



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“APLICACIÓN DE PRODUCTOS
NATURALES EN ALIMENTOS CON ACTIVIDAD
BIOLÓGICA”**

TESIS

Que para obtener el título de:
QUÍMICA DE ALIMENTOS

Presenta:
SAC NICTÉ FLORES FABIÁN

Director de tesis:
Dr. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA





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: Manuel Jiménez Estrada
Vocal: Guillermina Yazmín Arellano Salazar
Secretario: Elizabeth Reyes López
1er. Suplente: Rodolfo Fonseca Larios
2do. Suplente: Adriana Berenice Pérez Jiménez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**Lab 2-10, Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química,
UNAM.**

ASESOR DE TEMA:

Dr. Manuel Jiménez Estrada

SUPERVISORA TÉCNICA:

Dra. Rosario Tavera Hernández

SUSTENTANTE (S):

Sac Nicté Flores Fabián

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto de Química por brindarme la oportunidad de realizar el trabajo de investigación de doctorado y por los servicios analíticos y capacitaciones brindadas.

Agradezco a la Facultad de Química por brindarme la oportunidad de formarme académicamente y los servicios brindados.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, por el apoyo brindado al proyecto, a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (Proyecto BG200321)

Extiendo un agradecimiento muy especial al Dr. Manuel Jiménez Estrada por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo. Así mismo, agradezco a la Dra. Rosario Tavera Hernández por ser una guía y un enorme soporte en el cumplimiento de los objetivos en la tesis presentada.

Agradezco a los miembros del jurado: Guillermina Yazmín Arellano Salazar, Elizabeth Reyes López, Rodolfo Fonseca Larios y Adriana Berenice Pérez Jiménez por sus valiosas aportaciones realizadas en la revisión del presente trabajo de tesis.

Agradezco al personal académico del Instituto de Química especialmente a la M. en C. Elizabeth Huerta Salazar, a la Q. María de los Ángeles Peña González, a la Dra. Ma. Isabel Chávez Uribe, a la Dra. Beatriz Quiroz García y al Dr. Rubén Luis Gaviño Ramírez del laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear; al Dr. Francisco Javier Pérez Flores y al I. Q. Luis Velasco Ibarra, del laboratorio de Espectrometría de Masas. Agradezco de manera muy especial al M. en C. Antonio Nieto Camacho y a la M. en C. María Teresa Ramírez Apan del laboratorio de Pruebas Biológicas.

Agradezco al M. En C. Simón Hernández de laboratorio de difracción de rayos X.

RESUMEN

Los productos naturales obtenidos directamente de plantas, animales o microorganismos, son utilizados en la industria farmacéutica y en la industria alimentaria. La modificación química de los productos naturales, proporcionan nuevos compuestos con una actividad biológica o características fisicoquímicas diferentes. Es por esto, que en el presente trabajo se plasma la obtención de los sesquiterpenos acetato de cacalol y acetato de maturina, presentes en las raíces de *Psacalium decompositum* y *Psacalium peltatum*, respectivamente. También se proponen métodos para la adición del grupo nitro en estos sesquiterpenos y en el compuesto umbeliferona adquirida comercialmente, además, se realizan pruebas biológicas a todos los compuestos obtenidos, evaluando su actividad antiproliferativa y su capacidad de inhibir las enzimas acetilcolinesterasa y α -glucosidasa. Con la suma de los resultados, en la última parte del trabajo se plantea el consumo de las raíces en forma de té auxiliar en el tratamiento de enfermedades.

Se logró extraer y purificar el acetato de cacalol a partir del extracto acetilado de la raíz *Psacalium decompositum* y el acetato de maturina del extracto hexánico de la raíz *Psacalium peltatum*. De las reacciones de nitración resultaron los siguientes compuestos: acetato de 2-nitro-cacalol, 8-nitroumbeliferona, 6-nitroumbeliferona y 3-nitroumbeliferona. La umbeliferona y el derivado 3-nitro umbeliferona presentaron la mejor capacidad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa, con 67 y 71% respectivamente, a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Por otro lado, el nitro derivado del acetato de cacalol y el derivado 3-nitro umbeliferona presentaron la mejor capacidad para inhibir la enzima acetilcolinesterasa con valores de 70% (10 $\mu\text{g/ml}$) y 52 %, (1 $\mu\text{g/ml}$), respectivamente. A su vez el 2- nitro-acetato de cacalol presentó una destacable actividad del 80% en la inhibición de la enzima acetil colinesterasa.

El acetato de cacalol y umbeliferona inhibieron el crecimiento celular de la línea K562 en 66 y 53% respectivamente, a una concentración de 25 μM . El acetato de maturina mostró inhibir 73.3% el edema en oreja de ratón a una concentración de 1mg/oreja.

ABREVIATURAS

1-desoxinojirimicina	DNJ
7-hidroxicumarina	7-HC
Acetilcolinesterasa	AChE
Acetato de etilo	AcOEt
Nitrato de bismuto	Bi(NO₃)₃
Nitrato de amonio cérico (IV)	CAN
Cuanto baste para	cbp
Cromatografía en capa fina	CCF
Diclorometano	CH₂Cl₂
Cromatografía en placa preparativa	CPP
Diabetes Mellitus	DM
Enfermedad de Alzheimer	EA
Espectrometría de masas	EM
Impacto Electrónico	IE
Infrarrojo	IR
Nitrato de potasio	KNO₃
Nitrato de amonio cérico	(NH₄)₂[Ce(NO₃)₆]
Nitrato de sodio	NaNO₃
Resonancia Magnética Nuclear	RMN
Rayos X	RX
Tetrahidrofurano	THF
Tetradecanoilforbol	TPA
Ultravioleta	UV

Índice

1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Plantas medicinales	2
2.2 Terpenos	5
2.3 Fenoles	6
2.4 Cumarinas	8
2.5 Umbeliferona	9
2.6 Complejo de Matarique	10
2.7 <i>Psacalium decompositum</i>	11
2.8 <i>Psacalium peltatum</i>	13
2.9 Cacalol	14
2.10 Acetato de maturina	14
2.11 Modificación estructural	15
2.12 Nitración	17
2.13 Inhibidores de las enzimas α -glucosidasa y acetilcolinesterasa	19
3. Justificación	22
4. Hipótesis	24
5. Objetivos	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos particulares	24
6. Materiales y métodos	25
6.1 Reactivos y materiales	25
6.2 Equipo	25
7. Metodología	27
7.1 Obtención del extracto de la raíz <i>Psacalium decompositum</i>	27
7.2 Reacción de acetilación del extracto de acetato de etilo	27
7.3 Cromatografía en columna abierta del extracto de acetato de etilo	28
7.4 Nitración del acetato de cacalol	29
7.5 Obtención del extracto de la raíz de <i>Psacalium peltatum</i>	31
7.6 Cromatografía en columna abierta del extracto hexánico	31
7.7 Nitración del acetato de maturina	31
7.8 Obtención de derivados nitrados de umbeliferona	32
7.9 Pruebas biológicas	33
8. Resultados y discusión	35

8.1 Obtención del extracto de la raíz de Matarique.....	35
8.2 Obtención del acetato de cacalol.....	35
8.3 Obtención del extracto hexánico de la raíz de Matarique y del acetato de maturina..	37
8.4 Nitración de acetato de cacalol.....	38
8.5 Nitración de acetate de maturina.....	42
8.6 Nitración de umbeliferona	42
8.7 Pruebas biológicas.....	45
8.7.1 Ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa.....	45
8.7.2 Ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.....	47
8.7.3 Citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas.....	49
8.7.4 Actividad antiinflamatoria (TPA)	51
8.7.5 Bioensayo en Artemia spp. salina.....	51
9. Conclusiones	53
Referencias	55
Anexos	63

1. INTRODUCCIÓN

En el metabolismo secundario de un organismo vivo (bacteria, hongo, planta o animal) se lleva a cabo la formación de metabolitos secundarios o también llamados productos naturales. Estos metabolitos representan un rol importante en la interacción del organismo con el medio ambiente, siendo característicos en cada grupo taxonómico.

Dentro de los organismos vivos utilizados para la obtención de productos naturales se encuentran las plantas medicinales, a las cuales se les ha atribuido un efecto curativo, debido a que poseen distintos compuestos bioactivos. Los productos naturales tienen aplicaciones comerciales en forma de fármacos, agroquímicos, colorantes, narcóticos, antibióticos, aceites comestibles, biodiesel, esencias, saborizantes e insecticidas, entre otros.

Psacalium decompositum y *Psacalium peltatum* son plantas que pertenecen al complejo de Matarique. Dentro de los compuestos químicos aislados de sus raíces los que poseen actividad biológica de mayor importancia son los compuestos sesquiterpénicos denominados cacalol y el acetato de maturina, respectivamente. Por otro lado, los compuestos fenólicos son las moléculas que mayormente se encuentran en frutas, hortalizas y en numerosas plantas con propiedades biológicas importantes. Dentro de este gran grupo de compuestos se encuentra la familia de las cumarinas, siendo una de las principales la umbeliferona,

Esto conlleva a un aumento en las investigaciones sobre la extracción y caracterización de nuevos productos naturales con actividad biológica en los últimos tiempos. Que posteriormente se podrían aplicar como agentes terapéuticos, nutracéuticos o servir como estructuras base para modificarlas en sus estructuras para que proporcionen y/o mejoren la actividad biológica que presentan.

Dentro de las modificaciones estructurales que se les puede realizar a estas moléculas se encuentran las reacciones de nitración, halogenación, sulfonación, adición de otras moléculas como glucósidos o complejos organometálicos. El grupo nitro es un grupo funcional que produce una diversidad de actividades biológicas y

químicas. Las moléculas que contienen este grupo funcional tienen efectos antineoplásicos, antibióticos, así como, herbicidas, insecticidas, entre muchos otros.

2. ANTECEDENTES

2.1 Plantas medicinales

Algunas plantas y muchas especies animales han sido fuentes nutricionales para el ser humano desde siempre. No obstante, desde el descubrimiento de sus propiedades terapéuticas, son empleados en la prevención y tratamiento de enfermedades, los cuales constituyen un conocimiento que se transmite en forma oral de generación en generación, sin embargo, este conocimiento se va perdiendo debido a que las personas que lo conocen son los adultos mayores de los diferentes pueblos, aunado al incremento del cambio climático que ha hecho más difícil la reproducción de las plantas llegando a ser más complicado el acceso a ellas, así como la comercialización masiva de alimentos .

Se calcula en la actualidad que de las 260,000 especies de plantas que se conocen a nivel mundial, el 10% se pueden considerar medicinales. Se definen como plantas medicinales aquellas que contienen en alguno de sus órganos principios activos, los cuales, al ser administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos en las enfermedades del ser humano y de animales. La flora considerada medicinal se encuentra descrita y compilada dentro de los tratados médicos de fitoterapia, modernos y de épocas ancestrales, por presentar algún uso medicinal (Guevara, 2018).

En un tejido vegetal se encuentra una constante síntesis y degradación de metabolitos que determina el dinamismo de los sistemas biológicos. Estos metabolitos pueden ser clasificados en primarios y secundarios. Los compuestos primarios son todos aquellos que son esenciales para el funcionamiento de toda materia viva (crecimiento, desarrollo y reproducción), en esta categoría se

encuentran los glúcidos, lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Por otra parte, los compuestos secundarios cumplen, preferentemente, funciones ecológicas, son aprovechados por la planta que los sintetiza para interactuar con el medio, ya sea para atraer insectos y otros polinizadores, repeler predadores, impedir la competencia con otras plantas, adaptarse a condiciones adversas de suelo o clima, etc. (Ringuelet, 2013).

Los comúnmente llamados productos naturales de origen vegetal representan gran diversidad de metabolitos secundarios, provenientes de distintos orígenes biosintéticos, ejemplos de estos se encuentran los compuestos clasificados como alcaloides, bencenos, fenoles (C_6H_5OH), alcoholes bencílicos ($C_6H_5CH_2OH$), benzaldehídos, derivados de ácido fenilacético, benzofuranos, benzopiranos, flavonoides ($C_{15}H_{10}O_2$), terpenoides, entre otros; **Figura 1**.

Los metabolitos secundarios son de importancia debido a que han sido utilizados por el hombre en las industrias: farmacéutica, terapéutica, de cultivos, de perfumes, alimenticia (como suplementos, aditivos o colorantes), en el curtido de cueros (Ringuelet, 2013). Estos metabolitos están restringidos generalmente al metabolismo de algunas especies vegetales o familias botánicas. En muchos casos los productos naturales se utilizan como materia prima con el objetivo de crear nuevas moléculas capaces de incrementar su efectividad o disminuir sus efectos tóxicos, al igual que sirven como prototipos o modelos para la síntesis de fármacos que posean una mejor actividad biológica.

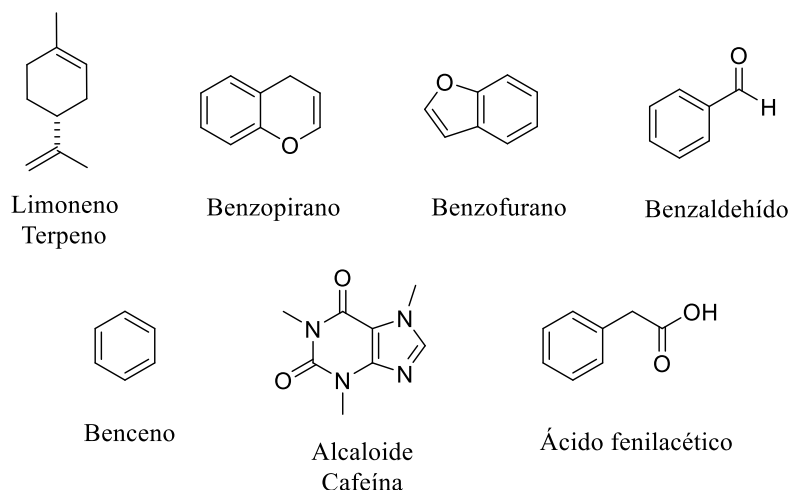


Figura 1. Ejemplos de metabolitos secundarios

Se tiene conocimiento que muchos de los metabolitos de las plantas poseen actividad biológica, pero aún no han sido estudiados, lo cual se demuestra con hallazgos del taxol, el etopósido, y la vincristina, compuestos que ahora son medicamentos de primera elección para diferentes tipos de cáncer (Márquez, 1999). Por lo que la caracterización y purificación de moléculas presentes en las plantas y en general en los organismos vivos (desde macroorganismos, insectos, animales terrestres, marinos y aves) son un camino importante para el descubrimiento de nuevos medicamentos, obtener un mejor conocimiento sobre los efectos benéficos y tóxicos para la salud, ya que el uso indiscriminado, transforman el consumo de herbolarios en un problema de salud pública. Otro rubro importante de esta caracterización es su aplicación dentro de la alimentación, ya que a partir del aislamiento y purificación de sustancias bioactivas de origen natural hacen posible el desarrollo de los nutraceuticos. Dichos productos se preparan en presentaciones farmacéuticas (cápsulas, comprimidos, sobres para disolver, etc.), que contienen concentraciones de dichas sustancias bioactivas en mucha mayor cantidad que la que tendrían raciones normales del alimento del que proceden. De esta manera, se obtienen las dosis efectivas para alcanzar los efectos benéficos esperados. En la **Figura 2**, se muestran las estructuras del taxol (abcam), etopósido (123RF, 2018) y

vincristina (ANMAT, 2007), los cuales son ejemplos de compuestos naturales utilizados en el tratamiento de cáncer (Muñoz, D. Cuca, L. 2016).

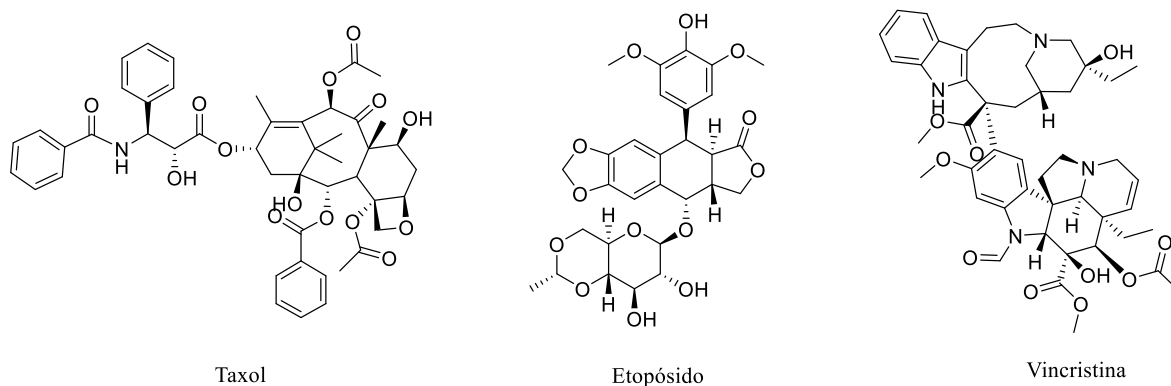


Figura 2. Compuestos naturales con actividad anticancerígena

En México, alrededor de 4,000 especies de plantas con flores (aproximadamente 15% de la flora total) tienen atributos medicinales, de las cuales solo 250 se han evaluado farmacológicamente (Sánchez, 2016). El país aporta una gran diversidad y tradición sobre los beneficios y usos de la flora medicinal, entre ellos se encuentran: *Roldana sessilifolia*, *lostephane madrensis*, *Liatris punctata*, *Psacalium sp.* y *Potentilla sp.* pertenecientes al complejo “cachani”, *Ligusticum porteri* y *Myroxylon balsamum* del complejo “chuchupate” y *Psacalium decompositum* *P. peltatum* *P. sinuatum* *P. sp.* y *Acourtia thurberi* que corresponden al complejo “Matarique” (Linares, 1987).

2.2 Terpenos

Los terpenos tienen estructura básica de unidades de isopreno, también llamados isoprenoides. En la naturaleza, pueden existir predominantemente como hidrocarburos, alcoholes o sus glucósidos, éteres, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y ésteres. Se encuentran en madera de coníferas, frutas cítricas, cilantro, lirios, clavel, especies de menta, romero, sabia, tomillo, eucalipto, lavanda, violetas y otras plantas o partes de ellas (raíces, rizomas, tallos, hojas, flores, frutas,

semillas) otorgando propiedades como el aroma agradable, sabor picoso o de actividades farmacológicas específicas.

Muchas plantas producen terpenos volátiles para atraer insectos para la polinización; terpenos menos volátiles, pero más amargos son usados para repeler ciertos animales que las utilicen como alimento, así como jugar un papel importante como compuestos señalizadores y reguladores del crecimiento en las plantas.

La extracción de terpenos es utilizada para la elaboración de perfumes, en la fitofarmacia y para refinar sabor y aroma en alimentos y bebidas.

Se clasifican de acuerdo al número de subunidades de isopreno: hemi- (C_5), mono- (C_{10}), sesqui- (C_{15}), di- (C_{20}), sester- (C_{25}), tri- (C_{30}), tetra- (C_{40}) y politerpenos (C_5)_n con $n > 8$ (Breitmaier, 2006). Los terpenos pueden ciclarse proporcionando una gran diversidad estructural en el ensamblado del esqueleto como resultado de la gran facilidad que tienen estos compuestos de reorganizarse, así como a los grupos funcionales y sus sustituyentes que conforman la estructura (Breitmaier, 2006). El cacalol y el acetato de maturina son dos sesquiterpenos de interés para el presente trabajo y a continuación se proporciona una breve información de ellos.

2.3 Fenoles

Los compuestos fenólicos son otro grupo de productos naturales caracterizados por poseer un grupo hidroxilo, dos (en las posiciones 1,2, 1,3 o 1,4) o tres (en las posiciones 1,3,5 o 1,2,3) grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático. Presentan comportamiento ácido dado que el oxígeno del grupo hidroxilo está fuertemente unido al anillo, mientras que el enlace relativamente débil entre el oxígeno y el hidrógeno permite la disociación de un protón al medio, originando un ion fenolato cargado negativamente.

Actualmente, cerca de 10, 000 compuestos fenólicos diferentes han sido identificados en la naturaleza y la mayoría de ellos son de origen vegetal. Juegan un papel importante en las funciones metabólicas de las plantas, en el crecimiento

y reproducción, y en la protección contra patógenos externos y el estrés, como la radiación UV y los depredadores (Rojano, 2015).

Estos compuestos aportan el color y las características organolépticas de los alimentos y bebidas procedentes de las plantas que se encuentran en frutas, verduras, plantas medicinales, especias, legumbres, cereales, frutos secos, granos, semillas, chocolates, té, café, vino y cerveza. Contribuyen en su color (pigmentos amarillos, naranjas, rojos y azules), sabor (por ejemplo, la astringencia y el amargor de frutas y hortalizas), olor y estabilidad oxidativa.

Además de sus propiedades antioxidantes, estos compuestos presentan un amplio rango de propiedades fisiológicas importantes: antialérgicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, cardioprotectores, vasodilatadores, anticancerígenos, etc.

El término compuesto fenólico, comprende a más de 8,000 compuestos con una gran diversidad estructural. Una forma de clasificar estos compuestos es basándose en su estructura química básica, teniendo en cuenta el número de carbonos y la estructura del grupo fenólico principal. Las principales familias de estos compuestos son fenoles simples y polifenoles (Peñarrieta, J. 2014). Dentro de la clasificación de los fenoles simples se encuentran: benzoquinonas, ácidos fenólicos (benzoicos, fenilacéticos, cinámicos) (UNIIQUIM, 2015) acetofenonas (Chemicalbook, 2017), fenilpropenos (The Merck Index, 2021), cumarinas, isocumarinas, naftoquinonas;

Figura 3.

