



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**ESTUDIO DE LA REACCIÓN DE ACOPLAMIENTO OXIDATIVO ENZIMÁTICO PARA MODIFICAR
COMPUESTOS TIPO VAINILLOIDE, HIDROXIBENZOATOS E HIDROXICINAMATOS**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q. ARMANDO NAVARRO CID DEL PRADO

DR. MIQUEL GIMENO SECO
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2015



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA

VOCAL: DR. MIGUEL COSTAS BASÍN

VOCAL: DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARABIA

VOCAL: DR. HÉCTOR MANUEL LUNA CONTLA

SECRETARIO: DR. JOSÉ GUILLERMO DE JESÚS AGUILAR OSORIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 314, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, CONJUNTO E FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Químicas por formarme al más alto nivel académico de México.

Al apoyo económico para la realización de este proyecto CONACYT 2012CB180128.

Al Dr. Miquel Gimeno Seco por su asesoría y pauta para la culminación de este proyecto.

A los miembros del jurado: Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dr. Miguel Antonio Costas Basín, Dra. Amelia Farrés González-Sarabia, Dr. Héctor Manuel Luna Contla y Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio, por sus valiosas aportaciones para el enriquecimiento de este trabajo.

Al Dr. Ernesto Sánchez Mendoza del Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la UAM-Xochimilco por su apoyo en la realización de la Resonancia Magnética Nuclear.

Dedicatoria

A mis padres por alentarme a continuar para crecer personal y profesionalmente.

A Brenda mi futura esposa, por el inmensurable amor compartido y el apoyo incondicional durante esta etapa (y las que faltan).

A mi tío Arturo por creer en mí, los consejos y la guía para ser un mejor profesional de la Química.

Contenido

Resumen.....	1
1. Introducción	3
2. Antecedentes	5
2.1 Hidroxicinamatos de alquilo.....	5
2.2 Derivados de vainillina.....	12
2.2.1 Derivados de vainillina: Curcuminoides.....	17
2.3 Acoplamiento oxidativo de fenoles	20
2.3.1 Acoplamiento oxidativo de fenoles catalizada por peroxidasas.....	22
3. Objetivos	35
3.1 Objetivo general	35
3.2 Objetivos particulares	35
4. Resultados y Discusión	37
4.1 Síntesis de los ésteres de metilo y etilo de los ácidos hidroxicinámicos	38
4.2 Síntesis de los derivados vainilloides (alcohol vainillínico, ácido vainillínico y 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-buta-3-en-2-ona)	44
4.3 Acoplamiento oxidativo de los ésteres de ácidos hidroxicinámicos y derivados vainilloides.....	52
5. Materiales y Métodos	69
5.1 Síntesis de los derivados vainilloides	69
5.1.1 Síntesis del alcohol vainillínico.....	69
5.1.2 Síntesis de ácido vainillínico. Conversión reductiva de ácido ferúlico con <i>Aspergillus niger</i>	69
5.1.3 Síntesis de 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-buta-3-en-2-ona	70
5.2 Síntesis de hidroxicinamatos de alquilo.....	70
5.2.1 Síntesis del cumarato de metilo	70
5.2.2 Síntesis del cumarato de etilo.	71
5.2.3 Síntesis del cafeato de metilo	71
5.2.4 Síntesis del cafeato de etilo	72
5.2.5 Síntesis del ferulato de metilo	72
5.2.6 Síntesis del ferulato de etilo	73
5.2.7 Síntesis del sinapato de metilo	73
5.2.8 Síntesis del sinapato de etilo.....	74

5.3 Preparación general del extracto vegetal de peroxidasa de rábano obtenida de rábano rojo	74
5.4 Acoplamiento oxidativo de derivados vanilloides con extracto vegetal de peroxidasa de rábano de rábano rojo	75
5.4.1 Acoplamiento oxidativo de 4-hidroxi-3-etoxibenzaldehído obtención del 5,5'-dietoxi-6,6'-dihidroxi-[1,1'-bifenil]-3,3'-dicarbaldehído	75
5.4.2 Acoplamiento orto-oxidativo de alcohol vainillínico obtención del 5,5'-bis (hidroximetil)-3,3'-dimetoxi-[1,1'-bifenil]-2,2'-diol (divainillina)	75
5.4.3 Acoplamiento orto-oxidativo de ácido vainillínico obtención del di ácido-6,6'-dihidroxi-5,5'-dimetoxi-[1,1'-bifenil]carboxílico (di ácido vainillínico).....	75
5.4.4 Acoplamiento orto-oxidativo de 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-buta-3-en-2-ona	76
5.5 Acoplamiento oxidativo de los hidroxicinamatos de alquilo	76
5.5.1. Acoplamiento oxidativo del cumarato de metilo obtención del (E)-2-(4-hidroxifenil)-5-(3-metoxi-3-oxoprop-1-enil)-2,3-dihidrobenzofuran-3-carboxilato de metilo.....	76
5.5.2. Acoplamiento oxidativo del ferulato de etilo obtención del (E)-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-7-metoxi-5-(3-metoxi-3-oxoprop-1-enil)-2,3-dihidrobenzofuran-3-carboxilato de etilo	77
5.5.3. Acoplamiento oxidativo del sinapato de etilo obtención del 7-hidroxi-1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-6,8-dimetoxi-1,2-dihidronaftalen-2,3-dicarboxilato de etilo	77
6. Conclusiones	79
7. Bibliografía	81
8. Apéndice.	88

Resumen

El presente trabajo describe el estudio de la reacción de acoplamiento oxidativo de ésteres de metilo y etilo de los ácidos hidroxicinámicos (ácido *p*-cúmarico, cafeico, ferúlico y sinápico) y de derivados vainilloides que utilizan vainillina como base como son: el alcohol vainillínico, ácido vainillínico, el derivado de curcumina 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-buta-3-en-2-ona (aquí mostrado como derivado vainilloide) y la forma de obtención de estos como materias primas para la reacción, así como del 4-hidroxi-3-etoxibenzaldehído con un extracto vegetal peroxidasa de rábano cruda obtenido de rábano rojo comercial (*Raphanus sativus*).

Los ésteres de los ácidos hidroxicinámicos se prepararon a partir de los ácidos correspondientes utilizando la esterificación de Fisher con rendimientos de buenos a excelentes utilizando metanol para los ésteres de metilo y etanol para los ésteres de etilo como agentes esterificantes y disolvente, donde es primordial un medio de reacción anhidro y tiempos de reacción largos basados en la sustitución del anillo aromático del ácido hidroxicinámico.

Por lo que se refiere a los derivados vainilloides, el alcohol vainillínico se obtuvo de la reducción química con NaBH_4 , el ácido vainillínico se preparó por un método biosintético utilizando *Aspergillus niger* como biocatalizador de la reducción de ácido ferúlico para la obtención de este a escala preparativa, mostrando la posibilidad de obtener ácido vainillínico con *Aspergillus niger* a partir de ácido ferúlico y su posible escalamiento a multi-gramos. Posteriormente se condensó vainillina y acetona como forma de obtener un derivado de curcumina mediante el condensación aldólica.

Finalmente se realizó el acoplamiento oxidativo de los ésteres hidroxicinámicos con el extracto vegetal de peroxidasa de rábano cruda de rábano rojo y se obtuvieron compuestos cíclicos para tres de los ésteres evaluados como resultado de un acoplamiento radicalario 5-8. El caso de los derivados vainilloides resultó en

productos acoplados *orto-orto* y en la oxidación del alcohol vainillínico durante la reacción de acoplamiento.

1. Introducción

Ya hace unas décadas los químicos sintéticos han dedicado sus esfuerzos a procesos más “verdes”, por lo que han recurrido a introducir en sus esquemas de síntesis procesos biocatalíticos, que muestran ventajas sintéticas con respecto a métodos sintéticos “clásicos”. Las enzimas son bien conocidas por catalizar reacciones en medios biológicos, así como *in vitro* donde han mostrado características y propiedades para llevar a cabo un amplio espectro de reacciones. Las ventajas que ofrece un biocatalizador o enzima con respecto a reacciones por otras vías es que éstas pueden ser usadas en medios acuosos y no acuosos, temperaturas moderadas (<100 °C), bajas presiones, no presentan toxicidad (aunque pueden ser alergénicas). La amplia superficie de contacto entre la enzima y el sustrato ofrece un alto potencial de regio- y estereo-control, así como poder incrementar la velocidad de reacción hasta 10^{20} veces con respecto a una reacción no catalizada¹.

Una de las reacciones centrales en química orgánica es la de las oxidaciones. Este tipo de reacciones presenta algunas desventajas como es la utilización de catalizadores basados en cromatos, y aunque se están realizando esfuerzos para utilizar procedimientos ambientalmente más benignos como es el uso de O₂ y H₂O₂, no es aún suficiente para catalizadores químicos. Debido a esto enzimas oxidantes como las oxigenasas, oxidasas y peroxidasas han surgido como pilares para catalizar reacciones de oxidación, pues presentan regioselectividad por oxidación de polioles, regio y enantioselectividad para oxi-funcionalizar enlaces C-H no activados, dobles enlaces C=C y oxidación selectiva de grupos funcionales en presencia de algunos más reactivos².

Las peroxidasas catalizan reacciones de acoplamiento de fenoles, el cual es un proceso que genera bastante atención dentro de la química orgánica debido a que provee de una forma rápida de síntesis de compuestos biarilo mediante acoplamiento C-C, unidad presente en diferentes moléculas encontradas en la naturaleza con bioactividad importante, además de que permite entender cómo

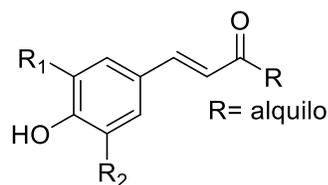
4 | INTRODUCCIÓN

ocurre la biosíntesis de productos naturales e incita a los químicos sintéticos a elaborar rutas biomiméticas para obtener derivados sintéticos de productos naturales de importancia para la industria farmacéutica, agroalimentaria y de aditivos en alimentos³.

2. Antecedentes

2.1 Hidroxicinamatos de alquilo

Los hidroxicinamatos de alquilo (Fig. 1) son derivados esterificados de los ácidos hidroxicinámicos (ácido *p*-cúmarico, ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido sinápico) con una cadena alifática que puede variar en su longitud. Estos pueden ser sintetizados mediante síntesis química (Síntesis de Fischer) o enzimática (Lipasas), según se ha reportado en varios trabajos, ya que los ácidos hidroxicinámicos presentan una potente actividad antioxidante⁴, esta puede ser mejorada mediante lipofilización, es decir, añadir una funcionalidad lipofílica a una molécula, obtenida vía esterificación de los ácidos hidroxicinámicos con alcoholes de cadena alifática corta y larga. Esta funcionalidad lipofílica incrementa la movilidad de estos antioxidantes hacia los sitios donde actúan, en comparación con los ácidos libres. Se ha observado en sistemas compartimentados como son: las emulsiones, membranas y células vivas que esta hidrofobicidad ofrece ventajas para obtener las propiedades atribuidas a los hidroxicinamatos de alquilo⁵.



ácido *p*-cúmarico R₁, R₂ = H
 ácido cafeico R₁= OH, R₂=H
 ácido ferúlico R₁=OH, R₂=OCH₃
 ácido sinápico R₁=OCH₃, R₂=OCH₃

Fig. 1. Estructura general de los hidroxicinamatos de alquilo.

De esta manera, existen trabajos en los que se han aislado ésteres de alquilo de los ácidos hidroxicinámicos y encontrado que son moléculas con actividad contra radicales libres o con alguna actividad biológica. Noda (1971)⁶ aisló el sinapato de metilo a partir de semillas de canola mediante cromatografía. Este es un derivado esterificado del ácido sinápico, el cual identificó ampliamente mediante técnicas

espectrofotométricas, espectroscópicas y cromatográficas. Muchos otros trabajos incluyen el uso de ésteres de alquilo, a fin de demostrar su actividad biológica. Por ejemplo seis diferentes hidroxicinamatos de metilo (*p*-cumarato, cafeato, ferulato, sinapato, *p*-metoxicinamato, 3,4-dimetoxicinamato) fueron probados en medios biológicos para observar su efecto contra *Pseudomonas fluorescens*⁷, y se encontraron que no existía un efecto significativo de inhibición del crecimiento del microorganismo. Sin embargo, cuando los hidroxicinamatos de metilo fueron usados como mezclas en el medio, la inhibición aumentaba debido a un efecto sinérgico, además de que el coeficiente de partición aceite-agua (buffer de fosfatos) también se veía incrementado. Posteriormente, Hashidoko y cols. (1992)⁸ aislaron e identificaron tres 4-hidroxicinamatos de alquilo de cadena larga (Fig. 2) de la planta *Rosa rugosa*, los cuales se biosintetizaron tras la esterificación del ácido 4-hidroxicinámico con los alcoholes correspondientes (Ej. Alcohol dodecanoico). Es posible encontrar otros hidroxicinamatos debido a que se han encontrado otros alcoholes de cadena larga (C₂₀, C₂₄, C₂₇, C₃₀, C₃₂) en esta planta si se utilizan otros métodos de extracción.

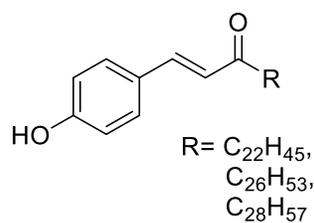


Fig. 2. Estructura de los 4-hidroxicinamatos de alquilo de cadena larga (Hashidoko, 1992).

Otro de los estudio fue evaluar los compuestos aislados de la planta *Ballota Nigra*, debido a que es bien conocido que sus extractos alcohólico tienen efectos terapéuticos contra influenza, tos común y efecto neuro-sedativo⁹, así encontraron que los extractos de las partes áreas de la planta contienen un cantidad importante de glicosil y no glicosil ésteres derivados de los ácidos cafeico y ácido ferúlico, y que solo uno de los derivados glicosilados tenía un efecto importante de inhibición contra bacterias Gram-positivo y Gram-negativo, mientras que el

derivado no-glicosilado (Fig. 3) tenía una actividad menor a la de los derivados glicosilados.

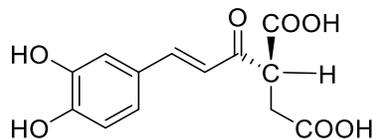


Fig. 3. Estructura del ácido cafeoil-L-málico, derivado no-glicosilado (Didry, 1999).

En la hierba *Marrubium vulgare*, Sahpaz (2002)¹⁰ identificó varios derivados esterificados del ácido cafeico, para los cuales se probó su actividad anti-inflamatoria, como fue descrito por Didry⁹. Los compuestos glicosilados se demostró tienen una mayor actividad comparados con los no-glicosilados. Una de las explicaciones es que el efecto estérico de los derivados glicosilados, donde las unidades de azúcares presentes impiden a la molécula llegar a los sitios activos de la enzima COX-1 y COX-2. Además de que ambos derivados presentan actividad antioxidante contra especies reactivas de oxígeno (ERO) como son radicales libres y peróxidos en la célula.

No solo se han aislado derivados esterificados de los ácidos hidroxicinámicos, sino que se ha descrito su síntesis y se han evaluado algunas propiedades biológicas. Con la finalidad de estudiar la actividad contra radicales libres, Silva (2001)⁴ sintetizó 3 derivados de ácido cafeico, esterificando con metanol, etanol y propanol mediante la esterificación de Fischer. Una vez sintetizados los derivados los autores realizaron el estudio de actividad contra radicales libres usando DPPH (2-difenil-1-picrilhidracil) y encontraron que los ésteres presentaban un alto poder antiradical cuando se comparaban con los ácidos. Cuando realizaron la esterificación del ácido dihidrocafeico observaron que el poder antiradical se veía considerablemente disminuido y que la actividad contra radicales libres era independiente de la cadena alifática. Por otro lado, para probar la estabilidad del aceite de girasol ante los procesos oxidativos los mismos investigadores sintetizaron los ésteres propílicos del ácido cafeico, ácido ferúlico e isoferúlico y del dihidrocafeico¹¹ mediante esterificación de Fischer de los ácidos con alcohol

isopropílico. La adición de estos derivados al aceite de girasol demostró que se incrementaba la estabilidad con los ésteres del ácido cafeico y del ácido dihidrocafeico. Sin embargo cuando se adicionaron los ésteres del iso y ácido ferúlico no existió diferencia en comparación con el aceite sin aditivos.

El estudio de la reacción de esterificación de ácido cafeico con metanol utilizando ácido *p*-toluensulfónico¹² demostró que la reacción procede con buen rendimiento a temperaturas de 60 a 70°C, exceso de metanol y cantidades catalíticas de ácido *p*-toluensulfónico como catalizador resulta conveniente para las reacciones de esterificación.

Jayaprakasam (2006)¹³, investigó la actividad contra la proliferación de células cancerosas y sintetizó varios derivados esterificados (cadenas alifáticas de C₃-C₂₀) mediante esterificación de Fischer para los ferulatos de alquilo y cafeatos de alquilo de cadena corta utilizando ácido *p*-toluensulfónico. Para los cafeatos de alquilo de cadena larga se prepararon los cloruros de ácido correspondientes y se condensaron estos con los alcoholes correspondientes. Los estudios de proliferación de células cancerosas *in vitro* demostraron que los hidroxicinamatos de alquilo de cadena larga presentaban una mayor actividad contra la proliferación de células cancerosas, mientras que para la actividad inflamatoria asociada a la enzima COX los cafeatos y ferulatos de cadena intermedia presentaban mejor actividad al inhibir la COX-1 y COX-2. Posteriormente, varios hidroxicinamatos de alquilo se prepararon utilizando ácido *p*-toluensulfónico para evaluar su actividad antimicrobiana¹⁴, y los ésteres de metilo, etilo, propilo y hexilo del ácido cafeico mostraron mayor actividad en relación con otros ésteres de ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido vainillínico, ácido gentísico y ácido protocatéquico), debido a que el ácido cafeico es un polifenol el cual es más fácilmente oxidado en su forma de hidroxilbenzoquinona.

Cuando se utilizaron lipasas como una estrategia más limpia como catalizadores de la reacción de esterificación¹⁵ se alcanzó la síntesis de hidroxicinamatos de alquilo y dihidrohidroxicinamatos de alquilo. Los dihidrohidroxicinamatos de alquilo se obtuvieron en menor proporción que los hidroxicinamatos de alquilo, ya que

tienen un doble enlace C-C en su estructura y el número de grupos metoxi o hidroxilo disminuía también la obtención de los ésteres, para los que se requirieron también mayores de tiempos de reacción. Weitkamp (2006)¹⁶, transesterificaron hidroxicinamatos de alquilo con 1-dodecanol utilizando lipasas como catalizadores de la reacción y encontraron que la transesterificación era más rápida que la esterificación misma, así como la estructura de los hidroxicinamatos de metilo afectaba los tiempos de reacción de transesterificación.

Esteves (2008)¹⁷ sintetizó tres trihidroxicinamatos para estudiar su actividad citotóxica y antioxidante y llevó a cabo la reacción de Knoevenagel entre el trihidroxibenzaldehído y ácido malónico o etilmalonato o dietilmalonato (Fig. 4).

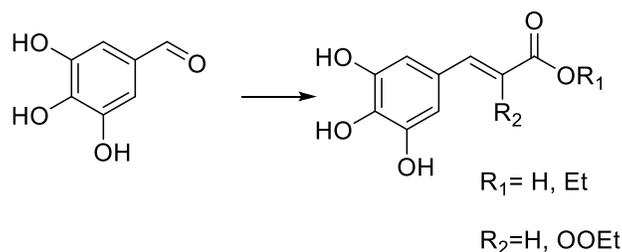


Fig. 4. Esquema de reacción de síntesis de trihidroxicinamatos (Esteves, 2008).

Para los 3 derivados encontró que la actividad antioxidante no era diferente entre ellos, debido a que uno de los factores que determinan la actividad es la cantidad de grupos hidroxilo en la estructura de las moléculas y que éster lineal era el único que funcionaba como un agente citotóxico, con una actividad comparable con los ésteres de ácido cafeico y ácido gálico. Asimismo, Teixeira (2013)¹⁸ estudió las propiedades de varios ésteres y diésteres de varios ácidos fenólicos y los obtuvo a partir de la esterificación de Fischer del ácido cafeico o vía condensación de Knoevenagel-Doebner del trihidroxibenzaldehído con ácido malónico, etil malonato y dietilmalonato, de estos derivados encontró que los híbridos del ácido galoilcinámico tienen un efecto antioxidante mayor que el ácido gálico o ácido cinámico por sí solos, así como que el incremento en la longitud de las cadenas alifáticas solo produce un aumento en la lipofilidad de los compuestos.

De la misma manera, se han estudiado los efectos antioxidantes contra oxidación de lipoproteínas utilizando ésteres de ácidos hidroxicinámicos como moléculas modelo¹⁹, utilizaron feruloil esterasas en medios microemulsionados con el fin de obtener los hidroxicinamatos de butilo y los resultados de los efectos de la demostraron que los sinapatos de butilo presentaban un mejor efecto antioxidante.

Otra aproximación para la obtención de hidroxicinamatos de alquilo fue descrita por Menezes (2011)²⁰, el cual a partir del ácido de Meldrum (2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona) con los alcoholes correspondientes, obtuvo ésteres del ácido malónico para posteriormente condensarlo con varios benzaldehídos vía modificación de la condensación de Knoevenagel (Fig. 5). De esta manera, concluyeron que los hidroxicinamatos de alquilo de la serie de derivados de ácido cafeico mostraban actividades antioxidantes mayores que la serie de derivados de ácido ferúlico.

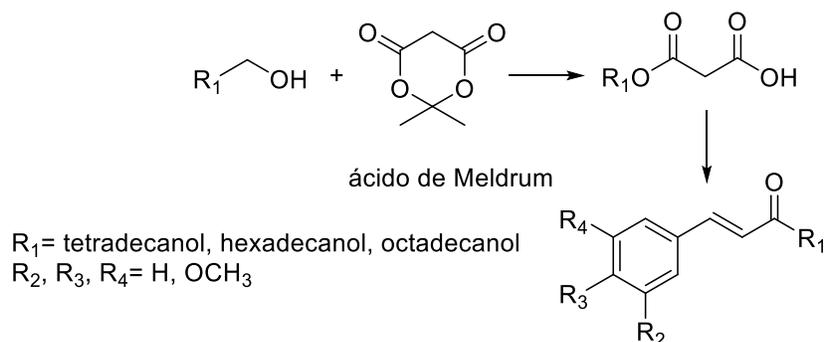


Fig. 5. Esquema de reacción de la síntesis de los ésteres de ácido ferúlico y ácido cafeico a partir del ácido de Meldrum vía modificación de la condensación de Knoevenagel (Menezes, 2011)

Es tan extensa la química de los ésteres derivados de los ácidos hidroxicinámicos que incluso han surgido estudios de espectroscopia de Raman²¹ donde se dan a conocer a fondo las estructuras y las conformaciones más energéticamente favorables, en relación a la conformación E alrededor del doble enlace. Además, se encontró que la conformación del grupo carbonilo con respecto al anillo aromático depende del derivado esterificado, y que la conformación *anti* estaba

favorecida para los cafeatos y que se tenía igual población de conformaciones *anti* y *syn* para los ferulatos.

Li (2009)²² desarrolló un método sintético para obtener ferulatos de alquilo mediante radiación con microondas, para lo cual estudiaron los efectos de la temperatura, el catalizador, la relación molar ácido ferúlico:etanol y tiempos de reacción. Al aplicarlo a la síntesis de ferulatos de alquilo de cadena más larga observaron que, comparado con métodos convencionales, los tiempos de reacción disminuían de horas a minutos, no importando el largo de la cadena alifática y los mejores rendimientos se obtenían para la misma serie por los dos métodos sintéticos.

En el mismo sentido cafeatos/ferulatos de metilo, etilo, propilo y butilo se sintetizaron por radiación de microondas basados en la síntesis de Fischer²³ reduciendo de esta manera los tiempos de reacción, el volumen de disolventes, así como el trabajo después de completar la reacción. Para medir su actividad contra estrés oxidativo en células neuronales, llevaron a cabo ensayos electroquímicos para determinar el potencial oxidante de los derivados, estos mostraron que un potencial oxidante significaba una mayor actividad antioxidante; así los ésteres del ácido cafeico poseían mayor actividad que los ésteres del ácido ferúlico en concordancia con trabajos anteriores con ensayos de actividad antioxidante con el estudio de la inhibición del radical estable del DPPH y FRAP (poder antioxidante reductor del hierro) y, por ende, presentaban mejor protección contra estrés oxidativo.

Yang (2012)²⁴ estudió la velocidad de reacción de esterificación vía enzimática para obtener derivados esterificados del ácido dihidrocafeico como modelo. Utilizó varios alcoholes de cadena corta y larga, observando que cuando se utilizaban los de cadena larga la reacción procedía con mayores rendimientos y éstos aumentaban con el tiempo de reacción. Así mismo, encontró que en mezclas de hexano y butanona la reacción se conducía de mejor manera. Cuando este modelo se utilizó con ácido cafeico y ácido ferúlico las conversiones eran bajas, debido a la solubilidad de estos en la mezcla de disolventes.

Recientemente otra de las rutas para sintetizar el ferulato de etilo es utilizar vainillina y ácido malónico en una condensación de Knoevenagel para obtener el ácido ferúlico, el cual es esterificado mediante síntesis de Fischer²⁵, que a su vez es reducido al dihidroferulato de etilo con el fin de realizar reacciones de transesterificación con polioles para tener nuevos bloques de moléculas que sirvan en polimerización química, al ser estos convertidos fácilmente en acrilatos y aliléteres.

Finalmente, Guo (2005)²⁶ desarrolló un método quimio-selectivo para obtención de ésteres de ácidos fenólicos, dentro de los cuales obtuvo éster de metilo y bencilo del ácido *p*-cumárico en un solo paso al hacer reaccionar KHCO_3 , un haluro de alquilo y DMF (Fig. 6). Los ésteres fueron obtenidos en altos rendimientos bajo condiciones suaves 40°C y tiempos de reacción cortos.

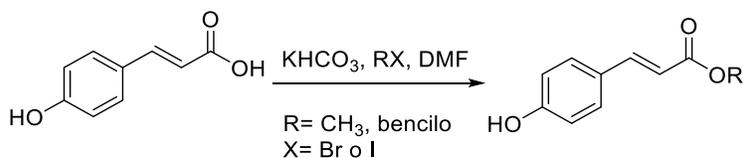


Fig. 6. Esquema de reacción de la síntesis de ésteres de ácido *p*-cumárico (Guo, 2005).

2.2 Derivados de vainillina

La vainillina es el principal compuesto encontrado en las vainas de la vainilla, y responsable del sabor dulce de esta. Estructuralmente pertenece a los compuestos fenólicos aromáticos, específicamente a los compuestos fenólicos simples $\text{C}_1\text{-C}_6$. La producción de vainillina en 2010 en el mundo ascendió a 15 000 000 Kg y de esta solo 1% del total es extraída de las vainas de vainillina ya que la producción sintética es la principal forma de obtención. Puede ser obtenida a partir de ácido ferúlico, eugenol, isoeugenol²⁷ o por depolimerización de la lignina²⁸. Recientemente ha ganado atención debido a que sirve como bloque sintético para la obtención de nuevos materiales con una variedad de aplicaciones. De esta manera, ha servido como bloque para la síntesis de bases de Schiff²⁹ lo cual se obtiene condensado la vainillina con diferentes anilinas en medio ácido (Fig. 7). Estas iminas fueron probadas como agentes antimicrobianos, observando

que estos derivados son efectivos en mayor proporción contra bacterias Gram negativo.

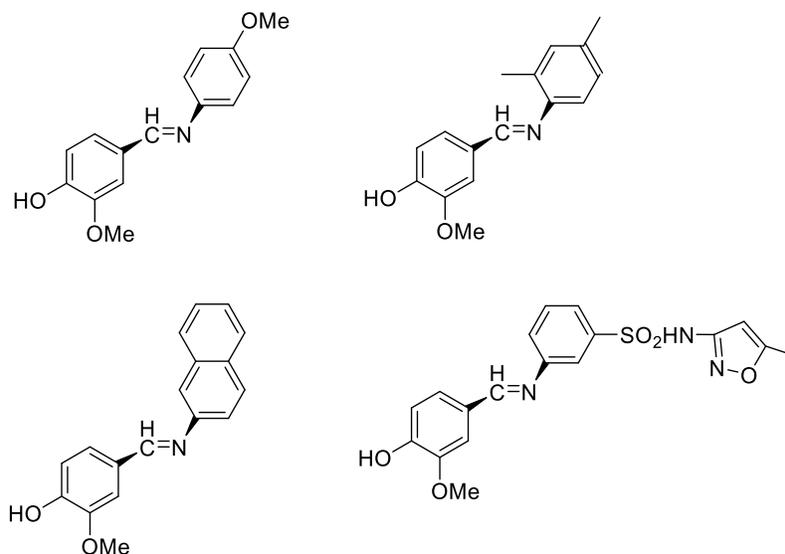


Fig. 7. Bases de Schiff basadas en vainillina (Vaghasiya, 2004).

Basados en la estructura de la vainillina, se condensaron diaminas con vainillina para obtener bases de Schiff, estas se usaron en la síntesis de glicidiléteres³⁰ compuestos de interés debido a que son materia prima para la obtención de resinas epóxicas ampliamente usadas en recubrimientos orgánicos, liberación de genes y desarrollo de nuevos fármacos.

Li (2010)³¹, sintetizaron dos derivados de vainillina haciéndola reaccionar con dos hidracinas aromáticas para obtener dos hidrazonas (Fig. 8), las cuales se utilizaron como ligantes en el diseño de nuevos compuestos de coordinación. El grupo de la vainillina presenta una variedad de posibilidades al poder ser un ligante monodentado, bidentado, como grupo quelato y puente quelato, extendiendo su química al uso en el diseño de materiales con propiedades optoelectrónicas.

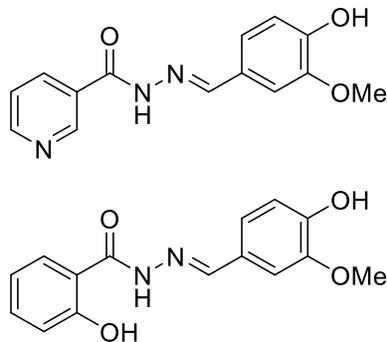


Fig. 8. Estructura de nuevos ligantes basados en la vainillina (Li, 2010).

La vainillina se ha utilizado recientemente como núcleo en la preparación de semiconductores orgánicos transformando está a eumelaninas (derivados N-de alquilindoles) las cuales pueden polimerizarse vía acoplamiento de Sonogashira³². Las eumelaninas derivadas de vainillina mostraron propiedades semejantes con respecto a semiconductores orgánicos obtenidos a partir de otros núcleos.

Los derivados alcohol, ácido y el dímero de la vainillina³³ (Fig. 9) fueron evaluados como inhibidores de acción de la tirosinasa, enzima que en mamíferos causa la pigmentación de piel, ojos y cabello; en plantas produce la coloración café lo cual determina la calidad del productos agrícolas de consumo humano; los resultados obtenidos mostraron que la vainillina y su dímero no presentaban inhibición de la actividad de la enzima mientras que el ácido vainillínico y el alcohol vainillínico si la mostraban.

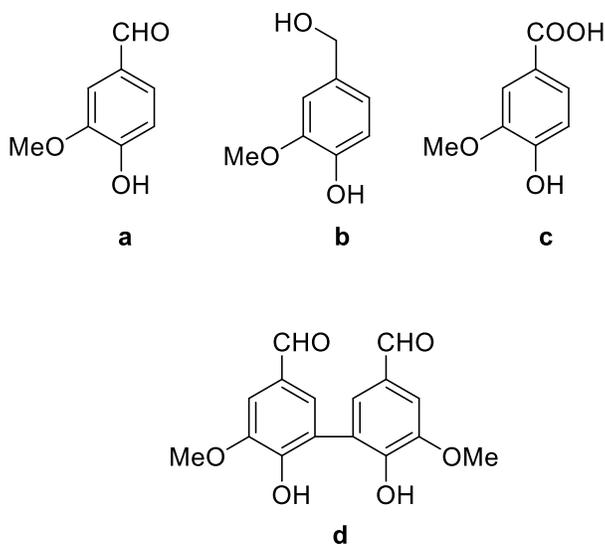


Fig. 9. Estructuras de la vainillina (a), alcohol vainillínico (b), ácido vainillínico (c) y bis-vainillina (d) (Bagheri, 2012)

La aplicación más importante de la vainillina como materia prima para nuevos materiales ha sido dirigida a la obtención de polímeros con diferentes propiedades: polímeros termoestables análogos a poliésteres y poliuretanos y polímeros para la liberación de fármacos.

La polimerización electroquímica de la vainillina, previo acoplamiento oxidativo produjo la polivainillina³⁴ (Fig. 10) con un 93% de rendimiento y de forma reproducible haciendo este un método eficiente para la obtención de un polímero termoestable con potencial para ser usado como atrapador de iones metálicos en soluciones acuosas.

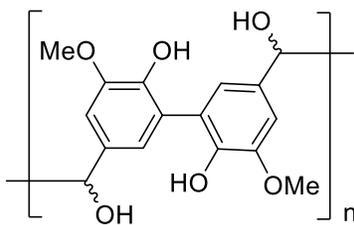


Fig. 10. Estructura de la polivainillina (Amarasekara, 2012)

Kevwitch (2012)³⁵ reportó la síntesis de una serie de oligómeros para estudiar el efecto de desensamble con el fin de sintetizar dendrímeros con aplicación en carga y liberación de fármacos basados en vainillina, formando los éteres de alilo o nitrobencilo con los respectivos bromuros para obtener los dímeros correspondientes, los cuales fueron tratados con N-bromosuccinimida (NBS) para sintetizar oligómeros de 3 unidades monoméricas.

En otro estudio de la vainillina usada como materia prima, se sintetizó un copolímero vía polimerización la vainillina utilizando la técnica de cadena con adición-fragmentación reversible (RAFT)³⁶. De esta manera se obtenía un derivado del metacrilato, permitiendo tener un polímero mediante técnicas sustentables y características semejante a copolímeros basados en estructuras lignolíticas. Firdaus³⁷ (2013) sintetizó varios monómeros de vainillina como bloques para la obtención de poliésteres, modificando su estructura y condensando el derivado reducido con haluros de ácidos grasos para obtener los éteres aromáticos, los cuales fueron transesterificados o se funcionalizaron con un grupo tiol (Fig. 11).

