

00550
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**“COMPUESTOS BIODINÁMICOS DE *Flourensia cernua*
(Asteraceae) Y DE LOS TALLOS DE
Piper sanctum (Piperaceae).**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. NADINA OLGA PÉREZ QUIROZ



**Ciencias
Químicas**

TUTOR: Dra. Rachel Mata E.

AÑO: 2003

TESIS CON
FOLIO DE ORIGEN

A



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.

PAGINACION

DISCONTINUA

JURADO ASIGNADO

Presidente	M. en C. Ángela Sotelo López.
Vocal	Dr. José Roberto Villagómez Ibarra.
Secretario	Dr. Rogelio Pereda Miranda.
Primer suplente	Dra. María Alejandra Rojas Molina.
Segundo suplente	Dr. Federico del Río Portilla.

Sitio de realización de la tesis:

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

Sustentante:



Q.F.B. Nadina Olga Pérez Quiroz.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo profesional.

NOMBRE: Pérez Quiroz, Nadina

Olga

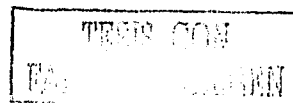
FECHA: 12 Febrero de 2003

FIRMA: [Handwritten Signature]

Asesor:



Dra. Rachel Mata Essayag



B

AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los proyectos: "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America" (NIH GRANTSUO1TWI**00316-03) y DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico) IN 200902.

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

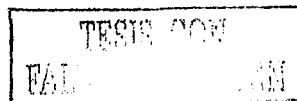
A la Q.F.B. Marisela Gutiérrez, por el registro de los espectros de IR, UV y rotación óptica, a la Q. Georgina Duarte, por el registro de los espectros de masas, a la Q.F.B. Rosa Isela Del Villar, por el registro de los espectros de RMN utilizados en el presente estudio; todos ellos personal de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM.

A la Dra. Rachel Mata Essayag, por su tutoría y dirección en la presente investigación y a la M. en C. Laura Acevedo por su asistencia técnica.

A los miembros del jurado designado para la revisión del manuscrito de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones.

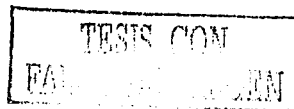
De manera especial, agradezco a las M. en C. Isabel y Blanca Rivero y al Dr. Fausto Rivero, por creer siempre en mí, por su cariño, apoyo y por esas palabras de aliento. En particular a la Maestra Isabel Rivero, por su eficiente asesoría técnica.

A mis compañeros de la maestría Sandra, Edgar y Gina por su transparente y sincera amistad.



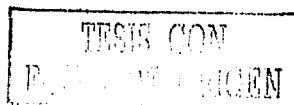
A mi padre, un ejemplo de fortaleza.

A Sergio Hernández, por todas las pruebas que hemos superado juntos.

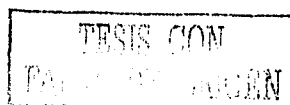


CONTENIDO.

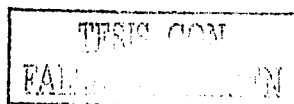
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Lista de Abreviaturas.....	vi
Lista de Cuadros.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Espectros del Apéndice II.....	x
I. ANTECEDENTES.....	1
1.1 Generalidades sobre la tuberculosis.....	1
1.2 Breves consideraciones sobre la búsqueda de nuevos agentes herbicidas.....	3
1.3 Antecedentes botánicos y etnobotánicos del género <i>Piper</i>	5
1.4 Antecedentes botánicos y etnobotánicos de la especie <i>Piper sanctum</i> (Miq.) Schl.....	7
1.4.1 Antecedentes químicos de la especie <i>Piper sanctum</i>	10
1.5 Antecedentes botánicos y etnobotánicos del género <i>Flourensia</i>	10
1.6 Antecedentes botánicos y etnobotánicos de la especie <i>Flourensia cernua</i> D.C.....	14
1.6.1 Antecedentes químicos de la especie <i>Flourensia cernua</i>	18
1.7 Consideraciones sobre el proyecto “Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America”.....	26
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	29
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	31
3.1 Procedimientos generales.....	31
3.1.1 Análisis cromatográficos.....	31
3.1.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.....	32
3.2 Recolección e identificación del material vegetal de las especies <i>Piper sanctum</i> (Miq.) Schl. y <i>Flourensia cernua</i> D.C.....	32
3.3 Ensayos biológicos.....	33
3.3.1 Determinación de la actividad antimicobacteriana para la especie <i>P. sanctum</i>	33



3.3.2 Determinación de la actividad fitotóxica para la especie <i>F. cernua</i>	34
3.3.2.1 Evaluación fitotóxica cuantitativa.....	34
3.3.2.2 Evaluación fitotóxica cualitativa.....	35
3.4 Preparación de los extractos orgánicos vegetales.....	35
3.5 Estudio Químico de la especie <i>Piper sanctum</i>	36
3.5.1 Fraccionamiento primario del extracto total de <i>P. sanctum</i>	36
3.5.2 Aislamiento del eugenol (68) y del éter metílico del eugenol (69) a partir de la fracción primaria activa F ₂	36
3.5.3 Aislamiento de la 5,6-deshidro-7,8-dihidrometisticina (6), la piperólida (10), la desmetoxiyangonina (70) y la cefaranona B (71) a partir de las fracciones primarias activas F ₅ y F ₆	37
3.5.4 Aislamiento de la cefaradiona A (1) a partir de la fracción primaria activa F ₈	39
3.5.5 Aislamiento de la piperolactama A (72) y las amidas; <i>N-trans</i> -feruloiltiramina (73) y la <i>N-p</i> -cumaroiltiramina (74) a partir de las fracciones primarias F ₈ y F ₉ ...	39
3.6 Estudio Químico de la especie <i>Flourensia cernua</i>	40
3.6.1 Fraccionamiento primario del extracto total de <i>F. cernua</i>	40
3.6.2 Aislamiento del orselinato de metilo (75) a partir de la fracción primaria activa F ₄	40
3.6.3 Aislamiento del 3,7-éter dimetílico de la quercetina (76) y el <i>p</i> -hidroxicinamato de heneicosanilo (77) a partir de la fracción primaria activa F ₅	41
3.6.4 Aislamiento del ácido deshidroflourénsico (80), del paquipodol (78) y de la kumatakenina (15) a partir de la fracción primaria activa F ₆	42
3.6.5 Aislamiento de la ermamina (79), del ácido deshidroflourénsico (80) y del flourensadiol (23) a partir de la fracción primaria activa F ₇	43
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.1 Estudio fitoquímico de la especie <i>Piper sanctum</i> (Miq.) Schl.....	44
4.1.1 Caracterización de la desmetoxiyangonina (70).....	48
4.1.2 Caracterización de las fenantrolactamas; cefaranona B (71) y piperolactama A (72).....	52



4.1.3 Caracterización de las amidas; <i>N-trans</i> -feruloiltiramina (73) y <i>N-p</i> -cumaroiltiramina (74).....	57
4.1.4 Actividad antimicobacteriana de los productos naturales aislados.....	61
4.2 Estudio fitoquímico de la especie <i>Flourensia cernua</i> D.C.....	62
4.2.1 Caracterización del ácido deshidroflourénsico (80).....	66
4.2.2 Caracterización del orselinato de metilo (75).....	72
4.2.3 Actividad fitotóxica de los productos naturales aislados.....	77
V. RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	79
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	81
APÉNDICE I.....	91
Resultados de fitotoxicidad a nivel posemergente conducida en los laboratorios BASF.....	92
APÉNDICE II.....	93
Espectros.	



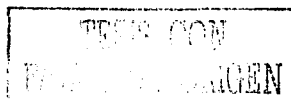
RESUMEN.

Como parte del proyecto de investigación "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America" las especies vegetales *Piper sanctum* (Miq.) Schl. (Piperaceae) y *Flourensia cernua* D.C. (Asteraceae) se seleccionaron para su estudio fitoquímico biodirigido como fuentes potenciales de compuestos antifímicos y fitotóxicos, respectivamente.

El estudio químico biodirigido del extracto orgánico de los tallos de *P. sanctum* y mediante la evaluación de su actividad antifímica a través de un ensayo de tipo fluorimétrico (MABA) permitió el aislamiento y la caracterización de diez metabolitos secundarios: tres alcaloides uno de tipo aporfina [cefadariona A (1)] y dos fenantrolactamas [cefaranona B (71) y piperolactama A (72)], dos estiril α -pironas [5,6-deshidro-7,8-dihidrometisticina (6) y desmetoxyangonina (70)], una cinamoilbutenólida [Z-piperólida (10)], dos fenilpropanoides [eugenol (68) y éter metílico del eugenol (69)] y dos amidas [*N*-tras-feruloiltiramina (73) y *N*-p-cumaroiltiramina (74)]. Todos los compuestos aislados exceptuando los fenilpropanoides resultaron activos y constituyen prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos agentes antifímicos.

Por otra parte, el estudio químico biodirigido del extracto orgánico de las hojas de *F. cernua*, mediante la evaluación de su potencial fitotóxico de tipo preemergente sobre el crecimiento radicular de las arvenses *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*, y de tipo posemergente sobre las malezas *Arabidopsis* y "bentgrass" permitió el aislamiento y caracterización de dos sesquiterpenoides [ácido deshidroflourénsico (80) y flourensadiol (23)] y un compuesto aromático derivado del ácido benzóico [orselinato de metilo (75)] como únicos principios fitotóxicos. De manera adicional se aislaron cuatro compuestos de tipo flavonoide [3,7-éter dimetílico de la quercetina (76), paquipodol (78), kumatakenina (15) y ermanina (79)] y un derivado del ácido cinámico [*p*- hidroxicinamato de heneicosanilo (77)].

Todos los productos aislados en este estudio se caracterizaron mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales.



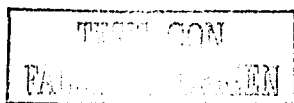
ABSTRACT.

As a part of the project "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America", *Piper sanctum* (Miq.) Schl. (Piperaceae) and *Flourensia cernua* D.C. (Asteraceae) were in order to isolate the antimycobacterial and phytotoxic compounds, respectively.

Bioactivity-directed fractionation of the active CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) extract, prepared from the stems of *P. sanctum* on the basis of its important antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis*, led to the isolation of three alkaloids, namely cepharadione A (1), cepharanone B (71) and piperolactam A (72), two styryl α -pyrones [5,6-dehydro-7,8-dihydromethysticin (6) and desmethoxyyangonin (70)], a cinnamylidenbutenolide [Z-piperolide (10)], two phenylpropanoids [eugenol (68) and eugenol methyl ether (69)] and two amides [*N*-trans-feruloyltyramine (73) and *N*-*p*-coumaroyltyramine (74)]. Compounds 1, 6, 10, 71, 72, 73 and 74 were identified as the main antimycobacterial principles of the extract.

F. cernua (aerial parts) was extracted with CH_2Cl_2 -MeOH (1:1). The resulting extract inhibited radicle growth of *Amaranthus hypochondriacus* and *Echinochloa crus-galli* seeds and was phytotoxic to *Arabidopsis* and *bentgrass*. Bioactivity-directed fractionation of the active extract led to the isolation of three phytotoxic compounds, namely, dehydroflourensic acid (80), flourensadiol (23) and methyl orsenillate (75). In addition, four flavonoids [quercetin 3,7-dimethyl ether (76), paquipodol (78), kumatakenin (15) and ermanin (79)], and a known cinamic acid derivative (77) were obtained. Compound 80 is a new natural product.

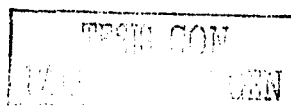
In general, the isolated compounds were identified by spectral methods, including MS and NMR measurements.



LISTA DE ABREVIATURAS.

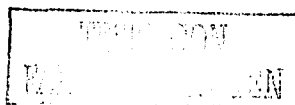
%	Por ciento	eV	Electron volts
° C	Grados centígrados	g	Gramo
Å	Angström 10^{-10} m	h	Hora
AcOEt	Acetato de etilo	HETCOR	Heteronuclear correlation
<i>brd</i>	Doblete ancho	Hex	Hexano
<i>c</i>	Cuarteto	HMBC	Heteronuclear multiple bond connectivity
CCF	Cromatografía en capa fina	HSQC	Heteronuclear simple-quantum coherence
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa		
CD ₃ CD	Metanol deuterado	Hz	Hertz
CDCl ₃	Cloroformo deuterado.	<i>int. rel.</i>	Intensidad relativa
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media	iPrOH	Isopropanol
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución	IR	Infrarrojo
cm	Centímetro	<i>J</i>	Constante de acoplamiento
cm ⁻¹	Número de onda	Kg	Kilogramo
CMI	Concentración mínima inhibitoria	λ	Longitud de onda
COSY	Correlated spectroscopy	m	Metro
δ	Desplazamiento químico	<i>m</i>	Multiplete
<i>d</i>	Doblete	M ⁺	Ión molecular
<i>dd</i>	Doble de dobles	<i>m/z</i>	Relación masa-carga
DEPT	Distortionless enhancement polarization transfer	MeOH	Metanol
DMSO	Dimetilsulfóxido	μg	Microgramos
EMIE	Espectrometría de masas por impacto electrónico	mg	Miligramos
		MHz	Megahertz
		min	Minuto
		μL	Microlitro
		mL	Mililitro
		μm	Micrómetro

mm	Milímetro	RMN- ¹ H	Resonancia Magnética
nm	Nanómetro		Nuclear de hidrógeno
ν_{\max}	Máxima longitud de onda	RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy		Nuclear de carbono trece
p.f.	Punto de fusión	s	Singulete
ppm	Partes por millón	t	Triplete
RMN	Resonancia Magnética Nuclear	TMS	Tetrametilsilano
		t _R	Tiempo de retención
		uma	Unidades de masa atómica
		UV	Ultravioleta



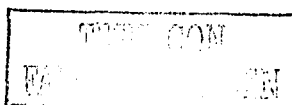
LISTA DE CUADROS.

Cuadro	Página
1 Usos populares y propiedades terapéuticas del género <i>Piper</i> .	6
2 Empleo de <i>P. sanctum</i> en la medicina tradicional mexicana.	11
3 Metabolitos secundarios aislados de la especie <i>Piper sanctum</i> .	12
4 Metabolitos secundarios aislados de la especie <i>Flourensia cernua</i> .	19
5 Fraccionamiento primario del extracto total de <i>P. sanctum</i> .	37
6 Fraccionamiento primario del extracto total de <i>F. cernua</i> .	41
7 Actividad antimicrobacteriana de las fracciones primarias obtenidas del extracto de <i>P. sanctum</i> .	45
8 Metabolitos secundarios aislados del tallo de la especie <i>P. sanctum</i> .	46
9 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la desmetoxiyangonina (70).	48
10 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la piperolactama A (72).	53
11 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la cefaranona B (71).	56
12 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de las amidas <i>N-trans-feruloiltiramina</i> (73) y <i>N-p-cumaroiltiramina</i> (74).	58
13 Datos de RMN- ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) de los compuestos 73 y 74.	59
14 Datos de RMN- ¹³ C (75.5 MHz, CD ₃ OD) de los compuestos 73 y 74.	60
15 Actividad antimicrobacteriana de los compuestos aislados de <i>P. sanctum</i> .	61
16 Actividad fitotóxica de las fracciones primarias obtenidas del extracto de <i>F. cernua</i> .	63
17 Metabolitos secundarios aislados de las hojas de la especie <i>F. cernua</i> .	64
18 Constantes espectroscópicas y espectrométricas del ácido deshidroflourénsico (80).	66
19 Constantes espectroscópicas y espectrométricas del orselinato de metilo (75).	74
20 Actividad fitotóxica de los compuestos aislados de <i>F. cernua</i> .	77



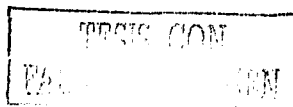
LISTA DE FIGURAS.

Figura	Página
1 <i>Piper sanctum</i> (Miq.) Schl. (Piperaceae).	8
2 Distribución geográfica de la especie <i>Piper sanctum</i> en la República Mexicana y Guatemala.	9
3 <i>Flourensia cernua</i> D.C. (Asteraceae).	15
4 Distribución geográfica de la especie <i>Flourensia cernua</i> en la República Mexicana y suroeste de Estados Unidos.	17
5 Cromatograma obtenido durante la purificación mediante CLAR de la desmetoxiyangonina (70).	38
6 Proyección estereoscópica de rayos X de la Z-piperólida (10).	47
7 Espectro de RMN- ¹ H COSY de la desmetoxiyangonina (70).	50
8 Correlaciones observadas en los espectros NOESY y HMBC del compuesto 70.	51
9 Espectro de RMN- ¹ H NOESY de la piperolactama A (72).	55
10 Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del ácido deshidroflourénsico (80).	68
11 Vista parcial (δ_H 0.9-1.8) del espectro de RMN- ¹ H del ácido deshidroflourénsico (80).	69
12 Vista parcial (δ_H 2.1-3.0) del espectro de RMN- ¹ H del ácido deshidroflourénsico (80).	70
13 Espectro de masas del ácido deshidroflourénsico (80).	71
14 Correlaciones más importantes observadas en el espectro NOESY del compuesto 80.	72
15 Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del ácido deshidroflourénsico (80).	73
16 Espectro de RMN- ¹ H NOESY del orselinato de metilo (75).	76



LISTA DE ESPECTROS.

Espectro	Página
1 Espectro de masas de la desmetoxiyangonina (70).	94
2 Espectro de RMN- ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) de la desmetoxiyangonina (70).	95
3 Espectro de RMN- ¹³ C (CD ₃ OD, 125 MHz) de la desmetoxiyangonina (70).	96
4 Espectro de RMN- ¹ H NOESY de la desmetoxiyangonina (70).	97
5 Espectro de RMN 2D HMBC de la desmetoxiyangonina (70).	98
6 Espectro de masas de la piperolactama A (72).	99
7 Espectro de RMN- ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) de la piperolactama A (72).	100
8 Espectro de RMN- ¹³ C (CD ₃ OD, 100 MHz) de la piperolactama A (72).	101
9 Espectros de masas de la cefaranona B (71).	102
10 Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de la cefaranona B (71).	103
11 Espectro de masas de la <i>N-trans</i> -feruloiltiramina (73).	104
12 Espectro de RMN- ¹ H (CD ₃ OD, 300 MHz) de la <i>N-trans</i> -feruloiltiramina (73).	105
13 Espectro de RMN- ¹³ C (CD ₃ OD, 100 MHz) de la <i>N-trans</i> -feruloiltiramina (73).	106
14 Espectro de masas de la <i>N-p</i> -cumaroiltiramina (74).	107
15 Espectro de RMN- ¹ H (CD ₃ OD, 300 MHz) de la <i>N-p</i> -cumaroiltiramina (74).	108
16 Espectro de RMN- ¹³ C (CD ₃ OD, 75 MHz) de la <i>N-p</i> -cumaroiltiramina (74).	109
17 Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del orselinato de metilo (75).	110
18 Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del orselinato de metilo (75).	111



I. ANTECEDENTES.

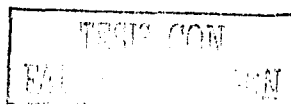
1.1 Generalidades sobre la tuberculosis.

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas más estudiada y conocida desde hace siglos, pues no sólo ha sido una causa importante de mortalidad y enfermedad prolongada, sino que también cobra importancia en el hecho de afectar principalmente a la población joven. El agente causal de la tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, pertenece a la familia *Mycobacteriaceae*, y es una bacteria aerobia, gram positiva, en forma de bacilo delgado, recto o ligeramente curvo y con extremos redondeados que mide entre 0.2 a 0.5 μm de ancho y 1 a 4 μm de longitud. La bacteria no forma esporas y carece de cápsula; sin embargo, su pared celular posee la particularidad de estar constituida por múltiples capas de ácido micólico y lípidos muy complejos, lo que le confiere un alto grado de resistencia bajo condiciones ambientales adversas (Joklik *et al.*, 1983).

Se estima que anualmente de 8 a 10 millones de individuos son víctimas de la tuberculosis y alrededor de 3 millones mueren a causa de ella (Raviglione *et al.*, 1995). Por otra parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) determinó que la prevalencia global de la tuberculosis en el año de 1997 fue de 1.86 billones de personas infectadas, principalmente en África, Asia y Europa (Dye *et al.*, 1999), y calcula que cerca de 30 millones de personas adquirirán la enfermedad en un futuro cercano (Niccolai *et al.*, 1997; Rango *et al.*, 2000).

La tuberculosis es una enfermedad generalmente crónica tanto del hombre como de muchas especies animales, caracterizada por causar lesiones granulomatosas de evolución lenta que provocan la destrucción de los tejidos. La enfermedad adopta formas muy diferentes según el órgano infectado y la intensidad de la infección (tuberculosis articular, laringea, miliar, menígea, hepática, prostática, etc.), no obstante la forma más común es la pulmonar por lo que se suele creer que la micobacteria sólo se localiza en el aparato respiratorio.

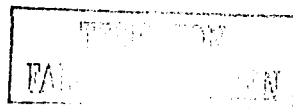
Las consecuencias de la ingestión o inhalación del bacilo tuberculoso dependen de su virulencia y de la resistencia del hospedero a la infección. La lesión primaria o primoinfección que aparece después de la inhalación, se observa como un pequeño granuloma de estructura



especial denominado tubérculo el cual se implanta en el parénquima pulmonar. Durante la primoinfección se establece un equilibrio entre los mecanismos de inmunidad del hospedero y la invasividad de la bacteria, lo que le permite mantenerse viva durante largos periodos que pueden incluso alcanzar varias décadas. Cuando el equilibrio se rompe, ya sea por reactivación de la lesión primaria o a través de reinfección tuberculosa, ocurre la reproducción bacteriana normal ocasionando necrosis caseosa, fibrosis y reblandecimiento de los tejidos involucrados; la liberación bacteriana posterior hacia los bronquios produce la formación de cavidades en el pulmón y la erosión de los capilares sanguíneos. Los bacilos pueden ser difundidos por diferentes vías: (i) a través de los bronquios a lugares distintos del pulmón; (ii) a través de gotas de saliva y expectoraciones hacia otros individuos; (iii) y por esputos ingeridos hacia el tubo digestivo y ganglios mesentéricos (Davis *et al.*, 1978; Stanier *et al.*, 1996). La sintomatología del tuberculoso se caracteriza principalmente por fiebre, pérdida de peso, astenia, hemóptisis e inspiración ruidosa.

Los agentes quimioterapéuticos de mayor uso para el tratamiento de esta enfermedad incluyen compuestos de origen sintético, natural y semisintético, con una gran diversidad estructural. Así mismo, los mecanismos a través de los cuales estos agentes ejercen su acción también son muy variados. Dentro de los fármacos de origen sintético se encuentran: (i) la isoniazida y el etambutol, los cuales actúan inhibiendo la síntesis e incorporación del ácido micólico en la pared celular microbiana; (ii) la crofazimina, un inhibidor de la replicación de ADN; (iii) la pirazinamida y la etionamida cuyos mecanismos de acción son desconocidos; (iv) por último, cabe mencionar algunas quinolonas como la ciprofloxacina, la ofloxacina, la fleroxacina y la esparfloxacina las cuales ejercen su acción mediante la inhibición de la enzima ADN-girasa durante la duplicación de ADN.

Entre los productos naturales se encuentran los antibióticos aminoglicósidos estreptomycinina y kanamicina producidos por los actinomicetos *Streptomyces griseus* y *S. kanamyceticus*, respectivamente; ambos productos inhiben la síntesis de proteínas. Otros fármacos naturales importantes son la cicloserina y la capreomicina aislados de las actinobacterias *Streptococcus orchidaceus* y *S. capreolus*. Estos dos productos inhiben la síntesis de la pared celular (Goodman *et al.*, 1996).



En la categoría de fármacos semisintéticos figuran dos derivados de las rifamicinas, la rifampicina y la rifabutina, los cuales bloquean la replicación del ADN bacteriano a través de la inhibición de la enzima ARN-polimerasa; algunos macrólidos derivados de las eritromicinas, claritromicina y azitromicina, y el aminoglucósido amikacina desarrollado a partir de la kanamicina; todos estos productos ejercen su efecto por inhibición de la síntesis de proteínas.

La quimioterapia del tuberculoso representa un alto riesgo para su salud, ya que los fármacos son empleados en combinaciones de tres a seis medicamentos durante periodos prolongados con el objetivo de lograr una mayor eficacia. Esta terapia de combinación aumenta considerablemente la toxicidad y el riesgo de efectos colaterales indeseables. Así mismo, en la actualidad a pesar de los esfuerzos realizados para contrarrestar la tuberculosis, la terapéutica para el tratamiento de infecciones causadas por micobacterias es insuficiente, debido al desarrollo de resistencia microbiana a los principales fármacos antifímicos tales como la isoniazida, la rifampicina y la estreptomina (Cohn *et al.*, 1997). De manera adicional, este problema sanitario se ha exacerbado por la pandemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) el cual, ha provocado un incremento extraordinario en la frecuencia de infecciones micobacterianas (Goodman *et al.*, 1996; Timmermann *et al.*, 1999; Rango *et al.*, 2000).

1.2 Breves consideraciones sobre la búsqueda de nuevos agentes herbicidas.

Un tópico de gran interés en la actualidad en el campo de los productos naturales biodinámicos, es el desarrollo de nuevos agentes herbicidas que permitan la protección y garanticen la producción de los principales cultivos agrícolas de importancia económica a nivel mundial. Las malezas y plantas arvenses nocivas afectan severamente a estos cultivos ya que crecen conjuntamente compitiendo por los nutrientes y el agua del subsuelo. Su crecimiento, además de causar grandes pérdidas económicas a la agricultura, daña carreteras, obstruye canales de riego y promueve la extinción de algunas especies vegetales al masificarse en amplias extensiones de terreno. De manera adicional, estas plantas son portadoras de bacterias y hongos

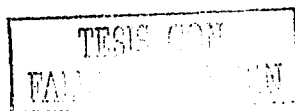
patógenos que afectan a las plantas agrícolas, pueden ejercer efectos fitotóxicos sobre las mismas y además, debido a su toxicidad ocasionan problemas de salud en humanos y animales (Hoagland, 1990; Cramer, 2000).

Actualmente, existe un número considerable de agentes herbicidas tanto de origen natural como de origen sintético. Los herbicidas sintéticos son los más empleados y entre ellos destacan los siguientes:

- (i) Compuestos clorados como los ácidos 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T). Ambos productos se emplean para el control de hierbas de hoja ancha en campos de cultivo y plantas leñosas en carreteras.
- (ii) Dinitrofenoles sustituidos como el dinitroortocresol.
- (iii) Algunas sales cuaternarias de amonio como el paracuat. Este último compuesto y el 2,4-D son sumamente tóxicos para humanos y animales.
- (iv) Otros herbicidas ampliamente utilizados incluyen a los carbamatos (profam y barbam), las ureas sustituidas (monourón y diurnón), las triazinas (atrazina), las anilinas (alaclor, propaclor y propanil), las dinitroanilinas (triflualin) y los derivados del ácido benzoico (amibén) [Berndt y Koschier, 1973; Bus *et al.*, 1983].

El uso racional de muchos de los productos arriba indicados ha evitado grandes pérdidas agrícolas. Sin embargo, el uso excesivo e indiscriminado de estos agentes ha ocasionado severos daños al ecosistema, contaminando suelos, aire y agua debido a la elevada persistencia y la lenta biodegradación que presentan. De la misma manera, muchos de los herbicidas de uso actual son tóxicos para la salud del hombre y los animales, son poco específicos y han provocado la aparición de numerosas especies resistentes. Además, muchos presentan impurezas con toxicidad y persistencia mayor que las propias sustancias activas (Landrigan *et al.*, 1983; Cremlyn, 1991; Richardson, 1998).

Con la finalidad de minimizar los efectos negativos ocasionados por el uso de los herbicidas sintéticos, se han propuesto otras estrategias alternas para la protección de los cultivos agrícolas, entre las más importantes figuran: el empleo de bioherbicidas, la rotación de cultivos, la eliminación manual o mecánica de malezas y plantas arvenses, la manipulación genética y la utilización de compuestos fitotóxicos alternos (Rodgers, 1993; Duke y Abbas, 1995; Uri, 1998; Cramer, 2000).

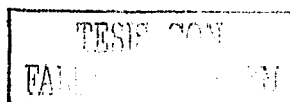


Con el propósito de descubrir compuestos fitotóxicos alternos, durante los últimos años se ha intensificado la investigación de los productos naturales de origen vegetal como una fuente potencial de nuevos agentes herbicidas. Estudios recientes han permitido la identificación de diversos compuestos de origen vegetal de gran interés debido a sus propiedades fitotóxicas, entre los cuales destacan: (i) los monoterpenos 1,8-cineol, alcanfor y pulegona; (ii) el ácido *p*-hidroxibenzóico; (iii) la tricolorina A; (iv) la sorgolenona; (v) y la juglona (Worsham, 1989; Gerig y Blum, 1991; Pereda-Miranda *et al.*, 1993; Streibig *et al.*, 1999). Cabe mencionar, que algunos de estos productos han representado prototipos estructurales para el diseño de derivados más potentes. Así los herbicidas cinmetilo, dicamba y picloram fueron diseñados a partir del 1,8-cineol y el ácido *p*-hidroxibenzoico, respectivamente (Duke y Abbas, 1995; Grossmann, 2000).

1.3 Antecedentes botánicos y etnobotánicos del género *Piper*.

El género *Piper* pertenece a la familia Piperaceae y comprende alrededor de 700 especies las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. De estas, *P. nigrum* es muy popular como condimento debido a que a partir de sus frutos se obtiene la pimienta (Parmar *et al.*, 1997), en tanto que la raíz de *P. methysticum* se emplea en las islas del Pacífico Sur para la preparación de una bebida estimulante de gran importancia social y ceremonial denominada kava o yagona (Klohs *et al.*, 1959; Smith, 1983). Cabe destacar también el uso de algunas especies como plantas ornamentales. De la misma manera otras especies de este género son ampliamente valoradas en la medicina tradicional o folklórica de diversas regiones del mundo debido a sus propiedades medicinales. En el Cuadro 1 se resumen los usos populares medicinales de algunas de estas especies y la parte de la planta empleada.

En general estas especies son plantas herbáceas o leñosas, arbustos y ocasionalmente árboles, con hojas alternas, opuestas o verticiladas; las flores son unisexuales dispuestas en espigas o amentos delgados y presentan fruto con semilla y perispermo amiláceo (Fernández y Domínguez, 1985).



Cuadro 1. Usos populares y propiedades terapéuticas del género *Piper*.

ESPECIE	PARTE DE LA PLANTA EMPLEADA	USO POPULAR	REFERENCIA
<i>P. aducum</i> <i>P. hispidum</i>	Ramas y hojas	En cuadros diarreicos, astringente, diurético, insecticida y repelente.	Argueta <i>et al.</i> , 1994. Márquez <i>et al.</i> , 1999.
<i>P. amalago</i> <i>P. psilorhachis</i> <i>P. schiedeanaum</i>	Hojas (infusión o decocción)	En dolores de pecho, tórax o de cabeza, fiebre y lavativas de la matriz posparto. Para el tratamiento de granos en la piel, hemorragia nasal e infecciones. Antiinflamatorio.	Domínguez y Alcorn, 1985. Argueta <i>et al.</i> , 1994. Zolla, 1994.
<i>P. auritum</i> <i>P. umbellatum</i>	Hojas, tallos y flores (infusión, jugo, elixir)	Como oxiótico y galactógeno; para lavativas de la matriz posparto, diarrea, bronquitis, tos, asma, laringitis, reumatismo, dolores musculares, quemaduras y picaduras venenosas.	Argueta <i>et al.</i> , 1994.
<i>P. sylvaticum</i> <i>P. dilatatum</i>	Raíz	Como antídoto para picadura de serpiente, anticrotático y contra la gangrena.	Argueta <i>et al.</i> , 1994. Parmar <i>et al.</i> , 1997.
<i>P. chaba</i> <i>P. fotokadsura</i> <i>P. guineense</i>	Raíz, tallos, hojas y frutos	En el tratamiento de asma, bronquitis, dolor abdominal, afecciones hemorroidales y condiciones artríticas.	Matsui y Munakata, 1975. Parmar <i>et al.</i> , 1997.
<i>P. brachystachyum</i> <i>P. falconeri</i> <i>P. acustileginum</i>	Hojas y tallos	Insecticida.	Jacobson y Crosby, 1971. Parmar <i>et al.</i> , 1993.
<i>P. scabrum</i> <i>P. oblicuum</i> <i>P. ribesoides</i>	Hojas, tallos y frutos	Para el empacho, hemorragia nasal, como carminativo y estimulante.	Ruangrunsi <i>et al.</i> , 1992. Zolla, 1994.

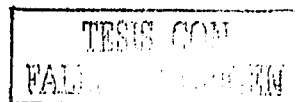
Las especies del género *Piper* se localizan principalmente en Asia [Indonesia, Taiwan, India y China], Oceanía [en las islas de Polinesia y Fiji], al oeste de África [Ghana] y en Latinoamérica desde México hasta Brasil, principalmente en Guatemala, Nicaragua, San Salvador, Jamaica y Belice (Klohs *et al.*, 1959; Smith, 1983; Domínguez y Alcorn, 1985; Argueta *et al.*, 1994; Parmar *et al.*, 1997; Moreira *et al.*, 2000).

1.4 Antecedentes botánicos y etnobotánicos de la especie *Piper sanctum* (Miq.)

Schl.

La especie *Piper sanctum* (Miq.) Schl. (Piperaceae) es un arbusto que mide aproximadamente de 1.5 a 5 m de altura, aunque también se describe como una hierba de 10 a 50 cm de alto. Se desarrolla en climas cálido, semicálido y templado entre 740 y 2600 m sobre el nivel del mar. Habita en terrenos de cultivo abandonados o asociado a bosque tropical perenifolio, matorral xerófilo y bosque mesófilo de montaña. Sus hojas son grandes, alternas y pecioladas, tienen forma acorazonada, miden de 20 a 25 cm de largo por 18 cm de ancho; son aromáticas, de sabor dulce y picante; sus tallos son lisos, sin espinas o pelos y sus ramas frágiles. Florece en los meses de septiembre y octubre; las inflorescencias se presentan en espigas cilíndricas muy densas semejantes a un cordón o cola de ratón de color blanco a amarillo claro; sus frutos son carnosos y contienen una semilla, Figura 1. (Argueta *et al.*, 1994; Zolla, 1994; Márquez *et al.*, 1999).

P. sanctum es particularmente abundante en Guatemala y en la República Mexicana en los estados de Sonora, San Luis Potosí, Veracruz, Puebla, Morelos, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas y Yucatán (Figura 2) (Martínez, 1979; Argueta *et al.*, 1994; Zolla, 1994; Márquez *et al.*, 1999). Se conoce popularmente con los nombres de hierba santa, hoja santa, santa maría, hoja de aján, hoja de anís, acuyo, cojolite, cordoncillo, palo de zanate, tlanipa, momo y tiya, entre otros (Martínez, 1979; Zolla, 1994).



