

## ACTIVIDAD CAPTADORA DE RADICALES LIBRES DE ALCALOIDES DE *Rollinia pittieri* (ANNONACEAE) POR EL MÉTODO DEL DPPH.

FREE RADICALS SCAVENGING ACTIVITY OF ALKALOIDS FROM *Rollinia pittieri*  
(ANNONACEAE) BY THE DPPH METHOD.

Guillermo L. Montoya P.,<sup>1</sup> Edison J. Osorio D.,<sup>1</sup> Nora S. Jiménez U.<sup>1</sup> y Gabriel J. Arango A.<sup>1\*</sup>

### RESUMEN

La búsqueda de compuestos con actividad antioxidante es de gran interés para las industrias farmacéuticas y de alimentos. A través del fraccionamiento cromatográfico de los tallos de *Rollinia pittieri* (Annonaceae) se aislaron 2 alcaloides con actividad antioxidante según el método del DPPH, la O-metil-moschatolina [1] con núcleo oxoaporfínico y la melosmina [2] con núcleo 7,7-dimetil-1,2,3,9- tetrahidraporfínico. Se evalúa además un derivado acetilado hemisintético de la melosmina, la O,O-diacetil-melosmina [3], el cual es sometido al mismo ensayo realizado a las moléculas anteriormente mencionadas. La actividad de los tres compuestos es comparada con 2 estándares antioxidantes frecuentemente empleados en la industria de alimentos, el 2-terbutil-hidroxitolueno (BHT) y el ácido ascórbico. La melosmina reporta una IC<sub>50</sub> igual a 3.037 µg/mL, 70 veces mayor a la presentada por el BHT con una IC<sub>50</sub> de 207.4 µg/mL. El ácido ascórbico presenta una IC<sub>50</sub> de 1.58 µg/mL. La identificación de los alcaloides se realizó por métodos espectroscópicos.

**Palabras clave:** Alcaloides aporfínicos, annonaceae, antioxidantes, DPPH; *rollinia pittieri*.

### ABSTRACT

The search of compounds with antioxidant activity has great interest for pharmaceutical and food industries. By chromatographic fractionation of the stems of *Rollinia pittieri* (annonaceae) two alkaloids are isolated with antioxidant activity according to the DPPH method: O-methyl-moschatoline [1] with oxoaporphine nucleous and melosmine with 7,7-dimethyl-1,2,3,9- tetrahydroaporphine nucleus[2]. It is also evaluated an acetylated hemisynthetic compound from melosmine, O-O-diacetyl-melosmine [3], which is put under the same test made to molecules previously mentioned. The activity of the three compounds is compared with two antioxidant standards commonly employed in food industry: 2-tert-butyl-hydroxytoluene (BHT) and ascorbic acid. Melosmine shows an IC<sub>50</sub> of 3.037 µg/mL, which is 70 times better than that for BHT with IC<sub>50</sub> 207.4 µg/mL. Ascorbic acid shows an IC50 of 1.58 µg/mL. The identification of the alkaloids is based on spectroscopic methods.

**Key words:** Annonaceae; antioxidants; aporphine alkaloids; DPPH; *rollinia pittieri*.

---

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas (GISB). Facultad de Química Farmacéutica. Corporación de Patologías Tropicales, Universidad de Antioquia. A.A. 1226. Medellín, Colombia.

\* Autor a quien se debe de dirigir la correspondencia: gjarango@quimbaya.udea.edu.co.

## INTRODUCCIÓN

El género *Rollinia* (Annonaceae) comprende 65 especies alrededor del mundo (1). En Colombia se encuentran 11 especies de *Rollinia* entre ellas *R. pittieri* (2), de la cual no se encontraron reportes con relación a su contenido de metabolitos o actividad biológica. *R. pittieri* es un árbol de 15 a 25 m de altura con una distribución desde Centroamérica en Costa Rica y Panamá, bordeando la costa pacífica hasta llegar a Colombia, principalmente en la región choacoana y en el Santander. En el género *Rollinia* se encuentran diferentes tipos de metabolitos como las acetogeninas y los alcaloides, a este último grupo de compuestos se le atribuyen diferentes actividades como antiagregantes plaquetarios (3,4), antimicrobianos, antifúngicos (5,6), inhibidores enzimáticos (7) y citotóxicos (8). Los reportes de actividad existentes para el género *Rollinia* y la falta de estudios sobre la especie *R. pittieri*, la convierten en promisoría para la búsqueda de compuestos naturales con actividad biológica.

