
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

OBTENCIÓN DEL CACALOL Y SUS DERIVADOS.
DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

JULIO CÉSAR GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente **Prof. YOLANDA CABALLERO ARROYO**

Vocal **Prof. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA**

Secretario **Prof. HERMILO LEAL LARA**

1er. Suplente **Prof. MARTHA YOLANDA GONZÁLEZ QUEZADA**

2do. Suplente **Prof. MARÍA ALICIA HERNÁNDEZ CAMPOS**

Sitio donde se realizó el tema:

Laboratorio 2-10. Instituto de Química, UNAM.

Asesor: Dr. Manuel Jiménez Estrada



Supervisor técnico: Dr. Arturo Navarro Ocaña



Sustentante: Julio César González Hernández



Dedicado a:

Mis padres: Fabián y Elisa, por el cariño y el apoyo en todo momento, por las palabras, por la paciencia; en fin por todo lo que me han brindado.

A mis hermanos: Roxana y Fabián con quienes he convivido toda la vida, por su eterna amistad, por los buenos cotorreos y por estar unidos a pesar de todo.

A mi sobrino Balam, ese pequeñín que con su chispa lo ilumina todo.

A mis abuelitas: Francisca y Guadalupe, que siempre han compartido su cariño, su sonrisa, y sus experiencias.

A Miguel quien ha sido como un hermano.

A toda mi familia por su apoyo, por los buenos momentos y por la unión en toda circunstancia.

A toda la banda de la UNAM y de NEZA, por todos los cotorreos, por su amistad y sin quienes la etapa de estudiante hubiera sido insoportable.

Agradecimientos:

A mi comité tutorial:

- Dr. Manuel Jiménez Estrada, por el apoyo brindado durante la realización de esta tesis y por las pláticas sostenidas en el laboratorio.

- Dr. Arturo Navarro Ocaña, por el tiempo brindado para la revisión y por la sugerencias.

- Dra. Yolanda Caballero Arroyo, por su revisión y sugerencias.

- Dr. Hermilo Leal Lara, por el tiempo brindado para la revisión de esta tesis.

- A Toño del laboratorio de Pruebas Biológicas y a Virginia del laboratorio de Resonancia Paramagnética del Electrón ambos del Instituto de Química, por las pruebas realizadas y por el tiempo para aclarar mis dudas.

- A la UNAM por las enseñanzas y las experiencias adquiridas durante todo este tiempo.

ÍNDICE.

1.- RESUMEN	8
2.- ANTECEDENTES	10
2.1.- Antioxidantes	10
2.1.1.- Definición de antioxidante	11
2.1.2.- Mecanismo de acción de los antioxidantes	11
2.1.3.- Clasificación de los antioxidantes	12
2.1.3.1.- Sintéticos	12
2.1.3.2.- Sinergistas	14
2.1.3.3.- Naturales	14
Tocoferoles (Vitamina E)	15
Ácido ascórbico (Vitamina C)	17
Carotenoides	18
Ácidos cinámicos	19
Flavonoides	21
Antioxidantes de hierbas aromáticas y especias	22
Antioxidantes de las semillas oleaginosas	23
Cacalol	24
2.1.4.- Actividad antioxidante	25
2.1.4.1.- Método del radical DPPH (1,1-difenil,2-picrilhidrazil).....	25
2.1.4.2.- Método de Resonancia Paramagnética del Electrón (RPE)	26
2.1.4.3.- Método de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS)	27
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
4.- HIPÓTESIS	31
5.- OBJETIVOS.	31
5.1.- Generales	31

5.2.- Particulares	31
6.- MATERIAL Y MÉTODOS.	32
6.1.- Material y reactivos	32
6.2.- Equipo utilizado	32
6.3.- Diagrama de la obtención del cacalol y del acetato de cacalol	34
6.4.- Diagrama general de síntesis de los derivados del cacalol	35
6.5.- Parte experimental	36
6.5.1.- Obtención de los extractos	36
6.5.2.- Obtención de los compuestos	36
6.5.2.1.- Obtención del cacalol	36
6.5.2.2.- Obtención del acetato de cacalol	37
6.5.2.3.- Obtención del 2- acetilacetato de cacalol	38
6.5.2.4.- Reacción de alquilación del 2-acetilacetato de cacalol con n-butil litio	39
6.5.2.5.- Obtención del 2- acetil cacalol.	40
6.5.2.6.- Obtención del compuesto 5 por reacción de 2-acetil cacalol con yodometano (MeI).	41
6.5.2.7.- Obtención del compuesto 5 por reacción de 2-acetil cacalol con Me ₂ SO ₄	42
6.5.2.8.- Obtención del compuesto 6 por reacción de alquilación.	43
6.5.2.9.- Obtención del compuesto 7 por reacción de deshidratación.	44
6.5.2.10.- Obtención del compuesto 8 por reacción de hidrogenación.	45
6.5.2.11.- Obtención del compuesto 9 por reacción de desmetilación.	46
6.5.3.- Pruebas de actividad antioxidante.	47
6.5.3.1.- Método del radical DPPH.	47
6.5.3.1.1.- Método espectrofotométrico.	47
6.5.3.1.2.- Método por RPE.	48
6.5.3.2.- Método de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS).	48

6.5.3.3.- Método de RPE para evaluación de la actividad antioxidante sobre radicales $\cdot\text{CH}_3$, $\cdot\text{OH}$ y $\text{O}_2\cdot^-$.	49
7.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.	50
7.1 Obtención de compuestos.	50
7.2 Resultados de las pruebas de actividad antioxidante.	58
7.2.1.- Evaluación de la actividad secuestrante sobre el radical DPPH.	58
7.2.2.- Actividad secuestrante sobre radicales $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$, Y $\cdot\text{CH}_3$.	61
7.2.3.- Resultados para la prueba de TBARS.	63
8.- CONCLUSIONES.	66
9.- BIBLIOGRAFÍA.	67
10.- APÉNDICE	71

1.- RESUMEN.

El cacalol es un compuesto sesquiterpénico, el cual fue aislado de las raíces de la planta *Psacalium decompositum*, la cual es conocida popularmente con los nombres de matarique, mataricue, matariqui, o su nombre en tarahumara (maturi pitawi). Es una planta silvestre originaria de México, habita en clima semiseco entre los 205 y los 1950 msnm.

Se han aislado y caracterizado algunos de los componentes del extracto hexánico de la raíz, de los más abundantes es el cacalol, aunque también en el extracto acuoso se ha encontrado este compuesto.

Se ha documentado que el cacalol tiene efecto hipoglucemiante, antibacteriano, neuroprotector, pero también se ha visto que tiene efecto antioxidante, por lo que en este trabajo se llevó a cabo la obtención del cacalol de las raíces, así como de una semisíntesis para obtener derivados de este con sustituyentes en la posición 2, y comparar como se modifica su actividad antioxidante.

Durante el presente trabajo, se utilizó el extracto hexánico de las raíces de *Psacalium decompositum*, en el cual se corroboró la presencia de cacalol por medio de cromatografía en capa fina.

Para la obtención de los derivados se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- 1.-Acetilación del cacalol con la finalidad de proteger al grupo OH, que es el responsable de la actividad antioxidante.
- 2.-Producción del 2-acetilacetato de cacalol con la finalidad de formar un derivado acetilado en la posición 2.
- 3.-Hidrólisis alcalina para obtener el fenol libre, con lo que se obtiene el 2-acetil cacalol.
- 4.- El 2- acetil cacalol se hizo reaccionar en condiciones básicas con la finalidad de proteger al grupo hidroxilo con un grupo metoxilo que es más resistente que el grupo acetato a las posteriores condiciones de reacción.
- 5.- Alquilación del 2-acetil cacalol con n-butil litio, con lo que se formó un alcohol terciario.
- 6.- Deshidratación del alcohol con cloruro de tionilo (SO_2Cl_2) en medio básico, con el fin de obtener un doble enlace en la cadena lateral.
- 7.- Hidrogenación, con la finalidad de saturar el doble enlace de la cadena lateral resultante de la deshidratación.

8.- Desmetilación para obtener el fenol libre, dando así el derivado de cacalol con la cadena hidrocarbonada saturada en la posición 2.

Al cacalol y a los derivados obtenidos se les realizaron pruebas para determinar su actividad antioxidante, tales como actividad secuestrante sobre radicales DPPH, actividad secuestrante sobre radicales metilo ($\cdot\text{CH}_3$), hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y superóxido (O_2^-), y de inhibición de peroxidación de lípidos en homogeneizado de cerebro de rata por el método de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS).

2.- ANTECEDENTES.

2.1.- Antioxidantes.

El estudio de los antioxidantes es interesante por al menos las siguientes razones: Primera, los antioxidantes pueden proteger a los alimentos del daño oxidativo especialmente de la peroxidación lipídica. Por ejemplo, las especias, que son ricas en antioxidantes han sido usadas durante siglos para retardar el deterioro oxidativo de los alimentos durante el almacenamiento o el cocimiento (Cárdenas y Packer, 2002). También la suplementación en la dieta del ganado con vitamina E puede mejorar la calidad de su carne, haciéndola más estable a la oxidación (Reynoso, 1998). El uso de sustancias tales como el butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT) y galato de propilo ha sido ampliamente cuestionado en cuanto a que promueven efectos negativos en la salud (Kulisic et al., 2004). Estudios toxicológicos han demostrado que el BHA promueve el desarrollo de células cancerosas en ratas (Khaled et al., 2002), y la adición de BHT en la alimentación de las ratas puede resultar en hemorragias fatales (Azizah et al., 1999), y se ha prestado atención en sustituir este tipo de antioxidantes sintéticos por otros de origen natural (antioxidantes del romero, antioxidantes del olivo, tocoferoles, tocotrienoles, flavonoides, etc.).

Segunda, los antioxidantes ingeridos en la dieta pueden ser absorbidos por el cuerpo humano y así ejercer efectos benéficos (Cárdenas y Packer, 2002).

Hasta época reciente se ha ingerido una dieta pobre en grasas poliinsaturadas en tanto que se consumía una dieta rica en compuestos fenólicos, por lo que el contenido de radicales libres de estas dietas es bajo, pero en las últimas décadas el consumo de grasas poliinsaturadas ha ido en aumento especialmente los aceites comestibles, principalmente para prevenir algunas enfermedades cardiovasculares. Los ácidos grasos insaturados se oxidan fácilmente in vivo con la consiguiente formación de radicales libres. Los radicales libres producidos por oxidación lipídica lesionan la pared de los vasos sanguíneos y provocan la formación de placas ateroscleróticas, también pueden convertir a otras sustancia en carcinogénicos potenciales. Los radicales libres también atacan los ácidos nucleicos modificando su estructura y cambiando el código genético lo que los hace agentes mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos, por lo que es importante la adición de antioxidantes a la dieta humana para evitar la formación de radicales libres o para evitar las reacciones de oxidación (Shafiur, 2003).

Tercera, los antioxidantes derivados de los alimentos pueden ejercer efectos benéficos, sin ser absorbidos en el tracto gastrointestinal. Los fenoles de las frutas, vino, té y vegetales pueden ejercer un efecto gastroprotector en situaciones de exceso de producción de especies reactivas de nitrógeno como el N_2O_3 el cual puede causar deaminación de bases de DNA especialmente guanina (Cárdenas y Packer, 2002).

Cuarta, también son de considerable interés, los extractos de plantas con uso terapéutico. Por ejemplo, un extracto de *Ginkgo biloba* que ha sido usado por siglos en medicina tradicional, tiene propiedades antioxidantes in vitro, aparentemente por los flavonoides que contiene los cuales incluyen a la quercetina, rutina, kaemferol y mirecitina (Cárdenas y Packer, 2002).

2.1.1.- Definición de antioxidante

Un antioxidante es una sustancia que cuando está presente a bajas concentraciones comparada con otra de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de ese sustrato. El término sustrato oxidable abarca casi todos los componentes (excepto el agua) en alimentos así como en tejidos vivos e incluye a los lípidos, proteínas, algunas vitaminas, carbohidratos y DNA (Cárdenas y Packer, 2002).

El uso de antioxidantes es uno de los métodos más comunes para controlar la oxidación de los lípidos.

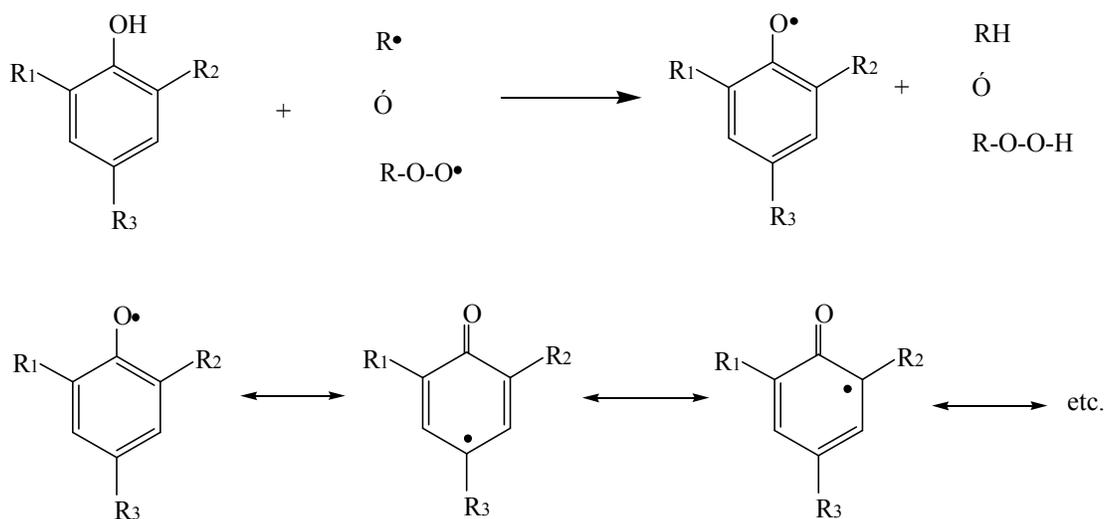
2.1.2.- Mecanismo de acción de los antioxidantes.

En general existen dos mecanismos fundamentales que se utilizan para evitar el deterioro oxidativo de los lípidos: los donadores de electrones y los secuestradores o quelantes (Santamaría, 2002).

El mecanismo de acción de los antioxidantes fenólicos consiste en inhibir la formación de radicales libres durante la etapa de iniciación o interrumpiendo la propagación de la cadena de radicales libres. El radical libre resultante no debe iniciar por sí mismo la formación de nuevos radicales libres o ser sujeto de una rápida oxidación por una reacción en cadena. Los antioxidantes fenólicos son excelentes donadores de electrones o de hidrógeno y sus radicales intermedios son relativamente estables debido a la deslocalización por resonancia y a la falta de posiciones adecuadas para ser atacadas por el oxígeno molecular (Fennema, 1993).

En el caso del mecanismo de acción de los secuestradores o quelantes, cabe mencionar que las sustancias quelantes no son antioxidantes en el sentido de que impidan la oxidación por que actúen de consumidores de oxígeno, sino que se comportan como valiosos antioxidantes sinergistas por que eliminan los iones metálicos que catalizan el proceso de oxidación formando complejos y alterando sus propiedades y efectos. Los ácidos cítrico y fosfórico, los polifosfatos y el ácido ascórbico son ejemplos de agentes complejantes de metales (Santamaría, 2002).

Mecanismo de acción de los antioxidantes fenólicos



2.1.3.- Clasificación de los antioxidantes.

Dependiendo del mecanismo de acción y del origen de los antioxidantes estos se clasifican en tres grupos: sintéticos, sinergistas y naturales (Santamaría, 2002).

2.1.3.1.- Sintéticos.

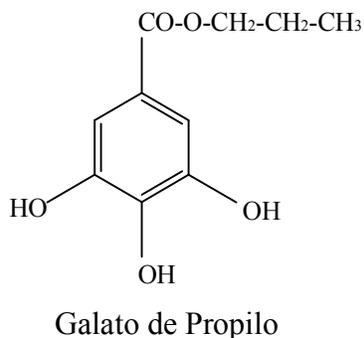
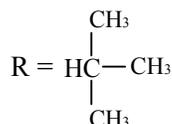
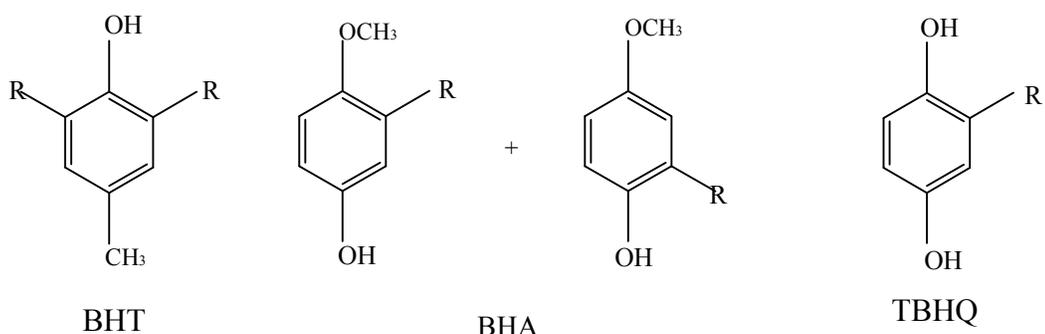
Muchos compuestos sintéticos son activos como antioxidantes, pero solo muy pocos se utilizan debido a las rigurosas normas sobre su seguridad. La mayoría son derivados fenólicos usualmente sustituidos por más de un grupo hidroxilo o metoxilo. Los antioxidantes fenólicos sintéticos son en su mayoría p-sustituidos, en tanto que los compuestos fenólicos naturales son en su mayoría o-sustituidos. Los compuestos sustituidos en meta son inactivos (Shafiur, 2003).

Los antioxidantes fenólicos sintéticos, tienen siempre sustituyentes alquilo para mejorar su solubilidad en grasas y aceites, y también para reducir su toxicidad (Omura, 1993).

Dentro de los antioxidantes sintéticos más utilizados en la industria alimentaria se encuentran el butilhidroxianisol (BHA), el butilhidroxitolueno (BHT), terbutilhidroquinona (TBHQ) y el galato de propilo (GP).

La concentración total de estos antioxidantes, bien individualmente o en combinación, no debe exceder el 0.02% del peso basado en la grasa contenida en el alimento. Otra característica de estos antioxidantes es que deben ser inocuos para el consumidor (Fennema, 1993).

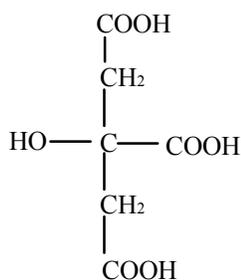
A continuación se muestran ejemplos de antioxidantes sintéticos.



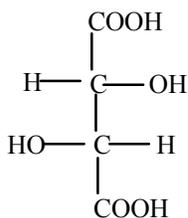
2.1.3.2.- Sinergistas.

El sinergismo se produce cuando una mezcla de antioxidantes tiene una actividad más pronunciada que la suma de las actividades de los antioxidantes individuales utilizados separadamente. Se conocen dos tipos de sinergismo, uno que implica la acción de aceptores de radicales libres mezclados y otro que implica la acción combinada de un aceptor de radical libre y un quelante de metales. Como ejemplo de sinergistas se tienen al ácido cítrico y sus ésteres isopropílicos, al ácido tartárico y a las lecitinas (Flores, 2003).

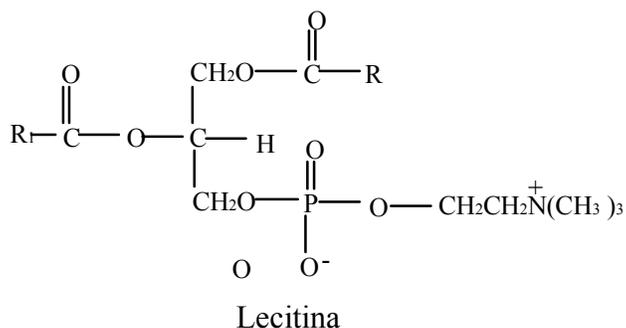
A continuación se muestran ejemplos de agentes sinergistas.



Ácido cítrico



Ácido tartárico



Lecitina

2.1.3.3.- Naturales.

Casi todas las plantas, microorganismos, hongos e inclusive los tejidos animales contienen antioxidantes de diversos tipos, los cuales por razones diversas (disponibilidad, seguridad del alimento y económica) pueden utilizarse como fuentes de antioxidantes solamente en ciertos casos (Shafiur, 2003).

Las plantas es donde se han encontrado la mayoría de antioxidantes de origen natural. (Madhavi, 1996). Ellas absorben la radiación solar, y producen altos niveles de oxígeno como metabolito secundario de la fotosíntesis. El oxígeno es fácilmente activado por la radiación ultravioleta proveniente de los rayos solares para producir especies reactivas de oxígeno (EROS), las cuales son tóxicas para las plantas. Estas especies reactivas de oxígeno, son

más reactivas que el oxígeno en su estado basal de triplete, entre estas se hayan las especies de oxígeno que se encuentran parcialmente reducidas, esto es, el superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot) (Hansberg, 2002).

Las plantas producen varios compuestos antioxidantes para contrarrestar los efectos de las EROS (Mohd, et al., 2002).

Los antioxidantes naturales son importantes no solo por su efecto protector contra la oxidación de los lípidos en los alimentos, sino también por que ayudan al mecanismo de defensa de la células vivas contra el daño oxidativo (Mohd, et al., 2002). El efecto protector de los antioxidantes naturales se debe a la presencia de grupos hidroxilo en su estructura química (Kulisic, et al., 2004)

En el caso de la industria alimentaria, en años recientes se ha incrementado el conocimiento y la promoción para el uso de los antioxidantes de origen natural sobre los antioxidantes sintéticos tales como el BHA y el BHT (Madhavi, 1996). Sin embargo el uso de los antioxidantes naturales está limitado debido a que mucha veces no existe la información acerca de su composición molecular, de los compuestos activos presentes en los extractos crudos y a la falta de datos toxicológicos (Amarowicz et al., 2004).

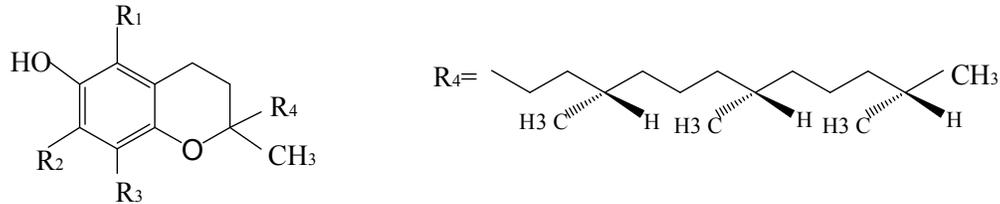
Los laboratorios de investigación y desarrollo han mostrado gran interés en explorar nuevos antioxidantes naturales, en especial por que les trae beneficios el hecho de que estos antioxidantes estén sometidos a menos regulaciones legales (Shafiur, 2003).

Debido a la gran cantidad de antioxidantes de origen natural, solo se mencionan en este trabajo algunos de los más significativos, siendo algunos de ellos: los tocoferoles (vitamina E), carotenos, ascorbatos (vitamina C), ácidos cinámicos, flavonoides y otros antioxidantes presentes en la especias, frutas y semillas oleaginosas.

Tocoferoles (Vitamina E).

Los tocoferoles son los antioxidantes más comunes, ya que están presentes al menos en trazas, en casi todos los alimentos, siendo la principal fuente los aceites de origen vegetal. Son derivados del cromano, con una cadena diterpénica (fitol); el sitio activo es el grupo fenólico (Shafiur, 2003). El tocoferol tiene tres carbonos asimétricos por lo que tiene ocho estereoisómeros, siendo el más activo de ellos el d- α -tocoferol (Hansberg, 2002).

A continuación se muestra la estructura de algunos tocoferoles.



R ¹	R ²	R ³	
CH ₃	CH ₃	CH ₃	α-tocoferol
CH ₃	H	CH ₃	β-tocoferol
H	CH ₃	CH ₃	γ-tocoferol
H	H	CH ₃	δ-tocoferol

El α-tocoferol neutraliza el oxígeno singulete, captura radicales hidroxilo, neutraliza peróxidos y captura anión superóxido (Rodríguez y Menéndez, 2001).

La vitamina E es considerada por algunos autores como la primera línea de defensa contra la peroxidación de lípidos en el cuerpo, protegiendo las membranas de la células en una etapa temprana del ataque por radicales libres (Cárdenas y Packer, 2002).

Los tocoferoles que se añaden a los productos alimenticios pueden ser sintéticos o concentrados naturales, obtenidos de los lodos de desodorización del refinado de aceites, o de los gérmenes de trigo y maíz o de otras fuentes, inclusive por síntesis. Los tocoferoles naturales tienen actividad óptica en tanto que los sintéticos no.

En los alimentos, los tocoferoles actúan como antioxidantes relativamente débiles (Shafiur, 2003).

Son los más efectivos antioxidantes liposolubles presentes en la naturaleza, protegen a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares. Están implicados en la protección contra enfermedades en las que están implicados los radicales libres tales como

cáncer, aterosclerosis, cataratas, enfermedades pulmonares y proceso de envejecimiento (Cárdenas y Packer, 2002).

En la industria alimentaria se usan como antioxidantes en grasas animales, grasas vegetales, pollo, puré de papas, deshidratados, etc. (Reynoso, 1998).

El tocoferol al igual que el ascorbato, puede reducir el Fe^{3+} y el Cu^{2+} por lo que puede ser prooxidante en presencia de estos metales de transición (Hansberg, 2002).

Se almacena protegiéndolo de la luz, el calor y se le inyecta gas inerte (Reynoso, 1998).

El acetato de tocoferol se utiliza en vez del tocoferol libre por que es más resistente a la oxidación durante el almacenamiento.

En la semillas oleaginosas, cereales y otros productos vegetales, los tocoferoles están acompañados por dehidrotocoferoles, tocodienoles y tocotrienoles que tienen 1, 2 y 3 dobles enlaces en la cadena lateral, respectivamente (Shafiur, 2003).

Ácido ascórbico (Vitamina C).

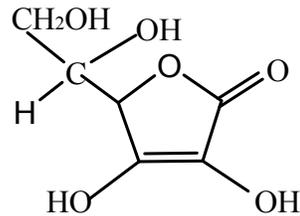
El ácido L-ascórbico es una lactona provista de un grupo enodiol (éster cíclico de un ácido hidroxicarboxílico) (Wong, 1989).

Se encuentra ampliamente distribuido en frutas y vegetales, es muy soluble en agua. El ser humano lo obtiene de la dieta y se encuentra ampliamente distribuido en todos los tejidos, especialmente en el ojo y en el pulmón. Se utiliza para desechar el H_2O_2 por la peroxidasa de ascorbato, reacciona con el superóxido, los radicales peróxido (Hansberg, 2002), y regenera la forma oxidada de la vitamina E (Rodríguez y Menéndez, 2001). El ácido ascórbico es un excelente antioxidante siempre y cuando no este en presencia de fierro o de cobre, pues en esas condiciones se genera el $\cdot\text{OH}$ (Hansberg, 2002).

Intracelularmente, la vitamina C puede actuar como antioxidante previniendo la oxidación de las proteínas intracelulares. Puede proteger a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la oxidación (Cárdenas y Packer, 2002) con lo que actúa contra enfermedades cardiovasculares, además actúa contra el cáncer, cataratas, envejecimiento, entre otras. Se almacena protegiéndolo de la luz y el aire (Reynoso, 1998).

En la industria alimentaria el ácido ascórbico se utiliza en el curado de carne de res, puerco y salsas; en aceites de pescado y soya es inhibida la autooxidación a una concentración de 0.2% de ácido ascórbico (Reynoso, 1998).

A continuación se muestra la estructura del ácido ascórbico.



Ácido L-ascórbico

Carotenoides.

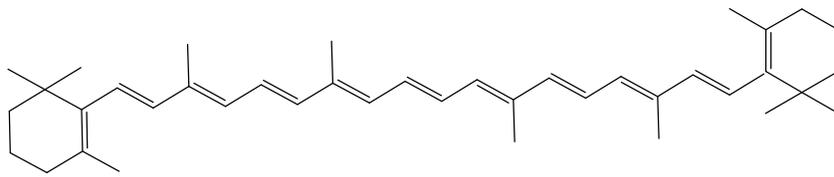
Los carotenoides son una clase de compuestos relacionados estructuralmente entre sí, se encuentran en plantas, algas y diversos organismos (Cárdenas y Packer, 2002). Se trata de un grupo de 500-600 pigmentos en donde el más representativo es el β -caroteno, el cual tiene actividad predominante de provitamina A (formando dos moléculas de retinol) (Sies y Stahi, 1995). Estos compuestos contienen un sistema de dobles ligaduras conjugadas que son las responsables de algunos de los colores encontrados en ellos como el anaranjado y el amarillo, les dan además la propiedad de ser excelentes desactivadores del oxígeno singulete y de radical peroxilo (Cárdenas y Packer, 2002 y Hansberg, 2002).

Los carotenoides pueden actuar inhibiendo las reacciones en cadena de radicales en solución, membranas y organelos celulares, también son componentes importantes del sistema de defensa del plasma contra el daño oxidativo, especialmente contra la modificación por daño oxidativo de las lipoproteínas de baja densidad.

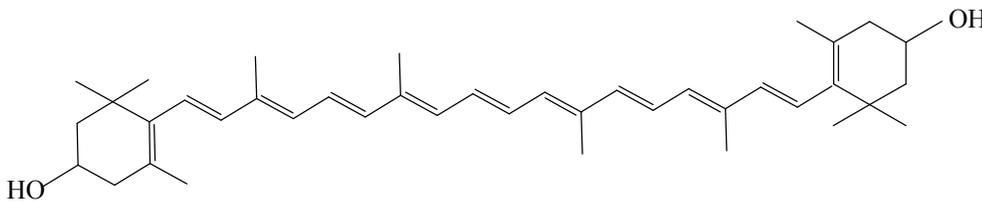
La mayor fuente de carotenoides en la dieta del humano son las frutas y los vegetales, encontrándose α -caroteno, β -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina y β -criptoxantina.

Los carotenoides están implicados en la prevención de la aterosclerosis (Cárdenas y Packer, 2002).

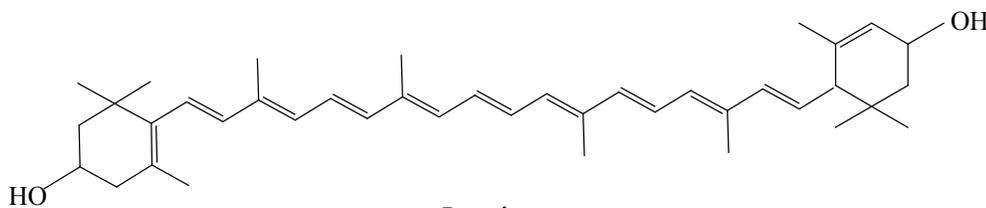
A continuación se presentan ejemplos de algunos carotenoides:



β -caroteno



Zeaxantina



Luteína

Ácidos cinámicos.

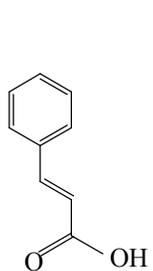
Los ácidos hidroxicinámicos son compuestos fenólicos derivados de la fenilalanina y juegan un papel central en el metabolismo fenólico de las plantas, contribuyen también a la estructura de las plantas como componentes de la pared celular y son precursores de los flavonoides. Usualmente estos ácidos fenólicos están presentes como ésteres, o combinados con azúcares, ácidos orgánicos y lípidos. Debido a su amplia distribución, los ácidos fenólicos son parte integral de la dieta humana; se encuentran en frutas, vegetales, flores, semillas y productos derivados de las plantas tales como vino, té, café y aceite de oliva. El ácido cafeico, clorogenico y p-cumárico están entre los ácidos fenólicos más ampliamente distribuidos en la naturaleza.

Los hidroxicinamatos están presentes en la naturaleza en su configuración más estable (trans), pero se isomerizan a la configuración cis por exposición a la luz ultravioleta. Diversos estudios han demostrado la capacidad antioxidante de estos compuestos, contra la oxidación

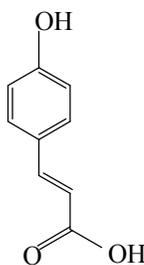
de las LDL, el ácido cafeico tiene gran poder de inhibir la peroxidación de lípidos in vitro en homogeneizado de cerebro de rata; el ácido clorogenico inhibe la peroxidación lipídica inducida con fierro en microsomas de bovino y el ácido cafeico inhibe eficientemente la oxidación de LDL catalizada con Cu^{2+} .

El proceso por el cual actúan para ejercer su actividad antioxidante, puede ocurrir en varios niveles; ya sea previniendo inicialmente los procesos de oxidación secuestrando radicales $\cdot\text{OH}$, a través de reacciones que incluyen la transferencia de electrones y posiblemente por quelación de metales de transición; sea inhibiendo el progreso de las reacciones en cadena estabilizando el radical peroxilo en la forma de peróxido a través de la donación de átomos de hidrógeno, o por regeneración del α -tocoferol por reducción del radical α -tocoferoxilo (Cárdenas y Packer, 2002).

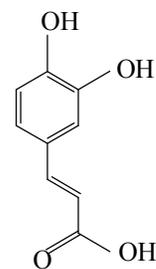
Enseguida se representan las estructuras de algunos ácidos cinámicos.



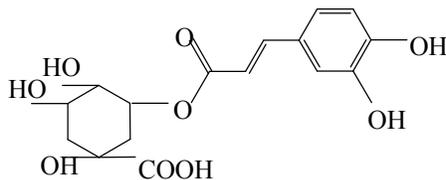
Ácido cinámico



Ácido p-cumarico



Ácido cafeico



Ácido clorogenico

Flavonoides.

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales, frutas, té negro, el café, la cocoa, la cerveza y el vino tinto, y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. (Martínez y González, 2002).

Existen trece subclases de flavonoides con un total de más de 5000 compuestos, todos presentando un esqueleto hidrocarbonado del tipo C6-C3-C6 (difencil-propano) derivado del ácido shiquímico y de tres restos de acetato (Pérez, 2003).

Los flavonoles son los flavonoides más ampliamente distribuidos en la naturaleza y los principales son quercetina, kaemferol y mirecitina. La quercetina es el principal constituyente fenólico de las plantas, y cuantitativamente el más importante flavonoide de la dieta (Cárdenas y Packer, 2002).

Los flavonoides poseen actividades antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorales, antiasmáticas, inhibidoras de enzimas y antioxidantes, siendo esta última la que ha despertado mayor interés, ya que se han realizado numerosos estudios principalmente de corte clínico y nutricional para tratar de aclarar dicha actividad.

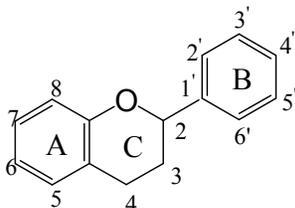
El efecto antioxidante de los flavonoides es debido principalmente a sus propiedades quelantes de metales de transición y sus capacidad secuestradora de radicales libres $\cdot\text{OH}$ y O_2^- , pueden aumentar la disponibilidad de antioxidantes endógenos, así como la actividad de enzimas antioxidantes, al mismo tiempo son capaces de inhibir enzimas involucradas en la generación de EROS. (Perez, 2003).

Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides son:

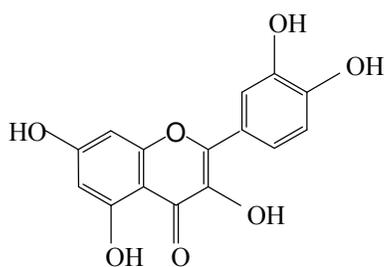
- Presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B; que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
- Doble ligadura, en conjunción con la función 4-oxo del anillo C.
- Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante.

