



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE  
HIDALGO**

**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

**“ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PARVIFOLINA AISLADA  
DE *Acourtia humboldtii*”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACOBIOLOGA**

PRESENTA:

**EDNA MILAGROS SILVA GARCÍA**

ASESORES DE TESIS:

**D.C. ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES**

Morelia, Michoacán. Junio de 2012



El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría de la D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres y el D.C. Hugo Alejandro García Gutiérrez.

Con el apoyo económico de los proyectos: Proyecto CONACYT (118827) y (1100-405-20153180-5103-0113), CIC-UMSNH.

---

Parte de este trabajo se presentó en el Congreso del XV Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico, del 24 al 27 de Agosto 2010, Nuevo Vallarta, Nayarit.

---

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	v
TABLA DE ABREVIATURAS.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Sesquiterpenos.....	4
2.2. Radicales Libres.....	12
2.3. Daño Oxidativo.....	14
DAÑO OXIDATIVO DE LÍPIDOS.....	16
DAÑO OXIDATIVO DE PROTEÍNAS.....	17
DAÑO OXIDATIVO AL ADN.....	18
2.4. Antioxidantes.....	19
CATALASA.....	20
GLUTATIÓN PEROXIDASA.....	20
SUPERÓXIDO DISMUTASA.....	21
VITAMINA A.....	22
VITAMINA C.....	22
VITAMINA E.....	23
GLUTATIÓN.....	24

2.5. Análisis de la Actividad Antioxidante <i>in vitro</i> . .....	26
3. JUSTIFICACIÓN.....	29
4. HIPÓTESIS.....	30
5. OBJETIVO GENERAL.....	30
5.1. Objetivos específicos. ....	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....	31
7. CONCLUSIONES.....	50
8. PERSPECTIVAS.....	51
9. PARTE EXPERIMENTAL.....	52
10. BIBLIOGRAFÍA.....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Petécatl, Dios azteca de las medicinas. ....	1
<b>Figura 2.</b> (A) Estructura de la parvifolina ( <b>1</b> ); (B) Modelo tridimensional de <b>1</b> obtenido mediante Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) a un nivel de cálculo B3LYP/DGDZVP. ....	3
<b>Figura 3.</b> (A) Estructura del cacalol; (B) Modelo tridimensional del cacalol obtenido mediante Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) a un nivel de cálculo B3LYP/DGDZVP. ....	8
<b>Figura 4.</b> Flor de la familia de las Asteraceae.....	9
<b>Figura 5.</b> Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).....	14
<b>Figura 6.</b> Especies Reactivas de Oxígeno y Daño Oxidativo. ....	15
<b>Figura 7.</b> Sitios susceptibles del ADN a las reacciones de radicales libres. ....	18
<b>Figura 8.</b> Estructura de la Vitamina A (Retinol).....	22
<b>Figura 9.</b> Estructura del Glutati6n. ....	25
<b>Figura 10.</b> Estructura del DPPH. ....	27
<b>Figura 11.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz en $\text{CDCl}_3$ de los pipitzoles <b>2</b> y <b>3</b> . .	32
<b>Figura 12.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz en $\text{CDCl}_3$ de <b>3</b> . ....	33
<b>Figura 13.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz en $\text{CDCl}_3$ de la parvifolina ( <b>1</b> ). ....	34
<b>Figura 14.</b> Espectro de COSY de la parvifolina ( <b>1</b> ). ....	35
<b>Figura 15.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ a 100 MHz en $\text{CDCl}_3$ de la parvifolina ( <b>1</b> ). ....	36
<b>Figura 16.</b> Espectro de HETCOR de la parvifolina ( <b>1</b> ). ....	37
<b>Figura 17.</b> Espectro de NOESY de la parvifolina ( <b>1</b> ). ....	38

<b>Figura 18.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz en $\text{CDCl}_3$ del dímero de la parvifolina ( <b>4</b> ).....	41
<b>Figura 19.</b> (A) Estructura del dímero de la parvifolina ( <b>4</b> ); (B) Modelo tridimensional de <b>4</b> obtenido mediante Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) a un nivel de cálculo B3LYP/DGDZVP.....	40
<b>Figura 20.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ a 100 MHz en $\text{CDCl}_3$ del dímero de la parvifolina ( <b>4</b> ).....	42
<b>Figura 21.</b> Espectro de COSY del dímero de la parvifolina ( <b>4</b> ).....	43
<b>Figura 22.</b> Espectro de HETCOR del dímero de la parvifolina ( <b>4</b> ).....	44
<b>Figura 23.</b> Espectro de NOESY del dímero de la parvifolina ( <b>4</b> ).....	45
<b>Figura 24.</b> Modelo tridimensional del conformero 1 de <b>4</b> obtenido mediante Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) a un nivel de cálculo B3LYP/DGDZVP.....	47
<b>Figura 25.</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz en $\text{CDCl}_3$ de la reversibilidad del dímero de la parvifolina ( <b>4</b> ).....	49

## ÍNDICE DE ESQUEMAS.

<b>Esquema 1.</b> Biosíntesis de terpenos.....	6
<b>Esquema 2.</b> Clasificación de sesquiterpenos.....	7
<b>Esquema 3.</b> Síntesis de la parvifolina (1) a partir de citronelal.....	11
<b>Esquema 4.</b> Transformación de perezona a pipitzol.....	11
<b>Esquema 5.</b> Peroxidación de lípidos.....	16
<b>Esquema 6.</b> Tipos de antioxidantes de acuerdo a su estructura química.....	19
<b>Esquema 7.</b> Reacción de la catalasa con el peróxido de hidrógeno.....	20
<b>Esquema 8.</b> Reacción de la glutatión peroxidasa con el peróxido de hidrógeno...20	
<b>Esquema 9.</b> Reacción enzimática de la glutatión reductasa con el glutatión oxidado.....	21
<b>Esquema 10.</b> Reacción general de la enzima SOD con anión superóxido.....	21
<b>Esquema 11.</b> Reacción de la Vitamina C frente a los radicales libres.....	23
<b>Esquema 12.</b> Reacción de la Vitamina E frente a los radicales libres.....	24



**TABLA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y ACRÓNIMOS.**

AcOEt	Acetato de etilo.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
CAT	Catalasa.
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Cloruro de metileno.
COSY	Espectro de Correlación Homonuclear.
DFT	Teoría de Funcionales de la Densidad.
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
Eq.	Equivalentes químicos.
FFP	Farnesil difosfato.
GAP	Gliceraldehído 3-fosfato.
GPP	Geranil difosfato.
GPx	Glutación peroxidasa.
GPx-c	Glutación peroxidasa celular.
GPx-p	Glutación peroxidasa extracelular.
GPx-PH	Glutación peroxidasa afín a lipoperóxidos.
GR	Glutación reductasa.
GSH	Glutación reducido.
GSSG	Glutación oxidado. Disulfuro de Glutación.
HETCOR	Espectro de Correlación Heteronuclear.
HMG-CoA reductasa	Hidroximetilglutarilcoenzima A reductasa.
HMG-CoA sintetasa	Hidroximetilglutarilcoenzima A sintetasa.
IPP	Isopentil difosfato.
IRA	Insuficiencia Renal Aguda.
IRC	Insuficiencia Renal Crónica.
LDL	Lipoproteína de baja densidad.
MeOH	Metanol.
mg	Miligramos.
mL.	Mililitros.

MRS	Metionina-sulfóxido reductasa.
M-SOD	Superóxido dismutasa unida a metales. (Cobre, Zinc, Manganeso o Hierro).
MVA	3- <i>R</i> -mevalónico.
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sodio.
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio.
NaOH	Hidróxido de sodio.
NOESY	Espectro de Correlación Homonuclear de Efecto Overhauser.
RCM	Reacción en cadena.
R <sub>f</sub>	Factor de retención.
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
RMN de <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono trece.
RMN de <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno.
ROOH	Hidroperóxidos orgánicos.
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa.
TAH	Reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno.
TAOC	Actividad antioxidante total.
TE	Reacciones de transferencia de electrones.
TROLOX	Ácido 6-hidróxi-2,5,7,8,-tetrametilcroman-2-carboxílico.

## 1. INTRODUCCIÓN.

Desde el principio de los tiempos, el ser humano ha tomado del medio los recursos básicos necesarios para su desarrollo y cuidado de su salud, de tal manera que las antiguas culturas prehispánicas se convirtieron en asiduos observadores de la flora y fauna. En México a la llegada de los españoles, encontraron poblaciones en las cuales se cazaban animales, cultivaban plantas y procesaban productos, es así que los mexicanos de aquel entonces construían albergues funcionales y elegantes usando madera, hojas, tallos de palma, zacates, tules, otates; además cuidaban su cuerpo con tejidos de fibra de algodón o agave y acolchados con piel de conejo o plumas finas.

Para los indígenas, el cuidado de la salud, como otras de sus actividades estaban ligadas con los dioses, guardando un halo de misterio y magia. La medicina indígena controlaba las enfermedades tanto físicas como mentales con infusiones, enjuagues, emplastos y lociones hechos a base de hierbas y productos de animales, al tiempo que alzaban oraciones a los dioses Ixtlilton, Toci y Petécatl, Figura 1. El legado de las culturas prehispánicas ha sobrevivido a través de compendios como el Códice Badiano y el Códice Florentino, así como la enseñanza de generación en generación.<sup>1</sup>



**Figura 1.** Petécatl, Dios azteca de las medicinas.

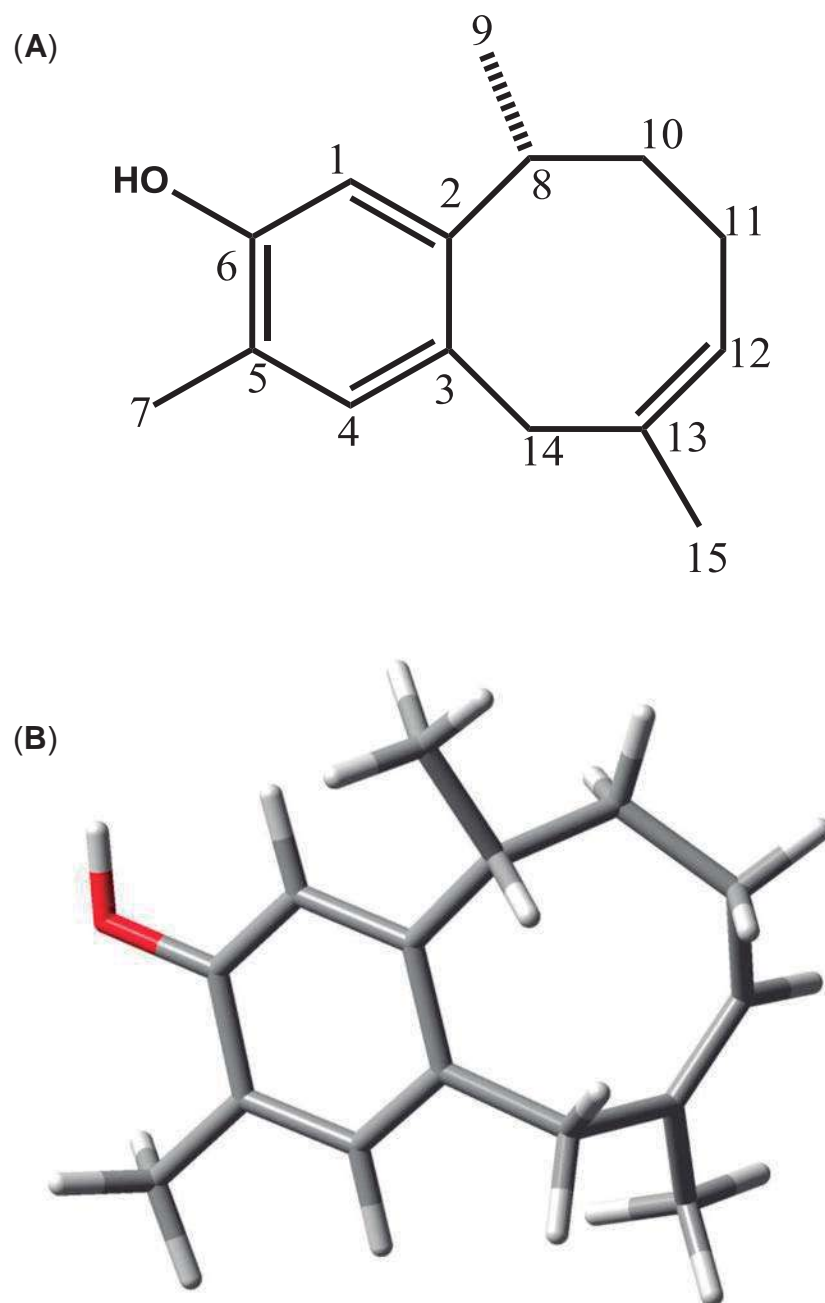
El legado histórico que respalda nuestro País ha despertado el interés para estudiar los compuestos activos que poseen las plantas, mismas que desde niños nuestros abuelos nos recomiendan para mitigar algún padecimiento.<sup>1</sup> Muchos de estos compuestos han sido identificados de tal manera que hoy se comercializan en forma de fármacos o principios activos, mismos que se sintetizan químicamente en el laboratorio. Es así que surge la Fitoquímica, rama de la química cuyo objetivo principal es el estudio de los constituyentes químicos de las plantas, abarcando su biosíntesis, metabolismo, distribución natural, función biológica, aislamiento, purificación y estructura química.

El estudio fitoquímico de las plantas permite aislar e identificar los compuestos presentes en ellas, para identificar los que pudieran tener alguna actividad biológica benéfica para la sociedad.<sup>2</sup> Dichos constituyentes activos de las plantas son producidos con moléculas de agua, dióxido de carbono y energía solar y son conocidos como metabolitos secundarios. Por lo tanto, un metabolito secundario es un compuesto orgánico sintetizado por las plantas mediante rutas metabólicas especializadas que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción de las mismas.

Dentro de estos metabolitos encontramos compuestos que ayudan en el tratamiento de enfermedades, por ejemplo dentro del género *Perezia*, el cual está constituido por más de cuarenta especies distribuidas por Norte América y de las cuales treinta y siete se localizan en nuestro país; existen reportes de la evaluación de su actividad biológica como antimicrobianos por ejemplo las lactonas sesquiterpénicas. Dentro de los sesquiterpenos con propiedades antiinflamatorias, encontramos el bisabolol: y como parte de los compuestos antioxidantes observamos a las moléculas polifenólicas.<sup>3</sup>

Debido a que diversas plantas de este género son utilizadas en la medicina tradicional, el presente trabajo está enfocado a la extracción de la parvifolina (**1**), Figura 2. A partir de *Acourtia humboldtii*, antes *Perezia*

*alamanii*; así como el análisis de su actividad antioxidante *in vitro* en presencia de un radical libre.



**Figura 2.** (A) Estructura de la parvifolina (1); (B) Modelo tridimensional de 1 obtenido mediante Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) a un nivel de cálculo B3LYP/DGDZVP.

## 2. ANTECEDENTES.

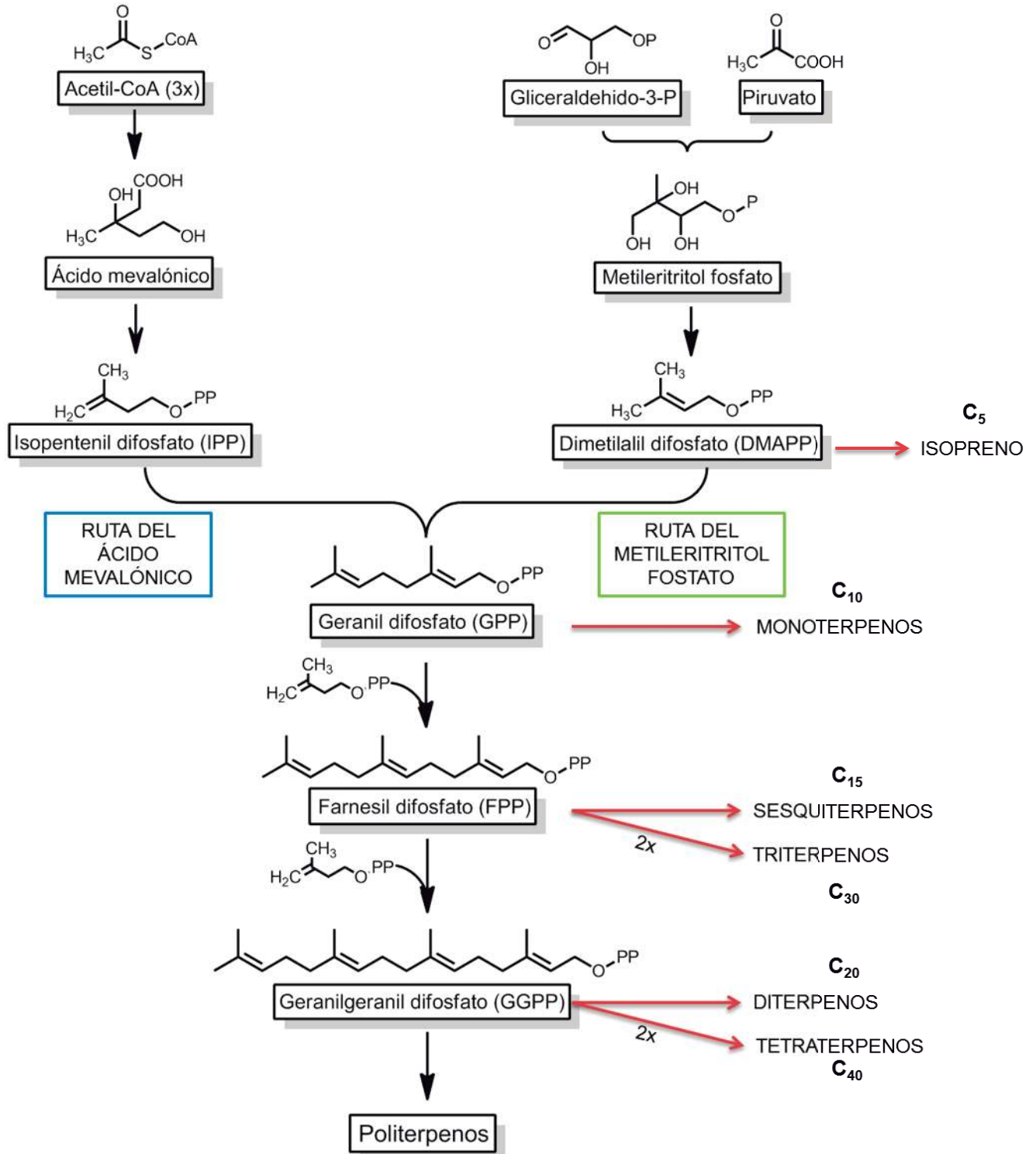
### 2.1. Sesquiterpenos.

Los sesquiterpenos pertenecen al grupo de los terpenos, la mayoría de estas moléculas son específicas del reino vegetal. Sin embargo, se pueden encontrar en los animales, por ejemplo: en las feromonas y hormonas juveniles sesquiterpénicas de los insectos; también en algunos organismos marinos se han encontrado sesquiterpenos.<sup>4</sup>

De los terpenos se puede considerar que están formados por la unión de un número entero de unidades pentacarbonadas ramificadas derivadas del 2-metilbutadieno, esta idea fue considerada desde 1887, cuando O. Wallach<sup>5</sup> pensaba que los terpenos debían estar constituidos a partir de unidades de isopreno y, algunos años después, en 1953, Ruzicka<sup>6</sup>, transformó esta hipótesis en regla, la cual dice “Cada grupo de terpenos es el resultado de la condensación cabeza-cola de un número variable de unidades isoprénicas” (ver Esquema 2, *vide infra*).

Esta misma regla postula que la diversidad estructural no es más que aparente, en cada grupo de terpenos, un único precursor conduce a los diferentes constituyentes conocidos por una sucesión de reacciones clásicas (ciclizaciones, funcionalizaciones, reordenamientos).

En la actualidad se sabe que los precursores de los principales tipos de terpenos son formados mediante reacciones catalizadas por enzimas dentro de las células vegetales, por medio de las rutas del ácido mevalónico y del metileritritol fosfato, la primera de ellas se lleva a cabo en el citoplasma; mientras que la ruta del metileritritol fosfato se lleva a cabo en el cloroplasto, en donde las moléculas de piruvato y gliceraldehido-3-fosfato son transformadas en metileritritol fosfato. En cada una de estas rutas se forman terpenos de cadenas más grandes en ésteres pirofosfóricos de alcoholes en  $(C_5)_n$ , Esquema 1.



Esquema 1. Biosíntesis de terpenos.

#### A) VÍA DEL MEVALONATO.

El proceso inicia con la condensación de tioésteres del ácido acético, formando acetilcoenzima A, a través de la enzima hidroximetilglutarilcoenzima A sintetasa (HMG-CoA sintetasa). Otra enzima, hidroximetilglutarilcoenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) transforma el producto de la reacción anterior en el ácido (3*R*)-mevalónico (MVA). La conversión de este ácido comienza con una doble fosforilación, a través de las cuales se introduce el grupo pirofosfato cuya eliminación permite la descaboxilación, la cual es inducida por la 5-difosfato-descaboxilasa; con lo cual se genera la formación del isopentenil difosfato (IPP).

#### B) VÍA DEL METILERITRITOL. (GAP/piruvato)

Esta vía comprende la siguiente secuencia de reacciones: Primero la condensación de una unidad bicarbonada procedente de la descarboxilación de una molécula de piruvato sobre el carbono del grupo carbonilo del gliceraldehído 3-fosfato (GAP); seguido de una transposición y reducción del primer intermediario en C<sub>5</sub>, para formar el 2-C-metil-*D*-eritrol-4-fosfato, probable precursor del IPP.