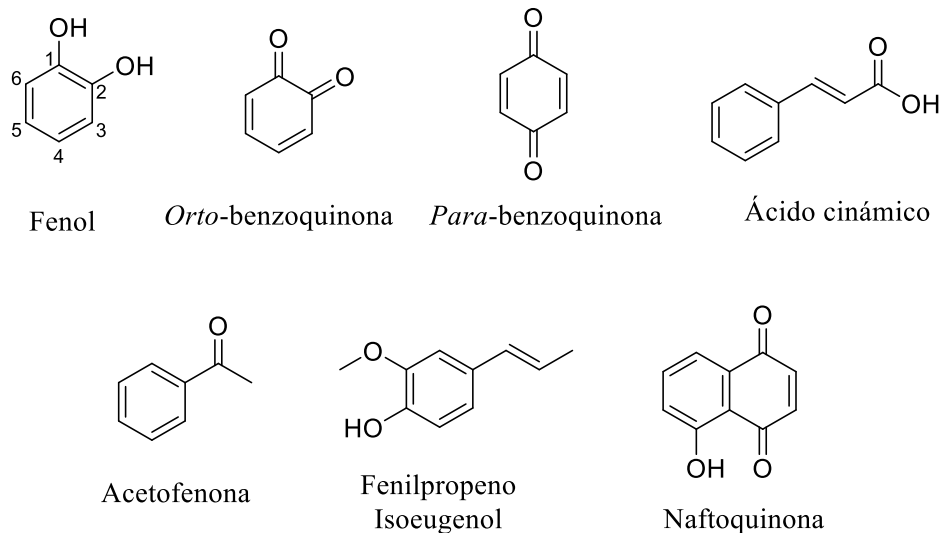


Figura 3. Ejemplos de fenoles simples

2.4 Cumarinas

Pertencen al grupo de benzopironas, consistentes en un anillo bencénico unido a una pirona (anillo heterocíclico de seis miembros que contiene un átomo de oxígeno y cinco carbonos con hibridación sp^2). Son compuestos con estructura de 2*H*-1-benzopiran-2-ona que pueden ser consideradas lactonas del ácido *o*-hidroxicinámico; presentan en su mayoría un grupo hidroxilo en C-7 (por ejemplo: umbeliferona, muy frecuente en la familia umbelíferas), **Figura 4**, muestran frecuentemente, una o varias unidades de isopreno en posiciones *orto* al oxígeno fenólico, a diferencia de los otros miembros de las benzopironas (los flavonoides), que contienen un grupo γ -pirona (Gómez, 2010).

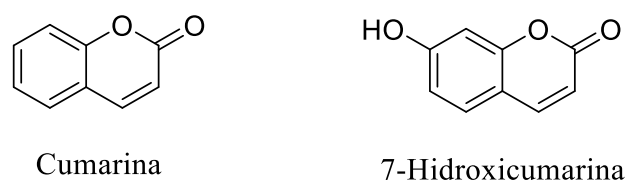


Figura 4. Estructuras químicas de la cumarina y su derivado 7-hidroxicumarina

La cumarina es estructura básica para numerosos compuestos naturales, se encuentran distribuidas ya sea en forma libre o como glucósidos en varias familias de plantas dicotiledóneas como las Apiaceae (*Anni majus*), Asteraceae (*Trilisa odorata*), Rutaceae (*Ruta grareolens*), Fabriaceae (*Melilolus officinalis*), Rosaeceae (*Prunus mabaleb*) y *Umbelliferae*, entre otras. También podemos encontrarlas en plantas monocotiledóneas, especialmente en las gramíneas y las orquídeas. A través de los años las cumarinas se han utilizado como remedios en el tratamiento de varias enfermedades como son dolores gástricos, gota, reumatismo, hemorroides, insomnio, tos, resfríos, hipertensión, epilepsia y calambre, entre otros (Macano, D. & Hasegawa, M. 2002).

La mayoría de las cumarinas naturales están ampliamente distribuidas en frutas y hortalizas. Han sido aisladas de plantas, pero también de microorganismos y animales.

La cumarina y sus derivados han sido utilizados por sus propiedades saborizantes en productos alimentarios y tabaco; como ingrediente en la manufactura de productos como jabones, detergentes, cremas y lociones; en materiales plásticos, en pinturas y sprays para neutralizar olores, así como el tratamiento de ciertas enfermedades.

2.5 Umbeliferona

En los seres humanos el principal metabolito de la cumarina es la 7-HC, que se encuentra en el plasma principalmente como el glucurónido. La 7-HC se llama también umbeliferona por haber sido aislada por primera vez a partir de resinas de umbelíferas.

Es un sólido cristalino blanco-amarillo que posee baja solubilidad en agua, pero alta solubilidad en etanol. Esta cumarina y otros compuestos relacionados presentan actividades biológicas de importancia terapéutica, entre las cuales destaca su capacidad para reducir el tamaño de tumores, por lo que se usa en fármacos anticancerígenos. Se han desarrollado diversos procedimientos de síntesis química debido a sus múltiples aplicaciones, siendo producto de partida para la obtención

de un gran número de productos naturales como la 7-metoxicumarina o la β -D-glucopiranosilumbeliferona (O'Kennedy, 1997).

2.6 Complejo de Matarique

Un complejo consiste en un conjunto de plantas taxonómicamente diferentes a nivel de especie, género y en algunos casos de familia, que comparten el nombre común, usos o aplicaciones en la medicina tradicional, características morfológicas y organolépticas; y composición química o principios bioactivos. El complejo Matarique está compuesto por 5 taxas: *Psacalium decompositum* (Gray) (**Figura 5**) en Chihuahua, *Psacalium peltatum* (H. B. K). (**Figura 6**) en el Valle de México, *Psacalium sinuatum* (Cerv.) en San Luis Potosí, *Psacalium radulifolium* (Kunth) en la Sierra Madre Occidental y *Acourtia thurberi* (Gray) en el norte de la Sierra Madre Occidental, especies pertenecientes a la familia *Asteraceae*.



Figura 5. Raíz *Psacalium decompositum*



Figura 6. Raíz *Psacalium peltatum*

El consumo de estas raíces en forma de té se usa como remedio para el reumatismo, dolores de espalda, cólicos, ictericia, diurético, y diabetes (Linares, E. Bye, R, 1987). Estas especies comparten compuestos químicos como alcaloides pirrolizídicos y los sesquiterpenos cacalol y maturina (Garduño et al., 2001), (Alarcón, 1997), (Wayne, 1999).

2.7 Psacalium decompositum

Es una planta silvestre que posee un rizoma fibroso grueso, los tallos son casi leñosos, densamente pilosos en la base con pelos café (Linares, E. Bye, R, 1987), la inflorescencia posee de 190 a 24 flores, con pedúnculos de hasta 2 cm de largo. Tradicionalmente el té de sus raíces se utiliza como remedio para la diabetes, la malaria, fiebre, tumores, úlceras, dolores del corazón y enfermedades renales. Las raíces machacadas se usan para tratar mordidas de serpientes, así como dolores dentales.

Del extracto hexánico de la raíz de *Psacalium decompositum* se han aislado y caracterizado químicamente compuestos sesquiterpénicos, siendo los principales el cacalol, la cacalona (Romo, 1994), la maturina, la maturinina y la maturinona (Correa, 1997). (**Figura 7**).

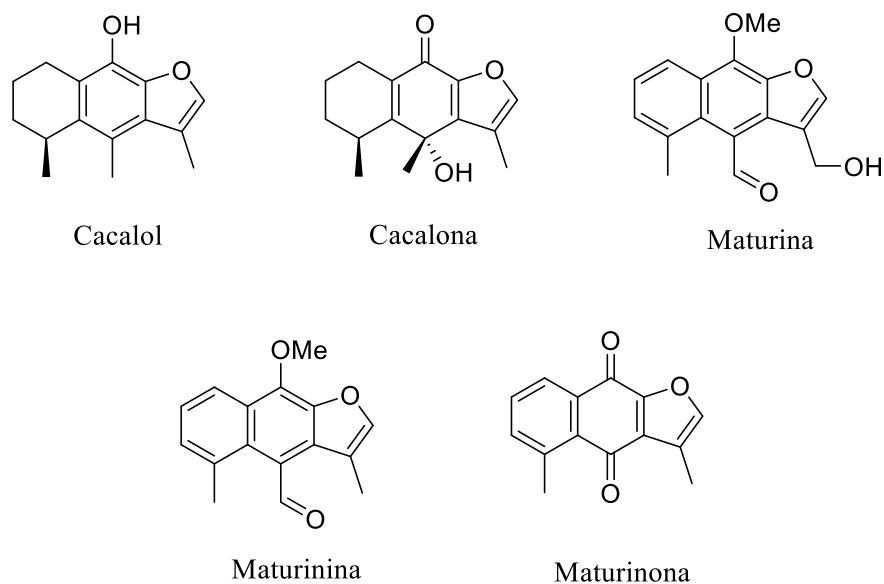


Figura 7. Estructuras de compuestos sesquiterpénicos aislados de *Psacalium decompositum*.

Aunado a lo anterior, se han publicado trabajos evaluando la acción biológica de los extractos de estas raíces; la administración intraperitoneal en ratones del extracto acuoso demostró reducir significativamente la glucosa en sangre (Alarcón, 2000) la decocción con agua liofilizada de la raíz redujo significativamente la glucosa en sangre de ratones sanos y ratones con una diabetes leve, al administrarse intraperitonealmente (Alarcón, 2000). Así como en un estudio del extracto hexánico se demostró que tiene actividad anti-inflamatoria (Jiménez, 2006). Por otra parte, se han investigado otras actividades biológicas de los componentes de las raíces; entre los que se encuentran las fracciones de fructooligosacáridos los cuales se sugiere tienen propiedades anti-inflamatorias e hipolipídicas para tratar de reducir la obesidad (Aguilar, 2014). En el caso de los sesquiterpenos como el cacalol, la cacalona y el acetato de cacalol se ha evaluado el efecto en el bloqueo de canales de potasio sensibles a ATP de manera similar al medicamento glibenclamida (Campos, 2009), así como compuestos heremofilanólidos, 3-hydroxicacalólido

y epi-3-hydroxicacalolido, que en mezcla mostraron poseer actividad anti-hiperglicémica (Wayne, 1999).

2.8 *Psacalium peltatum*

Es una planta herbácea perenne, la raíz es gruesa y fibrosa, los tallos con hojas y brácteas esparcidas, densamente pilosas o hirsutas, con pelos multicelulares. El tallo principal estriado acanalado y meduloso, lanoso en la base cerca de la raíz, hojas basales 3 ó 4 cm en roseta, láminas suborbiculares, peltadas y palmatinervias, profundamente multilobadas (Linares, E. Bye, R, 1987).

De los compuestos tipo sesquiterpenos en *P. peltatum* se han aislado: acetato de maturina, la maturinina, la maturina, la maturinona y el angelato de 3,4-dehidro-14-maturinol (**Figura 8**).

Diversos estudios *in vivo* con el extracto acuoso de *P. peltatum* en roedores son enfocados a su actividad hipoglucemiante debido al compuesto bioactivo denominado “peltatosa” (Contreras, 2002), así como la decocción de esta raíz ha tenido la misma actividad evaluada en conejos (Alarcón, 1998). También se ha visto que la fracción acuosa contiene carbohidratos y alcaloides que presentan actividad antioxidante y anti-inflamatoria (Alarcón, 2010).

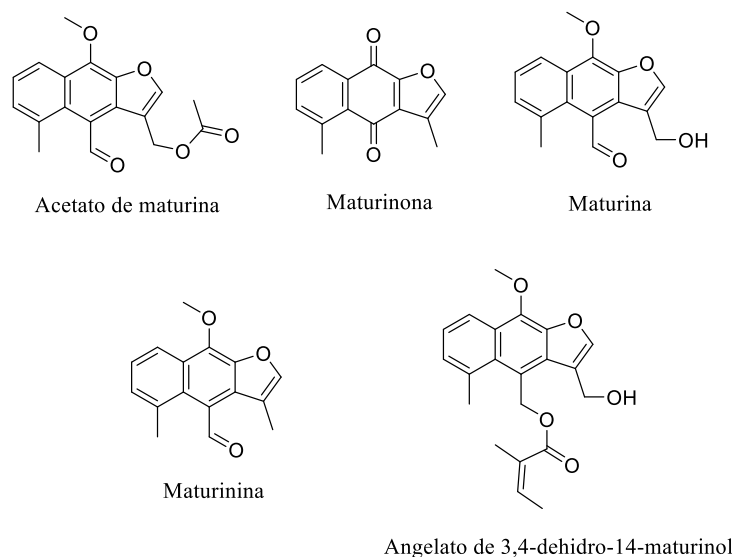


Figura 8. Estructuras químicas de compuestos sesquiterpénicos aislados de *Psacalium peltatum*.

2.9 Cacalol

El cacalol (9-hidroxi-3,4,5-trimetil-5,6,7,8-tetrahidronafto(2,3-b) furanol) (**Figura 7**) es un sesquiterpeno que tiene como núcleo base un benzofurano. Fue aislado por primera vez en 1964 por J. Romo y colaboradores de las raíces de *Cacalia decomposita* A. Gray (hoy conocida como *Psacalium decompositum*). También ha sido aislado de *Senecio spp.* y de *Roldana heterogama* (Bohlmann, 1982), (Bohlmann, 1990). Entre sus propiedades biológicas se ha descrito actividad antimicrobiana, actividad hipoglucemiante, actividad antioxidante y actividad antiinflamatoria (Jiménez, 2006), (González, 2007).

2.10 Acetato de maturina

El acetato de maturina (C₁₈H₁₆O₅) (4-formil-*p*-metoxi-5-metil-nafto[2,3-*b*]furan-3-il-metilacetato) es un terpeno de tipo furanoeremofilano sesquiterpénico. Es uno de los principales componentes de *Psacalium peltatum*. También se ha aislado de otras plantas mexicanas como: *Psacalium radoliforum* en 2003, de *Psacalium beamanii* y *Trichilia cuneata* en 2004 y *Roldana angulifolia* en 2006. Así como de *Senecio digitalifolius*, *Senecio lydenburgensis* y *Senecio affinis* (Pérez, 2004), (Juárez, 2013).

Se le ha encontrado actividad antiinflamatoria en ratones en un modelo de edema en un porcentaje de inhibición del 95.41% (Juárez, 2013).

También se ha encontrado que este compuesto estimula la viabilidad de macrófagos y esplenocitos, induce la actividad enzimática lisosomal, la pinocitosis, actividad de las células asesinas naturales (natural killer cells (NK)) e incrementa la producción de interleucina 2 (IL-2), interleucina 15 (IL-15) e Interferón- γ (Juárez, 2013).

2.11 Modificación estructural

Dentro del reino vegetal se presenta una extensa variedad de compuestos que proporcionan beneficios a la salud, estos se pueden tener directamente al consumir plantas o alimentos o también servir como base en el desarrollo de nuevos fármacos. Mediante modificaciones estructurales a las moléculas, se les puede proporcionar e incluso aumentar cierta actividad biológica que puedan tener y que son de importancia tanto en la industria farmacéutica como en la alimentaria. Un ejemplo de ello son las antocianinas, por ejemplo la chalcona (**Figura 9**), que aparte de ser pigmentos, también presentan actividad biológica, entre ella, actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, anticancerígena y antioxidante, sin embargo, presentan una limitada estabilidad, siendo afectadas por factores externos como pH, temperatura, oxígeno, luz, teniendo un impacto negativo en la calidad del color y propiedades biológicas; lo que ha llevado a la búsqueda de derivados modificados de antocianinas, como lo son las piranoantocianinas, las cuales no solo han sido aisladas del vino, sino que se han establecido protocolos de obtención mediante la reacción de antocianinas con ácido pirúvico, siendo mucho más estables a cambios de pH y degradación (Guzmán, 2010).

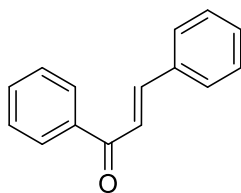


Figura 9. Chalcona.

Los compuestos químicos con estructuras complejas y múltiples sustituyentes requieren del uso de reacciones altamente selectivas para su modificación química. Los compuestos aromáticos son estables y resistentes a un cambio químico. Las reacciones de sustitución preservan la estructura del anillo bencénico y el patrón de enlaces π permanece intacto. La sustitución electrofílica aromática es la reacción más común de los compuestos aromáticos debido a los enlaces π ricos en electrones, lo cual lo representan las antocianinas por la alta cantidad de -OH

(electrodonadores al anillo) durante la reacción, un electrófilo reacciona con el anillo aromático y sustituye uno de los hidrógenos (Bailey, 2001).

Las principales reacciones son halogenación (Cl_2 , Br_2), nitración, sulfonación, alquilación de Friedel-Crafts y acilación de Friedel-Crafts. En estas reacciones generalmente se necesita un catalizador para formar la especie reactiva (electrófilo), por ejemplo: FeCl_3 , FeBr_3 , H_2SO_4 , AlCl_3 entre otros.

Un sustituyente donador de densidad electrónica activa principalmente las posiciones *orto*- y *para*- y un sustituyente atractor de densidad electrónica (como un grupo nitro) desactiva principalmente estas posiciones (Wade, 2011). Cuando en el benceno se encuentra mono sustituido va a afectar la unión de un segundo sustituyente. Entre los grupos sustituyentes activantes y desactivantes para una reacción de $\text{S}_{\text{E}}\text{A}$ se encuentran:

Orientadores *orto*- y *para*-: $-\text{Ph}$, $-\text{CH}_3$, $-\text{NHCOCH}_3$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$

Desactivantes orientadores *orto-para*: $-\text{I}$, $-\text{Br}$, $-\text{Cl}$, $-\text{F}$

Desactivantes orientadores *meta*-: $-\text{NH}_3$, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COCH}_3$, $-\text{COOH}$, $-\text{COOCH}_3$, $-\text{COH}$.

Dentro de los compuestos aromáticos se encuentran sistemas como los benzofuranos, los cuales tienen un grado de aromaticidad menor que el grupo indol ($\text{C1}(\text{NC}=\text{C2})=\text{C2C}=\text{CC}=\text{C1}$), por lo que sufren reacciones de reducción y oxidación con mayor facilidad. En compuestos con estructura del tipo benzofurano, se llevan a cabo las reacciones de $\text{S}_{\text{E}}\text{A}$, principalmente en el C2, siendo ligeramente más reactivo el anillo heterocíclico (**Figura 10, A**) que el anillo bencénico (**Figura 10, B**), sin embargo, si se presenta un grupo electroatractor o desactivante en el anillo heterocíclico o un sustituyente junto o activante fuerte en el anillo bencénico la $\text{S}_{\text{E}}\text{A}$ se lleva a cabo en el benceno (Sansbury, 2001).

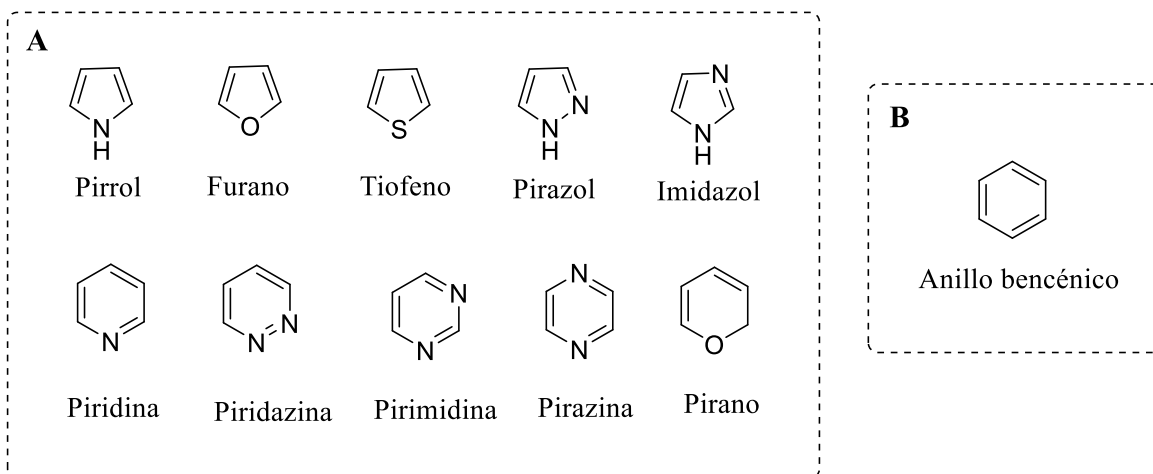


Figura 10. Estructuras de **A)** heterociclos y **B)** anillo bencénico

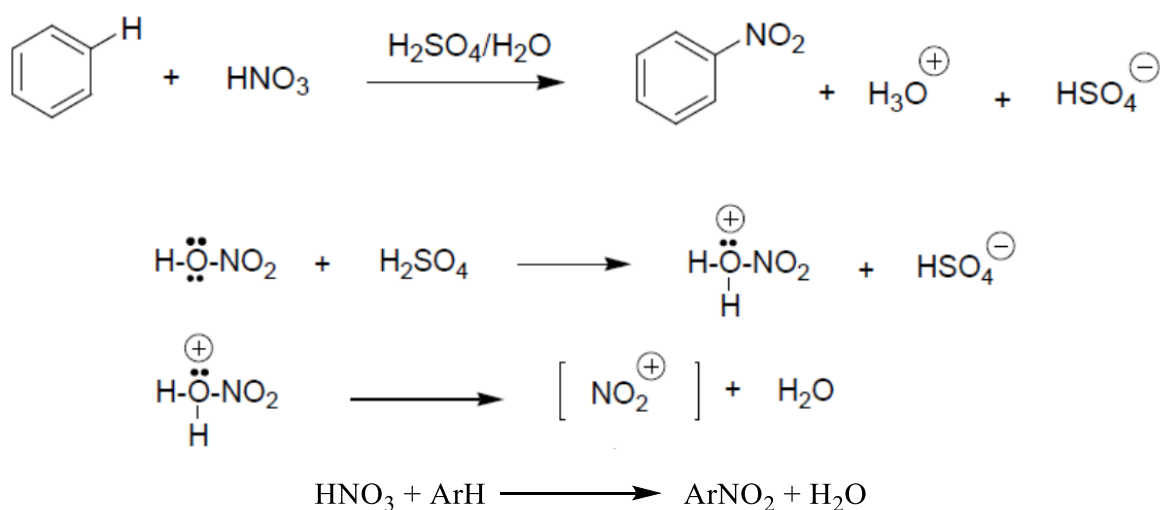
El grupo nitro ($-\text{NO}_2$) en un anillo aromático atrae electrones, es desactivador y orientador *meta*-, afecta fuertemente las posiciones *orto*- y *para*- desactivándolas, modificando la reactividad y polaridad de los compuestos. Este grupo participa en las reacciones de nitración sustituyendo a un átomo de hidrógeno y formando nitro derivados o nitro compuestos. En ellos, el nitrógeno les confiere un alto estado de oxidación por lo que muchos de sus derivados son explosivos como el trinitrotolueno. El grupo nitro proporciona una elevada polaridad a la molécula a la que se une, lo que les proporciona puntos de fusión y ebullición elevados y, si la cadena unida al grupo nitro no es muy voluminosa, son solubles en agua (Wade, 2011).

