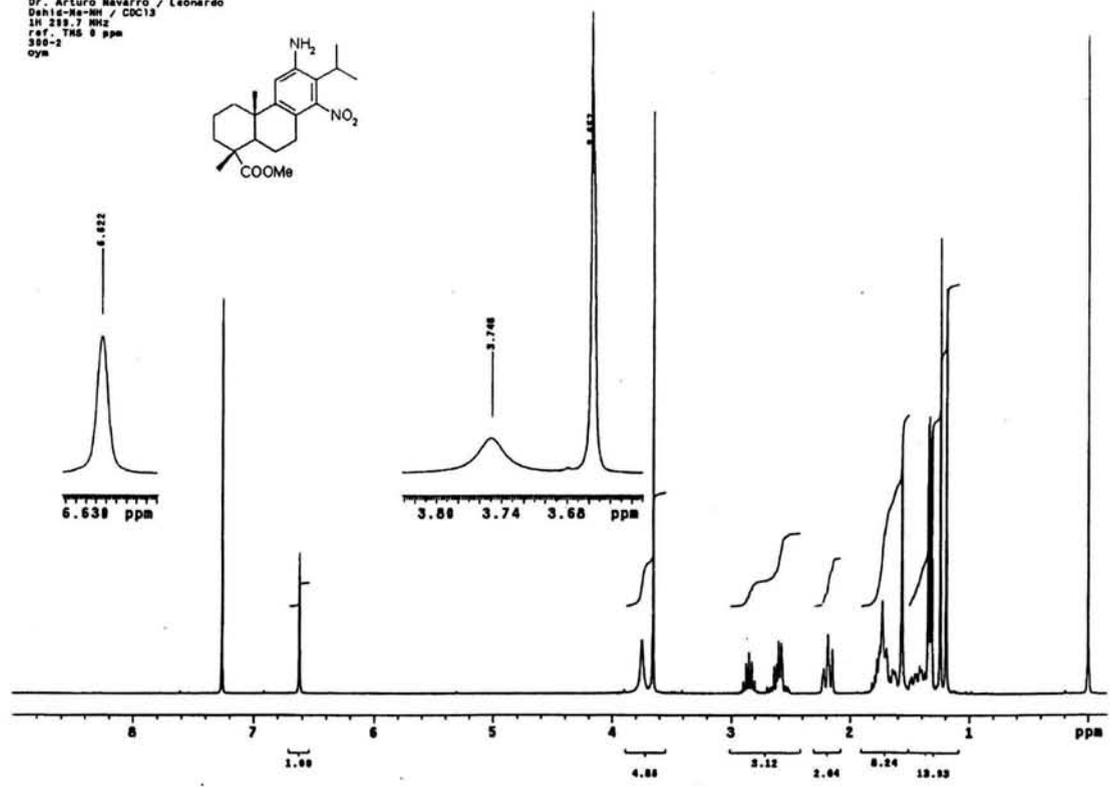
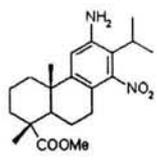
[TIC]
 Data : OTS649_DEHID-ME-NH2_003 Date : 08-Nov-102 15:53
 Sample:
 Note : USRI, Fac. de Quimica, UNFM.
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Ion Species : Normal Ion [MF-Linear]
 TIC Range : m/z 33 to 800 Output RT Range : 0.00 to 2.65 min



