



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

“ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA ISOPARVIFOLINA”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

ERIC DANIEL SALINAS ARELLANO

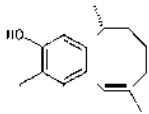
ASESORES DE TESIS:

D.C. ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES

QFB. RAMÓN GUZMÁN MEJÍA

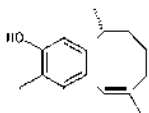
Morelia, Michoacán, Junio 2012.



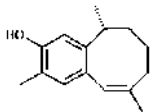


ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Daño o estrés oxidativo	4
2.2. Radicales libres	6
2.3. Efecto nocivo de los radicales libres	7
a) Lípidos	7
b) Proteínas	9
c) Ácido desoxirribonucleico (ADN)	9
2.4. Antioxidantes	10
2.5. Características de las enzimas antioxidantes.	11
a) Catalasa	11
b) Glutación peroxidasa	11
c) Superóxido dismutasa	11
2.6. Características de antioxidantes exógenos	12
a) Vitamina E	12
b) Vitamina C	13
c) Polienos	13
2.7. Características de antioxidantes no enzimáticos	14
a) Glutación	14
2.8. Técnicas para determinar la capacidad antioxidante total	15
2.9. Evaluación antioxidante con el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)	17
2.10. Sesquiterpenos y actividad antioxidante	18
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. OBJETIVO GENERAL	27
4.1. Objetivos específicos	27



5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	27
5.1. Actividad antioxidante de la isoparvifolina	36
5.2. Determinación de los productos de reacción de la isoparvifolina frente a DPPH	38
5.2.1. Ensayo de variación de la temperatura	41
5.2.2. Modelado molecular	43
5.2.3. Mecanismo de reacción	45
6. PARTE EXPERIMENTAL	46
6.1. Procedimientos generales de purificación de los compuestos	46
6.1.1. Cromatografía en capa fina	46
6.1.2. Cromatografía en columna	46
6.2. Datos generales de la espectroscopía y espectrometría utilizadas en la determinación estructural	46
6.2.1. Rotación óptica (OR)	46
6.2.2. Espectroscopía de infrarrojo (IR)	46
6.2.3. Espectroscopía de ultravioleta (UV)	46
6.2.4. Espectrometría de masas de baja resolución (EM)	46
6.2.5. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	46
6.3. Punto de Fusión	47
6.4. Mediciones de absorbencia para el ensayo DPPH	47
6.5. Reacción en microondas	47
6.6. Obtención de la parvifolina de la raíz <i>Acourtia humboldtii</i>	47
6.7. Obtención del acetato de parvifolina	47
6.8. Obtención del acetato de isoparvifolina	47
6.9. Obtención de isoparvifolina	48
6.10. Reacción DPPH-isoparvifolina	48
6.11. Cromatografía del producto de reacción del DPPH- isoparvifolina	49
6.12. Método del DPPH	49
6.13. Determinación de la actividad antioxidante	49
6.14. Curva de calibración	50
6.15. Preparación de las soluciones de la isoparvifolina	50
6.16. Análisis de datos	51
6.17. Modelado molecular	51
7. CONCLUSIONES	52
8. BIBLIOGRAFÍA	53



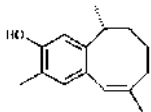
1. INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido desde la antigüedad un recurso al alcance del ser humano para su alimentación y la curación de sus enfermedades; estas últimas, llamadas plantas medicinales, eran veneradas por las virtudes que se les había reconocido, transmitiéndose sus cualidades de generación a generación; nadie buscaba el saber por qué o cómo actuaban, pero era un hecho incontestable y que parecía mágico.

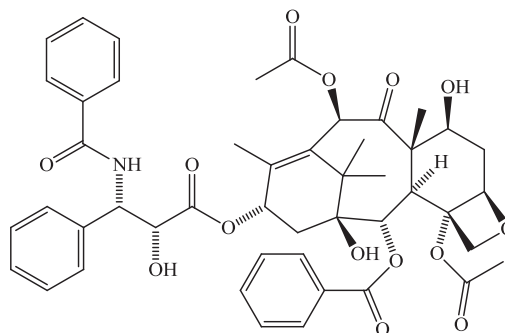
Aún en la actualidad cientos de plantas son utilizadas en la medicina, pero la ciencia moderna, analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas, quiere precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades, no con el fin de disminuir esta confianza en la naturaleza sino para agrupar a las plantas de efectos similares, para conocer los principios activos responsables de aliviar o curar enfermedades, obtenerlos de las plantas que los contienen, determinar sus estructuras químicas, procurar su síntesis, proponer modificaciones estructurales en busca de una mayor actividad y, finalmente, dar a conocer a la humanidad los resultados de los estudios. Un análisis de esta naturaleza debe ser realizado como una acción multidisciplinaria con la intervención de botánicos, químicos, farmacólogos, farmacognostas, entre otros.

Un elevado porcentaje de los principios activos de plantas está comprendido dentro de los llamados productos naturales o metabolitos secundarios, que son compuestos químicos de estructura relativamente compleja y de distribución más restringida y características de fuentes botánicas específicas¹.

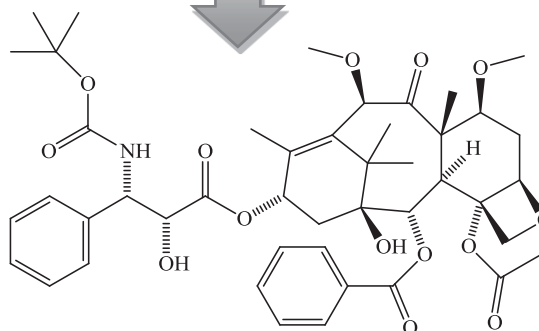
Por otro lado el aislamiento y conocimiento estructural de los compuestos de plantas, podría dar a lugar a diseñar reacciones para producir derivados semisintéticos, como se ha mencionado; así por ejemplo, el uso de la diosgenina como material inicial para la síntesis de la mayoría de las hormonas esteroideas usadas comúnmente en la medicina, o dar pautas para la síntesis de compuestos similares como en el caso de la cocaína, que sirvió como compuesto modelo para la producción de procaína y otros anestésicos locales; el Taxol que es un fármaco utilizado para el tratamiento del cáncer, el cual se aisló de la corteza de *Taxus brevifolia* y demostró ser un eficaz antitumoral contra el cáncer de pulmón, ovario, mama y formas avanzadas de Sarcoma de kaposi. Así mismo, se han realizado modificaciones químicas al Taxol y se han obtenido derivados como es el caso del Cabazitaxel, el cual posee una actividad biológica contra el cáncer de próstata² y se encuentra a la venta desde el 2010 (Esquema 1). Es entonces de gran importancia aislar los principios activos de las plantas, y su localización en las diferentes partes de las mismas, así como hacer modificaciones químicas a dichos compuestos y realizar ensayos biológicos adecuados.¹



Taxus brevifolia



Taxol

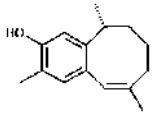


Cabazitaxel

Esquema 1. El Taxol y su derivado Cabazitaxel (anticancerígenos).

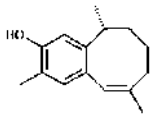
Por otro lado, el estilo de vida actual está favoreciendo la acumulación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno en nuestro organismo y como consecuencia de ello un aumento del estrés oxidativo a nivel fisiológico. La teoría de los radicales libres fue propuesta por Harman a mediados de los 50, los cuales son especies químicas, atómicas o moleculares, con un electrón desapareado en su orbital más externo. Este tipo de configuración electrónica hace que sean muy inestables y altamente reactivos, pudiendo alterar estructuras biológicas fundamentales como lípidos de membrana, ácidos nucleicos y proteínas. Todo ello se traduce en un aumento del estrés oxidativo, que está directamente relacionado con el envejecimiento celular y algunos procesos fisiopatológicos como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cataratas y cáncer.

Para neutralizar este efecto, nuestro organismo posee sistemas fisiológicos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, y por el estilo de vida actual está inclinándose hacia un



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA - UMSNH

aumento del estrés oxidativo, por ello es recomendable el aporte de antioxidantes exógenos a través de la dieta, suplementos alimenticios o mediante el uso de plantas medicinales con este



2. ANTECEDENTES

La oxidación es el proceso mediante el cual los átomos transfieren electrones a otro átomo o molécula. Se oxida el hierro, en contacto con el aire, se oxida la manzana cortada adquiriendo un color pardo propio de fenoles oxidados, se oxida la leña al quemarse, la oxidación es movimiento, es cambio, es liberación de energía.

Dos fenómenos muy importantes en nuestra vida son procesos oxidativos: la combustión y la respiración. Ambos se asemejan, ya que son procesos a través de los cuales sustratos combustibles se transforman en energía consumiendo oxígeno y liberando agua y dióxido de carbono.

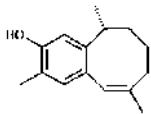
Así la combustión de la leña por ejemplo, es un proceso oxidativo en el cual un combustible compuesto por carbono se transforma en energía en forma de luz y calor, produciéndose además dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O). Pero si el proceso no es perfecto, la oxidación no es total y produce contaminantes, como el monóxido de carbono.

En la respiración ocurre lo mismo: un combustible—glucosa y ácidos grasos, también compuestos de carbono—se transforman en energía. Esta transformación se realiza al interior de la célula, en la mitocondria y se produce ácido adenosin trifosfato (ATP), la molécula clave para la síntesis de los componentes celulares. En la respiración se consume oxígeno, se genera ATP, y quedan como residuos dióxido de carbono y agua. Pero este proceso no es perfecto ya que se producen también otras moléculas contaminantes, las Especies Reactivas del Oxígeno (EROs). Entre el 1 y 3 % del oxígeno que respiran nuestras células al oxidar sus sustratos se transforman en EROs.

Los radicales libres son capaces de oxidar indiscriminadamente muchas estructuras biológicas, dañándolas. Es lo que llamamos el daño oxidativo, importante causa del envejecimiento, el cáncer, la aterosclerosis, los procesos inflamatorios crónicos y las cataratas, por nombrar algunas situaciones bien caracterizadas.⁴

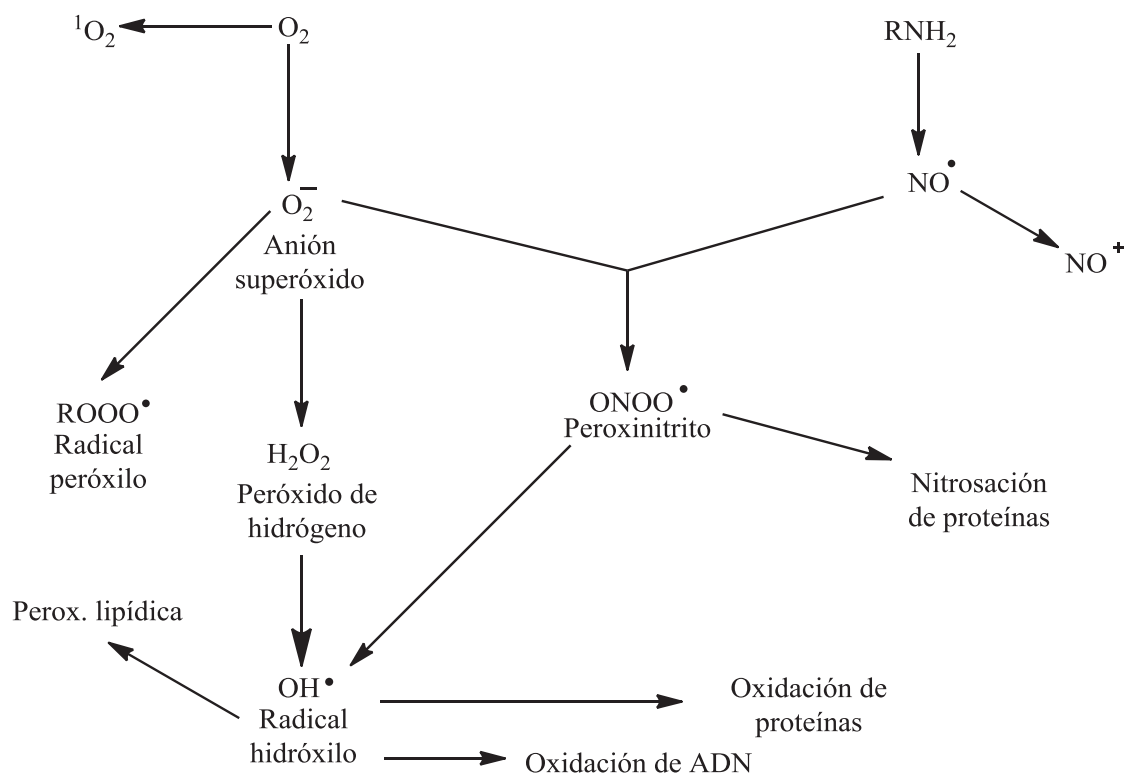
2.1. Daño o estrés oxidativo

En 1985, H. Sies propuso el concepto de “estrés oxidativo” como un desequilibrio, en el que hay un aumento de oxidantes o una disminución de antioxidantes, comparándose esta la situación con la definida como normal. El éxito del concepto fue inmediato y promovió la investigación biológica y clínica al incluir el término de disminución de antioxidantes y abrir la estrategia intervencionista de suplementación con compuestos y vitaminas antioxidantes. El concepto de estrés oxidativo fue aplicado experimentalmente a células, tejidos y organismos enteros. En el último caso mencionado, considerando un estrés oxidativo sistémico y determinando los niveles oxidantes y antioxidantes en sangre y plasma.⁵

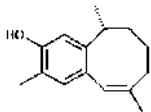


El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre los factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura–función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto se reconoce como mecanismo general de daño celular.

De manera habitual, el oxígeno se encuentra en su forma más estable (O_2), con los electrones que forman el enlace (π), antienlazante con el mismo espín, es decir, en lo que se conoce como estado triplete, así el oxígeno es poco reactivo con una velocidad de reacción a temperatura fisiológica baja; sin embargo, por reacciones puramente químicas, por acciones enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se pueden producir una serie de especies químicas o compuestos prooxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos) que son capaces de dar lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo, que llegan a producir daño celular ⁶ (Esquema 2).



Esquema 2. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.⁷



2.2. Radicales libres

Desde el punto de vista químico, los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad, señalizado por el punto situado a la derecha del símbolo. Son pequeñas moléculas ubicuas y difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación por lo que se producen daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales biomoléculas del organismo.

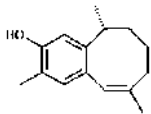
Los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica en el organismo como su participación en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno y de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la membrana y favorecen la quimiotaxis.

Las principales especies reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes son:

- Radical hidróxilo (OH^-)
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- Anión superóxido (O_2^-)
- Oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$)
- Oxígeno nítrico (NO^-)
- Peróxido (ROO^-)
- Semiquinona (Q)

Los radicales libres del oxígeno se clasifican de la forma siguiente:

1. Radicales libres inorgánicos o primarios. Se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan por tanto distintos estados en la reducción de este y se caracterizan por tener una vida media muy corta; estos son el anión superóxido, el radical hidróxilo y el óxido nítrico.
2. Radicales libres orgánicos o secundarios. Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de dos radicales primarios entre sí, poseen una vida media un poco más larga que los primarios; los principales átomos de las biomoléculas son: carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre.
3. Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno. Aquí se incluye un grupo de especies químicas que sin ser radicales libres, son generadoras de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno singulete, el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso, el peroxinitrito e hidroperóxidos orgánicos.



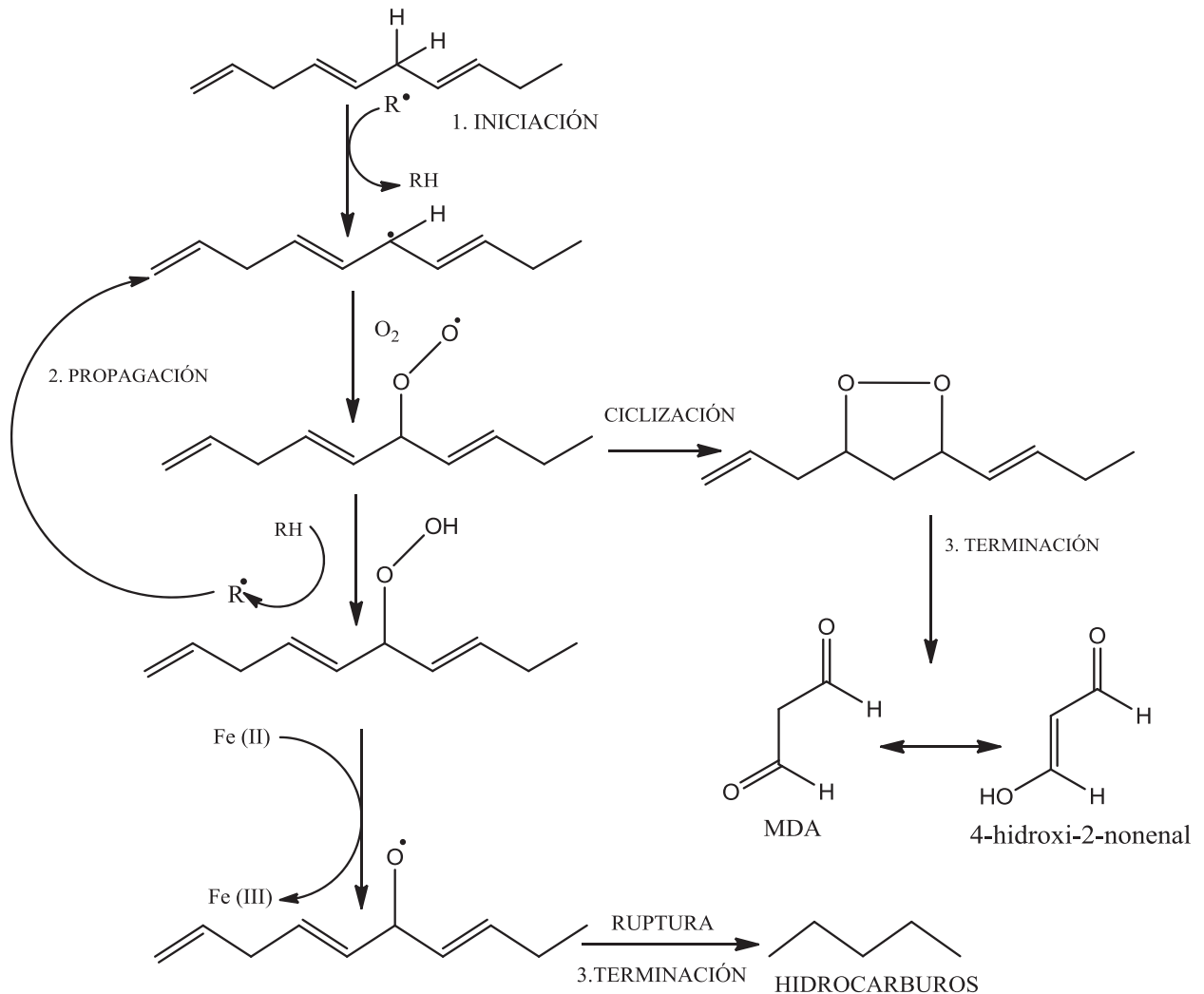
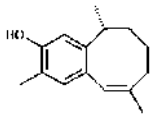
Los radicales libres se generan a nivel intracelular y extracelular. Entre las células relacionadas con la producción de radicales libres de oxígeno tenemos los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y células endoteliales. Las enzimas oxidantes involucradas son la xantina-oxidasa, la indolamindioxigenasa, la triptófano-dioxigenasa, mieloperoxidasa, la galactosa oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa, la monoamino-oxidasa y la NADPH oxidasa. También se producen radicales libres por la administración de paracetamol, tetracloruro de carbono y furosemida; por último, no se puede olvidar agentes como el humo de cigarro, las radiaciones ionizantes, la luz solar y el shock térmico.⁶

2.3. Efecto nocivo de los radicales libres

El daño celular producido por las especies reactivas del oxígeno ocurre sobre diferentes macromoléculas:

