

147



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

COMPUESTOS AROMATICOS SIMPLES DE *Piper sanctum*

(Miq.) Schl. (Piperaceae).

T E S I S

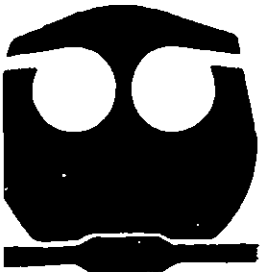
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

MARIA ELENA TORRES SANTIAGO

297475



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

2001.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

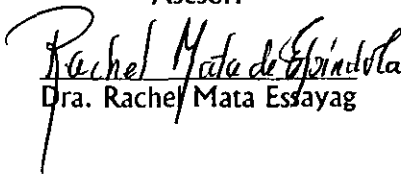
JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Yolanda Caballero Arroyo
Vocal	Dra. Rachel Mata Essayag
Secretario	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
1er. Suplente	M. en C. Martha Lydia Macías Rubalcava
2º. Suplente	M. en C. Laura Alicia Acevedo Arteaga

Sitio de realización de la tesis:

Laboratorio 124 del departamento de Farmacia
Facultad de Química. U.N.A.M.

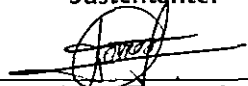
Asesor:


Dra. Rachel Mata Essayag

Supervisor técnico:

Rivero Cruz Isabel
M. en C. Isabel Rivero Cruz

Sustentante:


María Elena Torres Santiago

AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental de éste trabajo de tesis se realizó mediante el apoyo económico del proyecto " Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America" (NIH GRANT 5U01TW/**00316/03). Agradezco también la beca otorgada por este proyecto para la realización de mi tesis de licenciatura.

A los miembros del jurado por la revisión de este trabajo, sus valiosos comentarios ayudaron a mejorar la versión final de esta tesis.

A las Q.F.B. Graciela Chávez y Marisela Gutierrez, por el registro de los espectros IR; a la Q. Georgina Duarte, por el registro de los espectros de masas; y a los Q.F.B. Rosa Isela del Villar y Oscar Yáñez, por el registro de los espectros de RMN, todos ellos de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

A la Dra. Rachel Mata Essayag por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por su dedicación y enseñanzas para la realización de este trabajo y por ser un gran ejemplo para mi formación profesional.

A la M. en C. Isabel Rivero Cruz por la supervisión técnica, por su apoyo en todos los aspectos, por su excelente sentido del humor.

A los amigos y compañeros del Laboratorio 124: Iliana, Norma, Olga, Laura, Blanca, Adriana, Sandra, Janet, Martha, Mari Carmen, Ericka, Lupita, Sergio y José Antonio por los momentos divertidos en el laboratorio.

Finalmente y no menos importante, a mi segunda casa por la cual tengo un gran cariño y respeto. Es un orgullo ser parte de ella: A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.



DEDICATORIAS

A mi MADRE por dedicarme su vida, gracias a su comprensión, ayuda y apoyo he logrado llegar hasta donde estoy. Sigue siendo mi aliciente. TE AMO.

A mis hermanos: A Ismael por ser mi segundo padre y a Pepe por ser la chispa de la familia, gracias a ambos por estar siempre conmigo a pesar de estar tan lejos. Sé que son mis cimientos.

A María Luisa por darme tres nuevas esperanzas para ser mejor cada día: A Ismael que es el pilar de mis motivos, a Jonathan Misael por ser la alegría de mi corazón y a Gamaliel por ser la ternura de mi alma.

A mis tíos: Socorro y Daniel Torres, Delfino, Paulina y Julian Santiago. Gracias por la familia que tengo. Por apoyarme.

*A las siguientes familias por permitirme ser parte de ellas:
Morales Barrientos, Segura Pérez y Madera Torres.*

A los miembros del Instituto F.L.S.P.P.: Mis Conchitas, mis Esperanzas, Jose, Anita, Candi y Erika por la superación espiritual que alimenta el alma.

A mis amigos: Wendy, Lucerito, Iliana, Mayte, Anel, Lucecita, Elena, Mireya y Dante. A Rico y Alberto. Gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas.

A DIOS Por todo: La vida. Nunca me dejes.



INDICE

	Página
Lista de Cuadros	III
Lista de Figuras	IV
Lista de Espectros	V
Lista de Abreviaturas	VI
I JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	1
II ANTECEDENTES	4
2.1 Aspectos taxonómicos de <i>Piper sanctum</i>	4
2.2 Aspectos etnobotánicos y antropológicos de <i>Piper sanctum</i>	4
2.3 Aspectos químicos de <i>Piper sanctum</i>	7
III PARTE EXPERIMENTAL	11
3.1 Procedimientos generales	11
3.1.1 Análisis cromatográficos	11
3.1.2 Determinación de las constantes, físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales	11
3.2 Material vegetal	12
3.3 Estudio fitoquímico de <i>Piper sanctum</i>	12
3.3.1 Preparación del extracto a mediana escala	12
3.3.2 Fraccionamiento primario del extracto total del tallo de <i>Piper sanctum</i>	12
3.3.2.1 Aislamiento del β -sitosterol (F012)	13
3.3.3 Fraccionamiento secundario de la fracción activa F001	14

INDICE (Continuación...)

3.3.3.1 Aislamiento y purificación del compuesto 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxi-benceno (F013) a partir de la fracción activa F001-V	15
3.3.3.2 Aislamiento y purificación del 1-(2'-propeno)-3,4-dimetoxi-benceno (F016) a partir de la fracción activa F001-VII	15
3.3.3.3 Aislamiento y purificación del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxi-fenil)-hexadecano (F015) de la fracción F001-IX	15
3.3.4 Preparación de derivados químicos	17
3.3.4.1 Obtención del derivado metilado del 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxi-benceno (F013m)	17
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1 Selección de la especie <i>Piper sanctum</i> como candidato idóneo para la obtención de principios activos	18
4.2 Caracterización de los compuestos aislados y sus derivados químicos	20
4.2.1 Caracterización del 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxi-benceno (F013) y del 1-(2'-propeno)-3,4-dimetoxi-benceno (F016)	20
4.2.2 Caracterización del 2-oxo-16-(3'4'-metilendioxi-fenil)-hexadecano (F015)	24
V RESUMEN Y CONCLUSIONES	30
VI PERSPECTIVAS	31
VII BIBLIOGRAFÍA	32
APÉNDICE	

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Pág
1	Alcaloides aislados de <i>Piper sanctum</i>	8
2	Esteroides aislados de <i>Piper sanctum</i>	8
3	Kawapironas aisladas de <i>Piper sanctum</i>	9
4	Piperólidas aisladas de <i>Piper sanctum</i>	10
5	Fraccionamiento primario vía cromatografía en columna abierta del extracto total del tallo de <i>Piper sanctum</i>	14
6	Fraccionamiento secundario de la fracción activa F001 por cromatografía en columna abierta	16
7	Compuestos aislados de <i>Piper sanctum</i>	19
8	Constantes espectroscópicas y espectrométricas del 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxi-benceno (F013)	22
9	Constantes espectroscópicas y espectrométricas del 1-(2'-propeno)-3,4-dimetoxi-benceno (F016)	23
10	Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN ¹ H y RMN ¹³ C de los fenilpropanoides 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxi-benceno (F013) y 1-(2'-propeno)-3,4-dimetoxi-benceno (F016)	25
11	Constantes espectrométricas y espectroscópicas del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxiifenil)-hexadecano (F015)	27
12	Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN ¹ H y RMN ¹³ C del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxiifenil)-hexadecano (F015)	28

LISTA DE FIGURAS

Figura	Contenido	Pag.
1	<i>Piper sanctum</i> (Miq.) Schl. (Piperaceae)	5
2	Distribución de la especie <i>Piper sanctum</i> (Miq.) Schl. en la República Mexicana	6
3	Extracción y fraccionamiento del extracto diclorometano-metanólico (1:1) del tallo de <i>Piper sanctum</i>	13
4	Patrón de fragmentación del compuesto 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (F015)	28
5	Espectro de RMN modalidad NOESY del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (F015)	29

LISTA DE ESPECTROS

Espectro	Contenido	Pág
1	Espectro de RMN ¹ H del 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxi-benceno (F013)	35
2	Espectro de RMN ¹³ C del 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxi-benceno (F013)	36
3	Espectro de RMN ¹³ C modalidad HETCOR del 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxi-benceno (F013)	37
4	Espectro de RMN ¹ H del 1-(2'-propeno)-3,4-dimetoxi-benceno (F016)	38
5	Espectro de RMN ¹³ C del 1-(2'-propeno)-3,4-dimetoxi-benceno (F016)	39
6	Espectro de RMN ¹³ C modalidad HETCOR del 1-(2'-propeno)-3,4-dimetoxi-benceno (F016)	40
7	Espectro de RMN ¹ H del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (F015)	41
8	Espectro de RMN ¹³ C del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (F015)	42
9	Espectro de RMN ¹ H modalidad COSY del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (F015)	43
10	Espectro de RMN ¹³ C modalidad DEPT del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (F015)	44
11	Espectro de RMN ¹³ C modalidad HETCOR del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (F015)	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
cm	Centímetro
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
COSY	Correlación homonuclear
δ	Desplazamiento químico
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
DEPT	Distortionless Enhancement Polarization Transfer
d	Doblete
dd	Doble de doble
EMIE	Espectrometría de masas por Impacto Electrónico
eV	Electron volts
°C	Grados centígrados
g	Gramo
HETCOR	Correlación heteronuclear
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence
Hz	Hertz
Hex	Hexano
IR	Infrarrojo
Int. Rel.	Intensidad relativa
M ⁺	Ion molecular
Kg	Kilogramo
L	Litro
ν_{max}	Frecuencia máxima
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol

LISTA DE ABREVIATURAS (Continuación...)

mg	Miligramos
mL	Mililitros
m	Multiplete
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ppm	Partes por millón
%	Por ciento
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica de Hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
s	Singulete
sa	Singulete ancho
TMS	Tetrametilsilano
t	Triplete

I JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El presente trabajo de tesis se originó del proyecto de investigación “Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America”, que a su vez se encuentra incluido en el programa internacional denominado “International Cooperative Biodiversity Group Program” (ICBG). Este programa esta patrocinado por el “National Institute of Health (NIH)”, una institución gubernamental de los Estados Unidos de América.

Los objetivos iniciales del programa ICBG (Suffness, *et al.*, 1995) son los siguientes:

1. Detectar recursos naturales renovables en países en vías de desarrollo y proponer estrategias para la conservación de los mismos.
2. Desarrollar y establecer estrategias económicas y ecológicas para el cultivo de recursos naturales en países en vías de desarrollo.
3. Fomentar las investigaciones de los recursos naturales de varias regiones del mundo a un bajo costo.
4. Fomentar el establecimiento de nuevas industrias de tipo farmoquímico en países en vías de desarrollo que participan en el programa.
5. Descubrir nuevos fármacos de origen natural para el tratamiento de enfermedades endémicas.
6. Apoyar al mejoramiento de la infraestructura de investigación de los países en vías de desarrollo participantes.
7. Impulsar la formación de recursos humanos capacitados para realizar investigación de los recursos naturales renovables en los países que participan en el programa.

Los países que participan en el proyecto “Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America” son: Estados Unidos de América, Argentina, Chile y México, a través de las siguientes instituciones: En los Estados Unidos de América la Universidad de Arizona, en donde

reside el investigador principal del proyecto, Compañía BASF, Laboratorios Wyeth-Ayerst y la Universidad de Illinois. En Argentina, la Universidad Nacional de la Patagonia y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA. En Chile la Universidad Católica y en México la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de la Facultad de Química y el Instituto de Biología.