2.12 Nitración

Se trata de la reacción entre un compuesto orgánico y un agente nitrante. Se han usado numerosos métodos para efectuar el proceso de nitración, pero los más usuales son efectuados con ácido nítrico solo o mezclado con ácido acético, anhídrido acético o ácido sulfúrico, nitratos de acilo (acetilo y benzoilo) en solventes orgánicos o sales de nitronio en disolventes orgánicos, constituyen metodologías satisfactorias para preparar derivados mono-, di- y trinitrados de compuestos aromáticos, la metodología a elegir dependerá de la reactividad del anillo aromático.

Estos compuestos se utilizan principalmente como explosivos y a su vez sirven como sustratos para la preparación de materiales útiles como tintes, productos farmacéuticos, perfumes y plásticos (Ono, 2001).

Las condiciones de la reacción de nitración varían de acuerdo con la reactividad del compuesto aromático. Casi todas las nitraciones involucran un ataque electrofílico por el ion NO_2^+ . Por consiguiente, las reacciones pueden regularse controlando la concentración del ion nitronio en solución (Hendrickson, 1970). En el **Esquema 1** se muestra el clásico método de nitración aromática usando ácido nítrico y un catalizador ácido, por ejemplo, ácido sulfúrico, para la formación del ion nitronio bajo condiciones ácidas.



Esquema 1. Nitración con ácido nítrico y formación del ion nitronio.

El ácido nítrico diluido es usado como agente nitrante en compuestos como fenoles, pero las propiedades de oxidación de ácido nítrico concentrado pueden ser una desventaja. Soluciones de ácido nítrico o nitratos en ácido sulfúrico en diferentes concentraciones proporciona una amplia gama de reactivos para la nitración, adicionalmente, tienen la ventaja de que algunos compuestos orgánicos son solubles en ellos, pero pueden ser capaces de sulfonar algunos compuestos

aromáticos. Medios de reacción de mezcla del ácido nítrico con solventes orgánicos también proporcionan reactivos en los donde compuestos aromáticos son solubles. En estos casos, el ácido acético es probablemente el disolvente usado con mayor frecuencia. Estas soluciones son menos ácidas que soluciones con ácidos, lo que ayuda en compuestos que son sensibles a pH's fuertemente ácidos al ser nitrados (Schofield, 1980).

Entre los métodos encontrados, una de las alternativas que se propone es el uso de sólidos inorgánicos ácidos como catalizadores debido a que son fáciles de eliminar de la reacción, se pueden reutilizar e influye en la selectividad, estos en mezcla con agentes nitrantes inorgánicos como nitrato de bismuto ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$), nitrato de amonio cérico ($(\text{NH}_4)_2[\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]$), nitrato de sodio (NaNO_3) y nitrato de potasio (KNO_3) han resultado efectivos en la nitración de compuesto aromáticos (Badgujar, 2007).

El uso de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ y tetrahidrofurano (THF) con sólidos ácidos (como zeolitas), es un método que ha sido investigado y probado en la nitración aromática de anisol, naftaleno, fluoreno, criseno y dibenzofurano con excelente rendimiento, además se encontró que el ataque electrofílico por este medio es idéntico a la nitración cuando se utiliza ácido nítrico y al nitrato de acetilo formado cuando un agente nitrante se mezcla con anhídrido acético (Samajdar, 2001). Así mismo, este método ha demostrado ser eficiente en la introducción de un grupo nitro en moléculas de la cumarina, utilizando $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en THF con montmorillonita KSF a una temperatura arriba de los 50°C durante más de una hora.

2.13 Inhibidores de las enzimas α -glucosidasa y acetilcolinesterasa

Empíricamente se han utilizado las plantas medicinales para el tratamiento de la diabetes mellitus (DM) debido a los compuestos bioactivos que contienen.

Las α -glucosidasas son enzimas que actúan en el desdoblamiento de sacarosa, maltosa y otros oligosacáridos en monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa). La

inhibición de estas enzimas puede significar el decremento de hiperglicemia posprandrial y podría ser una estrategia clave para el control de la diabetes mellitus. Por ejemplo, se han aislado alrededor de 100 iminociclitoles con actividad inhibitoria de glicosidasas de plantas y microorganismos que contienen en su estructura ácidos carboxílicos y amidas, logrando a partir de ellos análogos sintéticos con diferentes variaciones, como la 1-desoxinojirimicina (DNJ), aislada de las raíces de *Morus alba* (planta que se consumía en la medicina tradicional de China), de la cual se sintetizó el Miglitol, primer fármaco del tipo iminociclitol comercializado para el tratamiento de DM no insulino dependiente (Gómez, 2013).

Los inhibidores de AChE son los primeros y el grupo más desarrollado de medicamentos aprobado para el tratamiento sintomático de la enfermedad de Alzheimer. El grupo más destacado de compuestos de origen natural que inhiben la AChE. son los alcaloides de las *Amaryllidaceae*, tales como galantamina y sanguinina, así como los alcaloides del *Lycopodium*, huperzina A y B (Valencia, 2015).

El diseño de nuevas estructuras sobre estructuras moldeadas por la naturaleza, provee una fuente importante de diversidad estructural muy difícil de alcanzar por medio de la síntesis orgánica total. En compuestos triterpénicos aislados de la especie *Chuquiraga erinacea*, perteneciente a la familia *Asteraceae*. Se ha realizado modificación química en sus estructuras mediante la incorporación de nitrógeno en sus moléculas con el fin de estudiar el efecto en la actividad inhibitoria de AChE (Castro, 2012).

Dentro de las enfermedades que causan a nivel mundial el mayor número de muertes se encuentra el cáncer; por lo que se ha vuelto motivo de numerosas investigaciones científicas, en todos los campos, entre ellos el estudio de extractos y derivados de plantas sobre el crecimiento de células tumorales, para de acuerdo, a los resultados experimentales el posterior desarrollo de medicamentos que se utilicen para el tratamiento de esta enfermedad.

Se han descrito casos exitosos donde se utilizan clínicamente derivados de plantas para diferentes tipos de cáncer. El Paclitaxel (Taxol) y Docetaxel (Taxotere) son diterpenos aislados de una planta del género *Taxus*. El Etopósido y Tenipósido son derivados semisintéticos provenientes de un lignano conocido como podofilotoxina 1, extraído de la planta *Podophyllum peltatum*. En la **Figura 11** se muestran los alcaloides vinblastina (Alkaban-AQ, Velban) y vincristina (Oncovir, Vincasar), se aislaron de *Catharanthus roseus* (Vinca de rosada) planta utilizada en el tratamiento de diabetes. Posteriormente, se le realizaron modificaciones químicas logrando obtener compuestos semisintéticos como la Vinorelbina (Navelbine) y Vindesina (Eldisine), **Figura 11**; estos compuestos se utilizan para el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico y para las metástasis de cáncer de mama y para tratar leucemia, linfoma, melanoma, cáncer de mama y de pulmón, respectivamente (Rivas, 2016).

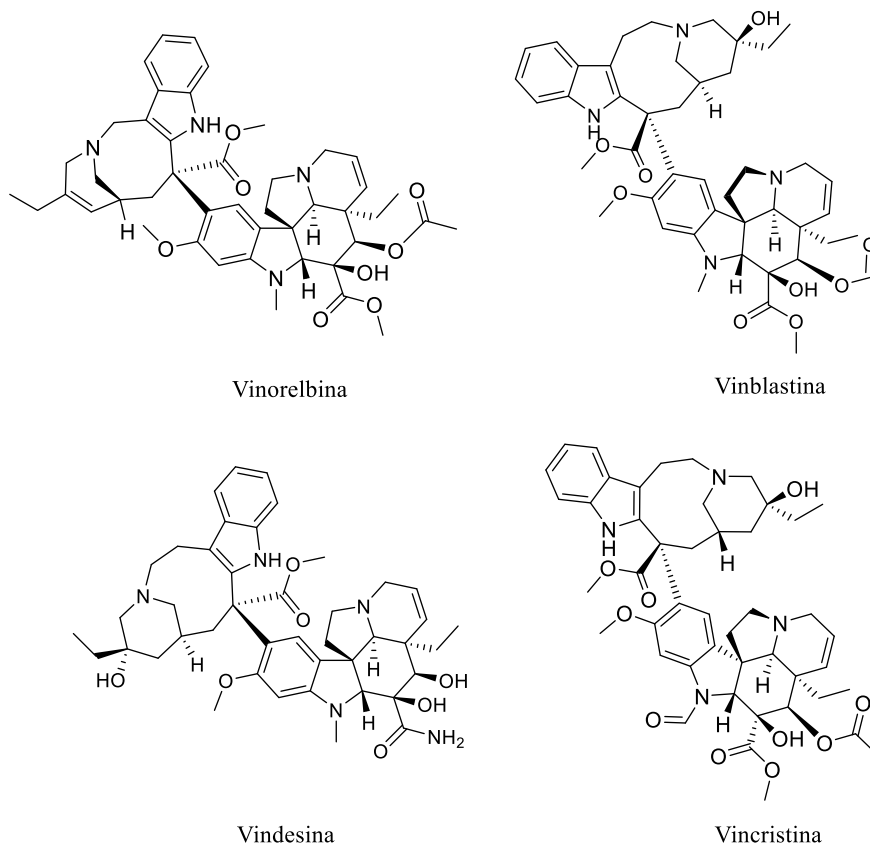


Figura 11. Alcaloides y sus derivados con actividad anticancerígena

Los compuestos mencionados sirven para ejemplificar la importancia en la búsqueda de nuevas moléculas de las fuentes naturales, que sirvan para el tratamiento de esta enfermedad y como base para aplicación en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

3. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas, el incremento en la búsqueda de un mejor estilo de vida ha llevado a la población a buscar cambios en sus hábitos alimenticios, entre los que se destaca la reducción del contenido calórico y dietas complementarias que ayuden al consumidor a prevenir enfermedades, como diabetes tipo II, obesidad, osteoporosis, enfermedades cardiovasculares, Alzheimer y Parkinson, entre otros. Por otro lado, la búsqueda de medicamentos con menores efectos secundarios sobre la salud lleva a considerar a los productos naturales como moléculas base para el desarrollo de agentes terapéuticos con una mejor actividad biológica y menos efectos secundarios.

Los productos vegetales son una gran fuente natural de moléculas bioactivas de amplias propiedades tales como: antioxidantes, antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias, sedantes, entre otras, proporcionando un variado número de ingredientes funcionales que pueden ser aprovechados para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales, nutracéuticos o suplementos alimenticios.

Los terpenos y compuestos fenólicos son el grupo de productos naturales más abundante en plantas y alimentos, y por ello los más estudiados en cuanto a beneficios a la salud y modificaciones estructurales para el mejoramiento de su actividad biológica. Por ello, con la información recabada, se plantea la introducción de un grupo nitro, mediante la búsqueda de diferentes métodos, tanto en la umbeliferona (compuesto fenólico perteneciente a la familia de la cumarina), así

como a compuestos sesquiterpénicos aislados de raíces de *P. decompsitum* y *P. peltatum*, los cuales se sabe que por sí solos poseen actividad biológica, por lo que se busca mejorarla y con esto plantear la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos. Esto, basado en los resultados obtenidos en la evaluación de su actividad antiproliferativa, anti-inflamatoria e inhibitoria de las enzimas α -glucosidasa y acetilcolinesterasa.

Además, los productos naturales son moléculas con estructuras químicas, que contienen diferentes grupos funcionales, los cuales las hacen inestables. Por lo que la búsqueda de condiciones de reacción adecuadas, como en este caso la reacción de nitración se requieren usar en el laboratorio reactivos específicos y probar condiciones más suaves, hasta encontrar las quedan mejores resultados, lo cual requiere más experimentación y cantidades mayores de la materia prima (productos naturales) que hay que obtener de su fuente natural.

4. HIPÓTESIS

Estudios previos han demostrado la actividad biológica del acetato de cacalol, del acetato de maturina y de la umbeliferona. Se espera que la obtención de derivados nitrados de estos compuestos modifique su actividad biológica.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Aislar, caracterizar y obtener derivados nitrados de compuestos sesquiterpénicos de las raíces *Psacalium decompositum* y *Psacalium peltatum*.

5.2 Objetivos Particulares

- Obtener extractos de las raíces de *Psacalium decompositum* y *Psacalium peltatum*.
- Acetilar el extracto de *Psacalium decompositum*, usando anhídrido acético y piridina.
- Separar y purificar mediante cromatografía en columna abierta el acetato de cacalol y acetato de maturina de los extractos de las raíces.
- Establecer un método para nitrar el compuesto comercial umbeliferona usada como control.
- Nitrar los compuestos sesquiterpénicos con el método utilizado en el compuesto control.
- Purificar, aislar y caracterizar los compuestos nitrados a través de métodos espectroscópicos (RMN, IR), EM y RX.
- Evaluar la actividad inhibitoria, antiproliferativa y de toxicidad de los extractos directos de los compuestos acetato de cacalol, acetato de maturina, umbeliferona y los nitro derivados obtenidos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reactivos y materiales

Los disolventes utilizados fueron obtenidos en el área de disolventes del Instituto de Química: hexano (C_6H_{14}), acetato de etilo ($CH_3CO_2C_2H_5$), diclorometano (CH_2Cl_2), metanol (CH_3OH), acetona, los cuales se destilaron antes de su uso.

Reacción de acetilación: piridina (C_5H_5N), anhídrido acético [$(CH_3CO)_2O$], hidróxido de potasio (KOH), bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) y ácido clorhídrico (HCl) 10%.

Reacciones de nitración: ácido nítrico (HNO_3), tetrahidrofurano (C_4H_8O) (THF), gel de sílice, nitrato de bismuto ($Bi(NO_3)_3$), ácido acético glacial (CH_3COOH), nitrato de amonio cérico (IV) ($NH_4 2Ce (NO_3)_6$) (CAN), anhídrido acético ($C_4H_6O_3$).

La umbeliferona fue adquirida comercialmente en Sigma Aldrich®.

6.2 Equipos

La separación cromatográfica de los extractos se realizó por columna por adsorción con gel

de sílice de tamaño de malla 70-230, mientras que para la separación de los derivados de los compuestos se utilizó gel de sílice de tamaño de malla 230-400.

Los disolventes fueron evaporados en rotaevaporador Büchi R-210.

Las reacciones de nitración y la purificación de los productos naturales y productos de reacción fueron monitoreados mediante cromatografía en capa fina. Se utilizaron placas de aluminio recubiertas de gel de sílice, tamaño de malla 60 con indicador fluorescente UV₂₅₄ de 0.20 mm de espesor (ALUGRAM Xtra SIL G/UV₂₅₄ MACHEREY-NAGEL®). Con las cuales se realizó el seguimiento de las fracciones de la columna visualizadas en cámara de luz UV con longitud de onda de 254 nm y 356 nm. El revelado se realizó por aspersion con una solución de sulfato cérico amónico.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns empleando cubreobjetos redondo, los resultados se reportaron sin corregir, en °C.

Los experimentos de RMN fueron realizados en equipos, Bruker® 500 Ascend y Bruker Avance® 300 MHz; los desplazamientos químicos se reportan en ppm referenciados con cloroformo (CDCl₃) en el caso de los sesquiterpenos y dimetilsulfóxido (DMSO) para los compuestos de la cumarina. Los espectros de IR se realizaron en un equipo FT-IR Bruker Tensor 750®. Los espectros de masas fueron realizados en los espectrómetros de masas The MStation JMS-700 y Jeol®, The AccuTOF JMS-T100LC®.

La estructura cristalina fue determinada en un difractómetro Bruker D8 Advance®.

7. METODOLOGÍA

Psacalium decompositum

7.1 Obtención del extracto de la raíz de *Psacalium decompositum*

Las raíces de Matarique *Psacalium decompositum*, se adquirieron en el Pasaje Comercial de Plantas Medicinales en el Centro Histórico de la CDMX.

Se realizaron dos extracciones sucesivas con AcOEt. Se pesaron 980 g de raíz seca cortada de *P. decompositum* y se colocaron en un matraz Erlenmeyer con 2.5 L de AcOEt, a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, se filtró el material vegetal y se eliminó el disolvente por destilación a presión reducida en un rotaevaporador para obtener el extracto. El monitoreo de la extracción se hizo por CCF.

7.2 Reacción de acetilación del extracto de AcOEt

En un matraz Erlenmeyer se colocaron 10 g de extracto de acetato de etilo de *P. decompositum*, se añadieron 17.24 ml de piridina anhidra y 11.37 ml de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó por 24 horas a temperatura ambiente. La formación del acetato de cacalol se monitoreo mediante CCF.

Una vez formado el acetato de cacalol, se agregaron 50 ml de agua destilada y 10 ml de HCl al 10%, posteriormente se realizó una extracción con acetato de etilo (3 x50 ml). Se recuperó la fase orgánica y se le agregó sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) para eliminar la humedad, se filtró y se concentró. Se obtuvo un extracto semisólido de color café rojizo.

7.3 Cromatografía en columna abierta del extracto de acetato de etilo después de la reacción de acetilación

Obtención del acetato de cacalol.

Se pesaron 9 g del extracto de acetato de etilo después de la reacción de acetilación y se disolvió con CHCl_2 , se agregaron a 6 gramos de gel de sílice. Se eliminó el disolvente y se mezcló hasta que quedó un polvo café-naranja.

La columna de vidrio se empacó utilizando 270 g de gel de sílice tamaño 70-230 como fase estacionaria y con hexano de fase móvil. Una vez empacada la columna se agregó el extracto acetilado (polvo café naranja) a la columna formando una franja uniforme.

Se colectaron fracciones de 20 ml utilizando hexano como fase móvil, posteriormente a partir de la fracción 61 se utilizó una mezcla hexano: AcOEt (99:1) como sistema de elución. Las fracciones se fueron monitoreando mediante CCF utilizando placas de aluminio recubiertas de gel de sílice, reuniendo las fracciones similares entre sí.

El acetato de cacalol se identificó y caracterizó por métodos espectroscópicos de RMN, IR y EM. Las fracciones que tuvieron un R_f correspondiente al acetato de cacalol se reunieron y se logró cristalizar.

- Acetato de cacalol

RMN ^1H (300 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ (ppm) 7.27 (s, 1H, H-2), 3.33 – 3.22 (m, 1H, H-5), 2.86 (m, 1H, H-8), 2.59 (s, 3H, H-14), 2.42 (s, 3H, H-11), 2.40 (s, 3H, H-10), 1.76 (m, 3H, H-6, H-7), 1.21 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-12). IR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 2935 (ν -OH) 1760 (ν -COOH), 1063.7 (ν C-O), 1452, EM-IE $^+$ m/z 272.

7.4 Nitración del acetato de cacalol

Se realizaron diferentes metodologías para lograr la unión de un grupo nitro en la base benzofurano del acetato de cacalol.

Método 1. Formación de una mezcla de gases NOx.

Se colocaron 80 mg del acetato de cacalol disuelto en 10 ml de THF en el matraz de fondo redondo. En otro matraz se colocó 1 ml de ácido nítrico (67%) y se adicionaron lentamente con agitación 0.6 ml de THF para generar los óxidos de nitrógeno. Debido a que es una reacción exotérmica, los gases de nitración generados fueron conducidos al matraz de fondo redondo hasta saturar la solución. La transformación se llevó en 20 minutos. A la solución de tetrahidrofurano, después de realizada la nitración, se le adicionaron 10 ml de una solución saturada de NaHCO₃. Se realizaron dos extracciones con diclorometano, posteriormente se lavó con agua hasta pH neutro, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró en baño. De esta reacción se obtuvo un líquido viscoso amarillo. El producto obtenido (1 mg) se separó por cromatografía en placa preparativa utilizando 150 ml del sistema de elución Hex:AcOEt (8:2).

Método 2. Reacción de nitración con Bi(NO₃)₃, THF y montmorilonita

A 50 mg de acetato de cacalol (2) se agregaron 177 mg de nitrato de bismuto, 5 ml de THF y 100 mg de arcilla a diferentes temperaturas, la reacción fue monitoreada con cromatografía en capa fina cada 10 minutos. La reacción se detuvo cuando la presencia del acetato de cacalol disminuyó (50°C / 90 min). La mezcla de reacción fue filtrada y el THF fue eliminado en el rotaevaporador obteniendo un líquido viscoso color café-anaranjado. El crudo de reacción fue separado mediante cromatografía en placa preparativa, con 60 ml de un sistema de elución Hex:AcOEt (8:2, v/v), las fracciones se extrajeron con diclorometano.

Método 3. Reacción de nitración con Bi(NO₃)₃, THF y Sílice

Se disolvieron 50 mg de acetato de cacalol (2) en 5 ml de THF con 183 mg de Bi(NO₃)₃ y 100 mg de sílice. La temperatura de la mezcla de reacción se fue

incrementando gradualmente y se detuvo a los 60 min a una temperatura de 50°C, aun sin consumirse toda la materia prima.

Una vez detenida la reacción, se filtró y el sólido obtenido se extrajo con diclorometano, obteniendo un líquido aceitoso amarillo. A este líquido se agregó una mezcla de hexano: diclorometano (1:1, v/v) con lo cual precipitó un sólido anaranjado.

Método 4. Reacción de nitración con $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ y ácido acético

Se colocaron 50 mg de acetato de cacalol y 44 mg de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ en 4 ml de ácido acético en un matraz de fondo redondo. La reacción se mantuvo a 30°C durante 45 minutos. Habiendo detenido la reacción, se filtró y se extrajo con diclorometano (cbp) obteniendo un sólido de color amarillo.

