



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**TRANSFORMACIONES QUÍMICAS Y
BIOTRANSFORMACIÓN CON BRÓCOLI (*Brassica
oleracea* variedad *italic*) DEL ACETATO DE MATURINA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

ALAN GARCÍA ACEVEDO



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Dr. Manuel Jiménez Estrada

VOCAL: M. EN C. Blas Flores Pérez

SECRETARIO: Dr. Arturo Navarro Ocaña

1er. SUPLENTE: M. EN C. Martha Menes Arzate

2° SUPLENTE: Dr. Jorge Arturo Aburto Anell

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES, LABORATORIO 2-10
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Manuel Jiménez Estrada

SUSTENTANTE:

ALAN GARCIA ACEVEDO

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Manuel Jiménez Estrada, por su asesoría y apoyo brindado en la realización de este proyecto.

A los miembros del jurado por tiempo en la revisión de este trabajo y sus comentarios para contribuir en la mejora de este trabajo.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología así como al Sistema Nacional de Investigadores por el estímulo económico con el número de expediente 828.

Le doy gracias a mis padres por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado y sobre todo por darme la oportunidad de tener una excelente educación a lo largo de mi vida. Por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

ÍNDICE

1.0	Introducción	1
2.0	Antecedentes	2
2.1	Química verde	2
2.2	Uso de plantas en síntesis orgánica	4
2.3	Brócoli, agua de coco y hoja de maíz como catalizadores	7
2.4	<i>Psacalium peltatum</i> como fuente de acetato de maturina	10
2.5	Acetato de maturina	13
2.6	Actividad antioxidante	13
2.6.1	Método de reducción del radical DPPH	14
2.6.2	Método de TBARS	15
3.0	Justificación	16
4.0	Objetivos	17
4.1	Objetivo general	17
4.2	Objetivos particulares	17
5.0	Metodología	18
5.1	Materiales, reactivos y equipo	19
5.2	Material vegetal	20
5.3	Obtención del extracto hexánico	21
5.4	Obtención del acetato de maturina por cromatografía en columna	21
5.5	Modificaciones químicas del acetato de maturina	23
5.5.1	Transformaciones químicas	23
5.5.1.1	Reacción con hidroxilamina hidrociorada ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$)	23
5.5.1.2	Reducción con boro-hidruro de sodio (NaBH_4)	24
5.5.1.3	Reducción con hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4) en THF	24
5.5.1.4	Saponificación con bicarbonato de sodio (NaHCO_3)	25
5.5.1.5	Oxidación	25
5.5.2	Biotransformaciones	26
5.5.2.1	Biotransformación con agua de coco	26
5.5.2.2	Biotransformación con brócoli	26
5.5.2.3	Biotransformación con hoja de maíz	27
5.6	Actividad antioxidante y citotóxica de los compuestos obtenidos	28
6.0	Resultados y Análisis	31
7.0	Conclusiones	46
8.0	Perspectivas	47
9.0	Referencias	48
10.0	Anexos	54

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Biorreducción de aldehídos con vegetales con 99% de rendimiento	6
Tabla 2. Resumen del fraccionamiento del extracto hexánico por CC con alúmina para la obtención de acetato de maturina	21
Tabla 3. Resumen del fraccionamiento del extracto hexánico por CC con gel sílice para la obtención de acetato de maturina	22
Tabla 4. Resultados de extracción de acetato de maturina por CC	31
Tabla 5. Rendimiento de transformaciones químicas de acetato de maturina	41
Tabla 6. Resumen de rendimientos de transformaciones de acetato de maturina con un producto similar (saponificación química, biotransformación)	42
Tabla 7. Resultados de actividad antioxidante (DPPH)	42
Tabla 8. Resultados de actividad antioxidante (TBARS)	43
Tabla 9. Resultados de actividad citotóxica	44
Figura 1. Reducción de cetona proquiral	5
Figura 2. Hidrólisis y reducción de 1-acetoxi-2-metilciclohexeno	5
Figura 3. Transferencia de hidruro de coenzima a grupo carbonilo	8
Figura 4. Ejemplificación de acción de la enzima pectin metil esterasa (PME) sobre pectina metoxilada	9
Figura 5. Planta de <i>Psacalium peltatum</i>	11
Figura 6. Metabolitos secundarios aislados de <i>P. decompositum</i> y de <i>P. peltatum</i>	12
Figura 7. Acetato de maturina	13
Figura 8. Molécula de DPPH·	14
Figura 9. Ejemplo de cromatoplaqueta de CCP para identificar el acetato de maturina en cromatografía en columna flash del extracto hexánico	32
Figura 10. Comatograma de HPLC del acetato de maturina	32
Figura 11. Estructura de la molécula de acetato de maturina	34
Figura 12. Espectro de HPLC del compuesto rojo	35
Figura 13. Producto de reacción con $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$	36
Figura 14. Reducción de acetato de maturina con NaBH_4	37
Figura 15. Reacción de saponificación de acetato de maturina	38
Figura 16. Posible estructura del dímero de maturina	39
Figura 17. Biotransformación de acetato de maturina	40
Figura 18. Ejemplo de cromatoplaqueta de reacción con brócoli	40
Figura 19. Maturina	41

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1. RMN ^{-1}H del acetato de maturina	55
Espectro 2. RMN ^{-13}C del acetato de maturina	56
Espectro 3. RMN experimento DEPT del acetato de maturina	57
Espectro 4. RMN experimento COSY del acetato de maturina	58
Espectro 5. RMN experimento HETCOR del acetato de maturina	59
Espectro 6. RMN ^{-1}H del compuesto rojo	60
Espectro 7. RMN ^{-13}C del compuesto rojo	61
Espectro 8. RMN ^{-1}H de la oxima de acetato de maturina	62
Espectro 9. Espectro de masas (IE) de la oxima de acetato de maturina	63
Espectro 10. RMN ^{-13}C de la oxima de acetato de maturina	64
Espectro 11. RMN experimento COSY de la oxima de acetato de maturina.	65
Espectro 12. RMN experimento HMBC de la oxima de acetato de maturina	66
Espectro 13. RMN ^{-1}H producto de oxidación del acetato de maturina con O_2	67
Espectro 14. IR oxidación del acetato de maturina con O_2	68
Espectro 15. RMN ^{-1}H producto de reducción con NaBH_4 1:0.25	69
Espectro 16. Espectro de masas (IE) del producto de reducción con NaBH_4 1:0.25	70
Espectro 17. RMN ^{-1}H producto de saponificación con NaHCO_3	71
Espectro 18. RMN ^{-13}C producto de saponificación con NaHCO_3	72
Espectro 17. RMN ^{-1}H producto de reacción con brócoli	73
Espectro 18. RMN ^{-13}C producto de reacción con brócoli	74
Espectro 19. Espectro de masas (IE) del producto de reacción con brócoli	75

Abreviaturas

AM:	Acetato de maturina
RMN:	Resonancia magnética nuclear
IR:	Infrarrojo
EM:	Espectrometría de masas
CC:	Cromatografía en columna
CCF:	Cromatografía en capa fina
CPP:	Cromatografía en placa preparativa
UV:	Ultravioleta
THF:	Tetrahidrofurano
mL:	mililitros
μ M:	micromolar
Conc:	concentración
%:	porcentaje
min:	minuto
h:	hora
g:	gramo
OMe:	Metoxilo (O-CH ₃)
OAc:	Acetato (O-CO-CH ₃)
IE:	Impacto electrónico
Hx:	Hexano
AcOEt:	Acetato de etilo
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DPPH:	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
TBARS:	Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico.
NaBH ₄ :	Borohidruro de sodio
LiAlH ₄ :	Hidruro de litio y aluminio
FeSO ₄ :	Sulfato de hierro (II)
NaHCO ₃ :	Bicarbonato de sodio
PBS:	Solución amortiguadora de fosfatos

1.0 Introducción

En la actualidad, a fin de evitar la formación de residuos tóxicos que contaminan el medio ambiente, se han desarrollado nuevas metodologías tomando en consideración el concepto de química verde. Éstas usando como catalizadores partes de plantas, para biotransformaciones como reducción de cetonas, lactonización enzimática, hidrólisis de ésteres, adición de cianuro de hidrógeno, reacciones de hidroxilación y reacciones de oxidación, pueden ser aplicadas en remediación de contaminación orgánica.

Este tipo de biotransformaciones son de gran importancia en la industria ya que se obtienen compuestos con cierta funcionalidad como farmacéuticos, agroquímicos y productos naturales. Además de que son una alternativa a las biocatálisis que emplean levaduras y cultivos celulares, ya que estas son llevadas a cabo en un medio con una fuente de carbono para su desarrollo, en comparación con el uso de partes de plantas en donde solo se utiliza un medio acuoso. Esto lleva a tener un método más económico y amigable con el ambiente.

Por otra parte se ha demostrado que el acetato de maturina, un sesquiterpeno del tipo furanoeremofilano constituyente de las raíces de *Psacalium peltatum*, que forma parte del complejo matarique, presenta actividad antiinflamatoria, posible actividad antioxidante (N. Rojano, 2005). Además de que se ha encontrado que el acetato de maturina induce la producción de células del sistema inmune (Juárez, 2013).

Para continuar con nuestros estudios de este tipo de compuestos decidimos obtener y modificar químicamente al acetato de maturina, dado los diferentes grupos funcionales que tiene este compuesto natural principalmente en el grupo aldehído, ya que generalmente este tipo de grupos funcionales le proporcionan cierta actividad antioxidante. De este modo determinar si hay un cambio en este tipo de actividad de los derivados obtenidos de la molécula.

2.0 Antecedentes

2.1 Química Verde

El incremento de los problemas ambientales; cambio climático, contaminación del aire, suelo y agua; ha aumentado en los últimos años afectando la vida en el planeta. Gran parte de esta contaminación se genera por procesos químicos, uso indiscriminado de recursos naturales, manejo inadecuado de residuos industriales, agrícolas y domésticos (Pájaro, 2011). Por esta razón, en la industria química ha surgido el concepto de “química verde”, enfocada principalmente en reducir la producción o uso de compuestos peligrosos para el medio ambiente, para lograrlo este tipo de química se basa en la invención, diseño y aplicación de productos químicos y procesos para reducir o eliminar el uso o generación de sustancias peligrosas tanto para el medio ambiente como para el ser humano. Su aplicación se ha incrementado desde 1991 y actualmente plantea 12 principios (Tundo, 2000):

1. **Prevenir la creación de residuos.** Resulta más útil evitar o reducir la producción de desechos que tratarlos o limpiarlos tras su formación.
2. **Maximizar la economía atómica.** Los métodos sintéticos deben maximizar la incorporación de cada material utilizado en el proceso
3. **Realizar síntesis química menos peligrosa.** Elaborar procesos que generen la mínima toxicidad e impacto ambiental.
4. **Diseñar productos y compuestos menos peligrosos.** Los productos químicos se deben diseñar con una toxicidad mínima.
5. **Utilizar disolventes y condiciones seguras de reacción.** Las sustancias auxiliares de los procesos químicos (disolventes, disoluciones amortiguadoras, aditivos de separación, entre otros), han de ser inocuos y su uso debe reducir al mínimo.
6. **Diseñar para la eficiencia energética.** Debe minimizarse los requerimientos energéticos para los procesos químicos, intentando llevar a cabo los métodos de síntesis a temperatura y presión ambiente.

7. **Utilizar materias primas renovables.** Los materiales de partida utilizados deben proceder de fuentes renovables, en la medida en que sea económica y técnicamente factibles.
8. **Evitar derivados químicos.** La síntesis debe diseñarse con el uso mínimo de grupos protectores para evitar pasos extras y reducir los desechos.
9. **Utilizar catalizadores.** Debe emplearse catalizadores lo más selectivos y reutilizables posibles.
10. **Diseñar productos fácilmente degradables al final de su vida útil.** Los productos químicos han de ser diseñados de tal manera que al culminar su función no persistan en el ambiente y puedan degradarse a derivados inertes o biodegradables.
11. **Monitorear los procesos químicos en tiempo real para evitar la contaminación.** Deben crearse sistemas de control y monitorización continuos para prevenir la producción de sustancias peligrosas durante los procesos.
12. **Prevenir accidentes.** Diseñar los procesos químicos, utilizando métodos y sustancias que reduzcan los accidentes (emisiones, explosiones, incendios, entre otros) y minimizar los daños cuando se produzca un accidente.

Para lograr una reducción de emisión de sustancias contaminantes se han empleado distintas herramientas, tratando de cumplir con los principios antes mencionados. Algunas rutas alternativas, para la síntesis de compuestos, incorporan procesos naturales como la síntesis fotoquímica y biomimética; pero en general se utilizan materias primas inocuas y renovables bajo condiciones de reacción alternas, empleando solventes inofensivos para la salud y el ambiente, además de la utilización de catalizadores que pueden ser fácilmente recuperados y reutilizados. De este modo, se incrementa la selectividad de las reacciones, disminuyendo o suprimiendo los residuos y las emisiones contaminantes. La selección adecuada de las herramientas de síntesis es fundamental y determinante para la selectividad, reactividad química e incremento de la eficacia. Actualmente, más del 80% de las sustancias químicas son producidas usando catálisis. Sin embargo, los catalizadores y disolventes empleados en

ella, pueden ser tóxicos, carcinógenos y contaminantes ambientales (Tundo, 2000; Cordell, 2007).

Las reacciones químicas que utiliza algún organismo o derivado de éste, se ha desarrollado en los últimos años, principalmente el uso de enzimas (hidrolasas, oxidoreductasas, transferasas liasas, isomerasas extraídos principalmente de microorganismos eucariotas) se ha explotado en la industria farmacéutica con el fin de incorporar centros quirales en algunos fármacos (Cordell, 2007). Algunos han utilizado microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) que mediante su metabolismo transforman los compuestos en los productos deseados, no obstante existen algunos problemas con este tipo de biocatalizadores; como pueden ser la extracción (en el caso de enzimas), el aislamiento (en el caso de microorganismo), así como la fuente de energía y condiciones de crecimiento, en el caso de microorganismos, para que puedan llevar a cabo la reacción; debido a estas necesidades se ha investigado el uso de plantas como biocatalizadores.

2.2 Uso de plantas en síntesis orgánica

En los últimos años el uso de plantas, de sus cultivos celulares o enzimas derivadas, como biocatalizadores ha recibido gran atención en la industria debido a su potencial en reacciones enzimáticas, bajo costo, gran versatilidad y eficiencia. Adicionalmente con los aspectos químicos que se tiene como quimioselectividad, regioselectividad y enantioselectividad. El uso de plantas como biocatalizadores tienen grandes ventajas; hay una gran colección de plantas diferentes taxonómicamente y están disponibles a un costo bajo, el producto se separa fácilmente del medio de reacción (mediante filtración, centrifugación, etc.) y adicionalmente es una reacción que generalmente se lleva en medio acuoso, con la ventaja de que los residuos generados de esta son biodegradables (Salvano, 2011).

Este tipo de biotransformaciones, utilizando cultivos celulares de plantas, se enfocan en compuestos aromáticos, cumarinas, alcaloides, terpenoides y esteroides. En el caso de enzimas derivadas de plantas se utilizan en biotransformaciones de lípidos.

En el caso de uso de las partes de plantas, principalmente se utilizan en transformación de compuestos con grupos carbonilo (reacción de oxidoreducción) e hidrólisis de compuestos esterificados (Cordell, 2007).

La bioreducción de aldehídos y cetonas aromáticos, con el uso de plantas, a sus correspondientes alcoholes son de gran importancia en la industria farmacéutica, de sabores y fragancias cosméticas principalmente. Generalmente para la oxidoreducción de estos compuestos utilizan catalizadores químicos como metales pesados y sus respectivos hidruros. Para reducir el uso de este tipo de compuestos se han estudiado varias metodologías con el uso de plantas o frutos de éstas, como por ejemplo el uso de zanahoria (*Daucus carota*, raíz) en la reducción de cetonas proquirales:

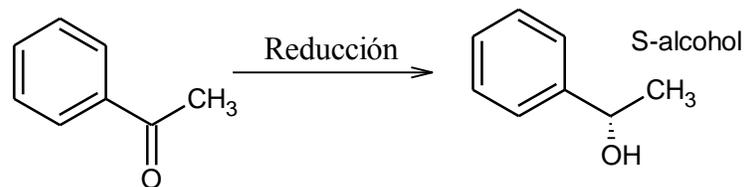


Figura 1. Reducción de cetona proquiral. Renato Bruni, et al, Tetrahedron letters 2002.

Este tipo de reacción también se obtiene con tallo de hinojo (*foeniculum vulgare*), fruto de calabacín (*cucúrbita pepo*) y en algunos casos cuando se puede presentar una hidrólisis previa antes de la reacción de reducción como en el caso de 1-acetoxi-2-metilciclohexeno:

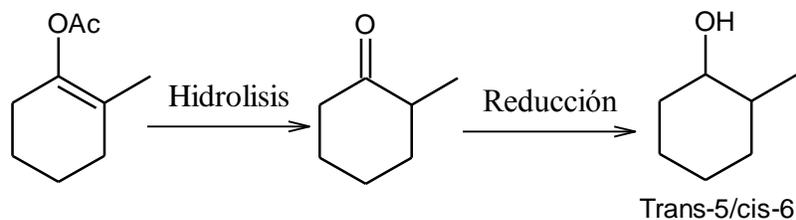
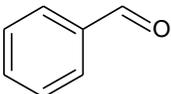
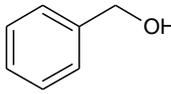
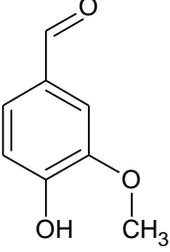
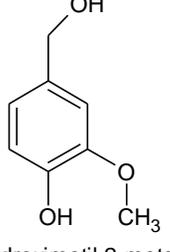
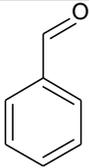
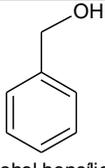
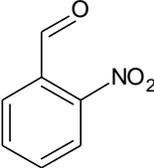
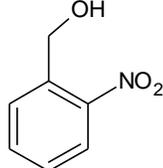
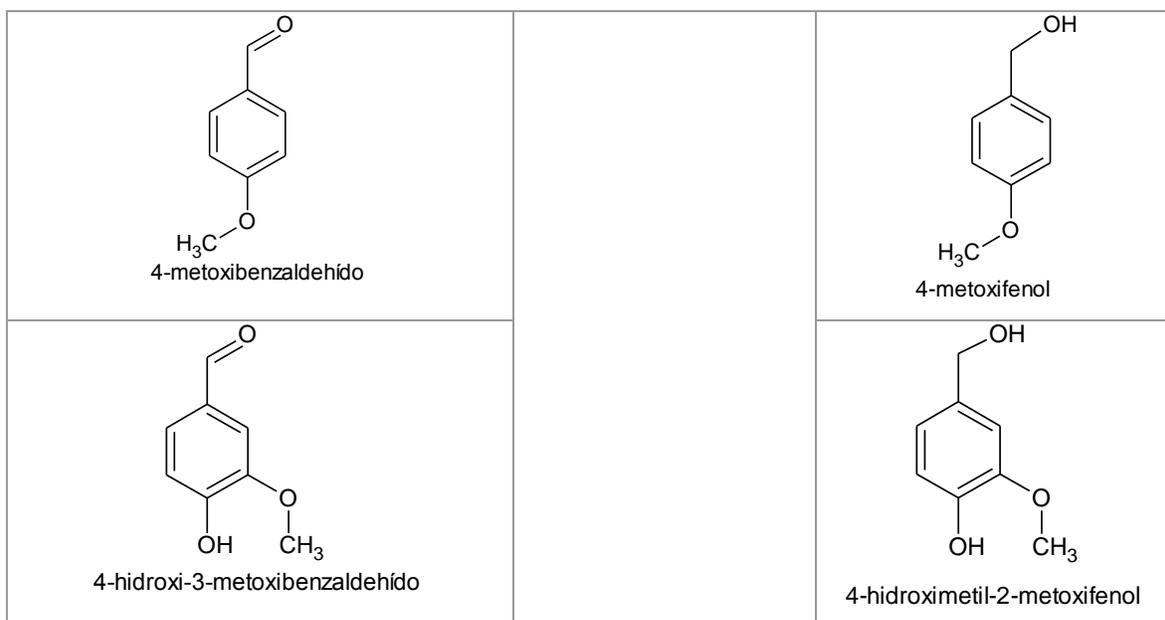


Figura 2. Hidrólisis y reducción de 1-acetoxi-2-metilciclohexeno (cetona proquiral). Renato Bruni, et al, Tetrahedron letters 2002.

Recientemente (Suarez, 2010), se ha estudiado la bioreducción de grupo carbonilo en aldehídos (principalmente aromáticos) de metabolitos secundarios, debido a que algunos alcoholes son considerados como la llave para la síntesis de compuestos aromáticos para la industria de fragancia cosmética y de saborizantes, como se puede observar en la tabla 1:

Tabla 1: Bioreducción de aldehídos con vegetales 99% de rendimiento (Suarez-Franco, 2010).

Reactivo	Vegetales utilizados (pH 7, 25 °C)	Producto
	Broccoli (<i>Brassica oleracea italica</i>), coliflor (<i>Brassica oleracea var. Bptrytis</i>), remolacha (<i>Beta vulgaris</i>) y espinaca (<i>Spinacia oleraceae</i>)	
 Vainillina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído)		 4-hidroximetil-2-metoxifenol
 Benzaldehído		 Alcohol bencilico
 2-nitrobenzaldehído		 2-nitrofenol



Generalmente para la reducción de este tipo de compuestos (tabla 1), se utilizan reactivos que podrían contaminar el ambiente, como metales o sus respectivos hidruros, adicionalmente que no siempre se obtienen los productos esperados. En este caso al utilizar partes de plantas se observa una de las ventajas de este tipo de reacción, la quimioselectividad, en aldehídos aromáticos sustituidos (como grupos nitro y heterociclos) con un rendimiento de 99% y con una separación simple del medio de reacción (por filtración). En general el uso de plantas o partes de éstas, tienen mayores ventajas en comparación con los métodos químicos.

2.3 Brócoli (*Brassica oleracea* var. *italic*), agua de coco (*Cocos nucifera* L.) y hoja de maíz (*Zea mayz*) como catalizadores.

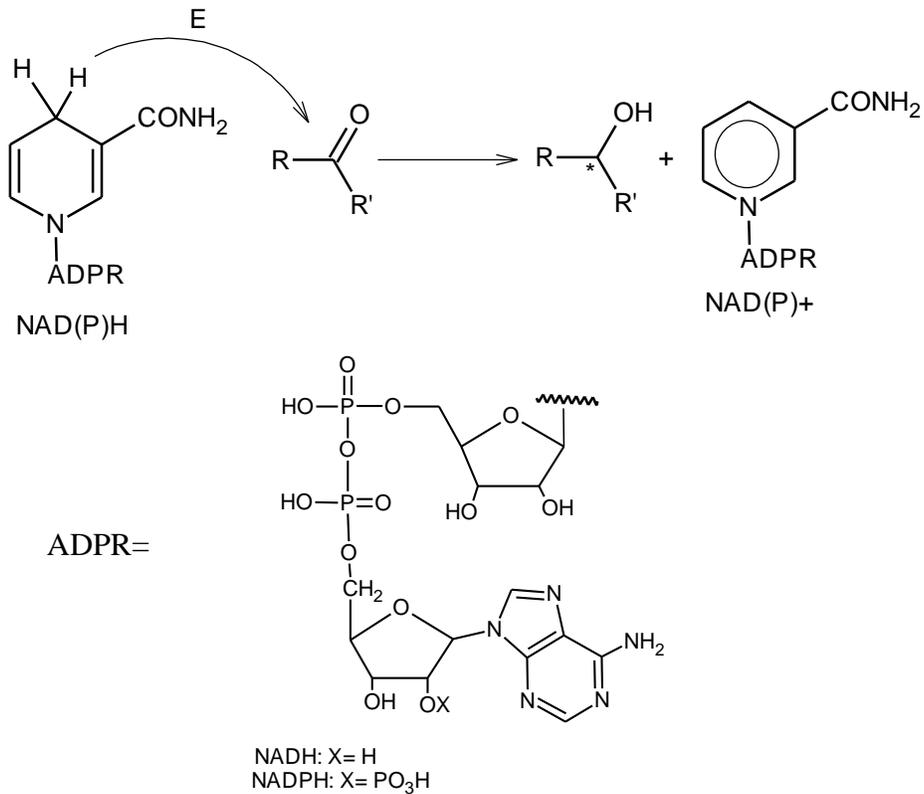
➤ Brocoli

En estudios recientes se ha encontrado que la reducción de aldehídos aromáticos llevados a cabo con homogenados de brócoli (*B. oleracea* var. *Italica*), coliflor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), remolacha (*Beta vulgaris* var. *Cicla*) y espinaca (*Spinacia oleracea*) resultan en mejores rendimientos comparados con la síntesis química de los mismos, además también se ha demostrado mayor rendimiento en la reducción de cetonas proquirales comparado con los demás vegetales. Al utilizar

brócoli como tal se encuentra actividad enzimática de distinta naturaleza, de las cuales las más importantes se podrían encontrar las siguientes (Matsuda, 2009):

- **Reductasas NAD⁺/NADH o NAD(P)H/NAD(P)⁺ dependientes:**

NAD(P)⁺/H (formada por dos nucleótidos unidos por sus grupos fosfato, adenina y nicotidamina) trabaja como coenzima en la cadena de transferencia de electrones aceptando dos electrones y un protón del sustrato, en la producción de energía de todas las células. Las enzimas que catalizan la reducción del grupo carbonilo requieren coenzimas las cuales actúan cediendo un protón (hidruro) al grupo carbonilo de acuerdo al siguiente mecanismo:



E = Cualquier enzima

Figura 3. Transferencia de hidruro de coenzima a un grupo carbonilo.

