

Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería



Caracterización fitoquímica de metabolitos secundarios
presentes en *Abronia maritima* y síntesis de derivados de 1-
fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona con actividad biológica

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

MC. Victor Wagner Barajas Carrillo

Tijuana, B.C.

Diciembre 2020

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 305

Tijuana, B. C., a 3 de Diciembre del 2020

C. Victor Wagner Barajas Carrillo
Pasante de: Doctor en Ciencias
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

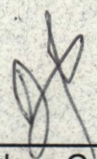
Es propuesto, por los C.C. Dr. Iván Córdova Guerrero

Dr. Raúl Díaz Molina

Quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente,
referido al tema Caracterización fitoquímica de metabolitos secundarios
presentes en Abronia marítima y síntesis de derivados de 1-fenil-3metil-2-
pirazolin-5-ona con actividad biológica.

El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

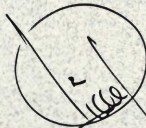
- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- ANTECEDENTES
- III.- OBJETIVOS
- IV.- HIPÓTESIS
- V.- EXPERIMENTAL
- VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- VII.- CONCLUSIONES
- VIII.- REFERENCIAS

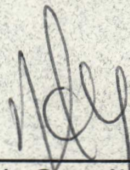

Dr. Iván Córdova Guerrero
Director de Tesis

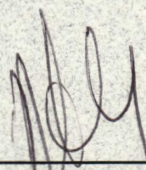
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO


Dr. Raúl Díaz Molina
Co- Director de Tesis


Dr. José Luis González Vázquez
Director


Q. Noemí Hernández Hernández
Sub-Directora

"El hombre no puede obtener nada sin dar algo a cambio. Para crear, algo de igual valor debe perderse. Esa es la primera ley de la Alquimia de Equivalencia de Intercambio."

Hiromu Arakawa, 2001

Instituciones participantes

Universidad Autónoma de Baja California



Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

Facultad de Medicina y Psicología



Centro de Graduados e Investigación en Química



**Centro de Graduados e Investigación en Química
del Instituto Tecnológico de Tijuana**

Universidad Autónoma de Nuevo León



Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Dedicatoria

Dedico esta Tesis a Isaac Torres Oliva, Carmen E. Carrillo González, Isabel Noriega Escurdia, María Evarista Arellano García, José Jack Barajas Carrillo, Minerva, Kuro Oni, Ñanda, Minino, Princesa miau y Presidenta miau; ya que en incontables veces sin importar el día u hora han estado a mi lado de distintas maneras y gracias a esos momentos se ha concluido este paso tan importante en mi vida tanto profesional y personal.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y a la facultad de Ciencias Químicas e ingeniería por abrirme las puertas y permitirme formar parte de estas magnas instituciones.

A los doctores Iván Córdova Guerrero, Horacio E. Almanza Reyes, Ignacio A Rivero Espejel, Raúl Díaz Molina, Dr. Víctor G. García González y Juan Cruz Reyes ya que con su guía, apoyo y paciencia y fue posible la conclusión de este trabajo.

Al laboratorio de Química Medicinal y Productos naturales que desde hace cinco años me permitió adentrarme al mundo de la fitoquímica experimental y la síntesis orgánica con el apoyo de todos mis compañeros y amigos Ana, Isabel, Rosa, Damián, Jesús, Eduardo, Ricardo, Rocío, Laura, Arturo, Manuel, Tania, Lluvia, Denise que muchas veces un cafecito con pan era la mejor terapia para un día pesado.

Al Centro de Graduados e Investigación en Química del Instituto Tecnológico de Tijuana (ITT), al Dr. Daniel Chávez Velazco así como al Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y al Dr. Ricardo Salazar Aranda, por el apoyo brindado en diferentes experimentos.

Finalmente agradezco el apoyo económico brindado por CONACyT, durante el desarrollo de este proyecto con el Número 449470.

Gracias a todos...

RESUMEN

Resumen

La química medicinal es la disciplina encargada de la búsqueda de compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales, así como el desarrollo de nuevas sustancias a través de herramientas como la síntesis orgánica y las técnicas computacionales, todo esto tiene como fin la obtención y desarrollo de nuevos productos farmacéuticos con fines terapéuticos.

El presente trabajo se enfoca en dos aspectos importantes de la química medicinal. El primero es una aproximación al conocimiento de los metabolitos secundarios presentes en una planta endémica de la región de Baja California conocida como *Abronia maritima*, a la cual por medio de una maceración hidroalcohólica se pudo obtener un extracto crudo y este a su vez se fraccionó con base en la metodología de Kupchan modificada con lo que se obtuvo cuatro particiones, las cuales se estudiaron de manera independiente por medio de las técnicas de tamizaje fitoquímico y perfil antioxidante. El resultado del tamizaje fitoquímico del extracto crudo y particiones, mostraron la presencia de alcaloides y glucósidos antraquinónicos en todos ellos y solo el extracto de DCM presentó el mayor número de resultados positivos, lo que sugiere que los metabolitos mayoritarios de *A. maritima* son de polaridad media. Para el caso de la evaluación antioxidante con la técnica de DPPH, el extracto de DCM mostró un mejor efecto con una CE_{50} de 0.120 mg/mL, mientras que en la técnica de ABTS el extracto crudo presentó una mayor actividad con una CE_{50} de 1.047 mg/mL y finalmente en β -caroteno, la partición hexánica tuvo el mejor perfil de inhibición oxidativa con un 67 %.

El segundo aspecto se enfoca en la síntesis orgánica de productos tipo éster a partir de la 1-fenil-3-metil-pirazolin-5-ona también conocida como Edaravona. De esta estructura se sintetizaron 16 productos, los cuales fueron caracterizados por medio de distintas técnicas espectroscópicas y una espectrométrica, además se evaluó su actividad antioxidante, perfil citotóxico, actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa y con el uso de herramientas computacionales se buscó la propuesta como agentes terapéuticos en el antiagregamiento del péptido β -amiloide 1-42 y la fracción 25-35, así como la predicción de sus propiedades ADME. La evaluación antioxidante de los derivados sintéticos indicó que el compuesto Edaval, presenta una mejor acción antirradicalaria frente a los radicales DPPH y ABTS con

CE₅₀ de 0.0078 y 0.2094 mg/mL. En el caso del perfil citotóxico, los productos Eda-Ptol y Eda-cinn presentaron una CT_{x50} de 0.04 y 0.47 mg/mL respectivamente. En la parte computacional, los compuestos sintéticos mostraron un mejor perfil de inhibición con la enzima acetilcolinesterasa que con los péptidos de β -amiloide. Finalmente, la evaluación de las propiedades ADME los productos presentan buenas propiedades de absorción gastrointestinal así como la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

Palabras clave

Química medicinal, Fitoquímica, Síntesis orgánica, Edaravona, producto tipo éster, acetilcolinesterasa, β -amiloide, Antioxidante, *Abronia maritima*, análisis *in silico*.

ÍNDICE

ÍNDICE

Hoja de firmas	I
Instituciones participantes	III
Dedicatoria	V
Agradecimientos.....	VI
Resumen	VIII
Palabras clave	IX
ÍNDICE.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
ÍNDICE DE TABLAS	XVIII
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	XX
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	XXII
I INTRODUCCIÓN	2
II ANTECEDENTES	5
2.1 Etnobotánica y aspectos históricos.....	5
2.2 Diversidad botánica	7
2.4 Metabolitos aislados con actividad biológica	9
2.5 Metabolitos aislados de miembros del género <i>Abronia</i>	13
2.6 Estrés oxidativo y enfermedades crónico degenerativas.....	15
2.7 Antioxidantes	17
2.8 Familia molecular de las pirazolinonas	17
2.9 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona	18
2.10 Síntesis de 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona y derivados.....	18
2.11 Generalidades de acetilcolinesterasa	26
2.12 Estructura de Acetilcolinesterasa.....	27
2.13 Estructura del sitio catalítico	29
2.14 Inhibidores	32
2.15 Alzheimer	33
2.16 β -amiloide (β A) y placas seniles	33
III Objetivos	37
3.1 Objetivos generales	37
3.2 Objetivos específicos	37

IV Hipótesis	39
V Experimental	41
5.1 Generalidades	42
5.1.1 Reactivos, solventes y condiciones de trabajo	42
5.1.2 Técnicas analíticas	42
5.1.3 Descripción taxonómica de <i>Abronia maritima</i>	45
5.1.4 Colecta, secado y procesamiento del material vegetal	45
5.2 Generación de extracto etanólico	47
5.3 Partición Kupchan modificado.	47
5.4 Tamiz fitoquímico	49
5.4.1 Alcaloides (estándar positivo: sulfato de quinina)	50
5.4.2 Taninos (estándar positivo: ácido gálico)	51
5.4.3 Esteroides y triterpenoides (estándar positivo: colesterol)	51
5.4.4 Flavonoides (estándar positivo: extracto cítrico)	52
5.4.5 Carbohidratos (estándar positivo: fructosa)	52
5.4.6 Saponinas (estándar positivo: saponina)	53
5.4.7 Glucósidos antraquinónicos (estándar positivo: ácido carminico)	53
5.4.8 Cumarinas	54
5.5 Determinación de la actividad antioxidante.	56
5.5.1 Método de decoloración del radical libre 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)....	56
5.5.2 Evaluación antioxidante	57
5.5.3 Método de reducción del catión radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)	59
5.5.4 Evaluación antioxidante	60
5.5.5 Método de decoloración oxidativa del β -caroteno.	62
5.5.6 Evaluación antioxidante	63
5.5.7 Síntesis de derivados de 1-fenil-3metil-2-pirazolin-5-ona	65
5.5.8 Cultivo celular	94
5.5.9 Ensayo de viabilidad celular por medio del ensayo MTT	97
5.5.10 Ensayo MTT	99
5.5.11 Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa	102
5.5.12 Análisis <i>in silico</i>	104
VI Resultados y Discusión del estudio fitoquímico	106

6.1 Resultados de la maceración etanólica en frío	106
6.2 Resultados de la partición Kupchan modificada	106
6.3 Resultados del tamizaje fitoquímico	108
6.4 Resultados de los ensayos antioxidantes del extracto etanólico y particiones de <i>Abronia maritima</i>	111
6.5 Resultados de la síntesis de derivados de 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona	116
6.5.1 Síntesis de 1-fenil-3-metil-4-benzoil-2-pirazolin-5-ona por la metodología de Jensen, 1959	116
6.5.2 Síntesis de derivados 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona por la metodología de Zamorano y Camus 2015 modificada.....	118
6.6 Resultados de la evaluación antioxidante de derivados acilados de la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona	160
6.7 Resultados de la evaluación de la viabilidad y citotoxicidad celular por medio del ensayo MTT	163
6.8 Resultados del ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa	169
6.9 Resultados del análisis <i>In silico</i>	172
6.9.1 Resultados de <i>docking</i> molecular de acetilcolinesterasa	172
6.9.2 Resultados de <i>docking</i> molecular de β -amiloide	175
6.9.3 Resultados de la evaluación <i>in silico</i> de los parámetros ADME.....	181
VII Conclusiones	187
VIII Referencias.....	190

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de 2'-O-Metilabronisoflavona (1), 9-O-Metil-4-hidroxiboeravinona B (2) y 6-Metoxiboeravinona C.	9
Figura 2. Estructuras de Mirabijalona A-D.	10
Figura 3. Estructura de la rotenona.	10
Figura 4. Estructura de 9-O-metil-10-hidroxicoccineona B.	10
Figura 5. Estructuras de boeravinona de izquierda a derecha G, H, I, J.	11
Figura 6. Boeravinona N.	11
Figura 7. Boeravinona B.	11
Figura 8. Pisonina B.	12
Figura 9. Pisovaninona.	12
Figura 10. Estructura del peltogynol.	12
Figura 11. Estructura de las bougainvinona A-H.	12
Figura 12. Especies del género Abronia.	13
Figura 13. Estructura de abronisoflavona.	14
Figura 14. Estructura de abroniona.	14
Figura 15. Estructura de abroniona A.	14
Figura 16. Pirazol e isómeros de pirazolona.	17
Figura 17. Estructuras de ampirona, metamizol y antipirina.	18
Figura 18. Estructura de 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona.	18
Figura 19. Estructuras tipo pirimidin-pirazolona con actividad antiviral.	22
Figura 20. Derivado 3-(4-nitrofenil) "13".	22
Figura 21. Estructuras con actividad inhibitoria de la tuberculosis.	23
Figura 22. Estructuras 4,4'-(arilmetilen) bis (1H-pirazol-5-ol).	23
Figura 23. Estructuras con actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética.	24
Figura 24. Especies moleculares de AChE, modificado de Taylor, 1994. Y Guiles.	28
Figura 25. Sitio catalítico.	29
Figura 26. Subsitio de unión aniónica.	30
Figura 27. Subsitio oxianión.	30
Figura 28. Subsitio aromático.	31
Figura 29. Subsitio aniónico periférico.	32
Figura 30. Moléculas utilizadas como inhibidores de AChE, de izquierda a derecha: tacrina, donepezilo, rivastigmina y galantamina.	32
Figura 31. Reacción general del radical DPPH frente a un antioxidante.	56
Figura 32. Reacción general del catión ABTS.	59
Figura 33. Reacción general de oxidación de β -caroteno.	62
Figura 34. Mecanismo de conversión de MTT a formazano por medio del metabolismo celular.	97
Figura 35. Compuesto 2, Eda-benz y numeración estructural.	121
Figura 36. Compuesto 3, Eda-cinn y numeración estructural.	124
Figura 37. Compuesto 4, Eda-ptol y numeración estructural.	126

Figura 38. Compuesto 5, Eda-acet y numeración estructural.....	129
Figura 39. Compuesto 6, Eda-val y numeración estructural.	131
Figura 40. Compuesto 7, Eda-DHA y numeración estructural.	133
Figura 41. Compuesto 8, Eda-2phcarb y numeración estructural.....	136
Figura 42. Compuesto 9, Eda-prop y numeración estructural.	138
Figura 43. Compuesto 10, Eda-hepta y numeración estructural.....	142
Figura 44. Compuesto11, Eda-otol y numeración estructural.....	144
Figura 45. Compuesto12, Eda-isobu y numeración estructural.	146
Figura 46. Compuesto13, Eda-octa y numeración estructural.....	148
Figura 47. Compuesto14, Eda-fenival y numeración estructural.	151
Figura 48. Compuesto15, Eda-phacet y numeración estructural.....	153
Figura 49. Compuesto16, Eda-naf y numeración estructural.....	155
Figura 50. Compuesto16, Eda-valp y numeración estructural.	158

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno de interés biológico (Tomado de Devasagayam y col. 2004).....	15
Tabla 2. Descripción de péptido de β A y característica más relevante.	34
Tabla 3. Metodologías realizadas en el extracto y particiones de <i>Abronia maritima</i>	50
Tabla 4. Parámetros y pesos obtenidos durante la etapa de maceración.	106
Tabla 5. Resultados de la partición Kupcham.....	107
Tabla 6. Aspecto físico del crudo y particiones.	107
Tabla 7. Resultados del tamizaje fitoquímico realizado a <i>Abronia maritima</i>	110
Tabla 8. Actividad antioxidante del extracto etanólico y particiones de <i>Abronia maritima</i>	111
Tabla 9. Claves de identificación y porcentajes de rendimiento de las moléculas sintetizadas.	118
Tabla 10. Datos de RMN ^1H y RMN ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 2, Eda-Benz.	122
Tabla 11 Datos de RMN ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC en CDCl_3 para el compuesto 3 Eda-cinn.	124
Tabla 12. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 4 Eda-ptol.....	126
Tabla 13. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 5 Eda-acet.....	129
Tabla 14. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 6 Eda-val.	131
Tabla 15. Datos de RMN ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC en CDCl_3 para el compuesto 7 Eda- DHA.....	134
Tabla 16. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 8 Eda-2phcarb.....	136
Tabla 17. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 9 Eda-prop.....	138
Tabla 18. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 10 Eda-hepta.....	142
Tabla 19. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 11 Eda-otol.	144
Tabla 20. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 12 Eda-isobu.	146
Tabla 21. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 13 Eda-octa.	148
Tabla 22. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 14 Eda-fenival.	151
Tabla 23. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 16 Eda-phacet.	153
Tabla 24. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 16 Eda-naf.....	156
Tabla 25. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 17 Eda-valp.	159
Tabla 26. Resultados de la evaluación antioxidante de los productos sintéticos.	161
Tabla 27. Resultados de la actividad citotóxica frente a una línea celular no tumoral de fibroblasto de ratón.....	168
Tabla 28. Actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa de los compuestos sintetizados.	Error! Bookmark not defined.
Tabla 29. Resultados del análisis de <i>docking</i> de los derivados sintéticos.	173
Tabla 30. Resultados del análisis de <i>docking</i> molecular de los derivados sintéticos para $\text{A}\beta$	176
Tabla 31. Cálculos de farmacocinética y e interacción con dianas biológicas de interés realizados por SwissADME.....	185

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Mecanismo de reacción entre acetoacetato de etilo y fenilhidrazina.....	19
Esquema 2. Condensación Claisen clásica y trasposición de Fries.	20
Esquema 3. Mecanismo de acilación directa en el carbono 4.	21
Esquema 4. Diagrama de flujo de la partición Kupcham modificada.	48
Esquema 5. Reacción global para la síntesis de derivados de 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona.	119
Esquema 6. Haluros de ácido empleados en la reacción de derivados.	119
Esquema 7. Mecanismo hipotético para la producción de radical edaravona por transferencia de electrones del anión edaravona al radical peroxilo y la formación de productos de oxidación (tomado de Watanabe y cols. 2017).	162
Esquema 8. Valores de solubilidad descrito por el modelo ESOL Log S.	181

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

•OH radical hidroxilo	EM espectrometría de masas
¹³C carbono 13	EtOH etanol
¹H hidrógeno 1	FeCl₃ cloruro férrico
¹O₂ Oxígeno singlete	H₂O agua
ABTS 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico	H₂O₂ peróxido de hidrógeno
AChE acetilcolinesterasa	HCl ácido clorhídrico
ACh acetilcolina	hep heptuplete o septuplete
AcOEt acetato de etilo	ICE inhibición de la colinesterasa
ADME absorción, distribución, metabolismo y excreción	iPrOH isopropanol
Br bromo	IR espectroscopia de infrarrojo
BuOH <i>n</i> -butanol	J constante de acoplamiento
°C grados centígrados	K₂S₂O₈ persulfato de potasio
C₄ carbono 4	KOH hidróxido de potasio
Ca(OH)₂ hidróxido de calcio	Me metilo
Ca⁺² ion calcio	Me₄Si tetrametilsilano
CAM nitrato de amonio cérico	mg miligramo
CDCl₃ cloroformo deuterado	mL mililitro
CT₅₀ Concentración citotóxica media	mM milimol
CI₅₀ concentración de inhibición media	m multiplete
Cl cloro	N nitrógeno
d doblete	N2a neuroblastoma de ratón
dd doble de dobletes	NaHCO₃ bicarbonato de sodio
ddd doble de doble de dobletes	nM nanomolar
DCM diclorometano	nm nanómetro
DMF dimetilformamida	NMR resonancia magnética nuclear
DPPH 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo	NO• Óxido nítrico
EA enfermedad de Alzheimer	NO₂ Dióxido de nitrógeno
	O₂• superóxido
	O₃ Ozono

OH hidroxilo

ONOO Peroxinitrito

ONOOH Ácido peroxinitroso

PPA proteína precursora amiloidea

ppm partes por millón

PrP-res proteína priónica resistente a
proteasa

p pentuplete o quinteto

q cuarteto o cuatruplete

RMN resonancia magnética nuclear

RNS reactive nitrogen species

ROO• radical peroxilo

ROOH hidroperóxido orgánico

ROS reactive oxygen species

seg Segundo

sext sextuplete o hextuplete

s singulete

ScN2a

seg. segundo

SOD superóxido dismutasa

tAChE acetilcolinesterasa de *T.*
californica

TCT cloruro de cianurilo

TLC cromatografía en capa fina

t triplete

tt triple de tripletes

WHO organización mundial de la salud

βA beta amiloide

δ desplazamiento químico

μg microgramo

μL microlitro

μM micromolar

INTRODUCCIÓN

I INTRODUCCIÓN

El presente trabajo está enfocado en tres aspectos relacionados a la química medicinal: En primer lugar se realiza una aproximación al conocimiento metabolitos secundarios presentes en la parte aérea de *Abronia maritima*, la cual es una planta endémica de la región de Baja California, a través de un estudio fitoquímico, el cual consiste en la obtención del material vegetal, generación de un extracto de carácter etanólico, seguido por un primer fraccionamiento para la obtención de particiones por medio del método de Kupcham modificado, lo siguiente que se realizó fue la caracterización de los metabolitos secundarios por técnicas colorimétricas para así obtener una aproximación del tipo cualitativa de los mismos, posteriormente se realizó los análisis de la actividad antioxidante por medio de tres técnicas, DPPH, ABTS y β -caroteno. Además se realizaron dos análisis enfocados a una parte biológica, los cuales fueron la inhibición enzimática de acetilcolinesterasa y de viabilidad celular.

El segundo lugar fue la síntesis de una serie de moléculas derivadas de la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona a través de distintas rutas sintéticas para la obtención de moléculas con potencial actividad biológica. De igual manera los productos sintéticos fueron caracterizados por técnicas analíticas como resonancia magnética de ^1H y ^{13}C así como espectrometría de masas. De igual manera para valorar su potencial uso como fármacos fueron evaluadas por técnicas antioxidantes las cuales fueron DPPH y ABTS. Como ensayos complementarios se valoró su potencial uso como inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa así como conocer si presentan toxicidad frente a una línea celular por medio del ensayo MTT.

Finalmente, como tercer parte de este trabajo está estructurado por el análisis *in silico* de los productos sintéticos, los cuales se analizaron vía *docking* molecular frente a tres dianas biológicas; dos pertenecientes a la enzima acetilcolinesterasa humana recombinante y de torpedo del pacífico, para la evaluación de afinidad hacia el receptor y la tercer diana utilizada fue una fracción tóxica del péptido β -amiloide (βA) 25-35 y 1-42 relacionada con la enfermedad de Alzheimer. Finalmente, se realizó una evaluación de las propiedades

ADME de los productos sintéticos para corroborar si los mismos pueden ser candidatos prometedores a moléculas terapéuticas.

ANTECEDENTES

II ANTECEDENTES

2.1 Etnobotánica y aspectos históricos

La etnobotánica es la disciplina que estudia la relación del ser humano con su medio vegetal, este término fue acuñado en 1896 por el botánico John William Harshberger (1869-1929) el cual fue utilizado para hacer referencia del uso de las plantas por los pueblos indígenas. Sin embargo, actualmente se le considera un campo de estudio interdisciplinario por lo cual se han desarrollado subdisciplina para su mejor entendimiento como arqueobotánica o paleobotánica (uso de las plantas en un contexto arqueológico), etnomicología (interacción de los seres humanos y los hongos), etnoecología (entendimiento del mundo natural por el ser humano), y etnofarmacología (uso del medio vegetal para la preparación de remedios farmacológicos).^{1,2}

Los registros más antiguos escritos del uso de las plantas provienen de la cultura egipcia de hace 3000 a 6000 años, la cual desarrolló valiosos preparados farmacológicos a base de materiales vegetales. En diversos papiros se tiene establecido que los doctores egipcios prescribían distintos tipos de remedios como sedantes, analgésicos, remedios para trastornos gastrointestinales, urinarios y resfriado común, de los cuales muchos eran administrados vía tópica, fumigación e inhalación de vapores. Algo más que se atribuye a los egipcios es el uso temprano de sustancias como el vino, aceite de ricino, marihuana, opio y cerveza hecha de cebada de trigo, los cuales los estudios modernos sugieren que estos habrían sido eficaces.³

El uso de preparados farmacológicos a base de plantas siguió en aumento en otras culturas como la china, griega, india, mesoamericana, entre otras.

La cultura china se ha caracterizado por tener un vasto conocimiento en materia botánica, por lo cual es ampliamente reconocida por su medicina tradicional. El origen de esta tradición se remonta a 3000 años antes de Cristo (a.C), con el emperador Shennong también conocido como el “divino granjero” quien se le atribuye la identificación de una gran variedad

de plantas con actividad farmacológica así como la primer farmacopea china “*Shennong pen ts'ao ching*”. Muchos de estos preparados siguen vigentes hasta nuestros días.^{2,4,5}

Por otro lado en India, evolucionó la medicina Ayurveda (del sánscrito *आयुर्वेद*: *āyuh*, ‘vida’ y *vedá*, ‘verdad, conocimiento’). El origen de la medicina Ayurveda es atribuido a los textos más antiguos, uno de estos es el *Atharva veda*, donde se hace mención de diversas enfermedades así como sus tratamientos. Fueron pioneros en utilizar presentaciones farmacéuticas como ungüentos, infusiones, maceraciones y preparados farmacológicos que incluían miel conocidos como electuario. Este vasto conocimiento no solo se centró en el tratamiento con preparados, sino también tuvo un impacto en áreas como la cirugía, lo cual es mencionado en el *Mahabharatha*, donde se hace referencia cirujanos que atienden a heridos y discapacitados con instrumentos y equipos en el campo de batalla. Algunas plantas medicinales ayurvédicas utilizadas hasta la fecha incluye *Azadirachta indica* A.Juss. (neem), *Centella asiatica* (L.) Urban (gotu kola), *Cinnamomum camphora* (L.) J.Presl. (alcanfor), *Elettaria cardamomum* (L.) Maton (ela o cardamomo), *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. Ex Kurz (raíz de serpiente india), *Santalum album* L. (sándalo), *Terminalia spp.* (myrobolan), *Withania somnifera* (L.) Dunal (aswargandha), *Boerhavia diffusa* L. (punarnava) entre otras.^{4,6,7}

En el continente americano en específico Mesoamérica, debido a su ubicación geográfica permitió que su diversidad vegetal fuera extremadamente rica, lo cual repercutió de manera positiva en los pueblos originarios. Previo a la llegada de los europeos ya existía una historia de por lo menos 3500 años en el uso de plantas para utilizadas para distintos fines, de las cuales muchas son consideradas sagradas debido a los distintos efectos ocurridos posterior a su administración, ejemplo de esto se tiene distintas plantas psicoactivas como el peyote (*Lophophora williamsii* (Lem.) J.M.Coult), ololiuqui (*Turbina corymbosa* (L.) Raf.), toluache (*Datura spp.*), así como plantas medicinales de las cuales podemos citar a la flor del corazón o *Yoloxóchitl* (*Talauma mexicana* (DC.) G. Don.), la flor de manita o *Macpalxóchitl* (*Chiranthodendron pentadactylon* Larreat.). Mesoamérica es también considerada cuna de distintas plantas útiles, ejemplo de esto tenemos plantas alimenticias como el maíz (*Zea mays* L.), aguacate (*Persea americana* Mill.), chile (*Capsicum spp.*), proveedoras de fibras

textiles tenemos el henequén (*Agave fourcroydes* Lem.), kapok (*Ceiba pentandra* (L.) Gaertn.), generación de bebidas alcohólicas, ejemplo el pulque (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck), tequila (*Agave tequilana* F.A.C.Weber), entre otras. Las cuales fueron domesticadas mucho antes de la llegada europea.^{2,4}

2.2 Diversidad botánica

En la actualidad podemos estimar la diversidad de plantas terrestres (Embryophyta) entre 291,658 a 297,857 especies, de las cuales el 85% son plantas con flores (angiospermas) y el resto, apenas el 15% es representado por musgos, helechos, licofitas y gimnospermas.^{8,9}

Halberstein (2005) menciona que la Organización mundial de la salud (WHO, por sus siglas en inglés) tiene reconocidas alrededor de 20,000 plantas medicinales, equivalente a un 7% de especies vegetales, por lo, tanto esto deja a la vista que más de un cuarto de millón de plantas no se tiene conocimiento de algún potencial uso terapéutico.³

De los *taxa* de plantas existentes en la actualidad, las angiospermas o plantas con flores, son el grupo más numeroso y es además con quien mantenemos una relación sumamente estrecha; así que, para su comprensión existen numerosos sistemas de clasificación, uno de estos es conocido como Angiosperm Phylogeny Group III (APG III, por sus siglas en inglés) el cual agrupa a sus miembros en 11 clados, 64 órdenes, 415 familias y alrededor de 254,247 especies^{8 10}. En el presente trabajo se hará énfasis en un miembro de la familia Nyctaginaceae.

2.3 Familia Nyctaginaceae

La familia Nyctaginaceae (del griego *nyct*, noche, en referencia a la floración nocturna) pertenece al orden Caryophyllales y este a su vez forma parte de las eudicotas nucleares.¹¹ Consta de ca. 34 géneros y 350 especies, principalmente tropicales y subtropicales, pero en su mayoría de americana.¹² La clasificación de Nyctaginaceae a niveles inferiores es compleja sin embargo, existen estudios como el de Douglas y Spellenberg (2010), que reconocen siete tribus: Leucastereae, Boldoeae, Colignonieae, Bougainvilleeae, Pisonieae, Nyctagineae y Caribeeae,¹³ de las cuales se han logrado aislar distintas moléculas de interés biológico.

2.4 Metabolitos aislados con actividad biológica

Los estudios sobre la extracción, aislamiento y caracterización de metabolitos de especies pertenecientes a la familia nyctaginaceae se remonta a la última década del siglo XX. Uno de estos trabajos fue realizado por Wollenweber y Dörr en 1996, quienes aislaron a partir de una extracción con acetona una serie de metabolitos tipo flavonoide en *Mirabilis viscosa* Cav.¹⁴

Años más tarde, en específico 2001, Yang y colaboradores separaron y caracterizaron tres nuevos compuestos fenólicos nombrados como 2'-O-Metilabronisoflavona, 9-O-Metil-4-hidroxiboeravinona B, y 6-Metoxiboeravinona C (Figura 1) a partir de la manipulación de cultivos celulares de *Mirabilis jalapa* L. donde los compuestos 1 y 2 presentaron actividad anti fúngica frente a *Candida albicans* DSY1024 con un CE₅₀ de 25 y 48 µg/mL respectivamente.¹⁵

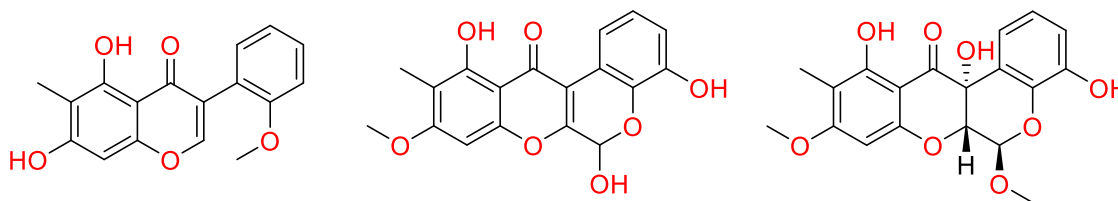


Figura 1. Estructuras de 2'-O-Metilabronisoflavona (1), 9-O-Metil-4-hidroxiboeravinona B (2) y 6-Metoxiboeravinona C.

El siguiente año, Wang y colaboradores describen que diversas plantas utilizadas en la medicina tradicional china poseen actividad frente (VIH), con lo cual refieren que la maceración etanólica de la raíz de *M. jalapa*, en concreto la fracción de acetato de etilo (AcoEt) exhibe una potente actividad inhibitoria *in vitro* frente a VIH, por lo cual buscan aislar los metabolitos presentes en esta fracción, con lo cual lograron separar cuatro nuevos rotenoides nombrados Mirabijalona A-D (Figura 2) entre otros metabolitos.

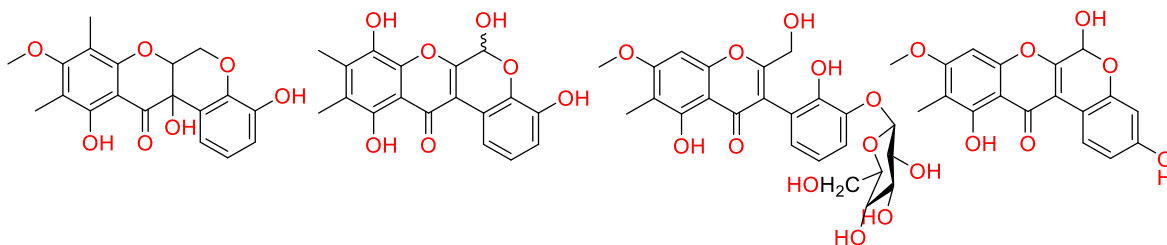


Figura 2. Estructuras de Mirabijalona A-D.

De las especies pertenecientes a la familia nyctaginaceae, el género *Boerhavia* ha sido ampliamente estudiado interés farmacológico. En este género, una de las especies más estudiadas es *Boerhavia diffusa* L., la cual es una planta muy popular en la medicina Ayurvedica utilizada comúnmente como diurético y analgésico. Ejemplos de estas sustancias aisladas tenemos las descritas por Borelli y colaboradores (2006), quienes evaluaron la actividad espasmolítica *in vivo* de compuestos derivados de la rotenona (Figura 3) conocidos como rotenoide (Figura 4)¹⁶

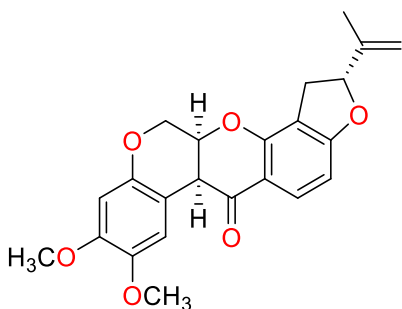


Figura 3. Estructura de la rotenona.

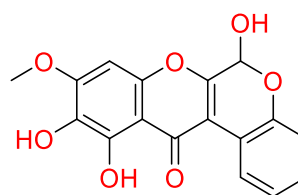


Figura 4. Estructura de 9-O-metil-10-hidroxicoccineona B.

Para el 2007, Ahmed-Belkacem y colaboradores publicaron un trabajo sobre el aislamiento de una nueva clase de inhibidores de la proteína de resistencia al cáncer de mama conocidos bajo el nombre de boeravinona G y H; además de otros 9 compuestos donde figuran boeravinona I y J como nuevas moléculas (Figura 5)¹⁷.

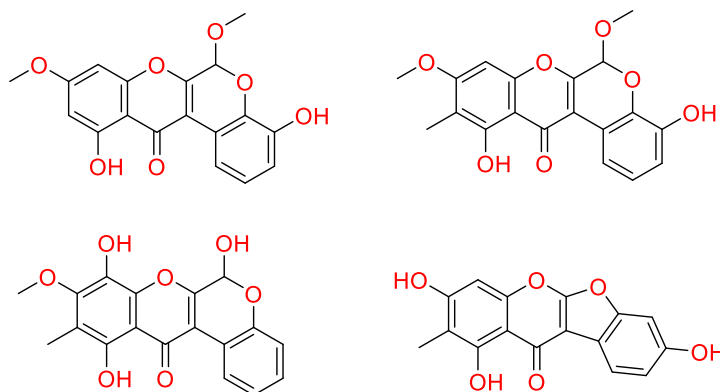


Figura 5. Estructuras de boeravinona de izquierda a derecha G, H, I, J.

Un ejemplo de componentes antiinflamatorios descubiertos en un miembro de la familia nyctaginaceae, fueron aislados por Baiwara y su grupo de investigación en el 2013, quienes publicaron un artículo en el cual describen la purificación de nueve compuestos por el método de maceración etanólica al 70% en frío, donde el compuesto llamado boeravinona N (Figura 6) mostró un mayor efecto inhibitorio sobre COX-1 y COX-2 *in vitro*, mientras que el compuesto conocido como boeravinona B (

Figura 7) fue el que exhibió un efecto antinflamatorio significativo *in vivo* ¹⁸

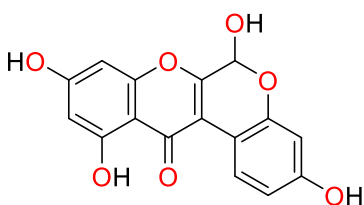


Figura 6. Boeravinona N.

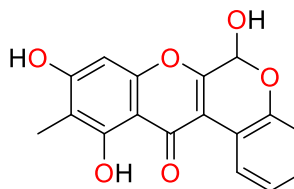


Figura 7. Boeravinona B.

Además de este género existen otros donde se han encontrado diversos metabolitos con efecto terapéutico, este es el caso de *Pisonia aculeata* L., para la cual Wu y colaboradores (2011) describieron una serie de metabolitos con actividad antituberculosa, los cuales pisonina B (Figura 8) y pisovaninona (Figura 9) fueron los que mostraron actividad farmacológica.¹⁹

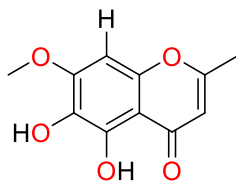


Figura 8. Pisonina B.

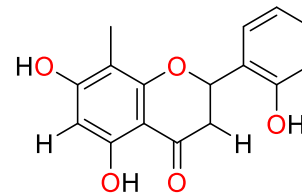


Figura 9. Pisovaninona

El trabajo más reciente de aislamiento de metabolitos con interés biológico sobre un miembro de la familia nyctaginaceae fue realizado por el grupo de investigación encabezado por Do en 2016, los cuales aislaron 8 nuevas moléculas tipo peltoginoide (Figura 10) de *Bougainvillea spectabilis* Willd., nombradas Bougainvinona A-H (Figura 11). Además de su aislamiento, estas moléculas fueron probadas sobre líneas de células tumorales para evaluar su actividad citotóxica donde, el compuesto 7 fue quien exhibió los mejores valores de IC_{50} en un rango comprendido entre 7.4–9.7 μM frente a las líneas celulares utilizadas en su trabajo

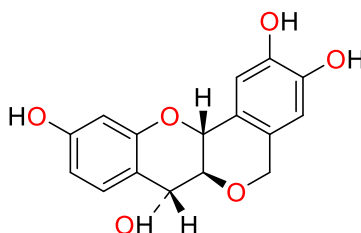


Figura 10. Estructura del peltogynol.

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1:	OH	H	OCH ₃	OCH ₃
2:	OH	H	OH	OCH ₃
3:	OH	H	OH	OH
4:	H	H	OH	OH
5:	H	H	OCH ₃	OH
6:	H	H	OCH ₃	OCH ₃
7:	H	OCH ₃	OH	OH
8:	H	OCH ₃	OCH ₃	OH

Figura 11. Estructura de las bougainvinona A-H

Desde un punto de vista químico y medicinal, es importante señalar que las bougainvinonas aisladas en este trabajo provienen de una planta considerada común y de uso extensivo como ornamental y medicinal, además esta moléculas tienen un valor quimiotaxonómico de importancia para la clasificación de otras especies pertenecientes a la familia nyctaginaceae²⁰

2.5 Metabolitos aislados de miembros del género *Abronia*

En el caso del género *Abronia* Juss., en la actualidad se tienen descritas ca. 20 especies, de las cuales solo de tres se tiene información sobre el aislamiento de moléculas con potencial interés taxonómico y terapéutico; estas especies son *Abronia latifolia* Eschsch., *Abronia nana* S. Watson y *Abronia villosa* S. Watson (Figura 12).



Abronia latifolia



Abronia nana



Abronia villosa

Figura 12. Especies del género *Abronia*.

Para *A. latifolia*, existe una publicación la cual fue desarrollada por Wollenweber, Papendieck y Schilling en 1993, los cuales extrajeron un metabolito estructuralmente conocido como isoflavona C-metilada nombrada abronisoflavona (Figura 13). Este hallazgo trajo con sígo dos consideraciones importantes, 1) fue la primer isoflavona C-metilada encontrada en la naturaleza, y 2) las isoflavonas son muy poco comunes en otras plantas que no sean leguminosas, por lo tanto, esta es la primer isoflavona aislada en un organismo vegetal no perteneciente a la familia Fabaceae.¹⁴

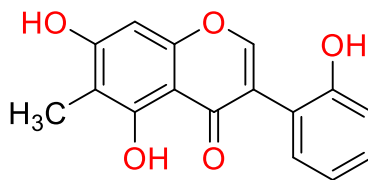


Figura 13. Estructura de abronisoflavona.

El siguiente trabajo enfocado a alguna especie del género *Abronia* fue publicado en 2011 por Starks y colaboradores, quienes a partir de una maceración EtOH/AcOEt (etanol / acetato de etilo) 1:1 de *A. villosa* a temperatura ambiente, aislaron un nuevo compuesto de tipo rotenoide llamado abroniona (Figura 14) así como dos metabolitos ya conocidos: boeravinona C y lupeol. Además del aislamiento de estas moléculas, abroniona fue probado sobre líneas celulares cancerosas humanas NCI-H460 (carcinoma pulmonar de células grandes) y HL-60 (células de leucemia promielocítica humana) la cual exhibió una citotoxicidad moderada.²¹

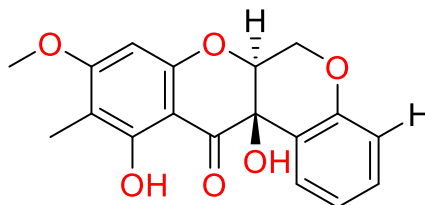


Figura 14. Estructura de abroniona.

Tiempo después en 2014, el grupo de investigación liderados por Se-Hoon Park, a través de cultivos celulares en suspensión de *A. nana* aislaron tres inhibidores selectivos de β -secretasa (BACE1), proteína relacionada a la enfermedad de Alzheimer. Estas moléculas resultaron ser rotenoides ya conocidos con anterioridad, los cuales son boeravinona D y mirabijalona D (aislada previamente de *Mirabilis jalapa* L.), así como un nuevo rotenoide C-metilado nombrado como abroniona A (Figura 15)²².

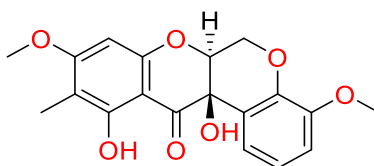


Figura 15. Estructura de abroniona A.

2.6 Estrés oxidativo y enfermedades crónico degenerativas

Dentro de los productos metabólicos generados por la célula existen un grupo conocido como radicales libres, los cuales se caracterizan principalmente por tener electrones desapareados en sus orbitales externos y tener vidas medias muy cortas dentro del orden de mili, micro o nanosegundos, además metabólicamente podemos dividirlos en dos grupos, las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS, por sus siglas en inglés) las cuales desempeñan funciones como señalizador celular, mantenimiento homeostático, mecanismo de defensa, entre otras (Tabla 1).²³

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno de interés biológico (Tomado de Devasagayam y col. 2004)

Especies reactivas	Símbolo	Vida media (en seg.)	Reactividad/observaciones
Especies reactivas de oxígeno			
Superóxido	$O_2^{\bullet -}$	10^{-6} s	Generado en las mitocondrias, en el sistema cardiovascular y otros
Radical hidroxilo	$\bullet OH$	10^{-9} s	Muy altamente reactivo, generado durante la sobrecarga de hierro y tales condiciones en nuestro cuerpo
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	estable	Formado en nuestro cuerpo por un gran número de reacciones y produce especies potentes como $\bullet OH$
Radical peroxilo	$ROO^{\bullet}$	s	Reactivo y formado a partir de lípidos, proteínas, ADN, azúcares, etc.
Hidroperóxido orgánico	$ROOH$	estable	Reacciona con iones metálicos transitorios para producir especies reactivas
Especies reactivas	Símbolo	Vida media (en seg.)	Reactividad/observaciones

Oxígeno singlete	$^1\text{O}_2$	10^{-6} s	Altamente reactivo, formado durante la fotosensibilización y reacciones químicas
Ozono	O_3	s	Presente como un contaminante atmosférico, puede reaccionar con diversas moléculas, produciendo 1O_2

Especies reactivas de nitrógeno

Óxido nítrico	$\text{NO}\cdot$	s	Neurotransmisor y regulador de la presión sanguínea, pueden producir oxidantes potentes durante estados patológicos
Peroxinitrito	ONOO^-	10^{-3} s	Formado de NO. Y superóxido, altamente reactivo
Ácido peroxinitroso	ONOOH	bastante estable	Forma protonada de ONOO^-
Dióxido de nitrógeno	NO_2	s	Formado por la contaminación atmosférica

No obstante, su sobre producción y sobreexposición desencadenan un proceso conocido como estrés oxidativo el cual está relacionado con padecimientos como el envejecimiento prematuro, deterioro cardiovascular, cáncer, Alzheimer entre otras.²⁴

2.7 Antioxidantes

La manera de como el organismo hace frente a la sobreproducción de radicales libres es por medio de moléculas conocidas como antioxidantes, las cuales son cualquier sustancia que puede neutralizar radicales libres o sus acciones, estos pueden ser de origen endógeno o exógeno. Los antioxidantes endógenos son producto del metabolismo, a su vez estos pueden provenir de una fuente enzimática y no enzimática; algunos ejemplos de estos son superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa, ácido lipoico, L-arginina etc. En el caso de los antioxidantes exógenos son obtenidos principalmente por la dieta, ejemplos de estos son el α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), los flavonoides y Polifenoles, entre otros.^{23,25}

2.8 Familia molecular de las pirazolinonas

La familia molecular de las pirazolinonas está conformada por un anillo lactama de cinco miembros que posee dos nitrógenos y una cetona en la misma estructura, las cuales derivan del pirazol, tienen una fórmula molecular base de $C_3H_4N_2O$ y existen tres isómeros posibles: 3-pirazolona, 4-pirazolona y 5-pirazolona (Figura 16).

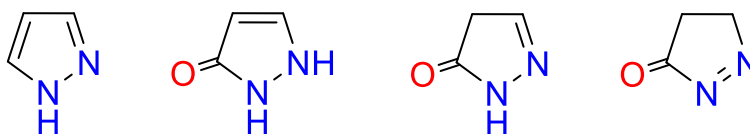


Figura 16. Pirazol e isómeros de pirazolona.

Gran parte de la importancia de estas moléculas recae en las excelentes propiedades farmacológicas de algunos de sus derivados de los cuales podemos citar a la ampirona, el metamizol y antes de la síntesis del ácido acetilsalicílico la antipirina (Figura 17).²⁶

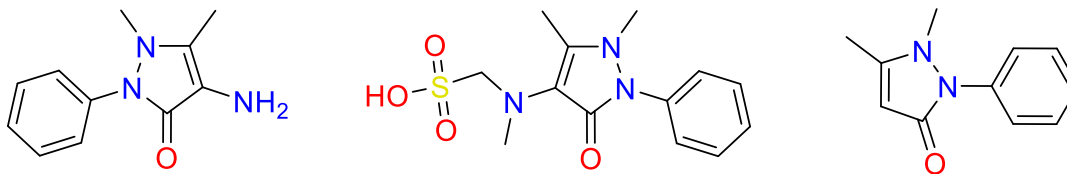


Figura 17. Estructuras de amiprona, metamizol y antipirina.

2.9 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona

La 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona, también conocido como edaravona o MCI-186 (Figura 18), es un nootrópico eliminador de radicales libres que previene el daño oxidativo, es utilizado junto al tratamiento en enfermedades cardiovasculares, además existen reportes sobre algunos de sus derivados sintéticos han presentado actividad biológica como antitumoral, antiviral, inhibidores del agente de la tuberculosis así como efectos terapéuticos en el tratamiento del cáncer y enfermedades relacionadas.^{27,28,29}

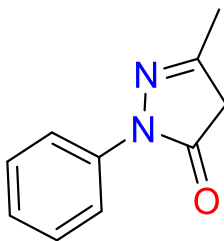


Figura 18. Estructura de 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona.

