



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTIOXIDANTE DE UN ANÁLOGO  
ESTRUCTURAL DEL ALCALOIDE CAULERPINA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**KARLA DANIELA CÁRDENAS GUTIÉRREZ**



**CDMX**

**AÑO 2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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:**

<b>PRESIDENTE:</b>	<b>Profesora: MIRANDA MARTÍNEZ INÉS</b>
<b>VOCAL:</b>	<b>Profesor: TORRES OCHOA RUBÉN OMAR</b>
<b>SECRETARIO:</b>	<b>Profesora: ÁLVAREZ CISNEROS YENIZEY MERIT</b>
<b>1er. SUPLENTE:</b>	<b>Profesor: TRAPALA REYNA JONATHAN</b>
<b>2° SUPLENTE:</b>	<b>Profesor: BÁEZ FERNÁNDEZ MARCOS FRANCISCO</b>

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

- **LABORATORIO 2-11 Y LABORATORIO DE PRUEBAS BIOLÓGICAS, INSTITUTO DE QUÍMICA UNAM**
- **LABORATORIO DE BIOMOLÉCULAS, UAM IZTAPALAPA**

**ASESOR DEL TEMA: DRA. YENIZEY MERIT ÁLVAREZ CISNEROS**

(nombre y firma)

**SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. ROSA MARÍA CHÁVEZ SANTOS**

(nombre y firma)

**SUSTENTANTE: KARLA DANIELA CÁRDENAS GUTIÉRREZ**

(nombre y firma)

*El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio 2-11 y en el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, así como en el laboratorio de biomoléculas de la UAM- Iztapalapa, bajo la asesoría de la Dra. Yenizey Merit Álvarez Cisneros, y la supervisión técnica de la Dra. Rosa María Chávez Santos y el M. en C. Antonio Nieto Camacho. Para el desarrollo del proyecto se contó con el apoyo de DGAPA (Proyecto PAPIIT IT201022) y del CONACYT (Proyecto A1-S-16584).*

*Se agradece el apoyo de la MVZ Claudia Rivera Cerecedo y el MVZ Héctor Malagón Rivero, personal del bioterio, por la donación de ratas para la prueba de TBARS.*

# ÍNDICE

<b>GLOSARIO</b> .....	<b>i</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>2. ANTECEDENTES (MARCO TEÓRICO)</b> .....	<b>6</b>
2.1 La caulerpina y sus análogos estructurales .....	6
2.2 Deterioro de lípidos.....	7
2.3 Radicales libres .....	7
2.4 Actividad antioxidante y métodos de evaluación .....	8
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>12</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>12</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
5.1 Objetivo general .....	13
5.2 Objetivos particulares .....	13
<b>6. METODOLOGÍA GENERAL</b> .....	<b>14</b>
6.1 Síntesis del análogo estructural de la caulerpina .....	15
6.2 Evaluación de la actividad antioxidante .....	19
6.3 Efecto del tratamiento térmico y pH en la actividad antioxidante.....	22
6.4 Análisis estadístico .....	24
<b>7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
8.1 Síntesis del análogo estructural de la caulerpina 7a .....	25
8.2 Evaluación de la actividad antioxidante .....	33

8.3 Evaluación de la estabilidad antioxidante .....	39
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>42</b>
<b>9. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>43</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>44</b>
I. Espectro RMN <sup>1</sup> H del compuesto 7a .....	44
II. Espectro RMN <sup>13</sup> C del compuesto 7a .....	45
III. Resultado y condiciones de cromatografía líquidos de alto rendimiento.....	47
IV. Gráficas método de FRAP .....	50
V. Gráficas método de ORAC .....	52
VI. Análisis estadístico .....	54
VII. Simposio Instituto de Química .....	66
VIII. Fotos .....	67
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>70</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Antioxidantes sintéticos.....	4
Figura 2. Antioxidantes naturales.....	4
Figura 3. Compuestos con núcleo de indol y sus bioactividades .....	5
Figura 4. Simplificación estructural del alcaloide caulperpina .....	6
Figura 5. Reacción del radical DDPH con un antioxidante.....	9
Figura 6. Reacción del Ácido tiobarbitúrico con MDA .....	10
Figura 7. Reacción de reducción del reactivo de FRAP .....	10
Figura 8. Decaimiento de la fluoresceína vs.. tiempo. Imagen tomada de protocolo de Biotek. ....	11
Figura 9. Ruta de síntesis del compuesto <b>7a</b> .....	16
Figura 10. Síntesis del xantato <b>3</b> .....	25
Figura 11. Síntesis del indol alquilado <b>5</b> .....	27
Figura 12. Síntesis del bisindol <b>7a</b> .....	28
Figura 13. Compuesto <b>7a</b> (Fotomar).....	30
Figura 14. Espectro RMN <sup>1</sup> H del compuesto <b>7a</b> .....	31
Figura 15. Espectro RMN <sup>13</sup> C del compuesto <b>7a</b> .....	32
Figura 16 Curva estándar trolox. FRAP .....	50
Figura 17. Equivalentes trolox (μM) de fotomar .....	50
Figura 18. Equivalentes trolox (μM) de ácido gálico.....	51
Figura 19. Equivalentes trolox (μM) de quercetina.....	51
Figura 20. Curva estándar de trolox. Método ORAC.....	52
Figura 21. Curva de respuesta antioxidante de fotomar .....	52
Figura 22. Curva de respuesta antioxidante del ácido gálico.....	53
Figura 23. Curva de respuesta antioxidante de la quercetina .....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental para la evaluación de la estabilidad y actividad antioxidante del compuesto FOTOMAR.....	23
Tabla 2. Repeticiones de la síntesis del xantato <b>3</b> .....	26
Tabla 3. Repeticiones de la síntesis del indol alquilado <b>5</b> .....	27
Tabla 4. Condiciones de reacción para la obtención de <b>7a</b> .....	29
Tabla 5. Actividad sobre el radical DDPH IC <sub>50</sub> .....	33
Tabla 6. Inhibición de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata.....	35
Tabla 7. Resultados FRAP.....	36
Tabla 8. Resultados ORAC.....	38
Tabla 9. Pruebas antioxidantes.....	39

## GLOSARIO

### Abreviaturas

AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
AAPH	2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride
CCF	Cromatografía en capa fina
DCE	Dicloroetano
DCM	Diclorometano
DLP	Peróxido de dilauroilo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	Actividad reductora del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
FRAP	Poder antioxidante reductor de hierro
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria al 50%
IR	Espectroscopia de infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
nm	Nanómetro
mL	Mililitros
μL	Microlitros
μM	Micromolar
MDA	Malondialdehído
ORAC	Capacidad de absorción de radicales del oxígeno
ppm	Partes por millón
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de protón

TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TE	Equivalentes trolox
TPTZ	2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine
Trolox	Ácido(±)-6-hidroxi -2,5,7,8-tetrametilcromano-2- carboxílico

### **Fórmulas**

CH <sub>3</sub> CN	Acetonitrilo
HCl	Ácido clorhídrico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sodio

## RESUMEN

En el presente trabajo se describe la síntesis y la evaluación antioxidante del análogo estructural **7a** del alcaloide caulerpina.

La ruta de síntesis se llevó a cabo por medio de los siguientes pasos de reacción:

1. Preparación de xantato por medio de una reacción de sustitución nucleofílica.
2. Reacción de alquilación por radicales libres.
3. Reacción de condensación aldólica (Knoevenagel).

El producto de condensación aldólica fue recristalizado en una mezcla de acetona/agua obteniéndose un precipitado que se caracterizó por análisis de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . La pureza fue evaluada mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Posteriormente se evaluó la actividad antioxidante por medio de las pruebas siguientes:

1. DPPH (Actividad reductora del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)
2. TBARS (Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico).
3. FRAP (Poder antioxidante reductor de hierro)
4. ORAC (Capacidad de absorción de radicales del oxígeno)

Por último, se evaluó la estabilidad del compuesto por medio de un diseño experimental de temperatura-tiempo versus pH, teniendo como variable respuesta la prueba de TBARS y utilizando lardo como fuente de lípidos lardo.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Se obtuvo un sólido de color amarillo mostaza con un rendimiento del 40%, peso molecular de 316.36 g/mol y punto de fusión de 238-240 °C.

Respecto a la evaluación antioxidante, el compuesto **7a** si presentó dicha actividad en las cuatro pruebas antioxidantes, no obstante, la única prueba en que compuesto bajo estudio es más activo que las referencias, fue en TBARS, en donde el valor de IC<sub>50</sub> fue de 4.55 ± 0.16 µM siendo menor que trolox (IC<sub>50</sub>= 28.75±2.34 µM) y que el ácido gálico (IC<sub>50</sub>=19.82±0.84 µM).

Finalmente, no se logró estandarizar la técnica utilizando como matriz de lípidos el lardo, por lo que se optó por regresar a la técnica inicial con cerebro de rata; se observó que la actividad antioxidante no se pierde en ninguno de los tratamientos, pero sí existen diferencias estadísticas entre ellos. Además, no se observó una tendencia homogénea en los tratamientos que indique que aun mismo pH o temperatura-tiempo, el efecto antioxidante aumente o disminuya.

Por lo tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas antioxidantes el compuesto **7a** sí presenta actividad antioxidante, pero el efecto es mínimo comparado con los antioxidantes de referencia, a excepción de TBARS. Factores como el tipo de reacción con el radical, así como el impedimento estérico y la solubilidad influyen en los resultados de la actividad antioxidante. Asimismo, el compuesto **7a** es estable a cambios de pH y temperatura.

## 1. INTRODUCCIÓN

En la industria alimentaria los aditivos son empleados para mejorar aspectos tecnológicos de los productos alimenticios como prolongar su vida útil, mejorar la calidad del producto, conservar propiedades nutricionales o mejorar sus propiedades físicas y sensoriales (OMS, 2018). De acuerdo con la norma general de aditivos alimentarios CODEX STAN 192-1995, estos se clasifican con base a su funcionalidad, dentro de ellos se encuentran agentes emulsionantes, estabilizadores, espesantes, reguladores de acidez, acentuadores de sabor, edulcorantes y también los antioxidantes.

Un antioxidante es una molécula capaz de prevenir o retrasar la oxidación lipídica (Del Río, Lomelí, Medina, & Sánchez, 2015). Debido a que la oxidación de los lípidos es una de las principales causas de la disminución del valor nutricional y de vida útil de los alimentos, en la industria alimentaria se añaden antioxidantes para prevenir la rancidez oxidativa y así alargar la vida de anaquel (Flores Jiménez , Pérez Vargas , & Minor Pérez, 2017).

Existe una gran variedad de antioxidantes, y una de las clasificaciones es de acuerdo con su origen: natural o sintético (Badui, 2006). Los antioxidantes sintéticos más utilizados en la industria alimentaria son butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), *terc*-butilhidroquinona (TBHQ) y algunos galatos (figura 1); y por nombrar ejemplos de antioxidantes naturales se encuentran los tocoferoles, tocotrienoles, ácidos fenólicos y flavonoides (figura 2).

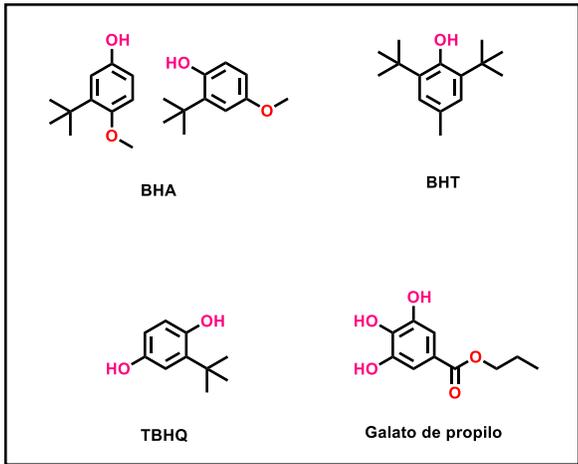


Figura 1. Antioxidantes sintéticos

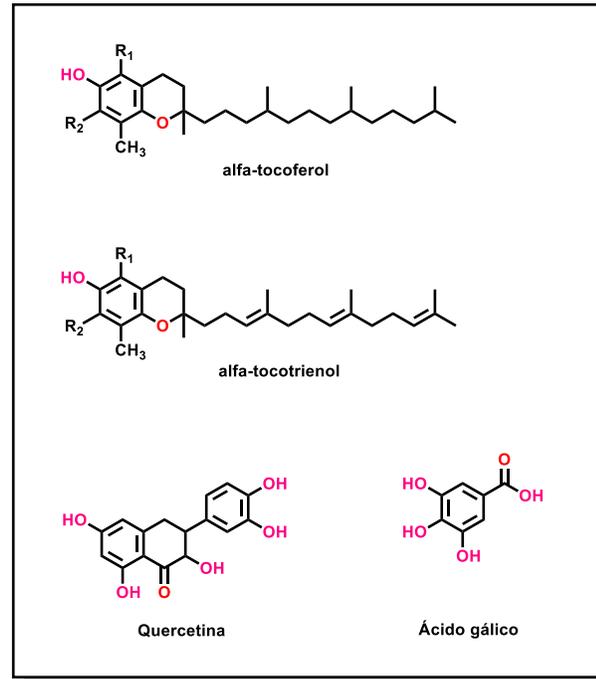


Figura 2. Antioxidantes naturales

Por otra parte, existen compuestos de origen natural o sintético que contienen en su estructura anillos tipo indólicos, este biciclo es considerado una estructura privilegiada por conferir a las moléculas ciertas actividades biológicas como antivirales, antibacterianas (Velezheva, y otros, 2016), antiinflamatorias (Onajale, y otros, 2013), antiproliferativas y también antioxidantes (Konus, y otros, 2022).

A continuación, en la figura 3 se muestran ejemplos de compuestos con núcleo de indol y su bioactividades, por mencionar un ejemplo la melatonina (estructura 5) presenta actividad antioxidante y antiinflamatoria (González Costa & Padrón González, 2019).

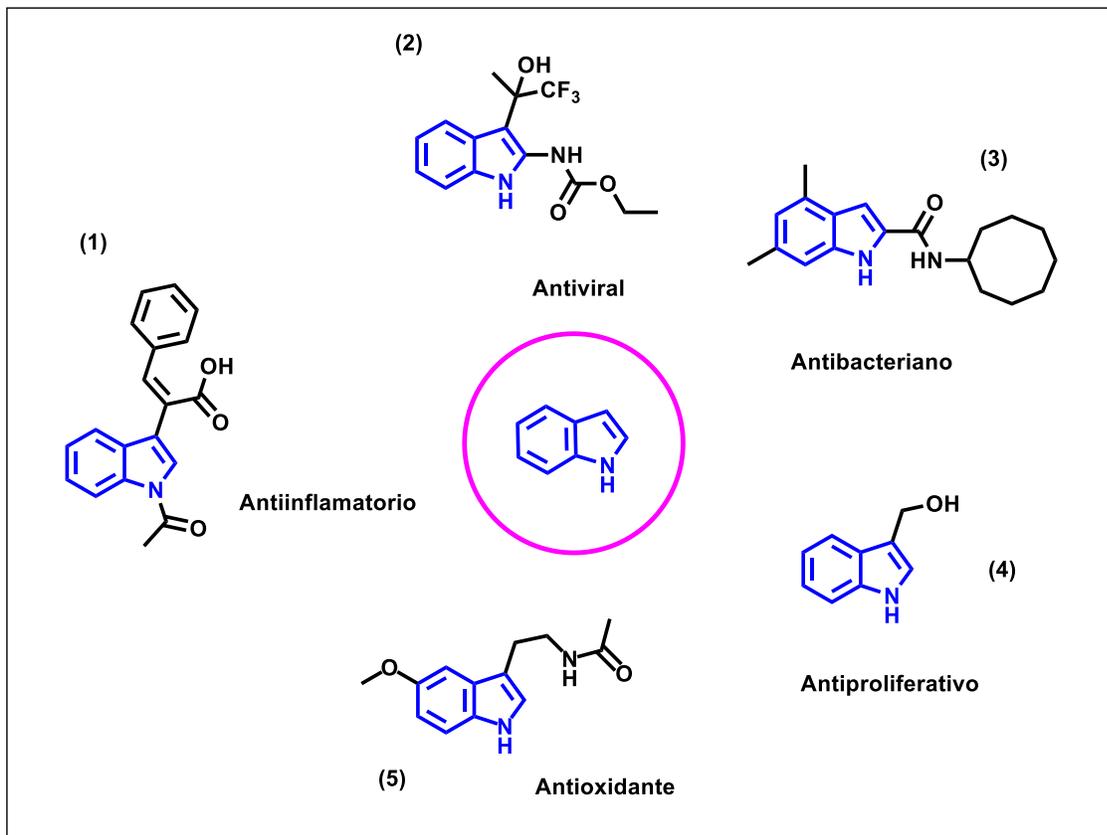


Figura 3. Compuestos con núcleo de indol y sus bioactividades

Otro ejemplo es la caulerpina, aislada del alga *Caulerpa racemosa* y *Caulerpa serrulata* (Aguilar-Santos, 1970), esta molécula tiene en su estructura dos anillos indólicos y presenta actividades biológicas como antiviral (Porto Viera Macedo, y otros, 2012) y antiinflamatoria (Canché, 2014). Aunado a esto, las algas marinas están siendo estudiadas por poseer moléculas bioactivas con potencial antioxidante (Subi M, Selvasudha, Ashraf, & Vasanthi, 2023).

## 2. ANTECEDENTES (MARCO TEÓRICO)

### 2.1 La caulerpina y sus análogos estructurales

La caulerpina es un alcaloide bisindólico de origen marino. Este compuesto presenta diversas actividades biológicas y tiene una baja toxicidad (Vidal, y otros, 1984). En el 2014, Canché Chay reportó la síntesis de la caulerpina y de siete análogos, así como también su actividad antiinflamatoria y antituberculosa. Posteriormente en el 2018, López Salazar sintetizó cinco bisindoles provenientes de la simplificación estructural de la caulerpina, estos fueron evaluados en seis líneas de carcinoma humano, así como en actividad antituberculosis. En la figura 4 se muestra la estructura de la caulerpina y el análogo **7a** de la simplificación estructural.