Método 5. Reacción de nitración con CAN y anhídrido acético

Se colocaron 200 mg de acetato de cacalol (**2**), 148 mg de CAN y 8 ml de anhídrido acético en un matraz bola de 50 ml. La reacción se llevó a cabo en un baño de hielo con agitación constante durante 6 horas a temperatura ambiente, posteriormente se detuvo la agitación y se dejó la reacción en reposo por 3 días en ausencia de luz. Después de este tiempo, se eliminó el anhídrido acético con ayuda de una bomba de vacío dejando una mezcla viscosa color amarillo. El crudo de reacción se purificó con cromatografía en columna abierta, empezando con 100% de hexano, siguiendo con 1% de AcOEt. Las fracciones se fueron monitoreando mediante cromatografía en capa fina (CCF) utilizando placas de aluminio recubiertas de gel de sílice y usando un sistema de elución 99:1 (Hex:AcOEt); reuniendo las fracciones similares entre sí. El derivado nitrado se identificó y caracterizó por métodos espectroscópicos de RMN, IR, EM y rayos X.

- Acetato 2-nitro cacalol

RMN- ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ (ppm) 3.30 (m, 1H, H-5), 2.90 (s, 3H, H-8), 2.65 (s, 3H, H-14), 2.40 (s, 3H, H-10), 1.80 (m, 4H, H-6, H-7), 1.20 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-12).

IR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 2940 (ν -OH) 1766.70 (ν -COOH), 1630 (ν C=O), 1515.11 y 1359 (ν N-O). EM-IE⁺ m/z 317.

Psacalium peltatum

7.5 Obtención del extracto de la raíz de *Psacalium peltatum*

El proceso de extracción se realizó mediante maceración de las raíces en hexano. Se pesaron 500 g de raíz seca troceada de *P. peltatum*. Se colocó en un matraz de bola con 2.5 L de hexano a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, se filtró para separar el material vegetal y se eliminó el disolvente del extracto por destilación a presión reducida en un rotaevaporador, obteniendo 4 g de extracto. El proceso de extracción se repitió 2 veces en las condiciones descritas. El monitoreo de la extracción se hizo por CCF usando un sistema de elución 8:2 Hex:AcOEt.

7.6 Cromatografía en columna abierta del extracto hexánico.

Para la obtención del acetato de maturina (7) se usaron 3.8 g del extracto hexánico con CH_2Cl_2 para mezclarlo con 6 g de gel de sílice. Se eliminó el disolvente y se mezcló hasta obtener un polvo café-naranja.

La columna se empacó utilizando 114 g de gel de sílice tamaño de malla 70-230 como fase estacionaria y mezclada previamente con hexano. Una vez empacada la columna se agregó el extracto en polvo a la columna formando una capa uniforme.

Se colectaron fracciones de 225 ml utilizando únicamente hexano como fase móvil, posteriormente a partir de la fracción 60 se utilizó Hex:AcOEt (99:1) como sistema de elución. Las fracciones se fueron monitoreando mediante CCF utilizando placas de aluminio recubiertas de gel de sílice. El sistema de elución se fue aumentando en 1% hasta llegar al 10% de AcOEt reuniendo las fracciones similares entre sí, hasta la presencia del acetato de maturina (7).

7.7 Nitración de acetato de maturina

Se colocaron 50 mg de acetato de maturina, 29 mg de CAN y 7 ml de anhídrido acético en un matraz bola de 50 ml. La mezcla se agitó por 2.5 h a temperatura

ambiente y fue monitoreada en CCF usando un sistema de elución 8:2 Hex:AcOEt. Una vez detenida la reacción, se añadieron 10 ml de agua y se extrajo con AcOEt (2 x 10 ml). La fase orgánica se concentró en un rotaevaporador y se purificó mediante cromatografía en columna abierta, la cual se inició con un sistema de elución de 100% hexano, continuando con 1% de AcOEt y 99% hexano.

Umbeliferona

7.8 Obtención de derivados nitrados de umbeliferona

Se disolvió $\text{Bi}(\text{NO}_2)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 mmol) y 500 mg de montmorillonita KFS (MNT-KFS) en 10 ml de THF a temperatura ambiente, posteriormente se añadió umbeliferona (10 mmol) y se mantuvo en agitación a 70 °C durante 5 horas. La reacción se monitoreó con CCF usando un sistema de elución 1:1 CH_2Cl_2 :AcOEt. El THF fue eliminado con un rotaevaporador y la mezcla de reacción fue purificada por cromatografía flash usando gel de sílice malla 200-400 iniciando con CH_2Cl_2 (100%) hasta llegar a CH_2Cl_2 :AcOEt 92:8. Los compuestos 8-nitro-, 6-nitro - y 3-nitroumbeliferona fueron identificados y caracterizados por RMN, IR y EM.

- 8-nitroumbeliferona

Sólido amarillo claro, RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.05 (1H, d, $J_p = 9.7$ Hz, H-4), 7.74 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 7.03 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6), 6.37 (1H, d, $J_m = 9.6$ Hz, H-3). EM-IE $^+$ m/z 207 [M] $^+$

- 6-nitroumbeliferona

Sólido amarillo fuerte, RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.42 (1H, s, H-5), 8.04 (1H, d, $J_m = 9.6$ Hz, H-4), 6.98 (1H, s, H-8), 6.41 (1H, d, $J_p = 9.6$ Hz, H-3). EM-IE $^+$ m/z 207 [M] $^+$

- 3-nitroumbeliferona

Sólido amarillo fuerte, RMN ^1H (500 MHz, MeOH- d_4) δ 8.99 (1H, s, H-4), 7.73 (1H, d, $J_{o-} = 8.7$ Hz, H-5), 6.92 (1H, dd, $J_{p-} = 8.7, 2.3$ Hz, H-6), 6.78 (1H, d, $J_{m-} = 2.2$ Hz, H-8). EM-IE $^+$ m/z 207 [M] $^+$

7.9 Pruebas biológicas

Las pruebas biológicas se realizaron en el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química de la UNAM. Las pruebas se realizaron al acetato de cacalol y su extracto de AcOEt, acetato de maturina y su extracto hexánico, umbeliferona, acetato de 2-nitrocacalol, 8-nitro umbeliferona, 6-nitro umbeliferona y 3-nitro umbeliferona.

- Actividad antidiabética

La prueba se realizó sobre la inhibición de la enzima α -glucosidasa de levadura en el extracto de AcOEt de *P. psacalium*, acetato de cacalol y acetato de 2-nitrocacalol; el extracto hexánico de *P. peltatum*, acetato de maturina; umbeliferona, 8-nitro-, 6-nitro- y 3-nitro umbeliferona. A concentraciones de 1, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ utilizando quercetina como control positivo.

- Actividad acetilcolinesterasa

En esta prueba se evaluó la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en los compuestos acetato de cacalol, acetato de maturina, acetato de 2-nitrocacalol, umbeliferona, 8-nitro umbeliferona, 6-nitro umbeliferona y 3-nitro umbeliferona, a concentraciones de 1, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$, utilizando galantamina como control positivo a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, mediante el método de Ellman.

- Actividad citotóxica

Los ensayos de citotoxicidad se evaluaron en las siguientes líneas celulares humanas: (U251) glía de sistema nervioso central, (PC-3) próstata, (K562)

leucemia, (HCT-15) colon, (MCF-7) mama, (SKLU) pulmón y (COS-7) línea celular de riñón de mono (no cancerosa). Se evaluaron el acetato de cacalol, acetato de maturina, umbeliferona, 8-nitro-, 6-nitro- y 3-nitroumbeliferona a una concentración de 25 μ M (25 μ g/ml) utilizando como vehículo DMSO.

- Actividad antiinflamatoria

La prueba de actividad antiinflamatoria se realizó mediante edema en oreja de ratón inducido por 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA), evaluando 1 μ l/oreja de acetato de maturina.

- Ensayo de toxicidad aguda

El ensayo de toxicidad aguda se realizó en larvas de *Artemia spp*, donde se determina la concentración que causa el 50% de muerte de una población de larvas a las 24 horas. Se realizó en acetato de cacalol, acetato de 2-nitrocacalol, extracto de acetato de etilo de *P. psacalium*, acetato de maturina, extracto hexánico de *P. peltatum*, umbelliferona, 8-nitro-, 6-nitro- y 3-nitroumbeliferona, a una concentración de 1, 10 y 100 μ g/ml.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Psacalium decompositum

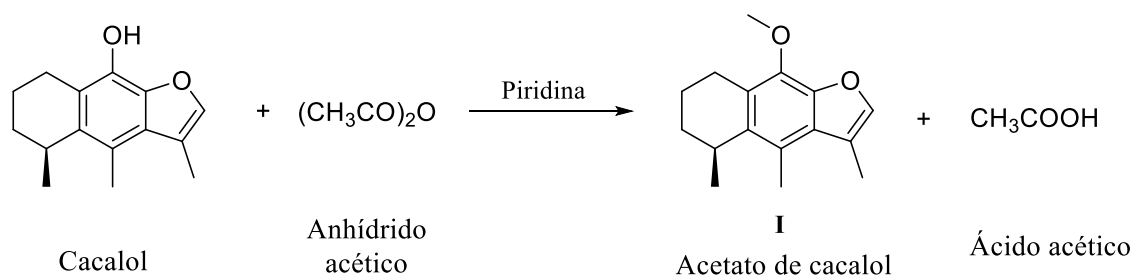
8.1 Obtención del extracto de la raíz de Matarique

De las extracciones realizadas a las raíces con hexano y acetato de etilo, se obtuvieron 5.8 g de extracto hexánico, lo que corresponde al 0.6% de rendimiento en peso seco, mientras que del extracto de acetato de etilo se obtuvieron 80.2 g, correspondientes al 8.18% de rendimiento en peso seco.

En trabajos anteriores se reporta el aislamiento del cacalol y del acetato de cacalol del extracto hexánico (Jiménez, 2006), (Romo, 1968), (Alarcón, 1987), (González, 2007), (Merino, 2009), (Reyes, 2012), (Merino, 2015). No se había trabajado con el extracto de acetato de etilo ni examinado si se podría aislar este compuesto; por lo que se decidió separar el acetato de cacalol de ambos extractos para comparar el rendimiento y determinar dónde se puede obtener más puro.

8.2 Obtención del acetato de cacalol

Dentro de la estructura del cacalol se encuentra un grupo fenólico, susceptible a una fácil oxidación, para proteger este grupo se realizó una reacción de acetilación. Esta reacción se llevó a cabo directamente sobre el extracto hexánico y el extracto de acetato de etilo, utilizando como reactivo anhídrido acético y como base la piridina para catalizar la reacción, **Esquema 2** (Morrison, 1998).



Esquema 2: Reacción de acetilación del cacalol

La reacción de acetilación llevada a cabo en ambos extractos, se monitoreó mediante cromatografía en capa fina, observando la presencia de acetato de cacalol (2) como una mancha color azul a una longitud de onda de 365 nm y con un factor de retención de 0.6 en un sistema de elusión Hex:AcOEt (8:2, v/v), el cual se separó mediante cromatografía en columna abierta monitoreada mediante cromatografía de capa fina.

Para la columna con 9 g del extracto de acetato de etilo se utilizó, como fase móvil, 100% hexano, posteriormente, cuando se empezó a observar en la placa la presencia del compuesto menos polar, se aumentó la polaridad con 1% de acetato de etilo y 99% hexano, con ello al momento de evaporar los disolventes de la fracción 75 a 91 se obtuvieron cristales amarillos.

El producto obtenido se recrystalizó de metanol, con lo que se obtuvieron 493 mg en forma de sólido blanco con un p.f = 102-104°C y Rf. = 0.61 en Hex:AcOEt (8:2, v/v). Lo que corresponde a 5.4% de rendimiento de los 9 g del extracto colocados en la columna.

En la columna abierta realizada para el extracto hexánico, se obtuvieron 100 mg de producto aislado en forma de sólido amarillo claro, con un p.f. =107-109°C, intervalo diferente al obtenido del sólido aislado del extracto de AcOEt debido a que no se logró aislar puro de este extracto, y aún con la recrystalización en metanol no se consiguió tener un compuesto puro, mostrando en cromatografía en capa fina similitud con el acetato de cacalol con R.f. = 0.58 en Hex:AcOEt (8:2, v/v). Corresponió al 1.72% de rendimiento de acetato de cacalol por gramo del extracto colocado en la columna.

Comparando los rendimientos del compuesto **I**, se puede observar que el mayor fue obtenido a partir del extracto acetilado de acetato de etilo.

Se corroboró que el compuesto obtenido fue acetato de cacalol (**Figura 12**) mediante técnicas espectroscópicas (RMN ¹H e IR) y EM.

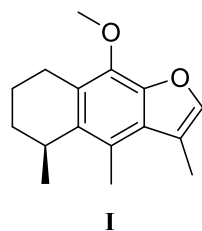


Figura 12: Estructura del acetato de cacalol

En el espectro de $^1\text{H-RMN}$ (Anexo), se pudo observar la presencia de un singulete en 2.59 ppm que corresponde al metilo del acetato y que integra para 3 hidrógenos. Mientras que en el espectro IR se observó una banda en una longitud de onda de 1760 cm^{-1} correspondiente a la vibración del grupo carbonilo del acetato y una banda de absorción a una longitud de onda de 1063.70 cm^{-1} que corresponde a la vibración del enlace C-O del grupo éster. En el espectro de masas obtenido mediante la técnica de impacto electrónico (Anexo) se observa un pico de alta intensidad correspondiente al ion molecular $[\text{M}^+]$ con un valor de m/z 272.

Psacalium peltatum

8.3 Obtención del extracto hexánico de la raíz de Matarique y del acetato de maturina

Se obtuvieron 3.8 g del extracto hexánico, lo que corresponde al 0.76% de rendimiento en peso seco de la raíz.

En comparación del cacalol, al que se tuvo que realizar una acetilación para obtener el compuesto más estable, acetato de cacalol; el acetato de maturina (7) se obtuvo directamente de la cromatografía en columna abierta del extracto hexánico de *Psacalium peltatum*. De esta separación se obtuvieron 300 mg de un sólido amarillo, correspondiente al 7.9% de rendimiento, con un p.f. = $84^\circ - 86^\circ\text{ C}$ y R.f = 0.33 en Hex:AcOEt (8:2, v/v).

Se corroboró que el compuesto obtenido fuera acetato de maturina (7) mediante técnicas de IR y EM.

En el espectro de IR se pudo observar la presencia de una banda de absorción en una longitud de onda de 1740.50 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del grupo carbonilo del acetato y una banda en 1680 cm^{-1} que corresponde al grupo carbonilo del aldehído.

En el espectro de masas obtenido, utilizando la técnica de impacto electrónico (Anexo), se observa un pico de alta intensidad correspondiente al ion molecular $[M^+]$ con un valor de m/z 312. Esto indica la masa molecular del acetato de maturina la cual corresponde a la fórmula molecular $C_{18}H_{16}O_5$ y coincide con el valor reportado en caracterizaciones anteriores de este compuesto **II**, **Figura 13** (Vilchis, 2015).

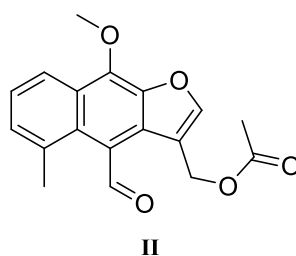


Figura 13: Estructura de acetato de maturina.

DERIVADOS NITRADOS

8.4 Nitración de acetato de cacalol

Una vez obtenido el acetato de cacalol, se buscó introducir un grupo nitro en el C2 del furano estableciendo diferentes condiciones de reacción. Se inició con el método descrito en las referencias (Método 1), donde se generan vapores de N_2O_4 producidos por la oxidación de THF/ácido nítrico, rápidamente se generaron vapores rojizos, obteniendo como producto un aceite viscoso café, en la CCF se observó la formación de aproximadamente 7 señales (Alarcón, 1987).

Al separarse por cromatografía en placa preparativa, se obtuvieron 5 fracciones. Se observó que todo el acetato de cacalol reaccionó, obteniendo fracciones con varios compuestos polares, siendo la cuarta fracción, la única con presencia de un compuesto en mayor concentración. Al separar esta fracción se obtuvieron aproximadamente 3 mg de sólido amarillo con un p.f = $142-144^{\circ}C$ y un R.f = 0.69

Hex:AcOEt (8:2, v/v). A pesar de obtener un sólido, resultó ser un compuesto inestable, debido a que se tornó color café con la exposición a la luz, señal de una posible oxidación, por lo que no se pudo seguir trabajando con él.

Por ello, se realizó la búsqueda de otras metodologías, con diferentes agentes nitrantes y usando otras condiciones de reacción más suaves, debido a que el Método 1 realizado, junto con el método tradicional de nitración (mezcla de ácido nítrico con ácido sulfúrico), son poco selectivos, compiten con la formación de productos de oxidación de la misma reacción y generan ácidos residuales. Una de las alternativas que se propuso fue el uso de sólidos ácidos como arcilla montmorilonita KFS y gel de sílice.

Se utilizó una mezcla de $\text{Bi}(\text{NO}_2)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en montmorilonita con THF (Método 2) y por otro lado, se colocó $\text{Bi}(\text{NO}_2)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en sílice 70/230 en THF (Método 3). Estas reacciones se dejaron a diferentes temperaturas y a distintos tiempos, ambos crudos de reacción se separaron mediante cromatografía en placa preparativa. En la placa se observó la presencia de 5 señales (mejor definidas que de la reacción con arcilla, método 3). El producto obtenido fueron 63 mg de pequeños cristales de color amarillo (Método 4). Sin embargo, lo único que se logró aislar fue la materia prima, el resto fueron mezclas.

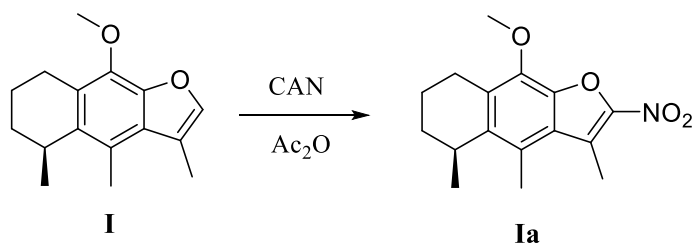
Como uno de los disolventes orgánicos más usados en las reacciones, de nitración es el ácido acético, se decidió usar la mezcla de este disolvente con $\text{Bi}(\text{NO}_2)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, a una temperatura de 30°C durante menos tiempo que las otras reacciones obteniendo 43 mg de una mezcla de sólido amarillo con anaranjado. Sin embargo, al realizar CPP se obtuvo una mezcla de un líquido viscoso.

Uno de los sistemas más frecuentemente usados para sustratos sensibles a la acidez, es HNO_3 en bajas concentraciones y anhídrido acético (Ac_2O), sin embargo, tienen que utilizarse bajas temperaturas debido a que la reacción es exotérmica. En años recientes, se ha reportado el CAN como otro agente nitrante utilizado en

mezcla con anhídrido acético, generando el nitrato de acetilo para la nitración aromática. Este método se ha utilizado en la mononitración de olefinas y compuestos heterocíclicos, entre ellos el benzofurano nitrado en el carbono C2, el cual es el compuesto base del acetato de cacalol, por lo que se decidió seguir este procedimiento (Tanemura, 2003).

El monitoreo de la reacción mediante CCF mostró la formación de un compuesto con un R.f por debajo del acetato de cacalol el cual absorbe en cámara UV a longitud de onda larga (365 nm) y en onda corta (254 nm), y al momento de ser revelado se torna de un color amarillo claro. Después de las 6 horas en agitación y 3 días de reposo se observa la formación de 4 compuestos por debajo del amarillo. La separación por cromatografía en columna abierta se realizó con un sistema de elución Hex:AcOEt (9:1, v/v) obteniendo en la fracción 3 y 4, 20 mg de un sólido amarillo con un p.f = 157°- 158°C y un R.f.= 0.55. La cristalización se realizó con un sistema de elución Hex:AcOEt (8:2, v/v), obteniendo cristales amarillos claros.

En el **Esquema 3** se muestra la condición de nitración del acetato de cacalol y a diferencia de los otros métodos realizados, esta reacción se inició en un baño de hielo y posteriormente se dejó a temperatura ambiente, lo que posiblemente ayudó a la separación del producto de reacción más estable.



Esquema 3. Reacción de nitración del acetato de cacalol.

Al obtener mayor pureza y rendimiento del compuesto por este método, el sólido aislado se caracterizó mediante IR, ¹H-RMN, EM y RX. En el espectro de ¹H-RMN del compuesto **Ia**, se observa la ausencia del protón unido al carbono dos (C-2), por

otro lado, se conserva la banda correspondiente al protón del metilo del acetato, ligeramente desplazada a mayor ppm que el acetato de cacalol (2.9 ppm) indicando que la sustitución por el grupo -NO_2 no afectó al grupo acetato en la molécula. En el espectro de IR se observa la banda de absorción en 1766.70 cm^{-1} , lo cual reitera que no sufrió modificación el grupo acetato con la reacción de nitración, por otro lado, se encontraron dos bandas de absorción en 1359 y 1515.11 cm^{-1} correspondientes a las flexiones del enlace N-O.

La masa molecular del compuesto obtenido de la reacción de nitración del acetato de cacalol mediante el Método 5, se determinó por espectrometría de masas con la técnica FAB, en donde se observó el ion molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ de m/z 318, de donde se deduce una masa molecular igual a 317 g/mol , correspondiente a la presencia de un solo grupo nitro en la estructura del acetato de cacalol, la cual coincide con el valor reportado con anterioridad para este derivado (Alarcón, 1987).

Finalmente, los rayos X corroboraron la estructura del acetato de cacalol nitrado en el C-2, como se muestra en la **Figura 14**. La muestra analizada se describe como un cristal amarillo tenue de dimensiones $0.234 \times 0.305 \times 0.411\text{ mm}$ que se resuelve con dos moléculas cristalográficamente independientes y con un centro quiral. La estructura del compuesto es casi planar en su mayoría, saliendo del plano los átomos C6 y C7, C14 y el grupo acetilo en ambas moléculas.