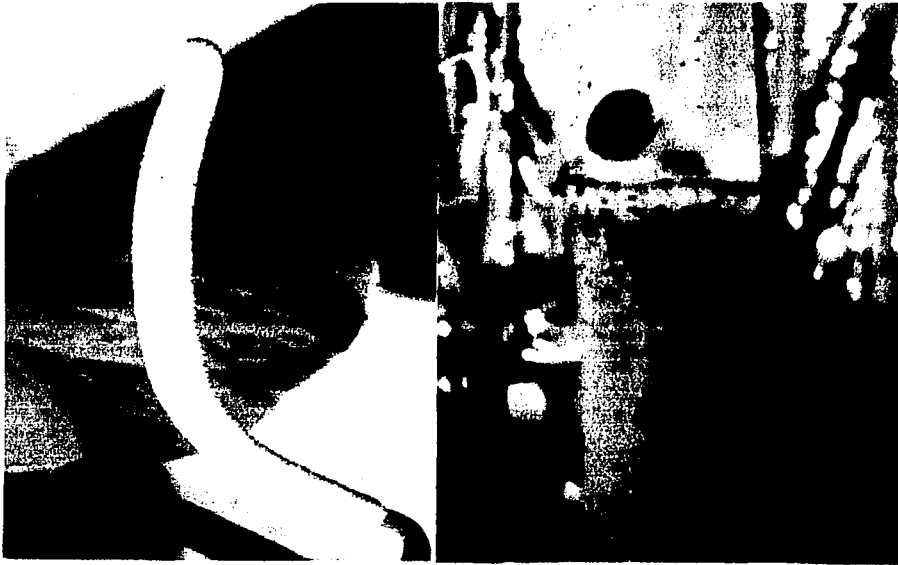
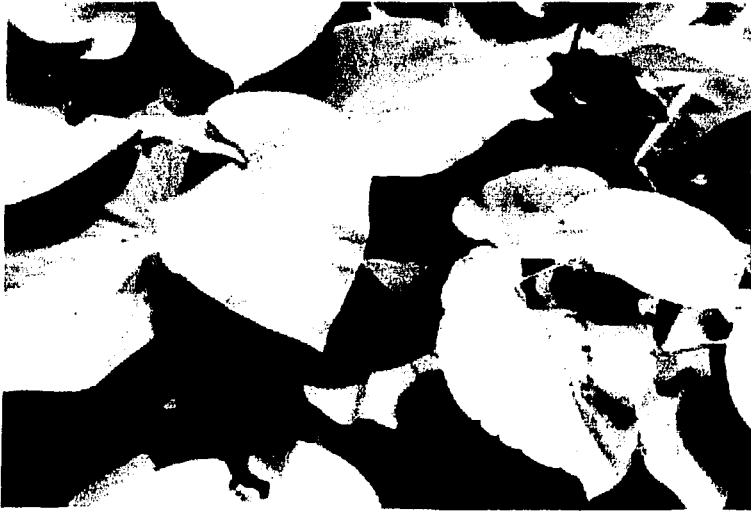
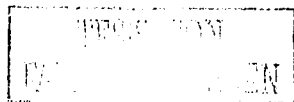


Figura 1. *Piper sanctum* (Miq.) Schl. (Piperaceae).



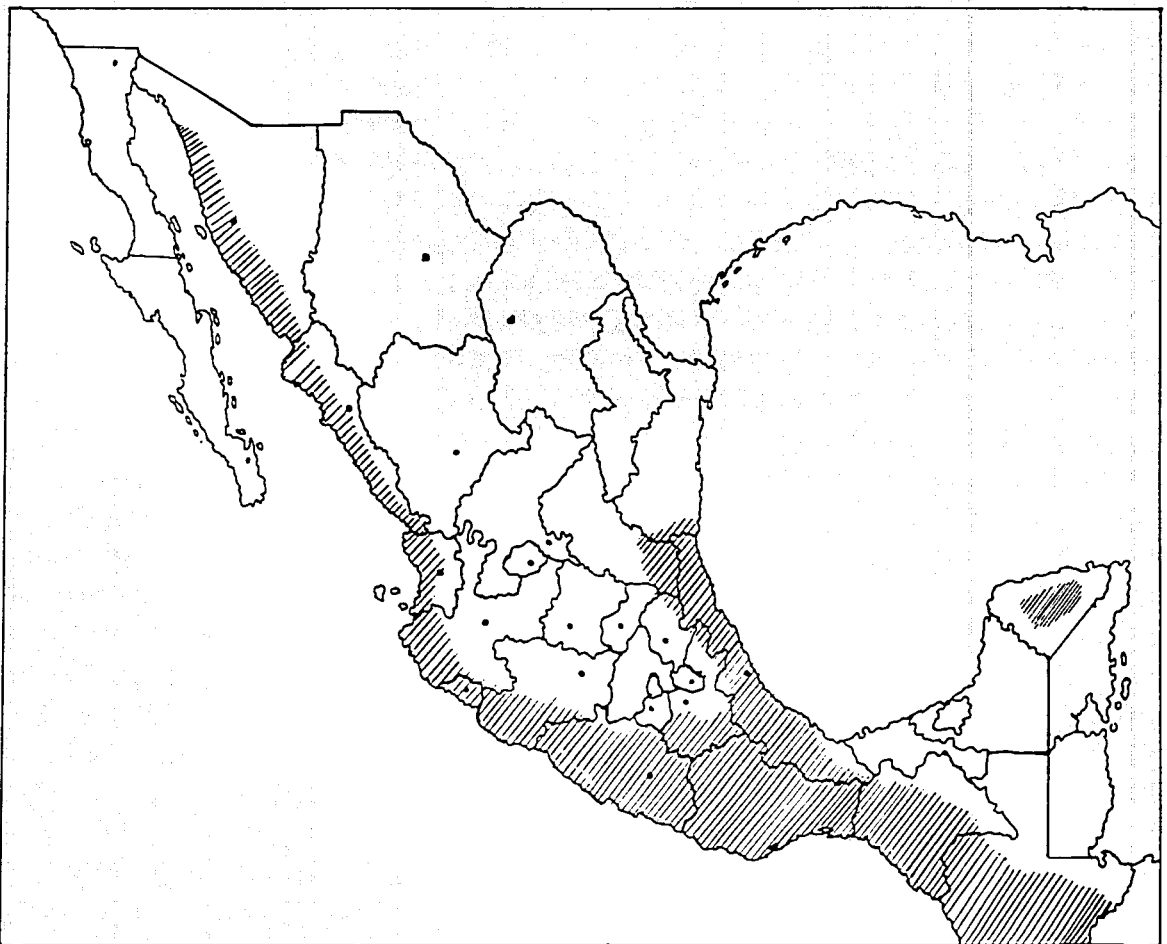


Figura 2. Distribución geográfica de la especie *Piper sancium* en la República Mexicana y Guatemala.

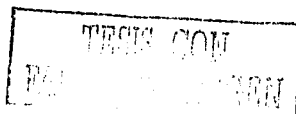
Las diferentes partes vegetales de *P. sanctum* se emplean en las prácticas médicas populares de México para el tratamiento de diversos padecimientos. Destacan sus usos como agente antihelmíntico, anticorotático, estimulante, estomáquico, antipalúdico, antiblenorrágico, emenagogo, cupéptico, antipirético y antidiarréico. También, se ha descrito el empleo de la planta entera para el tratamiento de la bronquitis, la laringitis aguda, el insomnio, enfermedades nerviosas, disnea, tumoración de mama, enfermedades del riñón y asma (Martínez, 1979; Argueta *et al.*, 1994; Márquez *et al.*, 1999). En el Cuadro 2 se presentan ejemplos de algunas preparaciones medicinales elaboradas a partir de la planta y sus usos.

1.4.1 Antecedentes químicos de la especie *Piper sanctum*.

Los diversos estudios químicos realizados sobre la raíz y el tallo de la especie *P. sanctum*, han permitido el aislamiento y la caracterización de los metabolitos secundarios que se muestran en el Cuadro 3. Estos metabolitos pertenecen a diversas categorías incluyendo alcaloides, fenilpropanoides, esteroides, estiril α -pironas y cinamoilbutenólidas.

1.5 Antecedentes botánicos y etnobotánicos del género *Flourensia*.

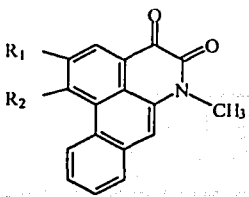
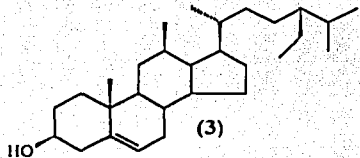
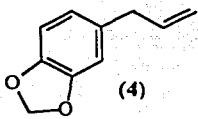
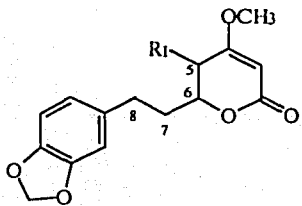
El género *Flourensia* de la familia Asteraceae, tribu *Heliantheae*, subtribu *Ecliptinae*, incluye 15 especies, las cuales se localizan principalmente en regiones áridas del continente americano tales como el norte y centro de la República Mexicana, el suroeste de Estados Unidos y Suramérica [en Bolivia, Perú, Argentina, Ecuador y Chile] (Rao *et al.*, 1970; Rzedowski, 1983; Bohlmann *et al.*, 1984; Wollenweber y Yatskievych, 1985; Stuppner y Müller, 1994; Fredrickson *et al.*, 1994; Richerson y Boldt., 1995; Priotti *et al.*, 1997; Faini *et al.*, 1997). Desde el punto de vista quimiotaxonómico este género, se encuentra estrechamente relacionado con los géneros *Encelia* y *Helianthella* (Heywood *et al.*, 1977; Bohlmann *et al.*, 1984).



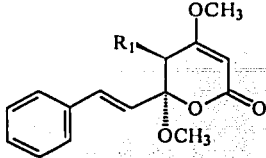
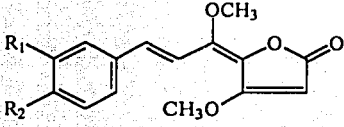
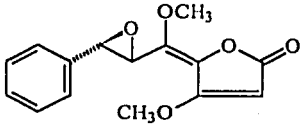
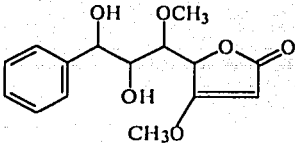
Cuadro 2. Empleo de *P. sanctum* en la medicina tradicional mexicana (Argueta *et al.*, 1994; Zolla, 1994).

PARTE DE LA PLANTA	PREPARACIÓN	USO MEDICINAL	LUGAR DONDE SE EMPLEA
HOJAS	* Dos o tres hojas hervidas en 1L de agua. * Infusión con media hoja en 1L de agua.	Dolor de estomago y cabeza, digestión, diarrea, tos, asma y gripa (se bebe una taza de la infusión o de la decocción tres veces al día). En el tratamiento de várices (se administra la infusión durante 9 días en ayunas).	Municipio de Huehuetlán, San Luis Potosí.
	* Hoja "soasada". * Hojas machacadas.	Urticaria (se restriega la hoja soasada con la parte afectada). Dolores externos en músculos, estómago y huesos (las hojas machacadas con bicarbonato y manteca se aplican de manera local).	Hueyapan de Ocampo, Veracruz. Motozintla, Chiapas.
RAÍZ	* Trozo de raíz de 10 a 20 cm limpio y lavado.	Dolor de muelas (se muerde la raíz con el diente afectado).	Hueyapan de Ocampo, Veracruz.
TALLOS, HOJAS Y FLORES	* Las tres partes se hierven acompañadas de hierba morada, santa maría, hierba de venado y hierba de maguey.	Para el tratamiento del "CACHAM o QUEMADA" (trastornos en la matriz posparto). El cocimiento se aplica en baños a la parturienta y el recién nacido y es ingerido como agua de uso.	Estado de Veracruz.

Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de la especie *Piper sanctum*.

NOMBRE	COMPUESTO	REFERENCIA
ALCALOIDES DE TIPO APORFINA		
(1) Cefaradiona A (2) Cefaradiona B	 <p style="text-align: center;">$R_1 = R_2$ (1) $O-CH_2-O$ (2) $-OCH_3$</p>	Hänsel y Leuschke, 1976
ESTEROIDES		
(3) β -Sitosterol	 <p style="text-align: center;">(3)</p>	Hänsel <i>et al.</i> , 1976
FENILPROPANOIDES		
(4) Safrol	 <p style="text-align: center;">(4)</p>	Argueta, 1994
ESTIRIL α - PIRONAS (Kawapironas)		
(5) Metisticina (6) 5,6-Deshidro-7,8-dihidrometisticina (7) 5-Metoxi-5,6-deshidrometisticina	 <p style="text-align: center;">R_1 C_5-C_6 C_7-C_8</p> <p>(5) 2-H C=C C=C (6) H C=C C=C (7) OCH_3 C=C C=C</p>	Langhammer <i>et al.</i> , 1972 Hänsel <i>et al.</i> , 1973 y 1976 Hänsel y Schulz, 1982

Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de la especie *Piper sanctum* (continuación).

NOMBRE	COMPUESTO	REFERENCIA
ESTIRIL α - PIRONAS (Kavapironas)		
<p>(8) 5-Hidroxi-6-metoxikavaina</p> <p>(9) 5-Acetoxi-6-metoxikavaina</p>	 <p style="text-align: center;"> R_1 (8) OH (9) OCOCH₃ </p>	<p>Hänsel <i>et al.</i>, 1973 y 1976</p> <p>Hänsel y Schulz, 1982</p>
CINAMOILBUTENÓLIDAS (Piperólidas)		
<p>(10) Piperólida</p> <p>(11) Metilendioxipiperólida</p>	 <p style="text-align: center;"> R_1 R_2 (10) H H (11) -O-CH₂-O- </p>	<p>Hänsel y Pelter, 1971</p> <p>Pelter y Hänsel, 1972</p> <p>Bradeczek <i>et al.</i>, 1978</p> <p>Hänsel <i>et al.</i>, 1979</p> <p>Hänsel y Schulz, 1982</p>
CINAMOILBUTENÓLIDAS (Piperólidas)		
<p>(12) 7,8-Epoxipiperólida</p>	 <p style="text-align: center;">(12)</p>	<p>Pelter y Hänsel, 1972</p> <p>Bradeczek <i>et al.</i>, 1978</p>
<p>(13) Treo-7,8-dihidroxipiperólida</p>	 <p style="text-align: center;">(13)</p>	<p>Hänsel y Schulz, 1982</p>

Los individuos de este género, por lo general son arbustos de 1 a 3 m de altura, perennes, de hojas ovales a lanceoladas, alternas y opuestas bajo la base, con cabezuelas grandes generalmente solitarias o asociadas en pequeños grupos con flores compuestas (Heywood *et al.*, 1977; Wollenweber y Yatskievych, 1985; Mauchamp y Janeau, 1993; Stuppner y Müller, 1994; Fredrickson *et al.*, 1994). Generalmente estos arbustos se emplean para el pastoreo de ganado, ovejas y cabras, como agentes insecticidas y en la industria de la resina (Estell *et al.*, 1994; Faini *et al.*, 1997). Así mismo, algunas especies del género son valoradas en la medicina tradicional mexicana por sus propiedades medicinales, tal es el caso de *F. resinosa* empleada para el tratamiento de reumatismo y calambres; para ello se emplean sus hojas en infusión para beber o como cataplasmas aplicando fricciones sobre la parte adolorida (Zolla, 1994).

Por otra parte, las especies *F. thurifera*, *F. resinosa* y *F. cernua* presentan la particularidad de secretar una resina que cubre sus hojas y ramas jóvenes, la cual esta asociada de manera importante con la química de defensa y comunicación de estas especies como parte de su estrategia de sobrevivencia (Zobel *et al.*, 1991; Faini *et al.*, 1997). El análisis químico de la resina permitió determinar que se encuentra constituida básicamente por compuestos de naturaleza terpenoide y flavonoides en el caso de *F. resinosa*; diversos cromenos y cumarinas en el caso de *F. thurifera*, en tanto que para *F. cernua* se identificaron mono y sesquiterpenoides, cromenos y compuestos de naturaleza fenólica (Wollenweber y Yatskievych, 1985; Estell *et al.*, 1994; Faini *et al.*, 1997).

1.6 Antecedentes botánicos y etnobotánicos de la especie *Flourensia cernua* D.C.

Flourensia cernua D.C. (Asteraceae) (Figura 3) es un arbusto semiperenne, de hoja caduca, que mide menos de 1 m y en algunas localidades entre 1 y 2 m de altura (Martínez, 1979; Fredrickson *et al.*, 1994); también se ha descrito como un arbusto multirramificado semejante a un cono invertido que mide 1.50 m de altura por 1 a 1.50 m de diámetro, sin tronco y ramas oblicuas desde la base (Ludwing *et al.*, 1975; Mauchamp y Janeau, 1993). Sus tallos son oscuros y las hojas son enteras, ovadas u ovales, de 2 a 2.5 cm de largo por 6 mm de ancho orientadas hacia arriba en una posición subvertical, cubiertas con una resina aromática y de

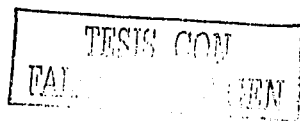




Figura 3. *Flourensia cernua* D. C. (Asteraceae).

sabor amargo; posee flores amarillas en cabezuelas que nacen de los axones terminales y axiales sostenidas por largos ejes (Rzedowski, 1983; Fredrickson *et al.*, 1994).

Esta especie se localiza en suroeste de Estados Unidos (en Arizona, Nuevo México y Texas) y el norte y centro de la República Mexicana (en los estados de Chihuahua, Baja California Norte, Durango, Coahuila, Nuevo León, Zacatecas, San Luis Potosí, Sonora y en la región árida del Valle del Mezquital del estado de Hidalgo) (Figura 4). Frecuentemente se encuentra asociada con otros arbustos de regiones áridas tales como *Prosopis sp.* (mezquite) y *Larrea tridentata* (gobernadora) formando matorrales que se desarrollan en altitudes superiores a 1000 m cubriendo amplias extensiones de terreno en Hidalgo (Actopan), San Luis Potosí, Zacatecas y Chihuahua (Rao *et al.*, 1970; Kingston *et al.*, 1971; Dillon *et al.*, 1976; Rzedowski, 1983; Estell *et al.*, 1994; Fredrickson *et al.*, 1994; Richerson y Boldt, 1995).

F. cernua recibe los nombres populares de hoja sen, hoja sé, arbusto de alquitrán, maleza negra y arbusto barnizado (Martínez, 1979; Dillon *et al.*, 1976; Estell *et al.*, 1994; Richerson y Boldt, 1995). Sus hojas y flores son comercializadas en los mercados populares de México y los Estados Unidos, ya que se emplean en las prácticas médicas populares como agentes curativos; las hojas preparadas en etanol a 90 °C (1 mL por vía oral) o en infusión (10 hojitas), se utilizan como remedio contra la indigestión y dolores; también es empleada como expectorante en enfermedades respiratorias (Martínez, 1959; Díaz, 1976; Fredrickson *et al.*, 1994; Richerson y Boldt, 1995). Por otra parte, las mujeres de la etnia Kiliwa en Baja California Norte utilizan la infusión de la raíz para estimular la menstruación (Zolla, 1994).

En su medio ambiente natural, se ha observado que el arbusto ejerce un efecto alelopático importante, ya que inhibe el crecimiento de otras plantas promoviendo así, el proceso de “desertificación” de pastizales a tierras de arbustos. De tal forma, que desde hace 120 años se ha incrementado de 2 a un 9 % la vegetación de *F. cernua* en el desierto de Chihuahua y suroeste de Nuevo México extendiéndose en más de 45 millones de hectáreas (Schlesinger *et al.*, 1990; Estell *et al.*, 1994; Schowalter, 1996).

La hoja sen posee un perfil nutricional semejante al de la alfalfa gracias a su alto contenido de proteínas, fósforo, calcio y nitrógeno no protéico y por lo tanto se utiliza como forraje para pastoreo de ganado, ovejas y cabras sustituyendo así las escasas hierbas en las regiones áridas (Nelson *et al.*, 1970; King *et al.*, 1996; Fredrickson *et al.*, 2000). Sin embargo,

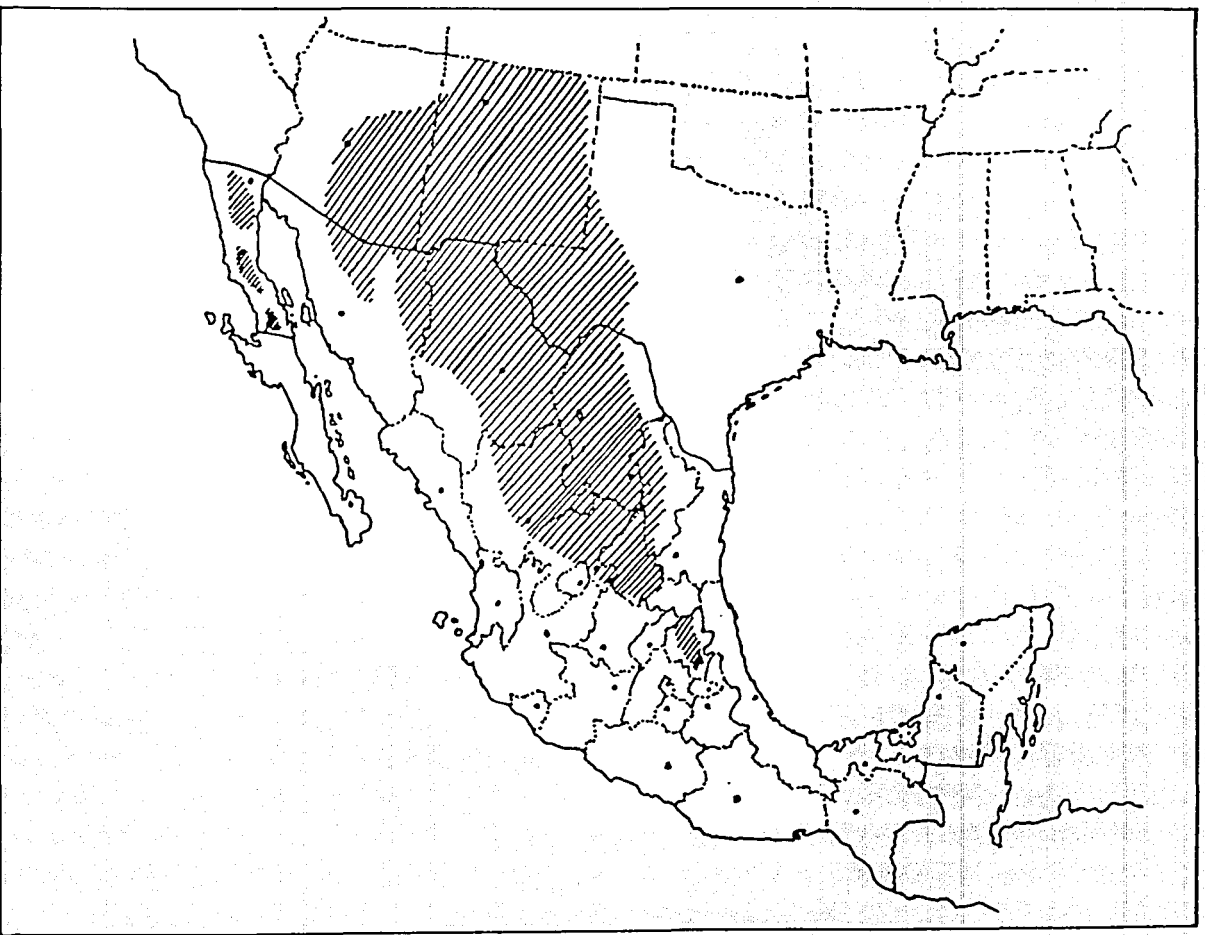


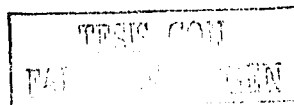
Figura 4. Distribución geográfica de la especie *Plourcensia cernita* en la República Mexicana y suroeste de Estados Unidos.

se ha descrito en la literatura que los componentes químicos de la resina o cera epicuticular de sus hojas son desagradables y tóxicos para los insectos (Rodríguez, 1985), además causan envenenamiento del ganado provocando alteraciones digestivas por la inhibición de la digestión de la celulosa y/o toxicosis que se manifiesta como daño al hígado y probable daño de músculos y otros tejidos (Mathews, 1944; Fredrickson *et al.*, 1994; King *et al.*, 1996). También se ha reportado que las flores y frutos del arbusto ocasionan toxicidad aguda a ovejas, cabras, conejos y antílopes, cuando se consumen en grandes cantidades (1% del peso corporal por día) o cuando el periodo de pastoreo es prolongado (Dollahite y Allen, 1975; Fredrickson *et al.*, 1994, 2000; Estell *et al.*, 2001). Los compuestos responsables de las alteraciones antes señaladas son algunos monoterpenoides (borneol, alcanfor, limoneno y β -pineno), cromenos y *p*-hidroxiacetofenonas (Oh *et al.*, 1967; Schwartz *et al.*, 1980; Estell *et al.*, 1994; Showalter, 1996; King *et al.*, 1996). Algunos autores sugieren que para evitar el envenenamiento del ganado, se restrinja el pastoreo a periodos de no floración, o bien remover la cera de la planta con disolventes apropiados antes de alimentar el ganado (Estell *et al.*, 1994 y 2001; Fredrickson *et al.*, 1994 y 2000).

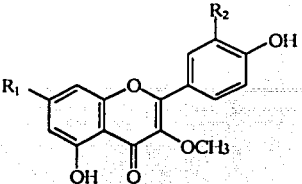
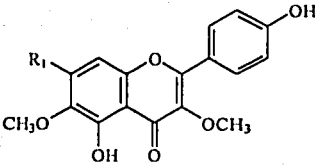
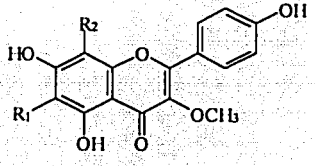
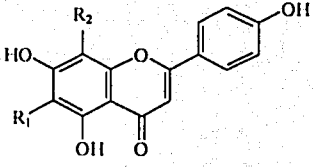
Por otro lado, los distintos estudios biológicos realizados sobre los extractos preparados con hexano, éter etílico y etanol a partir de las hojas de *F. cernua*, permitieron comprobar su actividad contra hongos (extracto hexánico), cianobacterias (extracto en éter) y plantas (ambos extractos). De la misma forma, las evaluaciones biológicas realizadas sobre termitas evidenció que los tres extractos presentan importantes propiedades insecticidas (Dayan y Tellez, 1999; Tellez *et al.*, 2001).

1.6.1 Antecedentes químicos de la especie *Flourensia cernua*.

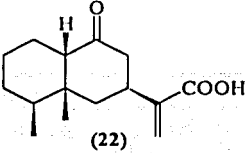
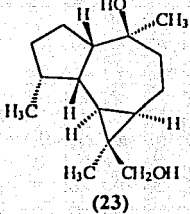
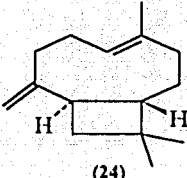
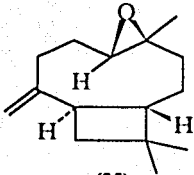
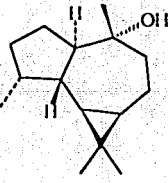
La especie *Flourensia cernua* ha sido investigada desde un punto de vista químico y los metabolitos secundarios aislados y caracterizados como resultado de su estudio incluyen flavonoides, sesquiterpenoides, triterpenoides, monoterpenoides, benzopiranos, benzofuranos, *p*-hidroxiacetofenonas, acetilenos y lactonas, los cuales se presentan en el Cuadro 4.






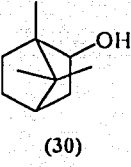

Cuadro 4. Metabolitos secundarios aislados de la especie *Flourensia cernua*.

NOMBRE	COMPUESTO	REFERENCIA
(14) 3- éter metílico de la quercetina (15) Kumatakenina.	 <p style="text-align: center;"> R_1 R_2 (14) OH OH (15) OCH₃ H </p>	Rao <i>et al.</i> , 1970. Dillon <i>et al.</i> , 1976. Dillon y Mabry, 1977.
(16) Hispidulina (17) Cirsimaritina	 <p style="text-align: center;"> R_1 R_2 (16) OH OH (17) OCH₃ OCH₃ </p>	Rao <i>et al.</i> , 1970.
(18) Neoschaftosido (19) Isoschaftosido	 <p style="text-align: center;"> R_1 R_2 (18) Glu Arab (19) Arab Glu </p>	Dillon <i>et al.</i> , 1976.
(20) Vicenina 1 (21) Vicenina 2	 <p style="text-align: center;"> R_1 R_2 (20) Xil Glu (21) Glu Xil </p>	Dillon <i>et al.</i> , 1976.

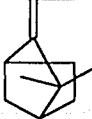
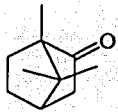
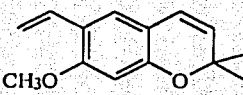
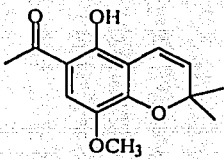
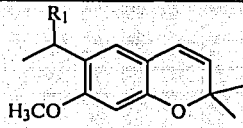
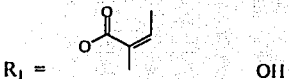

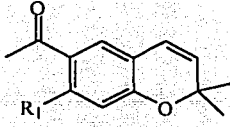

Cuadro 4. Metabolitos secundarios aislados de la especie *Flourensia cernua* (continuación).

NOMBRE	COMPUESTO	REFERENCIA
SESQUITERPENOIDES		
(22) Ácido flourénsico	 <p>(22)</p>	Kingston <i>et al.</i> , 1971. Kingston <i>et al.</i> , 1975.
(23) Flourensadiol	 <p>(23)</p>	Kingston <i>et al.</i> , 1975. Pettersen <i>et al.</i> , 1975.
(24) β -Cariofileno.	 <p>(24)</p>	Estell <i>et al.</i> , 1994.
(25) Óxido de cariofileno.	 <p>(25)</p>	Estell <i>et al.</i> , 1994.
(26) Globulol.	 <p>(26)</p>	Estell <i>et al.</i> , 1994.

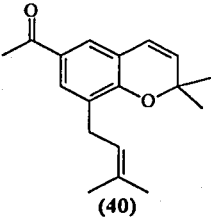
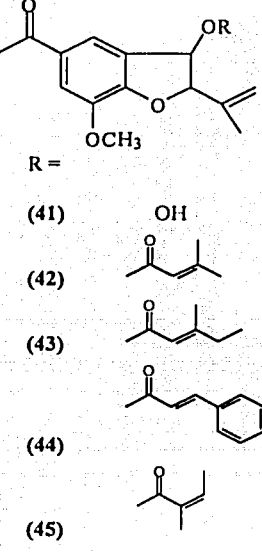

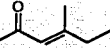
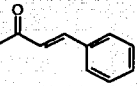

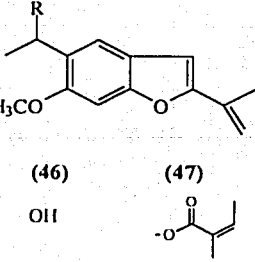

Cuadro 4. Metabolitos secundarios aislados de la especie *Flourensia cernua* (continuación).

NOMBRE	COMPUESTO MONOTERPENOIDES	REFERENCIA
(27) β -Mirreno	 <p>(27)</p>	Estell <i>et al.</i> , 1994.
(28) 3-Careno	 <p>(28)</p>	Estell <i>et al.</i> , 1994.
(29) 1,8-Cineol	 <p>(29)</p>	Estell <i>et al.</i> , 1994.
(30) Borneol	 <p>(30)</p>	Estell <i>et al.</i> , 1994.
(31) Limoneno	 <p>(31)</p>	Estell <i>et al.</i> , 1994.

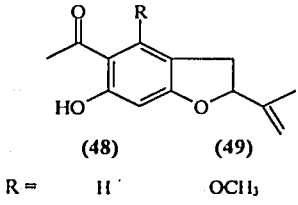
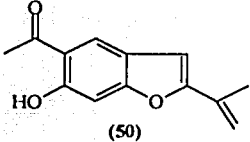
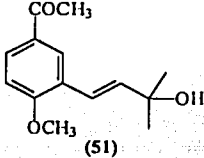
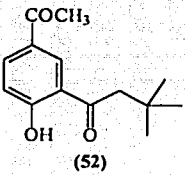
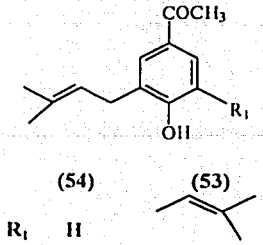
Cuadro 4. Metabolitos secundarios aislados de la especie *Flourensia cernua* (continuación).

NOMBRE	COMPUESTO	REFERENCIA
MONOTERPENOIDES		
(32) Canfeno	 <p style="text-align: center;">(32)</p>	Estell <i>et al.</i> , 1994.
(33) Alcanfor	 <p style="text-align: center;">(33)</p>	Estell <i>et al.</i> , 1994.
BENZOPIRANOS		
(34) Anhidroencecalinol	 <p style="text-align: center;">(34)</p>	Bohlmann y Grenz, 1977.
(35) 6-Acetil-5-hidroxi-8-metoxi-2,2-dimetil-2H-1-benzopirano.	 <p style="text-align: center;">(35)</p>	Bohlmann y Grenz, 1977.
(36) Encecalinol	 <p style="text-align: center;">(36)</p>	Bohlmann y Grenz, 1977.
(37) Angelato de encecalinol	<p style="text-align: center;">(37)</p>  <p style="text-align: center;">R₁ =  OH</p>	
(38) Desmetilencecalina	 <p style="text-align: center;">(38)</p>	Bohlmann y Grenz, 1977.
(39) 6-Acetil-2,2-dimetil-2H-1-benzopirano.	<p style="text-align: center;">(39)</p>  <p style="text-align: center;">R₁ = OH H</p>	

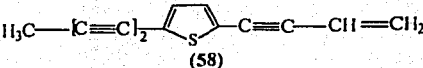
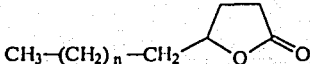
Cuadro 4. Metabolitos secundarios aislados de la especie *Flourensia cernua* (continuación).

NOMBRE	COMPUESTO	REFERENCIA
BENZOPIRANOS		
(40) 6-Acetil-8-(3,3-Dimetilalil)-2,2-dimetilcromeno.	 <p style="text-align: center;">(40)</p>	Bohlmann y Grenz, 1977.
BENZOFURANOS		
(41) Cernuanona (42) Senociato de cernuanona (43) 3-Metil-2-pentenoil cernuanona (44) Cinamoato de cernuanona (45) Angelato de cernuanona	 <p style="text-align: center;">R =</p> <p style="text-align: center;">(41) OH</p> <p style="text-align: center;">(42) </p> <p style="text-align: center;">(43) </p> <p style="text-align: center;">(44) </p> <p style="text-align: center;">(45) </p>	Bohlmann y Grenz, 1977.
BENZOFURANOS		
(46) Flourensianol (47) Angelato de flourensianol	 <p style="text-align: center;">R =</p> <p style="text-align: center;">(46) OH</p> <p style="text-align: center;">(47) </p>	Bohlmann y Grenz, 1977.

Cuadro 4. Metabolitos secundarios aislados de la especie *Flourensia cernua* (continuación).