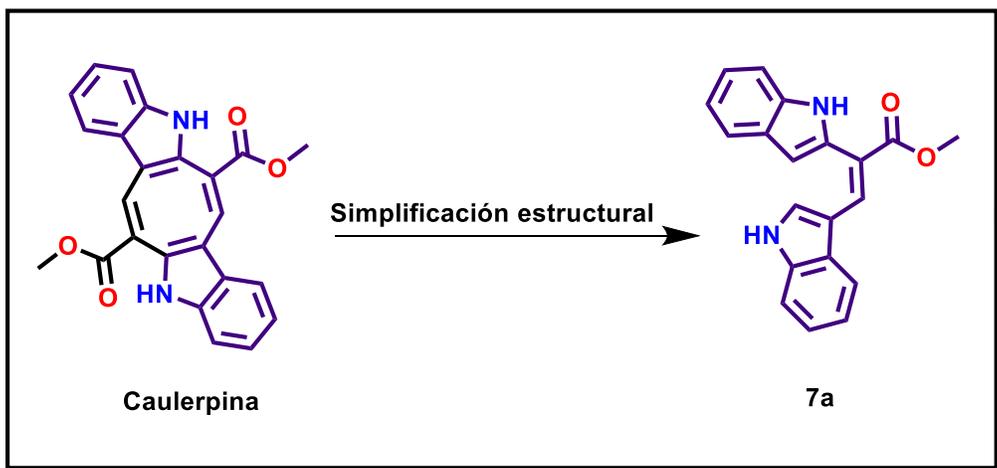


Figura 4. Simplificación estructural del alcaloide caulerpina

## **2.2 Deterioro de lípidos**

El deterioro de lípidos en alimentos es un proceso que afecta la calidad y la inocuidad alimentaria. Los lípidos son muy susceptibles a la oxidación, proceso en el cual los ácidos grasos se degradan y forman productos de reacción que pueden afectar el sabor, el aroma y el color de los alimentos reduciendo su vida de anaquel. La oxidación también afecta a la nutrición por la pérdida de ciertos nutrientes y a la salud de los consumidores por la formación de sustancias tóxicas (Laguerre, Bily, & Birtic, 2020). El deterioro de lípidos puede ocurrir por dos tipos de reacciones: la lipólisis (rancidez hidrolítica) y la autooxidación (rancidez oxidativa). La autooxidación, es una reacción de propagación en cadena vía radicales libres constituida por tres etapas de reacción: iniciación, propagación y terminación. Los factores que influyen en la oxidación de los lípidos son a luz UV, las temperaturas altas y la presencia de metales (Badui, 2006). Los lípidos insaturados son mayormente susceptibles a la oxidación comparados con los lípidos saturados, por lo tanto, los alimentos que presentan mayor proporción de grasas insaturadas son más susceptibles a la rancidez oxidativa (Thurnham, 2002).

## **2.3 Radicales libres**

Los radicales libres son compuestos muy reactivos que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad química, una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte, a su vez, en un radical libre al quedarse con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena (Avello, 2006); por lo que los antioxidantes actúan en la etapa de iniciación y propagación al ceder un átomo de hidrógeno a los

radicales de los ácidos grasos ( $R\bullet$ ) y a los hidroperóxidos ( $ROO\bullet$ ), restaurando el ácido graso ( $RH$ ) y el hidroperóxido ( $ROOH$ ) (Badui, 2006). Particularmente, los antioxidantes sintéticos son donadores de protones, éstos no detienen la formación de los radicales, sino que reaccionan con ellos, generando radicales del antioxidante menos activos (Nguyen & Schwartz, 2000).

#### **2.4 Actividad antioxidante y métodos de evaluación**

Por definición, la actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para retardar la degradación oxidativa (Prior, Wu, & Schaich, 2005). La actividad antioxidante está determinada por la reactividad química del antioxidante, la capacidad del antioxidante para acceder hasta el sitio de reacción y la estabilidad de los productos formados después del proceso de estabilización de radicales libres (Londoño, 2011).

Existen diversos métodos para medir la actividad antioxidante, y se clasifican como métodos directos e indirectos. En el método directo se estudia el efecto del antioxidante sobre la oxidación lipídica de un sistema, por su parte los métodos indirectos miden la capacidad para estabilizar algunos radicales libres.

Los métodos también se pueden clasificar en ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno y ensayos basados en la transferencia de electrones (Shahidi & Zhong, 2015).

A continuación, se describen los fundamentos de los métodos comúnmente utilizados.

El método DPPH es un método indirecto, fue propuesto originalmente por Brand-Williams (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995) y en él se utiliza el  $DPPH\bullet$ , uno de

los pocos radicales orgánicos estables. estable. El ensayo se fundamenta en la medición de la capacidad de la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical DPPH•. Cuando se añade un antioxidante a una solución de DPPH, el electrón desapareado del DPPH se transfiere al antioxidante, lo que provoca una decoloración de la solución de violeta oscuro a amarillo pálido. La disminución en la absorción de la luz a una longitud de onda de 517 nm se puede medir espectrofotométricamente y se utiliza para determinar la actividad antioxidante de la sustancia bajo estudio (figura 5).

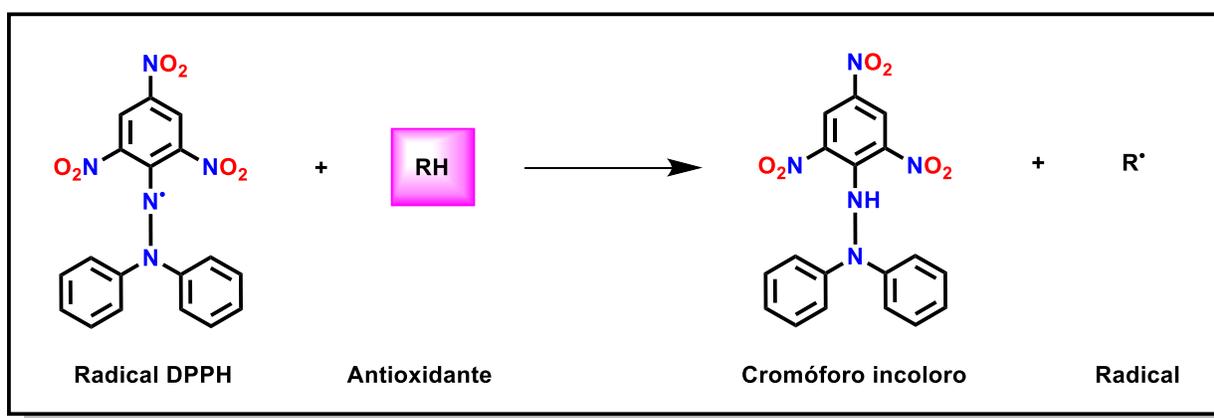


Figura 5. Reacción del radical DPPH con un antioxidante

Otra prueba para evaluar la oxidación lipídica es el ensayo SRAT (Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico), también conocido por su sigla en inglés como TBARS. En esta técnica se induce la peroxidación lipídica del sistema formándose como producto principal malondialdehído (MDA), el cual reaccionará con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar un producto de color rosa (figura 6) que puede ser medido espectrofotométricamente a 540 nm (Kishida Etsu, y otros, 1993).

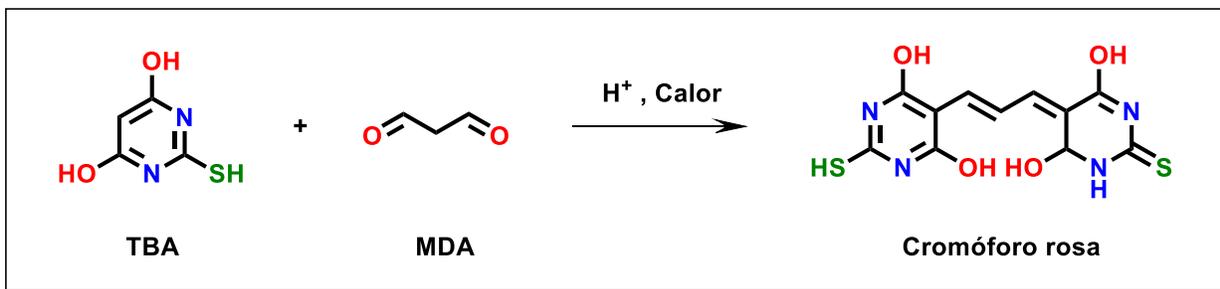


Figura 6. Reacción del Ácido tiobarbitúrico con MDA

Por otro lado, el método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power, por sus siglas en inglés), fue desarrollado originalmente por Benzie, I. y Strain, J. (año) para medir el poder reductor del plasma, aunque posteriormente fue adaptado para medir actividad antioxidante de productos fitoterapéuticos y nutraceuticos (Benzie & Strain, 1999). Los antioxidantes presentes en la muestra a estudiar reducen el  $Fe^{3+}$ , presente en el reactivo de FRAP, a  $Fe^{2+}$ , lo que produce un cambio de color de amarillo a azul intenso en la solución debido a la formación de un complejo coloreado entre el  $Fe^{2+}$  y el TPTZ (figura 7). La intensidad del color se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 595 nm. Cuanto mayor sea el valor FRAP, mayor será la capacidad antioxidante de la muestra.

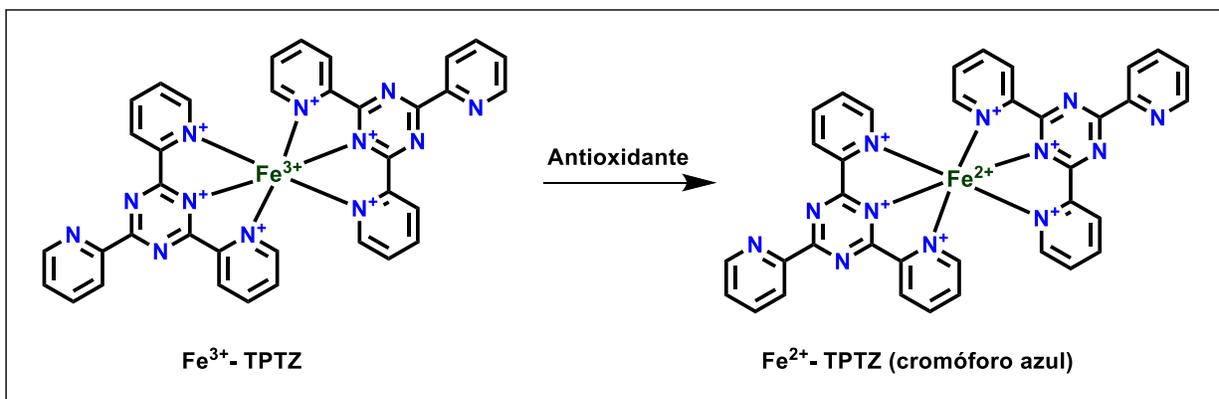


Figura 7. Reacción de reducción del reactivo de FRAP

Por otra parte, el método ORAC (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno) tiene como fundamento el decaimiento de la fluorescencia y la protección de esta por efecto del compuesto antioxidante. El AAPH se somete a una descomposición térmica por lo que pierde un mol de nitrógeno molecular, obteniéndose radicales AAPH• que al reaccionar con el oxígeno generarán radicales peroxilo (ROO•) los cuales reaccionan con la fluoresceína obteniéndose un producto no fluorescente. La capacidad antioxidante se determina por la disminución en la velocidad de degradación de la fluoresceína debido a la reacción de los radicales peroxilo con el antioxidante para generar un producto no radicalario. En esta prueba se realiza una cinética de decaimiento de la fluorescencia en el tiempo. Se integra el área bajo la curva (AUC, por sus siglas en ingles) y se calcula el valor del AUC neta. El resultado se expresa en términos de equivalentes trolox (análogo de vitamina E), por lo que se construye una curva patrón que será utilizada posteriormente para interpolar el AUC de la muestra a estudiar (Avello, 2006).

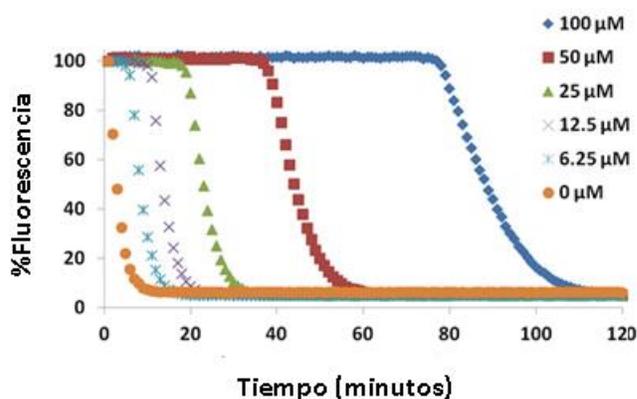


Figura 8. Decaimiento de la fluoresceína vs. tiempo.  
Imagen tomada de protocolo de Biotek.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la industria de los alimentos, los antioxidantes más utilizados son los sintéticos ya que presentan ventajas tecnológicas como su estabilidad química y eficacia frente a los naturales; sin embargo, en los últimos años esto está cambiando debido a la preferencia del consumidor de optar por aquellos que representen el menor riesgo toxicológico, por lo que surge una necesidad de obtener nuevas fuentes de antioxidantes. Por otra parte, dentro de los reportes de bioactividades de los compuestos que tienen anillo de indol en su estructura, está la actividad antioxidante. Por lo tanto, dado que el **compuesto 7a** posee dos anillos bisindólicos, y que es un análogo estructural de la caulerpina, se propuso completar su estudio biológico y evaluar la actividad antioxidante.

### 4. HIPÓTESIS

El análogo estructural de la caulerpina **7a** presenta actividad antioxidante, por lo que podría ser considerado como un potencial aditivo para prevenir la oxidación lipídica de alimentos susceptibles a esta reacción.

## 5. OBJETIVOS

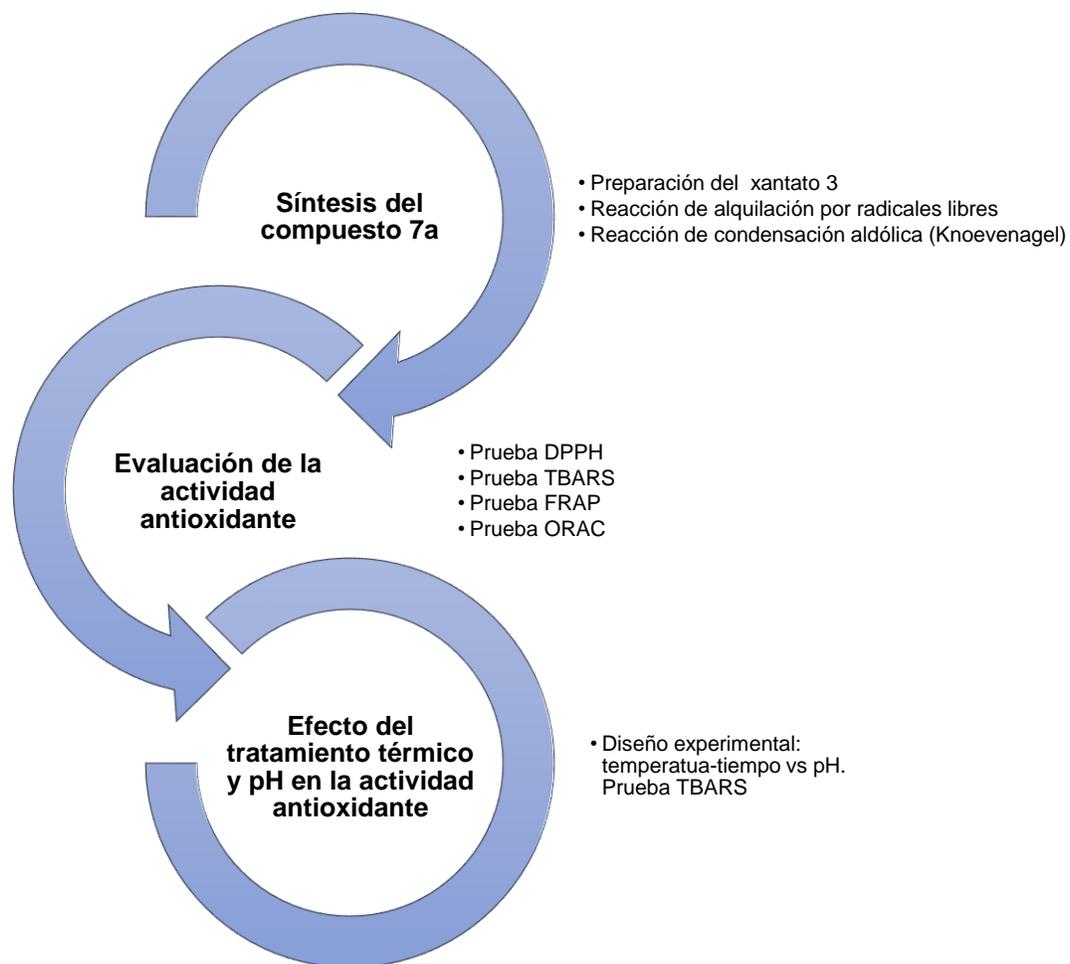
### 5.1 Objetivo general

- Sintetizar el análogo estructural **7a** de la caulerpina, y evaluar la actividad y la estabilidad antioxidante.

### 5.2 Objetivos particulares

- Sintetizar por medio de tres pasos de reacción el análogo estructural **7a**.
- Caracterizar el producto **7a** por análisis de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .
- Evaluar su pureza mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).
- Realizar las siguientes pruebas antioxidantes: DPPH (Actividad reductora del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), FRAP (Poder antioxidante reductor de hierro), ORAC (Capacidad de absorción de radicales del oxígeno) y TBARS (Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico).
- Evaluar la estabilidad del compuesto por medio de un diseño experimental de temperatura-tiempo versus pH, utilizando como fuente de lípidos lardo y teniendo como variable respuesta la prueba de TBARS.

## 6. METODOLOGÍA GENERAL



## 6.1 Síntesis del análogo estructural de la caulerpina

### 6.1.1 Ruta de síntesis

La ruta sintética se realizó por medio de tres pasos de reacción (figura 9). El primero de ellos fue la preparación del xantato **3** por medio de una reacción de sustitución nucleofílica a una temperatura de 0°C (Canché Chay, Gómez Cansino, Espitia Pinzón, Torres-Ochoa, & Martínez, 2014) entre el cloroacetato de metilo **1** y el ditiocarbonato de potasio **2** en presencia de acetonitrilo anhidro como disolvente. Posteriormente se realizó una reacción de alquilación por radicales libres entre el xantato **3** y el indol **4** utilizando peróxido de lauroilo (DLP) como iniciador radicalario y dicloroetano anhidro (DCE) como disolvente (Mahboobi & Bernauer, 1988). Finalmente, se llevó a cabo una reacción de condensación aldólica entre el indol alquilado **5** y el indol-3-carboxaldehído (**6**), en benceno (Canché Chay, Gómez Cansino, Espitia Pinzón, Torres-Ochoa, & Martínez, 2014). La ruta de síntesis se muestra en la figura 9.

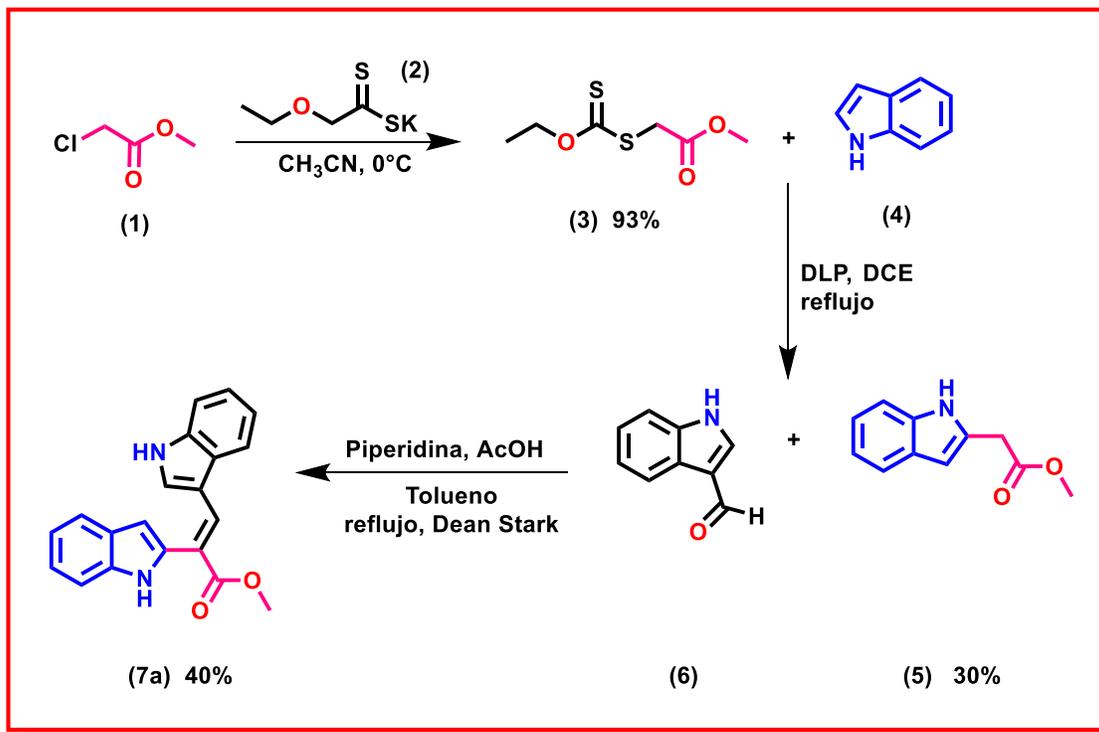


Figura 9. Ruta de síntesis del compuesto 7<sup>a</sup>

### 6.1.2 Preparación del xantato 3

En un matraz bola de dos bocas de 100 mL en atmósfera inerte con nitrógeno y en baño de hielo, se agregó cloroacetato de metilo (**1**) (2g, 0.018 mol), ditiocarbonato de potasio (**2**) (3.40 g, 0.021 mol) y 33 mL de acetonitrilo. La mezcla se dejó reaccionar durante una hora en agitación, y el avance fue monitoreado por CCF. Se observó en lámpara de UV  $\lambda$  corta, y como fase de elusión una mezcla de hexano:AcOEt (8:2)

Posteriormente la mezcla de reacción fue concentrada a presión reducida en rotavapor, y en seguida se realizaron extracciones con agua y DCM. La fase orgánica se recolectó y se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Finalmente se concentró a sequedad en rotavapor, y luego se conectó a línea de vacío hasta peso constante.

