



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CORRELACIÓN DEL POTENCIAL REDOX DEL PRIMER
PICO DE REDUCCIÓN DE QUINONAS DE ORIGEN
NATURAL CON SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A
FRANCISCO SIMAEL CEDEÑO RAMOS

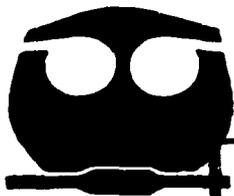
MEXICO, D.F.



2002

**TESIS CON
PARTIDA DE ORIGEN**

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente Prof. Yolanda Frías Ruiz
Vocal Prof. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Secretario Prof. Bernardo Antonio Frontana Uribe
1er. Suplente Prof. Carlos Pérez Muñoz
2o. Suplente Prof. Liz Janet Medina Reyes

El tema se desarrolló en el Laboratorio de Electroquímica y Electrosíntesis y en el Laboratorio de Pruebas Biológicas, Instituto de Química, UNAM.

Asesor: Dr. Bernardo Antonio Frontana Uribe



Supervisor técnico: M. en C. Antonio Nieto Camacho



Sustentante: Francisco Simael Cedefio Ramos



Dedicatorias:

A mis papás, por comprenderme y apoyarme en todos mis sueños y metas, fueran éstos pequeños o grandes.

A mi hermano Angel, por recordarme en todo momento lo afortunado que soy de formar parte de mi familia.

A Sabyne, por ser la maravillosa persona que eres. Por amarme en la forma como lo haces y por enseñarme que soy mejor persona a tu lado: junto a ti he vivido y sé que viviré los mejores momentos de mi vida.

A mis amigos, Argelia, Enrique, Gaby y Liz, por haberme enseñado el verdadero significado de la amistad y del compañerismo. A su lado compartí más que una carrera universitaria, a su lado compartí toda una vida: una vida que volvería a vivir de nueva cuenta.

Agradecimientos:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por todas las enseñanzas y experiencias que me dio a todo lo largo de mi estancia en ella.

Al Dr. Bernardo Antonio Frontana Uribe, por el apoyo, consejos y facilidades que me proporcionó para la realización de este trabajo.

A todos los integrantes del Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química, UNAM , por apoyarme en la realización de una importante parte de este trabajo.

Al Dr. Alejandro Baeza, por introducirme en el fascinante mundo de la electroquímica y de la química analítica.

TABLA DE CONTENIDO:

Resumen

Lista de Abreviaturas

I.	Introducción.....	1
II.	Objetivos.....	4
III.	Antecedentes	
III.1	Fundamentos de Electroquímica Analítica.....	5
III.1.1	Técnicas Electroquímicas Empleadas.....	8
III.2	Quinonas de Origen Natural.....	14
III.3	Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).....	16
III.4	Técnicas para Cuantificar el Daño Oxidativo.....	18
III.5	Antioxidantes de Origen Natural.....	22
IV.	Resultados y Discusión	
IV.1	Propiedades Redox de las Quinonas Naturales.....	23
IV.1.1	Polarografía.....	23
IV.1.2	Voltamperometría Cíclica.....	27
IV.1.3	Cronoamperometría de Pulso Directo.....	32

IV.2	<i>Actividad Antioxidante de las Quinonas Naturales.....</i>	<i>37</i>
	<i>IV.2.3 Prueba con DPPH.....</i>	<i>37</i>
IV.3	<i>Correlación de las Propiedades Redox con la Actividad Antioxidante de las Quinonas Naturales</i>	<i>42</i>
V.	<i>Conclusiones.....</i>	<i>51</i>
VI.	<i>Parte Experimental.....</i>	<i>53</i>
	<i>VI.1 Síntesis de los Derivados Metilados.....</i>	<i>53</i>
	<i>VI.2 Determinación del Potencial de Media Onda ($E_{1/2}$), del Potencial de Pico Catódico (E_{pc}) y del Potencial Formal Condicional (E°) de las Quinonas de Origen Natural.....</i>	<i>53</i>
	<i>VI.3 Estudio de la Actividad Antioxidante de las Quinonas de Origen Natural.....</i>	<i>55</i>
	<i>VI.4 Determinación del Área Superficial y Volumen Molecular de las Quinonas de Origen Natural.....</i>	<i>56</i>
VII.	<i>Anexos</i>	
	<i>Anexo 1. Compensación por Caída Óhmica y Estudios Cronoamperométricos de la 1, 4-benzoquinona.....</i>	<i>57</i>
	<i>Anexo 2. Determinación del Área del Electrodo de Trabajo.....</i>	<i>63</i>
	<i>Anexo 3. Resonancia Magnética Nuclear ^1H y ^{13}C.....</i>	<i>65</i>
VIII.	<i>Referencias.....</i>	<i>68</i>

RESUMEN:

Se determinaron los valores de E° , E_{pc} y $E_{1/2}$ del primer pico de reducción de 6 quinonas de origen natural (I, III-V, VIII, IX) y de 5 derivados metilados (II, VI, VII, X, XI) en medio acuoso por medio de voltamperometría de barrido triangular y polarografía clásica. Así mismo, se determinó el número de electrones involucrados en los procesos de electroreducción por medio de cronoamperometría de pulso directo; también se hace mención del coeficiente de difusión de los compuestos estudiados.

Posteriormente, se evaluó la actividad antioxidante de los 11 compuestos mediante la prueba con DPPH, de la cual se observa que los compuestos I, VI, VII y VIII son los más activos, mientras que los compuestos III, V, IX, X y XI son los menos activos.

Finalmente, se pudieron obtener cuatro modelos matemáticos que podrían predecir la actividad antioxidante de quinonas naturales con la ayuda de sus propiedades electroquímicas y área superficial o volumen molecular.

LISTA DE ABREVIATURAS

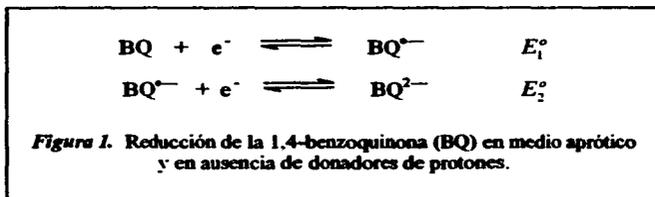
A	Amperes
ADN	Ácido desoxiribonucleico
C	Coulombs
BQ	1, 4-Benzoquinona
C₀	Concentración de una especie en solución (mol/L)
CA	Cronoamperometría de pulso directo
CC	Cronocoulombimetría de pulso directo
CI₅₀	Concentración inhibitoria cincuenta
D	Coefficiente de difusión de una especie en solución (cm²/s)
DME	Electrodo goteante de mercurio (Dropping Mercury Electrode)
DPPH	2, 2-difenil-1-picrilhidracilo
E_{1/2}	Potencial de media onda polarográfico (V)
E	Potencial (V)
E_{aux}	Electrodo auxiliar
ECS	Electrodo de Calomel Saturado
ENH	Potencial normal de hidrógeno (V)
E^o	Potencial estándar referido al ENH (V)
E^{o'}	Potencial formal condicional (V)
E_{pa}	Potencial de pico anódico (V)
E_{pc}	Potencial de pico catódico (V)
E_{ref}	Electrodo de referencia

E_T	Electrodo de trabajo
E_λ	Potencial de inversión (V)
F	Faradio (96458 C/mol)
GSH	Glutacion
HMDE	Electrodo de gota suspendida de mercurio (Hanging Mercury Drop Electrode)
I	Corriente (A)
I_d	Corriente regida por la difusión en la ecuación de Cottrell (A)
MDA	Malondialdehído
n	Número de electrones intercambiados en una reacción electroquímica
PBS	Amortiguador salino de fosfatos (Phosphate Buffer Saline)
Q	Cantidad de carga eléctrica (C)
Q	Quinona
ROS	Especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species)
s	Segundos
S	Superficie (área) del electrodo de trabajo (cm^2)
t	Tiempo (s)
τ	Tiempo de muestreo en CA (s)
V	Volts
VC	Voltametría cíclica
v	Velocidad de barrido (mV/s)

I. INTRODUCCIÓN

La función quinona es un grupo bien conocido y de importancia funcional en varios sistemas biológicos, por ejemplo, es un acarreador de electrones en la cadena respiratoria y en los sistemas de flujo de electrones de la fotosíntesis [1]. Existen numerosos artículos que hablan acerca de los mecanismos de transferencia de electrones y sus correspondientes equilibrios con protones en medios apróticos [2-5]. Como resultado de esto, los conceptos básicos y los mecanismos han sido establecidos, sin embargo estudios con respecto a su papel en los sistemas biológicos y sus aplicaciones aún se encuentran en desarrollo.

En medios apróticos, derivados simples de quinonas muestran dos procesos de reducción/oxidación sucesivos y distintos. En el caso de la reducción electroquímica de la 1,4-benzoquinona (BQ), las parejas redox $BQ/BQ^{\bullet-}$ y $BQ^{\bullet-}/BQ^{2-}$ se observan claramente en acetonitrilo, dimetilformamida o dimetilsulfóxido [2] (figura 1).



En lo que respecta a los procesos de reducción/oxidación en medios próticos, como es el caso del agua, se observa solamente una señal que involucra la transferencia de dos electrones y dos protones para formar la hidroquinona correspondiente. Esta señal es dependiente del pH del medio [6] (figura 2).



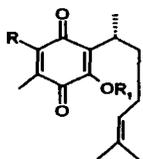
Figura 2. Reducción de la 1.4-benzoquinona (BQ) en medio prótico.

El sistema quinona/hidroquinona está presente en una gran cantidad de productos naturales, por ejemplo, diterpenoides aislados del género *Salvia* [7-10], el cual les confiere a éstos características antioxidantes [11]. Se ha reportado también, que algunas de estas quinonas tienen actividad antibacteriana [12], antituberculosa [13] y antiviral [14].

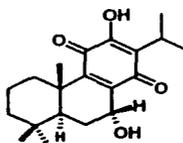
La actividad antioxidante que el sistema quinona/hidroquinona le confiere a los productos naturales se debe principalmente a su bajo potencial redox. Esta propiedad podría jugar un papel importante absorbiendo o neutralizando radicales libres, secuestrando al oxígeno singulete y triplete o descomponiendo peróxidos.

Existen numerosos estudios que han correlacionado las propiedades redox de quinonas con su potencial anticarcinogénico [15-20] y se ha reportado también un estudio en el cual se correlacionan las propiedades redox de nitróxidos estables con su actividad antioxidante [21]. Sin embargo, hasta donde sabemos, no se han reportado trabajos que correlacionen las propiedades redox de quinonas de origen natural con su actividad antioxidante. Recientemente, ha surgido un gran interés en encontrar antioxidantes de procedencia natural para su uso en alimentos y medicinas para reemplazar antioxidantes sintéticos, los cuales se han ido restringiendo debido a su toxicidad [22].

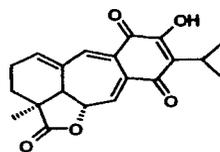
En el presente trabajo se evalúan las propiedades redox de quinonas de origen natural (I, III-V, VIII-IX) y de cinco derivados metilados (II, VI-VII, X-XI), para posteriormente correlacionar su actividad antioxidante con estos valores.



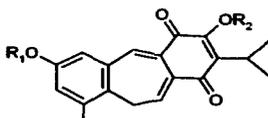
(I) R = H; R₁ = H
 (II) R = R₁ = Me



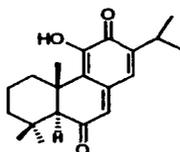
(III)



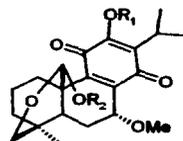
(IV)



(V) R₁ = R₂ = H
 (VI) R₁ = Me; R₂ = H
 (VII) R₁ = H; R₂ = Me



(VIII)



(IX) R₁ = R₂ = H
 (X) R₁ = H; R₂ = Me
 (XI) R₁ = R₂ = Me

Figura 3. Quinonas de origen natural y derivados metilados.

Perezona (I): 6-metil. 3-O-metilperezona (II): Horminona (III): Anastomosina (IV):
 Desmetilfruticulina (V): Fruticulina A (VI): 12-O-metil-desmetilfruticulina (VII):
 Taxodiona (VIII): 7α-O-metilconacytona (IX): 7α. 20-O-dimetilconacytona (X):
 7α.12.20-O-trimetilconacytona (XI).

II. OBJETIVOS

- Determinar el primer potencial de media onda polarográfico ($E_{1/2}$), el primer potencial de pico catódico (E_{pc}) y su correspondiente potencial de pico anódico (E_{pa}) por medio de voltamperometría cíclica y calcular el potencial formal condicional (E°) de quinonas de origen natural y sus derivados metilados.
- Determinar el número de electrones intercambiados en la primera electroreducción y el coeficiente de difusión (D) de las quinonas naturales y sus derivados metilados por medio de cronoamperometría de pulso directo.
- Evaluar la actividad antioxidante de estas mismas quinonas y sus derivados metilados mediante la prueba con DPPH.
- Correlacionar el potencial de media onda ($E_{1/2}$) y el potencial formal condicional (E°) de las quinonas de origen natural con su actividad antioxidante.
- Comparar la actividad antioxidante de las quinonas naturales y los derivados metilados.

III. ANTECEDENTES

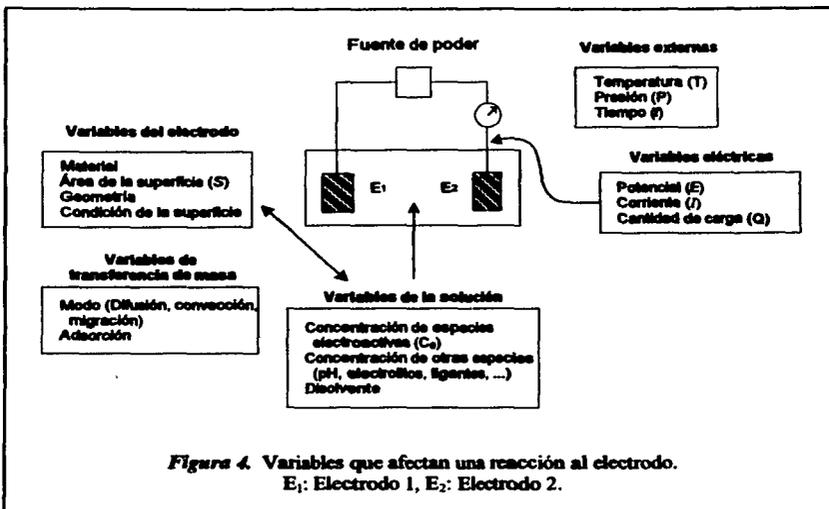
III.1 FUNDAMENTOS DE ELECTROQUÍMICA ANALÍTICA

La electroquímica analítica es la parte del análisis químico que emplea métodos electroquímicos para obtener información relacionada con la cantidad, propiedades y ambientes de especies químicas, particularmente de aquellas que presentan intercambio de electrones.

La electroquímica analítica está relacionada con la teoría de los procesos al electrodo, donde éste es usado como una sonda de cuantificación. Fundamentalmente, un electrodo es una unión entre un conductor iónico y un conductor electrónico. En la superficie del electrodo es donde se da la transferencia electrónica entre la fase electrónica y la iónica; por lo tanto, las técnicas electroanalíticas sólo pueden aplicarse a moléculas en solución que puedan alcanzar la superficie del electrodo y que sean electroactivas. La necesidad de contar con un conductor iónico implica que los estudios de electroquímica analítica deben realizarse en algún medio, o solución de electrolitos, en el cual la conducción iónica pueda existir y no limite la corriente eléctrica que circula por la celda.

En la práctica, como se necesita cerrar el circuito para que se dé un flujo de corriente eléctrica continua (acarreada por iones o por electrones), este debe contar con al menos dos electrodos; estas regiones son necesariamente heterogéneas y cada una muestra una interfase.

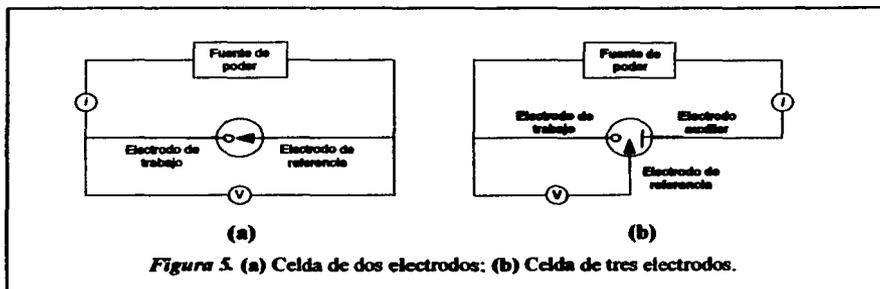
La investigación del comportamiento electroquímico de un sistema usualmente consiste en observar la respuesta de la corriente, el potencial o la concentración al perturbar el sistema. Los parámetros que hay que tomar en cuenta en una celda electroquímica se muestran en la figura 4.



Las celdas electroquímicas más usadas en electroquímica analítica son de dos y de tres electrodos (ver figura 5). En el primer arreglo (figura 5a), se tiene un electrodo de trabajo junto con un electrodo de referencia, cuyo comportamiento se aproxima al de un electrodo ideal no polarizable (electrodo en el cual no existe transferencia de carga a través de la interfase metal-solución a pesar de un potencial externo impuesto). Este tipo de sistema sólo es útil a valores de corriente bajos, puesto que valores altos afectan la composición química del electrodo de referencia.

