



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Aislamiento y caracterización del
2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo
de hojas de *Piper sanctum* (Miq.) Schl.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A :
ISOLDA ENRÍQUEZ MENDOZA



MÉXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Vocal: Dra. Rachel Mata Essayag

Secretario: Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

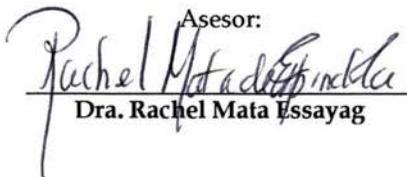
1er Suplente: M. en C. Blanca Estela Rivero Cruz

2do Suplente: M. en C. Isabel del Carmen Rivero Cruz

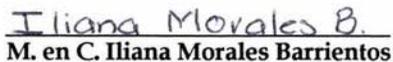
Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 124, Edificio E, Facultad de Química, UNAM

Asesor:


Dra. Rachel Mata Essayag

Supervisor Técnico:


M. en C. Iliana Morales Barrientos

Sustentante:


Enríquez Mendoza Isolda

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto CONACYT C01-018 por el apoyo económico para la realización del trabajo de investigación.

A los miembros del jurado por la revisión del presente trabajo y sus observaciones que mejoraron la versión final del mismo.

Al Dr. Robert Bye por proporcionar e identificar el material vegetal empleado en este estudio.

Al personal técnico de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, por el registro de los espectros, en particular a la QFB Marisela Gutiérrez, a la Q Georgina Duarte Lisci y a la QFB Rosa Isela del Villar.

A la Dra. Rachel Mata Essayag por su dirección y por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

A la M. en C. Iliana Morales Barrientos por su supervisión técnica y paciencia durante la realización de este trabajo.

A la M. en C. Isabel Rivero Cruz por la ayuda brindada para la realización de los ensayos conducentes a determinar la actividad antimicrobiana de los aceites analizados en el presente estudio.

A todos los compañeros del laboratorio 124 por la compañía y experiencias de estos meses.

DEDICATORIAS

A mis padres, por su apoyo y esfuerzo. A mi madre, por ser la razón de mi vida, por esa sensibilidad, sencillez e inocencia tan especiales. A mi padre, por enseñarme a perseguir la excelencia.

A mis hermanos, por siempre haber creído en mí. A Ramsés, por toda su dulzura. A Demian, por toda su pasión.

A mi tía Chabelita, por ser uno de los seres humanos más honestos e íntegros que hay.

A Sandy y Jessy, mis "niñas", por su amor y cariño.

A mis amigos por apoyarme siempre que lo necesito.

A Job, por ser un super amigo, por amar tanto la vida y por enseñarme que las cosas no son sólo blanco o negro. Gracias Juan.

A Miriam, Ana y Paque, por estar ahí desde hace tanto tiempo y no haber desistido, por todas las experiencias y momentos, por ayudarme a ser una mejor persona.

A Iliana, por ser más que una supervisora una amiga, te quiero amigas Amy.

ÍNDICE

	Página
Lista de Figuras	IV
Lista de Diagramas	VI
Lista de Cuadros	VI
Lista de Espectros	VIII
Lista de Abreviaturas	IX
I. ANTECEDENTES	
1.1 Aspectos generales del género <i>Piper</i> .	1
1.2 Antecedentes sobre la especie <i>Piper sanctum</i> .	8
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	14
III. PARTE EXPERIMENTAL	
3.1 Material vegetal	16
3.2 Procedimientos generales	
3.2.1 Análisis cromatográficos.	16
3.2.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.	17
3.3 Estudio químico de las hojas de <i>P. sanctum</i>	
3.3.1 Preparación del extracto orgánico	18
3.3.2 Fraccionamiento preliminar del extracto total de las hojas de <i>P. sanctum</i> .	19
3.3.3 Separación de los compuestos 2 - oxo - 16- (3', 4' - metilendioxfenil) hexadecano y 2 - [(6 - tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo de la fracción activa F4-3-IV.	21

3.3.4	Fraccionamiento secundario de la fracción F7.	22
3.3.5	Separación y purificación del compuesto 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofura-2il] acetato de metilo de la fracción secundaria F7-V.	23
3.3.6	Fraccionamiento secundario de la fracción F8.	24
3.4	Análisis de los aceites esenciales de <i>P. sanctum</i> .	
3.4.1	Preparación de los aceites esenciales de <i>P. sanctum</i> .	24
3.4.2	Determinación de los compuestos mayoritarios en los aceites esenciales de <i>P. sanctum</i> .	26
3.4.3	Aislamiento del safrol del aceite esencial de hojas de <i>P. sanctum</i> .	26
3.4.4	Determinación del perfil cromatográfico de los aceites esenciales de <i>P. sanctum</i> .	27
3.5	Ensayos biológicos	
3.5.1	Determinación de la actividad antimicobacteriana.	27
3.5.2	Determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de <i>P. sanctum</i> .	
3.5.2.1	Microorganismos de prueba	27
3.5.2.2	Conteo celular.	28
3.5.2.3	Determinación de la concentración crítica de los antibióticos.	29
A)	Preparación de las concentraciones de los antibióticos.	29
B)	Preparación de los inóculos.	30
C)	Preparación de las placas de agar.	30
D)	Bioensayo.	31

3.5.2.4	Determinación cualitativa de la actividad antibacteriana por método de difusión en agar utilizando discos de papel filtro.	31
3.5.2.5	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).	32
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		33
4.1	Caracterización del 2 - oxo - 16 - (3' , 4' - metilendioxfenil) - hexadecano de la fracción activa F4-3-IV.	33
4.2	Caracterización del 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).	35
4.3	Caracterización del 2- [(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo (32).	42
4.4	Composición de los aceites esenciales de las distintas partes de <i>Piper sanctum</i> .	49
4.5	Perfiles cromatográficos de los aceites esenciales.	51
4.6	Aislamiento del safrol (34).	54
4.7	Caracterización del safrol (34).	55
4.8	Actividad antimicobacteriana de los aceites, el safrol (34), y los compuestos naturales novedosos 2- [(5 - tetradecanil) tetrahidrofuran -2 - il] acetato de metilo (32) y el 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).	57
4.9	Actividad antibacteriana de los aceites.	58
V. RESUMEN Y CONCLUSIONES		59

VI. PERSPECTIVAS	60
VII. BIBLIOGRAFÍA	61
VIII. APÉNDICE DE ESPECTROS	66

Lista de Figuras

Figura	Contenido	Página
1	Estructuras de los principales compuestos identificados en los aceites esenciales de varias especies de <i>Piper</i> .	5
2	Fotografía de <i>Piper sanctum</i> .	9
3	Compuestos aislados de las raíces y tallos de <i>Piper sanctum</i> .	10
4	Constituyentes de las hojas de <i>Piper sanctum</i> (Morales, 2003).	13
5	Cromatograma de F-4-3-IV.	22
6	Aparato de destilación empleado para la elaboración de los aceites esenciales.	25
7	Cromatograma del aceite esencial de hojas frescas de <i>P. sanctum</i> .	26
8	Colocación de los discos en las placas.	32
9	Espectro de masas modalidad IE del compuesto 2-oxo-16-(3',4' metilendioxfenil)-hexadecano (25).	34
10	Vista estereoscópica del compuesto 2 - oxo -16 - (3' , 4' metilendioxfenil)-hexadecano (25).	34
11	Estructura parcial I.	36
12	Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).	38

13	Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).	39
14	Espectro de RMN modalidad HETCOR del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).	39
15	Espectro de RMN modalidad COSY del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo.	40
16	Espectro de RMN modalidad NOESY del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo.	40
17	Patrón de fragmentación del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).	41
18	Espectro de masas modalidad IE del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo.	42
19	Estructura parcial II	43
20	Espectro de RMN- ^1H del compuesto 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo (32).	45
21	Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo (32).	46
22	Espectro de RMN modalidad HETCOR del compuesto 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo (32).	46
23	Espectro de RMN modalidad COSY del compuesto 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo (32).	47
24	Patrón de fragmentación del compuesto 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo (32).	48
25	Espectro de masas modalidad IE del compuesto 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo (32).	48
26	CG del aceite esencial de hojas frescas.	50
27	CG del aceite esencial de tallo fresco.	50
28	CG del aceite esencial de tallo seco.	50

29	Compuestos determinados en los aceites esenciales.	51
30	Perfil cromatográfico del aceite esencial de las hojas frescas.	52
31	Perfil cromatográfico del aceite esencial de tallo fresco.	53
32	Perfil cromatográfico del aceite esencial de tallo seco.	54
33	Espectro de masas modalidad IE del compuesto safrol (34).	55
34	Espectro de RMN- ¹ H del safrol (34).	56
35	Espectro de RMN- ¹³ C del safrol (34).	57

Lista de Diagramas

Diagrama	Contenido	Página
1	Extracción y fraccionamiento primario de hojas de <i>P. sanctum</i> .	19
2	Estudio de la F-4 del extracto de hojas de <i>P. sanctum</i> (Morales 2003).	21

Lista de Cuadros

Cuadro	Contenido	Página
1	Principales componentes en los aceites esenciales de especies de <i>Piper</i> .	3
2	Extracción por maceración de las hojas de <i>P. sanctum</i> .	19
3	Resumen del fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del extracto crudo de las hojas de <i>P. sanctum</i> .	20
4	Resumen del fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción F7 del extracto crudo de las hojas de <i>P. sanctum</i> .	23

5	Resumen del fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción F8 del extracto crudo de las hojas de <i>P. sanctum</i> .	24
6	Material vegetal empleado para la elaboración de los aceites esenciales de <i>Piper sanctum</i> .	25
7	Bacterias de prueba y medios de cultivo empleados.	28
8	Estándar turbidimétrico de McFarland.	29
9	Antibióticos y concentraciones evaluados para determinar la concentración inhibitoria crítica.	30
10	Concentraciones de los antibióticos empleadas como controles positivos.	31
11	Constantes espectroscópicas (UV e IR) y espectrométricas del 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).	35
12	Datos de RMN del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).	37
13	Constantes espectroscópicas (UV e IR) y espectrométricas del 2-[(5-tetradecanil)-tetrahydrofuran-2-il] acetato de metilo (32).	42
14	Datos de RMN del compuesto 2-[(5-tetradecanil) tetrahydrofuran-2-il] acetato de metilo (32).	44
15	Compuestos identificados en los aceites esenciales de <i>P. sanctum</i> .	49
16	Rendimientos obtenidos en la preparación de los aceites esenciales.	51
17	Condiciones óptimas para el perfil de los aceites esenciales de <i>Piper sanctum</i> .	52
18	Datos de RMN del safrol (34).	56

Lista de Espectros

Espectro	Contenido	Página
1	Ampliación de la zona 3 - 2 ppm del espectro RMN- ¹ H del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il]acetato de metilo (33).	68
2	Espectro en el IR del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).	68
3	Espectro en el UV del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).	69
4	Ampliación de la zona 4 - 3 ppm del espectro RMN- ¹ H del compuesto 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il]acetato de metilo (32).	70
5	Espectro en el IR del compuesto 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo (32).	70
6	Espectro en el UV del compuesto 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo (32).	71

Lista de abreviaturas

<i>Abreviatura</i>	<i>Significado</i>
AcOEt	Acetato de etilo
cm	Centímetro
C	Concentración
J	Constante de acoplamiento
C.C.	Cromatografía en columna
c.c.f.	Cromatografía capa fina
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
COSY	Correlation Spectroscopy
δ	Desplazamiento químico
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
eV	Electrón volt
F	Flujo
FR	Fase reversa
$\nu_{\text{máx}}$	Frecuencia máxima
°C	Grados Celsius
g	Gramo
mg	Miligramo
μg	Microgramo
h	Hora

HETCOR	Heteronuclear correlation
Hex	Hexano
Hz	Hertz
M ⁺	Ion molecular
IR	Infrarrojo
Kg	Kilogramos
L	Litro
mL	Mililitros
μL	microlitros
λ	Longitud de onda
mm	Milímetro
m	Multiplete
m/z	Relación masa-carga
MHz	Megahertz
min	Minutos
nm	Nanómetro
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
ppm	Partes por millón
%	Por ciento
p.f.	Punto de fusión
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
s	Singulete
sa	Singulete ancho
snm	Sobre el nivel del mar
t	Triplete
t _R	Tiempo de retención

tdd	Triple de doble de dobles
TMS	Tetrametilsilano
uma	Unidad de masa atómica
UV	Ultravioleta

I. ANTECEDENTES

1.1. Aspectos generales del género *Piper*

El género *Piper*, con más de 700 especies, pertenece a la familia Piperaceae. Las plantas son hierbas erectas, arbustos o árboles pequeños que crecen en regiones tropicales o subtropicales del mundo (Parmar *et al.*, 1997).

Algunas especies de *Piper* tienen gran importancia económica. Así los frutos de *P. nigrum* son la fuente de las pimientas blanca y negra, empleadas como condimento, estimulante y desinfectante (Martins *et al.*, 1998). Otras especies se emplean medicinalmente, de tal forma que las raíces de *P. methysticum* son apreciadas en las islas del Pacífico como remedio contra el estrés y la ansiedad (Ranjith *et al.*, 2002); en India la raíz y los frutos de *P. chaba* se emplean para tratar asma, tos, bronquitis, fiebre, dolor abdominal, hemorroides, micosis, flemas y estados de angustia (Morikawa *et al.*, 2004; Parmar *et al.*, 1997); *P. aduncum* y *P. hispidum* se utilizan en Jamaica contra dolores estomacales y como repelentes de insectos; a *P. amalago* se le atribuyen propiedades antiinflamatorias y para aliviar dolores de pecho; el tallo de *P. futokadsura* es apreciado en la medicina china para tratar el asma y la artritis. Al oeste de África los frutos de *P. guineense* se usan como agente de sabor, en tanto que los preparados de las hojas, raíces y semillas se emplean para tratar la bronquitis, enfermedades gastrointestinales, enfermedades venéreas y el reumatismo; por último, las semillas se emplean por sus propiedades insecticidas y antiirritantes (Parmar *et al.*, 1997).

La fitoquímica de varias especies de *Piper* ha sido investigada ampliamente en todo el mundo; los distintos estudios han permitido el descubrimiento de compuestos activos, entre los que se encuentran: alcaloides, amidas, propenilfenoles, lignanos, terpenos, esteroides, kavapironas, piperólidas, chalconas, flavonas, flavonoides y lactamas (Chen *et al.*, 2004; Koul *et al.*, 1988; Morikawa *et al.*, 2004; Parmar *et al.*, 1997; *inter alia*).

Las partes aéreas de la mayoría de las especies son ricas en esencias, mismas que se obtienen por hidrodestilación. La determinación de la composición de estos aceites se ha realizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS) y más recientemente por resonancia magnética nuclear de carbono-13 (RMN-¹³C). En ambos casos, los resultados de los análisis se comparan con librerías de referencia a fin de establecer las estructuras de los distintos constituyentes (de Abreu *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 1998; Mundina *et al.*, 1998; Nair *et al.*, 1988; Pino, *et al.*, 2004; Vargas *et al.*, 2004; von Poser *et al.*, 1994).

Los aceites esenciales de las especies de *Piper* investigadas presentan diversos usos y propiedades. La esencia de *P. auritum* posee propiedades antifúngicas (Hernández *et al.*, 2003). Los aceites volátiles de *P. nigrum* y de *P. longum* tienen un efecto antibacteriano significativo; la oleoresina de *P. nigrum* puede ser administrada en cápsulas como carminativo y estimulante gástrico. Algunos preparados fitofarmacéuticos como el "Digestive Balance" son ricos en estas esencias y se emplean también como estimulantes gástricos y carminativos (Dorman *et al.*, 2000; <http://www.ibiblio.org/herbmed/eclectic/bpc1911/piper-nigr.html>). Otras esencias como la de *P. cubeba* se emplean en casos de bronquitis, catarro, congestión, infecciones de garganta, cistitis, flatulencia, indigestión, leucorrea y uretritis (<http://12121.hostinguk.com/Guide%20Oils.htm>).

Los aceites de las diferentes especies presentan una composición compleja, aunque casi siempre predomina un constituyente (de Abreu *et al.*, 2002). Los principales constituyentes encontrados en las esencias investigadas pertenecen a la categoría de los fenilpropanoides y terpenoides (mono y sesquiterpenoides). En el Cuadro 1 se resumen los distintos aceites de *Piper* analizados y su composición.

Cuadro 1. Principales componentes en los aceites esenciales de especies de *Piper*.

Especie	Compuesto	Porcentaje (%)		Referencia
		H	E	
<i>P. aduncum</i>	Dilapiol	82.2		Pino <i>et al.</i> , 2004.
	Piperitona	3.8		
	β -Cariofileno	2.6		
	Miristicina	1.4		
	Viridiflorol	0.9		
	Cubebol	0.8		
	Oxido de cariofileno	0.7		
<i>P. arboreum</i>	δ -Cadineno	25.1		Mundina <i>et al.</i> , 1998.
	α -Copaeno	7.4		
	β -Pino	6.6		
	Germacreno D	5.3		
	(E)-Nerolidol	5.2		
	β -Cariofileno	4.4		
	α -Pino	4.3		
<i>P. auritum</i>	Safrol	64.4		Pino <i>et al.</i> , 1998.
	β -Cariofileno	4.6		
	Germacreno D	3.1		
	(E)-Nerolidol	2.8		
	Linalol	2.3		
	γ -Terpineno	2.2		
	Terpinoleno	1.9		
<i>P. capense</i>	β -Pino	32.5		Martins <i>et al.</i> , 1998.
	β -Cariofileno	12.6		
	α -Pino	8.6		
	Ácido bencenpropanoico	7.8		
	Linalol	3.8		
	Limoneno	3.6		
	Germacreno D	3.3		
<i>P. carpunya</i>	Hojas			Vargas <i>et al.</i> , 2004.
	Espinas			
	Safrol	14.9	32.0	
	1,8-Cineol	13.0	30.2	
	α -Terpineno	12.1	9.8	
	p-Cimeno	10.9	7.7	
		9.8	6.2	
	Espatuleno	6.7	4.5	
	Biciclogermacreno	3.4	1.2	
Germacreno D				
	α -Pino			
	β -Pino			
	α -Terpineol			

<i>P. fimbriulatum</i>	Germacreno D	12.8	Mundina <i>et al.</i> , 1998.
	β - Cariofileno	11.3	
	Linalol	5.3	
	Acetato de linalilo	5.3	
	Espatuleno	2.9	
	6E-Nerolidol	2.7	
	Biciclogermacreno	2.7	
	δ - Cadineno	2.6	
	β - Elemeno	2.6	
<i>P. gaudichaudianum</i>	α - Humuleno	37.5	Von Poser <i>et al.</i> , 1994.
	β - Cariofileno	17.4	
	Allo-aromadendreno	7.7	
	β - Pineno	5.6	
	Linalol	4.8	
	Nerolidol	4.1	
	α - Pineno	2.0	
<i>P. guineense</i>	Dilapiol	44.8	Martins <i>et al.</i> , 1998.
	Miristicina	9.8	
	α - Felandreno	8.2	
	β - Felandreno	5.9	
	Linalol	3.4	
	Limoneno	2.6	
	α - Copaeno	1.9	
<i>P. mikianium</i>	Safrol	82.0	De Abreu <i>et al.</i> , 2002.
	Linalol	2.2	
	Limoneno	1.8	
	β - Cariofileno	1.7	
	α - Pineno	1.4	
	(Z)- Nerolidol	1.3	
	Biciclogermacreno	1.2	
<i>P. nigrum</i>	Limoneno	18.8	Martins <i>et al.</i> , 1998.
	Sabineno	16.5	
	β - Cariofileno	15.1	
	β - Pineno	10.7	
	α - Pineno	5.7	
	β - Felandreno	2.9	
	Furanodieno	2.1	
<i>P. obliquum</i>	β - Cariofileno	27.6	Mundina <i>et al.</i> , 1998.
	Espatuleno	10.6	
	Oxido de cariofileno	8.3	
	α - Copaeno	5.6	
	β - Bisaboleno	4.5	

	Germacreno D	3.9	
	1,5- Epoxisalvial-4(14)- eno	2.6	
<i>P. peltata</i>	Oxido de cariofileno	22.9	Pino <i>et al.</i> , 2004.
	Espatuleno	9.0	
	Trans- calameneno	5.4	
	α - Copaeno	5.2	
	Cadaleño	4.1	
	γ - Cadineno	3.4	
	Germacreno D	2.8	
<i>P. umbellatum</i>	β - Pineno	26.8	Martins <i>et al.</i> , 1998.
	α - Pineno	17.6	
	(<i>E</i>)-Nerolidol	12.4	
	β - Cariofileno	9.8	
	Linalol	7.9	
	(<i>Z</i>)- β - Ocimeno	6.8	
	Limoneno	3.8	

En la Figura 1 se ilustran las estructuras de los principales componentes de las distintas esencias del género *Piper*. Es importante señalar que la composición de una misma esencia varía, en función de la época del año y el lugar de recolección de la planta. Incluso en algunos casos las diferencias en la composición de la esencia se debe a variaciones intraespecíficas (de Abreu *et al.*, 2002; Mundina *et al.*, 1998; Pino *et al.*, 2004; von Poser *et al.*, 1994).