Siguiendo estos criterios, la quercetina es el que mejor reúne los requisitos para ejercer una efectiva función antioxidante.

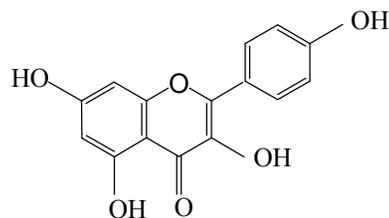
Se representan a continuación las estructuras de los flavonoides quercetina, kaemferol y mirecitina.



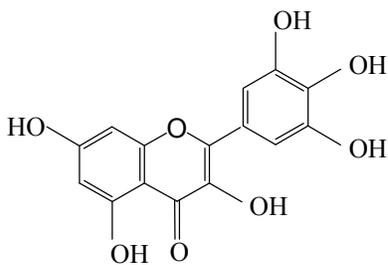
Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración.



Quercetina



Kaemferol



Mirecitina

Antioxidantes de hierbas aromáticas y especias.

Las hierbas aromáticas son principalmente hojas o tallos de diversas plantas utilizados para la preparación de infusiones, extractos o sopas. Muchas especias de este grupo de productos alimenticios son activas, debido principalmente a su contenido de compuestos fenólicos. Los representantes más importantes de este tipo de sustancias son las hojas de té (*Camelia sinensis*), tanto verde como fermentado. El té verde contiene una alto porcentaje (alrededor del 20%) de catequinas y compuestos emparentados. Por tanto, los extractos de

té verde son muy activos, en tanto que los extractos de las hojas de té verde fermentado son menos activos, por que durante la fermentación del té, las catequinas se oxidan parcialmente a sus respectivas quinonas, que se dimerizan a pigmentos del té.

Las especias han sido utilizadas por mucho tiempo para ayudar a preservar alimentos, pero también se usan para condimentar comidas y productos horneados; muchos de los ingredientes derivados de las especias son potentes antioxidantes ya que inhiben la peroxidación de lípidos, lo que explica su uso para la preservación de alimentos. Estos derivados son de gran interés por que pueden ayudar a proteger al cuerpo humano contra el daño de las EROS.

Algunos de los compuestos de las especias que tienen actividad antioxidante son: ácido carnosico y carnosol (*Salvia officinalis*), ácido rosmarínico (*Rosmarinus officinalis*), timol (*Thymus vulgaris*), eugenol (*Eugenia caryophyllata*), gingerol y zingerona (*Zingiber officinalis*), curcumina (*Curcuma longa*), capsaicina (Chile).

Antioxidantes de las semillas oleaginosas.

Diversas semillas oleaginosas importantes son fuente de antioxidantes distintos de los tocoferoles. De los mejores inhibidores de la oxidación conocidos son los que están presentes en la olivas, que son el fruto de la (*Olea europea*), el aceite virgen de oliva contiene diversos antioxidantes derivados del hidroxitiroso, un derivado de la tirosina.

Las semillas de sésamo (*Sesamum indicum*), contienen sesamol el cual posee actividad antioxidante; las semillas de girasol poseen ácido clorogénico y derivados fenólicos emparentados; los cacahuates (*Arachis hypogaea L.*) contienen flavonoides, taninos y diversos compuestos fenólicos; las semillas de algodón (*Gossypium hirsutum*) contiene gopipol, un compuesto con actividad antioxidantes pero que es tóxico; las semillas de colza (*Brassica napus*) y su pariente la semillas del nabo (*Brassica rapa*) contienen compuestos fenólicos como el ácido sinápico.

La lista de antioxidantes de origen natural es larga, sin embargo no todos los compuestos que presentan actividad antioxidante son seguros para su consumo, tal es el caso del ácido nordihidroguaiarético (NDGA), extraído del arbusto de la creosota, el cual se usó originalmente en la estabilización de alimentos, especialmente grasas comestibles, pero en la actualidad no está permitido puesto que no ha pasado los ensayos de seguridad realizados más recientemente (Shafiur, 2003)

Cacalol.

El cacalol (5,6,7,8-tetrahidro-3,4,5-trimetilnafto(2,3-b)furan-9-ol) fue aislado en 1964 por Romo y col.(Tafoya, 1984). Es un compuesto sesquiterpénico, que se encuentra en las raíces de la planta *Psacalium decompositum* (Jiménez et al., 1992), la cual es conocida popularmente con los nombres de matarique, mataricue, matariqui o por su nombre en tarahumara (maturi pitawi). Es una planta silvestre originaria de México, habita en clima semiseco entre los 205 y los 1950 msnm (Argueta y Zolla, 1993).

Las raíces de matarique se usan en medicina tradicional como remedio para el reumatismo, cólicos, resfriados, dolor de espalda, neuralgias, úlceras, ictericia y como diurético. (Argueta y Zolla, 1993 y Tafoya, 1984).

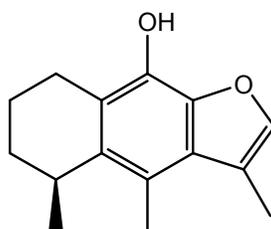
Se han aislado y caracterizado algunos de los componentes del extracto hexánico de la raíz, de los más abundantes es el cacalol (Jiménez et al., 1992), aunque también en el extracto acuoso se ha encontrado este compuesto (Alarcón et al., 1997).

El papel biológico del cacalol en la plantas no es conocido, pero probablemente actúa como un agente aleloquímico (metabolito secundario sintetizado por la planta en forma natural como respuesta al ataque de depredadores tales como hongos, bacterias e insectos, a las condiciones ambientales, así como para tratar de mantener libre de otras plantas su medio vital) (Tafoya, 1984).

Se ha documentado que el cacalol tiene efecto hipoglucemiante, antibacteriano pero también se ha visto que tiene efecto antioxidante, aunque no se sabe de que forma actúa, sobre que radicales y si tiene una alta o una baja actividad.

Por otro lado el cacalol se autooxida fácilmente en presencia de la luz y del oxígeno aún estando a temperatura ambiente, por lo que se debe mantener en refrigeración, protegido de la luz y bajo una atmósfera de nitrógeno hasta su utilización.

Se presenta a continuación la estructura del cacalol.



Cacalol

2.1.4.- Actividad antioxidante.

Existen diversos métodos para determinar la actividad antioxidante de un compuesto o un extracto, estos métodos difieren en la cualidad que miden, ya que puede ser la capacidad de secuestrar radicales libres, la capacidad de quelar metales, etc.

Los ensayos de actividad antioxidante son usados para darse una idea de la relativa actividad antioxidante en diferentes fluidos corporales, alimentos y bebidas y como cambian ellos por ejemplo, en la enfermedad o después del procesamiento de alimentos o en su almacenamiento (Cárdenas y Packer, 2002).

Dentro de estos métodos se encuentran los que en este trabajo se estudiaron, los cuales son el método del radical DPPH, el método de resonancia paramagnética del electrón (RPE) para medir la capacidad de secuestrar radicales $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{CH}_3$ y O_2^- y el método de especies reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) para medir inhibición de la peroxidación lipídica.

2.1.4.1.- Método del radical DPPH (1,1-difenil,2-picrilhidrazil).

Este método se basa en la reducción de una solución alcohólica de radical DPPH en la presencia de un antioxidante donador de hidrógeno (Kuliscic, 2004), es decir mide la actividad secuestrante del compuesto para reducir al radical mediante la donación de iones de H, esta medida puede realizarse por dos métodos diferentes, siguiendo espectrofotométricamente la decoloración que sufre el reactivo (DPPH) del púrpura al amarillo a 520 nm, (esta decoloración se manifiesta en la disminución de la absorbancia contra el tiempo en la reacción) (Flores, 2003); o por la técnica de RPE. En el caso de RPE después de la adición de una muestra antioxidante a la solución metanólica de DPPH, la disminución de la concentración de radical es monitoreada en el espectrómetro de RPM al final de la reacción entre el radical libre y el antioxidante; lo que se determina es la concentración de DPPH remanente por doble integral de la señal y se compara contra un blanco.

Los radicales formados por el antioxidante son raramente vistos en el espectro de RPE (Ancerewics et al., 1998).

Los resultados pueden ser dados como % de actividad secuestrante, % de reducción del DPPH ó % de inhibición de DPPH. Otro parámetro introducido para la interpretación de los resultados por el método de DPPH, es la IC_{50} , la cual está definida como la concentración de sustrato que causa el 50% de pérdida de actividad del radical DPPH (Molineux, 2004).

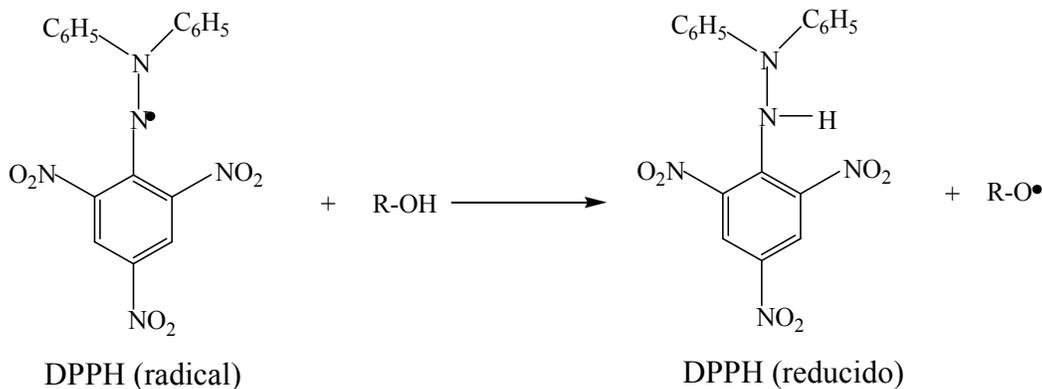
Este método solo reconoce actividad secuestrante de radicales libres y no actividad prooxidante (Amarowicz, 2004); es rápido y de mucha ayuda en la investigación de nuevos

antioxidantes, mide la actividad secuestrante de radicales libres de compuestos sintéticos puros, compuestos naturales aislados, extractos crudos de plantas y alimentos (Cavin y Hostettmann 1998 y Amarowicz, 2004). Con este método se intenta tener una idea de la capacidad de inactivar radicales libres en un sistema oxidante como en el que se lleva a cabo en la oxidación de lípidos.

El radical DPPH es estable en virtud de la deslocalización de su electrón desapareado sobre la molécula, la estequiometría está dada por las moléculas de DPPH reducidas por moléculas reductoras (antioxidantes) (Molineux, 2004).

Otros radicales estables son usados para la caracterización de antioxidantes, por ejemplo, el ABTS⁺ (2,2-azino-bis(etilbenzotiazoline)-6 sulfonato) y el radical galvinoxil (Cárdenas y Packer, 2002).

El mecanismo de reacción del radical DPPH es el siguiente:



2.1.4.2.- Método de Resonancia Paramagnética del Electrón (RPE).

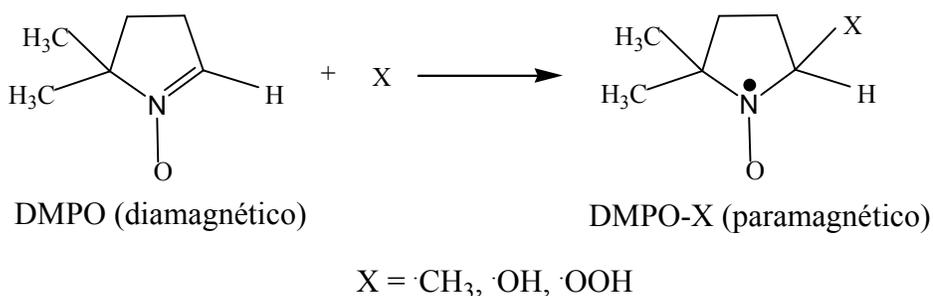
Este método puede ser aplicado al estudio de detección de radicales libres ya que detecta la presencia de electrones desapareados, es un método muy sensible ya que detecta concentración de radicales a concentraciones menores a 10^{-6} M o menores (Okezie, 1991).

Este método de detección de especies reactivas por atrapador de espín (AE), involucra el atrapar radicales libres de vida media corta por el uso de un compuesto diamagnético vía adición del radical libre a un doble enlace del AE para producir un producto radical más estable, ya que un radical muy reactivo dificulta observar se espectro de RPE (Cárdenas y Packer, 2002). Los aductos de espín son paramagnéticos y tienen un espectro de RPM con constantes de acoplamiento hiperfino y valores de g característicos del tipo de radical

atrapado. El atrapador de espín DMPO (5,5-dimetilpirroline-N-óxido) secuestra especies de radicales libres vía adición al carbono localizado en la posición alfa al nitrógeno (Yoshimura et al., 1999).

Para determinar la actividad antioxidante sobre radicales centrados en carbono y oxígeno estos se generan inmediatamente antes de la medición por la mezcla de DMSO, NaOH, Y H₂O₂ la que genera radicales ·OH, ·CH₃ y O₂⁻, la formación de estos radicales se hace evidente por la adición de un AE.

El mecanismo del radical y el AE es el siguiente:



2.1.4.3.- Método de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS).

El método de TBARS es un método espectrofotométrico que es usado para la determinación de la concentración de productos de peroxidación lipídica entre los que se encuentran el malondialdehído (MDA), hidroperóxidos y aldehídos conjugados; dicha concentración se determina por la reacción de estos productos con ácido tiobarbitúrico (TBA) (Dotan et al., 2004 y Kusilic, 2004).

Esta reacción da un complejo colorido y por espectrofotometría UV visible se confirma su presencia a una absorbancia de 532-535 nm (Fernández y Pérez, 1997).

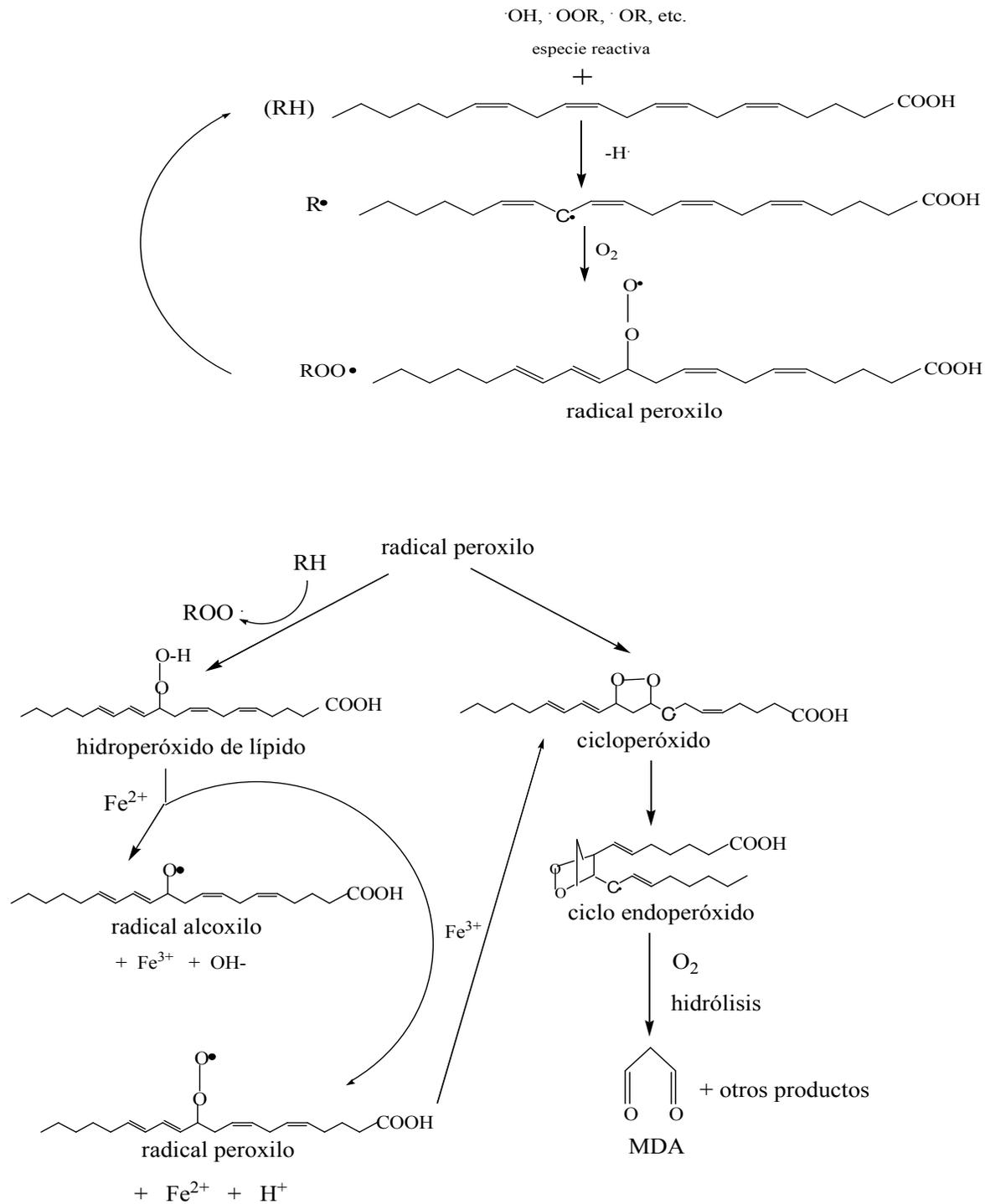
El MDA es creado durante el ensayo por descomposición de peróxidos lipídicos durante el calentamiento a bajo pH (Cárdenas y Packer, 2002).

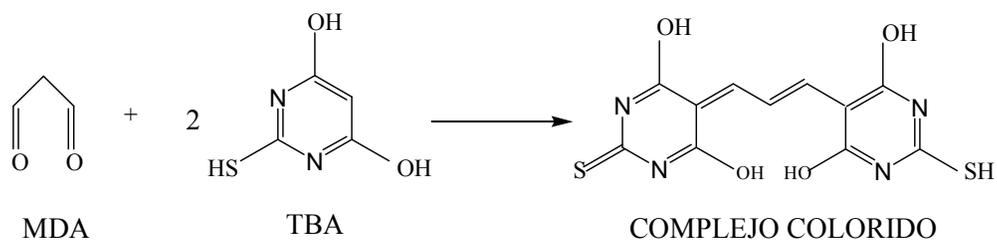
El MDA reacciona en una proporción molar 1:2 con TBA para dar el complejo colorido, esta reacción ocurre por ataque de la forma monoenólica del MDA sobre los grupos metileno activos del TBA (Wheatley, 2000).

Se extrapolan los valores de absorbancia del complejo en una curva estándar de MDA para obtener la concentración. En la realización de la curva se usa como precursor tetrametoxipropano (TMP), el cual se hidroliza en medio ácido para dar MDA en una reacción equimolar (Fernández, 1997).

Este método ha sido de los más ampliamente usados para medir la peroxidación de ácidos grasos en membranas y alimentos (Cusilik, 2004).

A continuación se muestra el mecanismo de peroxidación lipídica en el ensayo y la reacción del MDA con el TBA.





Las pruebas para determinar actividad antioxidante antes mencionadas, son las que se realizaron con los compuestos obtenidos en este trabajo.

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En los últimos años se han incrementado, tanto la importancia como el interés en el estudio de los antioxidantes de origen natural, debido a que algunos de ellos protegen del daño oxidativo a los lípidos en un sistema alimentario; este daño modifica tanto el sabor así como algunas veces la estructura del producto. También, estos antioxidantes pueden actuar como mecanismo de defensa de las células contra el daño oxidativo en los lípidos de los organismos vivos.

Este interés ha ido en aumento debido al hecho de que se ha cuestionado el uso de antioxidantes sintéticos (butilhidroxitolueno BHT, terbutilhidroquinona TBHQ, butilhidroxianisol BHA) en alimentos debido a que promueven efectos negativos en la salud. En cuanto a organismos vivos se refiere, el daño causado por la peroxidación de lípidos se asocia a un amplio rango de enfermedades degenerativas tales como diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, y, la ingesta de antioxidantes en la dieta puede ayudar a prevenir estas enfermedades, así como su adición en un sistema alimentario podría prevenir del daño producido por los productos de degradación de la peroxidación lipídica.

En este trabajo se estudia al cacalol, que es un compuesto que se encuentra en las raíces de *Psacalium decompositum*, y al cual se le han encontrado propiedades hipoglucemiantes, antimicrobianas, neuroprotectoras y también actividad antioxidante.

Sin embargo el propósito es llevar a cabo una semisíntesis para obtener derivados del cacalol con sustituyentes en la posición 2, y comparar como se modifica su actividad antioxidante y si aumenta su estabilidad a la autooxidación, ya que bajo condiciones ambientales el cacalol se autooxida fácilmente.

Dependiendo de los resultados obtenidos, en futuros trabajos se realizarían los ensayos de pruebas biológicas para analizar si otras propiedades no se ven afectadas, así como también realizar los estudios de toxicidad que sean necesarios.

4.- HIPOTESIS.

- Los derivados con sustituyentes en la posición 1 o en el carbono 2 del cacalol, le darán mayor estabilidad o retardarán su autooxidación, manteniendo su actividad antioxidante.

5.- OBJETIVOS

5.1.- Generales.

- Obtener derivados con sustituyentes en la posición 2 del cacalol.
- Determinar y comparar la actividad antioxidante del cacalol y sus derivados.

5.2.- Particulares.

- Obtener el cacalol a partir de la raíces de *Psacalium decompositum*.
- Llevar a cabo la protección del grupo fenólico del cacalol.
- Obtener derivados del cacalol, por medio de una reacción de acilación y una de alquilación en la posición 2.
- Determinar la estructura de los compuestos obtenidos en cada reacción por medio de RMN, IR y/o EM.

6.- MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1.- Material y reactivos.

- Las raíces de *Psacalium decompositum* fueron compradas en el mercado de Sonora de la Ciudad de México.

- K_2CO_3 , Ac_2O_2 (anhídrido acético), H_3PO_4 (99%), KOH, piridina (reactivos de Bayer).

- THF, BBr_3 , n-BuLi 2.25 M, CH_3I , $(CH_3)_2SO_4$ (reactivos de Sigma-Aldrich).

- $SOCl_2$ (reactivo de Merck).

6.2.- Equipo utilizado.

Para el aislamiento y caracterización de los productos obtenidos en este trabajo se utilizaron la cromatografía en capa fina (CCF), en placas de gel de sílice 60 G UV₂₅₄ 20 x 20 cm y 0.25 mm de espesor; la cromatografía en placa preparativa (CPP) en cromatoplasmas ALUGRAM SIL 100 G/UV₂₅₄ y 200 G/UV₂₅₀ de 20 x 20 cm; y la cromatografía en columna (C.C) utilizando columnas de diferentes longitudes y diámetros y gel de sílice (SiO_2) 230/400 y 70/230.

Los disolventes fueron destilados en un rotavapor BUCHI R-114 y baño de agua BUCHI B-480.

El monitoreo de las placas cromatográficas se llevó a cabo mediante la exposición a luz UV con dos longitudes de onda (254 nm y 365 nm) y posterior revelado por aspersion de la placas con una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N.

Los puntos de fusión se llevaron a cabo en un aparato de punto de fusión Fisher-Johns serie No. 591.

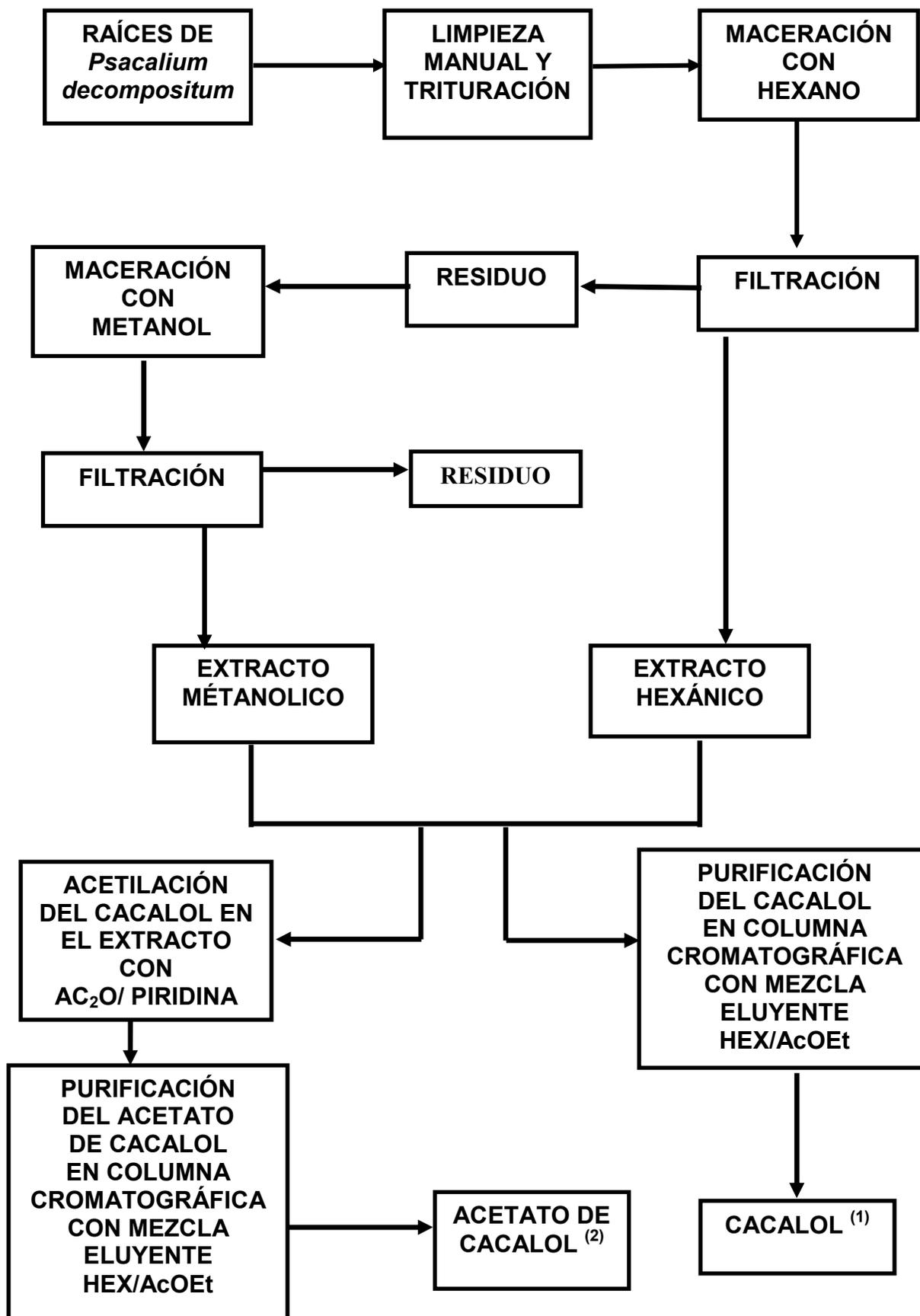
Los datos espectroscópicos de RMN- 1H y RMN- ^{13}C se obtuvieron en equipos Varian-Unity 300 Mhz, Varian-Gemini 200 Mhz, utilizando en cada caso disolventes deuterados y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

Los espectros de IR se obtuvieron en los equipos Perkin-Elmer 337 y Broker Tensor 37.

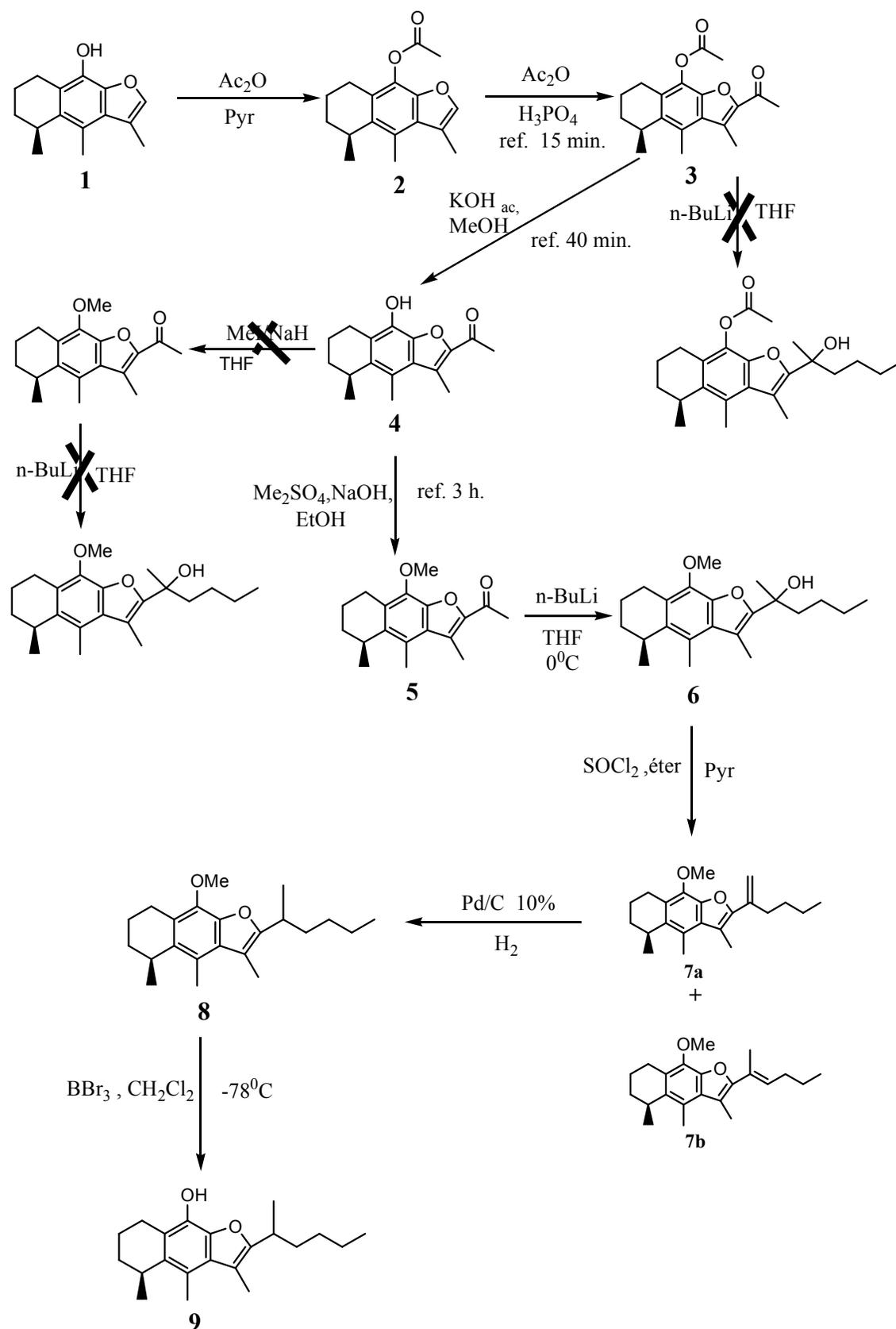
Los espectros de masas por la técnica de impacto electrónico se obtuvieron en el espectrofotómetro JEOL JMS-AX5505HA (70 eV).

Las mediciones por RPE se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Jeol JES-TE300 en banda X, y 100 Khz de frecuencia de modulación, con una actividad TE_{011} (cilíndrica). La adquisición, medición de las constantes y cálculo de la concentración se realizó con el programa ESPIRIT 382 series V1.916, conectado en línea con el espectrofotómetro.

6.3.- Diagrama de la obtención del cacalol y del acetato de cacalol.



6.4.- Diagrama general de síntesis de los derivados del cacalol.



6.5.- PARTE EXPERIMENTAL.

6.5.1.- Obtención de los extractos.

Las raíces de *Psacalium decompositum* se compraron en el mercado de Sonora de la Ciudad de México.

Se identificaron por comparación con un ejemplar del herbario del IMSS, así como por comparación por CCF.

Las raíces fueron secadas al aire, después se limpiaron de materias extrañas y se trituraron en trozos de aproximadamente 1 cm, quedando aproximadamente 960 g de raíces limpias y trituradas.

Los extractos hexánico y metanólico se obtuvieron por maceración en un matraz de fondo plano a temperatura ambiente.

Primero se pusieron las raíces en contacto con hexano por una semana, después se filtró la solución y se destiló el hexano a presión reducida en un rotavapor. El extracto hexánico era un aceite café rojizo de olor característico cuyo peso fue de 31.7 g.

El extracto metanólico se obtuvo siguiendo el mismo proceso, su apariencia también era de un aceite café rojizo con olor característico y su peso fue de 108.3 g.

Por comparación en CCF usando una mezcla eluyente de hexano-acetato de etilo (8:2) y CeSO_4 como revelador, se corroboró la presencia de cacalol en los dos extractos.

Los resultados se expresan a partir de que se trabajó con el extracto hexánico para la obtención del cacalol y sus derivados, ya que en este extracto es donde se encuentra mayor cantidad de cacalol.

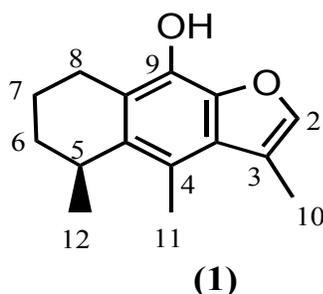
6.5.2.- Obtención de los compuestos

6.5.2.1.- Obtención del cacalol⁽¹⁾.

Se obtuvo de acuerdo al método usado por (Soto, 2002). Se tomaron 4 g del extracto hexánico y se fraccionaron por cromatografía en columna utilizando sílica gel como adsorbente y un gradiente de polaridad de una mezcla eluyente de hexano-acetato de etilo. Se realizó la CCF utilizando una muestra como referencia para confirmar la presencia de cacalol en las fracciones obtenidas, en la placa se presenta una mancha azul característica del cacalol.

Se purificó el compuesto por CC, utilizando SiO₂ gel y una mezcla de hexano-acetato de etilo (9.9:0.1).

El producto obtenido se recristalizó en hexano y se obtuvieron 0.55g (13.75% de rendimiento), en formas de cristales ligeramente amarillos con p.f = 72-74⁰C, R_f = 0.65 en Hex-AcOEt (8:2, v/v).



IR	(V _{max}) cm ⁻¹ 3400 (-OH fenol), 2929,2868,1451 (C-H alifático)
EM	m/z 230; (M ⁺ , 66), 215 (M ⁺ -15, 100), 200 (M ⁺ -30, 13).
RMN ¹H	CDCl ₃ TMS 200 MHz δ 1.18 (d, 3H, CH ₃ – 12); 1.8 (m, 4H, 2CH ₂ –6-7); 2.37 (s _a , 3H, CH ₃ – 10); 2.52 (s,3H, CH ₃ – 11); 2.6 y 3.0 (m, 2H, CH ₂ – 8); 3.20 (m,1H, CH – 5); 5.0 (s, 1H, –OH); 7.35 (m,1H, CH – 2).

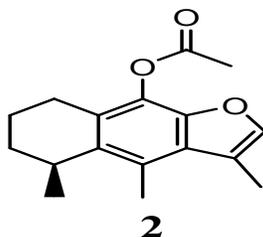
6.5.2.2- Obtención del acetato de cacalol⁽²⁾.

Se pesaron 5 g del extracto hexánico después de verificar la presencia de cacalol⁽¹⁾ por CCF y se colocaron en un matraz erlenmeyer de 500 mL, se le agregaron 20 mL de piridina y se calentaron en baño maría hasta disolver totalmente el extracto. Posteriormente se llevó a temperatura ambiente y se adicionaron 8 mL de anhídrido acético escurriendo cuidadosamente por las paredes del matraz. La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente por 24h.