NOMBRE	COMPUESTO	REFERENCIA
(48) Dihidrocuparina. (49) 4-Metoxidihidro- cuparina.	 <p style="text-align: center;">(48) (49)</p> <p style="text-align: center;">R = H OCH₃</p>	Bohlmann y Grenz, 1977.
(50) Euparina	 <p style="text-align: center;">(50)</p>	Bohlmann y Grenz, 1977.
<i>p</i> -HIDROXIACETOFENONAS		
(51) 3-(3-Hidroxi-3-metil- 1-butenil)-4-metoxi- acetofenona.	 <p style="text-align: center;">(51)</p>	Bohlmann y Grenz, 1977.
(52) 4-Hidroxi-3- isovalerilacetofenona.	 <p style="text-align: center;">(52)</p>	Bohlmann y Grenz, 1977.
(53) 3,5-Bis-(3,3- dimetilalil)-4- hidroxiacetofenona. (54) 3-(3,3-Dimetilalil)-4- hidroxi-acetofenona.	 <p style="text-align: center;">(54) (53)</p> <p style="text-align: center;">R₁ H</p>	Bohlmann y Grenz, 1977.

Cuadro 4. Metabolitos secundarios aislados de la especie *Flourensia cernua* (continuación).

NOMBRE	COMPUESTO ACETILENOS	REFERENCIA	
(55) 1-3-Tridecadieno-5,7,9,11-tetraeno.	$\text{H}_3\text{C}-[\text{C}\equiv\text{C}]_4-[\text{CH}=\text{CH}]_2\text{H}$ (55)		
(56) 1-Tridecadieno-3,5,7,9,11-pentaeno.	$\text{H}_3\text{C}-[\text{C}\equiv\text{C}]_5-\text{CH}=\text{CH}_2$ (56)		
(57) 4,6-Dieno-8,10,12-trieno-1-tetradecanol.	$\text{H}_3\text{C}-[\text{C}\equiv\text{C}]_3-[\text{CH}=\text{CH}]_2-(\text{CH}_2)_3\text{OH}$ (57)	Bohlmann y Grenz, 1977.	
(58) 2-(1,3-Pentadieno)-5-(1-ino-buteno) tiofeno.	 (58)		
LACTONAS			
(59) Tetracosan-4-ólida (60) Pentacosan-4-ólida (61) Hexacosan-4-ólida (62) Heptacosan-4-ólida (63) Octacosan-4-ólida (64) Nonacosan-4-ólida (65) Triacontan-ólida	 (59) (60) (61) (62) (63) (64) (65) n = 18 19 20 21 22 23 24		Pérez, 2000
OTROS			
(66) 1,3-Araquido behenicina.	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_{18}\text{CH}_3 \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_{20}\text{CH}_3 \end{array}$ (66)	Kingston <i>et al.</i> , 1975.	
(67) 1-Pentacosanol	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{22}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ (67)	Pérez, 2000	

1.7 Consideraciones sobre el proyecto "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America".

En el año de 1992, diversas agencias gubernamentales de Estados Unidos de Norteamérica preocupadas por la conservación de los recursos naturales y el descubrimiento de productos bioactivos de importancia terapéutica y agroquímica, fundaron un programa de carácter internacional conocido por sus siglas en inglés como ICBG (International Cooperative Biodiversity Group Program). Este programa tiene como objetivos primordiales: (i) el descubrimiento de nuevos fármacos, (ii) la conservación de la biodiversidad y (iii) el apoyo al crecimiento económico de países en vías de desarrollo (Suffness *et al.*, 1995).

Los objetivos particulares del programa ICBG, patrocinado por las siguientes instituciones de Estados Unidos: National Science Foundation (NSF), U. S. Agency for International Development (USAID) y National Institutes of Health (NIH), son los siguientes:

1. Identificar y conservar los recursos naturales renovables incluyendo los conocimientos etnobotánicos de los países en vías de desarrollo.
2. Desarrollar estrategias ecológicas y económicas para el cultivo de recursos naturales en países en vías de desarrollo.
3. Implementar la investigación para el estudio de los productos naturales a bajos costos.
4. Establecer nuevas industrias.
5. Descubrir nuevos fármacos de origen natural para el tratamiento de enfermedades que afectan de manera importante a la población mundial.
6. Contribuir al mejoramiento de la infraestructura de investigación y a la formación de recursos humanos de los países en vías de desarrollo que participan en el programa.
7. Descubrir agroquímicos para la conservación de cultivos.

En el contexto del programa ICBG, en el año de 1993 se creó el proyecto "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America" (Suffness *et al.*, 1995; Timmermann *et al.*, 1999), el cual está enfocado al descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos y agroquímicos a partir de las plantas de ecosistemas áridos y semiáridos de Argentina, Chile y



México. El programa es coordinado por la Dra. Bárbara Timmermann del departamento de Farmacología y Toxicología de la Universidad de Arizona en Tucson, Estados Unidos de Norteamérica.

En este proyecto también participan las siguientes instituciones: la Compañía BASF, los Laboratorios Wyeth y la Universidad de Illinois en Estados Unidos; la Universidad Nacional de la Patagonia (UNP) y el Instituto de Tecnología Agropecuaria (INTA) en Argentina; la Facultad de Química y el Instituto de Biología de la UNAM en México y finalmente en Chile, la Pontificia Universidad.

La Facultad de Química de la UNAM contribuye en la obtención de compuestos bioactivos a partir de plantas medicinales mexicanas realizando las siguientes actividades:

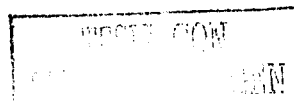
- Preparación de extractos vegetales a partir de las especies preseleccionadas mediante un criterio etnomédico.
- Envío de los extractos a los laboratorios participantes para determinar su actividad biológica potencial
- Fraccionamiento biodirigido de los extractos activos.
- Aislamiento y purificación de los compuestos responsables de las actividades biológicas.
- Elucidación de la estructura molecular de los principios biodinámicos aislados.

Desde sus inicios el proyecto **“Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America”** se ha desarrollado de una manera exitosa debido a que los beneficios que se han obtenido a través del esfuerzo conjunto de las universidades, compañías participantes y las agencias gubernamentales patrocinadoras han sido numerosos. En el caso particular de México estos beneficios han incidido primordialmente en la conservación de la biodiversidad en los estados de Chihuahua y San Luis Potosí a través de varios programas educativos desarrollados por los Doctores Robert Bye y Edelmira Linares del Instituto de Biología de la UNAM. A través de este proyecto se ha promovido la creación de programas de información pública acerca del cuidado y cultivo de las plantas medicinales más utilizadas en varias comunidades indígenas mexicanas. También con este mismo propósito se han creado programas de enseñanza



escolarizados en la Patagonia en Argentina y en la región de Pucón en Chile. Para estos dos países se creó un banco de datos altamente especializado con información acerca de la distribución de especies medicinales en peligro de extinción con la intención de facilitar su conservación, propagación y cultivo (Zarate *et al.*, 1996; Timmermann *et al.*, 1999).

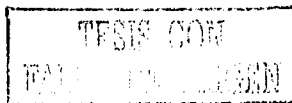
Por último, la incidencia del programa ha sido importante en la formación de recursos humanos y en aportaciones al conocimiento de la biodiversidad tanto de Chile como de México.



II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

Considerando la problemática actual sobre la alta toxicidad, poca eficacia y baja selectividad que presentan algunos fármacos antifímicos, y los efectos tóxicos de los agentes herbicidas sintéticos de uso actual, se justifica la necesidad de continuar con la búsqueda de agentes antifímicos y herbicidas novedosos, que puedan emplearse por sí mismos o que sirvan como prototipos estructurales para el diseño y síntesis de análogos más potentes, selectivos y eficaces. En este sentido, la biodiversidad de México ofrece buenas posibilidades para el descubrimiento de nuevas fitotoxinas y compuestos antifímicos de utilidad para el desarrollo de agentes agroquímicos y terapéuticos, respectivamente. De manera adicional, en México existe una gran tradición en el uso de plantas con fines curativos, mismas que constituyen un punto de partida apropiado para el descubrimiento de nuevos productos bioactivos. El descubrimiento de herbicidas y sustancias de utilidad terapéutica con base en el criterio etnomédico es un hecho bien documentado en la literatura científica de los productos naturales de aprovechamiento económico (Cutler, 1988; Lewis y Elvin, 1995; Houghton, 2001). Así mismo, el descubrimiento de principios alelopáticos con base en consideraciones de tipo ecológico, también constituye una fuente importante de agentes herbicidas potenciales (Macías, 1995; Vyvyan, 2002).

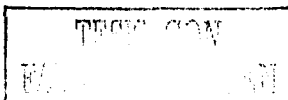
En el marco del proyecto de investigación "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America" (Suffness *et al.*, 1995; Timmermann *et al.*, 1999), la evaluación del potencial antimicobacteriano de un extracto de los tallos de *P. sanctum* en el Instituto de Investigaciones sobre la Tuberculosis de la Universidad de Illinois, Chicago permitió establecer sus propiedades antimicobacterianas. El extracto inhibió en un 95 % el crecimiento de *M. tuberculosis*. Así mismo, la evaluación del extracto preparado a partir de las partes aéreas de *F. cernua* sobre la germinación y el crecimiento radicular de las arvenses *E. crus-galli* y *A. hypochondriacus* empleando el bioensayo de la caja de Petri confirmó el potencial fitotóxico de esta especie. Por lo tanto, los objetivos primordiales del presente trabajo de tesis son obtener los productos naturales responsables de las actividades antifímica y fitotóxica detectadas de manera preliminar en los extractos de *Piper sanctum* (Miq.) Schl. (Piperaceae) y *Flourensia cernua* D.C. (Asteraceae), respectivamente, a través, de un estudio



fitoquímico biodirigido, y con la finalidad de contribuir al desarrollo de agentes terapéuticos y agroquímicos, respectivamente.

Los objetivos específicos se detallan a continuación:

- i. Separar los constituyentes antifímicos del extracto activo de *P. sanctum* mediante un procedimiento biodirigido.
- ii. Obtener los principios fitotóxicos de *F. cernua* utilizando también una estrategia biodirigida. Como ensayo de monitoreo se empleará un método bioautográfico.
- iii. Enviar las fracciones y compuestos puros obtenidos de los tallos de *P. sanctum* al Instituto de Investigaciones sobre la Tuberculosis de la Universidad de Illinois, Chicago, para determinar su actividad antimicobacteriana a través de un ensayo de tipo fluorimétrico MABA (Microplate Alamar Blue Assay).
- iv. Cuantificar la actividad fitotóxica de los productos aislados a partir de las fracciones fitotóxicas mediante el método de la caja de Petri.
- v. Establecer la estructura molecular de los compuestos activos obtenidos, mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.



III. PARTE EXPERIMENTAL.

3.1 Procedimientos Generales.

3.1.1 Análisis Cromatográficos.

Los análisis cromatográficos, en las modalidades de cromatografía en capa fina analítica (CCF) y cromatografía en capa fina preparativa (CCFP), se realizaron de acuerdo a las técnicas convencionales (Marcel, 1992) empleando diversos sistemas de elución. La CCF se efectuó sobre placas de aluminio de diferentes dimensiones recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla 3.5-7.0 ASTM) de 0.25 mm de espesor. Como agente revelador se empleó sulfato cérico amoniacal (Lowrey *et al.*, 1993).

La separación y la purificación de los productos naturales mediante CCFP se realizó sobre placas de vidrio (20 x 20 cm) recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck) de 0.25 mm de grosor. La cromatografía de adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice [Kieselgel 60 Merck, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, malla de 70 - 230 μ m ASTM].

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se realizó en un cromatógrafo marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, M. A., USA) equipado con un detector de UV con arreglo de diodos (996). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa de software Millennium 2000 (Waters). Los análisis se realizaron a temperatura ambiente. La purificación se efectuó empleando una columna de gel de sílice (Waters, μ porasil, 125 Å, tamaño de partícula de 10 μ m) de 19 mm de diámetro interno y 300 mm de longitud.

Se recurrió a la técnica de corte de núcleo y reinyección de la muestra, la cual consiste en someter el o los picos mayoritarios de interés a un corte, eliminando así la contaminación causada por compuestos minoritarios eluidos antes y después del pico en cuestión, mismo que se reinyectó en el sistema cromatográfico tantas veces como fue necesario para alcanzar su purificación (Hostettman y Hostettmann, 1998).

3.1.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Para el registro de los espectros en el infrarrojo (IR) se empleó un espectrofotómetro modelo 599-B, de rejilla Perkin-Elmer, utilizando la técnica de pastilla de KBr o película.

La rotación óptica y los espectros en el UV se obtuvieron en un polarímetro digital JASCO Dip 360 y en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 202, respectivamente.

Los espectros de masas de impacto electrónico (EMIE) se obtuvieron mediante un espectrómetro de masas HP 5890 (serie II) por introducción directa a 70 eV y un barrido de 33 a 800 unidades de masa carga (m/z) por segundo.

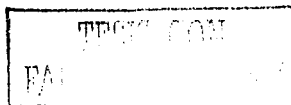
Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN- ^1H) y de carbono 13 (RMN- ^{13}C), así como los espectros de RMN bidimensional homonuclear (^1H - ^1H -COSY, NOESY) y heteronuclear (HETCOR, HMBC), se registraron en un aparato Varian VXR-300S a 300 (^1H)/75 (^{13}C) MHz, o Varian Unity INOVA o en un aparato Bruker DMX 500 a 500 (^1H)/125 (^{13}C) MHz, empleando CDCl_3 y CD_3OD como disolventes. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm, referidos al TMS como estándar interno.

El registro de los espectros se efectuó en la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación [(USAI), Facultad de Química], en el Instituto de Química de la UNAM y en el laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Autónoma Metropolitana, plantel Iztapalapa.

El estudio de difracción de rayos X se efectuó en el Instituto de Química, UNAM y se obtuvo en un difractómetro Nicolet R3m.

3.2 Recolección e identificación del material vegetal de las especies *Piper sanctum* (Miq.) Schl. y *Flourensia cernua* D. C.

El tallo de *Piper sanctum* (Miq.) Schl. se recolectó en los Tuxtlas en el municipio de San Andrés Tuxtla, estado de Veracruz, el día 4 de Mayo de 1999. Las hojas de *Flourensia cernua*



D. C., se obtuvieron en el mercado de San Luis Potosí, San Luis Potosí, el día 28 de Octubre de 1995.

La recolecta y clasificación de las dos especies estuvieron a cargo del Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM). Un ejemplar de cada espécimen se depositó como referencia en la colección etnobotánica del Herbario Nacional MEXU del Instituto de Biología, con los números de Voucher; GM 423-t para *P. sanctum* y R. Bye 20468 para la especie *F. cernua*.

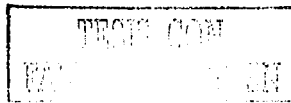
3.3 Ensayos biológicos.

3.3.1 Determinación de la actividad antimicobacteriana para la especie *P. sanctum*.

La determinación de la actividad antimicobacteriana del extracto, fracciones y compuestos puros obtenidos a lo largo del estudio biodirigido de *P. sanctum*, se realizó en el Instituto de Investigaciones sobre la Tuberculosis de la Universidad de Illinois, en la ciudad de Chicago, Illinois, Estados Unidos. Para ello se aplicó el bioensayo de tipo fluorimétrico MABA (Microplate Alamar Blue Assay) de acuerdo a los protocolos previamente descritos (Collins y Franzblau, 1997; Cantrell *et al.*, 1998).

La prueba de susceptibilidad microbiana se realizó por el método de microdilución sobre una microplaca de 96 pozos de fondo claro (Packard Instrument Co., Meriden, Conn), donde se colocaron unas series de diluciones (1:2) de una solución concentrada de la muestra a evaluar. A continuación se evaporó el disolvente y se procedió a sembrar 0.1 mL de inóculo de la cepa de *M. tuberculosis* H₃₇ RV ATCC 27294 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) previamente desarrollada en el medio Middlebrook 7H9 broth (Difco) y estandarizada a 2×10^5 UFC (unidades formadoras de colonias). El volumen necesario para obtener las concentraciones apropiadas se completó con el mismo medio de cultivo.

Adicionalmente, se preparó un control positivo (medio y rifampina 2 µg/µL) y un control de crecimiento (medio e inóculo) en la misma placa, la cual se incubó a 37 °C durante 4 días. Al cabo de este periodo, se adicionó a cada pozo 20 µL de la solución reveladora de azul de alamar y 12.5 µL de "tween" 80 (20 %); la placa se incubó nuevamente a 37 °C; a las 12 y 24 h de incubación, se realizó la lectura de las placas. El cambio en el color de azul a rosa



fluorescente indica el crecimiento celular o viabilidad. El crecimiento se mide con un fluorímetro o espectrómetro en unidades de fluorescencia (UF) o visualmente. La concentración mínima inhibitoria (CMI), se encuentra definida como la concentración más baja de muestra donde ya no hay cambio de color. El porcentaje de inhibición se determina de acuerdo a la relación UF de la muestra / UF del control positivo x 100.

3.3.2 Determinación de la actividad fitotóxica para la especie *F. cernua*.

3.3.2.1 Evaluación fitotóxica cuantitativa.

La determinación cuantitativa de la actividad fitotóxica a nivel preemergente para el extracto, fracciones primarias y compuestos puros, se realizó valorando su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular en semillas de las especies *Amaranthus hypochondriacus* L. y *Echinochloa crus-galli* (Beauv) L., empleando el método de la caja de Petri (Castañeda *et al.*, 1992; Anaya *et al.*, 1995).

El bioensayo se realizó en cajas de Petri que contenían un disco de papel filtro de 10 cm de diámetro (Whatman No. 1). Las muestras a evaluar se disolvieron en diclorometano o en metanol preparando disoluciones a las concentraciones de 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, 3 mL de cada disolución se vertió sobre el papel filtro en diferentes cajas de Petri permitiendo la evaporación completa del disolvente. Una vez completada la evaporación, se inició la germinación adicionando a cada caja de Petri 3 mL de agua destilada y 15 semillas de la especie de prueba. La incubación se realizó a 30 °C y la actividad fitotóxica se determinó calculando el porcentaje del crecimiento radicular y el de la germinación después de 24 h para *A. hypochondriacus* y 48 h para *E. crus-galli*. El control negativo (agua), positivo [ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)] y de disolvente (CH_2Cl_2 o MeOH) se procesaron de la misma manera.

Estas determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba estadística de ANADEVVA ($\alpha = 0.05$). El cálculo de los valores de CI_{50} se realizó utilizando un análisis Probit a partir de los porcentajes de inhibición obtenidos.



Una vez más, este bioensayo permitió detectar la actividad fitotóxica presente en el extracto de las hojas de *F. cernua* durante las evaluaciones preliminares.

3.3.2.2 Evaluación fitotóxica cualitativa.

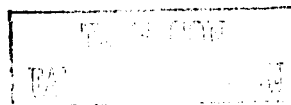
Para monitorear la actividad fitoinhibitoria de las fracciones obtenidas a lo largo del estudio biodirigido de *F. cernua*, se utilizó un método bioautográfico (Inoue *et al.*, 1992).

La bioautografía se realizó sobre placas de vidrio recubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ (2.5 x 10 cm, 0.25 mm de espesor, Merck) siguiendo las técnicas convencionales de CCF y empleando semillas de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli* como especies de prueba. Se aplicó 2 mg de la muestra a evaluar disueltos en la mínima cantidad del disolvente apropiado sobre las placas, las cuales se desarrollaron en un sistema de elución adecuado. Al término del proceso de elución se permitió la evaporación completa del disolvente, posteriormente las placas se cubrieron con 5 mL de una suspensión de agar bacteriológico al 1 % (DIFCO). Una vez solidificado el agar, se colocaron las semillas de prueba sobre la superficie de una manera homogénea. Las placas se incubaron bajo una atmósfera húmeda y en total oscuridad a 28 °C durante 24 h y 48 h para *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli*, respectivamente.

Transcurrido el periodo de incubación se detectaron las zonas de inhibición de la germinación o crecimiento radicular y se determinó el factor de retención (R_r) por comparación con una placa control eluida bajo las mismas condiciones y revelada con el agente cromógeno apropiado. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se emplearon controles de disolvente y control positivo de ácido 2,4-D.

3.4 Preparación de los extractos orgánicos vegetales.

El proceso de desecación del material vegetal se llevó a cabo a temperatura ambiente bajo la sombra, una vez desecado se fragmentó en un molino de cuchillas Willey Modelo 4.



El material vegetal seco y molido del tallo de *P. sanctum* (2.95 Kg) se extrajo mediante un proceso de maceración; inicialmente con una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) y posteriormente con MeOH. El extracto final se filtró y se concentró al vacío obteniéndose 95.0 g de un residuo café.

De la misma forma 2.431 Kg de hojas secas y molidas de *F. cernua* se maceraron inicialmente con una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) y posteriormente con MeOH. El extracto final se filtró y se concentró al vacío obteniéndose 600 g de un residuo pastoso verde.

3.5 Estudio Químico de la especie *Piper sanctum*.

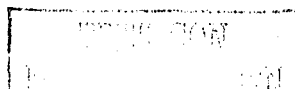
3.5.1 Fraccionamiento primario del extracto total de *P. sanctum*.

El extracto crudo de la especie *P. sanctum* (95.0 g) se fraccionó mediante una cromatografía en columna abierta empleando como fase estacionaria gel de sílice (1.25 Kg); el proceso de elución se efectuó con un gradiente de polaridad hexano-AcOEt-MeOH. Este proceso generó un total de 12 grupos de fracciones primarias (F_1 a F_{12}). La evaluación de las mismas sobre la inhibición del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* mediante un bioensayo de tipo fluorimétrico, permitió evidenciar que la actividad biológica se concentraba en las fracciones primarias F_2 , F_3 , F_5 , F_6 y F_8 . El proceso cromatográfico correspondiente al fraccionamiento primario del extracto total de *P. sanctum* se resume en el Cuadro 5.

3.5.2 Aislamiento del eugenol (68) y del éter metílico del eugenol (69) a partir de la fracción primaria activa F_2 .

El fraccionamiento de la fracción primaria activa F_2 mediante una cromatografía en columna abierta [80 g, gel de sílice; Hex (99:1) \Rightarrow CH_2Cl_2 (0:1) y CH_2Cl_2 (1:0) \Rightarrow MeOH (1:1)] permitió la obtención de 11 grupos de fracciones secundarias; F_2 -I a F_2 -XI.

La purificación mediante CCFP utilizando como sistema de elución CH_2Cl_2 de las fracciones F_2 -V [Hex- CH_2Cl_2 (9:1)] y F_2 -VII [Hex- CH_2Cl_2 (7:3)] permitió la obtención de 39.1



mg de eugenol (68) y 59.6 mg de éter metílico del eugenol (69), respectivamente. Ambos productos se obtuvieron bajo la forma de aceite ligeramente amarillo.

Cuadro 5. Fraccionamiento primario del extracto total de *P. sanctum*.

Eluatos	Fase móvil	Proporción	Fracciones reunidas	Clave	Peso (g)
1-24	Hexano	-	1-37	F ₁	0.7482
25-38	Hex / AcOEt	9:1			
39-57	Hex / AcOEt	8:2	38-43	*F ₂	0.9497
58-87	Hex / AcOEt	7:3	44-49	*F ₃	0.4461
88-101	Hex / AcOEt	6:4	50-56	F ₄	1.1367
102-117	Hex / AcOEt	1:1	57-78	*F ₅	3.5065
118-130	Hex / AcOEt	4:6	79-94	*F ₆	1.2042
131-143	Hex / AcOEt	3:7	95-113	F ₇	1.5924
144-154	Hex / AcOEt	2:8	114-145	*F ₈	3.2950
155-167	AcOEt	-	146-167	F ₉	1.9430
168-181	AcOEt/MeOH	9:1	168-181	F ₁₀	11.8482
182-198	AcOEt/MeOH	1:1	182-194	F ₁₁	28.7677
199-209	MeOH	-	195-209	F ₁₂	15.6454

* Fracciones bioactivas.

3.5.3 Aislamiento de la 5,6-deshidro-7,8-dihidrometisticina (6), la piperólida (10), la desmetoxyangonina (70) y la cefaranona B (71) a partir de las fracciones primarias activas F₅ y F₆.

Las fracciones activas F₅ y F₆ se combinaron con base en su similitud cromatográfica y se fraccionaron mediante una cromatografía en columna abierta [74 g, gel de sílice; Hex (1:0)⇌CH₂Cl₂ (0:1) y CH₂Cl₂ (1:0)⇌MeOH (4:6)]. El proceso anterior permitió obtener 7 grupos de fracciones secundarias; F₅-F₆-I a F₅-F₆-VII. La evaluación biológica de las mismas permitió evidenciar que la actividad se concentraba en las fracciones F₅-F₆-III, F₅-F₆-IV y F₅-F₆-VI.

De las fracciones F₅-F₆-III y F₅-F₆-IV [Hex-CH₂Cl₂ (3:7)] cristalizaron de manera espontánea 453 mg de unos cristales amarillos translúcidos en forma de agujas con un punto de



fusión de 102-103 °C identificados como la piperólida (10) y 70 mg de un sólido amorfo de apariencia esponjosa y color amarillo el cual se purificó mediante CLAR en fase normal utilizando como fase móvil una mezcla ternaria constituida por Hex-iPrOH-MeOH (85:7.5:7.5). El cromatograma resultante se muestra en la **Figura 5**. De este se proceso se obtuvieron 10.2 mg de la desmetoxyangonina (70) bajo la forma de un sólido blanco con un punto de fusión de 136 –137 °C.

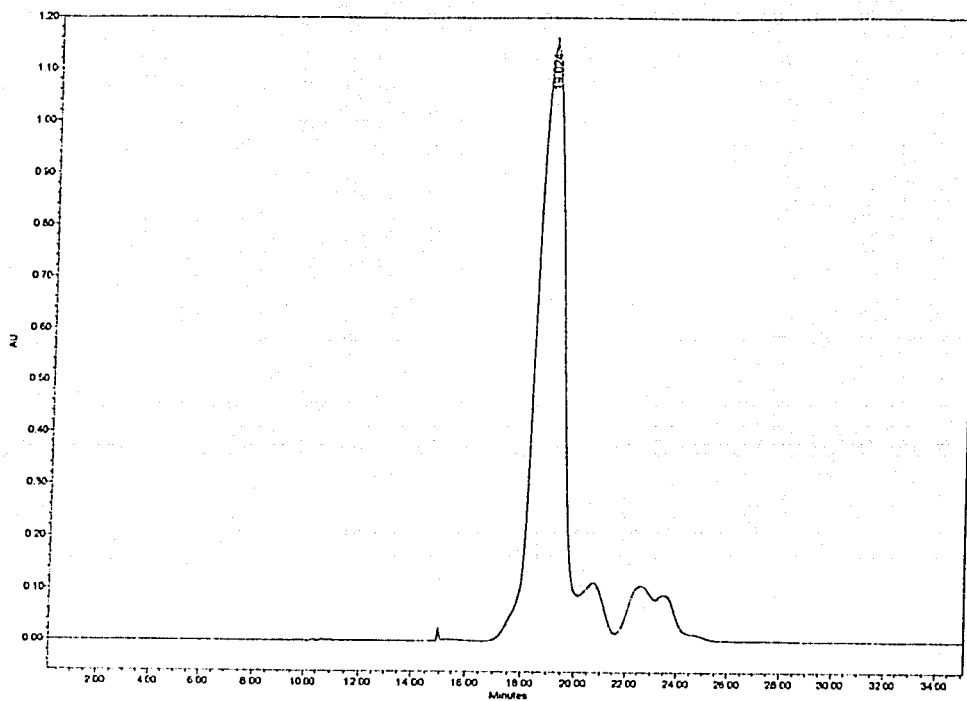


Figura 5. Cromatograma obtenido durante la purificación mediante CLAR de la desmetoxyangonina (70). Condiciones de análisis: Detector UV/Visible, $\lambda=342$ nm., sistema de elución; Hex-IPA-MeOH (85:7.5:7.5), flujo de 7 mL/min., muestra de 1 mg/50 μ L, pico a t_R 19.02 min.

La fracción **F₅-F₆-VI** [Hex-CH₂Cl₂ (1:9)] se sometió a un proceso cromatográfico en columna abierta [30 g, gel de sílice; Hex (1:0)⇌AcOEt (0:1)]. Este proceso permitió obtener siete grupos de fracciones terciarias; **F₅-F₆-VI-1** a **F₅-F₆-VI-7**.

Las fracciones terciarias **F₅-F₆-VI-4** [Hex-AcOEt (8:2)] y **F₅-F₆-VI-6** [Hex-AcOEt (6:4)] se sometieron a un procedimiento adicional de purificación mediante CCFP, utilizando como sistema de elución AcOEt. De este proceso se obtuvieron 6 mg de **5,6-deshidro-7,8-dihidrometisticina (6)** como un sólido de color amarillo con un punto de fusión de 150 °C, y 5 mg de la **cefaranona B (71)** en forma de agujas amarillas con un punto de fusión de 264 °C, respectivamente.

3.5.4 Aislamiento de la cefaradiona A (1) a partir de la fracción primaria activa **F₈**.

De la fracción primaria **F₈** (Cuadro 5) precipitaron de manera espontánea 96.3 mg de un sólido amorfo de color naranja. La purificación de este sólido mediante una cromatografía en columna [12 g, gel de sílice; CH₂Cl₂ (1:0)⇌MeOH (95:5)] generó cinco grupos de fracciones secundarias; **F₈-I** a **F₈-V**.

La fracción **F₈-II** se sometió a un procedimiento adicional de purificación mediante cromatografía en capa fina de tipo preparativa (CCFP), utilizando como sistema de elución CHCl₃-MeOH (9:1). El proceso permitió obtener 5 mg de la **cefaradiona A (1)** como un sólido de color naranja con un punto de fusión mayor a 300 °C (descomponen).

3.5.5 Aislamiento de la piperolactama A (72) y las amidas; *N-trans*-feruloiltiramina (73) y *N-p*-cumaroiltiramina (74) a partir de las fracciones primarias **F₈** y **F₉**.

El análisis cromatográfico realizado para las aguas madres de la fracción **F₈** y la fracción **F₉** permitió evidenciar la similitud entre ambas, por lo cual se decidió reunir las para su estudio conjunto. El fraccionamiento secundario de las fracciones **F₈-F₉** (3.867 g) realizado a través de



cromatografía en columna [75 g, gel de sílice; CH₂Cl₂ (1:0)⇌MeOH (1:1)], condujo a la obtención de ocho fracciones secundarias; F₈-F₉-I a F₈-F₉-VIII.

A partir de la fracción F₈-F₉-V [CH₂Cl₂-MeOH (98:2)] precipitaron espontáneamente 10 mg de un sólido amorfo de color amarillo. Su recristalización de MeOH permitió obtener 4 mg de piperolactama A (72) en forma de agujas translúcidas amarillas con un punto de fusión mayor a 300 °C (descompone).

Por otra parte, de las fracciones secundarias F₈-F₉-VI [CH₂Cl₂-MeOH (97:3)] y F₈-F₉-VII [CH₂Cl₂-MeOH (97:3 y 96:4)] precipitaron dos sólidos amorfos de color crema (70 mg) y café (78.7 mg), respectivamente. La purificación mediante CCFP de ambos sólidos utilizando AcOEt como eluyente, permitió la obtención de 12 mg de un producto amarillo pálido correspondiente a la *N-trans-feruloiltiramina* (73) con un punto de fusión de 94 °C; y 13.4 mg de *N-p-cumaroiltiramina* (74) como un sólido de color blanco con un punto de fusión de 248-249 °C.

3.6 Estudio Químico de la especie *Flourensia cernua*.

3.6.1 Fraccionamiento primario del extracto total de *F. cernua*.

El extracto total de la especie *F. cernua* (600 g) se fraccionó mediante una cromatografía en columna abierta, empleándose como fase estacionaria gel de sílice (3 Kg); el proceso de elución se efectuó con un gradiente de polaridad hexano-AcOEt-MeOH. Este proceso generó 10 grupos de fracciones primarias (Cuadro 6).

3.6.2. Aislamiento del orselinato de metilo (75) a partir de la fracción primaria activa F₄.

La fracción primaria activa F₄ (19.414 g, Cuadro 6) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna [215 g, gel de sílice; Hex (1:0)⇌AcOEt (0:1)]. Este proceso permitió la obtención de seis grupos de fracciones secundarias; F₄-I a F₄-VI. La evaluación de la actividad fitotóxica de las mismas indicó que solo la fracción F₄-II era activa.

De la fracción F₄-II [Hex-AcOEt (9:1)] precipitaron espontáneamente 36.6 mg de un sólido amorfo blanco. El análisis cromatográfico del mismo, reveló la presencia de un constituyente mayoritario, el cual se purificó mediante la técnica de CCFP utilizando como sistema de elución CH₂Cl₂-MeOH (98:2). Esta cromatografía permitió la obtención de 14.4 mg del orselinato de metilo (75) como un sólido amarillo y con un punto de fusión de 136-138 °C.

Cuadro 6. Fraccionamiento primario del extracto total de *F. cernua*.

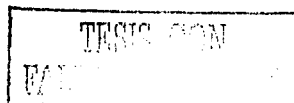
Eluatos	Fase móvil	Proporción	Fraciones reunidas	Clave	Peso (g)
1-20	Hexano	-	1-3	F ₁	0.6875
			4-19	* F ₂	0.0210
21-37	Hex / AcOEt	9:1	20-25	F ₃	15.8600
			26-38	* F ₄	19.4142
38-63	Hex / AcOEt	8:2	39-67	* F ₅	44.4982
64-87	Hex / AcOEt	7:3	68-80	* F ₆	16.6692
88-101	Hex / AcOEt	6:4	81-119	* F ₇	76.8473
102-120	Hex / AcOEt	1:1			
121-138	AcOEt	-	120-141	F ₈	69.8481
139-152	AcOEt/MeOH	9:1			
153-167	AcOEt/MeOH	8:2	142-173	F ₉	93.1196
168-175	AcOEt/MeOH	7:3			
176-178	AcOEt/MeOH	1:1	174-178	F ₁₀	45.0150

* Fracciones bioactivas.

3.6.3 Aislamiento del 3,7-éter dimetilico de la quercetina (76) y el *p*-hidroxi-cinamato de heneicosanilo (77) a partir de la fracción primaria activa F₅.

La fracción primaria activa F₅ (44.498 g, Cuadro 6) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna [500 g, gel de sílice; Hex (1:0)⇒AcOEt (0:1)]. Este proceso generó un total de ocho grupos de fracciones secundarias (F₅-I a F₅-VIII) y su evaluación biológica permitió determinar que la actividad se concentraba en la fracción F₅-IV.

El fraccionamiento terciario de la fracción activa F₅-IV (12.44 g, Hex-AcOEt 9:1), mediante cromatografía en columna [187.5 g, gel de sílice; Hex (1:0)⇒AcOEt (1:1)], condujo



a la obtención de seis fracciones terciarias; **F_{5-IV-1}** a **F_{5-IV-6}**. De estas fracciones, **F_{5-IV-4}** y **F_{5-IV-5}** presentaron actividad fitotóxica.

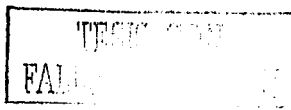
De la fracción **F_{5-IV-4}** (Hex-AcOEt 8:2), cristalizaron 12.4 mg del **3,7-éter dimetilico de la quercetina (76)** en forma de un sólido cristalino amarillo con un punto de fusión de 147-148 °C, y 196 mg de un sólido de color blanco identificado como **p-hidroxicinamato de hencicosanilo (77)** con un punto de fusión de 95-97 °C.

3.6.4 Aislamiento del ácido deshidroflourésico (80), del paquipodol (78) y de la kumatakenina (15) a partir de la fracción primaria **F₆**.