### 6.1.3 Reacción de alquilación por radicales libres

En un matraz bola de dos bocas se pesó el indol **4** (1g, 0.0085 mol), se disolvió en 35 mL de DCE anhidro y se conectó a un sistema de reflujo. A continuación, con ayuda de una cánula se burbujeó con nitrógeno la disolución por 30 min con agitación. La reacción tomó una coloración amarilla. Por otra parte, el xantato **3** (2.98 g, 0.0154 mol) fue adicionado gota a gota vía cánula al seno de la reacción. Luego la reacción se llevó a reflujo, y una vez alcanzado este, se adicionó la primera porción de DLP, el total de DLP (6.12 g, 0.0154 mol) se dividió en siete porciones y se agregó una porción cada hora (0.87 g / hora), excepto la primera adición que fue del doble. La reacción cambió de color amarillo a naranja-rojizo. Concluidas las adiciones, la reacción se dejó en reflujo una hora más. Se procedió a realizar una CCF para observar el avance de reacción y se observó la formación de productos más polares que la materia prima. Se observó en lámpara de uv  $\lambda$  corta con fase móvil 8:2 hexano:AcOEt

Se retiró del sistema de reflujo y se dejó enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente. A continuación, el crudo de reacción se concentró en el rotavapor a presión reducida. Luego se disolvió en 50 mL de acetonitrilo caliente y se realizó una extracción con 3 porciones de 80 mL de hexano, esto con el fin de retirar los restos de DLP. Se recolectó la fase de acetonitrilo y se concentró a presión reducida en el rotavapor. Finalmente se procedió a realizar una cromatografía en columna flash con sílica gel 230/400 como fase estacionaria y como fase móvil se utilizaron las mezclas de hexano:AcOEt de polaridad 95:5, 90:10 y finalmente 87:13. Se obtuvo un sólido naranja con punto de fusión de 68°C-70°C, correspondiente al indol alquilado **5**.

#### 6.1.4 Reacción de condensación aldólica (Knoevenagel)

En un matraz de dos bocas se pesó el indol-3-carboxaldehído **6** (0.299g, 0.002 mol) y se adaptó a un sistema de reflujo con mantilla y una trampa de Dean Stark llena de malla molecular para absorber el agua que se forma como subproducto de la condensación. Por la boca del refrigerante se agregó 10.5 mL de benceno, posteriormente se colocó agitación magnética y se calentó a temperatura de reflujo. Una vez iniciado el reflujo se adicionó la piperidina (0.19 mL, 0.003 mol) y el ácido acético (0.18 mL, 0.003 mol) dando lugar a una mezcla que paso de transparente a amarilla.

Por separado se pesó en un vial el indol alquilado **5** (0.3g, 0.0016 mol) y se disolvió en 5 mL de benceno; con ayuda de una cánula y una bomba de adición se añadió al seno de la reacción a velocidad de 3 mL/hora. Una vez concluida la adición, la jeringa se enjuagó con 2 mL de benceno y la solución resultante se agregó al matraz gota a gota con ayuda de una bomba de adición. Al avanzar el tiempo de la reacción, esta fue tomando una coloración anaranjada. Después de 2h de reacción se monitoreó por CCF. Una vez terminada, esta se dejó enfriar a temperatura ambiente y enseguida se concentró a presión reducida para retirar los restos del disolvente. El producto crudo fue extraído con 50 mL de AcOEt caliente y la fase orgánica fue lavada secuencialmente con: solución de HCl 1 N (3 lavados con 50 mL c/u), solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 lavados con 50 mL c/u) y salmuera (3 lavados con 50 mL c/u).

El residuo sólido se resuspendió con DCM frío, se filtró al vacío y se lavó con volúmenes pequeños de DCM frío. Después el producto fue recristalizado por partición de disolventes (acetona/agua); en primer lugar, el producto **7a** se disolvió en acetona caliente, para retirar las impurezas se agregó bajo agitación carbón activado y se filtró al

vacío sobre celita. La solución filtrada fue colocada en baño de hielo e inducida a recristalización añadiendo gota a gota agua fría hasta que se observó turbidez, posteriormente se dejó en reposo hasta la formación cristales. Finalmente, se filtró al vacío hasta peso constante.

## **6.2 Evaluación de la actividad antioxidante**

### **6.2.1. DPPH (Actividad reductora del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)**

Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de muestra por cuatuplicado en los pozos de la microplaca y se adicionaron 150  $\mu\text{L}$  de DPPH 133.33  $\mu\text{M}$ . Se realizó una incubación a 37 °C durante 30 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 517 nm en el espectrofotómetro Biotek Synergy HT microplate reader, y se calculó el valor de la  $\text{IC}_{50}$  (Guija, Inocente, Ponce, & Zarzosa, 2015). Como blanco se utilizó metanol al 50%.

### **6.2.2. TBARS (Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico)**

Se realizó una curva estándar de MDA usando como precursor tetrametoxipropano (TMP). Se preparó un stock de TMP 10 mM, para lo cual se tomaron 41  $\mu\text{L}$  de TPM 6M y se aforó a 25 mL con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 1% en agua desionizada, finalmente se hidrolizó por dos horas a temperatura ambiente cubriendo de la luz. Posteriormente se preparó una solución trabajo de TPM 0.1 mM la cual se utilizó para preparar las diluciones para la curva con un intervalo de concentración final 0 a 10  $\mu\text{M}$ . Se agregó TBA 0.67% disuelto en NaOH 0.05N y se calentó en baño de agua a 70°C durante 30 min. Finalmente se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de cada tubo por duplicado en una microplaca de 96 pozos y se midió la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro Biotek Synergy HT microplate reader (Esterbauer & Cheeseman, 1990).

Después se diseccionó y se homogenizó el cerebro de rata en PBS (9.5 mM, pH=7.4) (Ohkawa, Ohishi, & Yagi, 1979); enseguida se realizó cuenta de proteínas por el método de Lowry. (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951).

Se colocaron 375  $\mu$ L de sobrenadante de cerebro de rata ajustado a 2.66 mg proteína/mL en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se agregaron 50  $\mu$ L de EDTA 20  $\mu$ M disuelto en PBS (pH 7.4, 9.5 mM), la concentración final fue de 2  $\mu$ M. Enseguida se adicionaron 25  $\mu$ L de la muestra (20 veces más concentrada) y se incubó durante 30 min a 37 °C con agitación. Posteriormente se agregaron 50  $\mu$ L de FeSO<sub>4</sub> 100  $\mu$ M (concentración final 10  $\mu$ M) y se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación (Gutteridge & Quinlan, 1983). Terminada la incubación se agregaron 500  $\mu$ L de reactivo TBA y se dejaron reposar los tubos durante 10 minutos en baño de hielo, luego se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 min, e inmediatamente se incubaron durante 30 minutos en baño de agua de 70°C - 80 °C. Se enfriaron los tubos a temperatura ambiente y se destaparon para liberar la presión (Rossato, y otros, 2002). Finalmente se colocaron 200  $\mu$ L de cada tubo por duplicado en una microplaca de 96 pozos y se midió la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro Biotek Synergy HT micropilote reader; se interpolaron los valores en la curva estándar de MDA para obtener la concentración de TBARS en solución, así como la IC<sub>50</sub> (Domínguez, y otros, 2005).

### **6.2.3 FRAP (*Poder antioxidante reductor de hierro*)**

La actividad antioxidante por el método de FRAP se realizó de acuerdo con la metodología propuesta (Pulido & Saura-Calixto, 2000). El reactivo de FRAP fue recién preparado e incubado a 37 °C: 1 mL de TPTZ 10 mM (disuelto en 40 mM HCl), 1 mL de FeCl<sub>3</sub> 20 mM y 10 mL de buffer de acetatos 300 mM (proporción 1:1:10).

Se realizó una curva patrón utilizando como estándar ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) disuelto en metanol al 50% en un intervalo de concentración de 0-500  $\mu\text{M}$ .

La reacción se llevó a cabo en tubos Eppendorf de 1.5 mL, mezclando 100  $\mu\text{L}$  de muestra o solución trolox y 750  $\mu\text{L}$  del reactivo de FRAP; cada reacción se incubó a 37 °C durante 30 min. En una microplaca de 96 pozos se colocó una alícuota de 150  $\mu\text{L}$  (por cuadruplicado) y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en el lector de placas (Synergy HT Biotek). Como blanco se utilizó una mezcla de 100  $\mu\text{L}$  de MeOH al 50% y 750  $\mu\text{L}$  del reactivo de FRAP. Los resultados se reportaron en equivalentes trolox.

#### **6.2.4 ORAC (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno)**

La actividad antioxidante por el método de ORAC se realizó de acuerdo con la metodología propuesta en el manual de Biotek (Biotek, 2005).

Se realizó una curva patrón de trolox con cuatro distintas concentraciones: 6.25, 12.50, 25 y 50.00  $\mu\text{M}$ . En una microplaca de 96 pozos de fondo negro para fluorescencia se adicionaron: 25  $\mu\text{L}$  de la dilución respectiva de trolox y 150  $\mu\text{L}$  de sal sódica de Fluoresceína (30 nM), esto se realizó por triplicado. Enseguida se llevó a cabo una pre-incubación a 37 °C durante 30 minutos, posteriormente se adicionaron 25  $\mu\text{L}$  de AAPH (2,2'-azo-bis(2-metilpropionamidin) dihidro-cloro, 38.5 mM) a la mezcla previamente incubada y se determinó la fluorescencia a longitudes de onda de excitación y emisión, de 485 nm y 528 nm en el espectrofotómetro Biotek Synergy HT microplate reader,

respectivamente. Utilizando el software del lector de placas se calcularon las áreas bajo la curva. Los resultados se reportaron en equivalentes trolox. Para determinar los equivalentes de trolox de cada muestra se utilizó la relación entre la pendiente (m) obtenida del análisis lineal del compuesto y la pendiente de la regresión lineal de trolox (Brescia, 2021).

Nota 1: Se utilizó un blanco de reacción: 25  $\mu$ L de buffer de fosfatos (75 mM, pH 7.4), 150  $\mu$ L de sal sódica de fluoresceína (30 nM) y 25  $\mu$ L de AAPH (153 mM). Para la solución stock de trolox, este se disolvió en metanol y para la solución stock del compuesto fue en DMSO. Las diluciones y los reactivos se disolvieron en un buffer de fosfatos 75 mM, pH=7.4.

*Nota 3:* Los equivalentes trolox se calculan por medio de la relación de la pendiente de la muestra y de la pendiente de la curva patrón de trolox: TE (range of concentrations) = m compound/m trolox

### **6.3 Efecto del tratamiento térmico y pH en la actividad antioxidante**

Se evaluó la estabilidad del compuesto **7a** y su actividad antioxidante a diferentes condiciones de temperatura, tiempo y pH, teniendo como variable respuesta la prueba de TBARS descrita en el apartado [6.2.2](#). Nota: Se realizaron ensayos con diferente matriz de fuente de lípidos, primero con lardo y posteriormente se realizaron con cerebro de rata. Se tomó como control el compuesto **7a** sin modificar el pH y sin aplicar tratamiento térmico. Los tratamientos se prepararon de acuerdo con el diseño experimental de la tabla 1.

**Tabla 1. Diseño experimental para la evaluación de la estabilidad y actividad antioxidante del compuesto FOTOMAR**

Tratamiento	Temperatura/tiempo	pH
Control	Sin Temperatura	Sin modificar pH
T1	60°C / 5 min	
T2	60°C / 15 min	
T3	60°C / 30 min	
T4	80°C / 5 min	
T5	80°C / 15 min	
T6	80°C / 30 min	
T7	Sin Temperatura	9
T8	60°C / 5 min	
T9	60°C / 15 min	
T10	60°C / 30 min	
T11	80°C / 5 min	
T12	80°C / 15 min	
T13	80°C / 30 min	
T14	Sin Temperatura	7
T15	60°C / 5 min	
T16	60°C / 15 min	
T17	60°C / 30 min	
T18	80°C / 5 min	
T19	80°C / 15 min	
T20	80°C / 30 min	
T21	Sin Temperatura	5
T22	60°C / 5 min	
T23	60°C / 15 min	
T24	60°C / 30 min	
T25	80°C / 5 min	
T26	80°C / 15 min	
T27	80°C / 30 min	

#### 6.4 Análisis estadístico

Para las pruebas DPPH y TBARS, el análisis estadístico se realizó en el programa SigmaStat versión 3.5. Se analizaron tres experimentos independientes ( $n= 3$ ) y se reportó  $\pm$  el error estándar de la media. Los datos se sometieron a un análisis de varianza de un factor, y para aislar grupos con diferencia significativa se realizó la prueba de Dunnett con valores de  $p \leq 0.05$  (\*) y  $p \leq 0.01$  (\*\*).

En el caso de las pruebas FRAP, ORAC y para el ensayo del efecto del tratamiento térmico y pH en la actividad antioxidante, el análisis estadístico se realizó con el complemento de Excel XLSTAT versión 2014.5.03. Para FRAP y ORAC se analizaron tres experimentos independientes ( $n= 3$ ) y para el ensayo de estabilidad antioxidante se utilizó  $n=2$ ; además se reportó  $\pm$  el error estándar de la media. Los datos se sometieron a un análisis de varianza de un factor, seguida de una prueba de Tukey para aislar grupos con diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$ .

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 8.1 Síntesis del análogo estructural de la caulerpina 7a

Se realizó la preparación del xantato por medio de una reacción de sustitución nucleofílica entre el cloroacetato de metilo **1** con ditiocarbonato de potasio **2** en acetonitrilo anhidro a 0°C (Canché, 2014), esto ocurre debido a que la sal de ditiocarbonato de potasio **2** es un buen nucleófilo y el cloroacetato de metilo **1** tiene un buen grupo saliente. Se obtuvo un aceite amarillo correspondiente al xantato **3** con un rendimiento promedio del 93%. Se debe tomar en cuenta que para evitar la descomposición del xantato **3**, debe ser resguardado de la luz y almacenarse en refrigeración. La reacción se presenta en la figura 10 y en la tabla 2 las repeticiones realizadas, las primeras repeticiones tienen un rendimiento menor respecto a las demás debido a que el xantato **3** presentó impurezas por lo que se realizó purificación por columna flash con sílica gel 230/400.

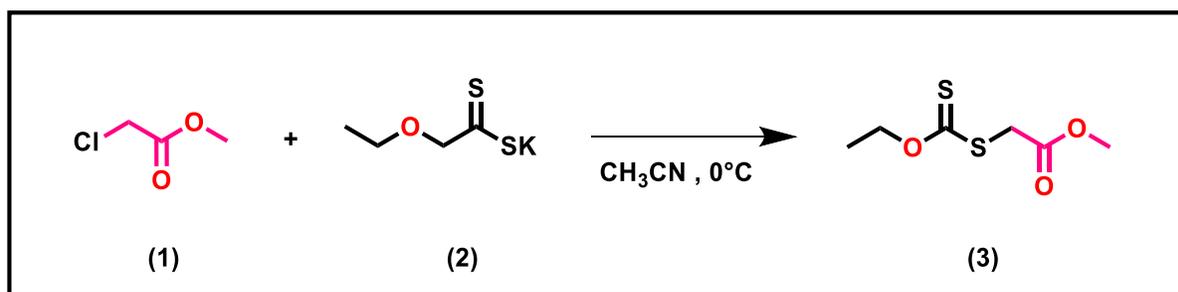


Figura 10. Síntesis del xantato **3**

**Tabla 2. Repeticiones de la síntesis del xantato 3**

Repetición	Cloroacetato de metilo (g)	Equivalentes cloroacetato de metilo	Equivalentes ditiocarbonato de potasio	% Rendimiento
1	0.1	1	1.15	73.93
2	1	1	1.15	81.58
3	2	1	1.15	95.05
4	2	1	1.15	98.53
5	2	1	1.15	99.44
6	2	1	1.15	97.98
7	2	1	1.15	98.01
8	2	1	1.15	99.30

Posteriormente se hizo reaccionar al xantato **3** con el indol **4** utilizando como disolvente DCE anhidro en atmósfera inerte. La síntesis del indol alquilado ocurre por medio de una reacción de sustitución radical oxidativa aromática, también nombrada alquilación por radicales libres, esta reacción ocurre en la posición C-2, en donde se forma un radical centrado en un átomo de carbono promovida por la fragmentación homolítica de un peróxido, el electrón resultante del alquilación se transfiere luego a una molécula de peróxido, generándose una especie catiónica cuya pérdida de un protón en la posición vecina conduce al compuesto aromático (Canché, 2014), se utilizó DLP como agente oxidante e iniciador de radicales (Osornio, 2004). La reacción se muestra en la figura 11.

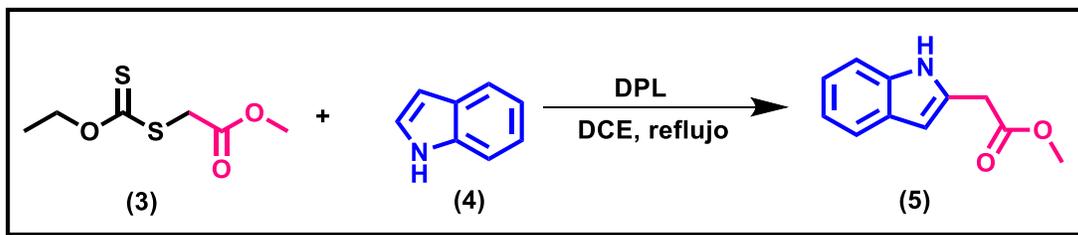


Figura 11. Síntesis del indol alquilado 5

Terminada la reacción, el producto crudo se concentró y realizaron extracciones para eliminar los restos de DLP. La reacción presentó subproductos y materia prima sin reaccionar, por lo que fue necesario purificarla en columna flash con sílica gel 230/400. Se obtuvo un rendimiento promedio del 30%. A continuación, en la tabla 3 se muestran las repeticiones realizadas.