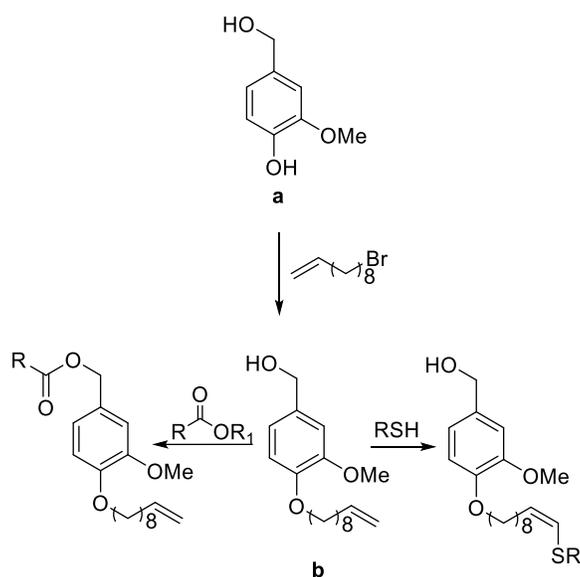


Fig. 11. Esquema de síntesis de los monómeros derivados de la vainillina funcionalizados con ácidos grasos a) alcohol vainillínico, b) 3metoxi-4-(undec-10-en-1-iloxi)fenil)metanol (Firdaus, 2013).

Recientemente, Fache (2015)^{38,39} sintetizó una serie de epoxi vainilloides, utilizando la vainillina y sus derivados oxidados y reducidos, ácido vainillínico y alcohol vainillínico, respectivamente, para lo cual los bloques primarios fueron eterificados vía reacción con epiclorohidrina o esterificados con haluros de alilo. Posteriormente fueron funcionalizados con tioles o transformados a derivados carbonato.

2.2.1 Derivados de vainillina: Curcuminoides

Una de las unidades que pueden ser obtenidos a través de la vainillina son las estructuras análogas de curcumina, el cual es un compuesto encontrado en la planta de la cúrcuma. Ha recibido atención debido nutracéutico o como componente para el diseño de alimentos preventivos de cáncer. La curcumina tiene un sistema de dos fenoles metoxilados conjugados con una β -dicetona (Fig. 12), teniendo así la propiedad de atrapar radicales libres y presentar alta actividad antioxidante gracias a su estructura⁴⁰.

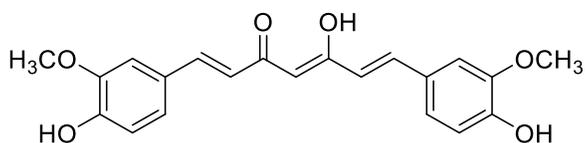


Fig. 12. Estructura de la curcumina (Masuda, 2001).

En el estudio de agentes contra el cáncer de próstata varios derivados curcuminoides se sintetizaron, condensando diferentes benzaldehídos sustituidos incluidos la vainillina con 2,4-pentandionas usando anhídrido bórico⁴¹, de esta manera fue posible obtener derivados con un solo grupo arilo o con 2 grupos arilo cuando se utilizaban dos equivalentes de los benzaldehídos, sin embargo si se requería de dos anillos arilo diferentes la relación de benzaldehídos era 1:1. Los derivados de curcumina fueron probados contra actividad citotóxica en células cancerosas los compuestos que tenían una estructura basada en la vainillina presentaron baja actividad contra otros derivados con mayor semejanza con la curcumina.

Ryu (2006)⁴² desarrolló una serie de derivados de vainillina (Fig. 13) con el objetivo de obtener curcuminoides, y examinaron su efecto en la acumulación de placas amiloides y nodos neurofibrilares dentro del cerebro, causantes de la enfermedad de Alzheimer para lo cual condensaron los derivados vanilloides con acetona u 2,4-pentanodiona.

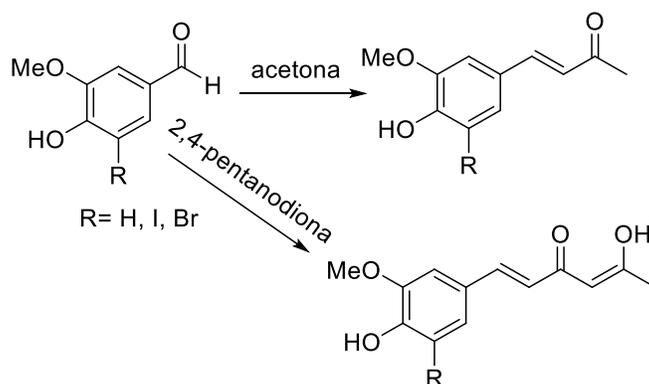


Fig. 13. Esquema de síntesis de curcuminoides a partir de derivados de vainillina (Ryu, 2006)

En estudios similares, derivados de vainillina fueron condensados con acetona, ciclopentanona y ciclohexanona⁴³ para obtener las estructuras análogas de la curcumina. La finalidad era tener compuestos que poseyeran un solo grupo carbonilo al ser probado que la funcionalidad de un solo grupo modifica la acción del curcuminoides esto lo hace eficaz para su uso en actividad antiinflamatoria.

Zhang (2008)⁴⁴ obtuvo a partir de vainilloides eterificados (Fig. 14) análogos de la curcumina; haciendo reaccionar la vainillina con 2,4-pentanodiona en una reacción de Claisen-Schmidt.

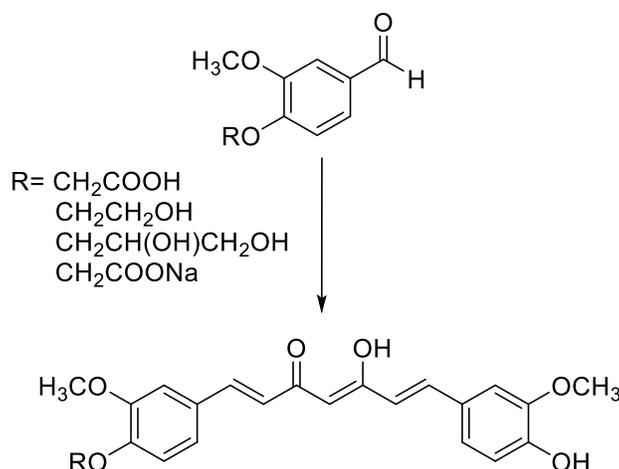


Fig. 14. Esquema de la condensación de Claisen- Schmidt de vainilloides con 2,4-pentanodiona (Zhang, 2008).

Análogamente varios curcuminoides simétricos y asimétricos se sintetizaron en una reacción de condensación aldólica en medio básico o ácido⁴⁵, usándose diferentes benzaldehídos hidroxi y metoxi sustituidos (Fig. 15), se encontró que los curcuminoides asimétricos tenían un menor rendimiento en comparación con los simétricos. Sin embargo, los derivados eran obtenidos en mayor rendimiento cuando poseían un hidroxilo en posición *orto* y las condiciones de reacción eran en medio ácido, para los demás derivados los mejores resultados fueron obtenidos en medio básico. Asimismo, la reducción de la cadena al obtener derivados con un solo carbonilo en comparación con la curcumina incrementa el potencial antioxidante de éste, así como la ausencia de grupos fenólicos disminuye su actividad comparado con los que tienen algún grupo fenólico. Esta actividad es incrementada cuando existe un grupo hidroxilo en posición *para*.

Finalmente cuando se probó la actividad antitumoral la correlación de la posición de los grupos fenólicos fue semejante a la de su actividad antioxidante, aunque es relevante la posición *orto* al encontrarse que las estructuras que poseían un hidroxilo en esta posición tenían una mayor actividad.

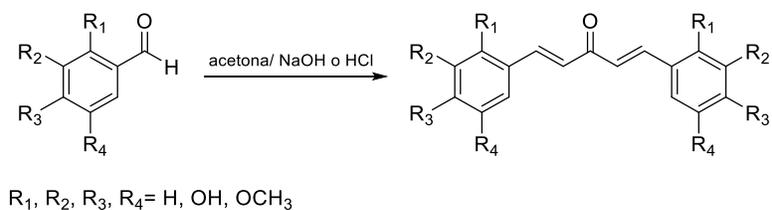


Fig. 15. Esquema de la condensación de benzaldehídos disustituídos con acetona en una relación 2:1 (Li, 2015).

2.3 Acoplamiento oxidativo de fenoles

El acoplamiento oxidativo de fenoles es un tipo de reacción orgánica que ha generado interés para la obtención de moléculas con alguna aplicación, pues abre la posibilidad de acceso a compuestos biarilos acoplando compuestos arilo mediante enlaces C-C o enlaces C-O, los cuales sirven como bloques químicos en la síntesis de productos naturales. Ej. polifenoles, alcaloides, terpenoides y policetidos³.

Para entender el acoplamiento oxidativo es necesario estudiar las consideraciones mecanísticas de éste, debido a que conlleva a la formación de radicales libres, obtenidos a través varios mecanismos. (Fig. 16).

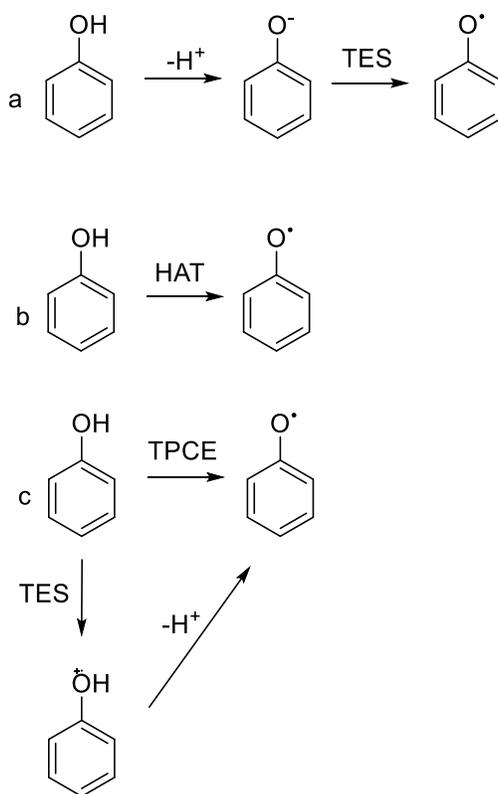


Fig. 16. Consideraciones mecánísticas para el acoplamiento de fenoles. TES (transferencia de electrón simple), HAT (transferencia de un átomo de hidrogeno), TPCE (transferencia concertada protón-electrón) (Quideau, 2014).

Una vez obtenido el radical fenoxi, este puede ser estabilizado por resonancia en el anillo aromático (Fig. 17) dando posibilidad a diferentes acoplamientos del radical $C_{orto}-O$, $C_{para}-O$, $C_{orto}-C_{orto}$, $C_{orto}-C_{para}$, $C_{para}-C_{para}$ y $O-O$.

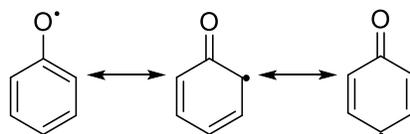


Fig. 17. Posibilidades de acoplamiento C-C o C-O.

El primer mecanismo (Fig. 17, a) es la desprotonación del fenol al poseer un enlace O-H polarizable convirtiendo a este en un ácido de Brønsted con un pKa entre 7 y 12. Sin embargo, si el fenol contiene sustituyentes electro-atradores *orto/para* este pka puede ser disminuido, una vez formado el ion fenolato este es

estabilizado por tautomería en el anillo aromático, el cual mediante un mecanismo de transferencia de electrón simple (TES) produce el radical fenoxi. El segundo mecanismo (Fig. 17, b) es la conversión directa del fenol en el radical fenoxi vía un mecanismo de transferencia de un átomo de hidrógeno (TAH), debido a la baja energía de disociación del enlace O-H y al igual que en el mecanismo (a), los sustituyentes electro-donadores orto/para disminuyen la energía de disociación, así como estabilizan el radical fenoxi. El tercer mecanismo (Fig. 17, c) es la transferencia concertada protón-electrón (TPCE), el cual también puede ser no concertado en un proceso de TES para producir el fenoxi catión radical para posterior desprotonación del catión radical³.

Uno de los oxidantes más utilizados para reacciones de acoplamiento oxidativo son aquellos que llevan a cabo mecanismos de transferencia de electrón simple, al lograr producir eficazmente radicales fenoxi, entre los oxidantes inorgánicos utilizados se encuentran compuestos de Fe(II), Ag(I) y Cu (II) como $K_3Fe(CN)_6$, $FeCl_3$ y Ag_2O y varios complejos aminados de Cu(II). El acoplamiento oxidativo puede ser logrado por enzimas, particularmente las oxidasas como lacasas, tirosinasas y peroxidasas³.

2.3.1 Acoplamiento oxidativo de fenoles catalizada por peroxidasas

Las peroxidasas las cuales son hemo proteínas que contienen una protoporfirina (IX) como grupo prostético (Fig. 18).

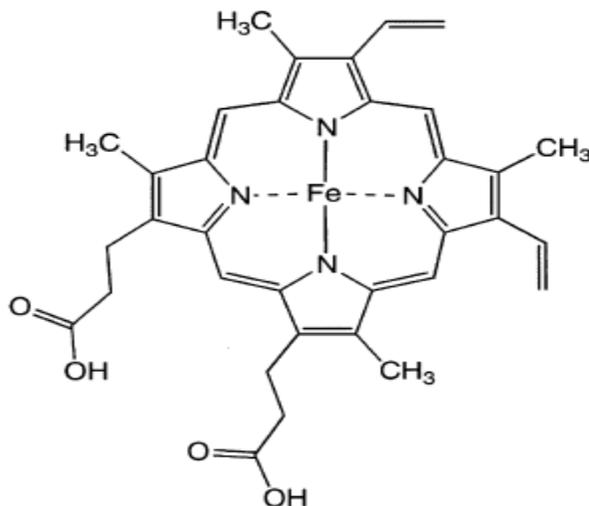


Fig.18. Estructura del grupo hemo de la peroxidasa (peroxidasa de rábano) (Hamid, 2009).

La actividad de las peroxidasas se ha encontrado en plantas, y se clasifican como peroxidasas tipo III, estas participan en dos procesos catalíticos: i) Regular el ciclo peroxidativo reduciendo H_2O_2 a H_2O transfiriendo electrones a moléculas donadoras como fenoles, precursores de lignina o de metabolitos secundarios; ii) en un ciclo hidroxílico para generar ERO's (Especies Reductoras de Oxígeno), ayudando en la adaptación de éstas a ambientes más oxigenados o en la formación de estructuras rígidas dentro de la planta⁴⁶.

La aplicación de las peroxidasas va desde la remoción de compuestos fenólicos de aguas residuales, decoloración de disoluciones de colorantes sintéticos, deodorización de estiércol y como biosensor en inmunoensayos⁴⁷. En síntesis orgánica cataliza la oxidación (acoplamiento oxidativo) de varios sustratos entre los que se encuentran los fenoles, usando H_2O_2 u otros peróxidos orgánicos^{47,48}, polimerización, hidroxilación y nitración enzimática de fenoles, así como sulfoxidación asimétrica de tioéteres⁴⁸.

En este sentido, han sido bastantes los esfuerzos por utilizar las peroxidasas en síntesis orgánica para obtener moléculas nuevas con alguna aplicación, actividad biológica o hasta en pasos sintéticos hacia la síntesis total de productos naturales,

así como para entender los factores por el que catalizan las reacciones de acoplamiento oxidativo de fenoles.

Las peroxidasas catalizan reacciones de acoplamiento debido a la generación de radicales en los sustratos utilizados. Scott (1965)⁴⁹ propuso que las peroxidasas son capaces de generar productos ópticamente activos cuando se utilizan sustratos “naturales” a la enzima, aunque el uso de sustratos “no naturales” forma productos variados del acoplamiento de los distintos radicales generados por la enzima, concluyendo así que la enzima no es regioselectiva y que las peroxidasas solo generan los radicales en la superficie de la enzima. Danner (1973)⁵⁰ estudio los aspectos cinéticos de varios sustratos fenólicos y encontró indicios del que radical formado por el sitio activo de la enzima, se mantiene unido al sitio activo durante el proceso de acoplamiento, pues en los compuestos utilizados sólo se identificó la presencia de un solo producto. De esta manera, sugirieron que esto se debía a que los productos se oxidan una vez que son formados, así como el sustrato fenólico se une a la enzima a través del fenol y no otra posición del anillo.

El mecanismo por el cual las peroxidasas de rábano (PR) catalizan reacciones de acoplamiento ha sido estudiado extensivamente. De esta manera, puede ser representado por el siguiente mecanismo.



Así como el proceso catalítico de la peroxidasa para formación de los radicales utilizando ácido ferúlico como sustrato reductor (Fig. 19).

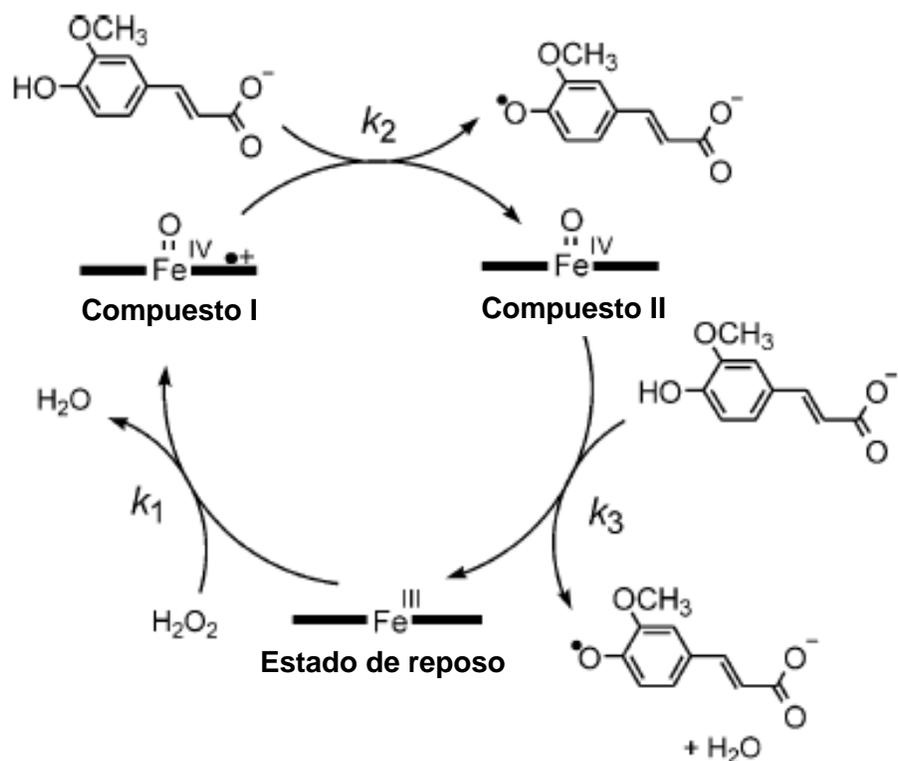


Fig. 19. Ciclo catalítico de la peroxidasa de rábano (Veitch, 2004).

El proceso catalítico implica la oxidación Fe(III) conocido como estado de reposo de la enzima por parte de un agente oxidante (H_2O_2), para ser oxidado a Fe(IV) denominado compuesto I y la formación de un catión radical dentro de la porfirina, seguido de una reducción del compuesto I, el cual requiere de un agente reductor (Ej. Ácido férulico o compuesto fenólicos) para dar como resultado el compuesto II, debido a que los compuestos I y II tienen un estado de oxidación mayor al del estado de reposo pueden servir como oxidantes; se ha estimado que el potencial redox de los compuestos está cercano a +1 V. Durante el proceso catalítico los agentes reductores de los compuestos I y II se convierten en especies oxidadas por una TES y genera así las especies radicales de los sustratos que llevan a cabo acoplamiento oxidativo.

Durante el acoplamiento oxidativo los sustratos reductores pueden acoplarse en dímeros, trímeros u oligómeros⁵¹ Esta particularidad hace interesante a las peroxidases para obtener dímeros, los cuales promueven la generación de

polifenoles basados en medios biológicos, así como nuevas moléculas que tengan una importante actividad biológica.

Los esfuerzos por obtener dímeros usando peroxidadas han sido intensamente trabajados pues proveen de una herramienta sintética “verde” para obtener moléculas novedosas a partir de compuestos fenólicos. Chioccara (1993)⁵² realizó la oxidación de tres fenil propanoides (Fig. 20) utilizando peroxidasa de rábano (PR) en un sistema de mezclas de disolventes (Metanol/H₂O) a un pH= 3-7.4, obteniendo los dímeros en mayor proporción que estaban acoplados en un sistema β-5 y que todos los compuestos presentaban dos centros quirales, así como la estereoquímica que presentaban eran *trans*; así como también identificaron en menor proporción productos acoplados mediante un sistema β-O-4. Al cambiar las condiciones de las reacciones: el pH óptimo para tener los mayores rendimientos era 3. A su vez, el efecto del disolvente en una proporción de 1:1 o metanol en mayor proporción mostró que el acoplamiento β-O-4 de los compuestos aumentaba el rendimiento de éstos.

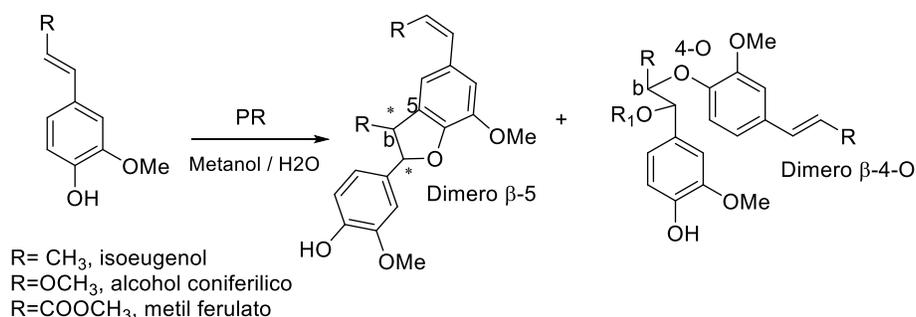


Fig. 20. Esquema del acoplamiento oxidativo de isoeugenol, alcohol coniferílico y metil ferulato (Chioccara, 1993).

La reacción de acoplamiento de fenol, aportó datos sobre el mecanismo de formación de radicales fenólicos en el acoplamiento oxidativo, al hacer reaccionar fenol con PR en presencia de H₂O₂, así fue posible aislar 10 productos que precipitaron en el medio de reacción los cuales se separaron mediante centrifugación y fueron identificados como los productos de acoplamiento *orto,orto*-difenol, *para,para*-difenol, 2,4-difenol, *p*-fenoxifenol, *o*-fenoxifenol, *o,p*-

difenol, 4-(4-fenoxifenoxi)fenol⁵³, en concordancia con los aspectos mecanísticos para el acoplamiento oxidativo de fenoles.

Posteriormente, Setälä⁵⁴ sintetizó el sinapato de metilo a partir de vainillina, para lo cual bromo y metoxilo la vainillina para obtener siringaldehído, el cual mediante una reacción de Knoevenagel con ácido malónico y posterior esterificación de Fischer con metanol obtuvo el éster esperado, con el que realizó reacciones de acoplamiento con PR y peróxido de hidrógeno como oxidante, la síntesis fue llevada en medios acuosos a pH= 4 (buffer de citratos) en mezcla con acetona y metanol (Fig. 21), el acoplamiento en medios acuoso con acetona dio los productos de dimerización β - β y subsecuente aromatización del intermediario metenquinona. Sin embargo, en medios acuosos metanólicos dio como resultado espiro dímeros diastereoisoméricos en los cuales, una vez realizado el acoplamiento β - β el intermediario metenquinona sufren una adición de metanol, seguido de un ataque nucleofílico por parte del anillo aromático al estar la funcionalidad quinona protonada debido al medio impuesto por el buffer.

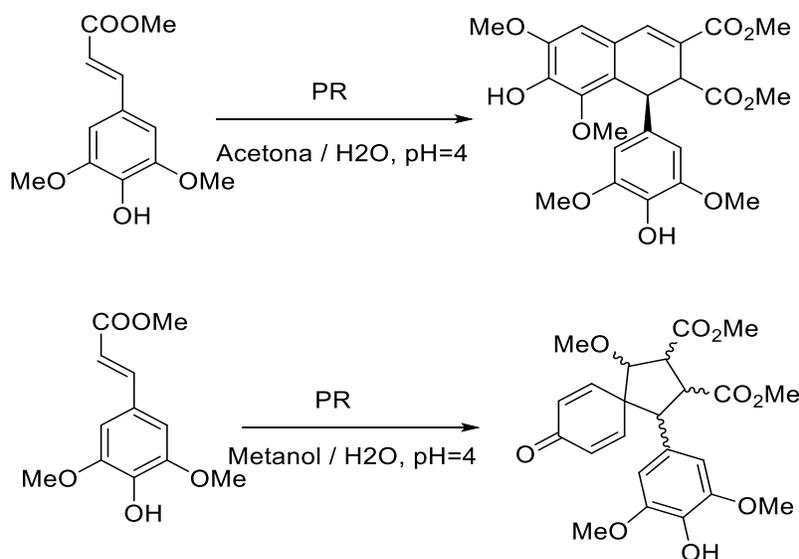


Fig. 21. Esquema de reacción para la síntesis del dímero β - β y espiro dímeros del metil sinapato (Setälä, 1994).

Sridhar (1997)⁵⁵ realizó el acoplamiento oxidativo de 2-naftoles para obtener estructuras diméricas (1,1-binaftil-2,2'-dioles) con peroxidasa de rábano, al ser

estos auxiliares quirales en síntesis orgánica, la reacción oxidación es comparable con métodos tradicionales de obtener binaftoles en buenos rendimientos (>70%). No obstante, Schmitt (1998)⁵⁶ efectuó el mismo estudio para la síntesis de biarilos, incluyendo el 2-naftol y observó que la peroxidasa no era selectiva pues se obtienen sólo mezclas racémicas en excesos enantioméricos pobres bajo diferentes condiciones (pH, temperatura, disolvente) contraponiendo los resultados obtenidos por Sridhar. Para la síntesis de un fragmento biarilo perteneciente a la vancomicina⁵⁷, tres diferentes derivados aminoácidos aromáticos (Fig. 22) fueron hetero-acoplados con peroxidasa de soya y PR, para obtener principalmente uniones C-O en rendimientos moderados dando lugar al fragmento esperados, aunque también acoplamiento C-C y homo-acoplamiento se encontraron en la mezcla de reacción.

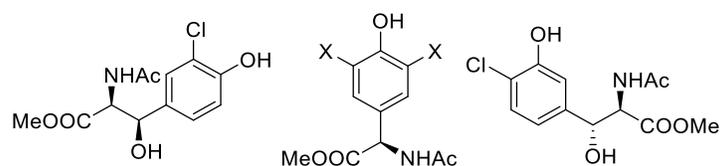


Fig. 22. Estructura molecular de aminoácidos hetero-acoplados (Malnar, 200).

Con base en el objetivo de obtener compuestos fenólicos con actividad biológica, una serie de metoxi-*o*-fenoles fueron sujetos a oxidación con peroxidasa de soya⁵⁸, obteniendo dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros, donde se demostró que es posible obtener dímeros si las concentraciones de disolvente son bajas y que en condiciones ácidas pH igual o menor a 4 estos son favorecidos, y que a pH mayores se obtienen una serie de mezclas de dímeros y oligómeros.

Cuando se acoplaron enzimáticamente 3,4-dihidroxi fenilpropanoides con peroxidasa, sólo se obtuvieron los reactivos iniciales presumiblemente debido a que los radicales obtenidos por esta vía son rápidamente transformados a su derivado quinona más estable, aunque si se acoplaban los fenilpropanoides 4,5-dihidroxi-3-metoxi el resultado era la obtención de dímeros unidos en la forma 8-O-3⁵⁹.

La síntesis del alcohol dehidroconiferílico demostró que el acoplamiento oxidativo con peroxidasa puede ser enantioselectivo si el precursor fenilpropanoide es modificado con una función aminoácido al ser este un auxiliar quiral⁶⁰ (Fig. 23), el cual puede ser fácilmente hidrolizado al ácido correspondiente, que es reducido y posibilita no solo la obtención del alcohol sino de otros fenilcumaranos análogos en altos rendimientos y ópticamente puros.

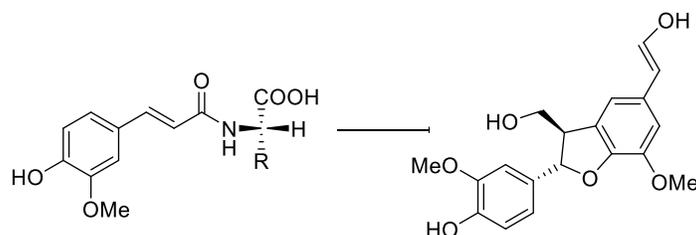


Fig. 23. Esquema del acoplamiento de fenilpropanoides modificados con un aminoácido utilizado como auxiliar quiral (Bolzacchini, 1998).

Guo(1998)⁶¹ utilizaron una ruta quimio-enzimática para la síntesis total de bastadinas, para lo cual acoplaron con PR derivados halogenados de tirosina y tiramina, logrando el acoplamiento C-O y obtener el bloque isoditirosina por síntesis enzimática como precursor de las bastadinas. Durante el trabajo, encontraron que el medio de reacción era importante al observar pues en un buffer de fosfatos pH=4 los productos de acoplamiento no fueron identificados, aunque en uno de acetatos pH=5 la reacción de oxidación procedía obteniendo rendimientos moderados. De la misma manera, el acoplamiento oxidativo con PR se realizó para la síntesis de americanol A e isoamericanol A, compuestos con actividad neurotrófica, acoplando ácido cafeico para obtener ácidos dicarboxílicos 1,4-dibenzodioxanos (Fig. 24) vía un acoplamiento C-O.

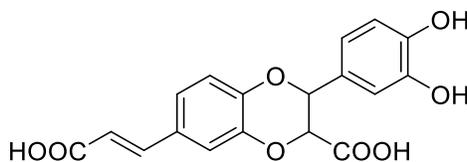


Fig. 24. Estructura de los ácidos dicarboxílicos 1,4-dibenzodioxanos (Guo, 1998).

El acoplamiento entre resveratrol y ácido ferúlico mediante oxidación con peroxidasa⁶² para determinar el efecto de estos como anticancerígenos dio como resultado un heterodímero (Fig. 25) el cual mostro un efecto anticancerígeno mayor a los de los monómeros.

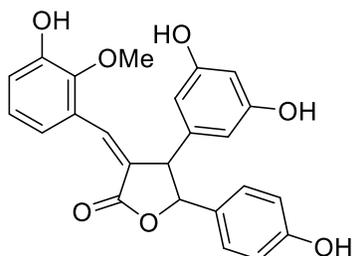


Fig. 25. Estructura del heterodímero obtenido entre el acoplamiento de ácido ferúlico y resveratrol (Bee-Bei, 2007).

Por otro lado se han generado diversas síntesis de lignanos, compuestos encontrados en plantas para entender completamente el proceso por el que deriva la lignificación en estructuras vegetales.

Karhunen (1995)⁶³ sintetizaron dos estructuras de dibenzodioxocinas (Fig. 26), realizando la oxidación de alcohol dehidrovainillínico y dehidropropilguaicol con isoeugenol en una relación 1:1 utilizando peroxidasa de rábano en presencia de H_2O_2 , aparentemente el acoplamiento C-O es el paso inicial de la reacción, dando lugar a una funcionalidad metenquinona, la cual se cicla intramolecularmente para formar el anillo de 8 miembro de las dibenzodioxocinas.

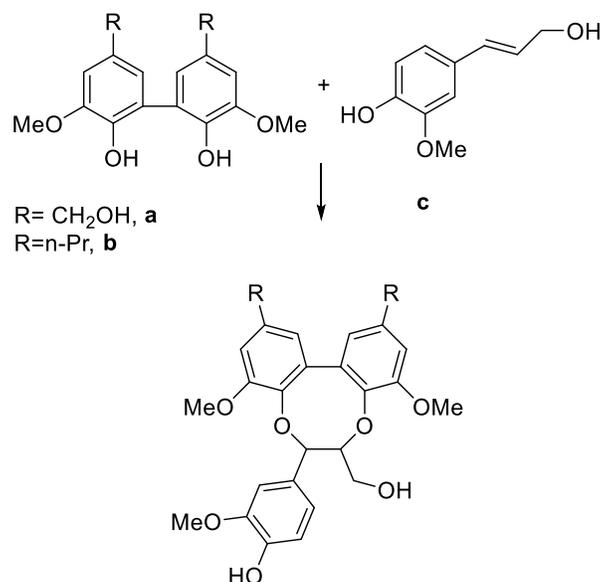


Fig. 26. Síntesis de benzodioxacinas. a) alcohol dehidrovainillínico, b) dehidropropilguaicol c) isoeugenol (Karhunen, 1995).

Para aportar evidencias de que los monómeros de ésteres de ácido ferúlico se incorporan a la lignina dentro de las paredes celulares de las plantas⁶⁴ dímeros de ácido ferúlico, principalmente los acoplados 5-5, alcohol coniferílico y precursores lignolíticos, se unieron en reacciones con PR utilizando H_2O_2 . De esta manera, se obtuvieron derivados acoplados que mostraban uniones C-C, C-O encontradas usualmente en reacciones de este tipo. Obtuvieron también formas de acoplamiento en la que la funcionalidad de ferulato se acoplaba a los precursores lignolíticos en una manera 8-5 y 8-O-4 (Fig. 27). De esta manera, se encontró tal a y como se incorporan los monómeros de éster del ácido ferúlico también se incorporan a la cadena polimérica de la lignina, al ser posible el acoplamiento en dos posiciones del polímero en crecimiento.