En la celda de tres electrodos (figura 5b), la corriente circula entre el electrodo de trabajo y un electrodo auxiliar (o contra-electrodo). El electrodo auxiliar idealmente es de un material inerte que no produce sustancias por electrólisis que alcancen la superficie del electrodo de trabajo y causen reacciones interferentes. El área del electrodo auxiliar debe ser mucho mayor que la del electrodo de trabajo para evitar que se limite el paso de corriente por este electrodo. El valor de potencial requerido es impuesto por la fuente

externa en el electrodo de trabajo, éste se impone con respecto a un electrodo de referencia, que debe estar posicionado cerca del electrodo de trabajo.



El electrodo de referencia tiene alta impedancia, así que la corriente que circula por este electrodo es mínima y es empleado para determinar el potencial del electrodo de trabajo. Esto evita cambios en su composición y su potencial permanece constante. Este arreglo de tres electrodos disminuye la contribución a la caída óhmica por la resistencia de la solución. Por estas cualidades el arreglo de celda de tres electrodos es el más usado en experimentos electroanalíticos.

III.1.1 TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS EMPLEADAS

Voltamperometría Cíclica (VC)

La técnica consiste en la imposición de un potencial variable con el tiempo en forma lineal, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$E_{\text{app}} = E_0 + v(t) \quad (\text{ecuación 1});$$

donde v representa la velocidad de barrido de potencial en mV/s.

Los patrones de respuesta para una especie redox en esta técnica son curvas de intensidad-potencial, donde la corriente de respuesta aumenta progresivamente conforme se incrementa el potencial. Esto se debe a un aumento en la velocidad de transferencia de carga, respecto a la velocidad de transporte de masa al electrodo. Se llega entonces a un máximo correspondiente al límite de competencia entre ambos procesos ("pico voltamperométrico"), seguido de una disminución en la corriente debido a la disminución de la concentración de la especie electroactiva en la interfase del electrodo. Para poder evidenciar las reacciones químicas acopladas a la transferencia de electrones, se invierte la dirección del barrido en un valor de potencial determinado, llamado potencial de inversión (E_{λ}), apareciendo, si los hay, los picos de corriente asociados a la transferencia de electrones de la especie formada al electrodo. Esto se representa en la figura 6 [23a].

El valor de corriente registrado en el máximo (corriente de pico, I_p), es regido por la ecuación 2, conocida como *ecuación de Randles y Sèvick* y es válida en sistemas que presentan un comportamiento reversible:

$$I_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} S D^{1/2} v^{1/2} C_0 \quad (\text{ecuación 2})$$

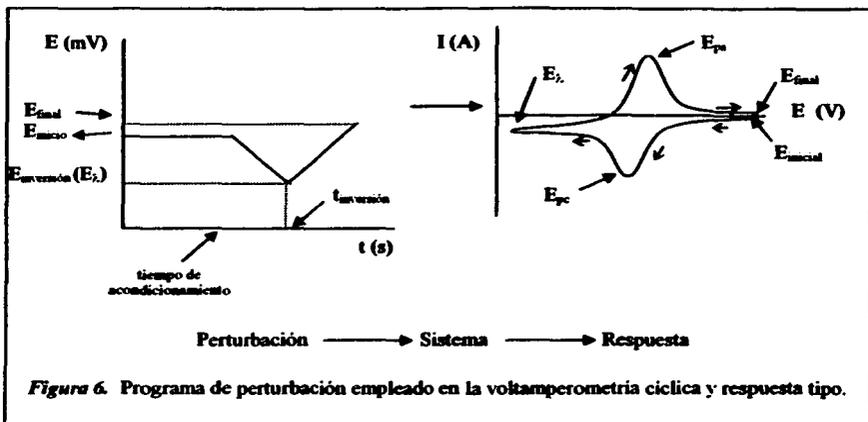


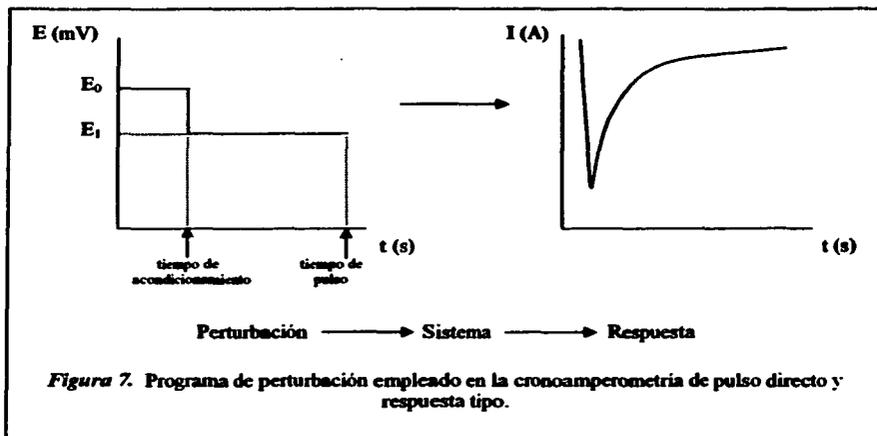
Figura 6. Programa de perturbación empleado en la voltamperometría cíclica y respuesta tipo.

Con esta técnica entonces es posible determinar el potencial de pico catódico (E_{pc}) y el potencial de pico anódico (E_{pa}), y con estos datos se puede calcular el potencial formal condicional ($E^{o'}$), para sistemas reversibles, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$E^{o'} = \frac{E_{pc} + E_{pa}}{2} \quad (\text{ecuación 3})$$

Cronoamperometría de Pulso Directo (CA)

Esta técnica consiste en la imposición de un pulso de potencial constante durante cierto tiempo y el registro de la corriente que circula por la celda (figura 7) [23b].



La ecuación que rige la corriente generada en este experimento se conoce como *ecuación de Cottrell* (ecuación 4) y describe una función lineal de la corriente controlada por la difusión (I_d) con respecto a $t^{-1/2}$. La ecuación es sólo válida en regiones de potencial donde la transferencia de electrones esté controlada por la difusión de la especie electroactiva.

$$I_d = nFSD^{1/2}C_0(\pi t)^{-1/2} \quad (\text{ecuación 4})$$

Existe la posibilidad de generar curvas intensidad-potencial a partir de datos de cronoamperometría de pulso directo [23b], las cuales permiten la evaluación del número de electrones intercambiados en la reacción electroquímica mediante el análisis de curvas $E = f(\log(I_\infty - I)/I)$, como en polarografía [23c].

De acuerdo a la ecuación de Cottrell, si se grafica la función $I_d = f(t^{-1/2})$, la pendiente de esta curva será igual a $nFSD^{1/2}C_0\pi^{-1/2}$. Si se conoce el número de electrones intercambiados (n), el área del electrodo (S) y la concentración del analito (C_0), entonces es posible determinar el coeficiente de difusión de la especie en solución (D).

Baranski et al. [24] proponen la determinación del número de electrones intercambiados (n) en la electroreducción de especies electroactivas en las que existen reacciones acopladas. Su ecuación relaciona la pendiente de la función $I_d = f(t^{-1/2})$ (pendiente de Cottrell, s), la corriente de difusión (I_{lim}), el número de electrones intercambiados (n) y la concentración (C) del compuesto en estudio con la $I_{lim(Std)}$, n_{Std} y C_{Std} de un estándar (ecuación 5):

$$\frac{n}{n_{Std}} = \frac{s^2 I_{lim(Std)} C_{Std}}{s_{Std}^2 I_{lim} C} \quad (\text{ecuación 5})$$

Cronocoulometría de Pulso Directo (CC)

Esta técnica analítica permite la evaluación directa del número de electrones intercambiados en una reacción electroquímica, mediante la imposición de un potencial constante a la celda electroquímica, de acuerdo al esquema de perturbación presentado en la figura 8 [23d].

La carga total está relacionada con la corriente de acuerdo a la ecuación 6. Por lo tanto, si se conoce el número de electrones intercambiados, la concentración y el coeficiente de difusión de la especie electroactiva, es posible determinar el área del electrodo (S) graficando $Q = f(t^{1/2})$.

$$Q = \int_{t=0}^t I dt = nFSD^{1/2}C_0\pi^{-1/2} \int_{t=0}^t t^{-1/2} dt = 2nFSD^{1/2}C_0\pi^{-1/2}t^{1/2} \quad (\text{ecuación 6})$$

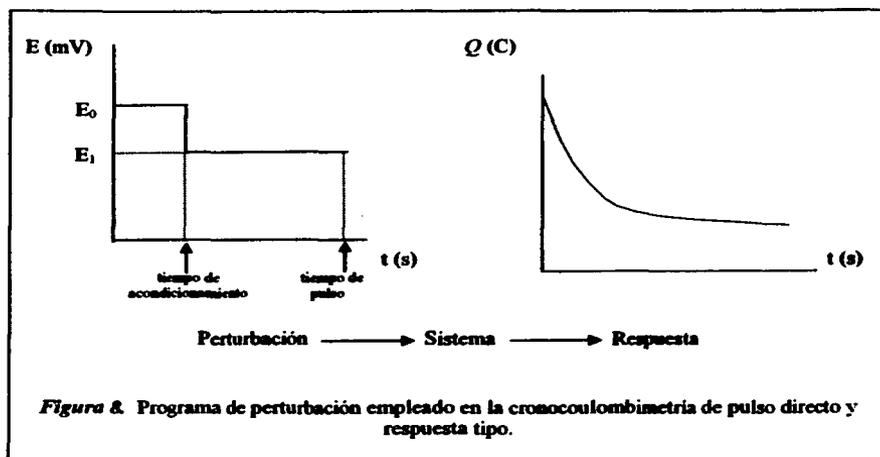


Figura 8. Programa de perturbación empleado en la cronocoulometría de pulso directo y respuesta tipo.

Polarografía

La polarografía es una técnica voltamétrica cuya corriente de respuesta está determinada por el transporte de masa combinado de difusión/convección. La polarografía es un tipo especial de medición que cae en la categoría de voltamperometría de barrido lineal, donde el potencial varía de una forma lineal de un potencial inicial a uno final. La diferencia entre la polarografía y otras técnicas de voltamperometría de barrido lineal, es que la polarografía hace uso del electrodo goteante de mercurio (dropping mercury electrode, DME). El DME consta de un capilar de un diámetro interno de $\sim 5 \times 10^{-3}$ cm que es alimentado por un depósito de mercurio a una altura de 20 a 100 cm. El mercurio llega al capilar a través de una manguera y forma una gota casi esférica a la salida de éste, la cual crece hasta que su peso no puede ser soportado por la tensión superficial. Una gota de mercurio típicamente tiene un diámetro del orden de 0.1 cm. Cuando cae la gota, agita la solución y elimina (no completamente) el efecto de agotamiento de la especie electroactiva en las cercanías del electrodo, así que cada gota es un experimento con un nuevo electrodo.

El DME posee muchas características que dan a la polarografía una posición favorable entre los métodos electroanalíticos: el goteo es muy reproducible y la superficie es constantemente renovada. Estos factores hacen posibles mediciones de alta precisión y esto tiene la ventaja adicional de que el electrodo no se modifica permanentemente por reacciones del electrodo (e.g., reducciones o adsorciones de muchos iones metálicos).

La corriente que fluye a través de una gota del DME, cuando se impone un potencial en la región de transferencia de masa controlada por electrólisis, o sea, la corriente de difusión límite, está relacionada con la concentración del analito por la ecuación de Ilkovic (ecuación 7):

$$I_d = 708nD^{1/2}C_0m^{2/3}t^{1/6} \quad (\text{ecuación 7});$$

donde I_d es la corriente de difusión límite en amperes; n , el número de electrones intercambiados; D , el coeficiente de difusión del analito en cm^2/s ; C_0 , la concentración del analito en mol/cm^3 ; m , la velocidad de flujo de mercurio en mg/s , y t , el tiempo de goteo en segundos. Del polarograma obtenido se puede obtener el potencial de media onda ($E_{1/2}$), el cual está relacionado con el potencial estándar (E°) de la reacción redox en estudio (figura 9).

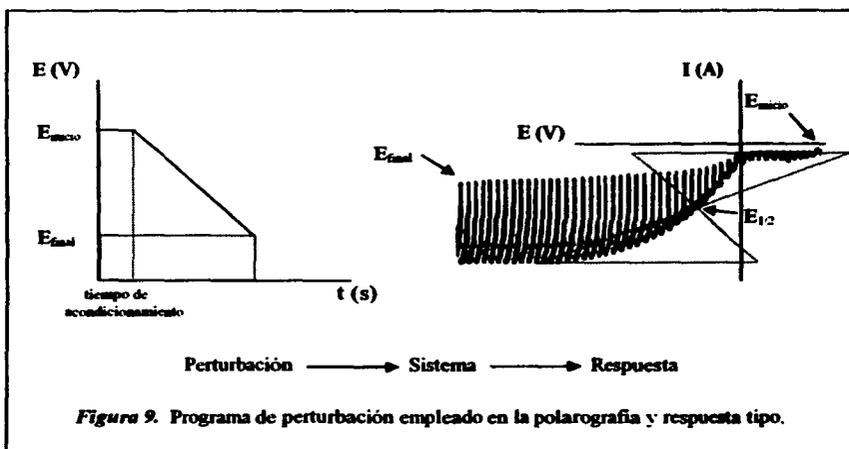


Figura 9. Programa de perturbación empleado en la polarografía y respuesta tipo.

III.2 QUINONAS DE ORIGEN NATURAL

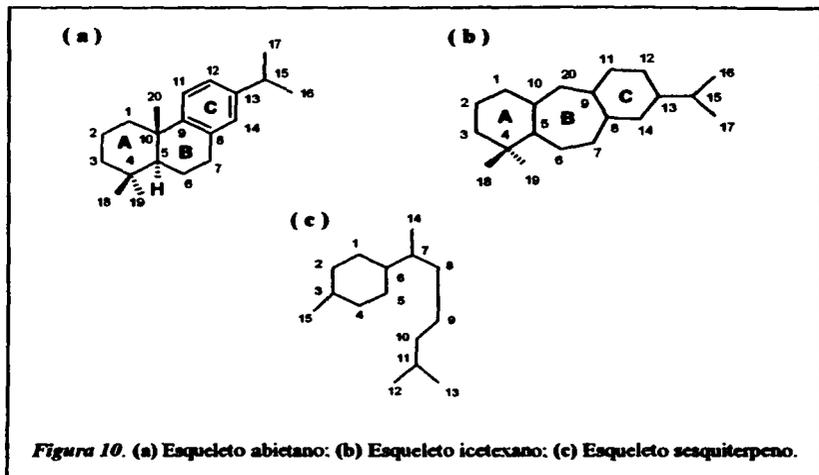
Las plantas han sido usadas para un gran rango de propósitos, incluyendo la medicina, nutrición, saborizantes, bebidas, repelentes, fragancias, cosméticos, como drogas y para propósitos industriales.

Desde tiempos remotos, las plantas fueron la base de toda la terapia médica hasta el desarrollo de los fármacos sintéticos en el siglo XIX. Hoy en día, las plantas siguen encontrándose en el 40 % de las prescripciones médicas [25].

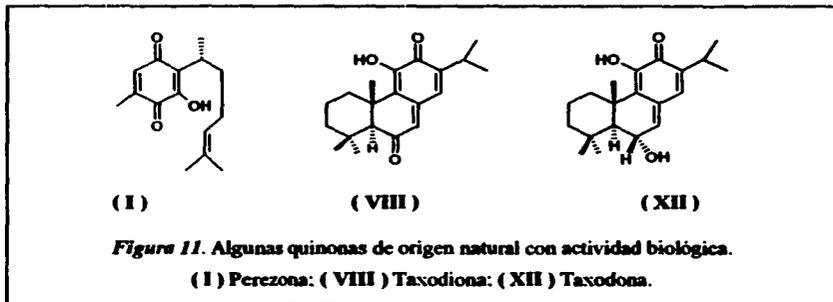
Los estudios fitoquímicos de raíces, tallos, hojas, flores y frutos de plantas han llevado al aislamiento de un gran número de productos naturales bioactivos. Una característica distintiva de estos productos naturales es el hecho de que poseen una gran cantidad y variedad de grupos funcionales en su estructura, lo que les permite actuar de diversas maneras sobre los organismos vivos.

La función quinona, por ejemplo, se encuentra en un gran número de productos aislados de plantas y les confiere a éstos diferentes actividades biológicas. Algunas de estas incluyen actividades antioxidantes [11], antibacteriana [12], antituberculosa [13] y antiviral [14].

De especies del género *Salvia* de la familia Labiatae (Lamiaceae) se han aislado un gran número de compuestos diterpénicos en cuya estructura se puede encontrar la función quinona. Los compuestos III-V y VIII-X son un ejemplo de éstos. Algunos de estos últimos compuestos tienen un esqueleto abietano (compuestos III, VIII-X), aunque también se pueden encontrar ejemplos con esqueleto icetexano (compuestos IV-V). Por otro lado, también encontramos que de las raíces del género *Perezia* es posible aislar quinonas sesquiterpénicas (como la perezona, I) (figura 10).