Tabla 3. Repeticiones de la síntesis del indol alquilado 5

Repetición	Indol (g)	Equivalentes indol	Equivalentes xantato 3	% Rendimiento
1	0.1	1	1.4	30.84
2	0.5	1	1.4	22.37
3	1	1	1.4	28.70
4	1	1	1.4	34.55
5	1	1	1.4	28.28
6	1	1	1.4	34.33
7	1	1	1.4	31.29

Finalmente, para obtener el compuesto **7a**, se realizó una reacción de condensación aldólica (Knoevenagel), haciendo reaccionar al indol alquilado **5** con indol-3-carboxaldehído **6**, la reacción se muestra en la figura 12.

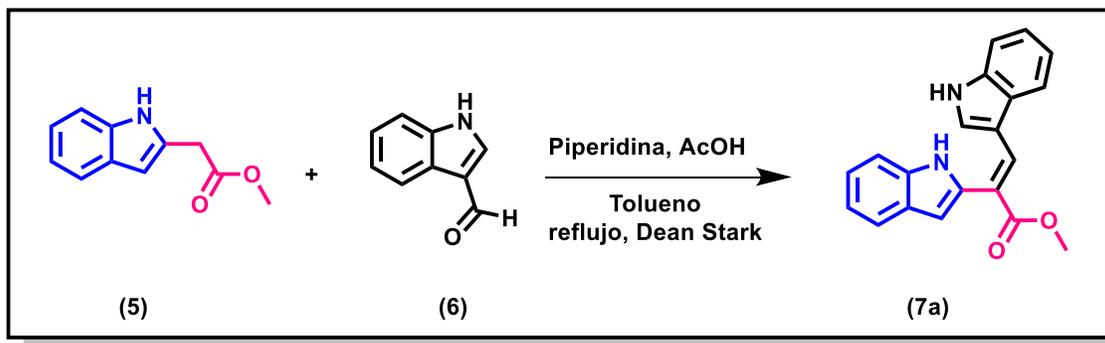


Figura 12. Síntesis del bisindol **7a**

Como catalizador se utilizó una mezcla de piperidina y ácido acético, donde ocurre una reacción ácido-base formándose consigo el acetato de piperidinio, posteriormente la piperidina (como base), desprotona al carbonilo del éster en la posición alfa, generando el ión enolato estabilizado por efecto de resonancia, el cual reacciona con el carbonilo del carboxaldehído. Por último, el aldol se deshidrata y se libera el bisindol **7a** y una molécula de agua (López Salazar, 2018).

En la tabla 4 se observan las diferentes repeticiones realizadas con diferentes disolventes y tiempos de reacción.

**Tabla 4. Condiciones de reacción para la obtención de 7a**

Repetición	Indol alquilado (g)	Equivalentes indol alquilado	Equivalentes indol-3-carboxaldehído	Disolvente	Horas de reacción	%Rendimiento	Observación
1	0.1	1	1.2	Benceno	6.5	41	Se filtró al vacío
2	0.3	1	1.3	Benceno	9	9	Se filtró al vacío y se realizó columna
3	0.1	1	1.3	1,4-dioxano	6.5	19	Se filtró al vacío y se realizó columna
4	0.3	1	1.3	Benceno	10.5	14	Se filtró al vacío y se realizó columna
5	0.3	1	1.3	Benceno	14	5	Se realizó columna
6	0.3	1	1.3	Tolueno	6.5	40	Se filtró al vacío

Como puede verse en la tabla 4, el rendimiento obtenido con tolueno es similar al obtenido con benceno, pero con disminución del riesgo tóxico del disolvente. También se observa que en los ensayos donde el crudo de reacción se purificó por columna, el rendimiento disminuyó considerablemente, aún cuando ésta se basificó con trielamina al 10% el compuesto quedaba retenido en la sílica gel. Debido a lo anterior, se optó por realizar extracciones con AcOEt caliente, la fase orgánica se lavó secuencialmente con solución de 1 N de HCl, solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y al último con salmuera. El residuo sólido se resuspendió con DCM frío y se filtró al vacío. Por último, para obtener un producto con mayor grado de pureza, se recristalizó por par de disolventes (acetona/agua), por lo cual se disolvió el producto en acetona caliente, enseguida para retirar las impurezas se agregó carbón activado y se filtró al vacío sobre celita. La solución filtrada fue colocada en baño de hielo e inducida a recristalización añadiendo gota a gota agua fría hasta que se observó turbidez, posteriormente se dejó en reposo hasta la formación cristales. Finalmente, se filtró al vacío hasta peso constante.

Se obtuvo un sólido color amarillo mostaza correspondiente al compuesto **7a** (figura 10) con un peso molecular de 316.36 g/mol, punto de fusión de 238-240 °C, con un rendimiento del 40 %. La pureza del compuesto 7a mediante cromatografía líquidos de alto rendimiento (HPLC) fue del 94%.

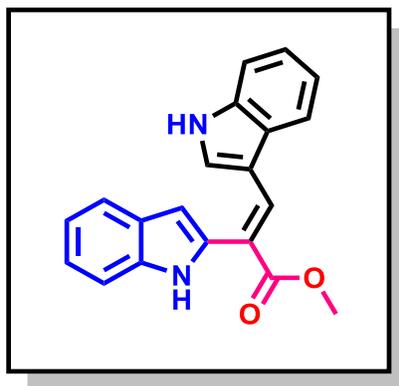


Figura 13. Compuesto **7a** (Fotomar)

Finalmente, el compuesto **7a** fue identificado por el análisis de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  que a continuación se muestran.

En la figura 14 o Anexo I, se encuentra el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , los protones correspondientes al metilo ( $3\text{H}$ ,  $\text{O}-\text{CH}_3$ ) se pueden identificar con la señal en  $3.73$  ppm, la señal del protón del metino en posición C-2 del sistema indólico opuesto ( $1\text{H}$ ,  $\text{NH}-\text{C}=\text{CH}-\text{C}$ ) se localiza en  $6.40$  ppm, entre  $6.49$  a  $7.61$  ppm están las señales de los protones de la región aromática ( $8\text{H}$ ,  $\text{CH}-\text{Ar}$ ), en  $8.27$  ppm se ubica la señal del protón del metino del doble enlace ( $1\text{H}$ ,  $\text{CH}=\text{C}-\text{CO}_2$ ) y por último se identifican las señales de los protones de los NH de los indoles ( $1\text{H}$ ,  $\text{C}-\text{NH}-\text{C}$ ) en  $11.39$  ppm y ( $1\text{H}$ ,  $\text{C}-\text{NH}-\text{C}$ ) y  $11.54$  ppm.

$^1\text{H}$

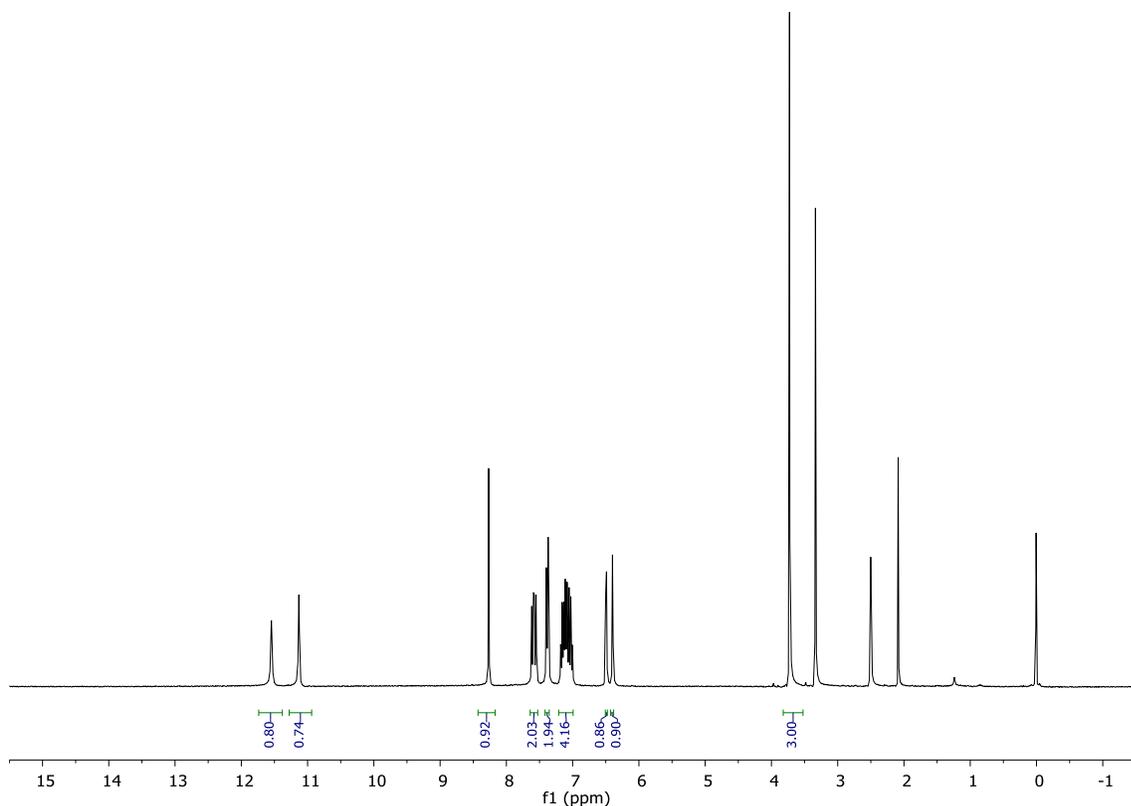


Figura 14. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **7a**

En figura 15 o Anexo II, se encuentra el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , en la que se observan las señales correspondientes a los 20 carbonos que contiene el compuesto **7a**, la señal de 167.9 ppm corresponde al carbono del carbonilo (C=O) y la de 52.37 ppm al carbono del metilo (C-OH<sub>3</sub>).

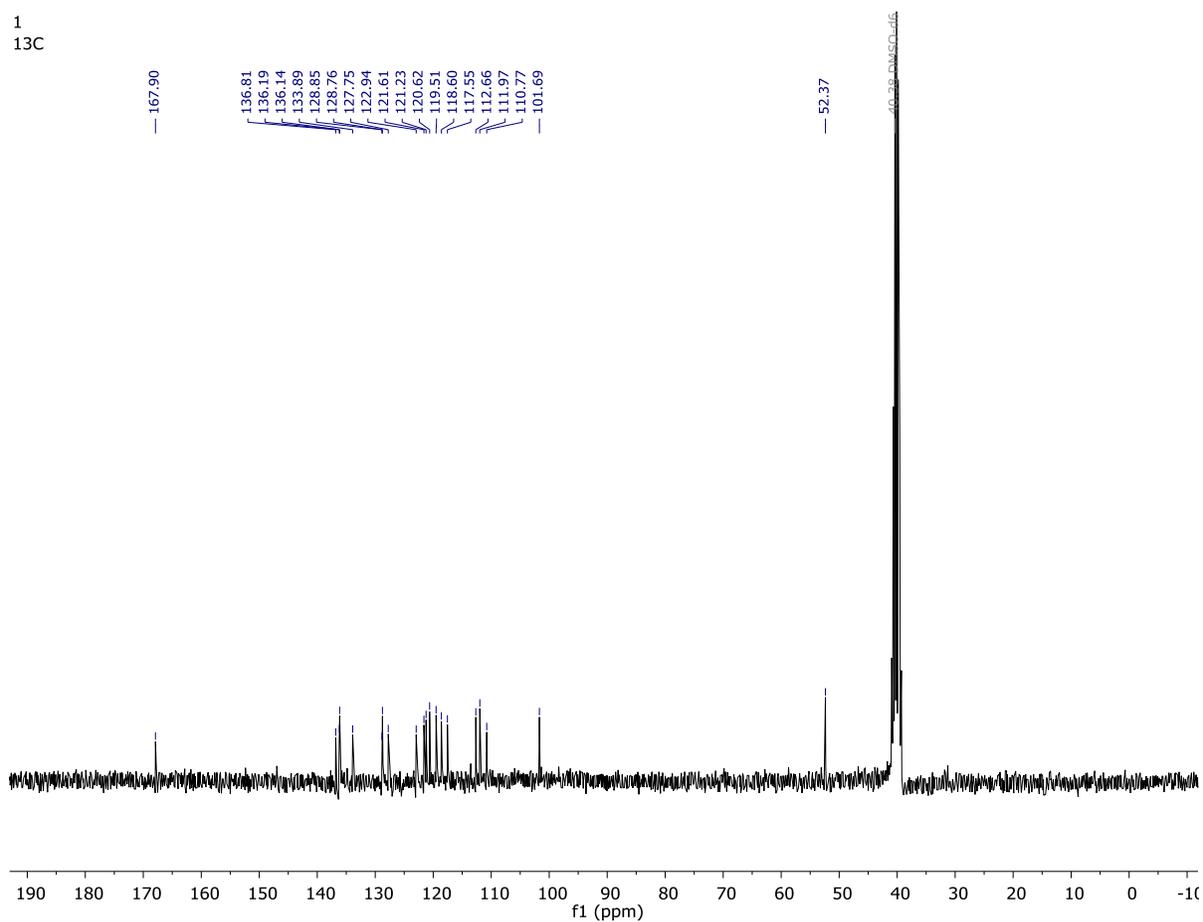


Figura 15. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **7a**

## 8.2 Evaluación de la actividad antioxidante

A continuación, se muestran los resultados de la actividad antioxidante, cabe mencionar que en DPPH y TBARS la actividad se reporta de acuerdo con un valor de IC<sub>50</sub>, que se interpreta como, la concentración necesaria de un compuesto para inhibir una actividad biológica a un 50% (Swinney, 2011). Por otra parte, las pruebas FRAP y ORAC se reportan en Equivalentes trolox (TE).

Como puede observarse en la tabla 5, el **compuesto 7a** si presentó actividad antioxidante en la técnica del radical DPPH, cuyo valor de IC<sub>50</sub> fue de 947.98±19.75 µM, no obstante, presenta aproximadamente cien veces menor actividad que el ácido gálico 8.76±0.89 µM.

**Tabla 5. Actividad sobre el radical DPPH IC<sub>50</sub>**

Muestra	Concentración (µM)	Reducción del DPPH (%)	IC <sub>50</sub> (µM)
Trolox	3.16	7.88±0.34**	19.57±0.31
	5.62	14.19±0.57**	
	10	25.13±0.53**	
	17.78	43.90±0.84**	
	31.62	77.59±1.26**	
	56.23	95.59±0.14**	
	100	96.02±0.11**	
Ácido gálico	1	8.67±0.88	8.76±0.89
	3.16	20.78±1.51**	
	10	56.52±5.81**	
	31.62	94.62±0.07**	
	100	94.74±0.09**	
Compuesto 7a (Fotomar)	1	-3.97±3.47	≈ 947.98±19.75
	10	-0.75±2.70	
	100	13.32±2.17*	
	1000	50.96±0.46**	
Compuesto 7a (Fotomar) 2 horas de incubación	1	-0.37±0.16	≈ 148.14±5.40
	10	6.82±0.01	
	100	41.09±1.33	
	1000	93.21±0.46	

Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes (n= 3) ± error estándar de la media. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguida de un prueba de Dunnett para aislar los grupos con diferencia significativa. Los valores de  $p \leq 0.05$  (\*) y  $p \leq 0.01$  (\*\*) se consideraron como diferencia significativa con respecto al radical DPPH.

De acuerdo con Brand-Willis, cada antioxidante reacciona cinéticamente diferente, como se muestra en su estudio, el ácido ascórbico reacciona rápidamente con el DPPH estabilizando el radical de inmediato; el tocoferol reaccionó más lento y alcanzó un estado estacionario en 30 minutos, y el resto de los compuestos reaccionaron progresivamente, y alcanzaron el estado estacionario en un lapso de 1 a 6 horas (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995). Para que los resultados de  $IC_{50}$  fueran estadísticamente comparables se estandarizó la lectura de absorción a 515 nm después de 30 minutos de reacción, pero debido a que se observó que el compuesto **7a** aumento su actividad antioxidante con el tiempo, por lo que se realizó una segunda lectura de absorción después de dos horas de reacción, obteniéndose un valor de  $IC_{50}$  de  $\approx 148.14 \pm 5.40$ . Es importante mencionar que este método es muy utilizado porque fácil y rápido de ejecutar, sin embargo, el tiempo de incubación fijo subestima la actividad antioxidante en moléculas de reacción lenta (Mishra, Ojha, & Chaudhury, 2012). Otra desventaja de este método es que muchas sustancias con actividad antioxidante que reaccionan con radicales peroxilo, reaccionan lentamente con DPPH o no reaccionan (Huang, Boxin, & Prior, 2005).

Por otra parte, la prueba de TBARS es ampliamente utilizada en alimentos como indicador de la rancidez oxidativa en alimentos (Ruano, 2023), en este ensayo se induce la peroxidación lipídica del sistema formándose como producto principal malondialdehído (MDA), el cual reaccionará con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar un producto de color rosa. El resultado obtenido está relacionado con la capacidad de un compuesto de inhibir la peroxidación lipídica, es decir, entre menor se el valor de  $IC_{50}$  mayor es la actividad antioxidante. Los resultados obtenidos son que el **compuesto 7a**

( $IC_{50}=4.55\pm 0.16\mu M$ ) fue más siete veces más activo que el trolox ( $IC_{50}= 28.75\pm 2.34\mu M$ ) y que cinco veces más que el ácido gálico ( $IC_{50}=19.82\pm 0.84\mu M$ ).

**Tabla 6. Inhibición de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata**

Muestra	Tratamiento/ Concentración ( $\mu M$ )	TBARS (nmol/mg prot.)	Inhibición (%)	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )
Trolox	Basal	0.31 $\pm$ 0.04	NA	<b>28.75<math>\pm</math>2.34</b>
	Control	9.97 $\pm$ 0.49		
	3.16	9.15 $\pm$ 0.72	8.52 $\pm$ 2.88	
	5.62	8.36 $\pm$ 0.41*	16.11 $\pm$ 1.89*	
	10	7.33 $\pm$ 0.24**	26.34 $\pm$ 2.39**	
	17.78	6.82 $\pm$ 0.19**	31.51 $\pm$ 1.59**	
	31.62	4.61 $\pm$ 0.21**	53.34 $\pm$ 4.32**	
	56.23	1.31 $\pm$ 0.43**	86.41 $\pm$ 5.14**	
100	0.39 $\pm$ 0.04**	96.12 $\pm$ 0.29**		
Ácido gálico	Basal	0.39 $\pm$ 0.12	NA	<b>19.82<math>\pm</math>0.84</b>
	Control	10.06 $\pm$ 0.52		
	1.78	10.22 $\pm$ 0.38	-1.74 $\pm$ 2.08	
	3.16	9.93 $\pm$ 0.17	0.89 $\pm$ 4.11	
	5.62	9.47 $\pm$ 0.11	5.53 $\pm$ 3.90	
	10	8.21 $\pm$ 0.16**	17.92 $\pm$ 4.96**	
	17.78	5.27 $\pm$ 0.08**	47.33 $\pm$ 2.61**	
	31.62	2.71 $\pm$ 0.14**	73.06 $\pm$ 1.23**	
56.23	1.22 $\pm$ 0.17**	87.90 $\pm$ 1.17**		
100	0.52 $\pm$ 0.15**	94.92 $\pm$ 1.22**		
Compuesto a (Fotomar)	1	9.27 $\pm$ 0.38	7.75 $\pm$ 1.73	<b>4.55<math>\pm</math>0.16</b>
	1.33	8.95 $\pm$ 0.30	10.88 $\pm$ 2.03	
	1.78	8.46 $\pm$ 0.34	15.84 $\pm$ 1.22	
	2.37	7.76 $\pm$ 0.53*	22.93 $\pm$ 2.09*	
	3.16	7.22 $\pm$ 0.36**	28.25 $\pm$ 0.75**	
	4.22	5.65 $\pm$ 0.57**	44.16 $\pm$ 2.81**	
	5.62	3.50 $\pm$ 0.68**	65.70 $\pm$ 5.34**	
	7.5	1.35 $\pm$ 0.33**	86.79 $\pm$ 2.62**	
10	0.98 $\pm$ 0.53**	90.57 $\pm$ 4.69**		

Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  error estándar de la media. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett para aislar grupos con diferencia significativa. Los valores de  $p \leq 0.05$  (\*) y  $p \leq 0.01$  (\*\*) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

En el caso de la prueba de FRAP se monitorea una reacción de transferencia de electrones, el antioxidante a estudiar reduce el  $\text{Fe}^{3+}$  presente en el reactivo de FRAP, a  $\text{Fe}^{2+}$  lo que produce un cambio de color a azul intenso por el complejo  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ. El aumento de la absorbancia indica una mayor potencia reductora (Rodríguez-Bonilla, 2017).