Después en un matraz erlenmeyer de 500 mL se puso hielo hasta la mitad y se adicionó la mezcla de reacción, enseguida se lavó la mezcla con agua y se extrajo el producto con acetato de etilo. Se eliminó el exceso de piridina con una solución acuosa de HCl al 10%. El exceso de ácido se eliminó con agua hasta llegar a un pH aproximadamente neutro. La muestra se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y destiló el acetato de etilo en el rotavapor.

Se purificó el compuesto por CC, utilizando SiO₂ gel y una mezcla de hexano-acetato de etilo (9.8:0.2).

Se recristalizó en diclorometano-hexano, obteniéndose 0.664 g (13.28 % de rendimiento) en forma de cristales blancos con p.f = 105-106 °C, Rf = 0.72 en Hex-AcOEt (8:2, v/v).



EM	m/z; 272 (M ⁺ , 25); 230 (M ⁺ -42, 100); 215 (M ⁺ -57, 98).
RMN ¹H	CDCl ₃ TMS 200 MHz δ 1.18 (d, 3H, CH ₃ – 12); 1.8 (m, 4H, 2CH ₂ –6-7); 2.36 (s _a , 3H, CH ₃ – 10); 2.39 (d, 3H, CH ₃ – 11); 2.56 (s, 3H, CH ₃ – metilo acetato); 2.8 (m, 2H, CH ₂ – 8); 3.20 (m, 1H, CH – 5); 7.23 (m, 1H, CH – 2).

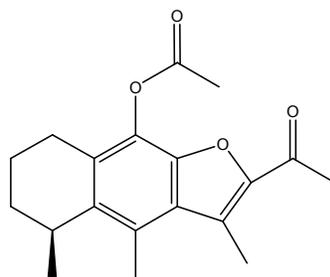
6.5.2.3.- Obtención del 2- acetilacetato de cacalol⁽³⁾.

Se obtuvo de acuerdo al método usado por (Jiménez et al., 1992). El acetato de cacalol⁽²⁾ (500 mg) se disolvió en anhídrido acético (8 mL) y se añadió 1 mL de ácido fosfórico al 99%. La mezcla se calentó a reflujo durante 15 min. y se dejó reposar durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla se vertió en agua fría (100 mL) y la muestra aceitosa se extrajo con éter (3 extracciones).

La fase orgánica se lavó con una solución acuosa de NaHCO₃ hasta obtener un pH neutro, enseguida se lavó con agua para quitar el exceso de bicarbonato, después se secó con Na₂SO₄ anhidro y se destiló el éter, recibiendo el éter en un matraz colocado en un baño de hielo.

Se purificó el compuesto por CC utilizando SiO₂ gel y una mezcla de hexano-acetato de etilo (9.8:0.2).

Se recristalizó el compuesto de hexano-acetona, obteniéndose 355 mg (71% de rendimiento) en forma de cristales ligeramente amarillos con p.f = 131-134 °C, Rf = 0.61 en Hex-AcOEt (8:2, v/v).



(3)

EM	m/z; 314 (M^+ , 19); 272 (M^+ -42, 100); 257 (M^+ -57, 72).
RMN 1H	CDCl ₃ TMS 300 MHz δ 1.18 (d, 3H, CH ₃ – 12); 1.8 (m, 4H, CH ₂ – 6-7); 2.42 (s, 3H, CH ₃ -10); 2.54 (s, 3H, CH ₃ -11); 2.6 (s, 3H, CH ₃ – metil cetona); 2.8 (s, 3H, CH ₃ – metilo acetato).
RMN ^{13}C	CDCl ₃ 300 MHz δ 191.4 (C=O); 29.8, 23.7, 16.5 (3CH ₂ – 6-7-8); 29.0 (CH – 5); 27.8 (CH ₃ – 11); 21.3 (CH ₃ – 12); 20.3 (CH ₃ – 10); 14.5 (CH ₃ – metil cetona); 12.0 (CH ₃ – metilo acetato).

6.5.2.4.- Reacción de alquilación del 2-acetilacetato de cacalol con n-butil litio

Se colocaron 200 mg de 2-acetilacetato de cacalol en un matraz de bola de 25 mL, se tapó con un septum, se le puso una jeringa de salida y se le inyectó nitrógeno al matraz para desplazar el aire presente, y se colocó el matraz en un baño de hielo seco.

Enseguida se inyectó THF seco al matraz y con agitación se disolvió totalmente la muestra, después de 5 min. se inyectaron 1 mL de n-BuLi 2.5 M a la mezcla de reacción y se dejó transcurrir la reacción por 3 h. La mezcla de reacción se mantiene en agitación durante todo el tiempo.

Se monitoreó la reacción por CCF usando una mezcla eluyente de hexano-acetato de etilo (8:2) y CeSO₄ como revelador, y tomando como referencia el producto de la reacción anterior. Transcurrido el tiempo de reacción, se llevó la muestra hasta un pH de 7 y se le

agregó agua para desplazar al litio y protonar los oxígenos para obtener el producto final, el cual se extrajo con diclorometano.

El siguiente paso fue secar la muestra con Na_2SO_4 anhidro, filtrarla y concentrarla en el rotavapor para posteriormente separar los productos por CPP, eluyendo con una mezcla de hexano-acetato de etilo (9:1).

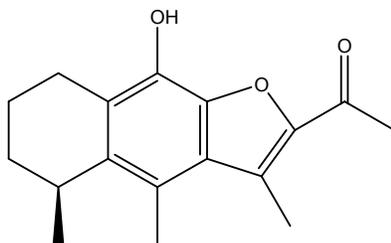
Ninguno de los compuestos separados corresponde al esperado, sin embargo se identificó uno de ellos como 2-acetil cacalol⁽⁴⁾, lo que indica que hubo una hidrólisis del grupo acetato protector debido a que el n-BuLi es una base muy fuerte, por lo que se optó por utilizar un grupo protector más resistente a las condiciones de reacción.

6.5.2.5.- Obtención del 2- acetil cacalol⁽⁴⁾.

Se disolvieron 500 mg de 2-acetil cacalol en metanol, se añadió una solución acuosa de KOH (500 mg / 5 mL), y se calentó a reflujo durante 40 min. La mezcla de reacción se vertió en agua y se acidificó con una solución acuosa de HCl (5%, 15 mL). Se formó un precipitado color verde que se extrajo con acetato de etilo, se lavó el extracto con agua para quitar el exceso de ácido, enseguida se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y el acetato de etilo se destiló en el rotavapor; la presencia del compuesto se corroboró por CCF usando una mezcla eluyente de hexano-acetato de etilo (8:2) y CeSO_4 como revelador.

Se purificó el compuesto por CC utilizando SiO_2 gel y una mezcla de hexano-acetato de etilo (9.7:0.3).

Se recristalizó el compuesto en hexano–diclorometano, se obtuvo en forma de cristales ligeramente amarillos (65% de rendimiento), p.f = 162-163 °C, Rf = 0.44 en Hex-AcOEt (8:2, v/v).



(4)

IR	(ν_{\max}) cm^{-1} 3386 (-OH fenol), 2929,2853,1457 (C-H alifático), 1673 (cetona α - β insaturada)
RMN ^1H	CDCl_3 TMS 300 MHz δ 1.18 (d, 3H, CH_3 - 12); 1.8 (m, 4H, 2CH_2 - 6-7); 2.55 (s, 3H, CH_3 -10); 2.58 (s, 3H, CH_3 -11); 2.8 (s, 3H, CH_3 - metil cetona); 3.0 (m, 2H, CH_2 - 8); 3.2 (m, 1H, CH - 5); 5.3(s, 1H, -OH).
RMN ^{13}C	CDCl_3 75.4 MHz δ 191.3 (C=O); 29.9, 23.26, 16.44 (3CH_2 -6-7-8); 28.9 (CH -5); 28.1 (CH_3 -11); 21.29 (CH_3 -12); 14.09 (CH_3 -10); 12.21 (CH_3 - metil cetona).

6.5.2.6.- Obtención del compuesto 5 por reacción de 2-acetil cacalol⁽⁴⁾ con yodometano (MeI).

Se disolvieron en THF con agitación y a temperatura ambiente 485 mg de 2-acetil cacalol⁽⁴⁾ en un matraz de bola de 25 mL el cual estaba tapado con un septum, se le puso una jeringa de salida y se desplazó con nitrógeno el aire que estaba dentro del matraz. Enseguida se agregaron poco a poco 100 mg de NaH previamente desengrasados con hexano, y se dejó la mezcla en agitación por 90 min. tiempo en el cual ya no se observó desprendimiento de hidrógeno, posteriormente se agregó a la mezcla 1 mL de MeI y se dejó la reacción en agitación por 21 hrs. Transcurrido este tiempo se paró la reacción con metanol para quitar el exceso de hidruro, enseguida se lavó la mezcla con agua para eliminar sales que se hubieran formado. Se extrajo a continuación la fase orgánica con acetato de etilo y se llevó hasta pH neutro, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se destiló el acetato de etilo en el rotavapor.

Se separaron los productos formados en la reacción por medio de CC, utilizando SiO_2 gel y una mezcla de hexano-acetato de etilo (9.9:0.1).

El producto mayoritario se obtuvo como un aceite amarillo (rendimiento 60%), $R_f = 0.68$ en Hex-AcOEt (8:2, v/v).

IR	(ν_{\max}) cm^{-1} 2966,2932, 2871,1466 (C-H alifático), 1674 (C=O)
EM	m/z; 286 (M^+ , 2); 328 (M^+ +42, 7); 314 (M^+ +28, 100); 299 (M^+ +13, 45)
RMN ^1H	CDCl_3 TMS 300 MHz δ 1.18 (d,3H, CH_3 -12); 1.22 (2d); 1.4 (s); 1.8 (m, 4H, 2CH_2 -6-7); 2.58 (s, 3H, CH_3 -11); 2.82 (s, 3H, CH_3 – metil cetona); 3.0 (m, 2H, CH_2 -8); 3.2 (m, 1H, CH-5).
RMN ^{13}C	CDCl_3 75.4 MHz δ 198.1 (C=O); 59.9 (CH_3 -metoxilo); 37.24 (CH); 29.9, 23.84, 16.75 (3CH_2 -6-7-8); 29.0 (CH – 5); 26.56, 18.39 y 18.25 (3CH_3); 21.43 (CH_3 – 12); 14.34 (CH_3 – 11); 12.21 (CH_3 – metil cetona).

6.5.2.7.- Obtención del compuesto 5 por reacción de 2-acetil cacalol⁽⁴⁾ con Me_2SO_4 .

En un matraz equipado con un condensador se colocaron 435 mg de 2-acetil cacalol, se disolvieron calentando en etanol (5 mL) y se calentaron a reflujo por 4 h. Enseguida se removió la fuente de calentamiento y a la solución caliente se le adicionaron alternadamente y con agitación 3 mL de una solución de NaOH (4 g / 10 mL H_2O), a continuación se adicionaron 0.4 mL de sulfato de dimetilo. Hubo un cambio de color de amarillo a anaranjado. Se desprende calor durante la reacción y hace que la solución hierva. Después de 20 min. de completada la adición, se adiciona 1 mL de una solución de NaOH (1 g / 2 mL H_2O) y se dejó calentando la mezcla a reflujo durante 3 h. Después de este tiempo se destiló en el rotavapor el etanol y quedó un líquido residual, el cual se enfrió en un baño de hielo y se saturó con NaCl. Después de lo cual quedó un aceite en el fondo del matraz, el cual se extrajo con diclorometano, se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró en el rotavapor.

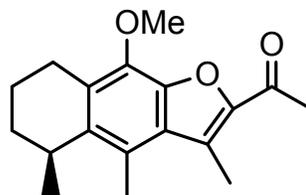
Al concentrado se le realizó CCF usando una mezcla eluyente de hexano-acetato de etilo (9:1) y CeSO_4 como revelador, se observaron dos compuestos.

Se le agregó hexano a la muestra, se obtuvieron dos fases, una soluble y la otra insoluble.

La fase insoluble contiene 2-acetil cacalol que no reaccionó.

La fase soluble se concentró en el rotavapor y, se fraccionó por C.C utilizando SiO_2 gel y hexano. Se obtuvieron dos compuestos siendo el minoritario 2-acetil cacalol y el mayoritario el producto esperado.

El producto mayoritario (5), se obtuvo como un aceite amarillo claro (rendimiento 37%), solidificó al enfriarse a -4°C , $R_f = 0.75$ en Hex-AcOEt (8:2, v/v).



(5)

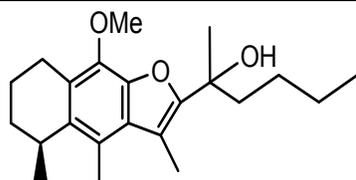
IR	(ν_{\max}) cm^{-1} 2929,2869, 2855,1458 (C-H alifático), 1676 (C=O)
EM	m/z 286 (M^+ , 100); 271 ($M^+ - 15$, 72).
RMN ^1H	CDCl_3 TMS 300 MHz δ 1.17 (d, 3H, $\text{CH}_3 - 12$); 1.8 (m, 4H, $2\text{CH}_2 - 6-7$); 2.58 (s, 3H, $\text{CH}_3 - 10$); 2.59 (s, 3H, $\text{CH}_3 - 11$); 2.81 (s, 3H, $\text{CH}_3 - \text{metil cetona}$); 3.0 (m, 2H, $\text{CH}_2 - 8$); 3.25 (m, 1H, $\text{CH} - 5$); 4.1 (s, 3H, $\text{CH}_3 - \text{metoxilo}$).
RMN ^{13}C	CDCl_3 75.4 MHz δ 191.6 (C=O); 59.9 ($\text{CH}_3 - \text{metoxilo}$); 29.9, 23.85, 16.75 ($3\text{CH}_2 - 6-7-8$); 29.01 ($\text{CH} - 5$); 27.9 ($\text{CH}_3 - 11$); 21.4 ($\text{CH}_3 - 12$); 14.3 ($\text{CH}_3 - 10$); 12.1 ($\text{CH}_3 - \text{metil cetona}$).

6.5.2.8.- Obtención del compuesto 6 por reacción de alquilación.

La reacción se llevó a cabo con el mismo procedimiento que en el punto (6.5.2.4).

Se pusieron a reaccionar 162 mg del compuesto (5) y 0.8 mL de n-BuLi 2.5 M. por 40 min. Transcurrido este tiempo por CCF usando una mezcla eluyente de hexano-acetato de etilo (8:2) se observó la presencia de dos compuestos. Estos compuestos se purificaron por CC, utilizando SiO_2 gel y hexano.

El producto mayoritario (6), se obtuvo como un aceite amarillo oscuro (rendimiento 73%), no solidifica al enfriarse a -4°C , tiene un $R_f = 0.67$ en Hex-AcOEt (8:2, v/v).



(6)

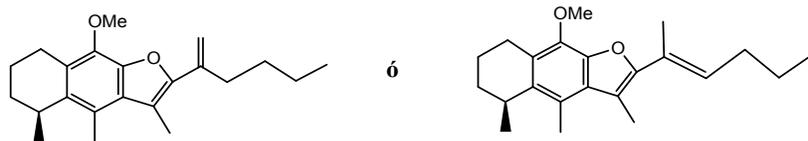
IR	(ν_{\max}) cm^{-1} 3456 (-OH); 2955,2930, 2867,1465 (C-H alifático), 721-754(-CH ₂ -CH ₂) cadena lateral
EM	m/z; 344 (M ⁺ , 32); 329 (M ⁺ -15, 8); 287 (M ⁺ -57, 100); 271 (M ⁺ -63, 4); 257 (M ⁺ -87, 6).
RMN ¹H	CDCl ₃ TMS 300 MHz δ 0.98 (t, 3H, CH ₃ – cadena); 1.17(d, 3H, CH ₃ – 12); 1.25 (s, 3H, CH ₃ – cadena); 1.5 (m, 2H, CH ₂ – cadena); 1.79 (m, 4H, 2CH ₂ – 6-7); 2.44 (s, 3H, CH ₃ – 10); 2.56 (s, 3H, CH ₃ – 11); 3.1 (m, 2H, CH ₂ – 8); 3.25 (m, 1H, CH – 5); 4.0 (s, 3H, CH ₃ – metoxilo).

6.5.2.9.- Obtención del compuesto 7 por reacción de deshidratación.

Se disolvieron con agitación 119 mg de (6) en éter a 0°C, enseguida se le adicionaron 0.3 mL de piridina a la solución, a continuación se agregaron 0.3 mL de SOCl₂ y al observar la formación de un precipitado amarillo se filtró la solución, el precipitado se disolvió con éter, la solución etérea se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró en el rotavapor. Se realizó una CCF a la muestra concentrada usando una mezcla eluyente (8:2) de hexano-acetato de etilo y se observaron tres productos.

Se separaron los productos por CPP, eluyendo con una mezcla de hexano-acetato de etilo (8:2).

El producto mayoritario (7), se obtuvo como un aceite amarillo (rendimiento 58%), R_f = 0.78 en Hex-AcOEt (8:2, v/v).



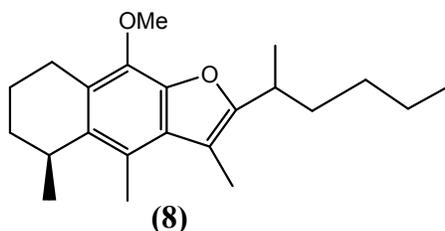
PRODUCTOS DE DESHIDRATACIÓN (7)

IR	(ν_{\max}) cm^{-1} 2959,2930, 2870,1465 (C-H alifático).
EM	m/z; 326 (M^+ , 64); 311 (M^+ -17, 16).
RMN ^1H	CDCl_3 TMS 300 MHz δ 0.98 (t, 3H, CH_3); 1.18 (d, 3H, CH_3 - 12); 1.2-1.6 (m, CH_2 y CH_3 - cadena); 1.8 (m, 4H, 2CH_2 - 6-7); 2.4 (s, 3H, CH_3 - 10); 2.6 (s, 3H, CH_3 - 11); 3 (m, 2H, CH_2 -8); 3.2 (m, 1H, CH - 5); 4.0 (s, 3H, CH_3 - metoxilo); 5.8 (m, doble ligadura).

6.5.2.10.- Obtención del compuesto 8 por reacción de hidrogenación.

En un matraz de hidrogenación se colocaron 15 mg de catalizador Pd/C 10 % y 15 mL de acetato de etilo, se conectó el matraz al aparato de hidrogenación y la mezcla se dejó en agitación por 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se agregó el compuesto (7) al matraz y se dejó hidrogenando la muestra por 21 hrs., manteniendo la agitación todo el tiempo de la reacción. Después se filtró la mezcla y se concentró en el rotavapor.

El producto (8) se obtuvo como un aceite amarillo (rendimiento 76%), $R_f = 0.6$ en Hex-AcOEt (9.5:0.5, v/v).



EM	m/z 328 (M^+ , 65); 313 (M^+ -15, 16); 271 (M^+ -57, 100):
RMN ^1H	CDCl_3 TMS 300 MHz δ 0.8 (m, 3H, CH_3); 1.18 (d, 3H, CH_3 -12); 1.2-1.4 (m, 7H, 2CH_2 y CH_3); 1.6 (m, 2H, CH_2); 1.8 (m, 4H, 2CH_2 - 6-7); 2.3 (s, 3H, CH_3 -10); 2.5 (s, 3H, CH_3 -11); 2.9 (m, 1H, CH); 4.0 (s, 3H, CH_3 - metoxilo).

RMN ¹³C	CDCl ₃ 75.4 MHz δ 59.86 (CH ₃ -metoxilo);35.48 (CH ₂ -cadena); 31.12 (CH -cadena); 30.28, 23.52, 17.05 (3CH ₂ - 6-7-8); 29.85 (CH ₂ -cadena); 29.01 (CH - 5); 22.69 (CH ₂ -cadena); 21.55 (CH ₃ - 12); 19.71 (CH ₃ -cadena); 14.00 (CH ₃ - 11); 14.03 (CH ₃ -cadena); 11.25 (CH ₃ - 10).
---------------------------	---

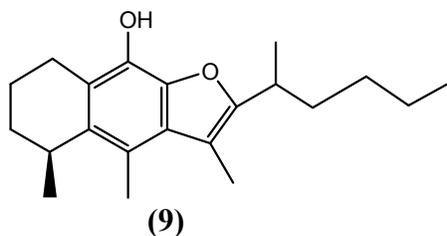
6.5.2.11.- Obtención del compuesto 9 por reacción de desmetilación.

En un matraz de bola de 10 mL provisto de un agitador, un septum (el cual tiene una aguja de salida) y con flujo de nitrógeno, se agregaron 35 mg de compuesto (8) en 5 mL de CH₂Cl₂ anhidro. El matraz se llevó a un baño de hielo seco/acetona para enfriar la muestra a -78^oC, posteriormente se inyectaron 0.15 mL de BBr₃ [1M] en CH₂Cl₂ y la mezcla de reacción se dejó en agitación por 30 min. Al término de este tiempo el matraz de reacción se llevó a un baño de hielo y se continuó con la agitación por 3 hrs.

Una vez terminada la reacción se adicionó lentamente a la mezcla de reacción una solución saturada de NH₄Cl, se hizo la extracción con acetato de etilo, la fase orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se destiló el disolvente en el rotavapor.

Se realizó una CCF utilizando hexano para corroborar que se llevó a cabo la reacción.

El producto (9) se separó por CPP, utilizando una mezcla eluyente de hexano-acetato de etilo (8:2), obteniéndose un aceite amarillo (rendimiento 51%), R_f = 0.51 en Hex-AcOEt (9.5:0.5, v/v).



IR	(v_{max}) cm ⁻¹ 3384 (-OH fenol), 2959,2929, 2868,1456 (C-H alifático).
EM	m/z; 314 (M ⁺ , 26); 299 (M ⁺ -15, 6); 257 (M ⁺ -57, 80); 240 (M ⁺ -74, 18).

RMN ¹H	CDCl ₃ TMS 300 MHz δ 0.8-1.6 (13H, 3CH ₃ y 2CH ₂); 1.8 (m, 4H, 2CH ₂ – 6-7); 2.31 (s, 3H, CH ₃ – 10); 2.5 (s, 3H, CH ₃ – 11); 3 (m, 2H, CH ₂ – 8); 3.2 (m, 1H, CH – 5); 5.3 (s, 1H, -OH).
--------------------------	---

6.5.3.- PRUEBAS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Las pruebas de actividad antioxidante se realizaron en el laboratorio de pruebas biológicas y en el laboratorio de Resonancia Paramagnética del Electrón (RPE), ambos laboratorios del Instituto de Química de la UNAM.

6.5.3.1.- MÉTODO DEL RADICAL DPPH

El método de la reducción del radical DPPH se realizó por dos técnicas, una espectrofotométrica y por medio de resonancia paramagnética del electrón (RPE).

6.5.3.1.1.- MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO.

La actividad antioxidante de los compuestos puros (1, 4 y 9), se realizó midiendo de manera indirecta la reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) mediante una técnica espectrofotométrica.

Se toman 50 μ L de la solución problema a diferentes concentraciones (μ M) y se depositan por triplicado en placas de ELISA de 96 pozos, posteriormente se agregan 150 μ L de una solución etanólica de DPPH 100 μ M. La mezcla se protege de la luz y se agita durante 30 minutos a 37⁰C, posteriormente se lee su densidad óptica (DO) a 515 nm en lector de ELISA (ELx808).

La actividad sobre el DPPH se expresa como porcentaje de reducción del radical y se calcula con la fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = (C - E/C) 100$$

en donde

C = DO del control (DPPH 100 μ M)

E = DO del experimental (mezcla DPPH 100 μ M + compuesto problema).

Se obtuvo también la concentración inhibitoria media (IC₅₀) para los compuestos estudiados.

6.5.3.1.2.- MÉTODO POR RPE

La actividad sobre el radical DPPH por medio de la técnica de RPE se realizó a los compuestos (1, 2 y 4). Se determinó mezclando 150 µL de una solución etanólica 133 µM de DPPH con 50 µL de una solución etanólica de compuesto puro, la concentración de DPPH remanente se determinó por doble integral de la señal y comparación con un estándar.

6.5.3.2.- MÉTODO DE ESPECIES REACTIVAS DEL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Se realizó por medio de una técnica analítica para determinar la concentración de malondialdehído cuya producción es inducida con FeSO₄ en homogeneizado de cerebro de rata. Se realizó el experimento por triplicado.

Se colocan 425 µL del homogeneizado (2.3529 mg prot/mL) en tubos ependorf de 1.5 mL, enseguida se agregan 25 µL del compuesto a probar (20 veces más concentrado disuelto en vehículo), se incuba la muestra 30 min a 37⁰C con agitación, enseguida se agregan 500 µL de reactivo TBA (mezcla 1:1 de TBA 1% y ácido tricloroacético (TCA) 30%) y se incuban en un baño de hielo 10 min, después se centrifuga la muestra 5 min a 10 000 rpm a temperatura ambiente, luego se incuba 30 min en baño de agua a 90⁰C, enseguida se enfrían los tubos en un baño de hielo y se destapan para liberar la presión.

Se mide la absorbancia a 532 nm, extrapolando los resultados en una curva de malondialdehído previamente preparada, para obtener la concentración de MDA (nmol/mL), que en los resultados se expresan como concentración de TBARS (nmol/mg proteína).

El porcentaje de inhibición se obtiene de la siguiente manera

$$\% \text{ inhibición} = (C - E / C) \times 100$$

donde:

C = TBARS (nmol/mg prot) control.

E = TBARS (nmol/mg prot) muestra.

Se obtuvo también la concentración inhibitoria media (IC₅₀) para los compuestos estudiados.

6.5.3.3.- Método de RPE para evaluación de la actividad antioxidante sobre radicales $\cdot\text{CH}_3$, $\cdot\text{OH}$ y $\text{O}_2\cdot^-$.

La evaluación de la actividad sobre radicales centrados en carbono y oxígeno se determinó utilizando el sistema reportado por Yoshimura, (1999), utilizando la mezcla $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}/\text{DMSO}$, mediante la cual se generan especies reactivas ($\cdot\text{CH}_3$, $\cdot\text{OH}$, y $\text{O}_2\cdot^-$) que se utilizan para evaluar la actividad secuestrante.

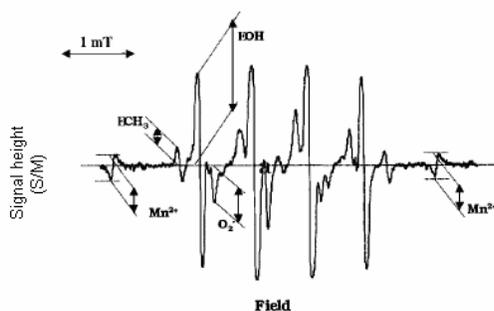
Para determinar la actividad secuestrante sobre los radicales $\cdot\text{CH}_3$, $\cdot\text{OH}$ y $\text{O}_2\cdot^-$, éstos se generaron simultáneamente e inmediatamente antes de la medición por la mezcla de DMSO , NaOH y H_2O_2 , y la formación de estos se hizo evidente por la adición de un atrapador de espín (AE) que en este caso fue el DMPO.

El $\text{O}_2\cdot^-$ y el $\cdot\text{OH}$ son generados por degradación del H_2O_2 , reacción que es facilitada en el medio alcalino. El $\cdot\text{CH}_3$ es generado por la acción del radical $\cdot\text{OH}$ sobre el DMSO .

Para obtener el porcentaje de cada radical secuestrado, se toma la altura de cada señal de los aductos formados por los radicales y se comparan contra la altura de la señal de Mn^{2+} que sirve como referencia, y el resultado se toma como S/M.

Las alturas de la señales fueron calculadas usando un programa analizador de radicales anexo al espectrómetro.

A continuación se muestra un espectro típico de RPE utilizando el sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}/\text{DMSO}$. Tomado de Yoshimura, 1999.



Constante de acoplamiento hiperfino de los aductos de espín

7.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

7.1 Obtención de compuestos.

Se obtuvo el cacalol⁽¹⁾ para con el tener una referencia y compararlo con los demás compuestos obtenidos, también, para con el realizar pruebas de actividad antioxidante.

Con respecto a su espectro de IR, se observó una banda característica del grupo –OH a 3400 cm^{-1} , que corresponde al fenol del cacalol.

En el espectro de masas el valor del ión molecular (M^+) es de 230 y corresponde al calculado para este compuesto.

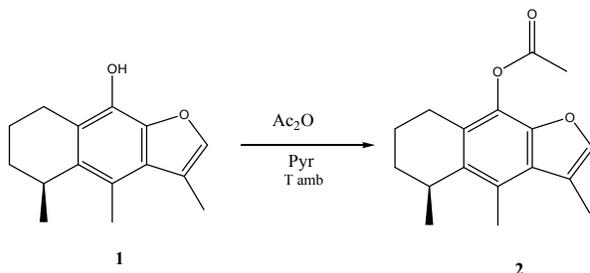
Para el espectro de RMN ^1H se observa a 5.03 ppm la señal correspondiente al protón del grupo –OH, y a 7.35 ppm la señal correspondiente al protón del C-2.

Como se mencionó anteriormente, este compuesto es muy inestable ya que se autooxida fácilmente en presencia de luz y oxígeno aún a temperatura ambiente, por lo que se guarda en refrigeración, protegido de la luz y bajo atmósfera de nitrógeno hasta su utilización.

Esto se corroboró por medio de una CCF en donde se observan manchas correspondientes a los productos de la oxidación del cacalol, las placas se realizaron aproximadamente a las 12 h de dejar al cacalol expuesto a las condiciones ambientales.

Debido a estas características, se decidió proteger al grupo fenólico del cacalol con un grupo acetato, esta reacción se llevó acabo directamente en el extracto hexánico y así se obtuvo el acetato de cacalol⁽²⁾, el cual es estable a la autooxidación.

El esquema de la reacción es el siguiente:

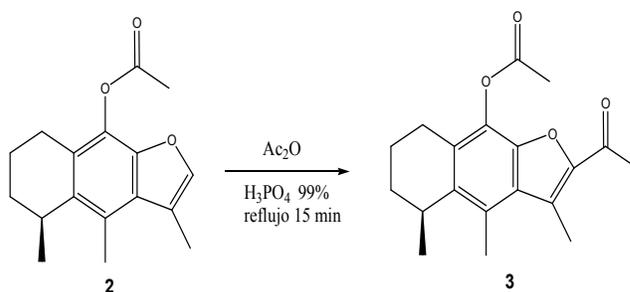


En el espectro de masas del acetato de cacalol, el valor de M^+ es de 272 lo que indica el aumento de peso molecular correspondiente al grupo protector.

Con respecto al espectro de RMN 1H se observa que la señal correspondiente al protón del grupo $-OH$ desaparece, y se observa otra señal a 2.56 ppm que corresponde a los protones del metilo del acetato.

Posteriormente se formó el 2-acetil acetato de cacalol⁽³⁾ con el método descrito en la bibliografía (Romo et al., 1966) que menciona que los benzofuranos reaccionan con anhídrido acético y ácido fosfórico para formar derivados acilados en la posición 2. Por lo que se hizo reaccionar el acetato de cacalol en estas condiciones para obtener el 2- acetilacetato de cacalol

El esquema de reacción es el siguiente:



En el espectro de masas el valor de M^+ corresponde al esperado que es de 314, es decir hay un aumento de masa correspondiente a la metil cetona.

En el espectro de RMN 1H se observa ahora una señal simple a 2.6 ppm que corresponde a los protones del grupo acilo en C-2; en lo que respecta al espectro de RMN ^{13}C se observan las señales esperadas para este compuesto siendo la señal a 191.4 ppm la que corresponde al grupo carbonilo, a 14.5 ppm la señal del carbono de la metil cetona y en 12 ppm la señal del carbono del metilo del acetato.

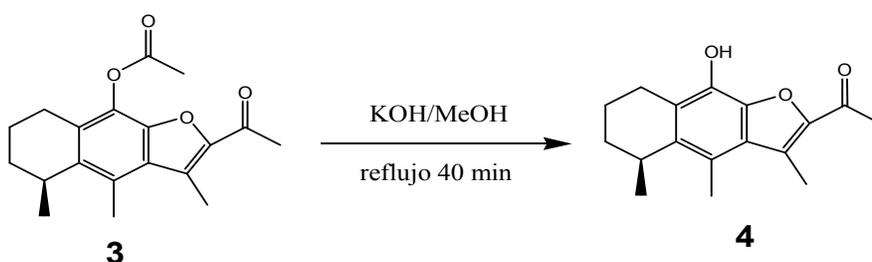
Además para este compuesto se corroboró su estructura por experimentos HETCOR, COSY y DEPT.

En el siguiente paso se realizó una reacción de alquilación, usando en este caso n-butil litio. Esta descrito que un compuesto organoalcalino, por una adición nucleofílica 1,2 (directa) y 1,4 (conjugada), sobre el carbonilo de la cetona α - β no saturada forma el compuesto correspondiente (McMurry, 1994), en este caso el compuesto con la cadena carbonada.

En este caso se llevó a cabo la reacción con 2-acetil acetato de cacalol y n-butil litio, pero bajo estas condiciones de reacción el compuesto esperado se formó en muy pequeñas cantidades, ya que el n-butil litio es una base muy fuerte e hidroliza el enlace del grupo protector, con lo cual se formó en su gran mayoría otro compuesto identificado después como 2-acetil cacalol⁽⁴⁾.

Debido a esto se optó por proteger al fenol del cacalol con un grupo metoxilo el cual es más resistente a las condiciones de reacción; para ello fue necesario formar primero el 2-acetil cacalol⁽⁴⁾ a partir del 2-acetil acetato de cacalol⁽³⁾ por medio de una hidrólisis alcalina tal como está descrito en la bibliografía (Jiménez et al., 1992).

El esquema de la reacción es el siguiente:



El 2-acetil cacalol, en su espectro de IR presenta una señal a 3386 cm^{-1} que corresponde al grupo -OH, lo que indica que si se llevó a cabo la hidrólisis del acetato, también se observa una señal a 1673 que corresponde a la cetona α - β no saturada.

En el espectro de RMN ¹H a 5.3 ppm se observa una señal simple que corresponde al protón del grupo -OH, pero ya no se observa la señal de los protones del metilo del acetato; en lo que respecta al espectro de RMN ¹³C, se observan las señales esperadas, a 191.3 ppm

se nota la δ del carbonilo, y a 12.21 la δ del carbono del metilo de la metil cetona, la cual se desplazó a un campo más alto de 14.5 ppm en 2-acetil acetato de cacalol a 12.21 ppm en 2-acetil cacalol, en este caso ya no se observa la señal que corresponde al metilo del acetato.

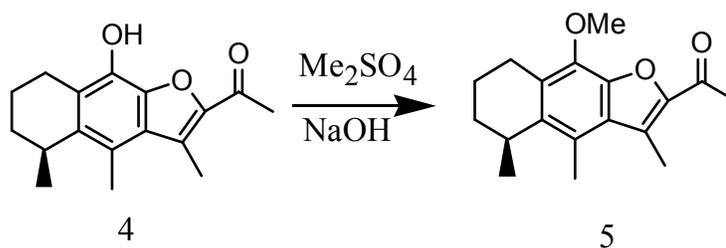
Por experimentos HETCOR, COSY y DEPT se corroboró la estructura del 2-acetil cacalol.

El 2-acetil cacalol al igual que el cacalol es inestable, ya que presenta reacciones de oxidación ante la presencia de la luz y oxígeno aún a temperatura ambiente, con la diferencia de que en el 2-acetil cacalol las reacciones de oxidación tardan más tiempo en aparecer haciéndolo un poco más estable, lo cual se corroboró por medio de CCF como en el caso del cacalol, sólo que para el 2-acetil cacalol los compuestos de oxidación aparecen aproximadamente a las 24 h.

