



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

“QUÍMICA Y OBTENCIÓN DE ÉSTERES DE CACALOL”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA**

PRESENTA

MIRNA AIDEE REYES SOLIS



MÉXICO, D.F.

2012



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: Profesor: María Luisa Carmen García y Padilla

VOCAL: Profesor: Manuel Jiménez Estrada

SECRETARIO: Profesor: José Manuel Méndez Stivalet

1^{er} SUPLENTE: Profesor: María Isabel Gracia Mora

2° SUPLENTE: Profesor: Fernando Cortés Guzmán

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Departamento de Productos Naturales. Laboratorio 2-10

Instituto de Química, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Manuel Jiménez Estrada

SUSTENTANTE:

Mirna Aidee Reyes Solis



AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Manuel Jiménez Estrada, por su asesoría y apoyo brindado durante la realización del presente trabajo.

A los miembros del jurado, por el tiempo dedicado a la revisión de la tesis, cuyos valiosos comentarios contribuyeron a la mejora de este trabajo.

A los técnicos académicos del Instituto de Química, M. en C. Héctor Ríos, Dr. Rubén Gaviño, M. en C. Elizabeth Huerta y Dr. Javier Pérez por la realización de los análisis espectroscópicos.

Al M. en C. Antonio Nieto Camacho por su ayuda en la realización de las pruebas biológicas.

A Ada Paulina Vázquez Candanedo, por su asesoría, críticas tan acertadas y sugerencias durante la elaboración de la tesis.

A Armando José Torres Avilez, por su tiempo, enseñanzas, paciencia, comentarios y asesorías durante toda mi estancia en el laboratorio, así como en la realización de este trabajo.

A Nadia Rojano, Cristina Canché y Saúl Flores por resolver mis dudas y darme valiosos comentarios.

Al CONACyT por la beca otorgada a través del proyecto No. 83462.



DEDICATORIAS

Gracias a Dios, por darme vida, llenarme de bendiciones, darle alas a mis sueños y poner ángeles en mi camino.

A mis padres, Enrique y Aurora, por traerme al mundo, apoyarme siempre, confiar en mí, tenerme paciencia, educarme, darme su cariño, por su sacrificio y esfuerzo al brindarme la oportunidad de estudiar lejos de mi hogar. Muchas gracias.

A mi hermana Karen Zarina, por impulsarme a estudiar en la UNAM, creer en mí, enseñarme tantas cosas, apoyarme, aceptar que pensamos distinto y aún así quererme, por las pláticas tan extensas y por hacerme reír.

A mi hermanita Ilse Georgina, por la paciencia y aceptar mi ausencia, por el cariño, por exponer tu punto de vista y hacerme entender que habías crecido y que ahora yo puedo aprender mucho de ti, por pedir por mí y animarme.

A Iliana e Irene, por su compañía, amistad y animarme a permanecer en el Distrito Federal.

A Fabiola, Jesuitas y Laura Ruíz, por su amistad y compañía desde el primer día de clases.

A Itzel y Erika Müller, por su desinteresada amistad y abrirme las puertas de su hogar tan generosamente.

A Hugo Andrés, por la peculiar forma de decirme las cosas, compañía, apoyo, paciencia, aceptar mis diferencias, confiar en mí, compartir alegrías y tristezas, animarme, impulsarme a ser mejor persona, demostrarme su cariño, ayudarme a expresar lo que siento y ganarse mi corazón.

A Anel y Donovan, por confiar en una desconocida, brindarme su amistad y compartir lo mejor de su ser conmigo.



A mi querido club de químicos:

Adrián, por mostrarme el lado positivo de las cosas y escucharme;

Alicia, por soportar mis ocurrencias, apoyarme e ir conmigo a natación;

Araceli, por escucharme, confiar en mí y hacerme parte del laboratorio;

Sergio, por explicarme lo que no entiendo, tenerme paciencia y animarme.

Gracias por su amistad incondicional, los momentos compartidos y los que faltan.

A Adán, Diana, Elizabeth, Lida, Ramón y Yesica, por ser parte importante de mi formación académica y brindarme su amistad.

A Laura León, por sus extensas pláticas, reflexiones, consejos, risas y demostrarme su amistad.

A mis compañeros del laboratorio 2-10, Ada, Alan, Ara, Armando, David, Erandi, Fany, Felipe, Gabriel, Graciela, Juan Carlos, Laura, Lilí, Nadia, Odín, Nadia, Rafael, Sandra, Vero y Wenceslao, por hacer que el trabajo fuera más agradable con sus chistes, música y ocurrencias, sin olvidar el chisme, la hora de comida y los convivios.

A Luisa Rascón, por su invaluable amistad.

A los profesores, en especial a Jesús González Pérez, por esas “palabras” en el momento exacto, las cuales me ayudaron a seguir adelante.

A mi tutor Javier González Cruz, por su apoyo y consejos que me ayudaron durante la carrera.

A Marcela Valadés, por su asesoría y recordarme que la vida tiene muchos aspectos que debemos mantener en equilibrio.

A Amaya, por sus sabios consejos y desarrollar mi parte espiritual.

A Sara Butrón por su compañía y compartir sus anécdotas conmigo.



El significado del éxito

Ganar el respeto de la gente inteligente y el afecto de los niños;
apreciar la belleza de la naturaleza y de todo lo que nos rodea;
buscar y fomentar las mejores cualidades en los demás;
poder dar un regalo a los demás sin esperar nada a cambio,
porque es al dar que recibimos;
cumplir una tarea, ya sea salvando a un alma perdida, curando a un niño
enfermo, escribiendo un libro, o arriesgando la vida por un amigo;
haber celebrado y reído con gran alegría y entusiasmo, y haber cantado;
tener esperanza aún en tiempos de desesperación, porque mientras tengas
esperanza, tienes vida;
amar y ser amado;
comprender y ser comprendido;
saber que por lo menos una vida ha sido más fácil porque tú has estado ahí;
éste es el significado del éxito.

Ralph Waldo Emerson
Modificado por Ray Serway



ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Productos naturales	3
2.2 Medicina tradicional.....	5
2.2.1 Plantas medicinales	6
2.3 Complejo matarique	6
2.3.2 Cacalol	10
2.4 Proceso inflamatorio y su terapéutica	11
2.4.1 Glucocorticoides	12
2.4.2 Antiinflamatorios no esteroideos (AINE´s)	12
2.4.2.1 Naproxeno e ibuprofeno	15
2.5 Ácido cinámico y ácido <i>p</i> -metoxicinámico	16
2.6 Modelo de edema en oreja de ratón inducido con acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol (TPA).....	18
2.7 Actividad antioxidante	19
2.7.1 Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH•)	19
2.7.2 Método de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	20
2.8 Síntesis Híbrida.....	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. OBJETIVOS.....	24
4.1 Objetivo general.....	24
4.2 Objetivos particulares	24
5. METODOLOGÍA	25
5.1 Material, reactivos y equipo	26
5.2 Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas. .	27
5.3 Obtención de material vegetal.....	27
5.4 Obtención del residuo del extracto hexánico	27
5.5 Obtención de cacalol.....	28
5.5.1 Cromatografía en columna flash al vacío del residuo del extracto hexánico	28



5.5.2 Hidrólisis del acetato de cacalol.....	28
5.5.2.1 Reacción de acetilación del residuo del extracto hexánico de <i>P. decompositum</i>	28
5.5.2.2 Cromatografía en columna flash al vacío, del residuo del extracto hexánico acetilado	29
5.6 Obtención de derivados de cacalol.....	30
5.6.1 Esterificación de cacalol con naproxeno	30
5.6.2 Esterificación de cacalol con ibuprofeno.	31
5.6.3 Esterificación de cacalol con ácido cinámico.....	31
5.6.4 Esterificación de cacalol con ácido <i>p</i> -metoxicinámico	32
5.6.4.1 Metoxilación de ácido <i>p</i> -hidroxicinámico.....	32
5.6.4.2 Esterificación de cacalol con ácido <i>p</i> -metoxicinámico	33
5.7 Actividad antiinflamatoria y antioxidante de los derivados.	34
6. DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS	35
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
7.1 Obtención de cacalol.....	39
7.1.1 Obtención de acetato de cacalol.....	39
7.1.2 Hidrólisis del acetato de cacalol.....	40
7.2 Obtención de los ésteres de cacalol.....	41
7.2.1 Éster de naproxeno con cacalol.....	43
7.2.2 Éster de ibuprofeno con cacalol.....	45
7.2.3 Éster de ácido cinámico con cacalol	47
7.2.4 Éster de ácido <i>p</i> -metoxicinámico con cacalol.....	49
7.3 Pruebas de actividad biológica.....	53
7.3.1 Resultados de las pruebas de actividad antiinflamatoria.....	53
7.3.2 Resultados de las pruebas de actividad antioxidante	54
8. CONCLUSIONES	58
9. PERSPECTIVAS	59
10. REFERENCIAS	60
11. ANEXOS	65



ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Ejemplos de la comercialización de fármacos modernos de productos naturales.	4
Tabla 2. Clasificación de los AINE´s.....	14
Tabla 3. Datos de los ésteres de cacalol obtenidos	43
Tabla 4. Actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA	53
Tabla 5. Actividad antioxidante en el modelo de DPPH•	54
Tabla 6. Inhibición de la peroxidación de lípidos de homogeneizado de cerebro de rata evaluada por la técnica de TBARS.	56
Figura 1. <i>Psacalium decompositum</i> , ejemplar de Chihuahua	8
Figura 2. Flores a) y hojas b) de <i>Psacalium decompositum</i>	9
Figura 3. Sesquiterpenos naturales de las raíces de <i>P. decompositum</i>	9
Figura 4. a) Estructura del naproxeno y b) estructura del ibuprofeno (\pm)	15
Figura 5. Estructura del ácido cinámico a) y ácido <i>p</i> -metoxicinámico b)	17
Figura 6. a) 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, b) 2,2-difenil-1-picrilhidrazina	20
Figura 7. Benorilato, fármaco híbrido.	21
Figura 8. Trioxaquina PA1103.....	22
Figura 9. Estructura de acetato de cacalol.....	40
Figura 10. Mecanismo para la formación de cloruro de acilo	41
Figura 11. Mecanismo de esterificación de un cloruro de acilo y un alcohol en piridina	42



ÍNDICE DE ESPECTROS (ANEXOS)

Anexo 1. Cacalol

Anexo 1.1. Espectro de IR (CHCl_3 , disolución) de cacalol.	65
Anexo 1.2. Espectro de masas (IE) de cacalol.	66
Anexo 1.3. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de cacalol.	67
Anexo 1.4. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) de cacalol.	68

Anexo 2. Acetato de cacalol

Anexo 2.1 Espectro de IR (disolución de CHCl_3) de acetato de cacalol.	69
Anexo 2.2. Espectro de masas (IE) de acetato de cacalol.	70
Anexo 2.3. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) de acetato de cacalol.	71
Anexo 2.4. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) de acetato de cacalol.	72

Anexo 3. Compuesto 1

Anexo 3.1. Espectro de IR (disolución de CHCl_3) del compuesto 1.	73
Anexo 3.2. Espectro de masas (IE) del compuesto 1.	74
Anexo 3.3. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 1.	75
Anexo 3.4. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 1.	76
Anexo 3.5. Experimento DEPT del compuesto 1.	77

Anexo 4. Compuesto 2

Anexo 4.1. Espectro de IR (disolución de CHCl_3) del compuesto 2.	78
Anexo 4.2. Espectro de masas (IE) del compuesto 2.	79
Anexo 4.3. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) del compuesto 2.	80
Anexo 4.4. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) del compuesto 2.	81
Anexo 4.5. Experimento DEPT del compuesto 2.	82

Anexo 5. Compuesto 3

Anexo 5.1. Espectro de IR (disolución de CHCl_3) del compuesto 3.	83
Anexo 5.2. Espectro de masas (IE) del compuesto 3.	84
Anexo 5.3. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 3.	85
Anexo 5.4. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 3.	86
Anexo 5.5. Experimento DEPT del compuesto 3.	87

Anexo 6. Compuesto 4

Anexo 6.1. Espectro de IR (disolución de CHCl_3) del compuesto 4.	88
Anexo 6.2. Espectro de masas (IE) del compuesto 4.	89
Anexo 6.3. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 4.	90
Anexo 6.4. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 4.	91
Anexo 6.5. Experimento DEPT del compuesto 4.	92

Anexo 7. Metodologías de pruebas biológicas	93
--	-----------



ABREVIATURAS

$(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$	Dimetil sulfato
μM	Micromolar
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINE's	Antiinflamatorios no esteroideos
CaCl_2	Cloruro de calcio
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFV	Cromatografía en columna flash al vacío
CCl_4	Tetracloruro de carbono
CDCl_3	Cloroformo deuterado
cm	Centímetros
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
d	Doblete
dd	Doble de dobles
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DPPH	Difenilpicrilhidrazilo
EM-IE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
eV	Electrón Volt
FeSO_4	Sulfato de hierro II
g	Gramos
g/mol	Gramos por mol
GC	Cromatografía de gases
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
HETCOR	Correlación heteronuclear
Hx	Hexano
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HSQC	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear.
Hz	Hertz
IC_{50}	Concentración media inhibitoria
Int. Rel.	Intensidad relativa
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K_2CO_3	Carbonato de potasio
KOH	Hidróxido de potasio
L	Litros
m	Metros
M.M.	Masa molar



m/z	Relación masa carga
M ⁺	Ión molecular
MDA	Malondialdehído
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mmol	Milimol
msnm	Metros sobre el nivel del mar
nm	Nanómetros
°C	Grados Celsius
OMS	Organización Mundial de la Salud
PGE2	Prostaglandina E2
PGG2	Prostaglandina G2
PGH2	Prostaglandina H2
ppm	Partes por millón
q	Cuadruplete
Rf	Factor de retención
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
s	Singulete
SO ₂	Dióxido de azufre
SOCl ₂	Cloruro de tionilo
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TMS	Tetrametilsilano
TPA	Acetato de tetradecanoilforbol
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
V _{max}	Longitud de onda máxima
δ	Desplazamiento químico

1. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevos fármacos es una necesidad del hombre para resolver los problemas de salud. Sin embargo, actualmente el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos es un gran reto para los científicos por la dificultad y los costos que conlleva obtenerlos. No obstante, que se han desarrollado nuevas metodologías para sintetizar compuestos activos, el tiempo para obtener un fármaco se ha prolongado, dado que en los años sesenta tardaba 8 años y en la última década se ha incrementado entre 12 y 15 años.

México ocupa el tercer lugar a nivel mundial en flora de climas templado y cálido, seguido de Brasil y Colombia. Nuestro país tiene cerca de 21 600 especies de plantas vasculares, de las cuales más de 3 350 son consideradas como plantas medicinales. Sin embargo, a pesar de su riqueza y variedad, solo un porcentaje pequeño de las plantas medicinales mexicanas han sido investigadas desde el punto de vista fitoquímico y/o farmacológico. De este modo, el potencial de las plantas medicinales mexicanas es una fuente de compuestos bioactivos que permanece en gran medida inexplorado.

Una alternativa para la búsqueda de nuevos compuestos, es el diseño de moléculas híbridas o fármacos híbridos, que se definen como la unión de dos moléculas diferentes mediante un enlace covalente, que pueden tener la misma o diferente actividad biológica.

En este trabajo se obtuvieron cuatro moléculas híbridas por medio de la reacción de esterificación del cacalol, un sesquiterpeno separado de las raíces de *Psacalium decompositum*, con ácidos carboxílicos.

Dos de los ácidos carboxílicos utilizados son AINE's (naproxeno e ibuprofeno). Éstos tienen efectos secundarios adversos, principalmente la irritación en el tracto gastrointestinal y en menor medida nefrotoxicidad y hepatotoxicidad. Se ha descrito en la literatura que la toxicidad

gastrointestinal puede ser disminuida con el enmascaramiento del grupo funcional carboxilo, mediante la formación de ésteres y amidas.

Los otros ácidos empleados, son el ácido cinámico y el ácido *p*-metoxicinámico, a los que se les ha encontrado propiedades biológicas interesantes como son: hepatoprotectora, antibacterial y antioxidante. Además, algunos de sus ésteres poseen efectos antiinflamatorios.

A las moléculas sintetizadas en el presente trabajo, se les evaluó la actividad antiinflamatoria y antioxidante, con la finalidad de establecer una posible opción terapéutica, a partir de los productos naturales de nuestro país.

2. ANTECEDENTES

2.1 Productos naturales

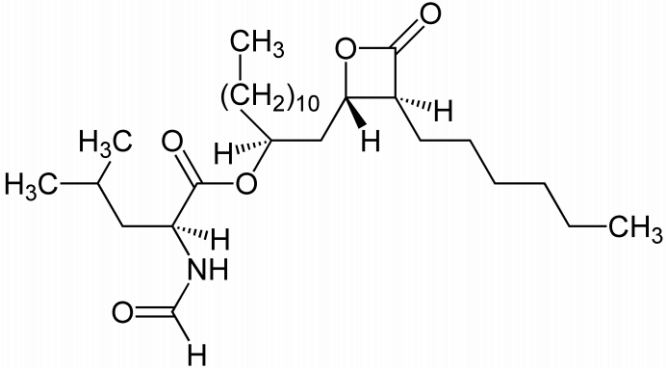
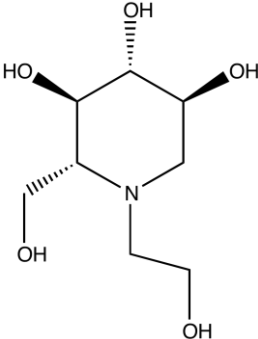
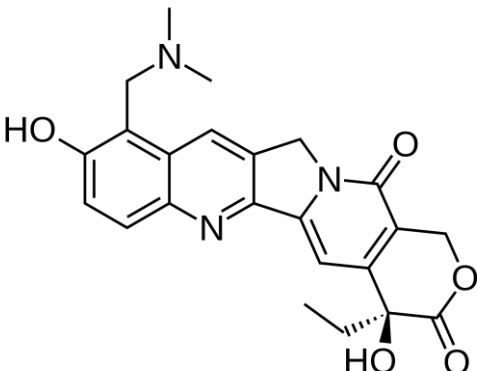
La palabra natural es un adjetivo que se refiere a algo que está presente o es producido por la naturaleza. Cuando se menciona la palabra natural muchas veces se asume que es algo identificado como bueno o puro. No obstante, muchos venenos efectivos son productos naturales. En un sentido estricto, los productos naturales son sustancias originadas por fuentes microbianas, vegetales o animales.

El interés en los productos naturales se debe a que desde principios de la historia, éstos han proporcionado tratamientos para el dolor, paliativos o curativos para diversas enfermedades, siendo una fuente importante de fármacos desde tiempos antiguos y aproximadamente la mitad de los fármacos que se utilizan hoy en día son derivados de productos naturales (Harvey, 2008).

Gran parte de los compuestos de origen natural con actividad son importantes porque son difíciles de producir comercialmente por síntesis química. Entre los productos naturales que están despertando el interés de los investigadores se encuentran los alcaloides, flavonoides, cumarinas y terpenoides. Asimismo, de los 20 fármacos más vendidos en el mercado en el año 2000, que no son proteínas, 7 de estos fueron derivados o desarrollados a partir de moléculas base generadas de productos naturales (Ahluwalia V. K., 2008; Ahluwalia & Chopra, 2008).

Diversos medicamentos modernos que se derivan de productos naturales, fueron descubiertos como resultado de la separación de compuestos activos de plantas usadas en la medicina tradicional. Ejemplos de la comercialización de fármacos modernos procedentes de productos naturales se pueden ver en la tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de la comercialización de fármacos modernos de productos naturales. Modificado al español (Ahluwalia & Chopra, 2008).

Producto Natural (Compañía)	Año de introducción	Indicación
<p data-bbox="298 428 521 464">Orlistat (Roche)</p>  <p>The chemical structure of Orlistat is a complex molecule. It features a central chiral center bonded to a methyl group (H₃C), a propyl chain, a hydroxyl group (OH), and a nitrogen atom (NH) which is part of a cyclic amide structure. This central center is also bonded to a long decyl chain ((CH₂)₁₀) and a butyrate ester group. The butyrate group is shown as a four-membered ring with a carbonyl group (C=O) and a hydrogen atom (H) on the ring oxygen.</p>	1999	Obesidad
<p data-bbox="298 890 513 926">Miglitol (Bayer)</p>  <p>The chemical structure of Miglitol is a piperidine ring substituted with four hydroxyl groups (OH) at the 2, 3, 4, and 6 positions. A propyl chain is attached to the nitrogen atom (N) of the piperidine ring.</p>	1996	Antidiabético (tipo II)
<p data-bbox="298 1320 786 1356">Topotecan (Smith Kline Beecham)</p>  <p>The chemical structure of Topotecan is a complex polycyclic molecule. It consists of a quinoline ring system fused to a pyridine ring, which is further fused to a piperidine ring. The piperidine ring is substituted with a methyl group (CH₃) and a hydroxyl group (OH). The quinoline ring has a hydroxyl group (OH) at the 8-position and a dimethylamino group (N(CH₃)₂) at the 2-position. The pyridine ring is substituted with a methyl group (CH₃) and a hydroxyl group (OH) at the 4-position.</p>	1996	Antineoplásico

2.2 Medicina tradicional

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la medicina tradicional es la suma de conocimientos, técnicas y prácticas, basadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, que se utilizan para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar trastornos físicos o mentales.

Existen muchas formas de medicina tradicional, entre las que se incluyen la medicina tradicional china, el ayurveda hindú, la medicina unani árabe y las diversas formas de medicina indígena. Su práctica varía en gran medida de un país a otro y ésta se ve influenciada por factores como la historia, las actitudes personales y la filosofía.

La OMS ha estimado que más del 80 % de la población mundial recurre principalmente a la medicina tradicional para la atención primaria de su salud, siendo la herbolaria una de las prácticas más recurridas (Ahluwalia & Chopra, 2008).

Dependiendo de las terapias implicadas, la medicina tradicional puede clasificarse en terapias de medicación (utilizando hierbas, partes de animales o minerales) y en terapias sin medicación (como acupuntura, terapia termal, yoga y otras terapias físicas, mentales o espirituales).

En países donde el sistema de salud dominante se basa en la medicina alopática o donde la medicina tradicional no se ha incorporado en el sistema de salud nacional, la medicina tradicional se clasifica a menudo como medicina complementaria, alternativa o no convencional.

2.2.1 Plantas medicinales

Una planta medicinal es cualquier especie vegetal que contiene sustancias que son empleadas en el tratamiento tradicional de enfermedades, su estudio proviene de usos transmitidos.

México está clasificado como el tercer país en megadiversidad después de Brasil y Colombia, con flora de clima tropical y templado (Bye, 1995). Existen en nuestro país cerca de 21 600 especies de plantas vasculares, de las cuales más de 3 350 son consideradas como plantas medicinales. Sin embargo, a pesar de su riqueza y variedad, sólo un porcentaje pequeño de las plantas medicinales mexicanas han sido investigadas desde el punto de vista fitoquímico y farmacológico. De este modo, el potencial de las plantas medicinales mexicanas como una fuente de compuestos bioactivos permanece en gran medida inexplorada (Tringali, 2001). Además, la caracterización de los principios activos permite purificar los compuestos presentes en las plantas y descartar en los estudios con modelos animales, aquellos que pudieran ser tóxicos o generar efectos secundarios.

2.3 Complejo matarique

Ciertas plantas medicinales mexicanas se agrupan para su reconocimiento en complejos. Un complejo está compuesto por especies de plantas que comparten nombres en común, características morfológicas y/o aromáticas, así como el uso terapéutico en la medicina tradicional (Linares & Bye, 1987). El complejo permite explorar las bases etnobotánicas para entender cómo la gente reconoce, aprovecha y maneja las plantas para satisfacer sus necesidades.

Existen cinco especies de la familia Asteraceae nativas de México y Estados Unidos: *Psacalium decompositum*, *Psacalium peltatum*, *Psacalium sinuatum*, *Psacalium radulifolium* y *Acourtia thurberi* que se agrupan en el llamado Complejo Matarique. Además, todas estas especies son usadas

como remedio para diabetes, reumatismo, enfermedades gastrointestinales y del riñón. *Psacalium decompositum* es sumamente valorada porque además de emplearse en su ámbito natural, se comercializa en mercados a distancia y es considerada la especie más efectiva del complejo en el tratamiento de las afecciones antes mencionadas (Linares & Bye, 1987).

2.3.1 *Psacalium decompositum*

Es una planta terrestre silvestre originaria de México (figura1) que habita principalmente en la Sierra Madre Occidental y en el centro del país en un clima semiseco entre los 1 950 y 2 050 msnm, distribuida en zonas montañosas, asociada a matorral xerófilo y a bosque de pino.

Dicha planta llega a medir hasta un metro de altura. Posee un rizoma fibroso grueso, tallos casi leñosos, densamente pilosos o hirsutos en la base y con pelillos. Las hojas están divididas y miden hasta 40 cm de largo. Sus flores son blancas y están agrupadas en cabezuelas (figura 2).

Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Psacalium*

Especie: *Psacalium decompositum* (Gray) H.E. Robins & Brettell.

Nombre común: Matarique

Sinonimia: *Cacalia decomposita* A. Gray, *Mesadenia decomposita* (A. Gray)

Standley, *Odontotric decompositum* (A. Gray) Rydberg.



Figura 1. *Psacalium decompositum*, ejemplar de Chihuahua (Cronquist, 1980).

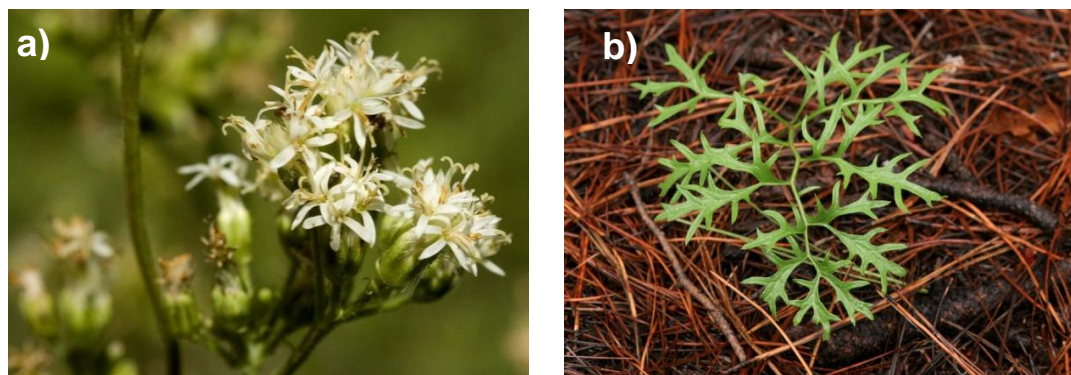


Figura 2. Flores a) y hojas b) de *Psacalium decompositum* (Alexander, 2006).

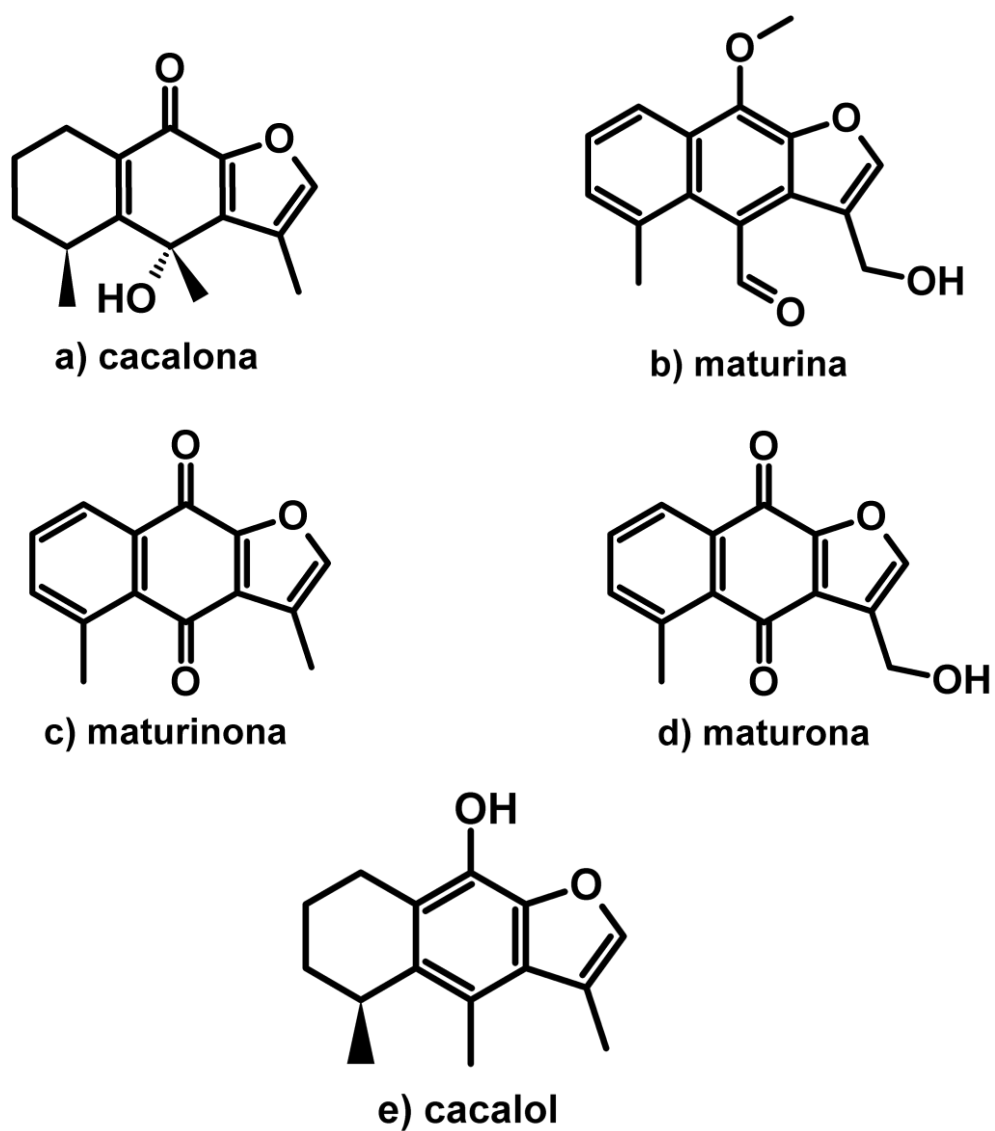


Figura 3. Sesquiterpenos naturales de las raíces de *P. decompositum*

Tradicionalmente el té de sus raíces se emplea como remedio para reumatismo, artritis, dolores musculares, resfriados, dolor de espalda, ictericia, cólicos en bebés, enfermedades renales, como diurético, para el tratamiento de diabetes, malaria y fiebre (Linares & Bye, 1987). Además, las raíces machacadas se utilizan en mordeduras de víbora y la infusión de las raíces como antiséptico en heridas (Bennett & Zingg, 1976).

Estudios fitoquímicos de las raíces de *P. decompositum* han mostrado que la cacalona, la maturina, la maturinona, la maturona y el cacalol (figura 3), son los principales constituyentes del extracto hexánico. Los liofilizados del extracto acuoso obtenido de las raíces de *P. decompositum* exhibieron actividad hipoglucemiante, tanto en ratones normoglucémicos, como en ratones diabéticos inducidos con aloxana (Alarcon-Aguilar et al., 2000).