- a) **Lípidos.** Es aquí donde se producen el mayor daño en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica, afecta las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular produciendo edema y muerte celular.⁷ La peroxidación lipídica representa una forma de daño histórico que puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singulete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Los ácidos grasos insaturados son componentes esenciales de las membranas celulares, por lo que son importantes para su funcionamiento normal, sin embargo, son vulnerables al ataque oxidativo iniciado por los radicales libres de oxígeno.⁸

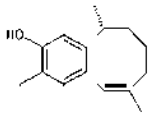
El proceso completo de peroxidación de lípidos consiste en tres etapas: iniciación, propagación y terminación. El malondialdehído y el 4-hidroxi-2-nonenal, dos aldehídos producto de la peroxidación de lípidos, son altamente tóxicos y mutagénicos⁹ (Esquema 3)



Esquema 3. Peroxidación de lípidos.¹⁰

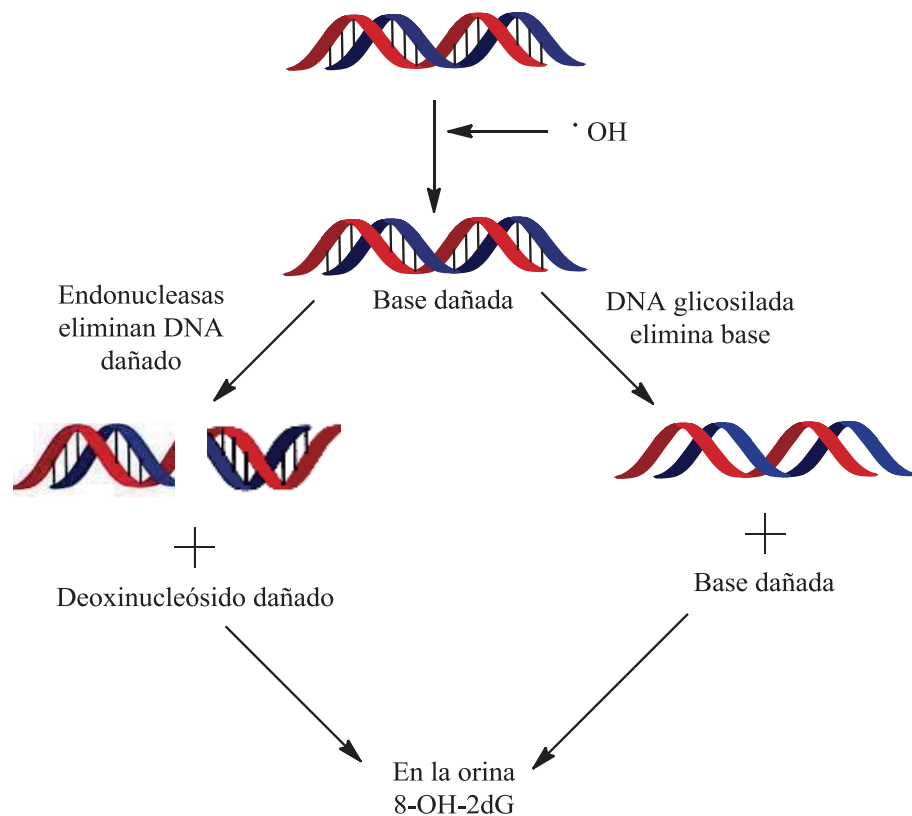
Los factores que influyen en la magnitud de la peroxidación lipídica son:

- ✓ Naturaleza cualitativa y cuantitativa del agente iniciador.
- ✓ Los contenidos de la membrana en ácidos grasos poliinsaturados y su accesibilidad.
- ✓ La tensión de oxígeno.
- ✓ El contenido celular de antioxidantes (glutatión, alfa-tocoferoles, betacarotenos).
- ✓ La activación de enzimas que pueden hacer terminar la cadena de reacción como es el caso de la glutatión peroxidasa. (GSH-Prx).

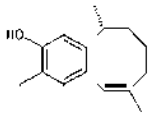


Una vez que se inicia, el proceso toma forma de “cascada”, con producción de radicales libres que lleva a la formación de peróxidos orgánicos y otros productos, a partir de los ácidos grasos insaturados; una vez formados, estos radicales libres son los responsables de los efectos citotóxicos.¹¹

- b) **Proteínas.** Hay oxidación de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina; además se forman entrecruzamiento de cadenas peptídicas, y por último hay formación de grupos carbonilos.⁶
- c) **Acido desoxirribonucleico (ADN).** Los oxirradicales libres pueden producir una lesión importante al ADN, tanto mitocondrial como celular. Se ha demostrado que la formación de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OH-2dG) es un indicador de la lesión oxidativa del ADN y su determinación en orina puede ser un marcador útil de este proceso. La lesión oxidativa del ADN puede inducir mutagénesis espontáneas que pueden tener un papel importante en el envejecimiento y en la carcinogénesis (Esquema 4).



Esquema 4. Lesión de ADN por EROs.⁷

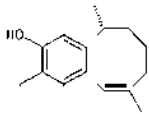


2.4. Antioxidantes

Un antioxidante se define como aquel compuesto que presente en concentraciones muy pequeñas comparadas con las del sustrato oxidable, disminución o evite la oxidación del sustrato. También puede considerarse como un donador de electrones capaz de evitar una reacción en cadena de óxido-reducción. Los antioxidantes han sido clasificados en exógenos, endógenos y no enzimáticos estableciendo sus diferencias de acuerdo a la estructura química y función biológica¹² (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los antioxidantes, de acuerdo a su origen y acción.⁶

Origen	Acción
1. Exógenos.	
Vitamina E.	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Neutraliza el oxígeno singulete. ➤ Captura radicales libres de hidróxilo. ➤ Captura O₂⁻ ➤ Neutraliza peróxidos.
Vitamina C.	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Neutraliza oxígeno singulete. ➤ Captura radicales libres de hidróxilo. ➤ Captura O₂⁻ ➤ Regenera la forma oxidada de la vitamina E.
Betacarotenos, flavonoides, licopenos.	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Neutraliza el oxígeno singulete.
2. Enzimáticos	
Superóxido dismutasa (SOD).	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Degrada el radical superóxido a oxígeno y anión peróxido.
Catalasa (CAT)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno reduciéndolo a agua y oxígeno.
Glutación peroxidasa (GPx).	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a agua, o bien la de los hidroperóxidos a alcoholes o agua.
3. No enzimáticos.	
Glutación	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Es un antioxidante tiólico, que se encuentra en altas concentraciones (mM) en los compartimientos celulares, tiene la alta capacidad de eliminar los EROs.
Coenzima Q Ácido Tioctico	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Transportadores de metales. (Transferrina y ceruloplasmina).



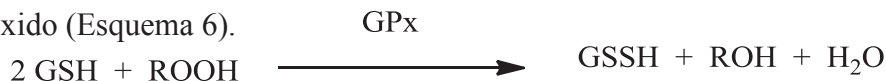
2.5. Características de las enzimas antioxidantes

- a) **Catalasa.** Tiene una amplia distribución en el organismo, alta concentración en hígado y riñón, baja concentración en tejido conectivo y epitelios, prácticamente nula en tejido nervioso y se localiza a nivel celular: mitocondrias, peroxisomas, citosol (eritrocitos); presenta dos funciones fundamentales: catalítica y peroxidativa y forma parte del sistema antioxidante CAT/SOD que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (Esquema 5).



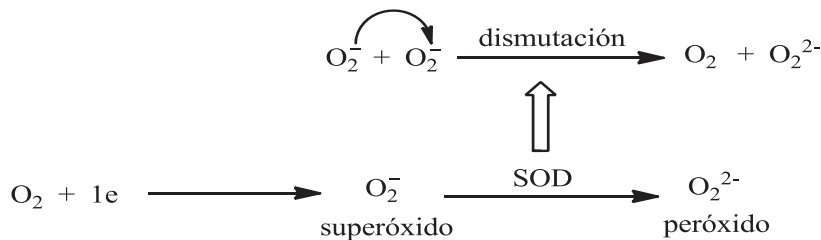
Esquema 5. Reacción de la catalasa con el peróxido de hidrógeno.¹³

- b) **Glutación peroxidasa.** Es una enzima seleno dependiente que cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno o lipoperóxido (L-OOH), usa como agente reductor el glutación reducido (GSH) y se localiza en: citosol (eritrocitos) y lisosomas (neutrófilos, macrófagos y otras células del sistema inmune). Existen tres formas de GPx: GPx-c o forma celular, la cual tiene mayor afinidad por el peróxido de hidrógeno que por el lipoperóxido; GPx-p o forma extracelular, que presenta afinidad semejante para ambos sustratos; GPx-PH, que tiene afinidad específica para los lipoperóxido. Las formas GPx-c y GPx-p no son capaces de utilizar los lipoperóxido (Esquema 6).

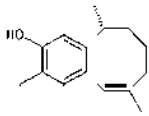


Esquema 6. Reacción del glutación peroxidasa con lipoperóxidos.¹³

- c) **Superóxido dismutasa.** Está formada por un grupo de enzimas metaloides (Cu-SOD y Zn-SOD), contienen cobre y zinc en un sitio activo y se encuentran en el citosol y en el espacio inter-membranoso mitocondrial; la Mn-SOD contiene manganeso y se localiza en la matriz mitocondrial; la Fe-SOD contiene hierro y se localiza en el espacio periplasmático de la *E. coli*.⁶ Estas enzimas catalizan la transferencia de un electrón de un superóxido a otro, resultando una molécula de oxígeno y un anión peróxido (Esquema 7).

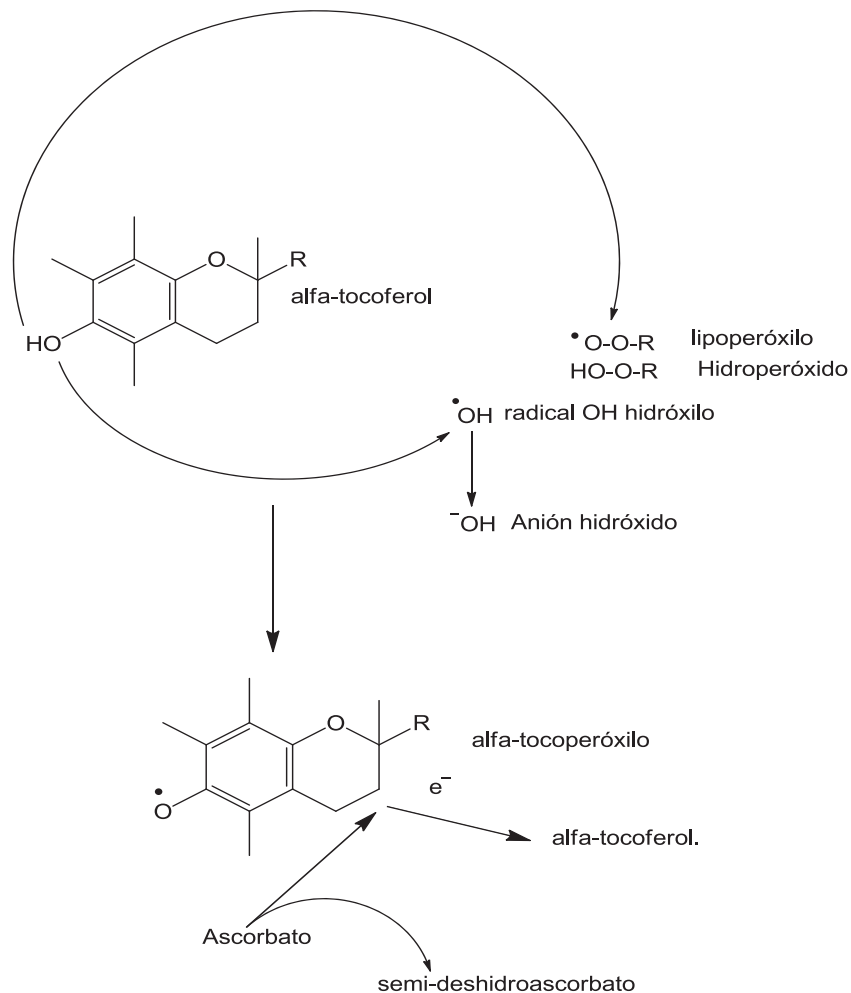


Esquema 7. Reacción del superóxido dismutasa con el superóxido.⁷

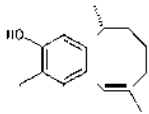


2.6. Características de antioxidantes exógenos

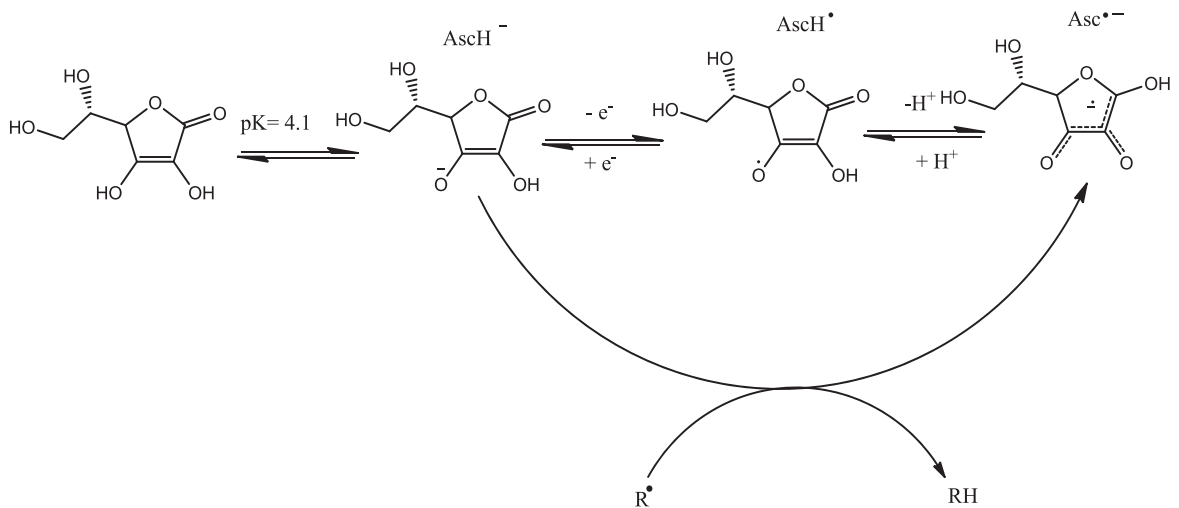
- a) **Vitamina E.** Es un lípido isoprenoide sustituido, de la familia de los tocoferoles. Su forma biológicamente activa es el *D*- α -tocoferol, cuyo hidróxilo fenólico en el anillo cromano es el responsable de la reducción antioxidante. La actividad de la vitamina E es una de las primeras barreras de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. Los fosfolípidos de la membrana plasmática mitocondrial y del retículo endoplásmico poseen afinidades para el α -tocoferol, por lo que está muy concentrado en estos sitios (Esquema 8). Los tocoferoles actúan interrumpiendo reacciones de cadenas con radicales libres como resultado de su capacidad de transferir hidrógeno fenólico a un radical peróxido libre, quedando, a la vez, en la forma de radical fenoxilo, en reacciones intermedias no reversibles que presuponen la transformación de la vitamina hasta su producto final inocuo.



Esquema 8. Reacción de la vitamina E frente a un radical libre.¹³



- b) **Vitamina C.** Es un derivado ácido de la glucosa. Presenta una configuración de lactona, en la que los grupos hidroxilos asociados al doble enlace funcionan como agentes con alto potencial reductor, lo que le permite, incluso, participar en la reducción directa del oxígeno, funcionando así como sustrato donante en las reacciones de las peroxidasas. El mecanismo de acción molecular de esta vitamina la sitúa en un nivel antioxidante de alta jerarquía, pues incluye la inhibición de la formación de radicales superóxido, o de nitrosaminas durante la digestión¹⁴ (Esquema 9).



Esquema 9. Vitamina C y su reacción con radicales libres.¹⁰

- c) **Polienos.** Las estructuras poliénicas (Figura 1) permiten la formación de radicales estabilizados por deslocalización del electrón desapareado sobre los dobles enlaces vecinos. Estas estructuras pueden reaccionar con un radical X[•] a través de los dos mecanismos: a) adición del radical a uno de los dobles enlaces, formándose un enlace covalente entre X y el polieno; b) cesión de un electrón de uno de los dobles enlaces a la especie X[•], quedando convertido el polieno en un catión radical (Esquema 10).

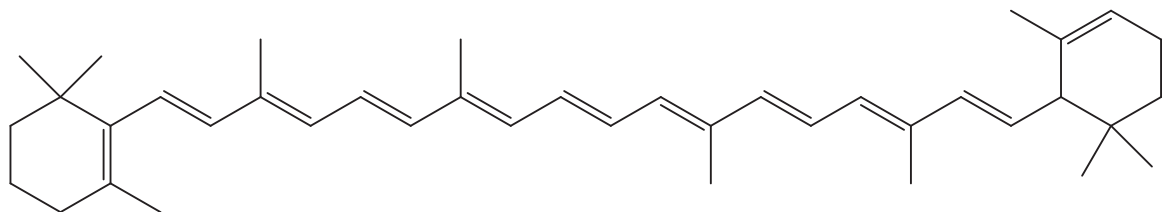
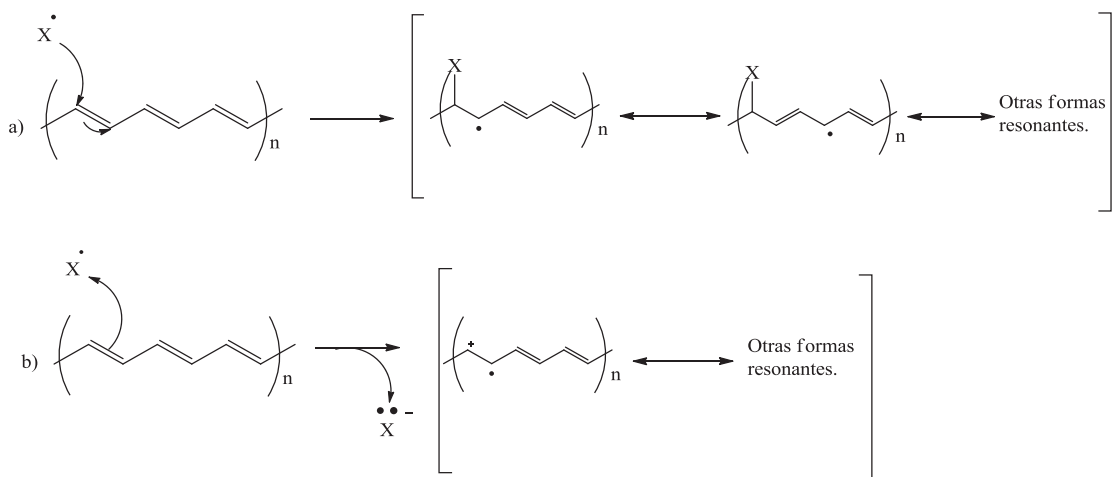
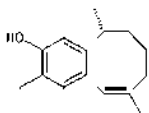


Figura 1. α-Caroteno



Esquema 10. Acción antioxidante de los polienos.⁷

2.7. Características de antioxidantes no enzimáticos

- a) **Glutati3n.** El glutati3n (Figura 2) es probablemente el m1s importante antioxidante presente en las c3lulas debido a su capacidad de eliminar las EROs que se forman en la cadena respiratoria¹⁵ (Esquema 11). Es un antioxidante ti3lico, que se encuentra en altas concentraciones (mM) en los compartimientos celulares y es considerado como el principal antioxidante hidrosoluble en las c3lulas.¹⁶