La Facultad de Química, en el marco de un convenio realizado con la Universidad de Arizona, realiza las siguientes actividades:

- a) Preparación de extractos vegetales en pequeña escala de las especies seleccionadas por el criterio etnomédico.
- b) Envío de los extractos obtenidos a los laboratorios participantes (Compañía BASF, Laboratorios Wyeth-Ayerst y el Instituto de Investigaciones sobre Tuberculosis, en la Universidad de Illinois) en los Estados Unidos de América para determinar su actividad biológica.
- c) Obtención de los extractos en mediana escala de las especies que resultaron activas en su evaluación preliminar.
- d) Fraccionamiento biodirigido de los extractos activos.
- e) Aislamiento y purificación de los compuestos activos responsables de las actividades biológicas detectadas.
- f) Determinación de la estructura molecular de los principios biodinámicos aislados.

Estas actividades están enfocadas al descubrimiento de nuevos fármacos a partir de algunas especies medicinales de la República Mexicana.

Con base en el acuerdo realizado con la Universidad de Arizona, en donde se establece un apartado de confidencialidad sobre los resultados de las pruebas biológicas, estos resultados no pueden ser difundidos sin un registro de patentes que justifiquen los descubrimientos obtenidos de la investigación; respetando esta cláusula, en este trabajo de tesis no se reportará ningún tipo de resultado biológico.

En el marco del proyecto “Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America” la especie medicinal *Piper sanctum* (Miq.) Schl. fue seleccionada como una fuente de principios activos de interés terapéutico. Por lo tanto, el objetivo primordial del siguiente trabajo es la iniciación del estudio fitoquímico biodirigido del extracto integro del tallo de *Piper sanctum* con la finalidad de obtener los principios activos responsables de la actividad farmacológica detectada en el proceso de selección.

Los objetivos particulares son los siguientes:

- Preparar el extracto integro a mediana escala del tallo de *Piper sanctum* por un proceso de maceración.
- Realizar el fraccionamiento biodirigido del extracto total, utilizando la técnica de cromatografía en columna abierta.
- Separar los principios de interés, por lo menos de una de las fracciones activas aplicando técnicas cromatográficas convencionales.
- Caracterizar los compuestos activos obtenidos mediante la aplicación de métodos espectrométricos y espectroscópicos.

II ANTECEDENTES SOBRE *Piper sanctum* (Miq.) Schl. (Piperaceae)

2.1 Aspectos taxonómicos de *Piper sanctum*

El género *Piper*, perteneciente a la familia Piperaceae del orden Piperales, contiene más de 700 especies ampliamente distribuidas en las regiones tropicales e intertropicales del mundo. Muchas de estas especies tienen gran importancia comercial, económica y medicinal. Desde el punto de vista económico y comercial, los frutos de algunas especies proporcionan las pimientas negra y blanca que son relevantes en el mercado de las especias, en tanto que otras por sus follajes son cultivadas como plantas ornamentales. (Parmar *et al.*, 1997).

Piper sanctum (Miq) Schl., originaria de México y Guatemala, es una especie que crece favorablemente en climas semicálidos y templados a una altitud entre 740 y 2600 m snm y florece entre los meses de Septiembre y Octubre. La planta mide entre 0.5 y 5 m de altura, presenta hojas alternas, pecioladas, redondeado-acorazonadas, oblongas, membranosas, aromáticas de sabor dulce y poco picante (Figura 1); sus flores en forma de espigas cilíndricas y muy densas son semejantes a la cola de ratón o cordoncillo, de color blanco o amarillo; su tallo es liso sin espinas con ramas frágiles y fruto carnoso y con semilla. Su desarrollo es evidente en terrenos de cultivo abandonados o asociados a bosques tropicales perennifolios, mesófilos de montaña y matorrales xerófilos. En México esta especie se encuentra distribuida en Sonora, Michoacán, Morelos, Puebla, Oaxaca, Veracruz y San Luis Potosí. *Piper sanctum* se conoce popularmente como: hoja santa, hierba santa, hoja de aján y hoja de anís, entre otros.

En la Figura 2 se presenta la distribución de la especie en la República Mexicana (Argueta *et al.*, 1994; Márquez *et al.*, 1999).

2.2 Aspectos etnobotánicos y antropológicos de *Piper sanctum*

En varias regiones de la República Mexicana se reporta el uso terapéutico tradicional de la planta *Piper sanctum*, principalmente de sus hojas. Así, la planta es apreciada para el tratamiento

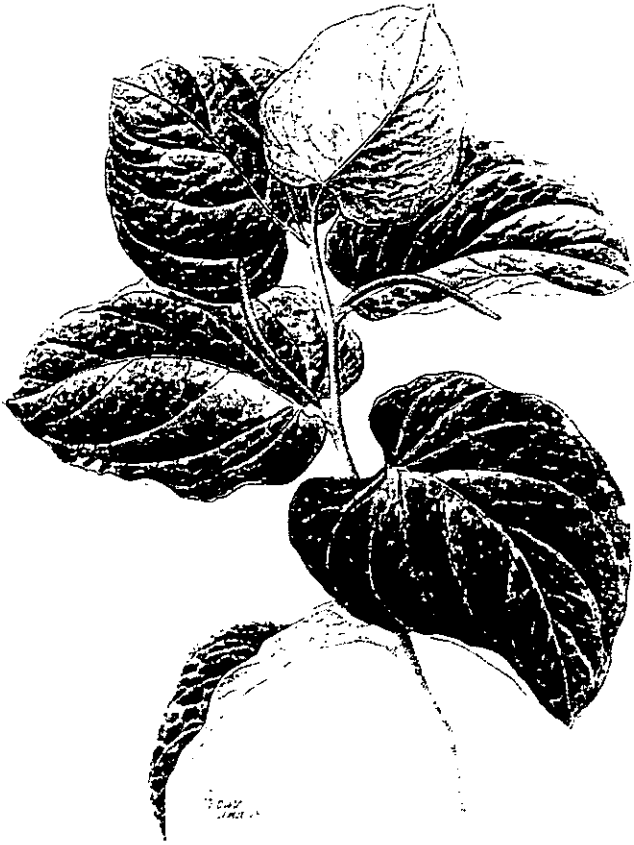


Figura 1. *Piper sanctum* (Miq.) Schl. (Piperaceae)

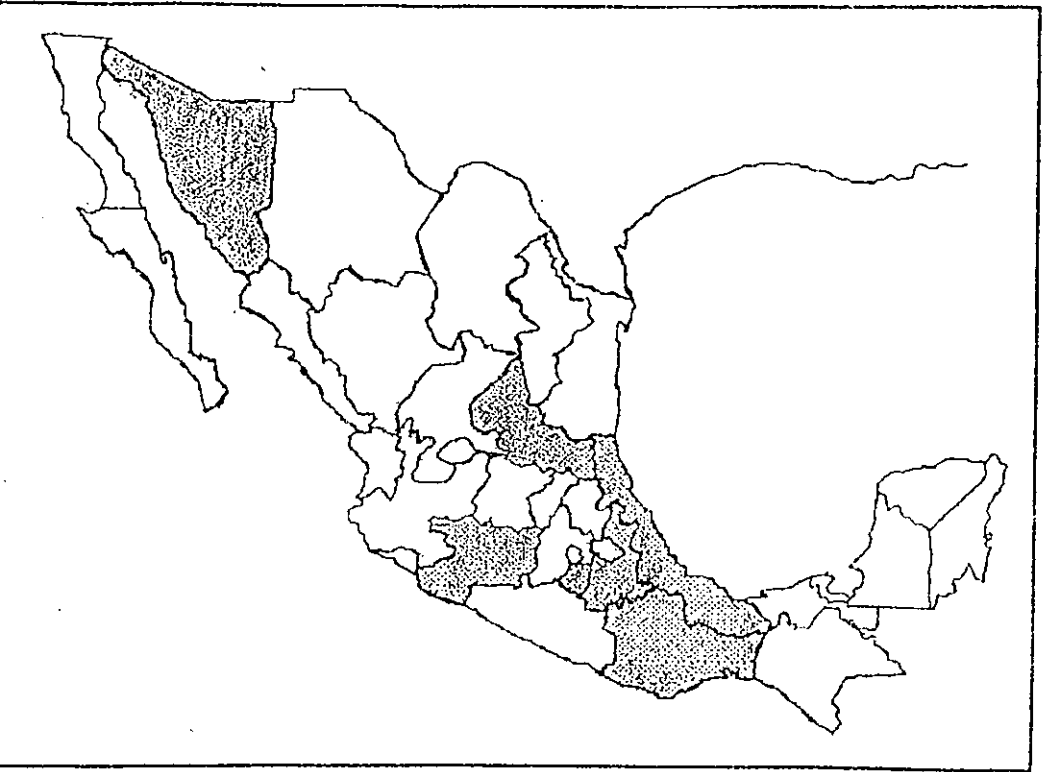


Figura 2. Distribución de la especie *Piper sanctum* (Miq.) Schl. en la República Mexicana.

de dolores de diversa etiología, del asma, la tos, urticarias, gripe, varices y como un agente antiséptico.

Para dolores estomacales se prepara una infusión con 3 ó 4 hojas en un litro de agua, se bebe la cantidad de tres tazas por día, o más, si es necesario; para prevenir estos dolores se prepara media hoja por taza y se ingiere después de cada comida, esto también ayuda a la digestión, dolor de cabeza, tos y asma. Para otro tipo de trastornos estomacales se untan las hojas con manteca y bicarbonato y se aplica tópicamente. Los dolores externos disminuyen si se machacan las hojas, formando una plasta que se aplica en el lugar del dolor (músculo, estomago y huesos). En la urticaria e inflamación se soasa la hoja y se frota en la parte afectada, la inflamación también se trata aplicando la hoja tibia, previamente expuesta al agua caliente por unos segundos (Argueta *et al.*, 1994; Márquez *et al.*, 1999).

La planta entera como infusión, también se utiliza para el dolor estomacal, además, alivia la gripe si se bebe tres veces al día; administrada durante nueve días y en ayunas, se usa para tratar las varices; este cocimiento también es útil para bañar a recién nacidos y parturientas (limpia la matriz) (Argueta *et al.*, 1994).

Para el dolor de muelas, se corta un pedazo de raíz de 10 a 20 cm, se lava y se mastica con la parte afectada para que la muela dañada se desprenda.

El tallo, hojas y flores se hierven acompañadas de hierba morada, Santa María, hierba de venado y de mamey; esta decocción es útil para el tratamiento del cacham.

Otras propiedades atribuidas a *Piper sanctum* son: estimulante, anestésico local, eupéptico, alexitere, emenagogo, balsámico, antipalúdico, antipirética, antiblenorrágica, antidiarreica, contra laringitis, tumoración de las mamas, cistitis, dispepsia, enteritis, nefritis y uretritis. (Márquez *et al.*, 1999).

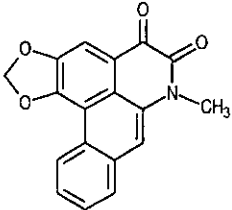
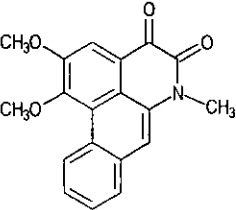
2.3 Aspectos químicos de *Piper sanctum*

Desde el punto de vista químico, los estudios realizados en diferentes especies del género *Piper*, han permitido el aislamiento y caracterización de numerosos y variados compuestos, pertenecientes al grupo de los fenilpropanoides, lignanos, neolignanos, terpenoides, esteroides, α -

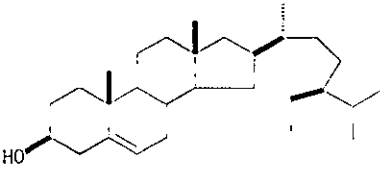
pironas, alcaloides, furanólidas y flavonoides (Haensel *et al.*, 1973, 1976, 1982; Pelter *et al.*, 1972; Bradeczek *et al.*, 1978; Pereda-Miranda *et al.*, 1997, *Inter. alia*).

