



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**SÍNTESIS DE CURCUMINOIDES
Y ESTUDIO DE REACTIVIDAD FRENTE AL RADICAL SUPERÓXIDO VÍA
VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA**

TESIS

**PARA OPTAR POR EL GRADO
DE**

**DOCTOR EN
CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. FERNANDO BELMONT BERNAL

**TUTORA: DRA. PATRICIA GUADARRAMA
ACOSTA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
MATERIALES**

México D.F. 2016



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**SÍNTESIS DE CURCUMINOIDES Y ESTUDIO DE
REACTIVIDAD FRENTE AL RADICAL SUPERÓXIDO VÍA
VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA Y EVALUACIÓN
BIOLÓGICA**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. FERNANDO BELMONT BERNAL

**TUTORA: DRA. PATRICIA GUADARRAMA
ACOSTA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES**



México, D. F.

2016

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: DR. RAUL GUILLERMO ENRIQUEZ HABIB
VOCAL: DR. EDUARDO GUILLERMO DELGADO LAMAS
VOCAL: DR. BERNARDO ANTONIO FRONTANA URIBE
VOCAL : DR. JULIO CESAR AGUILAR CORDERO
SECRETARIO: DR. VICTOR MANUEL UGALDE SALDIVAR

SITIO DONDE SE REALIZÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES UNAM.

ASESORA:

DRA. PATRICIA GUADARRAMA ACOSTA

ALUMNO

M. EN C. FERNANDO BELMONT BERNAL

Agradecimientos:

- AL CONACyT por la beca otorgada para llevar a cabo la realización de este proyecto (becario No. 235627).
- A la Dra. Patricia Guadarrama Acosta por su valiosa tutoría así como por depositar su confianza en mí.
- A la UNAM y al IIM por las instalaciones y el apoyo otorgado para la generación de este trabajo.
- Al Comité Tutor integrado por la Dra. Pilar Carreón Castro y el Dr. Norberto Farfán García por sus valiosas observaciones y recomendaciones.
- Al Dr. Raúl Henríquez Habib por su incondicional apoyo en el desarrollo y conclusión de este proyecto.
- A la Dra. Irma Gabriela González Herrera por realizar las pruebas biológicas que determinaron el rumbo de este trabajo.
- Al Dr. Julio César Aguilar Cordero por su apoyo en la adquisición de los experimentos de Voltamperometría cíclica.
- Al jurado integrado por: Dr. Raúl Henríquez Habib, Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas, Dr. Bernardo Antonio Frontana Uribe, Dr. Julio César Aguilar Cordero, Dr. Víctor Manuel Ugalde Saldívar.
- A la Q. Ma. De los Ángeles Peña González y a la M. en C. Elizabeth Huerta Salazar por su apoyo en este trabajo.
- A la Dra. Rocío G. de la Torre Sánchez por su apoyo en la publicación de la patente.
- Al Ing. Gerardo Cedillo Valverde y al Ing. Caín González Sánchez por su asesoría técnica.
- A todo el equipo de trabajo del laboratorio E-105 del Departamento de Polímeros del IIM mi más grande reconocimiento y agradecimiento.

Dedicatorias:

Para Fernando, Lupita y Esteban

Culminar con este trabajo implica agradecer a un gran número de personas que siempre confiaron en mí y nunca me dejaron claudicar ni dudar de mí mismo.

Primero a mis padres y mi hermano, también a mis tíos Aurora y Bertín Cervantes y a mi prima Karina Cervantes por su apoyo y ejemplo. A mi primo Gustavo Armando De La Cerda y a mi abuelo Ricardo Belmont, pero la familia no queda solo ahí. Helio Flores, Rogiero Silva y Adrián Vázquez son hermanos que no comparten sangre, pero sí muchas aventuras, risas, pláticas y kilómetros recorridos. En el camino me encontré a Agustín Contreras y Ale Miñón quienes siempre apoyan con ingenio y humor los buenos y malos momentos. Gracias a Gerardo Moreno y Aimeé Mauries que han sido compañeros de viaje.

La familia crece y también están Liz O'Reilly, Helio Patrick Flores O'Reilly y André Silva, espero que lleguen cada vez más integrantes nuevos.

Conocí a grandes colegas y compañeros como Armando Ramírez, Héctor Zavala, Adrián Sánchez, Norma Castillo, Eduardo Mendoza y Marco Almarás (LAB107), les deseo lo mejor. Al Dr. Vázquez le agradezco la lección más importante, en mi queda la decisión de superar las limitaciones impuestas por los demás. Al leer "El Libro Completo de las Leyes de Murphy" encontré una ley máxima de la ironía: "la mediocridad imita"; aprendí a no imitar.

Al Dr. Helio Flores Ramírez†, la Dra. Elvira Santos Santos y al Dr. Eugene Bratoeff† les agradezco todo lo que me han enseñado, los mejores mentores que cualquier científico pudiera desear.

Fue divertido pasar tiempo en el E105, Gabriel Vera, Luis López y Jonathan Cruz todos grandes químicos. Víctor Apolonio aprendió mucho y Felicia Flores terminó satisfactoriamente su maestría. A mi gran amigo Dr. Martín Landeros, le agradezco el ejemplo y de perseverancia en la carrera por obtener el grado.

Gracias a la Dra. Patricia Guadarrama por la oportunidad que me concedió para realizar mi doctorado con un ejemplo de libertad de pensamiento y responsabilidad. Gracias al Dr. Raúl Enríquez Habib por su apoyo incondicional para la culminación de este proyecto. Quiero expresar que necesitamos investigadores como ellos en esta universidad

Quedan muchas cosas por completar y mucho por aprender pero me siento satisfecho de concluir esta etapa tan importante en mi vida.

Siendo así disfruto este logro que en la raíz fue mi gran aventura, y que sin importar los obstáculos, concluyó en tiempo y forma gracias a la dedicación y esfuerzo de mi tutora y de un servidor.

Mi misión en la vida es transmitir este aprendizaje a los que vienen atrás de mí.

Además, de que disfruto demasiado lo que hago.

"Por mi raza, hablará el espíritu"

Difusión de los resultados del proyecto

- Registro ante el IMPI de la patente “Síntesis de un conjugado dendrón-curcumina que permite la solubilización de la curcumina en agua, sin perder su actividad antioxidante”.
- Presentación del proyecto en el congreso QuimiUNAM 2015 con el título “Curcumin Derivatives with enhanced water solubility, antioxidant power and anti-tumor activity”.
- Presentación del trabajo “Dendronization as strategy to improve solubility and bioavailability of bioactive molecules. Curcumin as case of study.” En el simposio de Biomaterials for Medical Applications presentado en el XXIII International Materials Research Congress 2014.
- Presentación del trabajo “Synthetic strategies to improve water solubility of bioactive molecules. Curcumin as case of study” en International Conference on Polymers and Advanced Materials POLYMAT-2015.
- Presentación del trabajo “Curcuminoids synthesis and study of reactivity towards superoxide radical via cyclic voltammetry” en International Conference on Polymers and Advanced Materials POLYMAT-2015.
- Presentación de los avances de este proyecto en el XXXVI Congreso Nacional de Farmacología 2014.

Contenido

1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1 Especies reactivas de oxígeno y radicales libres (ERO)	4
2.2 Radical superóxido y voltamperometría cíclica	9
2.3 Curcumina: generalidades y actividad antioxidante	15
2.4 Terapia macromolecular (TM)	28
2.5 Materiales dendriméricos sobresalientes en aplicaciones biomédicas	30
2.6 Esterificación de Steglich	33
3. Hipótesis	36
4. Objetivos	36
4.1 Objetivo general del proyecto	36
4.2 Objetivos particulares	36
5. Desarrollo Experimental	37
5.1 Estrategia sintética	38
5.1.1 Esterificación de Steglich (procedimiento general)	38
5.1.2 Desprotección (procedimiento general)	38
5.1.3 Esterificación con anhídrido glutárico (procedimiento general)	38
5.1.4 Hidrólisis de la piperina	39
5.2 Espectroscopía UV-Vis	41
5.3 Voltamperometría cíclica	41
5.4 Pruebas Biológicas	41
5.4.1 Determinación del poder antioxidante determinado por el método FRAP (capacidad del plasma para la reducción del hierro).....	41
5.4.2 Cultivo celular de Glioblastoma de Rata tipo C6.....	42
5.4.3 Captación Celular	42
5.5 Procedimientos de síntesis	43
6. Análisis y discusión de resultados	57

6.1 Síntesis de curcuminoides derivados de dendrones de bis-mpa y anhídrido glutárico.	57
6.2 Voltamperometría cíclica	63
6.3 Análisis de $i_p(O_2/O_2^{\bullet-})$ vs. Concentración de curcuminoides	69
6.3.1 Análisis de $i_p(O_2/O_2^{\bullet-})$ vs. Concentración de curcuminoides de acuerdo al número de sustituciones de dendrones de primera generación (Tabla 2).....	70
6.3.2 Análisis de $i_p(O_2/O_2^{\bullet-})$ vs. Concentración de curcuminoides de acuerdo a la generación de dendrones (primera y segunda generación) di sustituidos en la curcumina (Tabla 5).....	74
6.3.3 Análisis de $i_p(O_2/O_2^{\bullet-})$ vs. Concentración de curcuminoides de acuerdo al número de sustituyentes y a la acidez de los grupos funcionales (Tabla 8).....	77
6.3.4 Análisis de $i_p(O_2/O_2^{\bullet-})$ vs. Concentración de curcumina, ácido ferúlico y ácido succínico, comparación entre a la acidez y características estructurales (Tabla 11)	79
6.3.5 Análisis de $i_p(O_2/O_2^{\bullet-})$ vs. Concentración de curcumina, piperina y ácido pipérico, para corroborar su potencial actividad antioxidante (Tabla 14).....	82
6.4 Porcentaje de captura de radicales libres	85
6.5 Pruebas de solubilidad en agua	87
6.6 Pruebas biológicas <i>in vitro</i>	90
6.6.1 Determinación de la actividad antioxidante en agua por medio del ensayo de FRAP (Ferric Reduction Ability of Plasma)	90
6.6.2 Comparación del valor de FRAP como función dependiente de la concentración	91
6.6.3 Pruebas de captación celular	92
6.6.4 Viabilidad celular	93
7. Conclusiones	95
8. Trabajos de publicación y difusión de éste proyecto	95
9. Anexo de espectroscopia y espectrometría	97
10. Anexo de voltamperometría	148
11. Datos numéricos normalizados de los compuestos más importantes para el análisis de resultados en voltamperometría cíclica.	155
12. Declaración de uso de imágenes	158

1. Introducción

Durante los últimos años, la investigación de enfermedades degenerativas en las células, tejidos y órganos en seres humanos ha tomado un rumbo muy particular, dirigido al estudio del daño que los radicales libres generan al organismo.

Particularmente los radicales libres conocidos como especies reactivas de oxígeno (por sus siglas ERO) son moléculas altamente reactivas que generan oxidaciones en la estructura química de los organelos celulares. Si bien estas especies pueden generarse de manera natural a consecuencia del metabolismo celular, una sobreexposición a estos radicales de manera crónica, puede sobrepasar la respuesta de los mecanismos naturales de defensa que posee la célula para dicha agresión.

Actualmente el estilo de vida moderno, la obesidad, el sedentarismo, las actividades industriales humanas, la radiación natural del sol y malos hábitos como el tabaquismo, e incluso la herencia genética son factores que, junto con la agresión de las ERO, pueden incidir en padecimientos que están catalogados como los retos clínicos del siglo XXI. Por nombrar unos ejemplos tenemos: la diabetes, el cáncer y la enfermedad de Alzheimer.

De las ERO, el radical superóxido es por mucho el más importante y el que representa más riesgo para los seres vivos, ya que posee un tiempo de vida media muy prolongado, lo que le permite dañar a la célula por periodos más extendidos y a mayores distancias fuera de la mitocondria. Es el primer ERO generado por la acción oxidante del oxígeno elemental y por lo tanto, se encuentra en diferentes etapas de la actividad química celular, así como también dentro de otros procesos celulares localizados en la mitocondria. De hecho, el radical superóxido es el iniciador para formar al resto de ERO.

Los compuestos antagonistas a los radicales libres, que pueden proteger a las células de los efectos dañinos de las ERO como el radical superóxido, son aquellos conocidos como antioxidantes, tales como resveratrol, trólox y vitamina E, entre muchos otros. En los últimos años, un metabolito secundario de la planta *Curcuma longa*, ha adquirido interés por su versatilidad biológica. Nombrada a partir de la planta de origen, la *curcumina* es un metabolito secundario que posee cualidades antioxidantes, antiparasitarias y antiinflamatorias de interés clínico. Sin embargo, posee una baja biodisponibilidad dado que su solubilidad en agua es marginal.

En este estudio se presentan los métodos para sintetizar 9 moléculas derivadas de la curcumina (curcuminoides); 7 de ellas no reportadas en la literatura, así como su interacción con el radical superóxido vía voltamperometría cíclica. Los resultados arrojan evidencias de actividad antioxidante para casi la totalidad de las moléculas estudiadas, con diferencias interesantes en su mecanismo de acción para capturar al radical superóxido, así como en la eficiencia con la que lo neutralizan.

De todos estos compuestos, uno de ellos (etiquetado como CurcDiSust.-D2G-OH) posee el balance hidrofóbico-hidrofílico para actuar como prototipo farmacéutico ya que su solubilidad aumenta la biodisponibilidad de la curcumina. Este compuesto, posee una eficiencia superior a la curcumina para capturar al radical superóxido mediante un mecanismo de reacción no esperado, en comparación con la curcumina misma.

Esta solubilidad en agua fue documentada mediante técnicas de absorción de UV-Vis para después ser evaluada mediante técnicas de FRAP (por sus siglas en inglés *Ferric Reduction Ability of Plasma*, que traducido significa *habilidad de reducción de hierro en plasma*), pruebas de capacidad total antioxidante (CTA), pruebas *in vitro* de captación celular y pruebas de viabilidad celular.

En el caso de las pruebas de FRAP, el compuesto CurcDiSust.-D2G-OH exhibe actividad antioxidante proporcionalmente superior a la curcumina en medios acuosos. En las pruebas de CTA se confirma que existe una dependencia de la concentración para mantener dicha actividad.

Adicionalmente, en las pruebas de captación celular se observa que el compuesto CurcDiSust.-D2G-OH penetra a la célula con perfiles y niveles de saturación distintos a la curcumina, esto sugiere un mecanismo de acción diferente. En pruebas de citotoxicidad, este nuevo compuesto exhibió resultados positivos al disminuir la proliferación celular de células cancerígenas de glioblastoma de rata de tipo C6.

Se concluye de manera general que modificar la estructura de la curcumina de la forma en que se realizó durante este trabajo, no disminuye su actividad biológica, y de hecho en algunos casos esta actividad se ve aumentada.

Abstract

In recent years, the research aimed at degenerative diseases in human organs has taken a particular direction to study the damage that free radicals cause to the body.

Particularly, reactive oxygen species (by its acronym ROS) are highly reactive chemical species generated by oxidation in the cellular organelles. Even though these species can be generated naturally as a result of cellular metabolism, chronically overexposure to these radicals may exceed the natural defense mechanisms that the cell owns to respond to such aggression.

Currently modern lifestyle, obesity due to sedentarity and even genetics are factors, along with the aggression of ROS, which can trigger diseases (as diabetes, cancer and Alzheimer's disease, among others) that could be classified as clinical challenges of the XXI century. In addition to these factors, human industrial activities, natural sunlight and bad habits such as smoking generate overexposure to free radicals.

Among ROS, the superoxide radical is by far the most important due to the risk it represents for human beings. Its dangerousness lies in having a very long lifetime, allowing cell damage for more extended periods and at greater distances. The superoxide radical is the first ROS generated by the oxidizing action of elemental oxygen, and is responsible for the formation of all other ROS.

Antagonist compounds to free radicals, that can protect cells from the damaging effects of ROS like superoxide radical, are those known as antioxidants, i.e. resveratrol, Trolox and vitamin E, among others. In recent years, a secondary metabolite of the plant *Curcuma longa*, has gained much interest because of their biological versatility. Named from plant origin, *curcumin* is a secondary metabolite that has antioxidant qualities, as well as antiparasitic and anti-inflammatory activity, which are of clinical interest; however it exhibits low bioavailability due to its marginal solubility in water.

In the present investigation, nine molecules derived from Curcumin (curcuminoids) were synthesized, and their interaction with superoxide radical was studied via cyclic voltammetry. The results show evidence of antioxidant activity of almost all the molecules studied, with marked differences in their mechanisms of action to scavenge the superoxide radical, as well as the efficiency to neutralize it.

Of these compounds, one of them (labeled as CurcDiSust.-D2G-OH) with adequate hydrophilic-hydrophobic balance, has the potential to act as a water-soluble pharmaceutical prototype, since it has a higher efficiency in scavenging the superoxide radical by an unexpected reaction mechanism, compared to curcumin itself.

The water solubility of CurcDiSust.-D2G-OH was documented by UV-Vis absorption techniques and then evaluated by FRAP method (for its acronym Ferric Reduction Ability of Plasma), Total Antioxidant Capacity tests (TAC), cellular uptake and cell viability assays *in vitro*.

From FRAP results, CurcDiSust.-D2G-OH exhibits an antioxidant activity proportionally higher than curcumin in aqueous media. The TAC assay confirmed that there is a concentration dependence to maintain this activity.

Additionally, cellular uptake assay shows that compound CurcDiSust.-D2G-OH penetrates into the cell with different profiles and levels of saturation than curcumin, suggesting a different action mechanism. In cytotoxicity assays, the new compound exhibited positive results in decreasing cell proliferation of cancer cells of glioblastoma C6 rat type.

We can conclude that altering the structure of curcumin in the way it was conducted here does not diminish its antioxidant activity; on the contrary, it seems to be increased.

2. Antecedentes

2.1 Especies reactivas de oxígeno y radicales libres (ERO).

En años recientes, los avances en bioquímica han hecho posible reconocer la sensibilidad del ambiente celular a la presencia de radicales libres. Particularmente aquellos radicales conocidos como especies reactivas de oxígeno (por sus siglas ERO), que incluyen al radical superóxido, al radical hidroperoxilo, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilos¹. Todos ellos han sido relacionados con el llamado estrés oxidativo (desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de reparar el daño resultante en las estructuras biológicas), que está frecuentemente asociado a un daño en células, tejidos y órganos, no obstante que estas mismas especies reactivas participen de forma activa en la fisiología celular, incluyendo procesos de señalización así como otras funciones importantes².

El hecho innegable es que el exceso de radicales libres en organismos vivos está implicado en la patogénesis de más de 100 enfermedades, incluyendo arterosclerosis, cáncer, diabetes, enfermedad de Alzheimer, artritis reumatoide y síndrome de colon irritable³. El radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) es el más importante de todas las ERO ya que posee una vida media mayor al resto de los radicales y por lo tanto puede recorrer distancias mayores en la célula⁴, actuando también como un iniciador a otras formas de radicales igualmente dañinas, a través de la reacción de Haber-Weiss⁵. El radical superóxido es de naturaleza nociva y posee la habilidad de reaccionar con diferentes compuestos orgánicos por sus características redox. Su implicación en el estrés oxidativo de la célula está bien documentada⁶.

Este tipo de estrés ocurre cuando los mecanismos naturales para la eliminación de radicales libres, como lo son las ERO, sufren una falla o bien, se ven sobrepasados en su eficiencia por factores ajenos al organismo, como pueden ser los ambientales. Las actividades humanas tales como la contaminación ambiental y hábitos dañinos a la salud como el tabaquismo son un elemento importante a considerar en la exposición crónica a las ERO. La figura 1 muestra algunos ejemplos⁷.

¹ Biswas S. ; Chida A.S. ; Rahman I. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, 71(5), pp. 551-564.

² Poli G. ; Leonarduzzi G. ; Biasi F ; Chiarpotto E. *Curr Med. Chem.* **2004**, 11(9), pp. 1163-1182.

³ K. Radha J. *Ethnopharmacol.* **1994**, 42, pp. 88-89.

⁴ Martha K. C. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2004**, 24(1), pp.23-28.

⁵ James P. K. ; *Toxicology* **2000**, 149, pp. 43-50.

⁶ Mohammad M. ; Khan A. Y. ; Subhani M.S. ; Bibi N. ; Ahmed S. ; Saleemi S. *Resear. Chem. Interm.* **2001**, 27, pp. 259–267.

⁷ Yu Z.W. *World Diabetes* **2012**, 3(1), pp. 19-28.

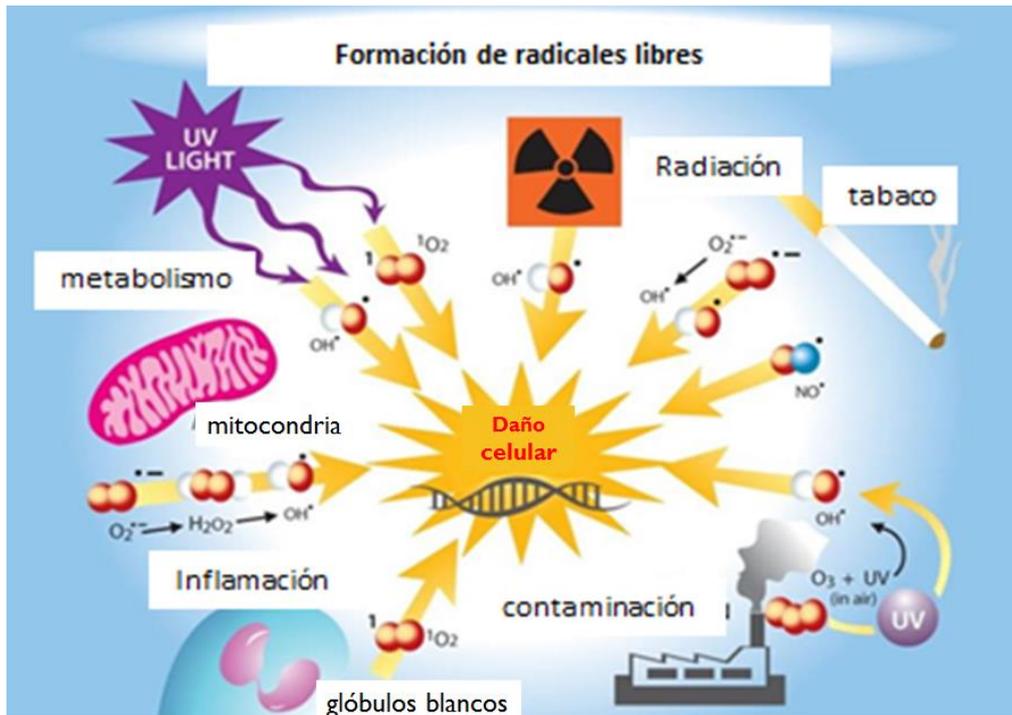


Figura 1.
Factores que promueven la generación de radicales libres⁹.

Aunque no son totalmente claros los mecanismos que llevan a la sobreproducción de ERO, hay evidencias que confirman la existencia de sistemas defensivos de la célula para contrarrestarlos⁸. El sistema regulado por el factor de transcripción Nrf2 (*Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-like 2*) se describió originalmente como una de las defensas antioxidantes más importantes de las células. La función de este sistema ahora es conocida como una respuesta metabólica antioxidante⁹.

El sistema Nrf2 se une a una secuencia nucleotídica llamada *Antioxidant Response Element* (por sus siglas en inglés ARE), en la región promotora de genes que codifican a las enzimas antioxidantes, las cuales incluyen a la Heme oxigenasa-1 (HO-1), la superóxido dismutasa (SOD), la sequestosoma-1, NAD(P)H quinona oxidoreductasa-1 (NAD(P)QO:1), Glutatión peroxidasa (GPS), Glutatión S-Transferasa (GST), y Glutamato-Cisteína Ligasa (GCL) entre otras¹⁰.

De acuerdo con la literatura, existe información sobre la activación del sistema Nrf2 con agentes terapéuticos naturales como el resveratrol, la 3-galato-epigallocatequina y la curcumina. Estos metabolitos son reconocidos como agentes sensibilizadores que protegen a

⁸ Bo Chen. B. ; Lu Y. ; Chen Y. Cheng J. *J Endocrinol*, **2015**, 225, pp. 83-89.

⁹ Hybertson B. M. ; Gao B. ; Bose S. K. McCord, J. M. *Mol. Aspects of Medicine* **2011**, 32, pp. 234-246. <https://blogs.brandeis.edu/flyonthewall/breaking-research-fruit-flies-provide-insights-into-metabolism-and-how-we-age/>.

¹⁰ Zhang Y. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, 4-3 (7), pp. 885-893.

la célula de ser atacada por las ERO¹¹; siendo la curcumina el compuesto de mayor interés en nuestro proyecto.

El oxígeno es uno de los elementos que, junto con el carbón, compone uno de los bloques primordiales para la continuidad de la vida en la tierra. En nuestro planeta está presente en la atmósfera (21 %), en el agua (89 %) y en los silicatos (49 %). Su obtención fue descrita por C. W. Scheele en 1773 al calentar KNO₃ sobre ácido sulfúrico, pero fue reportado hasta 1777¹².

El oxígeno es esencial para la vida, ya que participa de manera activa y constante en la cadena de fosforilación oxidativa para la síntesis de ATP. De forma natural se en su forma di atómica en la atmósfera de la tierra como "O₂" (ya sea como singulete o triplete) o bien en su forma triatómica "O₃" y llamarse ozono. Cualquiera que sea su fórmula mínima, tiene la capacidad de ser altamente reactivo, principalmente como una sustancia con gran disposición de adquirir electrones; es decir un agente oxidante.

El O₂ en el estado excitado denominado como "singulete" presenta una alta reactividad, y se refiere a él como radical di atómico¹³. A diferencia del estado "triplete", en este estado el oxígeno presenta dos electrones de valencia apareados con un orbital de anti-enlace desocupado (figura 2).

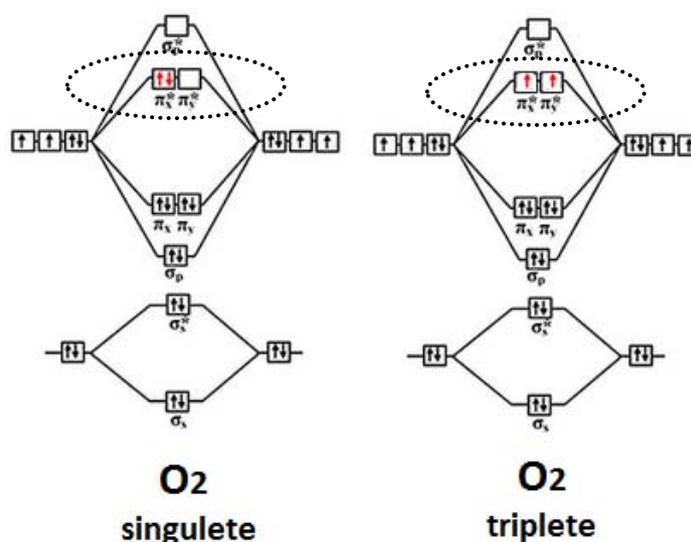


Figura 2.

Diferencia en el diagrama de energías para los orbitales moleculares de oxígeno en dos estados diferentes: "singulete" (estado excitado) y "triplete" (estado basal). Para lograr esta transición energética de triplete a singulete es necesario irradiar luz en la disolución (22 Kcal/mol) con la ayuda de un fotosensibilizador como el azul de metileno.

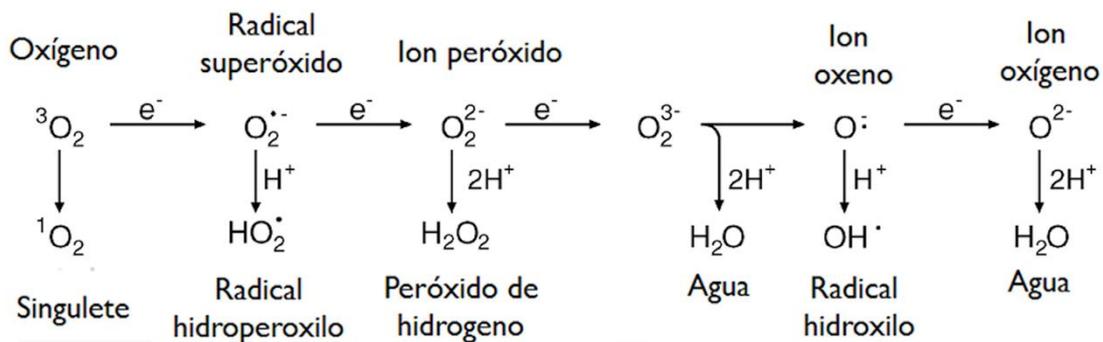
¹¹ Anderson R.A. & Polansky M.M. *J Agric Food Chem.* **2002**, *50*, pp. 7182–7186. Baur J.A. ; Pearson K.J. ; Price N.L. ; Jamieson H.A. ; Lerin C. ; Kalra A. ; Prabhu V.V. ; Allard J.S. ; Lopez Lluich G. ; Lewis K. ; *Nature* **2006**, *444*, pp. 337–342. Kang E.S.; Woo I.S. ; Kim H.J. ; Eun S.Y. ; Paek K.S. ; Kim H.J. ; Chang K.C. ; Lee J.H. ; Lee H.T. ; Kim J.H. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *43*, pp. 535–545. Balogun E. ; Hoque M. ; Gong P. ; Killeen E. ; Green C.J. ; Foresti R. ; Alam J. ; Motterlini R. *Biochem. J.* **2003**, *371*, pp. 887–895. McNally S.J. ; Harrison E.M. ; Ross J.A. ; Garden O.J. *Int. J. Mol. Med.* **2007**, *19*, pp. 165–172. Aggarwal B.B. *Annu. Rev. Nutr.* **2010**, *30*, pp. 173–199.

¹² Cooper P.D. *J. of Chem. Ed.* **2012**, *89* (2), pp. 181-182.

¹³ Apel K. & Heribert H. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2004**, *55*, pp. 373–99. Clennan E. L. *Tetrahedron* **2000**, *56*, pp. 9151-79. Prein M. & Adam W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, pp. 477-94.

Sin embargo, existe una restricción para la reactividad de esta especie y es que solamente puede reaccionar con electrones que se encuentren desapareados y con espines paralelos, lo que limita la interacción con muchas moléculas orgánicas convencionales¹⁴. No obstante, puede existir transferencia electrónica o energética para así transformar la molécula de oxígeno en las muy reactivas ERO, que son mucho más propensas a reaccionar con el medio ambiente, o con un mayor número de moléculas que puedan funcionar como donadores de electrones.

Apel y Heribert representan esquemáticamente las transformaciones que sufre el oxígeno para formar las ERO (esquema 1)¹³.



Esquema 1. Génesis de las diferentes especies de ERO.¹³

Cómo se puede observar el radical superóxido es el primero en formarse de una serie de ERO's que provocan daños a la estructura interna de la célula.

Estas especies pueden formarse dentro de la célula por acciones metabólicas, y neutralizadas de forma natural. Como se puede observar, estas son especies químicas que pueden actuar como radicales libres, y por lo tanto como agentes oxidantes, así como también ser bases de Brönsted que acepten protones. Es decir, pueden reaccionar de varias formas, y de manera muy agresiva para un organismo vivo.

Se ha encontrado que estas especies se forman en la mitocondria durante la transferencia electrónica de la respiración aeróbica, y tienen una participación en algunos procesos de señalización en eventos como la apoptosis, expresión de genes y la activación de procesos en cascada más complicados, y como comunicadores inter celulares¹⁵.

El daño que estos radicales puede causar es variado; sin embargo, uno es particularmente importante: la peroxidación lipídica, que puede desencadenar una degradación significativa de la pared celular, comprometiendo la selectividad de interacción entre el interior de la célula y el exterior. Las reacciones ocurren típicamente en cadena donde un radical libre captura un átomo de hidrógeno a partir de un carbón insaturado para formar agua. Esto deja un electrón desapareado en el ácido graso, que es entonces capaz de capturar una molécula de oxígeno en forma de triplete, formando así un radical peróxido. Los peróxidos de lípidos son inestables y se descomponen para formar una serie compleja de compuestos, que a su vez continuarán reaccionando y degradando la pared celular.

¹⁴ Cadenas E. *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, 58, pp. 79–110.

¹⁵ Hancock J.T. ; Desikan R. ; Neill S.J. *Biochem Soc Trans.* **2001**, 29(2), pp. 345-350.

Descripción de las ERO más reconocidas

Radical superóxido: Es una forma reducida de oxígeno molecular, formado por la recepción de un electrón durante el transporte de electrones en los sistemas mitocondriales. Las mitocondrias generan energía usando 4 reacciones en cadena para reducir el oxígeno a una molécula de agua. Algunos de estos electrones interactúan con oxígeno y forman aniones superóxido.¹⁶ También juega un papel importante en la formación de otras ERO, ya que es aquel que inicia la cadena en la formación del resto de los radicales. El radical superóxido puede reaccionar con óxido nítrico para formar peroxinitrito (ONOO⁻), precursor de compuestos altamente tóxicos¹⁷.

Radical hidroxilo: Es el más reactivo de las ERO; puede ser formado a partir del anión superóxido o del peróxido de hidrógeno en presencia de iones metálicos. El radical hidroxilo tiene el potencial de reducción más positivo (2.31 mV) y pueden reaccionar con constantes de velocidad de segundo orden, y con tiempos prolongados de vida media (10^{-10} segundos). Los radicales hidroxilo pueden reaccionar con lípidos, polipéptidos, proteínas y ADN; especialmente con el amino ácido tiamina, y así dañar severamente el metabolismo mitocondrial, o del núcleo¹⁸.

Peróxido de hidrógeno: Se genera principalmente a través del anión superóxido y la superóxido dismutasa, aunque enzimas tales como aminoácido oxidasa y xantina oxidasa también pueden producirlo a partir del mismo anión. Es altamente permeable y cruza la membrana plasmática fácilmente, lo que le permite interactuar en la maquinaria celular, o interferir de manera negativa en la señalización metabólica de la célula. El peróxido de hidrógeno es la molécula menos reactiva entre las ERO, y es estable bajo temperatura y pH fisiológicos. Puede generar un radical hidroxilo en presencia de iones metálicos presentes en el medio celular, así como producir oxígeno en forma de singulete con cloroaminas presentes en los sistemas vivos. También puede degradar ciertas proteínas sanguíneas, siendo la más importante la hemoglobina y, como consecuencia, liberar cationes de hierro creando un desbalance metabólico de este ion, así como un problema serio en el transporte de oxígeno molecular. Esta reacción ha sido estudiada con anterioridad en medios de reacción convencionales conocida como la reacción de Fenton¹⁹.

Radicales peroxilo y alcoxilo: los radicales peroxilo (ROO•) son formados por una reacción directa de oxígeno con radicales alquilo, por ejemplo, la reacción entre los radicales lipídicos y el oxígeno. La descomposición de peróxidos de alquilo (ROOH) también resulta en radicales alcoxilo (RO•). La irradiación de la luz UV o la presencia de iones de metales de transición puede causar homólisis de peróxidos para producir estos radicales. Esta reacción se observa con frecuencia en la etapa de propagación de la peroxidación lipídica; a menudo el radical alquilo formado a partir de esta reacción puede interactuar con el oxígeno para formar otro

¹⁶ Harman D. *Acad. Sci.* **2000**, 928, pp. 1–21

¹⁷ Halliwell B. *Nutr. Rev.* **1997**, 55, pp. 44–9.

¹⁸ Korycka-Dahl M.B. & Richardson T. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1978**, 10, pp. 209–241. Ashok B. & Ali R. *Exp Gerontol* **1999**, 34, pp. 293–303. Padmaja S. & Madison S.A. *J. Phys. Org. Chem.* **1999**, 12, pp. 221–226.

¹⁹ Halliwell B. *Nutr. Rev.* **1997**, 55, pp. 44–49. Stief T. W. *Thromb. Res.* **2000**, 99, pp. 1–20. Stief T. W. *Med. Hypoth.* **2003**, 60, pp. 567–572. Koppenol W.H. *Free Rad. Bio. and Med.* **1993**, 15 (6), pp. 645–651.

radical peroxilo, manteniendo activa una reacción en cadena. Algunos radicales peroxilo sufren rupturas para liberar el anión superóxido, o reaccionar entre sí para generar oxígeno. Radicales alcoxilo y peroxilo aromáticos son menos reactivos que sus contrapartes de cadena abierta debido a la deslocalización de los electrones en el anillo²⁰.

2.2 Radical superóxido y voltamperometría cíclica

Para el estudio de la interacción de analitos con actividad antioxidante y especies reactivas de oxígeno, la electroquímica ofrece una herramienta de análisis muy importante para determinar, no solo la eficiencia antioxidante de un compuesto, sino también el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la reacción. Para el estudio del radical superóxido, la voltamperometría cíclica (VC) permite descubrir cualitativa o cuantitativamente, cuál es el mecanismo bajo el cual esta ERO está siendo transformada en disolución, vía el análisis de las señales eléctricas generadas por el monitoreo con los electrodos de referencia, trabajo y contraelectrodo.

La voltamperometría cíclica es la técnica electroquímica elegida en el presente proyecto como herramienta de análisis, y es por ello que, a continuación, se definirán los parámetros involucrados en ella.

Diagrama de perturbación del potencial en función del tiempo para la voltamperometría cíclica (VC)

Con un potenciostato el voltaje aplicado al electrodo de trabajo es direccionado en forma lineal desde un valor de potencial inicial E_i a un límite predeterminado como E_λ , (conocido como potencial de inversión anódico) a partir del cual la sufre una dirección del barrido es dirigida al sentido contrario (figura 3).

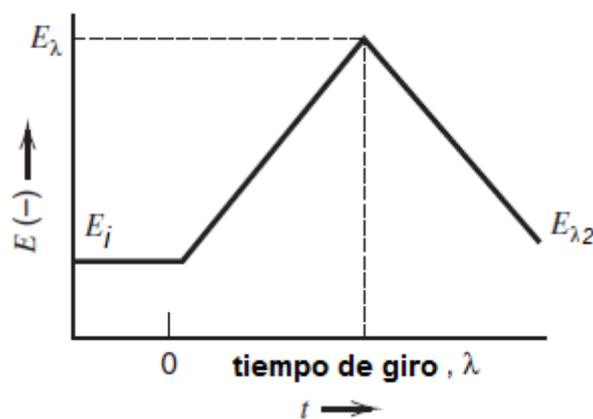


Figura 3.²¹

Aplicación del potencial inicial (E_i) y cambio de dirección en el potencial de inversión anódico (E_λ) donde posteriormente vuelve a cambiar hasta regresar al potencial inicial. El potencial de inicio y final deben de ser el mismo para cerrar el ciclo.

²⁰ Decker E.A. *Food Lipids Chem. Nutr. and Biotech.* **1998**, pp. 397–401.

El operador puede imponer el voltaje libremente, mantenerlo en un punto fijo entre E_i y $E_{\lambda 1}$ o incluso recorrer el escaneo hasta otro potencial preseleccionado $E_{\lambda 2}$ (este último puede ser diferente de E_i) La respuesta de la corriente es trazada como una función del potencial aplicado. Normalmente deben observarse cambios prácticamente nulos entre el primer ciclo y los sucesivos escaneos. Sin embargo, los cambios que sí aparecen de forma repetitiva son elementos claves para obtener información acerca del sistema en estudio.

La VC es una técnica que permite medir, de manera simple y directa, el potencial formal de media reacción cuando las formas oxidada y reducida son estables durante el tiempo en que se requiera obtener el voltamperograma.

Nicholson y Shain²¹ en el año de 1964, publicaron un estudio completo y representativo sobre cuáles son las reacciones que pueden ocurrir en un sistema químico-voltamperométrico. Si bien el estudio describe 8 posibles escenarios de reacción, los procesos más elementales son descritos como: irreversible, reversible y quasi-reversible.

Estos procesos describen al sistema electroquímico como totalidad y no solo como descripción de la reacción química en estudio. Este sistema consta de la reacción Red/Ox que ocurre en la superficie del electrodo.

Un proceso irreversible ocurre cuando la transferencia de electrones desde el electrodo al sistema Red/Ox es más lenta que el fenómeno de difusión/convección de los analitos en la disolución. En el caso de un proceso reversible la transferencia de electrones desde el electrodo al sistema Red/Ox es más rápida que el fenómeno de difusión/convección de los analitos en la disolución. Finalmente el proceso quasi-reversible ocurre cuando la transferencia de electrones desde el electrodo al sistema Red/Ox es de rapidez similar a aquella del fenómeno de difusión/convección de los analitos en la disolución²¹.

Como ejemplo, tomemos en cuenta la reacción de reducción de oxígeno a superóxido (esquema 2) y su voltamperograma donde podemos encontrar el predominio de especies en función del potencial impuesto (figura 4).



Esquema 2.²¹

Reacción reversible del sistema oxígeno-radical superóxido ($\text{O}_2/\text{O}_2^{\cdot -}$). El oxígeno puede ser reducido electroquímicamente a superóxido en disolución de DMSO anhidro, aplicando un potencial de -0.64 V.

Es importante mencionar que el cambio en la intensidad es una medición directa de la rapidez con la que el oxígeno es transformado.

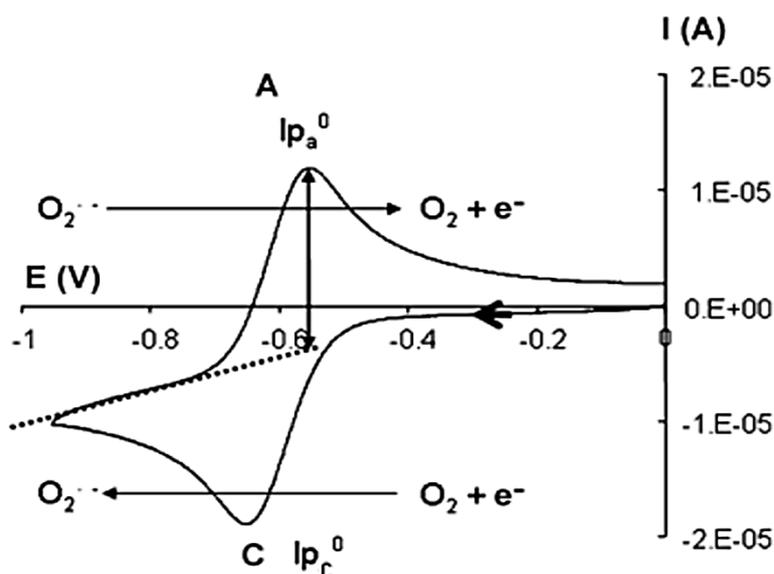


Figura 4.²²

Predominio de especies en un voltamperograma para la reacción reversible (rápida) de oxígeno y el radical superóxido, el lado izquierdo del esquema corresponde a la reducción (radical superóxido) mientras que el derecho corresponde a la oxidación (oxígeno elemental). La dirección del barrido queda determinada en dirección a potenciales negativos desde 0 E(V) a -0.98 E(V), es aquí donde inicia el cambio en la dirección de potencial (potencial de inversión anódico) hasta regresar al potencial de inicio. El mínimo Ip_c^0 (intensidad de pico catódico inicial) corresponde a la máxima rapidez de reducción del oxígeno al radical superóxido (reacción que se lleva a cabo en el cátodo "C"), mientras que el máximo Ip_a^0 (intensidad de pico anódico inicial) corresponde a la máxima rapidez de oxidación del radical superóxido a oxígeno (reacción que se lleva a cabo en el ánodo "A").

Para la figura 4 el mínimo Ip_c^0 corresponde a la intensidad de corriente de pico catódico; éste muestra que la rapidez de transformación de oxígeno a superóxido (un proceso químico de reducción) ha llegado a su máxima velocidad; posterior a -0.66 V, la rapidez con la que se reduce el oxígeno empieza a disminuir. Es hasta este punto que todo el oxígeno se ha transformado en superóxido.

Una vez reducido todo el oxígeno, la dirección de escaneo toma un sentido opuesto y ahora es observable la reacción de oxidación de superóxido a oxígeno. Observamos un fenómeno similar en sentido opuesto y con una rapidez de reacción similar a la reducción. Este máximo Ip_a^0 corresponde a la intensidad de corriente de pico anódico. Este es el ejemplo de una reacción reversible; en este tipo de procesos la proporción entre oxígeno (especie oxidada) y superóxido (especie reducida) queda prácticamente inalterada; es decir, la reacción de transferencia del electrón es tan rápida que las condiciones de equilibrio se mantienen²¹.

El radical superóxido ha sido estudiado con anterioridad en presencia de antioxidantes de actividad conocida. Un ejemplo de esto son las flavonas e isoflavonas estudiadas por Ahmed y Shakeel. Quedó demostrado que los cambios en la corriente son directamente proporcionales

²¹ Boehlert, W. & Mundy, C. , **1986**. ANALYTICAL AND PHYSICAL ELECTROCHEMISTRY, (Powles 1981), pp. 265–267. Bard, A. J. & Faulkner, L. R. , **2001**. ELECTROCHEMICAL METHODS FUNDAMENTALS AND APPLICATIONS, (Wiley 1981), pp. 227-228. Nicholson R.S. & Shain I. *Analytical Chemistry* **1964**, *36*(4), pp. 706-723. Evans D. H ; O'Connell K. M. ; Petersen R. A. ; Kelly M. J. *J. Chem. Educ.* **1983**, *60* (4), pp. 290-293.

a la concentración del radical y por lo tanto, una medición directa de la actividad de un analito cuando se agrega como antioxidante a la disolución²².

La voltamperometría cíclica es una excelente herramienta para caracterizar sistemas moleculares electroactivos, ya que, además de ser una técnica sensible, simple, de bajo costo y rápida, ofrece información valiosa respecto al potencial antioxidante de una especie, relacionando directamente la proclividad hacia la oxidación electroquímica y la habilidad de capturar radicales libres.

Como se mencionará en la sección experimental, se consideró al Ácido ascórbico y a la curcumina como compuestos de referencia para estimar la actividad antioxidante de los curcuminoides sintetizados frente al radical superóxido.

De acuerdo con Ahmed y Shakeel²³, existen tres mecanismos básicos bajo los cuales los antioxidantes pueden reaccionar frente al radical superóxido (figuras 5,6 y 7):

- 1.- Mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno (TAH).
- 2.- Mecanismo de donación directa de electrones (DE).
- 3.- Mecanismo de transferencia de protón (TP).

Estos mecanismos pueden ser identificados monitoreando los cambios en las intensidades de corriente anódica y catódica, en el ciclo de reacción $O_2/O_2^{\bullet -}$ cuando éste es sometido a la interacción de un analito. En este caso un antioxidante. La interpretación en el cambio de intensidades queda descrita a continuación.

1.- Disminución en la corriente anódica: mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno (TAH)

De acuerdo con Bourvellec²⁴ y otros investigadores como Nanni²⁵ en sus trabajos con antioxidantes flavonoides, un mecanismo de tipo TAH registra un decaimiento en la corriente anódica cuando se incrementa la concentración del antioxidante en estudio. En el caso de la corriente catódica no se observa una variación significativa. Esto significa que el oxígeno fue consumido en forma de radical superóxido de forma irreversible después de agregar el analito. Es decir que, la interacción entre el agente antioxidante y la especie reactiva de oxígeno, solo ocurre posteriormente a la reducción en el cátodo, lo que no genera alteraciones en la concentración de oxígeno elemental; es decir, no registra cambios en la corriente. Estas observaciones son consistentes con un mecanismo TAH (figura 5).

²² Le Bourvellec C. *Talanta*. **2008**, 75, pp. 1098–1103.

²³ Ahmed S. & Shakeel F. *Czech J. Food Sci.* **2012**, 30(2), pp. 153-163.

²⁴ Bourvellec C.L. *Talanta* **2008**, 75, pp. 1098–1103.

²⁵ Nanni E.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102(13), pp. 4481-4485.

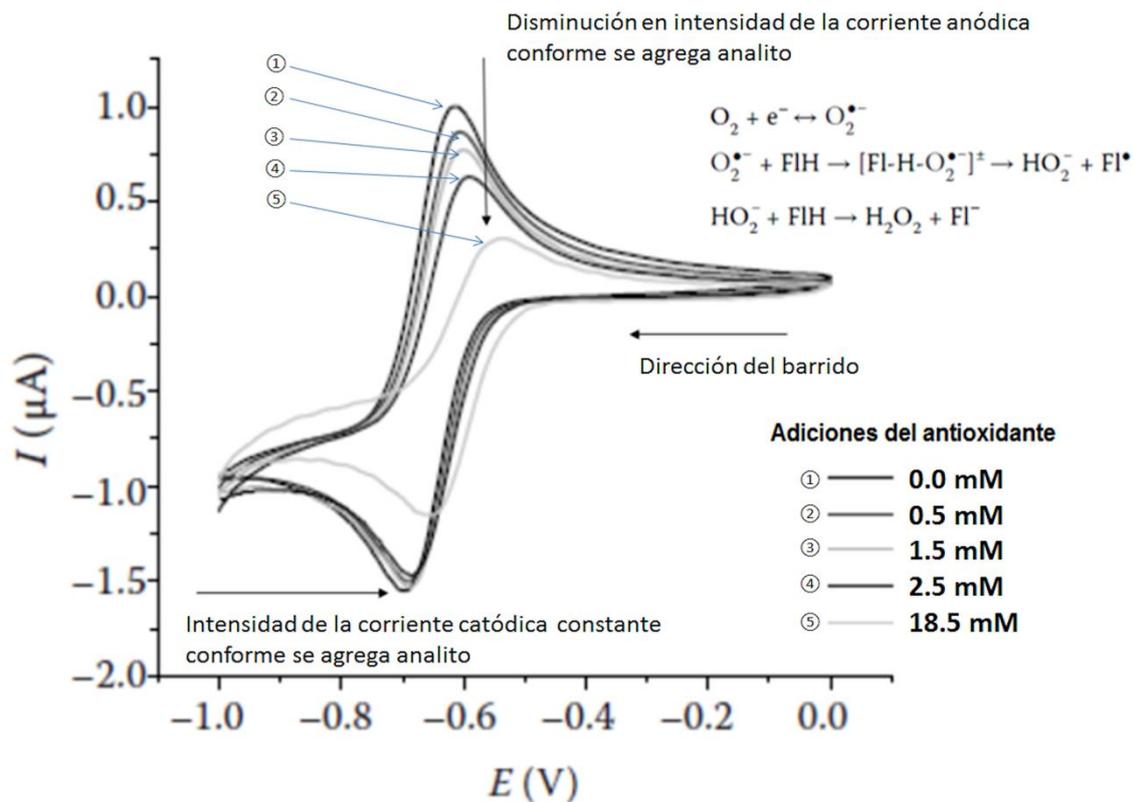


Figura 5.²³

Voltamperograma característico de la neutralización del radical superóxido mediante el mecanismo de TAH. En la esquina superior derecha se observa la reacción del radical superóxido con una flavona (FI) que actúa como antioxidante.

2.- Disminución en la corriente anódica y en corriente catódica: mecanismo de donación directa de electrón (DE)

En este caso, el agente antioxidante en estudio genera una disminución en la corriente catódica y en la corriente anódica (figura 6), esto es atribuido al consumo del oxígeno elemental por parte del agente antioxidante antes de iniciar el barrido. Ya que consume el oxígeno elemental antes de ser transformado en el cátodo a radical superóxido. Esta reacción entre el O_2 y el agente antioxidante produce la base conjugada del peróxido de hidrógeno, el cual no es electroactivo en la ventana de potencial y por lo tanto no es detectable. El oxígeno elemental, al ser consumido desde el inicio, provoca que ambas corrientes disminuyan conforme aumenta la concentración del agente antioxidante.

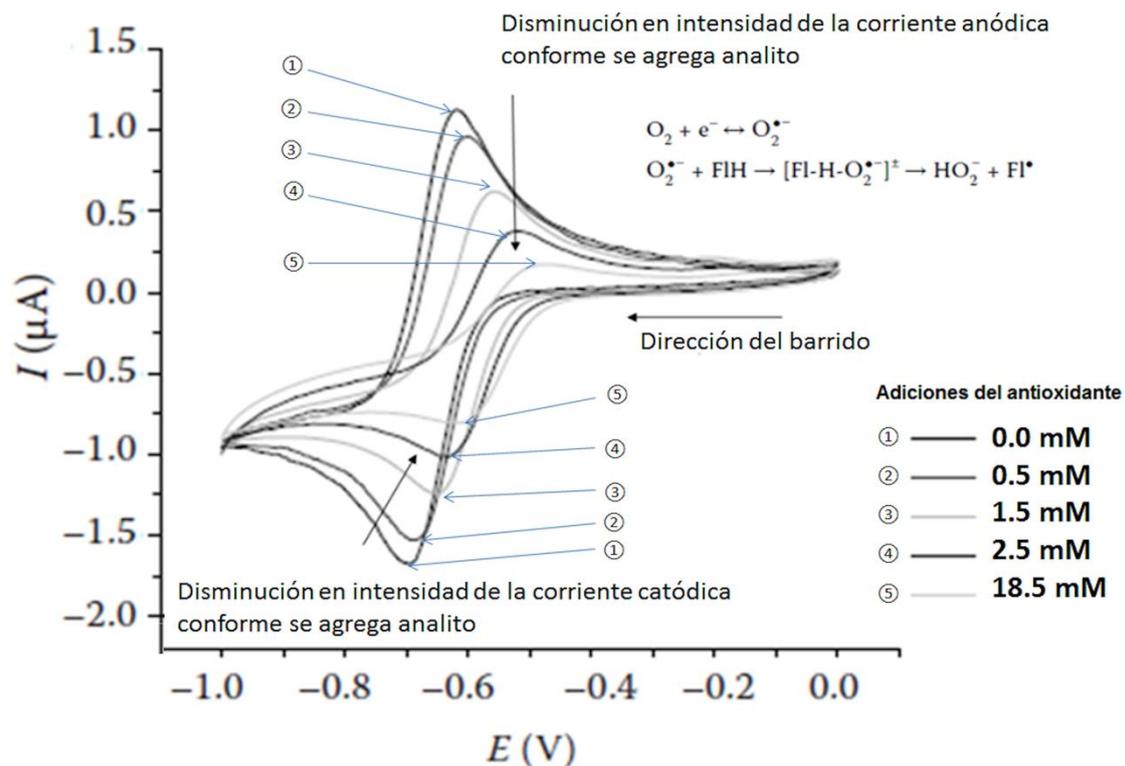


Figura 6.²³

Voltamperograma característico de transferencia directa de electrones (DE).

En la esquina superior derecha se observa la reacción del radical superóxido con una flavona (FI) que actúa como antioxidante.

3.- Disminución en la corriente anódica y aumento en la corriente catódica: mecanismo de transferencia directa de protón

Como el nombre lo indica, este mecanismo transforma al radical superóxido mediante una reacción ácido-base. Al poseer una carga formal negativa, el radical superóxido puede sustraer un protón del antioxidante para formar el radical hidroperoxilo. Este radical tiene la capacidad de reaccionar con otro radical superóxido y oxidarlo para formar peróxido de hidrógeno y oxígeno elemental. Esta transformación a O_2 ocurre después de a la reducción en el cátodo, lo que implica que el radical superóxido fue consumido por el antioxidante, así que se observará una disminución de la corriente catódica.

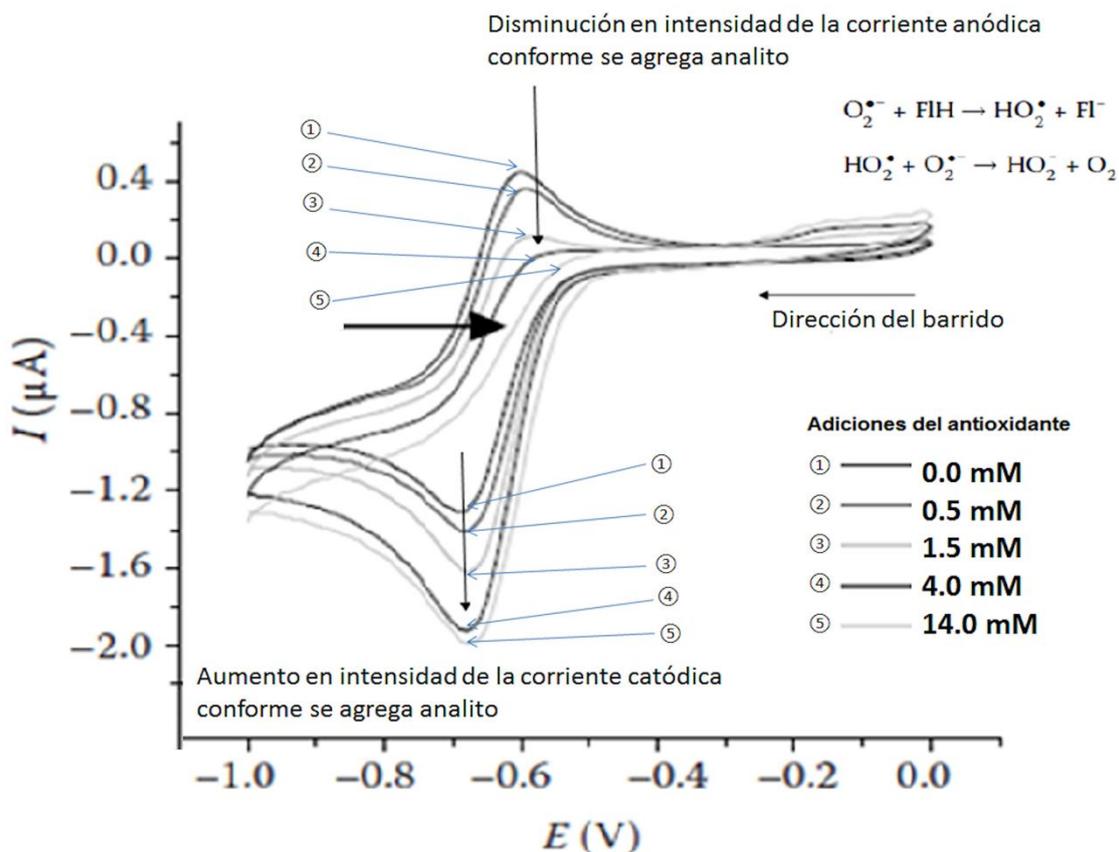


Figura 7.²³

Voltamperograma característico de transferencia directa de protón (TP).

En la esquina superior derecha se observa la reacción del radical superóxido con una flavona (FI) que actúa como antioxidante.

2.3 Curcumina: generalidades y actividad antioxidante

La molienda de la raíz de la planta llamada Curcuma longa (polvo tumérico) ha sido utilizada por siglos en las regiones de Asia central y sobre todo en el subcontinente indio. Marco Polo describe su uso como especia y remedio herbolario desde finales del siglo XIII. Esta planta pertenece a la familia del jengibre, y fue conocida en Europa como Azafrán de la India. La principal característica de este preparado es el color amarillo intenso que posee, y es el componente de este color lo que le otorga propiedades terapéuticas importantes²⁶.

La planta contiene metabolitos secundarios denominados curcuminoides; entre el 3 y 5 % de su masa corresponde a estos metabolitos, y de este porcentaje, alrededor de 60 % es curcumina, además de un 5 % de resinas y aceites esenciales²⁷.

²⁶ Aggarwal B. B. ; Sundaram C. ; Malani N; Ichikawa H. *Adv.Exp. Med. Biol.* **2007**, 595, pp. 1.

²⁷ Chaudhary P. ; Sharma P. K. ; Garg V. K. ; Varshney J. *Pharmacologyonline* **2010**, 3, pp. 193.

Esatbeyoglu T. ; Huebbe P. ; Ernst I. M. A. ; Chin D. ; Wagner A. E. ; Rimbach G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, pp. 5308 – 5332.

La curcumina ha sido objeto de estudio durante mucho tiempo ya que se conocen sus propiedades antiparasitarias y antioxidantes²⁸, sin embargo, en los últimos 20 años se ha incrementado significativamente el interés científico por esta molécula (figura 8).

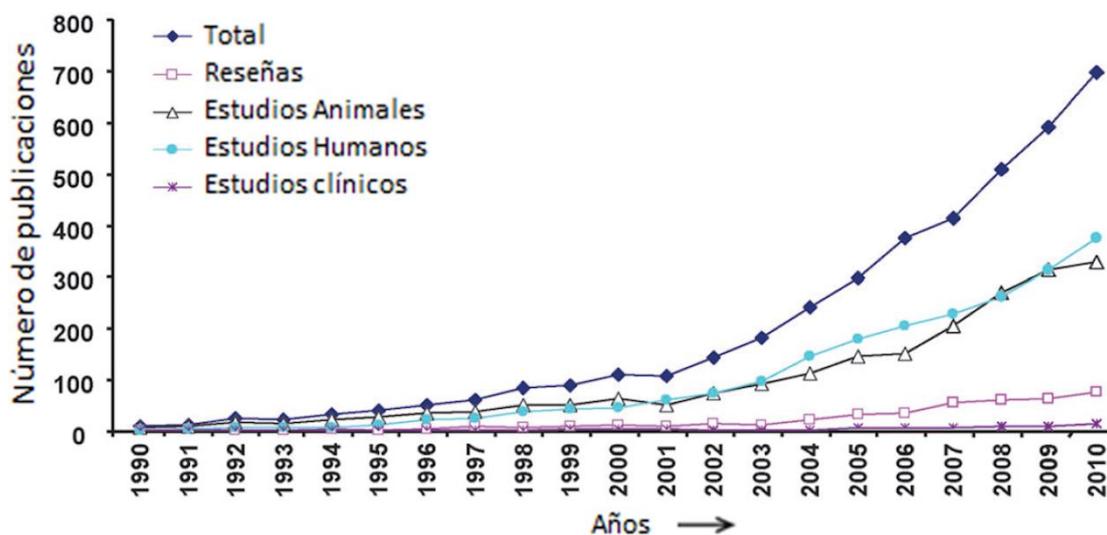


Figura 8.²⁹

Publicaciones de curcumina desde 1990 hasta 2010. Un gran número de publicaciones han sido registradas en los últimos años demostrando el gran interés por desarrollar aplicaciones prácticas a la curcumina.

En 2004, la Organización Mundial de la Salud determinó que el consumo de curcumina es seguro para una ingesta diaria de 0 – 3 mg/kg, lo que la coloca en una posición de consumo cotidiano, sin representar un riesgo importante a la salud³⁰.

La estructura de la curcumina integra los siguientes grupos funcionales: β -dicetona, dos enlaces vinílicos, dos fenoles y dos metóxilos, que en conjunción forman una molécula con una alta conjugación, y simetría de rotación de tipo C_2 , cuya preferencia es permanecer en el tautómero enol (en lugar de la β -dicetona) en disolución (en la mayoría de disolventes orgánicos). Nombre IUPAC: (1*E*, 4*Z*, 6*E*)-5-hidroxi-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)hepta-1,4,6-trien-3-ona (figura 9).

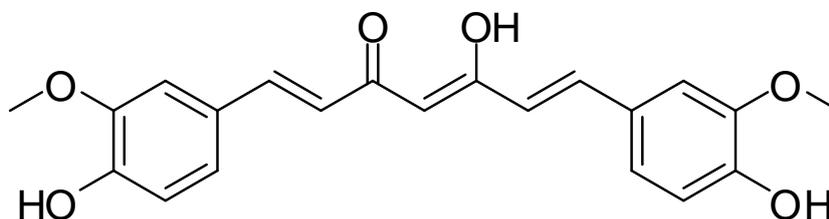


Figura 9.

Estructura de la curcumina. Contiene los grupos funcionales: dos grupos fenilo, dos metoxilos, dos vinílicos, un cetónico y un enólico. Posee una alta simetría con un eje de rotación de tipo C_2 así como también una planaridad que le confiere estabilidad por la conjugación entre los anillos aromáticos y las dobles ligaduras de la molécula

²⁸ Srimal R.C. *Fitoterapia* **1997**, *68*, pp. 483-493.

²⁹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=curcumin>

³⁰ EFSA ; *European Food Safety Authority Journal*. **2010**, *8* (1), pp. 1414-1446.

Algunas de las características de la curcumina son enlistadas a continuación en la Tabla 1.

curcumina	
Estado físico	Sólido
Color	Amarillo a naranja
Olor	Inodoro
Punto de fusión (°C)	173-175
Flamabilidad	No flamable
Sensibilidad a la luz	Muy sensible a la luz
Solubilidad	Insoluble en agua, soluble en etanol

Tabla 1.

Características físicas más comunes de la curcumina.

Si bien la curcumina puede ser obtenida de forma natural, también puede ser sintetizada para obtener un producto de alta pureza a partir de materias primas comerciales.

En 1950, Pavolini sintetizó curcumina en solo 30 minutos, calentando dos partes de vainillina y una parte de acetilacetona en presencia de trióxido de boro. Desafortunadamente el rendimiento solo fue alrededor de 10 %³¹.

En 1964, Pabon mejoró significativamente el rendimiento en un 80 %, al utilizar trietilboranos, *n*-butilamina como alternativa al uso de vainillina (esquema 3)³².

A la curcumina se le han atribuido efectos específicos en varios sistemas, tejidos y órganos como: la piel, el sistema gastrointestinal, sistema respiratorio, el hígado y más recientemente el sistema nervioso. La principal utilidad es la capacidad antioxidante que ofrece esta molécula, ya que se ha reportado que posee una habilidad especial para neutralizar radicales libres³³.

La presencia de los grupos fenólico, β - dicetonico y metoxilo, contribuyen a la habilidad de captar radicales libres que caracteriza a la curcumina. Algunos autores han postulado que la actividad antioxidante se debe principalmente a los grupos fenoles presentes, así como al protón que se encuentra en la posición *alfa* a ambos carbonilos. En la literatura, la mayor efectividad para neutralizar radicales libres se ha observado en compuestos con grupos fenólicos y esteres fenólicos, en cuyo anillo aromático se encuentran donadores de electrones como sustituyentes³⁴.

Desde hace algunos años se ha estudiado el efecto que la piperina (proveniente de *piperus nigrum*) ejerce en la actividad antioxidante de la curcumina. Este efecto se explica con la capacidad que tiene la piperina de disminuir la velocidad con la que el hígado y el intestino

³¹ Lampe V. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1918**, *51*, pp. 1347-1355.

³² Pabon H. J. *J. Rec. Trav. Chim. Pays. Bas.* **1964**, *83*, pp. 379-386.

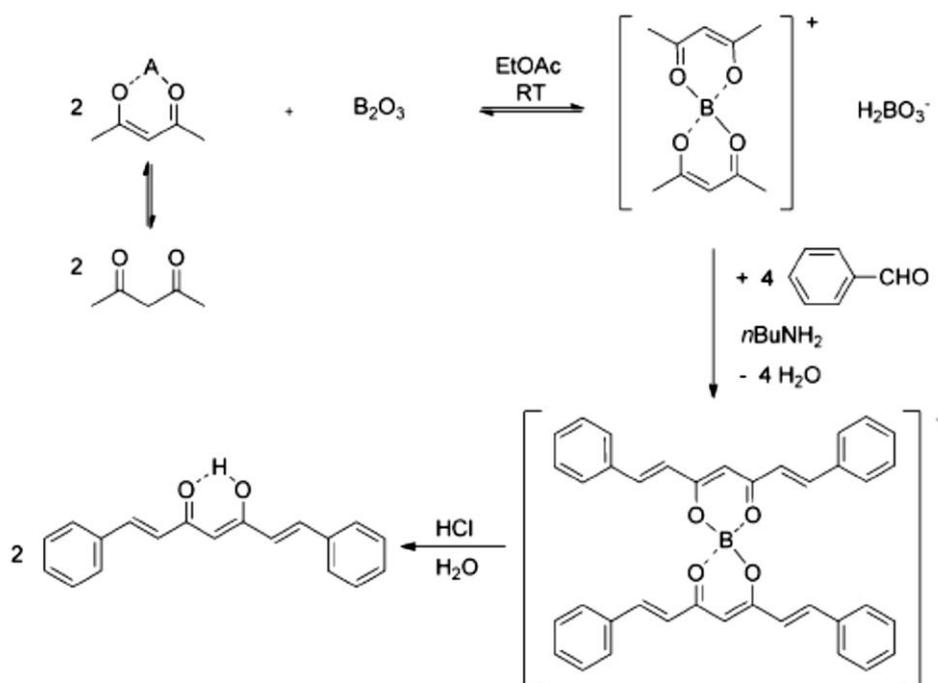
³³ Priyadarsini K. I. ; Maity D. K. ; Naik G. H ; Kumar M. S. ; Unnikrishnan M. K. ; Satav J. G. ; Mohan H. *Free Radical Biol. Med.* **2003**, *35*, pp. 475-484.