2.3.2 Cacalol

El cacalol (5,6,7,8-tetrahidro-3,4,5-trimetilnafto(2,3-b)furan-9-ol) (figura 3e) es un sesquiterpeno del tipo furanoeremofilano, el cual fue aislado de las raíces de *P. decompositum* (Romo, 1964). También se ha obtenido este compuesto de *Cacalia delphiniifolia* Sleb et Zucc (Shindo et al., 2004).

Entre sus actividades biológicas publicadas, se ha demostrado que el cacalol tiene actividad antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Staphylococcus aureus*, y *Streptococcus pyogenes* (Jiménez-Estrada, 1992); posee actividad antihiperoglucemiante utilizando ratones de la línea C57BL-6J (Inman et al., 1999); produjo una inhibición significativa en el crecimiento radial de hongos fitopatógenos de *Alternaria* y *Fusarium* (Anaya, 1996); mostró una potente actividad antioxidante en el modelo de homogeneizado de cerebro de rata, además de ser una potente sustancia neuroprotectora (Shindo, et al., 2004) y presentar actividad antiinflamatoria en el modelo de edema en pata de ratón, inducido con carragenina y en el

modelo de edema en oreja de ratón, inducido con TPA (Jimenez-Estrada et al., 2006).

El cacalol se oxida fácilmente en presencia de la luz y del oxígeno, aún a temperatura ambiente, por lo que se debe mantener en refrigeración y protegido de la luz (González, 2007).

2.4 Proceso inflamatorio y su terapéutica

La inflamación constituye la reacción a un estímulo nocivo. Puede ser desencadenado por diversos agentes lesivos (como infecciones, anticuerpos o lesiones físicas). Al estar en contacto un organismo vivo con patógenos ambientales o sufrir una lesión, la capacidad de desencadenar una reacción inflamatoria resulta esencial para la supervivencia. Sin embargo, algunas veces, la respuesta inflamatoria normal puede ser demasiado intensa y sostenida, sin beneficio manifiesto e incluso conlleva graves consecuencias adversas, entre ellas procesos de enfermedad.

Sea cual sea el estímulo inicial, el proceso inflamatorio clásico consiste en calor, dolor, rubor y tumefacción (hinchazón). La respuesta inflamatoria surge en tres fases cronológicas precisas, cada una al parecer mediada por mecanismos diferentes:

1) **Fase aguda.** La cual se caracteriza por vasodilatación local transitoria y mayor permeabilidad capilar.

2) **Fase subaguda tardía.** Caracterizada por infiltración de leucocitos y células fagocíticas.

3) **Fase proliferativa crónica.** Donde hay degeneración y fibrosis hísticas (Brunton, 2007).

Existen diferentes medicamentos para el tratamiento de la inflamación, éstos generalmente se clasifican en dos grupos: los esteroideos, como los glucocorticoides y los no esteroideos (AINE's), como el ácido acetilsalicílico.

2.4.1 Glucocorticoides

Los glucocorticoides son los agentes inflamatorios más potentes disponibles. Varios son los mecanismos responsables de estas acciones. Los glucocorticoides inhiben el acceso de los leucocitos al foco inflamatorio y suprimen la producción de numerosos mediadores químicos de la inflamación o sus efectos.

Los glucocorticoides interfieren con todas las etapas de la respuesta inflamatoria. Además, tienen una amplia influencia y afectan cada célula en el sistema inmune.

Sus efectos adversos, están relacionados a la cantidad de fármaco administrado diariamente y la duración del tratamiento. Entre los efectos adversos se incluyen: incremento de apetito, aumento de peso, indigestión, ansiedad, hirsutismo, diabetes mellitus, osteoporosis, úlcera péptica, hipertensión, depresión, glaucoma, entre otros (Hitner & Nagle, 2012).

2.4.2 Antiinflamatorios no esteroideos (AINE's)

El principal mecanismo de acción de los AINEs es la inhibición de la actividad metabolizadora del ácido araquidónico de la enzima ciclooxigenasa (COX).

Existen dos isoenzimas COX: COX-1 y COX-2. COX-1 es una enzima constitutiva con funciones de vigilante, implicada en la homeostasis celular; COX-2 es una enzima inducida en las células inflamatorias y produce los mediadores prostanoideos de la inflamación.

Las enzimas ciclooxigenasas son bifuncionales ya que presentan dos actividades diferentes: la acción principal, que da lugar a la prostaglandina E₂ (PGE₂) y una acción de peroxidasa, la cual convierte la prostaglandina G₂ (PGG₂) en prostaglandina H₂ (PGH₂). Tanto los inhibidores de COX-1 como los de COX-2 inhiben únicamente la reacción principal de peroxidación.

La inhibición de la COX-1 en general, es instantánea e irreversible por competitividad. La inhibición de la COX-2 es independiente del tiempo. Otras acciones además de la inhibición de la COX pueden contribuir a los efectos antiinflamatorios de algunos AINE's. Los radicales de oxígeno reactivos producidos por los neutrófilos y macrófagos, están implicados en la lesión tisular de algunas enfermedades y los AINE's que presentan efectos eliminadores de radicales de oxígeno especialmente potentes, así como actividad inhibidora de la COX, pueden reducir la lesión tisular.

Los AINE's presentan tres acciones principales farmacológicamente deseables, que resultan de la inhibición de la ciclooxigenasa del ácido araquidónico en las células inflamatorias (isoenzima COX-2) y el consiguiente descenso de la síntesis de prostanoïdes. Sus efectos consisten en:

1) Acción antiinflamatoria, el descenso de las prostaglandinas vasodilatadoras significa menos vasodilatación e indirectamente menos edema. La acumulación de células inflamatorias no se ve reducida.

2) Efecto analgésico, la menor generación de prostaglandinas origina una menor sensibilización de las terminales nerviosas nociceptoras por los mediadores inflamatorios, como bradicinina y 5-hidroxitriptamina. El alivio de la cefalea es probablemente el resultado de una menor vasodilatación mediada por prostaglandinas.

3) Efecto antipirético, se debe principalmente a un descenso de la prostaglandina mediadora (generado en respuesta al pirógeno inflamatorio IL-1) que es el responsable de la elevación del punto de ajuste de la temperatura hipotalámica, lo que causa fiebre (Rang et al., 2004).

Todos los AINE's, incluidos los inhibidores selectivos de la COX-2, son fármacos antipiréticos, analgésicos y antiinflamatorios, con excepción del acetaminofén, el cual es antipirético y analgésico, con una actividad antiinflamatoria mínima.

La administración de los AINES debe ser cuidadosamente valorada, ya que producen una gran variedad de efectos secundarios como náuseas, vómitos, dolor abdominal, ulceraciones en tracto digestivo, diarrea, antiagregación plaquetaria, ictericia, cefalea, mareos, insomnio e hipertensión. Por su recurrencia y trascendencia clínica, la patología digestiva que incide sobre la mucosa gastrointestinal es la que más destaca (Espinós et al., 2009).

La toxicidad gastrointestinal de los AINE's está relacionada con la supresión de la síntesis de prostaglandinas mediante la inhibición de la actividad de la COX. Las prostaglandinas inhiben la secreción de ácido gástrico estimulada por la alimentación, la histamina o la gastrina, y aumentan la secreción de la mucosa en el estómago y el intestino delgado. Estos efectos ayudan a mantener la integridad de la mucosa gástrica, promover la curación y contribuir así a la citoprotección del epitelio gástrico (Kourounakis et al., 2000).

En la tabla 2 se indica la clasificación de los AINE's de acuerdo con Brunton *et al.*

Tabla 2. Clasificación de los AINE's (Brunton *et al.*, 2007).

Clase	Fármacos
Salicilatos	Acido acetilsalicílico, benorilato, diflunisal
Derivado paraaminofenol	Acetaminofén
Derivados del ácido propiónico	Ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno
Derivados del ácido acético	Indometacina, sulindac, tolmetina, diclofenaco, etodolaco, ketorolaco
Fenamatos	Ácido mefenámico, meclofenamato, ácido flufenámico
Derivados del oxicam	Piroxicam, meloxicam, tenoxicam
Inhibidores selectivos de la COX2	Celecoxib, valdecoxib, parecoxib

2.4.2.1 Naproxeno e ibuprofeno

En Estados Unidos se ha aprobado el uso de los derivados del ácido propiónico en el tratamiento sintomático de artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante y artritis gotosa aguda. También se les utiliza como analgésicos en tendinitis, bursitis agudas y en la dismenorrea primaria.

Dentro de este grupo se encuentran varios compuestos (ejemplos en Tabla 2), entre ellos el naproxeno (ácido S-2-(6-metoxinaftil) propanoico) y el ibuprofeno (ácido R, S-2-(4-isobutilfenil) propanoico); los cuales están entre los fármacos AINE's más prescritos comúnmente para el control de la inflamación y el dolor (figura 4a y 4b).

El ibuprofeno es el AINE de mayor uso en Estados Unidos y fue el primer miembro de la familia de los derivados de ácido propiónico en ser una alternativa mejor tolerada que el ácido acetilsalicílico (Brunton, et al., 2007). El naproxeno y el ibuprofeno bloquean las enzimas COX-1 y COX-2 que producen prostaglandinas, en consecuencia reducen la inflamación, el dolor y la fiebre. Además, el ibuprofeno actúa como un analgésico central e inhibe la actividad fúngica. Sin embargo, estos fármacos están asociados con importantes efectos secundarios adversos, especialmente complicaciones de úlcera gastrointestinal (Katritzky et al., 2009). La presencia del grupo carboxílico es parcialmente responsable de esta toxicidad (Jankowski et al., 2004).

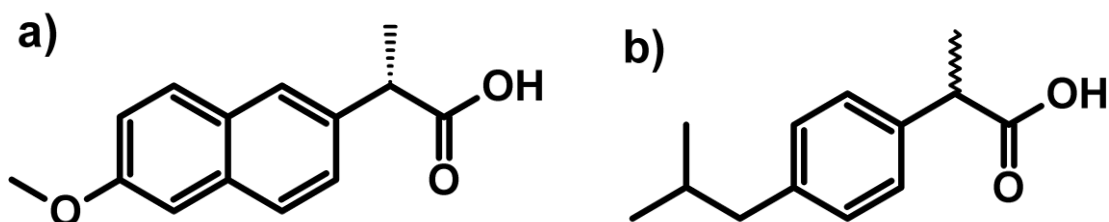


Figura 4. a) Estructura del naproxeno y b) estructura del ibuprofeno (\pm)

Varias estrategias han sido usadas para reducir el daño gastrointestinal ocasionado por estos fármacos. Éstas incluyen el uso

racional de los AINE's, el uso de co-terapia para prevenir la toxicidad asociada a ellos, así como la síntesis de nuevos y mejores candidatos.

Enmascarar el grupo carboxílico de los AINE's reduce significativamente la acción irritante tópica. Por lo tanto, la utilización de profármacos que protegen temporalmente los grupos funcionales ácidos de estos antiinflamatorios, debería reducir o suprimir la irritación debido al contacto directo y el aumento en su absorción. La amidación del carboxilo es una posibilidad, aunque también puede ser hecho por la vía de diferentes esterificaciones (Jankowski, et al., 2004). Además nuevos profármacos, ésteres de ibuprofeno derivados de α -alquil-glucopiranosido y otros azúcares, han demostrado poseer un incremento de actividad antiinflamatoria y analgésica con reducción de la úlcera gastrointestinal (Katritzky, et al., 2009). También, varios derivados sintetizados de naproxeno en forma de ésteres, amidas y glicolamidas se han descrito (Halen et al., 2007; P. C. Sharma et al., 2011).

2.5 Ácido cinámico y ácido *p*-metoxicinámico

El ácido cinámico (figura 5a) es un compuesto que se encuentra naturalmente en muchas especias (por ejemplo, canela y clavo), arándanos y ciruelas pasas.

Los ácidos cinámicos son abundantes en muchas fuentes naturales y usados también como precursores para la síntesis de ésteres cinámicos de importancia comercial.

Se ha descrito que poseen varias propiedades biológicas incluyendo las actividades hepatoprotectora (Perez-Alvarez et al., 2001), antimalárica (Wiesner et al., 2001) y antioxidante (Natella et al., 1999).

El ácido cinámico se utiliza como saborizante en la industria alimentaria y los ésteres cinámicos que son obtenidos de diversas fuentes naturales tienen aplicación en perfumería, industrias cosméticas y farmacéuticas (P. Sharma, 2011). Ésteres derivados del ácido cinámico con

ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico presentaron alta actividad antimicrobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra (Adisakwattana et al., 2004). Asimismo, resulta interesante la actividad antiinflamatoria encontrada en los ésteres cinamato de pulegilo y cinamato de mentilo (Godoy et al., 2000).

El cinamato de isobutilo exhibió una fuerte actividad antibacterial contra bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) y Gram negativo (*Escherichia coli*), así como propiedades antifúngicas (Narasimhan et al., 2004).

El ácido *p*-metoxicinámico (figura 5b) exhibe una potente acción protectora en hepatocitos de rata, induciendo toxicidad con tetracloruro de carbono (CCl₄) (Lee et al., 2002), una potente actividad inhibitoria de la α -glucosidasa (Adisakwattana, et al., 2004); propiedad antihiper glucemiante (Adisakwattana et al., 2005), así como actividad antidiabética, ya que mostró buena actividad en la secreción de insulina cuando se usó glibenclamida como control positivo (Yibchok-anun et al., 2008).

Además, este ácido es un inhibidor no competitivo de la α -glucosidasa, mientras que el *p*-metoxicinamato de etilo muestra una mayor actividad inhibitoria de la α -glucosidasa microbiana, en comparación con varios derivados de ácido cinámico (Adisakwattana, et al., 2004).

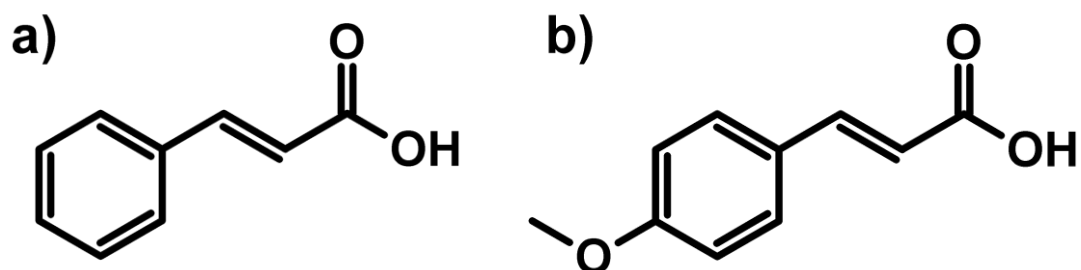


Figura 5. Estructura del ácido cinámico a) y ácido *p*-metoxicinámico b)

2.6 Modelo de edema en oreja de ratón inducido con acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol (TPA)

En la búsqueda de nuevos compuestos antiinflamatorios es importante el empleo de modelos experimentales en animales, ya que dependiendo del protocolo experimental, los resultados se pueden en parte extrapolar al posible comportamiento en humanos. Existen varios tipos de protocolos en función de la forma de aplicación; del agente irritante utilizado o de la duración del proceso inducido. Dentro de los modelos de inflamación aguda se encuentran el edema en pata de ratón inducido por carragenina, el edema en oreja de ratón inducido con TPA y el protocolo experimental por aceite de croton (Gómez-Estrada et al., 2011).

El modelo de edema en oreja de ratón inducido con TPA (por sus siglas en inglés) usa este compuesto, ya que es un potente agente proinflamatorio y promotor de tumores que se encuentra en el aceite de croton (*Croton tiglium* L.). La administración tópica de TPA provoca un edema agudo con infiltración leucocitaria (Hetter, 2000). Tras la aplicación de TPA en oreja de ratón, se produce un eritema y vasodilatación entre 1-2 h, y a las 3-4 h aumenta el grosor como consecuencia de la extravasación de líquido. A nivel histológico se observa agregación plaquetaria a las 2 h.

La evaluación del efecto farmacológico se hace mediante la medición de la diferencia de peso entre una oreja inflamada y la oreja no inflamada, para lo cual se requiere el sacrificio previo del animal. El porcentaje de inhibición del edema es el incremento de peso de la muestra de la oreja derecha con respecto a la izquierda.

La ventaja del método es la rapidez y se necesita poca muestra para desarrollar un estudio e incluso una curva dosis-efecto. El principal inconveniente radica en la falta de selectividad, ya que un elevado número de fármacos y sustancias objeto de análisis, suelen dar resultados positivos en esta prueba (Young & De Young, 1989).

2.7 Actividad antioxidante

Los antioxidantes son compuestos que inhiben o retardan los procesos oxidativos, abatiendo la iniciación de las reacciones oxidantes, las cuales son efectuadas por especies reactivas del oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) y especies reactivas del nitrógeno (RNS) principalmente. Los mecanismos de acción antioxidante implican el atrapamiento de radicales libres, la capacidad de quelar iones oxidantes y la liberación de moléculas antioxidantes mediante la expresión de genes. En la actualidad las moléculas oxidantes cumplen una función muy importante en el área médica, ya que algunos trastornos crónico-degenerativos como la artritis reumatoide, aterosclerosis, diabetes mellitus, carcinoma cutáneo, ciertos desórdenes neurodegenerativos y algunas enfermedades debilitantes del sistema inmune, se han relacionado con el estrés oxidativo. Este fenómeno lo experimentan un gran número de moléculas en los sistemas biológicos, como los lípidos (peroxidación), las proteínas y el ADN (Dominguez et al., 2005).

Los antioxidantes además tienen aplicación en otras áreas como la fabricación de cosméticos y en la industria alimentaria, como conservadores de alimentos ricos en lípidos.

Existen diferentes métodos para determinar la actividad antioxidante de un compuesto, los cuales difieren en el mecanismo de acción. Dentro de éstos se encuentran el método del radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (representado como DPPH•) y método de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) para medir la peroxidación lipídica, los cuales se realizaron en el presente trabajo.

2.7.1 Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH•)

Es un método espectrofotométrico basado en la capacidad de un compuesto para reducir al radical DPPH• (Huang et al., 2005). Este radical

presenta un máximo de absorción UV-visible a 515 nm donde su color es púrpura y al adicionar un neutralizador de radicales libres o un compuesto antioxidante, el DPPH• (figura 6a) se reduce pasando a un color amarillo (Molyneux, 2004).

El porcentaje de DPPH• (figura 6b) remanente es proporcional a la actividad antioxidante. La concentración de antioxidante que provoca una disminución del 50 % en la concentración inicial de DPPH• se define como IC₅₀.

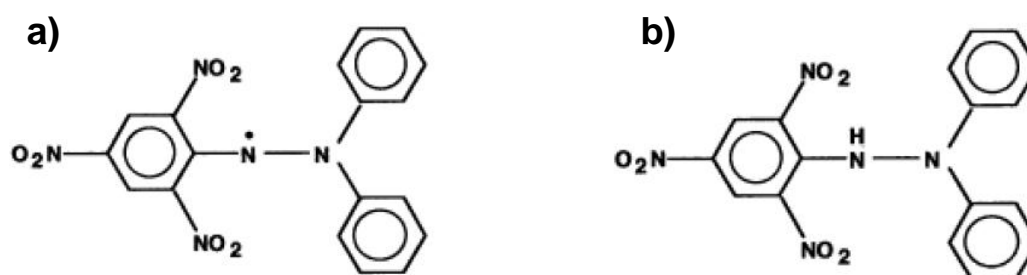


Figura 6. a) 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, b) 2,2-difenil-1-picrilhidrazina

Este método es rápido y de mucha ayuda en la investigación, ya que mide la actividad atrapadora de radicales libres por compuestos puros, compuestos naturales aislados, extractos crudos de plantas y alimentos (Amarowicz et al., 2004).

2.7.2 Método de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS)

La peroxidación de lípidos es una consecuencia principal del estrés oxidativo y se considera generalmente como el resultado de una interacción de las especies reactivas de oxígeno con lípidos poliinsaturados en membranas celulares.

Un método extensamente adoptado y sensible para la medida de peroxidación de lípidos es el ensayo de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS por sus siglas en inglés).

El ensayo TBARS cuantifica el estrés oxidativo midiendo el daño peroxidativo a lípidos, que ocurre con la generación de radicales libres. Como resultado de la peroxidación de lípidos se forma entre otros productos el malondialdehído (MDA), el cual reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) cuando es calentado a pH bajo, para producir un cromóforo rosa que puede ser medido espectrofotométricamente a 535 nm (Esterbauer & Cheeseman, 1990).

2.8 Síntesis Híbrida

La investigación médica está en constante búsqueda de mejorar la eficacia de los fármacos. A veces un fármaco simple no siempre es capaz de controlar la enfermedad, por lo que se requiere la combinación de fármacos con diferentes perfiles terapéuticos (Schellenberg et al., 2006). Uno de los avances médicos para resolver esta problemática involucra el uso de los llamados fármacos híbridos, los cuales constan de la incorporación de dos farmacóforos en una sola molécula, con el propósito de ejercer una acción dual. Una de las partes híbridas puede ser incorporada para contrarrestar los efectos secundarios asociados con la otra parte de la molécula o para amplificar sus efectos a través de la acción en otro blanco biológico (Saadeh et al., 2009).

Por ejemplo, el paracetamol con propiedades analgésicas y el ácido acetilsalicílico con propiedades analgésicas y antiinflamatorias, forman la molécula híbrida de benorilato (figura 7) mediante su unión covalente, teniendo así un fármaco con acción dual (Avendaño, 2001).

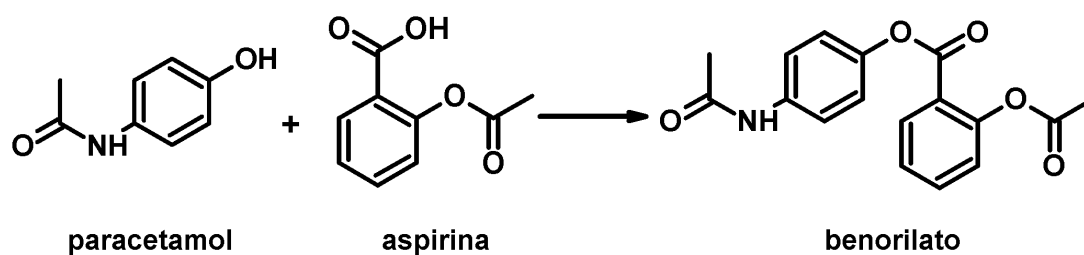


Figura 7. Benorilato, fármaco híbrido.

Las moléculas híbridas están formadas por dos porciones estructurales o moléculas que constituyen principios activos; estos componentes son capaces de desencadenar respuestas biológicas por mecanismos distintos.

Básicamente, los fármacos híbridos pueden convertirse en moléculas nuevas con identidades independientes de sus precursores (Saadeh, et al., 2009).

La calificación de híbrido sólo se aplica a moléculas constituidas por componentes diferentes (Meunier, 2008).

En la literatura se mencionan diversas moléculas que se han desarrollado como moléculas híbridas. Entre ellas se encuentra la trioxaquina PA1103 (figura 8), molécula híbrida antimalaria (Muregi & Ishih, 2010).

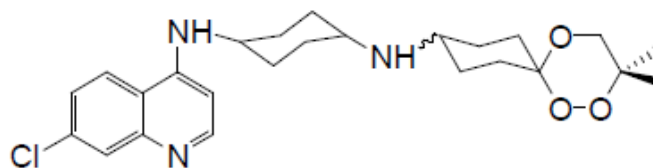


Figura 8. Trioxaquina PA1103

3. JUSTIFICACIÓN

Los AINE´s son fármacos que se utilizan ampliamente en la medicina para el tratamiento de los procesos inflamatorios. Sin embargo, los grupos carboxílicos que contienen algunos de estos compuestos son parcialmente responsables de los efectos secundarios adversos como la toxicidad gastrointestinal. Se ha demostrado que esta toxicidad se ve disminuida cuando se enmascara el grupo carboxilo obteniendo derivados de ésteres y de amidas.

En este trabajo se estudia al cacalol, un sesquiterpeno que se obtiene de las raíces de *P. decompositum*, el cual posee actividad antiinflamatoria; tomando como base a este compuesto, se pretende obtener moléculas híbridas que sean derivados esterificados de naproxeno e ibuprofeno, con la propuesta de mejorar la actividad antiinflamatoria del cacalol y por consiguiente disminuir la toxicidad gastrointestinal que generan estos AINE´s.

Además, se ha encontrado recientemente que el ácido cinámico y ácido *p*-metoxicinámico tienen efecto antiinflamatorio. Por ello, se tiene interés en obtener también ésteres de cacalol con ácido cinámico y ácido *p*-metoxicinámico, para probarlos como antiinflamatorios.

Diferentes grupos de investigación proponen que la actividad antiinflamatoria de algunos compuestos se debe a su actividad antioxidante, es por ello que a las moléculas híbridas también se les evaluó su actividad antioxidante.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

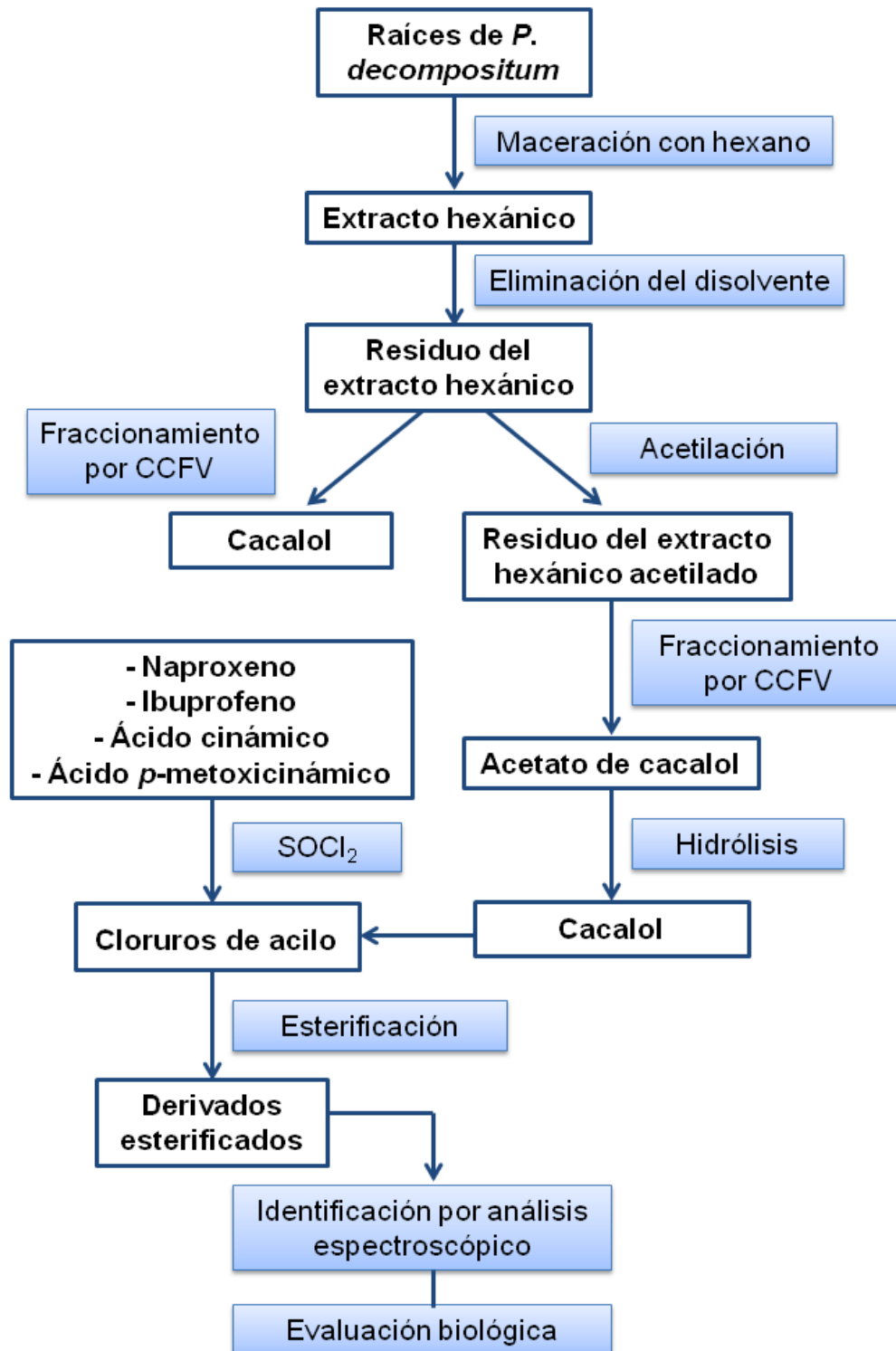
Obtener por semisíntesis ésteres de cacalol con naproxeno, ibuprofeno, ácido cinámico y ácido *p*-metoxicinámico y llevar a cabo la evaluación de su actividad antiinflamatoria y antioxidante.

4.2 Objetivos particulares

- Obtener cacalol del extracto hexánico de las raíces de *P. decompositum*.
- Sintetizar los derivados de cloruro de acilo de naproxeno, ibuprofeno, ácido cinámico y ácido *p*-metoxicinámico.
- Obtener por semisíntesis los ésteres de cacalol con naproxeno, ibuprofeno, ácido cinámico y ácido *p*-metoxicinámico.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de los ésteres de cacalol obtenidos, mediante el modelo de TPA y la actividad antioxidante por medio de los modelos de DPPH y TBARS.

5. METODOLOGÍA

La metodología general del estudio se muestra a continuación:



5.1 Material, reactivos y equipo

La cromatografía por adsorción en columna abierta se realizó en gel de sílice, tamaño de malla 70-230. La cromatografía en columna flash con vacío se realizó con gel de sílice, tamaño de malla 230-400 en una columna de vidrio con filtro, capacidad de 500 mL y 3.5 cm de diámetro.

Para la cromatografía en capa fina (CCF) se utilizaron placas de aluminio recubiertas de gel de sílice 60 (ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄ MACHEREY-NAGEL) de 0.20 mm de espesor y para la cromatografía en placa preparativa se usaron placas de vidrio de 10 x 20 cm, recubiertas de gel de sílice 100 (ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄ MACHEREY-NAGEL).

El monitoreo de las fracciones se realizó mediante placas cromatográficas visualizadas a la luz UV con longitud de onda 254 nm y 356 nm. El revelado de las placas se realizó por aspersion con una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N, seguido de un calentamiento hasta la visualización de los compuestos.

Los disolventes hexano (Hx), diclorometano, acetato de etilo (AcOEt), acetona y etanol, fueron destilados antes de utilizarse.

- Ácido trans-cinámico, 97%, Aldrich-Chemistry
- Ácido *p*-cumárico, 98.0% (HPLC), Sigma
- Anhídrido Acético, 97% para análisis, Merck
- Carbonato de Potasio, 99.5%, Técnica Química, S.A.
- Cloruro de tionilo, para síntesis, Merck
- Dimetil sulfato, 99+%, Aldrich
- Ibuprofeno, 98% (GC), Sigma
- Naproxeno, USP, Sigma-Aldrich
- Piridina anhidra, 99.8%, Sigma-Aldrich

5.2 Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

Los análisis se efectuaron en el Instituto de Química de la UNAM. Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Fisher-Johns y no se encuentran corregidos.

Los espectros de IR se obtuvieron en un espectrofotómetro FT-IR Bruker Tensor 27, en solución de cloroformo.