Figura 1. Estructuras de los principales compuestos identificados en los aceites esenciales de varias especies de *Piper*.

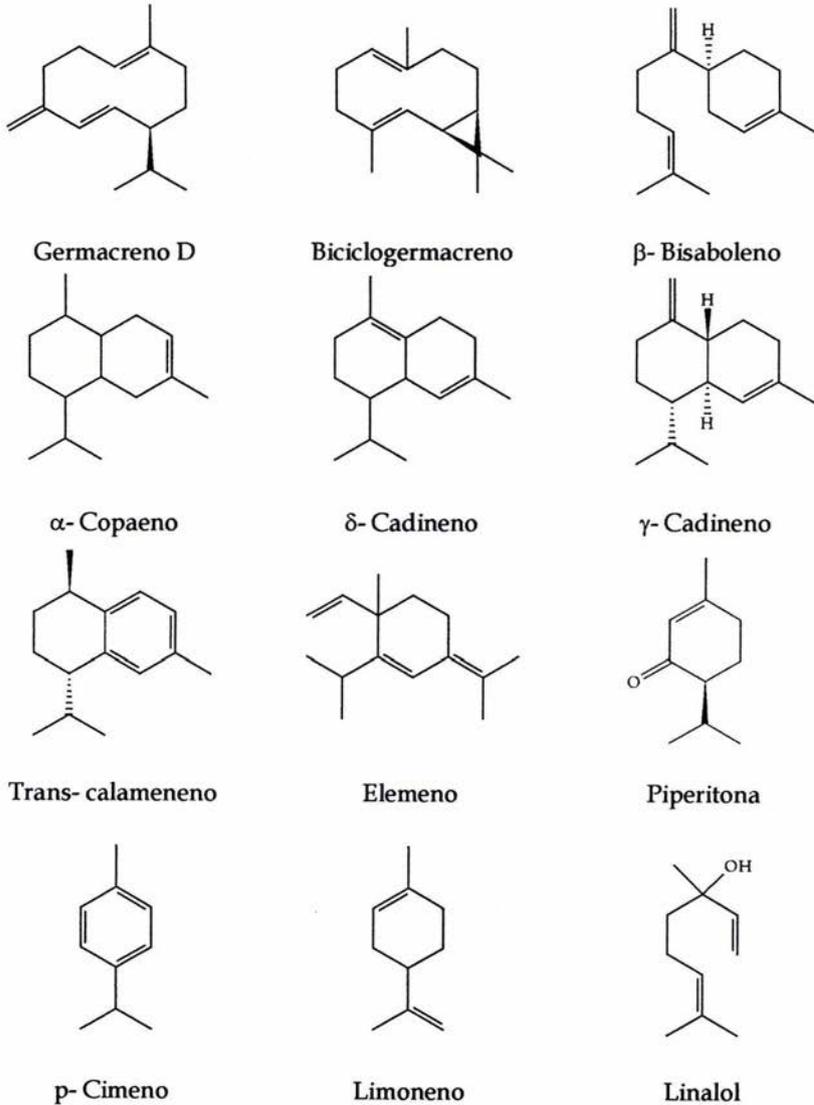


Figura 1. Estructuras de los principales compuestos identificados en los aceites esenciales de varias especies de *Piper*.

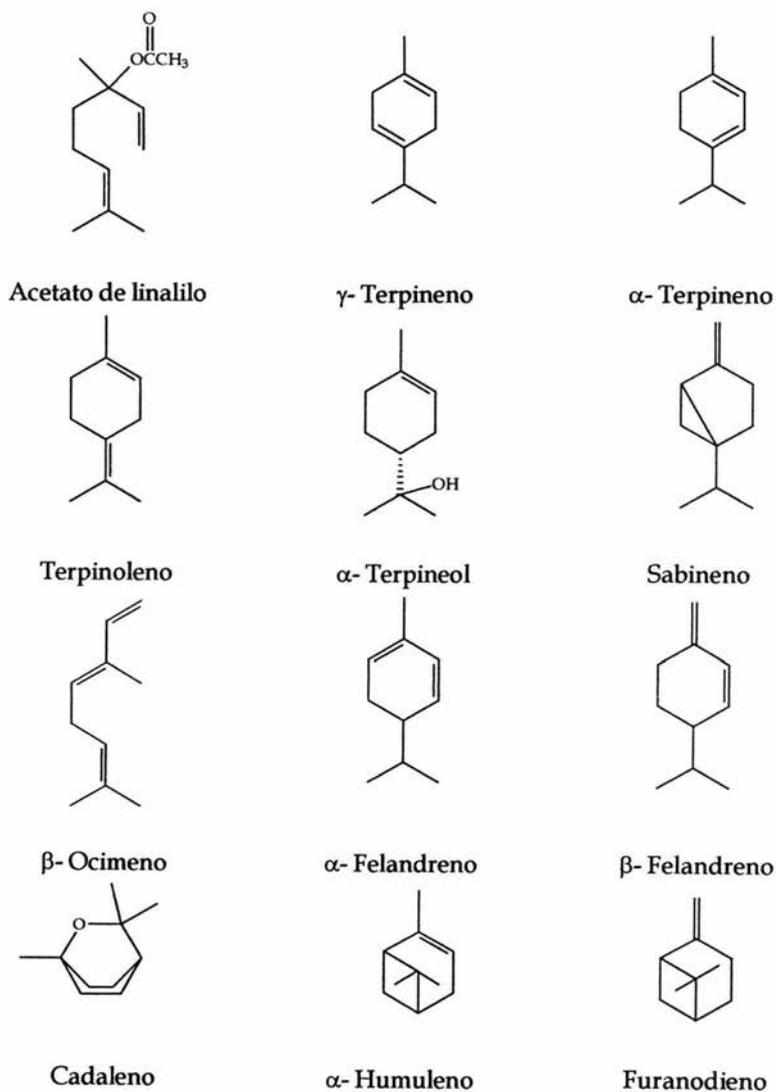


Figura 1. Estructuras de los principales compuestos identificados en los aceites esenciales de varias especies de *Piper*.

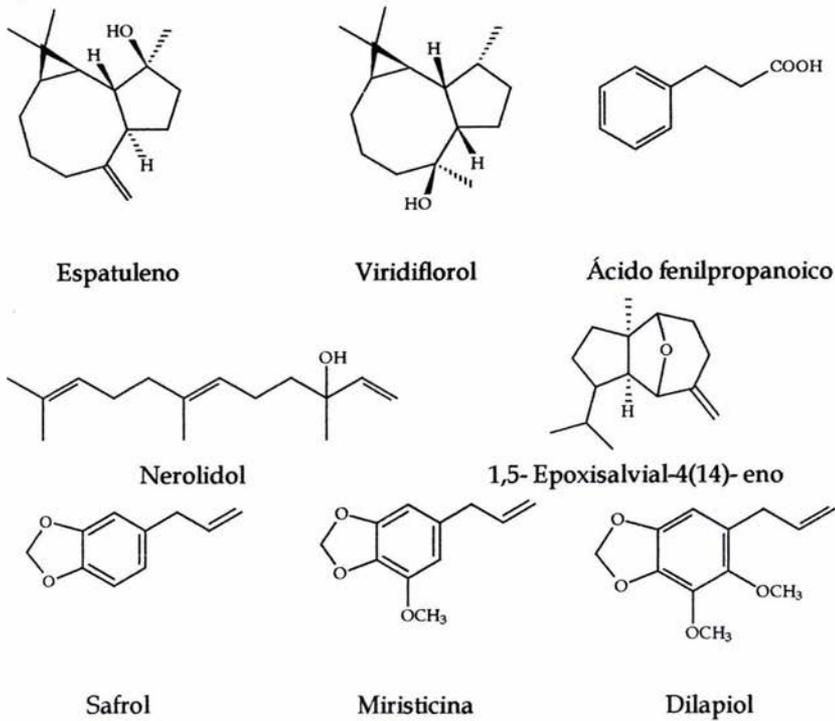


Figura 1. Estructuras de los principales compuestos identificados en los aceites esenciales de varias especies de *Piper*.

1.2. Antecedentes sobre la especie *Piper sanctum*

Piper sanctum (Figura 2) es conocida popularmente como hoja santa, hierba santa, acuyo, acoyo, hoja de aján y de anís, entre otros. Esta especie es originaria de México y Guatemala (Argueta *et al.*, 1994); en México se encuentra distribuida principalmente en Sonora, Michoacán, Morelos, Puebla, Oaxaca, Veracruz y San Luis Potosí (Márquez *et al.*, 1999). Generalmente, esta especie crece en lugares semicálidos y templados entre una altitud de 740 y 2600 snm. Mide entre 50 cm y

1.5 m de altura. Sus hojas tienen forma acorazonada; los frutos son carnosos y contienen una semilla. *P. sanctum* tiene flores color amarillo claro, muy pequeñas, y están agrupadas en forma de espigas cilíndricas (Argueta *et al.*, 1994; Martínez 1979).

La hoja santa se utiliza en la medicina tradicional mexicana para tratar distintos padecimientos. La infusión de la planta se emplea para el dolor de estómago, la gripe y las várices; la hoja tibia se emplea como antiinflamatorio; la raíz se usa contra el dolor de muelas; así mismo, a la especie se le atribuyen efectos benéficos contra el asma, la bronquitis, fiebre, helmintosis y mordeduras de serpiente (Argueta *et al.*, 1994; Espinosa 1994; Márquez *et al.*, 1999).



Figura 2. Fotografía de *Piper sanctum*.

Los compuestos que biosintetiza *P. sanctum* (Figura 3) incluyen amidas (Hänsel *et al.*, 1976; Parmar *et al.*, 1997; Pérez 2003), fenilpropanoides (Pérez 2003; Torres 2001), esteroides (Parmar *et al.*, 1997), kavapironas (Hänsel *et al.*, 1976; Hänsel *et al.*, 1982; Parmar *et al.*, 1997) y piperólidas (Hänsel *et al.*, 1982; Hänsel *et al.*, 1976; Hänsel *et al.*, 1972; Hänsel *et al.*, 1971; Parmar *et al.*, 1997). Estos productos se han obtenido de la raíz y tallo de la planta. En el estudio realizado por Pérez (2003) se comprobó que la cefaradiona B y la piperolactama presentan una notable actividad antimicrobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis*.

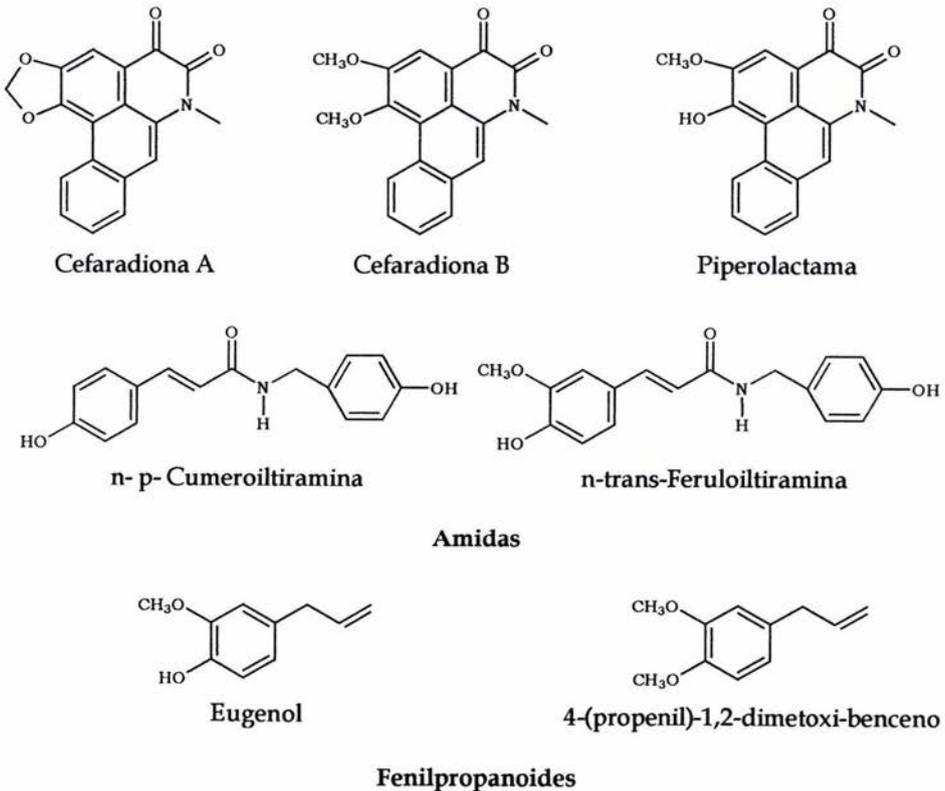
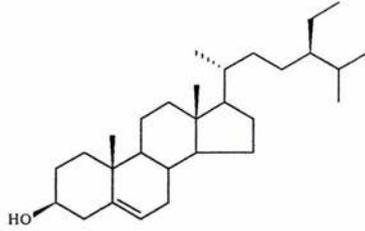
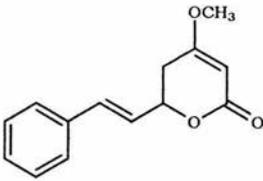


Figura 3. Compuestos aislados de las raíces y tallos de *Piper sanctum*

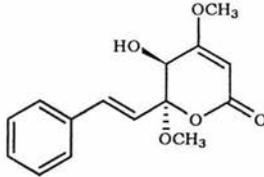


β -Sitosterol

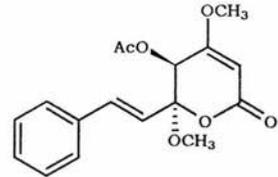
Esteroides



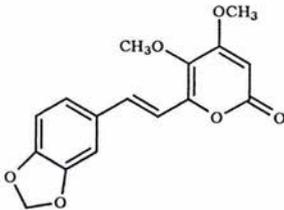
Kavaina



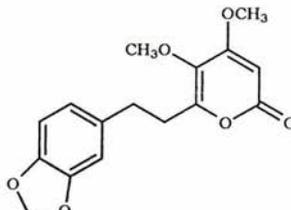
5-Hidroxi-6-metoxikavaina



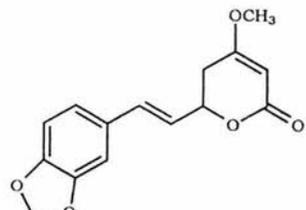
5-Acetoxi-6-metoxikavaina



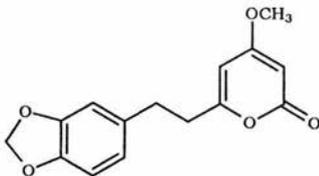
5-Metoxi-5,6-deshidro-metisticina



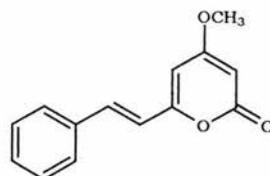
5-Metoxi-5,6-deshidro-7,8-dihidro-metistitina



Metisticina



5,6-Deshidro-7,8-dihidrometisticina



Desmetoxyyangonina

Kavapironas

Figura 3. Compuestos aislados de las raíces y tallos de *Piper sanctum*

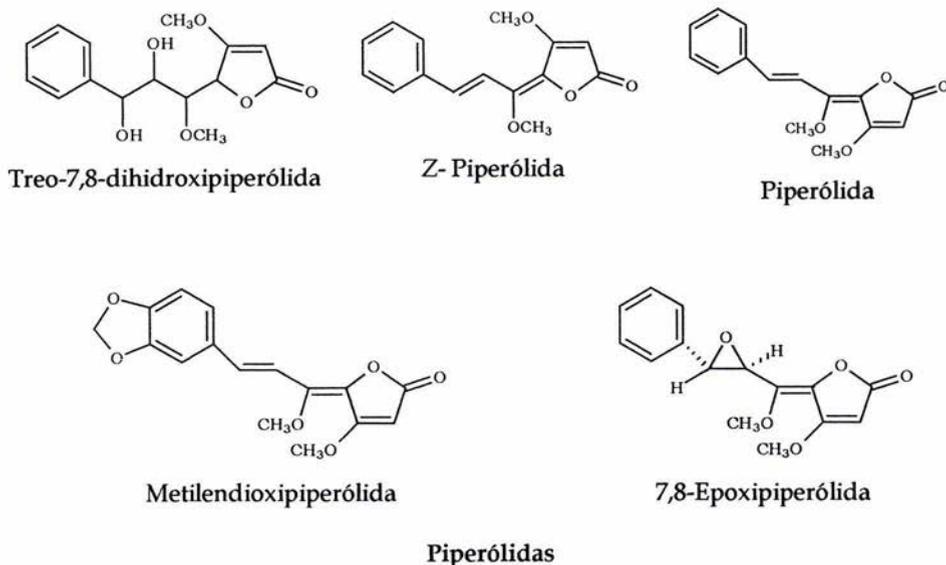


Figura 3. Compuestos aislados de las raíces y tallos de *Piper sanctum*

Recientemente, también en nuestro grupo de trabajo, se realizó el estudio del extracto íntegro de hojas de *P. sanctum* (Morales; 2003) debido a sus propiedades antimicobacterianas. El fraccionamiento del extracto por métodos cromatográficos condujo a la obtención de ocho fracciones primarias (F1-F8). Las fracciones F4, F5 y F6 presentaron notable actividad antimicobacteriana. El análisis de las fracciones F5 y F6 se realizó de manera integral en tanto que el de la fracción F4 se hizo de manera parcial. Esta investigación condujo a la obtención de varios compuestos fenilalquilos novedosos cuyas estructuras se ilustran en la Figura 4. Los compuestos 22, 23, 25 y 26 presentaron actividad antimicobacteriana (CMI ~ 6.00 µg/mL).

