



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA



**EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA INTERACCIÓN ANTIOXIDANTE-ZINC EN
REACCIONES ANTIRRADICALARIAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACOBIOLOGA

PRESENTA:

SANDRA ZANABRIA HERNANDEZ

ASESORES:

DOCTOR EN QUÍMICA MARIO ARMANDO GÓMEZ HURTADO

DOCTORA EN QUÍMICA GABRIELA RODRÍGUEZ GARCÍA

Morelia, Michoacán.

Febrero de 2017.

ÍNDICE

Símbolos, abreviaturas y acrónimos.....	i
Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 Radicales libres.....	3
2.2 Antioxidantes.....	7
2.3 Ferulato de bornilo.....	12
2.4 Ácido ascórbico.....	13
2.5 Interacción farmacológica.....	13
3. Justificación.....	18
4. Objetivos.....	19
4.1 Objetivo general.....	19
4.2 Objetivos particulares.....	19
5. Metodología.....	20
6. Discusión de resultados.....	22
6.1 Ensayo de captura de radicales libres mediante el método de DPPH....	29
7. Conclusiones.....	33
8. Parte experimental.....	34
8.1 Métodos instrumentales.....	34
8.2 Materia vegetal.....	34
8.3 Obtención de extracto.....	34
8.4 Cromatografía de extracto.....	35

8.5 Materiales y reactivos.....	35
8.6 Análisis químico.....	35
8.7 Ensayo de captura DPPH.....	36
9. Bibliografía.....	37

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

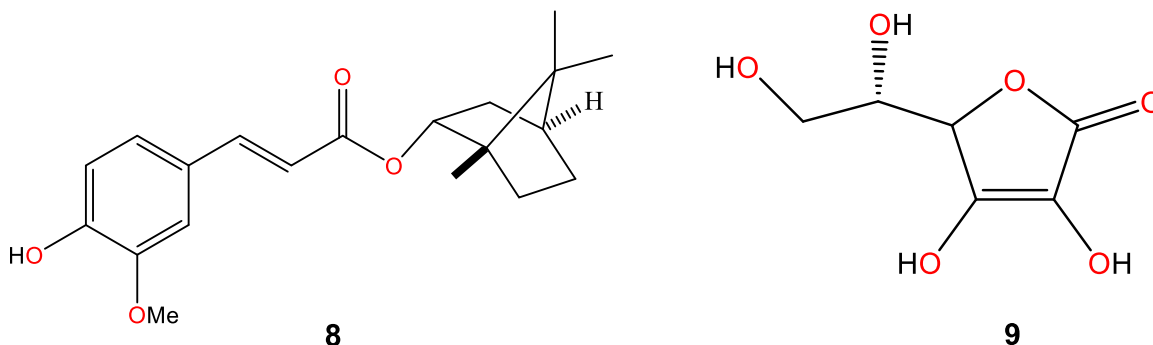
°C	Grados Celsius
δ	Desplazamiento químico
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromolar
AcOEt	Acetato de etilo
COSY	CORrelation SpectroscopY
d	Señal doble
dd	Señal doble de dobles
ddd	Señal doble de dobles de dobles
dddd	Señal doble de dobles de dobles de dobles
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
g	Gramos
HETCOR	Heteronuclear Correlation Spectroscopy
Hz	Hertz
CE ₅₀	Concentración efectiva 50
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
km	Kilometro
m	Señal múltiple
MeOH	Metanol
mg	Miligramo

MHz	Mega Hertz
Min	Minutos
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OMe	Grupo metoxi
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN de ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN de ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
s	Señal simple
TMS	Tetrametilsilano

RESUMEN

Existen diversos compuestos que inactivan a las denominadas especies reactivas de oxígeno (EROs) y las especies reactivas de nitrógeno (ERNs), estos compuestos son conocidos como antioxidantes, los cuales pueden encontrarse en una gran variedad de especies vegetales, incluyen estructuras como flavonoides, antocianinas, cumarinas, lignanos, catequinas, isocatequinas, fenoles, entre otros. Dentro de la familia de las asteráceas, se encuentra el género *Verbesina* de donde se han aislado compuestos fenólicos. De la especie *V. parviflora* existe el antecedente del aislamiento de un éster de borneol en buenos rendimientos. Por otro lado, se ha descrito que la incorporación de metales en estructuras de algunos compuestos orgánicos con actividad biológica potencializa o modifican su actividad.

En el presente trabajo se aisló al ferulato de borneol (**8**) a partir del extracto hexánico de raíces de *Verbesina parviflora*, su estructura se caracterizó por RMN de 1D y 2D. La evaluación de su potencial antirradicalario por el método de DPPH se llevó a cabo, mostrando una moderada capacidad de neutralización de DPPH. Este estudio también se llevó a cabo con ácido ascórbico (**9**) así como con las mezclas de **8**-ZnCl₂ y **9**-ZnCl₂ en proporción 1:1 (peso-peso), los resultados de estos ensayos mostraron una significativa influencia del ZnCl₂, a concentraciones bajas.

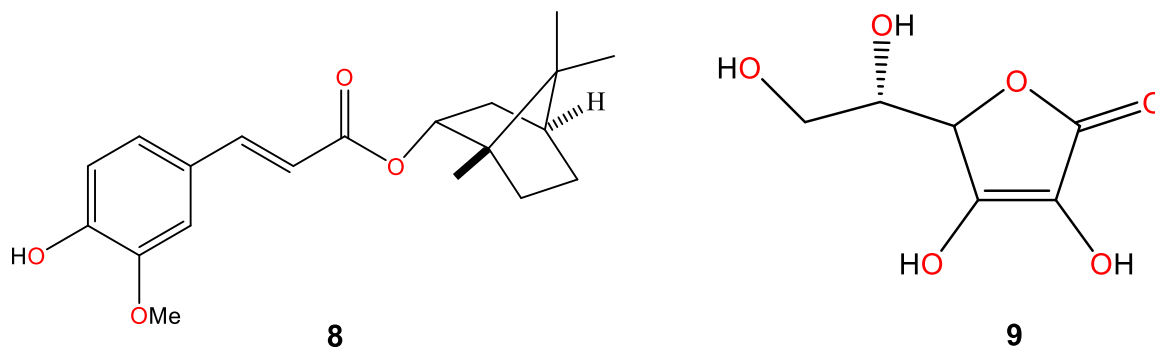


Palabras clave: Antioxidante, ferulato de borneol, ácido ascórbico, DPPH.

ABSTRACT

Several Reactive Oxygen Species (ROS) and Reactive Nitrogen Species (RNS) neutralizer compounds exist, and they are known as antioxidants and found in a wide variety of vegetal species; chemical structures as flavonoids, anthocyanins, coumarins, lignans, catechins, isocatechins, phenolics, among others, are included. The *Verbesina* genus belongs to the Asteraceae family, and the isolation of phenolic compounds from these plants is described. The presence of bornyl ester derivatives in good yields from *V. parviflora* is reported. On the other hand, the metal incorporation in biological active organic compounds revealed the increase or modification of its biological activity.

In this work, the isolation of bornyl ferulate (**8**) from the hexanic extract from the roots of *V. parviflora* is described, its structural characterization by 1D and 2D NMR spectra was determined. The antiradical potential of **8** by DPPH assays was defined. The radical capture studies with ascorbic acid (**9**), as well as the **8**-ZnCl₂ and **9**-ZnCl₂ mixtures at 1:1 (w/w) ratio were also performed, resulting significant influence by ZnCl₂ in all assays in the lower experimental concentrations.



Keywords: Antioxidant, bornyl ferulate, ascorbic acid, DPPH.

1. INTRODUCCIÓN

Los radicales libres son producidos continuamente en nuestro organismo como parte del metabolismo celular en algunas reacciones oxidativas, son conocidos como especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERNs). Nuestras células cuentan con sistemas antioxidantes de defensa que le permiten mantener en bajas concentraciones dichas especies y así evitar el daño oxidativo sobre las macromoléculas biológicas. La excesiva producción de EROs por los fagocitos juega un papel fisiológico muy importante en la protección del organismo contra muchas infecciones. Así, los radicales constituyen verdaderas armas químicas para la destrucción de los agentes infecciosos; sin embargo, cuando se pierde el equilibrio oxidante-antioxidante y se genera el denominado estrés oxidativo se dañan macromoléculas esenciales para llevar a cabo las funciones normales de una célula, lo cual se puede traducir en diversos procesos patológicos. Algunos ejemplos de patologías asociadas al estrés oxidativo que aquejan al ser humano y que actualmente se han vuelto tan comunes son la artritis reumatoide, aterosclerosis, diabetes, cáncer, hipertensión, enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson (Valko *et al.*, 2007; Moskovitz *et al.*, 2002).

Dado que es muy difícil evitar el estrés oxidativo por el ritmo de vida actual, y debido a que en las grandes ciudades predominan factores que agravan o incluso que lo inducen (contaminantes del aire y radiaciones), se han venido desarrollando alternativas terapéuticas basadas en productos farmacéuticos, eficientes para disminuir los radicales libres (Labieniec & Gabryelak, 2005); pero más eficientes han resultado los fitofármacos o metabolitos secundarios provenientes de especies vegetales a las cuales se les atribuye un alto potencial antioxidante, actividad atribuible a la presencia de flavonoides, isoflavonas, flavonas, antocianinas, cumarinas, lignanos, catequinas, isocatequinas y fenoles. (Prior *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2004; Kaur & Kapoor, 2002).

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos más abundantes de biomoléculas presentes en especies vegetales, son sustancias químicas que

poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, y pueden incluir otros grupos funcionales, como ésteres, glicósidos, entre otros (Cartaza & Reynaldo, 2001). Dentro de la familia de las asteráceas, las cuales pueden encontrarse en casi todas las altitudes y regiones climáticas del mundo dada su alta capacidad de adaptabilidad, se encuentra el género *Verbesina* de donde se han aislado compuestos fenólicos. De la especie *V. parviflora* existe el antecedente en nuestro grupo de trabajo del aislamiento de un éster de borneol (Cruz, 2011) el cual en su estructura presenta un grupo fenol; el cual podría ser usado para la incorporación de metales, ya que se ha descrito que algunos compuestos orgánicos con actividad biológica, al ser utilizados como ligandos y coordinarse a un centro metálico potencializan o modifican esa actividad (Garima, 2011).

En el presente trabajo se describe el aislamiento, purificación y caracterización del ferulato de bornilo (**8**) a partir del extracto hexánico de raíces de *Verbesina parviflora* así como su potencial antirradicalario por el método de DPPH. Este estudio también se llevó a cabo mezclando a **8** con ZnCl_2 en proporción 1:1 (peso-peso). El mismo estudio se describe para el ácido ascórbico (**9**). Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. Este es el primer estudio en el que se evalúa la reactividad de antioxidantes orgánicos frente a un radical libre en presencia de una sal metálica.

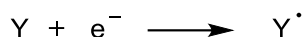
2. ANTECEDENTES

2.1 Radicales libres

Los radicales libres son moléculas o fragmentos moleculares que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, esto los hace muy inestables y extraordinariamente reactivos, con una enorme capacidad para combinarse con otras moléculas (Halliwell *et al.*, 1989).

Los mecanismos de formación de los radicales libres son tres:

- a) Transferencia electrónica, en la que se produce la cesión de un electrón a una molécula neutra.



- b) Pérdida de un electrón de un no radical.



- c) Ruptura homolítica de un enlace covalente de cualquier molécula, de manera que cada fragmento obtenido conserva uno de los electrones apareados del enlace.



Una vez que se ha formado el radical libre en la reacción de iniciación, éste tiene la capacidad de ceder el electrón a cualquier otro compuesto, originándose nuevos radicales, lo cual constituye la reacción de propagación en cadena que puede amplificarse tanto, que llegue a afectar a los tejidos corporales (Emina, 2008; Venereo & Justo, 2002).

Los radicales libres existen como derivados de muchos elementos o moléculas químicas, los más importantes desde el punto de vista biológico son los derivados del oxígeno (EROs) y del nitrógeno (ERNs) (Cárdenas & Pedraza, 2006), en la tabla 1 se enlistan algunos ejemplos, en donde se incluyen especies radicales y neutras. Estas especies se producen en animales y vegetales en condiciones

fisiológicas y patológicas (Evans & Halliwell, 2001), pueden actuar de dos maneras (Mitjavila *et al.*, 2001):

-Desestabilizando las moléculas que se encuentran a su alrededor para buscar su estabilidad.

-Actuando como mediadores en procesos fisiológicos en nuestro organismo.

Teniendo en cuenta lo anterior estas moléculas son necesarias para desencadenar procesos metabólicos importantes.