A continuación se hizo reaccionar el 2-acetil cacalol con MeI, ya que está demostrado en la bibliografía (Smith, 1996) que los hidroxilos fenólicos son fácilmente metilados con MeI en condiciones básicas; sin embargo el producto obtenido, el cual no pudo ser identificado, presenta en su espectro de masas un valor de M^+ de 328 que no corresponde con el esperado que era de 286. Además el espectro de RMN 1H presenta la señal del metoxilo, pero presenta señales que no corresponden al compuesto esperado, por RMN ^{13}C tenemos señales para más carbonos de las que se esperaban, y por DEPT se observan dos CH_3 y un CH en exceso.

El siguiente paso fue cambiar las condiciones de reacción, ya que está documentado que los éteres metílicos pueden ser preparados por el tratamiento de un alcohol con dimetilsulfato en presencia de una base (Smith, 1996), por lo que se realizó la reacción con dimetilsulfato y NaOH como base.

El esquema de la reacción es el siguiente:



El compuesto 5 mostró en el espectro de IR la banda correspondiente al -OH.

Por espectro de masas el valor de M^+ de 286 en el espectro de masas corresponde al compuesto esperado, ya que el aumento en el valor corresponde a un grupo metilo adicionado a la molécula.

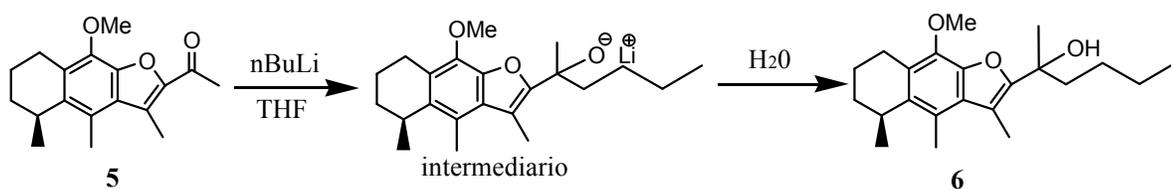
En el espectro de RMN 1H se observa la señal correspondiente al metoxilo en 4.1 ppm y ya no se observa la señal del protón del -OH; en el espectro de RMN ^{13}C se presentan las señales esperadas siendo algunas de ellas, a 191.6 ppm la señal del carbono del carbonilo y a 59.9 ppm la del metoxilo.

El experimento DEPT confirmó la presencia de -CH, -CH₂ y -CH₃ para este compuesto.

El compuesto 5 a diferencia de los compuestos 1, 2, 3 y 4, no cristaliza, sino que se obtiene en forma de un aceite, es decir se aprecia un cambio con el uso del grupo metilo protector en comparación con el grupo acetato.

Para lograr aumentar la cadena carbonada en la posición 2 del cacalol a partir de la metil cetona del compuesto 5, se hizo una reacción de alquilación con n-butil litio, con lo que se formó un alcohol terciario.

Algunos autores proponen la formación de un intermediario para estas reacciones (Buhler, 1973), como se muestra en el esquema siguiente:



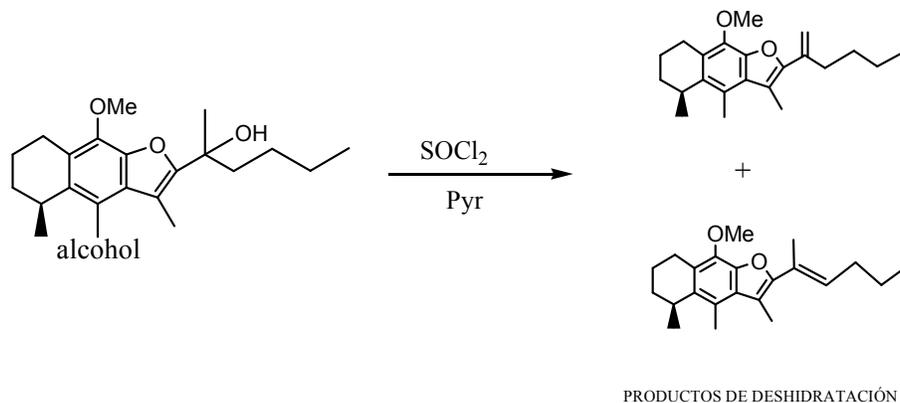
El espectro de IR para el compuesto 6 presenta una banda a 3456 cm^{-1} que corresponde al grupo -OH de la cadena lateral.

El espectro de masas el valor de M^+ de 344 es el calculado para este compuesto.

Para el espectro de RMN ^1H a 0.98, 1.25 y 1.5 ppm se observan señales que corresponden a los protones de la cadena lateral, a 5.25 se observa la señal para el protón del grupo $-\text{OH}$.

El alcohol resultante se deshidrató con cloruro de tionilo (SO_2Cl_2) en medio básico. En este caso se usó piridina como base y como disolvente, con la finalidad de neutralizar el HCl formado durante la reacción.

El esquema de reacción es el siguiente:



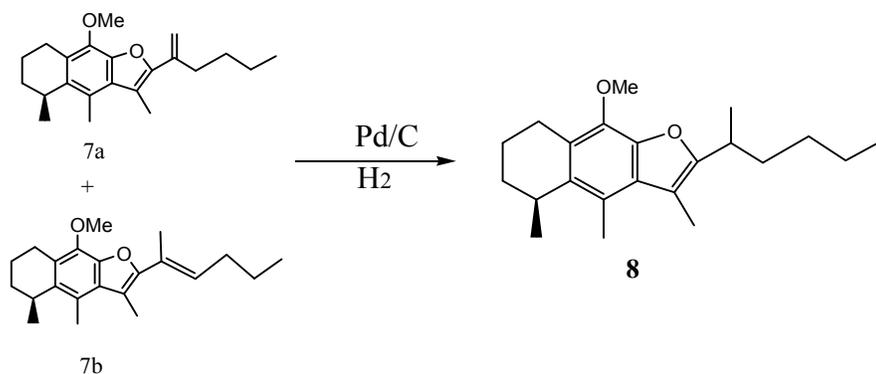
Para el compuesto 7 el espectro de IR ya no presenta la señal para el grupo $-\text{OH}$.

En el espectro de masas el valor de M^+ de 326 es el esperado.

En el espectro de RMN ^1H aún se observan las señales de los protones de la cadena lateral, así como la señal de los protones del metoxilo a 4.0 ppm, aunque también se observa una señal a 5.8 que corresponde a los protones de la doble ligadura formada durante la deshidratación.

A continuación se hidrogenó el compuesto 7, usando como catalizador Pd/C 10 %, con la finalidad de saturar el doble enlace de la cadena lateral resultante de la deshidratación.

El esquema de reacción es el siguiente:



El espectro de masas del compuesto 8 presenta un valor de M^+ de 328 que corresponde al calculado para este compuesto.

En el espectro de RMN 1H ya no se observa la señal para la doble ligadura, pero se mantiene la señal de los protones del metoxilo a 4.0 ppm; en el espectro de RMN ^{13}C se observan las señales esperadas, una de ellas a 59.86 ppm que es del metoxilo.

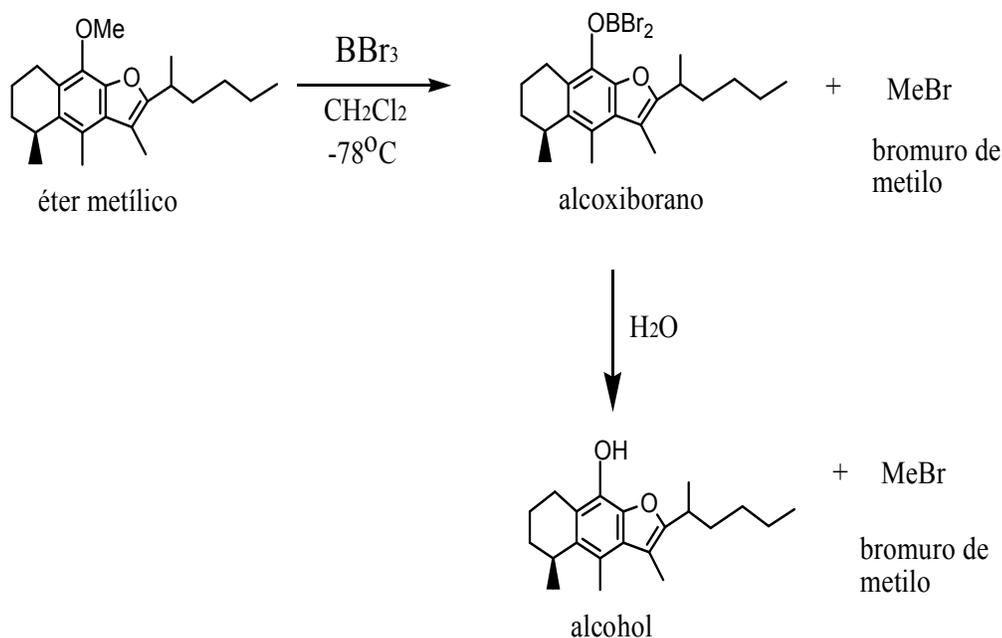
Por los experimentos HETCOR, COSY y DEPT se confirmó la estructura de la molécula del compuesto 8.

Como paso final se llevó a cabo la desprotección del fenol. Esta reacción se realizó usando tribromuro de boro (BBr_3), el cual es un reactivo muy usado para remover éteres metílicos cuando actúan como grupos protectores.

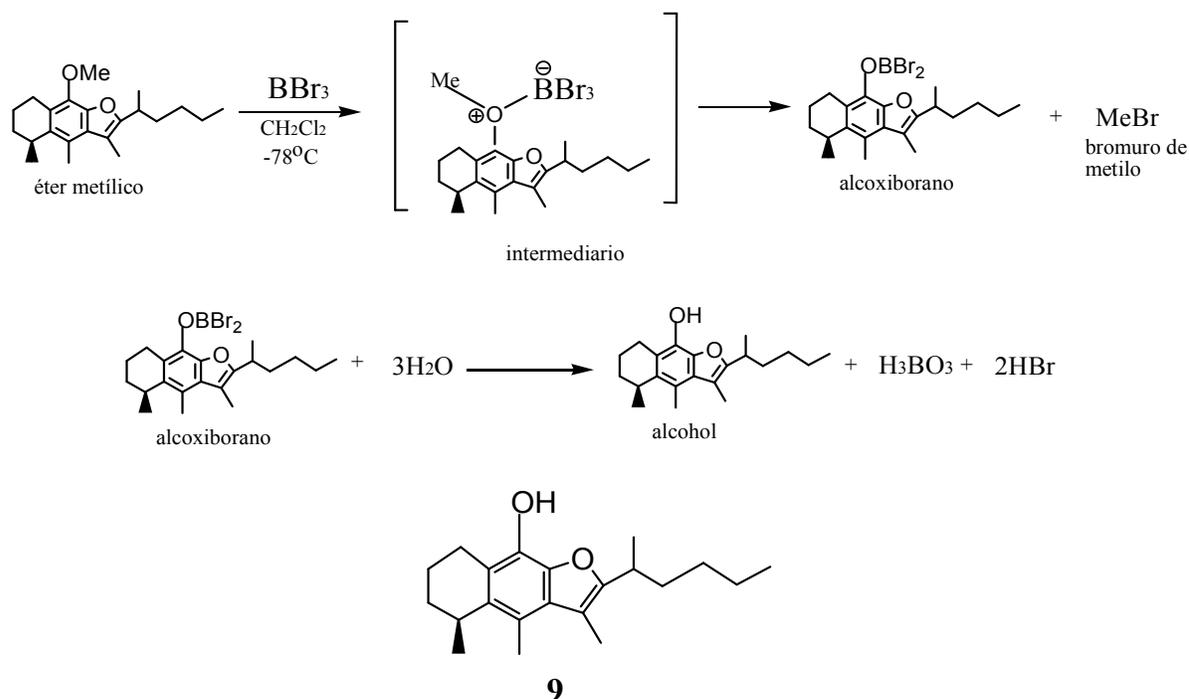
El BBr_3 se coordina con el átomo de oxígeno del éter y promueve la ruptura del enlace C-O para dar un alcoxiborano el cual es hidrolizado para formar el alcohol correspondiente. (Paquette, 1995).

Algunos autores (McOmie, 1968 y Paquette, 1995), proponen algunos de los siguientes mecanismos para estas reacciones.

a)



b)



El compuesto **9** fue identificado como el 2-(hexan-2-il)-5,6,7,8-tetrahidro-3,4,5-trimetilnafto(2,3-b)furano-9-ol, o 2-hexanil cacalol.

En el espectro de IR del compuesto **9** se observa la señal a 3384 cm^{-1} que corresponde al grupo $-\text{OH}$, lo que indica que si se llevó a cabo la reacción y se removió el metilo que protegía al $-\text{OH}$.

En los resultados de EM se observa el valor de M^+ de 314 esperado para este compuesto.

En el espectro de RMN ^1H desaparece la señal correspondiente al metoxilo, y se observa la señal correspondiente al protón del $-\text{OH}$ a 5.3 ppm, sin embargo se presentan también algunas impurezas, las cuales se observan en las zonas donde están las señales de los metilos y metilenos 0.8-2.0 ppm.

Este compuesto al igual que el cacalol y el 2-acetil cacalol, es muy inestable, ya que se oxida en presencia de luz y oxígeno aún a temperatura ambiente, por lo que hay que mantenerlo protegido bajo las mismas condiciones.

7.2 Resultados de las pruebas de actividad antioxidante.

Durante el proceso de obtención del cacalol y sus derivados, se obtuvieron otros compuestos tales como el acetato de cacalol⁽²⁾ y el 2-acetil cacalol⁽⁴⁾, a los cuales junto con el cacalol⁽¹⁾ y el 2-hexanil cacalol⁽⁹⁾ se les realizaron pruebas de actividad antioxidante, con la finalidad de observar el efecto al proteger el fenol y al adicionar sustituyentes en la posición 2 del cacalol. Al 2-hexanil cacalol solo se le realizaron las pruebas de DPPH por el método espectrofotométrico y de TBARS, debido a que la cantidad de compuesto obtenido no fue suficiente para realizar todos los experimentos.

7.2.1.- Evaluación de la actividad secuestrante sobre el radical DPPH.

La primera prueba de actividad antioxidante fue la actividad secuestrante de radical DPPH, esta se realizó por dos métodos diferentes, por RPE y por espectrofotometria.

Para el método por RPE, el ensayo se realizó con los compuestos (1, 2 y 4), los resultados obtenidos se presentan en la tabla (1).

Los compuestos (1 y 2), presentan una muy buena actividad secuestrante con el radical DPPH, observándose a una concentración de 25 μM un 60% de actividad para ambos compuestos, sin embargo el acetato de cacalol es prácticamente inactivo con el radical, ya que a las concentraciones usadas no se observa una actividad considerable siendo su valor máximo de 6% de actividad a una concentración de 100 μM .

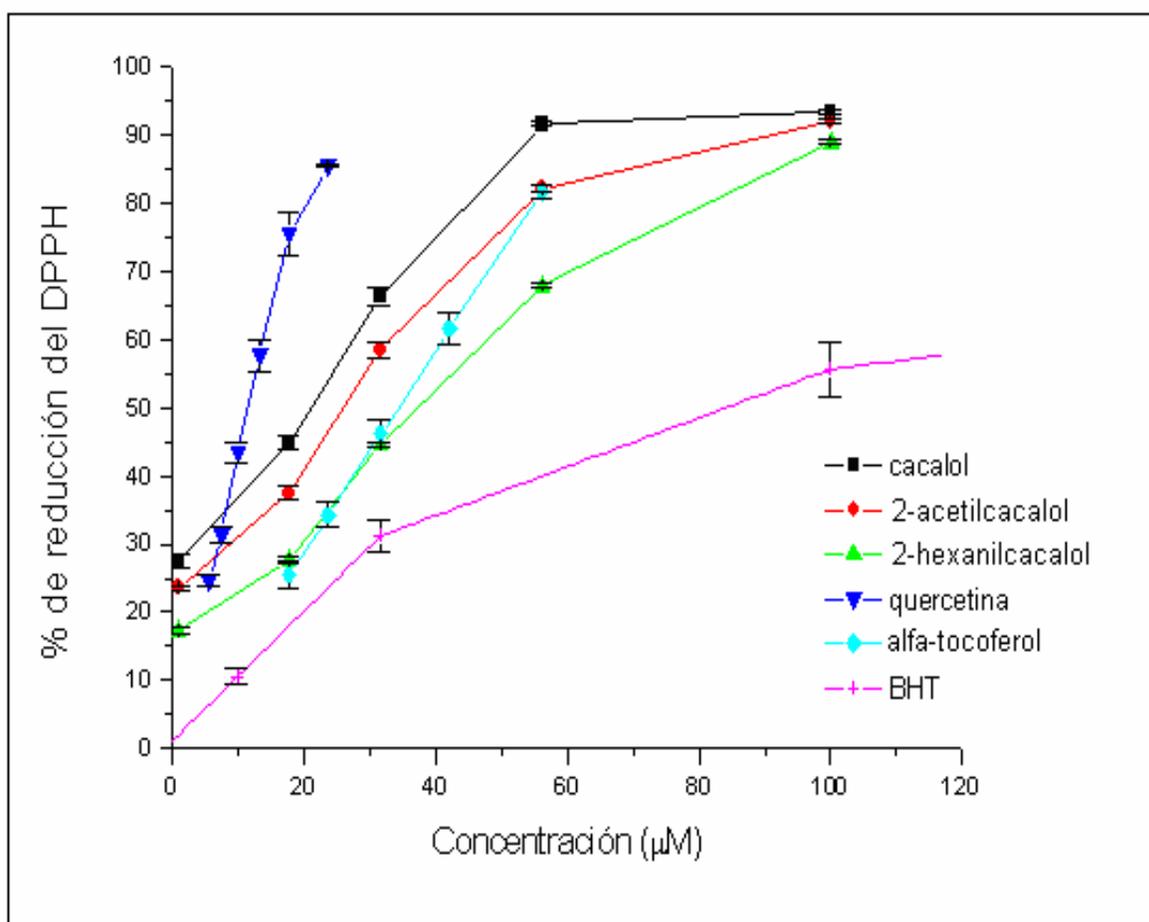
MUESTRA	CONCENTRACIÓN (μM)	% de actividad secuestrante con radical DPPH
Cacalol (1)	12.5	23.6
	25	60
	62.5	96.8
Acetato de cacalol (2)	10	1.37
	20	3
	50	6
	100	6.1
2-acetil cacalol (4)	12.5	2.31
	25	60
	125	98.3

Tabla 1.- % de actividad secuestrante con radical DPPH del cacalol, acetato de cacalol y 2-acetil cacalol.

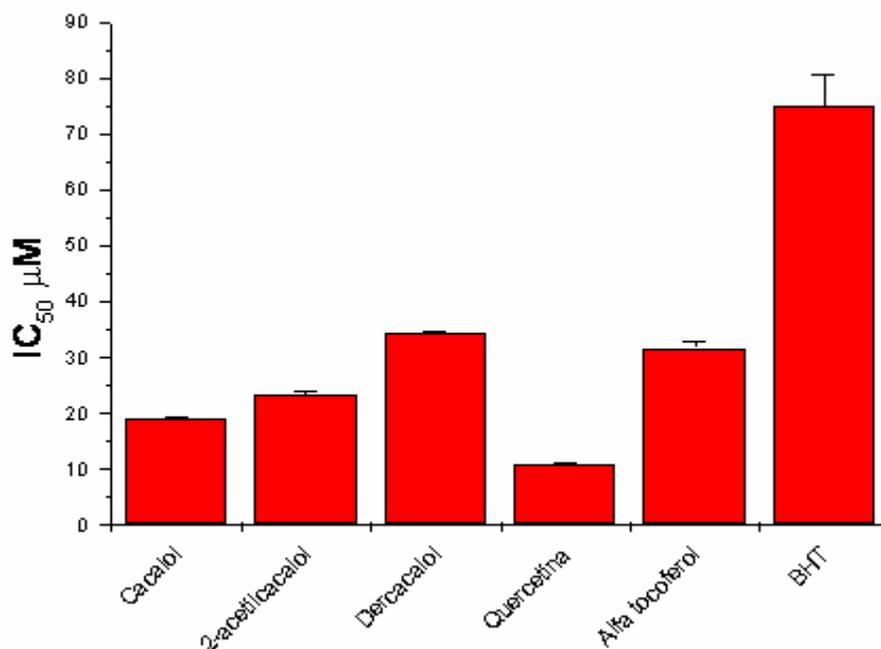
Los radicales formados por los antioxidantes, son rara vez vistos en el espectro de RPE.

Para el caso del método espectrofotométrico el ensayo se realizó con los compuestos (1, 4 y 9), y se compararon con tres antioxidantes conocidos los cuales eran quercetina, α -tocoferol y BHT.

Los resultados para las distintas concentraciones de los compuestos están representados en la gráfica 1, y las IC_{50} en la gráfica 2.



Gráfica 1.- % de reducción del DPPH con cacalol (1), 2-acetil cacalol (4) , 2-hexanil cacalol (9), quercetina, α -tocoferol y BHT.



Gráfica 2.- IC₅₀ (micromolar) con radical DPPH, para cacalol (1), 2-acetil cacalol (4), 2-hexanil cacalol (9), quercetina, α-tocoferol y BHT.

Al igual que por EPR, en el ensayo espectrofotométrico se observa buena actividad secuestrante para el cacalol⁽¹⁾, 2-acetil cacalol⁽²⁾ y 2-hexanil cacalol⁽⁹⁾.

La actividad del cacalol (IC₅₀= 18.99) y el 2- acetil cacalol (IC₅₀= 23.44), solo es superada por la quercetina (IC₅₀= 10.89), el 2- hexanil cacalol (IC₅₀= 34.41) muestra una actividad parecida al α-tocoferol (IC₅₀= 31.74), y los tres compuestos obtenidos superan por mucho la actividad mostrada por el BHT (IC₅₀= 74.91).

La quercetina ha sido ampliamente estudiada y ha mostrado tener una buena actividad secuestrante de radicales libres, por lo que los resultados obtenidos para el cacalol y sus derivados son interesantes por que nos indican que tienen también buena actividad secuestrante, y esto permite seguir realizando más ensayos sobre actividad antioxidante.

Por el método de actividad secuestrante de radical DPPH se observa que la actividad disminuye drásticamente cuando se protege el fenol del cacalol; sin embargo cuando se adiciona un sustituyente en la posición 2 del cacalol también disminuye la actividad, solo que en este caso la disminución es pequeña y su actividad sigue siendo aceptable aún en comparación con la actividad de los antioxidantes conocidos con los que se compararon en este caso, en particular la actividad del cacalol (antioxidante natural) contra la actividad del BHT (antioxidante sintético).

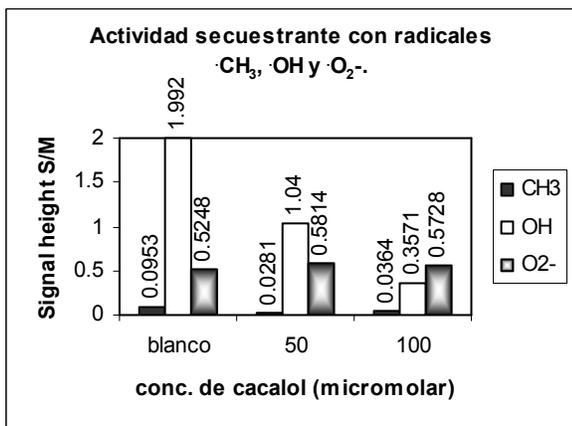
El término de IC₅₀ usado en este método, no debe confundirse con el usado en una prueba biológica, ya que los radicales de DPPH no son representativos de los formados en sistemas biológicos, además esta prueba solo indica la capacidad de secuestrar radicales libres pero no el tipo de radicales en los que actúa el antioxidante.

7.2.2.- Actividad secuestrante sobre radicales ·OH, O₂⁻, Y ·CH₃.

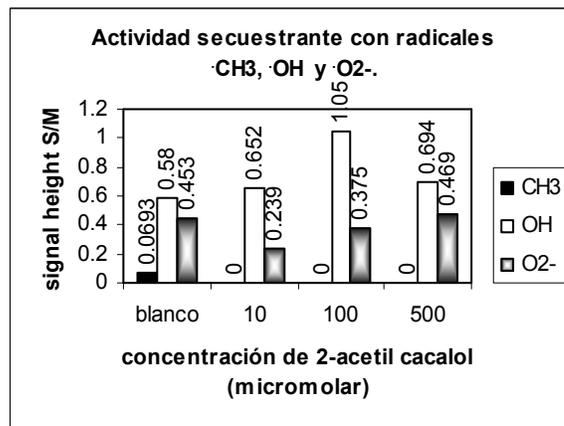
Debido a los buenos resultados obtenidos por los compuestos (1 y 4) en la prueba de actividad secuestrante de radical libre DPPH, se decidió realizar con ellos la prueba de actividad secuestrante de radicales libres centrados en carbono (·CH₃) y en oxígeno (·OH, O₂⁻) por la técnica de RPE.

Los espectros obtenidos por RPE se muestran en el apéndice.

Las gráficas 3 y 4 muestran los valores de S/M para las diferentes concentraciones de los compuestos (1 y 2), y el porcentaje de actividad secuestrante de radicales ·CH₃, ·OH y O₂⁻ se presentan en la tabla 2.



Gráfica 3. Valores de S/M para diferentes concentraciones de cacalol (1).



Gráfica 4.- Valores de S/M para diferentes concentraciones de 2-acetil cacalol (4).

Muestra	Concentración (µM)	% actividad secuestrante		
		·CH ₃	·OH	O ₂ ⁻
Cacalol ⁽¹⁾	50	70.5	47.8	-
	100	61.8	82	-
2-acetil cacalol ⁽⁴⁾	10	100	-	47.2
	100	100	-	17.2
	500	100	-	-

Tabla 2.- Actividad secuestrante sobre radicales ·CH₃, ·OH y O₂⁻, del cacalol y 2- acetil cacalol

El cacalol, a las concentraciones usadas presenta buena actividad secuestrante sobre el radical metilo e hidroxilo, pero no presenta actividad sobre el radical superóxido.

El 2-acetil cacalol tiene una muy buena actividad secuestrante sobre el radical metilo ya que a todas las concentraciones usadas lo inhibe por completo, también actúa sobre el radical O₂⁻ siendo más activo a la más baja concentración; sin embargo en el caso del radical hidroxilo se ha reportado en la bibliografía (Rapta, 2005) que durante la formación de los radicales ·CH₃, ·OH y O₂⁻ en el sistema utilizado se forma también un radical ·OOH por protonación del radical O₂⁻, el cual presenta una constante de acoplamiento a un campo similar al radical ·OH, lo que hace difícil de identificarlos por separado en el espectro de RPM, por lo que el aumento del valor S/M observado en la gráfica 4 para el radical ·OH, pueda deberse a esta causa. Por ello es difícil afirmar si hay actividad sobre el radical ·OH por parte de 2-acetil cacalol, y si la hay de que magnitud es.

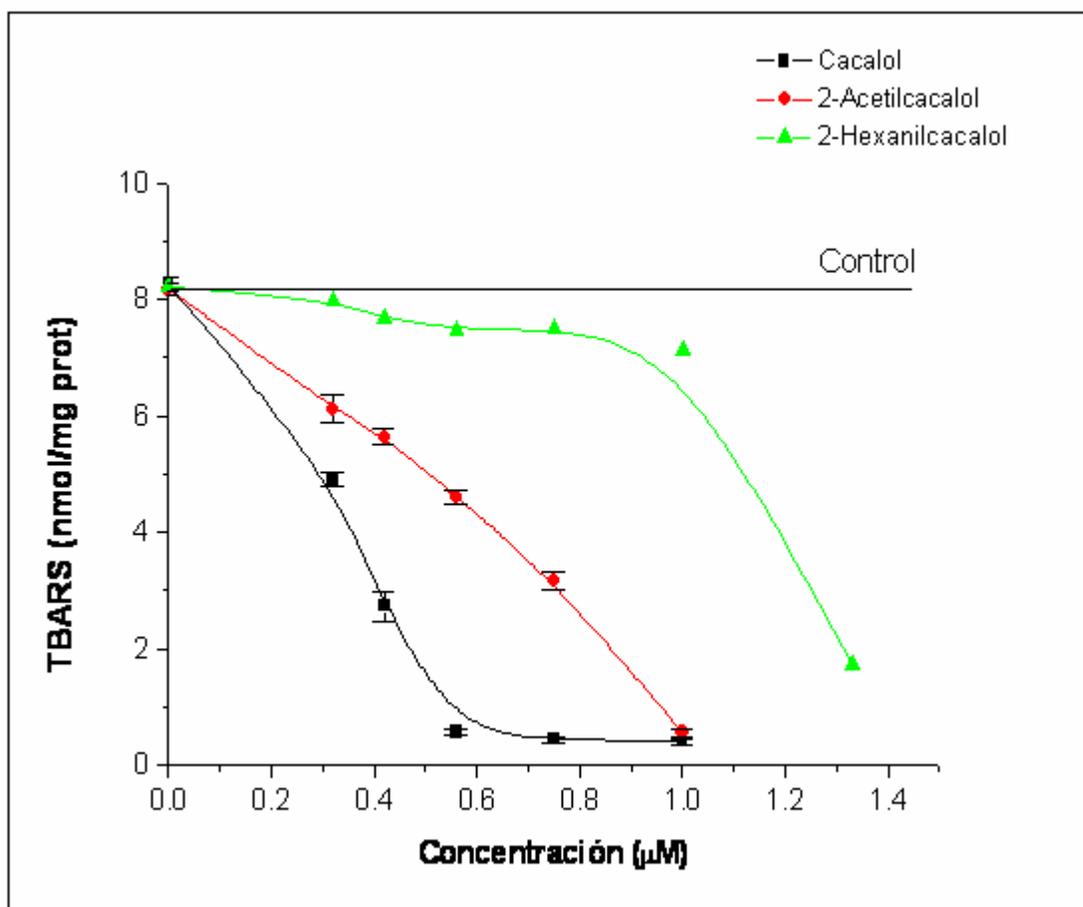
Por otro lado se puede hacer la suposición de que el cacalol también actúa sobre el radical ·OOH debido a lo observado en la gráfica 3, donde el valor de la señal para el radical ·OH disminuye.

En este ensayo se corrobora lo expresado anteriormente, que el radical DPPH solo indica la capacidad secuestrante de radicales libres, pero no el tipo de radicales sobre los que actúa un antioxidante.

También es importante decir que la adición de sustituyentes en la posición 2 del cacalol, a la vez que disminuye la actividad secuestrante de radicales libres, también cambia la afinidad del compuesto por cierto radicales como se observa en el caso del cacalol y el 2-acetil cacalol.

7.2.3.- Resultados para la prueba de TBARS.

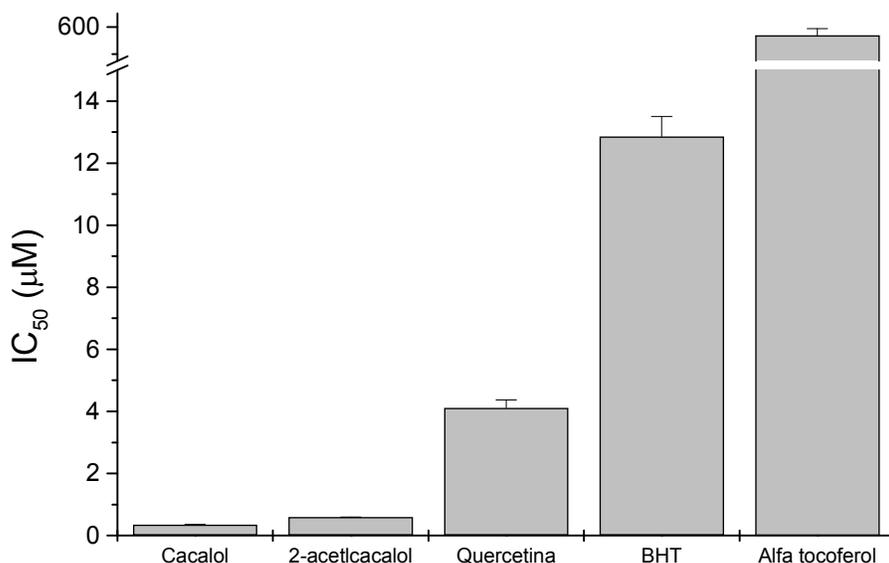
Para ver la capacidad de inhibición de la peroxidación de lípidos de los compuestos (1, 4 y 9), en este caso se llevó a cabo el ensayo de TBARS en homogeneizado de cerebro de rata, y se compararon los resultados con los obtenidos para antioxidante conocidos como quercetina, α -tocoferol y BHT. La gráfica 5 muestra el comportamiento de los compuestos (1, 4 y 9). Para este ensayo, la quercetina, el α -tocoferol y el BHT no se representan en esta gráfica ya que las concentraciones a las que inhiben son mucho más grandes. En la gráfica 5 se representan los valores de las IC_{50} para todos los compuestos. Los resultados están dados en nmol de TBARS por mg de proteína presente en el homogeneizado de cerebro de rata.



Gráfica 5.- TBARS (nmol/mg prot) para cacalol (1), 2-acetilcacalol (4) y 2-hexanil cacalol (9).

El cacalol, 2-acetil cacalol y 2-hexanil cacalol son los que presentaron la mejor capacidad de inhibición de la peroxidación, presentándose para el cacalol y el 2-acetil cacalol a una concentración de 1 μM una producción de TBARS de 0.41 y 0.56 respectivamente, y para el 2-hexanil cacalol a una concentración de 1.33 μM una producción de TBARS de 1.73. El porcentaje de inhibición de peroxidación para estas concentraciones es de 90% para el cacalol, 93.1% para el 2-acetil cacalol y 78.9% para el 2-hexanil cacalol.

La quercetina con un valor de $\text{IC}_{50} = 4.11$, tiene la mejor actividad de los tres antioxidantes con los que se comparan el cacalol y sus derivados, ya que a una concentración de 1 μM tiene una producción de TBARS de 8.33 que corresponde a 11.7% de inhibición de peroxidación de lípidos. Los resultados para todos los compuestos se encuentran en el apéndice.



Gráfica 6.- IC_{50} (μM) de la prueba de TBARS para cacalol (1), 2-acetilcacalol (4), quercetina, BHT y α -tocoferol.

La IC₅₀ del 2-hexanil cacalol no se realizó debido a que este compuesto muestra un comportamiento irregular al hacer las determinaciones de TBARS, tal como se muestra en la gráfica 5 (el ensayo se hizo tres veces y los resultados presentados son los que tuvieron mejor comportamiento).

En gráfica 6 se observa mejor la gran diferencia entre el poder de inhibición de peroxidación de lípidos del cacalol (IC₅₀= 0.35) y 2-acetil cacalol (IC₅₀= 0.59) en comparación con el de quercetina (IC₅₀= 4.11), α-tocoferol (IC₅₀= 569.09) y BHT (IC₅₀= 12.86).

Esta diferencia en los resultados despiertan el interés por el estudio del cacalol y sus derivados, ya que de acuerdo a lo reportado en la bibliografía (Cárdenas y Packer, 2002), dentro de los antioxidantes de origen natural, la quercetina y el α-tocoferol, son algunos de los que más se han estudiado y presentan un buen poder de inhibición de peroxidación de lípidos de membrana.