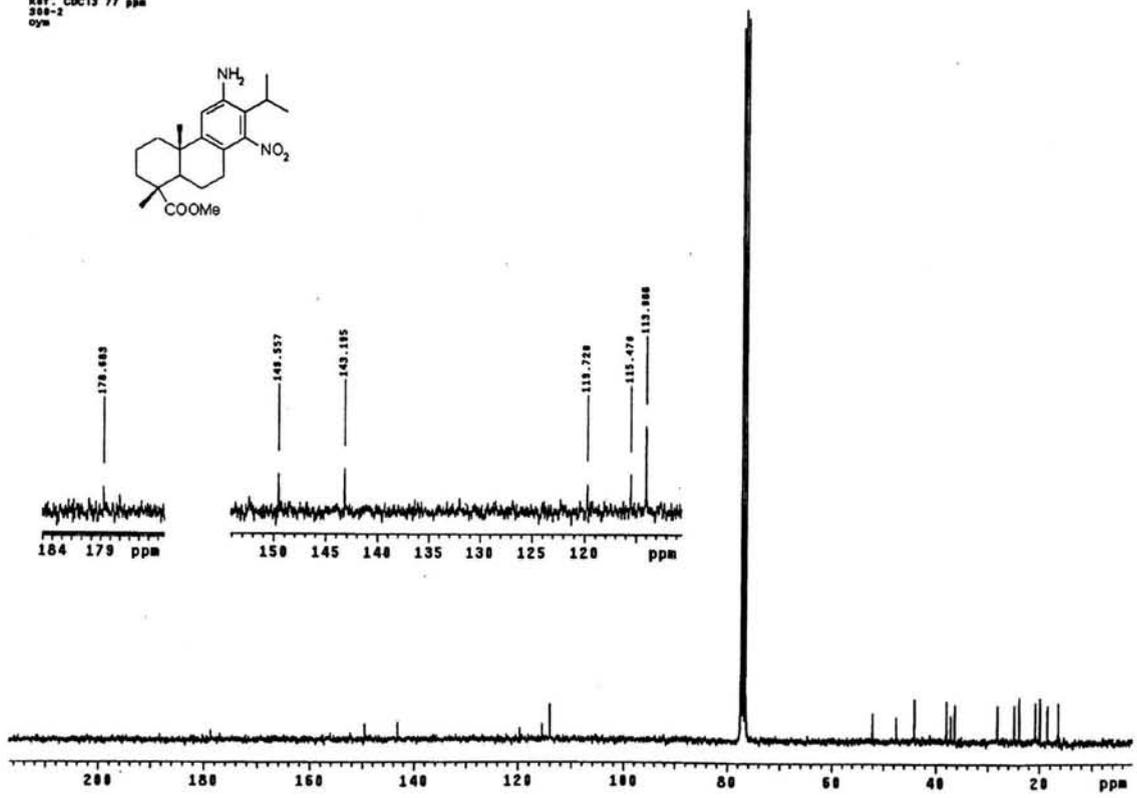
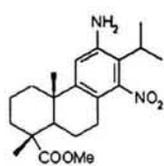
[Mass Spectrum]
 RT : 0.94 min Scan# : (35,36)
 Ion Mode : EI+ Int. : 25.41 Temp : 6.4 deg.C



USA1
 28 enero 2003
 Dr. Arturo Navarro / Leonardo
 Dehid-Me-MH / CDC13
 1H 250.7 MHz
 ref. TMS 0 ppm
 300-2
 oym



USA1
 28 enero 2003
 Dr. Arturo Navarro / Leonardo
 Dehid-Me-MH / Leonardo
 13C 75.5 MHz
 Ref. CDC13 77 ppm
 300-2
 oym



[TIC]

Data : OT6771 AMIDA-ACO 001

Date : 15-Aug-03 11:19

Sample: MATRIZ-ALCOHOL NITROBENCILICO

Note : Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigacion (USAI), F.O. UNAM

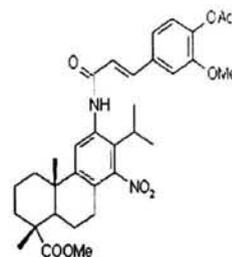
Inlet : Direct

Ion Mode : FAB+

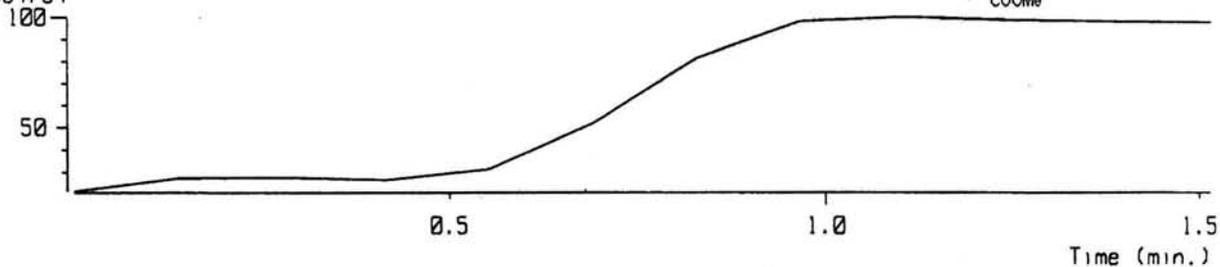
Ion Species : Normal Ion [MF-Linear]

TIC Range : m/z 10 to 2000

Output RT Range : 0.00 to 1.51 min



23364784



[Mass Spectrum]

RT : 1.10 min

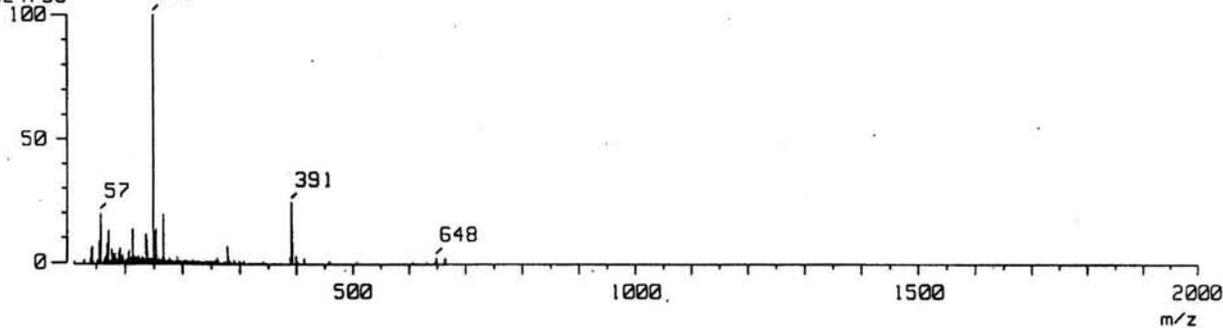
Scan# : (8,11)

