

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS QUÍMICAS

"COMPUESTOS AROMÁTICOS ANTIMICOBACTERIANOS DE LAS HOJAS DE *Piper sanctum*
(Piperaceae)"

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A

Q.F.B. ILIANA MORALES BARRIENTOS

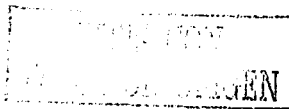
TUTOR

DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

UNAM a la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico e impr
contenido de mi trabajo recepci
NOMBRE: Iliana Morales
Barrientos
FECHA: 09-Abril-03
FIRMA: Iliana Morales B.



Ciencias
Químicas



2003



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.

PAGINACION

DISCONTINUA

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Leovigildo Quijano
Vocal	Dr. Federico del Río Portilla
Secretario	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Primer Suplente	Dr. Francisco Hernández Luis
Segundo Suplente	Dr. Fernando Calzada Bermejo

Sitio de realización de la tesis:

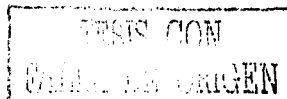
Laboratorio 124 del departamento de Farmacia
Facultad de Química, UNAM.

Sustentante:

Iliana Morales B.
Q.F.B. Iliana Morales Barrientos

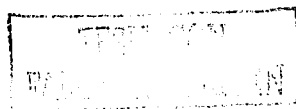
Tutor:

Rachel Mata Essayag
Dra. Rachel Mata Essayag

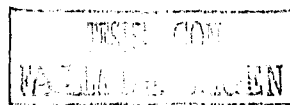


INDICE

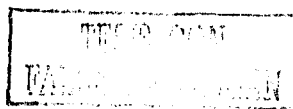
	Página
Lista de cuadros	IV
Lista de figuras	V
Lista de diagramas	VI
Lista de espectros	VI
Lista de abreviaturas	VIII
Resumen	XI
Abstract	XII
Agradecimientos	XIII
I. ANTECEDENTES	
1.1 Aspectos generales sobre la tuberculosis	1
1.2 Aspectos generales sobre el género <i>Piper</i>	11
1.3 Antecedentes sobre <i>P. sanctum</i>	12
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	16
III. PARTE EXPERIMENTAL	17
3.1 Material vegetal	17
3.2 Procedimientos generales	17
3.2.1 Análisis cromatográficos	17
3.2.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales	18
3.3 Estudio químico de las hojas de <i>P. sanctum</i>	19
3.3.1 Preparación del extracto orgánico	19
3.3.2 Fraccionamiento preliminar del extracto total de las hojas de <i>P. sanctum</i>	19



3.3.3	Fraccionamiento secundario de la fracción activa F4*	21
3.3.4	Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria F4-3*	21
3.3.4.1	Separación de los compuestos 2-oxo-12-(3',4'-metilendioxfenil)-dodecano (22), 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-tetradecano (23), 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (25), el 2-oxo-18-(3',4'-metilendioxfenil)-octadecano (26) y del producto (24) de la fracción F4-3-IV*	21
3.3.4.2	Separación de los compuestos metil[6-(10-fenildecil)tetrahydro-piran-2-il]acetato (28) y 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (27) de las fracciones terciarias F4-3-III* y F4-3-II*	22
3.3.4.3	Separación de los compuestos 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-3-tetradeceno (29) y 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-3-hexadeceno (30) de la fracción terciaria F6-V-IV*	22
3.4	Determinación de la actividad antifúngica	23
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		24
4.1	Selección de la especie <i>P. sanctum</i> como un candidato apropiado para la obtención de principios antifúngicos	24
4.2	Aislamiento y purificación de los principios activos	24
4.2.1.	Caracterización de los compuestos 2-oxo-12-(3',4'-metilendioxfenil)-dodecano (22), 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-tetradecano (23), 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (25) y el 2-oxo-18-(3',4'-metilendioxfenil)-octadecano (26).	29
4.2.2.	Caracterización del 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (27)	37
4.2.3.	Caracterización del metil[6-(10-fenildecil)tetrahydro-piran-2-il]acetato (28)	43
4.2.4.	Caracterización de los compuestos 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-3-tetradeceno (29) y 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-3-hexadeceno (30)	46
4.3	Actividad antimicrobacteriana de los nuevos productos naturales aislados de las hojas de <i>P. sanctum</i>	50

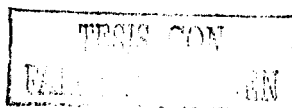


V. RESUMEN Y CONCLUSIONES	51
VI. BIBLIOGRAFIA	52
APÉNDICE DE ESPECTROS	57



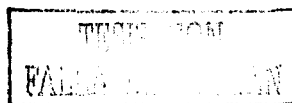
LISTA DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Página
1	Fármacos de primera línea empleados para el tratamiento de la tuberculosis	8
2	Fármacos de segunda línea empleados en la terapéutica contra la tuberculosis	9
3	Fármacos de tercera línea empleados en la terapéutica contra la tuberculosis	10
4	Agente cromógeno utilizado para los análisis cromatográficos en capa fina	17
5	Sistemas de elución utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina	18
6	Procedimiento de extracción de la especie <i>P. sanctum</i>	19
7	Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna abierta del extracto crudo de las hojas de <i>P. sanctum</i>	20
8	Actividad antimicobacteriana de las fracciones activas obtenidas del extracto crudo de las hojas de <i>P. sanctum</i>	25
9	Metabolitos aislados de las hojas de <i>P. sanctum</i> en el presente estudio	28
10	Constantes espectroscópicas y espectrométricas de los productos 22, 23, 25 y 26	29
11	Datos espectroscópicos de RMN de los productos 22 y 23	30
12	Datos espectroscópicos de RMN de los productos 25 y 26	31
13	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (27).	37
14	Datos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (27).	37
15	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del metil[6-(10-fenildecil)tetrahydro-piran-2-il]acetato (28).	43
16	Datos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del metil[6-(10-fenildecil)tetrahydro-piran-2-il]acetato (28)	43
17	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-3-tetradeceno (29) y 2-oxo-16-(3'-4'-metilendioxfenil)-3-hexadeceno (30)	47
18	Actividad antimicobacteriana de los compuestos aislados de las hojas de <i>P. sanctum</i> .	50



LISTA DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
1	Representación del contagio por <i>M. tuberculosis</i>	3
2	Representación de una <i>Micobacteria</i>	5
3	<i>Piper sanctum</i> (hojas)	13
4	Cromatograma de la fracción activa F4-3-IV*	26
5	Cromatograma de la fracción activa F4-3-III*	26
6	a. Cromatograma de la fracción activa F4-3-II* b. Cromatograma de la fracción activa F6-V-IV*	27
7	Espectro en el UV del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (25)	34
8	Espectro de masas modalidad IE del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (25)	34
9	Patrón de fragmentación del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (25)	35
10	Espectro de RMN- ¹ H del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (25)	36
11	Espectro de RMN- ¹³ C del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (25)	36
12	Espectro de RMN- ¹ H del 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (27)	39
13	Espectro de RMN- ¹³ C del 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (27)	40
13a	Espectro de masas modalidad IE del 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (27)	41
14	Patrón de fragmentación del 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (27)	41
15	Espectro de RMN modalidad COSY del 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (27)	42
16	Correlaciones más relevantes del espectro HMBC del metil[6-(10-fenildecil)tetrahidro-piran-2-il]acetato (28)	45
17	Patrón de fragmentación del metil[6-(10-fenildecil)tetrahidro-piran-2-il]acetato (28)	46
18	Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-3-tetradeceno (29)	49
19	Espectro de RMN- ¹ H del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-3-hexadeceno (30)	49

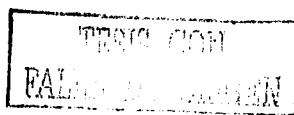


LISTA DE DIAGRAMAS

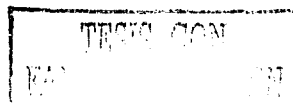
Diagrama	Contenido	Página
1	Extracción y fraccionamiento preliminar de <i>P. sanctum</i>	20

LISTA DE ESPECTROS

Espectro	Contenido	Página
1	Espectro de RMN modalidad COSY del 2-oxo-16(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (25)	58
2	Espectro de RMN modalidad HETCOR del 2-oxo-16(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (25)	59
3	Espectro de masas modalidad IE del 2-oxo-12-(3',4'-metilendioxfenil)-dodecano (22)	60
4	Espectro de RMN- ¹ H del 2-oxo-12(3',4'-metilendioxfenil)-dodecano (22)	60
5	Espectro de RMN- ¹³ C del 2-oxo-12(3',4'-metilendioxfenil)-dodecano (22)	61
6	Espectro de masas modalidad IE del 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-tetradecano (23)	61
7	Espectro RMN- ¹ H del 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-tetradecano (23)	62
8	Espectro RMN- ¹³ C del 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-tetradecano (23)	62
9	Espectro de masas modalidad IE del 2-oxo-18-(3',4'-metilendioxfenil)-octadecano (26)	63
10	Espectro RMN- ¹ H del 2-oxo-18-(3',4'-metilendioxfenil)-octadecano (26)	63
11	Espectro RMN- ¹³ C del 2-oxo-18-(3',4'-metilendioxfenil)-octadecano (26)	64
12	Espectro de masas modalidad IE del metil[6-(10- fenildecil) tetrahidropiran-2-il] acetato (28)	64

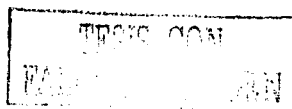


Espectro	Contenido	Página
13	Espectro de RMN-1H del metil[6-(10-fenildecail)tetrahydro-piran-2-il]acetato (28)	65
14	Espectro de RMN-13C del metil[6-(10-fenildecail)tetrahydro-piran-2-il]acetato (28).	65
15	Correlaciones más relevantes en el espectro HMBC del metil[6-(10-fenildecail)tetrahydro-piran-2-il]acetato (28)	66
16	Espectro de RMN modalidad NOESY del metil[6-(10-fenildecail)tetrahydro-piran-2-il]acetato (28)	67
17	Expansión del espectro de RMN modalidad NOESY del metil[6-(10-fenildecail)tetrahydro-piran-2-il]acetato (28)	68
18	Espectro de masas modalidad IE del 2-oxo-14-(3',4'-metilen dioxifenil)-3-tetradeceno (29)	69
19	Espectro de masas modalidad IE del 2-oxo-16(3',4'-metilen dioxifenil)-3-hexadeceno (30)	69
20	Espectro de RMN modalidad COSY del 2-oxo-14-(3',4'-metilen dioxifenil)-3-tetradeceno (29)	70
21	Espectro de RMN modalidad COSY del 2-oxo-16(3',4'-metilen dioxifenil)-3-hexadeceno (30)	71



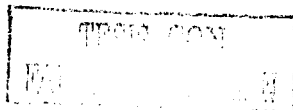
LISTA DE ABREVIATURAS

%	por ciento
δ	desplazamiento químico
λ	longitud de onda
μg	microgramos
μL	microlitros
ν_{max}	frecuencia máxima
$^{\circ}\text{C}$	grados centígrados
Å	angström
ACN	acetonitrilo
AcOEt	acetato de etilo
C	Concentración
C.C.	cromatografía en columna
c.c.f.	cromatografía en capa fina
CDCl_3	cloroformo deuterado
CG-EM	cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CH_2Cl_2	diclorometano
CLAR	cromatografía de líquidos de alta resolución
cm	centímetro
cm^{-1}	número de onda
CMI	concentración mínima inhibitoria
COSY	correlation spectroscopy
d	doble
dd	doble de dobles
dddd	doble de doble de doble de dobles
ddt	doble de doble de triples
dt	doble de triples
EM-IE	espectrometría de masas por impacto electrónico



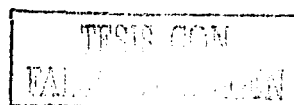
LISTA DE ABREVIATURAS (continuación...)

eV	electrón volts
F	flujo
FN	fase normal
FR	fase reversa
g	gramo
h	hora
HETCOR	heteronuclear correlation
Hex	hexano
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
Hz	hertz
Int. Rel.	intensidad relativa
IR	infrarrojo
J	constante de acoplamiento
Kg	kilogramo
L	litro
m	múltiple
m/z	relación masa-carga
M ⁺	ión molecular
MeOH	metanol
mg	miligramo
MHz	mega hertz
min.	minutos
mL	mililitro
mm	milímetro
nm	nanómetro
NOESY	nuclear overhauser effect spectroscopy
OMS	Organización Mundial de la Salud
p.f.	punto de fusión



LISTA DE ABREVIATURAS (continuación...)

ppm	partes por millón
q	quintuple
RMN	resonancia magnética nuclear
RMN- ¹³ C	resonancia magnética nuclear de carbono-13
RMN- ¹ H	resonancia magnética nuclear protónica
s	singulete
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
snm	sobre el nivel del mar
t	triplete
tr	tiempo de retención
td	triple de dobles
tdd	triple de doble de dobles
TMS	tetrametilsilano
uma	unidad de masa atómica
UV	ultravioleta
VIH	virus de inmunodeficiencia humana

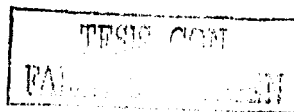


RESUMEN

En el marco del proyecto de investigación "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America" la especie *Piper sanctum* (Miq.) Schl. (Piperaceae) se seleccionó como una fuente potencial de agentes antituberculosos, con base en su fuerte actividad antimicobacteriana en contra de *Mycobacterium tuberculosis*. El bioensayo de selección fue de tipo radiorespirométrico.

El estudio químico biodirigido del extracto integro de las hojas de *P. sanctum*, utilizando como método de monitoreo el ensayo de tipo fluorométrico azul de alamar ("blue alamar"), condujo al aislamiento de los siguientes metabolitos novedosos: 2-oxo-12-(3',4'-metilendioxfenil)-dodecano (**22**), 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-tetradecano (**23**), 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (**25**), 2-oxo-18-(3',4'-metilendioxfenil)-octadecano (**26**), 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (**27**), metil[6-(10-fenildecil)tetrahydro-piran-2-il]acetato (**28**), 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-3-tetradeceno (**29**) y 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-3-hexadeceno (**30**); estos metabolitos se caracterizaron mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales.

Los compuestos **22**, **23**, **25** y **26** inhibieron en forma significativa el desarrollo de *M. tuberculosis* cuando se evaluaron mediante el método azul de alamar. Estos compuestos constituyen prototipos estructurales novedosos para el desarrollo de agentes antimicobacterianos.

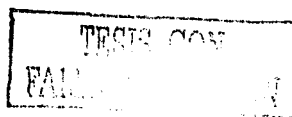


ABSTRACT

As a part of the project "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America", *Piper sanctum* (Miq.) Schl. (Piperaceae) was selected as an appropriate candidate to isolate the antimycobacterial compounds.

Bioactivity-directed fractionation of the active CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) extract, prepared from the leaves of *P. santum* on the basis of its important antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis*, led to the isolation of six compounds: 2-oxo-12-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-dodecane (22), 2-oxo-14-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-tetradecane (23), 2-oxo-16-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-hexadecane (25), el 2-oxo-18-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-octadecane (26), 2-oxo-16-phenyl-3-hexadecene (27), methyl[6-(10-phenyldecail)tetrahydro-pyran-2-il]acetate (28), 2-oxo-14-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-3-tetradecene (29) y 2-oxo-16-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-3-hexadecene (30).

The structures of these compounds were established by spectral means (IR, NMR and MS). Compounds 22, 23, 25 y 26 were identified as the main antimycobacterial principles of the extract.



AGRADECIMIENTOS

A los proyectos: "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America" (NIH GRANT5U01TWI**00316-03) Y DGAPA (Dirección General de asuntos del Personal Académico) IN 200902, por el apoyo económico para la realización del trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría.

A la Q.F.B. Marisela Gutiérrez, por el registro de los espectros de IR y UV; a la Q. Georgina Duarte, por el registro de los espectros de masas y al M. en C. Oscar Yáñez, por el registro de los espectros de RMN, todo ellos de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM.

A la Dra. Teresa Gutiérrez Lugo por registrar los espectros de RMN del compuesto 28.

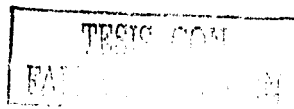
Al Dr. Rogelio Pereda Miranda por su gentileza al proporcionarme el dibujo de la hoja santa.

A los miembros del jurado por la revisión del presente trabajo y por sus valiosas observaciones.

A la Dra. Rachel Mata Essayag, por su dirección y apoyo durante el desarrollo del presente proyecto. Gracias.

A la M. en C. Laura Acevedo por su valiosa asesoría técnica y el interés brindado a esta investigación.

A la M. en C. Isabel Rivero por su asistencia técnica.



I. ANTECEDENTES

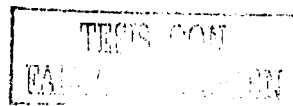
1.1 Aspectos generales sobre la tuberculosis

El presente trabajo de tesis se originó en el marco del proyecto de investigación "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America", incluido en el programa "Internacional Cooperative Biodiversity Group"(ICBG). Este programa cuenta con el patrocinio de las siguientes instituciones gubernamentales de los Estados Unidos de América del Norte: National Science Foundation (NSF), U.S. Agency for International Development (USAID) y National Institute of Health (NIH).

El proyecto "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin American" se realiza en Estados Unidos de América del Norte, Argentina, Chile y México. Las instituciones norteamericanas a las que pertenece son: la Universidad de Arizona donde reside el investigador principal del proyecto, BASF Corporation, Wyeth Laboratories y el Instituto de Investigaciones Sobre la Tuberculosis de la Universidad de Illinois, en la ciudad de Chicago. En Argentina participa la Universidad Nacional de la Patagonia y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA; en Chile la Pontificia Universidad Católica; por último, en México, la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de la Facultad de Química y el Instituto de Biología (Suffness *et al.*, 1995; Timmermann *et al.*, 1999). La participación de la Facultad de Química en este proyecto se ha enfocado al descubrimiento de productos biodinámicos de especies medicinales mexicanas con la finalidad de contribuir al desarrollo de fármacos y agentes agroquímicos. En el campo de los fármacos los esfuerzos se han canalizado principalmente al descubrimiento de agentes antisépticos de posible utilidad para el tratamiento de la tuberculosis y otras afecciones (Acevedo *et al.* 2000; Mata *et al.*, 2001; Timmermann *et al.*, 1999).

Como hemos referido anteriormente el interés por diversas instituciones en el proyecto "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin American" responde en parte a una emergencia global que es el resurgimiento de la tuberculosis y se estima que de no encontrarse alguna solución eficaz para frenar la expansión de la enfermedad, antes del año 2020 aparecerán 200 millones de casos nuevos y 70 millones de muertes por causa de la infección. Por otro lado, considerando factores como la inmigración y el turismo intercontinental, es evidente que las cepas resistentes de la bacteria podrían extenderse gradualmente por todo el mundo.

En México se registran al año 16,000 nuevos casos y 3,100 defunciones por tuberculosis pulmonar, por lo que ésta enfermedad es considerada como un problema de salud pública.

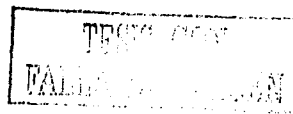


Así, México ocupa el tercer lugar de América Latina en número de casos y el número 20 a nivel mundial (OMS/OPS, 2002).

La tuberculosis es una enfermedad, conocida desde la antigüedad. Su agente etiológico es principalmente *M. tuberculosis* y excepcionalmente *M. bovis*. En los últimos años debido a la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y a la incidencia de enfermedades que deprimen el sistema inmunológico se ha presentado un resurgimiento en los casos de la tuberculosis, así como un cambio en su epidemiología pues se ha desencadenado un incremento en la resistencia a los fármacos utilizados hasta la fecha para su tratamiento. Todo lo anterior ha motivado que la búsqueda de nuevos agentes antimicobacterianos se encuentre intensificada a nivel mundial.

El riesgo de contraer tuberculosis aumenta con el contacto frecuente con personas que padecen la enfermedad ya que puede transmitirse por el aire en microgotas expulsadas por el portador al hablar, toser o estornudar y por condiciones de vida insalubres o de hacinamiento; en la **Figura 1** se representa la transmisión de la enfermedad por microgotas suspendidas en el aire.

Existen dos factores que gobiernan la infección tuberculosa, el primero es el tamaño del inóculo bacteriano y el segundo es la respuesta inmunitaria del huésped. La población inmunosuprimida tiene mayor riesgo de desarrollar la enfermedad comparada con la población inmunocompetente; así los pacientes infectados con el VIH se consideran de alto riesgo pues la posibilidad de contraer la enfermedad durante el primer año a partir del contacto con el bacilo de la tuberculosis es elevada. También se consideran como factores de riesgo alguna de las siguientes condiciones: bajo peso, diabetes mellitus, silicosis, cáncer en cabeza o cuello, leucemia y adicciones por drogas. La población inmunocompetente está expuesta a una infección latente ó infección tuberculosa pues al estar en contacto con el bacilo de la tuberculosis puede impedir su desarrollo; la permanencia de las bacterias vivas en el cuerpo se conoce como infección latente pues estas pueden reactivarse años después y provocar un caso grave de la enfermedad. En el periodo de la infección latente no se presentan signos de la enfermedad, pero se presenta una respuesta positiva a la prueba cutánea de la tuberculina; estos pacientes pueden desarrollar la enfermedad si no reciben un tratamiento preventivo.



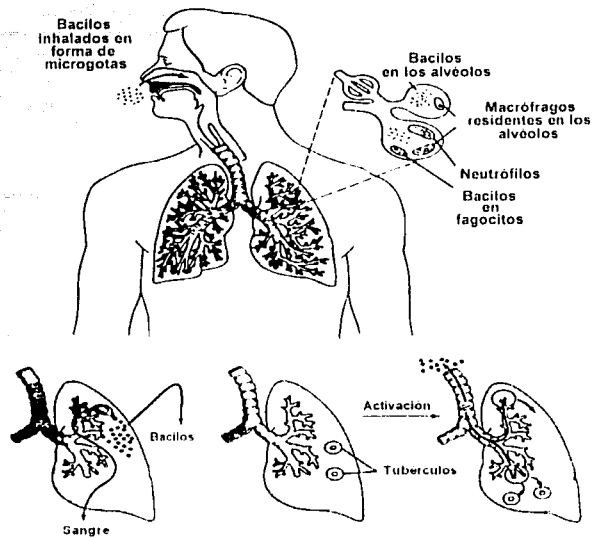


Figura 1. Representación del contagio por *M. tuberculosis*

La enfermedad se caracteriza por la formación de granulomas en los tejidos, en los cuales la bacteria se está multiplicando y atacando diferentes partes del cuerpo. Aunque se trata principalmente de una enfermedad pulmonar, también puede afectar diferentes órganos como los riñones, la columna dorsal y el cerebro. El curso de la enfermedad es crónico y puede conducir a la muerte si el paciente no recibe tratamiento. Los síntomas de la enfermedad incluyen debilitamiento, pérdida de peso, fiebre, falta de apetito, escalofríos y sudoración nocturna. Existen otros síntomas que son característicos del sitio en el cual se aloje el microorganismo. Así por ejemplo si la enfermedad está localizada en los pulmones se presenta además tos severa acompañada de sangrado y dolor en el pecho. La tuberculosis pulmonar o de garganta es muy contagiosa, pues las bacterias pueden ser transmitidas al toser, hablar o estornudar mientras que la tuberculosis que se encuentra en otras partes del cuerpo, por lo general, no es contagiosa.