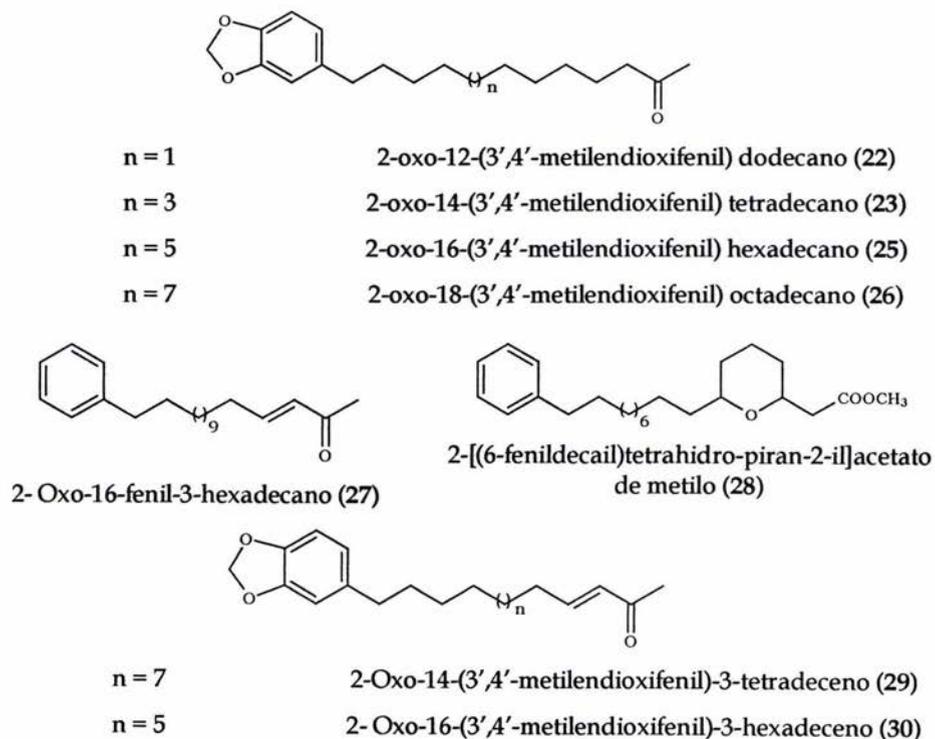


Figura 4. Constituyentes de las hojas de *Piper sanctum* (Morales, 2003).

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El presente trabajo se realizó con la finalidad de completar el estudio biodirigido de Morales (2003). Como se indicó en la sección de antecedentes la especie *P. sanctum* fue elegida de acuerdo al criterio etnomédico como una fuente potencial de agentes antimicobacterianos.

La importancia de completar el estudio radica en que en los últimos años ha habido un resurgimiento de la tuberculosis debido a la aparición del Síndrome de Inmuno Deficiencia Humana Adquirida (SIDA), así como al aumento de enfermedades inmunosupresoras y al desarrollo de resistencia a los medicamentos antimicobacterianos por parte de la bacteria. Así, es de vital importancia el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad antimicobacteriana.

Por otro lado, es importante señalar que uno de los grandes problemas que surgen en el creciente mercado global de preparados fitofarmacéuticos es el de no contar con la información necesaria para desarrollar los métodos de control de calidad de estos preparados y drogas crudas. Por lo tanto, otro objetivo del presente trabajo es contribuir al conocimiento detallado del contenido metabólico de los extractos y aceites esenciales de las distintas partes de la planta (hoja y tallo) con la finalidad de establecer los compuestos marcadores de utilidad en las pruebas de control de calidad. Por último, este trabajo se formuló con la intención de determinar si el aceite esencial posee propiedades antibacterianas.

Para la realización del presente estudio se propusieron los siguientes objetivos particulares:

- A. Completar el estudio de la fracción activa F4 para continuar con el aislamiento de los compuestos antimicobacterianos.

- B. Realizar el fraccionamiento secundario de las fracciones F7 y F8 con la finalidad de completar el estudio químico de la planta y obtener información relevante para el desarrollo de pruebas de control de calidad.
- C. Identificar los compuestos aislados mediante métodos espectrométricos y espectroscópicos.
- D. Obtener los aceites esenciales de las diferentes partes de la planta.
- E. Establecer la composición química de las esencias por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- F. Evaluar el potencial antibacteriano de los aceites.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Material vegetal

Las hojas de *Piper sanctum* (Miq.) Schl. fueron recolectadas en la región de Los Tuxtlas, 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, UNAM (Voucher, GM 423-h).

El tallo de la planta se recolectó en la región de la Sierra Juárez, en Oaxaca, en Abril del 2003. Un ejemplar de referencia se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional MEXU, Instituto de Biología, UNAM (Voucher, RB-HS-t). El material vegetal desecado a temperatura ambiente se fragmentó en un molino Willey Modelo 4.

Las hojas (Voucher AP-HO-2004) y el tallo frescos (Voucher AP-TO-2004) empleados para preparar los aceites se recolectaron en la región de los Valles Centrales en el municipio de Santa María el Tule, en Oaxaca en Abril del 2004. En todos los casos el material vegetal fue identificado por el Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM).

3.2 Procedimientos generales

3.2.1 Análisis cromatográficos

Los análisis cromatográficos en capa fina de tipo analítico se realizaron en placas de aluminio recubiertas con una capa de gel de sílice de 0.25 mm de espesor (sílica gel 60 F₂₅₄ Merck). Para los análisis de cromatografía en columna abierta se utilizaron columnas de vidrio empacadas con gel de sílice (sílica gel 60 Merck,

tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm, malla 70-230). Para la visualización de los compuestos en las cromatoplas se utilizó una lámpara de UV (onda corta, 254 nm; onda larga, 365 nm) y/o sulfato cérico como agente cromógeno. Para el desarrollo de color con este último reactivo, las placas se calentaron en una parrilla eléctrica a una temperatura superior a 30 °C.

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

La purificación de los compuestos se llevó a cabo con columnas de fase reversa sobre gel de sílice empleando una columna preparativa (Prep. Nova-Pak® HR C₁₈ 60 Å, 6 µm) de 19 x 300 mm. La detección se ajustó a 214 y 215 nm para el detector dual. Para establecer los perfiles cromatográficos de las esencias se empleó una columna analítica (Prep. Nova-Pak® HR C₁₈ 60 Å, 6 µm; 3.9 x 300 mm) y la longitud de onda se ajustó entre 200 y 300 nm para el detector de fotodiodos (pda).

3.2.2 Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

Para medir los puntos de fusión se utilizó un aparato Fisher-Johns y éstos no están corregidos.

Los espectros en el infrarrojo (IR) se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer, modelo 1605, utilizando la técnica de pastilla de KBr o película.

Los análisis de cromatografía de gases acoplados 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 espectrómetro 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 del RMN bidimensionales homonucleares (^1H - ^1H COSY y NOESY) y HETCOR se registraron en un aparato Varian Unity INOVA, el cual se operó a una frecuencia de 300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C . Los espectros se registraron en CDCl_3 y los desplazamientos químicos [δ (ppm)] se refieren al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los análisis arriba indicados se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química.

El análisis de difracción de rayos X se realizó en un difractómetro Broker Smart Apex CCD en el Instituto de Química de la 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 como se resume en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Extracción por maceración de las hojas de *P. sanctum*

Tiempo (h)	Disolventes	Proporción	Volumen(L)
240	CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH	1:1	7.5
336	CH ₃ OH	100%	6.85

Los extractos obtenidos se filtraron y concentraron al vacío. Obteniéndose 162.4 g de extracto crudo.

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 mediante una columna abierta utilizando gel de sílice como adsorbente (178.7 g). La elución se realizó con hexano, hexano-CH₂Cl₂(100:0 → 0:100) y CH₂Cl₂-CH₃OH (100:0 → 0:100). En el Diagrama 1 se resume el procedimiento de extracción y fraccionamiento primario del extracto de *P. sanctum*.

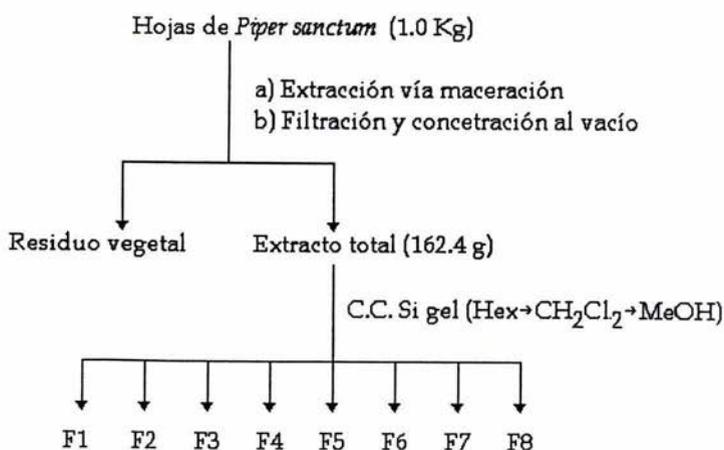


Diagrama 1. Extracción y fraccionamiento primario de las hojas de *P. sanctum*

Este procedimiento generó ocho fracciones primarias. En el Cuadro 3 se resume el fraccionamiento primario.

Cuadro 3. Resumen del fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del extracto crudo de las hojas de *P. sanctum*.

Fracciones	Eluyente	Proporción (%)	Fracciones reunidas	Clave	Peso (g)
1-14	Hexano	100	1-38	F1	0.2169
15-36	Hex-CH ₂ Cl ₂	90:10	39-56	F2	1.5227
37-50	Hex-CH ₂ Cl ₂	80:20	57-76	F3	1.2998
51-58	Hex-CH ₂ Cl ₂	70:30	77-113	F4*	4.0421
59-74	Hex-CH ₂ Cl ₂	60:40	114-140	F5*	3.1106
75-93	Hex-CH ₂ Cl ₂	50:50	141-172	F6*	5.5606
94-108	Hex-CH ₂ Cl ₂	40:60	173-192	F7	51.6236
109-125	Hex-CH ₂ Cl ₂	30:70	193-266	F8	65.1908
126-140	Hex-CH ₂ Cl ₂	20:80			
141-157	Hex-CH ₂ Cl ₂	10:90			
158-172	CH ₂ Cl ₂	100			
173-190	CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH	90:10			
191-208	CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH	80:20			
209-223	CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH	70:30			
224-238	CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH	60:40			
239-254	CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH	50:50			
255-266	CH ₃ OH	100			

* Fracciones con actividad antimicobacteriana.

Cabe mencionar que los procesos de extracción, fraccionamiento primario y el estudio completo de las fracciones F5 y F6 se efectuaron durante el estudio de Morales (2003). Así mismo, en ese estudio se inició el análisis de la fracción F-4 de acuerdo a la metodología que se resume en el Diagrama 2.

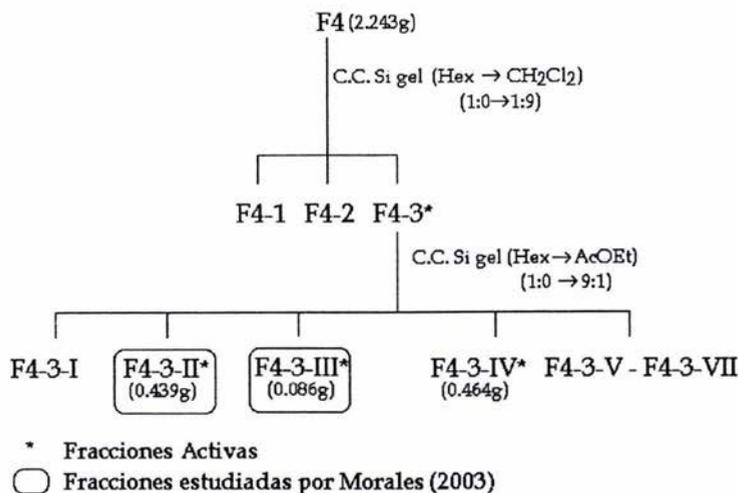


Diagrama 2. Estudio de la F4- del extracto de hojas de *P. sanctum* (Morales, 2003).

3.3.3. Separación de los compuestos 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxiifenil)-hexadecano y 2-[(6-tridecanil)tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo de la fracción activa F4-3-IV.

Parte de la fracción activa F4-3-IV se sometió a un proceso de separación por CLAR empleando como fase móvil una mezcla de $\text{CH}_3\text{CN}-\text{CH}_3\text{OH}$ (4:1) con un flujo de 7.11 mL/min. La longitud de onda utilizada para la detección de los compuestos fue de 214 nm, la concentración de las inyecciones de la muestra fue de 3 mg/50 μL (Figura 5). Este procedimiento permitió la separación 5.6 mg de un producto cristalino ($t_R = 14.2$ min) que se analizó por difracción de rayos X, resultando ser el compuesto 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxiifenil) hexadecano.

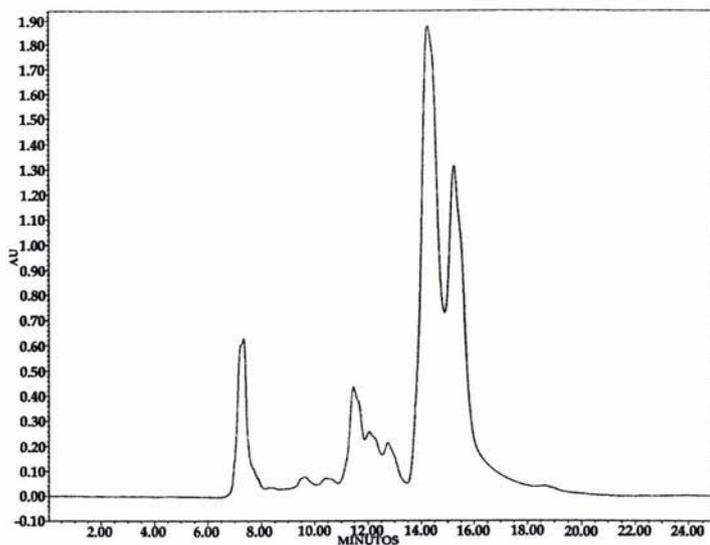


Figura 5. Cromatograma de la fracción F4-3-IV

El resto de la fracción se sometió a un proceso de separación por c.c.f. preparativa, obteniéndose el compuesto 2-[(6-tridecanil)tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo con un rendimiento de $3 \times 10^{-2} \%$.

3.3.4 Fraccionamiento secundario de la fracción F7.

La fracción F7 se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna abierta usando gel de sílice como fase estacionaria (362.7 g). El proceso de elución se realizó utilizando: hexano, hexano-AcOEt (100:0 → 0:100) y AcOEt-CH₃OH (100:0 → 0:100). Se recolectaron 779 fracciones de 125 mL, las cuales se analizaron por c.c.f., reuniéndose aquellas que presentaban similitud cromatográfica para generar así 14 fracciones secundarias (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resumen del fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción F7 del extracto crudo de las hojas de *P. sanctum*.

Fraciones	Eluyente	Proporción (%)	Fraciones reunidas	Clave	Peso (g)
1-15	Hexano	100	1-32	F7-I	0.0157
16-34	Hex-AcOEt	99:1	33-39	F7-II	0.8727
35-281	Hex-AcOEt	97:3	40-51	F7-III	4.0343
282-596	Hex-AcOEt	96:4	52-74	F7-IV	1.6942
597-655	Hex-AcOEt	94:6	75-127	F7-V	0.5340
656-688	Hex-AcOEt	92:8	128-149	F7-VI	0.2036
689-705	Hex-AcOEt	90:10	150-226	F7-VII	0.5325
706-720	Hex-AcOEt	86:14	227-281	F7-VIII	0.1780
721-732	Hex-AcOEt	80:20	282-311	F7-IX	0.3527
733-744	Hex-AcOEt	70:30	312-428	F7-X	1.6083
745-760	Hex-AcOEt	60:40	429-667	F7-XI	2.9892
761-771	Hex-AcOEt	50:50	668-741	F7-XII	7.9295
772-776	AcOEt	100	742-751	F7-XIII	4.8245
777-779	CH ₃ OH	100	752-779	F7-XIV	17.3514

3.3.5. *Separación y purificación del compuesto 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo de la fracción secundaria F7-V*

La fracción secundaria F7-V se sometió a un proceso de separación y purificación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), la fase móvil consistió en una mezcla de CH₃CN-CH₃OH (4:1); el flujo fue de 7.11 mL/min. La longitud de onda utilizada para la detección de los compuestos fue de 215 nm y la concentración de las inyecciones de la muestra fue de 3 mg/50μL. Este procedimiento permitió la separación del 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo con un t_R de 14.7 minutos y un rendimiento de 2 x 10⁻³ %.

3.3.6. *Fraccionamiento secundario de F8.*

La fracción F8 se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna abierta usando gel de sílice como fase estacionaria (847.8 g). El proceso de elución se realizó utilizando: hexano-CH₂Cl₂ (10:90 → 0:100) y CH₂Cl₂-CH₃OH (100:0 → 0:100) como fase móvil; éste proceso condujo a la obtención de ocho fracciones secundarias (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resumen del fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción F8 del extracto crudo de las hojas de *P. sanctum*.

Fracciones	Eluyente	Proporción (%)	Fracciones reunidas	Clave	Peso (g)
1-10	Hex- CH ₂ Cl ₂	10:90	1-7	F8-I	0.2018
11-20	CH ₂ Cl ₂	100	8-23	F8-II	0.0351
21-36	CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH	90:10	24-29	F8-III	2.1876
37-42	CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH	85:15	30-36	F8-IV	0.4665
43-44	CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH	80:20	37-44	F8-V	4.2876
45-48	CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH	70:30	45-48	F8-VI	6.1586
49-52	CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH	50:50	49-53	F8-VII	5.6306
53-58	CH ₃ OH	100	54-58	F8-VIII	6.1384

El estudio de las fracciones F8-I–VIII no condujo a la separación de compuesto alguno.