Temp : 6.4 deg.C

Ion Mode : FAB+

Int. : 431.51

4524736



[TIC]

Data : OT6772_AMIDA_001

Date : 15-Aug-103 11:23

Sample: MATRIZ:ALCOHOL NITROBENCILICO

Note : Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigacion (USAI), F.O. UNAM

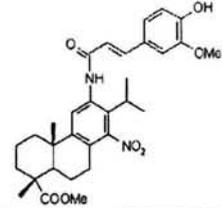
Inlet : Direct

Ion Mode : FAB+

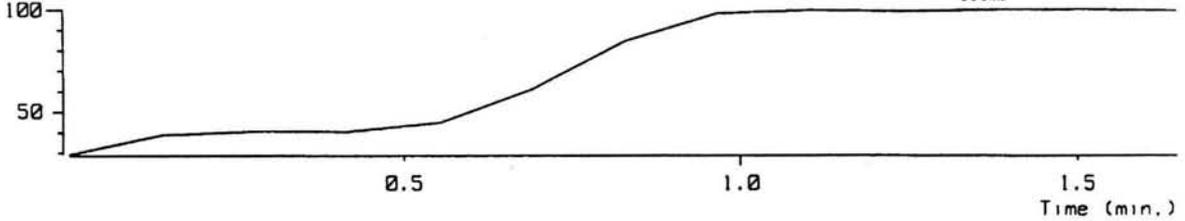
Ion Species : Normal Ion [MF-Linear]

TIC Range : m/z 10 to 2000

Output RT Range : 0.00 to 1.65 min



26346684



[Mass Spectrum]

RT : 1.24 min

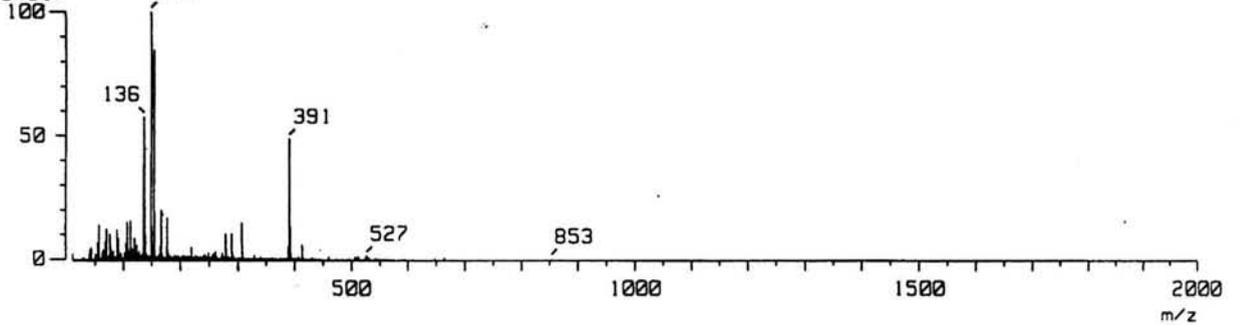
Scan# : (8,12)