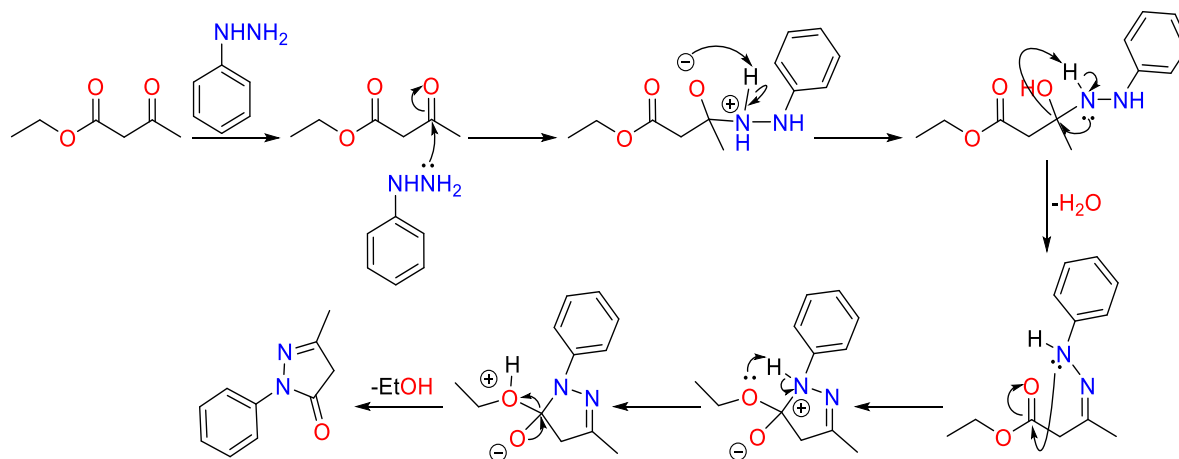
2.10 Síntesis de 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona y derivados

El primer informe de la síntesis de 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona se remonta a 1883, publicado por Ludwig Knorr en “*Chemische Berichte*”, donde hace reaccionar fenilhidrazina y acetoacetato de etilo, con lo que se obtiene agua, etanol y un producto de reacción con la fórmula $C_{10}H_{10}N_2O$.³⁰

Ya en el siglo XX más preciso 1919, J.B. Cohen en su libro “*A Class-Book of Organic Chemistry*” describe a mayor detalle la síntesis de 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona, de igual manera hace mención del uso de clorhidrato de fenilhidrazina, acetoacetato de etilo y en este caso se incluye al ácido clorhídrico como catalizador bajo condiciones de baño de agua

tibia durante 15 minutos (Esquema 1). Transcurrido el tiempo menciona que se obtuvo una solución rojo claro que se neutralizó cuidadosamente con hidróxido de sodio hasta obtener la precipitación de cristales que pueden ser purificados por res cristalización con etanol.³¹

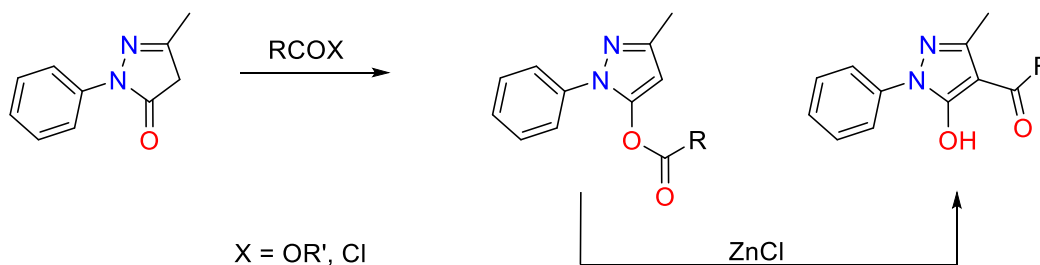
Esquema 1. Mecanismo de reacción entre acetoacetato de etilo y fenilhidrazina.



Referente a los derivados sintéticos de 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona, existen publicaciones donde se hace referencia a la inserción de distintos sustituyentes en el carbono de la posición 4 del anillo de pirazolina, lo que proporciona una diversidad de estructuras sintéticas con interés en la industria así como farmacológico.³²

Los primeros registros sobre la modificación en la posición 4 datan desde finales del siglo XIX, las cuales son estructuras de tipo 4 acil pirazolinonas. Las estrategias sintéticas iniciales fueron propuestas por F. Stolz, basado en la condensación Claisen clásica de ésteres con 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona catalizada por sales ácidas de sodio o etóxido de sodio, o por la transposición de Fries de pirazolinonas O-aciladas a productos C-acilados con el uso de cloruro de zinc anhidro (Esquema 2). Ambos protocolos tienen inconvenientes tales como bajos rendimientos y productos secundarios.^{33,34}

Esquema 2. Condensación Claisen clásica y trasposición de Fries.

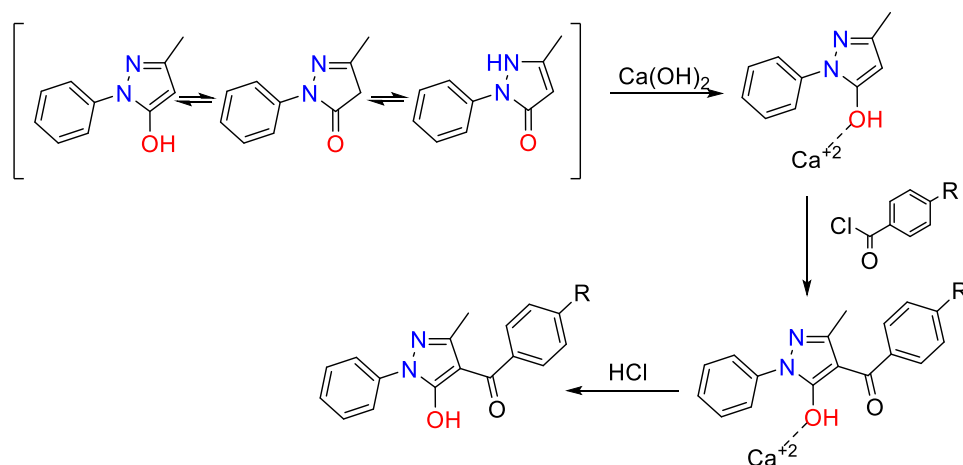


No fue hasta 1959 que Bror Skytte Jensen en la búsqueda de nuevos agentes quelantes de metales en solución líquido-líquido publica un protocolo innovador para la síntesis de acil pirazolinonas, el cual ha sido ampliamente utilizado debido a su sencillez y alto rendimientos. Este método se basa en la acilación directa en la posición 4 con el uso de cloruros de acilo o anhídridos en presencia de hidróxido de calcio y como solvente dioxano.^{35,36}

El fundamento de esta reacción es descrito por Kurteva y Petrova (2014), quienes mencionan que el hidróxido de calcio formalmente no "cataliza" esta reacción, si no que desempeña dos papeles fundamentales: primero, el pH básico mantiene la forma tautomérica enol para así ser activado el carbono 4; y en segundo lugar, el grupo OH enol es protegido por los iones Ca^{+2} para evitar la O -acilación. Además, se usan 2 equivalentes para atrapar el cloruro de hidrógeno liberado, y así mantener el medio básico y evitar la descomposición del complejo antes de finalizar la acilación. Una vez concluida la reacción se agrega ácido clorhídrico diluido para descomponer el complejo y favorecer la precipitación del producto 4 acilado (

Esquema 3). Desde un punto de vista sintético, es muy importante formar el complejo de calcio antes de la acilación. Si el agente acilante se añade inmediatamente después del hidróxido de calcio, se corre el riesgo de la formación de subproductos de reacción tales como ésteres.³⁴

Esquema 3. Mecanismo de acilación directa en el carbono 4.



A partir de la síntesis de Jensen, trabajos sintéticos similares son publicados para la extracción de metales, algunos de estos son el publicado por Menzel y colaboradores que 1976 utilizan la 1-fenil-3-metil-4-benzoil-2-pirazolin-5-ona como quelante de oxovanadio (IV) y cobre (II), King y Fritz (1988) sintetizan la 1,3-dimetil-4-acetil-2-pirazolin-5-ona con el objetivo de complejar circonio (IV), torio (IV) y en especial uranio (IV) disueltos en solución acuosa.^{37,38}

Las propiedades de los derivados 4-acil pirazolinonas no solo se limitan a ser quelante de metales, estos también poseen actividad biológica, este es el caso del trabajo realizado por fan y colaboradores (2006), quienes sintetizaron estructuras tipo pirimidin-pirazolona (nucleósido quimera) con actividad anti ortopoxvirus *in vitro* (Figura 19).³⁹

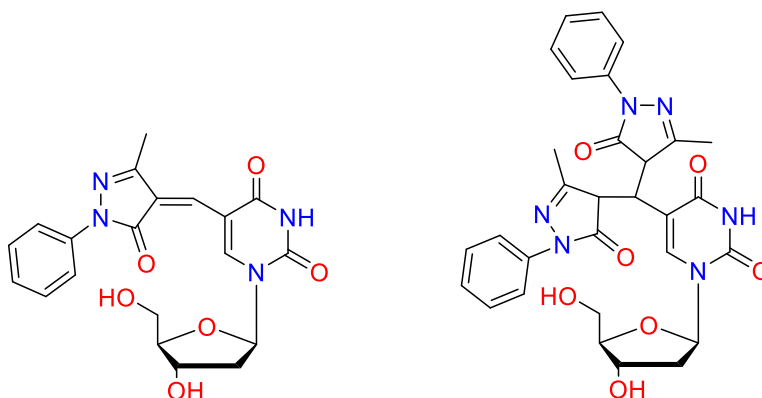


Figura 19. Estructuras tipo pirimidin-pirazolona con actividad antiviral.

En 2007, el grupo de trabajo dirigido por Kimata, realizaron la síntesis de 19 compuestos con actividad anti proteína priónica resistente a proteasa (PrP-res), donde el compuesto identificado como 3-(4-nitrofenil) "13" (Figura 20), fue 130 veces más activo que la quinacrina, con valores Cl_{50} 3 nM y Cl_{50} 400 nM respectivamente frente a las líneas celulares N2a (neuroblastoma de ratón) ScN2a y F3; Además, otra de las moléculas sintetizadas en este trabajo la cual corresponde a un derivado benzoílo previamente utilizado como quelante de metales exhibió actividad antipriónica.⁴⁰

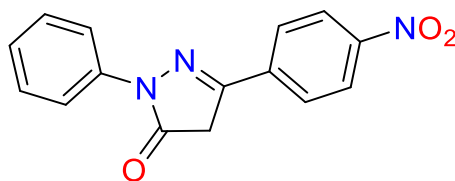


Figura 20. Derivado 3-(4-nitrofenil) "13"

Castagnolo *et al.* Durante el 2008 y 2009 se enfoca en la síntesis de diversas moléculas con propiedades inhibitorias del bacilo *Mycobacterium tuberculosis* Zopf, de las cuales dos presentaron una concentración mínima inhibitoria de 4 μ g/mL. Durante el desarrollo de estos trabajos, los autores mencionan que hay ciertos criterios que deben mantenerse para mantener la efectividad de las moléculas: Primero, la presencia de heteroátomos pesados (Cl y Br) en posición *para* de los anillos fenílicos; Segundo: no sustituir el grupo metilo del anillo de pirazolinona al igual que mantener el doble enlace entre el nitrógeno y carbono del mismo anillo; Tercero: La presencia grupos N-Me-piperazina y morfolina demostraron ser muy activos sin embargo, la falta de un heteroátomo en la posición 4 de mismo anillo cicloalquil amina aniquila la actividad farmacológica Finalmente, un factor significativo que puede favorecer la actividad es el mantenimiento de la rigidez entre el C4 y los grupos alquilo(Figura 21).^{41,42}

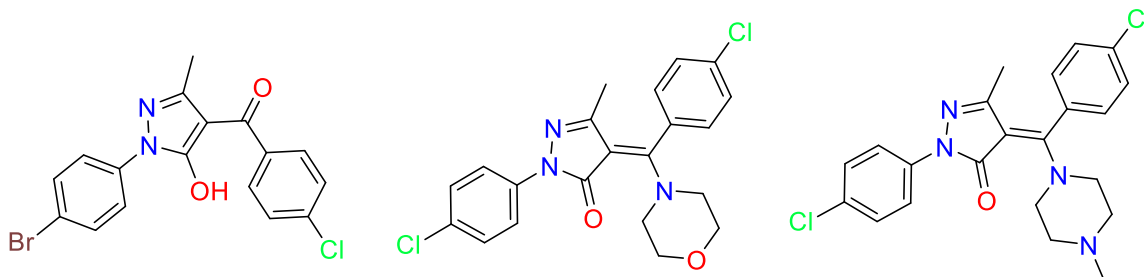


Figura 21. Estructuras con actividad inhibitoria de la tuberculosis.

Sujatha y colaboradores realizan la síntesis en agua de estructuras de tipo antiviral 4,4'-(arilmetilen)bis(1H-pirazol-5-ol) en rumiantes por medio de la reacción Knoevenagel–Michael en tándem con el uso de distintos aldehídos y como catalizador nitrato de amonio cérico (CAM), donde los derivados con los sustituyentes de benzaldehído, 4-metilbenzaldehído y 2-furfuraldehído mostraron un actividad superior que el control ribavirina(Figura 22).⁴³

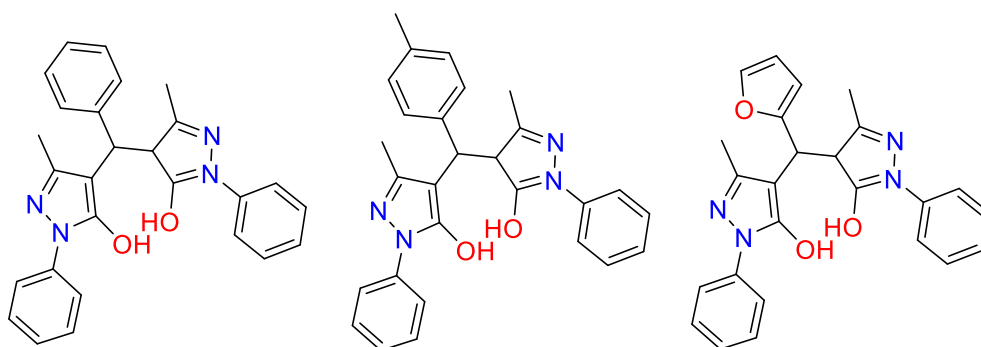
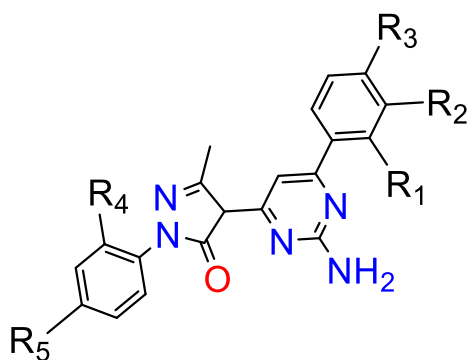


Figura 22. Estructuras 4,4'-(arilmetilen) bis (1H-pirazol-5-ol).

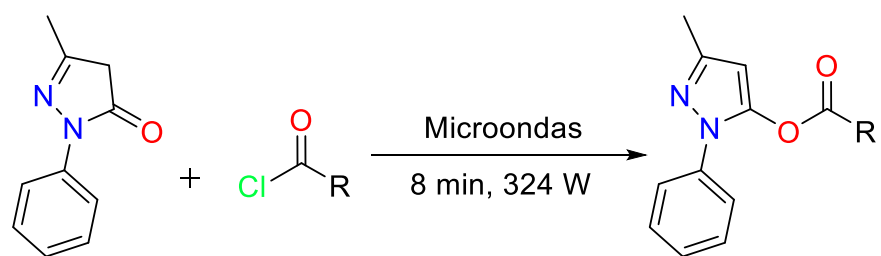
Antre y copartícipes publican la síntesis asistida por microondas de un derivado 4 acilado el cual posteriormente realizan diversas modificaciones que dan como resultado la obtención de 20 estructuras (divididas en dos grupos de 10) con potencial actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética, de las cuáles 6 mostraron valores de efectividad similares a los utilizados como estándar (Figura 23).⁴⁴



	R1	R2	R3	R4	R5
1	H	O-Me	OH	H	H
2	H	H	O-Me	H	H
3	OH	H	H	H	H
4	H	H	N(Me) ₂	H	H
5	H	O-Me	OH	NO ₂	NO ₂
6	H	H	N(Me) ₂	NO ₂	NO ₂

Figura 23. Estructuras con actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética.

Como ha sido descrito anteriormente, los derivados de edaravona poseen un amplio rango de moléculas con fines terapéuticos sin embargo, mayoritariamente las síntesis reportadas se enfocan en la modificación de la posición 4 o el nitrógeno del anillo de pirazolinona. Dentro de los pocos trabajos enfocados en la modificación en el carbonilo del anillo de pirazolinona se encuentra el realizado por Bai y colaboradores del 2002 quienes a través de síntesis mediada por microondas libre de solvente sintetizaron ocho derivados con rendimientos variados con el uso de edaravona y haluros de ácido aromáticos⁴⁵. De igual manera encontramos publicado en 2006 por Maruoka y colaboradores quienes sintetizan diversos derivados tipo aciloxipirazoles que posteriormente reordenan los productos con el uso de un rearrreglo de Fries para la formación de derivados acilados en el nitrógeno 2⁴⁶. Esto muestra que existen pocos estudios sobre la síntesis de estructuras tipo aciloxipirazoles, lo cual su exploración permite la obtención de nuevos productos con distintas aplicaciones de interés en la ciencia.



R	Rendimiento (%)
C ₆ H ₅	87
2-ClC ₆ H ₄	79
2NO ₂ C ₆ H ₄	40
4-ClC ₆ H ₄	81
4-NO ₂ C ₆ H ₄	86
4-CH ₃ OC ₆ H ₄	48
4-CH ₃ C ₆ H ₄	37
3,5-(NO ₂) ₂ C ₆ H ₃	68

Figura 24. Condiciones de reacción descritas en Bai y cols. 2002.

2.11 Generalidades de acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa es una enzima perteneciente al grupo de las hidrolasas, (AChE, EC 3.1.1.7), está presente en un gran número de organismos vivos, como vertebrados e invertebrados. Esta puede encontrarse en los sistemas nervioso, muscular y en la superficie de los hematíes; a nivel molecular, la AChE está codificada por un solo gen (7q22) en el cromosoma humano, el alto grado de polimorfismo de esta enzima es dado durante el proceso de empalme alternativo. La AChE es responsable de la regulación de la concentración del neurotransmisor acetilcolina (ACh) durante la transmisión de señales nerviosas, en el sistema nervioso central y periférico la cual termina por la escisión de ACh por AChE directamente en el espacio sináptico. La hidrólisis de ACh mediada por la AChE da como resultado la formación de colina y ácido acético. La AChE es un catalizador muy eficiente, cataliza la hidrólisis de la ACh con un número de recambio de 10^8s^{-1} , aproximándose al límite permitido por la difusión del sustrato^{47,48,49,50}.

Los primeros trabajos sobre la presencia de AChE en los tejidos musculares se remontan a la década de 1930, con el trabajo publicado en 1936 por Brown y colaboradores que mediante estudios en músculo gastrocnemio de gato y perro⁵¹. Tres años después en 1939 se publicó un trabajo sumamente importante referente al aislamiento de AChE altamente activa, este se realizó por Nachmansohn y Lederer, la cual fue obtenida a partir de tejido eléctrico de *Torpedo marmorata* Risso⁵²; para 1947, Rothenberg y Nachmansohn describen una metodología para la obtención de AChE de proveniente del órgano eléctrico de *Electrophorus electricus* L. con un alto grado de pureza⁵³.

No fue hasta la segunda mitad del siglo XX que se publica los primeros trabajos en los cuales se obtienen por primera vez cristales de AChE, en específico 1966 con la publicación de Leuzinger y Baker, donde los cristales obtenidos fueron de una forma tetramérica purificada a partir de tejido de órgano eléctrico de *E. electricus*⁵². Para 1975, es publicado el manuscrito de Chothia y Leuzinger en el cual describe detalles de los cristales de AChE por medio de la técnica de cristalografía de rayos X⁵⁴, al igual que en 1987 Schrag y colaboradores publican otro trabajo de difracción de rayos X de AChE 11 S⁵⁵. Estos trabajos trajeron avances significativos para el conocimiento de la enzima sin embargo, hasta ese momento aún no se han presentado datos estructurales de AChE.

Ya en La última década del siglo XX se publicó datos de la primera estructura cristalográfica de AChE, esta fue resuelta en 1991 por Sussman y colaboradores obtenida del organismo *Tetronarce californica* Ayres⁵⁶, la cual fue depositada en *Protein Data Bank* en 1993 con el trabajo encabezado por Harel y colaboradores (código pdb: 1ACJ)⁵⁷.

2.12 Estructura de Acetilcolinesterasa

La AChE, como ya fue mencionado anteriormente pertenece al grupo de las hidrolasas, es una enzima que presenta un alto grado de polimorfismo, la cual consiste en subunidades globulares con una masa de 70-80 kDa⁴⁹. *T. californica* el monómero enzimático presenta una estructura conformada por 537 aminoácidos⁵⁶, en el caso de la AChE humana, es el gen *ACHE* que está encargado de guardar la información para la codificación de esta enzima, constituida por 543 aminoácidos codificados por los exones E2, E3 y E4⁵⁸.

Se han encontrado tres tipos de subunidades de AChE, denominadas AChE_S, AChE_H y AChE_T; estos difieren en su funcionalidad C-terminal así como asociaciones. AChE_S, carece de la capacidad para formar enlaces disulfuro entre las subunidades, existe solo como un monómero soluble (G1)^{49, 50, 59}. La forma AChE_H es anfifílica y está asociada con 20 kDa de glucofosfatidilinosito (GPI) conocido como anclaje GPI, que puede existir como un monómero asociado a la membrana (G1a-Tipo I) o un dímero unido por un enlace disulfuro (G2a-Tipo I)^{49, 50, 59}. La subunidad, AChE_T, muestra el mayor complejidad, esto es dado por el número de estructuras asociadas, que incluye monómeros anfifílicos (G1a-Tipo II), dímeros (G2a-Tipo II), tetrámeros solubles (G4), tetrámeros hidrófobos que tienen una subunidad P adicional (G4a) y asociaciones grandes unidos por colágeno de uno a tres tetrámeros (A4, A8 y A12). Estos tetrámeros están unidos por interacciones electrostáticas e hidrófobas, entre dos dímeros unidos por enlaces disulfuro^{49, 50, 59}. En la Figura 25 se muestra una representación de estos tipos de subunidades.

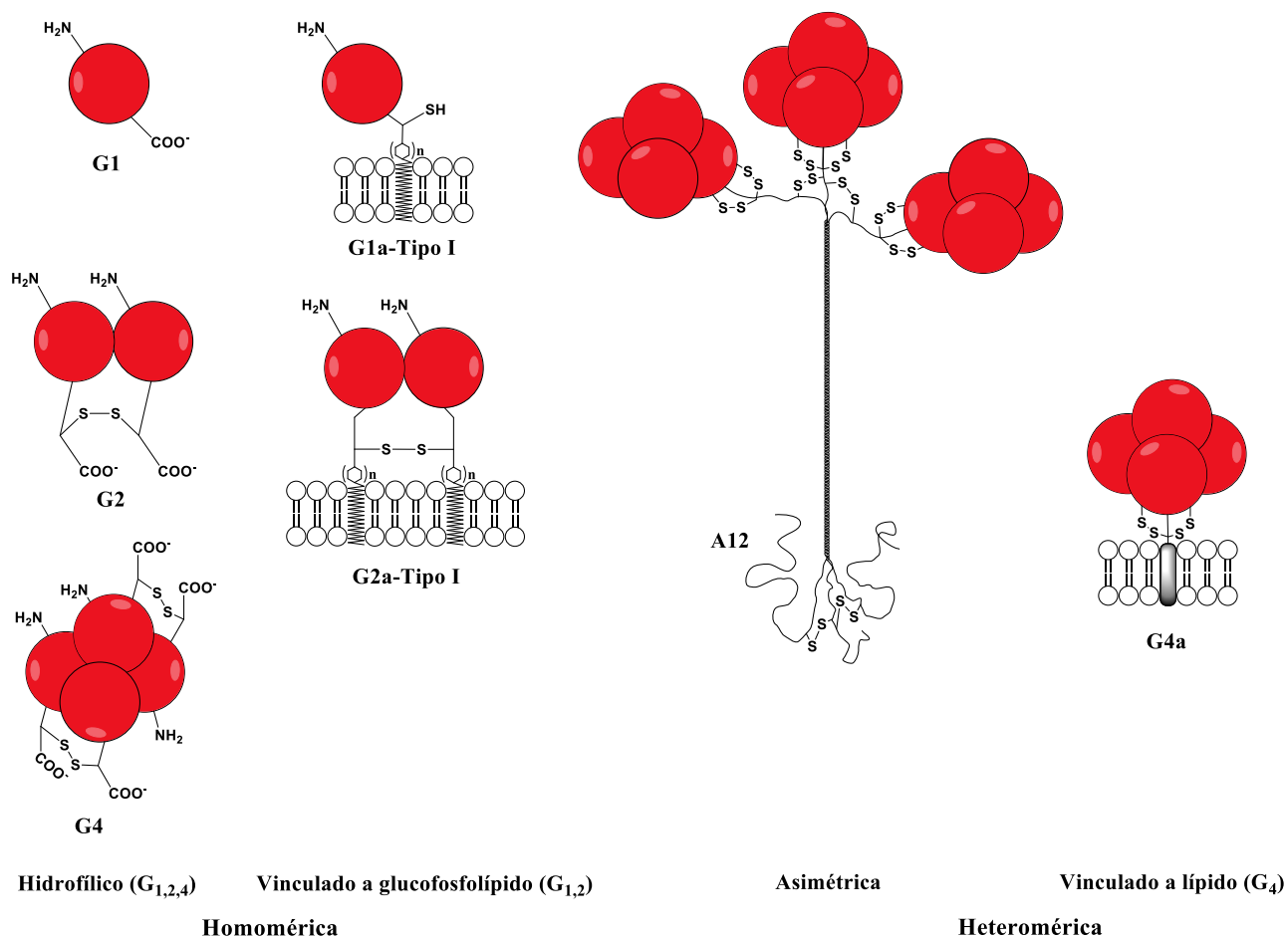


Figura 25. Especies moleculares de AChE, modificado de Taylor, 1994. Y Guiles.

Las especies se dividen en dos clases: La clase homomérica, existen como monómeros, dímeros y tetrameros y se puede dividir en las formas hidrófilas o anfifílicas (unidas a glucosfolípidos). La clase heteromérica, que consiste en subunidades catalíticas unidas por puente disulfuro a una subunidad unida a lípidos o una triple hélice de subunidades que contienen colágeno. Nomenclatura que designa propiedades hidrodinámicas (A = asimétrico y G = globular) y También se muestra el número de subunidades catalíticas⁵⁰.

2.13 Estructura del sitio catalítico

La primera estructura cristalina de AChE resuelta fue reportada en 1991 por Sussman y colaboradores con una resolución de 2.8 Å, la cual se obtuvo de *T. californica*, esto reveló características estructurales muy interesantes^{56, 60}.

El monómero enzimático es una α/β hidrolasa de 537 aminoácidos, es de forma elipsoidal, con dimensiones aproximadas de 45 Å por 60 Å por 65 Å. que consiste en 12 lámina- β mixtas y 14 hélices- α y tiene un parecido sorprendente con varias estructuras tipo hidrolasa, como la dienolactona hidrolasa, serina carboxipeptidasa-II, tres lipasas neutras y haloalcano deshalogenasa. La característica más notable es la estructura del sitio activo, conocida como "la garganta", la cual es profunda y estrecha de ~20 Å de largo, que penetra hasta la mitad de la enzima y se extiende cerca de su base, Catorce residuos aromáticos recubren una porción sustancial de la superficie de la garganta⁵⁶.

El sitio activo está compuesto de subsitios importantes

Subsitió esterático. Compreendido por la tríada catalítica de Ser200, His440 y Glu327. En este subsitió los sustratos se unen covalentemente a la serina, mientras que los residuos de la histidina y el ácido glutámico actúan como aceptador/donador de protones durante el proceso de hidrólisis^{56, 57, 60, 61} Figura 26.

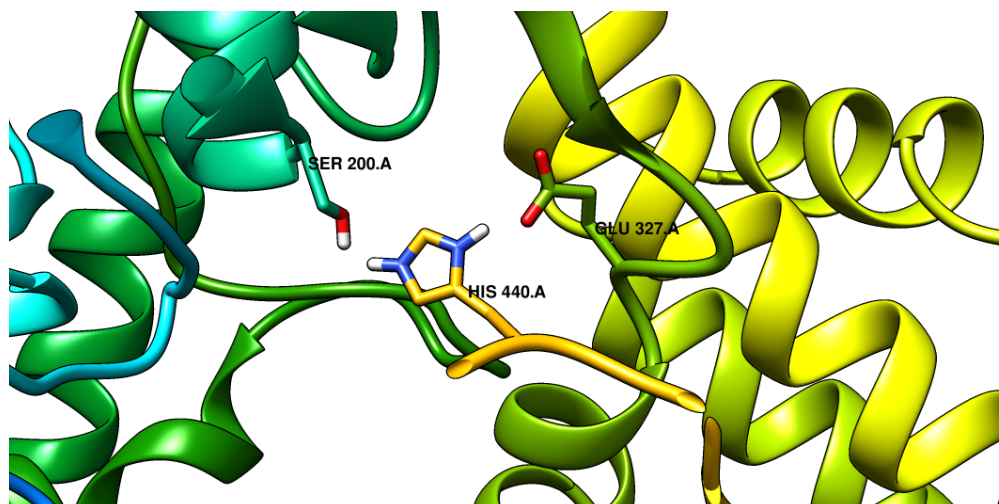


Figura 26. Sitio catalítico

Subsitio de unión aniónica. Formado por Trp84 Tyr121 y Phe330, aquí el amonio cuaternario de ACh interactúa con los electrones π de los grupos aromáticos^{56, 57, 60, 61} Figura 27.

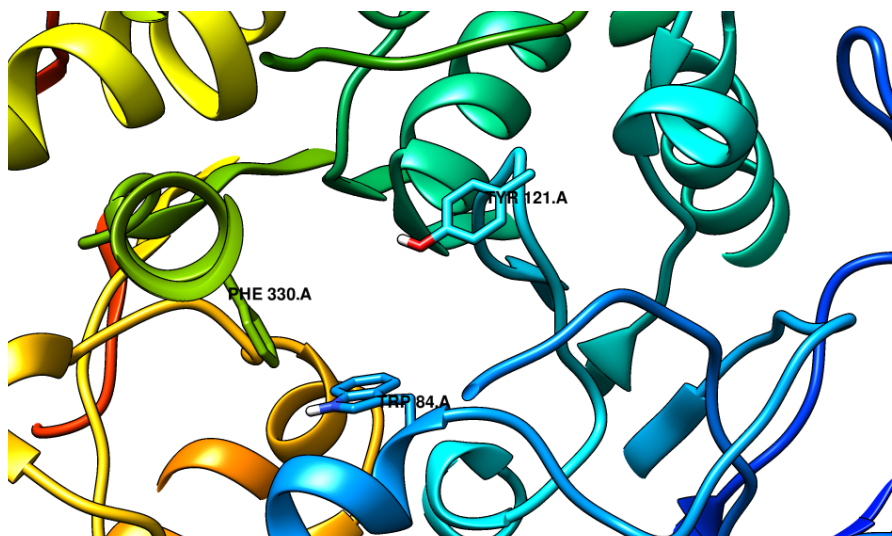


Figura 27. Subsitio de unión aniónica.

Subsitio oxianión. Gly118, Gly119 y Ala201, durante la hidrólisis de ACh este subsitio interacciona con el oxígeno del carbonilo, y que el oxígeno del éster para que el ligando pueda interactuar con el imidazol de His440⁵⁶ Figura 28.

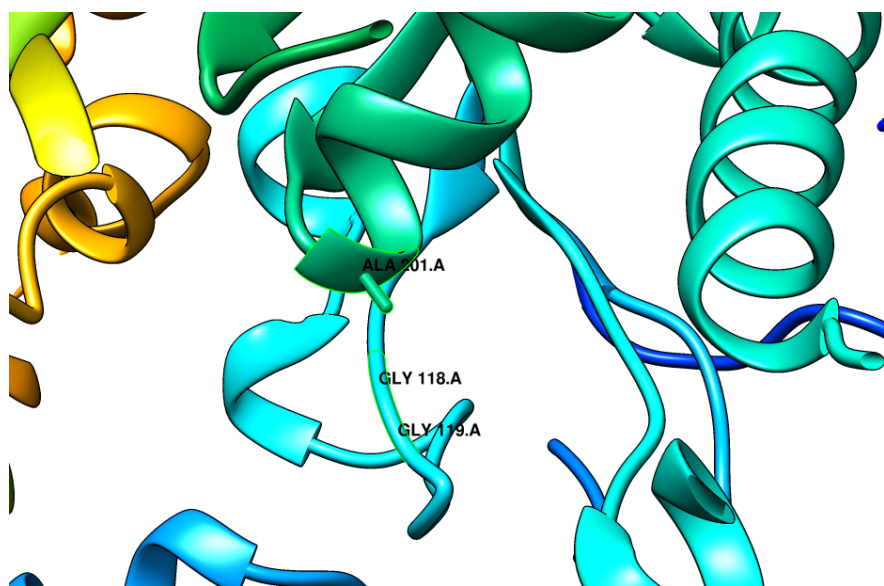


Figura 28. Subsitio oxianión.

Subsitio aromático. Contiene un alto contenido de aminoácidos aromáticos responsables de las interacciones π -catión entre el amonio cuaternario de acetilcolina y los aminoácidos

aromáticos. La AChE es bastante selectiva para la acetilcolina debido a que no todos los ésteres pueden penetrar a través de la garganta y no se pueden acoplar al sitio activo. En total, se presentan 14 residuos aromáticos, incluidos Phe330, Trp279, Phe120, Trp233, Trp432, Tyr70, Tyr121, Phe288, Phe290, Phe331, Tyr130, Tyr334, Tyr442 y Trp84^{62, 61} Figura 29.

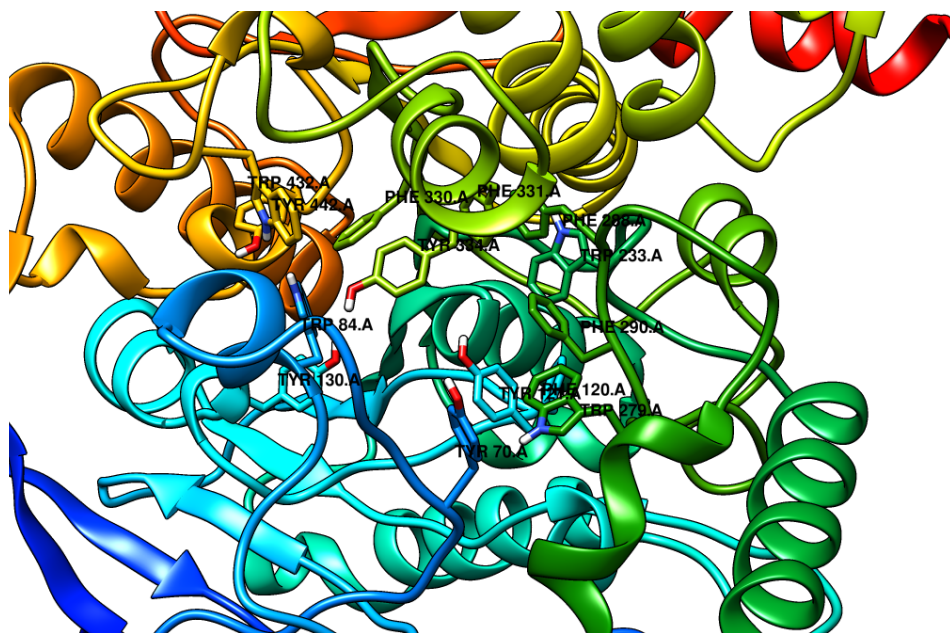


Figura 29. Subsitio aromático.

Subsitio aniónico periférico. Encierra la entrada en la cavidad aromática y se encuentra en la superficie de la molécula de enzima. Es responsable de las funciones no colinérgicas de AChE como la adhesión, la diferenciación de las células y se sospecha que está involucrado en la deposición de placas amiloides en la EA. Las propiedades del sitio aniónico periférico están determinadas por los cinco aminoácidos: Tyr70, Asp72, Tyr 21, Trp279 y Tyr334 (numerados de acuerdo con AChE de *T. californica*)⁶¹ Figura 30.

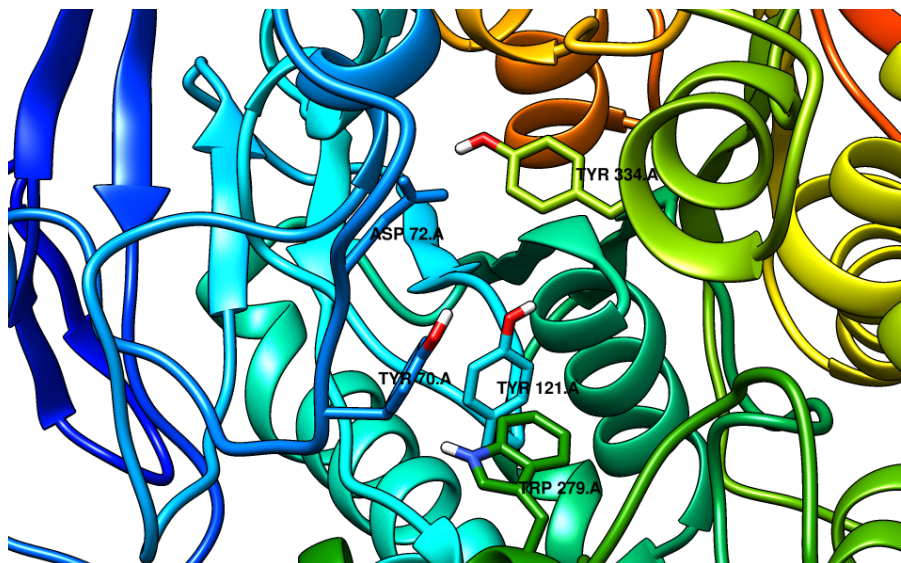


Figura 30. Subsitio aniónico periférico.

Los estudios enfocados a la elucidación estructural de la enzima proveniente de diferentes organismos han permitido establecer que regiones importantes para la actividad de la enzima como el sitio activo se encuentran evolutivamente conservados, ya que aunque cambie ligeramente el número de aminoácidos las regiones activas conservan su disposición.

2.14 Inhibidores

En la actualidad los fármacos empleados en la inhibición de la colinesterasa (ICE) y aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) son tacrina (1993), seguido fármacos con mejor especificidad y tolerabilidad como el donepezilo (1996), rivastigmina (2000) y galantamina (2001)⁴⁷ Figura 31.

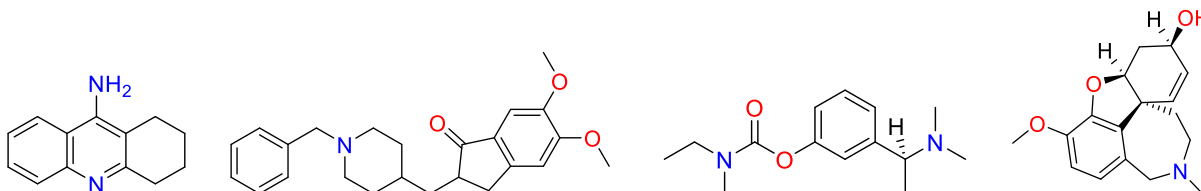


Figura 31. Moléculas utilizadas como inhibidores de AChE, de izquierda a derecha: tacrina, donepezilo, rivastigmina y galantamina.

2.15 Alzheimer

A más de 100 años de haber sido descrita la enfermedad de Alzheimer (EA) la cual es la forma más común de demencia principalmente en adultos mayores, esta incidencia va en aumento con el envejecimiento de la población en todo el mundo, en el 2015 las estadísticas a nivel mundial mostraron una prevalencia de 44 millones de personas, en su mayoría mayores de 60 años y esta cifra se estima en se duplicará 2050 lo que conlleva a una enorme carga socioeconómica.^{63,64} Esta enfermedad se caracteriza como un trastorno neurodegenerativo multifactorial propiciado por el estrés oxidativo, deterioro mitocondrial, neuroinflamación, disfunción sináptica y alteración de la barrera hematoencefálica, que puede ser causada en parte por la acumulación extracelular anormal de péptido β -amiloide (β A) en placas amiloides y agregación de proteínas tau en ovillos neurofibrilares intracelulares (NFT).⁶⁴

2.16 β -amiloide (β A) y placas seniles

β -amiloide (β A) es un péptido de bajo peso molecular y de longitud variable la cual en humanos suelen ser dos tipos principales, β A 1-40 y 1-42 aminoácidos, donde el fragmento de 40 aminoácidos es más abundante, sin embargo, los fragmentos de longitud de 42 aminoácidos forma fibrillas mucho más rápido. De igual manera en cerebros de pacientes con la EA se ha observado fragmentos truncados ya sea en C-terminal o N-terminal de 39 aminoácidos e inclusive microfragmentos de menor longitud como de 1-5 y 6-16 aminoácidos,⁶⁴ así como una región de 25-35 aminoácidos la cual es la región más tóxica y juega un papel importante en el desarrollo de la EA^{65,66}. El precursor de β A es una proteína conocida como proteína precursora amiloidea (PPA) la cual es una proteína transmembranal altamente conservada en el reino *Animalia*, encontrada en organismos como *Drosophila melanogaster* Meigen, *Caenorhabditis elegans* Maupas y en todos los mamíferos⁶⁷; de manera natural participa en diversas funciones en el organismo como en la regulación sináptica⁶⁸, actividad antimicrobiana⁶⁹ entre otras. En el ser humano el gen *APP* es el encargado de codificar a la PPA, esta se encuentra localizada en el cromosoma 21q21.3, contiene 18 exones que abarcan 240 a 290 kilobases.^{70,71,67,72}

Matsui y colaboradores en su artículo de 2007 describen que se han observado diversas isoformas de *splicing* alternativo de APP en humanos, las cuales son de longitud variable (639-770 aminoácidos) donde ciertas isoformas expresadas están asociadas a la EA.⁷³

En la Tabla 2. Descripción de péptido de β A y característica más relevante. Se describen la el péptido de β A o su fracción más común, su secuencia de aminoácidos y característica más relevante.

Tabla 2. Descripción de péptido de β A y característica más relevante.

β -amiloide o fracción	Secuencia de aminoácidos	Características
β A 1-42	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	• Menos soluble que las otras isoformas del péptido, desarrolla fibrillas mucho más rápido • Promueve la agregación de formas más pequeñas como la 1-40
β A 1-40	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	• Representa aproximadamente el 90% de todos los Aβ normalmente liberados de las células, parece contribuir solo a las fases posteriores de la patología.
β A 25-35	GSNKGAIIGLM	• Descrito como la parte más tóxica del péptido, se agrega rápidamente y es neurotóxico de forma inmediata.
β A 29-35	GAIIGLM	• Forman lentamente agregados estables y se transforman en neurotóxicos después de un proceso de incubación.

Además de los trastornos que causa la acumulación de βA en la barrera hematoencefálica, estos péptidos suele acumularse y forma una serie de depósitos en la materia gris del cerebro conocido como placas seniles, de los cuales βA es el componente principal de estos depósitos. Otra característica asociada a esta enfermedad es la reducción en los niveles del neurotransmisor acetilcolina, a medida que avanza la enfermedad, lo que resulta en la disminución de la capacidad cognitiva.⁷⁴

OBJETIVOS

III Objetivos

3.1 Objetivos generales

1. Caracterizar estructuralmente metabolitos secundarios del extracto etanólico y de las particiones de la parte aérea de *Abronia maritima*
2. Sintetizar moléculas derivadas de la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona con actividad biológica.

3.2 Objetivos específicos

1. Obtener un extracto etanólico de la parte aérea de *Abronia maritima*, y la generación de sus particiones por el método de Kupcham modificado.
2. Evaluar la actividad antioxidante del extracto etanólico y particiones de *Abronia maritima*.
3. Realizar la síntesis derivados de la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona.
4. Elucidar estructuralmente los productos obtenidos sintéticamente por medio de distintas técnicas espectroscópicas.
5. Evaluar la actividad antioxidante de los productos sintéticos.
6. Evaluar la actividad de los productos sintéticos sobre una línea celular no tumoral.
7. Evaluar la actividad de los productos sintéticos obtenidos como inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa.
8. Realizar un *in silico* los productos sintéticos frente a diferentes dianas biológicas y determinar sus propiedades ADME.

HIPÓTESIS

IV Hipótesis

Abronia maritima biosintetiza metabolitos secundarios mayoritarios con perfiles bioactivos de tipo antioxidante.

La transformación conjuntiva del grupo carbonilo del 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona mediante reacciones de O-acilación, genera productos de tipo éster bioactivos.

EXPERIMENTAL

V Experimental

En este capítulo se conforma de nueve apartados. En primer lugar se especifica las casas comerciales de las cuales se obtuvieron los reactivos y solventes utilizados en las secciones de fitoquímica así como la sintética y los ensayos de viabilidad celular e inhibición enzimática, al igual que las condiciones generales de trabajo.

El segundo apartado consiste en la descripción de las técnicas analíticas y equipos empleados durante el desarrollo de este trabajo, como los análisis de Resonancia Magnética Nuclear, análisis de espectrometría de masas y de UV visible.

El tercer apartado está dedicado a la descripción taxonómica de *Abronia maritima* así como el sitio y condiciones de colecta del material vegetal empleado en la marcha fitoquímica para la obtención del extracto etanólico y las particiones por medio de la solubilidad diferencial; El siguiente apartado se enfocó en el tamiz fitoquímico, el cual permitió conocer qué tipos de metabolitos secundarios se encuentran presente tanto en el extracto etanólico así como su distribución en las distintas particiones.

En el quinto apartado, se presenta las distintas metodologías enfocadas a la determinación de la actividad antioxidante tanto en el extracto etanólico como las diferentes particiones así como las moléculas sintéticas generadas en este trabajo.

En sexto lugar está la sección enfocada a la descripción detallada de la síntesis de los distintos derivados de la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona, así como las condiciones de reacción para cada molécula y su respectiva caracterización. En la séptima sección se describe la metodología general para el manejo de la línea celular empleada para este trabajo así como la descripción del ensayo MTT enfocado a la viabilidad celular. La octava sección se enfocó a la evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa y finalmente la novena sección se realiza el análisis *in silico* de los productos sintéticos frente a tres dianas biológicas las cuales fueron la enzima acetilcolinesterasa de torpedo del pacífico así como la fracción 1-42 y 25-35 de β -amiloides, además se determinó las propiedades ADME de los productos sintéticos.

5.1 Generalidades

5.1.1 Reactivos, solventes y condiciones de trabajo.

Los reactivos utilizados fueron adquiridos de la compañía Sigma-Aldrich, Faga lab, Fermont, Baker analyzed, Wako Pure Chemical y MC&B de grado reactivo, algunos fueron utilizados con purificación previa. Los solventes no requirieron secado previo para su uso; en la etapa sintética todas las reacciones de acilación se realizaron bajo atmósfera inerte (Nitrógeno de ultra alta pureza) para minimizar la presencia de agua. La síntesis del cloruro de ácido fue realizada sin la necesidad de atmósfera inerte. El material de cristal fue secado en estufa antes de ser utilizado en la etapa fitoquímica y sintética.

5.1.2 Técnicas analíticas

Los análisis espectroscópicos fueron realizados en el Centro de Graduados en Investigación en Química del Instituto Tecnológico de Tijuana, con ayuda del Dr. Ignacio A. Rivero Espejel, Dr. Daniel Chávez Velasco y en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Baja California Campus Tijuana con el apoyo del MC. Arturo Estolano Cobian.

5.1.2.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

El análisis de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) fue realizado en un equipo marca Varian 200 MHz modelo Mercury y Bruker 400MHz. El disolvente que se utilizó para los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H) y de resonancia magnética de carbono (RMN ^{13}C) fue cloroformo deuterado (CDCl_3); los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C se expresan en partes por millón (ppm) relativos al tetrametilsilano Me_4Si , los valores de las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertzios (Hz) en todos los casos, los valores de desplazamiento químico (δ) están expresados en partes por millón (ppm).

5.1.2.2 Espectrometría de masas

Para el análisis de espectrometría de masas se utilizó un equipo Thermo Scientific modelo ISQ LT single quadrupole mass spectrometer por impacto electrónico con los siguientes parámetros: Temperatura Inicial de 120 y final de 220 °C, rango de incremento de 40 °C/min, la temperatura de la Fuente de iones fue de 240 °C. El análisis tuvo una duración de 15 min con un inicio de detección a los 2.50 min. La concentración de las muestras fue de entre 100 a 200 µg y el solvente utilizado para la disolución de las muestras fue cloroformo, diclorometano o acetato de etilo según solubilidad de la muestra.

5.1.2.3 Espectrofotometría de UV visible

La evaluación de la actividad antioxidante por la técnica de DPPH y ABTS fue realizada en un equipo de espectrofotometría de UV visible Thermo Scientific modelo Genesys 20 a una longitud de onda de 517 nm para DPPH y 734 nm para ABTS con el uso de una celda de cuarzo.

5.1.2.4 Espectroscopia de infrarrojo

Para el análisis de infrarrojo se realizó con el uso de un equipo Thermo Scientific FT-IR Nicolet iS 5. Los valores de transmitancia (μ) están expresados en cm^{-1} .