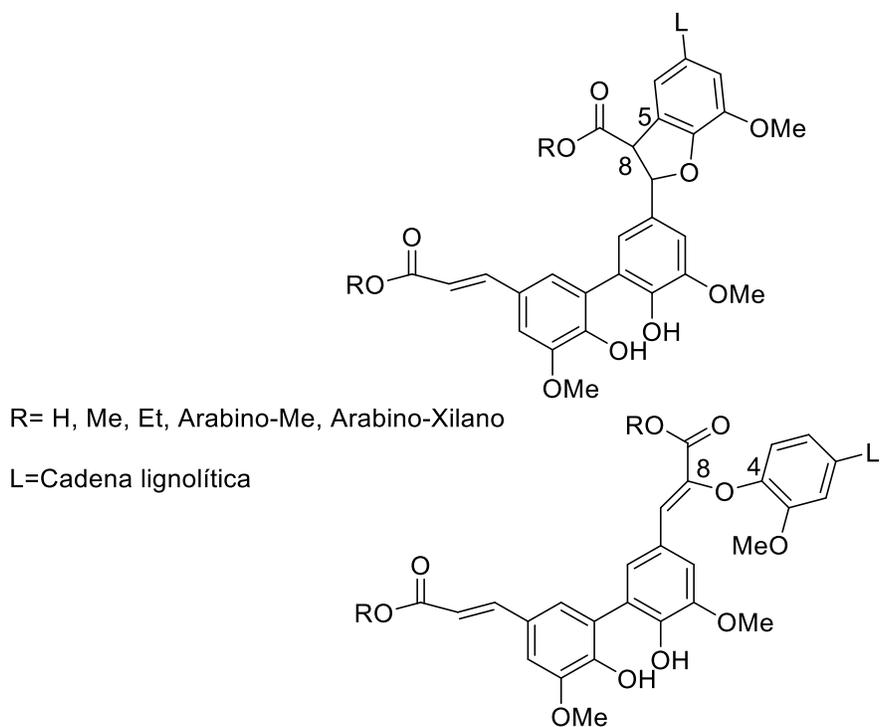


Fig. 27. Estructuras lignolíticas del acoplamiento de ésteres de ácido ferúlico (Quideau, 1997).

Syrjänen (1998)²⁸ evaluó los potenciales de oxidación de alcohol p-cumarílico, coniferílico y sinapílico (precursores lignolíticos) al acoplarlos con dímeros β -O-4 previamente sintetizados (Fig. 28). De esta manera, encontraron que los productos solo se acoplaban cuando estos tenían potenciales de oxidación semejantes, aunque los alcoholes se acoplaban entre ellos más rápidamente debido a que la posición C-5 tiene una mayor reactividad en comparación con los dímeros β -O-4, los cuales tienen un potencial más bajo y obtuvieron la recuperación cuantitativa de los dímeros β -O-4 sin transformación después de la reacción.

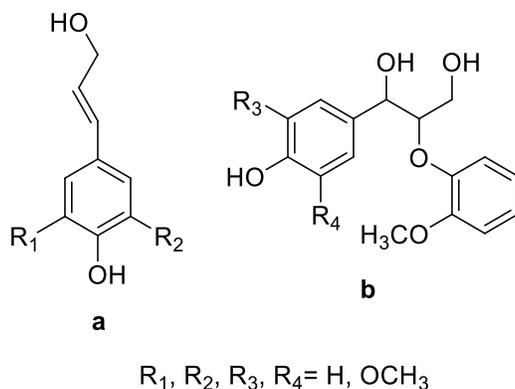


Fig. 28. Estructura de los alcoholes cumarílicos (a) y dímeros β -O-4 (b) (Syrjänen, 1998).

En otro estudio sobre la relación estructural encontrada en la lignina y el tipo de acoplamiento⁶⁵ efectuada en las plantas durante el proceso de lignificación, compuestos derivados de pinosinol fueron sintetizados obteniendo trímeros del acoplamiento entre alcohol coniferílico y dímeros coniferílicos acoplados 5-5 y 5-O-4 (Fig. 29). Observaron que el mecanismo de lignificación por el cual este se lleva a cabo no implica solo el acoplamiento entre dos monolignoles (alcohol coniferílico) y su posterior acoplamiento con el residuo lignolítico, sino que un monolignol se une al residuo lignolítico formando productos derivados de pinosinol 5-5 y 5-O-4, ampliando el conocimiento en el cual se produce el proceso de lignificación en plantas.

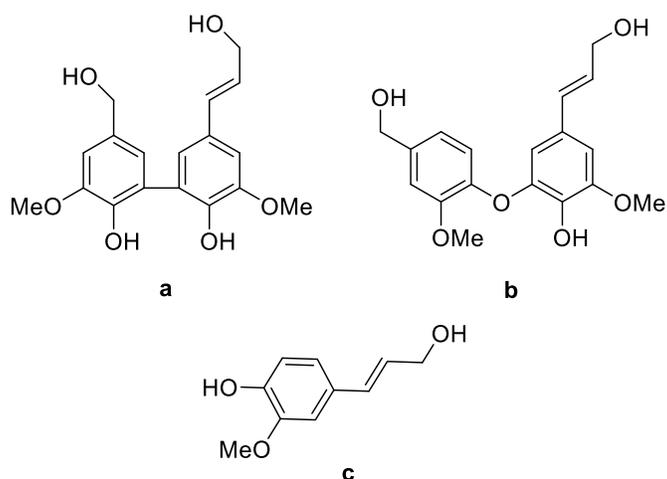


Fig. 29. Estructuras diméricas coniferílicas a) 5-5 , b) 5-O-4 y c) alcohol coniferílico (Yue,2012).

Saliu (2011)⁶⁶ estudió la reacción de hetero-acoplamiento con PR de ésteres de metilo de ácidos hidroxicinámicos, donde obtuvieron una serie de dehidrobenzofuranos, los cuales tienen estructuras análogas al 3',4-di-O-metilcedrusin (Fig. 30) producto natural de interés biológico, de la misma manera realizaron la síntesis selectiva⁶⁰ de estos nuevos derivados debido a que por otras rutas solo mezclas racémicas se obtenían logrando así excesos enantioméricos de los dehidrobenzofuranos.

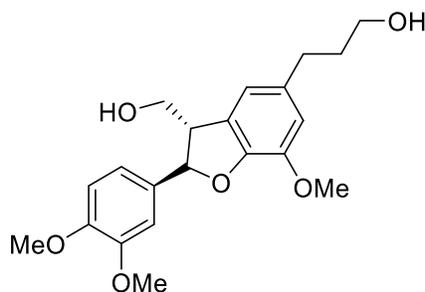


Fig. 30. Estructura del 3',4-di-O-metilcedrusin (Saliu, 2011).

Para entender cómo el mecanismo por el cual los tejidos de plantas son sanados, particularmente en especies de papa⁶⁷, se acoplaron los 4 ácidos hidroxicinámicos en mezclas equimolares y se obtuvieron heterodímeros del acoplamiento de ácido cafeico con ácido ferúlico y ácido sinápico. Sin embargo, en las otras mezclas solo se obtenían homodímeros de los ácidos por mecanismos previamente elucidados, a partir de lo cual determinaron la reactividad y la rapidez con que los ácidos eran dimerizados a sus correspondientes homodímeros siendo el orden el siguiente: ferúlico>cafeico>*p*-cumárico.

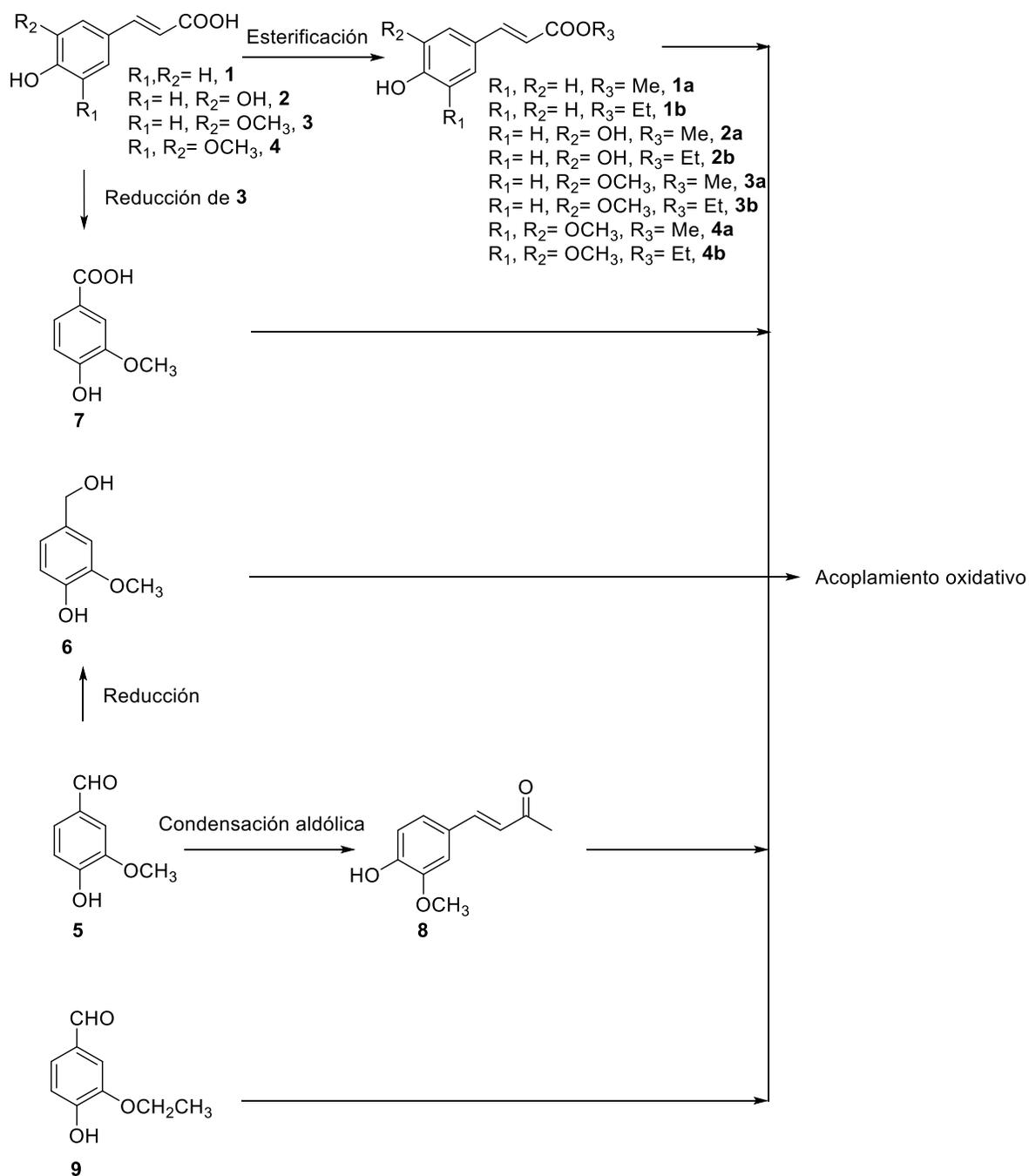
3. Objetivos

3.1 Objetivo general

- Estudiar las reacciones de acoplamiento *orto*-oxidativo con extractos de peroxidasa de rábano obtenidas de rábano rojo (*Rhapanus sativus*) como un método accesible y fácil para la obtención de dímeros de derivados vainilloides e hidroxicinamatos de alquilo.

3.2 Objetivos particulares

- Sintetizar los compuestos vainilloides y los hidroxicinamatos de alquilo.
- Realizar la reacción de acoplamiento con el extracto vegetal de peroxidasa de rábano cruda de rábano rojo de los compuestos vainilloides y los hidroxicinamatos de alquilo.
- Identificar los productos obtenidos por acoplamiento oxidativo de los derivados vainilloides e hidroxicinamatos de alquilo por resonancia magnética nuclear.



Esquema global de ruta sintética propuesta para la síntesis de los compuestos vainilloide e hidroxicinamatos de alquilo y productos de acoplamiento oxidativo.

4. Resultados y Discusión

En el presente trabajo evaluó la obtención de productos acoplamiento oxidativo de derivados fenólicos: derivados vainilloides y alquil ésteres de ácidos hidroxicinámicos mediante el uso de extracto vegetal de PR cruda obtenida de rábano rojo comercial (*Raphanus sativus*) como un método de síntesis biocatalizada.

En la primera etapa del trabajo se obtuvieron los ésteres de metilo y etilo de los ácidos hidroxicinámicos: sinapato de etilo (**1a**), sinapato de etilo (**1b**), cafeato de metilo (**2a**), cafeato de metilo (**2b**), ferulato de metilo (**3a**), ferulato de etilo (**3b**), sinapato de metilo (**4a**) y sinapato de etilo (**4b**) (Fig. 31). De igual manera, se obtuvieron derivados de la vainillina (**5**): alcohol vainillínico (**6**), ácido vainillínico (**7**), 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-buta-3-en-2-ona (**8**) y se propuso el acoplamiento del ácido 3-etoxi-4-hidroxibenzoico (**9**) (Fig. 32).

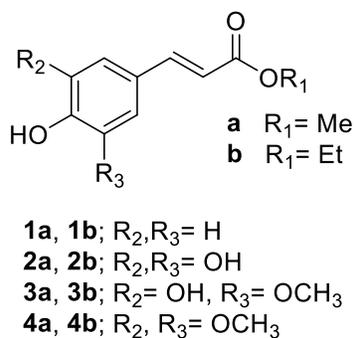


Fig. 31. Estructura de los ésteres de metilo y etilo de los ácidos hidroxicinámicos.

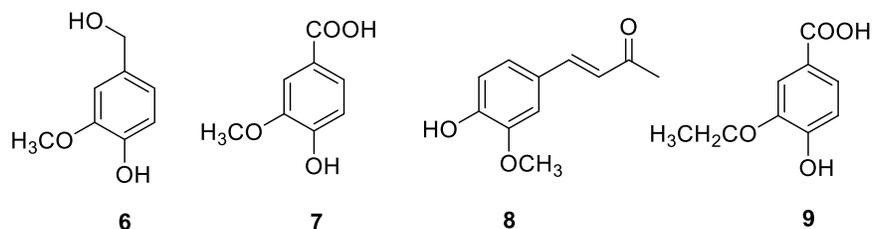


Fig. 32. Estructura de los derivados vainilloides

En una segunda etapa se evaluó el uso del extracto vegetal de PR cruda en los diferentes derivados fenólicos como biocatalizador de la reacción de acoplamiento oxidativo para obtención de productos de dimerización.

4.1 Síntesis de los ésteres de metilo y etilo de los ácidos hidroxicinámicos

La síntesis de los ésteres de metilo y etilo se llevó a cabo mediante la esterificación de Fischer (Fig. 33), para lo cual se hizo reaccionar el ácido hidroxicinámico correspondiente en un exceso del alcohol utilizado como agente acilante y como disolvente (metanol o etanol) en medio ácido según el producto deseado, a fin de evitar la hidrólisis del éster formado la reacción se llevó en condiciones de ausencia de agua utilizando malla molecular. Los tiempos de reacción se establecieron en un rango de 24 h en el caso de los ácidos hidroxicinámicos monosustituidos (ácido *p*-cumárico) y disustituidos (ácido cafeico y ácido ferúlico) y en 48 horas en el caso del ácido hidroxicinámico trisustituido (ácido sinápico). De esta manera se obtuvieron los ésteres de alquilo **1a**, **2a**, **1b**, **2b**, **3a**, **3b**, y **4b**, previa purificación por cromatografía en columna o recristalización. Los productos se caracterizaron por Resonancia Magnética de protón y carbón (RMN ^1H y ^{13}C).

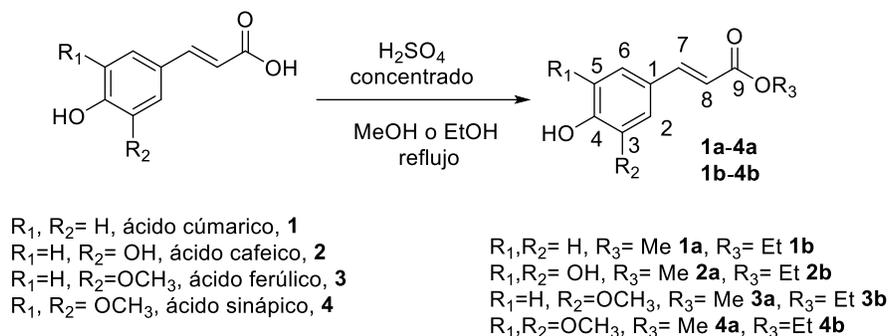


Fig. 33. Esquema de la reacción de esterificación de Fischer de los ácidos hidroxicinámicos.

El cumarato de metilo (**1a**) se obtuvo como un sólido blanco en un rendimiento de 94% posterior a su recristalización, rendimiento esperado para la síntesis de **1a**; en la espectroscopía de RMN de protón fue identificado en 3.72 ppm (partes por millón) el grupo del éster metílico, en 6.35 doblete, así como en 7.61 doblete para los hidrógenos en las posiciones 8 y 7 respectivamente con una constante de acoplamiento $J = 16$ Hz, correspondiente al isómero *trans*. En resonancia de carbono se identificó en 50.59 ppm el desplazamiento correspondiente al metilo del grupo éster, en 114.42 ppm el desplazamiento para el carbono en posición 8, así como en 144.45 ppm el desplazamiento para el carbono en posición 7 y finalmente en 166.45 ppm el carbonilo del éster.

Por otro lado, se logró sintetizar el cumarato de etilo (**2a**) como un sólido anaranjado en un rendimiento de 71.5%. Después de purificación por cromatografía en columna, en la caracterización por RMN de protón se identificó en 1.28 ppm un triplete correspondiente al CH_3 del grupo etilo, así como un cuadruplete en 4.19 ppm del metileno, en 6.34 ppm se encontró un doblete que se asignó al hidrógeno en posición 8 y en 7.60 ppm doblete para el hidrógeno en posición 7, ambos desplazamientos presentaban una constante acoplamiento de $J = 15.9$ Hz correspondiente al isómero *trans*. En RMN de carbono se identificó en 13.76 ppm el CH_3 , en 59.58 ppm el CH_2 , de la misma forma se observó en 166.47 ppm el desplazamiento para el grupo carbonilo de éster.

En el caso de la esterificación del ácido cafeico, se obtuvo el cafeato de metilo (**1b**) como un polvo amarillo en un rendimiento de 60%, este se caracterizó por RMN de protón; se observó en 3.72 ppm singulete para el desplazamiento correspondiente al metilo del éster, en 6.29 ppm doblete con una constante de acoplamiento $J= 15.9$ Hz correspondiente al hidrógeno en posición 8, así como en 7.55 ppm doblete con una constante de acoplamiento $J= 15.9$ Hz, correspondiente al isómero *trans*. En RMN de carbono se identificó en 50.59 ppm el metilo del éster, así como en 166.92 ppm el desplazamiento para el grupo carbonilo del éster.

La síntesis del cafeato de etilo (**2b**) dio como resultado un polvo blanco en un rendimiento de 58%, este se caracterizó por RMN de protón, donde en 1.57 ppm se observó un triplete correspondiente al CH_3 , así como en 4.18 ppm cuadruplete para el CH_2 del grupo etilo, en 6.27 y 7.53 ppm se encontró el desplazamiento de los hidrógenos para las posiciones 8 y 7 respectivamente, los cuales tiene una constante de acoplamiento de $J= 15.9$ Hz asignada al isómero *trans*. En RMN de carbono se observó en 13.76 ppm el carbono de metilo, en 59.57 ppm el carbono del CH_2 del grupo etilo, en 166.46 ppm se encontró el desplazamiento para el carbonilo del éster.

La síntesis del ferulato de metilo (**3a**) dio como resultado un sólido amarillo, previa purificación en cromatografía en columna en un rendimiento de 79.43%. El producto se identificó por RMN de protón donde se observó en 3.75 ppm un singulete correspondiente al metilo del éster, en 6.32 ppm doblete con una constante de acoplamiento $J= 15.9$ Hz y en 7.65 ppm doblete con una constante de acoplamiento $J= 15.8$ Hz propios de los hidrógenos en posición 8 y 7 constantes de acoplamiento propias del isómero *trans*. En RMN de carbono se observó en 51.2 ppm el desplazamiento de carbono correspondiente al metilo del éster, en 167.60 ppm el desplazamiento para el carbonilo del éster.

Por otro se obtuvo el ferulato de etilo (**3b**) como un sólido anaranjado que purificado por cromatografía en columna alcanzo un rendimiento de 94.4%, el éster se caracterizó por RMN de protón, se observó en 1.33 ppm triplete

correspondiente al CH₃, cuádruplete en 4.26 ppm correspondiente al CH₂ del grupo etilo del éster, en 6.29 ppm y 7.61 ppm los desplazamientos de los hidrógenos en posición 8 y 7 con constante de acoplamiento $J= 15.9$ Hz correspondientes al isómero *trans*. Por otro lado en la RMN de carbono se observó en 14.32 ppm el CH₃ y en 60.33 ppm el CH₂ del grupo etilo del éster, igualmente en 167.60 ppm se identificó el desplazamiento para el carbonilo de éster.

Finalmente la esterificación del ácido sinápico dio como resultado la obtención del sinapato de etilo (**4b**) en un rendimiento de 93.8%, el cual se caracterizó por RMN de protón donde observó en 1.34 ppm triplete para el CH₃, en 4.26 ppm cuádruplete correspondiente al CH₂ del grupo etilo del éster, así como en 6.30 ppm el desplazamiento para el hidrógeno en posición 8 con una constante de acoplamiento de $J= 15.8$ Hz y en 7.60 ppm desplazamiento para el hidrógeno en posición 7 con una constante de acoplamiento de $J= 15.9$ Hz, valor de la constante para el isómero *trans*. De modo similar en RMN de carbono se encontró en 14.31 ppm el desplazamiento para el CH₃, en 60.36 ppm el desplazamiento para el CH₂, finalmente en 167.60 ppm el desplazamiento para el carbonilo de éster.

A pesar de, haber obtenido el sinapato de etilo puro y en rendimiento aceptable, cuando se realizó la síntesis del sinapato de metilo (**4a**) no fue posible obtener un producto puro después de purificación de la mezcla de reacción debido a la complejidad de productos obtenidos durante la reacción¹² y posiblemente debido a esto, las pocas publicaciones donde se hace uso del sinapato de metilo como materia prima para las reacciones de acoplamiento oxidativo⁵⁴.

Las reacciones de esterificación de los ácidos hidroxicinámicos para la obtención de los metil y etil ésteres dieron como resultado 5 ésteres en rendimientos de buenos a excelentes Tabla 1.

Éster	Rendimiento %
<i>p</i> -cumarato de metilo	94.4
<i>p</i> -cumarato de etilo	71.5
cafeato de metilo	61.3
cafeato de etilo	58
ferulato de metilo	79.43
ferulato de etilo	94.4
sinapato de metilo	No determinado
sinapato de etilo	93.8

Tabla 1. Rendimientos obtenidos para los ésteres de los ácidos hidroxicinámicos

Cuando se compararon las reacciones de esterificación del ácido *p*-cumárico y el ácido cafeico el patrón de doble sustitución encontrado en el ácido cafeico tiene un resultado de disminuir la electrofilia del ácido carboxílico por efectos electrónicos de los dos hidroxilos presentes dentro del anillo aromático, lo que se observa en el menor rendimiento de los productos **2a** y **2b** con respecto a los demás ésteres sintetizados. Si se comparan los rendimientos de los ésteres sintetizados a partir de ácido ferúlico con los ésteres con mono, doble (dos grupos hidroxilo) o triple sustitución en el anillo aromático, la presencia del grupo hidroxilo y el grupo metoxilo incrementa la conjugación a través de la estructura incrementando la electrofilia del ácido carboxílico favoreciendo el ataque nucleofílico por parte del alcohol, lo que deriva en la obtención de los mejores rendimientos de los ésteres sintetizados.

Por otro lado, el caso de los productos de esterificación del ácido sinápico dio como resultado solo el aislamiento del éster **4b** en un excelente rendimiento

después de largos tiempos de reacción, el doble comparado con los tiempos para la esterificación de los ácidos hidroxicinámicos con uno o dos sustituyentes sobre el anillo aromático, aparentemente la triple sustitución afecta el ataque nucleofílico del alcohol al ácido carboxílico por un efecto estérico más que por un efecto electrónico. De esta manera, es posible obtener el éster o la mezcla de productos durante largos tiempos de reacción pero sin un control de los productos obtenidos.

La razón principal para el éxito de la reacción de esterificación de Fisher en medio ácido, debido a que en esta reacción existe el equilibrio ácido-éster (Fig. 34) y esta es reversible dando lugar a rendimientos bajos del éster; el uso de exceso de alcohol o ácido durante la reacción, así como la remoción de agua genera altos rendimientos del éster durante varias horas.

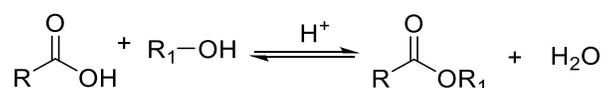


Fig. 34. Esquema del equilibrio ácido-éster

Así de esta forma, al ser utilizado exceso de alcohol y llevarse a cabo la remoción de agua del medio de reacción durante la experimentación. Se observó que los mayores tiempos de reacción para la obtención de los ésteres, se llevan a cabo cuando existe una triple sustitución en el anillo aromático posibilitando la obtención del éster e incluso altos rendimientos, para el caso de doble sustitución en el anillo aromático un grupo metoxi (ácido ferúlico) incrementa los rendimientos, comparables con los obtenidos para los ésteres del ácido *p*-cumárico con una sola sustitución durante tiempos de reacción iguales. Por otra parte, la longitud de la cadena alifática de los alcoholes utilizados parece no tener un relevancia en la obtención de los ésteres, pues se observó igual obtención de los ésteres con metilo y etilo independientemente de la longitud de la cadena del alcohol en buenos y altos rendimientos.

De esta manera se propone que para obtener los ésteres en cantidades adecuadas y relativamente puros, depende de la sustitución del anillo aromático y

de la naturaleza del ácido, más que de la longitud de la cadena alifática del alcohol utilizado como agente esterificante.

4.2 Síntesis de los derivados vainilloides (alcohol vainillínico, ácido vainillínico y 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-buta-3-en-2-ona)

Los derivados vainilloides o derivados de vainillina fueron sintetizados mediante la reducción con NaBH_4 de la vainillina, la oxidación de ácido ferúlico en un proceso biosintético con *Aspergillus niger*⁶⁸ y la síntesis de un derivado asimétrico de la curcumina.

La síntesis del alcohol vainillínico (**6**) se realizó por la reducción de la vainillina⁶⁹ (**5**) en un medio básico utilizando borohidruro de sodio (NaBH_4) (Fig. 35) como agente reductor en un proceso de condiciones suaves debido a que se llevó a cabo a temperatura ambiente y en cantidades mínimas de disolvente.

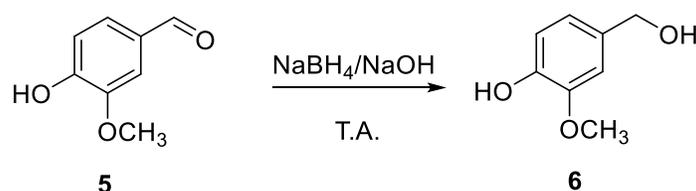


Fig. 35. Esquema de la síntesis del alcohol vainillínico.

De esta manera se aisló un sólido blanco en un rendimiento del 90%, el cual se caracterizó por resonancia magnética de protón y carbón. En RMN de protón se observó en 3.72 ppm singulete para el desplazamiento para los tres hidrógenos del metoxilo, en 4.34 ppm singulete para los dos hidrógenos del metileno, así como en 6.68 ppm y 6.85 ppm el desplazamiento de los hidrógenos de la anillo aromático de **6**. En RMN de carbón se encontró en 55.58 ppm del desplazamiento del carbono del metoxilo, en 62.98 ppm la señal correspondiente al carbono del metileno y en 133.45 ppm para el carbono en posición 1 del anillo aromático. Todas las señales encontradas para los hidrógenos y carbonos de **6**, están de acuerdo con datos de la literatura⁷⁰.

El caso de la obtención del ácido vainillínico (**7**) esta se llevó a cabo mediante la bioconversión de ácido ferúlico con *Aspergillus niger*. Cuando se utilizaba este hongo para llevar a cabo la reacción de descarboxilación de ácido ferúlico, el cual se encuentra en cantidades apreciables en el nejayote y es un residuo agroalimentario obtenido del proceso de nixtamalización de maíz, es posible obtener compuestos de valor agregado como lo son ácido ferúlico y sus derivados mediante biosíntesis⁶⁸. De esta manera, durante el proceso de descarboxilación del ácido ferúlico contenido en el nejayote se puede obtener 4-vinilguayacol. Sin embargo se encontró que en estudios de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) el micelio del hongo libre *Aspergillus niger*, no solo realizaba la descarboxilación del ácido ferúlico (**3**) dentro de la matriz (nejayote) y el 4-vinilguayacol (3-metoxi-4-hidroxiestireno) se obtenía como producto principal, sino que también se generaban pequeñas cantidades del compuesto **7** mediante la conversión reductiva del ácido ferúlico⁷¹ (Fig. 36).

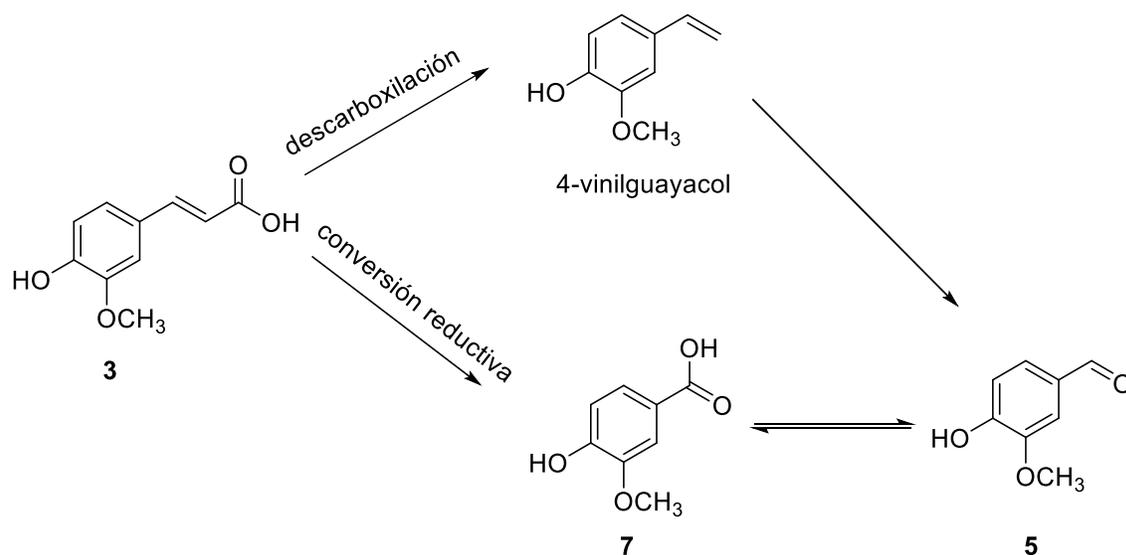


Fig. 36. Esquema de la conversión biosintética de ácido ferúlico por hongos (Priefert, 2001).

De este modo, se propuso obtener el derivado vainilloide **7** utilizando este método, haciéndolo de manera sintética sin una matriz vegetal y realizar la reducción con estándares de ácido ferúlico.

Por esta razón, seguimos el procedimiento experimental descrito para la oxidación con *Aspergillus niger* utilizando ácido ferúlico grado reactivo. Se colocó la biomasa en un medio adecuado para el crecimiento del micelio del hongo y una vez obtenida la biomasa tras un proceso de incubación del hongo por 24 h, se trasladó al medio de reacción donde se agregó el ácido ferúlico y se incubó la reacción por 24 h por cuadruplicado. Después, se realizó un análisis por CLAR (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución) por el método descrito en la Tabla 2.

Sistema			
Fase móvil	A: 4% Ácido acético B: Ácido acético/ Acetonitrilo/Metanol (1:5:94)		
Flujo	1mL/min		
Inyección	10 μ L		
Gradiente	Tiempo (min)	A	B
	0-30	100	0
	30-40	48	52
	40	100	0

Tabla 2. Método de CLAR para determinación de la bioconversión de ácido ferúlico a ácido vainillínico.

El perfil cromatográfico de la reducción del ácido ferúlico a ácido vainillínico (Fig 37) está de acuerdo en lo descrito en la literatura⁶⁸, se determinó en un tiempo de retención de 14.34 ± 0.01 minutos al ácido vainillínico, el cual se calculó en un rendimiento de 96.20% antes de la extracción.

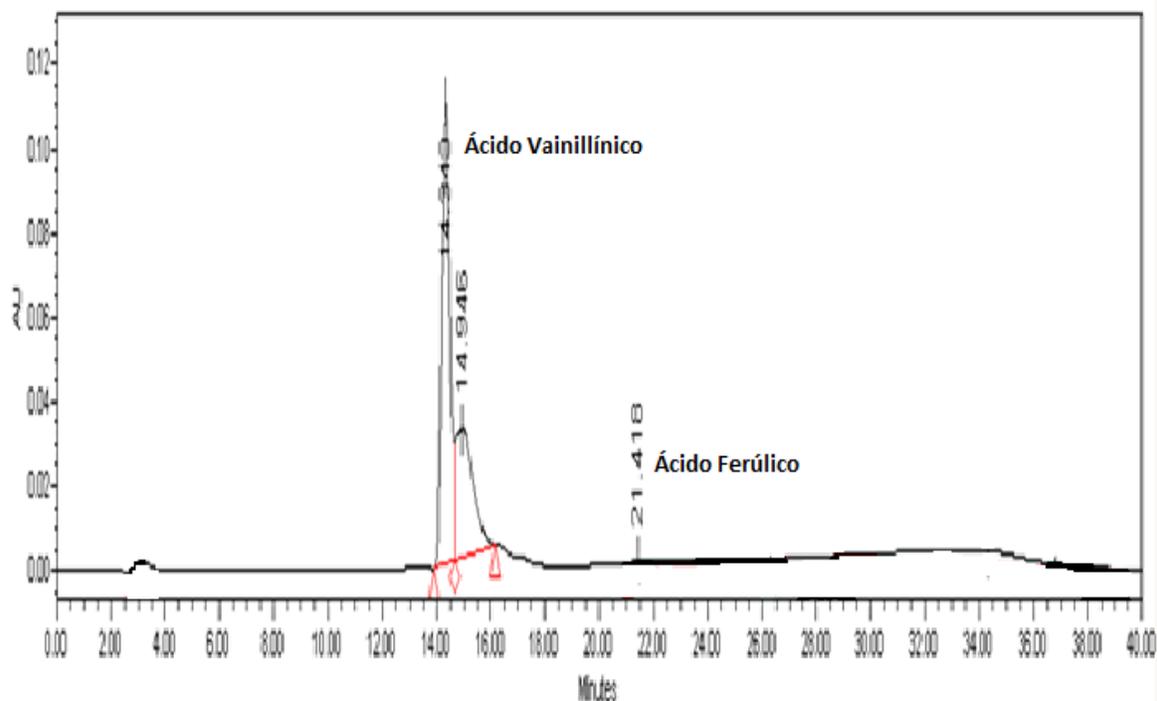


Fig. 37. Perfil cromatográfico de la conversión de ácido ferúlico a ácido vainillínico.