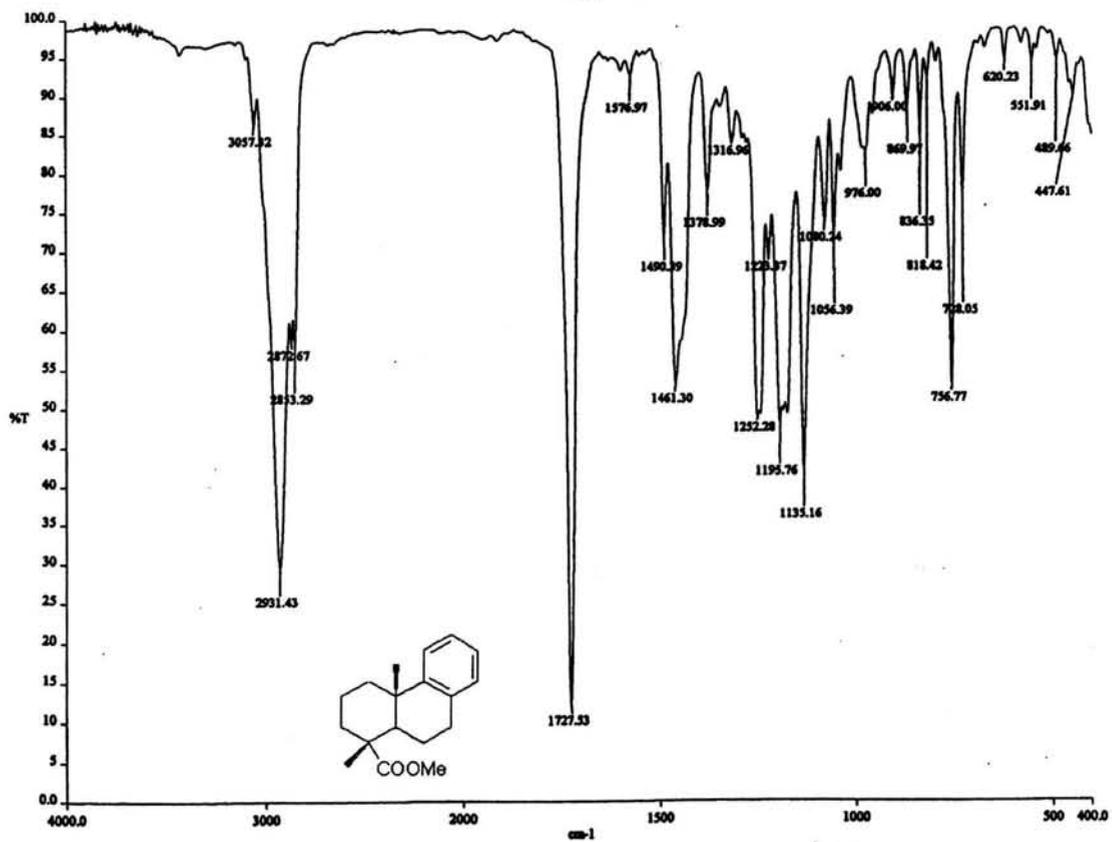
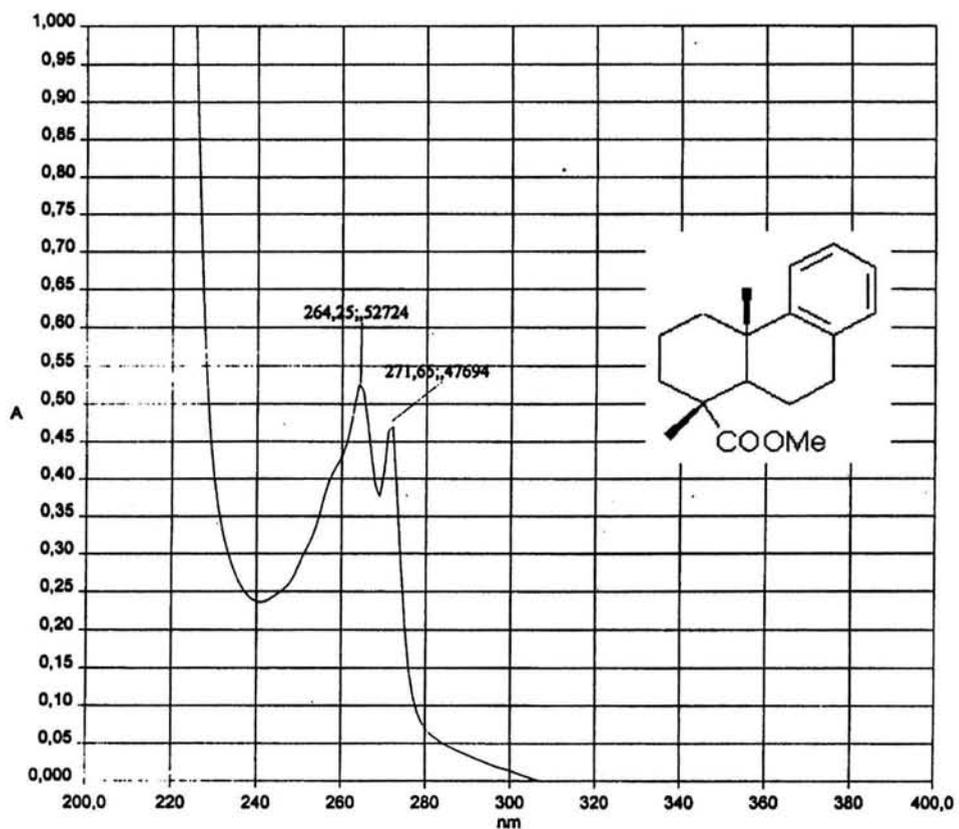
Temp : 6.4 deg.C