Algunas especies de *Salvia* se usan desde tiempos remotos en el tratamiento de enfermedades, por lo cual se ha despertado un reciente interés en el estudio de sus metabolitos secundarios [7]. Además, se han reportado actividades antitumorales de algunos compuestos aislados de este género, como la taxodiona (VIII) y la taxodona (XII) (figura 11) [26]. También se ha reportado el uso de la perezona (I) en el tratamiento de la reperusión inducida por arritmias (figura 11) [27].



III.3 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Los radicales libres generalmente son moléculas muy reactivas que poseen electrones no apareados. Estos radicales libres se producen continuamente en las células como derivados del metabolismo y se ha demostrado que varios químicos (e.g., etanol, tetracloruro de carbono, nitriloacetato de hierro) y varios fármacos (e.g., acetaminofén, tamoxifén) inducen daño por radicales [28].

Las reacciones más importantes de radicales libres en células aeróbicas involucran al oxígeno molecular y sus radicales derivados (anión superóxido y radicales hidroxilo), peróxidos y metales de transición. Las células han desarrollado una gran variedad de mecanismos de defensa antioxidante para prevenir la formación de radicales libres y limitar sus efectos dañinos. Estos mecanismos incluyen enzimas que inactivan a los peróxidos (catalasa y superóxido dismutasa, entre otras), proteínas para secuestrar metales de transición y una diversidad de compuestos que secuestran a los radicales libres [28].

En años recientes se ha acumulado una creciente evidencia que sugiere que el daño oxidativo a los componentes celulares, debido a las especies reactivas de oxígeno (ROS), podría tener un papel patofisiológico importante en varios tipos de enfermedades humanas [29].

Las membranas biológicas son altamente susceptibles al daño oxidativo como resultado de su alto contenido de ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs) [30, 31]. La peroxidación de lípidos es una de las consecuencias del daño oxidativo a membranas y ha sido sugerida como un mecanismo general de daño y muerte celular [32]. El malondialdehído (MDA), uno de los productos finales de la peroxidación de lípidos, es una molécula altamente reactiva (figura 12). Se ha demostrado que se une con los fosfolípidos y proteínas de membranas y altera una variedad de funciones, lo cual lleva a sobrevivencia disminuida de las células [33-35]. Los radicales libres también pueden oxidar biomoléculas (carbohidratos, proteínas y ADN) (figura 12) llevando a la muerte de la célula y lesión del tejido [28].

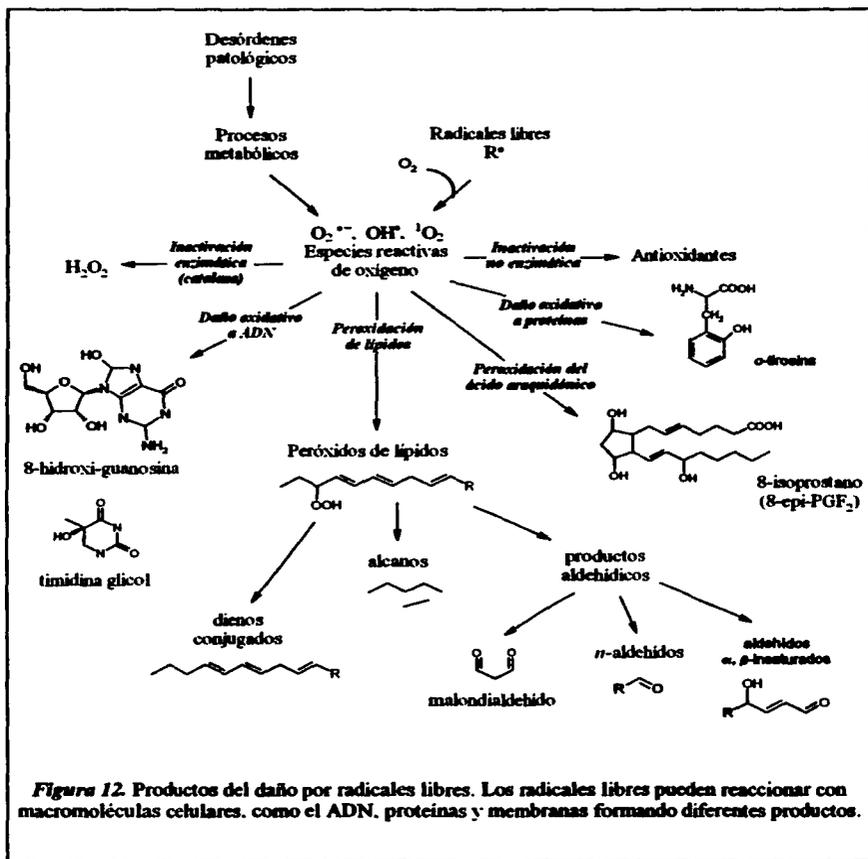


Figura 12. Productos del daño por radicales libres. Los radicales libres pueden reaccionar con macromoléculas celulares, como el ADN, proteínas y membranas formando diferentes productos.

III.4 TÉCNICAS PARA CUANTIFICAR LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Actualmente existen varias técnicas para cuantificar la actividad antioxidante de compuestos, las cuales involucran la detección de una gran variedad de productos finales del daño oxidativo por radicales libres (tabla 1).

Tabla 1. Métodos de cuantificación de la actividad antioxidante.

Método	Técnica analítica	Referencia
ACTIVIDAD ATRAPADORA DE RADICALES LIBRES		
DPPH	UV-VIS	[44, 45]
PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS		
TBARS	UV-VIS	[28]
MDA-TBA	HPLC/fluorescencia HPLC/UV-VIS	[28]
MDA-PFPH	GC/ECD GC/MS	[28]
MDA-NMH	GC/NPD	[28]
MDA-PBH	HPLC/fluorescencia	[28]
HNE-PFB	GC/MS	[28]
Peróxidos de lípidos	UV/VIS	[38]
Dienos conjugados	UV-VIS	[38]
Etano y pentano	GC	[28]
Isoprostanos	GC-MS EIA	[28]
DAÑO OXIDATIVO AL ADN		
8-OH-dG, 8-OH-G, TG y dTG	Extracción en fase sólida/HPLC y detección electroquímica	[28]
DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS		
<i>o</i> -tirosina y dítirosina	HPLC/MS	[28]

DPPH: α, α -difeníl- β -picrilhidracilo; TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico; MDA: malondialdehído; TBA: ácido tiobarbitúrico; PFPH: pentafluorofenilhidrazina; NMH: *N*-metilhidrazina; PBH: 4-(2-ftalimidil)benzohidrazida; PFB: *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)-hidroxilamina; 8-OH-dG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina; 8-OH-G: 8-hidroxi-guanina; TG: timina glicol; dTG: timidina glicol.

UV/VIS: ultravioleta/visible; HPLC: cromatografía de líquidos de alta resolución; GC: cromatografía de gases; ECD: detección electroquímica; MS: espectrometría de masas; NPD: detección de nitrógeno-fluóforo; EIA: Ensayo inmunoenzimático.

El monitoreo de la actividad atrapadora de radicales libres es un primer acercamiento importante en el estudio de la actividad antioxidante de compuestos y la prueba de DPPH es un sistema modelo ampliamente aceptado.

El DPPH es un radical libre estable. Este compuesto presenta en su estructura un electrón desapareado, por lo que puede aceptar o donar un electrón de otros compuestos para convertirse en una molécula estable. Debido a este electrón desapareado, el DPPH presenta una fuerte absorción a una longitud de onda de 517 nm (en etanol) y sus soluciones son de un color violeta fuerte. Si este electrón reacciona, entonces se produce un decremento en su absorción a esta longitud de onda, con la consecutiva desaparición del color violeta [44, 45].

El índice de peroxidación de lípidos más usado es la formación de malondialdehído (MDA), frecuentemente ensayado con ácido tiobarbitúrico (TBA). Sin embargo, en este método existen varias interferencias por la reacción de otros productos con el TBA, por lo cual el nivel de peroxidación de lípidos con esta prueba es reportado como TBARS (sustancias reactivas hacia el ácido tiobarbitúrico). Además, dadas las condiciones ácidas y la alta temperatura para llevar a cabo la reacción entre el MDA y el TBA, existe la posibilidad de que el MDA se forme como un artefacto [36]. En combinación con la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), la selectividad del ensayo del MDA se ha mejorado grandemente y el límite de detección es cerca de 3 pmol [37]. El uso de otros agentes derivatizantes aparte del TBA ha sido empleado en varias metodologías, reportándose resultados similares [28].

Las mediciones de hidrocarburos volátiles, principalmente etano y pentano, han sido usadas y validadas como una cuantificación de la peroxidación de lípidos en estudios *in vivo* e *in vitro*, pero las mediciones de éstos están limitadas por la complejidad de la técnicas relacionadas y debido a que se requiere mucho tiempo para realizarlas. Esto hace difícil su aplicación rutinaria y la comparación de los resultados obtenidos en diferentes laboratorios. Otro problema importante es la contaminación de las muestras con el aire del ambiente [28].

Un grupo de compuestos conocidos como F₂-isoprostanos son producidos en los humanos *in vivo* por un mecanismo de radicales libres no catalizado por ciclooxigenasas, el cual involucra la peroxidación del ácido araquidónico. Los métodos analíticos disponibles principalmente se basan en cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Esto reduce la aplicabilidad general de este método analítico. Sin embargo, varios ensayos inmunoenzimáticos se han desarrollado. Recientemente, un kit de inmunoensayo enzimático se ha introducido para mediciones de un isoprostano en particular, el 8-isoprostano, el cual es uno de los isoprostanos cuya formación se ve favorecida [28].

La cuantificación de dienos conjugados es otra metodología disponible para determinar el daño oxidativo a lípidos. La peroxidación de lípidos se ve acompañada por un rearrreglo de los dobles enlaces de los ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs), llevando a la formación de dienos conjugados, los cuales absorben a 233 nm. Por lo tanto, la peroxidación de lípidos puede ser cuantificada registrando el incremento en la absorbancia de membranas extraídas. Esta metodología es una prueba sensible de la peroxidación de lípidos *in vivo* e *in vitro* [38].

La reducción de los peróxidos por el yoduro es un método conveniente para determinar la cantidad de hidroperóxidos de lípidos presentes en una membrana. Bajo las condiciones del ensayo, sólo los hidroperóxidos de lípidos reaccionan con el yoduro. Esta técnica tiene la ventaja sobre el ensayo del MDA-TBA de permitir una comparación más exacta de los niveles de peróxidos de lípidos en lípidos de membranas dañados [38].

Por otra parte, se sabe que el ADN es otro blanco de las especies reactivas de oxígeno. Estas especies causan entrecruzamientos del ADN-proteínas, daño al esqueleto desoxirribosa-fosfato, así como modificaciones químicas específicas de las bases púricas y pirimidínicas. *In vivo*, el ADN es reparado por endonucleasas y glicosilasas liberando bases y desoxinucleótidos, respectivamente. Las bases se excretan directamente en la orina y, posteriormente, los desoxirribonucleótidos se metabolizan a mono-nucleósidos antes de ser excretados en la orina. Por lo tanto, la cuantificación de los niveles de nucleótidos oxidados en la orina tiene una relación directa con la magnitud del daño oxidativo al ADN [28].

La timina glicol (TG) y la timidina glicol (dTG) son dos de los productos de hidroxilación del ADN que se encuentran más frecuentemente en la orina. Una vez que se liberan del ADN en los tejidos, ambos son eliminados en un curso de 24 horas de la sangre a la orina sin metabolismo posterior. Aunque el dTG podría servir como un marcador del daño oxidativo por radicales libres *in vivo*, el procedimiento analítico involucrado es muy laborioso y consume mucho tiempo [28].

Se ha puesto un mayor interés en la cuantificación de la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG) y la 8-hidroxi-2'-desoxiguanina (8-OH-G) como un método indirecto para determinar el daño oxidativo por radicales libres *in vivo*. El método analítico de ambos aductos involucra una extracción en fase sólida y HPLC con detección electroquímica. Esta metodología ha demostrado ser 3 órdenes de magnitud mejor que el ultravioleta, en sensibilidad y selectividad [28].

Los productos de oxidación de proteínas y derivados carbonilos de proteínas pueden resultar de modificaciones oxidativas de las cadenas laterales de aminoácidos, rompimiento de péptidos mediado por especies reactivas de oxígeno y de reacciones con productos de oxidación de lípidos y carbohidratos [28].

La oxidación de la fenilalanina resulta en la formación de la *orto*-tirosina (*o*-Tyr). La oxidación de la *L*-tirosina por donación de un electrón genera radicales tirosilo que pueden polimerizarse para formar ditirosina (DT). La detección de estos productos se realiza por medio de HPLC y MS [28].

III.5 ANTIOXIDANTES DE ORIGEN NATURAL

Los antioxidantes son compuestos que pueden demorar o inhibir la oxidación de otras moléculas inhibiendo la iniciación o propagación de las reacciones de oxidación [39].

Podemos encontrar varios antioxidantes en muchas frutas y vegetales que incluyen al glutatión (GSH), ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, ácido clorogénico y quercetina [40]. Muchas de estas frutas y vegetales contienen una gran cantidad de antioxidantes diferentes a los mencionados anteriormente. El efecto antioxidante se debe principalmente a los compuestos con nitrógeno [39, 40] y a componentes fenólicos, como los flavonoides, ácidos fenólicos y diterpenos fenólicos [41]. Muchos de estos compuestos poseen capacidades antioxidantes significativas que están asociadas con una menor incidencia y proporciones de mortalidad menores por cáncer en varias poblaciones humanas [39].

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 PROPIEDADES REDOX DE LAS QUINONAS NATURALES

Como primera parte de este estudio se evaluaron las propiedades redox de los compuestos I-XI (véase *VI. Parte Experimental* para descripción de la metodología).

Para la discusión de los resultados obtenidos, las propiedades redox de los compuestos se van a agrupar de acuerdo a la técnica utilizada.

IV.1.1 POLAROGRAFÍA

En la figura 13 se muestra un polarograma del medio de trabajo. En éste se observa un medio de trabajo limpio en el rango de 0.15 V a -1.70 V vs ECS, el cual es apropiado para el estudio de las quinonas de origen natural.

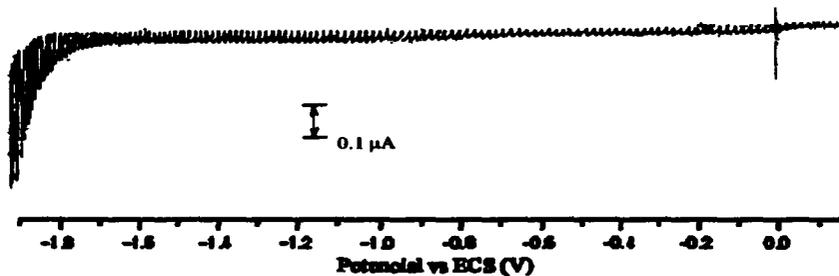


Figura 13. Polarograma del medio de trabajo (amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.0 + 100 μL de solución acuosa de trítón X 1:1000). E_T : DME; E_{max} : Pt; E_{ref} : ECS; N_2 , 15 minutos.

Todos los polarogramas obtenidos se realizaron a una velocidad de barrido (v) de 5 mV/s y a tres diferentes concentraciones, tal como se menciona en la parte experimental. Los potenciales de media onda ($E_{1/2}$) reportados son el promedio de los obtenidos a las tres diferentes concentraciones.

En la figura 14 se muestran los polarogramas de una quinona sesquiterpénica (perezona), una quinona diterpénica con esqueleto abietano (horminona) y de una quinona diterpénica con esqueleto icetexano (desmetilfruticulina).

Los potenciales de media onda ($E_{1/2}$) del primer pico de reducción de las quinonas naturales se muestran en la tabla 2. En este estudio estamos particularmente interesados en el valor del potencial de la primera transferencia electrónica, dado que esta transferencia corresponde, en medios prácticos, a la reducción del sistema quinona [6].

Tabla 2. Potenciales de media onda ($E_{1/2}$) de las quinonas de origen natural.

<i>Compuesto</i>		<i>$E_{1/2}$ (V vs ECS)</i>
Perezona	(I)	-0.195
6-metil, 3- <i>O</i> -metilperezona	(II)	-0.207
Horminona	(III)	-0.215
Anastomosina	(IV)	-0.209
Desmetilfruticulina	(V)	-0.221
Fruticulina A	(VI)	-0.072
12- <i>O</i> -metil-desmetilfruticulina	(VII)	-0.216
Taxodiona	(VIII)	—
7 α - <i>O</i> -metilconacytona	(IX)	-0.260
7 α , 20- <i>O</i> -dimetilconacytona	(X)	-0.223
7 α , 12, 20- <i>O</i> -trimetilconacytona	(XI)	-0.202

Como se puede observar en la tabla 2, no se reporta el $E_{1/2}$ de la taxodiona (VIII). Esto se debe a la presencia de una fuerte preonda de adsorción al electrodo.