La prueba de la tuberculina o intradermorreacción de Mantoux permite diagnosticar si la persona ha sido infectada con el bacilo de la tuberculosis. Esta prueba se practica a las personas que han tenido contacto con alguien que sufra de tuberculosis, que presente padecimientos que

debiliten el sistema inmunológico y que presente los síntomas característicos de la enfermedad (Jawetz *et al.*, 1996; Zinsser *et al.*, 1998).

La denominación del bacilo tuberculoso incluye dos especies, *M. tuberculosis* y *M. bovis*, que son capaces de producir esta enfermedad. Existen especies estrechamente relacionadas como *M. ulcerans*, *M. microti* y *M. africanum*, que no causan la enfermedad en el hombre. Este último es el único reservorio de *M. tuberculosis*, sin embargo, la enfermedad causada por este microorganismo puede afectar a primates y a otras especies de mamíferos que están en contacto con él. El mecanismo fundamental de transmisión de la tuberculosis provocado por *M. tuberculosis* es por vía respiratoria; mientras que la causada por *M. bovis*, es transmitida por vía digestiva mediante la ingestión de leche contaminada.

El bacilo de la tuberculosis puede presentar resistencia primaria o secundaria; se habla de resistencia primaria cuando no hay antecedentes de un tratamiento previo del paciente y de resistencia secundaria cuando el tratamiento ha sido interrumpido o inadecuado.

Los organismos del género *Mycobacterium* son bacilos aerobios clasificados como bacilos "ácido-resistentes". Dentro de este género se encuentra también, el agente causal de la lepra, *M. leprae*, enfermedad que ha causado grandes pandemias a lo largo de la historia de la humanidad.

La pared celular de las micobacterias está constituida por polímeros de dos clases, uno de tipo arabinogalactano y el otro de tipo peptidoglucano. Los dos polímeros se unen entre sí mediante enlaces de tipo fosfodiéster que se establecen entre un residuo de ácido murámico presente en el peptidoglucano y una unidad de arabinosa presente en el arabinogalactano. Aproximadamente, uno de cada diez residuos de arabinosa en el polímero está esterificado por una molécula de ácido micólico. El arabinogalactano presenta ramificaciones terminales que están constituidas por oligosacáridos lineales, y son el principal determinante inmunógeno de la molécula.

La pared contiene además diversos lípidos que incluyen ácidos micólicos, ceras y fosfátidos, los cuales hasta cierto punto son causantes de la resistencia a los ácidos y alcoholes. Por otro lado, son los responsables del 60% del peso seco de la pared celular y confieren propiedades que permiten que el microorganismo resista condiciones ambientales adversas. Los lípidos están unidos en su mayor parte a los dos polímeros antes mencionados. El muramildipéptido (del peptidoglucano) combinado con los ácidos micólicos puede ocasionar la

formación de granulomas y los fosfolípidos inducen la generación de necrosis caseosa. Las cepas virulentas de los bacilos tuberculosos forman "cordones" microscópicos de tipo serpentín en los cuales los bacilos ácido-resistentes se encuentran ordenados en cadenas paralelas. La formación de cordones está relacionada con la virulencia; se ha aislado un "factor formador de cordones" (trehalosa-6-6'-dimicolato) que inhibe la migración de leucocitos causando granulomas crónicos y puede actuar como un coadyuvante inmunitario. En la superficie de la célula se localizan glucolípidos unidos al peptidoglucano.

La cera D, es un oligómero de la pared celular responsable de la actividad inmunoadyuvante. El peptidoglucano contiene aminoácidos proteicos que están presentes como lipoproteínas o glicolipoproteínas, esenciales para la actividad tuberculínica de los preparados de la pared; uno de los polipéptidos más abundantes es el ácido poli- α -L-glutámico que solo se encuentra en *M. tuberculosis* y *M. bovis*; en algunos casos constituye el 8% del peso total de la pared celular. En la **Figura 2** se ilustran las características de una micobacteria (Stefan, 2002; Jawetz *et al.*,1996; Zinsser *et al.*,1998).

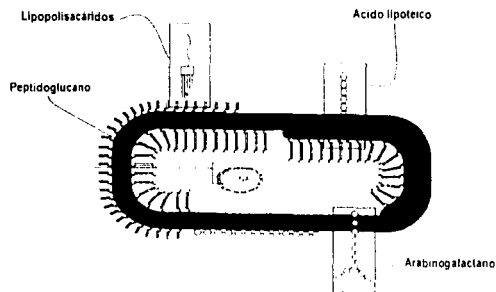


Figura 2. Representación de una *Micobacteria*

La quimioterapia empleada para el tratamiento de la tuberculosis contempla la combinación de por lo menos dos fármacos para reducir el problema de resistencia. Como este bacilo presenta periodos prolongados de inactividad metabólica intracelular, el tratamiento debe ser por periodos largos, lo cual ocasiona numerosas reacciones adversas.

Los antibióticos usados en el tratamiento de la tuberculosis pueden dividirse en fármacos de primera, segunda y tercera línea (Goodman *et al.*, 1996; Litter, 1992; Katzung, 1987).

Los antibióticos de primera línea son los más eficaces y se consideran esenciales para los tratamientos cortos y para combatir la enfermedad activa; los compuestos de primera elección combinan el máximo nivel de eficacia con un grado aceptable de toxicidad; en esta categoría se encuentran la isoniazida (a), la rifampicina (b), la pirazinamida (c), el etambutol (d) y la estreptomina (e). En el **Cuadro 1** se muestran las estructuras de dichos fármacos.

La isoniazida constituye el fármaco primario en la quimioterapia antifimica, químicamente es la hidracida del ácido isonicotínico; el producto es bacteriostático en los bacilos en etapa de reposo pero bactericida si están en fase de división rápida. Su mecanismo de acción involucra la inhibición de la biosíntesis de los ácidos micólicos, interfiriendo así con la formación de la pared celular. Los ácidos micólicos son característicos de las micobacterias y por ello, dicha acción podría explicar el alto grado de selectividad de la isoniazida para el tratamiento de esta enfermedad.

La isoniazida sigue siendo el fármaco más importante a nivel mundial para tratar todos los tipos de tuberculosis. Sus efectos tóxicos pueden disminuirse mediante la administración profiláctica de la piridoxina, compuesto análogo a la isoniazida; la frecuencia y gravedad de las reacciones indeseables de la isoniazida no son frecuentes y están relacionadas con la dosis y el tiempo de administración. Las principales reacciones adversas son las del sistema nervioso central y periférico e incluyen convulsiones, neuritis, contracturas musculares parciales, vértigo y ataxia entre otras. La sensibilización a la isoniazida es poco común, pero puede ocasionar fiebre, hepatitis y erupciones cutáneas (Goodman *et al.*, 1996; Katzung, 1987; Bevan, 1982).

La rifampicina, es un derivado semisintético de la rifamicina B, un antibiótico producido por *Streptomyces mediterranei*. La rifampicina es bactericida para el bacilo de la tuberculosis y la

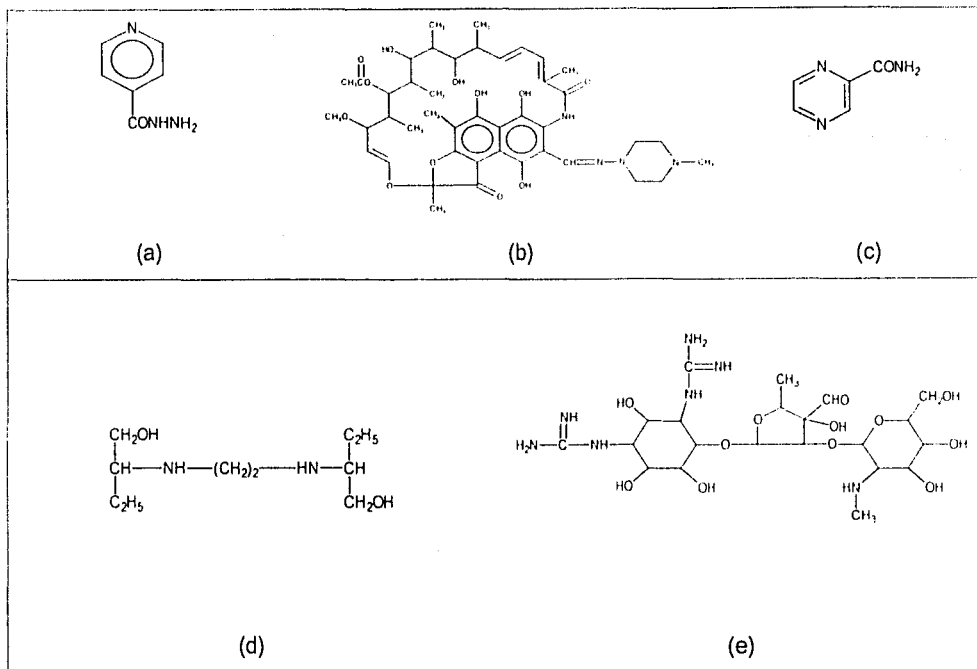
administración de este producto esta indicado en casos de resistencia. El mecanismo de acción de la rifampicina es la inhibición de la ARN polimerasa dependiente de ADN de la micobacteria y en consecuencia la síntesis del ARN. La rifampicina penetra fácilmente a las células fagocíticas y puede destruir micobacterias y otros microorganismos intracelulares. El uso de este medicamento puede causar coloración naranja en la orina, sudor y lágrimas. Los efectos adversos incluyen erupciones de la piel, trombocitopenia, vómito, náuseas, diarrea, nefritis y deterioro de la función hepática.

La pirazinamida es un análogo sintético de la nicotinamida y constituye un componente importante en terapias de combinación por lapsos breves. Mediante el uso de este medicamento se pueden lograr efectos clínicos satisfactorios pero su toxicidad es alta, en particular, el fármaco induce el deterioro de la función hepática.

El etambutol es un compuesto sintético que suprime la proliferación de casi todos los bacilos de tuberculosis resistentes a la isoniazida y la estreptomina. Este fármaco actúa interrumpiendo la incorporación del ácido micólico en la pared de la micobacteria e inhibe la síntesis de ARN. El etambutol produce pocas reacciones adversas, la más importante es la neuritis óptica que disminuye la agudeza visual; también ocasiona dificultad para diferenciar entre el rojo y el verde. La intensidad de la dificultad visual depende de la duración del tratamiento después de que se manifiesta por primera vez el problema. El paciente recupera la función visual cuando se interrumpe el tratamiento.

La estreptomina fue el primer fármaco clínicamente eficaz para combatir la tuberculosis. Inicialmente se administraba en dosis elevadas pero los problemas de toxicidad y la aparición de resistencia por parte de los microorganismos limitaron su uso. En la actualidad, es el último antibiótico de primera elección en la lista de agentes antituberculosos. La actividad de la estreptomina es bacteriostática pues no penetra fácilmente en las células por lo cual impide la erradicación del bacilo de la tuberculosis (Goodman *et al.*, 1996; Goth, 1990; Katzung, 1987).

Cuadro 1. Fármacos de primera línea empleados para el tratamiento de la tuberculosis.



Los fármacos de segunda línea son considerados menos eficaces y pueden provocar más efectos adversos que los anteriores; se emplean en casos de resistencia de las micobacterias a los productos primarios, o de alergia. Dentro de este grupo se encuentran el ácido *para*-aminosalicílico (f), la etionamida (g), la cicloserina (h), la kanamicina (i), la capreomicina (j), la amikacina (k) y la tiacetazona (l). Las estructuras correspondientes se ilustran en el Cuadro 2.

El ácido *para*-aminosalicílico presenta un efecto marcado sobre el bacilo tuberculoso pues su actividad antimicrobiana es muy específica y ataca únicamente a *M. tuberculosis* y no a otros microorganismos. Su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis del ácido fólico. El uso de este ácido para el tratamiento de la tuberculosis pulmonar ha disminuido desde que se cuenta con fármacos más activos y mejor tolerados como la rifampicina y el etambutol.

Los efectos adversos más importantes de este producto incluyen erupciones cutáneas, fiebre, anorexia, problemas gastrointestinales que incluyen náuseas, dolor epigástrico, molestias abdominales y diarrea.

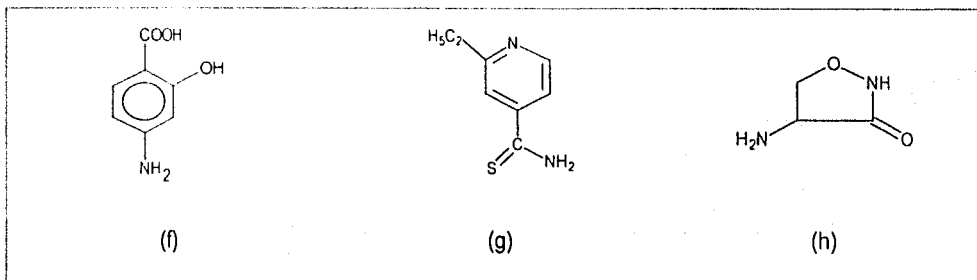
La etionamida es un agente estructuralmente semejante a la isoniazida y, a pesar de su semejanza, no existe resistencia cruzada entre ambas drogas. La etionamida inhibe la síntesis de los ácidos micólicos y provoca una intensa irritación gástrica, vómito, anorexia, diarrea y molestias neurológicas. Por consiguiente, es recomendable usar la etionamida en combinación con otros agentes antituberculosos (Goodman *et al.*, 1996; Smith y Cedric, 1992; Katzung, 1987).

Dentro de los fármacos de tercera línea se encuentran la rifabutina (m), la ciprofloxacina (n) y la esparfloxacina (ñ). En el **Cuadro 3** se ilustran las estructuras correspondientes.

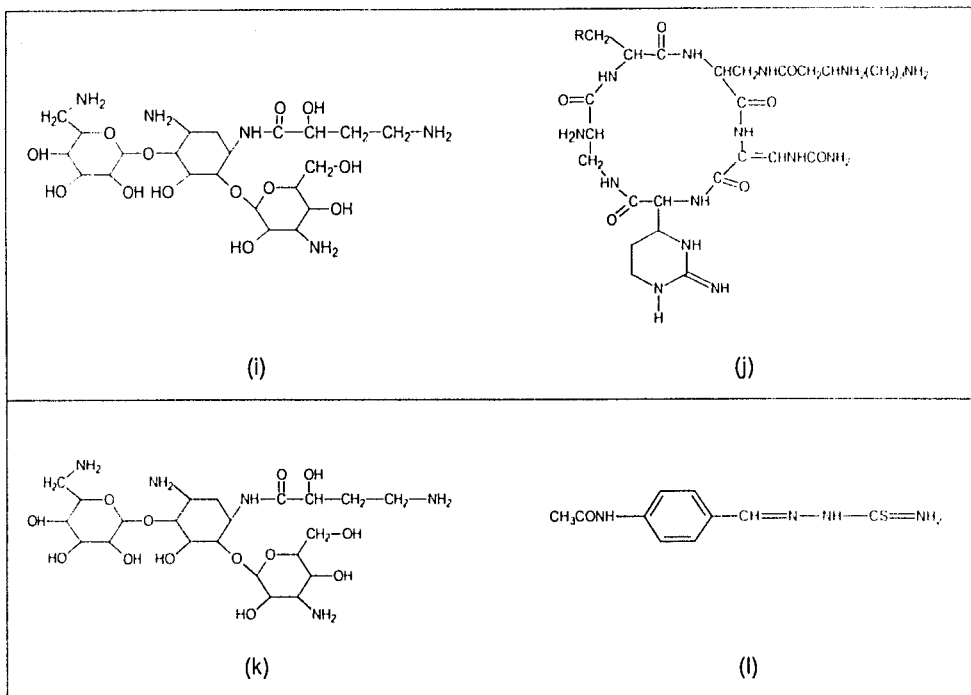
La rifabutina es un derivado de la rifamicina S. Su mecanismo de acción es igual al de la rifampicina ya que inhibe la ARN polimerasa micobacteriana. Se ha observado resistencia cruzada entre la rifampicina y la rifabutina en caso de *M. avium* y *M. tuberculosis*. Algunas de sus reacciones adversas incluyen erupciones de la piel, irritación gastrointestinal y neutropenia. Al igual que la rifampicina, este fármaco genera un color anaranjado en la piel, en la orina, en las heces, en la saliva y en las lágrimas.

La ciprofloxacina y la esparfloxacina son quinolonas que poseen amplia actividad antimicrobiana; son eficaces para combatir diversas enfermedades infecciosas. Las quinolonas generalmente son bien toleradas y las reacciones adversas más comunes incluyen náuseas, molestias abdominales, cefalea y mareos (Goodman *et al.*, 1996; Katzung, 1987).

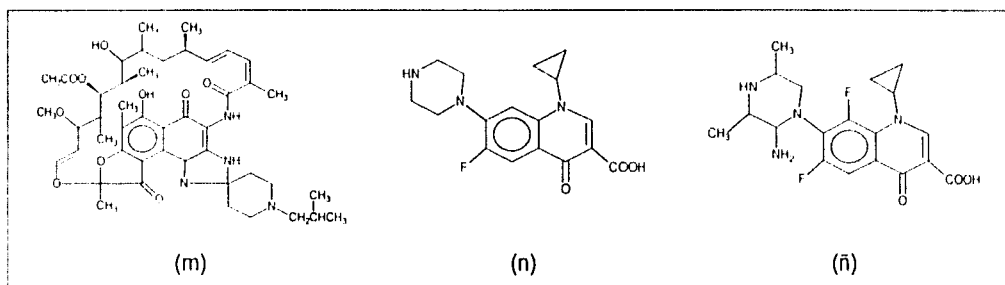
Cuadro 2. Fármacos de segunda línea empleados en la terapéutica contra la tuberculosis.



Cuadro 2. Fármacos de segunda línea empleados en la terapéutica contra la tuberculosis.



Cuadro 3. Fármacos de tercera línea empleados en la terapéutica contra la tuberculosis.



1.2 Aspectos generales sobre el género *Piper*

El género *Piper* pertenece a la familia Piperaceae y al orden Piperales; dentro de este género se clasifican más de 700 especies distribuidas en diversas regiones del mundo, principalmente en las tropicales. Generalmente son hierbas, arbustos o árboles muy pequeños. Varias especies del género *Piper* tienen importancia económica tanto en la medicina como en la industria de alimentos. Así, los frutos de *P. nigrum* nos proporcionan las pimientos negra y blanca que son importantes en el mercado de las especias; *P. methysticum* mejor conocida como Kava Kava; utilizada y comercializada en todo el mundo; su raíz se emplea para la elaboración de bebidas que combaten la ansiedad y el estrés. Estudios recientes han confirmado que el uso de esta especie es útil en trastornos de ansiedad; además su empleo no ocasiona dependencia física o psicológica; *P. capense* se usa como carminativo; *P. guineense* se utiliza como antibacteriano y a *P. umbellatum* se le atribuyen propiedades rubefacientes, estimulantes y desinfectantes. Por último, otras especies se cultivan como plantas ornamentales como ejemplo tenemos: *P. ornatum*, *P. sylvaticum* y *P. crocatum* entre otras. El metabolismo secundario de estas especies se caracteriza por la biosíntesis de compuestos de distinta naturaleza incluyendo alcaloides de los tipos aristolactamas, 4,5-dioxoaporfina y piperolactamas; esteroides, flavonoides, fenilpropanoides, furanólidas, kava lactonas, lignanos, neolignanos, α -pironas, piperólidas, polifenoles y terpenoides. Hay que señalar que todas las especies producen aceites esenciales, que confieren a las plantas sus propiedades aromáticas tan apreciadas en las prácticas culinarias alrededor del mundo. Estos aceites además de ser alelopáticos, cumplen funciones ecológicas, como son la de atracción de polinizadores (Ranjith y Dharmaratne, 2002; Martins y Salgueiro, 1998; Parmar y Subas, 1998; Parmar *et al.*, 1997; Pereda *et al.*, 1997; Desai *et al.*, 1988; Smith, 1983; Wnanbyr *et al.*, 1983; Häensel y Pelter, 1971; Häensel *et al.*, 1973, 1976.1982; Atal y Moza, 1968). Recientemente se publicó una revisión detallada de la química del género *Piper* (Parmar *et al.*, 1997).

1.3 Antecedentes sobre *P. sanctum*

Piper sanctum (Miq) Schl. (Figura 3), es originaria de México y Guatemala. En México se distribuye principalmente en los estados de Sonora, Michoacán, Morelos, Puebla, Oaxaca, Veracruz y San Luis Potosí.

Esta especie crece en climas semicálidos y templados a una altitud de entre 740 y 2600 m snm y florece en los meses de Septiembre y Octubre. *Piper sanctum* es conocida como hoja santa, hierba santa, hoja de aján, hoja de anís y acoyo, entre otras denominaciones (Argueta *et al.*, 1994; Zolla, 1994; Márquez *et al.*, 1999). En el Atlas de las Plantas Medicinales de la Medicina Tradicional Mexicana III, se hace una descripción detallada de la especie (Argueta *et al.*, 1994).

Piper santum es un arbusto que mide entre 50 cm y 1.5 m de altura. Sus hojas tienen forma acorazonada; con las flores de color amarillo claro, muy pequeñas y están colocadas como en un cordón. Los frutos son carnosos y contienen una semilla.

En diversas regiones de la República Mexicana, *P. sanctum* es apreciada en las prácticas médicas tradicionales; su uso medicinal es ancestral y se ha conservado hasta los tiempos actuales. La planta entera de *P. sanctum* se emplea para el tratamiento de padecimientos de diversa etiología (en casos de asma, tos, gripe, urticarias) y como antiséptico (Argueta *et al.*, 1994). A la hoja santa se le atribuyen también propiedades estimulantes, anestésicas locales, antipiréticas, antidiarreicas, antihelmínticas y anticrotálicas entre otras (Márquez *et al.*, 1999).