Los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico se determinaron en un espectrofotómetro Jeol JMS-AX505 HA (70 eV).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN ^1H) y de Carbono 13 (RMN ^{13}C) se realizaron en los equipos Varian Unity Inova (500 MHz) y Bruker Avance III (400 MHz), utilizando en todos los experimentos CDCl_3 como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

5.3 Obtención de material vegetal.

Las raíces de matarique (*Psacalium decompositum*) se compraron en el mercado de Sonora, ubicado en la Delegación Venustiano Carranza del Distrito Federal.

La identificación se llevó a cabo mediante comparación del perfil cromatográfico de un ejemplar previamente identificado proveniente del Estado de Chihuahua.

5.4 Obtención del residuo del extracto hexánico

El proceso de extracción se hizo mediante maceración de las raíces en hexano. Se pesaron 1 000 g de raíces secas de *P. decompositum*, las cuales se trituraron en un molino de cuchillas con tamiz de 2 mm. Se colocó el material vegetal molido en un matraz de bola, con 3 L de hexano, a

temperatura ambiente, durante 24 horas. Posteriormente, se filtró para separar el material vegetal y se eliminó el disolvente del extracto orgánico por destilación, a presión reducida en un rotaevaporador. El proceso de extracción se repitió 8 veces en las condiciones descritas. El monitoreo de las maceraciones se hizo por cromatografía en capa fina (CCF).

5.5 Obtención de cacalol

5.5.1 Cromatografía en columna flash al vacío del residuo del extracto hexánico

3 g del residuo del extracto orgánico de *P. decompositum* se sometieron a un fraccionamiento mediante cromatografía en columna flash al vacío (CCFV). El residuo se disolvió con 5 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) y se le añadieron 3 g de gel de sílice para pre-adsorberse. Se eliminó el disolvente con agitación constante hasta la obtención de un polvo.

La columna se empacó utilizando 15 g de gel de sílice (previamente mezclado con hexano) como fase estacionaria. Posteriormente, el residuo adsorbido se añadió a la columna, formando una capa uniforme. El desarrollo de la columna se realizó empleando como fase móvil mezclas de hexano y acetato de etilo en polaridad creciente.

Se colectaron 45 fracciones de 20 mL, las cuales fueron monitoreadas por CCF. Las fracciones que presentaron similitud cromatográfica se reunieron y fueron concentradas al vacío.

5.5.2 Hidrólisis del acetato de cacalol

5.5.2.1 Reacción de acetilación del residuo del extracto hexánico de *P. decompositum*

En un matraz Erlenmeyer se colocaron 9 g del residuo del extracto hexánico de *P. decompositum*, se le añadieron 8 mL de piridina anhidra y 10

mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó 48 h a temperatura ambiente.

Posteriormente a dicha mezcla de reacción, se le añadieron 15 mL de agua y 15 mL de acetato de etilo. El contenido del matraz se trasvasó a un embudo de separación y se le añadieron 10 mL de una solución de HCl al 10%. La fase acuosa se llevó hasta pH neutro con una solución de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) al 10%. Se recuperó la fase orgánica y se le agregó sulfato de sodio (Na_2SO_4) anhidro para eliminar los residuos de agua, se filtró y se concentró a presión reducida.

5.5.2.2 Cromatografía en columna flash al vacío, del residuo del extracto hexánico acetilado

El producto de la reacción de acetilación se separó mediante CCFV. Se tomaron 5 g del residuo acetilado, se disolvieron con 7 mL de CH_2Cl_2 y se le añadieron 5 g de gel de sílice. Se eliminó el disolvente con agitación constante hasta que se obtuvo un polvo.

La columna se empacó utilizando 15 g de gel de sílice (previamente mezclado con hexano) como fase estacionaria. Una vez empacada la columna, el residuo acetilado adsorbido se agregó a la columna formando una capa uniforme. Se colectaron fracciones de 20 mL cada una, empleando hexano como fase móvil.

Se obtuvieron 131 fracciones en total. El fraccionamiento fue monitoreado por cromatografía en capa fina, reuniendo las fracciones que mostraron similitud. Estas fracciones se concentraron en el rotaevaporador.

5.5.2.3 Reacción de hidrólisis de acetato de cacalol

El acetato de cacalol se sometió a una reacción de hidrólisis, para lo cual se colocaron en un matraz Erlenmeyer 120 mg (0.4411 mmol) del compuesto, 10 mL de etanol y 8 mL de solución de KOH al 10%. La mezcla de reacción se calentó en baño de agua durante 20 minutos, enseguida se

vertió a un embudo de separación donde se adicionaron 10 mL de AcOEt y 10 mL de agua y se trató con solución acuosa de HCl al 10% hasta pH neutro. Se separó la fase orgánica y se le agregó Na_2SO_4 anhidro, después se filtró y se concentró en un rotaevaporador hasta eliminar todo el disolvente. En el matraz bola se observó la formación de un sólido amarillo.

5.6 Obtención de derivados de cacalol

5.6.1 Esterificación de cacalol con naproxeno

En un matraz bola (matraz A) se colocaron 96.4 mg (0.4191 mmol) de naproxeno y 0,5 mL de cloruro de tionilo (SOCl_2). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación constante, a reflujo a 70 °C, en un baño de aceite. Se instaló una trampa de cloruro de calcio (CaCl_2) en el extremo superior del refrigerante y la mezcla se mantuvo en reacción durante una hora y media.

Terminado el tiempo de reacción, la mezcla se dejó enfriar y el exceso de SOCl_2 se destiló a presión reducida.

Se pesaron 113,6 mg (0.4176 mmol) de acetato de cacalol y se realizó la hidrólisis como se describe anteriormente. Los cristales de cacalol obtenidos se disolvieron en 6 mL de piridina anhidra y esta solución se vertió al matraz A, al cual se le se adaptó un refrigerante en posición vertical, con una trampa de CaCl_2 y se mantuvo a temperatura ambiente, con agitación constante durante 15 horas.

Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se colocó en un embudo de separación y se le añadieron 10 mL de agua, 10 mL de AcOEt y 5 mL de una solución de HCl al 10 %. Se separó la fase orgánica y se extrajo dos ocasiones más con solución de HCl al 10 %. La fase acuosa se llevó a pH neutro, utilizando una solución de NaHCO_3 al 10 %. Separada la fase orgánica, se trató con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. Se procedió a purificar el residuo por cromatografía en placa

preparativa de gel de sílice, empleando como eluyente la mezcla de disolventes Hx:AcOEt (8:2).

5.6.2 Esterificación de cacalol con ibuprofeno.

En un matraz bola (matraz B) se colocaron 91.1 mg (0.4416 mmol) de ibuprofeno y 0,5 mL de SOCl_2 . La mezcla de reacción se mantuvo con agitación constante, a reflujo a 70 ° C, en un baño de aceite. Se instaló una trampa de CaCl_2 en el extremo superior del refrigerante y la mezcla se mantuvo en reacción durante una hora y media. Transcurrido este tiempo, la mezcla se dejó enfriar y el exceso de SOCl_2 se destiló a presión reducida.

Se pesaron 119.8 mg (0.4404 mmol) de acetato de cacalol y se realizó la hidrólisis como se describe previamente. Los cristales de cacalol obtenidos se disolvieron en 6 mL de piridina anhidra y esta solución se trasvasó al matraz B, al cual se le adaptó un refrigerante en posición vertical, con una trampa de CaCl_2 y se mantuvo a temperatura ambiente, con agitación constante durante 15 horas.

Después de este tiempo, la mezcla de reacción se vertió en un embudo de separación y se le añadieron 10 mL de agua, 10 mL de AcOEt y 5 mL de una solución de HCl al 10 %. Se separó la fase orgánica y se extrajo dos ocasiones más con solución de HCl al 10 %. La fase acuosa se llevó a pH neutro con una solución de NaHCO_3 al 10 %. Separada la fase orgánica, se trató con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. Se purificó el residuo por cromatografía en placa preparativa de gel de sílice, empleando como eluyente la mezcla de disolventes Hx:AcOEt (8:2).

5.6.3 Esterificación de cacalol con ácido cinámico.

En un matraz bola (matraz C) se colocaron 62.4 mg (0.4216 mmol) de ácido cinámico y 0,5 mL de SOCl_2 . La mezcla de reacción se mantuvo con agitación constante, a reflujo a 70 ° C, en un baño de aceite. Se instaló una

trampa de CaCl_2 en el extremo superior del refrigerante y la mezcla se mantuvo en reacción durante una hora y media. Terminado el tiempo de reacción, la mezcla se dejó enfriar y el exceso de SOCl_2 se destiló a presión reducida.

Se pesaron 113,6 mg (0.4176 mmol) de acetato de cacalol y se realizó la hidrólisis como se describe previamente. Los cristales de cacalol obtenidos se disolvieron en 6 mL de piridina anhidra y esta solución se trasvasó al matraz C, al cual se le adaptó un refrigerante en posición vertical, con una trampa de CaCl_2 y se mantuvo a temperatura ambiente, con agitación constante durante 15 horas.

Transcurrido este lapso, la mezcla de reacción se colocó en un embudo de separación y se le añadieron 10 mL de agua, 10 mL de AcOEt y 5 mL de una solución de HCl al 10 %. Se separó la fase orgánica y se extrajo dos ocasiones más con solución de HCl al 10 %. La fase acuosa se llevó a pH neutro con NaHCO_3 al 10 %. Separada la fase orgánica, se trató con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. Se procedió a purificar el residuo por cromatografía en placa preparativa de gel de sílice, empleando como eluyente la mezcla de disolventes Hx:AcOEt (8:2).

5.6.4 Esterificación de cacalol con ácido *p*-metoxicinámico

5.6.4.1 Metoxilación de ácido *p*-hidroxicinámico

La metodología seguida para la síntesis del ácido *p*-metoxicinámico fue tomada de (Bisogno et al., 2007). En un matraz bola se pesaron 500 mg (3.0458 mol) de ácido *p*-hidroxicinámico y se disolvieron en 80 mL de acetona anhidra, se añadieron 1,7 g de carbonato de potasio (K_2CO_3) y 4 mL de dimetil sulfato anhidro ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$), la mezcla de reacción fue calentada en reflujo a 80 °C por 4 horas. Terminado el tiempo de reacción, la mezcla se filtró y se concentró en el rotaevaporador. El producto obtenido se colocó en un matraz Erlenmeyer, se le adicionaron 15 mL de solución de KOH al 10%, 20 mL de etanol y se colocó en baño de agua durante 20 minutos.

Posteriormente se vertió a un embudo de separación donde se añadieron 15 mL de AcOEt, se trató con solución acuosa de HCl al 10% y se llevó a pH de 6. Se agregó Na₂SO₄ anhidro a la fase orgánica, se filtró y se concentró a presión reducida hasta eliminar todo el disolvente.

5.6.4.2 Esterificación de cacalol con ácido *p*-metoxicinámico

En un matraz bola (matraz D) se colocaron 74,1 mg (0.4158 mmol) de ácido *p*-metoxicinámico y 0,5 mL de SOCl₂. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación constante, a reflujo a 70 ° C, en un baño de aceite. Se instaló una trampa de CaCl₂ en el extremo superior del refrigerante y la mezcla se mantuvo en reacción durante una hora y media. Terminado el tiempo de reacción, la mezcla se dejó enfriar y el exceso de SOCl₂ se destiló a presión reducida.

Se pesaron 114.1 mg (0.4194 mmol) de acetato de cacalol y se realizó la hidrólisis como se describe previamente. Los cristales de cacalol obtenidos se disolvieron en 6 mL de piridina anhidra y esta solución se trasvasó al matraz D, al cual se le adaptó a un refrigerante en posición vertical, con una trampa de CaCl₂, a 70 °C, con agitación constante durante 15 horas.

Posteriormente, la mezcla de reacción se vertió en un embudo de separación y se le añadieron 10 mL de agua, 10 mL de AcOEt y 5 mL de una solución de HCl al 10 %. Se separó la fase orgánica y se extrajo dos ocasiones más con solución de HCl al 10 %. La fase acuosa se llevó a pH neutro con una solución de NaHCO₃ al 10 %. Separada la fase orgánica, se trató con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. Se procedió a purificar el residuo por cromatografía en placa preparativa de gel de sílice, empleando como eluyente la mezcla de disolvente Hx:AcOEt (8:2).

5.7 Actividad antiinflamatoria y antioxidante de los derivados.

Las actividades antiinflamatoria y antioxidante de los ésteres de cacalol obtenidos, fueron evaluadas en el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química de la UNAM.

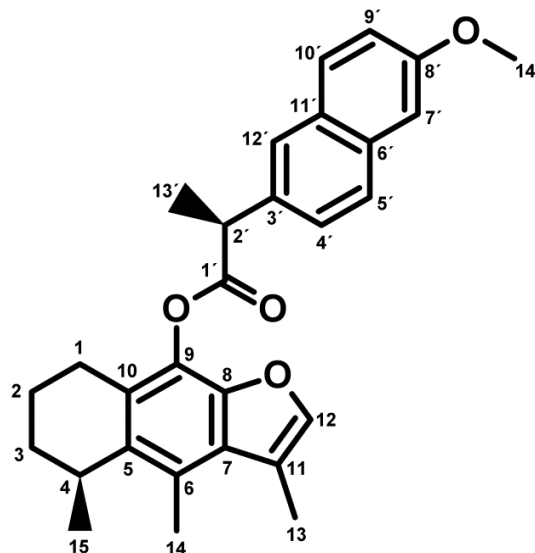
6. DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS

Compuesto 1.

Éster de naproxeno con cacalol

(C₂₉H₃₀O₄)

M.M. 442 g/mol



IR ν_{\max} cm⁻¹ (CHCl₃): 3008 (C-H aromático), 2935 (C-H alifático), 2871 (C-H alifático), 1753 (C=O), 1606 (C=C conjugado), 1454 (C-H alifático), 1393 (C-H alifático), 1237 (C-O-C) y 1173 (C-O-C).

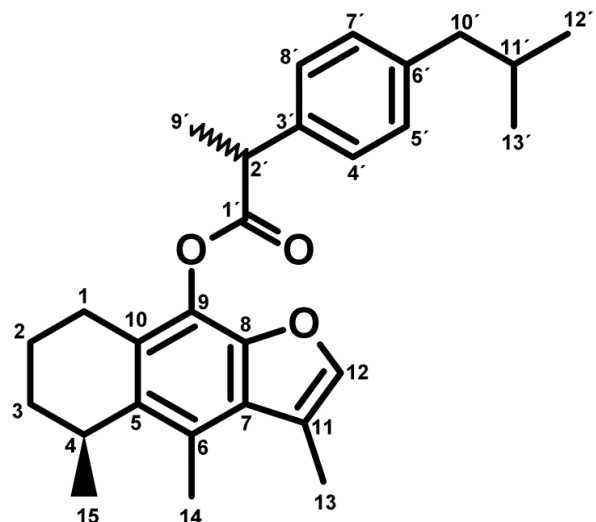
EMIE 70 eV m/z (Int. Rel.): 442 [M]⁺ (11), 230 [M-C₁₄H₁₂O₂]⁺ (38), 215 [M-C₁₅H₁₅O₂]⁺ (24), 212 [M-C₁₅H₁₈O₂]⁺ (100), 185 [M-C₁₆H₁₇O₃]⁺ (100).

RMN ¹H (CDCl₃), 400 MHz, δ ppm: 7.77 (s, 1H, H-C_{12'}), 7.65-7.69 (m, 2H, H-C_{5'}, H-C_{10'}), 7.49 (dd, J=8.5, 1.8 Hz, 1H, H-C_{4'}), 7.18 (s, 1H, H-C₁₂), 7.09-7.12 (m, 1H, H-C_{9'}), 7.07 (s, 1H, H-C_{7'}), 4.15 (q, J=7.1 Hz, 1H, H-C_{2'}), 3.86 (s, 3H, H-C_{14'}), 3.09-3.13 (m, 1H, H-C₄), 2.46 (s, 3H, H-C₁₄), 2.28 (d, J=1.3 Hz, 3H, H-C₁₃), 2.13-2.17 (m, 1H, H-C₁), 1.68 (d, J=7.2 Hz, 3H, H-C_{13'}), 1.04 (d, J=7.0 Hz, 3H, H-C₁₅).

RMN ¹³C (CDCl₃), 100 MHz, δ ppm: 172.13 (C=O), 157.68 (C_{8'}), 145.21 (C₈), 141.40 (C₁₂), 135.38 (C₁₀), 135.32 (C_{3'}), 133.81 (C_{6'}), 131.40 (C₉), 129.33 (C_{10'}), 129.01 (C_{11'}), 127.03 (C₅), 126.66 (C₇), 126.52 (C_{5'}), 126.38 (C_{4'}, C_{12'}), 125.06 (C₆), 118.94 (C_{9'}), 116.59 (C₁₁), 105.67 (C_{7'}), 55.31 (C_{14'}), 45.44 (C_{2'}), 29.86 (C₃), 28.85 (C₄), 23.19 (C₁), 21.35 (C₁₅), 18.79 (C_{13'}), 16.46 (C₂), 14.22 (C₁₄), 11.27 (C₁₃).

Compuesto 2.**Éster de ibuprofeno con cacalol**(C₂₈H₃₄O₃)

M.M. 418 g/mol



IR ν_{\max} cm⁻¹ (CHCl₃): 3027 (C-H aromático), 2958 (C-H alifático), 2870 (C-H alifático), 1753 (C=O), 1628 (C=C conjugado), 1455 (C-H alifático), 1381 (C-H alifático), 1240 (C-O-C) y 1140 (C-O-C).

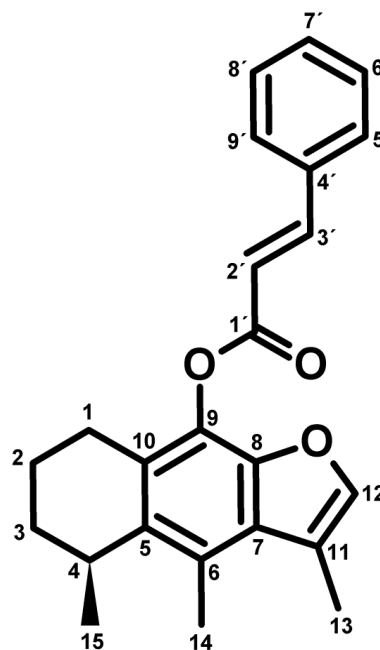
EMIE 70 eV m/z (Int. Rel.): 418 [M]⁺ (5), 230 [M-C₁₃H₁₆O]⁺ (100), 215 [M-C₁₄H₁₉O]⁺ (32), 188 [M-C₁₅H₁₈O₂]⁺ (13), 161 [M-C₁₆H₁₇O₃]⁺ (36).

RMN ¹H (CDCl₃), 300 MHz, δ ppm: 7.34-7.38 (m, 2H, H-C_{4'}, H-C_{8'}), 7.25 (s, 1H, H-C₁₂), 7.14 (d, J=8.4 Hz, 2H, H-C_{5'}, H-C_{7'}), 4.06 (q, J=7.6 Hz, 1H, H-C_{2'}), 3.17-3.20 (m, 1H, H-C₄), 2.53 (s, 3H, H-C₁₄), 2.48 (d, J=7.2 Hz, 2H, H-C_{10'}), 2.35 (s, 3H, H-C₁₃), 1.82-1.89 (m, 1H, H-C_{11'}), 1.68 (d, J=6.9 Hz, 3H, H-C_{9'}), 1.14 (d, J=7.2 Hz, 3H, H-C₁₅), 0.91 (d, J=6.9 Hz, 6H, H-C_{12'}, H-C_{13'}).

RMN ¹³C (CDCl₃), 75.4 MHz, δ ppm: 172.11 (C=O), 145.25 (C₈), 141.38 (C₁₂), 140.69 (C_{6'}), 137.32 (C_{3'}), 135.41 (C₁₀), 131.35 (C₉), 129.30 (C_{4'}, C_{8'}), 127.52 (C_{5'}, C_{7'}), 127.01 (C₅), 126.58 (C₇), 125.09 (C₆), 116.54 (C₁₁), 45.07 (C_{2'}), 45.06 (C_{10'}), 30.24 (C_{11'}), 29.91 (C₃), 28.87 (C₄), 23.04 (C₁), 22.33 (C_{12'}, C_{13'}), 21.36 (C₁₅), 18.36 (C_{9'}), 16.49 (C₂), 14.22 (C₁₄), 11.27 (C₁₃).

Compuesto 3**Éster de ácido cinámico con cacalol**(C₂₄H₂₄O₃)

M.M. 360 g/mol



IR ν_{\max} cm⁻¹ (CHCl₃): 2931 (C-H alifático), 2856 (C-H alifático), 1724 (C=O), 1637 (C=C conjugado), 1451 (C-H alifático), 1310 (C-O-C) y 1142 (C-O-C).

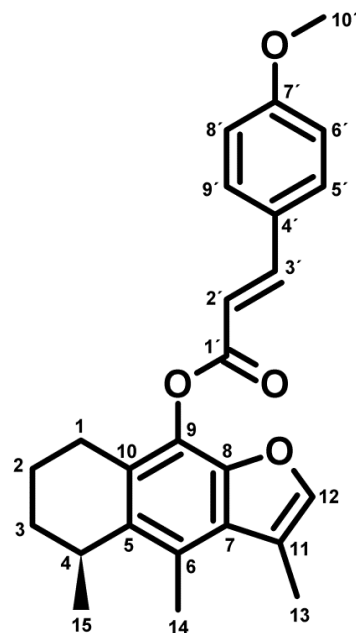
EMIE 70 eV m/z (Int. Rel.): 360 [M]⁺ (32), 230 [M-C₉H₆O]⁺ (39), 215 [M-C₁₀H₉O]⁺ (18), 131 [M-C₁₅H₁₇O₂]⁺ (100), 103 [M-C₁₆H₁₇O₃]⁺ (22).

RMN ¹H (CDCl₃), 400 MHz, δ ppm: 7.92 (d, J=16.0 Hz, 1H, H-C_{3'}), 7.57-7.60 (m, 2H, H-C_{5'}, H-C_{9'}), 7.39-7.41 (m, 3H, H-C_{6'}, H-C_{7'}, H-C_{8'}), 7.23 (s, 1H, H-C₁₂), 6.72 (d, J=16.0 Hz, 1H, H-C_{2'}), 3.22-3.28 (m, 1H, H-C₄), 2.87 (dd, J=16.7, 5.7 Hz, 1H, H-C₁), 2.57 (s, 3H, H-C₁₄), 2.37 (d, J=1.3 Hz, 3H, H-C₁₃), 1.77-1.80 (m, 2H, H-C₂), 1.19 (d, J=7.0 Hz, 3H, H-C₁₅).

RMN ¹³C (CDCl₃), 100.62 MHz, δ ppm: 164.53 (C=O), 146.77 (C_{3'}), 145.32 (C₈), 141.50 (C₁₂), 135.41 (C₁₀), 134.30 (C_{4'}), 131.42 (C₉), 130.63 (C_{7'}), 128.96 (C_{6'}, C_{8'}), 128.33 (C_{5'}, C_{9'}), 127.15 (C₅), 126.85 (C₇), 125.15 (C₆), 116.84 (C_{2'}), 116.72 (C₁₁), 30.01 (C₃), 28.96 (C₄), 23.55 (C₁), 21.42 (C₁₅), 16.62 (C₂), 14.29 (C₁₄), 11.31 (C₁₃).

Compuesto 4**Éster de ácido *p*-metoxicinámico con cacalol**(C₂₅H₂₆O₄)

M.M. 390 g/mol



IR ν_{\max} cm⁻¹ (CHCl₃): 3069 (C-H aromático) 2930 (C-H alifático), 2868 (C-H alifático), 1728 (C=O), 1602 (C=C conjugado), 1458 (C-H alifático), 1396 (C-H alifático), 1254 (C-O-C) y 1134 (C-O-C).

EMIE 70 eV m/z (Int. Rel.): 390 [M]⁺ (13), 230 [M-C₁₀H₈O₂]⁺ (4), 215 [M-C₁₁H₁₁O₂]⁺ (5), 161 [M-C₁₅H₁₇O₂]⁺ (100), 133 [M-C₁₆H₁₇O₃]⁺ (15).

RMN ¹H (CDCl₃), 400 MHz, δ ppm: 7.89 (d, J=16.0 Hz, 1H, H-C_{3'}), 7.55 (d, J=8.6 Hz, 2H, H-C_{5'}, H-C_{9'}), 7.25 (s, 1H, H-C₁₂), 6.93 (d, J=8.8 Hz, 2H, H-C_{6'}, H-C_{8'}), 6.60 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-C_{2'}), 3.85 (s, 3H, H-C_{10'}), 3.24-3.29 (m, 1H, H-C₄), 2.88 (dd, J=16.8, 5.5 Hz, 2H, H-C₁), 2.58 (s, 3H, H-C₁₄), 2.38 (s, 3H, H-C₁₃), 1.78-1.80 (m, 2H, H-C₂), 1.20 (d, J=7.0 Hz, 3H, H-C₁₅).

RMN ¹³C (CDCl₃), 100.62 MHz, δ ppm: 164.87 (C=O), 161.67 (C_{7'}) 146.47 (C_{3'}), 145.36 (C₈), 141.45 (C₁₂), 135.41 (C₁₀), 131.46 (C₉), 130.04 (C_{5'}), 129.70 (C_{9'}), 127.08 (C_{4'}), 127.02 (C₅), 126.73 (C₇), 125.19 (C₆), 116.68 (C₁₁), 115.25 (C_{2'}), 114.39 (C_{6'}), 114.31 (C_{8'}), 55.38 (C_{10'}), 29.99 (C₃), 28.94 (C₄), 23.54 (C₁), 21.40 (C₁₅), 16.60 (C₂), 14.27 (C₁₄), 11.30 (C₁₃).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Obtención de cacalol

Después de ocho extracciones, se obtuvieron 63.8 g del residuo del extracto hexánico de 1 000 g de raíces secas de *P. decompositum*, lo que corresponde al 6.38 % de rendimiento de peso seco.

3 g del residuo del extracto hexánico de *P. decompositum* fueron separados en CCFV usando como sistema de elución Hx:AcOEt en polaridad creciente, obteniéndose 45 fracciones. De las fracciones 23 a la 26 cristalizaron 63 mg de un sólido amarillo con punto de fusión de 91-92 °C y un Rf de 0.51 en un sistema de elución de Hx:AcOEt (8:2). Dicho compuesto fue caracterizado mediante IR, EM y RMN ¹H como cacalol.

En el espectro de infrarrojo se observó una banda característica del grupo OH en 3495 cm⁻¹, que corresponde al fenol.

En el espectro de masas, el valor del ión molecular (M⁺) es de 230 m/z, que corresponde a la masa molar del compuesto.

Respecto al espectro de RMN-¹H, se presenta a 5.12 ppm la señal correspondiente al hidrógeno del grupo OH y a 7.22 ppm se distingue la señal perteneciente al hidrógeno del C₁₂.

El cacalol fue guardado en un vial ámbar en el refrigerador para tenerlo como referencia y realizar pruebas biológicas (actividad antiinflamatoria y antioxidante) posteriormente.

7.1.1 Obtención de acetato de cacalol

Como se describió anteriormente, el cacalol se oxida con facilidad, lo que dificulta su obtención, por ello, se propuso hacer una protección al grupo fenólico del cacalol mediante una reacción de acetilación (Nathan et al., 1970). La reacción se llevó a cabo directamente sobre el residuo del extracto hexánico de *P. decompositum* y el acetato de cacalol se separó mediante

cromatografía en columna flash al vacío. Se colectaron 131 fracciones, utilizando únicamente hexano como fase móvil. De la fracción 33 hasta la 81 se obtuvo acetato de cacalol (figura 9).

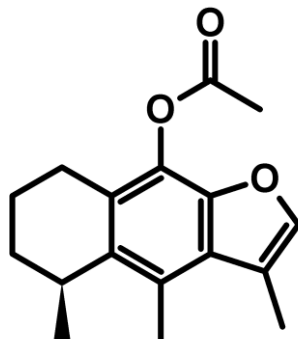


Figura 9. Estructura de acetato de cacalol

A partir de 8.9 g del residuo del extracto hexánico acetilado, se obtuvieron 498 mg de acetato de cacalol, que corresponde al 5.6 % de rendimiento del peso del residuo acetilado. El acetato de cacalol se presentó como un sólido color beige, con punto de fusión de 105-106 °C y un Rf de 0.63 en Hx:AcOEt (8:2).

Mediante el espectro de IR y RMN ^1H se corroboró la identidad del acetato del cacalol. En el espectro de infrarrojo se observó una banda en 1764 cm^{-1} que corresponde al grupo carbonilo del acetato, además que desapareció la banda en 3495 cm^{-1} , perteneciente al grupo hidroxilo del fenol. Además de observar la señal del carbonilo, la presencia de la vibración C-O en 1107 cm^{-1} nos da la confirmación de que existe un grupo éster en la molécula.

7.1.2 Hidrólisis del acetato de cacalol

Al hacer la hidrólisis del acetato de cacalol *in situ*, se observó un sólido amarillo en el matraz bola. Al hacer la CCF del sólido se presentó una única mancha con el mismo Rf del cacalol de referencia.

7.2 Obtención de los ésteres de cacalol

Para obtener los ésteres de cacalol, se procedió inicialmente a la formación del cloruro del ácido correspondiente, con el propósito de activar el grupo carbonilo y facilitar la reacción de esterificación.

Se empleó SOCl_2 ya que es uno de los reactivos más utilizados para formar los cloruros de acilo, pues los subproductos que se forman son gases que se liberan fácilmente del medio de la reacción.

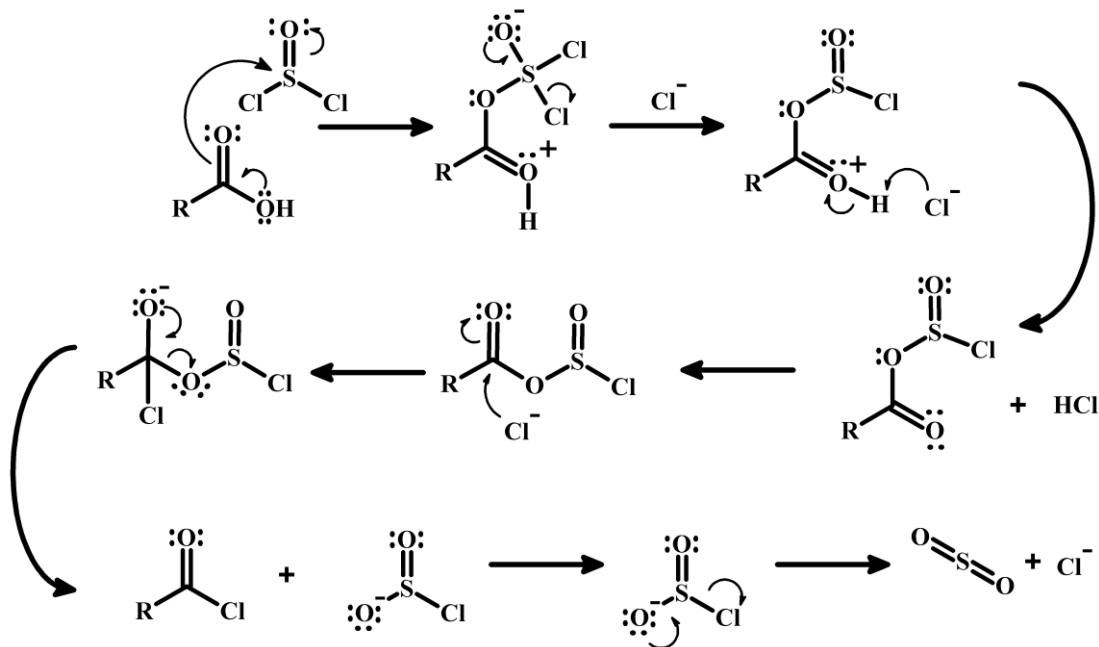


Figura 10. Mecanismo para la formación de cloruro de acilo

En el mecanismo de la reacción de formación de cloruros de acilo, el par libre de electrones del oxígeno del hidroxilo forma doble enlace C=O y a su vez, un par de electrones del doble enlace del carbonilo ataca nucleofílicamente al átomo de azufre y se libera un ión cloruro, mismo que ataca al carbonilo, formando finalmente el cloruro de acilo así como ácido clorhídrico (HCl) y dióxido de azufre (SO_2).