Para que este tipo de enzimas junto con las coenzimas correspondientes lleven a cabo la reacción debe de haber una fuente de hidrogeno para actuar de la siguiente manera:

- a) Coenzima y sustrato se unen a la enzima
- b) El sustrato es reducido mientras que la coenzima es oxidada
- c) El producto y la coenzima son liberados de la enzima

Estas coenzimas son muy importantes ya que participan en importantes reacciones en el metabolismo de organismos vivos (anabolismo y catabolismo) o en reacciones de protección del organismo (sustancias reactivas del oxígeno) (Elving, 1982).

- **Actividades enzimáticas adicionales.**

Existen infinidad de enzimas que pudieran actuar en el medio de reacción, debido a que son células no diferenciadas y hay gran número de enzimas, algunas que pueden tener gran relevancia son:

Hidrolasas. Ya que pueden actuar catalizando la hidrolisis de algún grupo funcional como el grupo metoxilo o el grupo acetato, correspondientes al acetato de matorina. Una de estas enzimas es la pectin metil esterasa (PME) que actúa en la degradación de la pectina de vegetales y frutos, la cual es un componente importante en la pared celular compuesta principalmente de ácido galacturónico y que está metoxilado para darle funcionalidad, la importancia de esta enzima radica en que hidroliza el enlace éter liberando metanol al medio y dejando a la pectina sin la función correspondiente, mantener la estructura celular (Christiaens, 2011).

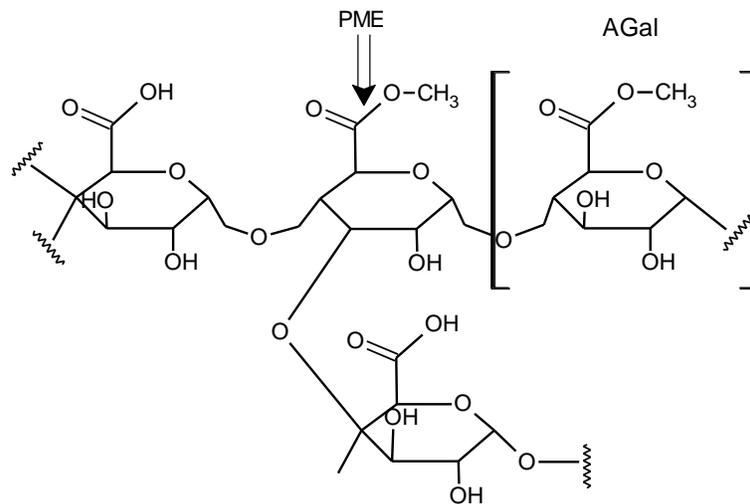


Figura 4. Ejemplo de la acción de la enzima pectin metil estarasa (PME) sobre pectina metoxilada.

Acetilesterasa. Se ha encontrado, en la familia *Brassica oleraceae* (H.M. Schwards 1964), que podría tener algún tipo de acción importante en la molécula de estudio, principalmente en el grupo acetato. Este tipo de actividad enzimática es general en los sistemas vegetales y pueden estar presentes en cualquier planta.

- **Agua de coco**

Debido a que el coco es esencialmente una semilla, contiene una gran cantidad de enzimas, requeridas para su desarrollo, presentes en el agua de coco. De las cuales se ha encontrado actividad enzimática de interés (Jean W., 2009):

- Catalasa y peroxidasa
- Deshidrogenasa
- Diastasa

Estas son enzimas con actividad oxidoreductora (diastasa y deshidrogenasa) similar a las reductasas cediendo electrones y aceptando hidruros y podrían tener algún tipo de acción con el compuesto en estudio, al igual que con el brócoli.

- **Hoja de maíz**

En el caso de hojas de maíz no se ha reportado como tal actividad enzimática oxidoreductora pero se pretende saber si existe este tipo de actividad en el compuesto de estudio debido a que al ser parte de una planta podría tener actividad de interés (principalmente reductasas).

2.4 *Psacalium peltatum* como fuente de acetato de maturina

P. peltatum es una planta medicinal que forma parte del complejo conocido como matarique, el cual está constituido por *Psacalium peltatum*, *Psacalium palmeri*, *Psacalium sinuatum*, *Psacalium decompositum*, *Psacalium radulifolium* y *Acourtia thurberi* (Bye R., 1995; Garduño, Ramírez, 2001). Este complejo es empleado como remedio para la diabetes y padecimientos del riñón.

P. peltatum (fig. 5) pertenece a la familia Asteraceae, es una hierba perenne que crece en los bosques de encino y juníperos en la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental y el centro de México. Se utiliza principalmente la raíz para la preparación de remedios y preparado en forma de infusiones para el tratamiento de diabetes (con *Tecomastans* L.), padecimientos de riñón (con *Arctosta phytospungenes*, *Tecomastans*) y dolor de cabeza (con *Tecomastans*). Además la maceración alcohólica de las raíces se utiliza en el tratamiento del reumatismo (Bye, 1995; Garduño, Ramírez, 2001).



Figura 5. Planta de *Psacalium peltatum*.

Se han llevado a cabo diversos estudios de las especies del complejo matarique, tanto en composición química como en actividad biológica. Encontrado compuestos, de gran interés (fig. 6) como el cacalol (1), la cacalona (2), el éter metílico del dehidrocacalol (3), la maturinina (4), la maturina (5a), la maturinona (6) y maturona (7). Que son compuestos de naturaleza sesquiterpenica y un núcleo furanoemolfilano en su estructura base. Entre otros compuestos de estructura similar. El cacalol (1) es uno de los compuestos más estudiados debido a la actividad biológica que presenta (Jiménez y col., 1992), como: antioxidante, neuroprotector, antiinflamatorio, hipoglucemiante, antimicrobiano, antihistamínico, antiproliferativo y quimiopreventivo en células de cáncer de seno, fitotóxico, fungicida y un posible potente biopesticida.

Del mismo modo los compuestos aislados de las especies del complejo matarique presentan una actividad similar al cacalol.

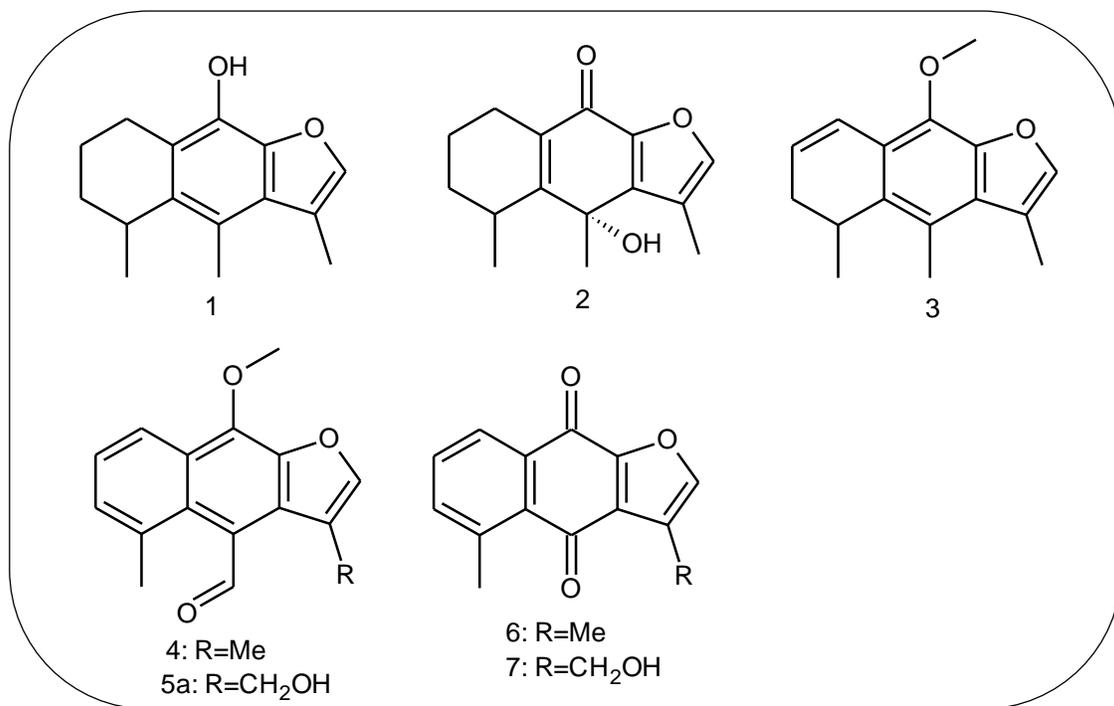


Figura 6. Metabolitos secundarios aislados de *P. decompositum* y de *P. peltatum* (4-7).

Adicionalmente se ha aislado el acetato de maturina de *P. peltatum* que es la molécula de interés.

2.5 Acetato de maturina

El acetato de maturina, obtenido de las raíces de *P. peltatum* (Hernández-Tejeda, 1999), es un sesquiterpeno del tipo furanoeremofilano (Fig. 7) que presenta actividad antiinflamatoria (disminución de edema en modelo TPA), además incrementa la disponibilidad de macrófagos y esplenocitos de ratón. Induce actividad lisosomal, pinocitosis y actividad de las células NK (células inmunitarias). Además de que puede ser un auxiliar en la restauración de las funciones del sistema inmune en enfermedades inmunosupresoras (Juárez-Vázquez, Alonso-Castro, et al, 2013).

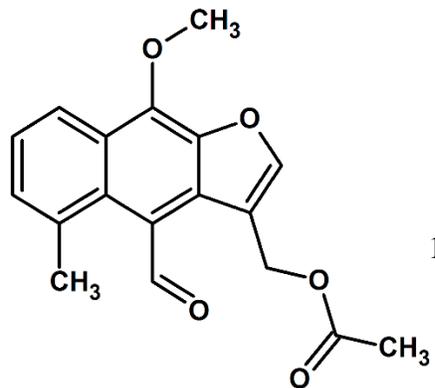


Figura 7: Acetato de maturina

Basados en que tiene una actividad antiinflamatoria (en modelo TPA). Posiblemente tenga una actividad antioxidante, debido a que la acción captadora de radicales libres (ERO) generados en el proceso de inflamación, es un posible mecanismo por el cual las sustancias pueden tener un efecto antiinflamatorio (Franco O., 2013). Al modificar algún grupo funcional de la molécula posiblemente esta actividad (antioxidante) pueda tener un cambio significativo. Adicionalmente se evaluará el efecto citotóxico pues este tipo de compuestos tienen actividades biológicas importantes.

2.6 Actividad antioxidante

Los antioxidantes son compuestos que retardan los procesos de oxidación, que son efectuados por las especies reactivas del oxígeno (ERO) y las especies reactivas del nitrógeno (ERN) principalmente. Existen varios mecanismos para retardar la oxidación como: reducción de radicales libres, quelación de iones oxidantes (metálicos) y liberación de moléculas antioxidantes por expresión genética.

Los antioxidantes tienen una amplia aplicación en medicina, cosmética y en la industria alimentaria como conservadores principalmente.

Existen diferentes métodos para determinar la actividad antioxidante de un compuesto, estos nos dan información acerca del mecanismo de acción del compuesto. Dentro de estos métodos se encuentran el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) y el método de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) realizadas en este trabajo.

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

Es un método espectrofotométrico basado en la capacidad reductiva de un compuesto en contra del radical DPPH \cdot (Huang, et al, 2005). Este radical de color púrpura, presenta un máximo de absorción a 515 nm UV-visible, al adicionar un antioxidante capaz de reducir el radical, su color cambia a amarillo (Molyneux, 2004).

El porcentaje de DPPH \cdot remanente es proporcional a la actividad antioxidante. Es un método rápido y determina la capacidad reductora de radicales libre de compuestos puros o mezcla de compuestos.

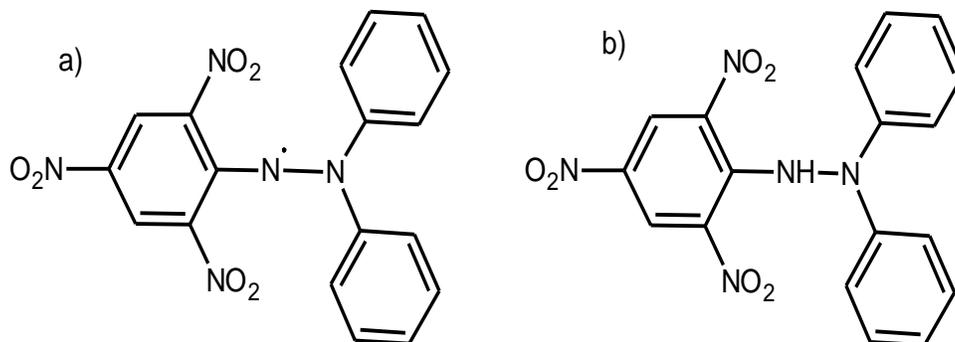


Figura 8. a) 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, b) 2,2-difenil-1-picrilhidrazina.

2.6.2 Método de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS).

El estrés oxidativo provoca la peroxidación de lípidos, resultado de la interacción de especies reactivas de oxígeno con lípidos poliinsaturados en membranas celulares. El ensayo TBARS cuantifica el estrés oxidativo midiendo el daño peroxidativo de lípidos, que ocurre con la generación de radicales libres. Uno de los principales productos de la lipoperoxidación es el malonaldehído, el cual reacciona con el ácido tiobarbitúrico, generando un cromóforo que al ser calentado a pH ácido tiene un color rosa que puede ser medido espectrofotométricamente a 535 nm (Esterbauer y Cheeseman, 1990).

3.0 Justificación

Debido al incremento de la contaminación química en el medio ambiente y a la actividad biológica que presenta el acetato de maturina (antiinflamatoria principalmente) se pretende modificar algún grupo funcional de esta molécula mediante el uso de nuevas metodologías “amigables” con el medio ambiente, una de estas es el uso de sistemas vegetales (plantas o frutos de éstas) en la biotransformación del compuesto. Enfocando el estudio en la biotransformación del grupo aldehído, ya que se ha demostrado que la reducción de grupos carbonilo mediante el uso de plantas, resulta más eficiente en comparación con una reducción utilizando compuestos químicos. De este modo probar si hay un cambio en la actividad biológica del producto obtenido comparado con el acetato de maturina. Adicionalmente probar si estos compuestos tienen cierta actividad citotóxica.

4.0 Objetivos

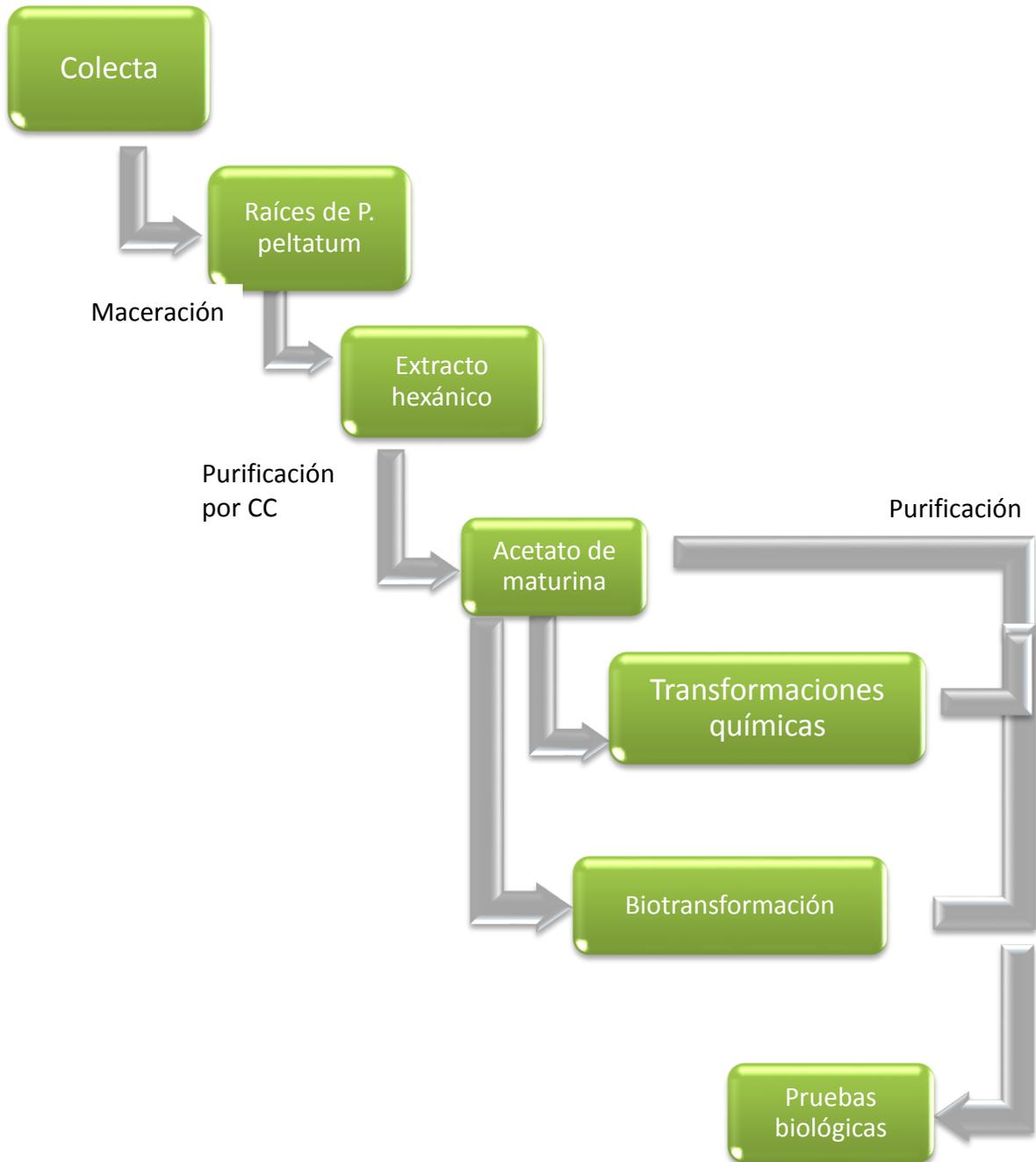
4.1 Objetivo general

Comparar el rendimiento y pureza de los derivados del acetato de matorina por medio de transformación química y biotransformación, determinar si hay un cambio en la actividad biológica del acetato de matorina al modificar algún grupo funcional dentro de la molécula.

4.2 Objetivos particulares

- Obtener el extracto hexánico de las raíces de *P. peltatum*
- Obtener del extracto hexánico el acetato de matorina mediante cromatografías con alúmina y con gel sílice como adsorbentes.
- Determinar la técnica cromatográfica óptima para la obtención del acetato de matorina.
- Realizar las pruebas de actividad antioxidante (DPPH y TBARS) y actividad citotóxica del acetato de matorina.
- Obtener los derivados del acetato de matorina mediante la oxidación, reducción (del aldehído) saponificación (del acetato) y biotransformación con brócoli.
- Determinar el cambio en los grupos funcionales del acetato de matorina mediante los estudios espectroscópicos correspondientes (IR, RMN) y espectrométricos (EM).
- Realizar las mismas pruebas de actividad biológica (DPPH, TBARS, citotoxicidad) de los derivados obtenidos y compararlos con los resultados obtenidos previamente del acetato de matorina.

5.0 Metodología



5.1 Materiales, reactivos y equipos

La cromatografía en columna se realizó: 1) con gel sílice como adsorbente (230-400, M60, 40-65 μm), en columna de vidrio con filtro y presión reducida, 2) abierta con alúmina (óxido de aluminio) como adsorbente en columna de vidrio con filtro.

El monitoreo del fraccionamiento por columna y de las reacciones hechas se realizó con CCF en placas de aluminio recubiertas de gel sílice de 0.20 mm de espesor, 60 (ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄ MACHEREY-NAGEL) con indicador de fluorescencia visualizadas en luz UV con longitud de onda 254 y 356 nm, reveladas por aspersión de una disolución de sulfato sérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N y calentamiento hasta revelado de compuestos. Para la cromatografía preparativa en placa se utilizaron placas de vidrio (20x20 cm) recubiertas de gel sílice 100 (ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄ MACHEREY-NAGEL).

Para el estudio por cromatografía de HPLC se utilizaron las siguientes condiciones: columna C-18 Luna, con un gradiente de ACN (A):H₂O (B), flujo de 0.2 mL/min, iniciando con A:B (30:70), hasta alcanzar A:B (100:0) a los 20 min. Como sistema de detección se empleó un sistema de arreglo de fotodiodos fijado a 254 nm.

Los disolventes utilizados, diclorometano, hexano, acetato de etilo, acetona, etanol se destilaron previamente.

Determinación de las propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Las determinaciones se realizaron en el Instituto de Química, UNAM.

Los puntos de fusión se realizaron en un aparato Fisher-Jones

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

Los espectros de los experimentos de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H) y de carbono (RMN ^{13}C) se realizaron en los equipos Bruker Avance III (400 MHz) y Varian Unity (300 MHz), utilizando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3) y como referencia interna tetrametilsilano (TMS).

Los espectros de masas se obtuvieron por medio de la técnica de impacto electrónico y se registraron en un espectrofotómetro Jeol JMS-AX505 HA (70 eV+).

5.2 Material vegetal

Las raíces de *P. peltatum* se obtuvieron en la comunidad la Estanzuela del municipio de Mineral del Chico, Hidalgo México. La identificación taxonómica de la especie se realizó por Gilda Ortiz Calderon, un ejemplar de *Psacalium peltatum* var. *peltatum*, fue depositado en el herbario MEXU en el Instituto de Biología con número de registro 1138692.

El brócoli (*Brassica oleracea* var. *italic*) utilizado se adquirió en un mercado ubicado en la colonia San Pablo Oztotepec, en la delegación Milpa Alta, D.F.

El agua de coco se obtuvo después de la extracción de cocos comprados previamente en tienda de autoservicio (Walmart)

La hoja de maíz fue facilitada por el Dr. Arturo Navarro Ocaña, almacenada previamente a -4°C .

5.3 Obtención del extracto hexánico

El extracto hexánico se obtuvo de 3 maceraciones (24 h cada una con hexano) usando 4.38 kg de raíces y rizoma de *P. peltatum*, posteriormente el extracto fue llevado a sequedad a presión reducida y temperatura de 40 °C en un rota-evaporador

5.4 Obtención del acetato a de maturina por cromatografía en columna:

Se llevaron a cabo dos metodologías para la obtención del AM, variando la fase estacionaria:

- a) Con presión reducida, utilizando gel sílice en proporción 10:1 con respecto a la muestra a separar.
- b) Abierta, utilizando alúmina en proporción 30:1 con respecto a la muestra a separar.

El procedimiento general es el siguiente: 8 g del extracto hexánico de raíz/rizoma de *P. peltatum*, se disolvió en diclorometano (CH_2Cl_2) y se agregó la fase estacionaria en proporción 1:1 para su preadsorción, se mezcló para evaporar el disolvente hasta formar un polvo fino. La columna se empacó previamente, empleando la fase estacionaria mezclada con hexano y se dejó reposar por 20 min. Al tener empacada la columna se agregó el extracto pre adsorbido. Se realizó el fraccionamiento empleando una mezcla de disolventes (fase móvil) con un gradiente de polaridad creciente de Hx: AcOEt, en diferentes proporciones de 100:0 hasta 0:100 respectivamente. Las fracciones obtenidas se analizaron por CCF en un sistema de elución Hx/AcOEt (8:2) y se combinaron aquellas fracciones semejantes a la referencia de AM (facilitada por la M. en C. Nadia Rojano Vilchis). Estas se llevaron a sequedad a presión reducida y a una temperatura máxima de 38 °C en un rota-evaporador.

Tabla 2: Resumen de fraccionamiento del extracto hexánico por CC con alúmina para la obtención de acetato de maturina.

Fracciones similares por CCF	Proporción Hx/AcOEt	Volumen de disolvente (mL)
1-20	100:0	400
21-80	98:2	1180
81-111	95:5	600
112-138	95:5	520
139-147	95:5	160
148-174	93:7	520
174-201	90:10	560
202-212	85:15	200
213-228	70:30	300
229-239	50:50	200
240-241	0:100	220

Tabla 3: Resumen de fraccionamiento del extracto hexánico por CC con gel sílice para la obtención de acetato de maturina.

Fracciones similares por CCF	Proporción Hx/AcOEt	Volumen de disolvente (mL)
1-20	100:0	800
21-29	99:1	320
30-45	98:2	600
46-65	98:2	760
66-85	98:2	760
86-101	98:2	600
102-110	98:2	320
111-119	95:5	320
120-155	95:5	1400
156-173	95:5	680
174-191	90:10	680
192-202	90:10	400

203-209	90:10	240
210-227	90:10	680
228-236	90:10	320
237-254	90:10	680
255-263	85:15	320
264-281	75:25	680
282-292	50:50	400
293-344	50:50	2040
345-365	0:100	800

En ambos métodos, después de concentrar las fracciones similares se obtuvieron compuestos sólidos. Se compararon mediante CCF, con una referencia del AM en un sistema de elución de Hx/AcOEt (8:2), al mismo tiempo que se comprobó su pureza. Las fracciones impuras se cristalizaron de hexano/acetona, se filtraron y juntaron.