En las prácticas médicas alternativas contemporáneas de México se preparan infusiones de las hojas de *P. sanctum* para tratar y prevenir los dolores estomacales, para mejorar la digestión, para disminuir los dolores de cabeza, la tos y el asma. En algunos trastornos estomacales se aplica tópicamente untando las hojas con manteca y bicarbonato. En las inflamaciones se aplica la hoja tibia después de haberla metido en agua caliente por unos segundos. La raíz de la hoja santa se utiliza también para disminuir el dolor de muelas (Argueta *et al.*, 1994; Márquez *et al.*, 1999). En las prácticas culinarias la hierba santa es muy apreciada por sus propiedades aromáticas y se emplea para la elaboración de platillos típicos de México (Argueta *et al.*, 1994).

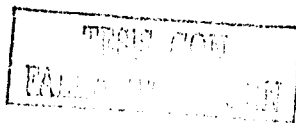
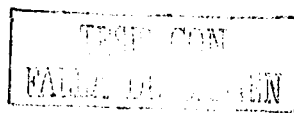
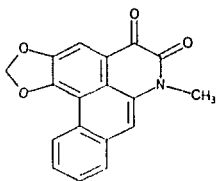




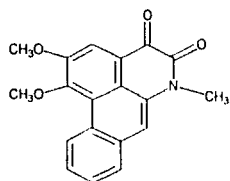
Figura 3. *Piper sanctum* (hojas)



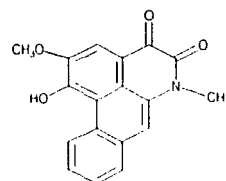
La raíz y el tallo de *P. sanctum* han sido objeto de diferentes estudios que han permitido el aislamiento y la caracterización de numerosos tipos de compuestos incluyendo alcaloides aporfínicos (1-3) [Häensel *et al.*, 1976; Pérez, 2003], un esteroide (4) [Häensel *et al.*, 1976], Kavapironas (5-12) [Häensel *et al.*, 1973, 1976; Parmar *et al.*, 1997], piperólidas (13-17) [Häensel *et al.*, 1971; Parmar *et al.*, 1997], fenil propanoides (18-19) [Torres, 2001; Pérez, 2003] y amidas derivadas de la tiramina (20-21) [Pérez, 2003]. De estos metabolitos quizás los más representativos del género son las kavapironas y las piperólidas.



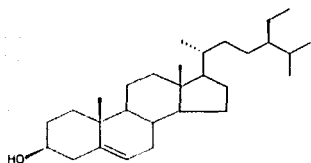
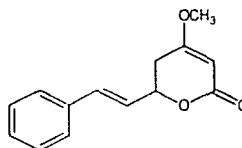
Cefaradiona A (1)



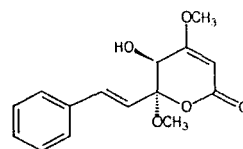
Cefaradiona B (2)



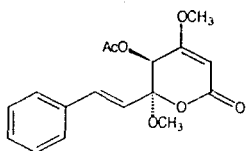
Piperolactama (3)

 β -sitosterol (4)

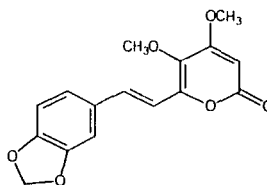
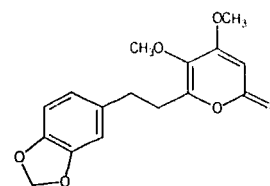
Kavaina (5)

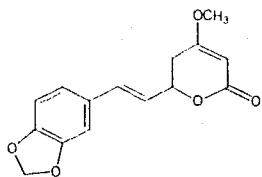


5-hidroxi-6-metoxikavaina (6)

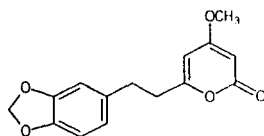


5-acetoxi-6-metoxikavaina (7)

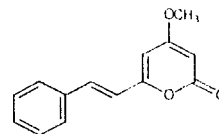
5-metoxi-5,6-deshidro-
metisticina (8)metoxi-5,6-deshidro-7,8-dihidro-
metisticina (9)



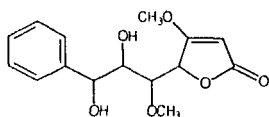
metisticina (10)



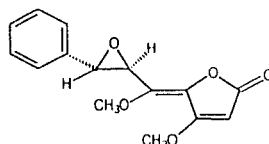
5,6-deshidro-7,8-dihidrometisticina (11)



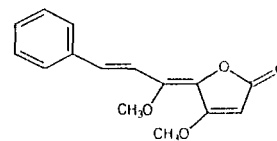
desmetoxiyangonina (12)



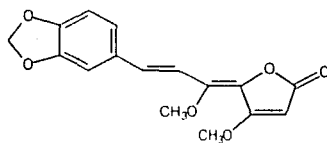
Treo-7,8-dihidropiperólida (13)



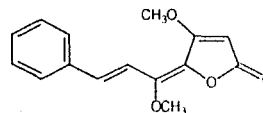
7,8-epoxipiperólida (14)



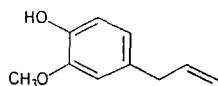
piperólida (15)



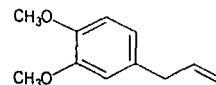
metilendioxipiperólida (16)



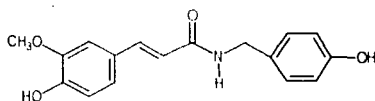
Z-piperólida (17)



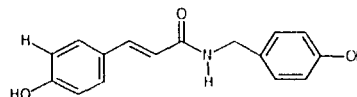
eugenol (18)



4-(propenil)-1,2-dimetoxi-benceno (19)



N-trans-feruloiltiramina (20)



N-p-cumeroiltiramina (21)

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Como se indicó en la sección de antecedentes, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Pulmonares, señalan que es necesario fortalecer el control de la tuberculosis, enfermedad de incidencia creciente a nivel mundial, para evitar la aparición de brotes ocasionados por especies o cepas multirresistentes de *M. tuberculosis*. Para el control de esta enfermedad es necesario, i) interrumpir su cadena de transmisión mediante el control de las fuentes de infección; ii) combatir al microorganismo; iii) identificar y proteger a los grupos de alto riesgo así como mejorar el conocimiento de la enfermedad tuberculosa mediante un sistema de información apropiado y iv) aplicar terapias apropiadas y encontrar fármacos alternativos más eficaces que los de uso actual. Para descubrir estos fármacos se han establecido numerosos programas de carácter internacional, entre ellos, el proyecto "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin American" que pretende, entre otros objetivos, descubrir antifímicos de origen vegetal. En el marco de este proyecto se estableció que *Piper sanctum* constituye una fuente de productos antifímicos al inhibir de manera notable el desarrollo de *M. tuberculosis*.

Considerando los resultados obtenidos de las evaluaciones biológicas preliminares, se decidió realizar el estudio fitoquímico biodirigido de *P. sanctum* con la finalidad de comenzar el aislamiento de los principios activos. Por consiguiente, el objetivo primordial del presente trabajo es la obtención de principios antifímicos del extracto activo de las hojas de *P. sanctum*, con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos agentes eficaces para el tratamiento de la tuberculosis.

Para el cumplimiento de este objetivo primordial se propusieron los siguientes objetivos particulares:

1. Aislar los principios biodinámicos presentes en el extracto mediante una estrategia biodirigida.
2. Evaluar los compuestos aislados aplicando el método de azul de alamar.
3. Realizar la caracterización química-estructural de los compuestos activos mediante la aplicación de los métodos espectrométricos y espectroscópicos convencionales.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Material vegetal

Las hojas de *Piper sanctum* (Miq.) Schl. fueron recolectadas en la región de Los Tuxtlas en el Municipio de San Andrés Tuxtla, en Veracruz el 4 de Mayo de 1999. Un ejemplar de referencia se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional MEXU, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (Voucher, GM 423-h). La identificación de la especie fue realizada por el Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM).

La desecación del material vegetal se realizó a temperatura ambiente y se fragmentó en un molino Willey Modelo 4.

3.2 Procedimientos Generales

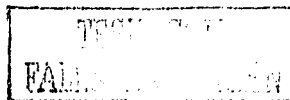
3.2.1 Análisis Cromatográficos

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron de acuerdo con las técnicas convencionales en placas de aluminio recubiertas con gel de sílice de 0.25 mm de espesor (sílica gel 60 GF₂₅₄ Merck) utilizando diferentes sistemas de elución según el caso y sulfato cérico como agente cromógeno. El reactivo revelador y los sistemas de elución empleados se resumen en los Cuadros 4 y 5, respectivamente. Para la técnica de cromatografía en columna abierta se utilizó gel de sílice (sílica gel G-60 Merck, gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 70-230) como adsorbente.

Cuadro 4. Agente cromógeno utilizado para los análisis cromatográficos en capa fina*.

Reactivo	Composición	Referencia
Sulfato cérico	12.0 g de sulfato cérico 22.2 mL de H ₂ SO ₄ conc. 350.0 g de hielo picado	Lowery; 1993

*Antes de efectuar el revelado se procedió a visualizar las placas con luz UV (onda corta, 254 nm; onda larga, 365 nm) Para el desarrollo del color fue necesario calentar aproximadamente 2 minutos a 35 °C.



Cuadro 5. Sistemas de elución utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

Sistemas de eluyentes	Composición	Proporción
1	Hexano	100 %
2	Hex-CH ₂ Cl ₂	diversas
3	CH ₂ Cl ₂	100%
4	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	diversas
5	Hex- AcOEt	diversas
6	AcOEt	100 %

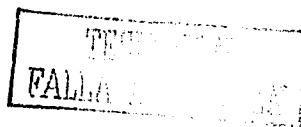
La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se realizó en un cromatógrafo marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography División Milford, MA, USA) equipado con un detector de UV con arreglo de fotodiodos (996) o un detector UV dual (2487). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento así como la manipulación de la información se realizaron utilizando el programa software Millennium 32, en su versión 3.05.01 (Waters).

La purificación de los compuestos se llevó a cabo empleando una columna analítica fase reversa sobre gel de sílice (Prep. Nova-Pak ® HR C₁₈ 60 Å, 6 µm), 3.9 x 300 mm y una columna preparativa fase reversa (Prep. Nova-Pak ® HR C₁₈ 60 Å, 6 µm), 19 x 300 mm. La detección se ajustó entre 200 y 300 nm para el detector de arreglo de fotodiodos (PDA) y a 214 nm para el detector dual. También se empleó una columna fase normal sobre gel de sílice (Waters, µporasil, 125 Å, tamaño de partícula de 10 µm), 19 x 300 mm. La detección se ajustó entre 200 y 300 nm para el detector de arreglo de fotodiodos (PDA) y a 270 nm para el detector dual.

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

Los espectros en el infrarrojo (IR) se registraron en un espectrofotómetro FT IR Perkin-Elmer, modelo 1605 en pastilla de KBr o película. Los espectros en el ultravioleta-visible (UV-VIS), se realizaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo lambda 2. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Los análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), se realizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890 serie II, empleando una columna capilar HP-5MS (metil fenil silicona como fase estacionaria al 5%), helio como gas acarreador y un espectrofotómetro de masas modelo Jeol SX-102 A .



Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^1H) y de Carbono 13 (RMN ^{13}C), así como los espectros de RMN bidimensional homonuclear (^1H - ^1H COSY y NOESY) y heteronuclear (HETCOR, HMBC), se generaron en un aparato Varian Unity INOVA, el cual fue operado a una frecuencia de 300 MHz para ^1H y a 75 MHz para ^{13}C . Los espectros se registraron en CDCl_3 y los desplazamientos químicos δ (ppm) referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

En general los análisis arriba indicados se efectuaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), de la Facultad de Química. Los espectros de RMN del producto 28 se registraron en la Universidad de Arizona y su rotación óptica se realizó en el Instituto de Química, UNAM.

3.3 Estudio químico de las hojas de *Piper sanctum*

3.3.1. Preparación del extracto orgánico

El material vegetal desecado y molido (1.0 Kg), se extrajo cinco veces mediante un proceso de maceración. En el Cuadro 6 se resumen las condiciones de extracción.

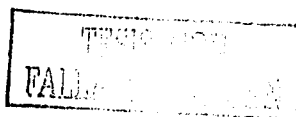
Cuadro 6. Procedimiento de extracción de la especie *P. sanctum*.

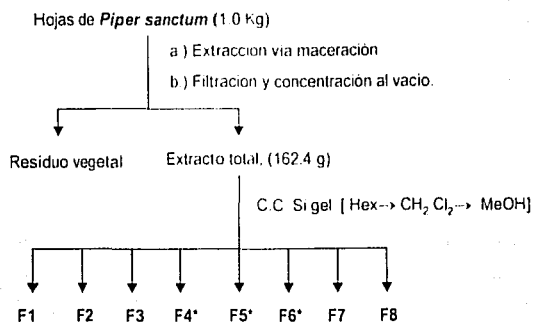
Tiempo (h)	Disolventes	Proporción	Volumen (L)
144	CH_2Cl_2 - MeOH	1:1	5.0
96	CH_2Cl_2 - MeOH	1:1	2.5
72	MeOH	100 %	2.5
120	MeOH	100 %	2.35
144	MeOH	100 %	2.0

Los extractos resultantes se filtraron y se concentraron al vacío. Posteriormente, se sometieron a un análisis por cromatografía en capa fina y se reunieron de acuerdo con su similitud cromatográfica generando un total de 162.4 g de extracto crudo de las hojas de *P. sanctum*.

3.3.2 Fraccionamiento preliminar del extracto total de las hojas de *P. sanctum*

El extracto total (162.4 g) se sometió a un fraccionamiento primario en columna abierta utilizando gel de sílice como adsorbente (178.7 g). El proceso de elución se realizó con hexano, mezclas de Hex- CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 , mezclas CH_2Cl_2 -MeOH y MeOH. En el Diagrama 1 se resume el procedimiento de extracción así como el fraccionamiento primario de *P. sanctum*.





*Fracciones activas

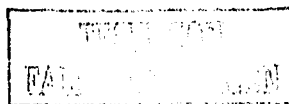
Diagrama 1. Extracción y fraccionamiento primario de *P. sanctum*.

Este procedimiento generó un total de 266 fracciones de 400 mL cada una, que se analizaron mediante cromatografía en capa fina (c.c.f.), reuniéndose todas aquéllas que cromatográficamente resultaron similares, generando así un total de ocho fracciones primarias; estos resultados se resumen en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Resumen del fraccionamiento primario via cromatografía en columna abierta del extracto crudo de las hojas de *P. sanctum*.

Fracciones	Proporción (%)	Eluyente (s)	Fracciones reunidas	Clave	Peso (g)
1-14	100	Hexano	1-38	F1	0.2169
15-36	90:10	Hex - CH ₂ Cl ₂	39-56	F2	1.5227
37-50	80:20	Hex - CH ₂ Cl ₂	57-76	F3	1.2998
51-58	70:30	Hex - CH ₂ Cl ₂	77-113	F4*	4.0421
59-74	60:40	Hex - CH ₂ Cl ₂	114-140	F5*	3.1106
75-93	50:50	Hex - CH ₂ Cl ₂	141-172	F6*	5.5606
94-108	40:60	Hex - CH ₂ Cl ₂	173-192	F7	51.6236
109-125	30:70	Hex - CH ₂ Cl ₂	193-266	F8	65.1908
126-140	20:80	Hex - CH ₂ Cl ₂			
141-157	10:90	Hex - CH ₂ Cl ₂			
158-172	100	CH ₂ Cl ₂ - MeOH			
173-190	90:10	CH ₂ Cl ₂ - MeOH			
191-208	80:20	CH ₂ Cl ₂ - MeOH			
209-223	70:30	CH ₂ Cl ₂ - MeOH			
224-238	60:40	CH ₂ Cl ₂ - MeOH			
239-254	50:50	CH ₂ Cl ₂ - MeOH			
255-266	100	MeOH			

*Fracciones que resultaron activas.



3.3.3 Fraccionamiento secundario de la fracción activa F4*

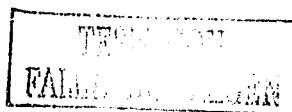
La fracción activa F4* se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (60 g). Como eluyentes se emplearon los siguientes: Hex-CH₂Cl₂ (10:0→0:10) y CH₂Cl₂-AcOEt (9:1→1:1). Se obtuvieron en total 161 fracciones de 20 mL, las cuales se analizaron por cromatografía en capa fina y se reunieron aquellas que presentaron similitud cromatográfica, para generar cuatro fracciones secundarias: F4-1 (0.0185 g), F4-2 (0.0080 g), **F4-3*** (1.585 g) y F4-4 (0.0642 g). De estas solo la **F4-3*** fue activa.

3.3.4 Fraccionamiento terciario de la fracción activa secundaria F4-3*

La fracción secundaria F4-3*, se sometió a un fraccionamiento terciario mediante una cromatografía en columna abierta. Para ello, se utilizaron 60 g de gel de sílice como adsorbente y Hex-AcOEt (10:0→9:1) como disolventes de elución. Este procedimiento condujo a la obtención de siete fracciones terciarias: F4-3-I (0.0024 g), **F4-3-II*** (0.4391 g), **F4-3-III*** (0.0860 g), **F4-3-IV*** (0.4641 g), F4-3-V (0.2076 g), F4-3-VI (0.0533 g) y F4-3-VII (0.0158 g). De las cuales las **F4-3-II***, **F4-3-III*** y **F4-3-IV*** resultaron activas.

3.3.4.1 Separación de los compuestos 2-oxo-12-(3',4'-metilendioxfenil)-dodecano (22), 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-tetradecano (23), 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (25), el 2-oxo-18-(3',4'-metilendioxfenil)-octadecano (26) y del producto (24) de la fracción F4-3-IV*

La fracción F4-3-IV* se resolvió en sus componentes mediante cromatografía de líquidos de alta resolución utilizando las siguientes condiciones: como fase estacionaria una columna analítica fase reversa C₁₈, y como fase móvil una mezcla de ACN-MeOH (80:20) con un flujo de 0.30 mL/min. La longitud de onda utilizada para la detección de los compuestos fue de 214 nm y las inyecciones de la muestra se realizaron a una concentración de 0.3 mg/50 µL. Este procedimiento permitió la separación de cinco metabolitos de interés: 2-oxo-12-(3',4'-metilendioxfenil)-dodecano (22), 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-tetradecano (23), 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (25), 2-oxo-18-(3',4'-metilendioxfenil)-octadecano (26) y el producto (24).

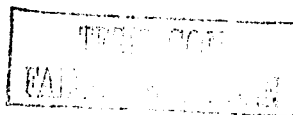


3.3.4.2 Separación de los compuestos metil[6-(10-fenildecil)tetrahydro-piran-2-il]acetato (28) y 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (27) de las fracciones terciarias F4-3-III* y F4-3-II*

La separación de los componentes de la fracción F4-3-III* se realizó también mediante cromatografía de líquidos de alta resolución y se utilizaron las siguientes condiciones: como fase estacionaria una columna analítica fase reversa C₁₈ y como fase móvil una mezcla ACN- MeOH (90:10) con un flujo de 0.3 mL/min, la longitud de onda utilizada para la detección fue de 214 nm y las inyecciones se realizaron a una concentración de 0.3 mg/50 µL. Posteriormente se realizó el escalamiento para el cual se utilizó como fase estacionaria una columna preparativa fase reversa C₁₈ y A CN-MeOH (90:10) como fase móvil a un flujo de 7.11 mL/min, utilizando una concentración de 3.0 mg/50 µL por inyección. La aplicación de este procedimiento permitió la separación del metil[6-(10-fenildecil)tetrahydro-piran-2-il]acetato (28) así como cantidades adicionales del 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-tetradecano (23). Por otro lado, el análisis de la fracción activa F4-3-II* por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), permitió detectar la presencia del 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (27) y cantidades adicionales de los compuestos metil[6-(10-fenildecil)tetrahydro-piran-2-il]acetato (28) y del producto (24); la fracción se sometió también a un análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución utilizando las siguientes condiciones: una columna preparativa fase reversa C₁₈, y ACN con un flujo de 7.11 mL/min, a una concentración de 3.0 mg/50 µL por inyección.

3.3.4.3 Separación de los compuestos 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-3-tetradeceno (29) y 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-3-hexadeceno (30) de la fracción terciaria F6-V-IV*

La fracción activa F6* se sometió a un fraccionamiento secundario en columna abierta sobre gel de sílice (60g). Como disolventes de elución se emplearon los siguientes: Hex-AcOEt (10:0→9:1). Este procedimiento generó un total 236 fracciones de 20 mL, cada una, que fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina (c.c.f.), reuniéndose todas aquellas que cromatográficamente resultaron similares, generando así un total de nueve fracciones secundarias: F6-I (0.0237 g), F6-II (1.2130 g), F6-III (0.1138 g), F6-IV (0.0497 g), F6-V* (0.9283 g), F6-VI



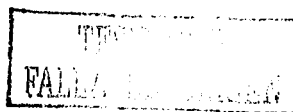
(0.0420 g), F6-VII (0.0863 g), F6-VIII (0.2634 g) y F6-IX (0.1504 g). De estas resultado activa la F6-V*.

La fracción F6-V*, se sometió a un fraccionamiento terciario en cromatografía en columna abierta. Para ello, se emplearon 50 g de gel de sílice como adsorbente y Hex-AcOEt (10:0→9:1), como disolventes de elución. Este proceso condujo a la obtención de diez fracciones terciarias: F6-V-1 (0.0128 g), F6-V-II (0.0744 g), F6-V-III (0.3524 g), F6-V-IV* (0.2367 g), F6-V-V (0.0237 g), F6-V-VI (0.0259 g), F6-V-VII (0.0333 g), F6-V-VIII (0.0337 g), F6-V-IX (0.0542 g) y F6-V-X (0.0668 g). De las cuales la F6-V-IV* resultó activa.

La fracción F6-V-IV*, se resolvió en sus componentes mediante el empleo de cromatografía de líquidos de alta resolución utilizando las siguientes condiciones una columna analítica fase normal y como fase móvil una mezcla Hex-AcOEt, (95:5) con un flujo de 0.3 mL/min. La longitud de onda empleada para la detección fue de 270 nm y las inyecciones de la muestra se realizaron a una concentración de 0.3 mg/50 μ L. Este procedimiento permitió la separación de dos metabolitos de interés: 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-3-tetradeceno (**29**) y 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-3-hexadeceno (**30**).