La fracción primaria activa **F₆** (Cuadro 5) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna, [270.1 g, gel de sílice; Hex (1:0)⇒AcOEt (0:1)]. Este proceso generó un total de ocho grupos de fracciones secundarias (**F_{6-I}** a **F_{6-VIII}**) encontrándose que las fracciones **F_{6-IV}** a **F_{6-VI}** eran fitotóxicas.

Con base en el perfil cromatográfico observado para las fracciones **F_{6-IV}** [Hex-AcOEt (8:2)] y **F_{6-V}** [Hex-AcOEt (7:3)], ambas se combinaron para su estudio químico. El proceso cromatográfico en columna de la reunión de estas fracciones [125 g, gel de sílice; CH₂Cl₂ (1:0)⇒MeOH (1:1)] permitió la obtención de un residuo café aceitoso. Parte de este residuo se purificó mediante CCFP empleando como sistema de elución CH₂Cl₂-MeOH (9:1), obteniéndose 18.9 mg del **ácido deshidroflourésico (80)**.

A partir de la fracción **F_{6-VI}** [Hex-AcOEt (8:2)] precipitaron 451.9 mg de un sólido amorfo de color amarillo verdoso; el análisis cromatográfico del mismo, permitió detectar la presencia de dos constituyentes mayoritarios, por lo que se procedió a realizar su separación mediante CCFP utilizando como sistema de elución CH₂Cl₂-MeOH (98:2). Al cabo de este proceso, se obtuvieron 33.3 mg del **paquipodol (78)** con un punto de fusión de 153-155 °C y 15.9 mg de la **kumatakenina (15)** con un punto de fusión de 215 °C, ambos como sólidos de color amarillo.



3.6.5 Aislamiento de la ermanina (79), del ácido deshidroflourensico (80) y del flourensadiol (23) a partir de la fracción primaria activa F₇.

De la fracción primaria activa F₇ (Cuadro 5) precipitó un sólido de color amarillo (978 mg) el cual se purificó mediante CCFP empleando como sistema de elución CH₂Cl₂-MeOH (97:3). Al cabo de la purificación se obtuvieron 533 mg **ermanina (79)** con un punto de fusión de 201-204 °C.

Posteriormente, las aguas madres de la fracción F₇ (76.847 g) se sometieron a un proceso cromatográfico en columna [533 g, gel de sílice; Hex (1:0)⇒AcOEt (0:1)] generando un total de ocho grupos de fracciones secundarias; F₇-I a F₇-VIII. La evaluación biológica de las mismas permitió determinar que la actividad se concentraba en las fracciones F₇-III, F₇-IV y F₇-VI.

A partir del estudio químico de las fracciones F₇-III y F₇-IV [Hex-AcOEt (8:2)], las cuales se combinaron con base en su perfil cromatográfico observado se obtuvo cantidades adicionales del **ácido deshidroflourensico (80)**.

El fraccionamiento terciario de la fracción activa F₇-VI [4.0 g, Hex-AcOEt (1:1)] mediante cromatografía en columna [60 g, gel de sílice; CH₂Cl₂ (1:0)⇒MeOH (0:1)] permitió la obtención de seis grupos de fracciones; F₇-VI-1 a F₇-VI-6, de las cuales solo la fracción F₇-VI-4 era activa.

El estudio mediante CCFP fase reversa para la fracción F₇-VI-4, empleando como sistema de elución MeOH-H₂O (9:1), permitió la obtención de 9.5 mg del **flourensadiol (23)** como un sólido blanco y un punto de fusión de 84-86 °C.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados de la presente investigación se describen en dos partes. La primera comprende el estudio químico de los tallos de *Piper sanctum* y la evaluación del potencial antimicobacteriano de los metabolitos aislados. La segunda parte se refiere al estudio fitoquímico biodirigido de *Flourensia cernua* incluyendo la evaluación del potencial fitotóxico de los compuestos obtenidos.

4.1 Estudio fitoquímico de la especie *Piper sanctum* (Miq.) Schl.

Con la finalidad de obtener los constituyentes activos a partir de la especie *P. sanctum*, se llevó a cabo su estudio fitoquímico biodirigido empleando el mismo ensayo fluorométrico para monitorear la actividad antimicobacteriana (inciso 3.3.1). La preparación del extracto activo a gran escala se realizó utilizando un proceso de maceración (inciso 3.4). El fraccionamiento preliminar del extracto mediante métodos cromatográficos permitió la obtención de doce fracciones primarias (F₁ a F₁₂, Cuadro 5). La evaluación biológica de las fracciones primarias, mediante el ensayo antes mencionado, determinó que la actividad se concentraba en las fracciones F₂, F₃, F₅, F₆ y F₈ (Cuadro 7). De manera adicional, para enriquecer algunos de los metabolitos detectados en la fracción F₈ se estudió la fracción F₉.

Con la intención de aislar y purificar los constituyentes bioactivos presentes en las fracciones F₂, F₅, F₆ y F₈, se efectuaron diversos análisis cromatográficos. Estos procesos permitieron el aislamiento de diez metabolitos secundarios, los cuales incluyen un alcaloide de tipo aporfina [cefaradiona A (1)], una dihidroestiril α -pirona [5,6-deshidro-7,8-dihidrometisticina (6)], una cinamoilbutenólida [Z-piperólida (10)], dos fenilpropanoides [eugenol (68) y éter metílico del eugenol (69)], una estiril α -pirona [desmetoxiyangonina (70)], dos fenantrolactamas [cefaranona B (71) y piperolactama A (72)] y dos amidas [*N*-transferuloiltiramina (73) y *N*-*p*-cumaroiltiramina (74)]. De estos, los productos 1, 6 y 10 se habían descrito con anterioridad en la especie (Langhammer *et al.*, 1972; Hänsel y Schulz, 1979;

Hänsel *et al.*, 1975), por lo tanto, los restantes compuestos son novedosos en la planta. En el Cuadro 8 se incluyen las estructuras de los compuestos aislados y sus rendimientos con relación al peso del material vegetal seco.

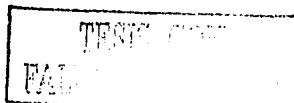
Cuadro 7. Actividad antimicobacteriana de las fracciones primarias obtenidas del extracto de *P. sanctum*.

<i>Fracciones primarias</i>	<i>Actividad antimicobacteriana (% de inhibición).</i>
extracto	95
F ₁	81
*F ₂	99
*F ₃	99
F ₄	67
*F ₅	99
*F ₆	98
F ₇	79
*F ₈	100
F ₉	81
F ₁₀	46
F ₁₁	30
F ₁₂	25

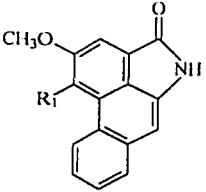
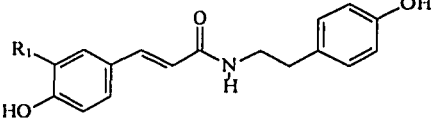
* Fracciones antimicobacterianas.
(criterio de actividad: % de inhibición \geq 95 %).

De manera general, la caracterización de los compuestos aislados se realizó mediante la aplicación de las técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales (inciso 3.1.2). Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos 1, 6, 10, 68 y 69 concordaron perfectamente con las descritas previamente en la literatura (Akasu *et al.*, 1974; Hänsel *et al.*, 1975; Hänsel y Schulz, 1979; Alencar *et al.*, 1984; Desai *et al.*, 1988; Achenbach *et al.*, 1991; Prizzolatti *et al.*, 2000). De manera adicional, la estructura del compuesto 10 se confirmó inequívocamente utilizando la técnica de difracción de rayos X (Figura 6).

A continuación, se describe de manera breve la elucidación estructural de los compuestos 70, 71, 72, 73 y 74.



Cuadro 8. Metabolitos secundarios aislados del tallo de la especie *P. sanctum* (continuación).

COMPUESTOS AISLADOS.	RENDIMIENTO (%) (con base en el peso del material vegetal seco).
 <p data-bbox="269 462 480 514">Cefaranona B (71) Piperolactama A (72)</p> <p data-bbox="519 439 585 514">R₁ OCH₃ OH</p>	<p data-bbox="861 326 1033 384">(71) 1.69×10^{-4} (72) 1.35×10^{-4}</p>
 <p data-bbox="207 713 493 768"><i>N-trans</i>-feruloiltiramina (73) <i>N-p</i>-cumaroiltiramina (74)</p> <p data-bbox="532 689 598 768">R₁ OCH₃ H</p>	<p data-bbox="861 619 1033 677">(73) 4.06×10^{-4} (74) 4.54×10^{-4}</p>

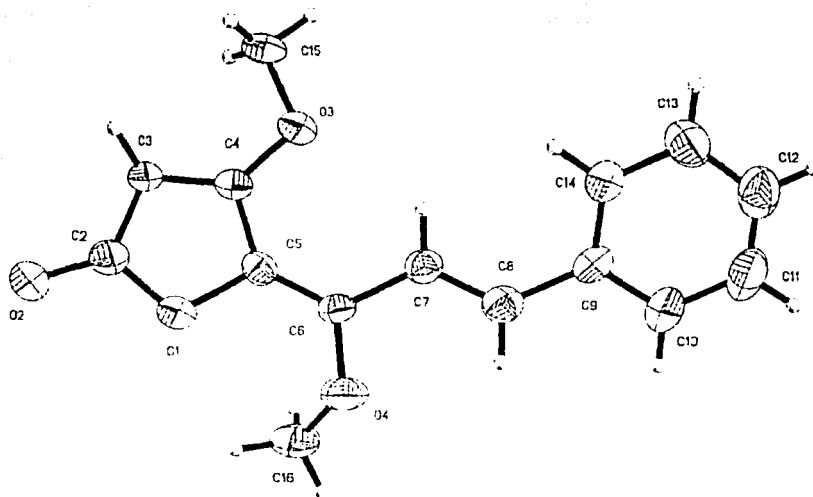
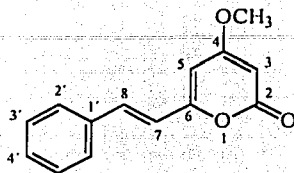


Figura 6. Proyección estereoscópica de rayos X de la Z-piperórida (10).

4.1.1 Caracterización de la desmetoxiyangonina (70).

El compuesto **70** se obtuvo como un sólido amarillo pálido con un p. f. de 136-137 °C; sus constantes espectroscópicas y espectrométricas se resumen en la Cuadro 9.

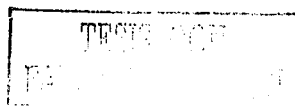


Desmetoxiyangonina.

Cuadro 9. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la desmetoxiyangonina (70).

Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
Peso molecular	228
UV (MeOH) λ _{max} nm (log ε)	207 (4.71), 224 (4.56), 230 (4.56), 254 (4.48), 342 (4.74).
IR (KBr) ν _{max} cm ⁻¹	3075, 3015, 2951, 1729, 1636, 1556, 1407, 1258, 1153, 964, 955, 832, 685.
EMIE <i>m/z</i> (int. rel.) Espectro 1	228 [M ⁺ (100)], 211 (4), 200 (37), 185 (9), 172 (5), 157 (35), 141 (4), 129 (14), 128 (10), 103 (11), 102 (5), 77 (11), 69 (11), 59 (3), 51 (4), 39 (1), 38 (1).
RMN- ¹ H 500 MHz (CD ₃ OD) Espectro 2	7.57 (2H, <i>m</i> , <i>J</i> = 8.3, 1.4, H-2', H-6'); 7.41 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 16.03, H-8); 7.35 (3H, <i>m</i> , <i>J</i> = 14.4, 1.3, H-3', H-5', H-4'); 6.83 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 16.05, 0.34, H-7); 6.22 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2.2, 0.47, H-5); 5.6 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2.2, H-3); 3.86 (3H, <i>s</i> , OCH ₃).
RMN- ¹³ C 125 MHz (CD ₃ OD) Espectro 3	173.6 (C-2), 166.6 (C-4), 160.3 (C-6), 136.7 (C-1'), 136.6 (C-8), 130.5 (C-4'), 129.9 (C-3'), 128.6 (C-2'), 120.0 (C-7), 102.7 (C-5), 89.9 (C-3), 56.9 (OCH ₃).

* *J* en Hz, δ en ppm.

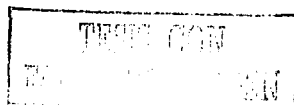


El espectro en el IR presentó absorciones asociadas con el carácter aromático de la molécula (3015, 1609 y 1556 cm^{-1}) y la presencia de una lactona de seis miembros altamente conjugada (1729 cm^{-1}). El espectro de masas (**Espectro 1**) generado por impacto electrónico presentó el ion molecular en una relación de m/z de 228 uma (pico base). La fórmula molecular se estableció como $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$ y permite 9 grados de insaturación.

Consideraciones de tipo quimiotaxonómico, así como la información proporcionada por la espectrometría de masas y el análisis detallado de los espectros de RMN (**Espectros 2 y 3**), permitieron establecer que el compuesto **70** era una estiril α -pirona (Klohs et al., 1959; Young et al., 1966; Smith, 1983; Smith et al., 1984).

Las características más importantes de los espectros de RMN del producto **70** se describen a continuación:

- i. En el espectro de ^{13}C se observan doce señales lo cual indica la presencia de dos señales equivalentes. Así, en δ_{C} 128.0 (C-2', C-6'); δ_{C} 129.9 (C-3', C-5'); y δ_{C} 130.5 (C-4') se encuentran señales para un anillo bencénico monosustituido. Estas señales, mostraron correlación en el espectro HSQC con los multipletes centrados en δ_{H} 7.57 y 7.35 correspondientes a los hidrógenos H-2', H-6' ($J= 18.3, 1.4$ Hz) y H-3', H-5', H-4' ($J= 14.9, 1.3$ Hz), respectivamente. Las correlaciones entre estos hidrógenos pueden ser observadas en el espectro COSY de la **Figura 7**.
- ii. En $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 6.83/120.0 y $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 7.41/136.6 se observó un sistema AB correspondiente a la doble ligadura disustituida entre C-7 y C-8. La magnitud de la constante de acoplamiento ($J= 16.05$ Hz) es consistente con la disposición *trans* de la misma. Estas señales muestran correlación en el espectro COSY (**Figura 7**).
- iii. En δ_{H} 5.60 y δ_{H} 6.22 se observan dos dobletes para los hidrógenos H-3 y H-5 de la porción α -pirona, respectivamente. Los cuales, se encuentran relacionados entre sí por un acoplamiento de tipo W ($J= 2.2$ Hz). Estas señales muestran correlación en el espectro HSQC con las señales para los metinos C-3 y C-5 en δ_{C} 89.4 y 102.0, respectivamente.
- iv. En $\delta_{\text{C}} / \delta_{\text{H}}$ 56.9 / 3.86 se aprecian las señales para un grupo metoxilo.



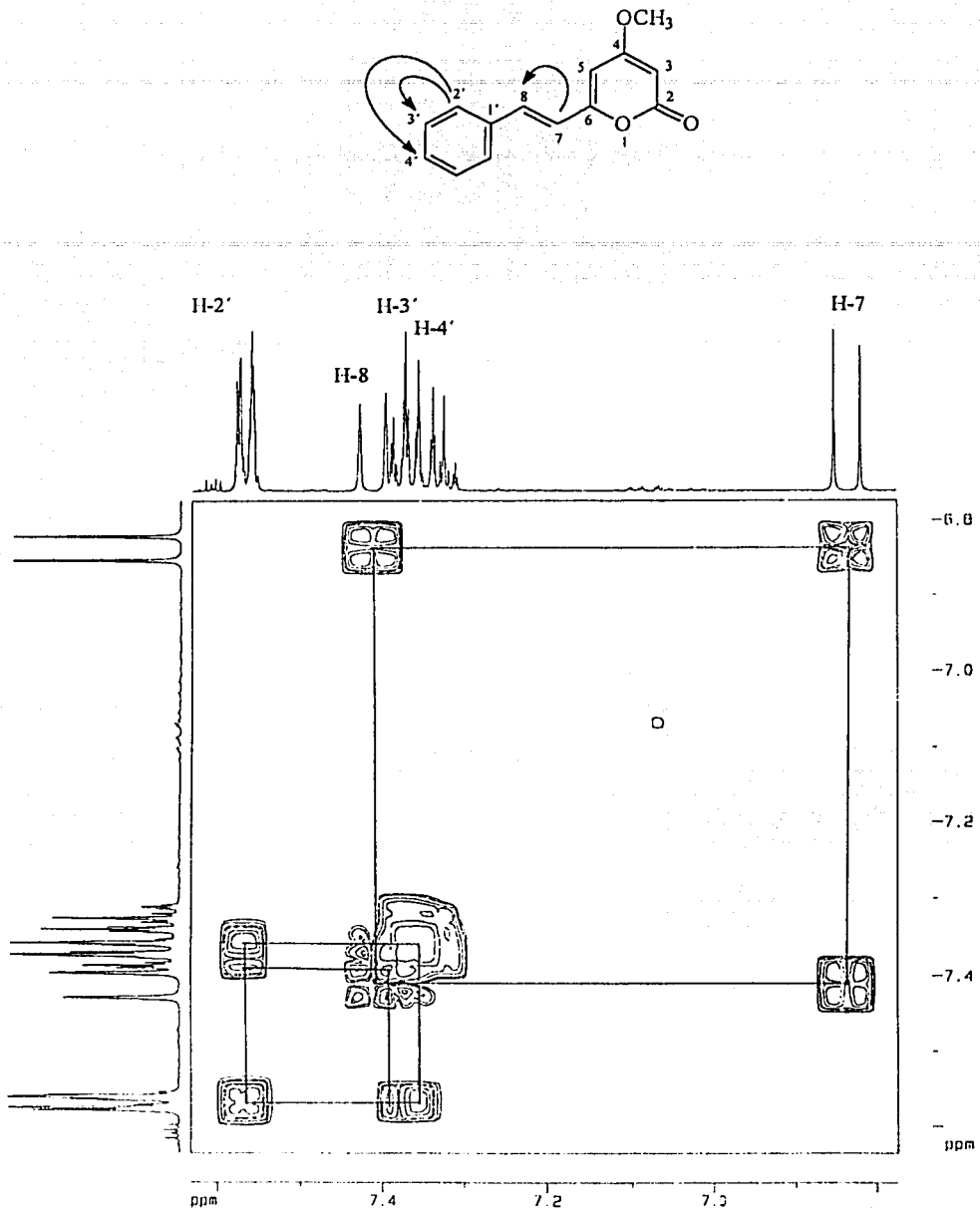
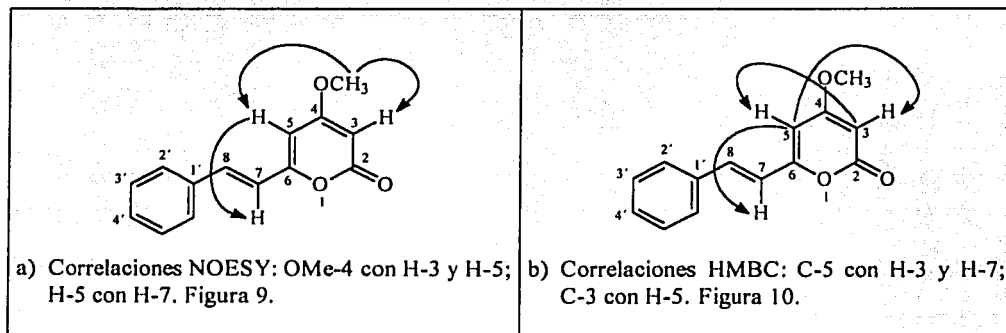


Figura 7. Espectro de RMN-¹H COSY de la desmetoxiyangonina (70).

v. Por último, el espectro de RMN- ^{13}C presenta cuatro señales para carbonos cuaternarios: dos son asignables a la función lactónica y aparecen en δ_c 160.3 (C-6) y δ_c 173.6 (C=O); el tercero corresponde a un carbono *ipso* y se aprecia en δ_c 136.7 (C-1'); la última señal aparece en δ_c 166.6 y corresponde al carbono unido a la función metoxilo.

El análisis detallado de los espectros NOESY y HMBC (Espectros 4 y 5) permitieron establecer los cuadros de conectividad indicados en la **Figura 8**, los cuales son consistentes con la ubicación del grupo metoxilo en la posición C-4 de la pirona.

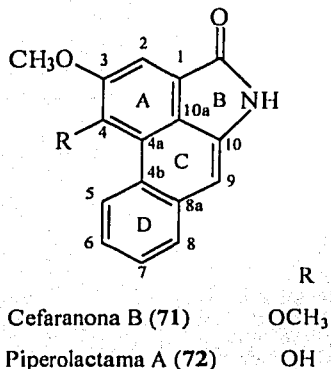
Figura 8. Correlaciones observadas en los espectros NOESY y HMBC del compuesto 70.



Con base en las evidencias presentadas el compuesto 70 se caracterizó como la **desmetoxiyangonina**, una kavalactona presente en la raíz y hojas de *Piper methysticum*, planta ampliamente valorada en la medicina folklórica como ansiolítico y para la preparación de una bebida ceremonial y estimulante (Klohs *et al.*, 1959; Young *et al.*, 1966; Smith, 1983, 1984). Su aislamiento a partir de *Piper sanctum* constituye el segundo reporte de su presencia en el género *Piper*.

4.1.2 Caracterización de las fenantrolactamas; cefaranona B (71) y piperolactama A (72).

Los productos **71** y **72** se obtuvieron en forma de agujas amarillas translúcidas con un p. f. de 264 °C y un p. f. mayor a 300 °C, respectivamente. Las constantes espectroscópicas y espectrométricas de estos alcaloides se resumen en las Cuadros 10 y 11.



Los espectros en el IR de ambos compuestos presentan bandas de absorción asociadas con la presencia de una función amida y un núcleo aromático (3180, 1708, 1676, 1656 cm⁻¹). En el espectro del compuesto **72** se observa además la señal característica de un grupo hidroxilo (3479 cm⁻¹). Sus fórmulas moleculares se establecieron por EMIE (Espectros 6 y 9) como C₁₇H₁₃NO₃ para el compuesto **71** y C₁₆H₁₁NO₃ para el compuesto **72** y presentaron iones moleculares en una relación de *m/z* de 279 y 265 uma, respectivamente. En ambos casos la fórmula molecular permite 12 grados de insaturación.

Con base en el análisis comparativo de sus espectros de RMN (Espectros 7, 8, 10 y 11) con aquellos de alcaloides de tipo aporfina y aristolactamas previamente descritos en la literatura fue posible establecer que los productos **71** y **72** poseen el núcleo fenantrolactama al igual que las aristolactamas (Crohare *et al.*, 1974; Achari *et al.*, 1984; Desai *et al.*, 1988; Priestap, 1989; Ruangrunsi *et al.*, 1992).

Cuadro 10. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la piperolactama A (72).

Fórmula molecular	C ₁₆ H ₁₁ NO ₃
Peso molecular	265
UV (MeOH) λ_{\max} . nm (log ϵ)	234 (4.61), 262 (4.50), 276 (4.56), 284 (4.56), 319 (4.01), 384 (3.96).
IR (MeOH) ν_{\max} . cm ⁻¹	3479, 3180, 2924, 1708, 1676, 1656, 1382, 1270, 1129, 1072, 748, 683.
EMIE m/z (int. rel.) Espectro 6	265 [M ⁺ (100)], 250 [M-15 (49)], 222 [M-15-28 (24)], 193 (4), 181 (3), 166 (25), 164 (9), 151 (5), 139 (12), 133 (4), 111 (2).
RMN- ¹ H 500 MHz (CD ₃ OD) Espectro 7	9.33 (1H, <i>m</i> , <i>J</i> = 6.4, 3.3, H-5); 7.85 (1H, <i>c</i> , <i>J</i> = 6.3, 3.3, H-8); 7.77 (1H, <i>s</i> , H-2); 7.53 (2H, <i>m</i> , <i>J</i> = 6.9, 1.2, H-6, H-7); 7.16 (1H, <i>s</i> , H-9); 4.09 (3H, <i>s</i> , OCH ₃).
RMN- ¹³ C 100 MHz (CD ₃ OD) Espectro 8	172.3 (C=O), 151.7 (C-3), 149.7 (C-4), 135.9 (C-10) ^a , 135.7 (C-8a) ^a , 129.9 (C-8), 129.2 (C-5), 128.8 (C-4b), 127.7 (C-6) ^b , 126.4 (C-7) ^b , 126.2 (C-10a), 116.9 (C-1) ^c , 116.0 (C-4a) ^c , 108.2 (C-2), 107.2 (C-9), 57.7 (OCH ₃).

* *J* en Hz, δ en ppm; (^{a, b, c}) valores intercambiables.

En el espectro de ¹³C de la piperolactama A (72) (Espectro 8) se aprecian señales para 16 átomos de carbono en armonía con la fórmula molecular establecida. Las características más relevantes de los espectros de RMN de este compuesto se resumen a continuación:

- i. Los desplazamientos químicos observados en la región aromática indicaron que los anillos C y D del núcleo base no se encontraban sustituidos (Achari *et al.*, 1984; Priestap, 1989). Los carbonos aromáticos correspondientes se encontraron en δ_c 129.2 (C-5), δ_c 127.7 (C-6), δ_c 126.4 (C-6), δ_c 129.9 (C-8) y δ_c 107.2 (C-9), y mostraron correlación en su espectro HETCOR con los metinos desplazados en δ_H 9.33 [H-5 (*J*= 6.4, 3.3 Hz)], δ_H 7.53 [H-6, H-7 (*J*= 6.9, 1.2 Hz)], δ_H 7.85 [H-8 (*J*= 6.3, 3.3 Hz)] y δ_H 7.16 (H-9). Así mismo, las señales

de los metinos H-5 y H-8, presentaron cuadros de conectividad en el espectro COSY con el multiplete correspondiente a los hidrógenos aromáticos H-6 y H-7.

Por otra parte, los carbonos cuaternarios C-4b, C-8a y C-10 de los anillos C y D se ubicaron en δ_C 128.8, 135.7 y 135.9, respectivamente.

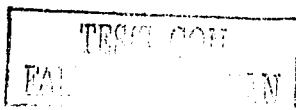
- ii. En δ_C 151.7 (C-3) y δ_C 149.7 (C-4) se observaron señales para dos carbonos cuaternarios del anillo A unidos a funciones oxigenadas. Estas funciones oxigenadas deben corresponder a un grupo metoxilo y a un grupo hidroxilo. El metoxilo se evidenció mediante la presencia de las señales δ_C / δ_H 57.72/4.09, en tanto que el hidroxilo se determinó por medio de sus espectros en el IR y de masas. Los carbonos cuaternarios restantes C-1, C-10a y C-4a se encuentran desplazados a δ_C 116.9, 126.2 y 116.0. La señal observada en δ_H / δ_C 7.77/108.2 corresponde al metino aromático ubicado en el C-2.
- iii. Por último, en δ_C 172.3 se observa una señal asignable al carbonilo de la lactama.

El análisis del espectro NOESY (Figura 9) fue de gran utilidad para ubicar los sustituyentes del anillo A. Los cuadros de conectividad H-5/H-6; H-8/H-9, H-8/H-7; y H-2/OMe son consistentes con la ubicación del OMe en el C-3 y el OH en el C-4.

Por su parte, las características espectroscópicas de la cefaranona B (71) (Cuadro 11), fueron muy similares a las ya descritas para la piperolactama A (72). La diferencia básica entre ambas moléculas radica en el sustituyente ubicado en el carbono C-4 del núcleo base, el cual en el caso del compuesto 71 corresponde a un metoxilo.

La ausencia del grupo hidroxilo de la cefaranona B, se manifestó por la ausencia de la banda de absorción característica en su espectro en el IR mientras que el ion molecular presentó 14 uma más con respecto al producto 72.

El espectro de RMN-¹H (Espectros 10) de este producto presentó dos señales simples que integran para tres hidrógenos cada una en δ_H 4.08 y 4.13, atribuibles a dos grupos metoxilos ubicados en los C-3 y C-4, respectivamente.



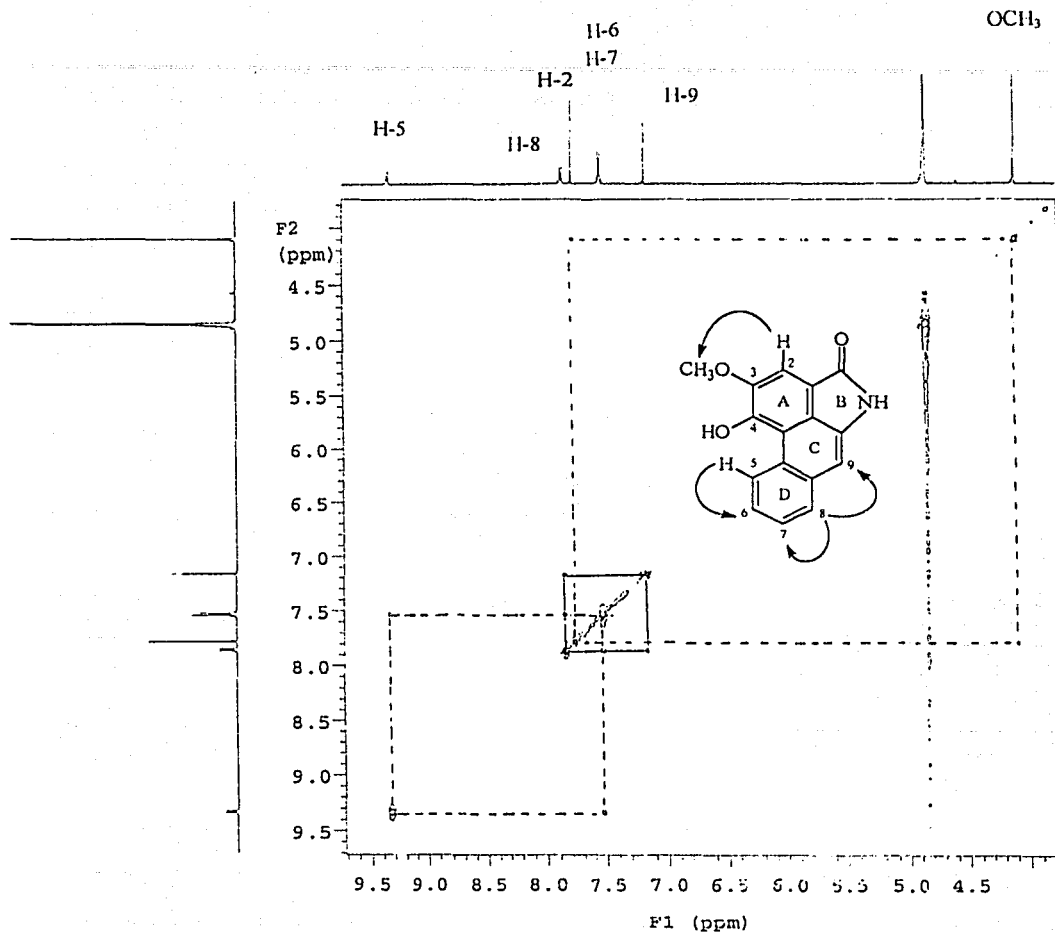


Figura 9. Espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ NOESY de la piperolactama A (72).

De nueva cuenta, el análisis detallado de su espectro NOESY permitió confirmar la ubicación de los grupos metoxilos mediante las interacciones observadas entre los hidrógenos H-5/OMe-4; H-2/OMe-3; y H-5/H-6.

La metilación con diazometano del producto 72 generó un compuesto idéntico en todos sus aspectos al alcaloide 71.

Cuadro 11. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la cefaranona B (71).

Fórmula molecular	$C_{17}H_{13}NO_3$
Peso molecular	279
IR (MeOH) ν_{max} cm^{-1}	3180, 2972, 2831, 1708, 1657, 1381, 1306, 1129, 1031, 817, 662.
EMIE m/z (int. rel.) Espectro 9	279 [M^+ (100)], 264 [M-15 (13)], 236 [M-15-28 (14)], 221 (14), 209 (10), 193 (15), 181 (9), 164 (11), 165 (11), 150 (4), 140 (5).
RMN- 1H 300 MHz ($CDCl_3$) Espectro 10	9.24 (1H, <i>m</i> , $J= 6.3, 3.6$, H-5); 7.81 (1H, <i>c</i> , $J= 6.4, 3.0$, H-8); 7.82 (1H, <i>s</i> , H-2); 7.58 (2H, <i>m</i> , $J= 6.7, 3.0$, H-6, H-7); 7.07 (1H, <i>s</i> , H-9); 4.13 (3H, <i>s</i> , OCH_3-4); 4.08 (3H, <i>s</i> , OCH_3-3).
RMN- ^{13}C 100 MHz ($CDCl_3$)	170.3 (C=O), 155.0 (C-3), 151.8 (C-4), 136.4 (C-10), 131.4 (C-8a), 124.4 (C-8), 128.1 (C-7), 127.9 (C-5), 127.5 (C-4b), 126.0 (C-6) ^p , 125.2 (C-1), 122.8 (C-4a), 121.5 (C-10a), 110.2 (C-2), 105.5 (C-9), 60.6 (OCH_3-4), 57.3 (OCH_3-3).

* J en Hz, δ en ppm.

Con base en las evidencias antes presentadas, los productos 71 y 72 se identificaron como la cefaranona B y la piperolactama A, respectivamente. Ambos productos han sido aislados con anterioridad de varias especies del género *Piper* y de las especies *Fissistigma balanse* y *F. oldhamii* pertenecientes a la familia Annonaceae (Desai *et al.*, 1988; Sinh *et al.*, 1996; Yi-Chen Chia *et al.*, 2000). La cefaranona B también se ha aislado a partir de *Aristolochia argentina* (Aristolochiaceae), *Goniothalamus velutinus* (Annonaceae) y *Stephania*

cepharantha (Menispermaceae) (Crohare *et al.*, 1974; Akasu *et al.*, 1974; Siraj *et al.*, 1992). Por lo tanto, este es el primer reporte de la cefaranona B (71) y la piperolactama A (72) en la especie *Piper sanctum*.

4.1.3 Caracterización de las amidas; *N-trans*-feruloiltiramina (73) y *N-p*-cumaroiltiramina (74).

Los productos 73 y 74 se obtuvieron como sólidos; el primero de color amarillo pálido identificado como la *N-trans*-feruloiltiramina con un p. f. de 94 °C, y el segundo de color blanco caracterizado como la *N-p*-cumaroiltiramina con un p. f. de 248-249 °C. En los Cuadros 12, 13 y 14, se resumen las constantes espectroscópicas y espectrométricas para ambos productos.

Los espectros en el IR de ambos compuestos muestran bandas de absorción intensas asociadas con la presencia de grupos hidroxilo (3393 cm^{-1}), amida α - β -insaturada (3328, 1647 cm^{-1}) y bandas para anillos aromáticos (1615, 1579, 1515 cm^{-1}).

Los espectros de masas generados por EMIE para ambos productos (Espectros 11 y 14) presentan iones moleculares en un relación de m/z de 313 y 283 uma, respectivamente. Estos iones corresponden a las fórmulas moleculares $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_4$ para el compuesto 73 y $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ para el compuesto 74. En ambos casos la fórmula molecular permite 10 grados de insaturación.

Por su parte, los espectros de RMN indicaron que los compuestos 73 y 74 son amidas de los ácidos ferúlico y *p*-cumárico, respectivamente, y la amina primaria tiramina (Inatani *et al.*, 1981; Singh *et al.*, 1996).