En el caso de *Piper sanctum* los estudios conducidos sobre la raíz y el tallo han permitido el aislamiento y la caracterización de los metabolitos secundarios ilustrados en los Cuadros 1-4.

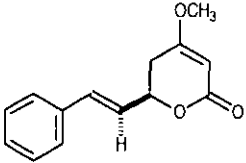
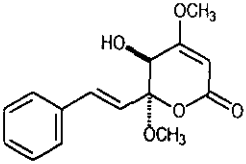
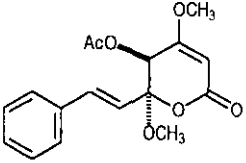
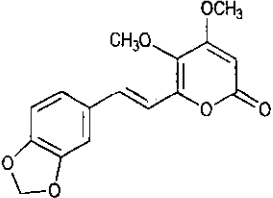
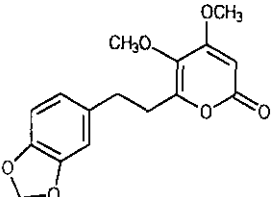
Cuadro 1. Alcaloides aislados de *P. sanctum*

ESTRUCTURA	COMPUESTO	REFERENCIA
	Cefaradiona A	Haensel <i>et al.</i> , 1976
	Cefaradiona B	Haensel <i>et al.</i> , 1976

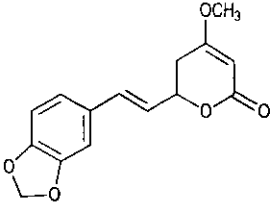
Cuadro 2. Esteroides aislados de *P. sanctum*

ESTRUCTURA	COMPUESTO	REFERENCIA
	β -Sitosterol	Haensel <i>et al.</i> , 1976

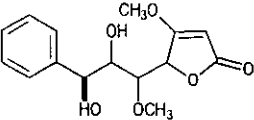
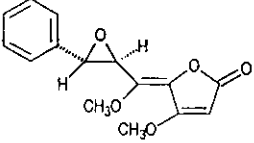
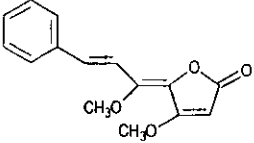
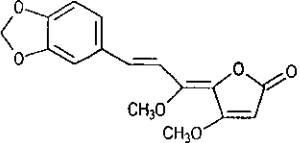
Cuadro 3. Kawapironas aisladas de *P. sanctum*

ESTRUCTURA	COMPUESTO	REFERENCIA
	Kawaina	Haensel <i>et al.</i> , 1982
	(+)-(5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-5-hidroxi-4,6-dimetoxi-6 <i>E</i> -estiril-5,6-dihidro-2 <i>H</i> -piran-2-ona	Haensel <i>et al.</i> , 1982
	(+)-(5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-5-acetoxi-4,6-dimetoxi-6 <i>E</i> -estiril-5,6-dihidro-2 <i>H</i> -piran-2-ona	Haensel <i>et al.</i> , 1976
	5-Metoxi-5,6-deshidro-metisticina	Haensel <i>et al.</i> , 1973
	5-Metoxi-5,6-deshidro-7,8-dihidro-metisticina	Haensel <i>et al.</i> , 1973

Cuadro 3. Kawapironas aisladas de *P. sanctum* (Continuación)

ESTRUCTURA	COMPUESTO	REFERENCIA
	Metisticina	Haensel <i>et al.</i> , 1973

Cuadro 4. Piperólidas aislados de *P. sanctum*

ESTRUCTURA	COMPUESTO	REFERENCIA
	(-)-treo-(3Z)-5-(2,3-dihidroxi-1-metoxi-3-fenilpropilideno)-4-metoxi-2-(5H)-furanona	Haensel <i>et al.</i> , 1982
	7,8-Epoxipiperólida	Pelter <i>et al.</i> , 1972 Bradeczcck <i>et al.</i> , 1978
	Piperólida	Pelter <i>et al.</i> , 1972; Bradeczcck <i>et al.</i> , 1978; Haensel <i>et al.</i> , 1971; Haensel <i>et al.</i> , 1979
	Metilenedioxipiperólida	Haensel <i>et al.</i> , 1971

III PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Procedimientos generales

3.1.1 Análisis cromatográficos

Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron en placas de aluminio recubiertas con gel de sílice de 0.25 mm de espesor (sílica gel 60 F₂₅₄, Merck); las placas se visualizaron con luz UV (onda corta 254 nm y onda larga 365 nm) y posteriormente se revelaron utilizando sulfato cérico como agente cromógeno; para el desarrollo de color las placas se colocaron en una parrilla eléctrica (110°C aprox.) por unos segundos. Para la realización de separaciones en columna abierta se utilizaron columnas de vidrio de diferentes capacidades y gel de sílice (sílica gel 60 F₂₅₄, Merck) como fase estacionaria. Las cromatografías preparativas en capa delgada se realizaron en placas de vidrio (20X20 cm) recubiertas de gel de sílice (1mm de espesor).

3.1.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales

Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato de Fisher-Johns y no se encuentran corregidos. Los espectros en el IR se registraron en un espectrofotómetro FTIR de rejilla Perkin-Elmer, Modelo 1605 o en un aparato Nicolet FT-5X, en pastilla de KBr o película.

Los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico se determinaron en un aparato JEOL JMS-SX102A Hewlett Packard 5890 serie II, mediante introducción directa a 70 eV.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-¹H) y de Carbono 13 (RMN ¹³C) se generaron en un aparato Unity-Inova, marca Varian, el cual se operó a una radiofrecuencia de 300 MHz. Los espectros se registraron en CDCl₃ y los desplazamientos químicos se designaron en unidades δ (ppm), referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

Los análisis arriba indicados se efectuaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM.

3.2 Material vegetal

El tallo de *Piper sanctum* (Miq.) Schl. Se recolectó en Los Tuxtlas en el Municipio de San Andrés Tuxtla, en el estado de Veracruz el 4 de Mayo de 1999.

La identificación de la especie fue realizada por el Dr. Robert Bye del Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM. Un ejemplar de referencia (Voucher GM 423-t) se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional MEXU, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.

El material vegetal se desecó a temperatura ambiente y se fragmentó en un molino Willey Modelo 4.

3.3 Estudio fitoquímico de *Piper sanctum*

3.3.1 Preparación del extracto a mediana escala

La especie vegetal desecada y molida (2.950 kg) se maceró inicialmente con una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) y posteriormente con MeOH. El extracto total se filtró y se concentró al vacío, obteniéndose 95.0 g de un residuo café.

3.3.2 Fraccionamiento primario del extracto total del tallo de *Piper sanctum*

El extracto total (95.0 g) se fraccionó mediante una cromatografía en columna abierta utilizando 1.250 Kg de gel de sílice; el proceso de elución se realizó con hexano, mezclas de Hex-AcOEt (diversas proporciones), AcOEt, mezclas de AcOEt-MeOH (diversas proporciones) y MeOH.

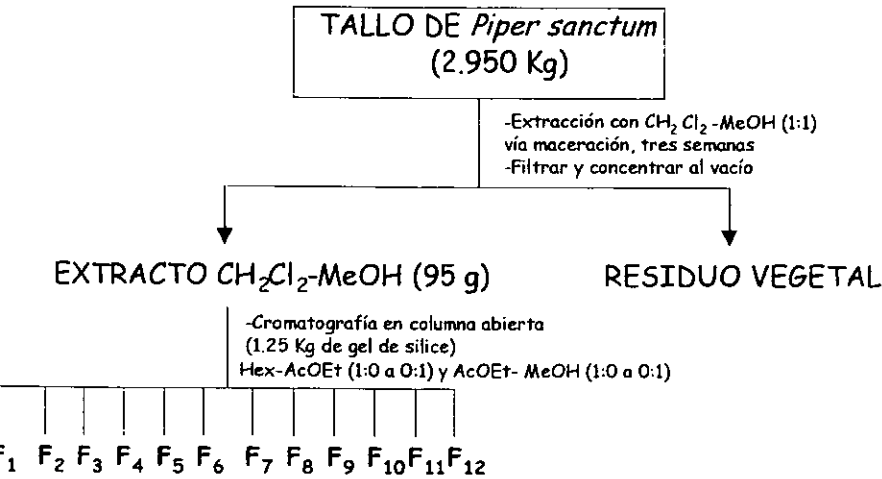


Figura 3. Extracción y fraccionamiento del extracto diclorometano-metanólico (1:1) del tallo de *Piper sanctum*.

Este proceso generó un total de 209 fracciones de 415 mL cada una, las cuales se analizaron por cromatografía en capa fina reuniéndose las que resultaron similares cromatográficamente, así se obtuvo un conjunto de 12 fracciones primarias. Este proceso se resume en el Cuadro 5.

3.3.2.1 Aislamiento del β -sitosterol (F012)

De la fracción primaria F003 precipitaron espontáneamente 0.1436 g de un sólido blanco opalescente con punto de fusión de 154-156°C identificado como β -sitosterol (F012), por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con aquellas de una muestra auténtica.

Cuadro 5. Fraccionamiento primario vía cromatografía en columna abierta del extracto total del tallo de *Piper sanctum*

ELUYENTE(S)	PROPORCIÓN	FRACCIONES	FRACCIONES REUNIDAS	CLAVE	PESO (g)
hexano		1-24	1-37	F001*	1.5536
Hex:AcOEt	9:1	25-38	38-43	F002*	0.9497
	8:2	39-57	44-49	F003*	0.4461
	7:3	58-87	50-56	F004	1.1367
	6:4	88-101	57-78	F005*	3.5065
	1:1	102-117	79-94	F006*	1.2042
	4:6	118-130	95-113	F007	1.5924
	3:7	131-143	114-145	F008*	0.2950
	2:8	144-154	146-167	F009*	0.9430
AcOEt		155-167	168-181	F010	11.8482
AcOEt:MeOH	9:1	168-181	182-194	F011	28.7677
	1:1	182-198	195-209	F012	15.6454
MeOH		199-209			

Fracciones activas

3.3.3 Fraccionamiento secundario de la fracción activa F001

La fracción F001 (1.5536 g) (Cuadro 5) fue recromatografiada mediante una columna abierta utilizando 80.0 g de gel de sílice y como eluyentes hexano, Hex-CH₂Cl₂ (diversas proporciones), CH₂Cl₂, CH₂Cl₂-MeOH (diversas proporciones) y MeOH; este procedimiento generó 442 fracciones de 55 mL cada una de las cuales se combinaron por su similitud cromatográfica, obteniéndose así un conjunto de 12 fracciones secundarias. Este proceso se resume en el Cuadro 6.

3.3.1 Aislamiento y purificación del compuesto 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxibenceno (F013) a partir de la fracción secundaria activa F001-V

La fracción activa F001-V (279.2 mg) fue recromatografiada mediante sucesivas placas preparativas, utilizando como sistema de elución CH_2Cl_2 . Este proceso permitió el aislamiento y purificación de 39.1 mg de 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxibenceno (F013) bajo la forma de un aceite amarillo claro.

3.3.2 Aislamiento y purificación del 1-(2'-propeno)-3,4-dimetoxibenceno (F016) de la fracción secundaria activa F001-VII

Sucesivas cromatografías preparativas de la fracción secundaria F001-VII (211.8 mg), utilizando CH_2Cl_2 como eluyente, permitieron la obtención de 59.6 mg de un compuesto oleoso identificado como 1-(2'-propeno)-3,4-dimetoxibenceno (F016) por métodos espectrométricos y espectroscópicos.

3.3.3 Aislamiento y purificación del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (F015) de la fracción secundaria F001-IX

Sucesivas cromatografías preparativas de la fracción secundaria F001-IX (393.1 mg), utilizando CH_2Cl_2 como eluyente, permitieron la obtención de 85.1 mg de un compuesto identificado como 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (F015) por métodos espectrométricos y espectroscópicos.