Una vez obtenido el perfil cromatográfico se aisló el ácido vainillínico como un sólido ligeramente amarillo, en un excelente rendimiento de 93.75%, después de la reacción de reducción del ácido ferúlico. No obstante el método para la obtención de **7** en la escala de grandes cantidades implica el crecimiento de cantidades mayores de biomasa, aunque se pueden obtener en bioreactores con el fin de escalar la reacción como método de obtención del ácido vainillínico biotecnológicamente. De cualquier modo, nuestros resultados demuestran que la reducción biosintética del ácido ferúlico es un método accesible y limpio el cual se realiza en condiciones suaves de reacción a 40°C y se producen mínimas cantidades de desechos durante el proceso, en comparación con los métodos químicos de oxidación para la síntesis de ácido vainillínico a partir de vainillina, la cuales hacen uso de óxido de plata y cantidades equimolares de hidróxido de sodio⁷², aunado a la producción de plata metálica después de terminada la reacción la cual debe ser removida del medio de reacción antes de la extracción completa del producto de oxidación junto con materia prima sin reaccionar cuando

se realizó la oxidación de la vainillina por este método, generando un producto de oxidación difícil de purificar y en bajos rendimientos.

De este modo, se propone que *Aspergillus niger* lleva a cabo los mecanismos de descarboxilación y reducción del ácido ferúlico, bajo dos condiciones experimentales diferentes. Por un lado como fue descrito el hongo sobre un soporte genera el producto de descarboxilación mayoritariamente y posiblemente debido a que el sustrato en estas condiciones solo la descarboxilasa actúa como catalizador de la bioconversión. Sin embargo, en conjunto con nuestra observación cuando intentamos la conversión reductiva del ácido ferúlico con el micelio de *Aspergillus niger* libre se encontró únicamente la producción de **7** en contraste con lo observado para el micelio soportado, esto posiblemente es atribuible a que en estas condiciones el ataque de hidruros a un intermediario quinona previa isomerización del ácido ferúlico, forma el ácido dihidroferúlico y posteriormente metabolizado a ácido vainillínico bajo condiciones aerobias⁷¹ como se propone en la conversión reductiva de ácido ferúlico por otros microorganismos (Fig. 38).

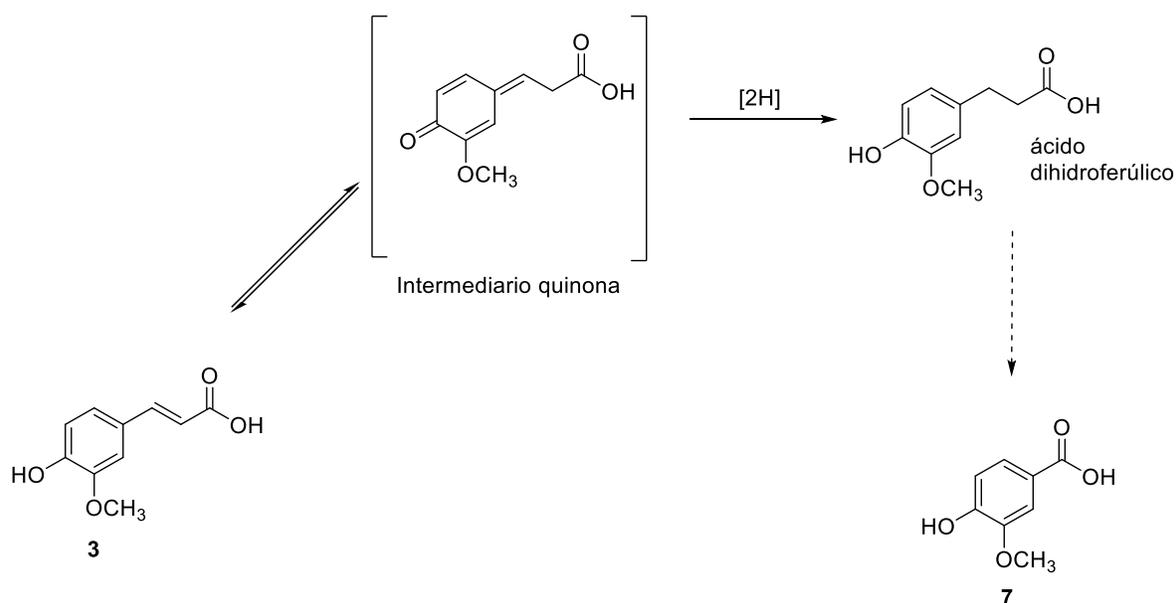


Fig. 38. Esquema del mecanismo propuesto para la conversión reductiva de ácido ferúlico con *Aspergillus niger* a ácido vainillínico (Priefert, 2001).

Para el caso del tercer derivado a partir de la vainillina se propuso la obtención de un derivado asimétrico de la curcumina, haciendo reaccionar la vainillina con acetona en medio básico en una reacción condensación aldólica típica en una modificación del procedimiento descrito en la literatura⁴⁵ (Fig. 39).

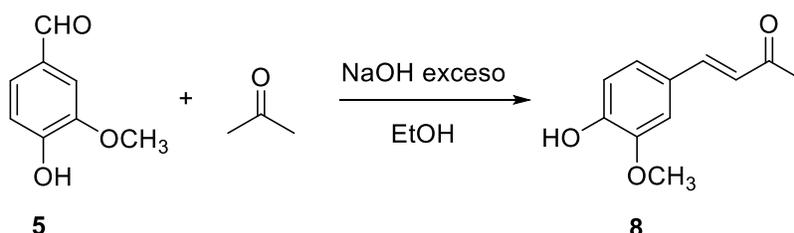


Fig. 39. Esquema de la reacción de condensación aldólica. Síntesis de la 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-buta-3-en-2-ona.

De esta manera, se obtuvo la 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-buta-3-en-2-ona (**8**) como un sólido café-verde, con un rendimiento del 55.15%, el cual se caracterizó por RMN de protón se encontró en 2.35 ppm singulete para el desplazamiento del metilo de **8**, en 3.85 ppm el desplazamiento para el grupo metoxi del anillo aromático, así como en 6.51 y 7.45 ppm dobletes con una constante de acoplamiento $J= 16$ Hz para la insaturación en la posición 3 de la cetona identificándose así el isómero *trans*; en 6.80 ppm doblete con una constante de acoplamiento $J= 7.7$ Hz para los hidrógenos en las posición 5 y 6 del anillo aromático.

Cuando se intentó sintetizar otros derivados de la curcumina condensando vainillina con acetofenona, dos equivalentes de vainillina y vainillina con 4-hidroxi-3-etoxibenzaldehído (**9**) (Fig. 39) se observó que la reacción no procedía en las condiciones descritas en la literatura⁴⁵ y solo la vainillina era recuperada al precipitar en el medio de reacción, así como una cantidad apreciable de un sólido blanco, posiblemente una sal sódica generada durante la reacción. Se pudo obtener el producto **8** al ser observado que cierta cantidad de este se generaba con las condiciones iniciales de reacción, y que agregando un exceso de NaOH y 3 equivalentes de acetona la obtención de **8** se incrementaba.

En el caso de los derivados de curcumina bajo las mismas condiciones de reacción descritas en la literatura para la condensación de vainillina:acetofenona, dos equivalentes de vainillina y vainillina:**9** (Fig. 40), los mismos efectos eran observados al obtenerse la vainillina después de la reacción junto con un sólido blanco como en la reacción de síntesis de **8**.

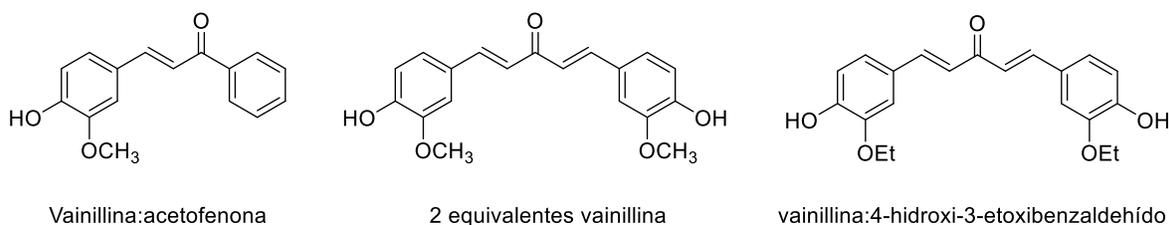


Fig. 40. Estructura de los derivados de curcumina a partir de vainillina

Asimismo, cuando efectuamos la modificación propuesta para la obtención de los derivados de curcumina adicionales no se observó mejora en la obtención de estos productos: una vez que se realizó el trabajo experimental no se aisló ningún producto para su identificación.

Las posibles causas de los bajos rendimientos pueden ser explicadas con base en las condiciones de reacción. En el caso de la síntesis de **8**, el carbanión formado en el tratamiento de la acetona con NaOH es menos estable que el ion enolato, al ser el oxígeno un átomo capaz de soportar la carga negativa generada (Fig. 41), la mayor estabilidad el ion enolato explicaría adecuadamente la formación de la sal sódica obtenida durante la reacción, también demostrando que el carbanión formado es rápidamente transformado al ion enolato y reduciendo la posibilidad de ataque nucleofílico por parte del poco estable carbanión.

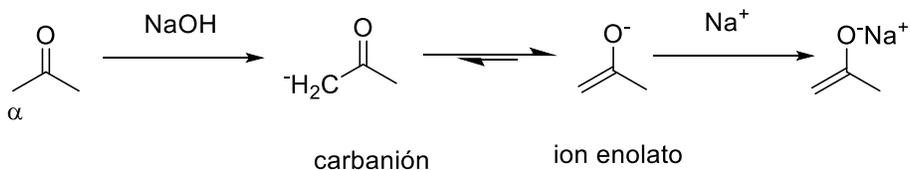


Fig. 41. Esquema del equilibrio carbanión-ion enolato.

De la misma manera pueden ser explicados los casos de las síntesis de los intentos de condensación al ser el paso clave de la reacción la desprotonación de la acetona, así como en el caso de la condensación con acetofenona, en todos los casos es indispensable la formación del carbanión para obtener el nucleófilo adecuado que lleve a cabo el ataque al grupo aldehído de la vainillina. Por otra parte, la sal sódica posiblemente obtenida es la formada por el ion enolato. En el caso de la condensación con acetofenona otro aspecto relevante es la poca acidez de los hidrógenos alfa al carbonilo ($pK_a=21.55$) los cuales son menos ácidos que los de la acetona ($pK_a=19$) y la probabilidad de formación del carbanión requerido es menor que en el caso de la condensación con acetona. Por otro lado, las condensaciones de dos equivalentes de vainillina con 4-hidroxi-3-etoxibenzaldehído una vez producido el intermediario para la obtención de los derivados de curcumina, sigue una vía semejante a la del producto **8**. Posiblemente la menor acidez los hidrógenos alfa al carbonilo de este intermediario con respecto a la acetona o acetofenona imposibilita la segunda condensación con otro equivalente de acetofenona o 4-hidroxi-3-etoxibenzaldehído (Fig. 42).

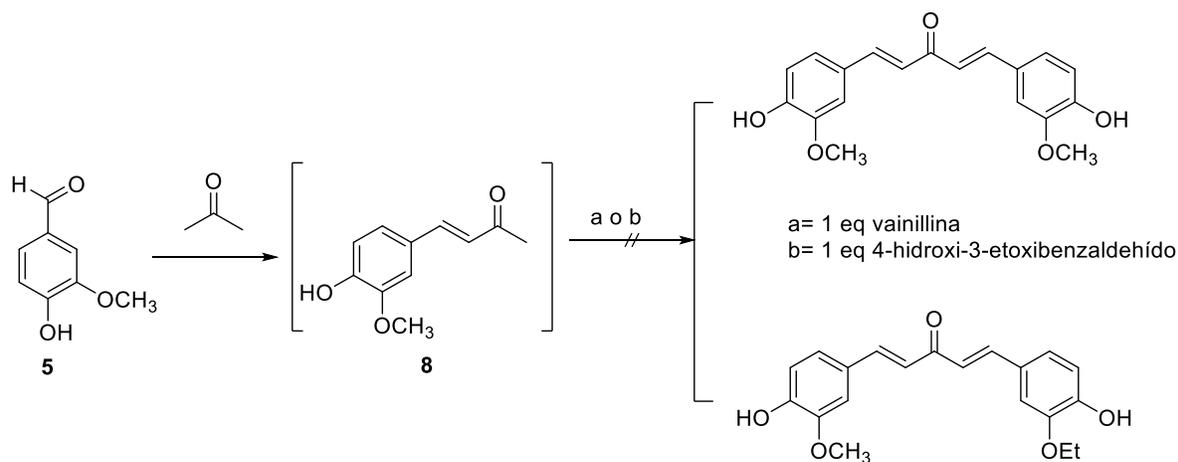


Fig. 42. Esquema de reacción de los derivados de curcumina con 2 eq vainillina y 4-hidroxi-3-etoxibenzaldehído.

4.3 Acoplamiento oxidativo de los ésteres de ácidos hidroxicinámicos y derivados vainilloides

La PR en su forma pura se ha utilizado ampliamente en reacciones de acoplamiento oxidativo de una diversidad de compuestos fenólicos. Sin embargo son pocos los trabajos donde el uso de extractos vegetales que contienen peroxidasas se ha utilizado como catalizador de la reacción de acoplamiento de fenoles^{73,74}. En nuestro equipo de trabajo se ha comprobado que la peroxidasa extraída de diversas fuentes vegetales promueve el acoplamiento de fenoles^{75,76}, en este sentido se utilizó el extracto vegetal crudo de PR de rábano rojo.

El acoplamiento oxidativo de los ésteres **1a**, **1b**, **2a**, **2b**, **3a**, **3b**, **4b** con el extracto vegetal (actividad enzimática= 1.35 U/mL⁷⁶) se llevó a cabo en un medio acuoso a pH=4 en buffer de acetatos. El pH en el que se realizaron las reacciones de acoplamiento oxidativo es el óptimo encontrado para la reacción de acoplamiento con extractos vegetales que contienen peroxidasas⁷⁵, así como con enzima comercial^{52,54,58}; debido a la poca solubilidad de los ésteres en el medio acuoso se utilizó un co-solvente que en todos los casos fue acetona, la cual se agregó hasta completa solubilidad del éster en el medio, una vez se tenía un medio homogéneo para la reacción, se agregó una solución de peróxido de hidrógeno al 3% para iniciar la reacción dando como resultado el compuesto **I** dentro del ciclo catalítico de la peroxidasa para cada uno de los ésteres evaluados (Fig. 19), el cual genera el radical fenólico intermediario para las reacciones de acoplamiento.

De esta manera, se realizó el acoplamiento de los hidroxicinamatos dando como resultado los productos de acoplamiento oxidativo de los ésteres **3b** y **4b** los cuales se obtuvieron como precipitados dentro del medio de reacción, facilitando su separación por filtración, estos se caracterizaron por RMN de protón y carbón.

El producto de acoplamiento del etil ferulato fue identificado como el (E)-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-7-metoxi-5-(3-metoxi-3-oxoprop-1-enil)-2,3-dihidrobenzofuran-3-carboxilato de etilo⁷³ (**3'b**) el cual es un compuesto

dihidrobencofurano lignolítico (Fig. 43), que se obtuvo como un sólido café en un rendimiento de 12.82%.

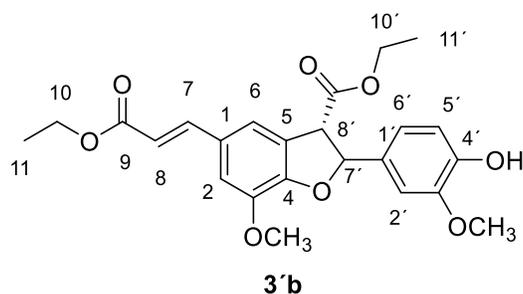


Fig. 43. Estructura del producto de acoplamiento del ferulato de etilo (Modificado de Moussoni, 2011).

Así mismo, se identificaron las señales correspondientes en RMN de protón y carbón con base en la literatura para los productos esperados de la reacción^{73,77}. En RMN de protón se observó en 3.76 ppm singulete correspondiente al metoxilo de la posición 3, en 3.84 ppm singulete correspondiente al metoxilo en posición 3', en 4.51 doblete con una constante de acoplamiento $J= 8$ Hz para el hidrógeno en la posición 8' y en 5.91 ppm doblete con una constante de acoplamiento $J= 8$ Hz para el hidrógeno en posición 7' asignaciones reportadas para el enantiómero con configuración *E*, en 6.55 ppm doblete con una constante de acoplamiento $J= 15.9$ Hz para el hidrógeno de la posición 8, así como en 7.62 ppm doblete con una constante de acoplamiento $J= 16$ Hz para el hidrógeno en posición 7.

Por otro lado, en RMN de carbono se observaron las 24 señales correspondientes al dímero, se observó en 14.02 y 14.22 ppm los metilos de las posiciones 11 y 11', en 54.18 ppm el carbono terciario correspondiente a la posición 7', igualmente en 87.23 ppm el carbono terciario correspondiente a la posición 8' los cuales son carbonos generados de la ciclación del acoplamiento del radical fenólico en posición 5 y el radical fenólico en posición 8, en 55.63 y 55.92 ppm el carbono correspondientes a los metoxilos de les estructura, en 59.80 ppm el metileno de la posición 10', en 61.32 ppm el metileno de la posición 10, en 126.21 ppm el carbón aromático de la posición 5 y en 149.35 ppm el carbón aromático de la posición 4.

De la misma manera, cuando se realizó la reacción de acoplamiento del éster **4b** se obtuvo un sólido café en un rendimiento del 11.13%, este se caracterizó por resonancia magnética nuclear, y fue identificado como el 6-hidroxi-1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-5,7-dimetoxi-1,2-dihidronaftalen-2,3-dicarboxilato de dietilo⁷⁸ (**4'b**) (Fig. 44).

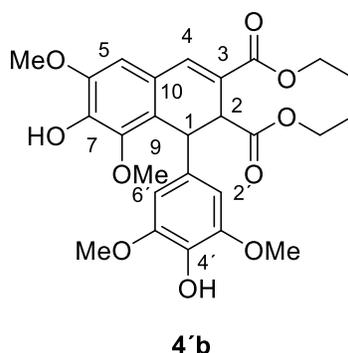


Fig. 45. Estructura del producto de acoplamiento del sinapato de etilo (Setälä, 1999).

El análisis de los espectros demostró en RMN de protón una señal en 4.13 ppm multiplete para el desplazamiento del hidrógeno en posición 2, en 4.81 ppm singulete para el hidrógeno en la posición 1, en 7.63 ppm singulete para el desplazamiento del hidrógeno en posición 4, en 3.60 ppm singulete para el desplazamiento de los hidrógenos de los metoxilos en posición 8, así como en 7.05 ppm singulete para el hidrógeno en posición 5. En RMN de carbono se observaron 22 señales correspondientes a los reportados para la estructura⁷⁸, en 31.27 ppm el desplazamiento para el carbón terciario en posición 1 y en 46.11 ppm el desplazamiento para el carbón terciario en posición 2 los cuales se generan de la ciclación de los radicales fenólicos en posición 8 del sinapato de etilo previo acoplamiento de estos, en 137.31 ppm el desplazamiento para el carbono en posición 4, así como en 166.00 ppm señal correspondiente al grupo carboxilo del éster en posición 3 y en 171.6 ppm señal correspondiente al grupo carboxilo del éster unido a la posición 2.

Cuando realizamos la reacción de acoplamiento de los ésteres **1b**, **2a**, **2b**, **3a** y **4a**, no se obtuvieron resultados semejantes al acoplamiento de **3b** y **4b**. Sin embargo,

se purificaron las mezclas de reacción por cromatografía en capa fina preparativa, a fin de identificar algún producto de acoplamiento. Durante el análisis de la espectroscopía de las reacciones de acoplamiento de ésteres solo fue posible identificar a través de RMN de protón y carbón el dímero (E)-2-(4-hidroxifenil)-5-(3-metoxi-3-oxoprop-1-enil)-2,3-dihidrobenzofuran-3-carboxilato de metilo⁷³ (**1'a**) (Fig. 45) como producto de acoplamiento del éster **1a**, el cual se purificó a partir de 53.7 mg de mezcla purificada se obtuvo en un rendimiento de 11.16% (6.4 mg).

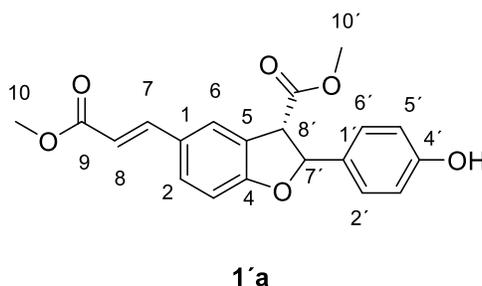


Fig. 45. Estructura del producto de acoplamiento del *p*-cumarato de metilo (Moussoni, 2011).

Por tanto, se observó en RMN de protón en 4.26 ppm doblete con una constante de acoplamiento $J = 7.5$ Hz para el hidrogeno en posición 8' y en 6.08 ppm doblete con una constante de acoplamiento $J = 7.5$ Hz para el hidrogeno en posición 7' asignaciones reportadas para el enantiómero *E*, también en 6.31 ppm doblete con una constante de acoplamiento $J = 16$ Hz para el hidrógeno en la posición 8 y en 7.65 ppm doblete con una constante de acoplamiento para el hidrógeno en la posición 7. Los resultados observados en la resonancia están en concordancia con la literatura⁷³.

La reacción de acoplamiento de los ésteres **1a** y **3b** realizados con extracto vegetal de PR cruda de rábano rojo da como resultado el acoplamiento de los radicales formados en las posiciones 5 y 8 de los ésteres como productos principales y los productos formados son explicados mediante en el siguiente mecanismo propuesto por Moussoni⁷³ (Fig. 46) para la formación de los ésteres de metilo del ácido *p*-cumárico y ferúlico.

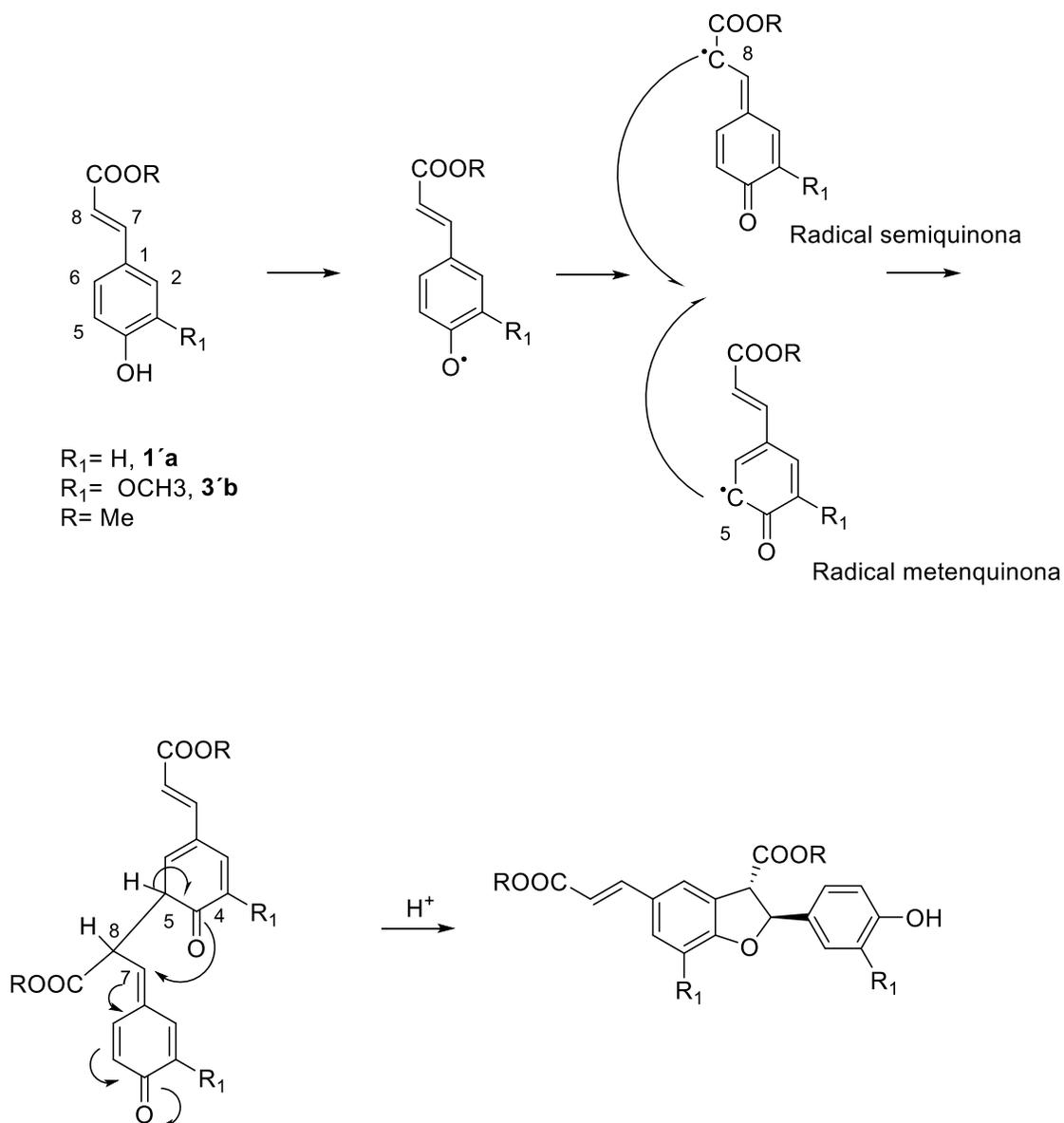


Fig. 46. Esquema del mecanismo propuesto para la formación de los dímeros de los ésteres metilo y etilo del ácido *p*-cumárico y ferúlico. (Modificado de Moussoni, 2011).

El primer aspecto una vez formado el radical fenólico por la peroxidasa, es el arreglo de este radical para la formación del radical semiquinona sobre la posición 8 y el radical metenquinona sobre la posición 5, los cuales se acoplan generando un nuevo enlace $\text{C}_8\text{-C}_5$ entre el radical semiquinona y metenquinona, seguido de la ciclación regio selectiva para dar una estructura más estable por el ataque

nucleofílico del oxígeno del carbonilo en posición 4 de la metenquinona al carbono en posición 7 de la semiquinona, dando lugar a la formación de los dihidrobenzofuranos. En el caso de los ésteres de metilo del ácido *p*-cumárico y ferúlico, la posición 5 es favorecida para la formación de un radical medianamente estable, de la misma manera que ha sido observado en el acoplamiento de la vainillina para la obtención de la divainillina⁷⁹. Si se analiza los posibles acoplamientos que se podrían observar durante la reacción, se observa que las formas resonantes del radical fenólico a través de las estructuras de los ésteres son cuatro formas en las existen 2 formas resonantes con un radical terciario (formas resonante 2 y 3) (Fig. 47). Estos últimos son radicales más estables que el originado en el oxígeno o en el observado para la forma resonante 4, siendo esperado el acoplamiento de estos debido a la estabilidad como es observado para la formación de radicales (estabilidad de radicales sobre carbono $3^\circ > 2^\circ > 1^\circ$), los cuales son efectos electrónicos de la molécula a considerar. No obstante, si consideramos los efectos estéricos de los radicales formados, el acoplamiento de la forma resonante 3 estaría imposibilitado por el volumen de los sustituyentes alrededor del radical (Fig. 48, a). De igual, la forma resonante 2 al ser una de los más estables por ser un radical secundario, se esperaría un acoplamiento 5-5 (Fig. 48, b), la cual no es observada durante el acoplamiento de **1a** y **3b**, posiblemente debido también a factores estéricos sobre el radical.

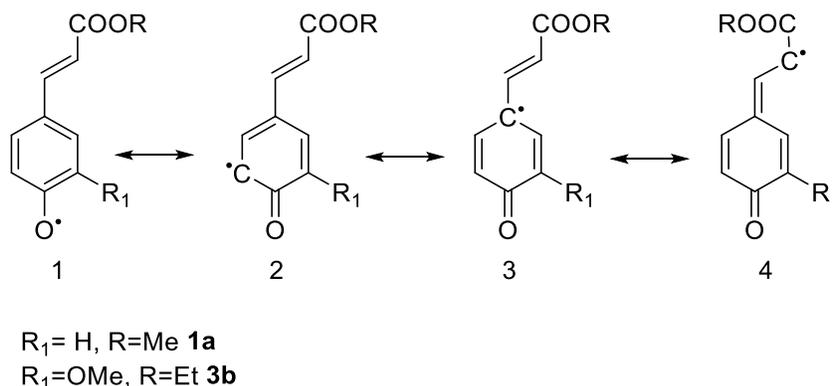


Fig. 47. Formas resonantes del radical formado por la PR para los ésteres **1a** y **3b**.

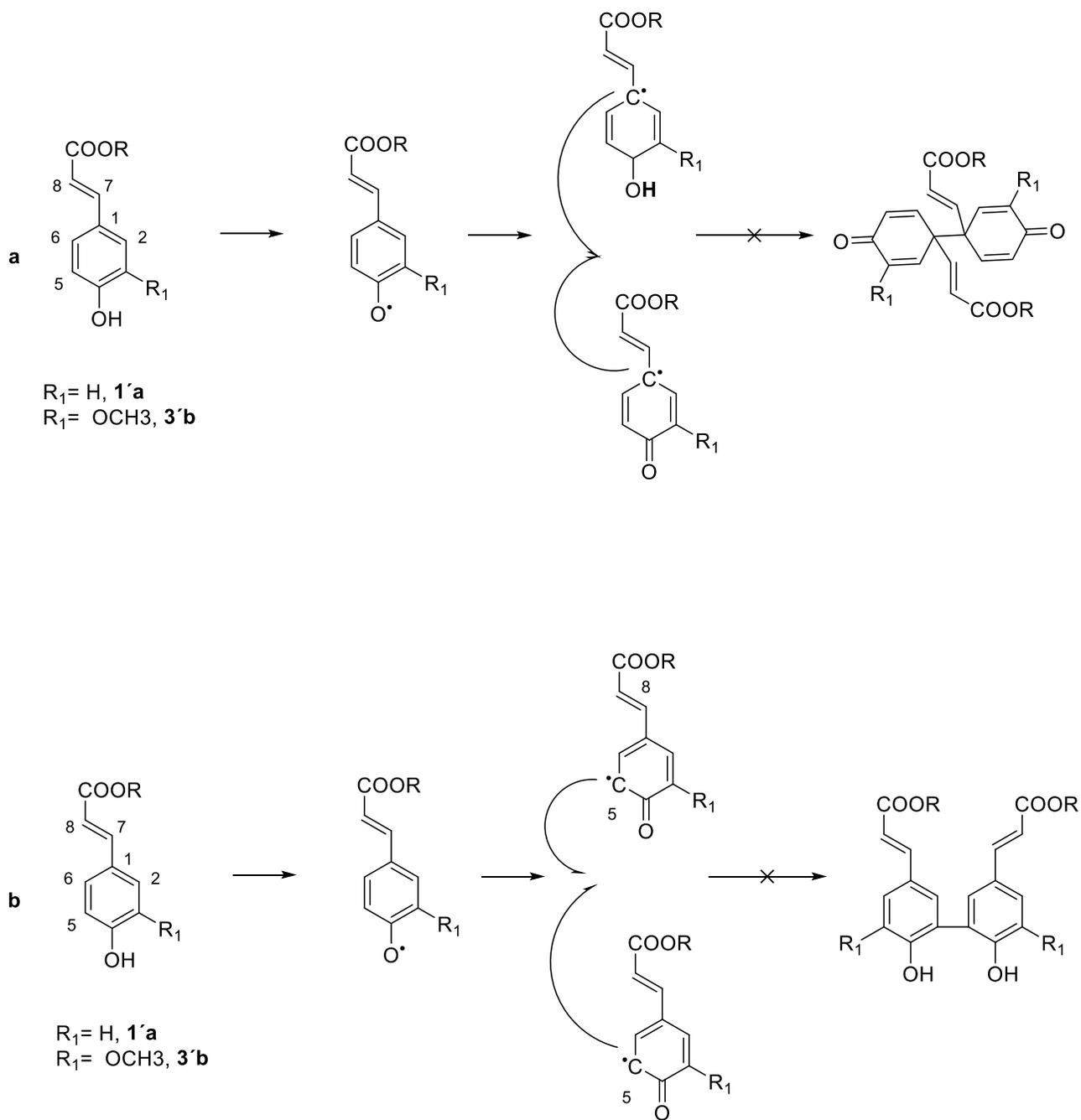


Fig. 48. Esquema de la reacción para los acoplamientos esperados cuando se usa la PR como catalizador de la reacción de acoplamiento oxidativo. a) Mecanismo propuesto para acoplamiento forma resonante 3, b) Mecanismo propuesto para acoplamiento forma resonante 2.

Análogamente, cuando se realizó el acoplamiento de éster **4b** dio como resultado el producto de ciclación resultado de la formación de dos radicales metenquinona lo que se puede observar en el siguiente mecanismo como propone Setälä⁵⁴ (Fig. 49).