Hay diversos factores que influyen en el rol que juegan los antioxidantes en la inhibición de la peroxidación de lípidos aparte de la capacidad de transferir un ión hidrógeno al radical peroxilo de los lípidos, estos son, la liposolubilidad, capacidad quelante de iones hierro y la localización del antioxidante en la membrana de la célula (Chantal, 2002); futuros estudios podrían comprobar el nivel al que actúan el cacalol, 2-acetil cacalol y el 2-hexanil cacalol, y demostrar el por que de su alto poder de inhibición de peroxidación de lípidos.

Los resultados obtenidos para el cacalol y sus derivados, los hacen buenos candidatos para ser tomados en cuenta como antioxidantes, si bien no para la preservación de alimentos debido a sus bajos rendimientos, si para alguna otra aplicación en la que se necesiten en cantidades menores, siempre y cuando se les realicen los estudios necesarios; también estos resultados en conjunto con las propiedades que se le han encontrado al cacalol motivan a que se siga estudiando este compuesto, que se sigan obteniendo más derivados, que se promueva más a fondo el estudio de la *Psacalium decompositum* (Matarique) para ver si a futuro se puede producir esta en cantidades mayores y ya no solo obtenerla de forma silvestre, que se estudien vías de síntesis del cacalol más sencillas a las existentes; en fin cualquiera de estas posibilidades resulta interesante para seguir ampliando el conocimiento del Matarique y del cacalol.

8.- CONCLUSIONES.

- Los compuestos cacalol, 2-acetil cacalol y 2-hexanil cacalol, presentan buena actividad antioxidante, secuestrando radicales libres e inhibiendo la peroxidación de lípidos.

- La protección del grupo –OH del fenol del cacalol anula prácticamente su actividad antioxidante.

- La adición de los sustituyentes utilizados en la posición 2 del cacalol, modifica la actividad antioxidante, así como también se modifica la afinidad por ciertos radicales.

- Los derivados del cacalol: 2-acetil cacalol y 2-hexanil cacalol son inestables ante la presencia de la luz y el oxígeno a temperatura ambiente, por lo que la adición de los sustituyentes empleados no mejoró su estabilidad; sin embargo al proteger el grupo hidroxilo se obtiene un compuesto estable como el acetato de cacalol, pero este no presenta actividad antioxidante.

9.- BIBLIOGRAFÍA.

- Alarcón, F., Roman, R., Reyes, R., González, B., Flores, J. (1997) Effects of three Mexican medicinal plants (Asteraceae) on blood glucosa levels in mice and rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*. 55, 171-177.
- Amarowics, R., Pegg, R., Rahimi-Moghaddam, P. (2004) Free radicals scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species the Canadian prairies. *Food Chemistry*. 84, 551-562.
- Ancerewicz, J., Migliavacca, E., Corrupt, P., Testa, B., (1998) Structure property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free radical biology and medicine*. 25, 113-120.
- Argueta, A., Zolla, C. Diccionario enciclopédico de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista. 1ª ed. 1993.
- Aruoma, O. (1998) Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *JAOCS*. 75, 199-209.
- Azizah A., Nik, N., Swee, T. (1999) Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. *Food Chemistry*. 64, 199-202.
- Buhler, J. (1973) Reaction of lithium alkyls with aldehydes and ketones. A general study. *Journal of Organic Chemistry*. 38,
- Cárdenas, E., Packer, L. Handbook of antioxidants. Ed. Marcel Dekker, Inc. 2002.
- Cavin, A., Hostettmann, K. (1998) Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. *Planta medica*. 64, 393-396.
- Chantal, H., Haenen, G. (2002) Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. *Free Radicals Research*. 36, 575-581.
- Dotan, Y., Lichtenberg, D. (2004) Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research*. 43, 200-227.
- El-Massry, K., El-Ghorab, A., Farouk, A. (2002) Antioxidant activity and volatile components of Egyptian *Artemisa judaica* L. *Food Chemistry*. 79, 331-336.
- Fennema, O. Química de los alimentos. Ed. Acribia. 1993.
- Fernández J., Pérez. (1997) Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*. 59, 345-353.

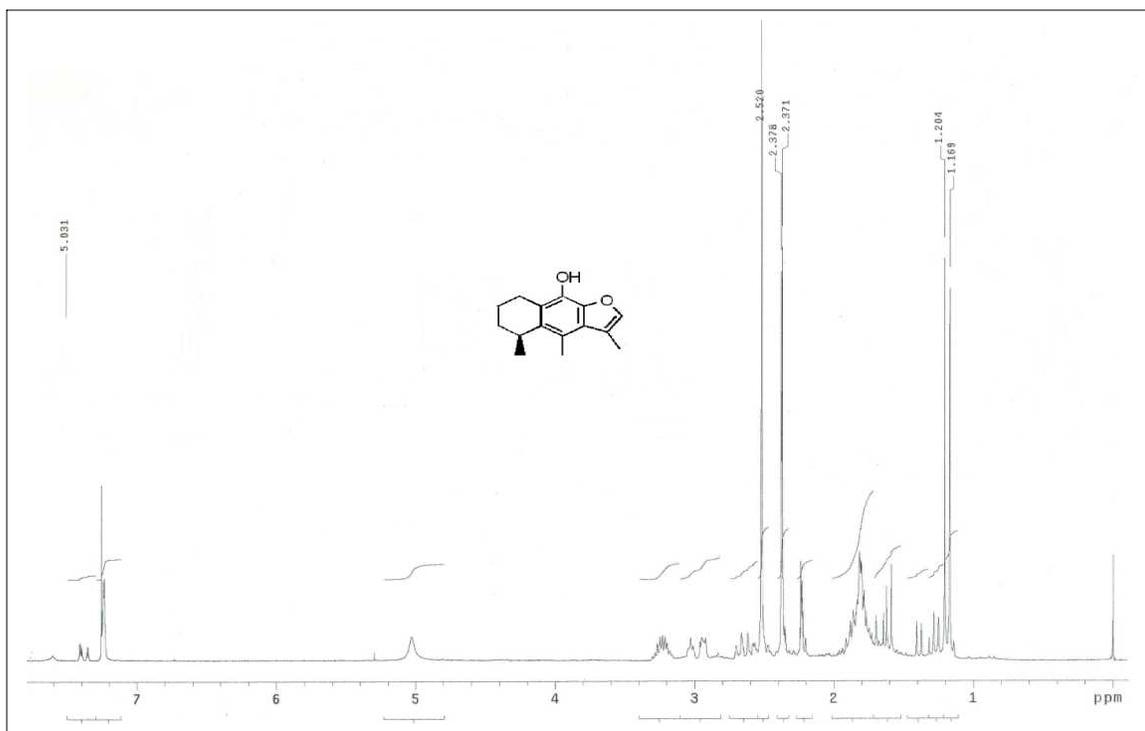
-
- Flores Álvarez Dulce María. 2003. Antioxidantes naturales derivados de la cáscara de la uva. Tesis de licenciatura. Facultad de Química UNAM.
 - Gray, J. (1978) Measurement of lipid oxidation: a review. *JAOCS*. 55, 539-546.
 - Hansberg, W. (2002) Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje bioquímico*. 26, 19-54.
 - Jiménez, M., Váldez, J., León, J., Alarcón, J., Biserka, S. (1992) Actividad antimicrobiana del cacalol y sus derivados. *Rev. Latinoamer. Quim.* 23/1 and 23/4, 14-17.
 - Kanner, J. (1977) Prooxidant and antioxidant effects ascorbic acid and metal salts in a β -caroteno linoleate model system. *Journal of Food Science*. 42, 60-64.
 - Kazutochi, S., Mari, K. (2004) Potent antioxidative activity of cacalol, a sesquiterpene contained in *Cacalia delphinifolia* sleb et zucc. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1393-1394.
 - Kulisik, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M. (2004) Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*. 85, 633-640.
 - Madhavi, D., Deshpande, S., Salunke, D. Foods antioxidants. Ed. Marcel Dekker, Inc. 1996.
 - Martínez, S., González, J. (2002) Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 17, 271-278.
 - McCarthy, T., Kerry, J. (2001) Evaluation of the antioxidant potential of natural foodplant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. *Meat Science*. 57, 45-52.
 - McMurry, J. Química orgánica. Ed. Gpo. Editorial Iberoamerica S.A. de C.V. 1994.
 - McOmie, J., Watts, M., West, D. (1968) Demethylation of aril methyl ethers by boron tribromide. *Tetrahedron*. 24, 2289-2292.
 - Mohd, Z., Abdul-Hamid, A., Osman, A. (2002) Antioxidative activity of extracts from Menkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. *Food Chemistry*. 78, 227-231.
 - Molineux, P. (2004) The use of the stable free radical DPPH for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26, 211-219.
 - Moure, A., Franco, D., Sineiro, J. (2002) Evaluation properties of methanolic extracts from Genuina avellana hulls as antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3890-3897.

-
- Munir, O., Ilhami, G., Irfan, O. (2003) Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensm.-Wiss U.-Technol.* 36, 263-271.
 - Okezie, I., Aruoma, G., Halliwell, B. Free radicals and food additives. Ed. Taylor and Francis. 1991.
 - Omura, K. (1993) Antioxidant synergism between butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *JAOCS.* 72, 1565-1572.
 - Palovka, M., Bresova, V. (2003) Antioxidant properties of tea investigated by EPR spectroscopy. *Biophys. Chem.* 106, 39-47.
 - Paquette, L. Enciclopedia of reagents for organic synthesis. Ed. John Willey and Sons. 1995.
 - Pérez, T. G. (2003) Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev. Cub. Invest. Biomed.* 22, 48-57.
 - Qiong, G., Steven, Y. (2003) Separation and identification of DMPO adducts of oxygen centered radicals formed from organic hydroperoxides by HPLC-ESR, ESI-MS and MS/MS. *J. Am. Soc. Mass. Spect.* 14, 862-871.
 - Rapta, P., Polovka, M. Zalibera, M. (2005) Scavenging and antioxidant properties of compounds synthesized by carotenogenic yeast stressed by heavy metals EPR spin trapping study. *Biophysical Chemistry.* 116, 1-9.
 - Reynoso Ocampo Carlos Abraham. 1998. Los antioxidantes en los alimentos perspectivas de aplicación. Tesis de licenciatura. FES Cuahutitlan, UNAM.
 - Rodríguez, K., Céspedes, E. (1999) Estrés oxidativo y envejecimiento. *Rev. Cub. Invest. Biomed.* 18, 67-76.
 - Rodríguez, J., Menéndez, J. (2001) Radicales libres en la biomedicina y el estrés oxidativo. *Rev. Cub. Med. Milit.* 30, 36-44.
 - Romo, J., Joseph-Nathan, P., Morales, J. (1966) Contribution the chemistry of cacalol. *Tetrahedron.* 22, 301-307.
 - Rossato, J., Ketzer, L. (2002) Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochemical Research.* 27, 297-303.
 - Santamaría Jiménez Sair. 2002. Aprovechamiento de la semilla de uva como fuente de aceite y antioxidantes naturales. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
 - Shafiur, M. Manual de conservación de los alimentos. Ed. Acibia. 2003.

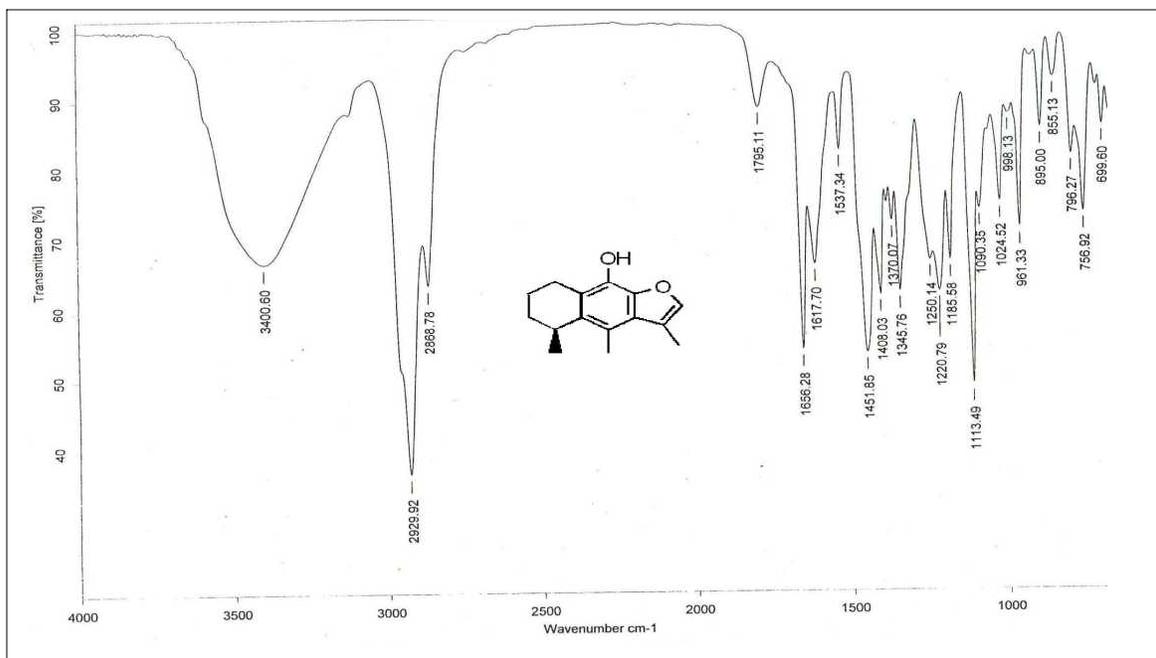
-
- Sies, H., Stahl, W. (1995) Vitamins E and C, beta- carotene and other carotenoids as antioxidant. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 210-215.
 - Smith, M. Organic synthesis. Ed. Mc Graw Hill. 1996.
 - Soto Hernández Aida. 2002. Evaluación de la actividad antimicrobiana del cacalol y sus derivados. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
 - Tafoya Saenz Ernesto. 1984. Fotólisis del cacalol y sus derivados. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
 - Yoshimura, Y., Tomoko, I. (1999) Evaluation of free radical scavenging activities of antioxidants with H₂O₂/NaOH/DMSO system by electron spin resonance. *J. Agric. Food. Chem.* 47, 4653-4656.
 - Yasunori, O., Yuya, T. (2005) Determination of the reaction rate constants of antioxidants with the hydroxyl radical by a rapid flow ESR method. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 78, 1757-1762.
 - Wheatey, R. (2000) Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation. *Trend in Analytical Chemistry.* 19, 617-628.
 - Wong, D. Química de los alimentos, mecanismos y teoría. Ed. Acribia S.A. 1989.
 - Yen, G., Duh, P. (1993) antioxidative properties of methanolic extracts from Peanut hulls. *JAOCS.* 70, 383-387.

10.- APÉNDICE

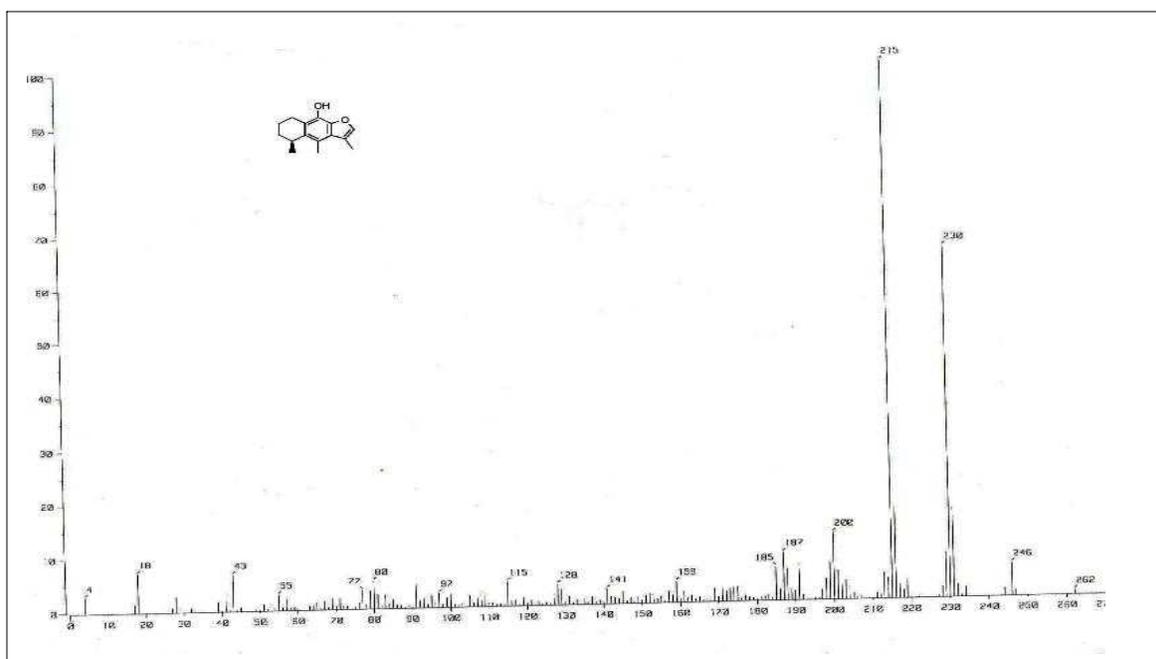
Espectro de RMN ^1H del cacalol⁽¹⁾.



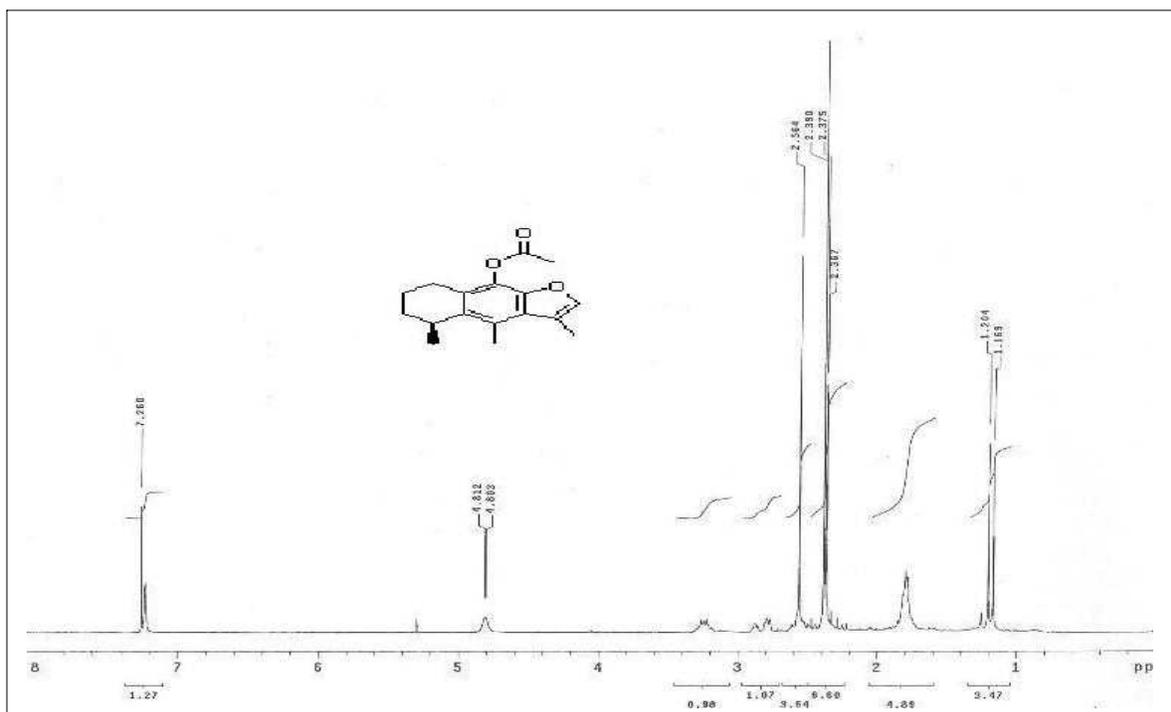
Espectro de IR del cacalol⁽¹⁾.



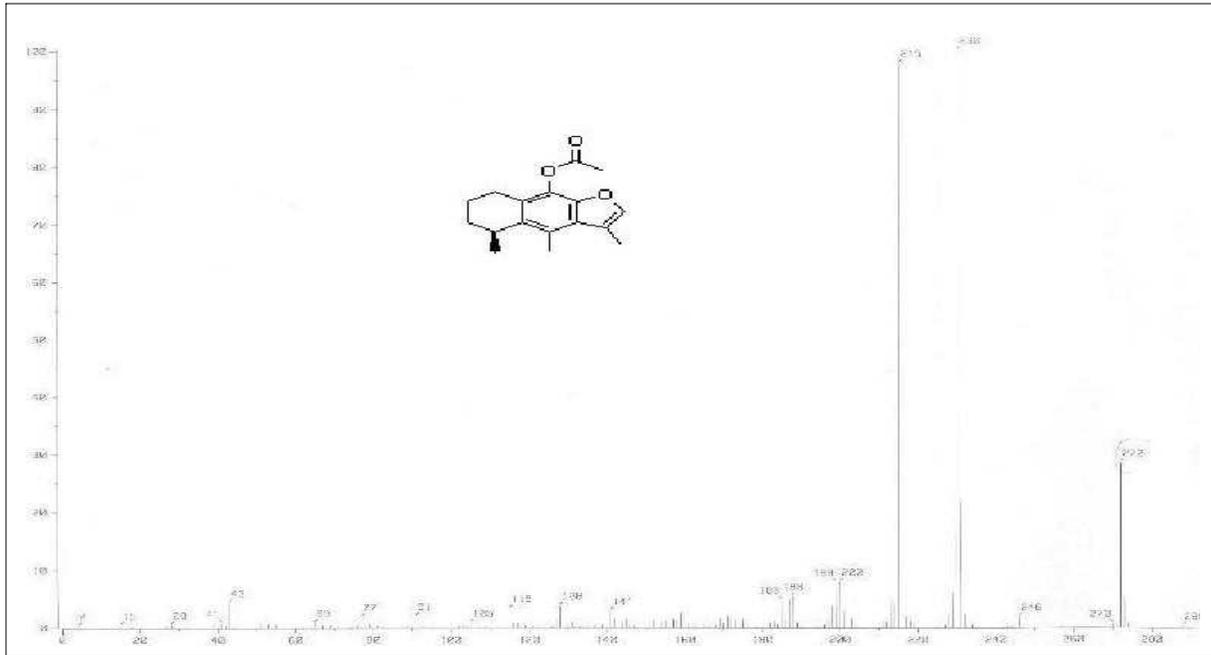
Espectro de EM del cacalol⁽¹⁾.



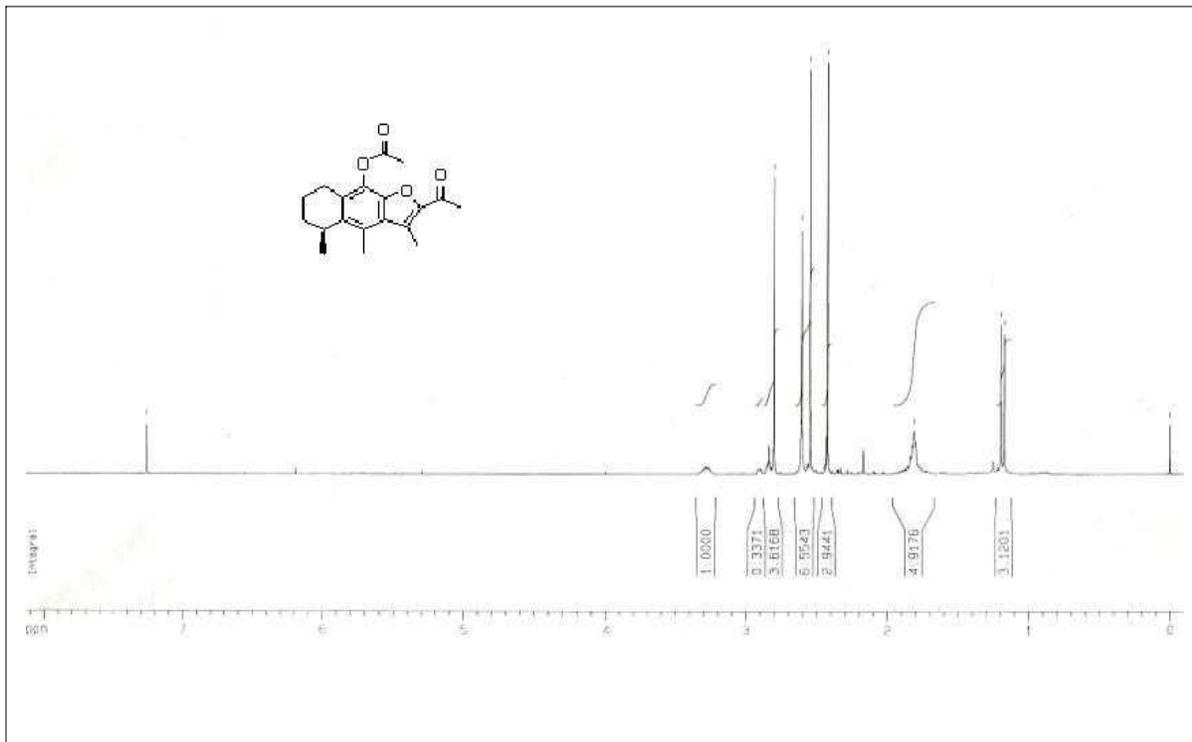
Espectro de RMN ¹H del acetato de cacalol⁽²⁾.



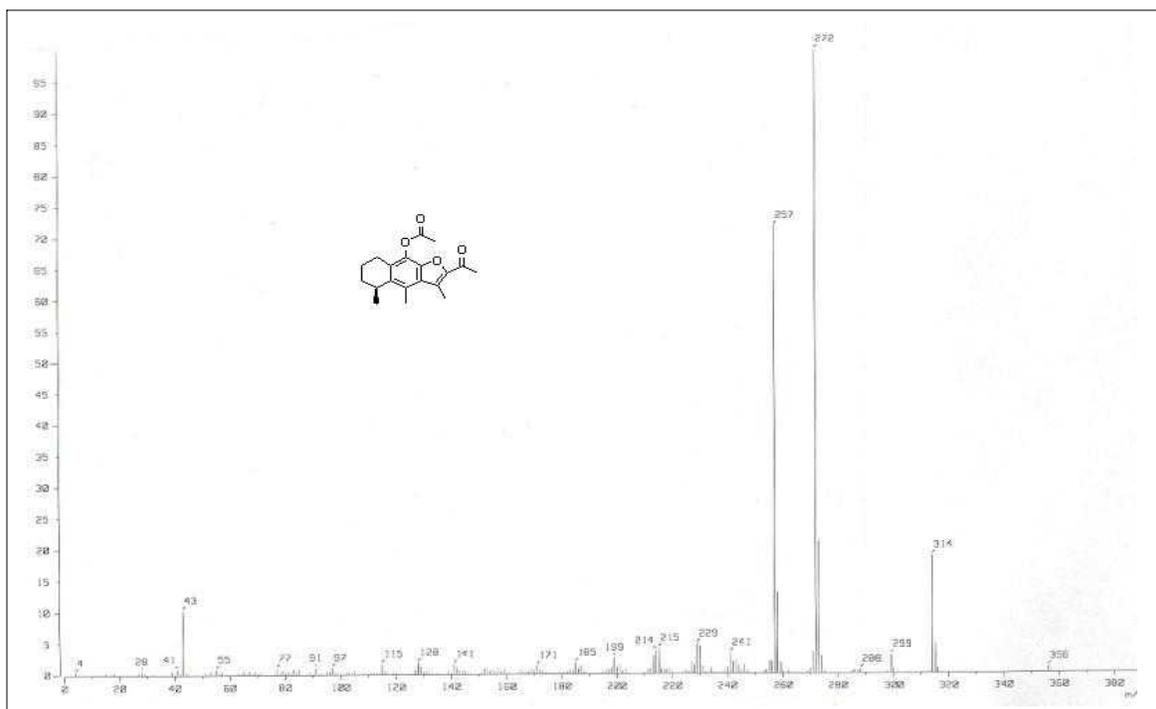
Espectro de EM del acetato de cacalol⁽²⁾.



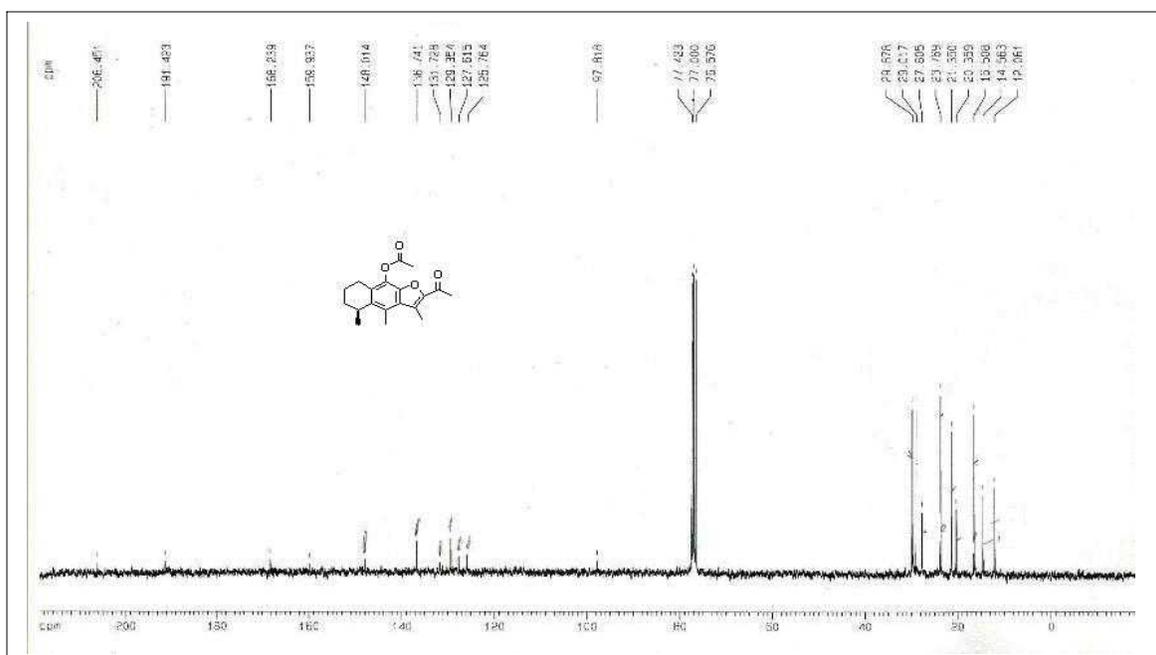
Espectro de RMN ¹H del 2- acetil acetato de cacalol⁽³⁾.



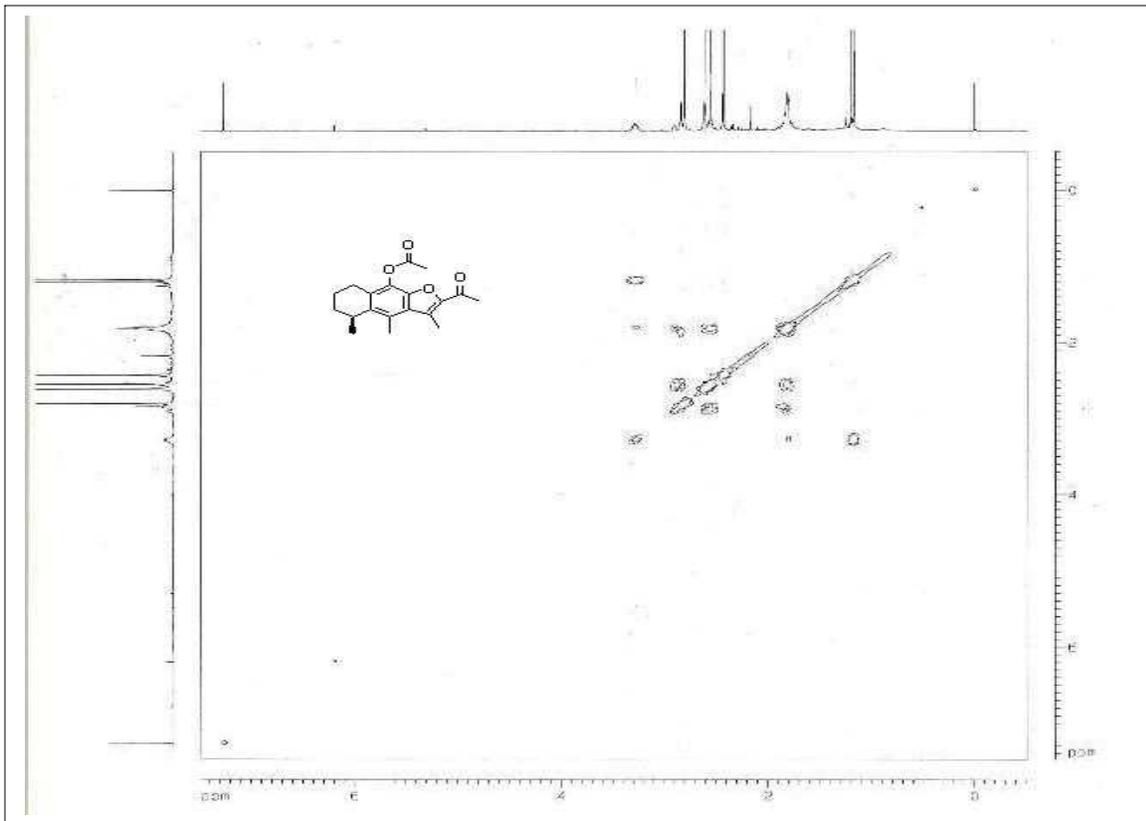
Espectro de EM del 2- acetil acetato de cacalol⁽³⁾.



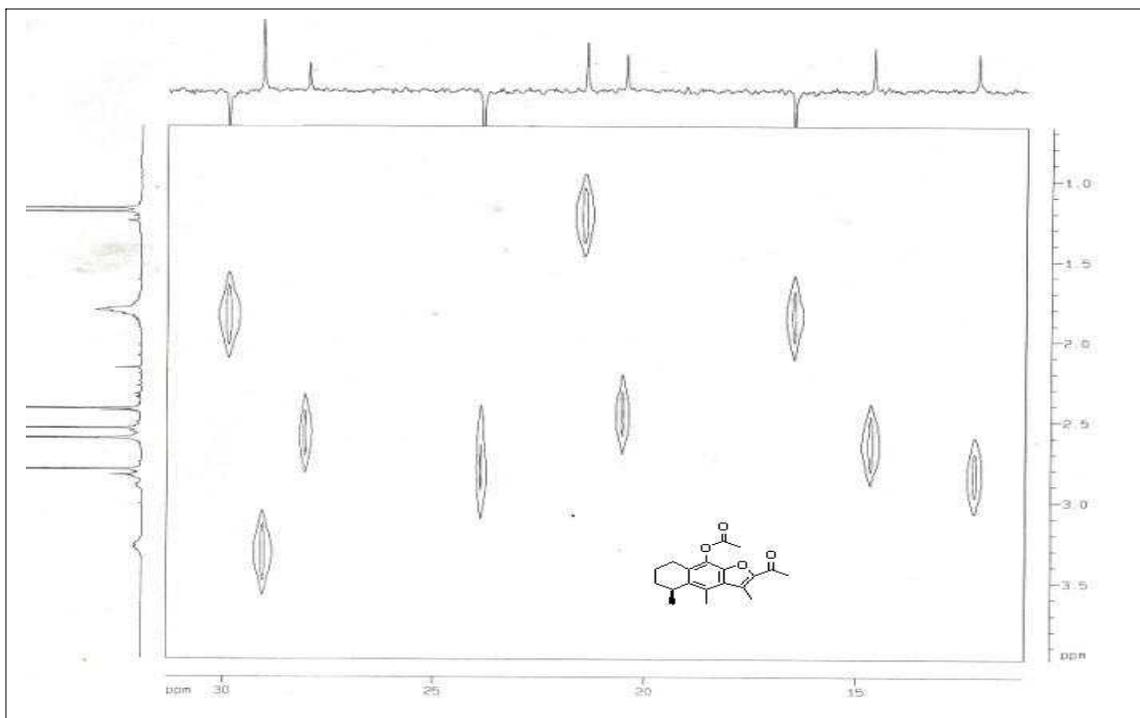
Espectro de RMN ¹³C del 2-acetil acetato de cacalol⁽³⁾.