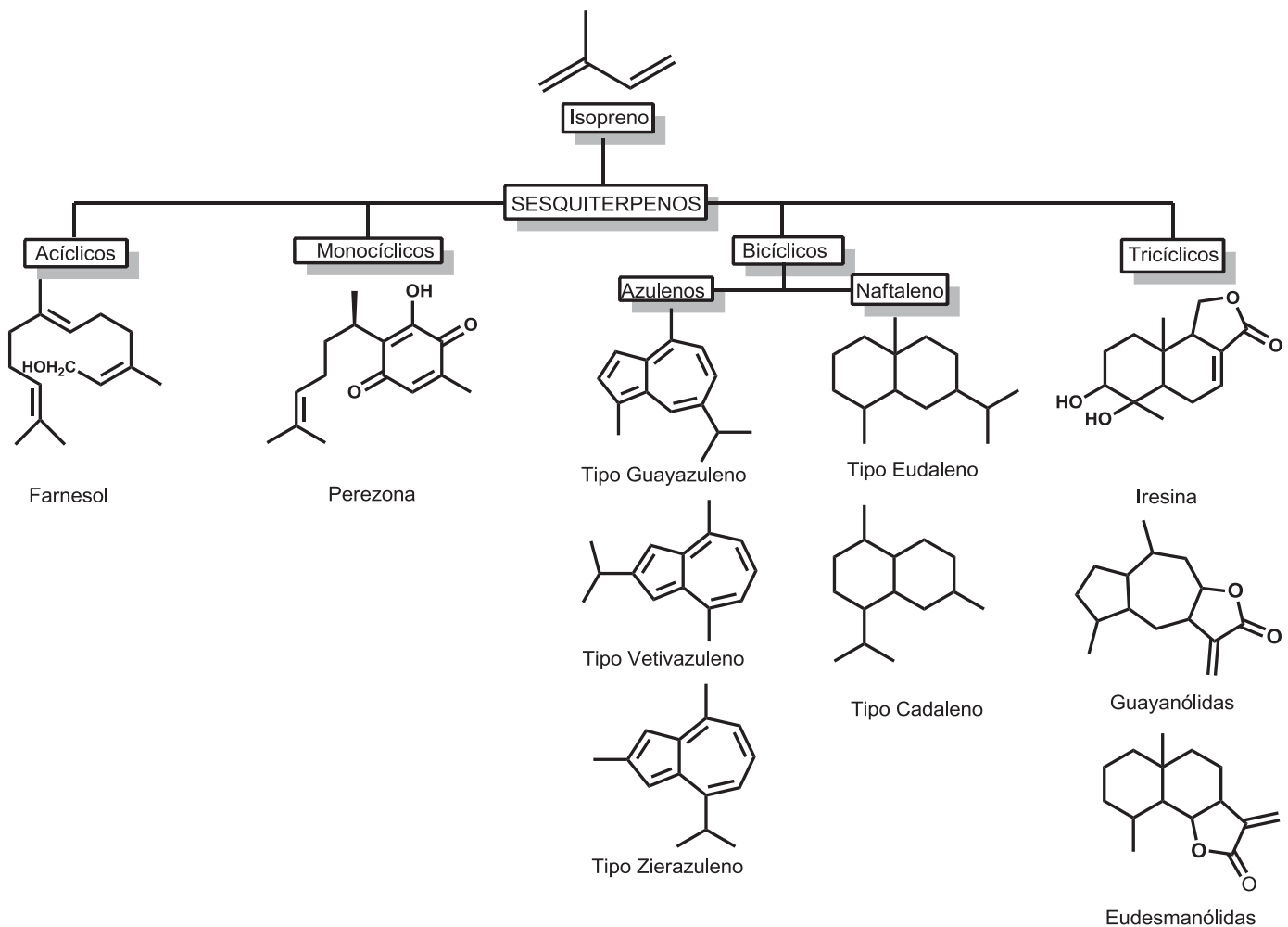
La adición de más moléculas de IPP se lleva a cabo por medio de una segunda condensación de unidades en C<sub>5</sub>, esta reacción es catalizada por la enzima preniltransferasa, la cual puede continuar con la adición de geranil difosfato (GPP) sobre un IPP lo que lleva al farnesil difosfato (FPP) y así sucesivamente para formar la serie de pirofosfatos homólogos. La elongación dependerá de enzimas preniltransferasas, algunas de las cuales son específicas para una longitud de cadena determinada.<sup>4</sup>

Ahora bien, teniendo una idea del origen biosintético, tenemos que los sesquiterpenos son moléculas de fórmula C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>, es decir, son derivados de tres moléculas de isopreno, el precursor de toda la serie es el 2*E*,6*E*-FPP; son compuestos no saturados.



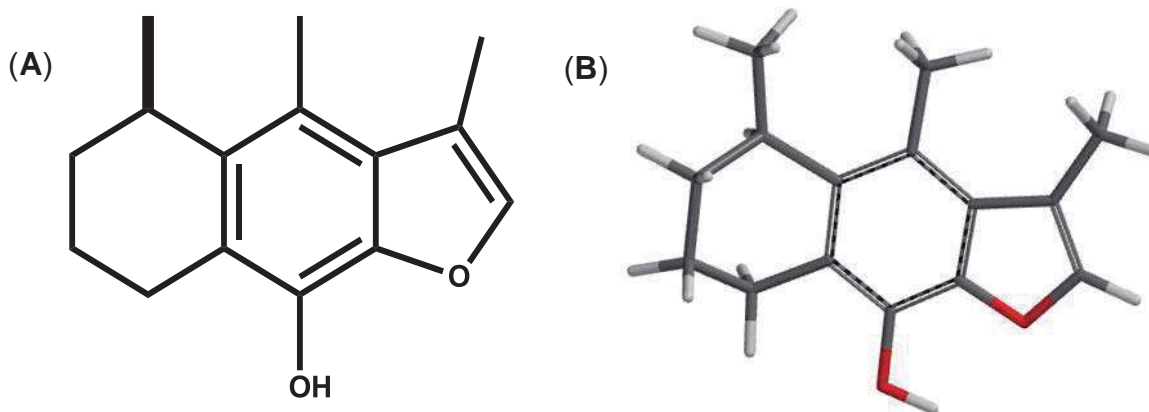
De acuerdo a su estructura, los sesquiterpenos se clasifican en: acíclicos, el más representativo de ellos y descrito en 1913 es el farnesol; ahora bien, los monocíclicos, son sesquiterpenos donde el esqueleto común posee insaturaciones y grupos funcionales, como la perezona; también existen sesquiterpenos bicíclicos, y tricíclicos.<sup>7</sup>

Refiriéndonos a los bicíclicos, pueden dividirse en dos grupos: del naftaleno y del azuleno, debido a las estructuras aromáticas que producen por deshidrogenación, Esquema 2.<sup>7</sup>



**Esquema 2.** Clasificación de los sesquiterpenos.

El estudio de los sesquiterpenos ha tomado relevancia debido a que son constituyentes habituales de los aceites esenciales de vegetales superiores y, en calidad de tales, puede intervenir en las propiedades farmacológicas, tal es el caso del bisabolol y sus derivados que se encuentran en el aceite esencial de manzanilla. Además otro grupo de sesquiterpenos, como las sesquiterpenlactonas han mostrado tener actividad antibacteriana, entre otras más. Sin embargo, algunas otras moléculas han mostrado actividad antiinflamatoria ó anti-oxidante, tal es el caso del cacalol, Figura 3, y la parvifolina (1).<sup>8</sup>



**Figura 3. (A)** Estructura del cacalol; **(B)** Modelo tridimensional del cacalol obtenido mediante Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) a un nivel de cálculo B3LYP/DGDZVP.

La parvifolina (1) es un sesquiterpeno bicíclico que se encuentra como metabolito secundario en plantas de la familia Asteraceae, principalmente en *Coreopsis sp.*, *Perezia carpholepis*, *Perezia longifolia* y *Perezia alamanii*, esta última ha sido reclasificada como *Acourtia humboldtii*.<sup>9</sup>

La familia Asteraceae, también llamada Compuesta reúne más de 23,000 especies, pertenece a las Angiospermas, es decir, se trata de plantas que producen frutos con semilla; se caracterizan por flores en forma de estrella, Figura 4. Debido a la variedad de especies la familia ha sido dividida en 12 subfamilias, y éstas a su vez en 23 tribus, esto de acuerdo a los estudios filogenéticos.<sup>10</sup>



**Figura 4.** Flor de la familia de las Asteraceae.

Las asteráceas están ampliamente distribuidas, abarcan desde regiones polares hasta los trópicos, dentro de ella podemos encontrar hierbas perennes, anuales o bienales, en cuanto a los compuestos químicos aislados se han descrito sesquiterpenos, sesquiterpenlactonas, poliacetilenos.<sup>11</sup> Algunas especies de esta familia son comestibles, un ejemplo es la lechuga (*Lactuca sp.*), otras usadas en medicina tradicional se enumeran en la Tabla 1.<sup>12</sup>

**Tabla 1.** Ejemplos de plantas medicinales de la familia Asteraceae y sus aplicaciones.

ESPECIE	NOMBRE COMÚN	USO EN MEDICINA TRADICIONAL	COMPUESTOS AISLADOS	DISTRIBUCIÓN
<i>Conyza filaginoides</i>	Zacachichic Prodigiosa	Aperitivo Antiemético Diurético Eupéptico Analgésico Antitusígeno Antipirético Carminativo Astringente	Esteroides Triterpenos Sesquiterpenos Flavonoides Hidrocarburos	Hidalgo Morelos Michoacán Guanajuato Estado de México
<i>Perezia hebeclada</i> , <i>Acourtia hebeclada</i>	Coapatli Hierba del diablo Cola de zorra Zamazaca	Laxante	Benzoquinonas y derivados de Benzoquinonas	Morelos Estado de México
<i>Tagetes lucida</i>	Pericón Santa Maria Jericón Hierbanís	Antidiarreico Antidisentérico Antiemético Antirreumático Antiasmático Antitifoidea Antihelmíntico Enemagogo	Terpenos Cumarinas Fenilpropanoides	Chiapas Morelos Jalisco Oaxaca Puebla Estado de México Guerrero Michoacán

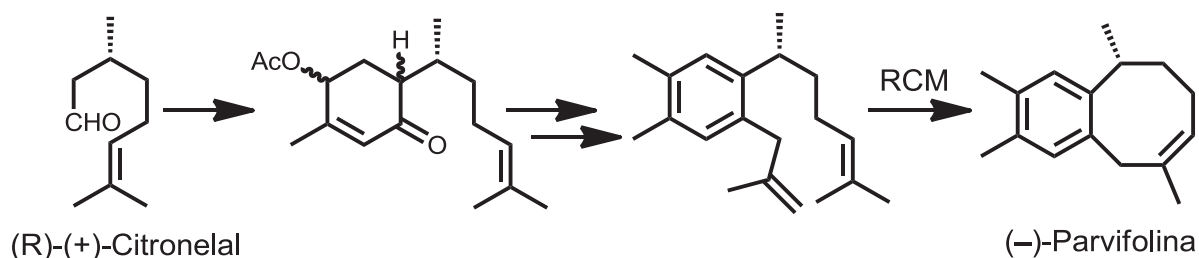
Ahora bien, *Acourtia humboldtii* es una planta herbácea perenne de 30 a 80 cm de alto, con tallos por lo general ramificados, glandular; cuyas hojas son sésiles, de 3 a 12 cm de largo y 1.8 a 7.5 cm de ancho, espinuloso-dentadas o reticuladas en el margen, las inferiores adheridas al tallo, rígidas; las inflorescencias son compuestas por cabezuelas, ubicadas en los extremos de las ramillas, sobresaliendo poco de las hojas subyacentes; el número de flores por cabezuela va de 7 a 12, sus corolas son de 8 a 12 cm de largo.<sup>8</sup>

La parvifolina (**1**) como otros sesquiterpenos, es sintetizada a partir de una ruta metabólica secundaria a través de la cual, las plantas producen y acumulan compuestos de diversa naturaleza química.

Desde el punto de vista químico, la parvifolina (**1**), así como derivados de ella, la isoparvifolinona y el isovalerato de parvifolina, son los únicos ejemplos de sesquiterpenos con estructuras de benzocicloocteno que se aíslan de manera natural a partir de fuentes vegetales.<sup>9</sup>

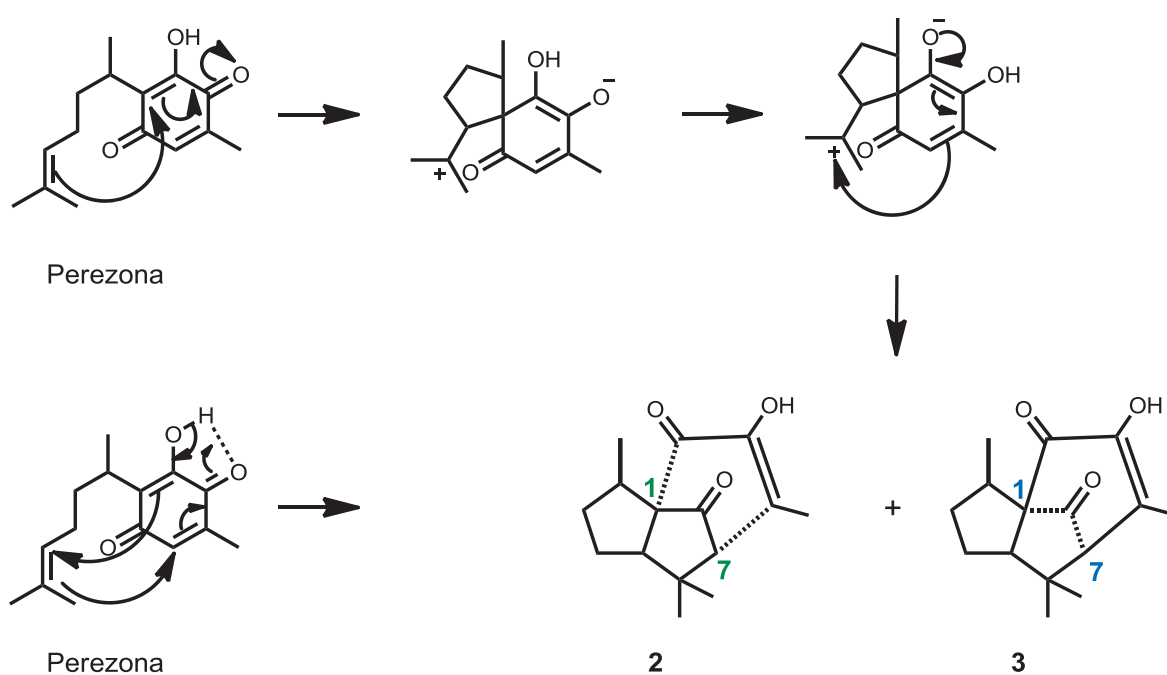
Analizando la estructura de la parvifolina (**1**), vemos que posee un ciclooctano lo cual le confiere una gran movilidad, de tal modo que cuando Subhas y colaboradores,<sup>14</sup> propusieron una ruta sintética para determinar la configuración absoluta por medio de una correlación química fue necesario revisar dos rutas posibles de síntesis.

La primera de ellas podía llevarse a cabo por medio de una ciclización intramolecular resultante de la sulfonación y oxidación del 1-iodo-2-(2-iodoetil)-benceno; con esta metodología se logra formar el benzociclooctano, pero faltarían los sustituyentes, hidroxilo (-OH) y un par de metilos (-CH<sub>3</sub>).<sup>13</sup> Ahora bien, la síntesis de parvifolina (**1**) a partir del (*R*)-(+)-Citronelal proporciona una ventaja enantioselectiva, es decir, que se ve favorecida la síntesis de la (-)-Parvifolina, además de incorporar el doble enlace al anillo de ocho miembros, permitió mantener el grupo quiral del anillo de benceno, Esquema 3.<sup>14</sup>



**Esquema 3.** Síntesis de la parvifolina (1) a partir del citronelal.

Algunos otros sesquiterpenos identificados dentro del género *Perezia* son el cipereno, el curcuquinol<sup>3</sup> y la perezona,<sup>15</sup> este último compuesto puede observarse en forma de cristales amarillos anaranjados. La perezona, al ser sometida a condiciones de calentamiento, forma los derivados sesquiterpénicos denominados pipitzoles. El mecanismo de transformación de la perezona a los pipitzoles se muestra en el Esquema 4.<sup>16</sup>



**Esquema 4.** Transformación de perezona a pipitzol.

Tanto el  $\alpha$ -pipitzol (2) y  $\beta$ -pipitzol (3), poseen la misma fórmula molecular ( $C_{15}H_{20}O_3$ ), la misma secuencia de átomos enlazados pero difieren en la estereoquímica de los C-1 y C-7. Los pipitzoles son cristales blancos

transparentes en forma de pequeños prismas que se obtienen del extracto hexánico de las raíces de las plantas del género *Perezia*. En contraste con la perezona, que son cristales amarillo-anaranjados; ambos compuestos han sido extraídos en el extracto hexánico de las raíces de algunas plantas de este género.<sup>16</sup>

Los pipitzoles, al ser estereoisómeros poseen varias características similares y espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) con un patrón de señales muy semejante. Sin embargo, otro dato que ayuda a la identificación de una manera más clara es la rotación específica, la cual se basa en la desviación producida de un haz de luz polarizada al pasar por una sustancia ópticamente activa.

De manera que, un compuesto se considera ópticamente activo si la luz linealmente polarizada sufre una rotación cuando pasa a través de dicho compuesto en solución. De acuerdo con lo reportado por Walls *et al.*, el  $\alpha$ -pipitzol posee una rotación de  $[\alpha]_D +192$ , mientras que el  $\beta$ -pipitzol gira la luz polarizada  $[\alpha]_D -172$ , mientras que la mezcla de ambos posee una rotación específica de  $[\alpha]_D +14$ .<sup>16</sup> Los pipitzoles son sesquiterpenos tricíclicos que pertenecen al grupo de los cedranólidos, cuyo esqueleto general es 3,6,8,8-tetrametil-3 $\alpha$ ,7-metanoperhidroazuleno.

## 2.2. Radicales Libres.

Los radicales libres o moléculas pro-oxidantes son estructuras definidas, que tienen uno o más electrones no apareados, caracterizada por su elevada reactividad y capacidad de formar otros radicales libres por reacciones químicas en cadena.

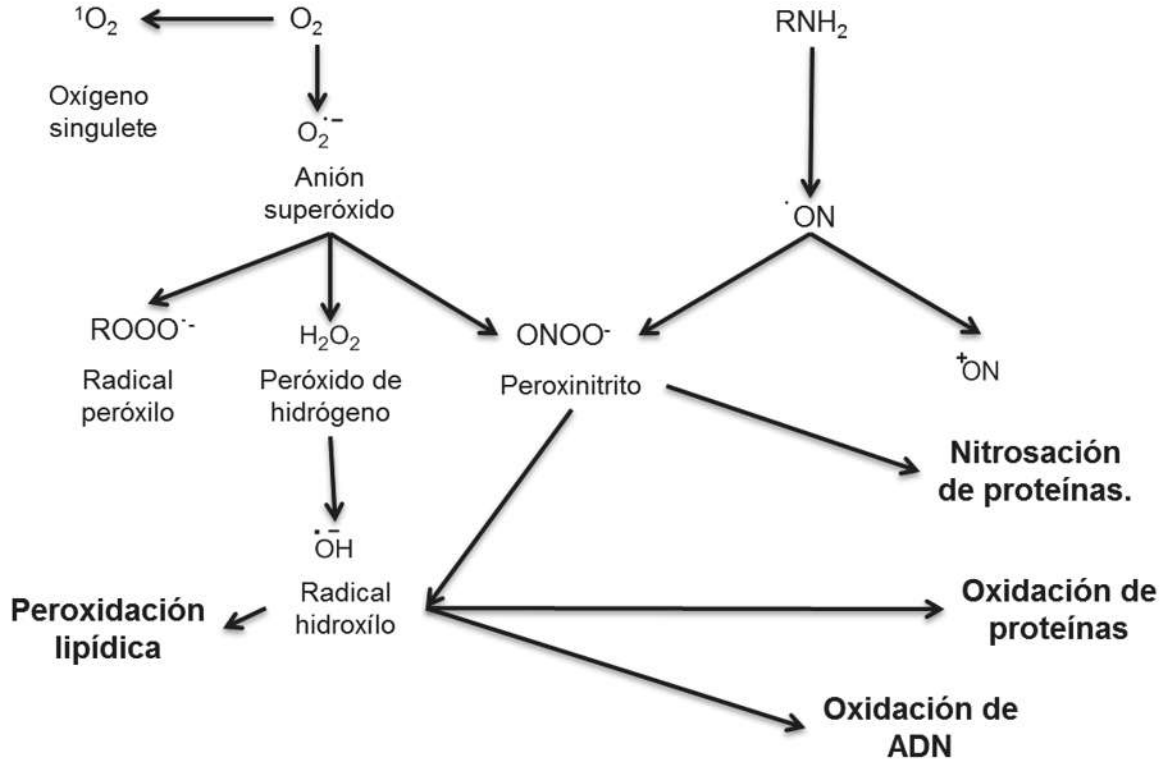
A diferencia de los iones que son estructuras químicas que poseen una carga eléctrica al igual que los radicales libres, estas últimas son inestables, por lo que tienden a reaccionar rápidamente con otros componentes químicos,

generalmente moléculas cercanas, de una forma relativamente rápida; esto se traduce en una corta vida media, característica de estas moléculas.<sup>17</sup>

Dentro de la célula existen radicales libres que participan en el metabolismo como transportadores de electrones, tal es el caso de la cadena respiratoria que se lleva a cabo en las mitocondrias.<sup>18</sup>

De manera general, en la naturaleza la mayoría de los radicales libres son generados por moléculas que poseen en su estructura átomos de oxígeno, a estas entidades se les denomina Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), de sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species.