Cuadro 6. Fraccionamiento secundario de la fracción activa F001 por cromatografía en columna abierta

ELUYENTE(S)	PROPORCION	FRACCIONES	FRACCIONES REUNIDAS	CLAVE	PESO (mg)	COMPUESTO
hexano		1-17	1-33	F001-0	3.9	
Hex-CH ₂ Cl ₂	99:1	18-27	34-55	F001-I	8.8	
	98:2	28-39	56-74	F001-II	3.5	
	95:5	40-58	75-93	F001-III	3.0	
	93:7	59-62	94-120	F001-IV	244.9	
	9:1	63-99	121-145	F001-V	279.2	F013
	8:2	100-257	146-250	F001-VI	307.5	
	7:3	258-277	251-271	F001-VII	211.8	F016
	6:4	278-300	272-278	F001-VIII	7.2	
	1:1	301-343	279-356	F001-IX	393.1	F015
	4:6	344-359	357-410	F001-X	13.1	
	3:7	360-382	411-442	F001-XI	79.4	
1:9	383-396					
CH ₂ Cl ₂		397-410				
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	9:1	411-425				
	1:1	426-437				
MeOH		438-442				

3.3.4 Preparación de derivados químicos

3.3.4.1 Obtención del derivado metilado del 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxi-benceno (F013m)

Para obtener el derivado metilado del 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxi-benceno (F013) (7.2 mg) se utilizó una solución etérea de diazometano preparada a partir de una solución de KOH (5.0 g de KOH en 7.5 mL de agua destilada), 25 mL de etanol y 21.9 g de N-metil-N-nitroso-*p*-toluensulfonamida (Diazald-Aldrich), en 45 mL de éter etílico. Por cada 100 mg del producto a metilar se utilizaron 20 mL de la solución etérea de diazometano. El producto a metilar se disolvió previamente en etanol o éter etílico, esta mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas.

Como resultado de esta reacción se obtuvo 6.0 mg de un compuesto, cuyas características físicas, espectroscópicas y espectrométricas resultaron idénticas al compuesto 1-(2'-propeno)-3,4-dimetoxi-benceno (F016).

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Selección de la especie *Piper sanctum* como candidato idóneo para la obtención de principios activos

La selección primaria de la especie *Piper sanctum* se realizó con base en consideraciones de tipo etnomédico. Esta consideración tiene su fundamento en que las plantas utilizadas en las prácticas médicas populares son de gran importancia en el descubrimiento de fármacos con posible aplicación terapéutica (Colix y Balick, 1994; Prance, 1994; Houghton, 2001). Como se indicó en la sección de antecedentes la especie goza de reputación folklórica como agente medicinal, en consecuencia es altamente probable que la misma contenga principios biodinámicos.

Una vez realizado el proceso de selección primaria, se procedió a la recolección del material vegetal y preparación del extracto en pequeña escala. Posteriormente el extracto resultante fue evaluado en los laboratorios subcontratados por el proyecto "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America" para determinar su posible actividad biológica. Con base en los resultados obtenidos en estos bioensayos se estableció que *Piper sanctum* es una fuente potencial de productos bioactivos de interés terapéutico. Sin embargo, los acuerdos de confidencialidad establecidos con la Universidad de Arizona no permiten describir las actividades biológicas demostradas por el extracto, fracciones y compuestos puros, por lo que en el presente trabajo sólo se reportarán los resultados derivados del estudio químico.

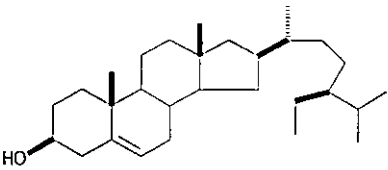
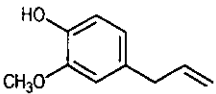
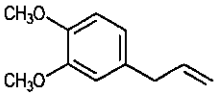
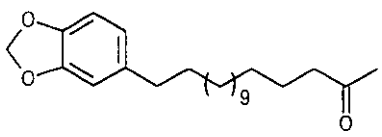
Con la finalidad de obtener los principios activos presentes en la especie *Piper sanctum*, se realizó un estudio fitoquímico biodirigido, para este fin se procedió en primer lugar a la preparación del extracto vegetal a mediana escala, utilizándose un proceso de maceración con una mezcla CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) como disolvente. Posteriormente, el extracto resultante se fraccionó de manera preliminar mediante cromatografía en columna abierta usando gel de sílice como adsorbente. El proceso generó un conjunto de 12 fracciones primarias F001-F012 (Cuadro 1, sección experimental). Las fracciones F001, F002, F003, F005, F006, F008 y F009 resultaron

ctivas. En este estudio de acuerdo a los objetivos planteados se estudió únicamente la fracción F001.

El aislamiento y purificación de los compuestos presentes en la fracción primaria activa F001, se realizó mediante el empleo de diferentes técnicas cromatográficas, incluyendo cromatografía en columna abierta y en capa fina. Estas técnicas permitieron el aislamiento y purificación de cuatro metabolitos secundarios. Estos productos se caracterizaron mediante la aplicación de métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos.

En el Cuadro 7, se ilustran las estructuras de los compuestos aislados de la fracción activa primaria F001 del extracto de *Piper sanctum*.

Cuadro 7. Compuestos aislados de *Piper sanctum*

COMPUESTO	RENDIMIENTO (planta seca, %)
	4.8×10^{-3}
	1.3×10^{-3}
	2.0×10^{-3}
	2.8×10^{-3}

2 Caracterización de los compuestos aislados y sus derivados químicos

2.1 Caracterización del 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxi-benceno (F013) y del 1-(2'-propeno)-3,4-dimetoxi-benceno (F016)

El 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxi-benceno (F013) se obtuvo mediante sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada de la fracción secundaria F001-V. Las constantes espectroscópicas y espectrométricas del producto natural se resumen en el Cuadro 8.

El espectro en el IR (Cuadro 8) presentó absorciones características para aromaticidad (1608 y 1513 cm^{-1}) y para funciones hidroxilo (3445 cm^{-1}) y metil éter fenólico (1267 cm^{-1}).

El espectro de masas (Cuadro 8) generado por la técnica de impacto electrónico (EMIE) mostró el ion molecular con una relación de m/z 164 uma y correspondió a la fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$. Esta fórmula permite cinco insaturaciones.

La información proporcionada por los espectros de masas y los espectros de RMN permitieron comprobar que el producto F013 presenta el perfil típico de un fenilpropanoide (Bohlmann *et al.*, 1983, 1985; Bottini *et al.*, 1986; Fuzzati *et al.*, 1995; Sugimoto *et al.*, 1995; *inter alia*). Las características más importantes observadas en los espectros de RMN se resumen a continuación (Espectros 1 y 2):

a) En δ_{H} 6.84 (d, $J=8.7$ Hz, H-6) y 6.68 (m, H-2 y H-5) se observan dos señales asignables a los protones del anillo aromático del núcleo base. En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 4) las señales para el anillo aromático aparecen en δ_{C} 131.9 (C-1), 121.1 (C-2), 146.4 (C-3), 143.8 (C-4), 111.0 (C-5) y 114.1 (C-6). Este conjunto de señales describe la presencia de un anillo aromático trisustituido. Así mismo, el desplazamiento químico de las señales en δ_{C} 143.8 y 146.4, indican que dos de los sustituyentes del anillo aromático son oxigenados.

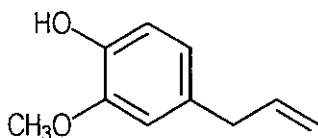
b) En δ_{H} 3.88 se aprecia un singulete y un singulete ancho correspondientes a un grupo metoxilo y un grupo hidroxilo, respectivamente. Esta última señal desaparece al equilibrar el espectro con D_2O . La señal del metoxilo correlaciona en el espectro de RMN ^{13}C HMQC (espectro 3) con la absorción en δ_{C} 55.8.

) Finalmente, los espectros contienen señales diagnósticas para la cadena propanoide del núcleo base los cuales se observan como sistema ABCX. La parte ABC corresponde a los hidrógenos de una doble ligadura terminal y las absorciones correspondientes aparecen en: δ_H 5.08 (m, H-3'_A), 5.06 (m, H-3'_B) y 5.95 (td, $J=6.9$ y 17.1 Hz, H-2') en el espectro de RMN¹H (Espectro 3) y en δ_C ~115 y ~137 en el espectro de RMN¹³C. La parte X del sistema se asigna a los protones bencílicos presentes en el C-1' de la cadena lateral. La señal correspondiente se observa como un doblete de tripletes ($J=1.2$ y 6.6 Hz) en δ_H 3.32 y en δ_C ~39 en los espectros de RMN¹H y RMN¹³C, respectivamente.

El patrón de sustitución del anillo aromático y la ubicación de los sustituyentes en el mismo se estableció mediante el análisis comparativo de los desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN con los de una serie de modelos descritos en la literatura (Bohlmann *et al.*, 1983, 1985; Bottini *et al.*, 1986; Fuzzati *et al.*, 1995; Sugimoto *et al.*, 1995; *inter alia*; Rivero Cruz, 1999). Con base en las evidencias presentadas el producto natural fue caracterizado como el 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxi-benceno. Es importante destacar que las constantes espectroscópicas concordaron con las previamente descritas para este producto (Hwang *et al.*, 1993; Avella *et al.*, 1994).

Por otra parte, el producto **F016** obtenido de la fracción secundaria F001-VII mediante sucesivas cromatografías en capa fina presentó las constantes espectroscópicas y espectrométricas resumidas en el Cuadro 9.

Cuadro 8. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxi-benceno (**F013**)



1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxi-benceno (**F013**)

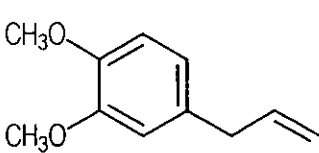
Fórmula molecular: $C_{10}H_{12}O_2$

IR $\nu_{\text{máx}}$ KBr, (cm^{-1}): 3445, 2924, 2850, 1704, 1637, 1608, 1513, 1463, 1431, 1267, 1233, 1149, 1122, 1034, 912, 817, 794, 745, 647, 598 y 556.

EMIE m/z (int. rel.): 164 [M^+ (100)], 149 (30.5), 131 (20.0), 121 (16.2), 103 (23.8), 91 (21.9), 77 (23.8), 65 (8.6), 55 (11.4), 51 (8.1), 39(4.8), 91 (21.9) y 77 (23.8).

El espectro en el IR (Cuadro 9) del producto **F016** evidenció la presencia de funciones metil-éter fenólico (1267 cm^{-1}). El espectro de masas (Cuadro 9) permitió determinar su fórmula molecular como $C_{11}H_{14}O_2$, la cual permite cinco insaturaciones, al igual que en el producto **F013**. El ión molecular observado en una relación de m/z 178 uma, presenta 14 unidades de masa más que el compuesto **F013**.

Cuadro 9. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del 1-(2'-propeno)-3,4-dimetoxi-benceno (**F016**).

 <p>1-(2'-propeno)-3,4-dimetoxi-benceno (F016)</p>
Fórmula molecular: $C_{11}H_{14}O_2$
IR $\nu_{m\acute{a}x}$ KBr, (cm^{-1}): 3075, 2999, 2927, 2852, 2833, 1715, 1637, 1590, 1514, 1464, 1418, 1337, 1260, 1235, 1189, 1154, 1140, 1030, 912, 805, 765, 747, 645, y 600.
EMIE m/z (int. rel.): 178 [M^+ (100)], 163 (38.9), 147 (35.6), 135 (16.7), 115 (10.0), 103 (27.8), 91 (27.8), 77 (12.2), 65 (8.9), 51 (6.7), 41 (4.4) y 39 (4.4).