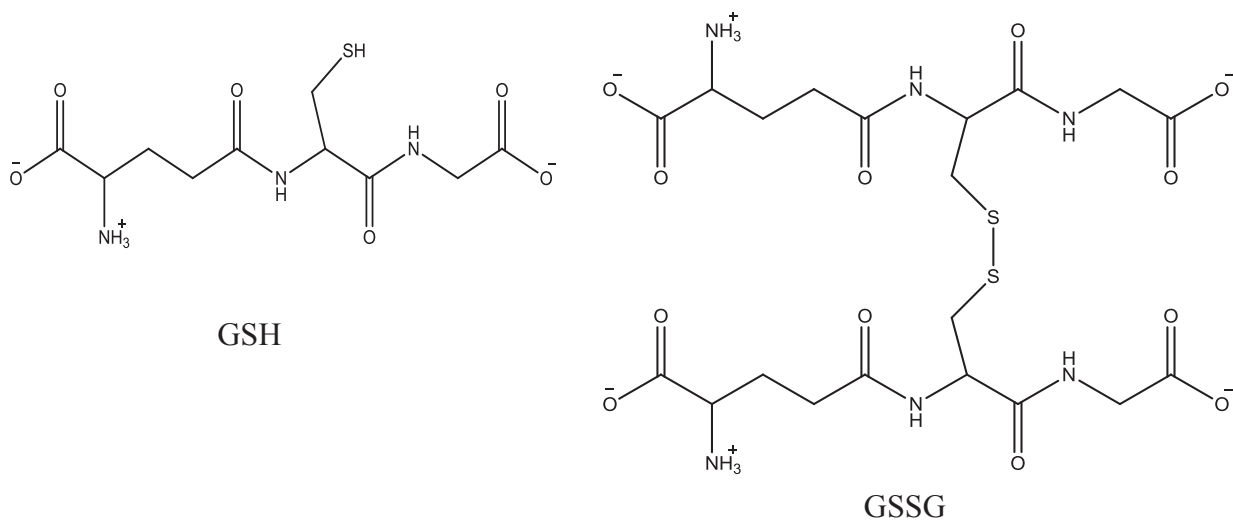
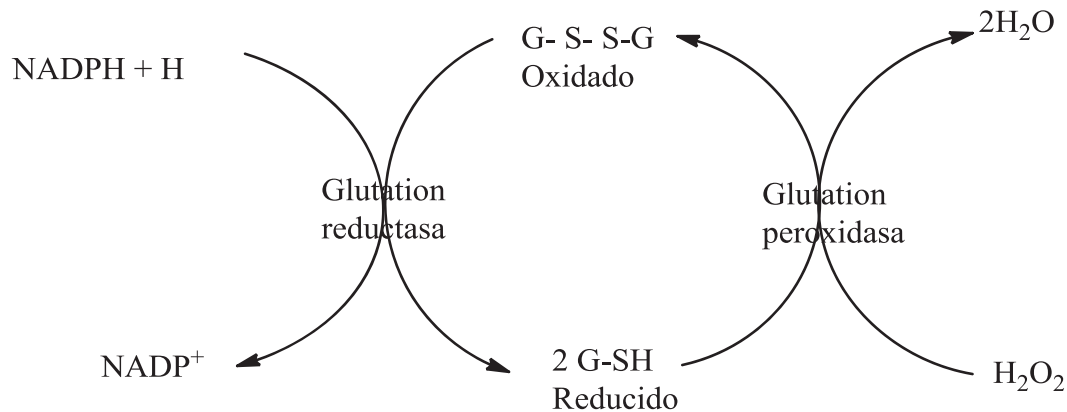
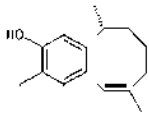


Figura 2. Estructuras del glutati3n reducido (GSH) y de glutati3n oxidado (GSSG).¹⁰



Esquema 11. Reducción por el NADPH del peróxido de hidrógeno mediada por glutatión.¹⁷

2.8. Técnicas para determinar la capacidad antioxidante total

Existen numerosas pruebas para la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* y dependiendo de la reacción involucrada se clasifican en dos tipos: pruebas basadas en reacciones de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) y pruebas basadas en la transferencia de electrones (ET)¹⁸ (Tabla 2).

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante total se basan en comprobar como un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o de la muestra. Por otra parte, hay ensayos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo. Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en el tiempo de evaluación, en la técnica instrumental utilizada, la sensibilidad y en las interacciones de la muestra con el medio de la reacción. La mayoría de los métodos de medida de la actividad antioxidante no emplean especies radicales de significado biológico, sino radicales que son oxidantes iniciadores ajenos al organismo; por ejemplo, el 2',2'-azobis-2-metilpropionamida (AAPH) o el 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

Algunos ensayos usan sistemas complejos para poder generar radicales libres y medir la capacidad antioxidante, tal es el caso del ensayo llamado habilidad del plasma para reducir las sales férricas (FRAP) donde el Fe^{+2} y el H_2O_2 en la reacción redox produce el radical $\cdot\text{OH}$. El empleo de los radicales peróxilo o hidróxilo en los ensayos les añade un mayor significado biológico, ya que estas especies reactivas son las más importantes a nivel fisiológico tales pruebas son por ejemplo la capacidad total de retiro de oxirradicales, capacidad de absorción de radicales de oxígeno y potencial total antioxidante de captación de radicales (TOSC, ORAC y TRAP).¹⁹

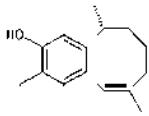


Tabla 2. Pruebas de actividad antioxidante *in vitro*.

<p>HAT</p> $\text{ROO}^\bullet + \text{AH} \longrightarrow \text{ROOH} + \text{A}^\bullet$ $\text{ROO} + \text{LH} \longrightarrow \text{ROOH} + \text{L}^\bullet$	<ul style="list-style-type: none"> • ORAC (Capacidad de absorber el radical de oxígeno) • TRAP (Potencial total reactiva de antioxidante) • IOU (Recaptura de oxígeno inhibida) • Inhibición de oxidación de ácido linoleico • Inhibición de la oxidación de LDL
<p>ET</p> $\text{M(n)} + \bar{e} \text{ (de AH)} \longrightarrow \text{AH}^\bullet + \text{M (n-1)}$	<ul style="list-style-type: none"> • TEAC (Capacidad antioxidante equivalente a trolox) • FRAP (Parámetro antioxidante reductor del ión férrico) • DPPH (radical 2,2,-difenil-1- picrilhidracilo) • Capacidad de reducción del cobre (II).
<p>Otras pruebas</p>	<ul style="list-style-type: none"> • TOSC (Capacidad total atrapadora antioxidante) • Quimioluminiscencia. • Electroluminiscencia.

2.9. Evaluación antioxidante con el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)

Este método se basa en la reducción del radical DPPH (Figura 3) por el antioxidante. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde cuando se añade un antioxidante (Esquema 12).

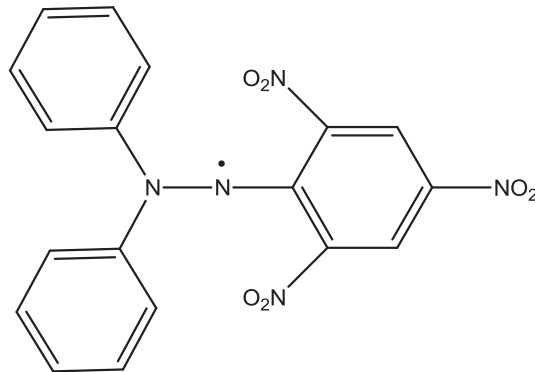
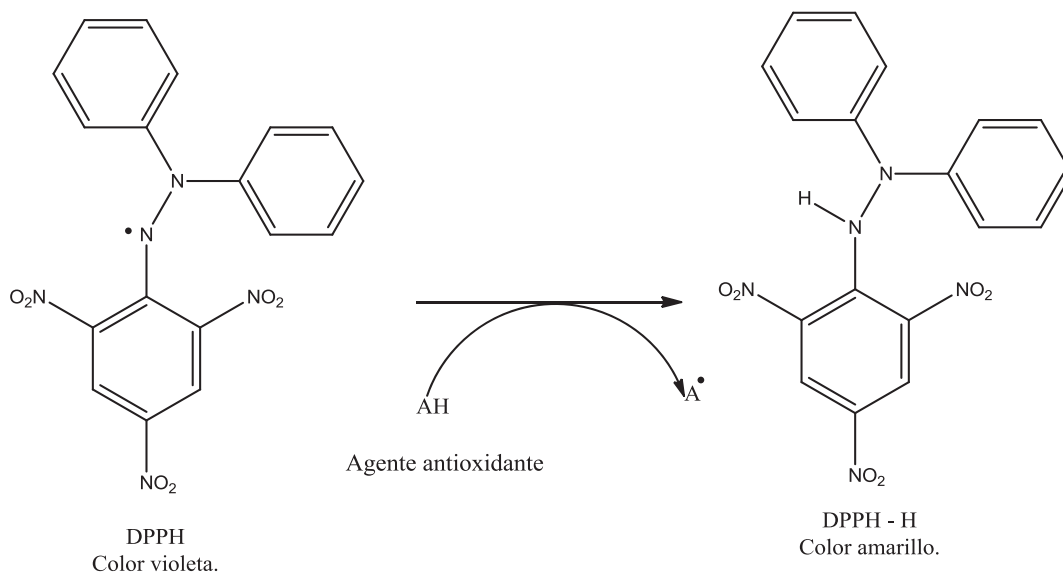
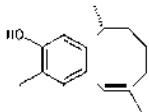


Figura 3. Estructura del DPPH.

La decoloración del radical se determina a 515 nm. Los tiempos de reacción son variables dependiendo de la naturaleza de los antioxidantes. En particular, las moléculas pequeñas con mejor accesibilidad al centro activo del radical poseen aparentemente una mayor actividad antioxidante por este método.



Esquema 12. Reacción de óxido-reducción del radical DPPH frente a un agente antioxidante.



El ensayo de DPPH es un método rápido y sencillo que para su cuantificación no requiere un equipo sofisticado. Es adecuado para medir la actividad antioxidante en alimentos o en productos naturales, por esta razón se trata de un método ampliamente utilizado para evaluación de actividad antioxidante total.²⁰ Sin embargo, presenta algunas desventajas, es un radical de nitrógeno estable el cual no comparte similitudes con los radicales peróxilo involucrados en la peroxidación de lípidos; además, muchos de los antioxidantes que reaccionan rápidamente con los radicales peróxilo pueden reaccionar lentamente o incluso ser inertes al DPPH.^{21, 22}

2.10. Sesquiterpenos y actividad antioxidante

Los terpenoides o isoprenoides, se derivan de la fusión de unidades de cinco carbonos llamada isopreno (C_5) y se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que lo forman (Figura 4).

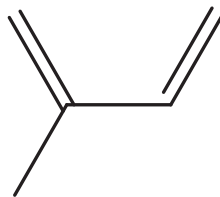
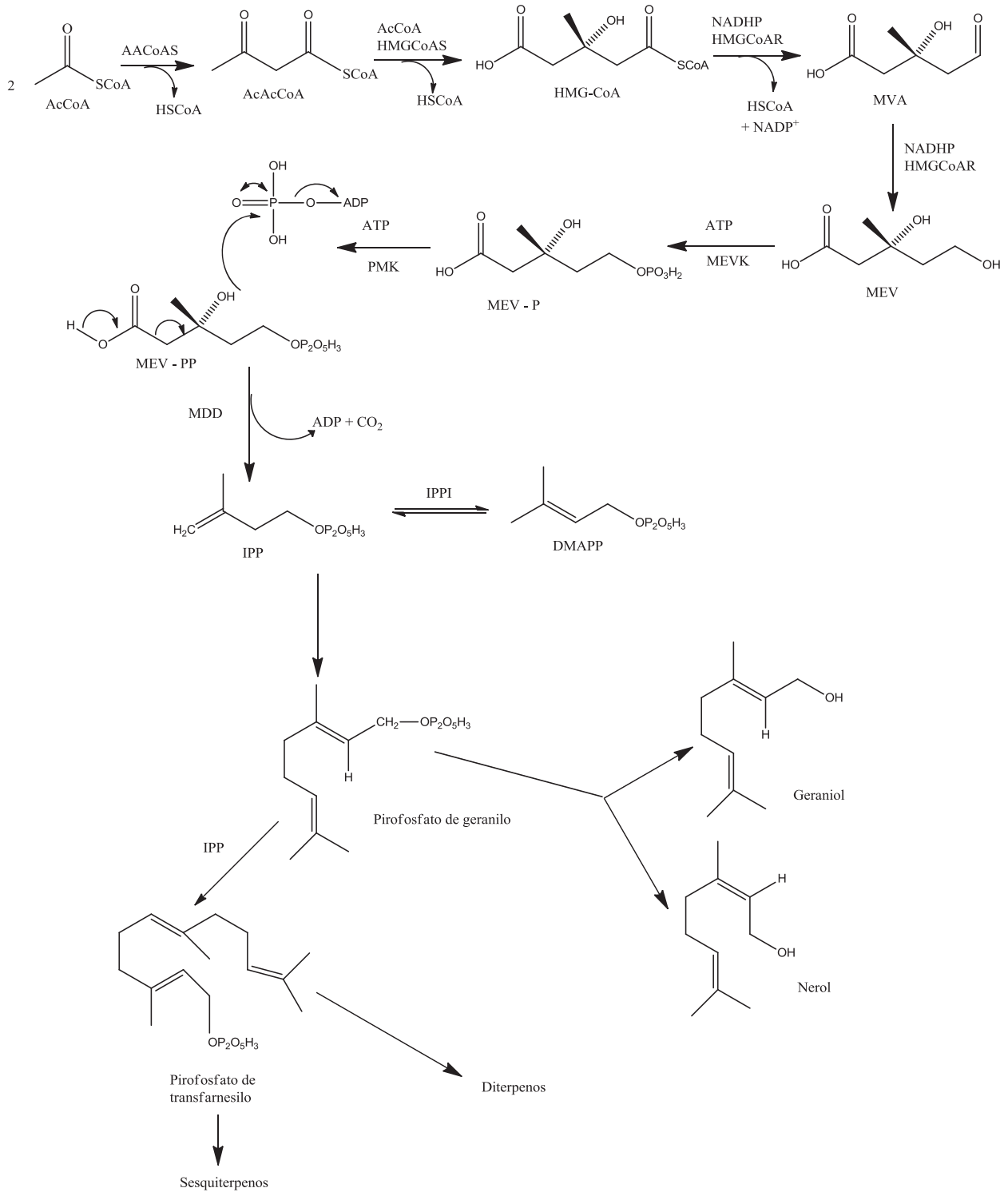
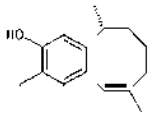
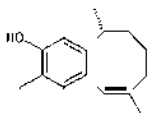


Figura 4. Estructura del isopreno.

En plantas, los isoprenos básicos para la síntesis de los terpenos son el isopentenil pirofosfato (IPP) o su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). La ruta del mevalonato es prácticamente universal y se lleva a cabo en el citosol. Por esta ruta se sintetizan principalmente diterpenos, sesquiterpenos y politerpenos (Esquema 13).



Esquema 13. Ruta del mevalonato para la biosíntesis de terpenos.²³



Por otra parte, la capacidad antioxidante de los terpenoides es de vital importancia para las plantas. Los caratenoides no solo son compuestos estructurales esenciales de los sistemas fotosintéticos, sino también son protectores del daño causado por la foto-oxidación (Figura 5).

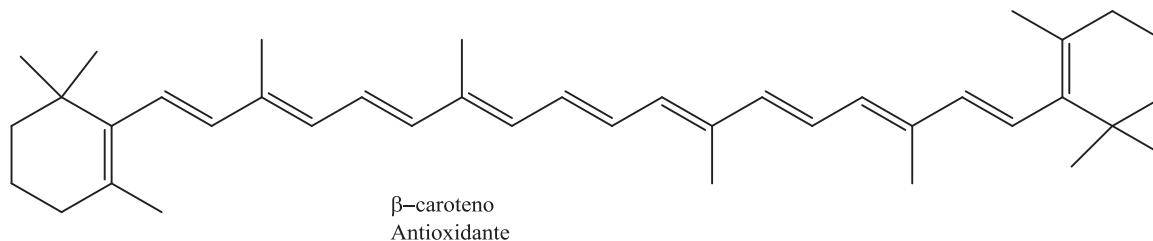


Figura 5. Terpeno con actividad biológica.

Así mismo, el isopreno podría ser un protector del daño causado por el ozono y quizá por su interacción con las membranas de los tilacoides es un protector del daño causado por las altas temperaturas.²⁴ Las betacianinas dan pigmentación rojo-violeta a plantas del orden *Caryophyllales*. Estos compuestos presentan una actividad antioxidante en ensayos *in vitro* usando sistemas de origen animal. En general la actividad de la betacianinas es mayor a la de los otros compuestos antioxidantes conocidos, tales como el ácido ascórbico, la catequina, la rutina y el α -tocoferol. Recientemente se mostró que cuando las hojas de betabel (*Beta vulgaris* L.) son heridas o infiltradas con bacterias, o bien con un sistema que genera H_2O_2 , se induce la síntesis de betacianinas. Por su capacidad antioxidante, los autores proponen que las betacianinas quizás atrapen el exceso de EROs producido bajo estas condiciones de estrés y así contribuyan a mantener el estado de óxido-reducción, que es tóxico para la misma célula (Figura 6).²⁵ Los fenilpropanoides simples y los flavonoides tienen una actividad antioxidante amplia dependiendo del sustituyente del hidróxilo de su anillo fenólico. Estos compuestos pueden actuar como agentes quelantes de los iones de fierro y de cobre, como cosechadores de radicales como es el radical hidróxilo, o reaccionar con moléculas como el ácido hipocloroso o nitroso y producir compuestos con una menor capacidad oxidativa. Por ejemplo, el ácido cafeíco, el ferúlico y el clorogénico, y el flavonoide cianidina de diversas frutas y vegetales, son poderosos antioxidantes capaces de consumir el H_2O_2 y contribuir con el ajuste del estado de óxido-reducción celular desencadenado durante el estrés (Figura 7).²⁶

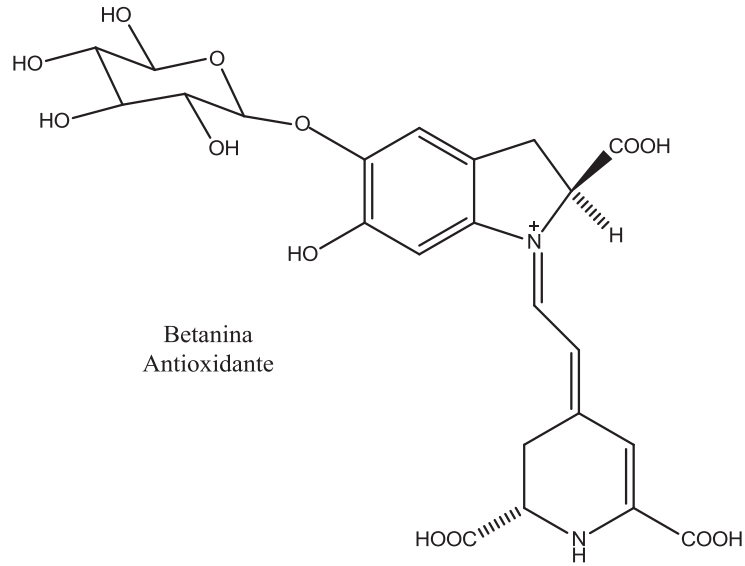
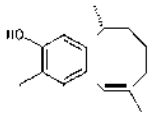


Figura 6. Betanina extraída de *Beta vulgaris*.