³⁴ Ak T. & Icin I. *G. Chem. Biol. Interact.* **2008**, *174*, pp. 27-37. Ahsan H. ; Parveen N. ; Khan N. U. ; S. M. Hadi *Chem. Biol. Interact.* **1999**, *121*, pp. 161.

Venkatesan P. ; Rao M. N. ; *J. Pharm. Pharmacol.* **2000**, *52*, pp. 1123. Youssef K. M. ; El-Sherbeny M. A. ; El-Shafie F. S. ; H. A. Farag ; Al-Deeb O. A. ; Awadalla S. A. *Arch. Pharm.* **2004**, *337*, pp. 42.

metabolizan a la curcumina. La administración de piperina en dosis pequeñas permite mantener concentraciones altas de curcumina en suero por hasta dos horas más. Así mismo la piperina ha reportado tener actividad antioxidante por sí misma. Dicha actividad está reportada como actividad hepatoprotectora ya que posee propiedades de protección al estrés oxidativo. Teniendo a bajas concentraciones la capacidad de neutralizar al radical hidroxilo e incluso al radical superóxido, deteniendo así la peroxidación lipídica de la pared celular³⁵.

Dos ejemplos de antioxidantes importantes son el tocoferol y trólox (figura 10), que son antioxidantes ya conocidos por tener una actividad importante en la neutralización de radicales libres³⁶.



Esquema 3.³⁷

Síntesis de curcuminoides propuesta por Pabon. La adición de boranos como catalizadores en la síntesis de curcuminoides fue una estrategia que mejoró significativamente la síntesis de curcuminoides. Los compuestos de Boro estabilizan el tautómero enólico de las di cetonas utilizadas como materia prima lo cual los hace más reactivas al complejo formado por la $n\text{BuNH}_2$ y el benzaldehído.

³⁵ Mittal R. & Gupta RL. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* **2000**, 22(5), pp. 271-4.

³⁶ Méndez-Robles M.D ; Permady H H. ; Jaramillo-Flores M. E. ; Lugo-Cervantes E. C., Cardador-Martínez A. ; Canales-Aguirre A.A. ; López-Dellamary F. ; Cerda-García-Rojas C. M. & Tamariz J. J. *Nat. Prod.* , **2006**, 69 (8), pp. 1140–1144. Bruno R. S. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, 40 pp. 689–697.

³⁷ Pabon H. J. J. *Rec. Trav. Chim. Pays. Bas.* **1964**, 83, pp. 379-386. Esatbeyoglu T. ; Huebbe P. ; Ernst I. M. A. ; Chin D. ; Wagner A.E. ; Rimbach G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, pp. 5308 – 5332.

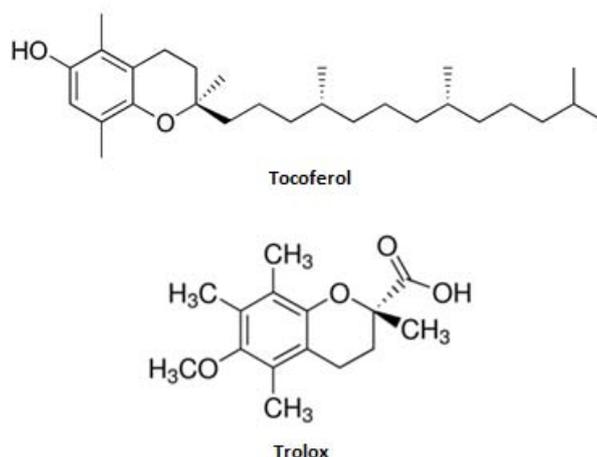


Figura 10.

Estructura del Tocoferyl y Trolox. Estos antioxidantes poseen grupos funcionales metóxidos o fenólicos a los cuales se les asigna la capacidad antioxidante. Son moléculas utilizadas frecuentemente como estándares en pruebas biológicas para determinar la captura de radicales libres.

En el año 2012, Barzegar³⁸ publicó información muy completa sobre los mecanismos de acción de la curcumina y concluye, a partir de experimentación y cálculos teóricos, lo siguiente: la curcumina es activa en sus dos formas tautoméricas (figura 11); la forma enólica elimina los radicales libres vía la acción de transferencia de átomo de hidrógeno y la forma cetónica vía donación directa de electrones. Ambos tautómeros poseen una alta conjugación entre sus grupos funcionales y estabilizan el radical formado de manera muy eficiente.

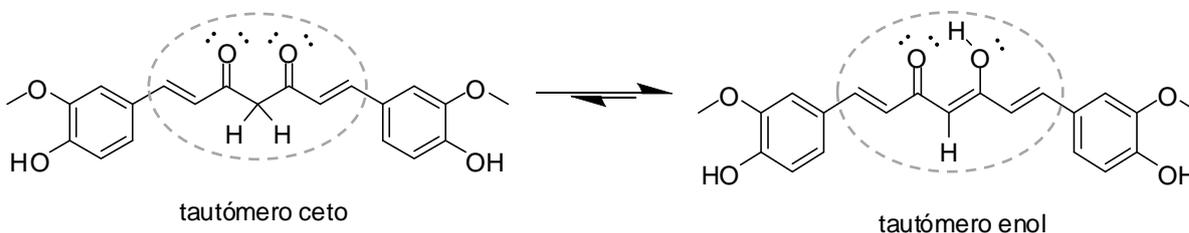


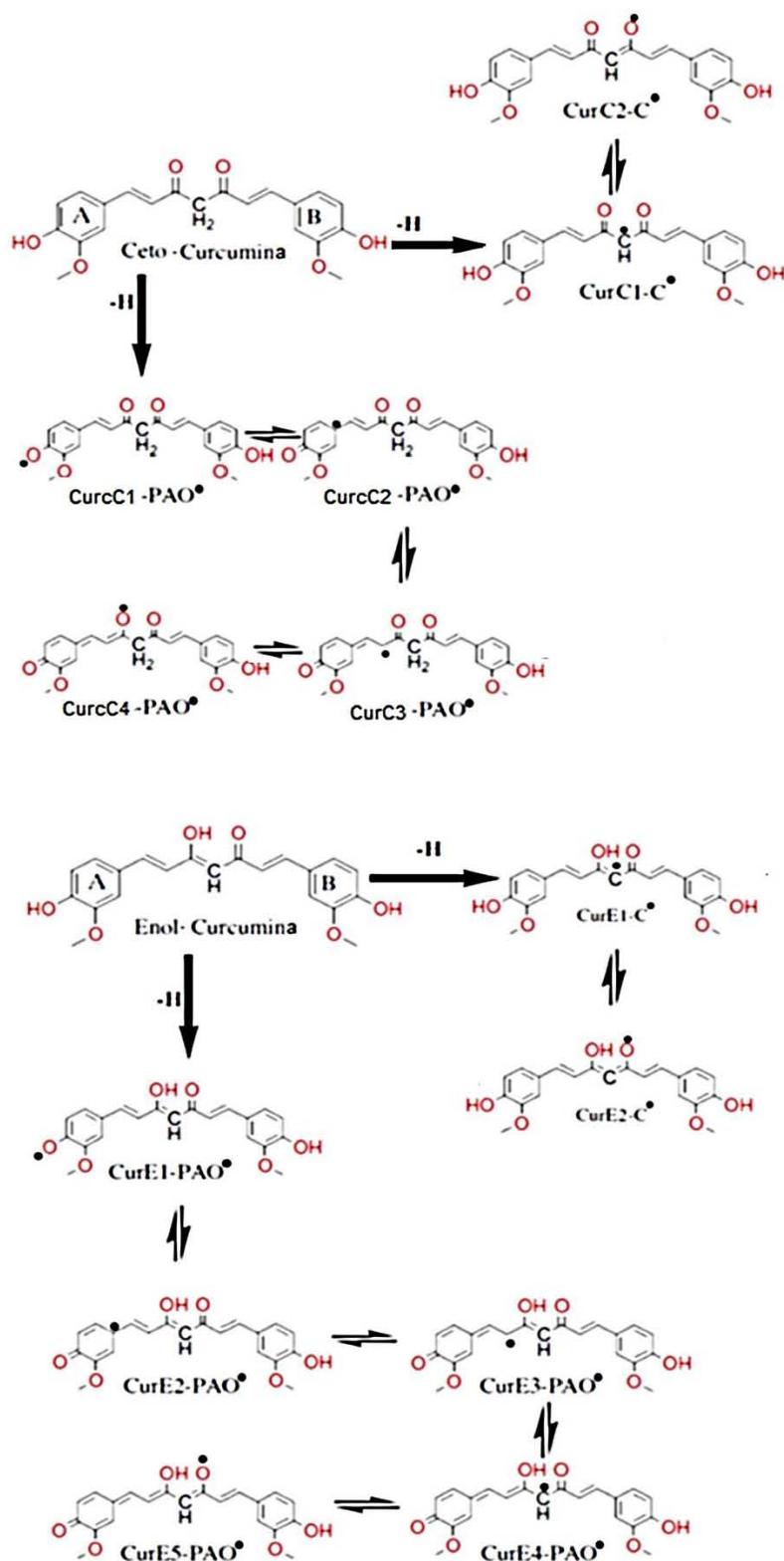
Figura 11

Tautómeros de la curcumina. Este equilibrio muestra preferencia al tautómero enólico por tres motivos: 1) los hidrógenos *alfa* a ambos carbonilos son ácidos, ya que existe una electro atracción fuerte promovida por ambas cetónicas. 2) En esta configuración existen un mayor número de conjugaciones en la molécula brindándole una mayor estabilidad por resonancia. 3) Otro factor adicional es el puente de hidrógeno que se genera entre el enol y el grupo cetónico el cual genera un ciclo de seis miembros muy estable.

Barzegar propone en un esquema didáctico y sencillo de comprender cuáles serían los sitios en los que la curcumina podría reaccionar como agente antioxidante, y posteriormente, estabilizar al radical de curcumina formado. Este esquema muestra la sustracción de átomo de hidrógeno en tres sitios diferentes para ambos tautómeros, el primero es el hidrógeno α a ambos carbonilos, el segundo en el fenol A de la curcumina y el tercero en el fenol B (esquema 4). Con la ayuda de cálculos teóricos determinó las entalpías de disociación de enlace, y otorgó mayor sustento a la propuesta de los tres sitios reactivos antes mencionados. Si bien ambos tautómeros son activos, el enol requiere de una menor energía para reaccionar, en

³⁸Barzegar A. *Food Chem.* **2012**, 135, pp. 1369–1376.

comparación con su contraparte ceto, lo que sugiere de manera concreta que el tautómero más activo es el enólico; así mismo, concluye que el grupo más activo frente a radicales libres es el fenol A de la curcumina, seguido por el fenol B. Esto implica que una molécula de curcumina puede reaccionar con dos equivalentes de agentes oxidantes, al tener la capacidad de donar dos átomos de hidrógeno por cada fenol que posee.



Esquema 4.³⁷

Estructuras resonantes propuestas por Barzegar. La curcumina en forma enólica posee siete estructuras resonantes, mientras que para la forma enólica solo existen seis estructuras para el mismo escenario. Al aumentar el número de estructuras resonantes existe una mayor estabilidad del radical. Lo que puede ser asociado a una mayor actividad antioxidante a la estructura enólica.

Solubilidad de la curcumina

Uno de los requisitos principales para la actividad biológica de cualquier profármaco (tipo o forma original de un fármaco a partir del cual se desarrolla otro tipo o forma de fármaco) en humanos y animales es su biodisponibilidad³⁹. Ésta se define como la cantidad y la velocidad a la que el principio activo se absorbe a partir de una forma farmacéutica, y llega al lugar de acción (biofase). Esto implica la condición de solubilidad en medios fisiológicos (medios fundamentalmente acuosos), además de cumplir con otras características y requerimientos como lo es toxicidad o la ausencia de la misma.

El problema asociado al aumento de la biodisponibilidad, mediante el aumento de la solubilidad en agua de sustancias hidrofóbicas, se ha abordado de diferentes maneras. En las décadas de los 80's y 90's, varios grupos de trabajo iniciaron el camino para encontrar formas novedosas de aumentar la biodisponibilidad de la curcumina en agua; algunos ejemplos son nombrados a continuación: Tønnesen⁴⁰ propone el uso de ciclodextrinas, Maing y Miller⁴¹ decidieron experimentar con geles protéicos asociados a núcleos metálicos, mientras que Leshik⁴² y Schranz⁴³ junto con Todd⁴⁴ propusieron utilizar polisacáridos, dada su biocompatibilidad y alta solubilidad en agua.

En 2003, Mizukami⁴⁵ y colaboradores lograron biotransformar con significativo éxito a la curcumina, uniéndola covalentemente a glucósidos no naturales y no reportados (figura 12), lo que eventualmente podría significar aprovechar la biosíntesis como un método efectivo para la obtención de profármacos; sin embargo, no logró transformar el total de curcumina agregada a los microorganismos, aunque mostró un camino importante en la derivatización química de la curcumina.

En 2011, Jain⁴⁶ y colaboradores lograron sintetizar exitosamente nanopartículas de curcumina, sin la necesidad de agregar algún tipo de coadyuvante (figura 13). Estos nanoaglomerados de curcumina, cuya formación fue corroborada por RMN, lograron ser solubles en agua con diámetros que van de 2 a 20 nm, y mostraron actividad citotóxica para ciertos microorganismos. La solubilidad observada fue atribuida al efecto aglomerante, que probablemente expone en la superficie de la nanopartícula a los grupos fenólicos, facilitando así su interacción con agua, sin alterar su estructura química. El avance es importante, sin embargo, podrían existir problemas para reproducir y estandarizar el método, y no se reportaron experimentos de actividad antioxidante de las nanopartículas sintetizadas.

³⁹ Ringman J. M. ; Frautschy S. A. ; Cole G. M. ; Masterman D. L. ; Cummings J. L. *Curr. Alzheimer Res.* **2005**, 2, pp. 131–136. Kawamori T. ; Lubet R. ; Steele V. E. ; Kelloff G. J. ; Kaskey R. B. ; Rao C. V. ; Reddy, B. S. *Cancer Res.* **1999**, 59, pp. 597–601.

⁴⁰ Tønnesen H.H. *Inter. J. of Pharm.* **2002**, 244, pp. 127-135.

⁴¹ Maing, Y.& Miller I. *Eur. Pat. Appl.* **1981**, EP 25 637 A1.

⁴² Leshik R.R. *Eur. Pat. Appl.* **1981** EP 37 204 A1.

⁴³ Schranz J.L. *UK Pat. Appl.* **1986** GB 2 132 205A.

⁴⁴ Todd P.H. *Curcumin-Komplexe Patentschrift* **1991**DE 40 26118 C2.

⁴⁵ Misukami H. ; Kaminaga Y. *FEBS Letters* **2003**, 555, pp. 311-316.

⁴⁶ Bhawana ; Basniwal R.K.; Buttar H.S. ; Jain V. K.; Jain N. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, pp. 2056–2061

Aplicaciones similares han sido propuestas por otros investigadores como Bora⁴⁷ y Gomez-Estaca,⁴⁸ que representan una aportación importante en el uso de nanopartículas para potenciar las propiedades de la curcumina.

Zhong⁴⁹ y su equipo abordaron el problema de manera diferente al encapsular la curcumina con caseína de leche de camello, lo cual aumentó significativamente su solubilidad hasta 28 µg/mL.

Se llevaron a cabo pruebas antioxidantes mediante el ensayo con ABTS (por las siglas en inglés del generador de radicales: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), observando una actividad superior a la curcumina libre y a la caseína (Gráfica 1).

Hasta este punto, las estrategias para solubilizar a la curcumina en agua, en conjunto con algunas evaluaciones biológicas, involucran plataformas moleculares de origen natural, en donde no se altera la estructura química de la curcumina, ya que, presumiblemente, la modificación de la molécula podría resultar en la pérdida de actividad antioxidante.

⁴⁷ Sahu A. ; Kasoju N. ; Goswami P. ; Bora U. *J. Biomater. Appl.* **2011**, 25, pp. 619–639.

⁴⁸ Gomez-Estaca J. *Food Hydrocolloids* **2012**, 28, pp. 82-91

⁴⁹ Pan K. ; Zhong Q. ; . Baek S. J. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, 61, 6036–6043.

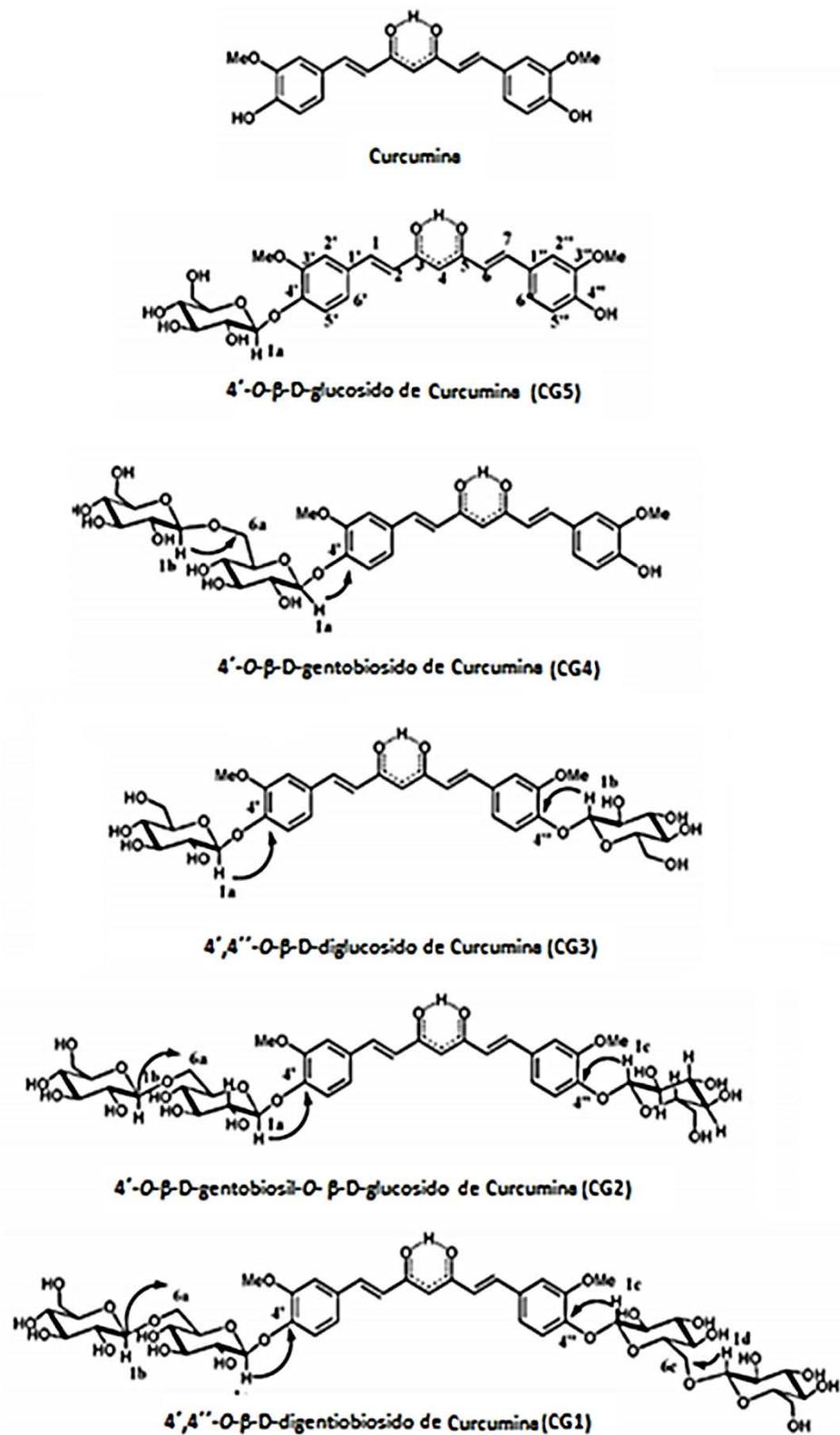


Figura 12.⁴⁵

Glucósidos sintetizados por Mizukami. La síntesis a micro escala de estos compuestos fue realizada mediante la biotransformación de la curcumina de forma exógena utilizando células de *Catharanthus roseus* aumentando significativamente la solubilidad del núcleo de curcumina.

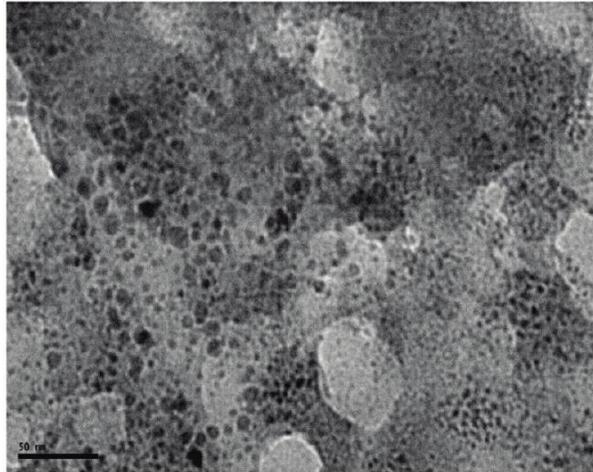
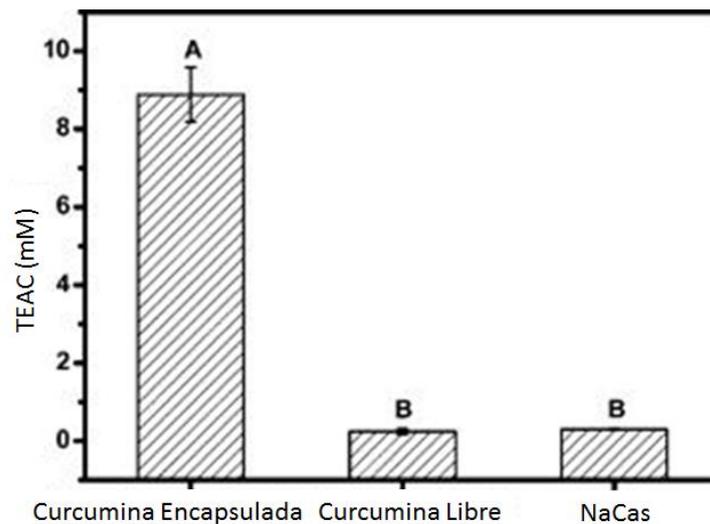


Figura 13.⁴⁶

Nanopartículas de curcumina sintetizadas por Jain (2-40 nm) por un proceso de fresado en agua y caracterizadas por TEM. Estas nanopartículas poseen una mayor dispersión en agua que la curcumina común aglomerada en polvo, dichas características se exhiben sin la necesidad de surfactantes o tenso activos adicionales en la disolución. Estas nanopartículas poseen actividad anti microbial novedosa.



Gráfica 1.⁴⁹

Actividad antioxidante de la curcumina encapsulada en caseína de camello sintetizada por dispersión en seco, comparada con curcumina libre y caseína de sodio. Esta actividad fue determinada mediante la técnica: capacidad antioxidante equivalente a Trolox (por sus siglas en inglés TEAC).

En 2011 Wang, Shen y Zhang⁵⁰ demostraron que la actividad de la curcumina puede ser conservada con la interacción de materiales sintéticos; ellos proponen encapsular a la curcumina en micelas de PEG (polietilenglicol) para, posteriormente, incluir el fármaco doxorubicina, una antraciclina que tiene actividad antitumoral y antibiótica⁵¹, esto con el objetivo de mantener concentraciones constantes de fármaco activo en el plasma sanguíneo (figura 14).

⁵⁰ Wang B. ; Shen Y.M. ; Zhang Q. ; Li Y. ; . Luo M.; Liu Z. ; Li Y. ; Qian Z. ; Gao X. ; Shi H. *International Journal of Nanomedicine* **2013**, *8*, pp. 3521–3531.

⁵¹ Tacar O. ; Sriamornsak P. ; Dass C.R. *The J. of Pharm. and Pharmac.* **2013**, *65* (2), pp. 157–170.

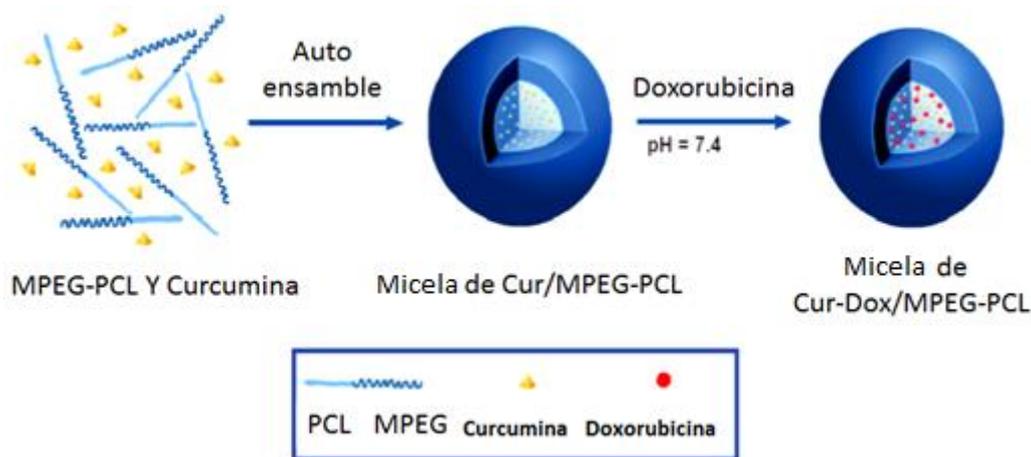


Figura 14.⁵⁰

Encapsulamiento de curcumina y doxorubicina en MPEG-PCL propuesta por Wang, Shen y Zhang. Esta técnica permite transportar y liberar de manera paulatina curcumina y doxorubicina de una manera más tolerable a ratones. También fue registrada una en su actividad antitumoral conjunta entre curcumina y doxorubicina.

En 2007 se publicó un avance importante en el entendimiento del metabolismo que siguen la curcumina y algunos curcuminoides, en un modelo animal, empleando ratones. Los experimentos de Aggarwal⁵² y colaboradores muestran que particularmente la curcumina sufre un cambio en su estructura química, una vez ingerida y metabolizada por estos animales, el primero es una esterificación de un fenol de la curcumina, y el segundo la sulfonación de dicho éster, lo que indudablemente implica una mayor solubilidad para ambos derivados de curcumina; sin embargo, este aumento en solubilidad no se reflejó en una mayor distribución en todo el organismo. En el esquema 5 se observa cuál es la ruta metabólica descrita por Aggarwal por medio de dos vías de administración, por vía oral y por vía intraperitoneal/intravenosa.

⁵² Anand P. ; Kunnumakkara A. B ; Newman R. A. ; Aggarwal B. B. *Molecular Pharm.* **2007**, 4(6), pp. 807–818.

Es claro el interés de la comunidad científica y médica para derivatizar a la curcumina y aprovechar los beneficios tan versátiles de esta molécula, mejorando su biodisponibilidad. En este sentido, la exploración de estrategias alternativas para lograr ese objetivo, ha tomado cada vez más importancia, y uno de los escenarios promisorios es el que ofrece la llamada terapia macromolecular, que surge de la necesidad de mejorar los tratamientos existentes contra el cáncer (como la quimioterapia), y que se define a continuación⁵³.

2.4 Terapia macromolecular (TM)

La TM se define como un tratamiento alternativo que involucra el uso de una macromolécula como acarreadora de un fármaco⁵⁴ impactando de manera positiva en la solubilidad, biodisponibilidad y biodistribución de moléculas biológicamente activas altamente hidrofóbicas. Las ventajas de la terapia macromolecular (TM) en comparación con la terapia convencional (fármaco libre) se resumen en la Tabla 2.

Terapia convencional vs terapia macromolecular	
Terapia convencional	Terapia Macromolecular
Problemas de solubilidad	→ Mejora la solubilidad en agua
Entrada celular por difusión	→ Entrada celular por endocitosis (habilidad para superar la resistencia a las drogas)
No tiene acumulación preferencial	→ Acumulación preferencial en tumores sólidos
Posible incorporación de anzuelo	→ Marcaje efectivo (incorporación de anzuelos celulares e intracelulares)
Rápida eliminación	→ Eliminación lenta
Toxicidad sistémica no específica	→ Decrece la toxicidad sistémica

Tabla 2.
Diferencias entre terapia convencional y macromolecular.

Al día de hoy existen numerosos trabajos de investigación que ponen de manifiesto el uso de la TM, mejorando las propiedades de solubilidad y biodisponibilidad de compuestos con potencial farmacéutico.

No obstante que la TM surgió con el uso de polímeros convencionales, se han empleado recientemente arquitecturas macromoleculares más sofisticadas como los dendrímeros y dendrones.

⁵³ Kumar, C. S. S. R. *Nanomaterials for cancer therapy*, (Nanotechnologies for the life sciences Vol.6), Wiley-VCH Verlag. Misra, R. ; Acharya, S. ; Sahoo, S.K. *Drug Discovery Today*, **2010**, 15 (19/20), pp. 842–850.

⁵⁴ Ringsdorf H. ; *J. Polym. Sci. Pol. Sym.* **1975**, 51, pp. 135 ; Bader H. *Angew. Makromol. Chem.* **1984**, 123, pp. 457 . Kopeček J. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, 50, pp. 61

Materiales usados en terapia macromolecular

La TM incluye tanto el uso de polímeros convencionales (ej. poli-(N-vinilpirrolidona)), así como macromoléculas más sofisticadas como micelas, liposomas, nanopartículas, polímeros hipóramificados y dendrímeros, con ventajas y desventajas propias de cada sistema. Particularmente las estructuras dendriméricas (dendrones y dendrímeros) han generado gran interés debido a su potencial aplicación en el acarreo de diversos fármacos⁵⁵ gracias a su alta multivalencia que promueve una endocitosis más rápida, y a su globularidad que coadyuva a la solubilización de moléculas hidrofóbicas con actividad farmacológica.

Las principales estrategias para lograr la solubilización y acarreo de fármacos vía estructuras dendriméricas se enlistan a continuación⁵⁶:

- i) Encapsulamiento del fármaco en el interior de la macromolécula vía interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y puentes de hidrógeno (figura 15 A).
- ii) Conjugación del fármaco a la superficie de la macromolécula vía enlaces covalentes lábiles (por ejemplo tipo éster) (figura 15 B)
- iii) Dendronización del fármaco mediante la unión covalente entre el fármaco y un dendrón (parte ramificada de un dendrímero) (figura 15 C).

Tanto la conjugación como la dendronización requieren un diseño cuidadoso que asegure un balance hidrofílico-hidrofóbico adecuado, regido por la carga de fármaco en el sistema, que garantice la solubilización de la especie dendrímero (ó dendrón)-fármaco en agua.

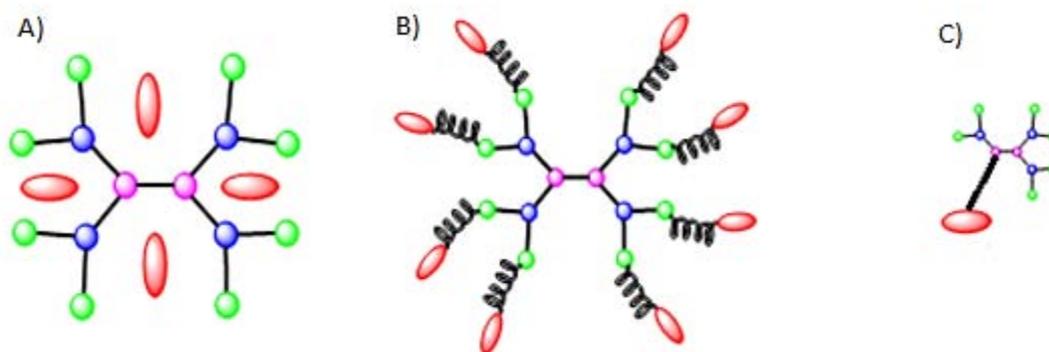


Figura 15.

A) encapsulación de un fármaco en las cavidades macromoleculares; B) fármaco enlazado a la superficie del dendrímero por medio de enlaces covalentes y C) fármaco dendronizado.

⁵⁵Tekade R. K. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, pp. 49-59. Felczak A. *New J. Chem.* **2013**, *37*, pp. 4156-4165. Ma M. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, pp. 93-98.

⁵⁶D'Emanuele A. *Adv. Drug. Delivery Rev.* **2005**, *57*, pp. 2147-2155. Boas U. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, pp. 43-51. Medina S. H. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, pp. 3141-3144.

La dendronización ha sido el escenario menos explorado, no obstante que puede representar un muy buen compromiso entre facilidad sintética y aumento de solubilidad del fármaco en agua.

La liberación del fármaco de la macromolécula normalmente está asociada con un cambio de pH hacia medios ácidos, involucrando al lisosoma como principal organelo celular receptor.

En cualquiera de los tres escenarios se mejora la solubilidad y decrece la toxicidad sistémica del fármaco; sin embargo, en el caso de la encapsulación, el fármaco puede ser liberado prematuramente en el organismo como resultado de la alta dilución o pequeños cambios de pH,⁵⁷ lo cual representa una desventaja cuando se requieren liberaciones por largos periodos de tiempo. En el caso de los conjugados o dendronizados vía enlaces covalentes lábiles, el fármaco presenta una acumulación preferencial, y los tiempos de circulación son más prolongados, favoreciendo una liberación lenta.

2.5 Materiales dendriméricos sobresalientes en aplicaciones biomédicas

Dendrímeros y dendrones

Entre los esqueletos dendriméricos más ampliamente utilizados en aplicaciones biomédicas se encuentran los de tipo PAMAM (poliamidoamina)⁵⁸ y los de tipo poliéster⁵⁹(figura 16), ya que han probado ser materiales no citotóxicos, con buena solubilidad en medios acuosos. Particularmente, la familia de poliésteres dendríticos alifáticos reúne varios de los requisitos (accesibilidad comercial, biocompatibilidad y posible degradación hidrolítica), para una real aplicación en el área de nanomedicina⁶⁰.

⁵⁷ Kojima C. *Bioconjugate Chem.* **2000**, *1*, pp. 910-917

⁵⁸ Sadekar S. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, pp. 571-580.

⁵⁹ Gillies E. R. & Fréchet J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, pp. 14137-14146.

⁶⁰ Feliu N. *Biomaterials* **2012**, *33*, pp. 1970-1976. Carlmark A. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, pp. 5858-5864.

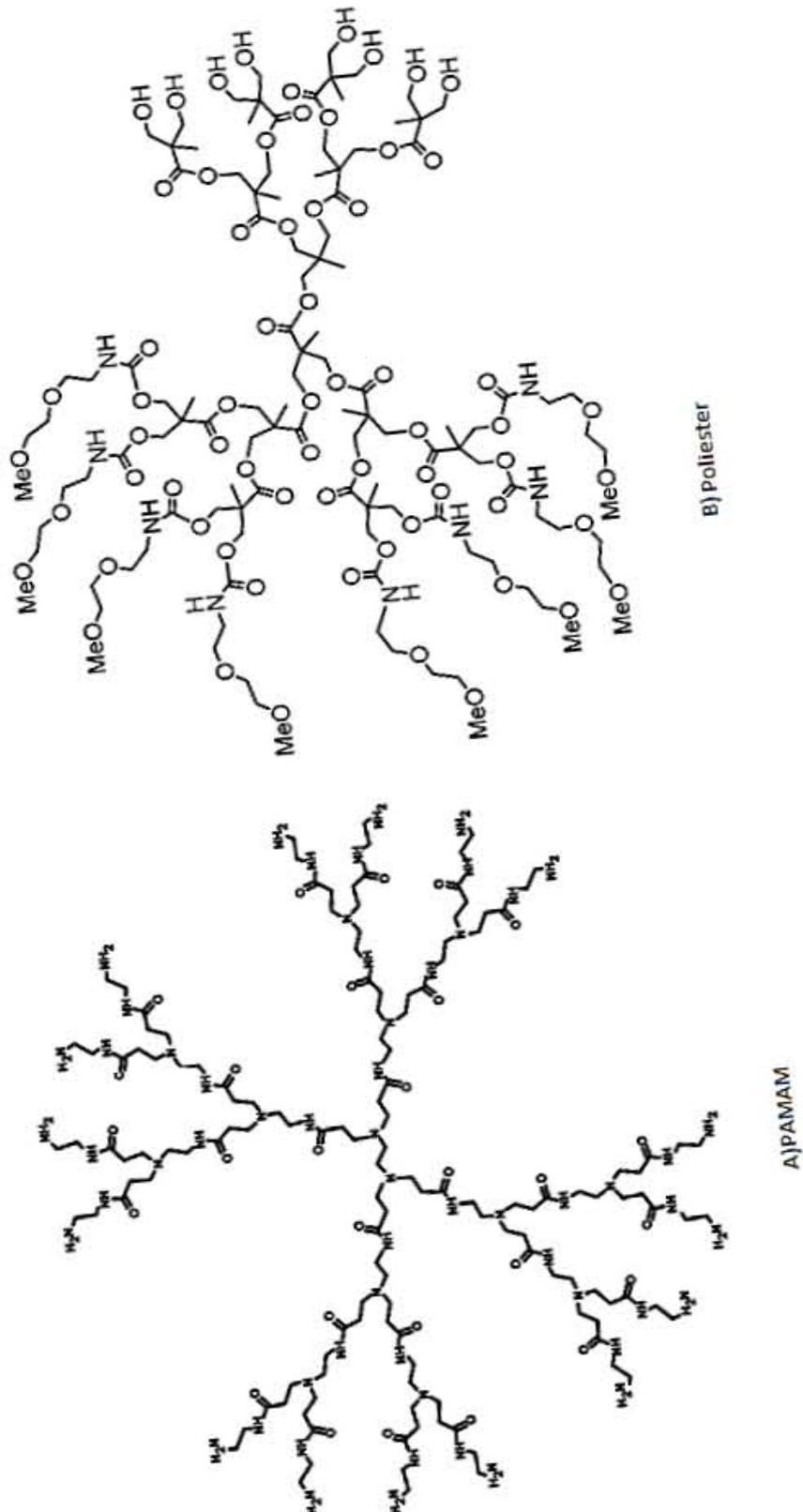


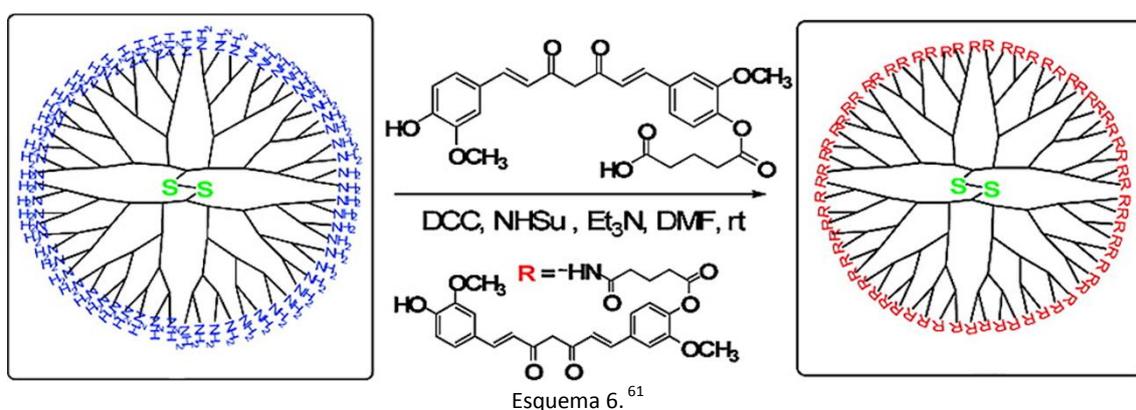
Figura 16.^{58, 59}

Estructuras de los dendrímeros de a) PAMAM y b) Poliéster. Los dendrímeros de PAMAM al tener terminaciones amino, pueden funcionar como donadores de pares electrónicos y alterar el equilibrio de protones en la célula. En el caso de los dendrímero de tipo poliéster, dicho compromiso no se exhibe, ya que los grupos terminales son hidroxilos.

Estos dos tipos de macromoléculas dendriméricas pueden ser utilizados en cualquiera de los tres escenarios de solubilización y acarreo de fármacos descritos anteriormente.

La aplicación de la curcumina en este ámbito tampoco se queda atrás (esquema 6), en 2007 fue reportado un conjugado dendrímico PAMAM-curcumina con núcleo de cistamina con el objetivo de aumentar la solubilidad de la curcumina, demostrando la utilidad de la mono funcionalización en la síntesis de polifenoles biomiméticos⁶¹.

El reto sintético para obtener este tipo de compuestos representa un problema a superar, además de que las terminaciones aminas en el dendrímico sintetizado podrían repercutir en la señalización química de un organismo vivo. Es bien sabido que los núcleos de cistamina con ramificaciones de PAMAM ya se han utilizado como agentes acarreadores de fármacos con éxito⁶², no se reporta hasta el momento ninguna actividad biológica para este material.



Conjugado PAMAM-curcumina. La curcumina ha sido objeto de estudio en terapia macromolecular, al ser conjugada mediante un espaciador con un dendrímico de PAMAM con núcleo de cisteína. El uso de PAMAM le confiere desventajas en aplicaciones clínicas ya que podría alterar la señalización celular.

No obstante el uso recurrente de los dendrímicos de PAMAM en aplicaciones biológicas, se ha documentado que sus terminales de tipo amina son susceptibles a protonarse, generando cargas positivas en su superficie, induciendo así citotoxicidad, toxicidad hemolítica, rápida eliminación de la sangre⁶³, y rápida opsonización.⁶⁴ Estos inconvenientes dificultan su aplicación clínica de forma práctica. Los dendrímicos de poliéster alifático, por otro lado, ofrecen una opción viable dado que son biodegradables y biocompatibles, son de toxicidad muy baja y por lo tanto se han propuesto como una opción para funcionar como vehículos de bioentrega *in vivo*, tanto en forma de conjugados como de complejos de inclusión.⁶⁵ Además, pueden ser sintetizados con materias primas económicas (como el monómero: *ácido 2,2-bis(hidroximetil) propiónico* (bis-MPA)) y obtenerse con rendimientos altos, crecer hasta capas de

⁶¹ Raja K. *Org. Lett.* **2007**, 9(26), pp. 5461-5464.

⁶² *Designing Dendrimers* Campagna S. ; Ceroni P. ; Puntoriero F **2012**, John Wiley & Sons, pp. 173-197.

⁶³ Shen Y. ; Zhou Z. ; Sui M. ; Tang J. ; Xu P. ; Van Kirk E.A. ; Murdoch, W. J. ; Fan, M. ; Radosz M. *Nanomedicine* **2010**, 5, pp. 1205-1217. Mishra V. ; Gupta U. ; Jain N. K. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **2009**, 20, pp. 141-166.

⁶⁴ **Opsonización** : Proceso por el cual un patógeno es marcado por ingestión y eliminado por un fagocito.

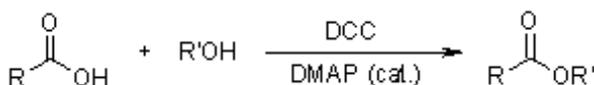
⁶⁵ Lee C. C. ; MacKay J. A. ; Frechet, J. M. J. ; Szoka, F. C. *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, pp. 1517-1526. Gillies E. R. ; Dy E. ; Frechet J. J. ; Szoka, F. C. *Mol. Pharmaceutics* **2005**, 2, pp.129-138. Almutairi A. ; Akers W. J. ; Berezin M. Y. ; Achilefu S. ; Frechet, J. M. J. *Mol. Pharmaceutics* **2008**, 5, pp.1103-1110.

cuarta generación por el método convergente, y pueden tener grupos hidroxilo en la periferia, los cuales no llevan carga alguna y por lo tanto no interfieren con señalización alguna⁶⁶.

Existen tres ventajas para el uso de estos dendrímeros, la primera es que aumentan la solubilidad de medicamentos hidrofóbicos⁶⁷, la segunda ofrecen protección de los alrededores a moléculas inestables o lábiles y la tercera evitan la eliminación temprana o la exposición a los tejidos sanos⁶⁸. Estas propiedades se traducen (junto con su arquitectura bien definida por su mono dispersión) resultados reproducibles y consistentes. Pueden ser administrados vía oral, transdérmica, ocular e intramuscular;⁶⁹ lo que demuestra una gran versatilidad para aplicaciones farmacéuticas prácticas, sin comprometer la toxicidad del vehículo en el organismo⁷⁰.

2.6 Esterificación de Steglich

La construcción de este tipo de dendrímeros involucra la óptima formación de enlaces de tipo éster (-COOR), a partir de un alcohol y de un ácido⁷¹, y la literatura ofrece varias opciones a este respecto, aprovechando la alta reactividad del agente acoplante conocido como diciclohexilcarbodiimida (DCC), para obtener rendimientos altos en este proceso.⁷² Esta reacción es comúnmente conocida como esterificación de Steglich (esquema 7), cuando es catalizada por la 4-(Dimetilamino)piridina (DMAP).



Esquema 7.
Esterificación de Steglich.

En esta reacción, la principal fuerza motriz es la transformación de la Dicclohexilcarbodiimida (DCC) en diciclohexilurea (DCU)⁷³. Es una reacción que funciona en condiciones suaves y

⁶⁶ Ihre H. ; Hult A. ; Soderlind, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, pp. 6388–6395.

⁶⁷ Zhou Z.Y. ; D'Emanuele A. ; Attwood, D. *Int. J. Pharmaceut.* **2013**, *452*, pp. 173–179. Gu L. ; Wu Z.H. ; Qi X.L. ; He H. ; Ma X.L. ; Chou X.H. ; Wen X.G. ; Zhang M. ; Jiao, F. *Pharm. Dev. Technol.* **2013**, *18*, pp. 1051–1057.

⁶⁸ Svenson, S. ; Tomalia, D.A. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, pp. 2106–2129. D'Emanuele A. & Attwood *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, pp. 2147–2162. Wolinsky J.B. & Grinstaff M.W. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, pp.1037–1055. Cheng Y.Y. & Xu T.W. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, pp. 2291–2297. Nanjwade B.K. ; Bechra H.M. ; Derkar G.K. ; Manvi F.V. ; Nanjwade, V.K. *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* **2009**, *38*, pp. 185–196. Svenson S. *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.* **2009**, *71*, pp. 445–462.

⁶⁹ Gula A. ; Ren L. ; Zhou Z. ; Lu D.D. ; Wang, S.Q. *Int. J. Pharmaceut.* **2013**, *453*, pp. 441–447. Gajbhiye, V. ; Kumar P.V. ; Sharma, A. ; Agarwal A. ; Asthana A. ; Jain N.K. *Indian J. Pharm. Sci.* **2008**, *70*, pp. 431–439. Yang H. & Kao W.J. *J. Biomat. Sci Polym. E.* **2006**, *17*, pp. 3–19. Fernandez L. ; Calderon M. ; Martinelli M. ; Strumia M. ; Cerecetto H. ; Gonzalez M. ; *J. Phys. Org. Chem.* **2008**, *21*, pp.1079–1085.

⁷⁰ Jain K. ; Kesharwani P. ; Gupta U. ; Jain, N.K. *Int. J. Pharmaceut.* **2010**, *394*, pp. 122–142.

⁷¹ Esterification: Methods, Reactions, and Applications. Junzo Otera *John Wiley & Sons* **2006**

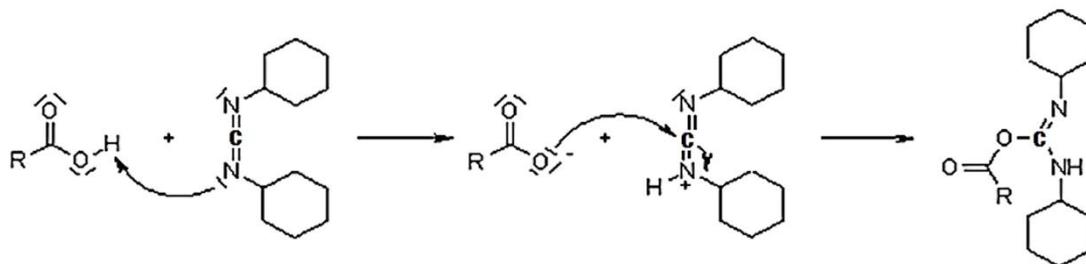
⁷² B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1978**, *17*, pp. 522-524.

⁷³ <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/steglich-esterification.shtml>

permite la conversión de sistemas altamente impedidos por condiciones estéricas, y sustratos con ácidos lábiles⁷⁴.

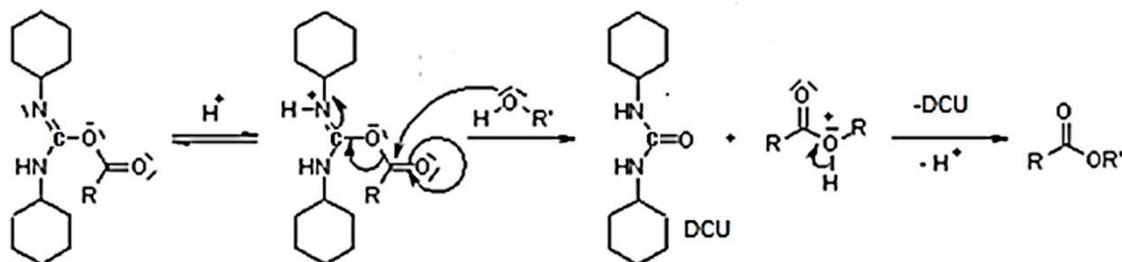
Mecanismo de la reacción de Steglich

La DCC y el ácido carboxílico pueden formar una O-acilisourea, que ofrece características en su reactividad química similares a las observadas en los anhídridos carboxílicos correspondientes (esquema 8).



Esquema 8.
Formación de O-acilisourea

El alcohol ahora podrá atacar nucleofílicamente al ácido carboxílico activado para formar la muy estable DCU y consecuentemente el éster de interés (esquema 10).

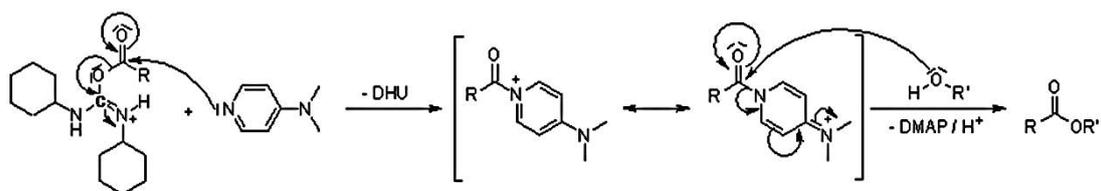


Esquema 9
Ataque nucleofílico del alcohol.

En la práctica se ha observado que las reacciones de ácidos carboxílicos con DCC y aminas ocurren sin problemas, sin embargo, la adición de 4-Dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizador, en al menos 5 % mol, es crucial para la formación de ésteres.

Una explicación comúnmente aceptada sugiere que la alta fuerza nucleofílica de la DMAP, superior a la del alcohol, la lleva a reaccionar con la O-acilisourea para formar la muy reactiva amida (éster activado). Este intermediario reacciona rápidamente con alcoholes, lo que convierte a la DMAP en un agente de transferencia de acilo en esta reacción (esquema 11).

⁷⁴ B. Neises ; W. Steglich *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, *17*, pp. 522-524.



Esquema 10.
Transformación de la O-acilisourea a éster.

En el año de 1990 Stupp⁷⁵ y sus colaboradores introdujeron el uso del *p*-toluensulfonato de la 4-Dimetilaminopiridina (DPTS) como un catalizador efectivo para aumentar los rendimientos de la esterificación de Steglich, en condiciones de reacción suaves, a pH neutro y temperatura ambiente. Se encontró que existe una relación directa entre la elección adecuada de proporciones de este catalizador y los rendimientos del producto deseado, y por ello es importante encontrar las condiciones específicas para cada sistema en estudio.

De acuerdo con estos antecedentes, en la siguiente sección se muestra la hipótesis y los objetivos de este trabajo de investigación y tesis.

⁷⁵ Moore J. S. & Stupp S. I. *Macromolecules*, **1990**, *23*(1), pp. 65-70.

3. Hipótesis

La esterificación de los grupos fenólicos de la curcumina con dendrones de tipo poliéster (a partir del monómero bis-MPA) y anhídrido glutárico modificará favorablemente su solubilidad en medios acuosos, sin anular sus propiedades antioxidantes; a su vez esta modificación estructural tampoco modificará el mecanismo por el cual se lleva a cabo la captura de radicales.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general del proyecto

Diseñar y sintetizar nuevos derivados de curcumina mono y di sustituidos, vía la esterificación de sus grupos fenólicos con anhídrido glutárico y dendrones de tipo poliéster (de primera y segunda generación), para evaluar su actividad antioxidante, tanto por voltamperometría cíclica así como por pruebas biológicas *in vitro*.

4.2 Objetivos particulares

- i) Diseñar y sintetizar derivados de curcumina mono y di sustituidos que no estén reportados en la literatura vía reacciones de esterificación de los fenoles presentes en esta molécula.
- ii) Caracterización de los productos por RMN de ^1H y ^{13}C , FT-IR y espectrometría de masas.
- iii) Estudio de las moléculas sintetizadas vía voltamperometría cíclica frente al anión radical superóxido para evaluar su actividad antioxidante.
- iv) Evaluación biológica *in vitro* de uno de los derivados sintetizados que exhibió mayor solubilidad en agua.

5. Desarrollo Experimental

Reactivos

curcumina (de *Curcuma longa*) cristalina (98 % w/w), ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico 98% (bis-MPA, 98% w/w), ácido p-toluensulfónico mono hidratado (98.5% w/w), 2,2-dimetoxipropano (98% w/w), bromuro de bencilo (98% w/w), resina de (H+) Dowex® 50WX2 100-200 mesh, Pd/C (10 % w/w), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP 99% w/w), 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC), trietilamina (99.5 % w/w), anhídrido glutárico (95% w/w), Sephadex® LH-20, piperina Kosher (97 % w/w), CaH₂ grado reactivo (95 % w/w) FeCl₃·6H₂O (98 % w/w) y Medio de Eagle modificado por Dulbecco (MEMD) suplementado con suero fetal bovino al 10 %, fueron adquiridos de SIGMA-ALDRICH (St. Louis MO, USA). p-toluensulfonato de 4-(dimetilamino)piridina (DPTS) fue preparado de acuerdo al procedimiento descrito en la literatura⁷⁶.

Acetona, hexano, acetato de etilo, metanol, diclorometano y 1,2 dicloroetano fueron usados sin purificación adicional.

Equipos utilizados

- Resonancia magnética nuclear (RMN): Jeol Eclipse 300 MHz y Bruker Avance 400 MHz.
- Espectrómetros de masas (MS): Jeol SX102A y Jeol JMS MStation.
- Potenciostato electroquímico de barrido (SECM) modelo 900C de CH Instruments.
- Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR): Thermo Scientific Nicolet 6700.
- Espectrómetro UV-Visible (UV-vis): UV300 UNICAM.
- Liofilizador: Labconco FreeZone1.
- Baño de agua con agitación Dubnoff Lab-Line Incu-Shaker.
- Espectrofotómetro SPECTRONIC Genesys 8 Thermo Scientific.
- Centrífuga refrigerada Eppendorf 5417R .

Acrónimos

- DCC: Diciclohexil carbodiimida
- DMF: Dimetilformamida
- DMAP: 4-(Dimetilamino)piridina
- DPTS: Paratoluensulfonato de la 4-(Dimetilamino)piridina
- DCU: Dicciclohexilurea. TBAP: Perclorato de terbutilamonio
- NEt₃: Trietilamina
- Bis-MPA: ácido 2,2-bis(hidroximetil)propanoico
- CH₂Cl₂: Diclorometano
- Bz-D1G-OH: (Bencil-2,2-bis(hidroximetil)propanoato)
- Cetónido: (Ácido isopropilideno-[G2]-COOH)
- D2G: (Isopropilideno-[G2]-CO₂CH₂C₆H₅)
- Ac.-D2G-P: (Isopropilideno-[G2]-COOH)

⁷⁶ Moore J.S. ; Stupp S.I. *Macromolecules* **1990**, (23), pp. 65–70.

5.1 Estrategia sintética

El esquema 11 muestra cual es la ruta sintética diseñada para obtener los compuestos derivados de curcumina (curcuminoides) y piperina (proveniente de *Piper nigrum*), para evaluar su reactividad frente al radical superóxido (vía voltamperometría cíclica), así como su posible actividad biológica vía ensayos *in vitro*. Siete de los compuestos sintetizados no están reportados en la literatura.

5.1.1 Esterificación de Steglich (procedimiento general)

100 mg (0.271 mmol) de curcumina es colocada en un matraz de bola de 50 mL junto con las correspondientes cantidades de ácido a esterificar (cetónido o Ac.-D2G-P), DPTS y DMAP con 20 mL de CH₂Cl₂ recién destilado y seco. El sistema es desgasificado con N₂ por 10 minutos y agitado magnéticamente durante una hora, manteniendo el sistema protegido de la luz en todo momento. Posteriormente se agrega una disolución de DCC con 5 mL de disolvente seco a través de una cánula dentro del sistema. La mezcla de reacción se mantiene en agitación por 24 h. a temperatura ambiente. Se agrega 1 mL de MeOH para eliminar la DCC sobrante y se agita durante 10 minutos. Llevado a sequedad se realizan varios lavados con hexano-acetato de etilo para eliminar la DCU formada. La purificación final se realiza por cromatografía en columna, con sílica gel de poro 60 Å y 70 - 230 mesh, con una mezcla de elución hexano-acetona o CH₂Cl₂-MeOH, como sea indicado.

5.1.2 Desprotección (procedimiento general)

La correspondiente cantidad de compuesto protegido (CurcMonoSust.-D1G-P, CurcDiSust.-D1G-P o CurcDiSust.-D2G-P), fue colocado en un matraz de bola de 50 mL y solubilizado en 30 mL de MeOH. Posteriormente se agregaron 50 mg de DOWEX™-50W 8X para alcanzar un intervalo de pH entre 5 y 6. La reacción se mantiene en agitación durante 3 h. a temperatura ambiente. El crudo es filtrado para obtener el correspondiente compuesto desprotegido con grupos hidroxilos en la periferia.

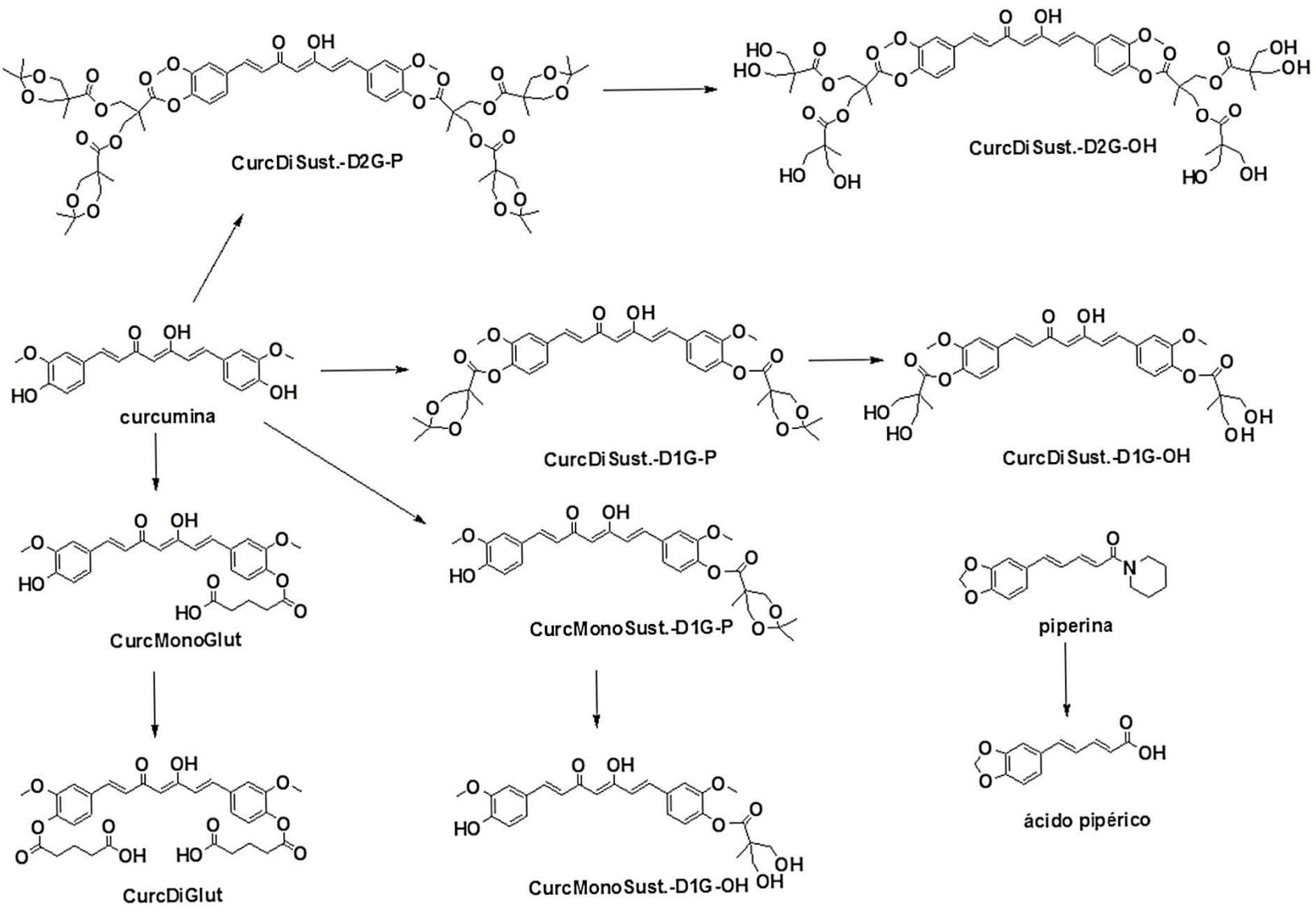
5.1.3 Esterificación con anhídrido glutárico (procedimiento general)

La correspondiente cantidad de compuesto (curcumina o CurcMono Glut.) es colocada en un matraz de bola de 50 mL, y las correspondientes cantidades de anhídrido glutárico y DMAP con 25 mL de THF, recién destilado y seco, son adicionadas. El sistema es desgasificado con N₂ por 10 minutos y agitado magnéticamente durante una hora, manteniendo el sistema protegido de la luz en todo momento. Posteriormente se agregan entre 1.3 y 1.5 mL de NEt₃ (recién destilada y secada sobre hidruro de calcio) a través de una cánula dentro del sistema. La mezcla de reacción se mantiene en agitación y reflujo por 24 h. La purificación final se realiza por cromatografía en columna, con sílica gel de poro 60 Å y 70 - 230 mesh, con una mezcla de elución de 1,2-dicloroetano-MeOH 98:2.

5.1.4 Hidrólisis de la piperina

En un matraz de bola de 100 mL se agrega la correspondiente cantidad de piperina con 25 mL de una disolución 2 N de KOH en una mezcla etanol/agua (96:4) en agitación por una hora. Se coloca un refrigerante en posición de reflujo y se calienta la mezcla de reacción durante 18 h. Transcurrido este tiempo se acidifica la mezcla de reacción, lentamente y en frío, con ácido clorhídrico al 10 % hasta observar la precipitación de un sólido amarillento. Se filtra al vacío y recristaliza con 70 mL de isopropanol por recristalización simple.

Esquema 11 Estrategia sintética para la obtención de curcuminoides, y del ácido pipérico por hidrólisis de piperina.



5.2 Espectroscopía UV-Vis

Se coloca 5 mg del curcuminoide CurcDiSust-D2G-OH en un matraz aforado de 10 mL y se añaden 3 mL del buffer correspondiente (pH de 3.58 o 7.35 respectivamente), se agita para solubilizar y se agrega el volumen restante de buffer a la marca de aforo. La disolución se filtra con un filtro de 0.45 μm para eliminar cualquier sólido residual. A partir de esta disolución inicial, se preparan disoluciones sucesivas de 1 a 10 mL, con el apoyo de una micropipeta de 1000 μl hasta obtener 10 disoluciones del curcuminoide para adquirir al menos 8 lecturas de absorción. Se utiliza el buffer como blanco para todos los espectros. Las lecturas fueron conseguidas utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de ancho en un intervalo de 300 a 450 nm.

5.3 Voltamperometría cíclica

Estos experimentos fueron realizados por el Dr. Julio César Aguilar Cordero en el Laboratorio 3C del Edificio A de la Fac. de Química UNAM

Los voltamperogramas de la disolución de oxígeno en DMSO conteniendo 0.1 M de TBAP, se adquirieron antes de adicionar varios volúmenes (o alícuotas) de aproximadamente 5 mM de cada compuesto antioxidante. Los analitos fueron adicionados en el mismo electrolito para obtener concentraciones en el rango de 0.02 mM hasta 1 mM de cada antioxidante. Después de cada adición de volumen fue registrado el voltamperograma del sistema oxígeno-superóxido y en algunos casos el comportamiento anódico del antioxidante fue comparado antes y después de la reducción de oxígeno en el electrodo de carbón vítreo.

Como contra electrodo fue utilizada una barra de grafito, mientras que el electrodo de referencia fue construido con un alambre de plata sumergido en una disolución saturada de AgNO_3 en DMSO. La concentración de oxígeno determinada en DMSO fue de $(9\pm 1)\times 10^{-4}$ M.

5.4 Pruebas Biológicas

Estos experimentos fueron realizados por Dra. Irma Gabriela González Herrera Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

5.4.1 Determinación del poder antioxidante determinado por el método FRAP (capacidad del plasma para la reducción del hierro)

El reactivo FRAP se preparó a partir de las tres siguientes soluciones. Disolución A: buffer de acetatos 300 mM, a pH 3.6. Disolución B: 10 mM TPTZ (2, 4, 6-tripiridil-s-triazina) diluida en HCl 40 mM. Disolución C: 20mM $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$. El reactivo se preparó mezclando 25 mL del buffer de acetato, 2.5 mL de disolución TPTZ, y 2.5 mL de disolución de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Se calienta a 37 °C (10 minutos por lo menos) en un baño de agua con agitación (500 rpm), y se agrega la muestra a concentración específica (50, 100, 150, 200, 250M de curcumina y CurcDiSust.-D2G-OH respectivamente) para calentar durante 30 minutos adicionales. El máximo de absorbancia fue determinado a 593 nm.

5.4.2 Cultivo celular de Glioblastoma de Rata tipo C6.

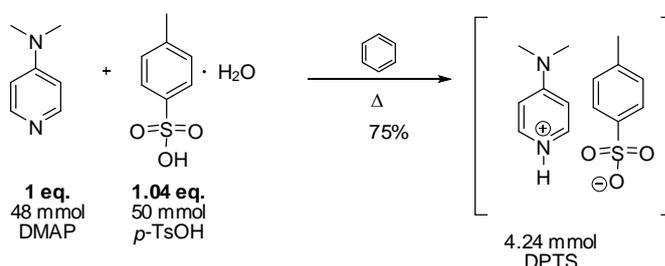
Las células fueron cultivadas en condiciones estériles en Medio de cultivo Dulbecco Modificado por Eagle suplementado con suero fetal bovino al 10 % y 15 % de suero de caballo y se mantuvieron en incubación a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂

5.4.3 Captación Celular

Las células de Glioblastoma de rata de tipo C6 fueron colocadas en placas de 24 pocillos (1x10⁵ células aproximadamente por cada pocillo) en MEMD suplementado con suero fetal bovino al 10 %; 24 h. después de incubación con este medio de cultivo se le agregaron concentraciones de 0 (blanco), 5, 10, 20, 50, 80, 100, 200 µM de curcumina o del equivalente de CurcDiSust.-D2G-OH, y reincubadas durante 6 h. Después de la incubación, las células se lavaron con una disolución de buffer de fosfatos 10 mM a pH 7.4, se tripsinizaron y se centrifugaron a 100 g con centrífuga refrigerada. El nuevo sedimento celular se suspendió en 1 mL de acetona y se sometió a ultrasonidos por 5 minutos. Fueron lisados y posteriormente centrifugados a 15,300 x g durante 15 minutos, y se recupera el sobrenadante. Las cantidades de curcumina y CurcDiSust-D2G-OH se determinaron mediante espectroscopia UV-Vis, leyendo los valores de absorbancia a $\lambda = 480$ nm, apoyados por una curva de calibración de cada compuesto.