Estas pueden ser producidas de manera exógena y endógena, e incluyen a radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que se forma dentro de la cadena respiratoria; por su parte el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso (HClO), radical hidroxilo ( $OH^{\cdot-}$ ), y el singulete de oxígeno ( $^1O_2$ ) son generados tras la activación de los leucocitos polimorfonucleares.<sup>19</sup> En el metabolismo del ácido araquidónico y en las reacciones catalizadas por enzimas podemos encontrar el anión-radical superóxido, peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico (NO), Figura 5.<sup>19</sup>



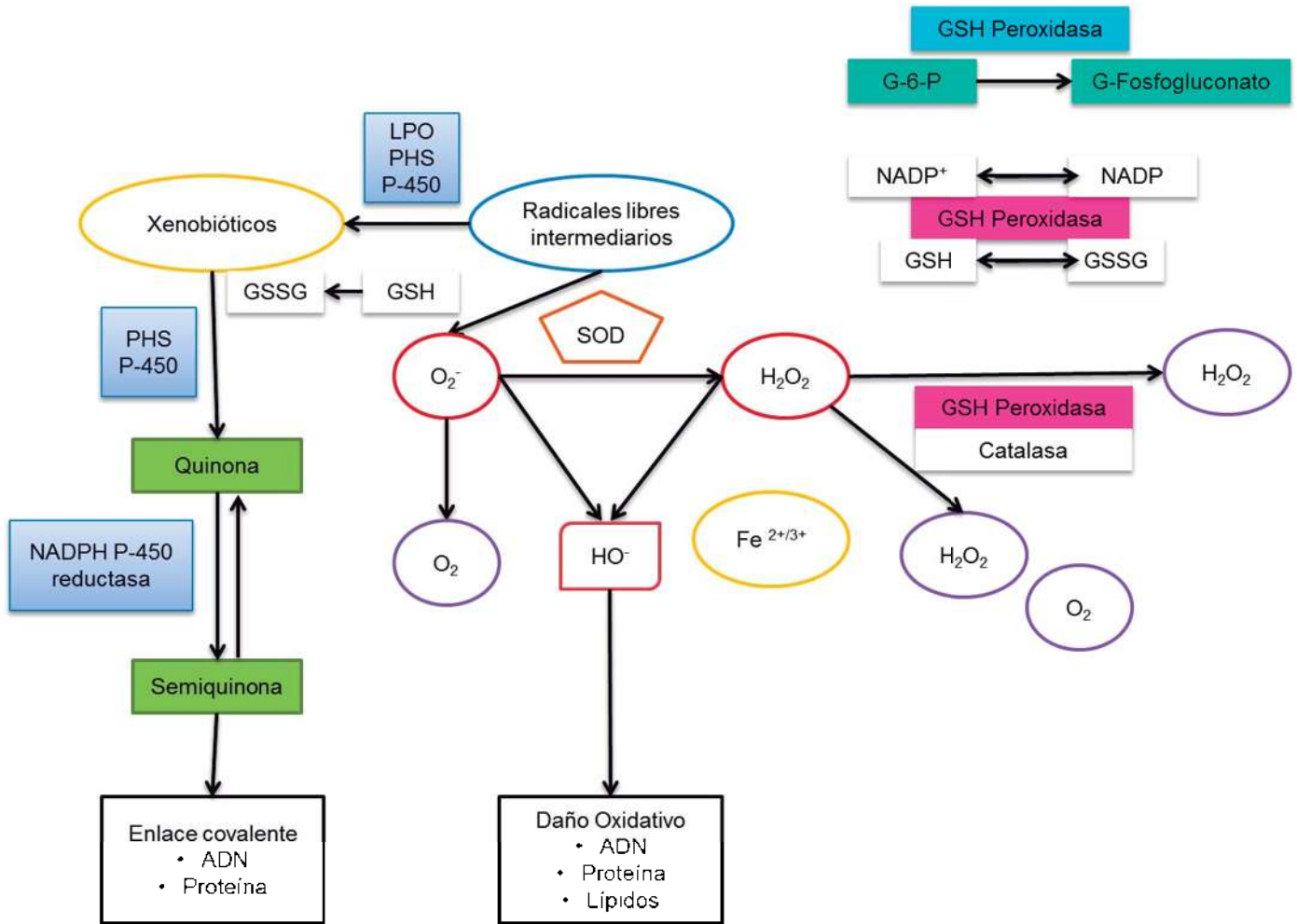
**Figura 5.** Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).

Por lo tanto podemos observar que el organismo produce ROS necesarias para el funcionamiento y balance armónico de diversos sistemas, sin los cuales se pueden producir desórdenes fisiológicos o alteraciones en el sistema inmune, dando lugar a diversas enfermedades o permite su evolución y desarrollo hacia diferentes estados patológicos.

### 2.3. Daño Oxidativo

Cuando el equilibrio entre antioxidantes y pro-oxidantes se rompe, es decir, existe una mayor concentración de radicales libres en la célula con respecto a la cantidad o actividad de los antioxidantes se genera el Estrés oxidativo, Figura 6; este desequilibrio puede ser resultado de factores exógenos como son la contaminación ambiental, las radiaciones de todo tipo, el consumo de alcohol, tabaco, drogas; así como los hábitos alimenticios, la exposición a sustancias tóxicas, el metabolismo de algunos fármacos y un elevado estrés físico y mental.





**Figura 6.** Especies Reactivas de Oxígeno y Daño Oxidativo.

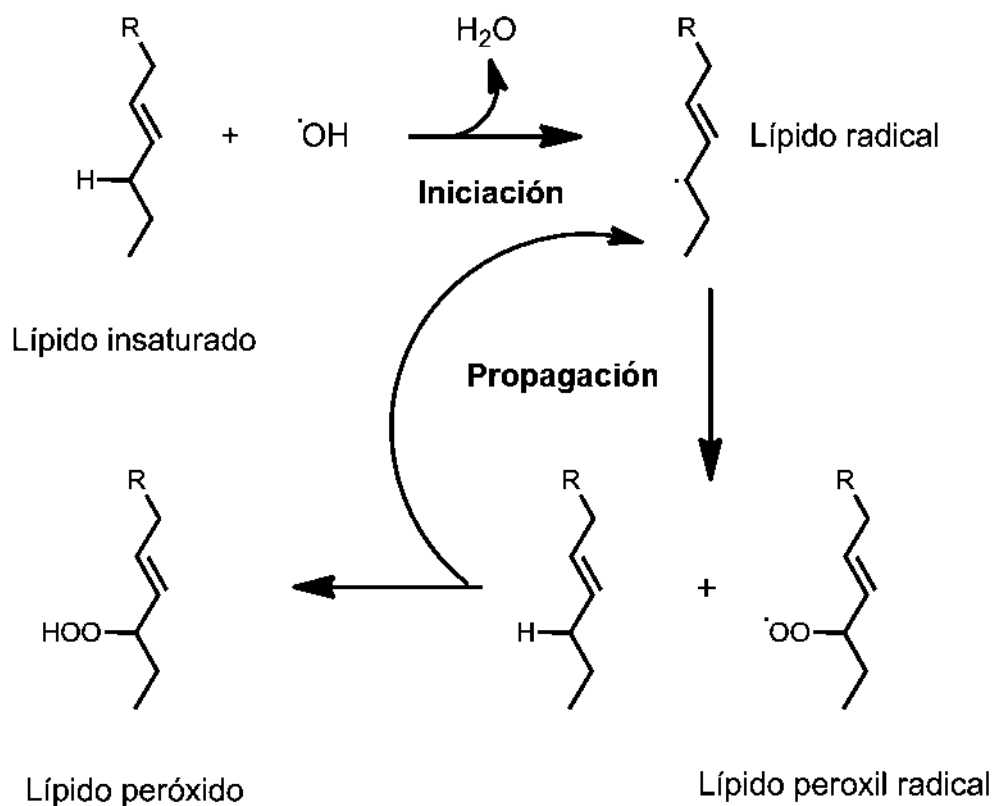
El resultado del daño oxidativo se observa en la alteración estructural de las macromoléculas, lípidos, proteínas y ácido desoxirribonucleico (ADN), las reacciones químicas que sufren estas biomoléculas resultan irreversibles y alteran su funcionamiento. Dichas reacciones generan derivados que propagan el Daño Oxidativo.

- DAÑO OXIDATIVO DE LÍPIDOS.

Al reaccionar los radicales libres con los cuerpos lipídicos de la célula, se genera la peroxidación de los ácidos grasos que los componen, Esquema 5. Los ácidos grasos se encuentran principalmente en las membranas, por lo tanto al oxidarse se ve alterada la entrada y salida de elementos importantes para la homeostasis celular, así como la formación de radicales libres con efectos citotóxicos.

Desde el punto de vista químico, los lípidos poseen enlaces dobles es decir, la unión carbono-carbono está dada por un enlace  $\sigma$  y otro  $\pi$ , característicos de la hibridación  $Sp^2$ . Ahora bien, esta disposición en el espacio los hace susceptibles ante los radicales libres debido a que se ve favorecida la sustracción de los electrones del enlace  $\pi$  por parte del agente oxidante. El contenido celular de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que puedan terminar la cadena de reacción como por ejemplo la enzima glutatión peroxidasa.

Algunos de los radicales libres con los que suele reaccionar los ácidos grasos son el oxígeno, el singulete de oxígeno, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo.<sup>19</sup>



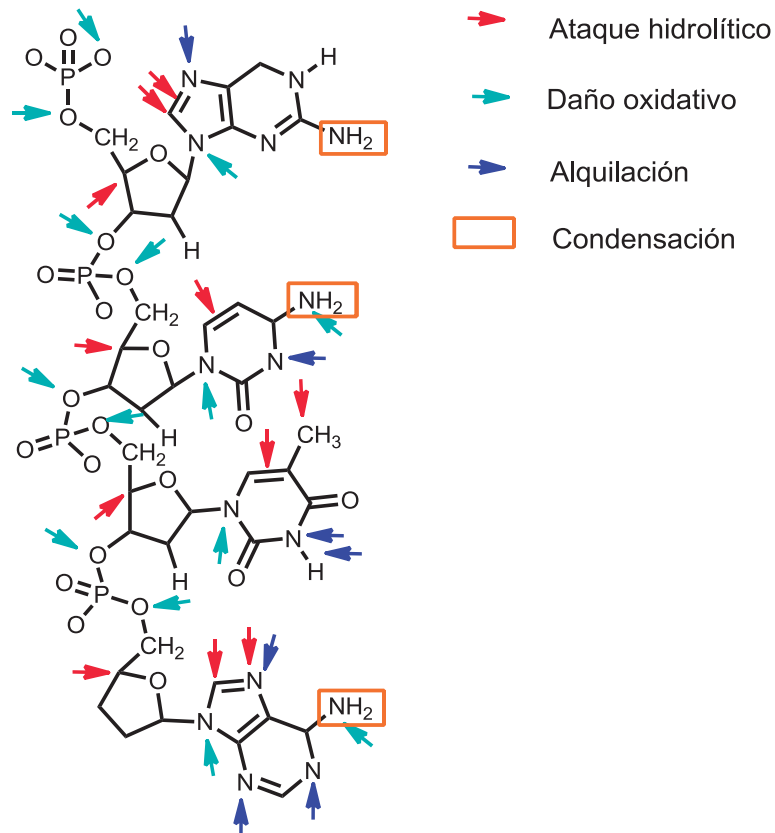
**Esquema 5.** Peroxidación de Lípidos.

- DAÑO OXIDATIVO DE PROTEÍNAS.

El daño provocado por los radicales libres en las proteínas se lleva a cabo por medio de la oxidación de un grupo de aminoácidos, tales como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina. A partir de las proteínas oxidadas se generan compuestos relativamente estables como los hidroperóxidos protéicos; ahora bien, estos compuestos pueden llevar a la producción de nuevos radicales al entrar en contacto con metales de transición. En el caso de los residuos de los aminoácidos azufrados como la lisina, se suelen generar grupos disulfuro; los cuales, favorecen la formación de puentes covalentes cruzados en las cadenas peptídicas. Cuando son oxidados los residuos de los aminoácidos de prolina, arginina o aspartato hay formación de grupos carbonilo, esta serie de cambios en la estructura de las proteínas lleva a la fragmentación de las cadenas polipeptídicas.<sup>20</sup>

- DAÑO OXIDATIVO AL ADN.

En la molécula de ADN los grupos de la desoxirribosa y las bases nitrogenadas son de naturaleza nucleofílica, por lo tanto son susceptibles a ataques electrofílicos de las ROS; estos radicales libres generan modificaciones en la estructura del ADN, lo que se traduce en la alteración de las funciones de esta molécula, la modificación de las bases de ADN, generación de sitios apurínicos o apirimidínicos por la ruptura del enlace glicosídico, alteración de la cadena de ADN debido al rompimiento del enlace fosfodiéster, mutaciones, activación de oncogenes e inhibición de genes supresores de tumores, así como inducción de metástasis. Figura 7.<sup>21</sup>

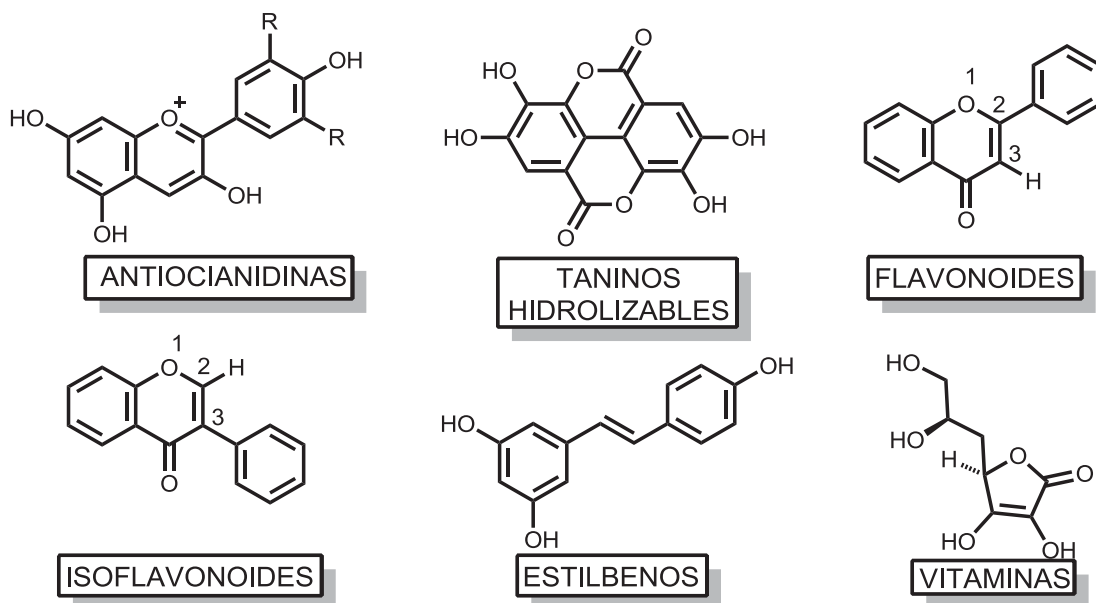


**Figura 7.** Sitios susceptibles del ADN a las reacciones de radicales libres.

## 2.4. Antioxidantes.

Los antioxidantes son sustancias que retardan o previenen el deterioro, daño o destrucción que puede ser causado por los radicales libres, de tal modo que un producto con propiedades antioxidantes puede estimular los mecanismos de reparación endógenos al daño causado por el ataque de los radicales libres; o bien, suministra entidades químicas que aumenta la capacidad endógena de secuestro de radicales libres formados en exceso en el organismo. Toda sustancia donadora de electrones es un agente reductor, por lo tanto es un antioxidante.

Los antioxidantes pueden clasificarse de distintas formas, por ejemplo, de acuerdo a su estructura química, en terpenos y polifenoles, ejemplos de estos últimos son: antocianidinas, ácido elágico, taninos, estilbenos, flavonoides e isoflavonoides. Dentro de los terpenos encontramos xantofilas, y carotenoides, compuestos coloridos que poseen excelentes propiedades antioxidantes, así como algunas vitaminas que contrarrestan el efecto de los radicales libres, tal es el caso de la Vitamina E, la Vitamina C y la Vitamina A, Esquema 6. Todos los compuestos antes mencionados pueden encontrarse en los alimentos como la soya, cebolla, aceituna, café, zanahoria, frutas y verduras verdes entre otros.<sup>22</sup>



**Esquema 6.** Tipos de antioxidantes de acuerdo a su estructura química.

De acuerdo con el papel que desempeñan dentro del cuerpo se pueden clasificar como antioxidantes enzimáticos o no enzimáticos. Como ejemplos de antioxidantes enzimáticos tenemos la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la superóxido dismutasa (SOD). Dentro de los antioxidantes no enzimáticos encontramos las vitaminas, como la Vitamina A, la Vitamina C y la Vitamina E; así como algunos péptidos, entre ellos el glutatión.

- CATALASA.

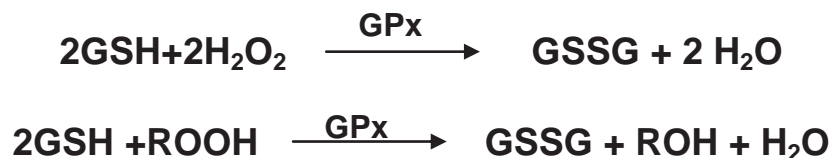
Es una enzima ampliamente distribuida en el organismo humano, específicamente en las mitocondrias, peroxisomas y citosol, su efecto reductor se ve favorecido cuando existen altas concentraciones de peróxido de hidrógeno, catalizando la reacción para formar agua y oxígeno, Esquema 7.



**Esquema 7.** Reacción de la catalasa con el peróxido de hidrógeno.

- GLUTATIÓN PEROXIDASA.

Es una enzima dependiente del selenio, cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos (ROOH), usando como agente reductor el glutatión reducido (GSH), transformándolos en derivados hidroxilados. Esquema 8.



**Esquema 8.** Reacción de la glutatión peroxidasa con el peróxido de hidrógeno.

El glutatión oxidado es reducido por acción de la glutatión reductasa, enzima que utiliza NADPH como donante de equivalentes de reducción, Esquema 9.



**Esquema 9.** Reacción enzimática de la glutatión reductasa con el glutatión oxidado.

El glutatión se localiza en el citosol de los eritrocitos y lisosomas de las células del sistema inmune principalmente. Esta enzima tiene tres formas, GPx-c o forma celular, tiene mayor afinidad por el peróxido de hidrógeno que por el lipoperóxido; GPx-p o forma extracelular, que posee afinidad para ambos sustratos; GPx-PH, que presenta una afinidad específica para los lipoperóxidos.

- SUPERÓXIDO DISMUTASA.

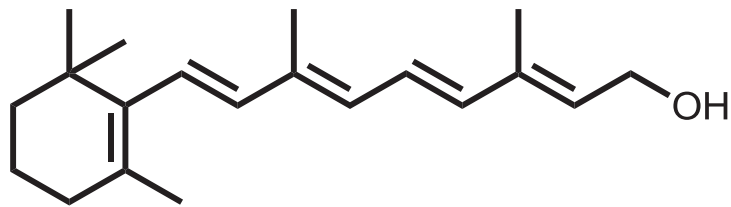
Esta enzima está formada por un grupo de metaloproteínas: Cu-SOD y Zn-SOD, que contienen cobre y zinc en su sitio activo, se localizan en el citosol y en el espacio intermembranal de las mitocondrias. La Mn-SOD, presenta un ion manganeso y se encuentra en la matriz mitocondrial. Mientras que la enzima Fe-SOD que contiene hierro se halla en el espacio periplasmático de la *Escherichia coli*. Este grupo de enzimas dismutan el oxígeno para formar peróxido de hidrógeno, su principal función es la protección ante el anión superóxido,<sup>23</sup> Esquema 10.



**Esquema 10.** Reacción general de la enzima SOD con el anión superóxido.

- VITAMINA A.