Ion Mode : FAB+

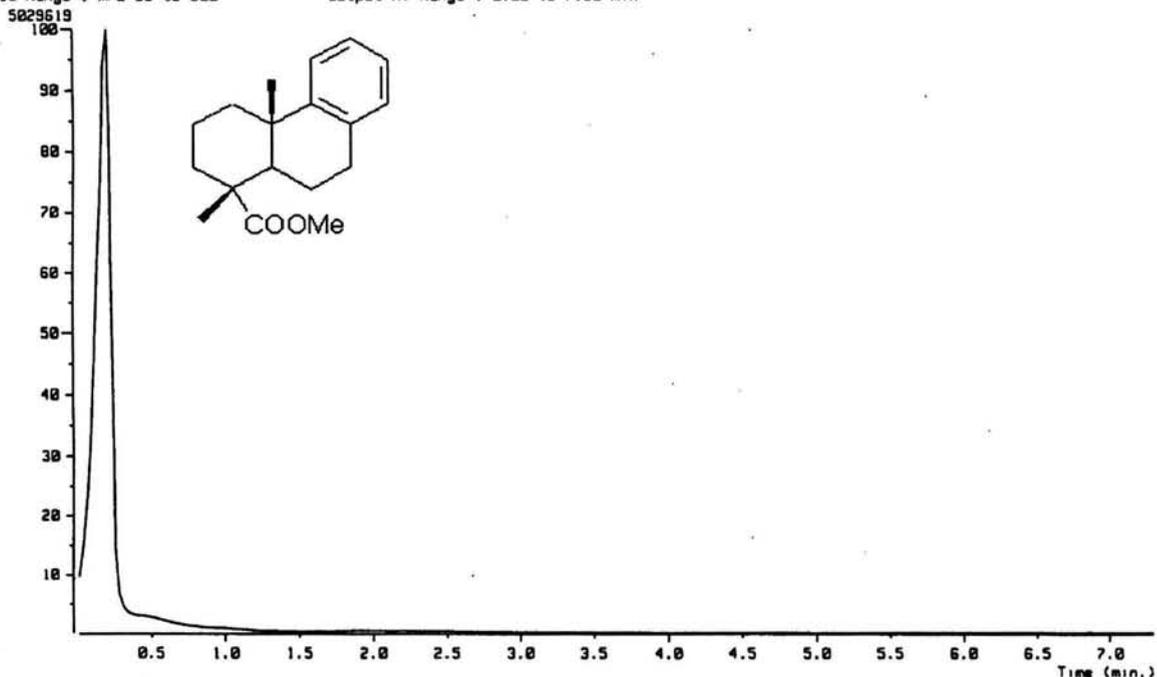
Int. : 256.98

2694617

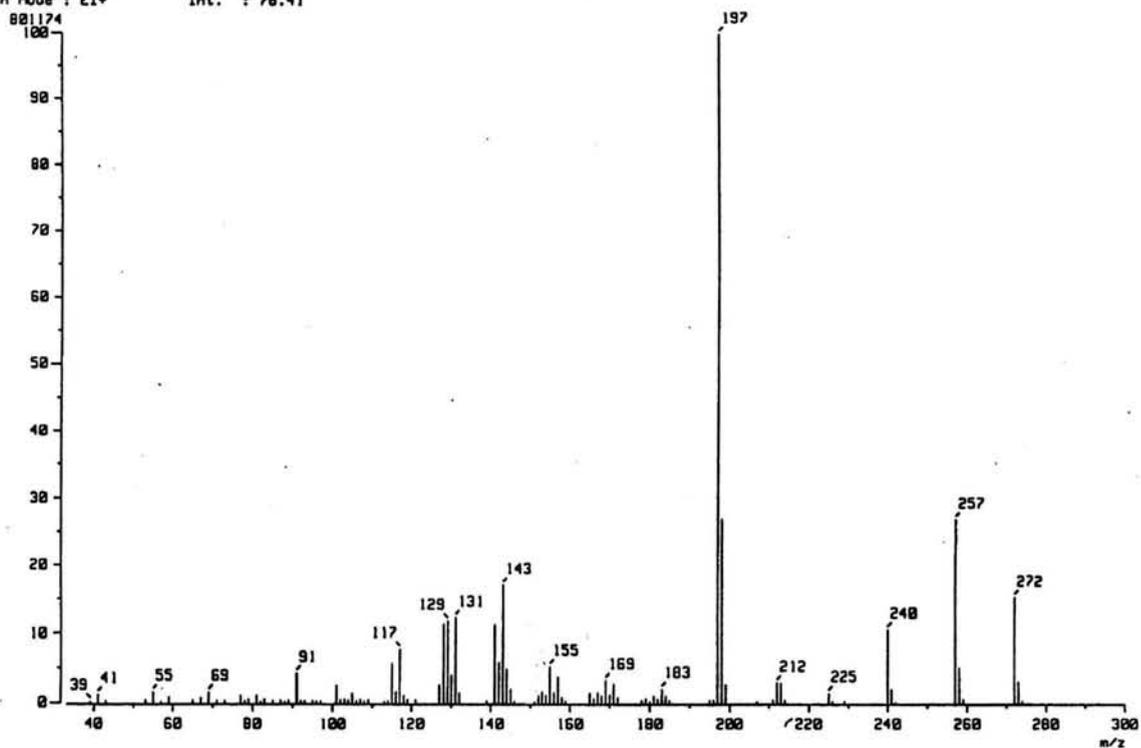




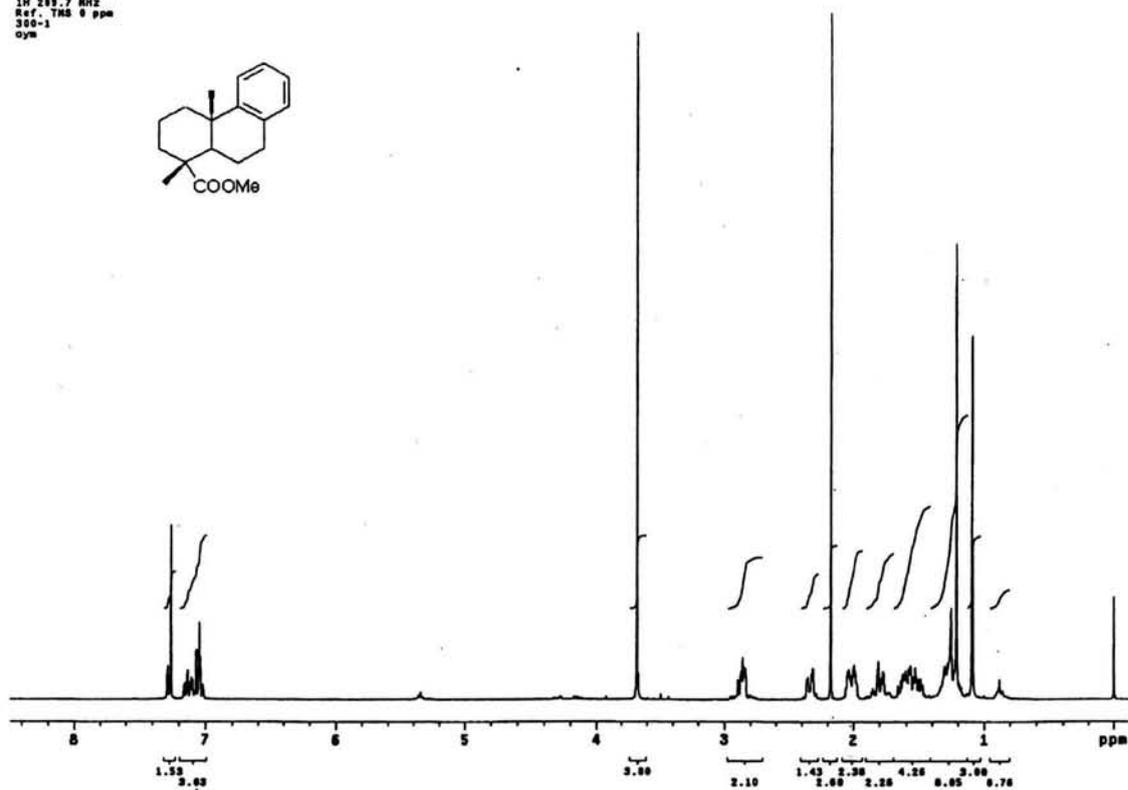
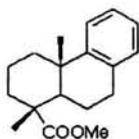
[TIC]
Data : OT5612_DEIS-2_002 Date : 05-Nov-102 11:38
Sample:
Note : USRI, Fac. de Quimica, UNAM.
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Ion Species : Normal Ion (MF-Linear)
TIC Range : m/z 33 to 800 Output RT Range : 0.00 to 7.30 min