En el caso de la *N-p*-cumaroiltiramina (74), el espectro de ^{13}C (Espectro 16, Cuadro 14) presentó señales para 13 átomos de carbono, lo cual indicó la presencia de cuatro señales equivalentes. Las señales para la porción derivada de la tiramina se observaron de la siguiente forma:

En δ_{C} 35.8 (C-2) y δ_{C} 42.5 (C-1) se encuentran dos señales asignables a los dos metilenos consecutivos, los cuales correlacionan en el espectro HETCOR con los tripletes en δ_{H} 2.74 ($J=7.2$ Hz) y δ_{H} 3.44 ($J=7.2$ Hz), respectivamente. Así mismo, en $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 7.39/130.5 y δ_{H}

δ_c 6.48/116.7 se ubicó el sistema $A_2 B_2$ correspondiente a los metinos H-2', H-6' ($J= 7.05, 1.8$ Hz) y H-3', H-5' ($J= 6.6, 1.8$ Hz) del anillo aromático B. También el espectro de ^{13}C mostró dos carbonos cuaternarios, uno de ellos corresponde al carbono *ipso* (δ_c 131.3) y el segundo, de acuerdo a la magnitud de su desplazamiento químico (δ_c 156.9) soporta una función oxigenada.

Cuadro 12. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de las amidas *N-trans*-feruloiltiramina (73) y *N-p*-cumaroiltiramina (74).

<i>N-trans</i> -feruloiltiramina (73)	<i>N-p</i> -cumaroiltiramina (74)
Fórmula molecular	
$C_{18}H_{19}NO_4$	$C_{17}H_{17}NO_3$
Peso molecular	
313	283
UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ)	
287 (4.07), 318 (4.12).	222 (4.78), 289 (4.71), 309 (4.32).
IR (MeOH) ν_{max} cm^{-1}	
3393, 3328, 2931, 1668, 1615, 1597, 1560, 1452, 1251, 1023, 973.	3357, 2923, 1647, 1579, 1554, 1512, 1436, 1223, 979, 828.
EMIE m/z (int. rel.)	
315 [MH^+ (8)], 313 [M^+ (18)], 193 (51), 192 (52), 177 (100), 149 (10), 145 (24), 120 (24), 107 (12), 89 (10), 77 (9), 65 (2), 51 (2).	284 [MH^+ (4)], 283 [M^+ (7)], 164 (65), 147 (100), 120 (47), 119 (19), 107 (11), 91 (16), 77 (6), 65 (7), 63 (2).

Por otro lado, la porción derivada del ácido *p*-cumárico presentó las siguientes señales:

Un sistema AB en δ_H/δ_c 6.37/118.3 y δ_H/δ_c 7.43/141.7 asignable a la doble ligadura entre el C-2 y C-3, respectivamente. La magnitud de la constante de acoplamiento ($J= 15.6$ Hz) es consistente con la disposición *trans* de la doble ligadura. El acoplamiento entre estos metinos

se observó en su espectro COSY y el carbonilo de la amida α - β -insaturada se ubicó en δ_c 169.2. Por último, las señales para el anillo aromático A de la porción derivada del ácido *p*-cumárico, confirmaron un sistema $A_2 B_2$ en δ_H 7.04 y δ_H 6.71 relacionado a los metinos H-2', H-6' ($J= 6.6, 2.1$ Hz) y H-3', H-5' ($J= 6.3, 2.1$ Hz), respectivamente. Los carbonos cuaternarios para este anillo se ubicaron en δ_c 127.6 para el carbono *ipso* y δ_c 160.6 para el carbono base de oxígeno y los carbonos correspondientes a los metinos aromáticos se encuentran en δ_c 130.7 (C-2', C-6') y δ_c 116.2 (C-3', C-5').

Cuadro 13. Datos de RMN- 1H (300 MHz, CD $_3$ OD) de los compuestos 73 y 74.

<i>N-trans-feruloiltiramina</i> (73)		<i>N-p-cumaroiltiramina</i> (74)	
tiramina		tiramina	
CH $_2$ -1	3.45 (2H, <i>t</i> , $J= 7.2$)	CH $_2$ -1	3.44 (2H, <i>t</i> , $J= 7.2$)
CH $_2$ -2	2.74 (2H, <i>t</i> , $J= 7.2$)	CH $_2$ -2	2.74 (2H, <i>t</i> , $J= 7.2$)
H-2', H-6'	7.05 (2H, <i>dd</i> , $J= 6.6, 2.1$)	H-2', H-6'	7.39 (2H, <i>dd</i> , $J= 7.05, 1.8$)
H-3', H-5'	6.72 (2H, <i>dd</i> , $J= 6.5, 1.8$)	H-3', H-5'	6.48 (2H, <i>dd</i> , $J= 6.6, 1.8$)
feruloil		cumaroil	
H-2	6.4 (1H, <i>d</i> , $J= 15.6$)	H-2	6.37 (1H, <i>d</i> , $J= 15.6$)
H-3	7.42 (1H, <i>d</i> , $J= 15.6$)	H-3	7.43 (1H, <i>d</i> , $J= 16.2$)
H-2'	7.11 (1H, <i>d</i> , $J= 1.8$)	H-2', H-6'	7.04 (2H, <i>dd</i> , $J= 6.6, 2.1$)
H-5'	6.79 (1H, <i>d</i> , $J= 8.1$)	H-3', H-5'	6.71 (2H, <i>dd</i> , $J= 6.3, 2.1$)
H-6'	6.98 (1H, <i>dd</i> , $J= 7.2, 2.1$)		
OCH $_3$	3.87 (3H, <i>s</i>)		

* J en Hz, δ en ppm.

Los espectros de RMN de la *N-trans-feruloiltiramina* (73) (Espectros 12 y 13) fueron muy similares a los del compuesto 74. La principal diferencia radica en las señales correspondientes a la función derivada del ácido, que en este caso corresponde al ferúlico. Por lo tanto, las señales del sistema $A_2 B_2$ asignables a la porción del ácido *p*-cumárico en el compuesto 74 se encuentran sustituidas por un sistema ABX en el producto 73 (ver Cuadro 13). Así mismo, el espectro de masas presentó un incremento de 30 uma con respecto al producto 74. La constante de acoplamiento de 15.6 Hz del doble enlace indicó su configuración de tipo *trans*.

Cuadro 14. Datos de RMN-¹³C (100, 75.5 MHz, CD₃OD) de los compuestos 73 y 74.

<i>N-trans-feruloiltiramina (73)</i>		<i>N-p-cumaroiltiramina (74)</i>	
tiramina		tiramina	
C-1	42.4	C-1	42.5
C-2	35.7	C-2	35.8
C-1'	131.3	C-1'	131.3
C-2', C-6'	130.7 <i>d</i>	C-2', C-6'	130.5
C-3', C-5'	116.2 <i>d</i>	C-3', C-5'	116.7
C-4'	156.8	C-4'	156.9
feruloil		cumaroil	
C=O	169.1	C=O	169.2
C-2	111.5	C-2	118.3
C-3	141.9	C-3	141.3
C-1'	149.8	C-1'	127.6
C-2'	118.8	C-2', C-6'	130.7
C-3'	124.7	C-3', C-5'	116.2
C-4'	149.3	C-4'	160.6
C-5'	116.4		
C-6'	123.2		
OCH ₃	56.4		

* δ en ppm

Finalmente, cabe mencionar que esta es la primera descripción de los compuestos 73 y 74 en la especie *Piper sanctum*. Sin embargo, ambos productos naturales han sido descritos como constituyentes del género *Piper* en las especies *P. argyrophyllum* y *P. nigrum* (Inatani *et al.*, 1981; Singh *et al.*, 1996). Estos compuestos se han aislado de otras especies pertenecientes a las familias Solanaceae, Aristolochiaceae, Papaveraceae y Menispermaceae (Yoshihara *et al.*, 1978; Hussain *et al.*, 1982; Zhao *et al.*, 1992).

4.1.4 Actividad antimicobacteriana de los productos naturales aislados.

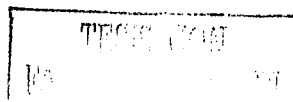
El potencial antifímico de los metabolitos secundarios aislados de las fracciones F₂, F₅, F₆, F₈ y F₉ de *P. sanctum* se determinó mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* utilizando el método fluorimétrico de “azul de alamar” descrito por Collins y Franzblau (1997) (inciso 3.3.1). Los resultados de este bioensayo se encuentran expresados como concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) del crecimiento de la micobacteria y se incluyen en la Cuadro 15. El criterio de actividad empleado considera como activo a un compuesto que presente una CMI menor o igual a 128, y exceptuando a los compuestos 68 y 69, todos los compuestos aislados presentan actividad antifímica significativa; siendo la cefaranona B (71), la 5,6-deshidro-7,8-dihidrometisticina (6) y la piperolactama A (72) los antifímicos de mayor potencia seguidos por los productos cefaradiona A (1), desmetoxiyangonina (70) y *N-p*-cumaroiltiramina (74).

Cuadro 15. Actividad antimicobacteriana de los compuestos aislados de *P. sanctum*.

<i>Compuesto</i>	<i>Actividad antimicobacteriana CMI (µg / mL)</i>
Cefaradiona A (1)	32
5,6-Deshidro-7,8-dihidrometisticina (6)	4
Z-Piperólida (10)	64
Eugenol (68)	> 128
<i>p</i> -Éter metílico del eugenol (69)	> 128
Desmetoxiyangonina (70)	32
Cefaranona B (71)	2
Piperolactama A (72)	8
<i>N-trans</i> -feruloiltiramina (73)	128
<i>N-p</i> -cumaroiltiramina (74)	32
Rifampina *	0.25

* control positivo.

A la fecha, no se ha descrito ningún estudio relacionado con la actividad antimicobacteriana para estos compuestos, de manera tal que este trabajo representa el primer



reporte de actividad antifúngica de los productos naturales aislados. Sin embargo, se ha descrito que las kavalactonas (estiril α -pironas) poseen efectos anestésicos, analgésicos, relajantes, antiepilépticos, antimicóticos, ansiolíticos y anticonvulsivos (Shulgin, 1973; Duve, 1981; Volz y Kieser, 1997; Boonen y Häberlein, 1998). Así mismo, la desmetoxyangonina presentó propiedades ansiolíticas en un estudio realizado por Boonen y Häberlein (1998).

Por otra parte, algunos estudios han comprobado que la piperolactama A inhibe completamente la agregación plaquetaria inducida por el colágeno y el ácido araquidónico, en tanto que la cefaranona B la promueve (Yi Chen-Chia et al., 2000). Las amidas 73 y 74 presentaron actividad citotóxica *in vitro* y son selectivas contra las líneas celulares derivadas de carcinoma de seno. Además, la *N-p*-cumaroiltiramina (74) mostró actividad citotóxica selectiva contra líneas celulares derivadas de cáncer de pulmón y colon (Zhao et al., 1992).

4.2 Estudio fitoquímico de la especie *Flourensia cernua* D. C.

Para la preparación del extracto vegetal a gran escala a partir de las hojas de *F. cernua*, se utilizó un proceso de maceración (inciso 3.4). Posteriormente, el extracto fitotóxico se sometió a un fraccionamiento preliminar mediante métodos cromatográficos generando diez grupos de fracciones primarias (F₁ a F₁₀, Cuadro 6); su evaluación biológica mediante el bioensayo cuantitativo de la caja de Petri (Anaya et al., 1995), determinó que la actividad se concentraba en las fracciones F₂, F₄, F₅, F₆ y F₇. Los resultados de fitotoxicidad para cada una de las fracciones se resumen en la **Cuadro 16**.

El aislamiento y la purificación de los compuestos presentes en las fracciones primarias fitotóxicas F₄, F₅, F₆ y F₇, se realizó a través de diversos análisis cromatográficos conduciendo al aislamiento de ocho metabolitos secundarios los cuales incluyen; cuatro flavonoides [3,7-éter dimetilico de la quercetina (76), paquipodol (78), kumatakenina (15) y ermanina (79)], un derivado del ácido benzóico [orselinato de metilo (75)], un derivado del ácido cinámico [*p*-hidroxicinamato de heneicosanilo (77)] y dos sesquiterpenoides [ácido deshidroflourensico (80) y flourensadiol (23)]. Cabe mencionar, que esta es la primera descripción de los flavonoides 76, 78 y 79, así como de los compuestos 75, 77 y 80 en esta especie; así mismo, el ácido

deshidroflourénsico constituye un nuevo producto natural. Las estructuras de los compuestos aislados y su rendimiento en relación al peso del material vegetal seco se presentan en el Cuadro 17.

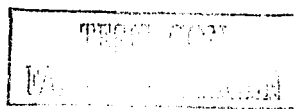
Cuadro 16. Actividad fitotóxica de las fracciones primarias obtenidas del extracto de *F. cernua*.

Fracción	CI ₅₀ (ppm) del crecimiento radicular.	
	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crus-galli</i>
extracto	300	>1000
F ₁	>1000	886.67
*F ₂	172.39	>1000
F ₃	>1000	>1000
*F ₄	143.82	162.25
*F ₅	195.08	279.5
*F ₆	316.22	152.98
*F ₇	135.39	358.31
F ₈	>1000	>1000
F ₉	>1000	>1000
F ₁₀	>1000	>1000

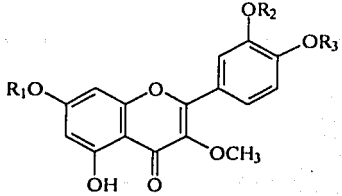
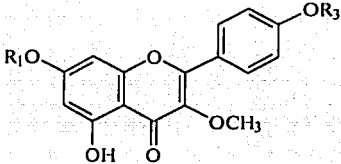
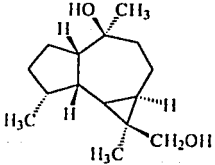
* F₂ = fracción no estudiada (poca cantidad de muestra).

* Fracciones fitotóxicas.

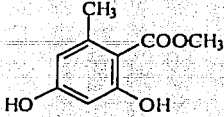
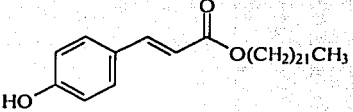
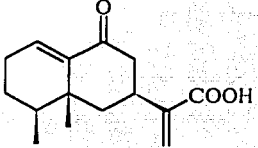
En general, los compuestos aislados se caracterizaron mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales. De nueva cuenta, la identificación de los compuestos 15, 23, 76, 78 y 79 se realizó por comparación de sus constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas con las descritas previamente en la literatura (Dillon *et al.*, 1976, 1977; Kingston *et al.*, 1971, 1975; Pettersen *et al.*, 1975; Wollenweber y Yatskievych, 1985) encontrándose en todos los casos una perfecta concordancia entre las constantes obtenidas y las reportadas.



Cuadro 17. Metabolitos secundarios aislados de las hojas de la especie *F. cernua*.

COMPUESTOS AISLADOS.	RENDIMIENTO (%) (con base en el peso del material vegetal seco).
 <p style="text-align: center;"> R_1 R_2 R_3 (76) OCH_3 OH OH (78) OCH_3 OCH_3 OH </p> <p style="text-align: center;">3,7-éter dimetilico de la quercetina (76) Paquipodol (78)</p>	<p>(76) 5.10×10^{-4} (78) 13.7×10^{-4}</p>
 <p style="text-align: center;"> R_1 R_2 Kumatakenina (15) OCH_3 OH Ermanina (79) OH OCH_3 </p>	<p>(15) 6.5×10^{-4} (79) 219×10^{-4}</p>
 <p style="text-align: center;">Flourensadiol (23)</p>	<p>(23) 3.9×10^{-4}</p>

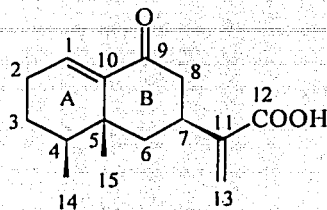
Cuadro 17. Metabolitos secundarios aislados de las hojas de la especie *F. cernua* (continuación).

<i>COMPUESTOS AISLADOS.</i>	<i>RENDIMIENTO (%)</i> <i>(con base en el peso del material vegetal seco).</i>
 <p>Orselinato de metilo (75)</p>	(75) 5.9×10^{-4}
 <p><i>p</i>- Hidroxicinamato de heneicosanilo (77)</p>	(77) 80×10^{-4}
 <p>Ácido deshidroflourésico (80)</p>	(80) 26.3×10^{-4}

A continuación se describirá la elucidación estructural de los compuestos fitotóxicos 75 y 80.

4.2.1 Caracterización del ácido deshidroflourénsico (80).

El compuesto **80** se obtuvo como un sólido vítreo de color café. Sus constantes espectroscópicas y espectrométricas se resumen en la Cuadro 18.



Ácido deshidroflourénsico.

Cuadro 18. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del ácido deshidroflourénsico (80).

Fórmula molecular	C ₁₅ H ₂₀ O ₃
Peso molecular	248
UV (MeOH) λ _{max} nm	203, 237.
IR (CHCl ₃) ν _{max} cm ⁻¹	3000, 2960, 2929, 1693, 1623, 1421, 1088, 948.
Rotación óptica [α] _D (CH ₂ Cl ₂ , 1 mg/mL).	-52°
EMIE <i>m/z</i> (int. rel.) Figura 13	248 [M ⁺ (90)], 233 [M-15 (47)], 260 [M-C ₃ H ₆ (100)], 191 (85), 174 (36), 160 (44), 145 (29), 135 (27), 107 (28), 91 (40), 79 (34), 77 (26), 65 (13), 53 (13).
RMN- ¹ H 300 MHz (CDCl ₃) Figura 10	6.59 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 3.6, H-1); 6.38 (1H, <i>s</i> , H-13); 5.67 (1H, <i>s</i> , H-13'); 2.88 (1H, <i>m</i> , H-7); 2.51 (1H, <i>brd</i> , <i>J</i> = 17.4, 4.2, 2.4, H-8); 2.41 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 17.4, 12.3, H-8'); 2.23 (2H, <i>m</i> , H-2); 2.13 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 13.8, 4.8, 2.4, H-6); 1.68 (1H, <i>m</i> , H-4); 1.5 (3H, <i>m</i> , H-3, H-6'); 0.96 (3H, <i>s</i> , CH ₃ -15); 0.93 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.6, CH ₃ -14).
RMN- ¹³ C 75 MHz (CDCl ₃) Figura 15	203.2 (C=O cetona), 170.8 (C=O ácido), 144.2 (C-10), 142.6 (C-11), 135.7 (C-1), 126.2 (C-13), 43.3 (C-8), 42.0 (C-6), 38.2 (C-4), 36.0 (C-5), 33.3 (C-7), 26.4 (C-3), 25.5 (C-2), 25.0 (CH ₃ -15), 16.0 (CH ₃ -14).

* *J* en Hz, δ en ppm.

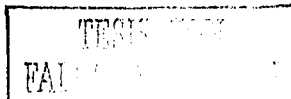
El espectro en el IR del compuesto **80** mostró bandas de absorción asociadas con la presencia de grupos carbonilo conjugados incluyendo la de un ácido carboxílico (3100-3000, 1693, 1690, 1623 cm^{-1}). El espectro de masas generado por impacto electrónico presentó el ion molecular en una relación de m/z de 248 uma. La fórmula molecular se estableció como $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$ y permite 6 grados de insaturación.

El análisis detallado de sus espectros de RMN (**Cuadro 18, Figuras 10 a 12**) permitió determinar que el compuesto **80** es un sesquiterpenoide de tipo eremofilano relacionado con el ácido flourénsico (Kingston *et al.*, 1971, 1975) y el aldehído 9-oxo-1(10), 11(13)-eremofiladien-12-al (Abell, 1985) aislados previamente de las especies *Flourensia cernua* y *Eremophila rotundifolia*, respectivamente.

La principal diferencia entre los espectros de RMN- ^{13}C del aldehído 9-oxo-1(10), 11(13)-eremofiladien-12-al y del ácido **80** radica en que la señal del grupo aldehído (δ_{C} 194.0) se encuentra sustituida por la de un grupo carboxilo (δ_{C} 170.8). Por otra parte, la diferencia más importante entre los espectros de RMN del producto **80** y los del ácido flourénsico (**22**) consiste en la presencia de una doble ligadura adicional entre los carbonos C-1 ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 135.7/ 6.59) y C10 (δ_{C} 144.2).

El análisis del espectro de masas del producto natural (**Figura 13**) corroboró la posición de la cetona α - β -insaturada y los grupos metilo en el núcleo eremofilano. Así, de acuerdo al patrón de fragmentación, el fragmento (M-15) observado en una relación de m/z de 233 uma y el producido por una fragmentación de tipo retro-Diels-Alder (M-C₃H₆, pico base) en una relación de m/z de 206 uma, son consistentes con la presencia de los grupos metilos en los carbonos C-4 y C-5, así como de una doble ligadura entre C-1 y C-10.

El patrón de acoplamiento observado por los hidrógenos de los metilenos en C-6 [δ_{H} 2.13 (1H, *dd*, $J=$ 13.8, 4.8, 2.4, H-6); δ_{H} 1.5 (1H, *m*, H-6')] y en C-8 [δ_{H} 2.51 (1H, *brd*, $J=$ 17.4, 4.2, 2.4, H-8); δ_{H} 2.41 (1H, *dd*, $J=$ 17.4, 12.3, H-8')] es consistente con la disposición ecuatorial de la porción del ácido α - β -insaturado en el C-7. Así mismo, las interacciones de H-4 [H-4/H-6ax, H-6eq, H-7 y H-8eq] y del metilo en el C-14 [CH₃-14/CH₃-15, H-6ax] en el espectro NOESY (**Figura 14**) indican que los metilos en los carbonos C-4 y C-5 se encuentran



INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
LABORATORIO DE QUÍMICA ORGÁNICA

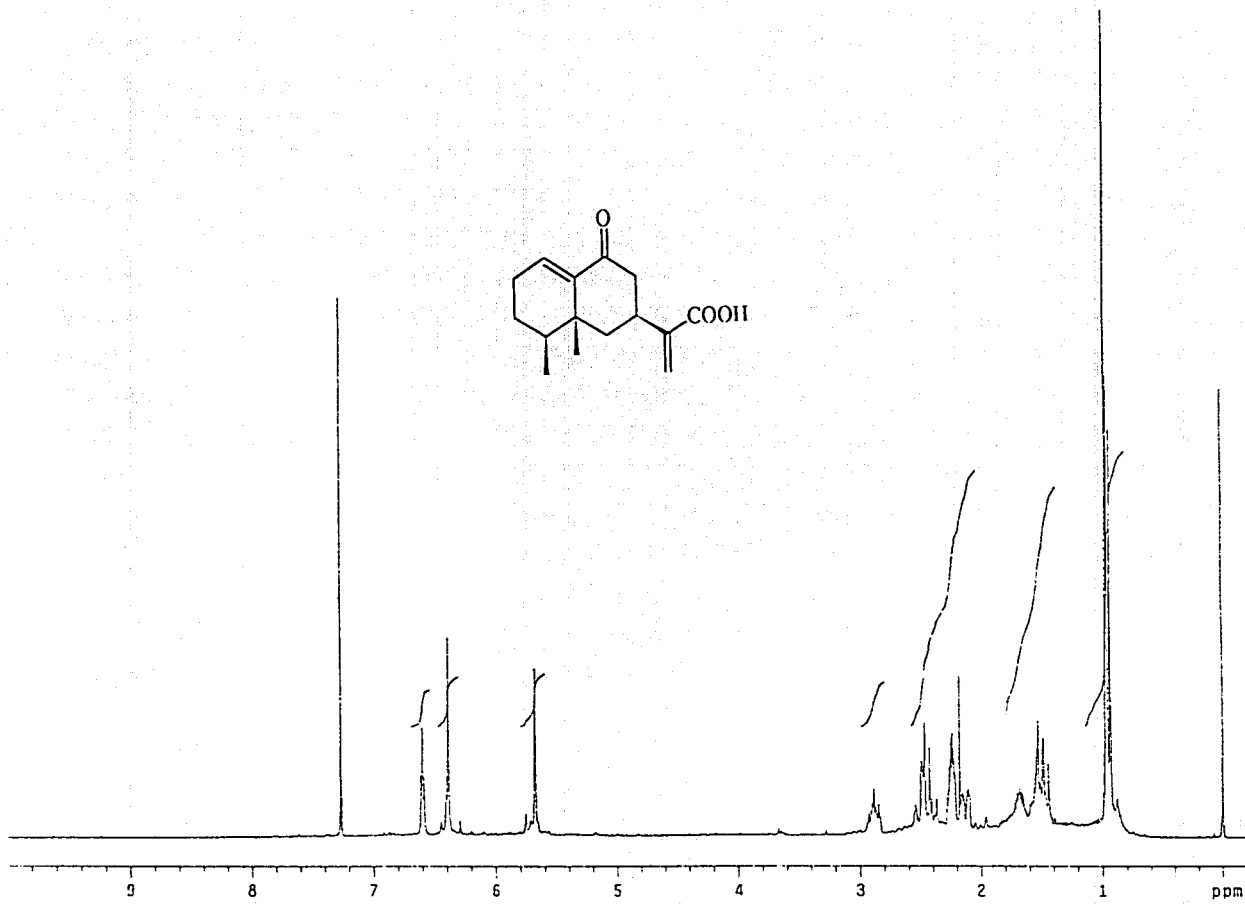


Figura 10. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) del ácido deshidroflourésico (80).

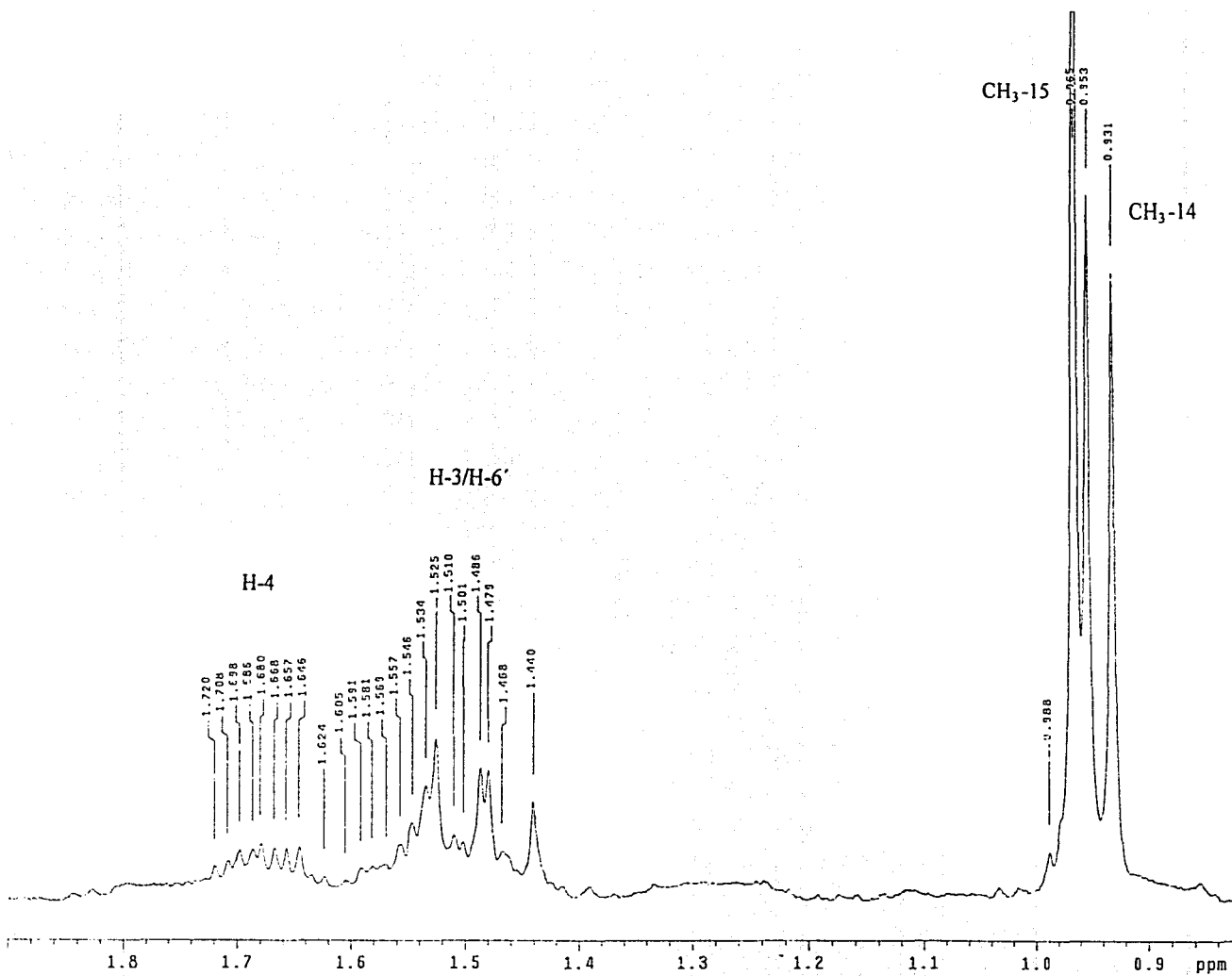


Figura 11. Vista parcial (δ_H 0.9-1.8) del espectro de RMN- ^1H del ácido deshidroflourensico (80).

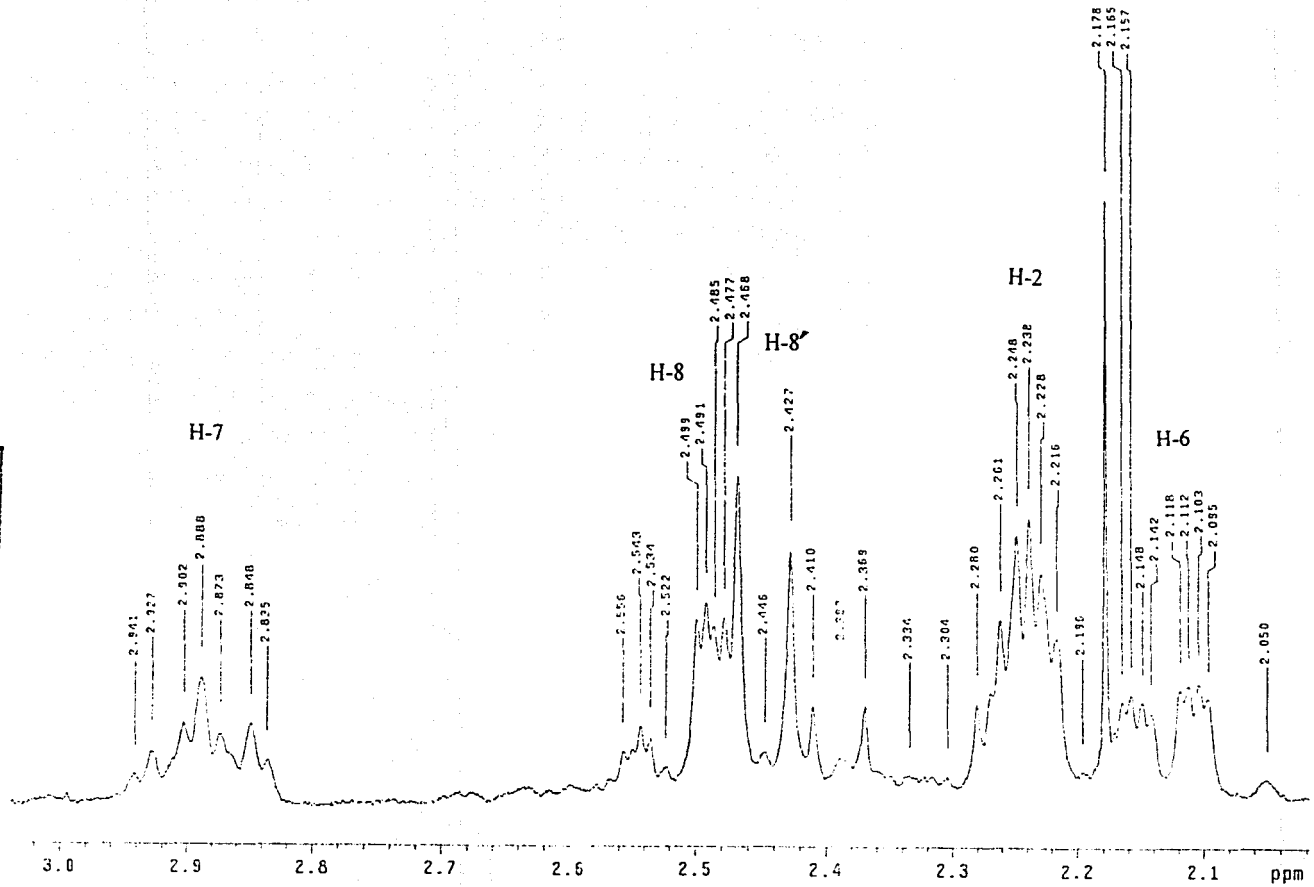


Figura 12. Vista parcial (δ_H 2.1-3.0) del espectro de RMN- ^1H del ácido deshidrofluorénico (80).

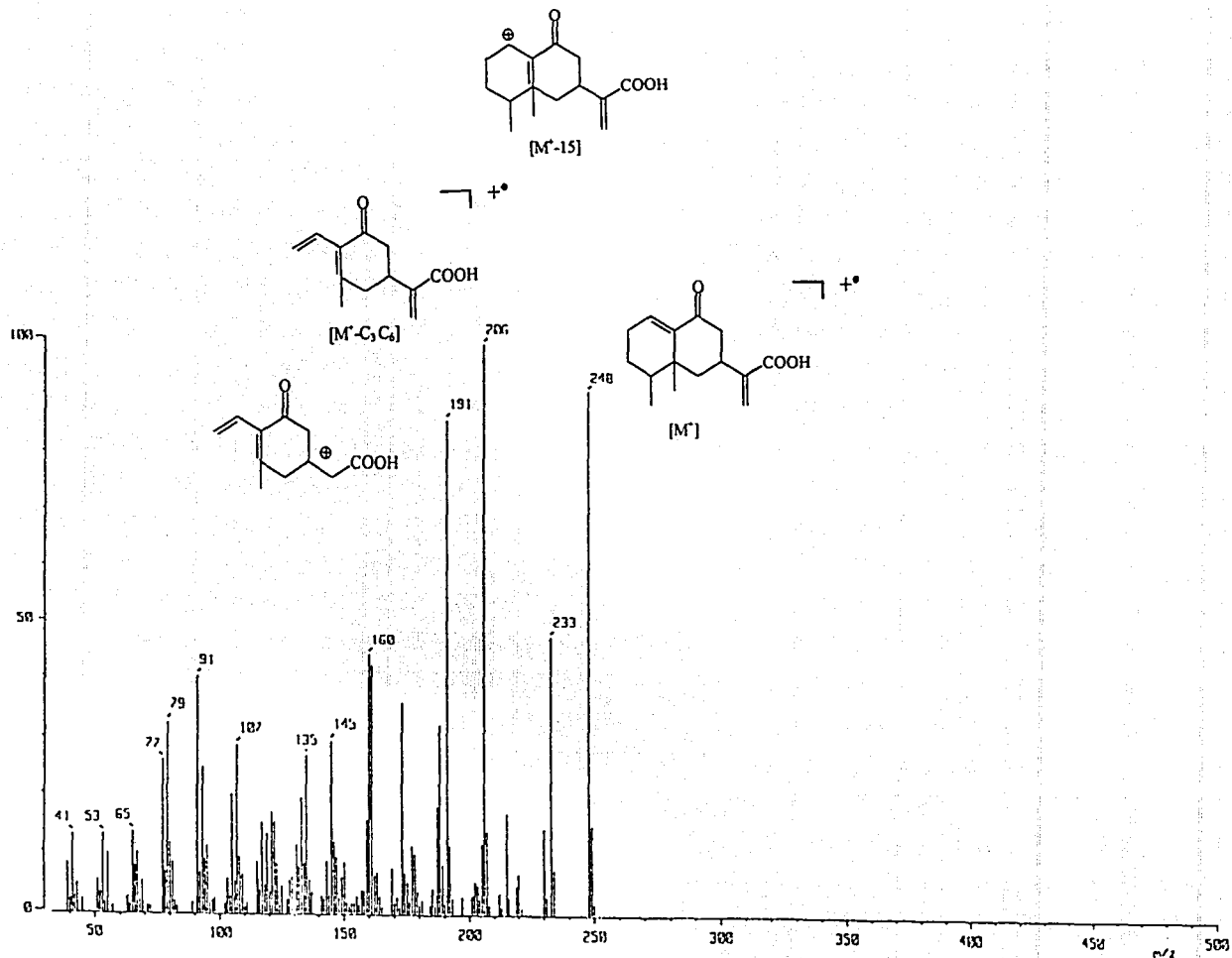


Figura 13. Espectro de masas del ácido deshidroflourensico (80).

en la misma cara de la molécula que la cadena de tres carbonos del producto **80** en C-7 (δ_c 33.3). Por lo tanto, la estereoquímica relativa de los centros quirales es igual a la del ácido flourénsico (**22**) y la del aldehído 9-oxo-1(10), 11(13)-eremofiladien-12-al (Kingston *et al.*, 1971, 1975; Abell, 1985).