Los cloruros de acilo reaccionan con una gran variedad de nucleófilos generalmente a través de un mecanismo de adición-eliminación de sustitución nucleofílica del grupo acilo.

En la esterificación de los cloruros de acilo con cacalol se empleó piridina como base para neutralizar el HCl que se forma en el proceso.

El mecanismo que se sigue para la formación de ésteres de cacalol, es el mecanismo general que se describe para la esterificación de un cloruro de acilo y un alcohol en presencia de piridina.

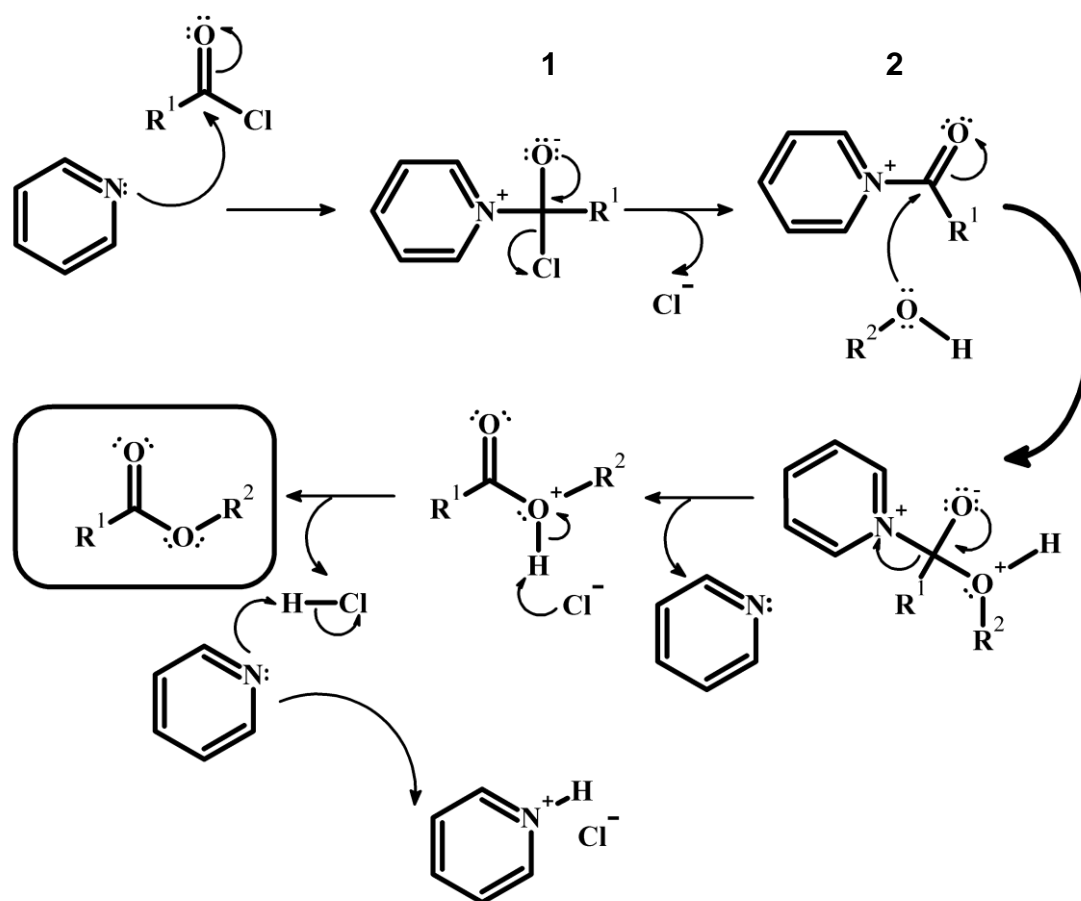


Figura 11. Mecanismo de esterificación de un cloruro de acilo y un alcohol en piridina

El par de electrones libre del nitrógeno de la piridina ataca al carbonilo, así un par de electrones del doble enlace del carbonilo migra al oxígeno, formando el intermediario 1. Este intermediario expulsa al ión cloruro,

formando el intermediario 2, el cual sufre un ataque del par de electrones del oxígeno del alcohol al carbonilo, seguido del desplazamiento del par de electrones del doble enlace del carbonilo al oxígeno.

Posteriormente, el par de electrones del oxígeno forma de nuevo el doble enlace del carbonilo, expulsando la piridina, dando origen al éster protonado. El protón del éster reacciona con el ión cloruro, para formar el éster neutro y HCl. La piridina toma el protón del HCl formado, originando así el cloruro de piridinio.

En la tabla 3 se presentan los rendimientos de los ésteres de cacalol, así como sus características físicas.

Tabla 3. Datos de los ésteres de cacalol obtenidos

Compuesto	Aspecto	Rf [*]	Rendimiento (%)
1	Ceroso blanquecino	0.53	37.67
2	Ceroso amarillo	0.75	39.08
3	Ceroso beige	0.60	30.26
4	Ceroso beige	0.45	31.79

* Determinado en Hx:AcOEt (8:2).

7.2.1 Éster de naproxeno con cacalol

El espectro de infrarrojo presenta una banda en 3008 cm^{-1} debida a la vibración C-H aromático y en 1606 cm^{-1} por la vibración de C=C conjugados. En 2935 cm^{-1} y 2871 cm^{-1} se observan señales debidas al estiramiento de C-H saturado, la confirmación se presenta en las bandas en 1454 cm^{-1} para metilenos y 1393 cm^{-1} para metilos.

En 1753 cm^{-1} se aprecia una banda de intensidad fuerte que corresponde al estiramiento C=O, mientras que las bandas en 1237 cm^{-1} y 1173 cm^{-1} pertenecen al estiramiento C-O-C, lo que nos confirma la presencia de un grupo éster en la molécula.

El espectro de masas distingue al ión molecular (M)⁺ en 442 m/z, el cual concuerda con la masa molar del compuesto.

Se observan dos pico base en (M-230) 212 m/z y en (M-257) 185 m/z que corresponden a las especies [C₁₄H₁₂O₂]⁺ y [C₁₃H₁₃O]⁺ respectivamente.

Se tienen pérdidas características en (M-212) 230 m/z que pertenece a la especie [C₁₅H₁₈O₂]⁺ y en (M-227) 215 m/z que corresponde a [C₁₄H₁₅O₂]⁺.

En espectro de RMN ¹H se muestra una señal simple en 7.77 ppm que se asigna al H-C₁₂'. Se aprecia una señal múltiple en 7.65-7.69 ppm que integra para dos hidrógenos, los cuales se atribuyen a los hidrógenos H-C₅' e H-C₁₀'.

Se presenta una señal doble de dobles en 7.49 ppm que integra para un hidrógeno que pertenece al H-C₁₂'.

Se distingue una señal múltiple en 7.09-7.12 ppm que corresponde al hidrógeno H-C₉'. En 7.07 ppm se observa una señal simple que se asigna al hidrógeno del C₇'. Aparece una señal cuádruple en 4.15 ppm que pertenece al hidrógeno del C₂'.

Los hidrógenos del metilo en C₁₄' se muestran con una señal simple en 3.86 ppm por la influencia del oxígeno, mientras que los hidrógenos del metilo en C₁₃' aparecen en 1.68 ppm con una señal doble.

En 3.09-3.13 ppm se observa una señal múltiple que se atribuye al hidrógeno H-C₄'. Se aprecia una señal múltiple en 2.13-2.17 ppm que por medio del experimento HSQC se asignó a un hidrógeno de C₁'.

Las señales de los metilos del furanoeremofilano se observan en 2.46 ppm (H-C₁₄'), 2.28 ppm (H-C₁₃') y 1.04 ppm (H-C₁₅').

En el espectro de RMN ¹³C se aprecia a campo bajo la señal del carbonilo C₁ en 172.13 ppm.

Respecto a los anillos aromáticos del naproxeno, se distinguen las siguientes señales en 157.68 ppm para el C₈', en 135.32 ppm para C₃', 133.81 ppm para C₆', 129.33 ppm para C₁₀', 129.01 ppm para C₁₁', 126.52 ppm C₅,

126.38 ppm para C₄' y C₁₂' que son carbonos equivalentes, 118.94 ppm para C₉' y 105.67 ppm para C₇'.

El carbono del metoxilo aparece en 55.31 ppm. La señal en 45.44 ppm pertenece al C₂' y la señal en 18.79 ppm al metilo del C₁₃'.

Las señales correspondientes a la estructura del cacalol se encuentran en 23.19 ppm para C₁, 16.46 ppm para C₂, 29.86 ppm para C₃, 28.85 ppm para C₄, 127.03 ppm para C₅, 125.06 ppm para C₆, 126.66 ppm para C₇, 145.21 ppm para C₈, 131.40 ppm para C₉, 135.38 ppm para C₁₀, 116.59 ppm para C₁₁ y 141.40 ppm para C₁₂.

Los carbonos asignados a los metilos de la estructura están en 11.27 ppm para C₁₃, 14.22 ppm para C₁₄ y 21.35 ppm para C₁₅.

El experimento DEPT 90 y 135 (anexo 3.5) corresponde con los tipos de carbono que tiene la estructura de la molécula, ya que presenta señales para cinco metilos (CH₃), tres metilenos (CH₂) y nueve metinos (CH).

7.2.2 Éster de ibuprofeno con cacalol.

El espectro de infrarrojo muestra una señal en 3027 cm⁻¹ para la vibración C-H aromático y en 1628 cm⁻¹ para C=C conjugados.

En 2958 cm⁻¹ y 2870 cm⁻¹ se observan señales debidas al estiramiento del C-H saturado, la confirmación se distingue en 1455 cm⁻¹ para metilenos y en 1381 cm⁻¹ para metilos.

Las señales que nos indican la presencia del grupo éster en la molécula son la banda en 1753 cm⁻¹ debida al estiramiento del enlace C=O y las bandas en 1240 cm⁻¹ y 1140 cm⁻¹ que pertenecen a C-O-C.

El espectro de masas presenta una señal en 418 m/z que pertenece al ión molecular (M)⁺. El pico base se encuentra en (M-188) 230 m/z que corresponde a la especie [C₁₅H₁₈O₂]⁺.

Se muestran pérdidas representativas que son (M-203) 215 m/z y (M-257) 161 m/z que pertenecen a las especies $[C_{14}H_{15}O_2]^+$ y $[C_{12}H_{17}]^+$ respectivamente.

En el espectro de RMN 1H para la estructura del ibuprofeno se exhibe una señal múltiple en 7.34-7.38 ppm que integra para dos hidrógenos que se atribuyen a H-C_{4'} e H-C_{8'}, también se aprecia una señal doble en 7.14 ppm que integra para dos hidrógenos que corresponden a H-C_{5'} e H-C_{7'}, ambas señales pertenecen al anillo aromático.

En 4.06 ppm aparece una señal cuádruple que integra para un hidrógeno y se asigna al H-C_{2'}. Se distingue una señal doble en 2.48 ppm que se atribuye a los hidrógenos del C_{10'} y una señal múltiple en 1.82-1.89 ppm que se asigna al H-C_{11'}.

Se observa en 1.68 ppm una señal triple que en realidad son dos señales dobles que se juntaron debido a la estereoquímica de la mezcla, la cual pertenece a los hidrógenos del C_{9'}. Los hidrógenos de los metilos pertenecientes al C_{12'} y C_{13'} son equivalentes, por lo que solo se aprecia una señal doble en 0.91 ppm.

Para la otra parte de la molécula, la estructura del cacalol, se observa una señal simple en 7.25 ppm y se atribuye al H-C₁₂.

En 3.17-3.20 ppm se presenta una señal múltiple que integra para un hidrógeno, el cual corresponde al H-C₄.

Las señales de los metilos del furanoeremofilano se observan en 2.35 ppm (H-C₁₃), 2.53 ppm (H-C₁₄) y 1.14 ppm (H-C₁).

Por medio del experimento HETCOR se percibió una interacción de un hidrógeno del C₂, el cual se traslapa con la señal del hidrógeno del C₉.

En el espectro de RMN ^{13}C se presenta a campo bajo la señal en 172.11 ppm que corresponde al carbonilo C₁.

Para el anillo aromático del ibuprofeno se presentan las siguientes señales: 140.69 ppm para el C_{6'} y 137.32 ppm para el C_{3'}. Se aprecia una sola señal

en 129.30 ppm y en 127.52 ppm que se atribuyen la primera señal para C_{4'} y C_{8'} y la segunda para C_{5'} y C_{7'}, para cada par anterior se ha demostrado experimentalmente que debido a su entorno químico son considerados carbonos equivalentes (SDBS(1)).

El C_{2'} aparece en 45.07 ppm, el C_{9'} en 18.36 ppm, el C_{10'} en 45.06 ppm y el C_{11'} en 30.24 ppm; mientras que los carbonos C_{12'} y C_{13'} son equivalentes y su respectiva señal se encuentra en 22.33 ppm.

Las señales correspondientes a la estructura del cacalol se observan en 23.04 ppm para C₁, 16.49 ppm para C₂, 29.91 ppm para C₃, 28.87 ppm para C₄, 127.01 ppm para C₅, 125.09 ppm para C₆, 126.58 ppm para C₇, 145.25 ppm para C₈, 131.35 ppm para C₉, 135.29 ppm para C₁₀, 116.54 ppm para C₁₁ y 141.38 ppm para C₁₂.

Los carbonos pertenecientes a los metilos de la estructura se encuentran en 11.27 ppm para C₁₃, 14.22 ppm para C₁₄ y 21.36 ppm para C₁₅.

El experimento DEPT 90 y 135 (anexo 4.5) mostró señales para seis metilos (CH₃), cuatro metilenos (CH₂) y ocho metinos (CH), los cuales concuerdan con el compuesto.

7.2.3 Éster de ácido cinámico con cacalol

El espectro de infrarrojo presenta una banda en 2931 cm⁻¹ y otra en 2856 cm⁻¹ para la vibración de C-H alifático. La confirmación se observa en la banda en 1451 cm⁻¹.

La banda en 1637 cm⁻¹ pertenece al estiramiento de C=C conjugado.

En 1724 cm⁻¹ se aprecia una banda de gran intensidad que corresponde al estiramiento C=O, mientras que las bandas en 1310 cm⁻¹ y 1142 cm⁻¹ pertenecen al estiramiento C-O-C, lo que nos confirma que tenemos el grupo éster en la molécula.

El espectro de masas distingue al ión molecular (M)⁺ en 360 m/z, el cual concuerda con la masa molar del compuesto (C₂₄H₂₄O₃).

El pico base se encuentra en (M-229) 131 m/z que corresponde a la especie [C₉H₇O]⁺.

Se tienen pérdidas características en (M-130) 230 m/z que pertenece a la especie [C₁₅H₁₈O₂]⁺ y se debe a la ruptura heterolítica, en (M-257) 103 m/z que corresponde a la especie [C₈H₇]⁺.

En espectro de RMN ¹H se muestra una señal doble en 7.92 ppm que se asigna al H-C₃.

Para el anillo aromático del cinamato se aprecia una señal múltiple en 7.57-7.60 ppm que integra para dos hidrógenos, los cuales se atribuyen a los hidrógenos equivalentes H-C₅' e H-C₉'.

Se presenta también una señal múltiple en 7.39-7.41 ppm que integra para tres hidrógenos, los cuales pertenecen a los hidrógenos H-C₆', H-C₇' e H-C₈'. Se distingue una señal simple que integra para un hidrógeno en 7.23 ppm que corresponde al hidrógeno vinílico del C₁₂.

En 6.72 ppm se observa una señal doble que se asigna al hidrógeno del C₂'. Aparece una señal múltiple entre 3.22-3.28 ppm que pertenece al hidrógeno del C₄'.

Las señales de los metilos de la estructura del furanoeremofilano se observan en 2.57 ppm (H-C₁₄), 2.37 ppm (H-C₁₃) y 1.19 ppm (H-C₁₅).

Para los dos hidrógenos diasterotópicos del C₁' se presenta una señal doble de dobles en 2.87 ppm para un hidrógeno y una señal múltiple que se traslapa con la señal de los hidrógenos del C₁₄', ésta última se determinó al analizar el experimento HSQC. En 1.77-1.80 ppm se observa una señal múltiple que corresponde a los dos hidrógenos del C₂'. Se aprecia para los hidrógenos diasterotópicos del C₃' una señal múltiple en 1.75-1.79 ppm para un hidrógeno y por medio del experimento HSQC se distingue que hay una señal que se traslapa con la señal múltiple de los hidrógenos del C₂'.

En el espectro de RMN ^{13}C se aprecia a campo bajo la señal del carbonilo C_1 en 164.53 ppm.

Respecto al anillo aromático del cinamato se distinguen las siguientes señales en 134.30 ppm para el $\text{C}_{4'}$, en 130.63 ppm para $\text{C}_{7'}$, en 128.96 ppm se encuentran $\text{C}_{6'}$ y $\text{C}_{8'}$, los cuales son carbonos equivalentes; mientras que la señal en 128.33 ppm se atribuye a los carbonos $\text{C}_{5'}$ y $\text{C}_{9'}$, ya que en la literatura se ha mostrado que tienen un desplazamiento químico similar porque su entorno es el mismo (SDBS(2), 1997).

Las señales en 146.77 ppm y 116.84 ppm corresponden a los carbonos vinílicos $\text{C}_{3'}$ y $\text{C}_{2'}$ respectivamente de la estructura del cinamato.

Las señales correspondientes a la estructura del cacalol se encuentran en 23.55 ppm para el C_1 , 30.01 ppm para el C_3 , 16.62 ppm para el C_2 , 28.96 ppm para el C_4 , 127.15 ppm para el C_5 , 125.15 ppm para el C_6 , 126.85 ppm para el C_7 , 145.32 ppm para el C_8 , 131.42 ppm para el C_9 , 135.48 ppm para el C_{10} , 116.72 ppm para el C_{11} y 141.50 ppm para el C_{12} . Los carbonos asignados a los metilos de la estructura están en 11.31 ppm para C_{13} , 14.29 ppm para C_{14} y 21.42 para C_{15} .

El experimento DEPT 90 y 135 (anexo 5.5) corresponde con los tipos de carbono que tiene la estructura de la molécula, ya que presenta señales para tres metilos (CH_3), tres metilenos (CH_2) y nueve metinos (CH).

7.2.4 Éster de ácido *p*-metoxicinámico con cacalol

El espectro de infrarrojo muestra señales para la parte aromática en 3069 cm^{-1} debido a la vibración Ar-C-H y en 1602 cm^{-1} debido a la vibración C=C conjugados. En 2930 y 2868 cm^{-1} se observan señales debidas al estiramiento de C-H saturado; la confirmación se presenta en las bandas 1458 cm^{-1} para metilenos y en 1396 cm^{-1} para metilos.

Las señales que nos indican la presencia del grupo éster son la banda en 1728 cm^{-1} debida al estiramiento de C=O y las bandas que aparecen a 1134 y 1254 cm^{-1} correspondientes a C-O-C.

El espectro de masas tiene una señal en 390 m/z que corresponde al ión molecular (M)⁺.

Se observan dos pérdidas características de este derivado, en ($M-229$) 161 m/z que es el pico base, corresponde a la especie $[\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_2]^+$ y es debida a la ruptura heterolítica de la pérdida de la molécula del cacalol sin un hidrógeno y en ($M-160$) 230 m/z que corresponde a la especie $[\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_2]^+$ la cual sugiere una transposición de tipo McLafferty.

En el espectro de RMN-¹H se observó una señal doble en 7.89 ppm que se atribuye al hidrógeno del C₃'.

Para el anillo aromático del metoxicinamato se muestra una señal doble en 7.55 ppm que integra para dos hidrógenos, los cuales corresponden a los hidrógenos C₅' y C₉', su señal se traslapa debido a que son equivalentes. De igual forma en 6.93 ppm se traslapan las señales de los hidrógenos pertenecientes al C₆' y al C₈'.

En 7.25 ppm se aprecia una señal simple correspondiente al hidrógeno vinílico en C₁₂. La señal doble en 6.60 ppm se atribuye al hidrógeno del C₂'. Se nota una señal simple en 3.85 ppm que pertenece a los tres hidrógenos del metilo del C₁₀'.

Entre 3.24 y 3.29 ppm se observa una señal múltiple que corresponde al hidrógeno del C₄.

Las señales de los metilos de la estructura del furanoeremofilano se aprecian en 2.58 ppm (H-C₁₄), 2.38 ppm (H-C₁₃) y en 1.20 ppm (H-C₁₅).

En 2.88 ppm se presenta una señal doble de dobles que integra para un hidrógeno y corresponde a un hidrógeno del C₁, el experimento HSQC nos permitió apreciar que hay otra interacción en 2.58 ppm con una señal múltiple que se traslapa con la señal de los hidrógenos pertenecientes al C₁₄, por lo que las señales corresponden a los dos hidrógenos diasterotópicos del C₁. Entre 1.78 y 1.80 ppm se observa una señal múltiple, que corresponde a los hidrógenos del C₂.

Los hidrógenos diasterotópicos que pertenecen al C₃ se distinguieron por medio del experimento HSQC, de los cuales, un hidrógeno se encuentra traslapado con la señal del hidrógeno del C₂ y el otro hidrógeno presenta una señal que se traslapa con la señal de los hidrógenos pertenecientes al C₁₅.

En el espectro de RMN-¹³C se presenta una señal en 164.87 ppm que corresponde al carbonilo C₁'.

Para el anillo aromático del metoxicinamato se presentaron las siguientes señales: 161.67 ppm que pertenece al C₇', 130.04 ppm y 129.70 ppm se atribuyen a los carbonos C₅' y C₉'. De igual manera, los valores en 114.39 ppm y 114.31 ppm se atribuyen a los carbonos de las posiciones C₆' y C₈', experimentalmente se ha demostrado que dichos carbonos son equivalentes y su desplazamiento químico es muy parecido y por ello no se pueden asignar (SDBS(3)). La señal en 127.08 ppm pertenece al C₄'.

En 55.38 ppm se aprecia una señal que se asigna al carbono del metoxilo.

Para los carbonos vinílicos se tiene una señal en 146.47 ppm para el C₃' y en 115.25 ppm que pertenece al C₂'.

Las señales correspondientes a la estructura del cacalol son las siguientes: 23.54 ppm para C₁, 16.60 ppm para C₂, 29.99 ppm para C₃, 28.94 ppm para C₄, 127.02 ppm para C₅, 125.19 ppm para C₆, 126.73 ppm para C₇, 145.36 ppm para C₈, 131.46 ppm para C₉, 135.41 ppm para C₁₀, 116.68 ppm para C₁₁ y 141.45 ppm para C₁₂. Los carbonos pertenecientes a los metilos de la estructura se encuentran en 11.30 ppm para C₁₃, 14.27 ppm para C₁₄ y 21.40 ppm para C₁₅.

El experimento DEPT 90 y 135 (anexo 6.5) presenta señales para cuatro metilos (CH₃), tres metilenos (CH₂) y ocho metinos (CH), los cuales concuerdan con la estructura del compuesto 4.

7.3 Pruebas de actividad biológica

7.3.1 Resultados de las pruebas de actividad antiinflamatoria

Para evaluar la actividad antiinflamatoria de los ésteres obtenidos se utilizó el bioensayo de edema inducido en la oreja de ratón con TPA.

La tabla 4 muestra los resultados de la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema en oreja de ratón inducido con TPA y expresados como porcentaje de inhibición de la inflamación de los diferentes compuestos sintetizados a la concentración de 1 mg compuesto/oreja.

Tabla 4. Actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA

Compuesto	Inhibición (%)	Compuesto	Inhibición (%)
Cacalol	22.48		
Naproxeno	67.57	(1) Éster cacalol-naproxeno	45.43
Ibuprofeno	8.99	(2) Éster cacalol-ibuprofeno	24.80
Ácido cinámico	21.50	(3) Éster cacalol-ác. cinámico	30.52
Ácido <i>p</i>-metoxicinámico	6.37	(4) Éster cacalol-ác. <i>p</i>-metoxicinámico	25.46

Los datos representan el promedio de tres animales \pm el error estándar de la media. Los resultados se analizaron mediante una prueba *t* de Student y los valores de $p \leq 0.05$ y $p \leq 0.01$ se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos observar que todos los ésteres tuvieron mayor actividad antiinflamatoria que el cacalol. Los compuestos 2, 3 y 4 mostraron mayor actividad que sus respectivos ácidos precursores. La actividad del ibuprofeno bajo este modelo fue baja, esto se puede deber a que la vía de administración es tópica, ya que es más eficaz cuando la vía de administración es intraperitoneal (Metwally et al., 2007).

El compuesto 1 sintetizado posee menor actividad que el naproxeno, sin embargo, al tener el compuesto en forma de éster, dicho compuesto podría ser una alternativa como antiinflamatorio sin el efecto secundario de irritación de la mucosa gástrica (Katritzky, et al., 2009).

7.3.2 Resultados de las pruebas de actividad antioxidante

Para evaluar la actividad antioxidante de compuestos, uno de los métodos empleados es la capacidad de reducir el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH•) (Niki, 1987), siendo un procedimiento efectivo para estimar si los compuestos en estudio presentan actividad atrapadora de radicales (actividad antioxidante).

En la tabla 5 se muestran los resultados del ensayo para medir la actividad atrapadora del radical DPPH• del cacalol y los compuestos obtenidos.

Tabla 5. Actividad antioxidante en el modelo de DPPH•

Muestra	Concentración (µM)	A _{515 nm}	% de reducción del DPPH•
Blanco	100	0.717	0
Cacalol	1	0.698	2.70
	10	0.572	20.31
	100	0.096	86.57
(1) Éster cacalol-naproxeno	1	0.702	2.14
	10	0.693	3.44
	100	0.595	17.01
(2) Éster cacalol-ibuprofeno	1	0.711	0.93
	10	0.698	2.74
	100	0.669	6.78
(3) Éster cacalol-ác. cinámico	1	0.711	0.93
	10	0.709	1.16
	100	0.693	3.39
(4) Éster cacalol-ác. <i>p</i>-metoxicinámico	1	0.705	1.77
	10	0.654	8.78
	100	0.341	52.42

El cacalol tiene una actividad antioxidante de 86.57 % a una concentración de 100 μ M en el modelo de DPPH•.

A la concentración de 100 μ M, los compuestos 1, 2 y 3 no tuvieron actividad por el mismo modelo.

Por otra parte, a la misma concentración, el compuesto 4 presentó una actividad antioxidante de 52.42 % de reducción de DPPH• en comparación con el compuesto 3, el cual no mostró actividad significativa.

El compuesto 4 difiere del compuesto 3 sólo en el grupo metoxilo (O-Me), por lo que la actividad de 4 puede deberse a que el enlace C-O es débil en presencia de radicales libres, de ahí que se tendría una facilidad de reaccionar con el radical DPPH• y se formaría un radical más estable que con los demás compuestos, al presentar dobles enlaces conjugados.

Actividad antioxidante en el modelo TBARS

La mayoría de macromoléculas biológicas, como los carbohidratos, lípidos, proteínas y ADN pueden sufrir daño en presencia de ROS, siendo los lípidos de las membranas especialmente sensibles a la oxidación (Diplock et al., 1998).

Está descrito que muchas plantas medicinales contienen antioxidantes que capturan radicales libres o inhiben la peroxidación de lípidos (Anderson et al., 2001).

Por este motivo, empleando el ensayo TBARS se evaluó la lipoperoxidación en un homogeneizado de cerebro de rata, el cual es rico en lípidos y por lo tanto, sensible a sufrir peroxidación.

En la tabla 6 se observa el porcentaje de inhibición de la peroxidación de lípidos del cacalol, de los derivados de éste y de sus precursores a las concentraciones de 1, 10 y 100 μ M.

Tabla 6. Inhibición de la peroxidación de lípidos de homogeneizado de cerebro de rata evaluada por la técnica de TBARS.

Muestra	Concentración (μM)	TBARS (nmol/mg prot.)	Inhibición de peroxidación lipídica (%)
Basal		0.36	
FeSO ₄	100	8.09	
Cacalol	1	0.34	95.79
	10	0.24	97.01
	100	0.32	95.99
Naproxeno	1	8.32	- 1.21
	10	8.84	- 3.85
	100	9.01	- 9.62
Ibuprofeno	1	8.27	- 0.56
	10	8.40	- 2.13
	100	8.38	- 1.93
Ácido cinámico	1	8.22	0.04
	10	8.24	- 0.28
	100	8.12	1.29
Ácido <i>p</i> -metoxicinámico	1	7.89	3.94
	10	7.99	2.82
	100	8.09	1.53
(1) Éster cacalol-naproxeno	1	7.94	1.88
	10	1.78	77.93
	100	0.33	95.83
(2) Éster cacalol-ibuprofeno	1	7.93	1.96
	10	7.36	8.99
	100	0.42	94.73
(3) Éster cacalol-ác. cinámico	1	6.46	20.14
	10	2.74	66.16
	100	0.29	96.40
(4) Éster cacalol-ác. <i>p</i> -metoxicinámico	1	1.34	83.40
	10	0.28	96.48
	100	0.21	97.30

Como se puede observar, el cacalol por sí solo tiene una actividad antioxidante de 95.79 % a una concentración de 1 μM por el método de TBARS. Se ha descrito que el cacalol es muy reactivo a la oxidación electroquímica, debido a la presencia del fenol y del anillo del furano (Aguilar et al., 1996) . La actividad inhibitoria de peroxidación lipídica podría resultar del mismo efecto (Shindo, et al., 2004).

A la concentración de 1 μM los compuestos 1, 2 y 3 no presentan actividad antioxidante significativa por este método. Esto podría atribuirse a

que ya no se tiene el fenol libre del cacalol, pues se tiene un derivado esterificado. Además, al hacer el ensayo a sus precursores, se observó que dichos ácidos tienen una mínima actividad prooxidante.

Sin embargo, el compuesto 4 a la misma concentración mostró 83.40 % de inhibición de peroxidación lipídica. Este resultado se podría deber a que el grupo metoxilo (O-Me) que posee el compuesto, se fragmenta fácilmente vía radicales libres y por su conjugación de dobles enlaces dicho compuesto forma un radical que reacciona con los radicales generados en la cadena de lipoperoxidación, inhibiendo así la propagación de la cascada. El ácido precursor de 4, fue el único que presentó una mínima actividad antioxidante, lo cual también contribuye al efecto.