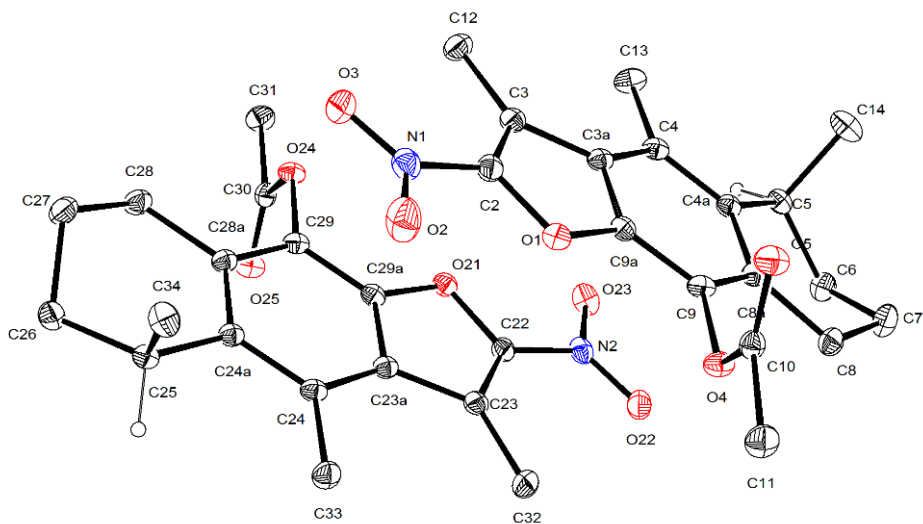


Figura 14. Estructura establecida para el acetato de cacalol nitrado por Rayos X.

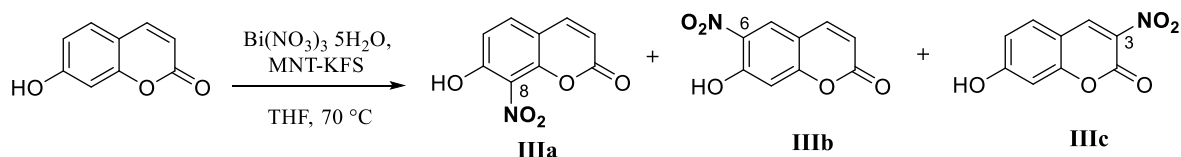
8.5 Nitración de acetato de maturina

Con el sistema utilizado en la reacción de nitración, cristaliza un compuesto con el mismo R.F. que el acetato de maturina, sin embargo, absorbió diferente en cámara UV de onda larga, cristalizó como pequeñas agujas color amarillo-naranja. A pesar de haber utilizado las mismas condiciones de nitración que en el acetato de cacalol, estas condiciones no fueron favorables ya que la introducción del grupo nitro no se llevó con éxito en esta molécula, obteniendo muy bajo rendimiento con un producto que visiblemente era igual al acetato de maturina aislado del extracto.

8.6 Nitración de umbeliferona

En el **Esquema 4** se muestran las condiciones de reacción de nitración de la cumarina umbeliferona. De la purificación del crudo de reacción, mediante cromatografía en columna flash, se obtuvieron los isómeros 8-nitroumbeliferona

(**IIIa**), 6-nitroumbeliferona (**IIIb**) y 3-nitroumbeliferona (**IIIc**). El compuesto **IIIa** se obtuvo como un sólido amarillo claro en 21.7% de rendimiento y un R.f.= 0.48. El producto **IIIb** se obtuvo como un sólido amarillo con un rendimiento de 19.4% y un R.f. = 0.75. Finalmente, se obtuvo el isómero **IIIc** como un sólido amarillo soluble en metanol con un rendimiento de 9.25% y un R.f. = 0.35. Estos se caracterizaron mediante la técnica espectroscópica de RMN-H¹ y espectrometría de masas (EM).



Esquema 4. Condición de reacción de nitración de la cumarina umbeliferona.

En los espectros de RMN-H¹ de los 3 compuestos derivados (Ver anexo y **Figura 15**) se observa la presencia de dos señales correspondientes a los protones del C4 y C5, sin embargo, en cada uno de los compuestos va a cambiar el desplazamiento de las señales y la ausencia de señales de acuerdo en donde se encuentre el sustituyente -NO₂, debido al efecto electroattractor que genera este grupo en el anillo aromático: en el espectro del compuesto **IIIa** se presentan dos señales dobles, una en 7.74 ppm y otra en 8.05 ppm correspondiente a los protones del C5 y C4, respectivamente, sin embargo, cuando el hidrógeno del carbono vecino (C3 o C6) es sustituido por un grupo nitro, el desplazamiento del protón más cercano será a mayores ppm (campo bajo) debido a que queda más desprotegido por la reducción de la densidad electrónica que provoca el grupo nitro. En el espectro del compuesto **IIIa** hay ausencia de un singulete protón correspondiente al protón unido a C8, el cual se presenta en los espectros de los otros dos compuestos, como singulete a 6.98 ppm en el compuesto **IIIb** y como doblete a 6.78 ppm en el compuesto **IIIc**, esto dependiendo de cuán alejado esté del grupo sustituyente nitro. En los espectros de los compuestos **IIIa** y **IIIb** se observa la presencia de un doblete en 6.37 ppm y 6.41 ppm, respectivamente, correspondiente al protón unido al C-3, mientras que en el

espectro del compuesto **IIIc** se observa la ausencia de esta señal, indicando que la unión del grupo -NO_2 se llevó a cabo en este carbono.

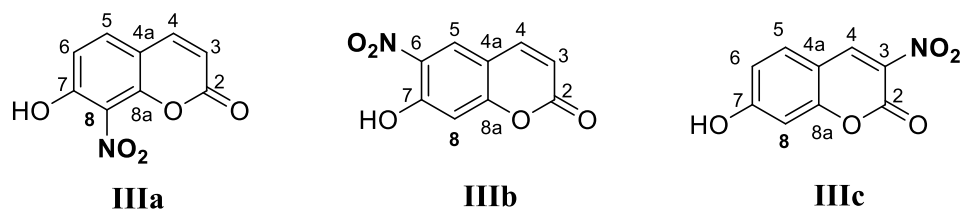


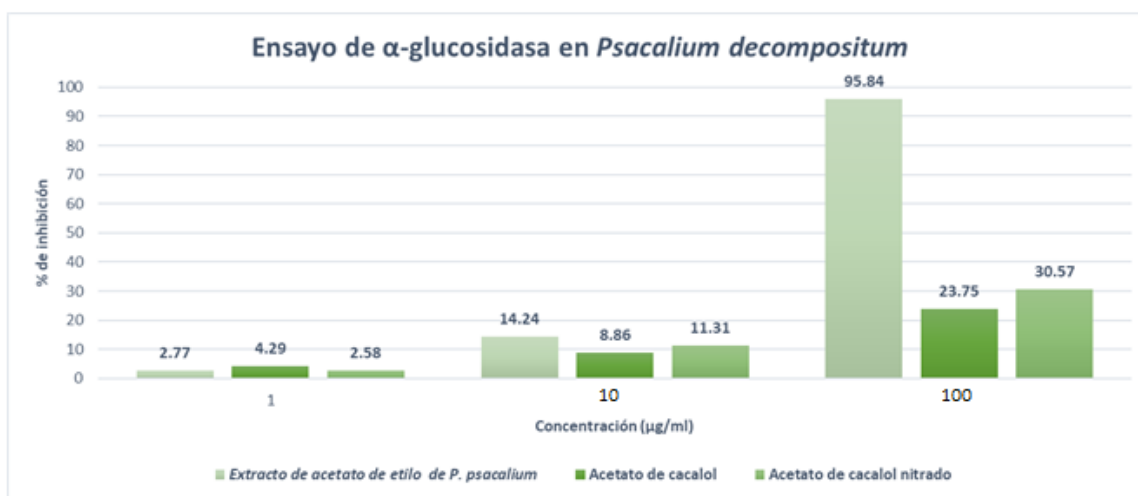
Figura 15. Estructuras de las nitrocumarinas **IIIa-IIIc**

Los espectros de masas obtenidos de los **compuestos IIIa, IIIb y IIIc** se realizaron mediante la técnica de Impacto Electrónico (Anexo). Como se puede apreciar en los espectros (Ver anexo) se observa una relación masa carga de 207 para el ion molecular $[M]^+$, correspondiente a la adición de un solo grupo NO_2 en cada una de las moléculas.

8.7 PRUEBAS BIOLÓGICAS

8.7.1 Ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa

La enzima α -glucosidasa se encarga de hidrolizar el almidón proveniente de los alimentos liberándose moléculas de glucosa, esta enzima se encuentra en el epitelio del intestino delgado. La inhibición de esta enzima disminuye la absorción de glucosa y la hiperglicemia postprandial. Se ha reportado, en investigaciones anteriores, el efecto hipoglucemiante del cacalol, en ratones, obtenido del extracto hexánico, presentando valores muy favorables. Por ello, se evaluó la inhibición de la enzima α -glucosidasa de levadura en los derivados obtenidos con la finalidad de observar el efecto al proteger el fenol y al adicionar un grupo nitro en el C2 del cacalol, así como su efecto en el extracto del cual se obtuvo. Los resultados obtenidos se presentan en la **Gráfica 1**.

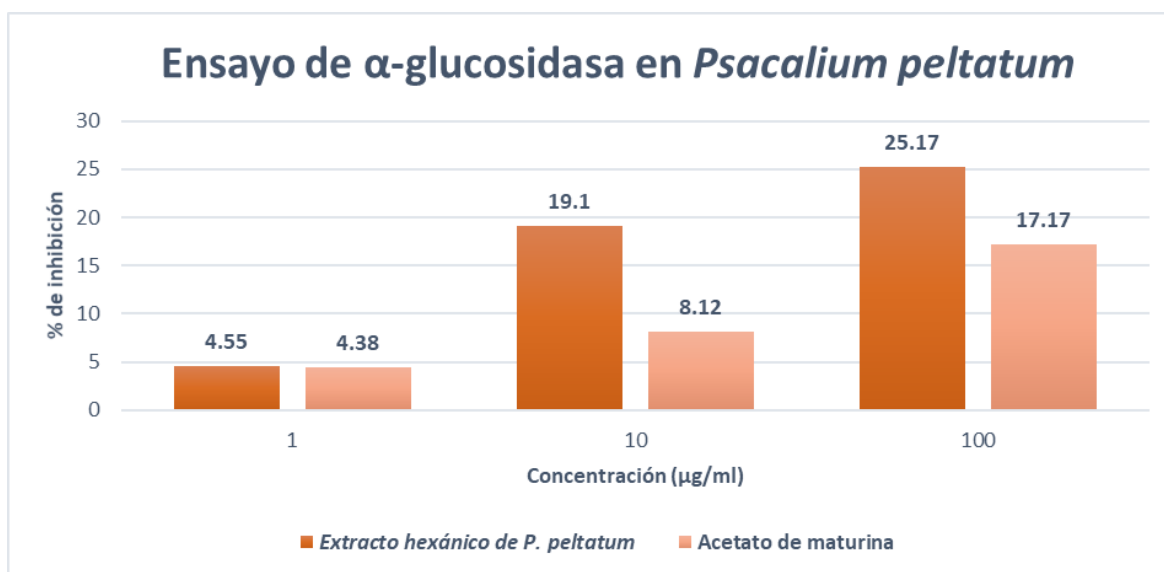


Gráfica 1. % de inhibición de la enzima α -glucosidasa en levadura de la raíz *P. decompositum* y los compuestos obtenidos de ella.

Como se puede observar, el extracto de acetato de etilo obtenido de la raíz presenta una alta capacidad inhibitoria de la enzima, cerca del 100%. La bibliografía nos indica que el cacalol es el compuesto mayoritario que le proporciona esta actividad hipoglucemiante a la raíz *P. decompositum*. Cuando se evalúa el acetato de cacalol la actividad disminuye por debajo del 50%. Cuando se evalúa el acetato de cacalol nitrado, la actividad no cambia mucho con respecto del acetato de cacalol, ya que

a las concentraciones evaluadas se observa una inhibición de la enzima alfa-glucosidasa 30.57% a los 100 $\mu\text{g/ml}$. Lo que asocia al grupo fenólico como el principal responsable de aportar la capacidad inhibitoria de la enzima, siendo una de las razones del porqué las personas practican el consumo de esta planta como tratamiento de diabetes.

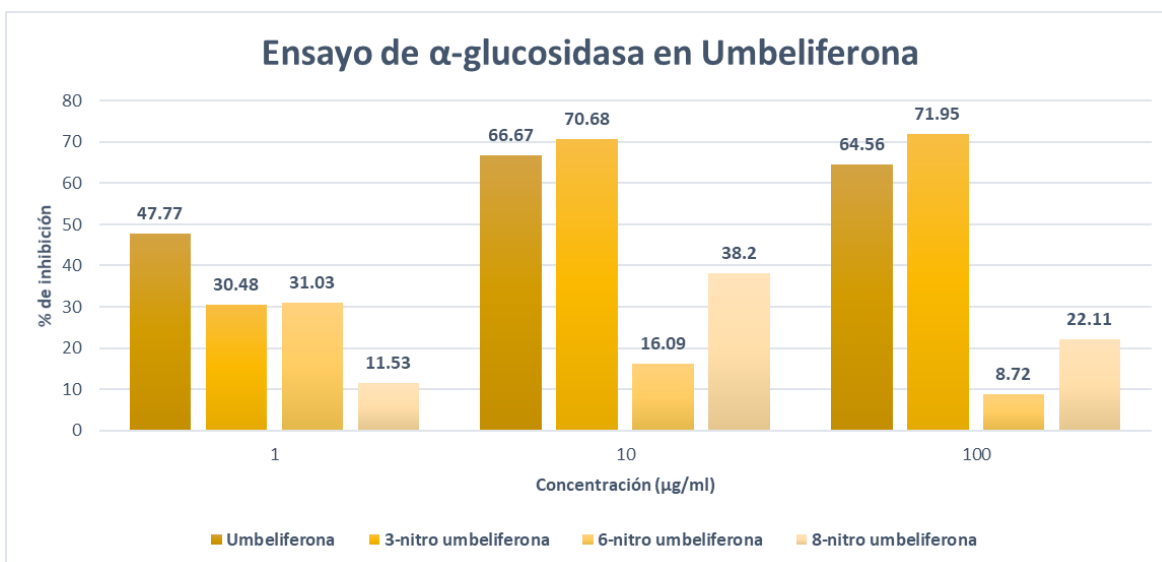
Con respecto a la raíz de *Psacalium peltatum*, como parte del complejo Matarique, también es usada empíricamente su cocción, en el tratamiento de diabetes, sin embargo, se puede observar en la **Gráfica 2**, que el extracto hexánico de esta raíz, al igual que el sesquiterpeno aislado, acetato de maturina, presentan una capacidad inhibitoria por debajo del 30% a la mayor concentración evaluada.



Gráfica 2. % de inhibición de α -glucosidasa en levadura de la raíz *P. peltatum* y del acetato de maturina.

Por otro lado, se ha estudiado que la administración intraperitoneal de umbeliferona en ratas diabéticas a una concentración de 10, 20 y 30 mg/kg de peso corporal, y se han observado efectos significativos en la disminución de glucosa en sangre. Por otro lado, la administración de 30 mg/kg de peso corporal en ratas sanas ha mostrado efectos positivos en el control glicémico (Ramesh, 2006).

Aunado a esto, los resultados de la evaluación *in vitro* de la umbeliferona plasmados en la **Gráfica 3**, muestran el efecto inhibitorio que tiene esta cumarina en la enzima α -glucosidasa. A una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$, la umbeliferona presenta una mejor actividad, de 47.77%, que los derivados nitrados, pero a concentraciones de 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$, la umbeliferona y el derivado 3-nitroumbeliferona, igualan su actividad con una inhibición por encima del 60% y mayor que los derivados nitrados en las posiciones 6- y 8-, que mantienen una actividad por debajo del 38.2%. Sin embargo, cuando se introduce un grupo nitro a su estructura este efecto cambia. Estos resultados acentúan la importancia de la posición del grupo nitro en la estructura benzopirano, en donde el nitro derivado sustituido en la posición 3- logra igualar la actividad de la umbeliferona a concentraciones de 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ y los grupos nitro en posición *orto*- al grupo hidroxilo provocan una disminución en su capacidad para inhibir la enzima α -glucosidasa.



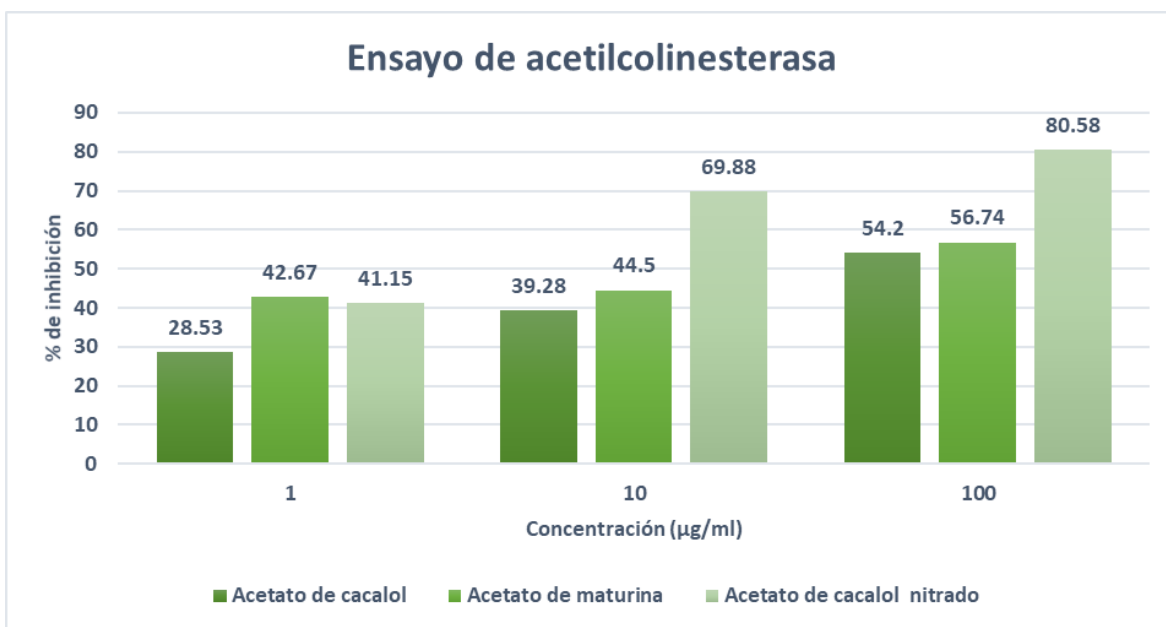
Gráfica 3. % de inhibición de la enzima α -glucosidasa en levadura del compuesto umbeliferona y sus derivados nitrados.

8.7.2 Ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE)

La enzima AChE juega un papel vital en los sistemas nerviosos central y periférico. Los inhibidores que actúan sobre el centro activo de la enzima impiden la unión de

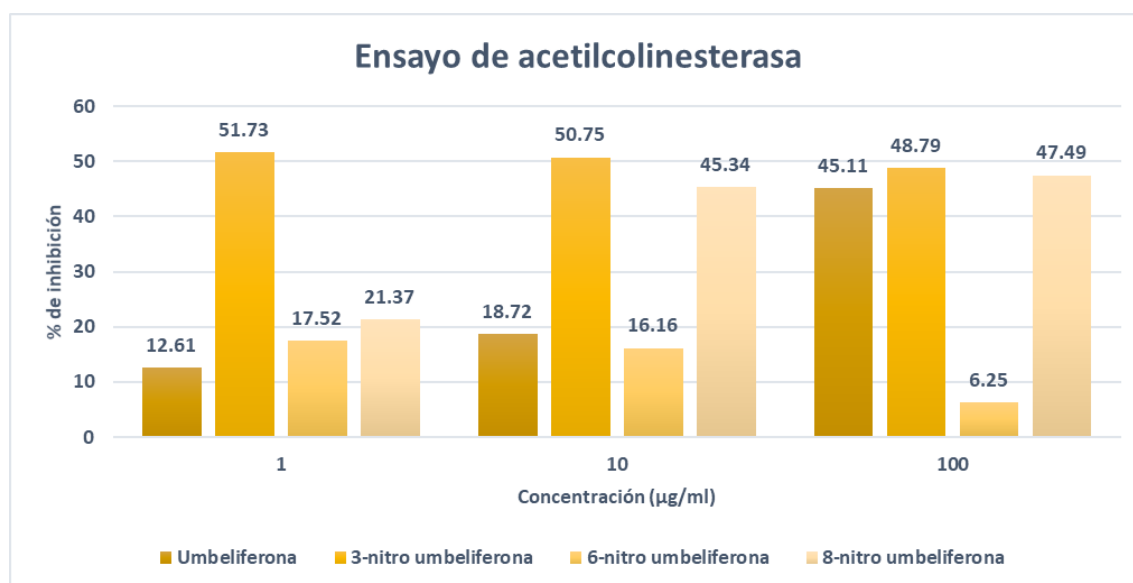
una molécula de sustrato o su hidrólisis, mediante el bloqueo del sitio por su alta actividad, reaccionando irreversiblemente con la serina próxima al centro catalítico. La actividad inhibitoria fue evaluada mediante el método de Ellman en el compuesto aislado de *P. psacalium*, de *P. peltatum*, así como de los derivados nitrados de la umbeliferona a concentraciones de 1, 10 y 100 µg/ml.

Conforme a los resultados mostrados en la **Gráfica 4**, el acetato de cacalol y acetato de maturina (7), inhibieron, poco más del 50%, la enzima AChE a una concentración de 100 µg/ml, un resultado favorable debido a que la mayoría de los compuestos naturales utilizados como inhibidores provienen de compuestos fenólicos, los cuales han servido de base para el desarrollo de medicamentos que pueden usarse para prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedad de Alzheimer (EA) o bien disminuir la severidad de los síntomas, siendo con esto otra fuente de compuestos que pueden servir como precursores de medicamentos para tratar esta enfermedad, ya que al obtener un derivado de estos sesquiterpenos, introduciendo un grupo nitro a la molécula acetato de cacalol (2), se observa como aumenta hasta un 80.5% la capacidad inhibitoria de esta enzima.



Gráfica 4. % de inhibición de la enzima AChE de los sesquiterpenos acetato de cacalol, acetato de maturina y acetato de cacalol nitrado.