Para este ensayo se utilizaron concentraciones de 100, 250, 500 y 1000  $\mu\text{M}$  del compuesto **7a**.

**Tabla 7. Resultados FRAP**

Muestra	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Equivalentes Trolox ( $\mu\text{M}$ )
<b>Fotomar</b>	100	7.35±0.64*
	250	17.54±0.64*
	500	34.02±1.70*
	1000	56.80±1.79*
<b>Ácido gálico</b>	3.125	5.87±1.40*
	6.25	25.87±1.95**
	12.5	55.69±3.53**
	25	123.28±4.19**
	50	248.46±9.69**
	100	482.72±12.11**
<b>Quercetina</b>	3.125	7.91±1.16**
	6.25	20.31± 3.06**
	12.5	61.06±3.64**
	25	139.76±3.57**
	50	287.12±6.96**

Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes ( $n= 3$ )  $\pm$  error estándar de la media. Los datos se sometieron a un análisis de varianza de una vía, seguida de una prueba Tukey para observar los grupos con diferencias a  $p \leq 0.05$ .

Como se observa en la tabla 7, a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  el compuesto **7a** presentó un valor de  $7.35 \pm 0.64$  TE, mientras que el ácido gálico  $482.72 \pm 12.11$  TE, siendo su efecto antioxidante 68 veces eficiente que la referencia, por lo que su actividad antioxidante apenas es considerable. A una concentración de 1000  $\mu\text{M}$  el compuesto **7a** tiene un valor de  $56.80 \pm 1.79$  TE, mientras que las referencias para tener un valor similar de TE requieren una concentración aproximada de 12.5  $\mu\text{M}$ , quizá una explicación de este comportamiento es por el impedimento estérico del radical o del compuesto **7a**. El estudio confirmó que el ensayo FRAP es simple, rápido y no requiere equipo especializado, aunque se ha señalado que puede no ser aplicable para detectar todos los antioxidantes (Wesolowska & Dżugan, 2017).

Respecto a la prueba de ORAC se realizó siguiendo el protocolo de (Biotek, 2005). Este ensayo se basa en la inhibición de la oxidación inducida de la fluoresceína por radicales peroxilo proveniente de la descomposición térmica a  $37^\circ\text{C}$  del AAPH. Se realiza una cinética de la degradación de la fluoresceína respecto al tiempo, por tanto, al usar un compuesto antioxidante, este puede retardar la oxidación de la sonda dependiendo de la capacidad antioxidante (Jiménez M., 2019).

Los resultados se muestran en la tabla 8, donde el compuesto **7a** ( $0.069 \pm 0.011$  TE) presentó un valor muy bajo de equivalentes trolox comparado con los antioxidantes de referencia, ácido gálico ( $0.318 \pm 0.065$  TE) y quercetina ( $2.449 \pm 0.751$  TE).

**Tabla 8. Resultados ORAC**

Compuesto	Pendiente	TE
Trolox	0.3642±0.020	NA
Fotomar	0.0252±0.003	0.069±0.011 <sup>a</sup>
Ácido gálico	0.116±0.013	0.318±0.065 <sup>b</sup>
Quercetina	0.892±0.156	2.449±0.751 <sup>c</sup>

Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes (n= 3) ± error estándar de la media. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Tukey, las letras como superíndices representan las diferencias significativas entre las medias de los grupos. Se consideró una  $p \leq 0.05$ . TE= Equivalentes trolox.

Para poder observar un efecto antioxidante se requirió que el compuesto Fotomar se encontrara en concentraciones altas a comparación de las referencias, pero hubo una limitante, cuando se realizó la solución stock con PBS (75 mM, pH=7.4), el compuesto **7a** precipitó, por lo que fue necesario realizarla con metanol y las diluciones en PBS (75 mM, pH=7.4), dado que el factor limitante en este ensayo fue la poca solubilidad, la concentración máxima utilizada fue 1000  $\mu$ M. Aunado a esto, se ha observado que el método ORAC desarrollado solo es válido para sustancias hidrosolubles ya que la presencia de sustancias liposolubles pueden verse completamente alteradas en presencia del medio acuoso en que se realiza el método ORAC (Zapata & Zapata, 2019). Por lo tanto, dada la deficiente solubilidad del Fotomar, en este método el valor obtenido pudo ser subestimado.

En resumen, de las cuatro pruebas de antioxidantes (tabla 9), en tres se observa la tendencia de que el compuesto **7a** requiere una concentración alta para presentar un efecto antioxidante, además el efecto antioxidante es menor a las referencias, sólo en la

prueba de TBARS se concluye lo contrario. Cabe recordar que cada prueba utiliza un radical diferente, por lo que el compuesto reaccionará de diferente manera.

**Tabla 9. Pruebas antioxidantes.**

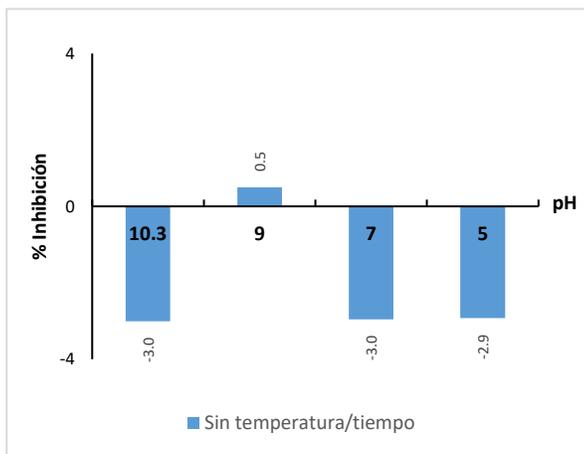
	DPPH	TBARS	FRAP	ORAC
<b>Muestra</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>TE</b>	<b>TE</b>
Trolox	19.57±0.31	28.75±2.34	NA	NA
Ácido gálico	8.76±0.89	19.82±0.84	482.72±12.11*	0.318±0.065
Fotomar	≈ 947.98±19.75	4.55±0.16	7.35±0.64*	0.069±0.011

### 8.3 Evaluación de la estabilidad antioxidante

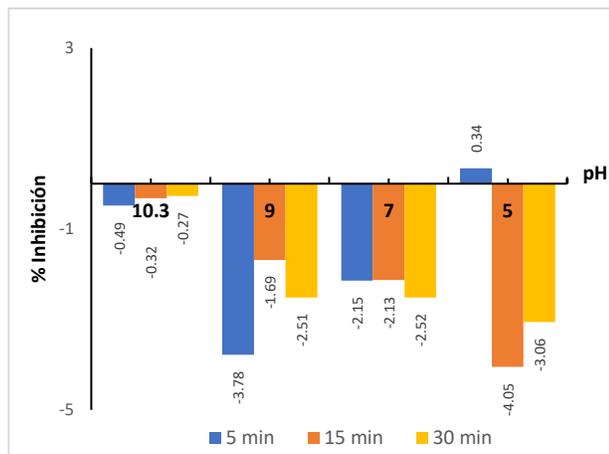
Para evaluar la estabilidad del compuesto **7a** se sometió a diferentes tratamientos de temperatura-tiempo versus pH ([Tabla 1](#)), teniendo como variable respuesta la prueba de TBARS, pero esta vez tomando como fuente de lípidos el lardo.

En las gráficas del inciso a), se puede observar que los porcentajes de inhibición son negativos, lo que significa que la matriz utilizada “lardo”, no se oxidó, una posible razón es que esta pieza proveniente del cerdo tiene en mayor proporción grasas saturadas las cuales tardan más tiempo en oxidarse (Badui, 2006), por lo que se requieren mínimo 30 días para que lardo tenga valores medibles de malondialdehído (Flavia, Zorica, & Delia, 2014), por lo que esta fuente de lípidos no fue viable para este ensayo.

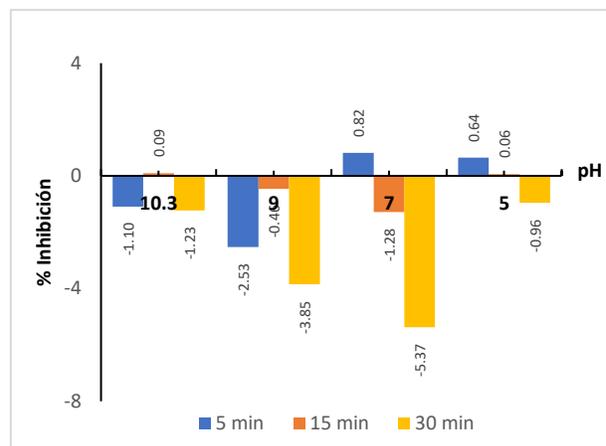
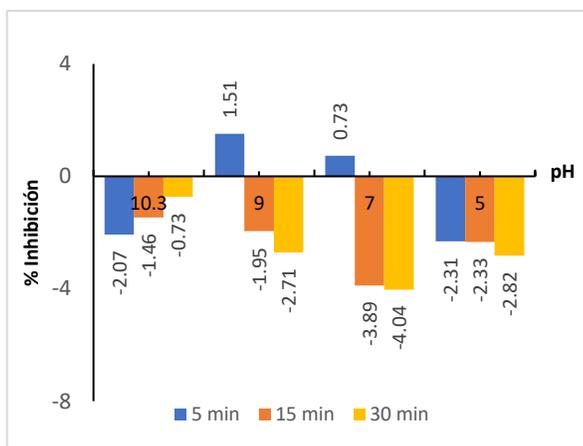
**a) Resultados obtenidos con lardo como fuente de lípidos**



Gráfica 2. Sin tratamiento térmico vs pH



Gráfica 1. 60°C-tiempo vs pH



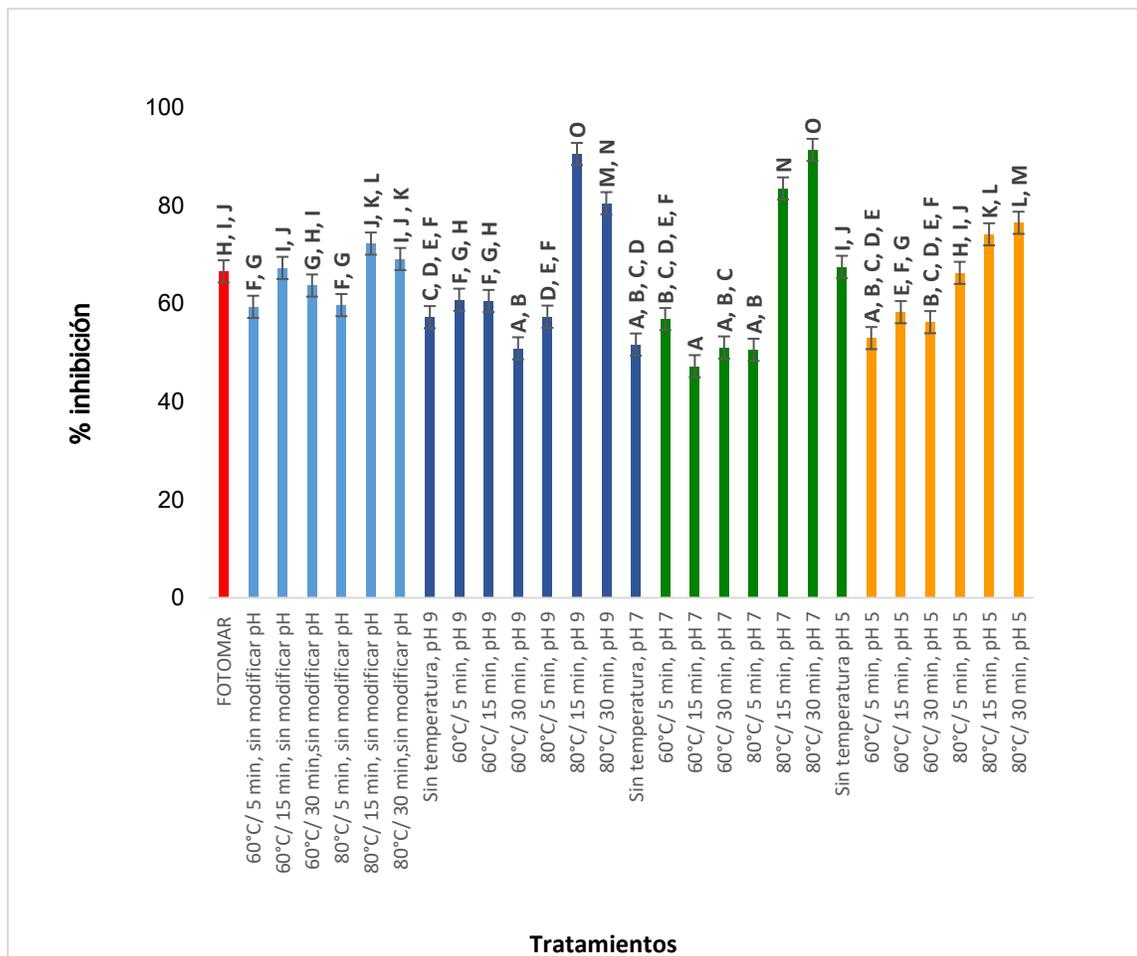
Gráfica 3. 100°C-tiempo vs pH

Debido a lo anterior se optó por regresar a la matriz de “cerebro de rata” rico en ácido insaturados que son más susceptibles a la peroxidación lipídica. En las gráficas del inciso [b\)](#), se encuentran los resultados de la estabilidad química del compuesto **7a**, se observa que la actividad antioxidante no se pierde pese a que el compuesto se sometió a diferentes tratamientos de temperatura-tiempo vs pH.

El tratamiento con el menor porcentaje de inhibición es 60°C/15 min a pH 7 y el tratamiento donde aumentó considerablemente el porcentaje de inhibición es 80°C/30 min a pH 7 y 80°C/30 min a pH 9 (gráfica 7). Sin embargo, no se observa una tendencia homogénea en los tratamientos que indique que aun mismo pH o temperatura-tiempo, el efecto antioxidante aumente o disminuya.

**b) Resultados obtenidos con cerebro de rata como fuente de lípidos**

**Gráfica 4. Media estimada de porcentajes de inhibición de los tratamientos**



Los resultados se sometieron a una prueba de varianza de una vía, seguida de una prueba de Tukey para observar diferencia significativa entre los tratamientos a una  $p \leq 0.05$ .

## 8. CONCLUSIONES

- Se sintetizó por medio de tres pasos de reacción el compuesto bisindólico **7a**, análogo estructural de la caulerpina.
- El rendimiento obtenido con tolueno es similar al obtenido con benceno, pero con disminución del riesgo tóxico.
- La pureza del compuesto **7a** mediante cromatografía líquidos de alto rendimiento (HPLC) fue del 94%.
- Se caracterizó el producto **7a** por el Resonancia Magnética Nuclear (RMN)  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .
- En la prueba de DPPH se obtuvo un valor de  $\text{IC}_{50}=947.98 \pm 19.75 \mu\text{M}$ , mientras que en la técnica de TBARS, el valor obtenido de  $\text{IC}_{50}$  fue de  $4.55 \pm 0.16 \mu\text{M}$ . Con respecto a la prueba de FRAP a una concentración de  $100 \mu\text{M}$  del compuesto, el valor de equivalentes trolox fue de  $7.35 \pm 0.64 \text{ TE}$ . Por último, en la técnica de ORAC se obtuvo un valor de  $0.0696 \pm 0.011 \text{ TE}$ .
- Los resultados obtenidos en las pruebas antioxidantes indican que el compuesto sí presenta actividad antioxidante, aunque el efecto es mínimo comparado con los antioxidantes de referencia.
- El tipo de reacción con el radical, así como el impedimento estérico y la solubilidad influyen en los resultados de la actividad antioxidante.
- No se logró estandarizar la técnica de TBARS utilizando el lardo como fuente de lípidos, por lo que, se evaluó la estabilidad del compuesto utilizando como matriz de lípidos cerebro de rata.

- La actividad antioxidante no se perdió en ninguno de los tratamientos del diseño experimental, pero si existen diferencias estadísticas entre ellos.
- No se observó una tendencia homogénea en los tratamientos que indique que aun mismo pH o temperatura-tiempo, el efecto antioxidante aumente o disminuya.