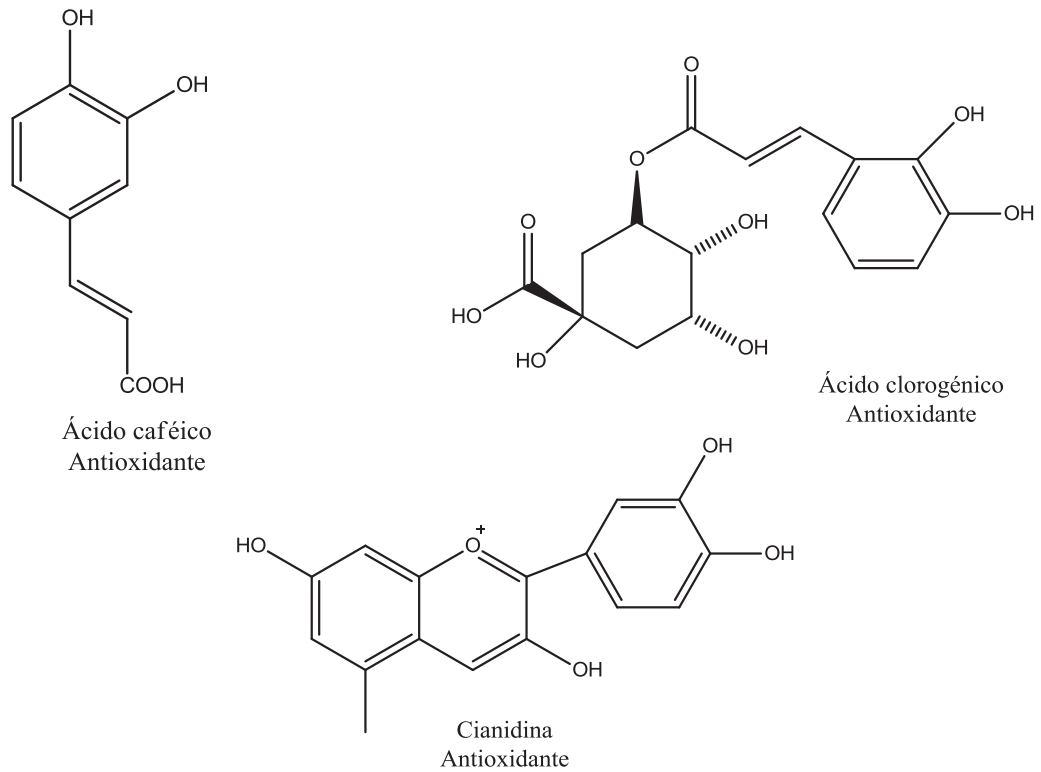
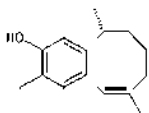
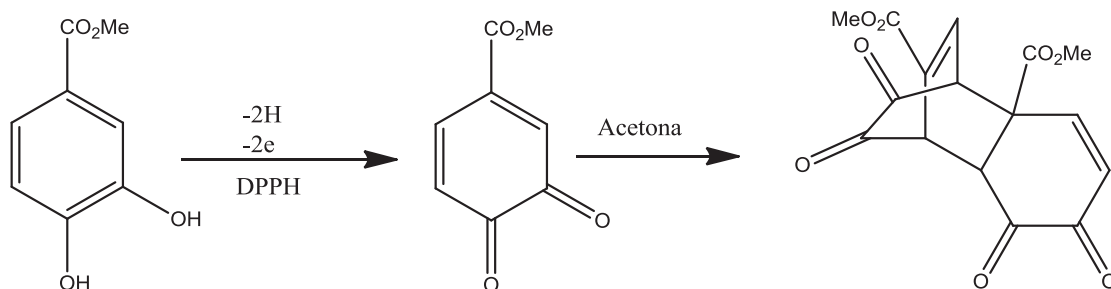


Figura 7. Estructuras de fenilpropanoides y de flavonoides con propiedad antioxidante.

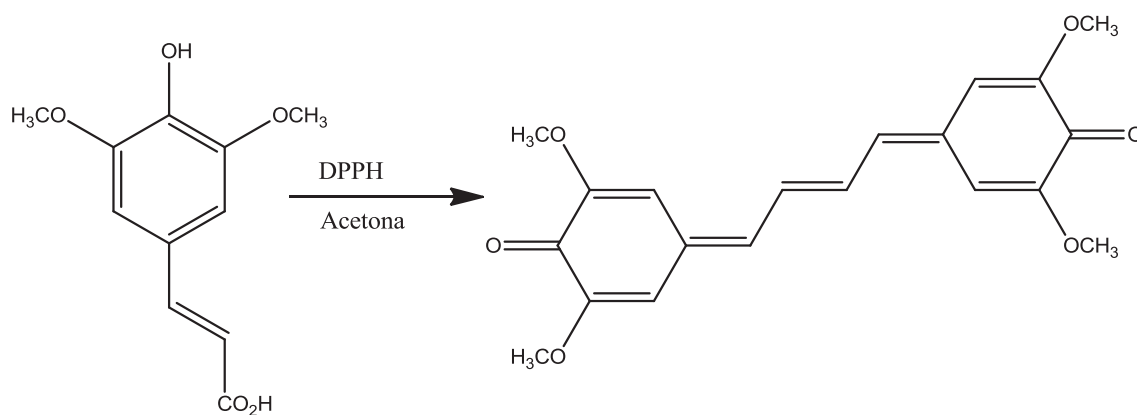


Una forma de investigar a profundidad sobre una molécula antioxidante, es estudiar directamente la reacción entre el DPPH y los compuestos a evaluar. Esto con el objetivo de entender el mecanismo de reacción de una molécula antioxidante y así poder construir nuevas moléculas que cumplan la función de atrapar radicales libres. También dicha reacción puede generar especies intermedias con propiedades químicas y biológicas de amplio interés, las cuales además se pueden manipular para generar otros compuestos interesantes. Algunos ejemplos de lo anterior, son los dímeros que se obtienen al hacer reaccionar ésteres de ácidos fenólicos con el DPPH²⁷ (Esquema 14).

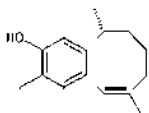


Esquema 14. Oxidación de derivados del catecol con DPPH.

Otro ejemplo es el bis (*p*-metilenquinona) etileno que es un compuesto dimérico que se obtiene al hacer reaccionar al ácido sinapínico con DPPH (Esquema 15).²⁸



Esquema 15. Reacción del ácido sinapínico con DPPH.



Otros ejemplos muy interesantes por ser aislados del coral *Sinularia sp.*, son los dos sesquiterpenos alicíclicos, el diepoxiguaiol y el guaianediol (Figura 8), ambos compuestos mostraron actividad antioxidante al estar en contacto con el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).²⁹

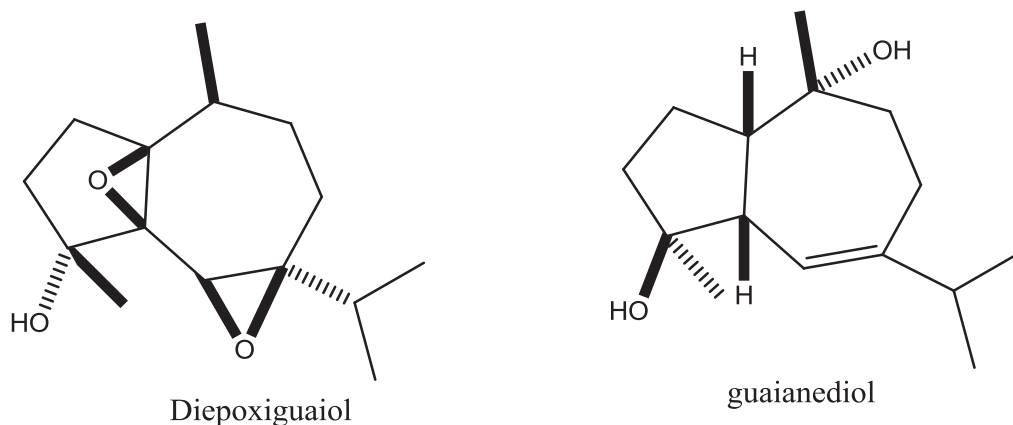


Figura 8. Sesquiterpenos alicíclicos.

Actualmente existe un gran interés por el descubrimiento de nuevos compuestos antioxidantes de origen natural. Por ello diversos estudios han generado buenas perspectivas, como es el caso del 5,6,7,8-tetrahidro-3,4,5-trimetilnafto (2,3-b) furan-9-ol conocido como cacalol (Figura 9) compuesto antioxidante aislado de *Cacalia decomposita* y *C. delphiniifolia*,^{30, 31} el cual al estar en contacto con DPPH se genera la Adenostina A o dímero del cacalol. (Esquema 16).¹³ La Adenostina A también ha sido aislada de la raíz de *C. adenostyloides*³² y *P. radulifolium*.^{33, 34}

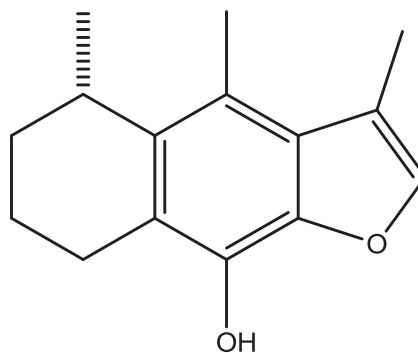
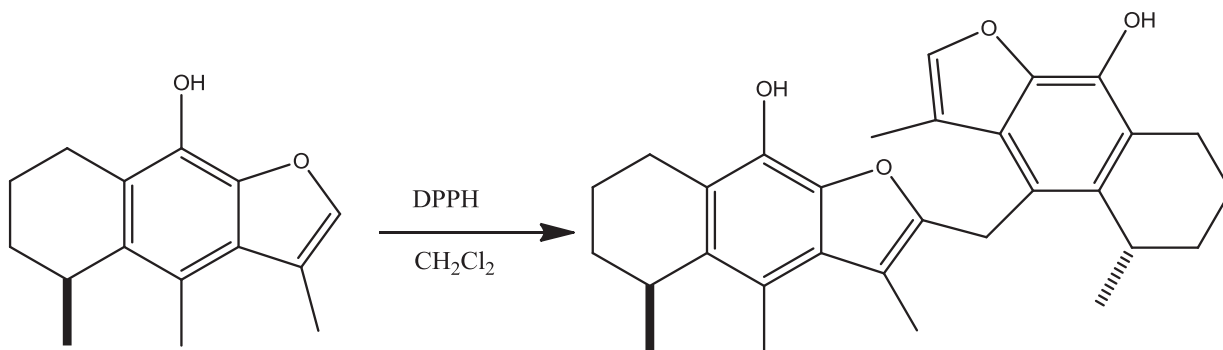
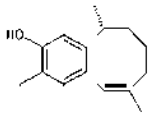


Figura 9. Cacalol.



Esquema 16. Reacción del cacalol con DPPH.

El cacalol presentó una concentración efectiva 50 (CE_{50}) de $12 \mu\text{M}$ frente al radical libre DPPH.³⁵

Dicho compuesto presentó actividad antioxidante al someterlo a la prueba de peroxidación lipídica en cerebro de rata.³¹ Recientemente se demostró su efecto antiproliferativo en células de cáncer de mama, donde induce apoptosis activando una vía proapoptótica que ocasiona el deterioro del tumor *in vivo*, bloqueando la expresión del gen FAS y modulando la vía Akt-SREBP.³⁶

En un trabajo reciente un sesquiterpeno de origen natural, llamado parvifolina (1) (Figura 10), el cual al estar en contacto con el DPPH en diclorometano generó el dímero de la parvifolina (Esquema 17).

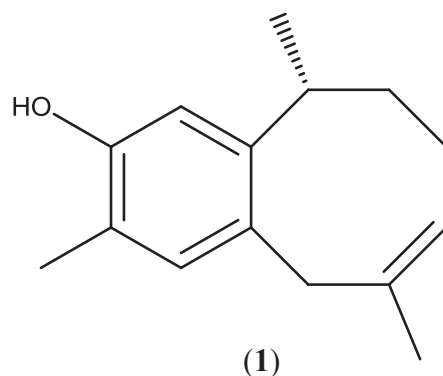
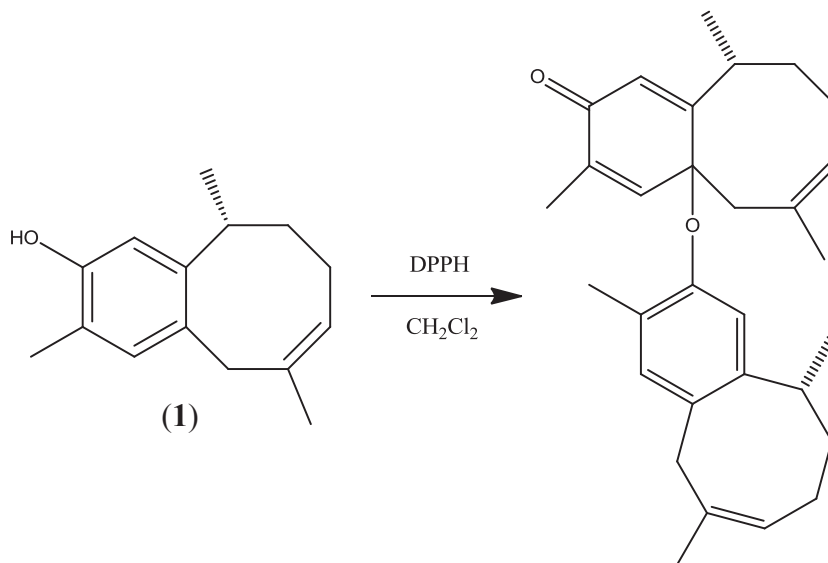
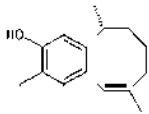
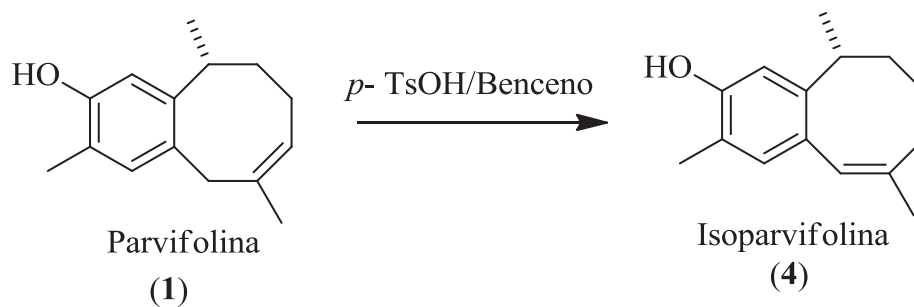


Figura 10. Parvifolina (1).

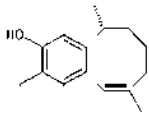


Esquema 17. Reacción de la parvifolina (1) con DPPH.¹⁰

Por lo que resulta interesante la preparación de un isómero de la parvifolina para probar su actividad antioxidante (Esquema 18).



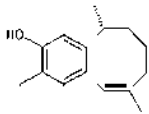
Esquema 18. Obtención de la isoparvifolina a partir de la parvifolina.^{10, 37, 38, 39}



3. JUSTIFICACIÓN

Los radicales libres son muy inestables y altamente reactivos, pudiendo alterar estructuras biológicas fundamentalmente como lípidos de membrana, ácidos nucleicos y proteínas; que está directamente relacionados con el envejecimiento celular y algunos procesos fisiopatológicos, por lo que es fundamental la búsqueda de nuevos antioxidantes más efectivos.

A partir de las investigaciones de productos naturales se podrá contribuir con el conocimiento de sustancias bioactivas capaces de capturar radicales libres. El estudio de los efectos antirradicalarios de sustancias de origen natural, aunado a la determinación de los subproductos químicos generados en dicha actividad, generará el conocimiento de sustancias químicas que pudieran funcionar como agentes activos contra los efectos adversos de las EROs como lo es la inflamación y el cáncer; y desde el punto de vista químico, se aportará la evidencia necesaria para el conocimiento de los mecanismos de reacción de las sustancias naturales frente a los radicales libres.



4. OBJETIVO GENERAL

1. Determinar la actividad antioxidante de la isoparvifolina.

4.1. Objetivos específicos

1. Obtener parvifolina a partir de *Acourtia humboldtii*.
2. Obtener isoparvifolina a partir de parvifolina.
3. Llevar a cabo la cinética antioxidante de la isoparvifolina.
4. Determinar la CE_{50} de la isoparvifolina.
5. Realizar un análisis químico y espectroscópico del producto de reacción de la isoparvifolina frente a DPPH.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La colecta de la planta se realizó en el km 63 de la carretera Morelia-Zacapu, de las raíces molidas de *Acourtia humboldtii* (Figura 11), se pesaron 830 g, se maceraron en hexano a temperatura ambiente por un día (tres veces) para obtener 72 g lo que representó un 8.7% de rendimiento. El espectro de RMN de 1H del extracto crudo (Figura 12), mostró como componente mayoritario a la parvifolina (1).

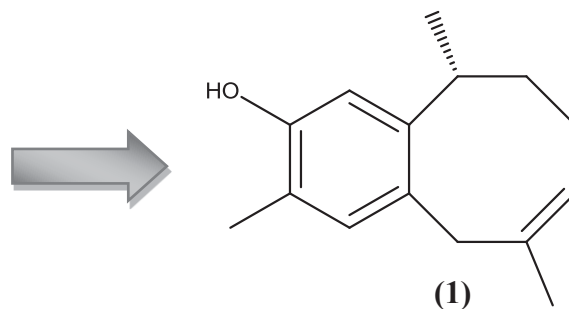


Figura 11. *Acourtia humboldtii*.

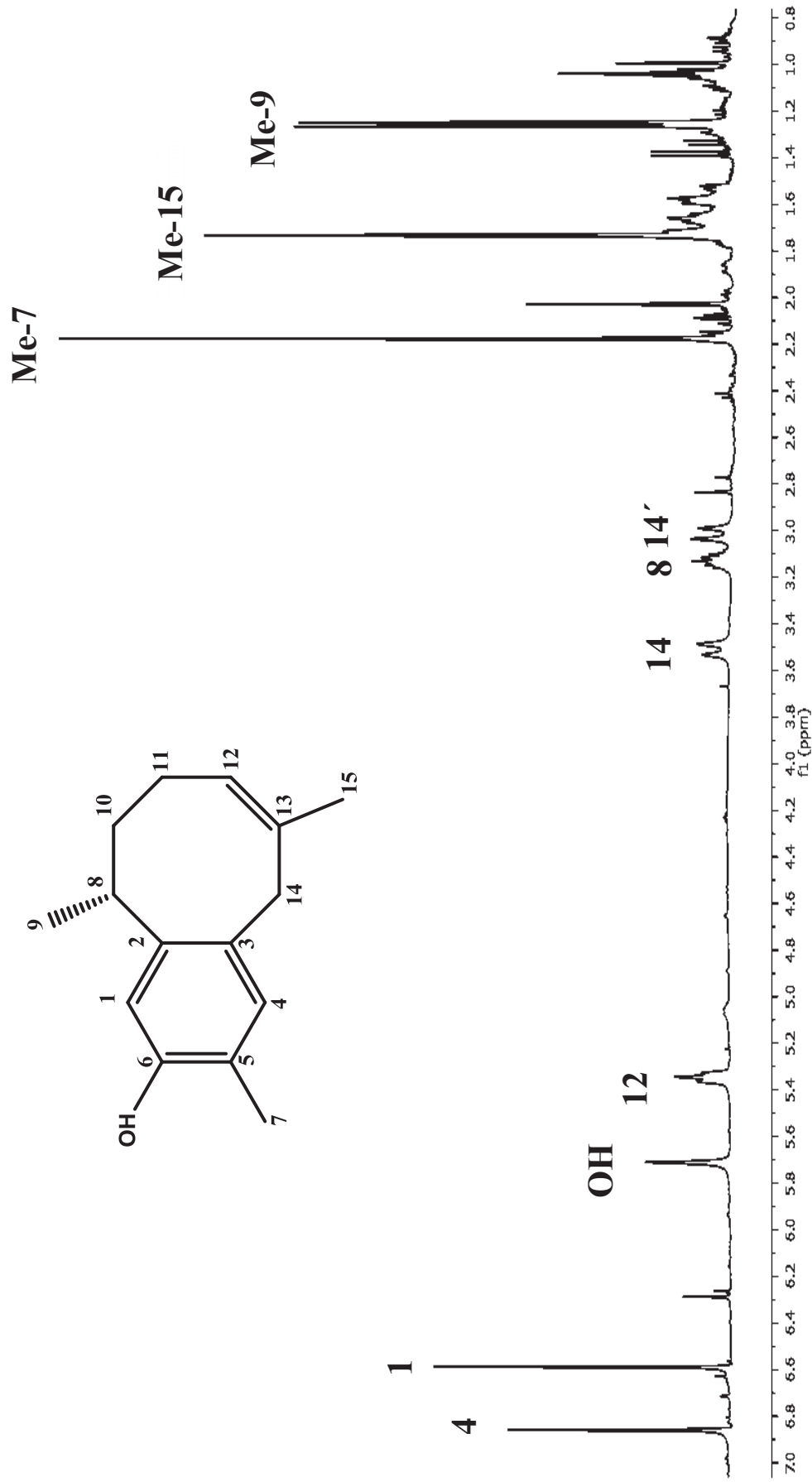
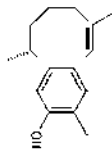
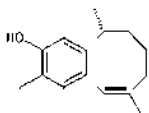
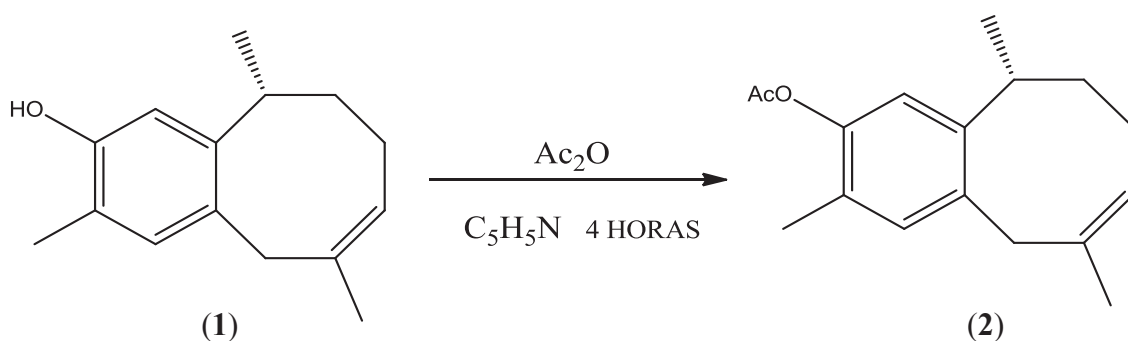


Figura 12. Espectro de RMN de ¹H del extracto hexánico de *Acourtia humboldtii* a 400 MHz en CDCl₃.