Teniendo como referente que los compuestos fenólicos son los principales inhibidores de la enzima AChE, y que dentro de estos compuestos se encuentran las cumarinas; al analizar los datos presentados en la **Gráfica 5**, se muestra que a una concentración de 100 µg/ml la umbeliferona presenta su mayor capacidad inhibitoria, siendo esta de un 45% cuando se introduce el grupo nitro en el C-3, presentando desde una concentración de 1 µg/ml una inhibición 51.3%, y manteniendo su efecto a las concentraciones de 10 y 100 µg/ml. Mientras que la actividad del derivado 8-nitroumbeliferona incrementa con la concentración, el derivado 6-nitroumbeliferona parece disminuir conforme aumenta su concentración.



Gráfica 5. % de inhibición de la enzima AChE del compuesto umbeliferona y sus derivados nitrados.

8.7.3 Citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas

Los resultados de la evaluación de la inhibición de la proliferación celular muestran en la **Tabla 1** que los sesquiterpenos no afectan el crecimiento de las células sanas, sin embargo, a pesar de compartir la estructura benzofurano como núcleo base, el

acetato de cacalol y el acetato de maturina no presentan los mismos resultados. Se observa que la capacidad inhibitoria de la proliferación celular en el acetato de maturina fue nula en todas las líneas celulares, mientras que el acetato de cacalol mostro un 56.5% de inhibición de proliferación de la línea celular K562 (leucemia).

Se ha reportado que por sí sola, la umbeliferona resulta ser efectiva como anti-carcinógeno, en conjunto con el compuesto 5-fluorouracilo resultan un potencial y efectivo agente quimioterapéutico contra la carcinogénesis inducida de colon (Mazimba, 2017). Para el caso de la umbeliferona, el bioensayo, solo muestra inhibición en la línea de leucemia (52.8%), mientras que en sus derivados esta capacidad inhibitoria de la proliferación celular disminuyó.

Tabla 1. Inhibición de la proliferación celular en diferentes líneas celulares.

Muestra	% de inhibición del crecimiento por la línea celular						
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS7
Acetato de cacalol	23.7	14.2	66.5	17.2	25.2	12.9	NC
Acetato de maturina	28.8	13.2	27.0	28.5	6.8	12.5	NC
Umbeliferona	NC	NC	52.8	9.1	40.5	8.7	9.6
3-Nitro umbeliferona	NC	NC	NC	30.2	NC	15.8	3.2
6-Nitro umbeliferona	NC	NC	48.8	23.8	NC	15.8	NC
8-Nitro umbeliferona	NC	6.8	49.0	17.9	40.3	13.8	12.4

U251= glía de sistema nervioso central, PC-3= próstata, K562= leucemia, HCT-15= colon, MCF-7= mama, SKLU= pulmón. COS-7: línea celular de riñón de mono (no cancerosa).

8.7.4 Actividad Antiinflamatoria (TPA)

Este ensayo se realizó mediante edema inducido por TPA en oreja de ratón, únicamente evaluando al compuesto acetato de matorina. La razón de esta decisión se debe a la bibliografía existen estudios con resultados positivos en este ensayo, y así poder hacer una comparación al tener como sustituyente un grupo nitro. Como se observa en la **Tabla 2**, presentó un porcentaje de inhibición de edema del 73.25%, utilizando una cantidad de 9.4 mg.

Tabla 2. Ensayo de actividad antiinflamatoria del acetato de matorina en el modelo de edema en oreja de ratón inducido por TPA.

Muestra	Control Oreja (mg)	Tratamiento con TPA Oreja (mg)	Edema T-C (mg)	Promedio	% de Inhibición
Acetato de matorina	9.4	11.5	2.1	2.03	73.25
	9.4	11.3	1.9		
	9.1	11.2	2.1		

8.7.5 Bioensayo *Artemia spp salina*

Como parte de un análisis de toxicidad aguda, se presenta el bioensayo de *Artemia spp salina*, determinando el porcentaje de letalidad ocasionado por los extractos de AcOEt de *P. decompositum*, de acetato de cacalol, acetato de 2-nitrocacalol, el extracto hexánico de *Psacalium peltatum*, el acetato de matorina, umbeliferona y sus nitro derivados sobre las larvas de este crustáceo. La **Tabla 3**, muestra el porcentaje de letalidad de los compuestos y extractos trabajados. El acetato de cacalol, el acetato de 2-nitro cacalol y el extracto de la raíz *P. decompositum* mostraron un porcentaje menor al 10% de letalidad en una concentración de 10µM, mientras que para el extracto hexánico de *Psacalium peltatum* y el acetato de matorina, a esa misma concentración, su letalidad llegó al 25%. Para el caso de umbeliferona, se

tuvo un resultado favorable en el compuesto sustituido en el C3, el cual, a una concentración de 100µM presentó un porcentaje menor al 5% de letalidad.

Tabla 3. % Porcentaje de letalidad del extracto de la raíz *P. psacalium*, el compuesto aislado acetato de cacalol y su derivado nitrado, del extracto de la raíz *P. peltatum* y su sesquiterpeno acetato de maturina y de umbeliferona y sus derivados nitrados.

Muestra	Concentración (µM)	% de letalidad
Acetato de cacalol	1	0
	10	2.94
	100	93.55
Acetato de 2-nitro cacalol	1	1.25
	10	2
	100	43.75
Extracto de acetato de etilo de <i>P. psacalium</i>	1	1.72
	10	12.5
	100	98.5
Acetato de maturina	1	0
	10	25
	100	54.76
Extracto hexánico de <i>P. peltatum</i>	1	0
	10	13.73
	100	43.24
Umbeliferona	1	0
	10	2.74
	100	90.53
3-Nitroumbeliferona	1	1.11
	10	1.64
	100	3.23
6-Nitroumbeliferona	1	3.8
	10	26.56
	100	36.17
8-Nitroumbeliferona	1	0
	10	11.48
	100	21.05

9. CONCLUSIONES

- Se obtuvo el extracto de AcOEt de *Psacalium decompositum* y el extracto hexánico de *Psacalium peltatum*.
- Se optimizó la separación cromatográfica del acetato de cacalol, requiriendo menor número de fracciones, obteniendo un mayor rendimiento del compuesto y purificando de metanol. Por cada 10 g de extracto acetilado se obtienen 495 mg de acetato de cacalol.
- El acetato de cacalol es una molécula inestable a ciertas condiciones de reacción como temperaturas altas, tiempo largo de reacción, condiciones ácidas. Se logró obtener su derivado nitrado cuando la reacción se llevó a cabo en baño de hielo.
- A pesar de haber implementado una nueva y exitosa metodología para la nitración de este compuesto, todavía se puede optimizar para mejorar el rendimiento.
- Los distintos sustituyentes que posee el acetato de maturina lo hace más estable, sin embargo, no se logró la introducción de un grupo nitro utilizando las mismas condiciones de reacción que en el acetato de cacalol, por lo que como perspectiva de este trabajo se buscarán otras condiciones en la reacción para esta molécula.
- Al unirle un grupo nitro a la estructura del acetato de cacalol, su actividad inhibitoria de la enzima AChE pasó de un 54.20% a un 80.20%. La actividad inhibitoria del acetato de cacalol nitrado se incrementó en un 26% en comparación al derivado sin nitrar.
- Por sí solo, el acetato de maturina presenta un 73.25% de inhibición de edema en oreja de ratón y un 56.74% de inhibición de la enzima AChE.
- Las modificaciones estructurales realizadas a los compuestos trabajados y su actividad biológica brindan una pauta para continuar buscando modificaciones con compuestos que sean viables para el uso del ser humano

en el control de enfermedades como obesidad, diabetes, entre otras crónico-degenerativas.

- En el día a día se pueden encontrar las raíces *Psacalium decompositum* y *Psacalium peltatum* en los mercados para su consumo en té. La población los toma debido al conocimiento que ha pasado de generación en generación acerca de coadyuvar en el tratamiento de enfermedades como la diabetes o para desinflamación. En este trabajo, con las modificaciones químicas hechas a los constituyentes naturales de las raíces y otros productos naturales y el apoyo bibliográfico de trabajos anteriores se pudo obtener un respaldo científico del porqué esos productos naturales ayudan al tratamiento de esos padecimientos, sin embargo, hace falta realizar su evaluación en estudios clínicos para poder tener una certeza y que confirmen los resultados obtenidos, se continúan con estas investigaciones.

Referencias

- Alarcón, F. (1987). *Derivados nitrogenados del cacalol* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.
https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/86HYUTB7L9VMVE1GJY51PMUD469HAFB94MIMRHJ1FX6R9EPA1U-41960?func=find-b&local_base=TES01&request=Derivados+nitrogenados+del+cacalol+&find_code=WRD&adjacent=N&filter_code_2=WYR&filter_request_2=&filter_code_3=WYR&filter_request_3=
- Badgujar, M., Talawar, M., Ashtana, S. & Mahulikar, P. (2007). Environmentally benign synthesis of aromatic nitro compounds using silica supported inorganic nitrates. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 66(3). 250-251.
https://www.researchgate.net/publication/301824260_Environmentally_benign_synthesis_of_aromatic_nitro_compounds_using_silica_supported_inorganic_nitrates
- Bailey, P. (2001). Sustitución Electrofílica Aromática. En *Química orgánica: conceptos y aplicaciones*. Pearson Education. pp. 169,170.
- Bohlmann, F., Bapuji, M. (1982). Cacalol derivatives from *Senecio lydenburgensis*. *Phytochemistry*. 21(3). 681-683.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0031942282831658>
- Bohlmann, F., Dupre', S. Nordenstam, B. (1990). Cacalol derivatives from dominican *Senecio species*. *Phytochemistry*. (29)10. 3163-3165.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/003194229080179K>
- Breitmaier, E. (2006). *Terpenes: Flavors, Fragances, Pharmaca, Pheromones*. Alemania. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Castro, J., Estevéz, A., Ravelo, G., Murray, A. & Faraoni, M. (2012). Productos naturales para el diseño de compuestos lideres con utilidad en la enfermedad de Alzheimer. *Revista de Fitoterapia*. 12(S1). 55. <https://www.fitoterapia.net/archivos/201608/rdf-12-s1-co13.pdf?1>

- Contreras, C., Pérez, S., Alarcón, F. & Roman, R. (2002). Anti-Hyperglycemic Effect of *Psacalium peltatum*. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 45. 134-136.
https://www.researchgate.net/profile/Ruben_RomanRamos/publication/11032314_Antihyperglycc_effect_of_Psacalium_peltatum/links/0f317532b0f2e3f30a000000.pdf
- F.J. Alarcón-Aguilar, R. Román-Ramos, M. Jiménez-Estrada, R. Reyes Chilpa, B. González, Paredes, J.L., Flores-Sáenz. (1997) Effects of three Mexican medicinal plants (Asteraceae) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*. 55(3). 171-177. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874196014948>
- F.J. Alarcón-Aguilar, M. Jiménez-Estrada, R. Reyes-Chilpa, R. Román-Ramos. (2000). Hypoglycemic effect of extracts and fractions from *Psacalium decompositum* in healthy and alloxan-diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 72(1-2). 21-27.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874100002026>
- F.J Alarcón-Aguilar, M. Jiménez-Estrada, R. Reyes-Chilpa B. González-Paredes, C. C. Contreras-Weber, R. Román-Ramos. (2000). Hypoglycemic activity of root water decoction, sesquiterpenoids, and one polysaccharide fraction from *Psacalium decompositum* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 69(3). 207-215.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874199000392>
- F.J. Alarcón-Aguilar, R. Román-Ramos, M. Jiménez-Estrada, R. Reyes-Chilpa, B. González-Paredes, J.L. Flores-Saenz. (1998). Effects of three Mexican medicinal plants (Asteraceae) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits. *Science Direct. Journal of Ethnopharmacology*. 55(3). 171-177.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874196014948>
- F.J. Alarcon Aguilar. (2006). Anti-inflammatory activity of cacalol and cacalone sesquiterpenes isolated from *Psacalium decompositum*. *Journal of Ethnopharmacology*. 105(1-2). 34-38.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887410500694X>
- F.J. Alarcon-Aguilar, A. Fortis-Barrera, S. Angeles-Mejia, T. R. Banderas-Dorantes, E. I. Jasso-Villagomez, J. C. Almanza-Perez, G. Blancas-Flores, A. Zamilpa, M. Diaz-Flores, R. Román-Ramos. (2010). Anti-inflammatory and antioxidant effects of a hypoglycemic fructan fraction

from *Psacalium peltatum* (H.B.K.) Cass. in streptozotocin-induced diabetes mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 132(2). 400-407.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874110005507>

Gómez Cortés, L. (2013). *Iminociclitoles como inhibidores de glicosidasas y su posible aplicación como coadyuvantes en el tratamiento de trastornos metabólicos e infecciones*. [Tesis de Doctorado, Universidad de Barcelona]. Tesis en red. https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/131050/01.LGC_1de2.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Gómez, M. (2010). *Desarrollo y evaluación de estrategias analíticas para la caracterización de compuestos bioactivos en alimentos funcionales* [Tesis de Doctorado, Universidad de Granada]. Dialnet <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=63095>

González Hernández, J. C. (2007). *Obtención del cacalol y sus derivados. Determinación de actividad antioxidante* [Tesis de Pregrado, UNAM]. Dirección General de Bibliotecas. https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/86HYUTB7L9VMVE1GJY51PMUD469HAFB94MIMRHJ1FX6R9EPA1U18629?func=findb&local_base=TES01&request=Obtenci%C3%B3n+del+cacalol+y+sus+derivados.+Determinaci%C3%B3n+de+actividad+antioxidante+&find_code=WRD&adjacent=N&filter_code_2=WYR&filter_request_2=&filter_code_3=WYR&filter_request_3=

Guevara Galárraga, E. R. (2018). *Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro del extracto hidroetanólico de hojas de *Origanum mejorana* en cepas de *Proteus spp.** [Tesis de Maestría, Universidad Regional Autónoma de los Andes] https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/05/996438/evaluacion-de-la-actividad-antimicrobiana-in-vitro-del-extracto_Nf67FDT.pdf

Guzmán, M., Ortega, A. & Anaya, C. (2010). Piranoantocianinas: modificaciones estructurales de antocianinas. *Tsia*. (4). 84-95. <https://tsia.udlap.mx/piranoantocianinas-modificaciones-estructurales-de-antocianinas/>

Hendrickson, J., Cram, D. & Hammond, G. (1970). Electrophilic Substitution; Aromatic Compounds. En *Organic Chemistry* (1279). Tokyo, Japan: International Student Edition. pp. 660-662.

- J. Correa, J. Romo. (1997). The constituents of *Cacalia decomposita* A. Gray. structures of maturin, maturinin, maturone and maturinone. *Tetrahedron*. 22(2). 685-691.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0040402066800388>
- Juárez, M., Alonso, A., Rojano, N., Jiménez, M. & García, A. (2013). Maturin acetate from *Psacalium peltatum* (Kunth) Cass. (Asteraceae) induces immunostimulatory effects in vitro and in vivo. *Toxicology in Vitro*. 27(3). 1001-1006.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0887233313000222>
- Jurárez, M. (2013). *Actividad inmunomoduladora in vitro de extractos y compuestos de plantas mexicanas medicinales*. [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza]. Tesiunam.
https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/86HYUTB7L9VMVE1GJY51PMUD469HAFB94MIMRHJ1FX6R9EPA1U31014?func=findb&local_base=TES01&request=+Actividad+inmunomoduladora+in+vitro+de+extractos+y+compuestos+de+plantas+mexicanas+medicinales&find_code=WRD&adjacent=N&filter_code_2=WYR&filter_request_2=&filter_code_3=WYR&filter_request_3=
- J. Romo, P. Joseph-Nathan. (1964). The constituents of *Cacalea decomposita* A. Gray: Structures of cacalol and cacalone. *Tetrahedron*. 20(10). 2331-2337.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040402001976227>
- K. Schofield (1980). *Aromatic Nitration*. London Cambridge University Press.
- Linares, E. Bye, R (1987). A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *Journal of Ethnopharmacology*. 19(2). 153-183.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378874187900390>
- M. Jimenez-Estrada, R. Reyes Chilpa, T. Ramirez Apan, Fernando Lledias, Wilhem Hansberg, Daniel Arrieta, Merino-Aguilar, H.; Arrieta-Baez, D.; Jiménez-Estrada, M.; Magos-Guerrero, G.; Hernández-Bautista, R.J.; Susunaga-Notario, A.D.C.; Almanza-Pérez, J.C.; Blancas-Flores, G.; Román-Ramos, R.; Alarcón-Aguilar, F.J. Effect of Fructooligosaccharides Fraction from *Psacalium decompositum* on Inflammation and Dyslipidemia in Rats with Fructose-Induced Obesity. *National Library of Medicine*. 6(2). 591-604.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24481132/>

Marcano, D. & Hasegawa, M. (2002). En línea. Fitoquímica Orgánica. Caracas, Venezuela:

Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.

María G. Campos, Martha Oropeza, Carlos Torres-Sosa, Manuel Jiménez-Estrada, Ricardo, Reyes-Chilpa. (2009). Sesquiterpenoids from antidiabetic *Psacalium decompositum* block ATP sensitive potassium channels. *Journal of Ethnopharmacology*. 123(3). 489-493.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887410900141X#bib1>

Márquez Alonso, C., Lara Ochoa, F., Esquivel Rodríguez, B., & Mara Essayag, R. (1999). Plantas medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica. México: UNAM. Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial.

<https://biblioteca.ecosur.mx/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=000041613>

Mazimba, O. (2017). Umbelliferone: Sources, chemistry and bioactivities review. *Journal science direct*. 2(55). 223-232.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1110093117300297#:~:text=Umbelliferone%20is%20a%20synthon%20for,coli%20anti%2Dbiofilm%20formation.>

Merino Aguilar, Héctor. (2009). *Evaluación del efecto hipoglucémico de los polisacáridos de la raíz de Psacalium decompositum (A. Gray) H. Robinson & Brettell (Matarique)*. [Tesis de Maestría, UNAM]. Tesiunam.
https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/86HYUTB7L9VMVE1GJY51PMUD469HAFB94MIMRHJ1FX6R9EPA1U16386?func=findb&local_base=TES01&request=Evaluaci%C3%B3n+del+efecto+hipogluc%C3%A9mico+de+los+polisac%C3%A1ridos+de+la+ra%C3%ADz+de+Psacalium+decompositum+%28A.+Gray%29+H.+Robinson+%26+Brettell+%28Matarique%29&find_code=WRD&adjacent=N&filter_code_2=WYR&filter_request_2=&filter_code_3=WYR&filter_request_3=

Merino Aguilar, H. (2015). *Efecto de Psacalium decompositum (a. gray) h. rob. & bret. en la prevención y desarrollo del síndrome metabólico inducido por fructosa en ratas*. [Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana].

<http://148.206.53.233/tesiuami/UAMI16581.pdf>

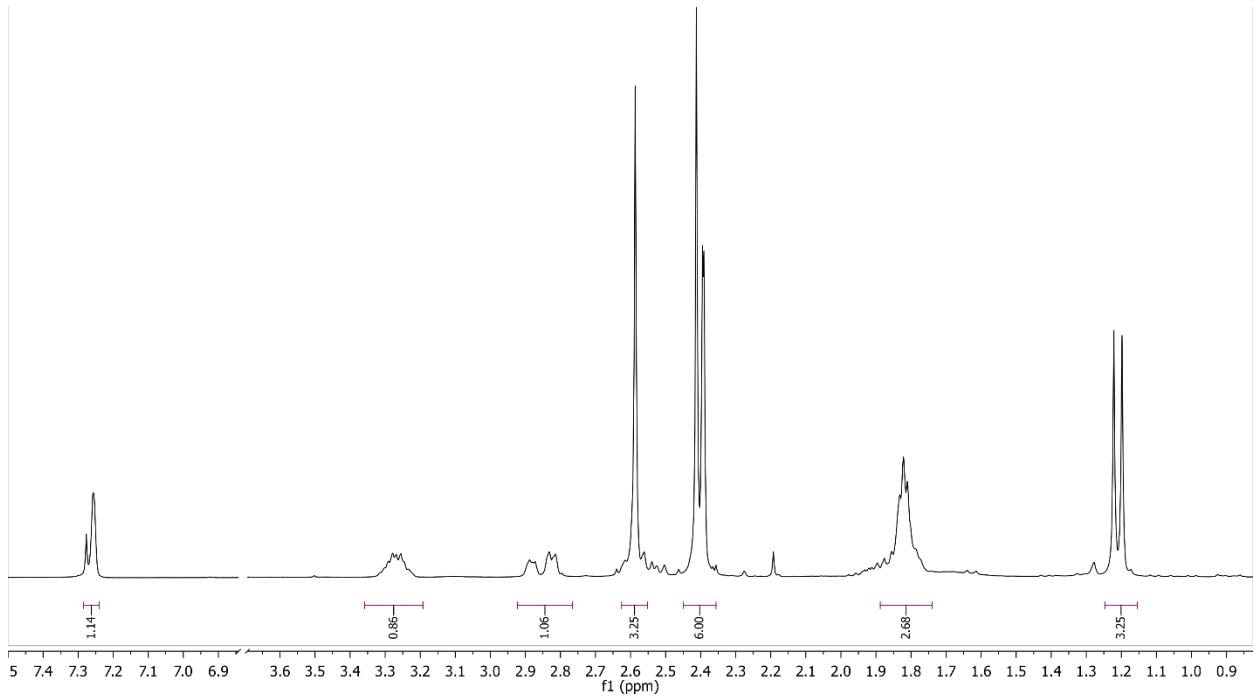
- Morrison, R. & Neilson, R. (1998). *Química Orgánica*. México: Pearson Education.
- Muñoz, D. Cuca, L. (2016). Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). *Colombiana de Cancerología*. 20(3). 124-134.
<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-830282>
- O'Kennedy, R., & Thornes, R. D. (1997). *Coumarins. Biology, applications and mode of action*. JOHN WILEY & SONS.
- Ono, N. (2001). *The nitro Group in organic synthesis*. USA: WILEY-VCH.
- Peñarrieta, J., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J., Bravo, J. (2014). Phenolic compounds in food. *Revista Boliviana de Química*. 21(3). 68-81.
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602014000200006
- Pérez, A., Arciniegas, A., Villaseñor, J., & Romo de Vivar, A. (2004). Furanoeremophilane Derivatives from *Psacalium beamanii*. *Revista de la Sociedad Química de México*. 48(1). 21-23.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0583-76932004000100005
- Plantas y Hongos (2021). Estructura de Quinona. [Imagen].
<https://www.plantasyhongos.es/glosario/quinonas.htm>
- Ramesh, K.V. Pugalendi. (2006). Anti-hyperglycemic effect of umbelliferone in streptozotocin-diabetic rats. *Journal Medicine. Food*. 9 (4) 562–566.
<https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/jmf.2006.9.562>
- Reyes Solis, M. A. (2012). *Química y obtención de ésteres de cacalol* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Autónoma de México]. Tesiunam.
https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/YUKU6IPYUVC3VHRICPQAY32NXRYHPESPDAYN9JE9NJ49K16R5701476?func=findb&local_base=TES01&request=Qu%C3%ADmica+y+obtenci%C3%B3n+de+%C3%A9steres+de+cacalol+&find_code=WRD&adjacent=N&filter_code_2=WYR&filter_request_2=&filter_code_3=WYR&filter_request_3=
- Ringuelet, J. Viña, S. (2013). *Productos naturales vegetales*. Buenos Aires, Argentina: Editorial de la Universidad de la Plata.