En la búsqueda de compuestos naturales con actividad antioxidante, se han encontrado compuestos fenólicos, carotenoides, tocoferoles, ácido ascórbico y sus derivados además de compuestos nitrogenados como péptidos, aminoácidos, aminas y alcaloides (9). La actividad captadora de radicales libres de alcaloides con gran cantidad de sustituciones, tales como, grupos hidroxilos aromáticos, acompañados de grupos alquílicos donadores de protones, hacen de este tipo de estructuras, moléculas promisorias para su estudio en relación a su actividad antioxidante. Se enfatiza en el hecho, de que los compuestos que poseen muy buena actividad captadora de radicales libres, son moléculas que pueden favorecer la disminución del riesgo de enfermedades dependientes de procesos oxidativos, tales como enfermedades neurodegenerativas, algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas, entre otras (10,11).

El consumo de productos alimenticios que contengan los principales antioxidantes naturales como vitamina E, vitamina C y carotenos es importante para un buen funcionamiento del organismo (12-14). Sin embargo, el suministro otros antioxidantes exógenos podría tener efectos benéficos y ser una alternativa en la prevención y tratamiento de las enfermedades antes mencionadas (15). El uso de los antioxidantes también es importante en la industria de los alimentos, cosmética, pinturas, acei-

tes, polímeros, y en general, para proteger cualquier sustancia susceptible a la oxidación mediada por radicales libres. En la industria de los alimentos, la investigación sobre nuevos antioxidantes toma un interés adicional, dado que antioxidantes sintéticos tales como 2 y 3-terbutil-4-metoxifenol (ej, 2-terbutil-hidroxianisol, BHA), 2,6-diterbutil-4-metilfenol (ej, 2-terbutil-hidroxitolueno, BHT) y el terbutil-hidroquinona (TBHQ) han sido adicionados a los alimentos, sin embargo, por problemas de toxicidad (16), el uso de dichos compuestos ha sido recientemente cuestionado (17,18). Todo lo anterior, ha promovido el incremento de investigaciones con el fin de identificar nuevas moléculas con capacidad antioxidante las cuales se puedan emplear a menores concentraciones y demuestren menor toxicidad.

El objetivo del presente estudio, fue identificar las sustancias responsables de la actividad antioxidante de la fracción de alcaloides totales (FAT) de tallos *R. pittieri* utilizando la habilidad de éstos para desactivar al radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). Los compuestos aislados [1] y [2] son alcaloides aporfínicos los cuales se reportan por primera vez en esta especie. Adicionalmente se realizaron algunas modificaciones químicas sobre la melosmina para determinar él o los grupos funcionales presentes en el esqueleto básico aporfínico responsable de la actividad antioxidante.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Procedimientos experimentales generales

Los espectros ultravioleta y los ensayos de la actividad captadora de radicales libres fueron realizados en un equipo Spectronic® Genesys 2. Los espectros IR se corrieron en un equipo Perkin-Elmer (FT-IR) utilizando un rango de barrido entre 4000 y 600  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros de masas fueron obtenidos en un Cromatógrafo de Gases acoplado a masas HP6890 con Detector selectivo 5973, columna DB5MS 30 x 0.25 x 0.25, flujo 0.7 mL/min de Helio 5.0 Los espectros de RMN se corrieron en  $\text{CDCl}_3$  con un espectrómetro Bruker de 300 MHz.

### Químicos

El radical DPPH fue suministrado por Sigma Chemical Co, St Louis, Mo. Los reactivos Hidróxido de Amonio y Ácido Clorhídrico grado reactivo y Metanol para análisis, fueron suminis-

trados por J. T. Baker. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear se realizaron en Cloroformo Deuterado de Merck.

### Material vegetal, extracción e identificación de alcaloides

La especie *Rollinia pittieri* (Annonaceae) fue colectada en el Corregimiento de Lomas Aisladas del Municipio de Turbo (Antioquia, Colombia) por el biólogo Fernando Alzate, la identificación de la especie se realizó en el Herbario de La Universidad de Antioquia HUA (Voucher A1072); El material vegetal seco y molido (2.7 Kg) se desengrasó con n-Hexano; en soxhlet por un periodo de 2.5 días. Posteriormente el residuo sólido obtenido se sometió a extracción alcalina (19); obteniéndose así la fracción FAT (3.8 g).