Se procedió a realizar una reacción de acetilación con el extracto crudo, para proteger el grupo OH de la parvifolina (1) que es inestable a la luz; y posteriormente facilitar su purificación. Se colocó en un vial 0.871 g de extracto con 2.5 mL de anhídrido acético y 2 mL de piridina, se dejó en baño maría por 4 horas (Esquema 19); tras realizar la purificación del crudo de reacción mediante cromatografía en columna se obtuvo 0.554 g de un sólido blanco con un punto de fusión 50-53°C y con un rendimiento de 63%.



Esquema 19. Reacción de acetilación al extracto de *Acourtia humboldtii*.

En el espectro de RMN de ^1H del producto de reacción (Figura 13), se observó una señal simple en 7.00 ppm característica de un protón aromático (H-4), otra señal simple en 6.78 ppm que corresponde a otro protón aromático (H-1), en 5.37 ppm una señal triple para un protón vinílico correspondiente al (H-12) y 3.56 ppm se observa una señal doble para el hidrógeno metileno (H-14); una señal múltiple en 3.17 ppm que corresponde al protón metino H-8; además, se observó otra señal doble en 3.07 ppm para el otro protón metileno (H-14'); en regiones altas, en 2.30 ppm se distingue una señal simple correspondiente al grupo acetato; las demás señales simples encontradas en 2.11 ppm y 1.75 ppm son características para el CH_3 -7 y CH_3 -15 respectivamente, y una señal doble en 1.32 ppm para el CH_3 -9; de 1.87-1.62 ppm se observan para los protones metilenos H-10 y H-11, correspondientes para la molécula (2).

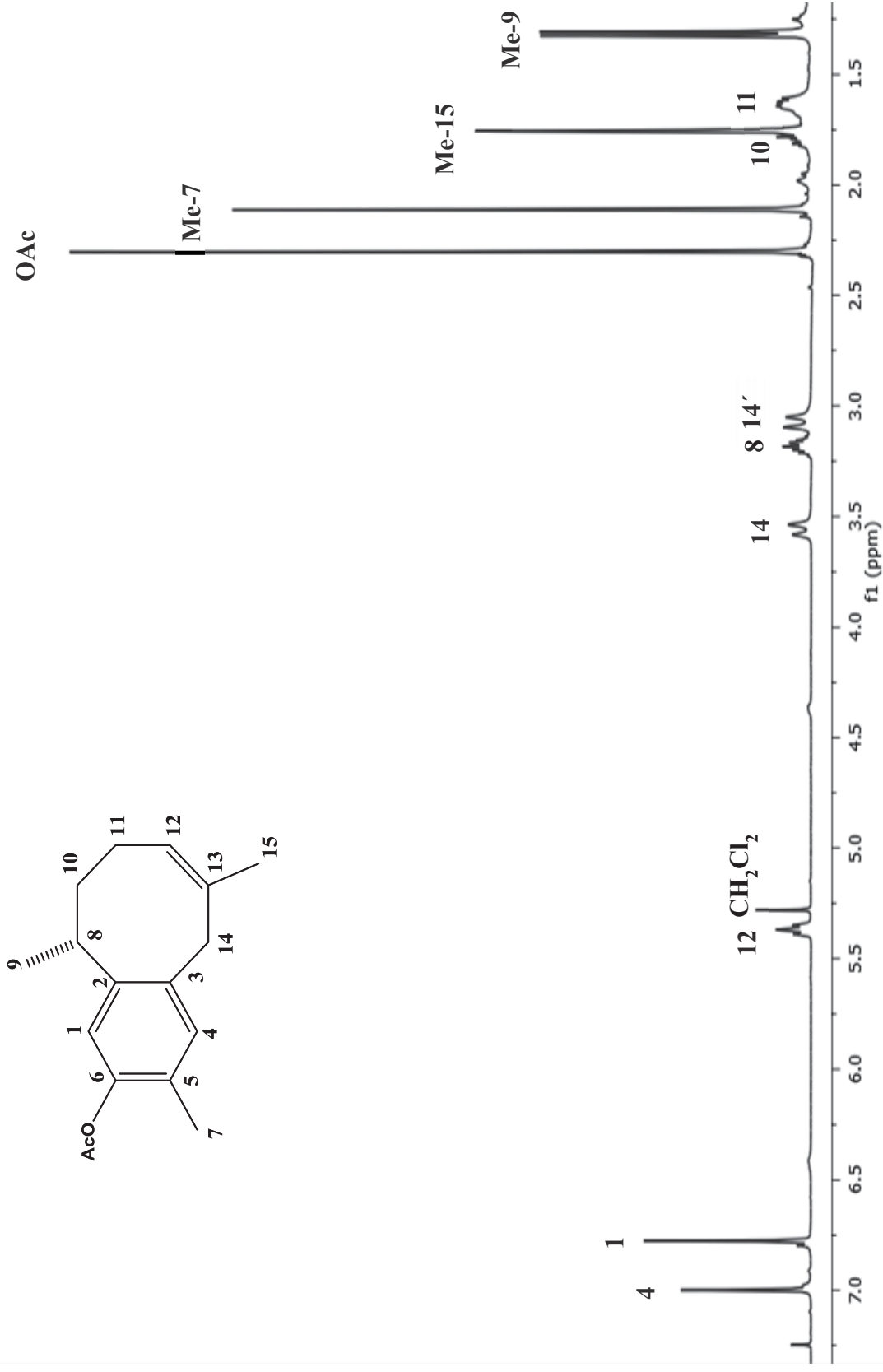
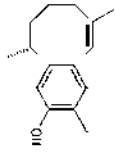
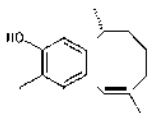
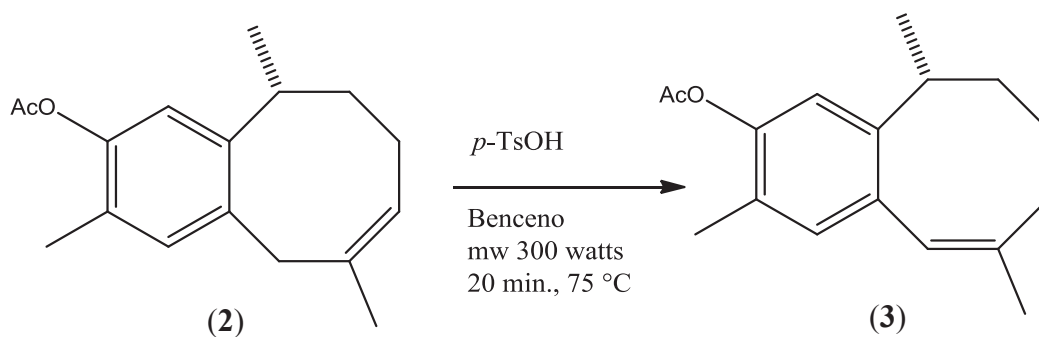


Figura 13. Espectro de RMN de ¹H del acetato de parvifolina (2) a 400 MHz en CDCl₃.



Siguiendo con la metodología descrita, se procedió a realizar una reacción de isomerización al acetato de parvifolina (**2**)³⁸ para promover la migración del doble enlace del cicloocteno y conjugarlo con el anillo aromático. Para realizar esto se utilizó ácido *p*-toluensulfónico (*p*-TsOH) en benceno y a reflujo por 1 hora; tras la isomerización se obtuvo la mezcla del acetato de isoparvifolina (**3**) y materia prima, por lo que se decidió realizar la reacción en microondas a unas potencia de 300 watts por 20 min a una temperatura de 75 °C (Esquema 20), obteniendo un rendimiento cuantitativo del acetato de isoparvifolina (**3**).



Esquema 20. Reacción de isomerización del acetato de parvifolina.

En el espectro de RMN de ¹H del acetato de isoparvifolina (**3**) (Figura14), se observó la modificación del desplazamiento del nuevo protón vinílico H-14 en 6.15 ppm; de igual manera se apreciaron dos señales múltiples en 1.54 ppm perteneciente al protón alifático H-12 así como en 1.43 ppm atribuida al protón metileno H-12'; el resto de las señales fueron consistentes para el sistema benzocicloocteno de la molécula.

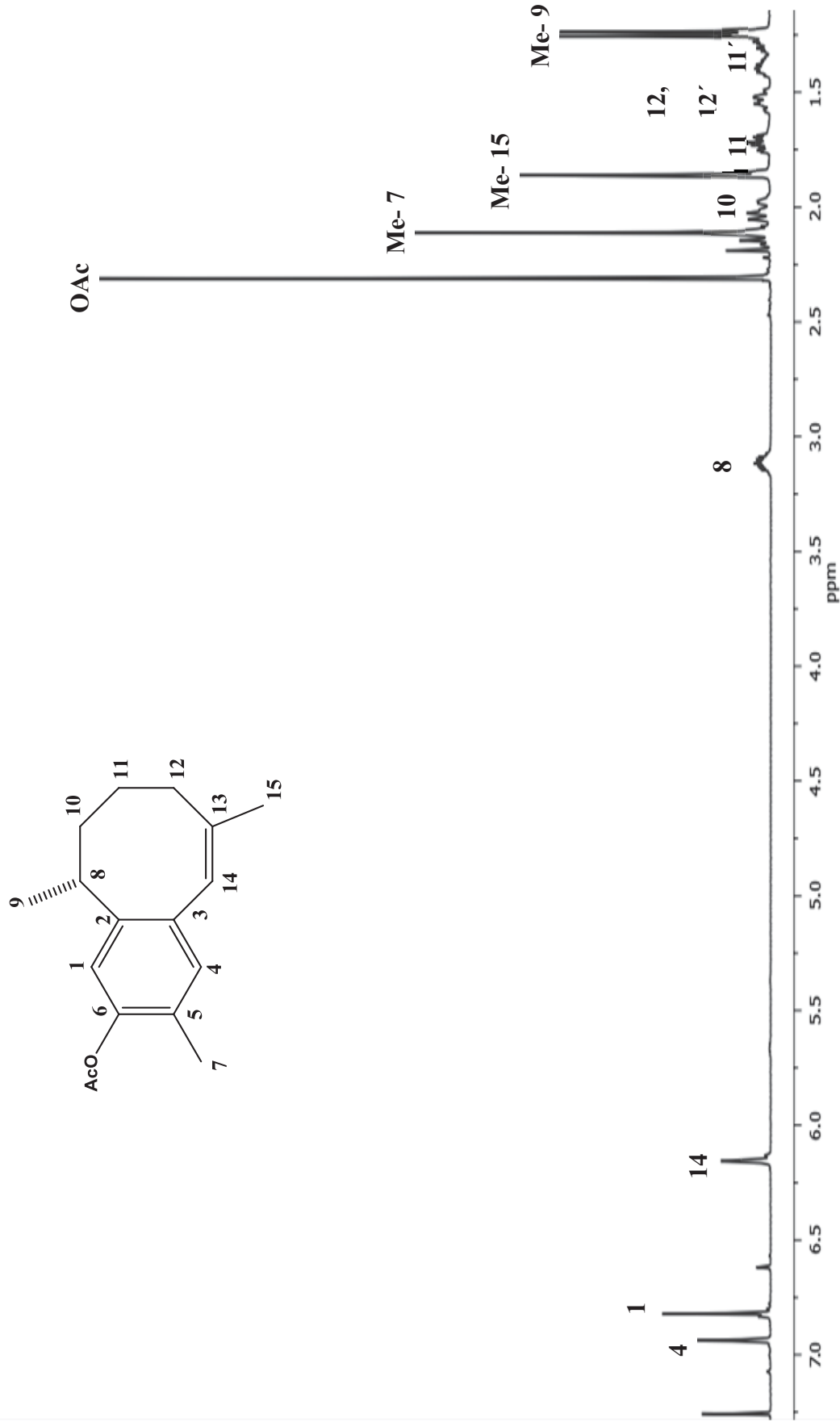
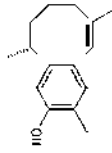
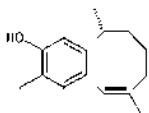
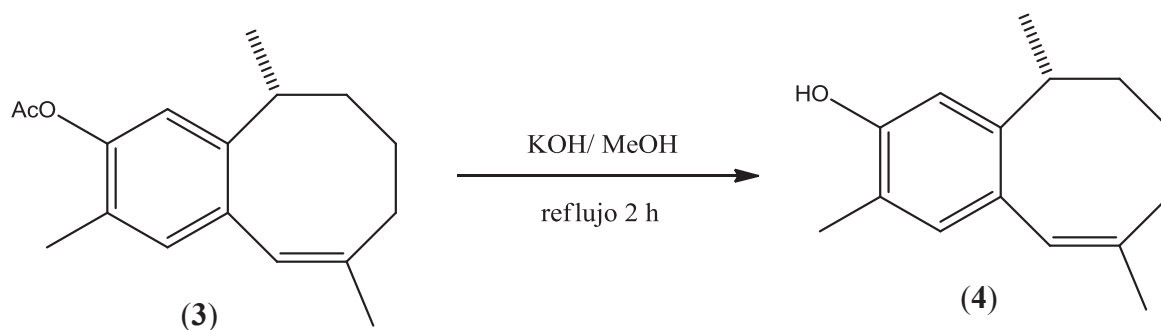


Figura 14. Espectro de RMN de ¹H del acetato de Isoparvifolina (3) a 400 MHz en CDCl₃.



Finalmente se realizó una hidrólisis al acetato de isoparvifolina (**3**), para generar nuevamente el alcohol fenólico y poder probar su actividad antioxidante frente al radical libre DPPH; para esto se pesaron 0.468 g de acetato de isoparvifolina, 0.303 g de KOH y se disolvieron en 75 mL de metanol, la solución se sometió a reflujo por dos horas (Esquema 20) para obtener 0.327 g de isoparvifolina (**4**) lo que representó un rendimiento del 70%.



Esquema 20. Reacción de hidrólisis del acetato de isoparvifolina (**3**).

En el espectro de RMN de ^1H de isoparvifolina (**4**) se apreció el mismo patrón de señales del derivado acetilado (**3**), se observó la desaparición del grupo acetilo y apareció una señal simple ancha en 4.57 ppm atribuida al grupo hidróxilo (Figura 15).

En el espectro de RMN de ^{13}C se observaron 15 señales de las cuales se observaron 8 entre 152.6 ppm y 112.0 ppm, las 7 señales restantes atribuidas al sistema alicíclico de la molécula se observaron entre 39.4 y 15.3 ppm, lo que confirmó la estructura de nuestro compuesto (Figura 16).

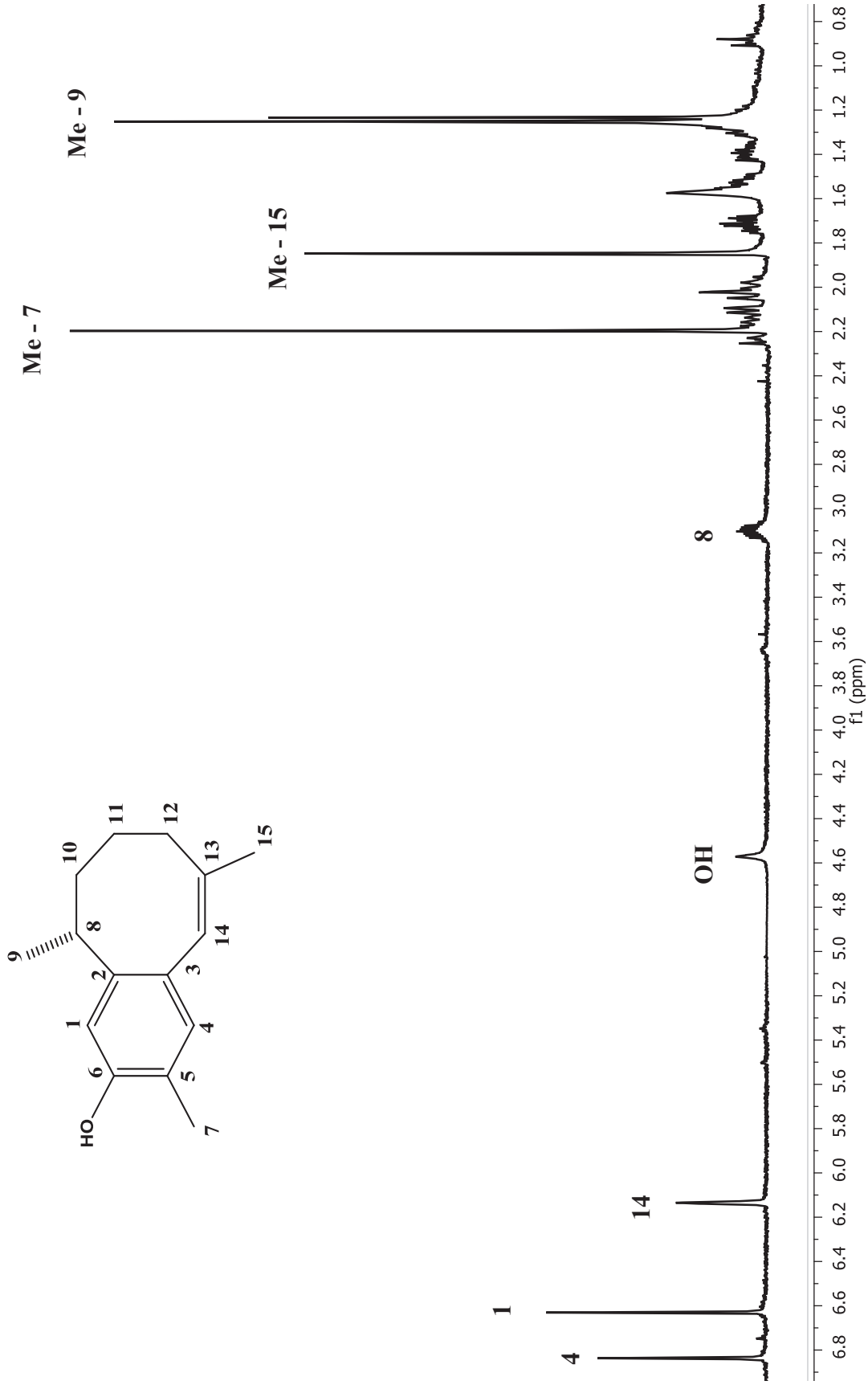
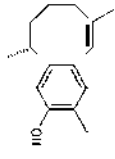


Figura 15. Espectro de RMN de ¹H de Isoparvifolina (4) a 400 MHz en CDCl₃.