3.4 Determinación de la actividad antifimica

La actividad antifimica preliminar se determinó en el Instituto de Investigaciones sobre la Tuberculosis de la Universidad de Illinois, en Chicago, Illinois, E.U., mediante un ensayo radiorespirométrico. Los compuestos puros y fracciones se evaluaron mediante el método fluorimétrico MABA (Microplate Alamar Blue Assay). Los procedimientos se describen con detalle en los trabajos de Cantrell y colaboradores (Cantrell *et. al.*, 1998) y Collins y Franzblau (Collins y Franzblau, 1997).



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Selección de la especie *P. sanctum* como un candidato apropiado para la obtención de principios antifímicos

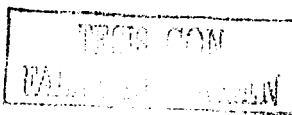
La preselección de la especie *P. sanctum* se realizó de acuerdo con el criterio etnomédico, el cual constituye uno de los criterios más importantes para seleccionar materias primas destinadas al descubrimiento de sustancias biológicamente activas (Fabricant y Fransworth, 2001).

Posteriormente, durante la realización de los ensayos biológicos preliminares efectuados en el Instituto de Investigaciones sobre Tuberculosis de la Universidad de Illinois en Chicago, se estableció que esta especie representa una fuente potencial de agentes antifímicos de interés terapéutico. Cabe mencionar que el extracto íntegro de la hojas de *P. sanctum* inhibió en un 100% el crecimiento de *M. tuberculosis*, agente etiológico principal de la tuberculosis. Como ensayo biológico para detectar la actividad inicial del extracto íntegro se utilizó el método radiorespirométrico (Cantrell *et al.*, 1998).

4.2 Aislamiento y purificación de los principios activos

La preparación del extracto destinado a la separación de principios activos se realizó mediante un proceso de maceración utilizando como disolvente de extracción una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH (1:1); esta mezcla se seleccionó como disolvente de extracción debido a que con este sistema se observó la mejor actividad en las pruebas biológicas iniciales. La metodología experimental se indicó en el Capítulo III, inciso 3.3.1.

Posteriormente, el extracto activo se fraccionó de manera preliminar mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. Este proceso generó ocho fracciones primarias. De estas, las fracciones F4-F6* presentaron actividad antimicobacteriana (**Cuadro 8**) de acuerdo con los resultados del ensayo azul de alamar (Collins y Franzblau, 1997).



Cuadro 8. Actividad antimicobacteriana de las fracciones activas obtenidas del extracto crudo de las hojas de *P. sanctum*

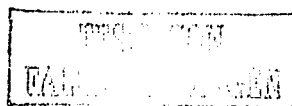
Fracciones primarias activas	Actividad antimicobacteriana (% de inhibición)
extracto crudo	100
F4*	100
F5*	100
F6*	100

*Fracciones antimicobacterianas (Criterio de actividad: % de inhibición $\geq 95\%$).

La fracción activa F4* se sometió a un fraccionamiento secundario por métodos cromatográficos. Los resultados de las evaluaciones biológicas indicaron que la fracción secundaria F4-3* era la parte activa. Para intentar la separación de los compuestos esta fracción se sometió a un fraccionamiento terciario. En las fracciones F4-3-II*, F4-3-III* y F4-3-IV* resultantes de este último proceso se concentró la actividad biológica (porcentaje de inhibición $\geq 98\%$). La fracción activa F4-3-IV* se sometió a un análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Este análisis permitió la detección de seis componentes los cuales se separaron por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Este proceso condujo al aislamiento de los siguientes compuestos: 2-oxo-12-(3',4'-metilendioxfenil)-dodecano (**22**), 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-tetradecano (**23**), 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (**25**), 2-oxo-18-(3',4'-metilendioxfenil)-octadecano (**26**) y el producto (**24**) que se encuentra en proceso de caracterización. En la **Figura 4**, se muestra el cromatograma de la fracción F4-3-IV*.

De la fracción activa F4-3-III* se separaron por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) los siguientes metabolitos: 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-tetradecano (**23**) y el metil[6-(10-fenildecil)tetrahydro-piran-2-il]acetato (**28**). Asimismo la fracción F4-3-II*, se sometió al mismo tratamiento lo que permitió la obtención del metabolito 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (**27**). En las **Figuras 5 y 6**, se muestran los cromatogramas correspondientes.

De la fracción activa F6-V-IV* (porcentaje de inhibición $\geq 98\%$) se obtuvieron por una combinación de cromatografía en columna y cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) **Figura 6**, los productos 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-3-tetradeceno (**29**) y 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-3-hexadeceno (**30**).



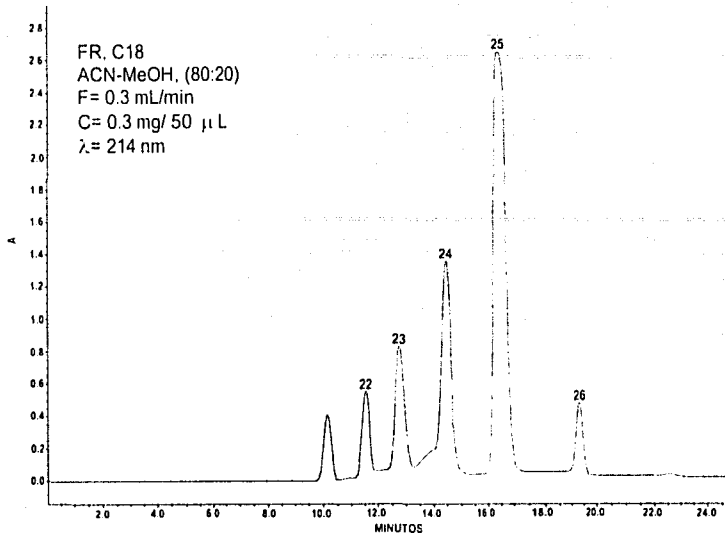


Figura 4. Cromatograma de la fracción activa F4-3-IV*

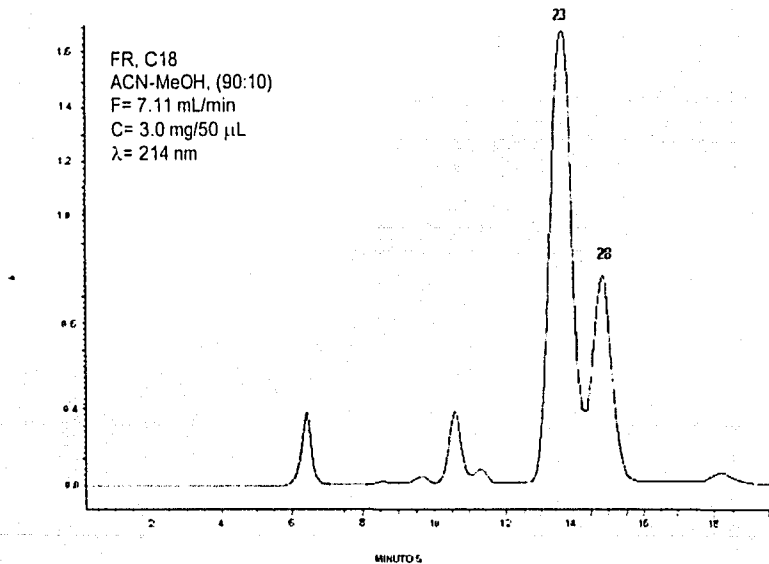
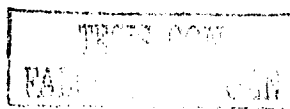
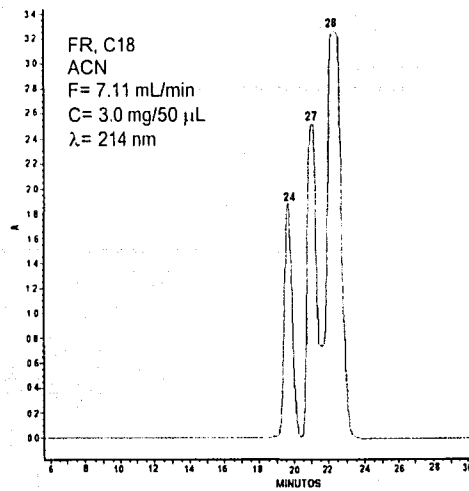
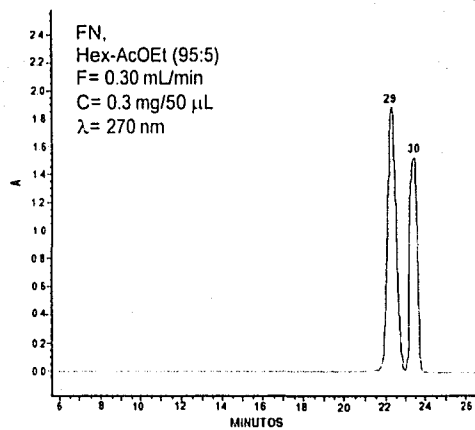


Figura 5. Cromatograma de la fracción activa F4-3-III*





a)

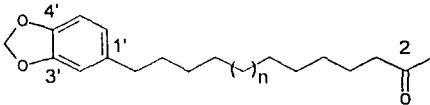
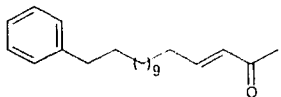
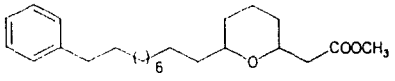
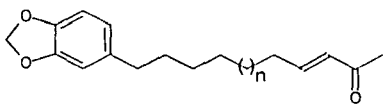


b)

Figura 6. a) Cromatograma de la fracción activa F4-3-II* y b) Cromatograma de la fracción activa F6-V-IV*.

En el Cuadro 9 se indican la fórmula mínima, el peso molecular, el tiempo de retención, los rendimientos de los compuestos aislados, así como las estructuras de los compuestos identificados a la fecha.

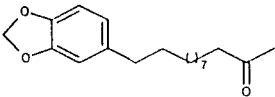
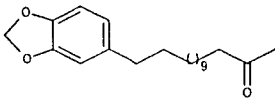
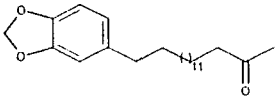
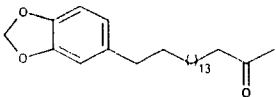
Cuadro 9. Metabolitos aislados de las hojas de *Piper sanctum* en el presente estudio.

Compuesto	Fórmula mínima	Peso molecular	t _R (minutos)	Rendimiento (%) (planta seca)
				
n= 1 (22)	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	304	10.26	2.8x10 ⁻⁴
n= 3 (23)	C ₂₁ H ₃₂ O ₃	32	12.75	7.0x10 ⁻⁴
n= 5 (25)	C ₂₃ H ₃₆ O ₃	360	16.41	5.9x10 ⁻³
n= 7 (26)	C ₂₅ H ₄₀ O ₃	88	19.27	2.0x10 ⁻⁴
 (27)				
 (28)				
				
n= 5 (29)	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	330	22.47	1.9x10 ⁻⁴
n= 7 (30)	C ₂₃ H ₃₄ O ₃	358	23.53	9.6x10 ⁻⁵

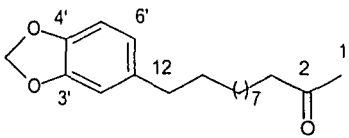
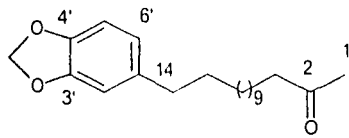
4.2.1 Caracterización de los compuestos 2-oxo-12-(3',4'-metilendioxfenil)-dodecano (22), 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-tetradecano (23), 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (25) y el 2-oxo-18-(3',4'-metilendioxfenil)-octadecano (26).

Las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los productos 22, 23, 25 y 26 se resumen en los Cuadros 10 (IR, EM) y 11-12 (RMN).

Cuadro 10. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de los productos 22, 23, 25 y 26.

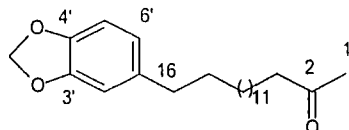
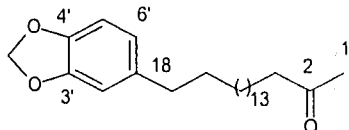
Metabolito	IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1}	EM/IE m/z
 <p>(22)</p>	2926, 2847, 1716, 1499, 1490, 1472, 1440, 1361, 1218, 1171, 1144, 1039, 940, 802, 715 y 404.	304[M ⁺ (100)], 289(1.4), 246(22.2), 218(2.7), 204(1.4), 177(1.4), 161(1.4), 140(4.16), 135(86.1), 105(2.7), 91(1.4), 77(2.7), 55(1.38) y 43(2.7).
 <p>(23)</p>	2913, 2841, 1713, 1489, 1490, 1476, 1440, 1353, 1228, 1191, 1164, 1039, 945, 918, 802 y 404.	332[M ⁺ (100)], 328(4.54), 274(18.1), 177(1.5), 163(1.5), 148(4.54), 135(90.9), 105(3.0), 91(6.0), 77(1.5), 55(1.5) y 43(3.0).
 <p>(25)</p>	2916, 2848, 1713, 1499, 1490, 1472, 1440, 1363, 1228, 1191, 1164, 1039, 940, 918, 802, 715 y 404.	360[M ⁺ (100)], 345(1.7), 302(22.3), 177(1.7), 148(4.4), 135(89.3), 105(2.6), 91(1.7), 77(2.6) y 43(3.5).
 <p>(26)</p>	2914, 2848, 1718, 1492, 1472, 1437, 1360, 1228, 1191, 1154, 1027, 918, 812, 715 y 428.	388[M ⁺ (100)], 373(2.7), 330(22.2), 288(1.4), 274(1.4), 302(22.3), 177(1.4), 140(4.2), 135(88.8), 123(1.4), 105(1.4), 91(1.4), 77(2.7) y 43(3.5).

Cuadro 11. Datos espectroscópicos de RMN de los productos 22 y 23.

Posición	Metabolito			
				
	(22)		(23)	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
CH ₃ CO	2.13 s	29.0	2.13 s	29.0
CO	---	209.5	---	209.2
3	2.40 t (7.2)	42.0	2.41 t (7.1)	41.8
4	1.52-1.59, m	22.8	1.52-1.59, m	23.0
5-10	1.20-1.30, m	26.0-28.0	1.22-1.30, m	26.0-28.0
11	1.52-1.59, m	32.0	1.22-1.30, m	26.0-28.0
12	2.51 ta (7.8)	34.0	1.22-1.30, m	31.8
13	---	---	1.52-1.59, m	34.0
14	---	---	2.51 ta (7.8)	
1'	---	136.0	---	135.0
2'	6.67 dd (1.8,0.3)	109.0	6.67 dd (1.8,0.3)	109.0
3'	---	149.2	---	149.5
4'	---	147.2	---	147.2
5'	6.72 dd (7.8, 0.3)	108.1	6.71 dd (7.8, 0.3)	108.1
6'	6.61 dda (7.8, 1.8)	120.5	6.60 dda (7.8, 1.8)	120.5
OCH ₂ O	5.91 s	100	5.91 s	100

* El desplazamiento químico está expresado en ppm. Los valores en paréntesis corresponden a las constantes de acoplamiento (J) en Hertz.

Cuadro 12. Datos espectroscópicos de RMN de los productos 25 y 26.

Posición	Metabolito			
	 (25)		 (26)	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
CH ₃ CO	2.13 s	29.0	2.13 s	29.0
CO	---	209.5	---	209.2
3	2.41 t (7.2)	42.0	2.41 t (7.1)	42.0
4	1.52-1.60, m	23.0	1.52-1.60, m	22.8
5-14	1.22-1.30, m	26.0-28.0	1.20-1.30, m	26.0-28.0
15	1.52-1.60, m	32.0	1.20-1.30, m	26.0-28.0
16	2.51 ta (7.8)	34.0	1.20-1.30, m	26.0-28.0
17	---	---	1.52-1.60, m	32.0
18	---	---	2.51 ta (7.5)	34.0
1'	---	136.0	---	136.2
2'	6.67 dd (1.8, 0.3)	109.0	6.67 dd (1.8, 0.3)	109.0
3'	---	149.0	---	148.5
4'	---	147.0	---	147.1
5'	6.72 dd (8.0, 0.3)	108.0	6.72 dd (8.0, 0.3)	108.0
6'	6.61 ddt (7.8, 1.8, 0.6)	120.5	6.61 dda (8.0, 1.8)	120.0
OCH ₂ O	5.91 s	100	5.91 s	100

* El desplazamiento químico está expresado en ppm. Los valores en paréntesis corresponden a las constantes de acoplamiento (*J*) en Hertz.

Los productos naturales se obtuvieron como sólidos cristalinos de bajo punto de fusión ~60-61 °C (compuestos **23** y **25**) o aceites transparentes (**22** y **26**). La fórmula molecular en todos los casos se estableció por espectrometría de masas como $C_{19}H_{28}O_3$, $C_{21}H_{32}O_3$, $C_{23}H_{36}O_3$ y $C_{25}H_{40}O_3$, respectivamente. Así los iones moleculares de los compuestos difieren entre sí por 28 uma. Cada una de las fórmulas mínimas establecidas permite un índice de deficiencia de hidrógenos de seis.

Los espectros en el IR, presentan bandas de absorción asociadas con la presencia de una cadena alquímica (~2916, 1472, 1440 y 715 cm^{-1}), aromaticidad (~1499, 1490, 918 y 802 cm^{-1}) y un grupo carbonilo de cetona (~1713 cm^{-1}). Los espectros en el UV contienen bandas de absorción congruentes con una sustancia aromática (λ ~233 y 286 nm) [Silverstein, 1997].

El análisis de los espectros de RMN, permitió establecer en todos los casos la presencia de: i) un anillo aromático trisustituido, ii) una cadena alquímica lineal, iii) un grupo metilendioxi y iv) un grupo carbonilo de cetona terminal. Estos fragmentos estructurales satisfacen los requerimientos de las fórmulas moleculares de los compuestos **22**, **23**, **25** y **26** en cuanto a número de oxígenos e índice de deficiencia de hidrógenos. Las características más relevantes de los espectros de RMN se resumen a continuación:

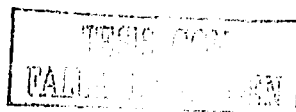
- 1) Las señales en δ_H 6.61 (ddt, $J = 7.8, 1.8, 0.6$ Hz, H-6'), 6.67 (dd, $J = 1.8, 0.3$ Hz, H-2') y 6.72 (dd, $J = 8.0, 0.3$ Hz, H-5') conforman un sistema ABC característico de un anillo aromático trisustituido. Todas las señales del sistema ABC correlacionan entre sí en el espectro COSY (**Espectro 1**). Las señales aromáticas antes descritas correlacionan en el espectro HETCOR (**Espectro 2**) con las señales en δ_C 120.5 (C-6'), 109 (C-2') y 108 (C-5'), respectivamente. De esta forma, se logró asignar los carbonos protonados del anillo aromático. Los desplazamientos químicos de las señales en δ_C 147 y 149, corresponden a dos de los carbonos cuaternarios del anillo aromático y sugieren la presencia de dos sustituyentes electronegativos que, de acuerdo con la fórmula mínima, se trata de dos grupos oxigenados; por lo tanto, la señal en δ_C 136, y última en la zona de carbonos aromáticos corresponde al carbono cuaternario que sostiene la cadena alifática lineal.
- 2) En δ_H 5.91 se aprecia un singulete con una integración para dos hidrógenos característico de un grupo metilendioxi; esta señal correlaciona en el espectro HETCOR (**Espectro 2**) con la absorción δ_C 100.

- 3) En $\sim\delta_H$ 2.51 (td, $J = 7.8$, - Hz) se observa una señal ancha atribuible a un metileno bencílico; esta correlaciona en el espectro HETCOR (**Espectro 2**) con la señal en $\sim\delta_C$ 34. La señal en $\sim\delta_H$ 2.41 (t, $J = 7.2$ Hz, H-3) corresponde al metileno α al carbonilo y correlaciona en el espectro HETCOR (**Espectro 2**) con la absorción en $\sim\delta_C$ 42 (C-3).
- 4) En el intervalo $\sim\delta_H$ 1.52-1.60 se aprecia una señal para cuatro hidrógenos, dos son asignables a los protones α al metileno bencílico y los dos restantes a los protones vecinales al metileno α al carbonilo. Estos protones correlacionan en el espectro COSY (**Espectro 1**) con las señales en δ_H 2.41 y 2.51, respectivamente.
- 5) En $\sim\delta_H$ 1.22-1.30 se observa un grupo de señales atribuible al resto de la cadena alquímica. En el espectro HETCOR (**Espectro 2**) se aprecia una correlación entre estas señales y las que aparecen en el rango de absorción de $\sim\delta_C$ 26-28.
- 6) En $\sim\delta_H$ 2.13 se observa un singulete correspondiente a un grupo metilo de una cetona terminal. Ésta señal correlaciona en el espectro HETCOR (**Espectro 2**) con la señal en $\sim\delta_C$ 29. Por último, en $\sim\delta_C$ 209.5 se aprecia una señal característica para un grupo carbonilo de cetona. Estas últimas señales sugieren que los productos naturales presentan una función metil-cetona al término de la cadena alquímica.

Todas las evidencias mencionadas permiten identificar cuatro productos naturales novedosos: 2-oxo-12-(3',4'-metilendioxfenil)-dodecano (**22**), 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-tetradecano (**23**), 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (**25**) y el 2-oxo-18-(3',4'-metilendioxfenil)-octadecano (**26**).

El patrón de fragmentación observado en los espectros de masas es congruente con las propuestas estructurales presentadas en el **Cuadro 10**. Así el pico base de cada compuesto constituye el ion molecular y el fragmento con una relación m/z 135 constituye el pico más abundante después del pico base y es generado por la pérdida de la cadena alquímica a partir del ion molecular mediante una ruptura bencílica. Este fragmento es característico para los derivados de tipo alquilbencénicos (Silverstein, 1997).

A manera de ejemplo, en las **Figuras 7-11** se muestran los espectros en el UV, de masas modalidad IE, el patrón de fragmentación, de RMN- 1H y de RMN- ^{13}C del compuesto **25**. Los espectros de masas y RMN de los compuestos restantes se muestran en el apéndice.