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

	Radicales	Neutras
Especies reactivas de oxígeno (EROs)	Superóxido (O_2^-)	Peróxido (H_2O_2)
	Hidroxilo (OH)	Ácido hipocloroso (HOCl)
	Peroxilo (RO_2)	Ácido hipobromoso (HOBr)
	Alloxilo (RO)	Ozono (O_3)
	Hidroperóxilo (OH_2)	Oxígeno singulete (1O_2)
Especies reactivas de nitrógeno (ERNs)	Óxido nítrico (NO)	Ácido nitroso (HNO_2)
	Dióxido de nitrógeno (NO_2)	Catión nitrosilo (NO^+)
	Anión nitroxilo (NO^-)	
	Peroxinitrito ($ONOO^-$)	
	Ácido peroxinitroso ($ONOO^-$)	
	Alquil peroxinitrito ($ROONO$)	

La generación de radicales libres puede ocurrir de manera endógena en nuestro metabolismo a través de cuatro procesos celulares:

a) Respiración, proceso esencial para la vida, en el transcurso normal de la respiración aeróbica, las mitocondrias consumen O_2 reduciéndolo en varias etapas a H_2O . Inevitablemente, a lo largo de este proceso aparecen subproductos como el O_2^- , H_2O_2 y $^{\cdot}OH$ (Ames *et al.*, 1998).

b) Las células fagocíticas (leucocitos neutrófilos, macrófagos y eosinófilos) al activarse por medio de mediadores proinflamatorios o de productos bacterianos, víricos o de parásitos, destruyen las células infectadas por medio de un ataque oxidativo en el que se producen grandes cantidades de radicales libres (Figura 1) (Forman & Torres, 2001).

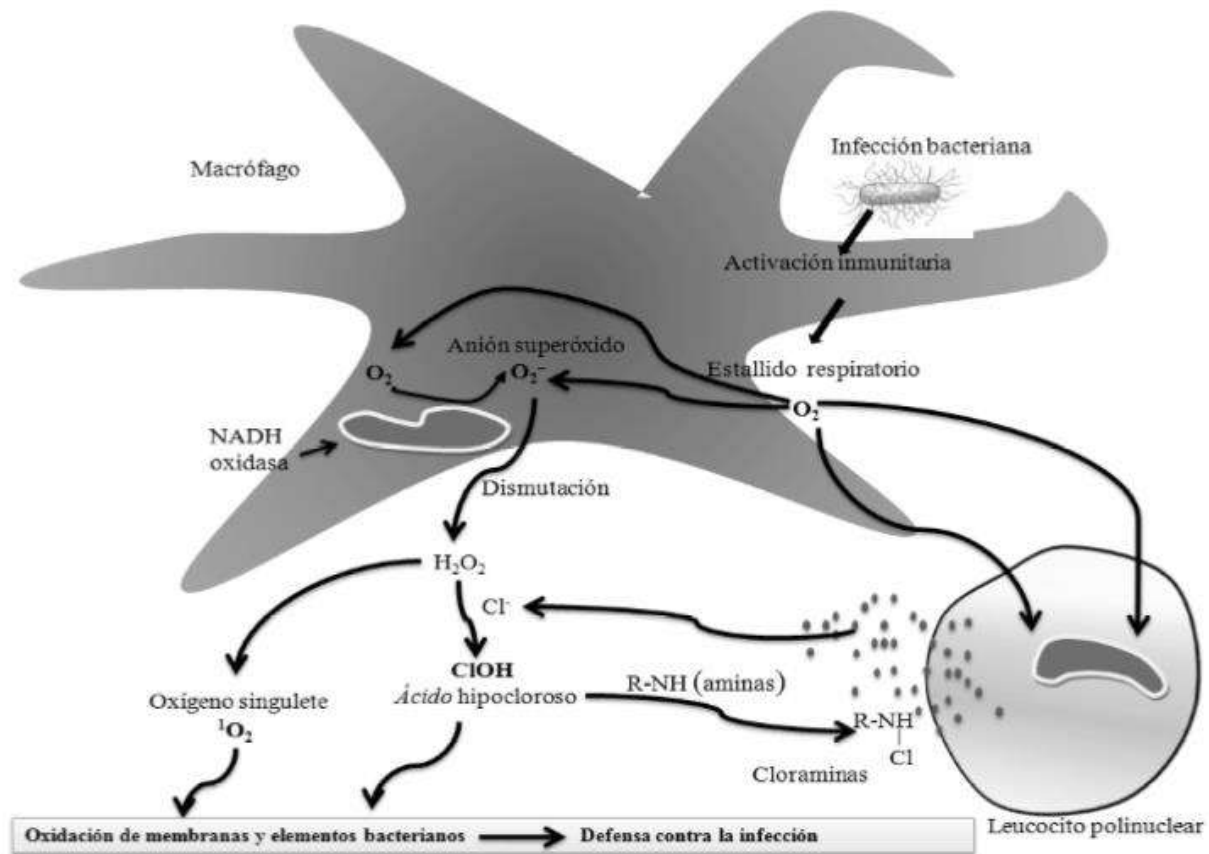


Figura 1. Representación esquemática del proceso respiratorio. Modificado de Maldonado *et al.*, 2010.

c) Los peroxisomas, orgánulos encargados de la degradación de ácidos grasos y otras moléculas, producen como subproducto H_2O_2 , que es degradado de forma natural por la enzima catalasa (Kasai *et al.*, 1989).

d) Las enzimas del complejo Citocromo P450, son las principales responsables del metabolismo oxidativo de los xenobióticos. La inducción de estas enzimas previene los efectos de toxicidad aguda de agentes extraños al organismo (Zangar *et al.*, 2004).

Por otra parte, las fuentes exógenas son ajenas a nuestro metabolismo, estas se generan de manera externa por factores que incluyen los alimentos que ingerimos a través de la dieta, el ambiente, y la obtención de nuevos productos a lo que se ve expuesto nuestro organismo (Lachance *et al.*, 2001; Fina, 2006; Dreosti, 2000).

Si bien es cierto que los radicales libres son elementos fundamentales en el metabolismo, también constituyen un riesgo, especialmente para las células y las biomoléculas, como los ácidos nucleicos, las proteínas, polisacáridos y lípidos (Figura 2).

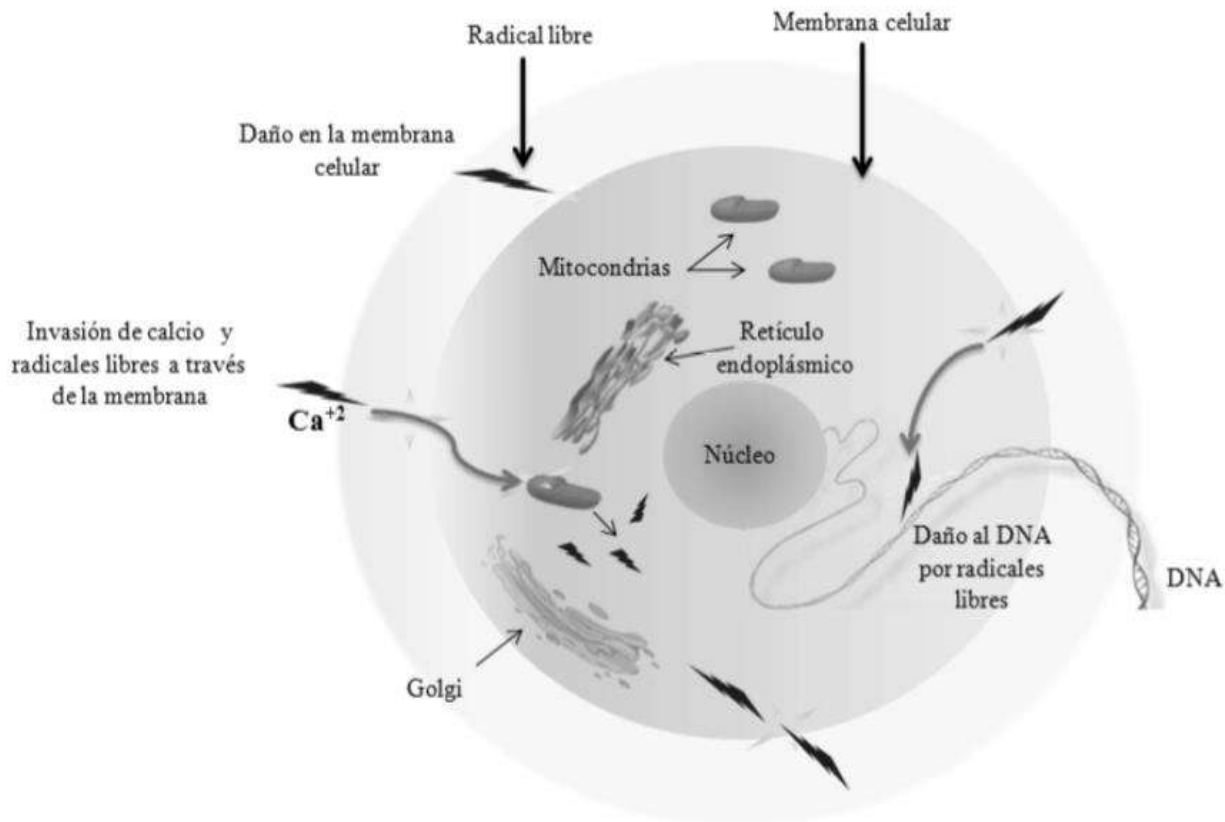


Figura 2. El daño celular provocado por radicales libres. Modificado de Maldonado *et al.*, 2010.

Conforme se ha ido profundizando en el conocimiento de los radicales libres, se ha descubierto que están asociados a muchas patologías en el ser humano, incluyendo procesos reumáticos, patologías de tipo gastroentéricas, renales, neurológicas, endócrinas, broncopulmonares, entre muchas otras; las más destacadas son las cardiopatías, cáncer y diabetes (Valko *et al.*, 2007; Moskovitz *et al.*, 2002).

2.2 Antioxidantes

Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno en procesos bioquímicos para obtener energía liberan radicales libres, lo cual es incompatible con la vida a

menos que existan mecanismos celulares de defensa que los neutralice. A estas defensas se les denomina antioxidantes que pueden definirse como toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato (Halliwell *et al.*, 1989). El antioxidante al colisionar con el radical libre le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un radical débil no tóxico y que en algunos casos como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. El sistema de defensa antioxidante juega un papel muy importante, controlando procesos provocados y derivados por los radicales libres, generan un tipo de desintoxicación radical (Thomas, 1994; Halliwell *et al.*, 1998).

Es posible distinguir entre aquellos antioxidantes que son normalmente biosintetizados por el organismo (endógenos) y aquellos que ingresan a través de la dieta (exógenos) (García *et al.*, 2001). Algunos ejemplos se aprecian en la tabla 2.

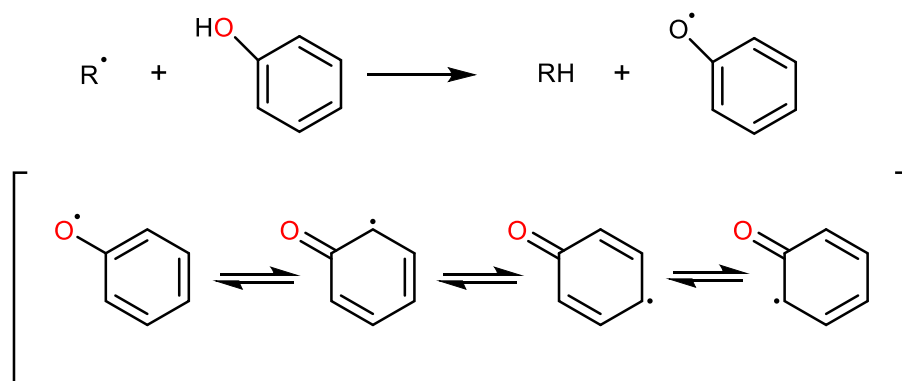
Tabla 2. Ejemplos de antioxidantes.

Exógenos	Endógenos
Vitamina E	Glutación
Vitamina C	Ácido tiótico
Betacaroteno	Coenzima Q
Flavonoides	Superóxidodismutasa
Licopeno	Glutaciónperoxidasa

Cuando el sistema de defensa celular, integrado por antioxidantes de carácter endógeno, no logra contrarrestar el efecto oxidante provocado por los radicales libres, estos provocan un desequilibrio generando enfermedades complejas como por ejemplo el cáncer (Valko *et al.*, 2001; Valko *et al.*, 2006), diabetes (Wiernsperger, 2003) y Alzheimer (Butterfield *et al.*, 2002).

Por lo anterior, es pertinente la búsqueda de sustancias que disminuyan y contrarresten los efectos adversos de los radicales libres en nuestro organismo, esto ha conllevado a la sociedad al uso de productos naturales como por ejemplo el té verde, las frutas y verduras contempladas como nutraceuticos (Kikuzaki *et al.*, 1991; Jitoe *et al.*, 1992; Kikuzaki & Nakatani, 1993; Lee *et al.*, 2003). El uso de plantas con capacidad antioxidante, también ha sido descrito, cuya actividad es atribuible a la presencia de flavonoides, isoflavonas, flavonas, antocianinas, cumarinas, lignanos, catequinas, isocatequinas y fenoles. (Prior *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2004; Kaur & Kapoor, 2002).

La actividad antioxidante de los fenoles depende de la aromaticidad, de los efectos de los sustituyentes en el anillo y la fuerza de las interacciones de enlaces de hidrógeno entre el fenol y el disolvente. El mecanismo de la reacción de los compuestos fenólicos generalmente se asocia a la labilidad del enlace oxígeno-hidrógeno del hidroxilo en el fenol; la ruptura de este enlace es homolítica, donde el radical hidrógeno es capaz de estabilizar el radical libre, mientras que el grupo fenóxido, por su estabilidad puede mantenerse hasta encontrar otra molécula análoga para reaccionar y neutralizarse por completo (Mastelic *et al.*, 2008).



Esquema 1. Mecanismo de reacción radicalaria de compuestos fenólicos antioxidantes.