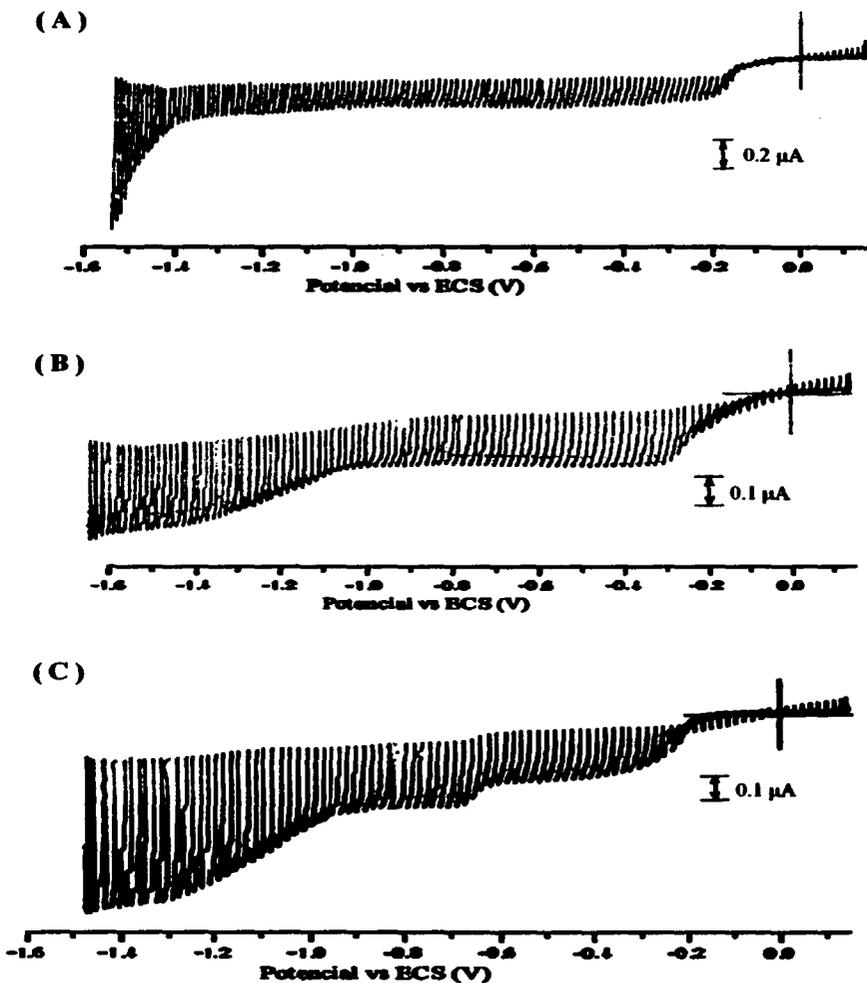


Figura 14. Polarogramas de quinonas naturales. (A) Perezona (I) 1 mM; (B) Horminona (III) 0.25 mM; (C) Desmetilfruticulina (V) 0.25 mM (amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.0 + 100 μ L de solución acuosa de tritón X 1:1000). E_T : DME; E_{an} : Pt; E_{ref} : ECS; N_2 , 15 minutos.

Tanto la perezona (I) como la 6-metil, 3-O-metilperezona (II) son quinonas sesquiterpénicas y además son los compuestos con estructura molecular más sencilla de los once evaluados. La 2-metil, 5-O-metilperezona (II) se obtiene al metilar a la perezona (I) con diazometano en éter.

Para (I) y (II) se obtuvieron potenciales de media onda de -0.195 V y -0.207 V vs ECS, respectivamente. Es posible que la disminución del potencial redox de (II) con respecto a (I), sea debida a la influencia de los metilos en la posición 3 y 6 (que sólo se presentan en el compuesto II). Además, se observa una sola transferencia electrónica, que corresponde a la reducción del sistema quinona.

En el caso de la desmetilfruticulina (V) y sus dos derivados metilados (VI y VII), así como para la 7 α -O-metilconacytona (IX) y sus dos derivados metilados (X y XI), se observa una variación del $E_{1/2}$ con la metilación de las moléculas.

La desmetilfruticulina (V) tiene un $E_{1/2}$ de -0.221 V vs ECS, mientras que para la fruticulina A es de -0.072 V vs ECS y para la 12-O-metil-desmetilfruticulina es de -0.216 V vs ECS. Se deduce entonces que la metilación del hidroxilo en la posición 2 (obteniéndose VI) y del hidroxilo en la posición 12 (obteniéndose VII) favorece la reducción de la quinona a su hidroquinona respectiva (particularmente cuando se encuentra metilado el hidroxilo de la posición 12).

De la 7 α -O-metilconacytona (IX) se obtiene un $E_{1/2}$ de -0.260 V vs ECS, mientras que para el derivado dimetilado (X) se observa un $E_{1/2}$ de -0.223 V vs ECS y para el derivado trimetilado (XI) un $E_{1/2}$ de -0.202 V vs ECS. En este caso, la metilación sucesiva de los hidroxilos presentes en la molécula disminuye el potencial de reducción del compuesto.

Se tiene entonces que el $E_{1/2}$ de las quinonas estudiadas tiene la siguiente tendencia:

$$E_{1/2}: \text{VI} < \text{I} < \text{XI} < \text{II} < \text{IV} < \text{III} < \text{VII} < \text{V} < \text{X} < \text{IX}$$

IV.1.2 VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA

A continuación se muestran los resultados obtenidos por medio de la técnica de voltamperometría cíclica para las quinonas naturales.

En la figura 15 se muestra un voltamperograma del medio de trabajo. En éste, se observa un dominio de electroactividad limpio de 0.15 V a -1.40 V vs ECS. La señal que se observa a un E_{pc} de -1.5 V puede ser asociada a la reducción del tritón X (ya que aparece al momento de agregarlo), la cual no se encuentra en la zona de potencial donde las quinonas se reducen, por lo que no se afecta nuestro estudio.

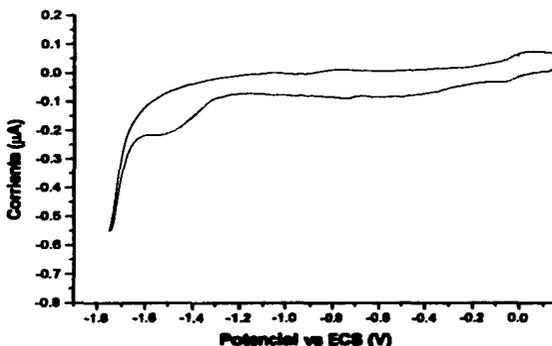
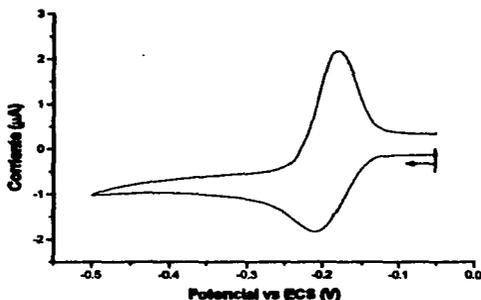


Figura 15. Voltamperometría cíclica del medio de trabajo (amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.0 + 100 μ L de solución acuosa de tritón X 1:1000).
 E_T : HMDE; E_{aux} : Pt; E_{ref} : ECS; v = 200 mV/s; N_2 = 15 min.

En la figura siguiente se muestran las voltamperometrías cíclicas de algunos compuestos analizados (figura 16). En esta figura se muestra la voltamperometría cíclica de la perezona (I). En ésta se observa un solo sistema redox, atribuible al par quinona/hidroquinona (tal como se discutirá más adelante). También podemos observar un voltamperograma más complejo, perteneciente a la desmetilfruticulina (V).

En el voltamperograma de (V) se puede ver que en la misma zona donde se reduce la perezona (I) (más o menos -0.2 V), aparece una señal de reducción clara, lo cual nos permite proponer que corresponde al sistema quinona/hidroquinona.

(A)



(B)

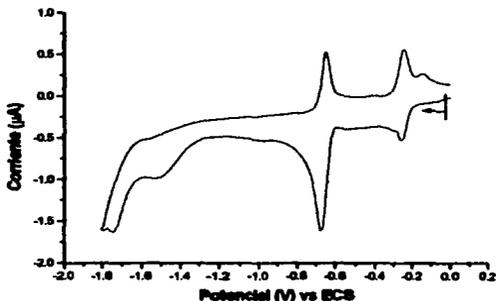


Figura 16. (A) Voltamperograma típico de la perezona (I) 0.10 mM y (B) Voltamperograma típico de la desmetilfructulina (V) 0.10 mM (amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.0 + 100 μ L de solución acuosa de triton X 1:1000). E_T : HMDE; E_{mat} : Pt; E_{ref} : ECS; v = 200 mV/s; N_2 , 15 minutos.

En las figuras 17 y 18 se muestra la dependencia del potencial de pico catódico (E_{pc}) y del potencial formal condicional ($E^{0'}$) de los compuestos analizados a las diferentes velocidades de barrido estudiadas.

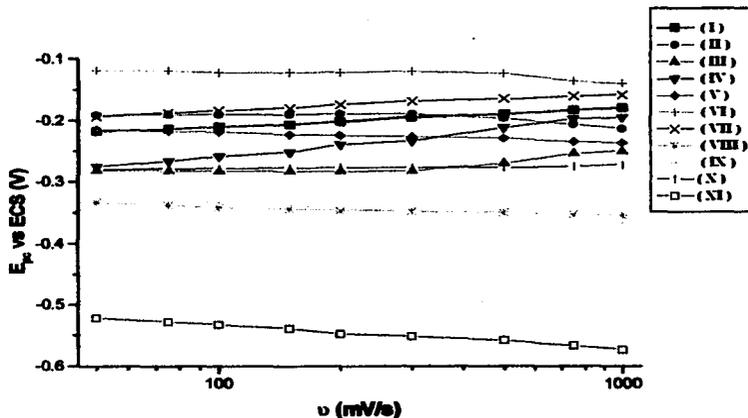


Figura 17. Potencial de pico catódico ($E_{p,c}$) del primer pico de reducción de las quinonas estudiadas (amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.0 + 100 μ L de solución acuosa de tritón X 1:1000). E_T : HMDE; $E_{m,c}$: Pt; E_{ref} : ECS; N_2 , 15 minutos.

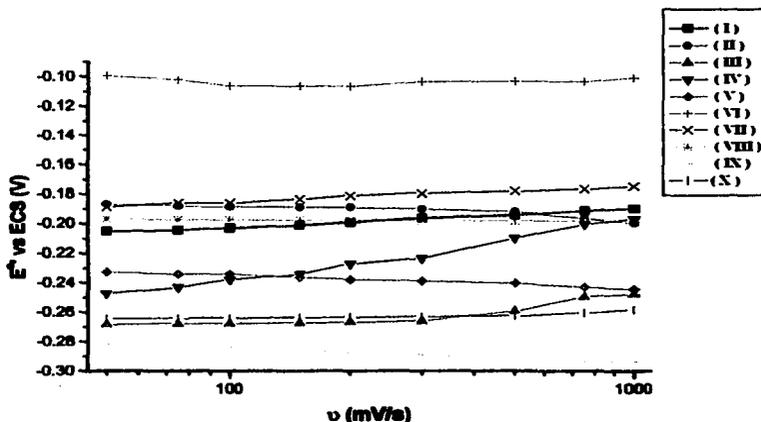


Figura 18. Potencial formal condicional ($E^{o'} = \frac{1}{2}E_{p,c} + \frac{1}{2}E_{p,a}$) de las quinonas estudiadas (amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.0 + 100 μ L de solución acuosa de tritón X 1:1000). E_T : HMDE; $E_{m,c}$: Pt; E_{ref} : ECS; N_2 , 15 minutos.

De las gráficas de las figuras 17 y 18, podemos observar que, tanto el potencial de pico catódico (E_{pc}) como el potencial formal condicional ($E^{\circ'}$), son prácticamente independientes de la velocidad de barrido; este comportamiento se puede observar mejor a altas velocidades de barrido. En la figura 18 también se puede ver que para el compuesto (XI) no se muestra su $E^{\circ'}$, esto se debe a que presenta un comportamiento electrónico irreversible (figura 19). En la tabla 3, se reportan los valores de E_{pc} y de $E^{\circ'}$ que se van a utilizar más adelante para la correlación del potencial redox de las quinonas de origen natural con su actividad antioxidante.

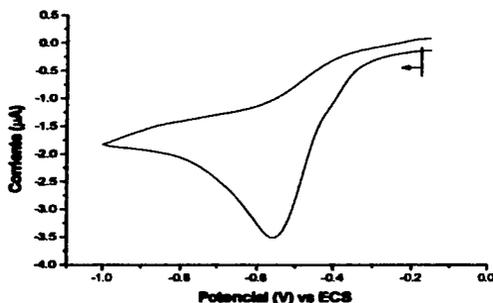


Figura 19. Voltamperometría típica de la 7 α , 12, 20-trimetilconocytona (XI) 0.10 mM (amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.0 + 100 μ L de solución acuosa de triton X 1:1000). E_T : HMDE; E_{sat} : Pt; E_{ref} : ECS; 15 minutos.

Al igual que en la polarografía, se puede observar que la metilación de la perezona (I) para formar la 6-metil, 3-O-metilperezona (II), disminuye el E_{pc} y el $E^{\circ'}$. Así mismo, se observa también que el E_{pc} y el $E^{\circ'}$ de la desmetilfructulina (V), la fructulina A (VI) y la 12-O-metil-desmetilfructulina (VII) siguen la misma tendencia que la observada en la polarografía, i.e., la metilación de la desmetilfructulina favorece la reducción de las quinonas formadas a sus hidroquinonas respectivas.

En lo que respecta a la 7 α -O-metilconacytona (IX) y sus derivados metilados, se observa que la metilación de (IX) en el hidroxilo en la posición 20 para formar (X), favorece su reducción, mientras que en el caso del compuesto trimetilado (XI), se observa una disminución drástica del E_{pc} , observándose también que el sistema se vuelve irreversible.

Tabla 3. Potenciales de pico catódico (E_{pc}) y potencial formal condicional (E°) de las quinonas de origen natural.

<i>Compuesto</i>		E_{pc} (V) ^a	E° (V) ^a
Perezona	(I)	-0.179	-0.190
6-metil, 3-O-metilperezona	(II)	-0.214	-0.200
Horminona	(III)	-0.251	-0.248
Anastomosina	(IV)	-0.195	-0.197
Desmetilfruticulina	(V)	-0.236	-0.244
Fruticulina A	(VI)	-0.140	-0.101
12-O-metil-desmetilfruticulina	(VII)	-0.158	-0.175
Taxodiona	(VIII)	-0.354	-0.198
7 α -O-metilconacytona	(IX)	-0.366	-0.294
7 α , 20-O-dimetilconacytona	(X)	-0.273	-0.258
7 α , 12, 20-O-trimetilconacytona	(XI)	-0.574	—

^a vs ECS.

De los experimentos de voltamperometría cíclica se observan entonces las siguientes tendencias:

$$E_{pc}: VI < VII < I < IV < II < V < III < X < VIII < IX < XI$$

$$E^{\circ}: VI < VII < I < IV < VIII < II < V < III < X < IX$$

IV.1.3 CRONOAMPEROMETRÍA DE PULSO DIRECTO

Para el estudio cronoamperométrico se empleó la propuesta por Bard [23b, 23c], que consiste en imponer pulsos de potencial de duración fija y evaluar la corriente de muestreo a un tiempo *determinado* (τ). De esta manera se construyeron las curvas I/E para todos los compuestos analizados, tomando una $\tau = 15$ segundos, que es donde se observan valores de corriente que son independientes de la corriente de carga de la doble capa eléctrica y dependen únicamente de la difusión de las especies en solución.

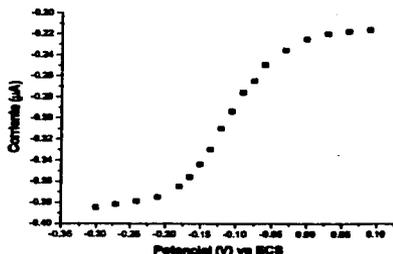
El número de electrones intercambiados (n) en la electroreducción de los compuestos se determinó de acuerdo a Baranski et al. [24] (ecuación 5). La i_{lim} , s , n y C del estándar (1,4-benzoquinona) se reportan en el *Anexo 1*.

La función $I_d = f(t^{-1/2})$ se construyó a partir de los datos de corriente del cronoamperograma de pulso directo obtenidos a un tiempo y potencial en el que se asegura un régimen de difusión (para que se cumpla la ecuación de Cottrell, ecuación 4). El coeficiente de difusión (D) también se calculó a partir de la función anterior.

A continuación se explica de forma breve cómo se determinaron n y D para la anastomosina (IV); el mismo procedimiento se empleó para las otras quinonas.

En la figura 20A se muestra la curva I/E de la anastomosina (IV). De esta figura se puede observar que a un potencial mayor de -0.22 V vs ECS ($i_{lim} = 0.38 \mu A$), la electroreducción de (IV) obedece a un régimen de difusión pura (se cumple la ecuación de Cottrell).