La vitamina A o retinol, Figura 8, es un carotenoide ampliamente distribuido en la naturaleza, y uno de los nutrientes más importantes para el ser humano. Es un antioxidante liposoluble que aumenta la eficiencia del sistema inmunológico. Se obtiene de la dieta en gran parte de las hortalizas verdes y amarillas como la lechuga, las espinacas y la zanahoria.<sup>24</sup>

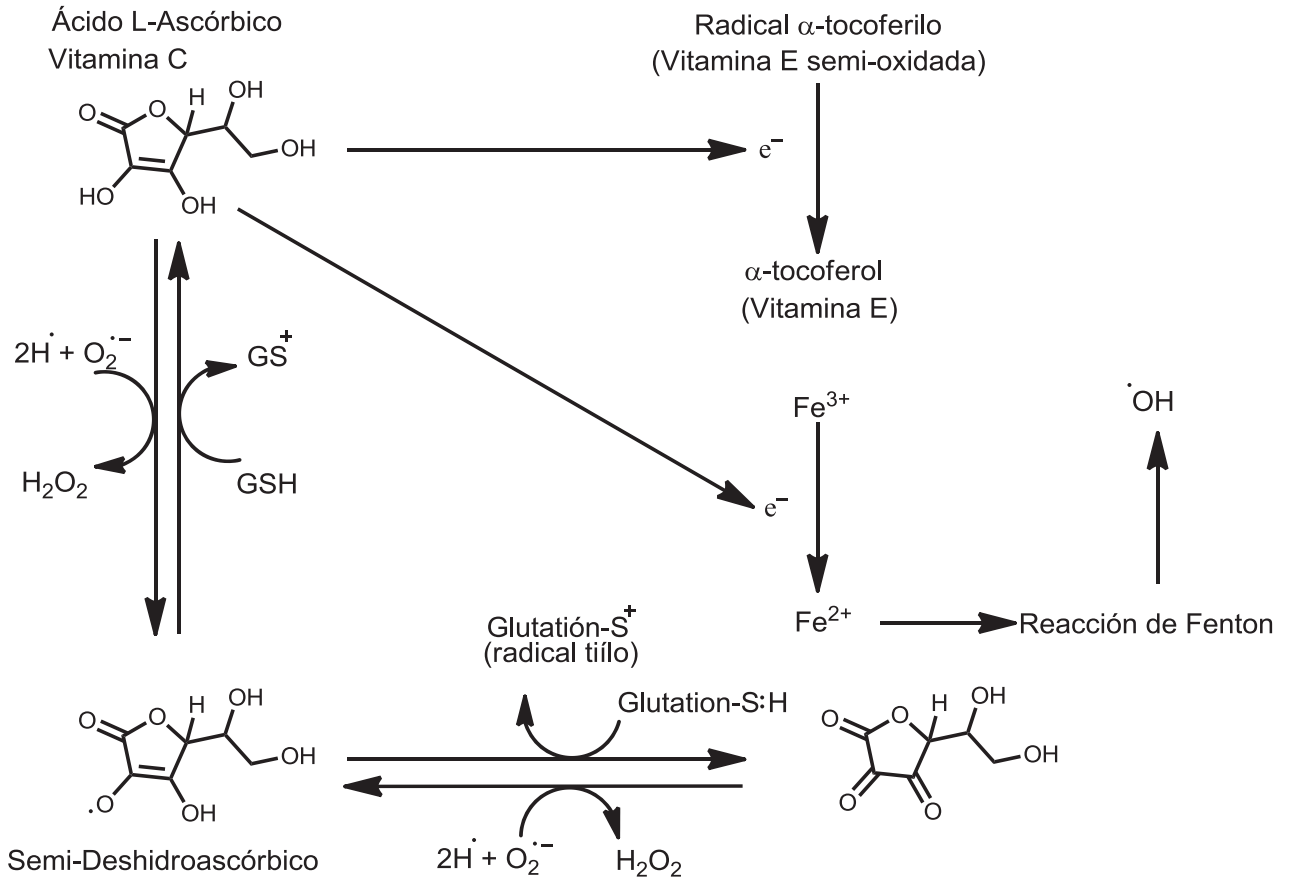


**Figura 8.** Estructura de la Vitamina A (Retinol).

- VITAMINA C.

La vitamina C o ácido ascórbico es un poderoso antioxidante que actúa en los ambientes acuosos de cuerpo, tales como los pulmones y el cristalino. El ácido *L*-ascórbico cede dos de sus hidrógenos con gran facilidad a los radicales libres, produciendo el radical libre tricarbonil ascorbato, éste último se estabiliza por resonancia; a pH fisiológico el 99% de la vitamina C está presente como ascorbato. El proceso inverso involucra al glutatión en su forma reducida, formándose el radical tío, Esquema 11.

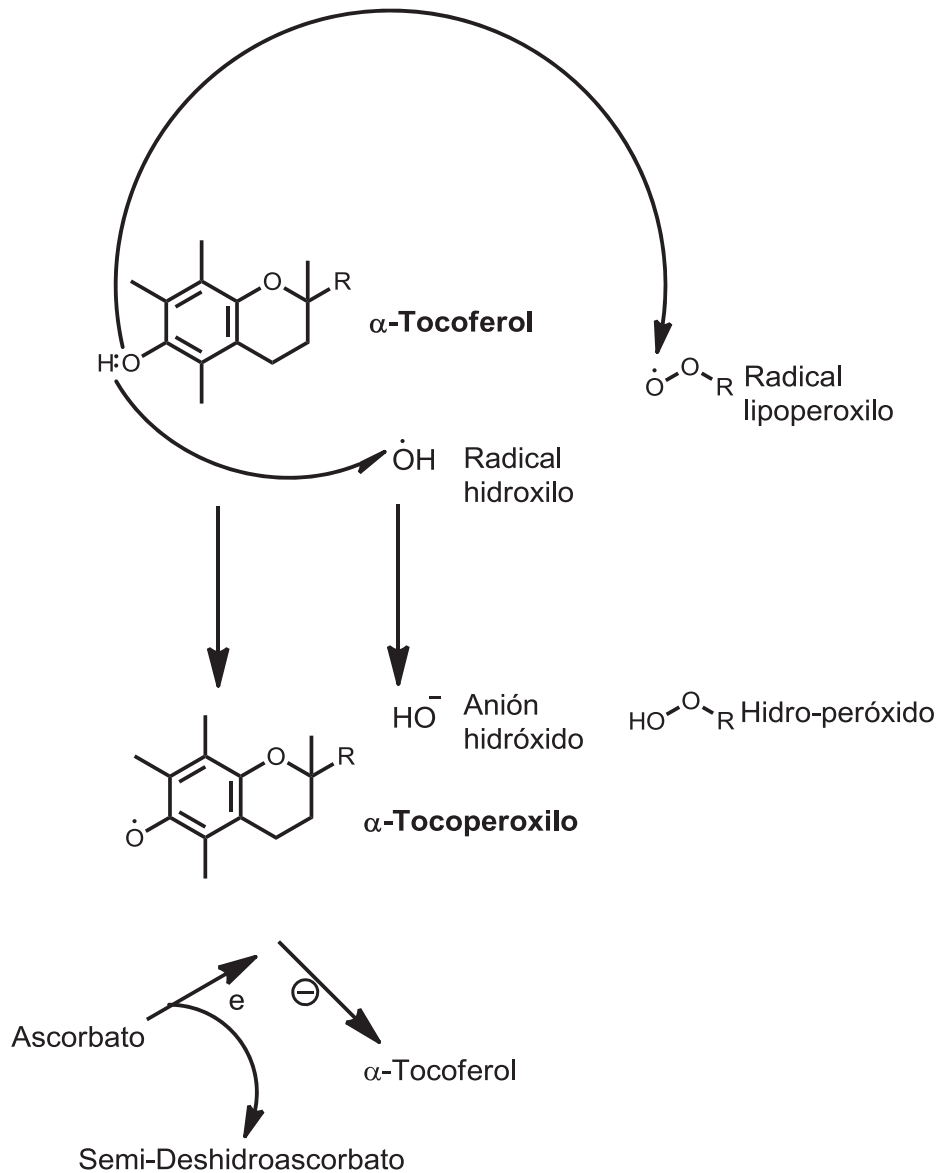




**Esquema 11.** Reacción de la Vitamina C frente a los radicales libres.

- **VITAMINA E.**

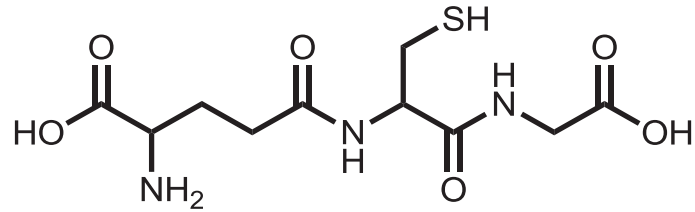
La vitamina E, es una molécula de naturaleza lipofílica y presenta ocho formas, de las cuales el  $\alpha$ -tocoferol es la forma más activa y es considerada como el principal antioxidante unido a membranas empleado por las células. Participa como protector en la peroxidación de lípidos.<sup>15</sup> Cuando la vitamina E reacciona en presencia de un radical libre forma el  $\alpha$ -tocoperóxido, estabilizando su reactividad, el radical formado de tocoferol es equilibrado al aceptar un protón del ascorbato, restituyendo la estructura de  $\alpha$ -tocoferol. Esta misma secuencia se lleva a cabo con el radical lipo-peróxido, Esquema 12.



**Esquema 12.** Reacción de la Vitamina E frente a los radicales libres.

- GLUTATIÓN.

El glutatión es un tripéptido formado por glutamato, cisteína y glicina, es considerado como el principal antioxidante hidrosoluble en la célula, se encuentra en altas concentraciones en los compartimentos celulares. La forma reducida del Glutatión es GSH, mientras que la forma oxidada es denominada disulfuro de glutatión (GSSG), Figura 9.



**Figura 9.** Estructura del Glutati3n.

En el caso de los antioxidantes no enzimáticos se puede mencionar a las vitamina E, es un 3cido graso poliinsaturado que se encuentra en las membranas celulares, adem3s de nutrirla, el  $\alpha$ -tocoferol, se encarga de detener las reacciones en cadena generadas por la oxidaci3n de los radicales libres.<sup>25</sup>

As3 mismo, los mecanismos antioxidantes con que cuenta el organismo humano para reducir el exceso de ROS, causado por factores end3genos o ex3genos, son los siguientes:

I. Mecanismo preventivo.

Este mecanismo est3 basado en la acci3n que ejercen prote3nas que poseen n3cleos coordinados o con capacidad de enlace de metales, tales como la alb3mina, metalotione3na y ceruloplasmina que poseen un n3cleo central de cobre (Cu) o fierro (Fe) como es el caso de la ferritina, transferrina y mioglobina. As3 se previene la formaci3n de ROS muy da3inas, como por ejemplo, los radicales hidroxilo, a partir de otras mol3culas.

II. Mecanismo secuestrador.

Consiste en la eliminaci3n de ROS formadas en el organismo, lo cual puede lograrse por la acci3n de enzimas tales como la super3xido dismutasa (SOD), glutati3n peroxidasa (GPx), catalasa y otras metaloenzimas o la presencia de otras entidades qu3micas con capacidad secuestradora de radicales libres, tales como los 3cidos grasos poliinsaturados, vitamina C, tocoferoles (Vitamina E), bilirrubina, carotenoides y flavonoides.

### III. Mecanismo reparador.

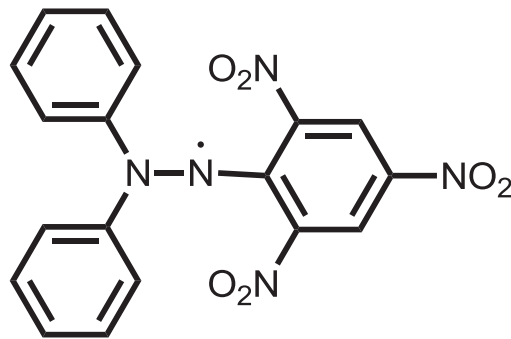
Como su nombre lo dice se trata de enzimas que reparan a las biomoléculas que han sido dañadas por los radicales libres, tales como la GPx, glutatión reductasa (GRd) y metionina-sulfóxido reductasa (MRS). Estas enzimas actúan como intermediarias en el proceso reparador del daño oxidativo, por el ataque de ROS producidas en exceso. Todo factor del medio que inhiba o modifique su actividad se convierte en una condición que favorece la aparición o reforzamiento del estrés oxidativo.<sup>18</sup>

#### **2.5. Análisis de la Actividad Antioxidante *in vitro*.**

Para el análisis de la actividad antioxidante *in vitro* de un compuesto existen diversos ensayos, estos se pueden clasificar como pruebas basadas en reacciones de transferencia de un átomo de hidrógeno (TAH), son los más comunes y miden la capacidad del antioxidante para neutralizar un radical por donación de un átomo de hidrógeno. Las reacciones TAH son independientes del pH y del disolvente, por lo que se llevan a cabo rápidamente. Ahora bien, las pruebas basadas en la transferencia de electrones (TE) miden la eficacia de un antioxidante para transferir un electrón y reducir un compuesto. Las reacciones TE son lentas, dependen del pH, por ello los resultados se cuantifican de acuerdo a la disminución del porcentaje del radical.<sup>26</sup>

La Actividad Antioxidante Total, denominada TAOC por sus siglas en inglés (Total Antioxidant Capacity) es una prueba espectrofotométrica que nos permite observar la actividad antioxidante no enzimática a través de la reducción de fosfomolibdeno, a diferentes concentraciones (0.24, 1.0, 5.0 y 10 mg/mL), a cada una de ellas se le agrega un volumen conocido del compuesto que se desea evaluar; el estándar utilizado para esta técnica es ácido ascórbico, por lo tanto la TAOC se expresa como equivalentes de ácido ascórbico.

De tal modo, se puede hacer una batería de pruebas con diferentes radicales libres, por ejemplo, se pueden realizar ensayos tomando el anión superóxido, anión hidroxilo y el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), Figura 10. Para cada uno de ellos se realizan estudios a diferentes concentraciones y un volumen constante del compuesto a evaluar. Cada uno de estos radicales libres aporta información específica y tangible sobre la respuesta que presenta el antioxidante frente a ellos, ya que se va cuantificando colorimétrica o espectroscópicamente la concentración de radical libre reducido.



**Figura 10.** Estructura del DPPH.

Como se ha revisado anteriormente, una molécula antioxidante es un agente reductor, por lo tanto es posible observar la capacidad reductora que tiene por medio de radicales libres de origen metálico como es el Hierro ( $\text{Fe}^{+2}$ ); en este caso el compuesto que se estudia se hace reaccionar con el metal y por medio de espectrofotometría se cuantifica la actividad quelante, teniendo como control positivo el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).<sup>27</sup>

A nivel celular existen algunas pruebas para analizar los efectos de los radicales libres sobre las biomoléculas, en estos experimentos el objetivo principal es observar la viabilidad de la célula, generalmente esta determinación se hace sobre líneas celulares cancerosas; a las células a evaluar se les agrega una solución de concentración conocida del compuesto en evaluación por un tiempo determinado y por medio de espectrofotometría, se establece la cantidad de

células viables. Para esta determinación se toma como estándar la densidad óptica de las células antes de ser tratadas y después de ser sometidas a un antioxidante fuerte, control positivo.<sup>26</sup>

Por medio de ensayos de quimioluminiscencia o electroluminiscencia, se pueden cuantificar las ROS intracelulares, en células tratadas con la molécula en estudio y como control positivo la muestra que recibió un tratamiento con antioxidantes enzimáticos como puede ser la SOD, el resultado se reporta en función de la enzima usada como control, en este caso en unidades de superóxido dismutasa.<sup>26</sup>

Para observar la acción de una molécula antioxidante sobre biomoléculas en específico se realizan pruebas con homogenado de hígado o cerebro de rata. Por ejemplo, el primero se usa cuando se evalúa la acción del antioxidante frente a la peroxidación de lípidos, teniendo además, la posibilidad de comparar los resultados obtenidos frente a la muestra no tratada, ya que las células hepáticas poseen una importante concentración de la enzima GSH.<sup>28</sup>

### 3. JUSTIFICACIÓN.

Se ha observado que en enfermedades crónico-degenerativas como la Aterosclerosis, en donde las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que forman la placa arteriosclerótica son oxidadas por los radicales libres se generan productos con un mayor poder aterogénico.<sup>29</sup> Otra patología en donde se ha sugerido la implantación de moléculas pro-oxidantes es el cáncer, ya que durante el desarrollo tumoral se producen óxidos radicalarios de nitrógeno, los cuales se unen a proteínas carcinogénicas como son las nitrosaminas, destruyendo las sustancias citoprotectoras de los tejidos sanos; dicha asociación entre proteínas y radicales libres se observa en el cáncer gástrico.

Además, en padecimientos en donde el paciente está sometido de manera constante a una alta concentración de radicales libres y un aumento del estrés oxidativo, se observan signos y síntomas agravados; algunos de estos padecimientos son: la Catarata senil; la Insuficiencia Renal Aguda (IRA), Crónica (IRC) y Diálisis; la Diabetes mellitus; la Hipertensión arterial; la Cirrosis, Insuficiencia hepática y Hepatopatía alcohólica; Artritis; inflamación y envejecimiento celular.<sup>24</sup>

Por lo tanto, teniendo como perspectiva la riqueza natural y el conocimiento herbolario con el que cuenta nuestro País, en particular, el Estado de Michoacán; aunado al conocimiento que se tiene sobre la importancia de mantener el equilibrio óxido-reducción entre radicales libres y antioxidantes, surge el interés por estudiar a la parvifolina (1) aislada de *Acourtia humboldtii* como una posible molécula para evitar la oxidación por radicales libres.

#### **4. HIPÓTESIS.**

La parvifolina (1) al presentar un grupo hidroxilo y enlaces dobles en su estructura, semejantes a los antioxidantes no enzimáticos, neutralizará radicales libres mediante un mecanismo secuestrador.

La semejanza estructural de la parvifolina (1) con los antioxidantes no enzimáticos indica que podría utilizarse como antioxidante.

#### **5. OBJETIVO GENERAL.**

El presente trabajo tiene como objetivo llevar a cabo la reacción de la parvifolina (1) con el radical libre DPPH, así como aislar e identificar el producto de dicha reacción.

##### **5.1. Objetivos específicos.**

- Aislar la parvifolina (1) del extracto hexánico de las raíces de *Acourtia humboldtii*.
- Realizar la reacción de la parvifolina (1) con el radical libre DPPH para determinar los productos de la reacción que se genera con esta interacción.
- Aislar e identificar los productos de la reacción de la parvifolina (1) con DPPH por métodos espectroscópicos.



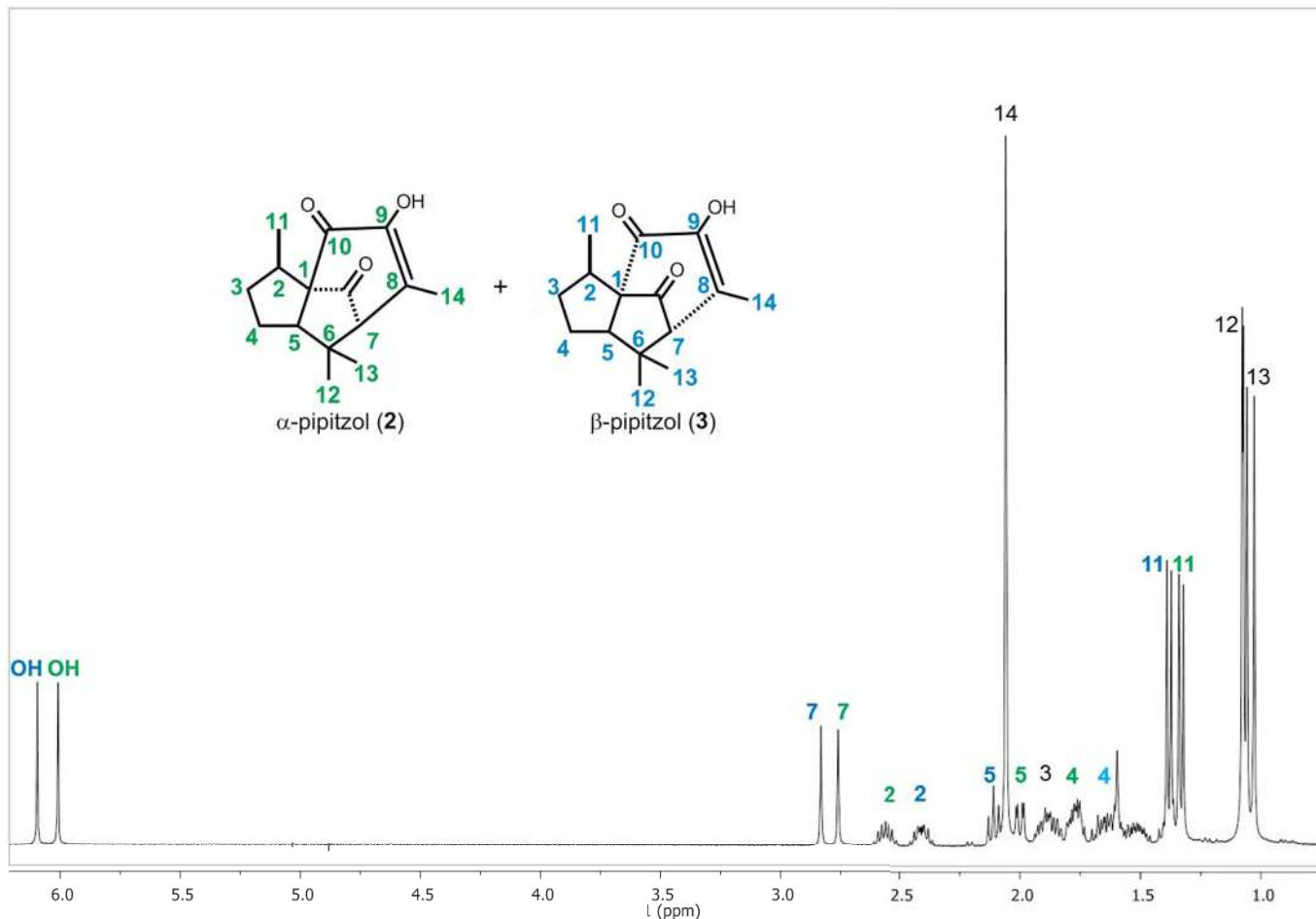
## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Con el propósito de obtener la parvifolina (**1**), fue macerada a temperatura ambiente durante cinco días la raíz molida de *Acourtia humboldtii*, la cual fue colectada el 2 de octubre de 2010, en el km 63 de la carretera Morelia-Zacapu.

Cuando fue obtenido el extracto hexánico se observó la formación de dos tipos de cristales, unos en forma de agujas transparentes, ligeramente amarillos; y otros en forma de prismas, blancos transparentes. El extracto total fue purificado por medio de cromatografía en columna. Obteniéndose a la parvifolina (**1**) en forma de una miel transparente e identificada por medio de RMN.