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos más abundantes de biomoléculas presentes en especies vegetales, son sustancias químicas que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo incluyendo derivados funcionales (ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.) (Cartaza & Reynaldo, 2001). Esta variedad de compuestos pueden encontrarse en especies de la familia Asteraceae, en la que se incluyen especies del género *Verbesina*. Estudios químicos de estas especies han indicado la presencia de metabolitos secundarios funcionalizados con grupos fenólicos.

De los estudios químicos de este género realizados a *V. virginica* obtuvieron a los compuestos fenólicos, eudesmanoles esterificados con derivados del ácido *p*-cumárico (Xu *et al.*, 2010).

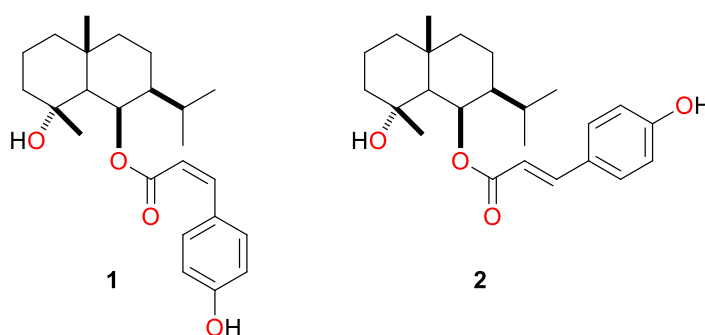


Figura 3. Eudesmanos reportados de *V. virginica*.

En extractos polares de *V. myricepala* se detectó la presencia de un flavonoide glicosilado, el cual fue identificado como rhamnocitrina-3-gucorónido (**3**) (Hildebert *et al.*, 1974).

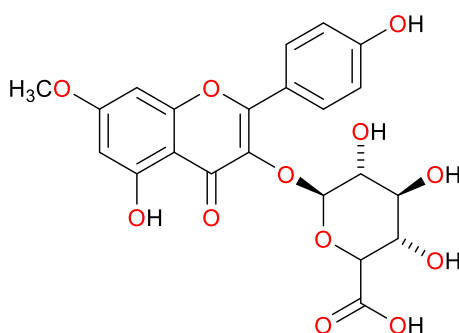


Figura 4. Rhamnocitrina-3-gucorónido (**3**).

Los estudios realizados en los extractos polares de flores y hojas de *V. encelioides* registraron la presencia de quercetina-3-galactósido (**4**), quercetina-3-galactósido-7glucósido (**5**) y quercetina-3-xylósido-7-glucósido (**6**) (Glennie *et al.*, 1980) (Figura 5).

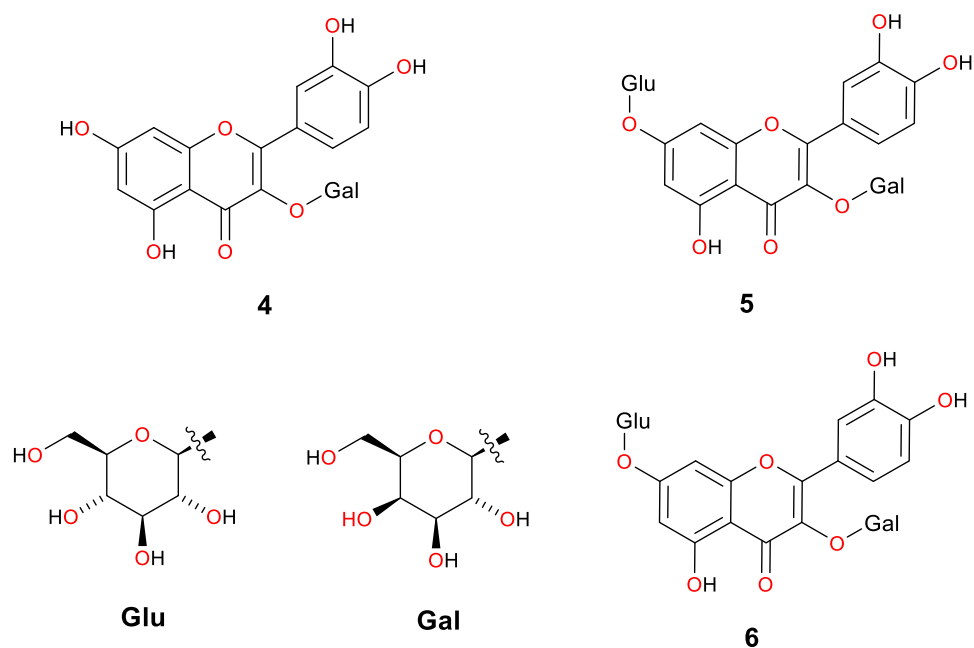


Figura 5. Flavonoides glicosilados de *V. encelioides*.

Por otra parte, se ha descrito el aislamiento de *p*-cumarato de bornilo a partir de *V. turbacensis* (Lobitz *et al.*, 1998) y *V. rupestris* (Box & Chan, 1975) (Figura 6).

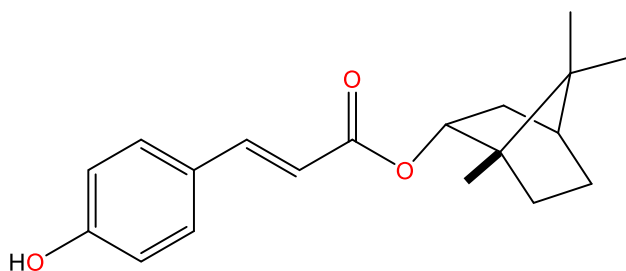


Figura 6. *p*-cumarato de bornilo (**7**).

2.3 Ferulato de bornilo

Es un metabolito secundario de tipo éster monoterpénico aislado de *Notopterygium incisum* (Zschocke *et al.*, 1997), *Conocephalum conicum* (Suire *et al.*, 1982; Lu *et al.*, 2006), *Valeriana hardwickii* (Chai *et al.*, 2015), *Aquilaria sinensis* (Yang *et al.*, 2012), *Myodocarpus gracilis* (Montagnac *et al.*, 1997), *Pinus ponderosa* (Himejima *et al.*, 1992; Fujii *et al.*, 1984). Dentro de la familia de las asteráceas se ha aislado de *Coreopsis mutica* (Maldonado *et al.*, 1998), *Smilanthus uvedalia* (Domínguez *et al.*, 1988) y del género *Verbesina* de especies como *enceloides* (Joshi *et al.*, 1983), *rupestris* (Box & Chan, 1975), *turbacensis* (Lobitz *et al.*, 1998) y *parviflora* (Cruz, 2011) (Figura 7).

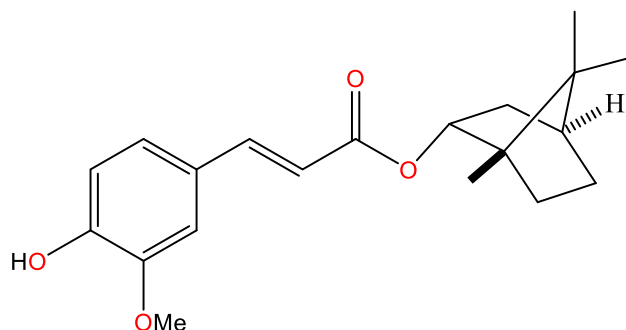


Figura 7. Ferulato de bornilo (8).

Este metabolito ha mostrado actividad antiinflamatoria (Maldonado *et al.*, 1998), inhibiendo las enzimas 5-lipoxigenasa (5-LO) y COX (Zschocke *et al.*, 1997; Lobitz *et al.*, 1998); antitumoral, mostrando una actividad moderada frente a células KB (Montagnac *et al.*, 1997) además de exhibir una alta citotoxicidad preferente contra las células PANC-1 y PSN1 (Li *et al.*, 2012).

2.4 Ácido ascórbico

Es un ácido orgánico, tiene estructura de lactona, un grupo alcohol primario y secundario, así como dos grupos hidroxilos enólicos (Figura 8). Estos últimos son importantes debido a la facilidad que presentan para oxidarse, debido a ello resultan excelentes grupos antioxidantes. El enantiómero L- del ácido ascórbico se conoce popularmente como vitamina C el cual es poco estable, por eso su contenido en alimentos disminuye con el almacenamiento de larga duración. Resulta inestable en soluciones neutras y alcalinas y cuando se expone al aire, la luz y el calor (Johnston, 2003).

El nombre "ascórbico" procede del prefijo a- (que significa "no") y de la palabra latina scorbuticus (escorbuto), una enfermedad causada por la deficiencia de vitamina C.

Dentro de la familia de este género se ha aislado por ejemplo de *Sonchus oleraceus* (Bruno *et al.*, 1980), *Cynara scolymus* (Alonso, 1998), *Eupatorium triplinerve* (Palacios, 1997).

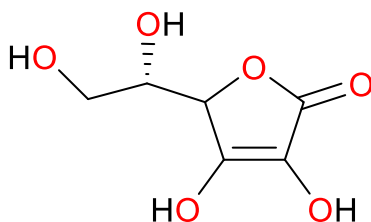


Figura 8. Ácido ascórbico (9).

2.5 Interacción farmacológica

Con el aumento de enfermedades complejas la necesidad de fármacos día a día es más alta, es por esto que se han empezado a implementar técnicas farmacológicas para lograr un efecto deseado con los medicamentos, por ejemplo, las combinaciones de analgésicos que se prescriben con frecuencia con el fin de mejorar el alivio del dolor y la reducción de los efectos adversos. Se ha

establecido que la administración de más de un medicamento puede dar efectos mayores o menores que el efecto de cada fármaco administrado individualmente (Cansier, 2003).

Una interacción farmacológica es la alteración en el efecto previsible de un fármaco que se produce por la administración de otro fármaco, alimento u otros agentes (Weideman *et al.*, 1999; Romac & Albertson, 1999). Las interacciones se clasifican en biofarmacéuticas, farmacocinéticas y farmacodinámicas (Molina *et al.*, 2007).

Las interacciones farmacodinámicas consisten en las modificaciones de los efectos de un fármaco por la presencia de otro, que aumente o disminuya la intensidad de la respuesta, lo cual produce sinergismo o antagonismo. Al aumento del efecto como resultado de la interacción debido a la adición de los efectos individuales de los fármacos involucrados, se le llama "sinergismo aditivo". De igual modo, se presenta el "sinergismo de potenciación" si el resultado del efecto es mayor que la suma del efecto de un solo fármaco. Por el contrario, ocurre "antagonismo" cuando hay una disminución del efecto como consecuencia de la combinación de fármacos (Corrie & Hardman, 2011).

Así, entonces, un ejemplo de sinergismo aditivo es: ampicilina + gentamicina, que genera aumento de la acción antibiótica (Cheryl, 2010). Sinergismo de potenciación: trimetoprim + sulfametoxazol, cuya mezcla potencia la actividad antimicrobiana. Antagonismo competitivo: salbutamol + propanolol. El primero produce estímulo de receptores beta y el segundo los bloquea; como resultado, se anula la acción del salbutamol. Antagonismo no competitivo: neostigmina + vecuronio. En esta combinación la neostigmina actúa revirtiendo la acción del relajante muscular porque inhibe la acetilcolinesterasa, de tal manera que no compite con el receptor (López *et al.*, 2008; Velasco, 2003)

Por otra parte, Garima (2011) describió que la incorporación de metales en estructuras de algunos compuestos orgánicos con actividad biológica, al ser

utilizados como ligandos y coordinarse a un centro metálico potencializan o modifican esa actividad.

Por ejemplo, a partir de derivados de alcanfor sintetizaron una serie de complejos empleando Fe(III), Co(II) y Cu(II) en donde estos presentaron mejor actividad antioxidante que el alcanfor libre (Choudhary *et al.*, 2011) (Figura 9).

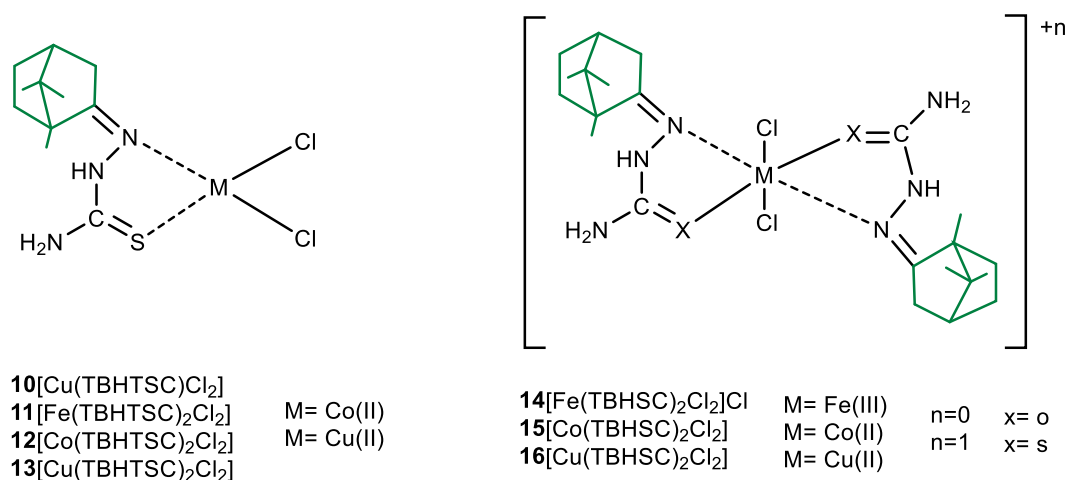


Figura 9. Estructuras de complejos metálicos con ligantes derivados de alcanfor.