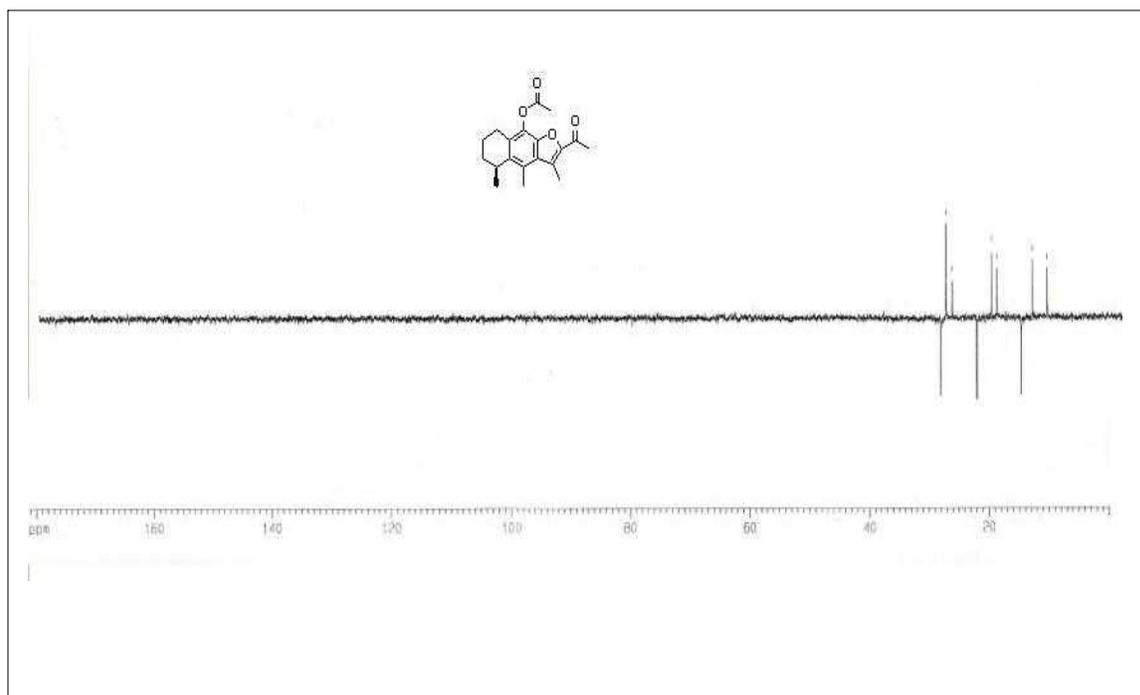
Espectro COSY del 2-acetil acetato de cacalol⁽³⁾.



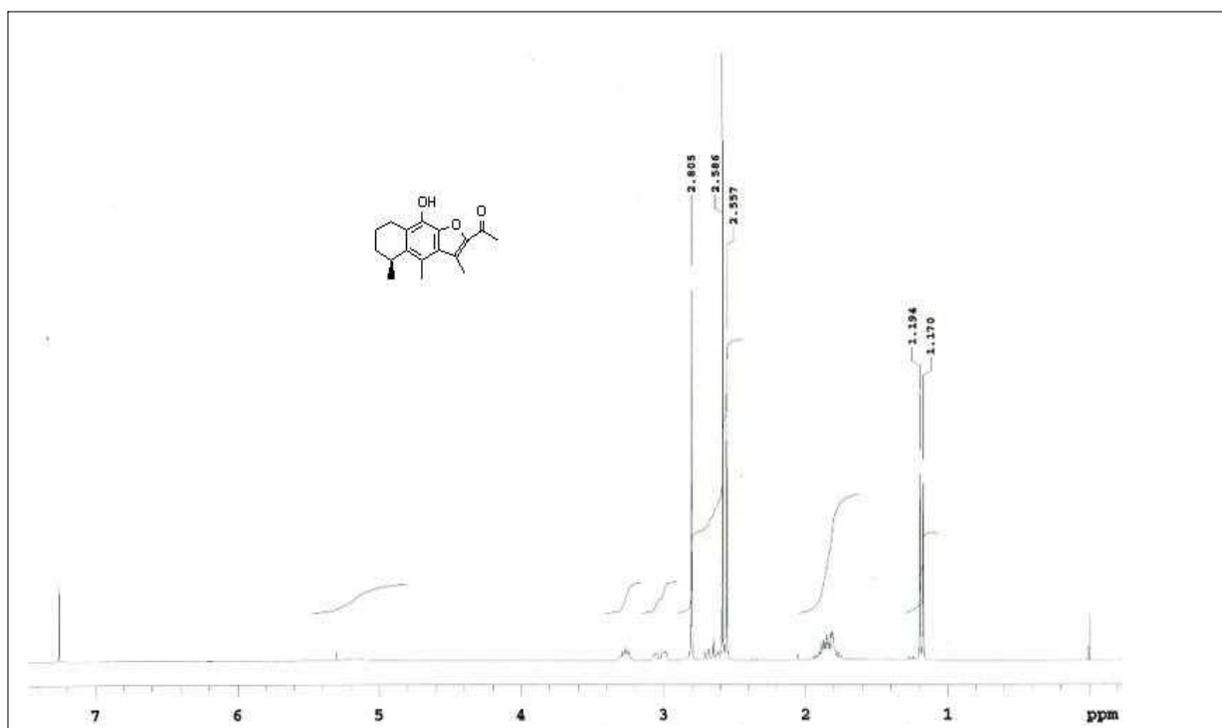
Espectro HETCOR del 2-acetil acetato de cacalol⁽³⁾.



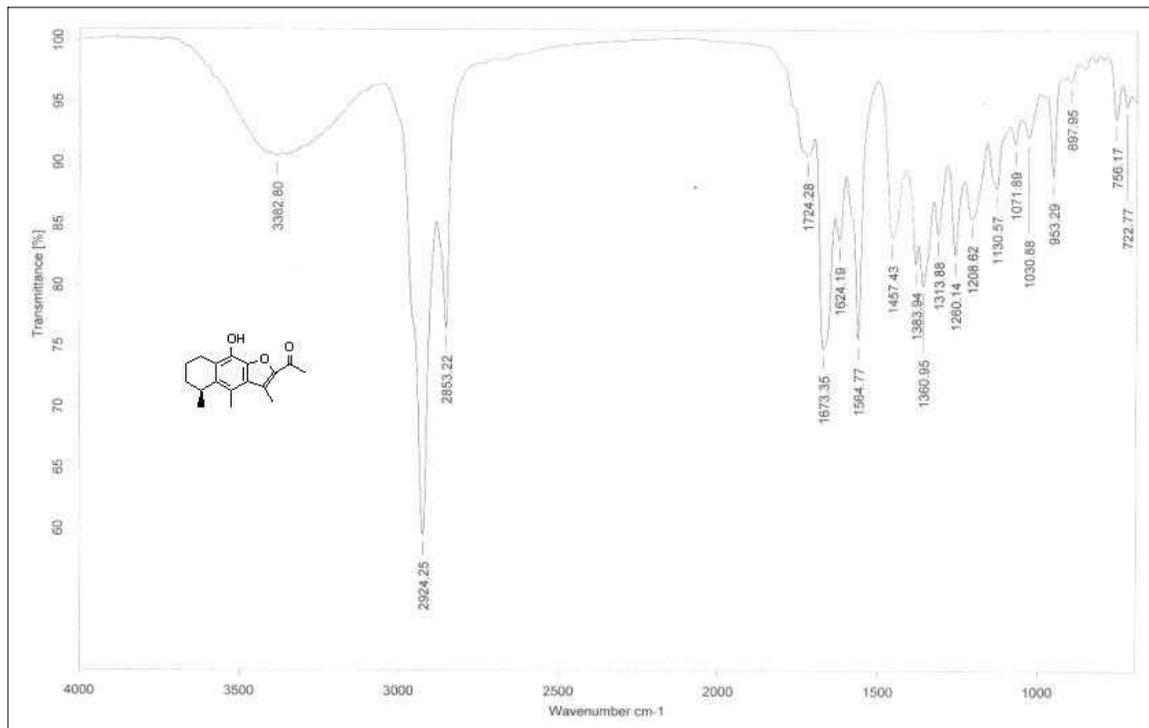
Espectro Dept del 2-acetil acetato de cacalol⁽³⁾.



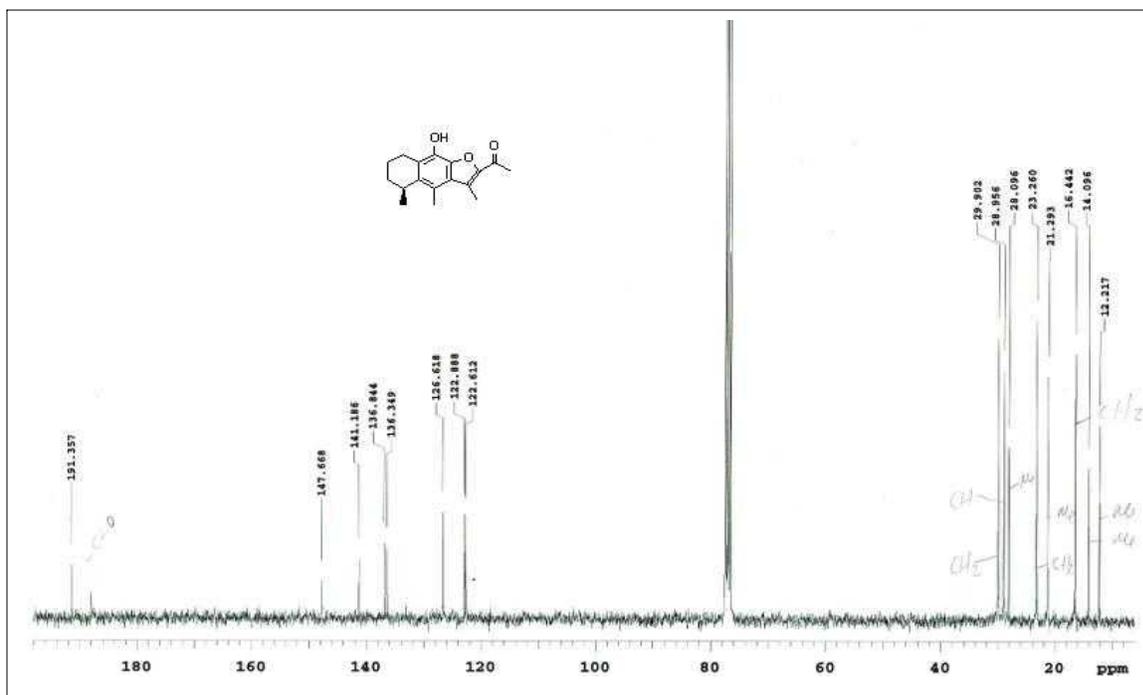
Espectro de RMN ¹H del 2- acetil cacalol⁽⁴⁾.



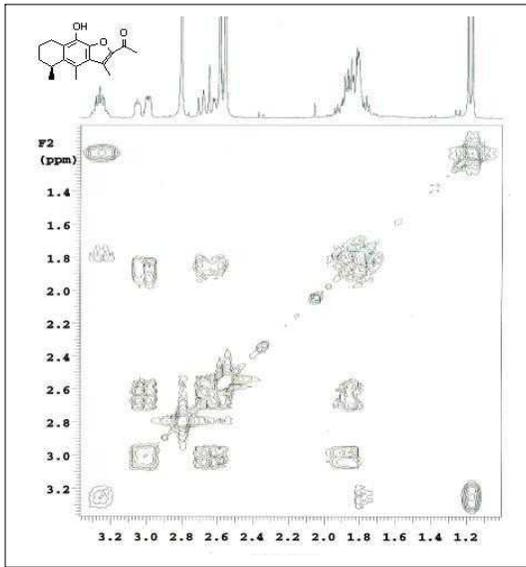
Espectro de IR del 2- acetil cacalol⁽⁴⁾.



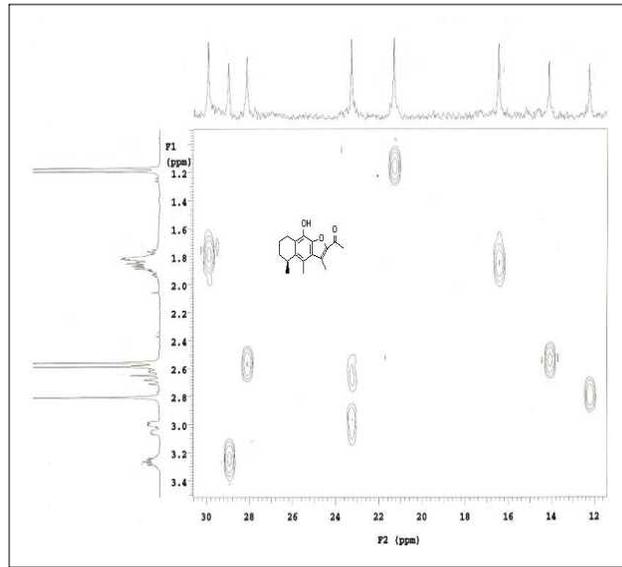
Espectro de RMN ¹³C del 2-acetil cacalol⁽⁴⁾.



Espectros de COSY (1) y HETCOR (2) del 2-acetil cacalol⁽⁴⁾.

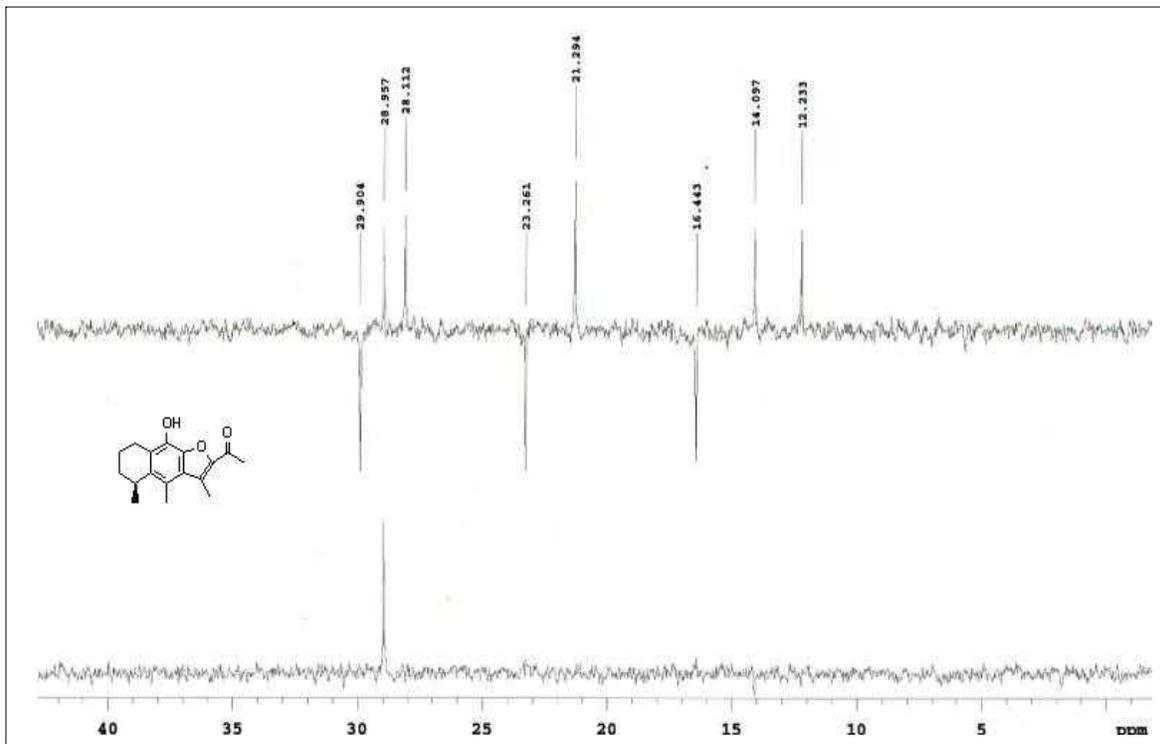


1

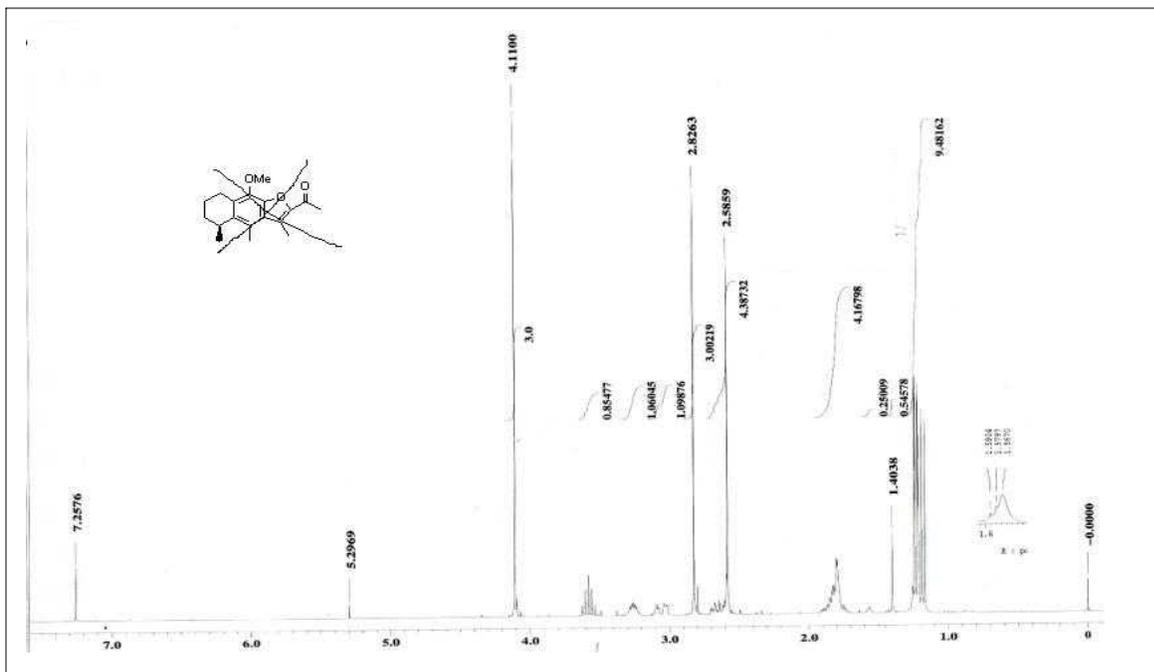


2

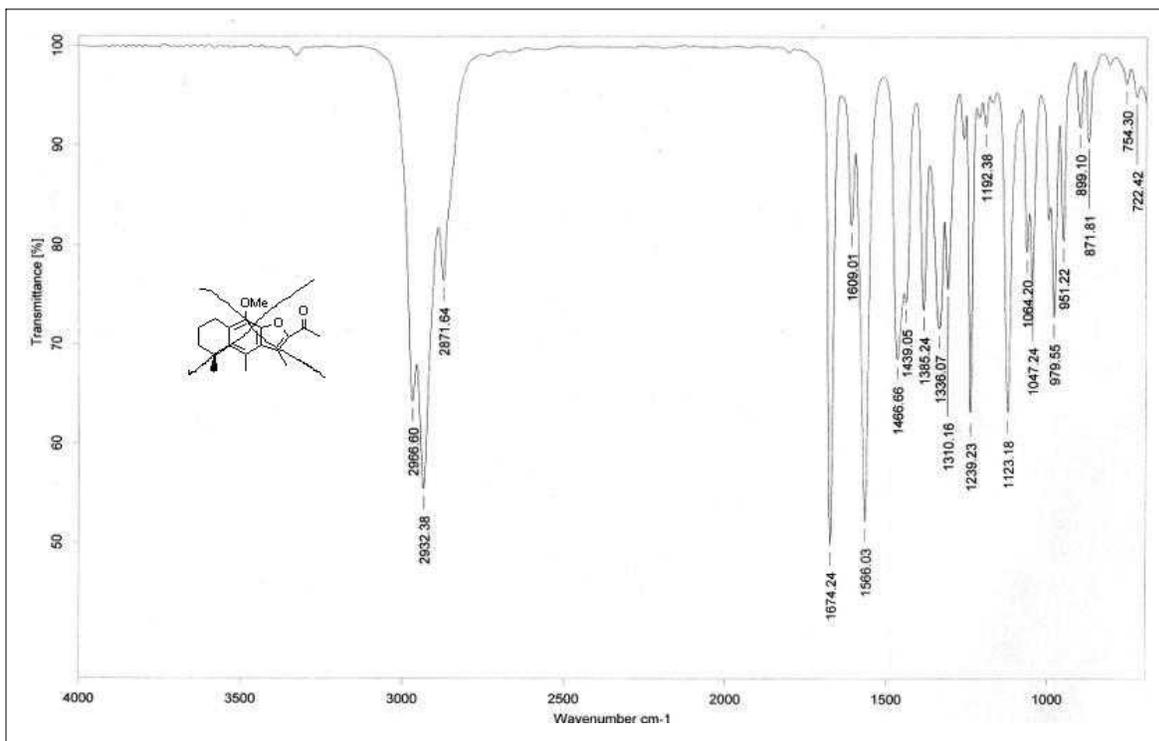
Espectro de DEPT del 2- acetil cacalol⁽⁴⁾.



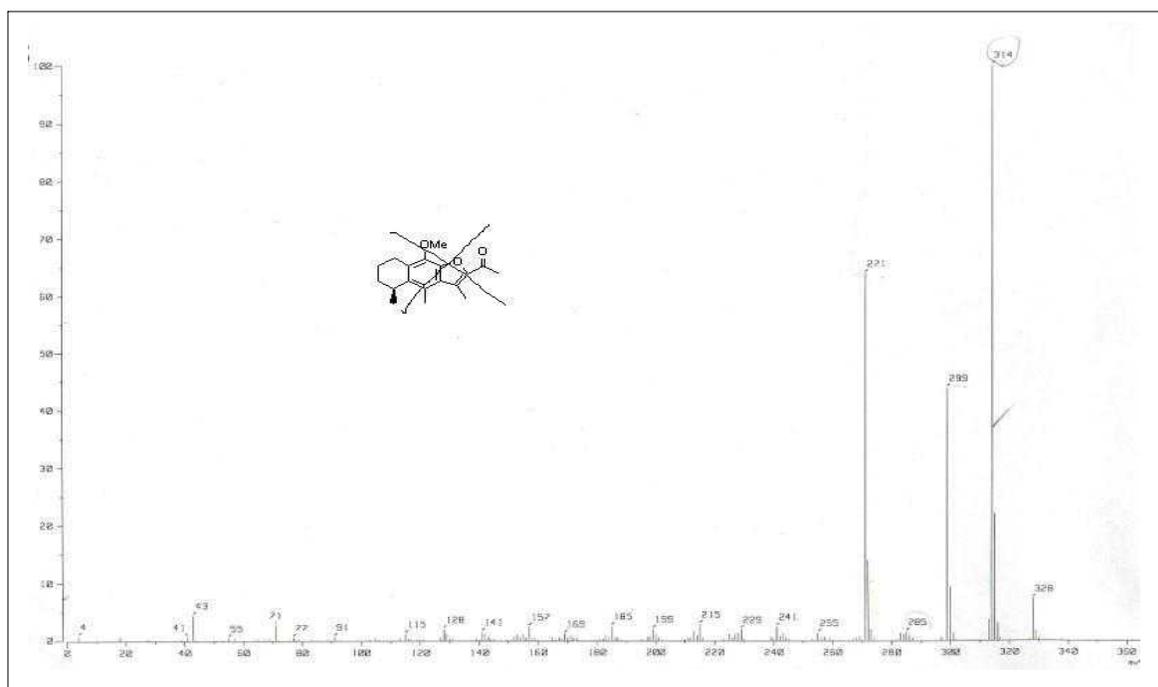
Espectro de RMN H¹ del producto de reacción del punto 6.5.2.6.



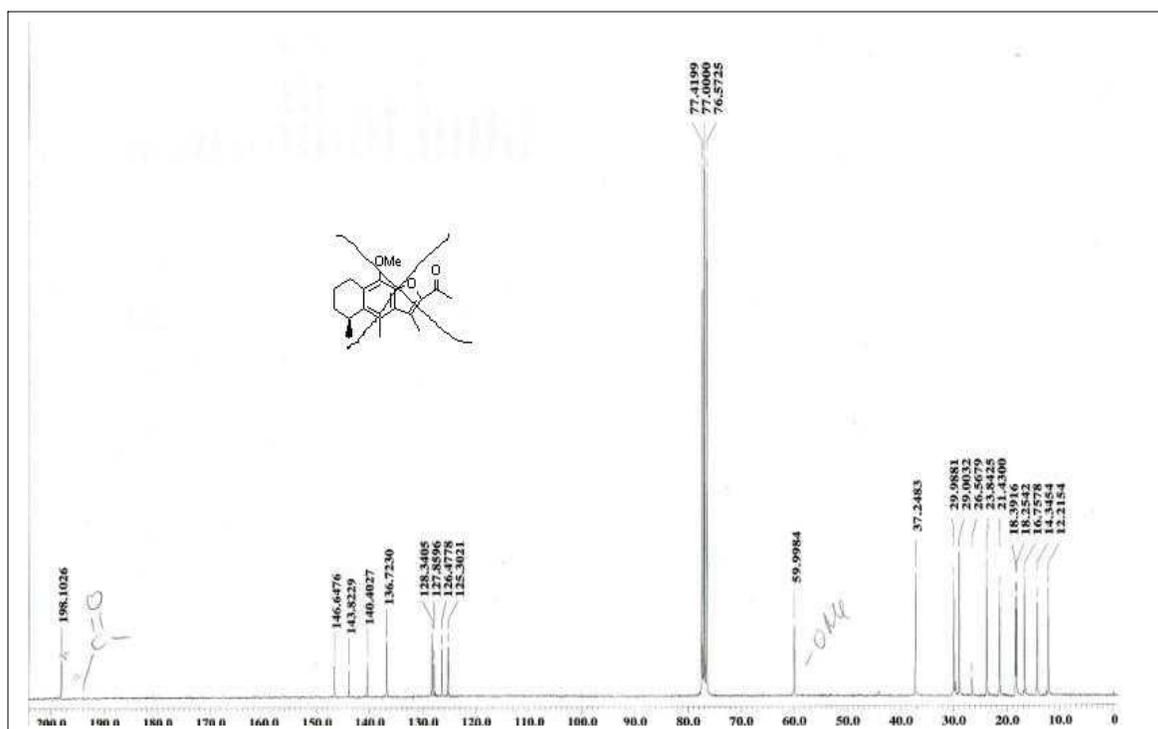
Espectro de IR del producto de reacción del punto 6.5.2.6.



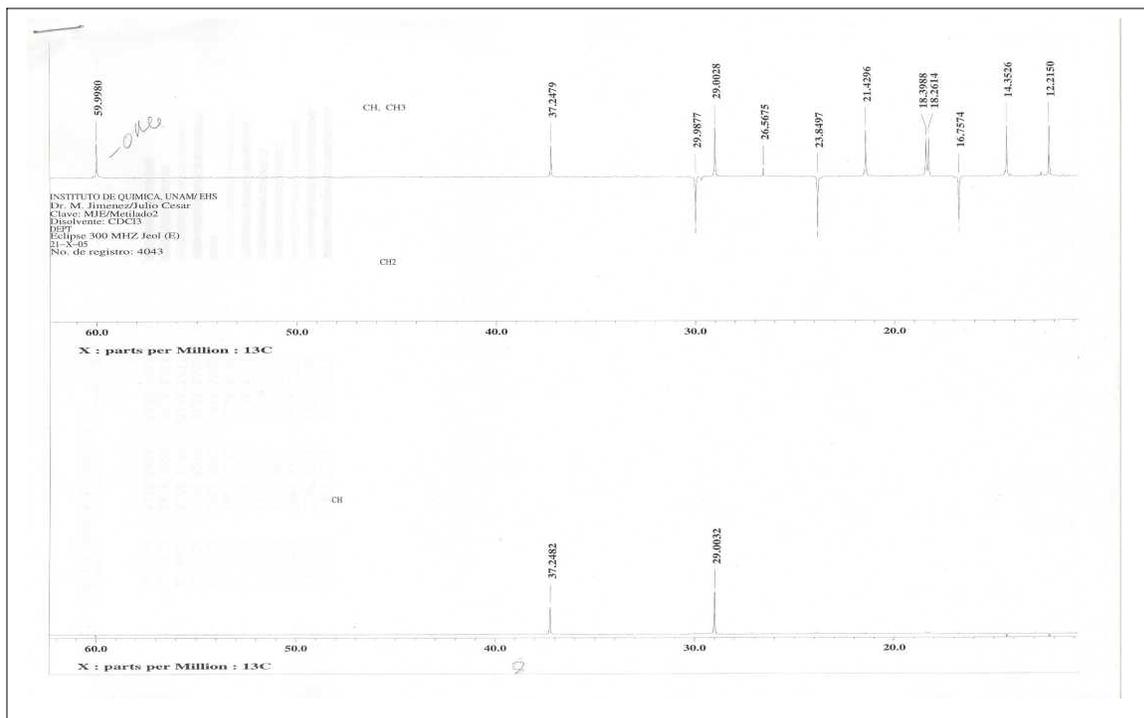
Espectro de EM del producto de reacción del punto 6.5.2.6.



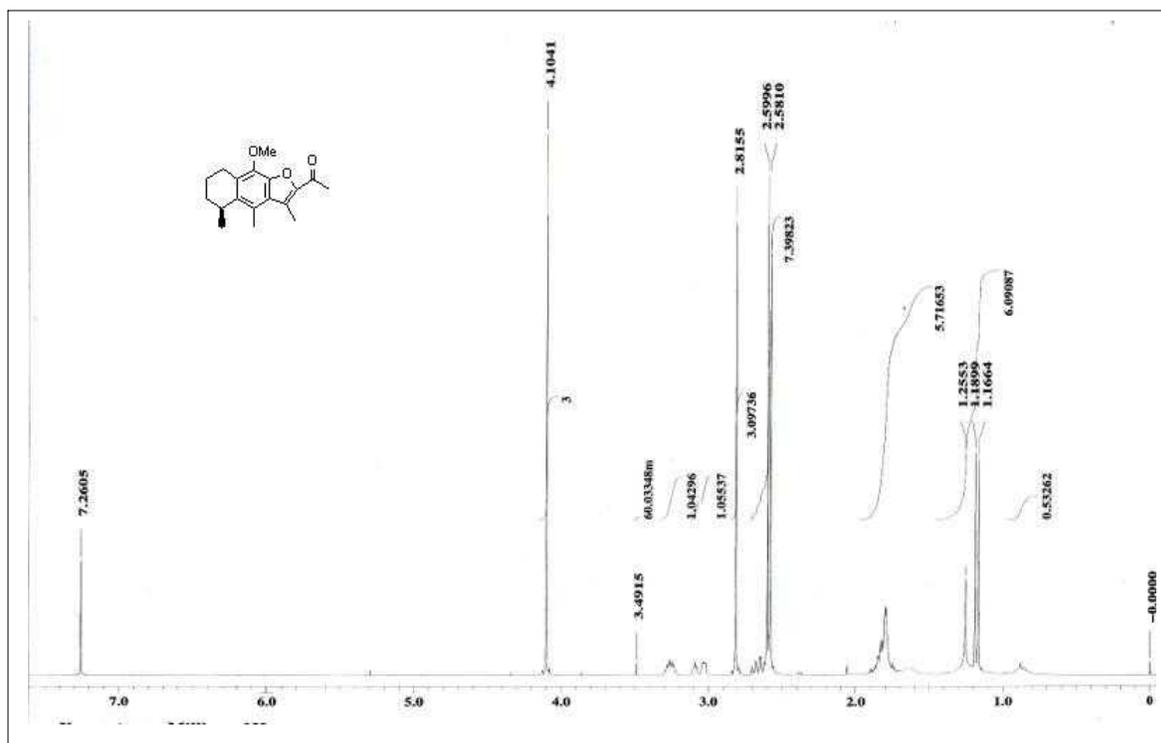
Espectro de RMN ¹³C del producto de reacción del punto 6.5.2.6.



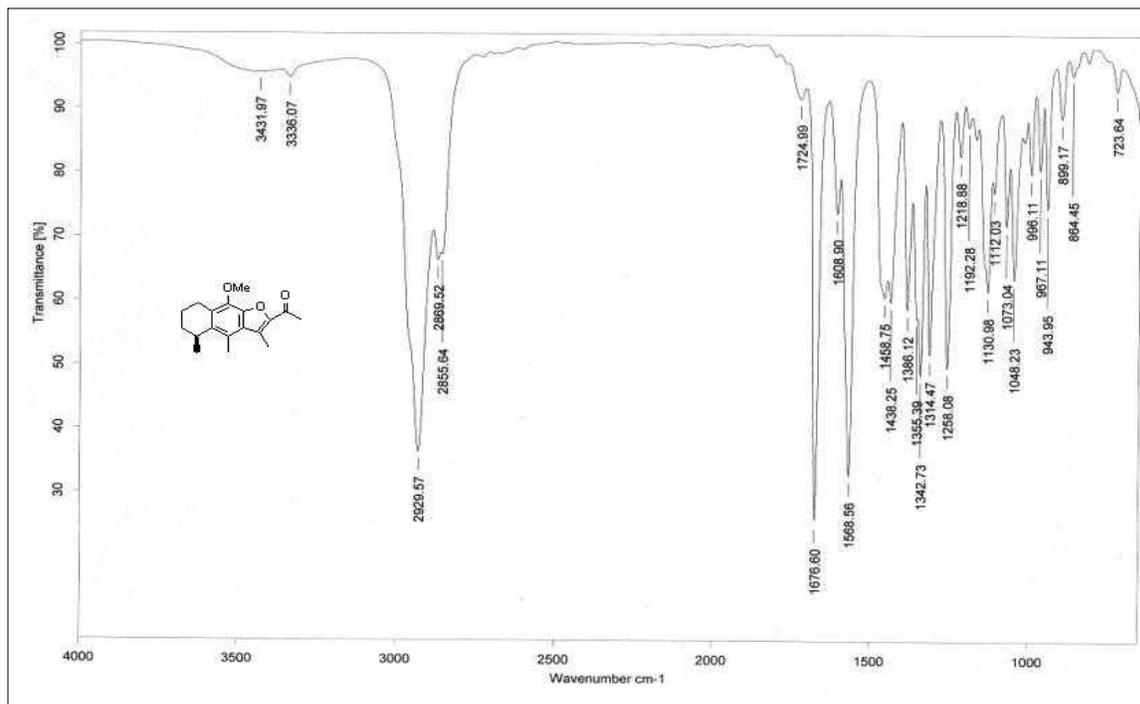
Espectro de DEPT del producto de reacción del punto 6.5.2.6.