5.5 Procedimientos de síntesis

DPTS (Paratoluensulfonato de la 4-(Dimetilamino)piridina)



A. S. Sayyad ; K. Balakrishnan ; P. M. Ajayan *Nanoscale*, **2011**,3, pp. 3605-3608. (Supplementary Information)

En un matraz de bola de dos bocas de 500 mL se acopla una trampa de Dean Stark y un refrigerante, y se colocan 9.13 g (50 mmol) de ácido para-toluensulfónico (*p*-TsOH), un agitador magnético y se purga el sistema con N₂ durante 10 minutos. Posteriormente se adicionan 150 mL de benceno seco. Se colecta el azeótropo benceno-agua (150 mL) a una temperatura de 80 °C con ayuda de la trampa Dean Stark. Una vez secado el *p*-TsOH, se prepara en un matraz de 100 mL una disolución desgasificada con N₂ de 6.108 g (48 mmol) de DMAP con tolueno. Se adiciona con cánula por la segunda boca del matraz y se continúa con la evaporación del benceno, observándose la precipitación de DPTS. Se evapora con cuidado todo el benceno, y se recrystaliza el crudo de reacción con 1,2-dicloroetano (500 mL), para obtener 12.5 g (75 % de rendimiento) de DPTS. Como un sólido de color blanco y cristalino que posee un punto de fusión de: 170-172 °C

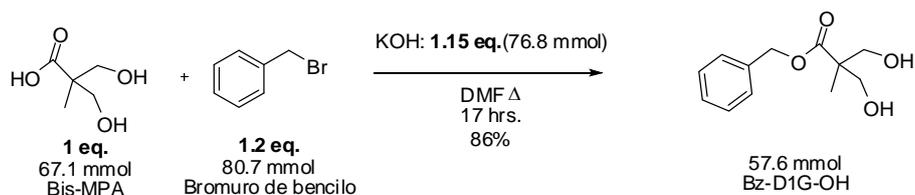
RMN ¹H (400 MHz, cloroformo-*d*, ppm) δ = 14.13 (s, 1H), 8.22 – 8.12 (m, 2H), 7.81 (d, *J*=8.1, 2H), 7.16 (dd, *J*=8.7, 0.7, 2H), 6.76 (dd, *J*=7.6, 1.1, 2H), 3.18 (s, 6H), 2.34 (s, 3H).

RMN ¹³C (101 MHz, cloroformo-*d*, ppm) δ = 157.36, 142.78, 139.87, 139.58, 128.83, 126.04, 106.95, 40.20, 21.40.

FTIR (Diamante cm⁻¹): 2918, 2794 (CH₂-H).

EI+: *m/z* 294 [(M⁺)], 172[M-122] (correspondiente al ácido paratoluensulfónico).

Bz-D1G-OH (Bencil-2,2-bis(metoxi)propionato)



En un matraz de bola de 250 mL se colocan 9 g de Bis-MPA (67.1 mmol), 4.3 g de KOH (76.8 mmol) un agitador magnético y 50 mL de DMF, y se calienta a 120 °C durante una hora hasta observar una disolución homogénea. Terminado el tiempo de reacción se adiciona por el refrigerante 9.6 mL de bromuro de bencilo (13.8 g equivalentes a 80.7 mmol) y se mantiene en agitación y reflujo por 17 h. Completado el tiempo de reacción se evapora la DMF y el crudo de reacción se disuelve en 30 mL de diclorometano, y se realizan tres extracciones líquido-líquido con 100 mL de agua. Se recupera la fase orgánica y se evapora el disolvente. El crudo de reacción se recristaliza por par de disolventes (diclorometano y hexano) para obtener 12.7 g (86 % de rendimiento) de Bz-D1G-OH un sólido de color blanco con un punto de fusión de: 63-66 °C. De ser necesario, el producto se purifica mediante cromatografía flash con 50 g de sílica gel y una fase móvil de hexano-acetato de etilo en proporción 1:1.

RMN ^1H (300 MHz, cloroformo-*d*, ppm) δ = 7.36 (s, 9H), 5.21 (s, 2H), 3.93 (d, $J=11.2$, 2H), 3.73 (d, $J=11.3$, 2H), 2.88 (s, 2H), 1.08 (s, 3H)

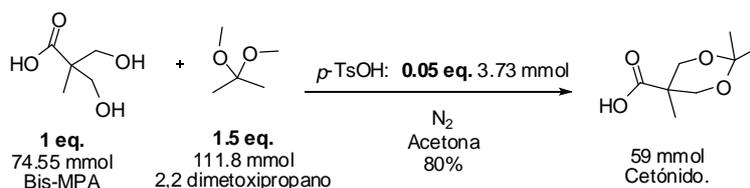
RMN ^{13}C (75 MHz, cloroformo-*d*, ppm) δ = 175.87, 135.79, 128.78, 128.45, 127.99, 68.44, 66.83, 49.38, 17.25.

FTIR (Diamante, cm^{-1}): 3515, 3350 (O-H) 2993, 2883 (CH-H) 1707 (C=O).

EI+: m/z 294 [(M^+)], 225[M+1 (H)].

Cetónido

Ac.-D1G-P (Ácido isopropilideno-[G2]-COOH)



En un matraz de 250 mL seco se colocan 10 g de Bis-MPA (74.55 mmol), 0.71 g de *p*-TsOH (3.73 mmol), un agitador magnético, y sella el sistema con tapón de goma. Se purga con con nitrógeno y se adicionan 50 mL de acetona seca, agitando hasta disolver la mezcla de reacción. Se agregan entonces 18 mL del 2,2-dimetoxipropano y se mantiene la agitación durante 3 h. Terminado el tiempo de reacción, se prepara una disolución saturada de gases de NH₄OH en 2 mL de etanol sobre malla molecular, y se adiciona vía cánula al matraz hasta observar la formación de un precipitado, que se re disuelve en diclorometano. Posteriormente se realizan 3 extracciones con 20 mL de agua y la fase orgánica se evapora. El crudo se disuelve en una mezcla de diclorometano-acetato de etilo 1:1, y se coloca en un recristalizador por un día, para obtener 10.3 g del producto como cristales blancos con un punto de fusión de 116-117 °C.

RMN ¹H (300 MHz, cloroformo-*d*, ppm) δ = 4.19 (d, *J*=12.0, 2H), 3.68 (d, *J*=12.1, 2H), 2.18 (s, 1H), 1.45 (s, 3H), 1.42 (s, 3H), 1.22 (s, 3H).

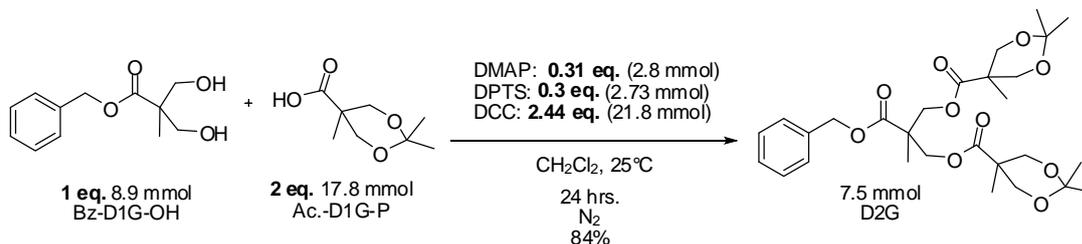
RMN ¹³C (75 MHz, cloroformo-*d*, ppm) δ = 180.10, 98.49, 66.04, 41.87, 25.42, 22.04, 18.55.

FTIR (Diamante, cm⁻¹): 2993, 1069, 827 (CH₂-H y CH-H) 1717 (C=O).

EI+: m/z 174 [(M⁺)], 159[M-15 (CH₃)].

Dendrón de segunda generación

D2G (Isopropilideno-[G2]-CO₂CH₂C₆H₅)



En un matraz de bola de 100 mL seco se agregan 2 g de Bz-D1G-OH (8.9 mmol), 3.094 g de Ac.-D1G-P (17.8 mmol), 0.806 g de DPTS (2.73 mmol), 0.343 g de DMAP (2.8 mmol) y la mezcla se agita magnéticamente bajo atmósfera de N₂ durante 10 minutos. Se agregan entonces 35 mL de diclorometano bidestilado y secado sobre hidruro de calcio. Posteriormente se colocan 4.506 g (2.18 mmol) de DCC en un matraz de bola de 10 mL previamente, se purga con N₂ durante 10 minutos, agregando posteriormente 10 mL del mismo diclorometano seco. La DCC en disolución se trasvasa vía cánula hacia la mezcla de reacción, manteniendo la agitación y la atmósfera de nitrógeno por 24 h. , a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de reacción, se agrega 1 mL de metanol, se agita por 30 minutos y se filtra con celita el sólido formado (DCU). La fase líquida se lleva a sequedad y el resto de la DCU se recrystaliza con una mezcla de hexano-acetato de etilo en proporción 1:1. Una vez retirada la mayor cantidad posible de DCU, el crudo de reacción se purifica con 100 g de sílica gel (de poro 60 Å y 70 - 230 mesh) en una columna de 4 cm de diámetro y una mezcla de elución de hexano-acetato de etilo 7:3 en modo gradiente hasta 100 % de acetato de etilo, para obtener 4.02 g (84 % rendimiento) del producto D2G, un líquido viscoso de coloración ligeramente ámbar.

RMN ¹H (400 MHz, cloroformo-*d*, ppm) δ = 7.35 (s, 2H), 5.17 (s, 2H), 4.36 (sd, *J*=1.5, 4H), 4.12 (d, *J*=11.9, 4H), 3.59 (d, *J*=11.7, 4H), 1.42 (s, 6H), 1.35 (s, 6H), 1.32 (s, 3H), 1.10 (s, 6H).

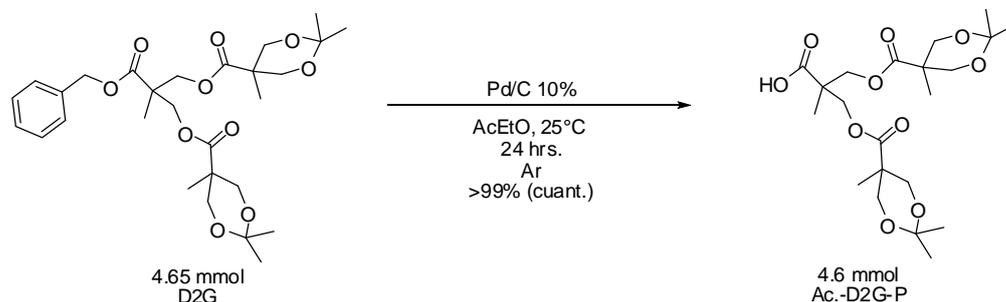
RMN ¹³C (101 MHz, cloroformo-*d*, ppm) δ = 173.46, 172.35, 135.46, 128.58, 128.37, 128.19, 98.02, 66.89, 65.88, 65.27, 46.79, 41.98, 25.06, 22.13, 18.41, 17.70.

FTIR (Diamante, cm⁻¹): 2992, 2937, 2877, 1079, 831 (CH₂-H y CH-H) 1733 (C=O).

EI+: *m/z* 536 [(M⁺)], 521[M-15 (CH₃)].

Dendrón de segunda generación con terminación focal ácida

Ac.-D2G-P (Isopropiliden-[G2]- COOH)



En un matraz de bola de 100 mL seco se colocan 2.5 g (4.65 mmol) de D2G, 60 mL de acetato de etilo, 20 mg de Pd/C al 10 % y un agitador magnético. El sistema se purga con argón por 10 minutos en ausencia de agitación, posteriormente el argón es desplazado por hidrógeno durante 20 minutos. Se provee al sistema de un suministro constante de hidrógeno por medio de globos adaptados al tapón del matraz, y se mantiene una agitación moderada durante 24 h. La reacción se monitorea mediante cromatografía en capa fina, con una mezcla de elución de hexano-acetato de etilo 7:3. Una vez terminada la reacción, se filtra el Pd/C sobre celita, apoyados de un embudo con fondo sinterizado de 1.5 cm de ancho y 5 cm de alto y se enjuaga con acetato de etilo toda la superficie del embudo que tuvo contacto con el producto. Se evapora el sobrenadante a presión reducida y se lleva a sequedad, para obtener 2.08 g (99 % de rendimiento) del producto Ac.-D2G-P, un líquido viscoso de coloración ligeramente ámbar.

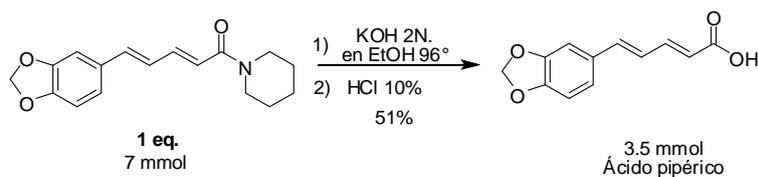
RMN ^1H (301 MHz, cloroformo-*d*, ppm) δ = 4.32 (s, 4H), 4.15 (d, $J=11.9$, 4H), 3.62 (d, $J=12.1$, 4H), 1.40 (s, 3H), 1.34 (s, 3H), 1.30 (s, 3H), 1.13 (s, 6H).

RMN ^{13}C (101 MHz, cloroformo-*d*, ppm) δ = 177.12, 173.60, 98.14, 65.93, 65.56, 41.95, 33.27, 24.49, 22.72, 18.57, 17.92.

FTIR (Diamante, cm^{-1}): 3523(HOOC-) 2987, 2923, 2863, 1077, 829 ($\text{CH}_2\text{-H}$ y CH-H) 1723 (C=O).

EI+: m/z 446 [(M^+)], 431[M-15 (CH_3)].

Ácido pipérico



En un matraz de bola de 100 mL se colocan 2.8 gramos (0.01 moles) de piperina con 25 mL de una disolución 2 N de KOH en etanol al 96 % con H₂O, previamente preparada, y una barra de agitación magnética. Se coloca un refrigerante en posición de reflujo y se calienta la mezcla de reacción con canastilla eléctrica durante 18 h. Transcurrido este tiempo se acidifica la mezcla de reacción, lentamente y en frío, con ácido clorhídrico al 10 % hasta observar la precipitación de un sólido amarillento. Se filtra al vacío y recristaliza con 70 mL de isopropanol por recristalización simple, se obtiene en 1.1 gramos (51 % de rendimiento) como un sólido amarillo que posee un punto de fusión de 213 - 215 °C.

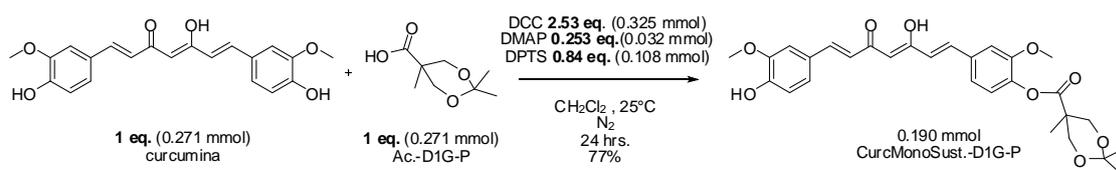
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ = 12.19 (s, 1H), 7.34 – 7.25 (m, 1H), 7.23 (d, *J*=1.6, 1H), 7.03 – 6.94 (m, 3H), 6.92 (d, *J*=8.0, 1H), 6.05 (s, 2H), 5.92 (d, *J*=15.2, 1H).

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ = 167.64, 148.11, 147.99, 144.61, 139.79, 130.52, 124.86, 123.10, 121.15, 108.52, 105.70, 101.38.

FTIR (Diamante, cm⁻¹): 2932, 2923 (CH-H) 1682 (C=O).

EI+: *m/z* 218 [(M⁺)], 201[M-17 (OH)].

CurcMonoSust.-D1G-P



En un matraz de bola de 50 mL seco, se agregan 100 mg de curcumina (0.271 mmol), 47.3 mg de Ac.-D1G-P (0.271 mmol), 33.9 mg de DPTS (0.108 mmol), 3.97 mg de DMAP (0.032 mmol) bajo agitación magnética. El sistema se sella y se purga con N₂ durante 10 minutos. Posteriormente se agregan 20 mL de diclorometano bidestilado y secado sobre hidruro de calcio (debe refluirse por lo menos 4 h. para obtener buenos resultados), agitar la mezcla durante una hora protegiendo el matraz de la luz. Transcurrido este tiempo se colocan 206.3 mg (0.325 mmol) de DCC en un matraz de bola de 10 mL previamente secado y se purga con N₂ durante 10 minutos, agregando posteriormente 5 mL del mismo diclorometano seco. La DCC en disolución se trasvasa vía cánula hacia la mezcla de reacción, manteniendo la agitación y la atmósfera de nitrógeno por 24 h. , a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de reacción se agrega 1 mL de metanol, se agita por 30 minutos y se filtra con celita/sílica gel la dicitclohexilurea (DCU) formada. La fase líquida se evapora a sequedad y el resto de la DCU se recristaliza con una mezcla de hexano y acetato de etilo en proporción 1:1. El crudo de reacción se purifica con 50 g de sílica gel (de poro 60 Å y 70 - 230 mesh) en una columna de 4 cm de diámetro y una mezcla de elución Hexano-acetona 7:3, para obtener 110 mg (77 % de rendimiento) del producto CurcMonoSust.-D1G-P como un sólido de color naranja.

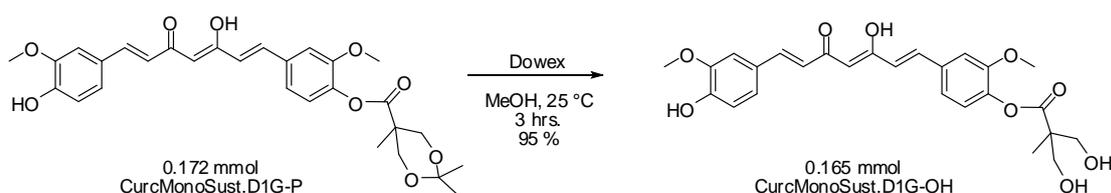
RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ = 16.27 (s, 1H), 9.71 (s, 1H), 7.67 – 7.48 (m, 2H), 7.34 (s, 2H), 7.15 (dd, *J*=16.2, 8.1, 3H), 6.97 (d, *J*=15.9, 1H), 6.88 – 6.74 (m, 2H), 6.13 (s, 1H), 4.16 (d, *J*=11.6, 2H), 3.84 (s, 7H), 3.74 (d, *J*=11.7, 2H), 1.41 (s, 3H), 1.34 (s, 3H), 1.26 (s, 3H).

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ = 184.87, 183.16, 181.34, 151.10, 149.51, 149.30, 147.95, 140.66, 138.93, 133.75, 126.22, 124.60, 123.33, 123.11, 121.09, 121.04, 115.65, 112.12, 111.33, 101.26, 65.01, 56.09, 55.65, 47.47, 22.00, 41.83, 25.32, 18.04.

FTIR (Diamante, cm⁻¹): 3348(HO-Ar) 2989, 2924, 2854, 1080, 822 (CH₂-H y CH-H) 1759 (C=O).

FAB+: *m/z* 524 [(M⁺)], 525[M+1 (H)].

CurcMonoSust.-D1G-OH



En un matraz de bola de 50 mL se colocan 100 mg de CurcMonoSut.D1G-P, se adicionan 30 mL de metanol y se agita magnéticamente a temperatura ambiente hasta solubilizar todo el compuesto. Se agregan 50 mg. de Dowex® 50WX2, verificando que el pH no disminuya de 5. La mezcla de reacción se mantiene en agitación por 3 h. y se monitorea por cromatografía en capa fina, donde el producto final exhibe un R_f de cero en una mezcla de elución hexano-acetato de etilo en proporción 7:3. La fase líquida se evapora a sequedad para obtener 80 mg (95 % de rendimiento) del producto CurcMonoSust.-1G-OH, como un sólido de color rojo.

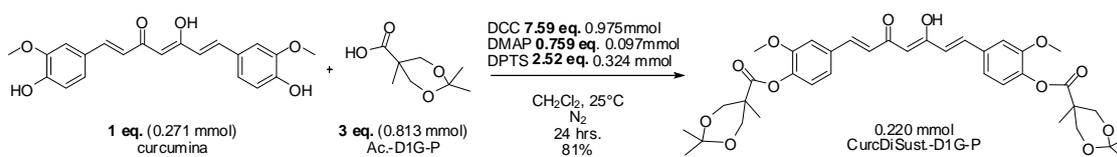
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ = 7.69 – 7.46 (m, 3H), 7.32 (td, *J*=7.2, 1.8, 2H), 7.19 – 7.08 (m, 2H), 7.02 – 6.72 (m, 3H), 6.13 (t, 1H), 3.84 (d, *J*=1.1, 3H), 3.82 (d, *J*=1.2, 3H), 3.67 – 3.60 (m, 4H), 1.20 (s, 3H).

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 184.79, 183.16, 181.44, 151.21, 149.49, 149.29, 147.94, 141.27, 140.65, 139.85, 139.04, 133.46, 126.22, 124.41, 123.25, 121.06, 115.65, 112.06, 111.27, 101.27, 63.52, 56.08, 55.65, 50.54, 16.85.

FTIR (Diamante, cm⁻¹): 3363(-OH) 2924, 2851, (CH₂-H y CH-H) 1751 (C=O).

EI+: m/z 484 [(M⁺)], 368[M-116 (C₅H₉O₃)] (correspondiente al fragmento de cetónido).

CurcDiSust.-D1G-P



En un matraz de bola de 50 mL seco, se agregan 100 mg de curcumina (0.271 mmol), 141.9 mg de Ac.-D1G-P (0.813 mmol), 101.7 mg de DPTS (0.324 mmol), 11.9 mg de DMAP (0.097 mmol) bajo agitación magnética. El sistema se sella y se purga con N₂ durante 10 minutos. Posteriormente se agregan 20 mL de diclorometano bidestilado y secado sobre hidruro de calcio (debe refluirse por lo menos 4 h. para obtener buenos resultados), agitar la mezcla durante una hora protegiendo el matraz de la luz. Transcurrido este tiempo se colocarán 618.9 mg (0.975 mmol) de la DCC en un matraz de bola de 10 mL previamente secado y se purga con N₂ durante 10 minutos, agregando posteriormente 5 mL del mismo diclorometano seco. La DCC en disolución se trasvasa vía cánula hacia la mezcla de reacción, manteniendo la agitación y la atmósfera de nitrógeno por 24 h. , a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de reacción se agrega 1 mL de metanol, se agita por 30 min y se filtra con celita / sílica gel la diciclohexilurea (DCU) formada. La fase líquida se evapora a sequedad y el resto de la DCU se recristaliza con una mezcla de hexano y acetato de etilo en proporción 1:1. El crudo de reacción se purifica con 60 g de sílica gel (de poro 60 Å y 70 - 230 mesh) en una columna de 4 cm de diámetro y una mezcla de elución de diclorometano y metanol 99:1. Para obtener un alto nivel de pureza, adicionalmente se realizó un proceso de exclusión de tamaño, utilizando una columna de 1 metro de alto y 2 cm de ancho con fase estacionaria de Sephadex LH-20 preparada con metanol, para obtener 150 mg (81 % de rendimiento) del producto CurcDiSust.-D1G-P como un sólido de color amarillo brillante.

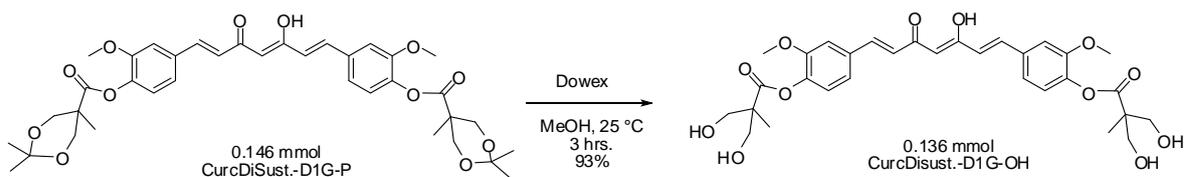
RMN ¹H (301 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 7.66 (d, *J* = 15.9 Hz, 2H), 7.54 (s, 2H), 7.36 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.13 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.01 (d, *J* = 16.0 Hz, 2H), 6.21 (s, 1H), 4.17 (d, *J* = 11.7 Hz, 4H), 3.84 (s, 6H), 3.75 (d, *J* = 11.7 Hz, 4H), 1.41 (s, 6H), 1.34 (s, 6H), 1.26 (s, 6H).

RMN ¹³C (76 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 183.21, 172.01, 151.15, 140.90, 139.83, 133.79, 124.66, 123.18, 121.47, 112.22, 101.74, 97.59, 65.07, 56.13, 41.86, 25.37, 22.03, 18.07.

FTIR (Diamante, cm⁻¹): 2995, 2942, 2871, 1068, 828 (CH₂-H y CH-H) 1751 (C=O).

EI+: *m/z* 680 [(M⁺)], 665[M- 15 (CH₃)].

CurcDiSust.-D1G-OH



En un matraz de bola de 50 mL colocar 100 mg de CurcDiSust.-D1G-P, un agitador magnético y 30 mL de metanol y se agita magnéticamente a temperatura ambiente hasta solubilizar todo el compuesto. Agregar 50 mg de Dowex® 50WX2 verificando que el pH que no disminuya de 5. La mezcla de reacción se mantiene en agitación por 3 h. y se monitorea por cromatografía en capa fina, donde el producto final exhibe un R_f de cero en una mezcla de elución hexano y acetato de etilo en proporción 7:3. La mezcla de reacción se filtra y se evapora a sequedad para obtener aproximadamente 82 mg (93 % de rendimiento) de producto CurcDiSust.-D1G-OH sólido de color rojo.

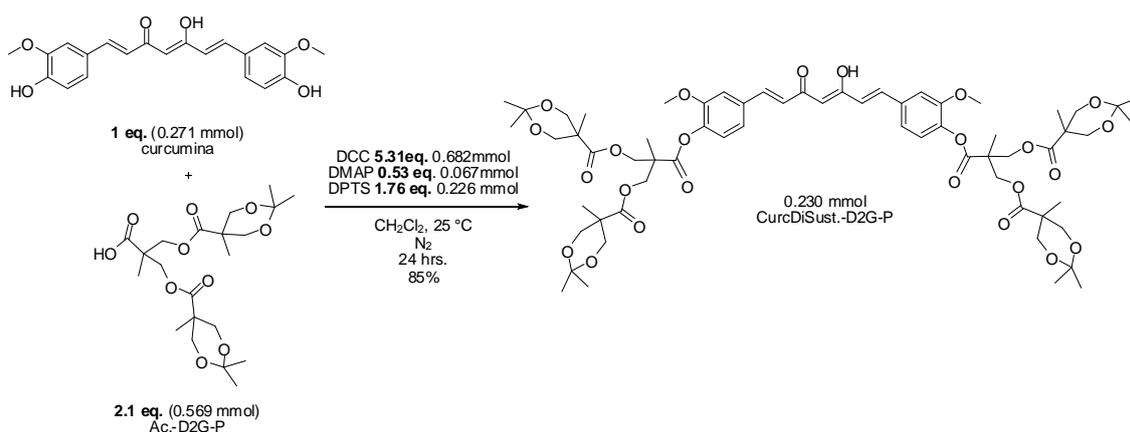
RMN ¹H (301 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 16.18 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 15.9 Hz, 2H), 7.51 (s, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.11 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.00 (d, *J* = 16.0 Hz, 2H), 6.20 (s, 1H), 4.72 (s, 4H), 3.83 (s, 6H), 3.63 (s, 8H), 1.20 (s, 6H).

RMN ¹³C (76 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 183.22, 172.97, 151.27, 141.29, 139.91, 133.45, 124.48, 123.48, 121.37, 112.22, 63.56, 56.14, 50.60, 16.90.

FTIR (Diamante, cm⁻¹): 3333(-OH) 2918, 2844, (CH₂-H y CH-H) 1745 (C=O).

EI+: m/z 600 [(M⁺)], 601[M+ 1 (H)].

CurcDiSust.-D2G-P



En un matraz de bola de 50 mL seco, se agregan 100 mg de curcumina (0.271 mmol), 254.1 mg de Ac.-D2G-P (0.569 mmol), 71.2 mg de DPTS (0.226 mmol), 8.4 mg de DMAP (0.097 mmol) bajo agitación magnética. El sistema se sella y se purga con N₂ durante 10 minutos. Posteriormente se agregan 20 mL de diclorometano bidestilado y secado sobre hidruro de calcio (debe reflujarse por lo menos 4 h. para obtener buenos resultados), y se agita la mezcla durante una hora protegiendo el matraz de la luz. Transcurrido este tiempo se colocarán 433.2 mg (0.975 mmol) de DCC en un matraz de bola de 10 mL previamente secado a 100 °C en estufa la noche anterior. Sellar con un tapón y parafilm. Desgasificar con N₂ durante 10 minutos, agregando posteriormente 5 mL del mismo diclorometano seco. La DCC en disolución se trasvasa vía cánula hacia la mezcla de reacción, manteniendo la agitación y la atmósfera de nitrógeno por 24 h. a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de reacción se agrega 1 mL de metanol, se agita por 30 min y filtra con celita / sílica gel la diciclohexilurea formada. La fase líquida se evapora a sequedad y el resto de la DCU se recrystaliza con una mezcla de hexano y acetato de etilo en proporción 1:1. El crudo de reacción con 65 g de sílica gel (de poro 60 Å y 70 - 230 mesh) en una columna de 4 cm de diámetro y una mezcla de elución de diclorometano y metanol 99:1 para obtener 283 mg (85 % de rendimiento) del producto CurcDiSust.-D2G-P como un sólido de color amarillo/naranja.

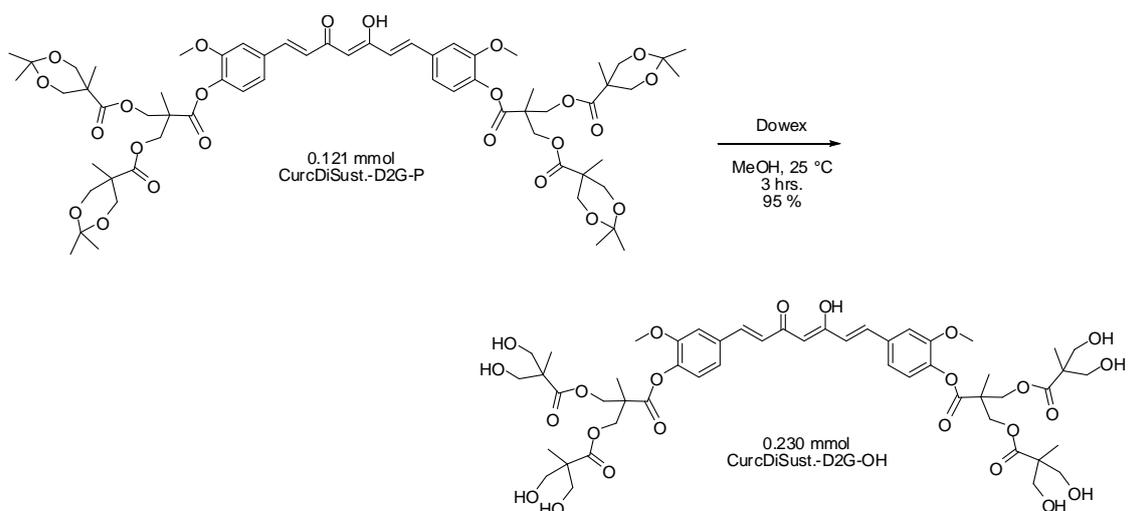
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ = 7.65 (d, *J*=15.8, 2H), 7.54 (sd, 2H), 7.36 (dd, *J*=8.4, 1.8, 2H), 7.15 (d, *J*=8.2, 2H), 7.01 (d, *J*=16.0, 2H), 6.20 (s, 1H), 4.44 – 4.33 (m, 8H), 4.04 (d, *J*=11.6, 8H), 3.83 (s, 6H), 3.65 (d, *J*=11.6, 8H), 1.39 (s, 6H), 1.37 (s, 12H), 1.24 (s, 12H), 1.06 (s, 12H).

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ = 183.20, 173.25, 170.48, 151.04, 140.42, 139.76, 134.05, 124.82, 123.13, 121.40, 112.28, 101.79, 97.49, 65.09, 64.78, 56.15, 46.70, 41.64, 25.92, 21.35, 17.92, 17.27.

FTIR (Diamante, cm⁻¹): 2993, 2945, 2876, 1075, 820 (CH₂-H y CH-H) 1748 (C=O).

FAB+: *m/z* 1225 [(M⁺)].

CurcDiSust-D2G-OH



En un matraz de bola 50 mL colocar 150 mg de CurcDiSust.-D2G-P, se adicionan 35 mL de metanol y se agita magnéticamente a temperatura ambiente hasta solubilizar todo el compuesto. Se agregan 85 mg de Dowex® 50WX2 verificando que el pH que no disminuya de 5. La mezcla de reacción se mantiene en agitación por 3 h. y se monitorea por cromatografía en capa fina, donde el producto final exhibe un Rf de cero en una mezcla de elución de hexano y acetato de etilo en proporción 7:3. La mezcla de reacción se lleva a sequedad para obtener 124 mg (95 % de rendimiento) de producto CurcDiSust.-D2G-OH como un sólido de color rojo.

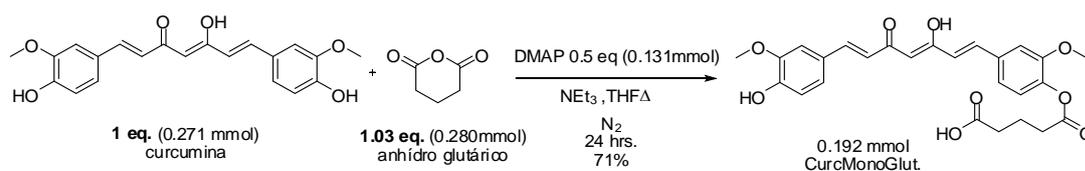
RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ = 7.66 (d, *J*=16.0, 2H), 7.53 (s, 2H), 7.34 (dd, *J*=8.5, 1.9, 2H), 7.15 (d, *J*=8.2, 2H), 7.00 (d, *J*=16.0, 2H), 6.21 (s, 1H), 4.29 (s, 8H), 4.06 (s, 8H), 3.84 (s, 6H), 3.54 – 3.44 (m, 16H), 1.35 (s, 6H), 1.07 (s, 12H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ = 183.17, 174.15, 170.65, 151.12, 140.59, 139.77, 133.96, 124.77, 123.14, 121.40, 112.17, 101.76, 64.74, 63.79, 56.14, 50.41, 46.66, 17.27, 16.73.

FTIR (Diamante, cm⁻¹): 3378(-OH) 2972,2945, 2885, (CH₂-H y CH-H) 1721 (C=O).

FAB+: m/z 1065 [(M⁺)], [1066[M+ 1 (H)]].

CurcMonoGlut.



En un matraz de bola de 50 mL seco, se agregan 100 mg de curcumina (0.271 mmol), 32 mg de anhídrido glutárico (0.280 mmol) y 16 mg de DMAP (0.131 mmol) y se purga el sistema con N_2 durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se agregan 25 mL de THF anhídrido recién destilado. La mezcla de reacción se agita magnéticamente durante 20 minutos a temperatura ambiente, y se agrega lentamente trietilamina seca doblemente destilada hasta observar un cambio de coloración rojizo en el matraz (entre 1.3 y 1.5 mL), entonces se calienta el sistema a reflujo en atmósfera inerte y protegido de la luz. Concluido el tiempo de reacción de 24 h., se purifica el crudo con 50 g de sílica gel (de poro 60 Å y 70 - 230 mesh) en una columna de 4 cm de diámetro y una mezcla de elución 1,2-dicloroetano-metanol 98:2, para 93 mg (71 % rendimiento) del producto CurcMonoGlut. un sólido de color rojo.

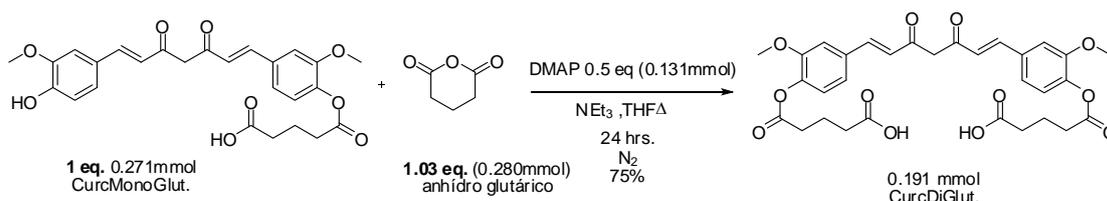
RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, ppm) δ 7.76 – 7.56 (m, 3H), 7.44 – 7.36 (m, 2H), 7.29 – 7.20 (m, 2H), 7.10 – 6.79 (m, 3H), 6.20 (t, $J = 29.1$ Hz, 1H), 3.91 (s, 6H), 2.69 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.43 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.99 – 1.88 (m, 2H).

RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, ppm) δ 184.84, 183.16, 181.37, 173.95, 170.63, 151.08, 149.30, 147.94, 141.52, 140.66, 139.81, 138.97, 133.71, 126.28, 124.55, 123.28, 121.07, 115.65, 111.91, 111.33, 101.68, 55.95, 55.65, 32.37, 19.94.

FTIR (Diamante, cm^{-1}): 3364 (HOOC-) 2965, 2915, 2836 ($\text{CH}_2\text{-H}$ y CH-H) 1706 (C=O).

El+: m/z 482 [(M^+)], 368 [$\text{M}-115$ ($\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_3$)] (correspondiente al espaciador glutárico).

CurcDiGlut.



En un matraz de bola de 50 mL seco, se agregan 130 mg de CurcMonoGlut. (0.271 mmol), 32 mg de anhídrido glutárico (0.280 mmol) y 16 mg de DMAP (0.131 mmol) y se purga el sistema con N₂ durante 10 min. Transcurrido este tiempo se agregan 25 mL de THF anhídrido y recién destilado. La mezcla de reacción se agita magnéticamente durante 20 min. a temperatura ambiente, se agrega lentamente trietilamina seca hasta observar un cambio de coloración rojizo en el matraz (entre 1.3 y 1.5 mL), entonces se calienta el sistema a reflujo en atmósfera inerte y protegido de la luz. Concluido el tiempo de reacción de 24 h. purificar el crudo con 50 g de sílica gel (de poro 60^Å y 70 - 230 mesh) en una columna de 4 cm de diámetro y una mezcla de elución 1,2-dicloroetano y metanol en proporción 98:2 para obtener 114 mg (75 % de rendimiento) del producto CurcDiGlut. un sólido de color rojo intenso.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ = 7.65 (d, *J*=15.9, 2H), 7.52 (d, *J*=1.9, 2H), 7.33 (dd, *J*=8.4, 1.9, 2H), 7.17 (d, *J*=8.2, 2H), 7.00 (d, *J*=15.9, 2H), 6.20 (s, 1H), 3.84 (s, 6H), 2.63 (t, *J*=7.3, 4H), 2.37 (t, *J*=7.3, 4H), 1.86 (t, *J*=7.4, 4H).

Nota: Después de 7 h. de adquisición se observa degradación de **CurcDiGlut** a la **CurcMonoGlut**

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ = 183.20, 173.99, 170.70, 151.13, 141.56, 140.91, 133.69, 124.61, 123.31, 121.47, 112.05, 101.71, 55.99, 32.40, 29.31, 19.97.

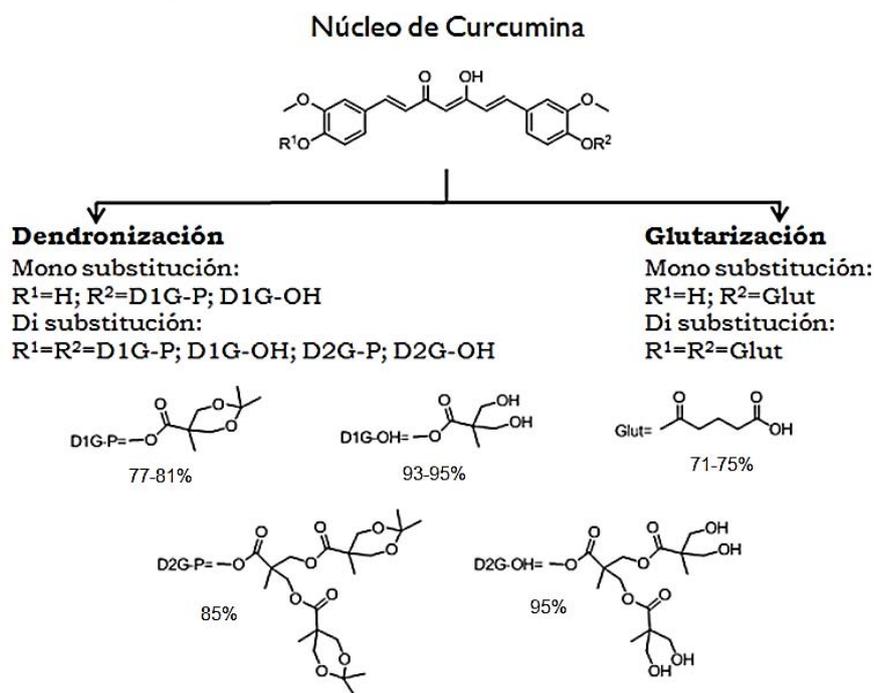
FTIR (Diamante, cm⁻¹): 3450, 3181(HOOC-) 2918, 2840, 2665 (CH₂-H y CH-H) 1716 (C=O).

FAB+: *m/z* 596 [(M⁺)], 597[M+ 1 (H)].

6. Análisis y discusión de resultados

6.1 Síntesis de curcuminoides derivados de dendrones de bis-mpa y anhídrido glutárico.

La estrategia sintética fue planificada de acuerdo al siguiente esquema:



Esquema 12
Curcuminoides sintetizados en este estudio.

La estrategia de síntesis se planeó para obtener un total de 8 curcuminoides mono y di sustituidos con dendrones de primera y segunda generación (hidroxilos protegidos con cetales, o libres en la periferia) así como también mono y di sustituidos a partir de la reacción con anhídrido glutárico (esquema 12).

Para la síntesis de los dendrones de primera y segunda generación se partió del compuesto bis-MPA, que se somete a reacciones de protección (del grupo ácido con bencilo y de los alcoholes con 2,2-dimetoxipropano) y desprotección (del grupo bencilado con Pd/C y del cetónido con resina ácida Dowex® 50WX2 -50W), con rendimientos que oscilan entre buenos (77 %) y muy buenos (85 %), dada la fuerza motriz que genera la transformación de DCC a DCU. La purificación para obtener la calidad adecuada de estos productos es muy importante, haciendo especial énfasis en la remoción de la DCU.

Dada su estructura química, la DCU puede interactuar con los dendrones (especialmente los de segunda generación) vía interacciones no covalentes como puentes de hidrógeno, y dado que posee una toxicidad no conocida, su presencia podría afectar pruebas biológicas *in vitro* posteriores.

Para eliminar este subproducto se diseñó un protocolo de purificación que involucra filtraciones múltiples con celita, recristalizaciones por par de disolventes (hexano-acetato de etilo) y una purificación final por cromatografía en columna (ver procedimiento sección 5.4). El

dendrímero de segunda generación posee alta solubilidad en CH_2Cl_2 cuando mantienen su grupo protector cetónido. Una vez eliminado este grupo, la presencia del dendrón con grupos terminales hidroxilo confiere al núcleo de curcumina un balance hidrofóbico/hidrofílico adecuado para exhibir una solubilidad en agua muy superior a la de la curcumina.

Las reacciones de dendronización de la curcumina (en sus diferentes escenarios) se llevaron a cabo en presencia del sistema de DCC/DMAP/DPTS, vía reacciones de esterificación, y las reacciones de glutarización se llevaron a cabo en presencia de DMAP/ NEt_3 , para esterificar el o los fenoles con el anhídrido glutárico.

Para la obtención de la mono esterificación de la curcumina con Ac.-D1G-P (dendrón de primera generación protegido), fue necesario explorar diferentes proporciones de materias primas y volúmenes de CH_2Cl_2 que permitieran obtener el mayor rendimiento posible del compuesto CurcMonoSust-D1G-P. El protocolo más efectivo para la síntesis de este compuesto incluye una estequiometría 1:1 de Ac.-D1G-P y curcumina, en 25 mL de disolvente para 0.271 mmol de esta última. Estas condiciones permiten esterificar *solo uno* de los fenoles de la curcumina.

La síntesis de CurcDiSust-D1G-P, implicó agregar un exceso de D1G-P (dendrón de primera generación protegido) en una proporción 1:3 entre la curcumina y el cetónido, ya que agregar una equivalencia menor a ésta, implica la obtención de una mezcla de productos (CurcMonoSust-D1G-P y CurcDiSust-D1G-P) que no fue posible separar por técnicas convencionales de cromatografía en columna.

En el caso de CurcDiSust.-D2G-P, solo se usó un ligero excedente de 0.1 equivalentes de Ac.-D2G-P (dendrón de segunda generación protegido), ya que es más reactivo y eficiente que Ac.-D1G-P para esterificar a los fenoles de la curcumina. Es tan reactivo que a pesar de varios intentos de mono sustitución, siempre se obtenía una mezcla separable de CurcDiSust.-D2G-P y curcumina. Aparentemente los grupos protectores (dos por cada dendrón) aumentan la electrofilicidad de los carbonilos, presumiblemente por un efecto electroatractor del heterociclo. Es interesante que, no obstante el aumento del impedimento estérico que implica un aumento en la generación del dendrón, la reactividad no se vea comprometida.

Por otro lado, la glutarización de la curcumina, específicamente la mono glutarización, se llevó a cabo tomando como punto de partida un protocolo ya reportado en la literatura; sin embargo, fue necesario hacer modificaciones a este protocolo para obtener rendimientos más altos. Principalmente se varió la cantidad de NEt_3 para asegurar la total desprotonación de la curcumina (cambio de coloración de naranja (curcumina) a rojo (curcumina desprotonada)) con fenol desprotonado), y así garantizar el ataque nucleofílico frente al carbonilo electrofílico del anhídrido glutárico. En el caso de la di glutarización, se siguió el mismo criterio "visual" que asegurara el desplazamiento del equilibrio ácido-base hacia la forma desprotonada de la curcumina.

Para llevar a cabo la di glutarización, fue necesario partir del compuesto mono sustituido (CurcMonoGlut.) ya que de no ser así, el resultado es una mezcla de los productos CurcMonoGlut. y CurcDiGlut. con muy bajos rendimientos del producto deseado.

La purificación de estos curcuminoides se llevó a cabo de manera óptima usando una mezcla de elución para cromatografía en columna de 1,2-dicloroetano y Metanol 99:1 (ver sección 5.4).

Todos los curcuminoides obtenidos son sólidos de colores que van del rojo oscuro al naranja intenso, son sensibles a la degradación al estar en contacto con la luz, así como a altas temperaturas (arriba de 80 °C); por lo que se recomienda mantenerlos alejados de la radiación solar y refrigerados.

Todos los productos se caracterizaron por técnicas espectroscópicas comunes. En el caso de RMN de ^1H y ^{13}C , la adquisición fue realizada en DMSO- d_6 .

Los espectros de RMN- ^1H nos muestran que la curcumina y todos los curcuminoides se encuentran tautomerizados de forma preferente hacia la estructura enólica. Es decir, que la esterificación de los fenoles no afecta la preferencia hacia este tautómero del núcleo de curcumina en nuestros compuestos.

En la figura 17B se puede observar la pérdida de simetría por la mono sustitución en el compuesto CurcMonoSust.-D1G-P, comparado con el espectro de la curcumina (figura 17A). En primera instancia, el ambiente magnético de los grupos aromáticos y del protón en posición alfa a los carbonilos, es muy diferente a aquellos de la curcumina, esto se refleja en el cambio de su desplazamiento y sobre todo en el aumento en la multiplicidad de sus señales.

El compuesto CurcDiSust.-D1G-P mantiene las mismas características de simetría de la curcumina, como se puede observar en su espectro de RMN- ^1H (figura 17C).

De los espectros de RMN- ^{13}C , es notorio el cambio de desplazamiento del carbón cuaternario del heterociclo señalado con las flechas en la figura 17 después de la reacción de desprotección (recuadros F y H en la esquina derecha de la figura 17), lo cual ofrece una evidencia de que los procesos de desprotección se han llevado a cabo. En la figura 17D se observa que en el espectro de RMN- ^{13}C de la curcumina no existe alguna señal. Posterior a la sustitución de uno o ambos fenoles (figuras 17E y 17G) se observa la aparición de la señal del carbón cuaternario del heterociclo. Una vez llevada a cabo la desprotección del cetónido con Dowex® 50WX2 el desplazamiento de éste carbón aumenta significativamente a una mayor desprotección. Desplazándose en ambos casos un aproximado de 10 ppm (figuras 17F y 17H).

La espectrometría de masas también ofrece información valiosa, sobre todo sugiere el posible sitio de acción de los curcuminoides ante generadores de radicales libres.

En la figura 18 se muestra que el sitio donde ocurre la primera fragmentación en la curcumina (figura 18A) y en la CurcMonoSust.-D1G-OH (figura 18B) es en el enlace del oxígeno del grupo fenólico, esto concuerda con el marco teórico revisado en los antecedentes⁷⁷ (página 18), donde se expone que los fenoles de la curcumina son el sitio de acción preferente para la captura de radicales libres.

⁷⁷ Barzegar A. *Food Chemistry* **2012**, 135, pp. 1369–1376

Sin embargo, en el caso de CurcDiSust.-D2G-OH, el mejor escenario que explica la fragmentación por la interacción con un generador de radicales (en este caso la fuerza ionizante de la técnica de masas), es aquel en donde se lleva a cabo la ruptura de enlace en el anillo aromático (figura 18C).

Cabe señalar que esta evidencia de masas demuestra que los fragmentos que se generan para esta molécula son escasos, ya que en el rango de 460 y 1070 m/z, solo aparecen tres señales correspondientes a [1066 (contribución isotópica de M^+ y M^+-H)], [615] y [460] (iones propuestos en la figura 18C), las tres con implicaciones importantes, ya que esto sugiere fuertemente que esta molécula puede generar radicales estables. Todos los compuestos están caracterizados en la sección de espectroscopia y espectrometría (anexo al final de la tesis).

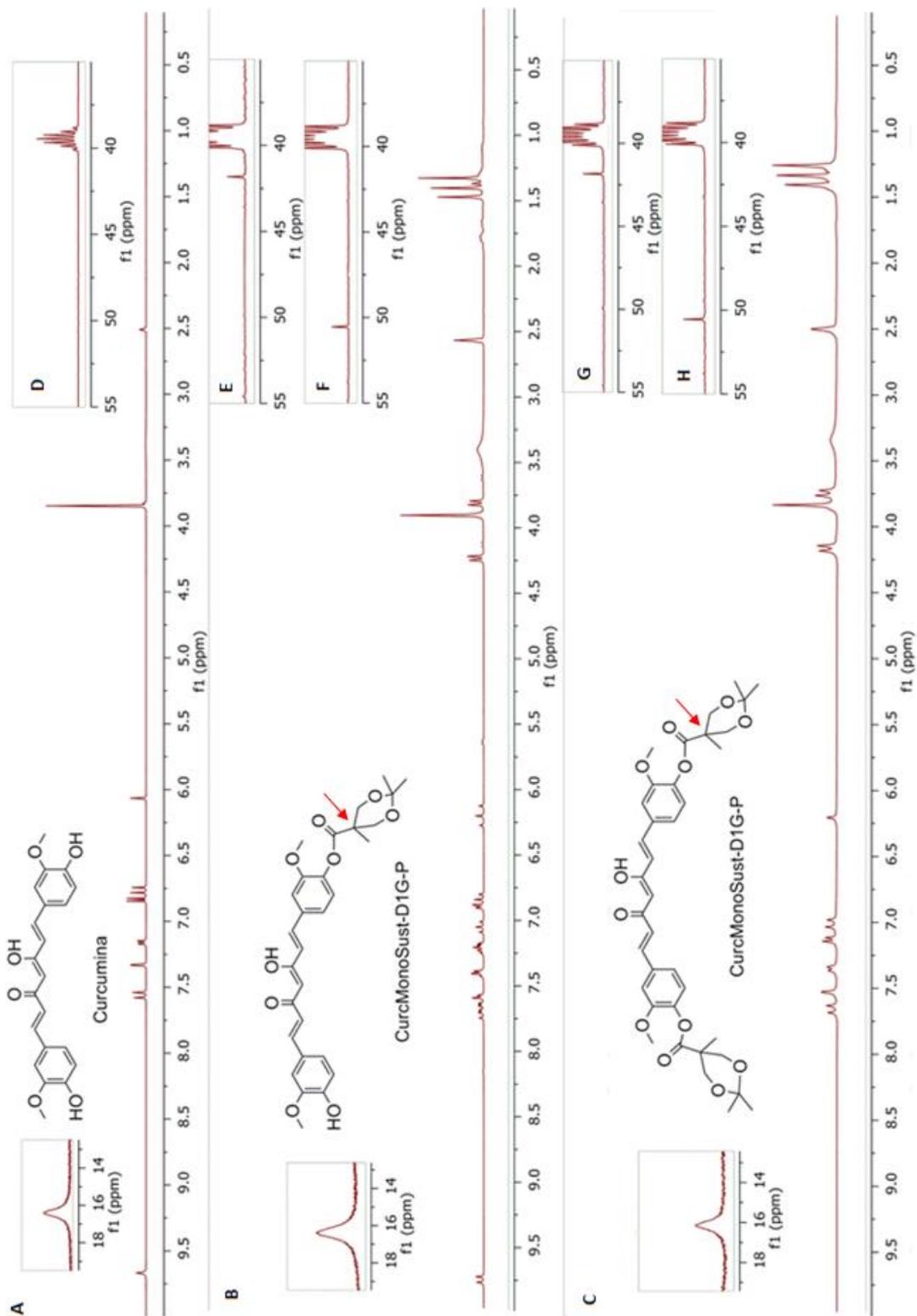


Figura 17.

Comparación de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C entre los compuestos curcumina, CurcMonoSust.-D1G-P y CurcDiSust.-D1G-P. Los espectros de RMN- ^1H A, B y C describen los efectos en la simetría por la mono y di sustitución de la curcumina con el D1G-P (dendrón de primera generación); del lado izquierdo se presentan las señales correspondientes al desplazamiento del grupo enólico de los curcuminoides. Del lado derecho se muestran los espectros de RMN- ^{13}C que demuestran la esterificación con D1G-P (E y G), y la posterior desprotección del cetónido para obtener los hidroxilos en la periferia D1G-OH (F y H). Espectro A: (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), espectros B y C: (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

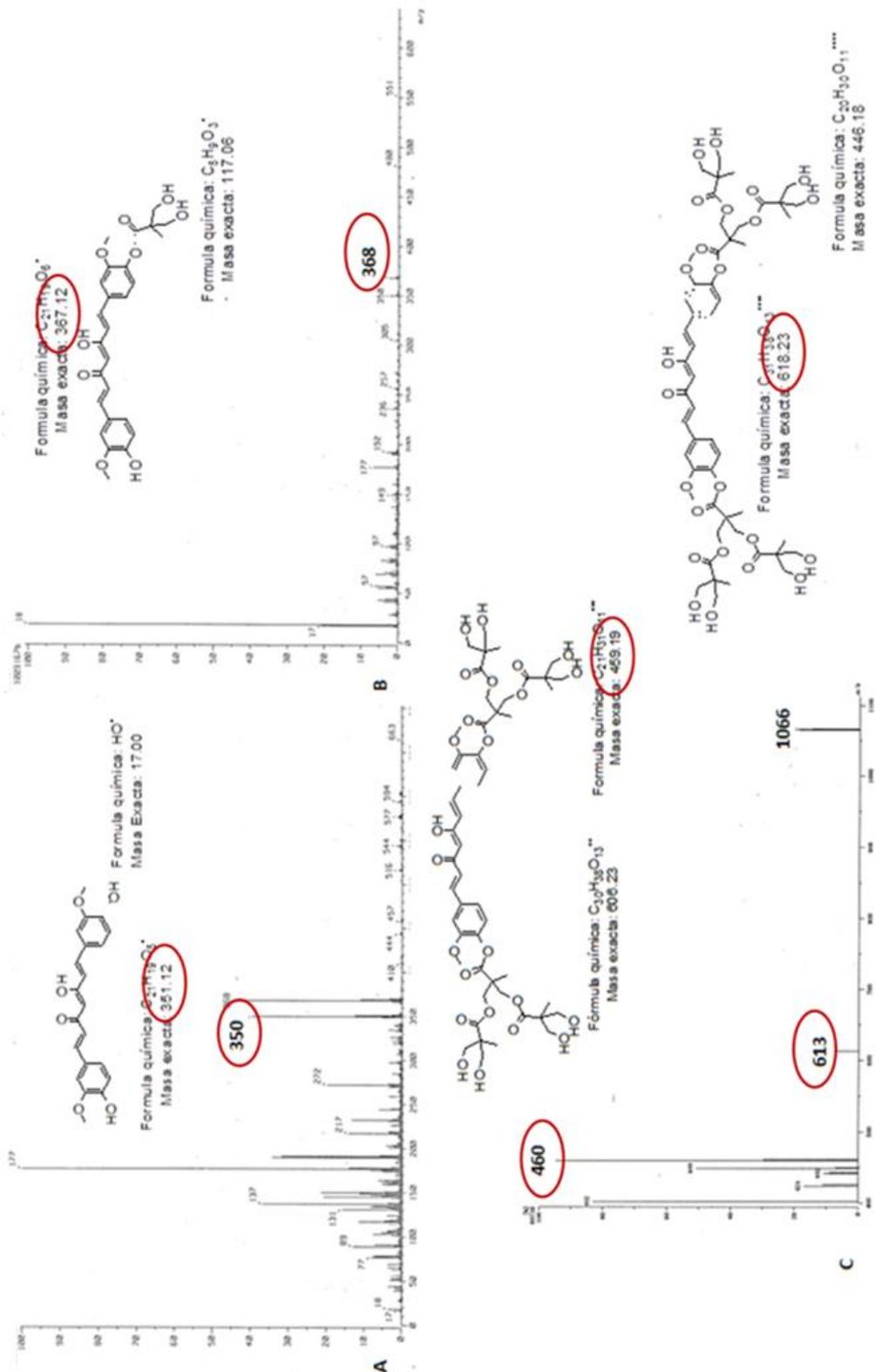


Figura 18.

Espectrometría de masas de los compuestos curcumina, CurcMonoSust.-D1G-OH y CurcDiSust.-D2G-OH en la cual se observa la estabilidad de los radicales de CurcDiSust.-D2G-OH. Tanto la curcumina como CurcMonoSust.-D1G-OH, generan fragmentaciones en la misma región del oxígeno del fenólico. Sin embargo el patrón de fragmentación descrito por CurcDiSust.-D2G-OH se explica con una ruptura en el anillo aromático donde 1066 corresponde a la señal M^+ y M^+-1 asociada a la contribución de la abundancia isotópica. Lo cual sugiere que éste es el sitio donde se genera la especie radicalaria orgánica estable para esta molécula. Espectros A y B: Inyección directa, tipo de ionización EI+. Espectro C: Inyección directa, tipo de ionización FAB+.

6.2 Voltamperometría cíclica

Reducción monoelectrónica de oxígeno (experimentos realizados por el Dr. Julio Aguilar Cordero en el Laboratorio 3C del Edificio A de la Fac. de Química UNAM) .

Para corroborar la formación del radical superóxido en solución, directamente relacionada con un proceso monoelectrónico, se compararon las intensidades de pico teóricas determinadas con la ecuación de Randles y Sevcik (ecuación 1) para el sistema $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$, con las determinadas experimentalmente en este estudio para el mismo sistema.

$$i_p = 0.4463nACF(nFDv/RT)^{1/2}$$

Ecuación 1.

Dónde:

i_p = corriente máxima en Amperes

n = número de electrones transferidos en la reacción redox (en este caso 1)

A = área del electrodo en cm^2

C = concentración en mol/cm^3

F = constante de Faraday en C/mol

v = velocidad de barrido en V/s

D = coeficiente de difusión en cm^2/s

R = constante de gases en $VC K^{-1} mol^{-1}$

T = temperatura en K

Para realizar esta comparación primero es necesario realizar una búsqueda bibliográfica del coeficiente de difusión; D , de la ecuación 1 para O_2 en DMSO. Los valores informados en la literatura para este coeficiente (en percloratos de tetrabutilamonio o de tetraetilamonio), y la solubilidad de O_2 en DMSO saturado con aire son iguales a $2.23 \times 10^{-5} cm^2 s^{-1}$ ($2.8 \times 10^{-5} cm^2 s^{-1}$) y $4.5 \times 10^{-4} M atm^{-1}$ respectivamente⁷⁸.

Para un electrodo de disco de carbono vítreo de 0.15 cm de radio, con una rapidez de barrido de $0.1 V s^{-1}$, usando los valores mostrados anteriormente para la concentración y el coeficiente de difusión de O_2 en DMSO, la corriente de **pico de reducción**, estimada **usando la ecuación de Randles y Sevcik** ($i_p = 0.4463nACF(nFDv/RT)^{1/2}$), **es igual a 14.2 μA** asumiendo un valor de **n igual a 1**. Si **n** fuese igual a 2, el valor de i_{pc} esperado sería de **40.2 μA** .

En un experimento voltamperométrico típico para el sistema $[Fe(CN)_6]^{3-} + e^- \rightarrow [Fe(CN)_6]^{4-}$, la corriente de pico de oxidación de $[Fe(CN)_6]^{4-}$ 2 mM sobre un electrodo de carbono vítreo de $0.071 cm^2$ de área, en DMSO conteniendo además TBAP 0.1 M, obtenida a una velocidad de barrido de $100 mV s^{-1}$ (igual a 24.3 μA), es igual al 92% de la esperada teóricamente a 22 °C para el intercambio de un electrón por molécula de $[Fe(CN)_6]^{4-}$. El cociente de la corriente de pico anódica experimental entre el producto de concentración por la raíz cuadrada de la rapidez de barrido por el área por el coeficiente de difusión es igual a $2.493 \times 10^5 A mol^{-1} s^{1/2}$.

Tomando este resultado en cuenta podemos decir que para una disolución de O_2 en DMSO se obtiene una corriente de pico catódica igual a 9.53 μA usando un electrodo de carbono vítreo de $0.071 cm^2$ de área, a 22 °C. **La corriente de pico (estimada a 1 atm) para un intercambio**

⁷⁸ S. Bollo ; P. Jara-Ulloa ; S. Finger ; L.J. Núñez-Vergara ; J.A. Squella *J. Electroanal. Chem.* , **2005**, 577 (2), pp. 235-242. Fujinaga, T. ; Isutzu, K. ; Adachi, T. *Bull. Chem. Soc. Japan* , **1969**, 42, pp. 140-145. Johnson H.L. ; Pool K.H. ; Hamm R.E. *Anal. Chem.* , **1966**, 38, pp. 183-185.

monoelectrónico es 12.9 μA , mientras que para uno bielectrónico es de 36.4 μA . Si se asume que la presión atmosférica es sólo de 0.76 atm (a la altura de la Ciudad de México), la concentración de oxígeno en DMSO equilibrado con aire debe ser cercana a $3.4 \times 10^{-7} \text{ mol cm}^{-3}$ y **la corriente de pico catódica monoelectrónica calculada es igual a 9.83 μA** , es decir, un 103% el valor experimental. Esto es una clara indicación de que la reducción de oxígeno en DMSO que estamos estudiando es la reducción monoelectrónica a superóxido. El cociente de la corriente de pico anódica experimental entre el producto de concentración por la raíz cuadrada de la rapidez de barrido por el área por el coeficiente de difusión es igual a $2.62 \times 10^5 \text{ A mol}^{-1} \text{ s V}^{1/2}$, mientras que el valor teórico debe ser (para $n = 1$) igual a $2.7 \times 10^5 \text{ A mol}^{-1} \text{ s V}^{1/2}$.

A continuación se presenta la tabla 1 con los valores usados y calculados en ambos casos.

Ferroceno				
C _{Fc} (exp, calc)	0.00199957	M		
C _{Fc} /(mol cm ⁻³)	2.00E-06			
A/cm ²	0.071			
D _{Fc} /(cm ² s ⁻¹)	4.70E-06	F	96485.34	C mol ⁻¹
n	1	R	8.314	J (mol K) ⁻¹
v/(V s ⁻¹)	1.00E-01	T	295.15	K
ip _{calc} /A	2.63E-05	ip _{exp} /ip _{calc}	9.23E-01	
ip _{exp} /A	2.43E-05	D _{calc}	4.05E-06	cm ² s ⁻¹
ip _{exp} /(AC(Dv) ^{1/2})	2.493E+05			
Oxígeno				
CO ₂ (estimada)	4.50E-04	M	Preducida	0.763157895
CO ₂ /(mol cm ⁻³)	3.43E-07			
A/cm ²	0.071			
DO ₂ /(cm ² s ⁻¹)	2.23E-05	F	96485.34	C mol ⁻¹
n	1	R	8.314	J (mol K) ⁻¹
v/(V s ⁻¹)	1.00E-01	T	295.15	K
ip _{calc} /A	9.83E-06	ip _{exp} /ip _{calc}	9.70E-01	
ip _{exp} /A	9.53E-06	D _{calc}	2.12E-05	cm ² s ⁻¹
ip _{exp} /(AC(Dv) ^{1/2})	2.618E+05			

Tabla 1.

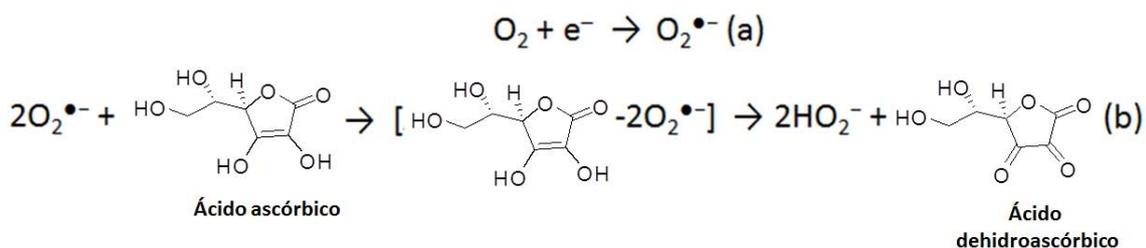
Actividad antioxidante de los curcuminoides sintetizados en éste estudio para neutralizar al radical superóxido.

La actividad antioxidante de los curcuminoides sintetizados en este trabajo fue evaluada de acuerdo a su reactividad ante el radical superóxido, siguiendo un protocolo de formación y monitoreo de este radical vía voltamperometría cíclica en DMSO (ver sección 5.2 en sección experimental).

Cada uno de estos mecanismos por los cuales los curcuminoides sintetizados reaccionan con el radical superóxido, puede ser identificado en voltamperometría cíclica, monitoreando los cambios en las corrientes anódica y catódica.

Mecanismo de donación directa de electrones (DE).

En el caso del mecanismo de donación directa de electrones (DE), los cambios esperados son: disminución de la corriente anódica y disminución de la corriente catódica, según el esquema 13, donde el antioxidante Ácido ascórbico captura radicales libres mediante el mecanismo de DE. La figura 16 ilustra claramente este tipo de mecanismo.



Esquema 13.

Mecanismo de donación directa de electrones (DE). En este esquema se observa como en la etapa (b) como se oxidan cada uno de los enoles a cetonas donando dos electrones en el proceso de oxidación; así como dos protones el resultado es la formación de dos equivalentes de la base conjugada del peróxido de hidrógeno (HO_2^-).

El ciclo inicia con la reducción de oxígeno elemental al radical superóxido (esquema 12a), hasta llegar a una concentración máxima de este radical, que es detectada en el cátodo. Conforme aumenta la concentración del antioxidante (Ácido ascórbico), la concentración del radical disminuirá al formarse un aducto entre ambas especies (esquema 12b), es aquí donde la reducción del superóxido de lleva a cabo para generar la base conjugada del peróxido de hidrógeno (HO_2^-), que al no dismutar en oxígeno elemental, provoca que la magnitud de ambas corrientes (catódica y anódica) disminuya conforme aumente la concentración del antioxidante. Al no existir un donador de protones, la reacción concluye en estas dos etapas. La figura 16 ilustra el mecanismo antes descrito.