3.4. *Análisis de los aceites esenciales de P. sanctum.*

3.4.1 *Preparación de los aceites esenciales de P. sanctum*

Los aceites esenciales se prepararon mediante una hidrodestilación. En un matraz bola se colocó el material vegetal (Cuadro 6) y se adicionaron aproximadamente 3.5 L de agua destilada; la mezcla se calentó a ebullición y el calentamiento se suspendió cuando las gotas de destilado ya no lucían turbias.

Posteriormente, el destilado se sometió a un proceso de partición con CH_2Cl_2 ; finalmente la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a sequedad al vacío. (Figura 6).

Cuadro 6. Material vegetal empleado para la elaboración de los aceites esenciales de *Piper sanctum*.

Material vegetal	Peso del material (g)
Hojas frescas	150.2
Tallo fresco	150.2
Tallo seco	228.4

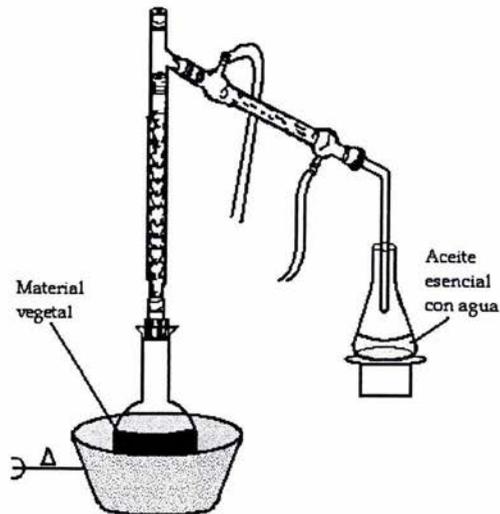


Figura 6. Aparato de destilación empleado para la elaboración de los aceites esenciales.

3.4.2 *Determinación de los compuestos mayoritarios en los aceites esenciales de P. sanctum.*

Las esencias obtenidas se analizaron por CG-EM. Los espectros de masas de cada componente se compararon con los espectros de muestras auténticas incluidos en la librería NIST; este análisis comparativo permitió determinar la identidad de los compuestos mayoritarios. Así mismo, la cuantificación de los compuestos se realizó comparando el área bajo la curva de los picos del cromatograma.

3.4.3 *Aislamiento del safrol del aceite esencial de hojas de P. sanctum.*

El aislamiento del safrol se realizó sometiendo el aceite esencial de las hojas frescas a un proceso de separación por CLAR, empleando como fase móvil CH₃CN-H₂O (7:3) y un flujo de 7.11 mL/min. La longitud de onda utilizada para la detección de los compuestos fue de 214 nm. El safrol (*t_R*= 8.9 min) se extrajo de la mezcla CH₃CN-H₂O con 100 mL de cloroformo, finalmente la fase orgánica se concentró a sequedad al vacío.

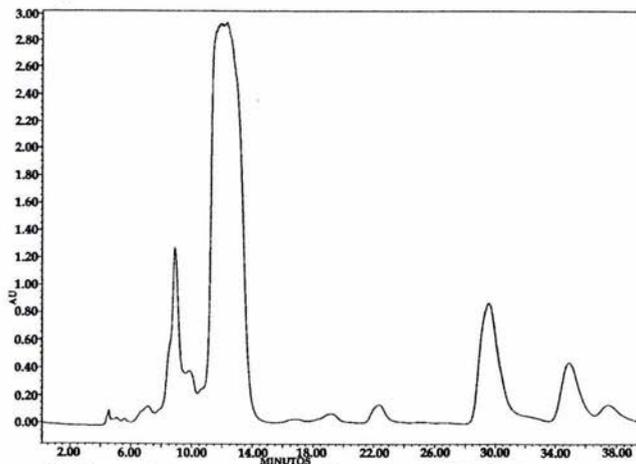


Figura 7. Cromatograma del aceite esencial de hojas frescas de *P. sanctum*.

3.4.4 *Determinación del perfil cromatográfico de los aceites esenciales de P. sanctum.*

Los perfiles cromatográficos por CLAR se establecieron utilizando el mismo aparato mencionado en la sección 3.2.1. Para desarrollar las mejores condiciones se registraron los cromatogramas empleando distintas fases móviles [CH₃CN-CH₃OH (1:0 → 1:1), CH₃CN-H₂O (4:1 → 3:2) y mezclas terciarias de CH₃CN-CH₃OH -H₂O], longitudes de onda y tiempos de corrida.

3.5 Ensayos biológicos.

3.5.1 *Determinación de la actividad antimicobacteriana.*

La actividad antimicobacteriana de las esencias, del saflor y los compuestos 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo y 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo se determinó aplicando el bioensayo fluorimétrico MABA (Microplate Alamar Blue Assay) en el Instituto de Investigaciones sobre la Tuberculosis de la Universidad de Illinois, Chicago, Illinois, E.E.U.U.; la rifampina fue utilizada como control positivo (Collins y Franzblau, 1997).

3.5.2 *Determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de P. sanctum.*

3.5.2.1 *Microorganismos de prueba.*

Para la realización de los bioensayos se emplearon cepas de microorganismos ATCC (American Type Culture Collection) que incluyen bacterias Gram positivo y Gram negativo. Todas estas fueron proporcionadas por

el Cepario de la Facultad de Química, UNAM. En el Cuadro 7 se enumeran las bacterias de prueba además de mencionarse las condiciones de incubación y los medios de conservación apropiados para cada una de ellas.

Los medios de cultivo se rehidrataron de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial. Los medios resultantes se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 121°C y 15 lb/cm² de presión por 30 minutos.

Cuadro 7. Bacterias de prueba y medios de cultivo empleados.

Grupo de bacterias	Bacterias	Condiciones de incubación	Medio de conservación
Gram positivo	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	37°C, aerobias	Agar nutritivo
	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	37°C, aerobias	Agar nutritivo
Gram negativo	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	37°C, aerobias	Agar nutritivo
	<i>Salmonella typhi</i> (ATCC 9992)	37°C, aerobias	Agar nutritivo
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	37°C, aerobias	Agar nutritivo

3.5.2.2 Conteo celular.

El número de bacterias en un medio líquido puede ser determinado por la comparación visual de su turbidez con la de un estándar turbidimétrico que representa un número conocido de bacterias en suspensión. En el Cuadro 8 se indican los reactivos y las cantidades necesarias de las soluciones requeridas para la preparación del estándar turbidimétrico de McFarland. La turbidez generada

por la mezcla de los reactivos corresponde a un número aproximado de células bacterianas presentes en el medio líquido.

Cuadro 8. Estándar turbidimétrico de McFarland.

Reactivo	0.5	1	2	3	4	5	6	5	8	9	10
mL BaCl₂ 1%	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	1.00
mL H₂SO₄ 1%	9.95	9.90	9.80	9.70	9.60	9.50	9.40	9.30	9.20	9.10	9.00
No. Cel. x 10⁸	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0	15.0	18.0	21.0	24.0	27.0	30.0

3.5.2.3 *Determinación de la concentración crítica de los antibióticos.*

Antes de llevar a cabo la determinación de la actividad antibacteriana de las esencias, se determinaron las concentraciones inhibitorias críticas de los antibióticos, utilizando el método de difusión en agar empleando discos de papel filtro y diferentes concentraciones del antibiótico a ensayar. Estas pruebas permitieron determinar las concentraciones apropiadas de antibiótico utilizadas como controles positivos.

A) Preparación de las concentraciones de los antibióticos.

Se emplearon cinco concentraciones diferentes, estas concentraciones y los antibióticos empleados para cada bacteria se indican en el Cuadro 9, las diluciones se realizaron en todos los casos con agua destilada estéril.

Cuadro 9. Antibióticos y concentraciones evaluados para determinar la concentración inhibitoria crítica.

Bacteria	Antibiótico	Concentraciones ($\mu\text{g}/5\mu\text{L}$)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ampicilina	0.01, 0.05, 0.1*, 0.25, 0.5
<i>Bacillus subtilis</i>	Rifampicina	0.5, 1.0, 2.0*, 4.0, 5.0
<i>Escherichia coli</i>	Cloranfenicol	1.0, 2.5, 5.0*, 7.5, 10.0
<i>Salmonella typhi</i>	Cloranfenicol	1.0, 2.0, 3.0*, 4.0, 5.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gentamicina	10, 25, 50*, 75, 100

* Concentración de referencia.

B) Preparación de los inóculos.

Las bacterias se cultivaron en agar nutritivo utilizando el medio en pico de flauta, incubándose bajo las condiciones previamente mencionadas en el Cuadro 7. El cultivo se cosechó en 3 mL de agua destilada estéril; esta suspensión se sembró en un matraz Erlenmeyer que contenía 100 mL del mismo medio sólido de cultivo y se incubó bajo las mismas condiciones por 24 horas. En un tubo con 15 mL de agua destilada estéril se ajustó visualmente el número de microorganismos a la turbidez correspondiente al estándar 0.5 de McFarland con este último cultivo.

C) Preparación de las placas de agar.

Las placas de agar se prepararon colocando 10 mL de agar inoculado con la bacteria de prueba en cada caja de Petri. El volumen de inóculo empleado de cada microorganismo fue de 0.2 mL por cada 100 mL de medio.

D) Bioensayo.

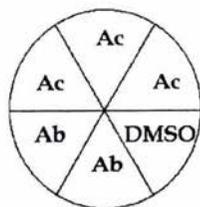
Una vez solidificadas las placas de agar se colocaron seis discos en forma equidistante en cada placa. Tres discos contenían 5 μL del antibiótico con la concentración de referencia y los otros tres contenían antibiótico con una de las otras concentraciones de prueba (Cuadro 9). Este proceso se realizó por duplicado con cada concentración para obtener seis valores con el fin de poder realizar un tratamiento estadístico y determinar la concentración a utilizar en la evaluación de los aceites. La concentración de cada uno de los antibióticos de prueba seleccionados como controles positivos se indica en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Concentraciones de los antibióticos empleadas como controles positivos.

Bacteria	Antibiótico	Concentración
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ampicilina	0.04 μg / 5 μL
<i>Bacillus subtilis</i>	Rifampicina	0.143 / 5 mL
<i>Escherichia coli</i>	Cloranfenicol	0.8 μg / 5 μL
<i>Salmonella typhi</i>	Cloranfenicol	2 μg / 5 μL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gentamicina	5.2 μg / 5 μL

3.5.2.4 *Determinación cualitativa de la actividad antibacteriana por método de difusión en agar utilizando discos de papel filtro.*

Para la determinación del potencial antibacteriano de los aceites se siguió el mismo procedimiento empleado para la determinación de la concentración inhibitoria crítica de los antibióticos, sólo que se emplearon concentraciones diferentes, impregnándose tres de los discos con 5 μL del aceite disuelto en DMSO. Las concentraciones evaluadas fueron de 1000, 750, 500, 250 y 100 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$, utilizándose como blanco un disco embebido sólo con DMSO (Figura 8).



Ab- Antibiótico
Ac- Dilución del aceite

Figura 8. Colocación de los discos en las placas.

3.5.2.5 *Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).*

La CMI se determina a partir de la concentración crítica inhibitoria de acuerdo al tratamiento de Linton (1983).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de completar la investigación fitoquímica biodirigida de la especie *P. sanctum* iniciada en el estudio de Morales (2003), se estudió la fracción activa F4-3-IV (ver sección experimental) con el propósito de encontrar otros compuestos con actividad antimicobacteriana. De tal forma que el análisis cromatográfico minucioso de esta fracción permitió la obtención de los compuestos 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano y 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo, este último un producto natural novedoso.

Así mismo, para completar el estudio fitoquímico de la especie, se llevó a cabo el análisis de las fracciones inactivas primarias F7 y F8 que no habían sido investigadas. De la fracción F7 fue posible obtener otro producto novedoso caracterizado como el 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo. El estudio de la fracción F8 no condujo a la separación de compuesto alguno.

Por último, se prepararon los aceites esenciales de las hojas y tallo de la especie, con la finalidad de determinar su composición, actividad antimicobacteriana y obtener los perfiles cromatográficos de utilidad para el control de calidad de *P. sanctum*, y contribuir así a la posterior realización de una monografía farmacopeica de esta especie tan utilizada en las prácticas médicas populares de México.

4.1 Caracterización del 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano de la fracción activa F4-3-IV.

Los análisis de CG acoplado a EM (Figura 9), infrarrojo y RMN-¹H indicaron que este producto era idéntico al 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil)-hexadecano (25), metabolito antimicobacteriano (CMI: 6.25 µg/mL) obtenido anteriormente por Morales (2003). Como los cristales formados fueron apropiados para su análisis por difracción de rayos X se procedió a la verificación de la estructura del compuesto

por este método analítico. En la Figura 10 se aprecia una vista estereoscópica del compuesto. De esta manera, se confirmó inequívocamente la estructura del producto natural 2-oxo-16-(3',4' metilendioxfenil)-hexadecano (25).

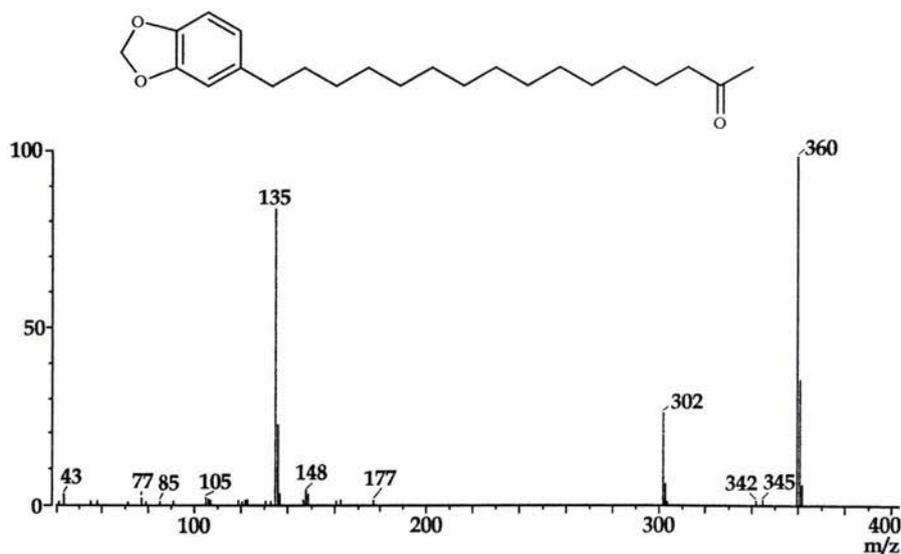


Figura 9. Espectro de masas modalidad IE del compuesto 2-oxo-16-(3',4' metilendioxfenil)-hexadecano (25).

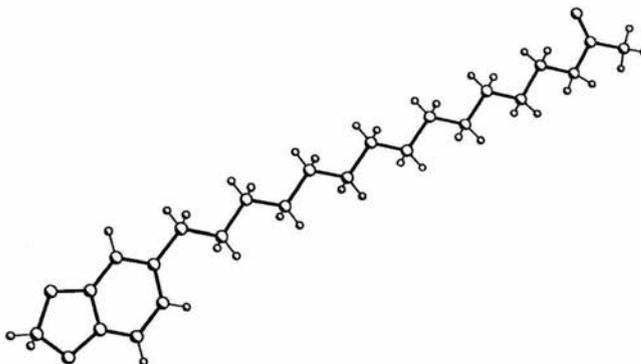


Figura 10. Vista estereoscópica del compuesto 2-oxo-16-(3',4' metilendioxfenil)-hexadecano (25).

4.2 Caracterización del 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).

El compuesto 33 se obtuvo como un aceite incoloro. Su fórmula molecular se estableció por espectrometría de masas como $C_{21}H_{40}O_3$. La fórmula molecular calculada permite un índice de insaturación de dos.

Las constantes espectroscópicas y espectrométricas del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33) se resumen en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Constantes espectroscópicas (UV e IR) y espectrométricas del 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).

UV $\lambda_{\text{máx}}$	IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1}	EM/IE m/z
275	2924, 2853, 1744, 1456, 1436, 1345, 1286, 1251, 1197, 1089, 1074, 1048, 721	340 $[M^+]$ (19.3), 322 (6.4), 267 (19.3), 248 (6.4), 222 (3.2), 185 (4.8), 157 (100), 129 (30.6), 125 (62.9), 116 (62.9), 97 (20.9), 69 (14.5), 43 (6.45)

El espectro en el IR presenta bandas de absorción asociadas con la presencia de un grupo carbonilo de éster (1744) y con la presencia de una cadena alquílica (2924, 1456, 1436 y 721 cm^{-1}).

El análisis de los espectros de RMN permitió establecer la presencia de una cadena alquílica lineal, un grupo carbonilo de éster, un grupo metoxilo y un ciclo de tetrahidropirano. Las características más significativas de los espectros de RMN y otras evidencias espectroscópicas se resumen a continuación:

- 1) La función éster quedó plenamente identificada no sólo a través de la RMN [δ_{H} 3.61 (s, OCH₃)/ δ_{C} 51.48 y δ_{C} 172.01] sino también por la pérdida de un fragmento de 59 uma en el espectro de masas. Este fragmento corresponde al radical COOMe (Silverstein, 1991).
- 2) La presencia de un sistema ABX en $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 2.39 (dd, $J = 15, 5.7$ Hz, H-2a)/41.61, 2.55 (dd, $J = 15, 8.1$ Hz, H-2b)/41.61 y 3.74, (dddd, $J = 10.8, 5.4, 3.0, 1.8$ Hz)/74.44 (esta última señal correspondiente a un metino unido a una función oxigenada), así como el fragmento con una m/z de 157 uma (pico base) en el espectro de masas permiten proponer la existencia en la molécula de la unidad estructural que se indica en la Figura 11; este fragmento incluye un anillo de pirano y satisface el número de insaturaciones requeridas por la fórmula molecular.

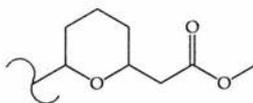
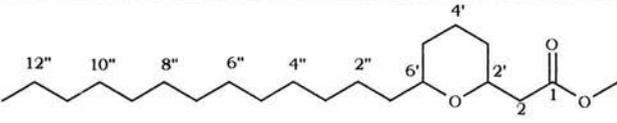


Figura 11. Estructura parcial I

- 3) Las absorciones observadas en δ_{H} 1.25 sa (H-1''– H-12'')/ δ_{C} 31.91-22.67 y δ_{H} 0.88 t ($J = 6.9$ Hz, H-13'')/ δ_{C} 14.09 indican la presencia de una cadena alquílica lineal en la molécula.

Cuadro 12. Datos de RMN del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).