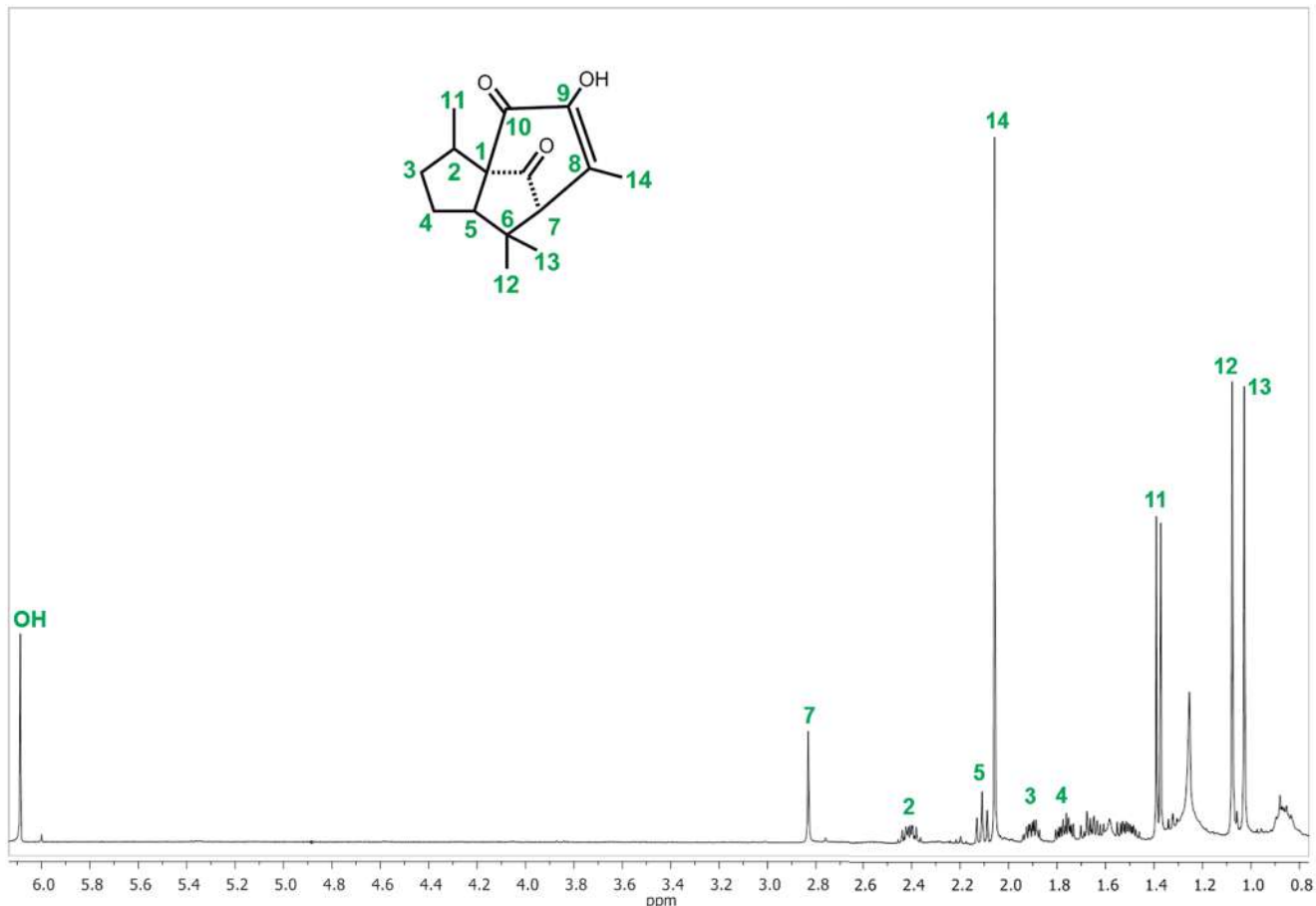
En las primeras fracciones obtenidas de la purificación del extracto hexánico total, eluidas con hexano fueron aislados unos cristales blancos transparentes en forma de prisma, semejantes a los observados en el extracto; dichos cristales fueron analizados por RMN de  $^1\text{H}$ , Figura 11. Las señales resultaron semejantes a los pipitzales **2** y **3**, los datos espectroscópicos experimentales obtenidos se compararon con los reportados.<sup>16, 30</sup>

Es necesario hacer notar que después de una búsqueda bibliográfica minuciosa hasta ahora no se han reportado su presencia en *Acourtia humboldtii* hasta ahora.



**Figura 11.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  de los pipitzoles **2** y **3**.

En la fracción 24, se logró aislar e identificar por medio de RMN de  $^1\text{H}$  el  $\alpha$ -pipitzol, el cual fue comparado con los datos espectroscópicos reportados en la bibliografía,<sup>30</sup> En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **2** se observó, a campos bajos la señal característica para el protón del grupo hidroxilo ubicado en C-9, mientras que a campos altos, a 2.83 ppm, se observó una señal simple correspondiente a H-7; de igual manera, para H-2, H-3 y H-4 se observaron señales múltiples, en 2.42 ppm, 1.90 ppm y 1.77 ppm respectivamente, por último las señales correspondientes a los protones de los metilos H-12, H-13 y H-14 se observaron como señales simples en 1.08 ppm, 1.03 ppm, 2.06 ppm cada una, Figura 12.



**Figura 12.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  de **2**.

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la parvifolina (**1**), Figura 13, en la región de los protones aromáticos se encontraron las señales de los protones H-4 y H-1 en 6.89 ppm y 6.61 ppm respectivamente, en 5.36 ppm se observó una señal característica para un protón vinílico (H-12), mientras que en 4.58 ppm se encontró una señal simple ancha correspondiente al protón del grupo hidroxilo del C-6. Para los protones  $\alpha$  y  $\beta$  de C-14 se observó un sistema AB, con señales en 3.53 ppm y 3.02 ppm; en 3.10 ppm se observó una señal múltiple atribuida a H-8. Los  $\text{CH}_3$ -7,  $\text{CH}_3$ -15 y  $\text{CH}_3$ -9, se encontraron en campos altos en 2.20 ppm, 1.75 ppm y 1.31 ppm; para confirmar la asignación de los metilenos  $\text{CH}_2$ -10 y  $\text{CH}_2$ -11 se realizó un análisis con el experimento bidimensional de correlación homonuclear (COSY).

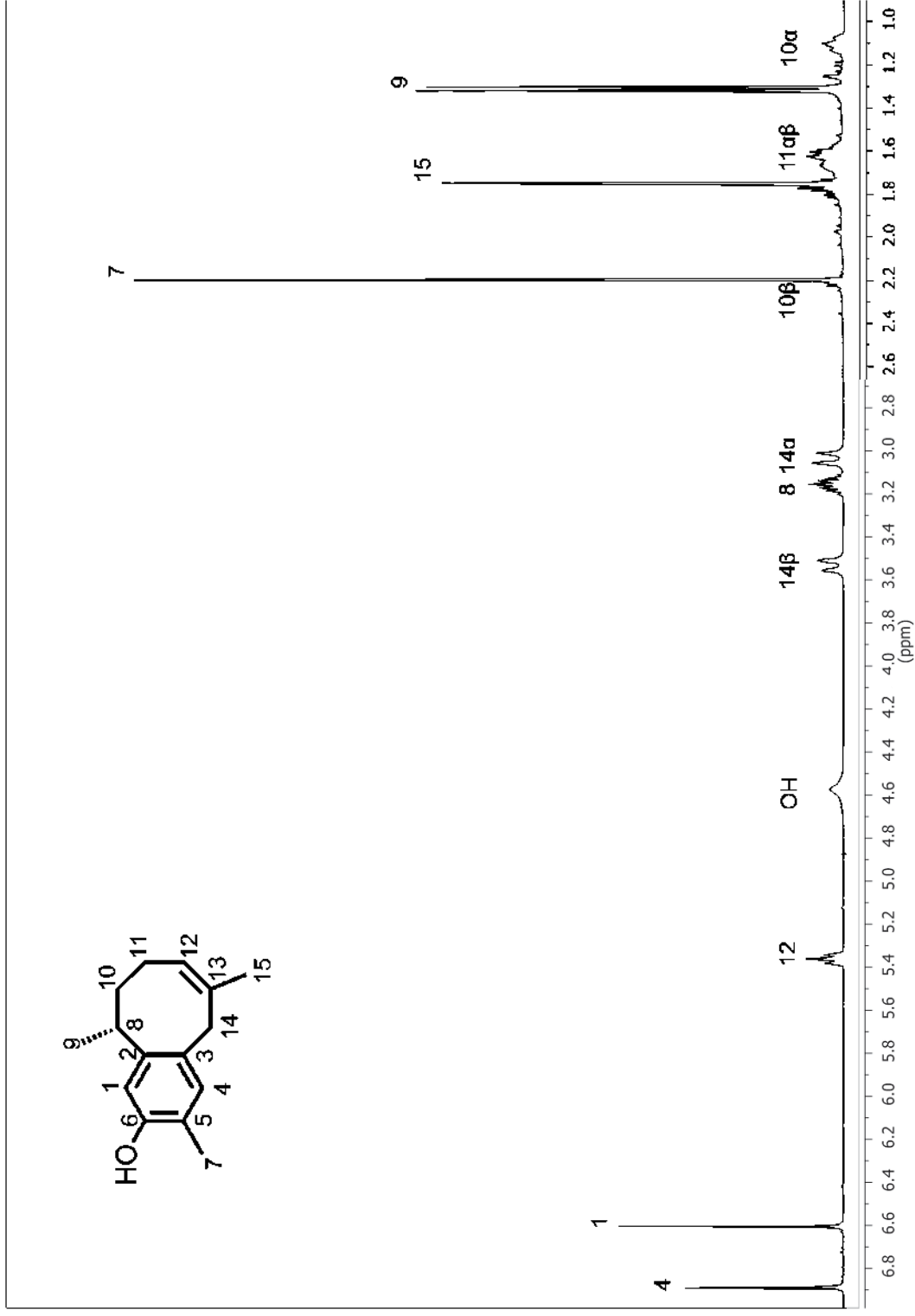
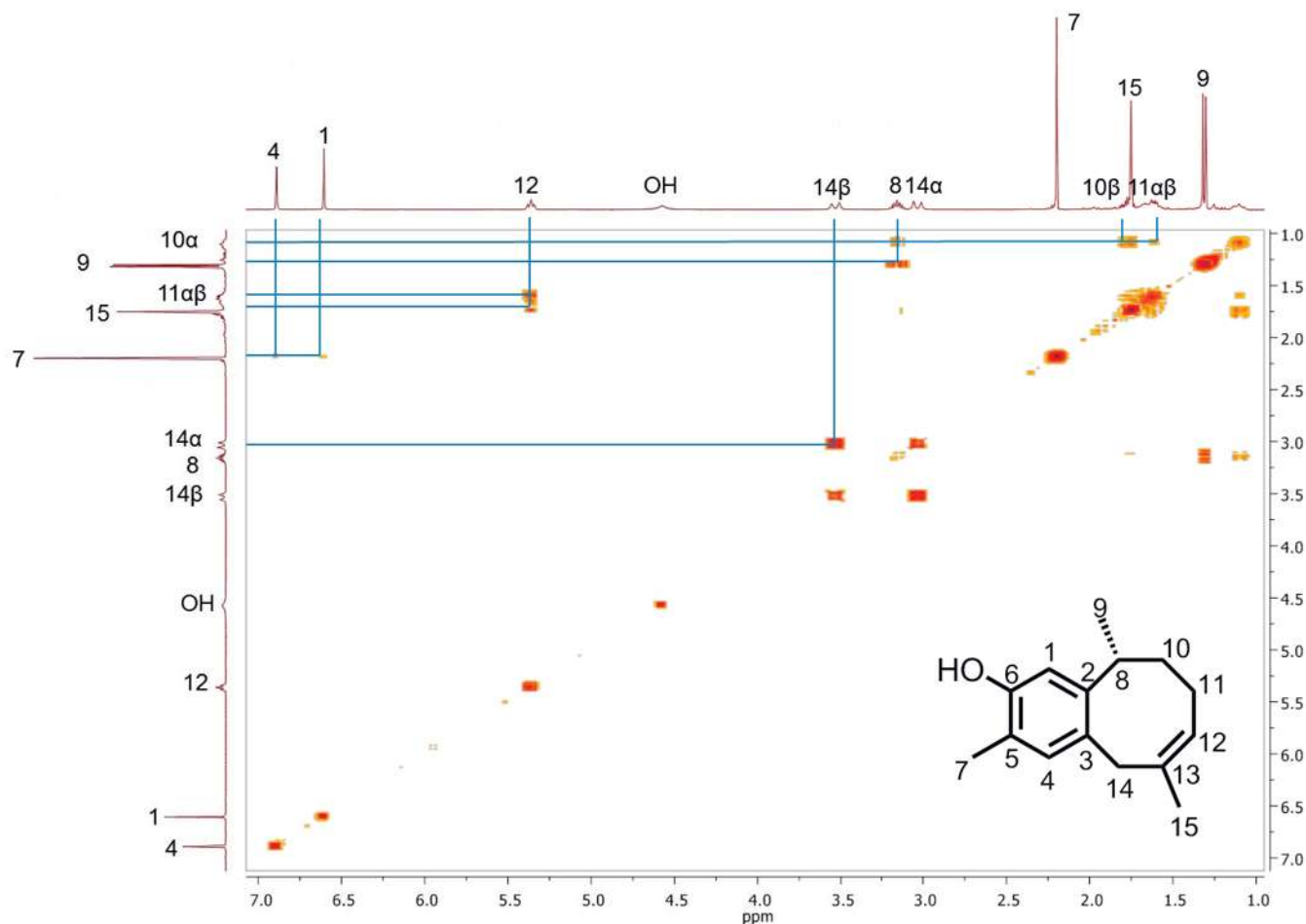


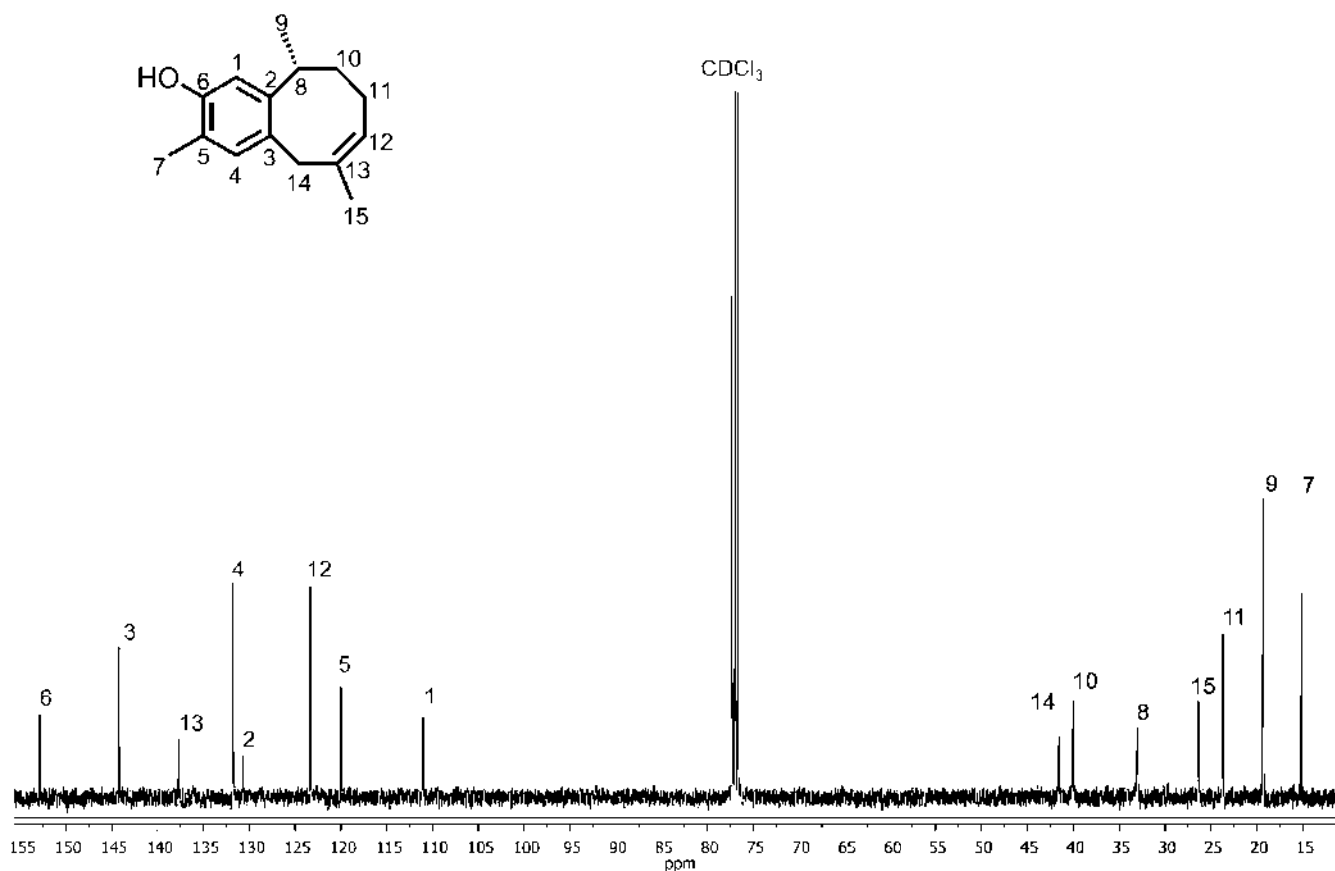
Figura 13. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub> de la parvifolina (1).

En el espectro COSY, se observó la correlación que existe entre el protón H-12 y H-11, mientras que H-8 presentó correlaciones con H-9 y H-10 $\alpha$ ; este último, presentó también una correlación con H-10 $\beta$ , Figura 14.



**Figura 14.** Espectro de COSY de la parvifolina (1).

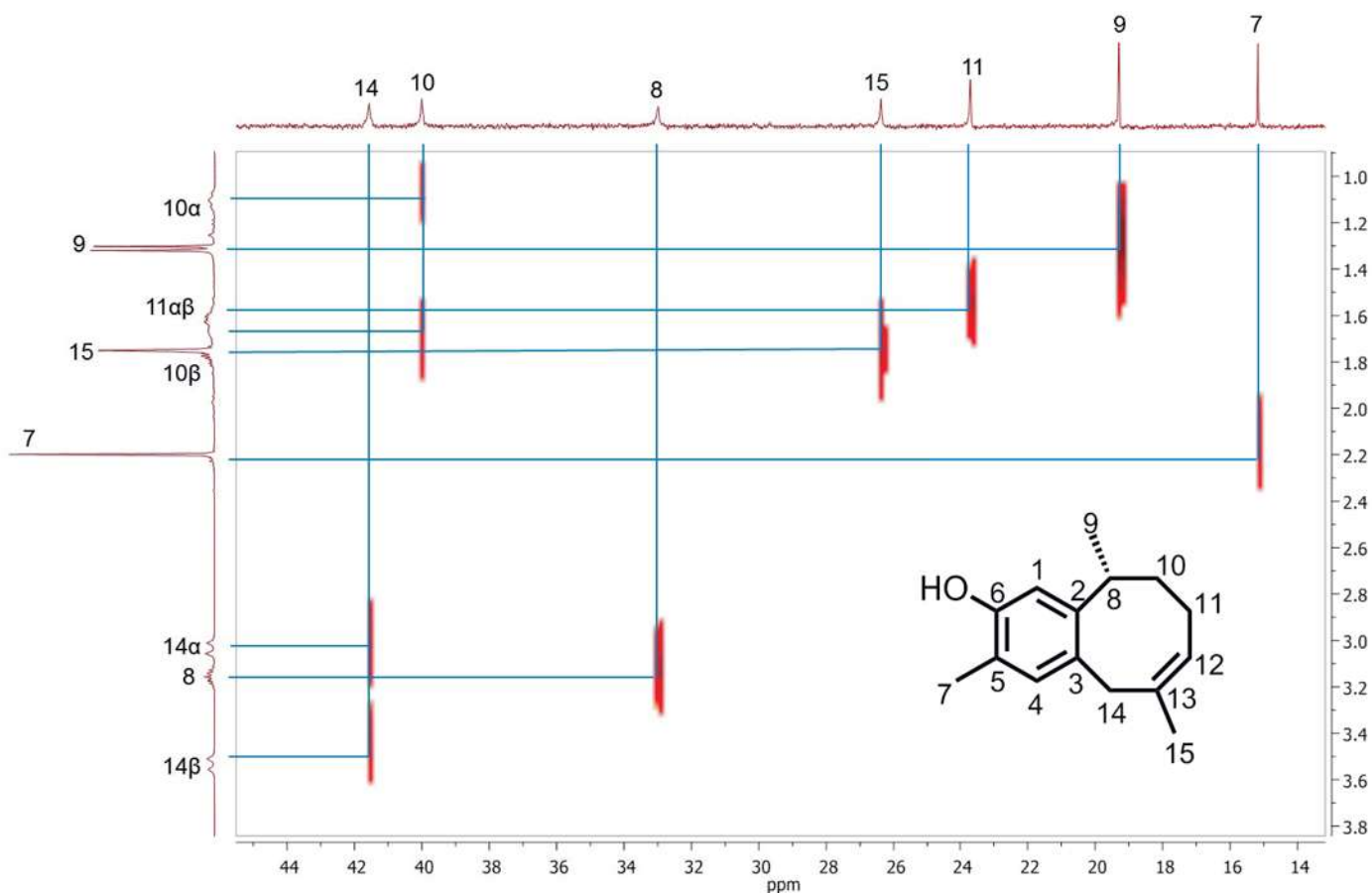
En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de la parvifolina (1), se observaron las quince señales características de los sesquiterpenos, la señales desplazadas a campos bajos correspondieron a los carbonos cuaternarios C-6, C-3, C-13 en 152.9 ppm, 144.2 ppm, y 137.8 ppm, respectivamente. Los CH-1 y CH-4 del anillo aromático se observaron en 111.1 ppm y 131.8 ppm. Entre 41.6 ppm y 15.2 ppm se observaron las señales características para los  $\text{CH}_3$ - y  $\text{CH}_2$ - presentes en la molécula, Figura 15.