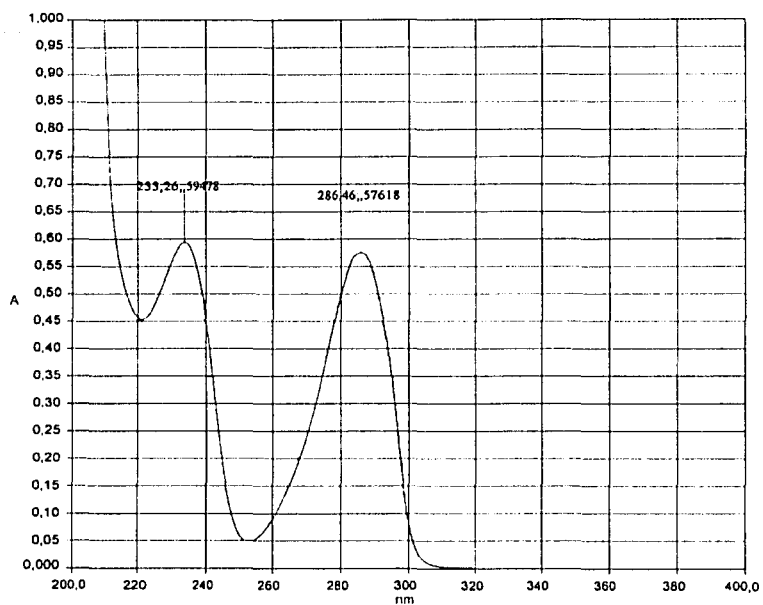


Figura 7. Espectro en el UV del compuesto 2-oxo-16-(3',4'metilendioxfenil)-hexadecano (25).

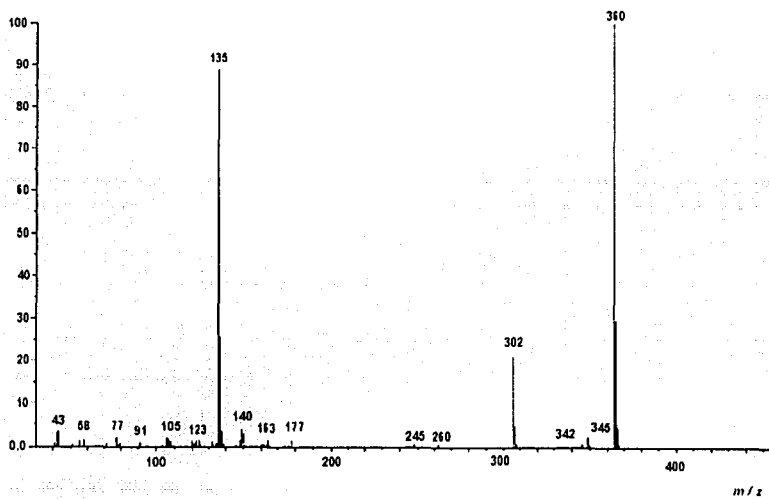


Figura 8. Espectro de masas modalidad IE del compuesto 2-oxo-16-(3',4'metilendioxfenil)-hexadecano (25).

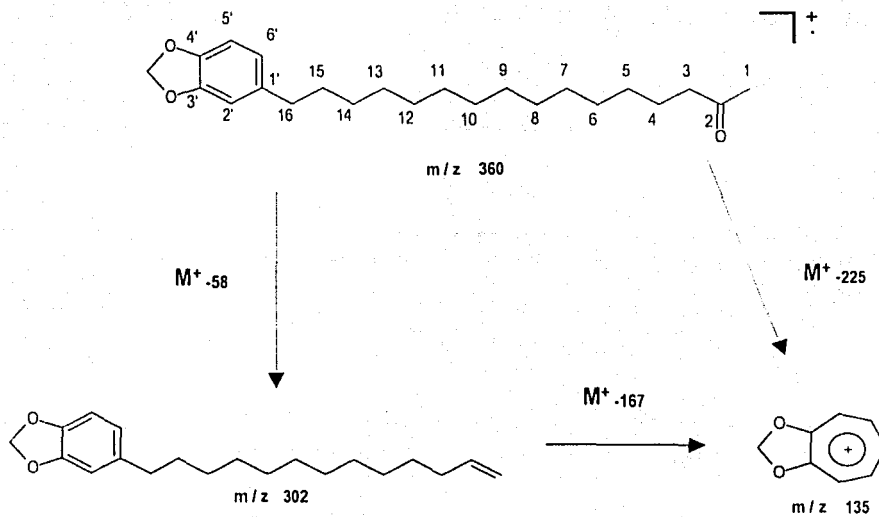


Figura 9. Patrón de fragmentación del compuesto 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxyfenil)-hexadecano (25).

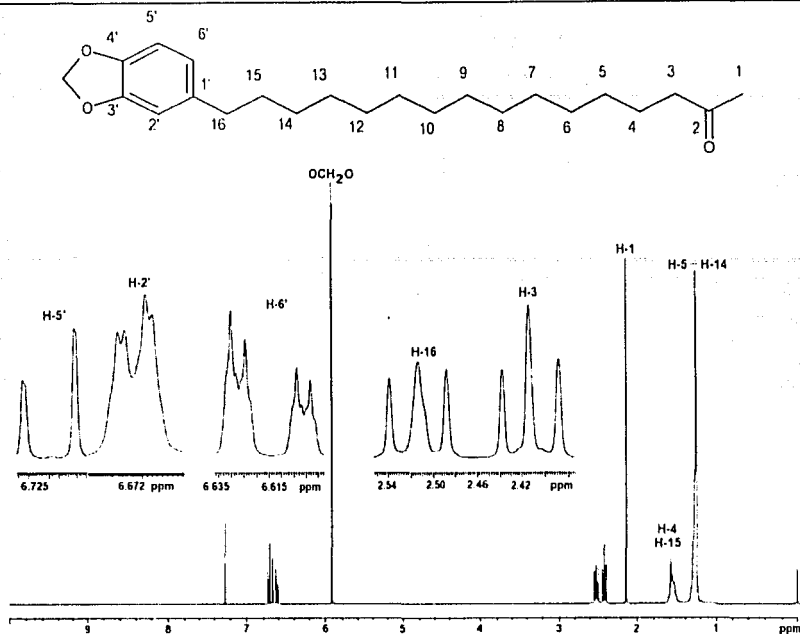


Figura 10. Espectro de RMN- ^1H del compuesto 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxyfenil)-hexadecano (25).

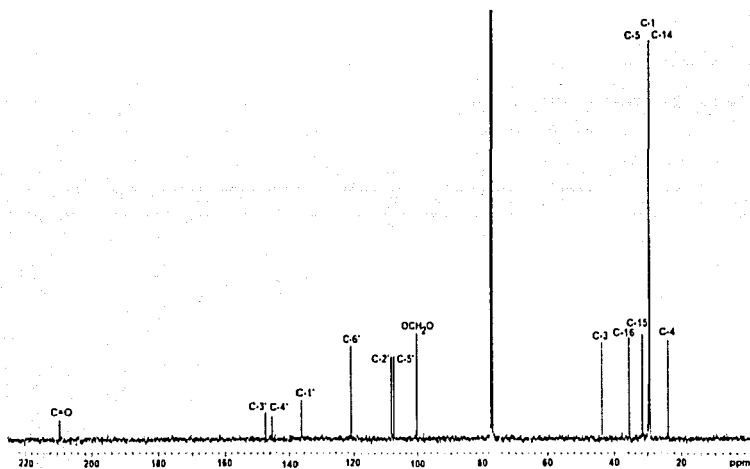


Figura 11. Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxyfenil)-hexadecano (25).

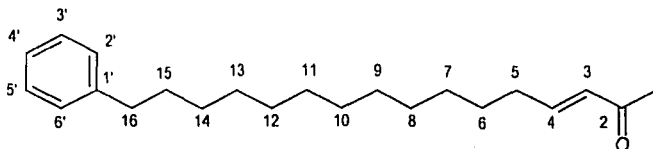
4.2.2 Caracterización del 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (27)

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto **27** se resumen en los Cuadros 13 y 14.

Cuadro 13. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (27).

Fórmula molecular	C ₂₂ H ₃₄ O
Peso molecular	314
IR $\nu_{\text{máx}}$ (película) cm ⁻¹	2925, 2853, 1738, 1677, 1627, 1495, 1463, 1453, 1359, 1252, 1177, 1029, 978, 746 y 698.
EMIE m/z (Int. Rel.)	315(17.7), 314(68.8), 296(4.4), 245(5.1), 256(8.8), 174(6.6), 160(6.6), 131(22.2), 117(17.7), 104(51.1), 97(64.4) y 91[M ⁺ (100)].

Cuadro 14. Datos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (27).



Posición	δ_C	δ_H
CH ₃ CO	28	2.2 s
CO	198.8	---
3	131.3	6.0 dt (15.9, 1.5)
4	148.7	6.8 dt (15.9, 6.9)
5	31.5	2.2, m
6	26.8	1.46 q (7.2)
7-12	29.2-29.6	1.6, m
13-14	29.2-29.6	1.2, m
15	32.4	1.2, m
16	35.9	2.6 ta (7.5)
1'	142.9	---
2',6'	128.2	7.1-7.3
3',5'	128.4	7.1-7.3
4'	125.5	7.1-7.3

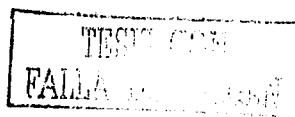
* El desplazamiento químico está expresado en ppm. Los valores en paréntesis corresponden a las constantes de acoplamiento (J) en Hertz.

El producto **27** también se aisló como un aceite incoloro. Su fórmula molecular se estableció por espectrometría de masas como $C_{22}H_{34}O$ observándose el ion molecular en una relación m/z de 314 uma. La fórmula molecular calculada, permite un índice de deficiencia de hidrógenos de seis.

El espectro en el IR, presenta bandas de absorción asociadas con la presencia de una cadena alquímica (2925, 1463, 1453 y 746 cm^{-1}), aromaticidad (1495, 978 y 698 cm^{-1}) y de un grupo carbonilo de cetona (1677 cm^{-1}). El espectro en el UV contiene bandas de absorción congruentes con una sustancia aromática (λ ~219 y 286 nm) [Silverstein, 1997].

Al igual que en el caso de los productos **22**, **23**, **25** y **26**, el análisis de los espectros de RMN (Figuras 12-15 y Cuadro 14), permitió establecer la presencia de un anillo aromático, de una cadena alquímica lineal y de un grupo carbonilo de cetona en la molécula. Las características más relevantes de los espectros de RMN se resumen a continuación:

- 1.) Las señales en δ_H 7.1-7.3 conforman un sistema AB_2C_2 característico de un anillo aromático monosustituído. Las señales en δ_C 142.9 (C-1'), 128.4 (C-5' y C-3'), 128.2 (C-2' y C-6') y 125.5 (C-4'), se asignaron a los carbonos aromáticos correspondientes.
- 2.) En el δ_H 6.8 (dt, $J = 15.9, 6.9$ Hz, H4) y 6.0 (dt, $J = 15.9, 1.5$ Hz, H-3) se aprecian dos señales asignables a una doble ligadura *trans* disustituída y conjugada. Las señales antes mencionadas correlacionan entre si en el espectro COSY (Figura 15) y los carbonos correspondientes aparecen en δ_C 131.3 (C-3) y 148.7 (C-4).
- 3.) La señal de δ_H 2.6 (ta, $J = 7.5$ Hz, H-16) es asignable a los protones del metileno bencílico que correlaciona en el espectro COSY con las señales en el intervalo δ_H 7.1-7.3 (H-2', H-6' y H-15). El carbono bencílico absorbe en δ_C 35.9.
- 4.) En δ_H 2.2 / δ_C 28 se aprecia la señal de un grupo metilo de cetona terminal. Al igual que en los productos anteriores, el producto natural presenta una función metil-cetona al término de la cadena alquímica.
- 5.) En δ_H 2.2 se observa una señal para dos protones asignables a los protones vecinales de la doble ligadura. Estos protones correlacionan en el espectro COSY con las señales en δ_H 1.46 (H-6), 6.8 (H-4) y 6.0 (H-3). El carbono correspondiente absorbe en δ_C 31.5.



- 6.) En δ_H 1.46 (q, $J = 7.2$ Hz, H-6) / δ_C 26.8, se aprecian las señales de otro grupo metileno (C-6). En el espectro COSY se observa su correlación con δ_H 2.2 (H-5) y 1.6 (H-7).

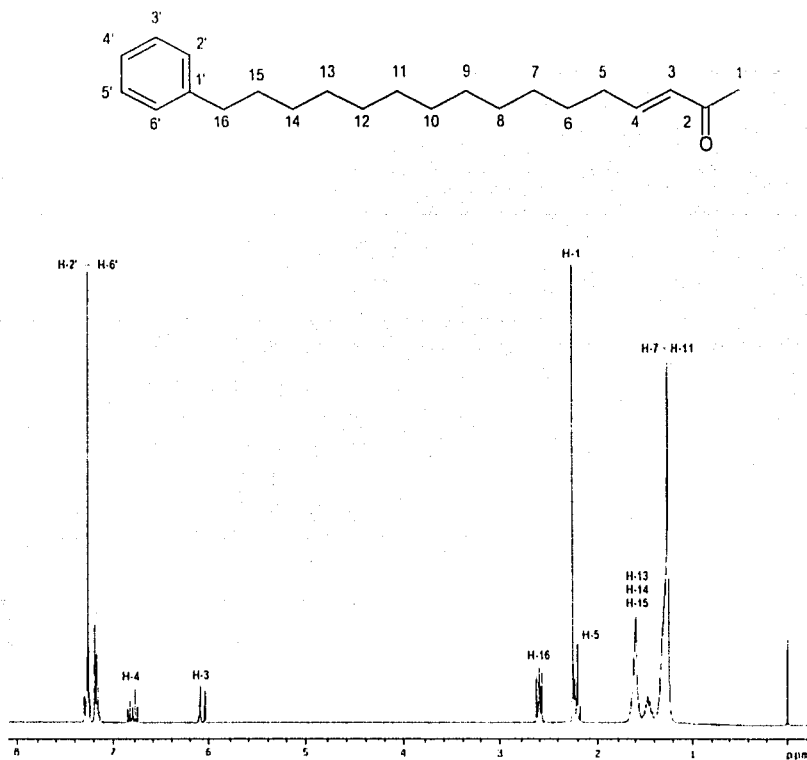


Figura 12. Espectro de RMN- 1H del compuesto del 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (27).

- 7.) En el rango δ_H 1.6-1.2 y δ_C 29.2-29.6 se observan las señales típicas de los metilenos restantes de la cadena alquímica (H-7 — H-12 y H-13 — H-15).
- 8.) Por último, en δ_C 198.8 se aprecia la señal de un grupo carbonilo. Esta señal aparece desplazada diamagnéticamente en comparación al carbonilo de cetona de los compuestos 22, 23, 25 y 26. Por lo tanto, la doble ligadura debe encontrarse entre los desplazamientos en δ_C 131.3 (C-3) y 148.7 (C-4).

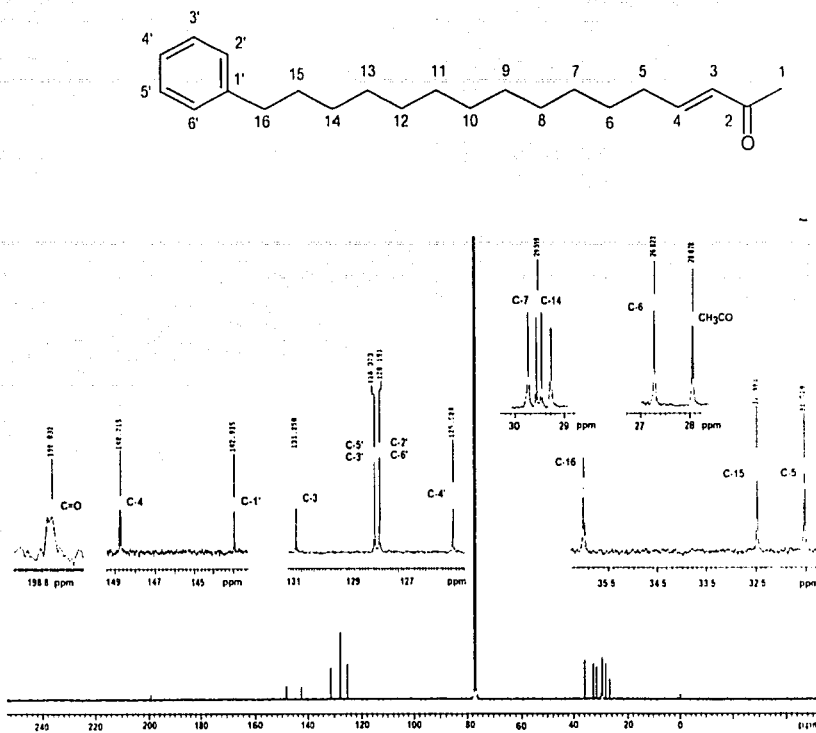


Figura 13. Espectro de RMN-¹³C del compuesto del 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (27).

De acuerdo con las evidencias presentadas, el nuevo producto natural se identificó como el 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (27). El patrón de fragmentación observado en el espectro de masas es congruente con la propuesta presentada pues el fragmento con relación m/z 91 una constituye el pico base del compuesto y es generado mediante una ruptura bencílica, con la posterior formación del grupo tropilio y una pérdida de 123 unidades de masa a partir del ion molecular (Silverstein, 1997). En la Figura 14 se muestra el patrón de fragmentación del compuesto 27.

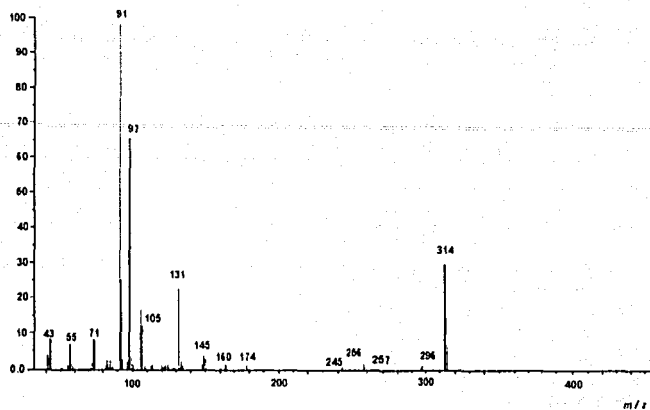


Figura 13a. Espectro de masas modalidad IE del compuesto 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (27).

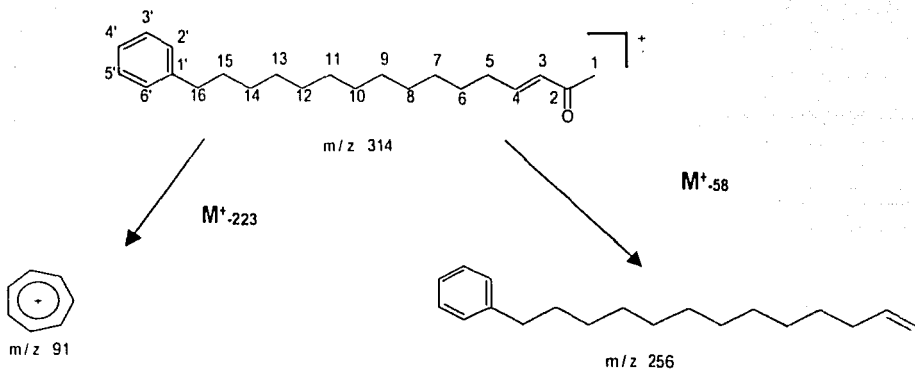


Figura 14. Patrón de fragmentación del compuesto 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (27).

TRABAJO
FALLA

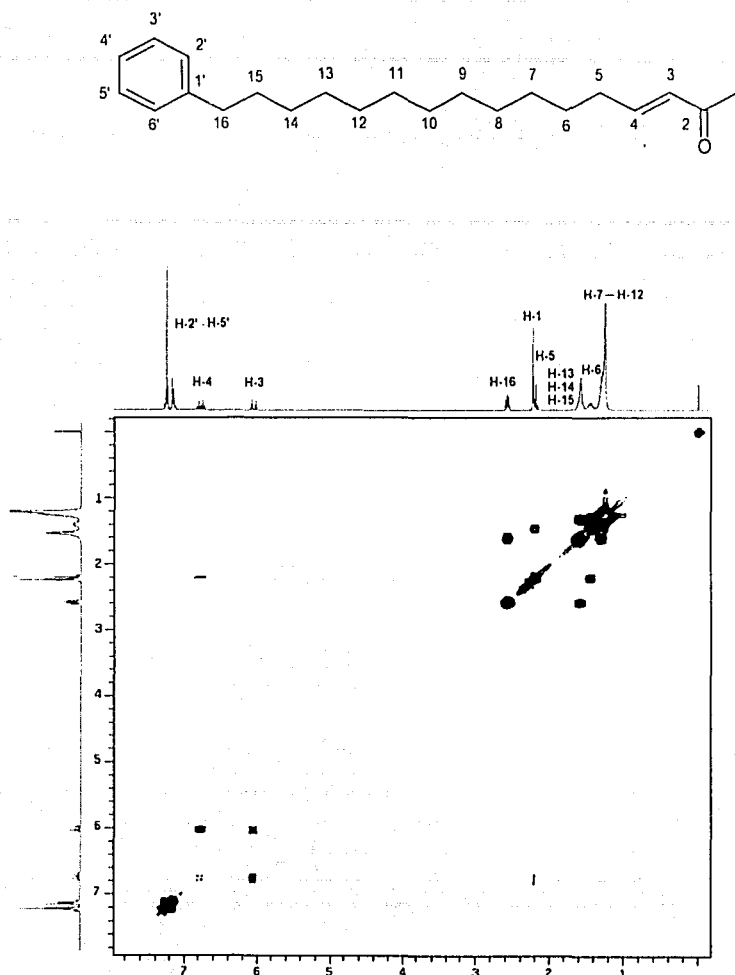


Figura 15. Espectro de RMN modalidad COSY del compuesto del 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (27).

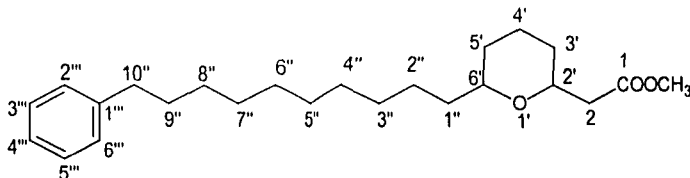
4.2.3 Caracterización del metil[6-(10-fenildecil)tetrahidro-piran-2-il]acetato (28)

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto 28 se resumen en los cuadros 15 y 16.

Cuadro 15. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del metil[6-(10-fenildecil)tetrahidro-piran-2-il]acetato (28).