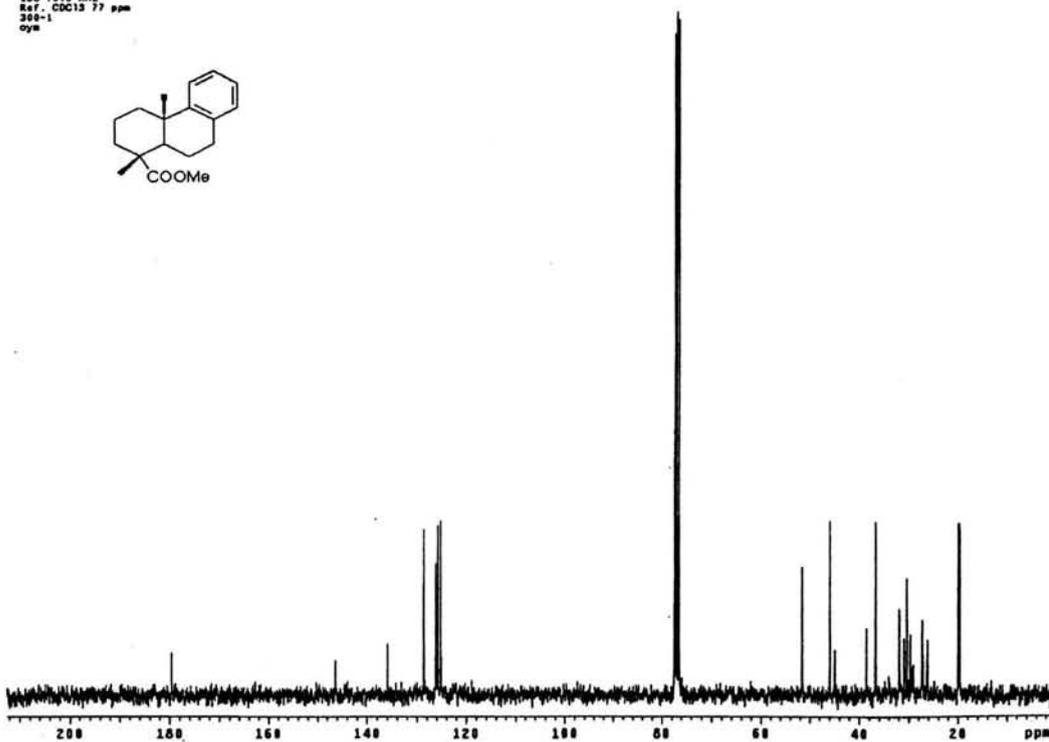
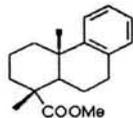
[Mass Spectrum]
RT : 0.11 min Scan# : (5,6) Temp : 6.4 deg.C
Ion Mode : EI+ Int. : 76.41

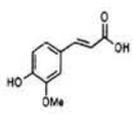
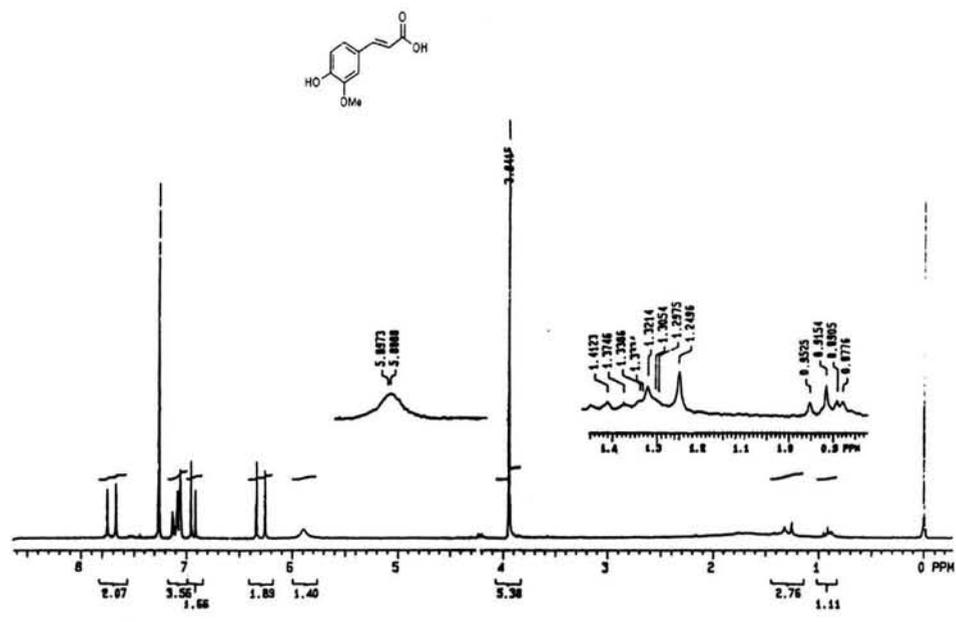
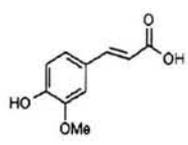
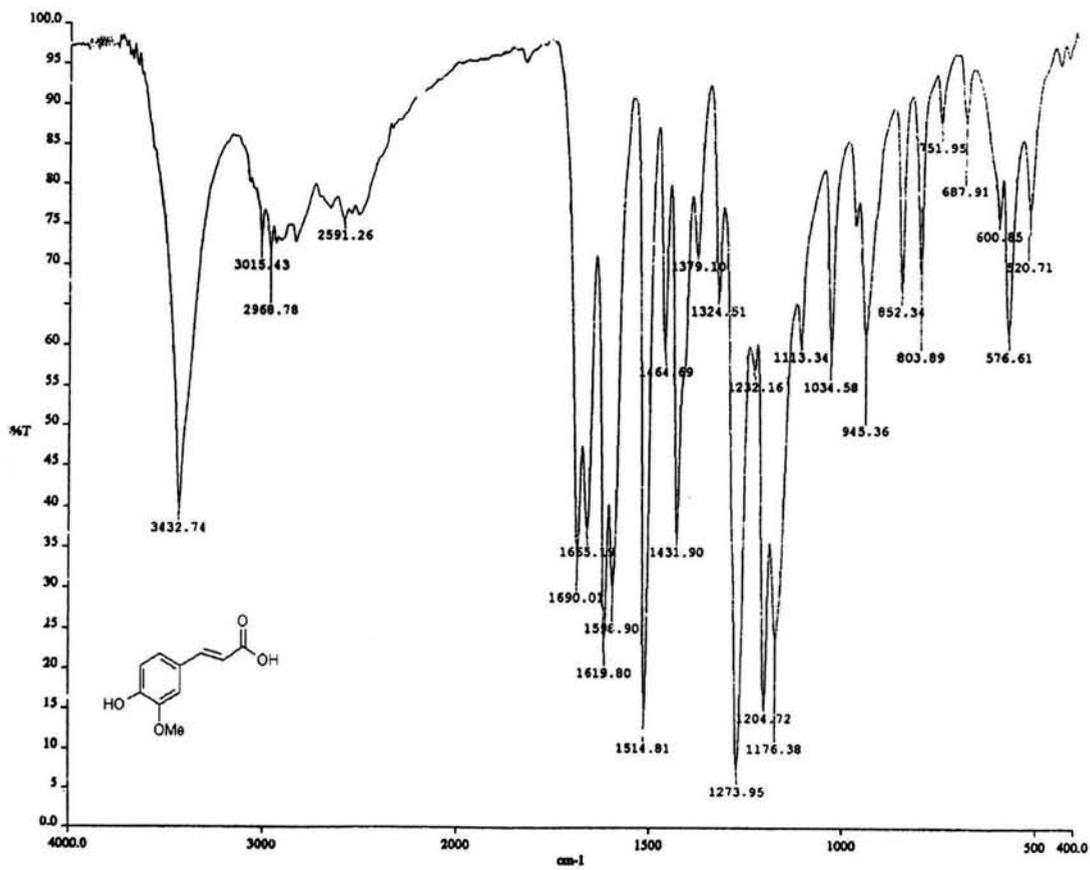