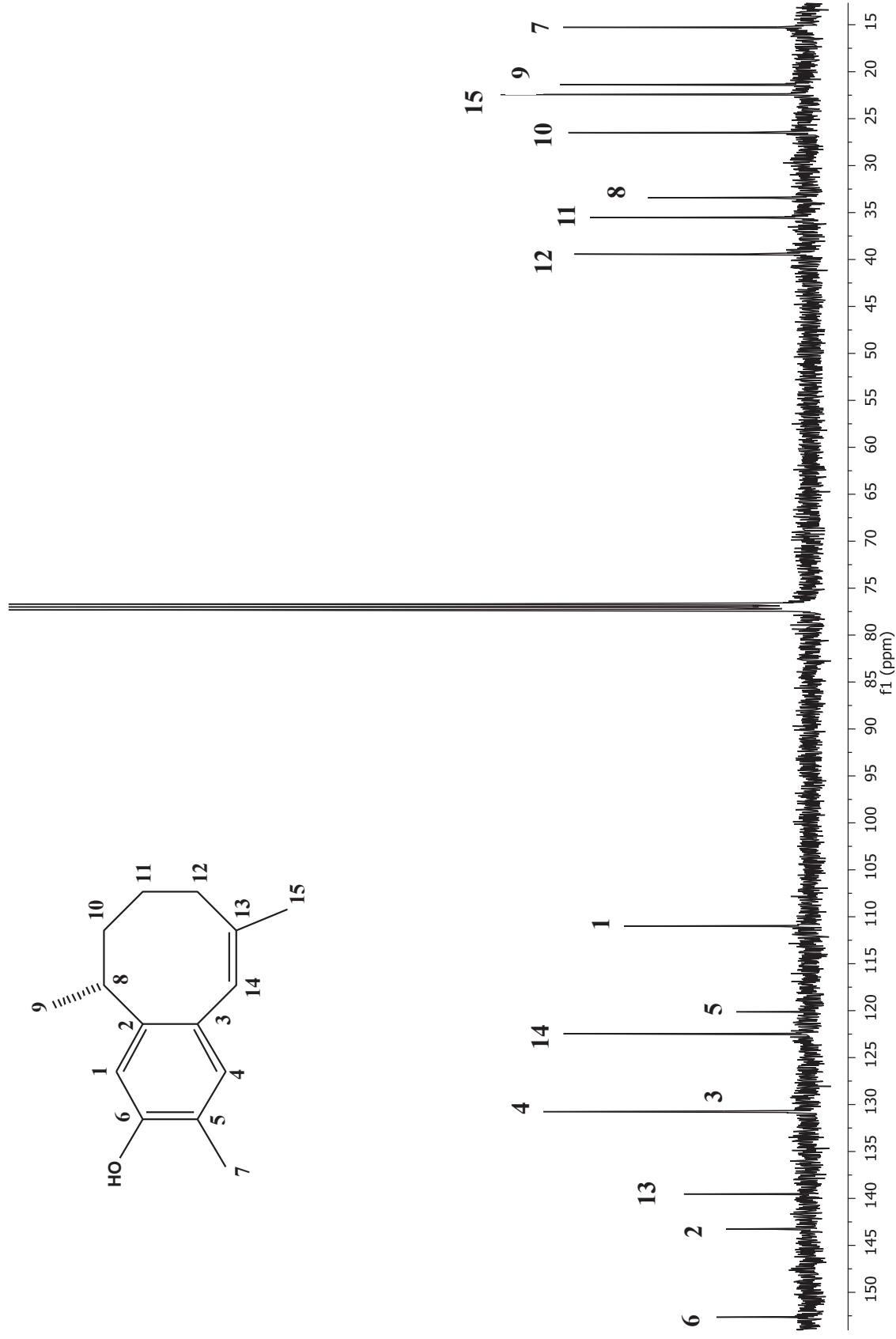
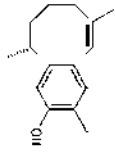
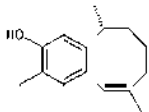


Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C de Isoparvifolina (4) a 100 MHz en CDCl_3 .



5.1. Actividad antioxidante de la isoparvifolina

Una vez aislada la isoparvifolina (**4**) y confirmada su estructura mediante RMN de ^1H , por comparación de sus desplazamientos químicos con los de la literatura, se llevaron a cabo los ensayos para determinar su actividad antioxidante a través de una cinética de extinción del radical DPPH y posteriormente la determinación de la concentración efectiva 50 (CE_{50}).⁴⁰ La cinética de captura de radical se llevó a cabo utilizando isoparvifolina (**4**) a distintas concentraciones de ensayo (0.02 mM, 0.1 mM, 0.2 mM y 2 mM), mientras que la del DPPH permaneció constante (0.09 mM). A concentración 2 mM de isoparvifolina se logró apreciar una caída importante en la concentración del DPPH en un lapso de seis minutos, después de este tiempo permanece constante el porcentaje de DPPH remanente (% DPPH_{REM}). En concentraciones menores de la muestra problema (**4**) se observó mayor % DPPH_{REM} lo que demostró que el efecto antioxidante de este compuesto depende directamente de la concentración (Figura 17).

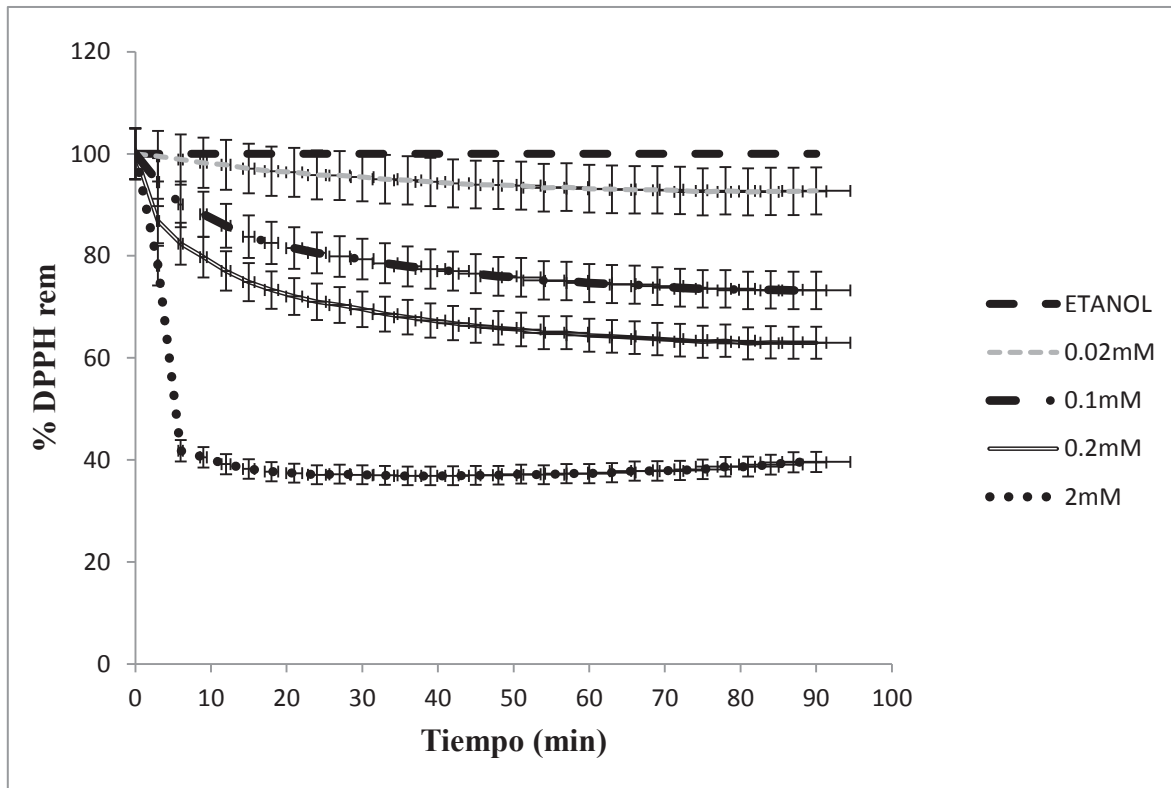
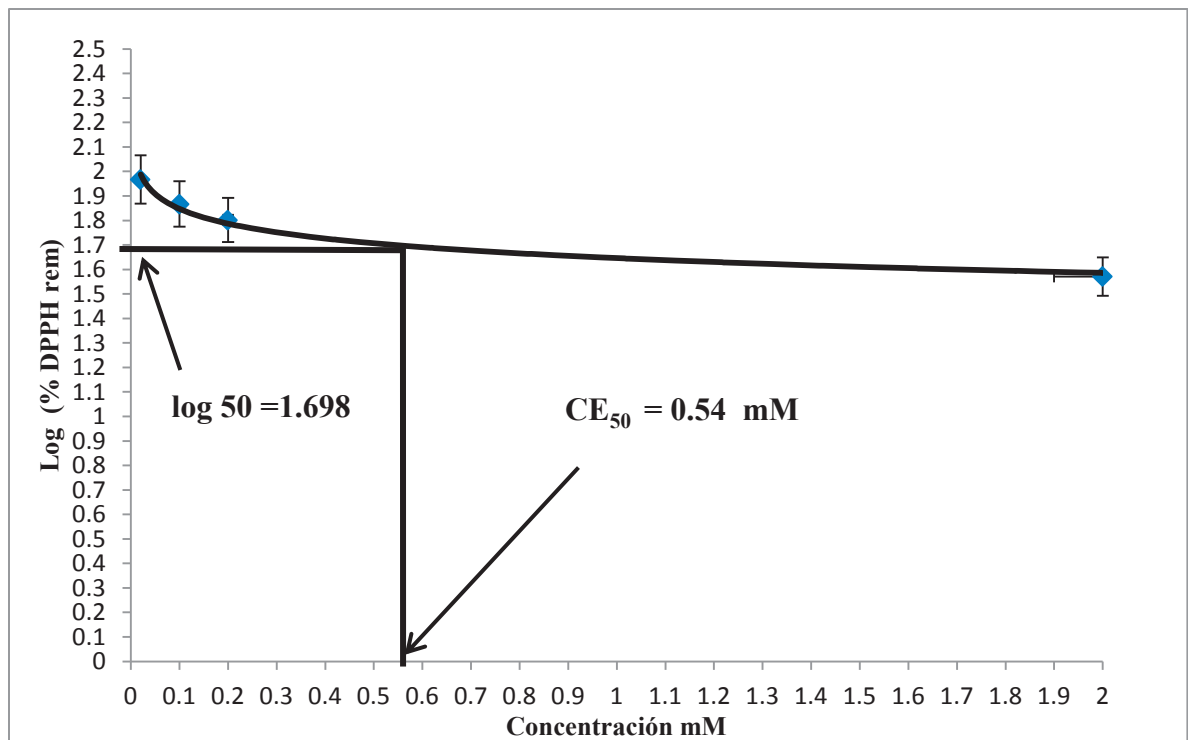
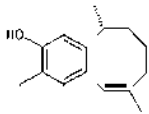


Figura 17. Cinética de extinción del DPPH frente a isoparvifolina.

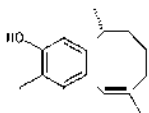


$$\text{Log (\% DPPH rem)} = -0.087 \ln (\text{concentración}) + 1.6462$$

$$r = 0.99, \quad \text{CE}_{50} = 0.54 \text{ mM} \pm 0.01$$

Figura 18. Cálculo de la CE₅₀ para la isoparvifolina (4).

La CE₅₀ está inversamente relacionada con la actividad antioxidante del compuesto, ya que expresa la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la concentración del radical libre en un 50%.^{40,41} Entre más baja sea la CE₅₀ mayor será la actividad antioxidante del compuesto. Como se puede observar la isoparvifolina (4) presenta una actividad antioxidante con una CE₅₀ de 0.54 mM (Figura 18), resultando ser un candidato viable para la búsqueda de principios activos contra enfermedades que involucren la captura de radicales libres, como lo son la inflamación y el cáncer.



5.2. Determinación de los productos de reacción de la isoparvifolina frente a DPPH

Para determinar los productos de reacción de la isoparvifolina (4), se procedió a realizar una reacción a escala de laboratorio de la siguiente manera:

0.422 g de isoparvifolina (4) y 0.763 g de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), en 13 mL de diclorometano, se dejaron reaccionar a temperatura ambiente en agitación por 2 horas, transcurrido este tiempo se evaporó el disolvente con una corriente de nitrógeno. La reacción de la isoparvifolina con el radical DPPH, es una reacción de óxido-reducción donde el DPPH se reduce cambiando de un color violeta a una solución de color café-amarillo, esta coloración nos indica que la reacción se llevó a cabo.

El producto de la reacción se sometió a una purificación por cromatografía en columna con gel de sílice (200–300 Merck) como soporte y utilizando hexano como eluyente obteniéndose 0.168 g de miel amarilla, la cual en su espectro de masas mostró un ión molecular M+1 de 431 m/z , este pico además mostró una intensidad relativa del 100% (Figura 19); debido al elevado peso observado y con base en los antecedentes de este tipo de reacciones se asume la presencia de un derivado dimérico de la isoparvifolina (5).

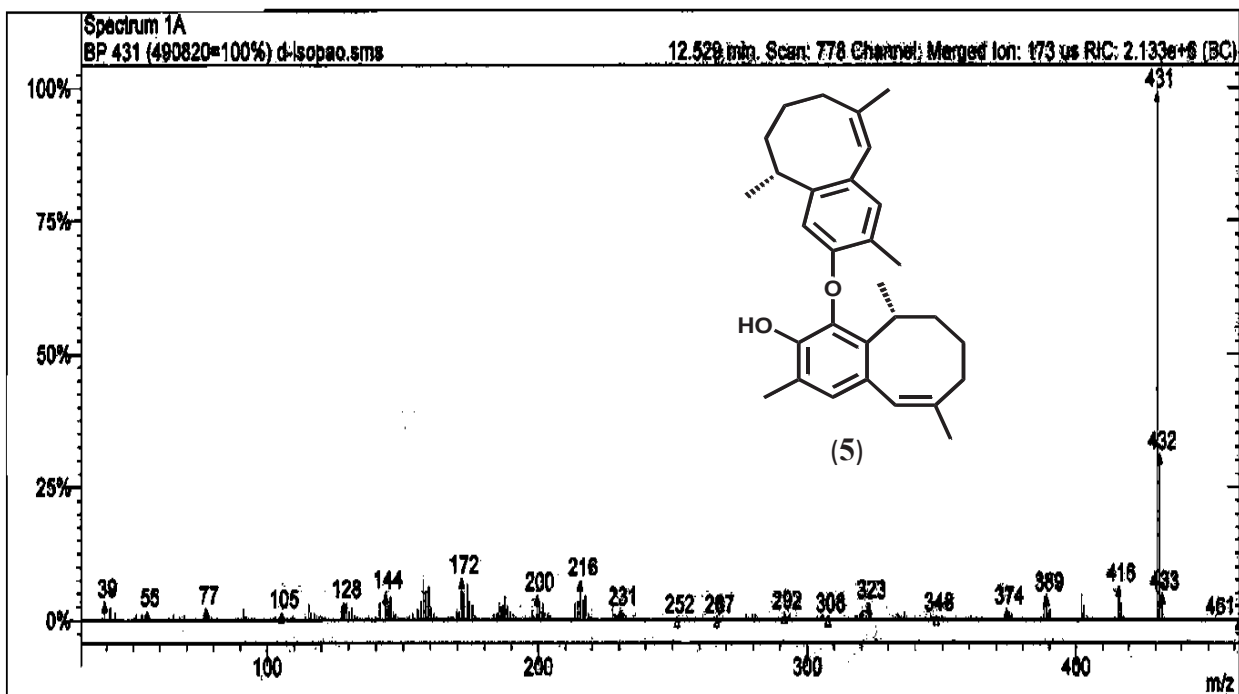
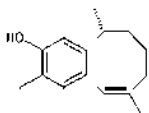


Figura 19. Espectro de masas por impacto electrónico del heterodímero de isoparvifolina (5).

En su espectro de UV, se observaron $\lambda_{\text{máx}}$ de 213 nm ($\log \epsilon$ 4.4) atribuida a la banda primaria (p), así como en 252 nm ($\log \epsilon$ 4.08) correspondiente a un sistema bencenoide.



En su espectro de IR se observó una banda de estiramiento en 3550 cm^{-1} atribuida a un grupo OH, en 3007 cm^{-1} se apreció una banda de intensidad moderada perteneciente al estiramiento de enlaces C-H aromáticos, mientras que en 2927 cm^{-1} se observó una banda intensa correspondiente al estiramiento C-H alifático, por último se detectó una banda de estiramiento en 1220 cm^{-1} para enlaces C-O aromáticos (Figura 20).

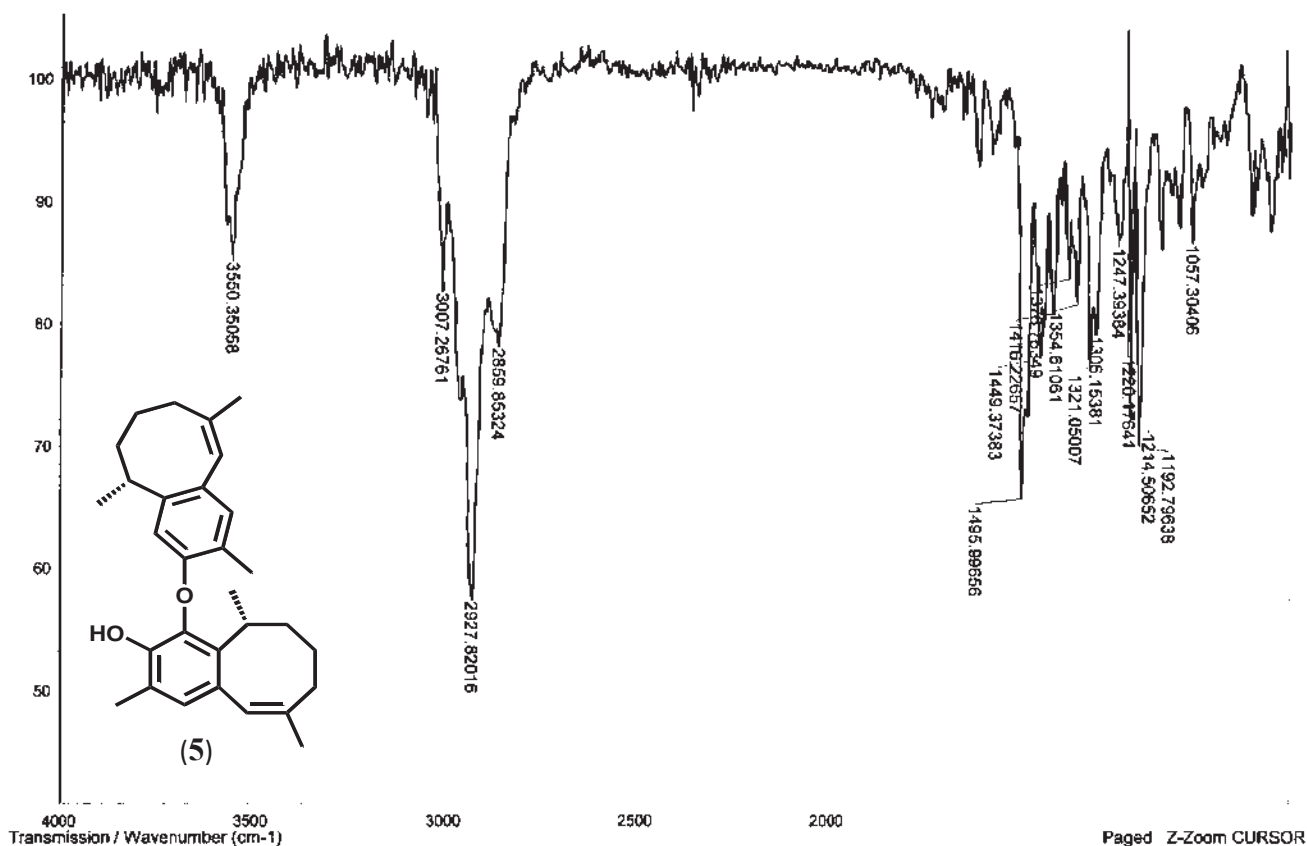


Figura 20. Espectro de IR del heterodímero de la isoparvifolina (5)

En el espectro de RMN de ^1H del dímero de isoparvifolina (5) se observó una baja resolución de señales anchas. Sin embargo, se apreció una señal simple en 6.91 ppm cuya integral denotaba la presencia de un protón aromático (H-4), en 6.23 ppm se observó una señal simple ancha la cual integró para tres protones (H-1, H-14, H-14'), en 5.20 ppm apareció una señal simple ancha la cual fue atribuida a un protón de hidroxilo, de igual manera se apreciaron dos señales anchas en 3.18 ppm y 3.03 ppm correspondientes a los protones metínicos H-8 y H-8' respectivamente. Finalmente se observaron tres señales simples en 2.39 ppm, 2.24 ppm y 1.84 ppm las cuales son los CH_3 -7', CH_3 -7, CH_3 -15 y CH_3 -15' estos dos últimos encontrándose traslapados (Figura 21).