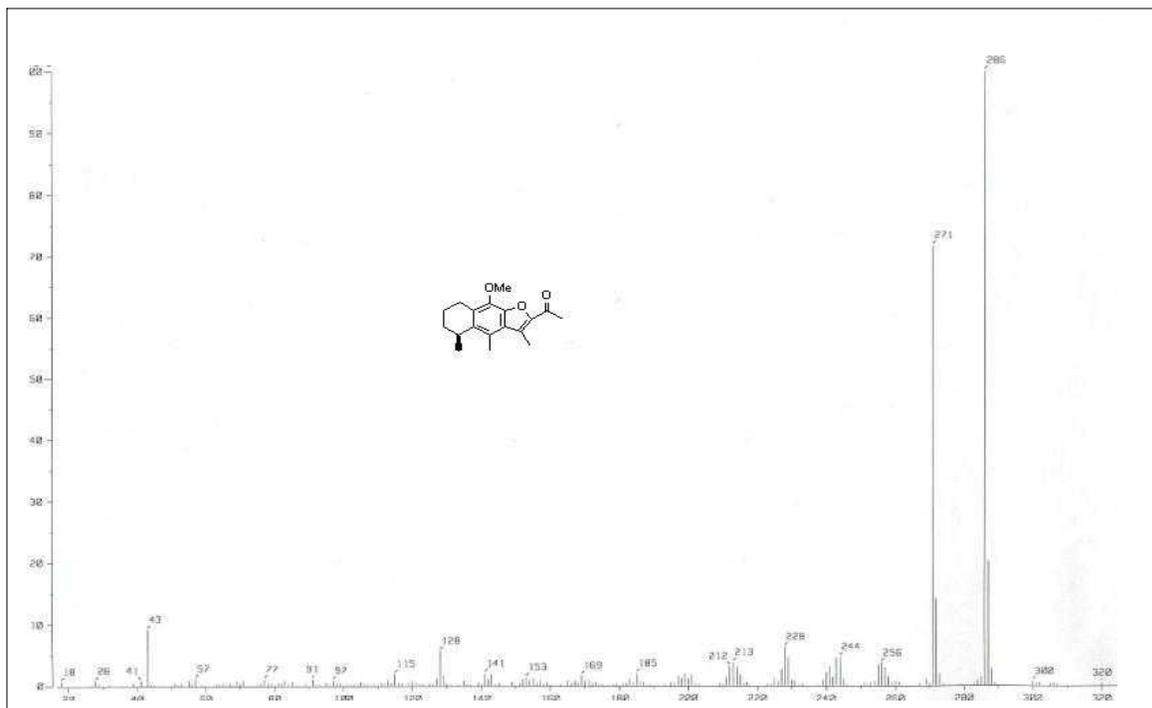
Espectro de RMN ¹H del compuesto 5



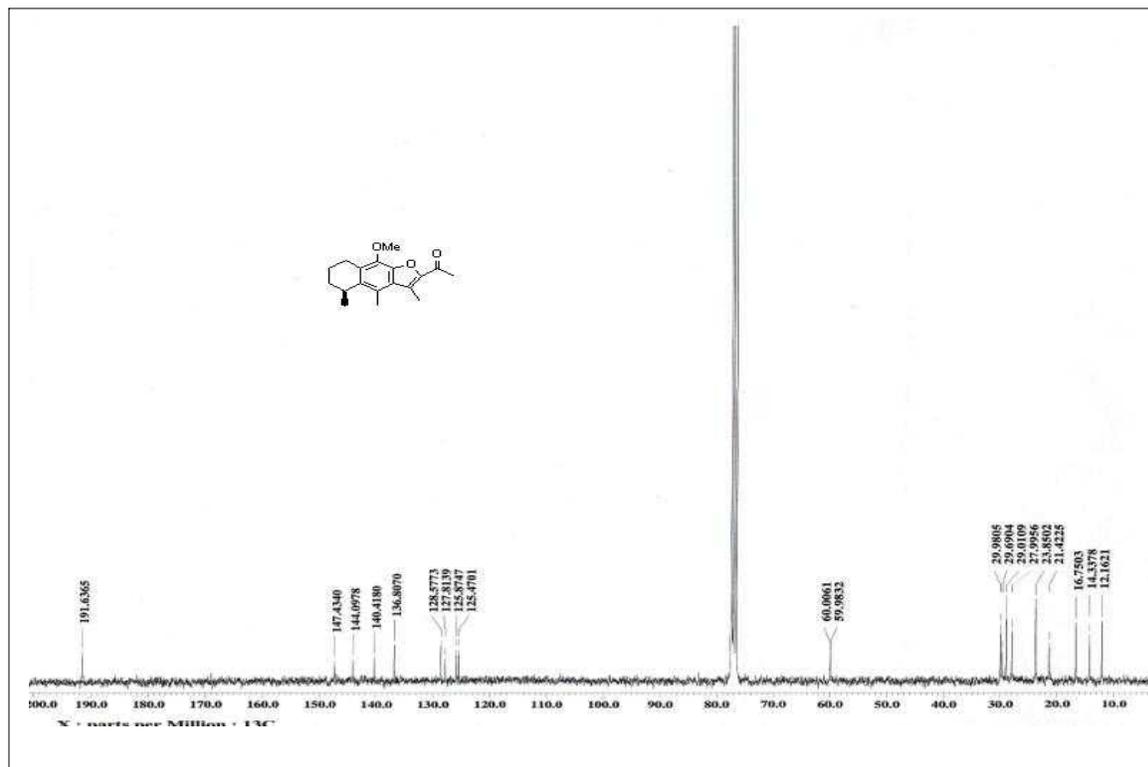
Espectro de IR del compuesto 5



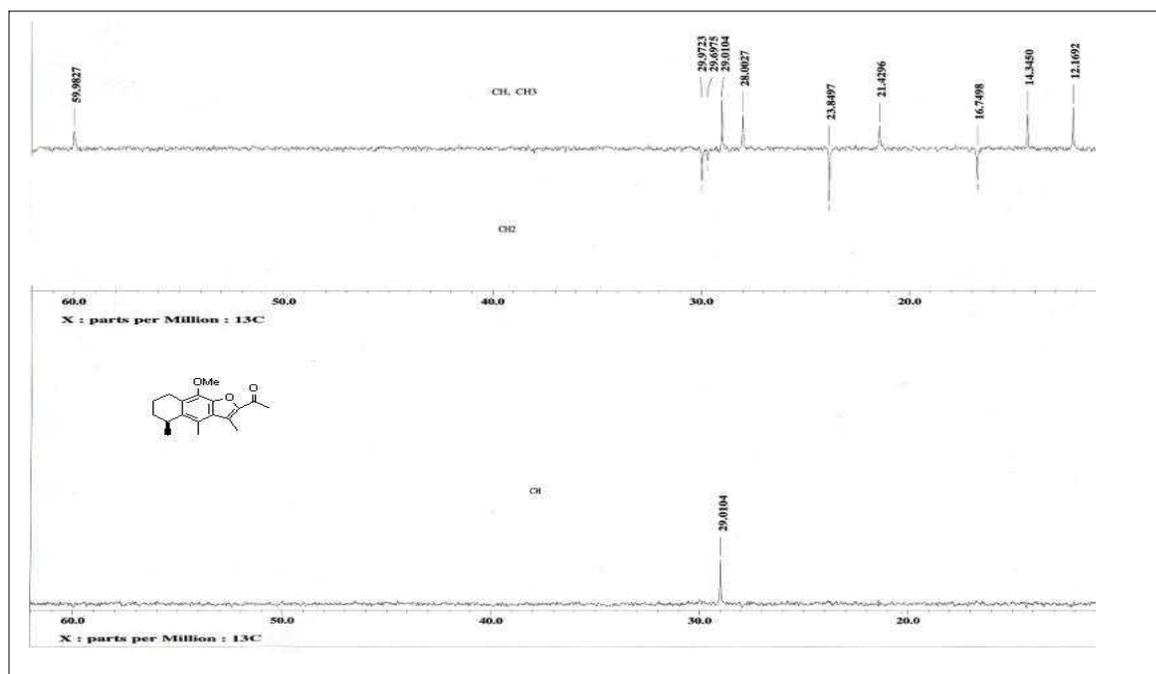
Espectro de EM del compuesto 5



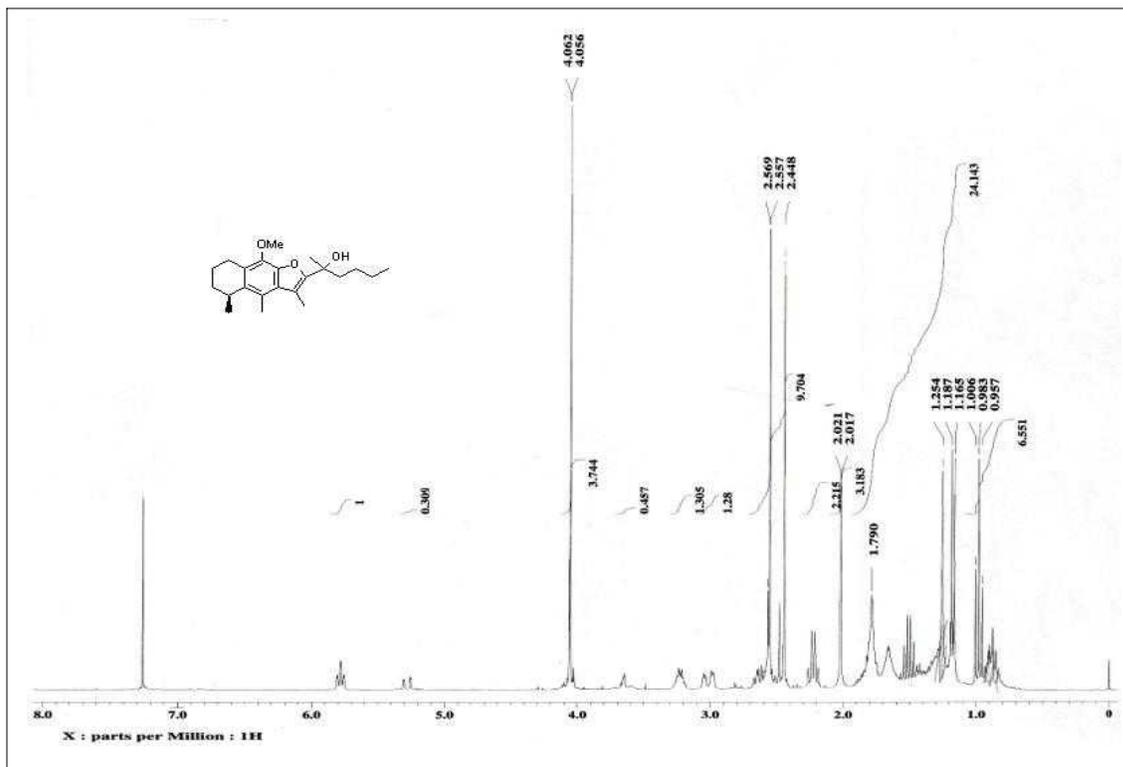
Espectro de RMN ¹³C del compuesto 5



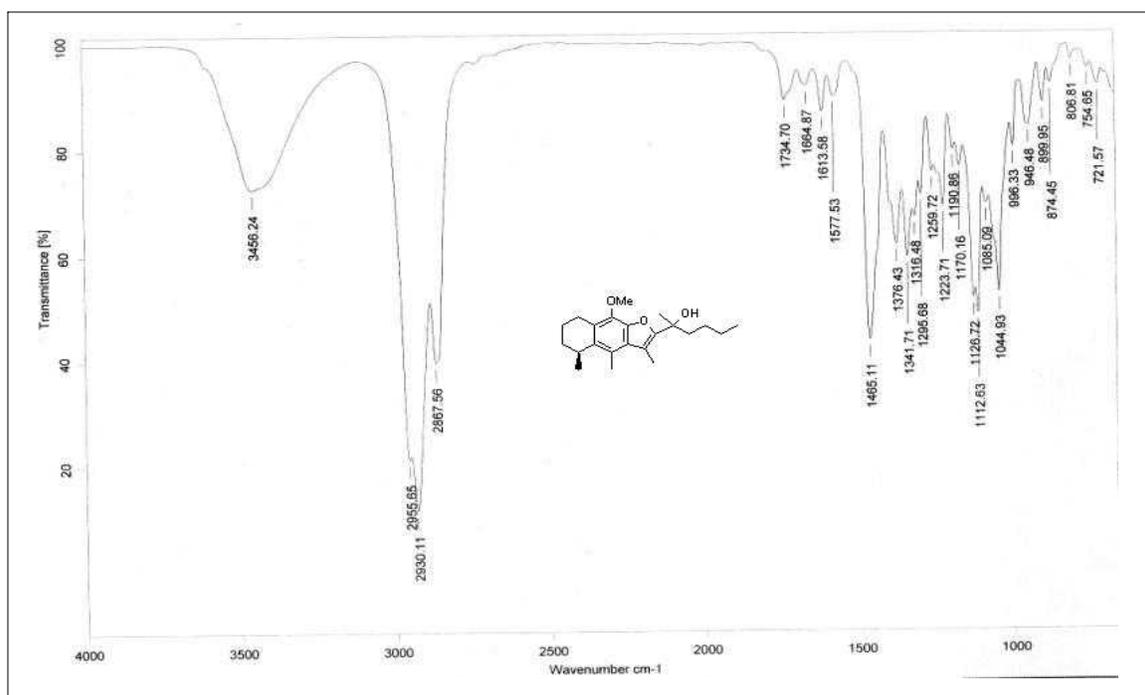
Espectro de DEPT del compuesto 5.



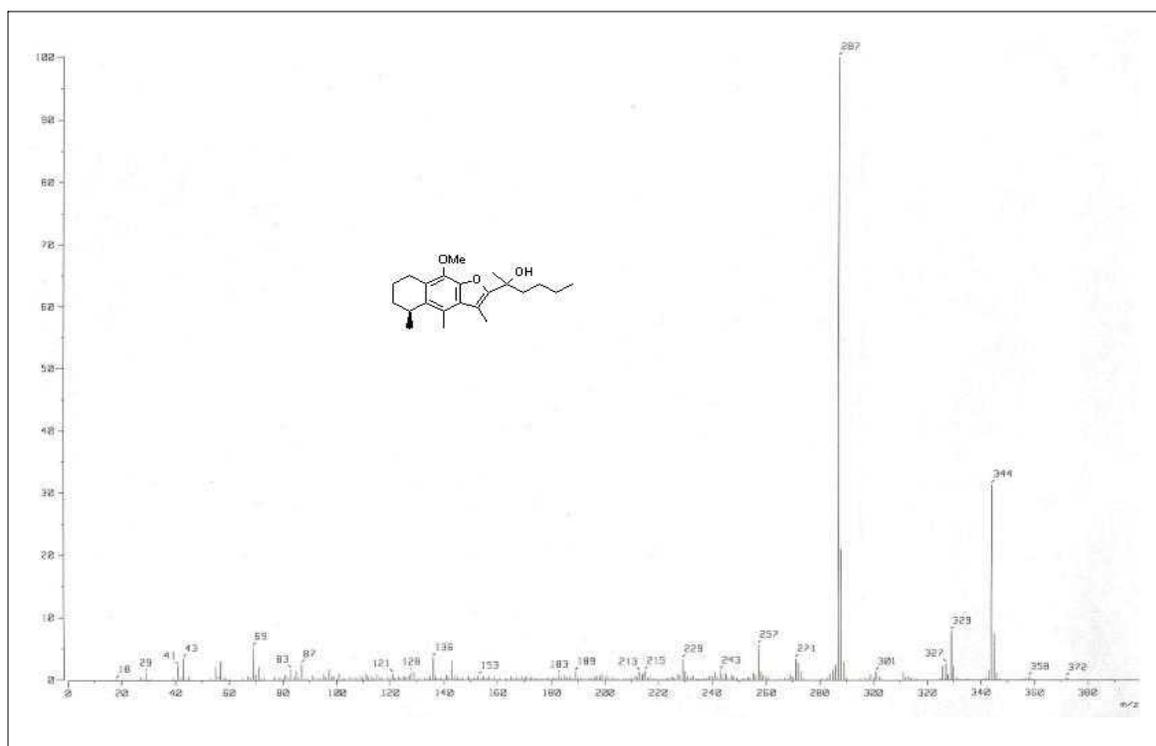
Espectro de RMN ^1H del compuesto 6.



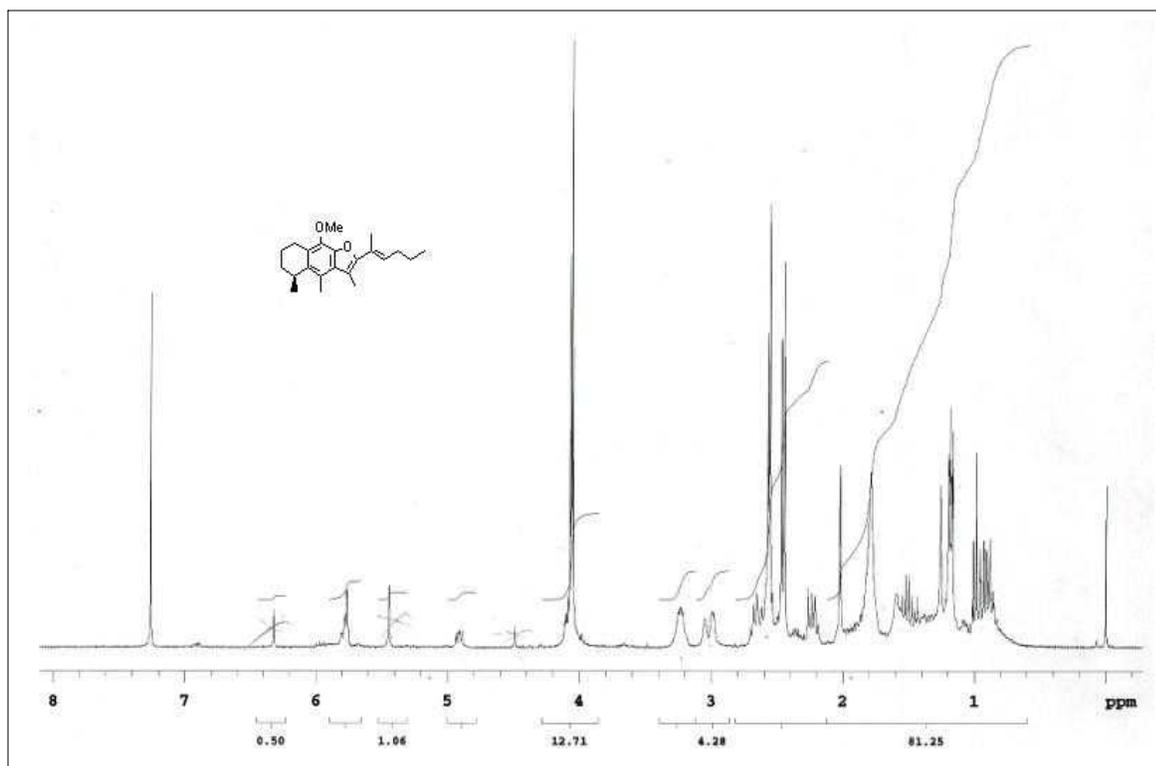
Espectro de IR del compuesto 6.



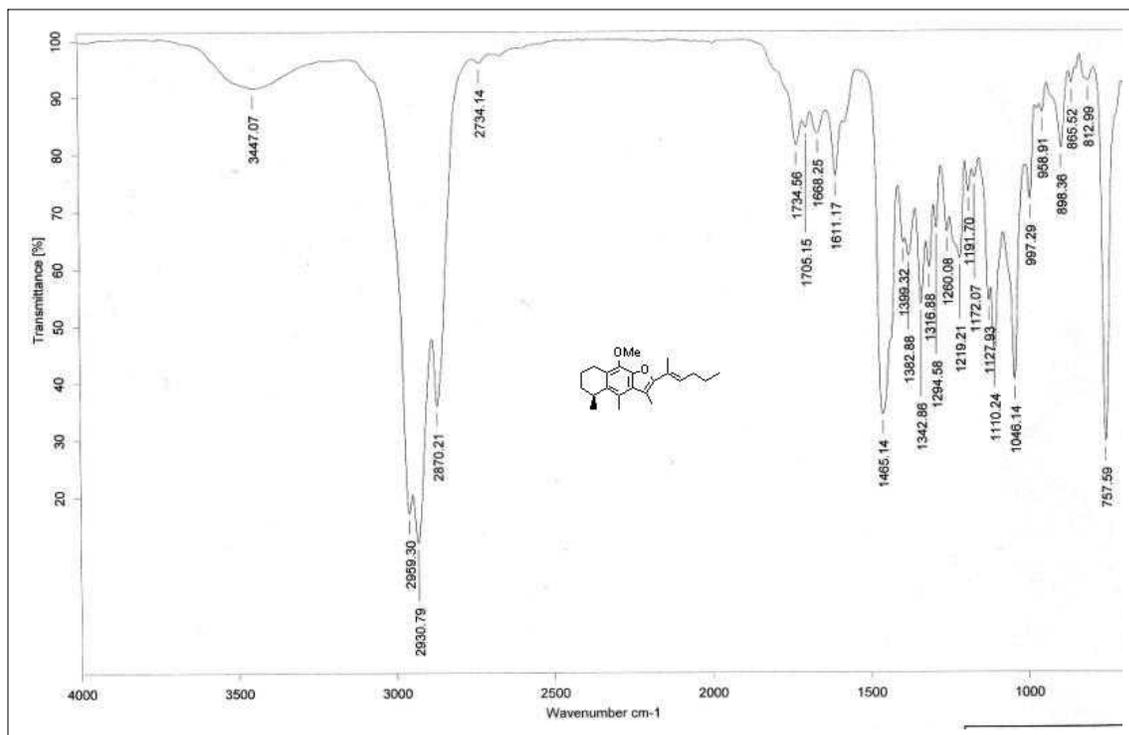
Espectro de EM del compuesto 6.



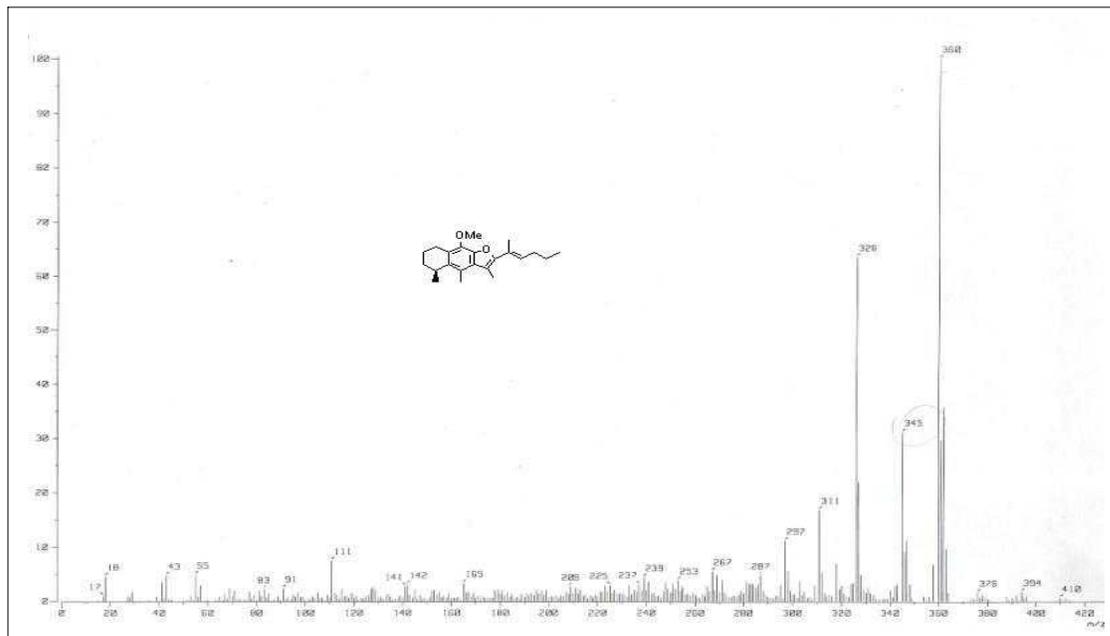
Espectro de RMN ^1H del compuesto 7.



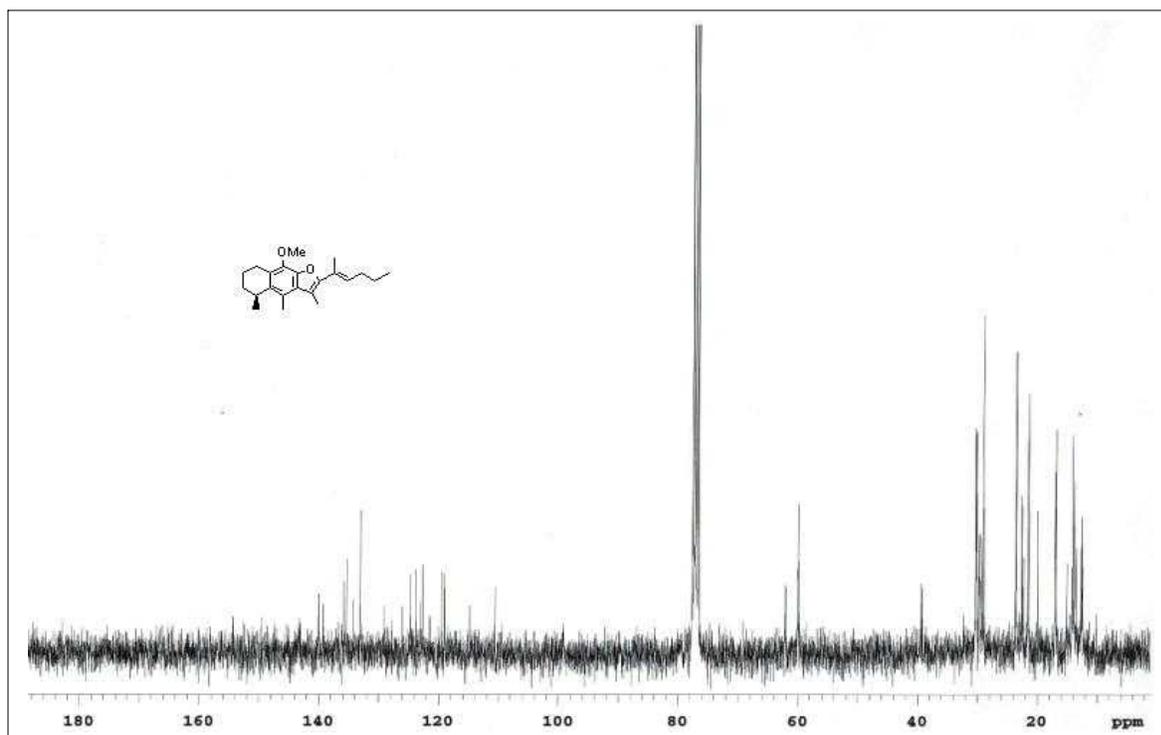
Espectro de IR del compuesto 7.



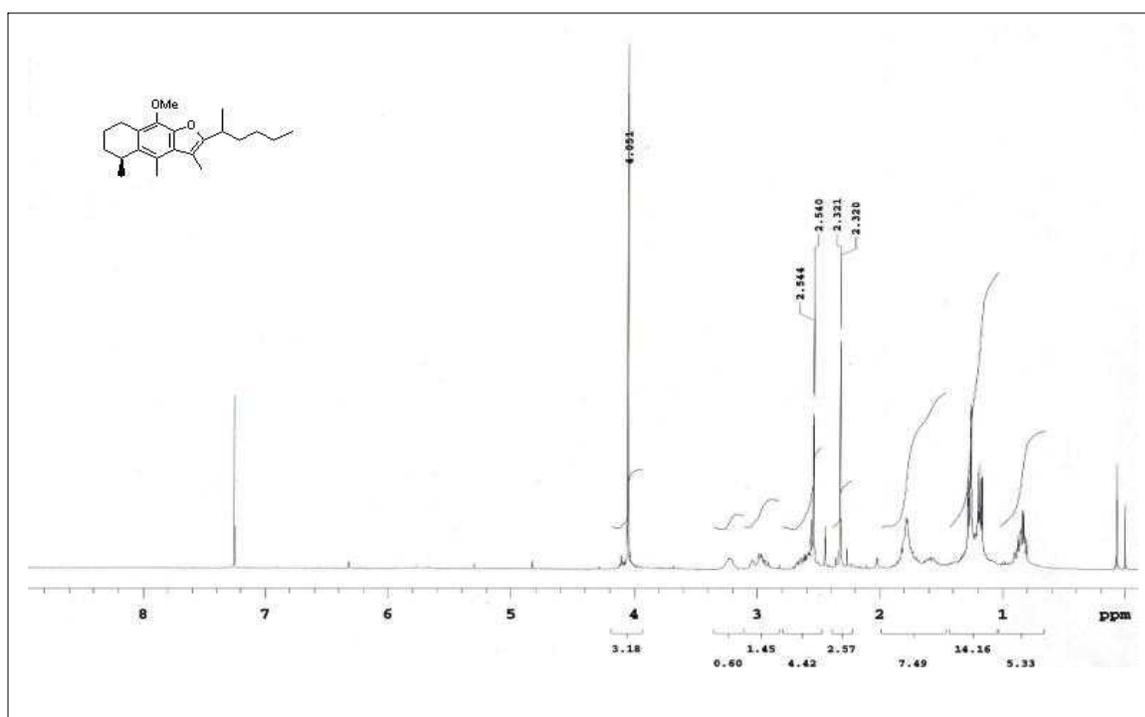
Espectro de EM del compuesto 7.



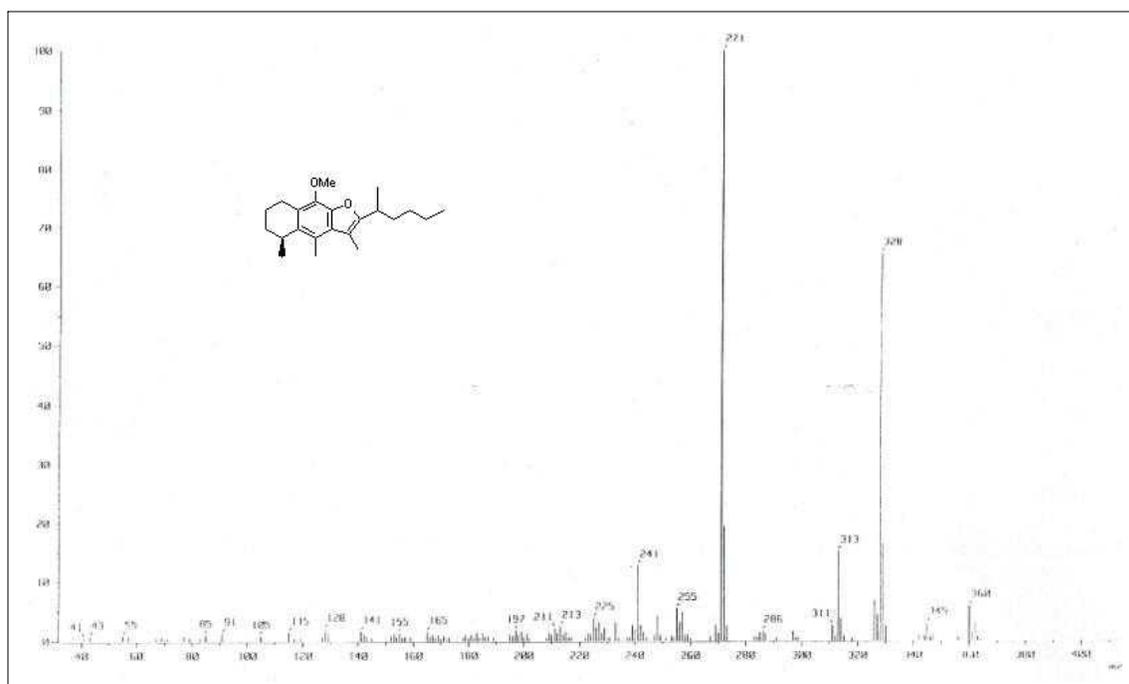
Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 7.



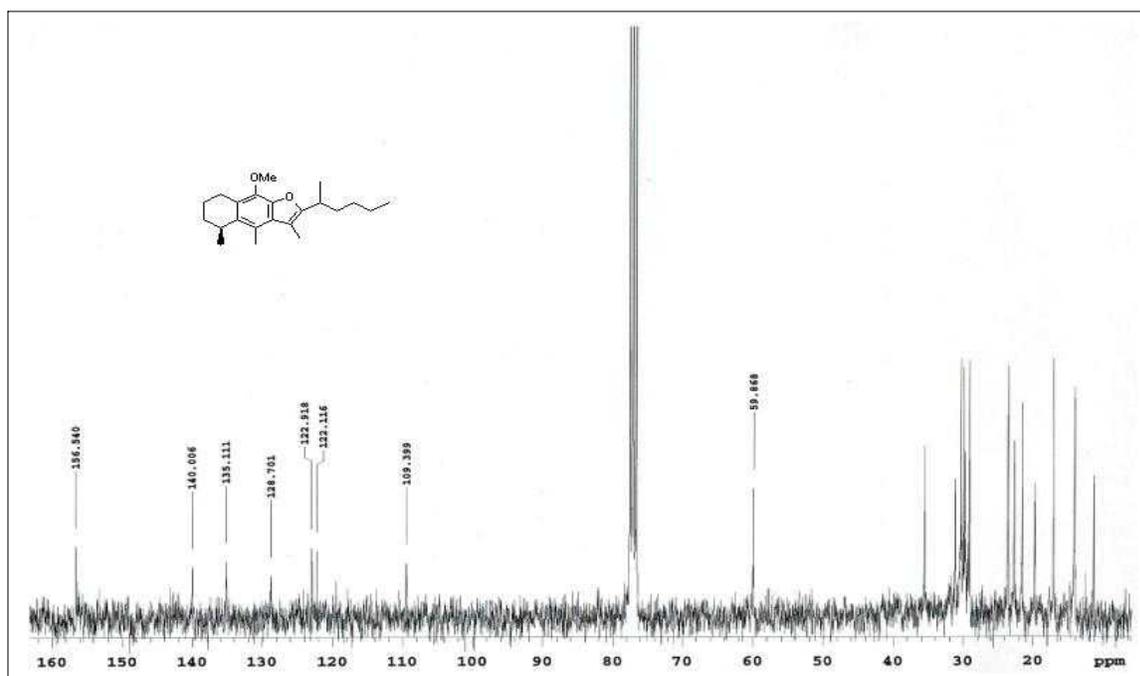
Espectro de RMN ^1H del compuesto 8.