Los espectros de RMN (Espectros 4.5 y 6) resultaron muy similares a los del producto **F013**, difiriendo fundamentalmente en la ausencia de la señal asignada a la función fenólica; en su lugar, en el espectro de RMN¹H se observa un singulete adicional en $\delta_{H1} \sim 3.8$ correspondiente a la presencia de otro grupo metoxilo. Estas observaciones, aunadas a la diferencia de 14 uma en el EM, permitieron inferir que el producto **F016** es el éter metílico del 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxibenceno (**F013**).

La correlación química del producto **F016** con **F013** a través de una reacción de metilación con diazometano permitió comprobar esta hipótesis. El tratamiento de **F013** con un exceso de una solución etérea de diazometano generó un producto idéntico en todos sus aspectos al producto natural **F016**; entonces el producto **F016** se caracterizó como 1-(2'-propeno)-3,4-dimetoxi-benceno.

El producto **F013** conocido con el nombre trivial de eugenol, es un componente del aceite esencial de clavo. El eugenol es un principio ampliamente utilizado en la industria perfumera, en la industria alimenticia (como agente de sabor), en la industria agrícola (como insecticida) y en la medicina (en la preparación de cemento dental y como anestésico local) (Houghton; 2001).

3.2.2 Caracterización del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (**F015**)

El 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (**F015**) se obtuvo mediante sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada a partir de la fracción secundaria F001-IX. Las constantes espectroscópicas y espectrométricas del producto natural se resumen en el Cuadro 11.

El espectro en el IR (Cuadro 11) presentó absorciones características para C-H alifático (2914 cm^{-1}), aromaticidad (1608 y 1513 cm^{-1}) y un grupo carbonilo de cetona (1713 cm^{-1}).

El espectro de masas (Cuadro 11) generado por la técnica de impacto electrónico (EMIE) mostró un ion molecular con una relación m/z de 360 una correspondiente a la fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{O}_3\text{H}_{36}$, la cual permite seis insaturaciones. Otros picos importantes en el espectro de masas (Cuadro 11) se observaron en m/z 302, 148 y 135.

Los espectros de RMN (Cuadro 12, Espectros 7-11) del producto **F015** permitieron evidenciar la presencia de un anillo aromático trisustituido, además de las absorciones diagnósticas para una cadena alifática, un grupo metilendioxi y un grupo acetilo. Las características más importantes de los espectros se resumen a continuación:

Cuadro 10. Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN¹H y RMN¹³C de los fenilpropanoides 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxi-benceno (F013) y 1-(2'-propeno)-3,4-dimetoxi-benceno (F016) (Espectros 1, 2, 4 y 5)

Posición	F013		F016	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1		131.90		132.52
2	6.68 m	121.13	6.74 dd (0.6,1.8)	120.30
3		146.38		148.78
4		143.83		147.28
5	6.68 m	111.03	6.72 d (9.9)	111.14
6	6.84 d (8.7)	114.18	6.8 d (8.4)	111.75
1'	3.32 dt (1.2,6.6)	39.88	3.33 dt (1.5,6.6)	39.72
2'	5.95 td (6.9,17.1)	137.80	5.96 td (6.9,16.8)	137.60
3' _A	5.08 m	115.52	5.09 m	115.51
3' _B	5.06 m		5.06 m	
OH	3.88 m	55.91		
OCH ₃	3.88 s	55.83	3.86 s	55.82
OCH ₃			3.85 s	55.68

*Los valores de desplazamiento químico se expresan en ppm. El estándar interno es TMS. Las constantes de acoplamiento se expresan en Hertz y se encuentran en paréntesis.

a) En δ_{H} 6.72 (dd, $J=8.0$ Hz, H-6'), 6.67 (sd, $J=1.6$ Hz, H-2') y 6.61 (dd, $J=1.6$ y 9.2 Hz, H-5') se observan tres señales asignables a los protones del anillo aromático. Estas señales forman un sistema ABX. En el espectro de RMN¹³C (Espectro 8) las señales para el anillo aromático aparecen en δ_{C} 136.8 (C-1'), 108.8 (C-2'), 145.3 (C-3'), 147.4 (C-4'), 121.0 (C-5') y 107.9 (C-6'). El conjunto de señales recién descritas revelaron la presencia de un anillo aromático trisustituido. Así mismo los desplazamientos químicos de las señales en δ_{C} 145.3 y 147.4 indican que dos de los sustituyentes del anillo aromático son oxigenados.

b) En δ_H 5.91 se observa la presencia de un singulete asignable a un grupo metilendioxi unido al anillo aromático. Esta señal correlaciona en es espectro de RMN¹³C HMQC (Espectro 11) con la absorción en δ_C 100.6.

c) En δ_H 1.56 y δ_H 1.27 se aprecian dos singuletes anchos que integran para 24 hidrógenos, asignables a los metilenos de una cadena alifática. La señal en δ_H 1.56 correlaciona en el espectro NOESY (Figura 5) con los dos tripletes ($J= 7.4$ Hz) en δ_H 2.51 y 2.41. A su vez estas dos últimas señales correlacionan con las absorciones en δ_C 35.6 y 43.8, respectivamente, en el espectro HMQC. El desplazamiento observado en los espectros de RMN para los dos grupos metilenos permitió inferir que el correspondiente a la señal en δ_H 2.51 se encuentra unido a un grupo carbonilo y que el segundo (δ_H 2.41) es de naturaleza bencílica. El patrón de fragmentación observado en el espectro de masas es congruente con esta propuesta ya que el pico intenso en m/z 135 se generó mediante una ruptura bencílica, seguida de una pérdida de 225 unidades de masa a partir del ion molecular. Este fragmento es característico para los derivados de tipo alquilbencénicos sustituidos con un grupo metilendioxi en el anillo aromático. En la Figura 5 se muestra el patrón de fragmentación del compuesto **F015** (Joshi *et al.*, 1975).

d) En δ_H 2.1 se aprecia un singulete correspondiente a un grupo acetilo unido a una cadena alifática. Esta señal correlaciona en el espectro HMQC con la absorción en δ_C ~29.

e) Finalmente, en δ_C 209.4 se aprecia una señal diagnóstica para un grupo carbonilo de cetona.

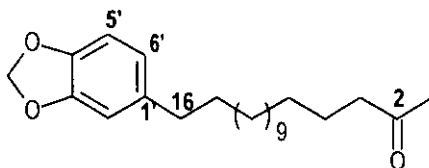
El conjunto de señales indicadas en los incisos **d** y **e** indicaron que el compuesto presenta una función metil cetona en el extremo de la cadena alifática.

Las evidencias proporcionadas por los espectros de RMN claramente indicaban que el producto contenía un anillo aromático trisustituido por un grupo metilendioxi y una cadena alquilica con una función metil cetona en su parte terminal.

El patrón de acoplamiento de los hidrógenos aromáticos y la correlación observada entre los hidrógenos aromáticos en δ_H 6.67 (H-2') y δ_H 6.61 (H-5') y los hidrógenos bencílicos en el espectro NOESY permitieron proponer que el grupo metilendioxi se encuentra ubicado en las posiciones C-3' y C-4' del anillo aromático.

Con base en las evidencias presentadas, el producto natural fue caracterizado como el 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (F015).

Cuadro 11. Constantes espectrométricas y espectroscópicas del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (F015)



2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (F015)

Fórmula molecular: $C_{23}O_3H_{36}$

IR $\nu_{\text{máx}}$ KBr, (cm^{-1}): 2914, 2848, 1713, 1498, 1490, 1471, 1439, 1362, 1228, 1190, 1162, 1032, 936, 916 y 715.

EMIE m/z (int. rel.): 360 [M^+ (100)], 345 (3.0), 302 (54.6), 163 (3.0), 148 (15.3), 135 (83.9), 105 (8.4), 91 (5.3), 77 (9.2), 58 (7.6), 43 (16.8) y 41 (4.6).

Cuadro 12. Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN¹H y RMN¹³C del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (**F015**) (Espectros 7 y 10)*

Posición	F015	
	δ_{H}	δ_{C}
1'		136.8
2'	6.67 sd (1.6)	108.8
3'		145.3
4'		147.4
5'	6.61 dd (1.6, 9.2)	121.0
6'	6.72 dd (8.0)	107.9
2	2.51 t (7.6, 15.2)	43.8
16	2.41 t (7.2, 14.8)	35.6
OCH ₂ O	5.91 s	100.0
CH ₃ CO	2.13 s	29.8
CH ₃ CO		209.4

- Los valores de desplazamiento químico se expresan en ppm. El estándar interno es TMS. Las constantes de acoplamiento se expresan en Hertz y se encuentran en paréntesis.

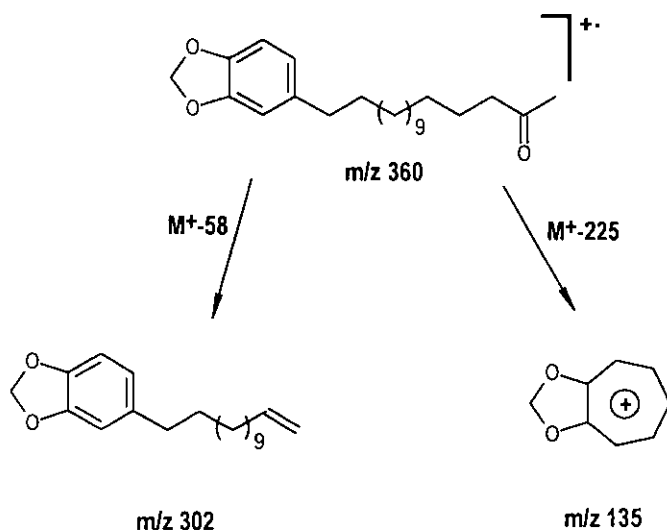


Figura 4. Patrón de fragmentación del compuesto 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (**F015**)

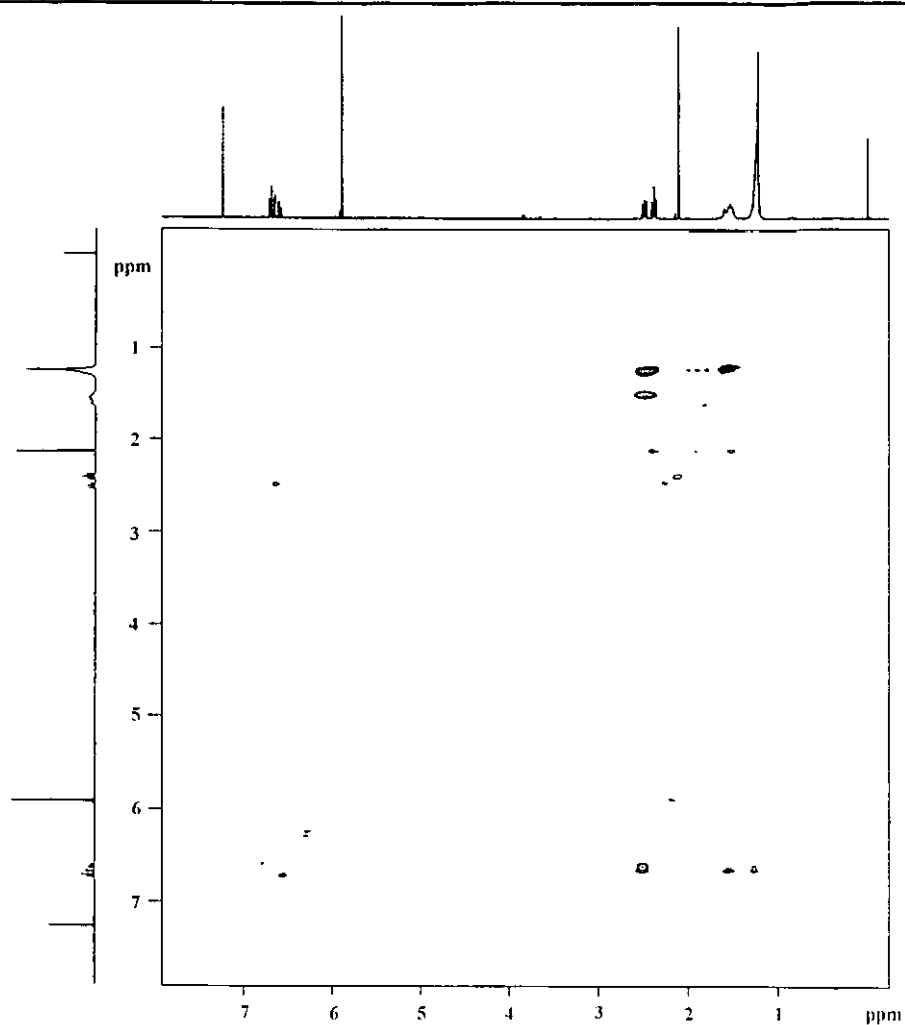


Figura 5. Espectro de RMN modalidad NOESY del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxyfenil)-hexadecano (F015).