8. CONCLUSIONES

- El método de mayor rendimiento para obtener cacalol, fue por medio de la acetilación del residuo del extracto hexánico de las raíces de *Psacalium decompositum* y posterior hidrólisis.
- Se prepararon por semisíntesis ésteres de cacalol con naproxeno, ibuprofeno, ácido cinámico y ácido *p*-metoxicinámico, los cuales se caracterizaron por espectrometría de masas y por las técnicas espectroscópicas de IR, RMN ^1H y RMN ^{13}C .
- Se determinó la actividad antiinflamatoria de los derivados esterificados con cacalol, con el modelo de edema en oreja de ratón inducido con TPA, donde se observó que el éster de cacalol con naproxeno fue el único con una actividad significativa (45.43 % de inhibición).
- Se determinó también la actividad antioxidante de los ésteres de cacalol con dos metodologías. Los resultados fueron los siguientes:
 - El éster de cacalol con ácido *p*-metoxicinámico y el cacalol a la concentración de 1 μM presentaron actividad antioxidante significativa, con el modelo de DPPH• con un porcentaje de reducción del 52.42 % y 86.57 % respectivamente.
 - En el modelo de TBARS, el éster de cacalol con ácido *p*-metoxicinámico y el cacalol a la concentración de 1 μM presentaron importante actividad antioxidante con un porcentaje de inhibición del 83.40 % y 97.79 %.

9. PERSPECTIVAS

A pesar de que el AINE naproxeno presenta una mayor actividad antiinflamatoria (67.57 % de inhibición), el éster de cacalol con naproxeno es una buena alternativa de molécula híbrida que podría ayudar a disminuir la toxicidad gástrica que genera el naproxeno.

Con base a las investigaciones descritas en la literatura, acerca de la actividad antimicrobiana y antifúngica que presentan algunos derivados del ácido cinámico, sería conveniente evaluar esta actividad en los ésteres de cacalol con ácido cinámico y de cacalol con ácido *p*-metoxicinámico.

De igual manera, para complementar este trabajo, se propone evaluar otras actividades biológicas en los cuatro ésteres, para proponerlos como fármacos híbridos.

10. REFERENCIAS

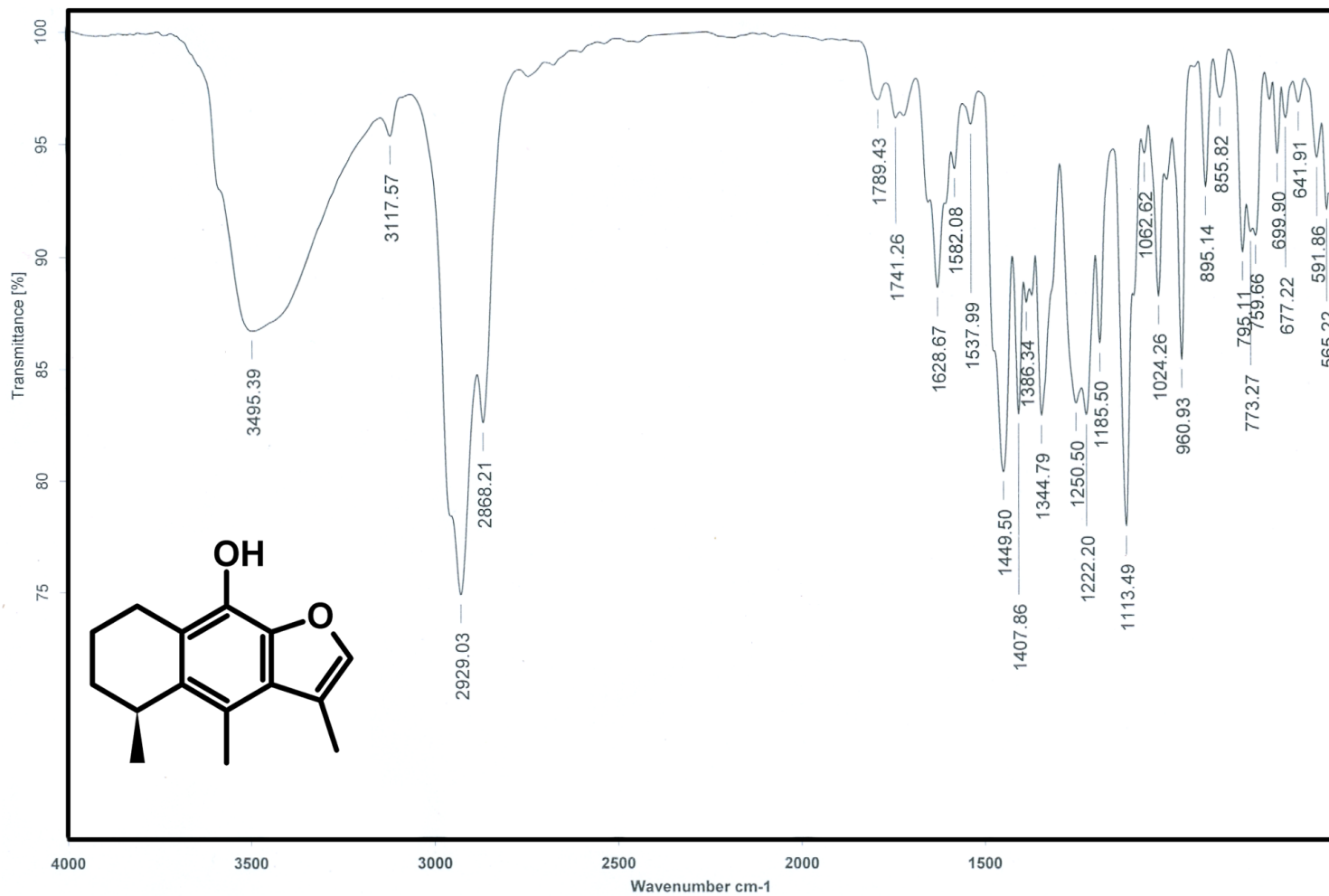
- Adisakwattana, S., Roengsamran, S., Hsu, W. H., & Yibchok-anun, S. (2005). Mechanisms of antihyperglycemic effect of p-methoxycinnamic acid in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci*, 78(4), 406-412.
- Adisakwattana, S., Sookkongwaree, K., Roengsumran, S., Petsom, A., Ngamrojanavanich, N., Chavasiri, W., et al. (2004). Structure-activity relationships of trans-cinnamic acid derivatives on alpha-glucosidase inhibition. *Bioorg Med Chem Lett*, 14(11), 2893-2896.
- Aguilar, M. M., Jiménez, E. M., Macías, R. N., & Lotina, H. B. (1996). Electrochemical properties of the herbicide cacalol and its derivatives in protic and aprotic solvents by using cyclic voltammetry. Correlation with Hill's reaction activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 290-295.
- Ahluwalia V. K., C. M. (2008). *Medicinal Chemistry*. Gopsons, Noida, India: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Ahluwalia, V. K., & Chopra, M. (2008). *Medicinal Chemistry*. Gopsons, Noida, India: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Alarcon-Aguilar, F. J., Jimenez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R., Gonzalez-Paredes, B., Contreras, C. C., & Roman-Ramos, R. (2000). Hypoglycemic activity of root water decoction, sesquiterpenoids, and one polysaccharide fraction from *Psacalium decompositum* in mice. *J Ethnopharmacol*, 69(3), 207-215.
- Alexander, P. (2006). Herbarium Network. Consultado el 21/07/12, de: <http://intermountainbiota.org/portal/imagelib/imgdetails.php?imgid=254039>
- Amarowicz, R., Pegg, R., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84(4), 551-562.
- Anaya, A. H., BE; TorresBarragan, A; LeonCantero, J; JimenezEstrada, M;. (1996). Phytotoxicity of cacalol and some derivatives obtained from the roots of *Psacalium decompositum* (A. Gray) H. Rob, & Brettell (Asteraceae), matarique or maturin. *Journal of Chemical Ecology*, 22(3), 393-403.
- Anderson, K. J., Teuber, S. S., Gobeille, A., Cremin, P., Waterhouse, A. L., & Steinberg, F. M. (2001). Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. *J Nutr*, 131(11), 2837-2842.
- Avendaño, L. C. (2001). *Introducción a la Química Farmacéutica* (2ª ed.). Madrid: McGraw-Hill/Interamericana.
- Bennett, W. C., & Zingg, R. M. (1976). *The Tarahumara: An Indian Tribe of Northern Mexico*. Glorieta, NM.

-
- Bisogno, F., Mascoti, L., Sanchez, C., Garibotto, F., Giannini, F., Kurina-Sanz, M., et al. (2007). Structure-antifungal activity relationship of cinnamic acid derivatives. *J Agric Food Chem*, 55(26), 10635-10640.
- Brunton, L. L., Lazo, J., & Parker, K. L. (2007). *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica* (11ª ed.). México.
- Bye, R., Linares, E. and Estrada, E. (1995). Biological diversity of Medicinal plants in Mexico. In J. Arnason, J. T. Romeo & R. Mata (Eds.), *Phytochemistry of Medicinal Plants. Recent Advances in Phytochemistry*. (Vol. 29, pp. 65-68). New York: Plenum Press.
- Cronquint, A. (1980). *Psacalium decompositum*. Tomado de: www.conabio.gob.mx/otros/herbario/nuevayork/363713.jpg
- Diplock, A. T., Charleux, J. L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., et al. (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr*, 80 Suppl 1, S77-112.
- Dominguez, M., Nieto, A., Marin, J. C., Keck, A. S., Jeffery, E., & Cespedes, C. L. (2005). Antioxidant activities of extracts from *Barkleyanthus salicifolius* (Asteraceae) and *Penstemon gentianoides* (Scrophulariaceae). *J Agric Food Chem*, 53(15), 5889-5895.
- Espinós, P. D., López, B. A., & Calvo, M. E. (2009). Monografías De La Real Academia Nacional De Farmacia., Bases farmacológicas y tratamiento de la inflamación. Consultado de: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/536>
- Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*, 186, 407-421.
- Godoy, M. E., Rotelli, A., Pelzer, L., & C. E. Tonn, C. E. (2000). Antiinflammatory Activity of Cinnamic Acid Esters. *Molecules*, 5(3), 547-548.
- Gómez-Estrada, H. A., González, R. K. N., & Medina, J. D. (2011). Actividad antiinflamatoria de productos naturales *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(3), 182-217.
- González, H. J. (2007). *Obtención del cacalol y sus derivados. Determinación de su actividad antioxidante.*, tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Halen, P. K., Raval, M. K., Chagti, K. K., Giridhar, R., & Yadav, M. R. (2007). Synthesis and evaluation of some gastrointestinal sparing anti-inflammatory aminoethyl ester derivatives of naphthalene-based NSAIDs. *Arch Pharm (Weinheim)*, 340(2), 88-94.
- Harvey, A. L. (2008). Natural products in drug discovery. *Drug Discov Today*, 13(19-20), 894-901.
- Hetter, G. P. (2000). An examination of the phenol-croton oil peel: Part I. Dissecting the formula. *Plast Reconstr Surg*, 105(1), 227-239; discussion 249-251.
- Hitner, H., & Nagle, B. (2012). *Pharmacology: an introduction*. (6ª ed.). New York.: McGraw-Hill.

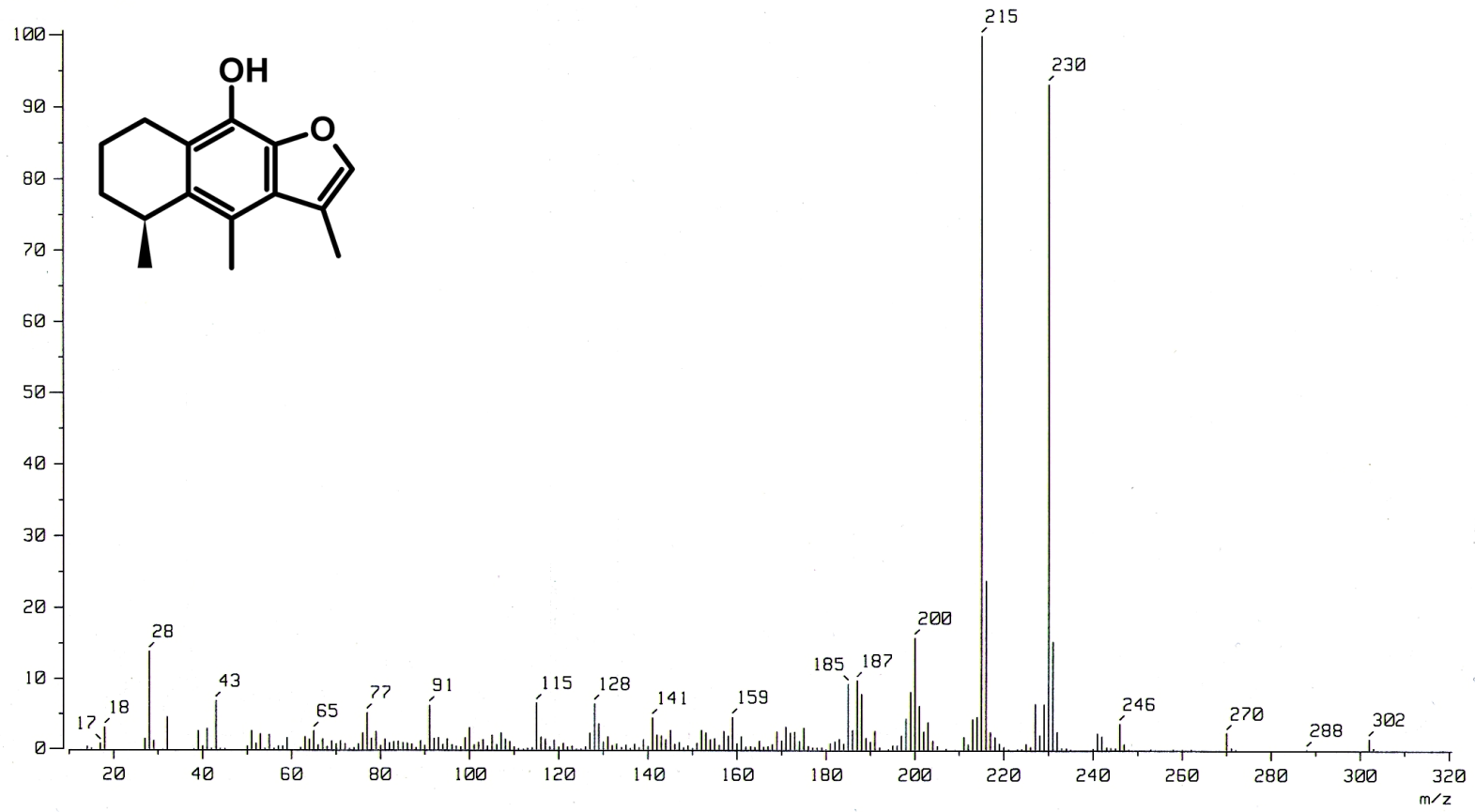
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*, 53(6), 1841-1856.
- Inman, W. D., Luo, J., Jolad, S. D., King, S. R., & Cooper, R. (1999). Antihyperglycemic sesquiterpenes from *Psacalium decompositum*. *J Nat Prod*, 62(8), 1088-1092.
- Jankowski, C. K., LeClair, G., Aumélas, A., Gonzalez-de la Parra, A., Jimenez-Estrada, M., Tejada, V., et al. (2004). Preliminary study on the synthesis and high-resolution NMR analysis of Naproxen and Ibuprofen esters. *Journal of Spectroscopy*, 18(3), 485-500.
- Jimenez-Estrada, M., Chilpa, R. R., Apan, T. R., Lledias, F., Hansberg, W., Arrieta, D., et al. (2006). Anti-inflammatory activity of cacalol and cacalone sesquiterpenes isolated from *Psacalium decompositum*. *J Ethnopharmacol*, 105(1-2), 34-38.
- Jiménez-Estrada, M. C.-L., R.; Valdés, J. M.; León-Cantero, J. R.; Alarcón, G.; and Sveshtarova, B. P. (1992). Actividad antimicrobiana del cacalol y sus derivados. *Revista Latinoamericana de Química*, 22, 14-17.
- Katritzky, A. R., Jishkariani, D., & Narindoshvili, T. (2009). Convenient synthesis of Ibuprofen and naproxen aminoacyl, dipeptidoyl and ester derivatives. *Chem Biol Drug Des*, 73(6), 618-626.
- Kourounakis, P. N., Tsiakitzis, K., Kourounakis, A. P., & Galanakis, D. (2000). Reduction of gastrointestinal toxicity of NSAIDs via molecular modifications leading to antioxidant anti-inflammatory drugs. *Toxicology*, 144(1-3), 205-210.
- Lee, E. J., Kim, S. R., Kim, J., & Kim, Y. C. (2002). Hepatoprotective phenylpropanoids from *Scrophularia buergeriana* roots against CCl(4)-induced toxicity: action mechanism and structure-activity relationship. *Planta Med*, 68(5), 407-411.
- Linares, E., & Bye, R. A., Jr. (1987). A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *J Ethnopharmacol*, 19(2), 153-183.
- Metwally, K. A., Yaseen, S. H., Lashine el, S. M., El-Fayomi, H. M., & El-Sadek, M. E. (2007). Non-carboxylic analogues of arylpropionic acids: synthesis, anti-inflammatory activity and ulcerogenic potential. *Eur J Med Chem*, 42(2), 152-160.
- Meunier, B. (2008). Hybrid molecules with a dual mode of action: dream or reality? *Acc Chem Res*, 41(1), 69-77.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH•) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.
- Muregi, F. W., & Ishih, A. (2010). Next-Generation Antimalarial Drugs: Hybrid Molecules as a New Strategy in Drug Design. *Drug Dev Res*, 71(1), 20-32.
- Narasimhan, B., Belsare, D., Pharande, D., Mourya, V., & Dhake, A. (2004). Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. *Eur J Med Chem*, 39(10), 827-834.

-
- Natella, F., Nardini, M., Di Felice, M., & Scaccini, C. (1999). Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *J Agric Food Chem*, 47(4), 1453-1459.
- Nathan, J., Negrete, M., & González, M. (1970). Studies in *cacalia* species. *Phytochemistry*, 9(7), 1623-1628.
- Niki, E. (1987). Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids*, 44(2-4), 227-253.
- Perez-Alvarez, V., Bobadilla, R. A., & Muriel, P. (2001). Structure-hepatoprotective activity relationship of 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) derivatives. *J Appl Toxicol*, 21(6), 527-531.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., & Moore, P. K. (2004). *Farmacología* (Quinta Edición ed.). Madrid.
- Romo, J.; Nathan, J. (1964). The constituents of *Cacalea decomposita* A. Gray. *Tetrahedron*, 20, 2331-2337.
- Saadeh, H. A., Mosleh, I. M., & Mubarak, M. S. (2009). Synthesis of novel hybrid molecules from precursors with known antiparasitic activity. *Molecules*, 14(4), 1483-1494.
- Schellenberg, D., Abdulla, S., & Roper, C. (2006). Current issues for anti-malarial drugs to control *P. falciparum* malaria. *Curr Mol Med*, 6(2), 253-260.
- SDBS(1). National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) *SDBS No. 41004CDS-13-198* Consultado el 28 de agosto de 2012, de:
http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi
- SDBS(2). (1997). National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) *SDBS No. 1997CDS-03-495* Consultado el 28 de agosto de 2012, de:
http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi
- SDBS(3). National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) *SDBS No. 6669CDS-12-220*. Consultado el 28 de agosto de 2012, de:
http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi
- Sharma, P. (2011). Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3(2), 403-423.
- Sharma, P. C., Yadav, S., Pahwa, R., Kaushik, D., & Jain, S. (2011). Synthesis and evaluation of novel prodrugs of naproxen. *Medicinal Chemistry Research*, 20(5), 648-655.
- Shindo, K., Kimura, M., & Iga, M. (2004). Potent antioxidative activity of cacalol, a sesquiterpene contained in *Cacalia delphiniifolia* Sleb et Zucc. *Biosci Biotechnol Biochem*, 68(6), 1393-1394.
- Tringali, C. (2001). *Bioactive compounds from natural sources*. New York: Taylor & Francis.
- Wiesner, J., Mitsch, A., Wissner, P., Jomaa, H., & Schlitzer, M. (2001). Structure-activity relationships of novel anti-malarial agents. Part 2: cinnamic acid derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, 11(3), 423-424.

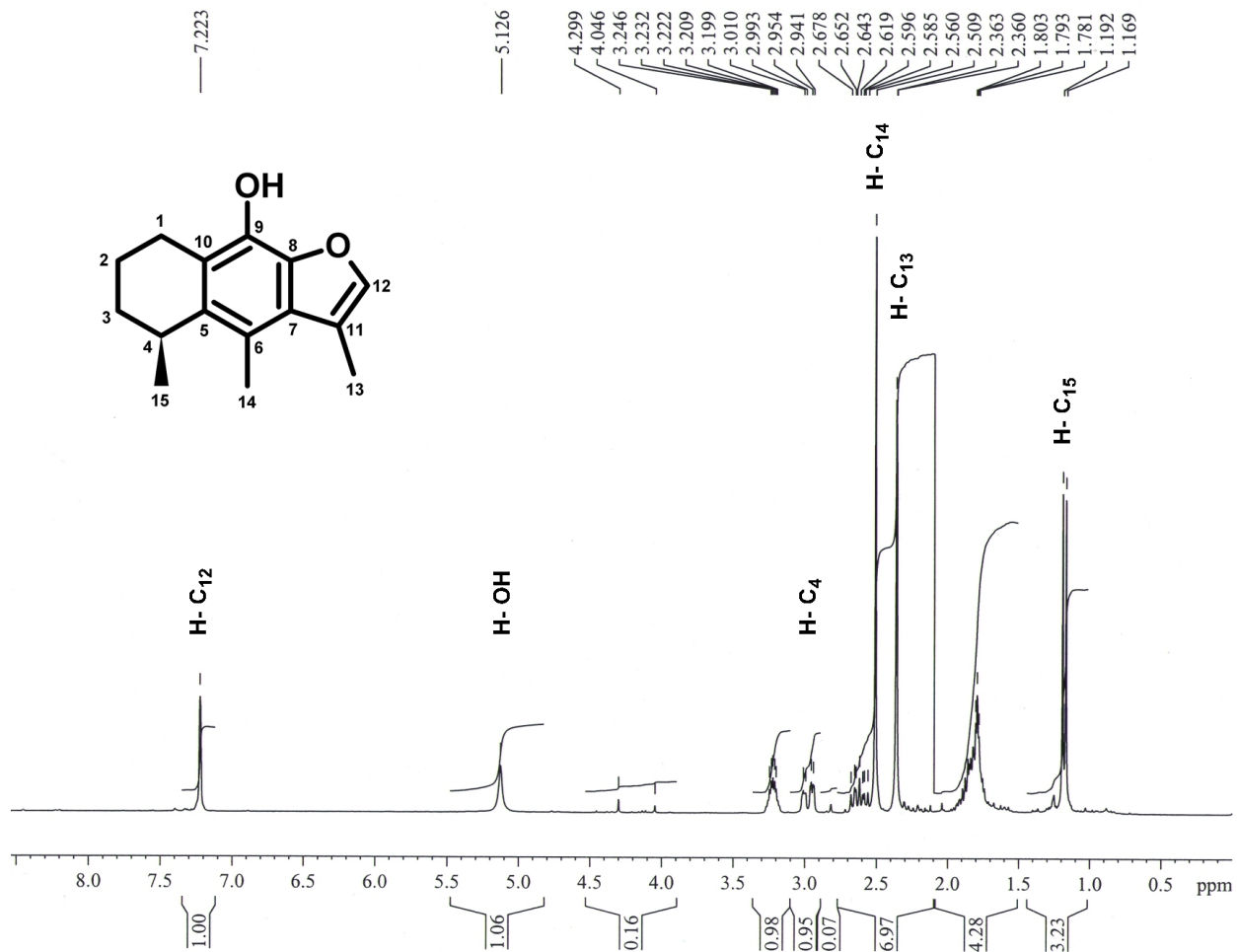
- Yibchok-anun, S., Adisakwattana, S., Moonsan, P., & Hsu, W. H. (2008). Insulin-secretagogue activity of p-methoxycinnamic acid in rats, perfused rat pancreas and pancreatic beta-cell line. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 102(5), 476-482.
- Young, J. M., & De Young, L. M. (1989). Cutaneous models of inflammation for the evaluation of topical and systemic pharmacological agents. In C. J. Y. & L. A. J. (Eds.), *Pharmacological Methods in the Control of Inflammation* (pp. 215-231). New York: A. R. Liss.



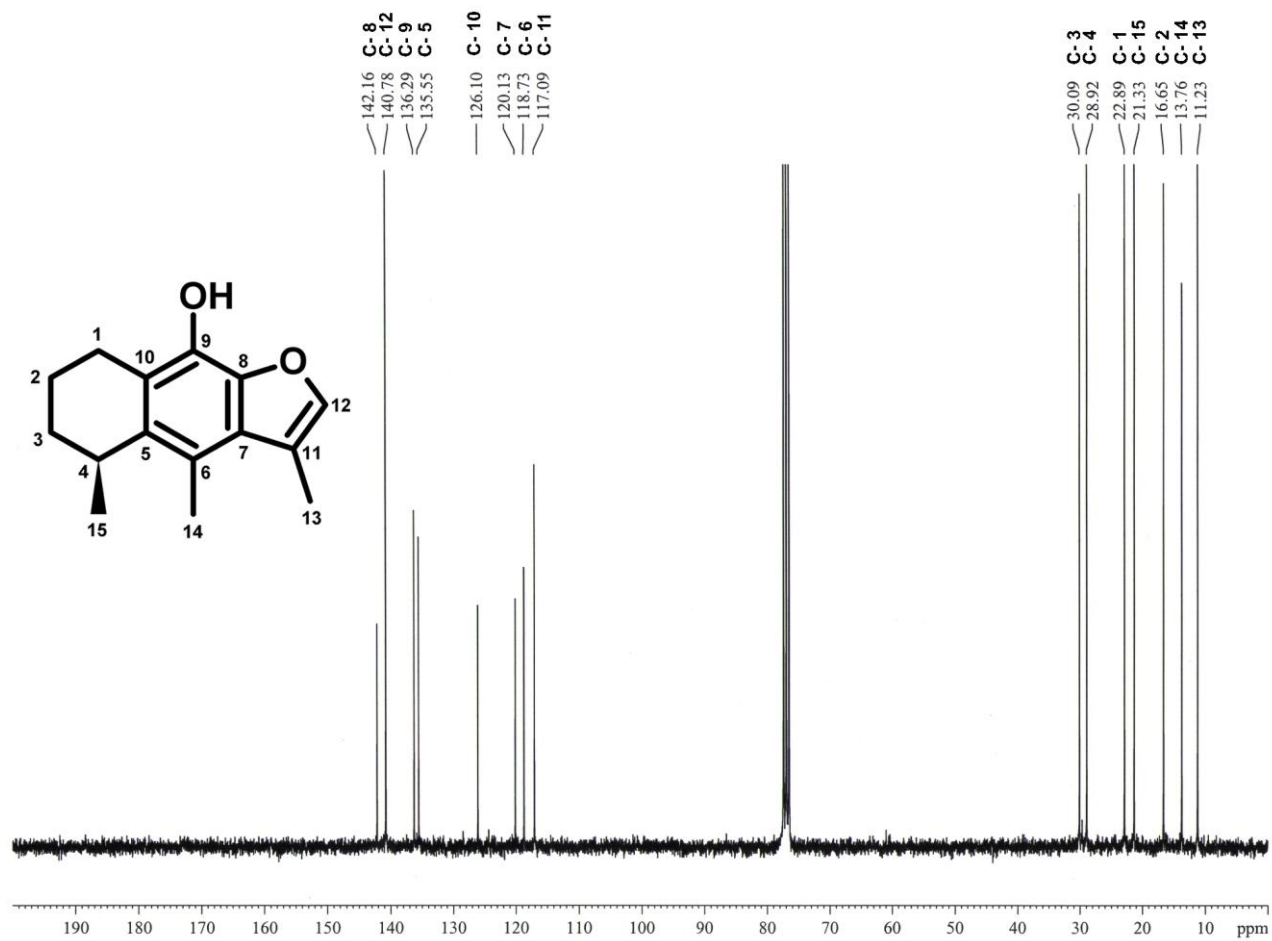
Anexo 1.1. Espectro de IR (CHCl₃, disolución) de cacalol.



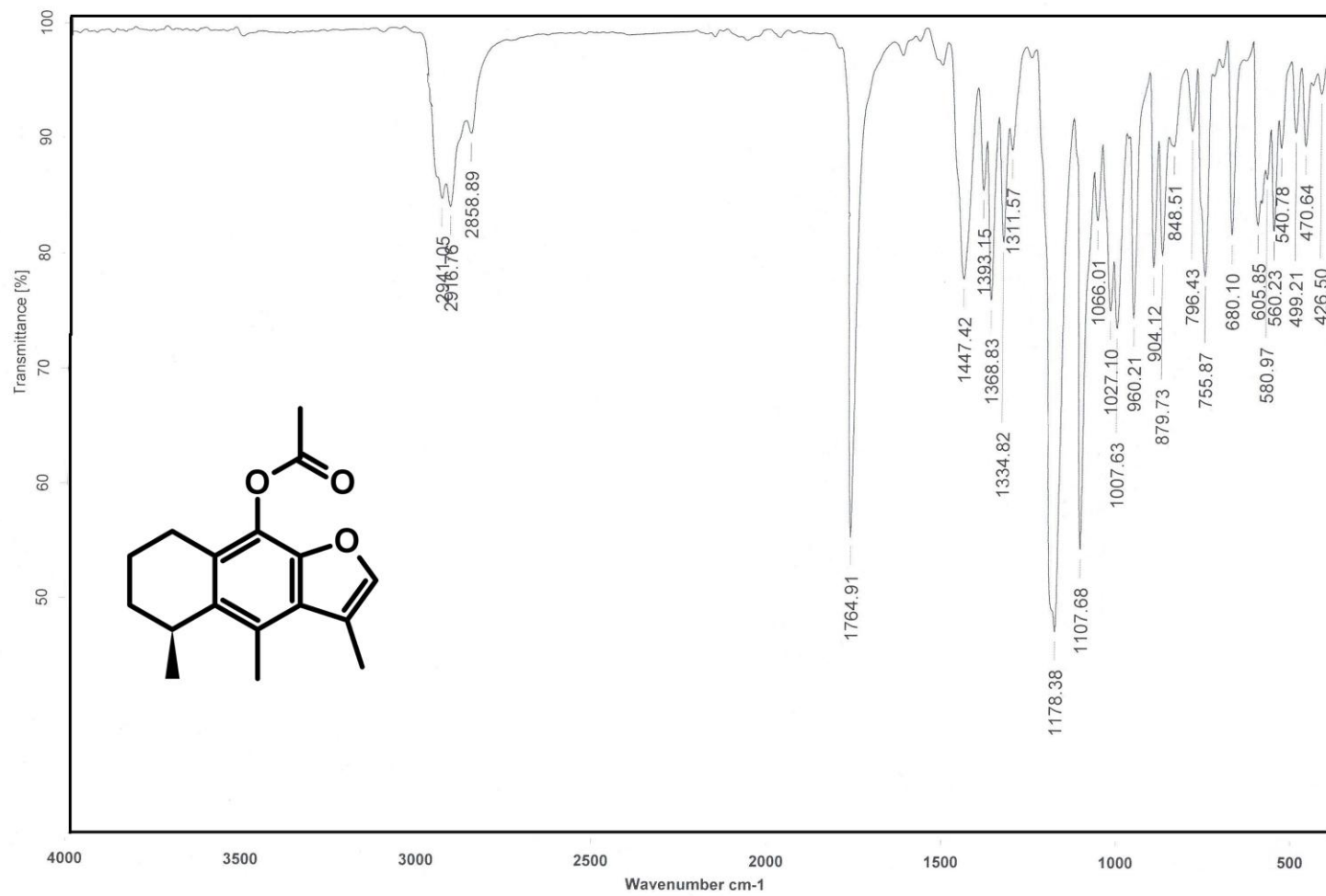
Anexo 1.2. Espectro de masas (IE) de cacalol.