Una vez comprobada la actividad antioxidante de la fracción FAT, se sometió a fraccionamiento por cromatografía en columna utilizando sílica gel 60F, tamaño de partícula de 0.063-0.2 mm de diámetro (Merck) y eluyendo con mezclas de EtOAc-NH<sub>4</sub>OH, obteniéndose 3 fracciones a las cuales se les comprobó actividad antioxidante. La fracción más activa se purificó mediante cromatografía de capa fina preparativa sobre gel de sílice GF<sub>254</sub> (Merck) y cromatografía en columna con Sephadex LH-20 (SIGMA) y eluyendo con gradientes de MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de donde se obtuvo 14 mg de [1] y 28 mg de [2].

O-metilmoschatolina [1]: Cristales naranja; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log e) 238, 273, 430 nm. IR V max cm<sup>-1</sup> 2947, 1661, 1578, 1204, 1156, 1093. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): H4 [d 8.21 (1H, d, J= 5.3 Hz)], H5 [8.96 (1H, d, J=5.29)], H8 [8.57 (1H, d, J= 7.8)], H9 [7.52 (1H, t, J= 7.3, J=7.7)], H10 [7.74 (1H, t, J=7.26, J=8,1)], H11 [9.11(1H, d, J=8.3)], 4.10 (3H,s), 4.19 (3H, s) y 4.08 (3H, s). RMN <sup>13</sup>C d ppm (CDCl<sub>3</sub>, 45 MHz): C1 147.76, C1' 1.37, C1a 116.01, C1b 123.21, C2 156.93, C2' 62.18, C3 148.86, C3' 61.84, C3a 145.81, C4 119.59, C5 144.83, C6a 131.5, C7 182.97, C7a 131.83, C8 129.26, C9 128.52, C10 134.74, C11 128.06, C11a 134.94. EIMS (70 eV) m/z 321[M](100), 306 (68), 291 (30), 278 (25), 263 (31), 248 (35), 235 (17), 220 (35).

Melosmina [2]: Polvo naranja, UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log e): 377 (3.38), 320 (3.17), 308 (316), 251 (3.71), 218 (Sh 3.73), 212 (Sh 3.71), HCl 0.1 N 449 (3.24), 284 (3.68), 278 (3.68), 251 (Sh 3.72),

224 (Sh 3.73) nm. IR V max cm<sup>-1</sup> 2925, 1734, 1609, 1409, 1305, 1200, 1099. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): H4 [d 7.66 (1H, d, 5.7)], H5 [8.42 (1H, d, 5.7)], H8 [7.16 (1H, d, 2.5)], H10 [6.85 (1H, dd, 2.5, 8.9)], H11 [8.83 (1H, d, 8.9)], 3.95 (3H, s), 4.13 (3H, s), 1.70 (6H, s). RMN <sup>13</sup>C  $\delta$  ppm (CDCl<sub>3</sub>, 45 MHz): C11 44.96, C1' 61.6, C1a 111.94, C1b 119.96, C2 142.84, C3 143.18, C3' 61.6, C3a 127.75, C4 112.88, C5 141.06, C6a 163.59, C7 42.59, C7' 33.13, C7'' 33.13, C7a 147.31, C8 113.96, C9 156.43, C10 114.31, C11 130.06, C11a 119.96. EIMS (70 eV) m/z 337 [M] (100), 322(70), 306(15), 289(30), 277(17), 264(20), 207(23).

### Actividad captadora de radicales libres por el método del DPPH

Para comprobar la actividad antioxidante de extractos y fracciones obtenidas durante el proceso de aislamiento de los alcaloides, se procedió a realizar un ensayo sobre TLC (cromatoplasmas de sílica gel 60 GF<sub>254</sub> en aluminio de 0.25 mm de espesor). Para ello, se eluyó con un sistema EtOAc-NH<sub>4</sub>OH en diferentes proporciones y se reveló con una solución de DPPH al 0.2 % en metanol. Los resultados aceptados como positivos fueron aquellos que presentaron la aparición de manchas amarillas sobre un fondo violeta luego de 5 minutos.

