

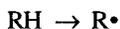
ANTIOXIDANTES DE ORIGEN VEGETAL

Ricardo Chávez R., Alberto Plaza P. y Olga Lock de Ugaz*

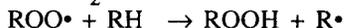
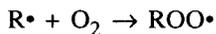
INTRODUCCION

Los antioxidantes son sustancias que retardan el comienzo o disminuyen la velocidad de oxidación de los materiales autooxidables [1]. Los ácidos grasos, presentes en las membranas celulares, son fácilmente oxidados tanto por peroxidación enzimática como autooxidativa debido a las reacciones en cadena de los radicales libres. Estas reacciones de oxidación generalmente constan de las siguientes etapas [2]:

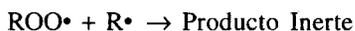
– Iniciación (I):



– Propagación (II):



– Terminación (III):

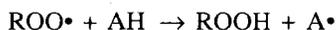


* Pontificia Universidad Católica del Perú, Dpto. de Ciencias, Sección Química.

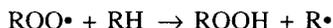
Esta peroxidación lípida tiene muchos efectos destructivos en la estructura de la membrana celular y en la función que cumple, puesto que le origina un desorden y genera varios compuestos altamente citotóxicos como aldehídos insaturados y lípidos hidroperoxidados. Estos compuestos pueden inactivar enzimas, modificar biomoléculas e iniciar la modificación de proteínas y la peroxidación lípida [3].

La iniciación de la peroxidación lípida (I) puede ser inducida por radicales libres ($O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$) y/o por el oxígeno singulete (1O_2) que se producen en sistemas biológicos [2].

Una sustancia retarda las acciones de oxidación cuando inhibe la formación de radicales libres en la etapa de iniciación (I) o cuando interrumpe la propagación (II) de la cadena de radicales libres [1]. La peroxidación lípida puede ser prevenida durante la iniciación por medio de los inhibidores de los oxígenos singulete o los aceptores (“limpiadores”) de radicales libres [2]. Sin embargo, como no se puede eliminar totalmente las trazas de los iniciadores, la mayoría de los estudios han concentrado su atención en la acción de los aceptores de radicales libres. Uno de los estudios más importantes sobre la acción de los antioxidantes postula que los antioxidantes inhiben la reacción en cadena actuando como donadores de hidrógeno o como aceptores de radicales libres, y concluye que el aceptor de radicales libres (AH) reacciona sobre todo con el $ROO\bullet$ y no con los radicales libres $R\bullet$ en una reacción denominada reacción de inhibición:

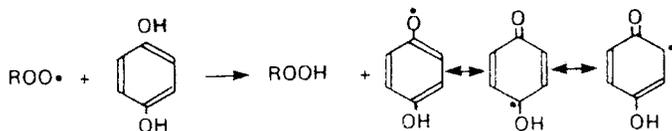


Este estudio además considera que el esqueleto básico del mecanismo puede visualizarse como una competición entre la reacción de inhibición y la reacción de propagación en cadena:

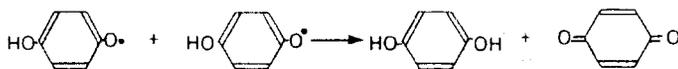


La eficacia de un antioxidante está relacionada con muchos factores, como la energía de activación, constantes de velocidad, potencial de óxido-reducción, solubilidad del antioxidante, etc. En las dos reacciones de competición mencionadas anteriormente, ambas exotérmicas, la energía de activación aumenta al aumentar las energías de disociación de los enlaces A-H y R-H y, por tanto la eficacia del antioxidante (AH) aumenta al disminuir la fuerza del enlace AH. Sin embargo, idealmente, el radical libre antioxidante

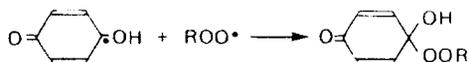
resultante no debe iniciar por sí mismo la formación de nuevos radicales libres o ser sujeto de una rápida oxidación por una reacción en cadena. Por esto es que los antioxidantes fenólicos ocupan una situación privilegiada, pues son excelentes donadores de electrones o de hidrógeno y además sus radicales intermedios son relativamente estables debido a la deslocalización por resonancia y a la falta de posiciones apropiadas para ser atacados por el oxígeno molecular. Por ejemplo, las hidroquinonas reaccionan con los radicales hidropéroxido dando lugar a híbridos resonantes estables de semiquinonas.



Los radicales intermedios de semiquinona pueden experimentar una gran variedad de reacciones dando lugar a productos más estables. Pueden formar un dímero, que al dismutarse produce quinonas que forman de nuevo la molécula del inhibidor original



o reaccionan con otro radical ROO^\bullet [1].



Debemos señalar que el oxígeno no es el único agente destructivo para los tejidos vivos. La luz, que es esencial para las plantas, también causa efectos dañinos pues tiene fotones ultravioleta de longitud de onda corta los cuales causan interacciones destructivas con muchas moléculas celulares, tales como aminoácidos de proteínas esenciales, ácidos nucleicos o lípidos de las membranas celulares [4].

Debido a la peroxidación lípida de la membrana celular y los daños que causa, las células y los organismos vivos han desarrollado varios mecanismos de defensa para protegerse de las especies reactivas oxigenadas. Se ha demostrado en experimentos *in vitro*, que las enzimas y los compuestos secundarios vasculares de las plantas protegen contra el daño oxidativo por

inhibición de la formación de radicales libres y/o por captura de las especies reactivas oxigenadas, incluidos los radicales peróxido [3].

Estos descubrimientos, el incremento de los estados patológicos que han sido asociados con el aumento de producción de radicales libres, y los efectos tóxicos que frecuentemente acompañan al uso de antioxidantes sintéticos, hacen interesante el examinar compuestos naturales con posible actividad antioxidante [5].

Diversas plantas conteniendo compuestos que presentan actividad antioxidante se encuentran reportadas en la literatura desde hace ya varios años. Todas estas plantas presentan la presencia de compuestos fenólicos, alcaloides u otros que por su facilidad de estabilizar o inhibir la propagación de especies radicalarias, o actuar como filtros de las radiaciones ultravioleta es que justamente ejercen su actividad antioxidante. Algunos ejemplos son mencionados en la tabla 1 [6].

Tabla 1.¹ Especies vegetales con actividad antioxidante.

NOMBRE	DESCRIPCION
APIUM GRAVELOENS L. (APIACEAE) Apio	Se ha encontrado actividad antioxidante en sus semillas.
CAMELLIA SINENSIS L. (THEACEAE) Te	Actividad antioxidante proveniente de algunos alcaloides.
CINNAMOMUM VERUM (LAURACEAE) Canela	Actividad antioxidante reportada en la fracción etérea del aceite esencial.
LARREA TRIDENTATA (ZYGOPHYLLACEAE) Chaparral	Contiene NDGA (ácido nordihídrico guayarático) que es un poderoso antioxidante usado para la preservación de grasas y aceites.
LYCOPERSICON ESCULENTUM (SOLANACEAE) Tomate	Contiene carotenos (vitamina A), ácido fólico, ácido pantoténico, biotina, vitamina K e inhibidores relacionados con la vitamina E (α -tocoferol).
MEDICAGO SATIVA (FABACEAE) Alfalfa	Contiene clorofila, carotenoides y vitamina E que han reportado actividad antioxidante.

Continúa...

PANAX GINSENG (ARALIACEAE) Ginseng Chino	Se ha reportado que un compuesto presente: 3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona (maltol $C_6H_6O_3$) mostró actividad antioxidante.
PERILLA FRUTESCENS (LAMIACEAE) Perilla	Se ha reportado actividad antioxidante en el aceite de las semillas que contiene β -caroteno, aminoácidos y flavonoides.
PIMIENTA DIOICA (MYRTACEAE) Pimienta de jamaica	Se ha reportado actividad antioxidante en las semillas.
PIPER BETEL L. (PIPERACEAE) Betelvina	Presenta actividad antioxidante en las hojas, las cuales presentan alcaloides en su composición.
ROSMARINUS OFFICINALIS L. (LAMIACEAE) Rosemary	Presentan compuestos fenólicos y curcuminoides con actividad antioxidante.
TANACETUM VULGARE L. (ASTERACEAE) Tanaceto	Presenta actividad antioxidante en sus hojas.
SATUREJA MONTANA L. (LAMIACEAE) Savory Español	Terpenos con grupos hidroxilos en las semillas presentan actividad antioxidante.