De esta manera, el compuesto **80** se caracterizó como el **ácido deshidroflourénsico** (ácido 9-oxo-1(10), 11(13) eremofiladien-12-óico), un nuevo producto natural. Cabe destacar que la configuración absoluta de los centros quirales se considera igual a la del ácido flourénsico con base en consideraciones biogénicas (Kingston *et al.*, 1975).

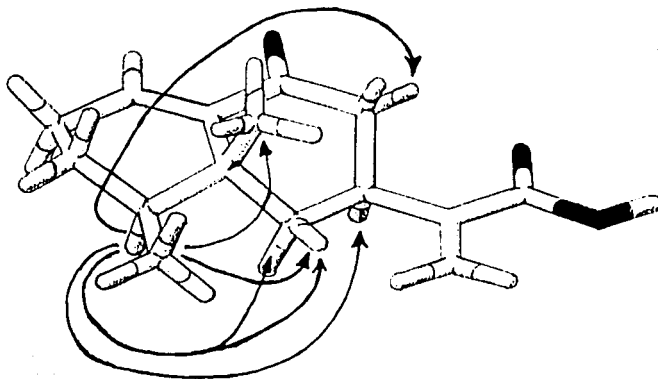


Figura 14. Correlaciones más importantes observadas en el espectro NOESY del compuesto **80**.

4.2.2 Caracterización del orselinato de metilo (**75**).

El compuesto **75** se obtuvo como un sólido amarillo con un p. f. de 136-138 °C; sus constantes espectroscópicas y espectrométricas se resumen en la Cuadro 19.

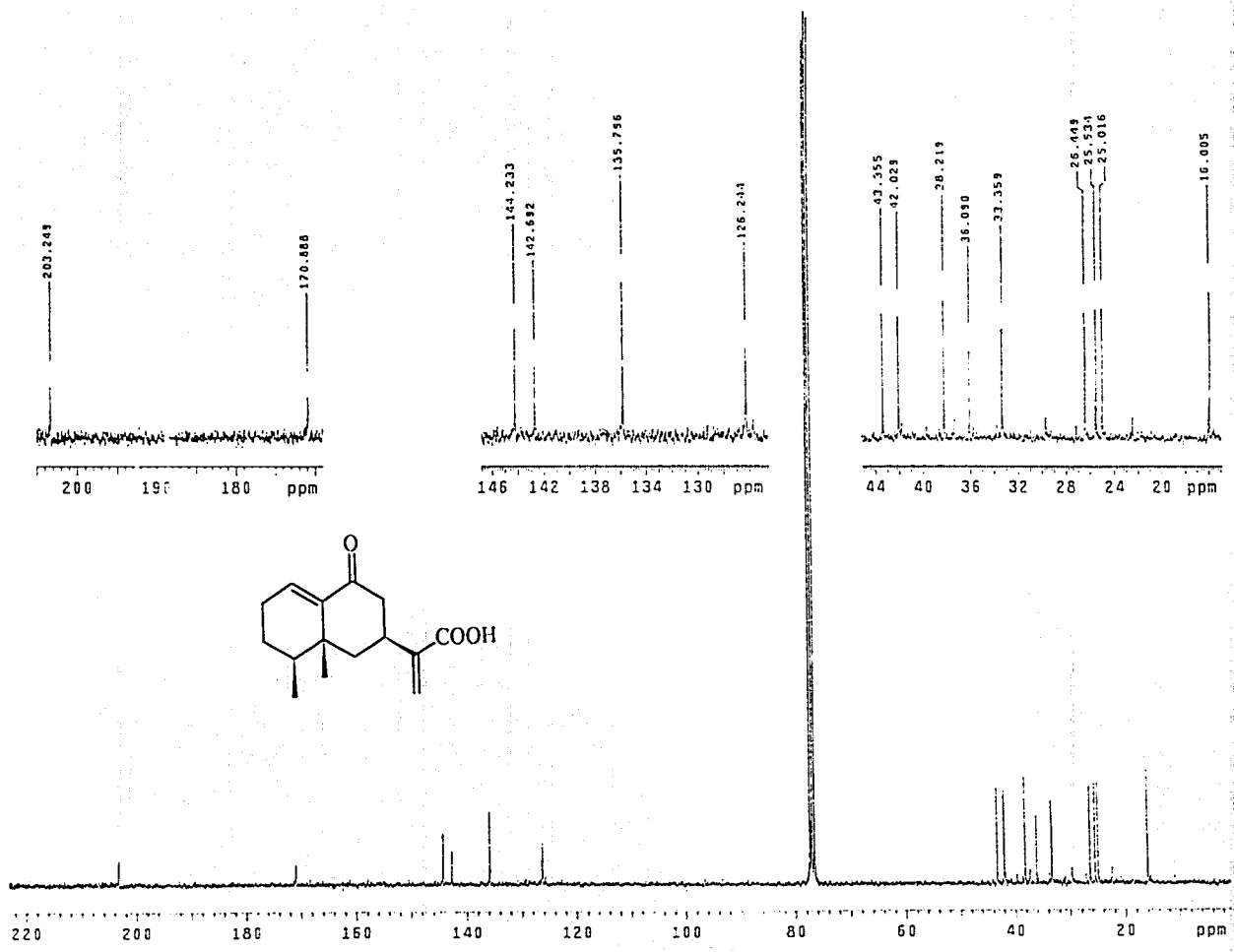
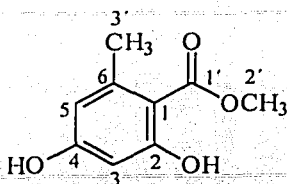


Figura 15. Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) del ácido deshidroflourenésico (80).

INSTITUTO VENEZOLANO
 DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
 DIVISIÓN DE QUÍMICA ORGÁNICA



Orselinato de metilo

Cuadro 19. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del orselinato de metilo (75).

Fórmula molecular	$C_9H_{10}O_4$
Peso molecular	182
IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}	3368, 3310, 2955, 2917, 2848, 1704, 1642, 1581, 1502, 1445, 1445, 1379, 1313, 1256, 1112, 951, 701, 622.
EMIE m/z (int. rel.)	2182 [M^+ (53)], 151 (33), 150 (100), 122 (40), 121(6), 94(7).
RMN- 1H 300 MHz ($CDCl_3$) Espectro 18	11.73 (1H, <i>s</i> , OH-2); 6.26 (1H, <i>d</i> , $J=3.0$, H-3); 6.22 (1H, <i>dd</i> , $J=3.0, 0.57$, H-5); 5.4 (1H, <i>s</i> , OH-4); 3.91 (3H, <i>s</i> , OCH_3 -2'); 2.47 (3H, <i>s</i> , CH_3 -3').
RMN- ^{13}C 75 MHz ($CDCl_3$) Espectro 19	172.1 (C=O), 165.3 (C-2), 160.2 (C-4), 143.9 (C-6), 111.3 (C-5), 105.6 (C-1), 101.2 (C-3), 51.8 (OCH_3 -2'), 24.2 (CH_3 -3').

* J en Hz, δ en ppm.

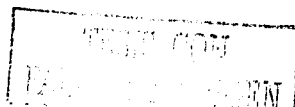
El espectro en el IR mostró absorciones asociadas con la presencia de grupos hidroxilo (3368 cm^{-1}), aromaticidad (2955, 1642, 1581 cm^{-1}) y carbonilo de éster (1704 cm^{-1}). El espectro de masas generado por este compuesto presentó el ion molecular en una relación de m/z de 182 una correspondiente a la fórmula molecular $C_9H_{10}O_4$, la cual permite 5 grados de insaturación.

La información proporcionada por la espectrometría de masas y el análisis detallado de los espectros de RMN (Espectros 18 y 19) permitieron establecer que el compuesto 75 es un derivado del ácido orselínico (Witiak *et al.*, 1967). Las características más importantes de los espectros de RMN se describen a continuación:

- El espectro de ^{13}C mostró señales para 9 carbonos en armonía con la fórmula molecular establecida. Este espectro en su modalidad DEPT permitió detectar dos carbonos de metinos en δ_{C} 101.2 (C-3) y δ_{C} 111.3 (C-5) de un anillo aromático tetrasustituido. Estas señales correlacionaron en el espectro HETCOR con el doblete en δ_{H} 6.26 y con el doble de doble en δ_{H} 6.22, respectivamente. La magnitud de su constante de acoplamiento ($J= 3.0$ Hz) indicó una relación de tipo *meta* entre ambos hidrógenos.
- En δ_{C} 172.1 se observó un singulete asignado al carbonilo de la función éster evidenciada en su espectro en el IR. La señales para el metoxilo de esta función se ubicaron en $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{C}}$ 3.91/51.
- En $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{C}}$ 2.47/24.2 aparecen las señales características para un metilo sobre anillo aromático.

Así mismo, el espectro DEPT mostró la presencia de cuatro carbonos cuaternarios aromáticos; dos de los cuales [δ_{C} 160.2 (C-4) y δ_{C} 165.3 (C-2)] se encuentran sustituidos con funciones oxigenadas de acuerdo con la magnitud de su desplazamiento químico. Estas funciones oxigenadas corresponden a dos grupos hidroxilo previamente indicados en su espectro en el IR. La presencia de la señal en δ_{H} 11.7 para un hidroxilo quelatado, indica que este se encuentra en posición *orto* a la función carboximetilo. Los dos carbonos cuaternarios restantes ubicados en δ_{C} 143.9 (C-6) y δ_{C} 105.6 (C-1), corresponden a los carbonos *ipso* que soportan a las funciones metilo y carboximetilo, respectivamente. Por otra parte, el desplazamiento químico observado para los metinos H-3 y H-5, así como la correlación detectada entre H-5 y el metilo en el espectro NOESY (Figura 16), permitieron ubicar al metilo en la posición C-6 del anillo aromático.

Con base en las evidencias presentadas, el compuesto 75 se caracterizó como el orselinato de metilo, este producto ha sido aislado previamente del líquen *Parmotrema*



tinctorum (Parmeliaceae) (Rojas *et al.*, 2000) y este estudio constituye el primer reporte de su aislamiento en la especie *F. cernua*.

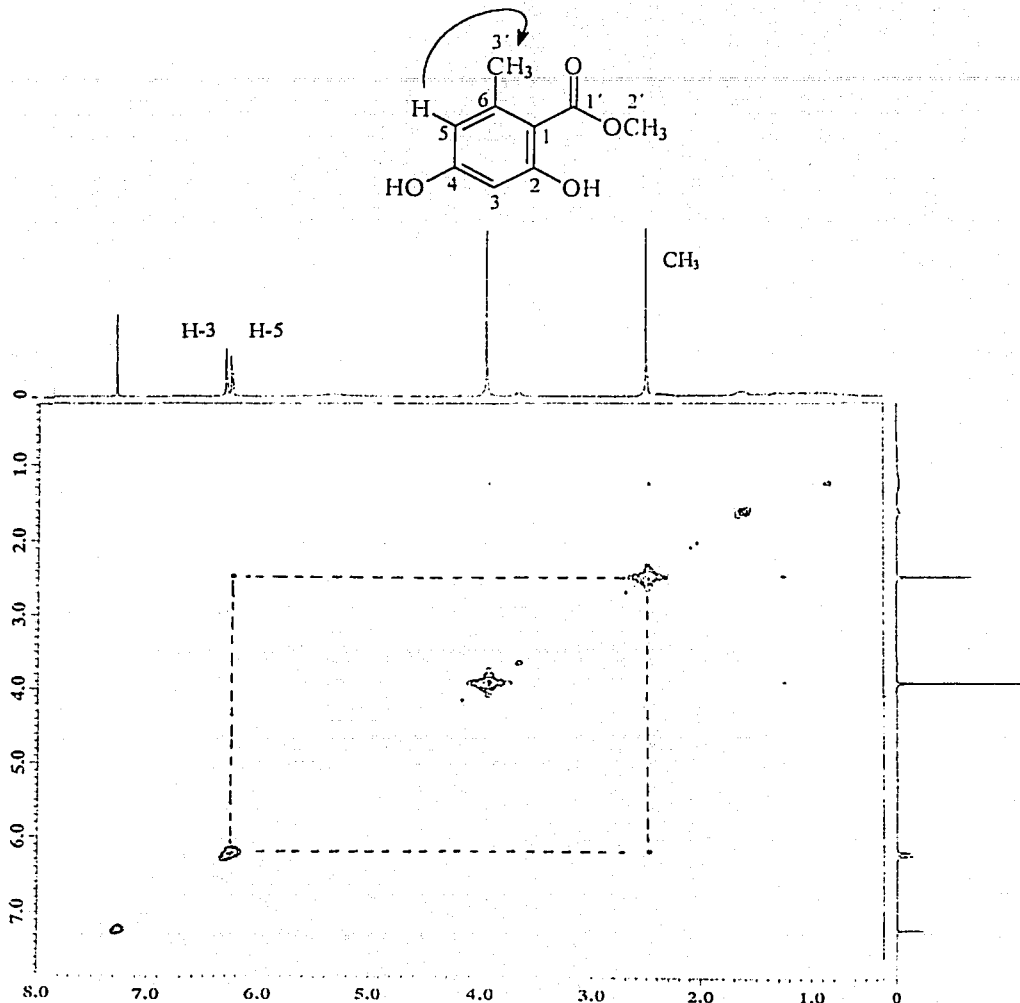


Figura 16. Espectro de RMN-¹H NOESY del orselinato de metilo (75).

4.2.3 Actividad fitotóxica de los productos naturales aislados.

El potencial fitotóxico de los metabolitos secundarios aislados de las fracciones activas de *F. cernua* se determinó mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento radicular y la germinación de las semillas de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli* utilizando el método de la caja de Petri (inciso 3.3.2.1). Los resultados de estas pruebas se encuentran expresados como concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) del crecimiento radicular y se muestran en la Cuadro 20. Como puede apreciarse el ácido deshidroflourénsico (80) y el orselinato de metilo (75) inhibieron significativamente el crecimiento radicular de las dos arvenses de prueba, en tanto que el flourensadiol (23) solo tuvo efecto significativo sobre *A. hypochondriacus*. Los flavonoides 15, 76, 78 y 79, así como el *p*-hidroxicinamato de heneicosanilo (77) no afectaron el crecimiento de las especies de prueba.

Cuadro 20. Actividad fitotóxica de los compuestos aislados de *F. cernua*.

Compuesto	Crecimiento radicular CI_{50} (M)	
	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crus-galli</i>
Kumatakenina (15)	$> 3.18 \times 10^{-3}$	$> 3.18 \times 10^{-3}$
Ácido deshidroflourénsico (80)	1.96×10^{-4}	6.2×10^{-4}
Flourensadiol (23)	4.12×10^{-4}	$> 4.2 \times 10^{-3}$
Orselinato de metilo (75)	2.9×10^{-4}	3.1×10^{-4}
3,7-éter dimetilico de la quercetina (76)	$> 3.0 \times 10^{-3}$	$> 3.0 \times 10^{-3}$
<i>p</i> -Hidroxicinamato de heneicosanilo (77)	$> 2.12 \times 10^{-3}$	$> 2.12 \times 10^{-3}$
Paquipodol (78)	$> 2.9 \times 10^{-3}$	$> 2.9 \times 10^{-3}$
Ermanina (79)	$> 3.18 \times 10^{-3}$	$> 3.18 \times 10^{-3}$
2,4-D *	1.8×10^{-4}	$> 2.3 \times 10^{-4}$

* control positivo.

Por otra parte, estudios previos de evaluación biológica realizados en la especie *F. cernua*, indicaron actividad fitotóxica en los extractos de hexano y éter etílico preparados a partir de sus hojas (Dayan y Tellez, 1999; Tellez *et al.*, 2001); sin embargo, no existen reportes de fitotoxicidad para los compuestos 23 y 80. El compuesto 75 fue aislado previamente del

liquen *Parmotrema tinctorum* y en este estudio se comprobó su actividad inhibitoria sobre la germinación y crecimiento radicular de las arvenses *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli* (Rojas *et al.*, 2000).

Es importante mencionar que el extracto y los productos aislados de *F. cernua* se evaluaron también en los laboratorios de la compañía BASF para determinar su actividad fitotóxica a nivel posemergente. Estas evaluaciones se llevaron a cabo como parte del convenio realizado con la Universidad de Arizona a través de proyecto “Bioactive Agents from Dryland of Latin America”. Los resultados obtenidos se muestran en el Apéndice I y como puede apreciarse, el ácido deshidroflourénsico (80) (clave F075) y el flourensadiol (23) (clave F025) inhiben significativamente el crecimiento vegetal de una especie de *Arabidopsis* y de un pasto común conocido en inglés como “*bentgrass*”.

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

1. Los resultados de la presente investigación corroboran que la selección de especies vegetales con base en los criterios etnomédico y ecológico en conjunto con la determinación de su potencial biológico mediante las evaluaciones apropiadas pueden conducir al descubrimiento de productos de posible utilidad terapéutica y agroquímica.
2. El estudio fitoquímico biodirigido del extracto antimicobacteriano preparado a partir de los tallos de *Piper sanctum* permitió el aislamiento de diez metabolitos secundarios identificados como la cefaradiona A (1), la 5,6-deshidro-7,8-dihidrometisticina (6), la Z-piperólida (10), el eugenol (68), el éter metílico del eugenol (69), la desmetoxiyangonina (70), la cefaranona B (71), la piperolactama A (72), la *N-trans*-feruloiltiramina (73) y la *N-p*-cumaroiltiramina (74). De estos productos los cuatro últimos se describen por primera vez en esta especie.
3. Todos los productos naturales aislados de *Piper sanctum* con excepción de los compuestos 68 y 69 presentaron actividad inhibitoria significativa sobre el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* y son candidatos apropiados para el desarrollo de nuevos fármacos antifímicos. La cefaranona B resultó ser el compuesto antifímico de mayor potencia (CMI de 2 µg/mL), seguida por la 5,6-deshidro-7,8-dihidrometisticina (CMI de 4 µg/mL) y la piperolactama A (CMI de 8 µg/mL). La cefaradiona A, la desmetoxiyangonina y la *N-p*-cumaroiltiramina presentaron una CMI de 32 µg/mL, la piperólida de 64 µg/mL y la *N-trans*-feruloiltiramina de 128 µg/mL. Con base en los reportes de citotoxicidad descritos para las amidas *N-trans*-feruloiltiramina y *N-p*-cumaroiltiramina estas no se consideran adecuadas para el desarrollo de antifímicos.
4. El análisis de difracción de rayos X de la Z-piperólida permitió confirmar su estructura y la configuración Z en el estado sólido de la doble ligadura entre los carbonos C-5 y C-6.

5. La presencia de kavalactonas en la especie *P. sanctum* podría estar relacionada con su uso popular en la medicina tradicional para el tratamiento de dolores (cabeza, estomacales y musculares) y trastornos en la matriz posparto debido a sus propiedades analgésicas, anestésicas y antisépticas comprobadas (Shulgin, 1973; Duve, 1981; Volz y Kieser, 1997; Boonen y Häberlein, 1998). Además, su uso en trastornos respiratorios como asma, tos y gripa pueden deberse a las propiedades antiinflamatorias de la piperolactama A. Por último, la presencia del eugenol con propiedades anestésicas bien conocidas posiblemente se encuentre vinculado al empleo de la planta para tratar dolores de muela.
6. El estudio fitoquímico biodirigido del extracto fitotóxico de la especie *Flourensia cernua*, permitió el aislamiento de cuatro flavonoides identificados como la kumatakenina (15), el 3, 7-éter dimetilico de la quercetina (76), el paquipodol (78) y la ermanina (79), además del flourensadiol (23), el orselinato de metilo (75), el *p*-hidroxicinamato de heneicosanilo (77) y el ácido deshidroflourénsico (80). Este estudio representa el primer reporte de los compuestos 75, 76, 77, 78, 79 y 80 en esta especie y la primera descripción de los productos 75 y 77 en el género *Flourensia*. De manera adicional, el ácido deshidroflourénsico constituye un nuevo producto natural.
7. El orselinato de metilo, el flourensadiol y el ácido deshidroflourénsico presentaron propiedades fitotóxicas notables de tipo preemergente sobre *Amaranthus hypochondriacus*. El ácido deshidroflourénsico y el flourensadiol presentaron actividad de tipo posemergente sobre las malezas *Arabidopsis* y "*Bentgrass*". En consecuencia estos productos constituyen candidatos valiosos para el desarrollo de herbicidas verdes. Así, estos productos pudieran ser los principios activos responsables de la actividad fitotóxica y algicida de diferentes extractos de *F. cernua* reportados por otros autores.
8. Este estudio contribuye al conocimiento de la química de las especies *Piper sanctum* y *Flourensia cernua*, así como del género *Flourensia*, y pone de manifiesto el potencial de ambas especies como fuentes de compuestos con actividad antifúngica y fitotóxica, respectivamente.

VI. BIBLIOGRAFÍA.

- * Abell, A. y Massay-Westrop, R. (1985) Eremophilane and Serrulatane Terpenoids from *Eremophila rotundifolia*. *Australian Journal of Chemistry* 38, 1263.
- * Achari, B., Bandyopadhyay, S., Chakravarty, A. y Pakrashi, S. (1984) Carbon-13 NMR Spectra of some phenanthrene derivatives from *Aristolochia indica* and their analogues. *Organic Magnetic Resonance* 22 (12), 741.
- * Achenbach, H., Frey, D. y Waibel, R. (1991) 6a, 7-Dehydro-2-hydroxy-4, 5-dioxonoroporphine and other alkaloids from *Monocyclanthus vignei*: ¹³C-NMR studies on 4, 5-dioxoaporphines. *Journal of Natural Products* 54 (5), 1331.
- * Akasu, M., Itowa, H. y Fujita, M. (1974) Four new fluorescent components isolated from the callus tissue of *Stephania cepharanta*. *Tetrahedron Letters* 41, 3609.
- * Alencar, J., Craveiro, A. y Matos, F. (1984) Kovats' indexes as a preselection routine in mass spectra library search of volatiles. *Journal of Natural Products* 47, 890.
- * Anaya, A., Calera, M., Torres, A., Pelayo, H. y Fernández, E. (1995) A Methodological model used in the search for Allelopathy potential in some Mexican plants. En: *Methodology for Allelopathy Research*. Waller, G. R. y S. Narwal (eds.).
- * Argueta, A., Cano, A., Rodarte, M. (1994) Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista, México. vol. II, pp. 49, 279, 813, 521-523, 1341.
- * Berndt, W. y Koschier, F. (1973) In vitro uptake of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4, 5-trichlorophenoxyacetic acid by renal cortical tissue of rabbits and rats. *Toxicology Applications Pharmacology* 26, 559.
- * Bohlmann, F. y Grenz, M. (1977) Über Inhaltsstoffe der Gattung *Flourensia*. *Chemische Berichte* 110, 295.
- * Bohlmann, F., Jakupovic, J., Schuster, A., King, R. y Robinson, H. (1984) Eudesmanolides and Costic Acid derivatives from *F. macrophylla*. *Phytochemistry* 23(7), 1445.
- * Boonen, G. y Häberlein, H. (1998) In vivo effects of the kavapirones (+) Dihydromethysticin and (+/-) Kavain on Dopamine, 3,4 -Dihydroxyphenylacetic Acid, Serotonin and 5-Hydroxyindoleacetic Acid Levels in Striatal and Cortical Brain Regions. *Planta medica* 64, 507.

- * Bradaczek, H. (1978) Crystal and molecular structure of cinnamylidene butenolides from *Piper sanctum*. *Journal of Crystal Molecular Structure* 7, 147.
- * Bus, J., Cagen, Z. y Gibson, J. (1983) A mechanism of paraquat toxicity in mice and rats. *Toxicology Applications Pharmacology* 35, 501.
- * 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.
- * Castañeda, P., García, M., Hernández, B., Torres, B., Anaya, A. y Mata, R. (1992) Effects of some compounds isolated from *Celaenodendron mexicanum* Stand (Euphorbiaceae) on seeds and phytopatogenic fungi. *Journal of Chemical Ecology* 18, 1025.
- * Cohn, D., Bustreo, F., Raviglione, M. (1997) Drug resistant tuberculosis: review of the world wide situation and the WHO/IUATLD global surveillance project. *Clinical Infectology Disease* 24 (suppl.1), 121-130.
- * 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.
- * Cramer, H. (2000) Crop Protection. En: F. Müller (ed.), *Agrochemicals. Composition, Production, Toxicology and applications*. Wiley-VCH, Federal Republic of Germany, 288.
- * Cremlyn, R. (1991) *Agrochemicals, preparation and mode of action*. J. Wiley & Sons. p. 217.
- * Crohare, R., Priestap, H., Fariña, M. y Rúveda, E. (1974) Aristololactams of *Aristolochia argentina*. *Phytochemistry* 13, 1957.
- * Cutler, H. (1988) Natural products and their potential in agriculture. En: H. Cutler (ed.), *Biologically Active Natural Products. Potential Use in Agriculture*. ACS Symposium Series 380, 1-22.
- * Davis, B., Dulbecco, R., Eisen, H. y McCarty (1978) *Tratado de microbiología*. 2a. edición. Salvat. Barcelona, España, pp. 867.
- * Dayan, F. y Tellez, M. (1999) Phytotoxicity of tarbush (*Flourensia cernua* D.C.) *Allelopathy J.* 6,1.
- * Desai, S., Prabhu, B. y Mulchandani, N. (1988) Aristolactams and 4,5-Dioxoaporphines from *Piper longum*. *Phytochemistry* 27 (5), 1511.

- * Díaz, J. (1976) Usos de las plantas medicinales de México, monografías científicas II. 1a. edición. IMEPLAM, México.
- * Dillon, M. y Mabry, T. (1977) Flavonoid Aglycones from *Flourensia*. *Phytochemistry* 16, 1318.
- * Dillon, M., Mabry, T., Besson, E., Bouillant, M. y Chopin, J. (1976) New Flavonoids from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry* 15, 1085.
- * Dollahite, J. y Allen, T. (1975) The toxicity of the fruit of *Flourensia cernua* (tarbush) (blackbrush). *Southwest Veterinary* 28, 113.
- * Domínguez, X. y Alcorn, J. (1985) Medicinal plants from Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* 13, 139.
- * Duke, O. y Abbas, H. (1995) Natural products with potential use as herbicides. *ACS Symposium series* 582, 348.
- * Duve, R. N. (1981) Gas-Liquid Chromatography Determination of Major Constituents of *Piper methysticum*. *Analyst* 106, 160.
- * Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V. y Raviglione, M. (1999) Global Burden of Tuberculosis. Estimated incidence, prevalence and mortality by country. *The Journal of the American Medical Association* 282 (7), 677.
- * Estell, R., Tellez, M., Fredrickson, E., Anderson, D., Havstad, K. y Remmenga, M. (2001) Extracts of *Flourensia cernua* reduce consumption of alfalfa pellets by sheep. *Journal of Chemical Ecology* 27 (11), 2275.
- * Estell, R., Anderson, D. y Havstad, K. (1994) Effects of organic solvents on use of tarbush by sheep. *Journal of Chemical Ecology* 20(5), 1137.
- * Estell, R., Havstad, K., Fredrickson, L. y Gardea-Torresdey, J. (1994) Secondary chemistry of the leaf surface of *Flourensia cernua*. *Biochemical Systematics and Ecology* 22(1), 73.
- * Faini, F., Labbe, C., Salgado, I. y Coll, J. (1997) Chemistry, toxicity and antifeedant activity of the resin of *F. thurifera*. *Biochemical Systematics and Ecology* 25(3), 189.
- * Fernández, E. y Domínguez, E. (1985) Las plantas con flores. 1a. edición. Reverté S.A., Barcelona, España. pp. 34.
- * Fredrickson, E., Estell, R., Havstad, K., Shupe, W. y Murray, L. (2000) The effect of feeding ewe lambs a 15 % tarbush (*Flourensia cernua* DC) pellet pre- and post-weaning on the subsequent diet selection of tarbush. *J. of Arid Environments* 44, 123.

- * Fredrickson, E., Thiisted, J., Estell, R. y Havstad, K. (1994) Effect of chronic ingestion of tarbush (*Flourensia cernua*) on ewe lambs. *Veterinary Human Toxicology* 36(5):409-415.
- * Gerig, T. y Blum, U. (1991) Effects of mixtures of four phenolic acids on leaf area expansion of cucuber seedlings grown in portsmouth by soil materials. *Journal of Chemical Ecology* 17, 29.
- * 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., Tomo II cap. 48.
- * Grossmann, K. (2000) Mode de action de auxin herbicides: a new ending to a long, draw uot story. *Trends in Plant Science* 5, 506.
- * Hänsel, R. y Leuschke, A. (1976) Ein Aporphinalkaloid aus *Piper sanctum*. *Phytochemistry* 15, 1323.
- * Hänsel, R. y Pelter, A. (1971) Cinnamylidenbutenolide aus *Piper sanctum*. *Phytochemistry* 10, 1627.
- * Hänsel, R. y Schulz, J. (1979) Z, E-Isomerie des Piperolides. *Zeitschrift furNaturforschung* 34-b, 1576.
- * Hänsel, R. y Schulz, J. (1982) Ein neues kawainolderivatans *Piper sanctum*. *Archives Pharmaceutical (Weinheim)* 315, 147.
- * Hänsel, R., Beer, C. y Schulz, J. (1973) Ein neues kawapyron aus *Piper sanctum*. *Chemische Beritche* 106, 3116.
- * Hänsel, R., Leuschke, A. y Gomez-Pompa, A. (1975) Aporphine Type Alkaloids from *Piper auritum*. *Journal of Natural Products (Lloydia)* 38 (6), 529.
- * Hänsel, R., Pelter, A., Schulz, J. y Hille, C. (1976) Ein 5-Acetoxy-6-methoxykawain aus *Piper sanctum* und Synthese beider Diastereomeren. *Chemische Beritche* 109, 1617.
- * Heywood, V., Harborne, J. y Turner, B. (1977) The Biology and Chemistry of the Compositae. Accademic Press. London, N.Y. Tomo VI, pp. 168, 642 y 686.
- * Hoagland, R. (1990) Microbes and microbial products as herbicides, an overview. En: R. E. Hoagland (ed.), *Microbes and Microbial Products as Herbicides*, ACS Symposium Series 439, 1-52.

- * Hostettmann, K. y Hostettmann, M. (1998) Preparative Chromatography Techniques, Applications in Natural Product Isolation. Edit. Springer Verlag Berlin Heidelberg, pp. 27.
- * Houghton, P. (2001) Old Yet New-Pharmaceuticals from Plants. *Journal of Chemical Education* 78 (2), 175.
- * Hussain, S., Gözler, B., Shamma, M. y Gözler, T. (1982) Additional bioactive compounds and trilobacin, a novel highly cytotoxic acetogenin, from the bark of *Asimina triloba*. *Journal of Natural Products* 55 (3), 347.
- * Inatani, R., Nakatani, R. y Fuwa, H. (1981) Structure and synthesis of new phenolic amides from *Piper nigrum* L. *Agricultural and Biological Chemistry* 45, 667.
- * Inoue, M., Nishimura, H., Li, H.-H., Mizutani, J. (1992) Allelochemicals of *Polygonum sachalinense* FR. SCHM (Polygonaceae). *Journal of Chemical Ecology* 18, 1833.
- * Jacobson, M. y Crosby, D. (1971) Naturally Occurring Insecticides (Marcel Dekker) 144, 226.
- * Joklik, W., Willett, H. y Amos, B. (1983) Zinsser Microbiología. 17a edición. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina, cap. 34.
- * King, D., Estell, R., Fredrickson, E., Havstad, K., Wallace, J. y Murray, L. (1996) Effects of *F. cernua* ingestion on intake, digesta kinetics, and rumial fermentation of sheep consuming tobosa. *Journal of Range Management* 49(4), 325.
- * King, D., Fredrickson, E., Estell, R., Havstad, K., Wallace, J. y Murray, L. (1996) Effects of *F. cernua* ingestion on nitrogen balance of sheep consuming tobosa. *Journal of Range Management* 49(4), 331.
- * Kingston, D., Rao, M. y Spittler, T. (1971) Isolation and structure determination of flourensic acid, a new sesquiterpene of the eremophilane type. *Tetrahedron Letters* 20, 1613.
- * Kingston, D., Rao, M., Spittler, T., Pettersen, R. y Cullen, D. (1975) Sesquiterpenes from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry* 14(9), 2033.
- * Klohs, M., Keller, R., Williams, M., Toekes, M. y Cronheim, G. (1959) A Chemical and Pharmacological Investigation of *Piper methysticum* Forst. *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry* 1 (1), 95.
- * Landrigan, P., Powell, K. y Taylor, P. (1983) Paraquat and marijuana: epidemiological risk assessment. *American Journal Public Health* 73, 784.

- * Langhammer, L., Hänsel, R. y Gómez-Pompa, A. (1972) Pharmakognostische Charakterisierung von *Piper sanctum*. *Deutsche Apotheker Ztg.* 112 (16), 591.
- * Lewis, W. y Elvin-Lewis, M. (1995) Medicinal plants as sources of new therapeutics. *Annual Missouri Botanical Garden* 82, 16.
- * Lowrey, C. (1993) Reagent chemicals. American Chemical Society Specification, Washington, D.C. pp. 90.
- * Ludwing, J., Reynolds, J. y Whitson, P. (1975) Size-biomass relationships of several Chihuahuan Desert shrubs. *American Midland Naturalist* 94, 451.
- * Marcel Dekker, Inc. (1992) Chromatografic Science series; Modern Thin-Layer chromatografic. Edit. Nelu Grinberg. New York, USA. Vol. 52.
- * Macías, F. (1995) Allelopathy in the search for natural herbicide models. *ACS Symposium Series* 582, 310.
- * Márquez, C., Lara Ochoa, F., Esquivel, R. y Mata, R. (1999) Plantas Medicinales de México II. UNAM, México. pp. 61, 99.
- * Martínez, M. (1979) Las Plantas Medicinales de México. 6ta. edición. Ediciones Botas. México D.F. pp. 186.
- * Martínez, M. (1979) Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de cultura económica. pp. 446, 875, 1081, 1150.
- * Mathews, F. (1944) The toxicity of the ripe fruit of blackbrush or tarbush (*Flourensia cernua*) for sheep and goats. *Texas Agricultural Experimental Sta. Bulletin* No. 664.
- * Matsui, K. y Munakata, K. (1975) Structure of piperenone, a new insect antifeeding substance from *Piper fotokadzura*. *Tetrahedron Letters* 1905.
- * Mauchamp, A. y Jancau, J. (1993) Water funneling by the crown of *F. cernua*, a Chihuahuan Desert shrub. *Journal of Arid Environments* 25, 299.
- * Moreira, D., Guimaraes, E., y Kaplan, M. (2000) A C-glucosylflavone from leaves of *Piper lhotzkyanum*. *Phytochemistry* 55, 783.
- * Nelson, A., Herbel, C. y Jackson, H. (1970) Chemical composition of forege species grazed by cattle on an arid New México range. *New Mexico Agricultural Experimental Sta. Bulletin* No. 561.