Posición		
	δ_H	δ_C
CH ₃ O	3.61	51.48
1	-	172.01
2a	2.39 dd (15, 5.7)	41.61
2b	2.55 dd (15, 8.1)	41.61
2'	3.74 dddd (10.8, 5.4, 3.0, 1.8)	74.44
3'	1.85-1.13 m	31.91- 22.67
4'	1.85-1.13 m	31.91- 22.67
5'	1.85-1.13m	31.91- 22.67
6'	3.27 tdd (10.7, 7.8, 1.5)	78.12
1''-12''	1.25 sa	31.91-22.67
13''	0.88 t (6.9)	14.09

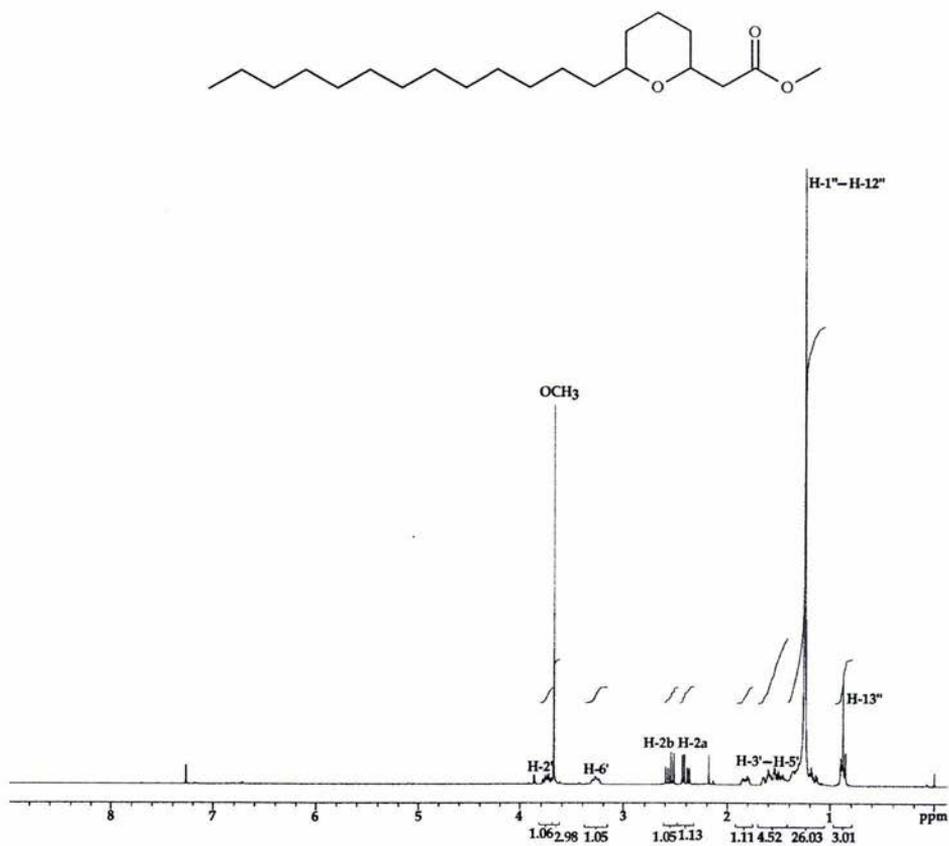


Figura 12. Espectro de RMN-¹H del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).

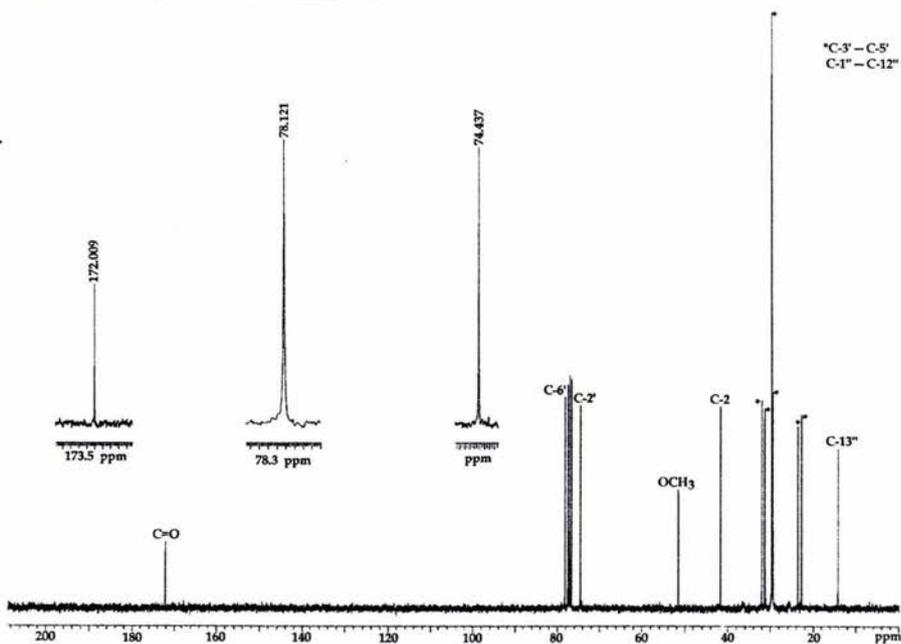


Figura 13. Espectro de RMN-¹³C del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).

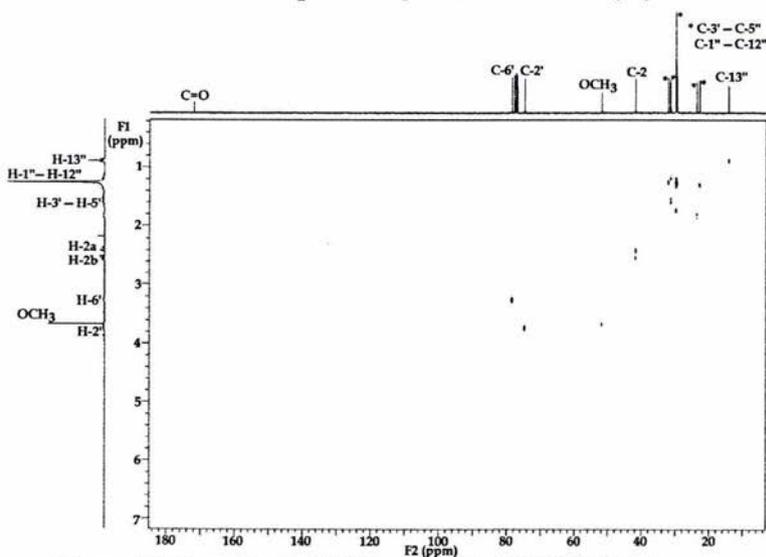


Figura 14. Espectro de RMN modalidad HETCOR del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).

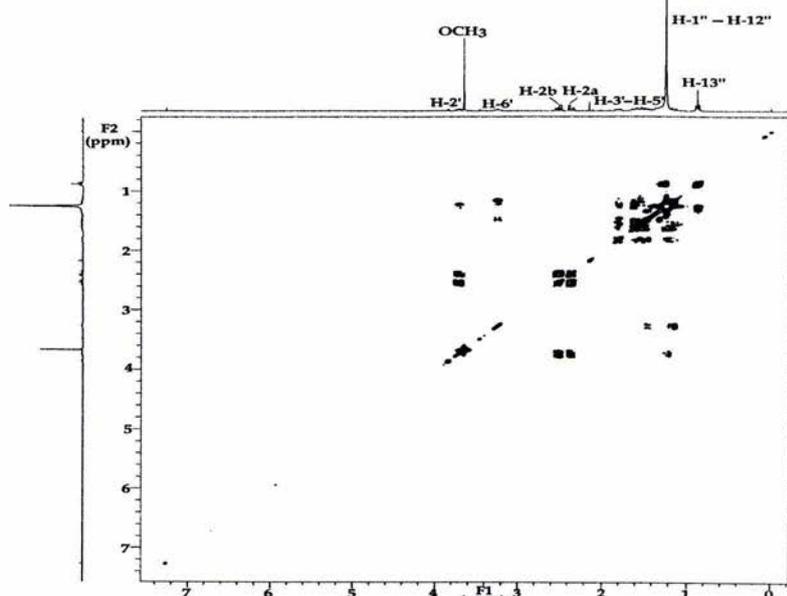


Figura 15. Espectro de RMN modalidad COSY del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).

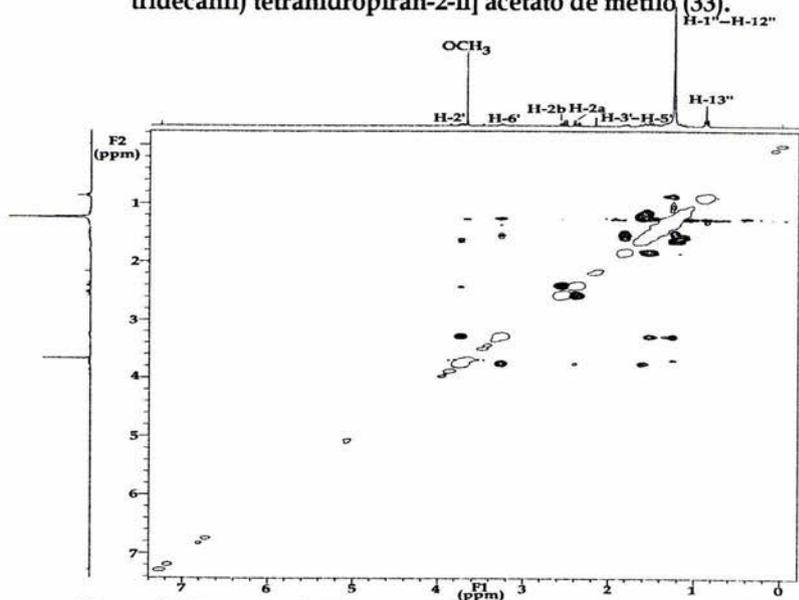


Figura 16. Espectro de RMN modalidad NOESY del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).

De acuerdo con las evidencias presentadas, el compuesto novedoso se identificó como el 2-[[6-tridecanil] tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33). El patrón de fragmentación observado en el espectro de masas (Figura 17) confirma esta propuesta. El pico base se aprecia en una relación m/z 157 una y se genera por una ruptura inductiva alfa al oxígeno heterocíclico del enlace C-6' – C-1''; el fragmento con una relación m/z 125 una es abundante y se genera a partir del fragmento de m/z 157 una, mediante la liberación de metanol y la formación del ion oxonio en C-1. Por último, el fragmento en m/z 267, se forma por la ruptura homolítica entre C-2 y C-2'.

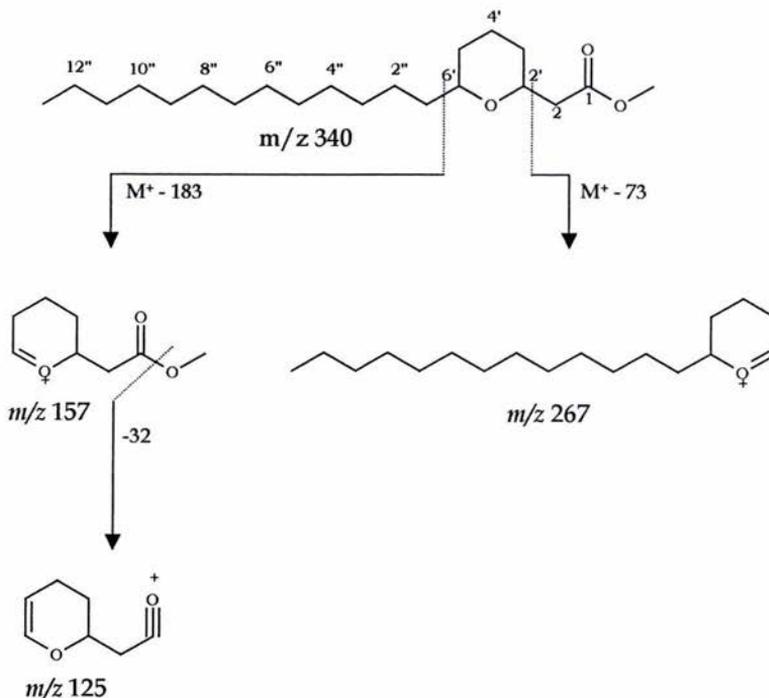


Figura 17. Patrón de fragmentación del compuesto 2-[[6-tridecanil] tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).

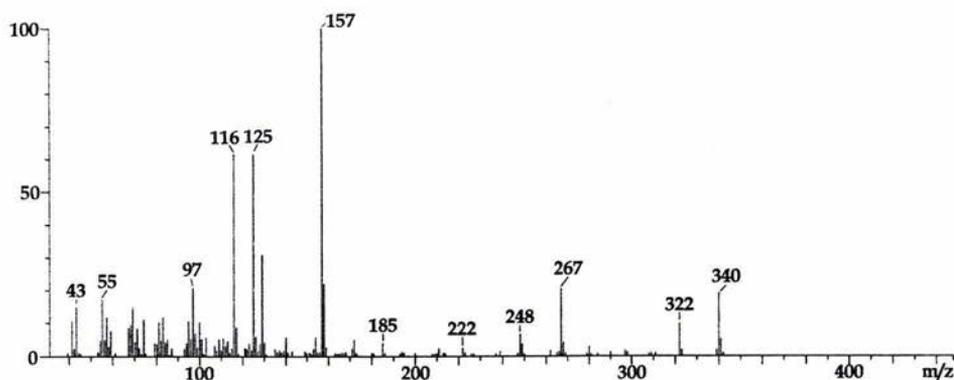


Figura 18. Espectro de masas modalidad IE del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).

4.3 Caracterización del 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo (32).

El compuesto se obtuvo como un aceite incoloro y presentó la misma fórmula y peso molecular que el compuesto 33. Las constantes espectroscópicas y espectrométricas del compuesto 2-[(5 tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo (32) se resumen en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Constantes espectroscópicas (UV e IR) y espectrométricas del 2-[(5-tetradecanil)-tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo (32).

UV $\lambda_{\text{máx}}$	IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1}	EM/IE m/z
271	2924, 2853, 1743, 1464, 1437, 1376, 1295, 1197, 1171, 1071, 721	340 [M^+] (4.9), 322 (3.27), 267 (16.3), 240 (1.6), 143 (100), 116 (73.7), 111 (50.8), 55 (18), 43 (14.75)

El espectro en el IR presenta también bandas de absorción asociadas con la presencia de un grupo carbonilo de éster (1741) y con la presencia de una cadena alquílica (2924, 1464, 1437 y 721 cm^{-1}).

Al igual que en el caso del compuesto 33 el análisis de los espectros de RMN y masas permitieron establecer la presencia de una cadena alquílica lineal, un grupo carbonilo de éster, un grupo metoxilo y un núcleo de tetrahidrofurano. Entonces, la única diferencia entre este producto y el compuesto 33, es la naturaleza del anillo heterocíclico. Al igual que en el compuesto 33 la función éster quedó plenamente identificada no sólo a través de la RMN [δ_{H} 3.69 (s, OCH_3)/ δ_{C} 51.56 y δ_{C} 171.77], sino también por la pérdida de un fragmento con una relación de m/z de 59 uma. La cadena alquílica se evidenció por las absorciones observadas en δ_{H} 1.25 (sa, H-1'' – H-13'')/ δ_{C} 32-22 y δ_{H} 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, H-14'')/ δ_{C} 14.09. Así mismo, en δ_{H} 2.46 (dd, $J = 15.3, 6.6$ Hz, H-2a), 2.64 (dd, $J = 15.3, 6.9$ Hz, H-2b) y δ_{H} 4.22 (m, H-2') se observó un sistema ABX. Este conjunto de señales y el pico en m/z 143 permitieron proponer la existencia del fragmento estructural que se ilustra en la Figura 19, el cual incluye un anillo de tetrahidrofurano. Las señales en $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 2.01 (m, H-3')/31.01 y 1.58 (m, H-4')/30.80 corresponden a los dos metilenos del ciclo.

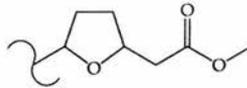
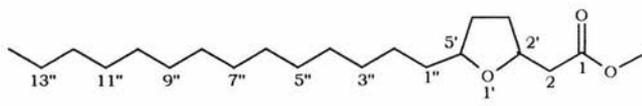


Figura 19. Estructura parcial II.

Cuadro 14. Datos de RMN del compuesto 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo (32).

Posición		
	δ_H	δ_C
CH ₃ O	3.69 s	51.56
1	-	171.77
2a	2.46 dd (15.3, 6.6)	41.01
2b	2.64 dd (15.3, 6.9)	41.01
2'	4.22 m	75.04
3'	2.01 m	31.01
4'	1.58 m	30.80
5'	3.83 m	79.89
1''-13''	1.25 s	32-22
14''	0.88 t (6.9)	14.09

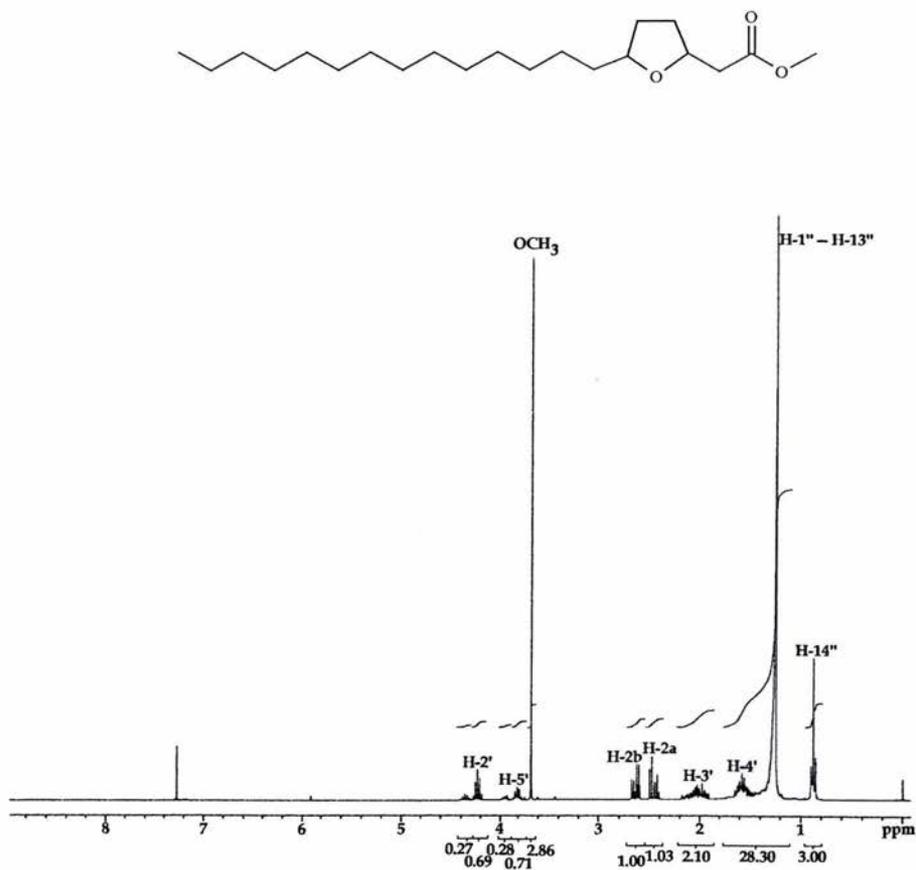


Figura 20. Espectro de RMN-¹H del compuesto 2-[(5-tetradecil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo (32).