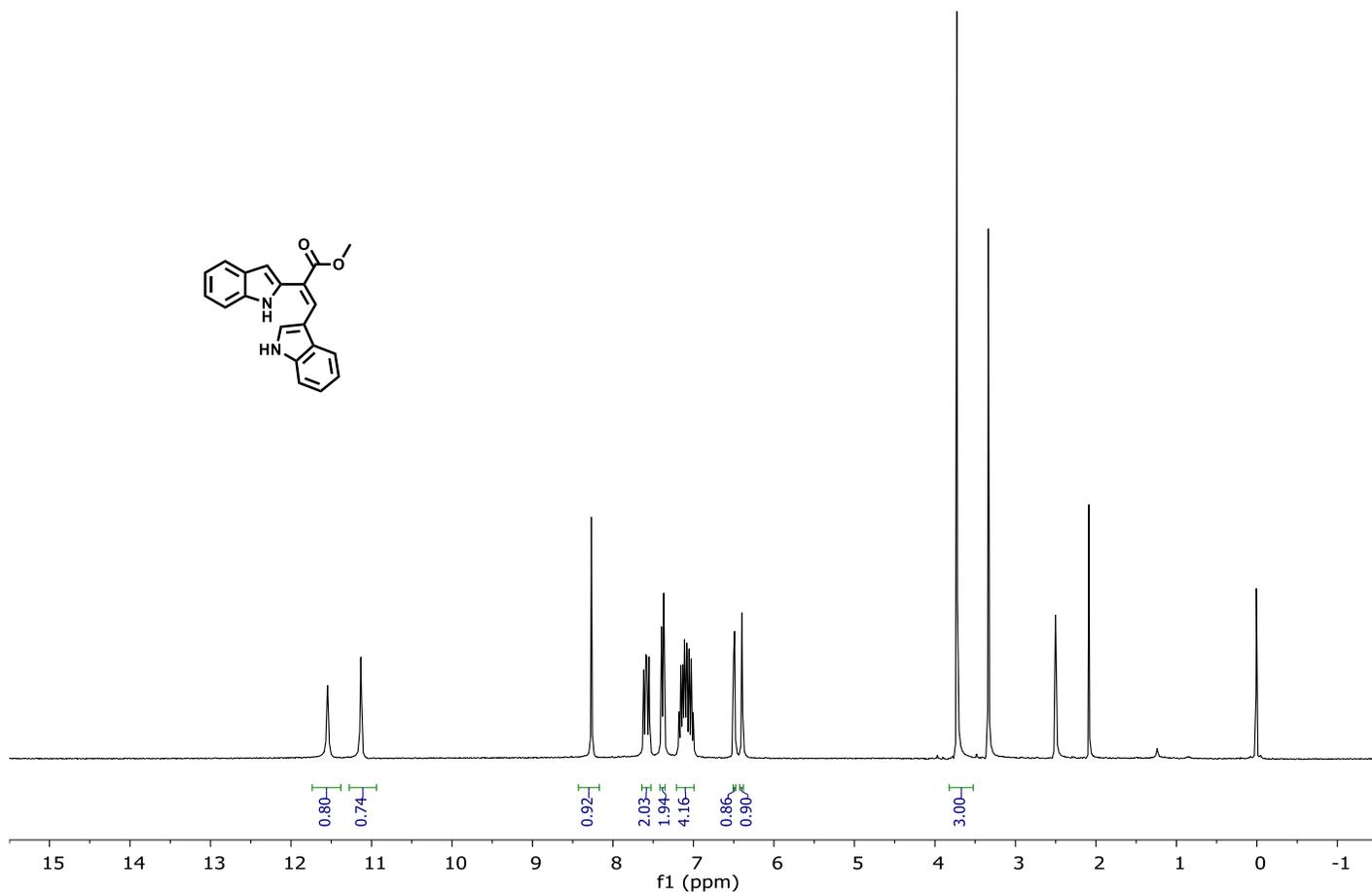
## 9. PERSPECTIVAS

De las cuatros pruebas de antioxidantes, la única donde el resultado obtenido de IC<sub>50</sub> (4.55±0.16 µM) indica una mejor actividad respecto a las referencias fue en la de TBARS, lo cual podría devenir en una aplicación en un campo diferente o en su defecto evaluar el compuesto en una matriz alimentaria más compleja (con ajustes en la prueba de TBARS) para observar si continúa la actividad antioxidante.

## ANEXO

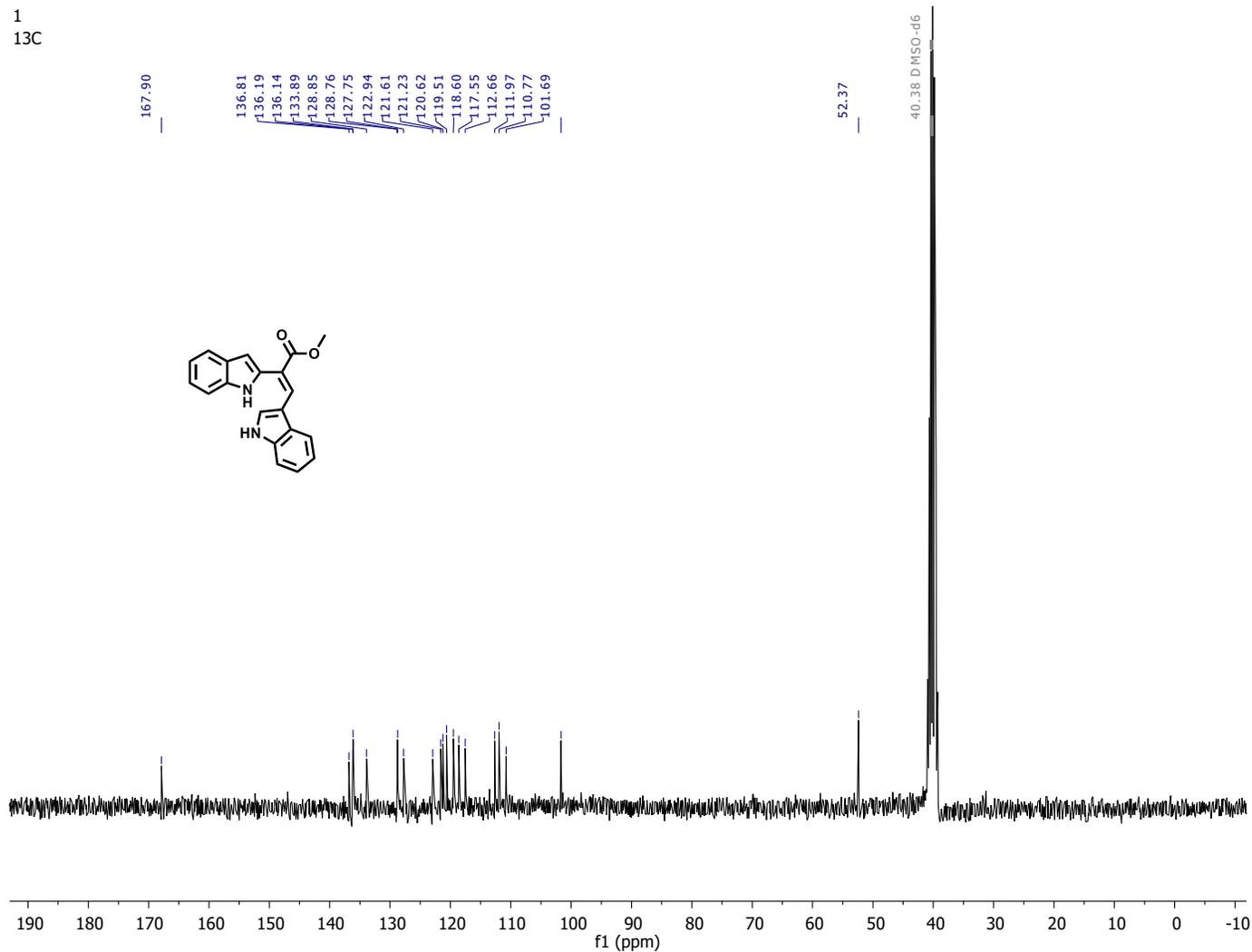
### I. Espectro RMN $^1\text{H}$ del compuesto 7a

1  
1H



**RMN  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$**  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ (ppm): 11.54 (sa, 1H, C-NH-C), 11.39 (sa, 1H, C-NH-C), 8.27 (s, 1H, CH=C-CO $_2$ ), 7.61 (d,  $J=7.6$  Hz, 1H, CH-NH-C=C-CH), 7.47 (d,  $J=7.6$  Hz, 1H, C=CH-C-CH), 7.40 (d,  $J=3.2$  Hz, 1H, CH-NH-C-CH), 7.38 (d,  $J=3.2$  Hz, 1H, C-NH-C-CH), 7.16 (td,  $J=7.6, 1.2$  Hz, 1H, CH-NH-C-CH=CH), 7.11 (td,  $J=7.6, 1.2$  Hz, 1H, C-NH-C-CH=CH), 7.08 (td,  $J=7.6, 1.2$  Hz, 1H, CH=C-C-CH=CH), 7.03 (td,  $J=7.6, 1.2$  Hz, 1H, C=CH-C-CH=CH), 6.49 (s, 1H, C=CH-NH), 6.40 (s, 1H, NH-C=CH-C), 3.73 (s, 3H, O-CH $_3$ ).

## II. Espectro RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto 7a



**RMN  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ (ppm): 167.9(C=O), 136.8 (C-CO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 136.2 (CH=C-CO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 136.1 (CH-NH-C), 133.8 (C-NH-C-CH), 128.8 (NH-C=CH-C), 128.8 (C=CH-NH), 127.7 (C=C-NH-CH), 122.9 (CH-NH-C-CH=CH), 121.6 (C-NH-C-CH=CH), 121.2 (CH=C-C-CH=CH), 120.6 (C=CH-C-CH), 119.5 (C=CH-C-CH=CH), 118.6 (CH-NH-C=C-CH), 117.5 (NH-C=CH-C), 112.6 (CH-NH-C-CH), 111.9 (C-NH-C-CH), 110.8 (C=CH-NH), 101.7 (NH-C=CH-C), 52.37 (C-OCH<sub>3</sub>).

### **Consideraciones:**

Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) están expresadas en Hertz (Hz). Para indicar la multiplicidad se indica con las siguientes abreviaturas: s, singulete; sa, singulete ancho; d, doblete; dt, doblete de triples.

### III. Resultado y condiciones de cromatografía líquidos de alto rendimiento



#### Laboratorio de Cromatografía Condiciones Cromatográficas

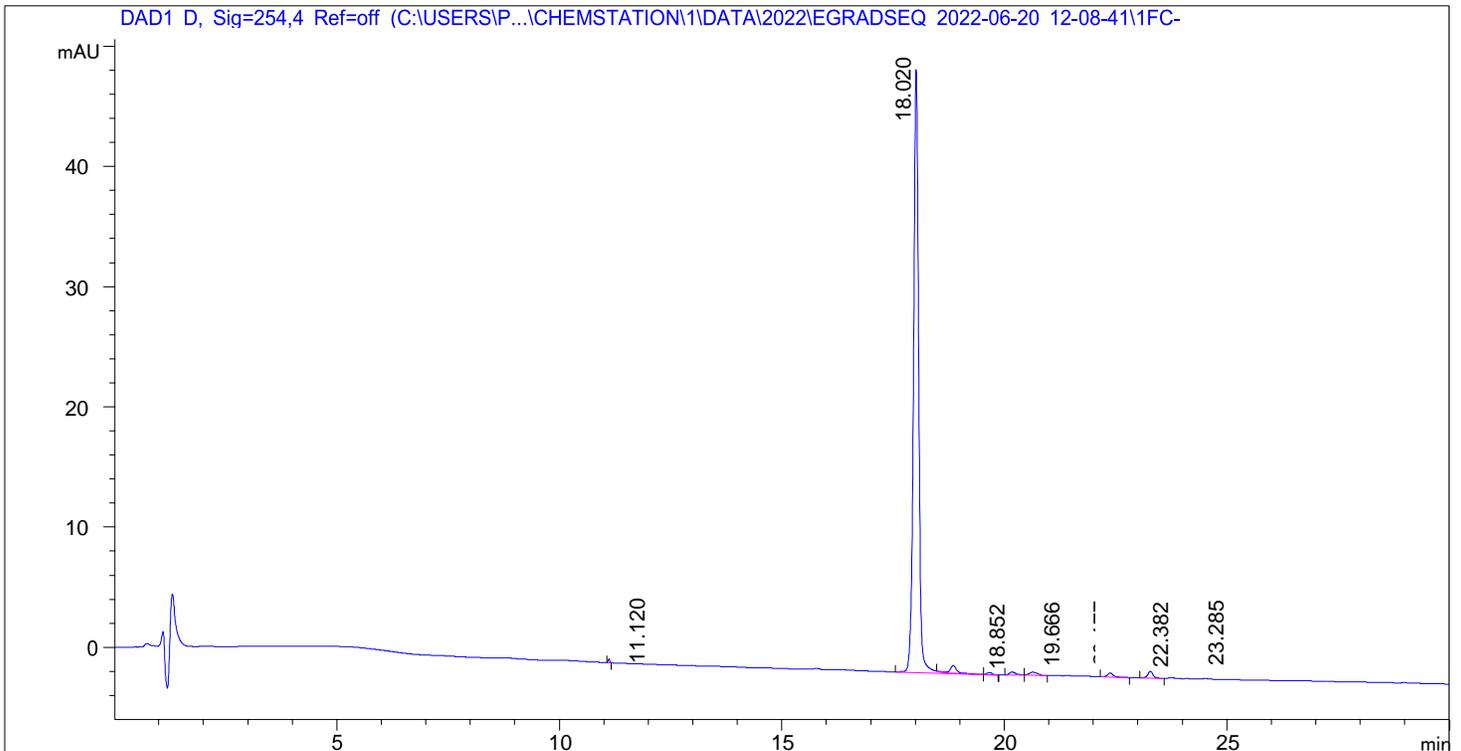
Muestra:	RxCDK2		
Cromatógrafo de Líquidos	Agilent 1260 Infinity II		
Detector	Agilent 1260 UV Arreglo de diodos		
Longitud de onda de los cromatogramas	254 nm		
Columna	Kinetex 5 µm EVO C18 100 Å 2.1 x 100 mm		
Eluyente	ACN	Agua (TEA 0.05%)	
	inicial	20	80
	30 min	100	0
Flujo	0.2 mL/min		
Disolvente de las muestras	ACN		
Fecha 20-06-2022	Analizó: Eréndira García		
	Revisó: Carmen Márquez		

FRP-LCR-IQUI-02-001

Data File C:\USERS\P...NTS\CHEMSTATION\1\DATA\2022\EGRADSEQ 2022-06-20 12-08-41\1FC-0301.D  
Sample Name: RxCDK2

=====

Acq. Operator : SYSTEM	Seq. Line : 3	Sample Operator : SYSTEM
Acq. Instrument : 1260 Infinity II DAD	Location : P1-F-03Injection	
Date : 6/20/2022 1:45:39 PM	Inj : 1	
	Inj Volume : 1.000 µl	
Acq. Method : C:\Users\Public\Documents\ChemStation\1\Data\2022\egradseq 2022-06-20 12-08		
	-41\egrad.M	
Last changed : 6/20/2022 11:51:43 AM by SYSTEM		
Analysis Method : C:\Users\Public\Documents\ChemStation\1\Data\2022\egradseq 2022-06-20 12-08		
	-41\egrad.M (Sequence Method)	
Last changed : 6/20/2022 2:10:27 PM by SYSTEM		
	(modified	
after loading) Additional Info		
: Peak(s) manually integrated		



=====  
 Area Percent Report  
 =====

Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 D, Sig=254,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	11.120	BB	0.0405	7.22733	2.95947	0.1725
2	18.020	BV R	0.1204	3970.52686	501.47461	94.7502
3	18.852	VV E	0.1538	69.94579	6.59381	1.6691
4	19.666	VB E	0.1184	14.68323	1.89495	0.3504

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
6	20.641	BB	0.1654	29.00581	2.49876	0.6922
7	22.382	BB	0.1418	32.68394	3.35167	0.7799
8	23.285	BB	0.1213	44.18201	5.64351	1.0543