FITOQUÍMICA EXPERIMENTAL

5.1.3 Descripción taxonómica de *Abronia maritima*

Abronia maritima Nuttall ex S. Watson en W.H. Brewer *et al.*, Bot. California. 2: 4. 1880.

Plantas perennes. **Tallos:** postrados, a menudo enterrados, a menudo ampliamente ramificados, formando grandes alfombras, succulenta, densamente glandular-pubescentes. **Hojas:** pecíolo 0,5-3 cm; hojas elípticas a oblongas o casi obovadas, 5-6.8 × 2,3-4,3 cm, márgenes generalmente enteros, a veces ± repando y undulado, superficies minuciosamente víscido-puberulento. **Inflorescencias:** pedúnculo más largo que subtendiendo al pecíolo; brácteas lanceoladas a lanceo-ovadas, 7-11 × 3-4 mm, papiráceo, minuciosamente glandular a glandular-pubescente; Flores 10-18. **Perianto:** Tubo rojo a verde rojizo, 6-10 mm, limbo rojo violáceo profundo, 7-10 mm de diámetro, lóbulos fuertemente reflexos. **Frutos:** turbinados, 10-14 × 6-18 mm, espeso, endurecido, ápice irregular truncado y ± picudo; alas 3-5, sin cavidades.

Floración durante todo el año. Se localiza en dunas costeras y en cordón de dunas inestables De 0-50 m; California; México (Baja California, Baja California Sur, Sinaloa, Sonora).

5.1.4 Colecta, secado y procesado del material vegetal

Previo a la colecta del espécimen vegetal se realizó una inspección de la zona para la localizar de poblaciones naturales de la planta, una vez localizada se realizó la identificación taxonómica con el uso de la clave descrita anteriormente. Confirmado que es la especie de interés se realizó una segunda visita al área de estudio para realizar la colecta. La colecta formal de la planta fue realizada el día 15 de marzo del 2016 en las dunas frente al mar en el núcleo urbano de la ciudad de Ensenada, BC., con las coordenadas **Long** 116° 36' 31.95" **O** **Lat** 31° 49' 0.24" N a una altura de 5 m.s.n.m.; la temperatura promedio registrada del día fue de 15.8 °C., solo se colectó parte aérea de la planta y esta fue realizada bajo el código de conducta para colectar plantas⁷⁵. (ANEXO)



Posterior a la colecta, en el Laboratorio de Química Medicinal y Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingenierías de la Universidad Autónoma de Baja California campus Tijuana se continuó con el procesado del material vegetal, esta fue secada al sol durante 3 días para eliminar el exceso de agua. Previo a la generación del extracto se realizó una cromatografía en capa fina (Thin-layer chromatography o TLC, por sus siglas en inglés) para observar si existía alguna diferencia en la composición entre el tallo y la hoja con una fase móvil *n*-hexano/acetato de etilo al 30%, el resultado de la TLC no mostró diferencia alguna entre la hoja y tallo por lo tanto, se procedió a tratar todo el material vegetal como igual.

5.2 Generación de extracto etanólico

La generación del extracto fue realizada posteriormente al secado parcial del material vegetal, este se realizó por un proceso de maceración en frío con el uso de etanol al 99% para la obtención del extracto inicial. El volumen utilizado de solvente fue de 13 litros y la maceración tuvo una duración de 23 días. La siguiente etapa consistió en el filtrado del extracto para eliminar cualquier partícula no deseada (fragmentos de planta, arena entre otros) y la rotaevaporación hasta sequedad.

Se le realizó una segunda maceración al material vegetal bajo los mismos parámetros antes mencionados solo que en esta ocasión solo fue dejada 14 días, posterior a esto se filtró y rotaevaporó hasta sequedad. El material vegetal restante se dispuso en un contenedor y se guardó indefinidamente.

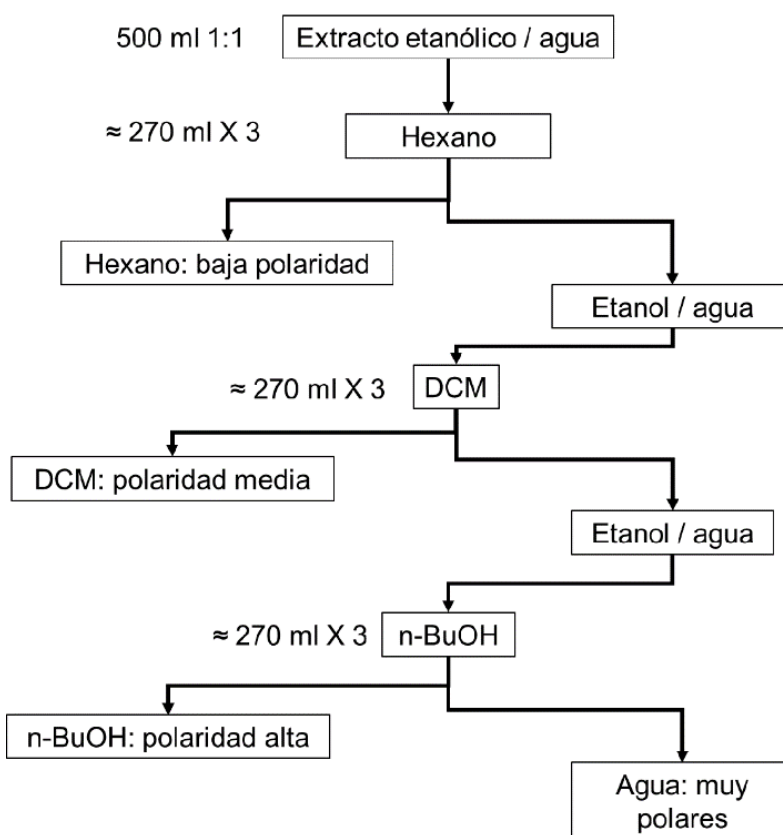
5.3 Partición Kupchan modificado.

Del extracto total fueron separados 100 gramos para realizar la partición Kupchan con modificaciones para este trabajo (Esquema 4) el cual, tiene la función de separar por solubilidad diferencial las distintas sustancias presentes en el extracto vegetal.⁷⁶

Los 100 gramos de extracto seco se resolvieron en 250 mL de etanol, a la cual, se agregaron 250 ml de agua, se agitó hasta solubilizar. El extracto solubilizado se transfirió a un embudo de separación con capacidad de 2 litros, seguido a esto, se agregó 270 ml de *n*-hexano, se agitó ligeramente para evitar emulsión y dejó separar las fases. Las particiones generadas fueron colectadas por separado, a la partición acuosa se volvió a realizar dos lavados más con 270 ml de *n*-hexano, obtenido el volumen de *n*-hexano se procedió a rotaevaporar hasta total eliminación del solvente. La partición restante agua/etanol fue regresada al embudo, posteriormente se agregó en tres etapas 270 mL de diclorometano (DCM), se agitó suavemente, se esperó hasta la separación de fases y se colectó la partición de DCM, se rotaevaporó hasta sequedad, de igual manera la partición agua/etanol fue devuelta al embudo de separación, se agregó por triplicado 270 ml *n*-

butanol (BuOH), se agitó suavemente, se esperó hasta total separación de fases y por separado se colectaron las particiones de *n*-BuOH y acuosa restante.

Debido a que la planta objeto de estudio es considerada una especie halófila (acumuladora de sales), en las particiones de mayor polaridad antes de total sequedad fue eliminada la sal, el método por lo cual se realizó esta separación fue a través de extracción con etanol; una vez eliminado todo resto de *n*-butanol y agua respectivamente se solubilizó las particiones en etanol absoluto, se colectó la fase orgánica y fue rotaevaporada hasta sequedad.



Esquema 4. Diagrama de flujo de la partición Kupchan modificada.

5.4 Tamiz fitoquímico

Como parte de una aproximación al conocimiento de los componentes naturales presentes en el extracto y particiones de *A. maritima*, se realizó el tamiz fitoquímico, que consisten en reacciones químicas con los componentes específicos presentes en las muestras evaluadas, a estos componentes se les conoce también como metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios son productos del metabolismo generalmente de bajo peso molecular, los cuales no son necesarios para la vida del organismo sin embargo, juegan un papel importante en las interacciones con otros organismos (ya sea como un atrayente o repelente) así como en el ecosistema. Su síntesis en la planta generalmente está restringida a sitios específicos como órganos, tejidos y células donde posteriormente pueden ser transportados y acumulados lejos de su sitio de origen sintético; a menudo entre especies del mismo grupo su contenido y tipos puede variar con lo que da lugar a caracteres taxonómicos estudiados por la quimiotaxonomía.

Protegen a las plantas frente al estrés originado por factores bióticos (bacterias, hongos, animales) y abióticos (físicos como la temperatura, humedad, intensidad lumínica y químicos como metales pesados u otros metabolitos generados por otras plantas). Y desde la antigüedad su uso por el ser humano han representado un gran valor económico debido a sus diferentes propiedades que van desde la obtención de fragancias, saborizantes, colorantes hasta fármacos e insecticidas⁷⁷.

En términos generales, se pueden clasificar en cuatro o cinco grupos: terpenos, alcaloides, compuestos fenólicos, policétidos y metabolitos secundarios que contiene azufre.^{77,78}

Las reacciones involucradas en el tamiz fitoquímico son variadas e identifican la presencia de algún metabolito secundario ya que producen una alteración en la estructura molecular del mismo, por ejemplo sea por modificación de grupos funcionales, apertura de anillos, formación de complejos, aparición de precipitados, cambios de color o la liberación de gas.

Previamente a efectuar los ensayos se pesó de manera separada 1 mg, 4 mg y 15 mg del extracto etanólico y de las particiones obtenidas previamente de *A. maritima*; los 15 mg fueron disueltos en 15 mL de etanol absoluto con lo que se obtuvo una concentración de 15 mg/mL, los 4 mg se mantuvieron en seco. A continuación en la Tabla 3, se describe los ensayos realizados así como su metodología específica.

Tabla 3. Metodologías realizadas en el extracto y particiones de *Abronia maritima*

Metabolitos secundarios a detectar	Metodología (s)
Alcaloides	Mayer Wagner Dragendorff
Taninos	FeCl ₃ Gelatina
Esteroides y triterpenoides	Lieberman - Burchard
Flavonoides	Shinoda
carbohidratos	Benedict
Saponinas	formación de espuma
Glucósidos antraquinónicos	Borntrager
Cumarinas	Erllich

5.4.1 Alcaloides (estándar positivo: sulfato de quinina)

- Los 4 mg de peso seco tanto extracto y particiones, por separado se adicionaron 4 mL de ácido clorhídrico al 5%.
- Se calentó en baño María por cinco minutos o hasta una disolución completa. Una vez a temperatura ambiente la solución anterior, se dividió en tres tubos de ensayo (un tubo para Mayer, otro para Dragendorff y otro para Wagner) y enseguida se adicionó 8 gotas del reactivo correspondiente, un reactivo distinto para cada tubo.

Procedimiento estándar.

- Se tomó la solución del estándar de sulfato de quinina, 1mL en cada tubo de ensayo (un tubo para Mayer, otro para Dragendorff y otro para Wagner) y enseguida adicionó ocho gotas del reactivo correspondiente, un reactivo distinto para cada tubo.
 - **Mayer (+)**: precipitado color crema
 - **Dragendorff (+)**: precipitado pardo-rojizo
 - **Wagner (+)**: precipitado pardo-rojo

5.4.2 Taninos (estándar positivo: ácido gálico)

- De la solución preparada anteriormente, se tomó 1mL y se adicionó ocho gotas del reactivo de cloruro férrico.
- En otro tubo por separado, se tomó 1mL de la solución preparada anteriormente y se adicionó 15 gotas de gelatina.

Procedimiento estándar.

- Se tomó 1mL de la solución del estándar de ácido gálico y se adicionó ocho gotas del reactivo de cloruro férrico. En otro tubo por separado, se tomó 1mL del estándar de ácido gálico y se adicionó 15 gotas de gelatina.
 - **Cloruro férrico (+)**: coloración verde, azul o negra
 - **Gelatina (+)**: precipitado blanco

5.4.3 Esteroides y triterpenoides (estándar positivo: colesterol)

- Se tomó 1mL de la solución etanólica del extracto y particiones preparada inicialmente y se adicionó 1 mL de anhídrido acético, se mezcló ligeramente, se agregó tres gotas del ácido sulfúrico concentrado lentamente por las paredes del tubo. NOTA: como precaución la reacción ocurrida es extremadamente exotérmica.

Procedimiento estándar.

- Se pesó 1mg de colesterol en polvo y se adicionó 1 mL de anhídrido acético, se mezcló ligeramente hasta que se observó una solución homogénea, se agregó tres

gotas de ácido sulfúrico concentrado lentamente por las paredes del tubo. NOTA: como precaución la reacción ocurrida es extremadamente exotérmica.

- **Esteroides y triterpenoides (+):** coloraciones azul- verde y violeta.

5.4.4 Flavonoides (estándar positivo: extracto cítrico)

- Se tomó 1mL de la solución etanólica del extracto y particiones preparada inicialmente, se adicionó tres gotas del ácido clorhídrico concentrado (lentamente y por las paredes del tubo), se dejó reposar cinco unos minutos, si se obtiene una coloración roja indica la presencia de auronas o chalconas, en el mismo tubo se colocó unas limaduras de magnesio metálico y se dejó reposar 5 minutos, mas. Si se forma una coloración naranja indica la presencia de flavonas, si es rojo flavonoles y si es magenta flavononas.

Procedimiento estándar.

- Se tomó 1 mL de la solución del extracto cítrico ya preparada, se adicionó tres gotas del ácido clorhídrico concentrado (lentamente y por las paredes del tubo), se dejó reposar cinco minutos. Si se obtiene una coloración roja indica la presencia de auronas o chalconas, en el mismo tubo se colocó unas limaduras de magnesio metálico y se dejó reposar 5 minutos, si se forma una coloración naranja indica la presencia de flavonas, si es rojo flavonoles y si es magenta flavononas.
 - **Auronas o chalconas (+)** color rojo
-Con adición de magnesio metálico-
 - **Flavonas (+)** color naranja
 - **Flavonoles (+)** color rojo
 - **Flavononas (+)** color magenta

5.4.5 Carbohidratos (estándar positivo: fructosa)

- Se tomó 1mL de la solución etanólica del extracto y particiones preparada inicialmente, se adicionó ocho gotas del reactivo de Benedict, se colocó el tubo en un baño María con agua hirviendo y se esperó entre cinco y diez minutos.

Procedimiento estándar.

- Se tomó 1ml de la solución de fructosa ya preparada y se adicionó ocho gotas del reactivo de Benedict, se colocó el tubo en un baño María con agua hirviendo y se esperó entre cinco y diez minutos.
 - **Carbohidratos (+):** precipitado pardo-rojizo

5.4.6 Saponinas (estándar positivo: saponina)

- El miligramo pesado de extracto y particiones seco se adicionó 2 mL de agua destilada, se agitó vigorosamente y se dejó quieto por lo menos 15 minutos.

Procedimiento estándar

- Se pesó 1mg del estándar de saponina, se adicionó 2 mL de agua destilada, se agitó vigorosamente y se dejó quieto por lo menos 15 minutos.
 - **Saponinas (+):** espuma estable por lo menos 15 minutos.

5.4.7 Glucósidos antraquinónicos (estándar positivo: ácido carminico)

- Se tomó 1mL de la solución etanólica del extracto y particiones preparada inicialmente, se adicionó 1 mL de ácido clorhídrico al 5%, posteriormente se adicionó 1 mL de cloroformo y finalmente se adicionó cuatro gotas de hidroxilo de amonio al 10%.

Procedimiento estándar

- Se tomó 1mL de la solución de ácido carminico ya preparada, se adicionó 1 mL de ácido clorhídrico al 5%, posteriormente se adicionó 1 mL de cloroformo y finalmente se adicionó cuatro gotas de hidroxilo de amonio al 10%.
 - **Glucósidos antraquinónicos (+):** anillo rosa- rojo en la superficie de la fase acuosa.

5.4.8 Cumarinas

- Se tomó 1mL de la solución etanólica del extracto y particiones preparada inicialmente, se concentró un poco con ayuda de calor, se agregó dos gotas de Reactivo Erlich y una gota de ácido clorhídrico concentrado. La coloración naranja, indica presencia de cumarinas.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

5.5 Determinación de la actividad antioxidante.

Se evaluó la actividad antioxidante del crudo del extracto etanólico de *Abronia maritima*, las particiones obtenidas por el método de Kupchan modificado y las moléculas sintetizadas. Las técnicas utilizadas fueron las siguientes: La decoloración del radical libre 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), reducción del catión radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).

5.5.1 Método de decoloración del radical libre 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH).

La evaluación de la actividad antioxidante se determinó por la metodología de La decoloración del radical libre 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) de acuerdo al método reportado por Salazar y colaboradores⁷⁹ con modificaciones para este trabajo.

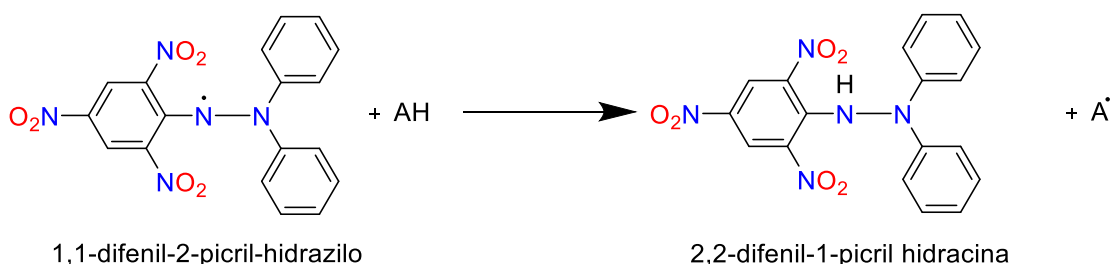


Figura 32. Reacción general del radical DPPH frente a un antioxidante.

5.5.1.1 Extracto y particiones

En cinco viales de cristal se pesó individualmente 4 mg del extracto crudo desalinizado y la partición de *n*-hexano, para el resto de las particiones (DCM, *n*-BuOH y acuosa) se pesó solo 1 mg. Una vez obtenido los pesos las muestras fueron disueltas en 4 mL de etanol, con lo que se obtuvo las soluciones iniciales del extracto crudo y la partición de *n*-hexano a una concentración de 1mg/mL, para el resto de las muestras una concentración de 0.3125mg/mL.

Se utilizó quercetina como estándar para la prueba, la cual se tiene documentado en la literatura como un potente antioxidante.

5.5.1.2 Moléculas sintéticas

Para la evaluación de la actividad antioxidante de las moléculas sintetizadas se pesaron individualmente cuatro miligramos, una vez obtenido los pesos fueron diluidas en 4 mL de etanol con lo que se obtuvo una concentración de 1mg/mL.

5.5.2 Evaluación antioxidante

Una vez pesados y disueltos los productos sintéticos fueron evaluados de la siguiente manera: Para cada muestra evaluada se utilizaron 30 tubos de ensayo dispuestos en tres filas de diez tubos cada una. En los últimos nueve tubos de cada fila se agregó 500 μ L de etanol y solo a los tubos de la primer hilera se agregó un 1 mL de la solución respectiva a evaluar preparada con anterioridad. Del primer tubo se tomó un alícuota de 500 μ L y estos se trasvasaron al tubo dos seguido al tubo tres y así subsecuentemente hasta que se obtuvo la dilución seriada.

Posteriormente en oscuridad se preparó una solución del radical DPPH 76 μ M; se pesó 1.5 mg del radical y se disolvió en 50 ml de etanol, la solución preparada fue utilizada para dos muestras que equivale a 60 tubos de disolución seriada. Previo a la adición del radical a las muestras evaluadas se calibró el espectrofotómetro, se ajustó al blanco que en este caso fue etanol a una longitud de onda de 517 nm, se leyó la absorbancia del radical al 100% con una disolución de 500 μ L de etanol y 500 μ L de la solución de DPPH 76 μ M, una vez obtenido este valor se procedió a la adición de 500 μ L de solución de DPPH 76 μ M a todos los tubos de manera rápida, primero a los tubos de la menor dilución en orden ascendente, una vez hecho esto, se cubrió de la luz directa y se dejó reaccionar durante 30 minutos (Para una sola muestra a evaluada). La lectura de las absorbancias se comenzó con los tubos de menor concentración y así sucesivamente. Los datos obtenidos de la lectura de absorbancias fueron concentrados y procesados en una base de datos con ayuda del software Microsoft Excel 2013®.

La actividad antioxidante fue calculada como porcentaje de decoloración del radical DPPH con el uso de la siguiente expresión matemática descrita en la Ecuación 1.

Ecuación 1. Porcentaje de actividad antioxidante frente a DPPH.

$$\% \text{ Actividad antioxidante} = \left[1 - \left(\frac{\text{Abs. promedio de la muestra}}{\text{Abs. control (sol de DPPH)}} \right) \right] \times 100$$

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Para cada producto, el porcentaje de decoloración del radical DPPH se trazó frente a la concentración de cada dilución, la concentración requerida para neutralizar el radical de DPPH en un 50% expresado como CE₅₀ se obtuvo a partir de un análisis de interpolación. Se usó quercetina como compuesto de referencia.

5.5.3 Método de reducción del catión radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).

El ensayo de decoloración del radical catiónico ABTS (ABTS^{•+}) Se determinó con el uso de la metodología descrita por Re *et al.* y Kuskoski *et al.*^{80,81} con modificaciones para este trabajo.

Previo al ensayo, se procedió a la activación de este radical, el cual inicia con el peso en una balanza analítica 0.0033 g de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) y 0.0194 g de ABTS, ambos se disolvieron en 5 mL de agua desionizada, con lo que se obtuvo una concentración de 2,45 mM de K₂S₂O₈ 7 mM de ABTS. La solución resultante se protegió de la luz directa con aluminio y se dejó reposar en la oscuridad por 18 horas. Una hora antes de cumplirse las 18 horas, se prepararon la solución patrón de muestras a evaluar.

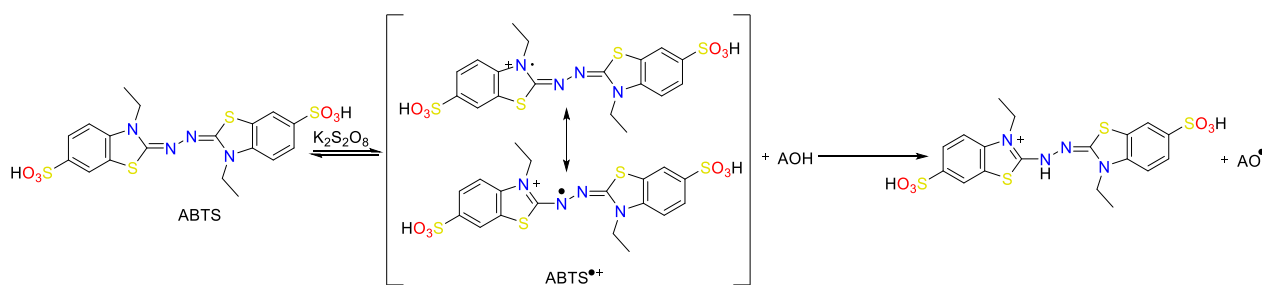


Figura 33. Reacción general del catión ABTS.

5.5.3.1 Extracto y particiones

En cinco viales de cristal se pesó individualmente 1mg de extracto crudo y las cuatro particiones, las cuales fueron disueltas en 1 mL de etanol con lo que se obtuvo cinco soluciones con una concentración de 1 mg/mL.

5.5.3.2 Moléculas sintéticas

Para la evaluación de la actividad antioxidante de las moléculas sintetizadas en nueve viales de cristal se pesó individualmente distintas cantidades de las muestras a evaluar, para la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona se pesó 0.5 mg y el resto de moléculas sintéticas se pesó 0.25 mg. Una vez obtenido el peso de cada molécula se disolvieron con 1 mL de etanol con lo cual se obtuvo una solución a diferentes concentraciones, para 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona concentración de 1 mg/mL y el resto de las moléculas se obtuvo una concentración de 0.25 mg/mL.

5.5.4 Evaluación antioxidante

La primer serie de las diluciones seriadas se realizaron en una gradilla provista de 30 tubos ("A"), el cual se adicionó 100 μ L de etanol en los últimos 9 tubos de cada fila y solo a los tubos de la primer hilera se agregó un 200 μ L de las soluciones preparadas anteriormente, del primer tubo se tomaron 100 μ L y estos se trasvasaron al tubo dos seguido al tubo tres y así subsecuentemente. Una vez listas las diluciones seriadas, en otra gradilla ("B") a con la misma cantidad de tubos que la primera, se agregó 20 μ L de cada dilución en el tubo correspondiente. Se calibró el espectrofotómetro a una longitud de onda de 734 nm y el blanco a evaluar fue etanol. Para una sola muestra a evaluar, se preparó una solución de ABTS la cual consta de 320 μ L de radical preparado 18 horas antes la cual se disolvió en 32 mL de etanol. Se utilizó etanol como blanco y la absorbancia control (ABTS + 100%) se obtuvo con 980 μ L de la solución ABTS + y 20 μ L de metanol, con lo que se obtuvo un volumen total de 1 mL. Se adicionó 980 μ L de la solución de ABTS anterior a todos los tubos de la gradilla "B", velozmente de la menor a mayor concentración a evaluar; de inmediato, se protegió de la luz directa con papel aluminio y se dejó esperar siete minutos, posterior a ese tiempo se tomó la lectura de las absorbancias, se inició con la menor concentración y así sucesivamente.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Para cada producto, el porcentaje de inhibición del radical catiónico ABTS + se trazó frente a la concentración de cada dilución, la concentración requerida para neutralizar el radical ABTS + en un 50% expresado

como CE₅₀ se obtuvo a partir de un análisis de interpolación. Se usó quercetina como compuesto de referencia. Los datos obtenidos de la lectura de absorbancias fueron concentrados y procesados en una base de datos con ayuda del software Microsoft Excel 2013®.

El porcentaje de inhibición del radical se obtuvo con el uso de la siguiente expresión matemática descrita en la Ecuación 2.

Ecuación 2. Porcentaje de actividad antioxidante frente a ABTS.

$$\% \text{ Actividad antioxidante} = \left(\frac{\text{Abs. ABTS} - \text{Abs. promedio muestra}}{\text{Abs. ABTS}} \right) \times 100$$

En el caso de estos dos primeros métodos antioxidantes para su interpretación se emplearon gráficos de tipo dispersión, donde se buscó que el coeficiente de correlación (R²) fuera mayor a 0.90; una vez estimado a R² se calculó la concentración efectiva media (CE₅₀) con la ecuación correspondiente y se tomó en cuenta que: X= CE₅₀ y Y= 50, con esto, se estimó la concentración efectiva media que inhibió a los radicales.

5.5.5 Método de decoloración oxidativa del β -caroteno.

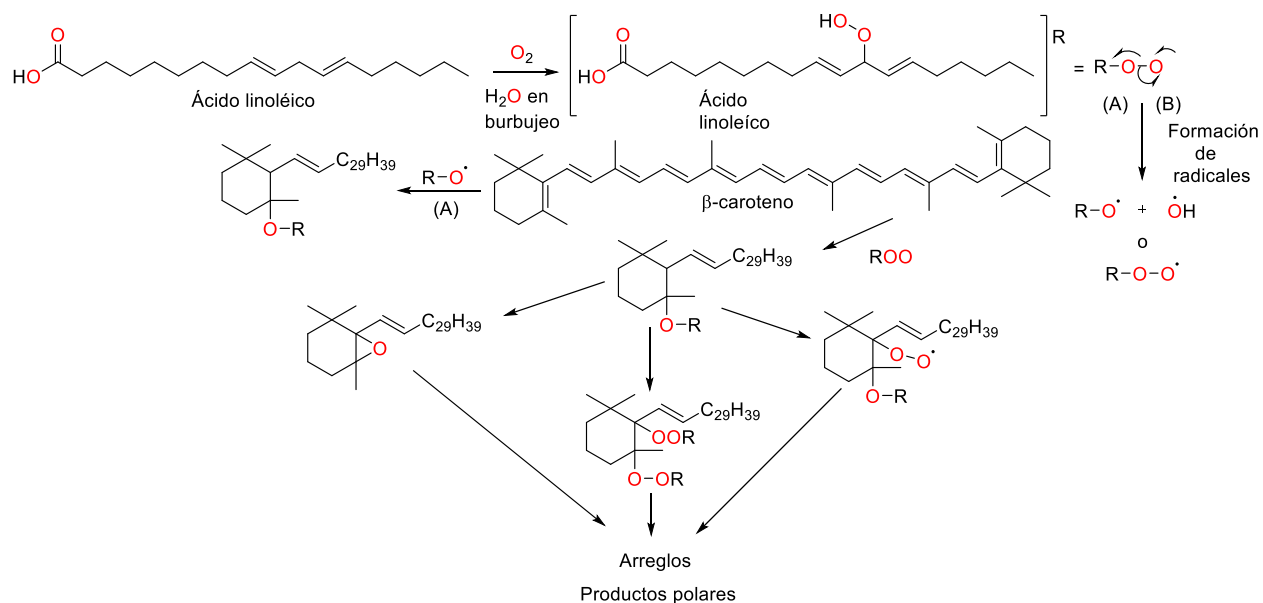


Figura 34. Reacción general de oxidación de β -caroteno.

Previo a realizar la prueba e colocó en un matríz Erlenmeyer de 125 ml de agua destilada y se dejó a burbujear durante una hora, mientras el tiempo transcurría se pesó 0.2 mg de β -caroteno y se disolvió en 2 ml de cloroformo; inmediatamente se adicionó 20 μ l de ácido linoleico y 200 μ L de Tween 20, se homogenizó la mezcla, se cubrió de la luz directa con papel aluminio y se esper   hasta total evaporación total del cloroformo a presión reducida con un rotavapor.

7.5.5.1 Extracto y particiones

Se pesaron 2 mg de extracto crudo y la partición de *n*-hexano las cuales fueron disueltas en 2 ml de etanol, para así tener una concentración de 1 mg/mL, mientras que las particiones DCM, *n*-BuOH y Acuosa solo se pesó 1 mg, las cuales fueron disueltas hasta una concentración de 1.5625×10^{-2} , el solvente utilizado para DCM y *n*-BuOH fue etanol, mientras que para partición acuosa se utilizó agua destilada.

5.5.6 Evaluación antioxidante

Se ajustó el espectrofotómetro a una longitud de onda de 470 nm, el blanco en esta prueba fue agua destilada, además se preparó un baño maría a una temperatura de 50 °C.

Se colocó en una gradilla 18 tubos de ensaye con tapa de rosca que equivalen a cada muestra por triplicado más tres del control, se tomó 350 μ L de las soluciones a evaluar y se colocó en cada tubo por triplicado.

Una vez evaporado el cloroformo se procedió a realizar la emulsión, se disolvió la mezcla de β -caroteno/ácido linoleico/Tween 20 en 50 ml de agua destilada previamente en burbujeo, se homogenizó bien e inmediatamente se adicionó 2.5 ml de esta emulsión a los tubos de ensaye lo más rápido posible. Se realizó la lectura de absorbancia de los tubos, se inició con los tubos control que solo contenían la emulsión y entre muestras diferentes se lavó la celda del espectrofotómetro para evitar contaminación. Una vez leída las absorbancias se cerraron los tubos y fueron colocados en el baño maría a una temperatura de 50 °C durante un periodo de 120 minutos. Trascurrido el tiempo se procedió a leer las absorbancias de cada muestra.

Los datos obtenidos de la lectura de absorbancias fueron concentrados y procesados en una base de datos con ayuda del software Microsoft Excel 2013®.

La expresión matemática descrita en la Ecuación 3 se empleó para la obtención de las lecturas de actividad antioxidante y se muestra a continuación.

Ecuación 3. Porcentaje de actividad antioxidante del β -caroteno.

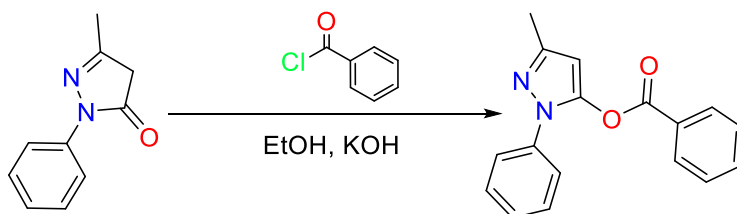
$$\% \text{ Actividad antioxidante} = \left[1 - \left(\frac{\text{Abs. prom. t0} - \text{Abs. prom. t120}}{\text{Abs. prom. C t0} - \text{Abs. prom. C t120}} \right) \right] \times 100$$

SÍNTESIS DE DERIVADOS DE 1-FENIL- 3METIL-2-PIRAZOLIN-5-ONA

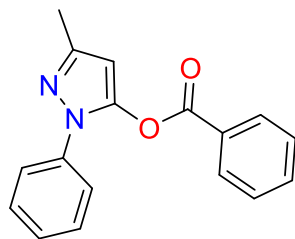
5.5.7 Síntesis de derivados de 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona

En este apartado se describe el procedimiento de la síntesis de los derivados de 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona, primera vez descrita por Jensen (1959)³⁵ y Zamorano y Camus (2015)⁸² con modificaciones para este trabajo, donde la segunda propuesta sintética fue la base de las condiciones empleadas para este trabajo; así como la síntesis de diversos haluro de ácido a partir de ácidos carboxílicos con tricloruro de fosforo en acetonitrilo.

5.5.7.1 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-benzoato



En un matríz de 250 ml provisto de un agitador magnético se disolvió el hidróxido de potasio (322.10 mg, 5.74 mmol) en 10 mL de etanol absoluto, una vez disuelto se adicionó la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona (500 mg, 2.87 mmol) disuelto en 20 mL de etanol absoluto. La mezcla se dejó en agitación por una hora a temperatura ambiente. Trascurrido el tiempo se adicionó el cloruro de benzoílo (0.5 mL, 4.30 mmol) gota a gota y se dejó en agitación 5 minutos más. La solución resultante fue evaporada a presión reducida hasta obtener un sólido amarillo claro. El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica en gel sílice (8:2 *n*-hexano-acetato de etilo). Se obtuvo un sólido amarillo claro con un rendimiento del 99%.



^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ : 8.01-7.96(m, 1H), 7.59-7.48(m, 3H), 7.43-7.29(m, 4H), 7.25-7.17(tt, 1H), 6.19(s, 1H), 2.28(s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ : 161.9, 149.1, 144.5, 134.40, 130.5, 129.1, 128.9, 127.9, 127.2, 123.2, 95.9, 14.7 ppm.

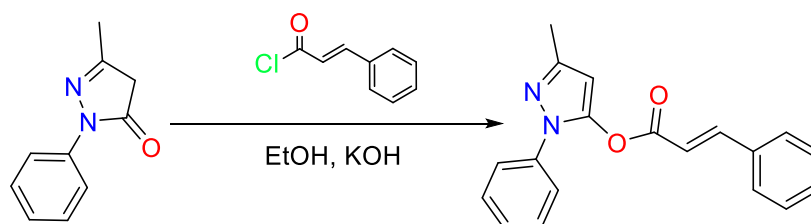
EM m/z (%) = 278.23 $[\text{M}]^+$ (< 1), 173(<1), 106(8), 105(100), 77(62), 51(15).

IR (ATR diamante, cm^{-1}) 3069 (C-H aromático), 1755 (C=O), 1504 (C-C) cm^{-1}

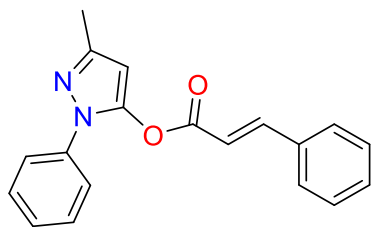
5.5.7.2 Purificación del cloruro de cinamoílo

En un matr  z de 250 mL se disolvió 500 mg de cloruro de cinamoílo impuro en 100 ml de diclorometano. Una vez disuelto se transfirió la solución a un embudo de separación de 250 mL y se lavó 3 veces con solución satura de NaHCO₃ (50 mL) y brine (20 mL), la fase orgánica fue evaporada a presión reducida hasta obtener un sólido amarillo claro de olor pungente. Se obtuvo 250 mg (50%) de cloruro de cinamoílo puro.

5.5.7 3 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-cinamoato



En un vial de 20 ml provisto de un agitador magnético se disolvió el hidróxido de potasio (64 mg, 1.148 mmol) en 2 mL de etanol absoluto, una vez disuelto se adicionó la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona (100 mg, 0.574 mmol) disuelto en 5.74 mL de etanol absoluto. La mezcla se dejó en agitación por una hora a temperatura ambiente. Trascurrido el tiempo se adicionó el cloruro de cinamoílo previamente purificado (239.1 mg, 1.435 mmol) disuelto 5 ml de diclorometano gota a gota, se obtuvo una solución amarilla y se dejó en agitación 10 minutos más. La solución resultante fue evaporada a presión reducida hasta obtener un sólido amarillo. El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica en gel sílice (9.5:5 *n*-hexano-acetato de etilo). Se obtuvo un sólido cristalino blanco con un rendimiento del 93%.



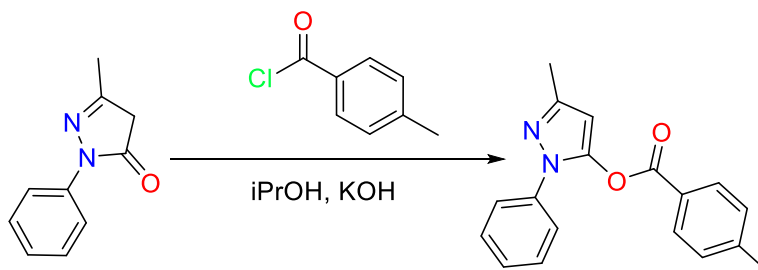
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.83(d, J = 16.0 Hz, 1H), 7.60-7.57(m, 2H), 7.56-7.53(m, 2H), 7.47-7.39(m, 5H), 7.34-7.29(m, 1H), 6.51(d, J = 15.9 Hz, 1H), 6.20(s, 1H), 2.35(s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 162.1, 149.0, 148.5, 144.5, 138.2, 133.7, 131.3, 129.09, 129.1, 128.5, 127.1, 123.1, 115.4, 95.8, 14.6 ppm.

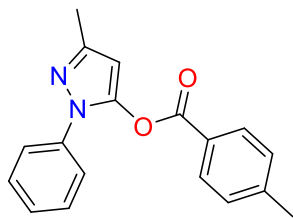
EM m/z (%) = 304.17 $[\text{M}]^+$ (<1), 173(3), 131(61), 104(4), 103(45), 77(100), 51(37).

IR (ATR diamante, cm^{-1}) 2920 (C-H alifático), 1747 (C=O), 1504 (C-C) cm^{-1}

5.5.7.4 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-4-metilbenzoato



En un matríz de 50 mL provisto de un agitador magnético se disolvió el hidróxido de potasio (322.1 mg, 5.74 mmol) en 5 mL de isopropanol absoluto, una vez disuelto se adicionó la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona (500 mg, 0.574 mmol) disuelto en 7 mL de isopropanol absoluto. La mezcla se dejó en agitación por una hora a temperatura ambiente. Trascurrido el tiempo se adicionó el cloruro de *p*-toluílo (0.569 mL, 4.30 mmol) gota a gota, se obtuvo una solución naranja claro y se dejó en agitación 10 minutos más. La solución resultante fue evaporada a presión reducida hasta obtener un fluido naranja claro. El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica de gel de sílice eluida con *n*-hexano puro. Se obtuvo un sólido amarillo claro con un rendimiento del 99%.



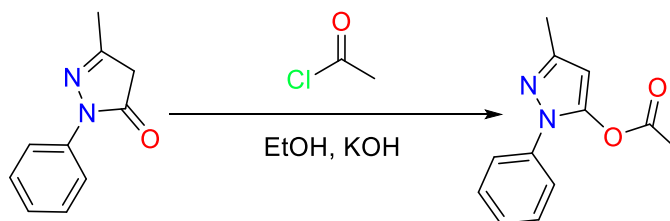
^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ : 7.96-7.90(m, 2H), 7.61-7.54(m, 2H), 7.44-7.22(m, 5H), 6.24(s, 1H), 2.40(s, 3H), 2.34(s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 162.0, 149.2, 145.5, 144.7, 138.1, 130.5, 129.6, 129.2, 127.3, 125.2, 123.3, 96.0, 21.9, 14.6 ppm.

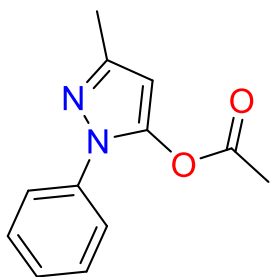
EM m/z (%) = 292.31 $[\text{M}]^+$ (<1), 173(<1), 119(100), 91(38), 77(20), 65(15), 51(7).

IR (ATR diamante, cm^{-1}) 3058 (C-H aromático), 1752 (C=O), 1504 (C-C) cm^{-1}

5.5.7.5 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-acetato



En un matríz de 250 mL provisto de un agitador magnético se disolvió el hidróxido de potasio (644.2 mg, 11.48 mmol) en 20 mL de etanol absoluto, una vez disuelto se adicionó la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona (1 g, 5.74 mmol) disuelto en 5 mL de etanol absoluto. La mezcla se dejó en agitación por una hora a temperatura ambiente. Trascurrido el tiempo se adicionó el cloruro de acetilo (1.229 mL, 17.22 mmol) gota a gota, se obtuvo una solución amarilla y se dejó en agitación 10 minutos más. La solución resultante fue trasferida a un embudo de separación de 500 mL y se lavó 3 veces con solución satura de NaHCO₃ (50 mL), brine (20 mL) y como fase orgánica diclorometano (100 mL) la fase orgánica fue evaporada a presión reducida hasta obtener un líquido viscoso amarillo claro de olor dulce, el cual fue purificado por columna cromatográfica de gel de sílice con el uso de una fase móvil (8:2 *n*-hexano-acetato de etilo) y se obtuvo 97% de producto puro.



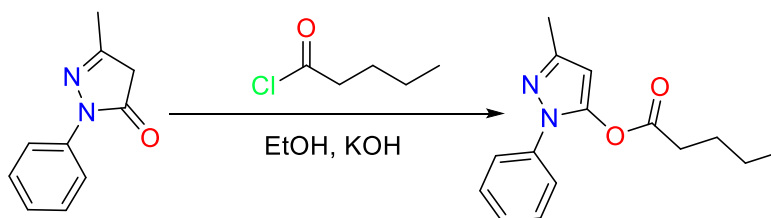
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.55-7.51(m, 2H), 7.46-7.41(m, 2H), 7.34-7.29(m, 1H), 6.09(s, 1H), 2.32(s, 3H), 2.25(s, 3H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 166.1, 148.9, 144.3, 138.1, 129.1, 127.1, 123.0, 95.9, 20.8, 14.5 ppm.

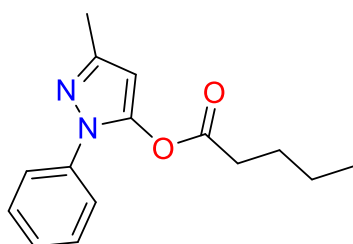
EM *m/z* (%) = 216.15 [M]⁺ (1,), 174(23), 129(5), 91(2), 77(41), 68(5), 51(28), 43(100).

IR (ATR diamante, cm⁻¹) 3063 (CH aromático), 2961 (C-H alifático), 1706 (C=O), 1498 (CC) cm⁻¹.

5.5.7.6 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-pentanoato



En un matríz de 250 mL provisto de un agitador magnético se disolvió el hidróxido de potasio (644.2 mg, 11.48 mmol) en 20 mL de etanol absoluto, una vez disuelto se adicionó la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona (1 g, 5.74 mmol) disuelto en 40 mL de etanol absoluto. La mezcla se dejó en agitación por una hora a temperatura ambiente. Trascurrido el tiempo se adicionó el cloruro de valero  lo (2.04 mL, 17.22 mmol) gota a gota, se obtuvo una solución amarilla y se dejó en agitación 10 minutos más. La solución resultante fue transferida a un embudo de separación de 500 mL y se lavó 3 veces con solución satura de NaHCO₃ (50 mL), brine (20 mL) y como fase orgánica diclorometano (100 mL) la fase orgánica fue evaporada a presión reducida hasta obtener un líquido viscoso amarillo claro de olor dulce, el cual fue purificado por columna cromatográfica de gel de sílice con el uso de una fase móvil (6:4 *n*-hexano-acetato de etilo), se obtuvo 92% de producto puro.



¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 7.55-7.48(m, 2H), 7.46-7.37(m, 2H), 7.34-7.25(m, 1H), 6.08(s, 1H), 2.49(t, 2H), 2.32(s, 3H), 1.70-1.55(pen, 2H), 1.41-1.19(m, 2H), 0.89(t, 3H) ppm.

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ : 164.5, 144.4, 139.9, 133.4, 124.6, 122.6, 118.8, 91.4, 29.2, 22.0, 17.5, 10, 9.2 ppm.

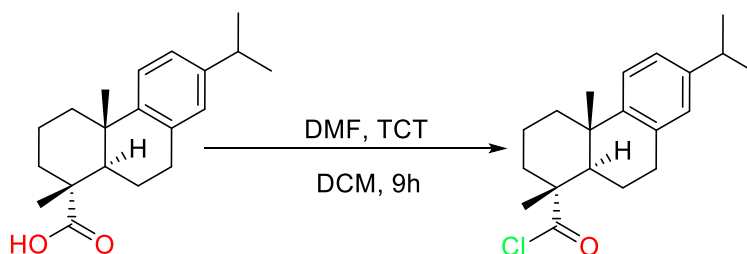
EM *m/z* (%) = 258.18 [M]⁺ (<1), 175(1), 174(10), 173(1), 129(1), 105(2), 85(42), 77(39), 57(100), 51(13), 41(36).

IR (ATR diamante, cm⁻¹) 3063 (CH aromático), 2961 (C-H alifático), 1706 (C=O), 1498 (CC) cm⁻¹.

5.5.7.7 Purificación del ácido dehidroabietico por columna cromatográfica

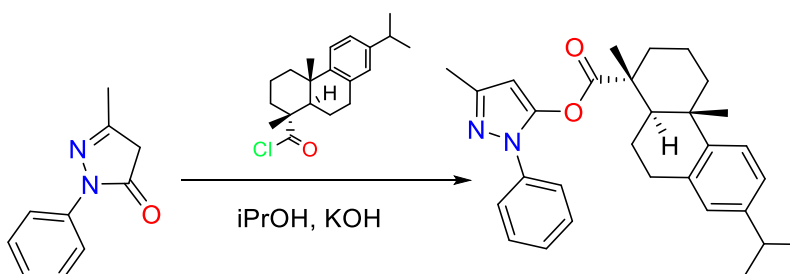
En un matríz de 100 mL se disolvió 1 g de ácido dehidroabietico 3 mL de diclorometano, una vez disuelto se adicionó gel de sílice hasta total impregnación, la mezcla fue evaporada a presión reducida hasta sequedad, posteriormente se procedió a purificar por columna cromatográfica en gel de sílice con *n*-hexano puro hasta eliminar el contaminante, una vez eliminado el contaminante se eluyó la columna cromatográfica con diclorometano puro. Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento del 90%.

5.5.7.8 Síntesis de cloruro de dehidroabietol   a partir de ácido dehidroabietico

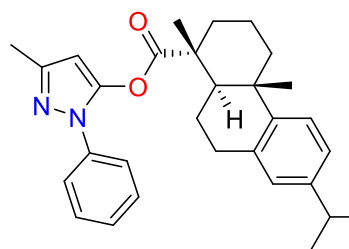


En un matríz de 250 mL provisto de un agitador magnético se disolvió el cloruro de cianurilo (460 mg, 2.49 mmol) con dimetilformamida (0.78 mL, 0.249 mmol), se dejó en agitación por 10 minutos, transcurrido el tiempo la mezcla de reacción se tornó un color amarillo claro, se agregó el ácido dehidroabietico (500 mg, 1.66 mmol) disuelto en 10 mL de diclorometano. La mezcla se dejó en agitación durante nueve horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo a la mezcla de reacción fue adicionada en 30 mL de diclorometano y se transfirió a un embudo de separación de 500 mL, se lavó 3 veces con solución satura de NaHCO₃ (100 mL) y brine (50 mL), la fase orgánica fue evaporada a presión reducida hasta obtener un sólido viscoso amarillo opaco. Se procedió a la siguiente etapa de reacción inmediatamente.