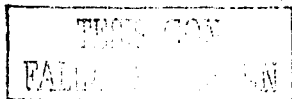
Fórmula molecular	C ₂₄ H ₃₈ O ₃
Peso molecular	374
IR $\nu_{\text{máx}}$ (película) cm ⁻¹	2926, 2853, 1743, 1604, 1495, 1454, 1436, 1372, 1346, 1287, 1250, 1197, 1074, 747 y 698.
EMIE m/z (Int. Rel.) [Espectro 12]	375(14.1), 374(52.8), 356(6.6), 342(13.2), 324(5.6), 314(1.8), 301(16.0), 282(14.1), 281(1.8), 256(5.6), 245(1.8), 242(1.8), 209(1.8), 202(2.83), 185(3.77), 172(2.8), 158(13.2), 157[M ⁺ (100)], 143(5.6), 125(5.6), 104(29.2), 91(73.58), 69(8.5), 55(11.3), 41(7.5).

Cuadro 16. Datos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del metil[6-(10-fenildecil)tetrahidro-piran-2-il]acetato (28).



Posición	δ_{C}	δ_{H}
OCH ₃	51.5	3.6 s
CO	172.0	---
2a	41.6	2.36 dd (14.7, 5.7)
2b	41.6	2.51 dd (14.7, 7.8)
2'	74.4	3.7 dddd (13.2, 7.8, 5.7, 1.8)
3'-5'	23.4-31.5	1.0-1.8, m
6'	78.0	3.2 tdd (11.1, 4.8, 1.8)
1''-9''	23.4-31.5	1.0-1.8, m
10''	36.0	2.6 ta (7.8)
1'''	142.0	---
2'''	128.3	7.1-7.3, m
3'''	128.1	7.1-7.3, m
4'''	125.4	7.1-7.3, m
5'''	128.1	7.1-7.3, m
6'''	128.3	7.1-7.3, m

* El desplazamiento químico está expresado en ppm. Los valores en paréntesis corresponden a las constantes de acoplamiento (J) en Hertz.

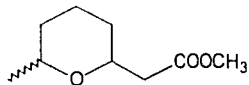


El producto **28** se aisló como un aceite incoloro. Su fórmula molecular se estableció como $C_{24}H_{38}O_3$ por espectrometría de masas observándose el ion molecular en una relación m/z de 374 uma. La fórmula molecular calculada permite un índice de deficiencia de hidrógenos de seis.

El espectro en el IR, presenta bandas de absorción asociadas con la presencia de C-H alifático (2926, 2853, 1454 y 747 cm^{-1}), aromaticidad (1495, 1436, 747 y 698 cm^{-1}) y de un grupo carbonilo de éster (1743 cm^{-1}). El espectro en el UV contiene bandas de absorción congruentes con una sustancia aromática (λ : ~253, 267 y 286 nm) y su $[\alpha]_D = -3.0$ [Silverstein, 1997].

El análisis conjunto de los espectros de RMN y masas (**Espectros 13-14 y Cuadro 16**), permitió establecer la presencia de un anillo aromático monosustituido, una cadena alquílica lineal, un anillo pirano y un grupo carbonilo de éster. Las evidencias que permitieron identificar estos fragmentos estructurales se indican a continuación:

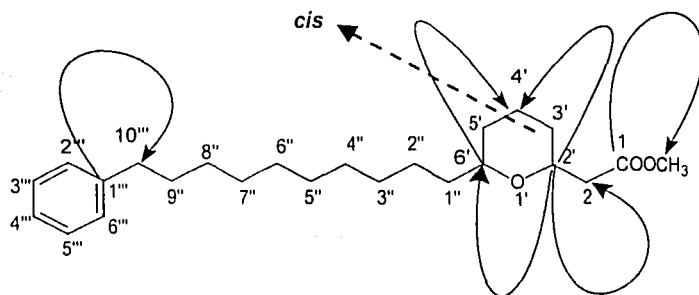
- i. El anillo aromático monosustituido se evidenció al igual que el compuesto **27** por la presencia de un sistema AB_2C_2 en el espectro de RMN- 1H (**Cuadro 16**) y por la presencia de un fragmento con relación m/z de 91 uma en el espectro de masas. Como ya se indicó este pico es diagnóstico de alquil fenilos (Silverstein, 1997).
- ii. La función éster quedó plenamente identificada no solo a través de los espectros de RMN (δ_H/δ_C 3.6/51.5 y δ_C 172.0) sino también por la pérdida de un fragmento con una relación m/z de 59 uma en el espectro de masas.
- iii. La ausencia de señal alguna para una doble ligadura aunado a que los elementos antes descritos satisfacen cinco de las seis insaturaciones esperadas, indicaron que la insaturación restante debía corresponder a un anillo. Así, el fragmento con una m/z de 157 uma (pico base), en conjunto con la presencia de un sistema ABX en δ_H 2.36 (H-2a), 2.51 (H-2b), 3.7 (H-2') y un grupo metino base de oxígeno (δ_H/δ_C 3.2 / 78.0) en los espectros de RMN permiten proponer la existencia del fragmento estructural que se indica como estructura parcial A, la cual incluye un anillo pirano, satisfaciendo de esta forma el número de insaturaciones requeridas por la fórmula molecular.



Estructura parcial A

- iv. La ausencia de metilo terminal en la molécula, permite inferir que el fragmento A esta localizado al final de la cadena alquílica. La presencia de esta cadena se encuentra indicada por las absorciones observadas en δ_H/δ_C 1.0-1.8/23.4-31.5 y 2.6/36.
- v. El análisis detallado del espectro HMBC (**Espectro 15**) permitió establecer los cuadros de conectividad indicados en la **Figura 16**, los cuales son consistentes con la presencia de un anillo pirano pues se observan las correlaciones C-2' (δ_C 74.49) / δ_H 3.2 (H-6'), 2.36 (H-2a), 2.51 (H-2b), 1.0-1.8 (H-4' y H-3'); C-6' (δ_C 78.0) / δ_H 1.0-1.8 (H-5', H-4' y H-3'); C-1 (δ_C 172) / δ_H OCH₃ (3.6) y C-1''' (δ_C 142) / δ_H H-10'' (2.6). Por último, el análisis del espectro NOESY (**Espectros 16 y 17**) permitió establecer una conformación *cis* de los protones H-2' y H-6' del anillo pirano.

Figura 16. Correlaciones más relevantes del espectro HMBC del compuesto metil[6-(10-fenildecail)tetrahidro-piran-2-il]acetato (28).



De acuerdo con las evidencias presentadas, el nuevo producto natural se identificó como el metil[6-(10-fenildecail)tetrahidro-piran-2-il]acetato (**28**). El patrón de fragmentación observado en el espectro de masas es congruente con la propuesta presentada pues el fragmento en m/z 157 una constituye el pico base y se genera a través de una ruptura en la posición C-6', α al oxígeno ; además, el fragmento con relación m/z 91 una constituye un pico abundante pues es generado mediante una ruptura bencílica con la posterior formación del grupo tropilio y una pérdida de 283 unidades de masa a partir del ion molecular (Silverstein, 1997).

En la Figura 17 se muestra el patrón de fragmentación del compuesto 28. Los espectros de RMN y masas, se encuentran en el apéndice.

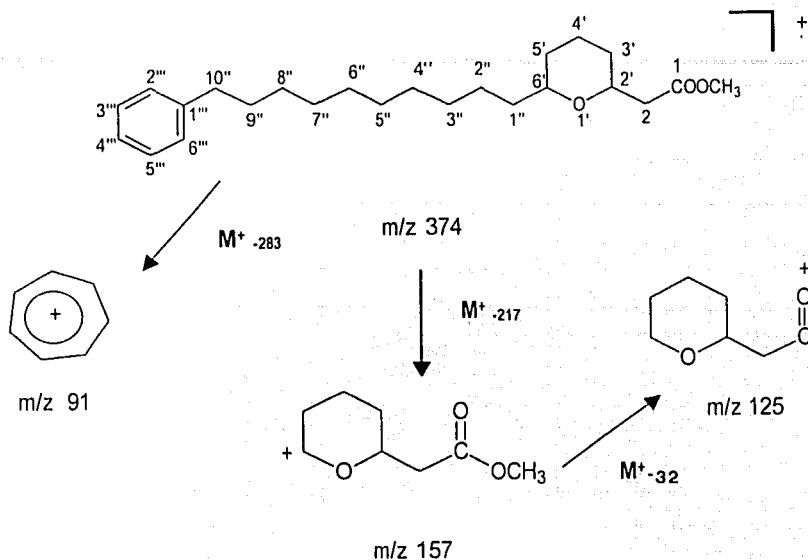


Figura 17. Patrón de fragmentación del compuesto metil[6-(10-fenildecail)tetrahidro-piran-2-il]acetato (28).

4.2.4 Caracterización de los compuestos 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-3-tetradeceno (29) y 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-3-hexadeceno (30).

Los productos naturales 29 y 30 se obtuvieron como aceites incoloros. Su fórmula molecular se estableció por espectrometría de masas como $C_{21}H_{30}O_3$ y $C_{23}H_{34}O_3$. Así, los iones moleculares de los compuestos difieren entre sí por 28 uma. Cada una de las fórmulas mínimas establecidas permite un índice de deficiencia de hidrógenos de siete.

Los espectros en el IR, presentan bandas de absorción asociadas con la presencia de una cadena alifática (~ 2913 , 1474 , 1442 y 714 cm^{-1}), aromaticidad (~ 1489 , 1491 , 914 y 798 cm^{-1}) y de un grupo carbonilo de cetona (~ 1645 cm^{-1}). El espectro en el UV contiene bandas de absorción congruentes con una sustancia aromática ($\lambda \sim 220$ y 285 nm) [Silverstein, 1997].

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos **29** y **30** se resumen en el Cuadro 17.

Cuadro 17. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-3-tetradeceno (29) y 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-3-hexadeceno (30).

Fórmula molecular	$C_{21}H_{30}O_3$ y $C_{23}H_{34}O_3$
Peso molecular	330 y 358
IR ν_{\max} (película) cm^{-1}	~2913, 1474, 1442, 1645, 1491, 1489, 1453, 1359, 1251, 1167, 978, 914 y 798.
EMIE m/z (Int. Rel.) (metabolito 29) [Espectro 18]	330(91), 272(2.0), 189(1.8), 136(53), 135[M ⁺ (100)], 105(3.3), 97(17.1) y 77(12.0).
EMIE m/z (Int. Rel.) (metabolito 30) [Espectro 19]	358(89), 343(1.8), 288(1.8), 175(1.2), 136(22), 135[M ⁺ (100)], 96(8.1) y 77(3.0).
RMN - 1H (metabolitos 29 y 30) [Figuras 18 y 19]	~ δ_H 6.61 (ddt, $J = 8.1, 1.8, 0.6$ Hz, H-6'), 6.67 (dd, $J = 1.8, 0.3$ Hz, H-2'), 6.72 (da, $J = 8.1$ Hz, H-5'), ~ δ_H 6.82 (dt, $J = 15.6, 6.9$ Hz, H4), 6.0 (dt, $J = 15.6, 1.8$ Hz, H-3), ~ δ_H 2.6 (ta, $J = 7.5$ Hz), δ_H 7.1-7.3 (H-2', H-6' y H-13 ó H-15, respectivamente), ~ δ_H 2.2 (s, H-1), δ_H 1.47 (q, $J = 7.2$ Hz, H-6), ~ δ_H 1.6-1.2 (H-7 — H-11 y H-13 — H-15).

Los espectros de RMN de los productos **29** y **30** fueron similares a los de los metabolitos **22**, **23** y **25-27**. Al igual que los productos **22**, **23**, **25** y **26** los espectros de los productos indicaron la presencia de un anillo aromático trisustituido por un grupo metilendioxi y una cadena alquílica lineal. Por otro lado, al igual que el producto **27** estos compuestos presentaron una metil cetona conjugada. Las características más relevantes de los espectros de RMN se resumen a continuación:

1. Las señales en $\sim\delta_H$ 6.61 (ddt, $J = 8.1, 1.8, 0.6$ Hz, H-6'), 6.67 (dd, $J = 1.8, 0.3$ Hz, H-2') y 6.72 (da, $J = 8.1$ Hz, H-5') conforman un sistema ABC característico de un anillo aromático trisustituido. Todas las señales del sistema ABC correlacionan entre sí en el espectro COSY (Espectros 20 y 21).
2. En el $\sim\delta_H$ 6.82 (dt, $J = 15.6, 6.9$ Hz, H4) y 6.0 (dt, $J = 15.6, 1.8$ Hz, H-3) se aprecian dos señales asignables a una doble ligadura *trans* disustituida y conjugada. Las señales antes mencionadas correlacionan entre sí en el espectro COSY.
3. La señal de $\sim\delta_H$ 2.6 (ta, $J = 7.5$ Hz) es asignable a los protones del metileno bencílico que correlaciona en el espectro COSY con las señales en el intervalo δ_H 7.1-7.3 (H-2', H-6' y H-13 ó H-15 respectivamente).
4. En $\sim\delta_H$ 2.2 se aprecia la señal del grupo metilo de una metil cetona.
5. En $\sim\delta_H$ 2.2 se observa una señal para dos protones asignables a los protones vecinales de la doble ligadura. Estos protones correlacionan en el espectro COSY con las señales en δ_H 1.47 (H-6), 6.8 (H-4) y 6.0 (H-3).
6. En δ_H 1.47 (q, $J = 7.2$ Hz, H-6), se aprecian las señales de otro grupo metileno, su correlación se observa en el espectro COSY en la absorción $\sim\delta_H$ 2.2 (H-5) y 1.6 (H-7).
7. En el rango $\sim\delta_H$ 1.6-1.2 se observan las señales típicas de los metilenos restantes de la cadena alquímica (H-7 — H-12, H-13 y H-7 — H-12, H-13 — H-15, respectivamente).

El patrón de fragmentación observados en los espectros de masas resulto idéntico al del producto 25. Con base en las evidencias descritas, los nuevos productos naturales se identificaron como: 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-3-tetradeceno (29) y 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-3-hexadeceno (30).

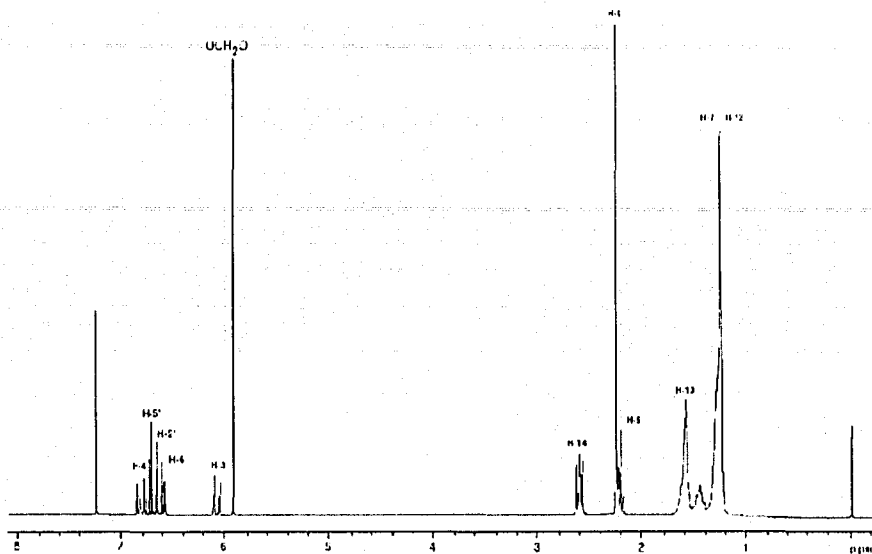


Figura 18. Espectro de RMN-¹H del compuesto 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxyfenil)-3-tetradeceno (29)

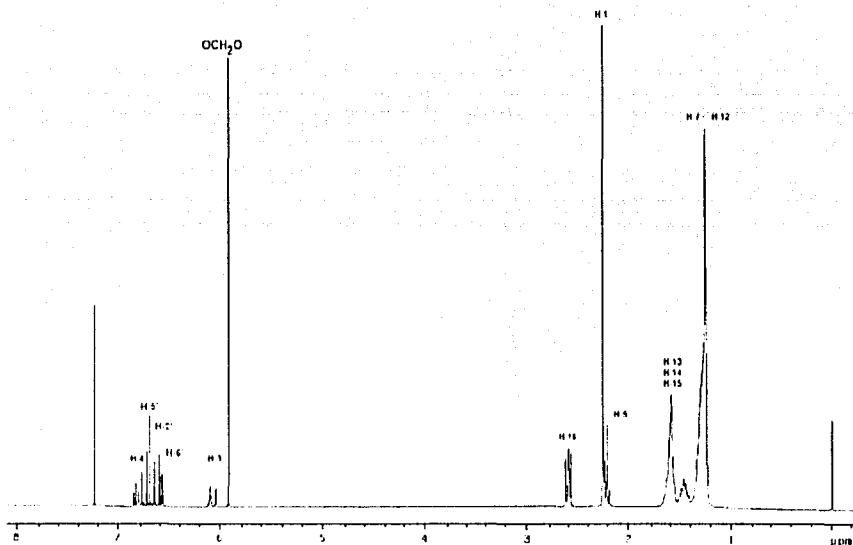


Figura 19. Espectro de RMN-¹H del compuesto 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxyfenil)-3-hexadeceno (30).

4.3 Actividad antimicobacteriana de los nuevos productos naturales aislados de las hojas de *P. sanctum*.

El potencial antifímico de los productos **22**, **23**, **25** y **26** se determinó mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* empleando el método fluorimétrico de azul de alamar descrito previamente por Franzblau y colaboradores (Collins y Franzblau, 1997).

Los resultados se expresan en términos de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del crecimiento de *M. tuberculosis* y se muestran en el Cuadro 18. El criterio para determinar la actividad considera como un compuesto activo a aquel que presente una CMI ≤ 128 $\mu\text{g}/\text{ML}$ (Cantrell *et al.*, 1998). Como se desprende de los resultados indicados en el Cuadro 18, los productos **22**, **23**, **25** y **26** presentan una actividad antifímica significativa.

Cuadro 18. Actividad antimicobacteriana de los compuestos aislados de las hojas de *P. sanctum*.

Compuesto	Actividad antimicobacteriana ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Rifampina*	3.0×10^{-7}
2-oxo-12-(3',4'-metilendioxfenil)-dodecano (22)	2.0×10^{-5}
2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-tetradecano (23)	1.8×10^{-5}
2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (25)	1.7×10^{-5}
2-oxo-18-(3',4'-metilendioxfenil)-octadecano (26)	1.5×10^{-5}

* Control positivo

Considerando que los productos aislados son novedosos no existe ningún reporte relacionado con su actividad antimicobacteriana, de tal manera que los resultados biológicos descritos en este trabajo son inéditos. Los productos **24**, **27-30** se encuentran en proceso de evaluación biológica en el Instituto de Investigaciones sobre Tuberculosis de la Universidad de Illinois, en Chicago.

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. Los resultados de la presente investigación corroboran que la preselección de especies vegetales de acuerdo con el criterio etnomédico garantiza la obtención de productos bioactivos.
2. El estudio biodirigido del extracto activo de las hojas de *P. sanctum* condujo al aislamiento de ocho metabolitos secundarios novedosos identificados como 2-oxo-12-(3',4'-metilendioxfenil)-dodecano (**22**), 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-tetradecano (**23**), 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (**25**), el 2-oxo-18-(3',4'-metilendioxfenil)-octadecano (**26**), 2-oxo-16-fenil-3-hexadeceno (**27**), metil[6-(10-fenildecil)tetrahydro-piran-2-il]acetato (**28**), 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-3-tetradeceno (**29**) y 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-3-hexadeceno (**30**).
3. Los resultados biológicos indicaron que los compuestos **22**, **23**, **25** y **26** aislados inhibieron de manera notable el crecimiento de *M. tuberculosis*. Los productos presentaron una CMI de $\sim 1.7 \times 10^{-5}$ $\mu\text{g/mL}$ por lo que constituyen candidatos adecuados para el desarrollo de fármacos antifímicos de origen vegetal.
4. Este estudio químico constituye el primero que se realiza sobre las hojas de *P. sanctum*. Los resultados indican que el perfil metabólico de las partes vegetales es distinto.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Acevedo, L., Martínez, E., Castañeda, P., Franzblau, S., Timmermann, B., Linares, E., Bye, R., Mata, R. (2000) New phenylethanoids from *Buddleja cordata* subs. *Planta medica* **66**, 259-261.
- ✓ 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.
- ✓ Atal, C., Moza, P. (1968) The structure of peepuloidin, an alkaloid from *Piper peepuloides*. *Tetrahedron Letters* **11**, 1397-1968.
- ✓ Barry, R. (1994) Tuberculosis. Pathogenesis, protection and control. ASM Press, Washington, D.C. Capítulo 20-23.
- ✓ Bevan, J. (1982) Fundamentos de Farmacología. Introducción a los principios de acción de los fármacos. 2ª. Edición. Harla, México, pp 585-586.
- ✓ Breitmaier, E. (1989) Structure elucidation by NMR in Organic Chemistry. A Practical Guide. John Willey and Sons, pp.237-241.
- ✓ Cantrell, C., Fischer, N., Urbatsch, L., McGuire, M. y Franzblau, S. (1998) Antimycobacterial crude plant extracts from South, Central and North America. *Phytomedicine* **5(2)**, 137-145.
- ✓ Collins and Kaufmann. (2002) Immunology of infectious diseases. ASM Press, Washington, D.C. pp-210-230.
- ✓ Collins, L. y Franzblau, S. (1997) Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 system for high throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 1004-1009.
- ✓ Desai, S., Prabhu, B., Mulchandani, N. (1988) Aristolactams and 4,5-Dioxoaporphines from *Piper longum*. *Phytochemistry* **27**, 1511-1515.
- ✓ Dutta, C. y Lala, P. (1972) Piperaceae. Constituents of *Piper methysticum*. *Phytochemistry* **11**, 2891-2892.