(A)



(B)

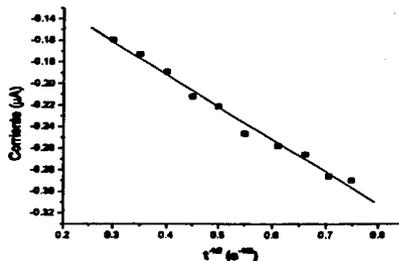


Figura 20. (A) Curva I/E de la anastomosis (IV) 0.10 mM; $\tau = 15$ s. (B) Curva $I_d = f(t^{-1/2})$ para la anastomosis (IV) 0.10 mM; $E_0 = 0.09$ V, $E_1 = -0.30$ V. (amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.0 + 100 μ L de solución acuosa de triton X 1:1000). E_T : HMDE; E_{max} : Pt; E_{ref} : ECS; N_2 , 15 minutos.

Para determinar n en la electroreducción de (IV), se realizó una cronoperimetría a un pulso de potencial que nos asegurara que trabajamos en un régimen de difusión pura ($E_0 = 0.09$ V, $E_1 = -0.30$ V). Posteriormente, se construyó la función $I_d = f(t^{-1/2})$ del cronoperograma obtenido. De ésta se obtiene una pendiente de Cottrell (s) de $0.3142 \mu\text{A s}^{1/2}$ ($r^2 = 0.99$) (figura 20B)

Tomando los valores de s_{std} , $I_{lim(std)}$, C_{std} , n_{std} (véase el Anexo I) y la s , I_{lim} y C del compuesto evaluado (tabla 4) y sustituyéndolos en la ecuación 5, se obtiene una n para (IV) de $0.78 e^- \approx 1 e^-$.

La determinación del coeficiente de difusión se realizó a partir del mismo valor de s obtenido anteriormente, pero tomando en cuenta que el electrodo utilizado no es plano, utilizamos la ecuación de Cottrell que involucra el factor de corrección esférico propio para un electrodo de gota suspendida de mercurio (ecuación 8).

$$I_d = nFSDC_0 \left[\frac{1}{(\pi Dt)^{1/2}} + \frac{1}{r} \right] \quad (\text{ecuación 8})$$

De la ecuación anterior, se tiene que la pendiente de la función $I_d = f(t^{-1/2})$ (pendiente de Cottrell, s) es igual a $nFSD^{1/2}C_0\pi^{-1/2}$. Siguiendo con el ejemplo de la anastomosis, si se tiene una $s = 0.3142 \mu\text{A s}^{1/2}$, una área del electrodo (S) de $1.72 \times 10^{-5} \text{ cm}^2$ (gota grande) (véase *Anexo 2*), una $n = 1 e^-$ y una concentración (C_0) de la anastomosis (IV) de 0.10 mM, se obtiene que el coeficiente de difusión de (IV) es $1.13 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$.

El número de electrones (n) y el coeficiente de difusión (D) de todos los compuestos evaluados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Número de electrones intercambiados en la electroreducción (n) y coeficiente de difusión (D) de las quinonas de origen natural.

Compuesto	E_0 (V) [§]	E_1 (V) [§]	I_{lim} (μA)	C (mM)	s ($\mu\text{A s}^{1/2}$)	n (e^-)	D (cm^2/s) [†]
(I)	-0.05	-0.30	-0.35	0.25	0.7642	2	2.67×10^{-8}
(II)	-0.06	-0.26	-0.37	0.25	0.5542	1	1.18×10^{-8}
(III)	0.00	-0.40	-0.46	0.25	0.9000	2	3.76×10^{-8}
(IV)	0.09	-0.30	-0.38	0.10	0.3142	1	1.13×10^{-7}
(V)	0.00	-0.30	-0.01	0.25	0.0772	1	1.09×10^{-7}
(VI)	0.00	-0.27	-0.02	0.25	0.1054	1	2.03×10^{-7}
(VII)	0.00	-0.30	-0.30	0.25	0.6991	2	2.23×10^{-8}
(VIII)	-0.20	-0.44	-0.23	0.50	—	—	—
(IX)	-0.10	-0.42	-0.80	0.25	1.5034	3	4.58×10^{-8}
(X)	-0.10	-0.40	-0.75	0.25	1.6815	4	3.23×10^{-8}
(XI)	-0.15	-0.66	-0.75	0.25	1.8068	5	2.38×10^{-8}

[§] Con respecto al electrodo de calomel saturado; [†] pendiente de Cottrell; ^{*} De acuerdo a Baranski et al. [24]; [†] D de la BQ = $9.05 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ [42] y $S = 1.85 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$ (ver *Anexo 2*)

De los datos del no. de electrones intercambiados (tabla 4) observamos que los compuestos (I), (III) y (VII) se reducen en un solo paso hasta su hidroquinona correspondiente (2 electrones).

En lo que respecta a los compuestos (II), (IV), (V) y (VI), se observa que sólo está involucrado un electrón; este comportamiento podría deberse a que en las condiciones de trabajo la reacción de protonación es lenta y se observa en un segundo paso la reducción de $Q^{\bullet-}$ a H_2Q (ver figura 16B).

En lo que respecta a la taxodiona (VII), la pendiente de Cottrell, el número de electrones intercambiados y el coeficiente de difusión no se determinaron debido a que este compuesto presentó una fuerte adsorción al electrodo.

Por otro lado, observamos que para los compuestos (IX), (X) y (XI) se relacionan 3, 4 y 5 electrones, respectivamente. Frontana et al. [43] reportaron que durante la reacción de electroreducción de (IX) se presenta una hidrogenólisis (véase figura 21). Para (X) y (XI) podrían proponerse rutas mecanísticas parecidas que expliquen los resultados obtenidos y el excedente de electrones involucrados en el proceso.

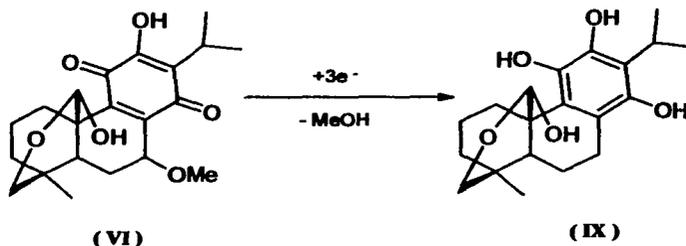


Figura 21. Reacción de hidrogenólisis de IX observada [43].

Con relación al coeficiente de difusión (D), se puede observar que la metilación de (I) para formar (II), disminuye su coeficiente de difusión, hecho que se puede atribuir al efecto estérico proporcionado por los dos metilos adicionales.

Por otro lado, se puede observar que la metilación de (V), formando (VI) y (VII), aumenta el valor de su coeficiente de difusión 2 y 10 veces, respectivamente. Esto podría deberse a que el compuesto (V) presenta en su estructura dos hidroxilos que podrían interaccionar con el disolvente (agua), formando puentes de hidrógeno, provocando la difusión más lenta de esta serie de compuestos en este medio. En lo que respecta a (VI) y

(VII), el primero se encuentra metilado en la posición 2 y conserva el hidroxilo de la posición 12 (que se encuentra vecino a un carbonilo de la quinona), el cual tiene favorecida su habilidad de formar puentes de hidrógeno con el disolvente. Por otro lado, el compuesto **(VII)** se encuentra metilado en la posición 12 y sólo cuenta con el hidroxilo del C-2, disminuyendo su interacción con el disolvente y, por lo tanto, aumentando su coeficiente de difusión.

Mientras tanto, para los compuestos **(IX)**, **(X)** y **(XI)** se observa que la metilación sucesiva de **(IX)** disminuye el valor de su coeficiente de difusión, comportamiento que es contrario al descrito para **(V)**, **(VI)** y **(VII)**. Con respecto a **(IX)**, **(X)** y **(XI)**, esta tendencia podría explicarse tomando en cuenta que su estructura es la más complicada de todos y que los efectos estéricos que aporta cada metilación es por lo tanto más importante.

IV.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS QUINONAS NATURALES

La evaluación de la actividad antioxidante de las quinonas de origen natural se realizó mediante la prueba con DPPH. A continuación se presentan los resultados obtenidos.

IV.2.1 PRUEBA CON DPPH

Debido a que las quinonas evaluadas en este trabajo presentan una cinética lenta en este sistema modelo, lo primero que se hizo fue determinar el tiempo de término de la reacción. En la figura 22 se muestra la cinética de algunas quinonas (I, II, VII, VIII) y de un control positivo (α -tocoferol) a lo largo de 37 horas.

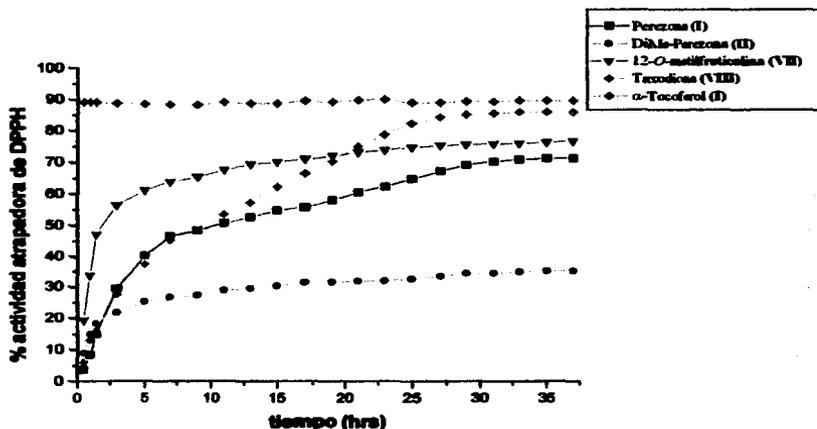
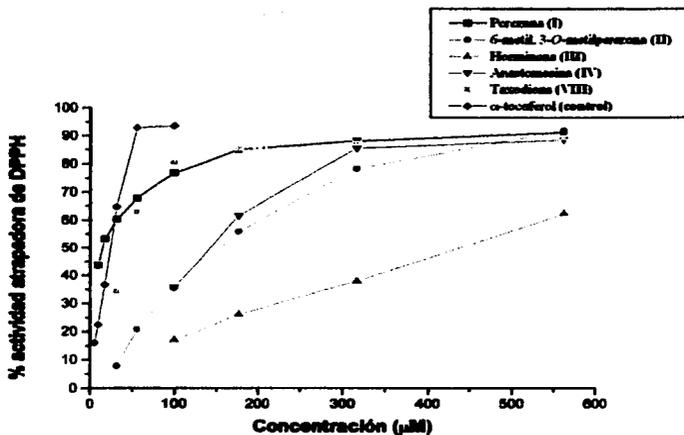


Figura 22. Cinética de la reacción de algunas quinonas naturales con DPPH durante 37 horas; se utilizó el α -tocoferol como control positivo. Todos los compuestos se evaluaron a una concentración de 100 μ M; la concentración del DPPH fue 50 μ M. Las lecturas se realizaron a una $\lambda_{517\text{ nm}}$

Se puede observar en la figura 22 que después de 33 horas, la reacción llega a su fin. Por lo tanto, las lecturas de los experimentos siguientes se realizaron a las 36 horas de reacción.

En las figuras 23A y 23B se muestran las curvas concentración-actividad atrapadora de radicales DPPH de las quinonas estudiadas y del control positivo (α -tocoferol). Así mismo, en la tabla 5 se presentan las concentraciones inhibitorias 50 (CI_{50}) de las quinonas naturales.

(A)



(B)

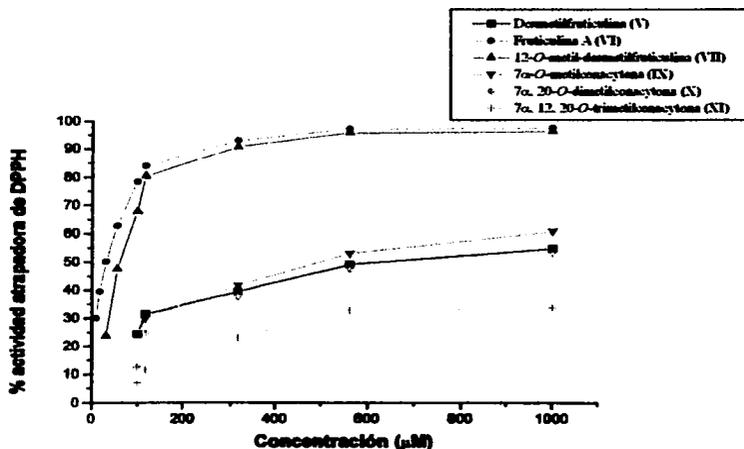


Figura 23. Curvas concentración-actividad atrapadora de radicales DPPH de las quinonas naturales. Tiempo de reacción: 36 horas; concentración del DPPH: 50 μM . Lecturas a $\lambda=517\text{ nm}$

Tabla 5. CI_{50} de las quinonas naturales en la prueba de DPPH.

<i>Compuesto</i>		<i>CI₅₀ (μM)</i>
Perezona	(I)	14.51
Fructulina A	(VI)	28.96
Taxodiona	(VIII)	44.64
12- <i>O</i> -metil-desmetilfructulina	(VII)	63.03
Anastomosina	(IV)	137.70
6-metil, 3- <i>O</i> -metilperezona	(II)	140.66
Horminona	(III)	402.63
7α- <i>O</i> -metilconacytona	(IX)	513.04
7α, 20- <i>O</i> -dimetilconacytona	(X)	690.08
Desmetilfructulina	(V)	699.13
7α, 12, 20- <i>O</i> -trimetilconacytona	(XI)	>1000
Control positivo (α-tocoferol)		23.37

Tomando como premisa que a menor CI_{50} se tiene una actividad antioxidante mayor, en la tabla 5 se observa que la perezona (I) es el compuesto más activo en la prueba con DPPH, en cambio, la 6-metil, 3-*O*-metilperezona (II), el derivado dimetilado de (I), presenta una actividad 10 veces menor.

Por el otro lado, se puede observar que mientras que la CI_{50} de la desmetilfructulina (V) es de 699.13, las CI_{50} de la fructulina A (VI) y la 12-*O*-metil-desmetilfructulina (VII) son 24 y 11 veces menores, respectivamente, lo que nos indica que la metilación de la desmetilfructulina (V) para obtener la fructulina A (VI) y la 12-*O*-metil-desmetilfructulina (VII) favorece la actividad atrapadora de radicales DPPH drásticamente

En lo que respecta a la 7α-*O*-metilconacytona (IX) y sus dos derivados metilados, se puede observar que son los menos activos de todos los compuestos evaluados. La metilación sucesiva de la 7α-*O*-metilconacytona (IX) para obtener (X) y (XI) disminuye la actividad atrapadora de radicales DPPH a tal punto que es imposible determinar una CI_{50} para la 7α, 12, 20-*O*-trimetilconacytona (XI). Para esta serie de compuestos, la disminución de la actividad antioxidante podría ser ocasionada por un impedimento cada vez más fuerte del centro redox ocasionado por la entrada sucesiva de los grupos metilo, y

por lo tanto, los efectos estéricos que aporta cada metilación es más importante, tal como se observa con la nemorosona [46].

De los experimentos anteriores podemos resaltar que los compuestos más activos de las quinonas evaluadas son: la perezona (I), la fruticulina A (VI), la 12-O-metil-desmetilfruticulina (VII) y la taxodiona (VIII).

IV3 CORRELACIÓN DE LAS PROPIEDADES REDOX CON LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS QUINONAS NATURALES

En un primer intento para correlacionar la actividad antioxidante (CI_{50}) de las quinonas naturales con sus propiedades redox, se evaluó la dependencia de la CI_{50} con respecto al $E_{1/2}$, E_{pc} y $E^{o'}$.

En la tabla 6 y la figura 24 se muestran las correlaciones analizadas.

Tabla 6. Matriz de correlación de la actividad antioxidante de las quinonas naturales con sus propiedades redox.

<i>Variable</i>	CI_{50} (μM)	$\log CI_{50}$ (μM)	$1/CI_{50}$ (μM^{-1})
$E_{1/2}$ (V/ECS)	(24.a) $r = 0.5273$	(24.b) $r = 0.6155$	(24.c) $r = 0.4743$
E_{pc} (V/ECS)	(24.d) $r = 0.4425$	(24.e) $r = 0.4691$	(24.f) $r = 0.4074$
$E^{o'}$ (V/ECS)	(24.g) $r = 0.7833$	(24.h) $r = 0.8019$	(24.i) $r = 0.5637$

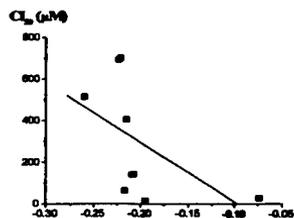
De las correlaciones mostradas en la tabla 6, se observa que los mejores coeficientes de correlación (r) se obtienen para el $E^{o'}$ en función de la CI_{50} y $\log CI_{50}$ (24.g y 24.h, respectivamente). Por otro lado, en la figura 24 se puede ver que en las gráficas 24.b, 24.c, 24.f, 24.h y 24.i existe un compuesto (perezona) que se aleja bastante de la tendencia mostrada por los demás (se indica con un círculo).

Debido a lo anterior, se procedió a evaluar otra vez la dependencia de la CI_{50} con respecto a sus propiedades redox sin incluir ahora a la perezona (I). Los resultados se muestran en la tabla 7 y en la figura 25.

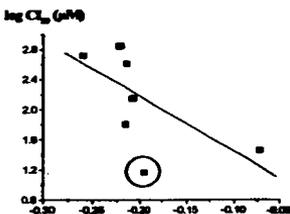
Tabla 7. Matriz de correlación de la actividad antioxidante de las quinonas naturales con sus propiedades redox excluyendo a la perezona (I).