Totals : 4190.52282 526.82053

=====  
 \*\*\* End of Report \*\*

#### IV. Gráficas método de FRAP

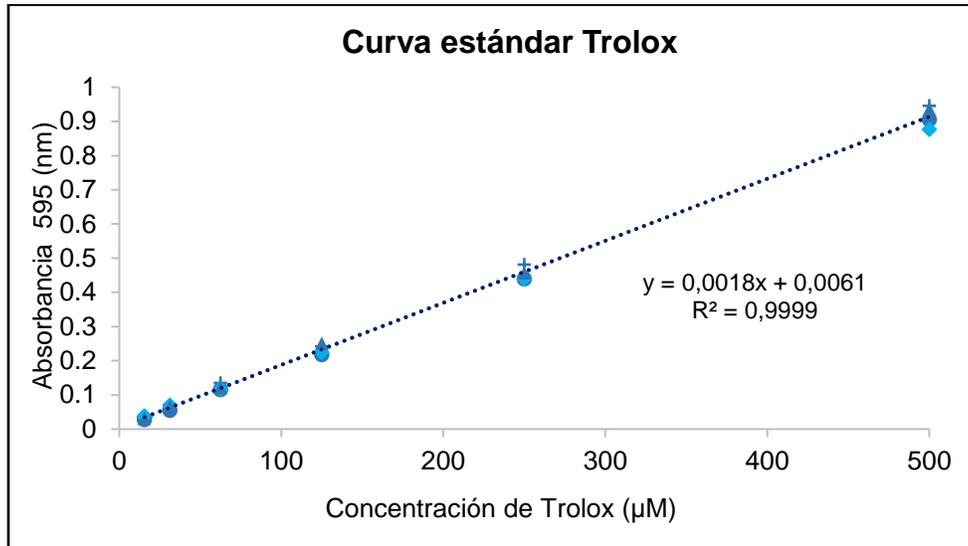


Figura 16 Curva estándar trolox. FRAP

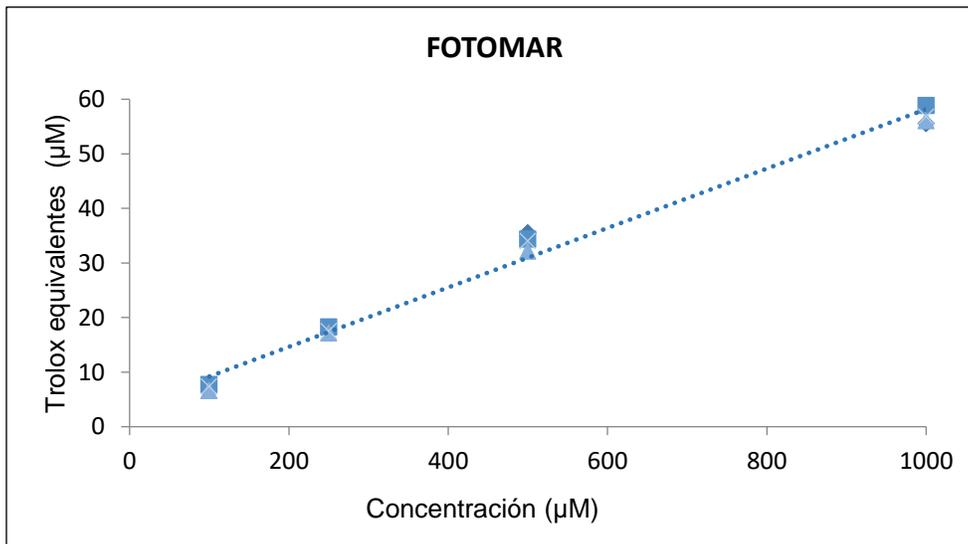


Figura 17. Equivalentes trolox ( $\mu\text{M}$ ) de fotomar

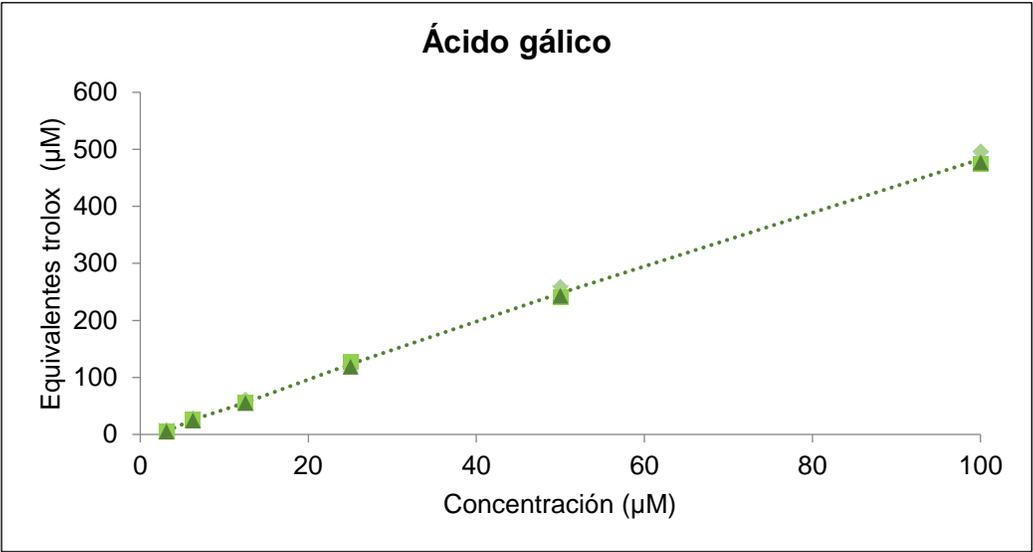


Figura 18. Equivalentes trolox (µM) de ácido gálico

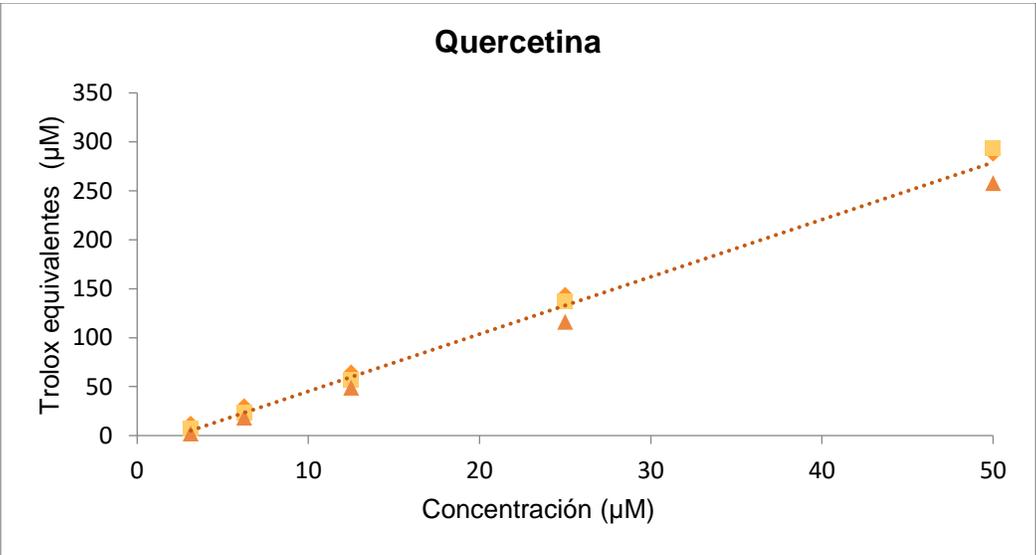


Figura 19. Equivalentes trolox (µM) de quercetina

## V. Gráficas método de ORAC

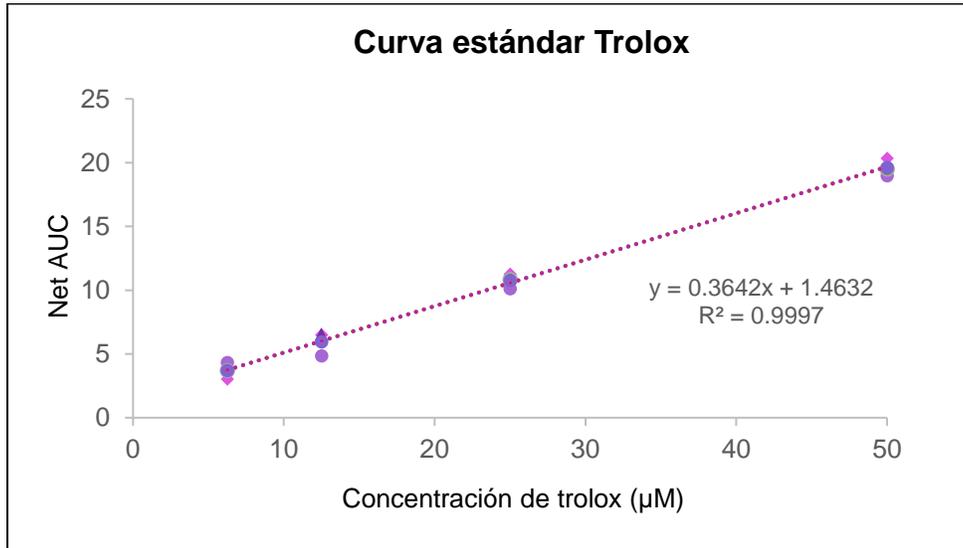


Figura 20. Curva estándar de trolox. Método ORAC

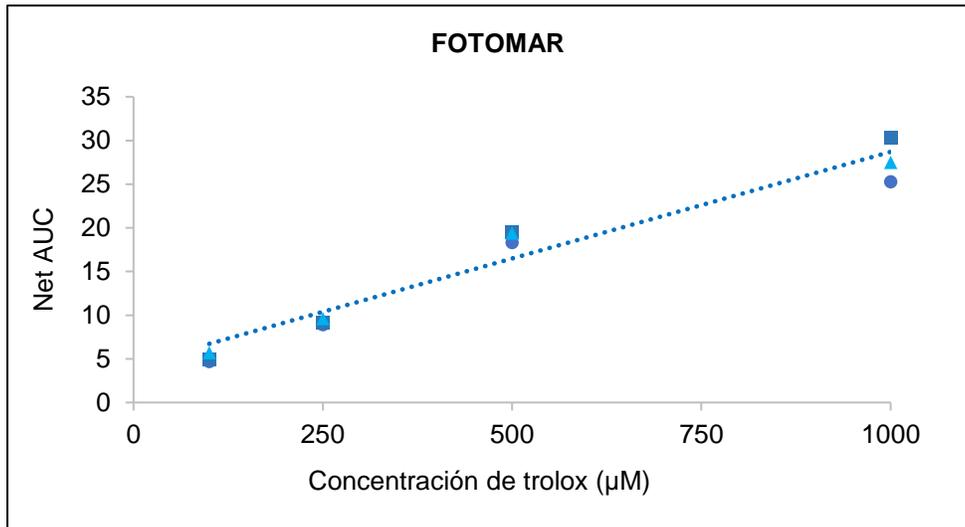


Figura 21. Curva de respuesta antioxidante de fotomar

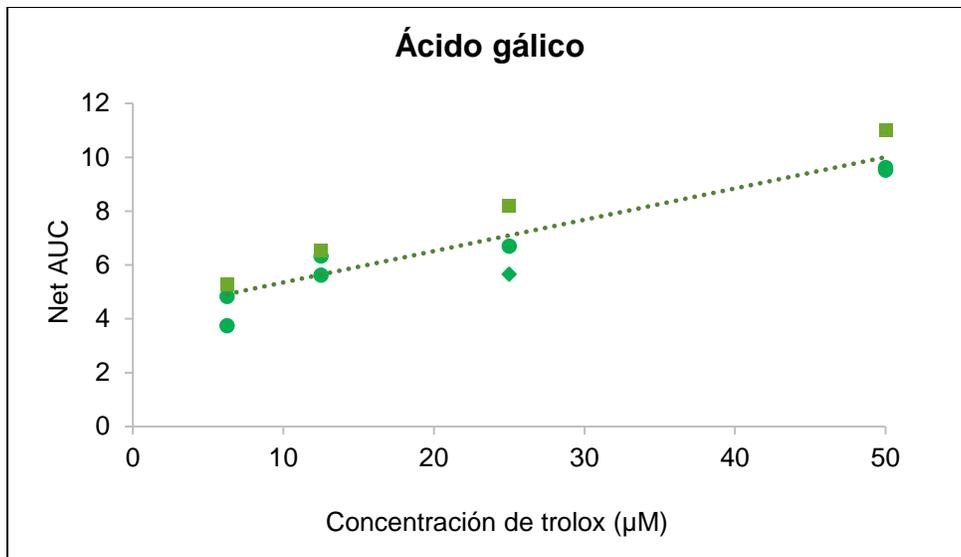


Figura 22. Curva de respuesta antioxidante del ácido gálico

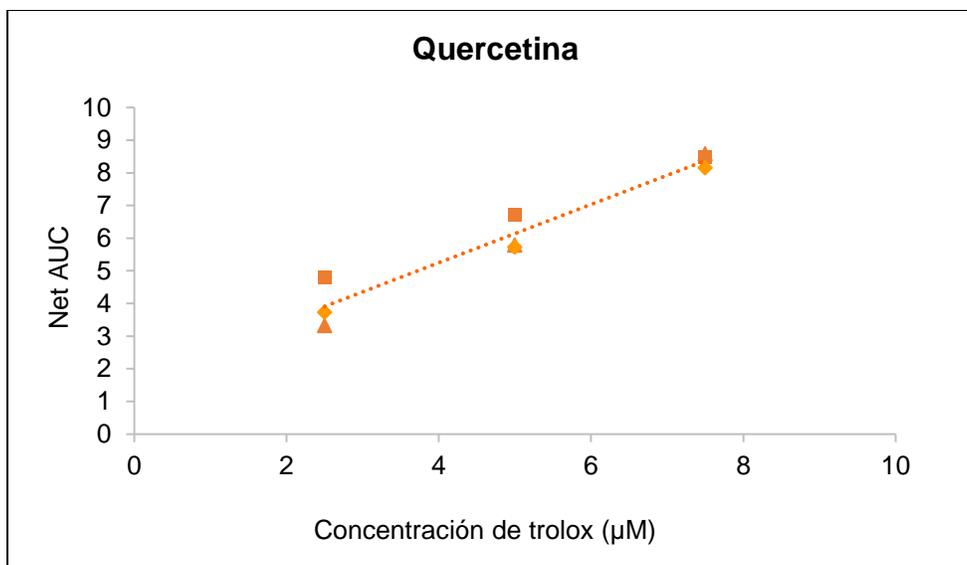


Figura 23. Curva de respuesta antioxidante de la quercetina

## VI. Análisis estadístico

### A. PRUEBA DPPH

#### ➤ Compuesto 7a

#### One Way Analysis of Variance

Normality Test: Passed (P = 0.114)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.802)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
DPPH	3	0	0.607	0.0469	0.0271
1	3	0	0.629	0.0149	0.00863
10	3	0	0.610	0.0204	0.0118
100	3	0	0.525	0.0189	0.0109
1000	3	0	0.297	0.0194	0.0112

#### ANOVA

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	0.229	0.0572	79.977	<0.001
Residual	10	0.007	0.0007		
Total	14	0.236			

#### Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method):

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
DPPH vs. 1000	0.310	14.180	--	Yes
DPPH vs. 100	0.082	3.756	--	Yes
DPPH vs. 1	0.022	1.018	--	No
DPPH vs. 10	0.003	0.143	--	Do Not Test

➤ **Ácido gálico**

**One Way Analysis of Variance**

**Normality Test:** Failed ( $P < 0.050$ )

**Equal Variance Test:** Passed ( $P = 0.352$ )

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
DPPH	3	0	0.640	0.011	0.0064
1	3	0	0.584	0.004	0.0027
3.16	3	0	0.507	0.012	0.0069
10	3	0	0.278	0.060	0.0349
31.62	3	0	0.034	0.000192	0.0001
100	3	0	0.033	0.000667	0.0004

**ANOVA**

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	5	1.105	0.221	336.041	<0.001
Residual	12	0.0079	0.0006		
Total	17	1.113			

**Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method):**

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
DPPH vs. 100	0.606	28.956	--	Yes
DPPH vs. 31.62	0.606	28.918	--	Yes
DPPH vs. 10	0.362	17.303	--	Yes
DPPH vs. 3.16	0.133	6.362	--	Yes
DPPH vs. 1	0.055	2.658	--	No

➤ Trolox

**One Way Analysis of Variance**

**Normality Test:** Passed (P = 0.057)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.181)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
DPPH	3	0	0.640	0.0111	0.0064
3.16	3	0	0.589	0.0107	0.0062
5.62	3	0	0.549	0.0131	0.0075
10	3	0	0.479	0.0131	0.0075
17.78	3	0	0.359	0.0153	0.0088
31.62	3	0	0.144	0.0163	0.0094
56.23	3	0	0.028	0.00192	0.0011
100	3	0	0.025	0.00135	0.0007

**ANOVA**

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	7	1.348	0.193	1411.644	<0.001
Residual	16	0.00218	0.000136		
Total	23	1.350			

**Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method):**

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
DPPH vs. 100	0.615	64.445	--	Yes
DPPH vs. 56.23	0.612	64.153	--	Yes
DPPH vs. 31.62	0.496	52.059	--	Yes
DPPH vs. 17.78	0.281	29.455	--	Yes
DPPH vs. 10	0.161	16.871	--	Yes
DPPH vs. 5.62	0.090	9.531	--	Yes
DPPH vs. 3.16	0.050	5.301	--	Yes

## B. PRUEBA TBARS

### ➤ Compuesto 7a

#### One Way Analysis of Variance

Normality Test: Passed (P = 0.612)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.989)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
FeSO <sub>4</sub>	3	0	10.061	0.896	0.517
1	3	0	9.269	0.656	0.379
1.33	3	0	8.948	0.514	0.297
1.78	3	0	8.457	0.585	0.338
2.37	3	0	7.766	0.922	0.532
3.16	3	0	7.217	0.615	0.355
4.22	3	0	5.648	0.980	0.566
5.62	3	0	3.501	1.173	0.677
7.5	3	0	1.348	0.568	0.328
10	3	0	0.985	0.919	0.530

#### ANOVA

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	9	295.926	32.881	50.040	<0.001
Residual	20	13.142	0.657		
Total	29	309.068			

#### Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method):

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
FeSO <sub>4</sub> vs. 10	9.077	13.714	--	Yes
FeSO <sub>4</sub> vs. 7.5	8.713	13.164	--	Yes
FeSO <sub>4</sub> vs. 5.62	6.560	9.912	--	Yes
FeSO <sub>4</sub> vs. 4.22	4.414	6.669	--	Yes
FeSO <sub>4</sub> vs. 3.16	2.845	4.298	--	Yes
FeSO <sub>4</sub> vs. 2.37	2.296	3.468	--	Yes
FeSO <sub>4</sub> vs. 1.78	1.604	2.424	--	No
FeSO <sub>4</sub> vs. 1.33	1.114	1.683	--	Do Not Test
FeSO <sub>4</sub> vs. 1	0.793	1.198	--	Do Not Test

➤ **Ácido gálico**

**One Way Analysis of Variance**

**Normality Test:** Failed (P < 0.050)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.458)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
FeSO <sub>4</sub>	3	0	10.061	0.896	0.517
1.789	3	0	10.219	0.658	0.380
3.16	3	0	9.931	0.301	0.174
5.62	3	0	9.465	0.190	0.110
10	3	0	8.210	0.281	0.162
17.78	3	0	5.274	0.136	0.078
31.62	3	0	2.705	0.241	0.139
56.23	3	0	1.224	0.292	0.169
100	3	0	0.520	0.256	0.148

**ANOVA**

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	8	388.254	48.532	261.658	<0.001
Residual	18	3.339	0.185		
Total	26	391.592			

**Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method):**

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
FeSO <sub>4</sub> vs. 100	9.541	27.134	--	Yes
FeSO <sub>4</sub> vs. 56.23	8.837	25.130	--	Yes
FeSO <sub>4</sub> vs. 31.62	7.356	20.919	--	Yes
FeSO <sub>4</sub> vs. 17.78	4.787	13.614	--	Yes
FeSO <sub>4</sub> vs. 10	1.851	5.264	--	Yes
FeSO <sub>4</sub> vs. 5.62	0.596	1.695	--	No
FeSO <sub>4</sub> vs. 1.789	0.158	0.449	--	Do Not Test
FeSO <sub>4</sub> vs. 3.16	0.130	0.369	--	Do Not Test

➤ Trolox

**One Way Analysis of Variance**

**Normality Test:** Passed (P = 0.127)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.384)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
FeSO <sub>4</sub>	3	0	9.973	0.842	0.486
3.16	3	0	9.150	1.254	0.724
5.62	3	0	8.362	0.713	0.411
10	3	0	7.329	0.420	0.243
17.78	3	0	6.815	0.326	0.188
31.62	3	0	4.611	0.355	0.205
56.23	3	0	1.308	0.746	0.431
100	3	0	0.388	0.076	0.0441

**ANOVA**

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	7	267.449	38.207	81.270	<0.001
Residual	16	7.522	0.470		
Total	23	274.971			

**Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method):**

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
FeSO <sub>4</sub> vs. 100	9.585	17.120	--	Yes
FeSO <sub>4</sub> vs. 56.23	8.665	15.478	--	Yes
FeSO <sub>4</sub> vs. 31.62	5.362	9.577	--	Yes
FeSO <sub>4</sub> vs. 17.78	3.158	5.640	--	Yes
FeSO <sub>4</sub> vs. 10	2.644	4.723	--	Yes
FeSO <sub>4</sub> vs. 5.62	1.611	2.877	--	No
FeSO <sub>4</sub> vs. 3.16	0.823	1.471	--	Do Not Test

## C. FRAP

### ➤ Compuesto 7a

#### Estadísticos descriptivos

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Control	3	0.16	0.0533	6.6667E-05
100	3	22.0556	7.3519	0.4115
250	3	52.6111	17.5370	0.4115
500	3	102.0556	34.0185	2.8807
1000	3	170.3889	56.7963	3.1893

#### ANOVA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4193.5185	3	1397.8395	811.1642	2.83E-10	4.0662
Dentro de los grupos	13.7860	8	1.733			
Total	4207.30	11				

#### Análisis de las medias por método de Tukey con un intervalo de confianza de 95%.

Comparación	Medias	std err	p-value	p<0.05
Control vs 100	7.299	0.6778	1.370E-4	Sí hay diferencia
Control vs 250	17.484	0.6778	4.1925E-08	Sí hay diferencia
Control vs 500	33.9652	0.6778	4.1637E-11	Sí hay diferencia
Control vs 1000	56.7429	0.6778	1.2522E-12	Sí hay diferencia

➤ **Ácido gálico**

**Estadísticos descriptivos**

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Control	3	0.16	0.053	6.6667E-05
3.125	3	22.611	7.537	20.164
6.25	3	69.277	23.092	20.164
12.5	3	172.6111	57.537	12.448
25	3	361.5	120.5	8.333
50	3	745.388	248.462	80.658
100	3	1462.05	487.351	311.213

**ANOVA**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	506976.88	5	101395.3770	1343.0339	4.7133E-16	3.10587524
Dentro de los grupos	905.967	12	75.4972			
Total	507882.85	17				

**Análisis de las medias por método de Tukey con un intervalo de confianza de 95%**

Comparación	Medias	std err	p-value	p<0.05
Control vs 3.125	7.483	4.6444	0.0950	No hay diferencia
Control vs 6.25	23.039	4.6444	0.0423	No hay diferencia
Control vs 12.5	57.483	4.6444	7.8625E-06	Sí hay diferencia
Control vs 25	120.446	4.6444	5.937E-10	Sí hay diferencia
Control vs 50	248.709	4.6444	3.1752E-14	Sí hay diferencia
Control vs 100	487.298	4.6444	2-1538E-14	Sí hay diferencia

➤ Quercetina

Estadísticos descriptivos: OBJ

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Control	3	0.160	0.0533	6.6667E-05
3.125	3	20.944	6.981	25.102
6.25	3	72.055	24.018	34.053
12.5	3	170.389	56.796	60.596
25	3	397.056	132.351	210.288
50	3	839.278	279.759	373.559

ANOVA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	148956.667	4.000	37239.167	264.6328	0.0000	3.4780
Dentro de los grupos	1407.202	10.000	140.720			
Total	150363.868	14.000				

Análisis de las medias por método de Tukey con un intervalo de confianza de 95%

Comparación	Medias	std err	p-value	p<0.05
Control vs 3.125	6.9281	6.2511	0.9652	No hay diferencia
Control vs 6.25	23.965	6.2511	0.1438	No hay diferencia
Control vs 12.5	56.742	6.2511	3.6845E-04	Sí hay diferencia
Control vs 25	132.298	6.2511	4.8127E-08	Sí hay diferencia
Control vs 50	279.705	6.2511	4.9204E-12	Sí hay diferencia

## D. ORAC

### Estadísticos descriptivos:

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fotomar	3	0.2089	0.0696	0.00012
Ácido gálico	3	1.6202	0.5401	0.00423
Quercetina	3	12.482	4.1607	0.56360

### ANOVA

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	P
Entre grupos	2	30.0671	15.0335	79.399	< 0.0001
Dentro de los grupos	6	1.13605	0.18934		
Total	8	31.2031701			

### Análisis de las medias por método de Tukey con un intervalo de confianza de 95%.

Comparación	Medias	std err	p-value	p<0.05
Fotomar vs Ácido gálico	0.47043	0.2512	0.4337	No hay diferencia
Fotomar vs Quercetina	4.0910	0.2512	6.3673E-05	Sí hay diferencia
Ácido gálico vs Quercetina	3.6206	0.2512	0.00012817	Sí hay diferencia

## E. Efecto del tratamiento térmico y pH en la actividad antioxidante

### Estadísticos descriptivos:

Variable	Observaciones	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
%Inhibición	56	46.5500	92.3300	64.3039	11.9054

### ANOVA

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	P
Modelo	27	7730.165	286.302	122.430	< 0.0001
Error	28	65.477	2.338		
Total	55	7795.642			



## VII. Simposio Instituto de Química



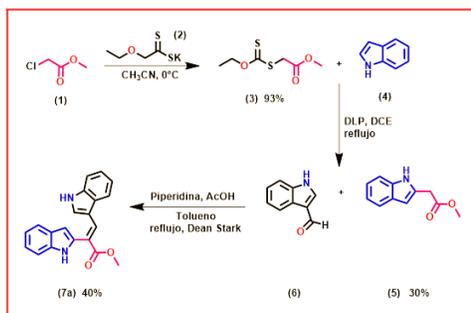
"Síntesis y evaluación antioxidante de un análogo estructural del alcaloide Caulerpina"

Karla Daniela Cárdenas Gutiérrez, Dr. Rubén Omar Torres Ochoa, Mtro. Antonio Nieto, Dra. Yenizey Merit Álvarez Cisneros, Dra. Rosa María Chávez -Santos, Dr. Roberto Martínez.