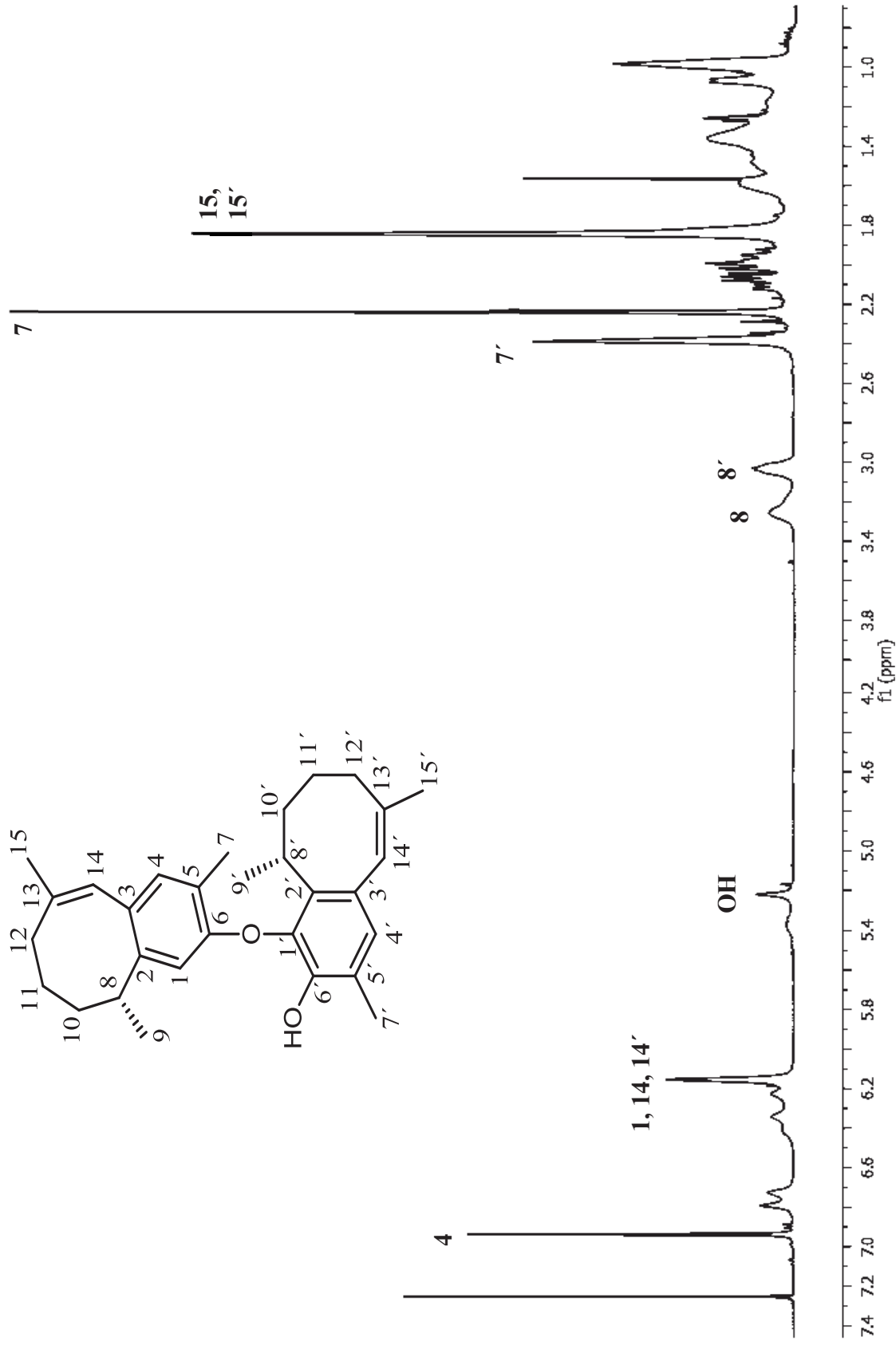
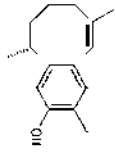
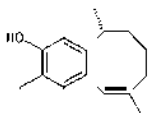


Figura 21. Espectro de RMN de ¹H del heterodímero de la Isoparvifolina (5) a 400 MHz en CDCl₃.



5.2.1. Ensayo de variación de la temperatura

En base a los antecedentes del efecto dinámico que presenta el dímero de la parvifolina.¹⁰ Se decidió realizar la medición de un espectro de RMN de ^1H a temperatura elevada. Para esto, se disolvió la muestra en DMSO- d_6 y se realizó la medición a 120 °C, observándose en esta ocasión el patrón de señales para un solo compuesto, en 7.68 ppm se apreció una señal simple ancha al grupo OH de la molécula, en 6.85 ppm y 6.68 ppm se observaron la señales correspondientes a los protones aromáticos H-4 y H-4' respectivamente; para los protones H-1, H-14 y H-14' aparecieron señales simples independientes en 6.27 ppm, 6.13 ppm y 6.12 ppm respectivamente; para los protones metínicos H-8 y H-8' se mostraron señales múltiples en 3.22 ppm y 2.95 ppm, finalmente se pudo resolver el sistema de señales simples correspondientes a los grupos metilos de la estructura los cuales aparecieron en 2.31 ppm ($\text{CH}_3\text{-7}$), 2.14 ppm ($\text{CH}_3\text{-7}'$), 1.80 ppm ($\text{CH}_3\text{-15}$), 1.77 ppm ($\text{CH}_3\text{-15}'$); dos señales dobles para los $\text{CH}_3\text{-9}$ y $\text{CH}_3\text{-9}'$ con desplazamientos 1.12 ppm y en 0.90 ppm respectivamente. Al elevar la temperatura durante la medición de este espectro se favorece un promedio de isómeros conformacionales y este genera el aparente patrón de señales de un solo confórmero, lo que facilita en gran medida el análisis estructural del dímero de la isoparvifolina (**5**) (Figura 22).

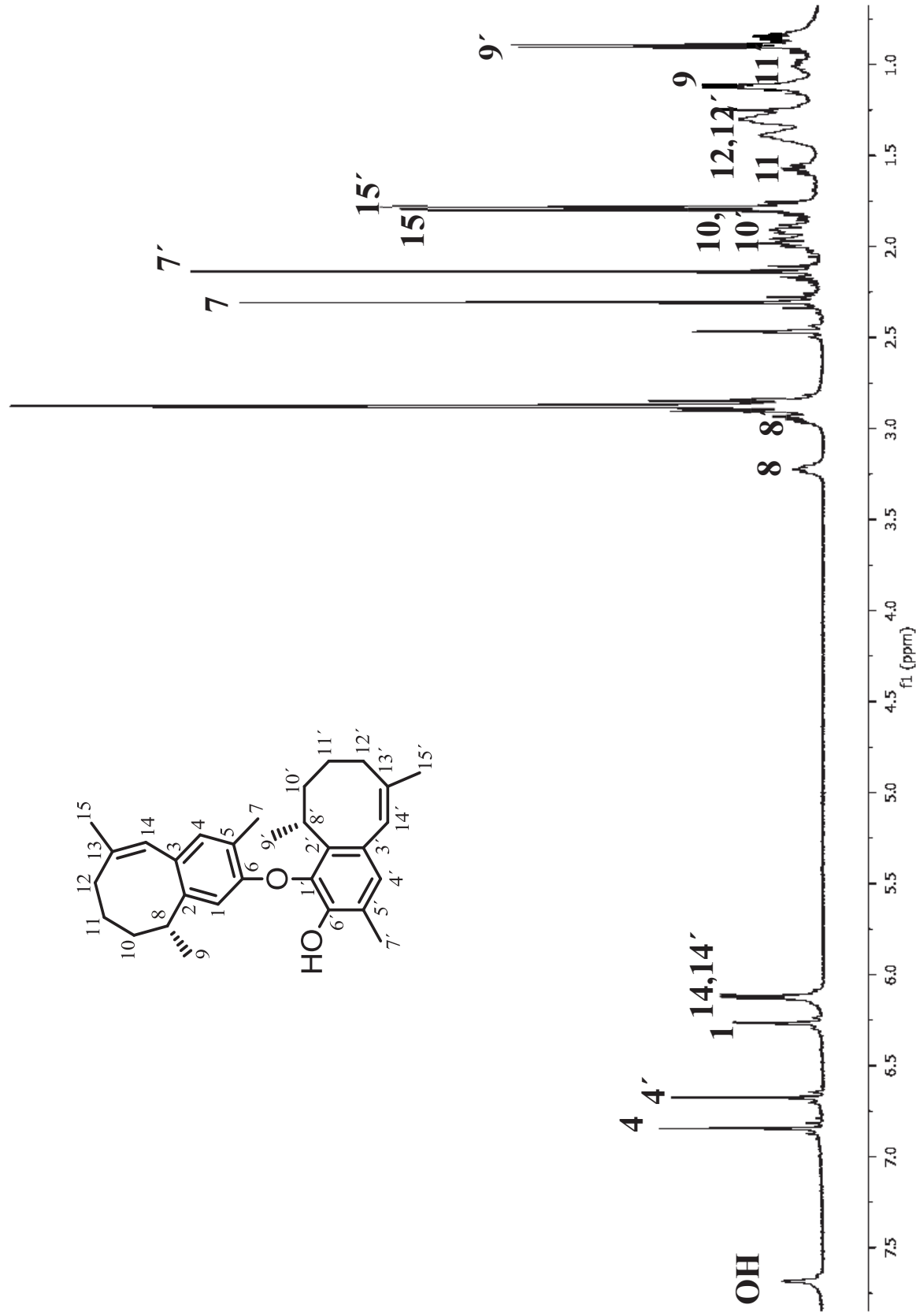
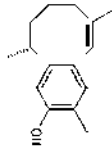
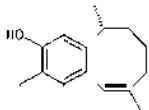
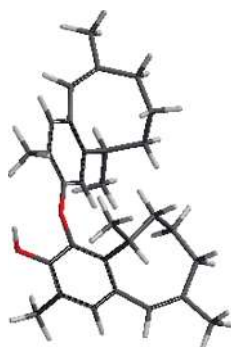
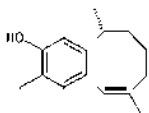


Figura 22. Espectro de RMN de ¹H del heterodímero de isoparvifolina (5) en DMSO – d₆ a 120°C.



5.2.2. Modelado molecular

Para el modelado molecular del heterodímero de la isoparvifolina (**5**) se propuso la conformación de la parvifolina (**1**) con base en la estructura de rayos X del benzoato de parvifolina,³⁸ se empleó el programa Spartan'08 y la delimitación de la búsqueda de conformeros se realizó mediante el protocolo Monte Carlo, empleando el campo de fuerza de mecánica molecular (MMFF), con este cálculo se obtuvieron las energías de los conformeros y se discriminaron a aquellos cuya ΔE fuera mayor a 3.5 kcal/mol. El análisis arrojó 7 conformeros (Figura 23) de los cuales se observó la población de Boltzmann determinando así la existencia de dos conformeros mayoritarios con un ΔE de 0.78 kcal/mol lo que pone en evidencia que dos isómeros conformacionales presentan un efecto dinámico y que estos son los causantes de observar más de un patrón de señales en RMN de ^1H .



$$E_{\text{MMFF}} = 98.65926650 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta E = 0.0000000 \text{ kcal/mol}$$

$$P_B = 0.7086$$



$$E_{\text{MMFF}} = 99.44282700 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta E = 0.78356050 \text{ kcal/mol}$$

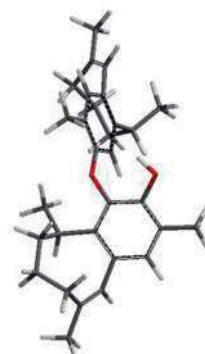
$$P_B = 0.1888$$



$$E_{\text{MMFF}} = 99.9990392 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta E = 1.33977270 \text{ kcal/mol}$$

$$P_B = 0.0738$$



$$E_{\text{MMFF}} = 100.953421 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta E = 2.2941545 \text{ kcal/mol}$$

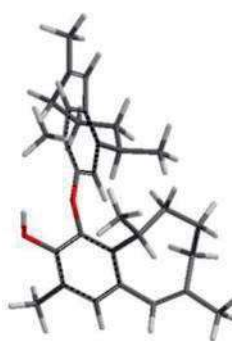
$$P_B = 0.0147$$



$$E_{\text{MMFF}} = 101.466612 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta E = 2.80734550 \text{ kcal/mol}$$

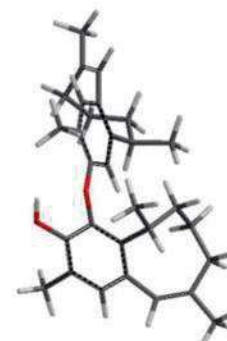
$$P_B = 0.0062$$



$$E_{\text{MMFF}} = 101.498856 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta E = 2.8395895 \text{ kcal/mol}$$

$$P_B = 0.0059$$

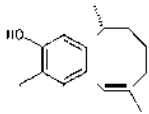


$$E_{\text{MMFF}} = 102.144565 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta E = 3.4852985 \text{ kcal/mol}$$

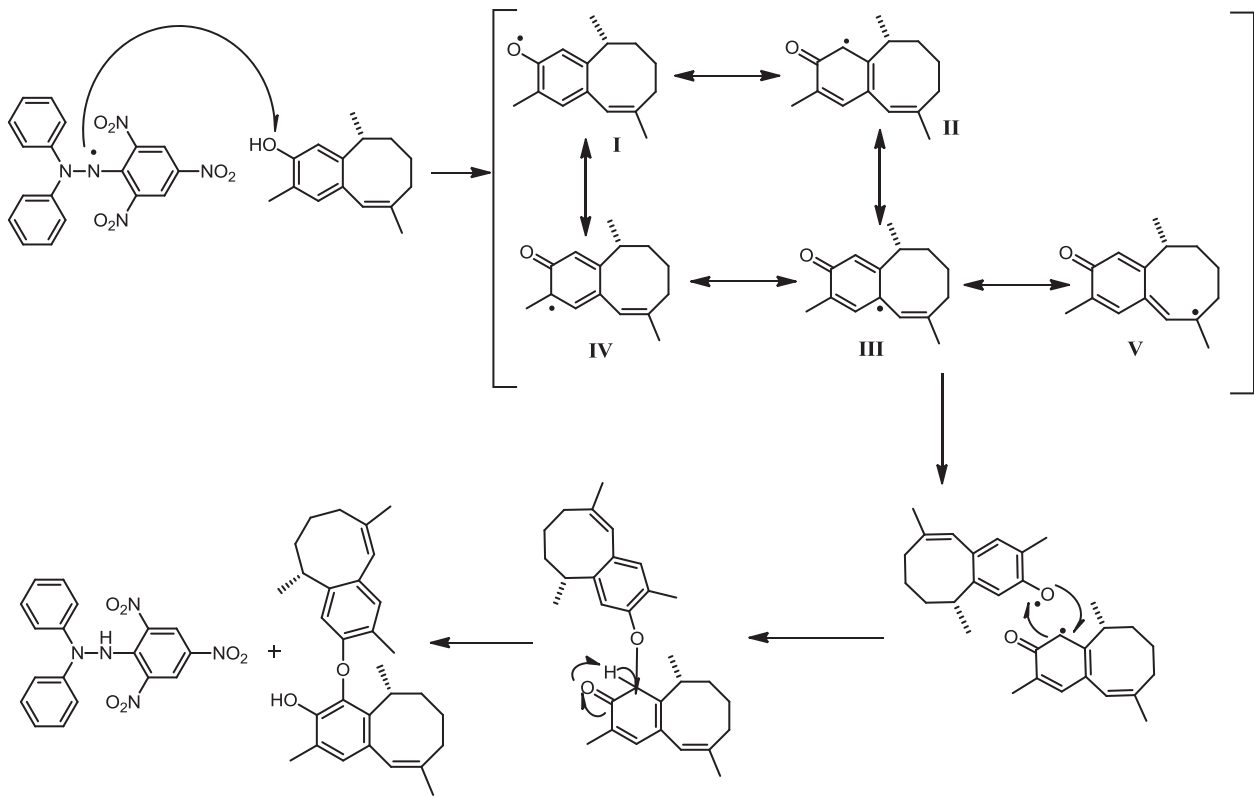
$$P_B = 0.0020$$

Figura 23. Energías y contribución poblacional de los conformeros del heterodímero de la isoparvifolina (5).

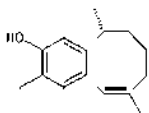


5.2.3. Mecanismo de reacción

Una vez confirmada la estructura del heterodímero de la isoparvifolina (**5**) y con base en los mecanismos clásicos de reacciones de radicales libres se pudo proponer el mecanismo de reacción de la isoparvifolina frente al DPPH; este último sustrae el protón fenólico de la isoparvifolina, formándose una especie radicalica de isoparvifolina que se estabiliza por resonancia generando cinco estructuras canónicas. En seguida ocurre un acoplamiento radicalico entre **I** y **II** con la formación de una estructura heterodimérica que se tautomeriza para recuperar la aromaticidad y formar un enlace difeniléter muy estable⁴² (Esquema 21).



Esquema 21. Mecanismo de reacción de la isoparvifolina (**5**) con el DPPH.



6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Procedimientos generales de purificación de los compuestos

6.1.1. Cromatografía en capa fina

Para los análisis cromatográficos se utilizaron cromatofolios de gel de sílice 60 soportada en aluminio con revelador UV marca Merck. La detección de los constituyentes se llevó a cabo utilizando luz UV de onda corta (254 nm) y de onda larga (365 nm).

6.1.2. Cromatografía en columna

Esta técnica se desarrolló empacando una columna de vidrio con gel de sílice de 70-230 y 230-400 mallas, utilizando como eluyente hexano y mezclas de hexano-AcOEt en orden de polaridad ascendente.

6.2. Datos generales de la espectroscopía y espectrometría utilizadas en la determinación estructural.

6.2.1. Rotación óptica (OR)

La rotación óptica se midió a cinco longitudes de onda: 589, 578, 546, 436, 365 nm, utilizando un polarímetro Perkin Elmer modelo 341 y empleando cloroformo como disolvente.

6.2.2. Espectroscopía de infrarrojo (IR)

El espectro de IR se obtuvo usando un espectrofotómetro Buck Scientific modelo 500 utilizando como disolvente CH_2Cl_2 .

6.2.3. Espectroscopía de ultravioleta (UV)

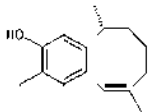
Las mediciones se llevaron a cabo usando un espectrofotómetro marca Perkin Elmer Lambda 2S empleando celdas de cuarzo de 1 cm de longitud y EtOH como disolvente.

6.2.4. Espectrometría de masas de baja resolución (EM)

Los espectros de masas se midieron en un equipo Varian Saturn 2000 por inserción directa mediante impacto electrónico a 70 eV.

6.2.5. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se midieron en CDCl_3 . Se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los espectros unidimensionales se



midieron a 400 MHz para ^1H y a 100 MHz para ^{13}C en un equipo Varian Mercury Plus-400.

6.3. Puntos de fusión

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Scientific y no están corregidos.

6.4. Mediciones de absorbencia para el ensayo DPPH

Las mediciones de absorbencia se llevaron a cabo usando un espectrofotómetro universal BioTek EL808UI empleando placas de ELISA de 96 pozos.

6.5. Reacción en microondas

La reacción en microondas se llevó a cabo utilizando un equipo de microondas CEM, modelo Discover System.