V RESUMEN Y CONCLUSIONES

1.- La especie medicinal *Piper sanctum* (Miq.) Schl. es una fuente potencial de principios activos de interés terapéutico. La potencialidad biológica del extracto se demostró en el marco del proyecto "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America".

2.- El fraccionamiento biodirigido del extracto total permitió el aislamiento y la caracterización de tres metabolitos secundarios a partir de la fracción activa F001. Los metabolitos se caracterizaron como: 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxi-benceno (F013), 1-(2'-propeno)-3,4-dimetoxi-benceno (F014) y 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (F015). Cabe destacar que el producto F015 constituye un nuevo producto natural. En general, la caracterización de los productos naturales y sus derivados se realizaron por métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos.

3.- El presente estudio constituye una aportación adicional al conocimiento de la flora medicinal mexicana y contribuye al conocimiento del contenido metabólico de la especie medicinal *Piper sanctum*.

4.- Desde el punto de vista quimiotaxonómico es importante mencionar que la presente investigación describe por primera vez la presencia de fenilpropanoides y compuestos relacionados en la especie *Piper sanctum*.

VI PERSPECTIVAS

Completar el estudio fitoquímico de las restantes fracciones activas derivadas del extracto CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) de la especie *Piper sanctum*.

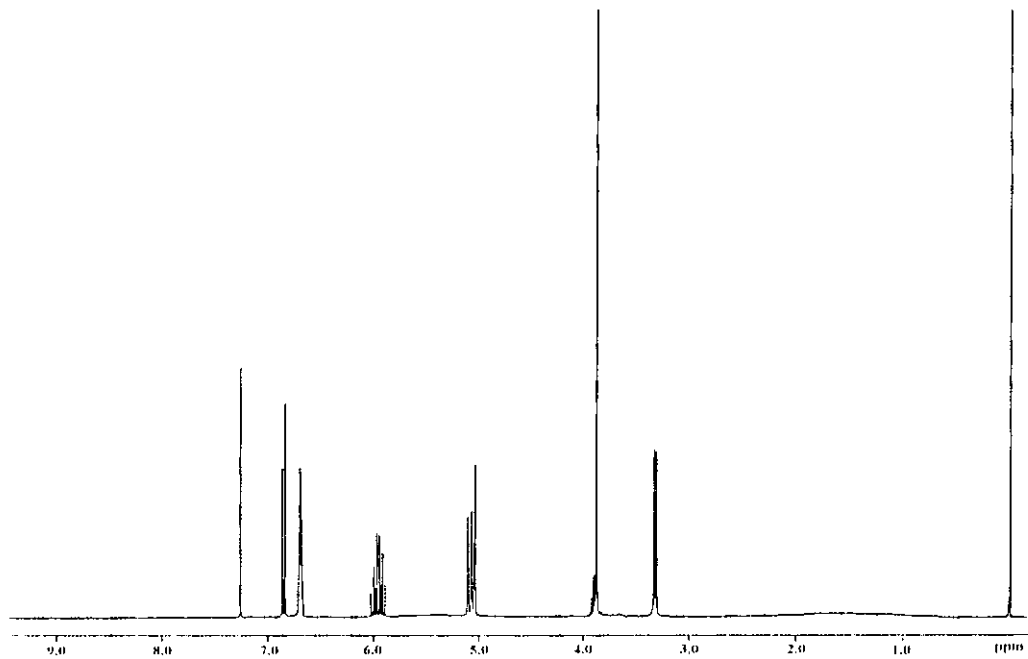
BIBLIOGRAFÍA

- Akasu, M. (1975). Oxoaporphine alkaloids from callus tissue of *Stephania cepharanta*. *Phytochemistry* **14**, 1673-1674.
- Argueta, A.; Cano, A.; Rodarte, M. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana II. Instituto Nacional Indigenista, México, pp 813.
- Bohlmann, F.; Ahmed, M.; Grenz, M.; King, R.; Robinson, H. (1983). Bisabolene derivatives and other constituents from *Coreopsis* species. *Phytochemistry* **22**, 2858-2859.
- Bohlmann, F.; Banerjee, S.; Jakupovic, J.; King, R.; Robinson, H. (1985). Bisabolene derivatives and acetylenic compounds from Peruvian *Coreopsis* species. *Phytochemistry* **24**, 1295-1297.
- Bottini, A.; Dev, V.; Garfagnoli, D.; Mathela, C.; Melkani, A.; Miller, A.; Sturm, N. (1986). Oxiranylphenyl ester from *Pimpinella diversifolia*. *Phytochemistry* **25**, 207-211.
- Desai, S.; Prabhu, B.; Mulchandani, N. (1988). Aristolactams and 4,5-Dioxoaporphines from *Piper longum*. *Phytochemistry* **27**, 1511-1515.
- Fuzatti, N.; Sutarjadi, W.; Dyatmiko, W.; Rahman, A.; Hostettmann, K. (1995). Phenylpropane derivatives from roots of *Cosmos caudatus*. *Phytochemistry* **39**, 409-412.
- Haensel, R.; Leuschke, A. (1976). Ein aporphinalkaloid aus *Piper sanctum*. *Phytochemistry* **15**, 1323.
- Haensel, R.; Leuschke, A.; Gomez-Pompa, A. (1975). Aporphine-Type Alkaloids from *Piper auritum*. *Journal of Natural Products* **38**, 529-530.

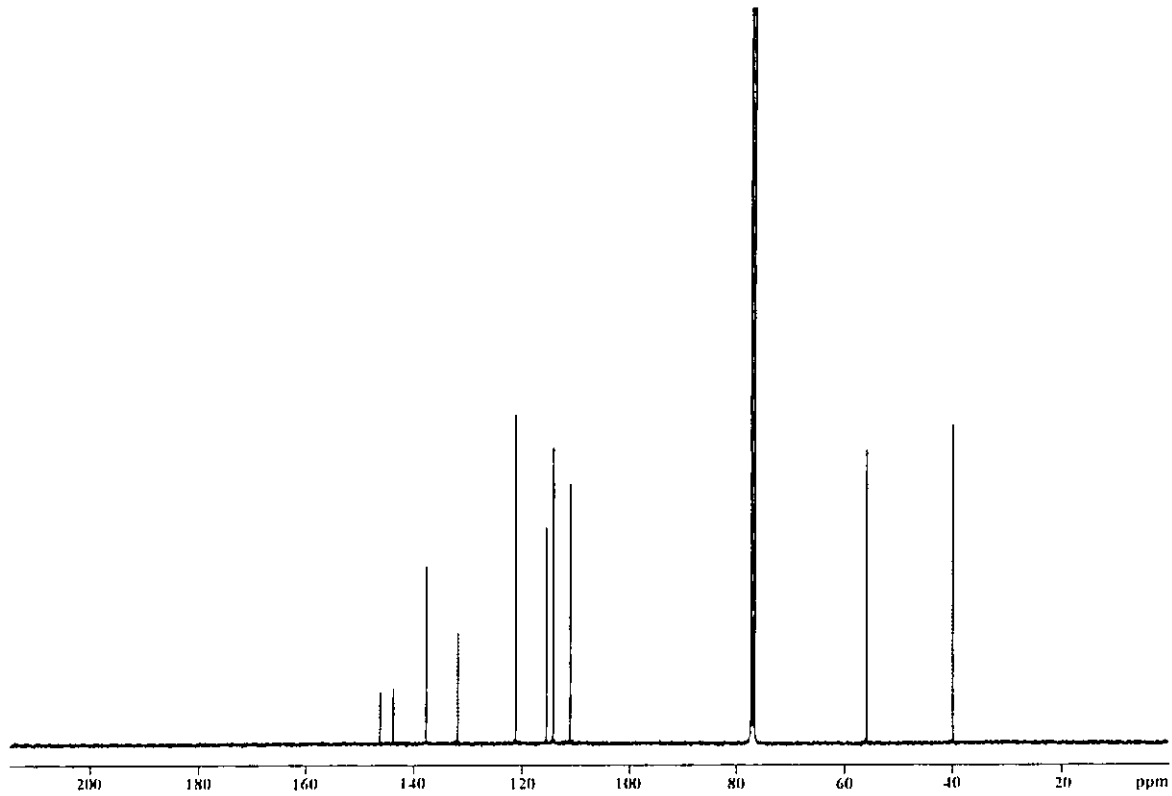
- Haensel, R.; Pelter, A. (1971). Cinnamylidenbutenolide aus *Piper sanctum*. *Phytochemistry* **10**, 1627-1634.
- Haensel, R.; Pelter, A.; Schulz, J.; Hille, C. (1976). Ein 5-acetoxy-6-metoxycawain aus *Piper sanctum* und synthese beider Diastereomeren. *Chemisch Berichte* **109**, 1617-1624.
- Houghton, P. (2001). Old yet New Farmaceuticals from Plants. *Journal of Chemical education* **78**, 175-184.
- Instituto Indigenista de México. (1994). Flora Medicinal Indigenista de México II y III, México, pp 643, 1040, 1187, 1527.
- Lowery, C. (1993). Reagents chemicals. American Chemical Society Specification. Edit. Washington, D.C., pp 90-91.
- Márquez, C.; Lara, F.; Esquivel, B.; Mata, R. (1999) Plantas Medicinales de México II "Composición, usos y actividad biológica". UNAM, pp 99.
- Martínez, M. (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Ed. Fondo de Cultura Económica. México, pp 446.
- Parmar, V.; Jain, S.; Bisht, K.; Jain, R.; Tahesa, P.; Jha, A. (1997). Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* **46**, 597-673.
- Pereda, R.; Bernárd, C.; Durst, T.; Arnason, T.; Sánchez, P.; Poveda, L.; San Román L. (1997) Methyl 4-Hydroxy-3-(3'-methyl-2'-butenyl)Benzoate, Major Insecticidal Principle from *Piper guanacastensis*. *Journal of Natural Products* **60**, 282-284.

- Rivero Cruz, I. (1999). Compuestos bioactivos de *Cosmos pringlei* Rob.& Fern. (Asteraceae). Determinación de la configuración absoluta del 8 α ,13-epoxilabdano-14S,15 diol. Tesis de Maestría. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Silverstein, R.M. (1997) Spectrometric identification of organic compounds., 5^a. edition., John wiley Sons, Inc., p. 419.
- Smith, R. M. (1983). Kava Lactones in *Piper methisticum* from fiji. *Phytochemistry* **22**, 1055-1056.
- Shrader, S. (1974). Introductory Mass Spectrometry. Edit. Allyn and Bacon. Inc., 2^a Edition., Boston, USA, pp 246.
- Suffness, M.; Cragg, G.; Grever, M.; Grifo, F.; Johnson, G.; Mead, J.; Schepartz, S.; Venditti, J.; Wolpert, M. (1993). The National Cooperative Natural Products Drug Discovery Group (NCPDDG) and International Cooperative Biodiversity Group (ICBG) Programs. *International Journal of Pharmacognosy* **33**, 175-184.
- Tabuneng, W.; Bando H.; Takeshi A. (1983). Studies on Constituents of the Crude Drug "Piperis Longi Fructus". On the Alkaloids of Fruits of *Piper longum* L. *Pharmaceutical Bulletin* **31**, 3562-3565.