<i>Variable</i>	CI_{50} (μM)	$\log CI_{50}$ (μM)	$1/CI_{50}$ (μM^{-1})
$E_{1/2}$ (V/ECS)	(25.a) $r = 0.5499$	(25.b) $r = 0.7495$	(25.c) $r = 0.9125$
E_{pc} (V/ECS)	(25.d) $r = 0.3906$	(25.e) $r = 0.4024$	(25.f) $r = 0.3682$
$E^{o'}$ (V/ECS)	(25.g) $r = 0.7897$	(25.h) $r = 0.8881$	(25.i) $r = 0.8892$

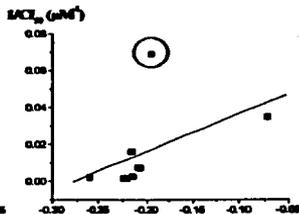
(24.a)



(24.b)

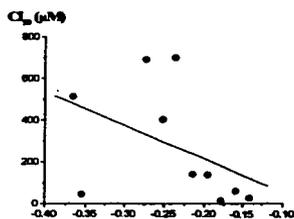


(24.c)

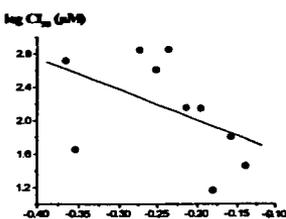


$E_{1/2}$ (V) vs ECS

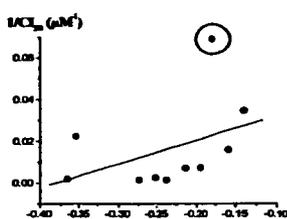
(24.d)



(24.e)

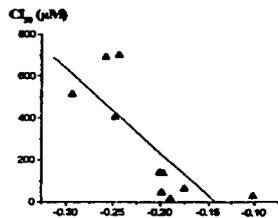


(24.f)

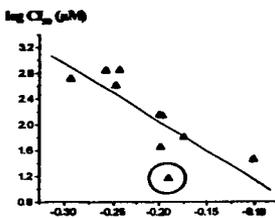


$E_{p,c}$ (V) vs ECS

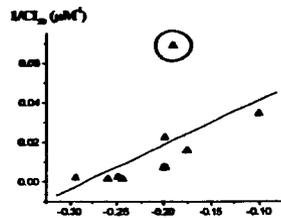
(24.g)



(24.h)



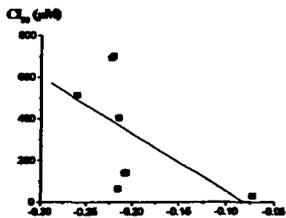
(24.i)



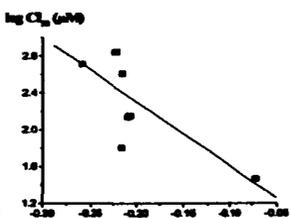
$E^{*•}$ (V) vs ECS

Figura 24. Actividad antioxidante de las quinonas naturales en función de sus propiedades redox.

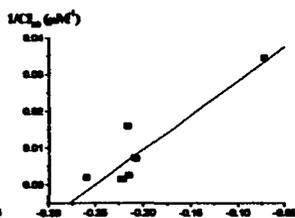
(25.a)



(25.b)

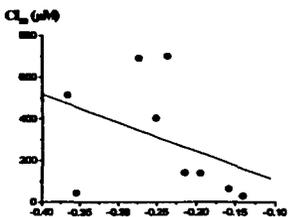


(25.c)

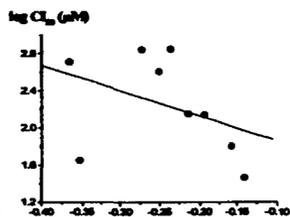


E_{D2} (V) vs ECS

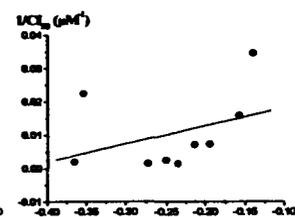
(25.d)



(25.e)

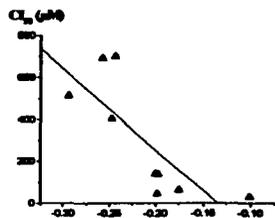


(25.f)

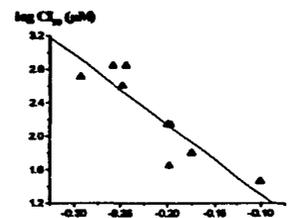


E_{pc} (V) vs ECS

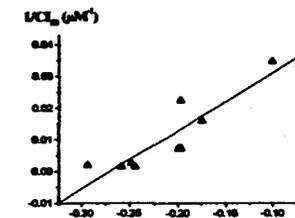
(25.g)



(25.h)



(25.i)



$E^{\bullet\bullet}$ (V) vs ECS

Figura 25. Actividad antioxidante de las quinonas naturales en función de sus propiedades redox excluyendo a la perezona (I).

De la tabla 7 y la figura 25, se puede ver que las gráficas 25.c, 25.g, 25.h y 25.i mejoraron su coeficiente de correlación al excluir del cálculo a la perezona (I), esto podría deberse a que la actividad antioxidante de este compuesto en particular depende de otros parámetros aparte de los electrónicos.

Como se puede observar en la gráfica 24.g, los compuestos más activos (con menor CI_{50}) son los que tienen menor potencial redox y también se puede ver cómo alrededor de los -0.20 V vs ECS existe una gran diferencia entre las actividades antioxidantes; i.e., a un potencial redox menor de -0.20 V, se tiene una mayor actividad antioxidante y a un potencial redox mayor de -0.20 V, se tienen compuestos con poca o nula actividad antioxidante.

A partir de este momento sólo se analizarán las gráficas 25.c, 25.g, 25.h y 25.i.

Hasta este punto sólo se ha evaluado la CI_{50} de las quinonas en función de sus propiedades electrónicas (potenciales redox), sin embargo, hay que tomar en cuenta que los compuestos estudiados presentan estructuras bastante diferentes, por lo que es importante también considerar la aportación de los efectos estéricos en su actividad antioxidante.

Los efectos estéricos a considerar son el área superficial y el volumen molecular de las quinonas naturales. Estos efectos se determinaron con la ayuda del programa de cómputo HyperChem[®] (véase VI.4 *Determinación del Área Superficial [AS] y el Volumen Molecular [VM] de las Quinonas de Origen Natural*).

En la tabla 8 se muestra el área superficial (AS) y el volumen molecular (VM) determinados.

Tabla 8. Área superficial (AS) y volumen molecular (VM) de las quinonas naturales.

<i>Compuesto</i>		<i>AS (Å²)</i>	<i>VM (Å³)</i>
Perezona	(I)	495.74	808.23
6-metil, 3-O-metilperezona	(II)	535.11	902.94
Horminona	(III)	525.91	939.69
Anastomosina	(IV)	528.99	915.61
Desmetilfruticulina	(V)	519.98	879.59
Fruticulina A	(VI)	549.76	934.76
12-O-metil-desmetilfruticulina	(VII)	541.74	927.74
Taxodiona	(VIII)	516.84	907.62
7α-O-metilconacytona	(IX)	559.07	999.37
7α, 20-O-dimetilconacytona	(X)	586.36	1054.57
7α, 12, 20-O-trimetilconacytona	(XI)	605.47	1102.68

Posteriormente, se procedió a realizar correlaciones multiparamétricas entre la Cl_{50} de las quinonas naturales, sus propiedades redox y su área superficial (AS) o volumen molecular (VM). La correlaciones multiparamétricas se realizaron con el programa de cómputo NLREG[®] versión 5.3 [47].

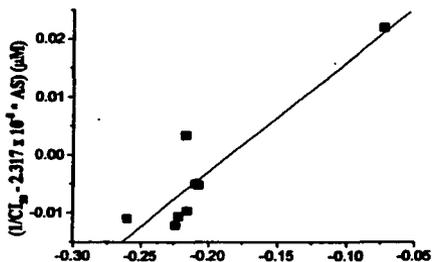
En la tabla 9 se muestran los coeficientes de correlación obtenidos. Todas las correlaciones se ajustaron al modelo ' $y = a + bx_1 + cx_2$ ', donde y se refiere a la actividad antioxidante de las quinonas naturales, x_1 es el potencial redox y x_2 es el área superficial (AS) o volumen molecular (VM).

Tabla 9. Coeficientes de correlación multiparamétricos entre la actividad antioxidante de las quinonas naturales, su potencial redox y el área superficial (AS) o volumen molecular (VM).

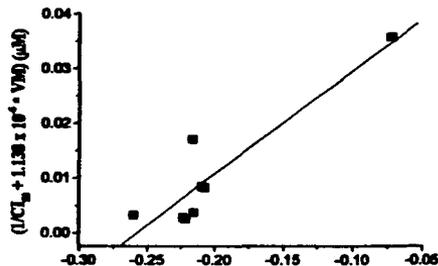
	<i>Coefficiente de correlación</i>	<i>a (μM¹)</i>	<i>b (μM⁻¹V)</i>	<i>c (μM¹Å²)</i>
$1/Cl_{50} = f(E_{1/2}, AS)$ (26.a)	0.9136	0.03460	0.1880	2.317×10^{-3}
$1/Cl_{50} = f(E_{1/2}, VM)$ (26.b)	0.9125	0.04820	0.1880	-1.138×10^{-3}
$Cl_{50} = f(E^{2+}, AS)$ (26.c)	0.8200	-2005	-3666	2.825
$Cl_{50} = f(E^{2+}, VM)$ (26.d)	0.8017	-1187	-3560	0.7786
$\log Cl_{50} = f(E^{2+}, AS)$ (26.e)	0.8949	-0.9468	-8.141	2.699×10^{-3}
$\log Cl_{50} = f(E^{2+}, VM)$ (26.f)	0.8887	0.1671	-8.202	3.528×10^{-4}
$1/Cl_{50} = f(E^{2+}, AS)$ (26.g)	0.8903	0.03707	0.1844	2.342×10^{-3}
$1/Cl_{50} = f(E^{2+}, VM)$ (26.h)	0.8974	0.02493	0.1944	2.865×10^{-3}

En la figura 26 se muestran las gráficas obtenidas de las regresiones multiparamétricas.

(26.a)

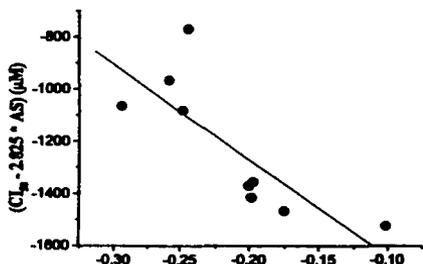


(26.b)

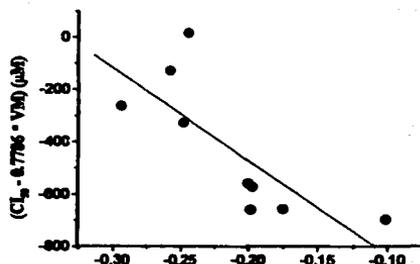


E_{U2} (V) vs ECS

(26.c)



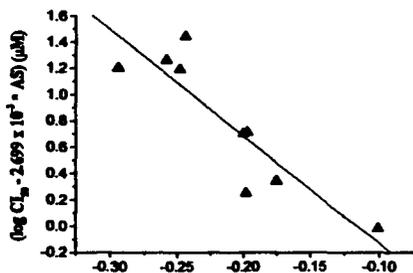
(26.d)



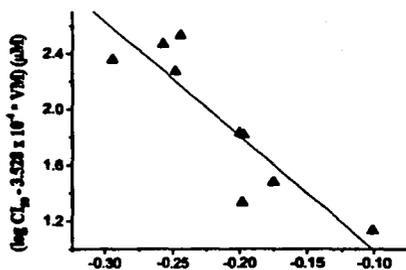
E^{**} (V) vs ECS

Figura 26. Actividad antioxidante de las quinonas naturales en función de sus propiedades redox y su área superficial o volumen molecular excluyendo a la perzona (I). (continúa en la siguiente página).

(26.e)

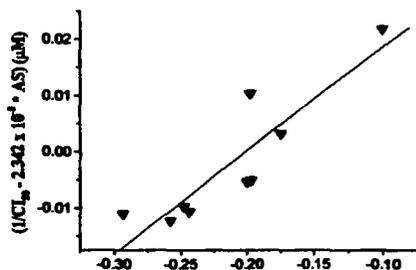


(26.f)

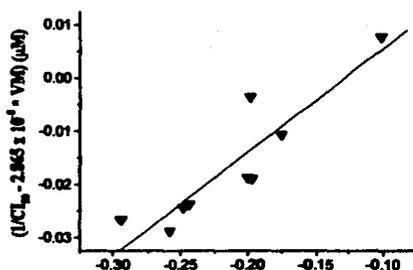


E° (V) vs ECS

(26.g)



(26.h)



E° (V) vs ECS

Figura 26 (continuación). Actividad antioxidante de las quinonas naturales en función de sus propiedades redox y su área superficial o volumen molecular excluyendo a la perezona (I).

Como se puede observar en la tabla 9, los mejores coeficientes de correlación se obtienen para el inverso de la actividad antioxidante ($1/IC_{50}$) en función del potencial de media onda ($E_{1/2}$) y el área superficial o volumen molecular (**26.a** [$r = 0.9136$] y **26.b** [$r = 0.9125$], respectivamente). Sin embargo, hay que tomar en cuenta que estas correlaciones multiparamétricas no consideran a la perezona (I), a la taxodiona (VIII) ni a la 7 α , 12, 20-*O*-trimetilconacytona (XI); en el caso de la taxodiona (VIII) se observa una fuerte pre-onda de adsorción al electrodo que no permite la determinación de su $E_{1/2}$, con respecto a la 7 α , 12, 20-*O*-trimetilconacytona (XI), este compuesto resultó no tener actividad antioxidante y como se comentó anteriormente, la perezona se excluyó del cálculo debido a que se alejaba demasiado de la tendencia.

De la tabla 9 también puede observarse que las correlaciones que involucran a la IC_{50} , el $E^{0'}$ y el área superficial o el volumen molecular no se ajustan al modelo descrito (**26.c** [$r = 0.8200$] y **26.d** [$r = 0.8017$], respectivamente).

En las gráficas **26.e**, **26.f**, **26.g** y **26.h** se correlacionan la IC_{50} , el $E^{0'}$ y el área superficial o volumen molecular y se obtienen coeficientes de correlación alrededor de 0.89. En estas gráficas, al contrario de las **26.a** y **26.b**, si se toma en cuenta a la taxodiona (VIII) (aunque también se observa la pre-onda de adsorción al electrodo, la determinación del $E^{0'}$ por medio de voltamperometría cíclica en este caso sí es posible).

Como se hizo notar en la página 43, la perezona (I) se aleja de la tendencia de los demás compuestos, razón por la cual se excluyó de las regresiones posteriores. Este comportamiento podría deberse a otros factores diferentes a los electrónicos y estéricos.

Hasta este punto observamos que las correlaciones **26.e** ($r = 0.8949$), **26.f** ($r = 0.8887$), **26.g** ($r = 0.8903$) y **26.h** ($r = 0.8974$) nos predicen prácticamente la misma respuesta y se puede concluir también que para poder discernir entre éstas existe la necesidad de realizar más experimentos.

Las ecuaciones correspondientes a las correlaciones 26.e, 26.f, 26.g y 26.h son:

- a) $\log CI_{50} = -0.9468 - 8.141 E^{01} + 2.699 \times 10^{-3} AS$ (26.e)
b) $\log CI_{50} = 0.1671 - 8.201 E^{01} + 3.528 \times 10^{-4} VM$ (26.f)
c) $1/IC_{50} = 0.03707 + 0.1844 E^{01} + 2.342 \times 10^{-5} AS$ (26.g)
d) $1/IC_{50} = 0.02493 + 0.1944 E^{01} + 2.865 \times 10^{-5} VM$ (26.h)

V. CONCLUSIONES:

- La perezona (I), horminona (III) y 12-*O*-metil-desmetilfruticulina (VII) presentan una primera electroreducción bielectrónica.
- La 6-metil, 3-*O*-metilperezona (II), anastomosina (IV), desmetilfruticulina (V) y fruticulina A (VI) presentan una transferencia de un electrón en su primera señal de reducción.
- La 7 α -*O*-metilconacytona (IX) presenta reacciones de hidrogenólisis, propuesta mecanística que también podría aplicarse a la 7 α , 20-*O*-dimetilconacytona (X) y a la 7 α , 12, 20-*O*-trimetilconacytona (XI).
- La taxodiona (VIII) presenta una fuerte pre-onda de adsorción al electrodo que no permite determinar su $E_{1/2}$, el número de electrones intercambiados en su electroreducción ni su coeficiente de difusión.
- El coeficiente de difusión (D) de las quinonas naturales y sus derivados metilados depende tanto de su estructura como de las interacciones de éstas con el disolvente.
- De la prueba con DPPH se observa que los compuestos más activos de las quinonas evaluadas son la perezona (I), la fruticulina A (VI), la 12-*O*-metil-desmetilfruticulina (VII) y la taxodiona (VIII); también se observa que la 6-metil, 3-*O*-metilperezona (II) y la anastomosina (IV) presentan una actividad intermedia. Estos compuestos son los de menor potencial redox de los estudiados.