- ✓ Estrada, L. (1987) Jardín Botánico de Plantas Medicinales Maximino Martínez. Universidad Autónoma de Chapingo., Chapingo. Fondo de Cultura Económica.
- ✓ Fabricant, D. S. y Fransworth, N. R. (2001) The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives* **109**, 69-74.
- ✓ Goodman, G., Hardman, J., Limbird, L., Molinoff, P., Ruddon, R. (1996) Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª edición. McGraw-Hill Interamericana, México D.F., Volumen II Capítulo 43 y 48.
- ✓ Goth, C. (1990) Farmacología clínica. 12ª edición. Médica Panamericana, México D.F., Capítulo 53.
- ✓ Häensel, R. y Leuschke, A. (1976) Ein aporphinalkaloid aus *Piper sanctum*. *Phytochemistry* **15**,1323.
- ✓ Häensel, R. y Pelter, A. (1971) Cinnamylidenbutenolide aus *Piper sanctum*. *Phytochemistry* **10**,1627-1634.
- ✓ Häensel, R. y Schulz, J. (1978) Notiz zur absolutkonfiguration des Epoxipiperolids. *Zeitschrift fur Naturforschung* **33-b**,688-689.
- ✓ Häensel, R. y Schulz, J. (1979) Z, E- Isomerie des Piperolides. *Zeitschrift fur Naturforschung* **34-b**,1576.
- ✓ Häensel, R. y Schulz, J. (1982) Ein neues kawainolderivatans *Piper sanctum*. *Archives Pharmaceutical* **315**, 147.
- ✓ Häensel, R., Beer, C. y Schulz, J. (1973) Ein neues kawapyron aus *Piper sanctum*. *Chemische Berichte* **106**, 3116.
- ✓ Häensel, R., Leuschke, A. y Gomez-Pompa, A. (1975) Aporphine Type Alkaloids from *Piper sanctum*. *Journal of Natural Products* **38** (6), 529.
- ✓ Häensel, R., Pelter, A., Schulz, J., Hille, C. (1976) Ein 5-acetoxy-6-metoxkawain aus *Piper sanctum* und synthese beider Diastereomeren. *Chemisch Berichte* **109**,1617-1624.
- ✓ Instituto Indigenista de México. (1994) Flora Medicinal Indigenista de México II y III, México, pp 643,1040,1187,1527.

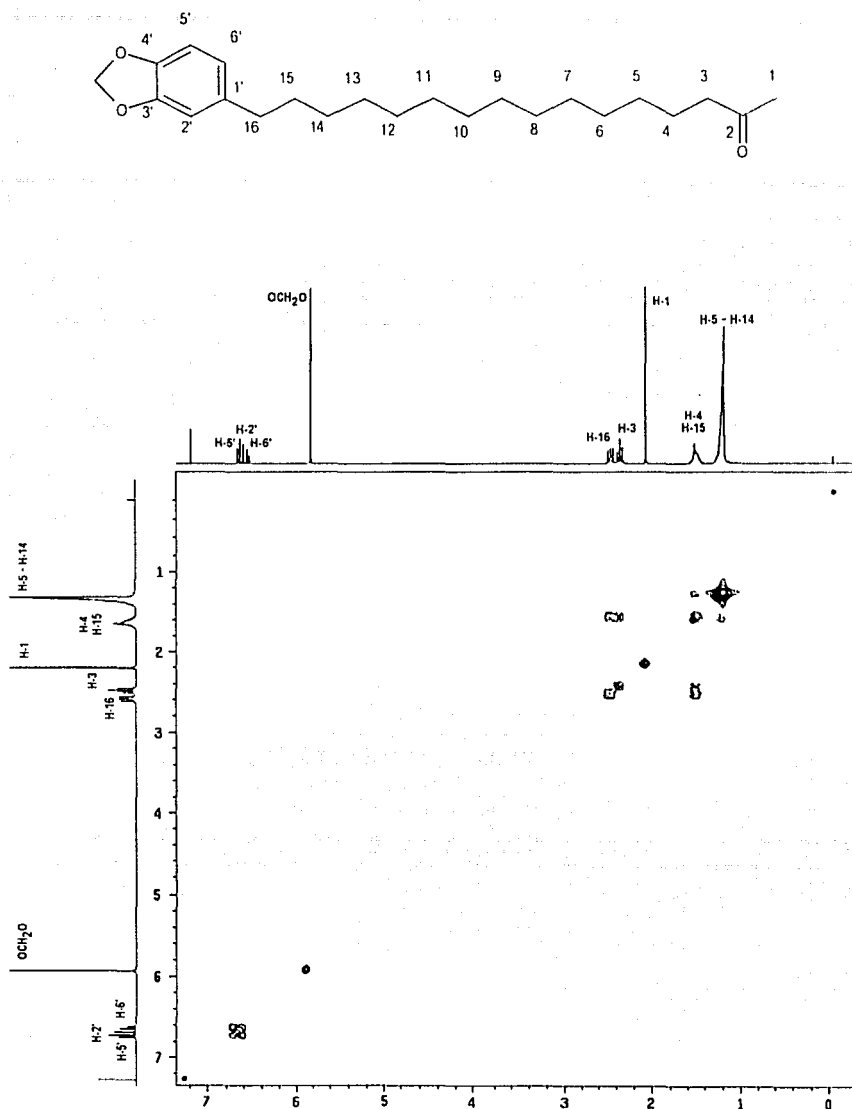
- ✓ Jawetz, Melnick y Adelberg (1996) Microbiología médica. El Manual Moderno, México D.F., Capítulo 24.
- ✓ Joseph-Nathan, P. y Diaz, E. (1980) Introducción a la resonancia magnética y nuclear. 1ª Edición. Limusa, México D.F., Capítulo 1 y 3.
- ✓ Katzung, G. (1987) Farmacología básica y clínica. 3ª edición. El Manual Moderno, México D.F., Capítulo 45.
- ✓ Koul, K. y Taneja, C. (1988) Minor amides of *Piper* species. *Phytochemistry* 27, 3525-3527.
- ✓ Levinson, W. y Jawetz, E. (1992) Microbiología e inmunología médicas. El Manual Moderno, México D.F., Capítulo 21.
- ✓ Litter, M. (1992) Compendio de Farmacología. 4ª edición. El Aleneo, México D.F., Capítulo 49.
- ✓ 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, E. (1999) Estudio químico de *Buddleja cordata* H.B.K (Loganiaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ✓ Martínez, M. (1979) Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Ed. Fondo de Cultura Económica. México, pp 446.
- ✓ Martins, P. y Salgueiro, L. (1998) Essential oils from four *Piper* species. *Phytochemistry* 49, 2019-2023.
- ✓ Mata, R., Martínez, E., Bye, R., Morales, G., Singh, M., Janso, J., Maiese, W., Timmermann, B. (2001) Biological and mechanistic activities of xanthorrhizol and 4-(1',5'-dimethylhex-4'-enyl)-2-methylphenol isolated from *Iostephane heterophylla* 64, 911-914.
- ✓ Miller, J. And Gerau, R. (2000). Therapeutic potencial and plant derived compounds: realizing the potential. En biologically active natural products: pharmaceutics (S.J. Cutter and H.G.Cutter, Eds). CRC Press; Nueva York., pp 25-38.

- ✓ Organización Mundial de la Salud / Organización Panamericana de la Salud. (2002) Detener la TB, combatir la pobreza . Vol. 5 pp 1.
- ✓ Parmar, S.y Subas, C. (1998) Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. *Phytochemistry* 49, 1069-1078.
- ✓ Parmar, V., Jain, S., Bisht, K., Jain, R., Tahesa, P., Jha, A. (1997) Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* 46, 597-673.
- ✓ Pelter, A. y Hänsel, R. (1972) Epoxipiperolid aus *Piper sanctum*. *Zeitschrift fur Naturforschung* 27-b,1186-1190.
- ✓ Pereda, R., Bernard, C., Durst, T., Arnason, T., Sánchez, T., 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.
- ✓ Pérez, O. (2003) Compuestos biodinámicos de *Fluorensia cernua* (Asteraceae) y de los tallos de *Piper sanctum* (Piperaceae). Tesis de Maestría. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ✓ Pizzolatti, G. y Luciano, C. (2000) Styryl- and dihydrostyryl-2-pyrone derivatives from *Polygala sabulosa*. *Phytochemistry* 55, 819-822.
- ✓ Ranjith, H. y Dharmaratne, W. (2002) Kavalactones from *Piper methysticum*, and their ¹³C NMR spectroscopic analyses. *Phytochemistry* 59, 429-433.
- ✓ Santiago, E. (2001) Aspectos prácticos en el diagnóstico y manejo del paciente con sospecha o confirmación de tuberculosis. *Infection* 5(4), 266-277.
- ✓ Shrader, S. (1974) Introductory Mass Spectrometry. Edit. Allyn and Bacon. Inc., 2a edition., Boston, USA, pp 246.
- ✓ Shulgin, A. (1973) Chemistry and pharmacology of de *Piper methysticum* and related species. *Bulletin Narcotics* 25, 59.
- ✓ Sifuentes, J. y Ponce, A. (1995) Resistencia de *Mycobacterium* en pacientes mexicanos. *Revista de Investigación Clínica* 47, 273-281.
- ✓ Silverstein, R. M. (1997) Spectrometric identification of organic compounds., 5a. edition., John Wiley Sons, Inc.

- ✓ Smith, M. and Cedric, M. (1992) Textbook of Pharmacology. W. B. Saunders Company, pp 861-870.
- ✓ Smith, R. (1979) Pipermethystine, a novel pyridone alkaloid from *Piper methysticum*. *Tetrahedron Letters* **35**, 437-439.
- ✓ Smith, R. M. (1983) Kava Lactones in *Piper methysticum* from Fiji. *Phytochemistry* **22**, 1055-1056.
- ✓ Stefan, H. (2002) Immunology of infectious diseases. ASM Press, Washington, D.C. pp 208-211.
- ✓ Suffness, M., Cragg, G., Grever, M., Grifo, F., Johnson, G., Mead, J., Schepartz, S., Venditti, J., Wolpert, M. (1995) The National Cooperative Natural Products Drugs Discovery Group (NCPDDG) and International Cooperative Biodiversity Group (ICBG) Programs. *International Journal of Pharmacognosy* **33**, 175-184.
- ✓ Timmermann, B., Wächter, G., Valcic, S., Hutchinson, B., Casler, C., Henzel, J., Ram, S., Currim, F., Manak, R., Franzblau, S., Maiese, W., Galinis, D., Suarez, E., Fortunato, R., Saavedra, E., Bye, R., Mata, R., Montenegro. (1999) The Latin American: ICBG: The First Five Years. *Pharmaceutical Biology* **37**, suppl. 35-54.
- ✓ Torres, S. (2001) Compuestos aromáticos simples de *Piper sanctum* (Piperaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ✓ Vasques da Silva, R., Deboni, H. (2002) Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* **59**, 521-527.
- ✓ White, J., McVaugh R. (1998) The torner collection of Sessé & Mociño. Biological illustrations. Carnegie Mellon CD Press.
- ✓ Zinsser, J. Wolfgang, K., Joklik, D. (1998) Microbiología. 20ª edición. Médica Panamericana, México D.F., Capítulo 31.
- ✓ Zolla, C. (1994) La Flora Medicinal Indígena de México. Instituto Nacional Indigenista, México. I y II.

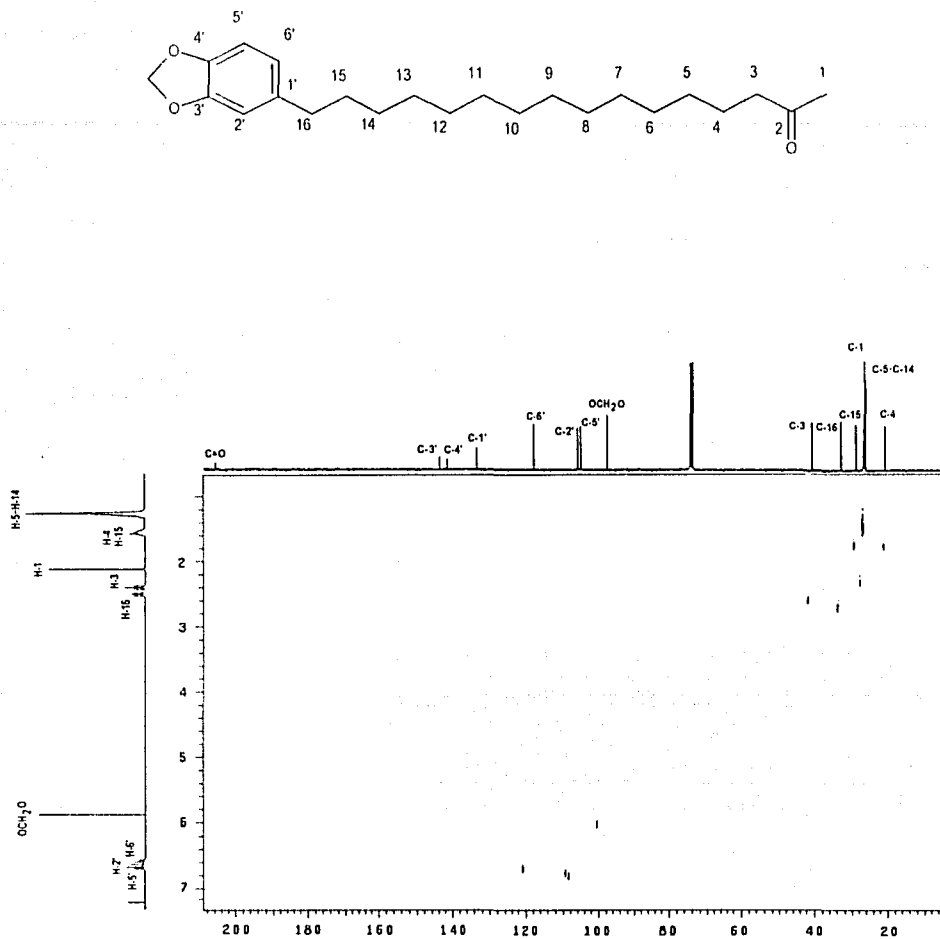
A P É N D I C E
D E
E S P E C T R O S

TESIS CON
FALLA EN EL EXAMEN

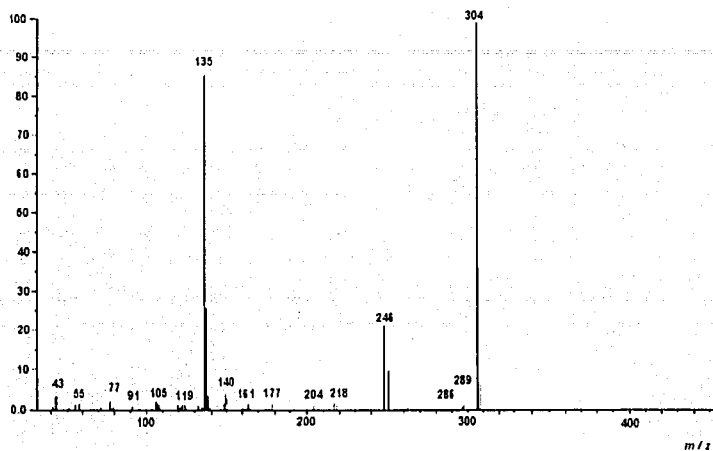
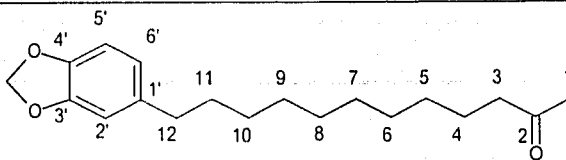


Espectro 1. Espectro de RMN modalidad COSY del 2-oxo-16(3',4'metilendioxfenil)-hexadecano (25).

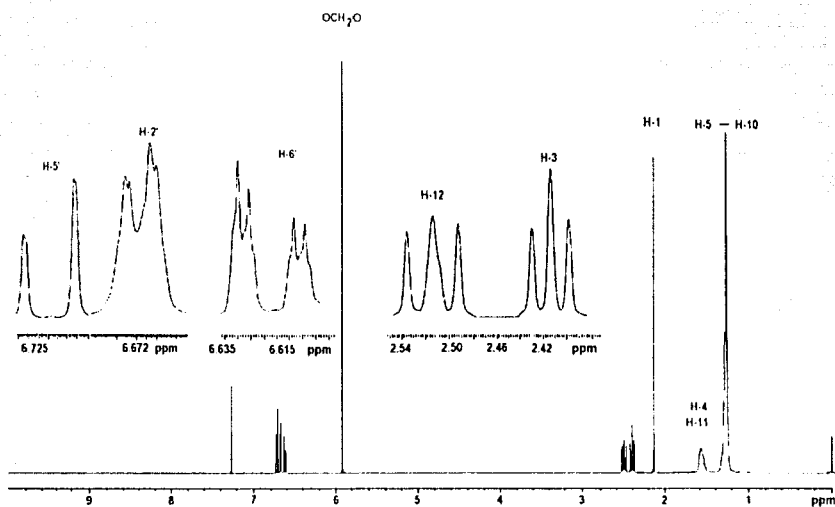
TESIS COM
FALLA EN



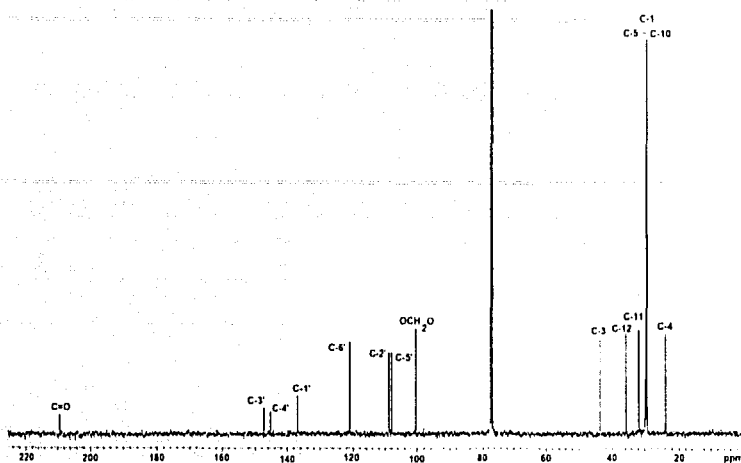
Espectro 2. Espectro de RMN modalidad HETCOR del 2-oxo-16(3',4'-metilendioxyfenil)-hexadecano (25).



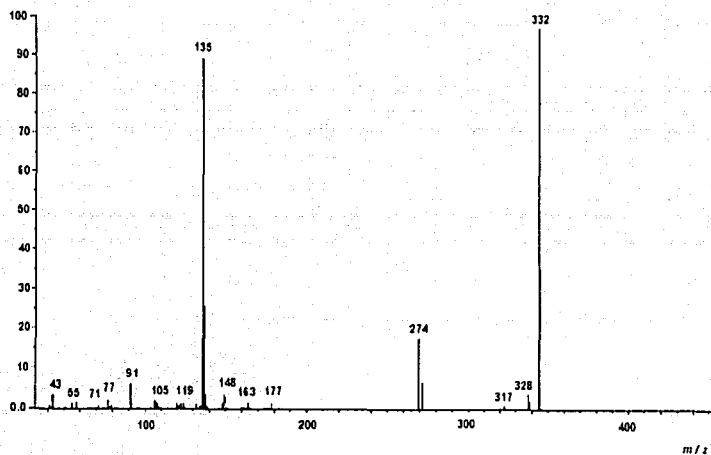
Espectro 3. Espectro de masas modalidad IE del compuesto 2-oxo-12-(3',4'-metilendioxiifenil)-dodecano (22).



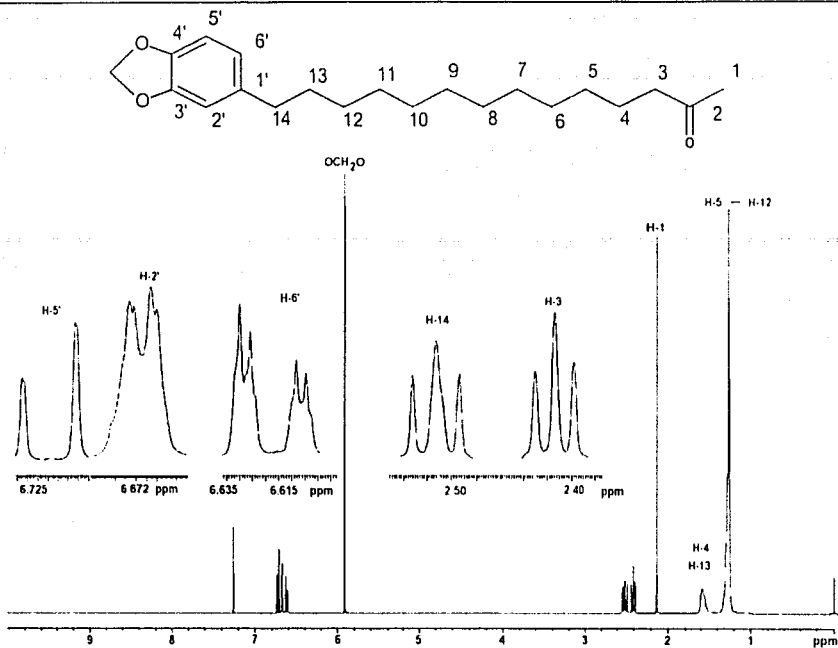
Espectro 4. Espectro de RMN-¹H del 2-oxo-12(3',4'-metilendioxiifenil)-dodecano (22).



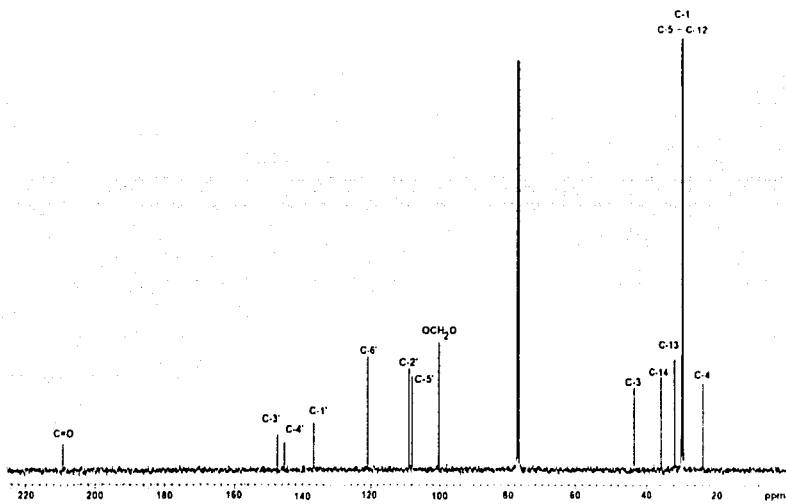
Espectro 5. Espectro de RMN-¹³C del 2-oxo-12(3',4'metilendioxiifenil)-dodecano (22).



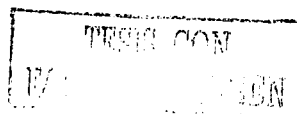
Espectro 6. Espectro de masas modalidad IE del compuesto 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxiifenil)-tetradecano (23).