5.5 Modificaciones químicas del acetato de maturina

5.5.1 Transformaciones químicas.

Los productos obtenidos en todas las reacciones, después de su purificación, se concentraron a una temperatura no mayor a 38°C.

5.5.1.1 Reacción con NH₂OH·HCl (hidroxilamina hidrociorada):

Se disolvió 100mg de AM en 3mL de piridina anhidra, se agregó 110mg de NH₂OH·HCl y se dejó reaccionar por una hora a temperatura ambiente, con agitación constante. El progreso de la reacción fue monitoreado mediante CCF comparándolo con el AM como referencia en un sistema de elución de Hx: AcOEt (6:4). Al término de la reacción se agregó agua destilada, se trasvasó a un embudo de separación y se realizó una extracción con AcOEt, se separó la fase acuosa y la fase orgánica se lavó con HCl (ac) hasta desaparición de olor característico a piridina. Se lavó con agua destilada

hasta pH neutro, se transvasó a un matraz en donde se agregó sulfato de sodio anhidro para secar. Esta fase se filtró y se concentró a sequedad presión reducida.

5.5.1.2 Reducción con NaBH₄ (boro-hidruro de sodio):

Se probaron dos condiciones de temperatura para esta reacción (a temperatura ambiente y en baño de hielo) y se probaron distintas proporciones de reductor (NaBH₄) 1:1, 1:0.5 y 1:0.25 (100 mg, 50 mg y 25 mg respectivamente).

El procedimiento general es el siguiente: se disolvió aproximadamente 100 mg de AM en etanol, en un matraz bola de 100 mL y se agregó poco a poco el NaBH₄ sólido, se dejó reaccionar por 15 min en agitación constante. Se siguió el avance de la reacción por medio de CCF en un sistema de elución de Hx:AcOEt (8:2). Se terminó la reacción agregando agua, se trasvasó a un embudo de separación y se realizó una extracción con acetato de etilo, se quitó el exceso de agua agregando sulfato de sodio anhidro, se filtró y después se concentró a sequedad a presión reducida. La separación del producto se realizó mediante cromatografía en placa preparativa (CPP) con un sistema de elución de Hx:AcOEt (7:3). La fracciones resultantes de la cromatografía fueron extraídas con acetato de etilo, comparándolas con AM por CCF en un sistema de elución Hx:AcOEt en (7:3), tomando la fracción mayoritaria y con un R_f de 0.21. Se realizaron los estudios espectroscópicos correspondientes.

5.5.1.3 Reducción con LiAlH₄ (hidruro de litio y aluminio) en disolución (THF):

Se agregó 100 mg de AM a una disolución de LiAlH₄ en THF 1.0M (3 mL) a temperatura ambiente contenido en un matraz bola de 100 mL, se dejó en agitación constante por 2 h. Al término de reacción se agregó unas gotas de agua destilada, se trasvasó a un embudo de separación y se realizó una partición con acetato de etilo, se agregó unas gotas de HCl 10 % y se neutralizó el exceso de ácido con agua destilada. Se trasvasó a un matraz de 250 mL y se secó con sulfato de sodio anhidro. Esta solución se filtró y se concentró a sequedad a presión reducida y posteriormente se separó por CPP en un sistema de elución de Hx:AcOEt (7:3). Extrayendo la fracción, con un R_f de 0.21,

con acetato de etilo, y concentrando esta fracción a sequedad y presión reducida. Obteniendo un producto similar al de reducción con NaBH_4 .

5.5.1.4 Saponificación con NaHCO_3

Se disolvieron 72.3 mg de AM en acetona y se agregó a una disolución acuosa de NaHCO_3 (200 mg) en un matraz bola de 100 mL, se calentó ligeramente ($\leq 70^\circ\text{C}$) por 2.5 h con agitación constante. Al término de la reacción se agregó agua destilada, se trasvasó a un embudo de separación de 500mL. El producto se extrajo con AcOEt , pasándolo a un matraz de 250mL, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. Este producto se separó por CPP en un sistema de elución de Hx:AcOEt (70:30). Se obtuvo una fracción mayoritaria, con un R_f de 0.30 en un sistema de elución Hx:AcOEt (60:40), la cual se extrajo con acetato de etilo y se concentró a presión reducida. Se realizaron los estudios espectroscópicos correspondientes.

5.5.1.5 Oxidación

Se llevó la oxidación de aldehído mediante el uso de dos metodologías:

a) Mediante una forma suave por el burbujeo de oxígeno (150kPa) por un periodo de 4h con agitación constante a una disolución de cloroformo (CHCl_3) del compuesto AM (80mg) en un matraz de 50mL, monitoreando el grado de avance de reacción por CCF en un sistema de elución de Hx:AcOEt (80:20) y comparando con una referencia de AM. Al finalizar el tiempo de reacción se evaporó el disolvente.

b) Mediante el reactivo de Jones: el AM (80 mg) se disolvió con cloroformo (10 mL) en un matraz de 50 mL, se agregó el reactivo de Jones (aprox. 2 mL) por un tiempo de 30 min. Se siguió la reacción por CCF comparado con una referencia de AM en un sistema de elución Hx:AcOEt (80:20). Al término de la reacción se agregó isopropanol y agua, se agregó ácido sulfúrico (H_2SO_4) hasta pH 3, se trasvasó a un embudo de separación de 250 mL y se realizó una extracción con AcOEt , esta fase se lavó con agua

hasta un pH neutro. Se trasvasó a un matraz de 250 mL y se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró la muestra a presión reducida.

5.5.2 Biotransformación

5.5.2.1 Con agua de coco (*cocos nucifera*):

Se disolvió 30 mg de AM en acetona, y se agregó poco a poco a un matraz de 125 ml con agua de coco (60 mL) y se dejó en agitación por 48 h a temperatura ambiente. Al finalizar la reacción se trasvasó a un embudo de separación en donde se realizó una partición con AcOEt por triplicado, recolectando las extracciones en matraces de 250 mL que se secaron con sulfato de sodio anhidro, se juntaron, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Para después separarlo por medio de CPP en un sistema de elución de Hx:AcOEt (60:40). Extrayendo, con AcOEt, las fracciones resultantes, se filtraron y concentraron a presión reducida. Tomando la fracción mayoritaria en masa y con un R_f de 0.30, en un sistema de elución de Hx/AcOEt (60:40).

5.5.2.2 Con brócoli (*Brassica oleracea var. Italic*):

Para esta reacción se dieron dos tratamientos previos al brócoli:

- 1) Se cortó en pequeños trozos (4 mm³) y puesto en buffer de fosfatos pH 6.9.
- 2) se congeló (aproximadamente a -70°C) y posteriormente se trituró en un mortero y puesto en buffer de fosfatos pH 6.9.

El procedimiento general es el siguiente: Se disolvió 30mg de AM en acetona, y se agregó poco a poco a un homogenizado de brócoli en un matraz de 125 mL. Se dejó reaccionar por 48 h con agitación constante y temperatura ambiente, al finalizar se filtró y a la fase acuosa se pasó a un embudo de separación donde se extrajo con acetato de etilo por triplicado, recolectando las extracciones en matraces de 250 mL. Se eliminó el agua agregando sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. Se separó por CPP en un sistema de elución Hx:AcOEt (60:40), extrayendo las fracciones resultantes con AcOEt, filtrándolas y concentrándolas a presión reducida. Se tomó la fracción mayoritaria en masa y con un R_f de 0.30 en un sistema de elución de Hx/AcOEt (60:40) para su análisis.

5.5.2.3 Con hoja de maíz (*Zea mays*):

Se disolvió 30 mg de AM en acetona, y se agregó poco a poco a un homogenizado de hoja de maíz cortada (2-3 mm³ de tamaño) en buffer de fosfatos pH 6.9 en un matraz de 125 mL. Se dejó reaccionar por 48 h con agitación constante y temperatura ambiente. Después de éste tiempo se filtró y la fase líquida se trasvasó a un embudo de separación donde se realizó extracción con acetato de etilo por triplicado, lavando la fase sólida con acetato de etilo, a estas extracciones agregó sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua. Se juntaron, filtraron y se concentraron a presión reducida. Se separó por CPP en un sistema de elución Hx/AcOEt (60:40). Extrayendo, con acetato de etilo, las fracciones resultantes, concentrándolas a presión reducida en un rotaevaporador. Tomando la fracción mayoritaria en masa y con un R_f de 0.30 en un sistema de elución de Hx/AcOEt (60:40) para su análisis.

5.6 Actividad Antioxidante y citotóxica de los compuestos obtenidos.

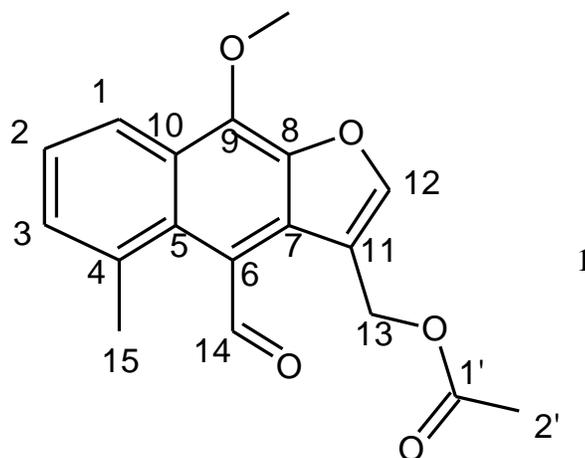
Los estudios de actividad biológica se realizaron en el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química.

Se realizaron pruebas antioxidantes por TBARS (Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico) midiendo el % de inhibición de oxidación lipídica y prueba de DPPH midiendo el porcentaje de reducción del radical DPPH. Las metodologías de ambas técnicas pueden consultarse en anexos.

Adicionalmente se probó la actividad citotóxica midiendo el porcentaje de inhibición de crecimiento en diferentes líneas celulares. La metodología general puede consultarse en anexos.

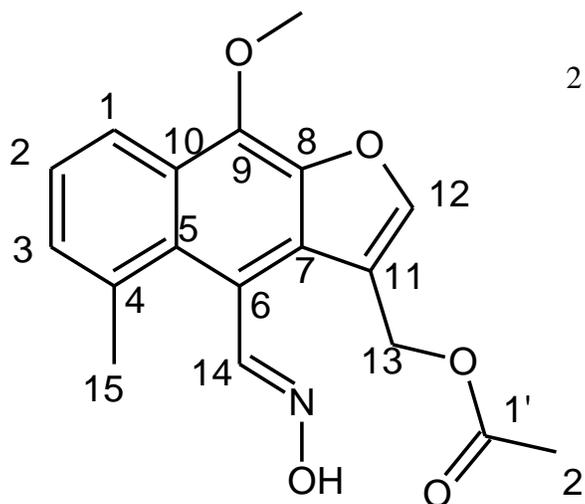
Datos espectroscópicos de los compuestos obtenidos.**Acetato de maturina (AM)**C₁₈H₁₆O₅

MM: 312.32 g/mol

IR V_{\max} cm⁻¹ CHCl₃: 1741 (OAc), 1677 (Aldehído C=O), 1620 (enlaces C=C)RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 11.02 (s, 1H de C14), 8.34 – 8.26 (m, 1H de C3), 7.84 (s, 1H de C12), 7.51 – 7.33 (m, 2H de C1 y 2), 5.34 (d, $J = 0.9$ Hz, 2H de C13), 4.45 (s, 3H de OMe), 2.79 (s, 3H de C15), 2.09 (s, 3H de C2').RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 193.46 (C14), 170.55 (C1'), 148.92 (C12), 130.21 (C1), 125.43 (C2), 121.03 (C3), 61.08 (C13), 58.46 (OMe), 26.60 (C2'), 20.98 (C15).

Oxima de acetato de maturinaC₁₈H₁₇O₅N

MM: 327.34 g/mol

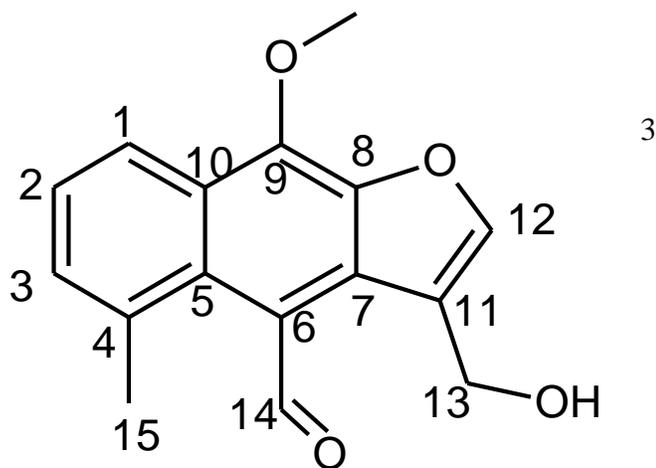


RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 8.96 (s, 1H de C14), 8.26 (t, *J* = 3.8 Hz, 2H de C1), 7.72 (s, 1H de C12), 7.46 – 7.14 (m, 2H de C 1 y 2), 5.20 (d, *J* = 0.4 Hz, 2H de C13), 4.35 (s, 3H de OMe), 2.77 (s, 3H de C15), 2.12 (s, 3H de OAc), 1.83 (s, 1H de OH).

RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ 171.29 (de C=O de OAc), 151.47 (C=N de C14), 147.15 (C12), 128.78 (C2), 124.43 (C3), 120.79 (C1), 61.05 (C13), 58.19 (OMe), 26.57 (C15), 21.04 (CH₃ de OAc).

MaturinaC₁₆H₁₄O₄

MM: 270.28g/mol



RMN de ¹H (500 MHz, cdcl₃): δ 10.91 (s, 1H de C14), 8.31 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H de C3), 7.81 (s, 1H de C12), 7.52 – 7.37 (m, 2H de C 1 y 2), 7.26, 4.76 (s, 2H de C13), 4.48 (s, 3H de OMe), 2.87 (s, 3H de C15), 1.25 (s, 1H de OH).

RMN de ¹³C (126 MHz, CDCl₃): δ 194.41 (C14), 148.46 (C12), 130.47 (C1), 124.05 (C2), 121.44 (C3), 61.16 (C13), 55.39 (OMe), 23.32 (C15).

6.0 Resultados y análisis:

6.1 Obtención del acetato de maturina

La obtención se sistematizó por fraccionamiento en CC del extracto hexánico con gel sílice y se comparó con la obtención con alúmina por medio del rendimiento porcentual con respecto al extracto como se observa en la siguiente tabla.

Tabla 4: Resultados de extracción de AM por CC.

Adsorbente	Tiempo de extracción (semanas)	Rendimiento (%)	R _f Hx:AcOEt (8:2)	Punto de fusión	Aspecto
Gel sílice	2	4.75	0.28	84-86°C	Sólido en forma de agujas de color amarillo pálido
Alúmina	4	2.13			

Del producto obtenido por CC con gel sílice con R_f de 0.28 se determinó una pureza de 98.99% de acuerdo a los resultados obtenidos por HPLC (Fig. 9), con un tiempo de retención de 16.29 minutos, lo que indica que el proceso de obtención del acetato de maturina, es adecuado con gel sílice ya que se obtiene mayor cantidad en comparación con la columna con alúmina. Esto debido probablemente a que puede hidrolizar el enlace éster del acetato, disminuyendo el rendimiento.

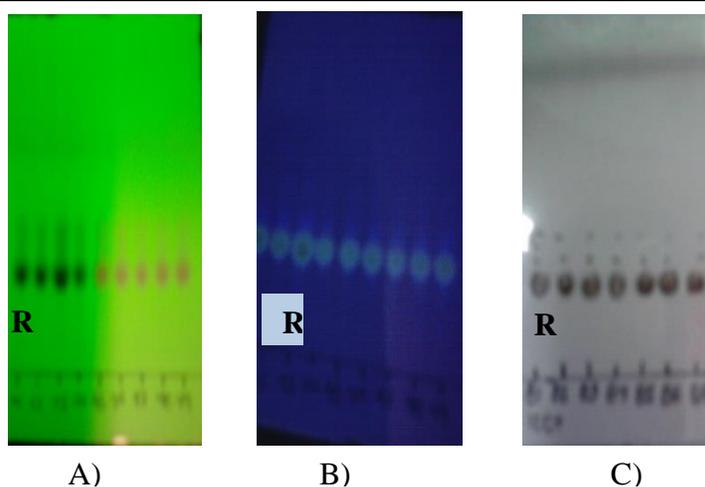


Figura 9. Ejemplo de cromatoplatea de CCP para identificar el acetato de maturina en cromatografía en columna flash del extracto hexánico. (R) compuesto de referencia; A) bajo luz UV (254nm), B) bajo luz UV (365nm), C) reveladas con sulfato sérico.

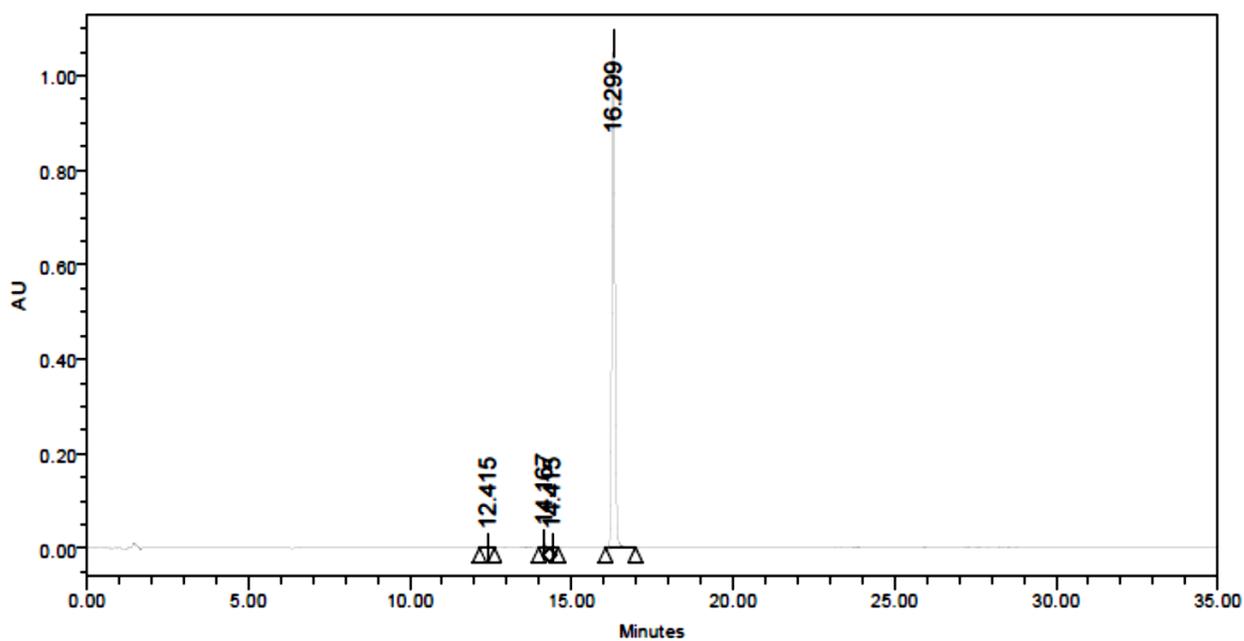


Figura 10. Cromatograma de HPLC de AM obtenido por CC con gel sílice.

Tomando los datos espectroscopicos del AM **(1)** y de acuerdo a los espectros de RMN de ^1H (Espectro 1-Anexos), se observa lo siguiente: una señal simple a 11.02 ppm que corresponde a 1H de C (14) del grupo aldehído. El triplete en 8.29 ppm que integró para 1H en C (3) del anillo aromático, en 7.84 ppm hay una señal simple que integró para 1H correspondiente al H de C (12) en el anillo furánico, el multiplete en 7.43-740 ppm integró para 2H correspondientes al H de C (1) y C (2) del anillo aromático, en 5.34 ppm se observa una señal simple que integra para 2H correspondientes a 1H de C (13), las señales simples en 4.45, 2.79 y 2.09 ppm integraron para 3H cada uno correspondientes a los H de lo metilos C(15) y C(2'') y a los H del metoxilo en C (9).

En el espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 2-Anexos), presenta una señal a 170.55 ppm correspondiente a C (14) el aldehído, una señal en 148.92 ppm correspondiente al C (12), las señales de 133.45, 130.45, 130.21, 129.37, 125.42, 124.75, 122.06, 121,03 y 116.45 ppm correspondientes a los carbonos de los anillos aromáticos, la señal de 61.09 ppm correspondiente al carbono del metoxilo en C (9), la señal de 58.46 ppm corresponde a C (13), las señales de 26.60 y 20.99 ppm corresponden a C (15 y 2'') respectivamente.

El experimento DEPT (Espectro 3-Anexos), mostró, en 148.92, 130.21, 124.75 y 121.04 ppm, señales para metinos correspondientes a C (12, 2, 3 y 1), en 58.46 ppm un metileno correspondiente al C (13), tres metilos en 61.09, 26,60 y 20.99 ppm correspondientes al metoxilo en C (9), C (15) y C (2'') respectivamente. En el experimento COSY (Espectro 4-Aexos) se observó correlación en 8.29 ppm de H (C-3) con la señal en 7.43-7.40 para H de C (1y 2), así como con un protón en 2.79 del C (15), una correlación en 7.83 ppm de C (12) con la señal en 5.34 ppm de C (13). En el experimento HETCOR (Espectro 5-Anexos), se observa correlación entre la señal en 148.92 ppm con 7.83 ppm de H de C (12), la señal en 130.21 ppm con 7.43 ppm de C (1), 124.75 ppm con 7.24 ppm de C (2), la señal de 121.03 ppm con la señal de 8.29 ppm de C (3), la señal de 61.10 ppm con la señal de 4.45 ppm correspondiente al metoxilo del C (9), la señal de 58.46 ppm con la señal de 5.34 ppm correspondiente a C (13), la señal 26.60 ppm con la señal de 2.79 ppm correspondiente con C (15) y la señal de 20.99 ppm con la señal de 2.09 ppm correspondiente con C (2'')., esto nos confirma la estructura de AM, con la siguiente estructura:

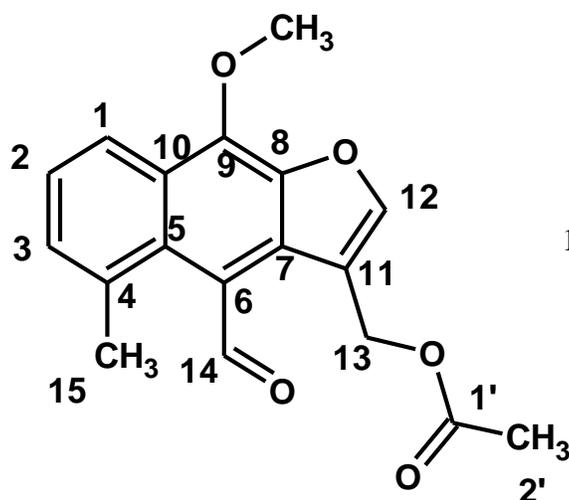


Figura 11: Estructura de la molécula de AM, con numeración reportada anteriormente, Correa and J. Romo, 1965, Garduño and Delgado 2003, N. Rojano 2005,

También del fraccionamiento se obtuvo un sólido naranja con un R_f muy similar al del acetato de maturina (0.28) en un sistema de elución Hx:AcOEt (8:2) con un rango de fusión de 111-114°C y de acuerdo a los resultados comparativos de HPLC (Fig. 11) es el acetato de maturina (16 min) con otro compuesto muy parecido (14.14 min). De acuerdo a los espectros de RMN (Espectros 6-7 anexos) donde aparecen señales dobles para los grupos funcionales, a excepción del grupo carbonilo (11.01 y 193.45 ppm) y para el grupo metoxilo (2.94 y 61.08 ppm), que posiblemente podría ser el acetato de maturona en combinación con el AM.

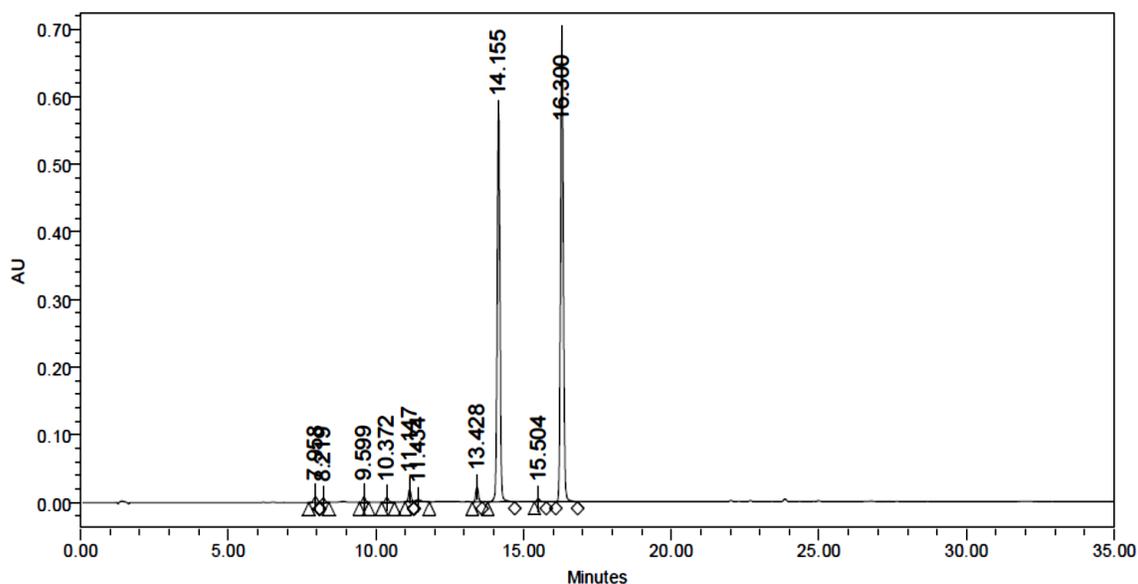


Figura 12. Cromatograma de HPLC de compuesto rojo aislado por CC

6.2 Resultados de reacción con $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$

La reacción con hidroxilamina hidrociorada ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) se hizo con el fin de corroborar la presencia del grupo aldehído, en donde se obtuvieron unos cristales amarillos translucidos con un R_f de 0.33 en un sistema de elución Hx/AcOEt (7:3) y de acuerdo a los resultados de EM se obtiene un ion molecular de 327m/z (espectro 9-anexos) correspondiente al producto esperado.