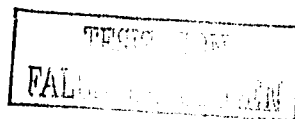
- * Niccolai, D., Tarsi, L., Thomas, R. (1997) The renewed challenge of antibacterial chemotherapy. *Chemical Communications* 2333.
- * Oh, H., Sakai, T., Jones, M. y Longhurst, W. (1967) Effect of various essential oils isolated from Douglas Fir needles upon sheep and deer rumen microbial activity. *Applied Microbiology* 15, 777.
- * Parmar, V., Jain, S., Bisht, K., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O., Prasad, A., Wengel, J., Olsen, C. y Boll, P. (1997) Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* 46 (4), 597.
- * Parmar, V., Sinha, R., Shakil, N., Tyagi, O., Boll, P. y Wengel, A. (1993) An insecticidal amide from *Piper falconeri*. *Indian Journal of Chemical* 32B, 392.
- * Pelter, A. y Hänsel, R. (1972) Epoxipiperolid aus *Piper sanctum*. *Zeitschrift für Naturforschung* 27b, 1186.
- * Pereda-Miranda, R., Mata, R., Anaya, A., Wickramaratne, D., Pezzuto, J., Kinghorn, A. (1993) Tricolorina A, mayor phytochemical inhibitor from *Ipomoea tricolor*. *Journal of Natural Products* 56, 571.
- * Pérez Quiroz Nadina Olga (2000) Estudio químico de las fracciones bioactivas de menor polaridad de la especie *Flourensia cernua* D.C. (Compositae). Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- * Pettersen, R., Cullen, D., Spitter, T. y Kingston, D. (1975). The Crystal and Molecular Structure of Flourensadiol, a natural product sesquiterpene isolated from a West Texas shrub. *Acta Crystallografica* B 31,1124.
- * Priestap, H. (1989) ¹³C NMR Spectroscopy of Aristolochic Acids and Aristololactams. *Magnetic Resonance in Chemistry* 27, 460.
- * Priotti, Z., Zygodlo, J. y Ariza-Espinar, L. (1997) Essential oils of *F. oolepis* S.L. Blake. *Journal Essential Oil Research* 9, 345.
- * Prizzolatti, M., Luciano, C. y Monanche, F. (2000) Styryl and dihydrostyryl-2-pyrone derivatives from *Polygala salubosa*. *Phytochemistry* 55, 819.
- * Rango, R., Marshall, G., Di Santo, R., Costi, R., Massa, S., Rompei, R. y Artico, M. (2000) Antimycobacterial Pyrroles: Synthesis, Anti-*Mycobacterium tuberculosis* Activity and QSAR Studies. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 8, 1423.
- * Rao, M., Kingston, D. y Spittler, T. (1970). Flavonoids from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry* 9, 227.

- * Raviglione, M., Snider, D., Kochi, A. (1995) Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a world wide epidemic. *The Journal of the American Medical Association* 273, 220.
- * Richardson, M. (1998) Pesticides Friend or foe?. *Water Science Technology* 37,19.
- * Richerson, J. y Boldt, P. (1995) Phytophagous insect fauna of *F.cernua* (Asteraceae:Heliantheae) in Trans-Pecos Texas and Arizona. *Environmental Entomology* 24 (3), 588.
- * Rodgers, P. (1993) Potential of biopesticides in agriculture. *Pesticide Science* 39, 117.
- * Rodríguez, E. (1985) Rubber and phytochemical specialities from desert plants of North America. *Plants for arid lands* 399.
- * Rojas, I., Lotina-Hennsen, B. y Mata, R. (2000) Effect of Lichen Metabolites on Thylakoid Electron Transport and Photophosphorylation in isolated Spinach Chloroplasts. *Journal of Natural Products* 63, 1396.
- * Ruangrunsi, N., Prathanurug, S., Lange, G. y Organ, M. (1992) An N-methyl aristolactam and an oxygenated cyclohexane derivative from *Piper ribesoides*. *Phytochemistry* 31 (7), 2397.
- * Rzedowski, J. (1983) Vegetación de México. Limusa. México D.F. pp. 77.
- * Schlesinger, W., Reynolds, J., Cunningham, G., Huenneke, L., Jarrell, W., Virginia, R. y Whitford, W. (1990) Biological feedbacks in global desertification. *Science* 247, 1043.
- * Showalter, T. (1996) Arthropod associates and herbivory on tarbush in southern New México. *The Southwestern Naturalist* 41(2), 140.
- * Shulgin, A. (1973) Chemistry and pharmacology of *Piper methysticum* and related species. *Bulletin Narcotics* 25, 59.
- * Singh, S., Prasad, A., Olsen, C., Jha, A., Jain, S., Parmar, V. y Wengel, J. (1996) Neolignans and alkaloids from *Piper argyrophyllum*. *Phytochemistry*. 43 (6), 1355.
- * Siraj, D., Chang, L., Fasihuddin, A., Jiu, X., Hasan, J. y Tetsuo, N. (1992) Phenanthrene Lactams from *Goniothalamus velutinus*. *Phytochemistry* 31 (12), 4395.
- * Smith, R. (1983) Kava lactones in *Piper methysticum* from Fiji. *Phytochemistry* 22 (4), 1055.

- * Smith, R., Thakrar, H., Arowolo, T. y Shafi, A. (1984) High-performance liquid chromatography of kava lactones from *Piper methysticum*. *Journal of Chromatography* 283, 303.
- * Stanier, R., Ingraham, J. y Painter, P. (1996) Microbiología. 2a. edición. Reverté. Barcelona, España, pp. 687.
- * Streigbig, J., Dayan, F. Rimando, A., Duke, S. (1999) Joint action of natural and synthetic photosystem II inhibitors. *Pesticide Science* 55, 137.
- * Stuppner, H. y Müller, E. P. (1994) Rare flavonoid aglycones from *F. retinophylla*. *Phytochemistry* 37(4), 1185.
- * Suffness, M., Cragg, G., Grever, M., Grifo, F., Johnson, G., Mead, J., Schepartz, S., Venditti, J. y Wolpert, M. (1995) The National Cooperative Natural Products Drug Discovery Group (NCNPDDG) and International Cooperative Biodiversity Group (ICBG) Programs. *International Journal of Pharmacognosy* 33, 5.
- * Tellez, M., Estell, R., Fredrickson, E., Powell, J., Wedge, D., Schrader, K. y Kobaisy, M. (2001) Extracts of *Flourensia cernua* (L): Volatile constituents and antifungal, antialgal, and antitermite bioactivities. *Journal of Chemical Ecology* 27 (11), 2263.
- * 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. y Montenegro, G. (1999) The Latin American: ICBG: The First Five Years. *Pharmaceutical Biology* 37, suppl. 35-54.
- * Uri, N. (1998) Government policy and the development and use of biopesticides. *Futures* 30, 409.
- * Volz, H. y Kieser, M. (1997) *Pharmacopsychiatry* 30, 1.
- * Vyvyan, J. (2002) Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* 58, 1631.
- * Witiak, D., Patel, D. y Jin, Y. (1967) Nuclear Magnetic Resonance. Influence of substituents on the long-range spin-spin coupling constant between benzylic and ring protons in the orcinol series. *Journal of the American Chemical Society* 89 (8), 1908.
- * Wollenweber, E. y Yastkievich, G. (1985) Flavonoides en la resina foliar de *F. resinosa*, compuesta endémica de Hidalgo, México. *Revista Latinoamericana Química* 16(1), 45.
- * Worsham, A. (1989) Current and potential techniques using allelopathy as an aid in weed management. En: Phytochemical ecology, mycotoxins and insect pheromones and alomones.

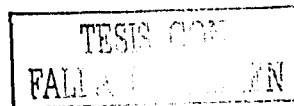
C. H. Choun y G. R. Waller (eds.) *Institute de Botany Academia Sinica, Monography Series* No. 9.

- * Yi-Chen Chia, Fang, C., Che-Ming, T. y Yang, W. (2000) Aristolactams and Dioxoaporphines from *Fissistigma balansae* and *Fissistigma oldhamii*. *Journal of Natural Products* 63, 1160.
- * Yoshihara, T., Takamatsu, S. y Sakamura, S. (1978) Three New Phenolic Amides from the roots of Eggplant (*Solanum melongena* L.) *Agricultural and Biologycal Chemistry* 42 (3), 623.
- * Young, R., Hylin, J., Plucknett, D., Kawano, Y. y Nakayama, R. (1966) Analysis de kawa pyrones in extracts of *Piper methysticum*. *Phytochemistry* 5, 795.
- * Zarate, P., Bye, R., Elechosa, M., Monroy, M., Morales, G y Mendoza, C. (1996) Métodos de propsgación convencionales y biotecnológicos de las especies medicinales en zonas áridas. En Izquierdo, J. Palomino, G. (de)., *Técnicas convencionales y biotecnológicas para la propagación de plantas de Zonas Aridas. Serie zonas Aridas y semiáridas* No. 9, Santiago, FAO 305-347.
- * Zhao, G., Hui, Y., Rupprecht, K. y McLaughlin, J. (1992) Additional bioactive compounds and trilobacin, a novel highly cytotoxic acetogenin, from the bark of *Asimina triloba*. *Journal of Natural Products* 55(3), 347.
- * Zobel, A., Wang, J., March, R. y Brown, S. (1991) Identification of eight coumarins occurring with psolaren, xanthotoxin and bergapten on leaf surfaces. *Journal of Chemical Ecology* 17, 1859.
- * Zolla, C. (1994) *La Flora Medicinal Indígena de México*. Instituto Nacional Indigenista, México. vol. I y II.



APÉNDICE I.

*Evaluación fitotóxica posemergente
conducida en los laboratorios BASF.*



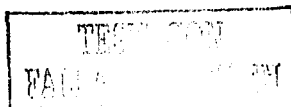
Fractions Received for Herbicide Testing

<u>Plant Name</u>	<u>UABG Source Code</u>	<u>Fractions Received</u>	<u>Cyanamid/BASF Lead Fraction</u>	<u>Activity in Herbicide Screen</u>
<i>Cosmos pringlei</i>	P057B5		EL 41239	
		F001		active
		F003		active
		F004		active
		F005		active
		F006		active
		F007		active
		F008		active
		F009		active
		F010		active
		F002, F011-F014 F023-F061 F083-F084		inactive inactive active on Chlamydomonas
<i>Flourensia cernua</i>	P051F9		EL 40815	
		F011	pure compound	inactive
		F011, A-G		never received samples
		F012	pure compound	inactive
		F013		
		F005-A		inactive
		F006-A	pure compound	inactive
		F006-B		inactive
		F007-A	pure compound	inactive
		F058	pure compound	inactive
		F060	pure compound	slightly active on Arabidopsis
		F049	pure compound	inactive
		F059	pure compound	inactive
		F075	pure compound	active on Arabidopsis & Bentgrass
		F034	organic	active on Bentgrass
		F007-I	organic	inactive
		F007-II	organic	inactive
		F007-III-IV	organic	active on Arabidopsis & Bentgrass
		F007-V	organic	active on Arabidopsis & Bentgrass
		F007-VI	organic	active on Arabidopsis & Bentgrass
		F007-VII-VIII	organic	active on Arabidopsis & Bentgrass
		F024	organic	active on Arabidopsis & Bentgrass
		F025	organic	active on Arabidopsis & Bentgrass
F026	organic	active on Arabidopsis		
F039	organic	inactive		
F079	pure compound	active on Arabidopsis & Bentgrass		
F086	pure compound	active on Arabidopsis & Bentgrass		
<i>Leucophyllum ambiguum</i>	P051G2		EL 40760	
		F020		inactive
		F055	pure compound	active on Bentgrass
		F063	pure compound	inactive
		F064	pure compound	active on Arabidopsis & Bentgrass
		F075	pure compound	active on Bentgrass
		F087	pure compound	inactive
		F088	pure compound	inactive
		F089	pure compound	inactive
<i>Haematoxylon brasiletto</i>	P051F5	F063-64		never received
		F075-76		never received
		F097, F099		never received
<i>Piper sanctum</i>	P061C3	F013		never received
<i>Amphypterygium adstringens</i>	P057D9	F017		inactive
		F014		never received
		F025-A,B		never received
		F021		never received

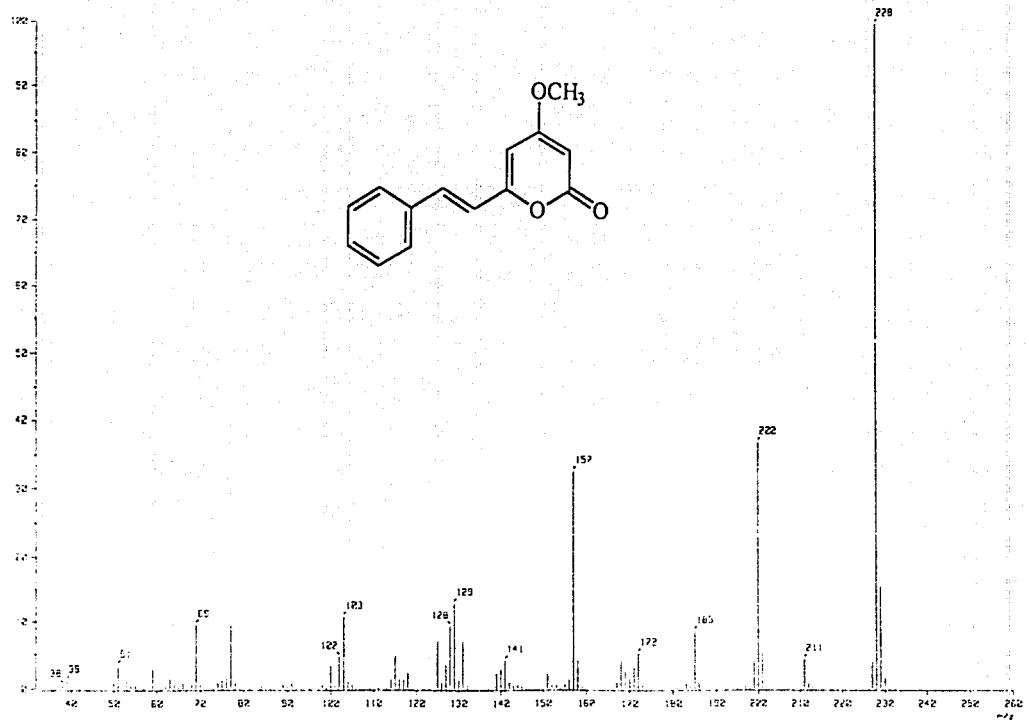


APÉNDICE II.

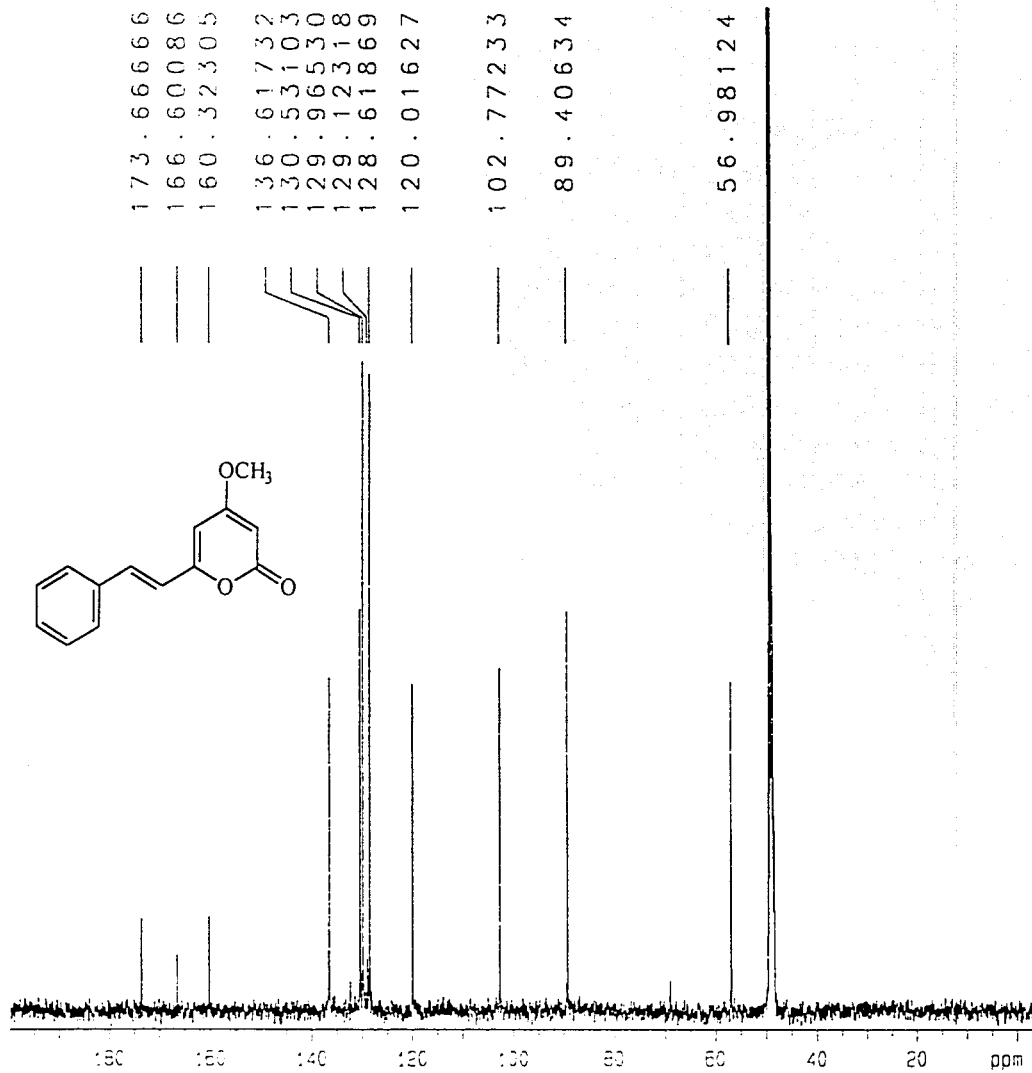
Espectros.



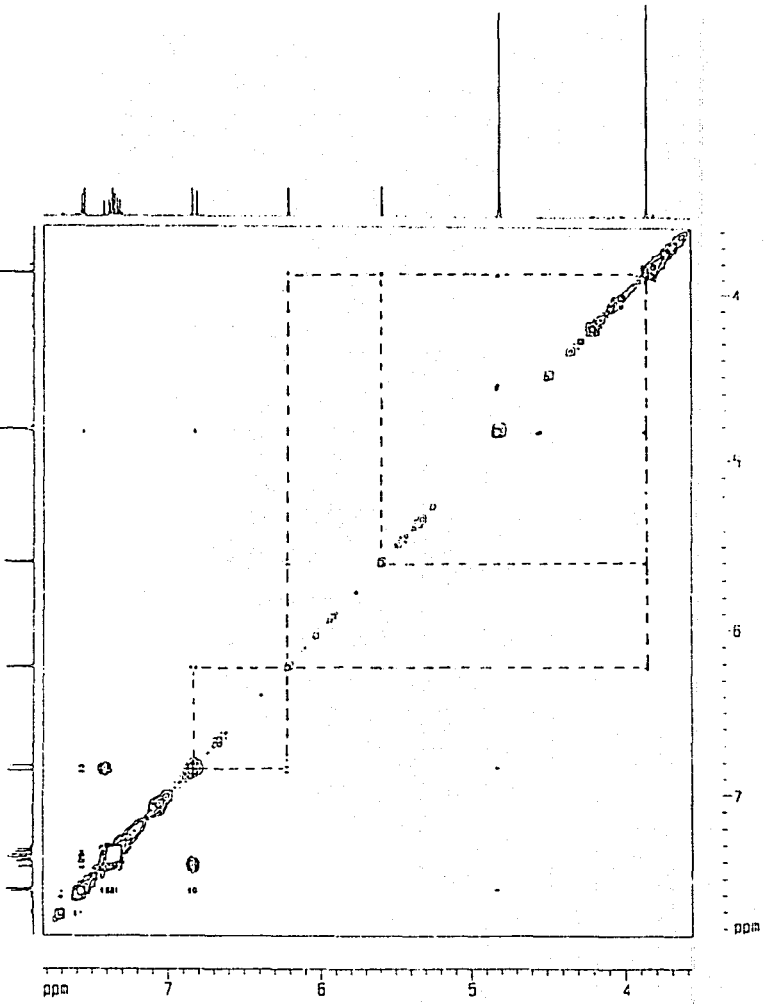
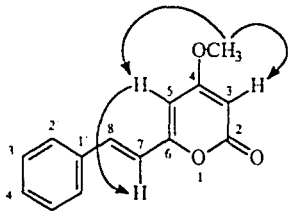
LABORATORIO DE FARMACIA
FARMACIA
FARMACIA



Espectro 1. Espectro de masas de la desmetoxyangonina (70).

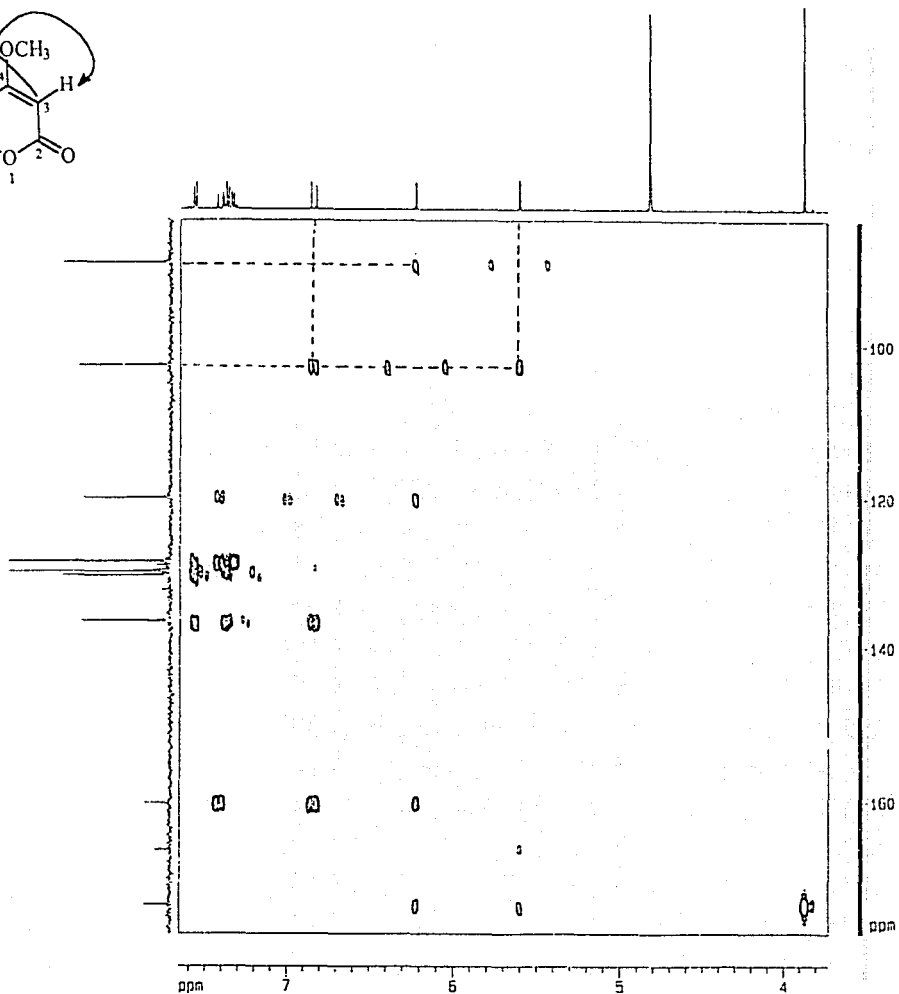
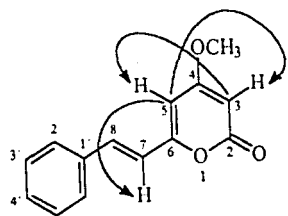


Espectro 3. Espectro de RMN- ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) de la desmetoxyangonina (70).



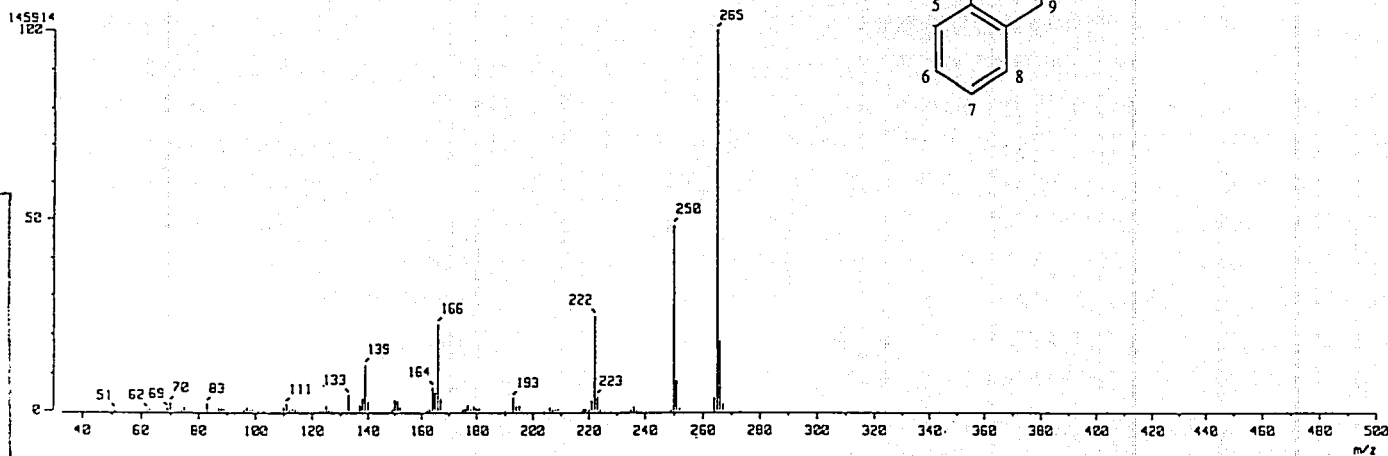
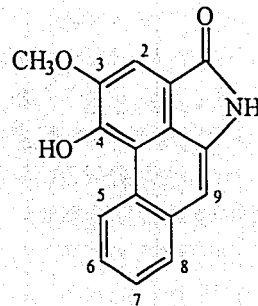
Espectro 4. Espectro de RMN-¹H NOESY de la desmetoxyangonina (70).

INSTITUTO VENEZOLANO
 DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
 DIVISIÓN DE QUÍMICA ORGÁNICA

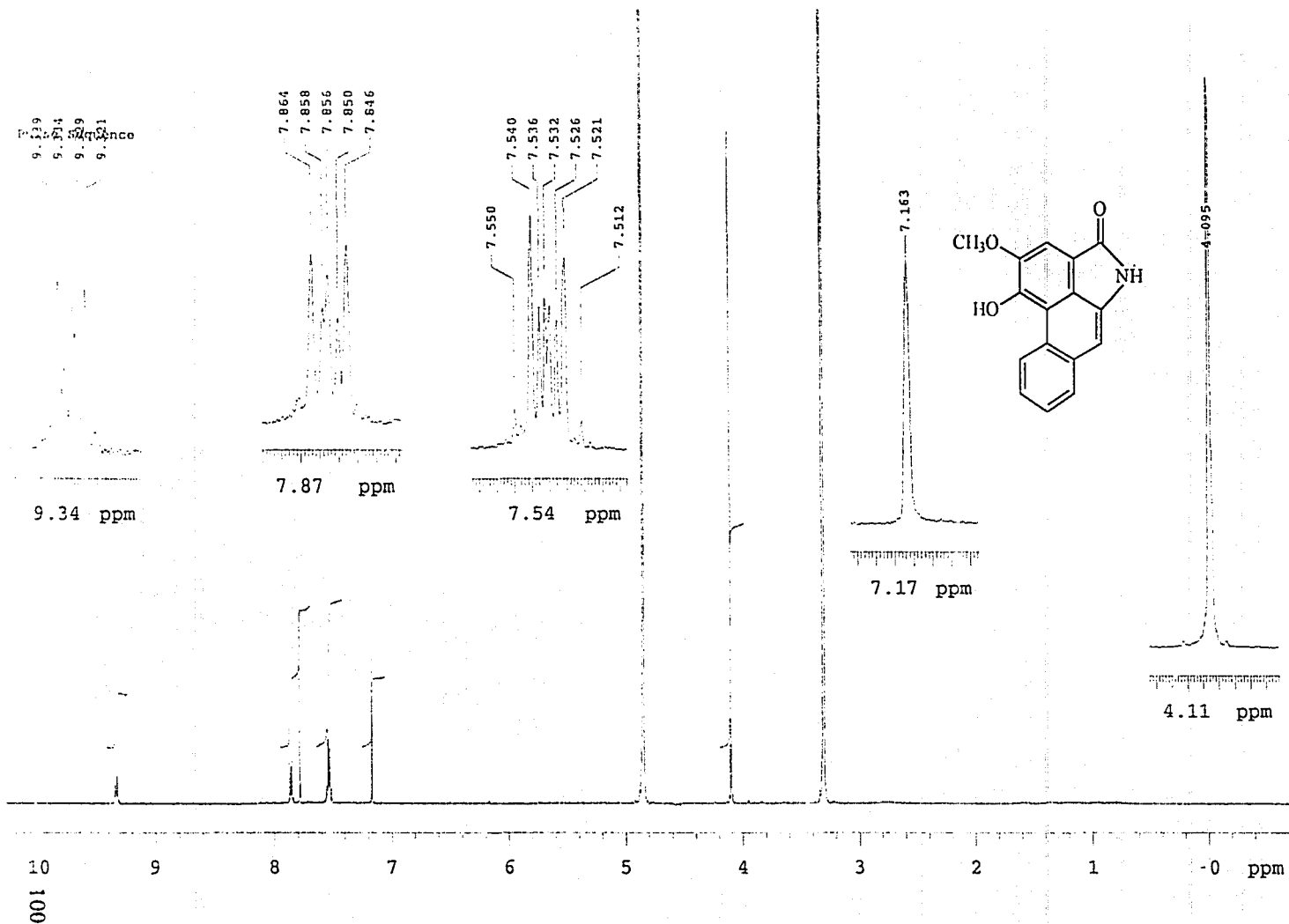


Espectro 5. Espectro de RMN 2D-HMBC de la desmetoxyangonina (70).

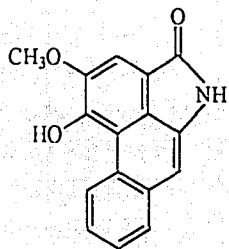
PATENTE DE INVENCION
 N.º 10.000.000.000.000



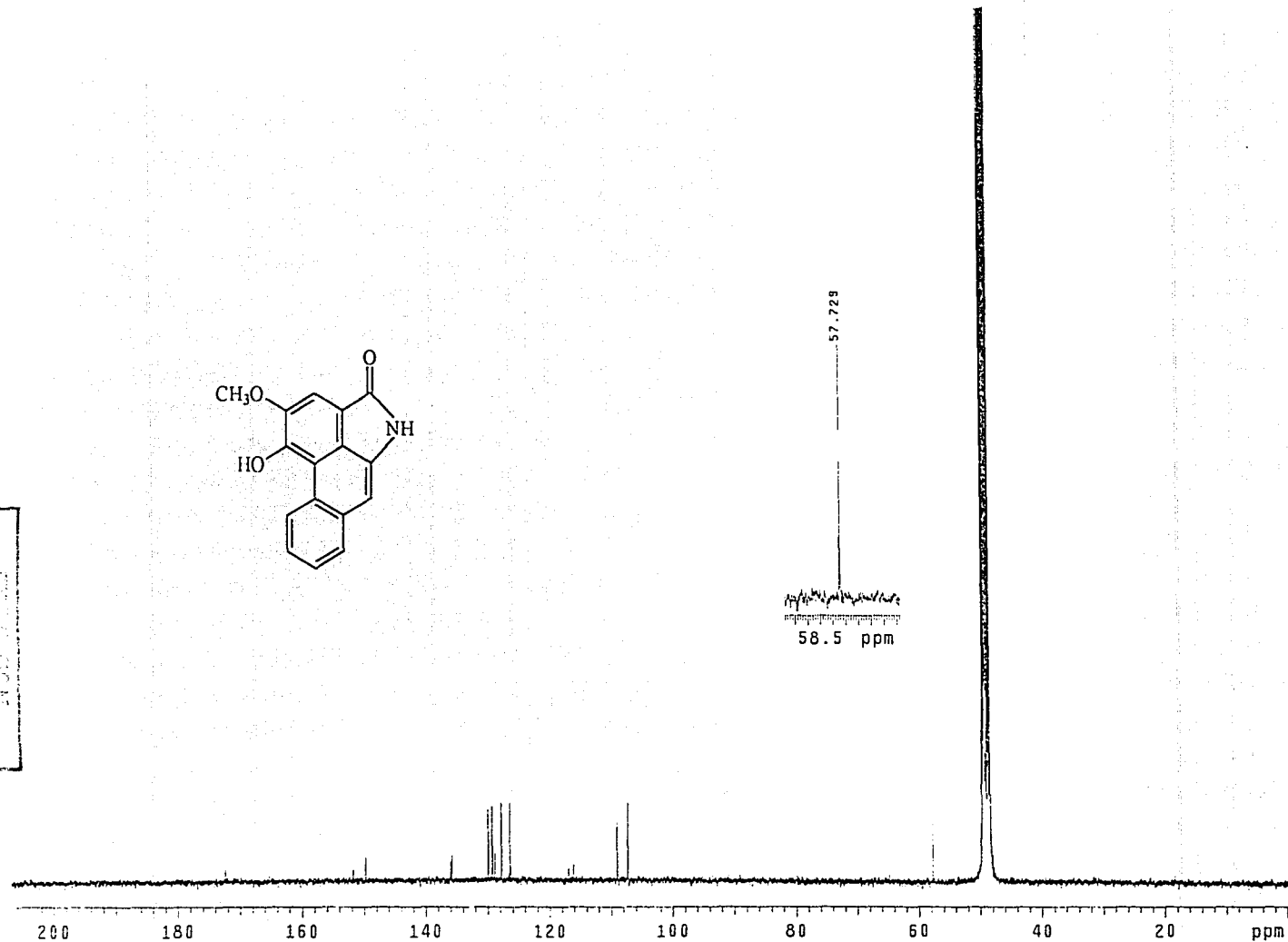
Espectro 6. Espectro de masas de la piperolactama A (72).