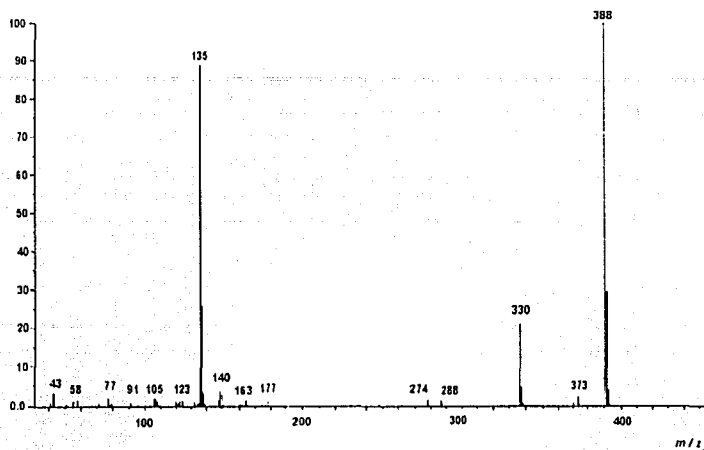
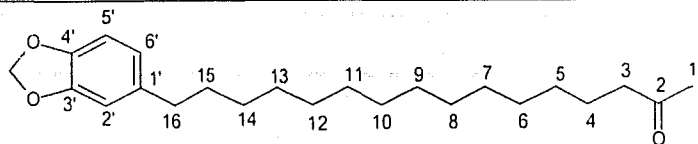


Espectro 7. Espectro RMN-¹H del compuesto 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-tetradecano (23).

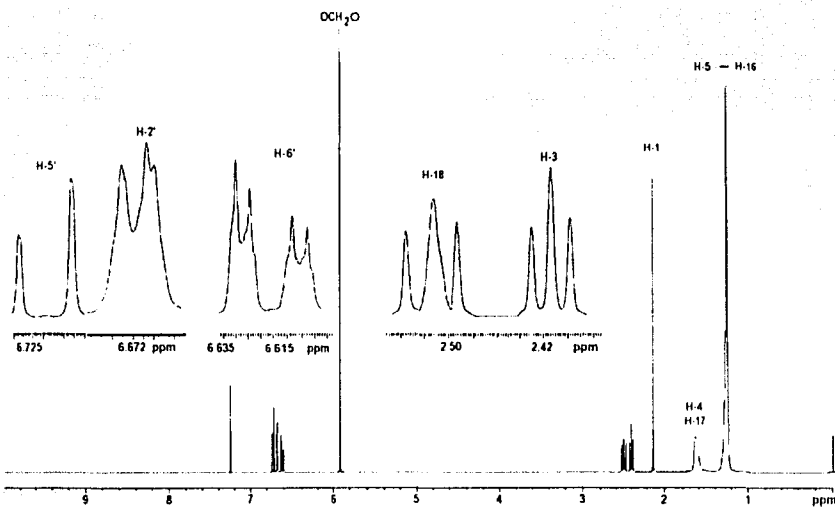


Espectro 8. Espectro RMN-¹³C del compuesto 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-tetradecano (23).

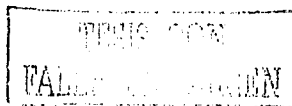


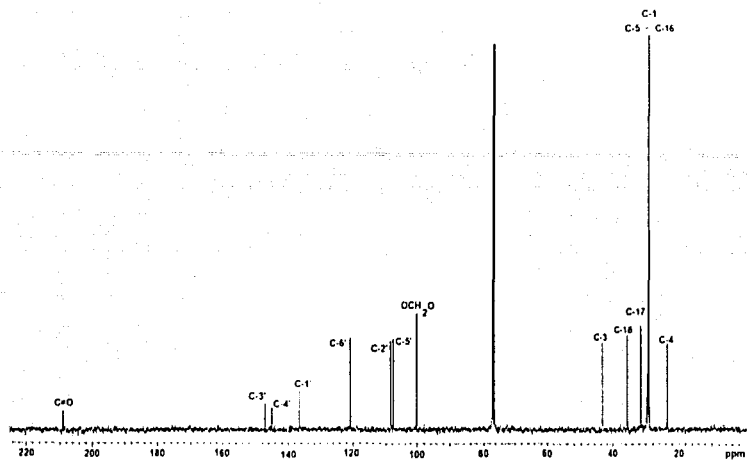


Espectro 9. Espectro de masas modalidad IE del compuesto 2-oxo-18-(3',4'-metilendioxiifenil)-octadecano (26).

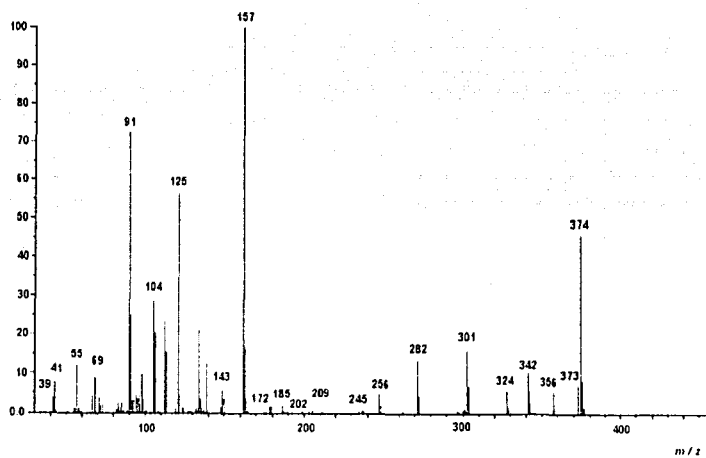


Espectro 10. Espectro RMN-¹H del compuesto 2-oxo-18-(3',4'-metilendioxiifenil)-octadecano (26).

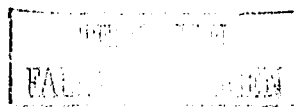


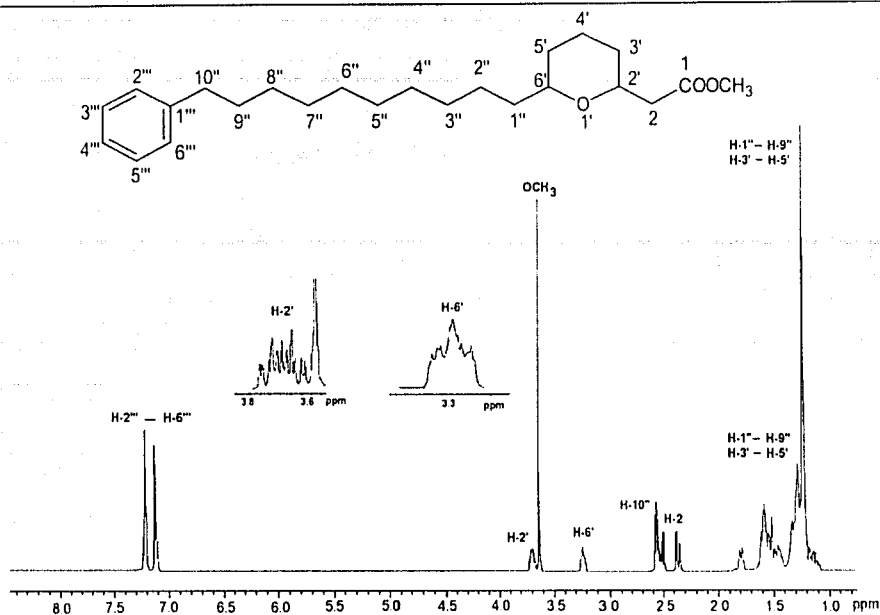


Espectro 11. Espectro RMN-¹³C del compuesto 2-oxo-18-(3',4'-metilendioxifenil)-octadecano (26).

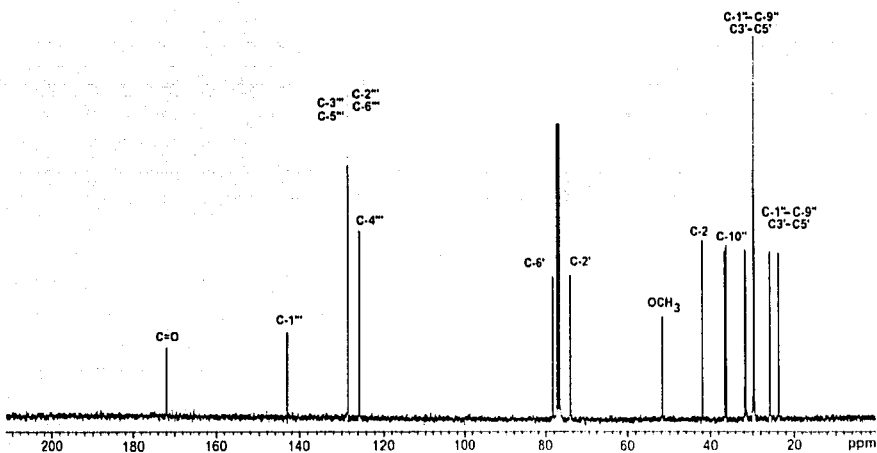


Espectro 12. Espectro de masas modalidad IE del compuesto metil[6-(10-fenildeca)l]tetrahydro-piran-2-yl]acetato (28).



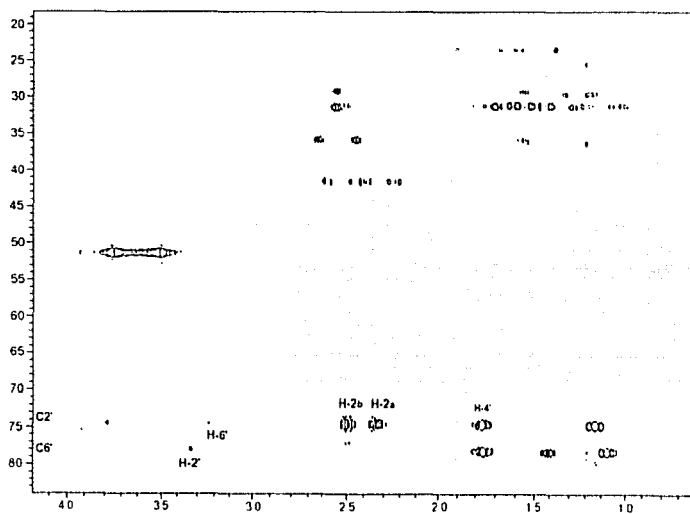
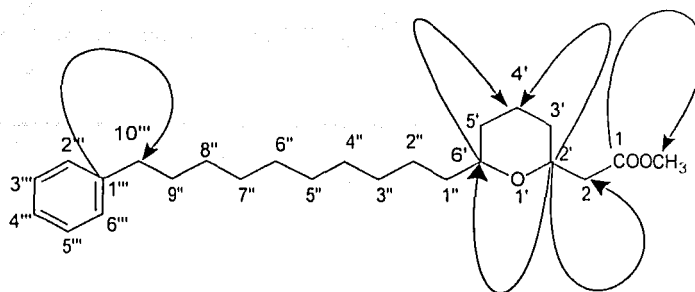


Espectro 13. Espectro de RMN-¹H del compuesto metil[6-(10-fenildeca)]tetrahidropiran-2-il]acetato (28).

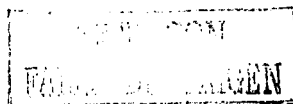


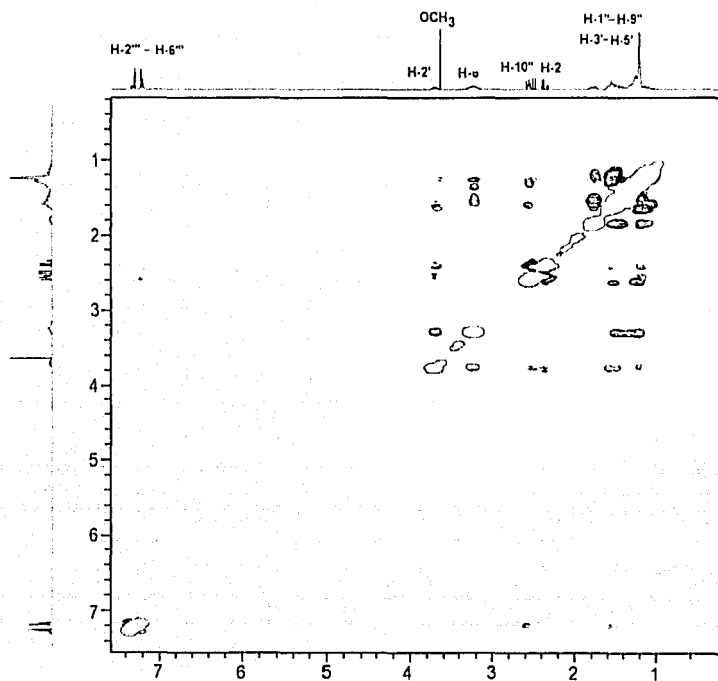
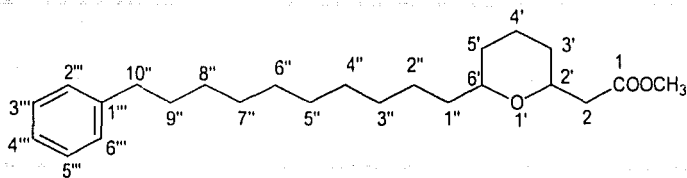
Espectro 14. Espectro de RMN-¹³C del compuesto metil[6-(10-fenildeca)]tetrahidropiran-2-il]acetato (28).



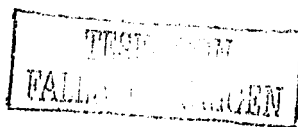


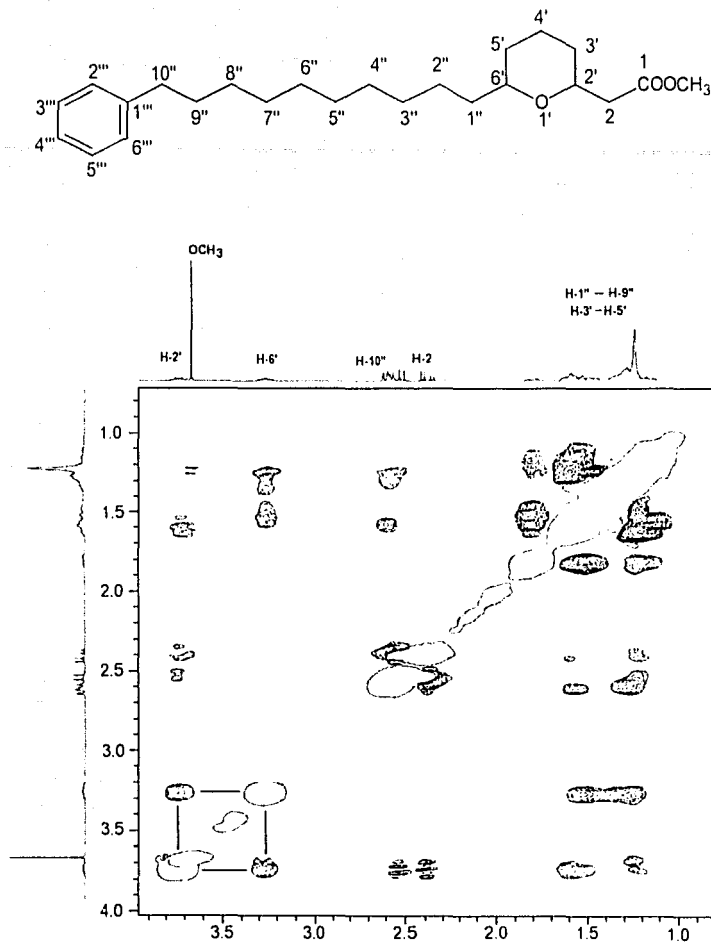
Espectro 15. Correlaciones más relevantes en el espectro HMBC del compuesto metil[6-(10-fenildeca-1-yl)tetrahidro-piran-2-il]acetato (28).



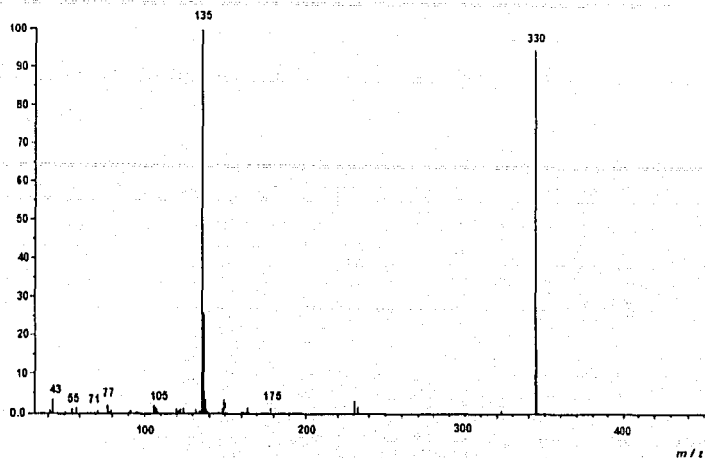


Espectro 16. Espectro de RMN modalidad NOESY del compuesto metil[6-(10-fenildeca-1-yl)tetrahidro-piran-2-il]acetato (28).

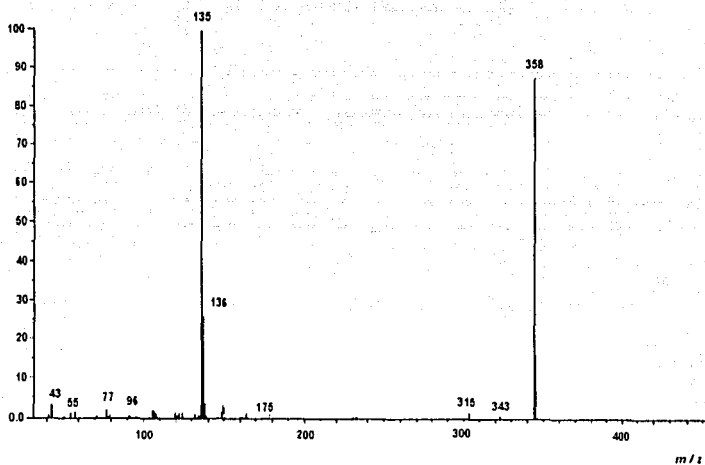




Espectro 17. Expansión del espectro de RMN modalidad NOESY del compuesto metil[6-(10-fenildeca)]tetrahidro-piran-2-il]acetato (28).

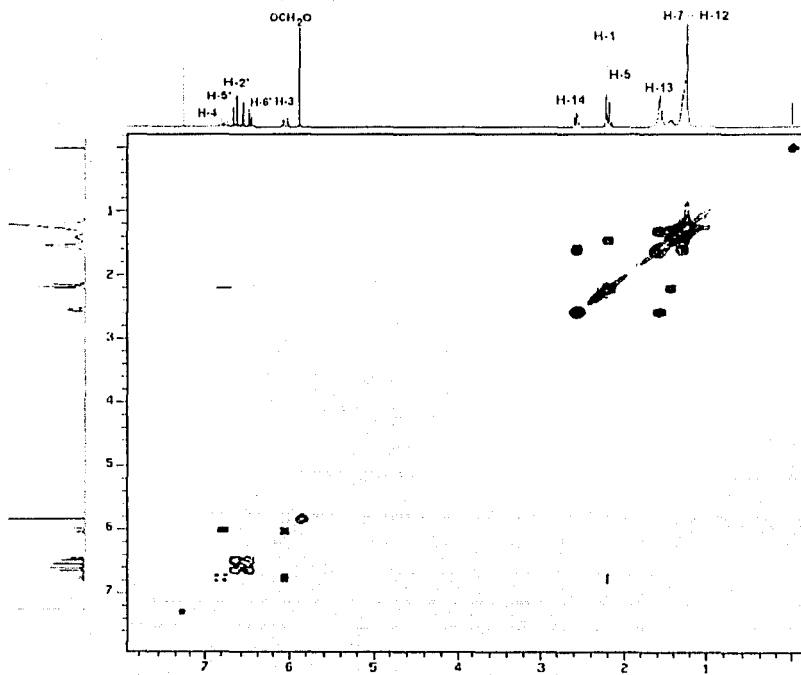
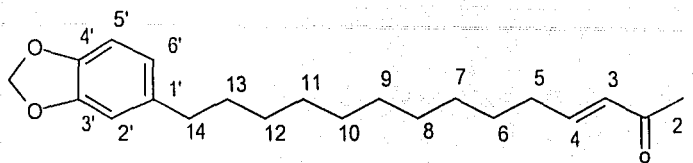


Espectro 18. Espectro de masas modalidad IE del compuesto 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil)-3-tetradeceno (29).

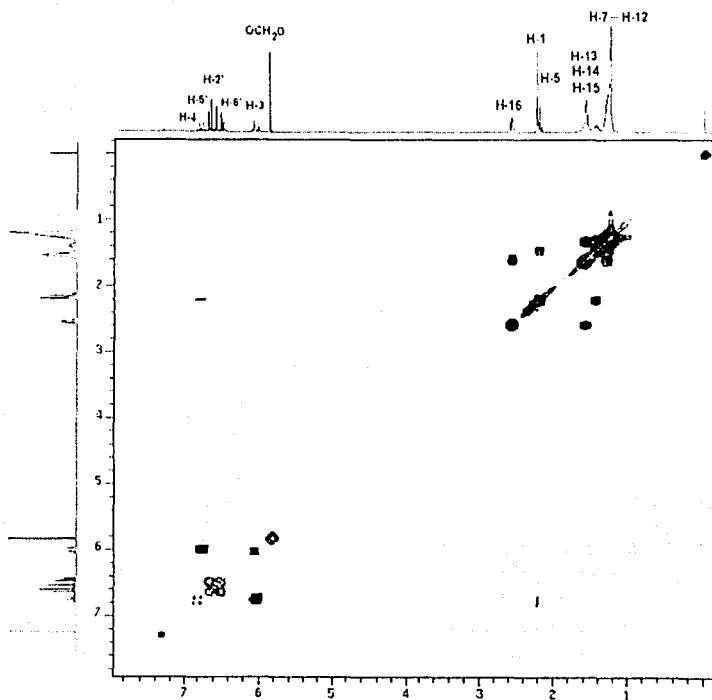
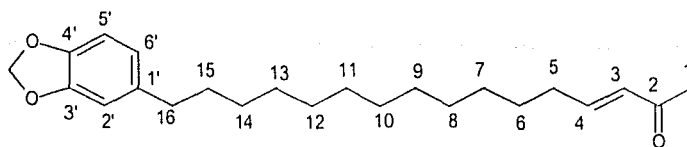


Espectro 19. Espectro de masas modalidad IE del compuesto 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-3-hexadeceno (30).

FALLA DE ORIGEN



Espectro 20. Espectro de RMN modalidad COSY del compuesto 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxyfenil)-3-tetradeceno (29).



TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Espectro 21. Espectro de RMN modalidad COSY del compuesto 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxyfenil)-3--hexadeceno (30).