### Resumen

En la industria alimentaria los aditivos son de gran importancia debido a que ayudan a mejorar algún aspecto tecnológico de los productos alimenticios, así como prolongar la vida de anaquel, mejorar la calidad y conservar las propiedades físicas y sensoriales. Existen diferentes grupos de aditivos, entre ellos destacan los antioxidantes que actúan previniendo o retrasando la oxidación de los lípidos, dentro de los cuales se encuentran compuestos de origen natural que contienen en su estructura anillos indólicos (M. Konus, D. Çetin, N.D. Kızılkán et al, 2022). Es por esta razón que el objetivo del presente proyecto se centra en sintetizar y evaluar la capacidad antioxidante de un análogo estructural del alcaloide Caulerpina para su uso potencial como aditivo en alimentos que sean susceptibles a la oxidación lipídica.

El compuesto fue sintetizado por medio de los siguientes pasos de reacción:



Se obtuvo un sólido color mostaza con un peso molecular de 316.36 g/mol, punto de fusión de 236-238 $^\circ\text{C}$ .



Se evaluó su actividad antioxidante por medio de las pruebas:

- DPPH
- TBARS
- ORAC
- FRAP

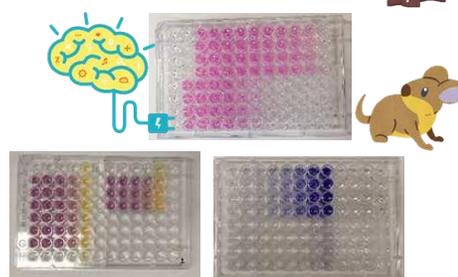


TABLA 1. Pruebas de antioxidantes

Muestra	MÉTODOS			
	TBARS IC 50 ( $\mu\text{M}$ )	DPPH IC 50 ( $\mu\text{M}$ )	FRAP Trolox equivalentes ( $\mu\text{M}$ )	ORAC Trolox equivalentes ( $\mu\text{M}$ )
Bisindol	4.55 $\pm$ 0.16	947.98 $\pm$ 19.75	56.80 $\pm$ 1.79	10.08 $\pm$ 1.44
Ácido gálico	19.82 $\pm$ 0.84	8.76 $\pm$ 0.89	487.35 $\pm$ 18.50	43.28 $\pm$ 3.81

Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes ( $n=3$ )  $\pm$  error estándar de la media

Finalmente, se realizaron pruebas de estabilidad a diferentes valores de pH y temperatura con el fin de observar el efecto del compuesto frente a la oxidación lipídica.

**Agradecimientos:**  
CONACYT Proyecto A1-S-16584



## VIII. Fotos



Foto 1. Indol alquilado

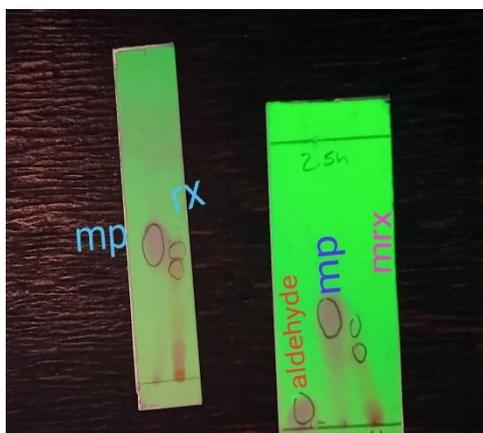


Foto 2. Avance de reacción



Foto 3. Producto crudo de la condensación aldólica

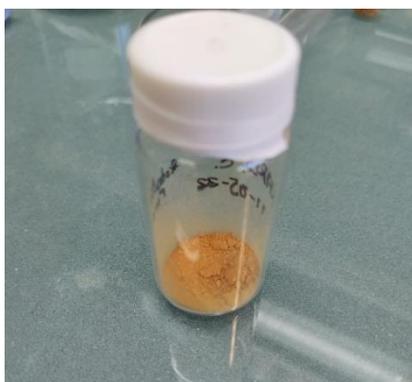


Foto 4. Compuesto 7a



Foto 5. Compuesto 7a recristalizado

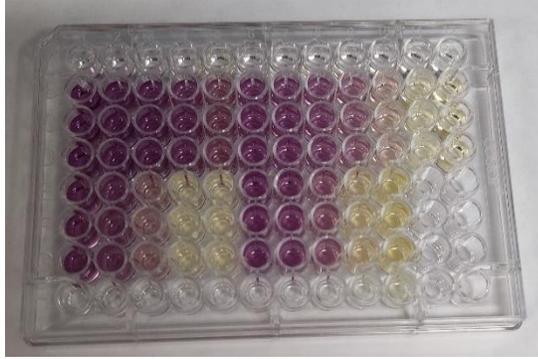


Foto 6. Placa de 96 pozos. Prueba DPPH

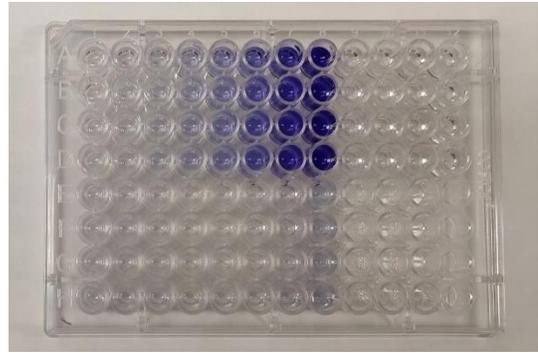


Foto 7. Placa de 96 pozos. Prueba FRAP

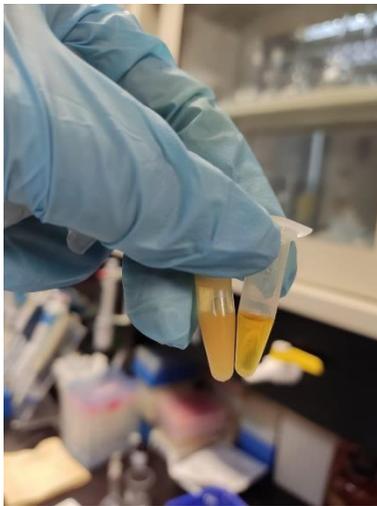


Foto 8. Preparación de muestra para prueba de ORAC



Foto 9. Prueba TBARS

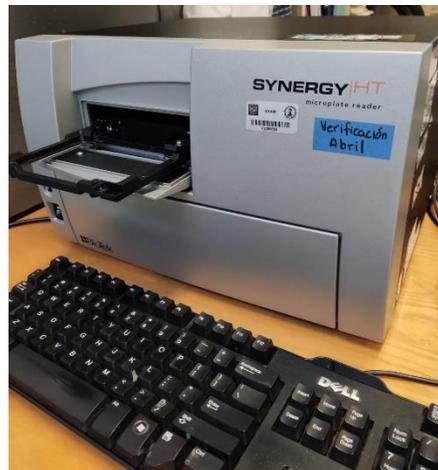


Foto 10. Lector de placas. Biotek Synergy HT



Foto 11. Curva MDA



Foto 12. Preparación de la muestra. Ajuste pH

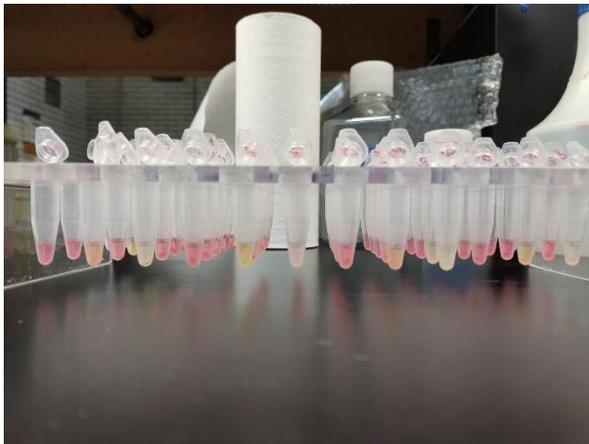


Foto 13. Prueba TBARS

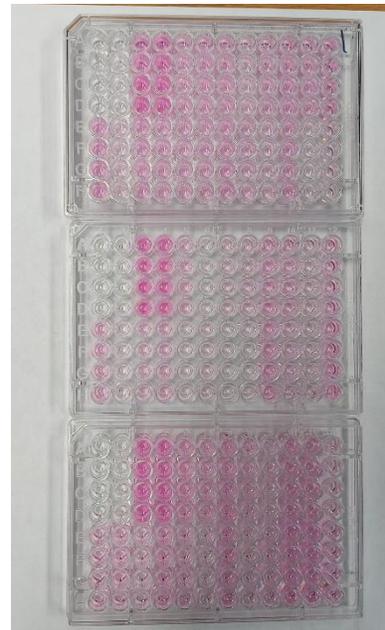


Foto 14. Placas de 96 pozos. TBARS, tratamiento térmico y pH

## REFERENCIAS

- Aguilar-Santos, G. (1970). *Chem Soc. C*, 842-843.
- Amarakoon, D., Lee, W.-J., & Tamia, G. (2023). Indole-3-carbinol: Occurrence, health-beneficial properties, and cellular/molecular mechanisms. *Anny Rev Food Sci Technol*, 347-366.
- Avello, M. &. (2006). *Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección*. 494,161-172: Atenea (Concepción).
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos* (Vol. Cuarta). México: Pearson Educación.
- Benzie, I., & Strain, J. (1999). *Ferric reducing/antioxidant power assay. Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration*. *Methods in enzymology*.
- Biotek. (2005). *Performing Oxygen Radical Absorbance Capacity Assays with SynergyTMHT ORAC Antioxidant Tests*. Recuperado el 5 de septiembre de 2022, de [https://www.biotek.com/resources/docs/ORAC\\_Assay\\_Application\\_Note.pdf](https://www.biotek.com/resources/docs/ORAC_Assay_Application_Note.pdf)
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Brescia, P. J. (septiembre de 2021). *Determination of Antioxidant potential using an Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Assay with SynergyTM H4. Agilent.com*. Recuperado el 18 de enero de 2023, de <https://www.agilent.com/cs/library/applications/determination-of-antioxidant-potential-5994-3310EN-agilent.pdf>
- Canché Chay, C. I., Gómez Cansino, R., Espitia Pinzón, C. I., Torres-Ochoa, R. O., & Martínez, R. (2014). Synthesis and anti-tuberculosis activity of the marine natural product caulerpin and its analogues. *Mar. Drugs*, 12, 1757-1772.
- Canché, C. (2014). *Síntesis de la caulerpina y sus análogos. Evaluación de su actividad anti inflamatoria y antituberculosa*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Canché, C. (2014). *Síntesis de la caulerpina y sus análogos. Evaluación de su actividad antiinflamatoria y antituberculosa*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. (2017). *Aditivos antioxidantes* (Vol. 7). Madrid: Dextra.
- Del Río, J. A., Lomelí, M. G., Medina, P. J., & Sánchez, C. L. (2015). Antioxidantes en alimentos. En *Alimentos funcionales y compuestos bioactivos* (págs. 224-225). Universidad Autónoma de Tamaulipas.
- Domínguez, M., Nieto, A., Marín, J. C., Keck, A. S., Jeffery, E., & Céspedes, C. L. (2005). Antioxidant activities of extracts from *Barkleyanthus salicifolius* (Asteraceae) and *Penstemon gentianoides* (Scrophulariaceae). *J. Agric. Food Chem*, 2005, 5589-5895.
- Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hidroxyonenal. *Methods in enzymology*, 186, 407-421.

- Flavia, P., Zorica, V., & Delia, B. (2014). Effects of temperature and storage time on the quality of alimentary animal. *International Food Research*, 1507-1514.
- Flores Jiménez , C., Pérez Vargas , J., & Minor Pérez, H. (2017). Mecanismos de oxidación de lípidos en emulsiones alimentarias y empleo de antioxidantes de origen vegetal para su control. *Tecnocultura*. Obtenido de Recuperado a partir de <https://tecnocultura>
- González Costa, M., & Padrón González, A. A. (2019). La melatonina y su rol en los procesos inflamatorios. *Revista Cubana de Reumatología*, 21, 89.
- Guija, E., Inocente, M. A., Ponce, J., & Zarzosa, E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico*, 15, 57-60.
- Gutteridge, J. M., & Quinlan, G. J. (1983). Malondialdehyde formation from lipid peroxides in the thiobarbituric acid test: the role of lipid radicals, iron salts, and metal chelators. *Applied biochemistry*, 5, 293–299.
- Howes, D. (2007). Lipid oxidation in food: an overview. *Woodhead Publishing Limited*.
- Huang, D., Boxin, O., & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Agricultural and Food Chemistry*, 1841-1856.
- Jiménez M., W. (2019). *Evaluación de la capacidad antioxidante por el método de ORAC utilizando un sistema de análisis por inyección en flujo*. Ciudad de México: UNAM.
- Kishida Etsu, Sadako, T., Yuki, I., Miyako, Y., Michiko, O., Hiroshi, I., & Shosuke, K. (1993). Comparison of the formation of malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactive substances from autoxidized fatty acids based on oxygen consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(10)1598-600.
- Konus, M., Çetin, D., N., D. K., C., Y., C., F., Algso, M., . . . A., K.-K. (2022). Synthesis and biological activity of new indole based derivatives as potent anticancer, antioxidant and antimicrobial agents. *Journal of Molecular Structure*, 1263, 133168. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022286022008250>
- Laguerre, M., Bily, A., & Birtić, S. (2020). Lipid oxidation in food. *Academic Press*, 243-287.
- Londoño, J. A. (2011). Desarrollo y transversalidad. En *Antioxidantes : importancia biológica y métodos para medir su actividad* (págs. 9, 130-155). Corporación Universitaria Lasallista.
- López Salazar, F. (2018). En *Síntesis de bis-indoles y evaluación de su actividad antiproliferativa y antituberculosa*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol. Chem*, 193, 265-275.
- Mahboobi, S., & Bernauer, K. H. (1988). *Acta* 1988. 71, 2034-2041.
- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. (2012). Estimation of Antiradical Properties of Antioxidants Using DPPH . *Food Chemistry*, 1036-1043.

- Nguyen, M., & Schwartz, S. (2000). *Lycopene, en Natural Food Colorants*. New York: Marcel Dekker.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95, 351-358.
- OMS. (2018). Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-additives>
- Onajale, O., Pieroni, M., Tipparaju, S., Lun, S., Stec, J., Chen, H., . . . Kozikowski, A. (2013). Preliminary Structure–Activity Relationships and Biological Evaluation of Novel Antitubercular Indolecarboxamide Derivatives Against Drug-Susceptible and Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains. *J. Med. Chem.*, 4093–4103.
- Osornio, Y. M. (2004). *Adición inter e intramolecular de radiales alquilo sobre sistemas heterocíclicos y su aplicación sintética*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Porto Viera Macedo, N. R., Ribeiro, M. S., Villanca, R. C., Ferreira, W., Pinto, A. M., Cirne-Santos, C., . . . Giogo, V. (2012). *Braz J. Pharmacol*, 861-867.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Pulido, R. B., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396-3402.
- Rodríguez-Bonilla, P. G.-H.-C.-N. (2017). Comparative study of the antioxidant capacity of four stilbenes using ORAC, ABTS+, and FRAP techniques. *Food Analytical Methods*, 10, 2994-3000.
- Rossato, J. I., Ketzler, L. A., Centuário, F. B., Silvia, S. J., Lüeni, G., Braga, A. L., . . . Rocha, B. T. (2002). Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem*, 27, 297-303.
- Ruano, D. (2023). *Determinación del índice TBARS como indicativo de la rancidez oxidativa en muestras de materia prima, producto en proceso y producto terminado*. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Functional Foods*, 757-781.
- Subi M, T. M., Selvasudha, N., Ashraf, A., & Vasanthi, H. R. (2023). Chapter 5 - Antioxidant potential of bioactive molecules from marine algae in chronic diseases: a critical review of antiox. *Academic Press*, 57-72.
- Swinney, D. C. (2011). Chapter 18 - Molecular mechanism of action (MMoA) in drug discovery. *Academic Press*, 46, 301-317.
- Thurnham, D. (2002). Antioxidants in Food: Practical Applications. *British Journal of Nutrition*, 87(4), 391-391.

Velezheva, V., Brennan, P., Ivanov, P., Kornienko, A., Lyubimov, S., Kazarian, K., . . . Apt, A. (2016). Synthesis and antituberculosis activity of indole–pyridine derived hydrazides, hydrazide–hydrazones, and thiosemicarbazones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 978-985.

Vidal, J., Laurent, D., Kabore, A., Rechencg E, Boucard, M., Girard, J. E., & Rossi, J. B. (1984). 27, 533-537.

Wesolowska, M., & Dżugan, M. (2017). The use of the photochem device in evaluation of antioxidant activity of polish honey. *Food Analytical Methods*, 10, 1568.

Zapata, C., & Zapata, P. (2019). *Estandarización del método ORAC como herramienta básica de análisis de la capacidad antioxidante*. Universidad CES. Recuperado el 15 de agosto de 2023, de [https://repository.ces.edu.co/bitstream/handle/10946/3943/1017248569\\_2019.pdf?sequence=](https://repository.ces.edu.co/bitstream/handle/10946/3943/1017248569_2019.pdf?sequence=8)

8