- Se obtuvieron cuatro modelos matemáticos que podrían predecir la actividad antioxidante de las quinonas naturales y sus derivados metilados, en los cuales se observa que esta actividad está relacionada con su potencial redox y sus propiedades estéricas:

$$\log CI_{50} = -0.9468 - 8.141 E^{0+} + 2.699 \times 10^{-3} AS \quad (r = 0.8949)$$

$$\log CI_{50} = 0.1671 - 8.201 E^{0+} + 3.528 \times 10^{-4} VM \quad (r = 0.8887)$$

$$1/CI_{50} = 0.03707 + 0.1844 E^{0+} + 2.342 \times 10^{-5} AS \quad (r = 0.8903)$$

$$1/CI_{50} = 0.02493 + 0.1944 E^{0+} + 2.865 \times 10^{-5} VM \quad (r = 0.8974)$$

- Se observa también que es necesaria la realización de nuevos experimentos con otras quinonas naturales para poder discernir entre los modelos propuestos.

VI. PARTE EXPERIMENTAL

VI.1 SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS METILADOS

Las quinonas naturales (I, III-V, VIII-X) fueron aisladas en el Laboratorio 2-8, Instituto de Química, UNAM por el M. en C. Jorge Cárdena Pérez. El tratamiento de (I), (V) y (X) con diazometano en éter genera a (II), (VI), (VII) y (XI) (ver tabla A).

Tabla A. Metilación de las quinonas naturales

Reactivo	Producto	Rendimiento (%)
Perezona (I)	6-metil, 3-O-metilperezona (II)	65.63
Desmetilfruticulina (V)	Fruticulina A (VI)	10.67
	12-O-metil-desmetilfruticulina (VII)	33.33
7 α , 20-O-dimetilconacytona (X)	7 α , 12, 20-O-trimetilconacytona (XI)	73.25

Los productos de reacción (II, VI, VII, X, XI) fueron purificados mediante cromatografía en capa fina preparativa y se caracterizaron por RMN ^1H y/o ^{13}C (ver Anexo 3).

VI.2 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEDIA ONDA ($E_{1/2}$), DEL POTENCIAL DE PICO CATÓDICO (E_{pc}) Y DEL POTENCIAL FORMAL CONDICIONAL (E^0) DE LAS QUINONAS DE ORIGEN NATURAL

La determinación de los potenciales de media onda ($E_{1/2}$) de las quinonas naturales se realizó por medio de polarografía clásica en un potenciostato-galvanostato Vimar PG-3EV, acoplado a un graficador x-y Perkin Elmer, usando una columna de mercurio de 120 cm de altura y un capilar Radiometer. Los polarogramas fueron trazados a una velocidad de barrido de 5 mV/s, utilizando como electrodo de referencia el electrodo de calomel saturado (ECS) y un electrodo auxiliar de platino (Pt).

Los experimentos de voltamperometría de barrido triangular, para la determinación de los potenciales de pico catódico (E_{pc}), los potenciales de pico anódico (E_{pa}) y los

potenciales formales condicionales (E°) de las quinonas naturales, al igual que los de cronoamperometría de pulso directo y cronocoulombimetría de pulso directo, se realizaron con un potenciostato-galvanostato EG&G PARC modelo 273A acoplado a una computadora mediante una interfase GPIIB. Las voltamperometría cíclicas se realizaron a velocidades de barrido de 50, 75, 100, 150, 200, 300, 500, 750 y 1000 mV/s. Se utilizó un electrodo de trabajo de mercurio de gota suspendida (Hanging Dropping Mercury Electrode, HMDE) EG&G PARC modelo 303A, como referencia se utilizó el ECS y un electrodo auxiliar de Pt.

Todos los experimentos se realizaron en una celda de volumen total de 6 mL, empleando una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH = 7. La solución de fosfatos se burbujó con N_2 durante 15 minutos para eliminar el oxígeno disuelto y posteriormente se agregaron 100 μ L de solución acuosa de Tritón X 1:1000 para eliminar máximos polarográficos.

El día de la determinación del $E_{1/2}$, del E_{pc} , del E_{pa} y del E° se prepararon soluciones stock de las quinonas en acetonitrilo de marca Aldrich de 99.8% de pureza (I, 60.73 mM; II, 10.91 mM; III, 15.06 mM; IV, 3.68 mM; V, 9.67 mM; VI, 9.26 mM; VII, 9.26 mM; VIII, 47.82 mM; IX, 13.30 mM; X, 12.82 mM; XI, 12.38 mM; 1, 4-benzoquinona, 27.78 mM). De la solución stock se tomaron las alícuotas correspondientes para preparar soluciones 0.10, 0.25 y 0.50 mM de la quinona a ensayar (excepto para el compuesto IV, para el cual se trabajaron concentraciones de 0.10, 0.20 y 0.30 mM y para la 1, 4-benzoquinona, para la cual se trabajaron concentraciones de 0.11 mM, 0.58 mM, 1.15 mM y 2.27 mM).

Como referencia interna se utilizó a la 1,4-benzoquinona (BQ). Los valores de potencial obtenidos de las quinonas naturales fueron corregidos para la caída óhmica con respecto a la 1,4-benzoquinona (ver *Anexo I*).

Todos los valores de potencial se reportan con respecto al electrodo de referencia de calomel saturado. Todos los experimentos se realizaron por triplicado con cada una de las

tres concentraciones evaluadas. Los datos presentados son el promedio de las tres réplicas a cada concentración, los cuales a su vez fueron promediados.

VL3 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS QUINONAS NATURALES

Para la determinación de la actividad antioxidante de las quinonas naturales, éstas se evaluaron en un sistema de estudio ampliamente usado: la prueba con DPPH.

La prueba se adaptó de Chen et al. [45] y se realizó tal como se describe a continuación. El día de las pruebas se prepararon soluciones stock 20 mM de las quinonas en etanol absoluto y se realizaron las diluciones necesarias para obtener las concentraciones finales a probar (10-1000 μ M).

A partir de una solución stock 1 mM de DPPH preparada recientemente, se prepara una solución 66.66 μ M. Se toman 1.5 mL de ésta, se agregan en un vial de 5 mL y a continuación se le agregan 0.5 mL de la solución de la quinona a probar (Muestra). En otro vial, se agregan otros 1.5 mL de solución 66.66 μ M de DPPH y 0.5 mL de etanol absoluto. Todos los viales se protegen de la luz con papel aluminio y se agitan durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se permiten 36 horas de reacción y se lee a 517 nm contra un blanco de etanol absoluto. Se hicieron lecturas de soluciones puras de las quinonas y la absorbancia de éstas fue restada de la absorbancia de la muestra. El por ciento de actividad atrapadora de radicales DPPH se calcula con la fórmula: (Absorbancia de la Muestra/Absorbancia del DPPH) x 100.

Para la determinación de la CI_{50} se construye la gráfica log concentración vs % actividad atrapadora de radicales DPPH, se realiza una regresión lineal de la parte lineal de la gráfica y por interpolación se determina la CI_{50} .

VI.4 DETERMINACIÓN DEL ÁREA SUPERFICIAL Y VOLUMEN MOLECULAR DE LAS QUINONAS NATURALES

El área superficial y el volumen molecular de las quinonas naturales se determinaron con la ayuda del programa de cómputo HyperChem for Windows[®] (Molecular Modelling System) versión 6.03 de Hypercube, Inc.

La optimización de la geometría de las moléculas se realizó con un método semi-empírico AM1 utilizando el algoritmo Eigenvector following.

Los métodos semi-empíricos resuelven la ecuación de Schrödinger, con ciertas aproximaciones, para describir las propiedades de átomos y moléculas. Para simplificar y acortar estos cálculos, los métodos semi-empíricos hacen varias simplificaciones, incluyendo: cálculos sólo para electrones de valencia; ignorar las integrales de ciertas interacciones; usar funciones básicas estándares, no optimizadas de órbitas de electrones, y usar parámetros derivados de experimentos. Los parámetros de experimentos eliminan la necesidad de calcular ciertas cantidades y corregir los errores resultantes de las aproximaciones.

El método semi-empírico AM1 es uno de los más exactos para moléculas orgánicas que proporciona HyperChem[®] v. 6.03.

VII. ANEXOS

Anexo 1. Compensación por caída óhmica y estudios cronoamperométricos de la 1, 4-benzoquinona

Para observar el efecto de la caída óhmica en el medio de trabajo utilizado se utiliza un estándar cuyo comportamiento electroquímico en medio acuoso sea conocido. Para este fin se utilizó a la 1, 4-benzoquinona (BQ), de la cual se sabe que en su electroreducción en medio acuoso se intercambian 2 electrones y que presenta un comportamiento reversible [48].

Las voltamperometrías cíclicas se realizaron a velocidades de barrido de 20, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 500, 750, 1000, 1500 y 2000 mV/s a cuatro diferentes concentraciones (0.11 mM, 0.58 mM, 1.15 mM y 2.27 mM) tal como se describe en la parte experimental.

En las figuras I, II y III se muestra la dependencia del potencial de pico catódico (E_{pc}), del potencial de pico anódico (E_{pa}) y del potencial formal condicional ($E^{\circ'}$) con respecto a la velocidad de barrido (v), respectivamente.

Si tomamos en cuenta que para un mecanismo electrónico reversible la diferencia entre el potencial de pico catódico y el potencial de pico anódico es igual a $0.057 V/n$, entonces la diferencia entre los potenciales de pico para este estándar debe ser de $0.0285 V$. Tal como se observa en las figuras I y II, se observa un desplazamiento del E_{pc} y del E_{pa} a medida que aumenta la velocidad de barrido y/o aumenta la concentración de la 1, 4-benzoquinona, aumentado por lo tanto la diferencia entre los potenciales de pico.

Para compensar este efecto de resistencia a la conducción electrónica debida al medio de trabajo se construyó una gráfica donde se representa la compensación por caída óhmica a cada concentración y velocidad de barrido estudiada (figura IV).

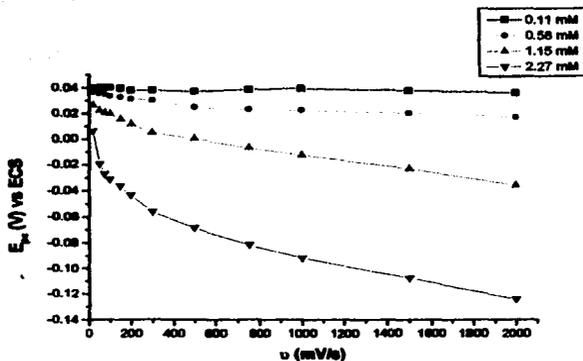


Figura I. Potencial de pico catódico (E_{pc}) para la reducción de la 1, 4-benzoquinona (amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.0 + 100 μ L de solución acuosa de trítón X 1:1000).
 E_T : HMDE; E_{mte} : Pt; E_{ref} : ECS; N_2 , 15 minutos.

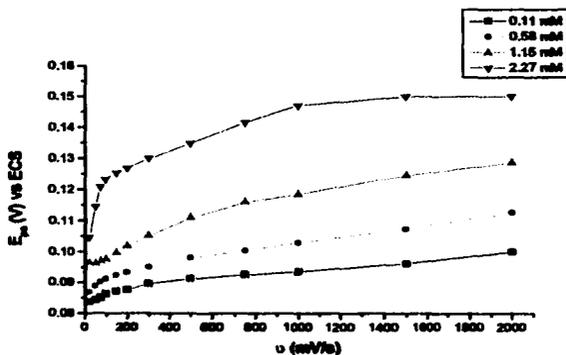


Figura II. Potencial de pico anódico (E_{pa}) para la reducción de la 1, 4-benzoquinona (amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.0 + 100 μ L de solución acuosa de trítón X 1:1000).
 E_T : HMDE; E_{mte} : Pt; E_{ref} : ECS; N_2 , 15 minutos.

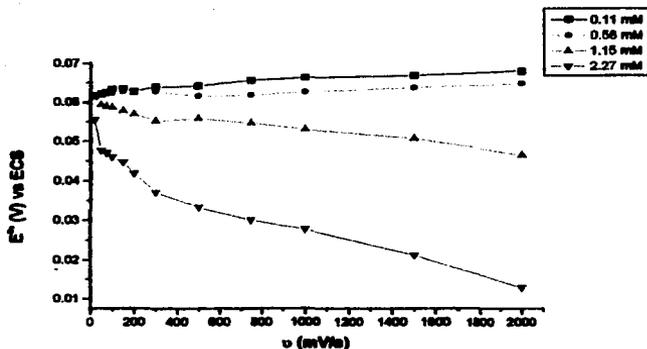


Figura III. Potencial formal condicional (E°) de la 1, 4-benzoquinona (amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.0 + 100 μ L de solución acuosa de tritón X 1:1000). E_T : HMDE; E_{max} : Pt; E_{ref} : ECS; N_2 , 15 minutos.

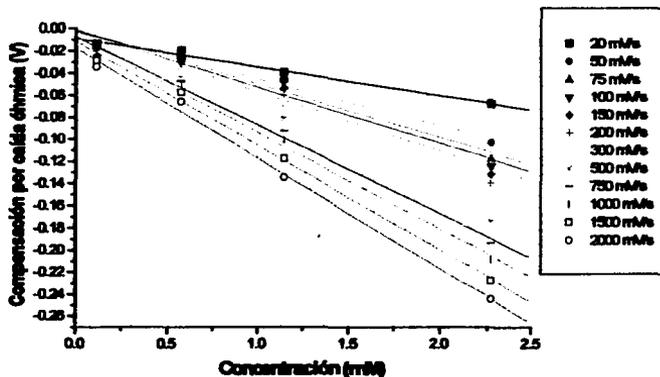


Figura IV. Efecto de la caída óhmica en función de la velocidad de barrido para la electroreducción de la 1, 4-benzoquinona (amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.0 + 100 μ L de solución acuosa de tritón X 1:1000). E_T : HMDE; E_{max} : Pt; E_{ref} : ECS; N_2 , 15 minutos.

Tabla I. Ecuaciones aplicadas para la compensación por caída óhmica.

v (mV/s)	Ecuación (y: compensación por caída óhmica en V; x: concentración del compuesto en mmol/L)	r^2
20	$y = -0.0087 - 0.0260 x$	0.9882
50	$y = -0.0025 - 0.0426 x$	0.9702
75	$y = -0.0008 - 0.0488 x$	0.9622
100	$y = -0.0013 - 0.0512 x$	0.9586
150	$y = -0.0024 - 0.0540 x$	0.9673
200	$y = -0.0029 - 0.0574 x$	0.9722
300	$y = -0.0046 - 0.0642 x$	0.9849
500	$y = -0.0076 - 0.0707 x$	0.9910
750	$y = -0.0070 - 0.0801 x$	0.9924
1000	$y = -0.0066 - 0.0871 x$	0.9948
1500	$y = -0.00108 - 0.0944 x$	0.9956
2000	$y = -0.00173 - 0.0997 x$	0.9882

Posterior a la determinación del potencial de pico catódico (E_{pc}) y del potencial de pico anódico (E_{pa}) de las quinonas naturales (I-XI), se compensó la caída óhmica de cada una de éstas a cada velocidad de barrido y a cada concentración estudiada utilizando las ecuaciones mostradas en la tabla I.

A continuación se procedió a la evaluación del número de electrones intercambiados en la electroreducción de la 1, 4-benzoquinona. En la figura V se muestra la curva I/E obtenida; con los datos de esta curva I/E es entonces posible evaluar el número de electrones intercambiados mediante la construcción de la curva $E = f(\log (I_a - I)/I)$.

De la pendiente de la curva $E = f(\log (I_a - I)/I)$ obtenemos un valor de 0.031 V y como la pendiente de esta curva es igual a $0.057 V/n$, entonces se obtiene que en la electroreducción de la 1, 4-benzoquinona se intercambian $1.84 e^- \approx 2 e^-$.

Posteriormente se evaluó la función $I_d = f(t^{-1/2})$ para este mismo compuesto. La función anterior se construyó a partir de un cronoamperograma con un programa de pulsos $E_0 = 0.005 V$, $E_1 = -0.120 V$ (figura VI).

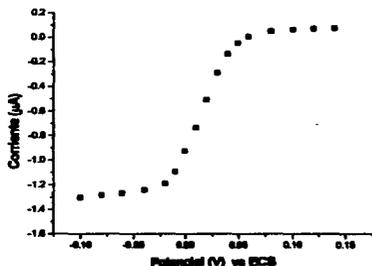
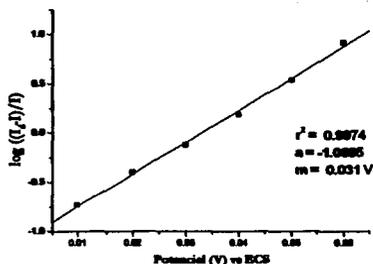
(A)**(B)**

Figura V. (A) Curva I/E de la 1, 4-benzoquinona 1.15 mM; $\tau = 15$ s. (B) Curva $E = f(\log(I_p - I)/I)$ para la 1, 4-benzoquinona 1.15 mM. $E_0 = 0.005$ V, $E_1 = -0.120$ V (amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.0 + 100 μ L de solución acuosa de tritón X 1:1000). E_T : HMDE; E_{max} : Pt; E_{ref} : ECS; N_2 , 15 minutos.