Para los alcaloides aislados, el ensayo de actividad antioxidante se basó en la decoloración del radical libre DPPH seguida por espectrofotometría ultravioleta de acuerdo a lo propuesto por Brand-Williams y colaboradores (20). Al DPPH se le aseguraba la concentración en el rango  $3.8 \times 10^{-5}$  -  $6.3 \times 10^{-5}$  M a través de una curva de calibración descrita por la ecuación:

$$A_{\lambda 517} = 20.36 [\text{DPPH}] + 0.02338$$

(Prueba de Bondad de ajuste: r<sup>2</sup> 0.9960, Sy.x 0.02522)

Se midió 0.5 mL de una solución stock del compuesto, luego se adicionó a 1.0 mL de metanol para obtener el blanco de la muestra; para la preparación de la muestra se tomaron 0.5 mL del compuesto y se mezclaron con 1.0 mL de la solución metanólica de DPPH (0.02 mg/mL); la disminución en la intensidad del color con respecto a un blanco que contiene 1.0 mL de solución de DPPH y 0.5 mL de metanol se midió espectrofotométricamente a una  $\lambda = 517$  nm luego de 5 minutos; posteriormente se realizaron diluciones de la solución stock de la muestra

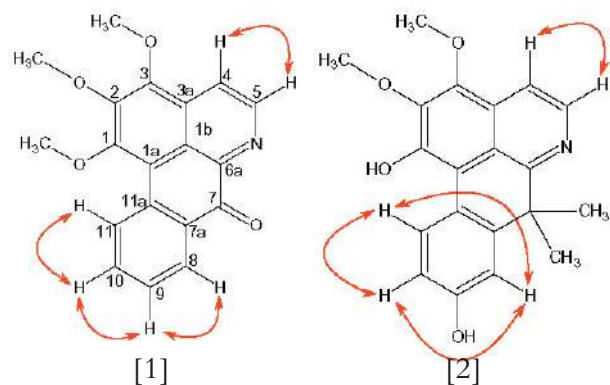
y se evaluó cada una de ellas siguiendo el mismo procedimiento descrito. El porcentaje de inhibición o decoloración del DPPH que corresponde a cada concentración de muestra evaluada se determina mediante la siguiente expresión:

Dónde  $A_m$  es la absorbancia de la muestra (muestra + DPPH),  $A_{bm}$  es la absorbancia del blanco de la muestra (muestra + Metanol) y  $A_{bDPPH}$  es la absorbancia del blanco del DPPH (metanol + DPPH). Con base en los porcentajes de inhibición obtenidos para cada concentración, el resultado se expresa cómo Concentración Inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ), es decir la concentración de muestra a la cual se ha decolorado en un 50% el DPPH.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

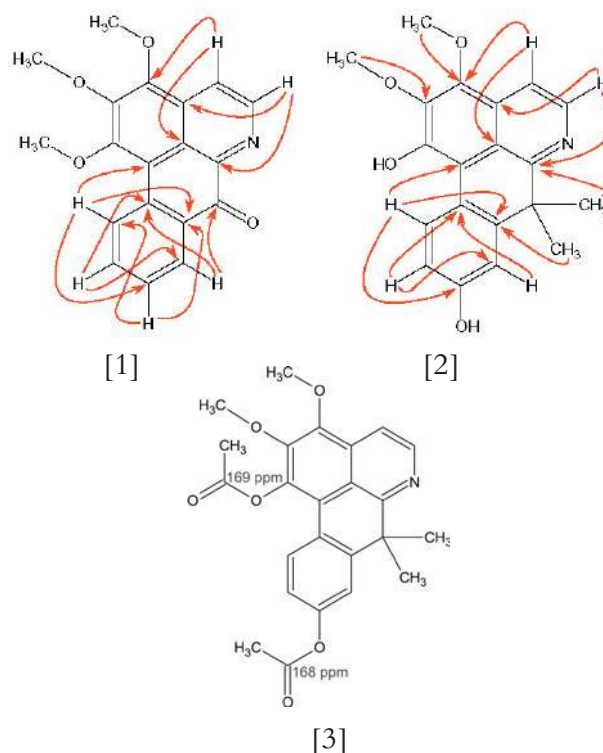
### Identificación de los compuestos aislados

La O-metilmoschatolina presenta una fórmula molecular de  $C_{19}H_{15}NO_4$  para un peso molecular de 321  $m/z$ , observado en el EI-MS. Presenta máximos de absorción en el UV a 238, 273, 430 nm, típicos de alcaloides oxoaporfínicos. El espectro IR sugiere la presencia de un grupo carbonilo a  $1661\text{ cm}^{-1}$ , y de bandas típicas del anillo aromático a  $1579$  y  $1392\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 1.** Principales correlaciones  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY de [1] y [2].