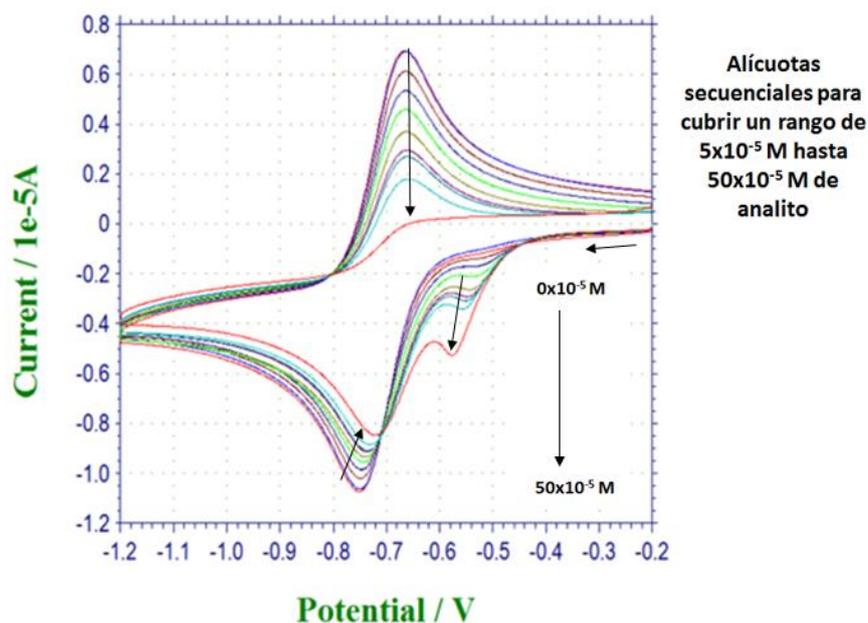
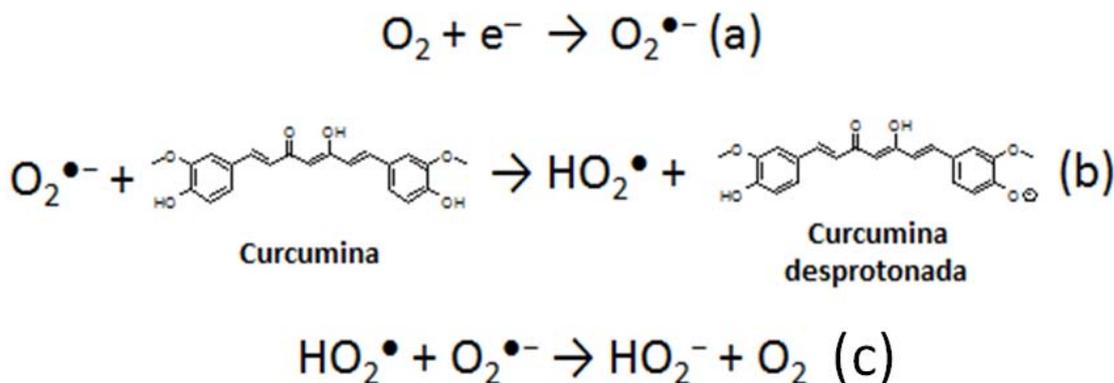


Figura 16.

Voltamperograma del radical superóxido y su captura con Ácido ascórbico. Mecanismo de donación directa de electrones (DE). Este voltamperograma fue adquirido experimentalmente para corroborar los cambios en las intensidades de corriente reportados en la literatura. Se puede observar una disminución en la intensidad de corriente catódica en el proceso de reducción de superóxido, conforme se adicionan alícuotas de Ácido ascórbico a la solución (desde 0×10^{-5} M hasta 50×10^{-5} M). Así mismo se observa una disminución de la corriente anódica durante la adición de dichas alícuotas. Adicionalmente a entre -0.051 y -0.55 V se observa una señal correspondiente a la reacción química acoplada a la reacción principal ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$) correspondiente a: $O_2 + H^+ + e^- \rightarrow HO_2^{\bullet}$.¹³ Esta reacción ocurre debido a la donación de protones del ácido ascórbico al sistema.

Mecanismo de transferencia de protón (TP).

Por otro lado, el mecanismo de transferencia de protón (TP) implica una disminución de la corriente anódica, así como un incremento en la corriente catódica; un registro de corrientes diferente al mecanismo analizado con anterioridad. Esto es explicado de manera gráfica con ayuda del esquema 14.



Esquema 14

Mecanismo de transferencia de protón (TP). En la etapa (b) del proceso se observa como el radical superóxido abstrae de la curcumina un protón para generar el radical hidroperoxilo que en la etapa (c) del proceso dismuta al reaccionar con otra molécula del radical superóxido para generar la base conjugada del peróxido de hidrógeno (HO_2^-) y oxígeno elemental.

La primera etapa de la reacción (esquema 14b) muestra claramente la reacción ácido-base entre curcumina y el radical superóxido que posee un carácter básico. Como resultado de esta reacción es generado el radical hidroperoxilo (HO_2^\bullet) que posee la capacidad de reaccionar con otro radical superóxido (esquema 14c), oxidándolo a oxígeno elemental; es decir, abstrae un electrón de éste, para formar un anión más estable (la base conjugada del peróxido de hidrógeno).

Como se observa en el esquema 13c, no se regenera el radical superóxido al final del proceso, lo que significa que el radical será consumido y por lo tanto no será oxidado en el ánodo, disminuyendo así la magnitud de la intensidad eléctrica en la corriente anódica; por el contrario, existe una regeneración de oxígeno elemental que podrá ser reducido de nuevo por el cátodo, aumentando de esta manera la intensidad de la corriente catódica.

La figura 17 muestra el comportamiento esperado para un analito que reduce al radical superóxido vía un mecanismo de TP.

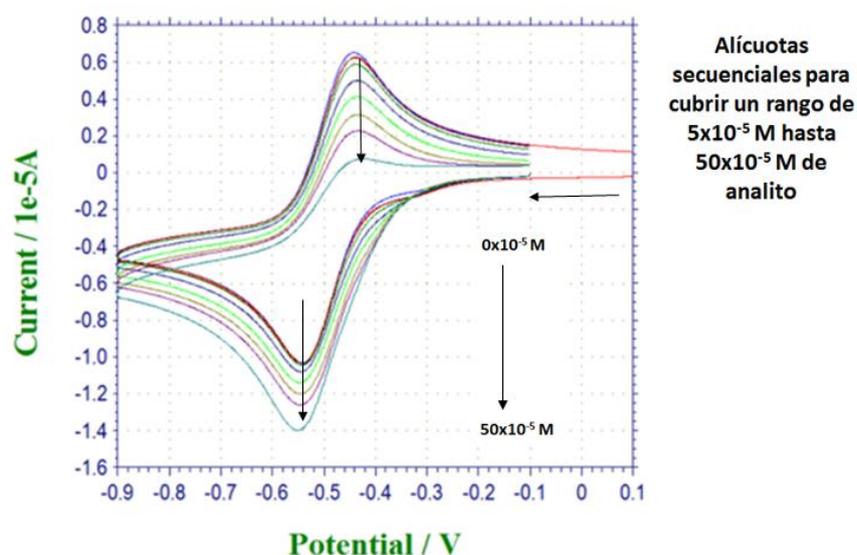


Figura 17.

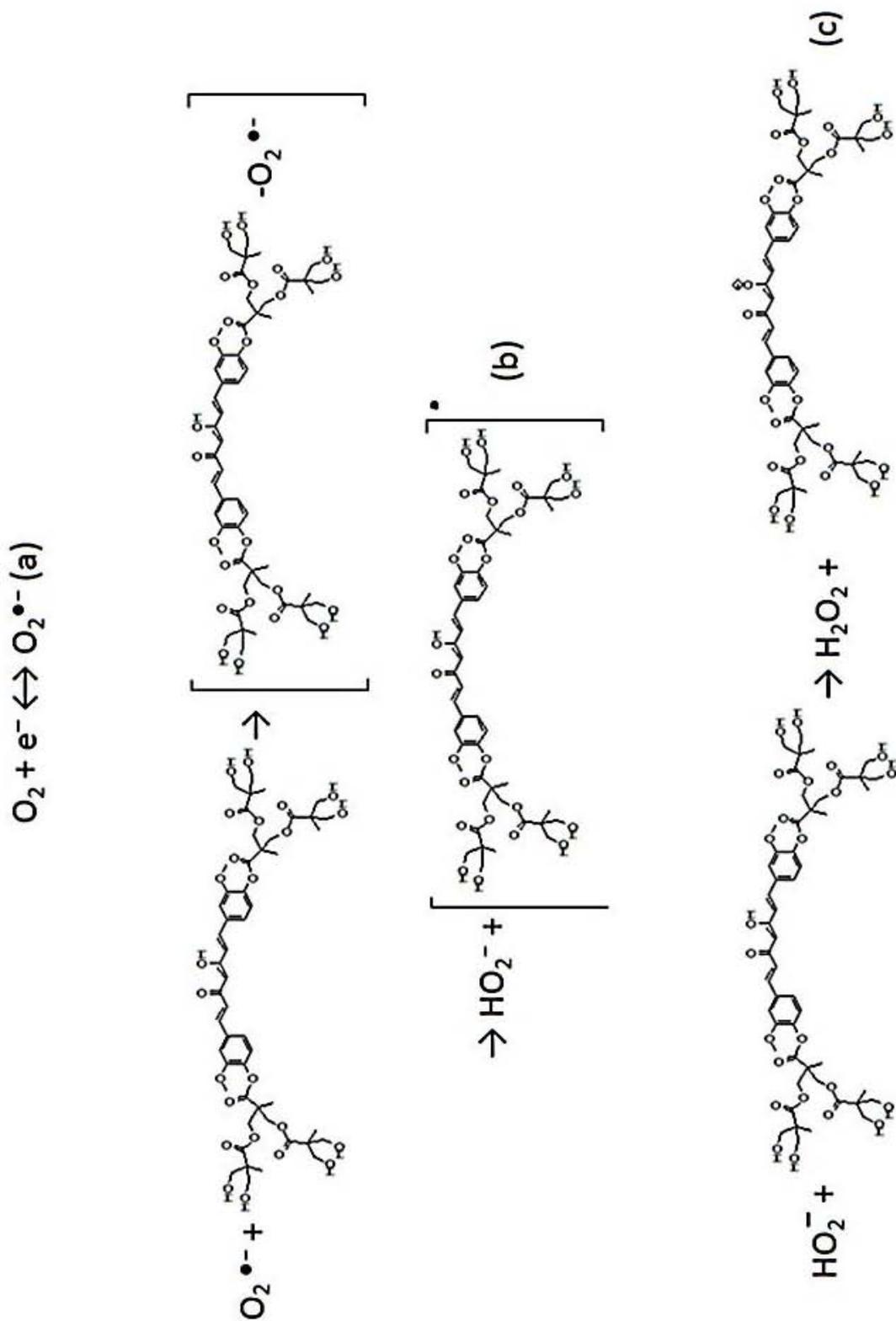
Voltamperograma del radical superóxido y su captura con curcumina. Mecanismo de transferencia de protón (TP).

Este voltamperograma fue adquirido experimentalmente para corroborar los cambios en las intensidades de corriente reportados en la literatura. Se puede observar un aumento en la intensidad de corriente catódica en el proceso de reducción de superóxido, conforme se adicionan alícuotas de curcumina a la solución (desde 0×10^{-5} M hasta 50×10^{-5} M). Así mismo se observa una disminución de la corriente anódica durante la adición de dichas alícuotas.

Mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno (TAH).

Finalmente, en el mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno (TAH) se espera solamente la disminución de la corriente anódica, obedeciendo el proceso representado en el esquema 15.

El mecanismo inicia con el consumo del oxígeno en disolución para formar al radical superóxido (esquema 14a), para posteriormente reaccionar con CurcDiSust.-D2G-OH que genere radicales libres a partir de la donación de un átomo de hidrógeno, formándose el radical $[\text{CurcDiSust.-D2G-OH}]^\bullet$ (esquema 14b). Este es un proceso muy similar al de la donación directa de electrones, sin embargo existe una reacción ácido-base adicional por parte de otra molécula de CurcDiSust.-D2G-OH, lo cual implica que no habrá regeneración de radical superóxido para ser detectado después de la oxidación en el ánodo, disminuyendo así la corriente anódica. La corriente catódica permanecerá sin cambios dado que cada ciclo consumirá una cantidad constante de oxígeno en disolución.



Esquema 15

Mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno (TAH). Este esquema propone que es durante la etapa (b) del proceso donde se genera un complejo entre el radical superóxido y CurcDiSust.-D2G-OH. Posterior a la formación de este complejo se lleva a cabo la transferencia de átomo de hidrógeno para formar la base conjugada del peróxido de hidrógeno (HO_2^-) y el radical orgánico estable $[CurcDiSust.-D2G-OH] \cdot$.

La figura 18 muestra el comportamiento esperado para un analito que reduce al radical superóxido vía un mecanismo de TAH.

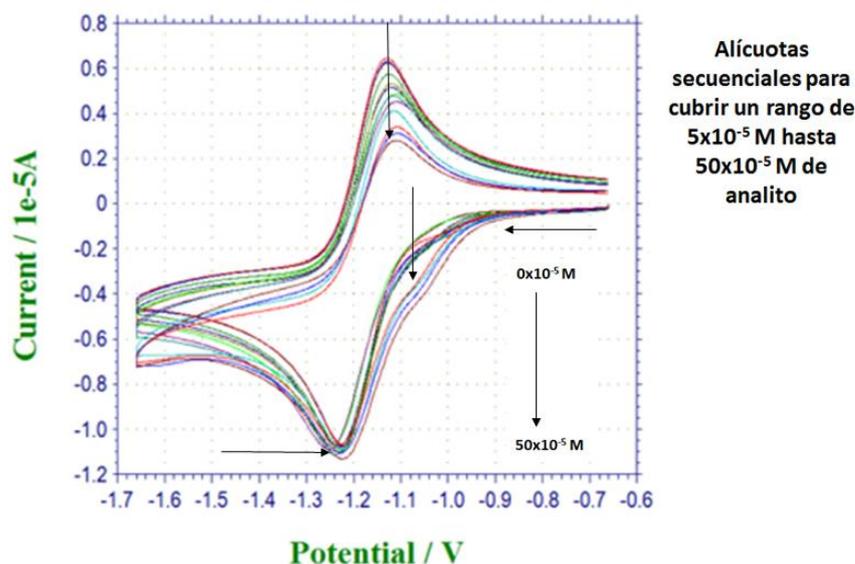


Figura 18.

Voltamperograma del radical superóxido y su captura con CurcDiSust.-D2G-OH. Mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno (TAH). Este voltamperograma demuestra experimentalmente la disminución en la intensidad de pico anódico conforme aumenta la concentración de CurcDiSust.-D2G-OH, mientras que los cambios en la corriente catódica son muy pequeños a bajas concentraciones y prácticamente nulos a concentraciones mayores.

A continuación mostramos el análisis de cada compuesto estudiado por voltamperometría cíclica.

6.3 Análisis de $i_p(O_2/O_2^{\cdot-})$ vs. Concentración de curcuminoides

El interés en el estudio voltamperométrico consiste en evaluar la eficiencia antioxidante de nuestros compuestos, así como indagar cualitativamente cuáles son los mecanismos que operaran cuando reaccionen con el radical superóxido.

La organización de los curcuminoides para su análisis con el radical superóxido obedece a características estructurales, grupos funcionales y reactividad química conocida. Todos serán comparados tomando como referencia el comportamiento voltamperométrico de la curcumina. Así mismo se llevará a cabo una comparación con el Ácido ascórbico⁷⁹ (un antioxidante por excelencia). Se discutirá también la voltamperometría cíclica de la piperina⁸⁰, reportada como potenciadora de la actividad antioxidante de la curcumina), así como del ácido pipérico, como un posible metabolito de la piperina.

⁷⁹ A. de Santiago Zárate. Miniaturización, Diseño y Caracterización de Metodologías Electroanalíticas y Ópticas para el Área de Química Farmacéutica Biológica. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM 2002.

Baeza, Alejandro. Documento de apoyo: Principios de Electroquímica Analítica. (2004) Págs. 2-18.

Disponible en línea: <http://mx.geocities.com/electroquimika/>

Baeza, Alejandro. Documento de apoyo: Electroquímica Analítica, estado del arte. (2006) Págs. 1-12.

Disponible en línea: <http://mx.geocities.com/electroquimika/>

⁸⁰ Shoba G. ; Joy D. ; Joseph T. ; Majeed M. ; Rajendran R. ; Srinivas P. S. S. R. *Planta Med.* 1998, 64(4) pp. 353-356.

Observaciones generales

Todos los compuestos sintetizados en este proyecto exhibieron una reactividad importante frente al radical superóxido, con diferentes mecanismos y eficiencias. De acuerdo a los cambios observados para las corrientes de pico para el sistema ($O_2/O_2^{\cdot-}$) no hay evidencia experimental de una donación directa de electrón (DE), mostrando más bien comportamientos asociados a los mecanismos de transferencia de protón (TP) o transferencia de átomo de hidrógeno (TAH).

Los compuestos sintetizados presentan características antioxidantes diferentes a las de la curcumina. Los resultados muestran claramente que la modificación química de los fenoles de la curcumina, pueden direccionar de manera directa la forma de reaccionar ante el radical superóxido, ya sea por TP o TAH. A continuación se muestra el análisis voltamperométrico, tomando en consideración las siguientes modificaciones sistemáticas de la curcumina: mono ó di sustitución (MonoSust y DiSust), sustitución con dendrones de primera o segunda generaciones (D1G y D2G), grupos terminales protegidos y desprotegidos (-P y -OH) y mono ó di glutarización (MonoGlut. Y DiGlut.), en donde queda de manifiesto que la acidez o polaridad del sustituyente juegan un papel muy importante.

6.3.1 Análisis de $i_p(O_2/O_2^{\cdot-})$ vs. Concentración de curcuminoides de acuerdo al número de sustituciones de dendrones de primera generación (Tabla 2)

Los resultados muestran un comportamiento muy interesante (Gráfica 1), ya que la curcumina ante el radical superóxido muestra claramente características de TP; de igual manera el resto de los compuestos exhiben este comportamiento, con la diferencia de que sus intensidades de pico catódico son menores y sus intensidades de pico anódicas son mayores respectivamente al voltamperograma del radical superóxido en presencia de curcumina. Esto de manera general significa dos cosas, que la capacidad ácida (TP) de los curcuminoides disminuyó, así como su eficiencia para reaccionar frente al radical superóxido. De manera ilustrativa también se muestra el voltamperograma del compuesto CurcMonoSust.-D1G-P (Gráfica 1), ya que es aquel que ilustra mejor el comportamiento de este análisis, consistentemente se puede observar los cambios en aumento de corriente catódica correspondientes al mecanismo de TP.

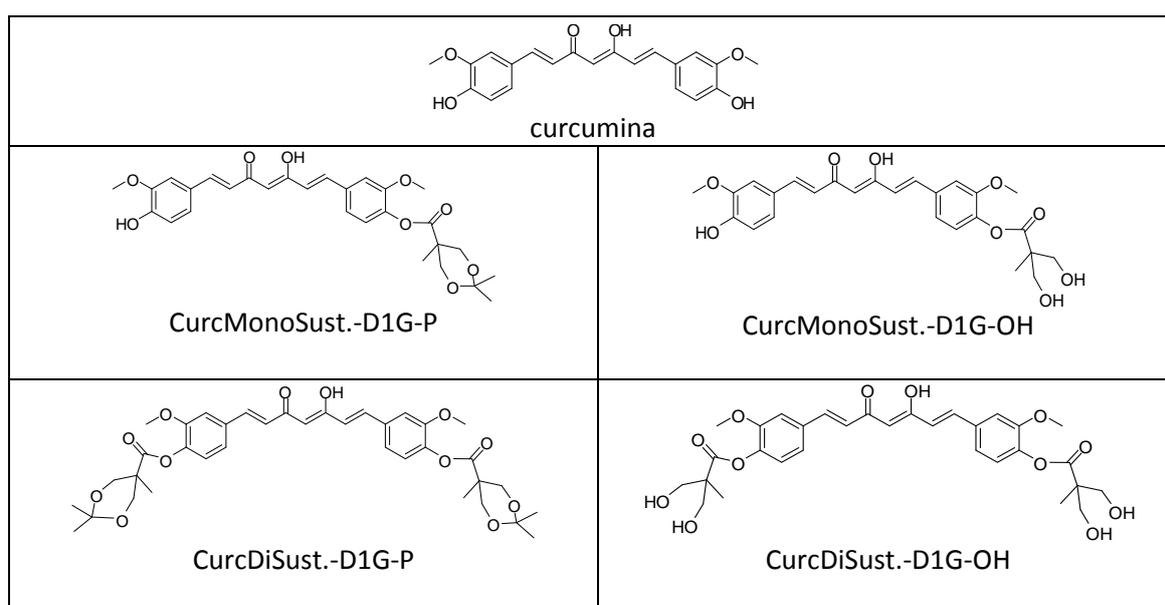


Tabla 2.

Los resultados voltamperométricos de la reacción del radical superóxido en presencia de curcumina, CurcMonoSust.-D1G-P, CurcMonoSust.-D1G-OH, CurcDiSust.-D1G-P y CurcDiSust.-D1G-OH fueron normalizados y graficados utilizando el programa Origin para su análisis, donde ip/ip_0 está definida como el cociente: *intensidad de pico con analito / intensidad de pico sin analito* para cada corriente (Cat. : Catódica y An. : Anódica). Ambas intensidades de corriente son dependientes de la concentración del analito (Gráfica 1).

Haciendo un análisis de la corriente catódica de manera particular, se observa una dependencia de la concentración para el comportamiento de TP de cada uno de los compuestos. En el caso particular de CurcDiSust.-D1G-OH se observa que por debajo de 4.0×10^{-4} M, exhibe un comportamiento similar al de CurcMonoSust.-D1G-P, sin embargo una vez superada esta concentración, CurcDiSust.-D1G-OH es el curcuminóide con mayor tendencia a la TP (sin llegar a superar a la curcumina).

La dependencia más significativa a la concentración corresponde a CurcDiSust.-D1G-P, ya que anterior a 2.0×10^{-4} M exhibe comportamiento similar al resto de los compuestos, una vez superada ésta concentración su capacidad ácida también disminuye. Lo que sugiere una ligera tendencia a actuar hacia un comportamiento diferente a TP.

Para el caso de CurcMonoSust.-D1G-P y CurcMonoSust.-D1G-OH se observa una dependencia a la concentración significativamente menor al resto de los compuestos.

En la Tabla 3 se observa el comportamiento de TP de estos compuestos como función de la concentración tomando como referencia a la curcumina.

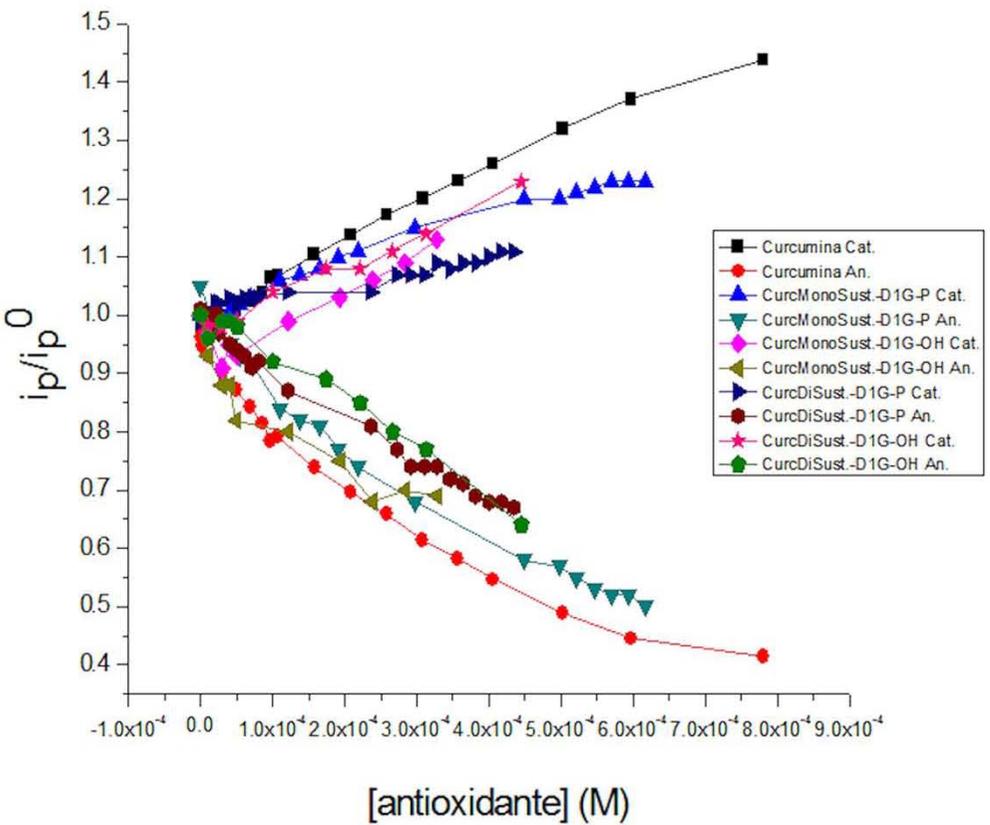
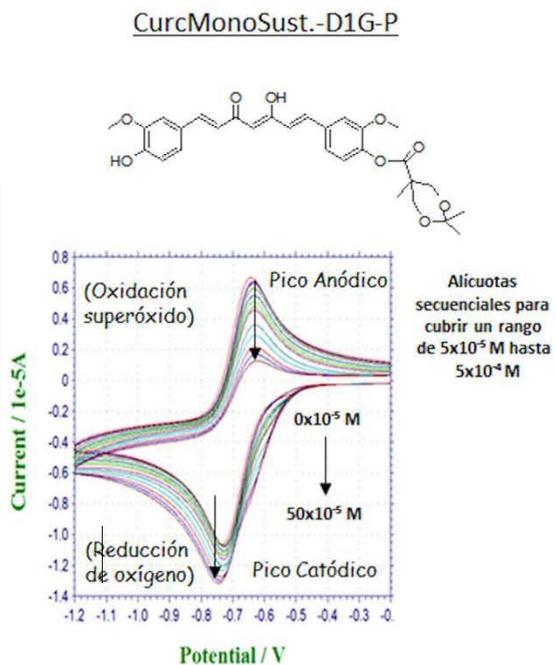
Tendencia al comportamiento TP en función de la concentración.			
Concentración	$0 < 2.0 \times 10^{-4}$ M	$2.0 \times 10^{-4} < 4.5 \times 10^{-4}$ M	$4.5 \times 10^{-4} < 5.0 \times 10^{-4}$ M
Mayor tendencia a TP	curcumina	curcumina	curcumina
	CurcDiSust.-D1G-P	CurcMonoSust.-D1G-P	CurcDiSust.-D1G-OH
	CurcMonoSust.-D1G-P	CurcDiSust.-D1G-OH	CurcMonoSust.-D1G-P
	CurcDiSust.-D1G-OH	CurcMonoSust.-D1G-OH	CurcMonoSust.-D1G-OH
Tendencia de TP a TAH	CurcMonoSust.-D1G-OH	CurcDiSust.-D1G-P	CurcDiSust.-D1G-P

Tabla 3.

Un análisis de la corriente anódica muestra cual es la eficiencia de los compuestos para neutralizar al radical superóxido. La curcumina ostenta la mayor habilidad para reaccionar con dicho ion en el mayor rango de concentraciones de la experimentación. Para CurcMonoSust.-D1G-OH se observa que a bajos niveles de concentración, presenta una reactividad ligeramente mayor hasta 1.0×10^{-4} M, posterior a los 2.5×10^{-4} M se genera un cambio aún mayor en la pendiente de la corriente anódica, lo que implica una disminución de su eficiencia de neutralizar al radical superóxido. CurcMonoSust.-D1G-P muestra un comportamiento constante a lo largo de las variaciones de concentración, siendo la segunda más eficiente después de 2.5×10^{-4} M. CurcDiSust.-D1G-P muestra una menor capacidad reactiva ante el radical superóxido con una menor dependencia a la concentración. En el caso de CurcDiSust.-D1G-OH se observa el comportamiento más interesante, ya que a concentraciones diluidas (anteriores de 1.25×10^{-4} M) mantiene un comportamiento similar al de los demás curcuminoides. Sin embargo, entre 1.75×10^{-4} y 3.25×10^{-4} M muestra la menor actividad de todos los analitos. Este comportamiento queda resumido en la Tabla 4.

Eficiencia en función de la concentración.				
Concentración	$0 < 1.5 \times 10^{-4}$ M	$1.5 \times 10^{-4} < 3.5 \times 10^{-4}$ M	$3.5 \times 10^{-4} < 4.5 \times 10^{-4}$ M	$3.5 \times 10^{-4} < 4.5 \times 10^{-4}$ M
Más eficiente	CurcMonoSust.- D1G-OH	curcumina	curcumina	curcumina
	curcumina	CurcMonoSust.- D1G-OH	CurcDiSust.-D1G- OH	CurcMonoSust.- D1G-P
	CurcMonoSust.- D1G-P	CurcMonoSust.- D1G-P	CurcMonoSust.- D1G-P	-
	CurcDiSust.- D1G-OH	CurcDiSust.-D1G- P	CurcMonoSust.- D1G-OH	-
Menos eficiente	CurcDiSust.- D1G-P	CurcDiSust.-D1G- OH	CurcDiSust.-D1G- P	CurcDiSust.- D1G-OH

Tabla 4.



Gráfica 1.

Curvas Voltamperométricas de curcumina, CurcMonoSust.-D1G-P, CurcMonoSust.-D1G-OH, CurcDiSust.-D1G-P y CurcDiSust.-D1G-OH así como el voltamperograma de CurcMonoSust.-D1G-P. Donde i_p/i_{p0} está definida como: *Intensidad de pico con analito / Intensidad de pico sin analito* para cada corriente (Cat.: Catódica y An.: Anódica). Todos tienen menor tendencia al mecanismo TP que la curcumina y todos son menos eficientes para capturar al radical superóxido, en comparación con la curcumina. Se muestra el voltamperograma de CurcDiSust.-D1G-P ya que presenta un mecanismo combinado de TAH y TP.

6.3.2 Análisis de $i_p(O_2/O_2^{\bullet-})$ vs. Concentración de curcuminoides de acuerdo a la generación de dendrones (primera y segunda generación) di sustituidos en la curcumina (Tabla 5)

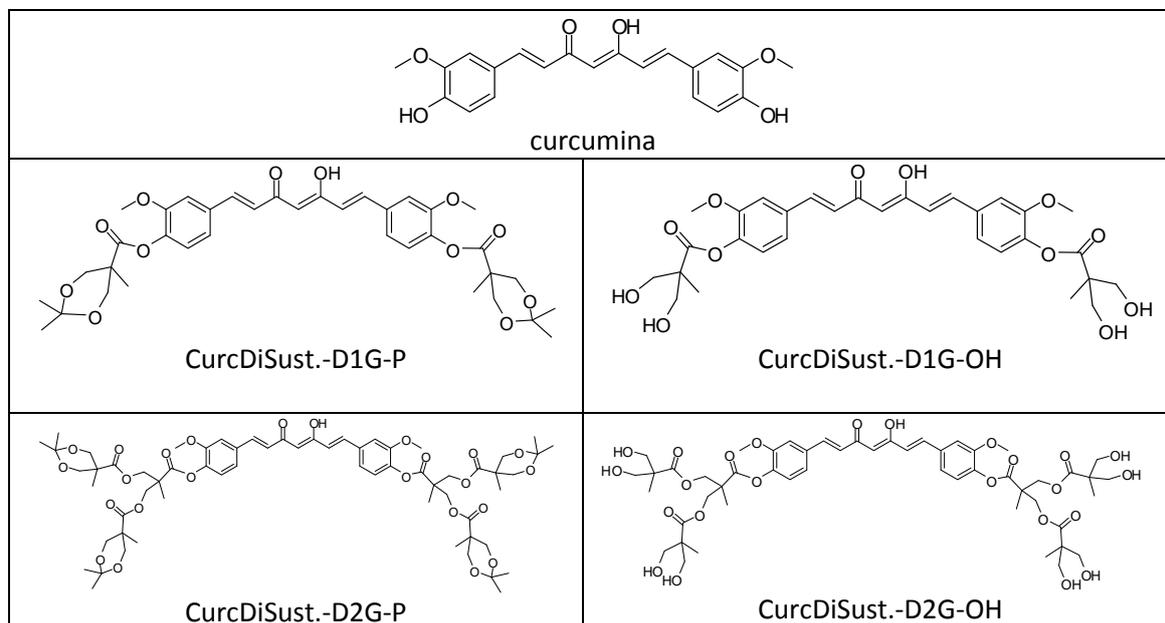


Tabla 5.

Los resultados voltamperométricos de la reacción del radical superóxido en presencia de curcumina, CurcDiSust.-D1G-P, CurcDiSust.-D1G-OH, CurcDiSust.-D2G-P y CurcDiSust.-D2G-OH fueron normalizados y graficados utilizando el programa Origin para su análisis, donde ip/ip_0 está definida como el cociente: *intensidad de pico con analito / intensidad de pico sin analito* para cada corriente (Cat. : Catódica y An. : Anódica). Ambas intensidades de corriente son dependientes de la concentración del analito (Gráfica 2).

Existe una evidente tendencia en la disminución de la pendiente catódica de cada uno de los curcuminoides como función de la generación del sustituyente, hasta transformar por completo el comportamiento de reacción del núcleo de curcumina, de transferencia de protón a transferencia de átomo de hidrógeno. En la Gráfica 2 se observa el voltamperograma de CurcDiSust.-D2G-OH, se puede observar claramente la magnitud del cambio en la corriente anódica y la permanencia de la intensidad de corriente en el pico catódico.

Tomando como referencia a la curcumina, el curcuminoide con mayor tendencia al comportamiento TP es CurcDiSust.-D1G-OH, lo que supondría que eliminar los grupos cetónidos protectores en el compuesto CurcDiSust.-D2G-OH, debería de aumentar dicho comportamiento del núcleo de curcumina, ya que aumentaría la polaridad de la molécula; sin embargo, los resultados experimentales muestran lo contrario. Gratificadamente CurcDiSust.-D2G-OH muestra una clara tendencia a mantener constante la pendiente de la corriente catódica a concentraciones superiores a 1.5×10^{-4} M, y casi imperceptible a concentraciones menores a ésta, demostrando que la variación del sustituyente en la curcumina podría modular el mecanismo de acción frente al radical superóxido. Este comportamiento queda resumido en la Tabla 6.

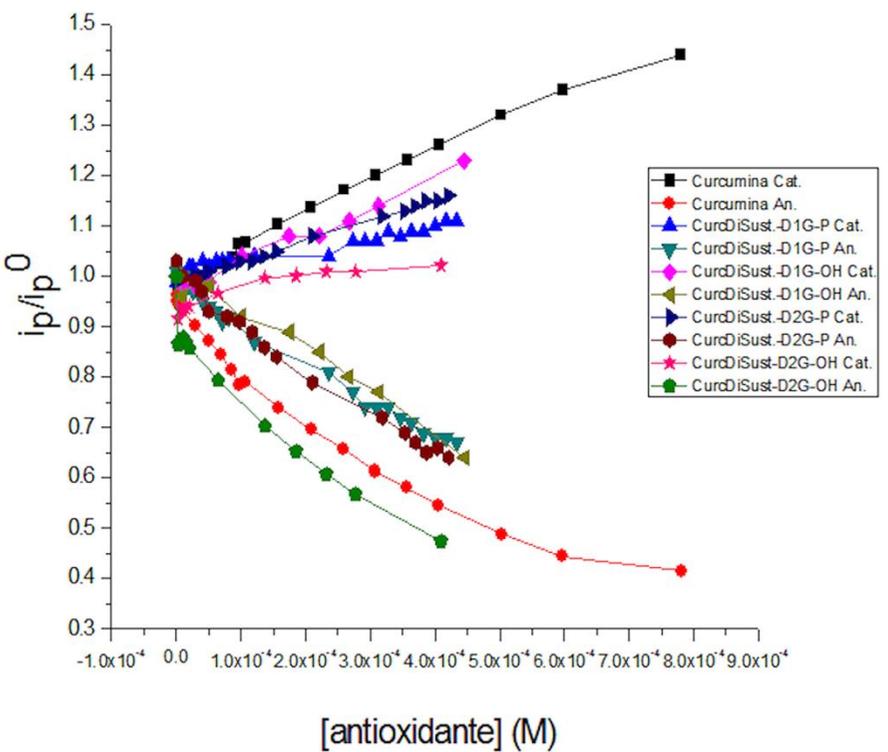
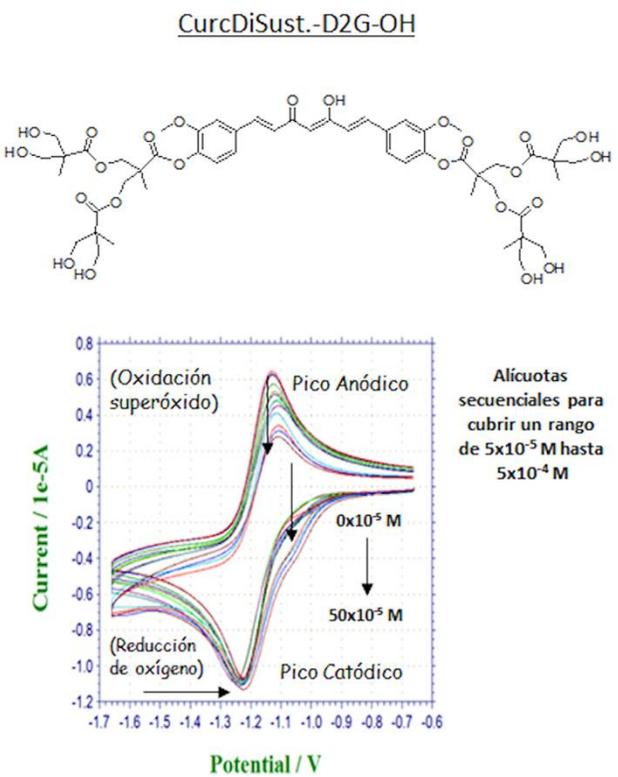
Tendencia al comportamiento TP en función de la concentración.			
Concentración	$0 < 1.5 \times 10^{-4}$ M	$1.5 \times 10^{-4} < 4.5 \times 10^{-4}$ M	$4.5 \times 10^{-4} < 5.0 \times 10^{-4}$ M
Mayor tendencia a TP	curcumina	curcumina	curcumina
Tendencia intermedia a TP	CurcDiSust.-D1G-P	CurcDiSust.-D2G-P	CurcDiSust.-D1G-OH
	CurcDiSust.-D2G-P	CurcDiSust.-D1G-OH	CurcDiSust.-D2G-P
	CurcDiSust.-D1G-OH	CurcDiSust.-D1G-P	CurcDiSust.-D1G-P
Menor tendencia a TP	CurcDiSust.-D2G-OH	-	-
Total preferencia a TAH	-	CurcDiSust.-D2G-OH	CurcDiSust.-D2G-OH

Tabla 6.

La disminución de la corriente anódica es observada en todos éstos; sin embargo, es importante mencionar que en esta ocasión, existe un compuesto con una pendiente menor a la de la curcumina. Esta corriente anódica pertenece a CurcDiSust.-D2G-OH, y se puede relacionar con un mecanismo diferente, y también es más eficiente para neutralizar al radical superóxido, en comparación con la curcumina. Estas características quedan resumidas en la Tabla 7

Eficiencia en función de la concentración.				
Concentración	$0 < 1.5 \times 10^{-4}$ M	$1.5 \times 10^{-4} < 3.5 \times 10^{-4}$ M	$3.5 \times 10^{-4} < 4.5 \times 10^{-4}$ M	$4.5 \times 10^{-4} < 5.0 \times 10^{-4}$ M
Más eficiente	CurcDiSust.-D2G-OH	CurcDiSust.-D1G-OH	CurcDiSust.-D2G-OH	CurcDiSust.-D2G-OH
	curcumina	curcumina	curcumina	curcumina
	CurcDiSust.-D1G-OH	CurcDiSust.-D1G-P	CurcDiSust.-D1G-OH	CurcDiSust.-D2G-P
	CurcDiSust.-D1G-P	CurcDiSust.-D2G-P	CurcDiSust.-D2G-P	CurcDiSust.-D1G-P
Menos eficiente	CurcDiSust.-D2G-P	CurcDiSust.-D1G-OH	CurcDiSust.-D1G-P	CurcDiSust.-D1G-OH

Tabla 7.



Gráfica 2.

Curvas Voltamperométricas de curcumina, CurcDiSust.-D1G-P, CurcDiSust.-D1G-OH, CurcDiSust.-D2G-P y CurcDiSust.-D2G-OH así como el voltamperograma de CurcDiSust.-D2G-OH. Donde i_p/i_{p_0} está definida como: *intensidad de pico con analito / intensidad de pico sin analito* para cada corriente (Cat.: Catódica y An.: Anódica). Se presenta el voltamperograma de CurcDiSust.-D2G-OH ya que exhibe un mecanismo de TAH y es más eficiente que la curcumina para capturar al radical superóxido.

6.3.3 Análisis de $i_p(O_2/O_2^{\cdot-})$ vs. Concentración de curcuminoides de acuerdo al número de sustituyentes y a la acidez de los grupos funcionales (Tabla 8)

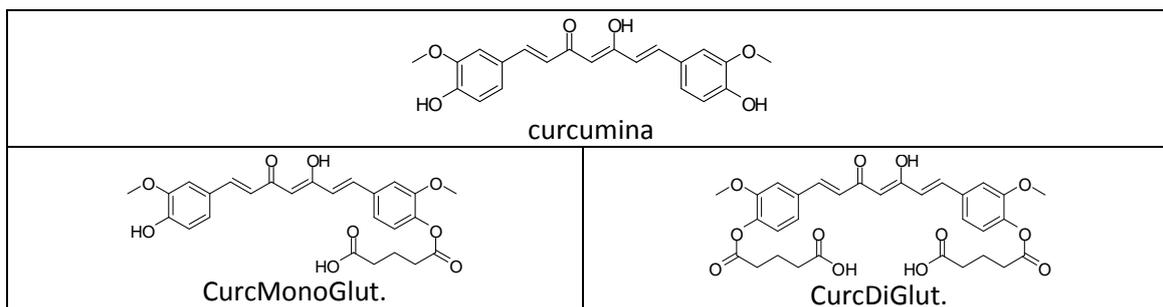


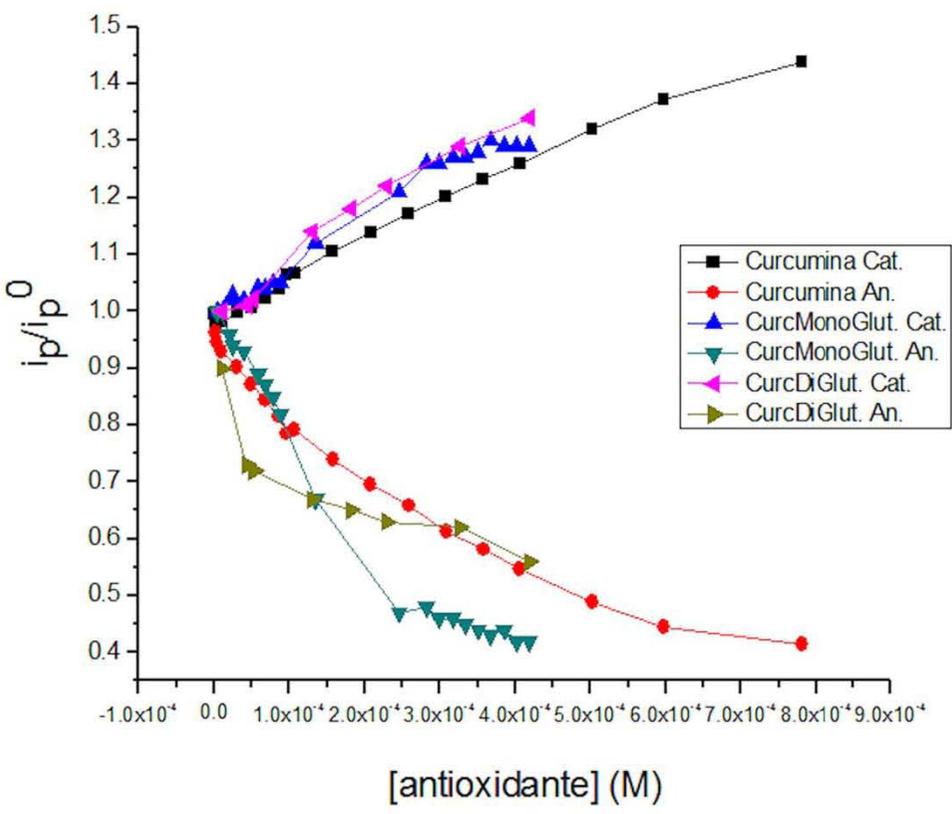
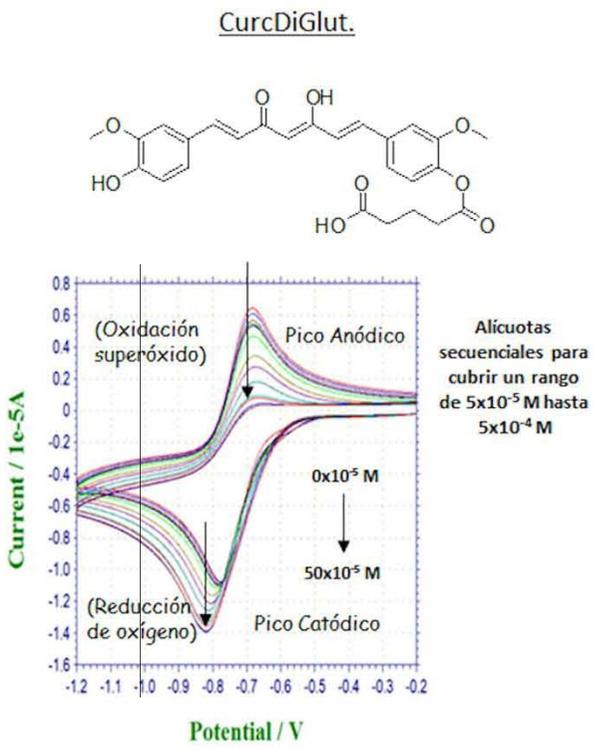
Tabla 8.

Los resultados voltamperométricos de la reacción del radical superóxido en presencia de curcumina, CurcMonoGlut. y CurcDiGlut fueron normalizados y graficados, utilizando el programa Origin para su análisis, donde ip/ip_0 está definida como el cociente: *intensidad de pico con analito / intensidad de pico sin analito* para cada corriente (Cat. : Catódica y An. : Anódica). Ambas intensidades de corriente son dependientes de la concentración del analito (Gráfica 3).

Para el análisis de la corriente catódica se observan los comportamientos esperados, dados los espaciadores ácidos enlazados al núcleo de curcumina. La presencia de los ácidos carboxílicos aumenta la tendencia al comportamiento de TP para ambos curcuminoides, superando a la curcumina misma. Esto sugiere que es la donación de protón por parte del grupo ácido quien participa en la reacción con el radical superóxido. Aunque CurcDiGlut posee dos grupos ácidos, es CurcMonoGlut. La que posee una pendiente ligeramente mayor en el mayor rango de concentraciones con una mayor actividad de TP. Es interesante mencionar que en el caso de la corriente catódica se observa un comportamiento consistente con lo esperado al aumentar el número de grupos ácidos presentes en la molécula. Estas características quedan resumidas en la Tabla 9.

Tendencia al comportamiento TP en función de la concentración.			
Concentración	$0 < 1.5 \times 10^{-4}$ M	$1.5 \times 10^{-4} < 4.5 \times 10^{-4}$ M	$4.5 \times 10^{-4} < 5.0 \times 10^{-4}$ M
Mayor tendencia a TP	CurcDiGlut	CurcDiGlut	CurcDiGlut
	CurcMonoGlut	CurcMonoGlut	CurcMonoGlut
Tendencia a TP	curcumina	curcumina	curcumina

Tabla 9.



Gráfica 3.

Curvas Voltamperométricas de curcumina, CurcMonoGlut. y CurcDiGlut. así como el voltamperograma de CurcMonoGlut. Donde i_p/i_p_0 está definida como: *intensidad de pico con analito / intensidad de pico sin analito* para cada corriente (Cat. : Catódica y An. : Anódica). Todos exhiben un mecanismo de TP y CurcMonoGlut. es más eficiente que la curcumina para capturar al radical superóxido se presenta su voltamperograma que muestra dicho comportamiento.

En el caso de la corriente anódica la eficiencia es significativamente diferente para cada uno de estos compuestos, ya que existe una dependencia de la concentración para neutralizar al radical superóxido. Es CurcMonoGlut. quien exhibe la mayor capacidad antioxidante de todos los compuestos curcuminoides estudiados hasta el momento. En la Gráfica 3 se muestra el voltamperograma de CurcMonoGlut. En él se puede observar la magnitud de cambio tan significativa en la corriente anódica, superada por la CurcDiGlut a concentraciones menores a 1.5×10^{-4} mM. Este comportamiento queda resumido en la Tabla 10.

Eficiencia en función de la concentración.			
Concentración	$0 < 1.5 \times 10^{-4}$ M	$1.5 \times 10^{-4} < 3.5 \times 10^{-4}$ M	$3.5 \times 10^{-4} < 4.5 \times 10^{-4}$ M
Más eficiente	CurcDiGlut.	CurcMonoGlut. (muy alta eficiencia)	CurcMonoGlut. (muy alta eficiencia)
	CurcMonoGlut.	CurcDiGlut.	CurcDiGlut.
Menos eficiente	curcumina	curcumina	curcumina

Tabla 10.

6.3.4 Análisis de $i_p(O_2/O_2^{\cdot-})$ vs. Concentración de curcumina, ácido ferúlico y ácido succínico, comparación entre a la acidez y características estructurales (Tabla 11)

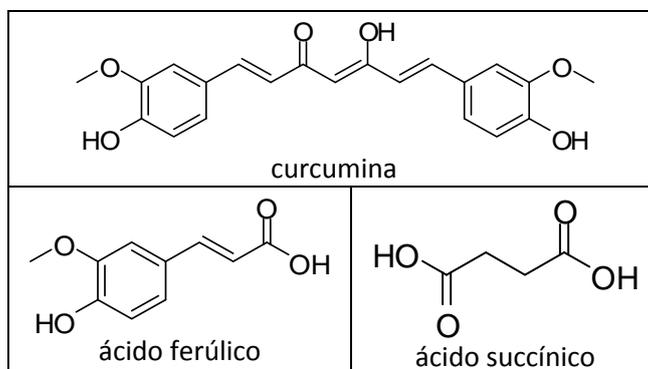
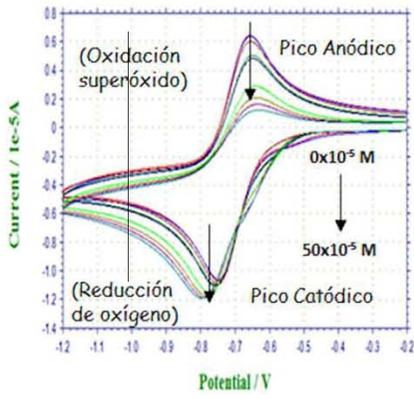
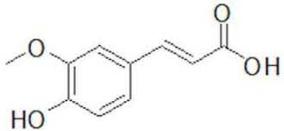


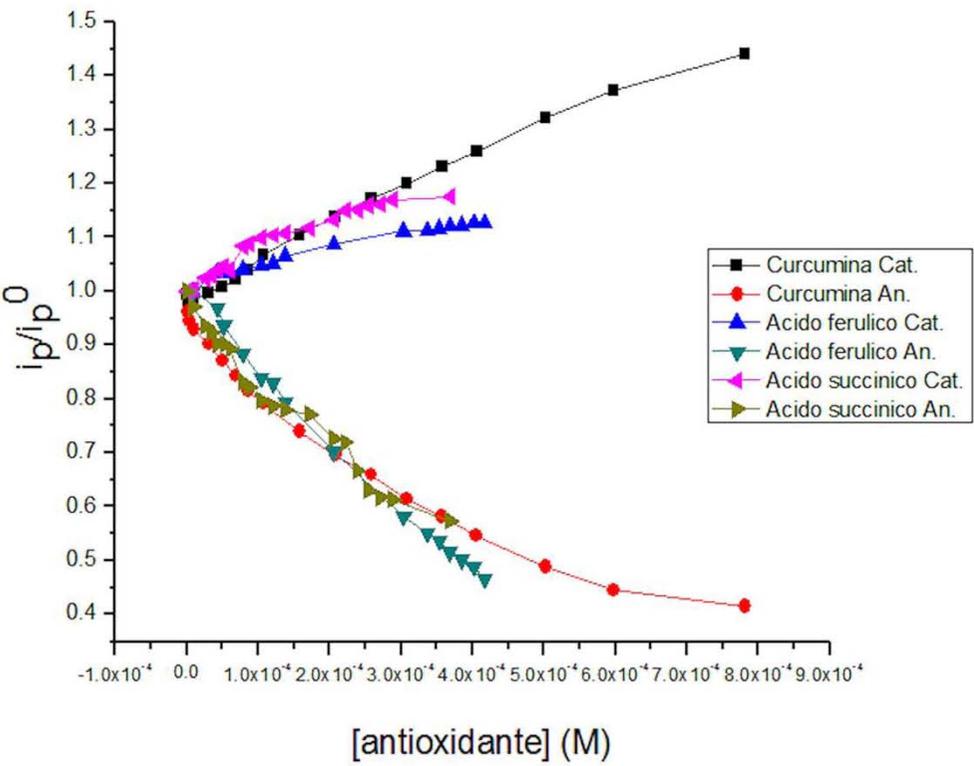
Tabla 11.

Los resultados voltamperométricos de la reacción del radical superóxido en presencia de curcumina, ácido ferúlico y ácido succínico fueron normalizados y graficados utilizando el programa Origin para su análisis, donde ip/ip_0 está definida como el cociente: *intensidad de pico con analito / intensidad de pico sin analito* para cada corriente (Cat. : Catódica y An. : Anódica). Ambas intensidades de corriente son dependientes de la concentración del analito (Gráfica 4).

Ácido Ferúlico



Alicuotas
secuenciales para
cubrir un rango
de 5×10^{-5} M hasta
 5×10^{-4} M



Gráfica 4.

Curvas Voltamperométricas de curcumina, ácido ferúlico y ácido succínico así como el voltamperograma de ácido ferúlico. Donde I_p/I_{p_0} está definida como: *Intensidad de pico con analito / Intensidad de pico sin analito* para cada corriente (Cat.: Catódica y An.: Anódica). Todos exhiben un mecanismo de TP y el ácido ferúlico es más eficiente que la curcumina para capturar al radical superóxido. Se presenta el voltamperograma del ácido ferúlico quien exhibe un mecanismo combinado de TAH y TP.

Para entender mejor la acción antioxidante de la estructura de la curcumina (pK_{a1} : 7.8, pK_{a2} : 8.5 y pK_{a3} : 9.0 en agua a 24 °C), ésta fue comparada con dos ácidos orgánicos diferentes, el ácido succínico (pK_{a1} : 4.2 y pK_{a2} 5.6 en agua a 24 °C) y el ácido ferúlico (pK_a : 4.58 en agua a 24 °C). Ya que el ácido ferúlico además de tener la posibilidad de donar protones, también comparte una similitud estructural con la curcumina. En primera instancia se puede observar que el ácido succínico muestra una actividad TP, muy similar al de la curcumina, como lo muestra la corriente catódica (Gráfica 4) a pesar de tener una significativa diferencia en sus valores de pK_a , esto probablemente atribuido a que la experimentación no se llevó cabo en agua (donde son reportados estos valores de pK_a) sino en DMSO, esto implica diferentes valores de disociación para estos compuestos⁸¹. Así mismo se podría especular en la formación de dímeros o la interacción con fuerzas débiles que alteren dicha reactividad. Para el ácido ferúlico se observa una clara diferencia en su reactividad con el radical superóxido. La corriente catódica muestra una pendiente menor a la curcumina, como puede constatarse en el voltamperograma de la Gráfica 4 (a pesar de que el ácido ferúlico posee una acidez superior a la curcumina según los valores de pK_a reportados en la literatura), lo que sugiere una tendencia a un comportamiento menos ácido, sin embargo es el mecanismo de TP el predominante pues se registra un cambio medible en la corriente de pico catódico. Estas características quedan resumidas en la Tabla 12.

Tendencia a la transferencia de protón en función de la concentración (TP).			
Concentración	$0 < 1.5 \times 10^{-4}$ M	$1.5 \times 10^{-4} < 4.5 \times 10^{-4}$ M	$4.5 \times 10^{-4} < 5.0 \times 10^{-4}$ M
Mayor tendencia a TP	curcumina	curcumina	curcumina
	ácido succínico	ácido succínico	ácido succínico
Menor Tendencia a TP	ácido ferúlico	ácido ferúlico	ácido ferúlico

Tabla 12.

Así mismo se observa una eficiencia similar entre los tres analitos hasta 2.0×10^{-4} M en la que se registra un ligero aumento de la misma, posterior a esta concentración. Esto resalta la importancia del grupo fenólico en el analito de estudio. El ácido succínico muestra una eficiencia análoga a la de la curcumina. Este comportamiento queda resumido en la Tabla 13.

Eficiencia en función de la concentración.			
Concentración	$0 < 2.5 \times 10^{-4}$ M	$2.5 \times 10^{-4} < 3.5 \times 10^{-4}$ M	$3.5 \times 10^{-4} < 4.5 \times 10^{-4}$ M
Más eficiente	curcumina	ácido ferúlico	ácido ferúlico
	ácido succínico	curcumina	curcumina
Menos eficiente	ácido ferúlico	ácido succínico	ácido succínico

Tabla 13.

⁸¹ Tonnesen H. H. ; Masson M. ; T. Loftsson, *Inter. J. of Pharm.* , **2002**, 244 (1-2), pp. 127–135. Meylan W.M. ; Howard P.H. ; *Environ. Toxicol. Chem.* **1991** ,10, pp. 1283-1293

6.3.5 Análisis de $i_p(O_2/O_2^{\bullet-})$ vs. Concentración de curcumina, piperina y ácido pipérico, para corroborar su potencial actividad antioxidante (Tabla 14)

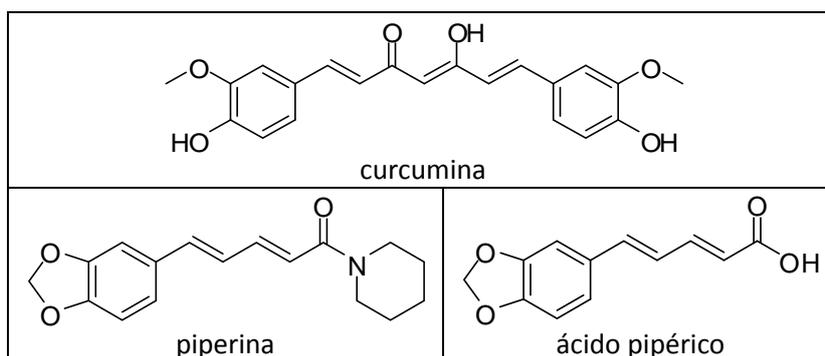


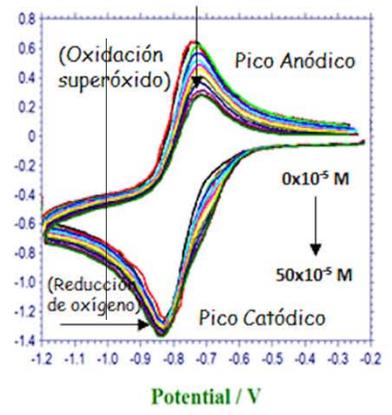
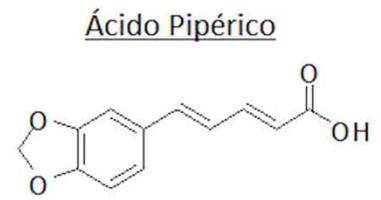
Tabla 14.

Los resultados voltamperométricos de la reacción del radical superóxido en presencia de curcumina, piperina y ácido pipérico fueron normalizados y graficados utilizando el programa Origin para su análisis, donde ip/ip_0 está definida como el cociente: *intensidad de pico con analito / intensidad de pico sin analito* para cada corriente (Cat. : Catódica y An. : Anódica). Ambas intensidades de corriente son dependientes de la concentración del analito (Gráfica 5).

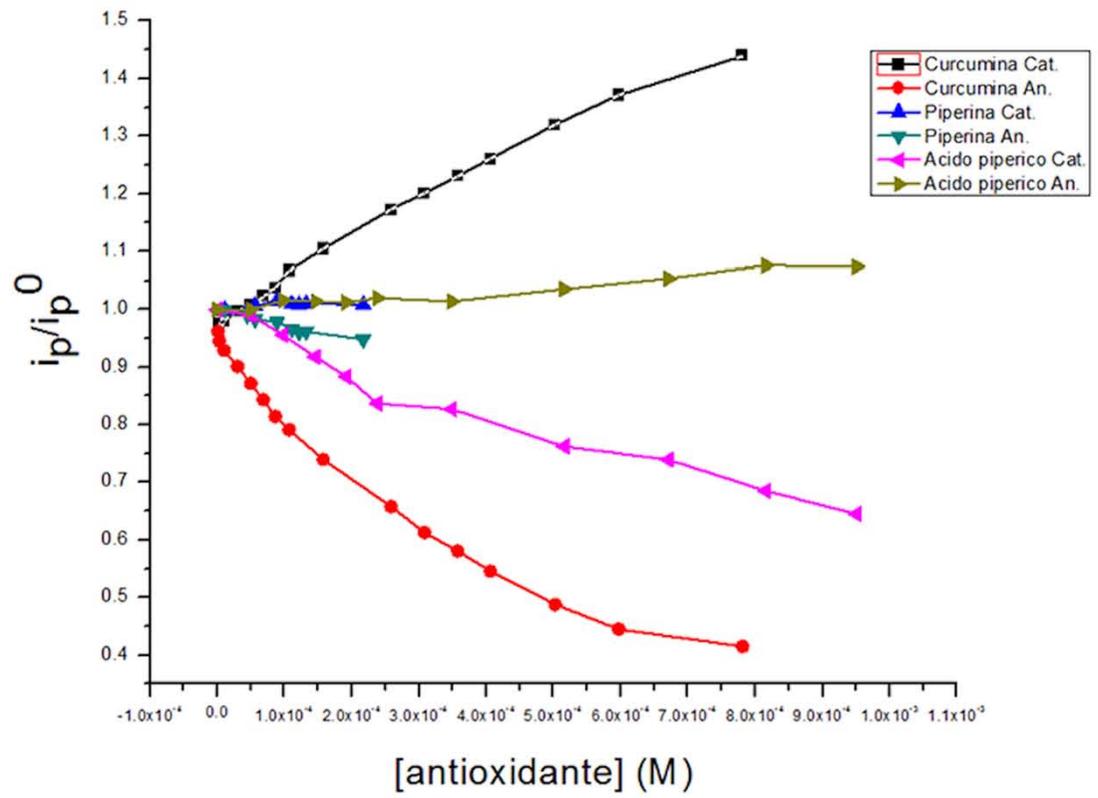
Según la literatura, existe una potenciación del efecto clínico de la curcumina en presencia de la piperina, presumiblemente por un efecto sinérgico metabólico entre ellas⁸². Tomando esto en cuenta se decidió estudiar a la piperina por voltamperometría, para evaluar su posible actividad antioxidante frente al radical superóxido. También se consideró al ácido pipérico en este estudio, ya que es un metabolito secundario de la pimienta.

Los resultados muestran que la piperina no tiene efecto alguno frente al radical superóxido ya que no se registran cambios en ninguna de las corrientes eléctricas, lo que claramente demuestra que esta molécula no tiene actividad antioxidante *per se*. Sin embargo, el ácido pipérico (sintetizado a partir de piperina; sección 5.4) sí presenta actividad frente al radical superóxido (Voltamperograma y curva voltamperométrica de la Gráfica 5), con un comportamiento muy interesante, ya que posee una actividad semiconstante en todo el intervalo de concentración para ambas corrientes, y entre 0 y 3.5×10^{-4} M muestra un comportamiento característico de TAH, a pesar de ser un ácido orgánico, cuyo comportamiento típico debería ser de TP. Superando la concentración de 3.5×10^{-4} M, se observa un aumento sutil en la pendiente de la corriente catódica, lo que sugeriría un comportamiento hacia el mecanismo TP. Esto queda resumido en la Tabla 15.

⁸²C. Moorthi ; K. Kiran ; R. Manavalan ; K. Kathiresan *Asian Pac J Trop Biomed* **2012**, 2, pp. 841–848. H.L. Yu, Q.R. Huang *Food. Chem.* **2010**,119, pp. 669–674. B.B. Aggarwal ; C. Sundaram ; N. Malani ; H. Ichikawa *Adv Exp Med Biol*, **2007**, 595, pp. 1–75. Shoba G. ; Joy D. ; Joseph T. ; Majeed M. ; Rajendran R. ; Srinivas P. S. S. R. *Planta Med.* **1998**, 64(4) pp. 353-356.



Alicuotas
secuenciales para
cubrir un rango
de 5×10^{-5} M hasta
 5×10^{-4} M



Gráfica 5.

Curvas Voltamperométricas de curcumina, piperina y ácido pipérico Succinico así como el voltamperograma de ácido pipérico. Donde I_{pa}/I_{pc} está definida como: *Intensidad de pico con analito / Intensidad de pico sin analito* para cada corriente (Cat. : Catódica y An. : Anódica). La piperina no presenta actividad antioxidante, el voltamperograma ácido pipérico evidencia una clara tendencia a dar una clara tendencia al mecanismo TAH , pero es menos eficiente que la curcumina para capturar al radical superóxido.

Tendencia a la transferencia de protón en función de la concentración (TP).		
Concentración	$0 < 3.5 \times 10^{-4} \text{ M}$	$3.5 \times 10^{-4} < 5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$
Mecanismo TP	curcumina	curcumina
Menor tendencia a TP	-	ácido pipérico
Sin registro de reactividad	piperina	piperina
Mecanismo TAH	ácido pipérico	-

Tabla 15.

En cuanto a la eficiencia registrada por la corriente anódica, el ácido pipérico muestra una significativa desventaja con respecto a la curcumina, ya que, como lo muestra la Gráfica 5, la diferencia tan grande en la magnitud de la pendiente anódica entre la curcumina y el ácido pipérico, coloca a este último como un antioxidante muy ineficiente. (Tabla 16). Estos datos indican que ni la piperina ni el ácido pipérico tienen una acción antioxidante superior al de la curcumina, lo que implica que la sinergia está estimulada por otros mecanismos.

Eficiencia en función de la concentración.	
IC_{50}	
Concentración	$0 < 5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$
Más eficiente	curcumina
Menos eficiente	ácido pipérico
Sin registro de reactividad	piperina

Tabla 16.

Después de este análisis encontramos que las moléculas de mayor interés para aplicación biológica son: CurcMonoGlut. y CurcDiSust-2G-OH, ya que ambas poseen una mayor eficiencia de capturar al radical superóxido, en comparación con la curcumina, además de que el segundo exhibe un mecanismo de acción diferente a todos los curcuminoides sintetizados en este estudio.

6.4 Porcentaje de captura de radicales libres

Para lograr una medida cuantitativa de la eficiencia de captura de radicales libres, se empleó la ecuación 2, definida como⁸³:

$$(I_{Pa}^0 - I_{Pa}^s) \times 100 / I_{Pa}^0$$

Ecuación 2

Donde:

I_{Pa}^0 es la intensidad de pico anódica del radical superóxido sin analito.

I_{Pa}^s es la intensidad de pico anódica del radical superóxido con analito.

Aplicando esta ecuación a los voltamperogramas de algunos de los curcuminoides sintetizados, y al mismo Ácido ascórbico y curcumina como estándares, se obtuvo la gráfica que se muestra a continuación, de la que se puede estimar el valor de IC_{50} (concentración requerida para obtener el 50 % de un máximo efecto; línea horizontal sobre la Gráfica 6).