Por su parte, los complejos de zinc y vanadio con alixin, un metabolito con actividad neurotrófica, mostraron efectos insulinoimiméticos significativos en modelos animales con diabetes mellitus tipo 1 y 2 (Adachi *et al.*, 2004; 2006) (Figura 10).

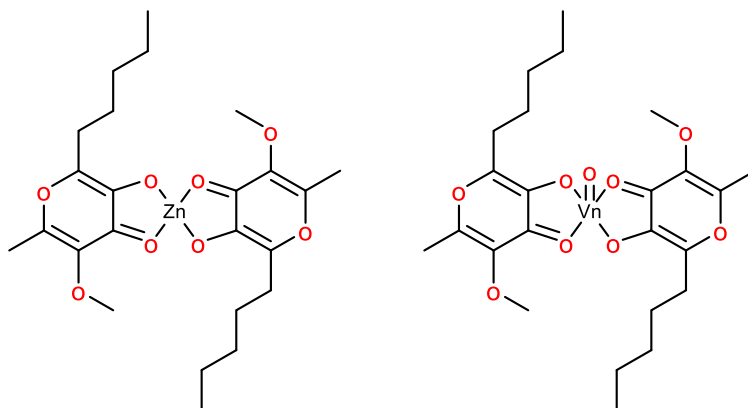


Figura 10. Complejos metálicos con alixinato.

El zinc es un elemento químico clasificado como metal de transición; su nombre proviene del alemán *zink*, que significa “diente o pico”. Se trata de un sólido color blanco azulado, dúctil y maleable a temperaturas mayores a 212 °C (Greenwood *et al.*, 2012). Este metal ocupa el 24° lugar de abundancia en la corteza terrestre (76 ppm) y sus principales minerales son el sulfuro (ZnS) y el carbonato de zinc (ZnCO₃) (Emsley, 2001). El zinc presenta como único estado de oxidación el 2+ que al tener su capa d completa no participa en reacciones de óxido-reducción (Burgess *et al.*, 2006).

El Zn(II) es un ión metálico de importancia biológica, se encuentra en más de 300 enzimas que intervienen en diversos procesos esenciales; como los dedos de zinc que participan en la transcripción del código genético para la síntesis de proteínas (García, 2006). Es el segundo ión metálico más abundante en las células animales y vegetales. El cuerpo humano contiene aproximadamente de 1.5 a 3 g de zinc; que regulan el crecimiento y desarrollo de numerosos sistemas funcionales, principalmente aquellos de carácter proliferativo como el sistema inmunológico, músculo esquelético, neuroendocrino, hormonal y reproductivo. Por lo tanto, una deficiencia de zinc en el organismo causa retraso en el crecimiento corporal, anorexia, hipoglucemia, alopecia, mala cicatrización, espermatogénesis defectuosa, ceguera nocturna, entre otras alteraciones (Salas, 2002).

Dicho lo anterior el zinc resulta ser un metal atractivo para la química de coordinación, y debido a que los metales pueden modificar la actividad biológica de compuestos orgánicos, se han sintetizado complejos de zinc con ligandos derivados del neral que al coordinarse a Cu(II), Zn(II), Cd(II), Hg(II) y Ni(II) han presentado propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes; resultando dos veces más activos los complejos de Zn(II) y Hg(II) que los ligantes libres (Sharma *et al.*, 2006; Halli *et al.*, 2013) (Figura 11).

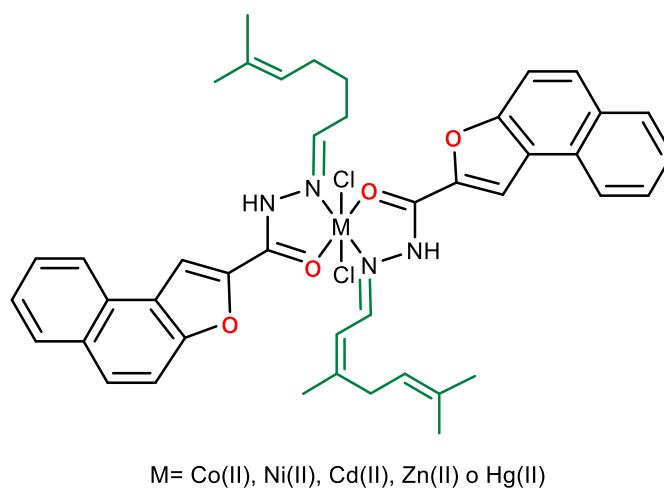
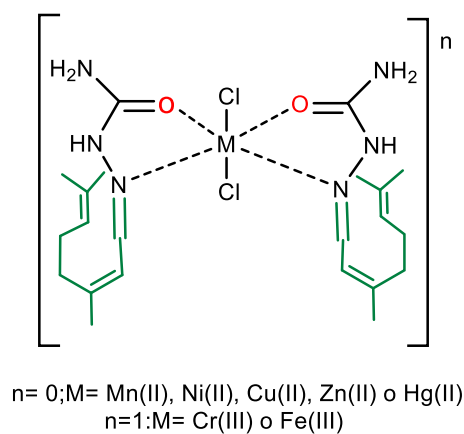


Figura 11. Complejos metálicos con ligandos derivados del neral.

De igual manera se ha reportado que al coordinarse a zinc la curcumina potencializa su actividad anticancerígena (Garima, 2011), de la misma forma sucede con la Bacitracina A (Craig *et al.*, 1969) y la Micacocidina (Ino *et al.*, 1999).

3. JUSTIFICACIÓN

A la fecha se ha reportado que los metales modifican la actividad biológica de compuestos orgánicos cuando estos se encuentran coordinados o ligados a un centro metálico; sin embargo, no se ha descrito la influencia de estos compuestos cuando se encuentran en mezcla con moléculas con algún potencial biológico. Es por esto que surge el interés de explorar el comportamiento antirradicalario del grupo fenol de la estructura del ferulato de bornilo y de los hidroxilos activos del ácido ascórbico en presencia de ZnCl_2 bajo ensayos colorimétricos de captura de radicales libres.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

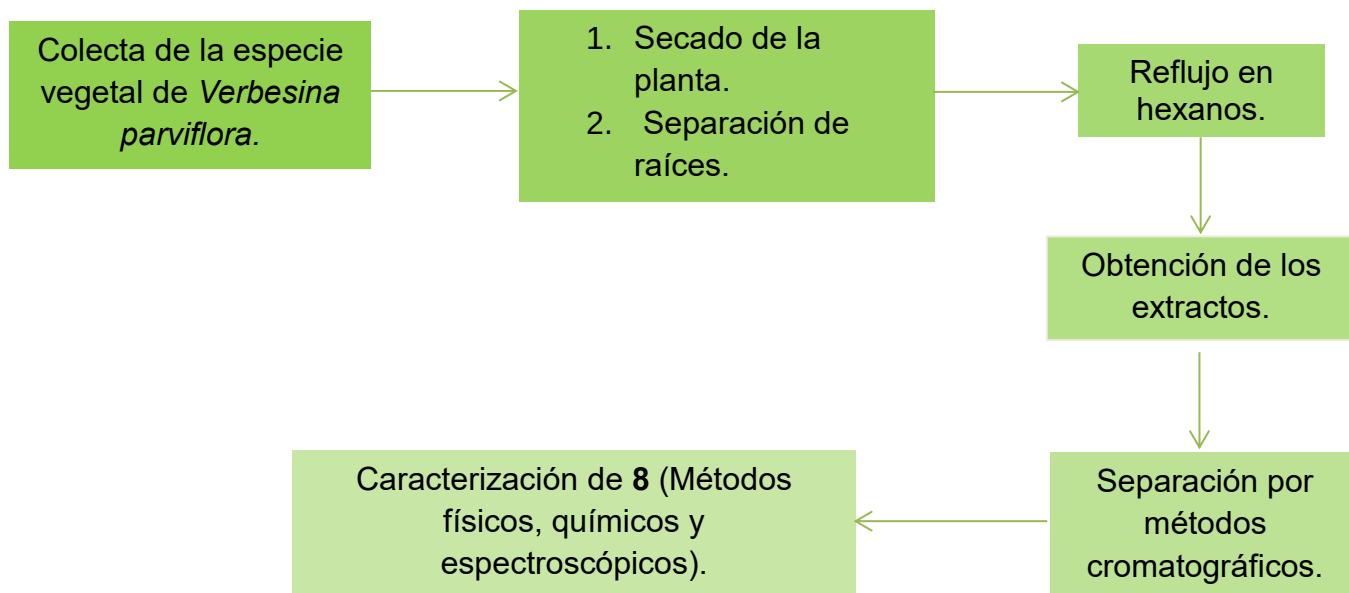
Evaluar la influencia que ejerce el ZnCl_2 en la capacidad antioxidante del ferulato de bornilo y del ácido ascórbico.

4.2 Objetivos particulares

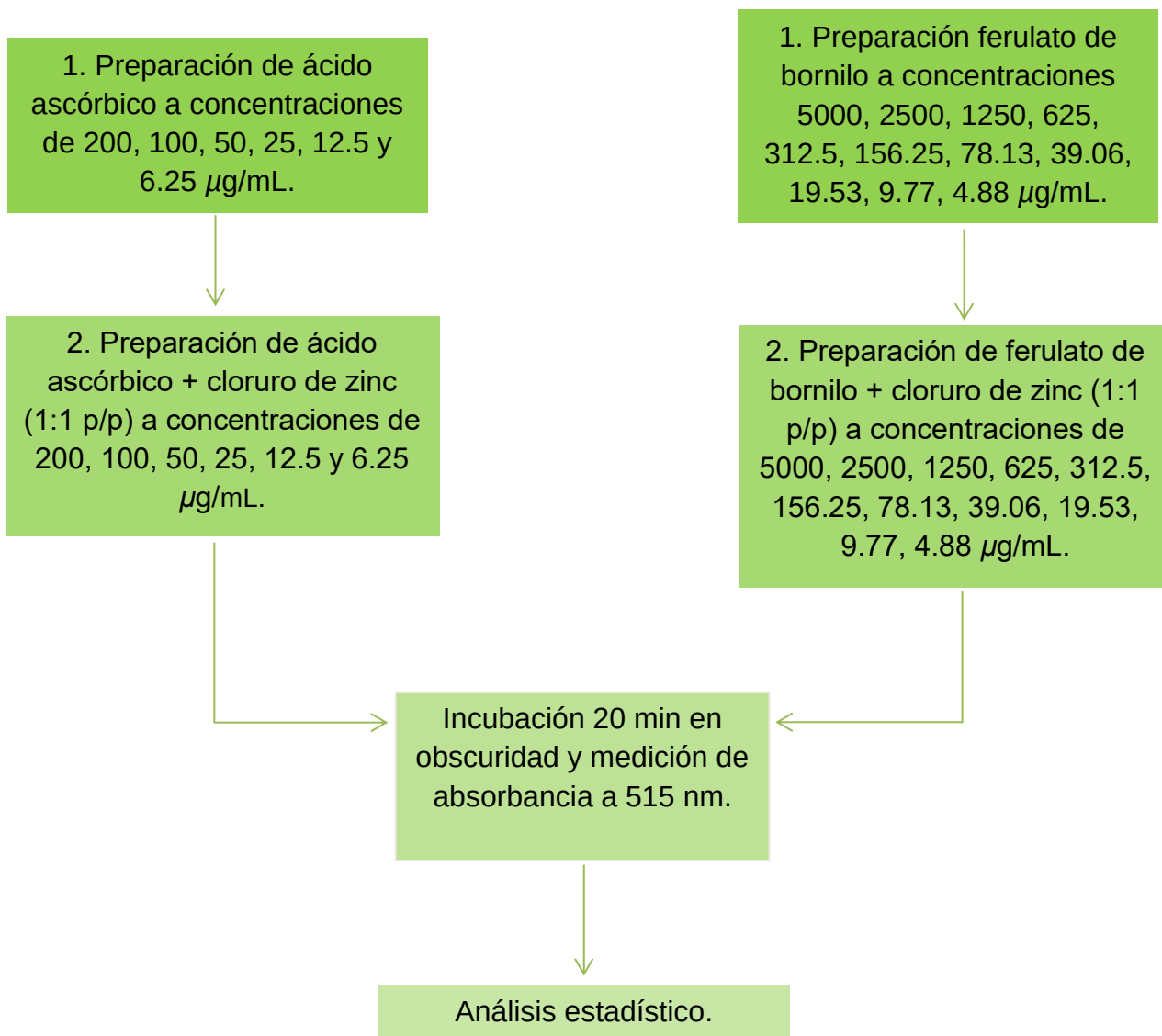
1. Aislar mediante técnicas cromatográficas a ferulato de bornilo a partir de *Verbesina parviflora*.
2. Caracterizar mediante técnicas cromatográficas el ferulato de bornilo.
3. Evaluar el potencial antioxidante del ferulato de bornilo en ausencia y presencia de ZnCl_2 mediante ensayos de captura de radical libre por el método de DPPH.
4. Evaluar la influencia de una sal metálica en el potencial antioxidante de un antioxidante por excelencia (ácido ascórbico).

5. METODOLOGÍA

La metodología para el desarrollo de este proyecto se resume en los esquemas 2 y 3.



Esquema 2. Diagrama de la metodología empleada para aislamiento y caracterización de ferulato de bornilo (8).