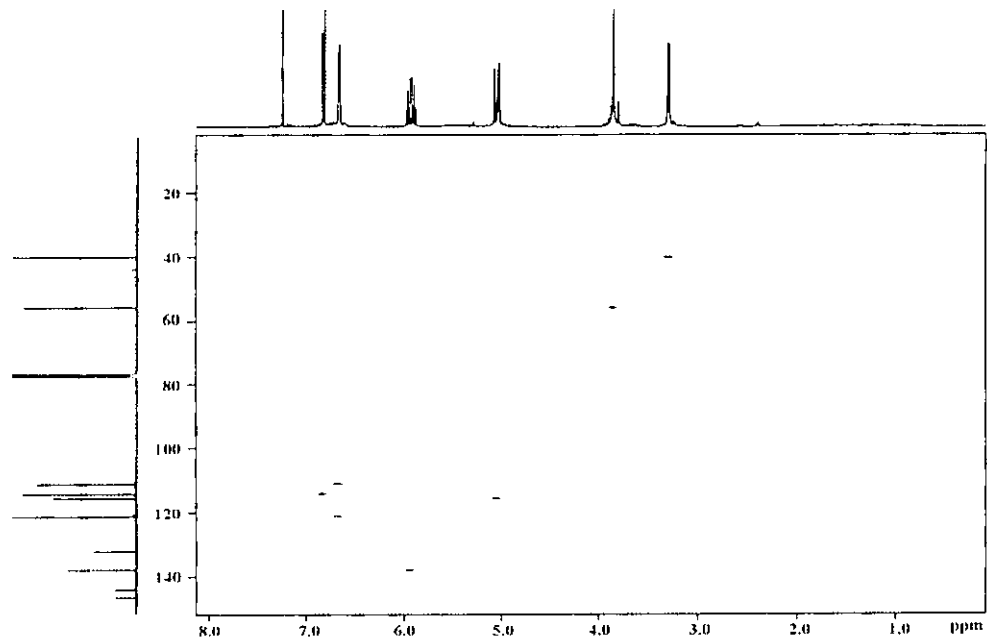
APÉNDICE



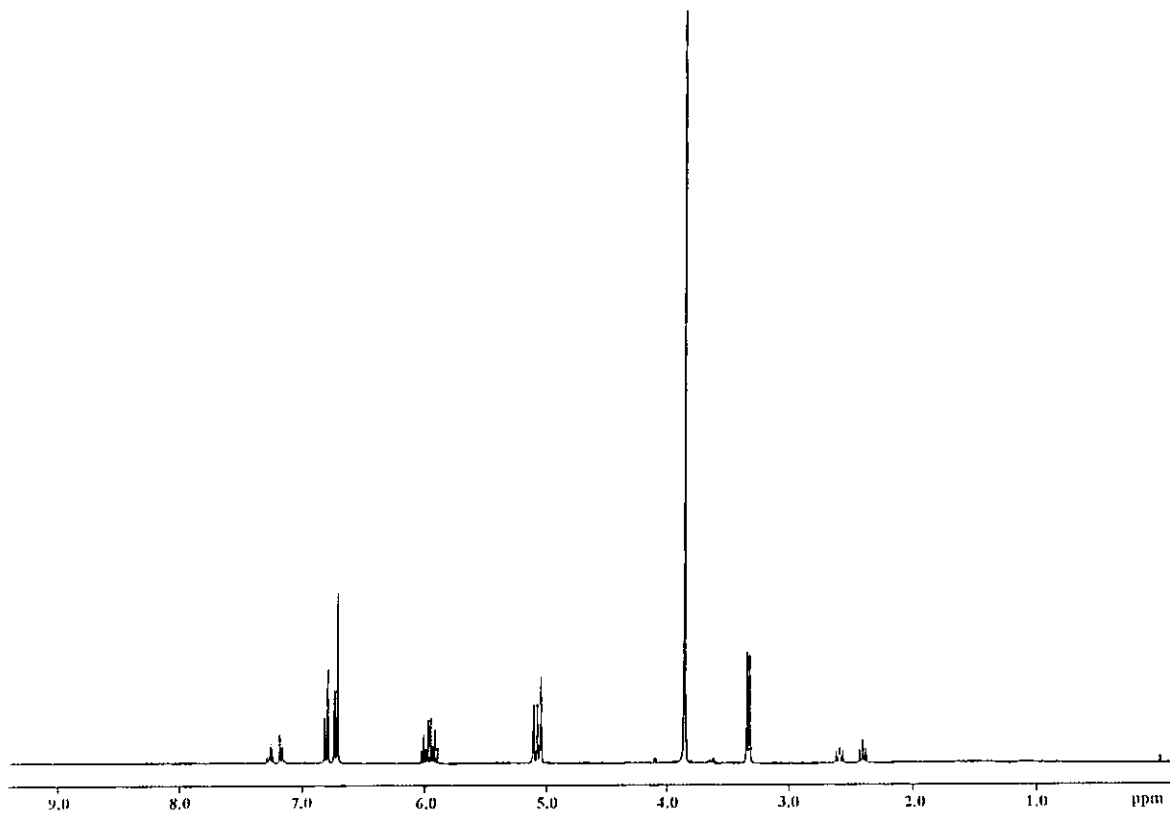
Espectro 1. Espectro de RMN¹H del 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxi-benceno (F013).



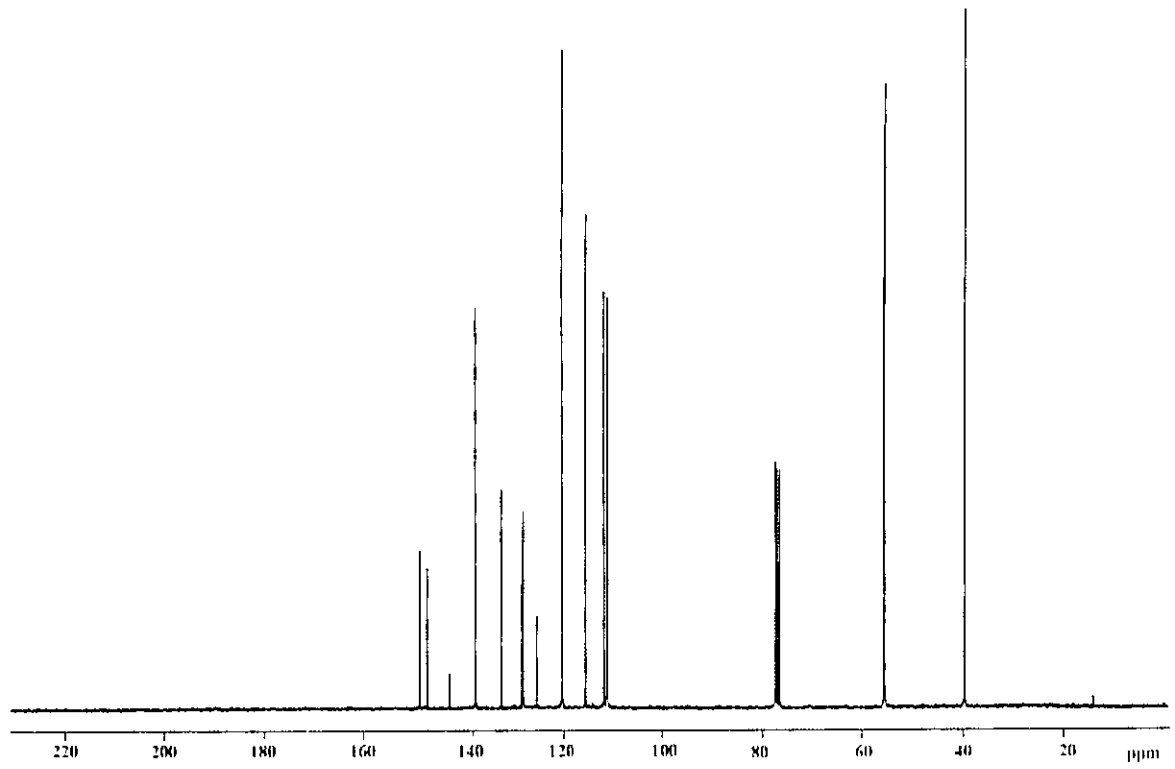
Espectro 2. Espectro de RMN ^{13}C del 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxi-benceno (F013).



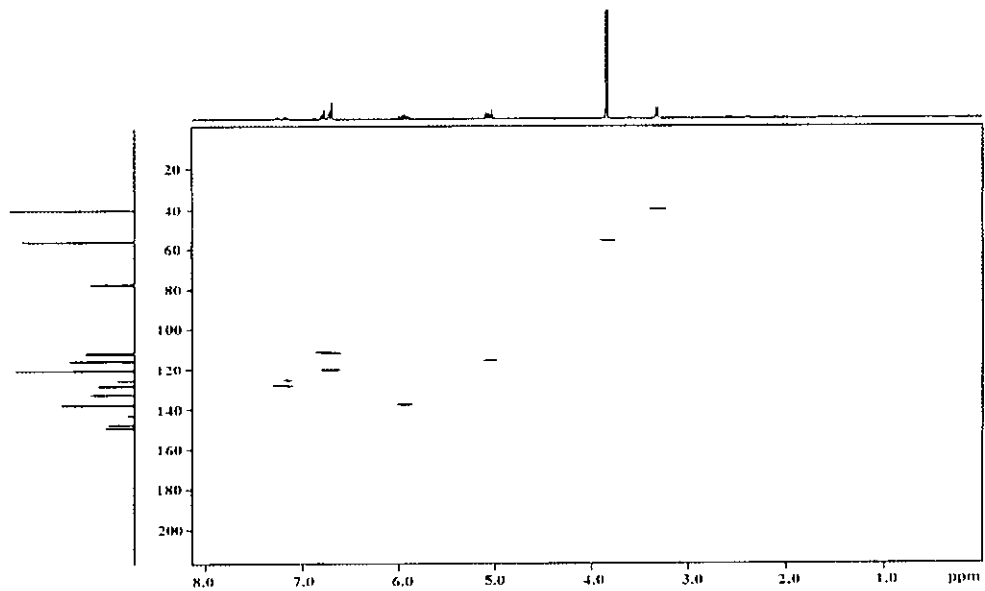
Espectro 3. Espectro de RMN^{13}C modalidad HETCOR del 1-(2'-propeno)-3-metoxi-4-hidroxi-benceno (F013).