De acuerdo a los resultados de RMN de ^1H (espectro 8-anexos) se obtiene lo siguiente: señales parecidas al acetato de maturina en los hidrógenos de los carbonos 1, 2, 3, 12, 13, 15, 2' y los hidrógenos del carbono del grupo metoxilo, pero sin el grupo aldehído en cambio se obtiene una señal en 8.96 ppm que integran para 1H correspondiente al hidrógeno del carbono 14 de la oxima (C=N) y una señal en 1.83 correspondiente a 1H del grupo hidroxilo de oxima del carbono 14.

En el espectro de ^{13}C (espectro 10-anexos), de igual forma se observan el mismo esqueleto para el producto de la reacción pero con desplazamiento diferente del carbono 14 en 151.47 ppm. En el experimento COSY (espectro 11-aenxos) se observan las correlaciones correspondientes a cada hidrógeno. Se tiene la siguiente estructura:

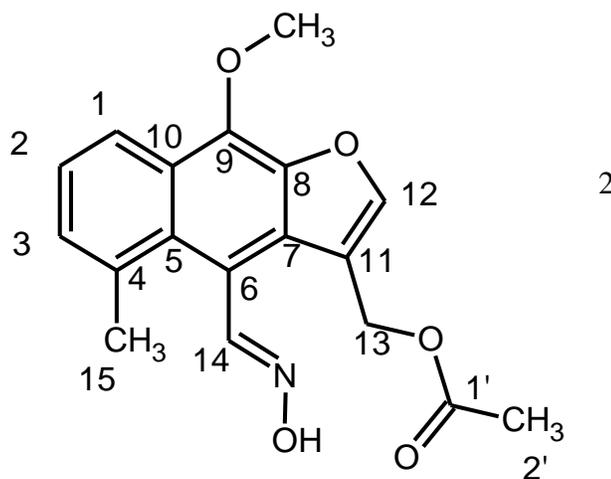


Figura 13. Producto de reacción con $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, con numeración referenciada en AM

6.3 Resultados de transformaciones químicas:

6.3.1 Oxidación:

-Por medio del burbujeo de oxígeno y agitación constante, se obtiene un sólido amarillo pálido en forma de agujas, con un R_f similar al AM en un sistema de elución de Hx:AcOEt (8:2), de acuerdo a los espectros de IR se observa el grupo aldehído (1680.09 cm^{-1} , espectro 14-anexos) y RMN (^1H espectro 13-anexos) no hay cambios en la molécula, al parecer el AM se recupera, el oxígeno en estado gaseoso no genera alguna reacción en el AM en el tiempo dado para que sucediera la reacción de oxidación para obtener el ácido correspondiente.

-La oxidación con reactivo de Jones se hizo con el AM de la reacción anterior, se obtuvo una mezcla de productos, de acuerdo al espectro de IR en donde se observan las bandas respectivas para el grupo aldehído (1670.54 cm^{-1}), solo se quería observar el cambio del grupo aldehído hacia un ácido carboxílico el cual no está en la molécula de acuerdo al espectro de infrarrojo, debido probablemente a que las condiciones de reacción son muy drásticas para oxidar el AM al ácido correspondiente y probablemente la oxidación

llevo hasta la oxidación del grupo metoxilo del AM. Además de una ruptura del enlace éster por la señal en 3536.39 cm^{-1} correspondiente a un grupo hidroxilo.

6.3.2 Reducción:

- Con NaBH_4 :

Se obtiene una mezcla de compuestos con aspecto aceitoso de color rojo/café. Con un R_f menor al AM en el sistema de elución utilizado, ya que al esperar el producto reducido (el alcohol) se esperaría un compuesto con mayor polaridad y por consecuencia un R_f menor en el sistema de elución utilizado. De acuerdo a los espectros de RMN de ^1H (espectro 15-anexos) se observa que si hay una reducción del acetato de maturina ya que no se observa la señal en 11 ppm correspondiente al hidrógeno del grupo aldehído de carbono 14, además de que se observa que se pierde el enlace éster en esta molécula ya que también no se encuentra la señal correspondiente a los hidrógenos del metilo del grupo acetato. Además en el espectro de RMN de ^{13}C (espectro 16-anexos) no se encuentra la señal de carbono del grupo aldehído y la correspondiente al grupo acetato, y esto ocurrió en las proporciones 1:1, 1:0.5 y 1:0.25 a temperatura ambiente pero se encuentra que la mezcla es difícil de separar además de que el rendimiento es muy bajo, en el caso de la proporción 1:0.25 a temperatura en baño de hielo se obtiene el producto hidrolizado sin reducción del grupo aldehído, pero de igual forma se obtiene una mezcla difícil de separar. De acuerdo a los resultados la reducción de AM con NaBH_4 se puede expresar con la siguiente reacción:

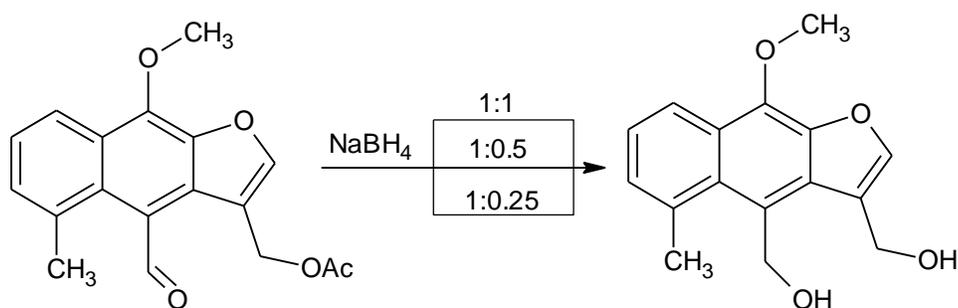


Figura 14. Reducción de Am con NaBH_4 , en diferentes proporciones y a temperatura ambiente.

- Con Hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4):

Se obtuvo un rendimiento similar que en las reacciones con NaBH_4 pero con mayor mezcla. Debido probablemente a se producen otro tipo de reacciones generando más compuestos con un R_f similar al producto de reducción. No se identificaron debido a que están en menor proporción y es muy difícil, por lo métodos empleados (CCP), poder separar cada producto.

6.3.3 Saponificación:

Se obtiene mayoritariamente el compuesto hidrolizado conocido como maturina de acuerdo a la siguiente reacción:

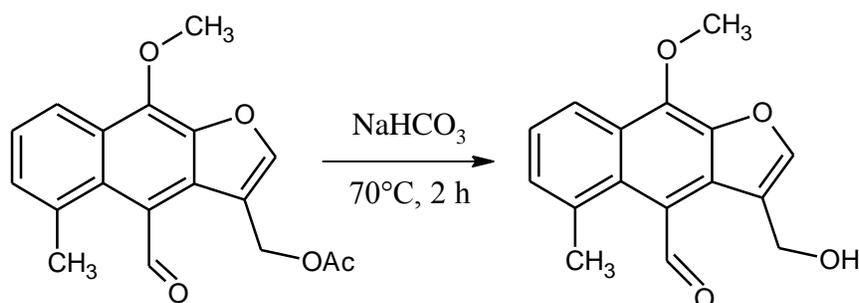


Figura 15. Reacción de saponificación de AM.

Se obtiene una mezcla de compuestos con un R_f menor al AM en el sistema de elución utilizado, debido a que si se lleva a cabo la ruptura del enlace éster de la molécula pero se generan otros productos.

De acuerdo a los espectros de RMN de ^1H (Espectro 17-anexos) se obtiene el mismo esqueleto que para el AM pero con la diferencia de no tener el grupo acetato ya que no se encuentra esta señal para los hidrógenos correspondientes al metilo del grupo acetato, además de que en el espectro de RMN de ^{13}C tampoco se observa la señal característica para los carbonos del grupo acetato (el carbono del metilo y el carbono del carbonilo). Además se obtiene una mezcla con otro compuesto aún después de separarlo por CPP, de acuerdo a las señales en el espectro de RMN de ^1H que se observa la señal del hidrógeno del grupo carbonilo en el carbono 14 a 10.96 ppm, las señales correspondientes a los hidrógenos de los anillos aromáticos de 7.30 a 8.32 ppm, la señal correspondiente a los hidrógenos del metilo carbono 15 y una señal en 1.25 que integra para un hidrógeno correspondiente al 1H del grupo hidroxilo en el carbono 13, pero se observa que no se encuentra el grupo acetato, además de que se observan señales en

5.05 a 5.37 ppm que podría indicar la presencia de un dímero de la maturina la dimaturina además de las señales dobles para los hidrógenos de los grupos funcionales, en RMN de ^{13}C (espectro 18-anexos) de igual forma se observa señales dobles para todos los carbonos a excepción del carbono 14 (carbonilo), y no se observa la presencia de los carbonos correspondientes a los carbonos del grupo acetato, por lo que es un dímero de la maturina con la siguiente estructura:

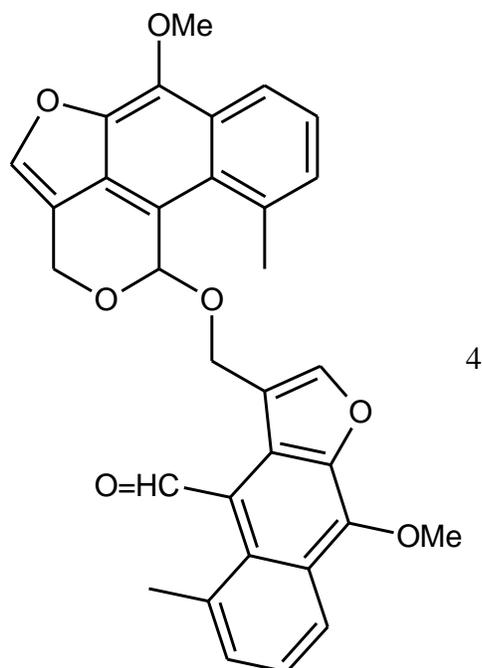


Figura 16. Posible estructura del dímero de maturina

Que se genera después de la ruptura del enlace éster de la molécula al tener los grupos carbonilo del aldehído reacciona con estos y forma el enlace formando el dímero y que tienen un R_f similar al producto de saponificación lo que hace más complicada la separación teniendo como producto la mezcla de compuestos.

Se encuentran estos inconvenientes al hacer las reacciones químicas utilizando catalizadores químicos, bajo rendimiento y mezcla de compuestos, por lo que se decidió realizar la biotransformación utilizando biocatalizadores.

6.4 Biotransformación:

De las tres biotransformaciones (brócoli, hoja de maíz y agua de coco) se obtiene el mismo compuesto, es decir las enzimas, o el medio de reacción utilizado nos da como resultado la hidrólisis del enlace éster de la molécula.

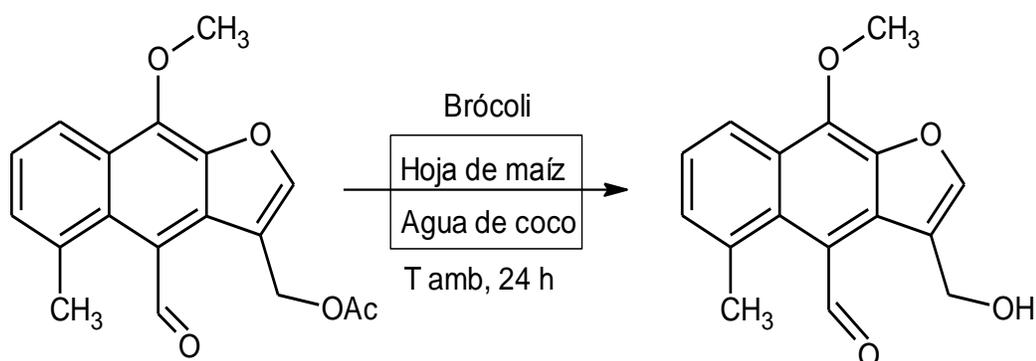


Figura 17. Biotransformación de AM en buffer de fosfatos pH 6.9

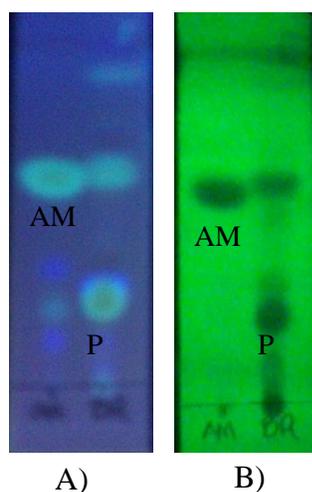
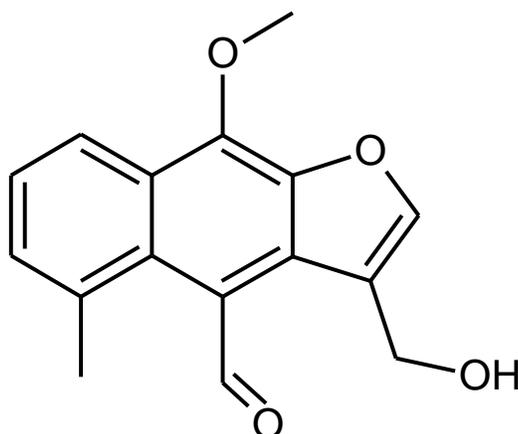


Figura 18. Ejemplo de cromatopla de reacción con brócoli. A) Bajo luz UV (365nm), B) bajo luz UV (254nm). (AM) acetato de matorina; (P) producto de reacción. Elución en sistema de hexano/Acetato de etilo en proporción 70:30.

En donde se obtiene mayor rendimiento es con el homogenizado de brócoli cortado, ya que en el ensayo con brócoli congelado previamente y triturado se obtiene un compuesto sin el grupo metoxilo en el carbono 9 y sin el grupo acetato de acuerdo a los espectros de RMN (Espectros 18 y 19-anexos) posiblemente debido a que al triturar hay mayor cantidad de enzimas libres que pueden actuar en otros grupo funcionales y

no solo hidrolizando el enlace éster o reduciendo el grupo aldehído, comparado con la saponificación química se obtiene un compuesto más puro, con un rango de fusión de 90-93°C y un R_f de 0.28 en un sistema de elución Hx:AcOEt (6:4) y es un sólido amarillo en forma de pequeñas agujas muy parecido al AM, probablemente debido a la acción de una esterasa que actúa hidrolizando el grupo acetato del AM. No se obtiene el compuesto reducido ya que posiblemente las reductasas no actúan sobre este compuesto, o tenga algún tipo de impedimento para actuar debida a los grupos funcionales restantes. En el espectro de RMN de ^1H se observa el mismo esqueleto que en AM a excepción de que no se observa una señal correspondiente a los hidrógenos del grupo acetato, en el espectro de RMN de ^{13}C no se observa las señales correspondientes a los carbonos del grupo acetato y se determina la siguiente estructura.



3

Figura 19. Maturina

Los rendimientos se resumen en las siguientes tablas:

Tabla 5: Rendimiento de transformaciones químicas de AM.

Reacción	Cantidad Inicial (mg)	Cantidad final (mg)	Rendimiento (%)
Oxidación			
Con O₂	60.6	60	99
Reactivo de Jones	45	8.13	18.08
Reducción con NaBH₄			
T amb			
1:1	96.9	26.1	36.60
1:0.5	100	26.9	26.90
1:0.25	93.7	21.0	22.70
Baño de hielo	127.5	10.8	14.43
Reducción con LiALH₄	100	11.9	11.90

Tabla 6. Resumen de rendimientos de transformaciones de AM con un producto similar (saponificación química, biotransformación)

Reacción	Cantidad Inicial (mg)	Cantidad final (mg)	Rendimiento (%)
Saponificación	72.3	14.9	20.60
Bio-trasformación			
Brócoli (Cortado)	85	35.4	44.25
Brócoli (Triturado)	50	14.5	29
Agua de coco	29	6.5	22.41
Hoja de maíz	28.9	5.2	17.9

En la mayoría de los casos se observa un rendimiento menor al 50%, sin embargo se obtiene una mezcla de compuestos aun después de separarlos por CPP, en el caso de las reducciones se obtiene el compuesto reducido y sin el grupo acetato, lo que indica que también se hidroliza el enlace éster y se generan las mezclas de compuestos que son difíciles de separar, además de que el rendimiento es bajo. En las saponificaciones (tanto química como biocatalizada) se observa un rendimiento similar, sin embargo la biotransformación se encuentra que es más eficiente ya que se observa un producto con más puro, por medio de CCF.

6.5 Resultados de la actividad biológica

Debido a los bajos rendimientos de las reacciones y al grado de mezcla de otros compuestos solo se realizaron pruebas biológicas al AM y producto obtenido con la biotransformación con brócoli.

6.5.1 Actividad atrapadora de radical DPPH:

Es un método utilizado para determinar si los compuestos en estudio presentan actividad atrapadora de radicales, midiendo el porcentaje de reducción del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH·).

Vehículo DMSO

Tabla 7: Resultados de actividad antioxidante (DPPH)

Muestra	Concentración (μM)	% de reducción de DPPH·
DPPH	100	-
		-5.08

		-4.12
		-2.97
		-4.45
		-3.71
		0.14
Acetato de Maturina	1	-5.93
	10	-4.12
	100	0.36
Maturina	1	2.26
	10	2.30
	100	3.89
α-tocoferol (control +)	1	26.06
	10	93.81
	100	93.29

En donde se observa que el AM y la maturina tienen actividad atrapadora del radical DPPH muy baja comparada con el control positivo, prácticamente no tienen este tipo de actividad, lo que indica que en este tipo de reacciones ambos compuestos no tienen actividad antioxidante y no presentan una actividad atrapadora de radicales libres.

6.5.2 Actividad antioxidante por medio de la prueba TBARS:

Este ensayo se llevó a cabo en homogenizado de cerebro de rata, el cual es rico en lípidos y por lo tanto susceptible a lipoperoxidación, evaluando el % de inhibición de lipoperoxidación.

Homogenizado en: PBS
 Vehículo: DMSO (25mL)
 Peroxidación: inducida con FeSO₄ (10 μ M)
 EDTA: 2 μ M

Tabla 8: Resultados de actividad antioxidante (TBARS)

Muestra	Concentración (μ M/mL)	% de Inhibición
Blanco	-	-
Basal		96.06
		-12.73
FeSO₄+vehículo		0.00
Acetato de maturina	1	2.87
	10	10.04
	100	79.58

Maturina	1	3.25
	10	37.84
	100	64.10
BHT (control +)	1	13.74
	10	93.89
	100	95.14
α-tocoferol (control +)	1	21.13
	10	59.00
	100	79.09

En donde se observa que hay un aumento en el porcentaje de inhibición, cuando se aumenta la concentración para ambos compuestos (AM y maturina), a una concentración de 100 μ M/mL el % de inhibición es de 79.58% para el AM en el caso de la maturina se obtiene 64.10% que son valores muy cercanos a los del control positivo (α -tocoferol). En comparación con el control positivo (BHT) el porcentaje de inhibición es menor en las concentraciones evaluadas, sin embargo ambos compuestos se podría decir que tienen actividad antioxidante en las reacciones de lipoperoxidación, que podría resultar como una alternativa a antioxidantes actualmente utilizados en la industria, pero se necesitarían más estudios para determinar este tipo de actividad para ambos compuestos al menos en comparación con el α -tocoferol.

6.5.3 Actividad citotóxica

Tabla 9. Resultados de actividad citotóxica.

Las pruebas de citotoxicidad se realizaron en las siguientes líneas celulares:

- U250= glía del sistema nervioso central
- PC-3= Cáncer de próstata
- K562= Leucemia
- HCT15= Carcinoma colo-rectal
- MF7= Cáncer de mama
- SKLU= Adenocarcinoma pulmonar.

Se evaluaron a una concentración de 50 μ M/mL, tomando en cuenta que se realiza en función de % de inhibición de crecimiento a la máxima concentración utilizada, se consideran activos los compuestos que inhiben más del 50% de crecimiento.

Línea celular	Inhibición de crecimiento (%)		
	Acetato de maturina	Maturina	Control (+) Adriamicina (1 μ M)
U251	SA	100	94.63
PC-3	77.85	100	56.11
K562	38.91	100	95.29
HCT15	32.88	100	73.9
MF7	36.26	93.2	82.6
SKLU	34.09	100	81.3

En donde se observa, para el acetato de maturina, un porcentaje de inhibición de crecimiento menor al 50% con excepción de la línea celular PC-3 (cáncer de próstata) en donde se tiene un porcentaje de 77.85%, que indica que en este tipo de células cancerígenas el acetato de maturina es activo.

Se observa que hay un aumento considerable en la actividad citotóxica al quitar el grupo acetato en la molécula ya que en los ensayos realizados con la maturina se obtuvo una actividad mayor al 90% de inhibición en todas las líneas celulares evaluadas. Por consecuencia la maturina es activa en las líneas celulares evaluadas. Comparada con el control positivo, la maturina tiene mayores porcentajes de inhibición de crecimiento, pero podría ser debida a la concentración utilizada, aun así no se descarta la posibilidad de que tenga una actividad citotóxica similar a algún compuesto como el control positivo. Cabe mencionar que la maturina **(3)** se ha aislado de forma natural de plantas (como *P. decompositum*) no se había determinado su actividad citotóxica y este hallazgo nos permite continuar con este estudio, además de que nos sugiere que cuidemos las condiciones de reacciones químicas además de que el uso de plantas, como fuente de enzimas, nos arroja buenos resultados.

7.0 Conclusiones.

- Se obtuvo mejor rendimiento de extracción en CC del acetato de maturina **(1)** con gel sílice como adsorbente comparado con la extracción en CC con alúmina como adsorbente.
- Debido a los bajos rendimientos y a la impureza de los productos de las transformaciones químicas, la biocatálisis resultó más eficiente en la hidrólisis del enlace éster del AM.
- En el caso de las biocatálisis, la de mejores resultados fue con brócoli cortado, con mayor rendimiento.
- Con las condiciones de la biotransformación se obtiene el producto hidrolizado del AM, la maturina.
- La maturina **(3)** presenta mayor actividad citotóxica, en las líneas celulares evaluadas, comparada con la actividad del acetato de maturina.
- Tomando en cuenta los 12 principios de la química verde, al realizar la biotransformación del acetato de maturina se cumplen los principios: realizar síntesis química menos peligrosa, utilizar disolventes, condiciones seguras de reacción, eficiencia energética, uso de reactivos renovables, evitar derivados químicos, el uso de catalizadores y uso de productos fácilmente biodegradables.

8.0 Perspectivas:

- Realizar más estudios con biocatalizadores para poder transformar este tipo de compuestos ya que se han encontrado muchas aplicaciones no solo en la industria de alimentos también en la farmacéutica de productos naturales.
- Realizar estudios más afondo de la actividad antioxidante para lípidos del acetato de maturina y maturina ya que los valores obtenidos indican que tienen una actividad antioxidante con un porcentaje similar al α -tocoferol, de inhibición de lipoperoxidación.
- Realizar más estudios sobre actividad citotóxica de la maturina ya que es activa en las líneas celulares evaluadas, cambiando la concentración.
- Comparar la biocatálisis entre distintas metodologías además de evaluar la actividad biológica de los derivados obtenidos para observar su cambio en actividad biológica.

Referencias bibliográficas:

-Alarcon Aguilar F.J., Roman Ramos R., Flores Saenz J.L., Aguirre García F. Investigation on the hypoglycaemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice. *Phytotherapy research*, **2002**, 16, 383-386.

-Alarcón, F.J., Fortis, A., Angeles, S., et al. 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*, **2010**, 132, 400-407.

-Alexandre Noiriél, Valeria Naponelli, Gale G. Bozzo, Jesse F. Gregory III, Andrew D. Hanson. Folate salvage in plants: pterin aldehyde reduction is mediated by multiple non-specific aldehyde reductases. *The plant journal*, **2007**, 51, 378-389

-Amarowicz R., Pegg R., Rahimi-Moghaddam P., Barl B., Weil J., 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food chemistry*, **2004**, 84 (4), 551-562.

-Avello, M. y Suwalsky, M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, **2006**, 494, 161-172.

-Bohlmann, F. y Bapuji, M. Cacalol derivatives from *Senecio lydenburgensis*. *Phytochemistry*, **1981**, 21(3), 681-683.

-Bohlmann, F., Dupré, S. and Nordestam, B. Cacalol derivatives from dominican seneczo species. *Phytochemistry*, **1990**, 29(10), 3163-3165.