- Rivas, C., Oranday, M. & Verde, M. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. Nuevo León, Monterrey: Omnia Science. Pp 272-274
- Rojano Vilchis, N. A. (2015). *Estudio fitoquímico, evaluación antiinflamatoria, regeneración in vitro y cuantificación del acetato de maturina de la planta medicinal Psacalium peltatum* (matarique [Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México]. Tesiunam.
<https://repositorio.unam.mx/contenidos/74266>
- Romo, J., Rodriguez, L., Manjarrez, A., Rivera, E. & Bellido, J. (1968). Nuevos constituyentes aislados de la *Cacalia decomposita* A. Gray. *Repositorio del Instituto de Química Base de datos*, (20), 19-29.
<http://rdu.iquimica.unam.mx/handle/20.500.12214/831>
- Sansbury, M. (2001). Heterocyclic Chemistry. The Royal Society of Chemistry, Joule, J., Milss, K., Smith, G. (1972). Heterociclyc Chemistry. Stanley Thonnes.
- Samajdar, S., Becker, F. & Banik, B. (2001). Montmorillonite impregnated with bismuth nitrate: A versatile reagent for the synthesis of nitro compounds of biological significance. *Archive for Organic Chemistry*. 2001(8). 27-33.
<https://quod.lib.umich.edu/a/ark/5550190.0002.804/1/--montmorillonite-impregnated-with-bismuth-nitrate-a-versatile?page=root;size=150;view=pdf>
- Sánchez, R. Rangel, M. Cristóbal, G. Martínez, A. Pérez, M. (2016). Sistematización del conocimiento tradicional asociado al uso de las plantas medicinales en una comunidad mazahua. *Revista Iberoamericana de Educación*. 3(6). 153-160.
https://www.researchgate.net/publication/315738653_Sistematizacion_del_conocimiento_tradicional_asociado_al_uso_de_las_plantas_medicinales_en_una_comunidad_mazahua
- Tanemura, K., Suzuki, T., Nishida, Y., Satsumabayashi, K. & Horaguchi, T. (2003). A Mild and Efficient Method for the Mononitration of Aromatic Compounds by Cerium (III) Ammonium Nitrate in Acetic Anhydride. *Journal of Chemical Research*. 8. 497-499.
<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.3184/030823403103174696>

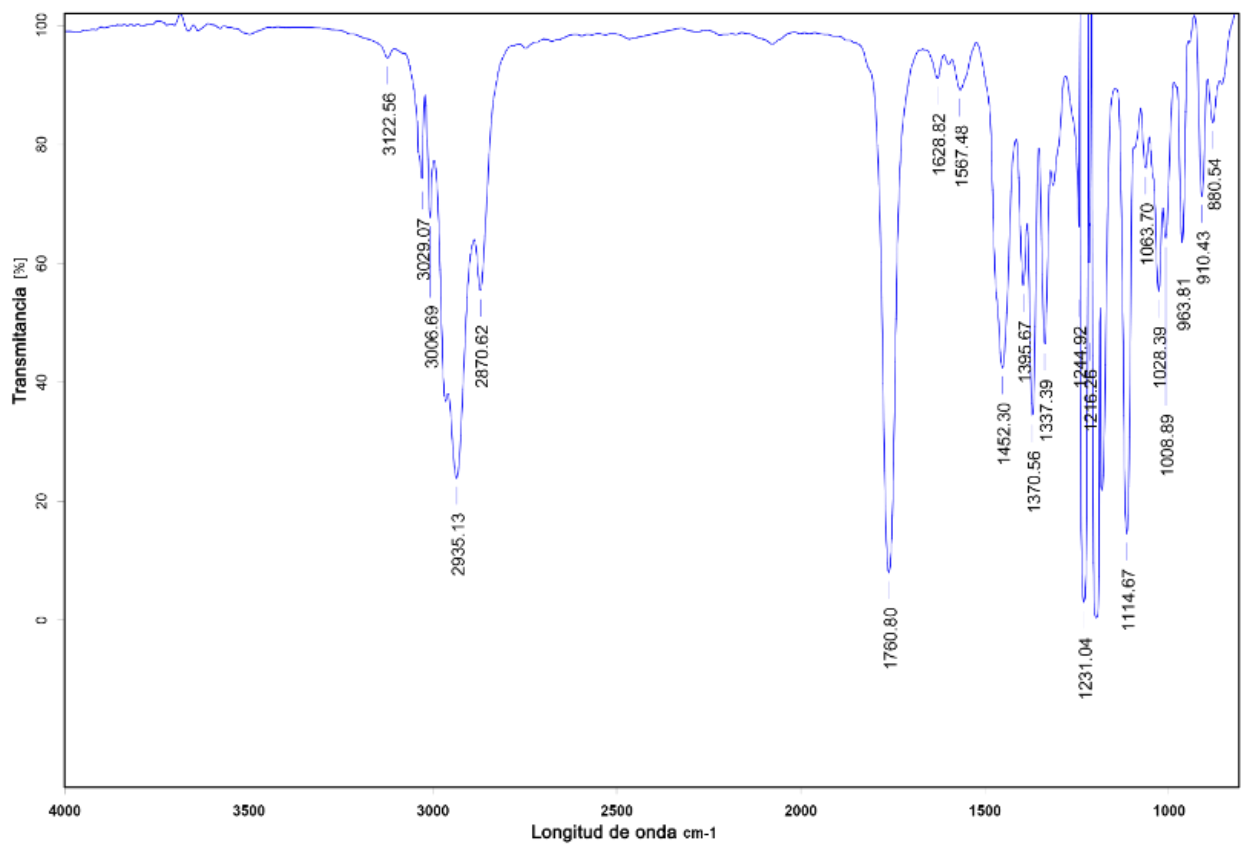
- Valencia Preciado, D. A. (2015). *Detección in vitro de inhibidores de la acetilcolinesterasa en plantas de la flora colombiana por el método de Ellman* [Tesis de pregrado, Universidad Tecnológica de Pereira].
<https://pdfs.semanticscholar.org/cd33/1c33e2defc1132b844826912c8049b32cbbb.pdf>
- Wade Jr, L. (2011). Reacciones de los Compuestos Aromáticos. En *Química Orgánica. Volumen II* (656). México: Pearson Education. pp. 765-766.
- Wayne D. Inman[†], Jian Luo, Shivanand D. Jolad, Steven R. King, and, and Raymond Cooper[‡]. (1999). Antihyperglycemic Sesquiterpenes from *Psacalium decompositum*. *Journal of Natural Products*. 62(8). 1088-1092.
<https://pubs.acs.org/action/showCitFormats?doi=10.1021%2Fnp990023v&href=/doi/10.1021%2Fnp990023v>

ANEXOS

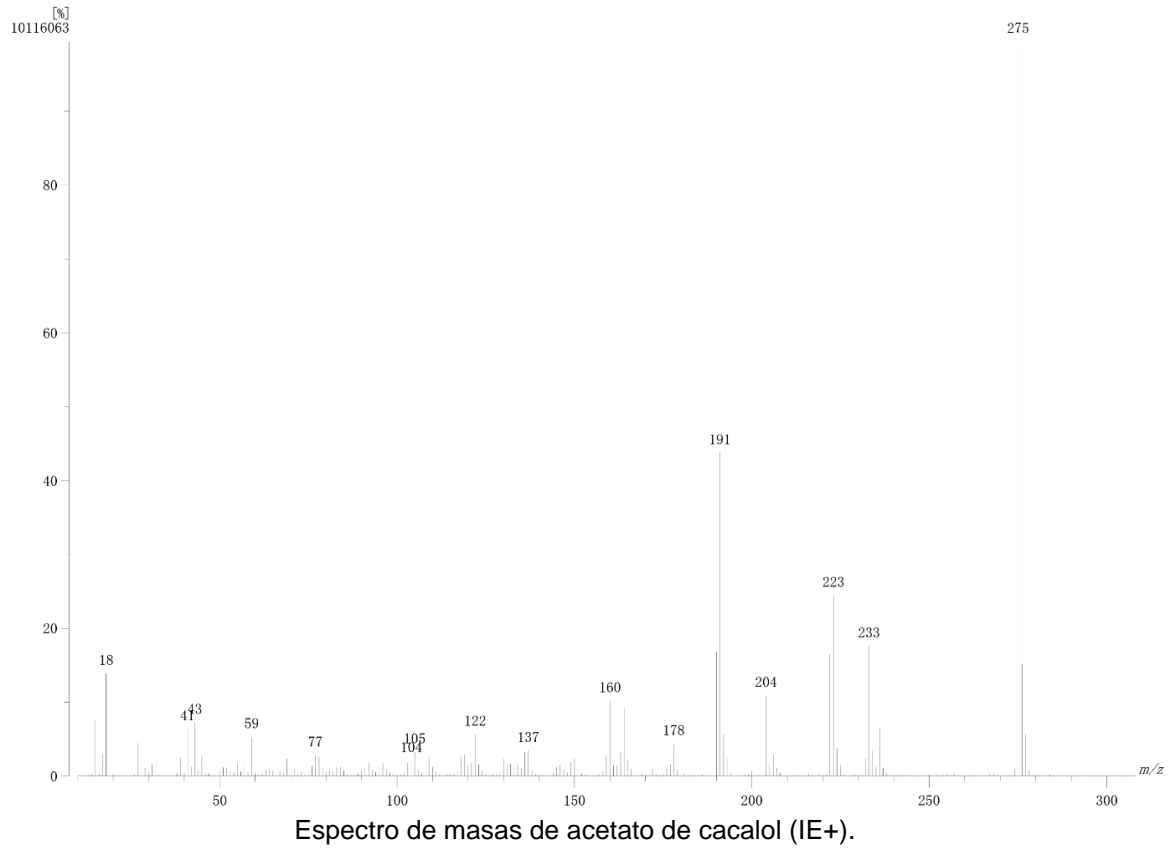
a. Espectros de Acetato de Cacalol



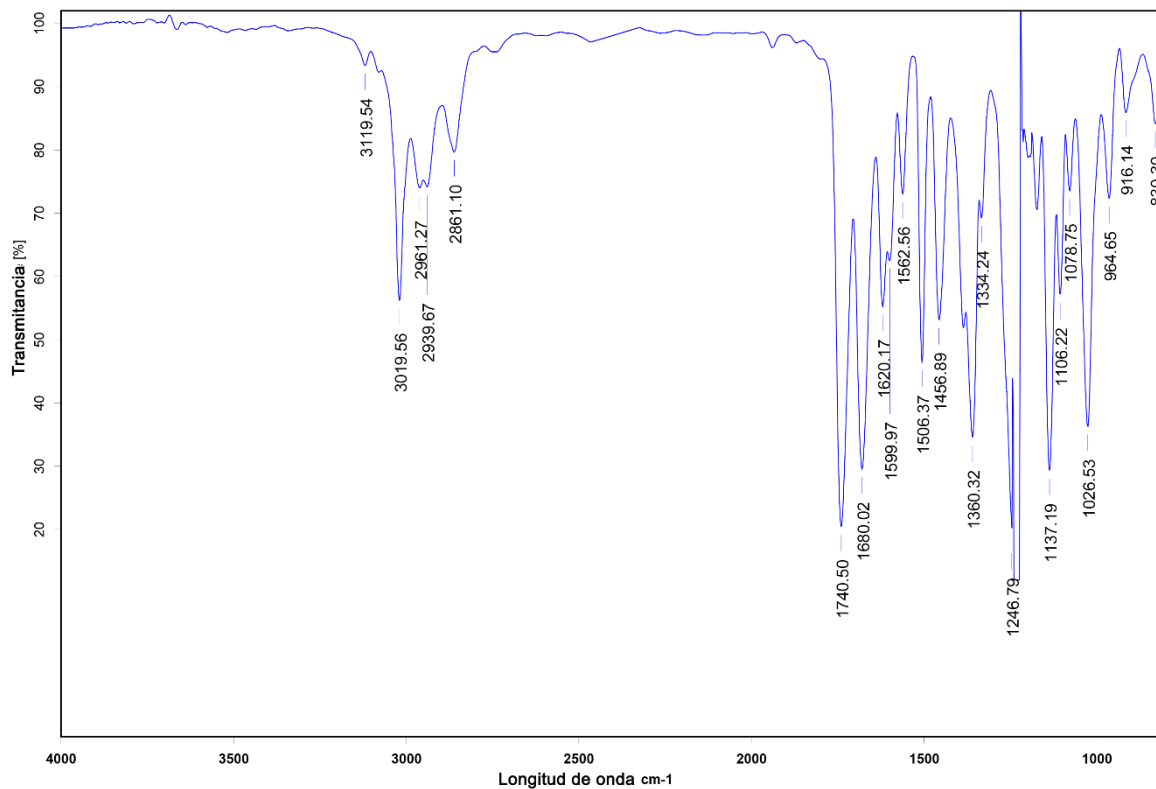
Espectro de RMN- H¹ del acetato de cacalol. (300 MHz, CDCl₃)



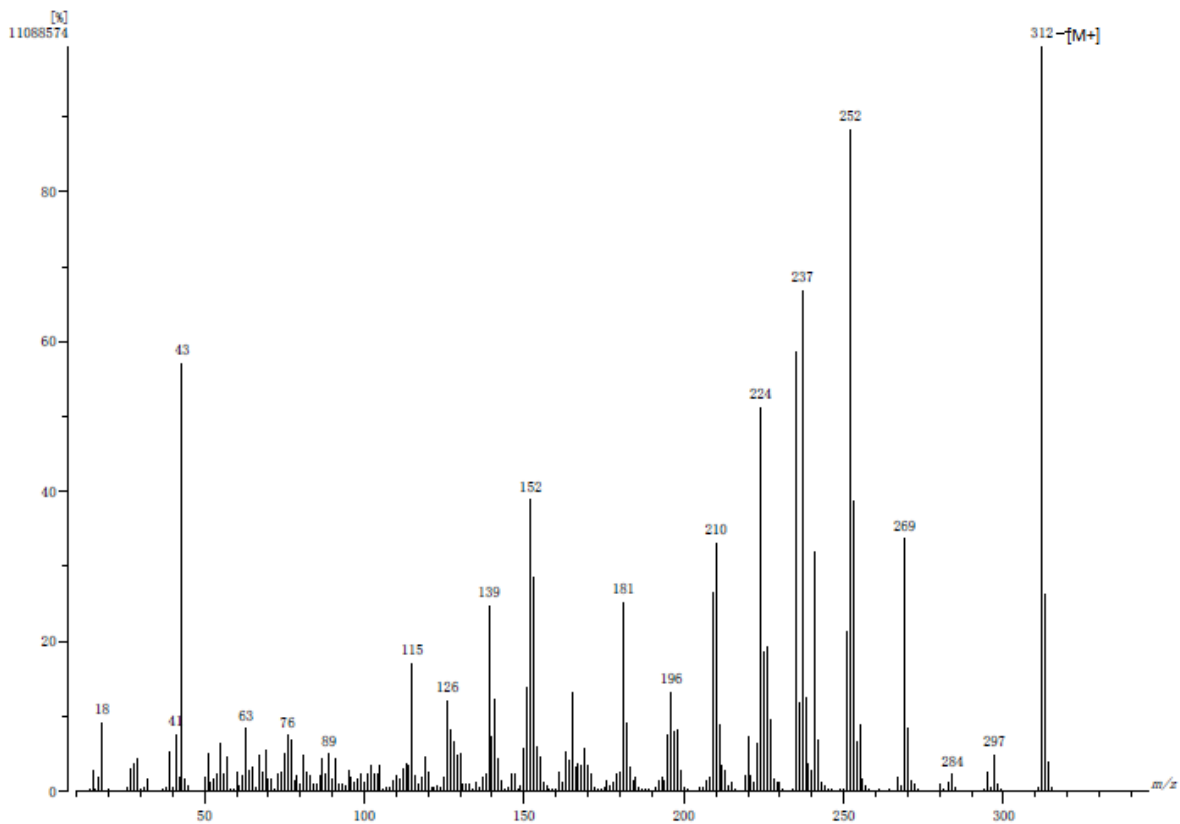
Espectro de IR del acetato de cacalol (sol. CHCl₃).



b. Espectros de Acetato de Maturina



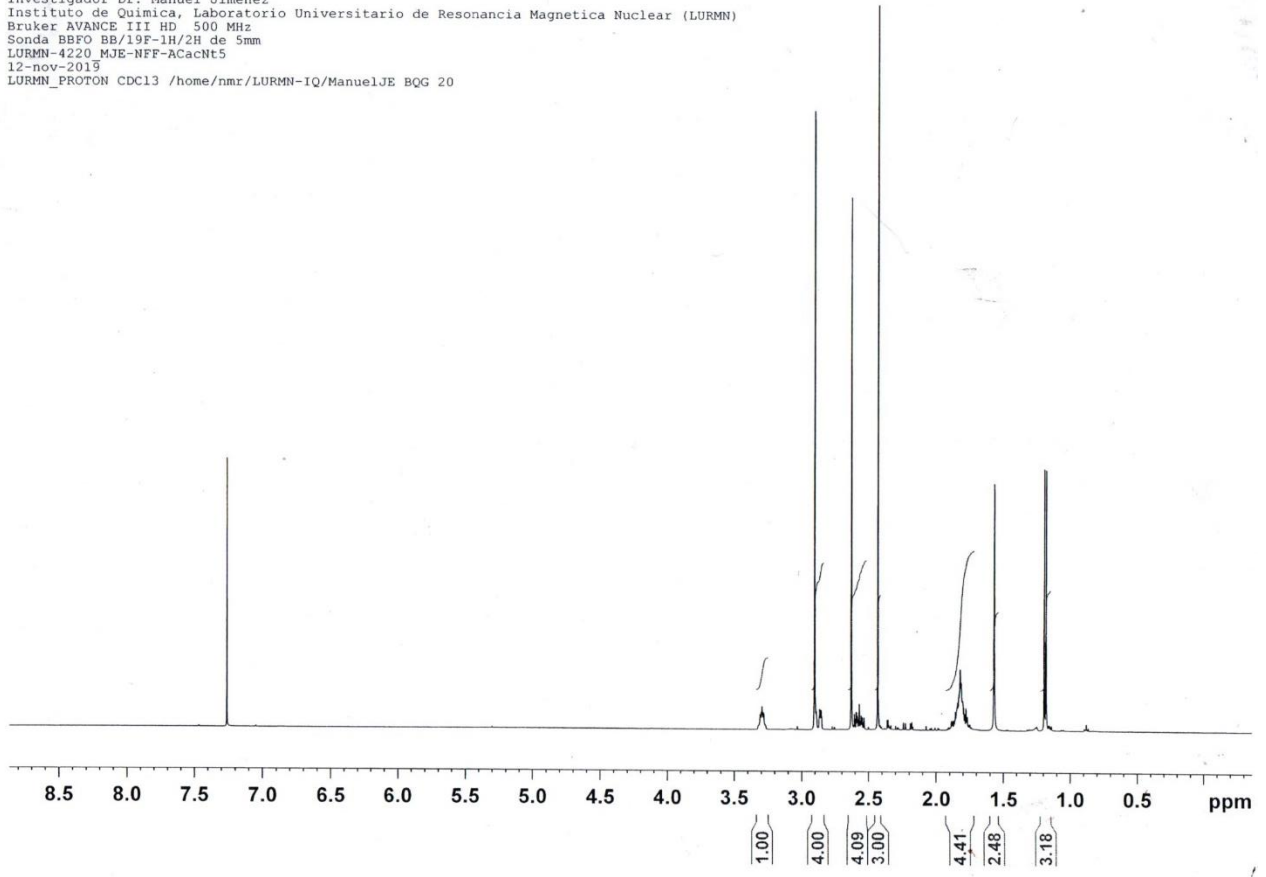
Espectro de IR del acetato de matorina (sol. CHCl_3).