**Figura 15.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz en  $\text{CDCl}_3$  de la parvifolina (1).

De acuerdo con la información proporcionada por el espectro de dos dimensiones de correlación heteronuclear (HETCOR), se observó que el carbono correspondiente al el protón vinílico H-12 se localizó en 123.3 ppm. Teniendo ubicadas las señales que se observan a campo alto en el espectro de hidrógeno fue realizada una expansión a la región de los protones alifáticos. De tal modo que para C-14 ubicado 41.6 ppm se observaron dos señales que corresponden a H-14 $\alpha$  y H-14 $\beta$ ; este mismo patrón se presentó para C-10 en 40.0 ppm. En cambio, para el C-11 en 23.7 ppm, solo se distinguió una sola señal por lo tanto, H-11 $\alpha$  y H-11 $\beta$  se localizaron en la misma señal múltiple en 1.62 ppm en la RMN de  $^1\text{H}$ . Revisando las señales asignadas con las que no mostraron ninguna correlación con el espectro de protón, se concluye que se tratan de los carbonos cuaternarios

C-2 y C-5, los cuales se observan a 130.8 ppm y 120.0 ppm, respectivamente, Figura 16.



**Figura 16.** Espectro de HETCOR de la parvifolina (1).

Por medio del experimento NOESY, Figura 17, se localizaron los hidrógenos de la molécula que interactúan en el espacio, además de identificar los protones que se encuentran en posición alfa o beta; de tal forma que se observa la correlación de H-4 con el H-14 $\alpha$ , mientras que H-14 $\beta$  se acopla con los protones del metilo 15. Por su parte los protones H-10 $\alpha$  y H-10 $\beta$  muestran correlación entre ellos y con el metilo 9.

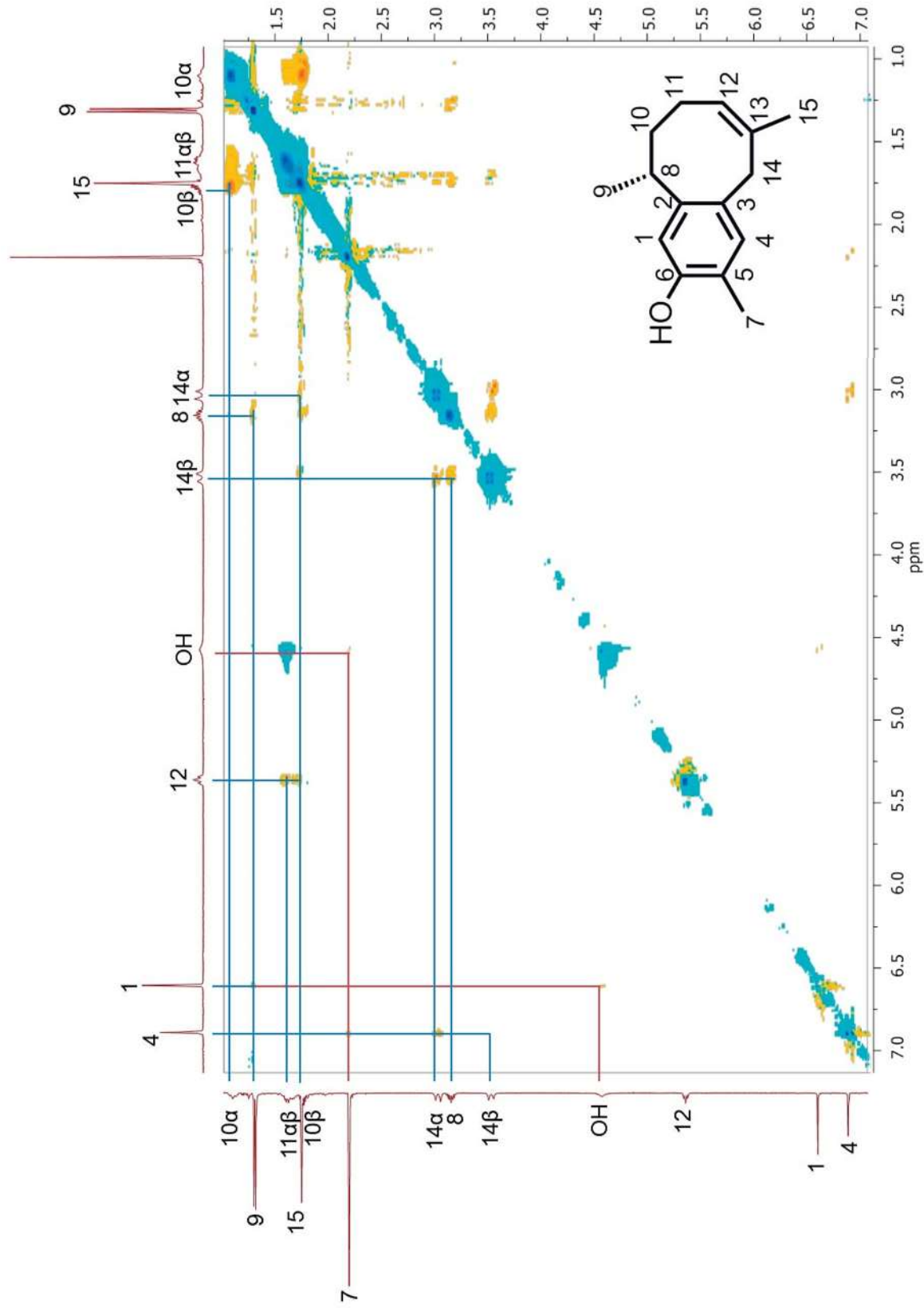
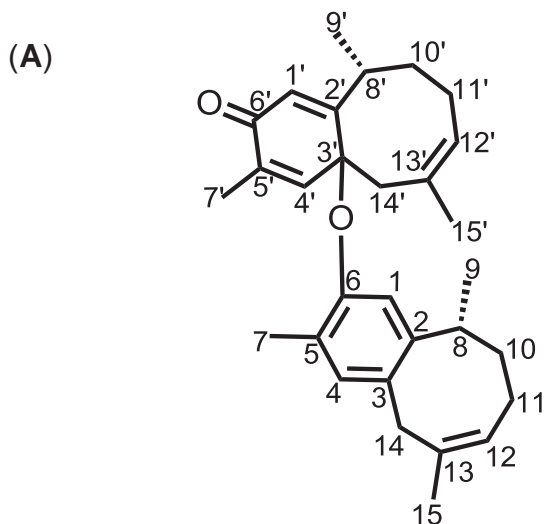


Figura 17. Espectro de NOESY de la parvifolina (1).



Una vez aislada la parvifolina (**1**), se observó que contenía una impureza asociada a ella, así que se sometió a una reacción de acetilación con anhídrido acético y piridina; esta reacción fue purificada logrando obtener cristales puros del acetato de parvifolina. Posteriormente el acetato se sometió a hidrólisis alcalina con hidróxido de potasio (KOH) y metanol (MeOH) mediante el reactor de microondas a 100 watts, por 10 minutos y a 80°C, para obtener nuevamente la parvifolina (**1**) pura y caracterizarla, Figura 16 y 17. A partir de **1** se procedió a realizar la reacción frente al DPPH bajo las siguientes condiciones: 1 Eq. de DPPH y 6.2 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> usando el reactor de microondas a 200 watts, por 15 minutos y a 70°C.

El crudo de la reacción fue purificado por cromatografía en columna utilizando gel de sílice de 230-400 mallas como soporte y mezclas de Hexano-AcOEt en orden de polaridad ascendente; de las fracciones 13 a 18 mostraron en su espectro de RMN de <sup>1</sup>H un compuesto mayoritario contaminado con DPPH reducido, por lo que se procedió a realizar una purificación mediante cromatografía en placa preparativa. El compuesto puro fue identificado y caracterizado por medio de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C como el dímero **4**, Figura 18.





**Figura 18.** (A) Estructura del dímero de la parvifolina (**4**); (B) Modelo tridimensional de **4** obtenido mediante Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) a un nivel de cálculo B3LYP/DGDZVP.

En el espectro de protón, se presentó un sistema de señales doble con respecto a la parvifolina (**1**), de tal modo que mientras H-4 y H-1 conservaron sus desplazamientos en 6.89 ppm y 6.61 ppm, y sus homólogos H-4' y H-1' se observaron como señales simples en 6.79 ppm y 6.30 ppm respectivamente. Los protones vinílicos H-12 y H12' se mostraron ligeramente desplazados en 5.50 ppm y 5.30 ppm, en comparación con la señal de la materia prima que se observaba en 5.36 ppm. La señal correspondiente a H-14 $\alpha$  ubicada en 3.00 ppm se encontró ligeramente traslapada con la señal de H-8 en 3.05 ppm y H-14' $\beta$  en 2.97 ppm; mientras que su equivalente H-14' $\alpha$  se observó en 2.36 ppm. Los seis metilos se concentraron en 2.24 ppm (H-7), 1.91 ppm (H-7'), 1.72 ppm (H-15), 1.61 ppm (H-15'), 1.00 ppm (H-9) y 0.71 ppm (H-9'), Figura 19.

Con el objetivo de localizar los protones de C-10 y C-11, además de sus homólogos, se realizaron experimentos de dos dimensiones COSY, HETCOR y NOESY.

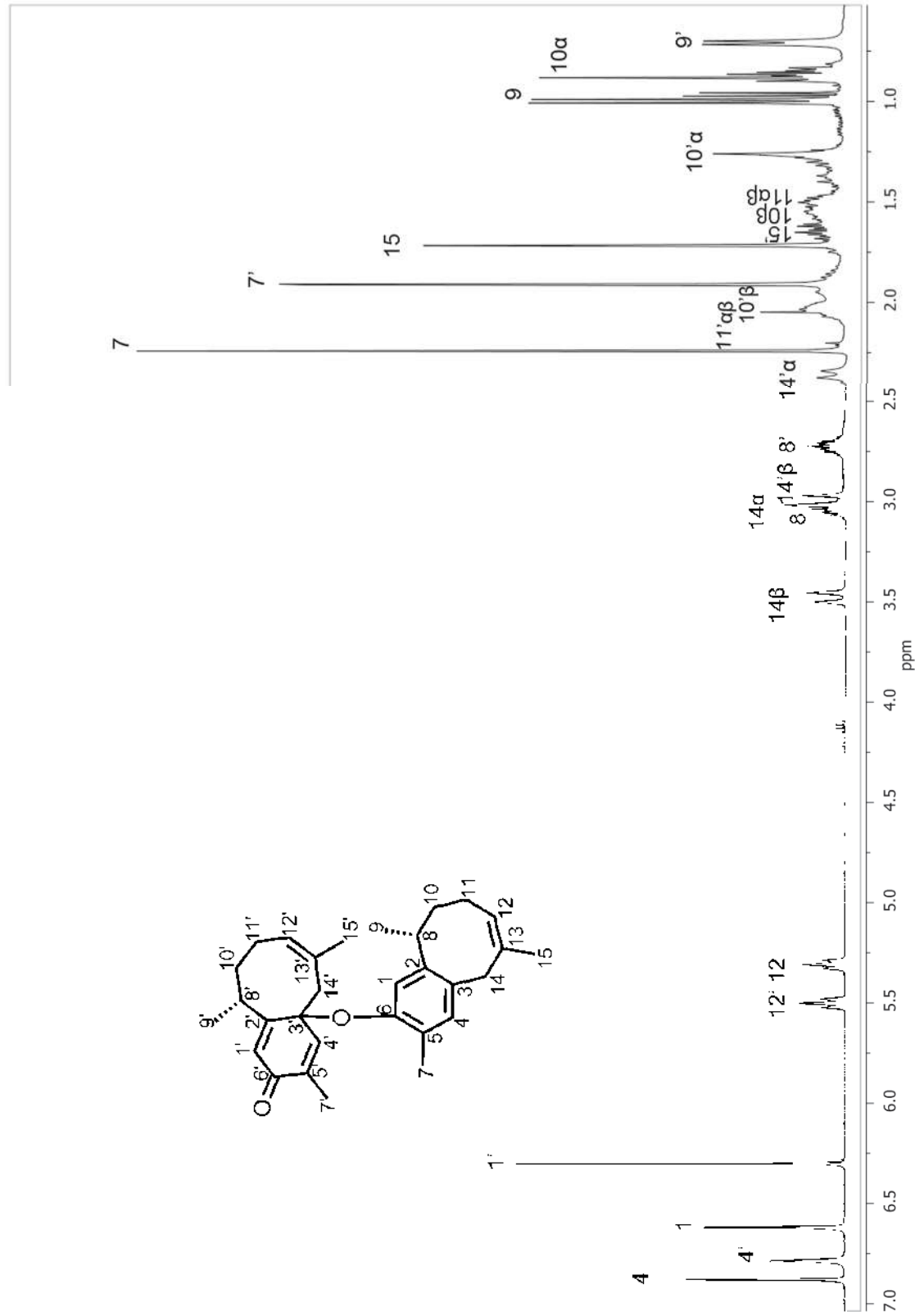
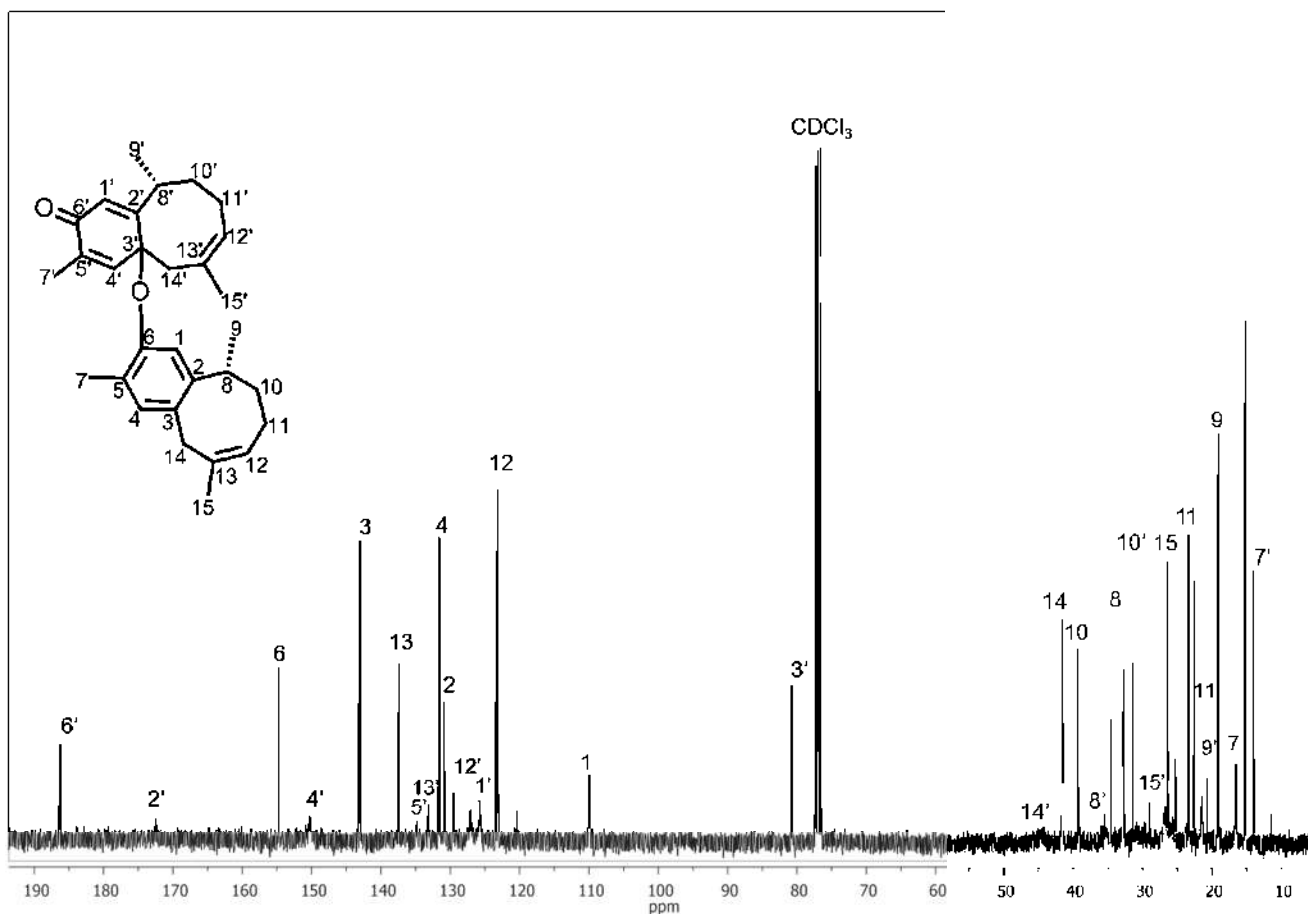


Figura 19. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del dímero de la parvifolina (4).

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , se observan las treinta señales lo que nos confirma la presencia de un producto dimérico **4**, de manera semejante al espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del monómero de parvifolina (**1**) se observaron patrones y desplazamientos semejantes en el producto de reacción. Sin embargo dentro de los carbonos cuaternarios, se distinguió C-6' base de cetona en 186.5 ppm y C-3' en 80.7 ppm, esto como resultado de la unión de los monómero de **1**. Además este espectro mostró varias señales anchas, las cuales corresponden a C-2' en 172.6 ppm, C-4' en 150.3 ppm, C-5' en 134.8 ppm, C-12' 127.1 ppm, C-1' en 125.8 ppm, C-8' en 35.6 ppm y C-15' en 26.8 ppm aproximadamente, este efecto podría deberse a un efecto dinámico que estuviese experimentando la molécula, Figura 20.



**Figura 20.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del dímero de la parvifolina (**4**).

En el experimento COSY, se observan las correlaciones semejantes a las del espectro de la parvifolina (1), por ejemplo, si el H-4 se acoplaba con H-7, la señal correspondiente a H-4' mostró una correlación con H-7'. Estas semejanzas fueron observadas para el resto de las señales del dímero de la parvifolina, Figura 21.