1. La tabla 1 ha sido elaborada por los autores con datos recopilados de la mencionada referencia.

Los compuestos específicos que llevan a cabo la acción antioxidante se presentan en las secciones siguientes de este artículo, así como su mecanismo general de acción. Estas sustancias antioxidantes pueden ejercer su efecto bien en sistemas bioquímicos como en sustancias con aplicación en la industria alimentaria.

COMPUESTOS FENOLICOS

Vitamina E

Las Vitaminas E o tocoferoles (**1**) (cuyas estructuras se encuentran representadas en la figura 1), son un grupo estrechamente relacionado a los

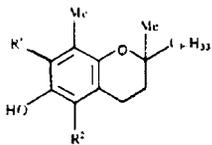
derivados fenólicos benzocromeno con extensa alquilación en el anillo. Estos compuestos existen no únicamente en plantas, sino también en los tejidos de los mamíferos. Como otros antioxidantes fenólicos, por ejemplo el BHT, su mecanismo normal de acción es la inactivación de dos equivalentes de la cadena que lleva los radicales peroxi, terminando con dos potenciales reacciones en cadena de radicales por cada molécula de inhibidor. A bajas concentraciones del radical, sin embargo, existe el potencial para la regeneración de la Vitamina E mediante la reacción con un agente reductor, tal como la Vitamina C [4].

La mayor actividad biológica de los cuatro principales tocoferoles corresponde al α -tocoferol (α -T, **1A**). Burton e Ingold [7] han demostrado que el α -T es uno de los más activos antioxidantes “rompedores de cadena” hasta ahora probados, siendo de lejos superior a los antioxidantes comerciales, BHA y BHT. Además, se ha especulado que la larga cadena “cola” fitilo de los tocoferoles permite la degradación del compuesto en las membranas lipofílicas de las células y organelos, donde presumiblemente ejerce su actividad antioxidante en la prevención del daño por oxidación [4]. La alta solubilidad en lípidos de la Vitamina E (la cual la hace un potente antioxidante *in vivo*) puede explicar por qué, al medir la actividad antioxidante de este compuesto en solución acuosa, los resultados que se obtienen son pobres, lo que no significa que la Vitamina E no sea activa, sino que los compuestos oxidantes al ser más solubles en agua que ésta, no alcancen los lugares donde exista una mayor concentración de α -T y, por lo tanto, no sean destruidos [4].

Flavonoides

Por algún tiempo ha sido reconocido que varias clases de flavonoides muestran actividad antioxidante ante una variedad de compuestos fácilmente oxidables. Los flavonoides están ampliamente distribuidos en el Reino Vegetal, y son especialmente comunes en hojas, inflorescencias y pólenes. Ellos están también presentes en abundancia en las partes leñosas tales como tallos y cortezas [8]. La concentración de flavonoides en las células vegetales frecuentemente excede 1 mM. La síntesis de muchos flavonoides y otros compuestos fenólicos es afectada fuertemente por la luz, resultando que a mayor exposición a la luz de la planta mayor será su contenido de flavonoides.

Se ha medido la eficiencia antioxidante de un grupo de flavonoides en un sistema de prueba incorporando dos lípidos fácilmente oxidables, ácido

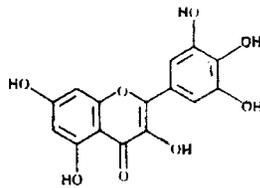


1A. α -Tocopherol ($\text{R}^1=\text{Me}$, $\text{R}^2=\text{Me}$)

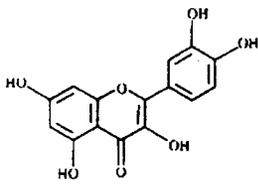
1B. β -Tocopherol ($\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=\text{Me}$)

1C. γ -Tocopherol ($\text{R}^1=\text{Me}$, $\text{R}^2=\text{H}$)

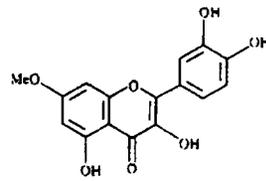
1D. δ -Tocopherol ($\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=\text{H}$)



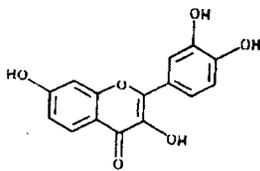
2



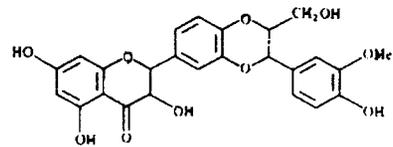
3



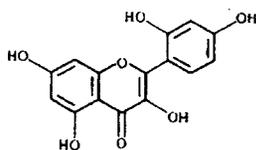
4



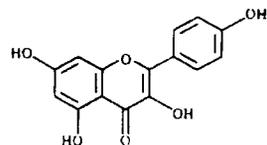
5



6



7



8

Figura 1. Tocoferoles y flavonoides usados en ensayos de actividad antioxidante

linoleico y β -caroteno. En un grupo de experimentos, la actividad fue demostrada por el prolongado periodo de tiempo requerido para "blanquear" la mezcla de prueba en presencia del antioxidante. En pruebas en suspensión a 50°C con una concentración de flavonoide de 5×10^{-4} M, las actividades más altas las mostraron los flavonoles libres (miricetina (2) y rabinetina) teniendo 3 grupos hidroxilo en el anillo B con un patrón de sustitución 3', 4' y 5'. Una actividad antioxidante ligeramente inferior, pero aún significativa, fue mostrada por las agliconas pentahidroxiladas quercetina (3) y dihidroquercetina; el 3-ramnósido de quercetina; el tetrahidroximetoxi flavonol ramnetina (4); y el tetrahidroxiflavonol fisetina (5). Muy pequeña actividad antioxidante fue exhibida por la rutina (3-ramnoglucósido de quercetina) o flavonoides teniendo menos de 4 grupos hidroxilo [4]. La dihidroquercetina, que se aisló de cacahuates españoles (*Arachis hypogea*), tiene alta actividad antioxidante en la prueba de aspersión en CCD usando β -caroteno. En algunos estudios, la quercetina y miricetina han mostrado que tienen actividad antioxidante a concentraciones menores de 1×10^{-5} M [4].

Otros estudios también mostraron que el complejo flavonol-lignano derivado de la silimarina (6) fue casi igualmente efectivo en la inhibición de la peroxidación de lípidos en distintas preparaciones de microsomas y mitocondrias [4].

Torel y otros [2] probaron una serie de flavonoides como inhibidores para la autooxidación del ácido linoleico emulsificado y del linoleato de metilo, en oscuridad y a temperatura ambiente. Establecieron que los dos compuestos con más alta actividad fueron la morina (7) y el kaempferol (8); los resultados de estos experimentos los podemos apreciar en las figuras 2, 3 y 4. Atribuyeron la actividad de los flavonoides a su habilidad para donar un átomo de hidrógeno al radical peroxi producto de la autooxidación del derivado de ácido graso. Un esquema del mecanismo propuesto lo podemos ver en la figura 5 aplicado a la formación de los isómeros hidroperóxido *cis,trans* y *trans,trans* con y sin flavonoides.