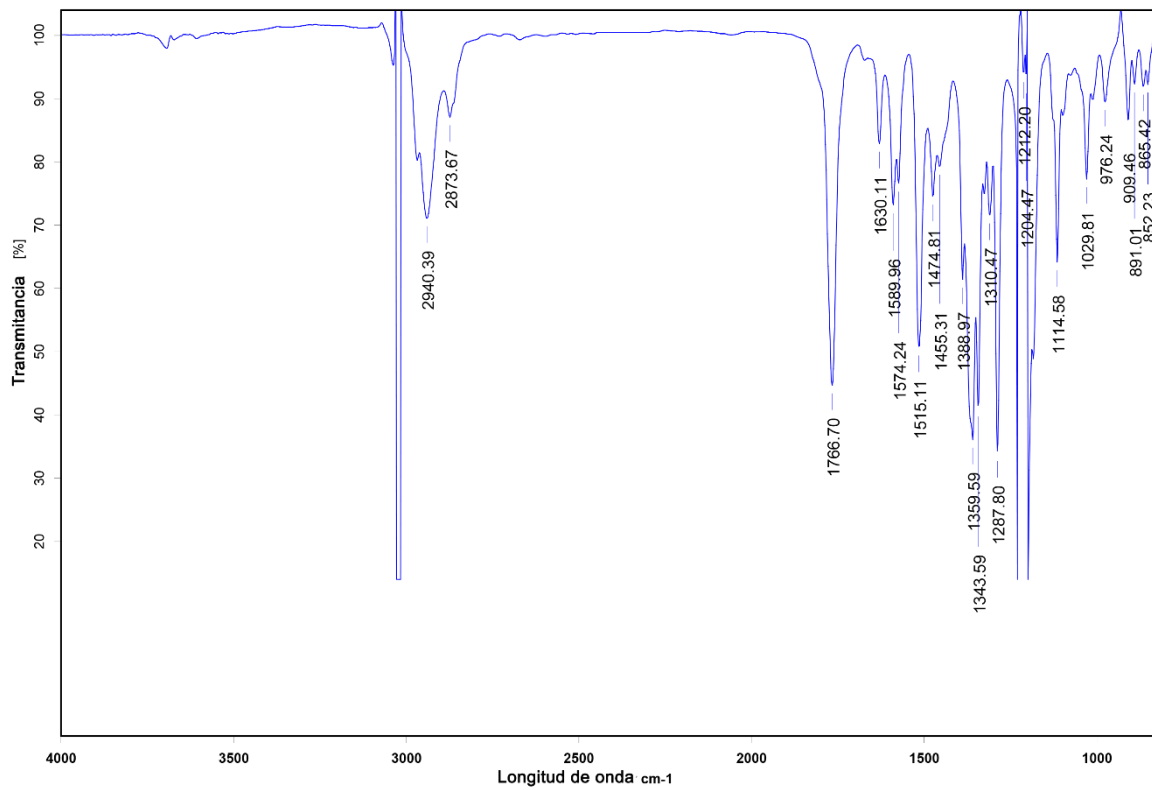
Espectro de masas [E⁺] del acetato de maturina

c. Espectros de Acetato de 2-nitro cacalol

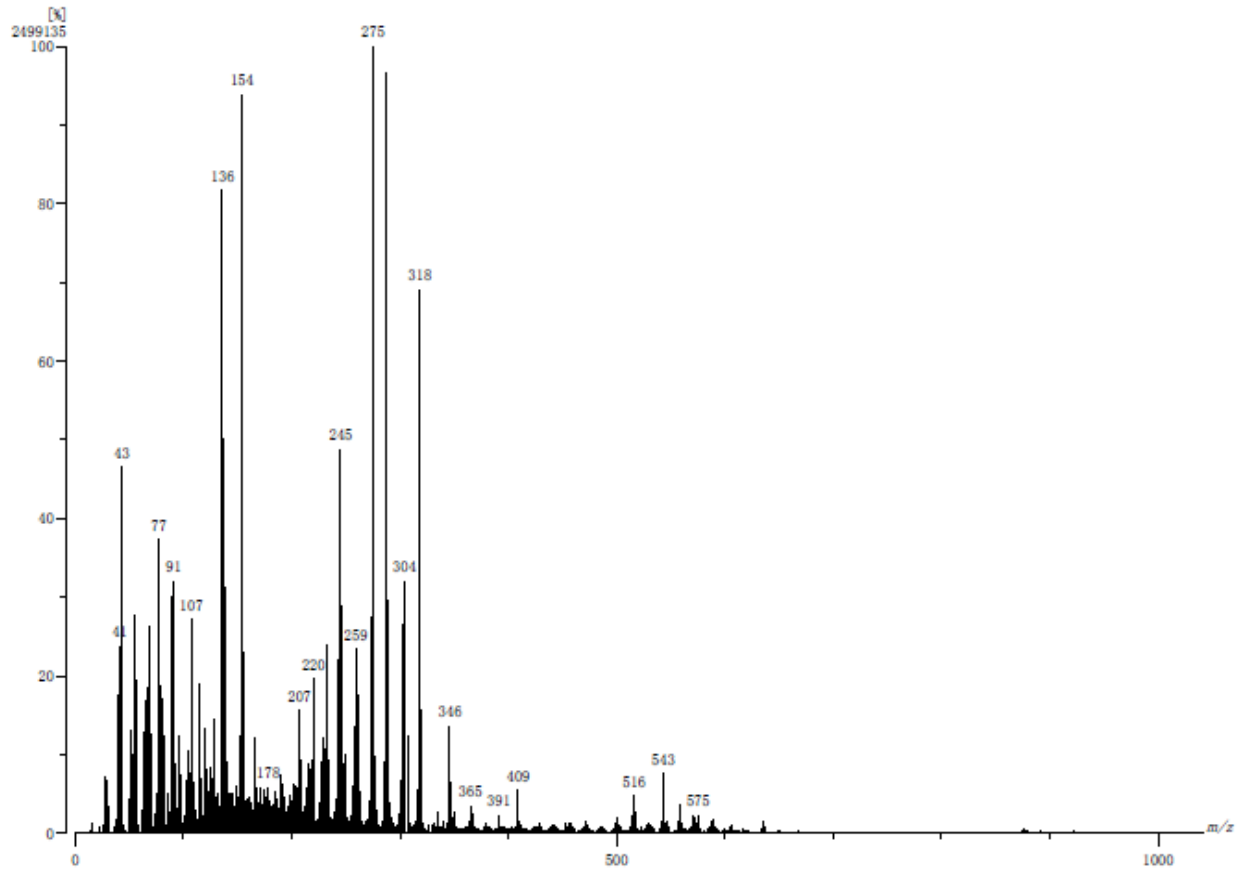
Investigador Dr. Manuel Jimenez
Instituto de Química, Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN)
Bruker AVANCE III HD 500 MHz
Sonda BBFO BB/19F-1H/2H de 5mm
LURMN-4220 MJE-NFF-ACacnt5
12-nov-2019
LURMN_PROTON CDCl3 /home/nmr/LURMN-IQ/ManuelJE BQG 20



Espectro de RMN- H¹ del acetato de 2-nitro cacalol. (500 MHz, CDCl₃)

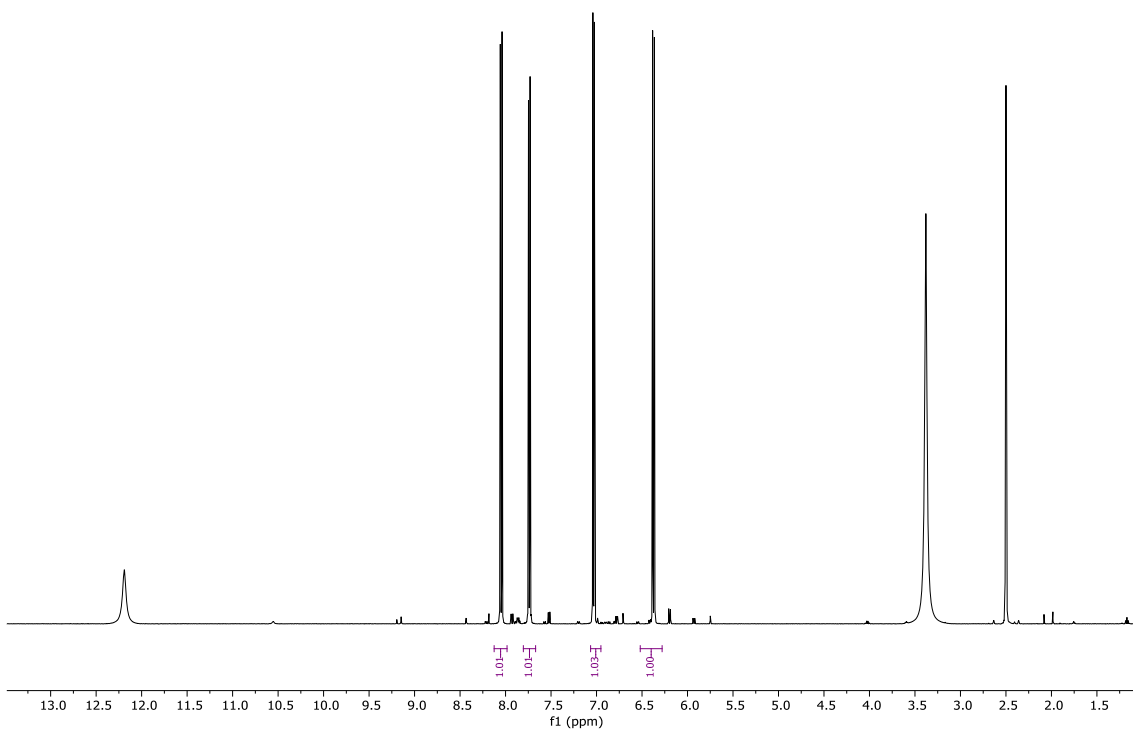


Espectro de IR del acetato de 2-nitro cacalol (sol. CHCl₃).



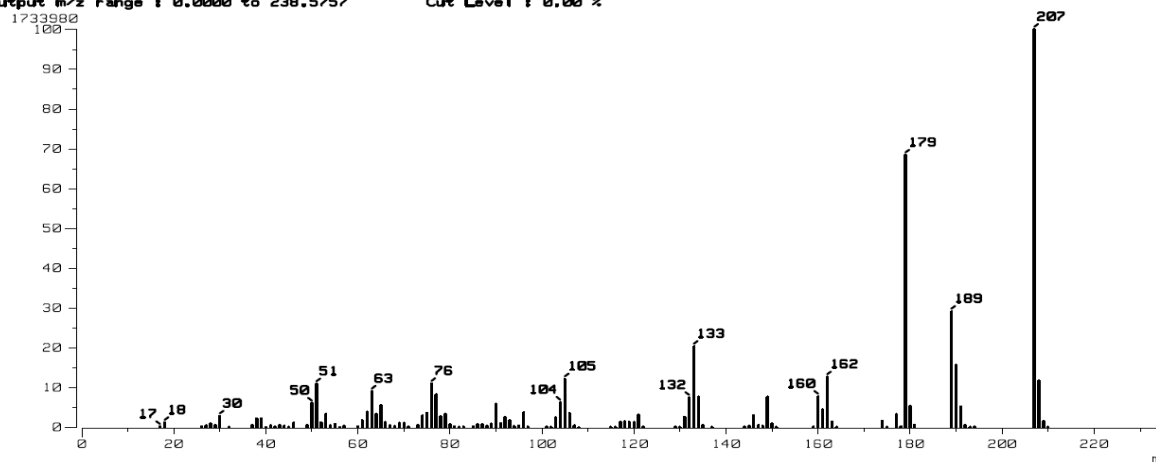
Espectro de masas del acetato de 2-nitro cacalol.

d. Espectros de Derivados de Umbeliferona

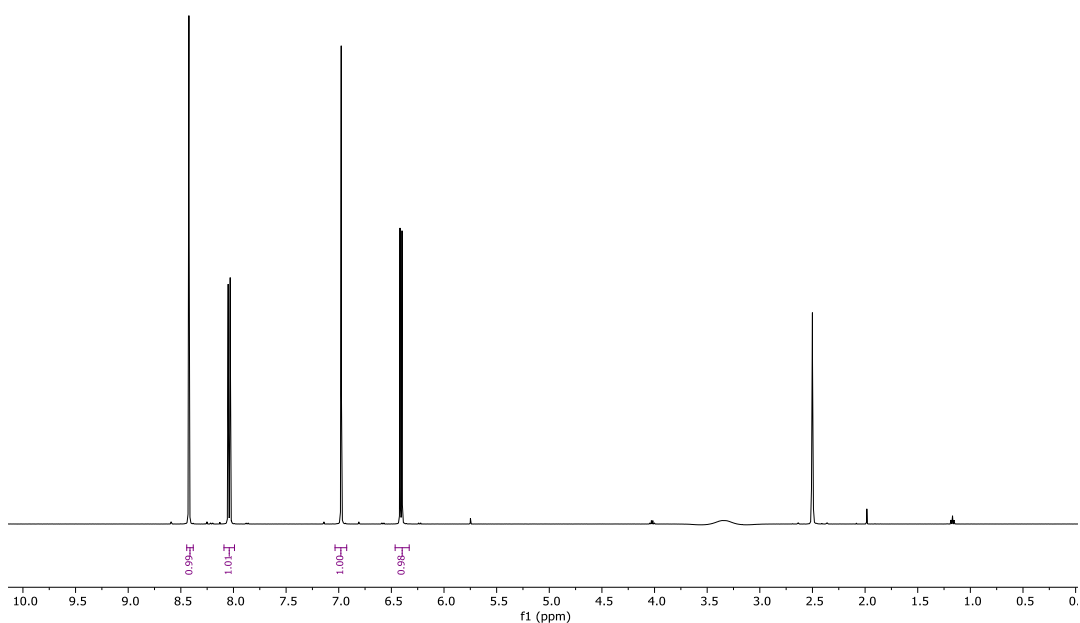


Espectro de RMN- H¹ del compuesto 8-nitro Umbeliferona (IIIa). (500 MHz, DMSO)

[Mass Spectrum]
 Data : Dr-Jimenez-Manuel-040 Date : 11-Feb-2019 19:09
 Sample: 228 MJE-RTH-Cu-R4-S1 Jeol SX102R
 Note : Operadores Carmen Garcia Javier Perez
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
 RT : 0.24 min Scan# : (6,10)
 BP : m/z 207.0000 Int. : 165.37
 Output m/z range : 0.0000 to 238.5757 Cut Level : 0.00 %

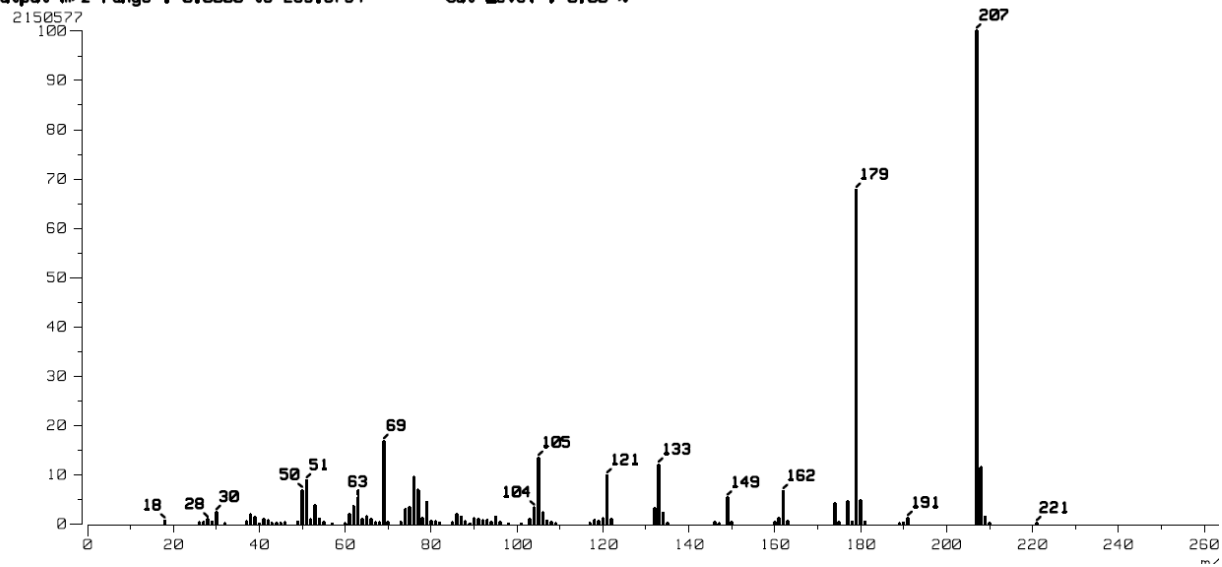


Espectro de masas del compuesto 8-nitro umbeliferona (IIIa).

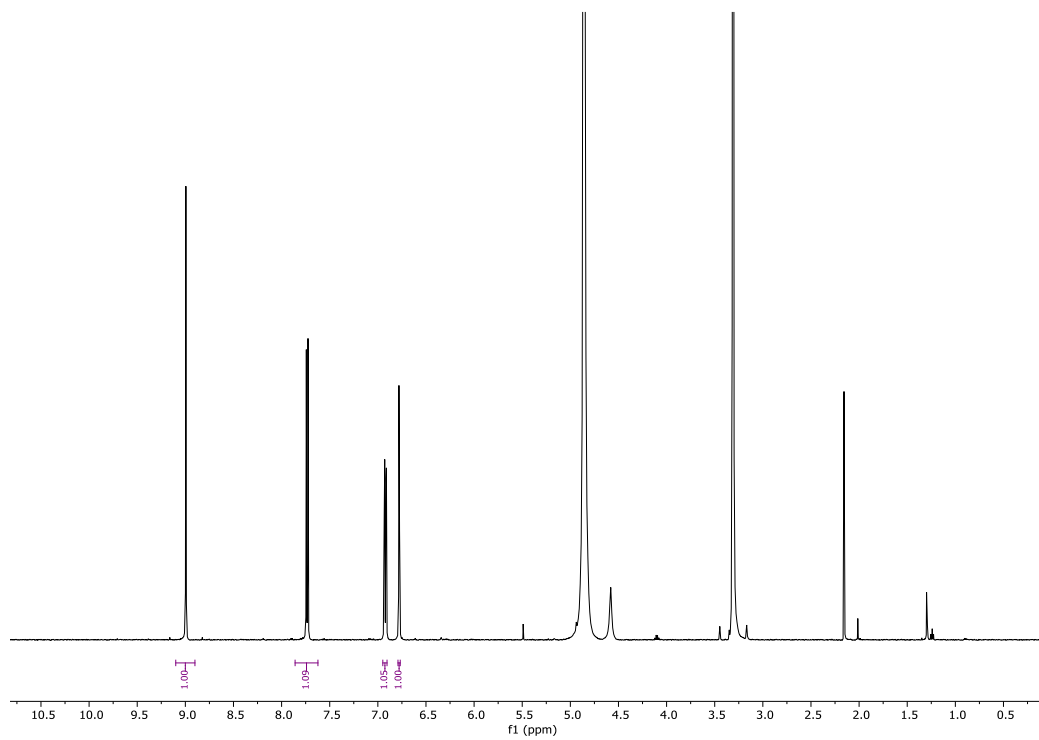


Espectro de RMN- H¹ del compuesto 6-nitro Umbeliferona (IIIb). (500 MHz, DMSO)

Data : Dr-Jimenez-Manuel-041 Date : 11-Feb-2019 19:12
 Sample: 229 MJE-RTH-Cu-R3-F1 Jeol SX102A
 Note : Operadores Carmen Garcia Javier Perez
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
 RT : 0.41 min Scan# : (11,16)
 BP : m/z 207.0000 Int. : 205.10
 Output m/z range : 0.0000 to 265.8754 Cut Level : 0.00 %

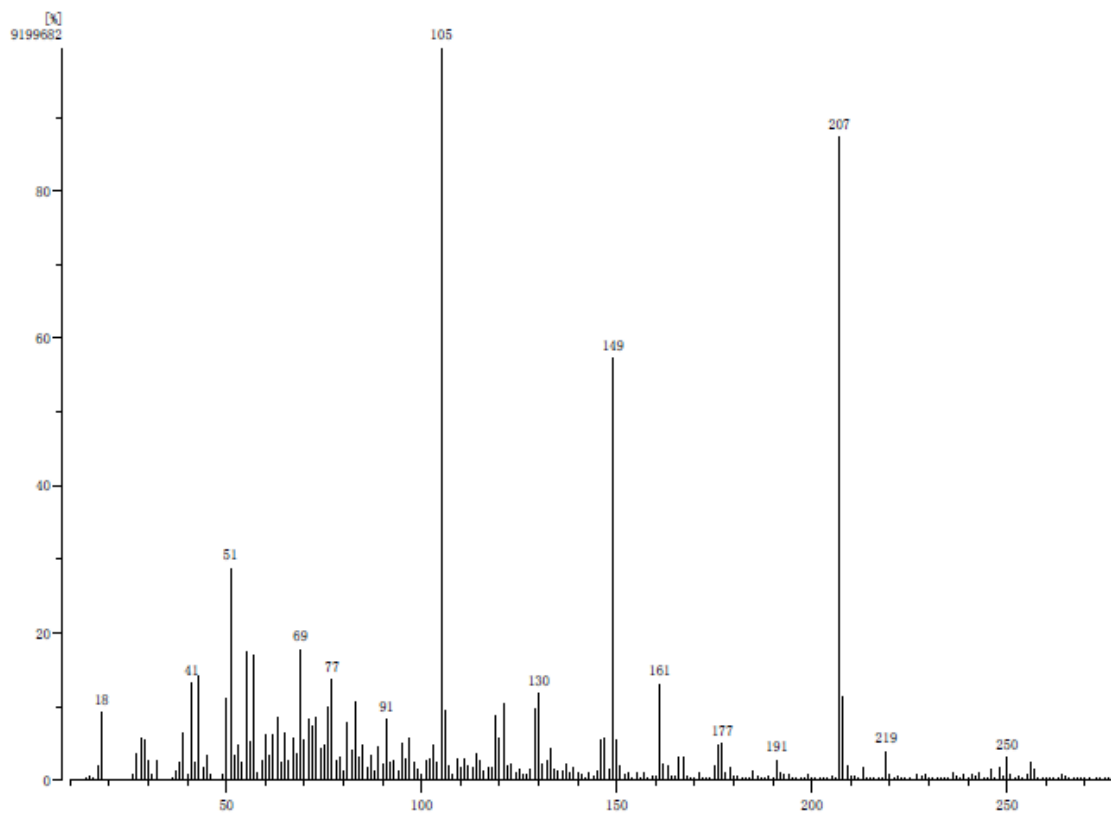


Espectro de masas del compuesto 6-nitro umbeliferona (IIIb).



Espectro de RMN- H¹ del compuesto 3-nitro Umbeliferona (**IIIc**). (500 MHz, DMSO)

[Mass Spectrum]
Data: Dr. Jimenez Manuel-021 Date: 09-Aug-2019 17:00
Instrument: MSStation
Sample: 1135 MJE-RTH-NR-R0-53
Note: Operadores: Carmen Garcia Javier Perez
Inlet: Direct Ion Mode: EI+
Spectrum Type: Normal Ion [MF-Linear]
RT: 0.34 min Scan#: (12,10) Temp: 3276.7 deg.C
BP: m/z 105 Int.: 882.74 (9256144)
Output m/z range: 10 to 280 Out Level: 0.00 %



Espectro de masas del compuesto 3-nitro umbeliferona (IIIc).