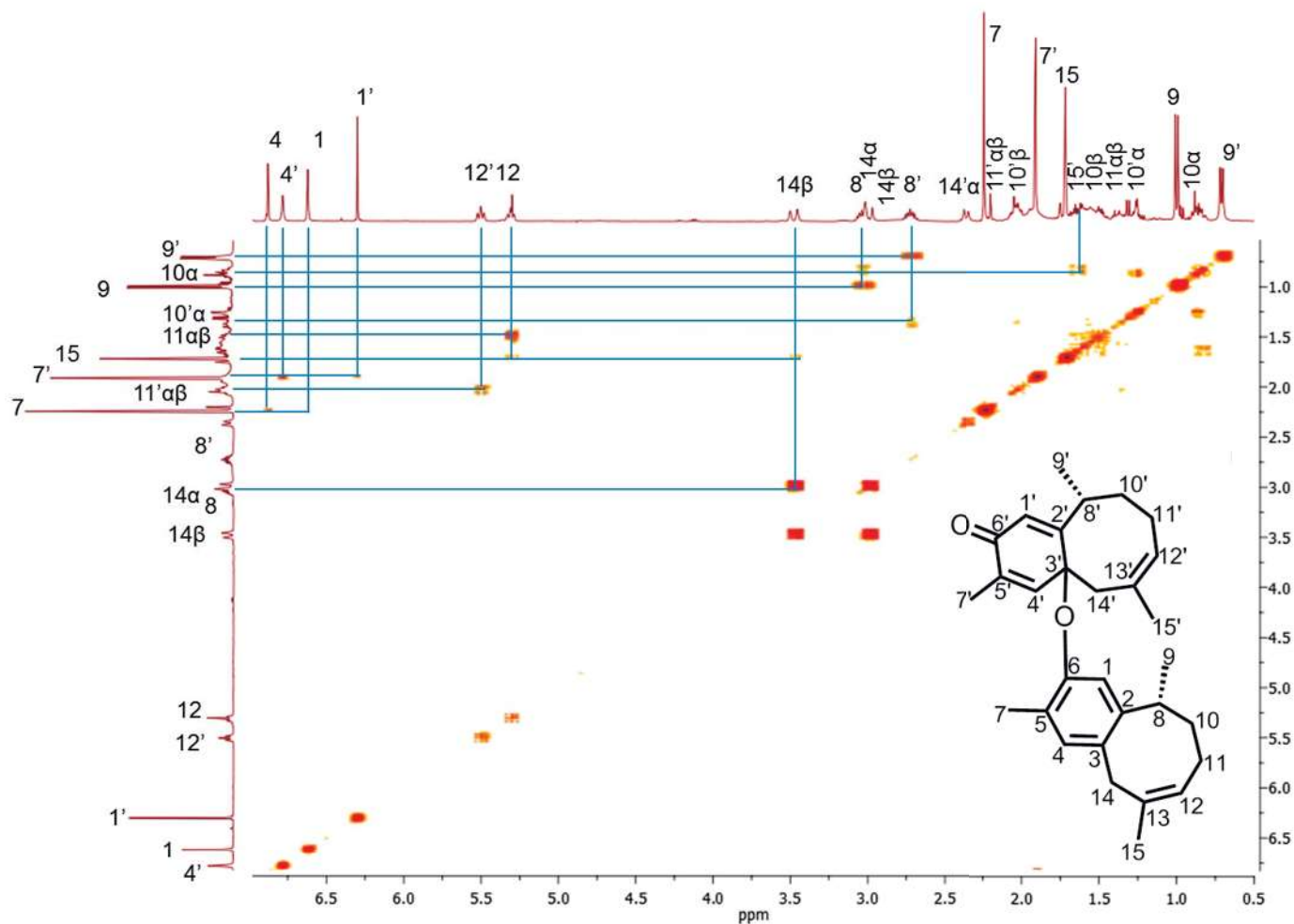
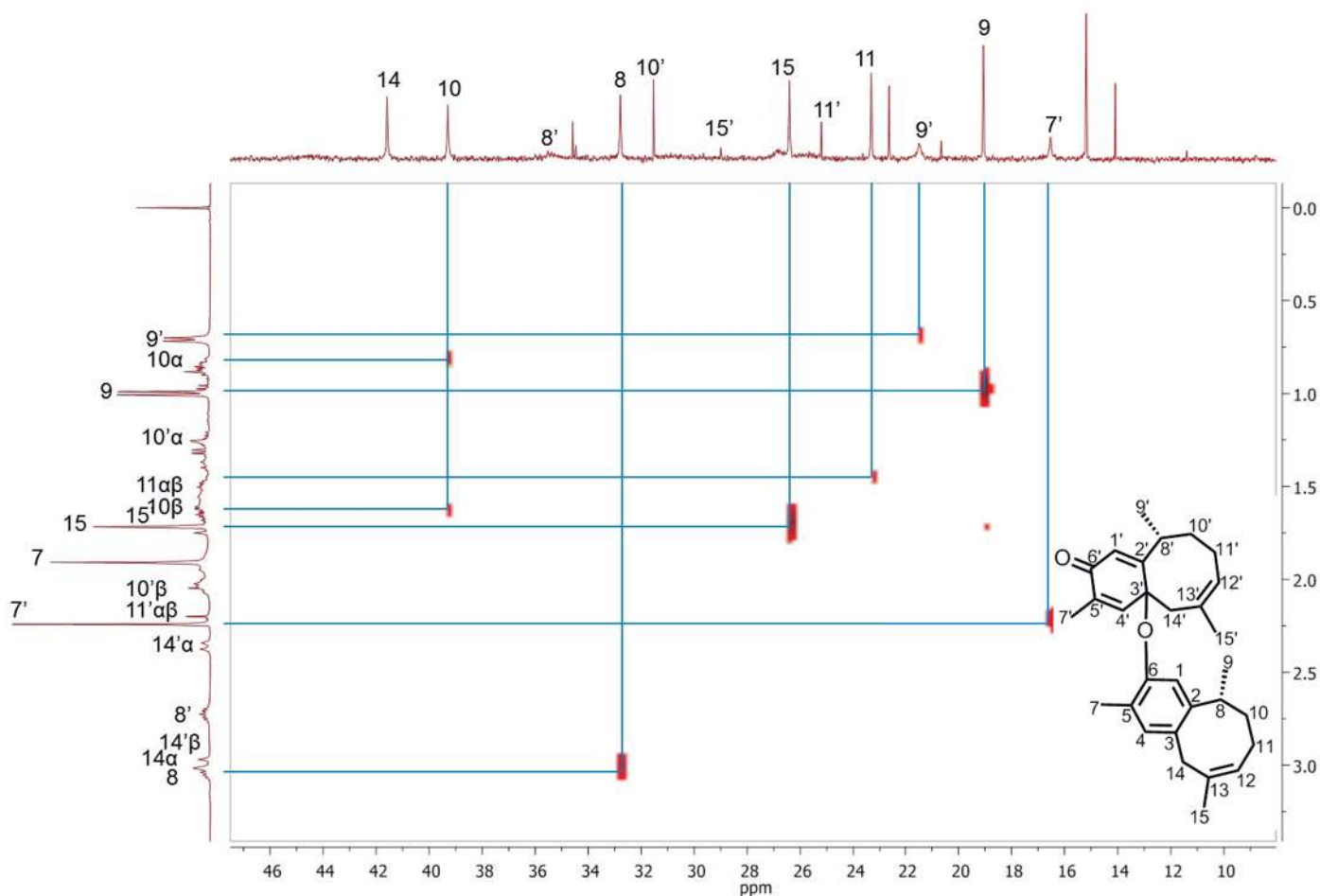


Figura 21. Espectro COSY del dímero de la parvifolina (4).

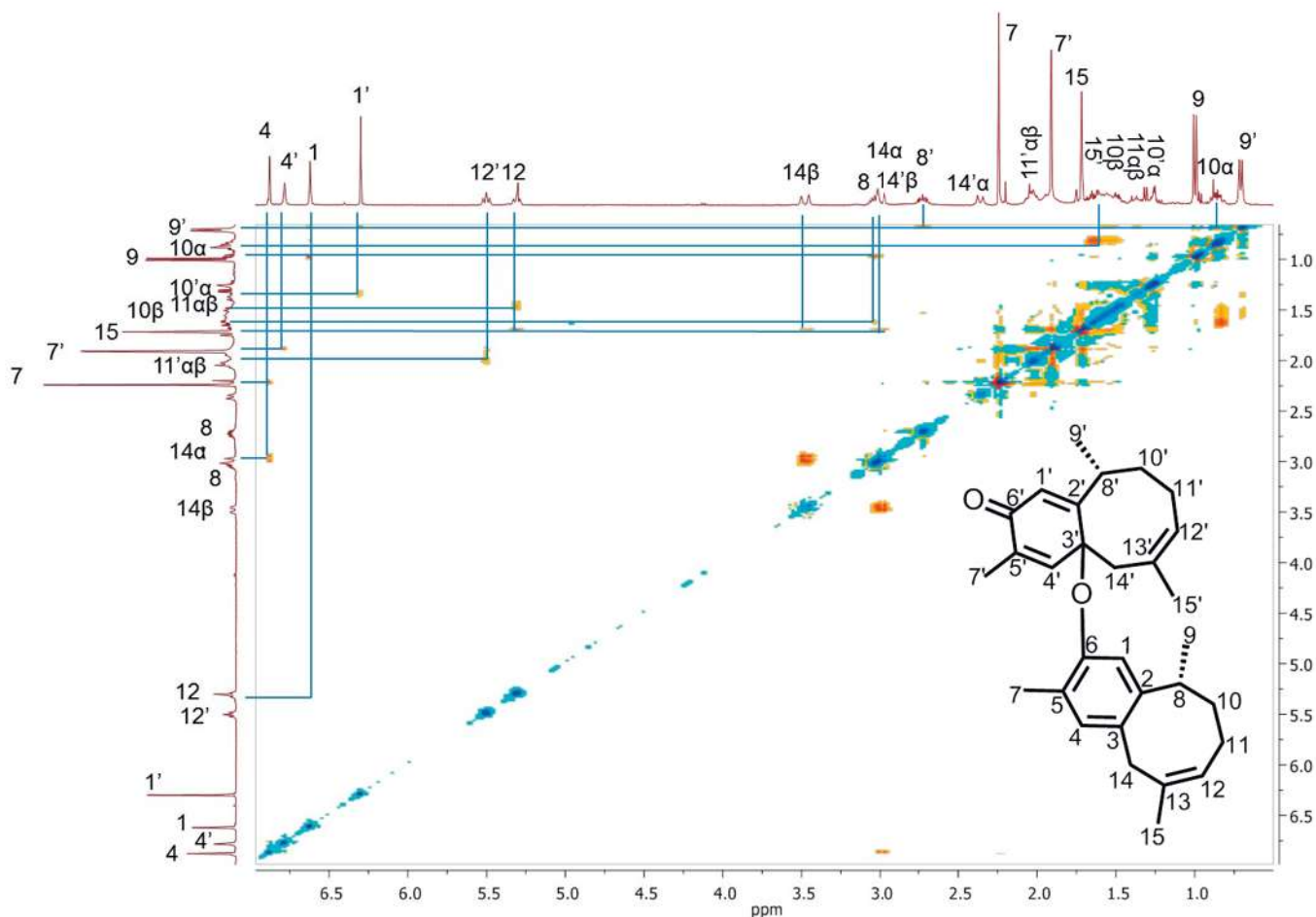
El espectro HETCOR permitió identificar con mayor certeza los protones correspondientes al C-10 y C-11, así como sus homólogos C-10' y C-11', ya que algunos de estos hidrógenos mostraron señales múltiples o traslapadas con otras; tal es el caso de H-10 $\alpha$  y H-10 $\beta$ , pertenecen a C-10 ubicado en 39 ppm. Además a través de una expansión se observó la correspondencia entre cada carbono ubicado entre 15 ppm y 45 ppm con su respectivo hidrógeno, ya que se observaba un juego de señales bastante cercanas. Figura 22.



**Figura 22.** Espectro HETCOR del dímero de la parvifolina (4).

Con la finalidad de observar la conformación del dímero de la parvifolina (4), se realizó un experimento NOESY. Al igual que en los espectros anteriores, se observó que las interacciones en el espacio entre cada uno de los átomos de los monómeros de parvifolina se conservaban. Sin embargo, se observan algunas

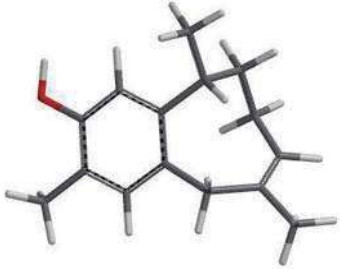
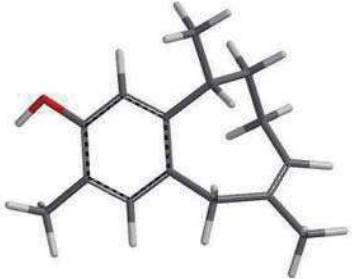
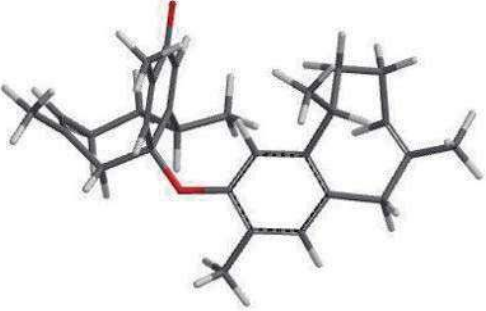

interacciones entre los protones de ambos monómeros, tal es el caso de H-10 $\alpha$  con H-9', que por medio del análisis teórico se sabe que se encuentran a 2.97 Angstrom (Å). También se observa la relación entre H-7 y H-8' que están a una distancia de 2.77 Å y el H-12 con H-9' con 2.8 Å de longitud. Figura 23.



**Figura 23.** Espectro NOESY del dímero de la parvifolina (4).

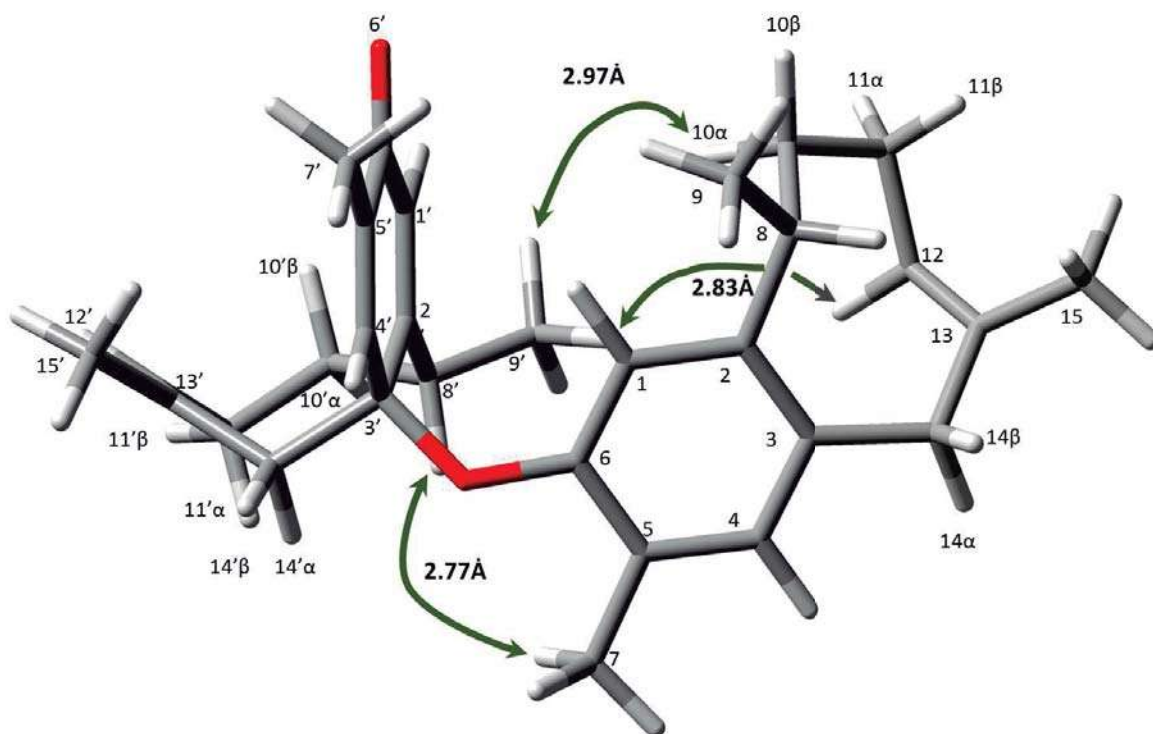
En base a los datos espectroscópicos obtenidos en el NOESY y los obtenidos a través de los cálculos teóricos de Análisis Conformacional empleando el programa Gaussian03 mediante Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) a nivel de cálculo B3LYP/DGDZVP, el conformero del dímero de la parvifolina (4) que se propone en la Figura 22, contribuye con un 97.16% de población de acuerdo con la Distribución de Boltzmann y concuerda con el compuesto identificado por RMN, Tabla 3.

**Tabla 3.** Confórmeros obtenidos para la parvifolina (1) y el dímero de la parvifolina (4).

MOLÉCULA.	MODELO.	ENERGÍA. (hartrees*)	POBLACIÓN. (Dist. De Boltzman)
Confórmero 1 de 1.		44.4110223	63.34%
Confórmero 2 de 1.		44.7352870	36.65%
Confórmero 1 del dímero de 1 (4).		143.5057539	97.16%
Confórmero 2 del dímero de 1 (4).		145.601733	2.83%

\* 1 hartree = 627.509 kcal/mol.





**Figura 24.** Modelo tridimensional del conformero 1 de **4** obtenido mediante Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) a un nivel de cálculo B3LYP/DGDZVP.

Al término del análisis espectroscópico de RMN del dímero de la parvifolina (**4**) se observó la aparición de un pequeño sistema de señales que resultaban semejantes a la materia prima, motivo por el cual se monitoreo por medio de RMN-<sup>1</sup>H hasta que la muestra no presentara cambios en su patrón de señales y tener así la certeza sí el dímero **4** era estable o no.

La muestra fue observada por veintidós días, cada tercer día, teniendo diez espectros, en los cuales se observó que entre los tripletes de los protones vinílicos H-12 y H-12' en 5.50 ppm y 5.30 ppm, una señal triple en 5.36 ppm, misma que corresponde al desplazamiento de la materia prima al tiempo que los tripletes del dímero van desapareciendo.

Además, la señal múltiple correspondiente a el protón H-8' que se observaba en 2.72 ppm, va decreciendo, hasta el punto que deja de observarse en

el espectro; este mismo patrón se observa en las señales de H-1', H-4', H-7', H-15', H-9', H-10'α, H-10'β, H-11'αβ, H-14'α y H-14'β.

Por otro lado, la señal de protón del grupo hidroxilo que posee la parvifolina (1) en la posición C-6 aparece en 4.58 ppm, mientras se van desapareciendo las señales originadas por la dimerización de la parvifolina; por lo tanto, las señales al final del monitoreo corresponden a las del monómero de parvifolina (1), Figura 23.

Se probó la estabilidad del dímero de la parvifolina (4) utilizando el antioxidante TROLOX (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), aumentando poco a poco los equivalentes químicos; cuando se colocó 0.25 Eq. se recuperó una mezcla uno a uno del monómero de la parvifolina (1) y el dímero de la parvifolina. En cambio, al aumentar la cantidad del TROLOX hasta 1.1 Eq. se obtuvo casi en su totalidad el monómero de la parvifolina (1).

Este efecto de reversibilidad, podría deberse a que la quinona que forma parte de la estructura del dímero tiende a aromatizarse, por lo que el enlace entre C-3' y el oxígeno de C-6, podría romperse, ganando un protón y formando nuevamente la parvifolina (1).

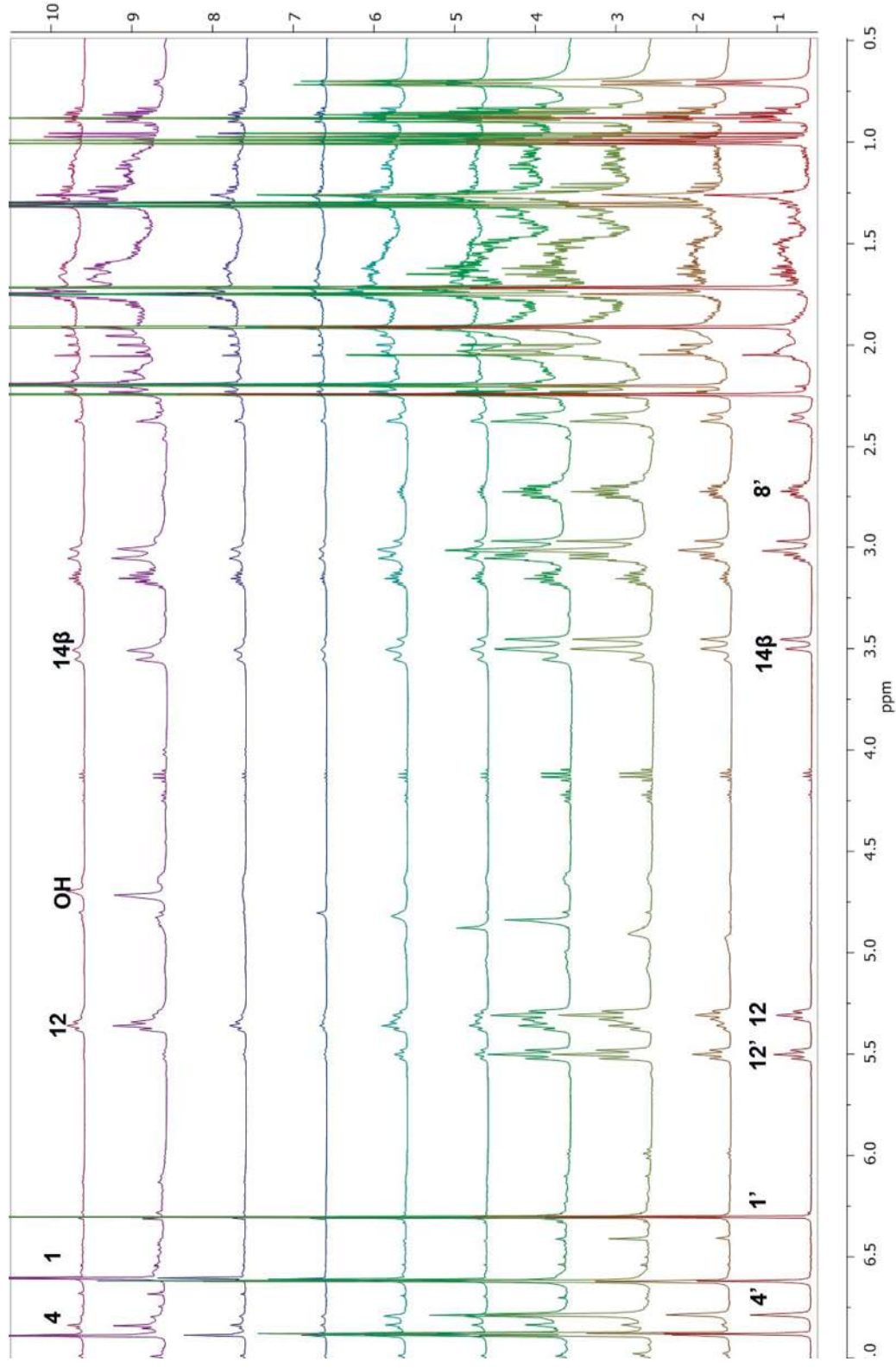
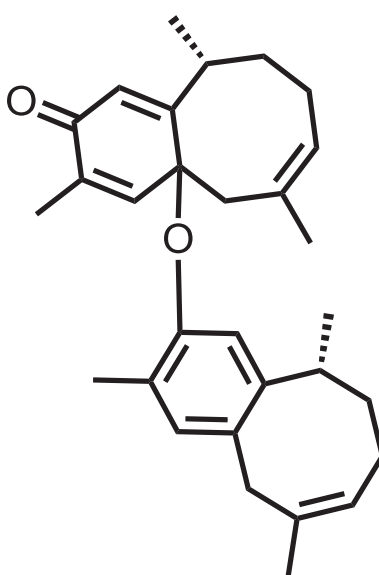


Figura 25. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  de la reversibilidad del dímero de la parvifolina (4).