-
- Brown, S., Brochu, M., Sinz, C. y MacMillan, D. The Direct and Enantioselective Organocatalytic α -Oxidation of Aldehydes, *JACS Communications*, **2003**, 125 (36), 10808-10809.
- Bryson, T., Jennings, J. and Gibson, J. A green selective reduction of aldehydes, *Tetrahedron letters*, **2000**, 41. 3523-3526.
- Bye R., Linares E. y Estrada. 1995. Biological diversity of medicinal plants in Mexico. Chapter four. In: J.T. Arnason et al. (Eds). *Phytochemistry of medicinal plants*. Plenum press. New York, p. 65.
- Contreras, C., Perez, S., Alarcon, F., Roman, R. Anti-hiperglycemic Effect of *Psacalium peltatum*. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, **2002**, 45, 134-136.
- Correa J. y Romo J. The constituents of *Cacalia decompositum* A. Gray. Structures of maturin, maturinin, maturone and maturinone. *Tetrahedron*. **1965**, 22, 685-691.
- Franco Ospina L.A., Castro Guerrero P., Ocampo B., Pájaro Bolívar B., Díaz Castillo F. Actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibacteriana de dos especies del género *Tabebuia*. *Revista cubana de plantas medicinales*. **2013**, 18 (1), 34-46.
- Garduño, M.L. y Delgado, G. New Eremophilanoids from the Roots of *Psacalium radulifolium*. Hypoglycemic, Antihyperglycemic and Anti-Oxidant Evaluations. *Revista de la sociedad química de México*, **2003**, 47 (2), 160-166.
- Esterbauer H., Cheeseman K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods enzymol*, **1990**, 186, 407-421.

- Geoffrey A. Cordell, Telma L.G. Lemos, Francisco J.Q. Monte, Marcos C. de Mattos. Vegetables as chemical reagents. *Journal of natural products*, **2007**, 70 (3), 487-492.
- Gribble, G., Sodium borohydride in carboxylic acid media: a phenomenal reduction system, *Chemical Society Reviews*, **1998**, 27, 395-404.
- Huang P., Ou B., Prior R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Agric food chemistry*, **2005**, 53 (6), 1841-1856.
- J. S. Yadav,* S. Nanda, P. Thirupathi Reddy, and A. Bhaskar Rao. Efficient Enantioselective Reduction of Ketones with Daucus carota Root. *Journal of Organic Chemistry*, **2002**, 67 (11), 3900-3903.
- Jean W. H. Young, Liya Ge, Yan Fei Ng, Swee Ngin Tan. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera L.*) water. *Molecules*, **2009**, 14, 5144-5164.
- Jose C. Jackson, André Gordon, Gavin Wizzard, Kayanne McCook y Rosa Rolle, Changes in chemical composition of coconut (*cocos nucifera*) water during maturation of the fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2004**, 84, 1049-1052.
- Juarez-Vazquez M.C., Alonso Castro A.J., Rojano Vilchis N., Jimenez Estrada M., García Carrancá A. Maturin acetate from *Psacalium peltatum* (Kunth) Cass. (Asteraceae) induces immunostimulatory effects in vitro and in vivo. *Toxicology in vitro*, **2013**, 27, 1001-1006.
- Leandro H. Andrade, Roberto S. Utsunomiya, Alvaro T. Omori, André L. M. Porto, João V. Comasseto. Edible catalyst for clean chemical reactions: Bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants. *Journal of molecular catalysis*, **2005**, 38, 84-90.

- Man-Li Zhanga, Jian-Jian Zhangb, Chang-Hong Huoa, Yu-Cheng Guc y Qing-Wen Sh.,
Chemical constituents of plants from the genus cacalia. *Chemistry & biodiversity*, **2010**,
7, 105-115.
- Manoranjan, B., Lakshmi, M., Rahman, A. Selective reduction of aldehydes to
alcohols by calcined Ni-Al hydrotalcite. *Journal of molecular catalysis*, **2003**, 206,
145-151.
- María del Carmen Juárez Franco, Angel J. Alonso Castro, Nadia Rojano Vilchis, Manuel
Jimenez Estrada, Alejandro García Carrancá. Maturin acetato from *Psacalium peltatum*
(Kunth) cass. (Asterceae) induces immunostimulatory effects in vitro and in vivo.
Toxicology in vitro, **2013**, 27, 1001-1006.
- Mario S. Salvano, Juan J. Canterob, Ana M. Vázquezc, Stella M. Formicad, Mario L.
Aimard,. Searching for local biocatalysts: Bioreduction of aldehydes using plant roots
of the Province of Córdoba (Argentina), *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*,
2011, 71, 16-21.
- Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH·) for
estimating antioxidant activity. *Journal of science and technology*, **2004**, 26 (2), 211-
219.
- Nerlis Paola Pájaro-Castro, Jesús T. Olivero-Verbel, Química verde: un nuevo reto,
Ciencia e ingeniería neogranadina, **2011**, 21 (2), 169-182.
- Pérez, A., Rciniegas, A., Villaseñor, J., Romo, A. Furanoeremophilane derivatives from
Psacalium beamanii. *Revista de la sociedad Química México*, **2004**, 48, 21-23.
- Pietro Tundo, Paul Anastas, David StC. Black, Joseph Breen, Terrence Collins, Sofia
Memoli, Junshi Miyamoto, Martyn Polyakoff, and William Tumas, Synthetic pathways

and processes in green chemistry. *Introductory overview, Pure and applied chemistry*, **2000**, 72 (7), 1207-1228.

- Renato Bruni, Giancarlo Fantin, Alessandro Medici, Paola Pedrini, and Gianni Sacchetti. Plants in organic synthesis: an alternative to baker's yeast, *Tetrahedron Letters*, **2002**, 43, 3377-3379

- Renato Bruni, Giancarlo Fantin, Silvia Maietti, Alessandro Medici, Paola Pedrini,* and Gianni Sacchetti. Plants-mediated reduction in the synthesis of homochiral secondary alcohols. *Tetrahedron: Asimmetry*, **2006**, 7, 2287-2291.

- Rojano, N. Inducción de sesquiterpenos en cultivos celulares de *Psacalium peltatum*, planta antidiabética, por homogenado de *Aspergillus niger*. (Tesis de maestría), 2005, Posgrado en ciencias biológicas, Instituto de Biología. UNAM.

Ross Johnson M., Rickborn B. Sodium borohydride reduction of conjugated aldehydes and ketones. *Reduction of conjugated aldehydes and ketones*, **1970**, 35 (4), 1041-1045.

- Silverstein, R.M., Webster, F.X. and Kiemle, D.J., 2005. *Spectrometric Identification of organic compounds*. Séptima edición. EUA: John Wiley & sons inc.

- Suarez Franco G., Hernandez Quiroz T., Navarro Ocaña A., Oliat Ros R.M., Valerio Alfaro G. Plants as a green alternative for alcohol preparation from aromatic aldehydes. *Biotechnology and bioprocess engineering*, **2010**, 15, 441-445.

- Takamitsu Utsukihara, Satoshi Watanabe, Atsushi Tomiyama, Wen Chai, C. Akira Horiuchi. Stereoselective reduction of ketones by various vegetables. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic*, **2006**, 41, 103-109.

- Tomoko Matsuda, Rio Yamanaka, Kaoru Nakamura. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, 20, 513-557.

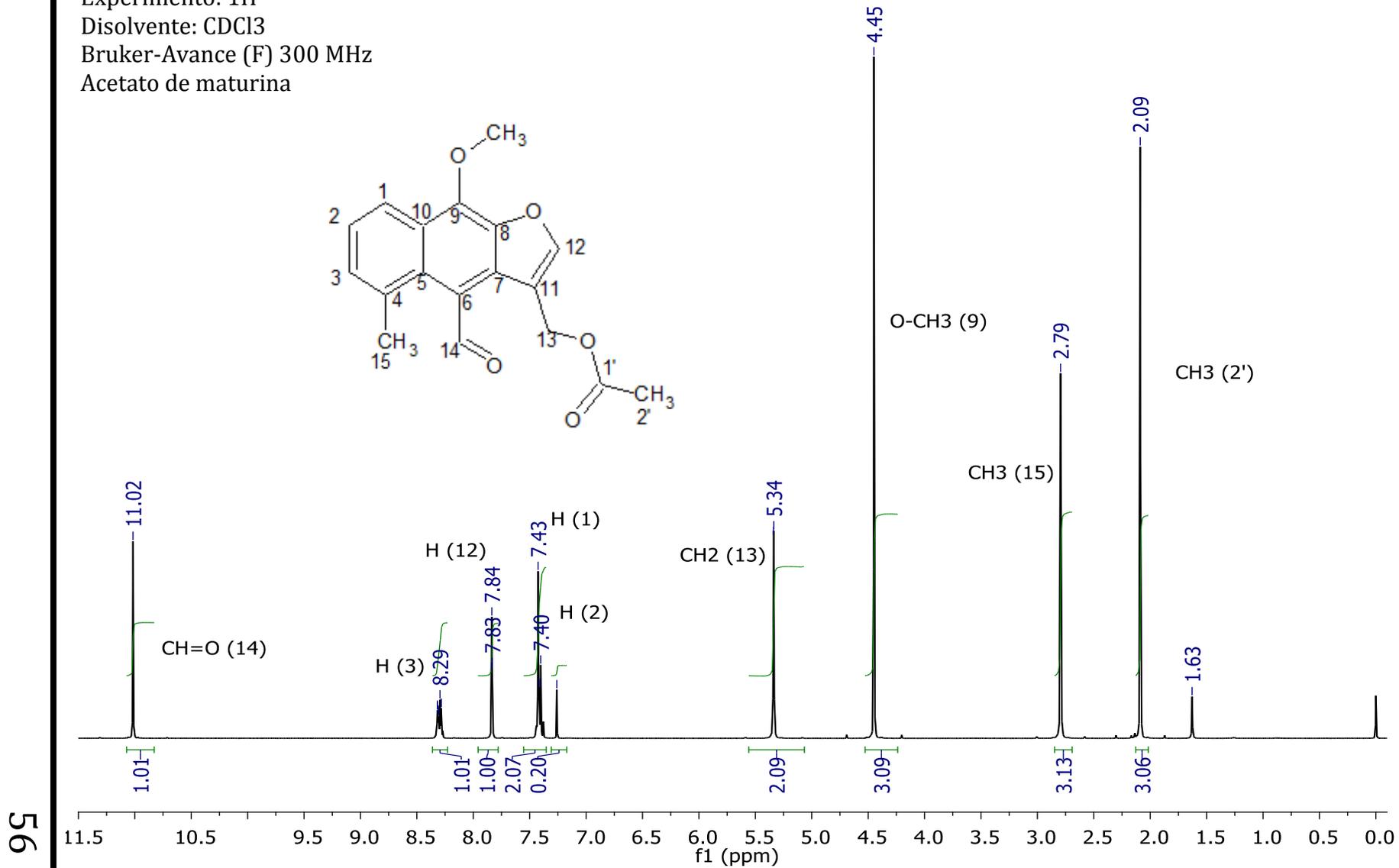
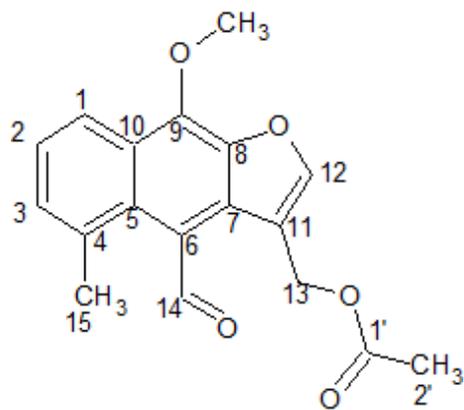
-Travis, B., Sivakumar, M., Hollist, O. and Borhan, B. Facile Oxidation of Aldehydes to Acids and Esters with Oxone. *Organic Letters*, **2003**, 5 (7), 1031-1034.

-Valenzuela, A. and Nieto, S. Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y aceites*, **1996**, 47(3), 186-196

-Zi Zhang, Kohei Nakano, Shigenori Maezawa. Comparison of the antioxidant enzymes of broccoli after cold or heat shock treatment at different storage temperatures. *Postharvest biology and technology*, **2009**, 54, 101-105.

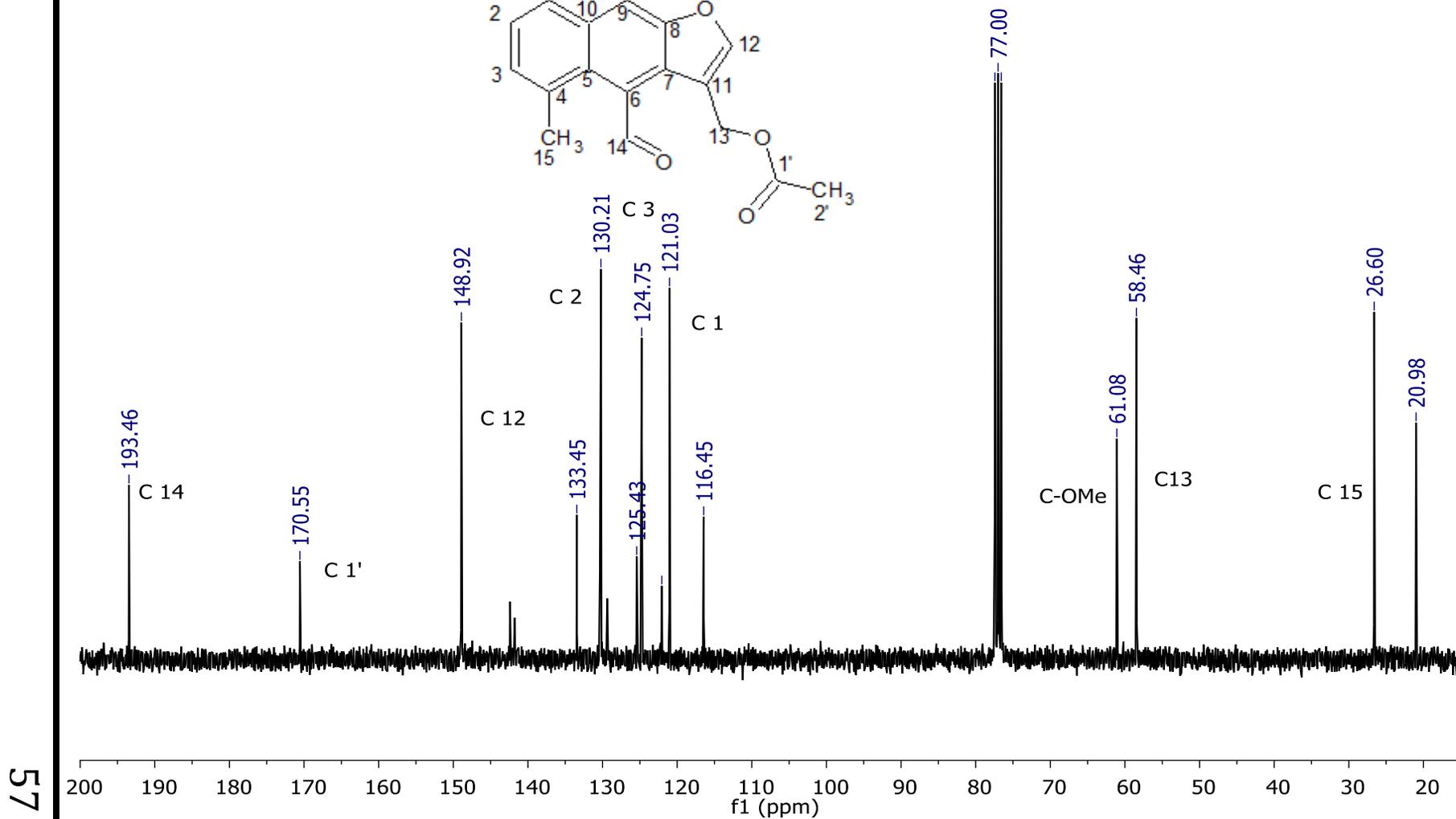
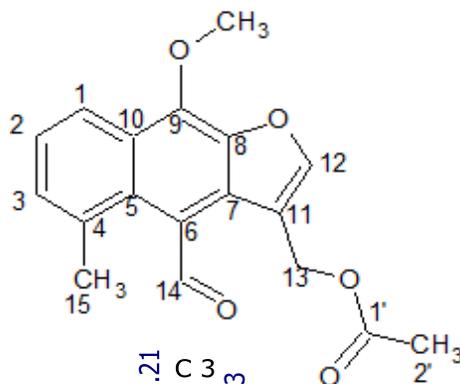
Anexos

Experimento: 1H
Disolvente: CDCl3
Bruker-Avance (F) 300 MHz
Acetato de maturina



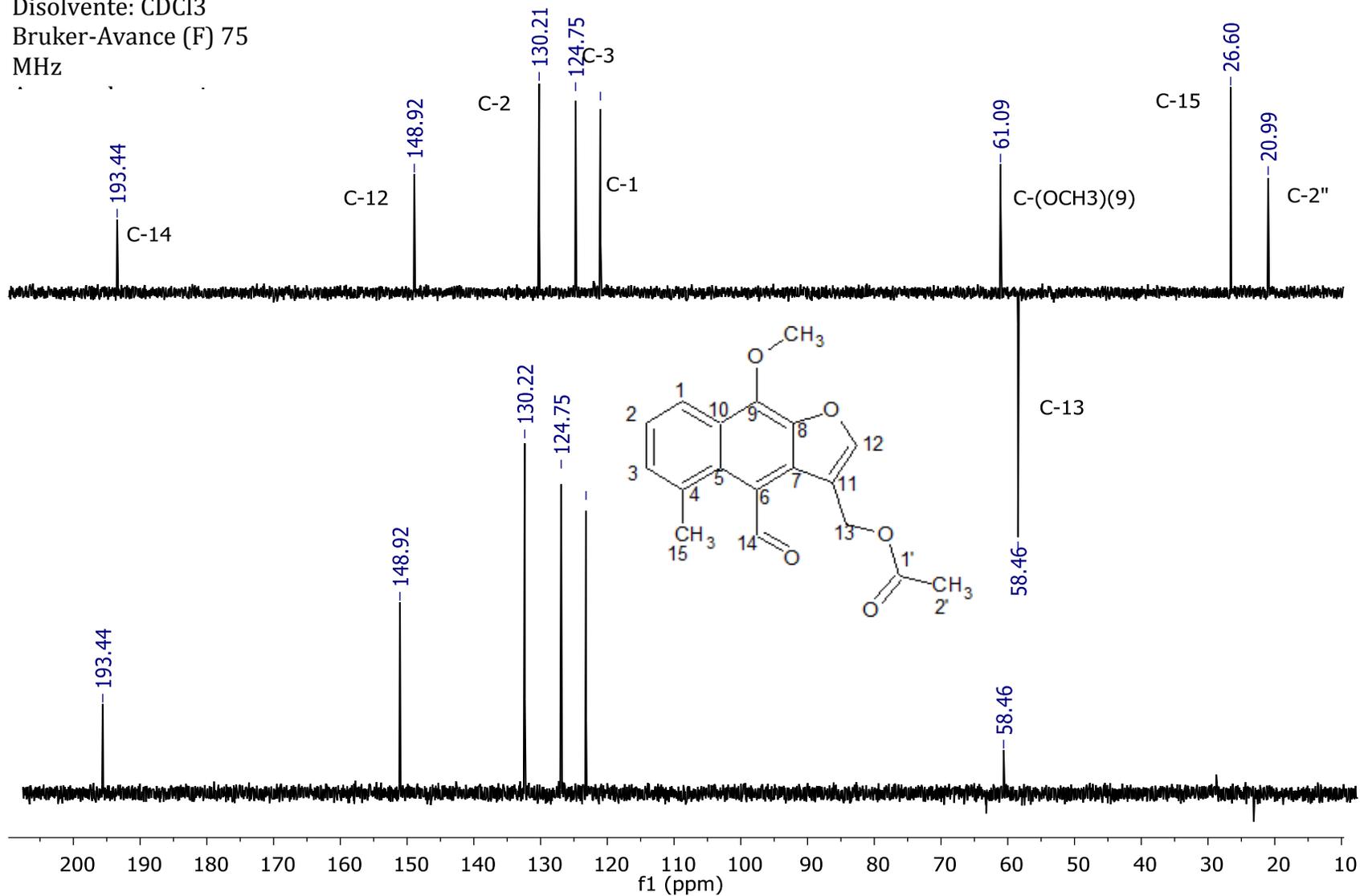
Espectro 1. RMN (¹H) de Acetato de maturina compuesto 1

Experimento: 13C
Disolvente: CDCl3
Bruker-Avance (F) 75 MHz
Acetato de maturina



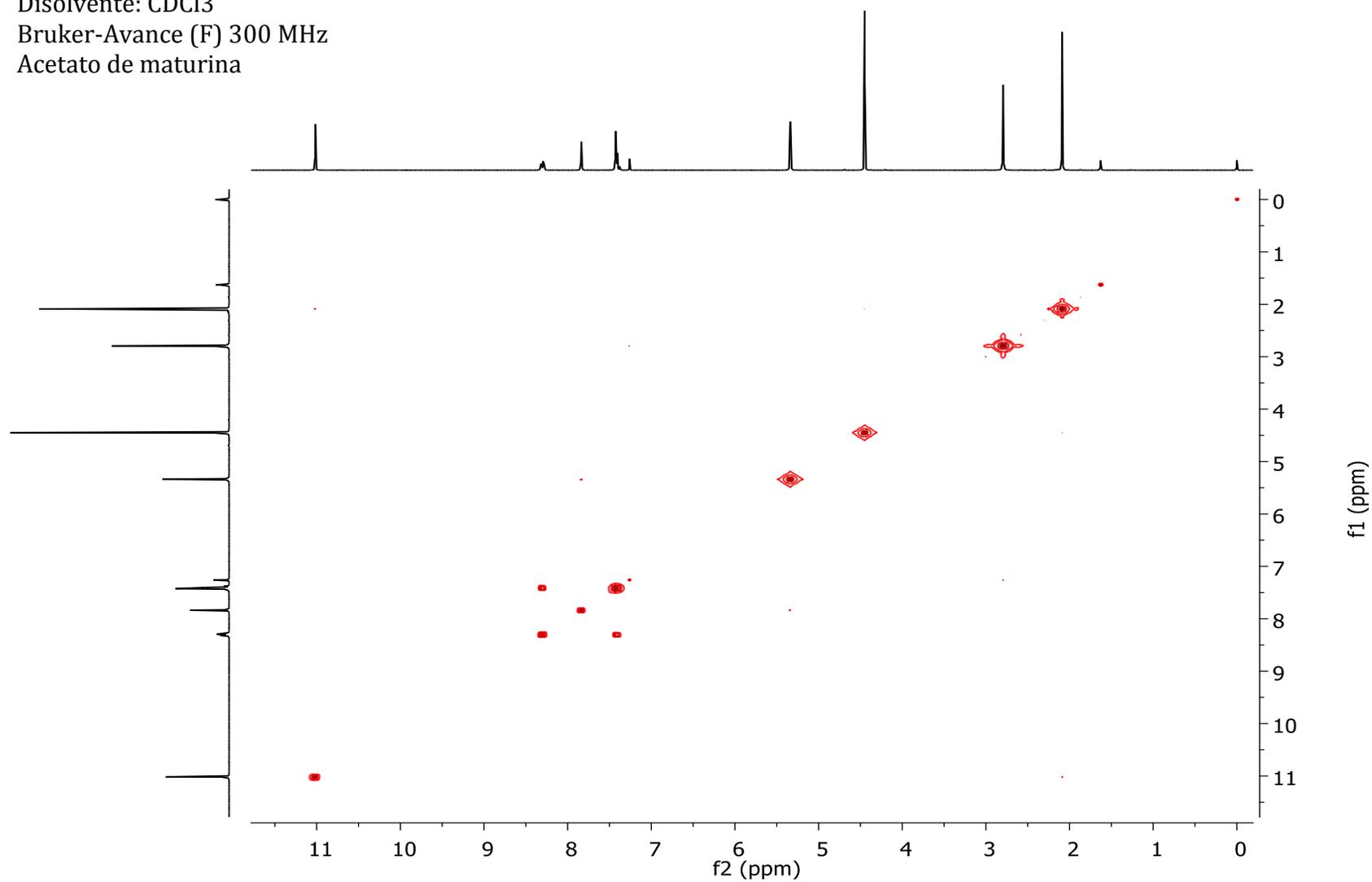
Espectro 2. RMN (¹³C) de Acetato de maturina compuesto 1