5.5.7.9 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-il (1*R*,4*aS*,10*aR*)-7-isopropil-1,4*a*-dimetil-1,2,3,4,4*a*,9,10,10*a*-octahidrofenantreno-1-carboxilato



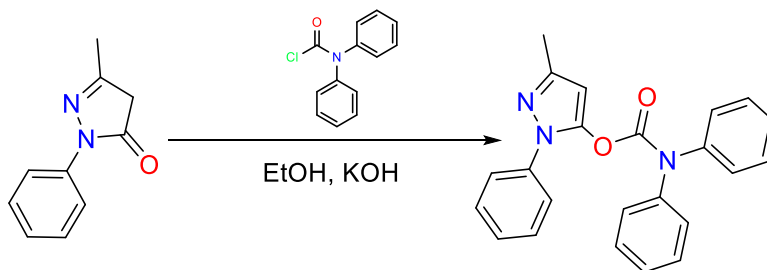
En un matríz de 250 mL provisto de un agitador magnético se disolvió el hidróxido de potasio (325 mg, 5.80 mmol) en 10 mL de isopropanol, una vez disuelto se adicionó la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona (500 mg, 2.90 mmol) disuelto en 10 mL de isopropanol. La mezcla se dejó en agitación por una hora a temperatura ambiente. Trascurrido el tiempo se adicionó el cloruro de dehidroabieto  lo disuelto en 7 mL de diclorometano gota a gota, la mezcla de reacción tornó un color naranja claro y se dejó en agitación toda la noche. La mezcla de reacción resultante fue evaporada a presión reducida hasta obtener un sólido rojo. El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica en gel sílice (9.5:0.5 *n*-hexano-acetato de etilo). Se obtuvo un rendimiento de reacción del 45%.



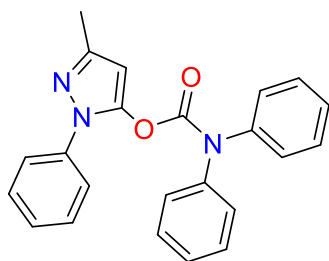
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.47-7.45(d, 2H), 7.33-7.29(td, 2H), 7.26-7.21(ddd, 1H), 7.14-7.12(d, 1H), 7.0-6.98(dd, 1H), 6.83-6.82(d, 1H), 6.03(s, 1H), 2.88-2.78(hep, 1H), 2.80-2.74(m, 1H), 2.66-2.56(ddd, 1H), 2.32(s, 3H), 2.30-2.29(d, 1H), 2.23-2.20(dd, 1H), 1.85-1.61(m, 6H), 1.49-1.42(td, 1H), 1.31(s, 3H), 1.24-1.22(d, 6H), 1.19(s, 3H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 174.13, 148.94, 146.39, 145.86, 145.00, 137.78, 134.37, 128.86, 127.41, 126.92, 123.96, 123.89, 95.46, 50.67, 48.23, 44.62, 37.88, 36.86, 36.36, 33.49, 29.54, 24.94, 24.02, 23.96, 21.70, 18.38, 16.55, 14.43 ppm.

5.5.7.10 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-difenilcarbamato



En un matríz de 250 mL provisto de un agitador magnético se disolvió el hidróxido de potasio (644.2 mg, 11.48 mmol) en 20 mL de etanol absoluto, una vez disuelto se adicionó la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona (1 g, 5.74 mmol) disuelto en 40 mL de etanol absoluto. La mezcla se dejó en agitación por una hora a temperatura ambiente. Trascurrido el tiempo se adicionó el cloruro de difenilcarbamoylo disuelto en 4 mL de diclorometano (8.61 mmol) gota a gota, se obtuvo una solución verde y se dejó en agitación 10 minutos más. La solución resultante fue trasferida a un embudo de separación de 500 mL y se lavó 3 veces con solución satura de NaHCO₃ (100 mL), brine (60 mL) y como fase orgánica diclorometano (200 mL) la fase orgánica fue evaporada a presión reducida hasta obtener un sólido verde oscuro. Se obtuvo 3.5 g de crudo de reacción, el cual se purificó en columna de gel de sílice (6:4 *n*-hexano-acetato de etilo) con lo cual se obtuvo un sólido amarillo claro de olor acre, se obtuvo 98% de producto puro.



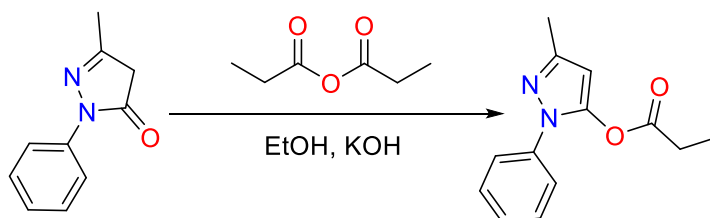
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.40-7.32(m, 5H), 7.29-7.20(m, 10H) 6.23(s, 1H), 2.34(s, 3H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 149.7, 148.8, 144.9, 141.4, 137.9, 129.3, 128.8, 127.1, 126.6, 122.8, 95.1, 14.5 ppm.

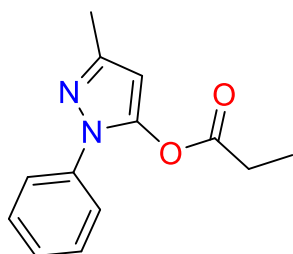
EM *m/z* (%)= 369.13 [M]⁺ (1), 196(100), 168(53), 167(27), 139(1), 115(2), 93(8), 77(53), 65(4), 51(12), 39(3).

IR (ATR diamante, cm⁻¹) 3061 (C-H aromático), 1747 (C=O), 1504 (C-C), 1303 (C-N) cm⁻¹.

5.5.7.11 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-propionato



En un matríz de 250 mL provisto de un agitador magnético se disolvió el hidróxido de potasio (676.4 mg, 12.05 mmol) en 20 mL de etanol absoluto, una vez disuelto se adicionó la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona (0.7 g, 4.01 mmol) disuelto en 40 mL de etanol absoluto. La mezcla se dejó en agitación por una hora a temperatura ambiente. Trascurrido el tiempo se adicionó el anhídrido propiónico (0.601 mL, 8.03 mmol) gota a gota, se obtuvo una solución amarillo claro y se dejó en agitación 10 minutos más. La solución resultante fue transferida a un embudo de separación de 500 mL y se lavó 3 veces con solución satura de NaHCO₃ (1000 mL), brine (40 mL) y como fase orgánica diclorometano (100 mL) la fase orgánica fue evaporada a presión reducida hasta obtener un líquido viscoso amarillo claro de olor ácido, el cual se purificó en columna de gel de sílice (6:4 *n*-hexano-acetato de etilo), con lo que se obtuvo un 99% de producto puro color amarillo brillante de olor láctico.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.54-7.52(d, 2H), 7.45-7.41(m, 2H), 7.33-7.29(m, 1H), 6.09(s, 1H), 2.52(q, 1H), 2.32(s, 3H), 1.19(t, 3H) ppm.

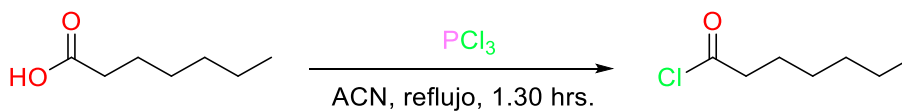
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 169.7, 148.9, 144.4, 138.0, 129.1, 129.0, 127.1, 123.1, 95.8, 27.5, 14.5, 8.8 ppm.

EM *m/z* (%)=230.12 [M]⁺ (16), 175(22), 174(100), 129(18), 105(11), 77(75), 57(99), 51(14), 39(8), 29(35).

IR (ATR diamante, cm⁻¹) 3069 (C-H aromático), 2928 (C-H alifático),

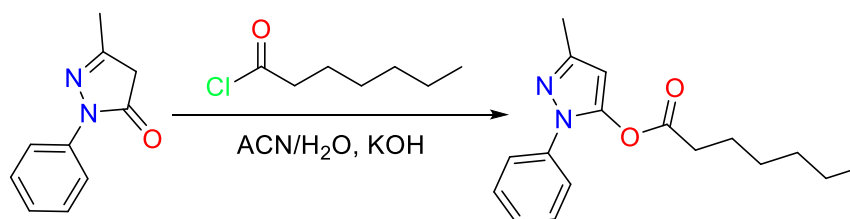
1776 (C=O), 1506 (C-C) cm⁻¹.

5.5.7.12 Síntesis de cloruro de heptanoilo

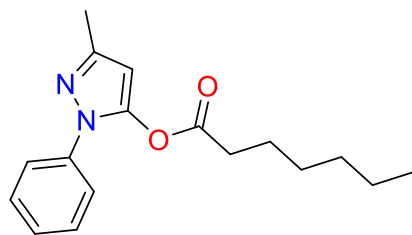


En un matríz de 50 mL provisto de un agitador magnético se adicionó 1.147 mL de ácido heptano  ico (8.03 mmol) disueltos en 20 mL de acetonitrilo, el matríz se colocó en un baño de arena provisto de un condensador para reflujo, se inició la agitación y la solución se llevó a temperatura hasta alcanzar el reflujo. Una vez alcanzado el reflujo a goteo constante se adicionó 0.350 mL de PCl_3 (4.015 mmol) gota a gota con ayuda de una cánula de acero, la reacción se dejó por 1.30 horas. El producto resultante se utilizó en la siguiente reacción sin purificación previa.

5.5.7.13 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-heptanoato



En un matríz de 250 mL provisto de un agitador magnético se agregó 50 mL de acetonitrilo como solvente, se agregó hidróxido de potasio (1,240 mg, 22.09 mmol) y agua gota a gota hasta disolución, una vez disuelto se adicionó la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona (0.7 g, 4.018 mmol). La mezcla se dejó en agitación vigorosa por una hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se adicionó el cloruro de heptano  ilo disuelto en acetonitrilo gota a gota, se obtuvo una emulsión blanca la cual se dejó en agitación 10 minutos más. La solución resultante fue trasferida a un embudo de separación de 500 mL y se lavó 3 veces con solución satura de NaHCO_3 (100 mL), brine (60 mL) y como fase orgánica diclorometano (150 mL) la fase orgánica fue evaporada a presión reducida hasta obtener un líquido viscoso amarillo claro de olor dulce. El crudo de reacción, el cual se purificó en columna de gel de sílice (7:3 *n*-hexano-acetato de etilo), se obtuvo 93% de producto puro.



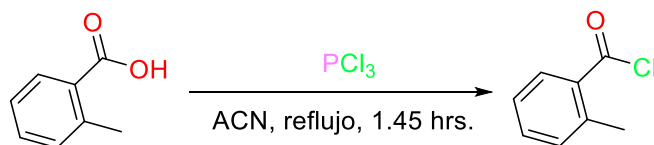
^1H NMR (^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.54–7.51 (m, 2H), 7.45–7.40 (m, 2H), 7.33–7.29 (m, 1H), 6.08 (s, 1H), 2.49 (t, 2H), 2.32 (s, 3H), 1.65 (p, 2H), 1.33–1.23 (m, 6H), 0.87 (t, 3H).ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 169.2, 149.1, 144.6, 138.3, 129.1, 127.3, 123.4, 95.9, 34.2, 31.5, 28.7, 24.7, 22.5, 14.6, 14.1. ppm.

EM m/z (%)= 286.15 $[\text{M}]^+$ (3), 174(100), 157(2), 145(3), 129(7), 113(94), 105(8), 95(11), 85(86), 77(61), 57(48), 42(77), 39(8).

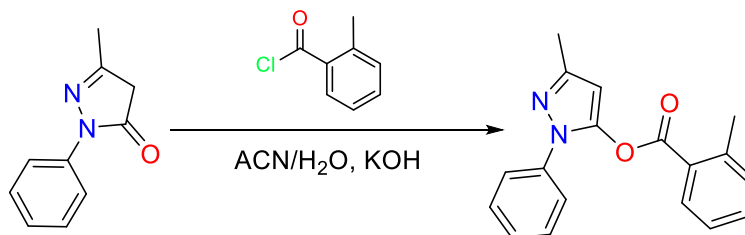
IR (ATR diamante, cm^{-1}) 3069 (C-H aromático), 2928 (C-H alifático), 1782 (C=O), 1504 (C-C) cm^{-1} .

5.5.7.14 Síntesis de cloruro de o-toluido



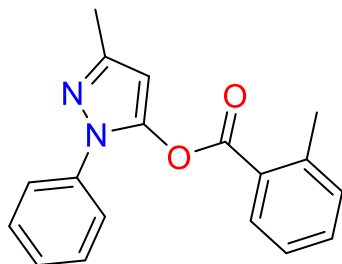
En un matr  z de 50 mL provisto de un agitador magnético se adicionó 1.0 g de ácido o-toluido (7.34 mmol) disueltos en 20 mL de acetonitrilo, el matríz se colocó en un baño de arena provisto de un condensador para reflujo, se inició la agitación y la solución se llevó a temperatura hasta alcanzar el reflujo. Una vez alcanzado el reflujo a goteo constante se adicionó 0.320 mL de PCl_3 (3.671 mmol) gota a gota con ayuda de una cánula de acero, la reacción se dejó por 1.45 horas. El producto resultante se utilizó en la siguiente reacción sin purificación previa.

5.5.7.15 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-2-metilbenzoato



En un matríz de 250 mL provisto de un agitador magnético se agregó 50 mL de acetonitrilo como solvente, se agregó hidróxido de potasio (1,240 mg, 22.09 mmol) y agua gota a gota hasta disolución, una vez disuelto se adicionó la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona (0.7 g, 4.018 mmol). La mezcla se dejó en agitación vigorosa por una hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se adicionó el cloruro de o-toluido disuelto en acetonitrilo gota a gota, se obtuvo una emulsión amarillo claro la cual se dejó en agitación 10 minutos más. La solución resultante fue transferida a un embudo de separación de 500 mL y se lavó 3 veces con solución satura de NaHCO_3 (100 mL), brine (60 mL) y como fase orgánica acetato de etilo (150 mL) la fase orgánica fue evaporada a presión reducida hasta obtener un sólido

amarillo claro. El crudo de reacción, el cual se purificó en columna de gel de sílice (8:2 *n*-hexano-acetato de etilo), se obtuvo 95% de producto puro.



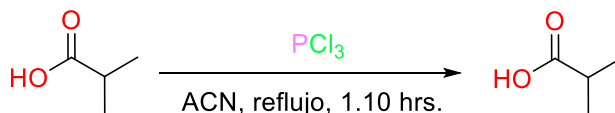
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.02(dd, 1H), 7.62(dd, 2H), 7.49(ddd, 1H), 7.46-7.41(m, 2H), 7.35-7.27(m, 3H), 6.26(s, 1H), 2.61(s, 3H), 2.40(s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 162.2, 149.0, 144.7, 142.2, 138.2, 133.4, 132.1, 131.1, 129.0, 127.2, 126.8, 126.1, 123.4, 95.9, 21.8, 14.5 ppm.

EM m/z (%) = 292.11 $[\text{M}]^+$ (1), 173(2), 120(18), 118(100), 106(2), 91(75), 77(31), 65(27), 51(9), 39(8).

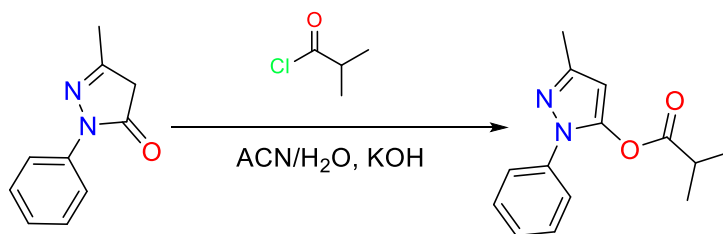
IR (ATR diamante, cm^{-1}) 3066 (C-H aromático), 2923 (C-H alifático), 1744 (C=O), 1506 (C-C) cm^{-1} .

5.5.7.16 Síntesis de cloruro de isobutirilo

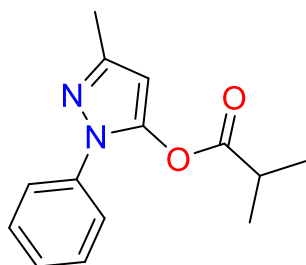


En un matríz de 50 mL provisto de un agitador magnético se adicionó 1.03 mL de ácido isobutirico (11.35 mmol) disueltos en 20 mL de acetonitrilo, el matríz se colocó en un baño de arena provisto de un condensador para reflujo, se inició la agitación y la solución se llevó a temperatura hasta alcanzar el reflujo. Una vez alcanzado el reflujo a goteo constante se adicionó 0.495 mL de PCl_3 (5.675 mmol) gota a gota con ayuda de una cánula de acero, la reacción se dejó por 1.10 horas. El producto resultante se utilizó en la siguiente reacción sin purificación previa.

5.5.7.17 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-isobutarato



En un matríz de 250 mL provisto de un agitador magnético se agregó 50 mL de acetonitrilo como solvente, se agregó hidróxido de potasio (1,240 mg, 22.09 mmol) y agua gota a gota hasta disolución, una vez disuelto se adicionó la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona (0.8 g, 4.018 mmol). La mezcla se dejó en agitación vigorosa por una hora a temperatura ambiente. Trascurrido el tiempo se adicionó el cloruro de o-toluílo disuelto en acetonitrilo gota a gota, se obtuvo una emulsión de color blanco la cual se dejó en agitación 10 minutos más. La solución resultante fue trasferida a un embudo de separación de 500 mL y se lavó 3 veces con solución satura de NaHCO_3 (100 mL), brine (60 mL) y como fase orgánica diclorometano (150 mL) la fase orgánica fue evaporada a presión reducida hasta obtener un líquido viscoso amarillo claro. El crudo de reacción, se purificó en columna de gel de sílice (1:1 *n*-hexano-acetato de etilo), se obtuvo 90% de producto puro.



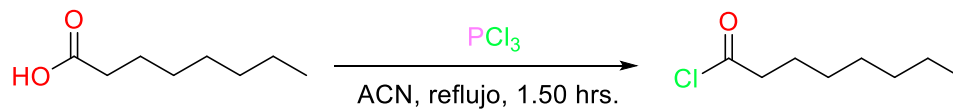
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.54–7.50(m, 2H), 7.45–7.40(m, 2H), 7.33–7.31(m, 1H), 6.08(s, 1H), 2.73(hep, 1H), 2.32(s, 3H), 1.22 (d, 6H). ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 172.4, 149.1, 144.8, 138.2, 129.1, 127.3, 123.5, 95.8, 34.2, 18.8, 14.6. ppm.

EM m/z (%)= 244.29 $[\text{M}]^+$ (1), 174(5), 145(<1), 129(2), 117(1), 105(3), 91(2), 77(38), 71(73), 51(11), 43(100), 41(9).

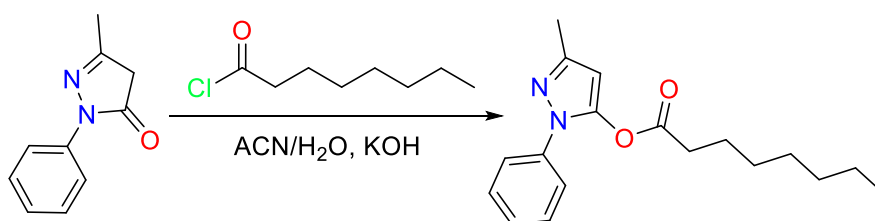
IR (ATR diamante, cm^{-1}) 3066 (C-H aromático), 2980 (C-H alifático), 1773 (C=O), 1506 (C-C) cm^{-1} .

5.5.7.18 Síntesis de cloruro de octanoilo

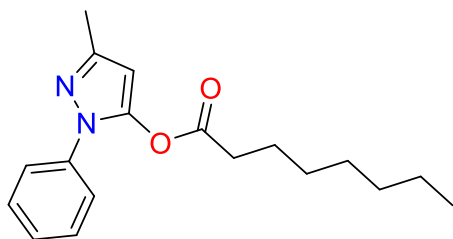


En un matríz de 50 mL provisto de un agitador magnético se adicionó 1.10 mL de ácido octano  ico (6.93 mmol) disueltos en 20 mL de acetonitrilo, el matríz se colocó en un baño de arena provisto de un condensador para reflujo, se inició la agitación y la solución se llevó a temperatura hasta alcanzar el reflujo. Una vez alcanzado el reflujo a goteo constante se adicionó 0.302 mL de PCl_3 (3.467 mmol) gota a gota con ayuda de una cánula de acero, la reacción se dejó por 1.50 horas. El producto resultante de la reacción se tornó color rosa y se utilizó en la siguiente reacción sin purificación previa.

5.5.7.19 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-octanoato



En un matríz de 250 mL provisto de un agitador magnético se agregó 50 mL de acetonitrilo como solvente, se agregó hidróxido de potasio (1,240 mg, 22.09 mmol) y agua gota a gota hasta disolución, una vez disuelto se adicionó la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona (0.7 g, 4.018 mmol). La mezcla se dejó en agitación vigorosa por una hora a temperatura ambiente. Trascurrido el tiempo se adicionó el cloruro de octanoilo disuelto en acetonitrilo gota a gota, se obtuvo una emulsión rosa claro la cual se dejó en agitación 10 minutos más. La solución resultante fue trasferida a un embudo de separación de 500 mL y se lavó 3 veces con solución satura de NaHCO_3 (100 mL), brine (60 mL) y como fase orgánica diclorometano (150 mL) la fase orgánica fue evaporada a presión reducida hasta obtener un líquido viscoso amarillo claro de olor acre. El crudo de reacción, el cual se purificó en columna de gel de sílice (8:2 *n*-hexano-acetato de etilo), se obtuvo 98% de producto puro.



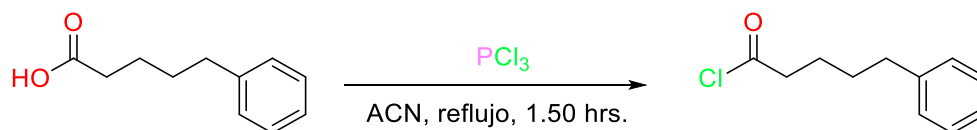
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.56-7.53 (m, 2H), 7.47-7.42 (m, 2H), 7.35-7.31 (m, 1H), 6.10 (s, 1H), 2.51 (t, 2H), 2.34 (s, 3H), 1.67 (pen, 2H), 1.33-1.27 (m, 8H), 0.90 (t, 3H). ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 169.0, 148.9, 144.5, 138.1, 129.0, 127.1, 123.2, 95.8, 34.0, 31.5, 28.8, 28.78, 24.5, 22.5, 14.5, 14.0 ppm.

EM m/z (%) = 300.18 $[\text{M}]^+$ (2), 174(100), 157(2), 145(3), 127(84), 109(17), 105(9), 91(4), 77(62), 67(16), 56(91), 43(36).

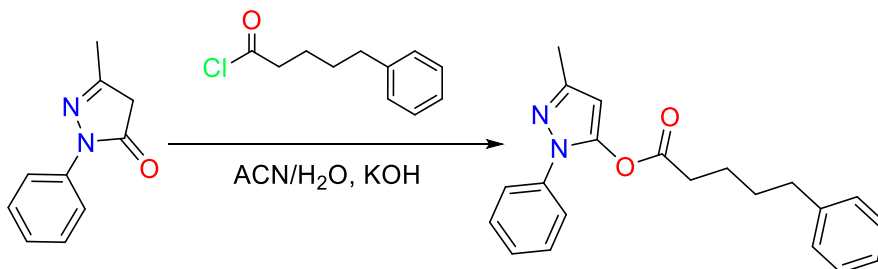
IR (ATR diamante, cm^{-1}) 3066 (C-H aromático), 2926 (C-H alifático), 1784 (C=O), 1504 (C-C) cm^{-1} .

5.5.7.20 Síntesis de cloruro de 5-fenilvalerilo



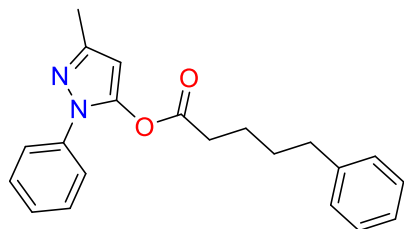
En un matríz de 50 mL provisto de un agitador magnético se adicionó 1g de ácido 5-fenilval  rico (5.61 mmol) disueltos en 15 mL de acetonitrilo, el matríz se colocó en un baño de arena provisto de un condensador para reflujo, se inició la agitación y la solución se llevó a temperatura hasta alcanzar el reflujo. Una vez alcanzado el reflujo a goteo constante se adicionó 0.244 mL de PCl_3 (2.805 mmol) gota a gota con ayuda de una cánula de acero, la reacción se dejó por 1.50 horas. El producto resultante de la reacción se utilizó en la siguiente reacción sin purificación previa.

5.5.7.21 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-5-fenilpentanoato



En un matríz de 250 mL provisto de un agitador magnético se agregó 50 mL de acetonitrilo como solvente, se agregó hidróxido de potasio (1,240 mg, 22.09 mmol) y agua gota a gota hasta disolución, una vez disuelto se adicionó la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona (0.7 g, 4.018 mmol). La mezcla se dejó en agitación vigorosa por una hora a temperatura ambiente. Trascurrido el tiempo se adicionó el cloruro de 5-fenilvalerilo disuelto en acetonitrilo gota a gota, se obtuvo una emulsión color blanco la cual se dejó en agitación 10 minutos más. La solución resultante fue trasferida a un embudo de separación de 500 mL y se lavó 3 veces con solución satura de NaHCO_3 (100 mL), brine (60 mL) y como fase orgánica diclorometano (150 mL) la fase orgánica fue evaporada a presión reducida hasta obtener

un líquido viscoso amarillo claro de olor acre. El crudo de reacción se purificó en columna de gel de sílice (1:1 *n*-hexano-acetato de etilo), se obtuvo 90% de producto puro.



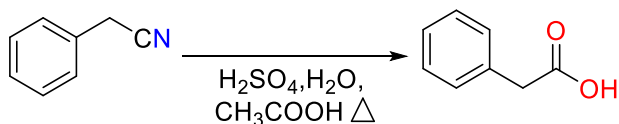
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.52–7.49 (m, 2H), 7.42–7.37 (m, 2H), 7.31–7.26 (m, 3H), 7.21–7.16 (m, 1H), 7.13 (dd, 2H), 6.07 (s, 1H), 2.60 (t, 2H), 2.52 (t, 2H), 2.32 (s, 3H), 1.74–1.59 (m, 4H) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 169.0, 149.1, 144.6, 141.8, 129.2, 128.5, 128.5, 127.3, 126.1, 123.4, 95.9, 35.6, 34.1, 30.7, 24.3, 14.6 ppm.

EM m/z (%) = 334.15 $[\text{M}]^+$ (<1), 175(9), 174(56), 143(3), 133(3), 117(76), 104(5), 91(100), 77(40), 65(8), 51(5), 39(4).

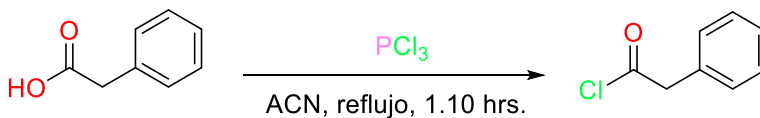
IR (ATR diamante, cm^{-1}) 3023 (C-H aromático), 2928 (C-H alifático), 1779 (C=O), 1504 (C-C) cm^{-1} .

5.5.7.22 Síntesis de ácido fenilacético a partir de bencilcianuro



En un matríz de 500 mL provisto de un agitador magnético y un condensador para reflujo se colocó 50 mL de agua destilada y se agregó lentamente 25 mL de ácido sulfúrico concentrado procurando que no se sobrecaliente la solución, una vez adicionado el ácido se procedió a la adición lenta de 25 mL de ácido acético glacial, la mezcla se mantuvo en agitación moderada. Una vez adicionado el ácido acético glacial se adicionó 24 mL de bencilcianuro (0.204 moles). La mezcla de reacción fue puesta en un baño de arena y se llevó a reflujo durante toda la noche. Al siguiente día, se observó la formación de una solución clara de aspecto oleoso, se detuvo el reflujo y se enfrió hasta la formación de un precipitado blanco con olor a miel. El precipitado obtenido se separ   de la fase acuosa por medio de filtración con el uso de un embudo Büchner provisto con papel filtro y equipado a un matríz kitasato conectado a una bomba de vació. El producto filtrado se lavó con 150 mL de agua fría (x3 veces). Se obtuvo un producto sólido blanco con un 98% de rendimiento.

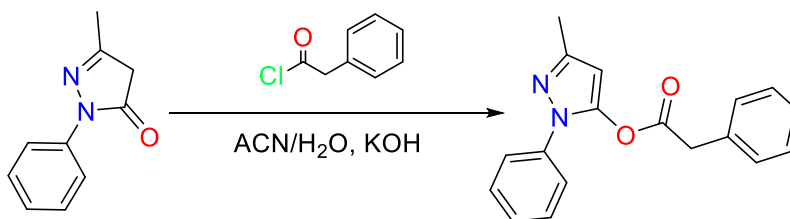
5.5.7.23 Síntesis de cloruro de fenilacetilo



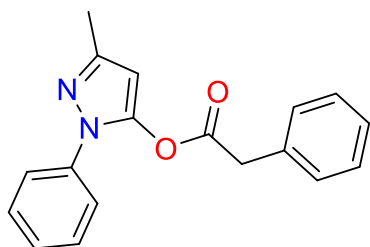
En un matríz de 50 mL provisto de un agitador magnético se adicionó 2 g de ácido fenilacético (14.69 mmol) disueltos en 15 mL de acetonitrilo, el matríz se colocó en un baño de arena provisto de un condensador para reflujo, se inició la agitación y la solución se llevó a temperatura hasta alcanzar el reflujo. Una vez alcanzado el reflujo a goteo constante se adicionó 0.640 mL de PCl₃ (7.34 mmol) gota a gota con ayuda de una cánula de acero, la

reacción se dejó por 1.10 horas. El producto resultante de la reacción se utilizó en la siguiente reacción sin purificación previa.

5.5.7.24 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-fenilacetato



En un matríz de 250 mL provisto de un agitador magnético se agregó 50 mL de acetonitrilo como solvente, se agregó hidróxido de potasio (1,240 mg, 22.09 mmol) y agua gota a gota hasta disolución, una vez disuelto se adicionó la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona (0.7 g, 4.018 mmol). La mezcla se dejó en agitación vigorosa por una hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se adicionó el cloruro de fenilacetilo disuelto en acetonitrilo gota a gota, se obtuvo una emulsión color blanco la cual se dejó en agitación 10 minutos más. La solución resultante fue trasferida a un embudo de separación de 500 mL y se lavó 3 veces con solución satura de NaHCO₃ (100 mL), brine (60 mL) y como fase orgánica diclorometano (150 mL) la fase orgánica fue evaporada a presión reducida hasta obtener un líquido viscoso amarillo claro de olor acre. El crudo de reacción, se purificó por medio de columna de gel de sílice (7:3 *n*-hexano-acetato de etilo), con lo que se obtuvo un 65% de producto puro.

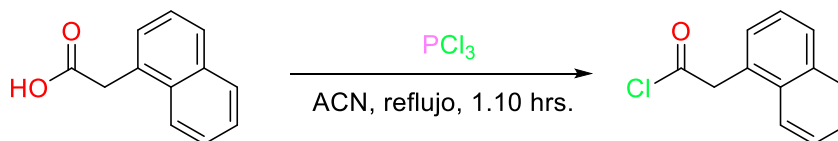


^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ : 7.84-7.78 (m, 2H), 7.58-7.45 (m, 2H), 7.43-7.29 (m, 5H), 7.27-7.18 (m, 1H), 6.10 (s, 1H), 3.74 (s, 2H), 2.25 (s, 3H)

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ : 171.0, 149.10, 144.37, 138.77, 135.50, 129.85, 128.71, 128.41, 127.06, 123.22, 97.02, 41.17, 14.05.

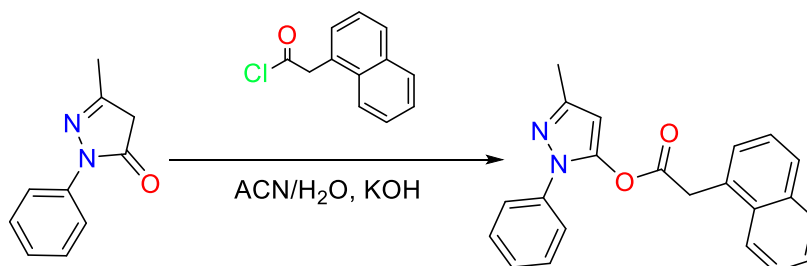
EM m/z (%) = 292.29 $[\text{M}]^+$ (7), 201(63), 173(3), 160(1), 130(8), 115(5), 104(10), 91(70), 77(83), 65(100), 51(33), 39(29).

5.5.7.25 Síntesis cloruro de 1-naftalenacetilo



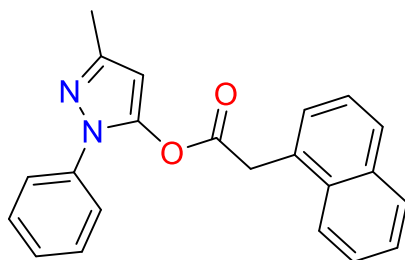
En un matríz de 50 mL provisto de un agitador magnético se adicionó 2 g de ácido 1-naftalenacético (10.74 mmol) disueltos en 15 mL de acetonitrilo, el matríz se colocó en un baño de arena provisto de un condensador para reflujo, se inició la agitación y la solución se llevó a temperatura hasta alcanzar el reflujo. Una vez alcanzado el reflujo a goteo constante se adicionó 0.468 mL de PCl_3 (5.371 mmol) gota a gota con ayuda de una cánula de acero, la reacción se dejó por 1.10 horas. El producto resultante de la reacción se utilizó en la siguiente reacción sin purificación previa.

5.5.7.26 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il- 2- (1-naftalenil) acetato



En un matríz de 250 mL provisto de un agitador magnético se agregó 50 mL de acetonitrilo como solvente, se agregó hidróxido de potasio (1,240 mg, 22.09 mmol) y agua gota a gota hasta disolución, una vez disuelto se adicionó la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona (0.7 g, 4.018 mmol). La mezcla se dejó en agitación vigorosa por una hora a temperatura ambiente. Trascurrido el tiempo se adicionó el cloruro de cloruro de 1-naftalenacetilo disuelto en acetonitrilo gota a gota, se obtuvo una emulsión color blanco la cual se dejó en agitación 10 minutos más. La solución resultante fue trasferida a un embudo de separación de 500 mL y se lavó 3 veces con solución satura de NaHCO_3 (100 mL), brine (60 mL) y como fase

orgánica diclorometano (150 mL) la fase orgánica fue evaporada a presión reducida hasta obtener un líquido viscoso amarillo claro de olor acre. El crudo de reacción, el cual se purificó en columna de gel de sílice (7:3 *n*-hexano-acetato de etilo), con lo que se obtuvo 70% de producto puro.



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.93-7.89(m, 2H), 7.87(d, 1H), 7.55-7.48(m, 2H), 7.46-7.40(m, 2H), 7.26-7.24(m, 2H), 7.22-7.18(m, 3H), 6.16(s, 1H), 4.26(s, 2H), 2.33(s, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 166.5, 148.8, 144.3, 137.77, 133.9, 131.9, 128.9, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 126.8, 126.1, 125.5, 123.3, 122.8, 95.7, 39.0, 14.5.

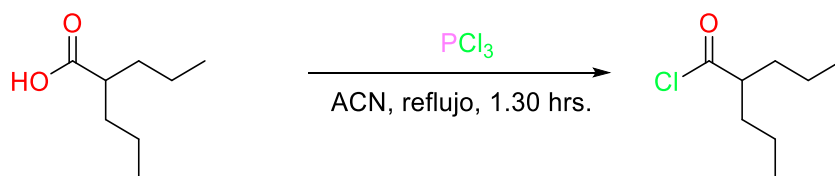
EM m/z (%) = 342.28 $[\text{M}]^+$ (2), 174(3), 168(28), 141(100), 115(23), 105(2), 91(2), 77(46), 63(5), 51(13), 40(7).

IR (ATR diamante, cm^{-1}) 3031 (C-H aromático), 2920 (C-H alifático), 1714 (C=O) cm^{-1} .

5.5.7.27 Obtención de ácido valproíco a partir de valproato de sodio

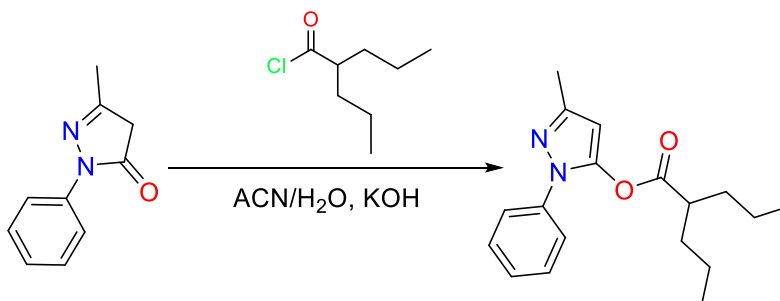
En un matríz de Erlenmeyer equipado con un agitador magnético se disolvió en 100 mL de agua destilada 10 g de valproato de sodio (0.060 moles). Una vez disuelto se agregó gota a gota ácido clorhídrico a la solución de valproato de sodio hasta alcanzar un pH de 4.0, una vez alcanzado el pH se mantuvo la agitación por 15 minutos más. La solución restante se transfirió a un embudo de separación, el producto se extrajo con diclorometano (x3 lavados de 100 mL). La fase orgánica resultante se evaporó a presión reducida hasta sequedad. Se obtuvo un 93% de ácido valpro  ico.

5.5.7.28 Síntesis de cloruro de valproilo

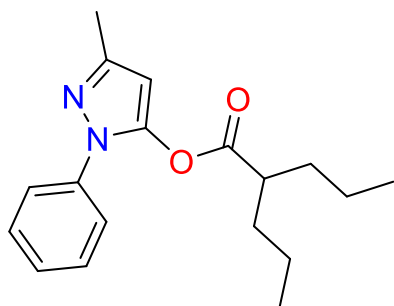


En un matríz de 50 mL provisto de un agitador magnético se adicionó 1.82 mL de ácido valpro  ico (13.87 mmol) disueltos en 20 mL de acetonitrilo, el matríz se colocó en un baño de arena provisto de un condensador para reflujo, se inició la agitación y la solución se llevó a temperatura hasta alcanzar el reflujo. Una vez alcanzado el reflujo a goteo constante se adicionó 0.605 mL de PCl_3 (6.934 mmol) gota a gota con ayuda de una cánula de acero, la reacción se dejó por 1.30 horas. El producto resultante se utilizó en la siguiente reacción sin purificación previa.

5.5.7.29 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-2-propilpentanoato



En un matríz de 250 mL provisto de un agitador magnético se agregó 50 mL de acetonitrilo como solvente, se agregó hidróxido de potasio (1,240 mg, 22.09 mmol) y agua gota a gota hasta disolución, una vez disuelto se adicionó la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona (1 g, 5.740 mmol). La mezcla se dejó en agitación vigorosa por una hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se adicionó el cloruro de valproilo disuelto en acetonitrilo gota a gota, se obtuvo una emulsión de color blanco la cual se dejó en agitación 10 minutos más. La solución resultante fue trasferida a un embudo de separación de 500 mL y se lavó 3 veces con solución satura de NaHCO₃ (100 mL), brine (60 mL) y como fase orgánica diclorometano (150 mL) la fase orgánica fue evaporada a presión reducida hasta obtener un líquido viscoso amarillo claro. El crudo de reacción, se purificó en columna de gel de sílice (7:3 *n*-hexano-acetato de etilo), con lo que se obtuvo 92% de producto puro.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.55-7.53(m, 2H), 7.46-7.42(m, 2H), 7.35-7.31(m, 1), 6.08(s, 1H), 2.56(tt, 1H), 2.34(s, 3H), 1.70-1.60(m, 2H), 1.53-1.46(m, 2H), 1.27(hex, 4H), 0.88(t, 6H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 171.7, 148.9, 144.6, 138.01, 128.9, 127.2, 123.7, 95.6, 45.3, 34.2, 20.5, 14.4, 13.9 ppm.

EM *m/z* (%) = 300.37 [M]⁺ (<1), 174(1), 127(5), 105(<1), 99(10), 77(13), 57(100), 43(8).

IR (ATR diamante, cm⁻¹) 3050 (C-H aromático), 2926 (C-H alifático), 1768 (C=O), 1506 (C-C) cm⁻¹.

CULTIVO CELULAR

5.5.8 Cultivo celular

Los estudios de citotoxicidad y viabilidad celular fueron desarrollados en una línea celular de fibroblasto de ratón C2C12 (ATCC® CRL-1772™), la cual tiene un modo de crecimiento adherente y forma monocapa. Se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal de bovino, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), glutamina (100 U/mL) y se incubó a 37°C con un atmósfera húmeda de CO₂ al 5%. A continuación se describen los pasos realizados para el mantenimiento de la línea celular.

5.5.8.1 Descongelación

La línea celular se extrajo de un congelador a -80C, fue descongelada en un baño maría a 37 C, una vez en estado líquido la suspensión celular se extrajo y fue transferida a un T25, inmediatamente se agregó 5 ml de medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 5%, se resuspendió y se mezcló lentamente por tres tiempos. Una vez homogenizado se dejó en incubación a 37°C por 90 minutos. Trascurrido el tiempo, se aspiró el líquido sobrenadante el cual contiene restos de células no adheridas y DMSO, se adicionó 5 ml de medio DEMEM suplementado con suero fetal bovino al 5% y posteriormente estas fueron incubadas a 37°C con una atmosfera humedad de CO₂ al 5%. El medio de cultivo fue cambiado 48 horas después.

5.5.8.2 Amplificación

Cada vez que las células alcanzaban su máximo de confluencia, fue necesario disminuir y distribuir la población de células hacia otros frascos con el fin de mantener en óptimas condiciones su crecimiento y viabilidad. Para fines de este estudio, una vez alcanzado el 80% de confluencia en un frasco T25 se procedió a su amplificación. Se inició con la extracción de todo el medio de cultivo con una pipeta serológica de 5 ml, se agregó 1.5 ml de medio DMEM sin suero con el fin de eliminar remanentes del medio anterior, se realizaron movimientos oscilatorios suaves sobre la caja para su lavado, inmediatamente

se aspira el medio DMEM sin suero y se agrega 1 ml de tripsina para eliminar remanentes de medio DMEM sin suero, se realizaron movimientos oscilatorios suaves, se aspira la tripsina e inmediatamente se agregó 1.5 ml de tripsina nueva, se realizaron movimientos oscilatorios suaves y se deja el frasco T25 a incubación a 37°C por 10 minutos para permitir la acción enzimática de la tripsina, la cual permite pasar a las células en monocapa a células en suspensión. Transcurrido el tiempo se observaron las células bajo el microscopio con lo que se apreció la total suspensión de las células, en seguida se realizaron los pases. Al frasco T25 con células en suspensión se agregó 3.5 ml de medio DMEM sin suero, se resuspendió y mezcló lentamente tres veces, se aspiró el total de la suspensión. A cada frasco T25 se agregó 0.5 ml de suspensión celular, el remanente fue descartado, inmediatamente se agregó 4.5 ml de medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 5%, se resuspendió y mezcló por tres tiempos. Los frascos T25 fueron incubados a 37°C con una atmosfera húmeda de CO₂ al 5%. El medio de cultivo fue cambiado cada tercer día.

5.5.8.3 Congelación

Para la congelación y preservación de células se realizó la metodología anterior hasta el paso de suspensión celular. Una vez obtenidas las células en total flotabilidad el contenido de los frascos se resuspendió en medio DMEM sin suero, se aspiró y transfirió la suspensión a un tubo de polipropileno Falcon, se centrifugó a 1200 RPM x 10 min. Durante el tiempo de espera se preparó los tubos de criopreservación, los cuales fueron llenados con 0.5 ml de solución de suero fetal bovino con DMSO al 20%. Trascurrido el tiempo se descartó el sobrenadante y solo se conservó el pellet celular el cual se resuspendió y mezcló con 1.8 ml de suero fetal bovino, se agregó 0.5 ml de la suspensión a cada tubo de criopreservación, fueron cerrados a presión, se homogenizó e inmediatamente fueron guardadas en un congelador a -80°C para su disposición final.

ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

5.5.9 Ensayo de viabilidad celular por medio del ensayo MTT

El MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) es un compuesto tipo tetrazol utilizado comúnmente para medir el número de células metabólicamente activas en ensayos *in vitro*. Se basa en la conversión de MTT amarillo soluble en agua en el producto final púrpura, insoluble en agua, formazano ((*E,Z*)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-1,3-difenil formazano), por la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial Figura 35. Mecanismo de conversión de MTT a formazano por medio del metabolismo celular. Esta técnica fue propuesta por Mossman en 1983, la cual su fundamento está basado en cantidad de formazano formado es proporcional al número de células metabólicamente activas.^{83,84,85}

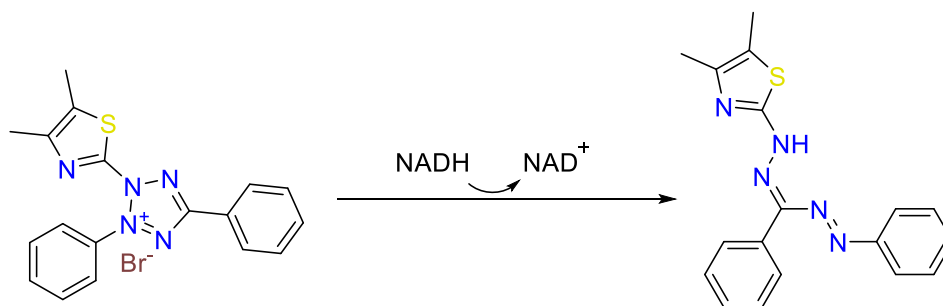


Figura 35. Mecanismo de conversión de MTT a formazano por medio del metabolismo celular.

5.5.9.1 Siembra en placa de 96 pocillos

48 horas previas a comenzar el ensayo MTT se procuró que la línea celular C2C12 estuviera en óptimas condiciones de crecimiento y no presentaras señales de estrés por falta de nutrientes disponibles.

Se realizó el procedimiento cotidiano de amplificación de líneas celulares, una vez obtenido la confluencia de 65 a 75% se procedió a tratar las células con 1.5 mL de tripsina durante 10 minutos a 37°C, Trascurrido el tiempo la suspensión celular con tripsina fue adicionado 2 mL de medio DMEM sin suero y 2 mL de medio DMEM suplementado con suero al 10%. Este procedimiento fue realizado con tres frascos para cultivo celular T25 con lo que se obtuvo aproximadamente 16 ml de suspensión celular.

En una placa estéril de 96 pocillos de fondo plano marca Thermo Scientific®, se colocó 50µL de suspensión celular por pocillo, se dejó reposar de 12 a 24 horas previo al ensayo de citotoxicidad.

5.5.9.2 Preparación de las muestras a evaluar

Se evaluó la viabilidad y la actividad citotóxica del precursor y las 16 moléculas sintéticas: 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona (Eda), 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-benzoato (Eda-benz), 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-cinamoato (Eda-cinn), 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-4-metilbenzoato (Eda-ptol), 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-acetato (Eda-acet), 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-pentanoato (Eda-val), 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il (1R,4aS,10aR)-7-isopropil-1,4a-dimetil-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidrofenantreno-1-carboxilato (Eda-DHA), Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-difenilcarbamoato (Eda-2phcarb), 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-propionato (Eda-prop), 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-heptanoato (Eda-hepta), 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-2-metilbenzoato (Eda-otolu), 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-isobutarato (Eda-isobu), 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-octanoato (Eda-octa), 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-5-fenilpentanoato (Eda-fenival), Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-fenilacetato (Eda-phacet), 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-2- (1-naftalenil) acetato (Eda-naf) y 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-2-propilpentanoato (Eda-valp).

Previo a la evaluación por medio del ensayo MTT, se pesó individualmente 10 mg de los productos sintéticos en tubos para microcentrifuga marca Eppendorf®, fueron disueltos en 100 µL de EtOH, lo cual es descrito por Young y colaboradores ⁸⁴ como un solvente compatible con ensayos de citotoxicidad celular, una vez obtenidas las muestras solubilizadas se procedió a realizar las diluciones seriadas. Dentro de una campana estéril de flujo laminar al tubo que contiene la muestra solubilizada se le colocó 900 µL de medio DMEM, se homogenizó con el uso de un vortex con lo cual se obtuvo una solución de 1 mg/mL; seguido de esto, por muestra a evaluar se colocó en siete tubos estériles los cuales fueron llenados con 450 µL de medio DMEM, al primer tubo se agregó 50 µL de la solución 1mg/mL, se agitó y homogenizó con ayuda de un vortex, con lo que se obtuvo la segunda dilución, seguido a esto, del segundo tubo se tomó 50µL de la solución y esta fue disuelta para obtener la tercer dilución, se continuó así con las siguientes soluciones, con lo cual se

obtuvo 8 soluciones a diferente concentración que va de 1mg/mL a 1×10^{-7} mg/mL. Una vez obtenidas todas las soluciones se procedió a la evaluación de la citotoxicidad de las moléculas sintéticas.