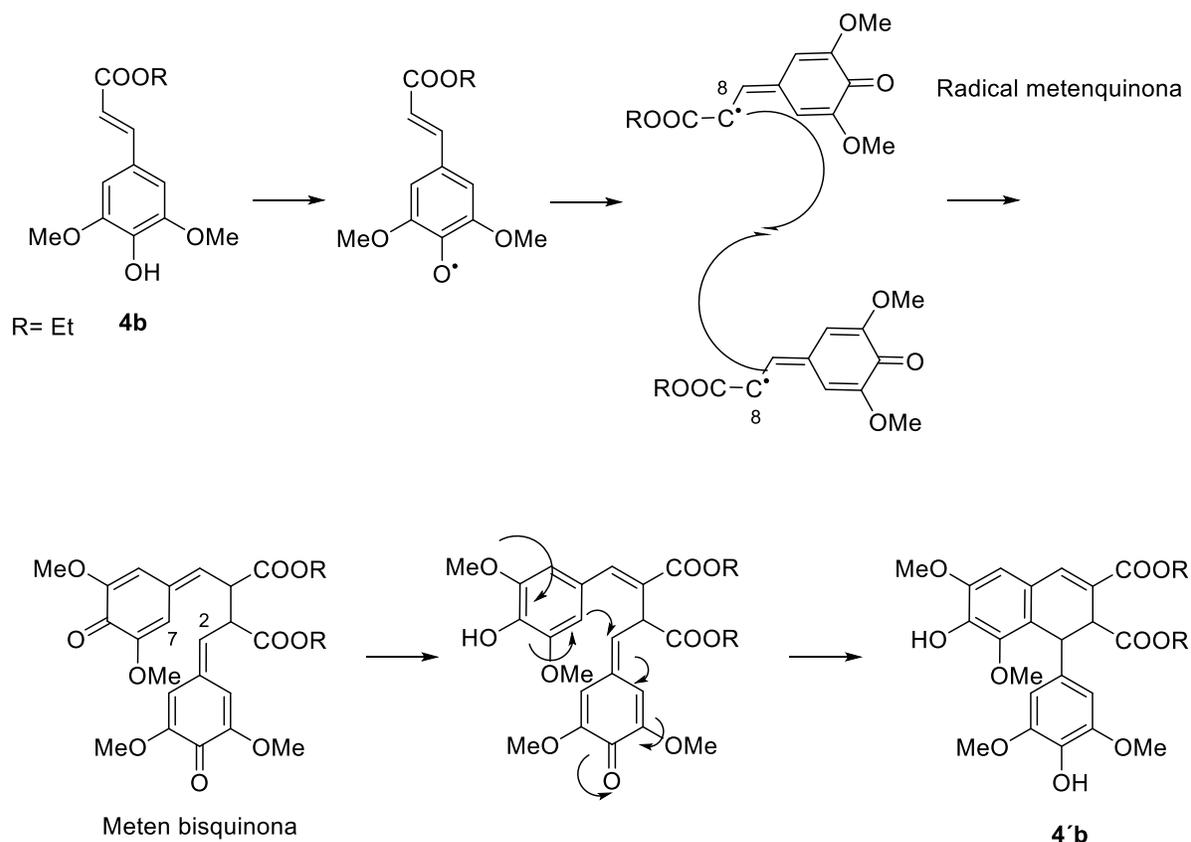


Fig. 49. Mecanismo propuesto para la obtención del dímero del sinapato de etilo (Modificado de Setälä, 1999).

El mecanismo propone que una vez formado el radical fenólico, subsecuentemente el radical metenquinona es cual es producido de la formación del radical en posición 8, dos radicales metenquinona se acoplan para la formación de la meten bisquinona lo cual es considerado el paso clave para la formación del dímero **4'b**, este sufre un rearrreglo prototrópico, es decir, la adición de un protón a la meten bisquinona, el cual promueve la estructura cinamoil de una de las metenquinona. Esta lleva a cabo el ataque nucleofílico al otro extremo

metenquinona a través del carbono en posición 2 de la nueva estructura cinamoil al carbono en posición 7 de la segunda metenquinona; aunque el caso del sinapato de etilo donde es posible formar dos radicales terciarios como se puede apreciar en las formas resonantes de 2 y 3 (Fig. 50), el hecho de no observar los productos de acoplamiento de alguna de estas posibles formas donde se puede encontrar el radical inducido por la PR, puede ser atribuido a los efectos estéricos observados alrededor de estas posiciones. Estos resultados están en acuerdo con los encontrados para el acoplamiento del ácido sinápico y su éster de metilo⁵⁴

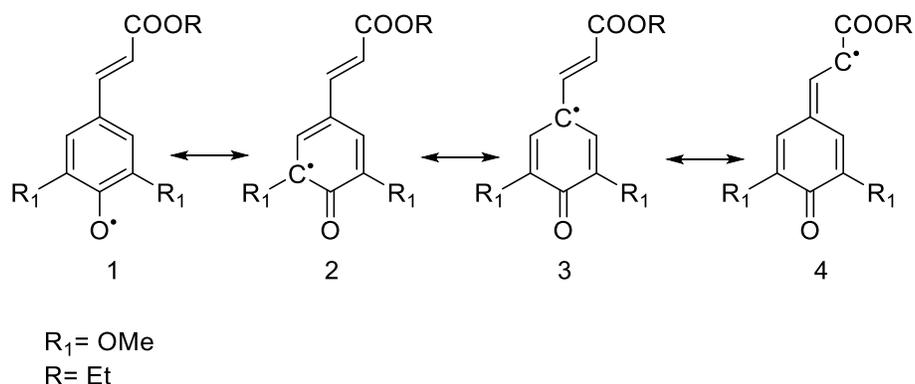


Fig. 50. Formas resonantes del radical formado por la PR para el éster **4'b**

Los resultados obtenidos para el caso de los ésteres de los dímeros **1'a**, **3'b** y **4'b**, permiten proponer que la PR no solo es capaz de producir el radical fenólico y comenzar la reacción de acoplamiento, la cual se cree es llevada a cabo fuera del sitio activo de la enzima. Si observamos tanto los efectos electrónicos y estéricos que dan estabilidad a los radicales formados y su posible unión entre estos, el radical formado en la posición 5 es el de mayor estabilidad comparado con los otros que se pueden producir, esperando productos del acoplamiento de este radical. Sin embargo, se observa la formación de un radical secundario obtenido en posición 8 y posición 5, quizás es debido que la estabilidad de los radicales producidos es consecuencia de la interacción del sustrato con la peroxidasa y no de los efectos electrónicos de los radicales.

Sin embargo, el extracto vegetal de PR cruda tiene regioselectividad para la formación de radicales en las posiciones 5 y 8 para compuestos fenólicos con posiciones *orto*-no sustituidas y α, β -insaturados como se observa en las estructuras de **1a** y **3b**, y la formación de radicales en la posición 8 para compuestos fenólicos *orto* disustituidos y α, β -insaturados como se aprecia en la estructura de **4b**. En contraste, la PR en su forma primitiva y sin purificación disminuye la posibilidad de estabilización de los radicales formados al ser obtenidas mezclas complejas de productos de acoplamiento.

Finalmente, se plantea que la purificación parcial del extracto vegetal PR cruda derive en la obtención de productos cíclicos para los ésteres estudiados, así como en una amplia variedad de dihidrobenzofuranos o dihidronaftalenos en sustratos con sistemas fenólicos similares a los ésteres estudiados.

Por otro lado, cuando se realizó el acoplamiento de los derivados de vainillina **6**, **7**, **8** y **9**, se realizó un método experimental semejante al realizado para los ésteres de alquilo de los ácidos hidroxicinámicos y observar el comportamiento de estos cuando un grupo funcional era cambiado en la estructura base de la vainillina; un grupo alcohol para **6**, un grupo carboxílico para **7**, un grupo enona para **8** y el cambio de un metoxilo por un etoxilo para **9**.

En ese orden una vez realizada la reacción de acoplamiento del alcohol vainillínico se obtuvo un sólido rojizo el cual se identificó por RMN como el 6,6'-dihidroxi-5,5'-dimetoxi-[1,1'-bifenil]-3,3'-dicarbaldehído **10** (Fig. 51) o en su nombre común divainillina en un rendimiento de 25.56 %.

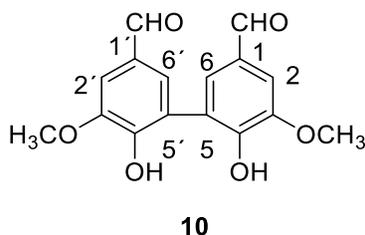


Fig. 51. Estructura de la divainillina (Modificado de Nishimura, 2010).

De este modo, en RMN de protón se encontró en 3.79 ppm multiplete para los 6 hidrógenos de los grupos metoxi y en 9.82 ppm multiplete para los 2 hidrógenos de los grupos aldehídos. En RMN de carbono se observó en 56.01 ppm señal para los 2 metoxi, en 127.73 ppm señal para los carbonos en posición 5 y 5' observada para la unión C-C en sistemas bifenilo, en 128 ppm la señal para los carbonos en posición 1 y en 191.34 ppm la señal para los carbonos de los grupos aldehído.

El caso de la reacción de acoplamiento se identificó la divanillina como el producto principal de la reacción inequívocamente debido a que no se observaron los desplazamientos del alcohol vainillínico como son los hidrógenos correspondientes a los metilenos, así como la señal en RMN de carbono en 191.34 ppm característica del grupo aldehído de la divainillina. La integración de las señales se observó para la estructura dimérica y se corroboró con lo reportado en la literatura⁷⁹.

Aunque no es clara la forma en que se lleva a cabo la reacción de oxidación de 6, Zhi⁸⁰ propone el mecanismo de oxidación de alcoholes primarios con PR, y se sugiere como posible mecanismo para la oxidación del alcohol vainillínico (Fig. 52).

acoplamiento de la recién formada vainillina durante la reacción con PR. Como se sabe durante la obtención de la divanillina con peroxidasa de rábano, esta se forma por la formación del radical en posición *orto* y subsecuente apareamiento de dos radicales resultando en la unión *orto-orto* (Fig. 53).

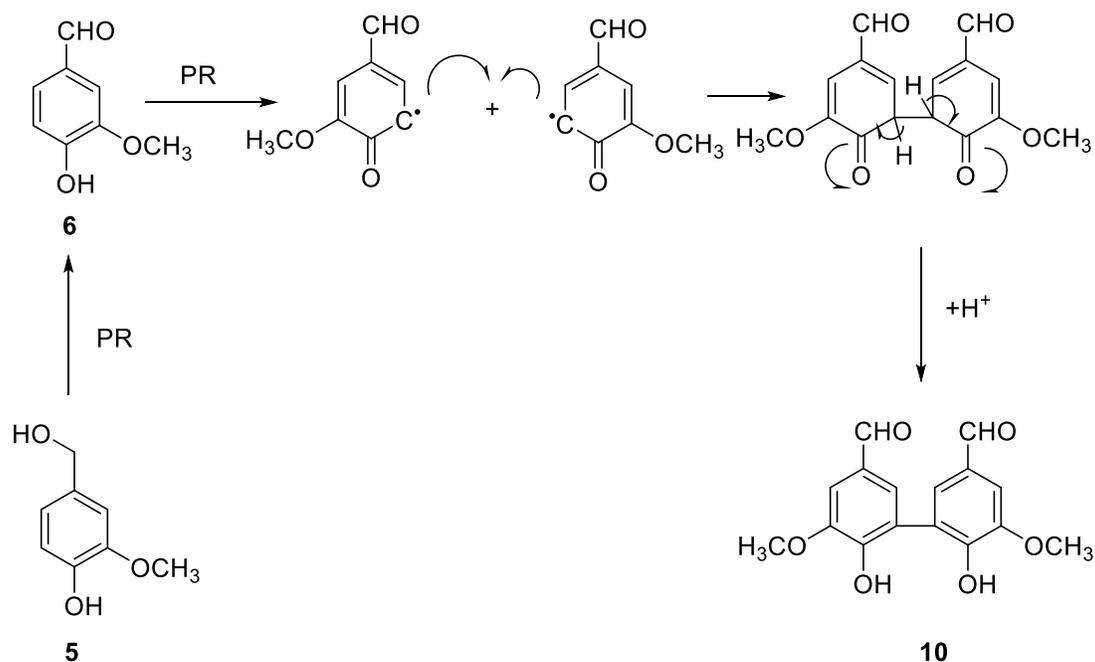


Fig. 53. Esquema del mecanismo de la reacción acoplamiento de la vainillina para la formación de la divanillina.

Para continuar el estudio del acoplamiento oxidativo de compuestos fenólicos se realizó el acoplamiento de **7**, en este sentido se obtuvo el producto de acoplamiento del ácido vainillínico identificado por RMN como el 3,3'-diácido-6,6'-dihidroxi-5,5'-dimetoxi-[1,1'-bifenil]carboxílico o comúnmente denominado como diácido vainillínico (**11**) (Fig. 54) como un sólido rojizo-café en un rendimiento de 15.16%.

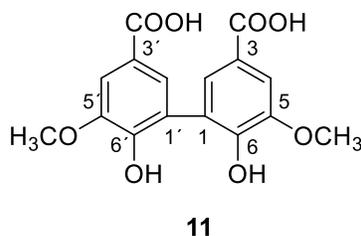


Fig. 54. Estructura del di ácido vainillínico.

En consecuencia se observó en RMN de protón los siguientes desplazamientos: en 3.34 ppm singulete para los hidrógenos de los dos metoxilos, así como en 12.85 ppm singulete correspondiente a los hidrógenos de los ácidos carboxílicos. En RMN de carbón se observó las siguientes señales: en 55.72 ppm señal para los carbonos de los metoxilos, en 123.43 ppm señal para la nueva unión C-C observada típicamente para la unión entre anillos aromáticos, en 148.12 ppm, en, y en 166.74 ppm señal para los carbonos de los grupos carboxílicos. El número de señales observadas está de acuerdo con la cantidad de señales esperadas para el dímero **11**, al ser esta una molécula simétrica, asimismo la integración de los hidrógenos en RMN de protón es equivalente para el producto.

El dímero obtenido de la reacción de acoplamiento de **7** dio como resultado el acoplamiento *orto-orto*, el cual es explicado mediante la formación del radical sobre la posición *orto* al grupo fenólico del ácido vainillínico del mismo modo que para la obtención de **10** (Fig. 53), así dando lugar a la unión *orto-orto* de este radical formado durante la reacción.

Para extender el rango de posibles sustratos para el presente estudio se probó la reacción de acoplamiento de **9** con el extracto vegetal de PR cruda bajo las mismas condiciones de reacción. De esta manera, se obtuvo el producto de acoplamiento en un rendimiento del 4.73% como un sólido café oscuro el cual se identificó como el 5,5'-dietoxi-6,6'-dihidroxi-[1,1'-bifenil]-3,3'-dicarbaldehído (**12**) (Fig. 55).

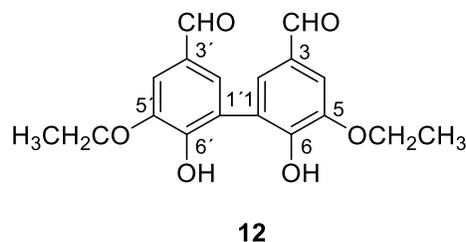


Fig. 55. Estructura del producto de acoplamiento **12**.

Este se caracterizó por RMN de protón y carbono encontrándose en 1.11 ppm singulete para el desplazamiento de los dos metilos de los etoxi, en 3.72 ppm multiplete para los hidrógenos de los dos metilenos de los grupos etoxi, igualmente en 8.72 singulete para los hidrógenos sobre los grupos aldehídos. En RMN de carbono se identificó los siguientes desplazamiento; se encontró en 14.52 ppm señal para los metilos, en 64.34 ppm señal para los metilenos, en 127.80 ppm señal para los carbonos en posición 1 y 1' resultado del acoplamiento de las posiciones *orto-orto* de **9** después de la reacción, así como en 191.7 ppm para los carbonos de los grupos funcionales aldehídos.

Finalmente con el fin de estudiar derivados α,β -insaturados en posición *para* y no sustituidos en posición *orto* al grupo fenólico se realizó la reacción para el producto **8**, al ser observado durante el acoplamiento de los ésteres de metilo y etilo de los ácidos hidroxicinámicos la posibilidad no solo del acoplamiento *orto-orto*, sino 5-8 como se observó para el acoplamiento de los ésteres de alquilo **1a**, **3b** y **4b**. Sin embargo, no se observó producto de acoplamiento y solo el sustrato se recuperó después de la reacción. Una de las posibilidades planteadas para explicar la falta de un producto de acoplamiento reside en que este derivado de vainillina, posee un sistema α,β -insaturado y posición *orto* no sustituida como los alquil ésteres estudiados (Fig. 56).

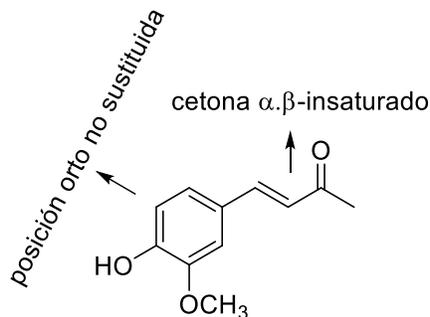


Fig. 56. Relación de la cetona α,β -insaturada y posición orto no sustituida de **8**.

A pesar de esto, a diferencia de los ésteres el producto **8** posee un grupo cetona, el cual no aporta efectos de estabilidad por resonancia al radical formado, lo que disminuye los posibles radicales que pueden ser formados, aunado a los efectos estéricos como en el caso de los ésteres de metilo y etilo.

Otra factor, se propone en la relación de extracto utilizado durante la reacción para el caso de los derivados vainilloides es de 1:1, mientras que para el caso de los ésteres de alquilo es 1:1.2 (volumen de buffer de acetatos: gramos de vegetal utilizado), relaciones que favorecen las reacciones de acoplamiento de los sustratos utilizados. Se propone también que el derivado de vainillina **8**, al tener una estructura similar a los ésteres (posición *orto*-no sustituida y un sistema α,β -insaturado en posición *para*) la relación 1:1 no favorezca el acoplamiento y como se observó para el caso de los ésteres una relación 1:1.2 permita obtener el producto de acoplamiento correspondiente al tener una estructura más análoga a estos.

De manera, que los derivados **6**, **7** y **9** evaluados para la reacción de acoplamiento con la PR en la matriz vegetal produce mayoritariamente los acoplamientos *orto-orto* como se esperaba para el caso de estos compuestos y se propone que el uso de una mayor cantidad de extracto vegetal de PR cruda favorecería la obtención del producto de acoplamiento para **8**.

Así como, el uso del extracto vegetal de PR cruda de rábano rojo en su forma primitiva y bajo las condiciones utilizadas, induce la oxidación de alcoholes

primarios como se observó en la reacción de acoplamiento de **6**, y se requiere investigación en este sentido.

Finalmente, el uso de un extracto vegetal de PR cruda como el del rábano rojo donde se observa actividad de la enzima, dio como resultado la síntesis de compuestos por acoplamiento oxidativo como se observa también en el uso de peroxidasas comerciales y/o con catalizadores inorgánicos, y la síntesis de derivados de interés químico mediante procesos biotecnológicos utilizando *Aspergillus niger* son procesos que pueden ser incluidos dentro de los procesos de la Química Verde o sostenible: pues hace uso de catalizadores (biocatalizadores) los cuales son sustancias renovables y de bajo coste, genera sustancias poco tóxicas o de ninguna toxicidad, minimiza el uso de energía al ser procesos que se llevan a cabo a temperatura ambiente o a bajas temperaturas, maximiza la incorporación de los materiales manejados y utiliza disolventes inocuos al medio ambiente.

5. Materiales y Métodos

Los reactivos se obtuvieron de Sigma- Aldrich y se utilizaron sin previa purificación. Los disolventes se manejaron sin destilar y se secaron cuando fue necesario. La resonancia magnética de ^1H y ^{13}C se realizaron en espectrómetro *Varian Unity Inova* 300 MHz (USAI) y espectrómetro *Agilent 600 DD2* 600 MHz (UAM-X). *Aspergillus niger* fue proporcionado como se cita en la Tesis de Maestría⁶⁸. La Cromatografía de Líquidos se realizó en cromatógrafo de líquidos de alta resolución: Autoinyector Waters 2707, bomba Waters 1525, detector UV Waters 2478, Columna Hypersil Gold 250 x 4.6 mm, 5 μ Thermo Scientific.

5.1 Síntesis de los derivados vainilloides

5.1.1 Síntesis del alcohol vainillínico

Se pesaron 5 gramos (32.89 mmol) de vainillina en un matraz bola de 50 mL, la cual fue disuelta en la mínima cantidad de etanol, con agitación y en baño de hielo, después de lo cual se adiciono gota a gota 10 ml de una solución de NaBH_4 6.5 M en 1.0 M de NaOH , la cual se agito vigorosamente. Una vez adicionado completamente la solución de NaBH_4 , se dejó la reacción por 20 minutos a temperatura ambiente hasta completar la reacción. Posteriormente se adiciono HCl concentrado hasta no evolución de gas (H_2), se comprobó que la mezcla tuviera un pH ácido, con lo cual se agito por 10 minutos más, formándose un precipitado blanco el cual se filtró al vacío y se lavó con porciones de agua de hielo, se secó al vacío para dar un sólido blanco (4.5 g) Rendimiento: 90%. RMN ^1H (ppm): 3.72 (s, 3H), 4.34 (s, 2H), 6.68 (s, 2H), 6.85 (s, 1H). RMN ^{13}C (ppm): 55.58, 62.98, 111.02, 115.01, 119.07, 133.45, 147.21, 147.31.

5.1.2 Síntesis de ácido vainillínico. Conversión reductiva de ácido ferúlico con *Aspergillus niger*

En un matraz Erlenmeyer se adicionaron 90 mL de agua estéril, 10 mL de medio mínimo y 0.5 g de glucosa, al cual se inoculo esporas de *Aspergillus niger*

previamente cultivadas⁶⁸, el medio se incubó por 24 horas a 40°C para el crecimiento de la biomasa (micelio).

La reacción de oxidación del ácido ferúlico se preparó lavando la biomasa con agua estéril (3 x 50 mL), se colocó el micelio en un matraz Erlenmeyer que contenía 90 mL de agua estéril, 10 mL de medio mínimo, 0.1 g de glucosa y 0.1 g de ácido ferúlico, el medio de reacción se incubó por 24 horas, después de lo cual se filtró la biomasa y se extrajo con AcOEt (3 x 30 mL), el disolvente se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó para obtener un sólido ligeramente amarillo (0.75 g). Rendimiento: 93.75% en masa. El ácido vainillínico se identificó por cromatografía de líquidos de alta resolución de la mezcla de reacción filtrada.

Preparación medio mínimo. En 100 mL de agua desionizada se disolvió 24 g de NaNO₃, 6 g de KHPO₄, 2 g de KCl y 2 g de MgSO₄•7H₂O.

5.1.3 Síntesis de 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-buta-3-en-2-ona

Se pesó 1g (6.57 mmol) de vainillina en un matraz bola de 50 ml, a la cual se adicionaron 9 mL de EtOH y 1.92 mL (26.28 mmol) de acetona, la cual se agitó vigorosamente, a continuación se agregó 8 mL de una solución de NaOH al 8%. La reacción se siguió por CFF durante dos horas, después de lo cual se agregó 4.45 ml de NaOH al 8% y un equivalente de acetona; la reacción se dejó por 1 hora más, precipitando un sólido el cual se filtró y se lavó con MeOH. Posteriormente los lavados se juntaron, se evaporó el disolvente a sequedad para dar un sólido café –verde (0.69 g). Rendimiento: 55.15%. RMN ¹H (ppm): 2.35 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 6.51 (d, 1H, *J*= 16 Hz), 6.80 (d, 1H, *J*=7.7 Hz), 7.02 (d, 2H, *J*= 7.9 Hz), 7.45 (d, 1H, *J*= 16 Hz).

5.2 Síntesis de hidroxicinamatos de alquilo

5.2.1 Síntesis del cumarato de metilo

Se pesó 1 g (6.09 mmol) de ácido p-cumárico en un matraz bola de 100 mL, se adicionó 50 mL de metanol seco, la mezcla se agitó vigorosamente hasta

completa disolución del ácido, después se agregó 5 mL de H₂SO₄ concentrado, se puso a reflujo la mezcla por 24 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se neutralizó la mezcla y se extrajo con AcOEt (3 x 20mL), el disolvente se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó al vacío en evaporador rotatorio. El residuo se cristalizó de Acetona/H₂O para dar un polvo blanco (1.02 g). Rendimiento: 94.4%. RMN ¹H (ppm): 3.72 (s, 3H), 6.35 (d, 1H, J= 16 Hz), 6.90 (d, 2H, J= 8.7 Hz), 7.55 (d, 2H, J= 8.7 Hz), 7.61 (d, 1H, J= 16 Hz). RMN ¹³C (ppm): 50.59, 114.42, 115.78, 126.09, 130.01, 144.45, 159.65, 166.94.

5.2.2 Síntesis del cumarato de etilo.

Se pesó 1 g (6.09 mmol) de ácido *p*-cumárico en un matraz bola de 100 mL, se adicionó 50 mL de etanol seco, la mezcla se agitó vigorosamente hasta completa disolución del ácido, posteriormente se agregó 5 mL de H₂SO₄ concentrado, se puso a reflujo la mezcla por 24 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se neutralizó la mezcla y se extrajo con AcOEt (3 x 20 mL), el disolvente se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó al vacío en evaporador rotatorio. El residuo se purificó en columna cromatográfica con un eluyente Hexano-AcOEt (80:20) para dar un sólido anaranjado (0.83 g), Rendimiento: 71.5%. RMN ¹H (ppm): 1.28 (t, 3H, J= 7.1 Hz), 4.19 (q, 2H, J= 7.1 Hz), 6.34 (d, 1H, J= 15.9 Hz), 6.90 (d, 2H, J= 8.6 Hz), 7.55 (d, 2H, J= 8.6 Hz), 7.60 (d, 1H, J= 15.9 Hz). RMN ¹³C (ppm): 13.76, 59.58, 114.80, 115.70, 126.15, 129.97, 144.22, 159.60, 166.47.

5.2.3 Síntesis del cafeato de metilo

Se pesó 1 g (5.5 mmol) de ácido cafeico en un matraz bola de 100 mL, se adicionó 50 mL de metanol seco, la mezcla se agitó vigorosamente hasta completa disolución del ácido, después se agregó 5 mL de H₂SO₄ concentrado, se reflujo la mezcla por 24 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se neutralizó la mezcla con NaHCO₃ al 10% y se extrajo con AcOEt (3 x 20 mL), el disolvente se secó

sobre Na_2SO_4 y se evaporó al vacío en evaporador rotatorio. El residuo se cristalizó de Acetona/ H_2O para dar un polvo amarillo claro (0.65 g) Rendimiento: 61.3%. RMN ^1H (ppm): 3.72 (s, 3H), 6.29 (d, 1H, $J= 15.9$ Hz), 6.88 (d, 1H $J= 8.1$ Hz), 7.05 (dd, 1H, $J= 8.2, 2.1$ Hz), 7.17 (d, 1H, $J= 2.1$), 7.55 (d, 1H, $J= 15.9$ Hz). RMN ^{13}C (ppm): 50.59, 114.29, 114.46, 115.47, 121.62, 126.72, 126.72, 144.50, 145.39, 147.82, 166.92.

5.2.4 Síntesis del cafeato de etilo

Se pesó 1 g (5.5 mmol) de ácido cafeico en un matraz bola de 100 mL, al cual se adicionó 50 mL de etanol seco, la mezcla se agitó hasta completa disolución del ácido, posteriormente se adiciono 5 mL de H_2SO_4 , la mezcla se reflujo por 36 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se neutralizo con NaHCO_3 al 10%, se extrajo con AcOEt (3 x 20mL), el disolvente se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó en evaporador rotatorio para dar un residuo, el cual se cristalizó de Acetona/ H_2O para dar un polvo blanco (0.67 g). Rendimiento: 58 %. RMN ^1H (ppm): 1.27 (t, 3H, $J= 7.1$ Hz), 4.18 (q, 2H, $J=7.1$ Hz), 6.27 (d, 1H, $J=15.9$ Hz), 6.87 (d, 1H, $J= 8.2$ Hz), 7.04 (dd, 1H, $J=8.2, 2.1$ Hz), 7.16 (d, 1H, $J= 2.1$ Hz), 7.53 (d, 1H, $J=15.9$ Hz). RMN ^{13}C (ppm): 13.76, 59.57, 114.27, 114.91, 115.46, 121.56, 127.77, 144.57, 145.38, 166.46.

5.2.5 Síntesis del ferulato de metilo

Se pesó 1g (5.15 mmol) de ácido ferúlico en un matraz bola de 100 mL, se adicionaron 50 mL de metanol seco, la mezcla se agitó hasta completa disolución del ácido, después se adicionaron 5 mL de H_2SO_4 , la mezcla se sometió a reflujo por 36 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se neutralizó con NaHCO_3 al 10%, se extrajo con AcOEt (3 x 20mL), el disolvente se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó en evaporador rotatorio para dar un residuo, el cual se purificó por columna cromatográfica utilizando un eluyente Hexano-AcOEt (80:20) para dar un

sólido amarillo (0.85 g). Rendimiento: 79.43 %. RMN ^1H (ppm): 3.75 (s, 3H), 6.32 (d, 1H, $J=15.9$ Hz), 6.90 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.65 (d, 1H, $J=15.8$ Hz). RMN ^{13}C (ppm): 51.2, 55.46, 111.17, 114.51, 115.53, 120.34, 125.67, 144.72, 146.68, 149.90, 167.60.

5.2.6 Síntesis del ferulato de etilo

Se pesó 1 g (5.15 mmol) de ácido ferúlico en un matraz bola de 100 mL, se adicionó 50 mL de etanol seco, la mezcla se agito hasta completa disolución del ácido, posteriormente se adicionó 5 mL de H_2SO_4 , la mezcla se refluyo por 36 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se neutralizó con NaHCO_3 al 10%, se extrajo con AcOEt (3 x 20 mL), el disolvente se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporo en evaporador rotatorio para dar un residuo, el cual se purificó por columna cromatográfica utilizando un eluyente Hexano-AcOEt (80:20) para dar un sólido anaranjado (1.03 g). Rendimiento: 94.4%. RMN ^1H (ppm): 1.33 (t, 3H, $J= 7.1$ Hz), 4.26 (q, 2H, $J= 7.1$ Hz), 6.29 (d, 1H, $J= 15.9$ Hz), 6.92 (d, 1H, $J= 8.1$ Hz), 7.03 (d, 1H, $J= 1.9$ Hz), 7.07 (dd, 1H, $J= 8.1, 1.9$ Hz), 7.61 (d, 1H, $J= 15.9$ Hz). RMN ^{13}C (ppm): 14.32, 60.33, 109.28, 114.68, 115.60, 122.97, 126.99, 144.63, 146.63, 147.88, 167.26.

5.2.7 Síntesis del sinapato de metilo

Se pesó 1 g (4.4 mmol) de ácido sinápico en un matraz bola de 100 mL, se adicionó 50 mL de metanol seco, la mezcla se agitó vigorosamente hasta completa disolución del ácido, después se agregó 5 mL de H_2SO_4 y se refluyo la mezcla por 48 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se neutralizo con NaHCO_3 al 10%, la mezcla se extrajo con AcOEt (3 x 20 mL), el disolvente se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporo en evaporador rotatorio para dar un polvo rosado, mezcla de materia prima, el producto esperado y subproductos. El producto no se pudo

cristalizar o purificar por columna cromatográfica debido a la complejidad de la mezcla de productos.

5.2.8 Síntesis del sinapato de etilo

Se pesó 1 g (4.4 mmol) de ácido sinápico en un matraz bola de 100 mL, se adicionó 50 mL de etanol seco, la mezcla de agito hasta completa disolución del ácido, enseguida se adiciono 5 mL de H₂SO₄ concentrado y se refluyo la mezcla por 48 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se neutralizo con NaHCO₃ al 10%, la mezcla se extrajo con AcOEt (3 x 20 mL), el disolvente se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó en evaporador rotatorio para dar un residuo. El residuo se cristalizó de Acetona/H₂O para dar un polvo blanco (1.04 g). Rendimiento: 93.8 %. RMN ¹H (ppm): 1.34 (t, 3H, *J*= 7 Hz), 3.92 (s, 6H), 4.26 (q, 2H, *J*= 7 Hz), 6.30 (d, 1H, *J*= 15.8 Hz), 6.77 (s, 2H), 7.60 (d, 1H, *J*= 15.9 Hz). RMN ¹³C (ppm): 14.31, 50.26, 60.36, 104.98, 115.99, 125.92, 137.02, 144.81, 147.81, 147.16, 167.12.

5.3 Preparación general del extracto vegetal de peroxidasa de rábano obtenida de rábano rojo

El rábano fresco o previamente refrigerado a -28°C, se retiró la piel y se licuo en un buffer de acetatos pH=4 en un relación 1:1, posteriormente se separó el residuo vegetal del extracto mediante filtración al vacío usando una gasa bajo baño de hielo, se adicionó 3 g de PVP (polivinilpirrolidona) y se agitó por 5 minutos. El extracto vegetal de peroxidasa se filtró al vacío a través de una cama de celita de aproximadamente 2 cm de espesor previamente lavada con agua destilada pH=4, el extracto se reservó bajo baño de hielo para su posterior utilización.

La actividad enzimática del extracto vegetal de PR cruda sin PVP se determinó como 1.31 U/mL y el extracto vegetal de PR cruda con PVP se determinó como 1.35 U/mL⁷⁶.

5.4 Acoplamiento oxidativo de derivados vanilloides con extracto vegetal de peroxidasa de rábano de rábano rojo

5.4.1 Acoplamiento oxidativo de 4-hidroxi-3-etoxibenzaldehído obtención del 5,5'-dietoxi-6,6'-dihidroxi-[1,1'-bifenil]-3,3'-dicarbaldehído

A un matraz Erlenmeyer de 150 mL se adicionó 60 mL de extracto vegetal de rábano rojo y 0.57 g (3.4 mmol) de 4-hidroxi-3-etoxibenzaldehído, seguido se agregó acetona como co-solvente hasta completa disolución del producto, se adiciono 4 mL de H₂O₂ al 3% y se agito durante 20 minutos, en seguida se añadió HCl concentrado hasta pH= 3. Finalmente la mezcla se filtró al vacío para dar un sólido café oscuro (0.053 g). Rendimiento: 4.73%. RMN ¹H (ppm): 1.11 (s, 6H), 4.31 (m, 4H), 6.70 (br s, 2H), 6.72 (br s, 2H), 8.72 (s, 2H). RMN ¹³C (ppm): 14.52, 64.34, 110.34, 124.63, 127.80, 127.88, 147.19, 150.50, 191.17.