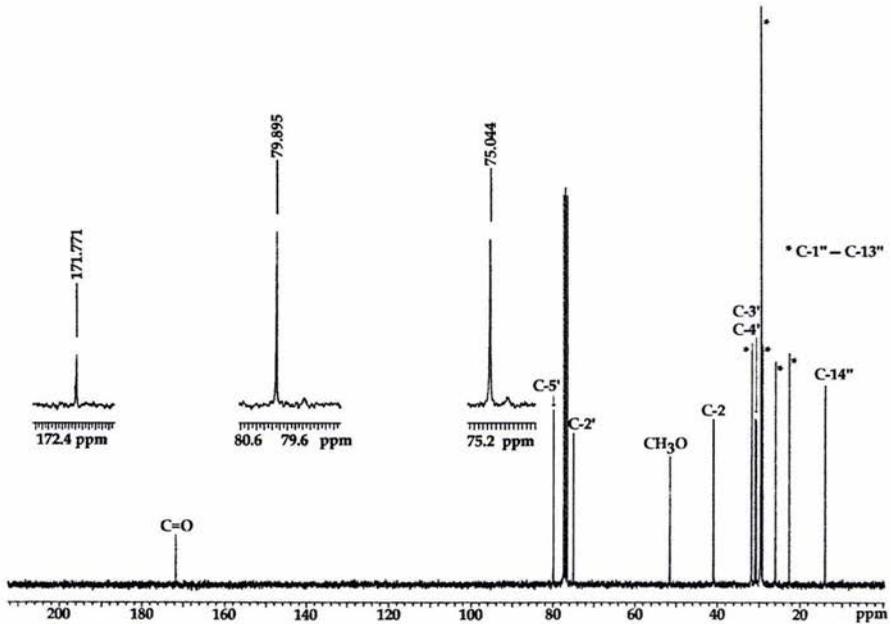


Figura 21. Espectro de RMN-¹³C del compuesto 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo (32).

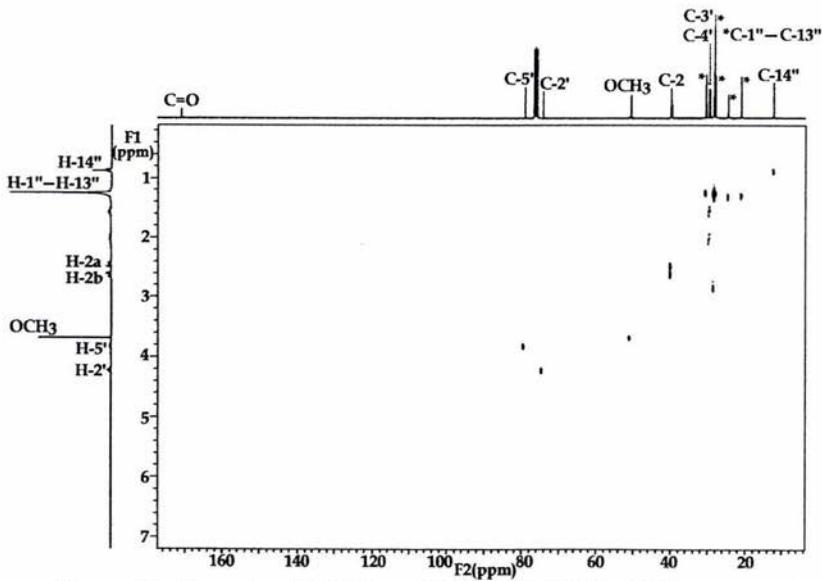


Figura 22. Espectro de RMN modalidad HETCOR del compuesto 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo (32).

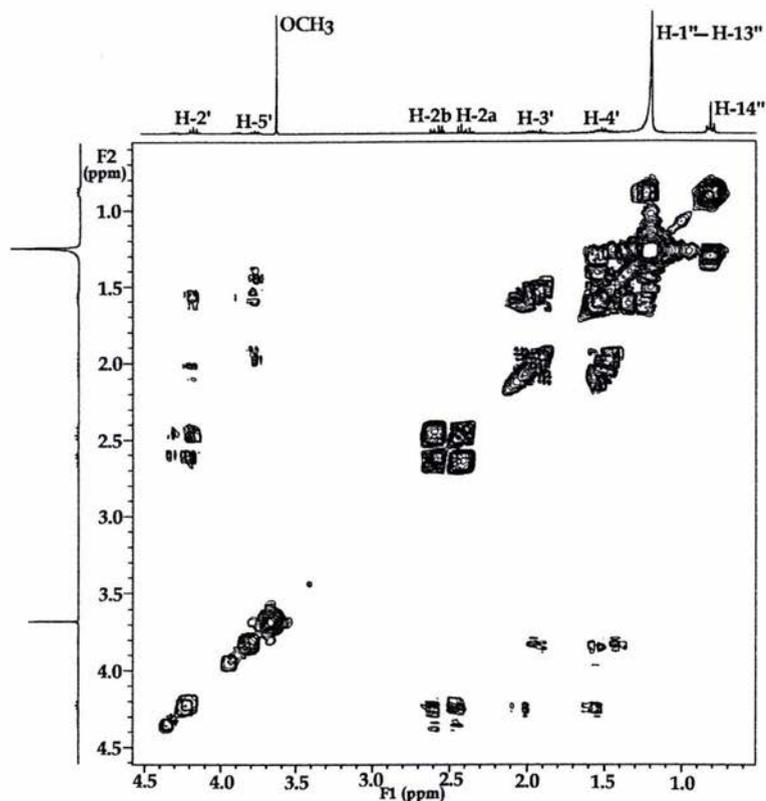


Figura 23. Espectro de RMN modalidad COSY del compuesto 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo (32).

En la Figura 24 se presenta el patrón de fragmentación del compuesto 32. El pico base con una m/z de 143 uma se genera de la misma manera que el pico de m/z 157 en el compuesto 33, es decir, por la pérdida de la cadena alquílica debida a una ruptura homolítica entre C-5' y C-1''. El fragmento en una relación de m/z 111 uma constituye un pico abundante que se genera a partir del fragmento de m/z 143 uma. Un fragmento menos abundante fue el de m/z 267, y se forma por la ruptura homolítica entre C-2 y C-2'. De acuerdo con las evidencias presentadas, el compuesto novedoso se identificó como el 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo (32).

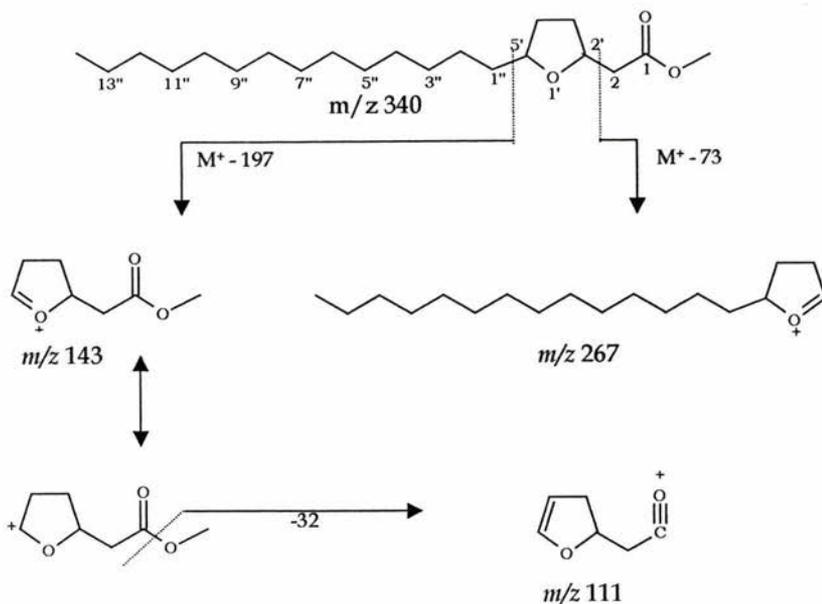


Figura 24. Patrón de fragmentación del compuesto 2-[(5-tetradecanil) tetrahydrofuran-2-il] acetato de metilo (32).

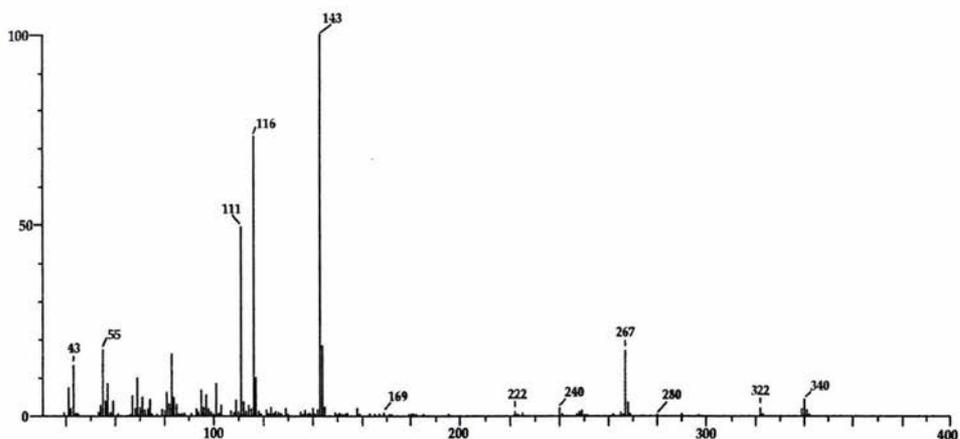


Figura 25. Espectro de masas modalidad IE del compuesto 2-[(5-tetradecanil) tetrahydrofuran-2-il] acetato de metilo (32).

4.4 Composición de los aceites esenciales de las distintas partes de *Piper sanctum*.

Los aceites esenciales se prepararon a partir de hojas frescas, tallos frescos y tallos secos de *P. sanctum* y fueron analizados por CG-EM; al comparar los patrones de fragmentación de los componentes con aquellos de los compuestos de referencia incluidos en la librería NIST se lograron identificar cuatro compuestos para el caso de las hojas y del tallo frescos y tres para el aceite de tallo seco. En el Cuadro 15 se indican los compuestos identificados, su tiempo de retención y la proporción en que se encuentran en los aceites. En las Figuras 26, 27 y 28 se indican los cromatogramas correspondientes a cada esencia.

Cuadro 15. Compuestos identificados en los aceites esenciales de *P. sanctum*.

Material vegetal	Picos	Compuestos	TR (minutos)	%
Hojas frescas	1	γ - terpineno (38)	4.67	2.62
	2	α - terpineno (37)	5.03	3.44
	3	Safrol (34)	7.45	84.48
	4	Miristicina (36)	9.20	0.97
Tallo fresco	1	3-careno (39)	7.23	0.22
	2	Safrol (34)	9.77	75.87
	3	Isosafrol (35)	10.40	1.03
	4	Miristicina (36)	11.13	5.09
Tallo seco	1	Safrol (34)	9.53	78.16
	2	Isosafrol (35)	10.23	2.79
	3	Miristicina (36)	11.27	2.83

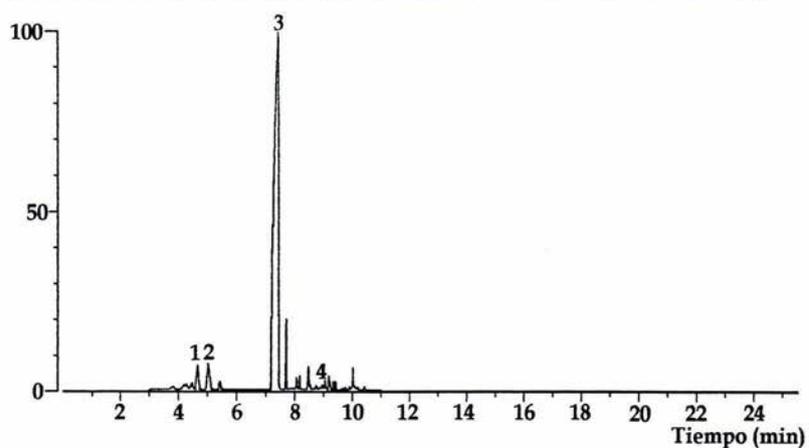


Figura 26. CG del aceite esencial de hojas frescas.

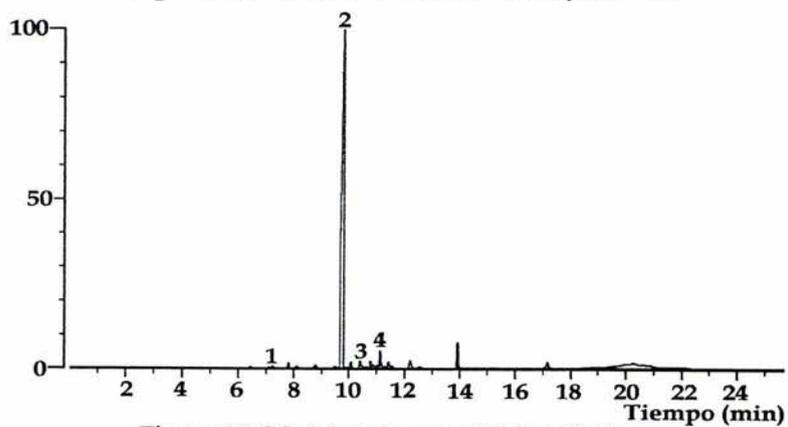


Figura 27. CG del aceite esencial de tallo fresco.

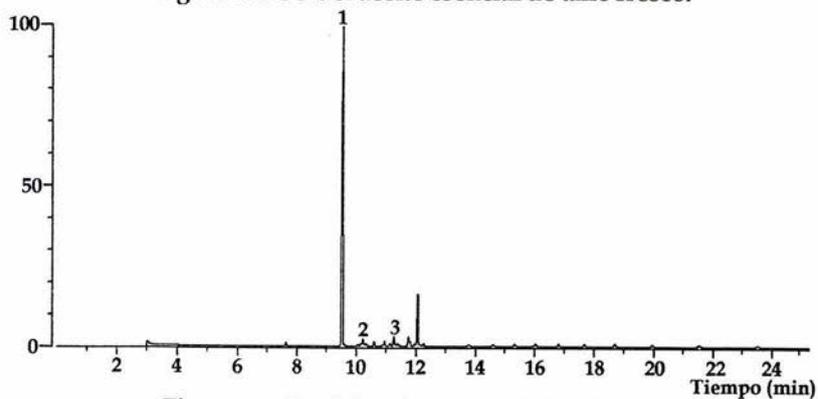


Figura 28. CG del aceite esencial de tallo seco.

El análisis comparativo de los resultados del estudio por CG-EM indicó que el safrol (34) es el constituyente mayoritario de las esencias de las hojas y tallo de *P. sanctum*. Así mismo, la miristicina esta presente en los tres aceites; sin embargo, los otros compuestos detectados son distintos. En el caso de las hojas se encontró α y γ terpineno (37 y 38) y en el tallo se encontró isosafrol (35) y 3-careno (39). Por otra parte, la única diferencia entre el aceite del tallo seco y del fresco fue la cantidad de miristicina (36) y la ausencia de 3-careno (39) en el aceite del primero. En la Figura 29 se ilustran las estructuras de los compuestos identificados y en el Cuadro 16 los rendimientos de la preparación de las esencias.

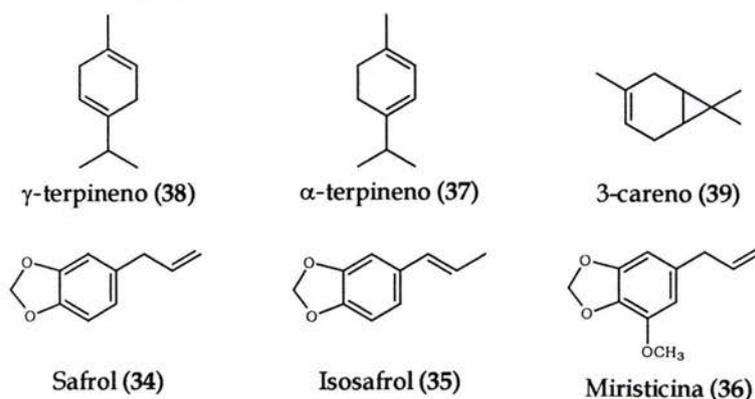


Figura 29. Compuestos determinados en los aceites esenciales.

Cuadro 16. Rendimientos obtenidos en la preparación de los aceite esenciales.

Aceite	Rendimiento (%)
Hojas frescas	0.91
Tallo fresco	0.18
Tallo seco	0.19

4.5 Perfiles cromatográficos por CLAR de los aceites esenciales.

Para la determinación de los perfiles cromatográficos por CLAR se analizaron distintas condiciones y las mejores se resumen en Cuadro 17. Así

mismo, los mejores perfiles obtenidos para las esencias se ilustran en las Figuras 30, 31 y 32.

Cuadro 17. Condiciones óptimas para el perfil de los aceites esenciales de *Piper sanctum*.

Material vegetal	Hojas	Tallo	Tallo seco
Flujo (mL/min.)	0.35	0.35	0.35
Columna	FR analítica	FR analítica	FR analítica
Fase móvil	CH ₃ CN-H ₂ O	CH ₃ CN-H ₂ O	CH ₃ CN-CH ₃ OH-H ₂ O
Proporción	7:3	7:3	6:1:3

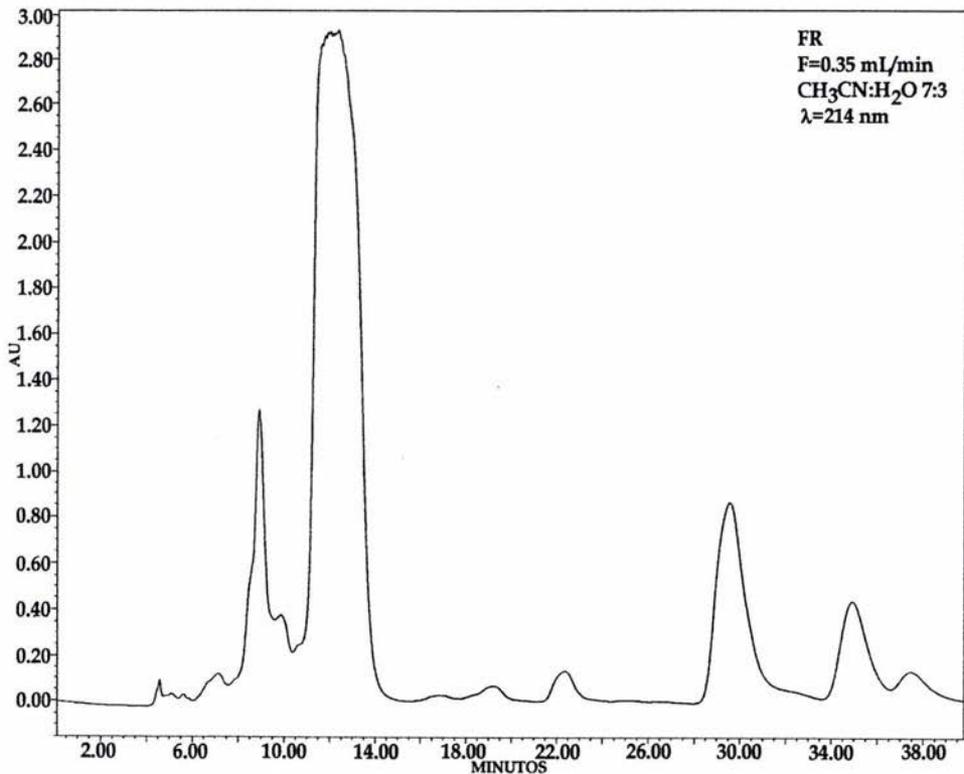


Figura 30. Perfil cromatográfico del aceite esencial de las hojas frescas.