Experimento: DEPT 135
Disolvente: CDCl₃
Bruker-Avance (F) 75
MHz



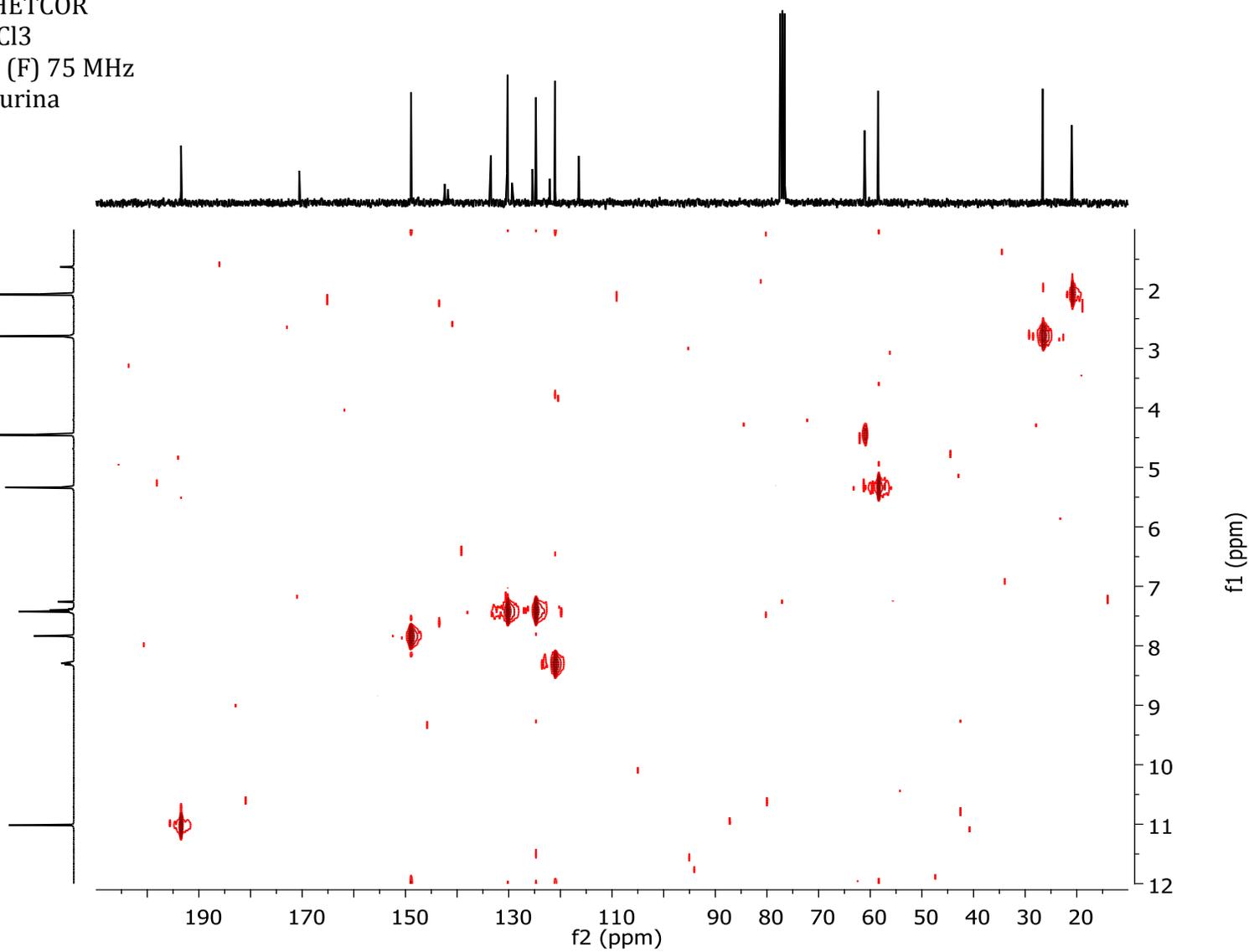
Espectro 3. RMN Experimento DEPT Acetato de maturina compuesto 1

Experimento: COSY
Disolvente: CDCl₃
Bruker-Avance (F) 300 MHz
Acetato de maturina



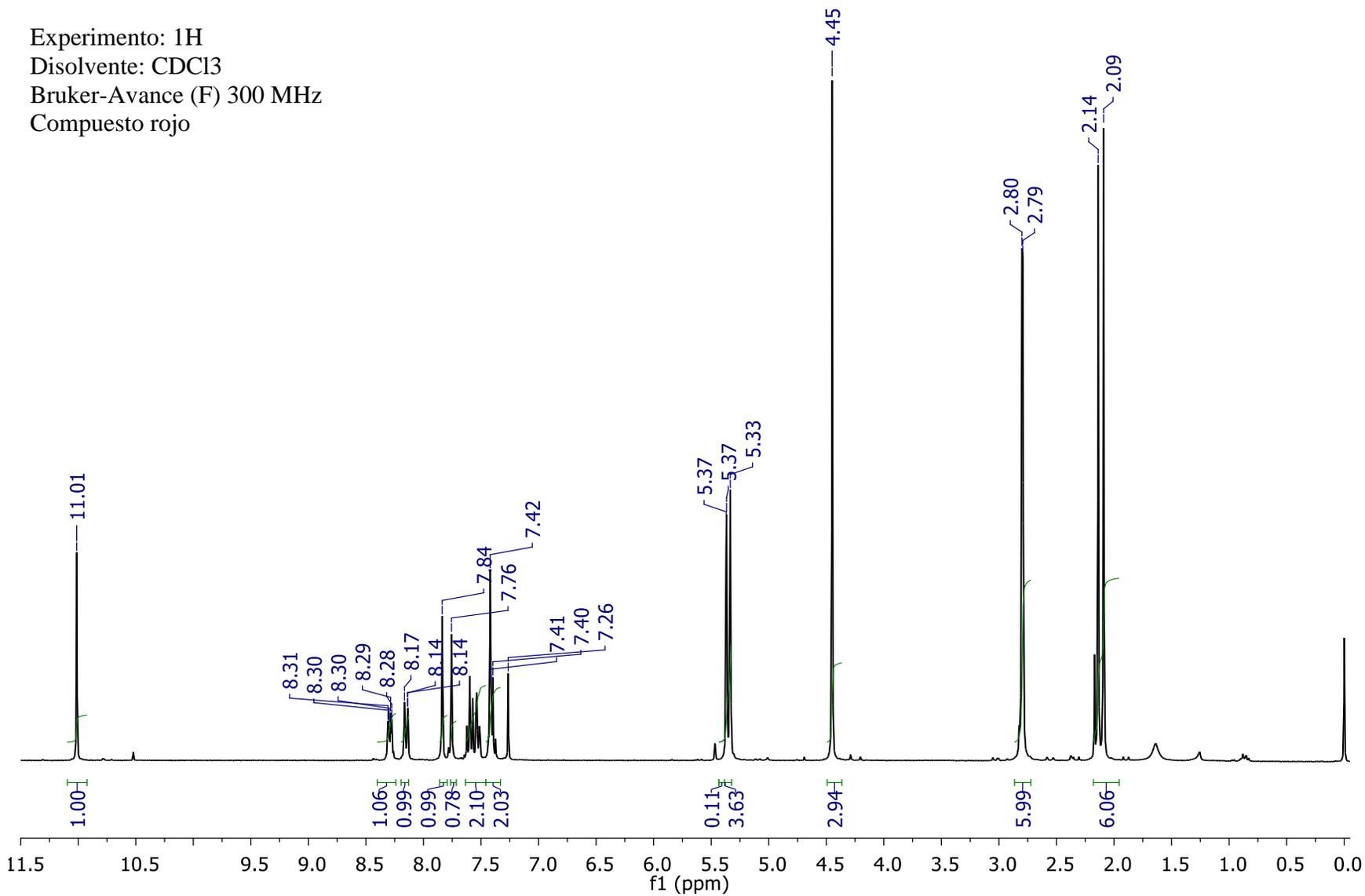
Espectro 4. RMN Experimento COSY Acetato de maturina compuesto 1

Experimento: HETCOR
Disolvente: CDCl3
Bruker-Avance (F) 75 MHz
Acetato de matorina



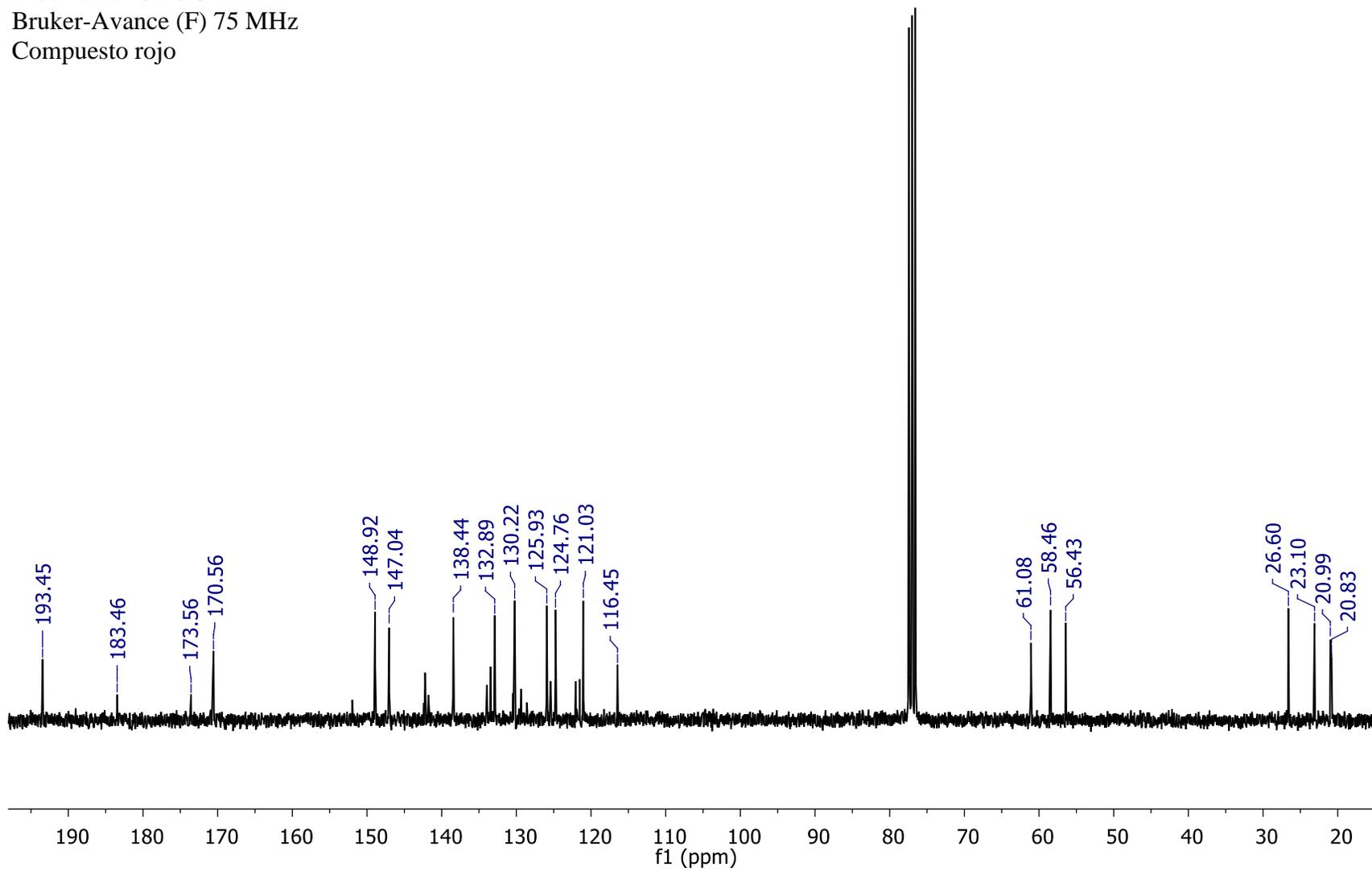
Espectro 5. RMN Experimento HETCOR Acetato de matorina compuesto 1

Experimento: 1H
Disolvente: CDCl₃
Bruker-Avance (F) 300 MHz
Compuesto rojo



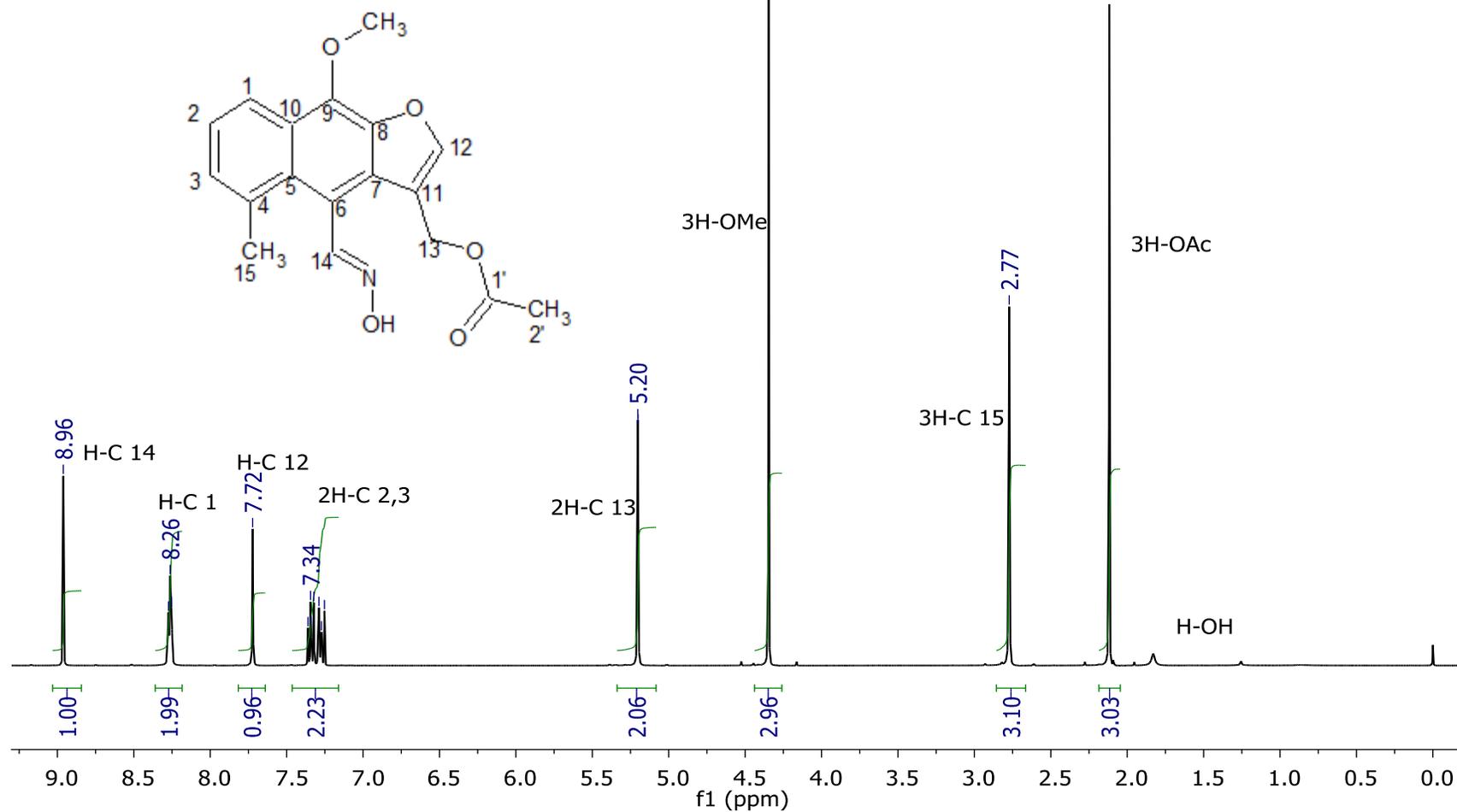
Espectro 6. RMN (¹H) Compuesto rojo extraído por CC (Compuesto 2)

Experimento: 13C
Disolvente: CDCl₃
Bruker-Avance (F) 75 MHz
Compuesto rojo

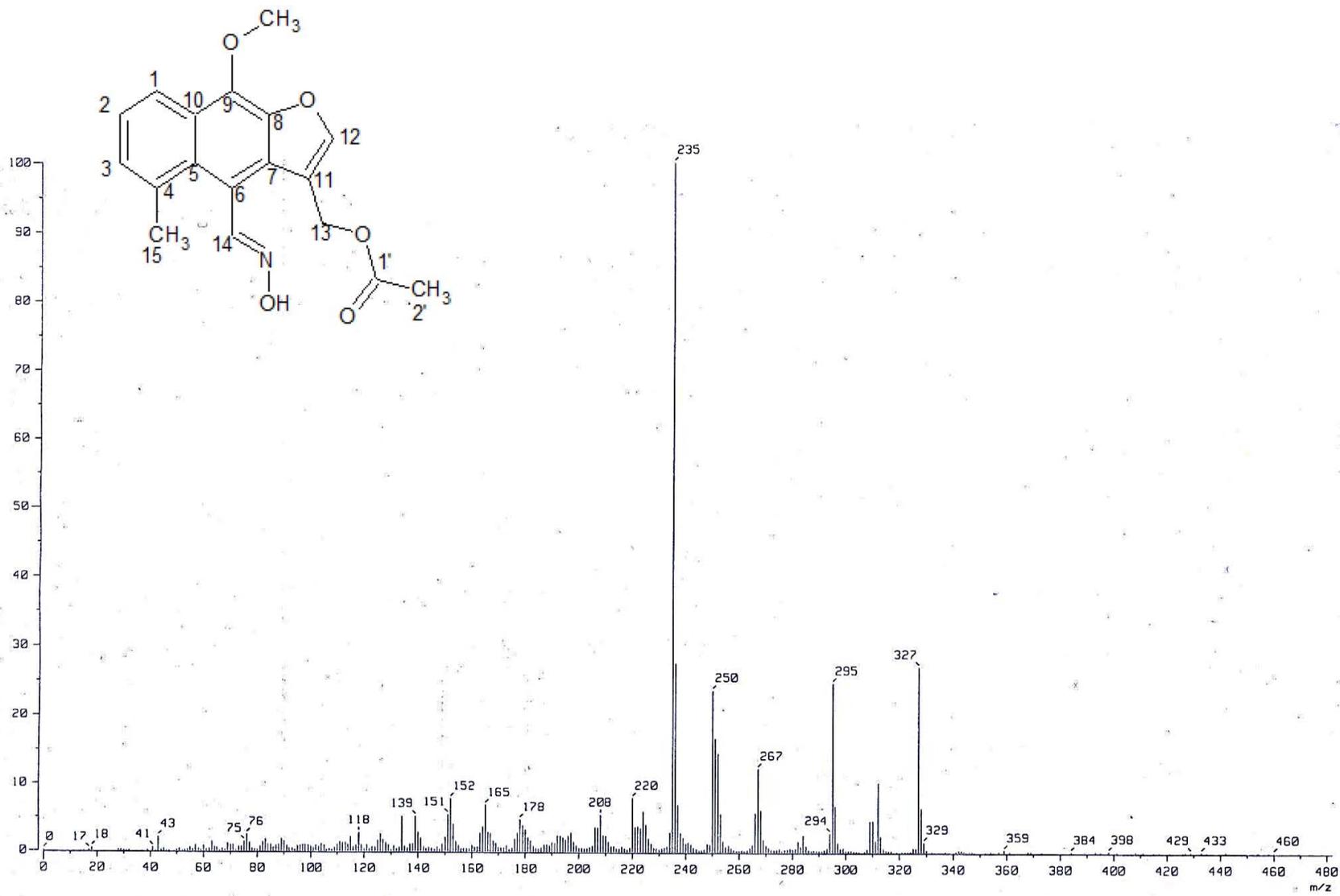


Espectro 7. RMN ¹³C Compuesto rojo extraído por CC (Compuesto 2)

Disolvente: CDCl₃
Experimento 1H
Bruker Avance III 400 MHz (H)
Oxima de acetato de matorina

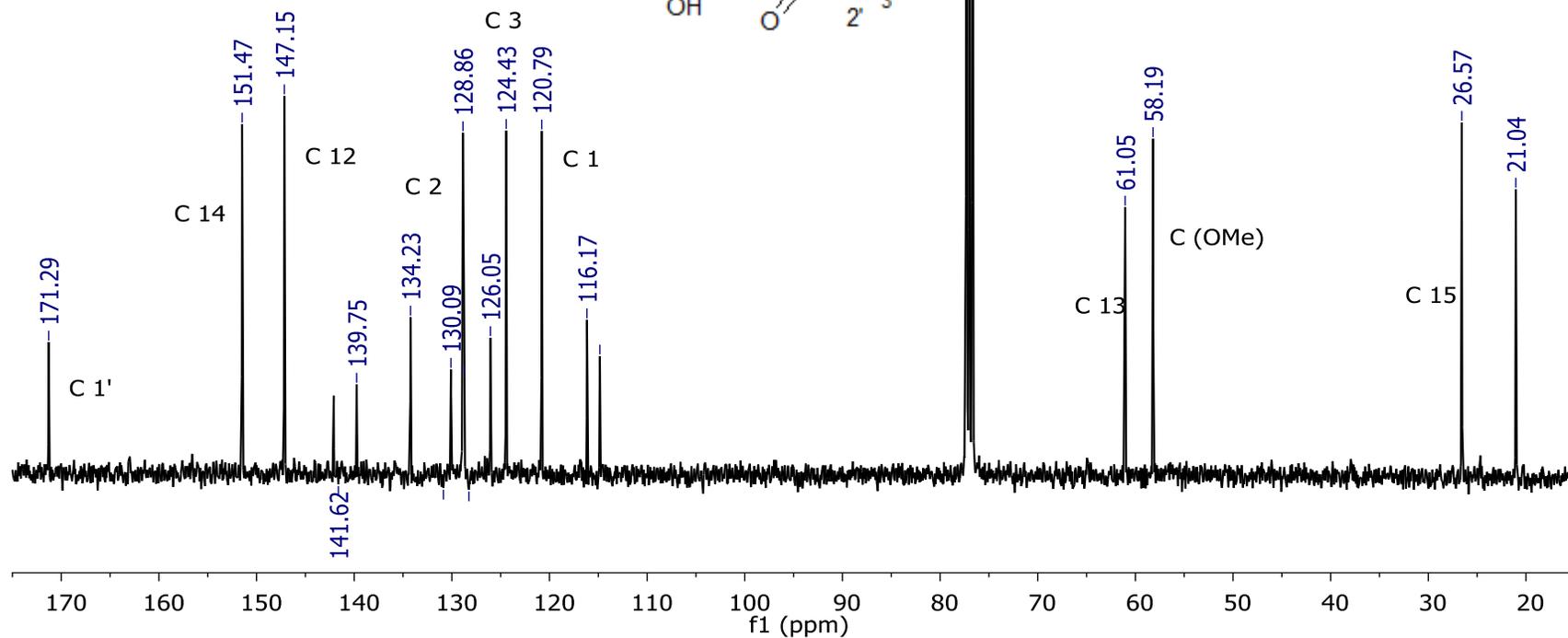
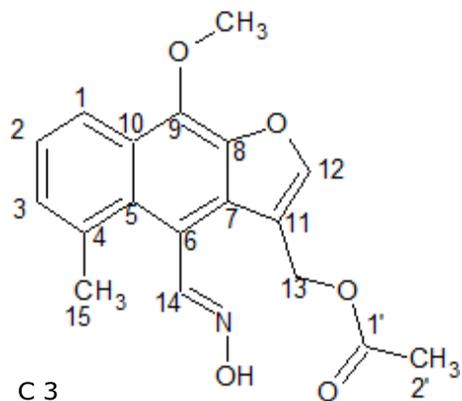


Espectro 8. RMN ¹H Oxima de acetato de matorina (Producto 1)



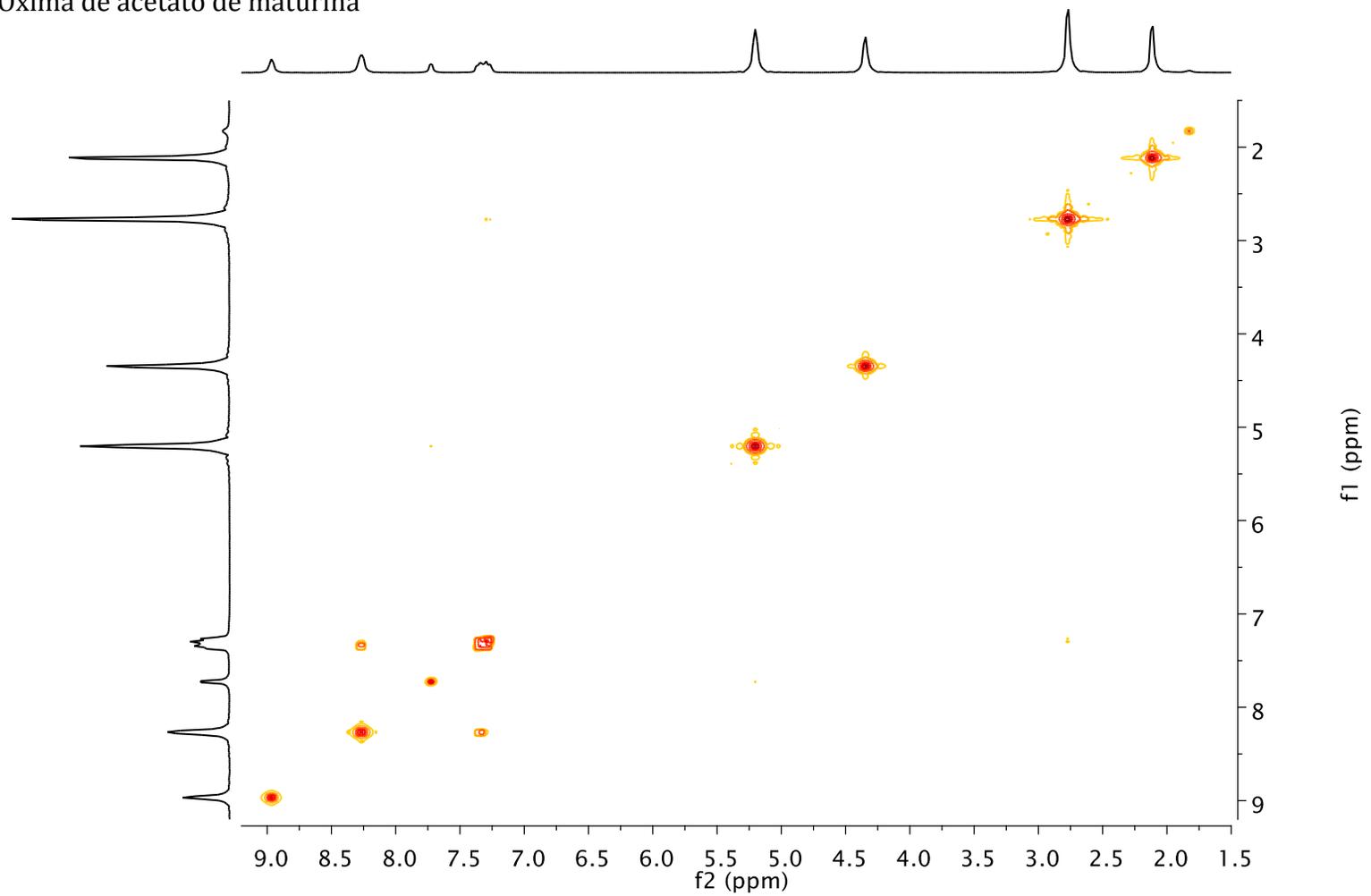
Espectro 9. Espectro de Masas (IE) Oxima de acetato de maturina (Producto 1)