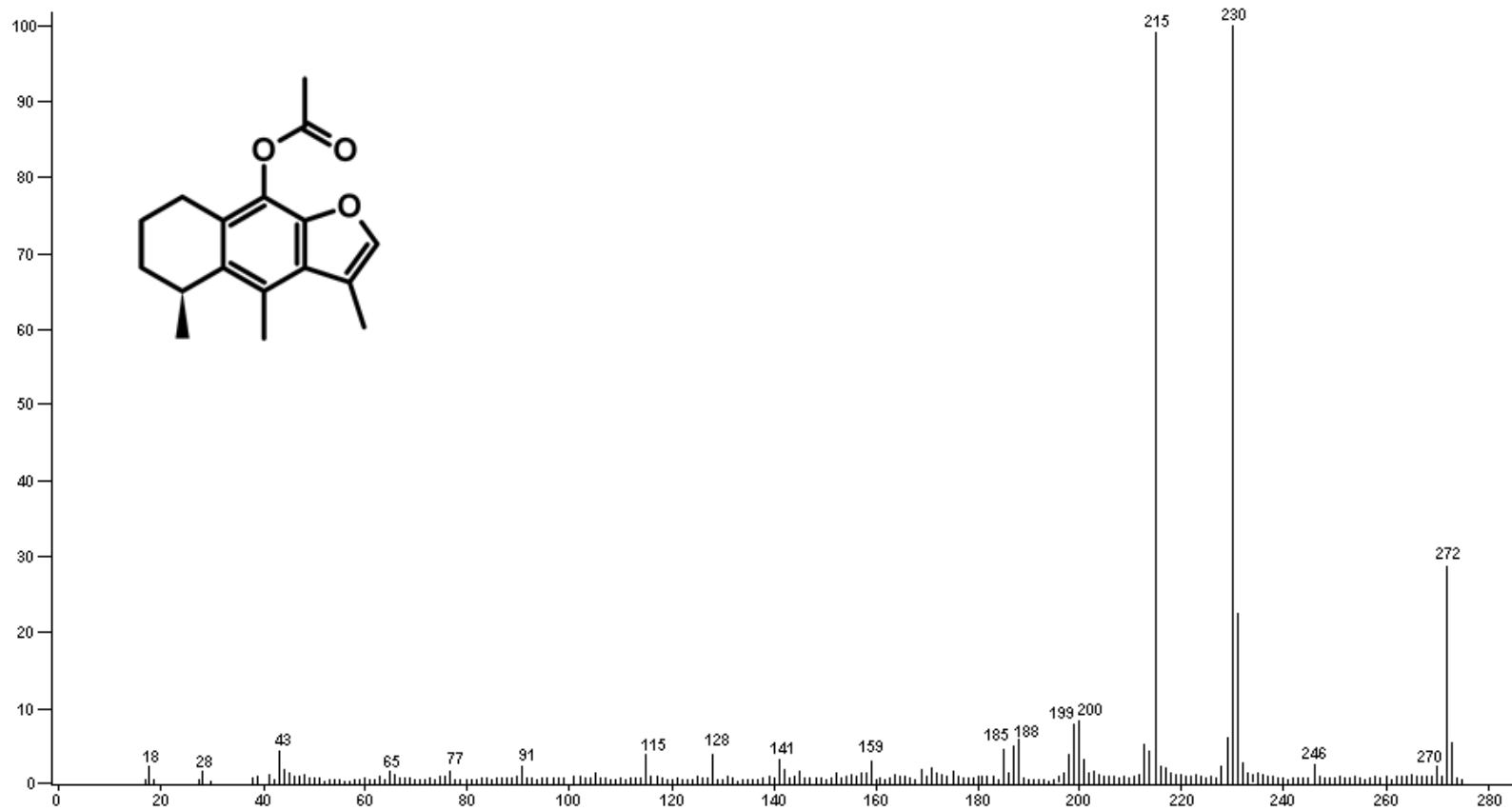
Anexo 1.3. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de cacalol.



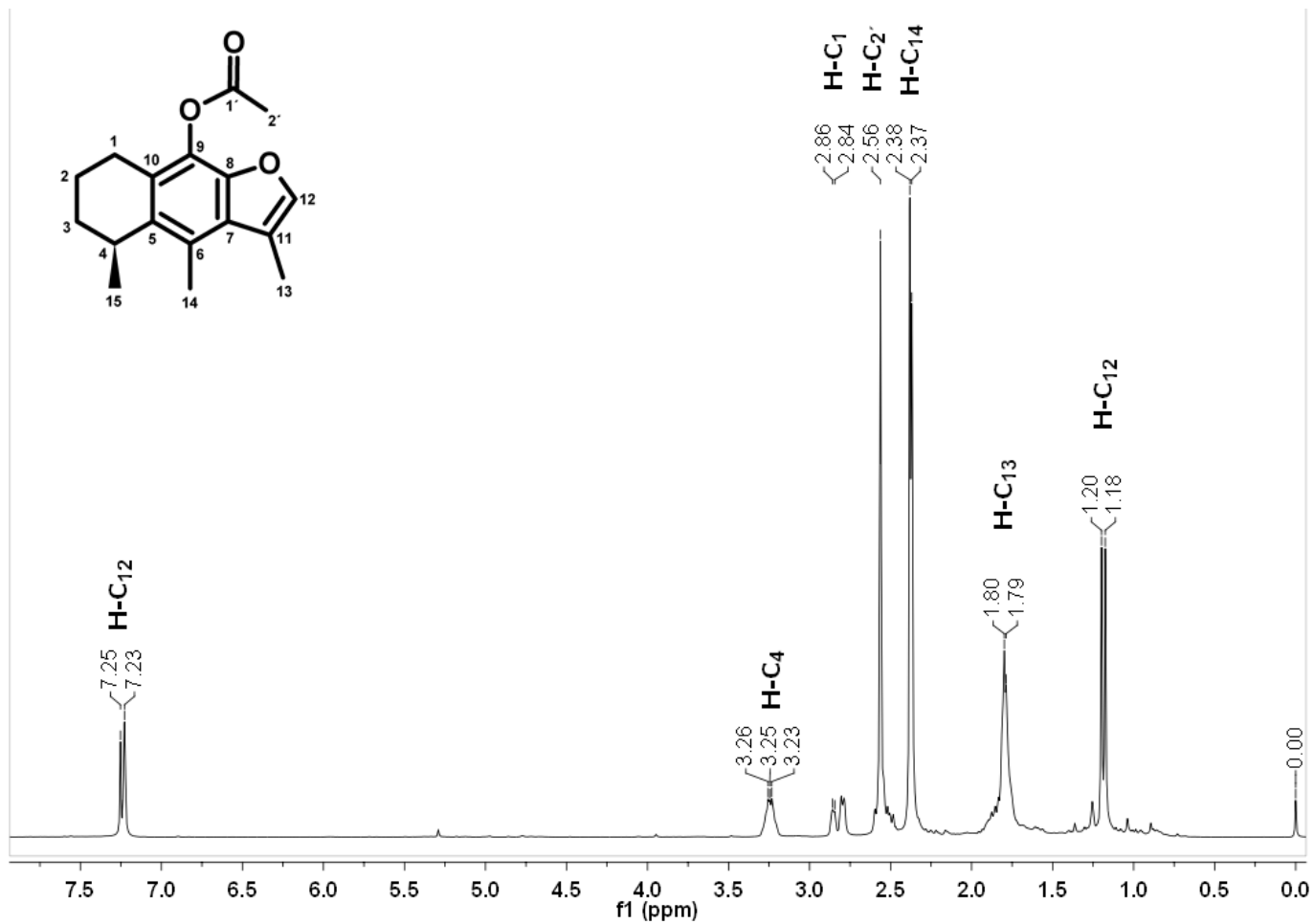
Anexo 1.4. Espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 300 MHz) de cacalol.



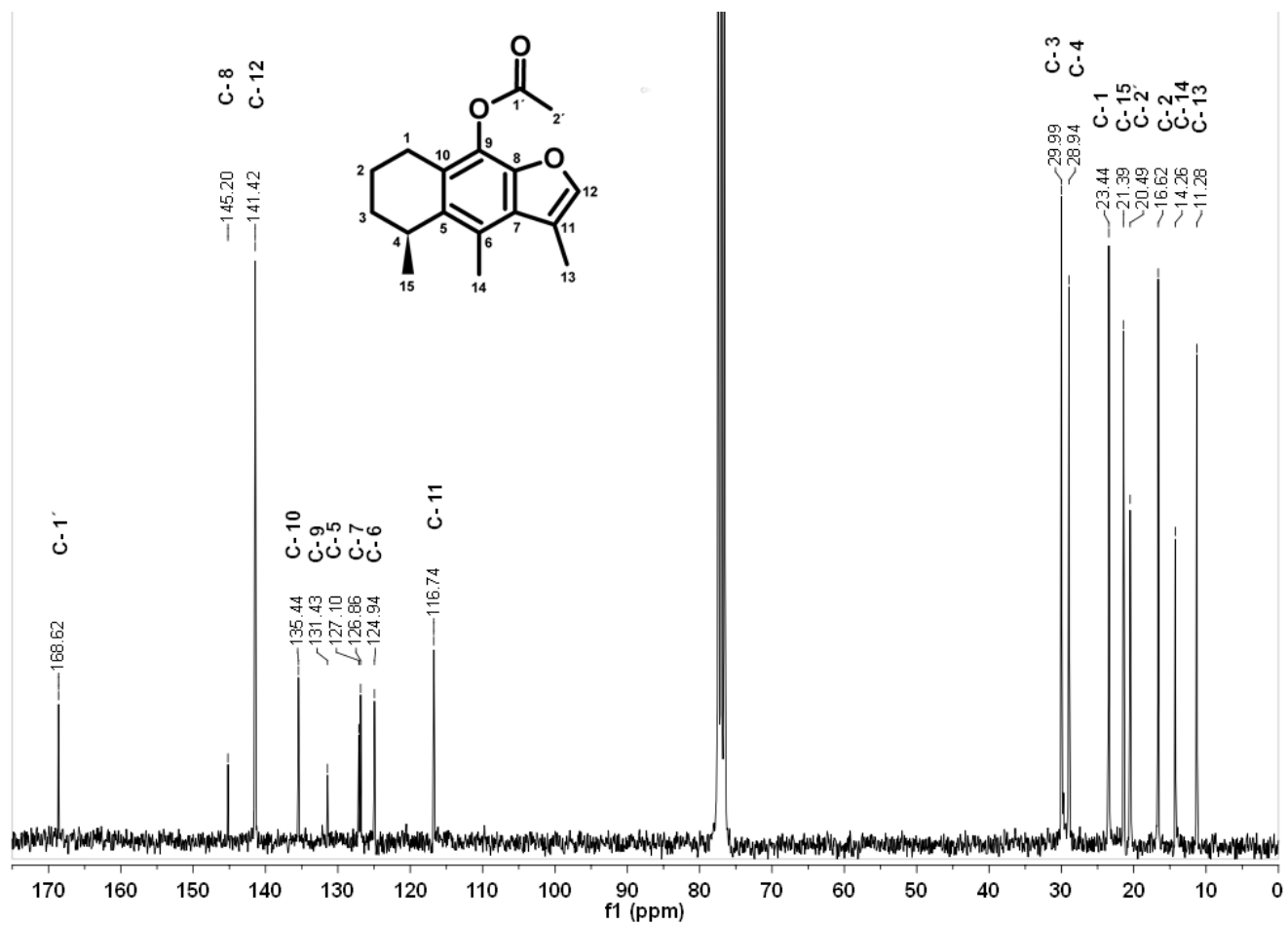
Anexo 2.1. Espectro de IR (CHCl₃, disolución) de acetato de cacalol.



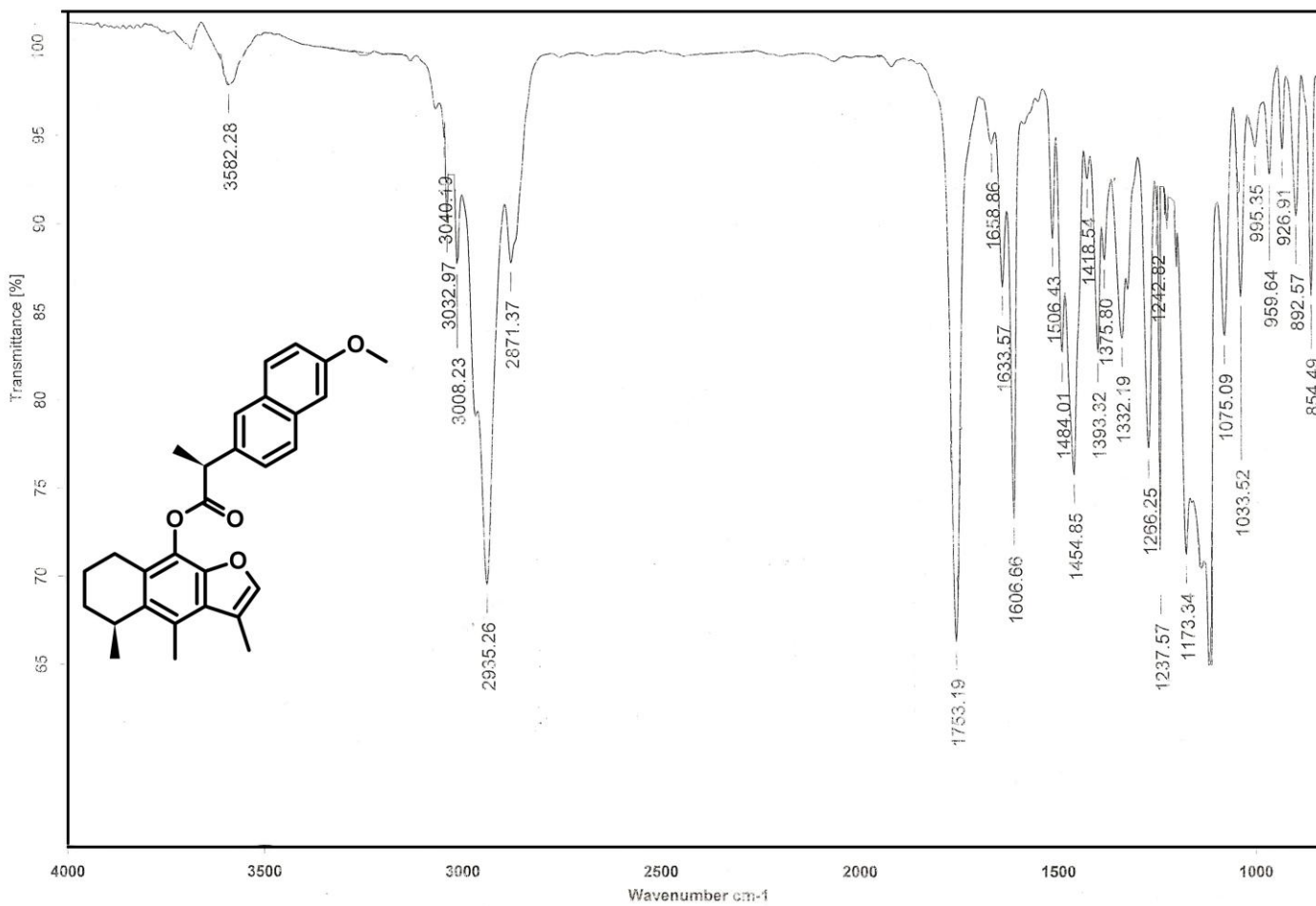
Anexo 2.2. Espectro de masas (IE) de acetato de cacalol.



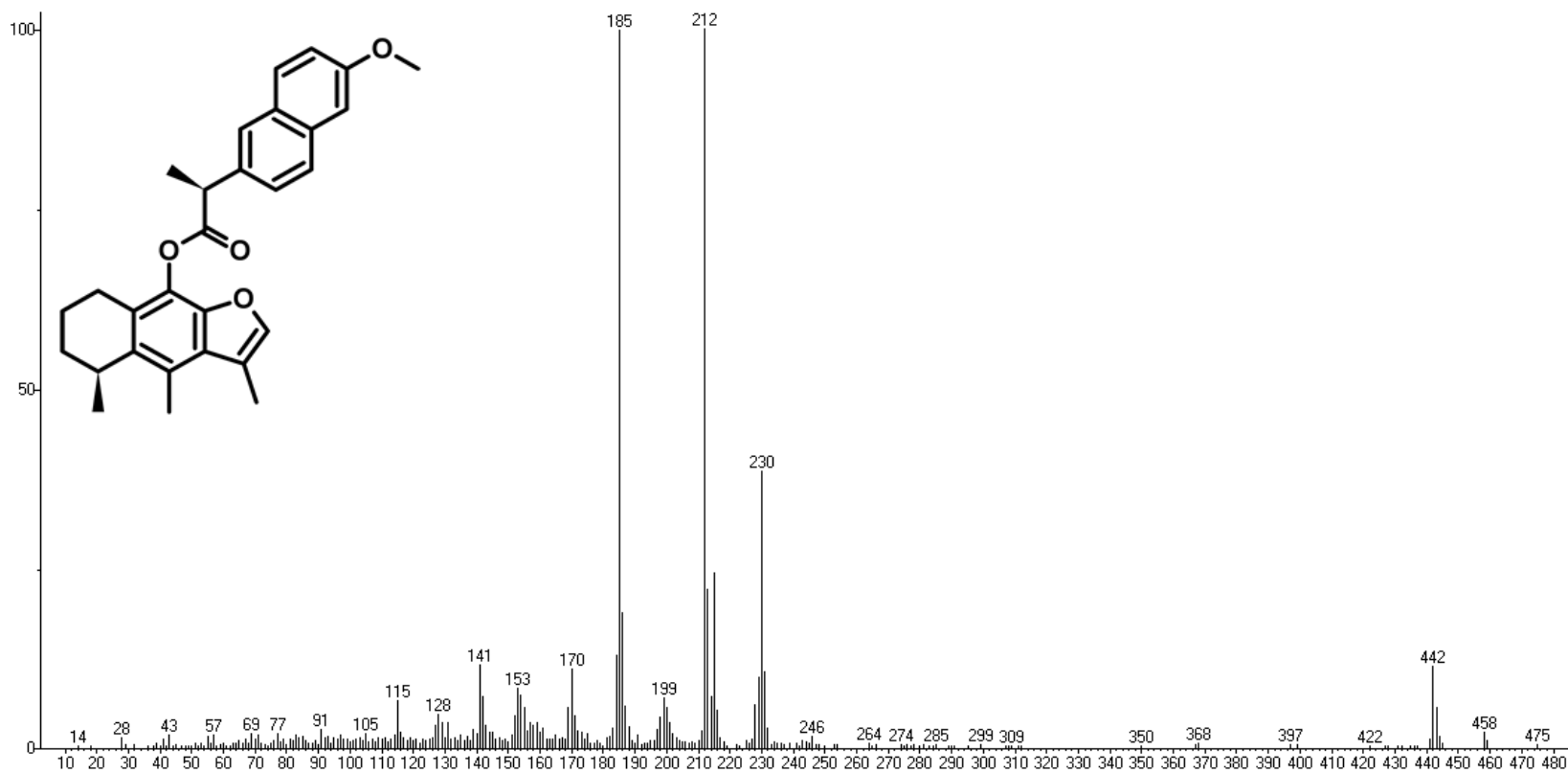
Anexo 2.3. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de acetato de cacalol.



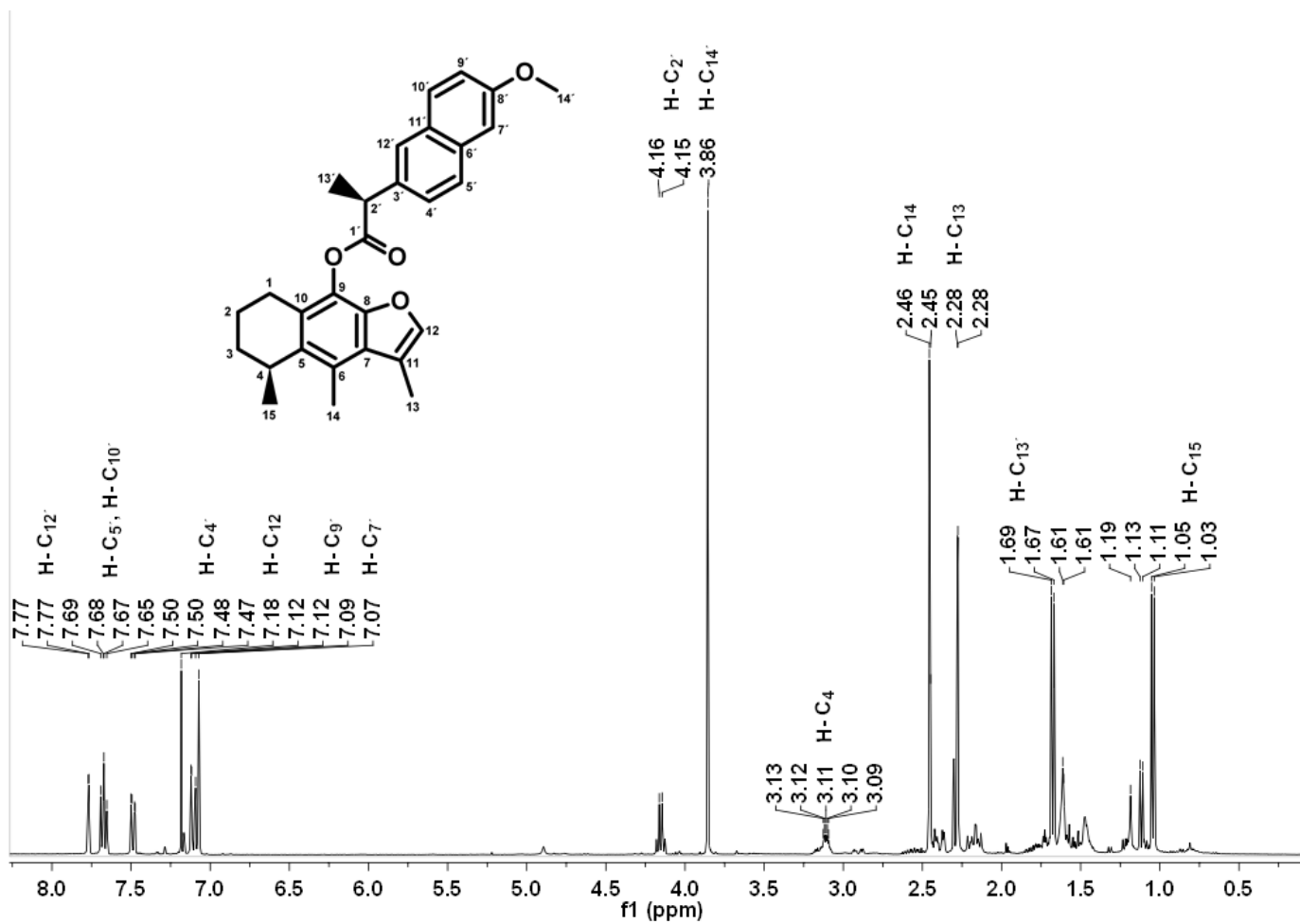
Anexo 2.4. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de acetato de cacalol.



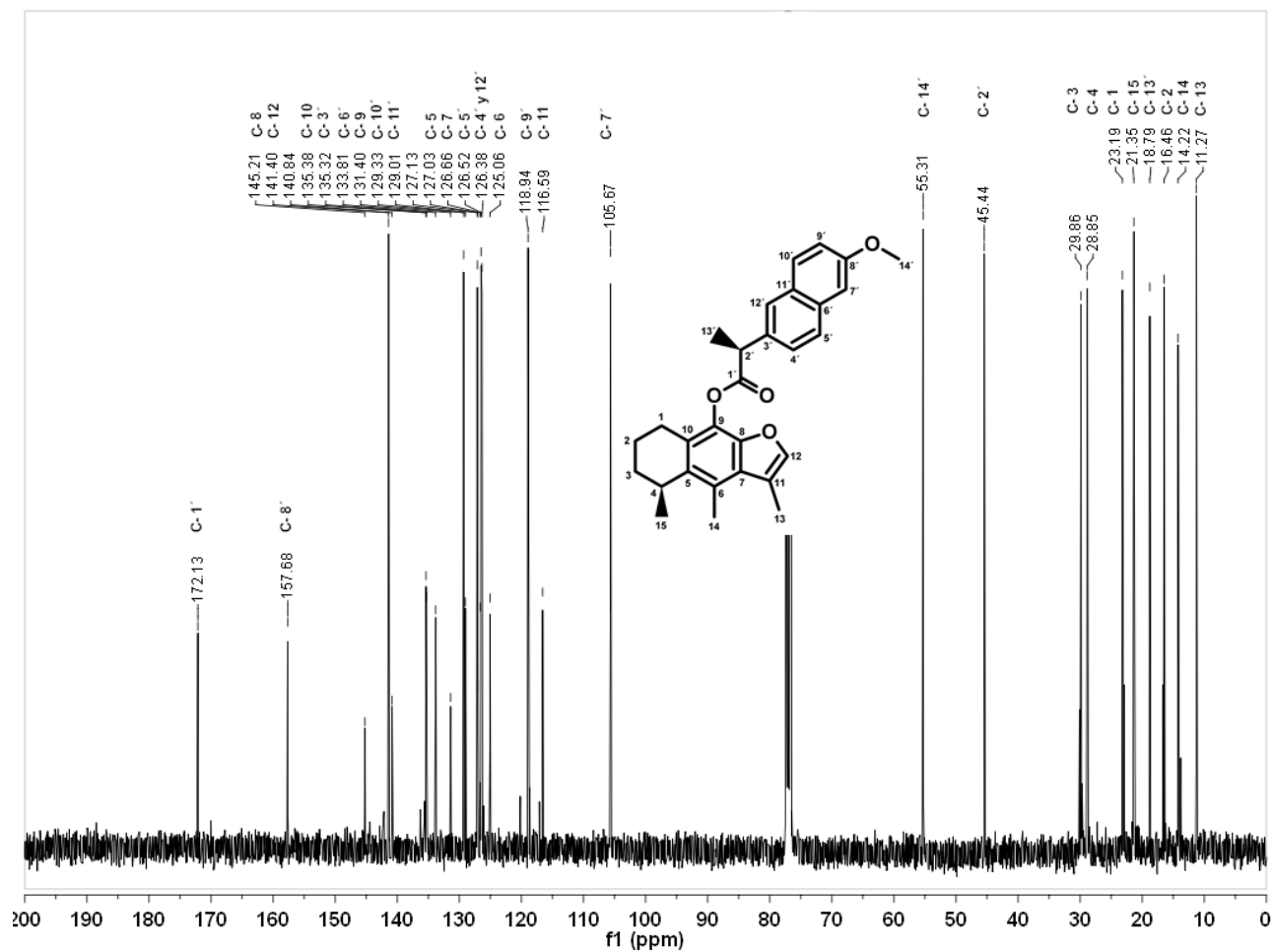
Anexo 3.1. Espectro de IR (CHCl₃, disolución) del compuesto 1.



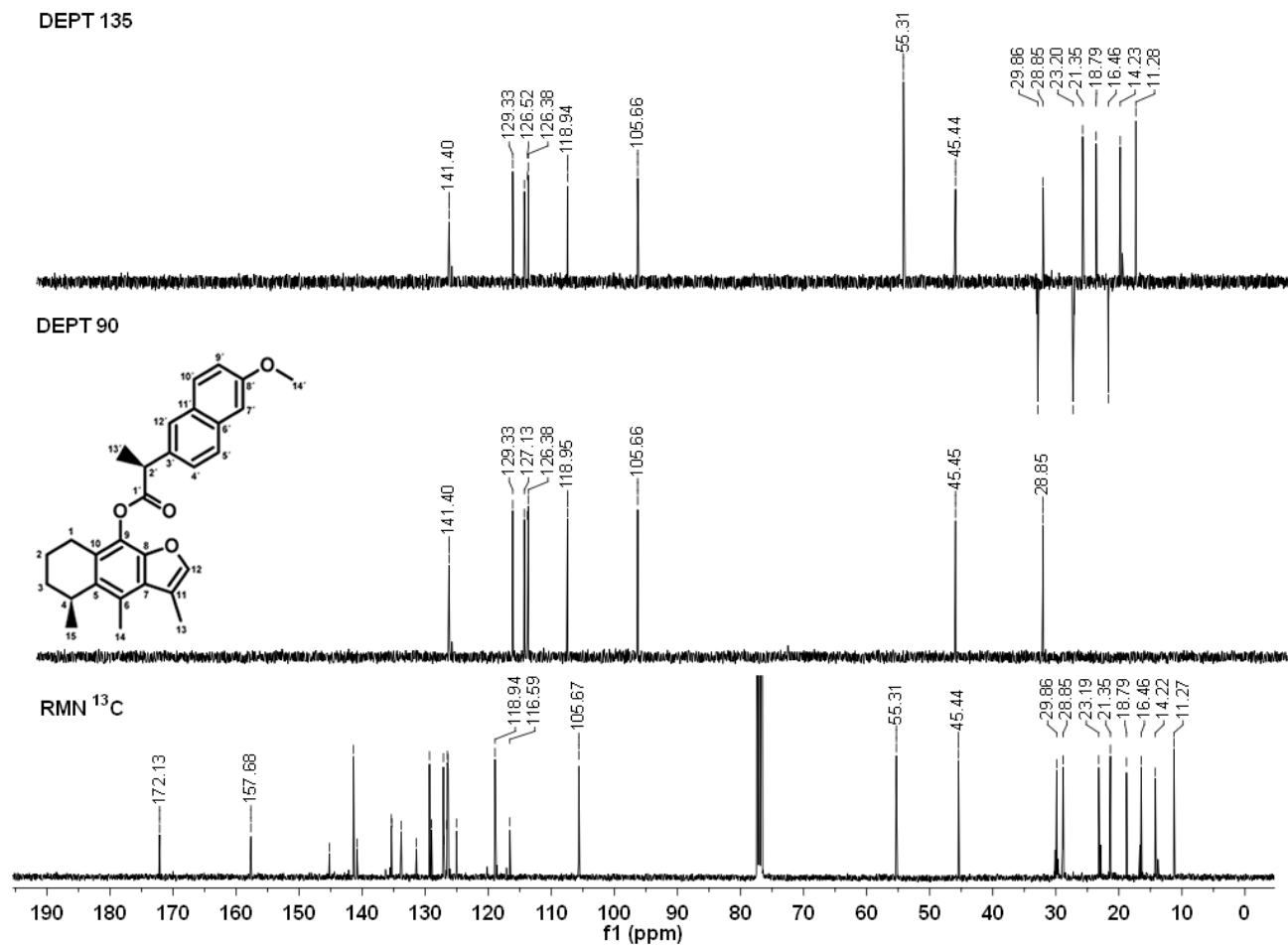
Anexo 3.2. Espectro de masas (IE) del compuesto 1.