Esquema 3. Diagrama de la metodología empleada para ensayo de la actividad antioxidante mediante el método de DPPH.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La cromatografía en columna del extracto hexánico de raíces de *V. parviflora* permitió la obtención de un sólido beige. En su espectro RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) se observa en 7.60 y 6.32 ppm, las señales dobles $J = 15.9$ Hz pertenecientes a los protones vinílicos del doble enlace en posición *trans* H-3' y H-2', respectivamente; en 7.09 ppm destaca la señal doble de dobles que pertenece al protón aromático H-9' $J = 8.2, 1.9$ Hz; en 7.05 y 6.92 ppm aparecen las señales dobles de los protones aromáticos H-5' $J = 1.9$ Hz y H-8' $J = 8.2$ Hz; este grupo de señales confirmaron la presencia del grupo ferulato de la estructura; en 5.01 ppm se observa una señal doble de dobles de dobles $J = 10.0, 3.3, 2.0$ Hz, correspondiente a protón base de éster (H-2); entre 2.41-0.86 ppm se observan señales de protones alifáticos, las cuales revelan la presencia de una porción terpénica, destacando tres señales simples que integran para tres hidrógenos cada una, atribuidas a los metilos CH_3 -8, CH_3 -9 y CH_3 -10 en 0.94, 0.90 y 0.88 ppm, respectivamente (Figura 12). El espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), muestra veinte señales, en 167.7 ppm aparece la señal característica del carbono del carbonilo de éster (C-1'); entre 148.1-109.5 ppm se ubican las señales de los carbonos del anillo aromático y las de dos carbonos vinílicos (144.5 y 116.3 ppm); en 80.0 ppm se localiza la señal del carbono base de éster C-2; en 56.1 aparece la señal del carbono de grupo metoxilo, nueve señales de carbonos alifáticos aparecen entre 49.1-13.8 ppm (Figura 13). Las asignaciones de las señales en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C fueron confirmadas mediante experimentos bidimensionales y comparadas (Tabla 3) con los de la literatura (Maldonado *et al.*, 1998), resultando iguales para el ferulato de bornilo (**8**). Algunas correlaciones importantes entre protones vecinales se resaltan en el espectro COSY (Figura 14), se confirmó la correcta asignación de los carbonos hidrogenados mediante el experimento HETCOR (Figura 15) y la del *gem*-dimetilo del esqueleto de bornilo con el experimento NOESY (Figura 16).

Tabla 3. Comparación de desplazamientos químicos de RMN de ^1H y ^{13}C de ferulato de bornilo (**8**).

Posición	^1H Exp	^1H Ref	^{13}C Exp	^{13}C Ref
1'	-	-	167.7	167.0
2'	6.32 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)	6.31 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)	116.3	116.1
3'	7.60 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)	7.59 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)	144.5	144.3
4'	-	-	127.3	127.0
5'	7.05 (1H, d, $J = 1.9$ Hz)	7.05 (1H, d, $J = 1.5$ Hz)	109.5	109.3
6'	-	-	146.9	146.8
7'	-	-	148.1	147.8
8'	6.92 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)	6.91 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)	114.9	114.7
9'	7.09 (1H, dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz)	7.08 (1H, dd, $J = 8.2, 2.2$ Hz)	123.2	123.0
OMe	3.93 (3H, s)	3.93 (3H, s)	56.1	55.9
1	-	-	49.1	48.9
2	5.01 (1H, ddd, $J = 10.0, 3.3, 2.0$ Hz)	5.02 (1H, ddd, $J = 10.0, 3.3, 1.8$ Hz)	80.0	79.8
3	2.41 (1H, dddd, $J = 13.7, 10.0, 4.5, 3.4$ Hz, H-3a) 1.05 (1H, dd, $J = 13.7, 3.6$ Hz, H-3b)	2.41 (1H, dddd, $J = 13.8, 10.0, 4.0, 3.5$ Hz, H-3a) 1.05 (1H, dd, $J = 13.3, 3.3$ Hz, H-3b)	37.1	36.8
4	1.70 (1H, m)	1.71 (1H, m)	45.1	44.9
5	1.78 (1H, m, H-5a) 1.28 (1H, m, H-5b)	1.78 (1H, m, H-5a) 1.29 (1H, m, H-5b)	28.3	28.0
6	2.05 (1H, m, H-6a) 1.31 (1H, m, H-6b)	2.06 (1H, m, H-6a) 1.31 (1H, m, H-6b)	27.4	27.2
7	-	-	48.0	47.8
8	0.90 (3H, s)	0.90 (3H, s)	19.9	19.7
9	0.94 (3H, s)	0.94 (3H, s)	19.1	18.8
10	0.88 (3H, s)	0.88 (3H, s)	13.8	13.5

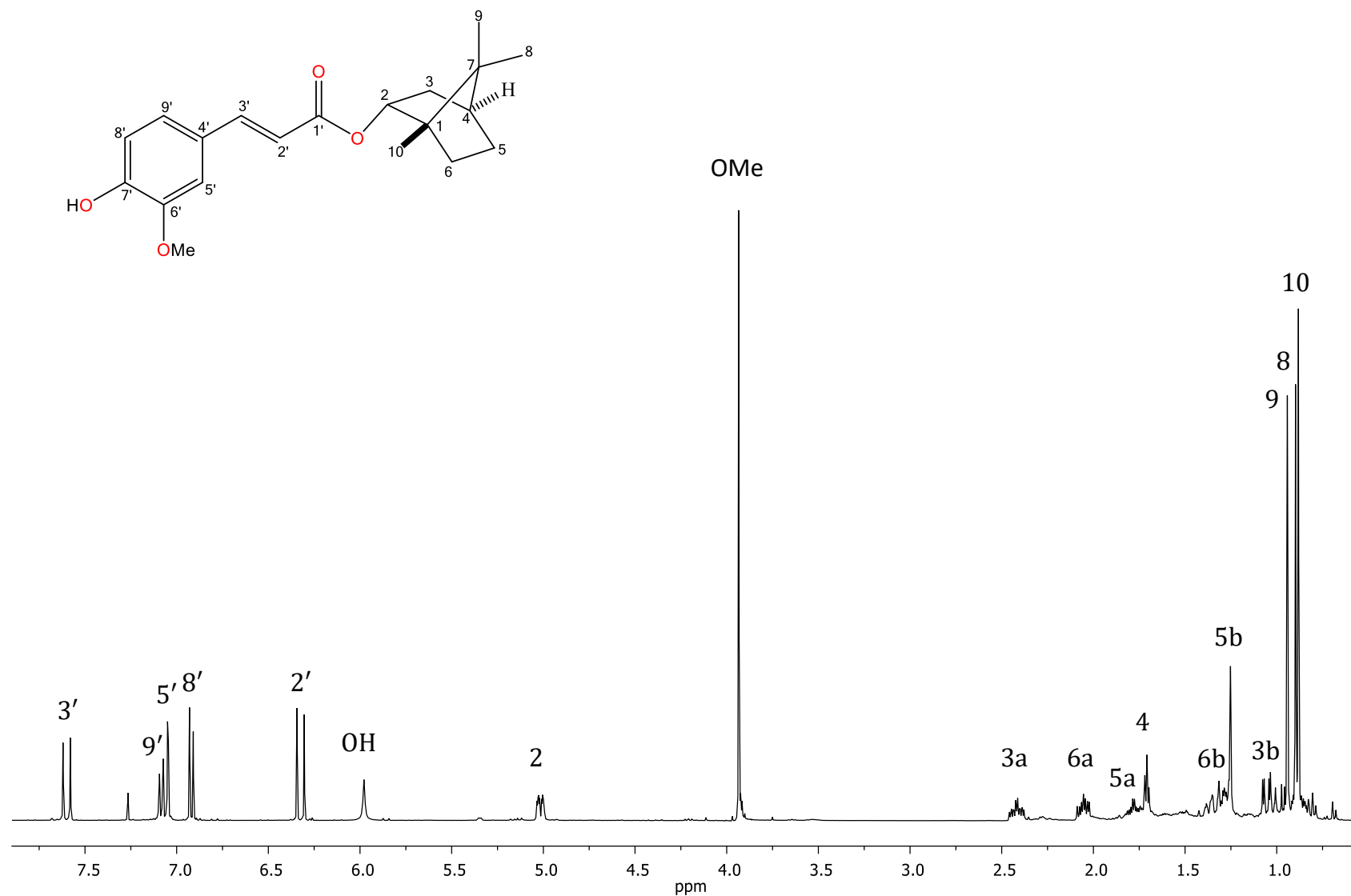


Figura 12. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz de **8**, en CDCl_3 .

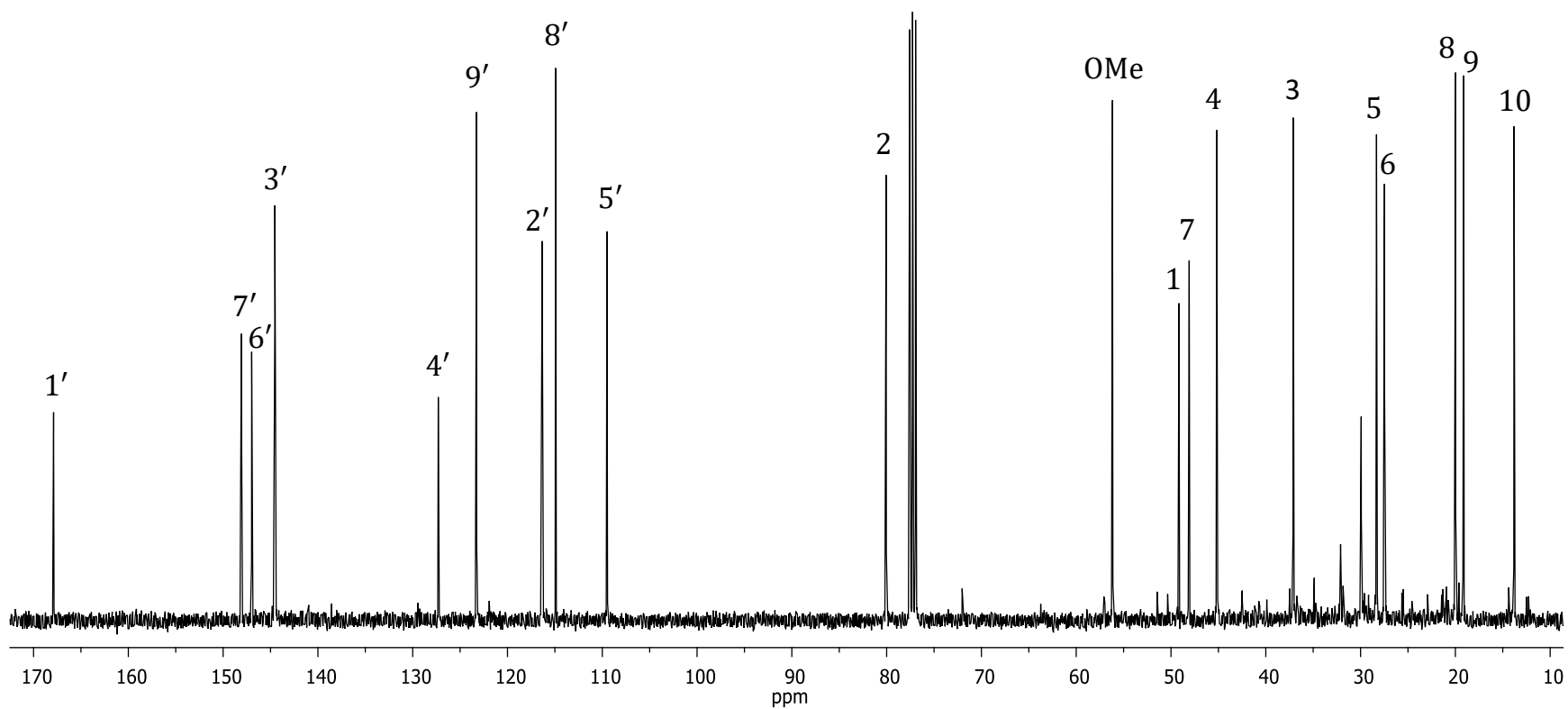
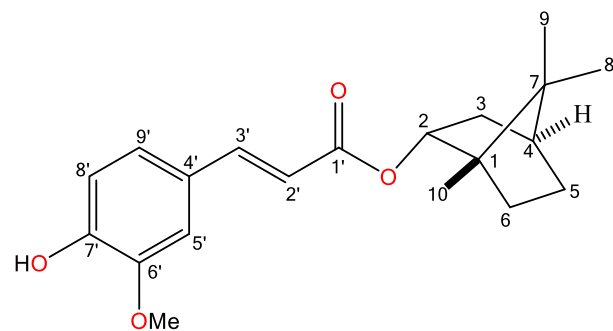


Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz de **8**, en CDCl_3 .