5.4.2 Acoplamiento orto-oxidativo de alcohol vainillínico obtención del 5,5'-bis (hidroximetil)-3,3'-dimetoxi-[1,1'-bifenil]-2,2'-diol (divainillina)

En un matraz Erlenmeyer de 150 mL se adiciono 60 mL de extracto vegetal de rábano rojo y 0.5064 g (3.2 mmol) de alcohol vainillínico, después de lo cual se añadió 4 mL de H₂O₂ al 3%, la mezcla se agitó por 15 minutos, se añadió HCl concentrado hasta pH= 3 para terminar la reacción. Finalmente la mezcla se filtró al vacío para dar un sólido rojizo (247.3 mg). Rendimiento: 25.56% RMN ¹H (ppm): 3.79 (m, 6H), 7.35 (m, 4H), 9.82 (m, 2H). RMN ¹³C (ppm): 56.01, 109.13, 124.54, 127.73, 128.14, 148.13, 150.37, 191.34

5.4.3 Acoplamiento orto-oxidativo de ácido vainillínico obtención del diácido-6,6'-dihidroxi-5,5'-dimetoxi-[1,1'-bifenil]carboxílico (diácido vainillínico)

En un matraz Erlenmeyer de 150 mL se adicionó 60 mL de extracto vegetal de rábano rojo y 0.5072 g (3.01 mmol) de ácido vainillínico, posteriormente se añadió 4 mL de H₂O₂ al 3%, la mezcla se agitó por 15 minutos, se añadió HCl hasta tener pH=3 para terminar la reacción. Finalmente la mezcla se filtró al vacío para dar un

sólido rojizo-café (160 mg). Rendimiento: 15.16%. RMN ^1H (ppm): 3.34 (s, 6H), 7.17 (m, 4H), 12.85 (s, 2H). RMN ^{13}C (ppm) 55.72, 113.52, 122.77, 122.84, 123.43, 148.12, 150.12, 166.74.

5.4.4 Acoplamiento orto-oxidativo de 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-buta-3-en-2-ona

En un matraz Erlenmeyer de 150 mL se adicionó 50 mL de extracto vegetal de rábano rojo y 0.156 g (1 mmol) de 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-buta-3-en-2-ona en agitación, seguido se agregó 5 mL de H_2O_2 al 3%, la mezcla se agitó durante 45 minutos, se añadió HCl concentrado hasta $\text{pH}=3$ para terminar la reacción. No se observó producto de acoplamiento.

5.5 Acoplamiento oxidativo de los hidroxicinamatos de alquilo

5.5.1. Acoplamiento oxidativo del cumarato de metilo obtención del (E)-2-(4-hidroxifenil)-5-(3-metoxi-3-oxoprop-1-enil)-2,3-dihidrobenzofuran-3-carboxilato de metilo

En un matraz Erlenmeyer de 150 mL se adicionó 60 mL de extracto vegetal de rabano rojo y 0.3020 g (1.69 mmol) del cumarato de etilo en agitación, así como acetona como co-solvente hasta disolución el éster, posteriormente se agregó 3.5 mL de H_2O_2 al 3%, la mezcla se agitó por 45 minutos y se siguió la reacción por CCF, después de lo cual se añadió HCl concentrado hasta $\text{pH}=3$ para terminar la reacción. La mezcla se extrajo con AcOEt (3 x 20 mL), el disolvente se secó sobre Na_2SO_4 y evaporó en evaporador rotatorio para dar un residuo del cual se purificó una mínima cantidad (53.7 mg) por cromatografía en capa fina preparativa utilizando un eluyente, se obtuvo un producto de acoplamiento mayoritario (6.4 mg). Rendimiento en masa purificada: 11.16%. RMN ^1H (ppm): 3.79 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 4.26 (d, 1H, $J=7.5$ Hz), 6.08 (d, $J=7.5$ Hz), 6.31 (d, 1H, $J=16$ Hz) 6.82 (d, 2H, $J=8.7$ Hz), 6.87 (d, 1H, $J=8.4$ Hz), 7.25 (m, 2H), 7.41 (dd, 1H, $J=8.3$ Hz),

7.56 (m, 1H), 7.65 (d, 1H, $J = 15.9$ Hz). RMN ^{13}C (ppm): 54.30, 55.53, 57.72, 89.01, 112.96, 117.87, 118.31, 127.58, 130.14, 130.47, 132.53, 133.44, 147.26, 158.64, 163.78, 170.46, 173.47.

5.5.2. Acoplamiento oxidativo del ferulato de etilo obtención del (E)-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-7-metoxi-5-(3-metoxi-3-oxoprop-1-enil)-2,3-dihidrobenzofuran-3-carboxilato de etilo

En un matraz Erlenmeyer de 150 mL se adicionó 60 mL de extracto de peroxidasa (78.3 g de producto vegetal), 0.3082 g (1.38 mmol) del ferulato de etilo y acetona hasta completa disolución del éster, finalmente se agregó 3.5 mL de H_2O_2 al 3% después de lo cual se agitó por 10 minutos, la reacción se terminó agregando HCl hasta $\text{pH}=3$, después de lo cual se obtuvo un producto café (78.23 mg). Rendimiento: 12.82%. RMN ^1H (ppm): 1.25 (m, 6H), 3.76 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 4.18 (m, 4H), 4.51 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 5.91 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 6.55 (d, 1H, $J = 15.9$ Hz), 6.77 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.81 (dd, $J = 8.1$ Hz), 7.00 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.62 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz). RMN ^{13}C (ppm): 14.02, 14.22, 54.18, 55.63, 55.92, 59.80, 61.32, 87.23, 110.75, 112.40, 115.31, 115.70, 118.22, 119.31, 126.21, 128.09, 129.77, 144.30, 144.52, 147.08, 147.68, 149.35, 166.46, 170.24.

5.5.3. Acoplamiento oxidativo del sinapato de etilo obtención del 7-hidroxi-1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-6,8-dimetoxi-1,2-dihidronaftalen-2,3-dicarboxilato de etilo

En un matraz Erlenmeyer de 150 mL se agregó 60 mL de extracto vegetal de rabano rojo y 0.245 g (0.97 mmol) del sinapato de etilo y acetona como co-solvente hasta disolución del éster, posteriormente se adicionó 3.5 mL de H_2O_2 al 3%, al cabo de 10 minutos precipito se separó un sólido café (53.45 mg). Rendimiento: 11.13%. RMN ^1H (ppm): 1.09 (t, 3H, $J=7.1$ Hz), 1.21 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz), 3.60 (s, 3H), 3.75 (m, 6H), 3.83 (s, 3H), 4.01 (m, 4H), 4.13 (m, 1H), 4.81 (s, 1H), 6.20 (s, 2H), 7.05 (s, 1H), 7.63 (s, 1H). RMN ^{13}C (ppm): 13.95, 14.14, 31.27,

46.11, 55.96, 56.01, 59.70, 60.13, 60.60, 104.96, 108.70, 121.84, 122.11, 123.06,
132.60, 134.47, 137.31, 141.81, 145.44, 147.66, 166.00, 171.26.

6. Conclusiones

- 1.- Se sintetizaron los derivados vainilloides por métodos químicos (reducción de la vainillina al alcohol vainillínico y por métodos biosintéticos (reducción del ácido ferúlico a ácido vainillínico); este último como método de obtención de un producto de valor agregado a partir de ácido ferúlico y bajo el precepto de química sustentable.
- 2.- Se sintetizó la 4-(4-hidroxifenil)-3-metoxifenil)-buta-3-en-2-ona por condensación aldólica de la vainillina con acetona en medio básico concentrado. Siendo el uso de un medio básico concentrado fundamental en la reacción para la obtención de derivados de la curcumina.
- 3.- Se obtuvieron los ésteres de los ácidos hidroxicinámicos en buenos rendimientos, los cuales mostraron pequeñas diferencias en rendimiento cuando el patrón de sustitución y los grupos sustituyentes del anillo aromático cambiaban.
- 4.- El extracto vegetal de PR cruda de rábano rojo promueve la reacción de los ésteres **1a** y **3b** a dihidrobenzofuranos, y para el éster **4b** a dihidronaftaleno por acoplamiento de los radicales en posiciones 5 y 8. Sin embargo, la PR cruda no presenta regio-selectividad por la formación de un radical como se esperaba.
- 5.- El acoplamiento de los derivados de vainillina **7** y **9** dio lugar al acoplamiento esperado *orto-orto*. Sin embargo, el intercambio del grupo aldehído en la vainillina por un grupo enona para el derivado **8** afecta la reactividad al no obtenerse producto de acoplamiento.
- 6.- Cuando se realizó la reacción de acoplamiento para **6**, la divainillina se obtuvo como producto inesperado, resultado de la oxidación del alcohol vainillínico durante la reacción, promovida por la PR en el extracto vegetal de rábano rojo.
- 7.- El extracto vegetal de PR cruda de rábano rojo se propone como un biocatalizador accesible obtenido de una fuente vegetal comercial para la reacción

de acoplamiento de compuestos fenólicos. La purificación parcial de la enzima daría lugar a rendimientos mayores y puros de productos de acoplamiento de compuestos fenólicos.

7. Bibliografía

1. Clouthier, C. M. & Pelletier, J. N. Expanding the organic toolbox: a guide to integrating biocatalysis in synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 1585 (2012).
2. Hollmann, F., Arends, I. W. C. E., Buehler, K., Schallmey, A. & Bühlerb, B. Green Chemistry Enzyme-mediated oxidations for the chemist. *Green Chem.* **13**, 226 (2011).
3. Quideau, S., Def, D. & Pouységu, L. Oxidative Coupling of Phenols and Phenol Ethers. *Compr. Org. Synth. II* **3**, 659 (2014).
4. Silva, F. A. M., Borges, F. & Guimara, C. Phenolic Acids and Derivatives : Studies on the Relationship among Structure , Radical Scavenging Activity , and Physicochemical Parameters. *J. Agric. Food Chem* **48**, 2122 (2000).
5. Laguerre, M. *et al.* How to boost antioxidants by lipophilization? *Biochimie* **95**, 20 (2013).
6. Noda, M. & Matsumoto, M. Sinapic acid and methyl sinapate in rapeseed lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **231**, 131 (1971).
7. Baranowski, J. D. & Nagel, C. W. Properties of alkyl hydroxycinnamates and effects on *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 218 (1983).
8. Hashidoko, Y., Tahara, S. & Mizutani, J. Long chain alkyl esters of 4'-hydroxycinnamic acids from leaves of *Rosa rugosa*. *Phytochemistry* **31**, 3282 (1992).
9. Didry, N., Seidel, V., Dubreuil, L., Tillequin, F. & Bailleul, F. Isolation and antibacterial activity of phenylpropanoid derivatives from *Ballota nigra*. *J. Ethnopharmacol.* **67**, 197 (1999).
10. Sahpaz, S., Garbacki, N., Tits, M. & Bailleul, F. Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. *J. Ethnopharmacol.* **79**, 389 (2002).
11. Silva, F. a M., Borges, F. & Ferreira, M. a. Effects of phenolic propyl esters on the oxidative stability of refined sunflower oil. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3936 (2001).
12. Wang, J., Gu, S., Pang, N., Wang, F. & Wu, F. A study of the esterification of caffeic acid with methanol using *p*-toluenesulfonic acid as a catalyst. *J. Serb. Chem. Soc.* **78**, 1023 (2013).

13. Jayaprakasam, B., Vanisree, M., Zhang, Y., Dewitt, D. L. & Nair, M. G. Impact of alkyl esters of caffeic and ferulic acids on tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzyme, and lipid peroxidation. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 5375 (2006).
14. Merkl, R., Hrádková, I., Filip, V. & Šmidrkal, J. Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic acids alkyl esters. *Czech J. Food Sci.* **28**, 275 (2010).
15. Vosmann, K., Weitkamp, P. & Weber, N. Solvent-free lipase-catalyzed preparation of long-chain alkyl phenylpropanoates and phenylpropyl alkanoates. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 2969–2976 (2006).
16. Weitkamp, P., Vosmann, K. & Weber, N. Highly efficient preparation of lipophilic hydroxycinnamates by solvent-free lipase-catalyzed transesterification. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 7062 (2006).
17. Esteves, M. *et al.* Antioxidant versus cytotoxic properties of hydroxycinnamic acid derivatives - A new paradigm in phenolic research. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **341**, 164 (2008).
18. Teixeira, J. *et al.* Exploring nature profits: Development of novel and potent lipophilic antioxidants based on galloyl-cinnamic hybrids. *Eur. J. Med. Chem.* **62**, 289–296 (2013).
19. Vafiadi, C., Topakas, E., Alissandratos, A., Faulds, C. B. & Christakopoulos, P. Enzymatic synthesis of butyl hydroxycinnamates and their inhibitory effects on LDL-oxidation. *J. Biotechnol.* **133**, 497 (2008).
20. Menezes, J. C. J. M. D. S. *et al.* Synthesis and antioxidant activity of long chain alkyl hydroxycinnamates. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 773 (2011).
21. Calheiros, R. *et al.* Antioxidant phenolic esters with potential anticancer activity: A Raman spectroscopy study. *J. Raman Spectrosc.* **39**, 95 (2008).
22. Li, N., Shi, Z., Tang, Y., Li, B. & Duan, J. Highly Efficient Esterification of Ferulic Acid Under Microwave Irradiation. *Molecules* **14**, 2118 (2009).
23. Garrido, J. *et al.* Alkyl esters of hydroxycinnamic acids with improved antioxidant activity and lipophilicity protect PC12 cells against oxidative stress. *Biochimie* **94**, 961 (2012).
24. Yang, Z., Guo, Z. & Xu, X. Enzymatic lipophilisation of phenolic acids through esterification with fatty alcohols in organic solvents. *Food Chem.* **132**, 1311 (2012).

25. Pion, F., Reano, A. F., Ducrot, P.-H. & Allais, F. Chemo-enzymatic preparation of new bio-based bis- and trisphenols: new versatile building blocks for polymer chemistry. *R. Soc. Chem. Adv.* **3**, 8988 (2013).
26. Guo, W. *et al.* A Simple and Effective Method for Chemoselective Esterification of Phenolic Acids. *Synth. Commun.* **35**, 145 (2005).
27. Gallage, N. J. & Møller, B. L. Vanillin – Bioconversion and Bioengineering of the Most Popular Plant Flavor and Its De Novo Biosynthesis in the Vanilla Orchid. *Mol. Plant* **8**, 40 (2015).
28. Syrjänen, K. & Brunow, G. Oxidative cross coupling of *p*-hydroxycinnamic alcohols with dimeric arylglycerol-aryl ether lignin model compounds . The effect of oxidation potentials. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 3425 (1998).
29. Vaghasiya, Y. K., Nair, R., Soni, M., Baluja, S. & Chanda, S. Synthesis , structural determination and antibacterial activity of compounds derived from vanillin and 4-aminoantipyrine. *J. Serb. Chem. Soc.* **69**, 991 (2004).
30. Mohammed, I. A. & Hamidi, R. M. Synthesis of new liquid crystalline diglycidyl ethers. *Molecules* **17**, 645 (2012).
31. Li, S. H., Gao, S. K., Liu, S. X. & Guo, Y. N. Five metal(II) coordination polymers constructed from two vanillin derivatives: From discrete structure to 3D diamondoid network. *Cryst. Growth Des.* **10**, 495 (2010).
32. Selvaraju, S. *et al.* Eumelanin-inspired core derived from vanillin: a new building block for organic semiconductors. *Chem. Commun.* **51**, 2957 (2015).
33. Bagheri-kalmarzi, M., Sajedi, R. H., Asadollahi, E., Nosrat, O. & Hajhosseini, R. Effect of vanillin and its acid and alcohol derivatives on the diphenolase activity of mushroom tyrosinase. *Mol. Biol. Res. Commun.* **1**, 74 (2012).
34. Amarasekara, A. S., Wiredu, B. & Razzaq, A. Vanillin based polymers : I . An electrochemical route to polyvanillin. *Green Chem.* **14**, 2395 (2012).
35. Kevitch, R. M., Shanahan, C. S. & McGrath, D. V. Vanillin and *o*-vanillin oligomers as models for dendrimer disassembly. *New J. Chem.* **36**, 492 (2012).
36. Holmberg, A. L., Stanzione III, J. F., Wool, R. P. & Epps, T. H. A Facile Method for Generating Designer Block Copolymers from Functionalized Lignin Model Compounds. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2**, 569 (2014).
37. Firdaus, M. & Meier, M. A. R. Renewable co-polymers derived from vanillin and fatty acid derivatives. *Eur. Polym. J.* **49**, 156 (2013).

38. Fache, M. *et al.* Vanillin, a promising biobased building-block for monomer synthesis. *Green Chem.* **16**, 1987 (2014).
39. Fache, M., Auvergne, R., Boutevin, B. & Caillol, S. New vanillin-derived diepoxy monomers for the synthesis of biobased thermosets. *Eur. Polym. J.* **67**, 527 (2015).
40. Masuda, T., Maekawa, T., Hidaka, K., Bando, H. & Takeda, Y. Chemical Studies on Antioxidant Mechanism of Curcumin: Analysis of Oxidative Coupling Products from Curcumin and Linoleate. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2539 (2001).
41. Lin, L. *et al.* Antitumor Agents. 250. Design and Synthesis of New Curcumin Analogues as Potential Anti-Prostate Cancer Agents. *J. Med. Chem.* **49**, 3963 (2006).
42. Ryu, E. K., Choe, Y. S., Lee, K. H., Choi, Y. & Kim, B. T. Curcumin and dehydrozingerone derivatives: Synthesis, radiolabeling, and evaluation for - amyloid plaque imaging. *Journal of Medicinal Chemistry* **49**, 6111 (2006).
43. Liang, G. *et al.* Synthesis and anti-inflammatory activities of mono-carbonyl analogues of curcumin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 1525 (2008).
44. Zhang, Q. *et al.* Synthesis and cytotoxic activity of novel curcumin analogues. *Chinese Chem. Lett.* **19**, 281 (2008).
45. Li, Q., Chen, J., Luo, S., Xu, J. & Huang, Q. Synthesis and assessment of the antioxidant and antitumor properties of asymmetric curcumin analogues. *Eur. J. Med. Chem.* **93**, 461 (2015).
46. Mathé, C., Barre, A., Jourda, C. & Dunand, C. Evolution and expression of class III peroxidases. *Arch. Biochem. Biophys.* **500**, 58 (2010).
47. Hamid, M. & Khalil-ur-Rheman. Potential applications of peroxidases. *Food Chem.* **115**, 1177 (2009).
48. Lopes, G. R., Pinto, D. C. G. A. & Silva, A. M. S. Horseradish peroxidase (HRP) as a tool in green chemistry. *R. Soc. Chem. Adv.* **4**, 37244 (2014).
49. Scott, A. I. Oxidative coupling of phenolic compounds. *Quarterly Rev.* **19**, 1 (1965).
50. Danner, D. J., Brignac, P., Arceneaux, D. & Patel, V. The Oxidation of Phenol Peroxidase and Its Reaction Hydrogen Product by Horseradish Peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **156**, 759 (1973).

51. Veitch, N. C. Horseradish peroxidase : a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* **65**, 249 (2004).
52. Chioccaro, F. *et al.* Regio- and Diastereo-selective Synthesis of Dimeric Lignans using Oxidative Coupling. *Acta Chem. Scand.* **47**, 610 (1993).
53. Huixian, Z. & Taylor, K. E. Products of Oxidative Coupling of Phenol by Horseradish Peroxidase. *Chemosphere* **28**, 1807 (1994).
54. Setälä, H., Pajunen, A., Kilpeläinen, I. & Brunow, G. Horse Radish Peroxidase-catalysed Oxidative Coupling of Methyl Sinapate to give Diastereoisomeric Spiro Dimers. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1163 (1994).
55. Sridhar, M., Vadivel, S. K., Bhalerao, U. T. Novel Horseradish Peroxidase Catalysed Enantioselective Oxidation of 2-Naphtols to 1,1'-Binaphthyl-2,2'-diols. *Tetrahedron Lett.* **38**, 5695 (1997).
56. Schmitt, M. M., Schüler, E., Braun, M., Häring, D. & Schreier, P. Horseradish peroxidase: An effective but unselective biocatalyst for biaryl synthesis. *Tetrahedron Lett.* **39**, 2945 (1998).
57. Malnar, I. & Sih, C. J. Synthesis of the bis-diaryl ether fragment of vancomycin via enzymatic oxidative phenolic coupling. *Tetrahedron Lett.* **41**, 1907 (2000).
58. Antoniotti, S., Santhanam, L., Ahuja, D., Hogg, M. G. & Dordick, J. S. Structural Diversity of Peroxidase-Catalyzed Oxidation Products of o-Methoxyphenols. *Org. Lett.* **6**, 2002 (2004).
59. Russell, W. R., Burkitt, M. J., Scobbie, L. & Chesson, A. Radical formation and coupling of hydroxycinnamic acids containing. *Bioorg. Chem.* **31**, 206 (2003).
60. Bolzacchini, E. *et al.* Enantioselective Synthesis of a Benzofuranic Neolignan by Oxidative Coupling. *Tetrahedron Lett.* **39**, 3291 (1998).
61. Guo, Z. W., Machiya, K., Salamonczyk, G. M. & Sih, C. J. Total synthesis of bastadins 2, 3, and 6. *J. Org. Chem.* **63**, 4269 (1998).
62. Bee-Bei, Y., Xiu-Zhen, H. & Hong-Xiang, L. Oligomers of Resveratrol and Ferulic Acid Prepared by Peroxidase-Catalyzed Oxidation and Their Protective Effects on Cardiac Injury. *J. Agric. Food Chem* **55**, 7753 (2007).
63. Karhunen, P., Rummakko, P., Sipila, J. & Kilpebinen, I. The Formation Of Dibenzodioxocin Structures By Oxidative Coupling. A Model Reaction For Lignin Biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **36**, 4501 (1995).

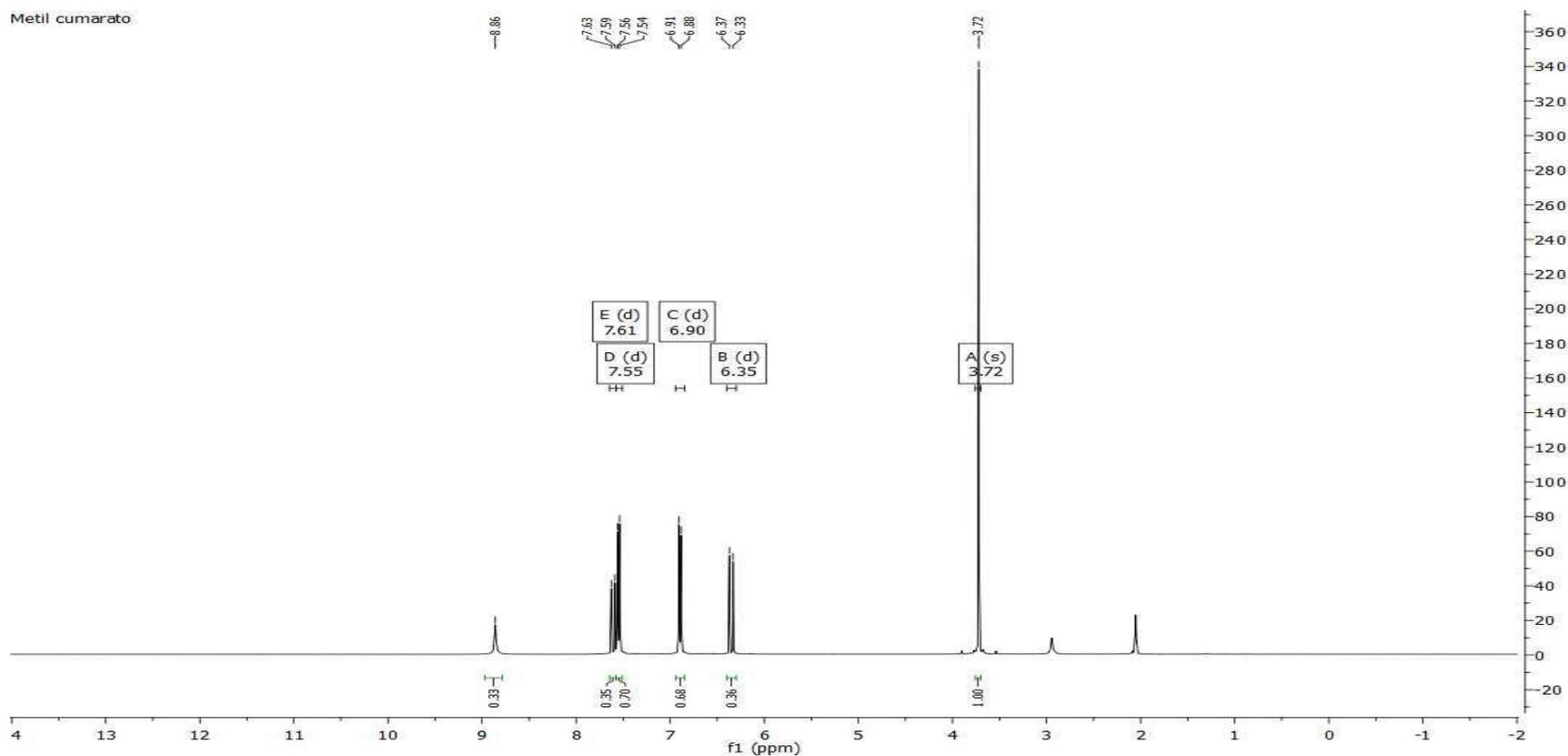
64. Quideau, S. & Ralph, J. Lignin-ferulate cross-links in grasses. Part 4. Incorporation of 5-5-coupled dehydroferulate into synthetic lignin. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 2351 (1997).
65. Yue, F., Lu, F., Sun, R. & Ralph, J. Synthesis and characterization of new 5-linked pinoresinol lignin models. *Chem. - A Eur. J.* **18**, 16402–16410 (2012).
66. Saliu, F., Tolppa, E., Zoia, L. & Orlandi, M. Horseradish peroxidase catalyzed oxidative cross-coupling reactions: the synthesis of 'unnatural' dihydrobenzofuran lignans. *Tetrahedron Lett.* **52**, 3856 (2011).
67. Arrieta-Baez, D. & Stark, R. E. Modeling suberization with peroxidase-catalyzed polymerization of hydroxycinnamic acids: Cross-coupling and dimerization reactions. *Phytochemistry* **67**, 743 (2006).
68. Lira-Parada, P. A. Expandiendo la diversidad estructural del ácido ferúlico mediante reacciones de oxidación química y enzimática para la obtención de compuestos de valor agregado. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2014).
69. Lecher, C. S. *Sodium Borohydride Reduction of Vanillin: A Low Solvent Synthesis of Vanillyl Alcohol*. Chemistry, Marion College (2007).
70. <http://sdbs.db.aist.go.jp> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 04/2015).
71. Priefert, H., Rabenhorst, J. & Steinbüchel, A. Biotechnological production of vanillin. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**, 296 (2001).
72. Pearl, I. a. Reactions of vanillin and its derived compounds; the reaction of vanillin with silver oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **68**, 429 (1946).
73. Moussouni, S. *et al.* Crude peroxidase from onion solid waste as a tool for organic synthesis . Part II : oxidative dimerization – cyclization of methyl *p*-coumarate , methyl caffeate and methyl ferulate. *Tetrahedron Lett.* **52**, 1165 (2011).
74. Anita, Y., Widiyarti, G. & Abbas, J. Synthesis and elucidation structure of O-para dehydroguaiacol prepared by crude of *Brassica oleracea* var alboglabra peroxidase catalyzed oxidation. *J. Appl. Pharm. Sci.* **4**, 62 (2014).
75. Morales-Toledo, L. Obtención de derivados fenólicos mediante reacciones de acoplamiento oxidativo promovido por peroxidasas de diferentes fuentes vegetales. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2013).

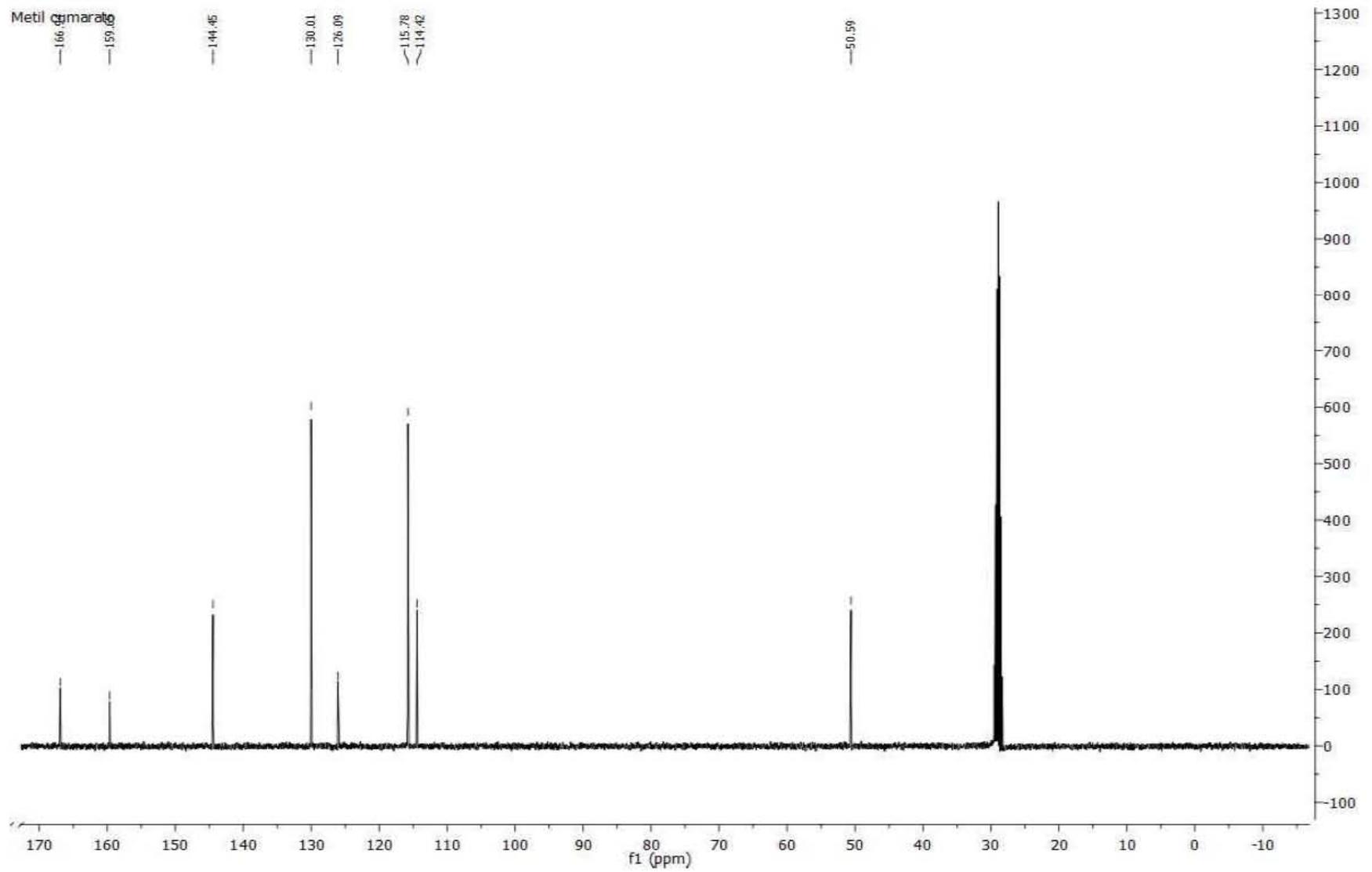
76. Arellano-García, A. C. Uso de peroxidasas vegetales en reacción de acoplamiento oxidativo de ácidos hidroxicinámicos. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2015).
77. Lu, F., Wei, L., Azarpira, A. & Ralph, J. Rapid Syntheses of Dehydrodiferulates via Biomimetic Radical Coupling Reactions of Ethyl Ferulate. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 8272 (2012).
78. Setälä, H., Pajunen, A., Rummakko, P., Sipilä, J. & Brunow, G. A novel type of spiro compound formed by oxidative cross coupling of methyl sinapate with a syringyl lignin model compound . A model system for the β -1 pathway in lignin biosynthesis. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 461 (1999).
79. Nishimura, R. T., Giammanco, C. H. & Vosburg, D. a. Green, enzymatic syntheses of divanillin and diapocynin for the organic, biochemistry, or advanced general chemistry laboratory. *J. Chem. Educ.* **87**, 526 (2010).
80. Zhi, L. F., Li, Q. X. & Li, Y. L. A novel application of horseradish peroxidase: Oxidation of alcohol ethoxylate to alkylether carboxylic acid. *Chinese Chem. Lett.* **19**, 1411 (2008).