El kaempferol ha sido también reportado por sufrir fotoblanqueamiento en cloroplastos iluminados. La reacción de "blanqueamiento" fue estimulada por el paraquat, un conocido agente de transferencia de electrones capaz de producir O_2^- a partir de oxígeno molecular, y fue suprimida por la enzima superóxido dismutasa. Estos resultados sugieren que los flavonoides inhiben las reacciones redox promovidas por el O_2^- en el interior de los cloroplastos [4]. Una evidencia adicional para este postulado fue obtenida en experimen-

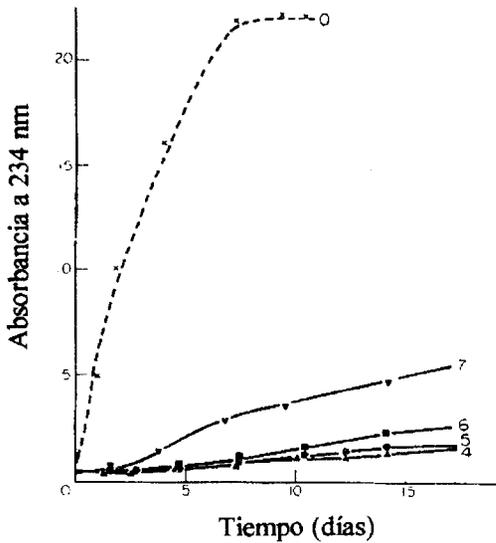
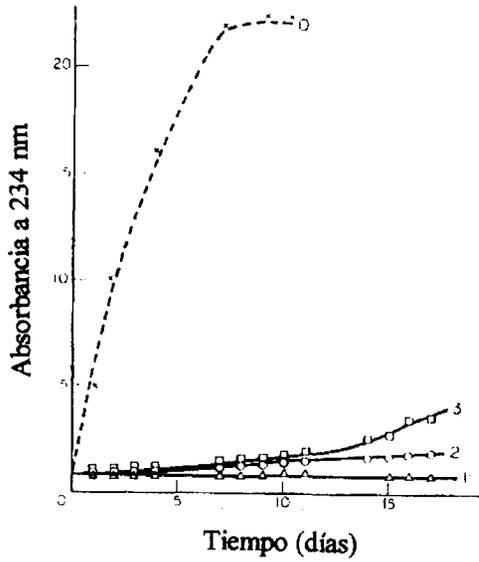


Figura 2. Nivel de dienos conjugados para la autooxidación del ácido linoleico con y sin flavonoides. 0: ácido linoleico sólo; 1: con morina (10 µg/mL); 2: con rutina (10 µg/mL); 3: con catequina (10 µg/mL); 4: con kaempferol (10 µg/mL); 5: con luteolina (10 µg/mL); 6: con quercetina (10 µg/mL); 7: con fustina (10 µg/mL). [2]

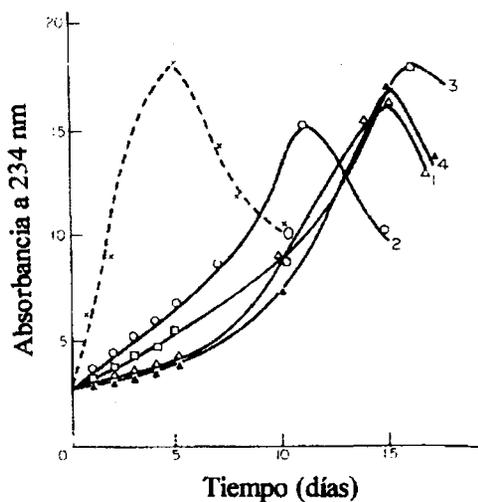


Figura 3. Nivel de dienos conjugados para la autooxidación del linoleato de metilo con y sin flavonoides. 0: linoleato de metilo sólo; 1: con morina (10 mg/mL); 2: con rutina (10 mg/mL); 3: con catequina (10 mg/mL); 4: con kaempferol (10 mg/mL). [2]

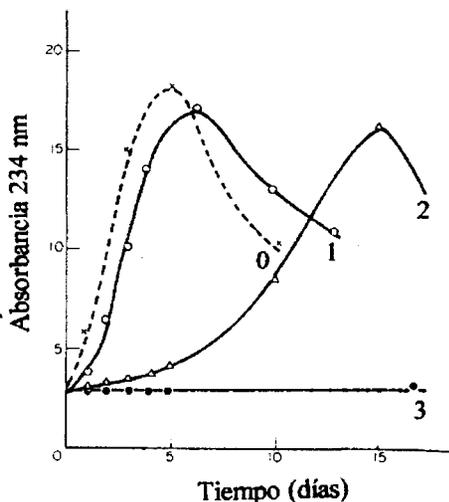


Figura 4. Efecto de la concentración de morina sobre el nivel de dienos conjugados para la autooxidación del linoleato de metilo. 0: linoleato de metilo sólo; 1: con morina (1 mg/mL); 2: con morina (10 mg/mL); 3: con morina (100mg/mL). [2]

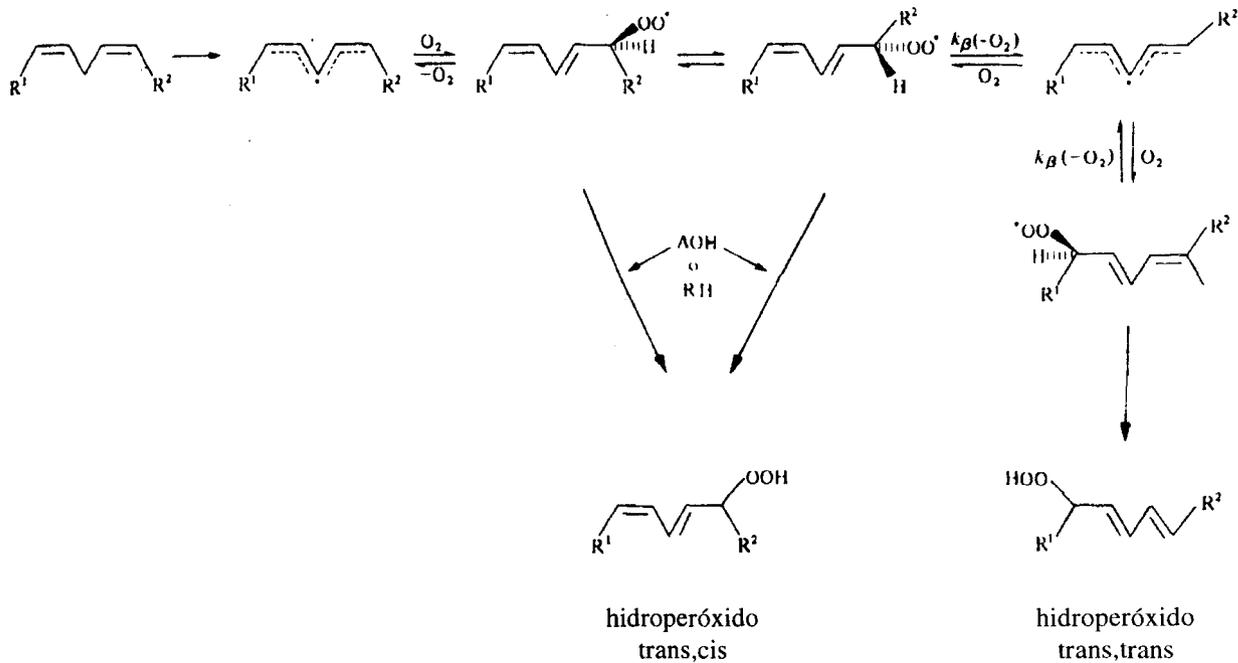


Figura 5. Formación de los isómeros hidroperóxido *cis,trans* y *trans,trans* con y sin flavonoides (AOH). [2]

tos que mostraron que la quercetina y el kaempferol a una concentración de aproximadamente 4×10^{-5} M, suprimen la fotoperoxidación de lípidos en un 50% en cloroplastos aislados de espinacas. Quercetina glicosidada, rutina y quercetrina fueron también inhibidores efectivos de las reacciones de peroxidación, pero requirieron concentraciones 2-3 veces más altas para alcanzar el mismo nivel de inhibición. Experimentos similares indicaron que el kaempferol así como la quercetina y sus glicósidos también inhibieron el fotoblanqueamiento de carotenoides en cloroplastos a niveles comparables con aquellos usados en experimentos de fotoperoxidación de lípidos [4].

Recientes evidencias sugieren que la quercetina y por implicación otros flavonoides, son potentes eliminadores de 1O_2 . Se ha demostrado que concentraciones de 10-100 μ M de quercetina inhibieron el “blanqueamiento” inducido por 1O_2 del pigmento carotenoides, crocina [4].