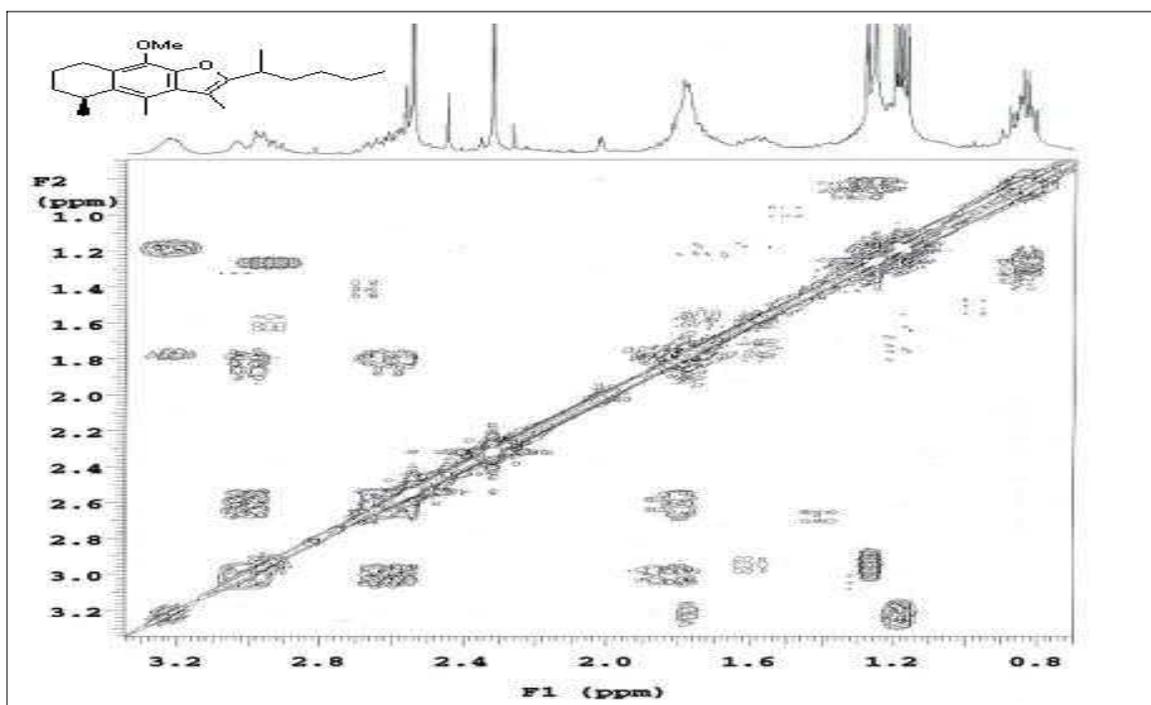
Espectro de EM del compuesto 8.



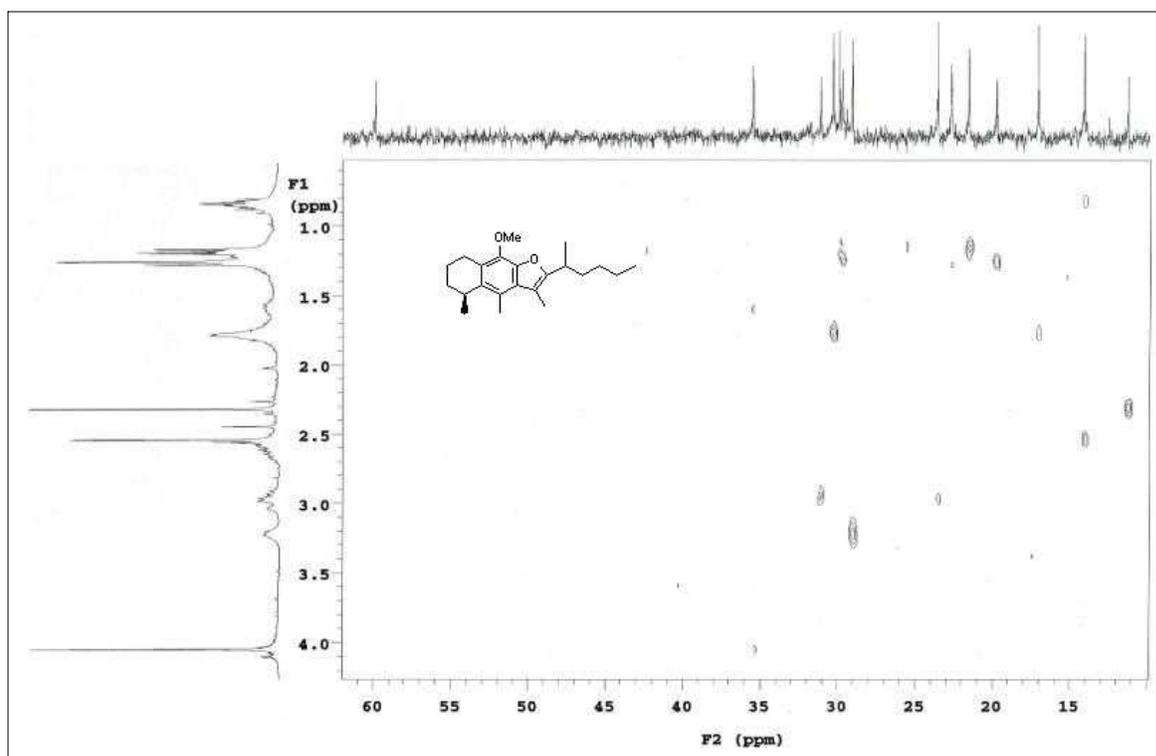
Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 8.



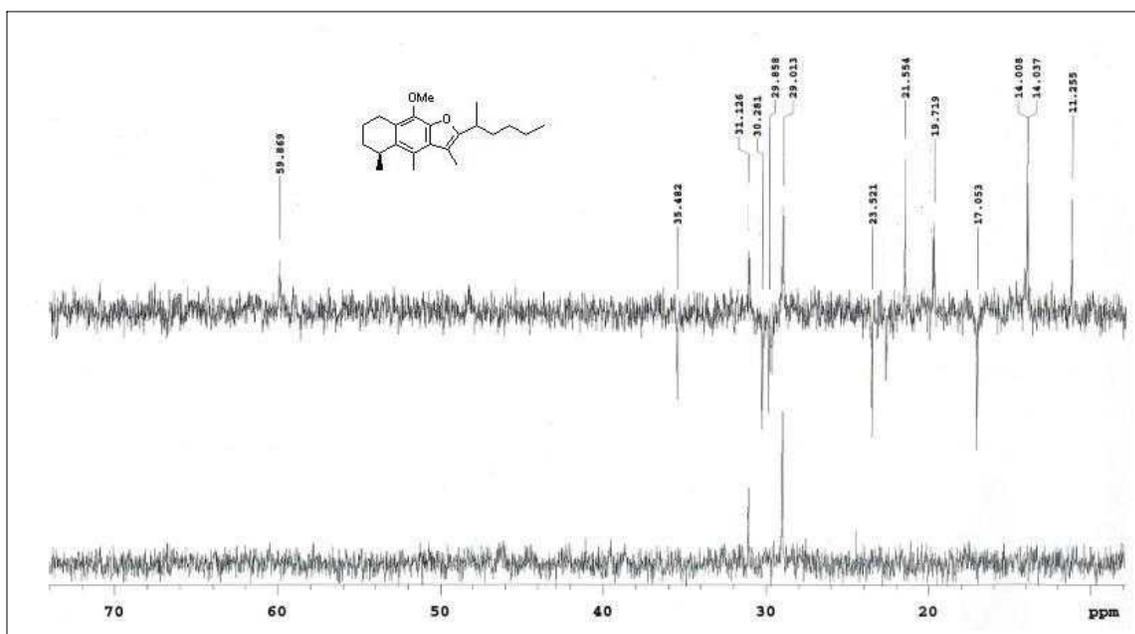
Espectros de COSY del compuesto 8.



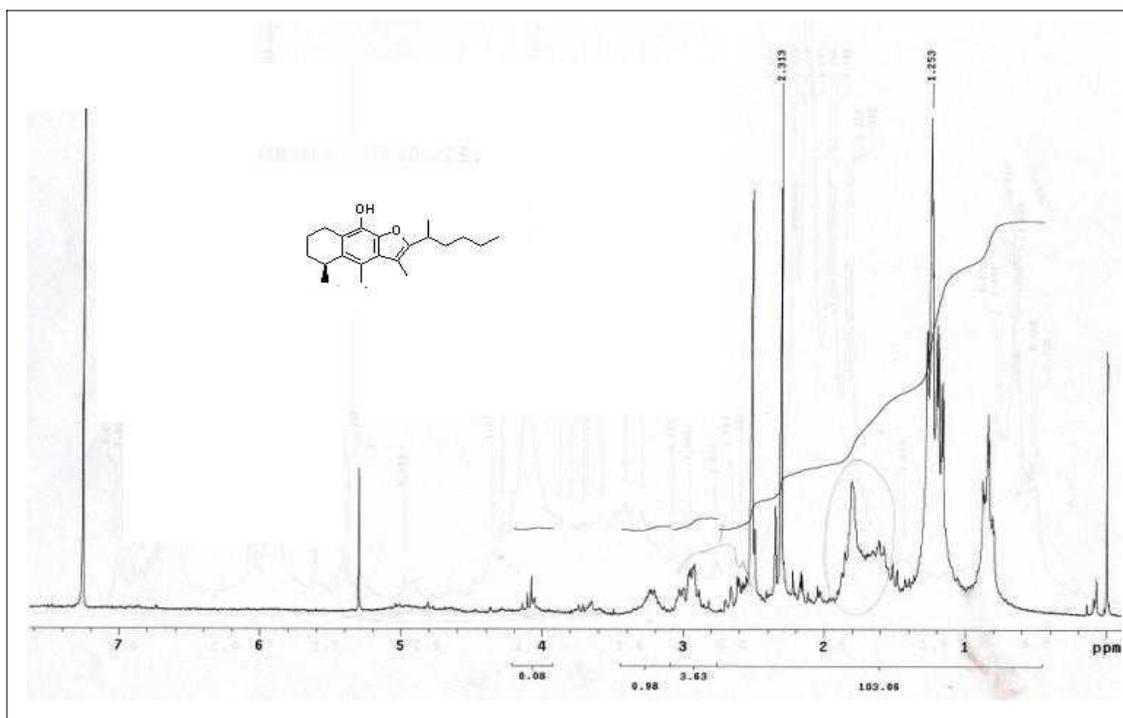
Espectro de HETCOR del compuesto 8.



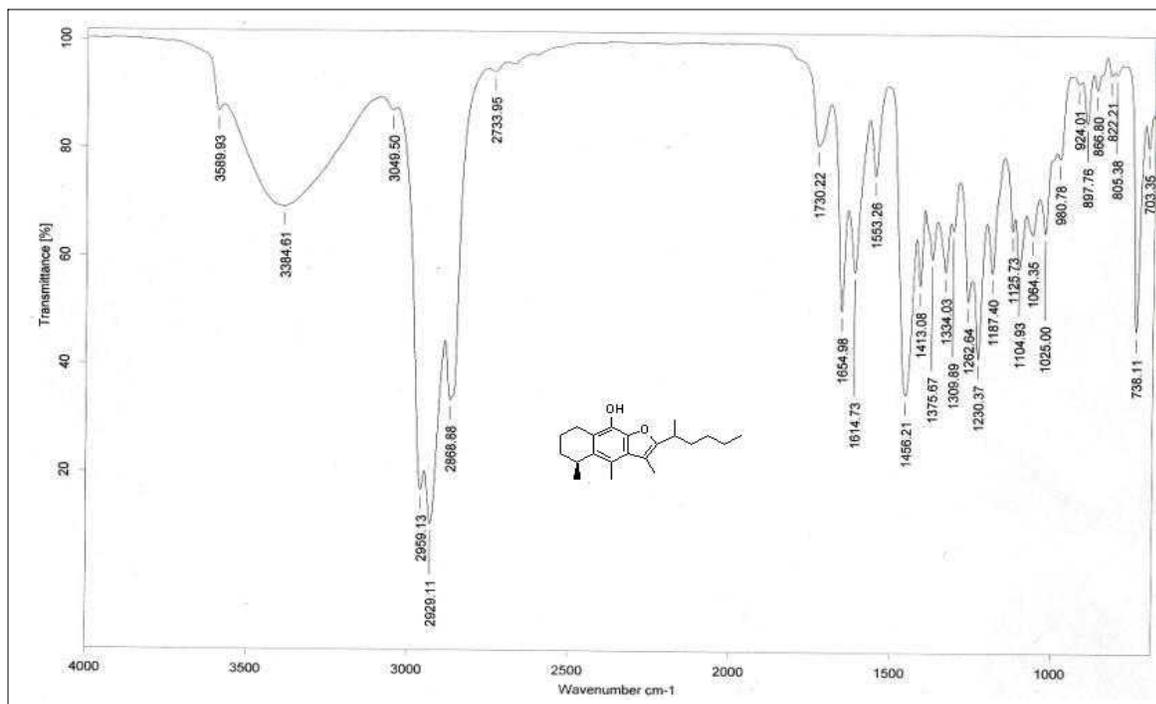
Espectro de DEPT del compuesto 8.



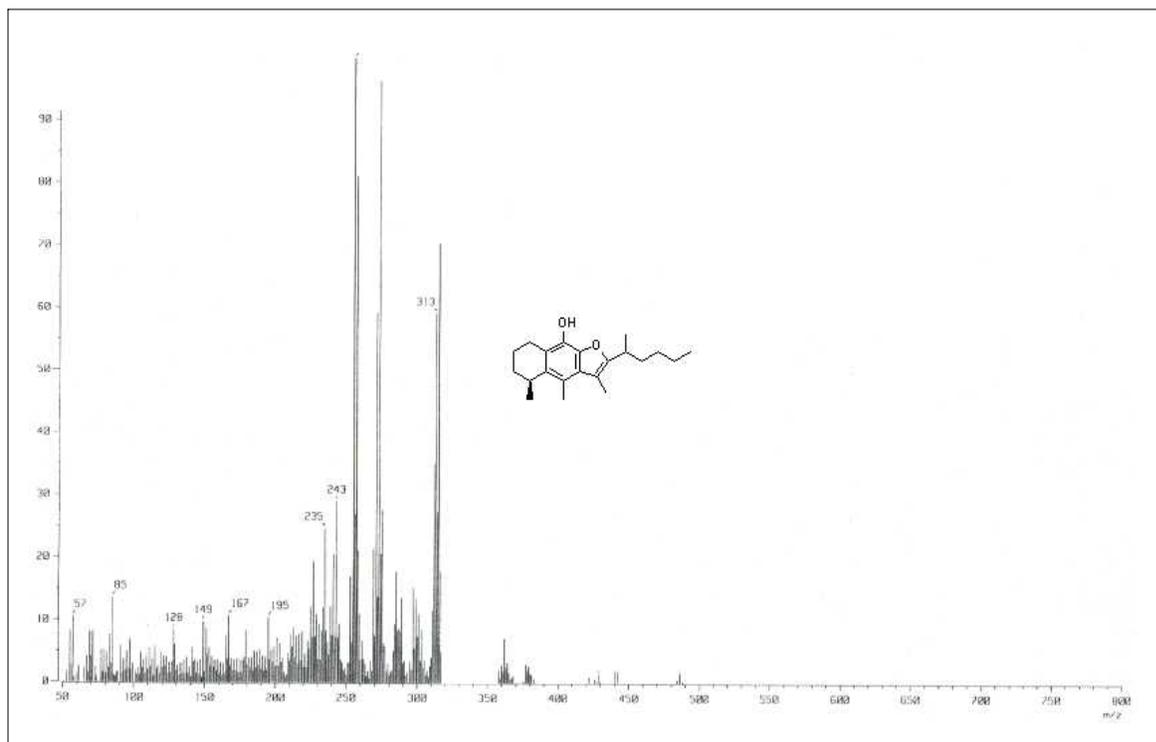
Espectro de RMN ^1H del compuesto 9. (2-hexanilcacalol).



Espectro de IR del compuesto 9.



Espectro de EM del compuesto 9.



Reporte de actividad sobre el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)

Dr. Manuel Jiménez

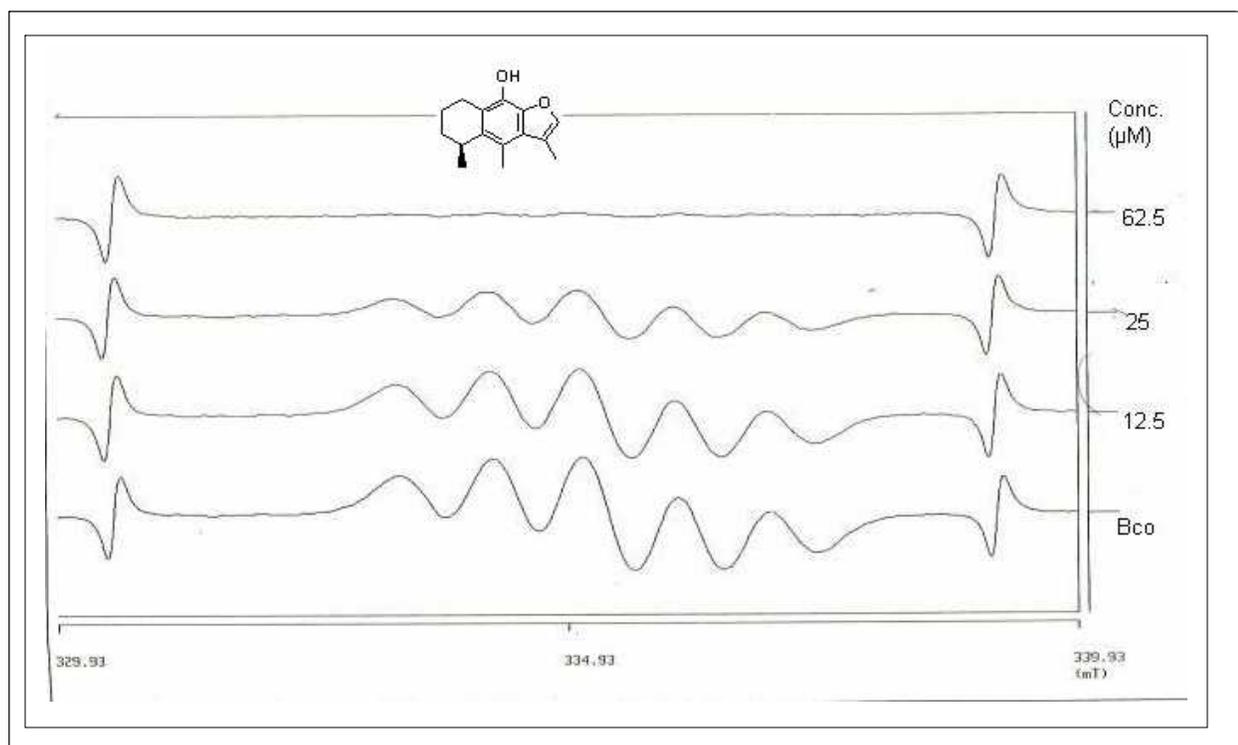
Solicita: Julio César

Vehículo: DMSO

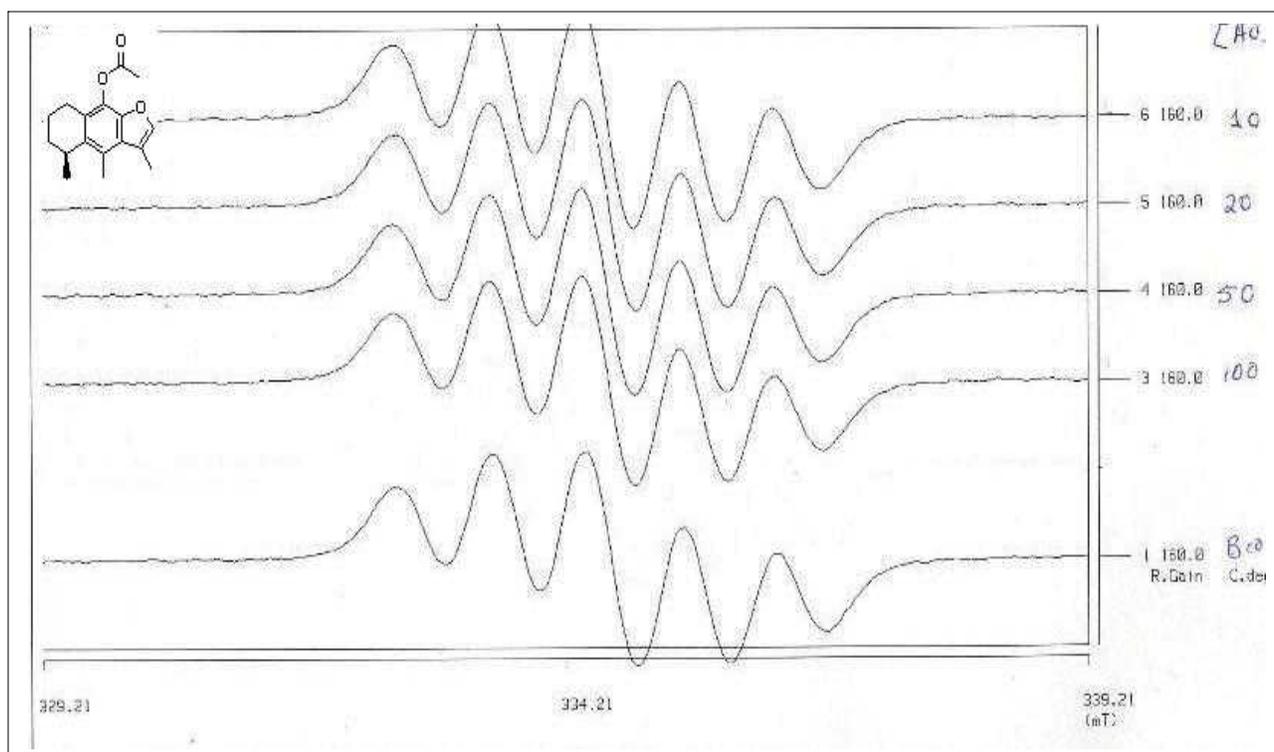
Muestra	Código	Concentración (µM)	A _{515 nm}	% de Reducción del DPPH	IC ₅₀ (µM)
Cacalol	JEM2	C	0.666±0.006	-	18.99±0.46
		1	0.482±0.006 **	27.51±0.95	
		17.78	0.366±0.006 **	44.96±0.94	
		31.62	0.205±0.008 **	69.26±1.26	
		56.23	0.056±0.003 **	91.64±0.35	
		100	0.044±0.003 **	93.36±0.37	
2-acetilcacalol	JEM3	C	0.666±0.006	-	23.44±0.50
		1	0.508±0.007 **	23.62±0.33	
		17.78	0.416±0.011 **	37.42±0.99	
		31.62	0.277±0.009 **	58.46±1.01	
		56.23	0.118±0.005 **	82.18±0.59	
		100	0.53±0.003 **	92.01±0.36	
Compuesto (9) (2-hexanilcacalol)	JEM1	C	0.666±0.006	-	34.41±0.26
		1	0.550±0.008 **	17.34±0.49	
		17.78	0.481±0.008 **	27.71±0.54	
		31.62	0.368±0.004 **	44.65±0.29	
		56.23	0.213±0.004 **	67.94±0.39	
		100	0.073±0.003 **	88.99±0.38	
Quercetina	-	C	0.741±0.018	-	10.89±0.47
		5.62	0.559±0.018 **	24.70±0.92	
		7.50	0.509±0.016 **	31.42±1.07	
		10	0.419±0.014 **	43.49±1.54	
		13.34	0.313±0.018 **	57.748±2.28	
		17.78	0.181±0.024 **	75.55±3.26	
		23.71	0.107±0.003 **	85.53±0.28	
α-tocoferol	-	C	0.741±0.018	-	31.74±1.04
		17.78	0.553±0.027 **	25.51±2.02	
		23.71	0.488±0.02 **	34.31±1.80	
		31.62	0.400±0.019 **	46.13±1.98	
		42.17	0.284±0.017 **	61.65±2.19	
		56.23	0.135±0.009 **	81.76±1.11	
BHT	-	C	0.737±0.022	-	74.91±5.76
		10	0.664±0.034	10.57±1.72	
		31.62	0.511±0.029 **	31.16±2.16	
		100	0.327±0.026 **	55.78±4.06	
		316.23	0.134±0.014 **	81.99±1.341	
		1000	0.123±0.026 **	83.58±2.99	

Los valores representan el promedio ± error estándar de tres o cuatro experimentos independientes (n=3). Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguida de un prueba de Dunnett para aislar grupos con diferencia significativa. Los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

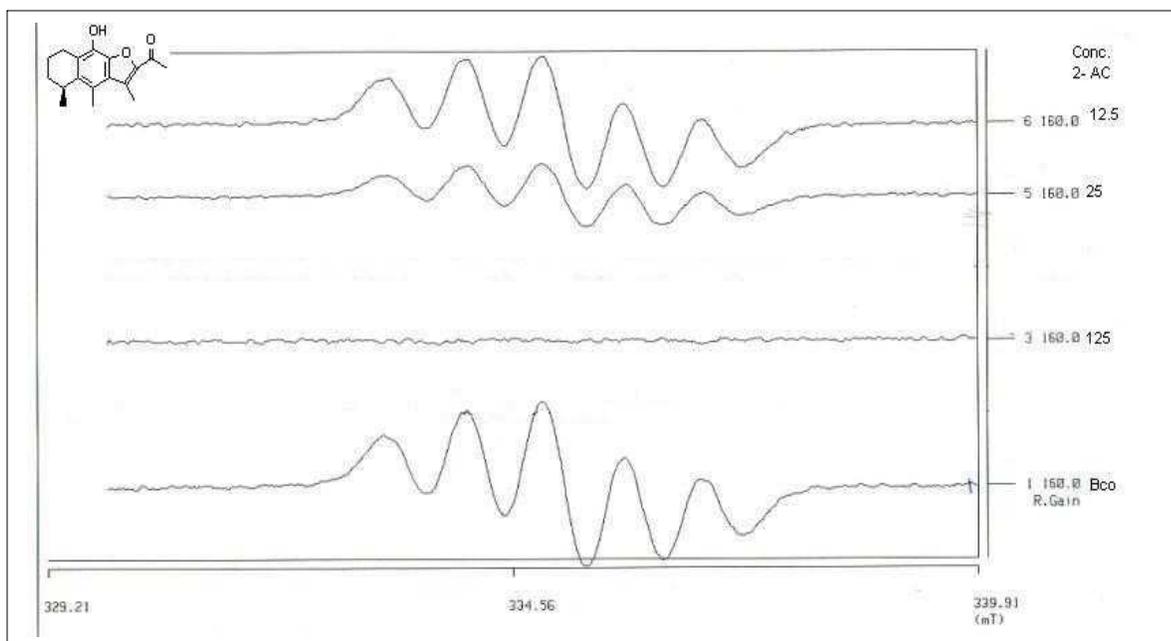
Espectro de actividad secuestrante sobre radical DPPH del cacalol⁽¹⁾.



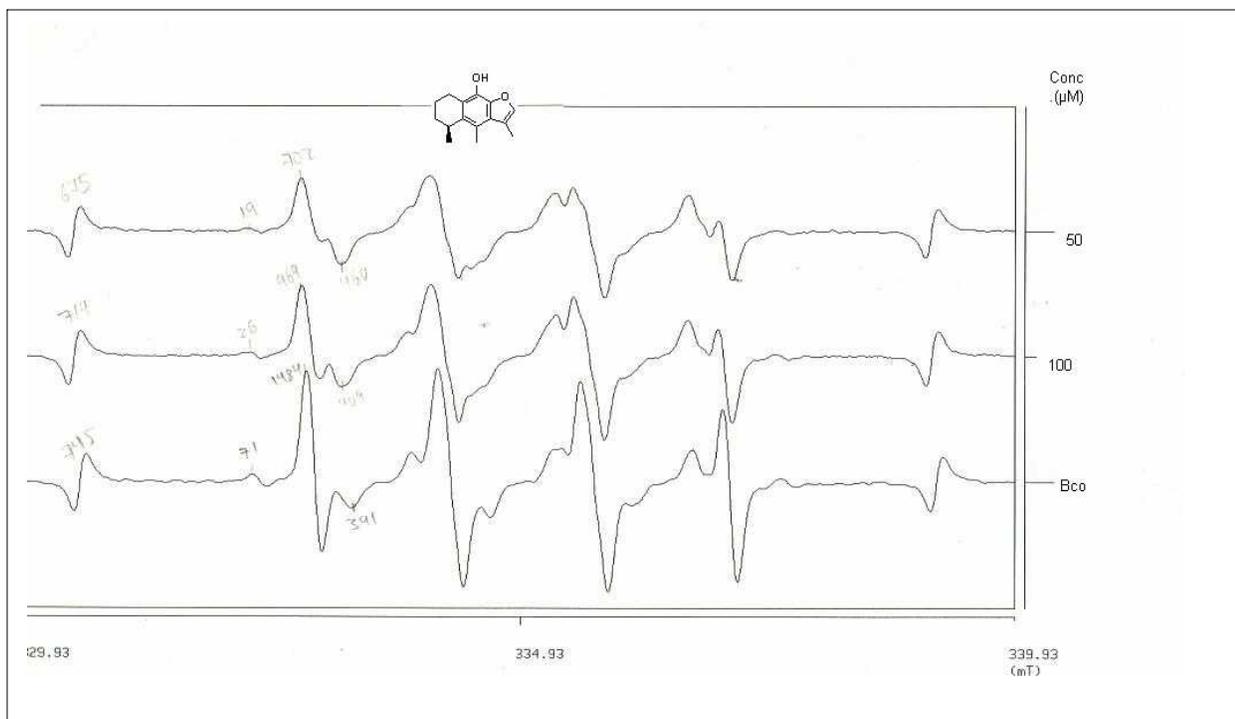
Espectro de actividad secuestrante sobre radical DPPH del acetato de cacalol⁽²⁾.



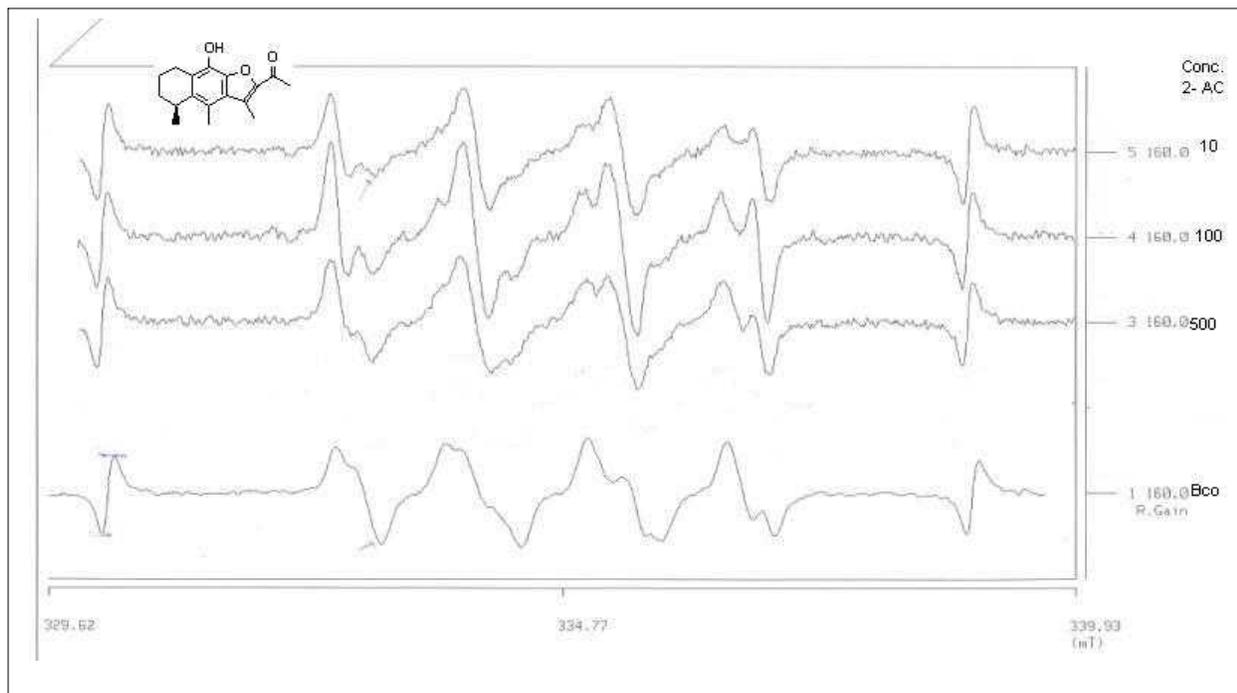
Espectro de actividad secuestrante sobre radical DPPH del 2-acetil cacalol⁽⁴⁾.



Espectro de actividad secuestrante sobre radicales $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{CH}_3$ y O_2^- , del cacalol⁽¹⁾.



Espectro de actividad secuestrante sobre radicales $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{CH}_3$ y O_2^- , del 2- acetil cacalol⁽⁴⁾.



Inhibición de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata

Investigador: Dr. Manuel Jiménez

Solicita: *Julio Cesar*

Homogenizado en: PBS

Vehículo: Metanol

Peroxidación: inducida con FeSO₄ (10 μM)

Muestra	Código	Concentración (μM)	TBARS (nmol/mg prot.)	Inhibición (%)	IC ₅₀ (μM)
Cacalol	JEM1	C	8.26±0.11	-	0.35±0.01
		0.32	4.91±0.12 **	40.57±2.25	
		0.42	2.73±0.26 **	66.90±3.35	
		0.56	0.57±0.05 **	93.09±0.76	
		0.75	0.44±0.05 **	94.66±0.70	
		1	0.41±0.05 **	95.05±0.63	
2-acetil cacalol	JEM2	C	8.17±0.10	-	0.59±0.01
		0.32	6.12±0.24 *	25.13±2.01	
		0.42	5.64±0.13 **	30.99±2.05	
		0.56	4.61±0.13 **	43.54±2.19	
		0.75	3.17±0.15 **	61.13±2.25	
		1	0.56±0.07 **	93.15±0.94	
α-tocoferol	-	C	9.48±0.23	-	569.09±24.54
		100	8.43±0.45	11.25±2.71	
		177.83	8.01±0.35	15.65±2.07	
		316.23	7.49±0.16 *	21.39±1.20	
		562.34	5.09±0.37 *	46.36±3.38	
		1000	1.66±0.44 *	82.28±4.80	
BHT	-	C	8.84±0.59	-	12.86±0.64
		7.50	7.65±0.42	8.16±1.78	
		10	5.86±0.78 *	23.98±6.41	
		13.34	3.90±0.71 *	54.99±7.25	
		17.78	1.09±0.21 *	82.15±6.98	
		23.71	0.79±0.18 *	90.27±2.51	
Quercetina	-	C	9.52±0.19	-	4.11±0.26
		1	8.33±0.33	11.70±2.14	
		1.78	7.64±0.47 *	19.29±3.32	
		3.16	6.21±0.24 *	34.16±3.05	
		5.62	3.20±0.55 *	66.05±5.62	
		10	1.27±0.29 *	86.61±2.92	

Los valores representan el promedio de tres o cuatro (n=3-4) experimentos independientes ± error estándar de la media ($\bar{x} \pm ES$). Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguida de un apueba de Dunnett para aislar grupos con diferencia significativa. Los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control (C).

Resultados de TBARS para el compuesto 9. (2-hexanil cacalol)

Peroxidación de lípidos en cerebro de rata (TBARS)
 Resultados del compuesto (9) (2-hexanilcacalol) 2-hexanilcacalol

Peroxidación de lípidos en cerebro de rata (TBARS)

Realizó: Antonio Nieto Camacho
 Homogenizado en: PBS
 Vehículo: DMSO (25 µL)
 Peroxidación: Inducida con FeSO₄ (10 µM)

Relación	A	B	Volumen (ml)
*A/B	-0.00877	0.07558	1

				T B A R S			
Pozo	Muestra	Código	Concentración	D. O. 540 nm	µM	nmol/mg prot.	Inhibición (%)
1 A-D	Blanco	-	-	0.000	-	-	-
2 A-D	Basal	-	-	0.082	1.194	1.194	85.47
3 A-D	FeSO ₄ (10 µM)	-	-	0.738	9.881	9.881	-20.20
4 A-D	FeSO ₄ +Vehículo	Control	-	0.613	8.220	8.220	0.00
5 E-H	Compuesto 9 (2-hexanilcacalol)	JEM6	0.32 µM	0.595	7.989	7.989	2.81
6 E-H			0.42 µM	0.572	7.682	7.682	6.55
7 E-H			0.56 µM	0.557	7.486	7.486	8.93
8 E-H			0.75 µM	0.558	7.500	7.500	8.77
9 E-H			1 µM	0.530	7.125	7.125	13.32
10 F-H			1.33 µM	0.122	1.731	1.731	78.95