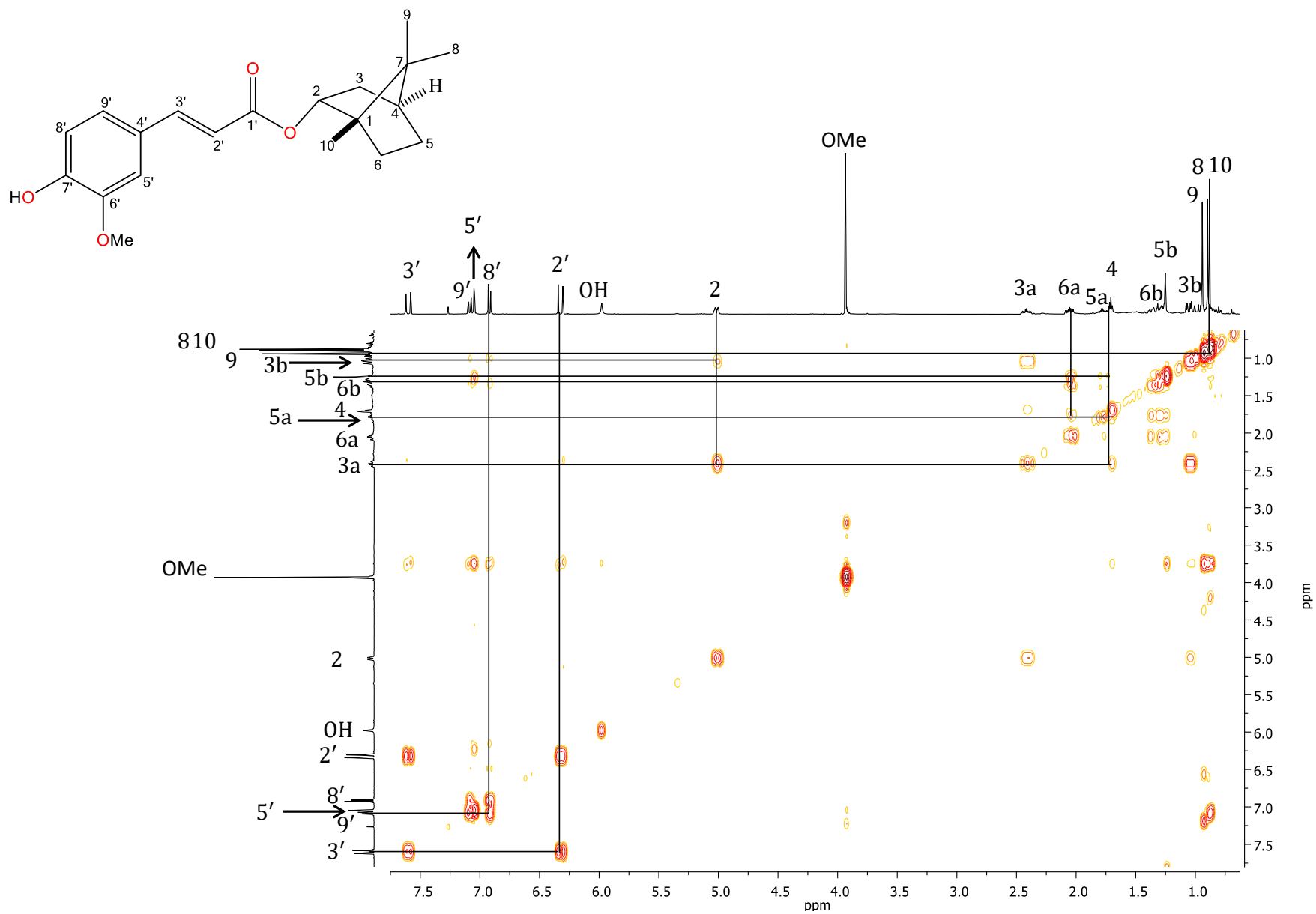
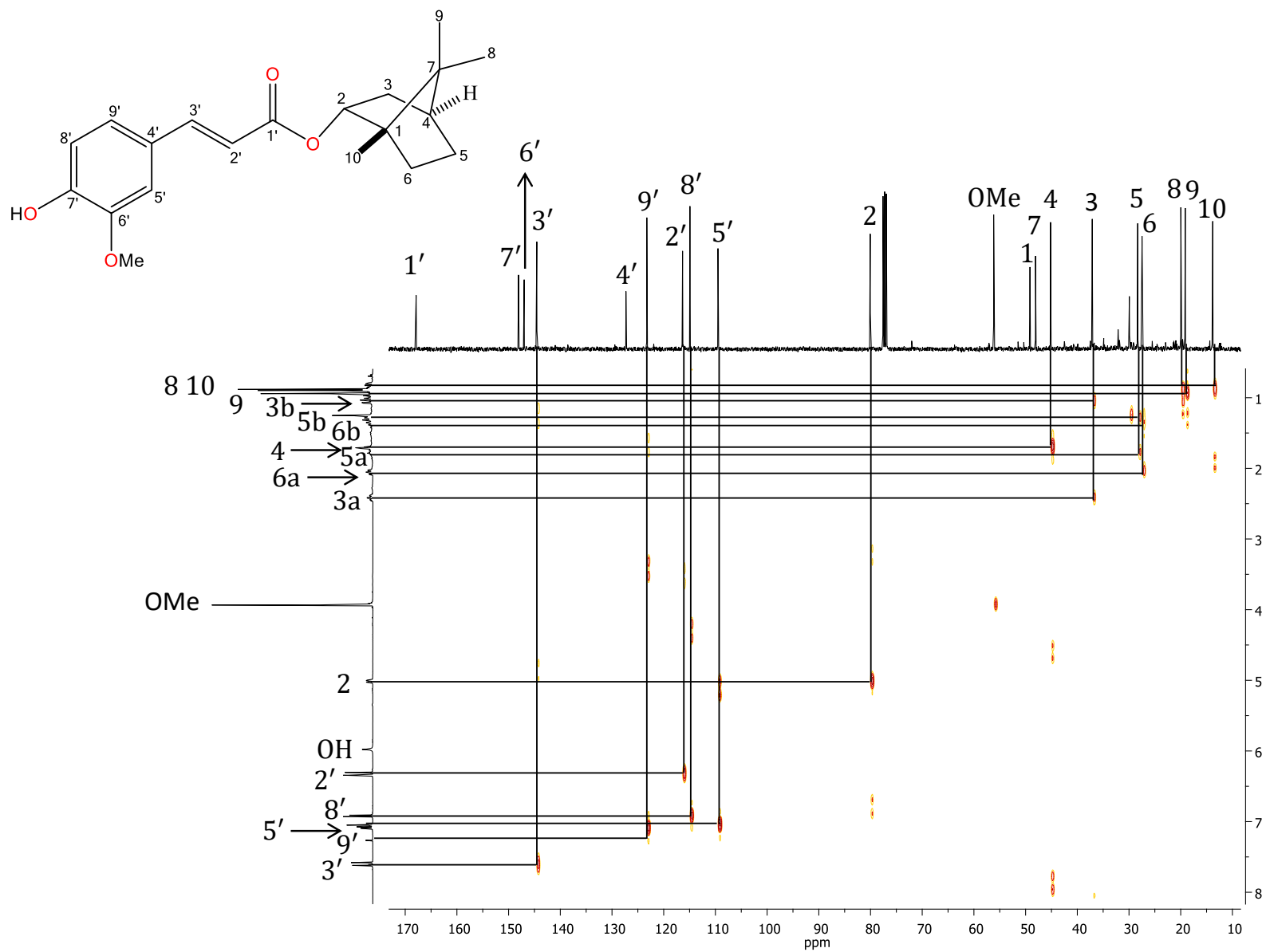


Figura 14. Experimento COSY del ferulato de bornilo (**8**).



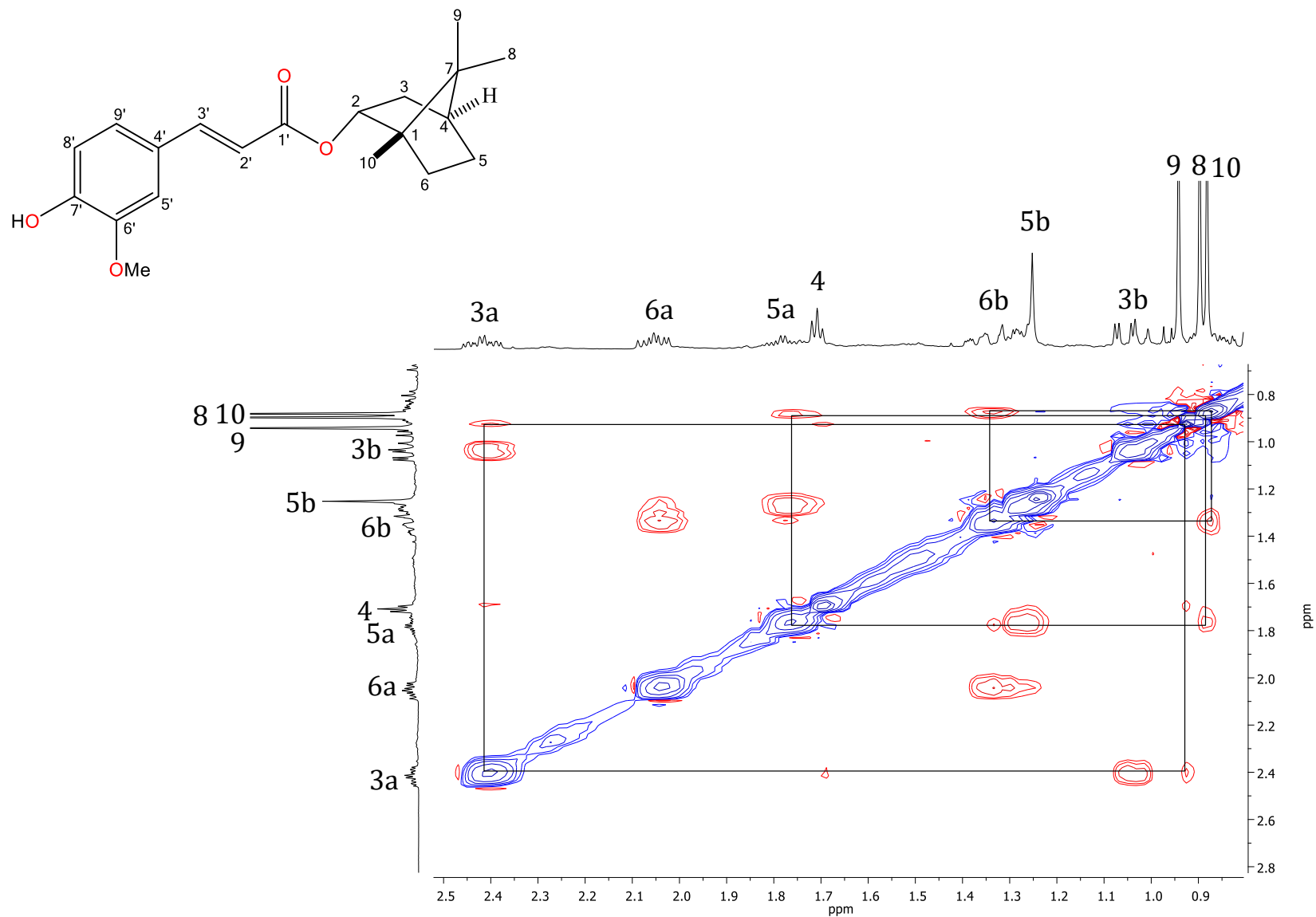


Figura 16. Experimento de correlación homonuclear (NOESY) del ferulato de bornilo (8).