Varios flavonoides han mostrado ser potentes inhibidores de las enzimas lipoxigenasa y prostaglandina sintetasa, las cuales convierten ácidos grasos poliinsaturados en derivados que contienen oxígeno. La más alta actividad contra ambas enzimas fue mostrada por la luteolina (5,7,3',4'-tetrahidroxi flavona) y la 3',4'-dihidroxi flavona; que a una concentración de 3×10^{-5} M inhibieron el 50% de la actividad de la lipoxigenasa [4].

Se ha sugerido la idea de que los flavonoides, gracias a su fuerte absorción en la región UV de 300-400 nm, actúan como filtros de luz internos para la protección de los cloroplastos y otros organelos del daño que produce la radiación UV [4]. Se ha demostrado que varios compuestos con absorción UV aparecen en altas concentraciones en las vacuolas de células epidérmicas así como en el interior de los cloroplastos. En concordancia con esto, se ha descubierto que las hojas de casi todas las especies en ambientes de alta radiación UV, tales como aquellas que habitan en altas elevaciones en el ártico y latitudes tropicales, tienen una muy baja transmitancia epidérmica UV. Asimismo, trabajos preliminares sobre flavonoides presentes en plantas alpinas sugirieron que sus concentraciones se incrementan con la altitud [4].

Las estructuras de los flavonoides antes mencionados se encuentran reunidas en la figura 1.

Ácidos Fenólicos

Los compuestos ácidos con grupos fenólicos han sido implicados repetidas veces como efectivos antioxidantes. Por ejemplo, el ácido cafeico (9),

el ácido clorogénico (**10**) y sus isómeros, incluyendo el ácido 4-O-cafeoilquínico (**11**) fueron aislados de camotes. Se ha establecido que el ácido clorogénico es el ácido fenólico más abundante en los extractos vegetales y también el más activo antioxidante; a una concentración de $1,2 \times 10^{-5}$ M inhibió cerca del 80% de la formación de peróxido en un sistema de prueba de ácido linoleico [4]. En un sistema diferente (manteca- β -caroteno), el ácido clorogénico (a una concentración de 5×10^{-5} M) se estableció como exento de actividad antioxidante, pero el ácido cafeico a la misma concentración tuvo alta actividad [4].

Esteres del ácido cafeico con esteroides y alcoholes triterpénicos han sido aislados de semillas del grass *Phalaris canariensis*. Los ácidos grasos de las semillas fueron predominantemente insaturados, sugiriendo que los ésteres están actuando como protectores de éstos con respecto a la oxidación. Los ésteres solubles en lípidos fueron antioxidantes efectivos en pruebas con manteca de cerdo o aceite de sardina calentados a 60° C. En las pruebas, los ésteres fueron añadidos como mezclas, pero algunos pocos componentes parecían tener una actividad aproximadamente igual o que excedía a la del BHT [4].

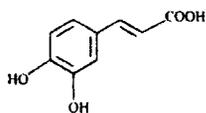
El ácido ferúlico, a la relativamente alta concentración de 1×10^{-3} M, ha mostrado un efecto de retardo en la fotoperoxidación del ácido linoleico. Esteres del ácido ferúlico con triterpenos y esteroides, los cuales se encuentran naturalmente en el salvado de arroz, han mostrado tener también alguna actividad [4].

Las estructuras de los ácidos fenólicos antes mencionados se encuentran reunidas en la figura 6.

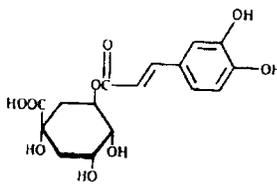
Curcuminoides

Un grupo de potentes antioxidantes para la oxidación por aire del ácido linoleico fue aislado de un extracto metanólico de los rizomas de la *Curcuma longa*. El más abundante y más activo constituyente del extracto fue el pigmento naranja, curcumina (**12**). La concentración inhibitoria de un 50% del ácido linoleico fue de aproximadamente 5×10^{-4} M; siendo por lo tanto más activa que la vitamina E, pero algo menos activa que los conocidos antioxidantes BHA y BHT [4].

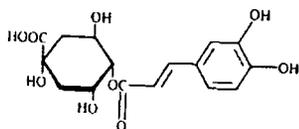
Masuda y otros [9], han aislado los curcuminoides: curcumina (**12**), demetoxicurcumina (**13**), bisdemetoxicurcumina (**14**), 1-hidroxi-1,7-bis(4-



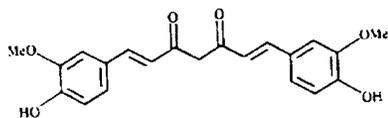
9



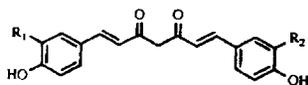
10



11

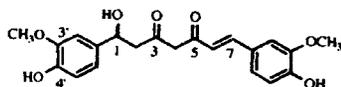


12

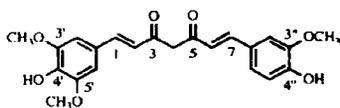


13: $R_1=OMe, R_2=H$

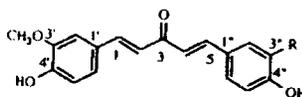
14: $R_1=H, R_2=H$



15



16



17: $R=OMe$

18: $R=H$

Figura 6. Ácidos fenólicos y curcuminoides usados en ensayos de actividad antioxidante.

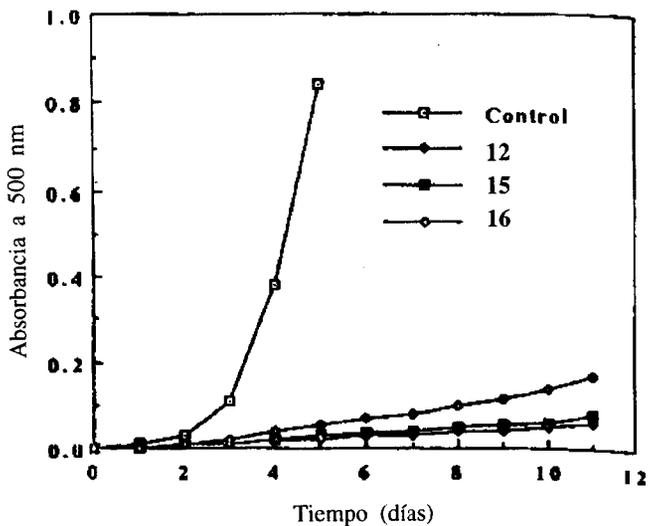


Figura 7. Efecto de los compuestos (12), (15) y (16) sobre la autooxidación del ácido linoleico.[9]

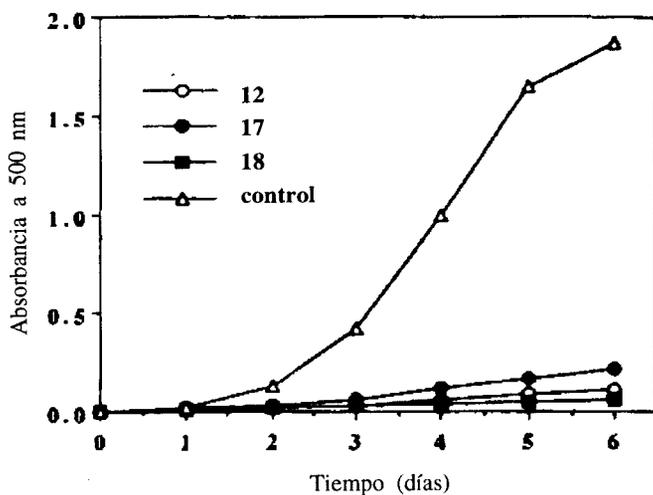


Figura 8. Efecto de los compuestos (17), (18) y (12) (cada uno 5.4 mol) sobre la autooxidación del ácido linoleico. [10]

hidroxi-3-metoxifenil)-6E-6-hepteno-3,5-diona (**15**) y 1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-(1E,6E)-1,6-heptadieno-3,5-diona (**16**) a partir de la *Curcuma xanthorrhiza* mostrando que (**12**), (**13**) y (**14**) tienen potente actividad antioxidante. Ellos midieron la actividad de (**15**) y (**16**) y la compararon con la de (**12**) (figura 7); (**16**) mostró actividad antioxidante ligeramente más fuerte que la de (**12**), pero (**15**) mostró actividad antioxidante más débil que la de (**12**). La eficiencia similar observada de (**16**) a (**12**) estuvo de acuerdo con los datos previamente obtenidos para (**12**), (**13**) y (**14**). La alta actividad antioxidante de la familia de las curcuminas ha sido explicada por la quelatación de metales con la porción de β -dicetona. Sin embargo, recientemente, se ha sugerido que la actividad de la curcumina depende de la delocalización del radical fenólico en la función cetona. La fuerte actividad de (**12**) y (**16**) con respecto a la de (**15**) indica que la delocalización del radical fenólico con la cadena alquílica conjugada es importante para la actividad antioxidante de los curcuminoides.