5.5.9.3 Evaluación de viabilidad celular.

Transcurrido las 24 horas de la siembra en las placas de 96 pocillos se procedió a evaluar por triplicado la toxicidad de las moléculas sintéticas. Previo a la adición de la solución a evaluar se decantó el medio de cada placa, seguido de cada pocillo de manera seriada se agregó 100µL de cada solución a evaluar, con lo que se obtuvo una concentración de 100µL por pocillo, se dejó como control negativo y positivo los carriles 1 y 2 respectivamente. Seguido a esto se dejó, incubar por 24 horas más.

5.5.10 Ensayo MTT

Previo a la evaluación por medio del ensayo MTT se retiró por decantación el medio de cada pocillo el cual fue reemplazado por 50µL de medio DMEM, seguido a esto, se agregó 10µL por pocillo de la solución de MTT, se agitó un poco para homogenizar, una vez concluido se procedió a incubar por cuatro horas a 37°C.

Finalizado el tiempo de incubación se agregó 100µL de DMSO directamente en el medio en cada pocillo, se pipeteo suavemente para la total disolución del formazano. El volumen final en el pocillo fue de 160µL.

Ya disuelto el formazano se procedió a leer la absorbancia en un espectrofotómetro para microplacas Multiskan® FC marca Termo Fisher Scientific®, la lectura se realizó a 570 nm con un filtro de 620 nm con lo cual se obtuvieron los valores de la absorbancia del ensayo. Todos los ensayos realizados fueron por triplicado.

El porcentaje de viabilidad celular se pudo obtener con el uso de la expresión descrita como Ecuación 4.

Ecuación 4: Porcentaje de viabilidad celular.

$$\% \text{de viabilidad celular} = (\text{abs}_{\text{tratados}} / \text{abs}_{\text{control}}) \times 100$$

Mientras que el porcentaje de citotoxicidad se calculó con el uso de la expresión etiquetada como Ecuación 5.

Ecuación 5: Porcentaje de citotoxicidad celular.

$$\% \text{de citotoxicidad celular} = (100(\text{abs}_{\text{control}} / \text{abs}_{\text{tratados}}) / \text{abs}_{\text{control}})$$

ENSAYO DE INHIBICIÓN DE ACETILCOLINESTERASA

5.5.11 Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa

La actividad de acetilcolinesterasa se determinó bajo la metodología reportada por Adewusi y colaboradores⁷⁴. En una placa de 96 pocillos se colocaron: 75 µL de amortiguador Trizma-HCl (50 mM, pH 8), se adicionaron a un pozo 75 µL de compuesto y se realizaron diluciones seriadas (concentraciones finales en el pozo entre 150 y 2.4 µg/mL en amortiguador y Dimetil sulfóxido (DMSO) a concentración final máxima de 0.15%). Posteriormente se adicionaron a cada pocillo 25 µL de una solución de Yoduro de Acetilcolina (ATCI) 15 mM en amortiguador (concentración final de 1.5 mM) y 125 µL de ácido 5,5'-Ditiobis-[2-nitrobenzoico] (DTNB) 3mM en amortiguador (concentración final de 1.5 mM). La absorbancia se midió en un lector de placas (Multiskan FC, Thermo Scientific) a 405 nm cada 45 seg. Durante tres ocasiones consecutivas. Posteriormente se adicionó a cada pozo 25 µL de una solución de enzima acetilcolinesterasa a 2 U/mL (Tipo VI-S obtenida de *Electrophorus electricus* L) en amortiguador adicionado con albúmina sérica bovina 0.1 mg/mL (concentración final de la enzima en el pozo 0.2 U/mL) y se midió la absorbancia en cinco ocasiones consecutivas cada 45 seg. Seis pocillos de cada placa fueron usados sin ningún compuesto prueba y sirvieron como control del 100% de actividad enzimática. La Galantamina se utilizó como control positivo. El incremento de absorbancia debido a hidrólisis espontanea del sustrato se corrigió restando la absorbancia antes de añadir la enzima de la absorbancia obtenida después de añadir la enzima. El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente expresión descrita como Ecuación 6.

Ecuación 6: Porcentaje de inhibición de acetilcolinesterasa

$$\% inh = 100 - (A_{Mta}/A_{ctrl})(100)$$

Donde A_{Mta} corresponde a la diferencia de absorbancia entre el tiempo 0 y el tiempo 225 seg, en presencia de cualquier compuesto prueba o inhibidor; y A_{ctrl} corresponde a la diferencia de absorbancia entre el tiempo 0 y el tiempo 225 seg, del control del 100% de actividad enzimática. La concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) se calculó por interpolación en la gráfica de los porcentajes de inhibición en función de las concentraciones utilizadas. Todos los experimentos se realizaron por triplicado

ANÁLISIS *IN SILICO*

5.5.12 Análisis *in silico*

Los modelos moleculares de los ligandos sintetizados se generaron con UCSF Chimera 1.11.2⁸⁶ a través de su cadena SMILES. Las estructuras se redujeron al mínimo en energía con el uso de los parámetros predeterminados del software, que incluyen los parámetros de libre rotación de todos los enlaces de los ligando con libertad conformacional, minimización de energía, AMBER ff14SB Antechamber y adición de cargas Gasteiger⁸⁶. En el software AutoDock Tools 1.5.6 se empleó para definir los enlaces rotantes y las cargas atómicas para cada ligando.

Las estructuras cristalográficas de los receptores AChE (PDB ID: 1EVE) torpedo del pacífico (*T. californica*) y β -amiloide (PDB ID: 1QWP y 1IYT) se descargaron del Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). Cada receptor se preparó con AutoDock Tools, con la eliminación del ligando cocrystalizado y las moléculas de agua, con adición de hidrógeno y cálculo de las cargas de Gasteiger. Para el análisis de acoplamiento molecular se utilizó AutoDock Vina⁸⁷, con el uso de una rejilla de 28 x 28 x 28 Å con coordenadas centrales para 1EVE: x = 3.11011, y = 66.7013, z = 63.9449; en el caso de 1QWP: x = 1.13752, y = 0.364232, z = -1.5735. Finalmente para 1IYT debido al tamaño de la diana se generó tres rejillas con sus respectivas coordenadas: rejilla 1: 28.8247 x 24.3406 x 21.2494; x = -4.2695, y = 1.53776, z = 12.2494. Rejilla 2: 28 x 28 x 28; x = 2.202 y = -2.65121 z = -0.001821. Rejilla 3: 24.8993 x 25.5279 x 30.0; x = 3.31704 y = 0.944141 z = -11.0283. Los resultados obtenidos fueron con una exhaustividad de 8 y una generación de 10 conformaciones acopladas para cada ligando analizado. Como control positivo se compararon los datos del acoplamiento molecular de en el caso de acetilcolinesterasa fue galantamina y para el caso de β -amiloide fue el precursor Edaravona. Como parámetro de validación del modelo se calculó la desviación de la raíz media cuadrática de las posiciones atómicas (*RMSD* por sus siglas en inglés) del ligando cocrystalizado frente a uno igual generado con el software Chimera, el valor obtenido fue menor a un angstrom.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI Resultados y Discusión del estudio fitoquímico

6.1 Resultados de la maceración etanólica en frío.

El peso final del material vegetal colectado fue de 2.4 kilogramos, en la Tabla 4 se especifica los tiempos y pesos obtenidos de las maceraciones.

Tabla 4. Parámetros y pesos obtenidos durante la etapa de maceración.

	Primer maceración	Segunda maceración	Peso final
EtOH utilizado	13 litros	13 litros	
Días en maceración	10	15	
Peso recuperado de crudo	168 g	50.1 g	218.1 g
Tiempo de rotaevaporación	15 días	10 días	

6.2 Resultados de la partición Kupchan modificada.

Una vez obtenido el extracto crudo se procedió a realizar el método de fraccionamiento diferencial o partición Kupchan modificado, el tiempo en el cual fue realizado esta metodología fue de dos días y 12 días más para tener las particiones a sequedad total. Los resultados de la partición Kupchan son mostrados en la Tabla 5.

Debido a la presencia de sales en las particiones de mayor polaridad, el tiempo estimado para la eliminación de estas mismas fue de 2 días para cada partición, el método utilizado para la separación fue mencionado en la sección de metodología. En las Tabla 6 se muestran características como el aspecto físico, coloración y otras características observadas en el crudo y las particiones.

Tabla 5. Resultados de la partición Kupchan.

Extracto	Masa (g)	Fase orgánica (%)
<i>n</i> -hexano	8.30	9.40
*DCM	3.60	4.08
* <i>n</i> -BuOH	11.52	13.05
Acuoso	64.81	73.45
Total extracto	88.23	

*Siglas: DCM diclorometano; *n*-BuOH butanol

Tabla 6. Aspecto físico del crudo y particiones.

Partición	Consistencia
Crudo	Sólido amorfo oscuro
<i>N</i> -hexano	goma verde oscuro
*DCM	Polvo rojizo en escamas
* <i>n</i> -BuOH	Goma parda
Acuosa	Sólido cristalino pardo

*Siglas: DCM diclorometano; *n*-BuOH butanol

6.3 Resultados del tamizaje fitoquímico

A continuación se muestran los resultados del tamizaje fitoquímico realizado al extracto y particiones de *A. maritima*. En la Tabla 7 se describe los resultados del tamizaje fitoquímico realizado al extracto crudo y particiones de *A. maritima*. Del extracto y particiones, quien presentó un mayor número de resultados positivos fue la partición de diclorometano (p-DCM) con once de las 14 pruebas realizadas, de las cuales solo mostraron un resultado negativo en la presencia de auronas y/o chalconas, flavononas y saponinas; seguido del extracto crudo (e-crudo) con nueve resultados positivos, donde solo la prueba de taninos, auronas y/o chalconas, flavonoles y saponinas fueron negativas. Las particiones de *n*-hexano (p-HEX) y butanol (p-BuOH) mostraron ocho resultados positivos, que para p-HEX fueron alcaloides, esteroides y triterpenoides, flavonas, carbohidratos, glucósidos antraquinónicos y cumarinas; mientras que p-BuOH presentó resultados positivos para alcaloides, taninos con FeCl₃, flavononas, carbohidratos, glucósidos antraquinónicos y cumarinas. Finalmente, la partición con cinco positivos fue p-H₂O, los cuales fueron alcaloides, flavononas y glucósidos antraquinónicos.

Hasta la actualidad, los constituyentes fitoquímicos de *A. maritima* no han sido descritos, y los únicos trabajos referente a otras especies del mismo género solo se limitan a el aislamiento de unas cuantas estructuras de tipo isoflavona. Mientras que, a nivel de familia taxonómica, se han identificado en especies como *B. diffusa*, *M. jalapa* y *B. spectabilis* la presencia de alcaloides, saponinas, compuestos fenólicos, glucósidos, taninos, terpenos, flavonoides y derivados de ellos.^{88,15,20} Por citar alguno de ellos, se encontraron metabolitos pertenecientes a los terpenoides, como el ácido ursólico, aislado en *B. diffusa*,⁸⁹ y el Ácido oleanólico aislado en *M. jalapa*.⁹⁰ De igual manera en *M. jalapa* se han aislado compuestos de tipo esteroide como el β -sitosterol, o el estigmasterol.⁹⁰ Dentro de los metabolitos más estudiados y aislados presentes en esta familia taxonómica se encuentran los flavonoides y derivados de ellos, como los rotenoides, isoflavonas y Peltoginoides, de los cuales últimos dos, solo no se encontraban descritos para la familia nyctaginaceae.

Como fue mencionado anteriormente, los estudios sobre el género *Abronia* son muy escasos, las publicaciones relacionadas a este grupo taxonómico se limitan en el aislamiento de flavonoides y rotenoides, estas especies de las cual se ha aislado son *A. latifolia*⁹¹ *A. villosa*²¹ y *A. nana*,²² lo que abre una nueva oportunidad para el aislamiento de los diferentes metabolitos secundarios así como la determinación de su actividad biológica y posterior aplicación dentro del campo de la química medicinal.

Tabla 7. Resultados del tamizaje fitoquímico realizado a *Abronia maritima*.

Metabolitos secundarios a detectar	Metodología(s)	e-crudo	p-HEX	p-DCM	p-BuOH	p-H ₂ O	
Alcaloides	Mayer	+	+	+	+	+	
	Wagner	+	+	+	+	+	
	Dragendorff	+	+	+	+	+	
Taninos	FeCl ₃	-	+	+	+	-	
	Gelatina	-	+	+	-	-	
Esteroides y triterpenoides	Lieberman - Burchard	+	+	+	-	-	
Flavonoides	Shinoda	auronas y/o chalconas	-	-	-	-	
		flavonas	+	+	+	-	-
		flavonoles	-	-	+	-	-
		flavononas	+	-	-	+	+
carbohidratos	Benedict	+	-	+	+	-	
Saponinas	formación de espuma	-	-	-	-	-	
Glucósidos antraquinónicos	Borntrager	+	+	+	+	+	
Cumarinas	Erlich	+	-	+	+	-	

Siglas: e-crudo: extracto crudo; p-HEX: partición de *n*-hexano; p-DCM: partición de diclorometano; p-BuOH: partición butanólica; p-H₂O: partición acuosa.

6.4 Resultados de los ensayos antioxidantes del extracto etanólico y particiones de *Abronia maritima*

El incremento de la contaminación ambiental propiciado por las actividades antropológicas ha desencadenado la emisión de sustancias que de manera indirecta o directa afectan en el equilibrio en la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y NOS), los cuales desatan un trastorno conocido como estrés oxidativo. Esta alteración desempeña un papel significativo en el desarrollo de diversas enfermedades crónico-degenerativas, tales como diabetes, cardiopatías, enfermedades neurodegenerativas, cáncer, etc. Como medida para contrarrestar este exceso de especies reactivas, el metabolismo utiliza diversas estrategias las cuales involucran moléculas conocidas como antioxidantes, estos pueden ser obtenidos de manera endógena o por medio de la dieta.

Fuentes importantes de antioxidantes son originados por las plantas, esto es debido a que por sus hábitos deben generar diferentes estrategias para lidiar con el estrés inducido por el ambiente. Con base en esto, se realizó la evaluación antioxidante del extracto etanólico y particiones obtenidos a partir de la parte aérea de *Abronia maritima*, con el uso de tres técnicas, reducción del radical libre DPPH, reducción del catión radical ABTS y la decoloración oxidativa de β -caroteno, los resultados de los experimentos son mostrados en la Tabla 8.

Tabla 8. Actividad antioxidante del extracto etanólico y particiones de *Abronia maritima*.

Extracto y particiones	DPPH CE ₅₀ (mg/mL)	ABTS CE ₅₀ (mg/mL)	β -Caroteno (%)
Extracto crudo (e-crudo)	0.299 $\pm$ 0.002	1.047 $\pm$ 0.054	29 $\pm$ 1.68
Partición <i>n</i> -Hexano (p-HEX)	0.888 $\pm$ 0.018	2.143 $\pm$ 0.174	67 $\pm$ 0.84
Partición diclorometano (p-DCM)	0.120 $\pm$ 0.062	1.433 $\pm$ 0.302	45 $\pm$ 2.53
Partición butanólica (p-BuOH)	0.163 $\pm$ 0.086	1.573 $\pm$ 0.136	44 $\pm$ 1.68
Partición acuosa (p-H ₂ O)	0.218 $\pm$ 0.065	7.952 $\pm$ 1.076	48 $\pm$ 1.68
Controles			
Quercetina	8.4x10 ⁻⁴ $\pm$ 0.037	0.075 $\pm$ 0.002	
α -tocoferol			60 $\pm$ 7.09

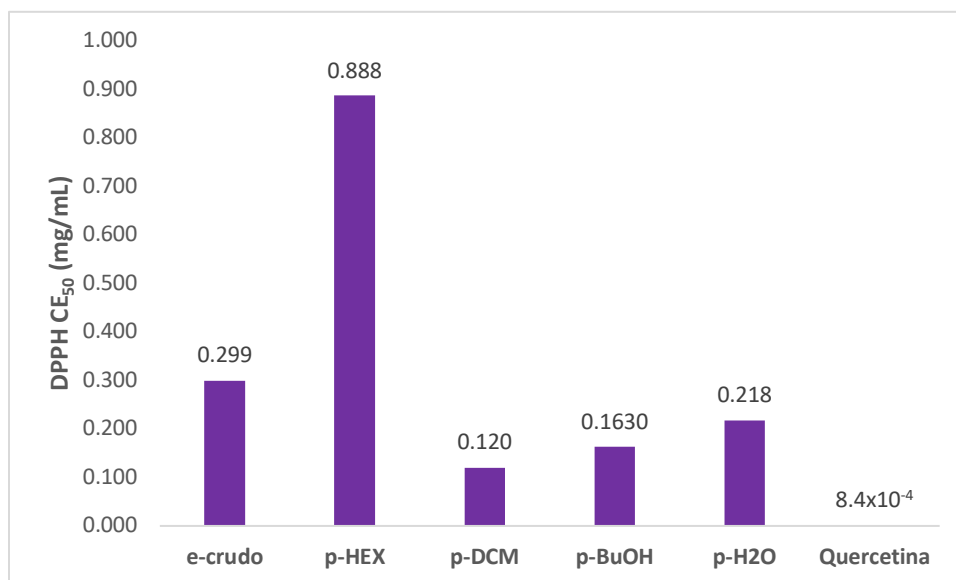


Gráfico 1. Resultados de la actividad antioxidante por medio del ensayo de DPPH.

Para la técnica de reducción del radical libre DPPH los resultados podemos observarlos en el Gráfico 1, donde, de las muestras evaluadas, p-DCM mostró la mejor actividad, con una concentración necesaria para inhibir al radical en un 50% (CE₅₀) de 0.120 mg/mL, seguido de p-BuOH y p-H₂O con 0.1630 mg/mL y 0.218 mg/mL respectivamente. En el caso del extracto crudo (e-crudo) valor exhibido fue de 0.299 mg/mL y finalmente el resultado con menor actividad de las muestras evaluadas para este ensayo fue p-Hex, con 0.888 mg/mL. Para esta prueba se utilizó quercetina como control, la cual tuvo un valor de 8.4x10⁻⁴, por lo tanto, de las muestras evaluadas ninguna tuvo una actividad superior al control.

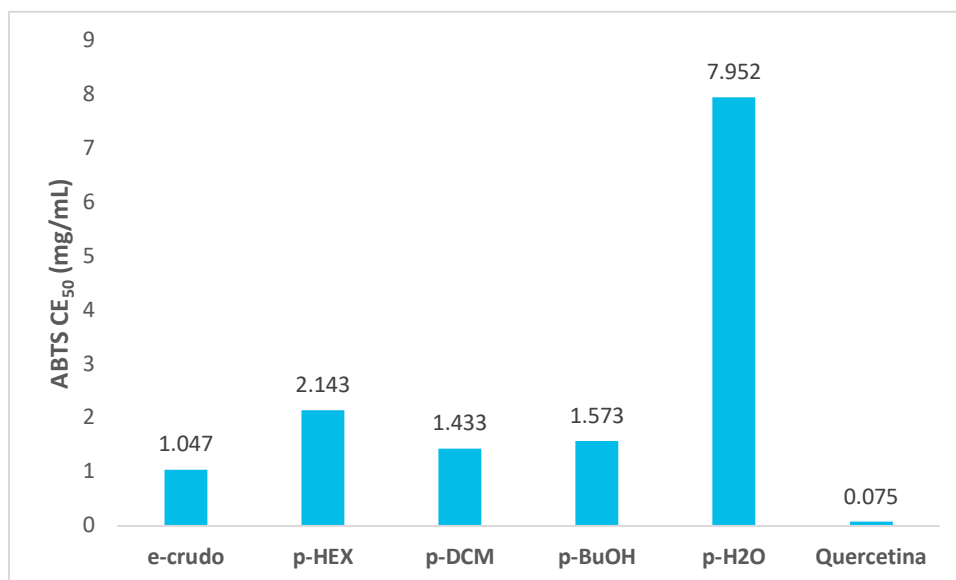


Gráfico 2. Resultados de la actividad antioxidante por medio del ensayo de ABTS.

El siguiente ensayo empleado fue la reducción del radical catiónico ABTS, para esta prueba, de las muestras evaluadas, e-crudo tuvo el mejor valor, con un resultado de 1.047 mg/mL, seguido por p-DCM con 1.433 mg/mL y muy cercano al valor anterior tenemos a p-BuOH con un resultado de 1.573 mg/mL, en cuarto lugar tenemos a p-HEX con un valor de 2.143 y finalmente, de las muestras evaluadas, p-H₂O tuvo el menor resultado con una CE₅₀ de 7.952 mg/mL. De igual manera, para este ensayo se empleó quercetina como control y al igual que en los resultados del ensayo anterior, ninguna de las muestras evaluadas pudo superar al control.

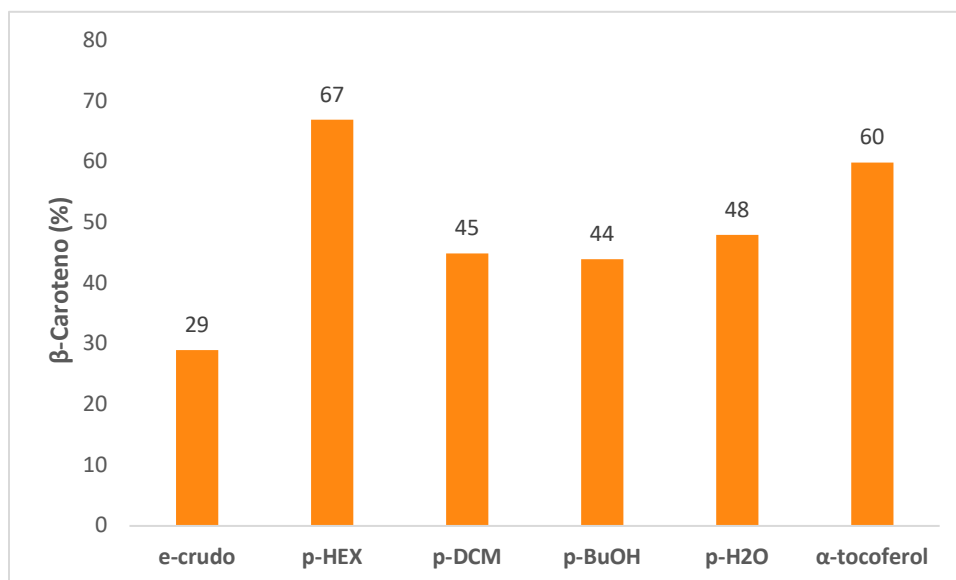


Gráfico 3. Resultados de la actividad antioxidante por medio del ensayo de β -caroteno.

La tercera prueba empleada para la evaluación de la actividad antioxidante fue el ensayo de la decoloración oxidativa de β -caroteno. A diferencia de los ensayos anteriores que su objetivo es inhibir una especie radicalaria, esta técnica se basa no solo en inhibir especies reactivas oxidantes, si no en proteger una molécula conocida por ser un antioxidante utilizada como indicador en este ensayo. De los resultados obtenidos podemos observar en el Gráfico 3, de las muestras evaluadas, p-HEX, presentó un porcentaje de actividad antioxidante del 67%, seguido de p-H₂O, p-DCM y p-BuOH con valores de 48%, 45 % y 44% respectivamente; e-crudo fue el menos activo de las muestras evaluadas con un valor de 29%. Cabe destacar que la muestra p-HEX mostró un valor superior al control que para este ensayo es α -tocoferol.

Aunque los resultados de la actividad antioxidante en DPPH y ABTS no superan al control, sin contar el extracto crudo, la partición que mostró un mejor perfil en estas técnicas fue la partición de diclorometano seguida de la partición butanólica, lo cual por la naturaleza estructural de moléculas como los flavonoides y afines en otros trabajos se han aislado con la ayuda de estos solventes de polaridad media y media alta.

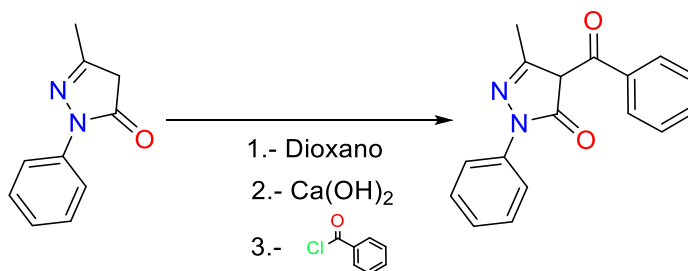
Sin embargo, en el ensayo de β -caroteno, el extracto de *n*-hexano mostró un mejor perfil antioxidante, esta actividad puede explicarse a la presencia de metabolitos secundarios de naturaleza apolar como el caso de terpenos y triterpenos. Un miembro de la familia botánica a la cual pertenece este género tiene diversos estudios referente a su actividad biológica, esta especie es *B. diffusa*. Un trabajo destacable hecho por Yahaya y colaboradores (2017),⁸⁸ donde realizan un fraccionamiento de polaridad creciente, en el extracto de *n*-hexano dio positivo a la presencia de terpenos, lo cual, podría respaldar la presencia de este tipo de metabolitos en la partición de *n*-hexano de *A. maritima* y de igual manera durante el tamizaje fitoquímico la presencia de estos metabolitos fue positiva.

6.5 Resultados de la síntesis de derivados de 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona

En la actualidad, la búsqueda de diversas moléculas de origen sintético sigue en aumento debido a las diversas aplicaciones para el desarrollo de fármacos, por lo tanto, esta búsqueda no solo se limita a nuevas síntesis si no el redescubrimiento de otras moléculas previamente sintetizadas con el objetivo de dar una nueva aplicación. Un ejemplo de esto es la estructura de 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona, la cual fue sintetizada en el siglo XIX y que recientemente se ha dado una aplicación médica como un excelente neuroprotector.⁹²

Como se citó en los antecedentes, existe evidencia publicada que respalda la síntesis de derivados de la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona ya que estos pueden ofrecer nuevas posibilidades farmacológicas, por lo tanto, para esta etapa se evaluó el método de acilación en el carbono 4 de la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona según lo reportado por Jensen³⁵ bajo las condiciones propuestas en su publicación.

6.5.1 Síntesis de 1-fenil-3-metil-4-benzoil-2-pirazolin-5-ona por la metodología de Jensen, 1959



Bajo lo descrito en literatura se realizó la acilación de la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona con cloruro de benzoílo, a pequeña escala. En un matríz bola de 50 ml provisto de un agitador magnético y condensador para reflujo se colocó 17.2 mg de 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona la cual fue disuelta en 1 mL de dioxano, el cual fue llevado a calentamiento suave sin llegar a reflujo. Una vez disuelto se agregó 11 mg de hidróxido de calcio con lo que se formó una pasta color ligeramente rosa a rojo intenso. La agitación se mantuvo por una hora, finalizado el tiempo se agregó 150 μ L de cloruro de benzoílo gota a gota, se mantuvo en agitación y

elevando la temperatura a reflujo por 30 minutos. Trascurrido el tiempo de reacción se enfrió con hielo y se descompuso el complejo de calcio con 5 mL de solución de ácido clorhídrico al 2N y se procedió a filtrar la solución en un embudo Büchner, al no observar la cristales alguno se monitorio el sobrenadante por cromatografía de capa fina y al ser observada bajo luz UV se observó una serie de subproductos. La reacción se intentó de nuevo, solo que ahora se utilizó otro haluro de ácido, en este caso cloruro de cinamoílo, para este caso se observó un número mayor de subproductos de difícil aislamiento, además se tomó en consideración un factor importante el cual fue la sustitución del solvente, ya que la reacción original requiere de uso de dioxano que está reportado por literatura como un agente posiblemente carcinógeno para humanos se procedió a la búsqueda de referencias bibliográficas que expusieran algún método alternativo para la formación de los derivados sintéticos de la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona con modificación en la posición deseada.

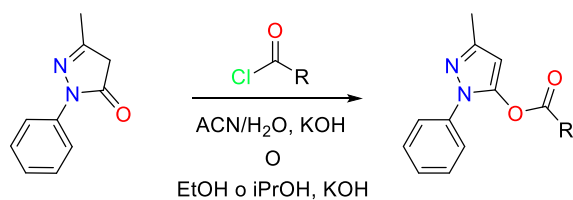
La búsqueda concluyó con un artículo publicado en el 2015 por Zamorano y Camus.⁸² por lo tanto se procedió a utilizar las condiciones planteadas y fueron ajustadas de acuerdo a las necesidades del proyecto.

6.5.2 Síntesis de derivados 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona por la metodología de Zamorano y Camus 2015 modificada

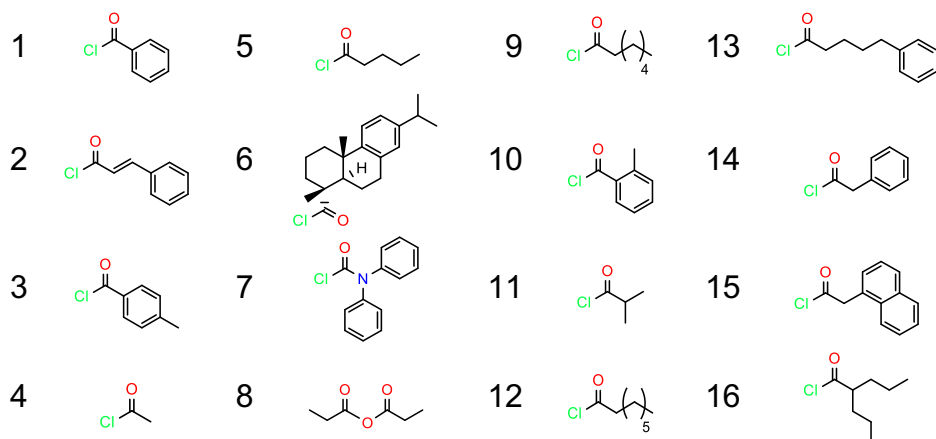
El método sintético propuesto por zamorano y Camus⁸² emplea a la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona en presencia de disulfuro de carbono en un medio alcalino-alcohólico que se hace reaccionar con un grupo halogenuro de alquilo. Para los fines buscados se modificó la metodología con el descarte del disulfuro de carbono, se utilizó un solvente de carácter polar y el halogenuro de alquilo se sustituyó por un haluro de ácido con lo que se logró obtener 16 derivados sintéticos mayoritarios con rendimientos que van desde el 45 al 99%, los cuales podemos observarlos en la Tabla 9; mientras que, en el Esquema 5 y Esquema 6 se muestra las condiciones generales de reacción para cada derivado, el anhídrido y los haluros de ácido utilizados.

Tabla 9. Claves de identificación y porcentajes de rendimiento de las moléculas sintetizadas.

COMPUESTO		Rend.	COMPUESTO		Rend.
1	Eda-Benz	99%	9	Eda-hepta	93%
2	Eda-cinn	93%	10	Eda-Otolu	95%
3	Eda-Ptol	99%	11	Eda-isobu	90%
4	Eda-acet	97%	12	Eda-octa	98%
5	Eda-val	92%	13	Eda-fenival	90%
6	Eda-DHA	45%	15	Eda-Phacet	65%
7	Eda-2Phcarb	98%	15	Eda-naf	70%
8	Eda-prop	99%	16	Eda-valp	92%



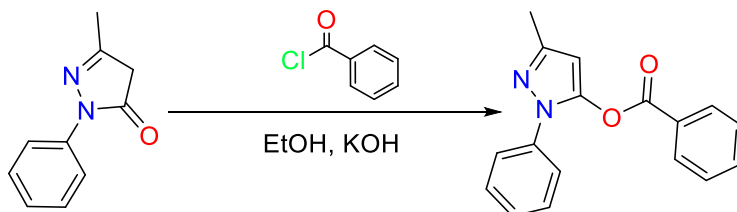
Esquema 5. Reacción global para la síntesis de derivados de 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona.



Esquema 6. Haluros de ácido empleados en la reacción de derivados.

Los compuestos sintetizados fueron caracterizados mediante las técnicas de IR, CG-EM, ^1H RMN y ^{13}C RMN y a continuación se describe cada una de ellas.

6.5.2.1 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-benzoato



Previo a la formación de los productos sintéticos de la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona esta fue sometida a condiciones alcohólico-básicas para el favorecimiento de la formación de un grupo alcoxi, antes de la condensación con el haluro de ácido ya que debido a la propiedad tautomérica del precursor se puede ver favorecido al menos tres formas, C-acilados, N-acilados y O-acilados que para el caso de este trabajo se favoreció principalmente la O-acilación⁹³. Una vez finalizada la reacción y purificada se obtuvo un rendimiento del 99%.

Se caracterizó el producto por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, donde podemos observar a un tiempo de retención (t_R) de 6.68 minutos un pico con un ion molecular de m/z de 278.23 que corresponde a la formula molecular del compuesto sintetizado ($C_{17}H_{14}N_2O_2$).

El análisis por resonancia magnética nuclear de 1H permitió confirmar la estructura del compuesto, a campo bajo a un desplazamiento químico (δ) comprendido entre 8.01-7.96 ppm, correspondiente a un multiplete que integra a 2 hidrógenos en posición *orto* del sistema aromático del anillo benzoílo, seguido de un multiplete que abarca de 7.59-7.48 ppm que integra a 3 hidrógenos que pertenecen al hidrógeno para del anillo de benzoílo y a los hidrógenos *orto* del anillo de pirazol, la siguientes señales que comprenden a un multiplete entre 7.43-7.29 e integran a 4 hidrógenos meta de los sistemas aromáticos, la última señal del sistema aromático a un δ comprendido entre 7.25-7.17 ppm que forma un triple de tripletes e integra a un 1 hidrógeno, a 6.19 ppm se observa un singulete que integra a un hidrógeno unido al carbono cuatro del anillo de pirazol, finalmente, a 2.28 ppm un singulete que integra a 3 hidrógenos correspondientes al metileno del anillo de pirazol.

El análisis de resonancia magnética nuclear de ^{13}C permitió corroborar la estructura sintetizada, confirma la presencia de 13 señales de carbono, que corresponden a la molécula sintetizada. Las señales características observadas son a 161.9 ppm que corresponde al carbonilo que une el grupo benzoílo con el oxígeno del pirazol, 149.1 ppm se observa una señal que pertenece al carbono que une al grupo metilo del anillo de pirazol; a 144.5 ppm se encuentra un carbono unido al oxígeno del anillo de pirazol; seguido de 138.12 ppm que corresponde al carbono que une el anillo aromático con el nitrógeno del anillo de pirazol, el siguiente carbono a 134.40 ppm el cual es un carbono cuaternario perteneciente al anillo aromático de benzoílo y por ultimo a 95.9 ppm que corresponde al carbono que une el grupo benzoílo y el anillo de pirazol.

En Figura 36 y la Tabla 10 se resume cada una de los datos de la estructura sintetizada.

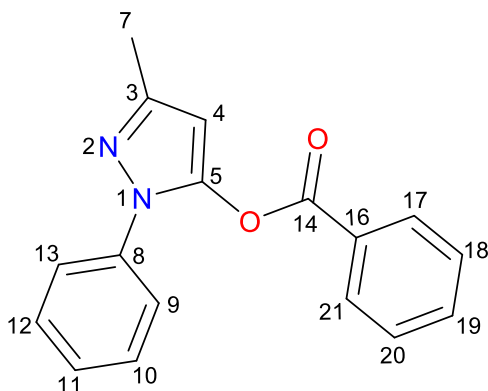


Figura 36. Compuesto 2, Eda-benz y numeración estructural.

Tabla 10. Datos de RMN ^1H y RMN ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 2, *Eda-Benz*.

Posición	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
3	---	149.1
4	6.19 (s, 1H)	95.9
5	---	144.5
7	2.28 (s, 3H)	14.7
8	---	138.1
9, 13	7.59 - 7.48 (m, 2H)	123.2
10, 12	7.43 - 7.29 (m, 2H)	129.1
11	7.25 - 7.17 (tt, 1H)	127.9
14	---	161.9
16	---	134.4
17, 21	8.01-7.96 (m, 2H)	127.2
18, 20	7.43 - 7.29 (m, 2H)	128.9
19	7.59 - 7.48 (m, 1H)	130.5

Una vez establecido que la metodología procedió de manera favorable se continuó con la síntesis de los siguientes derivados.

6.5.2.2 Purificación del cloruro de cinamoílo y síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-cinamoato

Previo a la síntesis del derivado con un grupo cinamoílo, este tuvo que ser purificado para el descarte de subproductos propios de la degradación del material precursor, los cuales pueden interferir en el avance y rendimiento de la reacción. El procedimiento consistió en lavados repetidos con solución saturada de NaHCO_3 a una disolución del cloruro de cinamoílo en diclorometano, con lo que se obtuvo 250 mg de material purificado.

La reacción de acoplamiento fue similar a lo mencionado anteriormente, con lo que se obtuvo una mezcla de reacción amarillo, la cual fue purificada por columna cromatográfica de gel de sílice con lo que se obtuvo un rendimiento del 93% de producto puro.

Se caracterizó el producto por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, donde podemos observar a un tiempo de retención (t_R) de 8.14 minutos un pico con un ion molecular de m/z de 304.17 que corresponde a la formula molecular del compuesto sintetizado ($\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$). El análisis por resonancia magnética nuclear de ^1H permitió confirmar la estructura del compuesto. A un desplazamiento químico (δ) de 7.83 ppm que corresponde a un doblete que integra a 1 hidrógeno y un segundo doblete a 6.51 ppm que integra a 1 hidrógeno, con una constante de acoplamiento $J = 16.0$ y 15.9 Hz, los cuales que pertenecen al sistema α,β insaturado del grupo cinamoílo (asignados como 17 y 16 respectivamente), el siguiente grupo de señales que podemos observar 7.47 - 7.39 ppm un multiplete que integra a 5 hidrógenos, seguido de una señal comprendida entre 7.34-7.29 que corresponde a un multiplete que integra a 1 hidrógeno (asignado a la posición 11), la siguiente señal característica del acoplamiento exitoso es un singulete que integra a 1 hidrógeno a 6.20 ppm del anillo de pirazol.

El análisis de resonancia magnética nuclear de ^{13}C permitió corroborar la estructura sintetizada, confirma la presencia de 15 señales de carbono, que corresponden a la molécula sintetizada. La primer señal a campo bajo que corresponde al carbono carbonílico del cinamoílo identificada como 14 a un δ de 162.1 ppm, la siguiente señal a δ de 148.5 y 115.4 ppm se observan las señales de los carbonos α,β insaturado identificado como 17 y

16 respectivamente, la señal identificada como 3, perteneciente al carbono 3 del anillo de pirazol a un δ 149.0 ppm, mientras que el carbono 5 del anillo de pirazol se asignó a 144.5 ppm, las señales observadas a 138.2, 133.7, 131.3, 129.09, 129.1, 128.5, 127.1, 123.1, 115.4 ppm corresponden a los carbonos aromáticos de la estructura sintetizada, los cuales se asignaron a las posiciones 8, 18, 21, 10, 12, 20, 22, 19, 23 y 11, a un δ de 95.79 ppm el carbono identificado como 4 que corresponde al carbono vinílico del anillo de pirazol, finalmente la última señal observada a 14.6 ppm asignado como 7. En la Tabla 11 se muestra los datos del compuesto 3

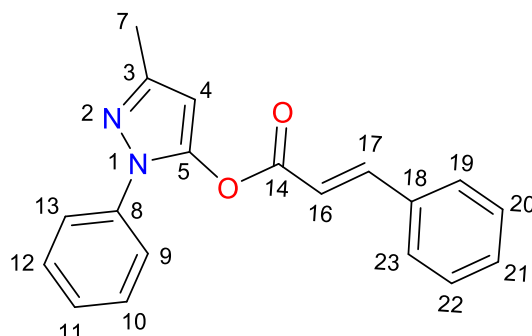


Figura 37. Compuesto 3, Eda-cinn y numeración estructural.

Tabla 11 Datos de RMN ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC en CDCl_3 para el compuesto 3 Eda-cinn.

Posición	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	COSY	HMBC
3	---	149.0		---
4	6.20 (s, 1H)	95.8		C3, C5, C7; C8(NH)*
5	---	144.5		---
7	2.35 (s, 3H)	14.6		C3, C4
8	---	138.2		---
9, 13	7.60-7.57 (qd, 2H)	123.1		C8, C9, C11, C13
10, 12	7.47-7.39 (m, 2H)	129.1		C8
11	7.34-7.29 (tt, 1H)	127.1	H-12,10	C8, C9, C13
14	---	162.1		---
16	6.53-6.49 (d, J = 15.9 Hz, 1H)	115.4	H-17	C5, C14, C17, C18
17	7.85-7.81 (d, J = 16.0 Hz, 1H)	148.5	H-16	C14, C16, C18, C19, C20, C22, C23
18	---	133.7		C21, C22
19, 23	7.56-7.53 (dd, 2H)	128.5	H-21; H-20, 22	C17, C21
20, 22	7.47-7.39(m, 2H)	149.0		C19, C20, C22, C23
21	7.47-7.39(m, 1H)	95.8		C19, C23

6.5.2.3 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-4-metilbenzoato

La síntesis de este derivado fue similar a las descritas anteriormente. La purificación de esta molécula consistió en un percolado con *n*-hexano, una vez eliminado el subproducto que eluye en el frente de la columna se recuperó un 99% del producto. Este material presenta un color amarillo claro y de consistencia terrosa, además de un olor ligeramente picante.

Se caracterizó el producto por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, donde podemos observar a un t_R de 7.16 minutos un pico con un ion molecular de m/z de 292.31 que corresponde a la formula molecular del compuesto sintetizado ($C_{18}H_{16}N_2O_2$). El análisis por resonancia magnética nuclear de 1H permitió confirmar la estructura del compuesto, a campo bajo a un desplazamiento δ comprendido entre 7.96-7.90 un multiplete que integra a 2 hidrógenos correspondiente los identificados como 17 y 21 del grupo *p*-toluílo, la siguiente señal comprendida entre 7.61-7.54 ppm la cual se observa como un multiplete que integra a 2 hidrógenos correspondientes a las posiciones 9 y 13, a 7.44-7.22 ppm observamos un multiplete, que integra a cinco hidrógeno, que pertenece a las posiciones 10, 11, 12, 18 y 20; a 6.24 ppm se observa un singulete que integra a 1 hidrógeno que corresponde a la posición 4 y a 2.40 ppm se observa de igual manera un singulete que integra a 3 hidrógenos pertenecientes al grupo metilo en posición *para* del grupo *p*-toluílo, finalmente, a 2.34 ppm se observa un singulete que integra a 3 hidrógenos asignados a la posición 7.

El análisis de resonancia magnética nuclear de ^{13}C permitió corroborar la estructura sintetizada, confirma la presencia de 15 señales de carbono, que corresponden a la molécula sintetizada. Las señales características observadas son el carbono carbonílico a 162.0 ppm asignado a la posición 14; a 149.2 ppm se observa la señal correspondiente al carbono asignado como 3, que une al grupo metilo del anillo de pirazol; 145.5 ppm corresponde al carbono asignado como 5 y une el oxígeno del grupo éster; las señales 144.7, 138.1, 130.5, 129.6, 129.2, 127.3, 125.2, 123.3 ppm pertenecen a los carbonos de los anillos aromáticos etiquetados como 19, 8, 10, 12, 18, 20, 17, 21, 11, 16, 9, 13; el carbono observado a 96.0 ppm asignado como 4, corresponde a un carbono vinílico; los

carbonos observados a 21.9 y 14.6 ppm corresponden a los grupos metilo de la estructura sintetizada, el grupo metilo asignados a las posiciones 22 y 7.

En la Figura 38 y la Tabla 12 se muestran los datos desglosados para este compuesto.

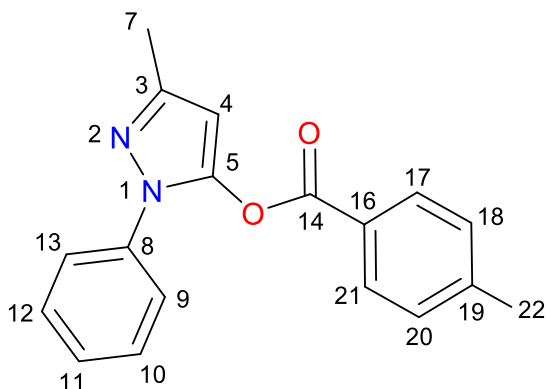


Figura 38. Compuesto 4, Eda-ptol y numeración estructural.

Tabla 12. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 4 Eda-ptol.

Posición	δ ^1H	δ ^{13}C
3	---	149.2
4	6.24 (s, 1H)	96.1
5	---	144.7
7	2.34 (s, 3H)	14.6
8, 16	---	138.1
9, 13	7.61-7.54 (m, 2H)	123.3
10, 12	7.44-7.22 (m, 2H)	130.5
11	7.44-7.22 (m, 1H)	127.3
14	---	162.0
17	7.96-7.90 (m, 1H)	129.2
18, 20	7.44-7.22 (m, 2H)	130.5
19	---	145.5
21	7.96-7.90 (m, 1H)	129.6
22	2.40 (s, 3H)	149.2

6.5.2.4 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-acetato

Para la síntesis de esta molécula se utilizó como solvente etanol, ya que el subproducto generado no interfería en la purificación de la misma. La reacción fue realizada bajo los parámetros mencionados anteriormente sin embargo, al momento evaporar el solvente a presión reducida la mezcla de reacción cambió de color, de amarillo claro a naranja claro con un olor a ácido acético, por lo tanto se tomó una alícuota y se monitorio por cromatografía de capa fina (CCF) con lo que se observó una serie de subproductos, por lo tanto la reacción volvió a ser repetida y una vez finalizada previo a la evaporación del solvente se realizaron lavados con solución saturada de NaHCO_3 y brine, se extrajo la fase orgánica con diclorometano, se retiró el solvente a presión reducida y se monitorizó por cromatografía de capa fina con lo que se observó solo dos productos, los cuales corresponden a la molécula esperada en mayor proporción y el segundo trazas del material de partida.

La explicación de la degradación de la molécula en la reacción sin lavados puede ser atribuida a la impureza propia del cloruro de ácido, en este caso el subproducto más común es ácido acético y como es mencionado en párrafos anteriores parte la reacción de condensación libera cloruro de hidrógeno (HCl) que es neutralizado por el mismo medio básico de la reacción, en este caso si existe un exceso de ácido provoca la degradación de la molécula que se observa como resultado una serie de subproductos en la cromatografía de capa fina, así que, los lavados con solución de NaHCO_3 eliminan el los restos de ácido con lo que favorece a la estabilidad del producto deseado.

Se caracterizó el producto por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, donde podemos observar a un t_R de 4.89 minutos un pico con un ion molecular de m/z 216.15, que corresponde a la formula molecular del compuesto sintetizado ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$).

El análisis por resonancia magnética nuclear de ^1H permitió confirmar la estructura del compuesto, a campo bajo a un δ comprendido entre 7.55-7.51 ppm un multiplete que integra a 2 hidrógenos pertenecientes al sistema aromático en posición *orto*, el siguiente grupo

comprendido de 7.46-7.41 ppm se observa un multiplete que integra a 2 hidrógenos meta del sistema aromático, la siguiente señal a 7.34-7.29 ppm correspondiente a un multiplete que integra a 1 hidrógeno correspondiente al hidrógeno *para*. A 6.09 ppm se observa el singulete que integra a 1 hidrógeno, señal característica y definitiva de la formación de los productos sintéticos; las siguientes señales a 2.32 y 2.25 ppm corresponden a ambas a un singulete que integran a 3 hidrógenos, que corresponden a los metilos, el primero es (s, 3H), 2.25 (s, 3H). El primero, es el etiquetado como 7 que está en el anillo de pirazol y el segundo, que es un singulete fino corresponde al metilo del grupo acetilo.