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostró la presencia de 6 protones aromáticos y de tres grupos metoxilos. Los acoplamientos típicos de los protones pertenecientes a los anillos aromáticos B y D fueron corroborados con el experimento  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY (Véase figura 1). Los protones 4 y 5 que pertenecen al anillo B son [8.21 (1H, d,  $J = 5.3$ ) y 8.96 (1H, d,  $J = 5.29$ )] respectivamente. El protón 8 del anillo D [8.57 (d,  $J = 7.8$ )] presenta una constante de acoplamiento *orto* con 9 [7.52 (t,  $J = 7.7, J = 7.3$ )], a su vez, el protón 9 presenta una constante de acoplamiento similar con 8 y otra con el protón 10 [7.74 (t,  $J = 7.26, J = 8, 1$ )]. El protón 10 muestra dos acoplamientos *orto* con el protón 9 y con el protón 11 respectivamente, y el protón 11 [9.11 (d,  $J = 8.3$ )] acopla con 10. El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  y los experimentos JMOD mostraron 10 carbonos cuaternarios, entre ellos el carbonílico, 3 O-metilos y ausencia de metilenos. Seguidamente en el experimento HMQC se observaron los carbonos correspondientes a los protones aromáticos previamente identificados y con ayuda del HMBC se corroboraron las posiciones de los carbonos de los anillos y demás carbonos (metoxílicos) de la estructura (Véase figura 2).



**Figura 2.** Importantes correlaciones HMBC de [1] y [2] y carbonos carbonílicos de [3]



La melosmina fue identificada por las mismas técnicas espectroscópicas aplicadas para [1]. El EI-MS  $m/z$  presentó un pico molecular a 337 el cual corresponde al peso molecular de la fórmula  $C_{20}H_{19}NO_4$ . El compuesto muestra en el UV máximos de absorción característicos de un alcaloide aporfínico sustituido en 1, 2, 3 y 9, los cuales sufren desplazamiento batocrómico al adicionar HCl 0.1 N (21). La espectroscopia IR muestra la presencia de grupos hidroxilo a  $3200\text{ cm}^{-1}$ , algunas señales típicas de sistemas aromáticos y ausencia de carbonilos lo cual sugiere un núcleo aporfínico.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  muestra 2 señales pertenecientes a los 2 protones del anillo B y tres del anillo D. Posteriormente el experimento  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY (Véase figura 1) permitió observar los acoplamientos de los protones aromáticos así: los protones que pertenecen al anillo B en posición *orto* presentaron una constante de acoplamiento característica H 4 [7.66 (1H, d,  $J = 5.7$ )], H 5 [8.42 (1H, d,  $J = 5.7$ )], los protones que constituyen el anillo D presentaron las siguientes constantes de acoplamiento; protones 8 [7.16 (1H, d,  $J = 2.5$ )] y 10 [6.85 (1H, dd,  $J = 2.5, J = 8.9$ )] los cuales se encuentran en posición *meta* y los protones 10 y 11 [8.83 (1H, d,  $J = 8.9$ )] se encuentran en posición *orto*. En el experimento JMOD se observaron 5 metinos (aromáticos), 11 carbonos cuaternarios, dos metoxilos y dos metilos. Mediante las correlaciones observadas en el experimento HMQC se realizaron las primeras asignaciones carbono-hidrogeno correspondientes a los protones aromáticos. Luego con ayuda del HMBC se procedió a asignar cada carbono de la estructura. (Véase figura 2). El carbono 3 según el espectro HMBC muestra correlaciones con los protones del grupo metoxilo de esa misma posición y con el protón 4 del anillo B, por tal motivo se sugiere la presencia de un grupo metoxilo en esta posición. Según el espectro IR, se observó la presencia de grupos hidroxilos y teniendo en cuenta que el compuesto poseía 2 grupos metoxilos, se concluyó entonces que el compuesto debería tener dos grupos OH según el peso molecular de 337.

Se procedió entonces a realizar una reacción de acetilación para comprobar la hipótesis anterior (La reacción se realizó con anhídrido acético en piridina por 20 horas), el compuesto acetilado [3] se aisló por TLC preparativa, eluyendo con diferentes mezclas de EtOAc:  $\text{NH}_4\text{OH}$ , procediéndose luego al análisis

espectral en RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto [3] presentó dos carbonos cuaternarios a 169 y 168 ppm pertenecientes a grupos carbonilos, corroborando así la acetilación de [2] (Véase figura 2). En el espectro RMN  $^1\text{H}$ , los metilos del grupo acetato presentaron los siguientes desplazamientos [3H (2.47, s)] y [3H (2.35, s)]; además se observó la presencia de dos metoxilos con el mismo ambiente químico, 6H (4.04, s), razón por la cual se sugirió que los dos grupos metoxilos estaban en posiciones contiguas, y en el carbono número 1 la presencia del grupo hidroxilo. Además, el protón 11 del anillo D apareció a campos más bajos debido a la protección ejercida por la presencia del grupo acetato en posición 9 del mismo anillo, confirmando la posición del grupo hidroxilo.