Masuda [10] también ha aislado dos nuevos compuestos fenólicos naturales de los rizomas de la *Curcuma domestica* (así como 4 conocidos curcuminoides). Estos son el 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-(1E,4E)-1,4-dien-3-ona (**17**) y el 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-5-(4-hidroxifenil)-penta-(1E,4E)-1,4-dien-3-ona (**18**). Su actividad antioxidante fue determinada por la inhibición de la autooxidación del ácido linoléico. Se sabe que la potente actividad antioxidante de los rizomas de la *Curcuma domestica* se debe al efecto del constituyente principal, la curcumina. En la figura 8, se ve el efecto comparado de (**17**), (**18**) y la curcumina (**12**) con respecto a la autooxidación del ácido linoléico. Los fenoles (**17**) y (**18**) muestran mayor actividad antioxidante que (**12**). Algunos investigadores han sugerido que la actividad de (**12**) se debe al sistema dicetónico. Sin embargo, Masuda [10] ha indicado que el efecto del sistema dicetónico fue bastante bajo.

Las estructuras de los curcuminoides mencionados en la presente sección se encuentran reunidas en la figura 6.

Dépsidos y Depsidonas

Los líquenes sintetizan una variedad de metabolitos, por ejemplo, dépsidos y depsidonas, cuya función no ha sido totalmente definida y que, debido a su estructura fenólica, puede constituir un mecanismo de defensa contra el daño por oxidación. Hidalgo y otros [3] han llevado a cabo un trabajo con el fin de asignar la actividad antioxidante de algunos dépsidos (ácido

divaricático (**19**) y atranorina (**20**) y depsidonas (pannarina (**21**) y 1'-cloropannarina (**22**)) empleando la autooxidación de cerebros de rata homogenizados y β -caroteno en una suspensión de ácido linolénico como sistemas modelo. Las estructuras de los metabolitos liquénicos investigados se muestran en la figura 9.

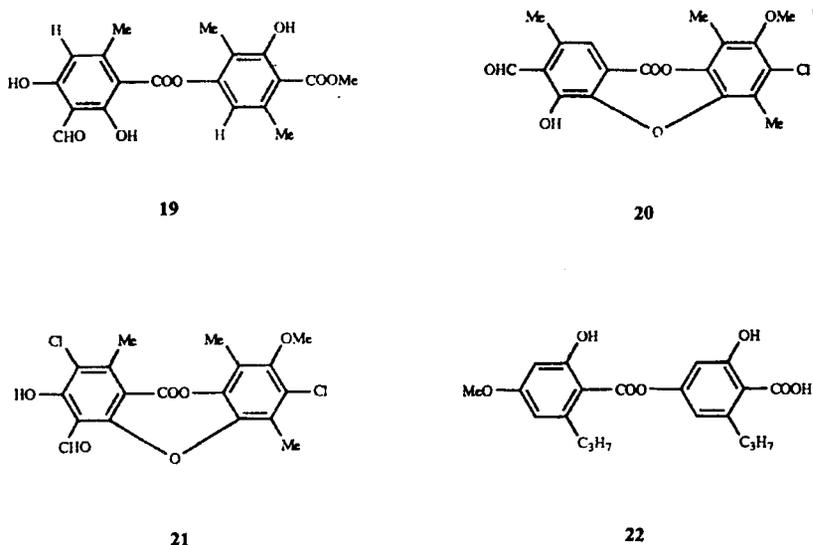


Figura 9. Estructuras de los dépsidos y depsidonas usados en los estudios de actividad antioxidante.

Los valores de la actividad antioxidante de los dépsidos y depsidonas obtenidos en experimentos de autooxidación están dados en la tabla 2, tomando como referencia los valores determinados empleando galato de propilo 1.3 μ M. La actividad antioxidante medida por este procedimiento fue casi la misma si los periodos de incubamiento se consideran, implicando un pequeño consumo de aditivo y/o falta de producción del metabolito con alta propiedad antioxidante.

Los valores de actividad antioxidante medidos a t=60 minutos usando el "blanqueamiento" del β -caroteno como un sistema modelo se muestran en la tabla 2. Estos valores también fueron muy bajos, dependiendo del tiempo de incubación, indicando un consumo escasamente significativo del aditivo por encima de los 60 minutos de incubación.

Tabla 2. Capacidad antioxidante (CA) de dépsidos y depsidonas evaluada por la inhibición de la reacción de autooxidación de cerebros de rata homogenizados y por la protección del β -caroteno. [3]

COMPUESTO	Inhibición Autooxidación Cerebros de Rata		Protección del β -caroteno	
	CONCENTRACION (μ M)	CA	CONCENTRACION (μ M)	CA
Atranorina	5	7.3	0.84	6.5
	10	9.5		
Acido divaricático	4	1.7	0.8	8.6
	6	8.4		
1'-Cloropannarina	0.58	27	0.8	30
	1.7	66		
Pannarina	0.57	13	0.88	23
	1.1	36		
Galato de propilo	1.3	70	--	--
BHT	--	--	1.4	83

Los datos de la tabla 2 muestran que los compuestos considerados presentan moderada actividad antioxidante en ambos sistemas, siendo para algunos de estos únicamente ligeramente menores que los de los típicos antioxidantes fenólicos. Además, estos datos indican que en ambos sistemas las depsidonas son antioxidantes más efectivos que los dépsidos. Establecer la razón para esta diferencia es difícil por el limitado número de compuestos empleados, particularmente por que la actividad antioxidante de un compuesto dado en los sistemas modelo considerados fueron determinados no únicamente por su reactividad hacia las cadenas que llevan radicales, sino también por su hidrofobicidad. Sin embargo, es interesante hacer notar que se ha mostrado que "puenteando" el grupo fenólico en la posición *para* se puede incrementar la actividad antioxidante de los fenoles debido al más eficiente solapamiento de los orbitales sustituidos dentro del sistema aromático.

La actividad antioxidante en los experimentos de autooxidación fue evaluada por la medición de la intensidad de luminiscencia emitida después de 60 minutos de incubamiento a temperatura ambiente [3].

La actividad antioxidante para la oxidación del β -caroteno se evaluó por el efecto del aditivo sobre el “blanqueamiento” del β -caroteno por medición de la absorbancia a 470 nm [3].

Lignanos

Los lignanos con estructuras fenólicas muy sustituidas pueden ser efectivos antioxidantes. No obstante, hay pocos estudios sistemáticos sobre la capacidad antioxidante de grupos de lignanos estrechamente relacionados. Este tipo de estudios es particularmente interesante ya que, en vista de la gran variedad de estructuras establecidas, los lignanos podrían ser usados en análisis de actividad-estructura en un intento de evaluar la influencia de los sustituyentes sobre la capacidad antioxidante.

El lignano (**23**), aislado de semillas de sésamo (*Sesamun indicum*) inhibe significativamente la autooxidación del ácido linoleico a 40°C cuando se añade en una concentración de 5.8×10^{-5} M. Sin embargo, no fue tan activo como la vitamina E [4].