Disolvente: CDCl₃
Experimento 13C
Bruker Avance III 100 MHz (H)
Oxima de acetato de maturina



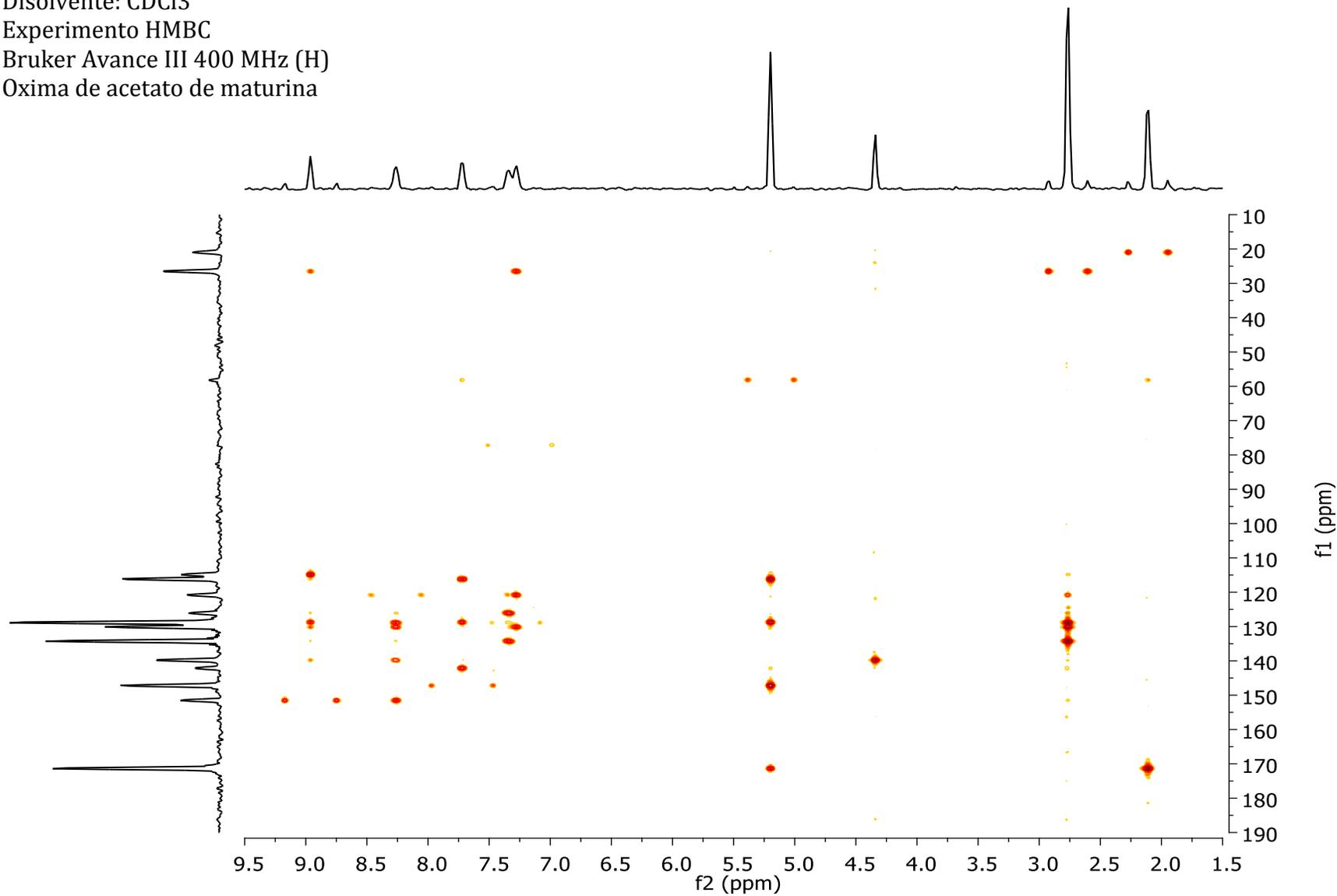
Espectro 10. RMN de ¹³C Oxima de acetato de matorina (Producto 1)

Disolvente: CDCl₃
Experimento COSY
Bruker Avance III 400 MHz (H)
Oxima de acetato de maturina



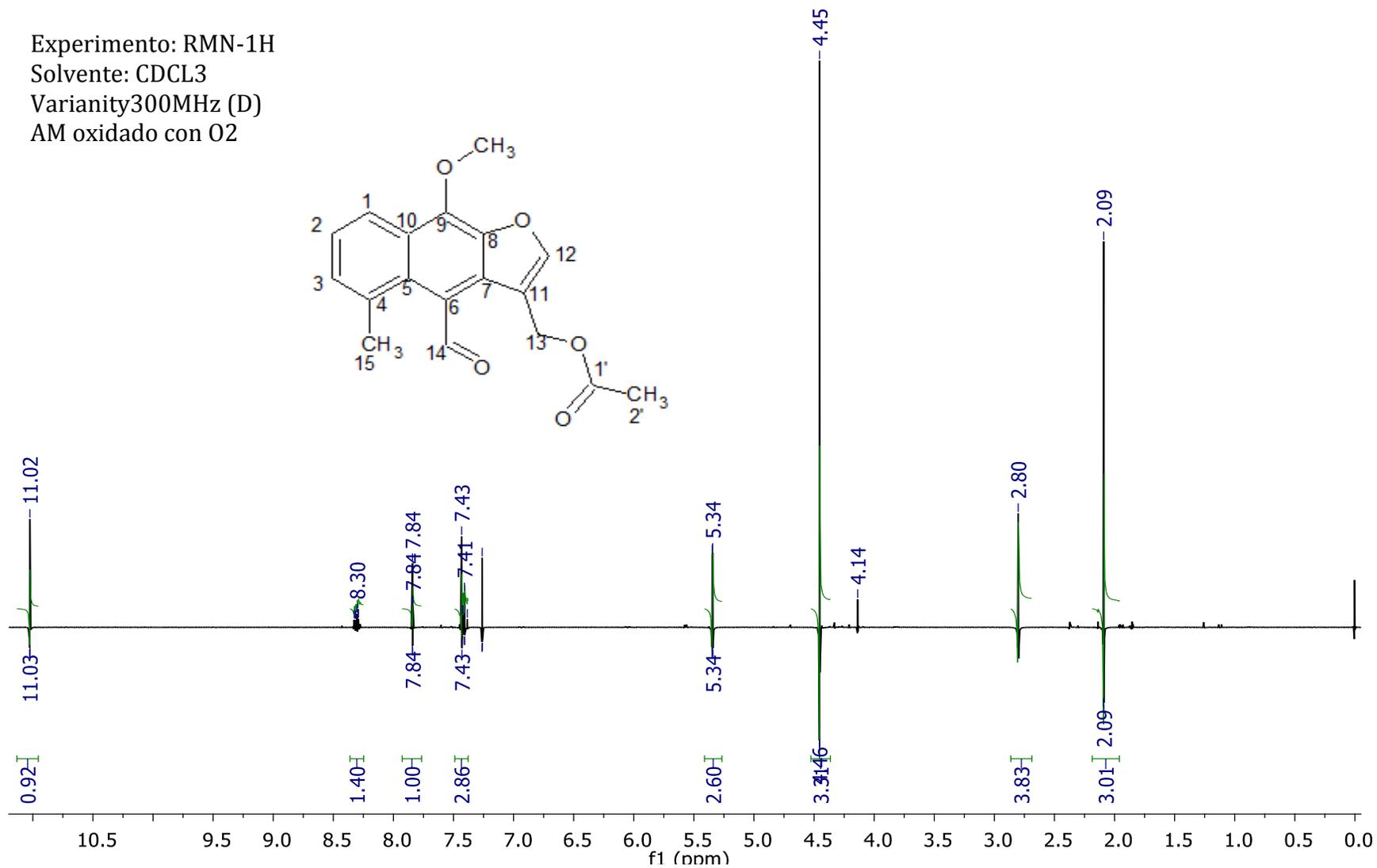
Espectro 11. RMN experimento COSY de Oxima de acetato de maturina (Producto 1)

Disolvente: CDCl₃
Experimento HMBC
Bruker Avance III 400 MHz (H)
Oxima de acetato de maturina

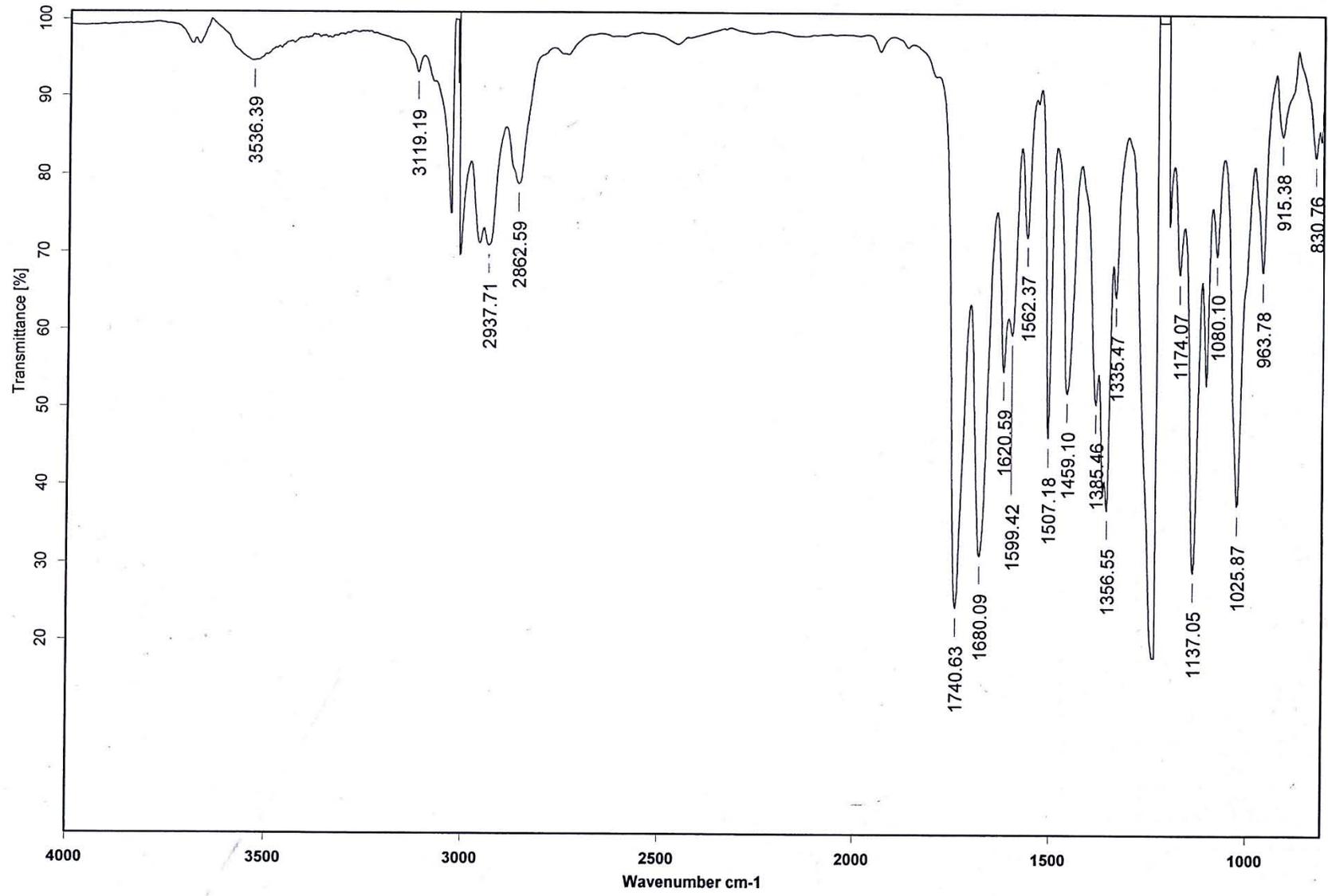


Espectro 12. RMN experimento HMBC de Oxima de acetato de maturina (Producto 1)

Experimento: RMN-1H
Solvente: CDCL3
Variación 300MHz (D)
AM oxidado con O2

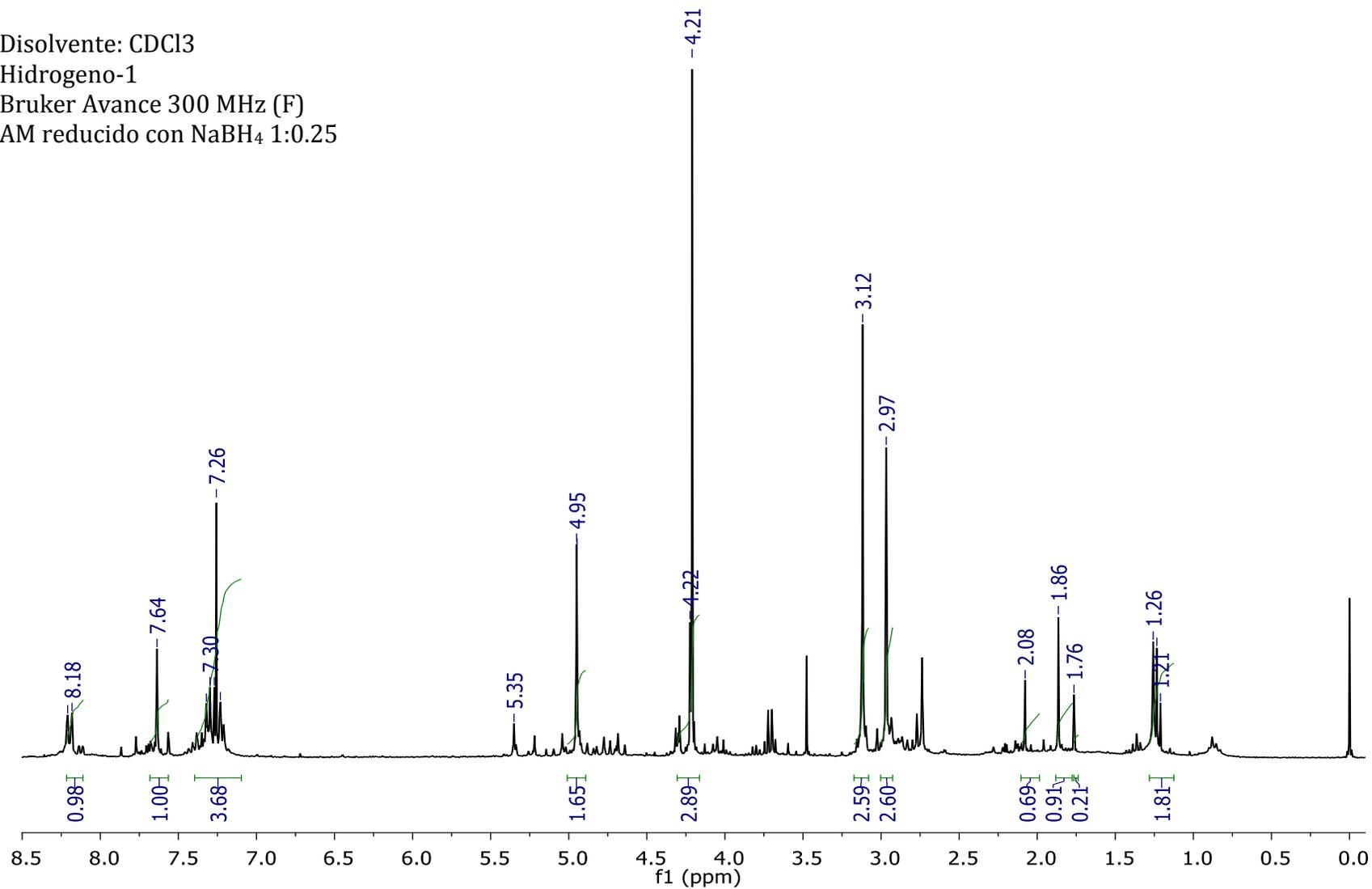


Espectro 13. RMN de ¹H Oxidación de AM con O₂ (Producto 2)

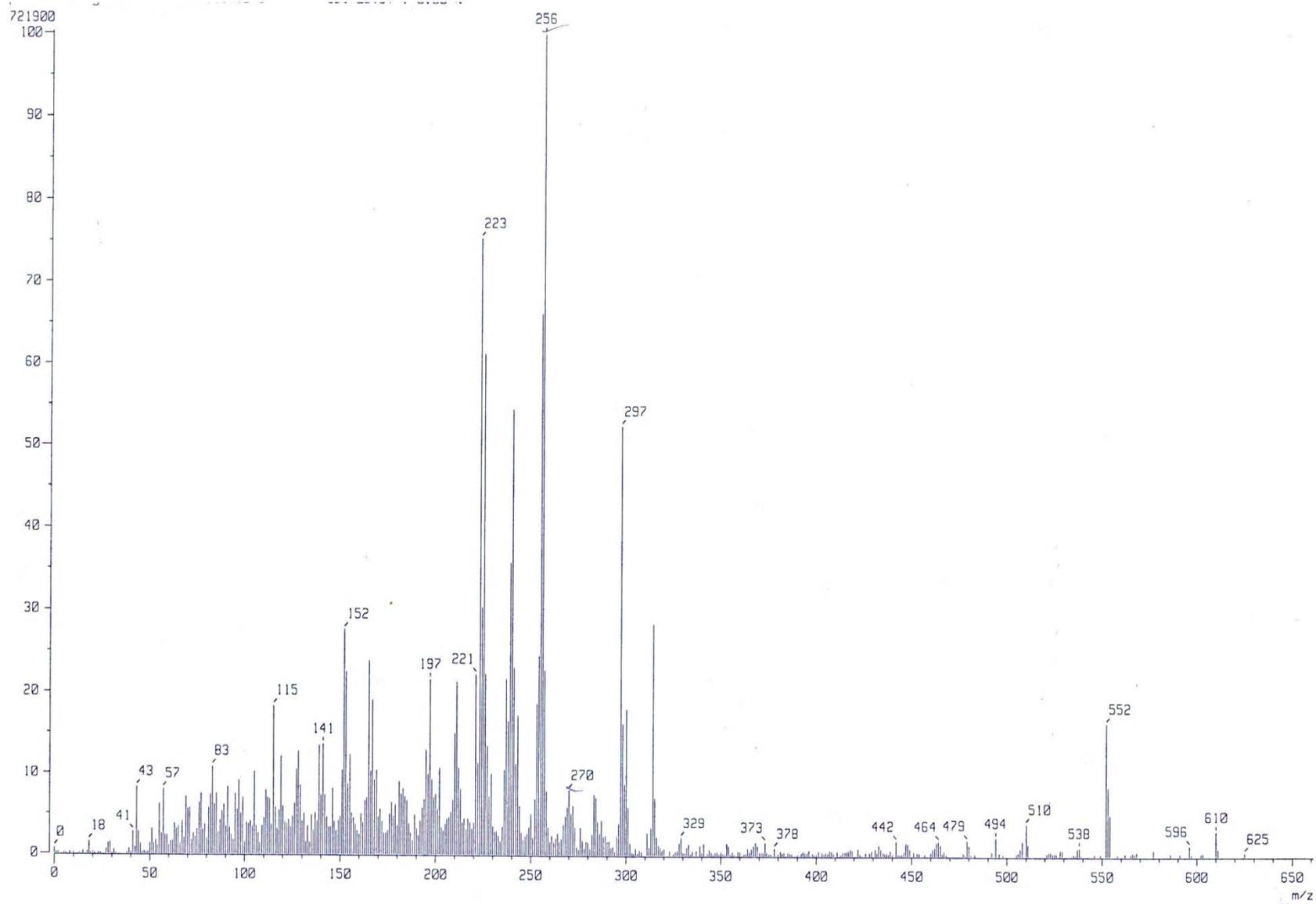


Espectro 14. IR de Oxidación de AM con reactivo de Jones (Producto 2)

Disolvente: CDCl₃
Hidrogeno-1
Bruker Avance 300 MHz (F)
AM reducido con NaBH₄ 1:0.25

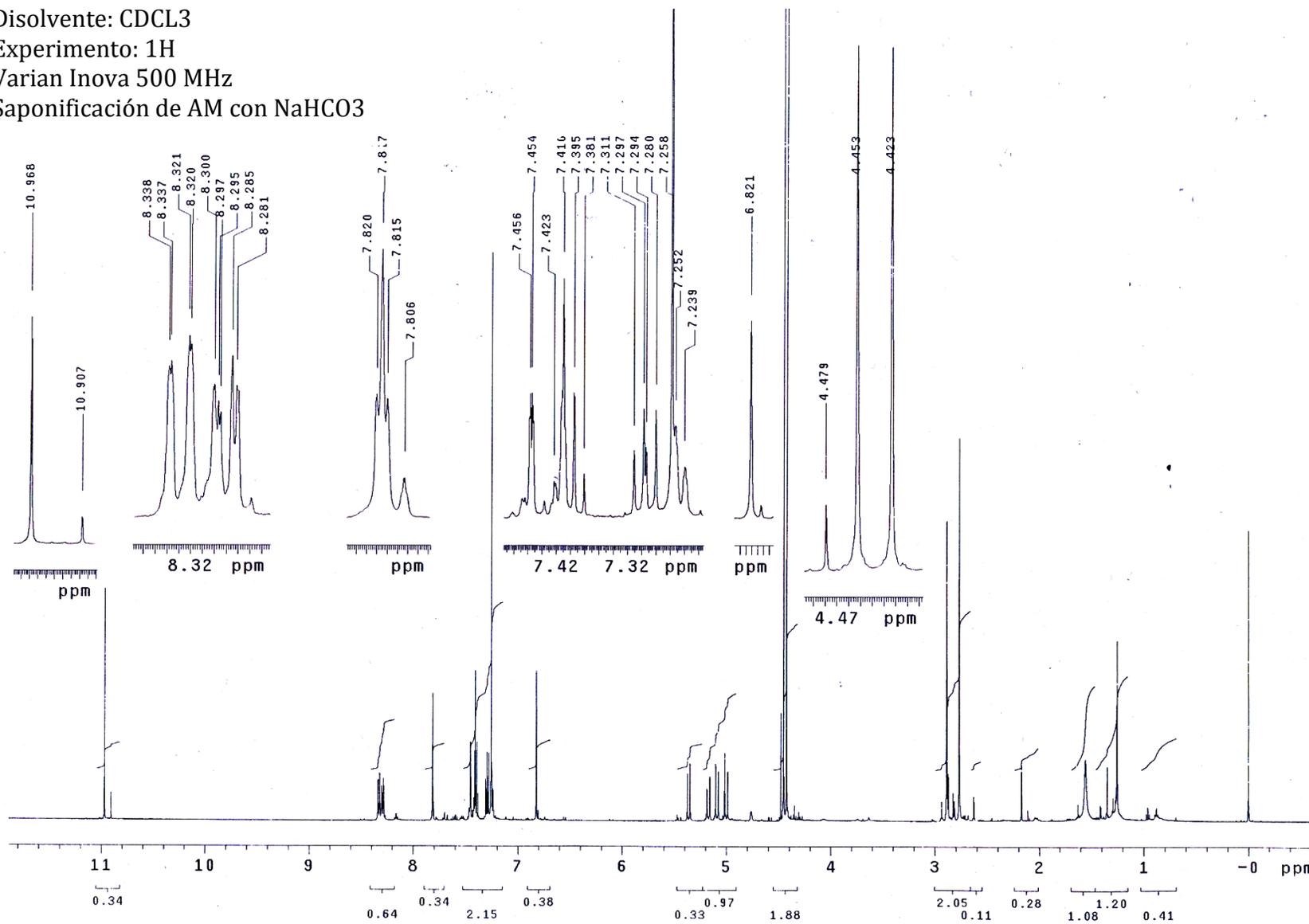


Espectro 15. RMN de ¹H Producto de Reducción con NaBH₄ 1:0.25 (Producto 3)