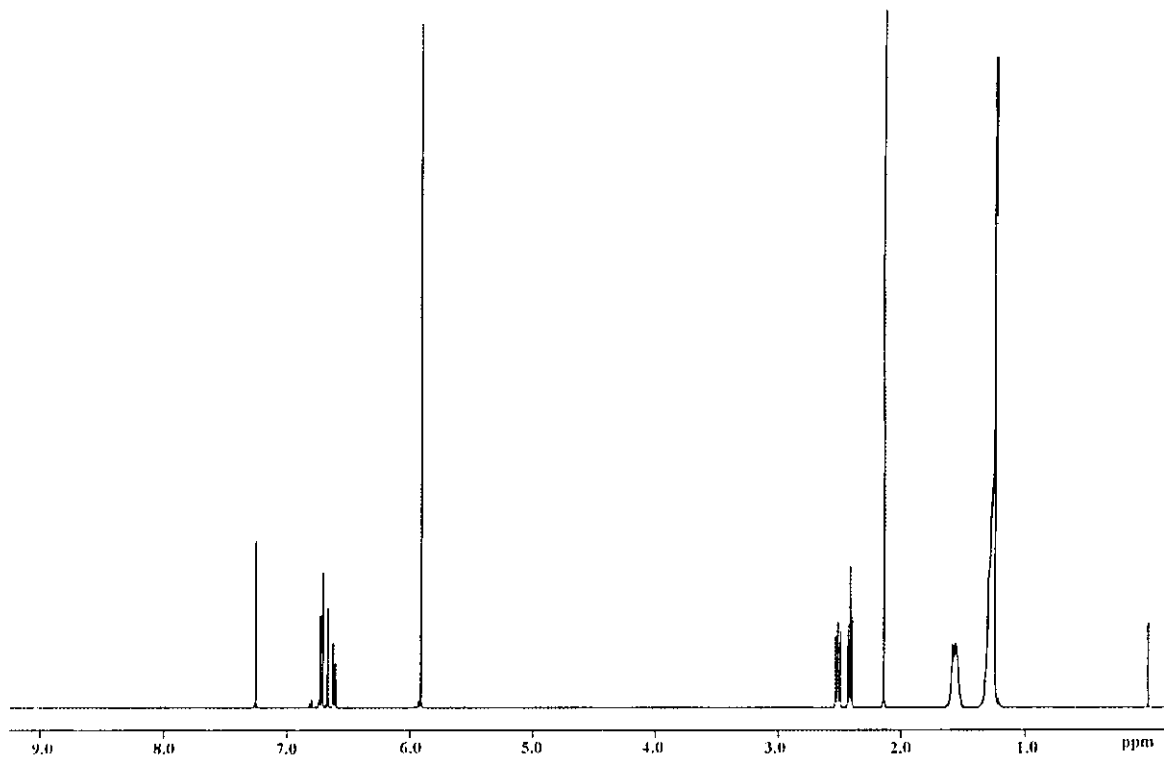
Espectro 4. Espectro de RMN¹H del 1-(2'-propeno)-3,4-dimetoxi-benceno (F016).



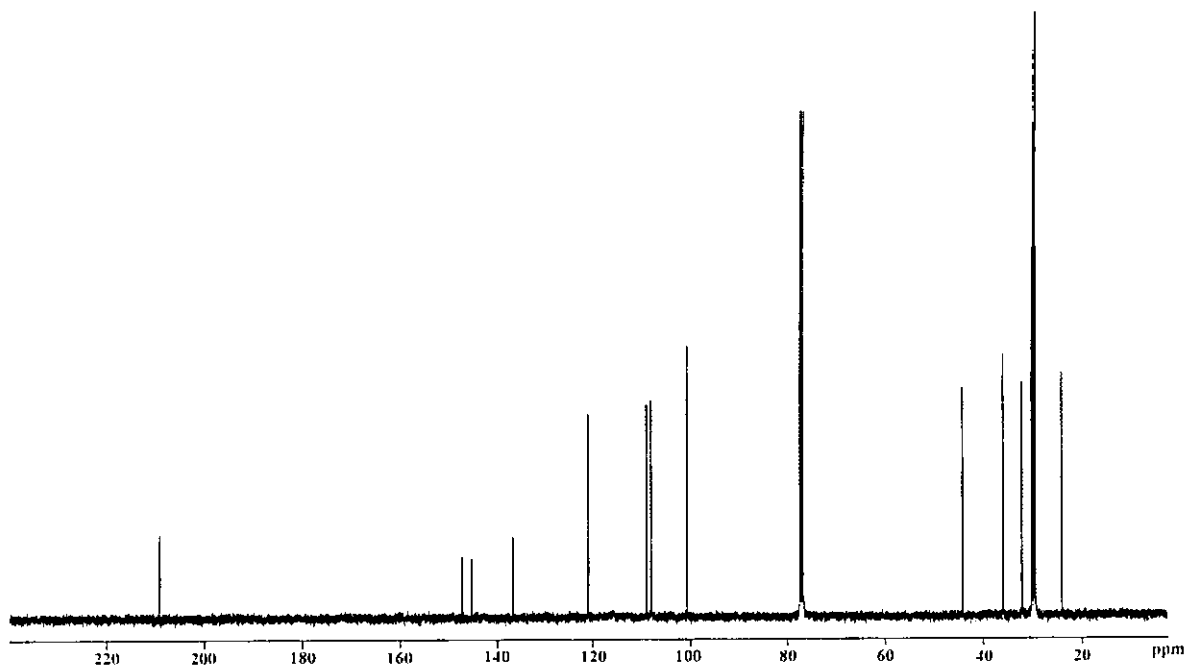
Espectro 5. Espectro de RMN¹³C del 1-(2'-propeno)-3,4-dimetoxi-benceno (F016).



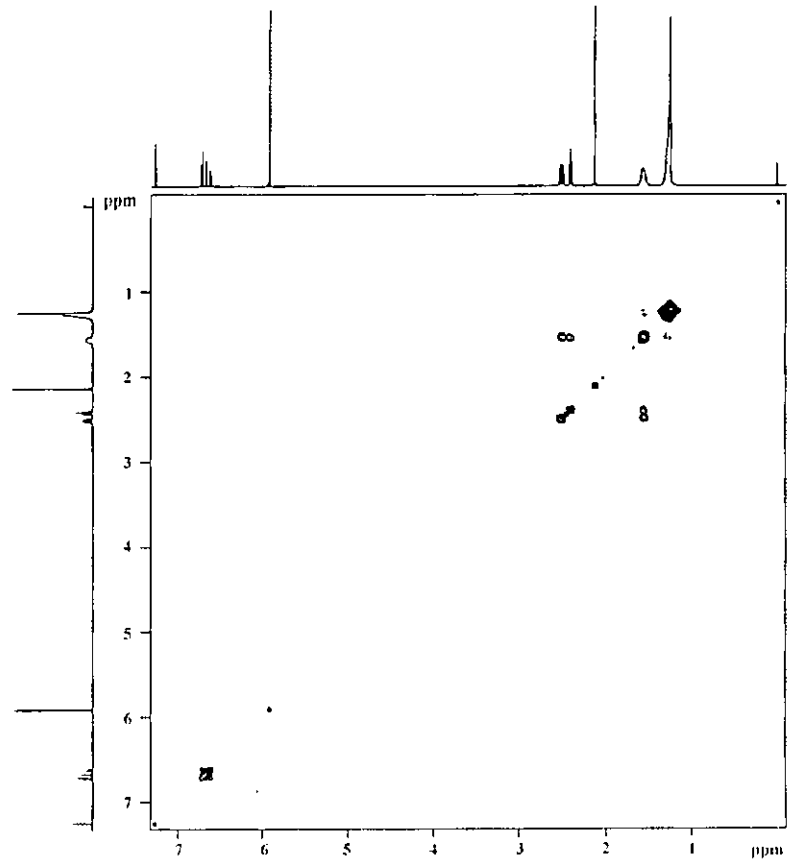
Espectro 6. Espectro de RMN ^{13}C modalidad HETCOR del 1-(2'-propeno)-3,4-dimetoxi-benceno (F016).



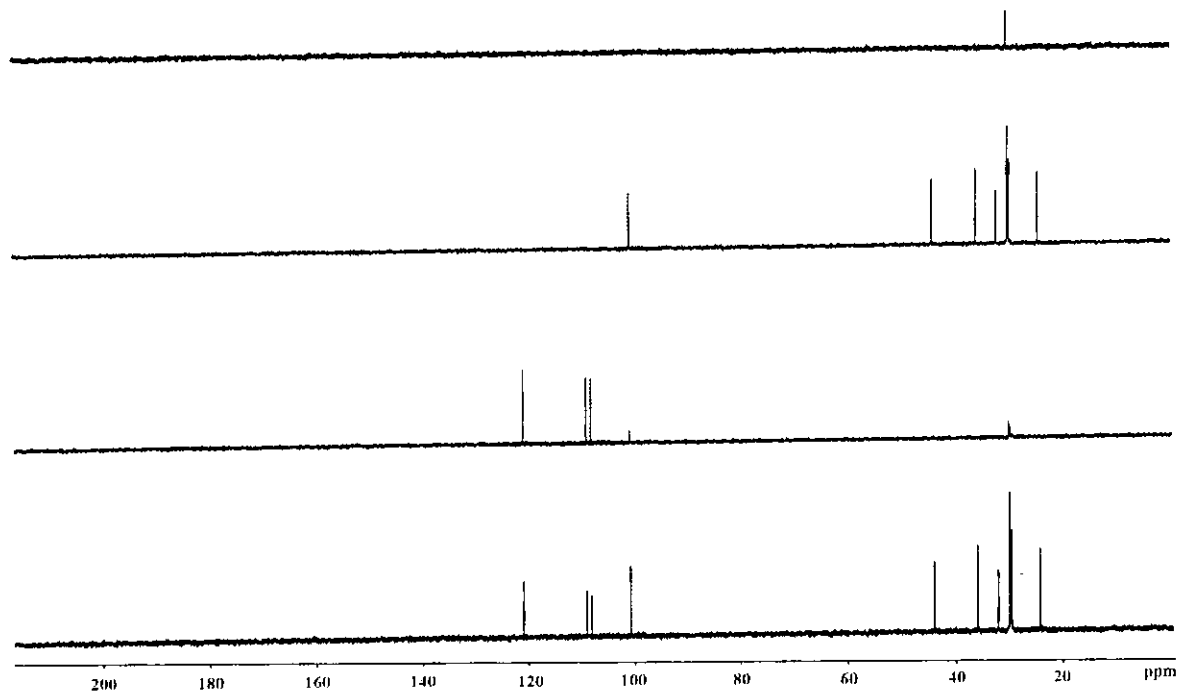
Espectro 7. Espectro de RMN¹H del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxyfenil)-hexadecano (F015).



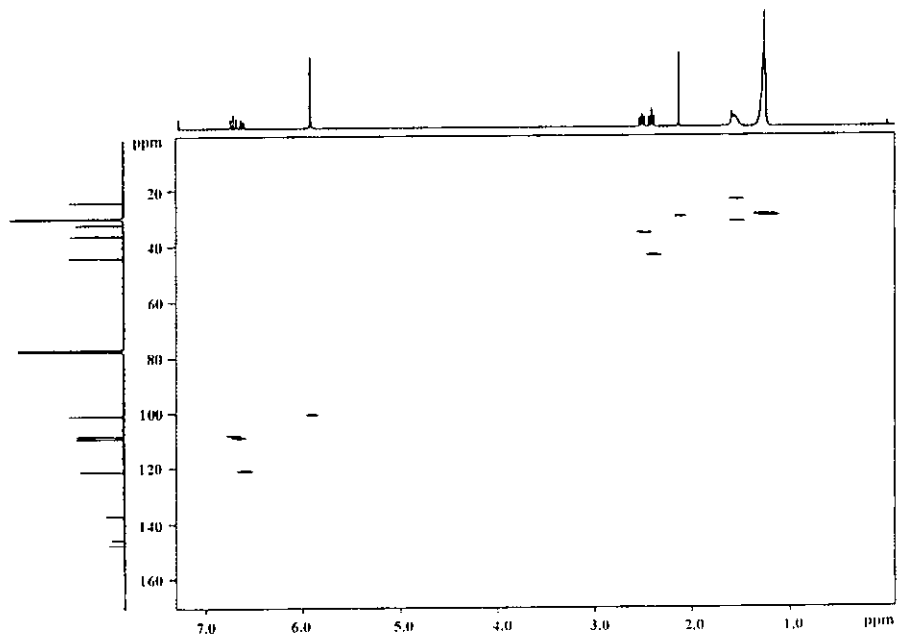
Espectro 8. Espectro de RMN ^{13}C del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxyfenil)-hexadecano (F015).



Espectro 9. Espectro de RMN¹H modalidad COSY del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxyfenil)-hexadecano (F015).



Espectro 10. Espectro de RMN^{13}C modalidad DEPT del 2-oxo-16(3',4'-metilendioxfenil) hexadecano (F015).



Espectro 11. Espectro de RMN¹³C modalidad HETCOR del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxyfenil)-hexadecano (F015).