La línea horizontal en la Gráfica 6 muestra cual es la concentración necesaria de cada compuesto para alcanzar el IC_{50} de captura de radicales libres. Como se observa en la gráfica 6, el Ácido ascórbico alcanza primero la línea de IC_{50} , y le sigue el curcuminóide etiquetado como CurcMonoGlut. El curcuminóide CurcDiSust-D2G-OH y curcumina siguen un perfil muy similar, siendo más eficiente el primero, de acuerdo a su IC_{50} . Esto significa que, tomando como referencia al Ácido ascórbico, el compuesto CurcMonoGlut. es el compuesto más activo de los sintetizados en este proyecto, seguido por CurcDiSust-D2G-OH, ambos más activos que la curcumina misma (Tabla 17).

Efecto de captura de radicales %.		
	Compuesto	IC_{50}
Más eficiente	ácido ascórbico	1.5×10^{-4} M
	CurcMonoGlut	2.3×10^{-4} M
	CurcDiSust-D2G-OH	3.9×10^{-4} M
Menos eficiente	curcumina	5.0×10^{-4} M

Tabla 17.

⁸³ Biswas M., Haldar P. K., and Ghosh A. K. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* **2010**, *1(1)*, pp. 29–34.

6.5 Pruebas de solubilidad en agua

La biodisponibilidad de moléculas activas de interés biológico depende, en gran medida, de su solubilidad en medios acuosos. La estrategia de dendronización seguida en el presente proyecto para derivatizar a la curcumina (cuya solubilidad en agua es marginal) suponía conferir un balance hidrofílico-hidrofóbico adecuado para solubilizarla en agua, sin perder actividad antioxidante.

Como se muestra en la siguiente figura, se observa que la solubilidad de la curcumina, particularmente en el compuesto CurcDiSust-D2G-OH, aumenta significativamente (15 veces más), en comparación con la curcumina sola (figura 19).

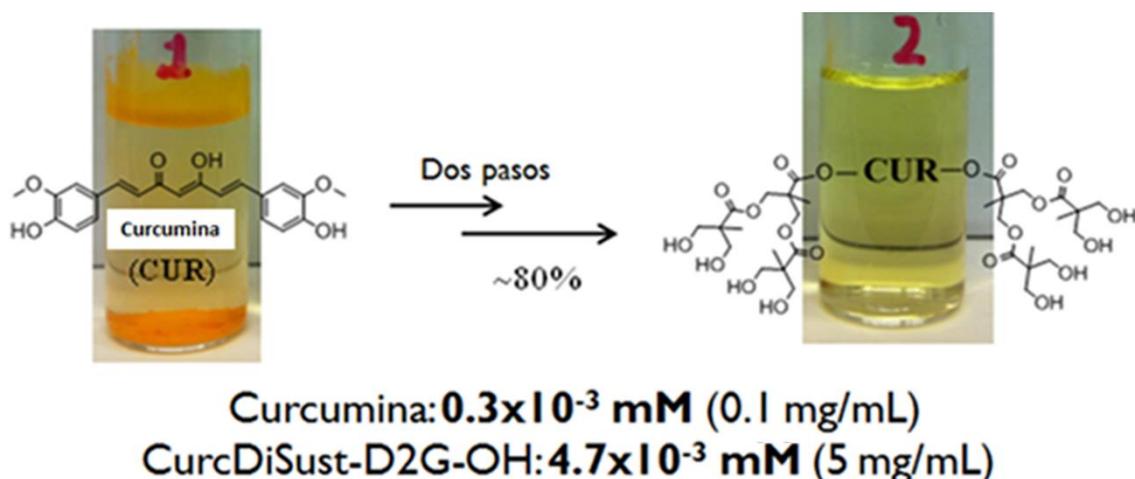
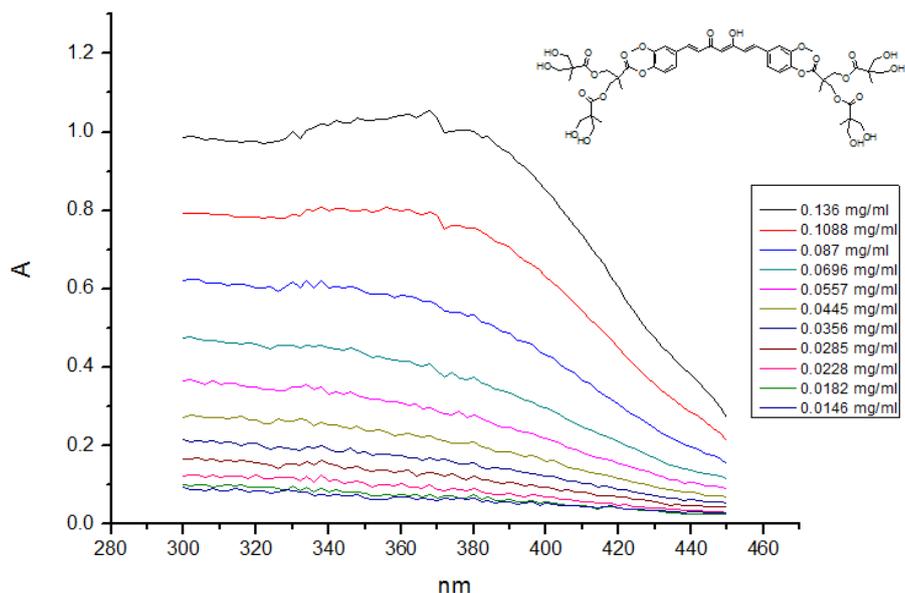


Figura 19

Comparación de la solubilidad del compuesto CurcDiSust-D2G-OH con curcumina en agua a temperatura ambiente. La conjugación de los dendrones de segunda generación con hidroxilos libres le confiere una solubilidad significativa al compuesto CurcDiSust-D2G-OH.

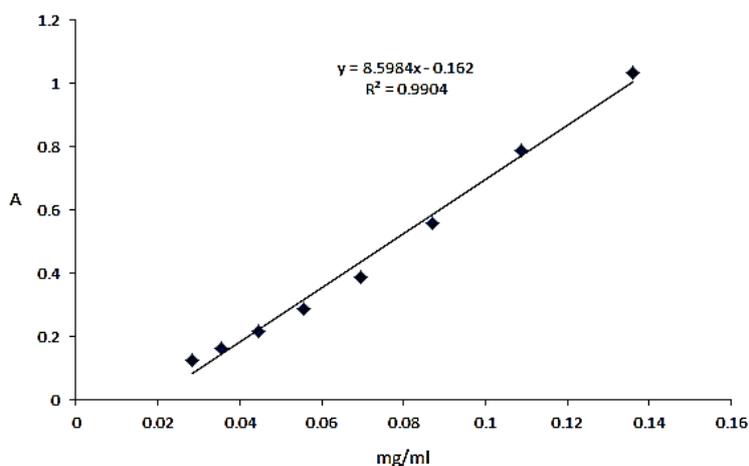
De manera cuantitativa, se midieron las absorptividades molares del compuesto CurcDiSust-D2G-OH en un buffer a pH de 7.35 en H₂O para evaluar su solubilidad y estabilidad en el medio. A continuación se muestra la colección de espectros de UV-Vis de este compuesto en esas condiciones, a concentraciones de 0.13 mg/mL (0.12×10^{-3} mM) hasta 0.03 mg/mL (0.02×10^{-3} mM), con un máximo de absorción en 370 nm. La disolución fue filtrada con un filtro de nylon para jeringa de 0.45 μ m para eliminar cualquier sólido residual que pudiese interferir con la medición espectroscópica.



Grafica 7.

UV-Vis de CurcDiSust-D2G-OH a pH 7.35 con máximo de absorción en 370 nm. Si bien la curcumina posee un máximo de absorción en metanol y etanol de 420 nm⁸⁴, dicho comportamiento no se observa en el compuesto CurcDiSust-D2G-OH. Esto podría sugerir que la presencia de los dendrones de segunda generación tiene un efecto importante en la conjugación interna del núcleo de curcumina.

A partir de estos datos se construyó una curva de calibración en el máximo de 370 nm, desde 0.13 mg/mL (0.12x10⁻³mM) hasta 0.01mg/mL (0.25x10⁻⁶mM), donde se observa la mayor tendencia a la linealidad, como demanda la Ley de Lambert y Beer⁸⁵.



Grafica 8.

Curva de calibración de CurcDiSust-D2G-OH a pH 7.35 a 370 nm con **R² de 0.9904**.

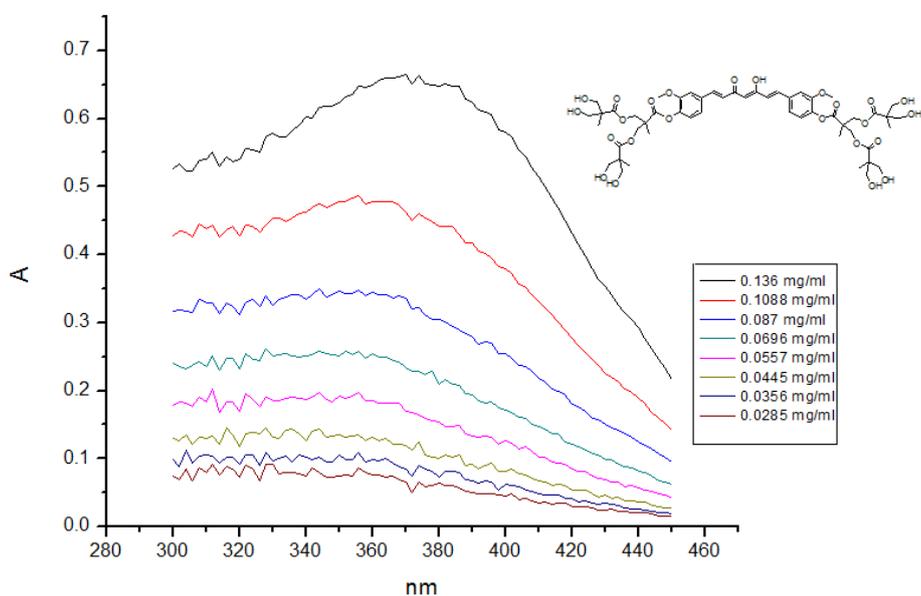
Como se puede observar, el curcuminoide CurcDiSust-D2G-OH exhibe una estabilidad considerable (relacionada con el comportamiento lineal mostrado) a este valor de pH, lo cual le confiere viabilidad como prototipo farmacéutico.

⁸⁴ Huppert D. ; Gepshtein R. ; Shomer S. ; Simkovitch R. ; Erez Y. *J. Phys. Chem. A*, **2014**, *118* (5), pp 872–884

⁸⁵ http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/cineticapractica6_19764.pdf

La estabilidad de este compuesto también se evaluó a un pH menor.

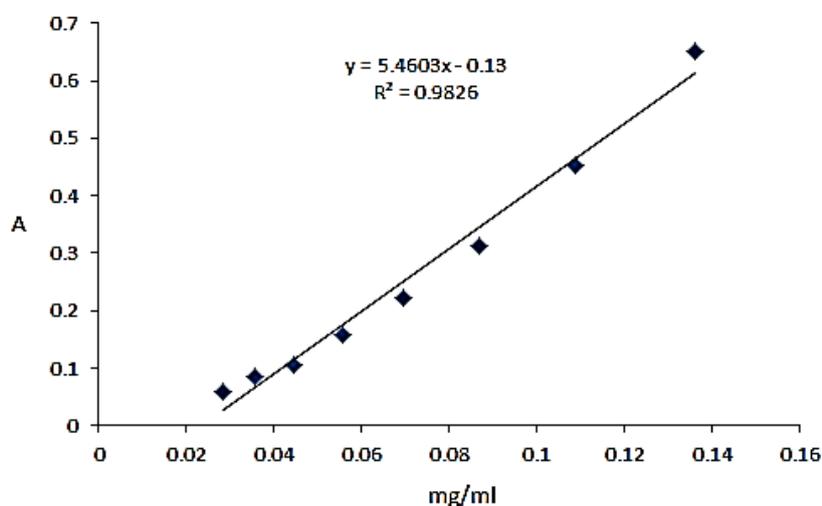
A continuación se muestra la colección de espectros de UV-Vis del compuesto CurcDiSust-D2G-OH en un buffer a pH de 3.58 en H₂O, a diferentes concentraciones, desde 0.136 mg/mL (0.12x10⁻³mM) hasta 0.015mg/mL (0.25x10⁻⁶mM), con un máximo de absorción en 376nm.



Grafica 9.

UV-Vis de CurcDiSust-D2G-OH a pH 3.58 con máximo de absorción en 376 nm. La variación a un pH menor no generó una descomposición de la molécula durante la determinación de éste experimento. Sin embargo se observa un desplazamiento en el máximo de intensidad diferente al determinado en el experimento anterior. Lo que sugiere que existe un cambio en la estructura del núcleo de la curcumina como función del pH.

A partir de estos datos se construyó una curva de calibración en el máximo de 376 nm desde 0.136 mg/mL (0.12x10⁻³mM) hasta 0.015mg/mL (0.25x10⁻⁶mM), donde se observa la mayor tendencia a la linealidad, nuevamente considerando la Ley de Lambert y Beer.



Grafica 10 .Curva de calibración de CurcDiSust-D2G-OH a pH 3.58 a 376 nm con R^2 de 0.9826.

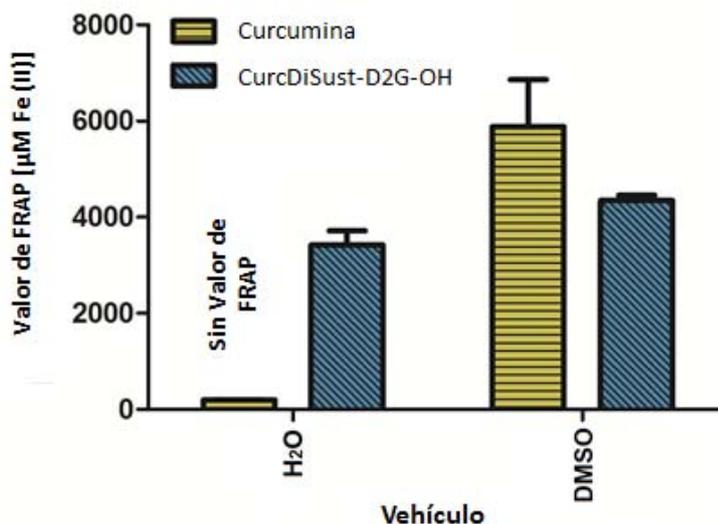
De acuerdo a la literatura⁸⁶, la curcumina posee una absorptividad molar máxima en 425 nm en etanol, sin importar la acidez del medio de estudio; en el caso del compuesto CurcDiSust-D2G-OH, el máximo sí se ve afectado por cambios de pH, ya que se desplaza de 370 nm a pH de 7.35 a 376 nm a pH de 3.58. Si bien este cambio es pequeño, es perceptible vía la técnica de Uv-Vis.

También la linealidad se ve ligeramente afectada por el cambio de pH hacia 3.58, lo que podría estar relacionado con cambios intrínsecos en la estructura de la molécula, propios del equilibrio ceto-enólico de la misma. En términos generales se puede decir que la molécula es soluble y estable a estas condiciones de pH.

6.6 Pruebas biológicas *in vitro*

6.6.1 Determinación de la actividad antioxidante en agua por medio del ensayo de FRAP (Ferric Reduction Ability of Plasma)

Este método fue seleccionado para determinar la capacidad antioxidante de CurcDiSust-D2G-OH ya que se trata de una prueba simple y de bajo costo, basada en la técnica de Benzie y Strain⁸⁷.



Gráfica 11.

Determinación de la actividad antioxidante mediante el método de FRAP mediciones realizadas por triplicado para 1 mg de compuesto. En medios acuosos el compuesto CurcDiSust-D2G-OH exhibe una actividad que la curcumina no posee. En el caso de las pruebas en DMSO donde ambos compuestos son solubles, el compuesto CurcDiSust-D2G-OH también exhibe una actividad proporcionalmente superior a la curcumina, esta eficiencia es de un orden de 2.14 superior.

Como se observa en la Gráfica 11, se midió la capacidad total antioxidante (CTA), tanto de la curcumina como del compuesto CurcDiSust-D2G-OH, en agua y en DMSO. La prueba mostró que el curcuminoide tiene una actividad antioxidante en agua que la curcumina no posee. El valor de CTA observado para CurcDiSust-D2G-OH en este medio fue de 3424.9 ± 291.5 , mientras que para la curcumina no se observó ningún valor.

⁸⁶ Karthick S.N. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**, 8, pp. 8320 - 8328

⁸⁷ Benzie F.F. & Strain J.J. *Anal. Biochem.* **1996**, 239 (1), pp. 70–76

En el caso de DMSO, ambas moléculas muestran valores altos de CTA; sin embargo, es importante resaltar que, para 2.7 mmol (1 mg) de curcumina se observa un valor de 5883.7 ± 69.27 en la prueba de FRAP, mientras que para el compuesto CurcDiSust-D2G-OH se registra un valor de 4348.9 ± 75.28 con solamente 0.93 mmol de curcumina neta (1 mg de compuesto), lo cual significa que, proporcionalmente hablando, el compuesto CurcDiSust-D2G-OH con un número menor de moles, obtiene un valor de FRAP mayor al de la propia curcumina. Haciendo un análisis dimensional entre unidades de CTA/mmol, encontramos que el compuesto CurcDiSust-D2G-OH posee una actividad 2.14 veces superior al de la curcumina.

Es importante aclarar que la disparidad en los valores de FRAP para el curcuminoide CurcDiSust-D2G-OH en agua y en DMSO (siendo más alto el valor en éste último) se asocia con diferencias en el grado de solubilidad de este compuesto en estos disolventes.

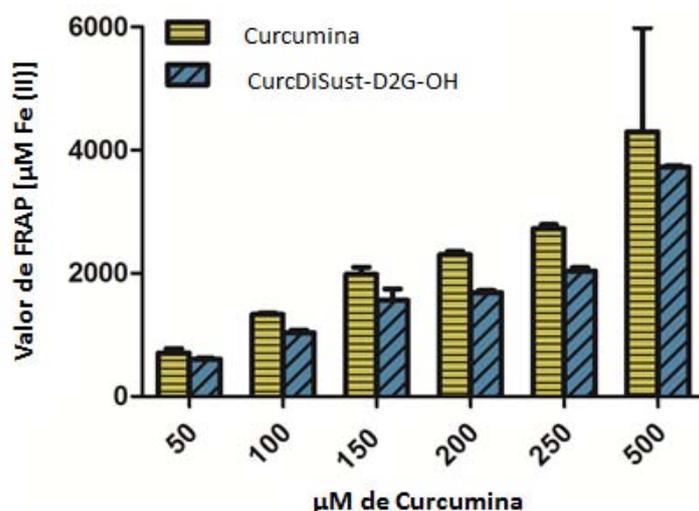
La actividad antioxidante observada para el compuesto CurcDiSust-D2G-OH es las condiciones de FRAP es congruente con lo observado en los experimentos voltamperométricos, particularmente los realizados para estimar la eficiencia de captura de radicales libres (Gráfica 6), en donde éste compuesto mostró superioridad en comparación con la curcumina.

6.6.2 Comparación del valor de FRAP como función dependiente de la concentración

Adicionalmente se estimó la respuesta antioxidante como función de la concentración (en equivalencia molar) para los compuestos CurcDiSust-D2G-OH y curcumina en DMSO. Estos experimentos se llevaron a cabo a concentraciones más diluidas (10^{-6} M). Los resultados muestran una actividad diferente a lo esperado, ya que de acuerdo a la Gráfica 11, se esperaría una mayor actividad de CurcDiSust-D2G-OH con respecto a la curcumina cuando se grafican concentraciones en μM .

No obstante que la actividad antioxidante del compuesto CurcDiSust-D2G-OH se mantiene, vemos claramente que dicha actividad se ve comprometida por efectos de concentración tales como: solubilidad, velocidad de reacción y equilibrio químico. Este comportamiento no es exhibido en el mismo grado por la curcumina como se puede observar en la Gráfica 12.

La respuesta del compuesto CurcDiSust-D2G-OH como función de la concentración, podría ser una característica importante en términos de modelos farmacéuticos de tipo Dosis-Respuesta para la administración de fármacos



Gráfica 12.

Comparación de la actividad antioxidante entre la curcumina y CurcDiSust-D2G-OH.

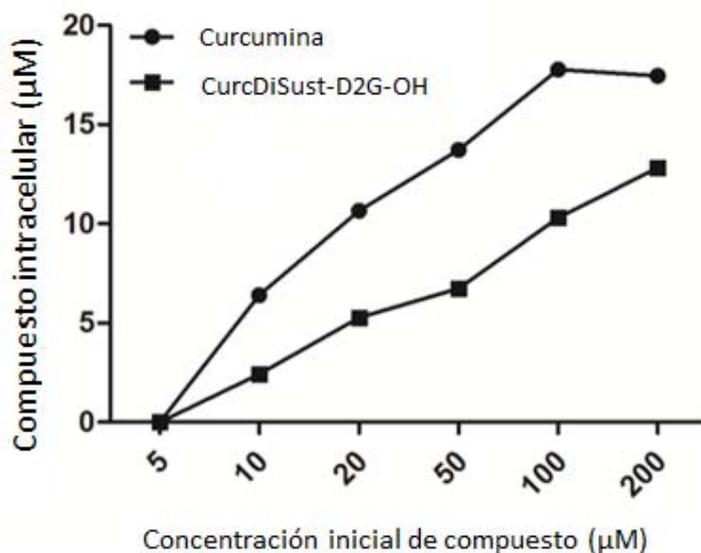
Valores de CTA a diferentes concentraciones en DMSO de los compuestos en estudio. Como se puede observar la CTA es una función de la concentración. A concentraciones iguales o menores de 500µM la eficiencia de la curcumina supera aquella del compuesto CurcDiSust-D2G-OH. Particularmente hablando esto es conveniente para la generación de profotofármacos ya que otorga un control en el modelo dosis-respuesta necesario en controles clínicos. Estas mediciones fueron realizadas por triplicado.

6.6.3 Pruebas de captación celular

Dado que a la curcumina se le han atribuido diferentes propiedades terapéuticas, pruebas de captación celular del compuesto CurcDiSust-D2G-OH fueron realizadas, comparándolo con curcumina en igualdad de condiciones.

Los resultados muestran que ambas moléculas son captadas por las células de glioblastoma de rata de tipo C6, sin embargo existen variaciones para ambos compuestos, la Gráfica 13 muestra que la curcumina obtuvo una captación celular más rápida que el compuesto CurcDiSust-D2G-OH, durante las 6 h. que duró la experimentación. Sin embargo, los resultados muestran que existe una saturación en la captación celular de curcumina para estas células a la concentración de 100 µM, mientras que para CurcDiSust-D2G-OH, esta limitante no se observa, y mantiene su captación hasta la concentración de 200 µM.

Esto sugiere que existen mecanismos de captación celular diferentes para cada compuesto, fenómeno atribuido a aumentar significativamente el tamaño del analito (CurcDiSust-D2G-OH).

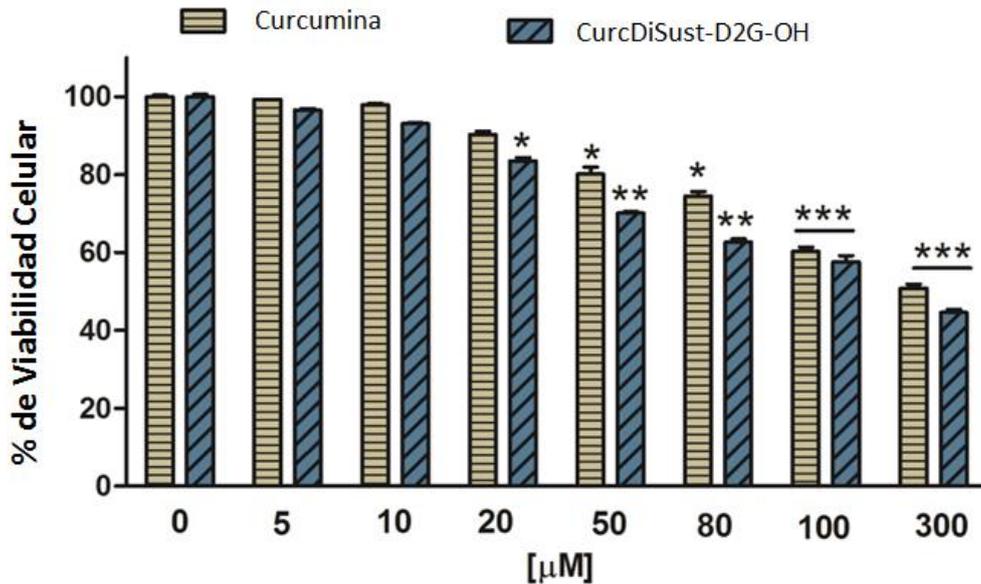


Gráfica 13.

Determinación de la captación de compuesto para curcumina y CurcDiSust-D2G-OH después de 6 h. de incubación a diferentes concentraciones. Como se puede observar después del tiempo de incubación la curcumina posee una velocidad de captación mayor al del compuesto CurcDiSust-D2G-OH. Sin embargo la saturación de la curcumina ocurre a los 100µM mientras que para CurcDiSust-D2G-OH dicho comportamiento no se observa. Estos análisis fueron determinados por triplicado.

6.6.4 Viabilidad celular

Concluida la etapa de pruebas de captación, ensayos de citotoxicidad para curcumina y CurcDiSust-D2G-OH fueron realizados en líneas celulares de glioblastoma de rata de tipo C6. Estos mostraron que el curcuminoide sintetizado posee una actividad antitumoral novedosa, la cual es dependiente de la concentración del compuesto, característica favorable al modelo de Dosis-Respuesta exhibido anteriormente. Un análisis de la Gráfica 15 muestra que durante el rango de 0 a 15 µM las células no se ven afectadas por alguno de los compuestos. Los cambios aparecen a concentraciones de 20 µM donde cambios empiezan a ser notorios. Para concentraciones por encima de 50 µM los cambios con mayores y se empieza a observar diferencia entre ambos compuestos, hasta llegar al punto que a 300 µM el compuesto CurcDiSust-D2G-OH exhibe una actividad mayor a la de la curcumina. A estas concentraciones la viabilidad celular de las células de glioblastoma de rata de tipo C6, han disminuido 50 %



Gráfica15.

CurcDiSust-D2G-OH inhibe el crecimiento de glioblastoma C6. Las pruebas de viabilidad celular fueron realizadas usando dosis iguales de curcumina y CurcDiSust-D2G-OH en las líneas celulares estudiadas. Las pruebas fueron realizadas por triplicado y los datos analizados y comparados con un control por una t de Student (n=3) Mean±SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Los resultados muestran que el compuesto CurcDiSust-D2G-OH una actividad antitumoral novedosa dependiente de la concentración. Efectiva de nuevo para el modelo de dosis-respuesta en ensayos clínicos. Particularmente para células de glioblastoma de rata tipo C6, conocidas por ser una línea de cáncer muy agresiva⁸⁸.

En resumen, de acuerdo a las pruebas biológicas *in vitro* realizadas en este trabajo, el compuesto CurcDiSust-D2G-OH exhibe un potencial real para ser considerado en etapas clínicas posteriores, relacionadas con terapias en donde el estrés oxidativo juegue un papel importante, tales como cáncer, diabetes y enfermedades neurodegenerativas.

⁸⁸ Grobden B. ; Deyn D. ; Slegers P.P. *Cell Tissue Res.* **2002**, 310(3), pp. 257-70

7. Conclusiones

- Se sintetizaron 7 nuevos derivados de curcumina mediante la esterificación de los grupos fenólicos.
- La esterificación con dendrones de segunda generación como estrategia de síntesis resultó en una opción eficaz, para aumentar la solubilidad de la curcumina en medios acuosos.
- La evaluación de la actividad antioxidante vía voltamperometría cíclica mostró que la curcumina posee una buena eficiencia con respecto al ácido ascórbico para capturar al radical superóxido, con un mecanismo del tipo transferencia de protón en las condiciones de este estudio; mientras que a mono y di sustitución de la curcumina con dendrones de tipo poliéster de primera generación disminuye ligeramente la eficiencia del curcuminoide resultante para capturar al radical superóxido; esta modificación no afecta significativamente la tendencia hacia el mecanismo de TP para este conjunto de curcuminoides.
- En el caso de la di sustitución con dendrones de primera y segunda generación se observa que la molécula CurcDiSust-D2G-OH es la única que exhibe la tendencia a capturar al radical superóxido por el mecanismo TAH, más eficientemente que la curcumina.
- En el caso de la glutarización, la adición de grupos funcionales ácidos aumenta la eficiencia de la curcumina en términos de captura del radical superóxido, especialmente cuando uno de los fenoles de la curcumina permanece libre (mono glutarización), generándose el curcuminoide más eficiente de todos.
- La actividad antioxidante frente al radical superóxido tanto de la piperina como del ácido pipérico no es significativa.
- En el caso de la evaluación biológica, las pruebas de FRAP y CTA muestran que existe una mayor eficiencia en CurcDiSust-D2G-OH que en curcumina para cada prueba respectivamente.
- CurcDiSust-D2G-OH presumiblemente posee un perfil de captación celular diferente a la curcumina y exhibe una importante actividad citotóxica frente a células de glioblastoma de rata C6.

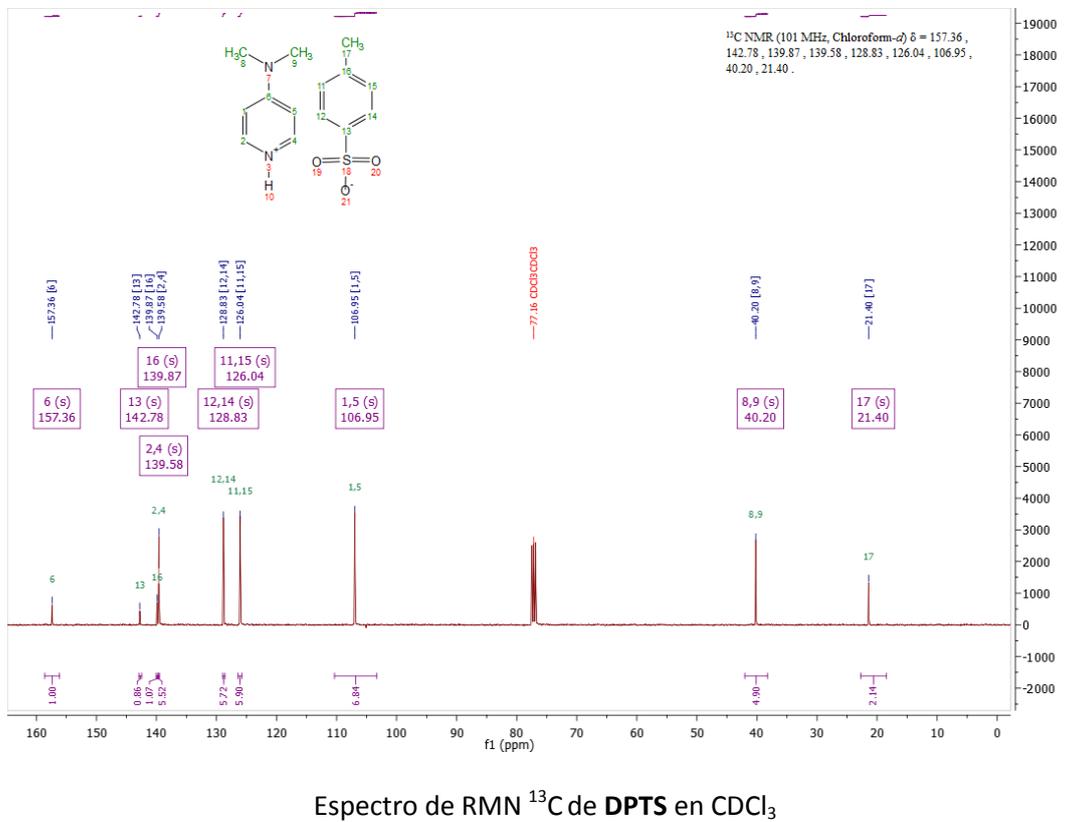
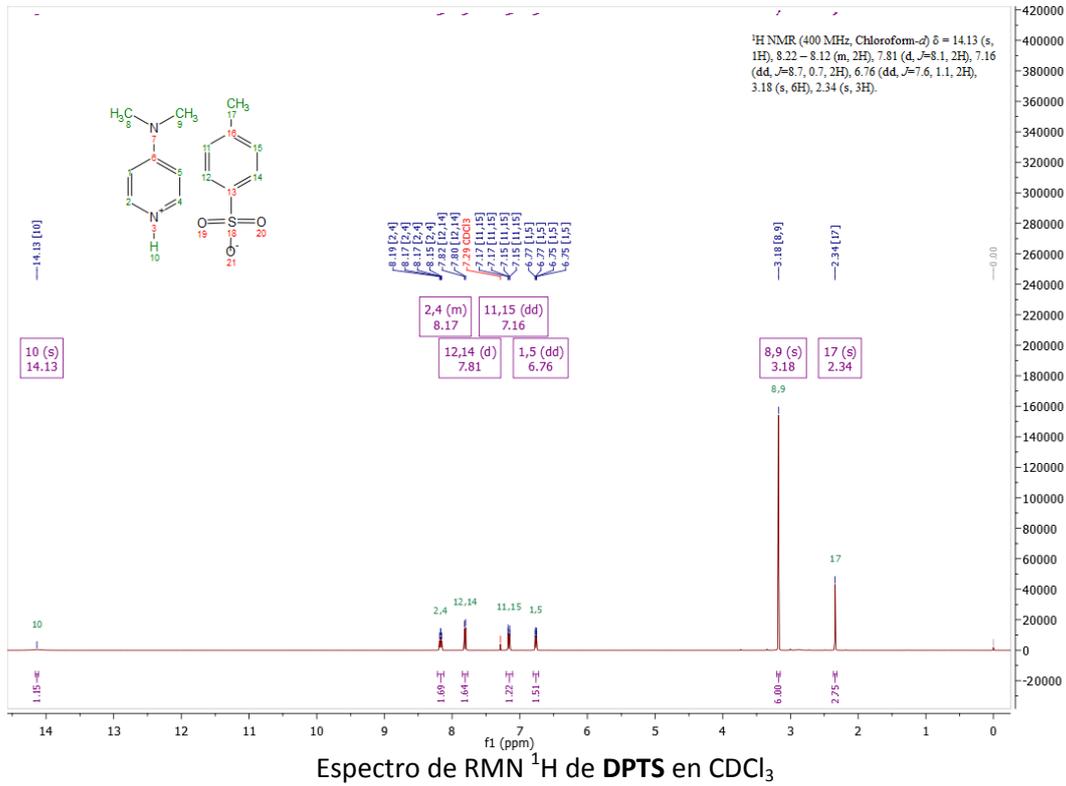
8. Trabajos de publicación y difusión de éste proyecto

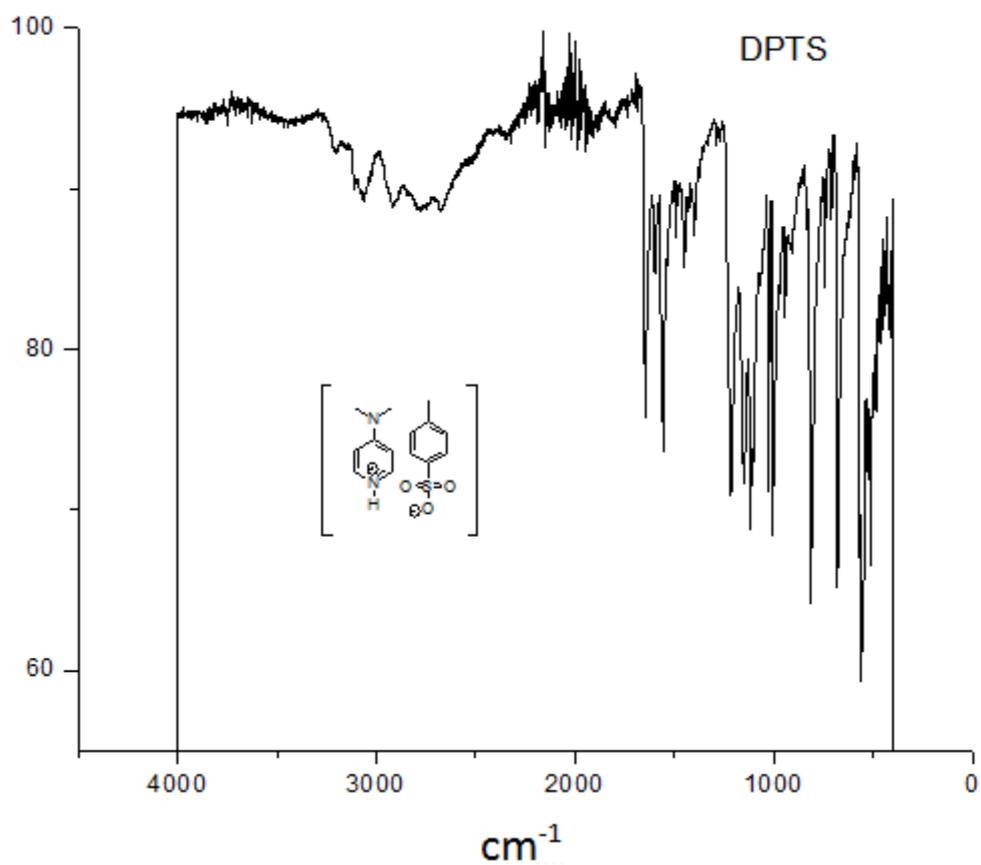
- Registro ante el IMPI de la patente “Síntesis de un conjugado dendrón-curcumina que permite la solubilización de la curcumina en agua, sin perder su actividad antioxidante”.
- Envío del artículo titulado “Two-step synthetic strategy to obtain a curcumin derivative with enhanced water solubility, antioxidant power and anti-tumor activity” a la revista Materials Science and Engineering C de Elsevier Editorial System.
- Preparación del artículo titulado “Synthesis of novel curcumin phenol esters derivatives and their response towards superoxide radical. Cyclic voltammetry and DFT study to evaluate and rationalized the antioxidant potential”.
- Presentación del proyecto en el congreso QuimiUNAM 2015 con el título “Curcumin Derivatives with enhanced water solubility, antioxidant power and anti-tumor activity”.
- Presentación del trabajo “Dendronization as strategy to improve solubility and bioavailability of bioactive molecules. Curcumin as case of study.” En el simposio de

Biomaterials for Medical Applications presentado en el XXIII International Materials Research Congress 2014.

- Presentación del trabajo “Synthetic strategies to improve water solubility of bioactive molecules. Curcumin as case of study” en International Conference on Polymers and Advanced Materials POLYMAT-2015.
- Presentación del trabajo “Curcuminoids synthesis and study of reactivity towards superoxide radical via cyclic voltammetry” en International Conference on Polymers and Advanced Materials POLYMAT-2015.
- Presentación de los avances de este proyecto en el XXXVI Congreso Nacional de Farmacología 2014.

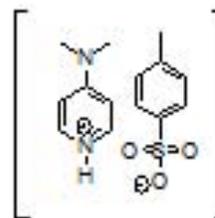
9. Anexo de espectroscopia y espectrometría



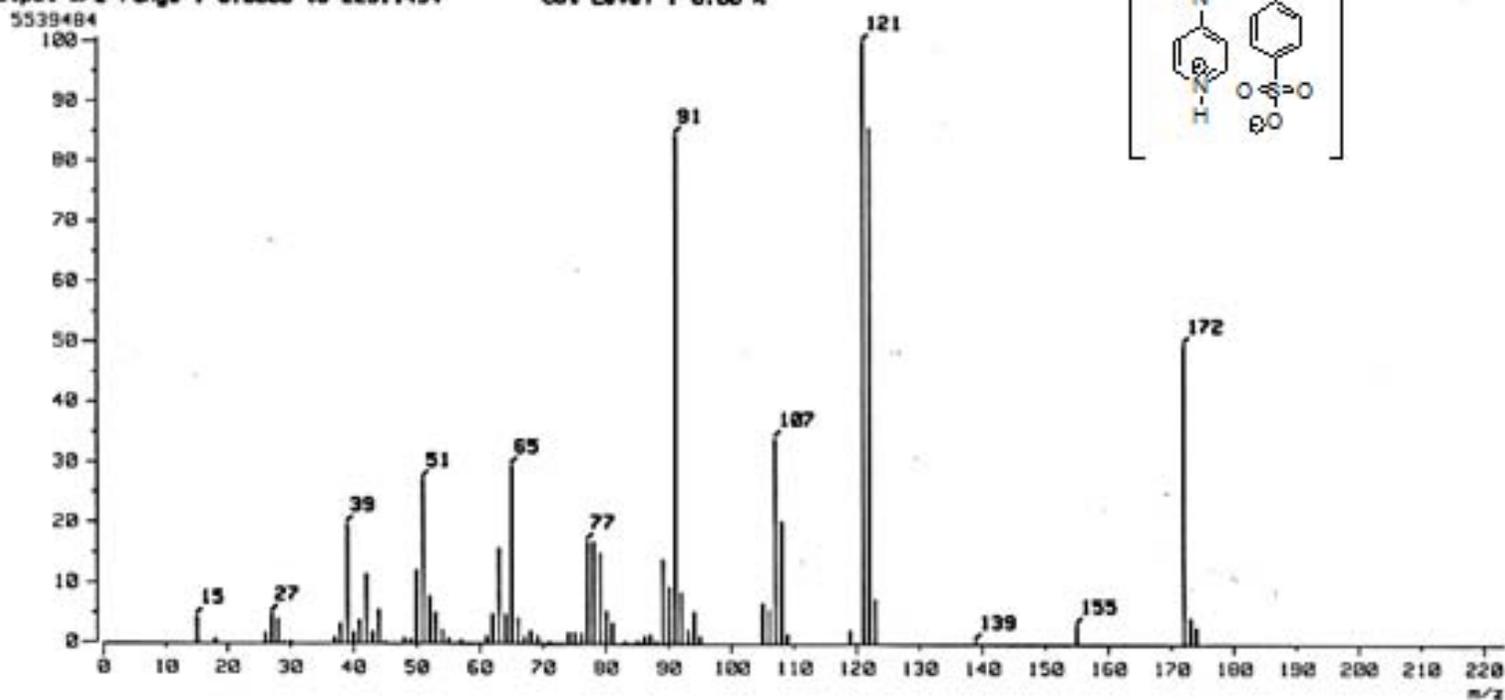


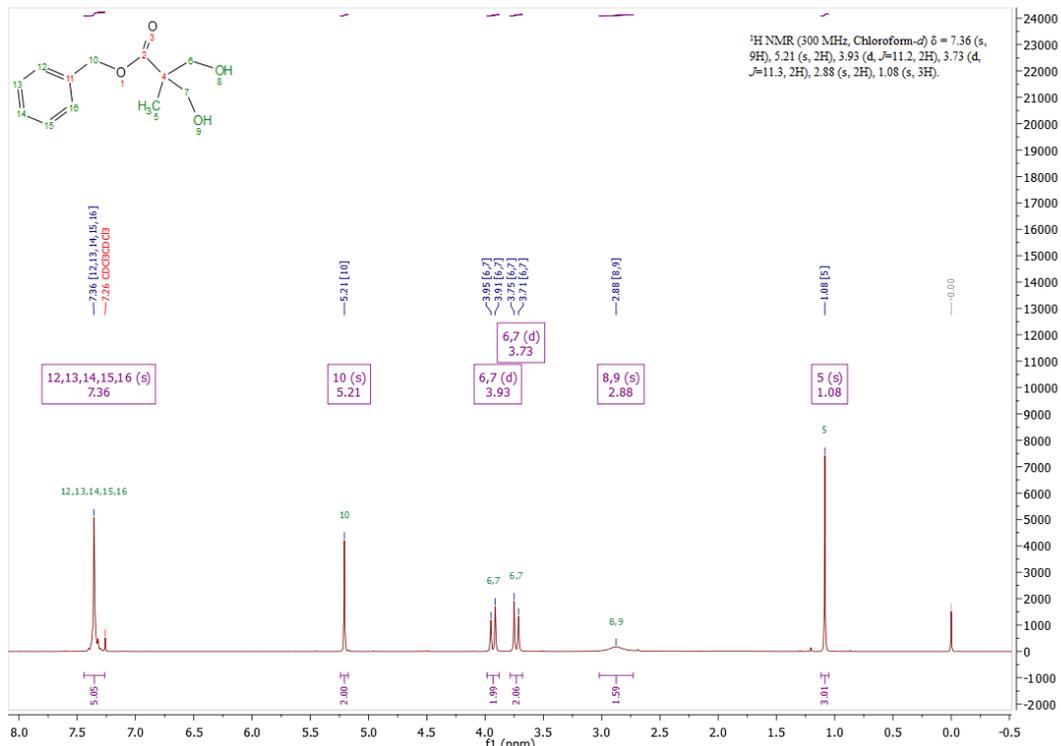
Ac.-D2G-P IR			
3206	92	1453	85
3110	90	1398	86
3062	89	1212	71
2918	88	1150	71
2794	88	1116	68
2670	88	1006	68
1652	76	813	63
1597	84	676	65
1549	73	504	66
1494	87		

[Mass Spectrum]
Date : Dr-Patricia-Guadarrama-267 Date : 21-Aug-2015 12:44
Sample: 614 STR-2824 DPTS Jeol SX102R
Note :
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion (MF-Linear)
RT : 0.48 min Scan# : (8,11)
BP : m/z 121.0000 Int. : 525.25
Output m/z range : 0.0000 to 223.1454 Cut Level : 0.00 X

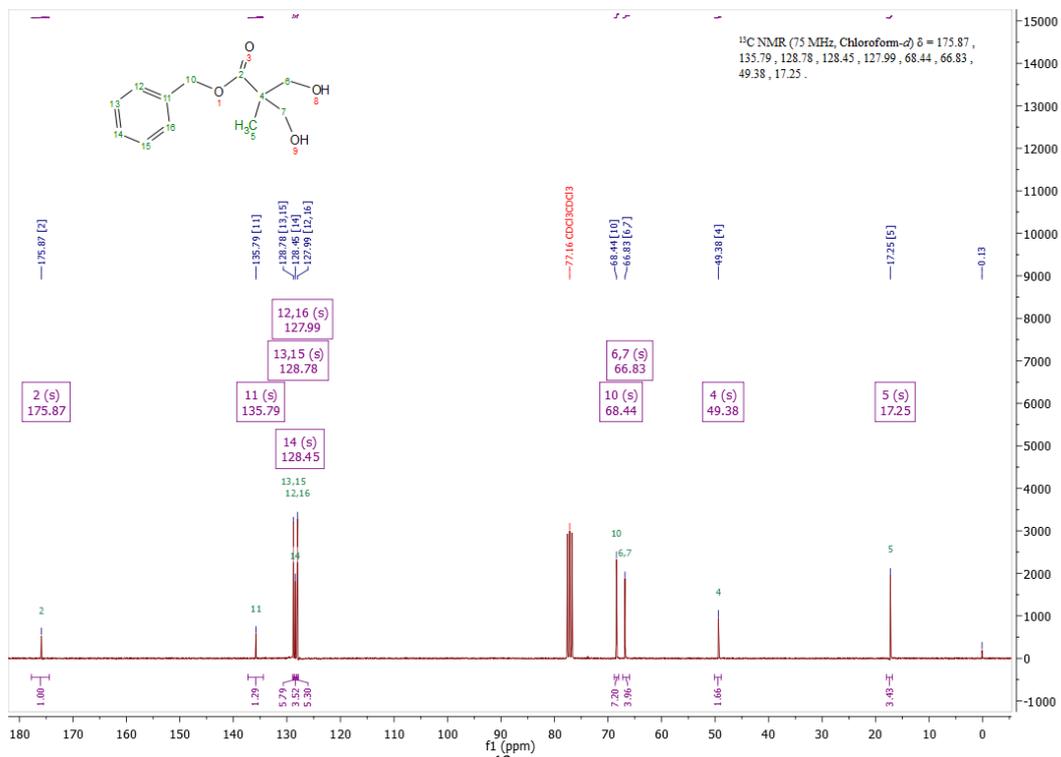


Espectrometría de masas de DPTS por EI+

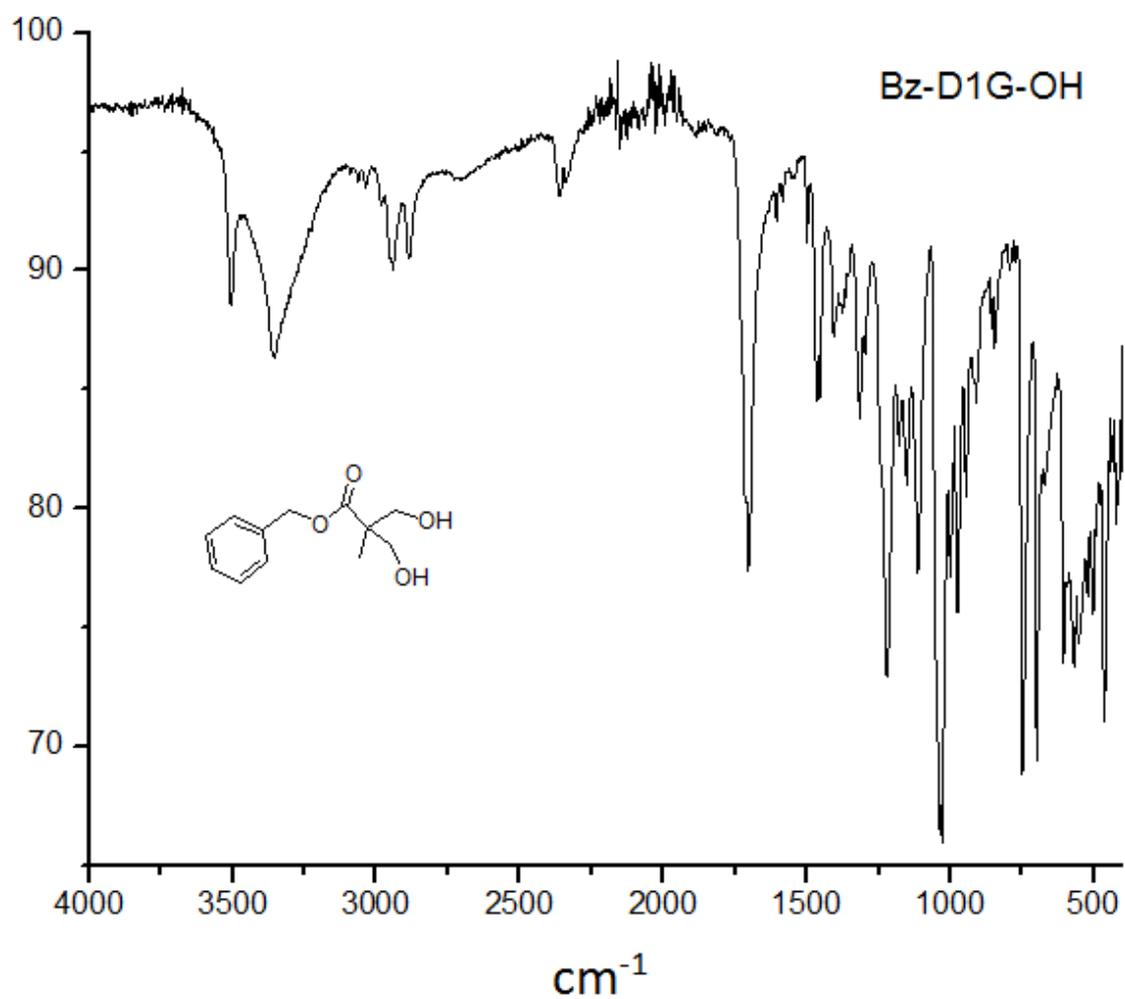




Espectro de RMN ¹H de Bz-D1G-OH en CDCl₃

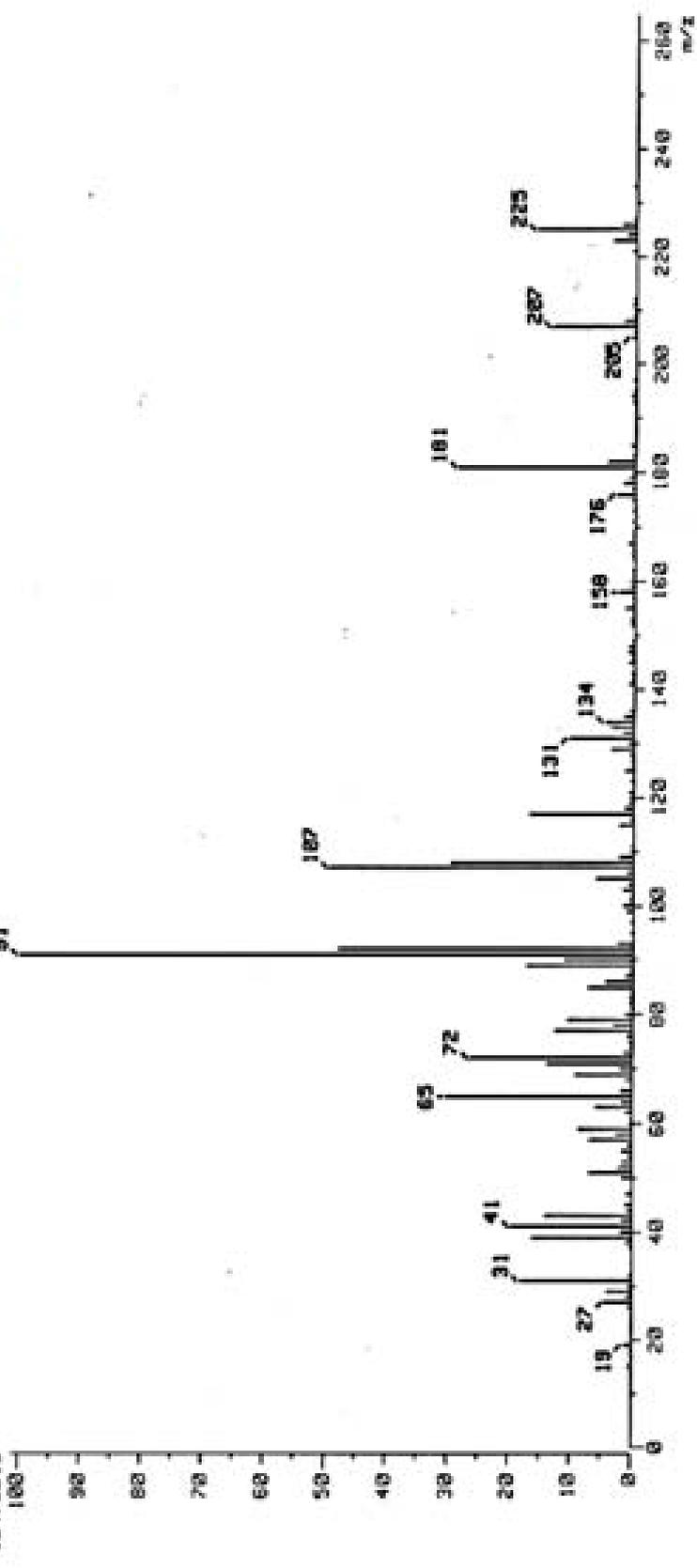
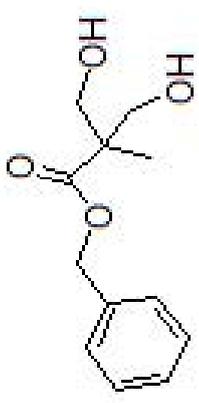


Espectro de RMN ¹³C de Bz-D1G-OH en CDCl₃

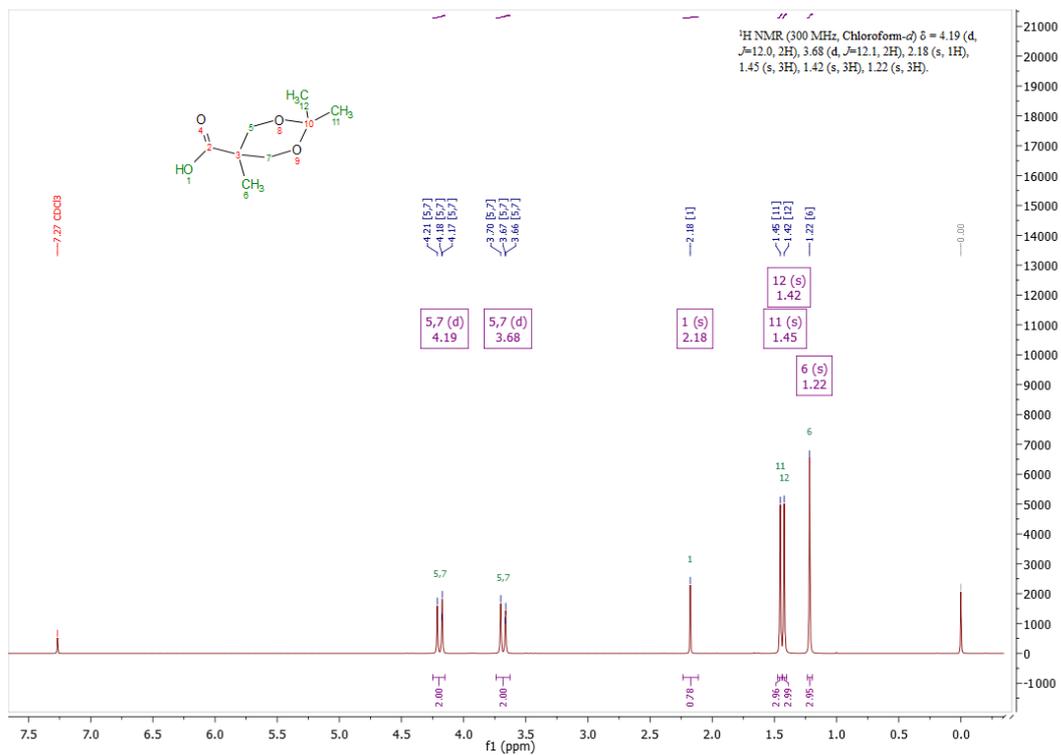


Bz-D1G-OH IR			
3515	88	1150	81
3350	86	1111	77
2993	90	1035	66
2883	90	1002	76
1707	77	968	75
1452	84	941	80
1402	87	903	84
1314	84	842	87
1222	72	748	69
1183	82	694	69

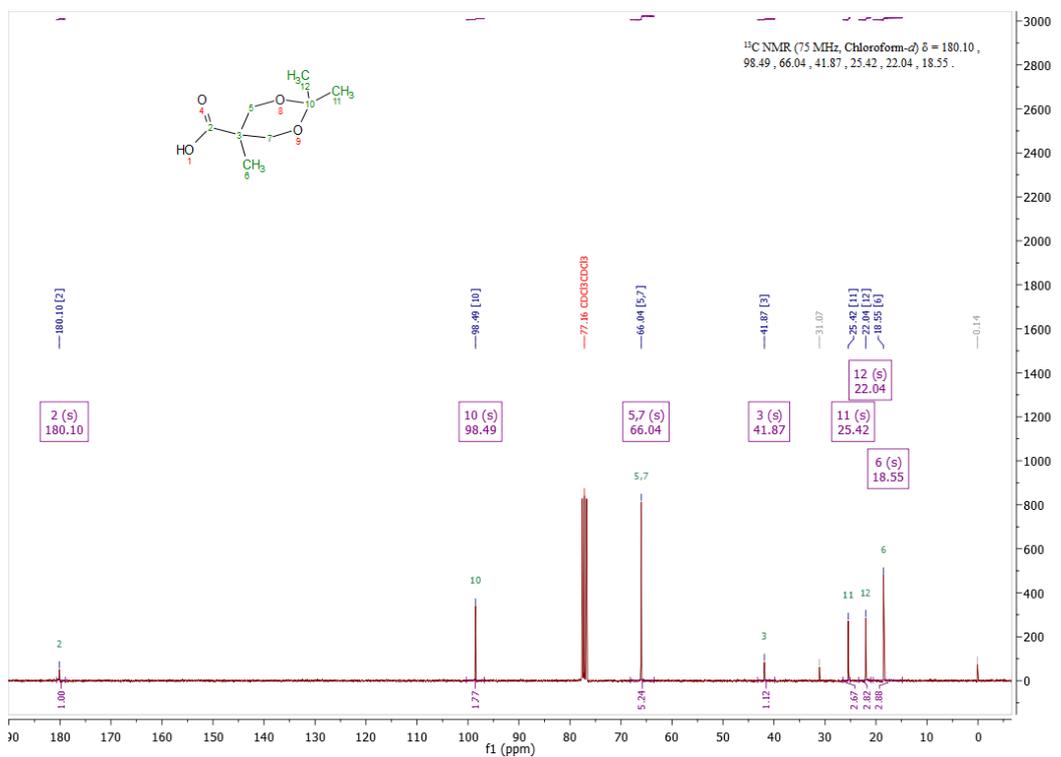
[Mass Spectrum]
 Date : Dr-Patricia-Guaderrama-259 Date : 21-Aug-2015 12:50
 Sample: 616 STM-2020 BZ Jao1 SX182A
 Note :
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion (HF-Linear)
 RT : 0.49 min Scan# : (0,10)
 BP : m/z 91.0000 Int. : 1273.86
 Output m/z range : 0.0000 to 254.6884
 13473213



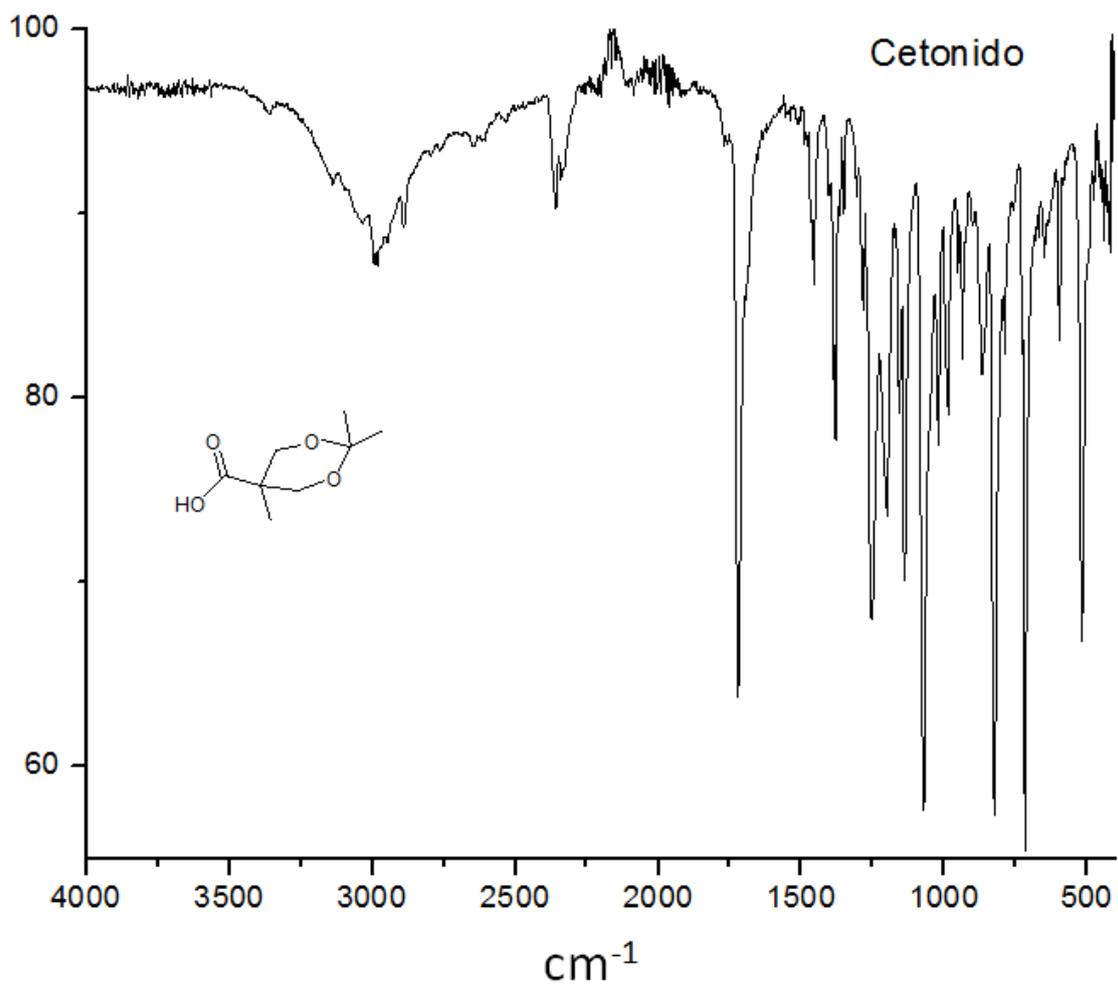
Espectrometría de masas de Bz-D1G-OH por EI+



Espectro de RMN ¹H de cetónido en CDCl₃

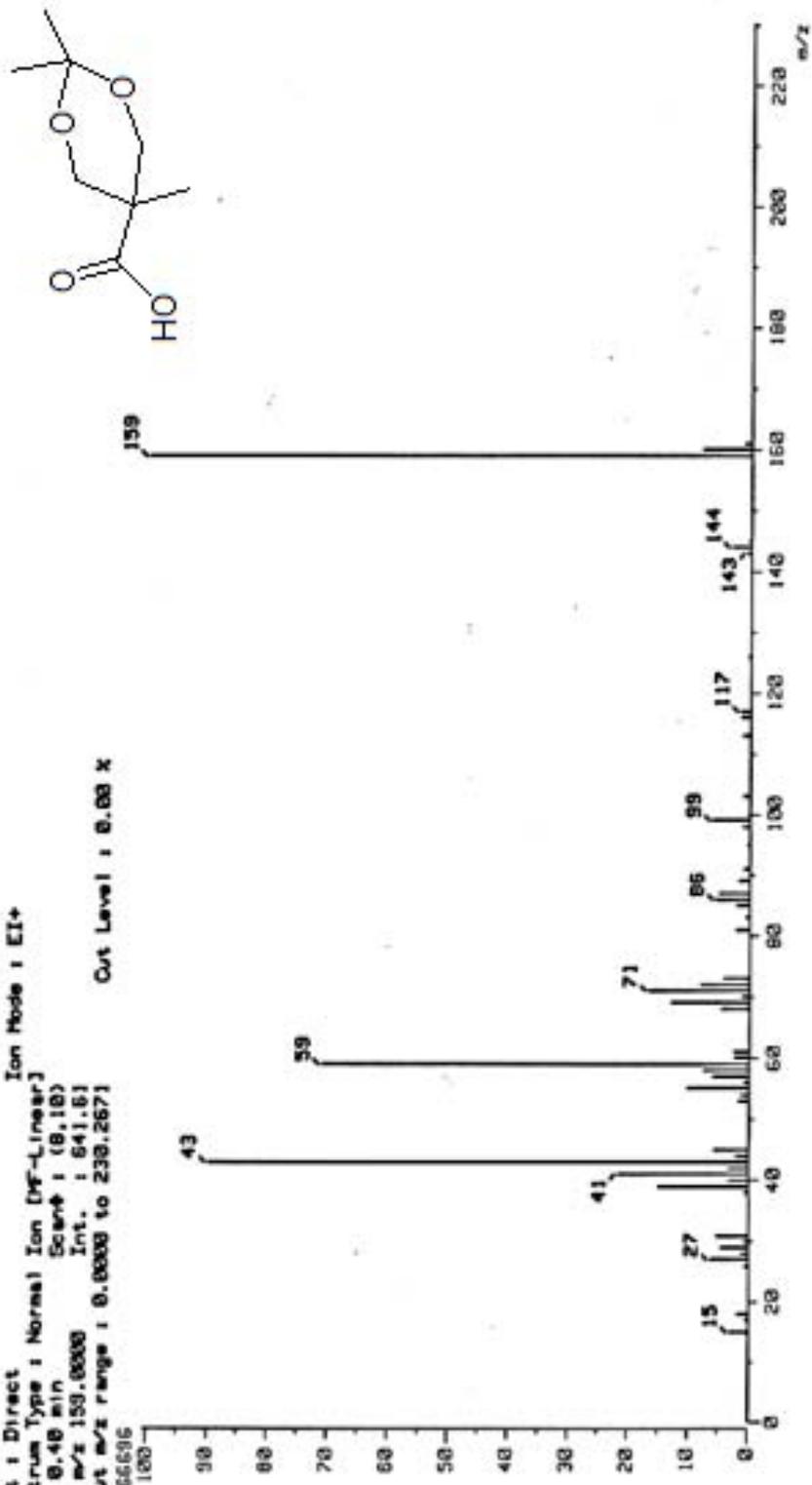


Espectro de RMN ¹³C de cetónido en CDCl₃

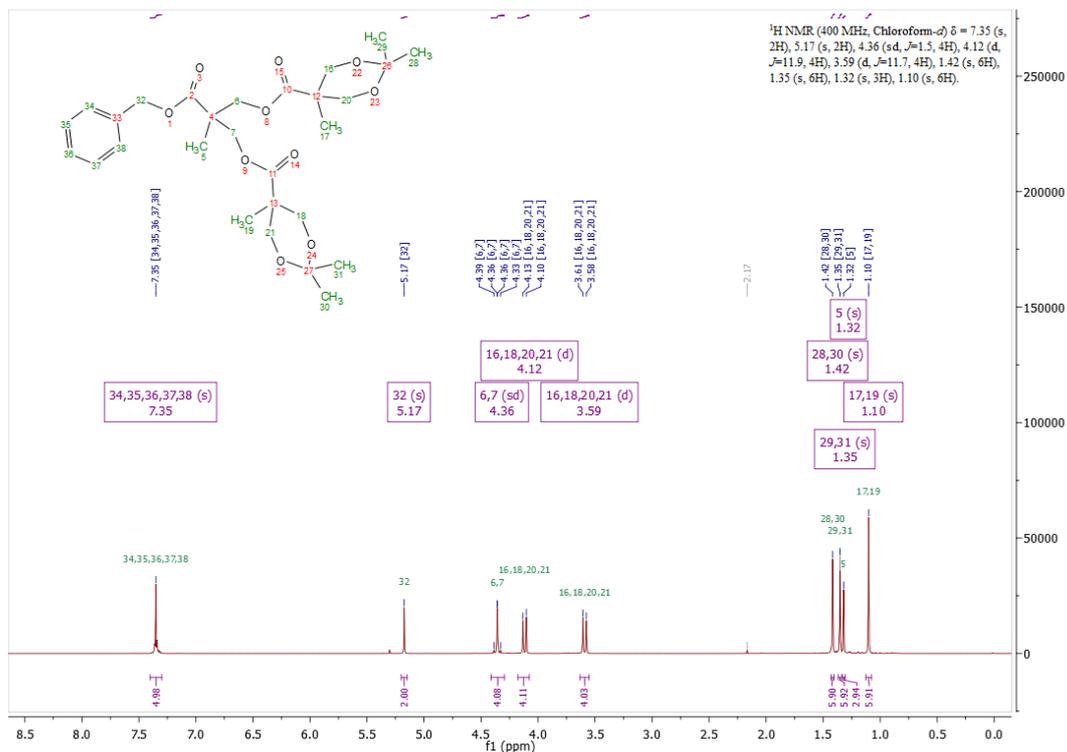


cetónido IR			
3140	91	1069	58
3036	89	1018	77
2993	87	991	79
1717	64	935	82
1452	82	870	81
1381	77	827	57
1249	68	787	82
1199	73	715	55
1161	79	595	83
1139	70	518	67

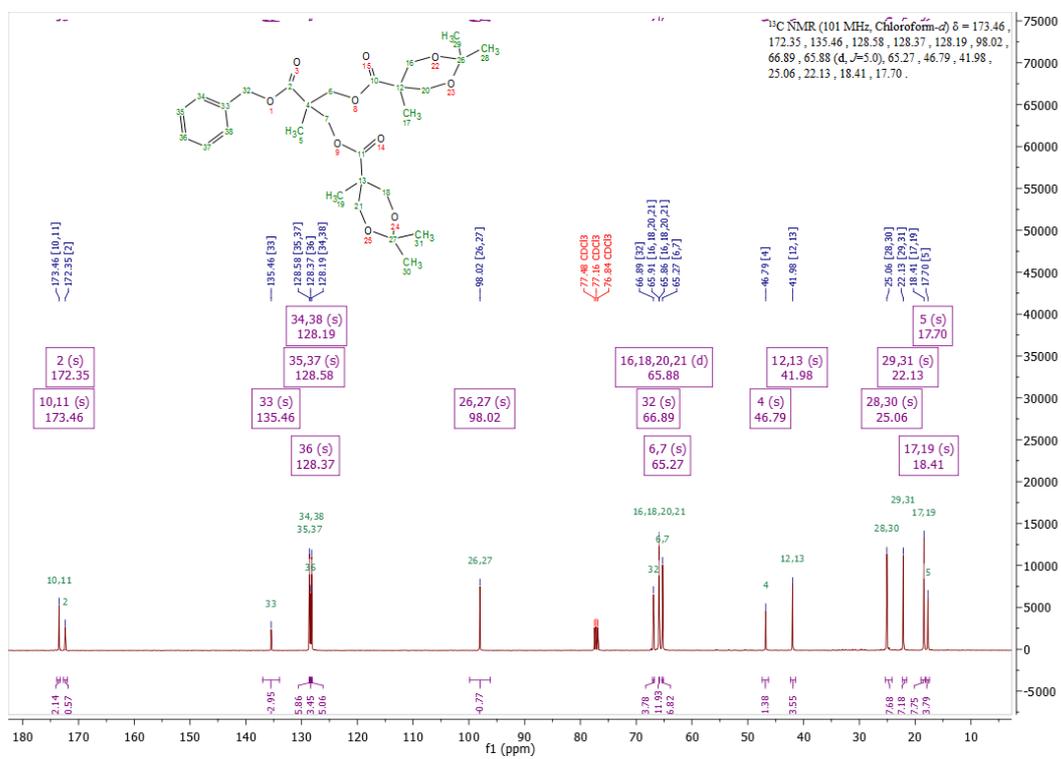
[Mass Spectrum]
 Date : D-Patricia-Guadarrama-278 Date : 21-Aug-2013 12:56
 Sample: 617 5179-2827 COT Jeol SX102R
 Note :
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
 RT : 0.48 min Scan# : (8,10)
 BP : m/z 150.0000 Int. : 641.61
 Output m/z range : 0.0000 to 230.2671
 6766016 Cut Level : 0.00 %



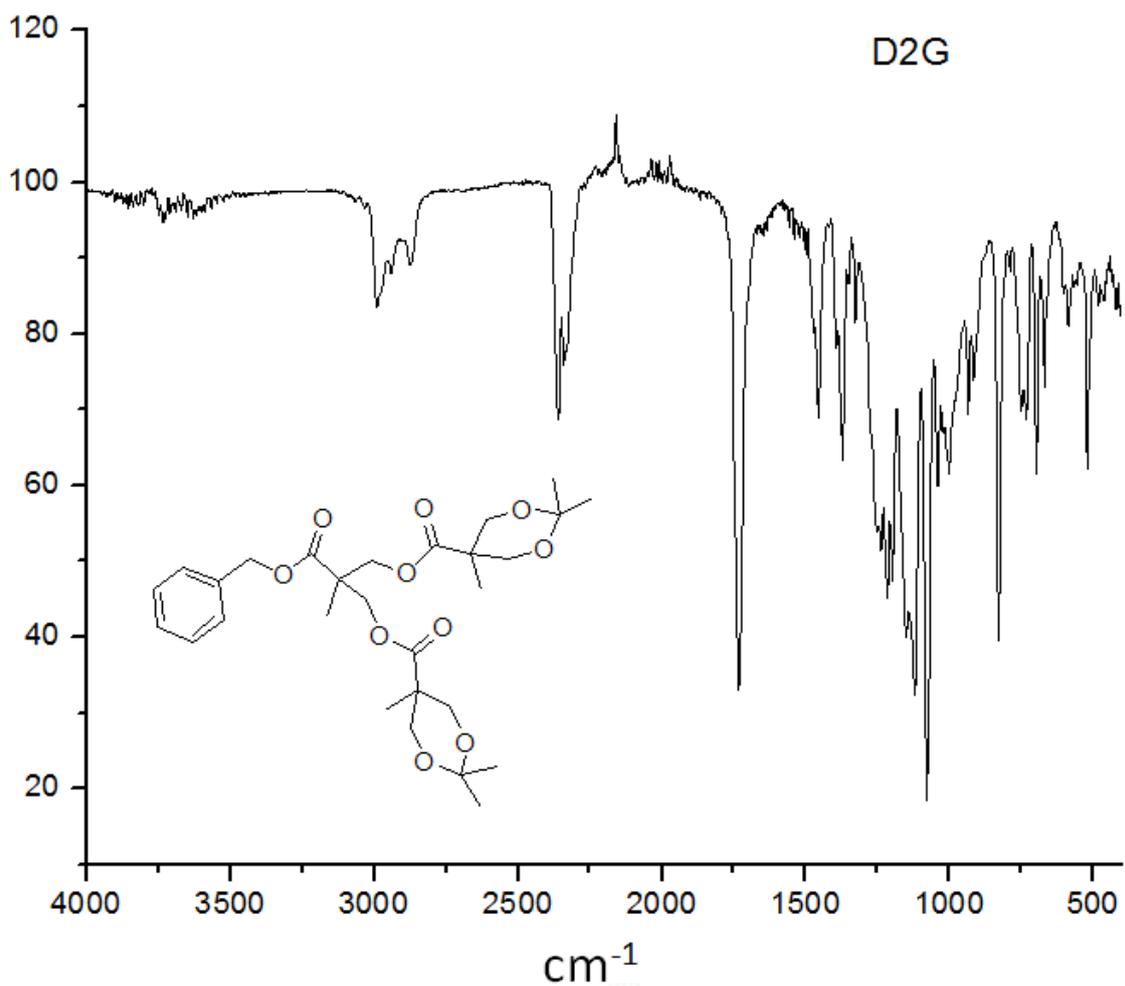
Espectrometría de masas de cetónido por EI+



Espectro de RMN ¹H de Dendron de segunda generacion (D2G) en CDCl₃



Espectro de RMN ¹³C de Dendron de segunda generacion (D2G) en CDCl₃

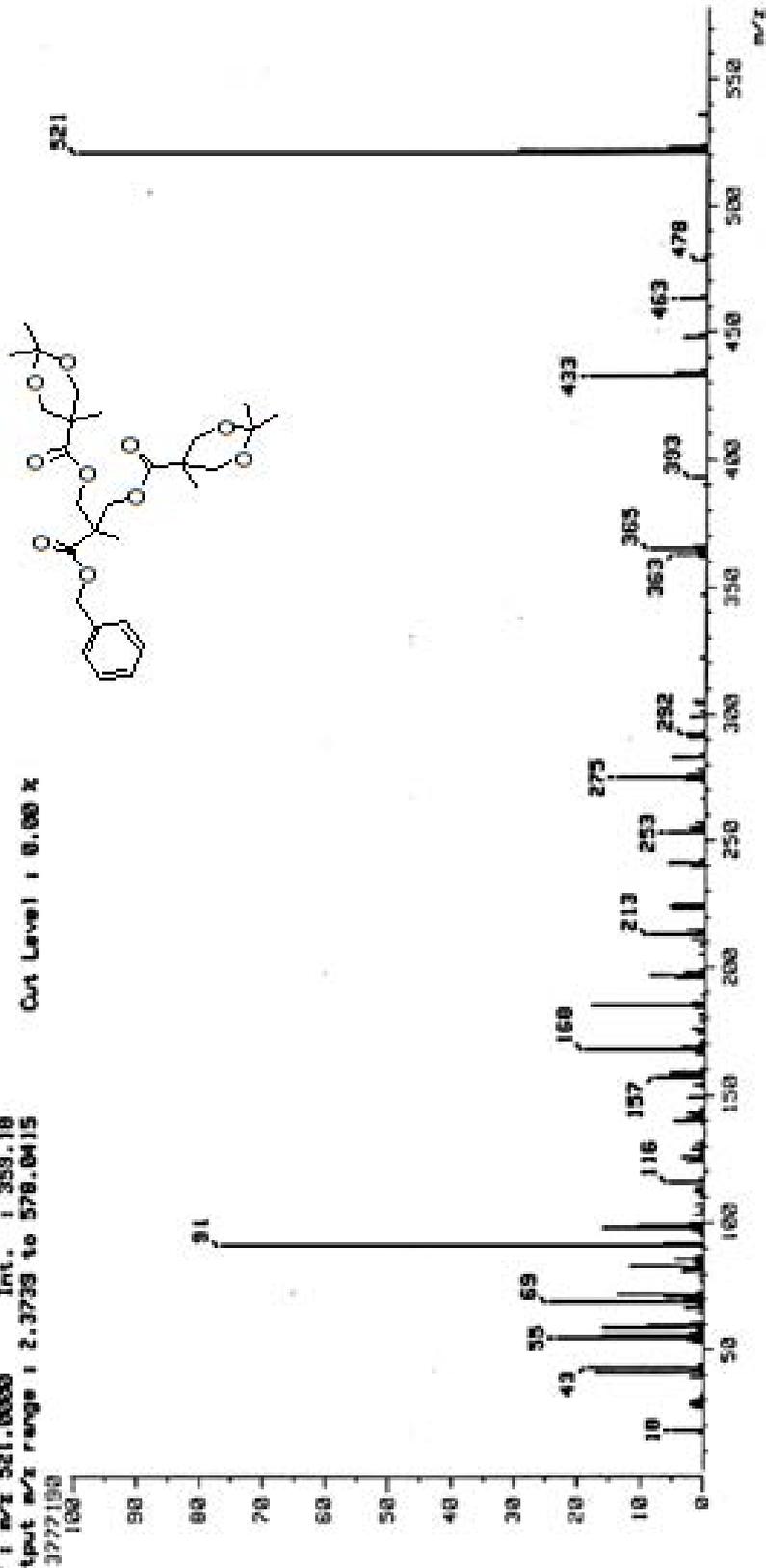


D2G IR			
2992	83	1117	32
2937	88	1079	19
2877	88	1046	60
1733	33	996	61
1463	69	935	70
1370	63	914	73
1238	56	831	40
1222	45	699	61
1194	47	666	73
1155	40	528	62

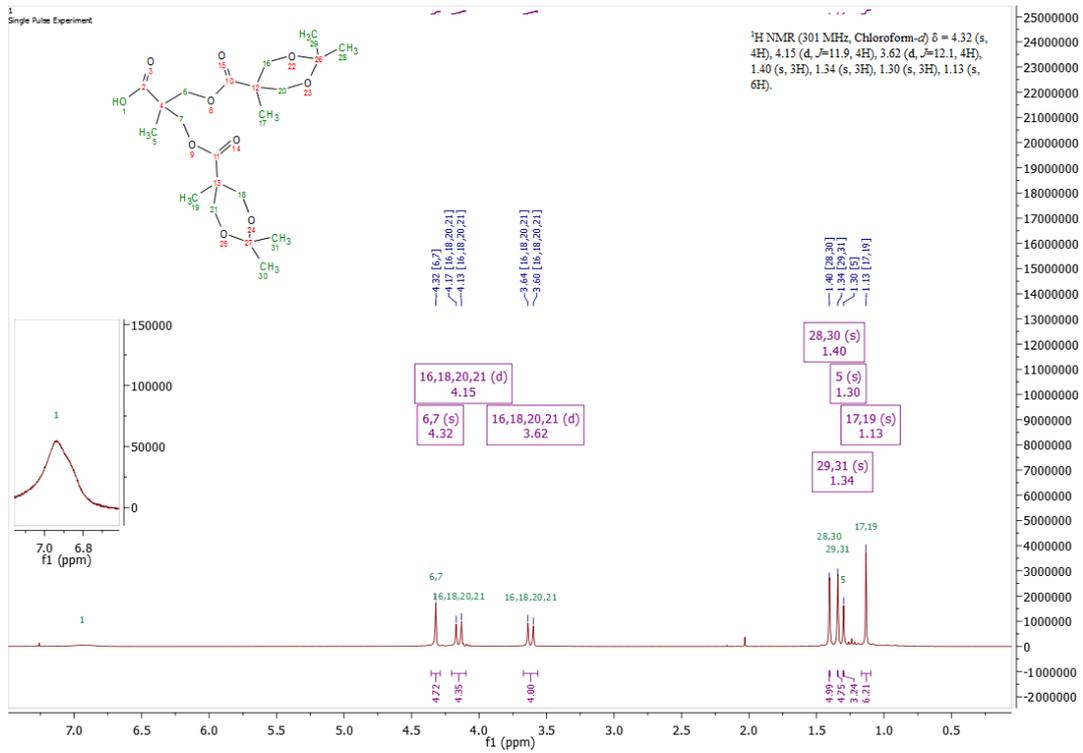
Nota: la señal 2368 corresponde a CO_2

[Mass Spectrum]
 Date : Dr-Guadarrama-Patricia-019 Date : 21-Sep-2015 12:12
 Sample: 635 5TH-2045 D2G Jeol SX102R

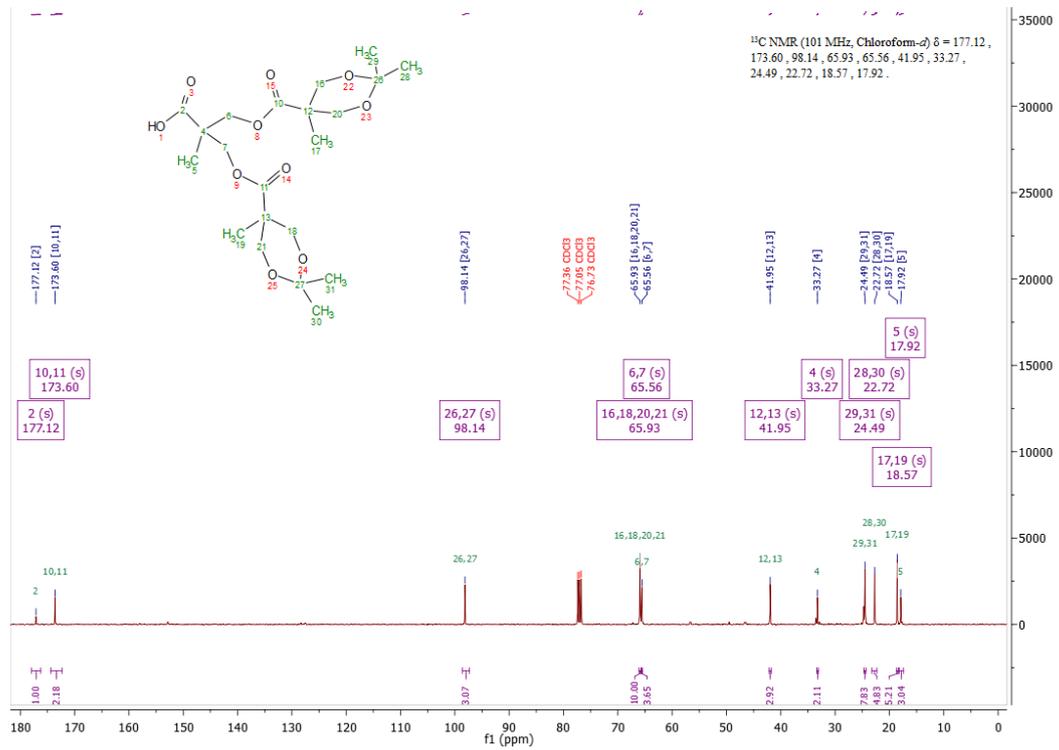
Note :
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion (MF-Linear)
 RT : 0.30 min Scan# : (7,8)
 BP : m/z 521.00000 Int. : 359.19
 Output m/z range : 2.3739 to 578.0415
 377190 Cut Level : 0.00 x



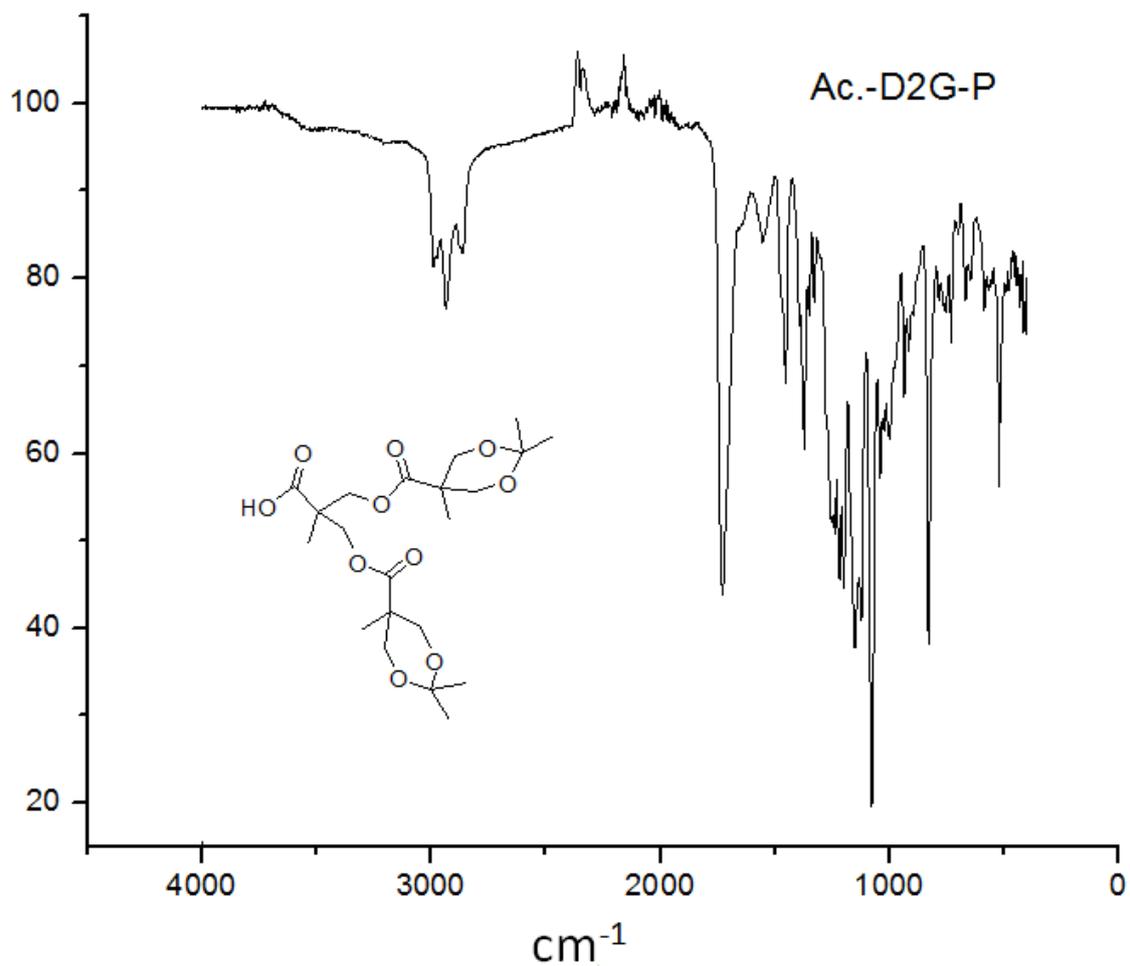
Espectrometría de masas de D2G por EI+



Espectro de RMN ¹H de Ac-D2G-P en CDCl₃



Espectro de RMN ¹³C de Ac-D2G-P en CDCl₃

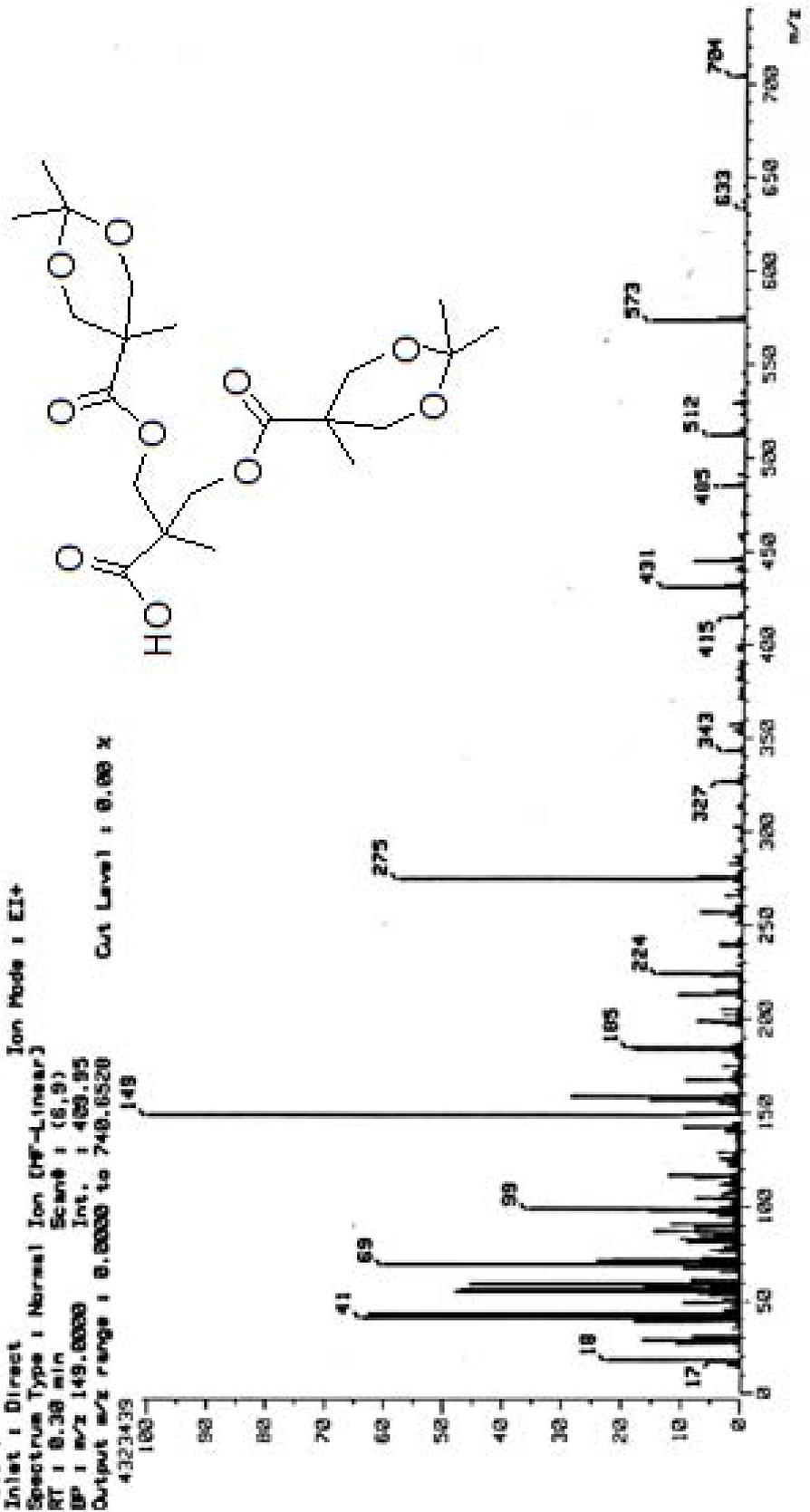


Ac.-D2G-P IR			
3523	96	1150	38
2987	81	1116	41
2923	76	1077	19
2863	84	1040	57
1721	43	992	62
1549	85	930	66
1460	68	910	72
1377	60	829	38
1247	50	738	73
1212	45	518	56

Nota: la señal 2368 corresponde a CO₂

[Mass Spectrum]
 Date : Dr-Patricia-Guedes-272 Date : 21-Aug-2015 13:00
 Sample: 619 STR-2009 Deslitz Jao1 SX(82A)

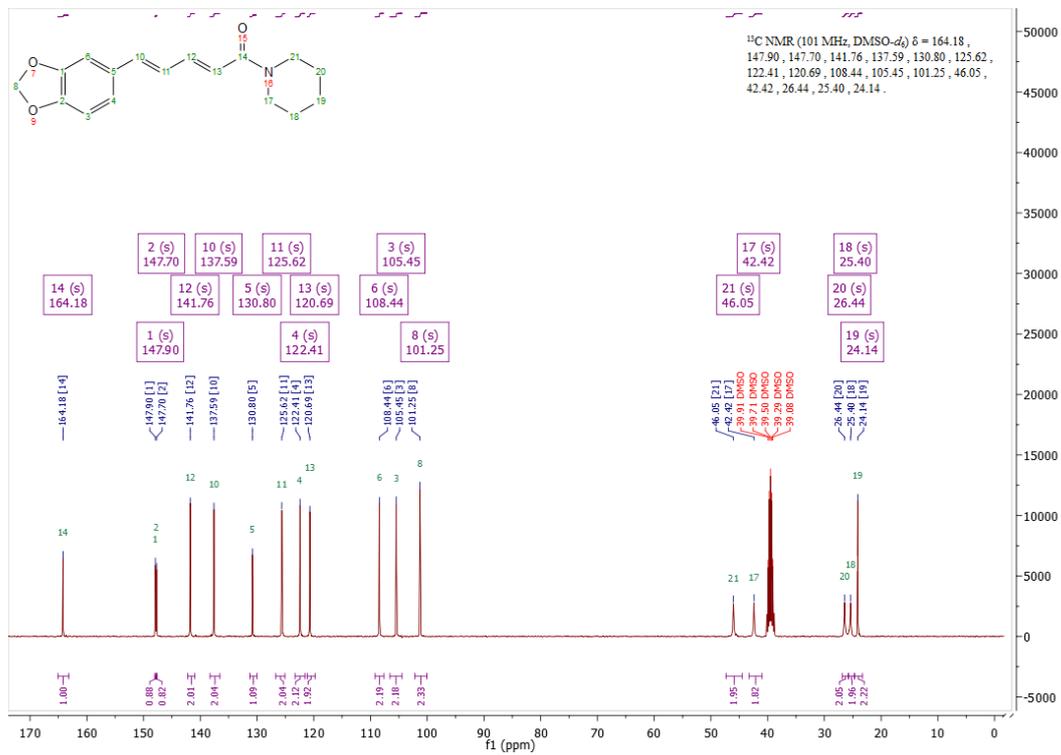
Note :
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion (HF-Linear)
 RT : 0.30 min Scan# : (6,9)
 BP : m/z 149.0000 Int. : 409.95
 Output m/z range : 0.0000 to 748.6520
 4323439 Cut Level : 0.00 x



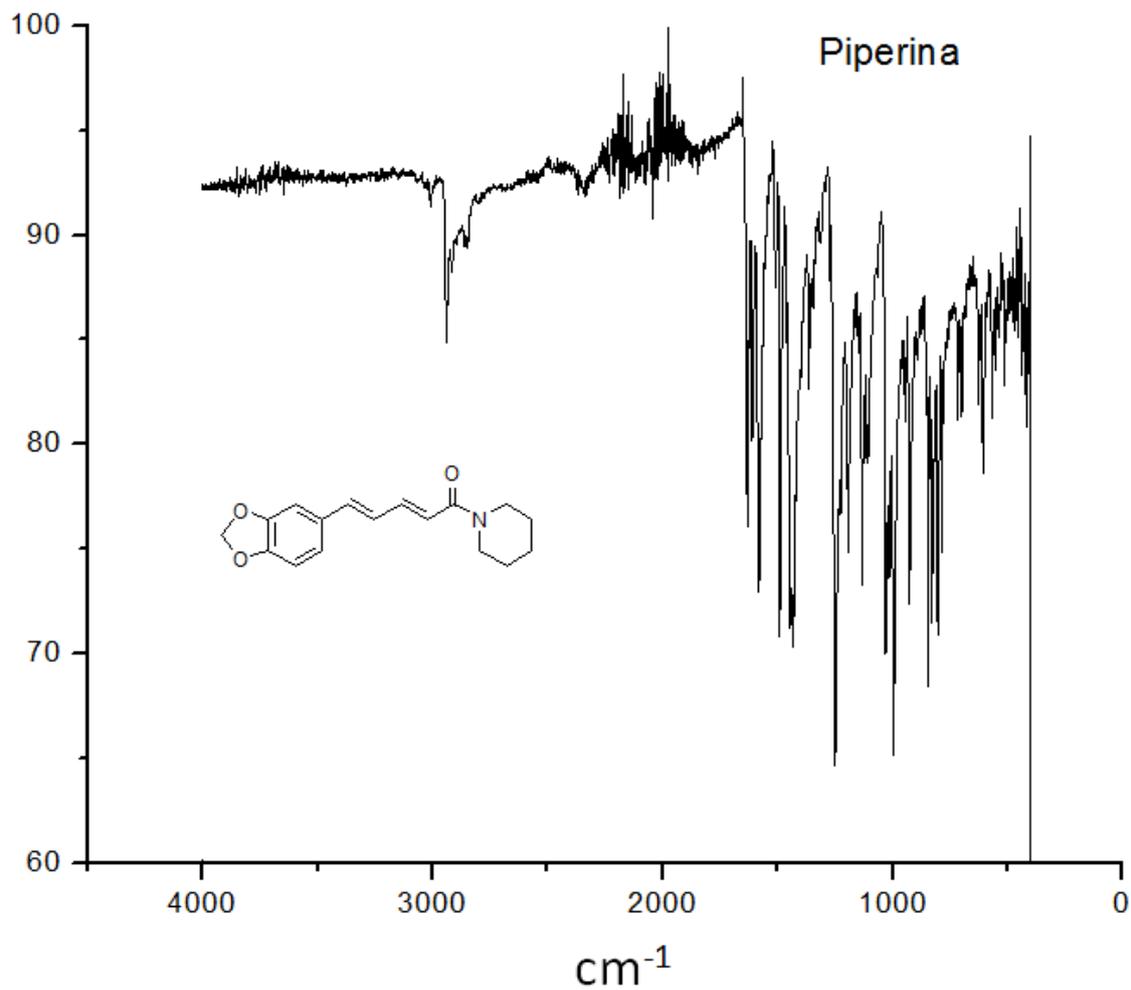
Espectrometría de masas de Ac.-D2G-P por EI+



Espectro de RMN ¹H piperina en DMSO-*d*₆

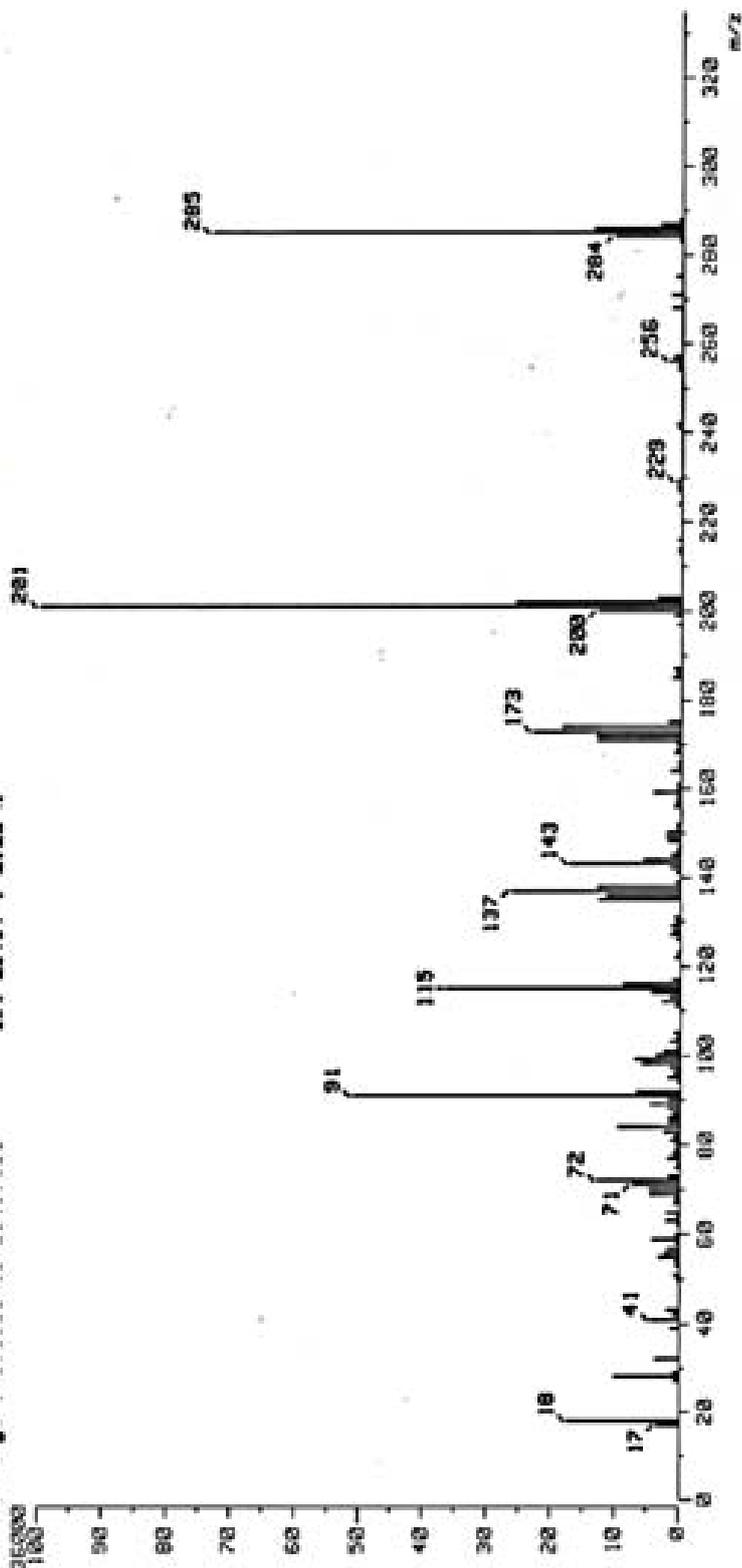
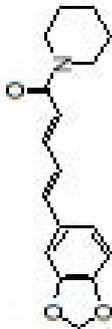


Espectro de RMN ¹³C piperina en DMSO-*d*₆

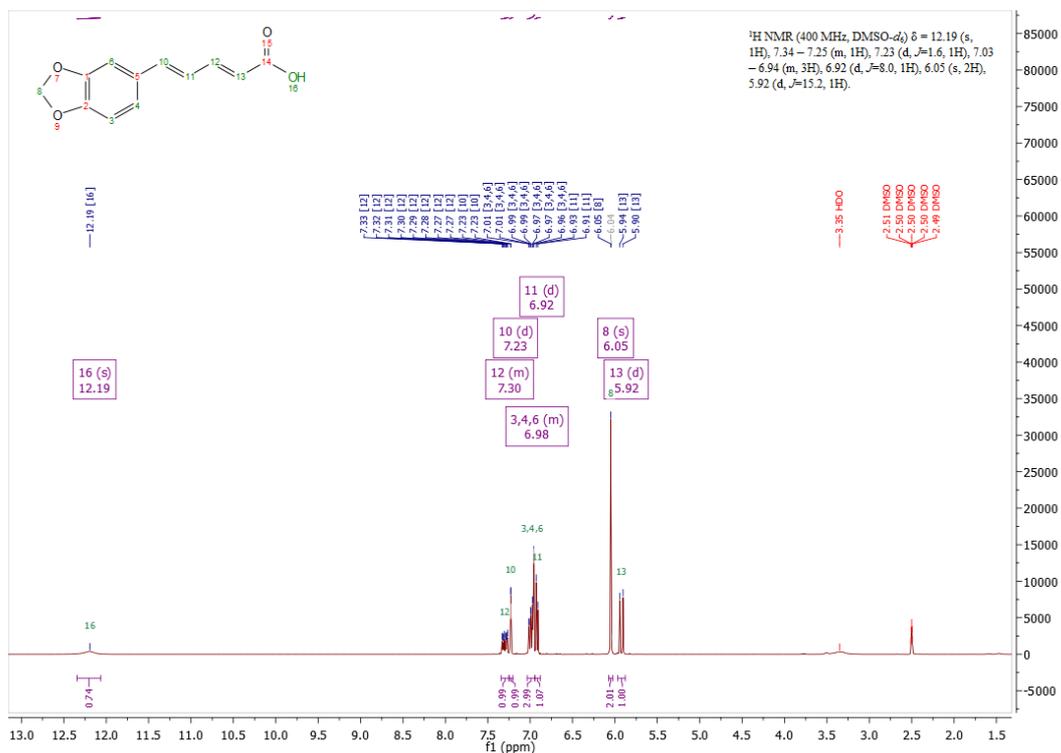


piperina IR			
2939	84	1194	74
2904	88	1132	73
2849	89	1022	64
1627	76	987	65
1613	80	932	72
1592	72	843	89
1489	70	829	71
1448	71	712	81
1365	82	622	79
1249	65	568	81

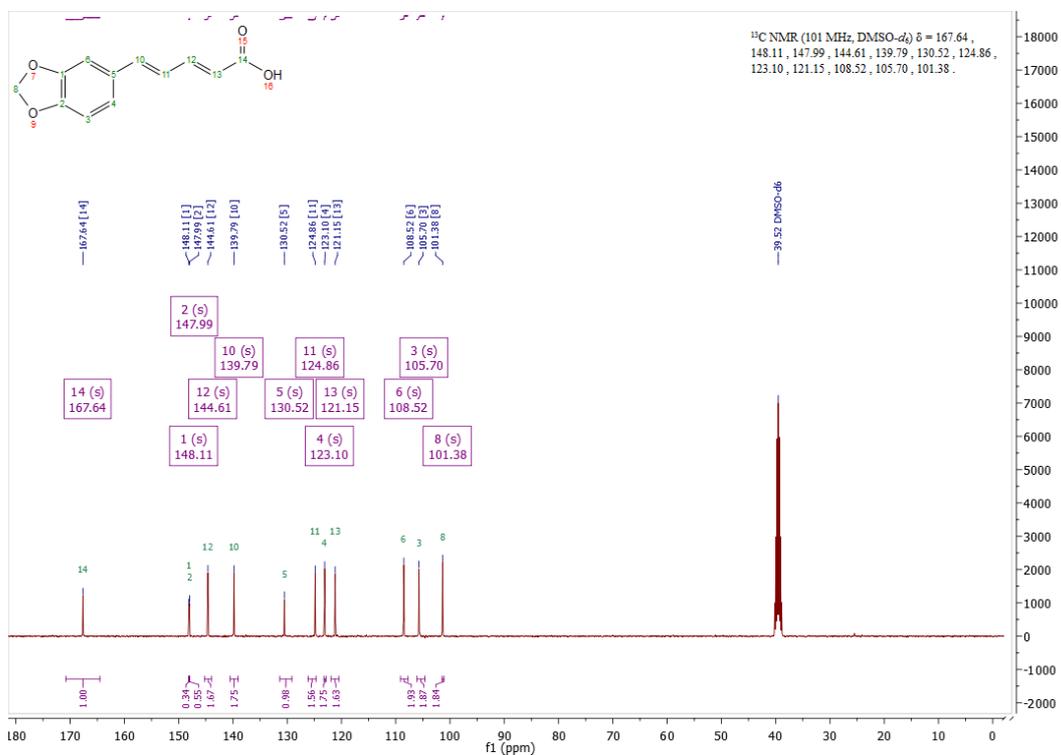
[Mass Spectrum]
 Date : Dr-Gudarrasa-Patricia082 Date : 21-Sep-2015 12:43
 Sample: 649 STR-2004 Piperina Jeol SX102A
 Note :
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion (HF-Linear)
 RT : 8.15 min Scan# : (4,5)
 BP : m/z 201.0000 Int. : 346.76
 Output m/z range : 0.0000 to 334.7181
 Cut Level : 0.00 %



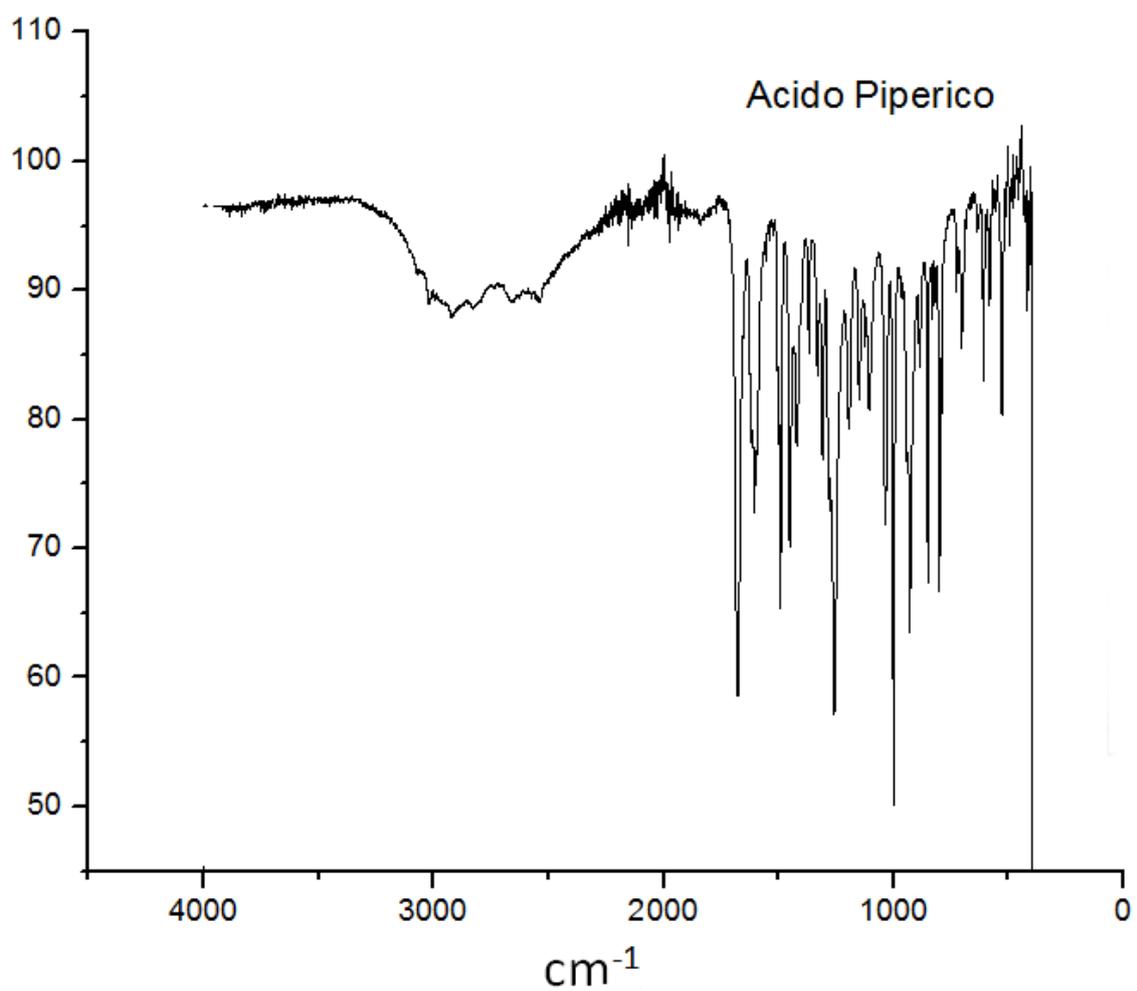
Espectrometría de masas de piperina por EI+



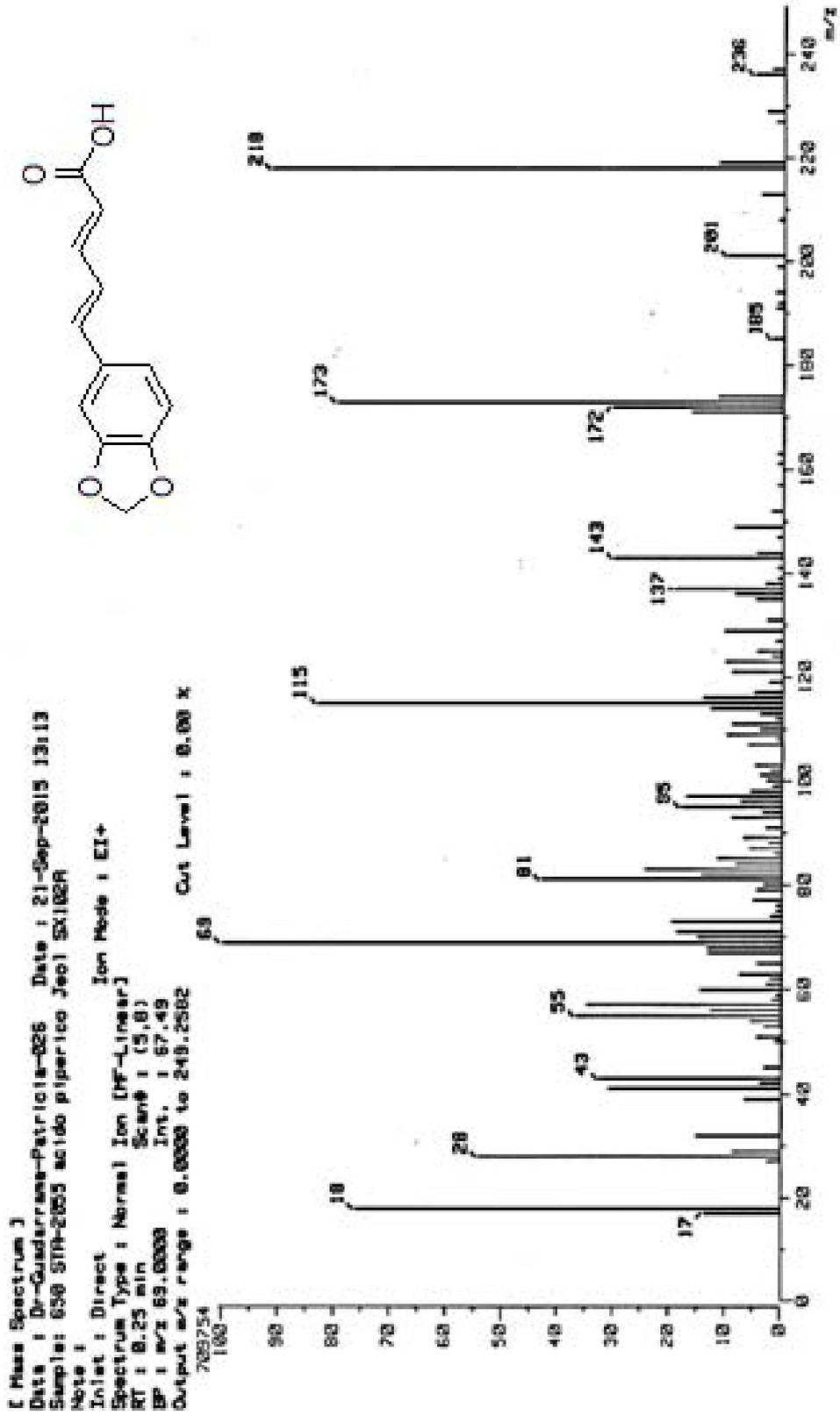
Espectro de RMN ¹H ácido pipérico en DMSO-*d*₆



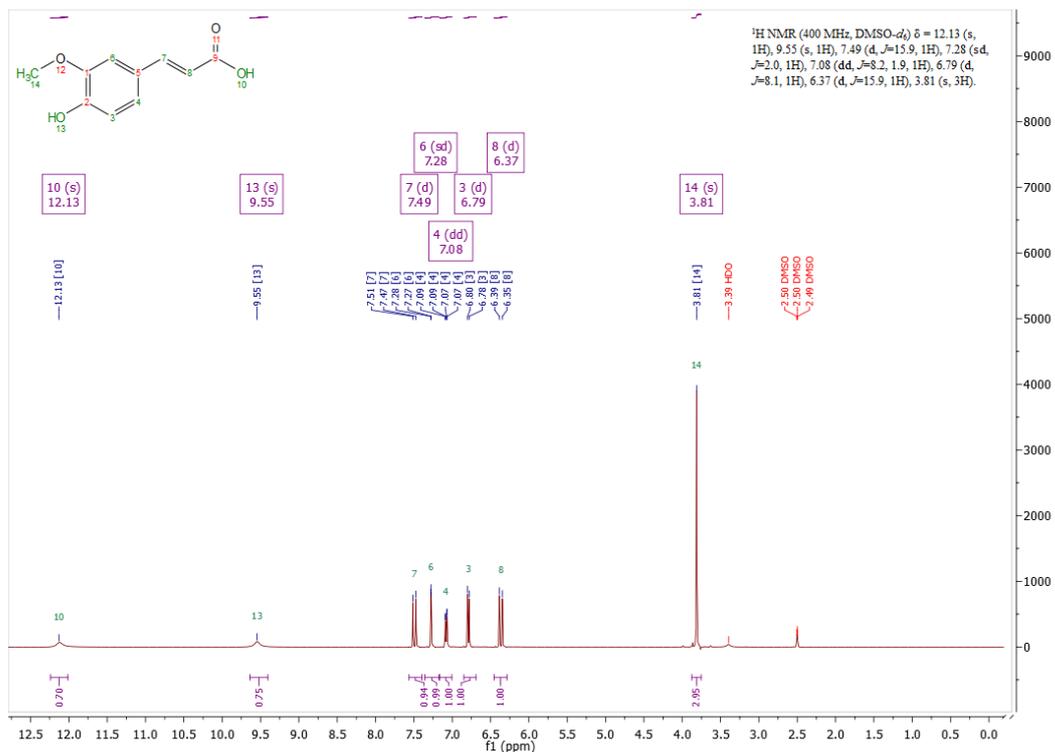
Espectro de RMN ¹³C ácido pipérico en DMSO-*d*₆



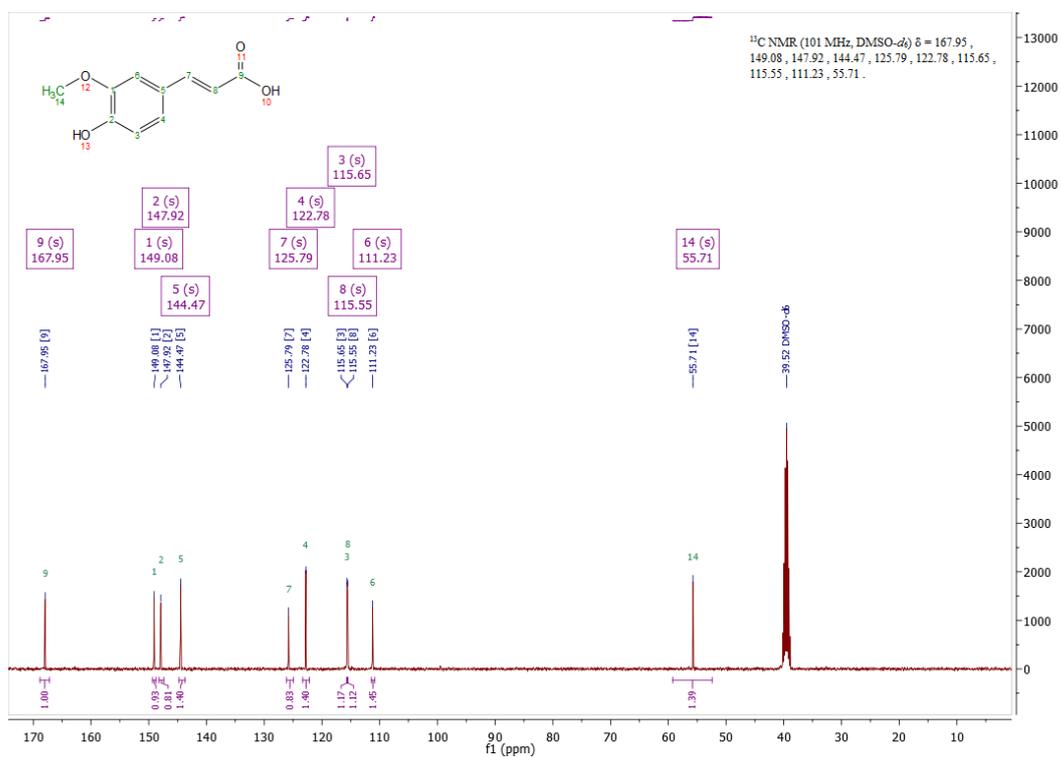
ácido pipérico IR			
3020	89	1370	85
2925	87	1308	77
2828	88	1253	57
2656	89	1192	79
2546	89	1143	81
1682	58	1102	81
1604	73	1040	72
1487	65	1006	50
1446	71	923	63
1418	78	855	67



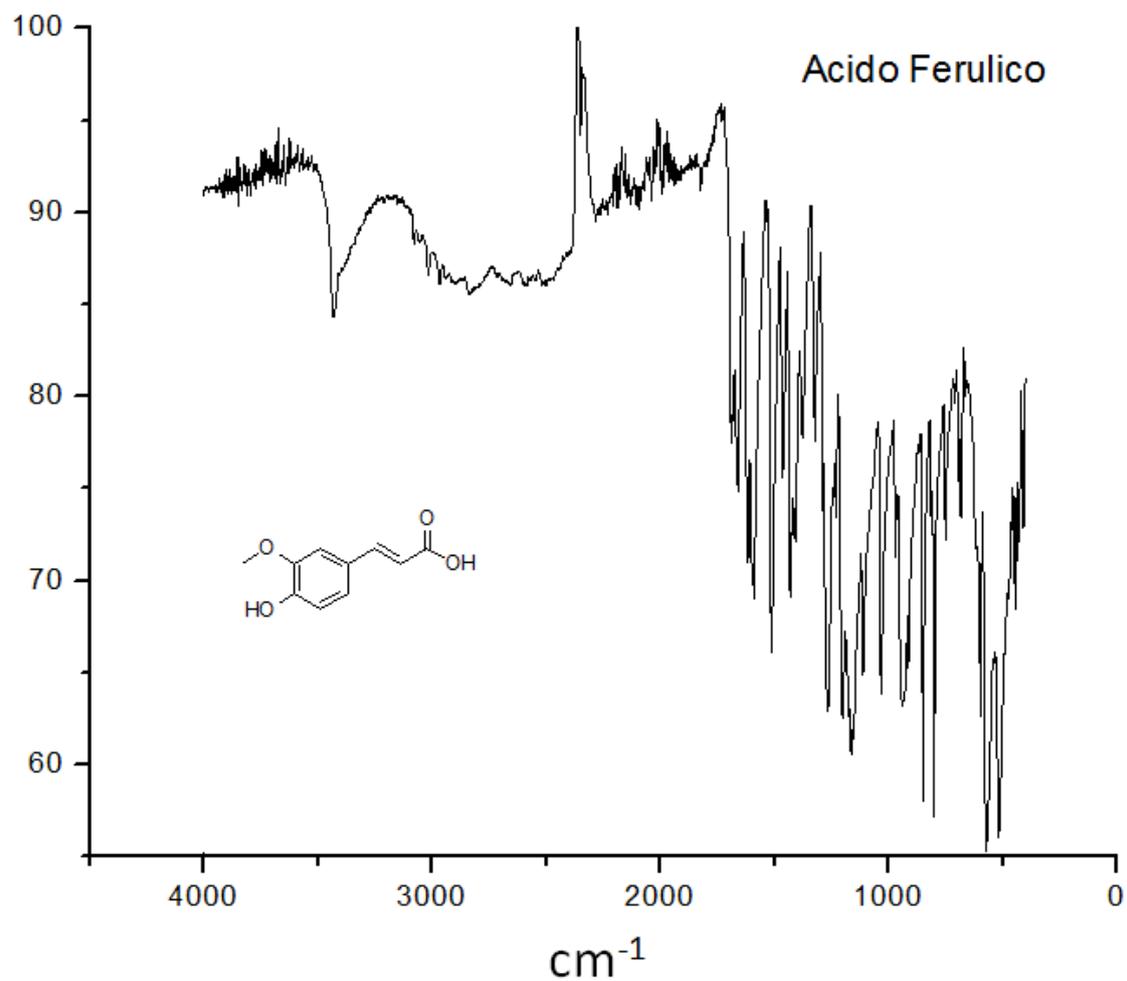
Espectrometría de masas de ácido pipérico por EI+



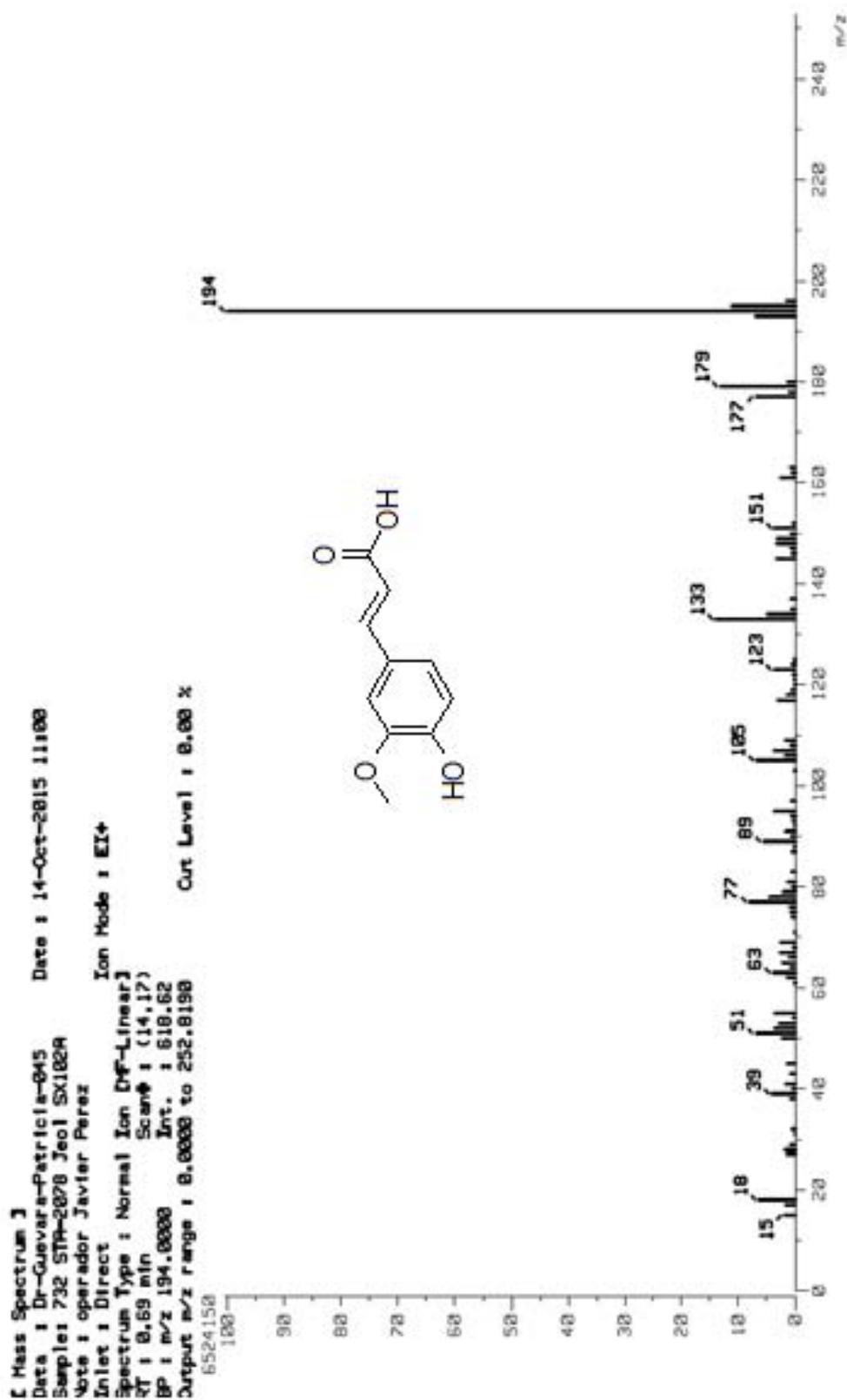
Espectro de RMN ¹H ácido ferúlico en DMSO-*d*₆



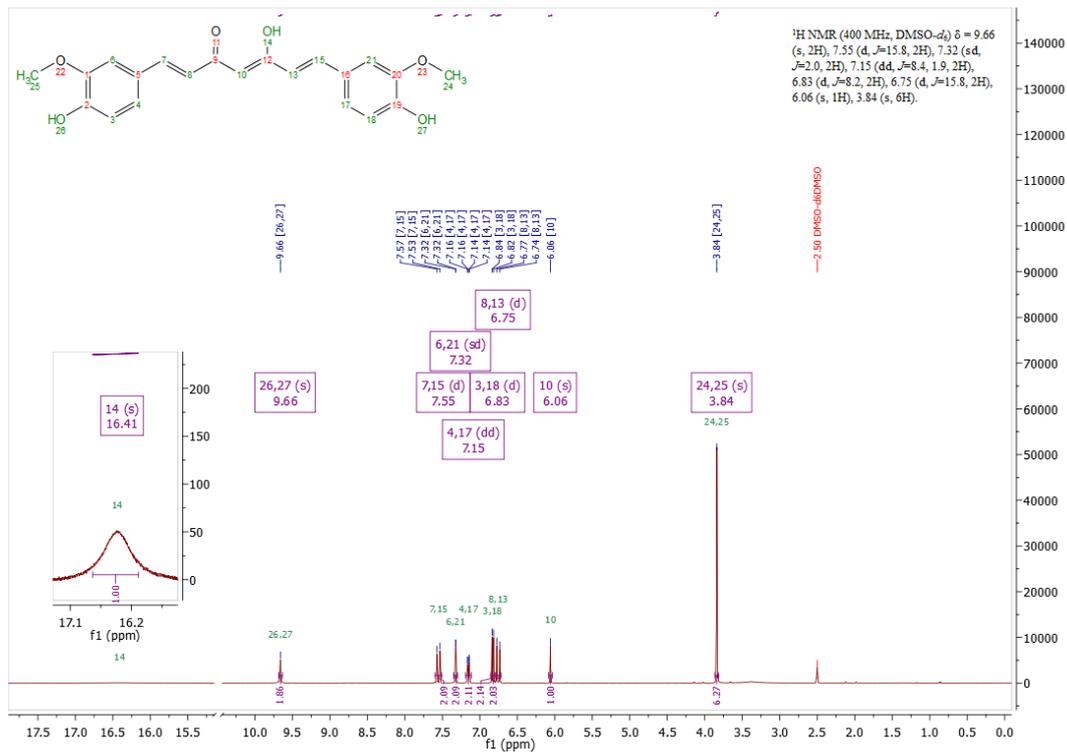
Espectro de RMN ¹³C ácido ferúlico en DMSO-*d*₆



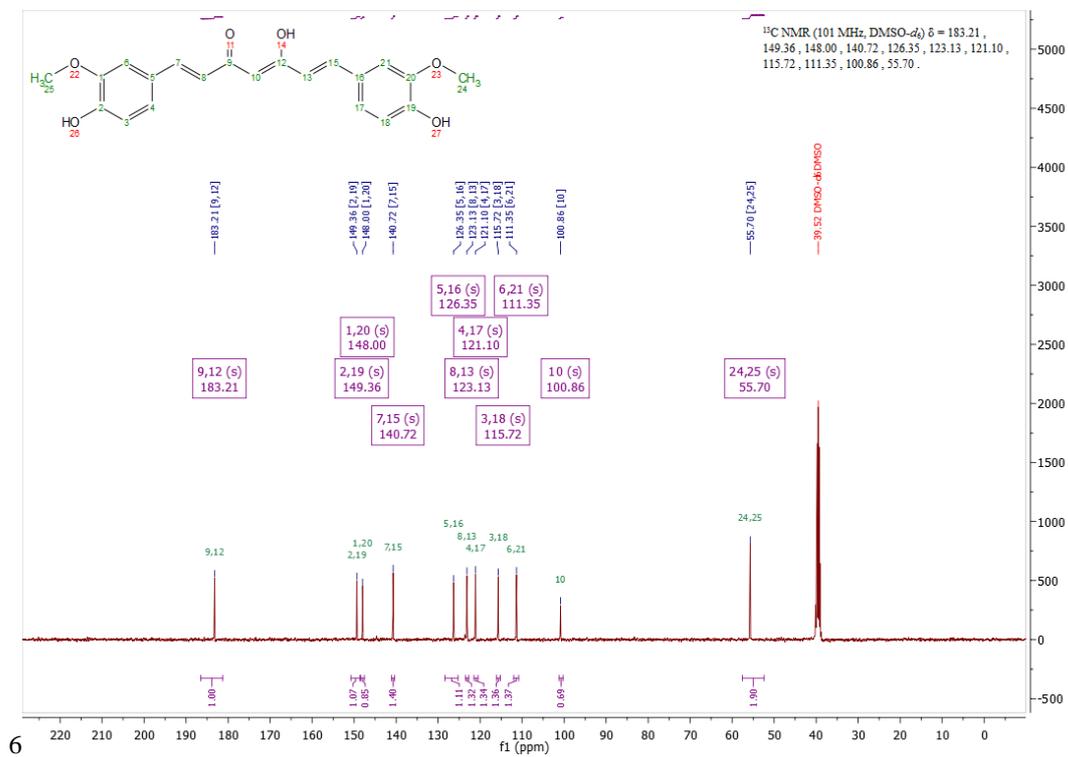
ácido ferúlico IR			
3440	84	1267	63
1693	77	1205	62
1659	75	1157	60
1618	71	1109	65
1590	69	1020	64
1508	60	930	63
1460	75	848	58
1432	69	793	57
1405	72	573	55
1370	71	511	56



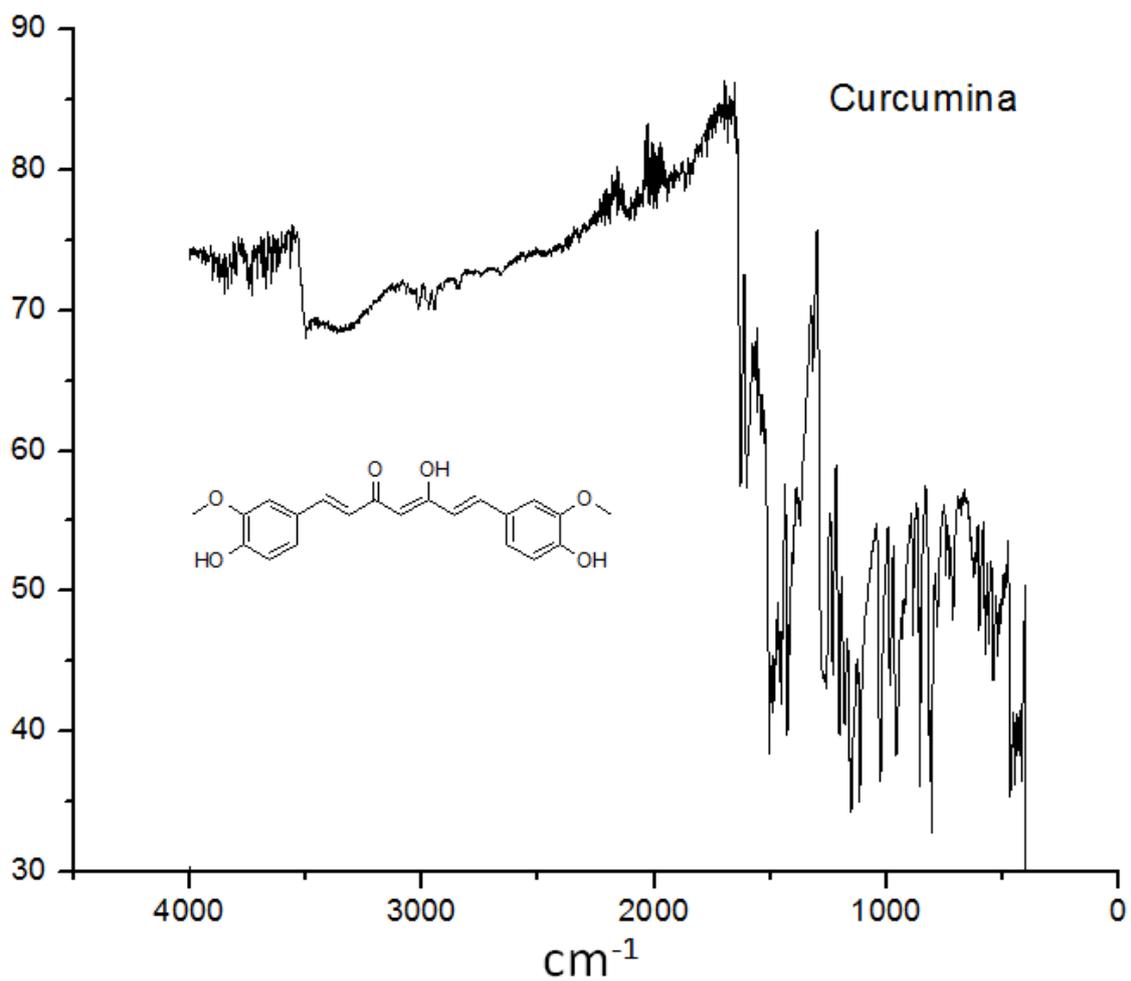
Espectrometría de masas de ácido ferúlico por EI+



Espectro de RMN ¹H curcumina en DMSO-*d*₆



Espectro de RMN ¹³C curcumina en DMSO-*d*₆



curcumina IR			
3502	68	1109	35
3330	68	1020	36
1625	57	985	43
1604	57	958	38
1515	38	882	47
1425	40	862	36
1267	43	813	32
1205	40	717	47
1178	40	532	44
1150	34	470	36

[Mass Spectrum]
Data : Dr-Guadarrama-Patricio-242 Date : 04-Jun-2015 19:13
Sample: 511 STA-1978 Curcumina Jeal SX1829

Note :

Inlet : Direct Ion Mode : EI+

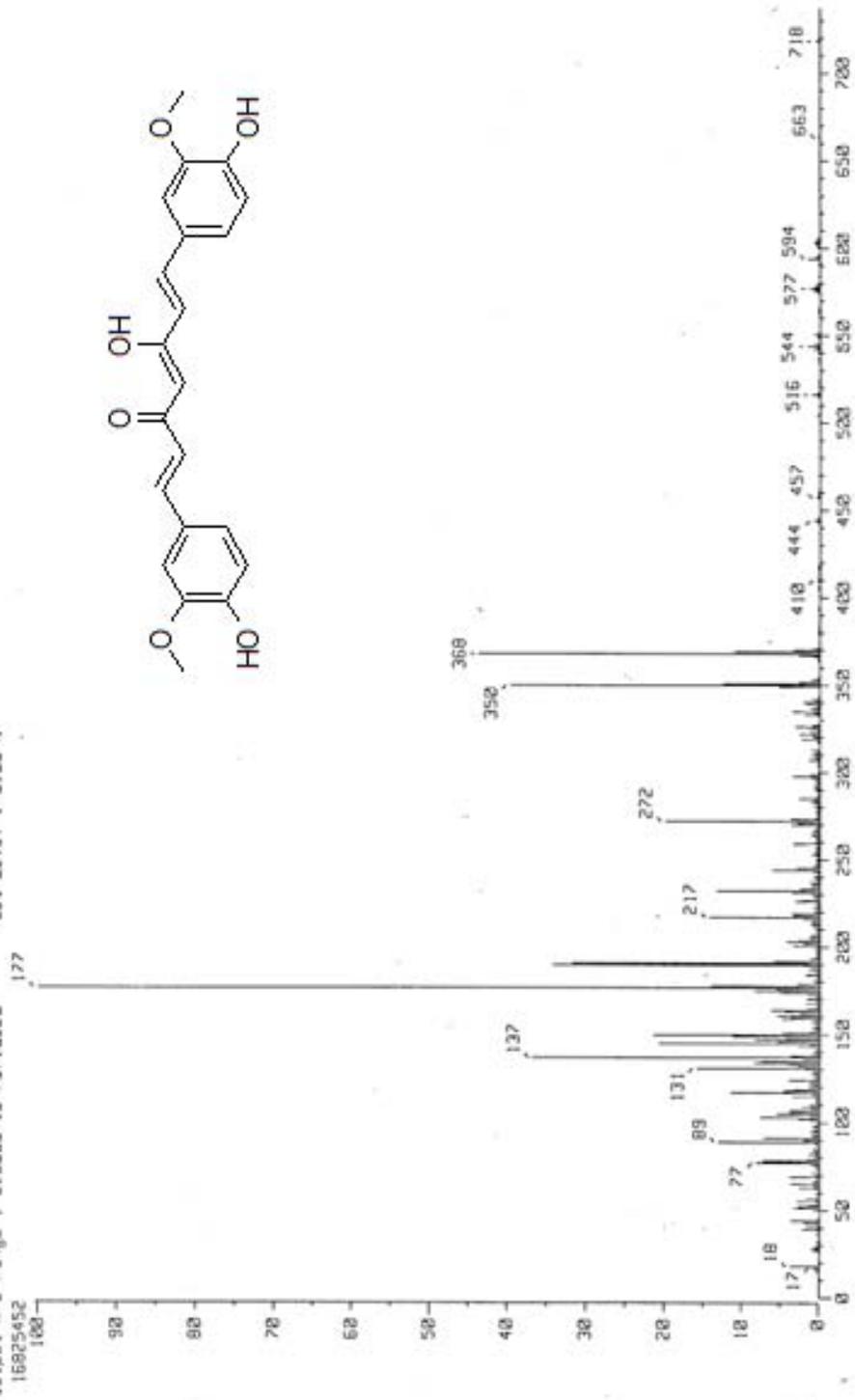
Spectrum Type : Normal Ion (M⁺-Linear)

RT : 2.88 min Scan# : 148,45

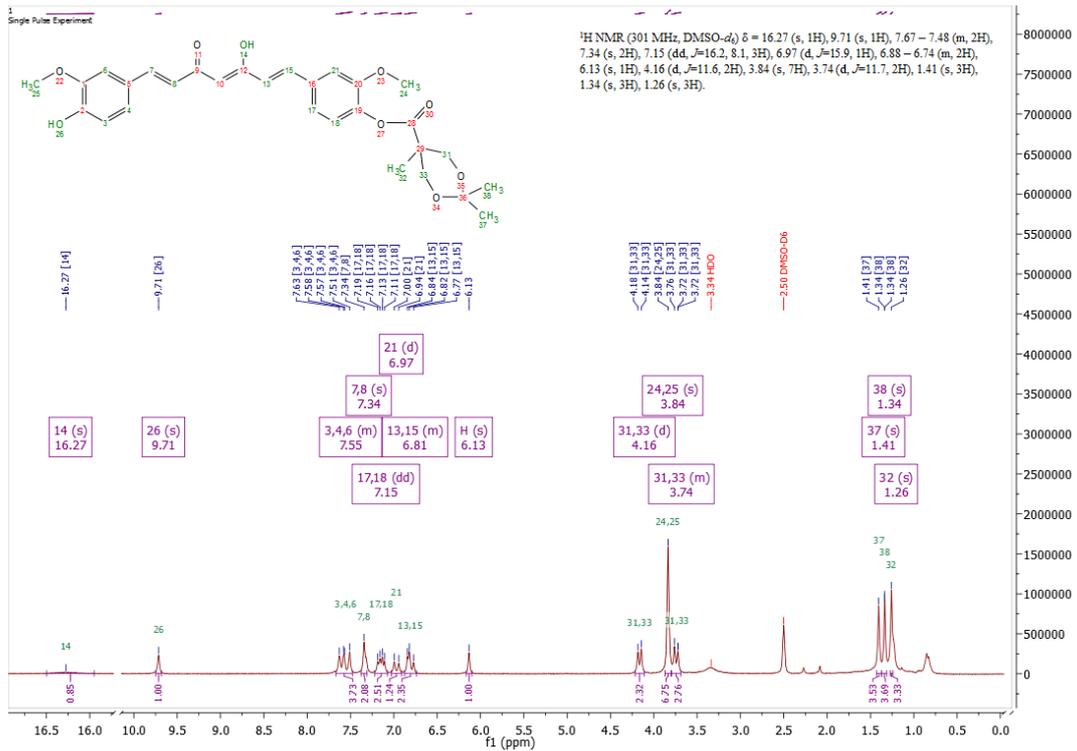
BP : m/z 177.0000 Int. : 1599.98

Output m/z range : 0.0000 to 737.0528

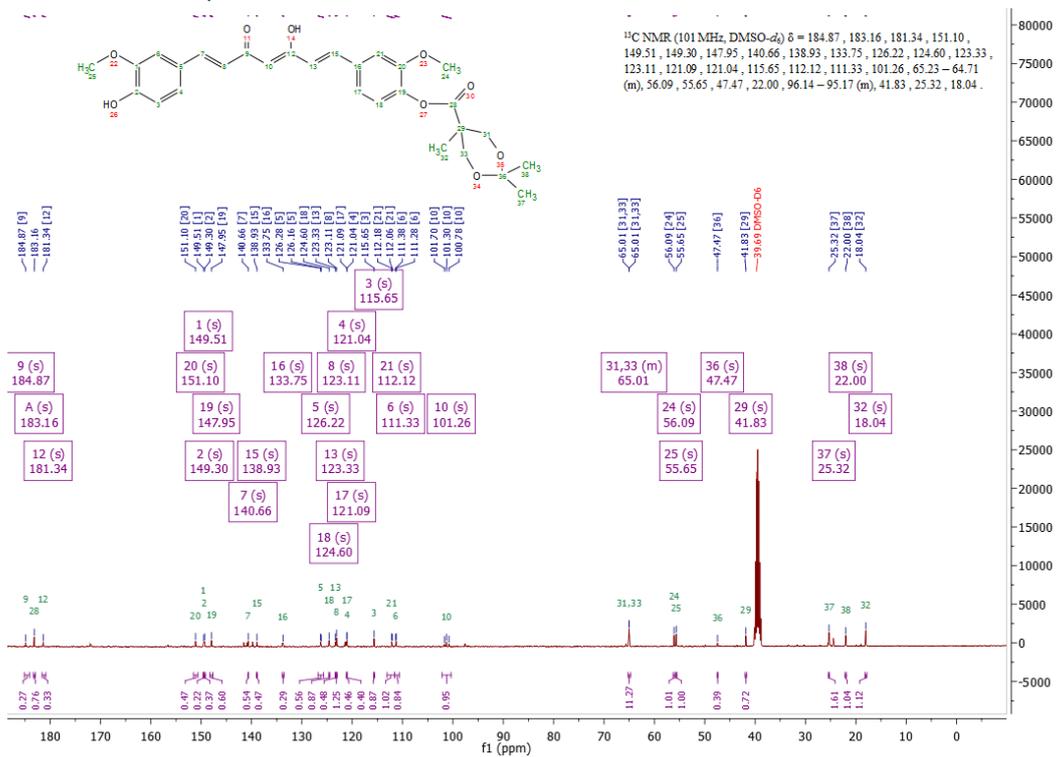
Cut Level : 0.00 %



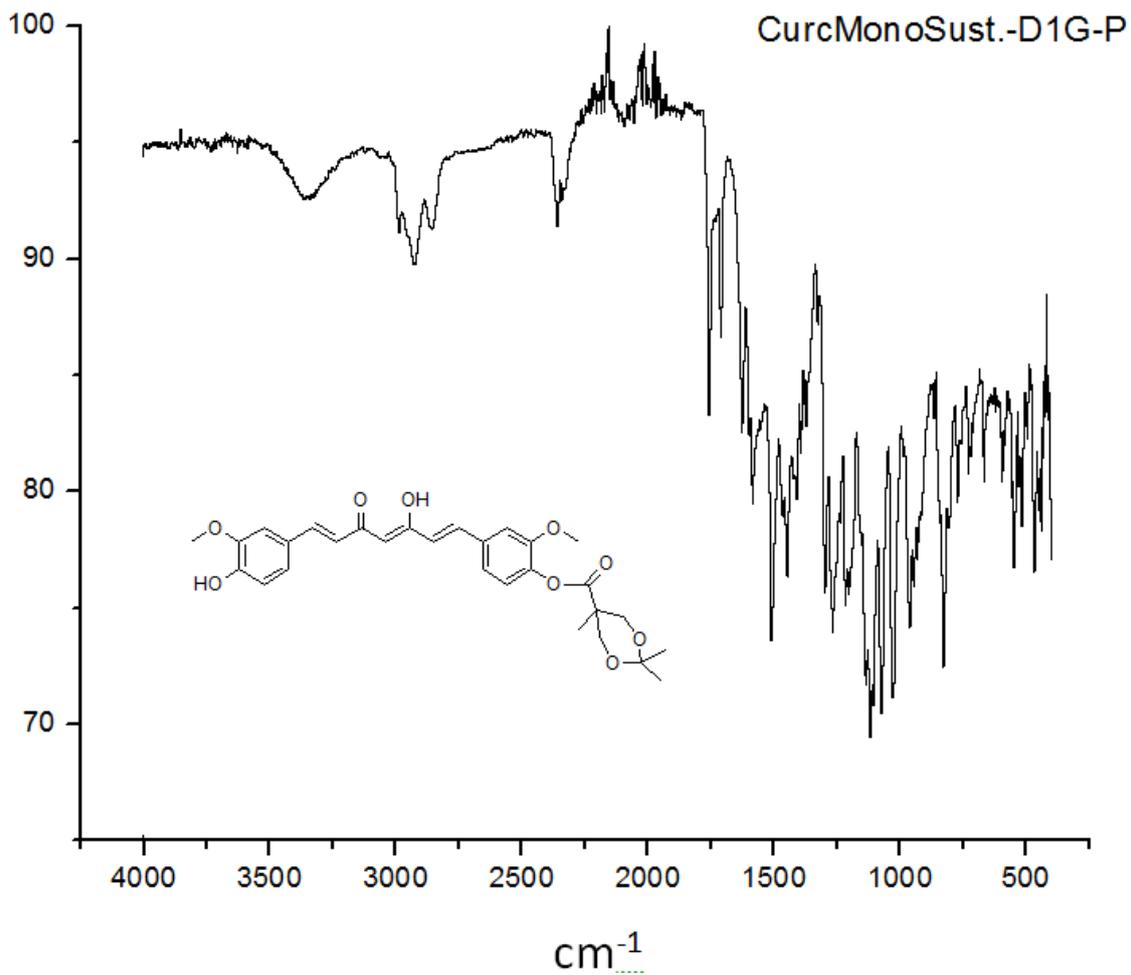
Espectrometría de masas de **curcumina** por EI+



Espectro de RMN ¹H de CurcMonoSust.-D1G-P en DMSO-*d*₆



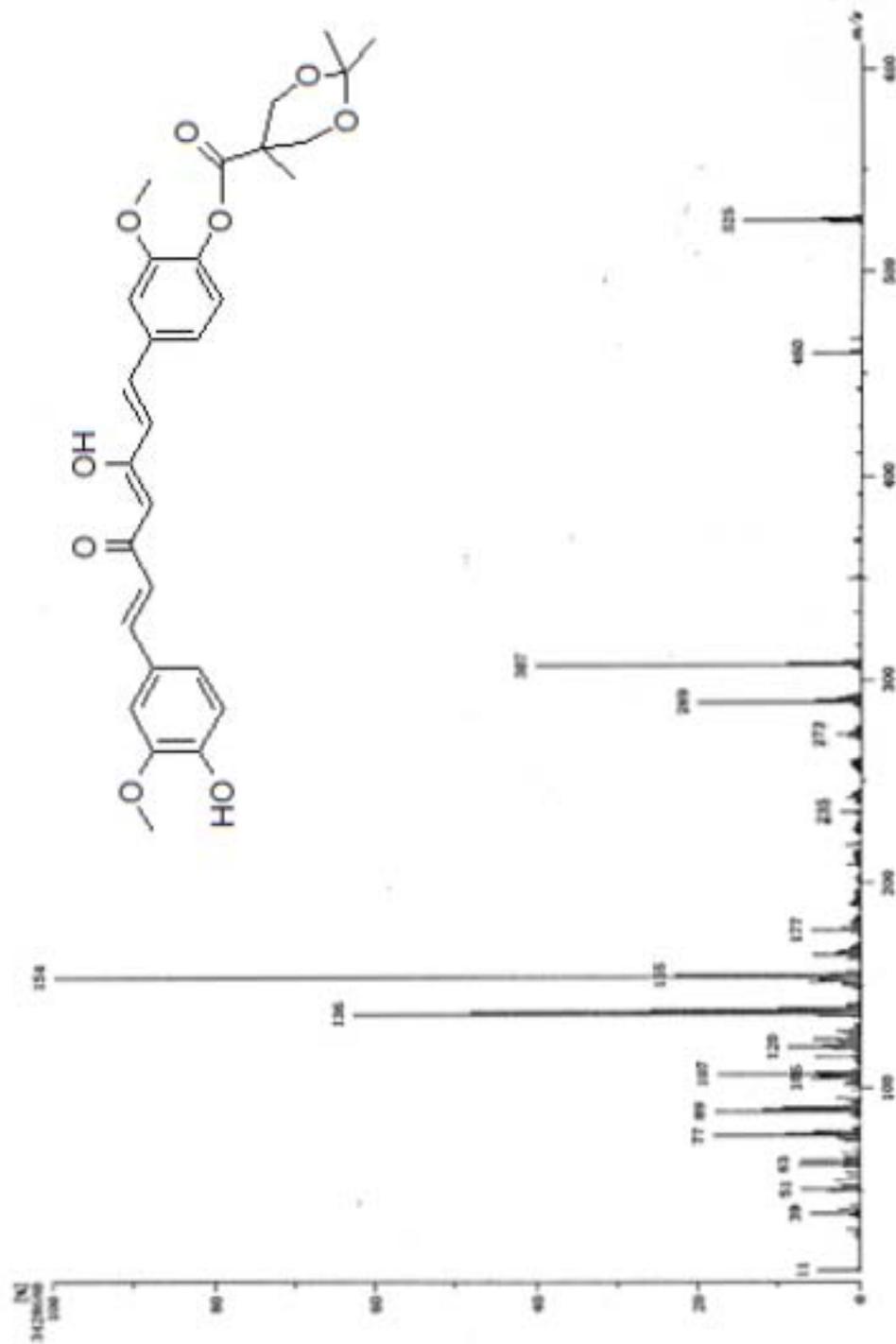
Espectro de RMN ¹³C de CurcMonoSust.-D1G-P en DMSO-*d*₆



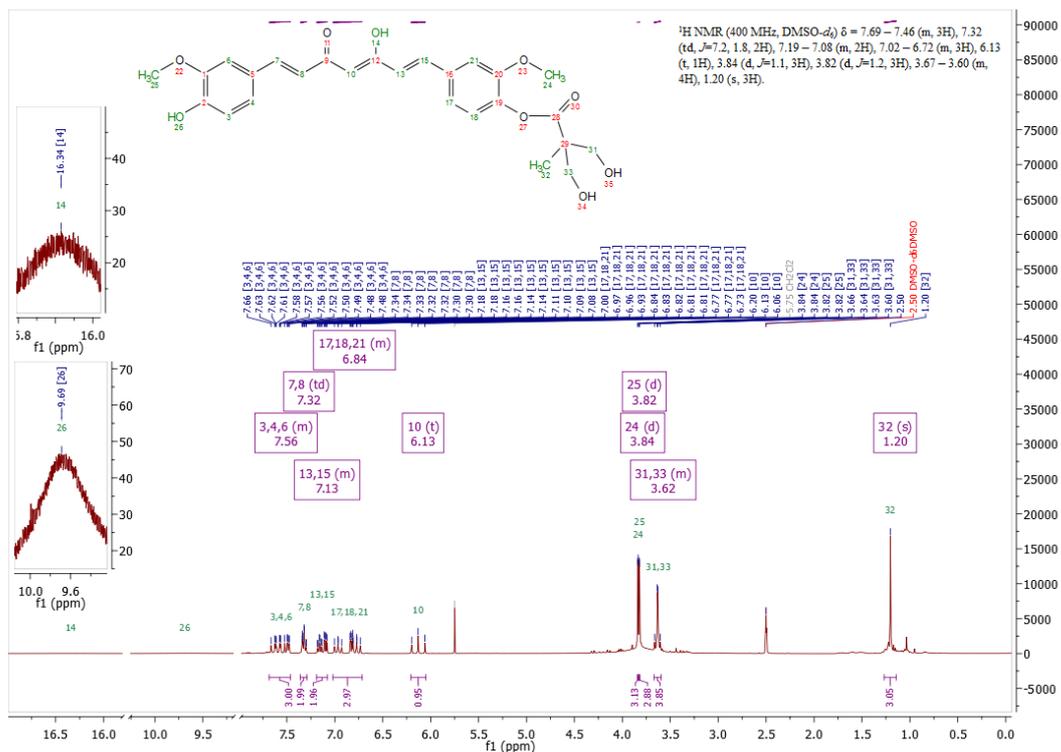
CurcMonoSust.-D1G-P IR			
3348	92	1272	74
2989	90	1215	75
2924	89	1127	69
1753	83	1080	70
1706	86	1021	71
1624	82	962	74
1589	79	822	72
1513	73	541	76
1449	76	471	76
1302	75	400	77

Nota: la señal 2368 corresponde a CO₂

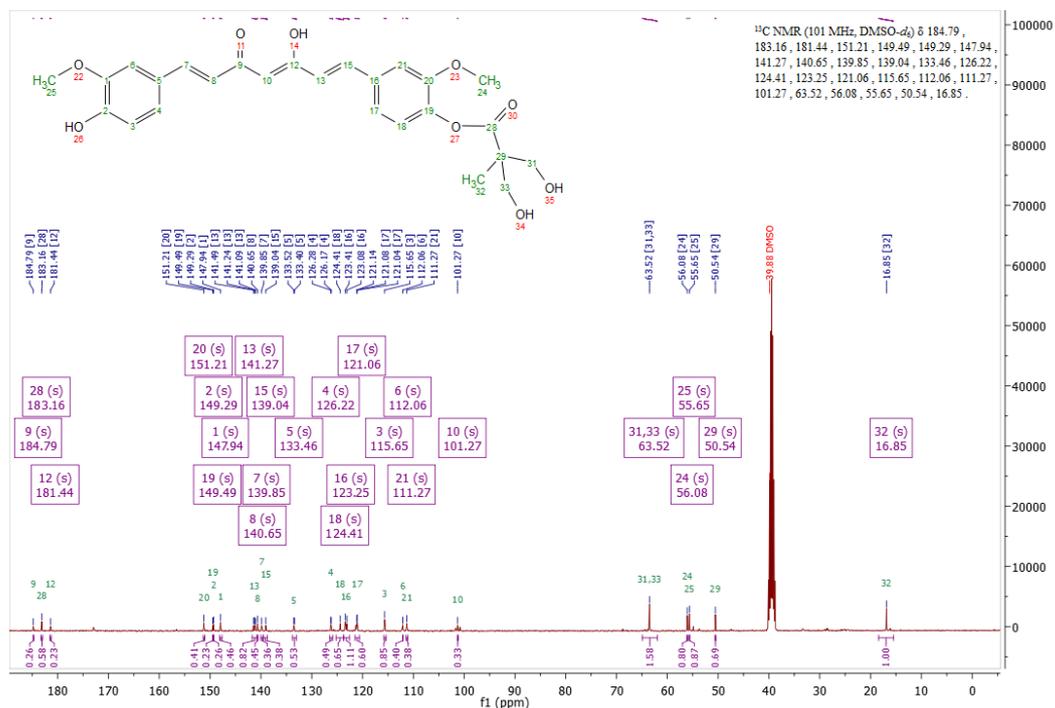
[Mass Spectrum]
 Date: Di Protona Sastre/2013 Date: 29-Aug-2013 18:37
 Instrument: Micromass
 Sample: 05 515-023 Monocult
 Note: -
 Salt: Direct Ion Mode: FAB+
 Scan: 1000
 ScanTimeType: NormalScan [MP+Laser]
 RT: 8.15 min Start: 0.000 Stop: 10.000
 MS: m/z 150 - 600 Scan: 10000
 Output m/z range: 10 to 612 Cell Level: 0.000 V

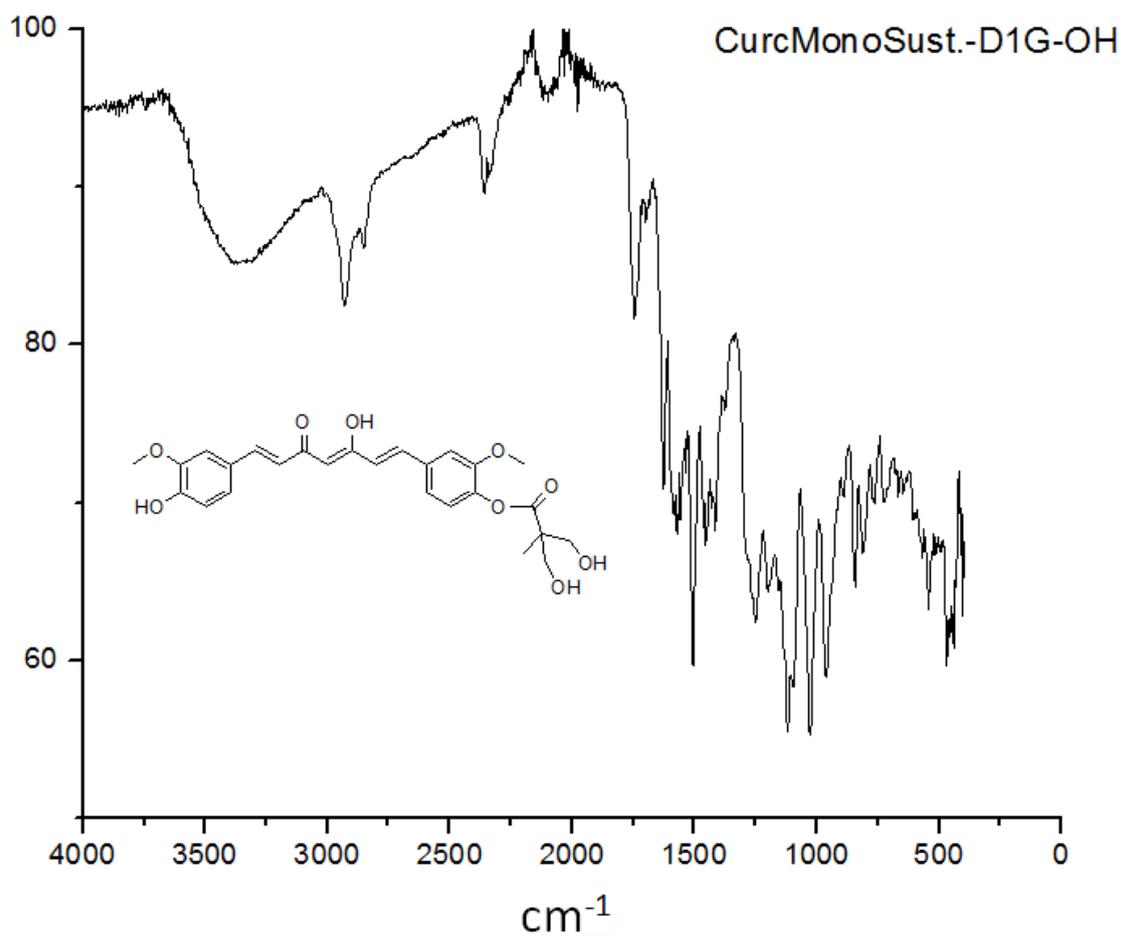


Espectrometría de masas de CurcMonoSust.-D1G-P por FAB+



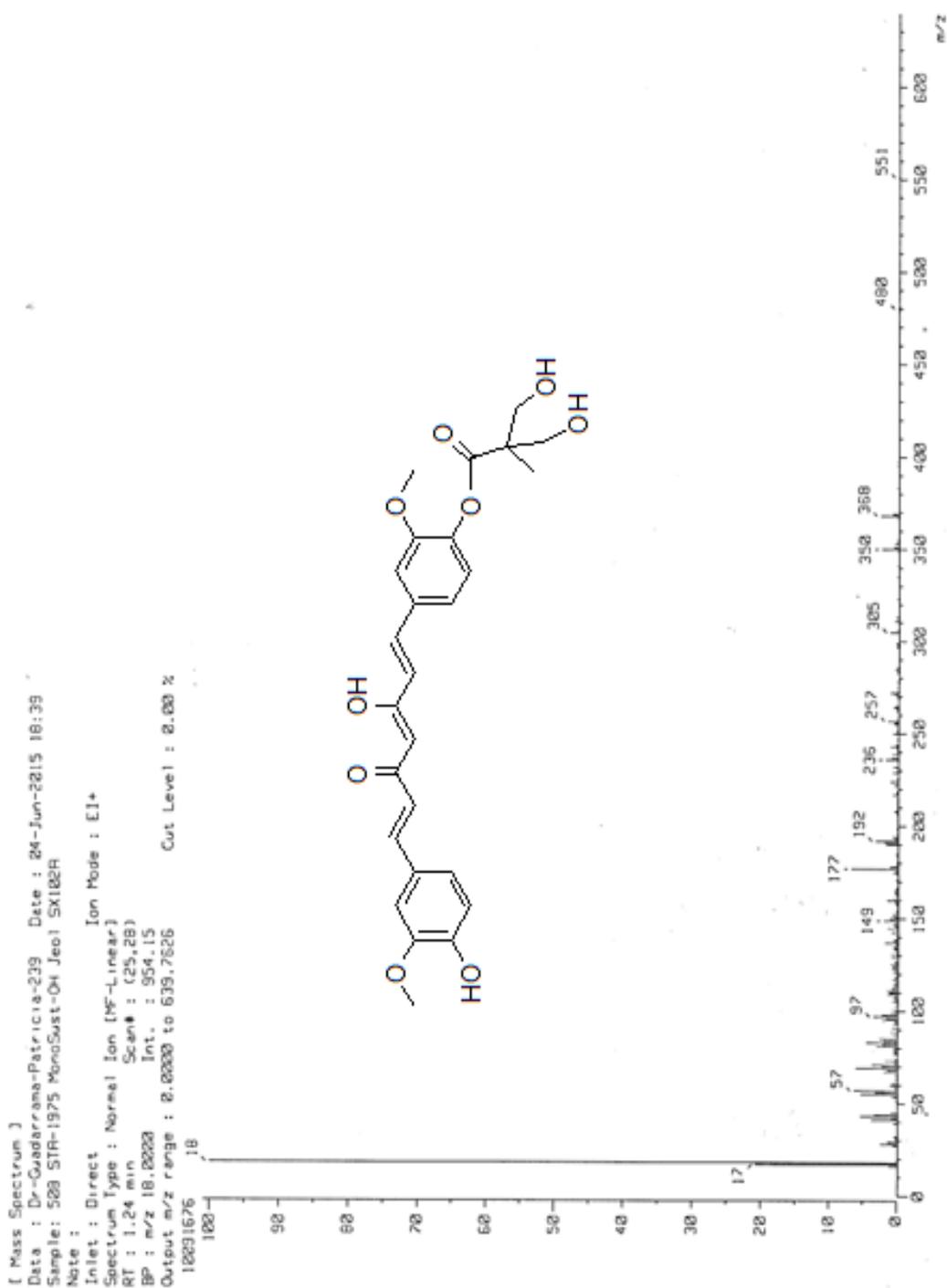
Espectro de RMN ¹H de CurcMonoSust.-D1G-OH en DMSO-*d*₆



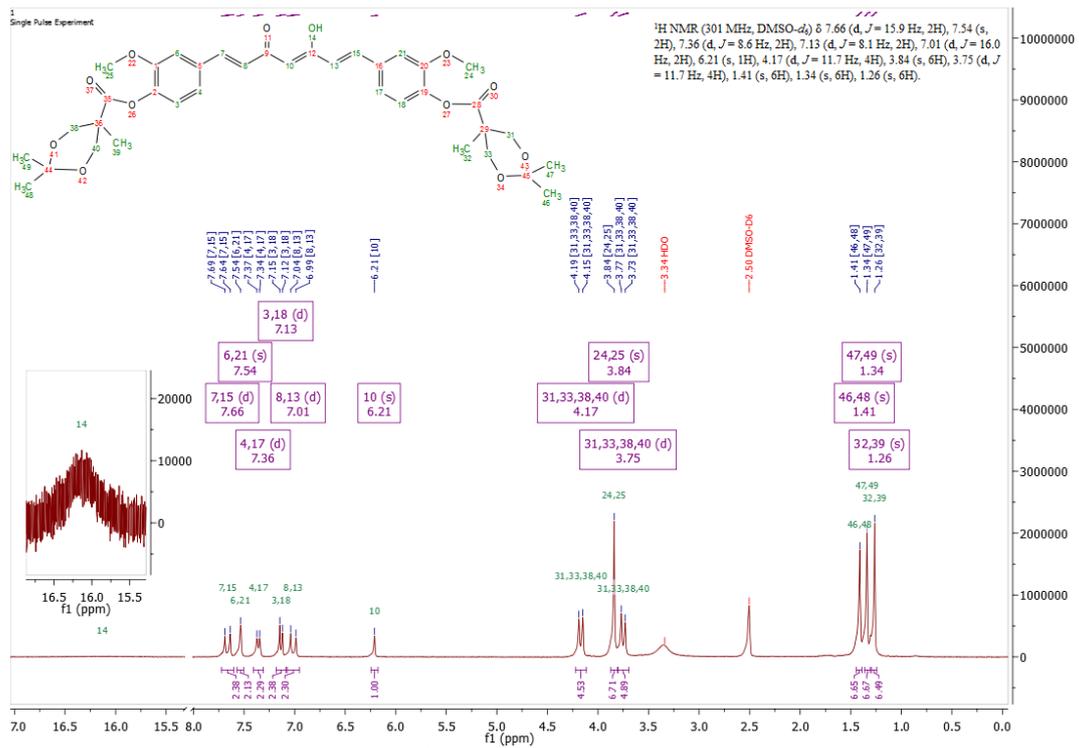


CurcMonoSust.-D1G-OH IR			
3363	85	1120	55
2924	82	1022	55
1751	81	962	59
1628	71	839	64
1572	68	809	66
1505	59	552	63
1456	67	467	60
1413	68	436	61
1249	62	400	62
1200	64		

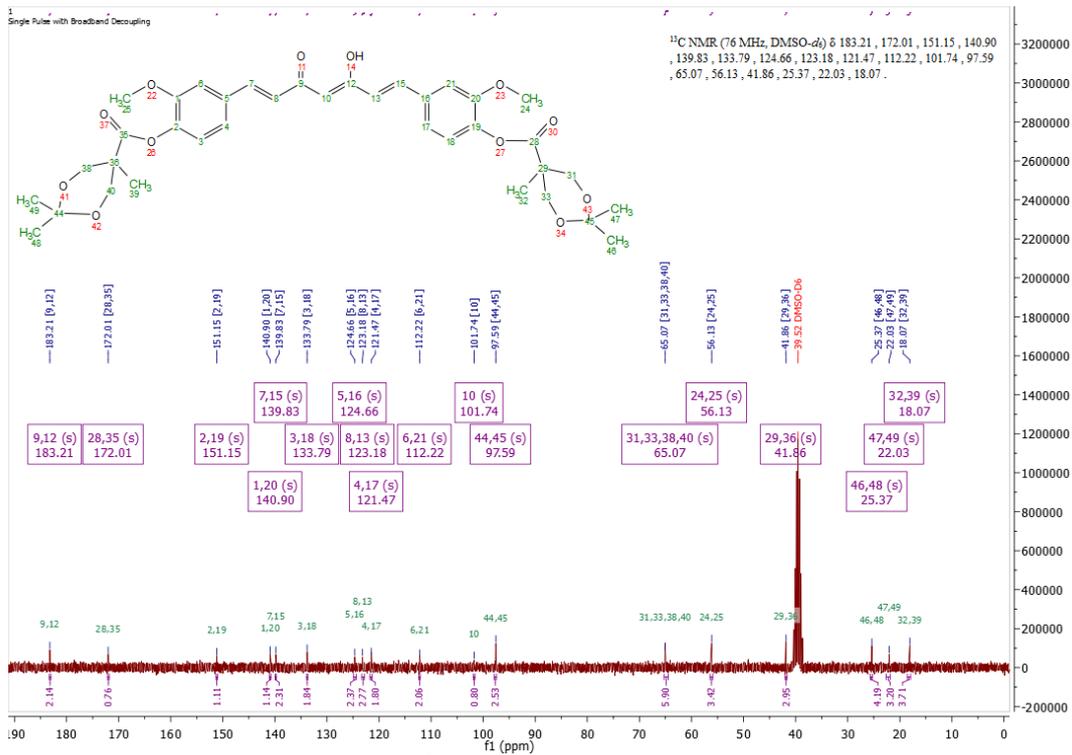
Nota: la señal 2368 corresponde a CO₂



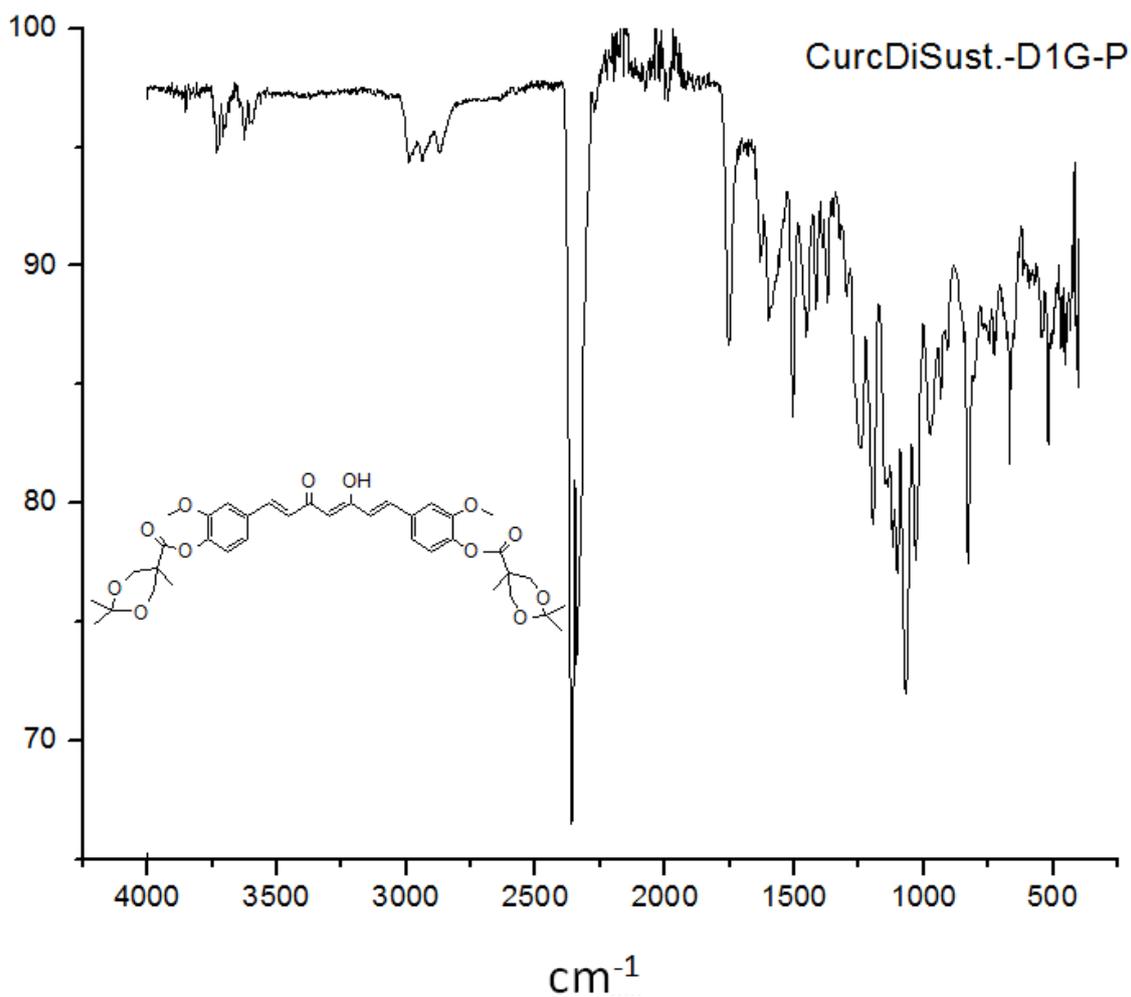
Espectrometría de masas de CurcMonoSust.-D1G-OH por EI+



Espectro de RMN ^1H de CurcDiSust.-D1G-P en $\text{DMSO}-d_6$



Espectro de RMN ^{13}C de CurcDiSust.-D1G-P en $\text{DMSO}-d_6$

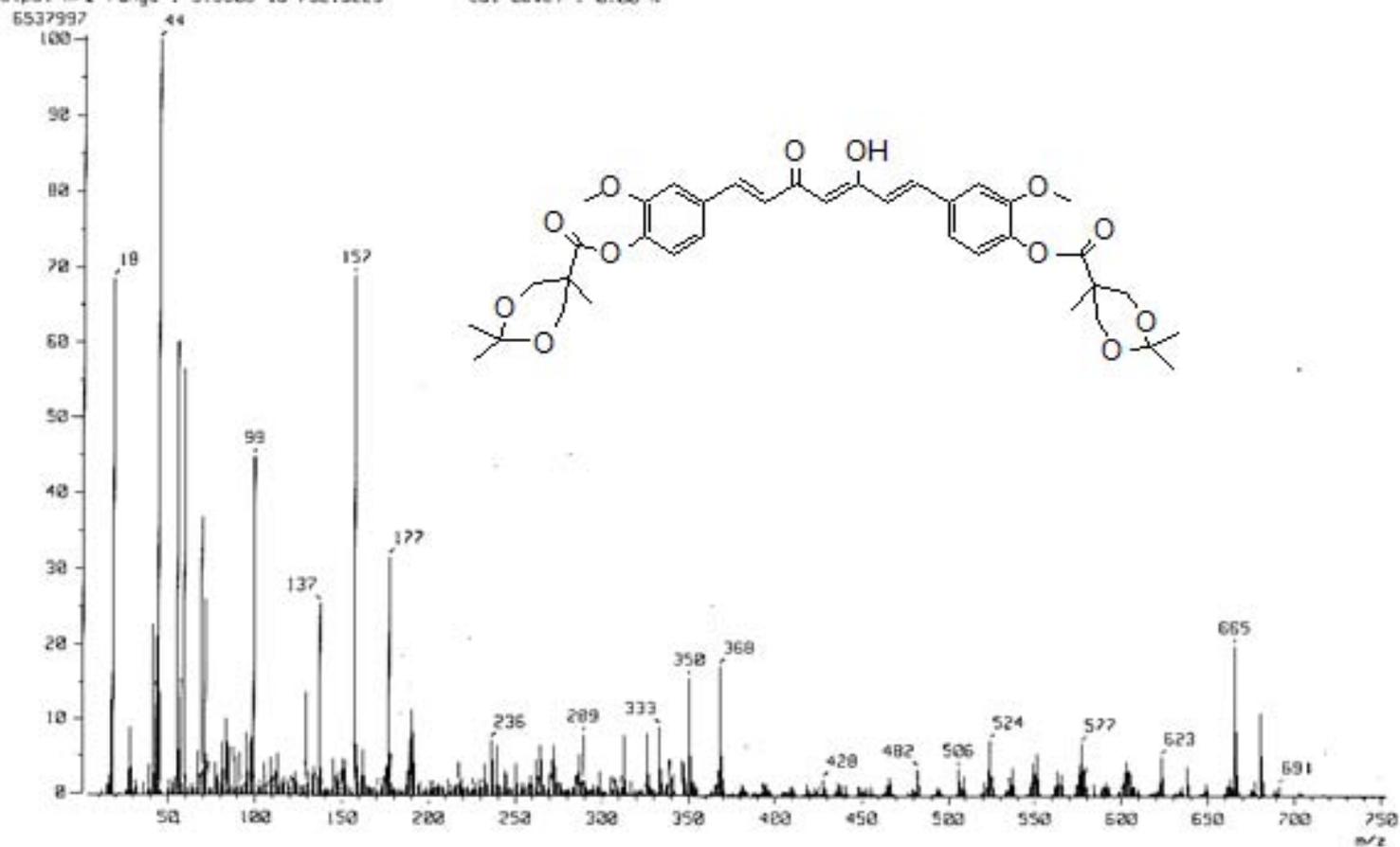


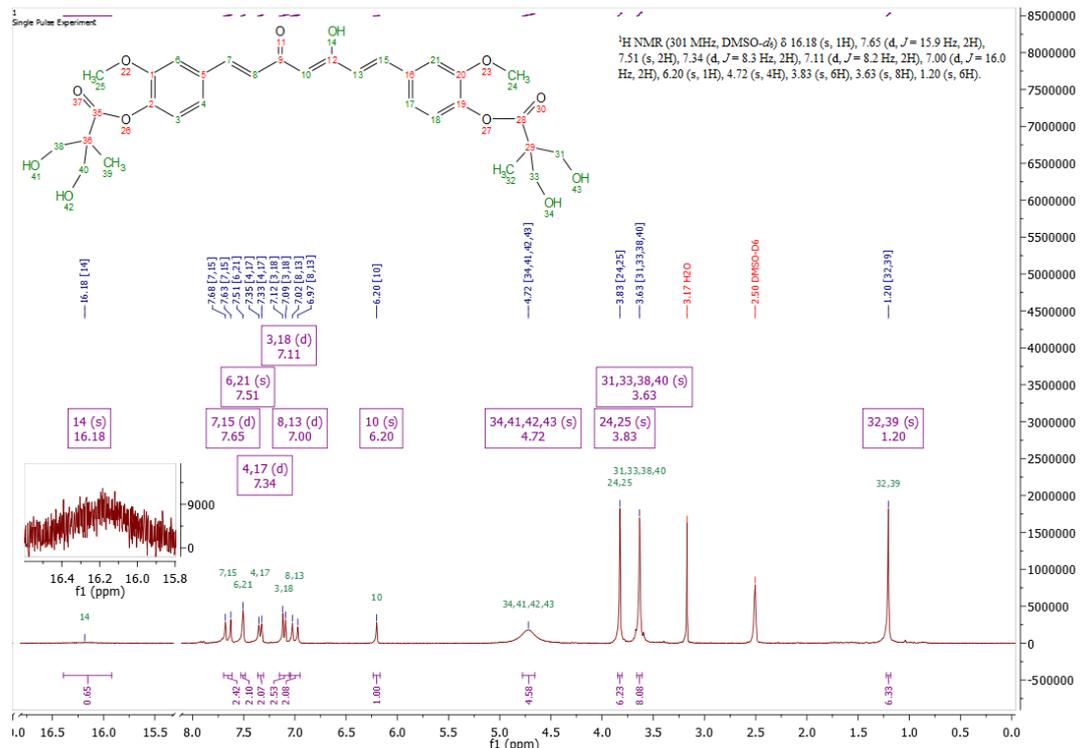
CurcDiSust.-D1G-P IR			
2995	85	1120	55
2942	82	1022	55
1751	81	962	59
1628	71	839	64
1572	68	809	66
1505	59	552	63
1456	67	467	60
1413	68	436	61
1249	62	400	62
1200	64		

Nota: la señal 2368 corresponde a CO₂

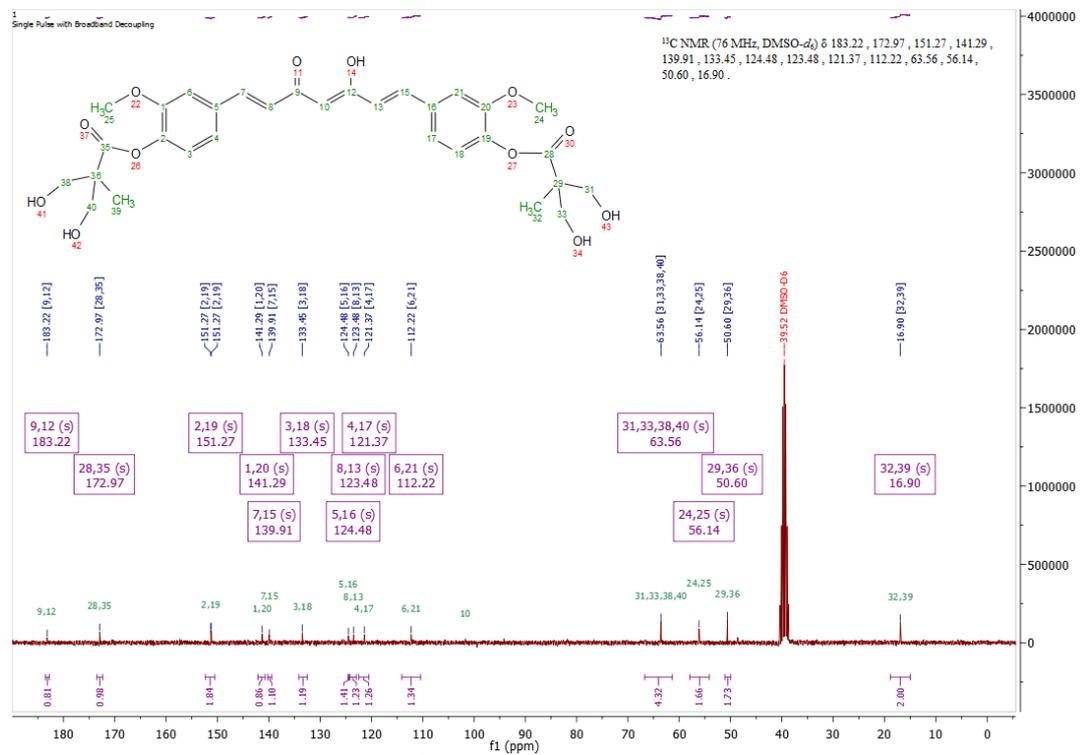
[Mass Spectrum]
Data : Dr-Guadarrama-Patricia-234 Date : 04-Jun-2015 17:50
Sample: 505 STR-1972 Disust- Jeol SX102R
Note :
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 3.26 min Scan# : (59,67)
BP : m/z 44,0000 Int. : 619.93
Output m/z range : 3.5608 to 752.5223 Cut Level : 0.00 %

Espectrometría de masas de CurcDiSust.-DIG-P por EI+

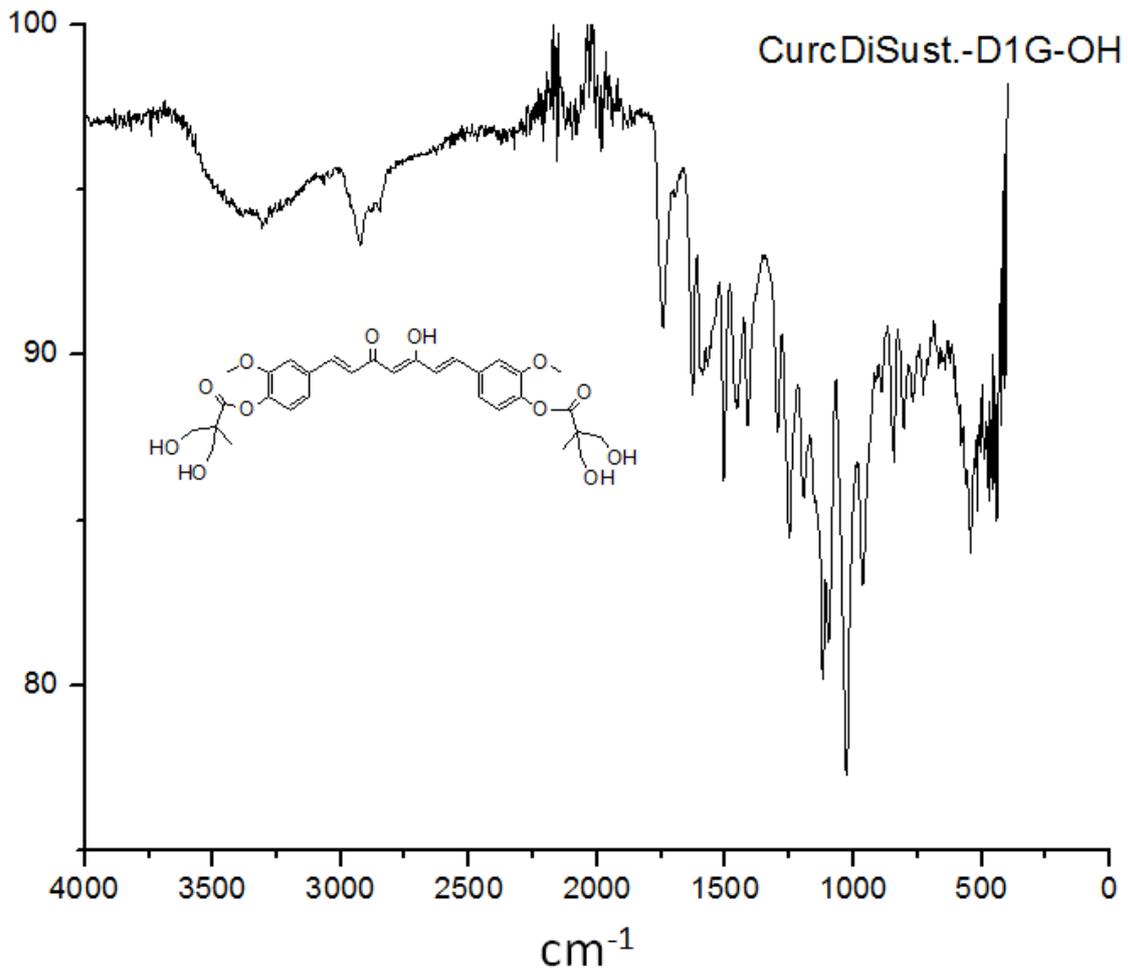




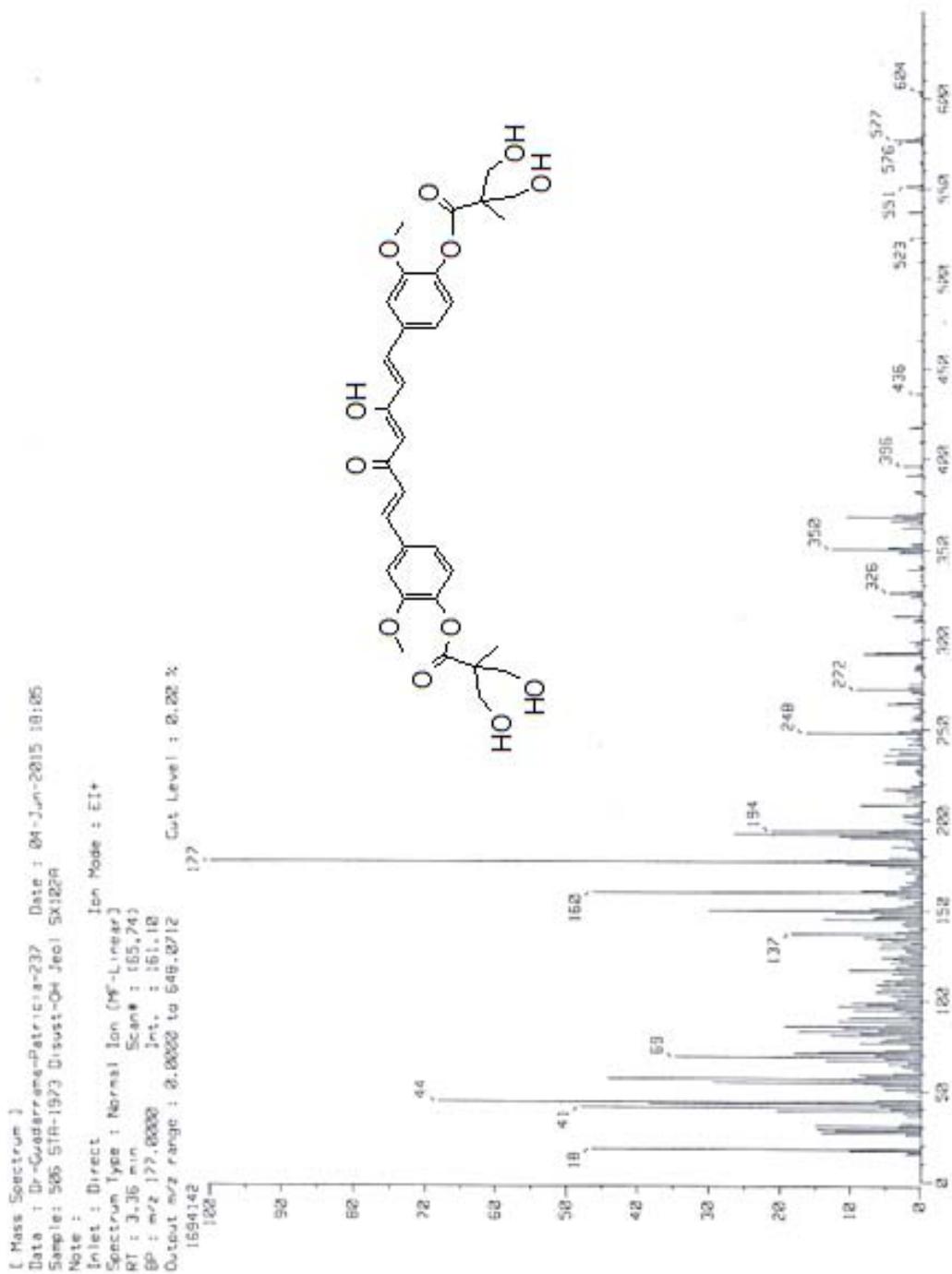
Espectro de RMN ¹H de CurcDiSust.-D1G-P en DMSO-*d*₆



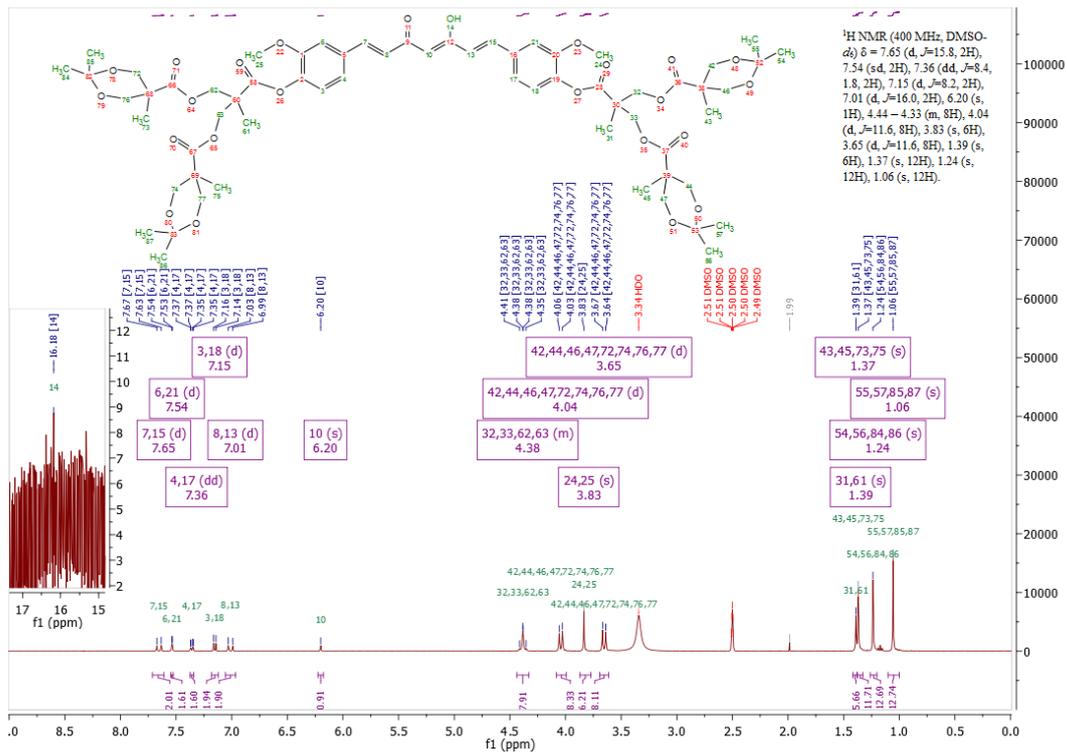
Espectro de RMN ¹³C de CurcDiSust.-D1G-OH en DMSO-*d*₆



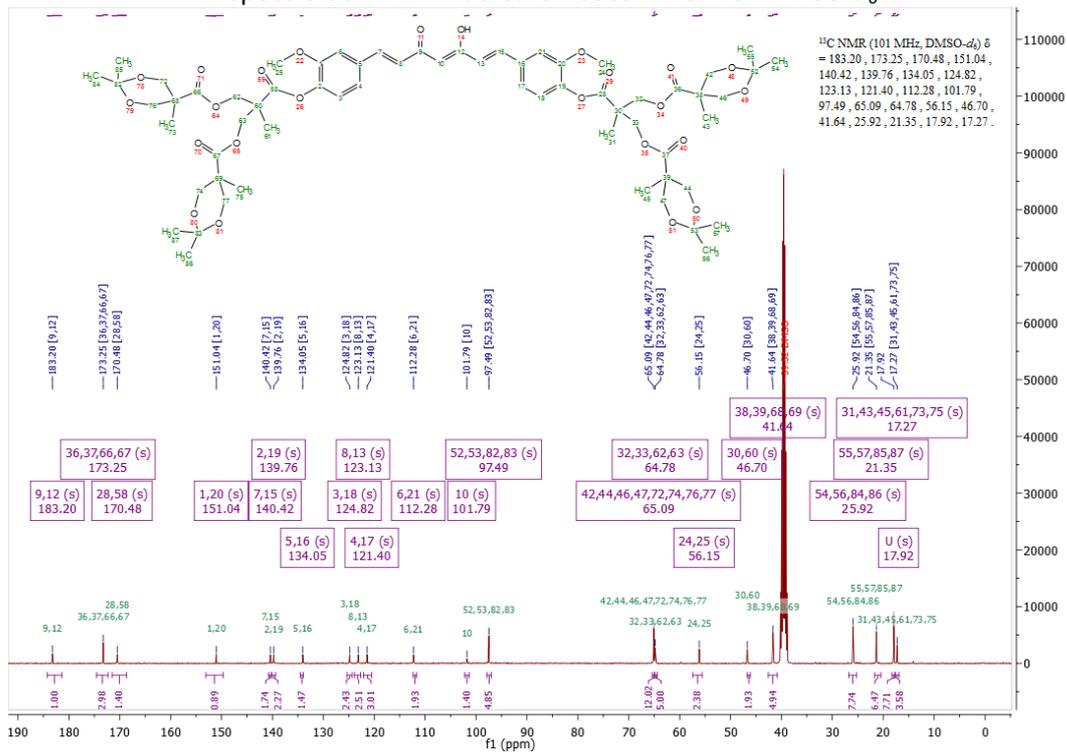
CurcDiSust.-D1G-OH IR			
3333	94	1292	87
2918	93	1249	84
2880	94	1194	85
2844	94	1120	80
1745	90	1090	81
1621	88	1029	77
1591	89	962	83
1505	86	839	86
1456	88	803	87
1413	87	546	84



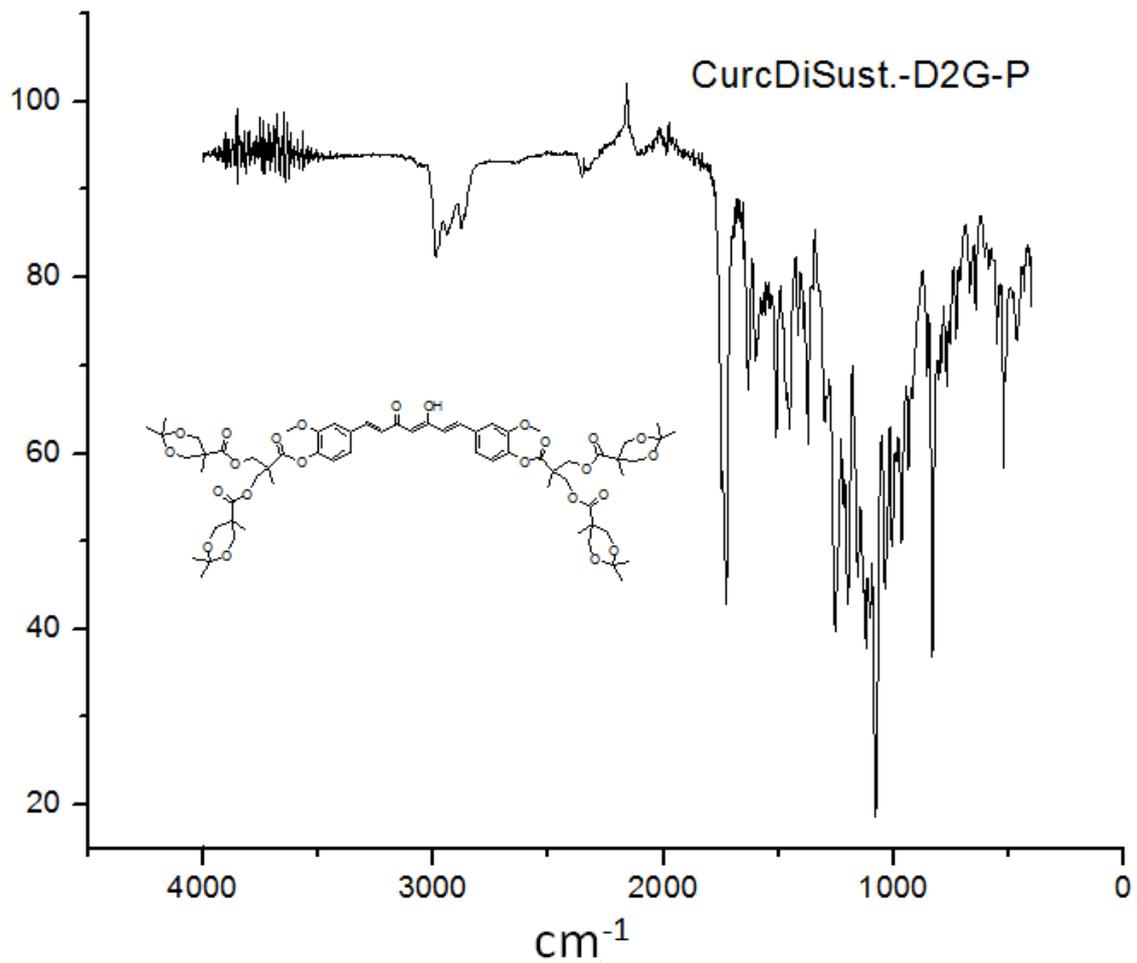
Espectrometría de masas de CurcDiSust.-D1G-OH por EI+