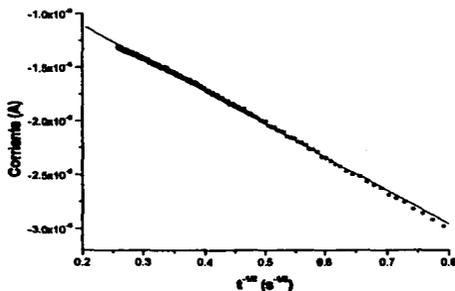


Figura VI. Curva $I_d = f(t^{-1/2})$ de la 1, 4-benzoquinona 1.15 mM; $E_0 = 0.005$ V, $E_1 = -0.120$ V. (amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.0 + 100 μ L de solución acuosa de tritón X 1:1000). E_T : HMDE; E_{max} : Pt; E_{ref} : ECS; N_2 , 15 minutos.

De la figura VI se determina una pendiente de Cottrell (s) para la 1, 4-benzoquinona de $3.25 \mu\text{A s}^{1/2}$ ($r^2 = 0.99$). En la tabla II se reportan los valores de $I_{lim(std)}$, C_{std} , s_{std} y n_{std} de la 1, 4-benzoquinona que se utilizaron para las determinaciones del número de electrones involucrados en la electroreducción de las quinonas naturales evaluadas (I-XI).

Tabla II. $I_{lim(std)}$, C_{std} , s_{std} y n_{std} del estándar interno (1, 4-benzoquinona).

$I_{lim(std)}$	-1.3 μA
C_{std}	1.15 mM
s_{std}	3.25 $\mu\text{A s}^{1/2}$
n_{std}	2 e^-

Anexo 2. Determinación del área del electrodo

El área del electrodo de trabajo que se determinó fue la del electrodo de mercurio de gota suspendida (Hanging Drop Mercury Electrode, HMDE). Este electrodo cuenta con gotas de tres diferentes tamaños: gota pequeña, gota mediana y gota grande.

El área del electrodo (en sus tres tamaños) se determinó por medio de cronocoulombimetría de pulso directo (CC) utilizando la 1, 4-benzoquinona (BQ) a cuatro diferentes concentraciones (0.23, 0.46, 0.69, 0.92 mM). El equipo y el procedimiento se describen en la parte experimental; se reporta el promedio de los experimentos a las cuatro diferentes concentraciones para cada tamaño de gota.

Después de la imposición de un programa de pulsos tal que se asegurara un régimen de difusión pura ($E_0 = 0.14$ V, $E_1 = -0.15$ V) se construyeron las curvas $Q = f(t^{1/2})$ (figura VII) para cada tamaño de gota y se determinó el área del electrodo en sus tres tamaños de acuerdo a la ecuación 8. En la tabla III se reportan las áreas del electrodo en sus tres tamaños con su intervalo de confianza correspondiente.

Con las áreas obtenidas, entonces es posible determinar el radio de cada una de las gotas de acuerdo con la fórmula del área de una esfera: $A = 4\pi r^2$.

Tabla III. Área y radio del electrodo de trabajo (HMDE) y su intervalo de confianza correspondiente.

Tamaño de gota	Área (cm ²)	Coefficiente de variación (%)	Radio (cm)
Chica	$8.26 \times 10^{-6} \pm 1.06 \times 10^{-6}$	3.48	8.11×10^{-4}
Mediana	$1.21 \times 10^{-5} \pm 2.24 \times 10^{-6}$	6.11	9.81×10^{-4}
Grande	$1.72 \times 10^{-5} \pm 1.68 \times 10^{-6}$	3.20	1.17×10^{-3}

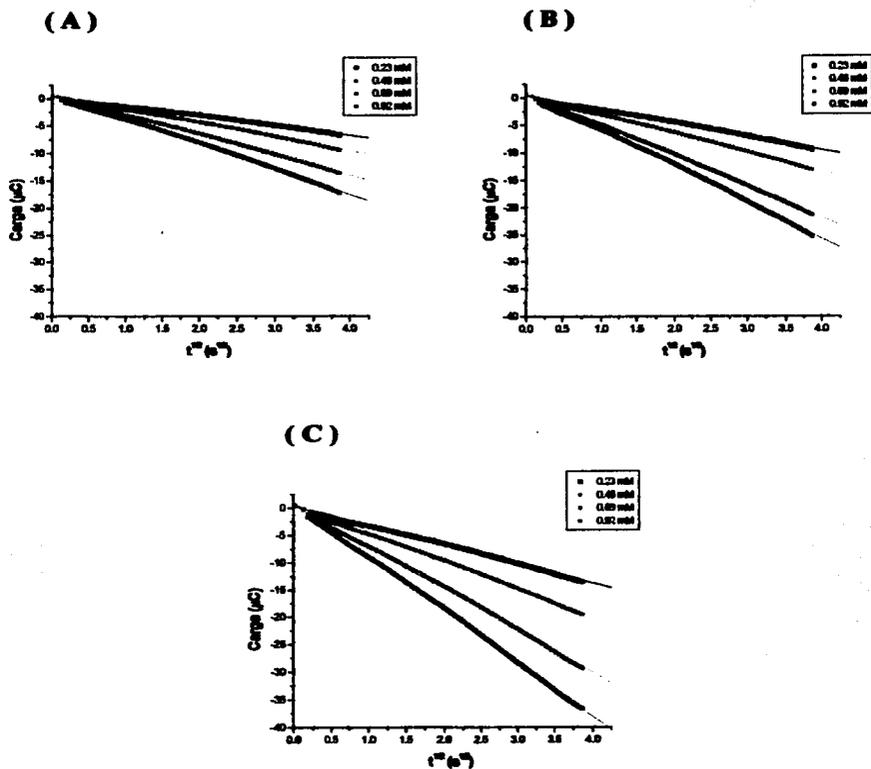


Figura VII. Curvas $Q = f(t^{1/2})$ para la determinación del área del electrodo de trabajo (HMDE). (A) Gota chica; (B) Gota mediana; (C) Gota grande. $E_0 = 0.14$ V, $E_1 = -0.15$ V. (amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.0 + 100 μ L de solución acuosa de triton X 1:1000). E_T : HMDE; E_{an} : Pt; E_{cat} : ECS; N_2 , 15 minutos.

Anexo 3. Resonancia Magnética ^1H y ^{13}C

6-metil, 3-O-metilperezona (II):

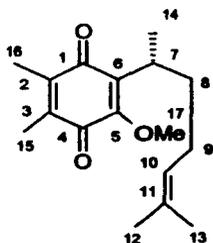


Tabla I. Datos espectrales de RMN ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75 MHz) del compuesto (II) (CDCl_3 , δ en ppm, valores de J en Hz).

	^1H	^{13}C
Me-2	1.99 (s)	
Me-3	1.99 (s)	
OMe-5	3.93 (s)	
H-7	3.10 (sxt, $J = 16.0$)	
Me-7	1.18 (d, $J = 17.0$)	
H-10	5.06 (t, $J = 11.7, 2.1$)	
H-12	1.53 (s) [§]	
H-13	1.64 (s) [§]	
C-1		183.94 (s) [§]
C-2		138.58 (s)
C-3		141.02 (s)
C-4		187.92 (s) [§]
C-5		155.80 (s)
C-6		136.50 (s)
C-7		29.99 (d)
C-8		34.81 (t)
C-9		26.83 (t)
C-10		131.39 (d)
C-11		124.55 (s)
C-12		18.99 (q)
C-13		25.63 (q)
C-14		17.61 (q)
C-15		11.81 (q)
C-16		12.54 (q)
C-17		60.84 (q)

[§] Los valores pueden ser intercambiables en cada columna.

Fruticulina A (VI):

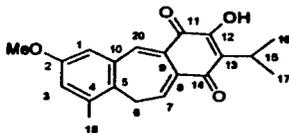


Tabla II. Datos espectrales de RMN ^1H (300 MHz) del compuesto (VI) (CDCl_3 , valores de J en Hz).

protón	δ (ppm)
H-1	6.63 (<i>d</i> , $J = 5.3$)
OMe-2	3.95 (<i>s</i>)
H-3	6.58 (<i>d</i> , $J = 5.3$)
Me-4	2.38 (<i>s</i>)
H-6	3.38 (<i>d</i> , $J = 5.3$)
H-7	6.67 (<i>t</i> , $J = 5.3$)
OH-12	7.54 (<i>s</i>)
H-15	3.28 (<i>spt</i> , $J = 14.5$)
Me-16	1.25 (<i>d</i> , $J = 5.3$) [†]
Me-17	1.25 (<i>d</i> , $J = 5.3$) [†]
H-20	7.58 (<i>s</i>)

[†] Señales superpuestas.

12-O-metil-desmetilfruticulina (VII):

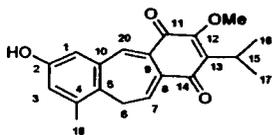


Tabla III. Datos espectrales de RMN ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75 MHz) del compuesto (VII) (CDCl_3 , J en Hz).

protón	δ (ppm)
H-1	6.66 (<i>d</i> , $J = 6.8$)
OH-2	
H-3	6.56 (<i>d</i> , $J = 5.8$)
Me-4	2.38 (<i>s</i>)
H-6	3.36 (<i>d</i> , $J = 4.7$)
H-7	7.53 (<i>t</i> , $J = 4.9$)
OMe-12	3.95 (<i>s</i>)
H-15	3.24 (<i>spt</i> , $J = 14.1$)
Me-16	1.25 (<i>d</i> , $J = 5.8$) [†]
Me-17	1.25 (<i>d</i> , $J = 5.8$) [†]
H-20	7.69 (<i>s</i>)

[†] Señales sobrelapadas.

III. REFERENCIAS

- [1] W. A. Cramer, D. B. Knaff, en: C.R. Cantor (Ed.), *Energy Transduction in Biological Membranes*, Springer-Verlag, New York, 1990 Ch. 4.
- [2] J. Q. Chambers, en: S. Patai, Z. Rappoport (Eds.), *The Chemistry of Quinonoid Compounds*, Vol. II, Wiley, New York, 1988 Ch. 12.
- [3] S. Wawzonek, R. Berkey, E. W. Blaha, M. E. Runner, *J. Electrochem. Soc.*, **103**, 456 (1956).
- [4] B. R. Eggins, J. Q. Chambers, *J. Electrochem. Soc.*, **117**, 186 (1970).
- [5] M. W. Lehmann, D. H. Evans, *J. Electroanal. Chem.*, **500**, 12 (2001).
- [6] A. Capon, R. Parsons, *J. Electroanal. Chem.*, **215**, 46 (1973).
- [7] L. Rodríguez-Hahn, B. Esquivel, A. Sánchez, C. Sánchez, J. Cárdenas, T. P. Ramamoorthy, *Rev. Latinoamer. Quím.*, **20**, 105 (1989).
- [8] L. Rodríguez-Hahn, B. Esquivel, C. Sánchez, J. Cárdenas, L. Estebanes, M. Soriano-García, R. Toscano, T. P. Ramamoorthy, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 5459 (1986).
- [9] K. S. Mukherjee, P. K. Ghosh, Badruddoza, *Phytochemistry*, **20**, 1441 (1981).
- [10] C. Sánchez, J. Cárdenas, L. Rodríguez-Hahn, T. P. Ramamoorthy, *Phytochemistry*, **28**, 1681 (1989).
- [11] J. G. Luis, L. San Andrés, W. Q. Fletcher, *Tetrahedron Letters*, **35**, 179 (1994).
- [12] A. Ulubelen, S. Öksüz, G. Topcu, A. C. Gören, W. Voelter, *J. Nat. Prod.*, **64**, 549 (2001).
- [13] N. L. Alvarenga, C. A. Velázquez, R. Gómez, N. J. Canela, I. L. Bazzocchi, E. A. Ferro, *J. Nat. Prod.*, **62**, 750 (1999).
- [14] M. Tada, K. Okuno, K. Chiba, E. Ohnishi, T. Yoshii, *Phytochemistry*, **35**, 539 (1994).
- [15] R. J. Driebergen, J. D. Hartigh, J. J. M. Hokhuis, A. Hulshoff, W. J. Van Oort, *Anal. Chim. Acta*, **233**, 251 (1990).

- [16] R. J. Dribergen, J. J. M. Holthuis, J. S. Blauw, S. J. Postma Kelder, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, W. E. Van der Linden, *Anal. Chim. Acta*, **234**, 285 (1990).
- [17] R. J. Dribergen, E. E. Moret, L. H. M. Janssen, J. S. Blauw, J. J. M. Holthuis, S. J. Postma Kelder, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, W. E. Van der Linden, *Anal. Chim. Acta*, **257**, 257 (1992).
- [18] E. E. Moret, M. de Boer, H. W. Hilbers, J. P. Tollensere, L. H. M. Janssen, J. J. M. Holthuis, R. J. Dribergen, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, *J. Med. Chem.*, **39**, 720 (1996).
- [19] I. Wilson, P. Wardman, T-S Lin, A. C. Sartorelli, *J. Med. Chem.*, **29**, 1381 (1986).
- [20] H. D. Beall, S. Winski, E. Swann, A. R. Hudnott, A. S. Cotterill, N. O'Sullivan, S. J. Green, R. Bien, D. Siegel, D. Ross, C. J. Moody, *J. Med. Chem.*, **41**, 4755 (1998).
- [21] M. C. Krishna, W. DeGraff, O.H. Hankovszky, C. P. Sár, T. Kálai, J. Jekő, A. Russo, J. B. Mitchell, K. Hideg, *J. Med. Chem.*, **41**, 3477 (1998).
- [22] N. Ito, S. Fukushima, A. Hasegawa, M. Shibata, T. Ogiso, *J. Natl. Cancer Inst.*, **70**, 343 (1983).
- [23] A. Bard, L. Faulkner. *Electrochemical Methods*. 4th ed. John Wiley & Sons, New York, 1980. (a) pp. 215; (b) pp. 138; (c) pp. 160; (d) pp. 290.
- [24] A. S. Baranski, W. R. Fawcett, C. M. Gilbert, *Anal. Chem.*, **57**, 166 (1985).
- [25] R. J. Smith, M. L. Zinder. Medicinal Garden. En *The National Herb Garden Guidebook*; Ober, R., Ed. The Herb Society of America, Inc. Springfield, VA, 1996, pp 61-71.
- [26] S. M. Kupchan, A. Karim, C. Marcks, *J. Org. Chem.*, **34**, 3912 (1969).
- [27] J. F. Téllez, K. Carvajal, D. Cruz, A. Cárabez, E. Chávez, *Life Sciences*, **65**, 1615 (1999).
- [28] L. De Zwart, J. H. N. Meerman, J. N. M. Commandeur, N. P. E. Vermeulen, *Free Radic. Biol. Med.*, **26**, 202 (1999).
- [29] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, C. E. Cross, *J. Lab. Clin. Med.*, **119**, 598 (1992).

- [30] M. R. Clemens, M. Ruess, Z. Bursa, H. D. Waller, *Free Radical Res. Commun.*, **3**, 265 (1987).
- [31] M. D. Scott, J. J. van den Berg, T. Repka, P. Rouyer-Fessard, R. P. Hebbel, Y. Beuzard, B. H. Lubin, *J. Clin. Invest.*, **91**, 1706 (1993).
- [32] S. Schmidtman, M. Muller, R. von Baehr, K. Precht, *Nephrol. Dial. Transplant*, **6**, 71 (1991).
- [33] S. K. Jain, P. Hochstein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 247 (1980).
- [34] D. Chiu, F. Kuypers, B. Lubin, *Semin. Hematol.*, **26**, 257 (1989).
- [35] R. P. Hebbel, A. Leung, N. Mohandas, *Blood*, **76**, 1015 (1990).
- [36] H. H. Draper, E. J. Hadley, *Meth. Enzymol.*, **186**, 421 (1990).
- [37] R. P. Bird, S. Silas, O. Hung, M. Hadley, H. H. Draper, *Anal. Biochem.*, **128**, 240 (1983).
- [38] J. A. Buege, S. D. Aust, *Meth. Enzymol.*, **52**, 302 (1978).
- [39] Y. S. Velioglu; G. Mazza; L. Gao; B. D. Oomah, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4113 (1998).
- [40] R. A. Larson, *Phytochemistry*, **27**, 969 (1988).
- [41] F. Shahidi, P. K. Janitha, P. D. Wanasundara, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **32**, 67 (1992).
- [42] *J. Electroanal. Chem*, **27**, 431 (1970).
- [43] B.A. Frontana, J. Cárdenas, L. Rodríguez-Hahn, A. Baeza, *Tetrahedron*, **53**, 469 (1997).
- [44] M. Wang et al., *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4869 (1998).
- [45] J. H. Chen, C. T. Hon, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2374 (1997).
- [46] O. Cuesta-Rubio, B.A. Frontana-Urbe, T. Ramírez-Apan, J. Cárdenas. *Z. Naturforsch*, **57c**, 372 (2002).
- [47] <http://www.nkreg.com>
- [48] P.J. Elving, Leone J.T, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1021 (1958).