6.1 Ensayo de captura de radicales libres mediante el método de DPPH

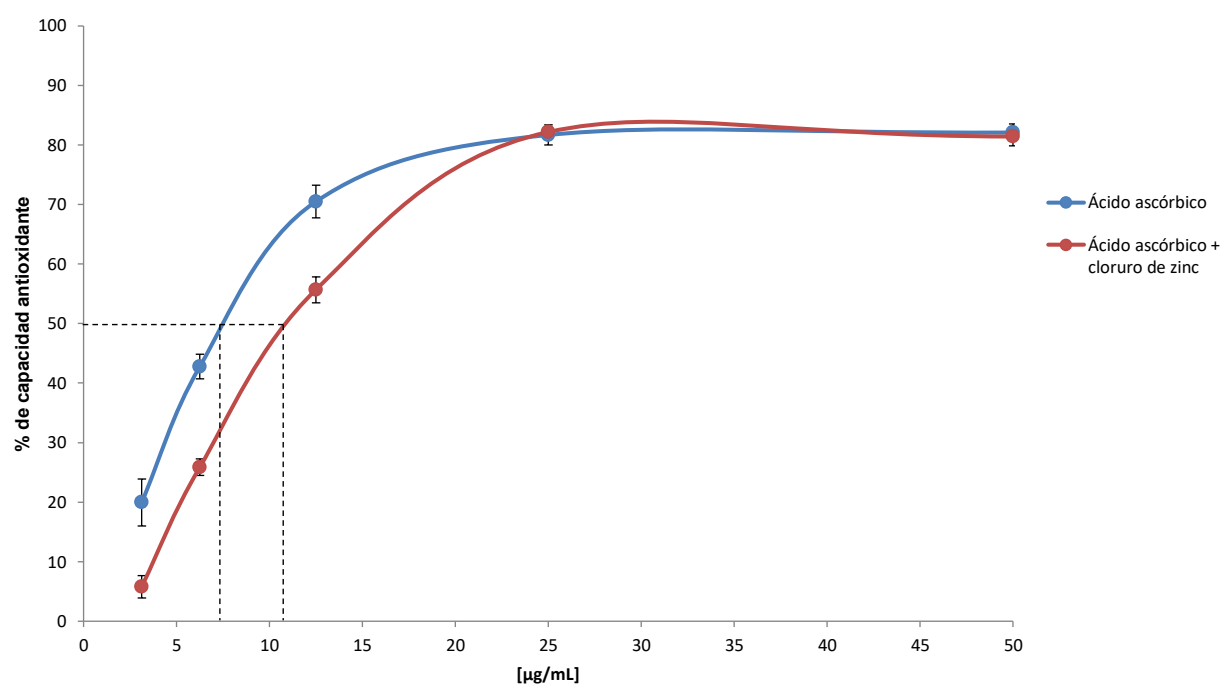
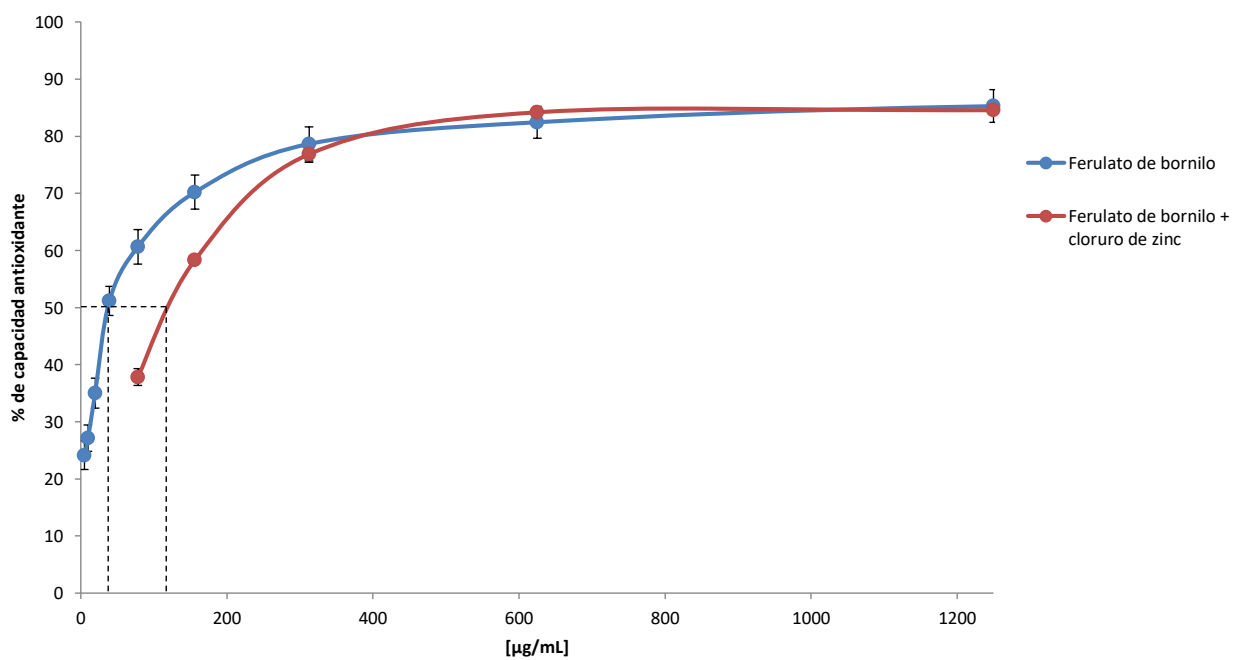
Con el ferulato de bornilo (**8**) aislado y el ácido ascórbico (**9**) se realizó un ensayo de captura de radicales libres por el método de DPPH en ausencia y presencia de cloruro de zinc. Se ensayó una curva control empleando el ácido ascórbico a concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 $\mu\text{g/mL}$ disuelto en DMSO. Bajo el mismo principio se realizó el ensayo con el compuesto **9** empleando concentraciones 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.25, 78.13, 39.06, 19.53, 9.77, 4.88 $\mu\text{g/mL}$ disuelto en $\text{MeOH-CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1). Por cada 192 μL de muestra se agregaron 8 μL de DPPH 5 mM; estas diluciones fueron preparadas en placa de 96 pocillos, se mantuvieron en reposo y agitación por 20 min en obscuridad y se midió la absorbancia a 515 nm. En este ensayo, el ácido ascórbico (**9**) mostró una CE_{50} de $7.49 \pm 2.4 \mu\text{g/mL}$ ($42.53 \mu\text{M}$) (Tabla 4 y gráfico 2) la cual coincide con la encontrada en la literatura (Chandra & Anju, 2014; Raghavendra *et al.*, 2013), mientras que el compuesto **8** mostró una moderada capacidad de neutralización de DPPH con una CE_{50} calculada de $35.93 \pm 2.5 \mu\text{g/mL}$ ($108.74 \mu\text{M}$) (Tabla 4 y gráfico 2). Posteriormente, se realizó el ensayo de la mezcla **8**- ZnCl_2 (1:1) y **9**- ZnCl_2 (1:1) peso-peso bajo las mismas condiciones empleadas con **8** y **9**, respectivamente. De igual manera, se llevó a cabo una curva con concentraciones de ZnCl_2 desde 5,000 hasta 4.88 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados de estos ensayos mostraron una considerable influencia del ZnCl_2 , únicamente en las concentraciones menores a partir de 312.5 $\mu\text{g/mL}$ para el ensayo **8**- ZnCl_2 y 25 $\mu\text{g/mL}$ **9**- ZnCl_2 , así la CE_{50} del ácido ascórbico de $42.53 \mu\text{M}$ aumentó a $62.19 \mu\text{M}$ y la CE_{50} del ferulato de bornilo de $108.74 \mu\text{M}$ aumentó a $356.82 \mu\text{M}$ (Tabla 5 y gráficos 1-2). El ensayo con ZnCl_2 mostró nula capacidad antirradicalaria en todas las concentraciones probadas. Cabe mencionar que los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y se validaron a partir de la curva obtenida del control positivo (ácido ascórbico).

Tabla 4. Resultados obtenidos en el ensayo de captura de radicales libres por el método de DPPH.

Muestra	Captación de radicales libres DPPH CE₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Captación de radicales libres DPPH CE₅₀ (μM)
Ácido ascórbico (9) (curva control)	7.49 $\pm$ 2.4	42.53
Ferulato de bornilo (8)	35.93 $\pm$ 2.5	108.74

Tabla 5. Resultados obtenidos en el ensayo de captura de radicales libres por el método de DPPH adicionado el cloruro de zinc.

Muestra	Captación de radicales libres DPPH CE₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Captación de radicales libres DPPH CE₅₀ (μM)
Ácido ascórbico (9) + Cloruro de zinc	10.95 $\pm$ 1.8	62.19
Ferulato de bornilo (8) + Cloruro de zinc	117.90 $\pm$ 1.9	356.82

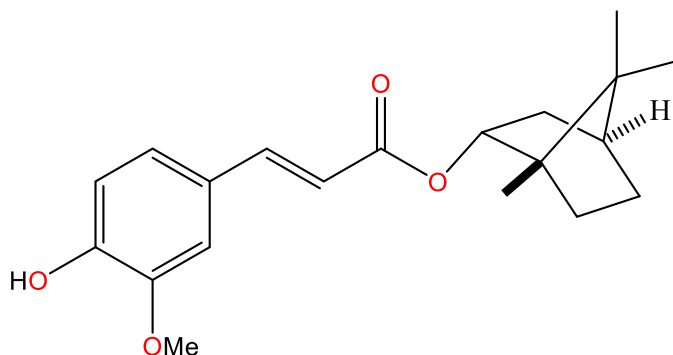


Estos resultados permiten proponer posteriores ensayos para determinar el tipo de efecto que ejerce el zinc hacia los compuestos estudiados, ya que con los experimentos realizados y los resultados presentados vislumbra una influencia interesante del metal-antioxidante que se ve reflejado en el comportamiento inusual del antioxidante en el ensayo de captura de radicales libres mediante el método de DPPH.

Además de que se sabe que muchos productos comerciales contienen aditivos para incrementar su calidad, entre ellos vitaminas como el ácido ascórbico y minerales como el zinc, por lo que el estudio de las interacciones entre estos compuestos para entender su comportamiento en mezcla puede avizorarse como prometedor a partir de los resultados obtenidos en este trabajo.

7. CONCLUSIONES

Del extracto hexánico de raíces de *Verbesina parviflora* se aisló a ferulato de bornilo (**8**).



Al compuesto **8** aislado se le realizó un ensayo de captura de radicales libres por DPPH, mostrando una moderada actividad antioxidante con una CE_{50} calculada de $108.74 \mu\text{M}$.

Segundo ensayo de captura de radicales libres por DPPH realizado a **8** y **9** en mezcla con una sal metálica, mostró que el metal modifica la capacidad antioxidante de ambos; sin embargo, para definir y comprender el tipo de interacción es necesario realizar más estudios.

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1 Métodos instrumentales

Los espectros de RMN de ^1H a 400 MHz y ^{13}C a 100 MHz, así como los diagramas bidimensionales de correlación COSY, HETCOR y NOESY se determinaron en un espectrofotómetro Varian Mercury Plus 400. En todas las determinaciones se utilizó como disolvente CDCl_3 y como referencia interna tetrametilsilano (TMS). Los espectros se procesaron en el programa de computo MestReNova.

Los puntos de fusión se obtuvieron mediante el instrumento Fisher Scientific, los cuales no están corregidos.

Las mediciones de potencial antioxidante, fueron realizadas en un espectrofotómetro de luz Ultravioleta-Visible, Biotek[®] modelo ELx808, a una longitud de onda de 515 nm, operando por el programa de computo Gen versión 2.01.14. Los parámetros estadísticos de las absorbancias medidas, se determinaron, utilizando una hoja de cálculo Microsoft Office Excel[®] (2010).

8.2 Materia vegetal

La especie vegetal de *Verbesina parviflora*, se colectó el mes de julio de 2012 en el Km 3.5 de la carretera Tiripetío-Acuitzeo del Canje. La planta fue identificada por el Dr. J. Rzedowski, conservando un ejemplar en el herbario de Instituto de Ecología Pátzcuaro A.C.

La planta se separó en sus distintas partes, para este estudio se usó la raíz y se secó a la sombra 8 días.

8.3 Obtención de extracto

Un lote de 1585 g de raíz seca y triturada se sometió a extracción por el método de reflujo con hexanos durante 6 horas, este proceso se realizó tres veces, posteriormente se llevó a evaporación del disolvente en rotavapor obteniéndose 6.18 g de extracto.

8.4 Cromatografía del extracto

La separación de los compuestos se realizó en columna cromatográfica de vidrio de diámetro de 3.0 cm; la fase estacionaria empleada fue gel de sílice 60 (230-400 mallas) de la marca MERK®, hexanos y mezclas de hexanos- CH_2Cl_2 como fase móvil. La cromatografía fue monitoreada por medio de cromatografía en capa fina.

8.5 Materiales y reactivos

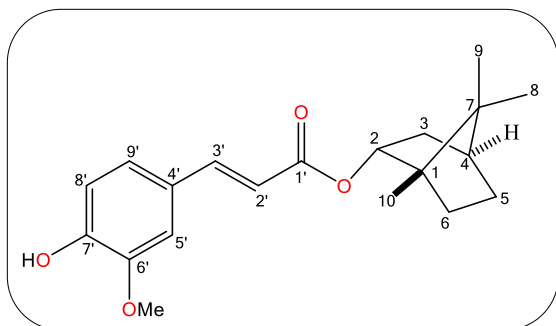
Se utilizaron micropipetas simples y multicanal de la marca Transferpette®, y placas de 96 pocillos costar®.

El ZnCl_2 se adquirió de manera comercial de la marca Fermont; mientras que la fuente de ácido ascórbico fue adquirido de casa comercial Farmacia MIER. Todos los reactivos anteriores fueron usados sin recibir un tratamiento posterior.

Los disolventes utilizados durante el proceso fueron destilados en el laboratorio.

8.6 Análisis químico

Ferulato de bornilo (8).



De las fracciones 78-137 en la polaridad (7:3) hexanos- CH_2Cl_2 se obtuvieron 900 mg de un sólido beige, punto de fusión de 88-90 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) y de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) Ver tabla 3.

8.7 Ensayo de captura DPPH

Se pesaron 10 mg de compuesto **8** y cloruro de zinc, posteriormente se colocaron en un tubo Eppendorf, el compuesto **8** se disolvió en 200 μL de MeOH-AcOEt (1:1); el cloruro de zinc se disolvió en 200 μL de MeOH. De ambas preparaciones se tomaron 100 μL y se diluyeron en 400 μL de MeOH para obtener una concentración de 50,000 $\mu\text{g/mL}$. Manejando una relación peso-peso se disolvieron 10 mg de ácido ascórbico (**9**) en 1 mL de DMSO, y 10 mg de cloruro de zinc en 1 mL de MeOH por separado; nuevamente de estas disoluciones se tomaron 100 μL , se colocaron en otro tubo Eppendorf y se disolvieron en 400 μL de MeOH quedando una concentración de 2,000 $\mu\text{g/mL}$. Para realizar el ensayo de los compuestos sin presencia de la sal metálica se tomaron 40 μL de muestra de cada uno de los compuestos depositándolos en el primer pocillo de las primeras filas de la placa de 96 pocillos, posteriormente se adicionaron 20 μL de MeOH en las siguientes seis filas de canales de la placa, se tomaron 20 μL de la muestra de la primera fila y se fueron pasando a las cinco filas posteriores, quedando seis filas con 20 μL de muestra las cuales se disolvieron con 172 μL de MeOH; en la fila número siete se colocaron 192 μL de MeOH siendo el control negativo. Se adicionó a cada canal de las siete filas 8 μL de DPPH 5 mM para obtener un volumen total de 200 μL , quedando en diluciones para **8** de 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.25, 78.13, 39.06, 19.53, 9.77, 4.88 $\mu\text{g/mL}$ y para **9** de 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 $\mu\text{g/mL}$. Se dejó la placa sobre hielo cubriéndola de la luz por 20 min. Trascurrido ese tiempo, se tomó la lectura de absorbancia a 515 nm. Por último, para el ensayo de las mezclas de **8** y **9** con cloruro de zinc se llevó a cabo la misma metodología con la variante de agregar junto con los 40 μL de los compuestos, otros 40 μL de las soluciones preparadas de cloruro de zinc respectivamente a la concentración de los compuestos ensayados anteriormente, se llevaron las diluciones en placa y se adicionaron 8 μL de DPPH 5 mM para completar los 200 μL .

Los ensayos se realizaron por triplicado y se determinó el promedio de la concentración, la CE_{50} y el error estándar.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi Y., Yoshida J., Koderá Y., Kato A., Yoshikawa Y., Kojima Y., Sakurai H.; A new insulin-mimetic bis(allixinato)zinc(II) complex: structure–activity relationship of zinc(II) complexes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* (2004) 9: 885-893.
- Adachi Y., Yoshida J., Koderá Y., Katoh A., Takada J., Sakurai H.; Bis(allixinato)oxovanadium(IV) complex is a potent antidiabetic agent: Studies on structure–activity relationship for a series of hydroxypyrrone–vanadium complexes. *Journal of Medicinal Chemistry* (2006) 49: 3251-3256.
- Alonso J. R.; Tratado de fitomedicina bases clínicas y farmacológicas. Ed. ISIS, Buenos Aires, Argentina (1998): 222-227.
- Ames B.; Micronutrients prevent cancer and delay aging. *Toxicol Letters* (1998) 102: 5-18.
- Box V. G. S., Chan W. R.; Terpenoids from *Verbesina rupestris*. *Phytochemistry* (1975) 14: 583.
- Bruno S., Amico A.; Vitamin C content of edible and medicinal plants of the Apulian region. *Bollettino-Societa Italiana Biologia Sperimentale* (1980) 56: 2067-2070.
- Burgess J., Prince R. H.; Encyclopedia of Inorganic Chemistry. Wiley (2006).
- Butterfield D. A., Castegna A., Lauderback C. M., Drake J.; Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death neurobiol. *Neurobiology of Aging* (2002) 23: 655-664.
- Cárdenas R. N., Pedraza C. J.; Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación química* (2006) 17: 164-173.

- Cai Y., Luo Q., Sun M.; Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Science Journal* (2004) 74: 2157-2184.
- Cansier A.; Environmental standards: Combined exposures and their effects on human beings and their environment. Springer (2003).
- Cartaza O., Reynaldo I.; Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales* (2001) 22: 5-14.
- Chai S. W., Zhai Y. S., Wang M. Y.; Chemical constituents from whole plants of *Valeriana hardwickii*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* (2015) 40: 4007-4011.
- Chandra S. T., Goyal A.; Antioxidant activity by DPPH radical scavenging method of *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves. *American Journal of Ethnomedicine* (2014) 1: 244-249.
- Cheryl A.; Antibiotics and Pharmacotherapeutics in the Neonate. *Newborn and Infant Nursing Reviews* (2010) 10: 203-208.
- Choundary A., Sharma R., Nagar M., Mohsin M., Meena H. S.; Synthesis, Characterization and antioxidant activity of some transition metal complexes whit terpenoid derivaties. *Journal of the Chilean Chemical Society* (2011) 56: 911-917.
- Corrie K., Hardman J.; Mechanisms of drug interactions: pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* (2011) 12: 156-159.
- Craig L. C., Phillips W. F., Burachik M., Bacitracin A.; Isolation by counter double-current distribution and characterization. *Biochemistry* (1969) 8: 2348-2356.
- Cruz S. A.; Estudio químico y actividad antimicrobiana de *Verbesina parviflora*. Tesis de licenciatura presentada en la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH (2011).

- Dominguez X. A., Hafez S., Slim J.; Cadinene derivatives from *Smallanthus uvedalia*. *Phytochemistry* (**1988**) 27: 1863-1865.
- Dreosti I. E.; Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition* (**2000**) 16: 692-694.
- Emina Č.; New markers of oxidative damage to macromolecules. *Journal medical brasovean* (**2008**) 27: 1-16.
- Emsley J.; Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements. Oxford University Press (**2001**).
- Evans P., Halliwell B.; Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *British Journal of Nutrition* (**2001**) 85: 67-74.
- Fina B.; Estrés oxidativo. Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral. Facultad de ciencias médicas-UNR-Rosario, Argentina (**2006**).
- Forman H. J., Torres M.; Redox signaling in macrophages. *Molecular Aspects of Medicine* (**2001**) 22: 189-216.
- Fujii R., Zinkel D. F.; Minor components of *ponderosa pine* oleoresin. *Phytochemistry* (**1984**) 23: 875-878.
- García B. L., García G. L. V., Domínguez D. M. R., Sánchez G. E.; Plantas con propiedades antioxidantes. *Revista cubana de investigaciones biomédicas* (**2001**) 20: 231-235.
- García C. C.; Las versátiles proteínas zinc fingers. *Revista Química Viva* (**2006**) 1: 8-18.
- Garima M.; Increased anticancer activity of curcumin-Zn (II) complex by species sensitive method. *Der Chemica Sinica* (**2011**) 2: 91-99.
- Glennie C. W., Jaint S. C.; Flavonol 3, 7-diglycosides of *Verbesina encelioides*. *Phytochemistry* (**1980**) 19: 157-158.

- Greenwood N. N., Earnshaw A.; Chemistry of the Elements. Elsevier (2012).
- Halli M. B., Sumathi R. B.; Synthesis, physico-chemical investigations and biological screening of metal (II) complexes with Schiff base derived from naphthofuran-2-carbohydrazide and citral. *Arabian Journal of Chemistry* (2013).
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C.; Free radical in biology and medicine. Oxford, Clarendon (1989).
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C.; Free radical in biology and medicine. 3a Ed, Oxford University Press (1998).
- Hildebert W., Aprameya M., Seligmann O.; Rhamnocitrin-3-glucuronid in *verbescina myricephala*. *Phytochemistry* (1914) 13: 493-494.
- Himejima M., Hobson K. R., Otsuka T., Wood D. L., Kubo I.; Antimicrobial terpenes from oleoresin of *ponderosa pine* tree *Pinus ponderosa*: A defense mechanism against microbial invasion. *Journal of Chemical Ecology* (1992) 18: 1809-1818.
- Ino A., Hasegawa Y., Murabayashi A.; Synthetic studies of thiazoline and thiazolidine-containing natural products-2. Total synthesis of the antimycoplasma antibiotic micacocidin. *Tetrahedron* (1999) 55: 10283-10294.
- Jitoe A., Masuda T., Tengah I. G. P.; Antioxidant activity of tropical ginger extracts and analysis of the contained curcuminoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1992) 40: 1337-1340.
- Johnston C. S.; Vitamina C. Conocimientos actuales sobre nutrición. 8 ed. Washington (2003) 191-198.
- Joshi K. C., Singh P., Singhi C. L.; Chemical constituents of *Verbesina encelioides* and *Holmskioldia sanguinea*. *Journal of Indian Chemical Society* (1983) 60: 905-906.

- Kasai H., Okada Y., Nishimura S., Rao M. S., Reddy J. K.; Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following long-term exposure to a peroxisome proliferator. *Cancer Research* (1989) 49: 2603-2605.
- Kaur C., Kapoor H. C.; Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science & Technology* (2002) 37: 153-161.
- Kikuzaki H., Usuguchi J., Nakatani N.; Constituents of Zingiberaceae I. Diarylheptanoid from the rhizomes of ginger (*Zingiber officinale roscoe*). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (1991) 39: 120-122.
- Kikuzaki H., Nakatani N.; Antioxidant effects of some ginger constituents. *Journal of Food Science* (1993) 58: 1407-1410.
- Labieniec M., Gabryelak T.; Measurement of DNA damage and protein oxidation after the incubation of B14 Chinese hamster cells with chosen polyphenols. *Toxicology Letters* (2005) 155: 15-25.
- Lachance P. A., Nakat Z., Jeong W. S.; Antioxidants: an integrative approach. *Nutrition* (2001) 17: 835-838.
- Lee S. E., Hwang H. J., Ha J. S.; Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Science Journal* (2003) 73: 167-179.
- Li F., Okamura Y., Dibwe D. F., Awale S., Kadota S., Tezuka Y.; Anti-austerity agents from rhizoma et radix *notopterygii* (Qianghuo). *Planta medica* (2012) 78: 796-799.
- Lobitz G. O., Heilmann J., Zschocke S., Tamayo-Castillo G., Bauer R., Merfort I.; Bornyl cinnamate derivatives with antiinflammatory activity from *Verbesina turbacensis*. *Pharmaceutical and pharmacological letters* (1998) 8: 115-118.
- López J., Díaz J., Cortázar Y.; Fundamentos de farmacología para enfermería. 2a ed, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Bogotá, D.C (2008).

- Maldonado E., Apan M. T. R., Pérez-Castorena A. L.; Anti-inflammatory activity of phenyl propanoids from *Coreopsis mutica* var. *mutica*. *Planta medica* (1998) 64: 660-661.
- Maldonado S. O., Jiménez V. E. N., Guapillo V. M., Ceballos R. G. M., Méndez B. E.; Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana* (2010).
- Mastelic J., Jerkovic I., Blazevic I., Poljak-Blazi M., Borovic S., Ivancic-Bace I., Smrecki V., Zarkovic N., Brcic-Kostic K., Vikic-Topic D., Muller Z. N.; Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol and eugenol derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2008) 56: 3989-3996.
- Mitjavila M. T., López D., Sáiz M. P.; Los radicales libres y su implicación en procesos fisiológicos y patológicos. *Nutrition in Clinical Practice* (2001) 258: 5-11.
- Moskovitz J., Yim B. M., Chock B. P.; Free radicals and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2002) 397: 354-359.
- Molina J., Pastó L., Garrido L.; Interacciones de fármacos. Elsevier, Farmacología en Enfermería, Madrid (2007).
- Montagnac A., Provost J. P., Litaudon M., Pais M.; Antimitotic and cytotoxic constituents of *Myodocarpus gracilis*. *Planta medica* (1997) 63: 365-366.
- Palacios J. W.; Plantas medicinales nativas del Perú II. 2a ed, CONCYTEC, Lima Perú (1997) 39-41.
- Prior R. L., Wu X., Schaich K.; Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry* (2005) 53: 4290-4302.
- Raghavendra M., Madhusudhana A. R., Pulala R. Y., Sudharshan A. R., Siva L. K.; Comparative studies on the in vitro antioxidant properties of methanolic leafy

extracts from six edible leafy vegetables of India. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* **(2013)** 6: 96-99.

Romac D., Albertson T.; Drug interactions in the intensive care unit. *Clinics in Chest Medicine* **(1999)** 20: 385-399.

Salas M. A.; Importancia del zinc en la Nutrición Humana. Universidad Mayor de San Andrés **(2002)**.

Sharma R., Agarwal S. K., Rawat S., Nagar M.; Synthesis, characterization and antibacterial activity of Some transition metal cis-3,7-dimethyl-2,6-octadienemicarbazone complexes. *Transition Metal Chemistry* **(2006)** 31: 201-206.

Suire C., Asakawa Y., Toyota M., Takemoto T.; Chirality of terpenoids isolated from the liverwort *Conocephalum conicum*. *Phytochemistry* **(1982)** 21: 349-352.

Thomas W. E.; Brain in macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Research* **(1994)** 17: 61-74.

Valko M., Morris H., Mazur M., Raptá P., Bilton R. F.; Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: Do the semiquinones of Vitamin K play a role in the a etiology of colon cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* **(2001)** 1527: 161- 166.

Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M.; Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* **(2006)** 160: 1-40.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M., Telser J.; Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **(2007)** 39: 44-84.

Velasco A.; Farmacología fundamental. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid **(2003)**.

- Venereo G., Justo R.; Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar* (2002) 31: 126-133.
- Weideman R., Bernstein I., McKinney W.; Pharmacist recognition of potential drug interactions. *American Journal of Health-System Pharmacy* (1999) 56: 1524-1529.
- Wiernsperger N.; El estrés oxidativo como diana terapéutica en la diabetes. *Revisitar la controversia Diabetes & Metabolism* (2003) 29: 579-585.
- Xu W. H., Liang Q., Liang Z. S., Li X. C.; Two new eudesmane derivatives from *Verbesina virginica*. *Chinese Chemical Letters* (2010) 21: 693-695.
- Yang L., Qiao L., Xie D., Dai J., Guo S.; Sesquiterpenes and monoterpene from *Aquilaria sinensis*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* (2012) 37: 1973-1976.
- Zangar R. C., Davydov D. R., Verma S.; Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology* (2004) 199: 316-331.
- Lu Z., Fan P., Ji M., Lou H.; Terpenoids and bisbibenzyls from Chinese liverworts *Conocephalum conicum* and *Dumortiera hirsute*. *Journal of Asian Natural Products Research* (2006) 8: 187-192.
- Zschocke S., Lehner M., Bauer R.; 5-Lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitory active constituents from Qianghuo (*Notopterygium incisum*). *Planta medica* (1997) 63: 203-206.