El análisis de resonancia magnética nuclear de ^{13}C permitió corroborar la estructura sintetizada, confirma la presencia de 10 señales de carbono, que corresponden a la molécula sintetizada. Las señales características observadas son el carbono carbonílico a 166.1 ppm asignado a la posición 14; a 148.9 ppm se observa la señal correspondiente al carbono asignado como 3, que une al grupo metilo del anillo de pirazol; 144.3 ppm corresponde al carbono asignado como 5 y une el oxígeno del grupo éster; las señales 138.1, 129.1, 127.1, 123.1 ppm pertenecen a los carbonos de los anillos aromáticos etiquetados como 8, 12, 10, 11, 13 y 9; el carbono observado a 95.9 ppm asignado como 4, corresponde a un carbono vinílico; los carbonos observados a 20.8 y 14.5 ppm corresponden a los grupos metilo de la estructura sintetizada, el grupo metilo asignados a las posiciones 16 y 7.

En Figura 39 y la Tabla 13 se describe a detalle las asignaciones para el compuesto Eda-acet.

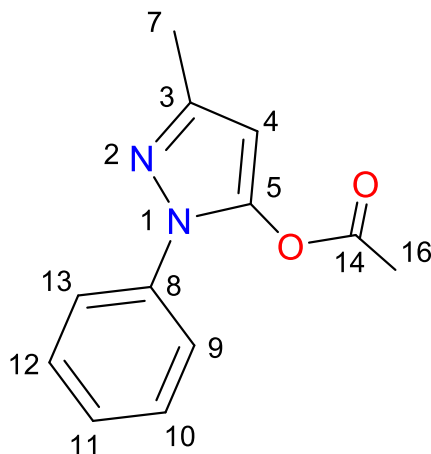


Figura 39. Compuesto 5, Eda-acet y numeración estructural.

Tabla 13. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 5 Eda-acet.

Posición	δ ^1H	δ ^{13}C
3	---	144.3
4	6.09 (s, 1H)	95.9
5	---	148.3
7	2.32 (s, 3H)	14.5
8	---	138.1
9, 13	7.55-7.51 (m, 2H)	123.0
10, 12	7.46-7.41 (m, 2H)	129.1
11	7.34-7.29 (m, 1H)	127.1
14	---	166.1
16	2.25 (s, 3H)	20.8

6.5.2.5 Síntesis y purificación de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-pentanoato

A partir del producto anterior, se procedió previo a la purificación de los productos sintéticos realizar un work up con solución de NaHCO_3 saturada y brine para la eliminación de subproductos de la síntesis y facilitar su purificación. Para la síntesis de esta molécula se utilizó como solvente etanol, La reacción fue realizada bajo los parámetros mencionados anteriormente. Se extrajo la fase orgánica con diclorometano, se retiró el solvente a presión reducida y se monitorizó por cromatografía de capa fina con lo que se observó solo dos productos, los cuales corresponden a la molécula esperada en mayor proporción y el segundo trazas del material de partida. Se obtuvo 1,192mg. Se purificó por medio de columna de gel de sílice con una fase móvil (6:4 *n*-hexano-acetato de etilo), se obtuvo 92% de producto puro.

Se caracterizó el producto por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, donde podemos observar a un t_R de 7.89 minutos un pico con un ion molecular de m/z de 258.18, que corresponde a la formula molecular del compuesto sintetizado ($\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$). Por otro lado, el análisis por resonancia magnética nuclear de ^1H permitió confirmar la estructura del compuesto, a campo bajo a un δ comprendido entre 7.34-7.25 ppm un multiplete que integra a 1 hidrógeno que está asignado como 11 perteneciente al hidrógeno en posición *para* del anillo aromático, la siguiente señal característica está a 6.08 ppm la cual es un singulete que integra a 1 hidrógeno asignado al número cuatro que corresponde a un hidrógeno vinílico del anillo de pirazol, la señal observada de 0.89 ppm la cual es un triplete que integra a 3 hidrógenos

El análisis de resonancia magnética nuclear de ^{13}C permitió corroborar la estructura sintetizada, confirma la presencia de 13 señales de carbono, que corresponden a la molécula sintetizada. Las señales características observadas son el carbono carbonílico a 164.53 ppm asignado a la posición 14; a 144.4 ppm se observa la señal correspondiente al carbono asignado como 3, que une al grupo metilo del anillo de pirazol; 139.9 ppm corresponde al carbono asignado como 5 y une el oxígeno del grupo éster; las señales 133.4, 124.6, 122.6, 118.8 ppm pertenecen a los carbonos de los anillos aromáticos

etiquetados como 8, 12, 10, 11, 13, 9; el carbono observado a 91.4 ppm asignado como 4, corresponde a un carbono vinílico; a 29.2, 22.0 y 17.5 ppm se observan las señales de los carbonos de la cadena alifática, etiquetados como 16, 17 y 18; los carbonos observados a 10.0 y 9.2 ppm corresponden a los grupos metilo de la estructura sintetizada, asignados a las posiciones 7 y 19.

A continuación se describe en la Figura 40 y la Tabla 14 se describe a detalle los datos del compuesto Eda-val.

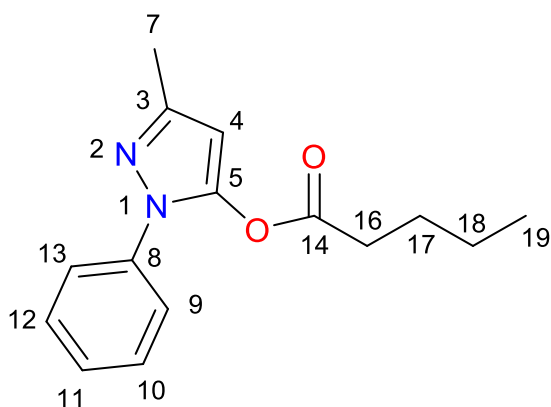


Figura 40. Compuesto 6, Eda-val y numeración estructural.

Tabla 14. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 6 Eda-val.

Posición	δ ^1H	δ ^{13}C
3	---	144.4
4	6.08 (s, 1H)	91.4
5	---	139.9
7	2.32 (s, 3H)	10.0
8	---	133.5
9, 13	7.55-7.48 (m, 2H)	118.8
10, 12	7.46-7.37 (m, 2H)	124.6
11	7.34-7.25 (m, 1H)	122.6
14	---	164.5
16	2.53-2.54 (t, 2H)	29.2
17	1.70-1.55 (pen, 2H)	144.4
18	1.41-1.19 (m, 2H)	91.4
19	0.92-0.85 (t, 3H)	139.9

6.5.2.6 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-il (1*R*,4*aS*,10*aR*)-7-isopropil-1,4*a*-dimetil-1,2,3,4,4*a*,9,10,10*a*-octahidrofenantreno-1-carboxilato

El compuesto etiquetado como Eda-DHA se purificó por medio de una columna cromatográfica de gel de sílice, primero con 350 mL de *n*-hexano, seguido de la fase móvil 9.5:0.5 *n*-hexano-acetato de etilo. Se obtuvo un rendimiento de reacción del 45%. El producto puro fue una goma color ligeramente amarillo sin olor. Por otro lado, el análisis por resonancia magnética nuclear de ^1H permitió confirmar la estructura del compuesto, a campo bajo a un δ comprendido entre 7.47-7.21 ppm se encuentran los 5 hidrógenos que corresponden al sistema aromático, dq para los asignados como 9 y 13, tq para 10 y 12 para 11; el siguiente grupo de señales corresponde a los hidrógenos aromáticos del anillo C de dehidroabietóilo, entre 7.14-7.12 ppm se observa un d que integra a 1 hidrogeno asignado como 27, la siguiente señal, a 7.0-6.98 ppm observada como un dd que integra a 1 hidrógeno que integra a 1 hidrogeno asignado como 28 y finalmente a 6.83-6.82 ppm un doblete que integra a 1 hidrógeno asignado como 30; a 6.03ppm se observa el singulete que integra a 1 hidrogeno asignado a la posición 4; la señal observada entre 2.88-2.78 ppm correspondiente a un heptuplete que integra a un hidrógeno, localizado en la posición 31 del grupo isopropilo, al igual que, a 1.24-1.23 y 1.22 ppm representan dos dobletes que ambos integran a 6 hidrógenos, estas 3 señales son características de los diterpenos abietánicos. Con estos datos, se corrobora la síntesis de esta molécula, la cual es la de mayor tamaño entre todas las estructuras sintetizadas.

El análisis de resonancia magnética nuclear de ^{13}C permitió corroborar la estructura sintetizada, confirma la presencia de 27 señales de carbono, que corresponden a la molécula sintetizada. Las señales características observadas son a 174.13 ppm el carbono carbonílico, seguido del carbono a 95.44 ppm que corresponde al carbono vinílico del anillo de pirazol, la siguiente señal característica se observa a 33.49 ppm, correspondiente al carbono que une a los dos metilo del grupo isopropilo en el anillo C de dehidroabietóilo y a 24.03 y 23.97 ppm los cuales son los carbonos metílicos del grupo isopropilo.

En la Figura 41y la Tabla 15 se da la descripción completa de las señales para Eda-DHA.

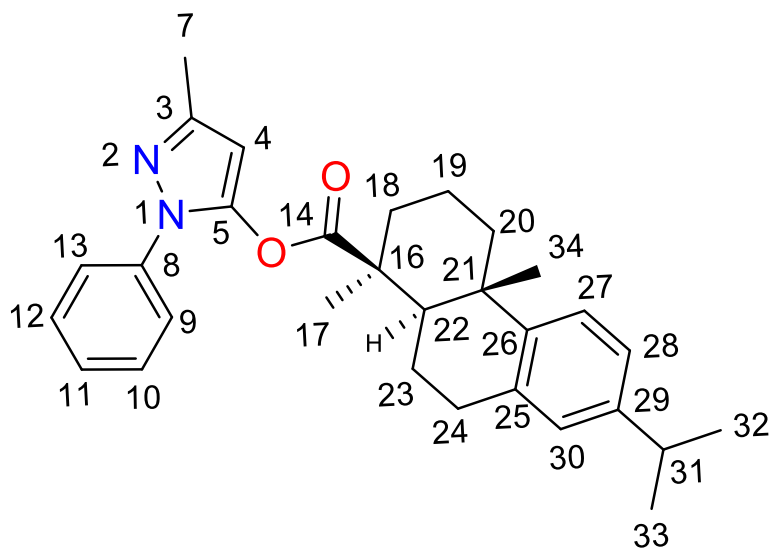


Figura 41. Compuesto 7, Eda-DHA y numeración estructural.

Tabla 15. Datos de RMN ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC en CDCl_3 para el compuesto 7 Eda-DHA.

Posición	δ ^1H	δ ^{13}C	COSY
3	---	148.94	
4	6.03 (s, 1H)	95.44	H7
5	---	144.96	
7	2.32 (s, 3H)	14.49	H20, H18, H19
8	---	137.89	
9, 13	7.47-7.45 (dq, 2H)	123.85	H10, H12
10, 12	7.33-7.29 (tq, 2H)	128.85	H9, H13
11	7.26-7.21 (tt, 1H)	127.34	H10, H12
14	---	174.13	
16	---	48.23	
17	1.31 (s, 3H)	16.57	
18	1.85-1.61 (m, 2H)	36.37	H17, H19
19	1.85-1.61 (m, 2H)	18.39	H17, H18, H20
20	2.30-2.29 (d, 1H), 1.49-1.42 (td, 1H)	37.89	H19
21	---	36.87	
22	1.19 (s, 3H)	44.63	H23
23	1.85-1.61 (m, 1H), 1.35-1.28 (dt, 1H)	21.71	H22, H24
24	2.80-2.74 (dd, 1H), 2.66-2.56 (ddd, 1H)	29.56	H23, H30
25	---	134.39	
26	---	146.39	
27	7.14-7.12 (d, 1H)	123.96	H28, H30
28	7.0-6.98 (dd, 1H)	123.96	
29	---	145.86	
30	6.83-6.82 (d, 1H)	126.93	H27, H28, H30
31	2.88-2.78 (hep, 1H)	33.49	H32, H33
32	1.22 (d, 3H)	23.97	
33	1.24-1.23 (d, 3H)	24.03	
35	1.19 (s, 3H)	24.96	

6.5.2.7 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-difenilcarbamoato

Para la síntesis de esta molécula se utilizó como solvente etanol, ya que el subproducto generado no interfería en la purificación de la misma. La reacción fue realizada bajo los parámetros mencionados anteriormente sin embargo, al momento de la adición del cloruro de difenilcarbamoilo la solución tornó a color verde. Se realizó un work up con solución saturada de NaHCO_3 y brine y la fase orgánica se extrajo con diclorometano, se retiró el solvente a presión reducida con lo que se obtuvo un sólido verde oscuro. Se monitorizó por cromatografía de capa fina con lo que se observó solo dos productos. La purificación del mismo fue realizada en columna cromatográfica de gel de sílice con fase móvil 6:4 *n*-hexano-acetato de etilo. Se obtuvo un 3.40 g de producto puro color amarillo claro de olor picante.

Se caracterizó el producto por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, donde podemos observar a un t_R de 10.77 minutos un pico con un ion molecular de m/z de 369.13, que corresponde a la fórmula molecular del compuesto sintetizado ($\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$). Por otro lado, el análisis por resonancia magnética nuclear de ^1H permitió confirmar la estructura del compuesto, a campo bajo a un δ 7.40-7.32 ppm se observó un multiplete que integra a 5 hidrógenos, asignados como 9, 10, 11, 12 y 13; el siguiente grupo de señales, observados como un multiplete comprendido entre 7.29-7.20 ppm que integra a 10 hidrógenos asignados a las posiciones 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 y 28. La siguiente señal característica de estos derivados, la cual se observa a 6.23 ppm, observado como un singulete que integra a 1 hidrógeno asignado como 4. La última señal es el un singulete observado a 2.34 ppm el cual integra a 3 hidrógenos del metileno asignado como 7.

El análisis de resonancia magnética nuclear de ^{13}C permitió corroborar la estructura sintetizada, confirma la presencia de 13 señales de carbono, que corresponden a la molécula sintetizada. Las señales características observadas son el carbono carbonílico del grupo carbamoilo a 167.43 ppm, la siguiente señal observada a 141.39 ppm, correspondiente a los carbonos de los anillos de fenilo unidos al nitrógeno del grupo

difenilcarbamoilo, mientras que, la señal del carbono del grupo fenilo del pirazol se observa a 137.87 ppm, la última señal característica es observada a 95.14 ppm, correspondiente al carbono 4 del anillo de pirazol.

En la Figura 42 y la Tabla 16 se describe a detalle la asignación de cada señal.

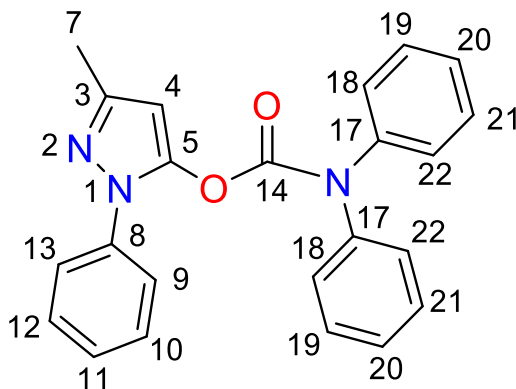


Figura 42. Compuesto 8, Eda-2phcarb y numeración estructural.

Tabla 16. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 8 Eda-2phcarb.

Posición	δ ^1H	δ ^{13}C
3	---	148.3
4	6.23 (s, 1H)	95.1
5	---	144.9
7	2.34 (s, 3H)	14.5
8	---	137.9
9, 13	7.40-7.32 (m, 2H)	122.9
10, 12	7.40-7.32 (m, 2H)	129.3
11	7.40-7.32 (m, 1H)	127.1
14	---	149.7
17	---	141.4
18, 22	7.29-7.20 (m, 4H)	148.3
19, 21	7.29-7.20 (m, 4H)	95.1
20	7.29-7.20 (m, 2H)	144.9

6.5.2.8 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-propionato

La reacción fue realizada bajo los parámetros mencionados anteriormente, la adición del anhídrido propiónico, no se observó cambio de color en la solución. Se realizó un work up con solución saturada de NaHCO_3 y brine y la fase orgánica se extrajo con diclorometano, se retiró el solvente a presión reducida con lo que se obtuvo un líquido amarillo. Se monitorizó por cromatografía de capa fina con lo que se observó un producto puro con ligeras trazas de impureza. La purificación del mismo fue realizada con un percolado en columna cromatográfica de gel de sílice con fase móvil 6:4 *n*-hexano-acetato de etilo. El rendimiento de reacción fue de 99% con lo que se obtuvo un líquido amarillo olor lácteo.

Se caracterizó el producto por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, donde podemos observar a un t_R de 5.12 minutos un pico con un ion molecular de m/z de 230.18 que corresponde a la formula molecular del compuesto sintetizado ($\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$). El análisis por resonancia magnética nuclear de ^1H permitió confirmar la estructura del compuesto, a campo bajo a un δ comprendido entre 7.54-7.52 ppm se observa un doblete que integra a 2 hidrógenos asignados como 9 y 13, a 7.45-7.41 ppm se observó un multiplete que integra a 2 hidrógenos asignados como 10 y 12, el segundo multiplete observado a 7.33-7.29 ppm que integra a 1 hidrógeno asignado a la posición 11 del anillo aromático; la siguiente señal a 6.09 ppm asignada a la posición 4 la cual se observa como un singulete y es característico de los productos sintéticos para este trabajo. A campo alto observamos las señales de la cadena alquílica a δ 2.52, 2.32 y 1.19 ppm, la primer señal se observa como un cuarteto el cual integra a dos hidrógenos asignados a la posición 16, la siguiente señal corresponde a un singulete que integra a 3 hidrógenos asignados a la posición 7 y la última señal es un triplete que integra a 3 hidrógenos que corresponde al asignado como 16.

El análisis de resonancia magnética nuclear de ^{13}C permitió corroborar la estructura sintetizada, confirma la presencia de 11 señales de carbono, que corresponden a la molécula sintetizada. Las señales características observadas son el carbono carbonílico a 169.7 ppm asignado a la posición 14; a 148.9 ppm se observa la señal correspondiente al

carbono asignado como 3, que une al grupo metilo del anillo de pirazol; 144.4 ppm corresponde al carbono asignado como 5 y une el oxígeno del grupo éster; las señales 138.0, 129.1, 129.0, 127.1, 123.1 ppm pertenecen a los carbonos de los anillos aromáticos etiquetados como 8, 12, 10, 11, 13 y 9; el carbono observado a 95.8 ppm asignado como 4, corresponde a un carbono vinílico; el carbono etiquetado como 16 es observado a 27.5 ppm; los carbonos observados a 14.5 y 8.8 ppm corresponden a los grupos metilo de la estructura sintetizada, el grupo metilo asignados a las posiciones 7 y 17.

En la Figura 43 y Tabla 17 se describen a detalle las asignaciones de la estructura sintetizada.

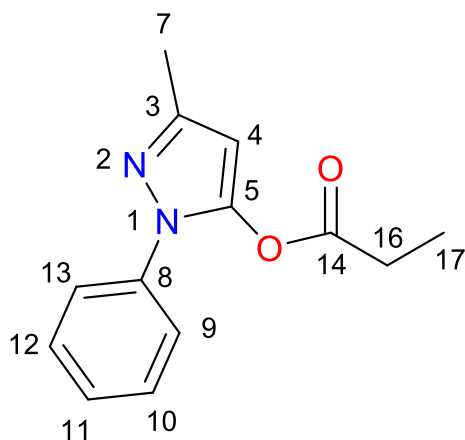


Figura 43. Compuesto 9, Eda-prop y numeración estructural.

Tabla 17. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 9 Eda-prop.

Posición	δ ^1H	δ ^{13}C
3	---	148.9
4	6.09 (s, 1H)	95.8
5	---	144.4
7	2.32 (s, 3H)	14.5
8	---	138.1
9, 13	7.54-7.52 (dd, 2H)	123.1
10, 12	7.45-7.41 (m, 2H)	129.1
11	7.33-7.29 (m, 1)	127.1
14	---	169.7
16	2.52 (q, 1H)	27.5
17	1.19 (t, 3H)	8.8

6.5.2.9 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-heptanoato

Para la síntesis de las subsecuentes moléculas se hizo un cambio de solvente en la reacción de acoplamiento, el cual fue acetonitrilo, ya que la síntesis de los diferentes haluros de ácido se realizó con este solvente. La reacción fue realizada bajo condiciones básicas, y el procedimiento fue igual a lo anterior descrito. Una vez finalizada la reacción, se realizó los lavados con solución saturada de NaHCO_3 y brine, se extrajo la fase orgánica con diclorometano, se retiró el solvente a presión reducida y se monitorizó por cromatografía de capa fina. El producto sintético obtenido fue un líquido amarillo de olor graso y fue purificado por medio de columna cromatográfica de gel de sílice con el uso de una fase móvil 7:3 *n*-hexano-acetato de etilo. El producto final tuvo un rendimiento del 93%. Se caracterizó el producto por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, donde podemos observar a un t_R de 5.96 minutos un pico con un ion molecular de m/z de 286.154 que corresponde a la formula molecular del compuesto sintetizado ($\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$).

El análisis por resonancia magnética nuclear de ^1H permitió confirmar la estructura del compuesto, a campo bajo se observó a campo bajo a un δ comprendido entre 7.54–7.51 ppm un multiplete que integra a 2 hidrógenos asignados como 9 y 13, entre 7.45–7.40 ppm se observó un segundo multiplete que integra a 2 hidrógenos correspondientes a 10 y 12 y entre 7.33–7.29 ppm se observó un multiplete que integra a 1 hidrógeno de la posición 11; a 6.08 ppm se observó el singulete que integra a 1 hidrógenos, el cual es característico de estos productos sintéticos; a campo alto a , 2.49 ppm se observó un triplete que integra a 2 hidrógenos asignados a la posición 16, a 2.32ppm se observó un singulete que integra a 3 hidrógenos que corresponde a la posición 7 del metilo del anillo de pirazol, a 1.65 ppm se observó un quinteto que integra a 2 hidrógenos asignados como 17, entre 1.33-1.23 ppm se observó un multiplete que integra a 6 hidrógenos asignados como 18, 19 y 20 finalmente, a 0.87 ppm se observa un triplete que integra a 3 hidrógenos asignados a la posición 21.

El análisis de resonancia magnética nuclear de ^{13}C permitió corroborar la estructura sintetizada, confirma la presencia de 15 señales de carbono, que corresponden a la molécula sintetizada. Las señales características observadas son el carbono carbonílico a

169.2 ppm asignado como 14, a 149.1 ppm asignado a la posición 3, 144.6 ppm el carbono 5, 138.3, 129.1, 127.3, 123.4 ppm que corresponden a los carbonos del anillo aromático, 95.9 ppm el carbono vinílico de la posición 4 , 34.2, 31.5, 28.7, 24.7, 22.5 ppm los carbonos de la cadena alifática asignados como 16, 17, 18, 19 y 20, a 14.6 ppm el carbono de la posición 7 y a 14.1 ppm el carbono de la posición 21.

En la Figura 44 y la Tabla 18 se describe a detalle la asignación para la estructura sintetizada.

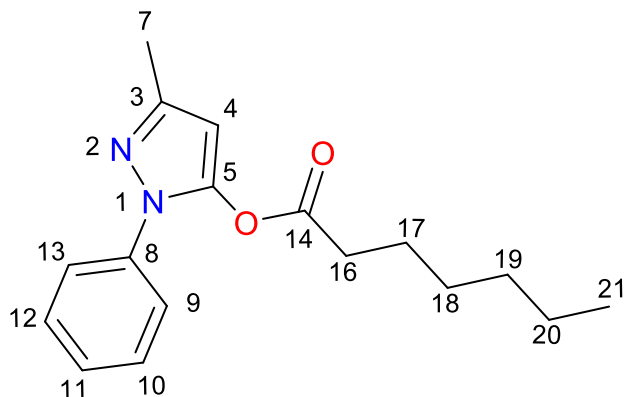


Figura 44. Compuesto 10, Eda-hepta y numeración estructural.

Tabla 18. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 10 Eda-hepta.

Posición	δ ^1H	δ ^{13}C
3	---	149.1
4	6.08	95.9
5	---	144.6
7	2.32	14.6
8	---	138.3
9, 13	7.54–7.51	123.4
10, 12	7.45–7.40	129.1
11	7.33–7.29	127.3
14	---	169.2
16	2.49	34.2
17	1.65	31.5
18	1.33–1.23	28.7
19	1.33–1.23	24.7
20	1.33–1.23	22.5
21	0.87	14.1

6.5.2.10 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-2-metilbenzoato

La reacción fue realizada bajo condiciones básicas, y el procedimiento fue igual a lo anterior descrito. Una vez finalizada la reacción, se realizó los lavados con solución saturada de NaHCO_3 y brine, se extrajo la fase orgánica con acetato de etilo, se retiró el solvente a presión reducida y se monitorizó por cromatografía de capa fina. El producto sintético obtenido fue un sólido amarillo claro y fue purificado por medio de columna cromatográfica de gel de sílice con el uso de una fase móvil 8:2 *n*-hexano-acetato de etilo. El producto final tuvo un rendimiento del 95%. Se caracterizó el producto por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, donde podemos observar a un t_R de 6.64 minutos un pico con un ion molecular de m/z de 292.11 que corresponde a la formula molecular del compuesto sintetizado ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$). El análisis por resonancia magnética nuclear de ^1H permitió confirmar la estructura del compuesto, a campo bajo se observan cinco grupo de señales correspondiente a los hidrógenos aromáticos de las estructura. A un δ comprendido entre 8.02 ppm tenemos un dd que integra a 1 hidrógeno, correspondiente al anillo aromático en la posición 17; seguido de un dd a 7.62 ppm que integran a 2 hidrógenos asignados a las posiciones 9, 13; a 7.49 ppm se observa un ddd, que integra a 1 hidrógeno asignado a la posición 19; entre 7.46-7.41 ppm se observa un multiplete, que integra a 2 hidrógenos asignados como 10 y 12; finalmente, a 7.35-7.27 ppm se observa un multiplete que integra a 3 hidrógenos asignados como 11, 18 y 20. A 6.26 ppm se observa un singulete que integra a 1 hidrógeno que corresponde a la posición 4 del anillo de pirazol; las dos últimas señales observadas corresponden a dos singuletes que integran a 3 hidrógenos cada uno y se localizan a 2.61 y 2.40 ppm asignados como 22 y 7.

El análisis de resonancia magnética nuclear de ^{13}C permitió corroborar la estructura sintetizada, confirma la presencia de 16 señales de carbono, que corresponden a la molécula sintetizada. Las señales características observadas son el carbono carbonílico a 162.2 ppm asignado a la posición 14; a 149.0 ppm se observa la señal correspondiente al carbono asignado como 3, que une al grupo metilo del anillo de pirazol; 144.7 ppm corresponde al carbono asignado como 5 y une el oxígeno del grupo éster; las señales 142.2, 138.2, 133.4, 132.1, 131.1, 129.0, 127.2, 126.8, 126.1, 123.4 ppm pertenecen a los

carbonos de los anillos aromáticos etiquetados como 21, 8, 19, 20, 17, 12, 10, 11, 16, 18, 13 y 9; el carbono observado a 95.9 ppm asignado como 4, corresponde a un carbono vinílico; los carbonos observados a 21.8, 14.5 ppm corresponden a los grupos metilo de la estructura sintetizada, el grupo metilo asignados a las posiciones 22 y 7.

En la figura Figura 45 y la Tabla 19 se muestra la estructura sintetizada así como su asignación.

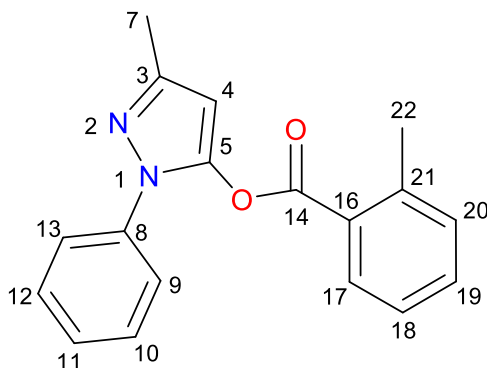


Figura 45. Compuesto 11, Eda-otol y numeración estructural.

Tabla 19. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 11 Eda-otol.

Posición	δ ^1H	δ ^{13}C
3	---	149.1
4	6.26 (s, 1H)	95.9
5	---	144.7
7	2.40 (s, 3H)	14.5
8	---	138.2
9, 13	7.62 (dd, 2H)	123.4
10, 12	7.46-7.41 (m, 2H)	129.0
11	7.35-7.27 (m, 1H)	127.2
14	---	162.2
16	---	126.8
17	8.02 (dd, 1H)	131.1
18	7.35-7.27 (m, 1H)	132.2
19	7.49 (ddd, 1H)	133.4
20	7.35-7.27 (m, 1H)	126.1
21	---	142.2
22	2.61 (s, 3H)	21.8

6.5.2.11 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-isobutarato

La reacción fue realizada bajo condiciones básicas, y el procedimiento fue igual a lo anterior descrito. Una vez finalizada la reacción, se realizó los lavados con solución saturada de NaHCO_3 y brine, se extrajo la fase orgánica con diclorometano, se retiró el solvente a presión reducida y se monitorizó por cromatografía de capa fina. El producto sintético obtenido fue un líquido amarillo intenso y fue purificado por medio de columna cromatográfica de gel de sílice con el uso de una fase móvil 1:1 *n*-hexano-acetato de etilo. El producto final tuvo un rendimiento del 90%. Se caracterizó el producto por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, donde podemos observar a un t_R de 5.24 minutos un pico con un ion molecular de m/z de 244.29 que corresponde a la formula molecular del compuesto sintetizado ($\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$).

El análisis por resonancia magnética nuclear de ^1H permitió confirmar la estructura del compuesto, a campo bajo se observó a campo bajo a un δ comprendido entre 7.54–7.50 ppm se observó un multiplete que integra a 2 hidrógenos asignados como 9 y 13 a un δ comprendido entre, 7.45–7.40 ppm se observó un multiplete que integra a 2 hidrógenos que corresponden a la asignación 10 y 12 y entre 7.33–7.31 ppm se observó un multiplete que integra a 1 hidrógeno que corresponde a 11; a 6.08 ppm se observó el singulete que integra a 1 hidrógeno, el cual es característico de estos productos sintéticos; a campo alto a 2.73 ppm se observó un heptuplete que integra a 1 hidrógeno de la posición 16, a 2.32 ppm se observó el un singulete que integra a 3 hidrógenos, que corresponde al metilo de la posición 7, finalmente a 1.22 ppm se observa un doblete que integra a 6 hidrógenos asignados como 17 y 18.

El análisis de resonancia magnética nuclear de ^{13}C permitió corroborar la estructura sintetizada, confirma la presencia de 15 señales de carbono, que corresponden a la molécula sintetizada. Las señales características observadas son el carbono carbonílico a 169.0ppm, a 149.1 ppm el carbono asignado como 3, 144.6 ppm el carbono 5, los carbonos aromáticos a 141.8, 129.2, 127.3, 123.4 ppm asignados como 8, 10, 12, 11, 9 y 13

respectivamente, a 95.9 ppm el carbono 4, 34.2 ppm asignado a la posición 16, 18.8 ppm correspondiente a 17 y 18, y 14.6 ppm asignado como 7.

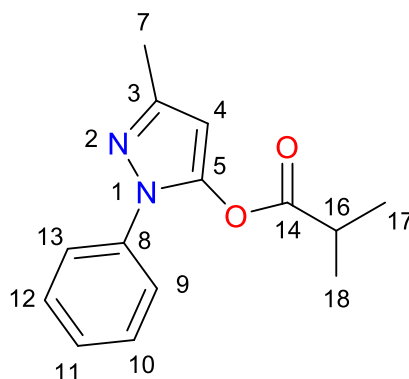


Figura 46. Compuesto 12, Eda-isobu y numeración estructural.

Tabla 20. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 12 Eda-isobu.

Posición	δ ^1H	δ ^{13}C
3	---	149.1
4	6.08 (s, 1H)	95.9
5	---	144.6
7	2.32 (s, 3H)	14.6
8	---	141.8
9, 13	7.54–7.50 (m, 2H)	123.4
10, 12	7.45–7.40 (m, 2H)	129.2
11	7.33–7.31 (m, 1H)	127.3
14	---	169.0
16	2.73 (hep, 1H)	34.2
17	1.22 (d, 3H)	18.8
18	1.22 (d, 3H)	18.8

6.5.2.12 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-octanoato

La reacción fue realizada bajo condiciones básicas, y el procedimiento fue igual a lo anterior descrito. Una vez finalizada la reacción, se realizó los lavados con solución saturada de NaHCO_3 y brine, se extrajo la fase orgánica con diclorometano, se retiró el solvente a presión reducida y se monitorizó por cromatografía de capa fina. El producto sintético obtenido fue un líquido amarillo olor acre y fue purificado por medio de columna cromatográfica de gel de sílice con el uso de una fase móvil 8:2 *n*-hexano-acetato de etilo. El producto final tuvo un rendimiento del 98%. Se caracterizó el producto por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, donde podemos observar a un t_R de 6.26 minutos un pico con un ion molecular de m/z de 300.18 que corresponde a la formula molecular del compuesto sintetizado ($\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$).

El análisis por resonancia magnética nuclear de ^1H permitió confirmar la estructura del compuesto, a campo bajo se observó a un δ 7.56-7.53 ppm observamos un multiplete, que integra a 2 hidrógenos correspondientes a las asignaciones 9, 13; a 7.47-7.42 ppm se observa un multiplete que integra a 2 de las posiciones 10 y 12; a 7.35-7.31 ppm se observa un m, que integra a 1 hidrógeno asignado como 11; a 6.10 ppm se observa un singulete que integra a 1 hidrógeno que corresponde a la posición 4; a 2.51 ppm se observa un triplete que integra a 2 hidrógenos que corresponde a la posición 16; el metilo del anillo de pirazol se observa como un singulete a 2.34 ppm; el resto de hidrógenos de la cadena alifática son observados a 1.67 ppm como un quintuplete que integra a 2 hidrógenos en la posición 17, 1.33-1.27 como un multiplete que integra a 8 hidrógenos asignados como 18, 19, 20 y 21, finalmente, 0.92-0.88 ppm un triplete que integra a 3 hidrógenos en la posición 22.

El análisis de resonancia magnética nuclear de ^{13}C permitió corroborar la estructura sintetizada, confirma la presencia de 16 señales de carbono, que corresponden a la molécula sintetizada. Las señales características observadas son el carbono carbonílico a 169.0 ppm, a 148.9 ppm corresponde al carbono de la posición 3, 144.5 ppm asignado al carbono 5, a 138.1, 129.0, 127.1, 123.2 ppm corresponden a los carbonos aromáticos 8,

12, 10, 11, 13 y 9; 95.8 ppm se asignó al carbono vinílico en la posición 4, 34.0, 31.5, 28.8, 28.8, 24.5, 22.5 ppm son los carbonos de la cadena alifática y se asignaron como 16, 19, 18, 20, 17 y 21; finalmente 14.5, 14.0 ppm se asignaron a los grupos metilo de la estructura sintetizada como 7 y 22.

En la Figura 47 y la Tabla 21 se muestra la estructura sintetizada así como su asignación.

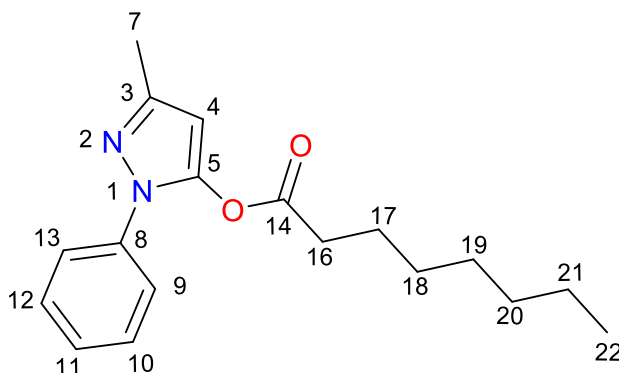


Figura 47. Compuesto13, Eda-octa y numeración estructural.

Tabla 21. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 13 Eda-octa.

Posición	δ ^1H	δ ^{13}C
3	---	144.5
4	6.10(s, 1H)	95.8
5	---	148.9
7	2.34 (s, 3H)	14.5
8	---	138.1
9, 13	7.56-7.53 (m, 2H)	123.2
10, 12	7.47-7.42 (m, 2H)	129.0
11	7.35-7.31 (m, 1)	127.1
14	---	169.0
16	2.51 (t, 2H)	34.1
17	1.67 (p, 2H)	24.5
18	1.33-1.27 (m, 2H)	28.8
19	1.33-1.27 (m, 2H)	31.5
20	1.33-1.27 (m, 2H)	28.8
21	1.33-1.27 (m, 2H)	22.5
22	0.90 (t, 3H)	14.0

6.5.2.13 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-5-fenilpentanoato

La reacción fue realizada bajo condiciones básicas, y el procedimiento fue igual a lo anterior descrito. Una vez finalizada la reacción, se realizó los lavados con solución saturada de NaHCO_3 y brine, se extrajo la fase orgánica con diclorometano, se retiró el solvente a presión reducida y se monitorizó por cromatografía de capa fina. El producto sintético obtenido fue un líquido amarillo claro y fue purificado por medio de columna cromatográfica de gel de sílice con el uso de una fase móvil 1:1 *n*-hexano-acetato de etilo. El producto final tuvo un rendimiento del 90%. Se caracterizó el producto por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, donde podemos observar a un t_R de 8.51 minutos un pico con un ion molecular de m/z de 334.150, que corresponde a la formula molecular del compuesto sintetizado ($\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$).

El análisis por resonancia magnética nuclear de ^1H permitió confirmar la estructura del compuesto, a campo bajo se observó a campo bajo a un δ comprendido entre 7.52–7.49 ppm un multiplete que integra a 2 hidrógenos que corresponde a las posiciones 9 y 13, entre 7.42–7.37 ppm se observa un multiplete que integra a 2 hidrógenos asignados como 10 y 12, a 7.31–7.26 ppm se observa un multiplete que integra a 3 hidrógenos asignados como 22, 23 y 24, entre 7.21–7.16 ppm se observa un multiplete que integra a 1 hidrógeno asignado a la posición 11, a 7.13ppm se observa un dd que integra a 2 hidrógenos asignados como 21 y 25, a 6.07 ppm se observa el singulete que integra a 1 hidrógeno, el cual es característico de estos productos sintéticos asignado a la posición 4; a 2.60 ppm se observa un triplete que integra a 3 hidrógenos asignados como 16, a 2.52 ppm se observa un segundo triplete que integra a 2 hidrógenos asignados a la posición 19, a 2.32ppm se observa un singulete que integra a 3 hidrógenos que corresponden a la posición 7, finalmente entre 1.74–1.59 ppm se observa un multiplete que integra a 4 hidrógenos asignados como 17 y 18.

El análisis de resonancia magnética nuclear de ^{13}C permitió corroborar la estructura sintetizada, confirma la presencia de 15 señales de carbono, que corresponden a la

molécula sintetizada. Las señales características observadas son el carbono carbonílico a 169.0ppm, 149.1ppm el carbono 3, 144.6 ppm el carbono asignado como 5, los carbonos aromáticos de la estructura son observados a 141.8, 129.2, 128.5, 128.5, 127.3, 126.1, 123.4 ppm y corresponden a 8, 10, 12, 22, 24, 21, 25, 23, 11, 9 y 13; , 95.9 ppm corresponde a la posición 4, los carbonos de la cadena alifática se observan a 35.6, 34.1, 30.7, 24.3 ppm y son los carbonos 16, 19, 17 y 18, finalmente el carbono 7 es observado a 14.6 ppm.

En la Figura 48 y la Tabla 22 se muestra la estructura sintetizada así como su asignación.

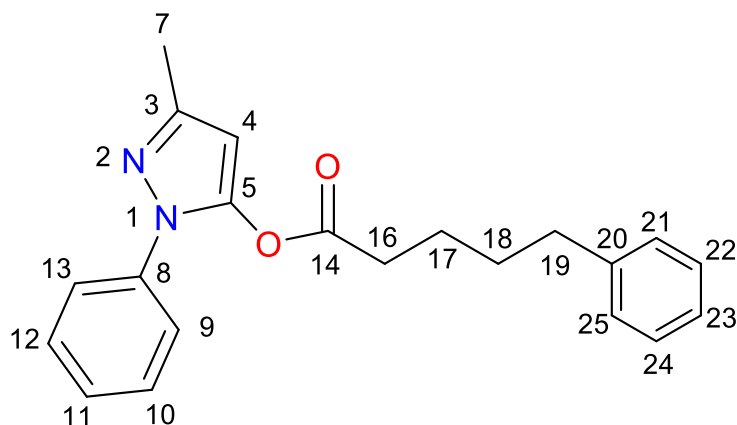


Figura 48. Compuesto 14, Eda-fenival y numeración estructural.

Tabla 22. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 14 Eda-fenival.

Posición	δ ^1H	δ ^{13}C
3	---	149.1
4	6.07 (s, 1H)	95.9
5	---	144.6
7	2.32 (s, 3H)	14.6
8	---	141.8
9, 13	7.52–7.49 (m, 2H)	123.4
10, 12	7.42–7.37 (m, 2H)	129.2
11	7.21–7.16 (m, 1H)	126.1
14	---	169.0
16	2.60 (t, 2H)	35.6
17	1.74–1.59 (m, 2H)	30.7
18	1.74–1.59 (m, 2H)	24.3
19	2.52 (t, 2H)	34.1
20	---	---
21	7.13 (dd, 1H)	128.5
22	7.31–7.26 (m, 1H)	128.5
23	7.31–7.26 (m, 1H)	127.3
24	7.31–7.26 (m, 1H)	128.5
25	7.13 (dd, 1H)	128.5

6.5.2.14 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-fenilacetato

La reacción fue realizada bajo condiciones básicas, y el procedimiento fue igual a lo anterior descrito. Una vez finalizada la reacción, se realizó los lavados con solución saturada de NaHCO_3 y brine, se extrajo la fase orgánica con diclorometano, se retiró el solvente a presión reducida y se monitorizó por cromatografía de capa fina. El producto sintético obtenido fue un líquido amarillo intenso y fue purificado por medio de columna cromatográfica de gel de sílice con el uso de una fase móvil 7:3 *n*-hexano-acetato de etilo. El producto final tuvo un rendimiento del 65 %. Se caracterizó el producto por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, donde podemos observar a un t_R de 6.63 minutos un pico con un ion molecular de m/z de 292.118 que corresponde a la formula molecular del compuesto sintetizado ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$).

El análisis por resonancia magnética nuclear de ^1H permitió confirmar la estructura del compuesto, a campo bajo se observó a campo bajo a un δ comprendido entre 7.84-7.78 ppm se observa un multiplete que integra a 2 hidrógenos que corresponde a la posición 9 y 13, a 7.58-7.45 ppm se observa un segundo multiplete que integra a 2 hidrógenos asignados como 10 y 12, un tercer multiplete comprendido entre 7.43-7.29 ppm que integra a 5 hidrógenos para las posiciones 18, 19, 20, 21 y 22, el último multiplete observado entre 7.27-7.18 ppm que integra a 1 hidrógeno asignado a la posición 11; a 6.10 ppm se observa el singlete que integra a 1 hidrógeno, el cual es característico de estos productos sintéticos y se asignó a la posición 4, a campo alto a un δ 3.74 ppm se observa un singlete que integra a 2 hidrógenos de la posición 16, finalmente a 2.25ppm se observa un singlete que integra a 3 hidrógenos asignados como 7.

El análisis de resonancia magnética nuclear de ^{13}C permitió corroborar la estructura sintetizada, confirma la presencia de 15 señales de carbono, que corresponden a la molécula sintetizada. Las señales características observadas son el carbono carbonílico a 171.0 ppm, a 149.10ppm el carbono asignado a la posición 3, 144.37 ppm el carbono de la posición 5, los carbonos aromáticos de la estructura se observan a 138.77, 135.50, 129.85,

128.71, 127.06, 127.30 123.22 ppm, asignados a las posiciones 8, 17, 10, 12, 19, 21, 18, 22 11 9 y 13, a 97.02 ppm se observa el carbono asignado a la posición 4, 41.17 ppm es el carbono asignado como 16 y finalmente, 14.05 ppm, se observa el carbono asignado como 7.

En la Figura 49 y la Tabla 23 se muestra la estructura sintetizada así como su asignación.

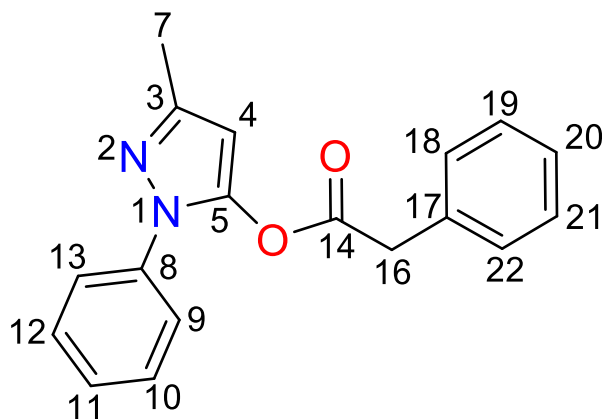


Figura 49. Compuesto15, Eda-phacet y numeración estructural.

Tabla 23. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 16 Eda-phacet.

Posición	δ ^1H	δ ^{13}C
3	---	149.10
4	6.10 (s, 1H)	97.02
5	---	144.37
7	2.25 (s, 3H)	14.05
8	---	138.77
9, 13	7.84-7.78 (m, 2H)	123.22
10, 12	7.58-7.45 (m, 2H)	129.85
11	7.27-7.18 (m, 1H)	127.06
14	---	171.0
16	3.74 (s, 2H),	41.17
17	---	135.50
18	7.43-7.29 (m, 1H)	128.71
19	7.43-7.29 (m, 1H)	129.85
20	7.43-7.29 (m, 1H)	127.30
21	7.43-7.29 (m, 1H)	129.85
22	7.43-7.29 (m, 1H)	128.71

6.5.2.15 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il- 2- (1-naftalenil) acetato

La reacción fue realizada bajo condiciones básicas, y el procedimiento fue igual a lo anterior descrito. Una vez finalizada la reacción, se realizó los lavados con solución saturada de NaHCO_3 y brine, se extrajo la fase orgánica con diclorometano, se retiró el solvente a presión reducida y se monitorizó por cromatografía de capa fina. El producto sintético obtenido fue un líquido amarillo claro y fue purificado por medio de columna cromatográfica de gel de sílice con el uso de una fase móvil 7:3 *n*-hexano-acetato de etilo. El producto final tuvo un rendimiento del 70 %. Se caracterizó el producto por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, donde podemos observar a un t_R de 10.64 minutos un pico con un ion molecular de m/z de 342.28 y de una abundancia 2 %, que corresponde a la formula molecular del compuesto sintetizado ($\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$).

El análisis por resonancia magnética nuclear de ^1H permitió confirmar la estructura del compuesto, a campo bajo se observó seis grupos de señales que corresponden a los carbonos aromáticos. El primer grupo de señales es observado a un δ de 7.93-7.89 ppm como un m que integra a 2 hidrógenos, etiquetados como 20 y 26; a 7.87 ppm se observa un d que integra a 1 hidrógeno que corresponde a la posición 23; las siguientes señales a 7.55-7.48 ppm se observan como un m, que integra a 2 hidrógenos que corresponden a 10 y 12; a 7.46-7.40 y 7.26-7.24 ppm se observan dos m que integra a 4 hidrógenos etiquetados como 24, 25 y 13, 9; finalmente, un tercer multiplete a 7.22-7.18 ppm que integra a 3 hidrógenos, etiquetados como 11, 21, 22. La señal observada a 6.16 ppm, la cual es un singulete que integra a 1 hidrógeno a la posición 4; un segundo singulete a 4.26 ppm que integra a 2 hidrógenos, que corresponde a la posición 16 finalmente a 2.33 ppm un singulete que integra a 3 hidrógenos que corresponde al grupo metilo del anillo de pirazol.

El análisis de resonancia magnética nuclear de ^{13}C permitió corroborar la estructura sintetizada, confirma la presencia de 20 señales de carbono, que corresponden a la molécula sintetizada. Las señales características observadas a un δ 166.54 ppm el

carbonilo asignado a la posición 14; a 148.82 ppm se observa la señal del carbono asignado a la posición 3; a 144.34 ppm corresponde al carbono asignado como 5; las siguientes señales corresponde, a los carbonos aromáticos, 137.77, 133.91, 131.95, 128.88, 128.78, 128.70, 128.64, 128.48, 126.82, 126.06, 125.48, 123.34, 122.84 ppm corresponden a los carbonos asignados como 8, 19, 18, 17, 12, 10, 20, 26, 22, 24, 11, 21, 25, 23, 13 y 9; a 95.67 ppm corresponde al carbono 4; 39.04 ppm al carbono 16 y finalmente a 14.46 ppm el carbono del metilo en posición 7.