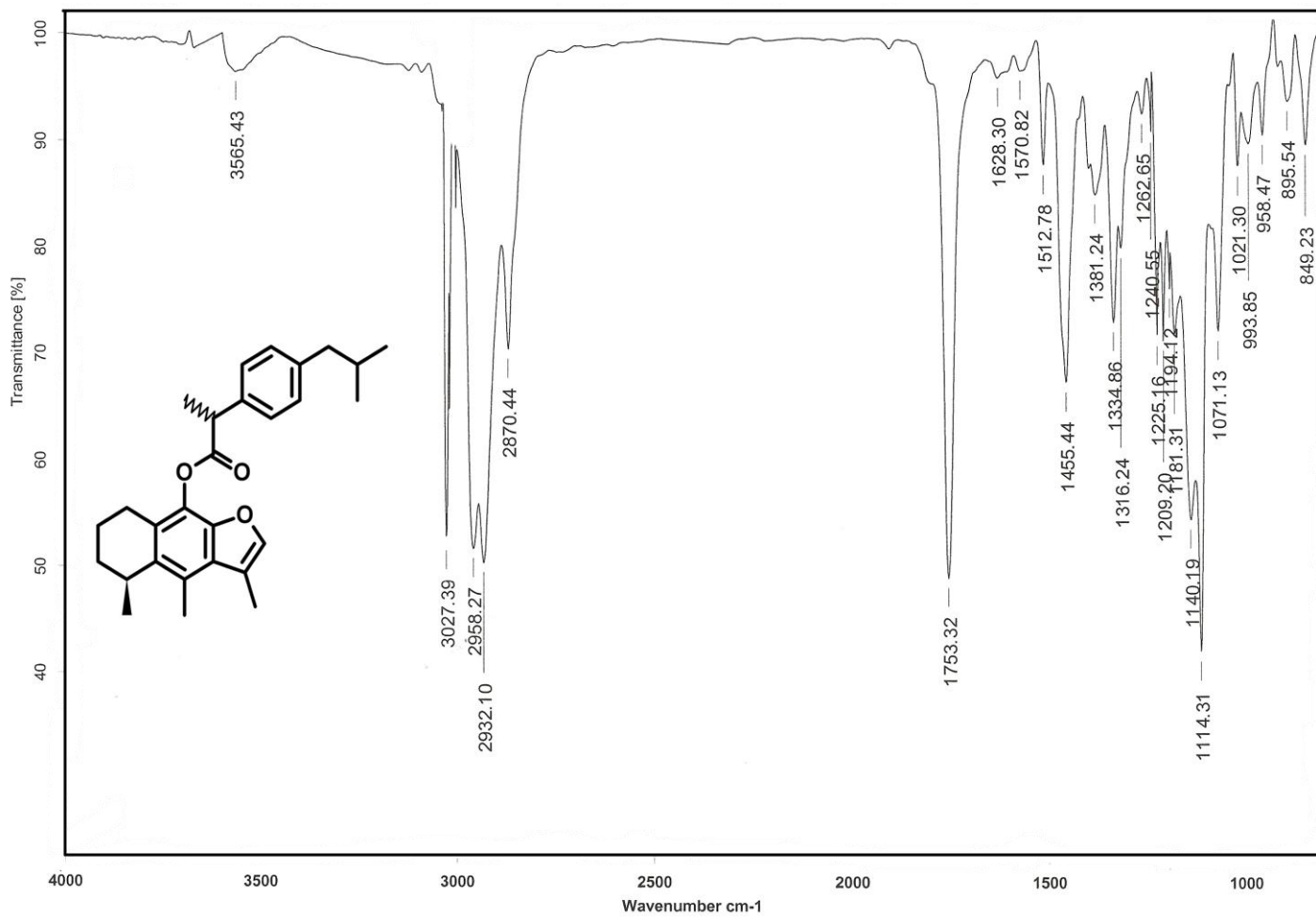
Anexo 3.3. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 1.



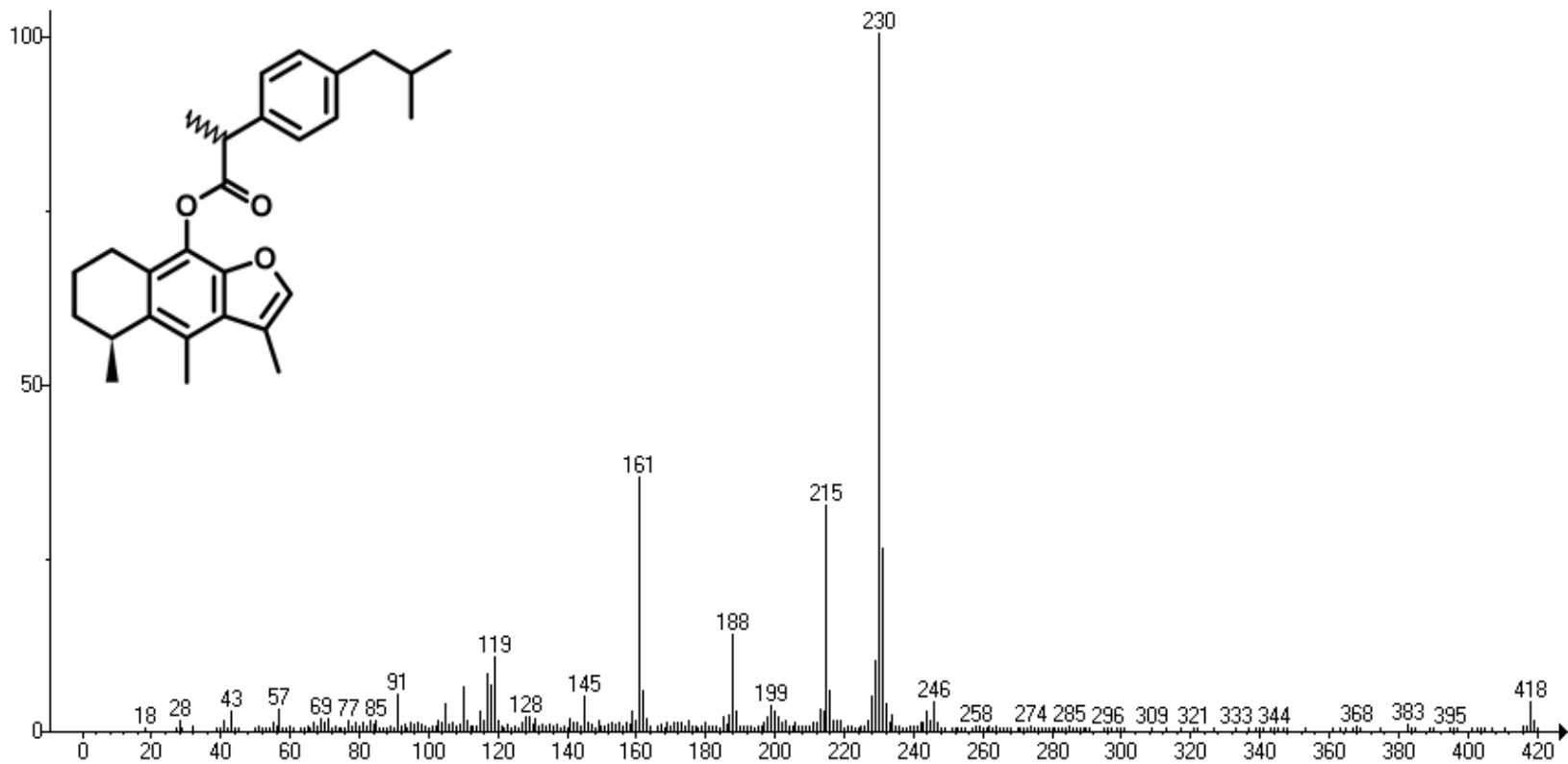
Anexo 3.4. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 1.



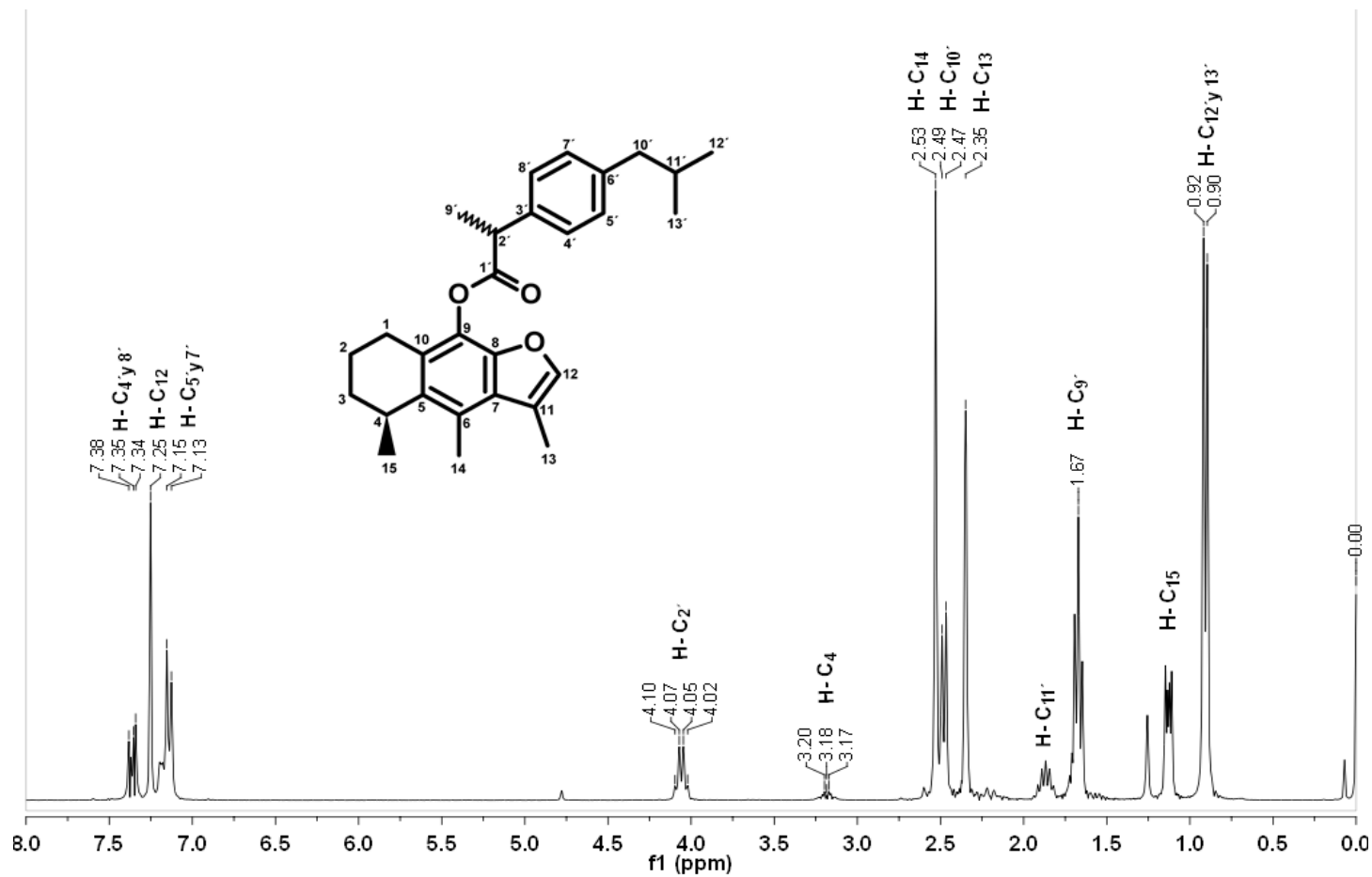
Anexo 3.5. Experimento DEPT del compuesto 1.



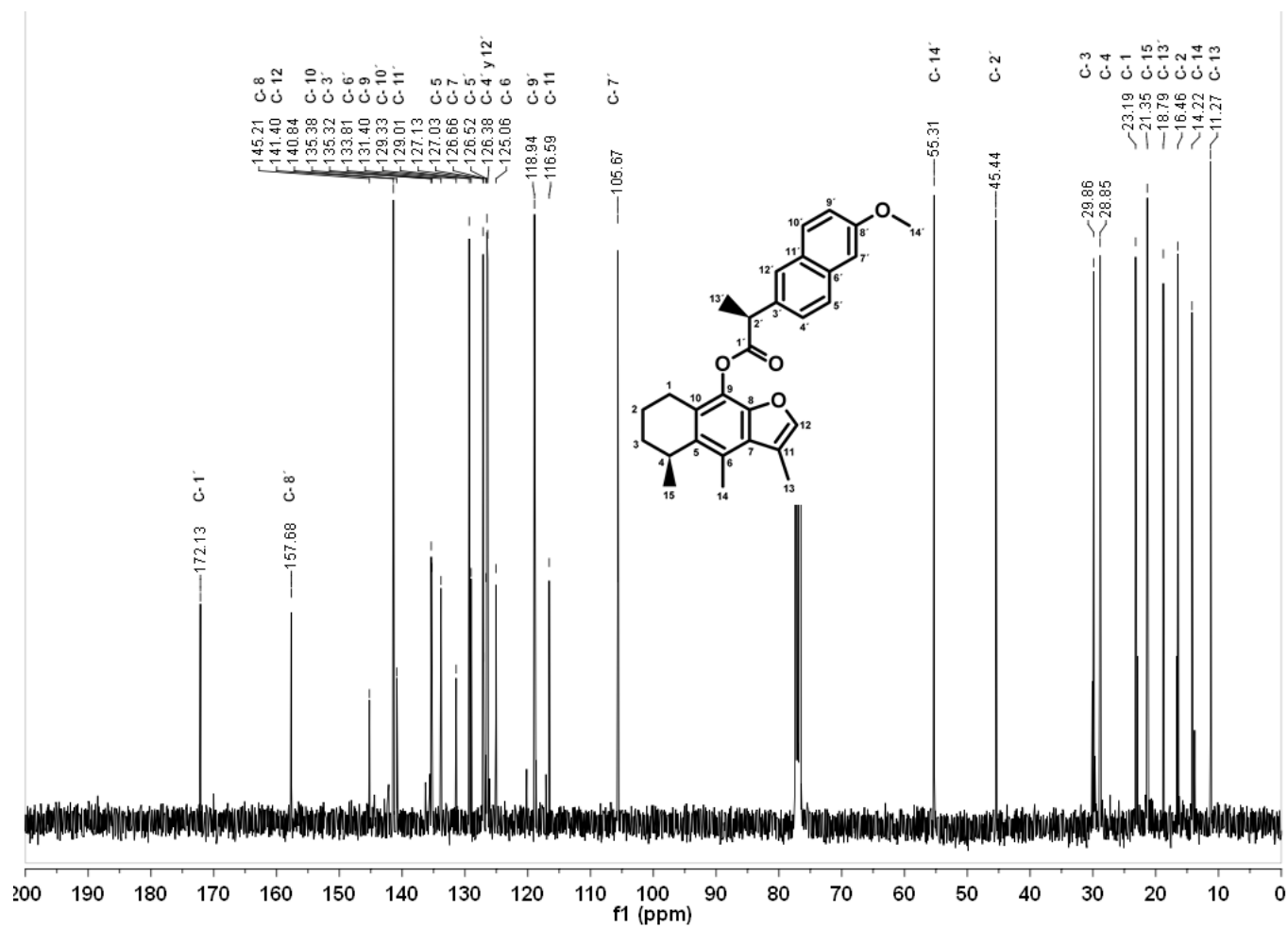
Anexo 4.1. Espectro de IR (CHCl₃, disolución) del compuesto 2.



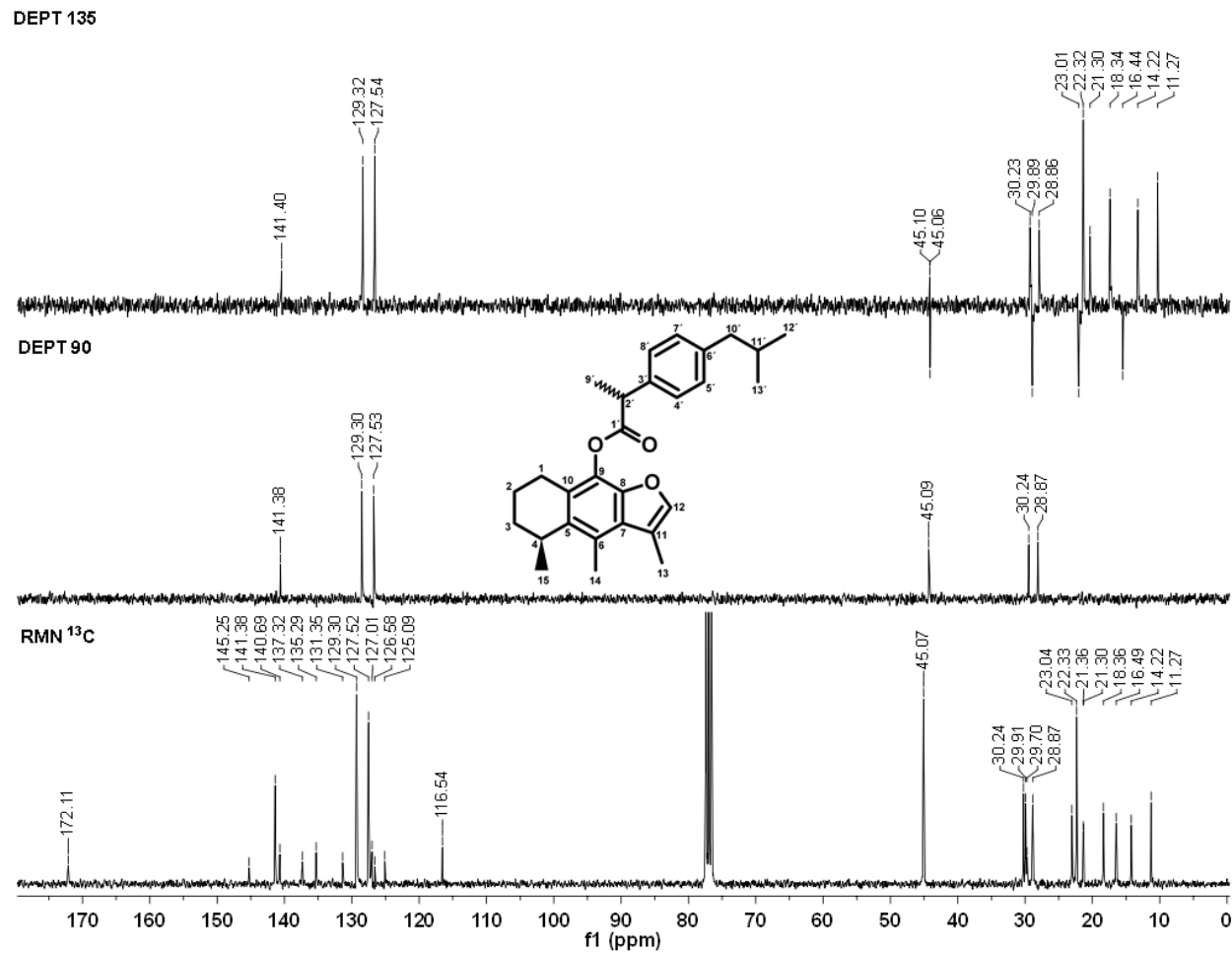
Anexo 4.2. Espectro de masas (IE) del compuesto 2.



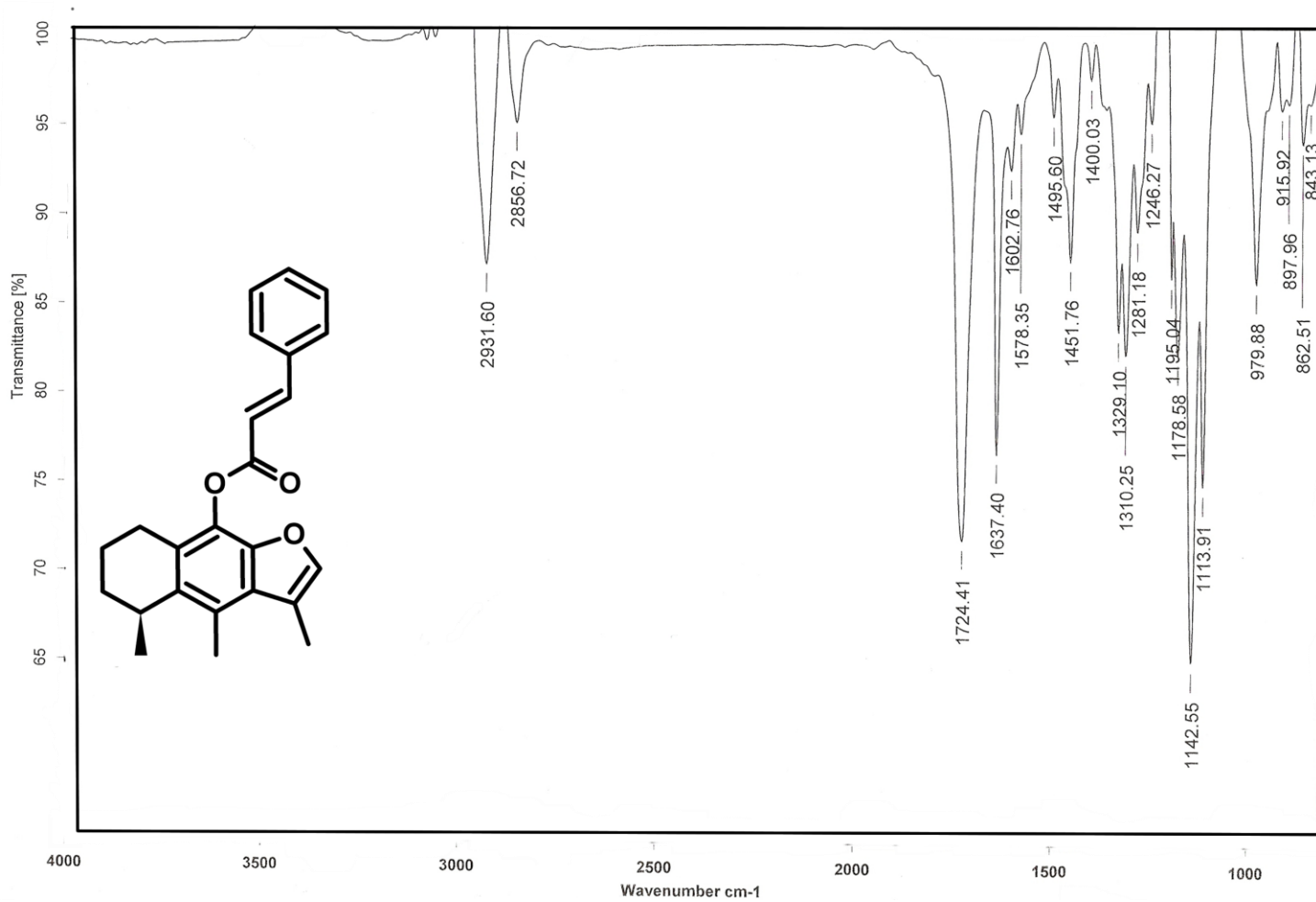
Anexo 4.3. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) del compuesto 2.



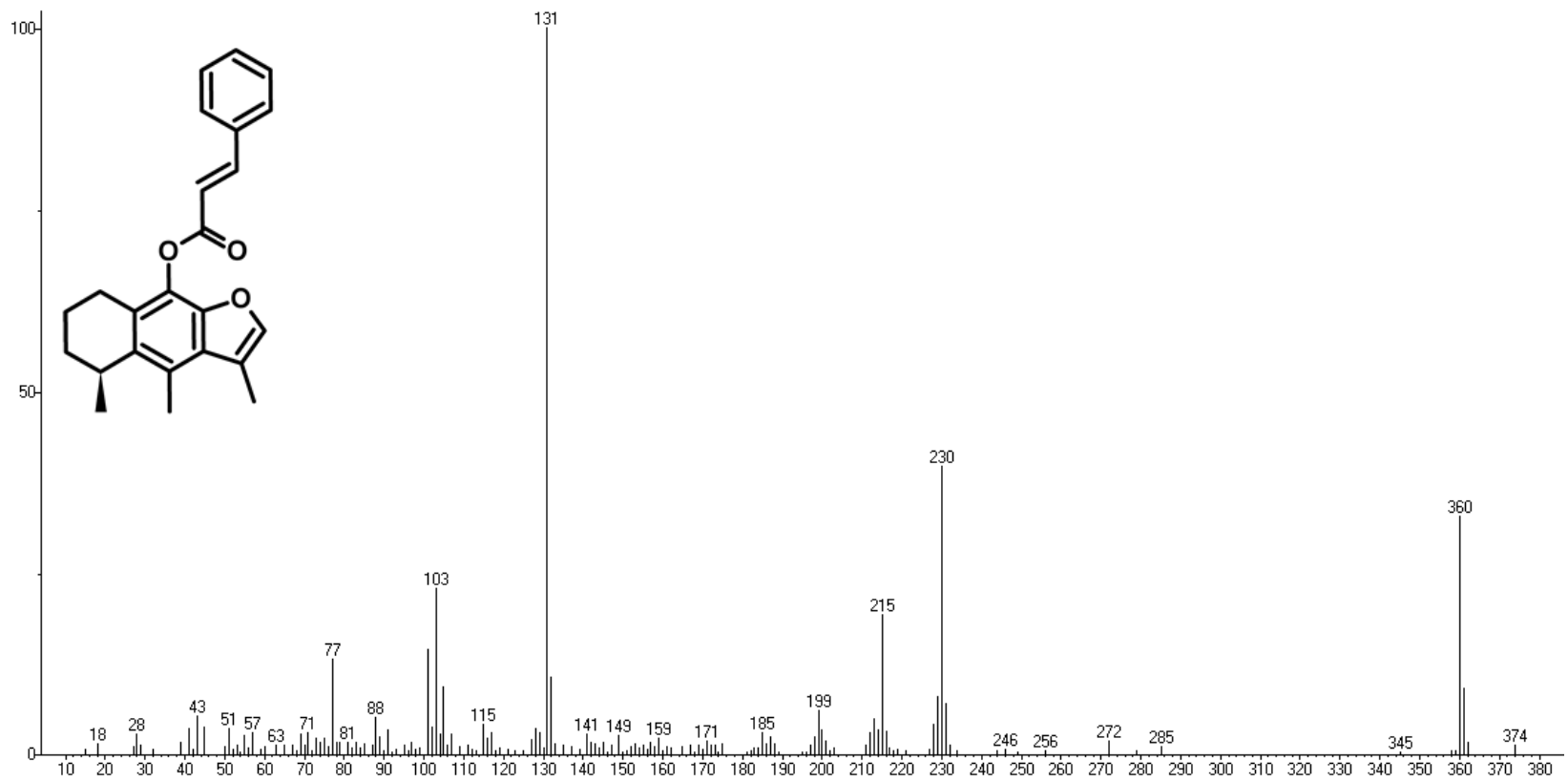
Anexo 4.4. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) del compuesto 2.



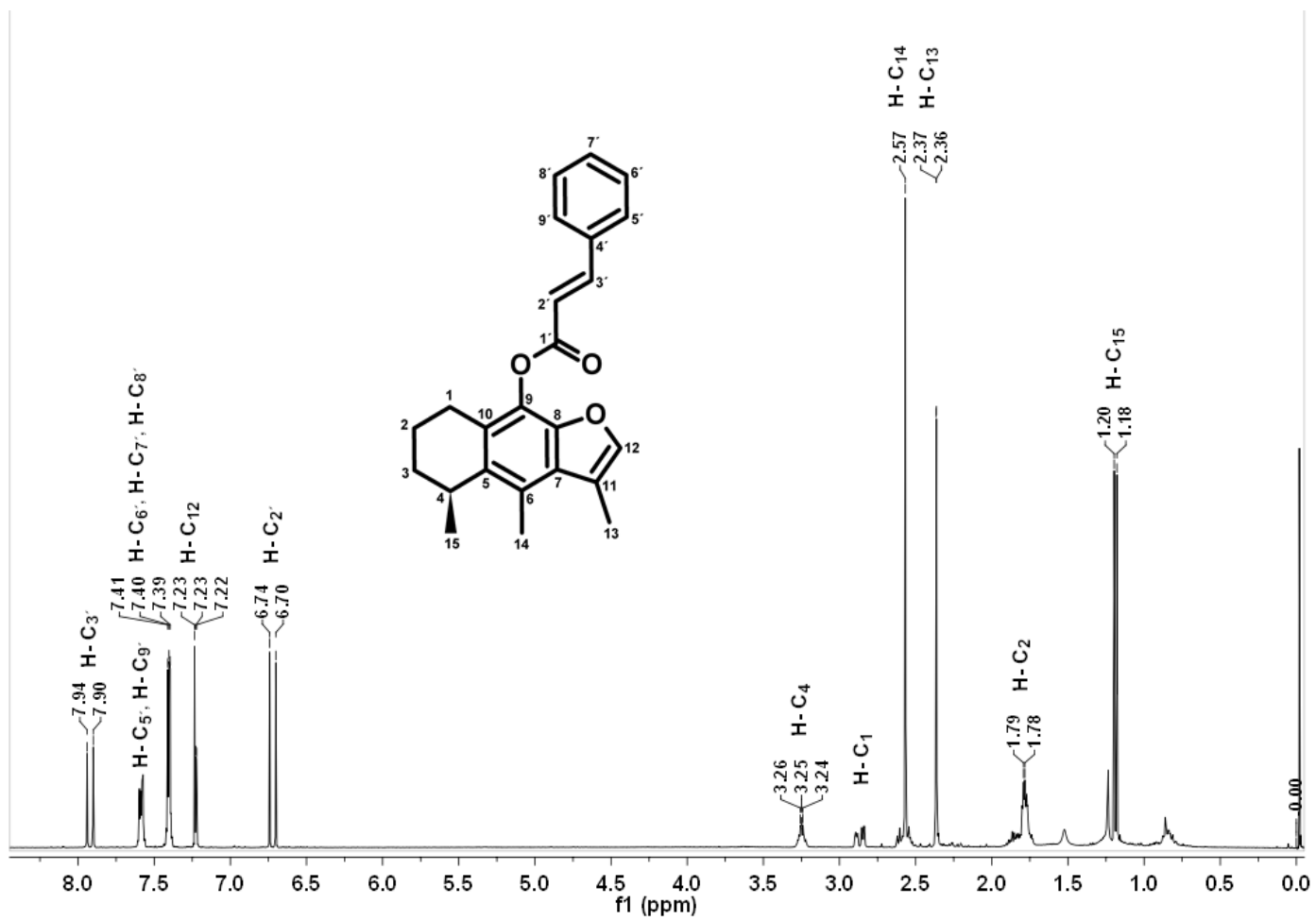
Anexo 4.5. Experimento DEPT del compuesto 2.