Fauré y otros [5] llevaron a cabo un trabajo con el objeto de asignar la capacidad antioxidante de lignanos estrechamente relacionados, aislados de los tallos de la *Porlieria chilensis* (ácido dihidroguayarético (**24**), isopregomisina (**25**), y guayacasina (**26**)). El sistema modelo utilizado fue la autooxidación de cerebros de rata homogenizados, y la extensión de la peroxidación del lípido fue evaluada por el producto de acumulación con el reactivo tiobarbitúrico (TBAR) [5]. La autooxidación de los cerebros de rata homogenizados es un sistema modelo conveniente para probar la capacidad antioxidante

La dependencia de los índices de capacidad antioxidante con la concentración de los lignanos, en el rango micromolar, indica una poderosa capacidad antioxidante. Un valor relativo de su capacidad es proporcionado por la concentración requerida para disminuir la velocidad de peroxidación de lípidos a un 50% del valor observado en ausencia de aditivos ($Q_{1/2}$). Los valores obtenidos de $Q_{1/2}$ están dados en la tabla 3 así como los que se obtienen para el galato de propilo, un antioxidante sintético usado ampliamente.

Los valores $Q_{1/2}$ pueden considerarse como inversamente proporcionales a las constantes de velocidad de las interacciones entre la cadena portando el radical y el antioxidante. Además, si cada grupo fenólico reacciona in-

dependientemente de los sustituyentes en el otro grupo fenólico, la constante de velocidad para la interacción entre la cadena portando el radical y la guayacasina, debe poder calcularse como el promedio de las constantes obtenidas para el ácido dihidroguayarático y la isopregomisina. Esto a su vez significa que, esta misma relación debe existir entre los valores de $(Q_{1/2})^{-1}$.

A partir de los datos de la tabla 3 se sabe que $(Q_{1/2})_{\text{Guayacasina}}^{-1}$ es 0.91, mientras que:

$$0.5 \times ((Q_{1/2})_{\text{Ácido dihidroguayarático}}^{-1} + (Q_{1/2})_{\text{Isopregomisina}}^{-1}) = 0.89$$

indicando que en éstos compuestos, debido a las dos cadenas de carbonos que actúan como espaciadores entre ambos grupos aromáticos, cada grupo fenólico ejerce su acción antioxidante independientemente de la otra mitad aromática.

En base a sus estructuras, todos los lignanos estudiados se espera sean buenos antioxidantes rompedores de cadena. Esto se confirma mediante los datos dados en la Tabla 3 que muestran que sus eficiencias son similares a las del propil galato. El factor de cuatro entre los valores $Q_{1/2}$ de los compuestos (24) y (26) pueden estar relacionados a los grupos metoxilo extras en este último compuesto. Está bien establecido para varias clases de compuestos fenólicos, que los derivados metoxilados son casi cinco veces más reactivos que los respectivos derivados metilados frente a los radicales peroxi. Este hecho puede relacionarse con la estabilización del radical fenoxilo formado en esta reacción por delocalización del electrón desapareado del par libre tipo *p* del oxígeno del grupo metoxilo.

Las estructuras de los lignanos antes mencionados se encuentran reunidas en la figura 10.

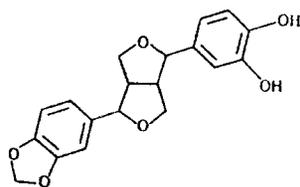
Otros Fenoles

El Rosmaridifenol (27), un derivado diterpénico con grupos OH adyacentes, fue aislado de *Rosmarinus officinalis* (Rosemary). Su actividad antioxidante en manteca de cerdo caliente excede a la del BHA y se aproxima a la del BHT [4]. Otros diterpenos fenólicos relacionados, con actividad antioxidante, también han sido aislados de esta planta.

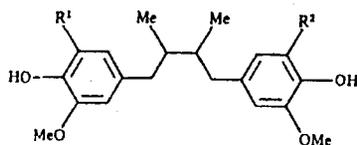
Las chalconas polihidroxiladas tales como la buteína (28), las cuales son intermediarios biosintéticos entre el ácido cinámico y los flavonoides, muestran

Tabla 3. Capacidad antioxidante de lignanos. [5]

COMPUESTO	$(Q_{1/2})_{TBAR}$ (μM)
Acido dihidro guayarético	2.8
Guayacasina	1.1
Isopregomisina	0.7
Galato de propilo	1.0



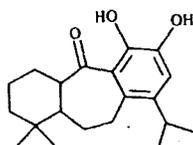
23



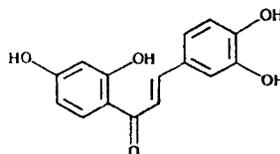
24: $R^1=H, R^2=H$

25: $R^1=H, R^2=OMe$

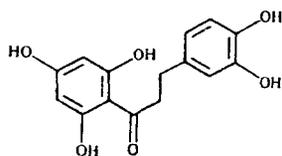
26: $R^1=OMe, R^2=OMe$



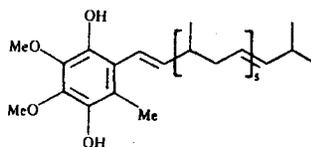
27



28



29



30

Figura 10. Lignanos y otros compuestos fenólicos usados en ensayos de actividad antioxidante.

también considerable actividad antioxidante para la manteca de cerdo. En este sistema, a 100°C, la buteína a una concentración de aproximadamente 1×10^{-3} M fue casi dos veces más activa que el flavonol quercetina o el α -tocoferol. Su prolongado período de inducción para la autooxidación de la manteca de cerdo fue de 1.3 a 50 horas. Es interesante que, chalconas con solo dos grupos OH adyacentes fueran también bastante efectivas; la introducción de grupos OH adicionales conduce únicamente a incrementos despreciables en la actividad inhibitoria de la autooxidación. La hidrogenación del doble enlace de la chalcona incrementa su actividad antioxidante en algún grado; por ejemplo, la pentahidroxidihidrochalcona (**29**) fue dos a tres veces más activa que la correspondiente chalcona insaturada [4].

El ubiquinol (**30**), un producto de la reducción de la ubiquinona (coenzima Q), se ha mostrado como un potente antioxidante *in vivo* bajo condiciones de poca concentración de oxígeno, como las que se presentan en muchos ambientes celulares. El compuesto inhibió la peroxidación de lípidos en emulsiones del ácido araquínódico conteniendo hemoglobina como iniciador, así como también la fotooxidación de los lípidos mitocondriales. Fue casi tan activo como la Vitamina E. La actividad mostrada por el ubiquinol frente al radical libre estable difenilpicrilhidrazilo sugiere que hubo una ruptura de la cadena antioxidante y que probablemente, reaccionaría con radicales peroxi *in vivo* [4].

Las estructuras de los compuestos fenólicos mencionados en la presente sección se encuentran reunidas en la figura 10.

COMPUESTOS NITROGENADOS

Alcaloides

A pesar del amplio uso de antioxidantes en procesos industriales que contienen nitrógeno, como la etoxiquina (**31**), la idea de que los alcaloides puedan jugar un rol importante en la protección de los tejidos de las plantas contra el daño oxidativo debido al oxígeno singulete o a otras especies ha recibido poca atención. Varios de los compuestos nitrogenados de las plantas superiores son potentes inhibidores de varios procesos oxidativos, tanto *in vivo* como *in vitro* pero su mecanismo de acción aún no ha sido descrito. Las mayores concentraciones de los alcaloides en las plantas se han encontrado en las células epidérmicas, donde la intensidad de la luz es más alta. Esto se debe a que muchos alcaloides absorben la radiación ultravioleta

fuertemente, lo que sugiere que al igual que otros compuestos, como los flavonoides por ejemplo, los alcaloides actúan como filtros de luz, protegiendo la mesófila de la radiación UV [11]. La peroxidación lípida inducida por irradiación de cobalto (en los liposomas de lecitina de soya) fue inhibida por el alcaloide cefarantina bisbenzil isoquinolina (**32**). Una concentración de 2.5×10^{-5} M inhibió el 50% de la peroxidación lípida de la mitocondria, la que normalmente ocurre en 20 minutos. La cafeína, de las hojas del té (*Thea sinensis*) y el café (*Coffea arabica*) mostraron una actividad antioxidante (en un test de oxidación del ácido linoléico) comparable a la del BHA y BHT [4].

Un compuesto sintético, 6-hidroxi-1,4-dimetilcarbazol (**33**), que es estructuralmente bastante parecido al alcaloide con actividad antitumoral 9-hidroxiellipticina (**34**), mostró ser un potente inhibidor *in vitro* de muchos sistemas peroxidativos. Su potencia es muy superior a la de conocidos antioxidantes sintéticos tales como el galato de propilo. Similarmente, la mepacrina (**35**), una droga antiprotozoos, inhibió completamente la hemólisis peroxidativa y la formación de malonaldehído en las ratas a una concentración de 50 μ M. Se cree que el alcaloide catiónico e hidrofóbico, interactúa fuertemente con los fosfolípidos y otros constituyentes aniónicos de las membranas celulares [4].

Muchos alcaloides de varios tipos de estructuras han mostrado ser potentes inhidores del oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) (tabla 4). Muchos de estos compuestos demostraron ser mejores inhibidores que la amina terciaria 1,4-diaza[2.2.2] bicycloctano (DABCO, **36**) Particularmente efectivos son los alcaloides como la estricnina (**37**) y la brucina (**38**) que tienen un nitrógeno básico en una estructura similar a una jaula rígida. Estos alcaloides indólicos tienen dos átomos de nitrógeno, pero el de la porción dihidroindólica de la estructura está enlazado y es débilmente básico. En general, las aminas no son reactivas con el $^1\text{O}_2$, así que es razonable que la actividad inhibitoria de la brucina y estricnina esté asociada con el otro nitrógeno (básico). Otros dos alcaloides indólicos, la reserpina (**39**) y la vincamina (**40**), con nitrógenos terciarios básicos y el núcleo indólico completamente conjugado inhiben el $^1\text{O}_2$ eficientemente. Los indoles monosustituídos como es de esperarse, ya que poseen un heterociclo débilmente básico, reaccionan lentamente con el $^1\text{O}_2$ (indoles con enlace doble 2,3 sustituido, son sin embargo, más reactivos).

La gran diferencia en la actividad inhibitoria entre la atropina (**41**) y la eucatropina (**42**) puede ser explicado por los factores estéricos que envuelven al nitrógeno básico de este último compuesto [11].

Tabla 4. Inhibición de la actividad del oxígeno singlete por alcaloides y heterociclos nitrogenados. [11]

COMPUESTO	CONSTANTE DE VELOCIDAD*	β (M)**
Brucina	$(3.85 \pm 0.62) \times 10^8$	2.6×10^{-5}
Estricnina	$(2.35 \pm 0.28) \times 10^8$	4.3×10^{-5}
8-Hidroxiquinolina	$(1.05 \pm 0.22) \times 10^8$	9.5×10^{-5}
DABCO	$(5.84 \pm 0.85) \times 10^7$	1.7×10^{-4}
Atropina	$(4.32 \pm 0.85) \times 10^7$	2.3×10^{-4}
Vincamina	$(4.27 \pm 0.31) \times 10^7$	2.3×10^{-4}
Nicotina	$(3.82 \pm 0.18) \times 10^7$	2.6×10^{-4}
Glaucina	$(3.08 \pm 0.30) \times 10^7$	3.2×10^{-4}
Reserpina	$(2.66 \pm 0.31) \times 10^7$	3.8×10^{-4}
Boldina	$(2.39 \pm 0.21) \times 10^7$	4.2×10^{-4}
Eucatropina	$(1.90 \pm 0.43) \times 10^6$	5.3×10^{-3}
6-Metoxiquinolina	$< 2 \times 10^5$	$> 5.0 \times 10^{-2}$

* Incluyendo desviación estándar

** β es la razón del decaimiento de $^1\text{O}_2$ debido a la inhibición por solvente y al decaimiento debido a la reacción con el inhibidor. Esto representa la concentración de inhibidor necesaria para inactivar la mitad de las moléculas de $^1\text{O}_2$ en un solvente determinado.

Dos alcaloides aporfínicos, la boldina (**43**) y la glaucina (**44**), muestran actividad comparable, y se encuentran dentro del rango de otras aminas terciarias examinadas.

El valor reportado para la nicotina en cloroformo fue mucho más alto al obtenido hace 25 años para este compuesto en metanol (4.4×10^5). Sin embargo, se ha recalculado la constante de inhibición de este relativa al DABCO en piridina y se obtuvo un valor aproximado de 4.3×10^6 . No se tienen reportes que afirmen que las grandes diferencias mostradas se deban a efectos de solvente, método experimental u otros factores [11].

La diferencia de actividad inhibitoria entre la 8-hidroxiquinolina (**45**) y la 6-metoxiquinolona (**46**) no es tan fácil de interpretar. Es posible que la proximidad estérica del grupo fenol con el par libre del nitrógeno ayude a promover la desactivación del oxígeno singulete a través de la facilidad de solapamiento del orbital en el estado de transición [11]. Estos alcaloides parecen ser inhibidores estrictamente físicos y no son destruidos químicamente durante la inhibición [12]. En principio, ellos podrían inactivar muchas moléculas de oxígeno singulete por molécula de alcaloide.

Las poliaminas como la espermina (**47**) son asociadas con los alcaloides acíclicos encontrados en las legumbres, al parecer tienen cierta actividad antioxidante relacionada con los efectos estabilizadores de las poliaminas de sustancias de la membrana celular [4].

Las aminas terciarias como la tetrametilamina han mostrado ser bastante efectivas como inhibidoras de los radicales peróxidos.

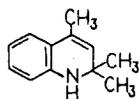
Los radicales derivados de las aminas tienen una constante de velocidad alta de terminación, lo que contribuye al eficiente cese de las reacciones en cadena de los radicales [13]. No se han realizado estudios de este tipo con alcaloides.

Los alcaloides del tipo de la quinolizidina, como la esparteína (**48**), han sido encontrados principalmente en las células epidérmicas de cuatro plantas del género *Lupinus*. Las concentraciones en esos tejidos fueron arriba de 20 mM. Se sugiere que el lugar donde se les ha ubicado es consistente con el rol fitoquímico que realizan como compuestos de defensa, pero es aún más consistente con un rol antioxidante. Es imposible que estos alcaloides actúen como filtros de luz UV, ya que su absorción en el rango UV solar es mínima [4].

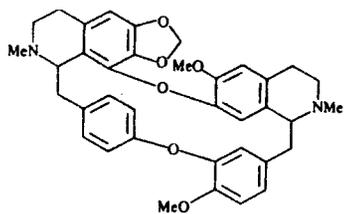
Las estructuras de los alcaloides antes mencionados se encuentran reunidas en la figura 11.

Derivados de Clorofila

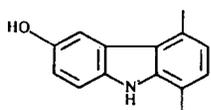
Aunque tanto la clorofila (**49**) como el feofitín (**50**) promueven la oxidación de lípidos en la luz, son inhibidores de la autooxidación en la oscuridad. A 30°C, la acción de la clorofila (a una concentración de 2×10^{-5} M) fue superior a la del BHT. Estos compuestos parecen no ser reactivos con



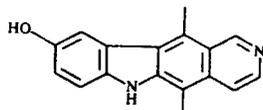
31



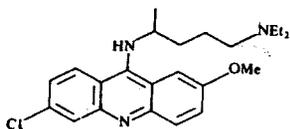
32



33



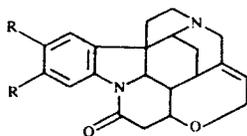
34



35

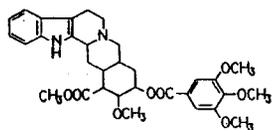


36



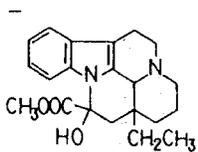
37: R=H

38: R=OMe

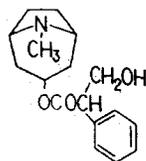


39

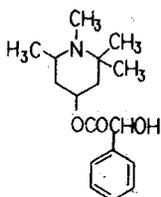
Figura 11. Alcaloides usados en ensayos de actividad antioxidante.