En la figura Figura 50 y Tabla 24 la se muestra la estructura sintetizada así como su asignación.

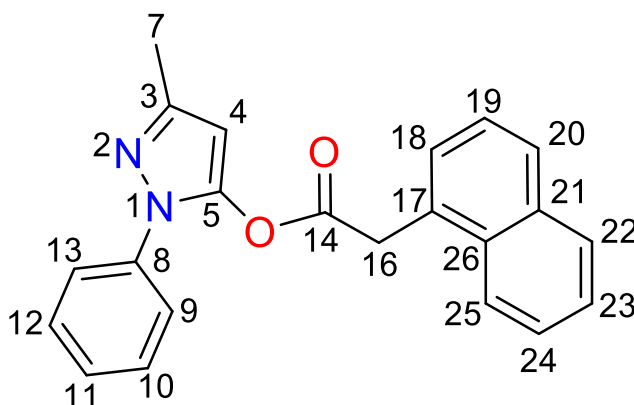


Figura 50. Compuesto16, Eda-naf y numeración estructural.

Tabla 24. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 16 Eda-naf.

Posición	δ ^1H	δ ^{13}C
3	---	148.8
4	6.16 (s, 1H)	95.7
5	---	144.3
7	2.33 (s, 3H)	14.5
8	---	137.8
9, 13	7.26-7.24(m, 2H)	122.8
10, 12	7.55-7.48 (m, 2H)	128.8
11	7.22-7.18(m, 1H)	126.8
14	---	166.5
16	4.26 (s, 2H)	39.0
17	---	128.9
18	7.22-7.18(m, 1H)	132.0
19	7.22-7.18(m,3H)	133.9
20	7.93-7.89 (m, 1H)	128.7
21	---	126.1
22	7.93-7.89 (m, 1H)	128.6
23	7.87 (d, 1H)	123.3
24	7.46-7.40 (m, 1H)	95.7
25	7.46-7.40 (m, 1H)	125.5
26	---	126.8

6.5.2.16 Síntesis de 1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-il-2-propilpentanoato

La reacción fue realizada bajo condiciones básicas, y el procedimiento fue igual a lo anterior descrito. Una vez finalizada la reacción, se realizó los lavados con solución saturada de NaHCO_3 y brine, se extrajo la fase orgánica con diclorometano, se retiró el solvente a presión reducida y se monitorizó por cromatografía de capa fina. El producto sintético obtenido fue un líquido amarillo claro y fue purificado por medio de columna cromatográfica de gel de sílice con el uso de una fase móvil 7:3 *n*-hexano-acetato de etilo. El producto final tuvo un rendimiento del 92 %. Se caracterizó el producto por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, donde podemos observar a un t_R de 6.11 minutos un pico con un ion molecular de m/z de 300.372, que corresponde a la formula molecular del compuesto sintetizado ($\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$).

El análisis por resonancia magnética nuclear de ^1H permitió confirmar la estructura del compuesto, a campo bajo se observó tres grupos de señales que corresponden a los hidrógenos del anillo aromático, a un δ 7.55-7.53 ppm se observó un m, que integra a 2 hidrógenos, correspondiente a 9,13, seguido a 7.46-7.42 ppm un tt que integra a 2 hidrógenos que corresponden a 10, 12 y a 7.35-7.31 ppm un multiplete que integra a un hidrógeno identificado como 11; a 6.08 ppm se observa un singulete que integra a 1 hidrógeno, correspondiente a la posición 4; A 2.56 ppm se observa un tt, que integra a 1 hidrógeno asignado como 16; a 2.34 ppm se observa un singulete que integra a 3 hidrógenos que corresponde al metilo del anillo de pirazol; entre 1.70-1.60 y 1.53-1.46 ppm se observa dos multiplete que integra a cuatro hidrógenos que corresponden a las posiciones 20 y 17 de la cadena de valproilo; finalmente, a 1.31-1.22 ppm se observa un hex que integra a 4 hidrógenos de la posición 18 y 21; y a 0.88 ppm un triplete que integra a 6 hidrógenos de la posiciones 19 y 22.

El análisis de resonancia magnética nuclear de ^{13}C permitió corroborar la estructura sintetizada, confirma la presencia de 16 señales de carbono, que corresponden a la molécula sintetizada. Las señales características observadas son el carbono carbonílico a 171.7 ppm asignado a la posición 14; a 148.9 ppm se observa la señal correspondiente al carbono asignado como 3, que une al grupo metilo del anillo de pirazol; 144.6 ppm corresponde al carbono asignado como 5 y une el oxígeno del grupo éster; las señales

138.0, 128.9, 127.2, 123.7 ppm pertenecen a los carbonos del anillo aromático; el carbono observado a 95.6 ppm asignado como 4, corresponde a un carbono vinílico; los carbonos observados a 45.3, 34.2, 20.5 ppm pertenecen a la estructura del radical y son asignados como 16, 17, 20 18 y 21; los siguientes carbonos pertenecen a los grupos metilo de la estructura sintetizada, a 14.4 y 13.9 ppm corresponden al grupo metilo asignado a la posición 7, 19 y 22.

En la figura Figura 51 y la Tabla 25 se muestra la estructura sintetizada así como su asignación.

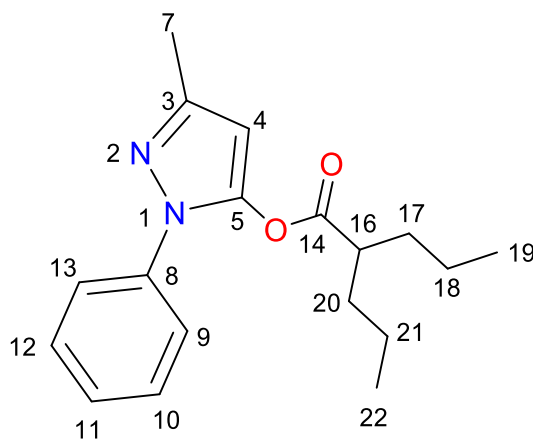


Figura 51. Compuesto16, Eda-valp y numeración estructural.

Tabla 25. Datos de RMN ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para el compuesto 17 Eda-valp.

Posición	δ ^1H	δ ^{13}C
3	---	148.9
4	6.08 (s, 1H)	95.6
5	---	144.6
7	2.34 (s, 3H)	14.5
8	---	138.0
9, 13	7.55-7.53(m, 2H)	123.7
10, 12	7.46-7.42 (m, 2H)	128.9
11	7.35-7.31(m, 1)	127.2
14	---	171.7
16	2.56(tt, 1H)	45.3
17	1.53-1.46(m, 2H)	34.2
18	1.27(hex, 2H)	20.5
19	0.88(t, 3H)	13.9
20	1.70-1.60 (dq, 2H)	34.2
21	1.27(hex, 2H)	20.5
22	0.88(t, 3H)	13.9

6.6 Resultados de la evaluación antioxidante de derivados acilados de la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona

La síntesis de diversos productos con propiedades antioxidantes se ha convertido en una tarea muy importante dentro de la química medicinal, ya que la exposición a factores ambientales y contaminantes puede generar en el organismo especies reactivas que a la larga ocasionan el desarrollo de diferentes enfermedades. Para este trabajo se emplearon dos métodos colorimétricos para la evaluación de esta actividad, los cuales son el método DPPH y el método ABTS.

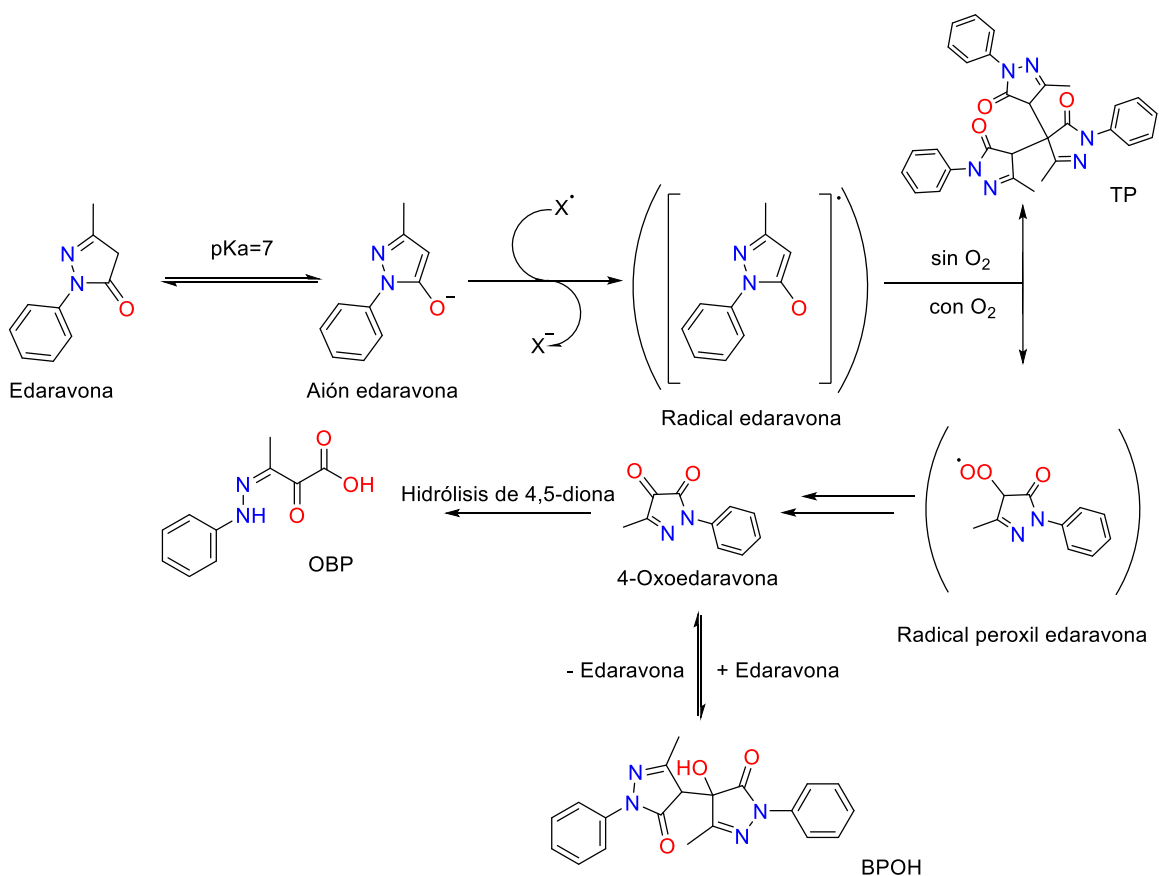
Los resultados de la evaluación antioxidante por medio de la técnica de DPPH y ABTS se muestran en la Tabla 26. Los productos sintéticos se compararon con quercetina y edaravona como estándares. Primeramente los productos evaluados por la técnica de DPPH se observó que los derivados de edaravona más activos fueron **6**, **16** y **9** con valores de CE_{50} de 0.0301, 0.1606 y 0.1920 mM (micro molar) respectivamente, mientras que los compuestos que mostraron la menor actividad fueron **17**, **7** y **2** con valores de CE_{50} de 4.7074, 19.410, 24.6805 mM respectivamente.

Para el caso del radical catiónico ABTS, los resultados se muestran de igual manera en la Tabla 26. De los productos que presentaron mejor actividad antioxidante fueron **6**, **9** y **16** con valores de CE_{50} de 0.8107, 3.5309, 3.6889 mM respectivamente, mientras que, los productos con menor actividad fueron **17**, **13** y **14** con una CE_{50} 104.0111, 95.7548, 35.5572 mM respectivamente.

Tabla 26. Resultados de la evaluación antioxidante de los productos sintéticos.

Compuestos		Actividad antioxidante			
		DPPH (CE ₅₀ , mg/mL)	CE ₅₀ , mM	ABTS (CE ₅₀ , mg/mL)	CE ₅₀ , mM
2	Eda-Benz	1.3101 ± 0.272	4.7074	3.9011 ± 0.072	14.0171
3	Eda-cinn	0.4220 ± 0.030	1.3866	6.7344 ± 0.820	22.1272
4	Eda-Ptol	0.5135 ± 0.063	1.7563	9.5909 ± 0.831	32.8073
5	Eda-acet	0.3704 ± 0.243	1.7127	1.0660 ± 0.658	4.9297
6	Eda-val	0.0078 ± 0.017	0.0301	0.2094 ± 0.866	0.8106
7	Eda-DHA	8.8631 ± 1.306	19.410	ND	---
8	Eda-2Phcarb	ND	---	ND	---
9	Eda-prop	0.0442 ± 0.073	0.1920	0.8131 ± 0.499	3.5311
10	Eda-hepta	0.3966 ± 0.309	1.3849	1.5406 ± 0.082	5.3796
11	Eda-Otolu	0.4504 ± 0.108	1.5408	6.0331 ± 0.594	20.6373
12	Eda-isobu	1.1367 ± 0.156	4.6531	4.6446 ± 0.807	19.0126
13	Eda-octa	1.0867 ± 0.101	3.6175	28.765 ± 0.34	95.7557
14	Eda-fenival	0.5522 ± 0.824	1.6512	12.247 ± 0.20	36.6216
15	Eda-Phacet	0.0755 ± 0.004	0.2582	2.9186 ± 0.024	9.9836
16	Eda-naf	0.0549 ± 0.053	0.1603	1.2631 ± 0.133	3.6890
17	Eda-valp	7.4140 ± 0.953	24.6805	31.245 ± 2.08	104.0113
1	Edaravona	0.0031 ± 0.001	0.0180	0.0357 ± 0.042	0.2049
	Quercetina	0.0008 ± 0.037	0.0028	0.075 ± 0.002	0.2482

Edaravona como un excelente eliminador de radicales debido a su propiedad anfífila, la cual le permite reaccionar con diversas especies radicalarias como peroxilo y otras formas de especies reactivas de oxígeno por medio de la donación de un átomo de hidrógeno de la posición **4**, además debido a la propiedad antes mencionada inhibe la oxidación lipídica y una vez donado este hidrogeno los subproductos radicales de edaravona es capaz de inactivarse en productos estables o continuar la cascada antiradicalaria.⁹⁴ En el Esquema 7 se muestra el mecanismo hipotético para su actividad antioxidante.



TP: 4,4-bis-(3-metil-5-oxo-1-fenil-2-pirazolin-4-il)-3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona; **BPOH:** 4-hidroxi-4-(3-metil-5-oxo-1-fenil-2-pirazolin-4-il)-3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona; **OBP:** Ácido 2-oxo-3-(fenilhidrazono) butanoico.

Esquema 7. Mecanismo hipotético para la producción de radical edaravona por transferencia de electrones del anión edaravona al radical peroxilo y la formación de productos de oxidación (tomado de Watanabe y cols. 2017).

Tanto en DPPH como en ABTS, los derivados sintéticos no fueron tan activos como el precursor sin embargo, en ambas técnicas el mejor derivado antioxidante fue el producto 5, con una CE_{50} de 0.0301 mM para DPPH y 0.8107 mM para ABTS; de igual manera en cada uno de los ensayos de antioxidantes, el producto menos activo fue **17**, con CE_{50} de 24,6804 mM en DPPH y 104,0113 mM en ABTS. En el caso de los productos sintéticos los resultados de la actividad antioxidante podrían ser potenciados gracias a la presencia de cadenas cortas no ramificadas adyacentes al carbonilo incorporado.

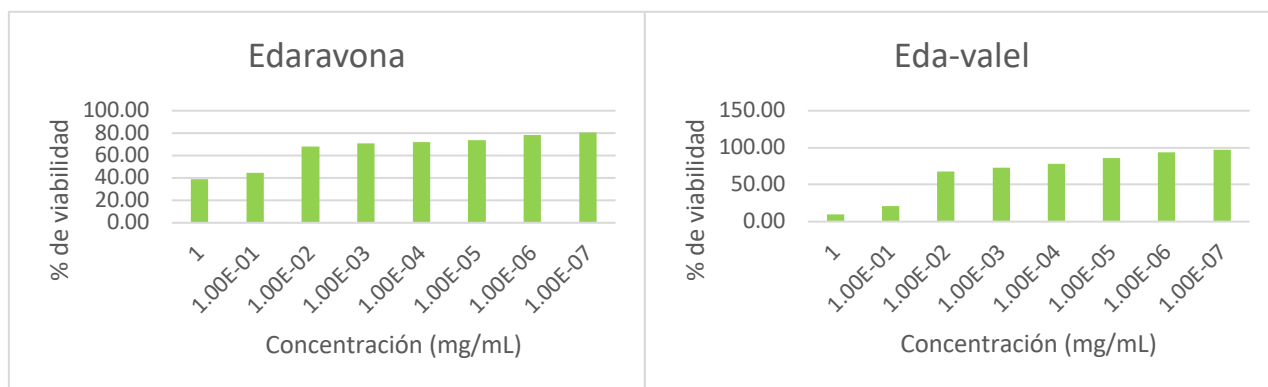
6.7 Resultados de la evaluación de la viabilidad y citotoxicidad celular por medio del ensayo MTT

Las 16 moléculas más el precursor fueron evaluadas a diferentes concentraciones (1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 0.01, 0.1 y 1 mg/mL) durante 24 horas por medio del ensayo MTT, con lo cual se pudo determinar la viabilidad y la citotoxicidad de las muestras frente a una línea celular no tumoral de fibroblasto de ratón, la cual fue C2C12 (ATCC® CRL-1772™) obtenida del American Type Culture Collection (ATCC®). El crecimiento de las células expuestas fue comparado con células cultivadas en ausencia de productos (control negativo), estas últimas representaron el 100% de crecimiento. La línea celular C212 corresponde a mioblasto (células musculares) de ratón con modo de crecimiento adherente, comúnmente utilizada para estudios de viabilidad y citotoxicidad.

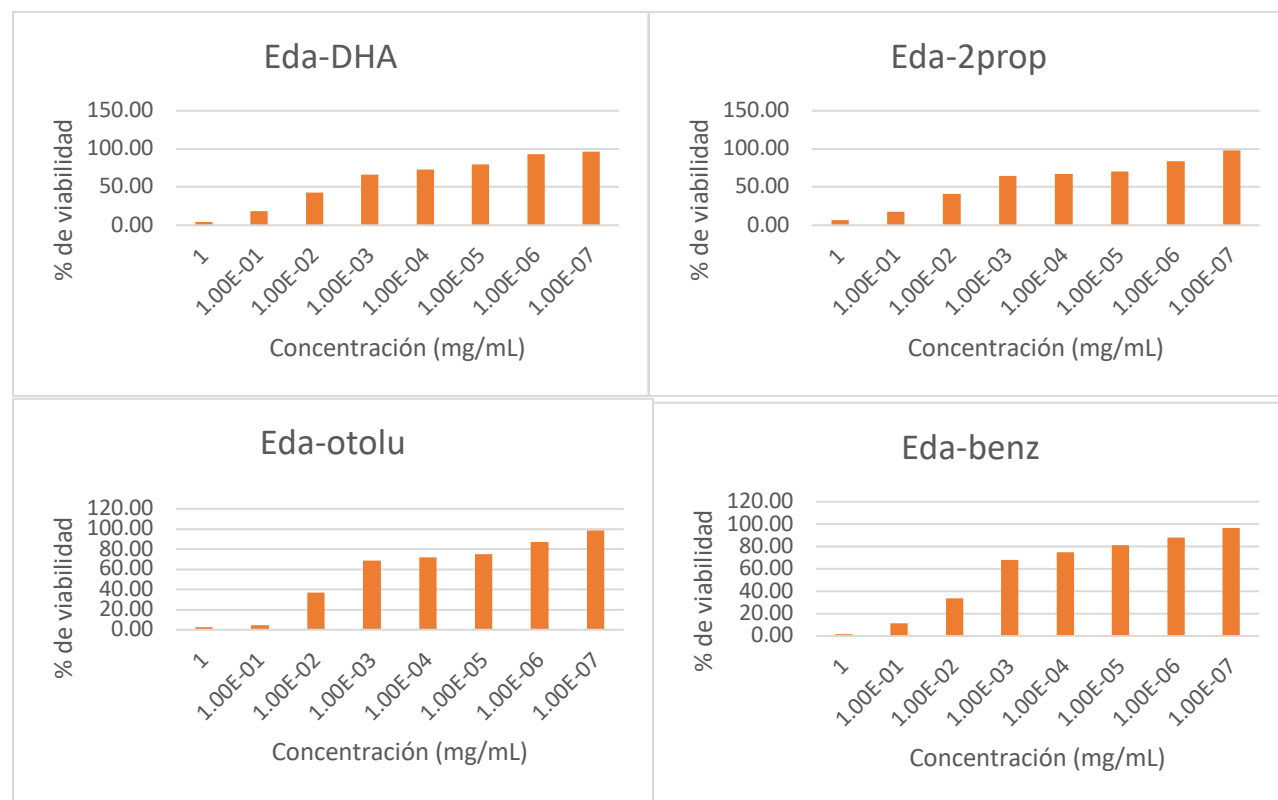
Los resultados obtenidos del ensayo de viabilidad celular se muestran en los gráficos; mientras que en la Tabla 27 se muestran los resultados obtenidos.

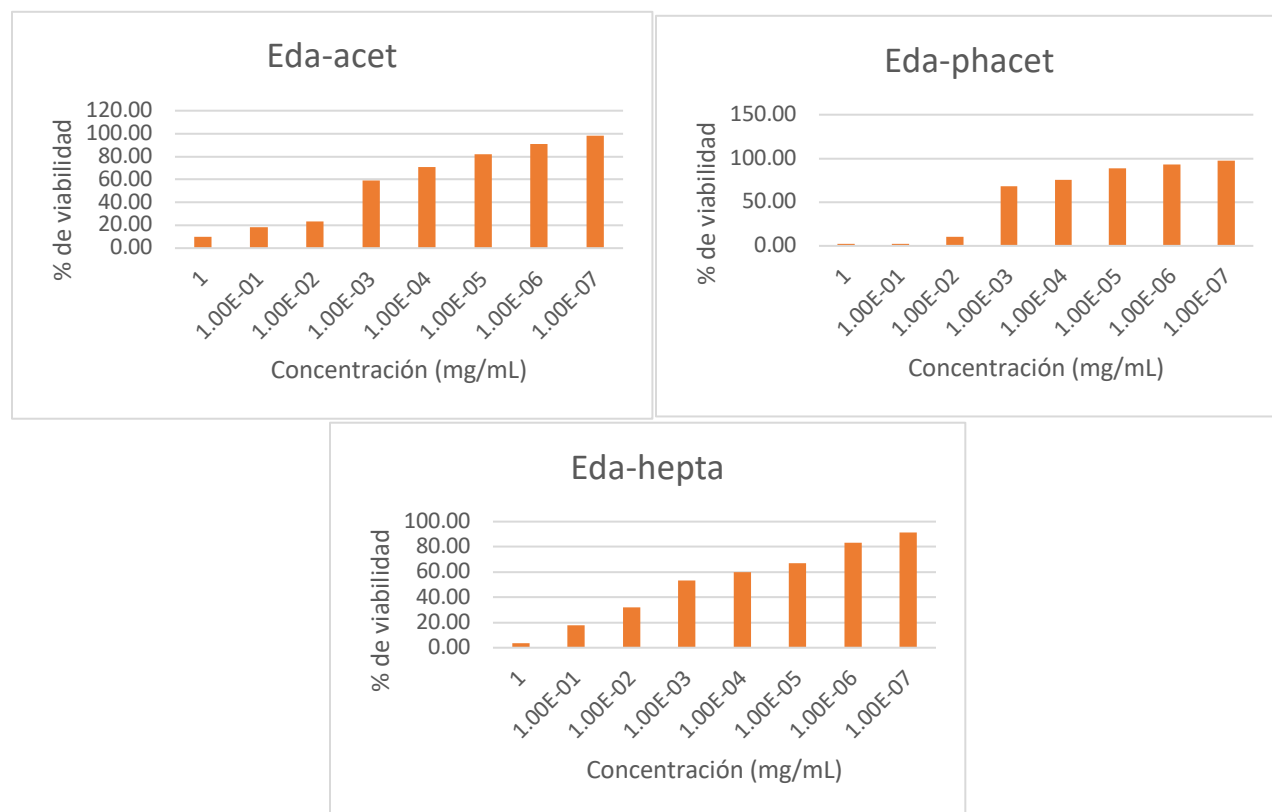
Los resultados de viabilidad celular fueron congregados en cuatro grupos diferentes con base en la concentración que se observó el 50% de viabilidad, estos grupos se muestran a continuación.

El primer grupo de gráficos son las moléculas las cuales el 50% de la viabilidad se encuentra entre la segunda y tercer concentración que corresponde a los intervalos de 1×10^{-1} y 1×10^{-2} mg/mL, donde en este grupo podemos observar que el precursor Edaravona y el producto sintético 6 etiquetado como Eda-valel, presentan los mejores resultados de viabilidad celular para la línea C2C12.

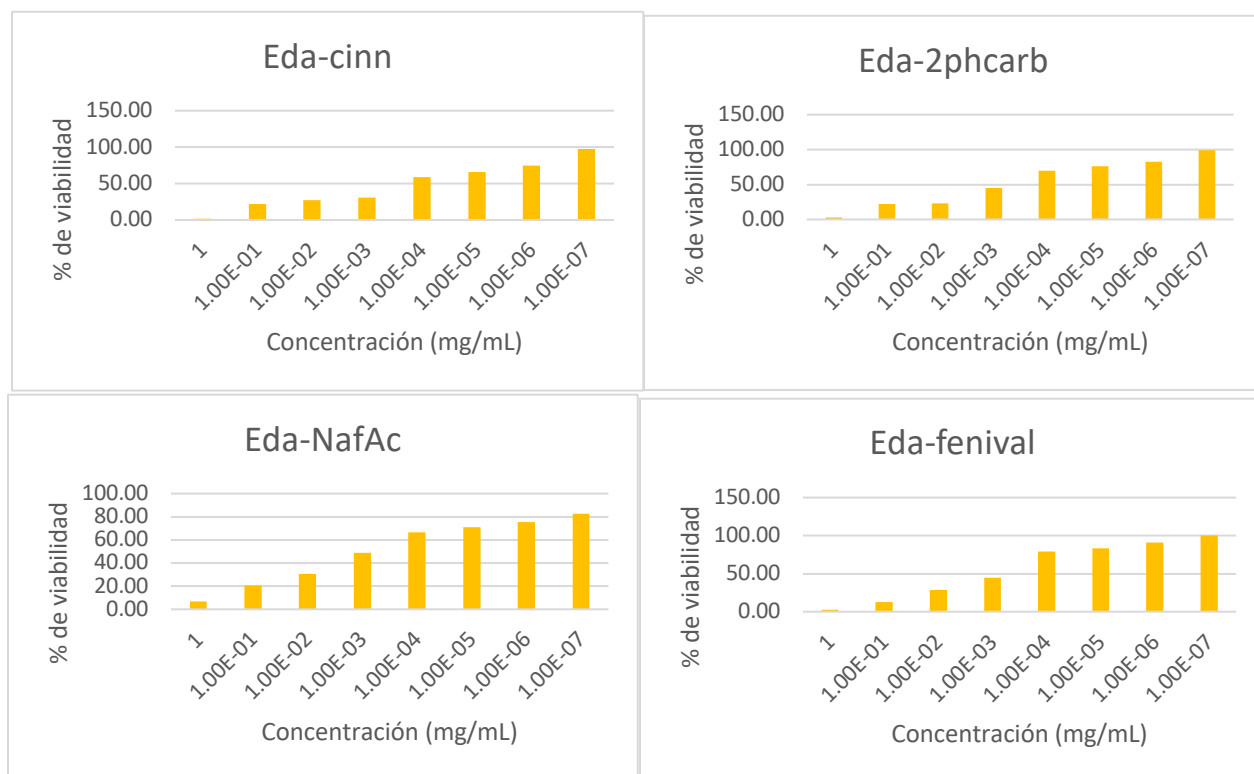


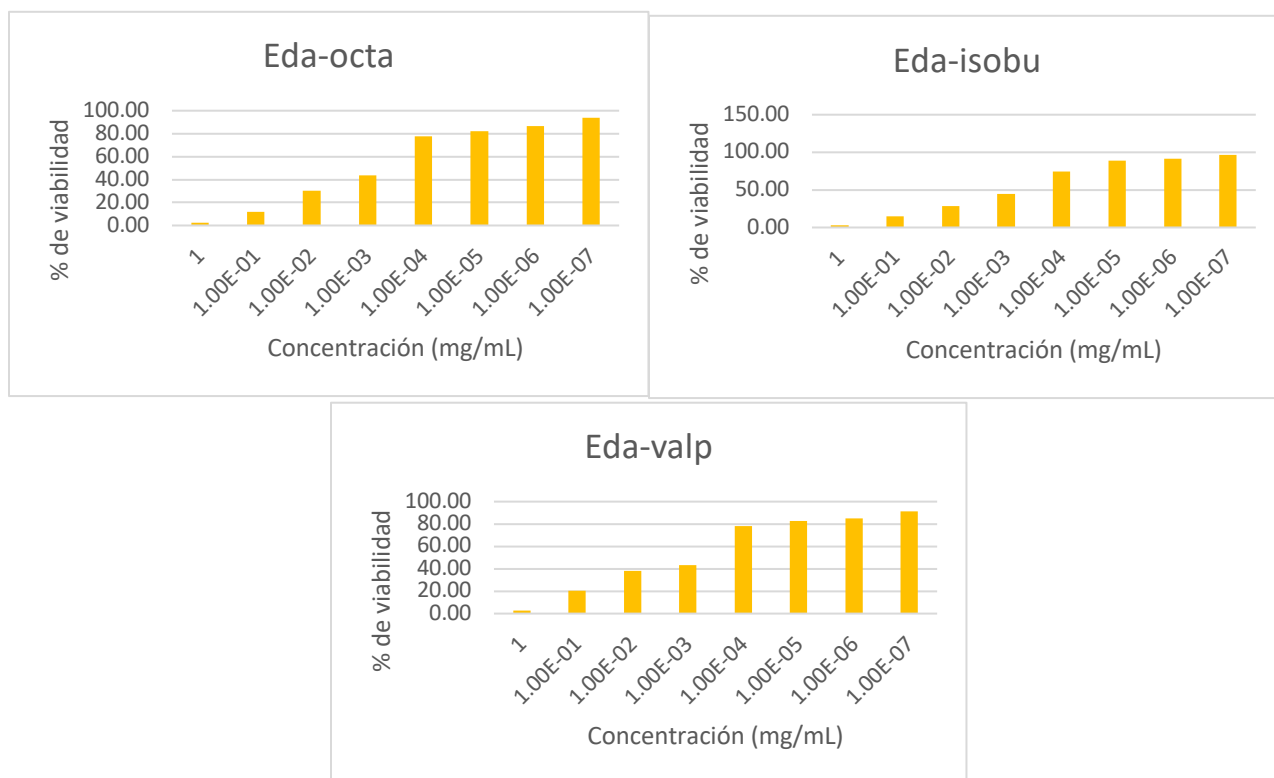
En el siguiente grupo de gráficos se observa que el 50% de la viabilidad celular se encuentra entre la tercer y cuarta concentración, que corresponde a 1×10^{-2} y 1×10^{-3} mg/mL. En este conjunto tenemos a los compuestos **7, 9, 11, 2, 5, 15** y **10**; que corresponden a los productos sintéticos Eda-DHA, Eda-prop, Eda-otolu, Eda-benz, Eda-acet, Eda-phacet y Eda-hepta.



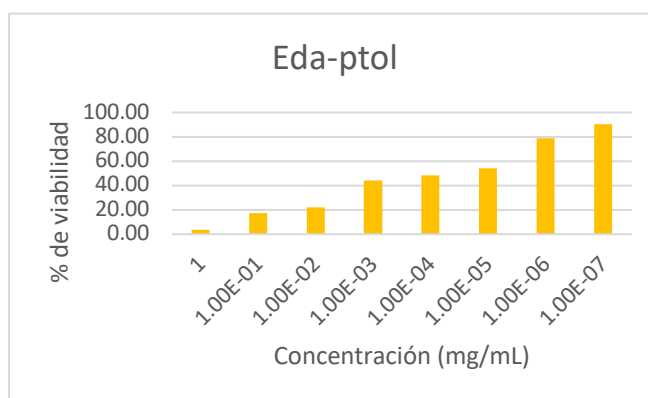


En la tercera serie de gráficos son los que el 50 % de viabilidad celular se encuentra entre la cuarta y quinta concentración, que corresponde a 1×10^{-3} y 1×10^{-4} mg/mL. Aquí se encuentran agrupados 7 productos sintéticos que corresponden a **16**, **14**, **12**, **17**, **13**, **8** y **3**; rotulados como Eda-naf, Eda-fenival, Eda-isobu, Eda-valp, Eda-Octa, Eda-2phcarb y Eda-cinn.





Finalmente, el último grupo conformado por una sola molécula correspondiente a **4** y es Eda-ptol, que la viabilidad celular del 50% se encuentra entre la quinta y sexta concentración, que corresponde a los intervalos de 1×10^{-4} y 1×10^{-5} mg/mL.



A la par de la obtención de los valores de viabilidad celular se pudo obtener los valores de la citotoxicidad celular. Los resultados de citotoxicidad celular son expresados como Ctx_{50} en mg/mL, este valor expresa la concentración requerida por una molécula para inducir la muerte celular a un 50%. Estos resultados podemos observarlos en la Tabla 27.

Tabla 27. Resultados de la actividad citotóxica frente a una línea celular no tumoral de fibroblasto de ratón.

	Compuestos	CTx50 (mg/mL)
	Edaravona	80.96 ± 0.98
2	Eda-Benz	6.33 ± 0.85
3	Eda-cinn	0.47 ± 0.04
4	Eda-Ptol	0.04 ± 0.39
5	Eda-acet	4.50 ± 2.60
6	Eda-val	48.55 ± 2.55
7	Eda-DHA	7.51 ± 3.78
8	Eda-2Phcarb	0.82 ± 0.04
9	Eda-prop	6.68 ± 1.01
10	Eda-hepta	3.80 ± 0.16
11	Eda-Otolu	6.34 ± 0.37
12	Eda-isobu	0.85 ± 0.02
13	Eda-octa	0.84 ± 0.25
14	Eda-fenival	0.86 ± 0.51
15	Eda-Phacet	4.27 ± 2.89
16	Eda-naf	0.93 ± 3.16
17	Eda-valp	0.84 ± 0.03

Aunque la síntesis de la Edaravona ya era conocida desde el siglo IXX, su aplicación en la medicina no fue sino hasta al final de 1980, por Abe y colaboradores como un agente terapéutico para el tratamiento del accidente cerebrovascular.⁹⁶ Ya en la actualidad el uso de esta molécula y sus derivados no solo se limita al tratamiento de este padecimiento sino que se ha extendido su aplicación a otros ámbitos de la medicina, con lo que se ha demostrado su amplia versatilidad. En concreto, estudios de la citotoxicidad de derivados sintéticos de Edaravona se enfocan principalmente en la parte terapéutica como en el caso del tratamiento del cáncer ⁹⁷ mientras que los estudios de citotoxicidad en líneas no tumorales son limitados.

6.8 Resultados del ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa

Los productos sintéticos fueron evaluados como inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, bajo el método de Ellman con modificaciones para este trabajo reportado por Adewusi y colaboradores,⁷⁴ donde se obtuvo los valores de importancia, la concentración inhibitoria del 50% (CI₅₀) a una concentración inferior a 150 µg/mL y un porcentaje de actividad inhibitoria a la concentración mencionada anteriormente (% de inh.). Para el caso del precursor Edaravona, el valor de CI₅₀ no fue posible debido a interferencia por color durante el ensayo. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 28, como compuesto de referencia para el ensayo se utilizó galantamina.

Tabla 28. Actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa de los productos sintetizados.

Compuesto		CI ₅₀ (< 150 µg/mL)	% de inh. (150 µg/mL)
2	Eda-benz	72.1 ± 4.7	31.6 ± 8.1
3	Eda-cinn	> 150	19.5 ± 4.7
4	Eda-Ptol	8.4 ± 1.7	41.9 ± 7.3
5	Eda-acet	> 150	20.7 ± 4.9
6	Eda-val	> 150	28.9 ± 8.6
7	Eda-DHA	> 150	ND
8	Eda-2Phcarb	> 150	23.9 ± 2.8
9	Eda-prop	> 150	25.8 ± 7.4
10	Eda-hepta	> 150	4.8 ± 1.0
11	Eda-Otolu	> 150	16.3 ± 3.3
12	Eda-isobu	> 150	3.0 ± 1.0
13	Eda-octa	> 150	1.7 ± 0.8
14	Eda-fenival	> 150	2.8 ± 1.8
15	Eda-Phacet	> 150	ND
16	Eda-naf	> 150	16.9 ± 1.8
17	Eda-valp	> 150	2.0 ± 1.2
Edaravona		ND	ND
Galantamina		0.574 ± 0.07	91.9 ± 0.82

Los productos sintetizados más activos fueron el **4** y **2**, con una Cl_{50} de 8.4 ± 1.7 y 72.1 ± 4.7 $\mu\text{g/mL}$, en el caso de **4** presentó porcentaje de actividad inhibitoria de $41.9 \pm 7.3\%$ y el producto **2** fue de $31.6 \pm 8.1\%$; el resto de productos la $Cl_{50} > 150$ $\mu\text{g/mL}$.

Para el caso de las moléculas que con los mejores valores de actividad presentan en su estructura un anillo aromático adyacente al carbonilo, donde el producto con mejor actividad que es el **4**, presenta un grupo metilo en posición *para*; En contraste, existe una molécula sintetizada que es el isómero del producto **4**, este es **11**, con un porcentaje de inhibición del $16.3 \pm 3.3\%$ sin embargo, la actividad se ve disminuida (poco más del 50%), esta molécula presenta la sustitución del grupo metilo en posición *orto*; por lo tanto, el cambio de posición puede ser responsable de la reducción de la actividad. Otro factor que puede intervenir en la disminución de la actividad es el aumento en el tamaño, como se observa en **8**, la molécula presenta dos anillos fenilo, unidos al nitrógeno de la cadena R, por lo cual la vuelve muy voluminosa y consecuentemente no facilita la correcta interacción con la enzima.

De los derivados con cadena R alifática que presentaron mejor actividad fueron **6**, **9** y **5** con valores de $28.9 \pm 8.6\%$, $25.8 \pm 7.4\%$ y $20.7 \pm 4.9\%$ respectivamente y en contraste los productos de cadena alifática que presentaron los valores más bajos fueron **12**, **17** y **13** con valores de $3.0 \pm 1.0\%$, $2.0 \pm 1.2\%$ y $1.7 \pm 0.8\%$; Estos resultados muestran que la mejor actividad está dada por la presencia de cadenas lineales cortas y esta se ve disminuida por la elongación de la cadena o ramificación de la misma.

Algo de destacar es que la presencia de un anillo aromático alejado del carbonilo incorporado por medio de una cadena alifática decrece la actividad como lo observamos en con **3**, **16** y **14**. En el caso de **3**, el anillo aromático se encuentra alejado a dos carbonos sin embargo, su actividad se mantiene probablemente a que existe un doble enlace, lo cual da cierta rigidez por lo tanto, esto favorece a la interacción con la enzima y esto se ve reflejado ya que mostró un valor de $19.5 \pm 4.7\%$; caso contrario a **16**, que aunque no es muy amplia la separación entre el anillo aromático y el carbonilo esta ligera flexibilidad se observó disminución de la actividad la cual fue de $16.9 \pm 1.8\%$. Y para el caso de **14**, su anillo

aromático está muy alejado del carbonilo, por lo tanto, existe mucha mayor flexibilidad con lo que se disminuye la interacción con la enzima, la cual fue solo del $2.8 \pm 1.8\%$.

6.9 Resultados del análisis *In silico*

En la actualidad el uso de métodos computacionales se ha convertido en una herramienta de gran importancia para la ciencia como lo es la química medicinal, ya que ha permitido que en un menor tiempo e inversión económica se pueda tener resultados aproximados para el diseño de nuevos fármacos así como sus interacciones con distintas dianas biológicas. Para este trabajo se realizó el análisis de *docking* molecular con tres dianas biológicas, la estructura de la enzima acetilcolinesterasa de *T. californica*, así como dos variantes del péptido β -amiloide (β A), las cuales son 25-35 y 1-42. Finalmente, se realizó la evaluación de las propiedades ADME (Administración, Distribución, Metabolismo y Excreción) de los distintos productos sintéticos para su futura evaluación *in vivo*.

6.9.1 Resultados de *docking* molecular de acetilcolinesterasa

Como fue descrito en este documento, la búsqueda de nuevas moléculas con actividad biológica es de suma importancia para la medicina. Con base en lo anterior, se seleccionó la estructura cristalográfica de AChE de torpedo del pacífico (tAChE) como modelo para relacionar los resultados obtenidos de la inhibición de esta enzima *in vitro* con los cálculos de *docking in silico* de los productos sintéticos derivados de edaravona.

Los resultados de las energías de unión de los análisis de *docking* se muestran en la Tabla 29 donde se muestran la energía de afinidad por el receptor así como su interacción por medio de enlaces de hidrógeno entre el ligando y el receptor.

Tabla 29. Resultados del análisis de docking molecular de los derivados sintéticos y su interacción con los residuos del receptor, 1EVE corresponde a la enzima AChE de *T. californica*.

Compuesto		Resultado <i>docking</i> (Kcal/mol) 1EVE	Residuos de interacción 1EVE
2	Eda-benz	-10.3	Ser200, His440
3	Eda-cinn	-10.1	Ser200
4	Eda-Ptol	-9.9	Ser200, His440
5	Eda-acet	-8.7	Ser122
6	Eda-val	-9.0	Ser122, π -W84
7	Eda-DHA	-14.0	-
8	Eda-2Phcarb	-8.9	Tyr70
9	Eda-prop	-8.8	Ser122
10	Eda-hepta	-7.8	Tyr121
11	Eda-Otolu	-11.1	Ser122
12	Eda-isobu	-8.5	Tyr121
13	Eda-octa	-8.4	Tyr121
14	Eda-fenival	-8.4	Tyr121
15	Eda-Phacet	-9.2	Ser200, His440
16	Eda-naf	-11.5	Ser122
17	Eda-valp	-8.0	Tyr121
Edaravona		-7.9	-
Galantamina		-9.3	Glu199, Ser200, His440

Los productos sintéticos analizados vía por *docking* molecular donde un valor más negativo representa una mejor afinidad en el complejo ligando-receptor. Como control se utilizó la estructura de galantamina, la cual mostró una afinidad de -9.3 Kcal/mol e interacción con los residuos Glu199, Ser200, His440. De los productos sintéticos, quienes mostraron una mejor afinidad por la diana y mostraron los valores de energía de unión más favorable con la enzima tAChE (acetilcolinesterasa de *T. californica*) fueron **7**, **16** y **11** con valores de afinidad de -14.0, -11.5 y -11.1 Kcal/mol y una interacción con los residuos en caso de 16 con Ser122 y 11 con Ser122; el producto 14 no mostró interacción con algún residuo. Los productos sintéticos que mostraron una menor afinidad fueron **13**, **14**, **17** y **10**, con lo que obtuvieron valores de -8.4, -8.0 y -7.8 Kcal/mol.

Como se describió en los resultados de inhibición enzimática *in vitro*, **16** y **11** mostraron un porcentaje de inhibición del 16% y estos bajo el análisis de *docking* molecular presentan

interacción con los residuos Ser122, por lo tanto, la afinidad con este residuo podría explicar una baja actividad inhibitoria; mientras que, **13**, **14**, **17** y **10** que presentaron los valores más bajos de actividad inhibitoria, la cual fue menor al 5% coinciden con la interacción con el residuo Tyr121, de igual manera los productos **12** y **14** presentan la misma interacción con lo que podría demostrar que la interacción con el mismo no favorece la actividad inhibitoria en el ensayo *in vitro*.

Dentro de los productos sintéticos que mostraron los mejores porcentajes de inhibición en el ensayo *in vitro* corresponden a **4** y **2**, estos al igual que galantamina presentan interacción con los residuos Ser202 e His440, lo que podría explicar por qué fueron los mejores valores en el ensayo de actividad inhibitoria, así como la no interacción con alguno de estos residuos decrece significativamente esta actividad como se observa con el compuesto **3**, el cual solo presenta afinidad con el residuo Ser200. Algo a destacar es observado en el producto **6**, el cual presentó un valor de actividad inhibitoria cercano a 29% y presenta una interacción con el residuo Ser122 al igual que los productos **5** y **9**, sin embargo, la ventaja que posee el producto **6** es poseer una interacción de tipo π con Trp84 por parte del anillo fenilo del pirazol lo que favoreció esta actividad, este efecto es descrito por Bartolucci y colaboradores (2010) lo cual las interacciones de tipo π - π favorecen la actividad inhibitoria así como la estabilidad de los compuestos sintéticos en el sistema ligando-receptor.⁹⁹

6.9.2 Resultados de *docking* molecular de β -amiloide

Actualmente no existe algún tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y solo las terapias disponibles se limitan al minimizar el deterioro progresivo del paciente. Como una de las características asociadas a este padecimiento se encuentra la pérdida masiva de neuronas colinérgicas asociada al depósito de cuerpos extracelulares conocidos como placas seniles formadas por agregados proteicos de β -amiloide (β A).⁶⁸ Como parte de las estrategias farmacológicas enfocadas en su tratamiento destacan el uso de moléculas pequeñas que su principal mecanismo de acción es inhibir el agregamiento de β A y así disminuir su neurotoxicidad.⁶³

Existen publicaciones referentes al uso de Edaravona con actividad múltiple frente a la EA, donde destaca la atenuación del estrés oxidativo y la neurotoxicidad¹⁰⁰ así como la inhibición de agregación de β A en ensayos *in vitro*.²⁴

Para este trabajo los productos sintéticos fueron evaluados mediante la técnica de *docking* molecular frente a dos dianas de β A conocida como la fracción 25-35 (β A 25-35) y 1-42(β A1-42).

Los resultados son mostrados en la Tabla 30, expresados como energía de unión entre ligando y receptor expresados en Kcal/mol así como la interacción de los ligando con el receptor fue de tipo enlace de hidrógeno.

Tabla 30. Resultados del análisis de docking molecular de los derivados sintéticos para A β .

Compuesto		Resultado β A 25-35 (Kcal/mol)	Residuos de interacción (enlace de hidrógeno)	Resultado β A 1-42 caja 1 (Kcal/mol)	Residuos de interacción (enlace de hidrógeno)	Resultado β A 1-42 caja 2 (Kcal/mol)	Residuos de interacción (enlace de hidrógeno)	Resultado β A 1-42 caja 3 (Kcal/mol)	Residuos de interacción (enlace de hidrógeno)
2	Eda-benz	-3.6	Ser26, Asn27	-5.5	Gln15	-5.1	Gln15	-4.3	
3	Eda-cinn	-3.8	Ser26, Asn27	-5.0	His6	-4.6	Gln15	-4.9	
4	Eda-Ptol	-4.1	Ser26, Asn27	-4.5	Gln15	-5.2	Gln15	-5.3	
5	Eda-acet	-3.8	Ser26, Asn27	-4.2	Gln15	-4.3	Gln15	-3.8	Lys16
6	Eda-val	-3.8	Ser26, Asn27	-4.6	Gln15	-4.5	Gln15	-3.9	
7	Eda-DHA	-5.7	Ser26	-5.4	Gln15	-5.7	Gln15	-6.4	
8	Eda-2Phcarb	-4.5	Asn27	-5.6	Gln15	-5.7	Gln15	-6.1	
9	Eda-prop	-3.7	Lys28	-4.4	Gln15	-4.4	Gln15	-4.2	
10	Eda-hepta	-3.5	Asn27	-4.5	Gln15	-3.8	Gln15	-4.5	
11	Eda-Otolu	-3.9	Asn27	-5.3	Gln15	-5.1	Gln15	-4.4	
12	Eda-isobu	-4.1	Lys28	-4.6	Gln15	-4.7	Gln15	-4.3	
13	Eda-octa	-3.4	Ser26, Asn27	-3.5	His6	-4.0	Gln15	-4.2	
14	Eda-fenival	-4.2	Ser26, Asn27	-5.8	Gln15, π Phe19	-5.1	Gln15	-4.9	Asn27
15	Eda-Phacet	-3.6	Ser26, Asn27	-5.6	Gln15, π Phe19	-5.7	Gln15, π Phe19	-4.2	
16	Eda-naf	-4.4	Ser26, Asn27	-5.4	Gln15, π Phe19	-5.5	Gln15, π Phe19	-4.8	
17	Eda-valp	-3.7	Lys28	-4.5	His6	-5.0	Gln15	-3.9	Asn27
Edaravona		-3.4	Ser26, Asn27	-4.5	Gln15	-4.6	Gln15	-3.9	Lys16

Los resultados de *docking* molecular para β A 25-35 muestran que el precursor sintético de los productos realizados para este trabajo posee un valor de -3.4 Kcal/mol así como la interacción con los residuos Ser26 y Asn27. Las moléculas que exhiben la mayor afinidad por el receptor son **7**, **8** y **16** con -5.7, -4.5 y -4.4 Kcal/mol. **7** presenta interacción con el residuo Ser26 **8** con Asn27 y **16** posee interacción con ambos residuos. Por lo contrario, los derivados sintéticos que poseen una menor afinidad son 2 y 15, con valores de -3.6 Kcal/mol, 10 y 13 con -3.5 y -3.4 Kcal/mol respectivamente; mientras que los residuos de interacción para **2**, **13** y **15** fueron Ser26 y Asn27, mientras que, en **10** solo presentó interacción solo con Asn27. El resto de productos sintéticos mostraron valores de afinidad similar así como la interacción con los residuos. 3, 5 y 6 mostraron valores de -3.8Kcal/mol así como la interacción con los residuos.