### Actividad captadora de radicales libres de extractos y alcaloides de *Rollinia pittieri*

La evaluación de la actividad antioxidante de las fracciones y compuestos alcaloidales de *R. pittieri* fue realizada utilizando una solución metanólica del radical libre estable DPPH, el cual presenta la ventaja de ser inalterado por ciertas reacciones como la quelación de iones metálicos y la inhibición enzimática provocadas por algunas sustancias presentes en matrices complejas (17). La solución de DPPH recién preparada es de color púrpura oscuro con un máximo de absorción a 517 nm, éste color, generalmente disminuye cuando un antioxidante está presente en el medio; así, las moléculas antioxidantes pueden disminuir los radicales libres del DPPH (proporcionando átomos de hidrógeno o electrones que eventualmente reaccionaran con el DPPH) y los convierte a un producto incoloro (2,2-difenil-1-hidrazina o análogos de hidrazina sustituidos), produciendo una disminución en la absorbancia a 517 nm (18). Entre más rápido la absorbancia decrece, es más potente la actividad antioxidante de un extracto o sustancia en términos de la capacidad de donar átomos de hidrógeno o electrones, sin embargo, se debe tener precaución cuando se interpretan los resultados. Las reacciones que puede sufrir el DPPH no son simples y se requiere conocer más acerca de su química (17). No obstante, la prueba del DPPH, es un ensayo normalmente empleado en estudios de sustancias antioxidantes y ofrece una rápida técnica de tamizaje para potenciales compuestos antioxidantes.

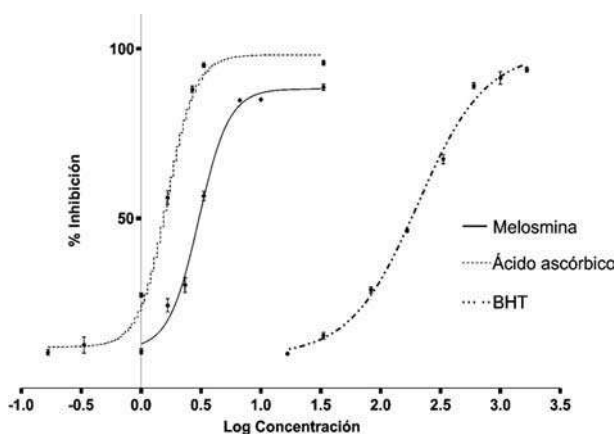
Utilizando la aspersión de DPPH sobre placas de TLC se realizó el aislamiento dirigido comprobando la actividad captadora de radicales de las fracciones obtenidas durante el proceso de aislamiento según la aparición de manchas amarillas sobre un fondo violeta, las fracciones conteniendo a [2] presentaron manchas intensas de aparición rápida a un tiempo menor de 5 minutos, por otra parte, la fracción conteniendo a [1] demostró manchas con menor intensidad que las observadas para la fracción anterior. Luego del aislamiento de los compuestos mayoritarios de las fracciones anteriormente mencionadas, se realizaron pruebas preliminares en TLC y posteriormente se procedió a realizar el ensayo espectrofotométrico según lo propuesto por Brand-Williams y colaboradores (20).

En el ensayo espectrofotométrico utilizando el radical libre se observó que el compuesto [1] presentaba una débil capacidad para decolorar el DPPH (datos no mostrados), lo cual sugiere que otro u otros compuestos minoritarios son los responsables de dicha actividad o se presenta un fenómeno de sinergismo; mientras que para el compuesto [2] se halló una importante actividad captadora de radicales libres, los resultados del ensayo se analizaron a través del paquete estadístico GraphPad Prism® para Windows versión 4.0. Los datos fueron sometidos a diferentes modelos estadísticos y se optó por el modelo sigmoidal dosis-repuesta (pendiente variable), obteniendo para