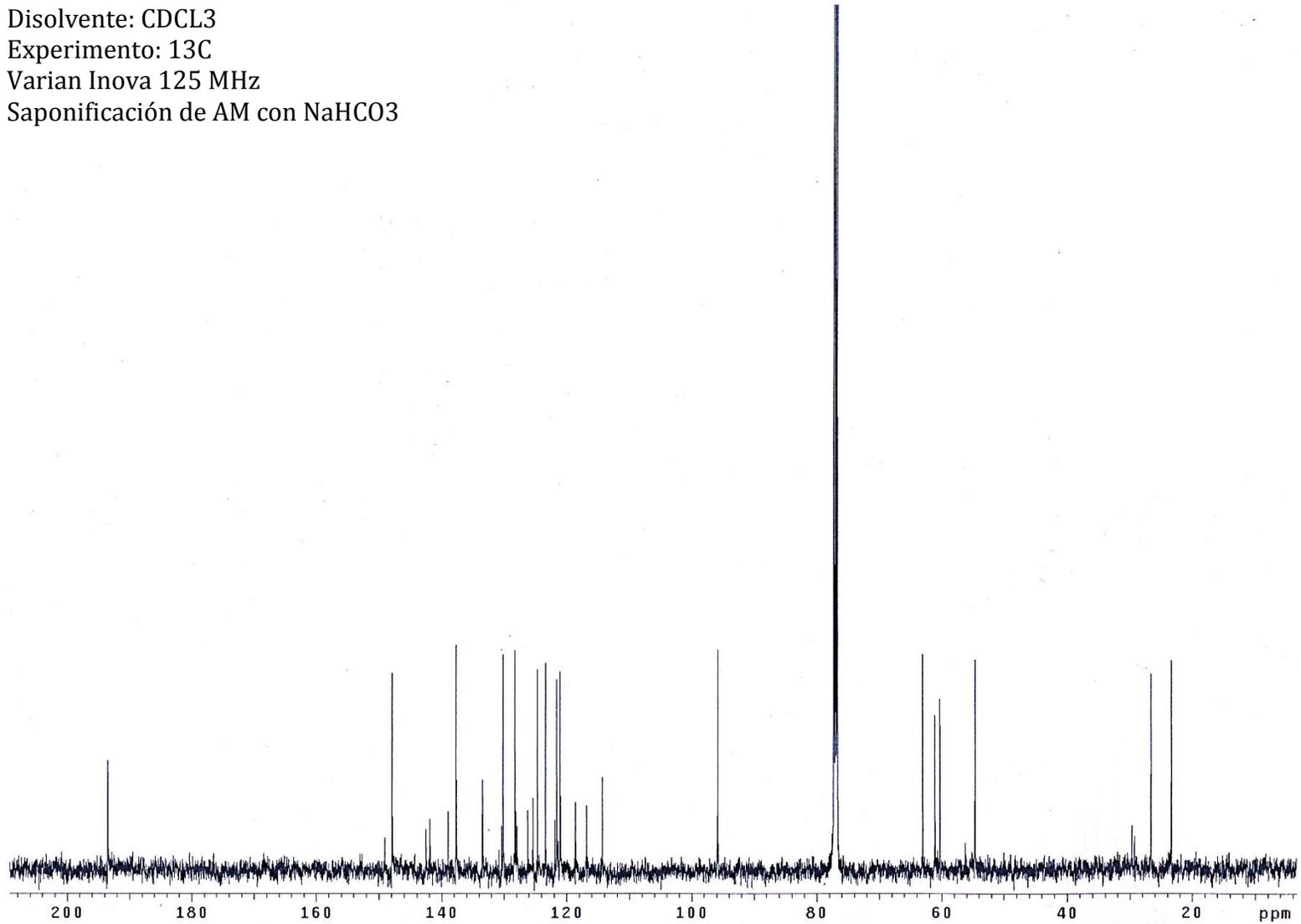
Espectro 16. Espectro de masas (IE) Producto de Reducción con NaBH_4 1:0.25 (Producto 3)

Disolvente: CDCL3
 Experimento: 1H
 Varian Inova 500 MHz
 Saponificación de AM con NaHCO3



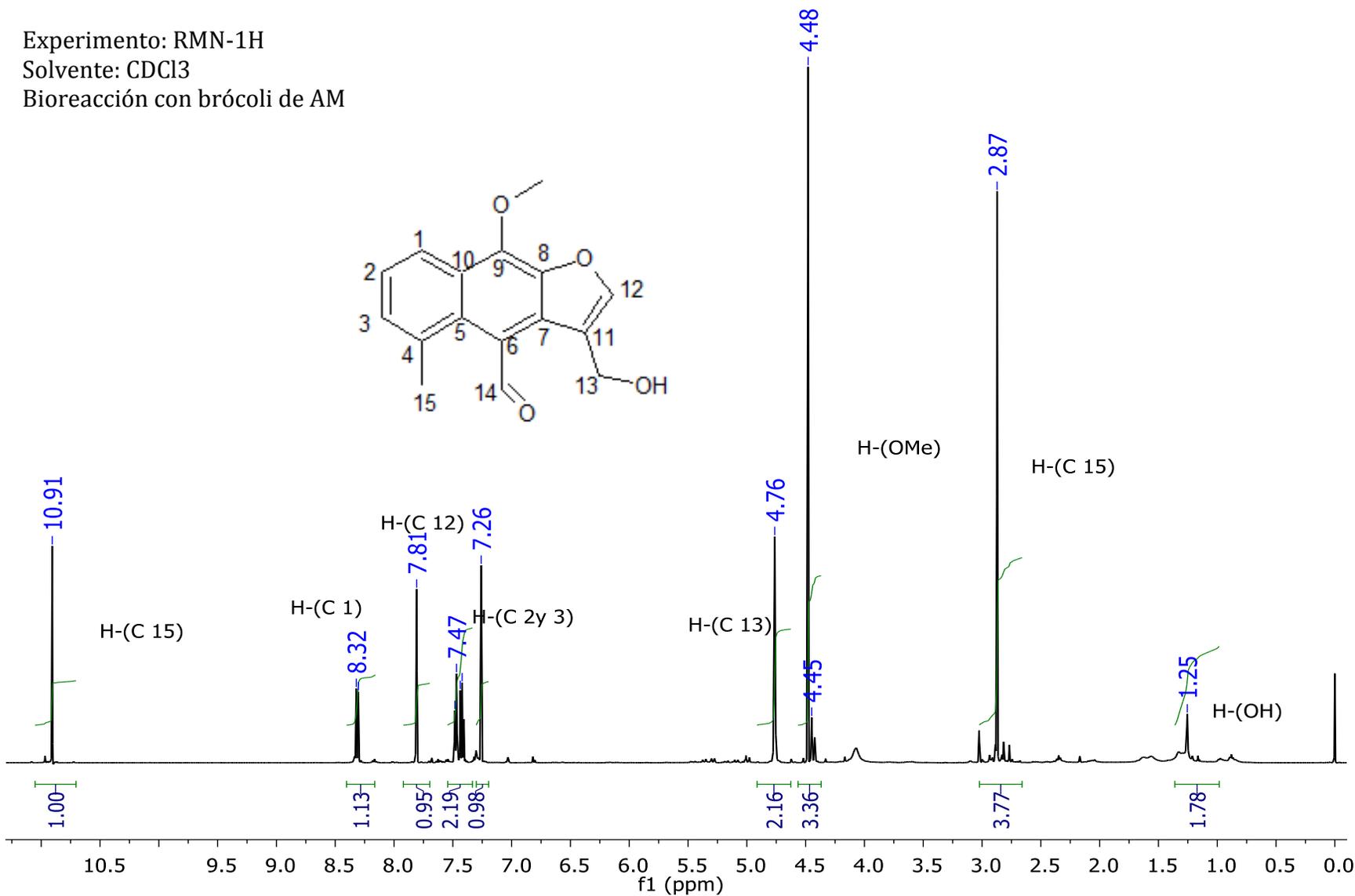
Espectro 17. RMN de ¹H Producto de saponificación con NaHCO₃

Disolvente: CDCL3
Experimento: 13C
Varian Inova 125 MHz
Saponificación de AM con NaHCO3



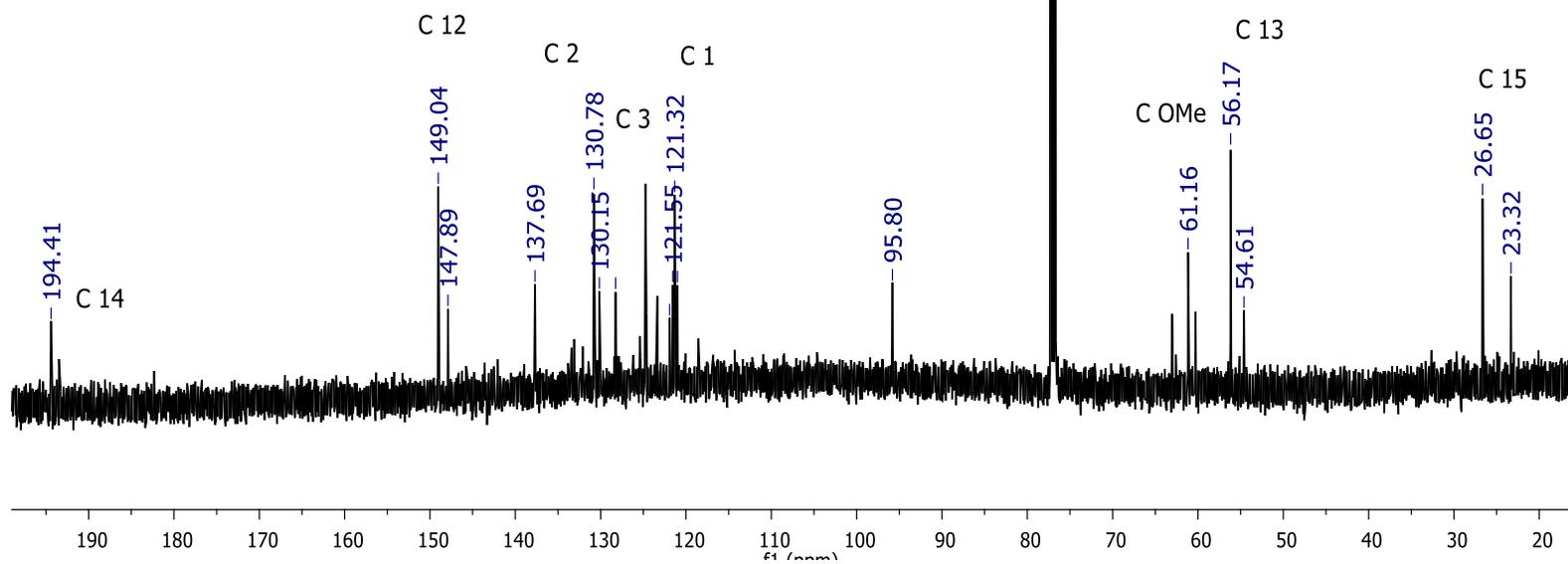
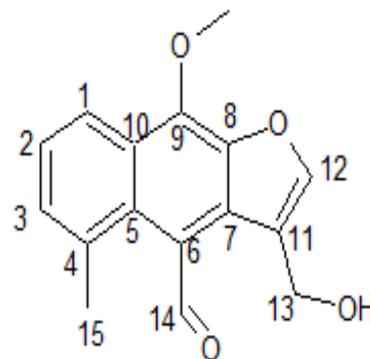
Espectro 18. RMN de ¹³C Producto de saponificación con NaHCO₃

Experimento: RMN-1H
Solvente: CDCl3
Bioreacción con brócoli de AM

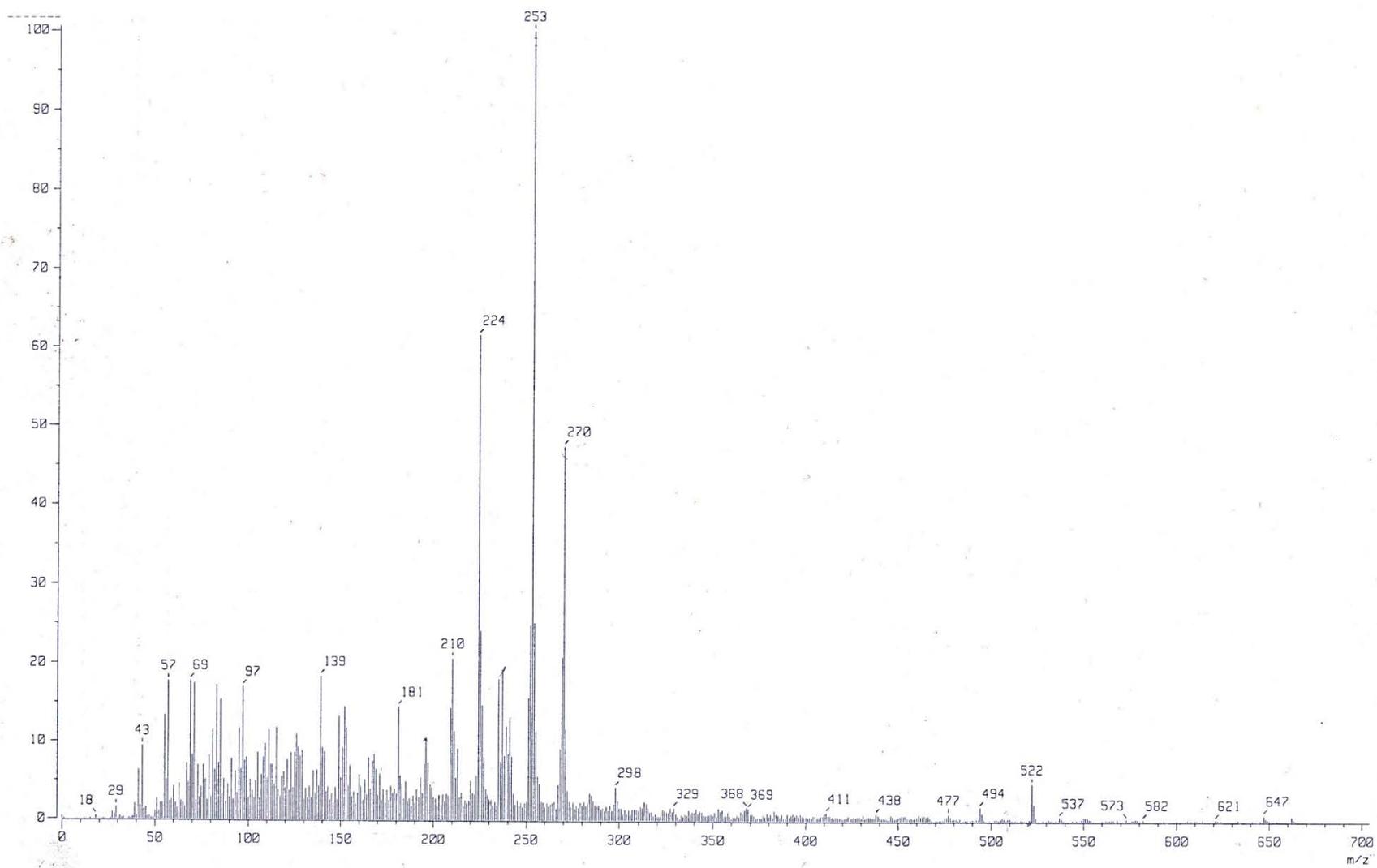


Espectro 19. RMN de ¹H Producto de reacción con brócoli (maturina, Producto 4)

Experimento: RMN-C13
Disolvente: CDCL3
UnityInova-125.71MHz (G)
Bioreacción con brócoli de AM



Espectro 20. RMN de ¹³C Producto de reacción con brócoli (maturina, Producto 4)



Espectro 21. Espectro de masas (IE) de producto de reacción con brócoli (maturina, Producto 4)

Metodologías empleadas para la realización de pruebas biológicas, proporcionadas por el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química.

1. Actividad antioxidante

● Método de DPPH·

La actividad antioxidante de los compuestos se realizó de la siguiente manera: Se tomaron por triplicado 50 µL, de las soluciones de cada uno de los compuestos, a diferentes concentraciones. Se depositaron en una microplaca de 96 pozos, posteriormente se agregaron 150 µL de una solución de DPPH· 133.33 µM en etanol (concentración final de 100 µL). La mezcla se protegió de la luz y se agitó por 30 min a 37 °C, posteriormente se realizaron las lecturas de absorbancia a 515 nm en un lector de microplacas (Biotek ELx808).

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

$$\% \text{ de reducción} = \left(\frac{C - E}{C} \right) \times 100$$

Donde:

C = Es la DO promedio del control (DPPH· 100 µL)

E = Es la DO promedio de las soluciones problema + DPPH· 100 µL

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

● Método de TBARS

Este método se realizó en tres etapas:

Primera etapa: Homogenización del cerebro de rata.

Se anestesiaron ratas, hembras Wistar, con éter y se sacrificaron por dislocación cervical. Se hizo una disección para extraer el tejido cerebral completo, que se colocó en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Se conservó a -70 °C hasta el inicio del experimento.

El cerebro se lavó con abundante agua destilada, para eliminar los eritrocitos presentes en el tejido, posteriormente se pesó y se agregaron 10 mL de PBS (9.5 mM pH 7) por cada gramo de cerebro, posteriormente se homogeneizó por 60 s, se centrifugó por 10 min a 3000 rpm y se recuperó el sobrenadante.

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

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

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

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

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

Tercera etapa: Inducción de oxidación con FeSO_4

Esta etapa se llevó a cabo en baño de hielo. Para cada muestra se colocaron por duplicado 375 μ L de sobrenadante de homogenizado de cerebro de rata en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente se agregaron, a todos los tubos, 50 μ L de una solución 20 μ M de EDTA en PBS y enseguida se adicionaron 25 μ L de la muestra (20 veces más concentrada) y se incubaron por 30 min a 37 °C con agitación constante.

Terminado el tiempo de incubación, se agregaron 50 μ L de una solución de FeSO_4 100 μ M y se incubaron por segunda vez a 37 °C con agitación constante por 1h. Terminado el tiempo de la segunda incubación se agregaron 500 μ L de reactivo TBA

(ácido tiobarbitúrico al 0.5% en NaOH 0.05N : ácido tricloroacético al 30% [1:1]) y se colocaron en baño de hielo por 10 min. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 12000 rpm a temperatura ambiente por 5 min, posteriormente se incubaron a 80°C en baño de agua. Pasado el tiempo de incubación se tomaron 200 µL de cada tubo y se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas.

Volúmenes utilizados en cada experimento.

Volumen (µl)	Blanco	Basal	FeSO₄	FeSO₄ + vehículo	Muestra
375	PBS	HCR	HCR	HCR	HCR
50	EDTA	EDTA	EDTA	EDTA	EDTA
25	Vehículo	PBS	PBS	Vehículo	Compuesto
50	FeSO ₄	Agua	FeSO ₄	FeSO ₄	FeSO ₄
500	TBA	TBA	TBA	TBA	TBA

TBA: Ácido tiobarbitúrico

HCR: Homogenizado de cerebro de rata

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos

2. Citotoxicidad

La citotoxicidad de las células tumorales después de su tratamiento con el compuesto a probar fue determinada empleando el colorante sulforodamina B (SRB) en microcultivos para medir el crecimiento y la viabilidad de las células.

El procedimiento consistió en lo siguiente

1. En dos placas (A1 y A2) de 96 pozos cada una, se colocaron por duplicado 100 µL de cada línea celular en evaluación y de blanco (medio de crecimiento). De acuerdo a la figura An-1. Una tercera placa (B) se utilizó como testigo (evaluación a tiempo cero) en la cual se colocaron los mismos volúmenes de cada línea celular y blanco. Las densidades celulares fueron las siguientes: 5x10⁴ células/pozo de K-562 y MCF-7, 7.5x10⁴ células/pozo de U251, PC-3 y

SCLU-1 y 10x10⁴ células/pozo de HCT-15. A continuación cada pozo se incubó a 37°C por 24h y atmosfera con 5% de CO₂.

2. Posteriormente se adicionaron en las placas, 50 µL de los compuestos evaluados, disueltos en medio (DMSO al 1%) las placas se incubaron por 48h bajo las mismas condiciones del paso anterior. Por su parte, a la placa B solo se agregaron 100 µL de medio y se incubó 1h en las mismas condiciones.
3. Una vez terminado el tiempo de incubación de cada placa, las células se fijaron con una disolución acuosa de ácido tricloroacético (ATCA) al 50% (50 µL/pozo). La placa se incubó durante 60 min a 4°C. los sobrenadantes se desecharon, la placa se lavó 3 veces con agua destilada y se dejó secar a T amb. Posteriormente las células se trataron con 100 µL de sulforodamina B al 0.4% durante 30 min a T amb. La SRB es un colorante aniónico que se une electrostáticamente a los residuos aniónicos de las proteínas de las células cancerosas que fueron fijadas con ATCA. Después se lavaron las placas con una solución de ácido acético al 1%. El colorante se extrajo con una solución de 10 mM de base tris no amortiguada.
4. Finalmente se mide la densidad óptica de las muestras tratadas en un lector de microplacas bio kinetic a una absorbancia de 515nm. La intensidad de color es directamente proporcional al número de células vivas, por tanto a mayor coloración en los pozos menor porcentaje de inhibición de crecimiento celular.
5. El porcentaje de inhibición de crecimiento celular (%IC) se calculó para cada concentración y para cada línea celular utilizando la siguiente ecuación:

$$\%IC = 100 - \left(\frac{B \times 100}{A} \right)$$

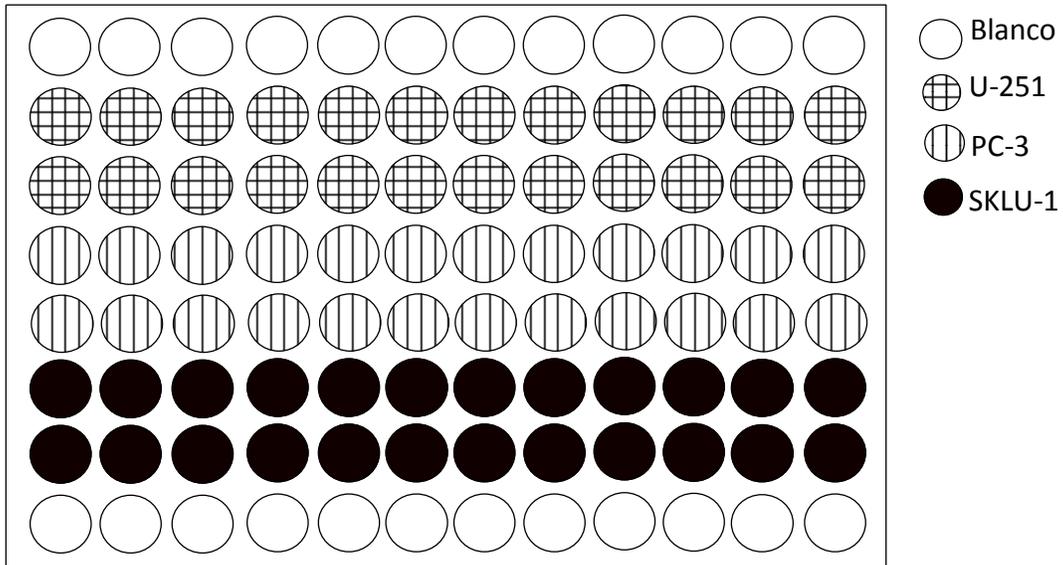
Donde:

%IC = Porcentaje de inhibición de crecimiento

A = DO promedio de las células sin tratar

B = DO promedio de las células tratadas con el compuesto en estudio.

Placa A1



Placa A2

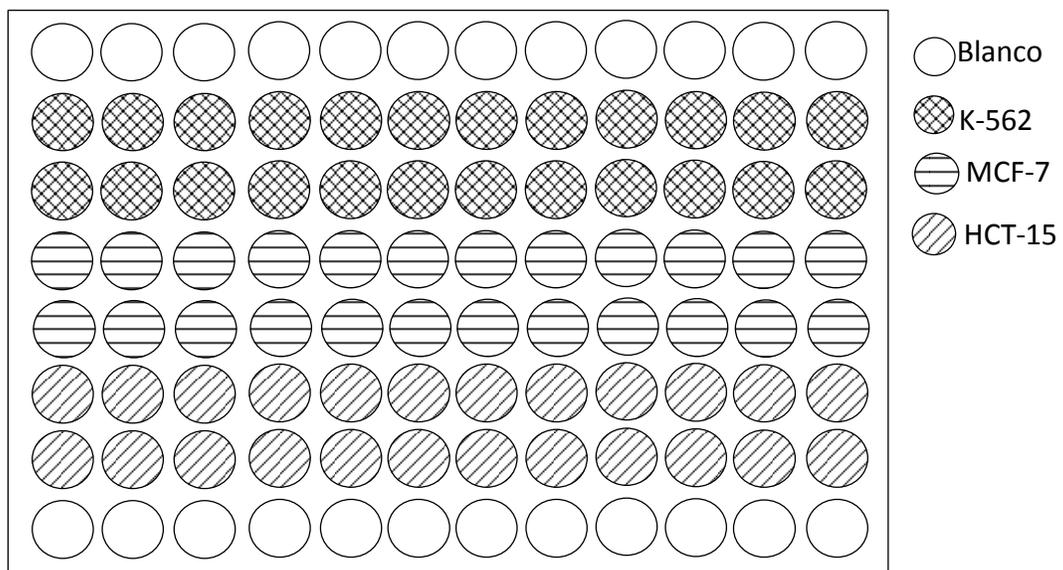


Figura An-1. Placas de microcultivos.