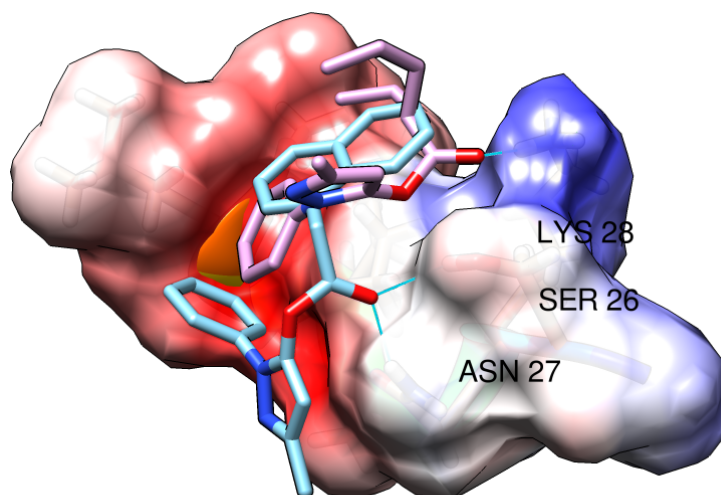
Los resultados de la evaluación *in silico* para el péptido A β 1-42, se obtuvieron al dividirlo en tres secciones, para la sección 1 que comprendió del residuo Asp1→Gln15, la sección 2 abarcó de Gln15→Lys28 y la sección 3 fue de Asn27→Ala42; con la finalidad de reconocer en que sección de péptido existe mayor interacción por parte de los productos sintéticos. Los resultados se describen a continuación.

El precursor sintético mostró los valores de afinidad por el receptor de -4.5, -4.6 y -3.9, de igual manera tuvo interacción con los residuos de aminoácido Gln15 y Lys16. En el caso de los productos sintéticos, quienes presentaron la mayor afinidad por el receptor fueron **14** con un valor de afinidad de -5.8, -5.1 y -4.9 Kcal/mol, de igual manera mostró interacción por los aminoácidos Gln15, Asn27 y una interacción de tipo π con Phe19; para la estructura **15** sus valores de afinidad fueron -5.6, -5.7 y -4.2 Kcal/mol, mientras que el producto 16 mostró valores de -5.4, -5.5 y -4.8 Kcal/mol, ambos productos tuvieron interacción por Gln15 y una interacción de tipo π con Phe19; el producto **8** presentó los valores de afinidad de -5.6, -5.7 y -6 Kcal/mol., mientras que **2** fueron -5.5, -5.1 y -4.3 Kcal/mol, ambos presentaron interacción con el residuo Gln5. El producto **7**, mostró los valores de -5.4, -5.7 y -6.4 Kcal/mol; el producto 11, con -5.3, -5.1 y -4.4 Kcal/mol, y la molécula 2 con valores de -5.5, -5.1 y -4.3 Kcal/mol, los tres productos mostraron interacción con Gln15. El producto **3**, con valores de -5.0, -4.6 y -4.6; 13, mostró valores de -3.5, -4.0 y -4.2 Kcal/mol y 17 con -4.5, -

5.0 y -3.9 Kcal/mol. Estos productos presentaron una interacción con el residuo His6 y Gln15, además para el producto **17** presentó una interacción con el residuo de Asn27. Los productos **6** y **12** mostraron afinidad solo por el residuo de Gln15; 6 mostró valores de afinidad de -4.6, -4.5 -3.9 Kcal/mol y 12 fueron de -4.6, -4.7 y -4.3Kcal/mol, al igual que las moléculas anteriores, **4** y **9** mostraron la misma afinidad por el residuo Gln15, 4 valores de -4.5, -5.2 y -5.3 Kcal/mol así como 9 fue de -4.4 y -4.2 Kcal/mol.

Los productos sintéticos mostraron una mayor afinidad por los residuos localizados entre las secciones **1** y **2**, donde interaccionaron con el aminoácido Gln15 además, solo 3 productos presentaron una interacción de tipo π con Phe19, y en menor medida con Hys6 y Asn27; solo el precursor y el producto 5 interaccionaron con el residuo Lys16. La sección 3 no fue un sitio de gran afinidad observada en el caso del péptido A β 1-42, caso contrario que con β A 25-35, donde prácticamente las estructuras mostraron afinidad por Ser27, Asn27 y en menor medida Lys28.

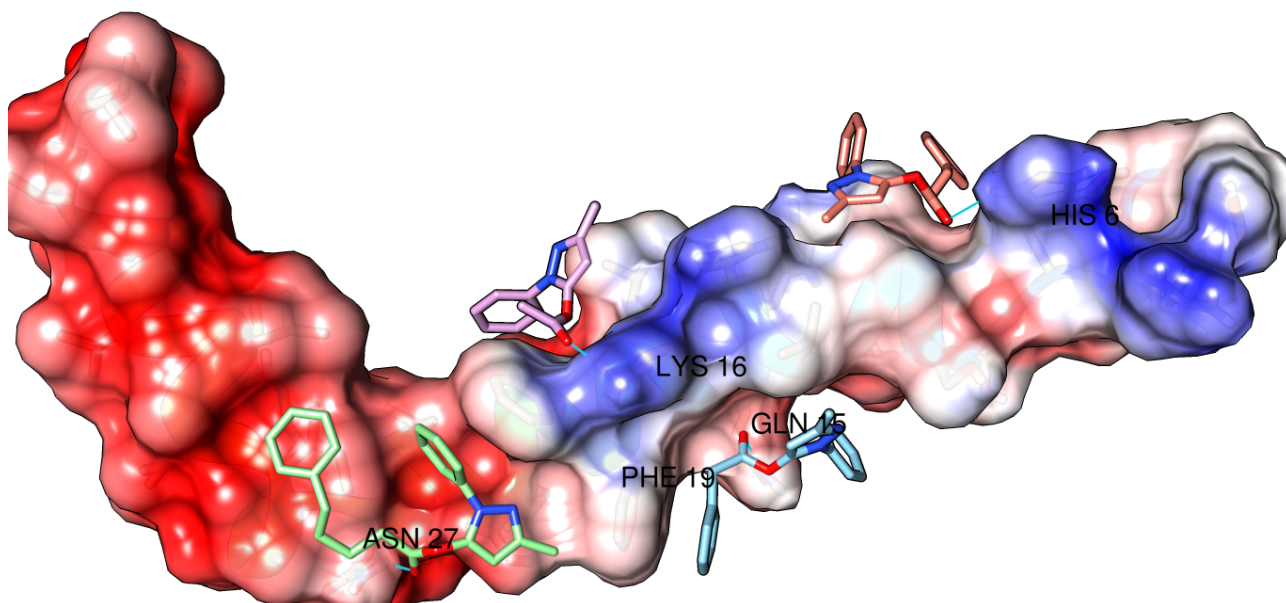
Se generó un mapa de potencial electrostático de los péptidos β A 25-35 y A β 1-42. Para β A 25-35, el receptor ofrece tres ventajas para favorecer la interacción con el mismo; Primero, el potencial electrostático del péptido forma tres regiones observables, una región de con carga tipo neutra, conformada por las cadena R de Ser26 y Asn27, la región electropositiva conformada por Gly25 y Lys28 y la región de carácter electronegativo conformada a partir de Gly29 hasta Met35. Segundo, en el caso de la interacción de los productos sintéticos con los residuos Ser26 y Asn27 presenta una zona con un potencial electrostático neutro, la disposición de los grupos R de los residuos favorece la formación de los enlaces de hidrógeno entre el ligando y el receptor, y en tercer lugar, la forma de la región adoptada entre los aminoácidos Ser26 y Asn27 favorece la interacción entre el ligando y el receptor; en la Figura 52 se observó estas características.



Esquema de colores: rojo potencial electronegativo; blanco potencial neutro; azul potencial electropositivo

Figura 52. Mapa de potencial electrostático de β A 25-35 e interacción con los ligando.

En A β 1-42 se observó de igual manera tres regiones, una región dominante de carga electronegativa distribuida por todo el péptido, la segunda ligeramente con carga neutra, distribuida de Asp1 a Phe20 y unos sitios con carga electropositiva distribuidos de Arg5, His6, His13, Lys16 y Lys28. Los productos fueron afines al residuo Gln15 debido a que la forma del sitio y la carga, es ligeramente neutra lo que favorece la formación de los enlaces de hidrógeno entre el carbonilo de los productos sintéticos y el residuo de aminoácido Gln15, además en el caso de los productos aromáticos que muestran una cadena alifática o ligera elongación se favorece la interacción de tipo π entre ligando y receptor. Algo a destacar es que el anillo fenilo de la pirazolinona puede formar una interacción de tipo π -catión con el mismo residuo Gln15 ya que posee una libre rotación. Dos productos presentaron interacción con el residuo His6 y Lys16, este sitio ofrece una ligera carga electropositiva, lo cual los productos sintéticos podrían formar enlaces de hidrógeno y finalmente, la interacción con Asn27 en el caso de A β 1-42 por la forma y la carga más electronegativa no favorece la formación de enlaces de hidrógeno a diferencia en β A 25-35, la cual es mucho menor la carga electronegativa. En la Figura 53 se ilustra estas características.



Esquema de colores: rojo potencial electronegativo; blanco potencial neutro; azul potencial electropositivo

Figura 53. Mapa de potencial electrostático de β A 1-42 e interacción con los ligando.

Como fue mencionado anteriormente, el uso de Edaravona reduce el estrés oxidativo ocasionado por A β y, la agregación de este mismo péptido, en ensayos *in vitro*, con lo observado en los resultados la mayoría de los productos sintéticos presenta una energía de unión con el receptor mayor que el precursor salvo 13 para β A 25-35 el cual es igual que el precursor y 5 en β A 1-42 posee menor energía de interacción. El análisis de *docking* molecular sugiere que los productos sintéticos presentan bajos valores de afinidad en contraste con otro análisis de interacción entre ligando-receptor mostrado en este trabajo por lo tanto, la manera de corroborar esta actividad es a través de un análisis *in vitro* de antiagregamiento de β A.

6.9.3 Resultados de la evaluación *in silico* de los parámetros ADME

La evaluación *in silico* para las propiedades ADME de los productos sintéticos fue realizada con el uso del servidor del Instituto Suizo de Bioinformática (en inglés, *Swiss Institute of Bioinformatics*), este servidor web permitió calcular descriptores fisicoquímicos, así como los parámetros ADME e interacciones con otras dianas de interés biológico. Los resultados de esta evaluación son mostrados en la Tabla 31.

Todos los productos sintéticos poseen un área de superficie polar topológica (TPSA en inglés, *Topological Polar Surface Area*) dentro de los parámetros sugeridos para una buena biodisponibilidad, el cual se encuentra entre 20-130 Å², valor descrito por Daina y colaboradores.¹⁰¹ El único producto que posee el TPSA ligeramente elevado comparado con los otros compuestos pero aún dentro del rango calculado es el producto **8** con 47.36 Å².

La siguiente propiedad a destacar el consenso Log *P*, el cual es obtenido por medio del promedio de distintos parámetros del cálculo del coeficiente de reparto octanol/agua (log *P_{o/w}*). 10 de los productos sintetizados presentan un coeficiente de reparto comprendido entre los intervalos 2.21 a 3.95, cinco de las moléculas sintetizadas se encuentran en los intervalos 4.16 a 4.46 y solo el compuesto **7** posee un coeficiente de reparto elevado, el cual es de 6.35. Ghose y colaboradores, describe un rango Log *P* que comprende entre -0.4 y +5.6 para una buena biodisponibilidad;¹⁰² por lo tanto, solo el compuesto **7** excede este parámetro, el resto de productos se mantiene dentro de este rango.

La tercera propiedad descrita es el valor ESOL Log *S* y la clase ESOL,¹⁰³ correspondiente a la solubilidad en agua estimada y a la clase de solubilidad a la que pertenece, estos valores, donde un valor más cercano a cero se considera altamente soluble, mientras que este valor se vuelve más negativo decae la solubilidad hasta ser prácticamente insoluble en agua. En el Esquema 8 se resume esta propiedad.

Insoluble < -10 < Pobremente < -6 < Moderadamente < -4 < soluble < -2 muy < 0 < altamente soluble

Esquema 8. Valores de solubilidad descrito por el modelo ESOL Log S.

Los productos **5, 6, 9,12** se consideran bajo este modelo como solubles, mientras que los productos **2,3,4,8,10,11** y **13 a 17** son moderadamente solubles y el producto **7** es considerado como pobremente soluble.

El siguiente consenso de propiedades farmacocinéticas es la absorción gastrointestinal (GI), la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) y la susceptibilidad a ser sustrato de la glucoproteína P (gp-P). Aunque la mayoría de los productos sintéticos poseen una moderada y uno de ellos una pobre solubilidad en agua, se predice que todos salvo **7**, tienen una alta absorción gastrointestinal, de igual manera la mayoría de los productos parecen presentar la capacidad de penetrar la barrera hematoencefálica y solo uno de ellos predictivamente es sustrato para glucoproteína P, el cual es el producto **7**.

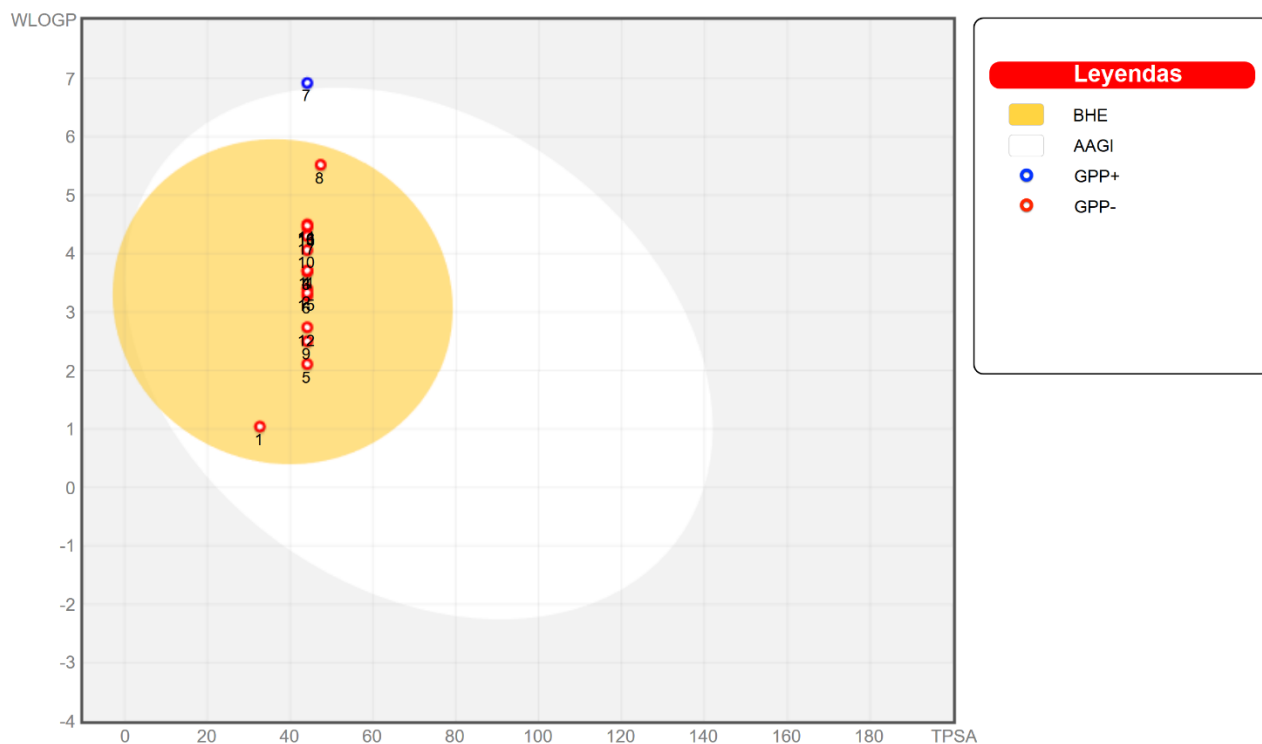
Los resultados del análisis SwissADME muestra también la interacción con un grupo especial de dianas biológicas, las cuales son los citocromo P450, esta superfamilia de isoenzimas juegan un papel fundamental en el metabolismo de diversas sustancias endógenas y exógenas como los fármacos a través del proceso de biotransformación. El servidor proporciona una serie de cinco isoformas de CYP450 las cuales se tiene documentado por literatura que un numeroso grupo de moléculas con fin terapéutico poseen alguna interacción sobre estas enzimas, las cuales son CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 y CYP3A4; lo cual la inhibición de estas isoenzimas son la causa de las interacciones farmacológicas¹⁰¹. Las dianas que resultaron ser más inhibidas por los ligando son CYP1A2, CYP2C19 y CYP2C9. El producto que no presentó actividad inhibitoria en CYP1A2 y CYP2C19 fue el rotulado como **7**, el resto de moléculas mostró una potencial actividad sobre esta diana biológica. En el caso de CYP2C9 los productos que predictivamente no presentaron inhibición sobre esta misma fueron **5** y **9**. El siguiente grupo de isoenzimas CYP450 en mostrar la menor afinidad inhibitoria por los productos sintéticos fueron CYP2D6 y CYP3A4, donde solo el producto **7** presentó actividad inhibitoria predictiva.

La última propiedad obtenida a través del servidor SwissADME es el algoritmo de la “regla de 5” de Lipinski, quien fue pionero en la exploración de la relación entre los parámetros

farmacocinéticos y fisicoquímicos que determinan si alguna molécula con objetivo farmacológico es apta para dicho fin¹⁰⁴. Quince de los dieciséis Los productos sintéticos evaluados por la “regla de 5” de Lipinski (cuyos parámetros evaluados son el peso molecular, el MLog *P*, así como el número de donantes y aceptores de enlace de H) respetan los parámetros establecidos; solo los productos que presentan alguna violación son el **7, 8, 14 y 16**. Esta violación está relacionada con el MLog *P*, el cual es alto y los convierte en productos de naturaleza lipofílica. Sin embargo, no descarta su posible uso como una molécula terapéutica.

Finalmente, como un complemento al estudio computacional en el Gráfico 4 se muestra el gráfico “*BOILED-egg*” el cual muestra de manera visual el rango de la absorción gastrointestinal, así como la permeabilidad de la barrera hematoencefálica¹⁰⁵.

- Los puntos ubicados en la región de la yema de en el gráfico “*BOILED-egg*” son moléculas que se predice que difundirán de manera pasiva a través de la barrera hematoencefálica.
- Los puntos ubicados en la región de la clara del gráfico “*BOILED-egg*” son moléculas que se predice que serán absorbidas pasivamente por el tracto gastrointestinal.
- Los puntos azules corresponden a las moléculas que se prevé que serán expulsadas del sistema nervioso central por la glucoproteína P.
- Los puntos rojos corresponden a las moléculas que se predice que no serán expulsadas del sistema nervioso central por la glucoproteína P.



Siglas; **BHE**: barrera hematoencefálica, **AAGI**: alta absorción gastrointestinal, **GPP**: glucoproteína P

Gráfico 4. Gráfico "BOILED-egg" que ilustra la permeabilidad del tracto gastrointestinal y la barrera hematoencefálica.

Los resultado de manera resumida nos muestran que la mayoría de las moléculas pueden ser absorbidas por GI y ser permeables por la BHE, además solo una, la cual es **7**, predictivamente no podrá atravesar la BHE y será susceptible a ser expulsada por glucoproteína P, el resto se mantendrán dentro del sistema nervioso central, con lo que permite considerar a los compuestos como prometedores fármacos y subsecuentemente la posible evaluación *in vivo*.

Tabla 31. Cálculos de farmacocinética y e interacción con dianas biológicas de interés realizados por SwissADME.

Compuesto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
PM (g/mol)	174.2	278.31	304.34	292.33	216.24	258.32	456.62	369.42	230.26	286.37	292.33	244.29	300.4	334.41	292.33	342.39	300.4
# de aceptor de enlace-H	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
# de donador de enlace-H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TPSA (Å²)	32.67	44.12	44.12	44.12	44.12	44.12	44.12	47.36	44.12	44.12	44.12	44.12	44.12	44.12	44.12	44.12	44.12
Consenso Log P	1.64	3.39	3.72	3.72	2.21	3.23	6.35	4.46	2.53	3.95	3.67	2.86	4.32	4.36	3.4	4.34	4.16
ESOL Log S	-2	-4.45	-4.75	-4.73	-2.99	-3.84	-7.37	-5.81	-3.28	-4.52	-4.73	-3.7	-4.86	-5.15	-4.4	-5.52	-4.83
ESOL Class	MS	Mod.S	Mod.S	Mod.S	S	S	PS	Mod.S	S	Mod.S	Mod.S	S	Mod.S	Mod.S	Mod.S	Mod.S	Mod.S
Absorción GI	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Baja	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Permeabilidad a BHE	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Sustrato de gp-P	No	No	No	No	No	No	Sí	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Inhibidor de CYP1A2	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Inhibidor de CYP2C19	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Inhibidor de CYP2C9	No	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Inhibidor de CYP2D6	No	No	No	No	No	No	Sí	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Inhibidor de CYP3A4	No	No	No	No	No	No	Sí	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
# de violación de Lipinski	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0

Siglas; **MS**: muy soluble, **S**: soluble, **Mod.S**: moderadamente soluble, **PS**: poco soluble

CONCLUSIONES

VII Conclusiones

Durante el desarrollo de este trabajo se abordó tres temáticas, la primer parte fue una aproximación al conocimiento de los distintos metabolitos presentes en el extracto etanólico de la planta *Abronia maritima* y una segunda parte enfocada en la síntesis de productos con actividad antioxidante y la propuesta de un antigregario de β -amiloide. Finalmente, se realizó la evaluación *in silico* de los productos sintéticos. Con lo que se establecieron las siguientes conclusiones:

1. Con la partición del extracto crudo de *A. maritima* se obtuvieron los extractos de *n*-hexano, DCM, *n*-BuOH y acuoso, con rendimientos del 9, 5, 13 y 73 % respectivamente.
2. El resultado del tamizaje fitoquímico del extracto crudo y sus particiones, indicó la presencia de alcaloides y glucósidos antraquinónicos en todos ellos, solo el extracto de DCM presentó el mayor número de resultados positivos, lo que sugiere que los metabolitos mayoritarios de *A. maritima* son de polaridad media.
3. En la evaluación antioxidante con la técnica de DPPH, el extracto de DCM mostró un mejor efecto antirradicalario con una $CE_{50} = 0.120$ mg/mL; en ABTS el extracto crudo presentó una mayor actividad frente a este radical catiónico ($CE_{50} = 1.047$ mg/mL), y en β -caroteno, la partición hexánica tuvo el mejor perfil de inhibición oxidativa con un 67 %.
4. Se obtuvieron 16 derivados sintéticos mediante reacciones de O-acilación del enolato generado a partir del 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona. Los rendimientos de estos productos oscilaron entre el 45 y 99 % y todos fueron caracterizados por espectroscopia infrarroja, RMN de 1H , ^{13}C y espectrometría de masas.

5. La evaluación antioxidante de los derivados sintéticos indicó que el compuesto Edaval presenta una mejor acción antirradicalaria frente a los radicales DPPH y ABTS. Estos resultados sugieren que la cadena alifática del grupo éster puede favorecer la actividad de estos productos comparados con aquellos que tienen un fragmento aromático.
6. Se requieren de un mayor número de elementos estructurales para poder explicar apropiadamente la toxicidad de los componentes evaluados, sin embargo, los compuestos que presentaron una menor concentración en este estudio, son los derivados **4** y **3** que corresponden a Eda-Ptol con una CT_{X50} de 0.04 ± 0.39 mg/mL y Eda-cinn con 0.47 mg/mL.
7. Los estudios de *docking* muestran una mejor interacción de los compuestos sintetizados con la enzima acetilcolinesterasa, que la obtenida con los agregados proteicos de β -amiloide, por lo que futuros estudios de nuevos compuestos podrían explorarse *in vitro* e *in vivo* sobre AChE como posible mecanismo de acción.
8. La predicción *in silico* demuestra que los compuestos pueden atravesar la barrera hematoencefálica y no ser expulsados por la glucoproteína-P por lo que se tiene un perfil prometedor como agentes anti agregamiento en la enfermedad de Alzheimer.

REFERENCIAS

VIII Referencias

- (1) Hamilton, A.C., Pei Shengji, Kessy, J., Khan, Ashiq A., Lagos-Witte, S. and Shinwari, Z. K. (2003) The Purposes and Teaching of Applied Ethnobotany. *Econ. Bot.* Martin Wal. WWF, Godalming.
- (2) Selin, H. (Ed.). (2008) Encyclopedia of the History of Science, Technology, and Medicine in Non-Western Cultures. Springer, New York.
- (3) Halberstein, R. A. (2005) Medicinal plants: Historical and cross-cultural usage patterns. *Ann. Epidemiol.* 15, 686-699.
- (4) Córdova-Gerrero, I. (2006) Estudio fitoquímico de *Salvia pachyphylla* y *S. clevelandii*. Aproximación sintética de diterpenos y sus derivados: Evaluación de actividades biológicas. Universidad de la laguna Instituto Universitario de bio-orgánica «Antonio González» Departamento de química orgánica.
- (5) Tecanhuey-Fernández, L. R. (2005) Estudio Fitoquímico de *Ipomoea murucoides*. Universidad de las Américas Puebla, Escuela de Ciencias, Departamento de Química y Biología.
- (6) Gurib-Fakim, A. (2006) Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med.* 27, 1-93.
- (7) Narayanaswamy, V. (1981) Origin and development of ayurveda: (a brief history). *Anc. Sci Life.* 1, 1-7.
- (8) Palmer, J. D., Soltis, D. E., y Chase, M. W. (2004) the Plant Tree of Life: an Overview and Some Points of View. *Am. J. Bot.* 91, 1437-1445.
- (9) Chapman, A. D. (2009) Numbers of Living Species in Australia and the World. *Heritage*.
- (10) Chase, M. W., Fay, M. F., Reveal, J. L., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Peter, F., Anderberg, A. A., Moore, M. J., Olmstead, R. G., Rudall, P. J., y Kenneth, J. (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.* 161, 105-121.
- (11) Stevens, P. (2016) ANGIOSPERM PHYLOGENY WEBSITE, version 12. *Angiosperm Phylogeny Website. Version 12*.
- (12) Tropicos.org. (2016) Flora of Nicaragua. *Missouri Bot. Gard.*
- (13) Douglas, N., y Spellenberg, R. (2010) A new tribal classification of Nyctaginaceae.

Taxon 59, 905-910.

(14) Wollenweber, E., y Dörr, M. (1996) Exudate Flavonoids from Aerial Parts of *Mirabilis viscosa* (Nyctaginaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 24, 799.

(15) Yang, S. W., Ubillas, R., McAlpine, J., Stafford, A., Ecker, D. M., Kelly Talbot, M., y Rogers, B. (2001) Three new phenolic compounds from a manipulated plant cell culture, *Mirabilis jalapa*. *J. Nat. Prod.* 64, 313-317.

(16) Borrelli, F., Ascione, V., Capasso, R., Izzo, A. A., Fattorusso, E., y Taglialatela-Scafati, O. (2006) Spasmolytic effects of nonprenylated rotenoid constituents of *Boerhaavia diffusa* roots. *J. Nat. Prod.* 69, 903-906.

(17) Ahmed-Belkacem, A., Macalou, S., Borrelli, F., Capasso, R., Fattorusso, E., Taglialatela-Scafati, O., y Di Pietro, A. (2007) Nonprenylated rotenoids, a new class of potent breast cancer resistance protein inhibitors. *J. Med. Chem.* 50, 1933-1938.

(18) Bairwa, K., Singh, I. N., Roy, S. K., Grover, J., Srivastava, A., y Jachak, S. M. (2013) Rotenoids from *boerhaavia diffusa* as potential anti-inflammatory agents. *J. Nat. Prod.* 76, 1393-1398.

(19) Wu, M. C., Peng, C. F., Chen, I. S., y Tsai, I. L. (2011) Antitubercular chromones and flavonoids from *Pisonia aculeata*. *J. Nat. Prod.* 74, 976-982.

(20) Do, L. T. M., Aree, T., Siripong, P., Pham, T. N. K., Nguyen, P. K. P., y Tip-pyang, S. (2016) Bougainvinones A–H, Peltogynoids from the Stem Bark of Purple *Bougainvillea spectabilis* and Their Cytotoxic Activity. *J. Nat. Prod.* 3, acs.jnatprod.5b00996.

(21) Starks, C. M., Williams, R. B., Norman, V. L., Lawrence, J. A., Goering, M. G., O'Neil-Johnson, M., Hu, J. F., Rice, S. M., y Eldridge, G. R. (2011) Abronione, a rotenoid from the desert annual *Abronia villosa*. *Phytochem. Lett.* 4, 72-74.

(22) Park, S. H., Yang, E. J., Kim, S. I., y Song, K. S. (2014) β -Secretase (BACE1)-inhibiting C-methylrotenoids from *Abronia nana* suspension cultures. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 24, 2945-2948.

(23) Devasagayam, T. P. A., Tilak, J., Boloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., y Lele, R. D. (2004) Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 52, 794-804.

(24) Jiao, S.-S., Yao, X.-Q., Liu, Y.-H., Wang, Q.-H., Zeng, F., Lu, J.-J., Liu, J., Zhu, C., Shen, L.-L., Liu, C.-H., Wang, Y.-R., Zeng, G.-H., Parikh, A., Chen, J., Liang, C.-R., Xiang,

- Y., Bu, X.-L., Deng, J., Li, J., Xu, J., Zeng, Y.-Q., Xu, X., Xu, H.-W., Zhong, J.-H., Zhou, H.-D., Zhou, X.-F., y Wang, Y.-J. (2015) Edaravone alleviates Alzheimer's disease-type pathologies and cognitive deficits. *PNAS* 112, 5225-5230.
- (25) Pham-Huy, L. A., He, H., y Pham-Huy, C. (2008) Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* 4, 89-96.
- (26) Pal, S., Mareddy, J., y Devi, N. S. (2008) High speed synthesis of pyrazolones using microwave-assisted neat reaction technology. *J. Braz. Chem. Soc.* 19, 1207-1214.
- (27) Higashi, Y., Jitsuiki, D., Chayama, K., y Yoshizumi, M. (2006) Edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one), a novel free radical scavenger, for treatment of cardiovascular diseases. *Recent Pat. Cardiovasc. Drug Discov.* 1, 85-93.
- (28) Watanabe, T., Tahara, M., y Todo, S. (2008) The novel antioxidant edaravone: From bench to bedside. *Cardiovasc. Ther.* 26, 101-114.
- (29) Pérez-González, A., y Galano, A. (2012) On the outstanding antioxidant capacity of edaravone derivatives through single electron transfer reactions. *J. Phys. Chem. B* 116, 1180-1188.
- (30) Knorr, L. (1883) Einwirkung von Acetessigester auf Hydra-zinchinin derivative. *Chem. Ber.* 3, 546-552.
- (31) Cohen, J. B. (1920) A class-book of organic chemistry.
- (32) Marković, V., Erić, S., Juranić, Z. D., Stanojković, T., Joksović, L., Ranković, B., Kosanić, M., y Joksović, M. D. (2011) Synthesis, antitumor activity and QSAR studies of some 4-aminomethylidene derivatives of edaravone. *Bioorg. Chem.* 39, 18-27.
- (33) Stolz, F. (1897) Zur Constitution der Saeurederivate des 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolons. *J. Prakt. Chem.* 55, 145-171.
- (34) Kurteva, V. B., y Petrova, M. A. (2015) Synthesis of 3-Methyl-4-(4-methylbenzoyl)-1-phenyl-pyrazol-5-one: How To Avoid O-Acylation. *J. Chem. Educ.* 92, 382-384.
- (35) Jensen, B. S. (1959) The Synthesis of 1-Phenyl-3-methyl-4-acyl-pyrazolones-5. *Acta Chem. Scand.*
- (36) Jensen, B. S., Sörensen, N. A., y Jensen, C. E. (1959) Solvent Extraction of Metal Chelates. II. An Investigation of some 1-Phenyl-3-methyl-4-acyl-pyrazolones-5. *Acta Chem. Scand.*
- (37) Menzel, E. R., Lorenz, D. R., Wasson, J. R., Nc, C. H., West, C., y Wv, M. (1976)

Spectral and magnetic properties of oxovanadium (IV) chelates with 4-benzoyl-3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one. *J. inorg. nucl. Chem* 38, 993-996.

(38) King, J. N., y Fritz, J. S. (1988) Synthesis, characterization, and analytical applications of 1, 3-dimethyl-4-acetyl-2-pyrazolin-5-one 207, 137-147.

(39) Fan, X., Zhang, X., Zhou, L., Keith, K. A., Kern, E. R., y Torrence, P. F. (2006) A pyrimidine-pyrazolone nucleoside chimera with potent in vitro anti-orthopoxvirus activity. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 16, 3224-3228.

(40) Kimata, A., Nakagawa, H., Ohyama, R., Fukuuchi, T., Ohta, S., Suzuki, T., y Miyata, N. (2007) New Series of Antiprion Compounds: \thinspace Pyrazolone Derivatives Have the Potent Activity of Inhibiting Protease-Resistant Prion Protein Accumulation. *J. Med. Chem.* 50, 5053-5056.

(41) Castagnolo, D., Manetti, F., Radi, M., Bechi, B., Pagano, M., De Logu, A., Meleddu, R., Saddi, M., y Botta, M. (2008) Synthesis, biological evaluation, and SAR study of novel pyrazole analogues as inhibitors of Mycobacterium tuberculosis. *Bioorganic Med. Chem.* 17, 5716-5721.

(42) Castagnolo, D., Manetti, F., Radi, M., Bechi, B., Pagano, M., De Logu, A., Meleddu, R., Saddi, M., y Botta, M. (2009) Synthesis, biological evaluation, and SAR study of novel pyrazole analogues as inhibitors of Mycobacterium tuberculosis: Part 2. Synthesis of rigid pyrazolones. *Bioorganic Med. Chem.* 17, 5716-5721.

(43) Sujatha, K., Shanthi, G., Selvam, N. P., Manoharan, S., Perumal, P. T., y Rajendran, M. (2009) Synthesis and antiviral activity of 4,4'-(arylmethylene)bis(1H-pyrazol-5-ols) against peste des petits ruminant virus (PPRV). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 4501-4503.

(44) Antre, R. V., Cendilkumar, A., Goli, D., Andhale, G. S., y Oswal, R. J. (2011) Microwave assisted synthesis of novel pyrazolone derivatives attached to a pyrimidine moiety and evaluation of their anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities. *Saudi Pharm. J.* 19, 233-243.

(45) Bai, Y., Lu, J., Gan, H., y Wang, Z. (2002) Rapid microwave-enhanced synthesis of 1-phenyl-3-methyl-5-Acyloxypyrazoles under solvent-free conditions. *Synth. Commun.* 32, 2549-2553.

(46) Maruoka, H., Yamagata, K., Okabe, F., y Tomioka, Y. (2006) Synthesis of 1-acyl-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-ones via Lewis acid-mediated rearrangement of 3-acyloxypyrazoles.

J. Heterocycl. Chem. 43, 859-865.

(47) Holzgrave, U., Kapková, P., Alptüzün, V., Scheiber, J., y Kugelmann, E. (2007)

Targeting acetylcholinesterase to treat neurodegeneration. *Expert Opin. Ther. Targets* 11, 161-179.

(48) Wiesner, J., Kříž, Z., Kuča, K., Jun, D., y Koča, J. (2007) Acetylcholinesterases – the structural similarities and differences. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 22, 417-424.

(49) Quinn, D. M. (1987) Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics, and Virtual Transition States. *Chem. Rev.* 87, 955-979.

(50) Taylor, P., y Radić, Z. (1994) The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34, 281-320.

(51) Brown, G. L., Dale, H. H., y Feldberg, W. (1936) Reactions of the normal mammalian muscle to acetylcholine and to eserine. *J. Physiol.* 87, 394-424.

(52) Leuzinger, W., y Baker, A. L. (1966) ACETYLCHOLINESTERASE, I. LARGE-SCALE PURIFICATION, HOMOGENEITY, AND AMINO ACID ANALYSIS*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57, 446-451.

(53) Rothenberg, M., y Nachmansohn, D. (1947) Studies on cholinesterase* III. purification of the enzyme from electric tissue by fractional ammonium sulfate precipitation. *J. Biol. Chem.* 168, 223-231.

(54) Chothia, C., y Leuzinger, W. (1975) Acetylcholinesterase: The structure of crystals of a globular form from electric eel. *J. Mol. Biol.* 97, 55-60.

(55) Schrag, J. D., Schmid, M. F., Morgan, D. G., Phillips, G. N., Chiu, W., y Tang, L. (1987) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of 11 S acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* 263, 9795-9800.

(56) Sussman, J., M. H., Frolov, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., y Silman, I. (1991) Atomic Structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A Prototypic Acetylcholine-Binding Protein. *Science* (80-.). 253, 872-879.

(57) Harel, M., Schalk, I., Ehret-Sabatier, L., Bouet, F., Goeldner, M., Hirth, C., Axelsen, P. H., Silman, I., y Sussman, J. L. (1993) Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 9031-9035.

(58) Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D., y Soreq, H. (1999) Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur. J. Biochem.* 264, 672-686.

- (59) Giles, K. (2002) AChE - Review.
- (60) Silman, I., y Sussman, J. L. (2008) Acetylcholinesterase: How is structure related to function? *Chem. Biol. Interact.* 175, 3-10.
- (61) Pohanka, M. (2012) Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008 – present). *Expert. Opin. Ther. Pat.* 22, 871-886.
- (62) Xu, Y., Colletier, J. P., Weik, M., Jiang, H., Moulton, J., Silman, I., y Sussman, J. L. (2008) Flexibility of Aromatic Residues in the Active-Site Gorge of Acetylcholinesterase: X-ray versus Molecular Dynamics. *Biophys. J.* 95, 2500-2511.
- (63) Nie, Q., Du, X., y Geng, M. (2011) Small molecule inhibitors of amyloid β peptide aggregation as a potential therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Acta Pharmacol. Sin.* 32, 545-551.
- (64) Hamley, I. W. (2012) The amyloid beta peptide: A chemist's perspective. role in Alzheimer's and fibrillization. *Chem. Rev.* 112, 5147-5192.
- (65) Manzano-León, N., y Mas-Oliva, J. (2006) Estrés oxidativo, péptido β -amiloide y enfermedad de Alzheimer. *Gac. Méd. Méx.* 142, 229-238.
- (66) Estrada Rodríguez, A. E., y Zomosa Signoret, V. C. (2017) Papel de la agregación del péptido Beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer. *REB* 36, 2-11.
- (67) Zheng, H., y Koo, E. H. (2006) The amyloid precursor protein: Beyond amyloid. *Mol. Neurodegener.* 1, 1-12.
- (68) Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H. A., y Herms, J. (2006) Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J. Neurosci. Res.* 26, 7212-7221.
- (69) Moir, R. D., Lathe, R., y Tanzi, R. E. (2018) The antimicrobial protection hypothesis of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* 14, 1602-1614.
- (70) Yoshikai S, Sasaki H, Doh-ura K, Furuya H, S. Y. (1990) Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* 87, 257-263.
- (71) Lamb BT, Sisodia SS, Lawler AM, Slunt HH, Kitt CA, Kearns WG, Pearson PL, Price DL, G. J. (1993) Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice. *Nat. Genet.* 5, 221-226.
- (72) Tharp, W. G., y Sarkar, I. N. (2013) Origins of amyloid- β . *BMC Genomics* 14.
- (73) Matsui, T., Ingelsson, M., Fukumoto, H., Ramasamy, K., Kowa, H., Frosch, M. P.,

- Irizarry, M. C., y Hyman, B. T. (2007) Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1161, 116-123.
- (74) Adewusi, E. A., Moodley, N., y Steenkamp, V. (2011) Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants. *S. Afr. J. Bot.* 77, 638-644.
- (75) Pattison, G. (1984) Código de conducta para la colecta de plantas. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos.
- (76) Kupchan, S. M., Streelman, D. R., y Sneden, A. T. (1980) Psorospermin, a new antileukemic xanthone from *Psorospermum febrifugum*. *J. Nat. Prod.* 43, 296-301.
- (77) Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., y Bansal, Y. K. (2015) Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.* 9, 294-305.
- (78) Mera, I. F. G., Falconí, D. E. G., y Córdova, V. M. (2019) Secondary metabolites in plants: Main classes, phytochemical analysis and pharmacological activities. *Rev. Bionatura* 4, 1000-1009.
- (79) Salazar-Aranda, R., Granados-Guzmán, G., Pérez-Meseguer, J., González, G. M., y De Torres, N. W. (2015) Activity of polyphenolic compounds against *Candida glabrata*. *Molecules* 20, 17903-17912.
- (80) Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231-1237.
- (81) Kuskoski, E.M., Asuero, A.G., Troncoso, A.M., Mancini, F.J., Fett, R. (2005) Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 25, 726-732.
- (82) Zamorano Sergio, C. J. (2015) Síntesis y caracterización RMN 1D Y 2D de derivados sulfurados de la 1- fenil-3- metil-2-pirazolín-5-ona y su potencial capacidad ligante. *Rev. Soc. Quím. Perú* 81, 24-32.
- (83) Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (84) Young, F. M., Phungtamdet, W., y Sanderson, B. J. S. (2005) Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human lymphoblastoid

cell line, WIL2NS. *Toxicol. Vitr.* 19, 1051-1059.

(85) Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., y Minor, L. (2004) Cell Viability Assays, en *Assay Guidance Manual*, pp 1-25.

(86) Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., y Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605-1612.

(87) Trott, O., y Olson, A. (2012) Software News and Updates Gabedit — A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares. *J. Comput. Chem.* 32, 174-182.

(88) Yahaya, E. S., Cordier, W., Steenkamp, P. A., y Steenkamp, V. (2018) Attenuation of oxidative stress and artificial wound closure in C2C12 myoblasts induced by sequential extracts of *Boerhavia diffusa*. *J. Pharm. Pharmacol.* 70, 111-123.

(89) Kuttan, G., Pratheeshkumar, P., Manu, K. A., y Kuttan, R. (2011) Inhibition of tumor progression by naturally occurring terpenoids. *Pharm. Biol.* 49, 995-1007.

(90) Saha, S., Deb, J., y Deb, N. K. (2020) Review on *Mirabilis jalapa* L., (*Nyctaginaceae*): A medicinal plant. *Int. J. Herb. Med.* 8, 14-18.

(91) Wollenweber, E., Papendieck, S., y Schilling, G. (1993) A Novel C-Methyl Isoflavone from *Abronia latifolia*. *Nat. Prod. Lett.* 3, 119-122.

(92) Otomo, E., Tohgi, H., Kogure, K., Hirai, S., Takakura, K., Terashi, A., Gotoh, F., Maruyama, S., Tazaki, Y., Shinohara, Y., Ito, E., Sawada, T., Yamaguchi, T., Kikuchi, H., Kobayashi, S., Fujishima, M., y Nakashima, M. (2003) Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction: Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters. *Cerebrovasc. Dis.* 15, 222-229.

(93) Okafor, E. C. (1980) Structures of I-Phenyl-3-methyl-pyrazolone-5 and its Benzoyl Derivatives + 1023, 1019-1023.

(94) Watanabe, K., Tanaka, M., Yuki, S., Hirai, M., y Yamamoto, Y. (2017) How is edaravone effective against acute ischemic stroke? *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 10.3164/j.1880.50860912-0009 R oto, Japan Kyjcbn17-62cb .17-62 JJCBNview the Society for Free Radical Research Japan urnal of Clinical Biochemistry and Nutrition stroke and amyotrophic lateral sclerosis? *J. Clin. Biochem. Nutr.* 62, 1-19.

(95) Borges, R. S., Queiroz, A. N., Mendes, A. P. S., Araújo, S. C., França, L. C. S., Franco, E. C. S., Leal, W. G., y da Silva, A. B. F. (2012) Density Functional Theory (DFT)

- Study of Edaravone Derivatives as Antioxidants. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 7594-7606.
- (96) Abe, K., Yuki, S., y Kogure, K. (1988) Strong attenuation of ischemic and postischemic brain edema in rats by a novel free radical scavenger. *Stroke* **19**, 480-485.
- (97) Erturk, A. G., y Omerustaoglu, H. (2020) Synthesis and cytotoxic evaluation of some substituted 5-pyrazolones and their urea derivatives. *Molecules* **25**, 1-20.
- (98) Huang, L., Huang, R., Pang, F., Li, A., Huang, G., Zhou, X., Li, Q., Li, F., y Ma, X. (2020) Synthesis and biological evaluation of dehydroabietic acid-pyrimidine hybrids as antitumor agents†. *RSC Adv.* **10**, 18008-18015.
- (99) Bartolucci, C., Haller, L. A., Jordis, U., Fels, G., y Lamba, D. (2010) Probing Torpedo californica acetylcholinesterase catalytic Gorge with two novel bis-functional galanthamine derivatives. *J. Med. Chem.* **53**, 745-751.
- (100) Zhang, G. L., Zhang, W. G., Du, Y., Yao, L., Sun, H., Zhang, R., Liu, E., Bu, N., Wu, H. Q., Zhang, L., Li, T. T., y Guo, Y. Y. (2013) Edaravone ameliorates oxidative damage associated with A β 25-35 treatment in PC12 cells. *J. Mol. Neurosci.* **50**, 494-503.
- (101) Daina, A., Michielin, O., y Zoete, V. (2017) SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* **7**, 1-13.
- (102) Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N., y Wendoloski, J. J. (1999) A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *J. Comb. Chem.* **1**, 55-68.
- (103) Delaney, J. S. (2004) ESOL: Estimating aqueous solubility directly from molecular structure. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **44**, 1000-1005.
- (104) Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., y Feeney, P. J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **46**, 3-26.
- (105) Daina, A., y Zoete, V. (2016) A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem* **11** 117-1121.

ANEXO

CÓDIGO DE CONDUCTA PARA LA COLECTA DE PLANTAS

I. Trabaje con el propósito de hacer el menor daño posible a las poblaciones naturales de plantas y teniendo en mente que dentro de éstas puede haber razas locales con diferencias genéticas; por ejemplo, la población de una loma puede ser distinta a la loma contigua, a pesar de su proximidad.

II. Apéguese enfáticamente y al pie de la letra a las disposiciones nacionales y locales, relativas a la colecta de plantas.

- Investigue qué leyes locales existen para poder llevarse y exportar plantas.
- Si se requiere una autorización, nunca colecte sin tenerla.
- Si la autorización especifica el número de plantas, o la naturaleza del material que puede colectarse, apéguese a lo dispuesto.
- Asegúrese de que las plantas que desea coleccionar no están en peligro de extinción, y cerciórese de que no hay sospecha de que lo estén.

III. Cuando tenga la intención de coleccionar en un país donde exista una sociedad en pro de algún grupo de plantas, por sus propios intereses y por cortesía, hágase presente ante los dirigentes de tal sociedad.

IV. Una vez que haya obtenido la autorización, coleccionar discretamente y no dé la impresión a los lugareños de que tales plantas tienen un valor comercial.

V. Considere toda posible amenaza, como urbanización, sobrepastoreo o la proximidad de un camino, y si estima que la población de especies está en peligro, haga un reconocimiento más completo e informe sus hallazgos a alguna sociedad local pro conservación de la naturaleza.

VI. De ser factible, tome fotografías y preserve material representativo, de preferencia fértil, para depositarlo en diferentes herbarios.

Pattison, G. (1984) Código de conducta para la colecta de plantas. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. 1-14.