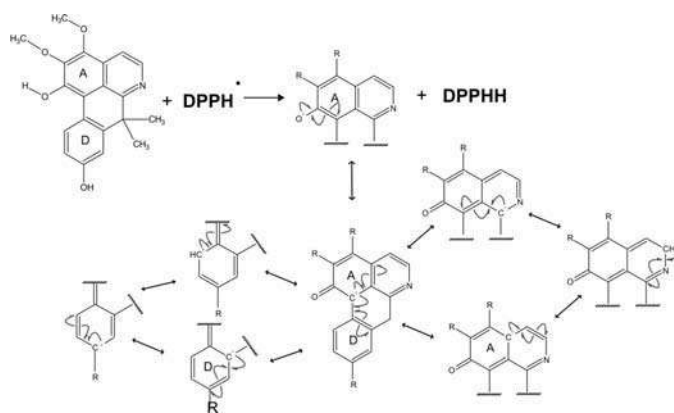
[2] una  $IC_{50}$  de  $3.037 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$  con un 95% de confiabilidad y un  $R^2$  de 0.9926 (Véase grafica 3).

Igualmente, se realizó el ensayo utilizando BHT y ácido ascórbico, sustancias antioxidantes comúnmente utilizadas en la industria de alimentos. Estos compuestos presentaron una  $IC_{50}$  de  $207.4 \pm 18 \mu\text{g/mL}$ ,  $R^2$  de 0.9960 y  $1.584 \pm 0.053 \mu\text{g/mL}$ ,  $R^2$  de 0.9975 respectivamente, con una confiabilidad del 95%. Los datos obtenidos se sometieron al mismo tratamiento estadístico y se adaptaron al mismo modelo sigmoidal dosis-repuesta (Véase figura 3).

Los resultados muestran a [2] como un potente antioxidante con relación al BHT y cercano a la actividad observada en el ácido ascórbico; la melosmina presenta en su estructura dos grupos hidroxilos, los cuales pueden ser responsables de la donación de átomos de hidrógeno necesarios para la actividad antioxidante (22), por otro lado, la ausencia de tales grupos en [1] podría explicar la pobre actividad observada. En la investigación de los grupos funcionales responsables de la actividad captadora de radicales libres y para corroborar lo anterior, se realizó el ensayo de actividad captadora de radicales libres (DPPH) con el compuesto [3], observándose en cromatografía en capa fina la ausencia de manchas amarillas, lo cual indica la pérdida de la capacidad captadora de radicales libres, asumiéndose que la actividad de [2] es dependiente de la presencia de los hidroxilos.



**Figura 3.** Porcentaje de inhibición de la decoloración del DPPH por distintas concentraciones del alcaloide [2]. Los datos de concentración han sido transformados al logaritmo para adaptación al modelo estadístico. El promedio de los resultados obtenidos por triplicado se expresan como la concentración inhibitoria del 50% de decoloración ( $IC_{50}$ ), calculado con GraphPad Prism® para Windows versión 4.0.



**Figura 4.** Mecanismo sugerido de la actividad atrapadora de radicales y estabilización del alcaloide [2]. El radical fenoxilo formado al reaccionar con el DPPH, es estabilizado por deslocalización del electrón alrededor de los anillos aromáticos A, B y D como se indica en las anteriores figuras resonantes.

De acuerdo a lo anterior, se propone un posible mecanismo de estabilización del radical alcaloidal generado durante la estabilización del radical DPPH, por medio de una deslocalización del electrón alrededor de los anillos aromáticos A, B y D (Véase figura 4). El grupo *orto*-metoxi en anillos aromáticos con un grupo hidroxilo presenta la capacidad de estabilizar el radical ariloxi por donación de electrones, aumentando por tanto la eficacia antioxidante y antirradical (23). El anillo A de [2] presenta dicho sistema, mientras el anillo D carece de sustituciones capaces de tales donaciones, por tal motivo, se podría sugerir que el grupo OH presente en el anillo A, es el responsable de la actividad captadora de radicales libres.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el alcaloide melosmina aislado por primera vez de tallos de *Rollinia pittieri* presenta una potente actividad captadora de radicales libres en comparación con BHT, aproximadamente 70 veces mayor. Además teniendo en cuenta que ambas moléculas presentan liposolubilidad similar, podemos inferir que el compuesto alcaloidal es una estructura promisoriosa como un antioxidante de posible aplicación en las industrias farmacéutica y alimentaria.