Espectro de RMN ¹H de CurcDiSust.-D2G-P en DMSO-*d*₆



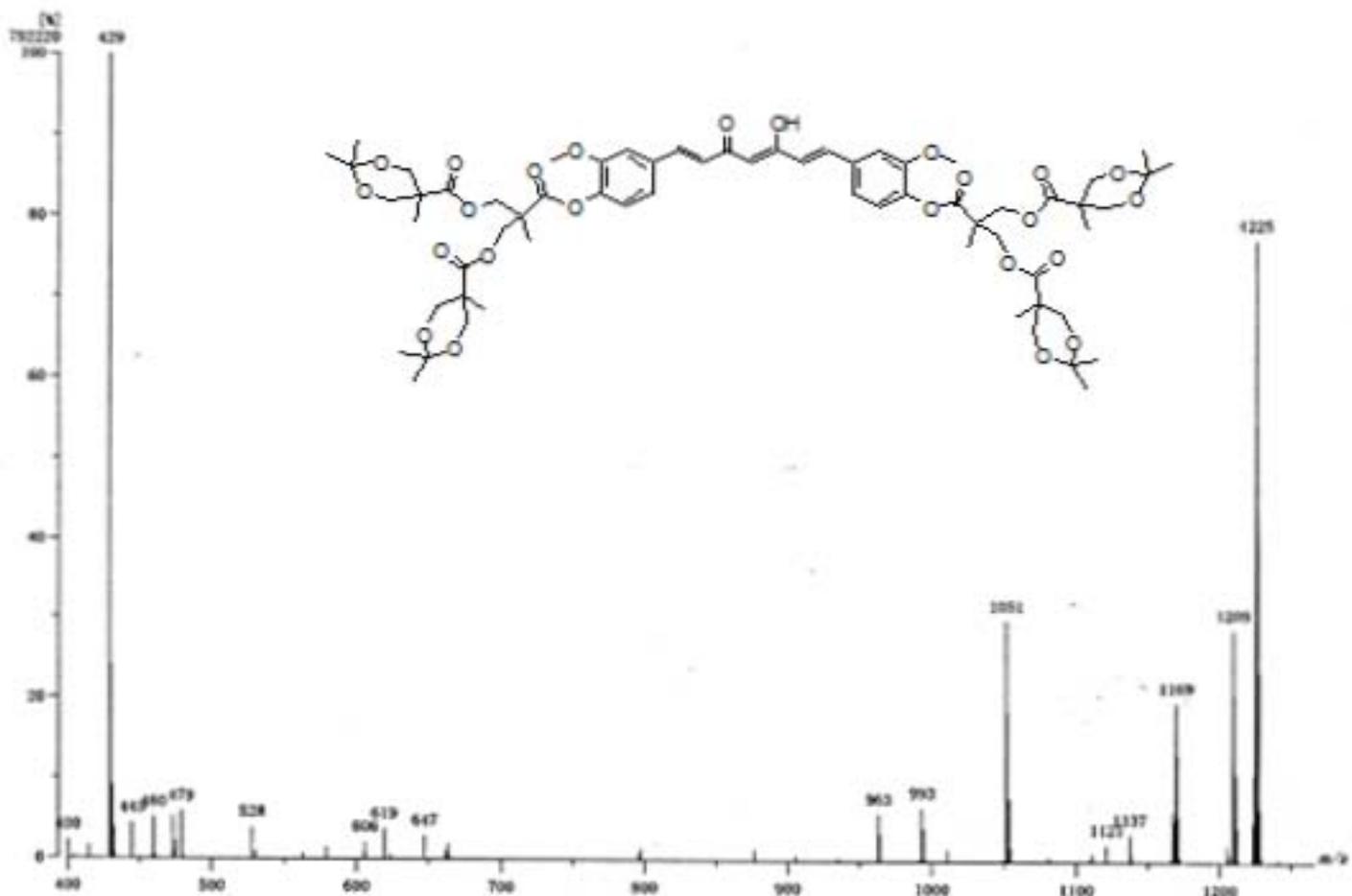
Espectro de RMN ¹³C de CurcDiSust.-D2G-P en DMSO-*d*₆



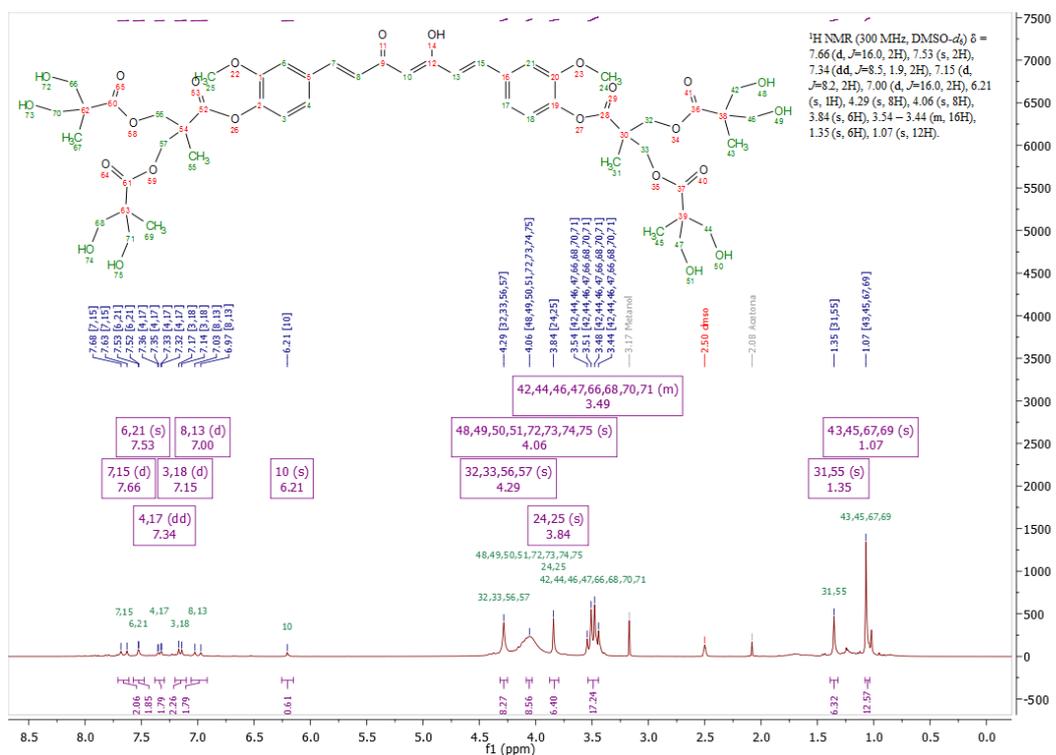
CurcDiSust.-D2G-P IR			
2993	82	1247	39
2945	84	1192	43
2876	85	1130	38
1748	56	1075	18
1728	43	1033	43
1632	67	1006	50
1597	70	958	50
1515	62	930	58
1460	62	820	37
1377	62	525	58

Nota: la señal 2368 corresponde a CO₂

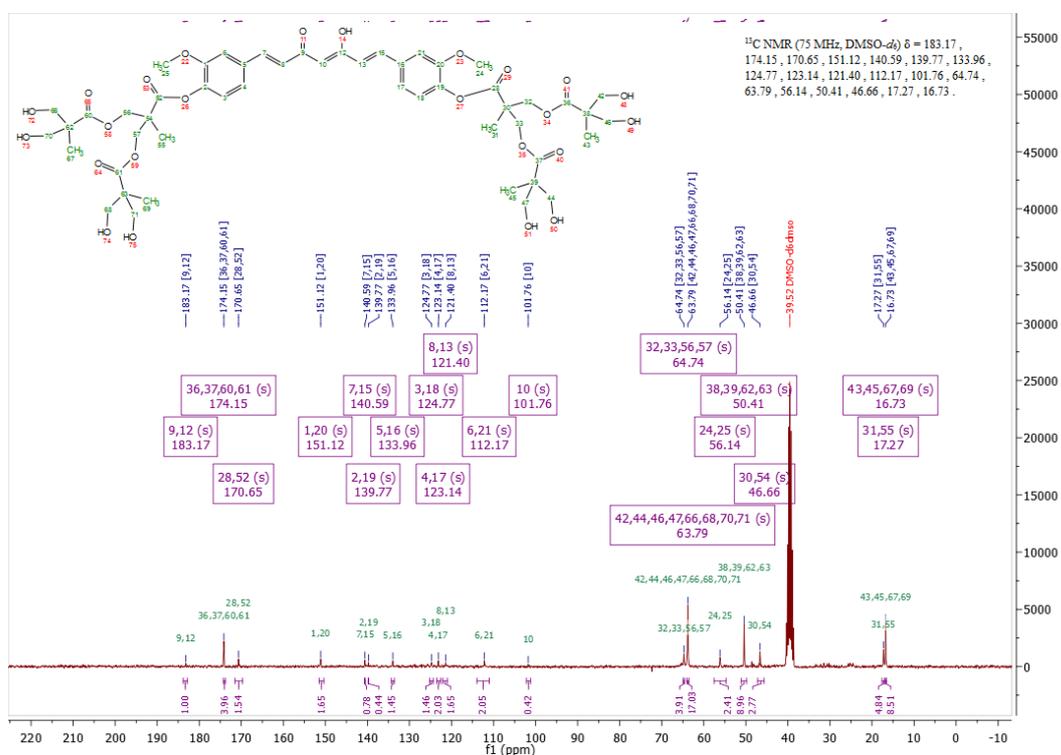
[Mass Spectrum]
 Date: 20 Aug 2013 16:37
 Instrument: MStation
 Sample: 608 574-2022 Dandelion
 Note: -
 Sol: DMSO Ion Mode: FAB+
 Spectrum Type: Normal Ion (MS+Linear)
 RT: 0.19 min Scan: (20) Temp: 3276.7 deg C
 SF: m/z 429 In: 71.74 (752229)
 Output m/z range: 400 to 1200 Cut Level: 0.05%



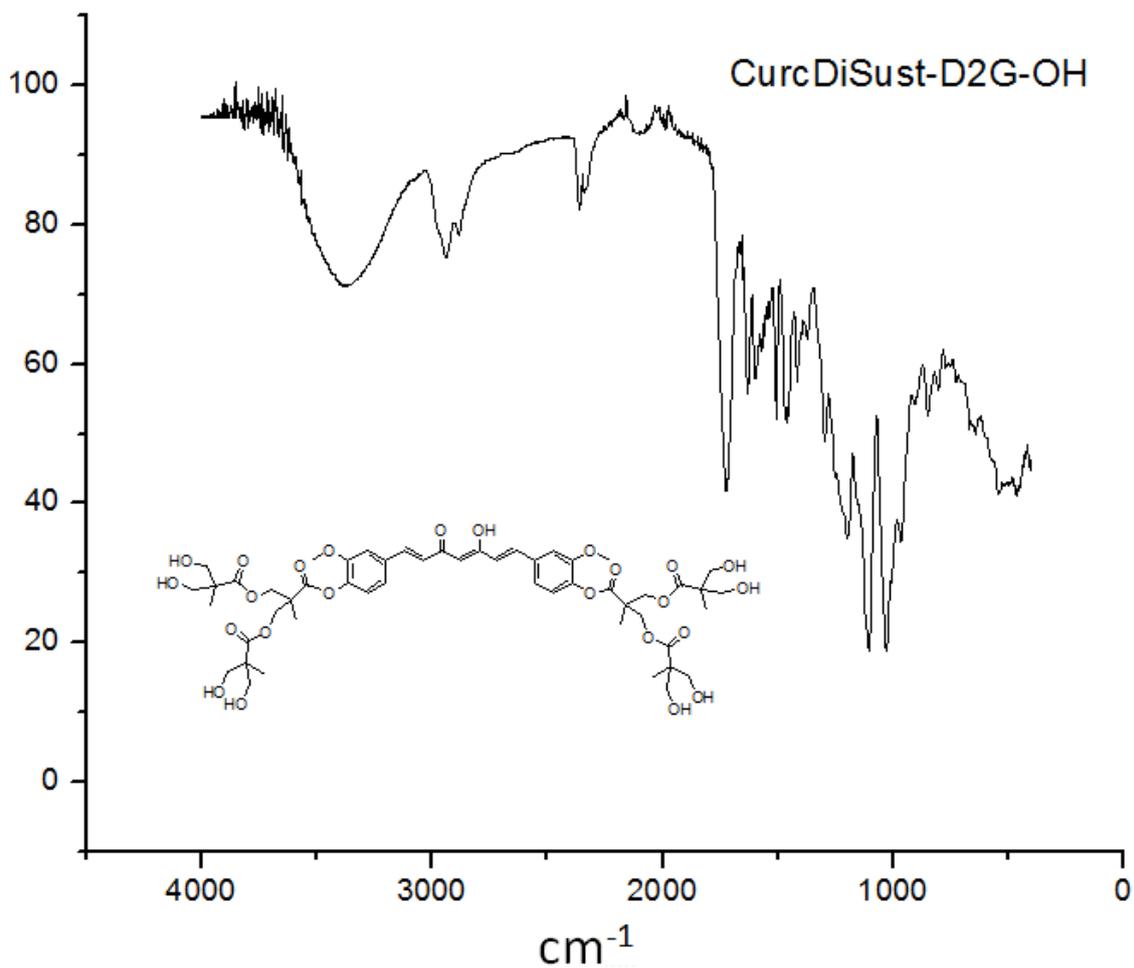
Espectrometría de masas de **Curcumin**-**DEG-P** por **FAB+**



Espectro de RMN ¹H de CurcDiSust.-D2G-OH en DMSO-*d*₆



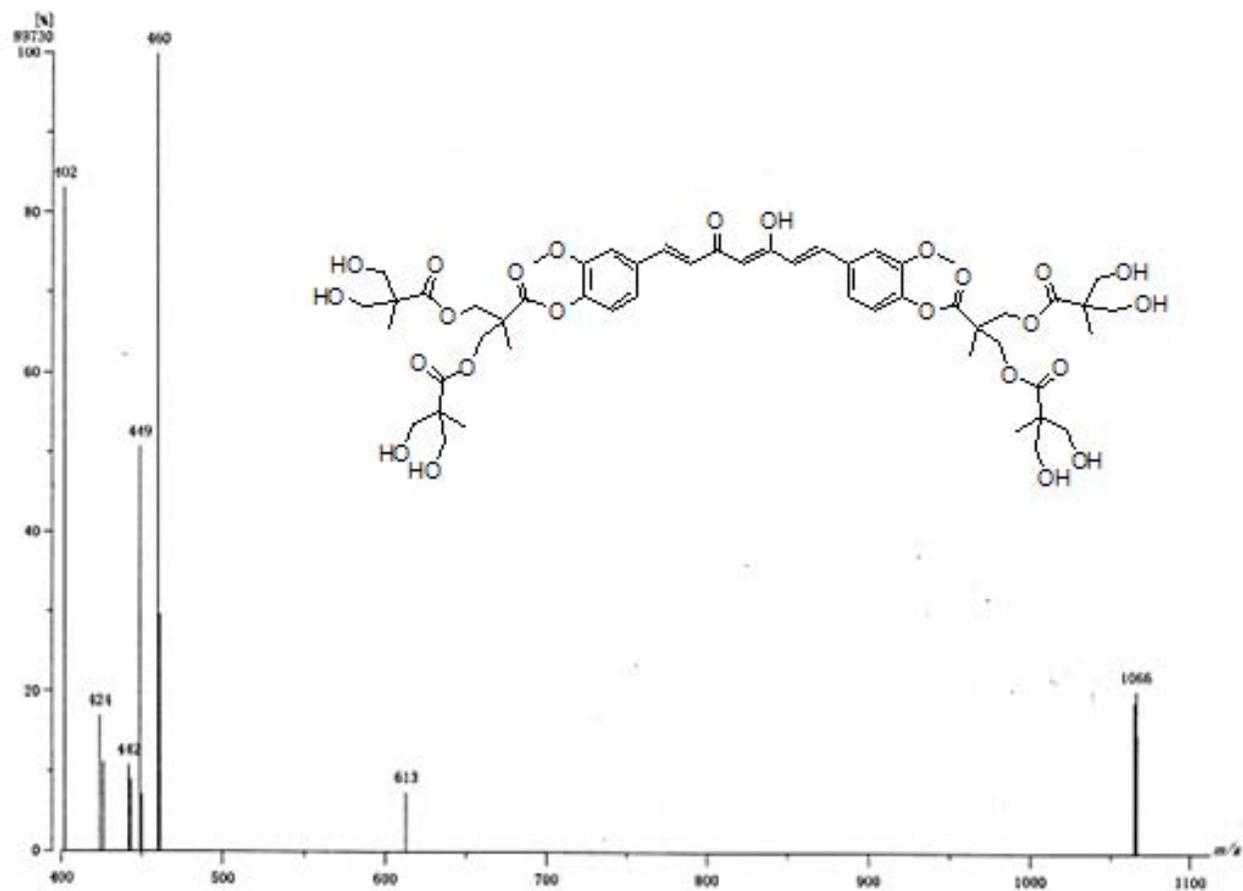
Espectro de RMN ¹³C de CurcDiSust.-D2G-OH en DMSO-*d*₆



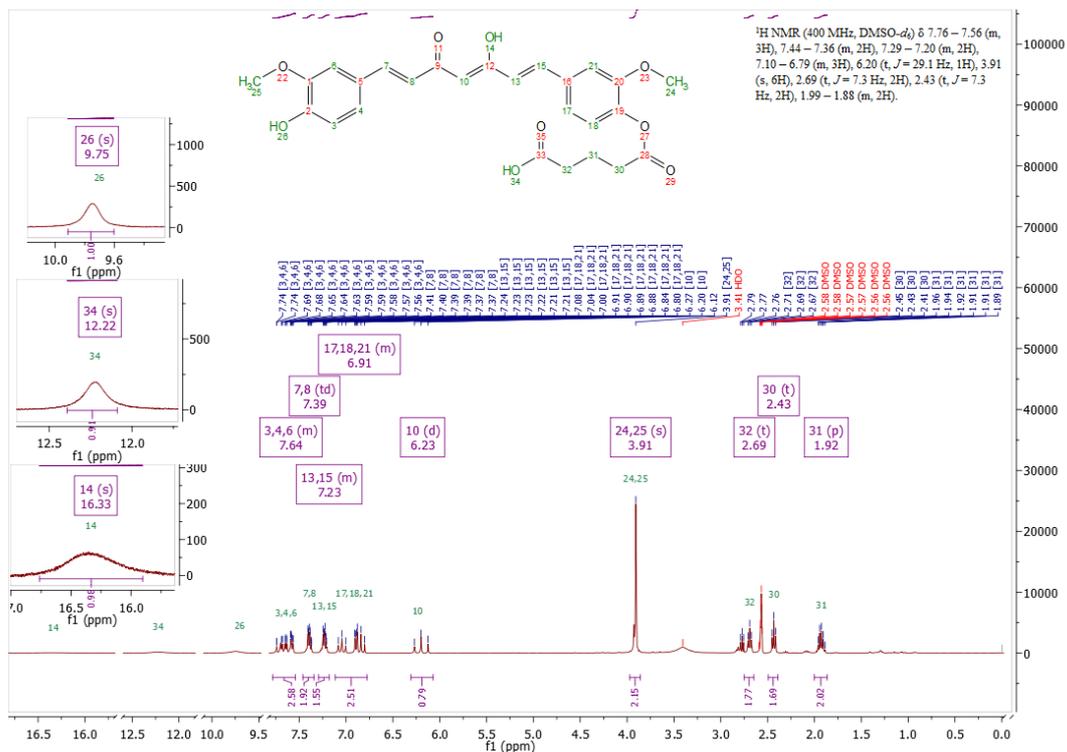
CurcDiSust.-D2G-OH IR			
3378	70	1370	64
2972	78	1295	49
2945	75	1198	34
2885	79	1102	18
1721	41	1020	18
1645	56	965	34
1590	58	848	53
1501	53	807	57
1467	51	648	50
1412	57	538	43

Nota: la señal 2368 corresponde a CO₂

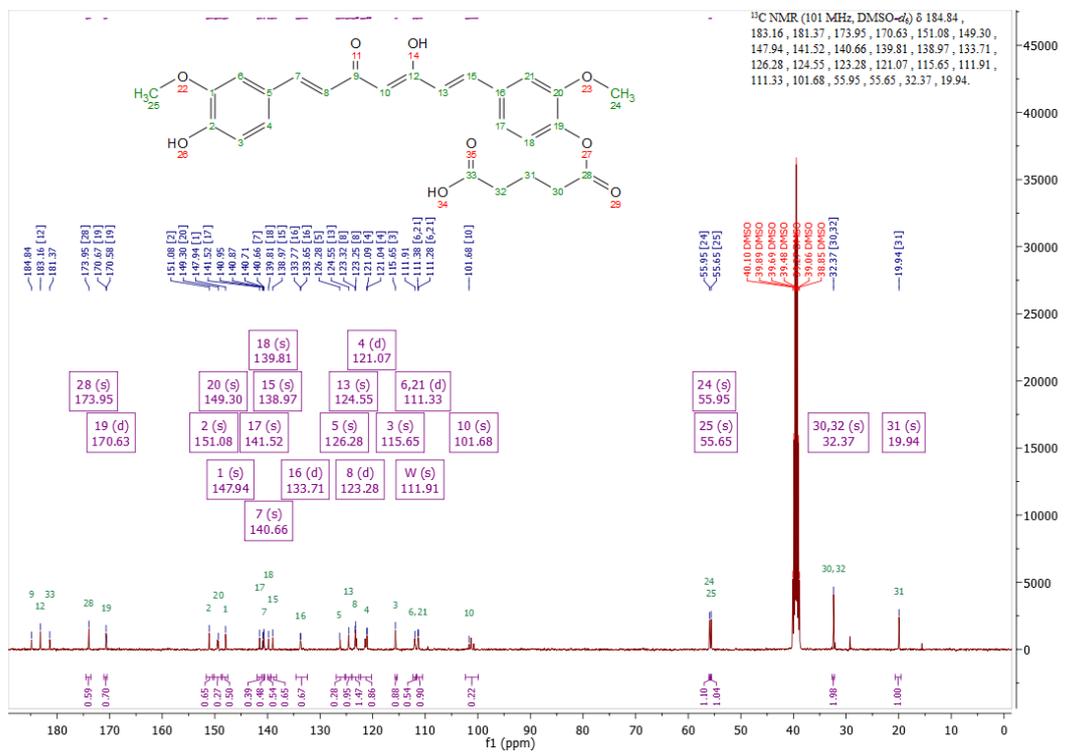
[Mass Spectrum]
Data : Dr Patricia Guadalupe062 Date : 20-Aug-2015 12:48
Instrument : MS1station
Sample : 607 STA-2021 DandriCurc-OH
Note : -
Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
Spectrum Type : Normal Ion [M⁺-Linear]
RT : 0.28 min Scan# : (4.12) Temp : 3278.7 deg.C
BP : m/z 480 Sc. : 6.58 (35750)
Output m/z range : 400 to 1112 Cut Level : 0.00 %



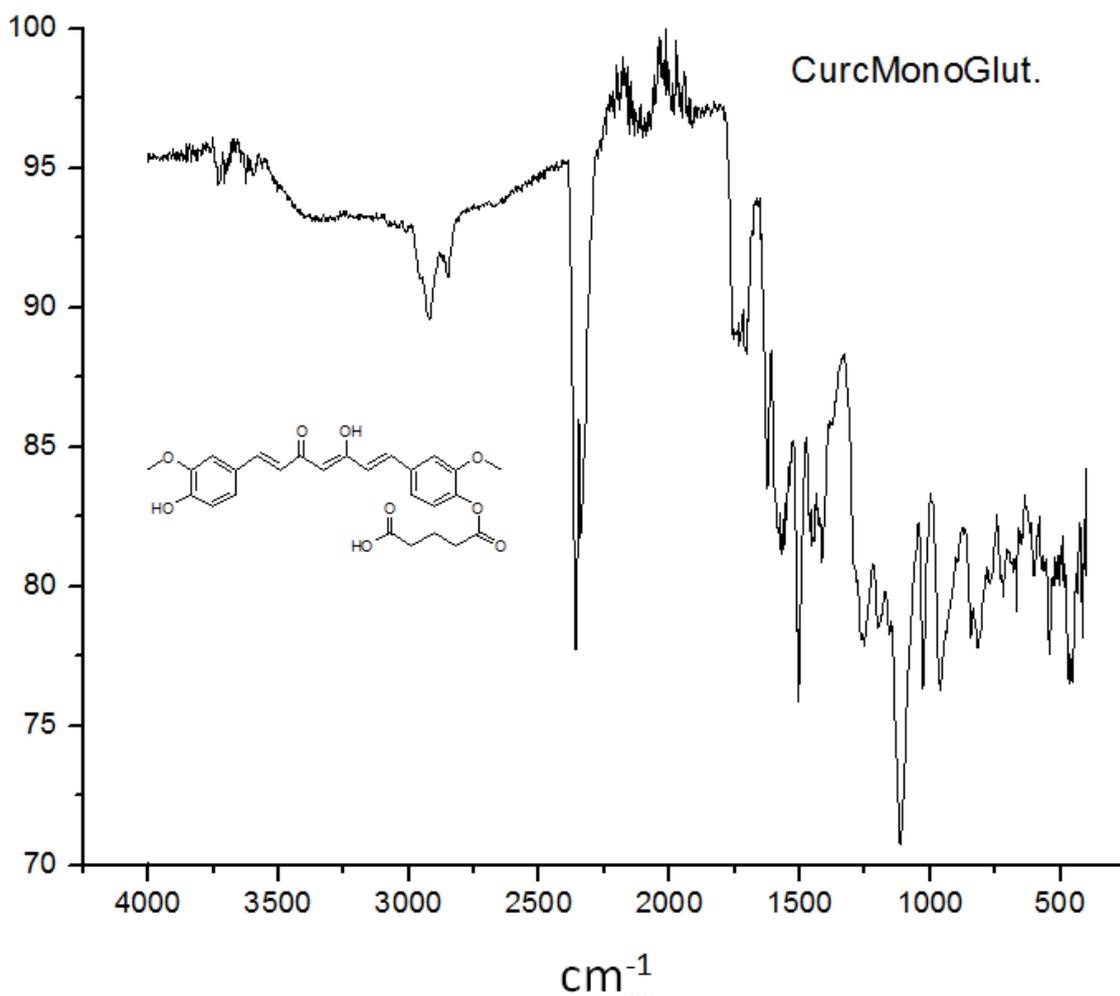
Espectrometría de masas de CurcidiSust.-D2G-OH por FAB+



Espectro de RMN ¹H de CurcMonoGlut. en DMSO-*d*₆



Espectro de RMN ¹³C de CurcMonoGlut. en DMSO-*d*₆

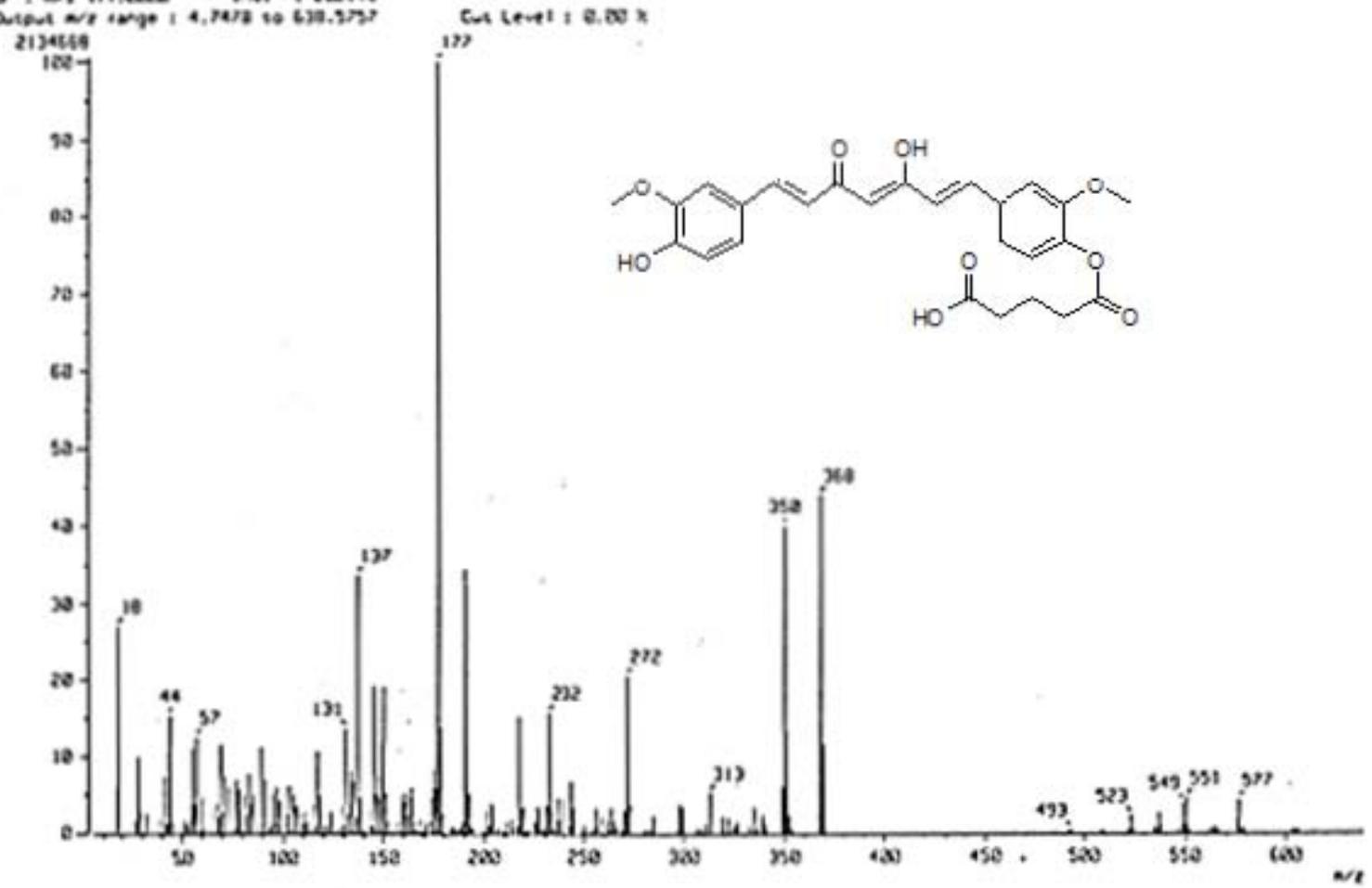


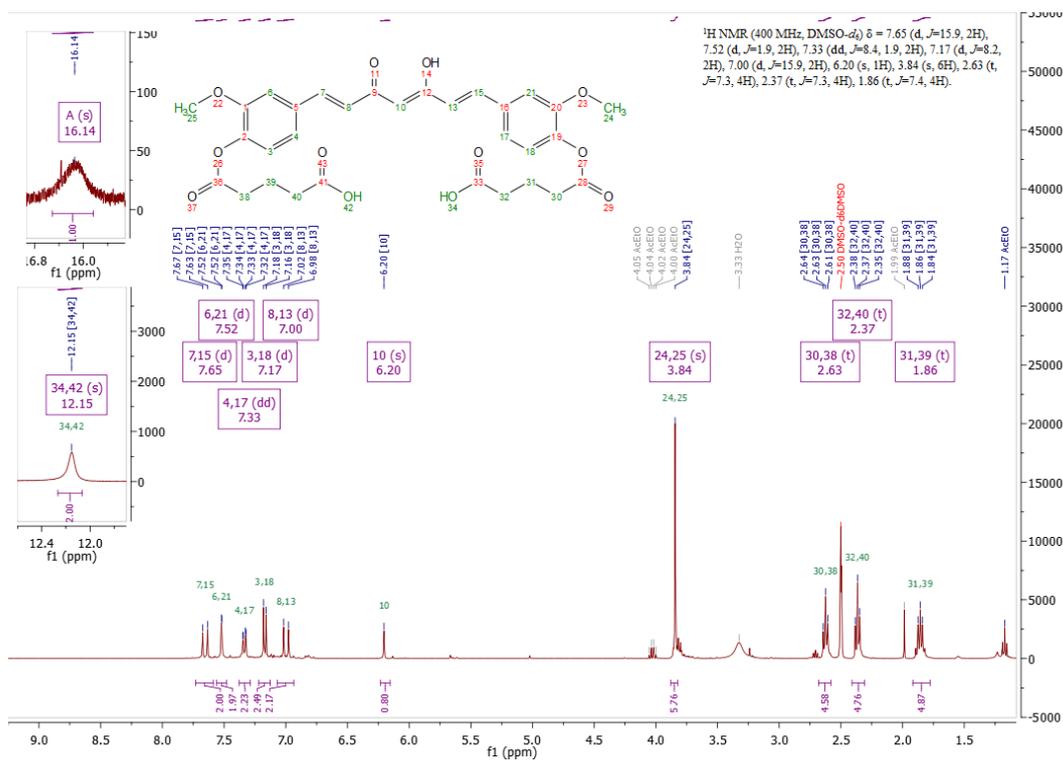
CurcMonoGlut. IR			
3364	93	1185	78
2965	90	1111	70
2915	89	1021	76
2836	91	962	76
1706	88	851	78
1624	83	821	77
1506	81	717	80
1507	75	672	79
1413	81	606	80
1255	77	538	77

Nota: la señal 2368 corresponde a CO₂

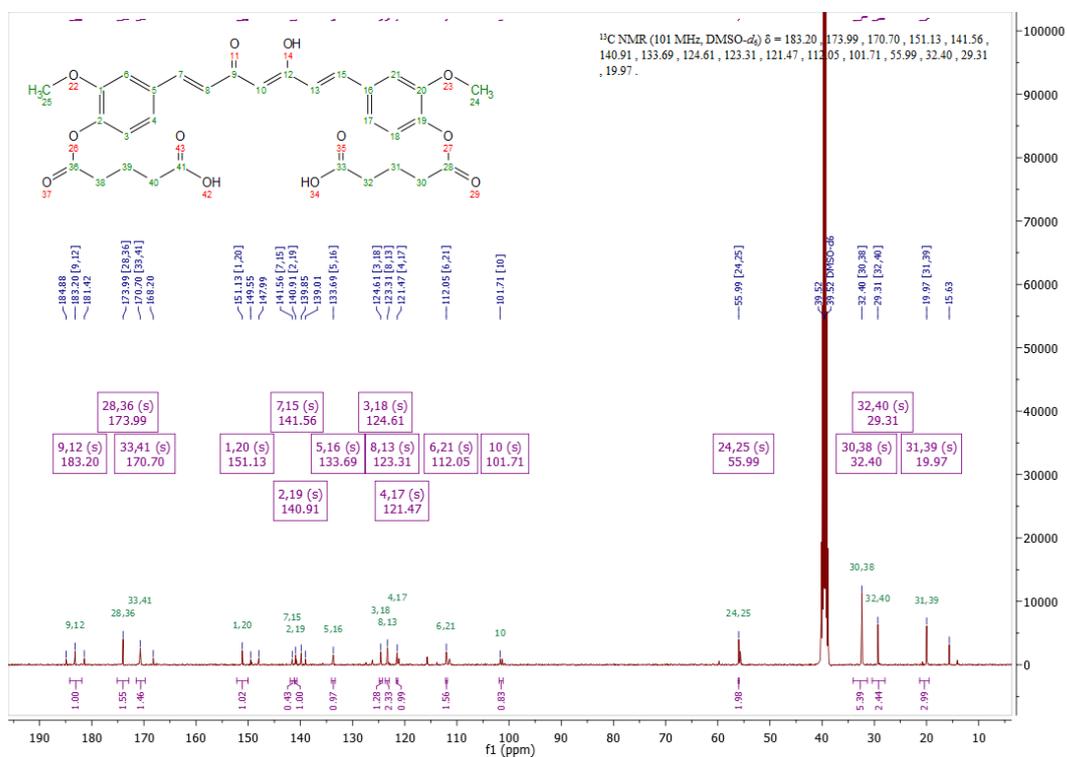
[Mass Spectrum]
 Data : Dr-Gustarrana-Patricia-241 Date : 04-Jun-2015 19:02
 Sample: S10 S1A-1977 Gluc Zeol SX102R
 Note :
 Inlet : Direct Ion Mode : E1+
 Spectrum Type : Normal Ion (MF-Linear)
 RT : 1.58 min Scan : 121,263
 BP : m/z 177,0000 Int. : 202,41
 Output m/z range : 4,7478 to 639,5757
 Cut Level : 0.00 %

Espectrometría de masas de CurcMonoglut. por EI+

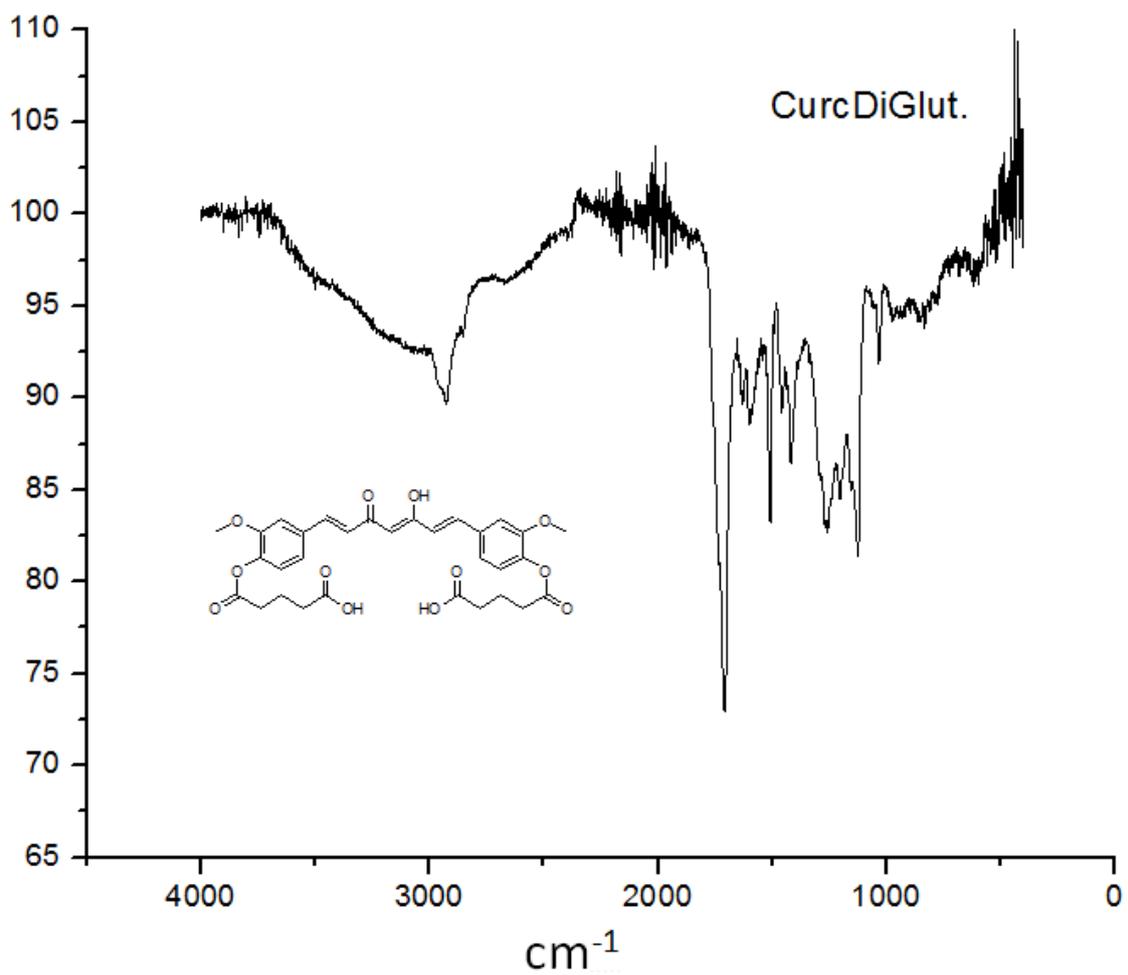




Espectro de RMN ¹H de CurcDiGlut. en DMSO-*d*₆



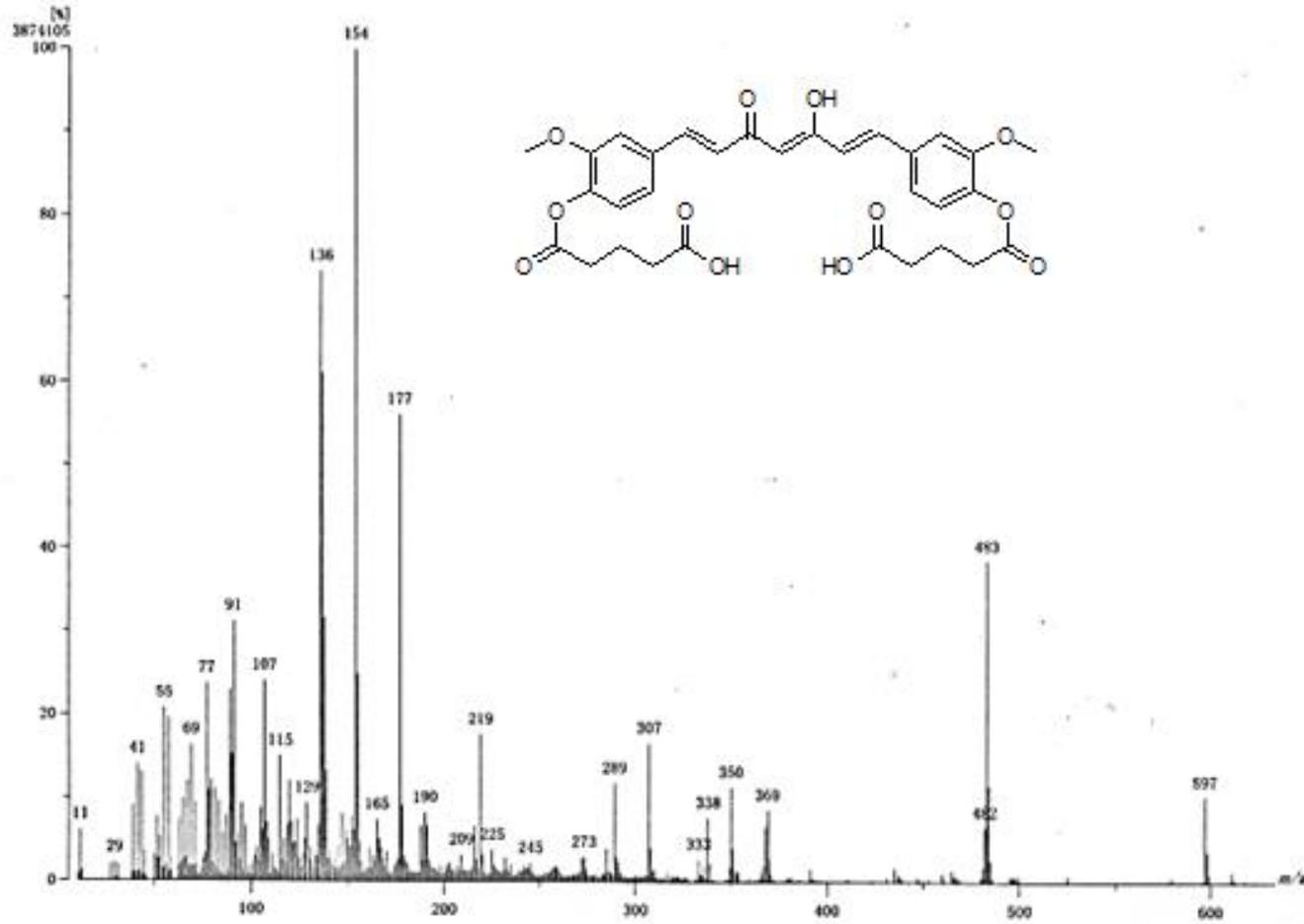
Espectro de RMN ¹³C de CurcDiGlut. en DMSO-*d*₆



CurcDiGlut. IR			
3450	96	1411	86
3180	93	1263	82
2918	89	1210	84
2840	93	1123	81
2665	96	1027	92
1716	73	966	94
1638	89	853	93
1594	89	591	96
1507	83		
1446	89		

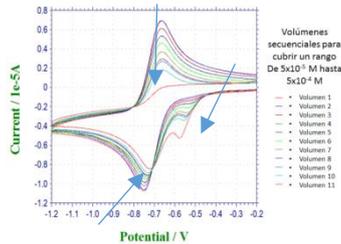
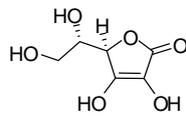
[Mass Spectrum]
Data: Dr Patricia Guadalupe090 Date: 20-Aug-2015 13:38
Instrument: MSStation
Sample: 806 STA-2020 DiGlut
Note: -
Inlet: Direct Ion Mode: FAB+
Spectrum Type: Normal Ion (MF-Linear)
RT: 0.28 min Scan: (3.24) Time: 3278.7 deg.C
BP: m/z 154 In: 388.48 (3874105)
Output m/z range: 10 to 634 Cut Level: 0.00 %

Espectrometría de masas de CurcidiGlut. por EI+



10. Anexo de voltamperometría

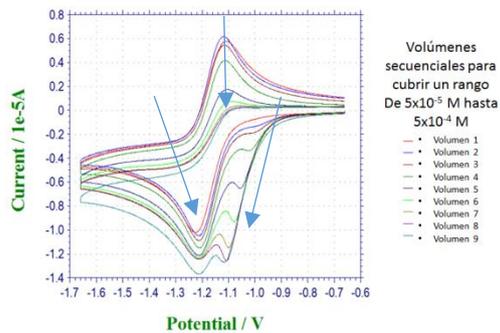
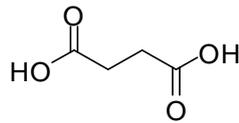
Ácido ascórbico



Voltamperograma 1
Ácido ascórbico

Las corrientes de pico catódicas y anódicas disminuyen a medida que se incrementa la concentración de Ácido ascórbico en la disolución, y el potencial de pico catódico se desplaza hacia valores de potencial más altos, mientras que aparece un pre pico catódico, que crece con la concentración de Ácido ascórbico.

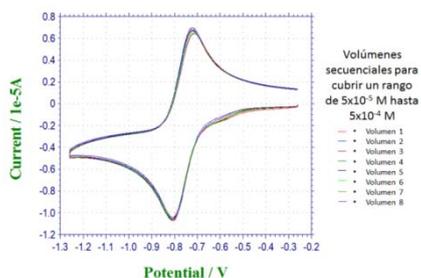
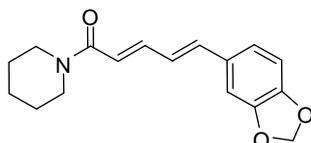
ácido succínico



Voltamperograma 2
ácido succínico

Las corrientes de pico catódicas y anódicas aumentan y disminuyen respectivamente, a medida que se incrementa la concentración de ácido succínico en la disolución, y el potencial de pico catódico se desplaza hacia valores de potencial más altos, a la vez que se observa claramente la aparición de un pre pico catódico debido a la reducción de oxígeno para formar un aducto superóxido-ácido succínico.

piperina

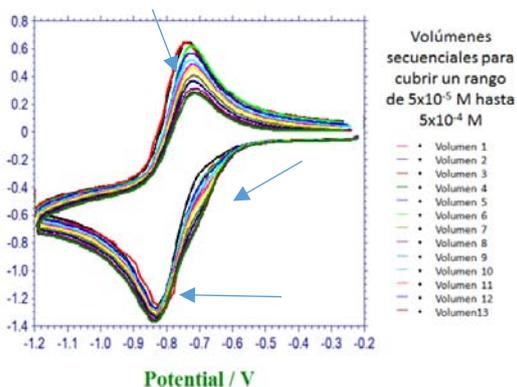
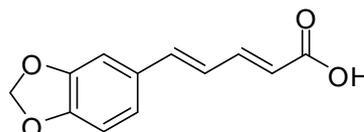


Voltamperograma 3

piperina

Para efectos prácticos no hay variación en los voltamperogramas con el aumento de la concentración de piperina

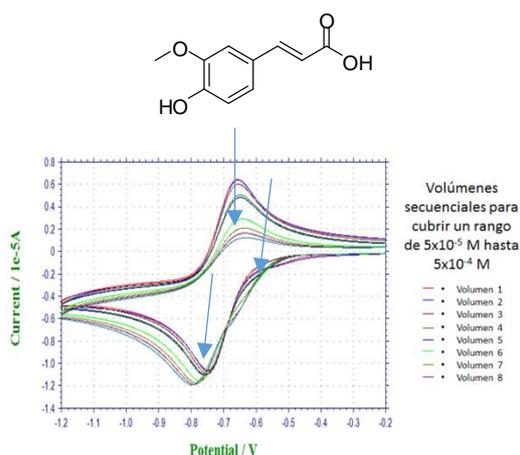
ácido pipérico



Voltamperograma 4
ácido pipérico

Las corrientes de pico anódicas disminuyen, conforme se incrementa la concentración de ácido pipérico en la disolución, y el potencial de pico catódico se desplaza ligeramente hacia valores de potencial más bajos, a la vez que se observa un hombro cuya intensidad de corriente crece al aumentar la concentración de ácido pipérico. La corriente de pico catódica prácticamente no cambia con el incremento de la concentración de ácido pipérico.

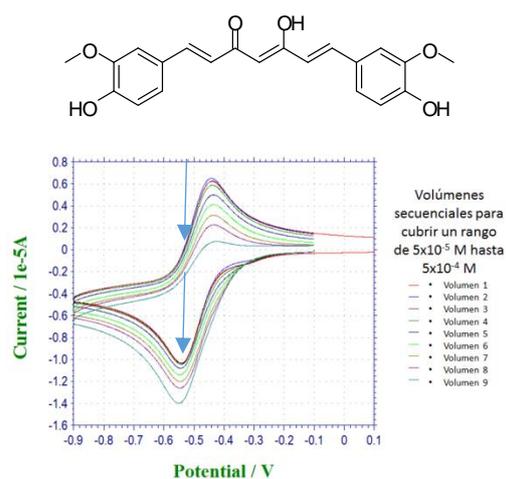
ácido ferúlico



Voltamperograma 5.
Ácido ferúlico.

El potencial de pico catódico cambia hacia valores de potencial un poco más bajos, y como ocurre para el ácido succínico y el derivado CurcDiGlut., se puede ver el incremento en la corriente de un hombro conforme aumenta la cantidad del ácido ferúlico en el medio.

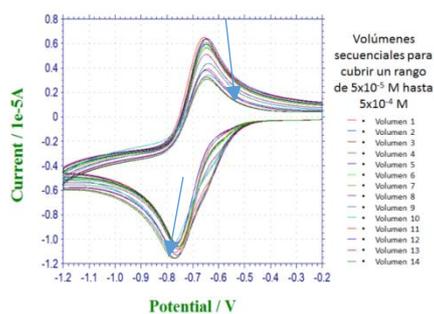
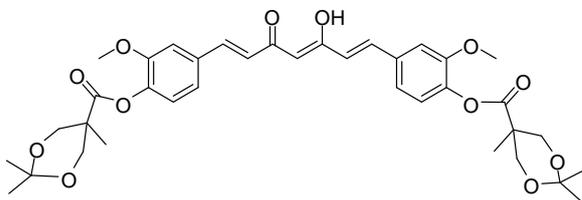
curcumina



Voltamperograma 6.
curcumina

Las corrientes de pico catódicas aumentan y anódicas disminuyen, a medida que se incrementa la concentración de curcumina en la disolución. Se observa ligeramente el ensanchamiento del pico catódico. Lo que implica un mecanismo de transferencia de protón.

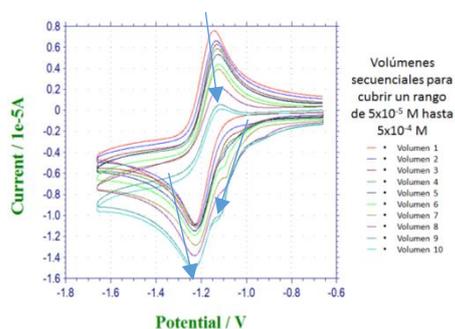
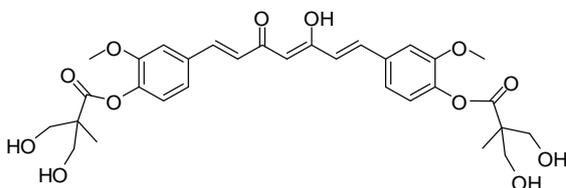
CurcDiSust.-D1G-P



Voltamperograma 9.
CurcDiSust.-D1G-P

La corriente de pico catódica aumenta un poco (menos que lo que se observa en el caso del derivado CurcMonoSust.-D1G-P) mientras que la corriente de pico anódica disminuye con el aumento de la concentración de CurcDiSust.-D1G-P (también ligeramente menos que en el caso del CurcMonoSust.-D1G-P). Se puede ver la aparición de un pequeño hombro previo al pico catódico.

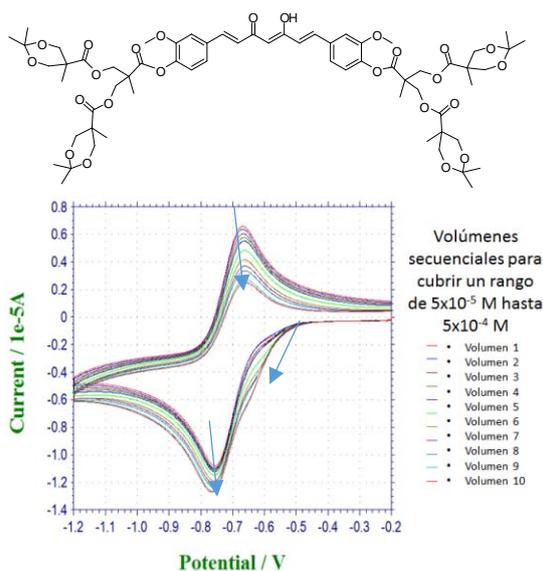
CurcDiSust.-D1G-OH



Voltamperograma 10.
CurcDiSust.-D1G-OH

Las corrientes de pico catódicas y anódicas aumentan y disminuyen, respectivamente, a medida que se incrementa la concentración de CurcDiSust.-D1G-OH en la disolución. El potencial de pico catódico cambia hacia valores de potencial un poco más bajos, y como ocurre para el ácido succínico y el derivado CurcDiGlut., se puede ver el incremento en la corriente de un prepico conforme aumenta la cantidad del derivado CurcDiSust.-D1G-OH en la disolución.

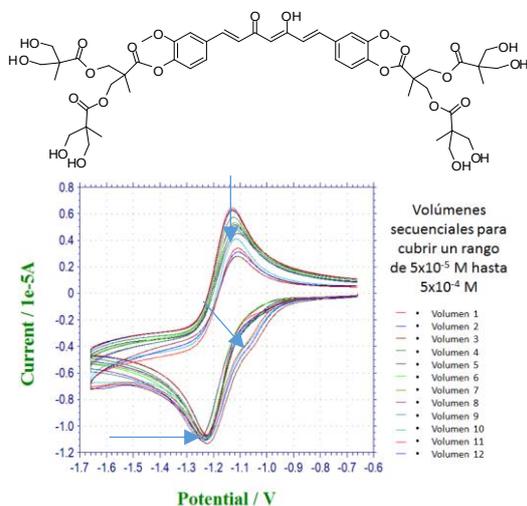
CurcDiSust.-D2G-P



Voltamperograma 11.
CurcDiSust.-D2G-P

El comportamiento de los voltamperogramas con el aumento de la concentración de CurcDiSust.-D2G-P es muy similar al observado en el caso del derivado CurcMonoSust.-D1G-P.

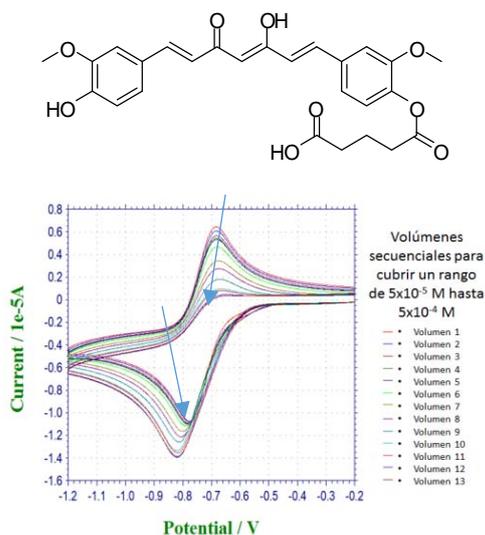
CurcDiSust.-D2G-OH



Voltamperograma 12.
CurcDiSust.-D2G-P

Las corrientes de pico anódicas disminuyen a medida que se incrementa la concentración de CurcDiSust.-D2G-OH en la disolución, mientras que la corriente de pico catódica se mantiene constante. Los potenciales de pico anódico varían ligeramente y se observa la aparición de un hombro anterior al pico catódico.

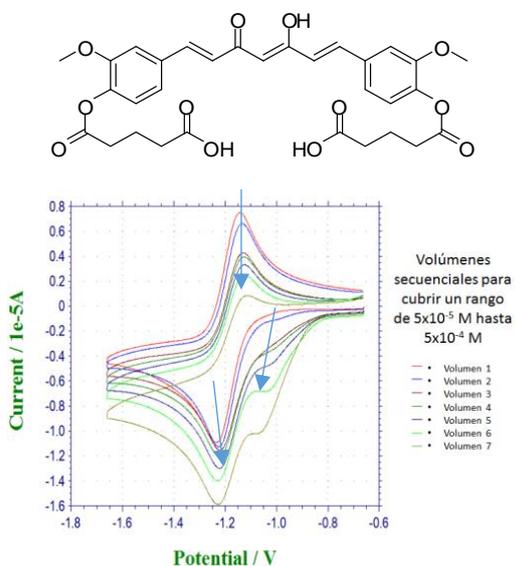
CurcMonoGlut.



Voltamperograma 13.
CurcMonoGlut.

El comportamiento de los voltamperogramas con el aumento de la concentración de cur-glut es similar al observado en los casos (CurcDiSust.-D2G-P y CurcMonoSust.-D1G-P), aunque para CurcMonoGlut el desplazamiento del potencial de pico catódico es más notorio, y el hombro previo al pico catódico es menos importante.

CurcDiGlut.



Voltamperograma 14.
CurcDiGlut.

Las corrientes de pico catódicas y anódicas aumentan y disminuyen, correspondientemente, a medida que se incrementa la concentración de CurcDiGlut. en la disolución, y el potencial de pico catódico se desplaza hacia valores de potencial más altos, a la vez que nuevamente se encuentra, como en el caso del ácido succínico, la aparición de un prepico catódico debido a la reducción de oxígeno a un aducto superóxido-CurcDiGluT

11. Datos numéricos normalizados de los compuestos más importantes para el análisis de resultados en voltamperometría cíclica.

Los siguientes datos fueron utilizados en: gráfica 1 , gráfica 2 y gráfica 3. Pertenecen a los compuestos curcumina, CurcDiSust.-D2G-OH y CurcMonoGlut. respectivamente.

$i_{p\text{ Cat}}$: intensidad de pico catódica con analito

$i_{p\text{ An}}$: intensidad de pico anódica con analito

i_{p0} : intensidad de pico sin analito

Datos de $i_p(\text{O}_2/\text{O}_2^{\bullet-})$ vs. Concentración de curcumina		
Concentración de curcumina (M)	$i_{p\text{ Cat.}}/i_{p0}$ curcumina	$i_{p\text{ An.}}/i_{p0}$ curcumina
1.04396E-6	0.99461	0.96225
3.12562E-6	0.97677	0.94553
1.03465E-5	0.98071	0.92903
3.04369E-5	0.99803	0.90146
4.97619E-5	1.00788	0.8719
6.83645E-5	1.02354	0.84367
8.62844E-5	1.03806	0.81477
1.06822E-4	1.0671	0.79163
1.5784E-4	1.10443	0.73959
2.58491E-4	1.17183	0.65822
3.08138E-4	1.20087	0.61304
3.57341E-4	1.23094	0.58082
4.06105E-4	1.25998	0.54584
5.02341E-4	1.32013	0.48826
7.8111E-4	1.43939	0.41519

Datos de $i_p(\text{O}_2/\text{O}_2^{\bullet-})$ vs. Concentración de CurcDiSust.-D2G-OH		
Concentración CurcDiSust.-D2G-OH (M)	$i_{p\text{ Cat.}}/i_{p0}$ CurcDiSust.-D2G-OH	$i_{p\text{ An.}}/i_{p0}$ CurcDiSust.-D2G-OH
2.52874E-6	0.91548	0.86548
1.51346E-5	0.93799	0.86814
2.01594E-5	0.94089	0.85773
6.49358E-5	0.96682	0.79384
1.37821E-4	0.99647	0.70317
1.85241E-4	1.00187	0.65179
2.31756E-4	1.00954	0.6064
4.09265E-4	1.02157	0.47453

Datos de $i_p(O_2/O_2^{\cdot-})$ vs. Concentración de CurcMonoGlut.		
Concentración de CurcMonoGlut (M)	$i_{p \text{ Cat.}}/i_{p 0}$ CurcMonoGlut	$i_{p \text{ An.}}/i_{p 0}$ CurcMonoGlut
4.97E-6	1	1
1.98E-5	1.02	0.96
2.47E-5	1.03	0.94
3.95E-5	1.02	0.93
5.9E-5	1.04	0.89
6.87E-5	1.04	0.87
7.83E-5	1.05	0.85
1.35E-4	1.12	0.67
2.46E-4	1.21	0.47
2.99E-4	1.26	0.46
3.17E-4	1.27	0.46
3.34E-4	1.27	0.45
3.51E-4	1.28	0.44
3.68E-4	1.3	0.43
3.85E-4	1.29	0.44
4.02E-4	1.29	0.42
4.19E-4	1.29	0.42

Datos utilizados para determinar el porcentaje de captura de radicales libres:

Los siguientes datos fueron utilizados para generar la gráfica 6, correspondiente al IC₅₀ de los compuestos ácido ascórbico, CurcMonoGlut., CurcDiSust-D2G-OH y Curcumina. Fueron obtenidos al utilizar la ecuación 1 en la página 76.

Concentración de ácido ascórbico (M)	Porcentaje de captura de radicales para ácido ascórbico	Concentración de CurcMonoGlut. (M)	Porcentaje de captura de radicales para CurcMonoGlut.	Concentración de CurcDiSust-D2G-OH (M)	Porcentaje de captura de radicales para CurcDiSust-D2G-OH	Concentración de Curcumina (M)	Porcentaje de captura de radicales para Curcumina
1.48E-05	0	4.97E-06	0	2.53E-06	13.45217	1.04E-06	3.77546
2.95E-05	18.59533	9.93E-06	1	5.05E-06	11.92427	2.09E-06	5.04872
4.41E-05	22.65304	1.49E-05	2	1.01E-05	12.20106	3.13E-06	5.4473
5.87E-05	26.48031	1.98E-05	4	1.51E-05	13.18645	1.03E-05	7.09699
7.33E-05	33.4736	2.47E-05	6	2.02E-05	14.22719	2.05E-05	8.37024
8.77E-05	35.07665	2.97E-05	7	3.02E-05	16.07617	3.04E-05	9.85385
1.02E-04	36.21882	3.46E-05	6	4.02E-05	16.96191	4.98E-05	12.81001
1.31E-04	44.0537	4.93E-05	8	8.95E-05	23.61603	8.63E-05	18.52303
1.45E-04	48.91293	5.90E-05	11	1.38E-04	29.68335	9.66E-05	21.55669
1.59E-04	51.40767	6.87E-05	13	1.85E-04	34.82064	1.07E-04	20.83702
1.73E-04	54.13285	7.83E-05	15	2.32E-04	39.36005	1.58E-04	26.04074
1.88E-04	56.7879	8.80E-05	18	2.77E-04	43.27945	2.08E-04	30.46944
2.16E-04	62.22823	9.75E-05	22	3.22E-04	46.70062	2.58E-04	34.17848
4.06E-04	81.71526	1.54E-04	35	4.93E-04	56.70948	4.06E-04	45.4163
		1.73E-04	37	5.74E-04	59.69885	5.02E-04	51.17361
		2.10E-04	44	6.52E-04	62.13463	5.97E-04	55.49159
		2.28E-04	47			7.81E-04	58.48096
		2.82E-04	52				
		3.17E-04	54				
		3.34E-04	55				
		3.51E-04	56				
		3.68E-04	57				
		4.19E-04	58				

12. Declaración de uso de imágenes

Figura 1 modificada de:

<https://blogs.brandeis.edu/flyonthewall/breaking-research-fruit-flies-provide-insights-into-metabolism-and-how-we-age/>

Figura 3 modificada de:

Bard, A. J. & Faulkner, L. R., **2001**. ELECTROCHEMICAL METHODS FUNDAMENTALS AND APPLICATIONS, (*Wiley 1981*), pp. 227

Figuras 5, 6 y 7 modificadas de:

Ahmed S. & Shakeel F. Czech J. Food Sci. 2012, 30(2), pp. 153-163.

Figura 8 modificada de:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=curcumin>

Figura 10 modificada de:

Méndez-Robles M.D ; Permady H H. ; Jaramillo-Flores M. E. ; Lugo-Cervantes E. C., Cardador-Martínez A. ; Canales-Aguirre A.A. ; López-Dellamary F. ; Cerda-García-Rojas C. M. & Tamariz J. J. Nat. Prod. , 2006, 69 (8), pp. 1140–1144.

Figura 12 modificada de:

Misukami H. ; Kaminaga Y. FEBS Letters 2003, 555, pp. 311-316.

Figura 13 modificado de:

Bhawana ; Basniwal R.K.; Buttar H.S. ; Jain V. K.; Jain N. J. Agric. Food Chem. 2011, 59, pp. 2056–2061

figura 16 modificada de:

Sadekar S. Adv. Drug Delivery Rev. 2012, 64, pp. 571-580. Gillies E. R. & Fréchet J. M. J. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, pp. 14137-14146.

Gráfica 1 modificada de:

Pan K. ; Zhong Q. ; . Baek S. J. J. Agric. Food Chem. 2013, 61, 6036–6043.

Figura 14 modificada de:

Wang B. ; Shen Y.M. ; Zhang Q. ; Li Y. ; . Luo M.; Liu Z. ; Li Y. ; Qian Z. ; Gao X. ; Shi H. International Journal of Nanomedicine 2013, 8, pp. 3521–3531.

Esquema 5 modificada de:

Anand P. ; Kunnumakkara A. B ; Newman R. A. ; Aggarwal B. B. *Molecular Pharm.* 2007, 4(6), pp. 807–818.

Esquema 6 modificado de:

Raja K. *Org. Lett* 2007, 9(26), pp. 5461-5464.

Esquemas 7,8,9 y 10 modificados de:

<http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/steglich-esterification.shtm>

Esquema 1 modificado de:

Apel K. & Heribert H. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004, 55, pp. 373–99.

Esquema 2 obtenido de:

Petersen R. A. ; Kelly M. J. *J. Chem. Educ.* 1983, 60 (4), pp. 290-293.

Esquema 3 modificado de:

Pabon H. J. *J. Rec. Trav. Chim. Pays. Bas.* 1964, 83, pp. 379-386

Esquema 4 modificado de:

Barzegar A. *Food Chem.* 2012, 135, pp. 1369–1376.