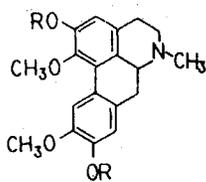
40



41

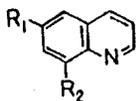


42



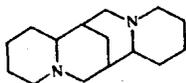
43: R=H

44: R=Me

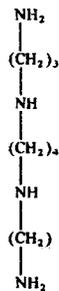


45: R₁=H, R₂=OH

46: R₁=OMe, R₂=H



48

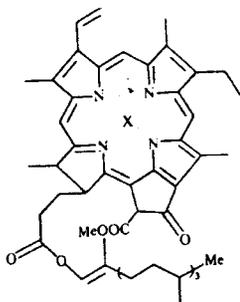


47

Figura 11. Alcaloides usados en ensayos de actividad antioxidante (continuación)

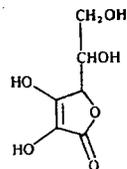
los hidroperóxidos lípidos, pero reaccionan con radicales peróxido; la resonancia de spin de electrón indica la presencia de un catión radical tetrapirrólico [4].

Las estructuras de los derivados de clorofila mencionados se encuentran en la figura 12.

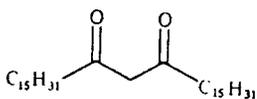


49: X=Mg

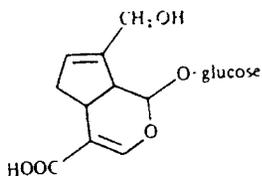
50: X=2 H



51



52



53

Figura 12. Derivados de clorofila y otros compuestos misceláneos usados en ensayos de actividad antioxidante.

Aminoácidos y aminas

A muchos aminoácidos se les ha probado su actividad antioxidante, especialmente en alimentos. Entre los aminoácidos que se cree que tienen actividad antioxidantes tenemos a la argenina, cisteína, histidina, triptófano, lisina, metionina y treonina [4]. La literatura es a menudo bastante confusa

en este sentido, pues reportan datos de algunos aminoácidos que pueden exhibir actividad antioxidante bajo ciertas condiciones de temperatura, pH o concentración de oxígeno; pero que no tienen efecto o de hecho promueven la oxidación en algunos otros casos. Por ejemplo, alanina e histidina han sido reportados como inhibidores de la oxidación del ácido linoléico a pH 9.5 y la promueven a pH 7.5 [14].

CAROTENOIDES

El principal rol reconocido de los carotenoides es el actuar como fotorreceptor “pigmento antena” para la fotosíntesis, capturando luz de longitudes de onda que no son absorbidas por la clorofila, también han sido reconocidos por muchas décadas –por lo menos el β -caroteno– por tener una función en contra de la oxidación.

Estudios realizados en los cloroplastos muestran que la clorofila y las enzimas permiten transiciones eficientes de energía electrónica entre el estado excitado de la clorofila y las moléculasceptoras en los fotosistemas, pero bajo algunas condiciones fisiológicas ocurren pérdidas de energía significantes, lo que origina que se produzcan daños. Por lo que a la clorofila se le considera como un eficiente generador de oxígeno singulete. Los cloroplastos son membranas particularmente ricas en ácidos grasos insaturados así que en caso de una oxidación se deterioraría fácilmente.

El oxígeno singulete es inhibido fuertemente por el β -caroteno con una alta constante de velocidad, la cual excede a la constante de velocidad del oxígeno singulete (con algún ácido graso insaturado importante biológicamente hablando) en un orden de magnitud de 4 ó 5. Esto permite una baja concentración de β -caroteno para la protección de las membranas de los lípidos contra la oxidación [4].

Los radicales libres son bastante reactivos con el β -caroteno, al menos bajo ciertas condiciones. Se ha comprobado que el β -caroteno es de 20 a 100 veces más reactivo que el 2,5-difenilfurano y el 1,4-diaza biciclooctano [4]. Pero una gran velocidad de reacción con radicales libres no es condición suficiente para un buen rompimiento de cadena antioxidante. Además, se ha demostrado que el β -caroteno trabaja como un potente antioxidante a bajas presiones de oxígeno (0.1 atm). A altas concentraciones de oxígeno, el β -caroteno puede ser convertido a especies radicales que tienen facilidad para

iniciar la propagación y pueden promover la oxidación. Se cree que el β -caroteno y compuestos parecidos a este se encuentran en regiones celulares que están expuestas a bajas presiones parciales de oxígeno [15].

OTROS COMPUESTOS

Vitamina C

El ácido ascórbico (vitamina C, **51**) (la estructura de la vitamina C se encuentra en la figura 12) ha sido reconocido durante bastante tiempo como un antioxidante biológico. El ascorbato también ha demostrado tener actividad antioxidante significativa. Por ejemplo, 10^{-3}M de ascorbato reducen dos equivalentes de O_2^- para producir H_2O_2 y un ácido derivado. El ascorbato también reacciona con el oxígeno singulete a una alta velocidad de reacción [4].

En un estudio cinético *in vitro*, la vitamina C inhibió al radical peróxido de una oxidación de metil lineolato cuando ésta ya estaba iniciada. La vitamina C actúa como un destructor de cadenas radicalarias para los peróxidos y además actúa como agente sinérgico con la vitamina E. Los estudios muestran que la vitamina C puede donarle un átomo de hidrógeno al fenolato, que es un derivado radicalario de la vitamina E, regenerándose luego la vitamina E [4].

Compuestos misceláneos

Un antioxidante inusual debido a su estructura, es una dicetona de cadena larga (**52**) que ha sido encontrada en la cera de las hojas de especies de *Eucalyptus*. Esta inhibió la baja autooxidación del ácido linoléico. Compuestos similares han sido reportados como estabilizadores de polímeros como el polibutadieno; su actividad ha sido atribuida a la intercepción de la luz UV por la forma enólica de la dicetona, seguido de un rearrreglo intramolecular y reconversión a su estado basal [4].

Un monoterpeno glicosidado, ácido geniposídico (**53**), aislado de la *Plantago asiatica*, es tan efectivo o similar a la acción del BHT o del BHA, para inhibir la oxidación por medio del aire del ácido linoléico. Los experimentos que relacionan la actividad con la estructura de varios compuestos glicosídeos parecidos, llevan a pensar que tanto la presencia del grupo carboxilo como la del sustituyente en el anillo de cinco miembros son importantes determinantes de la actividad antioxidante [4].

Hay varios reportes de lípidos complejos, como los fosfolípidos, que tienen actividad antioxidante. Es posible que estos compuestos actúen quelatando las trazas de metales que pueden iniciar la oxidación. Los lípidos pueden tener diferentes sustituyentes lo que hace diferente también su actividad [4].

Las estructuras de estos compuestos misceláneos se encuentran en la figura 12.

BIBLIOGRAFIA

1. Feneman, O. (1993) **Química de los Alimentos**. Editorial Acribia S.A., España.
2. Torel, J.; Cillard, J.; Cillard, P. (1986) *Phytochemistry* **25**, 383.
3. Hidalgo, M.E.; Fernández, E.; Quihot, W.; Lissi, E. (1994) *Phytochemistry* **37**, 1585.
4. Larson, R.A. (1988) *Phytochemistry* **27**, 969.
5. Fauré, M.; Lissi, E.; Torres, R. (1990) *Phytochemistry* **29**, 3773.
6. Duke, J. (1988) **Handbook of Medicinal Herbs**. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
7. Burton, G.W.; Ingold, K.U. (1981) *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 6472.
8. McClure, J.W. (1993) en **The Flavonoids: Advance in research since 1986**, (Harborne, J.B.; Mabry, T.J.; Mabry, H.; Eds.), Chapman & Hall, London.
9. Masuda, T.; Isobe, J.; Jitoe A. (1992) *Phytochemistry* **31**, 3645.
10. Masuda, T.; Isobe, J.; Jitoe A. (1993) *Phytochemistry* **32**, 1557.
11. Larson, R.A.; Marley, K.A. (1984) *Phytochemistry* **23**, 2351.
12. Gorman, A.A.; Hamblett, Y.; Smith, K.; Standen, M.C. (1984) *Tetrahedron Letters* **25**, 581.
13. Howard, J. A.; Yamada, T. (1981) *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 7102.
14. Marcuse, R. (1960) *Nature* **186**, 886.
15. Burton, G.W.; Ingold, K. U. (1984) *Science* **224**, 569.