USA1
21 noviembre 2002
Dr. Arturo Navarro / Leonardo R.
Date: 2 / CDC13
1H 299.7 MHz
Ref. TMS 0 ppm
300-1
oye



USA1
21 noviembre 2002
Dr. Arturo Navarro / Leonardo R.
Date: 2 / CDC13
13C 79.9 MHz
Ref. CDCl3 77 ppm
300-1
oye





[TIC]

Data : OT6770_FENOLICO-ACO_002

Date : 15-Aug-103 23:21

Sample:

Note : USRI, Fac. de Quimica, UNAM.

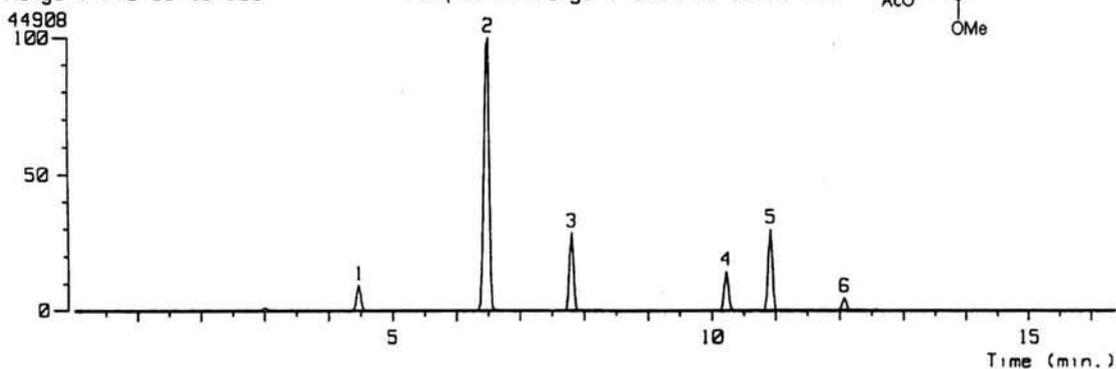
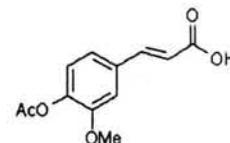
Inlet : GC

Ion Mode : EI+

Ion Species : Normal Ion [MF-Linear]

TIC Range : m/z 33 to 800

Output RT Range : 0.00 to 16.40 min



[Mass Spectrum]

RT : 7.80 min

Scan# : 284-280-290

Temp : 28.8 deg.C

Ion Mode : EI+

Int. : 1.38