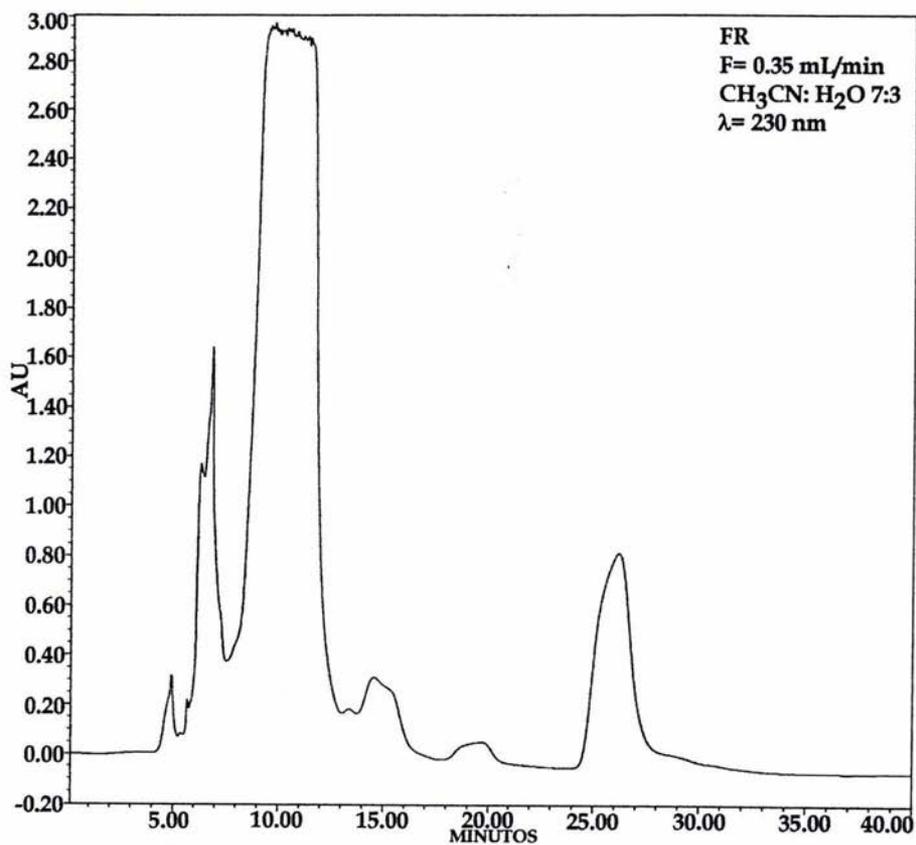


Figura 31. Perfil cromatográfico del aceite esencial de tallo fresco.

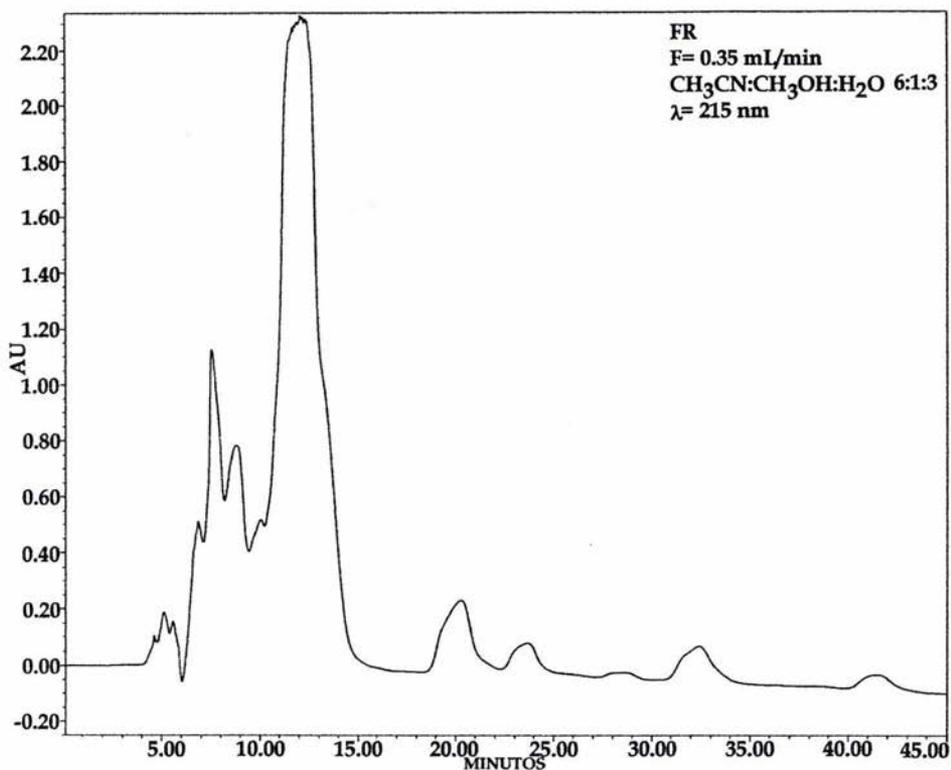


Figura 32. Perfil cromatográfico del aceite esencial de tallo seco.

4.6 Aislamiento del safrol (34).

El aceite esencial de las hojas fue sometido a un proceso de separación por CLAR empleando las condiciones indicadas en la sección experimental. Este proceso permitió el aislamiento de 3.9 mg de safrol a partir de 7 mg de aceite con un rendimiento del 0.54%.

4.7 Caracterización del safrol (34).

Las constantes espectroscópicas y espectrométricas del safrol fueron comparadas con bases de datos computarizadas. En el caso del espectro de masas, éste se comparó con los compuestos de la librería NIST, mientras que los espectros de RMN fueron idénticos a los de diversas bases de datos (Colección Sadler y Aldrich). Igualmente los espectros generados con el programa ACD/ HNMR Predictor y ACD/CNMR resultaron idénticos a los del compuesto asilado.

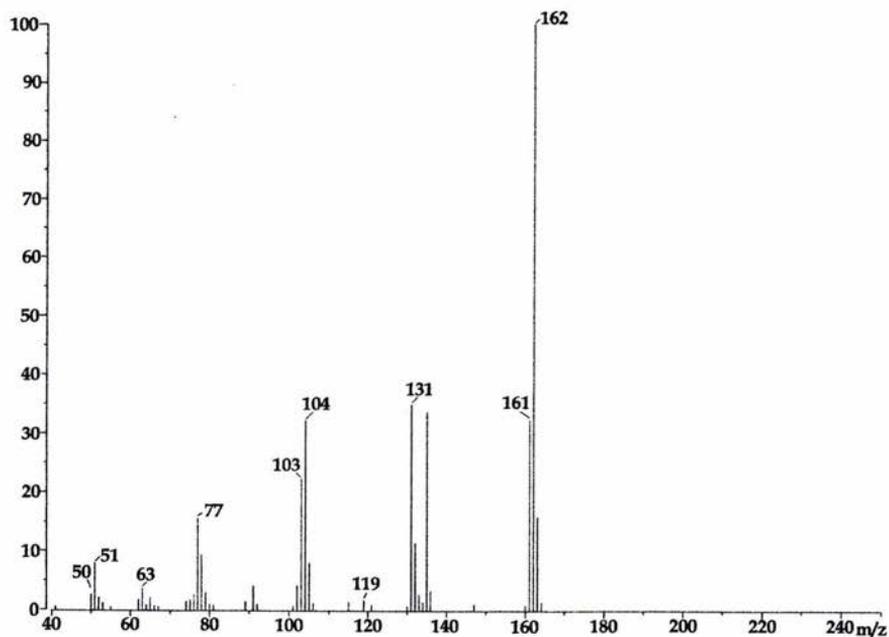
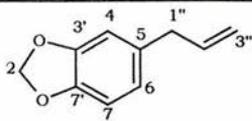
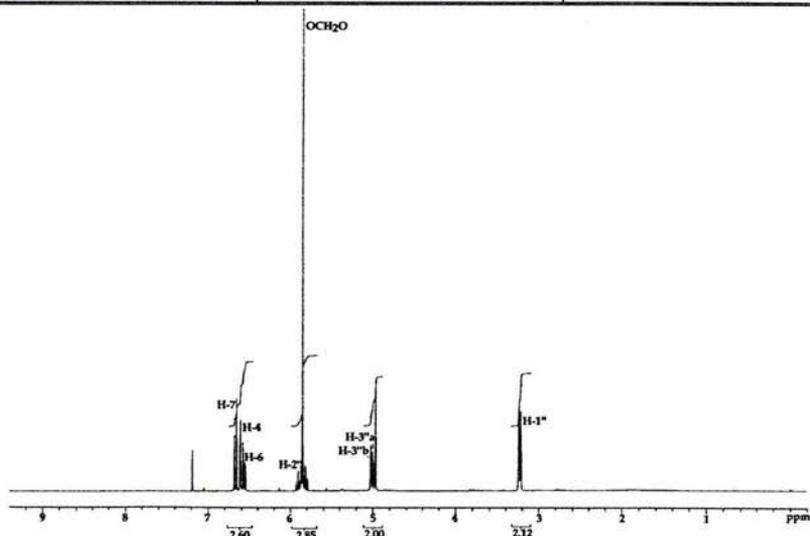


Figura 33. Espectro de masas modalidad IE del safrol (34).

Cuadro 18. Datos de RMN del safrol (34).

Posición		
	δ_H	δ_C
2	5.85 (sa)	100.78
3'	-	147.61
4	6.61 (dd, 1.2, 0.6)	108.15
5	-	133.85
6	6.56 (dd, 7.8, 1.5)	121.28
7	6.67 (dd, 7.8, 0)	109.08
7'	-	145.79
1''	3.23 (d, 6.6)	39.89
2''	5.85 (ddt, 18, 10.2, 6.6)	137.58
3a''	4.99 (dd, 3.3, 1.5)	115.67
3b''	5.02 (dd, 3.3, 1.8)	115.67

Figura 34. Espectro de RMN-¹H del safrol (34).

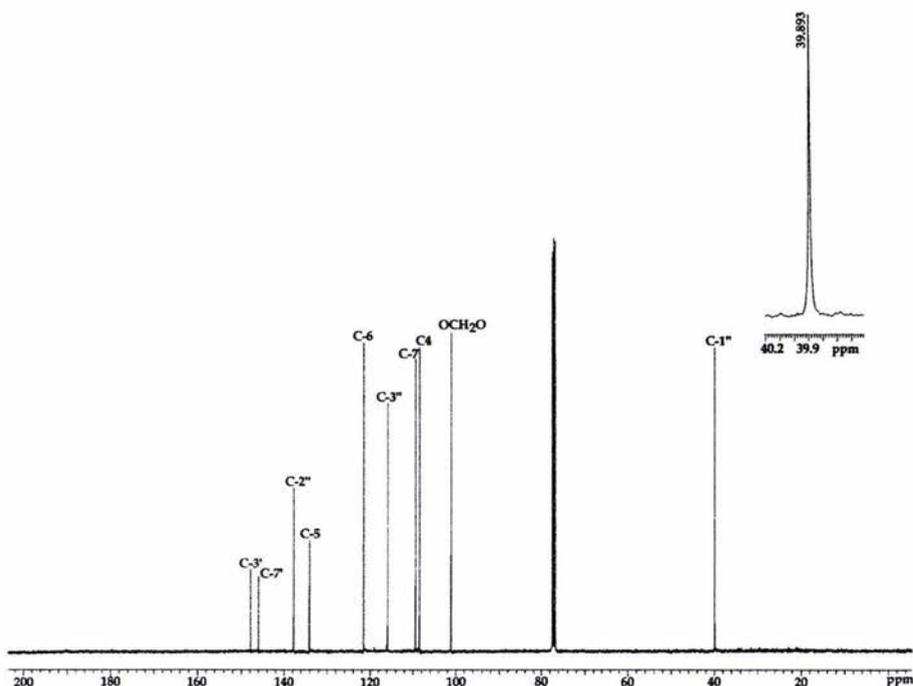


Figura 35. Espectro de RMN-¹³C del safrol (34).

4.8 Actividad antimicrobacteriana de los aceites, el safrol (34), y los compuestos naturales novedosos 2-[(5-tetradecanil) tetrahydrofuran-2il] acetato de metilo (32) y el 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).

El potencial antimicrobacteriano de aceites esenciales y productos aislados se determinó mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* empleando el método MABA (Collins y Franzblau, 1997). Los resultados se expresan en términos de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del crecimiento de *M. tuberculosis*. Se considera como un compuesto activo aquel que presenta una CMI ≤ 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Cantrell *et al.*, 1998).

Los aceites y los compuestos 32, 33 y 34 presentaron una CMI > 128 µg / mL, por lo que se considera que no tienen actividad antimicobacteriana.

4.9 Actividad antibacteriana de los aceites.

La evaluación de la actividad antibacteriana contra un panel de bacterias Gram positivo (*S. aureus* y *B. subtilis*) y Gram negativo (*E. coli*, *S. typhi* y *P. aeruginosa*), se realizó por el método de difusión en agar (Linton, 1983), encontrándose que los aceites no presentan actividad contra estas bacterias.

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. El estudio complementario de las fracciones activas e inactivas provenientes del extracto antimicrobiano de las hojas de *P. sanctum* condujo al aislamiento de 2 metabolitos novedosos: 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33) y 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo (32), caracterizados por métodos espectroscópicos y espectrométricos. Ninguno de estos productos presentó actividad antimicrobiana.
2. El análisis de los aceites esenciales de hojas y tallo de *P. sanctum* permitió determinar que el safrol (34) es el constituyente mayoritario de las tres esencias analizadas. Este producto y los aceites no presentaron actividad contra *M. tuberculosis* (CMI > 128 µg / mL). Otros constituyentes presentes en los aceites fueron los fenilpropanoides: isosafrol (35) y miristicina (36), así como, los monoterpenoides: α - terpineno (37), γ - terpineno (38) y 3- careno (39). Cabe destacar que las esencias presentaron un perfil metabólico distinto dependiendo de la parte vegetal utilizada para su preparación.
3. Los aceites no presentaron actividad antimicrobiana contra un panel de bacterias Gram positivo (*S. aureus* y *B. subtilis*) y Gram negativo (*E. coli*, *S. typhi* y *P. aeruginosa*).
4. Se logró establecer la conformación en estado sólido del metabolito antimicrobiano (CMI = 6.25 µg / mL) 2-oxo-16- (3',4'-metilendioxfenil) hexadecano (25) mediante difracción de rayos X.

VI. PERSPECTIVAS

1. Mejorar los perfiles cromatográficos de los aceites esenciales de la especie.
2. Preparar aceites esenciales de nuevas recolectas de material vegetal y compararlos con las esencias ya descritas en este estudio.
3. Validar farmacológicamente la eficacia de la especie para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales en las prácticas médicas populares de México.

VII. BIBLIOGRAFÍA

📖 Libros y revistas:

- Ames, B., Profet, M. And Gold, L.S. 1990. "Dietary pesticides (99.99% all natural)". *Medical Science*. 87. p.p. 7777-7781.
- Argueta, A., Cano, L. y Rodarte, M. 1994. *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Tomo II. Instituto Nacional Indigenista. México. pág. 813.
- Cantrell, C., Fischer, N., Urbatsch, L., McGuire, M. and Franzblau. 1998. "Antimycobacterial crude plant extracts from South, Central and North America". *Phytomedicine*. 5. (2). p.p. 137-145.
- Chen, YC., Chen JJ., Chang, YL., Teng, CM., Lin, WY., Wu, CC. and Chen, IS. 2004. "A New Aristolactam Alkaloid and Anti-Platelet Aggregation Constituents from *Piper taiwanense*". *Planta Medica*. 70. p.p. 174- 177.
- Collins, L. And Franzblau, S. 1997. "Microplate Alamar Blue Assay versus BACTER 460 system for high throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41. p.p. 1004-1009.
- De Abreu, A.M., Sevegnani, L., Machicado, A.R., Zimermann, D. and Rebelo, R.A. 2002. "*Piper mikianianum* (Kunth) Steudel from Santa Catarina, Brazil- a New Source of Safrole". *Journal of Essential Oils of Research*. 14. p.p. 361-363.
- Dorman, H.J. and Deans, S.G. 2000. "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils". *Journal of Applied Microbiology*. 88. p.p. 308-316.
- Espinosa, G. 1994. *Flora Medicinal Indígena de México*. Instituto Nacional Indigenista. México. pág. 1040.

- Guenther, T.M. and Luo, G. 2001. "Investigation of the role of the 2',3'-epoxidation pathway in the bioactivation and genotoxicity of dietary allylbenzene analogs". *Toxicology*. 160. p.p. 47- 58.
- Hänsel, R. Beer, C. and Schulz, J. 1973. "Ein neues kawapyron aus *Piper sanctum*". *Chemisch Berichte*. 106. p.p. 3119- 3120.
- Hänsel, R. and Leuschke, A. 1976. "Ein aporphinalkaloid aus *Piper sanctum*". *Phytochemistry*. 15. pág. 1323.
- Hänsel, R. and Pelter, A. 1971. "Cinnamylidenbutenolide aus *Piper sanctum*". *Phytochemistry*. 10. p.p. 1627- 1634.
- Hänsel, R., Pelter, A. , Schulz, J. and Hille, C. 1976. "Ein 5-Acetoxy-6-methoxykawain aus *Piper sanctum*". *Chemisch Berichte*. 109. p.p. 1617- 1624.
- Hänsel, R. and Schulz, J. 1982. "Ein neues kawainoderivat aus *Piper sanctum*". *Archives Pharmaceutica*. 315. pág. 147.
- Hänsel, R. and Schulz, J. 1982. "Ein glykolisches Piperolid aus *Piper sanctum*". *Archives Pharmaceutica*. 315. pág. 148-150.
- Hernández, D. L., Rodríguez J. M. García, D. et al. 2003. "Actividad antidermatofítica *in vitro* de aceites esenciales". *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 8. p.p. 1028-4796.
- Jiménez, A. 1997. Tesis de Doctorado. "*Swietenia humilis* Zuccarini (Melinaceae) y *Malmea depressa* (Baill.) R.E. Fries (Annonaceae)". Facultad de Química. UNAM. México.
- Johnson, B., Qiu, S.X., Zhang, S., Zhang, F., Burdette, J.E., Yu, L., Bolton, J. and van Breemen, R.B. 2003. "Identification of Novel Electrophilic Metabolites of *Piper methysticum* Forst. (Kava)". *Chemical Research of Toxicology*. 16. p.p. 733- 740.
- Koul, S.K., Taneja, S.C., Agarwal, V.K. and Dhar, K. 1988. "Minor amides of *Piper* species". *Phytochemistry*. 27. p.p. 3523- 3527.