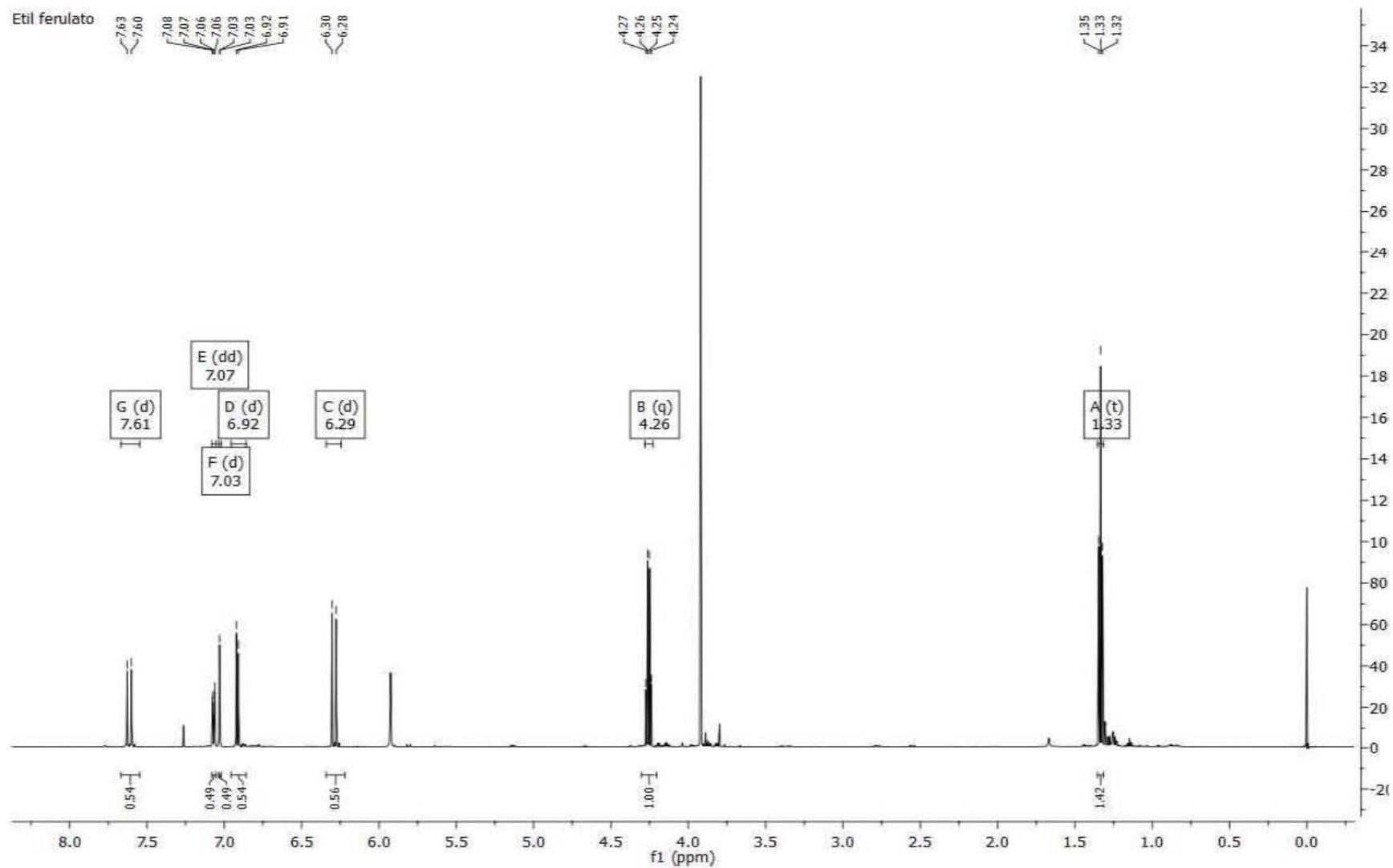
8. Apéndice.

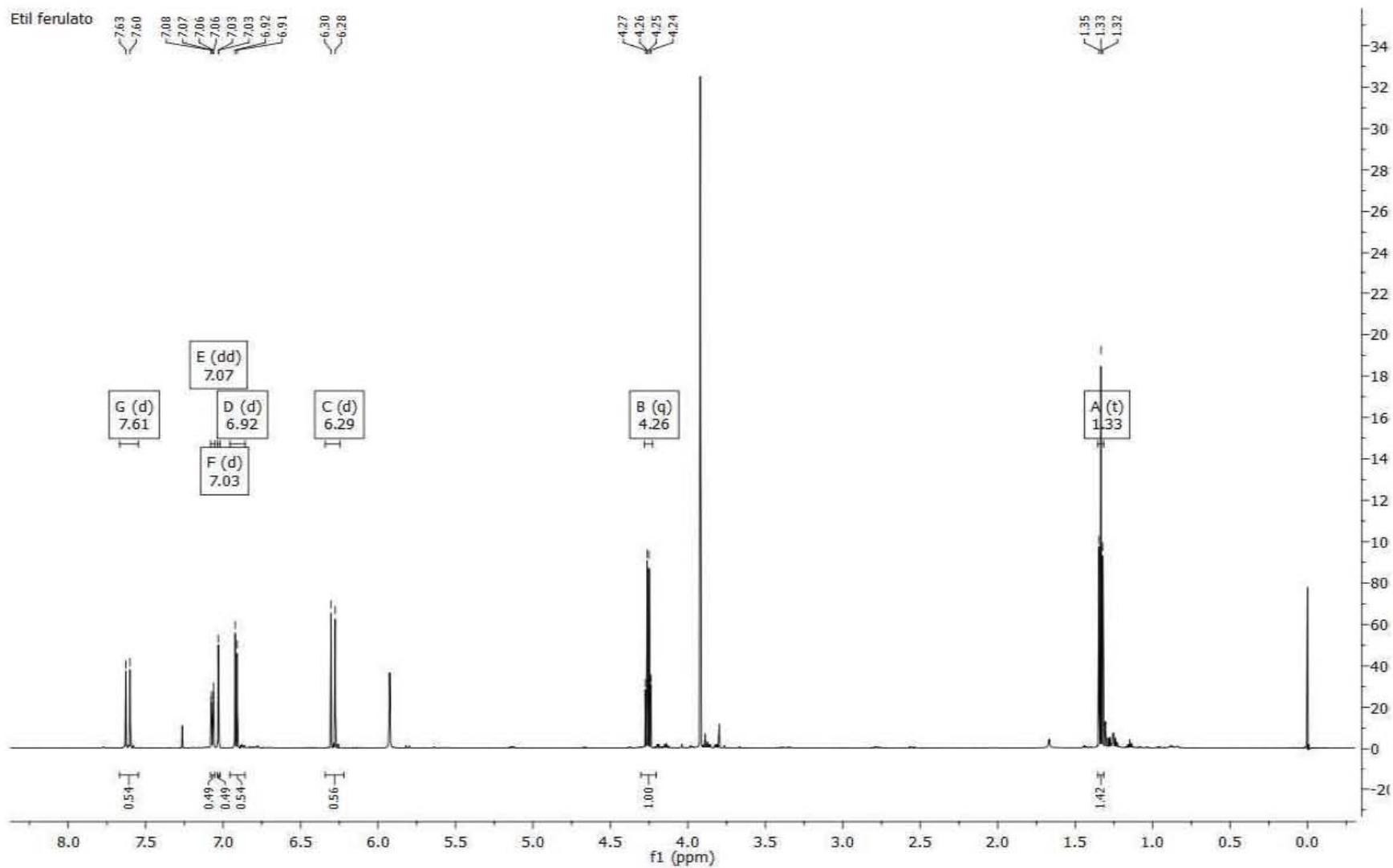
Se muestran los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C . De materias primas y sus respectivos productos de acoplamiento.

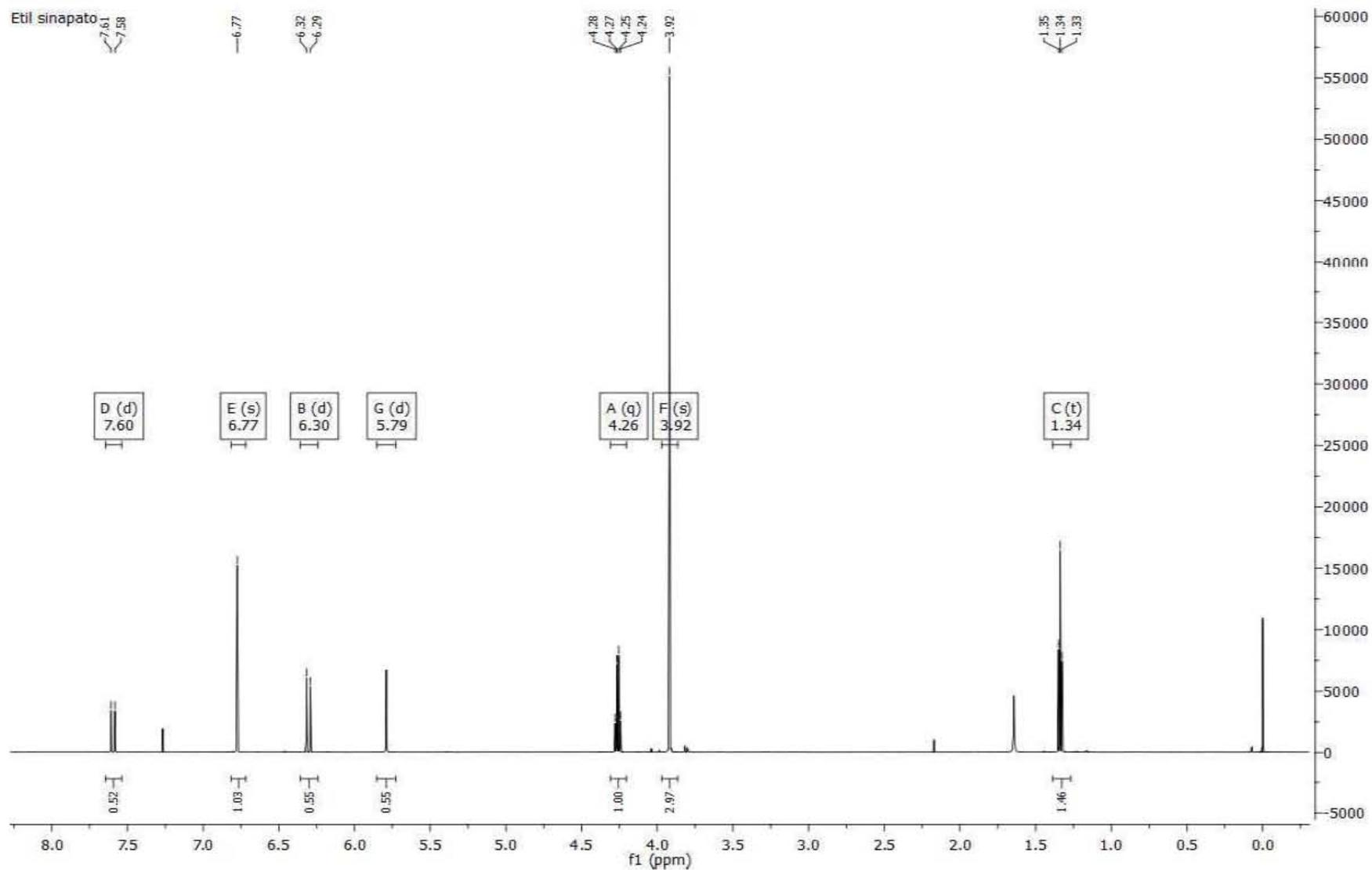
Espectro de RMN ^1H del cumarato de metilo (300 MHz, acetona- d_6)

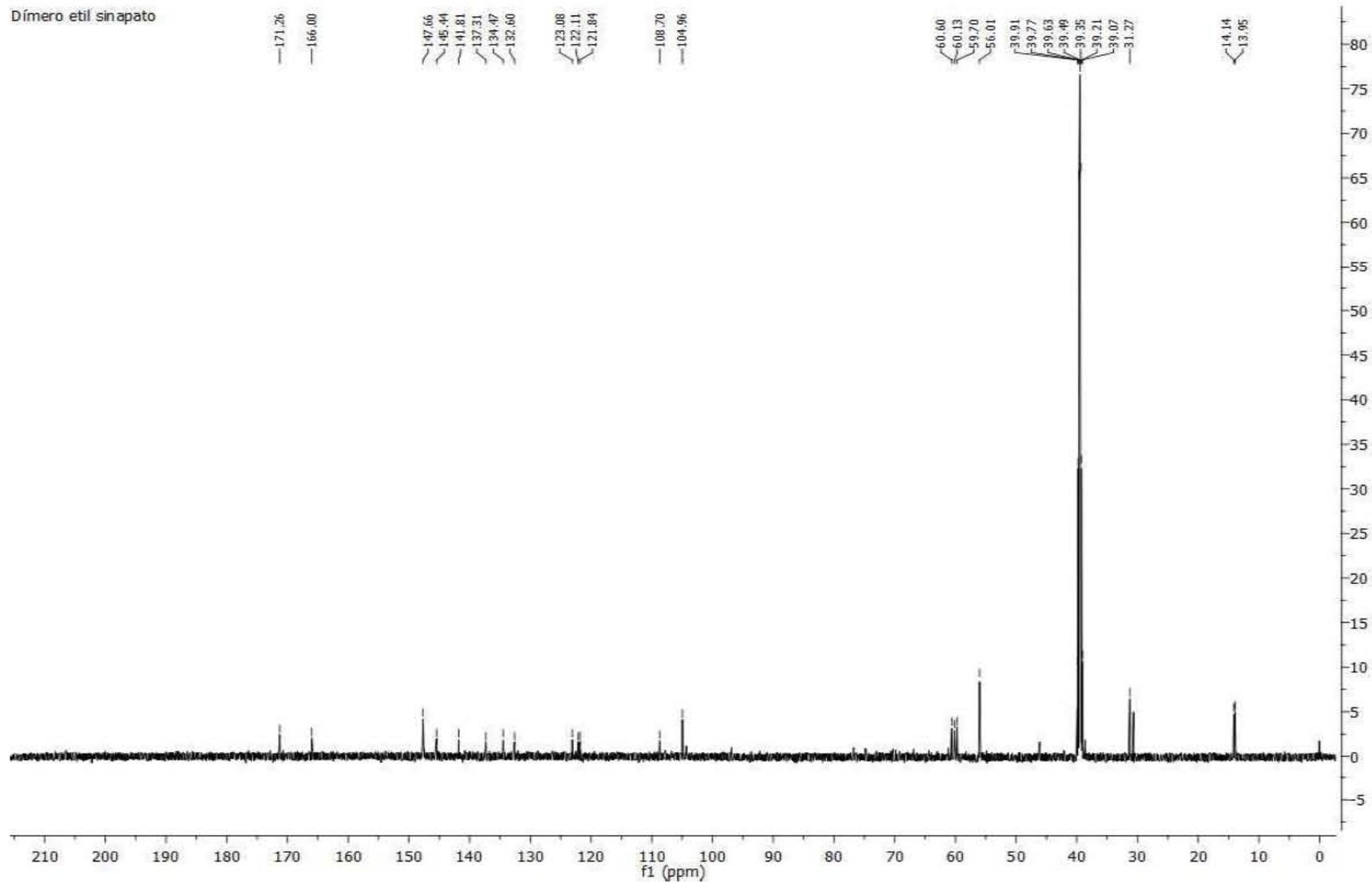


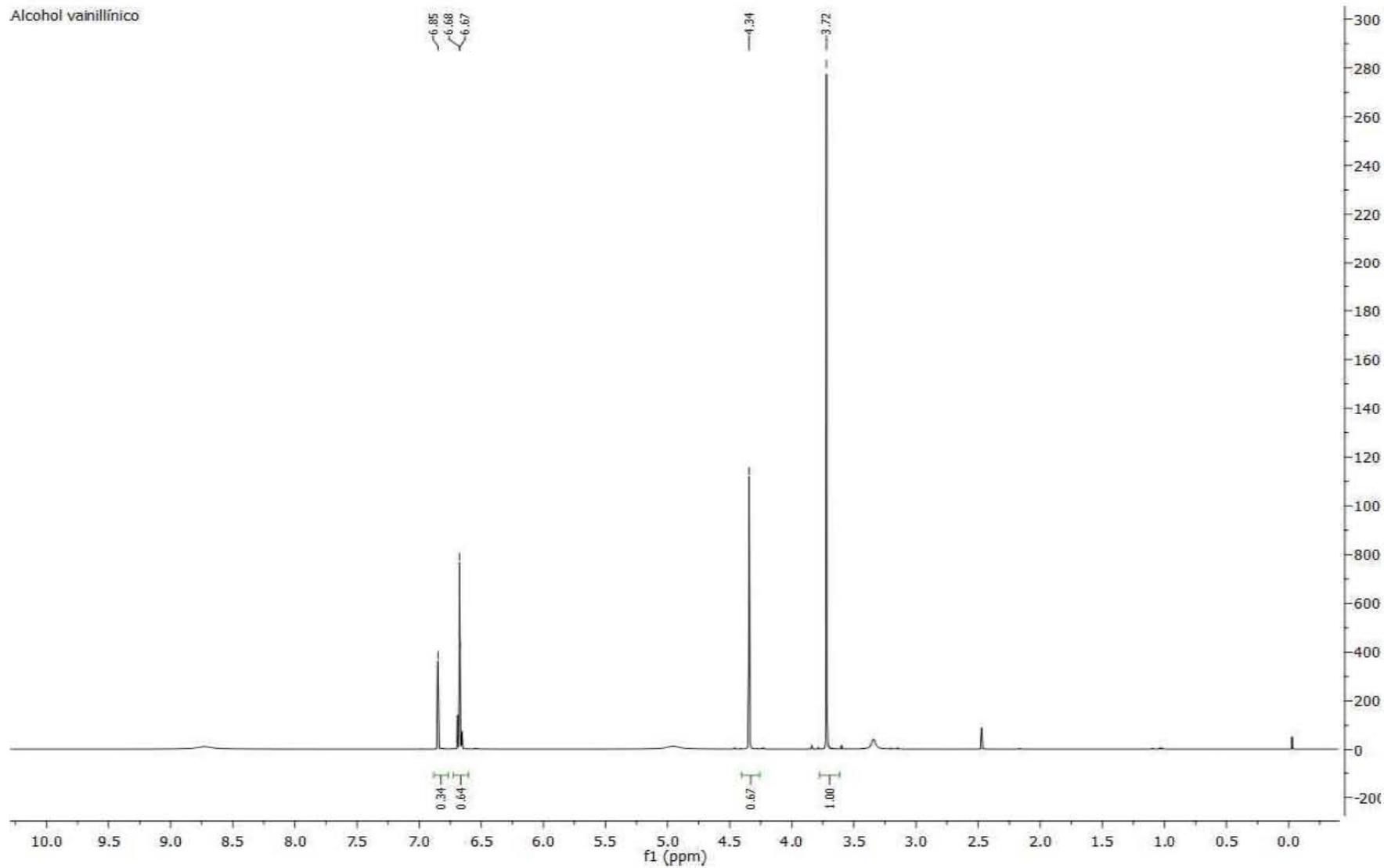
Espectro de RMN 13C del cumarato de metilo (300 MHz, acetona-d₆)

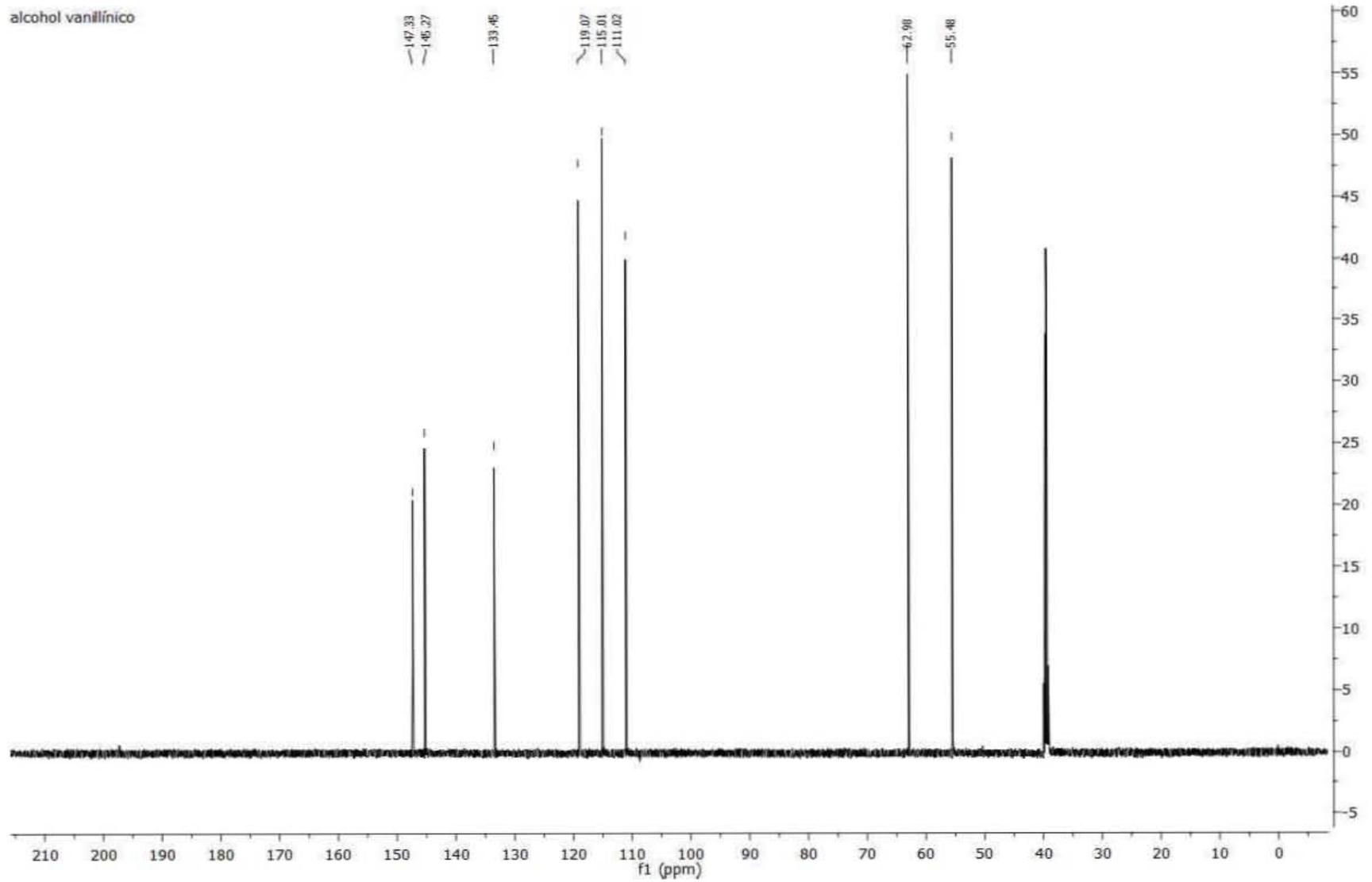
Espectro de RMN de ^1H del ferulato de etilo (300 MHz, acetona- d_6)

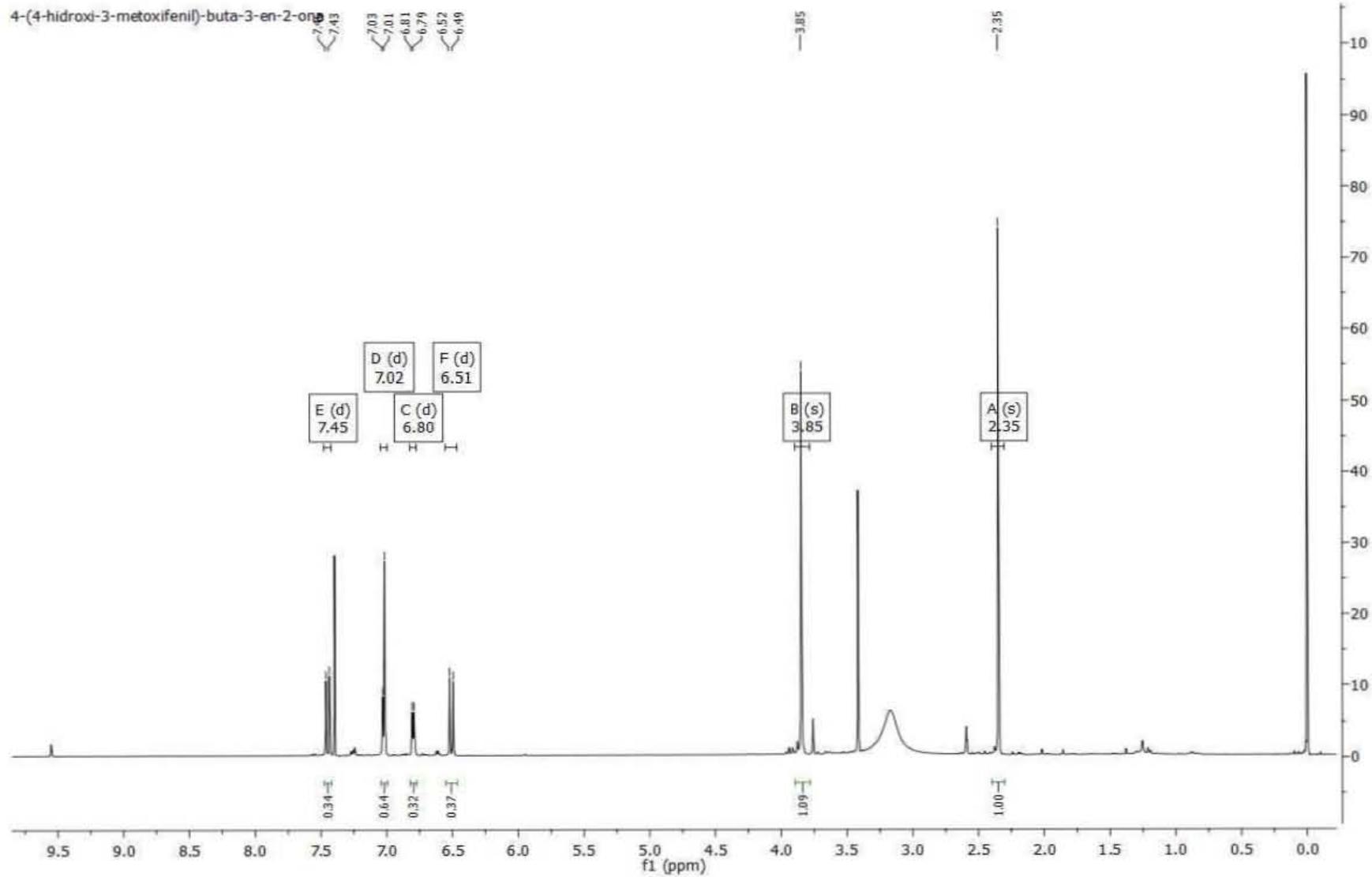
Espectro de RMN de ^{13}C del ferulato de etilo (300 MHz, acetona- d_6)

Espectro de RMN de ^1H del sinapato de etilo (300 MHz, acetona- d_6)

Espectro de RMN de ^{13}C del sinapato de etilo (300 MHz, acetona- d_6)

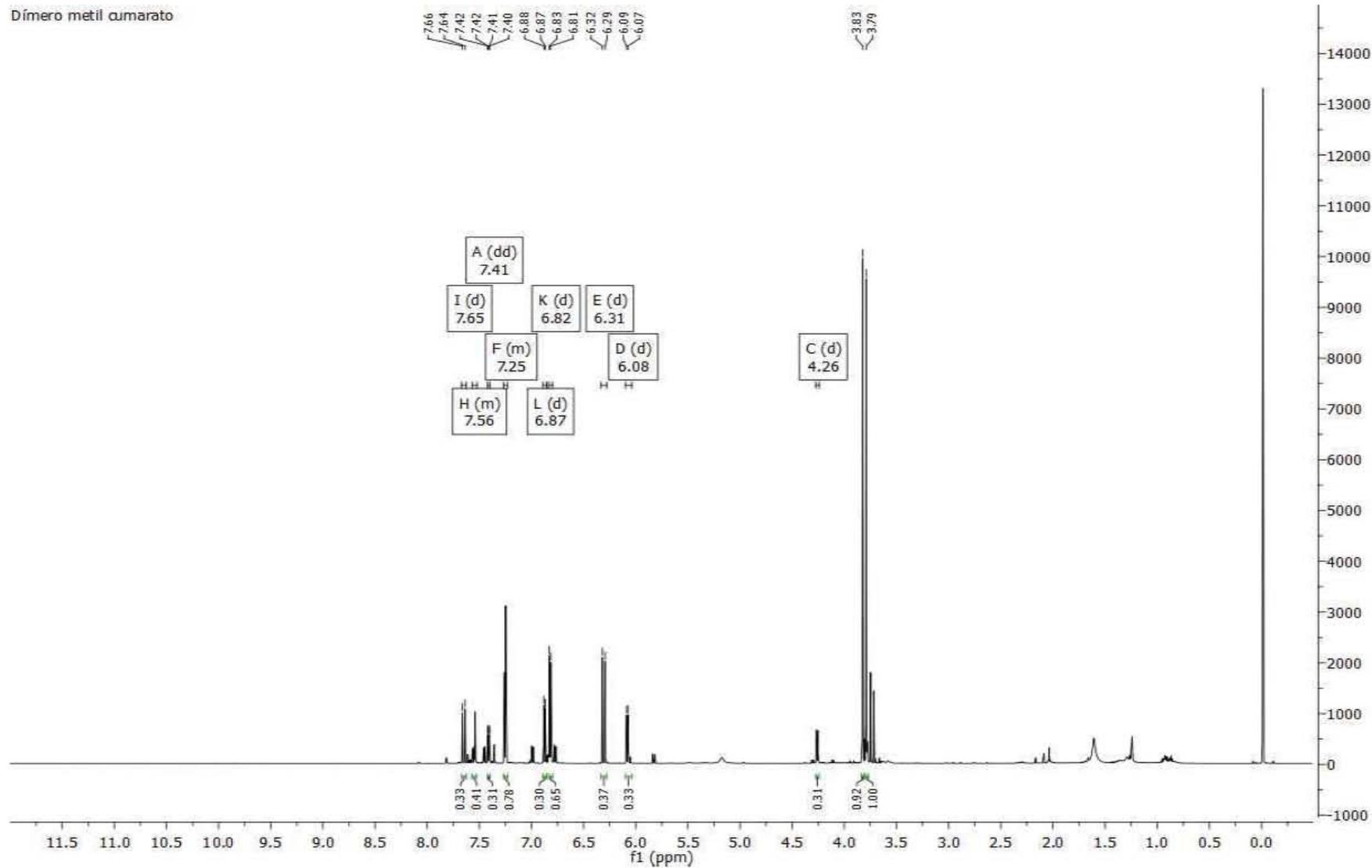
Espectro de RMN de ^1H del alcohol vainillínico (600 MHz, cloroformo-d)

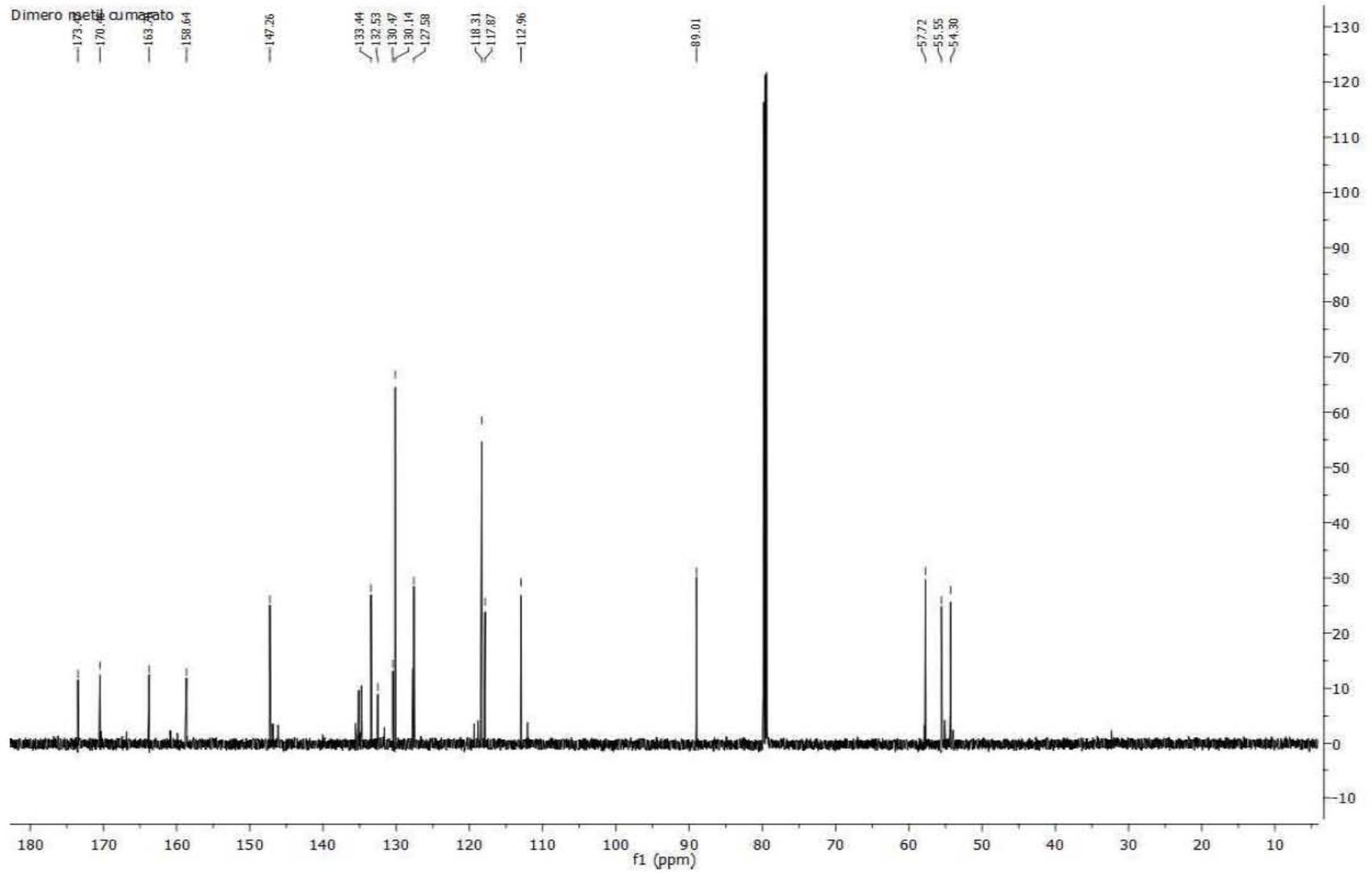
Espectro de RMN de ^{13}C del alcohol vainillínico (600 MHz, cloroformo-d)