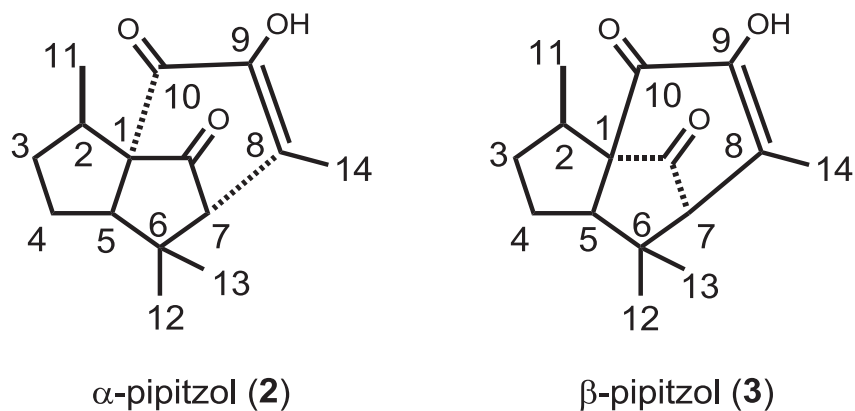
## 7. CONCLUSIONES.

De la raíz de *Acourtia humboldtii*, se obtuvo a la parvifolina (1), la cual se hizo reaccionar con el radical libre DPPH. De esta reacción se logró aislar e identificar el dímero de la parvifolina (4) por medio de Resonancia Magnética Nuclear. Además se observó que la reacción de dimerización de la parvifolina es reversible, esto debido a la capacidad que tiene la quinona del dímero de aromatizarse, generando una migración electrónica, lo que a su vez favorece la regeneración de su grupo hidroxilo de la molécula de parvifolina (1).



Dímero de la parvifolina (4).

De la misma raíz, se aislaron los pipitzoles 2 y 3, ambos fueron identificados por medio de RMN, los datos espectroscópicos experimentales obtenidos se compararon con los reportados, además es necesario hacer notar que una búsqueda bibliográfica exhaustiva reveló que hasta ahora no se ha reportado su presencia en *Acourtia humboldtii*.



## 8. PERSPECTIVAS.

Para observar el potencial antioxidante de la parvifolina (1), se podría plantear una metodología por medio de la cual se cuantificase la cantidad de dímero formado ante los radicales libres presentes en líneas celulares transformadas. O bien, realizar otras pruebas *in vitro* sobre homogenado de hígado o cerebro de rata.

En cuanto al aspecto fitoquímico, se torna interesante realizar el estudio completo y minucioso para identificar los compuestos presentes en cada una de las partes de la planta, de tal modo que se logre aislar e identificar los pipitzoles y su precursor. Ya que la presencia de los sesquiterpenos 2 y 3 sugiere que en determinado momento la pezona forma parte del grupo de metabolitos secundarios presentes en *Acourtia humboldtii*.

## 9. PARTE EXPERIMENTAL.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  fueron obtenidos a 400 MHz y 100 MHz respectivamente, así como los diagramas bi-dimensionales de correlación  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  (HETCOR),  $^1\text{H}/^1\text{H}$  (COSY) se determinaron en un aparato Varian Mercury Plus-400. En todas las determinaciones se utilizó como disolvente cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), tomando como referencia interna el tetrametil silano (TMS).

Para las técnicas de cromatografía en columna abierta se utilizó gel de sílice de la marca Merck 230-400 mallas. Mientras que para la separación cromatográfica en placa se usó TLC sílica gel 60 F<sub>254</sub> de 20 cm por lado.

### OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HEXÁNICO.

La maceración 500 g de raíz molida de *Acourtia humboldtii* colectada el dos de octubre de 2010, se realizó durante 5 días a temperatura ambiente usando como disolvente 1.5 litros de hexano. El extracto obtenido se concentró en rotavapor, lográndose extraer 3 g, con un rendimiento de 5%. La extracción de extracto hexánico fue repetido en varias veces.

### AISLAMIENTO DE PARVIFOLINA (1).

5 g de extracto hexánico se colocó en una columna de vidrio usando como fase estacionaria gel de sílice 230-400 mallas de 5 cm de diámetro y 10 cm de alto, fue eluída con disolventes en orden creciente de polaridad. Debido a que la parvifolina (1) es sumamente apolar las mezclas hexano-acetato de etilo utilizadas llegaron hasta una proporción 97:3. Las fracciones se evaporaron a temperatura ambiente, y por medio de cromatografía en capa fina se determinó la semejanza por comparación de su Factor de retención ( $R_f$ ), con lo que se identificó las fracciones contenían parvifolina (1) en los viales 24 a 36 de forma impura, razón por la cual estas fracciones se sometieron a una recromatografía. El rendimiento

total de parvifolina (**1**) fue de 1%. Este proceso se continuó hasta obtener un gramo de parvifolina.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.89 (1H, s, H-4), 6.61 (1H, s, H-1), 5.36 (1H, t,  $J = 7.9$  Hz, H-12), 4.58 (1H, sa, -OH) 3.53 (1H, da,  $J = 18.6$  Hz, H-14 $\beta$ ), 3.10 (1H, m, H-8), 3.02 (1H, da,  $J = 18.2$  Hz, H-14 $\alpha$ ), 2.20 (3H, s, H-7), 1.78 (1H, m, H-10 $\beta$ ), 1.75 (3H, s, H-15), 1.62 (1H, m, H-11), 1.31 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-9), 1.10 (1H, m, H-10 $\alpha$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  152.9 (C-6), 144.2 (C-3), 137.8 (C-13), 131.8 (C-4), 130.8 (C-2), 123.3 (C-12), 120.0 (C-5), 111.1 (C-1), 41.6 (C-14), 40.0 (C-10), 33.0 (C-8), 26.4 (C-15), 23.7 (C-11), 19.3 (C-9), 15.2 (C-7).

#### ACETILACIÓN DE PARVIFOLINA (**1**)

Se colocó un gramo de parvifolina disuelta con 9 mL piridina y 11 mL anhídrido acético en el reactor de microondas a 200 watts, por 15 minutos y a 120°C. Transcurrido el tiempo de reacción la mezcla se vertió sobre hielo, se extrajo con AcOEt, la fase orgánica se lavó dos veces con agua, cuatro veces con ácido clorhídrico (HCl) al 10%, dos veces con agua, cuatro veces con solución saturada de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), dos veces con agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), se filtró y se evaporó en el rotavapor, obteniéndose una miel color café oscuro, la cual se sometió a cromatografía en columna de cristal de 2.5 cm diámetro interno, usando como fase estacionaria gel de sílice 230-400 mallas a una altura de 10 cm. El acetato de parvifolina se aisló en las fracciones 5 y 6 que fueron eluidas con una mezcla 9:1 de Hexano-AcOEt.

## HIDRÓLISIS DEL ACETATO DE PARVIFOLINA.

500 mg del acetato de parvifolina, 5 mL de MeOH y 300 mg KOH disueltos en la mínima cantidad de agua, se dejaron en el reactor de microondas a 100 watts, por 10 minutos y a 80°C. Transcurrido este tiempo, el crudo de reacción se vertió sobre hielo, se adicionaron unas gotas de HCl y se extrajo con AcOEt, la fase orgánica se lavó dos veces con agua, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó en el rotavapor, el residuo se sometió a cromatografía en columna de cristal de 2.5 cm diámetro y 7 cm de altura, empacada con gel de sílice 230-400 mallas. La parvifolina (1) se obtuvo en las fracciones 13 a 17, como una miel amarillo claro, las cuales se eluyeron con una mezcla de disolventes 19:1 Hexano-AcOEt.

## REACCIÓN DE LA PARVIFOLINA (1) CON DPPH.

En un matraz balón de 20 mL se colocaron 200 mg de parvifolina (1) por separado se pesaron 200 mg del reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), los cuales se disolvieron en 1.5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se preparó una disolución de DPPH, disolviendo 200 mg del reactivo en 1.5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, posteriormente la disolución se adicionó al matraz que contenía la parvifolina (1). El matraz se protegió de la luz y se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante tres horas. Una vez transcurrido este tiempo, la reacción se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y fue lavada con agua, solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y agua. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó a temperatura ambiente con flujo de argón y protegida de la luz. El crudo de reacción fue sometido a purificación por medio de una cromatografía en columna abierta, se eluyeron 160 mL de hexano seguidos de 100 mL de Hexano-AcOEt 19:1, de las fracciones 29 a 32 se obtuvieron 6 mg el dímero de la parvifolina (4).



## REACCIÓN DE LA PARVIFOLINA (1) CON DPPH USANDO EL REACTOR DE MICROONDAS.

186 mg de parvifolina (1), 360 mg (1 eq.) de DPPH y 6.2 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> usando el reactor de microondas en las siguientes condiciones: 200 watts, por 15 minutos y a 70°C. El crudo de reacción se evaporó a sequedad a presión reducida y el residuo fue sometido a purificación por medio de una cromatografía en columna abierta, se eluyeron 160 mL de hexano seguidos de 100 mL de Hexano-AcOEt 19:1, de las fracciones 18 a 23 se obtuvo el dímero de la parvifolina (4). Sin embargo debido a las impurezas observadas estas fracciones se sometieron a una purificación en placa preparativa.

Las fracciones 18 a 23 se juntaron y aplicaron en una placa preparativa de 20 cm por 20 cm, eluída en dos ocasiones usando una polaridad de 49:1 de hexano-AcOEt. La banda mayoritaria denominada "B" mostró un Factor de Retención ( $R_f$ ) de 0.54, fue dividida en dos partes (B1 y B2), para su extracción de la sílice se usó una mezcla de Hexano-AcOEt, en una proporción 9:1. Cada una de las fracciones (B1 = 60 mg y B2 = 40 mg) fue evaporada bajo corriente de nitrógeno y almacenada en frasco ámbar en condiciones de refrigeración; el dímero de parvifolina (4) se obtuvo como una miel translúcida ligeramente amarilla.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.88 (1H, s, H-4), 6.79 (1H, s, H-4'), 6.62 (1H, s, H-1), 6.30 (1H, s, H-1'), 5.50 (1H, t,  $J = 8.07$  Hz, H-12'), 5.31 (1H, t,  $J = 9.0$  Hz, H-12), 3.48 (1H, da,  $J = 18.44$  Hz, H-14β), 3.04 (1H, m, H-8), 3.02 (1H, da,  $J = 17.1$  Hz, H-14α), 2.98 (1H, da,  $J = 10.1$  Hz, H-14'β), 2.72 (1H, m, H-8'), 2.36 (1H, da,  $J = 13.3$  Hz, H-14'α), 2.24 (3H, s, H-7), 2.04 (2H, m, H-11'α y H-11'β), 1.95 (1H, m, H-10'β), 1.91 (3H, s, H-7), 1.72 (3H, s, H-7'), 1.70 (3H, sa, H-15'), 1.65 (1H, m, H-10β), 1.50 (2H, m, H-11α y H-11β), 1.26 (1H, m, H-10'α), 1.00 (3H, d,  $J = 6.81$  Hz, H-9), 0.88 (1H, m, H-10α), 0.71 (3H, d,  $J = 6.85$  Hz, H-9').

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 186.5 (C-6'), 172.6 (C-2'), 154.6 (C-6), 150.3 (C-4'), 143.1 (C-3), 137.3 (C-13), 134.8 (C-5'), 133.2 (C-13'), 131.6 (C-4), 130.7 (C-2),

127.1 (C-12'), 125.8 (C-1'), 123.4 (C-5), 123.2 (C-12), 110.0 (C-1), 80.7 (C-3'), 44.4 (C-14'), 41.6 (C-14), 39.2 (C-10), 35.6 (C-8'), 32.8 (C-8), 31.6 (C-10'), 26.8 (C-15'), 26.4 (C-15), 25.2 (C-11'), 23.4 (C-11), 21.5 (C-9'), 19.2 (C-9), 16.4 (C-7), 15.2 (C-7').

#### REACCIÓN GENERAL DE ESTABILIDAD DEL DÍMERO DE PARVIFOLINA (4) CON TROLOX.

En un matraz balón de 20 mL se pesaron 132 mg de parvifolina (**1**), en el mismo matraz se pesaron 264 mg de DPPH. La mezcla se disolvió en 1.5 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , y se agregó 1.5 mL de la disolución de DPPH previamente preparada. La reacción se mantuvo en agitación constante durante tres horas. El matraz se protegió de la luz. Al término de las tres horas se detuvo la agitación y se agregó 170 mg (1.1 Eq.) TROLOX. La agitación continuó por treinta minutos más. Al transcurrir el tiempo de reacción, se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se lavó con agua,  $\text{NaHCO}_3$  y agua, se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La fase orgánica se filtró y se dejó evaporar bajo atmósfera de argón y protegiendo de la luz. Se tomó una alícuota de 5 mL y se evaporó bajo corriente de argón para analizarla por RMN- $^1\text{H}$ , observándose como producto principal parvifolina (**1**). Los 309 mg obtenidos del crudo de reacción fueron cromatografiados en una columna de 0.5 cm de diámetro interno y empacada con gel de sílice 230-400 mallas, hasta una altura de 22 cm. La columna fue empacada usando como fase móvil una mezcla Hexano-AcOEt en proporción 97:3, misma polaridad con la que se eluyeron las fracciones. En la misma columna de vidrio se colocó la mezcla. En las fracciones obtenidas del hexano se obtuvo la mezcla del dímero con la parvifolina (**4**) con la materia prima. Esta mezcla fue difícil de separar aún realizando cromatografías sucesivas.

## OBTENCIÓN DE $\alpha$ Y $\beta$ PIPITZOLES.

5 g del extracto hexánico de *Acourtia humboldtii*, se colocó en una columna de vidrio usando como fase estacionaria gel de sílice 230-400 mallas de 5 cm de diámetro y 10 cm de alto, de las fracciones eluidas con hexano se obtuvo la mezcla del  $\alpha$  y  $\beta$  pipitzol, solo una fracción correspondió al  $\alpha$ -pipitzol puro.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.09 (1H, s, OH), 2.83 (1H, s, H-7), 2.42 (1H, m, H-2) 2.11 (1H, t,  $J = 8.64$  Hz, H-5), 2.06 (3H, s, H-14), 1.90 (2H, m, H-3), 1.77 (2H, m, H-4), 1.38 (3H, d,  $J = 7.1$  Hz H-11), 1.08 (3H, s, H-12), 1.03 (3H, s, H-13).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  204.0 (C-10), 194.0 (C-9), 144.7 (C-8), 127.4 (C-1), 75.0 (C-6) 69.0 (C-7), 57.5 (C-5), 38.3 (C-3), 34.9 (C-2) 26.4 (C-12), 26.0 (C-4), 25.6 (C-13), 17.8 (C-14) 14.9 (C-11).<sup>29</sup>

## ANÁLISIS CONFORMACIONAL *in silico*.

Para realizar el modelado molecular se construyeron las moléculas en el programa Spartan'08.v1.2.0, en este mismo paquete computacional se realizó una búsqueda conformacional por el método de Monte Carlo empleando Mecánica Molecular. A partir de los datos obtenidos, a cada uno de los confórmeros se le optimizó la geometría en el programa Gaussian03 empleando la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) a un nivel de cálculo B3LYP/6-31G; tomando como base los modelos obtenidos de la optimización, se aumentó el nivel de cálculo a B3LYP/DGDZVP. Tanto la parvifolina (**1**) como su dímero (**4**) presentaron dos confórmeros principales cuyos datos se observan en la Tabla 3, para el estudio se tomó como prioritaria la molécula cuyo valor en la distribución de Boltzmann fuese mayor, ya que este guarda una relación directa con el aporte poblacional de cada confórmero.

---

## 10. BIBLIOGRAFÍA.

- <sup>1</sup> Aguilera, C. *Flora y Fauna Mexicana. Mitología y Tradiciones*. Editorial Everest Mexicana, S. A. 8. **1985**, 7-11.
- <sup>2</sup> Dewick, P. M. *Medical Natural Products a Biosynthetic Approach*. John Wiley & Sons. **1997**.
- <sup>3</sup> Mendoza, G. V., García, G. E. *Identification of sesquiterpenes from *Perezia turbinata**. Journal of Natural Products. **1993**, 56, 2073-2076.
- <sup>4</sup> Bruneton, J. *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales*. Editorial Acribia. **2001**.
- <sup>5</sup> Christmann, M. *Otto Wallach: founder of terpene chemistry and Nobel Laureate 1910*. Angew Chem Int Ed Engl. **2010**, 49, 9580-9586.
- <sup>6</sup> Ruzicka L. *The isoprene rule and the biogénesis of terpenic compounds*. 1953. **1994**, 50, 395-405.
- <sup>7</sup> Valencia-Ortiz, C. *Fundamentos de Fitoquímica. Capítulo 7: Terpenoides*. Editorial Trillas. **1995**, 171-209.
- <sup>8</sup> Shindo, K., Kimura M., Mayuko I. *Potent Antioxidative Activity of Cacalol, a Sesquiterpene Contained in *Cacalia delphiniifolia* Sleb et Zucc.* Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. **2004**, 68, 1393-1394.
- <sup>9</sup> Joseph-Nathan, P., Hernández-Medel, R., Martínez, E., Rojas-Gardida, M., Cerda, C. M. *Conformation and absolute configuration of naturally occurring parvifoline and several synthetic derivatives*. Journal of Natural Products. **1988**, 51, 675-689.
- <sup>10</sup> Panero, J. L., Funk, V.A. *Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae)*. Proc. Biol. Soc. Wash. **2002**, 115, 909-922.
- <sup>11</sup> Cronquist, A. *Vascular flora of the southeastern United States. Boutanny-Southern*. The University of North Carolina Press. **1980**, 1-5.
- <sup>12</sup> Márquez-Alonso, C., Lara-Ochoa, F., Esquivel-Rodríguez, B., Mata-Essayag, R. *Plantas Medicinales de México II. Composición Usos y Actividad Biológica*. Universidad Autónoma de México. **1999**.

- 
- <sup>13</sup> Grimm, E. L., Coutu, M. L., Trimble L. A. *Facile Construction of the Bicyclo [6.4.0] dodecane Ring System Via Intramolecular Cyclization of a Sulfone Stabilized Carbanion*. Tetrahedron. **1993**, 35, 7017-7018.
- <sup>14</sup> Subhas, P. C., Mahesh, T., Ganesh, F. J., Uttam R. K. *First Enantiospecific Synthesis of (-)-Parvifoline and (+)-Curcuquinone*. Journal of Organic Chemistry. **2006**, 71, 8986-8988.
- <sup>15</sup> Joseph-Nathan, P., Hernández, J. D., Román, L. U., García, G. E., Mendoza, V. *Sesquiterpenes from Perezia carpholepis*. Phytochemistry. **1982**, 21, 669-672.
- <sup>16</sup> Walls, F., Padilla, J., Joseph-Nathan, P., Giral, F. *Studies in Perezone derivatives. Structures of the Pipitzols and Perezone*. Tetrahedron. **1966**, 22, 2787-2399.
- <sup>17</sup> Núñez-Sellés A. J. *El Reto en la terapia antioxidante*. Editorial Científico-Técnica. **2008**.
- <sup>18</sup> Venereo-Gutiérrez, J. R. *Daño oxidativo, Radicales libres y Antioxidantes*. Rev Cubana Med Milit. **2002**, 31, 126-133.
- <sup>19</sup> Challem, J., Block, M. *Antioxidantes Naturales*. Ediciones Nowtilus. **2008**, 45-76.
- <sup>20</sup> Vicedo-Tomey, A., Vicedo-Ortega Y. *Relaciones del estrés oxidativo con el catabolismo de proteínas*. Rev. Cubana Invest. Biomed. **2000**, 19, 206-212.
- <sup>21</sup> Zorrilla-García A. E., Eirez-Izquierdo M., Izquierdo-Expósito M. *Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante*. Rev. Cubana Invest. Bioméd. **2004**, 23, 51-57.
- <sup>22</sup> Avello, M.; Suwalsky M. *Radicales libres, Antioxidantes naturales y Mecanismos de protección*. Atenea. **2006**, 494, 161-172.
- <sup>23</sup> Sagwan, S. D., Rao, V., Sharma, R. A. *In-vtro antioxidant activity of Maytenus emarginata (Willd.) using DPPH assay*. Journal of Pharmacy Research. **2011**, 4, 2276-2278.
- <sup>24</sup> Nelson, L. D., Cox, M. M. *Principios de Bioquímica de Lehninger. Capítulo 13. Vitaminas y Coenzimas*. Editorial Omega. **2006**, 341-367.
- <sup>25</sup> Guerra-Elejalde, J. I. *Estrés Oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes*. Anales de Medicina Interna. **2001**. 18, 326-335.
-

- <sup>26</sup> Mendoza-Gastélum, J. I. *Evaluación de la actividad antioxidante de sesquiterpenos derivados de benzociclooctano y del longipineno*. Tesis de Maestría presentada en la Sección Externa de Farmacología del CINVESTAV. México. **2008**.
- <sup>27</sup> Sun, L., Zhang, J., Lu, X., Zhang, L., Zhang, Y. *Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki*) leaves*. Food and Chemical Toxicology. **2011**, 49, 2689-2696.
- <sup>28</sup> Ljubuncic, P., Dakwar, S., Pornaya, I., Cogan, U., Azaizah, H., Bomzon, A. *Extractos acuosos de *Teucrium polium* poseen notable actividad antioxidante in vitro*. Complementary and Alternative Medicine. **2006**, 3, 329-338.
- <sup>29</sup> Camilo-Calderón, J., Zita-Fernández, A., María de Jesús, A. I. *Atherosclerosis, estrés oxidativo y actividad física. Revisión*. Invest. Clin. **2008**, 49, 397-410.
- <sup>30</sup> Nathan-Joseph, P. Gutiérrez, A. Hernández, J. D. Román, L. U. Santillán, R. L. <sup>13</sup>C-NMR studies of cedranolides. Journal of Natural Products. **1986**, 49, 79-89.