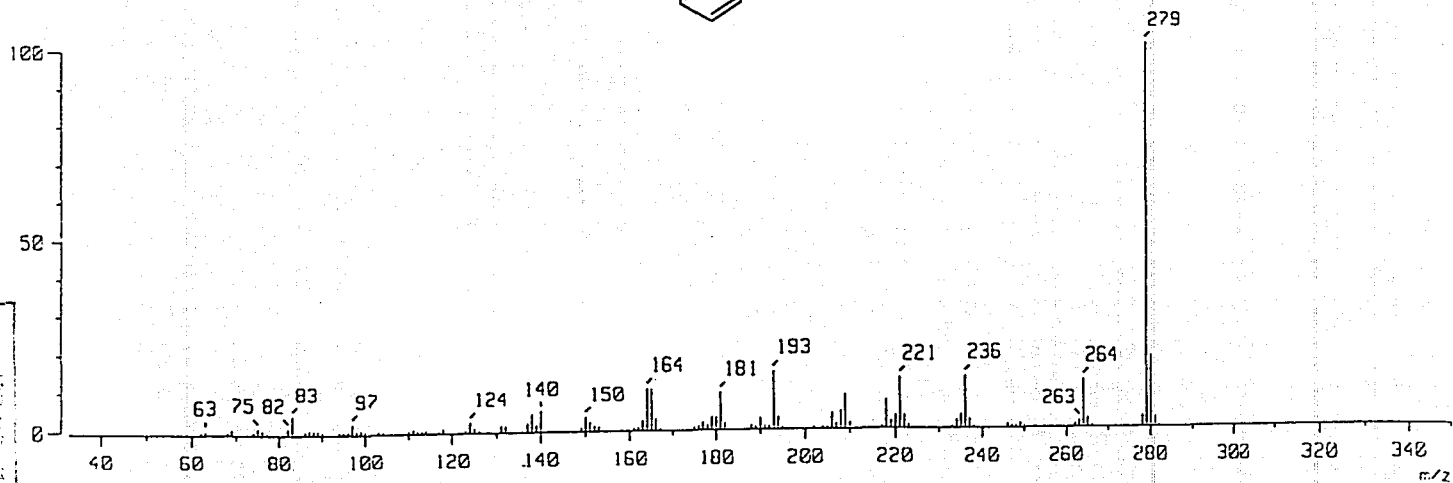
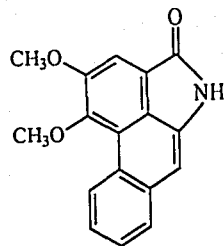
Espectro 7. Espectro de RMN¹-H (CD₃OD, 500 MHz) de la piperolactama A (72).



101



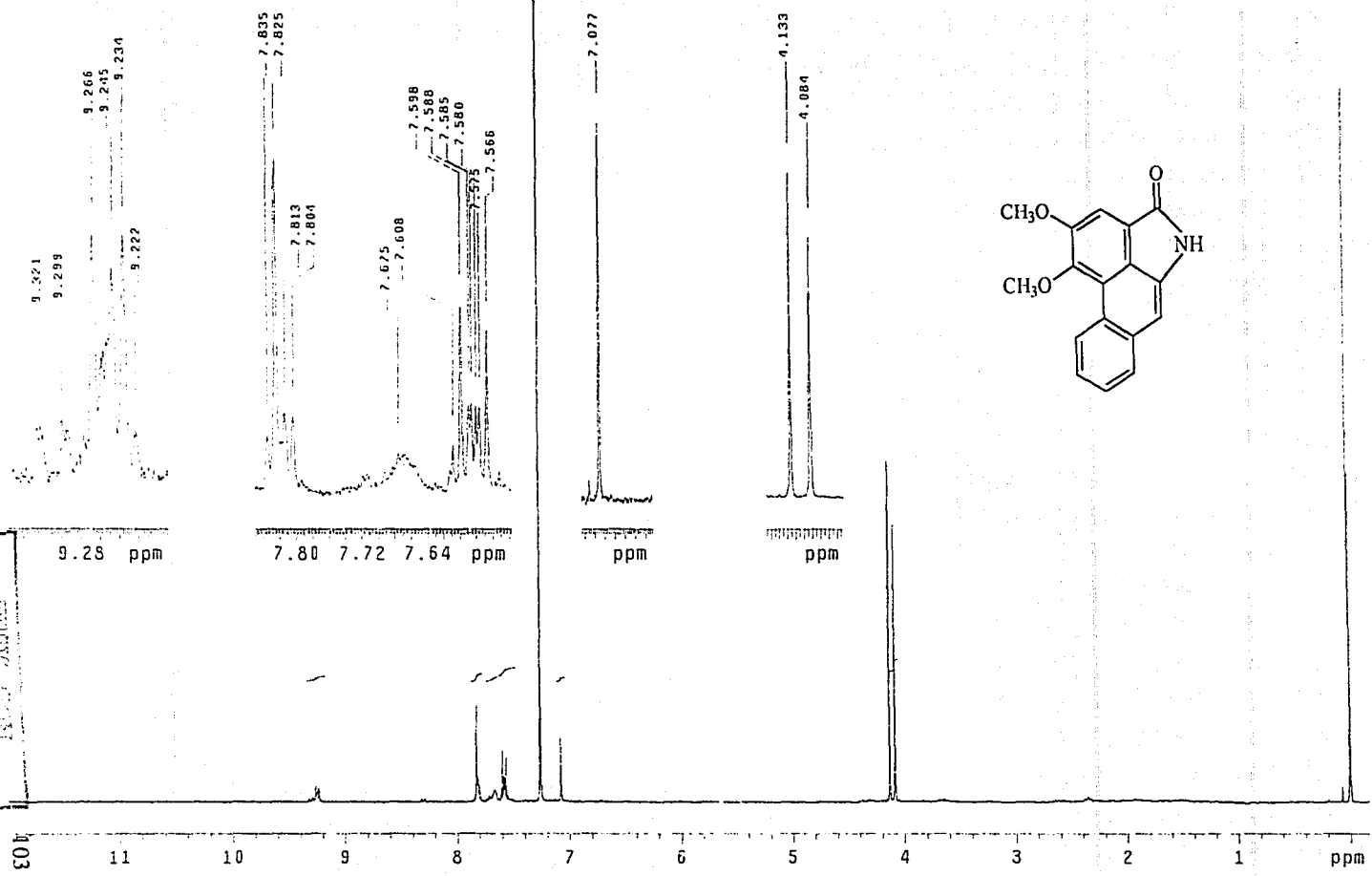
Espectro 8. Espectro de RMN-¹³C (CD₃OD, 100 MHz) de la piperolactama A (72).



Espectro 9. Espectros de masas de la cefaranona B (71).

TRIAS COM
FALSA DE CEFARAN

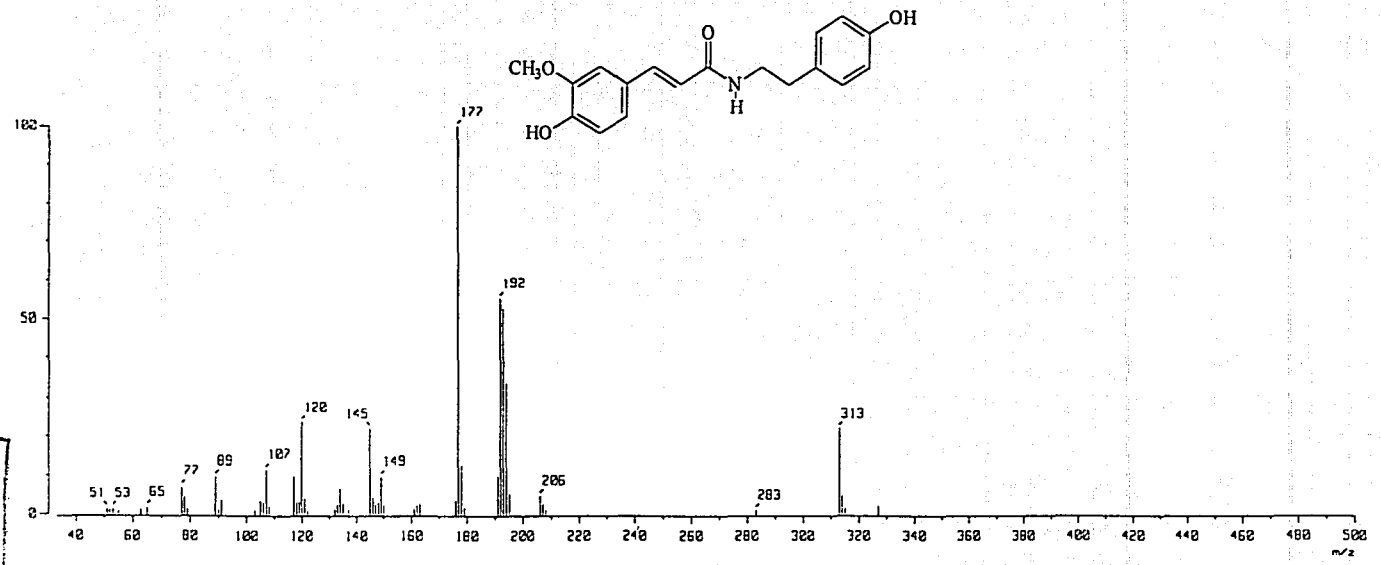
RAMA DE QUIMICA



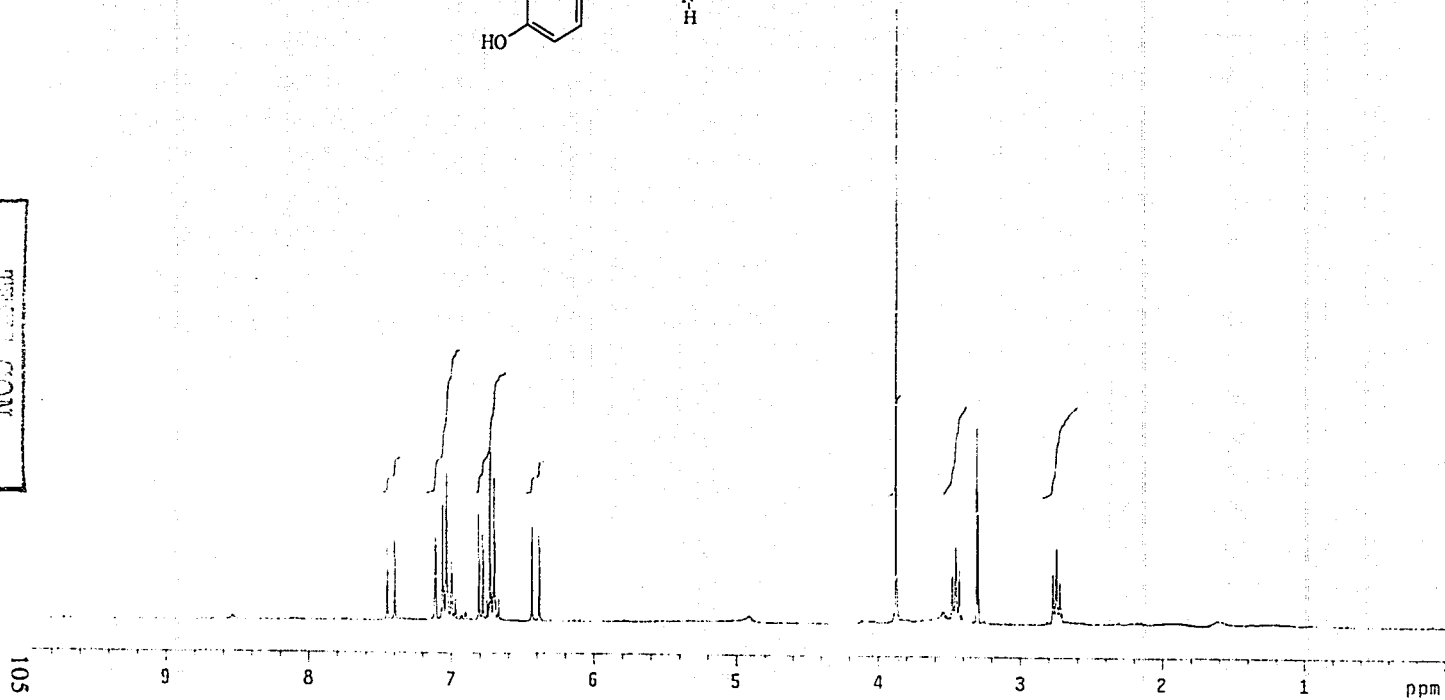
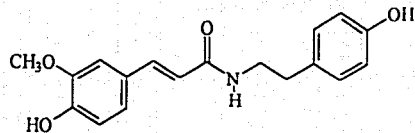
Espectro 10. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) de la cefaranona B (71).

RECIBO DE ENTREGA
N.º 104
FECHA 10/05/2011
LABORATORIO DE QUÍMICA ORGÁNICA

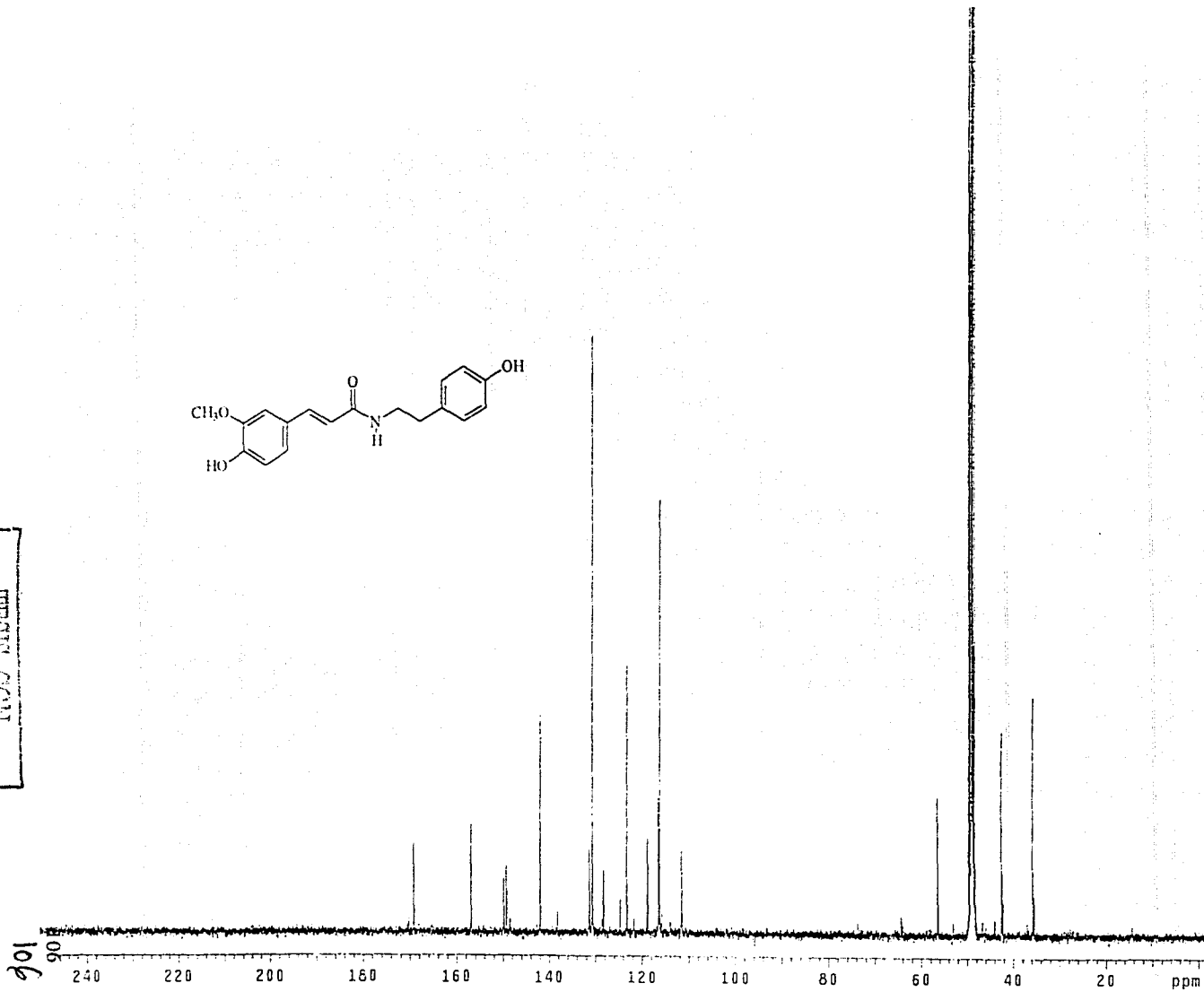
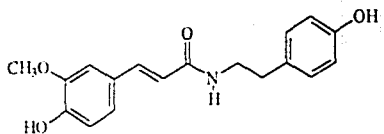
104



Espectro 11. Espectro de masas de la *N-trans*-feruloiltiramina (73).



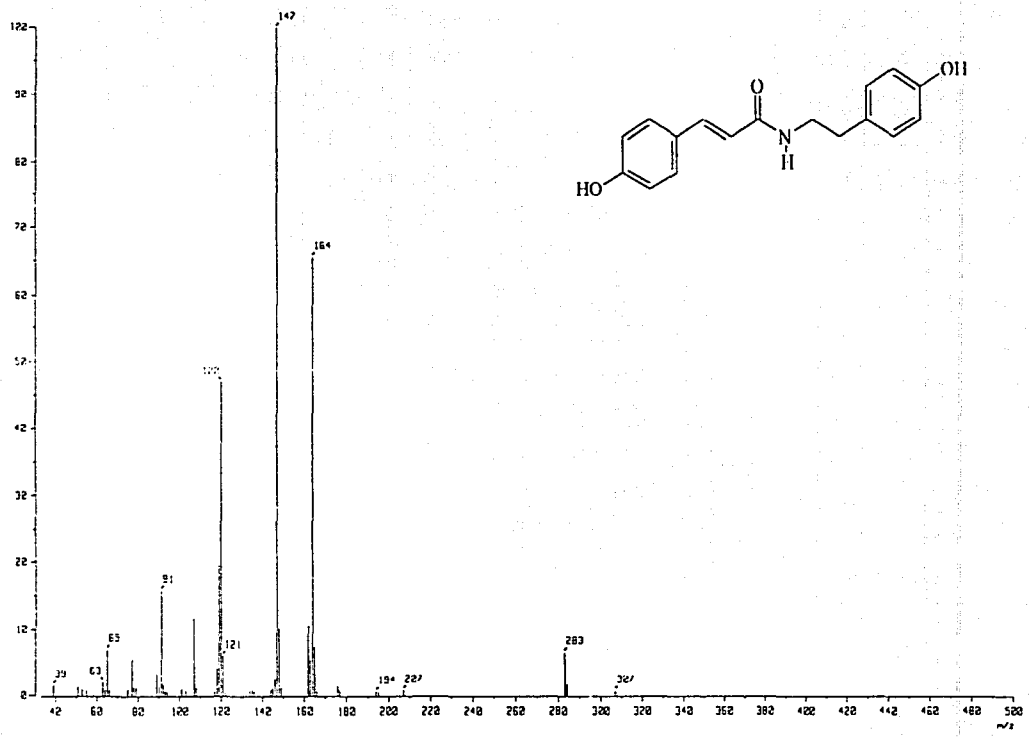
Espectro 12. Espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ (CD_3OD , 300 MHz) de la *N-trans*-feruloiltiramina (73).



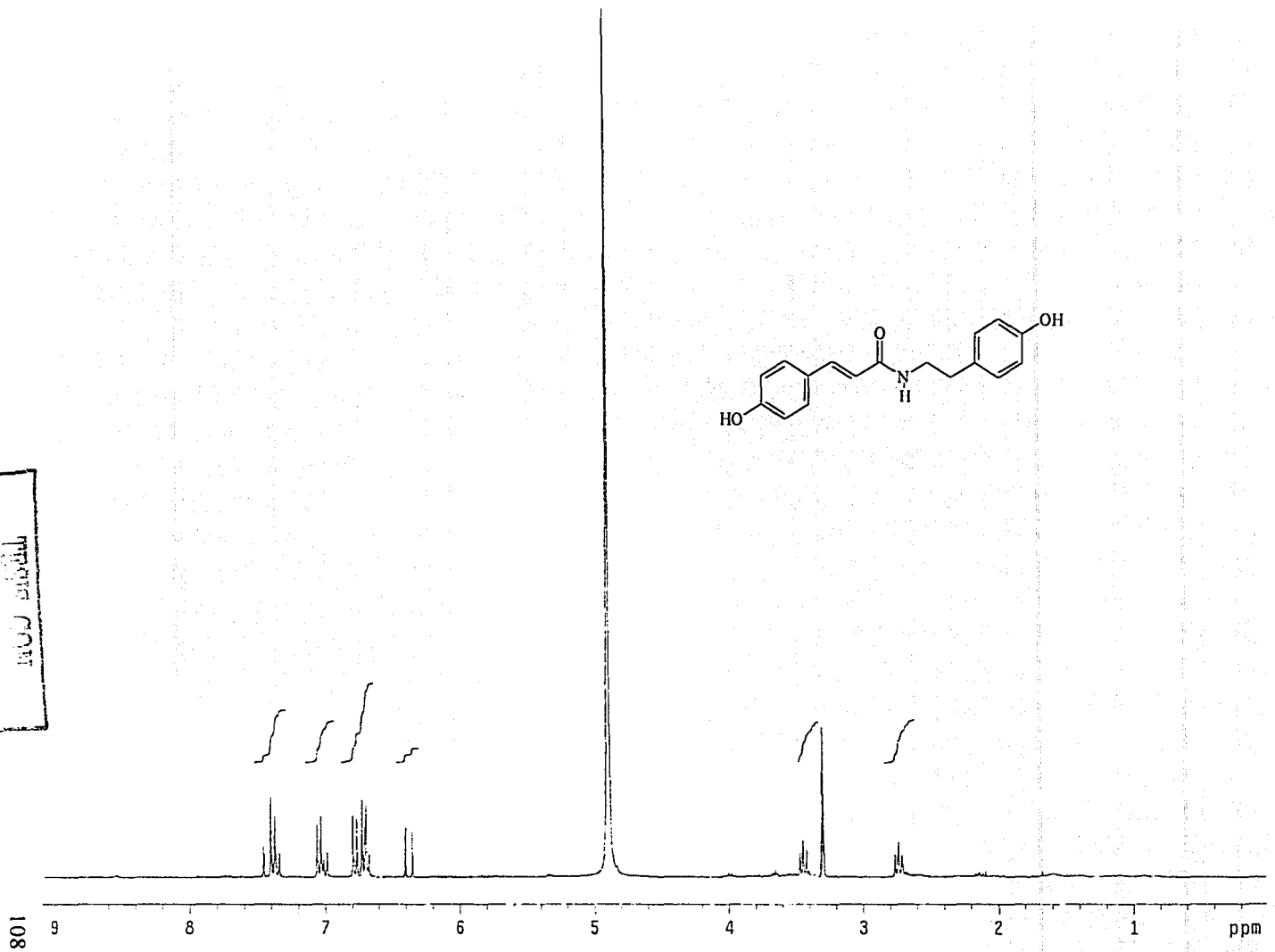
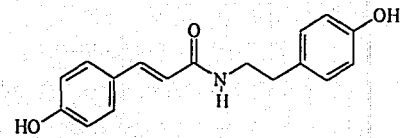
Espectro 13. Espectro de RMN- ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) de la *N-trans*-feruloyltiramina (73).

LABORATORIO DE QUÍMICA
FARMACIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

PAUL
PÉREZ
107



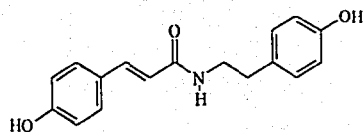
Espectro 14. Espectro de masas de la *N-p*-cumaroiltiramina (74).



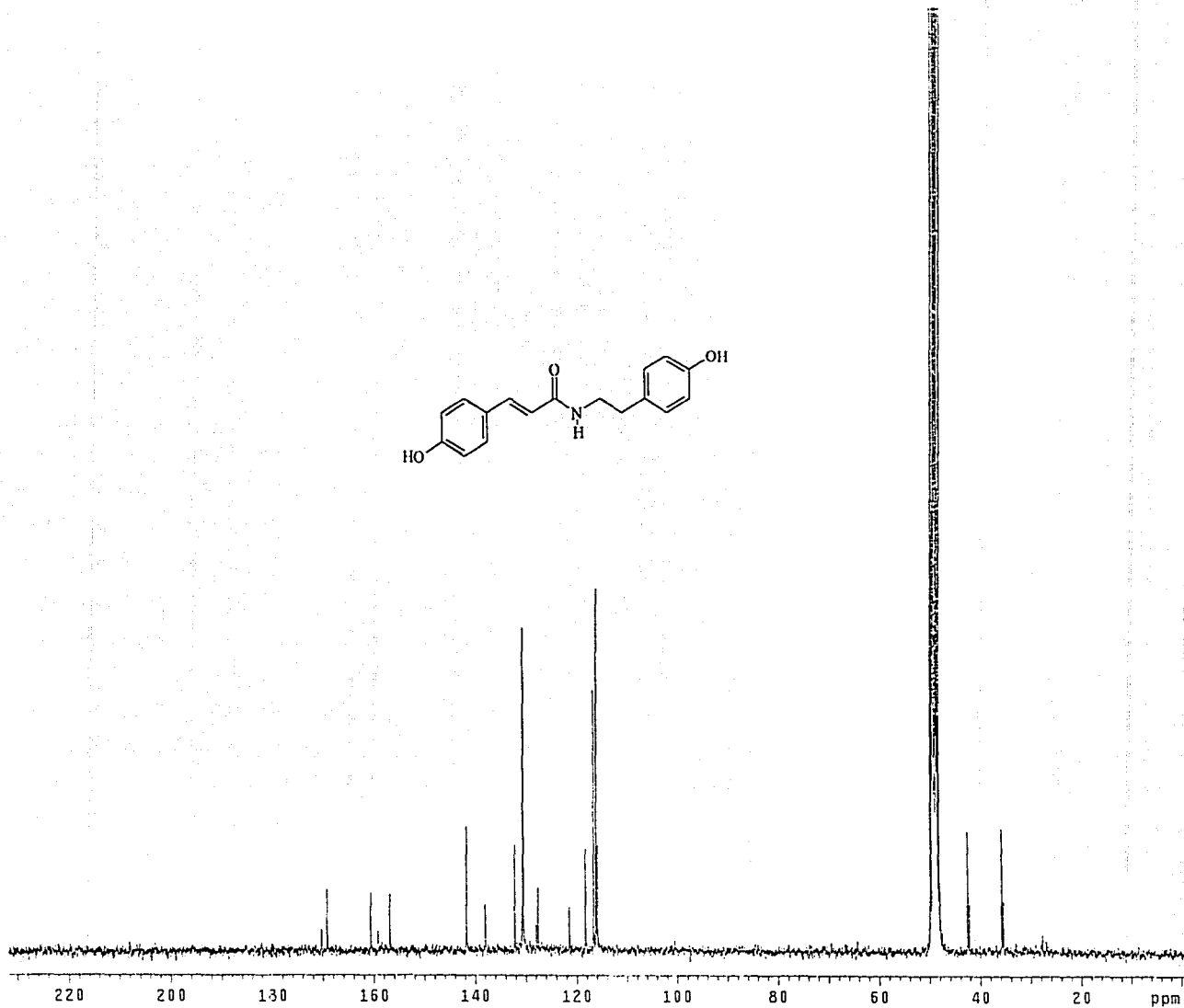
Espectro 15. Espectro de RMN- ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de la *N-p-cumaroiltiramina* (74).

108

PROCESADO
POR
COMPUTADOR

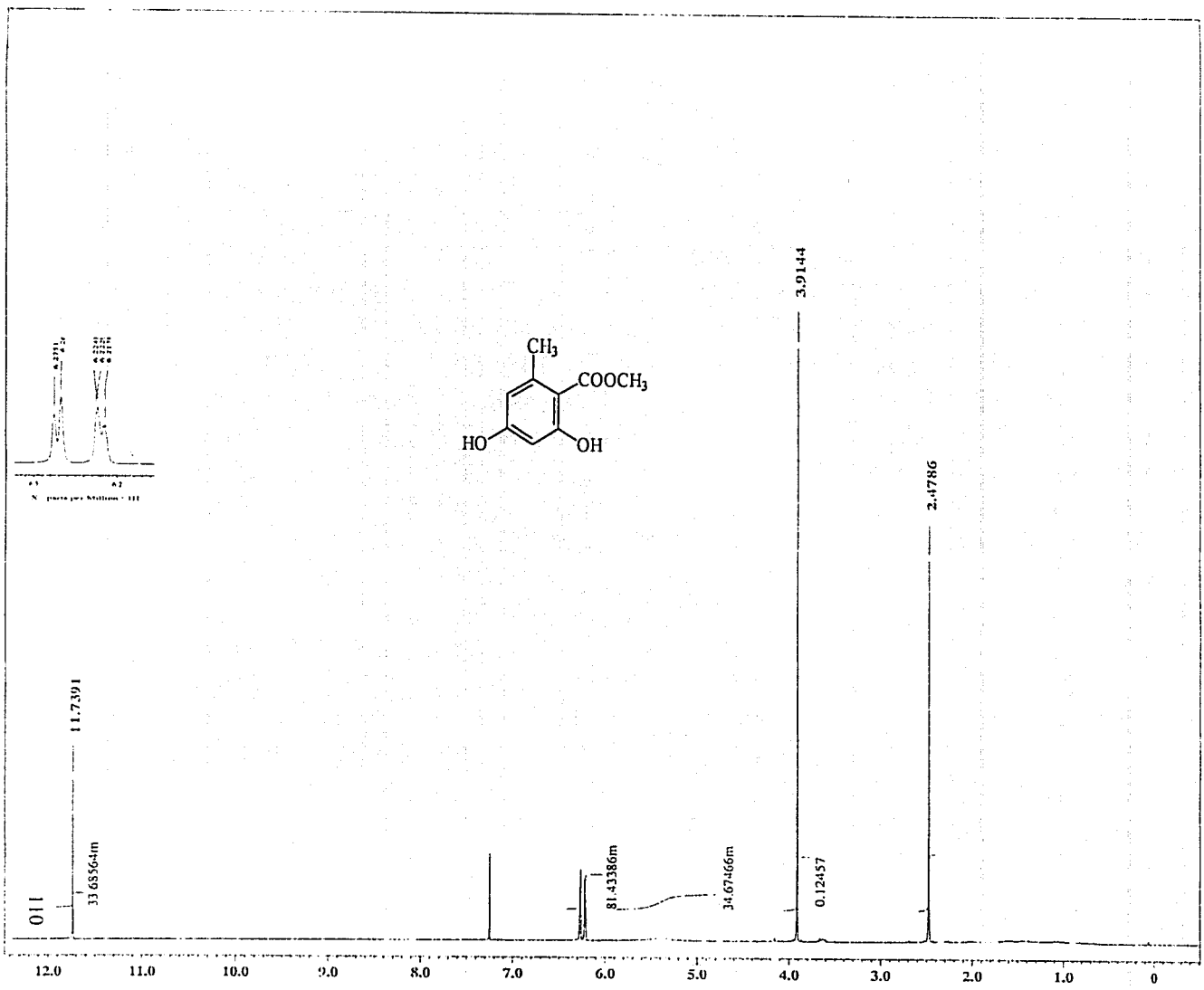


601

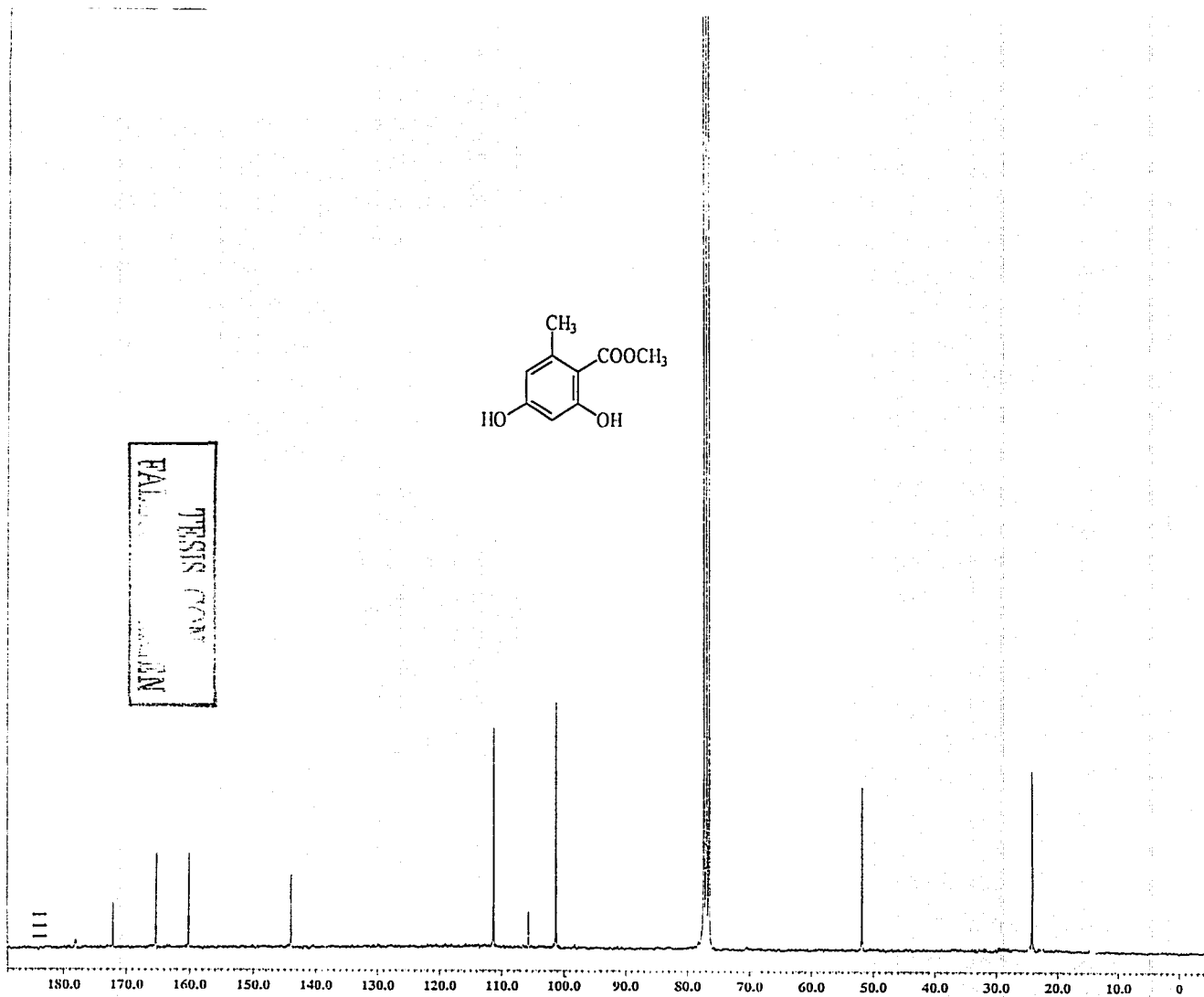


Espectro 16. Espectro de RMN-¹³C (CD₃OD, 75 MHz) de la *N-p-cumaroiltiramina* (74).

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
LABORATORIO DE QUÍMICA ORGÁNICA



Espectro 17. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) del orselinato de metilo (75).



Espectro 18. Espectro de $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ (CDCl_3 , 75 MHz) del orselinato de metilo (75).