6.6. Obtención de la parvifolina de la raíz *Acourtia humboldtii*

Un lote de 830 g de raíz molida de *Acourtia humboldtii* se sometió a maceración con hexano durante 3 días, obteniéndose 72 g de miel color ámbar.

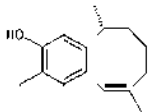
6.7. Obtención del acetato de parvifolina

Se colocó en un vial 0.871 g de extracto hexánico de raíz de *Acourtia humboldtii*, 2.5 mL de anhídrido acético y 2 mL de piridina, se dejó en baño maría por 4 horas. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo, se lavó tres veces con una solución de HCl al 10%, dos veces con agua, tres veces con solución saturada de NaHCO_3 y tres veces con agua, la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad en rotavapor. El crudo de la reacción fue purificado por cromatografía en columna obteniéndose 0.554 g de un sólido blanco con p.f. 50-53 °C. Con un rendimiento de 63%.

Acetato de parvifolina. Sólido blanco. p.f. 50–53 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.00 (s, 1H, H-4), 6.78 (s, 1H, H-1), 5.37 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-12), 3.56 (d, $J = 18.3$ Hz, 1H, H-14), 3.17 (m, 1H, H-8), 3.07 (d, $J = 18.2$ Hz, 1H, H-14'), 2.30 (s, 3H, OAc), 2.11 (s, 3H, Me-7), 1.81 (m, 1H, H-10), 1.75 (s, 3H, Me-15), 1.62 (m, 2H, H-11), 1.32 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, Me-9).

6.8. Obtención de acetato de isoparvifolina

Se pesó 0.484 g, de acetato de parvifolina, con 0.193 g de ácido *p*-toluensulfónico (*p*-TsOH) en 5 mL de benceno y se colocó a una temperatura de 75 °C a 300 watts por 20 min en un reactor de microondas. Transcurrido este tiempo el benceno se evaporó, la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo, se lavó tres veces con agua, la fase



orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. Se obtuvieron 0.480 g de un aceite ligeramente amarillo. Con un rendimiento del 99%.

Acetato de isoparvifolina. Miel ligeramente amarillo. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 6.94 (s, 1H, H-4), 6.82 (s, 1H, H-1), 6.15 (s, 1H, H-14), 3.11 (m, 1H, H-8), 2.31 (s, 3H, OAc), 2.11 (s, 3H, Me-7), 2.02 (m, 2H, H-10), 1.86 (s, 3H, Me-15), 1.71 (m, 1H, H-11), 1.54 (m, 1H, H-12), 1.43 (m, 1H, H-12'), 1.32 (m, 1H, H-11'), 1.24 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, Me-9).

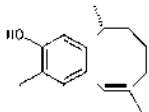
6.9. Obtención de isoparvifolina

Se pesaron 0.468 g de acetato de isoparvifolina, 0.303 g de KOH, y se disolvieron en 75 mL de MeOH, la mezcla se sometió a reflujo por dos horas. Transcurrido este tiempo de reacción, el crudo de reacción se concentró en el rotavapor, se resuspendió en HCl al 10% y se extrajo con acetato de etilo, se lavó tres veces con solución saturada de NaHCO₃ y tres veces con agua, la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad en rotavapor. El crudo de la reacción fue purificado por cromatografía en columna obteniéndose 0.327 g de miel amarilla. Con un rendimiento del 70%.

Isoparvifolina. Miel Amarilla. IR (CH₂Cl₂) ν_{\max} 3589 cm⁻¹ (OH), 3048 cm⁻¹ (C-H Arom) 2927 cm⁻¹ (C-H), 1502 cm⁻¹ (C=C), $[\alpha]_{589} = +338$, $[\alpha]_{578} = +356$, $[\alpha]_{546} = +417$, $[\alpha]_{436} = +843$, $[\alpha]_{365} =$ Baja energía, UV λ_{\max} EtOH 211nm (log ϵ 4.54), 251 nm (log ϵ 4.08). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 6.84 (s, 1H, H-4), 6.63 (s, 1H, H-1), 6.14 (s, 1H, H-14), 4.57 (s, 1H, OH), 3.09 (m, 1H, H-8), 2.20 (s, 3H, Me-7), 2.04 (m, 2H, H-10), 1.85 (s, 3H, Me-15), 1.71 (m, 1H, H-11), 1.55 (m, 1H, H-12), 1.38 (m, 1H, H-12'), 1.29 (m, 1H, H-11') 1.24 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, Me - 9). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 152.6 (1C, C-6), 143.2 (1C, C-2), 139.5 (1C, C-13), 130.7 (1C, C-4), 130.7 (1C, C-3), 122.5 (1C, C-14), 120.0 (1C, C-5), 111.0 (1C, C-1), 39.4 (1C, C-12), 35.5 (1C, C-11), 33.4 (1C, C-8), 26.5 (1C, C-10), 22.4 (1C, C-15), 21.3 (1C, C-9), 15.3 (1C, C-7).

6.10. Reacción DPPH-isoparvifolina

0.422 g de isoparvifolina y 0.763 g de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), en 13 mL de diclorometano, se dejaron reaccionar a temperatura ambiente en agitación por 2 horas, el crudo de reacción se evaporó el disolvente con corriente de nitrógeno. El producto de la reacción se purificó por cromatografía en columna obteniéndose 0.168 g de miel amarilla. Con un rendimiento de 40%.



6.11. Cromatografía del producto de reacción del DPPH–isoparvifolina

Se utilizó una columna de 2 cm de diámetro por 15 cm de largo empacada con gel de sílice (200-300 Merck), el producto de reacción se disolvió con diclorometano y se impregnó en gel de sílice. Se empleó como eluyente hexano, colectándose en 36 fracciones de 15 mL cada una en viales de color ámbar.

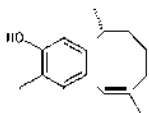
Dímero de isoparvifolina. Miel ligeramente amarillo. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 a 120 °C) δ ppm 7.68 (s, 1H, OH), 6.85 (s, 1H, H-4), 6.68 (s, 1H, H-4'), 6.27 (s, 1H, H-1), 6.13 (s, 1H, H-14), 6.12 (s, 1H, H-14'), 3.22 (m, 1H, H-8), 2.95 (m, 1H, H-8'), 2.31 (s, 3H, Me-7), 2.14 (s, 3H, Me-7'), 1.99 (m, 2H, H-10), 1.89 (m, 2H, H-10'), 1.80 (s, 3H, Me-15), 1.77 (s, 3H, Me-15'), 1.57 (m, 2H, H-11), 1.4 (m, 2H, H-12), 1.27 (m, 2H, H-12'), 1.12 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H, Me-9), 1.00 (m, 2H, H-11'), 0.90 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, Me-9'). IR (CH_2Cl_2) ν_{max} 3550 cm^{-1} (OH), 3007 cm^{-1} (C-H Arom), 2927 cm^{-1} (C-H), 1495 cm^{-1} (C=C), 1220 cm^{-1} (C-O Arom). $[\alpha]_{589} = +167$, $[\alpha]_{578} = +175$, $[\alpha]_{546} = +205$, $[\alpha]_{436} = +419$, $[\alpha]_{365} = +852$, UV $\lambda_{\text{max EtOH}}$ 213nm (log ϵ 4.4), 252 nm (log ϵ 4.08). EMIE m/z 431 $[\text{M}+\text{H}]^+$. MS (70 ev, EI): m/z (%): 431(100), 416(7.5), 389(5.0), 216(7.4), 172(7.8), 144(3.0), 128(2.3), 77(2.1), 41(2.4).

6.12. Método del DPPH

Las soluciones etanólicas del radical DPPH se prepararon cada vez que se hicieron los ensayos protegiéndolos de la luz. La absorbencia de una solución control negativo se registró a través del tiempo de análisis para comprobar la estabilidad del radical. El efecto de los compuestos sobre la absorbencia del DPPH se estimó usando el procedimiento descrito por Sánchez-Moreno con algunas modificaciones para optimizar la utilización de los compuestos a evaluar.^{40, 41} La absorbencia inicial osciló alrededor de $A = 0.35$ en todos los casos. Para el control negativo se utilizó etanol absoluto y DPPH. Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado.

6.13. Determinación de la actividad antioxidante

El ensayo de extinción del radical libre se realizó en el espectrofotómetro universal utilizando placas de 96 pozos, con una cinética programada para realizar lecturas de absorbencia a 515 nm cada 3 minutos durante 1 hora y media. Cada experimento se realizó por triplicado y se utilizó para el registro de los datos el programa Gen5.



6.14. Curva de calibración

Se realizó una curva de calibración para calcular las concentraciones de DPPH a partir de las medidas de absorbencia. Para construir la curva se utilizaron 5 concentraciones de DPPH (0.0125 mM, 0.025 mM, 0.05 mM, 0.1 mM y 1 mM) y las mediciones se llevaron por triplicado (Figura 24).

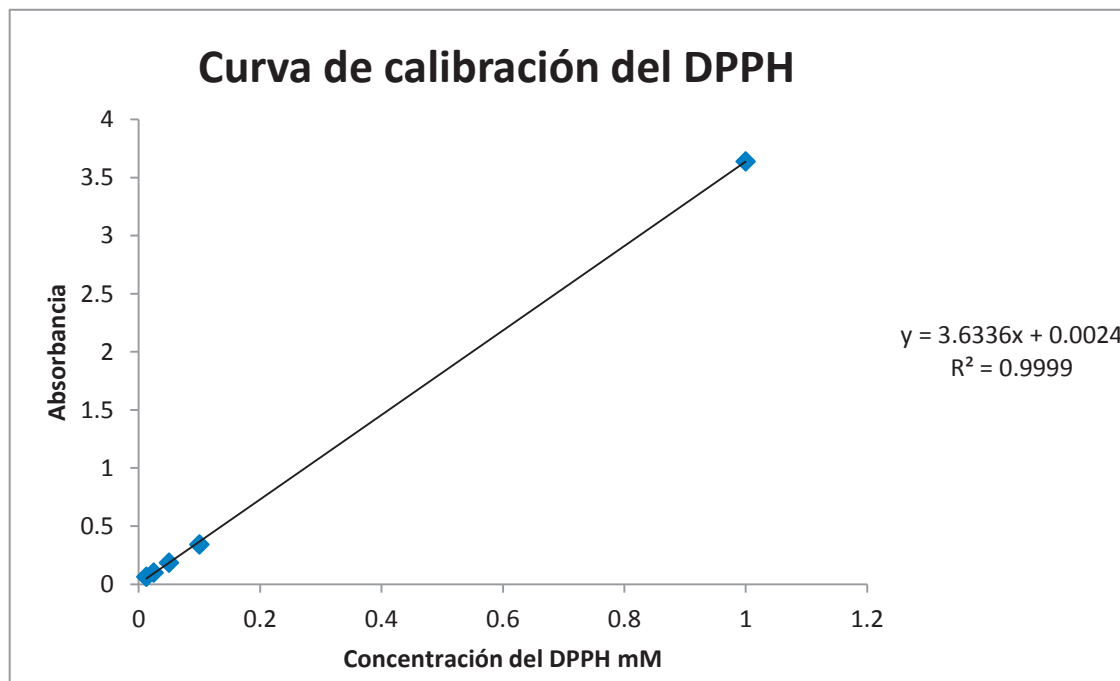
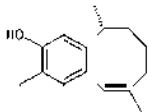


Figura 24. Curva de calibración para calcular la concentración del DPPH.

6.15. Preparación de las soluciones de isoparvifolina

Se preparó una solución patrón de 22 mM de isoparvifolina, de esta solución se hicieron diluciones para obtener concentraciones de 0.22 mM, 1.1 mM y 2.2 mM. De cada una de estas concentraciones se tomaron alícuotas de 10 μ l y se depositaron en los pozos de la placa, seguido se adicionaron 100 μ l de solución de DPPH 0.1 mM, obteniendo así concentraciones de ensayo de 0.02 mM, 0.1 mM, 0.2 mM y 2 mM de isoparvifolina.



6.16. Análisis de datos

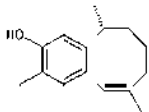
Se registró en una gráfica la cinética de las diferentes concentraciones de la isoparvifolina. De esta gráfica se determinó el porcentaje de DPPH remanente para cualquier tiempo (DPPH_{rem}) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{DPPH}_{\text{rem}} = ([\text{DPPH}_{\text{rem}}] / [\text{DPPH}_{t=0}]) \times 100$$

En donde $[\text{DPPH}_{t=0}]$ y $[\text{DPPH}_{\text{rem}}]$ corresponden a la concentración del radical al inicio y al momento de la medición, respectivamente. La determinación de la concentración del $[\text{DPPH}_{\text{rem}}]$ se llevó a cabo a varios tiempos, hasta llegar a un valor constante. Las concentraciones de la isoparvifolina en el medio de reacción se graficaron contra los porcentajes de DPPH remanente. La CE_{50} , definida como la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50%.

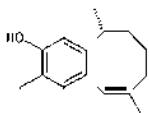
6.17. Modelado molecular

El modelado molecular realizó con el programa Spartan'08 para Windows. Con este programa se obtuvo la distribución de confórmeros y su energía mediante el protocolo Monte Carlo; las energías de los confórmeros se minimizaron mediante el campo de fuerza de mecánica molecular MMFF94.



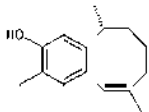
7. CONCLUSIONES

1. Se logró obtener isoparvifolina a partir de la parvifolina biosintetizada por *Acourtia humboldtii*.
2. Se determinó la capacidad antioxidante de la isoparvifolina frente el radical DPPH a partir de una cinética de captura de radicales libres.
3. Se determinó la actividad antioxidante de la isoparvifolina resultando una CE_{50} de $0.54 \text{ mM} \pm 0.01$, lo que la define como candidato viable para ensayos biológicos que involucren la captura de radicales libres, como lo son los de inflamación y cáncer.
4. El análisis espectroscópico y computacional sugirieron la presencia de al menos dos isómeros conformaciones del heterodímero de la isoparvifolina cuya energía es muy cercana, lo que permitió que fueran observados por RMN de ^1H . Una medición del espectro de RMN de ^1H a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ permitió confirmar la existencia de isómeros conformacionales del heterodímero de isoparvifolina.
5. Con base en los resultados experimentales y en los mecanismos clásicos de radicales libres, fue posible proponer el mecanismo de reacción para la generación del heterodímero de isoparvifolina a partir de isoparvifolina y radical libre DPPH.

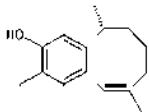


8. BIBLIOGRAFÍA

1. L. de Ugaz Olga. Análisis Fitoquímico y metabolitos secundarios. Revista de la Pontificia Universidad Católica del Perú. **1994**.
2. J. Newman David, Cragg M. Gordon. *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 311-335.
3. L. Victor, A. Silvia, C. Yolanda Rita, C. Ma. Isabel. Actividad antioxidante de plantas empleadas en la medicina tradicional navarra. Facultad de Farmacia. *Rev. de Fitoterapia.* **2007**, 7(1), 43-47.
4. Guisado Requena IM, Guisado Barrilao R, Bordés Gonzalez, Tristán Fernandez JM. Oxidación y producción de radicales libres. Escuela Universitaria de Ciencias de la Salud. Universidad de Granada. **2003**.
5. Alberto Boveris. La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. *Ars Pharm* **2005**, 46 (1), 85-95.
6. V. G. Justo R. Daño Oxidativo, Radicales libres y Antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit.* **2002**, 31 (2), 126-33
7. Menéndez. J.C. Diseño de fármacos basado en la química de radicales libres. En: Avendaño, Carmen, et. al. Introducción a la Química Farmacéutica. Aravaca: McGraw-Hill. **2001**.
8. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* **1997**, 58, 79-110.
9. B. Halliwell, S. Chirico. *Am. J. Clin. Nutr.* **1993**, 57, 716-721
10. Mendoza Gastelúm, J. I. Tesis de Maestría en Farmacología del CINVESTAV. Evaluación de la actividad antioxidante de sesquiterpenos derivados del benzocicloocteno y del longipineno. México, **2008**.
11. Rangon V, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radicals – mediated tissue injury. *Br Med Bull* **1993**, 49, 700-18.
12. J. Hicks Juan. Torres – Ramos Yesenia D. Sierra –Vargas Martha P. Estrés Oxidante. Concepto y Clasificación. *Rev Endocrinol y Nutr.* **2006**, 14 (4), 223-226.
13. B. Correa L. María. Tesis de licenciatura. Estudio químico y actividad antioxidante de compuestos aislados del género *senecio*. México. **2010**.
14. Benitez Zequeira Daniel Eugenio. Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa del estrés oxidativo. *Rev Cubana de Invest Biomed.* **2006**, 25(2).
15. Wu, D; Cederbaum, A. I. *Alcohol Research and Health* **2003**, 27, 277-284.



16. M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncola, M. Izakovic, M. Mazura. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *160*, 1-40.
17. C. Champe Pamela, A. Harvey Richard, R. Ferrier Denise. Enzimas que catalizan las reacciones antioxidantes. Bioquímica 4o. Edición. **2007**.
18. D. Huang, B. Ou, y R. L. Prior. *J. Agr. Food Chem.* **2005**, *53*, 1841-1856.
19. Q. E. A. Martha, S. C. José, Capacidad Antioxidante total. Bases y Aplicaciones. REB. **2009**, *28* (3).
20. J. Díaz Flores. Optimización de extracción y análisis de la capacidad antioxidante de la piel de kiwi. **2011**.
21. L. K. MacDonald – Wicks, L.G. Wood, M. L. Garg. *J. Sci. food agric.* **2006**, *86*, 2046-2056.
22. R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich. *J. Agr. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290-4302.
23. Romo de Vivar, Alfonso. *Productos Naturales de la flora mexicana*. Ed. Limusa. **1985**.
24. S. J. Gabriela, P. C. Helena, R. S. Mario .La Participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Rev. Mex. fitopatol.* **2003**, *21(003)*, 355-363.
25. Kanner, J., Harel, S., and Granit, R. Betalains – a new class of dietary cationized antioxidants. *J. Agri. Food Chem.* **2001**, *49*, 5178 – 5155.
26. Rice- Evans, C., Miller, N.J., and Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* **1997**, *2*, 152-159.
27. Kawabata, J.; Okamoto Y.; Kodama A., Makimoto, T.; Kasai, T. *J. Agri. Food Chem.* **2002**, *50*, 5468-5471.
28. Daquino, C.; Foti, M.C. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 1536-1547.
29. G. Zhang, X. Ma, J. Su, K. Zhang, H. Kurihara, X. Yao y L. Zeng. *Nat. Prod. Res.* **2006**, *20*, 659 – 664.
30. Romo J., Joseph – Nathan P. *Tetrahedron* **1964**, *20*, 2331- 2337.
31. K. Shindo, M. Kimura y M. Iga. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 1393 – 1394.
32. Kuroyanagi, M.; Naito, H.; Noro, T.; Ueno, A.; Fukushima, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 4792-4797.
33. Garduño-Ramírez, M. L.; Delgado, G. *J. Mex. Chem. Soc.* **2003**, *47*, 160-166.



34. Romo de Vivar, Alfonso. *Química de la flora mexicana*. 1ª. Edición. **2006**.
35. Ardila Fierro, Q. K. Tesis de Maestría en Farmacología del CINVESTAV. Estudio de la transformación del cacalol en presencia de radicales libres. México, **2011**.
36. Liu, W.; Shindo, K.; Watabe, M. *Breast Cancer Res. Treat.* **2010**, *128*, 57-68.
37. P. Joseph-Nathan, J. D. Hernández, L. U. Román, E. García G., V. Mendoza and S. Mendoza, *Phytochemistry*, **1982**, *21*, 1129-1132.
38. P. Joseph- Nathan, María del R. Hernández – Mendel, Elsa Martínez, Mirna Rojas – Gardida, Carlos M. Cerda, *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 679- 685.
39. E. García G., V. Mendoza, A. Guzmán B. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 1057 – 1058.
40. W. Brand – Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, *Technol.* **1995**, *28*, 25-30.
41. C. Sánchez-moreno, J.A. Larrauri, F. Saura-Calixto. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *76*, 270-276.
42. Z. Rappoport. *The chemistry of phenols*. Wiley, New York, **2003**, *1*, 479.