- Linton, A.H. 1983. "Theory of Antibiotics Inhibition Zone Formation Disc. Sensitivity Methods and MIC Determinations". *Assessment of Antimicrobial Activity and Resistance*. Academic Press. E.E.U.U. p.p. 19-31.
- López, B. 2003. Tesis de Licenciatura. "Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos y compuestos puros derivados de hongos y especies vegetales de amplio uso en la Medicina Tradicional de México". Facultad de Química. UNAM. México.
- Martínez, M. 1979. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. Fondo de Cultura Económica. México. pág. 446.
- Martins, A.P., Salgueiro, L., Vila, R., Tomi, F., Cañigual, S., Casanova, J., Da Cunha, A. and Adzet, T. 1998. "Essential Oils from four *Piper* species". *Phytochemistry*. 49. p.p. 2019- 2023.
- Márquez, C., Lara, F., Esquivel, B. y Mata, R. 1999. *Plantas Medicinales de México II. "Composición, usos y actividad biológica"*. UNAM. México. pág. 99.
- Morales, I. 2003. Tesis de Maestría. "Compuestos aromáticos antimicrobianos de las hojas de *Piper sanctum* (Piperaceae)". Facultad de Química. UNAM. México.
- Morikawa, T., Matsuda, H., Yamaguchi, I., Pongpiriyadacha, Y. and Yoshikawa, M. 2004. "New Amides and Gastroprotective Constituents from the Fruti of *Piper chaba*". *Planta Medica*. 70. p.p. 152- 159.
- Mundina, M., Vila, R., Tomi, F., Gupta, M.P., Adzet, T., Casanova, J. and Cañigual, S. 1998. "Leaf essential oils of three panamanian *Piper* species". *Phytochemistry*. 47. p.p. 1277- 1282.
- Nair, M., Sommerville, J. and Burke, B. 1989. "Phenyl propenoids from roots of *Piper auritum*". *Phytochemistry*. 28. p.p. 654- 655.
- Organización Mundial de la Salud / Organización Panamericana de la Salud. 2002. Detener la TB, combatir la pobreza. Vol. 5. pág. 1.

- Parmar, V., Jain, S., Bisht, K., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O.D., Prasad, A.K., Wengel, J., Olsen, C.E. and Boll, P.M. 1997. "Phytochemistry of the genus *Piper*". *Phytochemistry*. 46. p.p. 597- 673.
- Pérez, O. 2003. Tesis de Maestría. "Compuestos biodinámicos de *Fluorensia cernua* (Asteraceae) y de los tallos de *Piper sanctum* (Piperaceae)". Facultad de Química. UNAM. México.
- Pino, J.A., Marbot, R., Beso, A. and Urquiola, A. 2004. "Essential Oils of *Piper peltata* (L.) Miq. And *Piper aduncum* L. From Cuba". *Journal of Essential Oils of Research*. 16. p.p. 124- 126.
- Pino, J.A., Rosado, A., Rodríguez, M. And Garcia, D. 1998. "Composition of Leaf Oil of *Piper auritum* H.B.K. Grown in Cuba". *Journal of Essential Oils of Research*. 10. p.p. 333- 334.
- Ranjith, H., Dharmaratne, W., Nannayakkara, N.P. and Khan, I.A. 2002. "Kavalactones from *Piper methysticum*, and their ¹³C NMR spectroscopic analyses". *Phytochemistry*. 59. p.p. 429-433.
- Silverstein, R.M. 1991. *Spectrometric identification of organic compounds*. 5a Edition. John Wiley Sons, Inc.
- Southwell, I.A. and Brophy, J.J. 1992. "Differentiation within the Australian *Tasmania* by essential oil comparison". *Phytochemistry*. 31. p.p. 3073- 3081.
- Torres, E. 2001. Tesis de Licenciatura. "Compuestos aromáticos simples de *Piper sanctum* (Piperaceae)". Facultad de Química. UNAM. México.
- Vargas, L., Velasco-Negueruela, A., Pérez-Alonso, M.J. and Palá- Paúl, J. 2004. "Essential Oil Composition of the Leaves and Spikes of *Piper carpunya* Ruiz et Pavón (Piperaceae) from Peru". *Journal of Essential Oils of Research*. 16. p.p. 122- 123.

- Von Poser, G.L., Röring, L.R., Henriques, A.T., Lamaty, G., Menut., Bessiere, J.M. 1994. "Aromatic Plants from Brazil. III, The Chemical Composition of *Piper gaudichaudianum* Kunth and *P. mikanianum* (Kunth) Steudel Essential Oils". *Journal of Essential Oils of Research* . 6. p.p. 337- 340.
- Wu, T., Huang, S., Lai, J., Teng, C., Ko, F. and Kuoh, C. 1993. "Chemical and antiplatelet aggregative investigation of the leaves of *Clausena excavata*". *Phytochemistry*. 32. p.p. 449- 451.

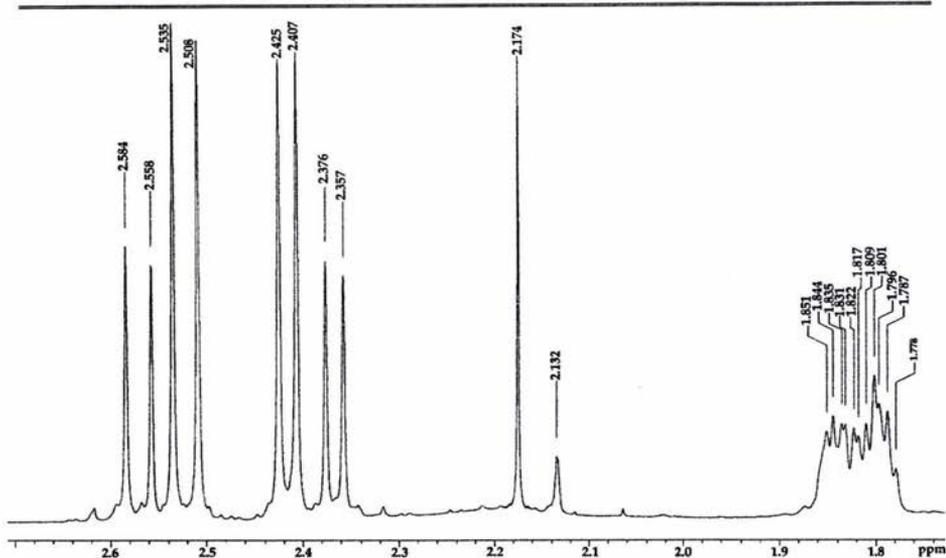
☞ Direcciones electrónicas:

- Anónimo. The British Pharmaceutical Codex. Pharmaceutical Press. 2004.
<http://www.ibiblio.org/herbmed/eclectic/bpc1911/piper-nigr.html>.
Guide to Essential Oils. <http://12121.hostinguk.com/Guide%20Oils.htm>

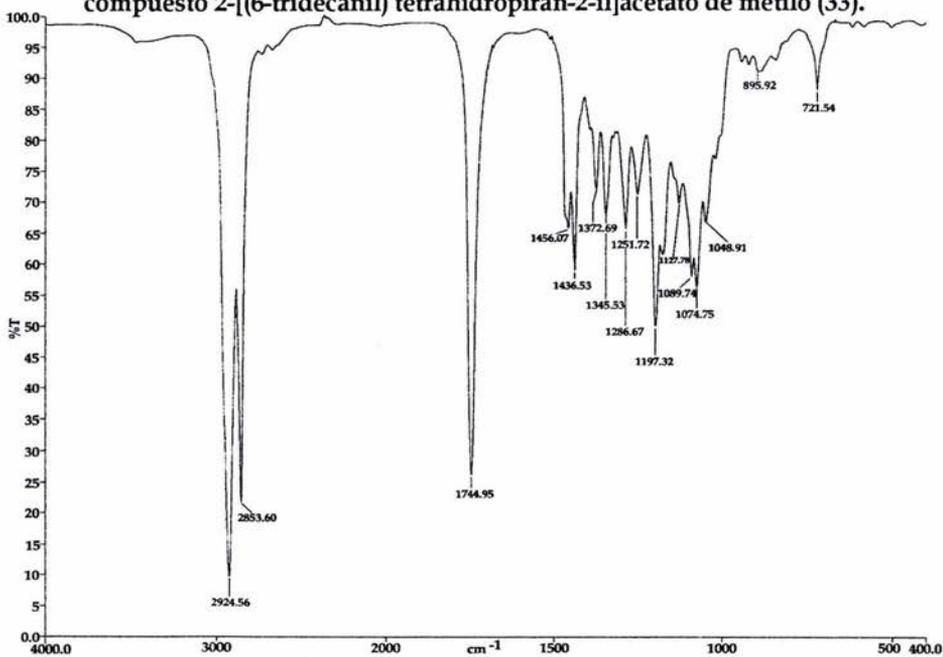
APÉNDICE

DE

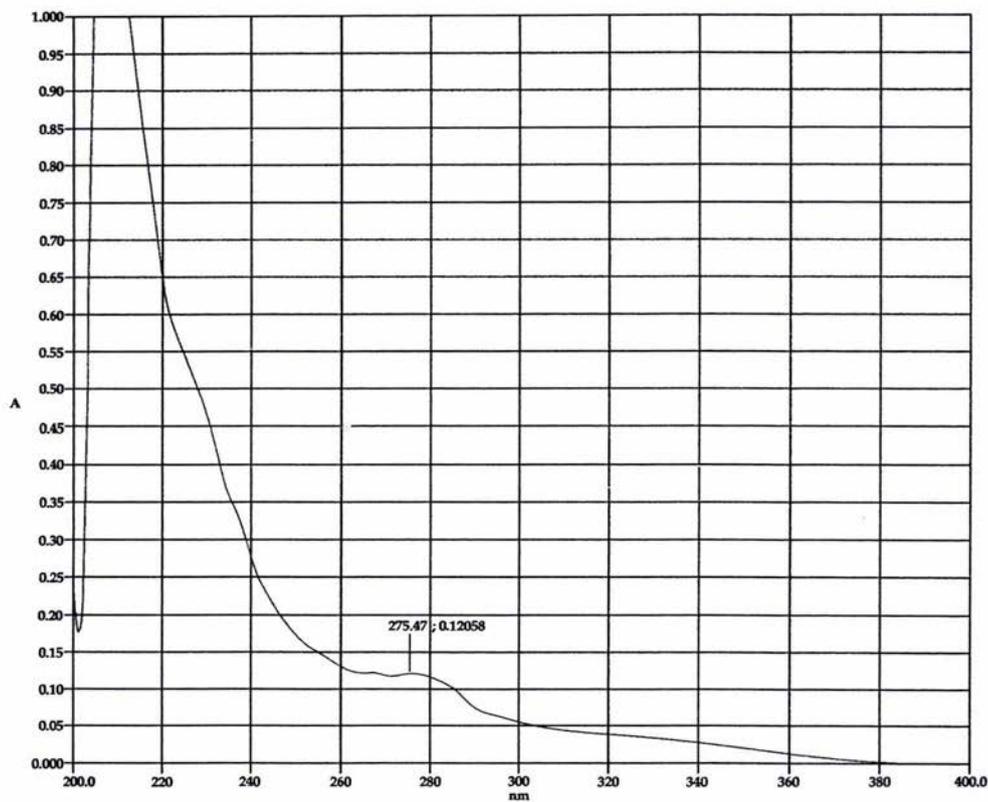
ESPECTROS



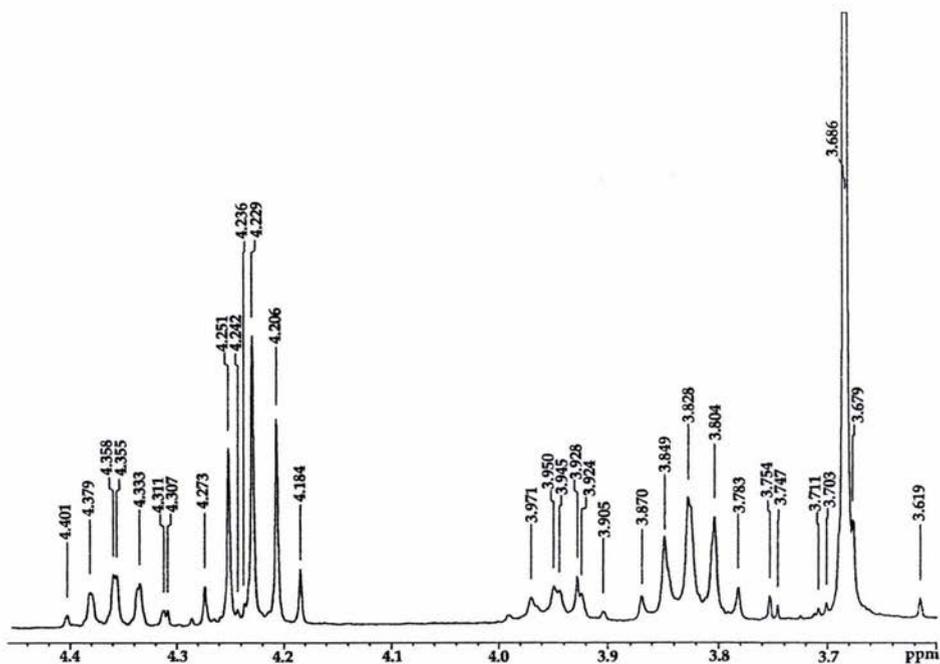
Espectro 1. Ampliación de la zona 3 – 2 ppm del espectro RMN-¹H del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il]acetato de metilo (33).



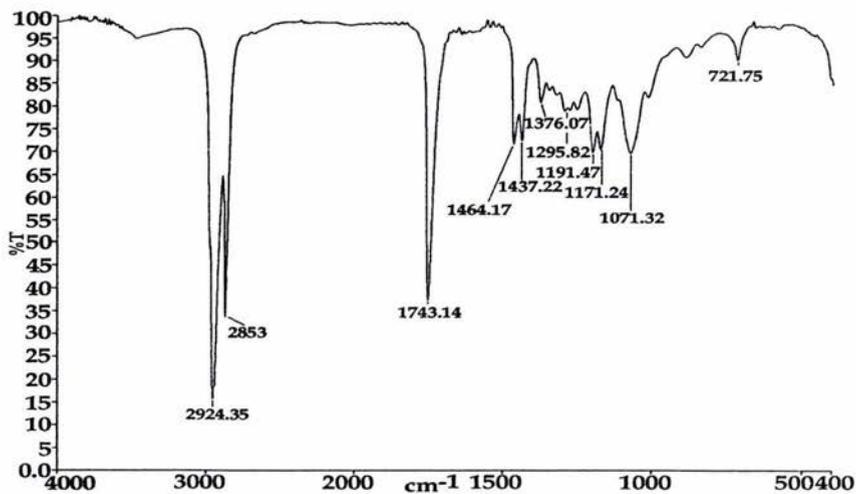
Espectro 2. Espectro en el IR del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).



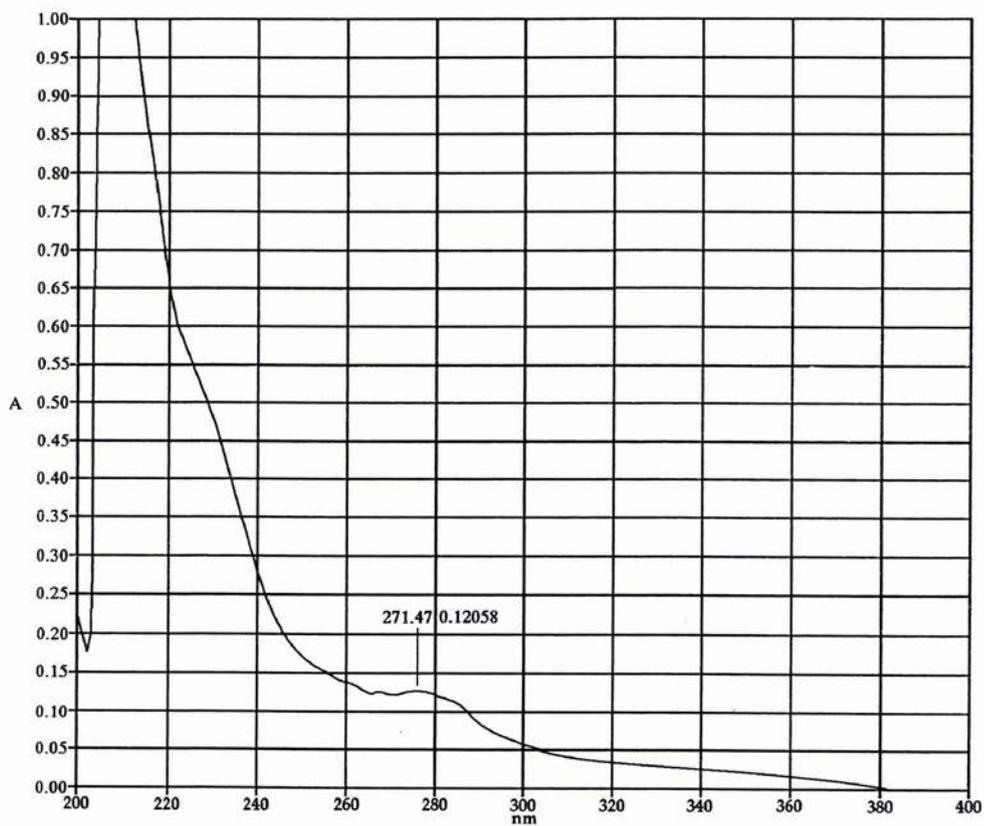
Espectro 3. Espectro en el UV del compuesto 2-[(6-tridecanil) tetrahidropiran-2-il] acetato de metilo (33).



Espectro 4. Ampliación de la zona 4 - 3 ppm del espectro RMN-¹H del compuesto 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il]acetato de metilo (32).



Espectro 5. Espectro en el IR del compuesto 2-[(5-tetradecanil) tetrahidrofuran-2-il] acetato de metilo (32).



Espectro 6. Espectro en el UV del compuesto 2-[(5-tetradecanil) tetrahydrofuran-2-il] acetato de metilo(32).