Debido a la complejidad de los procesos de oxidación, es obvio que no existe un único método de prueba de modo que refleje de forma completa el perfil antioxidante de una sustancia estudiada; por lo tanto, sería conveniente realizar otros estudios de evaluación antioxidante tales como el método de decoloración del *b*-caroteno, ensayos de peroxidación de lípidos biológicos y protección de liposomas de la peroxidación inducida por radicales entre otros (23), para garantizar un mejor perfil antioxidante del alcaloide melosmina de *Rollinia pittieri*.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el respaldo dado por Colciencias (contrato RC No. 08-2003) y a la Universidad de Antioquia (Estrategia de Sostenibilidad, 2001-2003), los cuales contribuyeron a la realización de este trabajo. Al profesor Carlos López de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales U. de A. por su valiosa colaboración en la toma de los espectros de Masas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Liaw, C., Chang F., Chen, Y., et al (1999) New Annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa*. J Nat Prod. 62 (12) : 1613-1617.
- Murillo, J. (2001) Las Annonaceae de Colombia. Biota Colombiana. 2 (1) : 49-58.
- Kuo, R. Y., Chaang F. R., Chen C. Y., et al (2001) Antiplatelet activity of N-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. Phytochemistry. 57 (3) : 421-425.
- Chen, K. S., Ko, F. N., Teng, C. M., et al (1996) Antiplatelet and vaso-relaxing action of some aporphinoids. Planta Med. 62 (2) : 133-136.
- Chen, Y., Chang F., Wu Y., et al (1996) Isoquinoline alkaloids and lignans from *Rollinia mucosa*. J Nat Prod. 59 (9) : 904-906.
- Marcal, P., Barbosa J., Lima E. O., et al., (1992) Antimicrobial activity of benzylisoquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* D.C. J. Ethnopharmacol. 36 (1) : 39-41
- Miski, M., Shen X., Cooper R., et al (1995) Aporphine alkaloids, CD45 protein tyrosine phosphatase inhibitors, from *Rollinia ulei*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 5 (14) : 1519-1522.
- Wu Y. C., Chang G. Y., Duh C. Y., et al (1993) Cytotoxic alkaloids of *Annona montana* Phytochemistry. 33 (2) : 497-500.
- Valentao, P., Fernández E., Carvalho F., et al (2002) Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. J. Agric. Food Chemistry. 50 (17) : 4989-4993.
- Cassarino, D., Bennet J. (1999) An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. Brain Res Rev. 29 (1) : 1-25.
- Collins, A. (1999) Molecular Epidemiology in Cancer Reserch. Molec Aspects Med. 19 (6) : 359-432.
- Benedich, A., Olson J. A. (1989) Biological actions of carotenoids. FASEB J. 3 (8) : 1927-1932.
- Block, G. & L. Langseth. (1994) Antioxidant vitamins and disease prevention. Food Technol. 48 (7) : 80-84.
- Popov, I., Lewin, G. (1999) Antioxidative homeostasis: Characterization by means of chemiluminescent technique. Methods Enzymol. 300 (1) : 437-456.
- Benzie, I. F. (2003) Evolution of dietary antioxidants. Comp Biochem Physiol A Mol Intergr Physiol. 136 : 113 - 126
- Joner, E. P. (1977) Butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluene (BHT) and ethoxyquin (EMQ) tested for mutagenicity. Acta Vet Scand. 18 (2) : 187 - 193.
- Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi, M. P. B., et al (2004) Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. Food Chemistry. 84 (4) : 551- 562.
- Yamaguchi, T., Takamura H., Matoba T., et al (1998) HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. Biosci Biotechnol Biochem. 62 (6) : 1201- 1204.
- Lock, O. (1994) Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de Productos Naturales. (Ed) Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. pp 225-226.
- Brand, W. W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie. 28 (1): 25-30.
- Zabel, V., Watson H. (1982) Melosmine and Melosmidine, 7,7-Dimethyltetrahydroaporphine alkaloids from *Guatteria melosma*. J Nat Prod. 45 (1) : 94-101.
- Shahidi, F., Janitha, P. K., Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. Crit Rev Food Sci Nutr. 32 (1) : 67-103.
- Pérez, R. M., Vargas, R., Martínez, F. J., et al (2003) Actividad antioxidante de los alcaloides de *Bocconia arborea*. Estudio sobre seis métodos de análisis. Ars Pharmaceutica. 44 (1) : 5-21.

Fecha de Recibo: Julio 23 de 2004

Fecha de Aceptación: Septiembre 3 de 2004