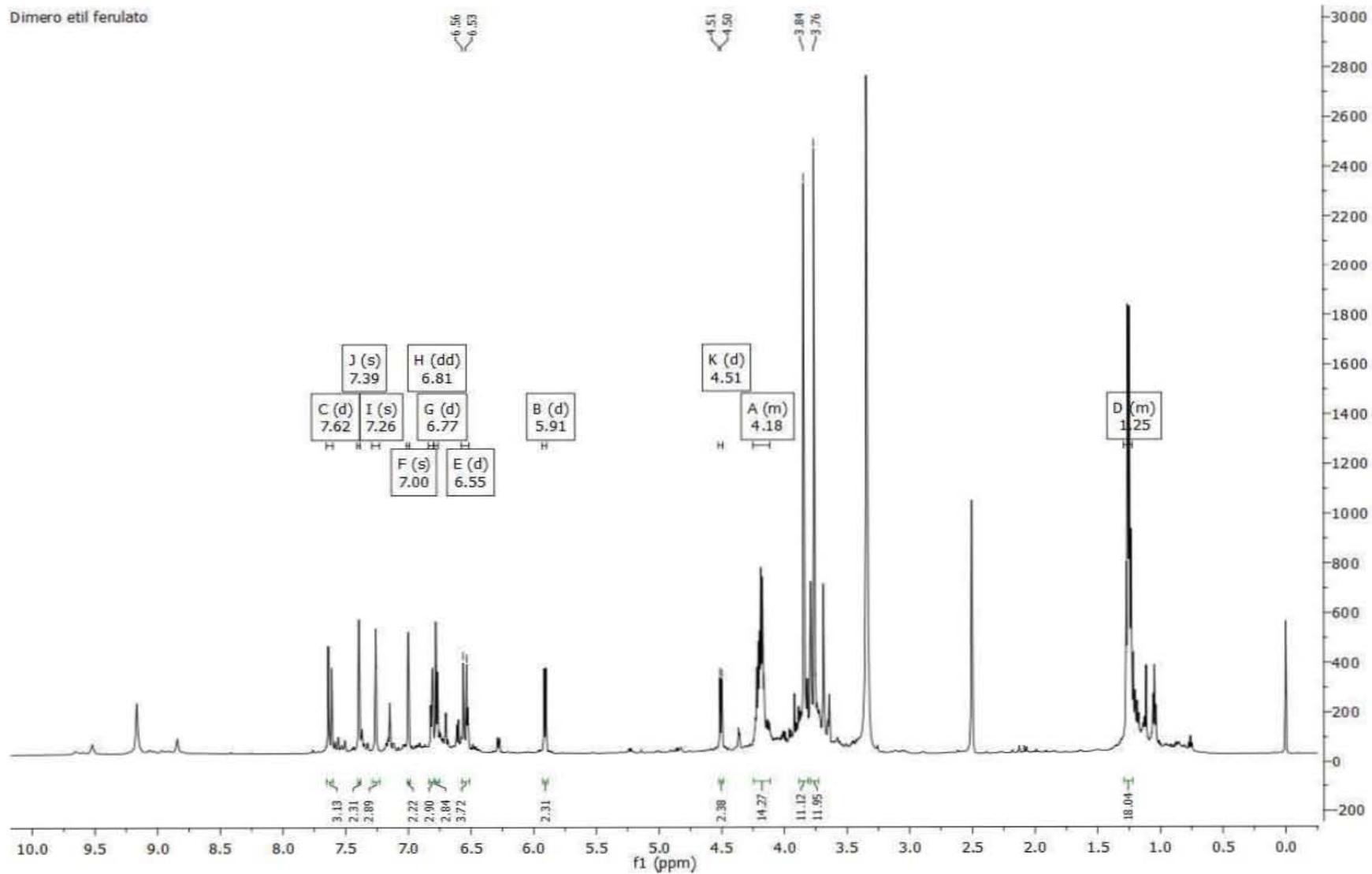
Espectro de RMN de ^1H de **8** (600 MHz, $\text{CHCl}_3\text{-d}$)

Espectro de RMN de ^1H de $1'a$ (600 MHz, DMSO-d_6)

Dímero metil cumarato

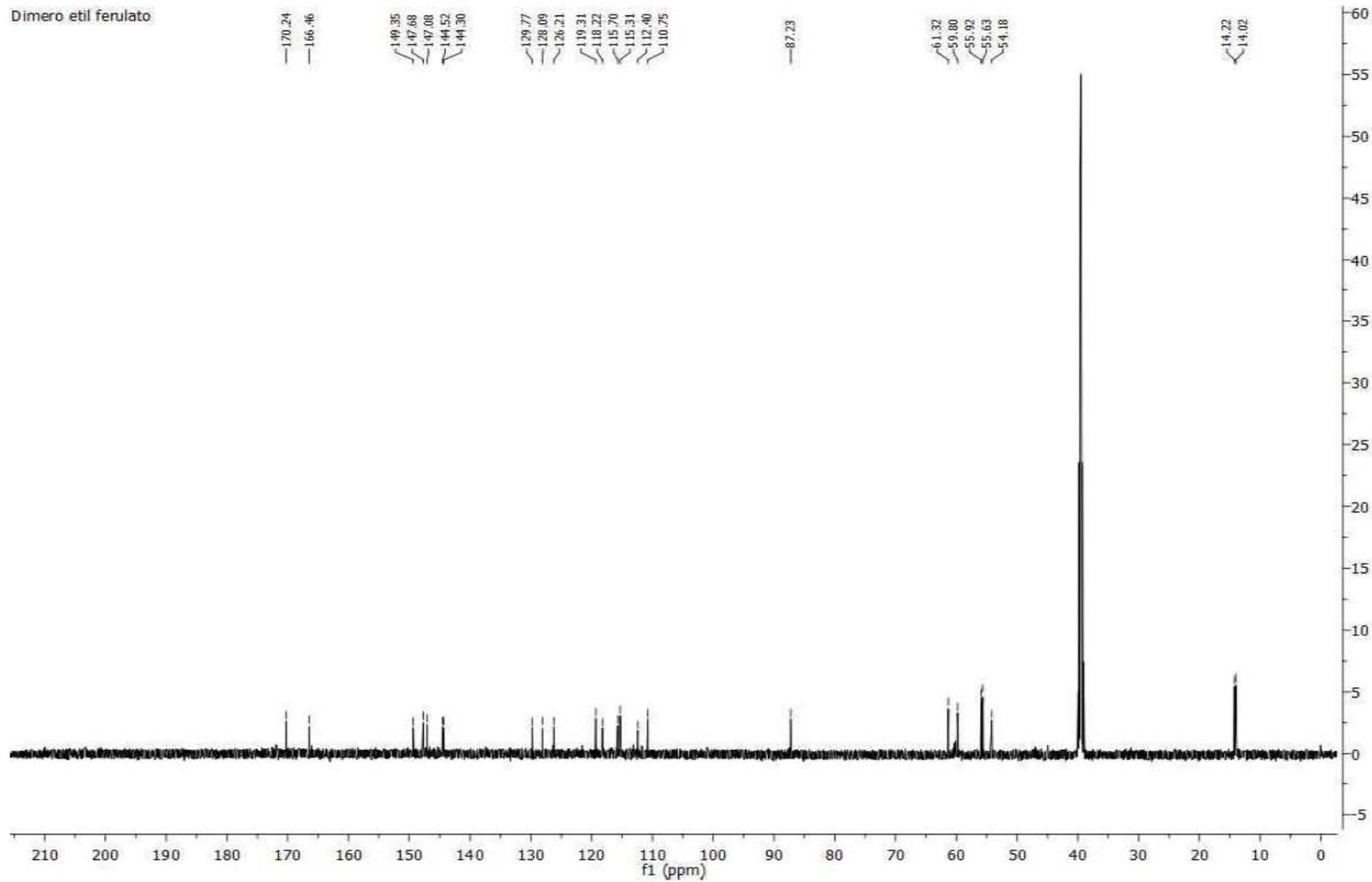


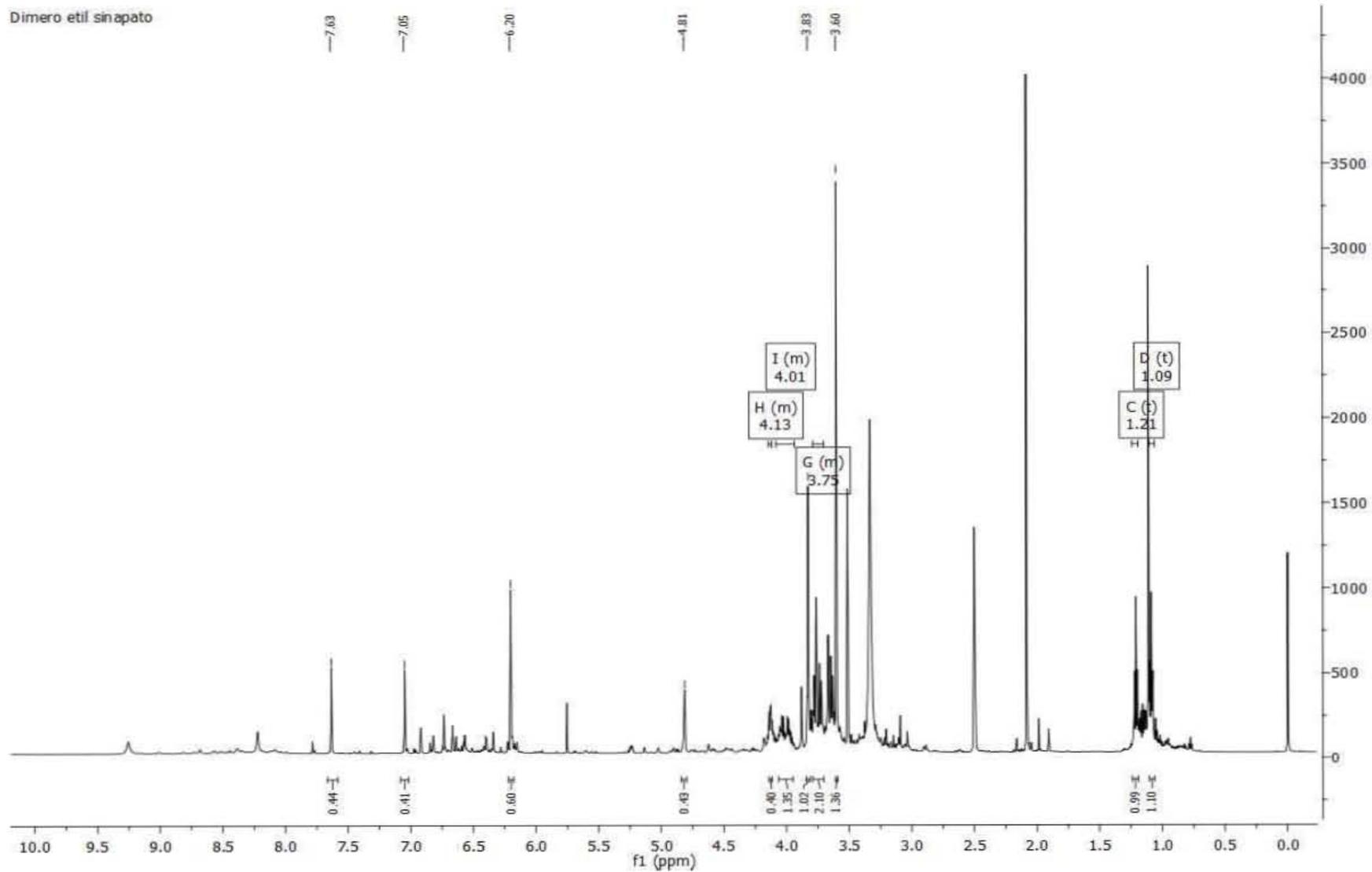
Espectro de RMN de ^{13}C de **1'a** (600 MHz, DMSO- d_6)

Espectro de RMN de ^1H de **3'b** (600 MHz, DMSO- d_6)

Espectro de RMN de ^{13}C de **3'b** (600 MHz, DMSO- d_6)

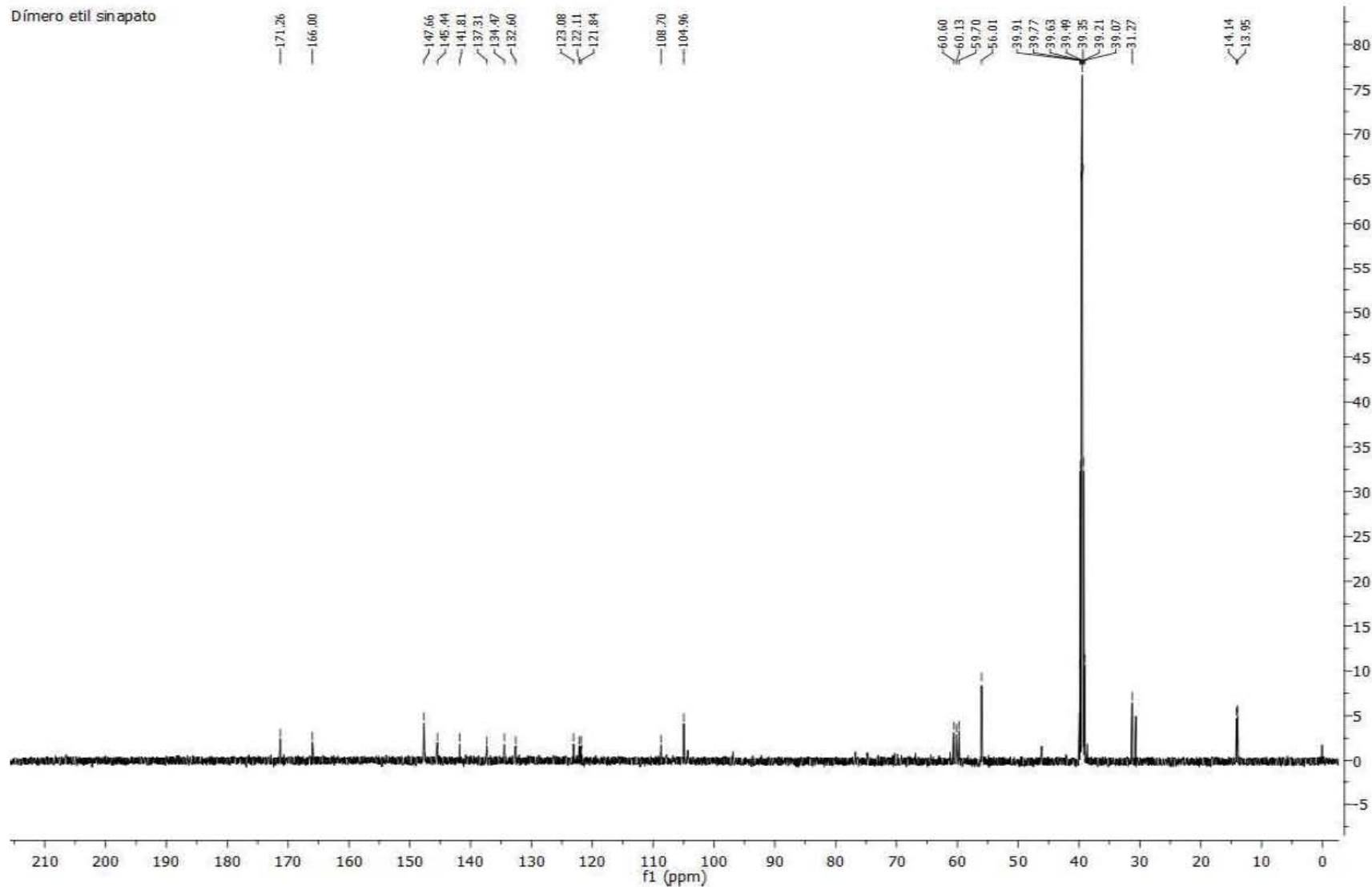
Dimero etil ferulato



Espectro de RMN de ^1H de **4b** (600 MHz, DMSO- d_6)

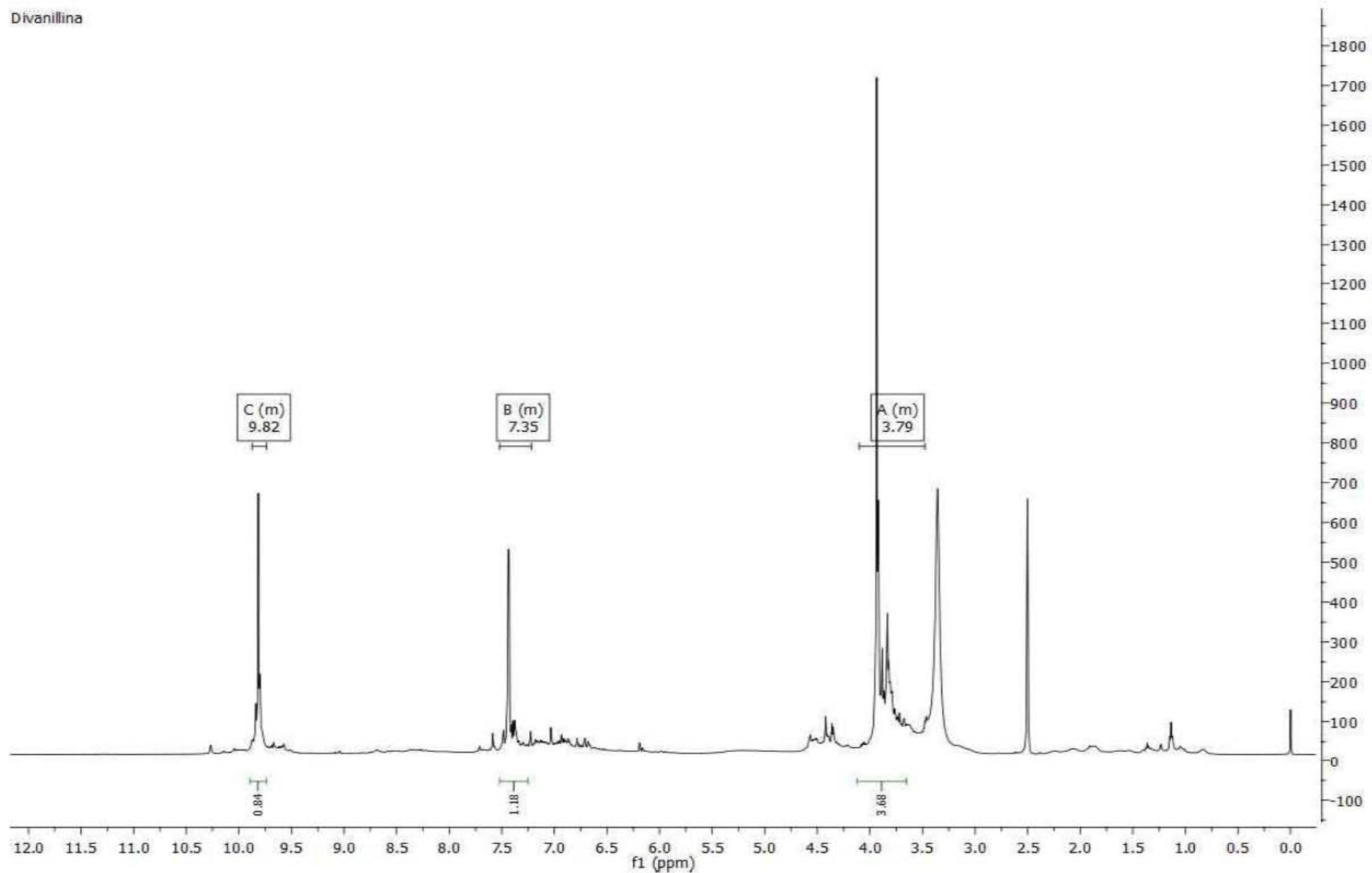
Espectro de RMN de ^{13}C de **4'b** (600 MHz, DMSO- d_6)

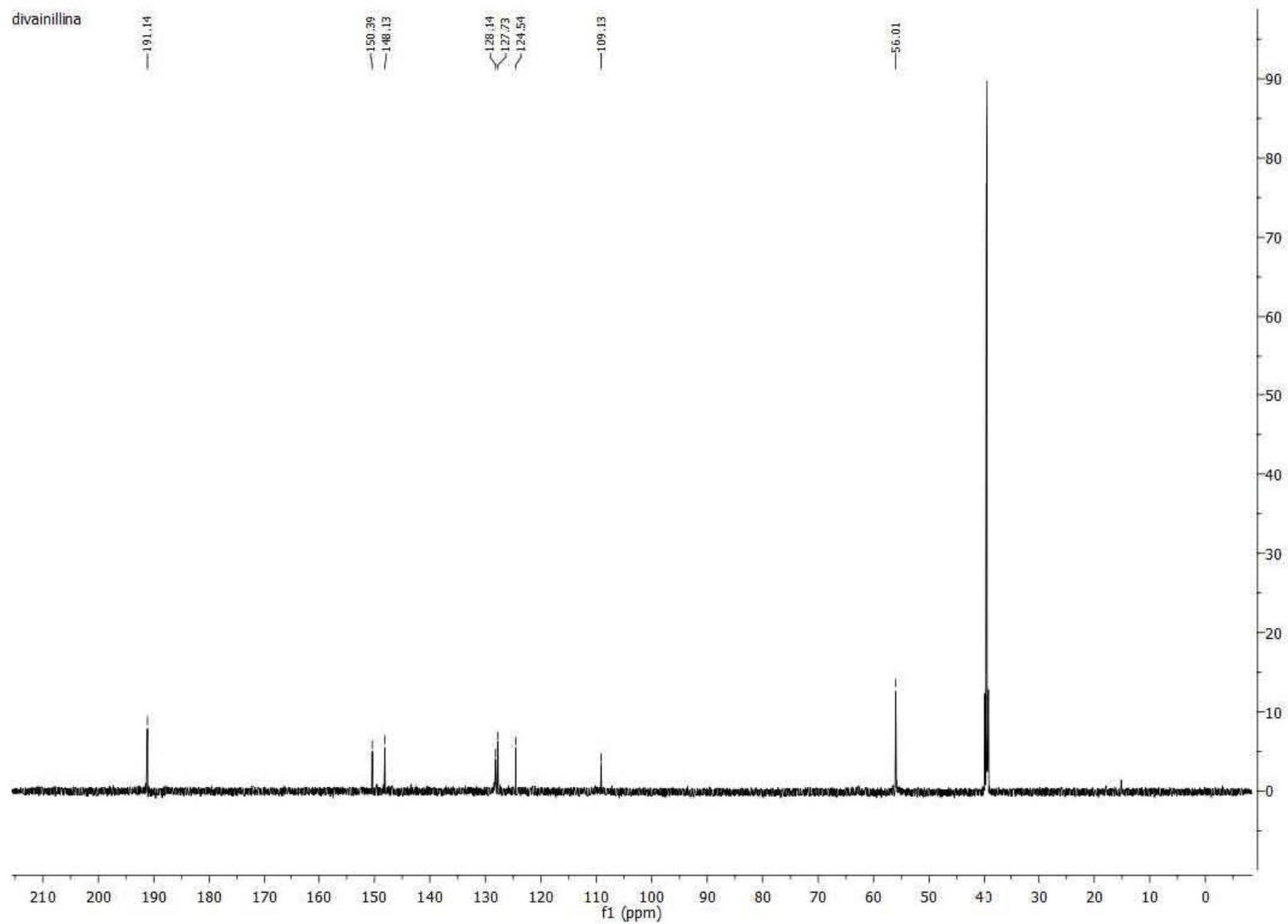
Dímero etil sinapato

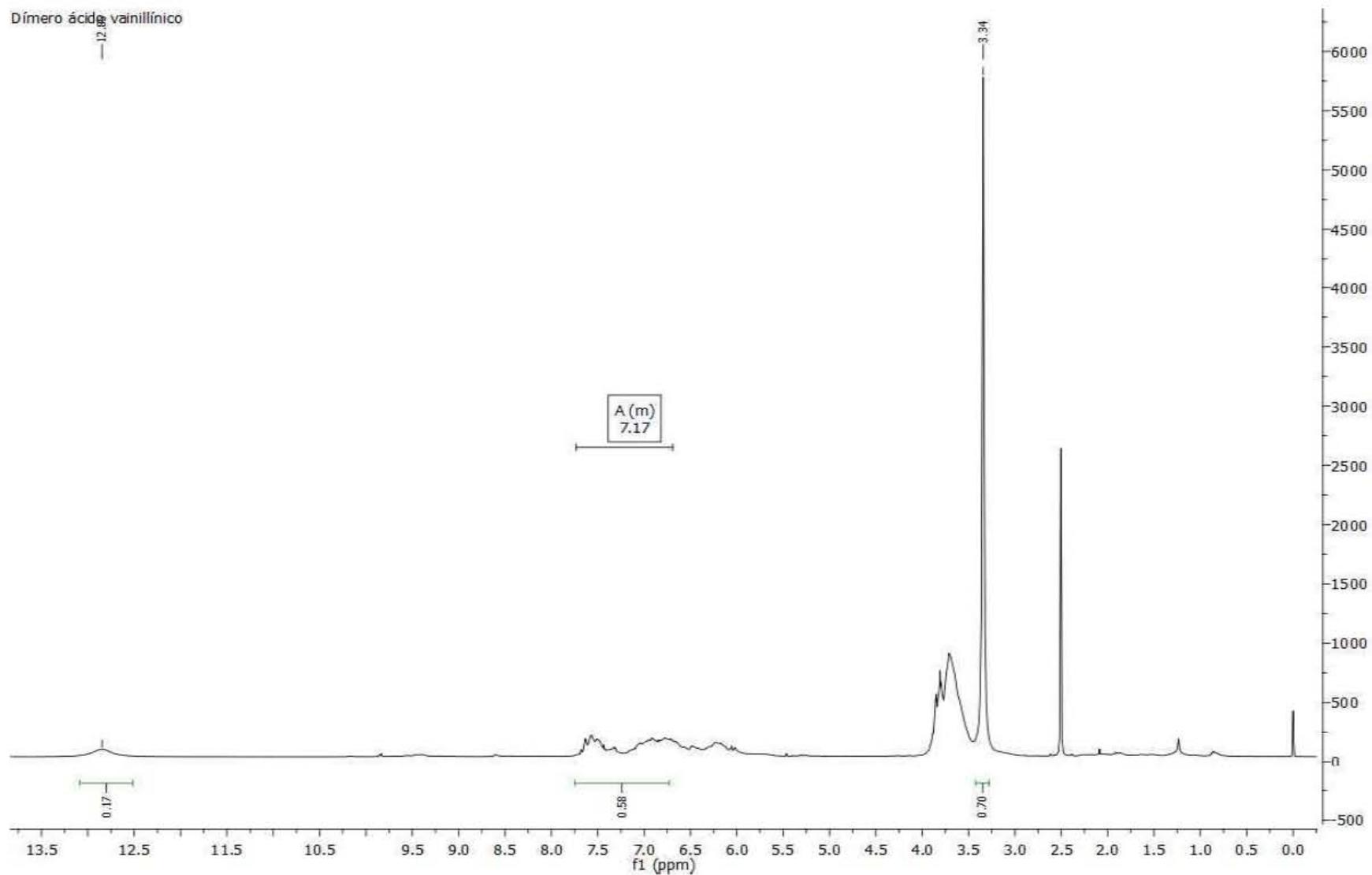


Espectro de RMN de ^1H **10** (600 MHz, DMSO- d_6)

Divanilina

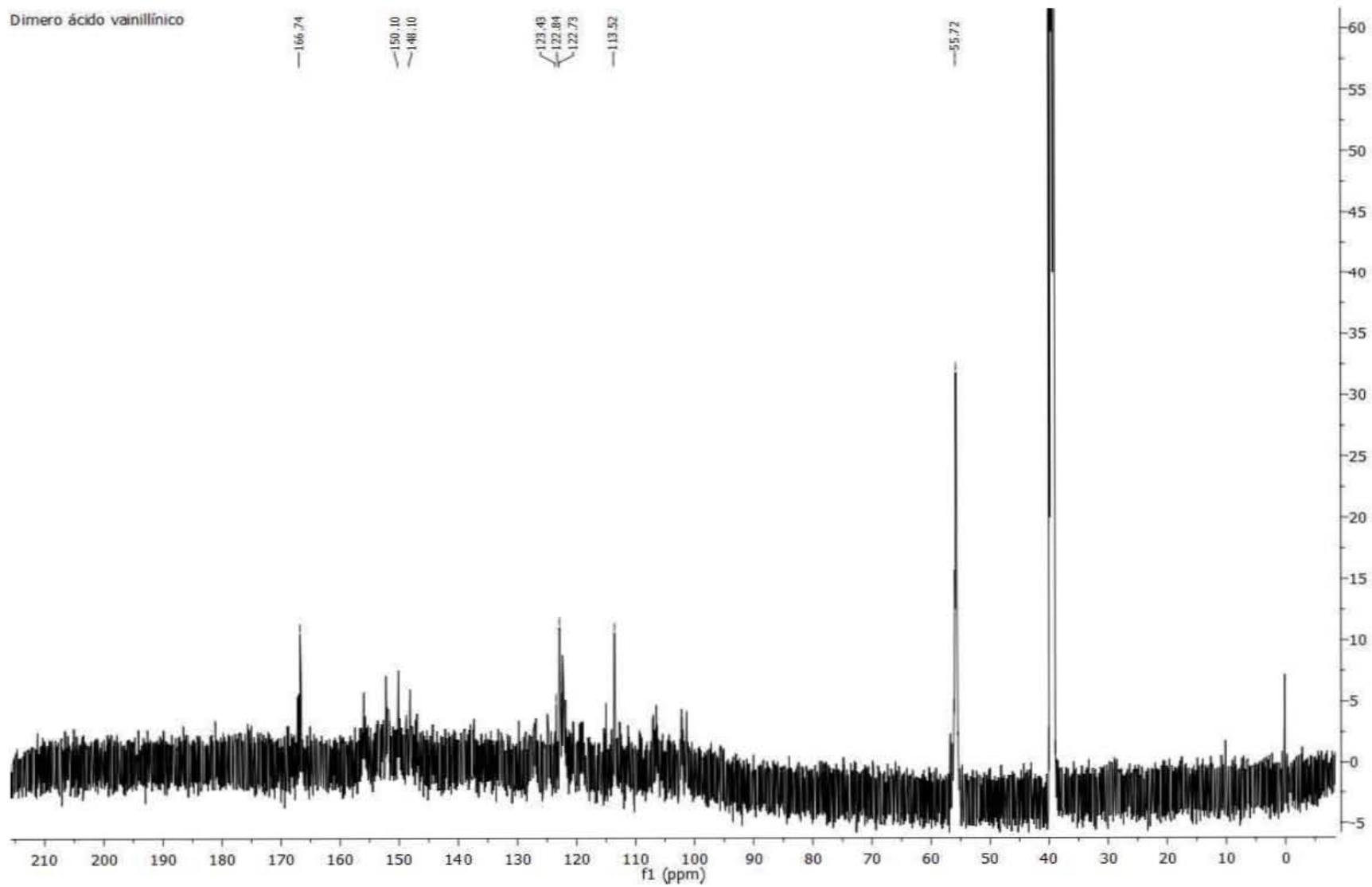


Espectro de RMN de ^{13}C **10** (600 MHz, DMSO- d_6)

Espectro de RMN de ^1H de **11** (600 MHz, DMSO- d_6)

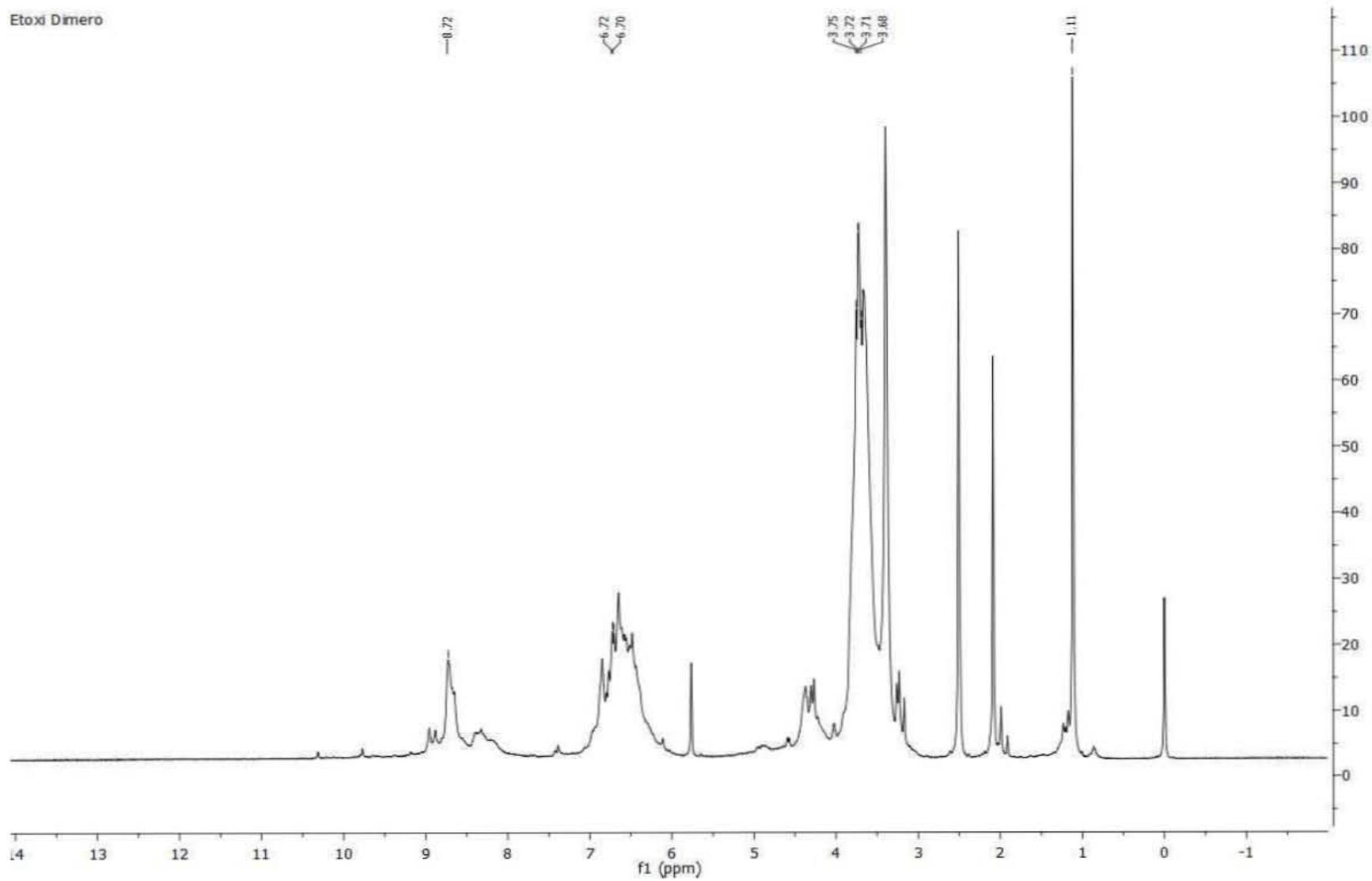
Espectro de RMN de ^{13}C de **11** (600 MHz, DMSO- d_6)

Dimero ácido vainillínico



Espectro de RMN de ^1H de **12** (600 MHz, DMSO- d_6)

Etoxil Dimero



Espectro de RMN de ^{13}C 12 (600 MHz, DMSO- d_6)