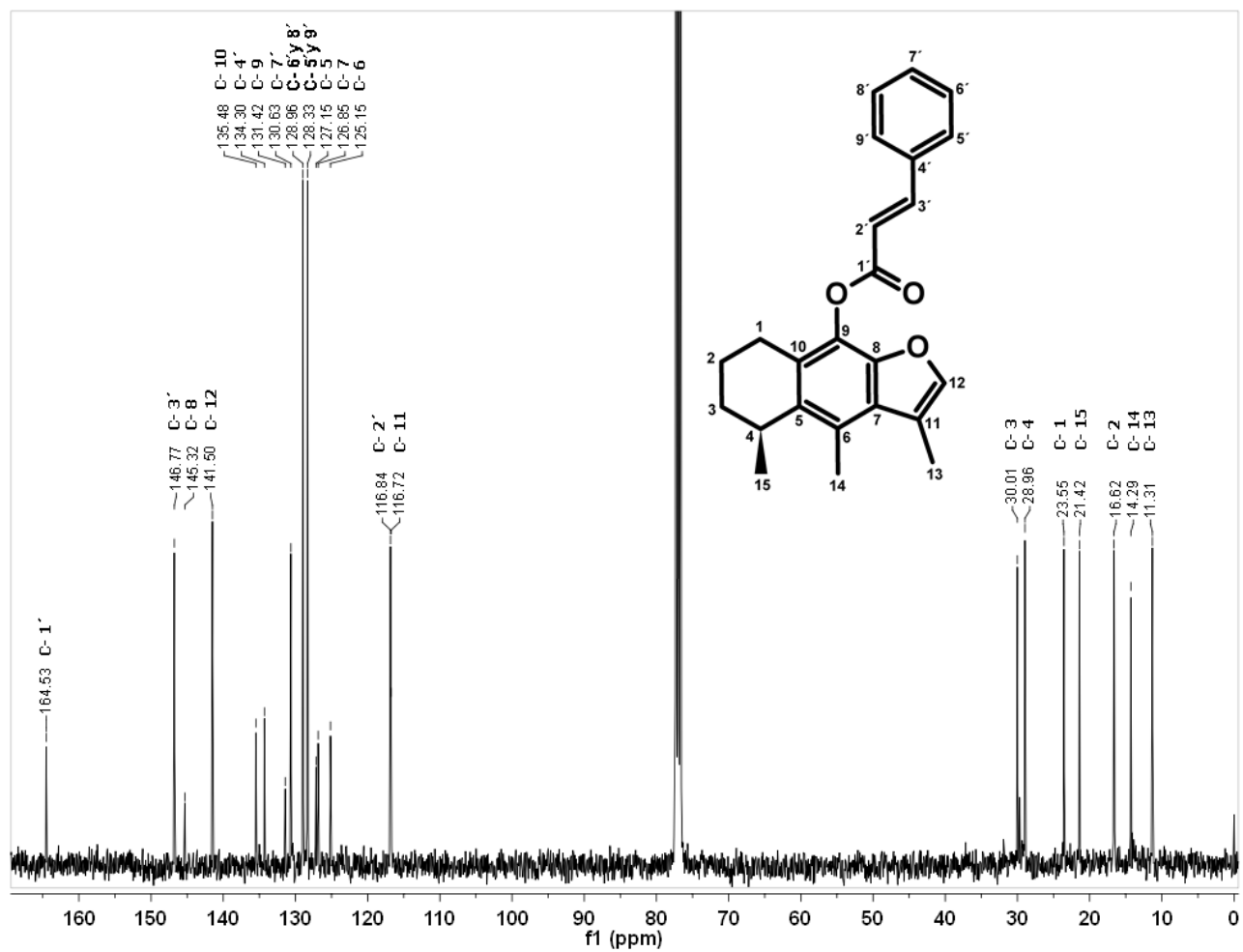
Anexo 5.1. Espectro de IR (CHCl_3 , disolución) del compuesto 3.



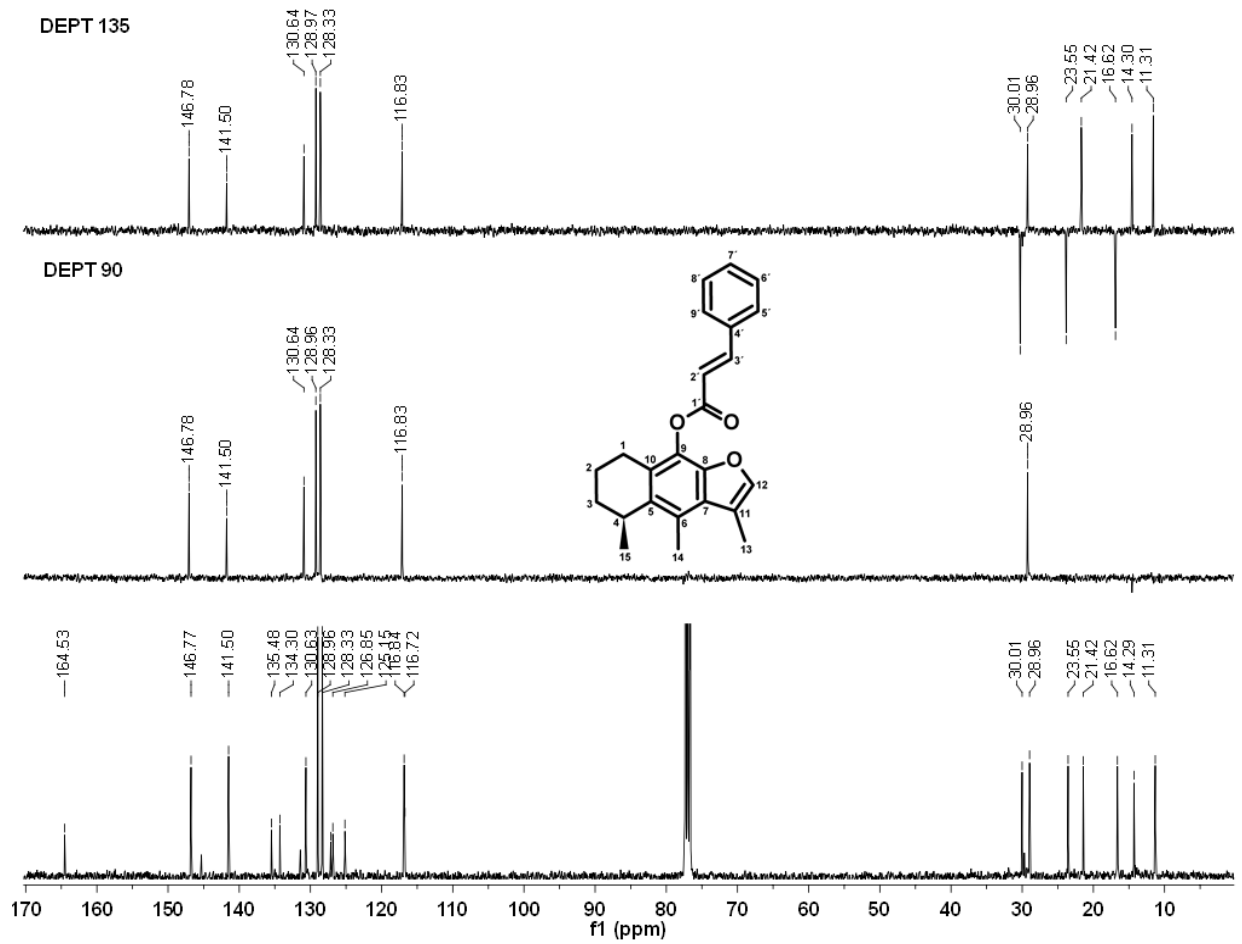
Anexo 5.2. Espectro de masas (IE) del compuesto 3.



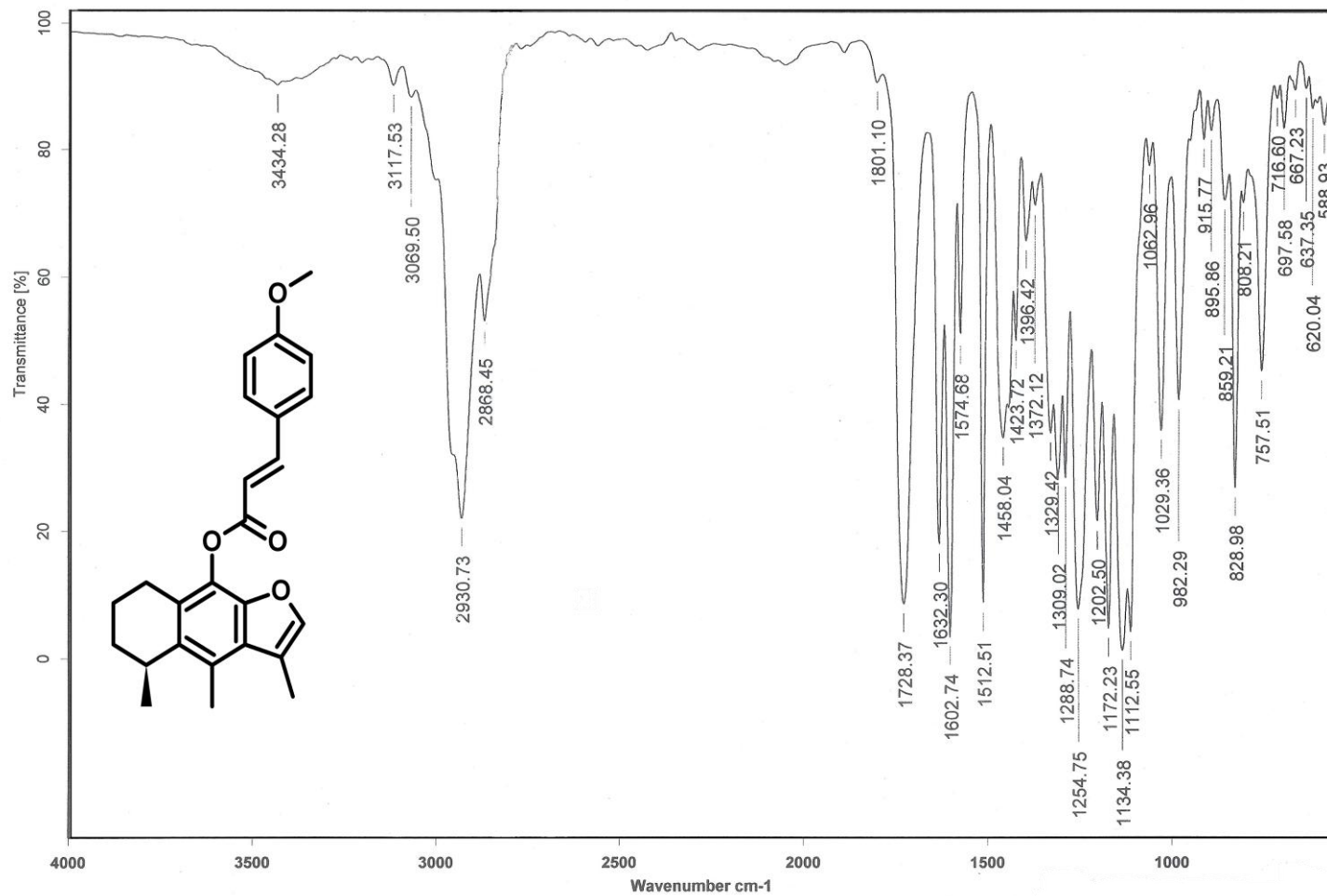
Anexo 5.3. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 3.



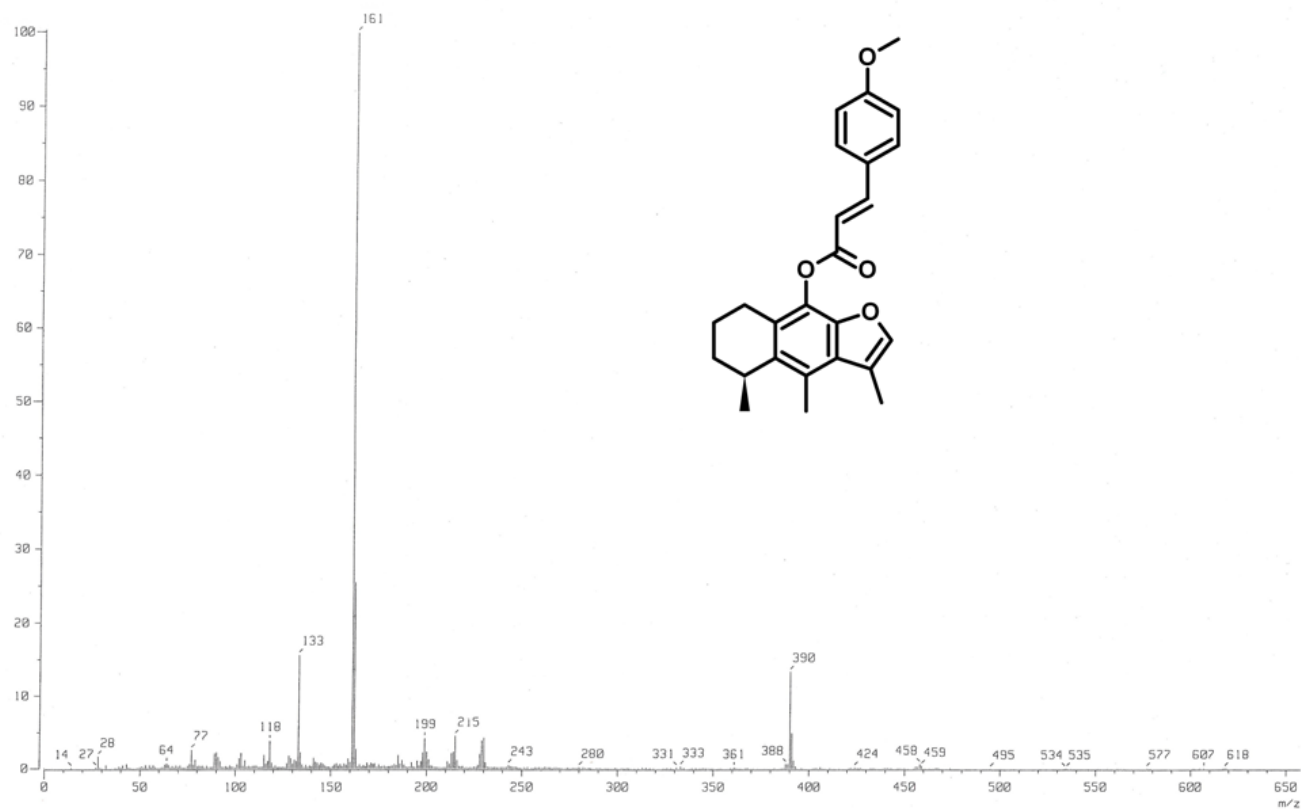
Anexo 5.4. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 3.



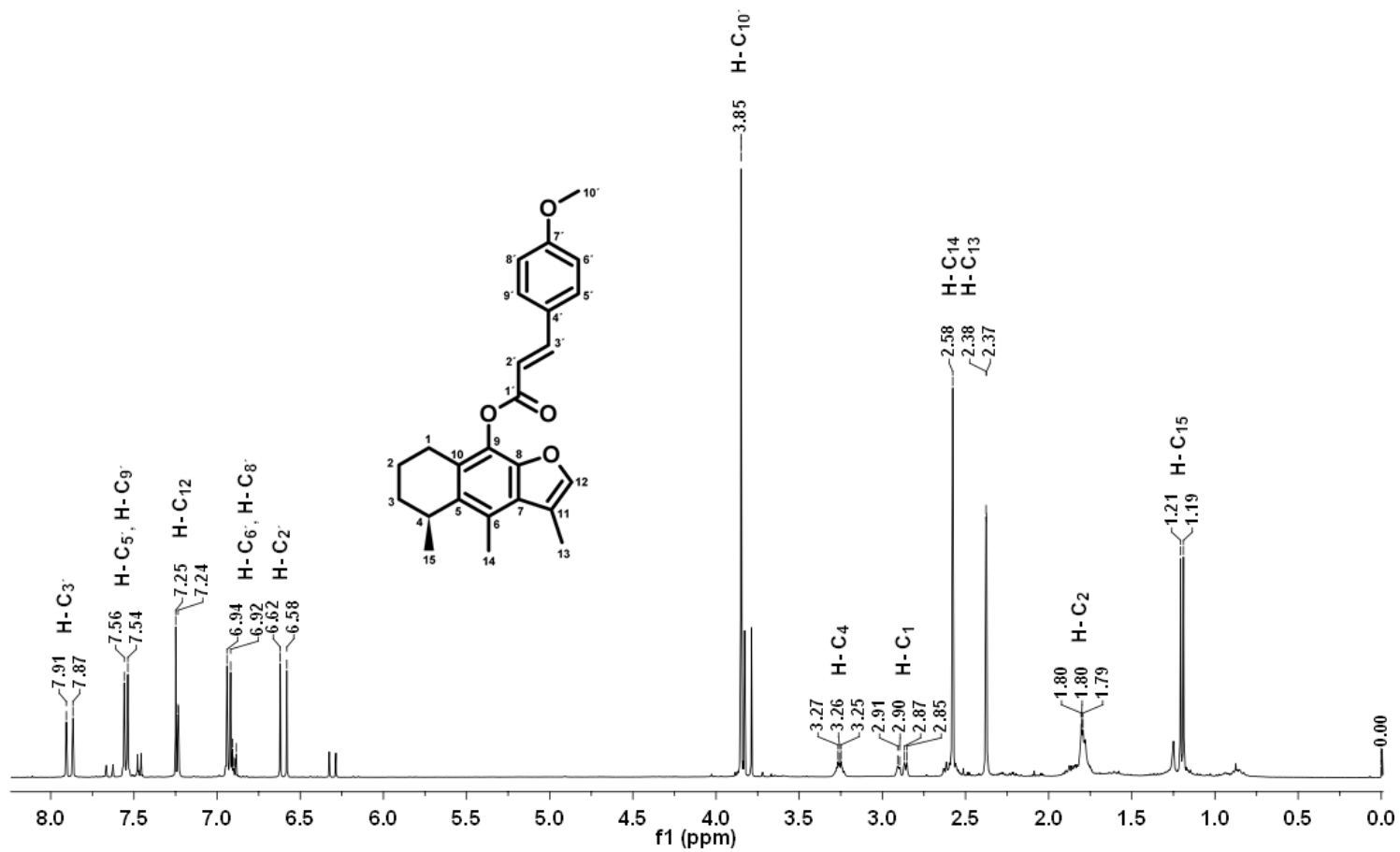
Anexo 5.5. Experimento DEPT del compuesto 3.



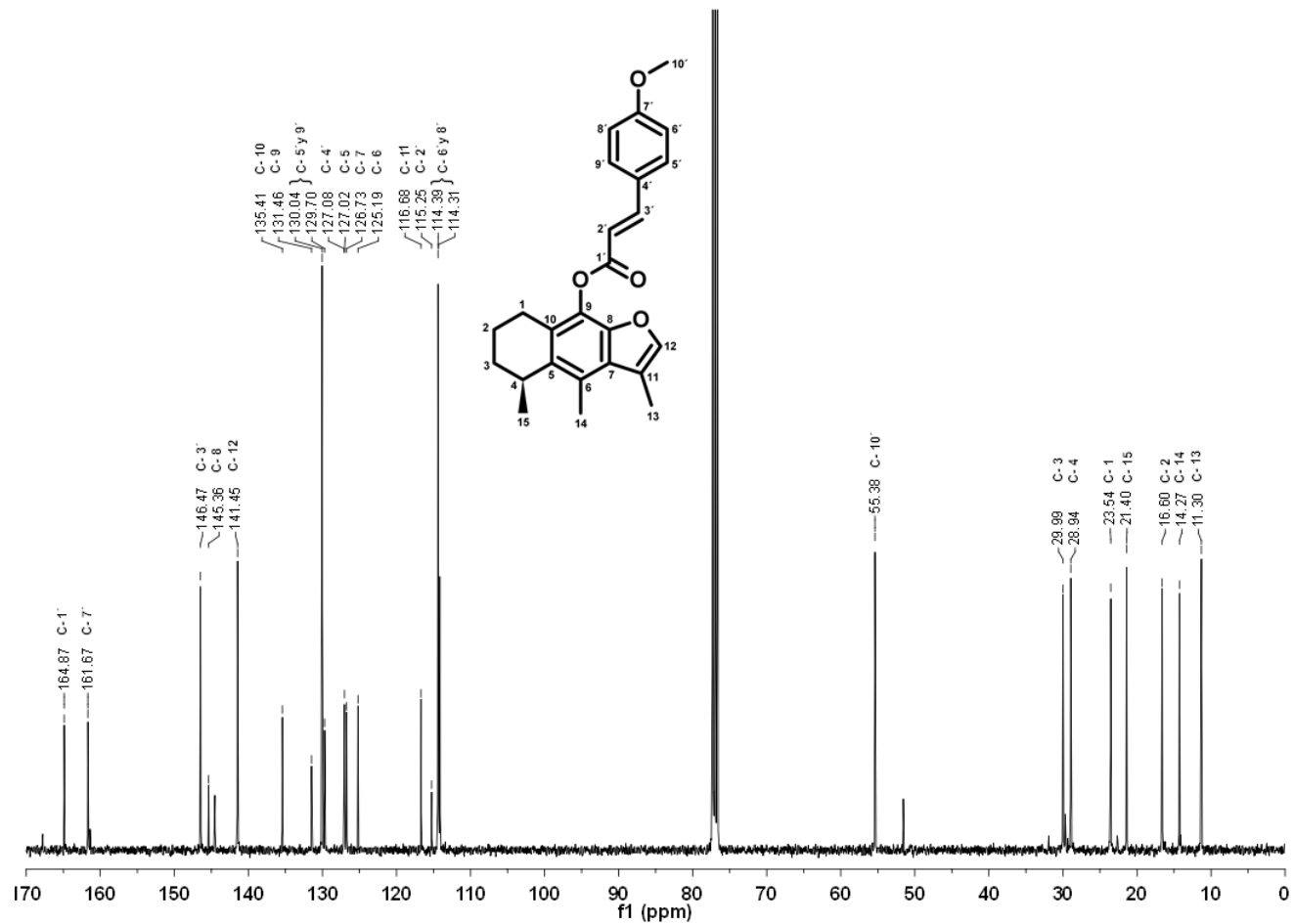
Anexo 6.1. Espectro de IR (CHCl_3 , disolución) del compuesto 4.



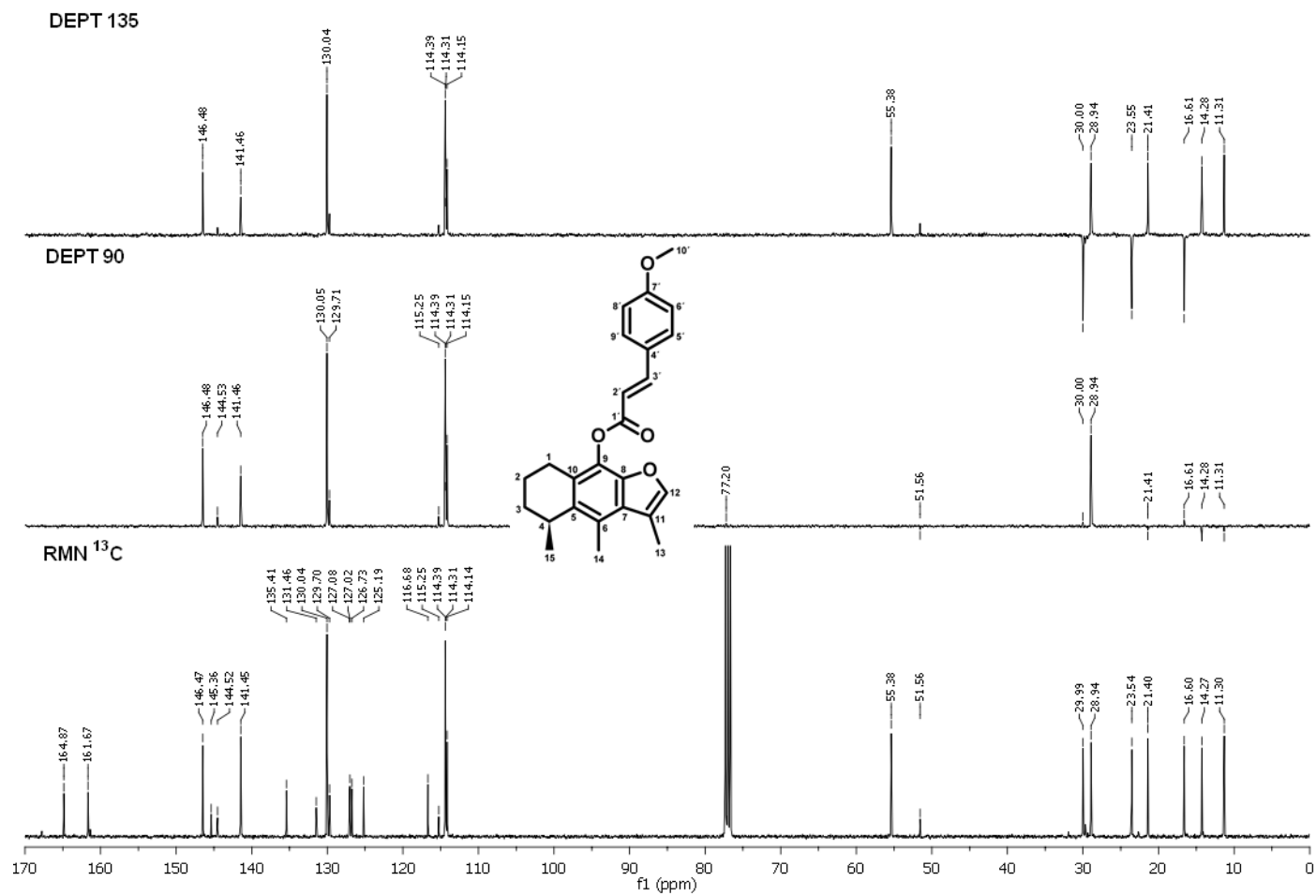
Anexo 6.2. Espectro de masas (IE) del compuesto 4.



Anexo 6.3. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto 4.



Anexo 6.4. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto 4.



Anexo 6.5. Experimento DEPT del compuesto 4.

Anexo 7

Las siguientes metodologías fueron proporcionadas por el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química.

Actividad antiinflamatoria por método de TPA

El ensayo de edema en oreja de ratón inducido con TPA se realizó siguiendo la metodología descrita anteriormente (Paya et al., 1996; Rao et al., 1993). Se emplearon ratones macho de la cepa CD1 (25 – 30 g). Los animales (n = 5) se colocaron en cajas de acrílico transparente a temperatura constante de 24 °C, con un fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad, con agua y alimento *ad libitum*. Cada grupo fue anestesiado con pentobarbital sódico (PBS) a una dosis de 31.5 mg/kg por vía intraperitoneal. Posteriormente a los ratones se les aplicaron 10 µL de solución etanólica de TPA (0.25 mg/mL) en la oreja derecha. Diez minutos después, en la misma oreja se aplicó 1.0 µmol de cada compuesto disuelto en 20 µL del vehículo (diclorometano). La oreja izquierda fue utilizada como control y se le aplicaron solamente 10 µL de etanol y 20 µL del vehículo del compuesto. Cuatro horas después, los animales se sacrificaron con CO₂, para tomar una muestra de 7 mm de diámetro de ambas orejas. El incremento de peso de la muestra de la derecha con respecto a la izquierda representa el edema. La inhibición del edema se calcula con la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = [(C - E) / C] 100$$

En donde:

C = Edema del grupo de control (tratado con TPA)

E = Edema del grupo experimental (TPA más el compuesto)

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguida de una prueba de Dunnett de comparación múltiple, para aislar los grupos con diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$).

Actividad antioxidante

Método de DPPH•

La actividad antioxidante de los compuestos se realizó siguiendo la metodología descrita (Cavin et al., 1998; Cotelle et al., 1996; Gamez et al., 1998). Se tomaron por triplicado 50 µL de las soluciones de cada uno de los compuestos a diferentes concentraciones y se depositaron en una microplaca de 96 pozos, posteriormente se agregaron 150 µL de una solución etanólica de DPPH• 133.33 µM (concentración final de 100 µL). La mezcla se protegió de la luz y se agitó durante 30 minutos a 37 °C, posteriormente se realizaron las lecturas de las absorbancias a 515 nm en lector de microplacas (Biotek ELx808).

La actividad sobre 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 = es la DO promedio del control (DPPH• 100 µL)

E = es la DO promedio de la solución problema + DPPH• 100 µL

% de reducción = al porcentaje de DPPH• reducido por el compuesto en estudio.

Método TBARS

Este ensayo se llevó a cabo en tres etapas:

Primera etapa. Homogeneización del cerebro de rata

Se anestesiaron las ratas (hembras Wistar) con éter y se sacrificaron por dislocación cervical. Se realizó la disección para extraer el tejido cerebral completo y se colocó en una disolución de buffer de fosfatos (PBS) fría (se conservó a -70 °C hasta el inicio del experimento). El cerebro se lavó con abundante agua destilada para eliminar los eritrocitos presentes en el tejido. El cerebro se pesó y se le agregaron 10 mL de PBS (9.5 mM, pH = 7.4) por

cada gramo de cerebro. Posteriormente, se homogeneizó por 60 segundos, se centrifugó 10 min a 3000 rpm y se recuperó el sobrenadante.

Segunda etapa. Cuantificación de proteína por el método de Lowry y ajuste de concentración.

Se tomaron por duplicado 5 μ L del sobrenadante del homogeneizado de cerebro de rata y se colocaron en una microplaca de 96 pozos, posteriormente se añadieron 20 μ L de agua destilada y 150 μ L de una mezcla de reacción (0.98 mL de una solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 2 % en NaOH 0.1 N, 0.01 mL de una solución de tartrato de Na/K al 2 % y 0.01 mL de una solución de sulfato de cobre (CuSO_4) al 1 %), se homogeneizaron e incubaron por 10 min a temperatura ambiente.

Terminado el tiempo de incubación, se adicionaron 25 μ L de reactivo de Folin (ácido fosfomolibdotúngstico) disuelto en agua (1:1) y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 540 nm y se obtuvo el contenido de proteína en el homogeneizado, mediante la ecuación:

$$\text{Proteína (mg/mL)} = \left(\frac{A_{540} - 0.05012}{0.0028} \right) 40$$

Se ajustó el contenido de proteína a 2.666 mg/mL con PBS (9.5 mM, pH = 7.4).

Tercera etapa. Inducción de la oxidación con sulfato de hierro (FeSO_4)

Todo el procedimiento se llevó a cabo en baño de hielo. Se colocaron por duplicado para cada muestra, 375 μ L de sobrenadante del homogeneizado de cerebro de rata (2.666 mg prot/mL) en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente se agregaron a todos los tubos 50 μ L de una solución 20 μ M de EDTA en PBS y enseguida se adicionaron 25 μ L de la muestra (20 veces más concentrada) y se incubaron 30 min a 37 $^{\circ}$ C con agitación.

Terminado el tiempo de la primera incubación se agregaron 50 μL de una solución de FeSO_4 100 μM y se incubaron por segunda vez durante 1 h a 37 $^\circ\text{C}$ con agitación. Finalizando el segundo tiempo de incubación se añadieron 500 μL de reactivo TBA (ácido tiobarbitúrico al 0.5 % disuelto en NaOH 0.05 N : ácido tricloroacético al 30 % [1:1]) y se colocaron en baño de hielo por 10 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 12000 rpm, a temperatura ambiente, por 5 min y posteriormente se incubaron 30 min en baño de agua a 80 $^\circ\text{C}$. En la tabla 3 se observan los volúmenes de las soluciones utilizadas para cada experimento. El volumen final es de 1 mL.

Volúmenes de las soluciones utilizadas para cada experimento de TBARS.

Tubos para cada experimento

Volumen (μL)	Blanco	Basal	FeSO_4	FeSO_4 + vehículo	Muestra
375	PBS	HC	HC	HC	HC
50	EDTA	EDTA	EDTA	EDTA	EDTA
25	Vehículo	PBS	PBS	Vehículo	Compuesto
50	FeSO_4	Agua	FeSO_4	FeSO_4	FeSO_4
500	TBA	TBA	TBA	TBA	TBA

TBA: Ácido tiobarbitúrico, HC: Homogeneizado de cerebro de rata,

EDTA: Ácido etilendiamino tetracético, PBS: Solución amortiguadora de fosfatos.

Pasado el tiempo de incubación a 80 $^\circ\text{C}$ se tomaron por duplicado 200 μL de cada tubo y se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas.