

Curso 2006/07  
**CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/25**  
I.S.B.N.: 978-84-7756-775-2

**ESTHER NINOSKA FLORES QUISBERT**

**Metabolitos secundarios bioactivos de especies  
del género *Piper* de la flora boliviana**

**Directores**

**IGNACIO ANTONIO JIMÉNEZ DÍAZ  
ISABEL LÓPEZ BAZZOCCHI**



**SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS**  
**Serie Tesis Doctorales**

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección de los Doctores Don Ignacio Antonio Jiménez Díaz y Doña Isabel López Bazzocchi a quienes expreso mi más profundo agradecimiento por su inestimable ayuda y amistad.

## *AGRADECIMIENTOS*

*A la Agencia Española de Cooperación Internacional MAEC-AECI, por la beca recibida durante el período 2003-2006, para la realización de la presente Tesis Doctoral.*

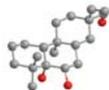
*Al Fondo Nacional para el medio Ambiente (FONAMA), a la Secretaría Ejecutiva del Convenio Andrés Bello (SECAB) y la International Foundation for Science (IFS), por los fondos destinados al estudio de plantas medicinales.*

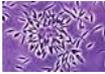
*Al subprograma X (proyecto X.5) del Programa de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), por la permanente colaboración en la capacitación.*

*A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés, por apoyarme durante este período.*

*Al Instituto Universitario de Bio-Organica Antonio González (IUBO), de la Universidad de La Laguna, por haberme acogido en sus laboratorios.*

*No es fácil expresar en tan pocas palabras, el sentimiento de gratitud a todas aquellas personas que de una u otra forma han hecho posible la realización de este trabajo*  
***Muchísimas Gracias!!!!***

ÍNDICE	página
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivo</b>	<b>15</b>
<b>3. Descripción botánica del género <i>Piper</i></b>	
Familia Piperaceae	19
Género <i>Piper</i>	19
<i>Clasificación taxonómica</i>	21
<i>Descripción botánica del género Piper</i>	21
Etnofarmacología y usos de especies del género <i>Piper</i>	22
Metabolitos secundarios aislados del género <i>Piper</i>	24
<b>4. Estudio fitoquímico de especies del género <i>Piper</i></b>	
Estudio fitoquímico de <i>Piper aduncum</i>	31
Estudio fitoquímico de <i>Piper acutifolium</i>	32
Estudio fitoquímico de <i>Piper elongatum</i>	35
Estudio fitoquímico de <i>Piper glabratum</i>	37
Estudio fitoquímico de <i>Piper heterophyllum</i>	40
Estudio fitoquímico de <i>Piper pilliraneum</i>	43
Estudio fitoquímico de <i>Piper rusbyi</i>	44
<b>5. Metabolitos aislados de las especies de <i>Piper</i>: Determinación estructural</b>	
<i>Kavalactonas</i>	
Introducción	49
Resultados y discusión	53
Datos físicos y espectroscópicos	63
<i>Flavonoides</i>	
Introducción	71
Resultados y discusión	77
Datos físicos y espectroscópicos	83

<b>Derivados del ácido benzoico</b>	
Introducción	87
Resultados y discusión	91
Datos físicos y espectroscópicos	129
<b>Benzopiranos y benzofuranos</b>	
Introducción	143
Resultados y discusión	148
Datos físicos y espectroscópicos	195
<b>Fenilpropanoides</b>	
Introducción	215
Resultados y discusión	218
<b>Terpenos</b>	
Introducción	223
Resultados y discusión	230
Datos físicos y espectroscópicos	235
<b>Apocarotenos</b>	
Introducción	239
Resultados y discusión	241
<b>Amidas</b>	
Introducción	245
Resultados y discusión	250
<b>6. Técnicas experimentales</b>	
Técnicas espectroscópicas y espectrométricas	253
Técnicas cromatográficas	254
Estudio fitoquímico	256
<b>7. Enfermedades parasitarias</b>	
Introducción	267
<b>Leishmaniasis</b>	277
Productos naturales con actividad leishmanicida	288
Resultados y discusión: actividad leishmanicida	295
<b>Enfermedad de Chagas</b>	311
Productos naturales con actividad tripanocida	317
Resultados y discusión: actividad tripanocida	321

<b>Malaria</b>	<b>325</b>
Productos naturales con actividad antimalárica	332
Resultados y discusión: actividad antiplasmódica	337
<b>Material y métodos</b>	<b>343</b>
<b>8. Conclusiones</b>	<b>357</b>
<b>9. Índice de productos</b>	<b>367</b>
<b>10. Anexos</b>	<b>371</b>

# ***1. INTRODUCCIÓN***

## INTRODUCCIÓN

El hombre ha utilizado los beneficios de los productos provenientes de la naturaleza, plantas, microorganismos, organismos marinos y animales, para curar o aliviar las alteraciones que afectan su salud desde el inicio de la humanidad. Los testimonios más antiguos se remontan a las civilizaciones asiria, babilónica y fenicia en el 2500 a.C., que dejaron escritos sus conocimientos etnobotánicos en el código de Hammurabi y las tablillas de arcilla de la famosa biblioteca de Assurbanipal, en los cuales se resume el conocimiento de 3000 años<sup>1</sup>.

Las plantas superiores se caracterizan por su habilidad para producir una gran diversidad de metabolitos secundarios, que han servido como modelo para el desarrollo de muchos fármacos de gran interés. Sin embargo, aún existe la necesidad de agentes específicos para curar ciertas enfermedades, tales como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, parasitarias como la malaria, schistosomiasis, tripanosomiasis, lepra y leishmania o las enfermedades infecciosas resistentes, que aún no tienen un tratamiento adecuado.

En la década de los años 70 y 80, los productos naturales pasaron por una fase de reducido interés en el descubrimiento de nuevas moléculas, debido a los enormes esfuerzos necesarios para aislar y elucidar las estructuras de los principios activos. Sin embargo, el desarrollo tecnológico, que ha permitido reducir el tiempo y la cantidad de muestra necesaria para llevar a cabo el aislamiento, la elucidación estructural y los ensayos biológicos de los principios activos, la extraordinaria diversidad y complejidad estructural encontrada en la naturaleza, difícil de imitar en el laboratorio, así como la acelerada degradación del medio ambiente con la consiguiente pérdida de especies vegetales de incalculable valor y la necesidad de una medicina alternativa para una población que no tiene acceso a la medicina occidental, han hecho resurgir el interés por los productos naturales<sup>2</sup>.

---

<sup>1</sup> Gómez, Camaño J. L. *Páginas de Historia de la Farmacia*. **1995**, Editorial Nestlé S.A., España.

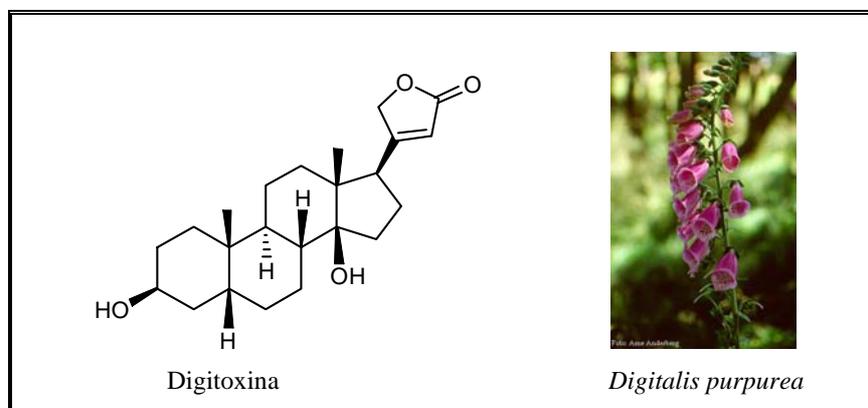
<sup>2</sup> Kubinyi, H. *Pharmazie*. **1995**, 50, 647-662.

El papel de los productos naturales en la medicina moderna como fuente de nuevos fármacos ha sido discutida y recogida recientemente en diversas revisiones<sup>3,4,5,6,7,8</sup> que podemos resumir en tres aspectos fundamentales:

- ✚ a) proporcionan nuevas entidades químicas con una amplia diversidad estructural que pueden servir de modelo para realizar modificaciones semisintéticas o síntesis total,
- ✚ b) el gran número de enfermedades tratadas por sustancias de origen natural y
- ✚ c) la frecuencia de su uso en el tratamiento de las enfermedades.

A modo ilustrativo, comentamos a continuación algunos ejemplos clásicos de productos naturales con las características anteriormente citadas.

- ✓ Proporcionan sustancias que son muy útiles y difíciles de obtener de modo rentable por la vía sintética, como por ejemplo los glucósidos cardiotónicos **digitoxina**, **digoxina** y **digitoxigenina**, aislados de *Digitalis purpurea*, utilizados por sus efectos cardiotónicos<sup>9,10</sup>.



<sup>3</sup> Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, 17, 215-234.

<sup>4</sup> Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1022-1037.

<sup>5</sup> Koehn, F. E.; Carter, G. T. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2005**, 4, 206-220.

<sup>6</sup> Butler, M. S. *Nat. Prod. Rep.* **2005**, 22, 162-195.

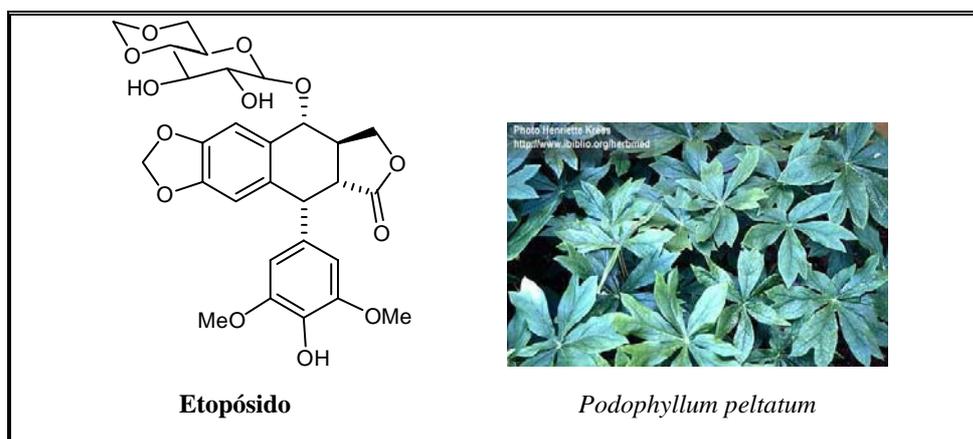
<sup>7</sup> Chin, Y. W.; Balunas, M. J.; Chai, H. B.; Kinghorn, D. A. *The AAPS Journal.* **2006**, 8, E239-E253.

<sup>8</sup> Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 461-477.

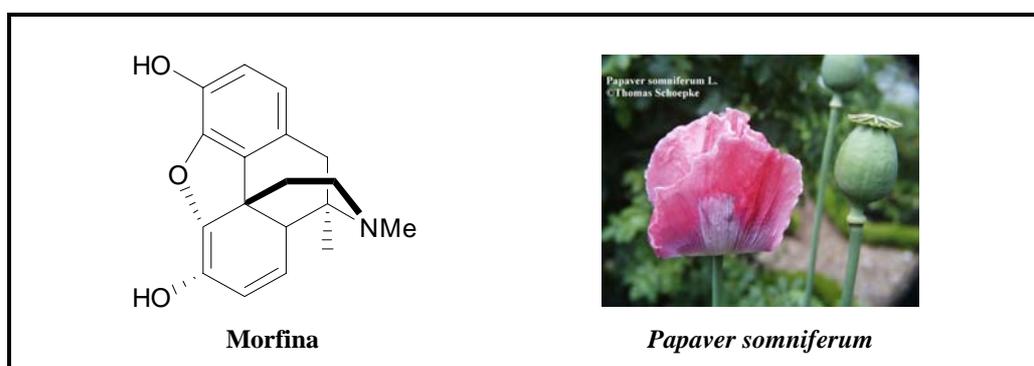
<sup>9</sup> Lewinton, A. *Plants for people.* **1990**, The Natural History Museum, London.

<sup>10</sup> Rietbrock, N.; Woodcock, B. G. *Trends Pharmacol. Sci.* **1985**, 6, 267-269

- ✓ Proveen compuestos que pueden ser modificados con el objeto de obtener otros más efectivos, menos tóxicos o con otras actividades. Así el **etopósido**, obtenido por semisíntesis de la podofilotoxina aislado de *Podophyllum peltatum*, es utilizado actualmente en el tratamiento del carcinoma de pulmón, linfomas y algunas leucemias<sup>11</sup>.



- ✓ Los productos naturales sirven como modelos para obtener drogas sintéticas con actividades fisiológicas similares a las naturales, como es el caso de la **metadona**, análogo de la morfina con actividad similar pero que no crea dependencia o el **dextrometorfano**, antitusivo sin actividad analgésica<sup>12</sup>.

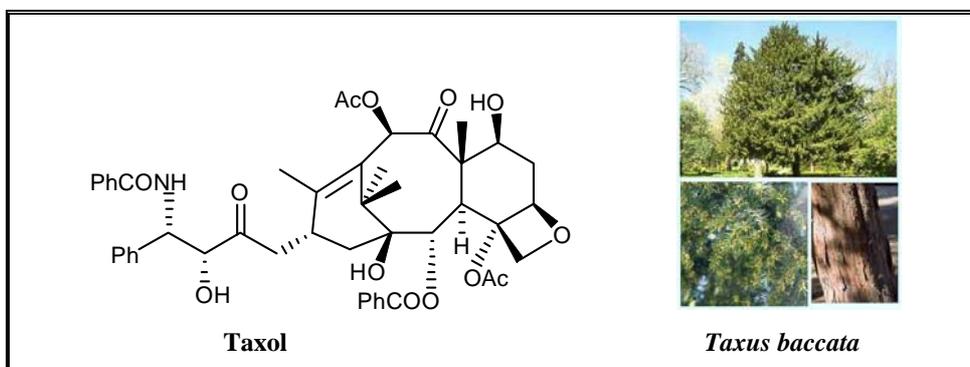


- ✓ Algunos productos naturales son inactivos o poseen muy baja actividad, pero pueden ser modificados mediante métodos químicos o biológicos para producir sustancias potentes que no son fáciles de obtener por otros métodos, ejemplo de ello es la **baccatina III** y la

<sup>11</sup> Neuss, N; Neuss, M. N. *The alkaloids*. **1990**, Academic Press, New York, 37, 229.

<sup>12</sup> Philipson, J. D. *Phytochemistry*. **2002**, 56, 237-243.

**10-desacetilbaccatina III**, aisladas de *Taxus baccata* y que pueden ser transformadas en **taxol** (Paclitaxel), potente anticancerígeno aislado de la corteza del tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia*<sup>13</sup>.



El análisis del origen de los fármacos desarrollados entre 1981-2002, muestran que los productos naturales o bien sus derivados constituyen el 28% del total de las nuevas sustancias introducidas en el mercado. En adición, el 24% de estas nuevas moléculas son sintetizadas o derivadas de compuestos naturales basadas en el estudio de farmacóforos relacionados con productos naturales. La combinación del porcentaje de las nuevas entidades químicas (52%), sugiere que los productos naturales son una importante fuente de nuevos fármacos, así como de compuestos líderes, que pueden modificarse convenientemente durante el desarrollo de los fármacos. Por otra parte, un cuidadoso análisis de las prescripciones farmacéuticas, teniendo en cuenta la fuente de los principios activos, pone de manifiesto que los productos naturales o bien sus derivados son utilizados en el tratamiento del 87% de todas las enfermedades incluyendo antibacterianos, anticancerígenos, anticoagulantes, antiparasitarios y agentes inmunosupresores, entre otros<sup>4</sup>.

La proporción de productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos deriva de la diversidad estructural y la complejidad de sus esqueletos carbonados. Por otra parte, los metabolitos secundarios procedentes de fuentes naturales son biosintetizados en sistemas biológicos, lo que hace que muestren "*una mayor afinidad fármaco-receptor que las moléculas sintéticas*", haciendo de ellos una excelente alternativa como candidatos para el desarrollo de

<sup>13</sup> Ulukan, H.; Swaan, P. W. *Drugs*. **2002**, 62 (14), 2039-2057.

nuevos fármacos<sup>5,14,15</sup>. Como consecuencia del reconocimiento del papel que juegan los productos naturales en la medicina, hoy en día existe un renovado interés en el mundo de la industria farmacéutica y la medicina por las sustancias bioactivas de origen natural.

Se han desarrollado diversas metodologías para la selección de especies vegetales a partir de las cuales realizar la búsqueda de sustancias bioactivas<sup>16</sup>. Las principales estrategias son las que se relacionan a continuación:

- ❖ **Aleatoria**, que implica la recolección de todas las plantas de una determinada región.
- ❖ **Fitoquímica**, en la cual se estudian todos los miembros de una familia de plantas conocida por su abundancia en una determinada clase de compuestos.
- ❖ **Quimiotaxonómica**, muy similar a la anterior pero basada en la presencia de marcadores quimiotaxonómicos como herramienta para la preselección.
- ❖ **Ecológica**, en la cual las interrelaciones planta y ecosistema son usadas como medio de selección.
- ❖ **Etnobotánica**, basada en el uso en la medicina tradicional de especies vegetales, incluyendo la etnomedicina.

De todas las metodologías mencionadas la etnobotánica es, sin duda, la más utilizada actualmente para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica. La popularidad de ésta radica en estudios que han demostrado que existe una diferencia significativa entre el porcentaje de compuestos biológicamente activos aislados de plantas seleccionadas con base en información etnobotánica y aquellos aislados de plantas elegidas siguiendo otra estrategia.

Un análisis reciente por Fabricant y Farnsworth muestran que el uso del 80% de 122 fármacos derivados de plantas estaban relacionados con el uso etnofarmacológico<sup>17</sup>, siendo la principal estrategia a seguir hoy día para el descubrimiento de fármacos de plantas terrestres el aislamiento bioguiado, lo que ha permitido el descubrimiento de importantes agentes anticancerígenos, como por ejemplo el **paclitaxel**, aislado de *Taxus brevifolia* o la **camptotecina**

---

<sup>14</sup> Balumas, M. J.; Kinghorn, A. D. *Life Sci.* **2005**, 78, 431-441.

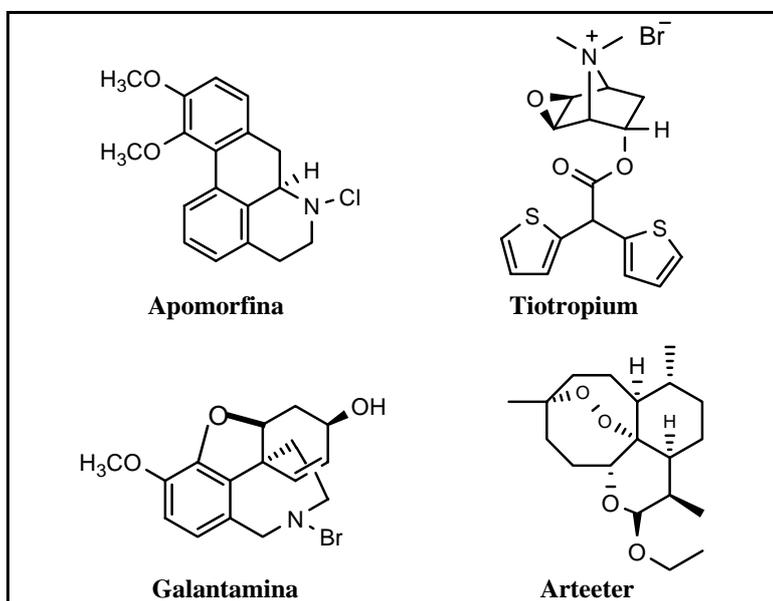
<sup>15</sup> Drahl, C.; Cravat, B. F.; Sorensen, E. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 5788-5809.

<sup>16</sup> Tringaly, C. *Bioactive Compound from Natural Sources.* **2001**, Taylor and Francis, New York.

<sup>17</sup> Fabricant, D. S.; Farnsworth, N. R. *Environ. Health Perspect.* **2001**, 109, 67-75.

de *Camptotheca acuminata*. A continuación se presentan otros ejemplos de productos naturales o bien análogos de productos naturales que poseen interés clínico y que fueron descubiertos durante el período 2000-2005<sup>7</sup>.

El **clorhidrato de apomorfina**, un derivado de la morfina aislada de *Papaver somniferum*, es un agonista de los receptores de la dopamina, utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, enfermedad neurodegenerativa<sup>18</sup>. El **bromuro de tiotropium**, un derivado de la atropina aislado de *Atropa belladonna*, fue aprobado por la FDA para el tratamiento de broncoespasmos asociado con la enfermedad pulmonar obstructiva<sup>19</sup>. El **bromohidrato de galantamina** es un alcaloide aislado de *Galanthus nivalis*, utilizado tradicionalmente en Bulgaria y Turquía para el tratamiento de enfermedades neurológicas, se introdujo en el mercado como inhibidor de la acetilcolinesterasa para el tratamiento del Alzheimer<sup>20</sup>. Otro ejemplo es **arteeter**, agente antimalárico derivado de la artemisinina, una lactona sesquiterpénica aislada de *Artemisia annua*, planta utilizada en la medicina tradicional China como remedio para la fiebre; otros derivados de artemisinina están en desarrollo clínico como fármaco antimalárico en Europa<sup>21</sup>.



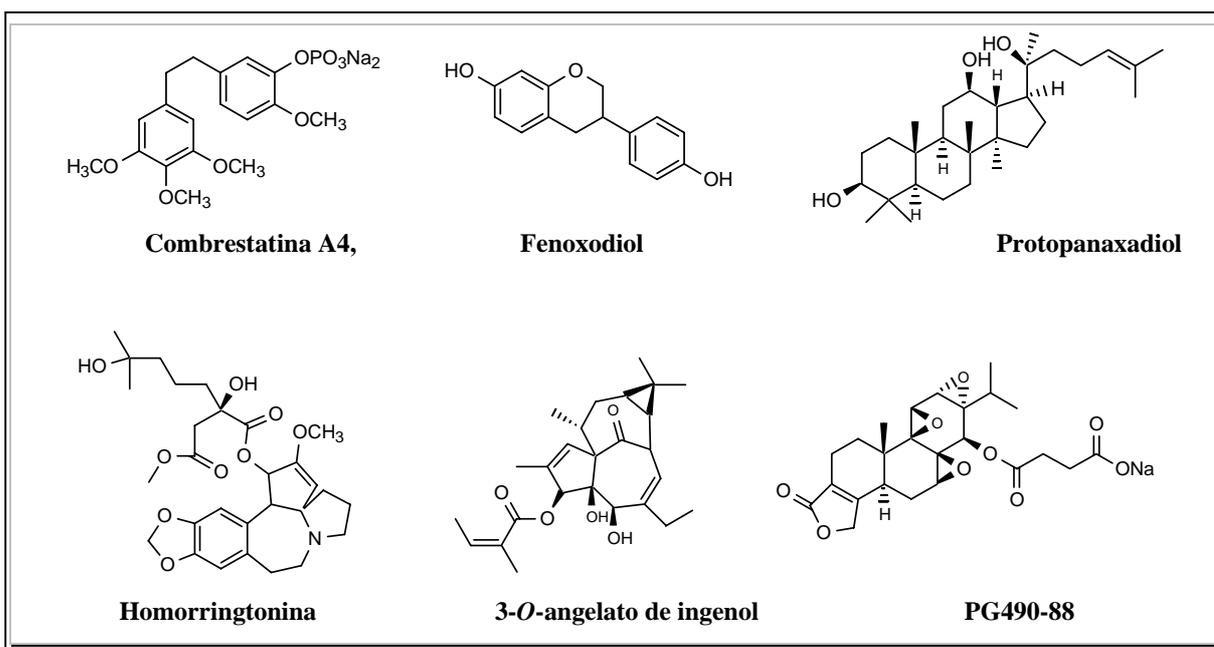
<sup>18</sup> Deleu, D.; Hanssens, Y.; Northway, M. G. *Drugs Aging*. **2004**, 21, 687-709.

<sup>19</sup> Koumis, T.; Samuel, S. *Clin. Ther.* **2005**, 27, 377-392.

<sup>20</sup> Heinrich, M.; Teoh, H. L. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, 92, 147-162.

<sup>21</sup> Van Agtmael, M. A.; Eggelte, T. A.; van Boxtel, C. J. *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, 20, 199-205.

Por otra parte, algunos metabolitos secundarios derivados de plantas se encuentran actualmente en fase clínica<sup>7</sup>, destacando **combrestatina A4**, **fenoxodiol**, **protopanaxadiol**, **homorringtonina**, **3-O-angelato de ingenol**, **PG490-88** (sal sódica de la 14-succiniltriptolida), incluyendo cuatro derivados de los conocidos anticancerígenos camptotecina, paclitaxel, epipodofilotoxina y vinblastina<sup>6</sup>.



Se estima que en el planeta existe entre 215.000 y 500.000 especies vegetales, de las cuales se estima que únicamente entre el 15 y 17% se han estudiado por su contenido en productos bioactivos. Más de la mitad de todas las especies vegetales se encuentran en regiones tropicales y al menos 120.000 especies viven en las selvas tropicales húmedas, que constituyen

a penas el 7% de la superficie de la tierra, lo que hace obvio a que parte del mundo se debe dirigir la búsqueda de moléculas bioactivas de plantas. Por otra parte, debido a la alarmante velocidad con la que muchas especies están desapareciendo, es importante apoyar e incentivar el estudio de las plantas medicinales. Cabe destacar que la destrucción de especies vegetales es un

fenómeno relativamente nuevo en la historia de la humanidad pues hasta 1960 solamente una especie, *Silphium*, había sido extinguida por causas imputables al ser humano<sup>22</sup>.

Los sistemas de medicina tradicional basados en plantas, han sido usados en todo el mundo durante miles de años. Estos sistemas continúan jugando un papel esencial en los cuidados de la salud de las personas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente el 80% de los 5200 millones de habitantes del mundo confía principalmente en la medicina tradicional para sus atenciones primarias, lo que implica que unos 3300 millones de personas usan plantas medicinales de forma regular<sup>23</sup>. Por lo tanto, es necesario realizar un estudio de estas plantas para buscar la máxima seguridad y eficacia, que permitan desarrollar una forma galénica normalizada y estable. En este sentido, podríamos considerar que el uso de *los productos naturales representa en el diseño de fármacos la evolución natural de esta vieja tradición*. Así, los estudios etnobotánicos<sup>24</sup> hoy en día se encuentran en boga en todo el mundo, de los cuales aproximadamente el 4% de de los mismos se desarrollan en Australia, el 12% en Europa, el 20% en África y el 22% en Asia, mientras que en América se desarrolla el 42%, lo cual no es sorprendente dada la diversidad biológica, cultural y étnica de cada región<sup>25</sup>. En América Latina, y particularmente en Bolivia, los grupos étnicos son poseedores de un conocimiento profundo del medio, y particularmente de plantas con propiedades medicinales.

En lo que respecta al papel de los productos naturales en el tratamiento de enfermedades parasitarias, en los últimos años ha resurgido el estudio de plantas medicinales con actividad antiparasitaria, en base a estudios etnofarmacológicos, información que se recoge en numerosas publicaciones, con listado de plantas medicinales, extractos de las plantas y productos naturales aislados que han mostrado actividad frente a parásitos de *Leishmania*, *Plasmodium* y *Trypanosoma*, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* <sup>26·27·28·29</sup>.

---

<sup>22</sup> Tyler, V. E. *Natural products and medicine: an overview*. En Medicinal resources of the tropical forest: Biology and resource management series. **1996**, Colombia University Press, New York, 6.

<sup>23</sup> Kirby, G. C. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1996**, 90, 605-609.

<sup>24</sup> Gilani, A. H.; Rahman, A. J. *Ethnopharmacol.* **2005**, 100, 43-49.

<sup>25</sup> Calixto, J. B. J. *Ethnopharmacol.* **2005**, 100, 131-134.

<sup>26</sup> Peña-Rodríguez, L. M.; Chan-Bacab, M. J. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 674-688.

<sup>27</sup> Tagboto, S.; Townson, S. *Adv. Parasitol.* **2001**, 50, 199-295

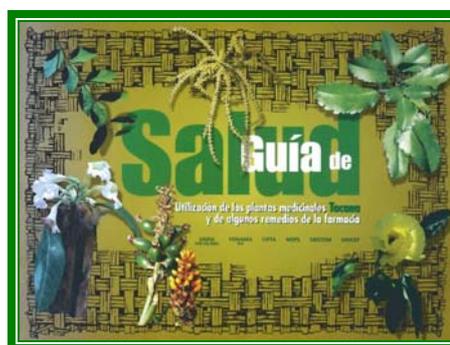
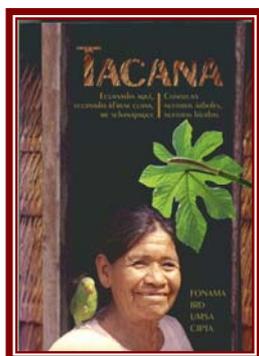
<sup>28</sup> Fournet, A.; Muñoz, V. *Current Trop. Med. Chem.* **2002**, 2, 1215-1237.

<sup>29</sup> Rocha, L.G.; Almeida, J. R. G. S.; Macedo, R. O.; Barbosa-Filho, J. M. *Phytomedicine.* **2005**, 12, 514-535.

Por otra parte, debido a la limitada disponibilidad de productos farmacéuticos, la mayoría de la población donde las enfermedades parasitarias son endémicas depende en gran medida de la medicina tradicional para aliviar sus síntomas, haciendo uso de plantas nativas con

las que se preparan extractos crudos, que se administran de forma oral y tópica para su tratamiento. Con este conocimiento y como parte de la búsqueda de nuevos medicamentos de fácil disponibilidad y baja toxicidad, la OMS dentro del Programa de Enfermedades Tropicales ha considerado la investigación de plantas utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de las enfermedades parasitarias como esencial y de alta prioridad<sup>30</sup>.

En este contexto, dentro del proyecto multidisciplinario "Conservación ambiental a través de la valoración etnobotánica y etnofarmacológica en Bolivia" (FONAMA-UMSA)<sup>31</sup>, en los años 90 se inician estudios encaminados al rescate del conocimiento etnobotánico de diversos grupos étnicos de Bolivia, así como la evaluación farmacológica, sobre bases científicas, de plantas medicinales utilizadas por las etnias Guaraníes, Chacobo, Alteños, Mosen y Tacana.



**Libros publicados sobre el uso de plantas medicinales en la comunicad Tacana**

En una primera etapa de este proyecto, se identifican todas las especies vegetales, árboles, arbustos, lianas y palmas, que son utilizadas como medicinales, , en las diferentes comunidades que formaban parte del proyecto y se recopiló la información de cada una de las especies. La información de las plantas utilizadas en la medicina tradicional de las etnias de los

<sup>30</sup> WHO. Traditional Medicine and Pharmaceutical Medicine Perspectives on Natural Products for the Treatment of Tropical Disease. **2000**, WHO/TDR Scientific Working Group, Geneva.

<sup>31</sup> Informe del proyecto Conservación Ambiental a través de la Valoración Etnobotánica y Etnofarmacológica en Bolivia, **1996**, FONAMA-UMSA.

Tacana<sup>32</sup> y Guaraniés<sup>33</sup> ha sido publicada en dos libros. En una segunda etapa se realizó la colecta del material vegetal, junto con los informantes de las comunidades y muestras de herbario se depositaron en el Herbario Nacional de La Paz, Bolivia y en el Missouri Botanical Garden para su identificación. Así mismo, se recolectaron muestras para realizar los estudios fitoquímicos y evaluaciones biológicas preliminares como antifúngica, antibacteriana, antiparasitaria y citotóxica, generándose así una base de datos de especies vegetales bolivianas con diversas actividades biológicas.

Parte de este ambicioso proyecto ha centrado su estudio en la búsqueda de sustancias naturales con actividad antiparasitaria, leishmaniasis, enfermedad de Chagas y malaria, siendo las patologías más importantes en estas regiones. Las especies vegetales que presentan actividad leishmanicida, tripanocida y antiplamódica de las etnias Chacobo y Alteños<sup>34</sup>, Mosecene<sup>35</sup> y Tacana<sup>36,37</sup>, se relacionan en las tablas 1 y 2.

**Tabla 1: Plantas medicinales bolivianas con actividad antiplasmódica**

Especie	Parte <sup>a</sup>	Especie	Parte <sup>a</sup>
<i>Baccharis genisteloides</i> <sup>b</sup>	Hojas	<i>Piper peltatum</i> <sup>b</sup>	Planta entera
<i>Bowdichia virgilioides</i> <sup>b</sup>	Corteza de tallo	<i>Pterocarpus amazonun</i>	Corteza de tallo
<i>Caesalpinia pluviosa</i> <sup>c</sup>	Corteza	<i>Satureja sp</i> <sup>b</sup>	Hojas
<i>Cinchona calisaya</i> <sup>b</sup>	Corteza	<i>Schinus andinus</i> <sup>c</sup>	Hojas
<i>Commelina elliptica</i> <sup>b</sup>	Parte aérea	<i>Swietenia macrophylla</i> <sup>b</sup>	Corteza
<i>Dunalia brachyacantha</i> <sup>b</sup>	Hojas	<i>Tagetes graveolens</i> <sup>b</sup>	Parte aérea
<i>Hymenachne donacifolia</i> <sup>c</sup>	Planta entera	<i>Tessaria integrifolia</i>	Hojas <sup>c</sup> , Raíz <sup>b</sup>
<i>Licaria canella</i> <sup>c</sup>	Corteza	<i>Trema micrantha</i> <sup>b</sup>	Corteza

<sup>32</sup> Bourdy, G. Tacana: *Conozca nuestros árboles, nuestras hierbas (Tacana: ecuanasha aquí ecuanashaid'rene cuana, me schanapaque)*. 2000, FONAMA-EIA, IRD, UMSA, CIPTA, La Paz, Bolivia.

<sup>33</sup> Bourdy, G. *Plantas del Chaco: Usos tradicionales Isocéño-Guaraní*. 2002, IRD, CYTED, HMB, USAID, UMSA, La Paz, Bolivia.

<sup>34</sup> Muñoz, V.; Sauvain, M.; Bourdy, G.; Arrazola, S.; Callapa, J.; Ruiz, G.; Choque, J.; Deharo, E. *J. Ethnopharmacol.* 2000, 71, 123-131.

<sup>35</sup> Muñoz, V.; Sauvain, M.; Bourdy, G.; Callapa, J.; Rojas, I.; Vargas, L.; Tae, A.; Deharo, E. *J. Ethnopharmacol.* 2000, 69, 139-155.

<sup>36</sup> Deharo, E.; Bourdy, G.; Quenevo, C.; Muñoz, V.; Ruiz, G.; Sauvain, M. *J. Ethnopharmacol.* 2001, 77, 91-98.

<sup>37</sup> Bourdy, G.; DeWalt, S. J.; Chavéz de Michel, L. R.; Roca, A.; Deharo, E.; Muñoz, V.; Valderrama, L.; Quenevo, C.; Giménez, A. *J. Ethnopharmacol.* 2000, 70, 87-109.

<i>Nectandra hihua</i> <sup>c</sup>	Corteza	<i>Triplaris americana</i> <sup>b</sup>	Hojas
<i>Peperomia pellucida</i> <sup>b</sup>	Planta entera	<i>Vallea stipularis</i> <sup>b</sup>	Hojas

<sup>a</sup> Extracto etanólico; <sup>b</sup> activo frente a *Plasmodium falciparum* *in vitro* e *in vivo*; <sup>c</sup> activo frente a *P. falciparum* *in vitro*.

**Tabla 2: Plantas medicinales bolivianas con actividad leishmanicida y tripanocida**

<b>Especie</b>	<b>Parte planta</b>	<b>Componentes</b>	<b>Parásito</b>
<i>Abuta pahni</i>	Tallo	Alcaloides	<i>Leishmania sp</i> <i>T. cruzi</i>
<i>Ampelocera edentula</i>	Tallo	Hidroxitetralona	<i>L. amazonensis</i> <i>T. cruzi</i>
<i>Anomospermum bolivianum</i>	Corteza	Alcaloides	<i>Leishmania sp</i> <i>T. cruzi</i>
<i>Beberis bolivianum</i>	Corteza	Extracto EtOH	<i>Leishmania sp</i> <i>T. cruzi</i>
<i>Bocconia integrifolia</i>	Hojas	Benzofenantedrina	<i>L. amazonensis</i> <i>T. cruzi</i>
<i>Cardiopetalum calophyllum</i>	Hojas, tallos	Alcaloides	<i>Leishmania sp</i> <i>T. cruzi</i>
<i>Dictyoloma peruvianum</i>	Corteza de tallo	Extracto AcOEt	<i>L. amazonensis</i>
<i>Galipea longiflora</i>	Tallo y raíz	Chimaninas	<i>L. amazonensis</i> <i>T. cruzi</i>
<i>Mandevilla antennaceae</i>	Tallo y hoja	Extracto EtOH	<i>Leishmania sp</i>
<i>Munnozia fournetti</i>	Tallo y hoja	Extracto EtOH	<i>Leishmania sp</i> <i>T. cruzi</i>
<i>Myrsine pellucida</i>	Corteza	Saponinas triterpénicas	<i>L. braziliensis</i>
<i>Oxandra espinata</i>	Corteza	Espintanol	<i>Leishmania sp</i> <i>T. cruzi</i>
<i>Peperomia galioides</i>	Planta entera	Extracto EtOH	<i>Leishmania sp</i>
<b><i>Piper aduncum</i></b>	Planta entera	Extracto EtOH	<i>L. amazonensis</i>
<b><i>Piper leavilimum</i></b>	Planta entera	Extracto EtOH	<i>Leishmania sp</i>
<b><i>Piper rusbyi</i></b>	Hojas y tallo	Extracto AcOEt	<i>Leishmania sp</i> <i>T. cruzi</i>
<i>Pera benensis</i>	Corteza de tallo	Plumbagina	<i>Leishmania sp</i>
<i>Solanum actaeobotrys</i>	Hojas	Extracto EtOH	<i>Leishmania sp</i> <i>T. cruzi</i>
<i>Stevia yaconensis</i>	Planta entera	Extracto AcOEt	<i>Leishmania sp</i> <i>T. cruzi</i>

<i>Vermonia squamulosa</i>	Tallo	Extracto EtOH	<i>Leishmania sp</i> <i>T. cruzi</i>
----------------------------	-------	---------------	---

EtOH: Etanol; AcOEt: Acetato de etilo.

Los datos que se presentan en las Tablas 1 y 2 reflejan que diversas especies del género *Piper* son utilizadas en la medicina tradicional boliviana para el tratamiento de las enfermedades parasitarias, particularmente en la malaria y la leishmaniasis.

Las especies del género *Piper* están ampliamente distribuidas en las regiones tropicales de Bolivia y se han encontrado alrededor de 35 especies, de las que no existen estudios fitoquímicos dirigidos hacia la búsqueda de compuestos bioactivos. Por otra parte, estas regiones están siendo destruidas debido al proceso de migración, chaqueo, así como la explotación de recursos arbóreos e hidrocarburos.

Los antecedentes descritos ponen de manifiesto el extenso uso de especies del género *Piper* en la medicina tradicional de Bolivia para el tratamiento de las enfermedades parasitarias, donde existe una alta incidencia de las mismas. Ello, unido a la acelerada pérdida de la biodiversidad en los bosques tropicales, nos llevan a considerar primordial llevar a cabo estudios de estas especies vegetales dirigidos hacia la búsqueda de potenciales agentes antiparasitarios, como alternativa a los fármacos en uso clínico, lo que constituye el objetivo del trabajo de investigación que se presenta en esta Memoria de Tesis.

## ***2. OBJETIVOS***

Con los antecedentes mencionados anteriormente, hemos considerado que la búsqueda de metabolitos de especies del género *Piper* como potenciales agentes antiparasitarios, se presenta como una excelente estrategia para aportar nuevas soluciones al acuciante problema que presenta la ineficacia existente en el tratamiento de las enfermedades parasitarias. En esta línea, el trabajo de investigación que se presenta en esta Memoria se centra en la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad leishmanicida, tripanocida y antiplasmódica de especies del género *Piper*, utilizadas en la medicina tradicional de Bolivia por sus propiedades antiparasitarias.

Los objetivos concretos que nos planteamos son:

- Identificación, recolección y preparación de extractos de las hojas de *Piper aduncum*, *P. acutifolium*, *P. elongatum*, *P. glabratum*, *P. heterophyllum*, *P. pilliraneum* y *P. rusbyi*.
- Evaluación de la actividad antiparasitaria *in vitro* frente a formas promastigotes de *Leishmania*: *L. donovani*, *L. amazonensis* y *L. braziliensis* de los extractos obtenidos.
- Fraccionamiento bioguiado de los extractos activos frente a las tres cepas de *Leishmania* anteriormente mencionadas.
- Aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en dichas especies
- Elucidación estructural de los metabolitos aislados con aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Estudio de la actividad antiparasitaria de los compuestos aislados: actividad leishmanicida, tripanocida y antiplasmódica.
- Revisión bibliográfica de los metabolitos aislados de especies del género *Piper* y sus actividades farmacológicas.
- Validación del uso en la medicina tradicional de Bolivia de especies del género *Piper* en el tratamiento de enfermedades parasitarias.
- Estudio de las cuestiones no previstas y que por su interés merezcan su análisis.

***3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA  
DEL GÉNERO PIPER***

## Familia Piperaceae

Las principales características de la familia Piperaceae son las de ser arbustos y trepadoras leñosas de hojas alternas, simples, a menudo con glándulas de aceites aromáticos, en ocasiones algo carnosas. Flores pequeñas, bisexuales o unisexuales, dispuestas en espádices o espigas opuestas a las hojas por lo general. Tienen 1-10 estambres y carecen de pétalos y sépalos. Fruto en baya carnosas indehiscente, con una sola semilla.



*Macropiper excelsa*



*Peperomia clusiifolia*



*Pothomorphea peltata*

La familia Piperaceae comprende diez géneros y unas 3.000 especies de distribución pantropical. Los géneros que incluye son: *Piper* (> 1.200 especies), *Peperomia* (> 700 especies), *Trianaeopiper* (44 especies), *Ottonia* (187 especies), *Arctotonia* (17 especies), *Macropiper* (30 especies), *Manekia* (9 especies), *Pothomorphea* (41 especies), *Sarcorachis* (15 especies), *Verhuellia* (8 especies) y *Zippelia* (6 especies)<sup>1</sup>.

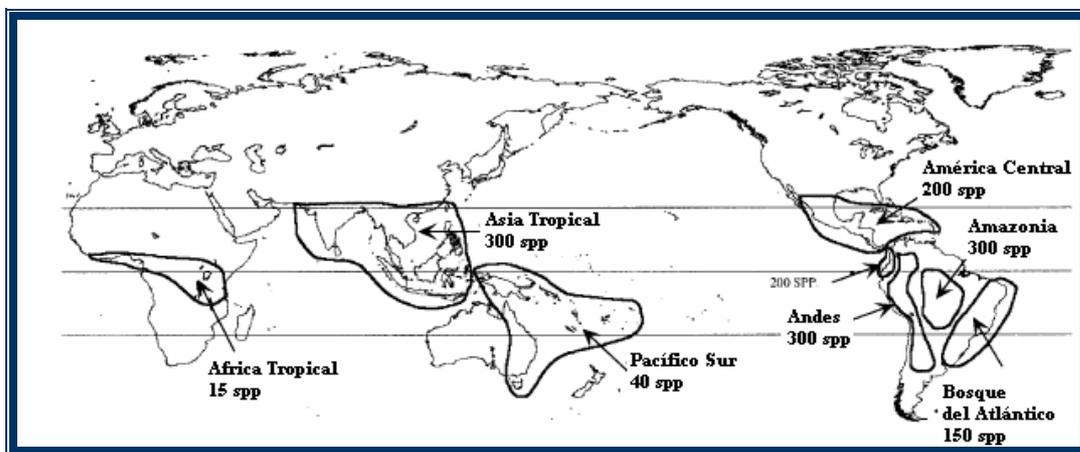
## Género *Piper*

El género *Piper* pertenece a la familia Piperaceae y comprende más de 1.200 especies<sup>2</sup>, ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y sub-tropicales del mundo, la gran mayoría de las cuales se encuentran en los trópicos de América (> 700 especies), seguido por las del Sur de Asia (> 300 especies), donde tiene especial importancia económica y comercial *Piper nigrum* L. (pimienta negra) y *Piper betle* L. Los patrones de distribución de las especies de *Piper* varía desde especies endémicas hasta aquellas que presentan una amplia distribución geográfica. Existen numerosas especies que se encuentran restringidas a centros específicos de diversidad,

<sup>1</sup> Kunth, K. *Bemerkungen über die Familie Piperaceen*. 1839, Linnaea-13, 562-726.

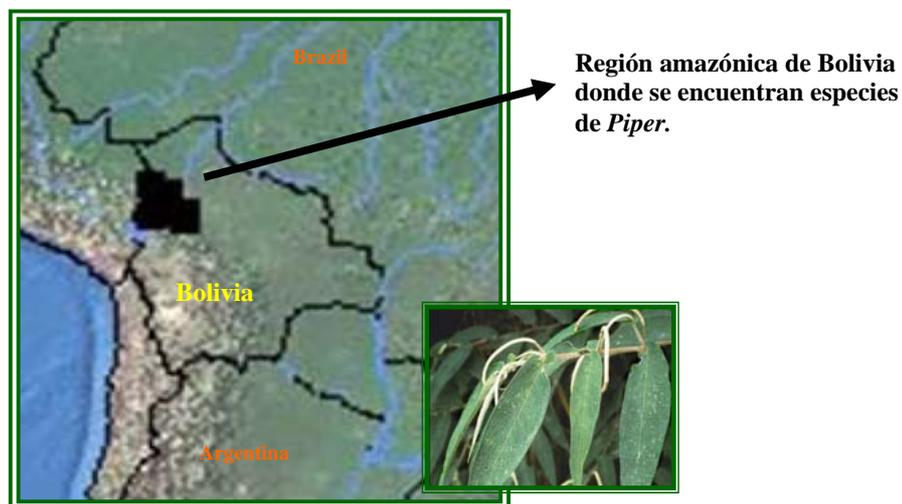
<sup>2</sup> Soltis, P. A.; Soltis, D. E.; Chase, M. W. *Nature*. 1999, 402, 402-404.

como por ejemplo los Andes o Centro América, mientras que otras pueden encontrarse a través del Neotrópico o Paleotrópico<sup>3,4</sup>.



Distribución geográfica de especies del género *Piper*

Bolivia por sus aspectos de ubicación, clima y suelo especiales, posee diversos tipos de bosques y otras formas de vegetación, con un gran número de especies vegetales, entre las que se encuentran alrededor de 35 especies del género *Piper*.



Distribución geográfica de especies del género *Piper* en Bolivia

<sup>3</sup> Jaramillo, M. A.; Manos, P. S. *Am. J. Botany*. **2001**, 88, 706-716.

<sup>4</sup> Quijano-Abril, M. A.; Callejas-Posadas, R.; Miranda-Esquivel, D. *J. Biogeog.* **2006**, 33, 1266-1278.

### Clasificación taxonómica

El método de clasificación seleccionado ha sido el adoptado por V. H. Heywood (1978), basado en el trabajo de G.L. Stebbins (1974)<sup>5,6</sup>.

Reino	Plantae
División :	Magnoliophyta (Angiospermas)
Clase:	Magnoliopsida (Dicotiledoneas)
Subclase :	Magnoliidae
Orden :	Piperales
Familia :	Piperaceae
Género:	<i>Piper</i>

### Descripción botánica del género *Piper*

Son comúnmente arbustos o árboles, aromáticos, más o menos leñosos, a veces trepadores o sub-trepadores con tallos elongados y usualmente con nudos engrosados, un solo prófalo lateral que aparece usualmente en los nudos floríferos, frecuentemente con la forma de una cobertura parecida a una tapa sobre el ápice del vástago. Hojas alternas, pecioladas, simples, enteras o lobuladas solo en la base, iguales en la base foliar o desiguales con un lado más corto en el pecíolo, a veces peltada unidas al pecíolo, variando en textura desde membranosas hasta gruesas-coriáceas, de superficie lisa, rugosa o vetricosa en el haz hasta alveolada en el envés, mostrando a menudo, especialmente en el envés, puntos glandulares pálidos u oscuros o conspicuamente alados, más o menos vaginados, en la base diminutos puntos translucidos. Pecíolo con márgenes usualmente angostos o con trayecto hasta la base foliar. Inflorescencia pedunculada con una espiga solitaria, sencilla opuesta a la hoja, lineal-cilíndrica, erecta, ascendente, o péndula, recta o raramente recurvada o arqueada. Flores numerosas, usualmente agrupadas densamente o con menos frecuencia, mas aisladas y distantes, principalmente sésiles. Fruto con una semilla, carnosos o secos, globoso, piramidal invertido, cilíndrico o turbinado,

<sup>5</sup> Heywood, V. H. *Flowering plants of the World*. 1978, Oxford University Press, Oxford, 335.

<sup>6</sup> Stebbins, G. L. *Flowering plants: evolution above the species level*. 1974, Arnold Press London, London, 399.

redondo o anguloso, a veces comprimido lateralmente, trígono o cuadrangular, liso glabro, apilado-pulverulento o hispiduloso, especialmente hacia arriba y alrededor del ápice.



Diferentes partes de una especie del género *Piper*

### Etnofarmacología y usos de especies del género *Piper*

Económicamente, las especies de la familia Piperaceae son importantes en el mercado mundial por la producción de pimienta. El fruto maduro de *Piper nigrum* es la fuente de pimienta blanca, mientras que el fruto inmaduro de la misma especie es la fuente de la pimienta negra.

Numerosas especies del género *Piper* tienen una gran popularidad en los sistemas de la medicina tradicional Ayurvedica de la India<sup>7,8</sup>. En las islas del Pacífico a partir de las raíces de *P. methysticum*<sup>9</sup>, arbusto conocido como kava, se prepara una bebida refrescante, que es consumida habitualmente como tranquilizante para combatir la ansiedad. Las raíces y frutos de *P. chaba* poseen numerosas aplicaciones en medicina y en particular son útiles para tratar el asma, la bronquitis, el dolor de abdomen, como estimulante y para curar afecciones hemorroidales<sup>10</sup>; *P. brachystachyum* presenta propiedades insecticidas<sup>11</sup> y los tallos de *P. futukadsura*, planta medicinal China, es ampliamente usado para el tratamiento del asma y la

<sup>7</sup> Kirtikar, K. R.; Basu, B.D. *Indian Medicinal Plants*, 1933, Vol. II, 2128-2132.

<sup>8</sup> *The Wealth of India*. Vol. VIII, Raw Materials. CSIR, New Delhi, 1969, 83-87.

<sup>9</sup> Singh, Y. N.; Blumenthal, M. *Herbalgram* (Special Review). 1997, 39, 33.

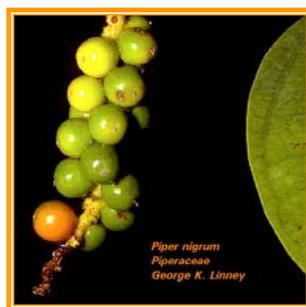
<sup>10</sup> Kirtikar, K. R.; Basu, B. D. *Indian Medicinal Plants*. 1993, Vol III, 2130.

<sup>11</sup> Jacobson, M.; Crosby, D. G. *Naturally Occurring Insecticides* (Marcel Dekker), 1971, 144, 226.

artritis. En Jamaica, de las once especies de *Piper* conocidas, se citan como medicinales solo *P. aduncum* para dolores estomacales y *P. hispidum* como repelente<sup>12</sup>. En América Latina, *P. amalago* distribuida desde México hasta Brasil, es usada para aliviar dolores de pecho y como agente antiinflamatorio<sup>13</sup>, mientras que la raíz de *P. sylvaticum* es utilizada como un efectivo antídoto contra la picadura de serpiente en la medicina popular de la India.



*Piper methysticum*  
Tranquilizante



*P. nigrum*  
Antiinflamatorio



*P. aduncum*  
Analgésico, antimicrobiano

Conocida con el nombre común de “matico”, los Kallawayas y Mosetenes<sup>14</sup> (Alto Beni-La Paz) hacen uso de las hojas de *Piper aduncum*, para curar el resfriado y la fiebre; en la etnia de los Chacobo<sup>15</sup> (Provincia Vaca Díez, Beni) es usada la planta entera de *P. lanceolatum* (“joshinia”) y *P. callosum* (“xequihahewa”) hervidas para los casos de viruela; en tanto que *P. dariense* (“nihibosa”) y *P. hostmanianum* (“rarasá”) se utilizan como analgésico para el dolor de muelas. En la etnia Tacana<sup>16</sup> utilizan las nervaduras de las hojas de *P. dariense* (“anu caperi”) para el dolor de muelas; en tanto que las hojas de *P. peltatum* (“richi ina”, “sipu-sipu”) se aplican en forma de cataplasma en casos de inflamación y las hojas de *P. aduncum*, *P. heterophyllum* y *Piper sp.* (“tudha”) son utilizadas como antiinflamatorio, en el dolor de los riñones, como desinfectante en heridas y en infecciones de la piel.

<sup>12</sup> Asprey, G. F.; Thornton, P. *Medicinal plants of Jamaica*, 17. *West Indies Medicinal Journal*, Kingston, Jamaica, **1954**.

<sup>13</sup> Domínguez, X. A.; Alcorn, J. B. *J. Ethnopharmacol.* **1985**, 13, 139-156.

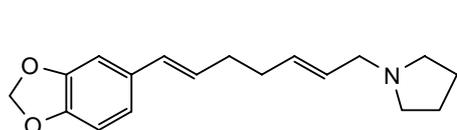
<sup>14</sup> Quintana, P. G.; Vargas, R. L.; Icona, C.; Bozo, S.; Cuata, C. *Guía popular de plantas utilizadas por los Mosetenes de Convento, Santa Ana y Muchanes (Alto Beni-Bolivia)*. **1995**, FONAMA.

<sup>15</sup> Bergeron, S.; Ortiz, B.; Ortiz, J.; Soria, C.; Ortiz, C. *Guía popular de plantas utilizada por la etnia Chacobo (Prov. Vaca Díez, Beni)*. **1996**, FONAMA.

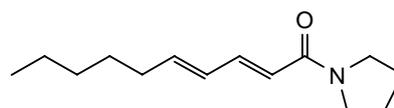
<sup>16</sup> Bourdy, B.; Giménez, A.; Flores, E. N. *Conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas*. **1999**, UMSA-CIPTA-IRD-FONAMA.

## Metabolitos secundarios aislados del género *Piper*

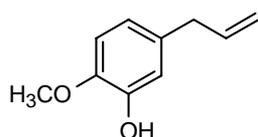
Las especies del género *Piper* han sido ampliamente investigadas y los estudios fitoquímicos han conducido al aislamiento de una amplia variedad de metabolitos secundarios<sup>17</sup>, destacando los alcaloides, lignanos, neolignanos, terpenoides, kavapironas, piperolidas, chalconas y dihidrochalconas, flavonas y flavanonas, los cuales presentan una amplia gama de actividades biológicas. Algunos ejemplos de metabolitos aislados se muestran a continuación:



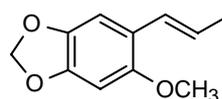
**Sarmentosina** (*P. sarmentosum*)  
Actividad antifúngica<sup>17</sup>



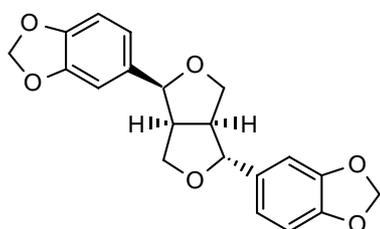
**Sarmentina** (*P. sarmentosum*)  
Actividad antiplasmódica<sup>18</sup>



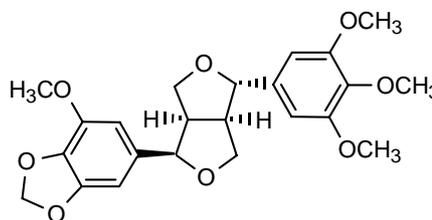
**Chavibetol** (*P. betle*)  
Actividad antiinflamatoria<sup>19</sup>



**Asaricina** (*P. lenticellosum*)  
Actividad antimicrobiana<sup>20</sup>



**Asarinina** (*P. longum*)  
Actividad quimiopreventiva<sup>21</sup>



**7-epi-Sesartemina** (*P. fimbriulatum*)  
Actividad larvicida<sup>22</sup>

<sup>17</sup> Virinder, S. P.; Subhash, C. J.; Kirpal, S. B.; Rajni, J.; Poonam, T.; Amitabh, J.; Om, D. T.; Ashok, K. P.; Jesper, W.; Carl, E. O.; Per, M. B. *Phytochemistry*. **1997**, 46, 597-673.

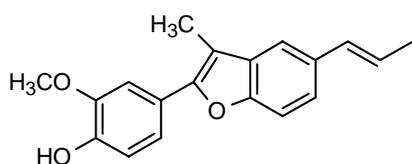
<sup>18</sup> Tuntiwachwuttikul, P.; Phansa, P.; Pootaeng-on, Y.; Taylor, W. C. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, 54, 149-151.

<sup>19</sup> Williams, L. A. D.; Vasquez, E. A.; Milan, P. P.; Zebitz, C.; Kraus, W. *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*. **2002**, 47, 221-227.

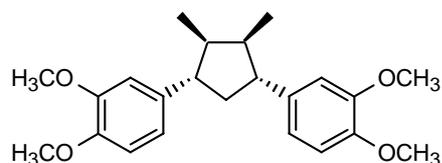
<sup>20</sup> Masuda, T.; Inazumi, A.; Yamada, Y.; Padolina, W. G.; Kikuzaki, H.; Nakatani, N. *Phytochemistry*. **1991**, 30, 3227-3228

<sup>21</sup> Konoshima, T.; Takasaki, M. *Studies in Natural Products Chemistry. Bioactive Natural Products*, Part E. vol. 24, **2000**, 215-267.

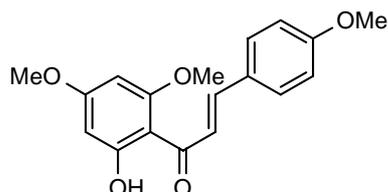
<sup>22</sup> Solis, P. N.; Olmedo, D.; Nakamura, N.; Calderón, A. I.; Hattori, M.; Gupta, P. M. *Pharm. Biol.* **2005**, 43, 378-381.



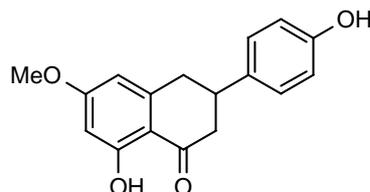
**Eupomatenoide 5** (*P. regnellii*)  
Actividad tripanocida<sup>23</sup>



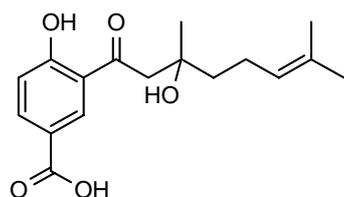
**Galgravin** (*P. Futokadsura*)  
Actividad antioxidante<sup>24</sup>



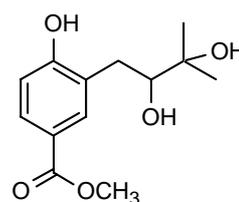
**Flavokvaina A** (*P. methysticum*)  
Inductor de la apoptosis<sup>25</sup>



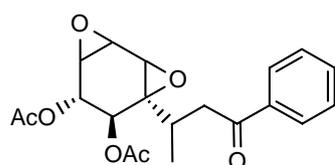
**Sakuranetina** (*P. elongatum*)  
Actividad leishmanicida<sup>26</sup>



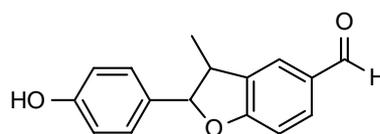
**Ácido crasinervico** (*P. crassinervium*)  
Actividad antifúngica<sup>27</sup>



**Hostmaniane** (*P. hostmannianum*)  
Actividad antifúngica<sup>22</sup>



**Croteposido** (*P. hookeri*)  
Actividad antitumoral<sup>28</sup>



**Decurrenal** (*P. decurrens*)  
Actividad insecticida<sup>29</sup>

<sup>23</sup> Luize, P. S.; Ueda-Nakamura, T.; Filho, B. P. D.; Cortéz, D. A. G; Nakamura, C. V. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 2126-2130.

<sup>24</sup> Konishi, T.; Konoshima, T.; Daikonya, A.; Kitanaka, S. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 121-124.

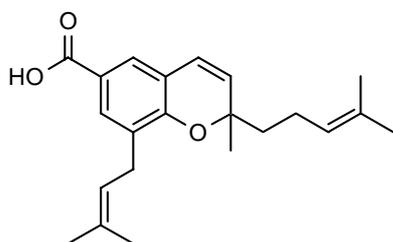
<sup>25</sup> Zi, X.; Simoneau, A. R. *Cancer Research.* **2005**, *65*, 8, 3479-3486.

<sup>26</sup> Bravo, J. A.; Sauvain, M.; Gimenez, A.; Massiot, G.; Deharo, E.; Lavaud, C. *Rev. Boliviana Quim.* **2003**, *20*, 11-17.

<sup>27</sup> Lago, J. H. G.; Ramos, C. S.; Campos D.; Casanova, C.; Morandim, A. A.; Bergamo, D. C. B.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani V. S.; Furlan M.; Guimaraes, E. F.; Young, M. C. M.; Kato, M. J. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1783-1788.

<sup>28</sup> Singh, J.; Dhar, K. L.; Atal, C. K. *Curr. Sci.* **1969**, *38*, 471.

<sup>29</sup> Chauret, D. C.; Bernard, C. B.; Arnason, J. T.; Durst, T.; Krishnamurty, H. G.; Sánchez-Vindas, P.; Moreno, N.; San Roman, L.; Poveda, L. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 152-155.



**Ácido gaudichaudianico** (*P. gaudichaudianum*)<sup>27</sup>  
Actividad antifúngica

Cabe destacar que de las especies del género *Piper* distribuidas por todo el mundo, solo el 12% de ellas han sido sometidas a estudios fitoquímicos, lo que corresponde a 84 especies. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, así como el interés biológico de los metabolitos aislados, no cabe duda que aún queda mucho por investigar en la fitoquímica del género *Piper*.

***4. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE  
ESPECIES DEL GÉNERO PIPER***

## ESTUDIO FITOQUÍMICO DE ESPECIES DEL GÉNERO *PIPER*

Con los antecedentes anteriormente citados y siguiendo los objetivos propuestos de aislamiento, elucidación estructural y evaluación de la actividad antiparasitaria de los metabolitos aislados, realizamos el estudio fitoquímico, mediante fraccionamiento bioquímico, de la fase orgánica obtenida en diclorometano tras partición líquido-líquido ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$ ) del extracto etanólico de las hojas de siete especies del género *Piper*: *P. aduncum*, *P. acutifolium*, *P. elongatum*, *P. glabratum*, *P. heterophyllum*, *P. pilliraneum* y *P. rusby*. Así mismo de forma paralela, se llevó a cabo el estudio fitoquímico de las fracciones inactivas en los ensayos de actividad leishmanicida de las especies citadas anteriormente.

El procedimiento experimental seguido para dicho estudio fitoquímico, es el que se detalla a continuación. En primer lugar, se prepararon los extractos etanólicos de las hojas de cada una de las especies, los cuales fueron resuspendidos en agua y extraídos con diclorometano. Las fracciones de diclorometano y acuosas así obtenidas de las siete especies, fueron ensayadas con el fin de evaluar su posible actividad biológica, y como se describe en la parte experimental, las siete fracciones orgánicas mostraron actividad leishmanicida frente al menos a una de las cepas de *Leishmania* utilizadas, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. donovani*. Posteriormente, las fracciones orgánicas de cada una de las especies, fueron fraccionadas por cromatografía líquida al vacío (CLV), usando como eluyente mezclas de *n*-hexano y acetato de etilo con polaridad creciente. Las diferentes fracciones así obtenidas fueron evaluadas para determinar su actividad leishmanicida. Estas fracciones fueron sometidas a sucesivas cromatografías, utilizando diferentes técnicas cromatográficas, como son la cromatografía de adsorción en columna con sílica gel, cromatografía de exclusión molecular en Sephadex LH-20, cromatografía preparativa y cromatografía en capa fina, usando como sistemas de elusión diferentes mezclas de eluyente (*n*-hexano, éter dietílico, diclorometano, acetona, acetato de etilo y metanol), al objeto de aislar e identificar los metabolitos secundarios presentes en dichas fracciones.

Las estructuras de los nuevos metabolitos aislados fueron elucidadas mediante técnicas espectroscópicas de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Resonancia Magnética Nuclear de protón y carbono), incluyendo experimentos homonucleares, COSY (Correlated Spectroscopy) y ROESY (Rotating

Frame Overhauser Effect) y heteronucleares, HSQC (Heteronuclear Single Quantum coherente) y HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), así como mediante IR (Infrarrojo), UV (Ultravioleta) y espectrometría de masas de baja (EM) y alta resolución (EMAR). Las configuraciones absolutas se determinaron, cuando fue posible, mediante el estudio de las curvas de dicroísmo circular o aplicación del método de Riguera, una modificación del método de Mosher. Por otra parte, las estructuras de los compuestos conocidos fueron establecidas basándonos en sus datos físicos y espectroscópicos y comparación de los mismos con los existentes en la bibliografía química.

Los productos aislados de las siete especies estudiadas fueron evaluados para determinar su posible actividad leishmanicida, antiplasmódica y tripanocida.

Los metabolitos aislados de las siete especies de *Piper* estudiadas, han sido agrupados y denominados de acuerdo a la similitud de sus estructuras químicas, para facilitar su estudio y discusión. Teniendo en cuenta esta consideración los productos los hemos clasificado y denominado como se cita a continuación:

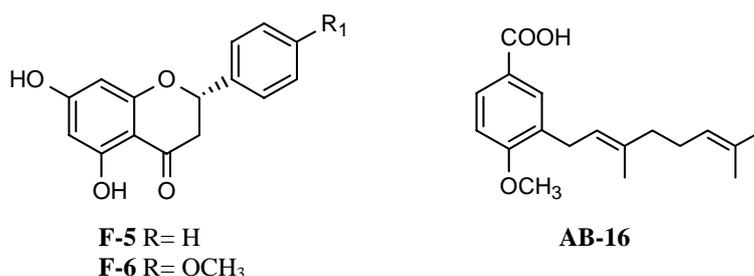
- ◆ **K:** Kavalactonas
- ◆ **F:** Flavonoides
- ◆ **AB:** Derivados del ácido benzoico
- ◆ **B:** Benzopiranos y benzofuranos
- ◆ **FP:** Fenilpropanoides
- ◆ **T:** Terpenos
- ◆ **C:** Apocarotenoides
- ◆ **A:** Amidas

A continuación pasamos a exponer los resultados obtenidos del estudio fitoquímico de las diferentes especies del género *Piper* estudiadas en la presente Memoria.

## ESTUDIO FITOQUÍMICO DE PIPER ADUNCUM

Del estudio fitoquímico del extracto de diclorometano de las hojas de *P. aduncum*, después de sucesivas cromatografías, como se detalla en la parte experimental, se aislaron diez metabolitos, nueve de los cuales habían sido descritos previamente y uno resultó nuevo en la bibliografía química.

Así de la fracción que resultó activa (PA2) en los ensayos de actividad leishmanicida (CI<sub>50</sub> 11-26 µg/ml), según se detalla en el apartado correspondiente a las actividades biológicas, aislamos tres metabolitos, previamente descritos, que identificamos como: 5,7-dihidroxi-flavanona<sup>1</sup> (**F-5**), 5,7-dihidroxi-4'-metoxi-flavanona<sup>2</sup> (**F-6**) y el ácido 3-(3,7-dimetil-2,6-octadienil)-4-metoxi-benzoico<sup>3</sup> (**AB-16**).



### Metabolitos aislados de la fracción leishmanicida de *P. aduncum*

El estudio cromatográfico de las fracciones restantes, y según se detalla en la parte experimental, dio lugar al aislamiento de seis metabolitos descritos previamente en la bibliografía, que identificamos como: ácido 4-hidroxi-3-(3-metil-1-oxo-2-butenil)-5-(3-metil-2-butenil) benzoico<sup>4</sup> (**AB-14**), 3'-hidroxi-isosafrol<sup>5</sup> (**FP-5**), nerolidol<sup>6</sup> (**T-1**), oplopanona<sup>7</sup> (**T-2**), β-sitosterol<sup>8</sup> (**T-8**) y blumenol A<sup>9</sup> (**C-1**). El compuesto que hemos denominados **F-9**,

<sup>1</sup> Díaz, P.; Arias, C.T.; Nathan, J. *Phytochemistry*. **1987**, 26, 809-811.

<sup>2</sup> Vasconcelos, J. M. J.; Silva, A. M.; Cavalheiro, J. A. S. *Phytochemistry*. **1998**, 49, 1421-1424.

<sup>3</sup> Boldoqui, D. C.; Kato, M. J.; Cavalheiro, A. J.; Da Silva Bolzani, V.; Young, M. C.; Furlan, M. *Phytochemistry*. **1999**, 51, 899-902.

<sup>4</sup> Orjala, J.; Erdelmeier, C. A. J.; Wright, A. D.; Rali, T.; Sticher, O. *Planta Med.* **1993**, 59, 546-551.

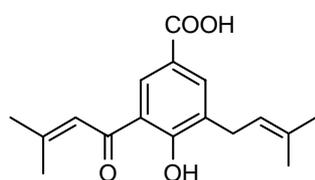
<sup>5</sup> Belleleire, J. L.; Mahmoodi, N. O. *J. Nat. Prod.* **1992**, 55, 194-206.

<sup>6</sup> Ramos L. S.; Da Silva M. L.; Luz, A. I. R.; Zoghi, M. G. B.; Maia J. G. S. *J. Nat. Prod.* **1986**, 49, 712-13.

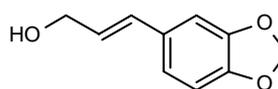
<sup>7</sup> Da Silva, M. H.; Zoghbi, M. G.; Andrade, E. H. A.; Maia, J. G.; Museu, P. E. G. *Flav. Frag.* **1999**, 14, 312-314.

<sup>8</sup> Fieser, L.; Fieser, M.; *Steroids*. **1950**, Reinhold Pubs.

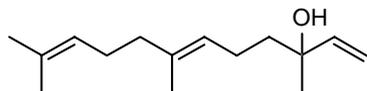
correspondiente a una flavanona, resultó nuevo en la bibliografía química y su elucidación estructural se describe posteriormente en el apartado de los flavonoides.



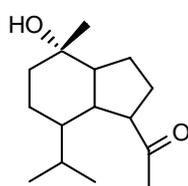
AB-14



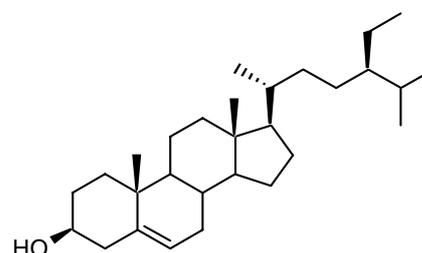
FP-5



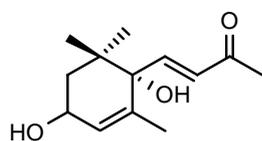
T-1



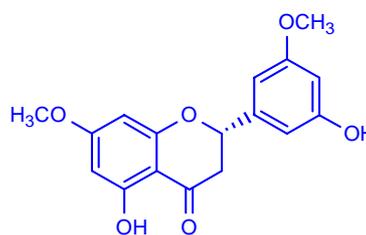
T-2



T-8



C-1



F-9

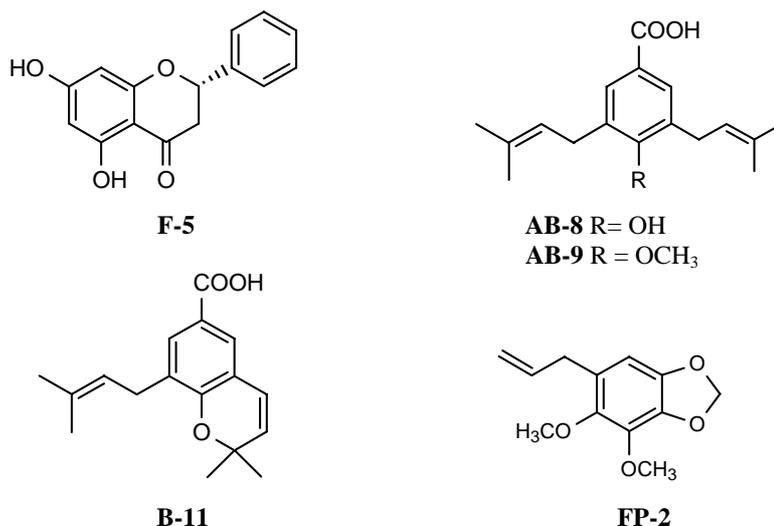
### Metabolitos aislados de *P. aduncum*

## ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *PIPER ACUTIFOLIUM*

El estudio fitoquímico de la fracción de diclorometano de las hojas de *P. acutifolium* y después de repetidas cromatografías, como se detalla en la parte experimental, rindió un total de veinte metabolitos, de los cuales ocho no habían sido descritos previamente en la bibliografía química.

<sup>9</sup> González, A. G.; Guillermo, J. A.; Ravelo, A. G.; Jiménez, I. A. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 400-402

De las fracciones activas (PC4 y PC5) en los ensayos leishmanicidas ( $CI_{50}$  20.8  $\mu\text{g/ml}$ ) se aislaron cinco metabolitos, que habían sido descritos previamente en la bibliografía química y fueron identificados como: 5,7-dihidroxi-flavanona<sup>1</sup> (**F-5**), ácido 4-hidroxi-3,5-bis-(3-metil-2-butenil)-benzoico<sup>10</sup> (**AB-8**), ácido-4-metoxi-3,5-bis-(3-metil-2-butenil)-benzoico<sup>4</sup> (**AB-9**), ácido 2,2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2*H*-1-cromeno-6-carboxílico (**B-11**)<sup>11</sup> y 1-alil-2,3-dimetoxi-4,5-metilendioxi-benceno<sup>12</sup> (**FP-2**).



### Metabolitos aislados de la fracción leishmanicida de *P. acutifolium*

El estudio de las fracciones inactivas ( $CI_{50} >100$   $\mu\text{g/ml}$ ), permitió el aislamiento de quince metabolitos, siete de los cuales habían sido descritos previamente, identificándose como: ácido 4-hidroxi-3-(3,7 dimetil-2,6-octadienil)-benzoico<sup>13</sup> (**AB-15**), esfatuleno<sup>14</sup> (**T-4**), transfitol<sup>15</sup> (**T-6**), 1-(1-hidroxi-2-propenil)-2,3-dimetoxi-4,5-metilendioxi-benceno<sup>12</sup> (**FP-3**), dilapional<sup>16</sup> (**FP-6**),  $\omega$ -hidroxiisodilapiola<sup>17</sup> (**FP-7**) y loliolida<sup>18</sup> (**C-4**). Por otra parte, los compuesto cuyas estructuras determinamos como: ácido 4-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-5-(3-metil-2-butenil) benzoico (**AB-10**), ácido 3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-5-(3-

<sup>10</sup> Burke, B.; Nair, M. *Phytochemistry*. **1986**, 25, 1427-1430

<sup>11</sup> Orjala, J.; Erdelmeier, C. A. J.; Wright, A.D.; Rali, T.; Sticher, O. *Phytochemistry*. **1993**, 34, 813-818.

<sup>12</sup> Ramos, L. S.; Da Silva, M. L.; Luz, A. I. R.; Zoghbi, M. G. B.; Maia, J. G. S. *J. Nat. Prod.* **1986**, 49, 712.

<sup>13</sup> Seeram, N. P.; Jacobs, H.; McLean, S.; Reynolds, W. F. *Phytochemistry*. **1996**, 43, 863-865.

<sup>14</sup> Fuyihiko, I.; Akira, A. *J. Chem. Soc. Perk. T 2*. **1985**, 1773-1778.

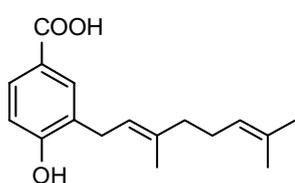
<sup>15</sup> Orjala, J.; Wright, A. D.; Erdelmeier, C. A. J.; Sticher, O.; Rali, T. *Helv. Chim. Acta.* **1993**, 76, 1481-1488.

<sup>16</sup> Tomar, S. S.; Mukerjee, S. K. K. *Indian J. Chem.* **1981**, 20, 723-724.

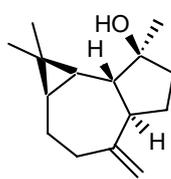
<sup>17</sup> Falkiner, M.; Loder, J. W.; Russel, J. B.; Shelton, M. *Aust. J. Chem.* **1972**, 2417-2420.

<sup>18</sup> Kimura, J.; Maki, N. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 57-58.

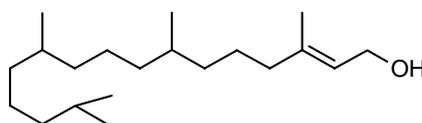
metil-2-butenil)-4-metoxi benzoico (**AB-11**), ácido 3-[(1*E*)-3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-5-(3-metil-2-butenil)]-4-metoxi benzoico (**AB-12**) y ácido 4-hidroxi-3,5 bis-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoico (**AB-13**), así como el ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-6-cromanocarboxílico (**B-8**), ácido 8-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-2,2-dimetil-2*H*-cromeno-6-carboxílico (**B-12**), ácido 2-hidroxi-7-(3-metil-2-butenil)-2,3-dihidro-benzofurano-5-carboxílico (**B-21**) y ácido 2-(1-hidroxi-1-metiletil)-7-(3-metil-2-butenil)-2,3-dihidro-benzofurano-5-carboxílico (**B-22**), resultaron nuevos en la bibliografía química y su elucidación estructural la describimos en su apartado correspondiente.



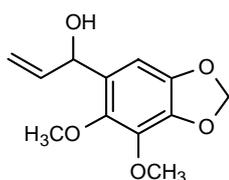
**AB-15**



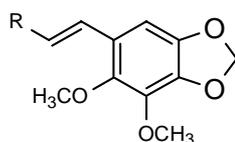
**T-4**



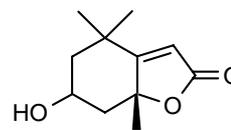
**T-6**



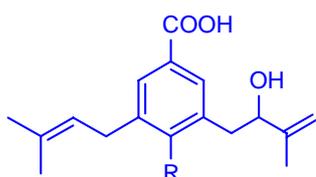
**FP-3**



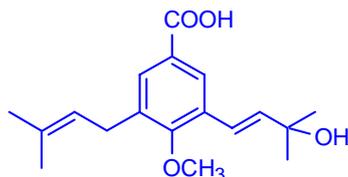
**FP-6** R= CHO  
**FP-7** R= CH<sub>2</sub>OH



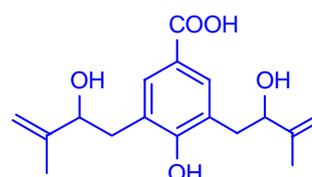
**C-4**



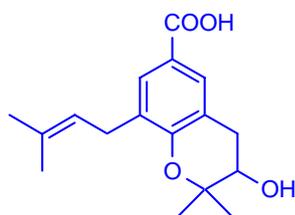
**AB-10** R= OH  
**AB-11** R= OCH<sub>3</sub>



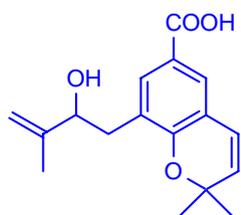
**AB-12**



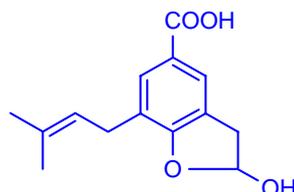
**AB-13**



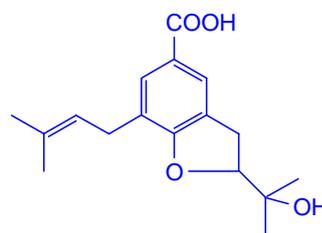
**B-8**



**B-12**



**B-21**



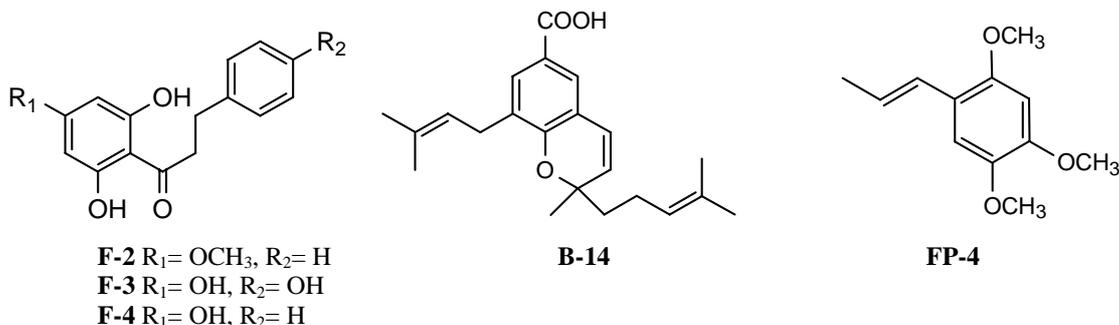
**B-22**

**Metabolitos aislados de *P. acutifolium***

## ESTUDIO FITOQUIMICO DE PIPER ELONGATUM

La fracción de diclorometano de las hojas de *P. elongatum*, después de sucesivas cromatografías, como se detalla en la parte experimental, permitió aislar un total de dieciocho metabolitos.

Así de las fracciones (PE4 y PE5) que resultaron activas (CI<sub>50</sub> 20-56 µg/ml) se aislaron cinco metabolitos, los cuales habían sido descritos previamente y que se identificaron como: 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-dihidrochalcona<sup>19</sup> (**F-2**), 2',6',4-trihidroxi-4'-metoxi-dihidrochalcona<sup>20</sup> (**F-3**), 2',4',6'-trihidroxi-dihidrochalcona<sup>21</sup> (**F-4**), ácido 2-metil-2-(4-metil-3-pentenil)-8-(3-metil-2-butenil)-2*H*-1-cromeno-6-carboxílico<sup>22</sup> (**B-14**) y  $\alpha$ -asarona<sup>23</sup> (**FP-4**).



### Metabolitos aislados de la fracción leishmanicida de *P. elongatum*

Sucesivas cromatografías de las fracciones restantes de la fase de diclorometano, nos permitieron aislar trece metabolitos descritos previamente y que fueron identificados basándonos en sus datos físicos y espectroscópicos, así como por comparación con los datos existentes en la bibliografía química, que resultaron coincidentes con los de las siguientes estructuras: 4',5'-dihidroxi-3',7'-dimetoxiflavanona<sup>24</sup> (**F-11**), ácido 4-hidroxi-3-(3,7-dimetil-2,6-octadienil) benzoico<sup>3</sup> (**AB-15**), el ácido 3-(3,7-dimetil-2,6-octadienil)-4-metoxi benzoico<sup>3</sup> (**AB-16**),  $\gamma$ -

<sup>19</sup> Bremner, P.D.; Meyer, M. *Planta Med.* **1998**, 64, 777.

<sup>20</sup> Orjala, J.; Wright, A.D.; Behrends, H.; Folkers, G.; Sticher O. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 18-26.

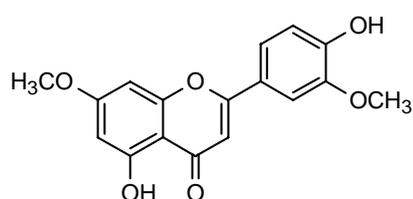
<sup>21</sup> Tanak, H.; Ichino, K.; Ito, K. *Phytochemistry.* **1984**, 23, 1198-1199.

<sup>22</sup> Lago, J. H. G.; Ramos, C. S.; Campos D.; Casanova, C.; Morandim, A. A.; Bergamo, D. C. B.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani V. S.; Furlan M.; Guimaraes, E. F.; Young, M. C. M.; Kato, M. J. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 1783-1788.

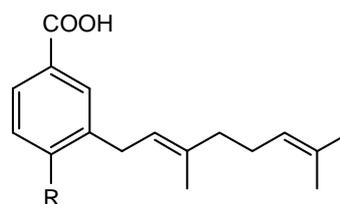
<sup>23</sup> Masuda, T.; Inazumi, A.; Yamada, Y.; Padolina, W. G.; Kikuzaki, H.; Nakatani, N. *Phytochemistry.* **1991**, 30, 3227-3228.

<sup>24</sup> Jensen, S.; Olsen, C. E.; Tyagi, O. D.; Boll, P. M.; Husaini, F. A.; Gupta, S.; Bisht, K. S.; Parmar, V. S. *Phytochemistry.* **1994**, 36, 789-792.

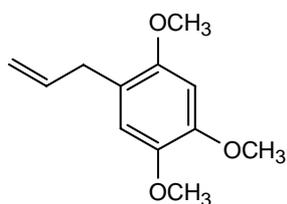
asarona<sup>25</sup> (**FP-1**), 2,4,5-trimetoxi-benzaldehído<sup>26</sup> (**DB-1**),  $\beta$ -sitosterol<sup>8</sup> (**T-8**), (-) boscialina<sup>27</sup> (**C-2**), dehidrovomifoliol<sup>28</sup> (**C-3**) y loliolide<sup>18</sup> (**C-4**), 4-metoxi-*N*-[2-(4-metoxi-5-hidroxi-fenil)-etil]-benzamida<sup>29</sup> (**A-1**), 4-hidroxi-*N*-[2-(4-metoxi-fenil)-etil]-benzamida<sup>30</sup> (**A-2**), *N*-*cis*-feruloil-tiramina<sup>30</sup> (**A-3**), *N*-*p*-cumaroil-tiramina<sup>30</sup> (**A-4**).



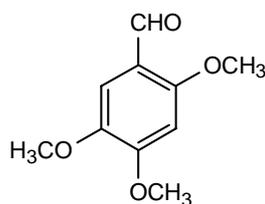
**F-11**



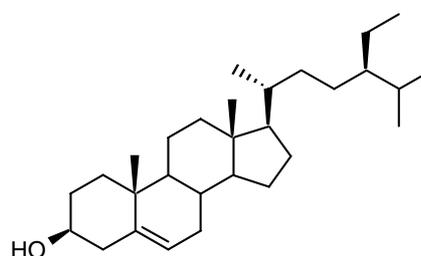
**AB-15** R= OH  
**AB-16** R= OCH<sub>3</sub>



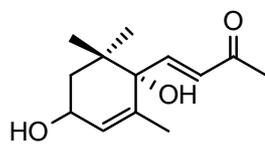
**FP-1**



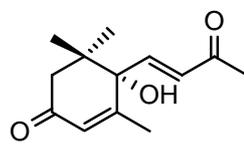
**DB-1**



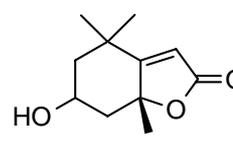
**T-8**



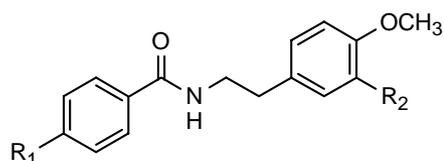
**C-2**



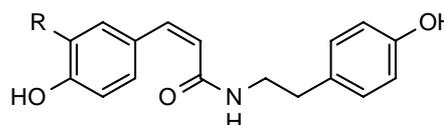
**C-3**



**C-4**



**A-1** R<sub>1</sub>= OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>= OH  
**A-2** R<sub>1</sub>= OH, R<sub>2</sub>= H



**A-3** R= OCH<sub>3</sub>  
**A-4** R= H

### Metabolitos aislados de *P. elongatum*

<sup>25</sup> Patra, A.; Mitra, A. K. *J. Nat. Prod.* **1981**, 44, 668-669.

<sup>26</sup> Prasad, A. K.; Tyagi, O. D.; Wengel, J.; Boll, P. M.; Olsen, C. E.; Bisht, K. S.; Singh A.; Sarangi, A.; Kumar, R.; Jain, S. C.; Parmar, V. S. *Phytochemistry*. **1995**, 39, 655-659.

<sup>27</sup> Pauli, N.; Séquim, U.; Walter, A. *Helv. Chim. Acta.* **1990**, 73, 578-582.

<sup>28</sup> Mori, K. *Tetrahedron*. **1974**, 30, 1065-1072.

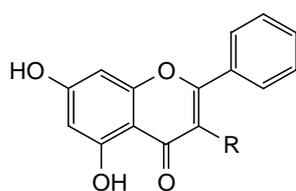
<sup>29</sup> Barbosa, F. J. M.; Da silva, E. C.; Bhattacharyya, J. *Química Nova*. **1990**, 13, 332-334.

<sup>30</sup> Fukuda, N.; Yonemitsu, M.; Kimura, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, 31, 156-160

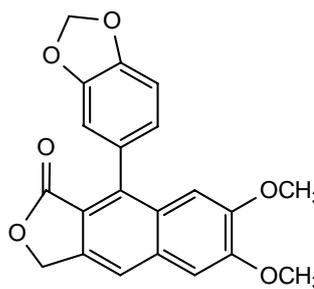
## ESTUDIO FITOQUIMICO DE PIPER GLABRATUM

La fracción de diclorometano de las hojas de *P. glabratum* y tras sucesivas cromatografías, según se describe en la parte experimental, dio lugar al aislamiento de veintiún metabolitos.

Así, de las fracciones activas (PG4 y PG5,  $CI_{50}$  7.6-25.3  $\mu\text{g/ml}$ ), se aíslan doce metabolitos, de los cuales cuatro ya habían sido descritos previamente y cuyas estructuras fueron identificadas como: crisin<sup>31</sup> (**F-10**), galangin<sup>32</sup> (**F-12**), ácido 2,2-dimetil-3-hidroxi-cromano-6-carboxílico (**B-4**) y justicidin B<sup>33</sup> (**L-1**). Los ocho compuestos restantes resultaron nuevos en la bibliografía química y sus estructuras corresponden a derivados del ácido benzoico: ácido 3,4-dihidroxi-5-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoato de etilo (**AB-2**), ácido 3-[(2-acetoxi)-3-metil-3-butenil]-4,5-dihidroxi-benzoato de metilo (**AB-5**) y ácido-3,4-dihidroxi-5-(3-metil-2-butenil)-benzoato de metilo (**AB-7**) y derivados de benzopirano: 3,8-dihidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de metilo (**B-1**), 3,8-dihidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de etilo (**B-2**), 3,4,8-trihidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de metilo (**B-3**), 3-acetoxi-8-hidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de metilo (**B-6**) y 8-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno-6-carboxilato de etilo (**B-10**). La elucidación estructural de los compuestos no descritos previamente se detalla en el apartado correspondiente a los derivados del ácido benzoico y de los benzopiranos.



**F-10** R =H  
**F-12** R =OH

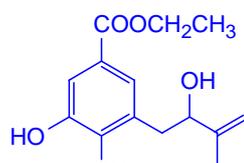


**L-1**

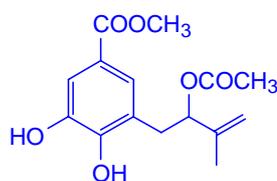
<sup>31</sup> Burke, B.; Fair, M. *Phytochemistry*. **1986**, 25, 1427-1430.

<sup>32</sup> Agrawal, P. K. *Studies in Organic Chemistry Series, N° 39: Carbon-13 NMR of Flavonoids*. **1989**, 152-153, Elsevier, Amsterdam.

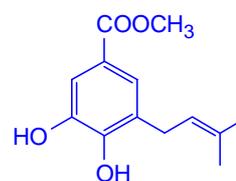
<sup>33</sup> Gleye, H. J. J.; Moulis, C. *J. Nat. Prod.* **1988**, 51, 599-600.



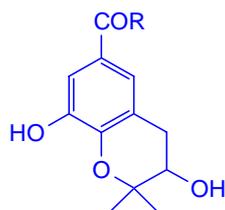
**AB-2**



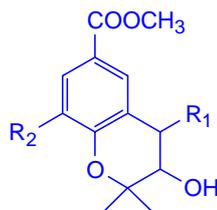
**AB-5**



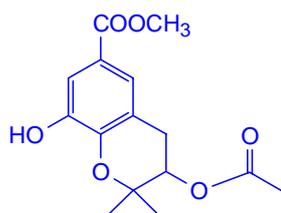
**AB-7**



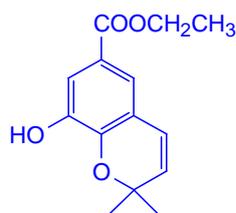
**B-1** R = OCH<sub>3</sub>  
**B-2** R = OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>



**B-3** R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>= OH  
**B-4** R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>= H



**B-6**



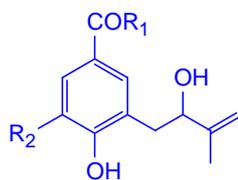
**B-10**

### Metabolitos aislados de la fracción leishmanicida de *P. glabratum*

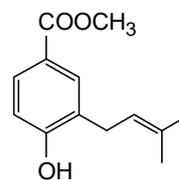
El estudio fitoquímico de las fracciones inactivas dio lugar al aislamiento de nueve metabolitos, cinco de los cuales habían sido descritos previamente y cuyas estructuras fueron establecidas como: 4-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoato de metilo<sup>1</sup> (**AB-3**), 4-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil) benzoato de metilo (**AB-6**), 8-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-1-cromeno-6-carboxilato de metilo<sup>3</sup> (**B-9**), esfatulenol<sup>14</sup> (**T-4**) y *N-p*-cumaroil-tiramina<sup>30</sup> (**A-4**).

Por otra parte, los compuestos identificados como: 3,4-dihidroxi-5-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoato de metilo (**AB-1**) y 4-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoato de etilo (**AB-4**), derivados del ácido benzoico y 3-hidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de etilo (**B-5**) y 3-hidroxi-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-2,3-dihidro-benzofurano-5-carboxilato de metilo (**B-20**) derivados de benzopirano y benzofurano, respectivamente, resultaron nuevos en la bibliografía química.

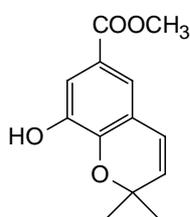
La elucidación estructural de aquellos compuestos que no habían sido descritos previamente, se detallan en el apartado correspondiente al grupo químico en los que los hemos incluido.



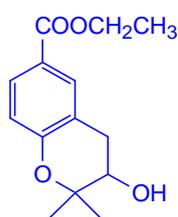
**AB-1** R<sub>1</sub>= OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>= OH  
**AB-3** R<sub>1</sub>= OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>= H  
**AB-4** R<sub>1</sub>= OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>= H



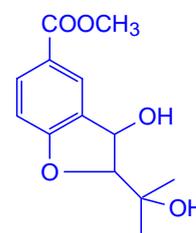
**AB-6**



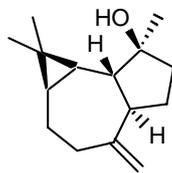
**B-9**



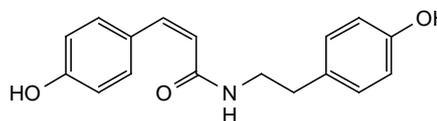
**B-5**



**B-20**



**T-4**



**A-4**

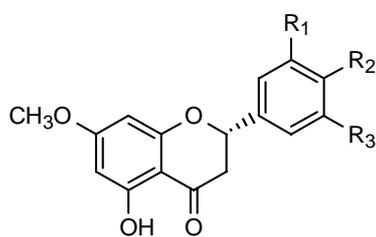
### Metabolitos aislados de *P. glabratum*

## ESTUDIO FITOQUIMICO DE PIPER HETEROPHYLLUM

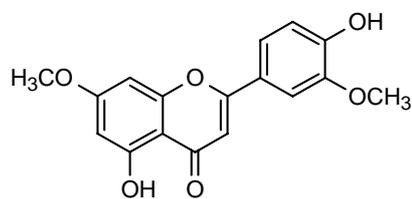
El extracto de diclorometano de las hojas de *P. heterophyllum*, después de sucesivas cromatografías, como se detalla en la parte experimental, rindió veinte metabolitos.

Así, de las fracciones que resultaron activas (PH4 y PH5, CI<sub>50</sub> 50.0-61.0 µg/ml) se aíslan once metabolitos descritos previamente en la bibliografía química y cuyas estructuras fueron

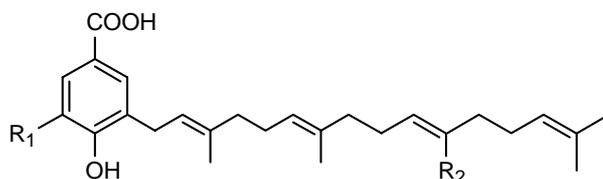
identificadas como: 5-hidroxi-4',7-dimetoxi-flavanona<sup>34</sup> (**F-7**), 3',5',5-trihidroxi-7-metoxi-flavanona<sup>35</sup> (**F-8**), 4',5-dihidroxi-3',7-dimetoxiflavona<sup>24</sup> (**F-11**), ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11,15-trimetil-hexadeca-2,6,10,14-tetraenil) benzoico (**AB-17**), ácido 3,4-dihidroxi-5-(3,7,11,15-trimetil-hexadeca-2,6,10,14-tetraenil) benzoico (**AB-18**)<sup>36</sup> y ácido 3,4-dihidroxi-5-(11-formil-3,7,15-trimetil-hexadeca-2,6,10,14-tetraenil) benzoico (**AB-19**)<sup>37</sup>. Los cinco restantes resultaron nuevos en la bibliografía química y sus estructuras, cuya elucidación se describe en el apartado correspondiente, fueron establecidas como derivado del ácido benzoico (**AB-20**) y benzopiranos (**B-16 - B-19**).



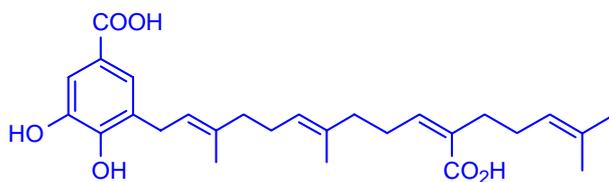
**F-7** R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>= H, R<sub>2</sub>= OCH<sub>3</sub>  
**F-8** R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>= OH R<sub>2</sub>= H



**F-11**



**AB-17** R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= CH<sub>3</sub>  
**AB-18** R<sub>1</sub>= OH, R<sub>2</sub>= CH<sub>3</sub>  
**AB-19** R<sub>1</sub>= OH, R<sub>2</sub>= CHO



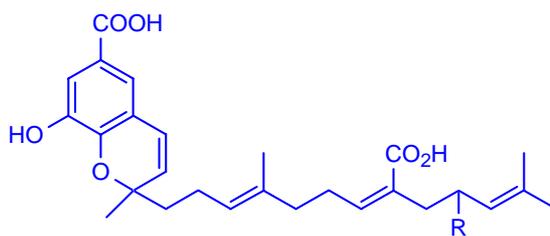
**AB-20**

<sup>34</sup> Agrawal, P. K. *Studies in Organic Chemistry Series, 39: Carbon-13 NMR of Flavonoids*, **1989**, 103-104, Elsevier, Amsterdam.

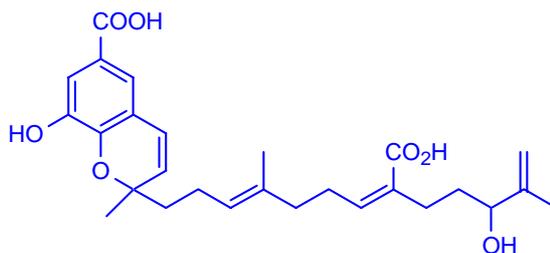
<sup>35</sup> Falzilatum, N.; Nornisah, M.; Zhari, I., Mas, S. J. *Trop. Med. Plants*. **2001**, 2, 17-22.

<sup>36</sup> Maxwell, A.; Rampersad, D. *J. Nat. Prod.* **1989**, 52, 614-618.

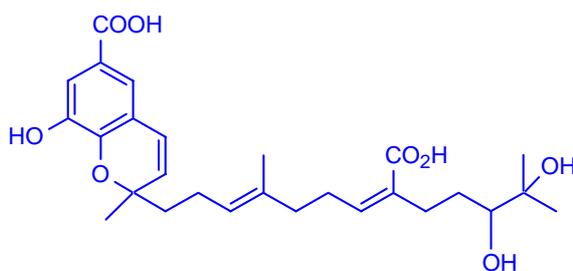
<sup>37</sup> Terréense, P.; Treadwell, E. M.; Wiemer, D. F. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 367-368.



**B-16** R= H  
**B-17** R= OH



**B-18**

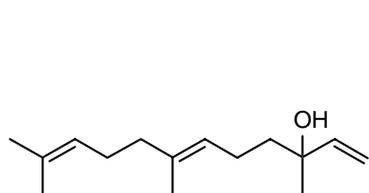


**B-19**

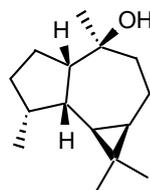
### Metabolitos aislados de la fracción leishmanicida de *P. heterophyllum*

Por otra parte, de las fracciones inactivas se aislaron nueve metabolitos, cuatro de los cuales habían sido descritos previamente y cuyas estructuras fueron identificadas como: nerolidol<sup>6</sup> (**T-1**), viridiflorol<sup>38</sup> (**T-3**), esfatulenol<sup>14</sup> (**T-4**) y  $\alpha$ -asarona<sup>23</sup> (**FP-4**). Los metabolitos que hemos denominado **AB-21** y **AB-22**, derivados del ácido benzoico, **B-7** y **B-15**, derivados de benzopirano y el terpeno **T-7** resultaron nuevos en la bibliografía química y su elucidación estructural la describimos en el apartado correspondiente a los derivados del ácido benzoico, benzopiranos y terpenos.

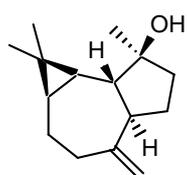
<sup>38</sup> San Feliciano, A.; Medarde, M.; Gordaliza, M.; Del Olmo, E.; Miguel del Corral, J. M. *Phytochemistry*. **1989**, 28, 2717-2721.



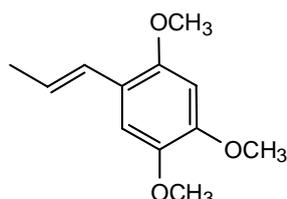
**T-1**



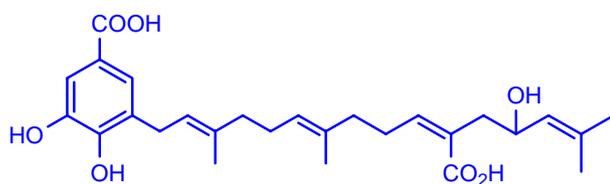
**T-3**



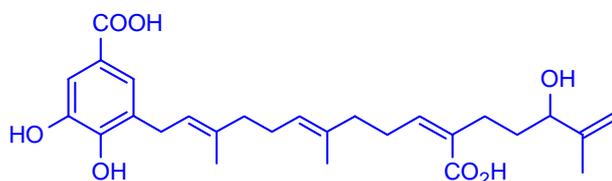
**T-4**



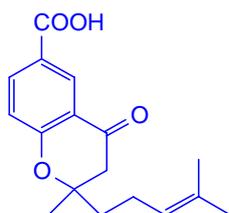
**FP-4**



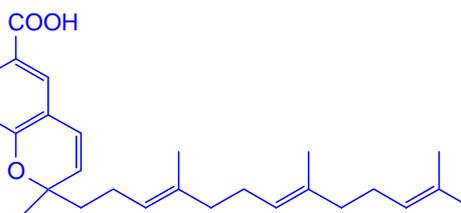
**AB-21**



**AB-22**



**B-7**



**B-15**

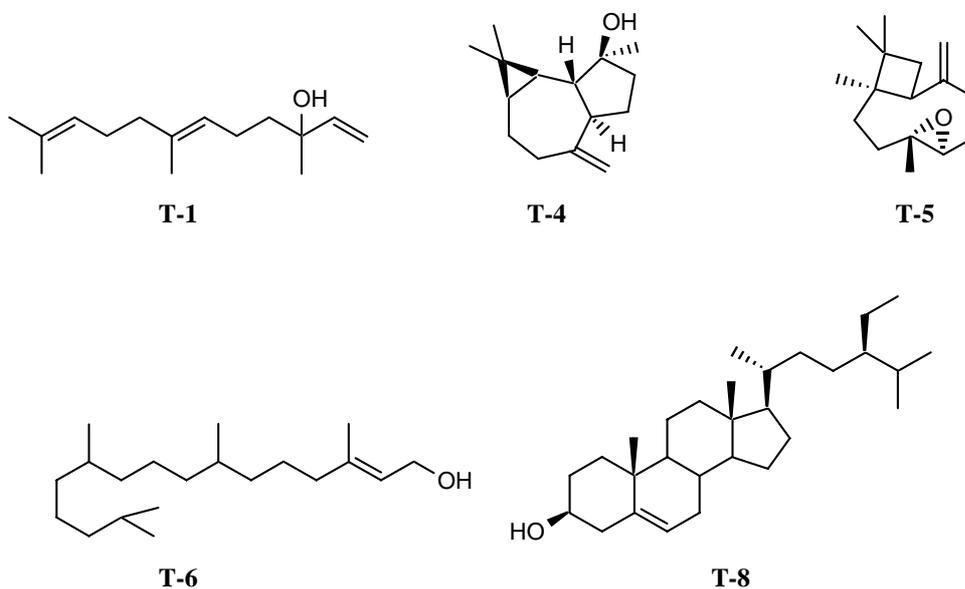
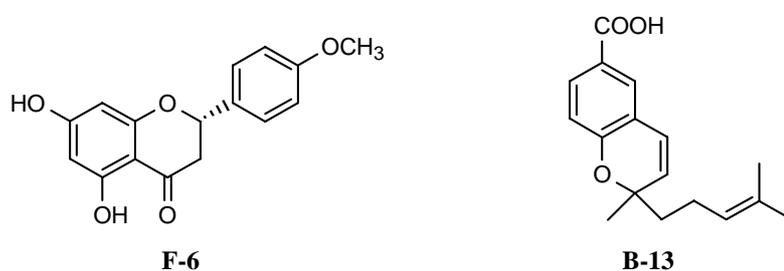


**T-7**

**Metabolitos aislados de *P. heterophyllum***

## ESTUDIO FITOQUIMICO DE PIPER PILLIRANEUM

Después sucesivas cromatografías del extracto de diclorometano de las hojas de *P. pilliraneum*, según se detalla en la parte experimental de esta Memoria, se aíslan siete metabolitos secundarios, descritos previamente en la bibliografía química. Estos fueron identificados como: 5,7-dihidroxi-4'-metoxi-flavanona<sup>2</sup> (**F-6**) y ácido 2-metil-2-(4-metil-3-pentenil)-2*H*-1-cromeno-6-carboxílico<sup>39</sup> (**B-13**), aislados de la fracción activa PP2 (CI<sub>50</sub> 10.0-16.0 µg/ml); mientras que aquellos cuyos datos espectroscópicos correspondieron a nerolidol<sup>4</sup> (**T-1**), esfatuleno<sup>14</sup> (**T-4**), óxido de cariofileno<sup>40</sup> (**T-5**), transfitol<sup>15</sup> (**T-6**) y β-sitosterol<sup>8</sup> (**T-8**) se aislaron de fracciones inactivas.



### Metabolitos aislados de *P. pilliraneum*

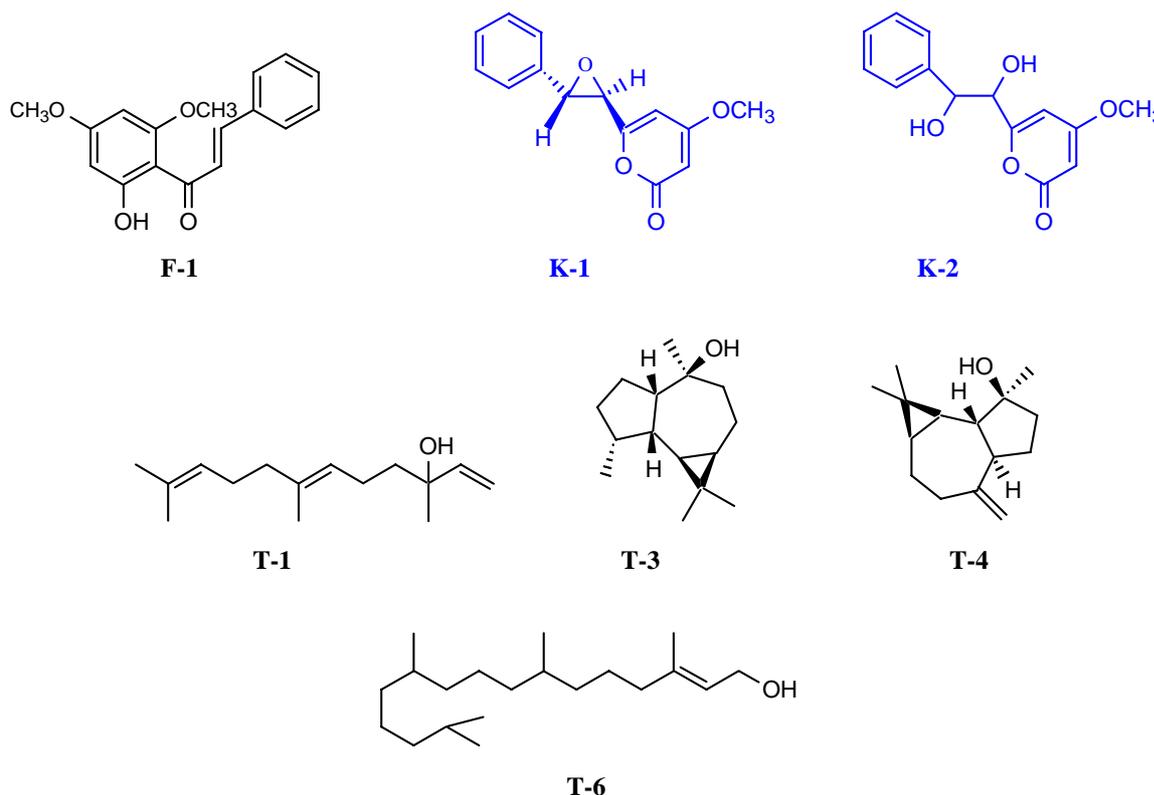
<sup>39</sup> Moreira, D. L.; Guimaraes, E. F.; Kaplan, M. C. C. *Phytochemistry*. **1998**, 49, 1339-1342.

<sup>40</sup> Torquillo, H. S.; Pinto, A. C.; Godoy, R. L. O.; Guimaraes, E. F. *J. Essential oil Research*. **1999**, 11, 429-430.

## ESTUDIO FITOQUIMICO DE PIPER RUSBYI

El extracto de diclorometano de las hojas de *P. rusbyi* y tras sucesivas cromatografías, como se detalla en la parte experimental, dio lugar al aislamiento de un total de siete metabolitos.

Así, de la fracción activa (PR2  $CI_{50}$  24.0-26.0 $\mu$ g/ml) se aíslan dos metabolitos, la flavokavaina B<sup>41</sup> (**F-1**), descrita previamente en la bibliografía química y que presentó una excelente actividad leishmanicida tanto en el modelo *in vitro* como *in vivo* y una kavalactona (**K-1**), que resultó ser nuevo en la bibliografía química. El estudio cromatográfico de las fracciones restantes dio lugar al aislamiento de cuatro metabolitos descritos previamente y cuyas estructuras fueron identificadas como: nerolidol<sup>6</sup> (**T-1**), viridiflorol<sup>40</sup> (**T-3**), esfatulenol<sup>14</sup> (**T-4**) y transfitol<sup>15</sup> (**T-6**), así como una nueva kavalactona. (**K-2**), cuya elucidación estructural describiremos en el apartado correspondiente a este grupo de compuestos.



### Metabolitos aislados de *P. rusbyi*

<sup>41</sup> Ranjith, H.; Dharmaratne, W.; Nanayakkara, N. P.; Ikhlas, A. K. *Phytochemistry*. **2002**, 59, 429-433.

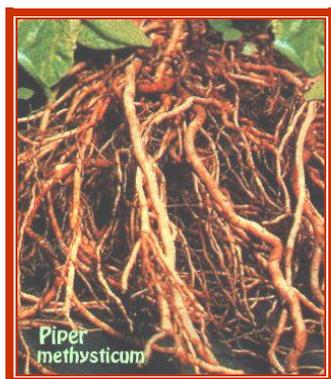
***5. METABOLITOS AISLADOS  
DE ESPECIES DEL GÉNERO PIPER:  
DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL***

*Kavalactonas*

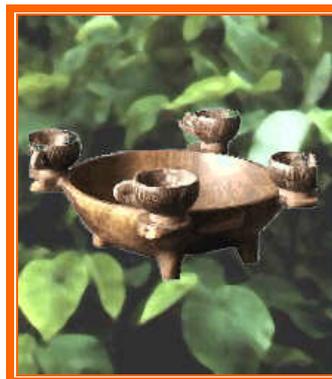
## KAVALACTONAS

### Introducción

Las kavalactonas son metabolitos secundarios presentes en las raíces y rizomas de *Piper methysticum*, Piperaceae, conocida comúnmente como “kava”.



Raíces de *P. methysticum*



Bebida ceremonial de kava

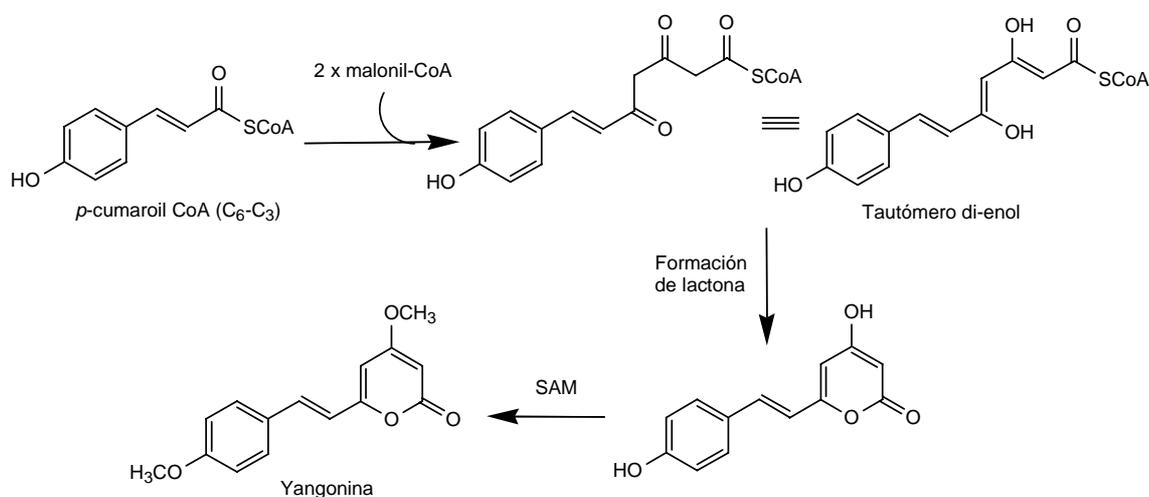
“Kava” es un arbusto que se encuentra en las Islas del Pacífico Sur, incluyendo la Polinesia, Melanesia y Micronesia. Las comunidades indígenas de estas regiones lo han utilizado durante cientos de años como bebida en ceremonias, por su acción relajante y tranquilizante<sup>1</sup>. Esta bebida es preparada con las raíces pulverizadas, sobre la cual se vierte agua o leche de coco, o bien las raíces se mastican una vez trituradas.

La planta de “kava” ha sido utilizada como remedio desde hace más de 3000 años y entre los usos tradicionales destaca su aplicación en el tratamiento de la gonorrea, sífilis, cistitis, asma, reumatismo, bronquitis, dolor de cabeza, dolor de estómago, infecciones urinarias y como relajante muscular. El “kava” ha sido adoptado como planta medicinal por los europeos después de que se descubriera en las islas del Pacífico Sur. A mediados del siglo XIX fue utilizado por los alemanes para el tratamiento de las enfermedades urinarias y la gonorrea y la primera preparación farmacéutica del mismo, como tintura para su uso como sedativo, data de 1920<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Lebot, V.; Merlin, M.; Lindstrom, L. *Kava-the Pacific Elixir: The definitive guide to its Ethnobotany, History and Chemistry*. 1997, Healing Art Press, Rochester.

<sup>2</sup> Folmer, F.; Blasius, R.; Morceau, F.; Taburdabu, J.; Dicato, M.; Jaspars, M.; Diederich, M. *Biochem. Pharmacol.* 2006, 71, 1206-1218.

El origen biogénico de las kavalactonas es mixto, al igual que el de los flavonoides; así, el anillo aromático y la cadena de dos átomos de carbono provienen de la ruta del ácido sikímico, mientras que el anillo de lactona procede de la ruta del acetato. La biosíntesis de las kavalactonas se inicia a partir de una unidad de *p*-cumaril-CoA (ruta del sikímico), el cual posteriormente se condensa con dos unidades de malonil-CoA, dando lugar a un policétido, a partir de la ciclación de cuyo tautómero di-enólico se origina el derivado lactónico y posterior reacción de metilación, da lugar a la **yangonina**<sup>3</sup>.

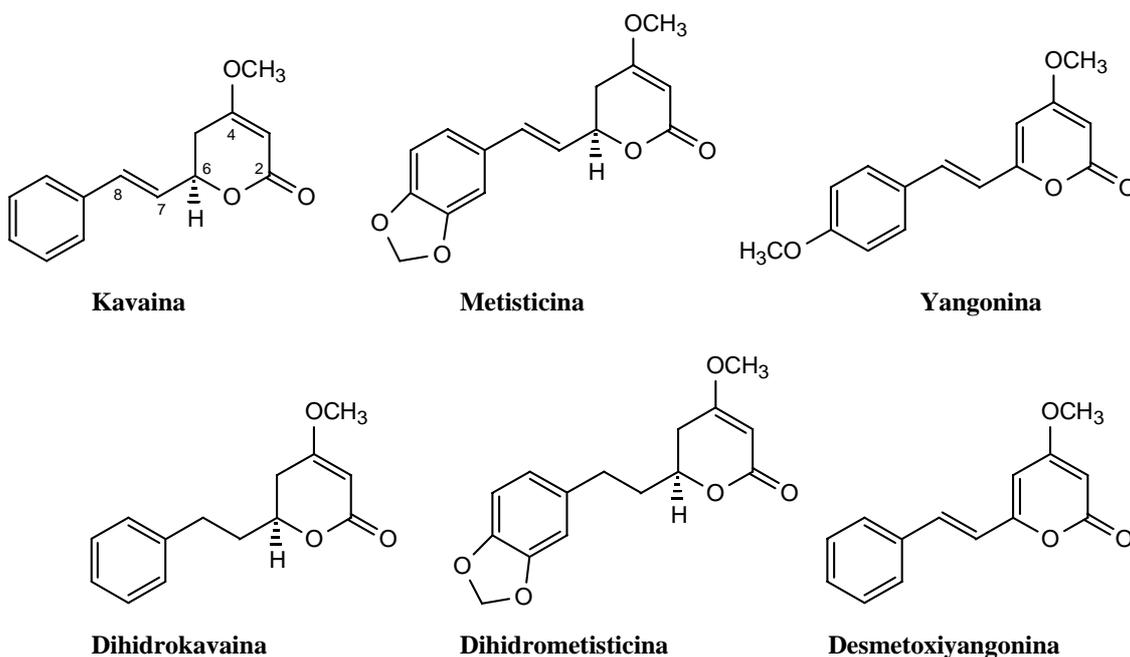


### Esquema biogénico de kavalactonas

Químicamente, las kavalactonas son una clase de  $\alpha$ -pironas y 5,6-dihidropironas, que poseen un anillo de benceno y una lactona metoxilada conectados por un puente de etilo o etileno, siendo la diferencia estructural entre distintas kavalactonas, el patrón de sustitución sobre el anillo de benceno y la presencia o ausencia de doble enlace en el puente. Se han descrito, hasta la fecha, diecinueve kavalactonas, de las cuales seis son fundamentales para el reconocimiento de la especie de *P. methysticum* con fines medicinales: kavaina, metisticina, yangonina, dihidrokavaina, dihidrometisticina y desmetoxyyangonina<sup>4</sup>.

<sup>3</sup> Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*. 2002, John Wiley and Sons, Ltda., U.K., 147-148

<sup>4</sup> Ranjith, H.; Dharmarantne, W.; Nanayakara N.P.; Ihhlas, A. P. *Phytochemistry*. 2002, 59, 429-433.



### Kavalactonas con actividad biológica

Todas las kavalactonas poseen cualitativamente la misma acción farmacológica, pero con diferente intensidad. Estas diferencias son debidas al grado de saturación de los enlaces en los carbonos C5-C6 y C7-C8, así como a los sustituyentes sobre el anillo aromático.

Estudios realizados en modelos animales han confirmado que el “kava” tiene un amplio espectro de propiedades terapéuticas como son: anestésico, sedativo, ansiolítico, analgésico, anticonvulsivante y antiespasmódico<sup>5</sup>.

Los metabolitos responsables de la actividad ansiolítica son la kavaina y la dihidrokavaina, que presentan una acción rápida pero de corta duración, así como la metisticina y la dihidrometisticina actúan más lentamente pero de forma prolongada<sup>6</sup>.

Por otra parte, la dihidrometisticina y la dihidrokavaina son los metabolitos responsables de la acción relajante muscular, con una eficacia superior a la de las sustancias habitualmente

<sup>5</sup> Singh, Y. N.; Singhn, N. N. *CNS Drugs*. **2002**, 16, 731-743.

<sup>6</sup> Pittler, M. H.; Ernest, E. J. *Clin. Psychopharm.* **2000**, 20, 84.

prescritas, como las benzodiazepinas<sup>7</sup>. Estas dos lactonas tienen una acción similar a la de la papaverina sobre el músculo liso e inhiben las convulsiones provocadas por la estricnina. Ensayos clínicos han puesto de manifiesto su efecto analgésico a una dosis de 120 mg/kg, dosis que es la mitad de la dosis de aspirina (200 mg/kg) necesaria para obtener el mismo efecto. La acción anestésica superficial debida a la dihidrokavaina, es de intensidad y duración idéntica a la de la cocaína; sin embargo, comparación de la actividad anestésica local de una mezcla natural de kavalactonas con la de la lidocaína al 5%, muestra que las kavalactonas a concentración idéntica, son de igual intensidad pero de duración más prolongada. Por otra parte, estudios recientes han descrito la actividad anticancerígena de la *cis*-yangonina sobre líneas celulares de leucemia y cáncer de ovario<sup>8</sup>.

A pesar de la gran cantidad de mezclas de kavalactonas disponibles del extracto crudo de “kava”, no se han obtenido kavalactonas enantioméricamente puras en grandes cantidades. De igual manera existen numerosas síntesis racémicas de kavalactonas, pero pocas son las síntesis asimétricas que se han desarrollado. Recientemente, se completó la síntesis enantioselectiva de la (+)-kavaina<sup>9</sup>. Sin embargo, a pesar del desarrollo de la síntesis de la kavaina y la metisticina<sup>10</sup>, la administración de estas sustancias es menos eficaz que la de los extractos naturales. Ello podría explicarse dado que como la mayoría de las plantas medicinales, “kava” contiene no un principio activo sino una mezcla compleja de estructuras relacionadas pero de intensidad de acción muy distinta. Así, existe más de un efecto sinérgico de las kavalactonas y de ahí que el extracto utilizado en su integridad da mejores resultados que los productos aislados.

---

<sup>7</sup> Wu, D.; Yu, L.; Nair, M. G.; DeWitt, D. L.; Ramsewak, R. S. *Phytomedicine*. **2002**, 9, 41-47

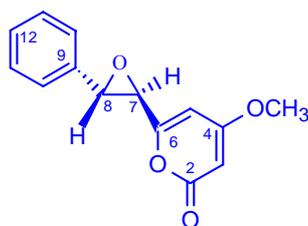
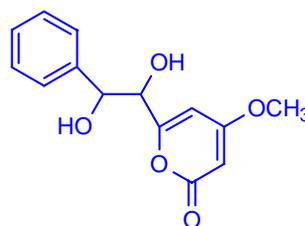
<sup>8</sup> Tabudravu, J. N.; Jaspars, M. *The South Pacific Journal of Natural Science*. **2005**, 23, 26-29.

<sup>9</sup> Smith, T. E.; Djang, M.; Velander, A. J.; Downey, W.; Carroll, K. A.; Van Alphen, S. *Org. Lett.* **2004**, 6, 2317-2320.

<sup>10</sup>Kamal, A.; Krishnaji, T.; Ramesh Kanna, G. B. *Tetrahedron Let.* **2006**, 47, 8657-8660.

## Resultados y discusión

Tras repetidas cromatografías del extracto de diclorometano de las hojas de *P. rusbyi*, se aíslan dos kavalactonas, que resultaron ser nuevas en la bibliografía química y que hemos denominado **K-1** y **K-2**.

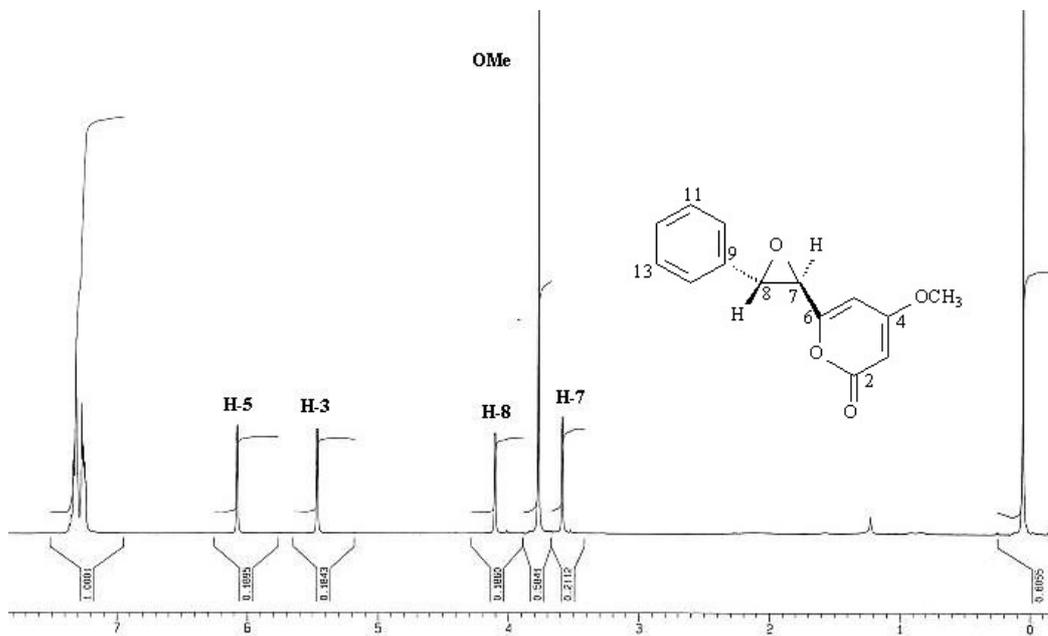
**K-1****K-2**

A continuación pasamos a describir la elucidación estructural de estos nuevos metabolitos aislados.

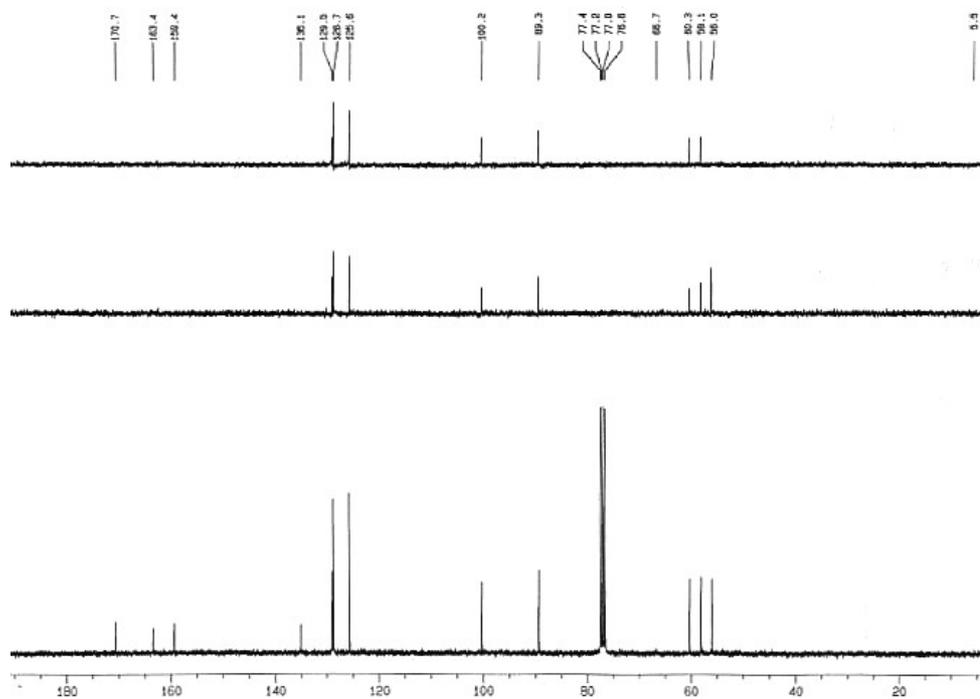
### Determinación estructural del producto K-1

El producto denominado **K-1** presentó en su espectro de masas un ión molecular a 244  $m/z$ , correspondiente a una fórmula molecular  $C_{14}H_{12}O_4$ , obtenida por espectrometría de masas de alta resolución, lo que indica que nuestro producto presenta nueve grados de insaturación. En el espectro de IR se observaron bandas de absorción características de un éster ( $1727\text{ cm}^{-1}$ ) y un anillo aromático ( $2962, 1653, 822, 759, 698\text{ cm}^{-1}$ ).

En su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se observaron dos dobletes a  $\delta$  3.58 (1H,  $J= 1.5\text{ Hz}$ , H-7) y  $\delta$  4.10 (1H,  $J= 1.5\text{ Hz}$ , H-8), asignables a protones oximetínicos; señal para un metoxilo a  $\delta$  3.78 (3H, s); dos dobletes a  $\delta$  5.46 (1H,  $J= 2.1\text{ Hz}$ , H-3) y  $\delta$  6.07 (1H,  $J= 2.1\text{ Hz}$ , H-5), correspondientes a dos protones vinílicos y en la región de aromáticos se observó un multiplete entre  $\delta$  7.24 y 7.31 que integra para cinco protones, evidenciando la presencia de un anillo aromático monosustituido.



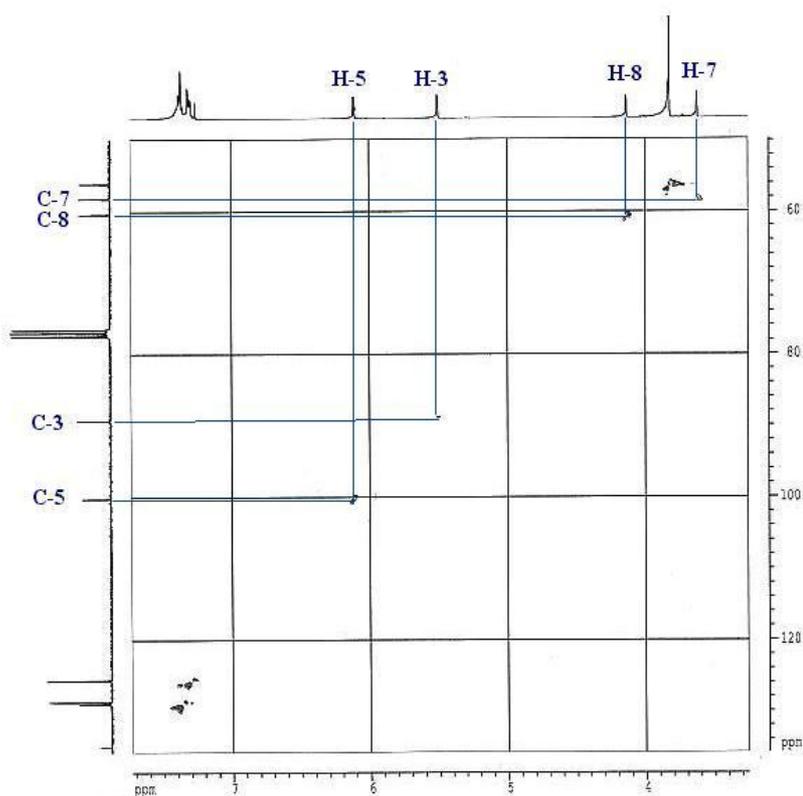
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **K-1**



Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) de **K-1**

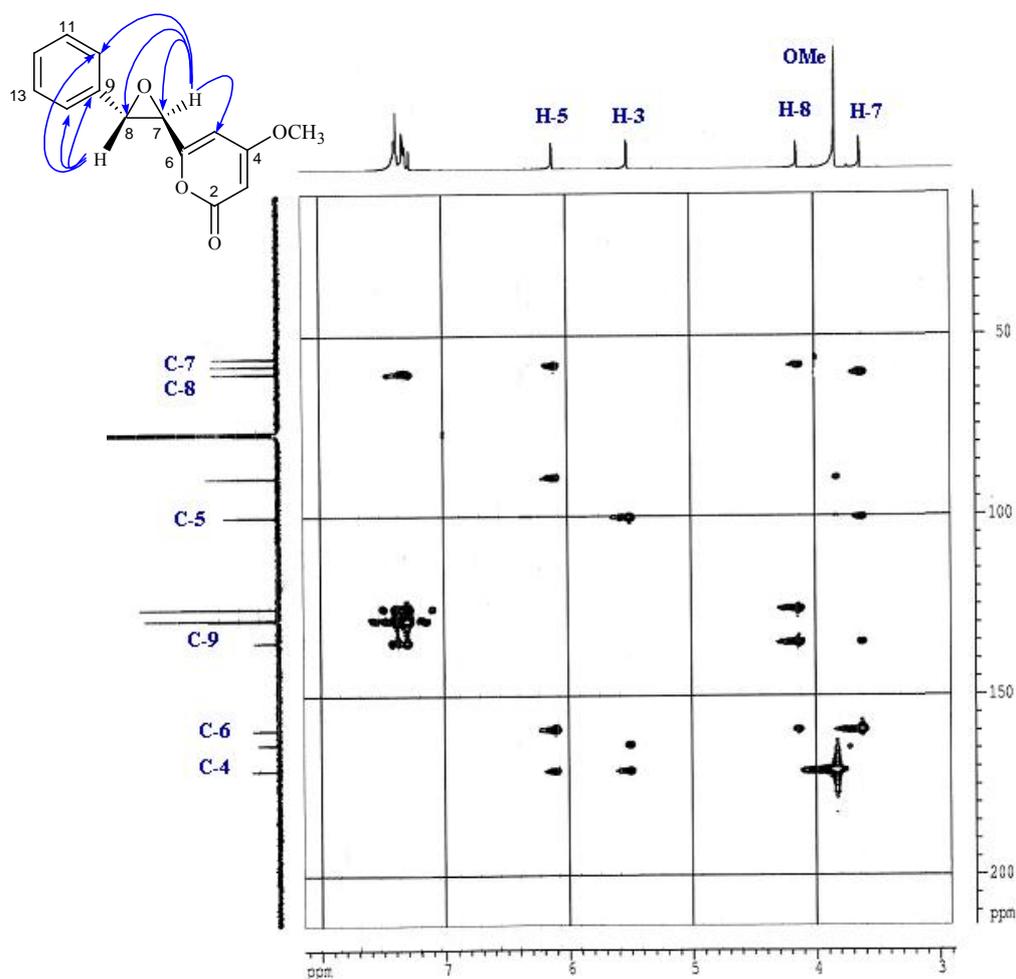
Estos datos fueron confirmados en su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , que presentó señales para 14 átomos de carbonos, lo que junto con los experimentos DEPT 90 y 135 indicaron la presencia de un metilo, nueve carbonos metínicos y cuatro carbonos cuaternarios, destacando las señales a  $\delta$  58.1 y 60.3, que corresponden a carbonos unidos a oxígeno, asignables a los carbonos C-7 y C-8, respectivamente; señales para un anillo de piranona, con carbonos a  $\delta$  163.4 (C-2),  $\delta$  89.3 (C-3),  $\delta$  170.7 (C-4),  $\delta$  100.2 (C-5) y  $\delta$  159.4 (C-6); correspondiendo el resto de las señales a carbonos aromáticos (125.6, 2xd), (128.7, 2xd), (129.0, d) y (135.1, s). Estos datos indican que el producto **K-1** presenta en su estructura un anillo aromático, un oxirano y una piranona.

Un cuidadoso estudio de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y de los experimentos bidimensionales  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC), nos permitieron la asignación de las señales correspondientes a los protones existentes en la molécula y además correlacionar cada átomo de carbono con sus respectivos protones.



Experimento HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **K-1**

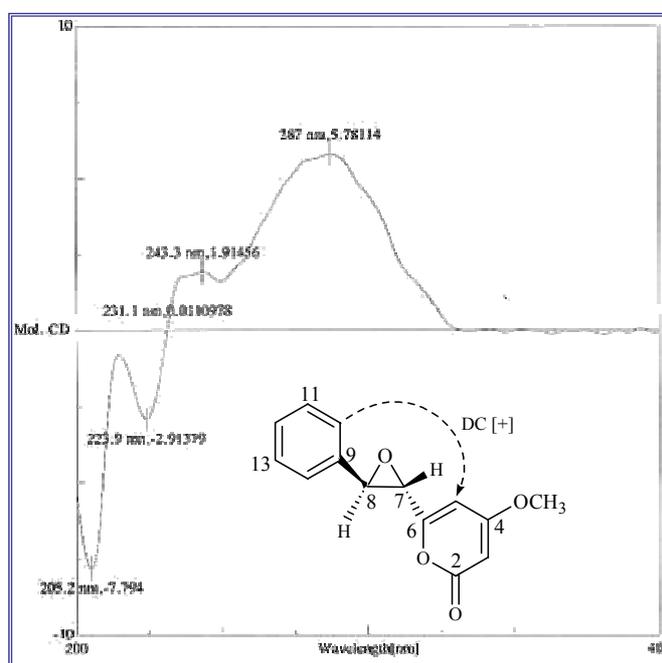
La localización de los grupos funcionales y los distintos carbonos cuaternarios presentes en la molécula se determinó mediante un experimento HMBC, donde se observó correlación del protón H-7 a  $\delta$  3.58 con los carbonos C-5 ( $\delta$  100.2), C-6 ( $\delta$  159.4), C-8 ( $\delta$  60.3) y C-9 ( $\delta$  135.1), y correlación entre la señal a  $\delta$  4.10 asignada a H-8 y los carbonos C-7 ( $\delta$  58.1), C-9 ( $\delta$  135.1), C-10 ( $\delta$  125.6) y C-14 ( $\delta$  125.6), estableciéndose la posición del grupo oxirano sobre C-7 y C-8. Correlación a tres enlaces de los protones del grupo metoxilo a  $\delta$  3.78 con el carbono cuaternario C-4 ( $\delta$  170.7), determinó la posición de dicho grupo.



Experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **K-1**

La estereoquímica relativa del epóxido sobre los carbonos C-7 y C-8 se estableció basándonos en la constante de acoplamiento ( $J= 1.5$  Hz), que nos indicó una relación *trans* entre H-7 y H-8. La configuración absoluta de **K-1** se estableció mediante el estudio de la curva de

dicroísmo circular (DC), haciendo uso del método de la quiralidad del benzoato, una extensión del método de excitón quiralidad<sup>11</sup>. El ángulo diedro entre los dos cromóforos se determinó mediante el programa de mecánica molecular (PC Model 7.0)<sup>12</sup>, usando los valores de la constante de acoplamiento  $J_{7,8}$ , lo que predijo un ángulo de aproximadamente 150°. El espectro de DC mostró una curva bisignada con un primer efecto Cotton positivo a 243.3 nm ( $\Delta\epsilon = +1.9$ ), debido al acoplamiento de los grupos cromóforos y un segundo efecto negativo a 205.3 nm ( $\Delta\epsilon = -7.8$ ), lo que unido a los datos descritos en la bibliografía química nos permitieron establecer la configuración absoluta de nuestro producto **K-1**<sup>13</sup>.



Espectro de dicroísmo circular de **K-1**

Estos datos y comparación con los descritos en la bibliografía química para yangonina, aislado de *P. methysticum*<sup>4</sup>, nos permitieron establecer la estructura y configuración absoluta de **K-1** como **7R,8S-epoxi-5,6-didehidrokavaina**, que dado su correlación química con yangonina<sup>4</sup>, hemos denominado **7R, 8S-epoxi-desmetoxyyangonina**.

<sup>11</sup> Harada, H.; Nakanishi K. *Dichroism Spectroscopy: Exciton coupling in organic stereochemistry*. **1983**, University Science Books, Mill Valley.

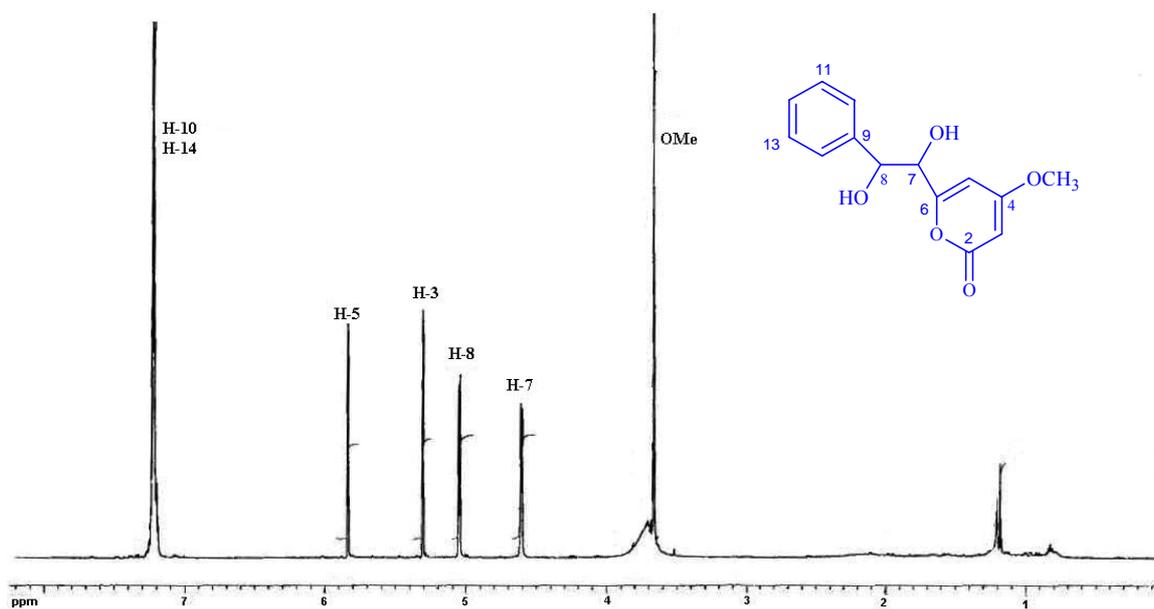
<sup>12</sup> PC Model from Serena Software, P. O. Box 3076, Bloomington, IN 47402-3076.

<sup>13</sup> Gottarelli, G.; Samori, B. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*. **1972**, 1998-2001

## Determinación estructural del producto K-2

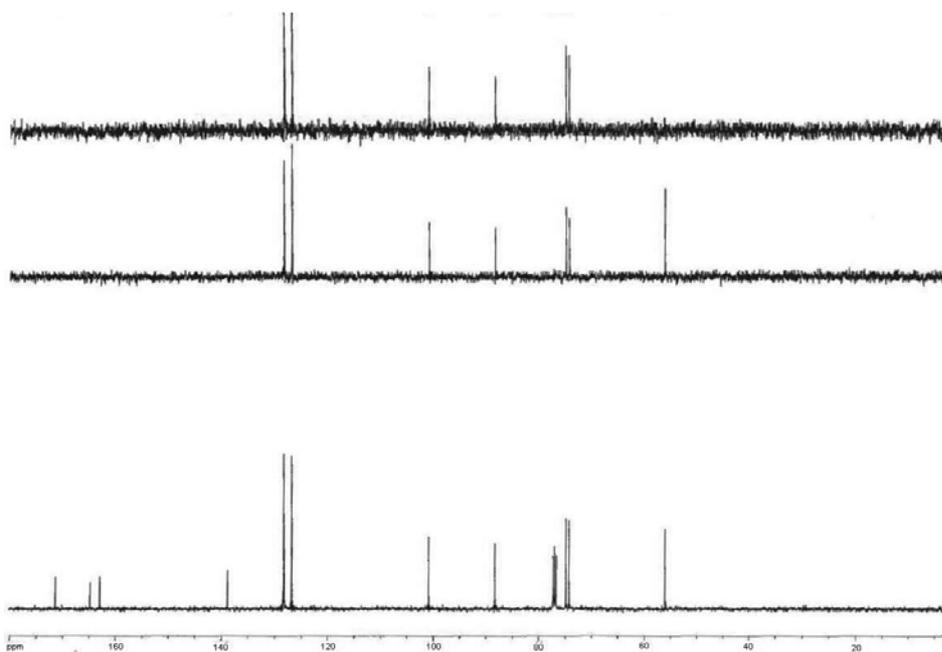
El producto denominado **K-2** presentó en su espectro de masas un ión molecular a 263  $m/z$  [ $M^+ + 1$ ], correspondiente a una fórmula molecular  $C_{14}H_{15}O_5$ , calculada por espectrometría de masas de alta resolución, lo que indicó que el producto presenta ocho grados de insaturación. En el espectro de IR se observaron bandas de absorción características de grupo hidroxilo ( $3389\text{ cm}^{-1}$ ), éster ( $1693\text{ cm}^{-1}$ ) y anillo aromático ( $1648, 755, 702\text{ cm}^{-1}$ ).

En su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se observaron dos dobletes a  $\delta$  4.64 (1H,  $J= 5.0\text{ Hz}$ , H-7) y  $\delta$  5.08 (1H,  $J= 5.0\text{ Hz}$ , H-8), asignables a protones oximetínicos; un singlete a  $\delta$  3.70 (3H, OMe), característico de un grupo metoxilo; dos dobletes a  $\delta$  5.34 (1H,  $J= 1.8\text{ Hz}$ , H-3) y  $\delta$  5.87 (1H,  $J=1.8\text{ Hz}$ , H-5), correspondientes a dos protones vinílicos y en la región aromática se observó un multiplete entre  $\delta$  7.24-7.31, que integra para cinco protones, lo que indica la presencia de un anillo aromático monosustituido.



Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de **K-2**

Estos datos fueron confirmados en su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , que presentó señales para 14 átomos de carbonos, lo que junto con los experimentos DEPT 90 y DEPT 135, indicaron la presencia de un grupo metoxilo, nueve carbonos metínicos y cuatro carbonos cuaternarios, destacando las señales a  $\delta$  74.1 y 74.9, correspondientes a carbonos unidos a oxígeno, asignables a los carbonos C-7 y C-8, respectivamente; señales para un anillo de piranona, con carbonos a  $\delta$  164.7 (s, C-2), 88.2 (d, C-3), 171.3 (s, C-4), 100.8 (d, C-5) y 162.9 (s, C-6) y señales correspondientes a carbonos aromáticos a  $\delta$  126.7 (2xd, C-10, C-14), 128.0 (d, C-12), 128.2 (2xd, C-11, C-13) y 138.7 (s, C-9). Estos datos indican que el producto **K-2** es una kavalactona, con un anillo aromático, dos alcoholes secundarios y una piranona.

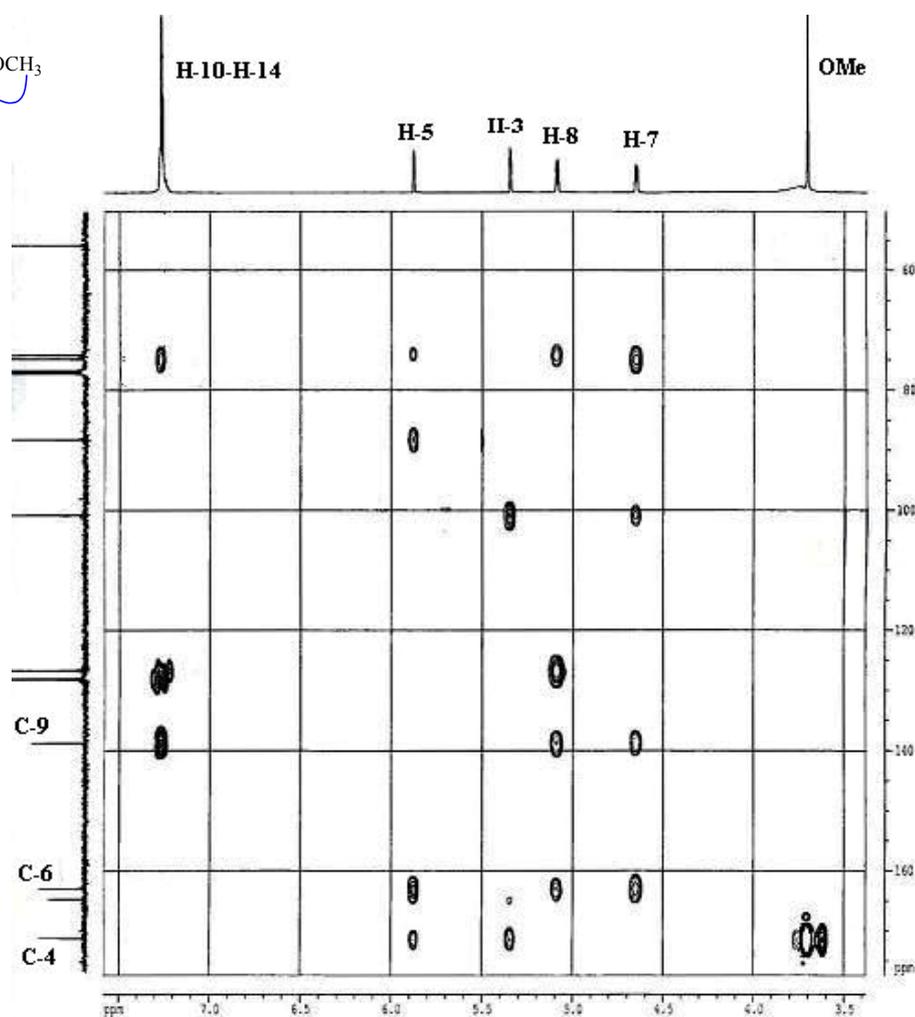
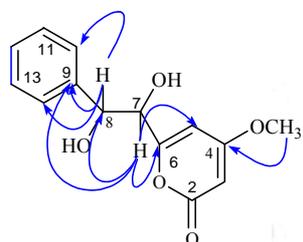


Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de **K-2**

Un cuidadoso estudio de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y de los experimentos bidimensionales  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC), permitieron la asignación de las señales correspondientes a los protones existentes en la molécula y además correlacionar cada átomo de carbono con sus respectivos protones. Así, el experimento COSY confirmó la presencia de un sistema AX en el puente etilo entre ambos anillos, formado por un sistema de alcoholes vecinales, correspondientes a H-7 y H-8.

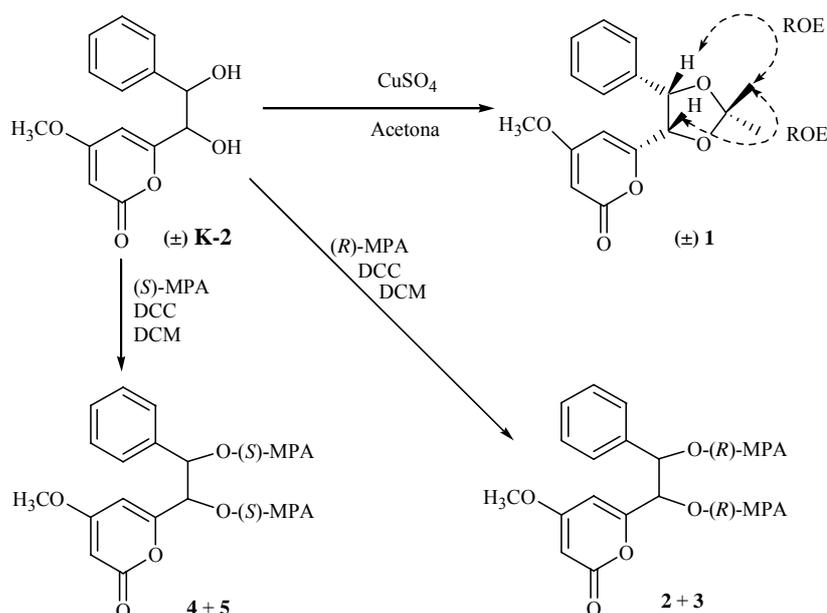
La localización de los grupos funcionales y los carbonos cuaternarios presentes en la molécula se determinó mediante un experimento HMBC, donde se observaron como correlaciones más significativas las existentes entre el protón H-7 a  $\delta$  4.64 y los carbonos C-5 ( $\delta$  100.8), C-6 ( $\delta$  162.9), C-8 ( $\delta$  74.9) y C-9 ( $\delta$  138.7), correlación entre la señal asignada a H-8 a  $\delta$  5.08 y los carbonos C-9, C-10 ( $\delta$  126.7) y C-14 ( $\delta$  126.7) y la correlación a tres enlaces de los protones del grupo metoxilo  $\delta$  3.70 con el carbono cuaternario C-4 ( $\delta$  171.3).

Estos datos nos permitieron establecer de la estructura de **K-2** como **7,8-dihidroxi-5,6-didehidrokavaina**, siendo la primera vez que se describe la presencia de un diol en este tipo de esqueleto.



Experimento HMBC (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C) de **K-2**

La configuración relativa de **K-2** se determinó mediante el análisis de la constante de acoplamiento entre H-7 y H-8 ( $J= 5.0$  Hz) y un experimento ROESY del derivado acetónido **1**, preparado según se indica en el siguiente esquema y se detalla en la parte experimental. Así, en el experimento ROESY del compuesto **1** se observó efecto ROE entre uno de los metilos del cetal con los protones H-7 y H-8, lo que sólo es compatible con una relación *cis* vecinal entre los grupos hidroxilos situados sobre C-7 y C-8.



**MPA:** ácido 2-fenil-2-metoxi-acético, **DCC:** 1,3-diciclohexil-carbodiimida, **DCM:** diclorometano

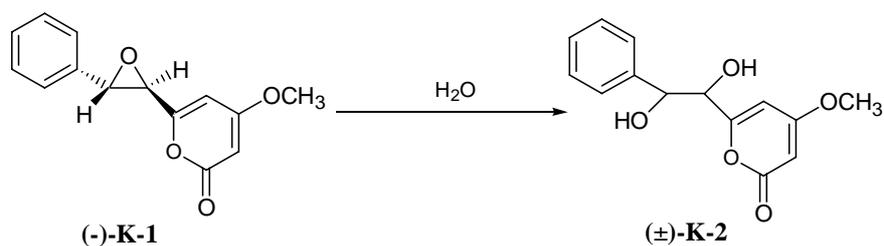
### Esquema de reacción de derivados de **K-2**

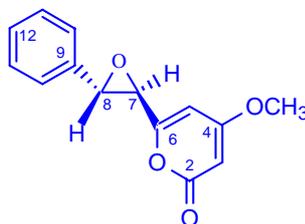
Con la finalidad de determinar la configuración absoluta de los alcoholes secundarios sobre C-7 y C-8 de **K-2**, aplicamos el método de Riguera<sup>14</sup>, una variación del método de Mosher, basada en el uso del ácido 2-fenil-2-metoxi-acético (MPA) como reactivo. Para aplicar esta metodología se requiere la preparación de los ésteres derivados del (S) o (R)-MPA, asignándose la configuración absoluta mediante el estudio y comparación de los desplazamientos químicos de los distintos ésteres derivados en sus espectros de RMN <sup>1</sup>H. Siguiendo este procedimiento esterificamos **K-2** con el ácido (S) o (R) MPA, usando como condiciones de reacción las que se detallan en el esquema, obteniéndose dos productos en cada una de las reacciones de

<sup>14</sup> Seco, J. M.; Riguera, R. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 17-117.

esterificación. Los derivados **2-5** fueron aislados y caracterizados basándonos en sus datos espectroscópicos (ver parte experimental).

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que el compuesto **K-2** es una mezcla racémica de (7*R*,8*R*/7*S*,8*S*)-7,8-dihidroxi-5,6-didehidrokavaina. Este compuesto podría formarse por el ataque nucleofílico no regioselectivo de una molécula de agua al grupo epóxido de la kavalactona **K-1**, descrita anteriormente y aislada así mismo de *Piper rusbyi*.



**DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS****Producto K-1: 7R,8S-Epoxi-desmetoxyiangonina**

Sólido cristalino (cristalizado en AcOEt, 1.2 g).

**Pf:** 99-100 °C.

**$[\alpha]_D^{20}$ :** +133.5 (*c* 1.52, CHCl<sub>3</sub>).

**UV  $\lambda_{\max}$  (EtOH):** 288 nm.

**DC  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>CN) nm** 243.3 ( $\Delta\epsilon = +1.9$ ); 231.1 ( $\Delta\epsilon = 0$ ); 205.3 ( $\Delta\epsilon = -7.8$ ).

**IR  $\nu_{\max}$  (película):** 2926, 1727, 1653, 1568, 1256, 1032, 822, 759, 698 cm<sup>-1</sup>.

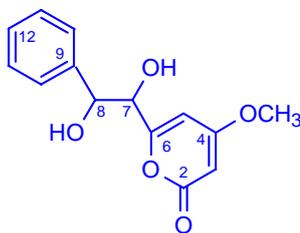
**RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>):** 3.58 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-7); 3.78 (3H, s, OMe); 4.10 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-8); 5.46 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-3); 6.07 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5); 7.24-7.31 (5H, m).

**RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>):** 56.0 (*c*, OCH<sub>3</sub>); 58.1 (*d*, C-7); 60.3 (*d*, C-8); 89.3 (*d*, C-3); 100.2 (*d*, C-5); 125.6 (2*xd*, C-10, C-14); 128.7 (2*xd*, C-11, C-13); 129.0 (*d*, C-12); 135.1 (*s*, C-9); 159.4 (*s*, C-6); 163.4 (*s*, C-2); 170.7 (*s*, C-4).

**EM *m/z* (%):** 244 [M]<sup>+</sup> (34), 228 (20), 187 (47), 138 (100), 125 (67).

**EM de alta resolución:** Calculado para C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>, 244.07356; observado, 244.07077.

**Producto K-2: (7R,8R/7S,8S)-Dihidroxi-5,6-didehidrokavaina**



Sólido amorfo (117mg).

**Pf:** 74-76 °C.

**$[\alpha]_D^{20}$ :** -5.6° (c 1.12, CHCl<sub>3</sub>).

**UV  $\lambda_{max}$  (EtOH):** 282 nm.

**IR  $\nu_{max}$  (película):** 3389, 2924, 2853, 1693, 1648, 1566, 1456, 1248, 816, 755, 702 cm<sup>-1</sup>.

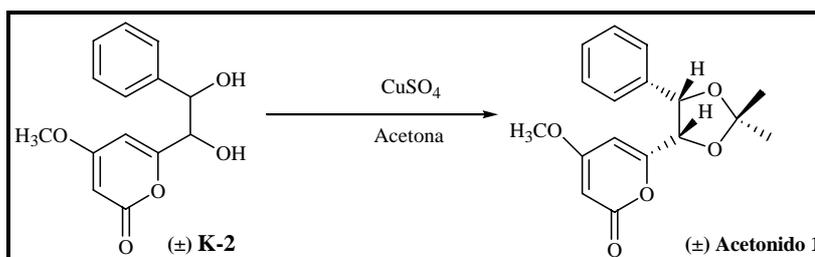
**RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>):** 3.70 (3H, s, OMe); 4.64 (1H, d, *J*= 5.0 Hz, H-7); 5.08 (1H, d, *J*= 5.0 Hz, H-8); 5.34 (1H, d, *J*= 1.8 Hz, H-3); 5.87 (1H, d, *J*= 1.8 Hz, H-5); 7.24-7.31 (5H, m).

**RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>):** 56.0 (c, OCH<sub>3</sub>); 74.1 (d, C-7); 74.9 (d, C-8); 88.2 (d, C-3); 100.8 (d, C-5); 126.7 (2xd, C-10, C-14); 128.0 (d, C-12); 128.2 (2xd, C-11, C-13); 138.7 (s, C-9); 162.9 (s, C-6); 164.7 (s, C-2); 171.3 (s, C-4).

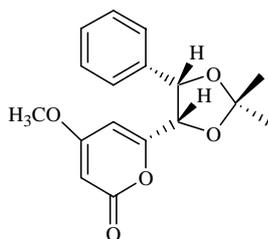
**EM *m/z* (%):** 263 [M<sup>+</sup> +1] (1), 244 (1), 228 (1), 200 (1), 156 (100), 125 (9), 107 (10), 79 (16).

**EM de alta resolución:** Calculado para C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>O<sub>5</sub> [M<sup>+</sup> +1], 263.0920; observado, 263.0908.

**Preparación del acetónido 1.** Una solución de **K-2** (8 mg) y sulfato cúprico anhidro (70 mg) se calentó a reflujo en acetona bajo atmósfera de argón durante 2 horas y posteriormente, el disolvente fue eliminado en el rotavapor. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía preparativa, usando como fase móvil *n*-hexane:EtOAc (7:3), obteniéndose el derivado **1**.



**Derivado 1: 7,8-Acetonido-5,6-didehidrokavaina**



Obtenido como un aceite (7.5 mg, rendimiento 81%).

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-1.2^\circ$  (*c* 0.75, CHCl<sub>3</sub>).

**IR**  $\nu_{\max}$  (película): 2962, 2925, 1731, 1653, 1571, 1257, 1082, 1032, 866, 800, 752, 702 cm<sup>-1</sup>.

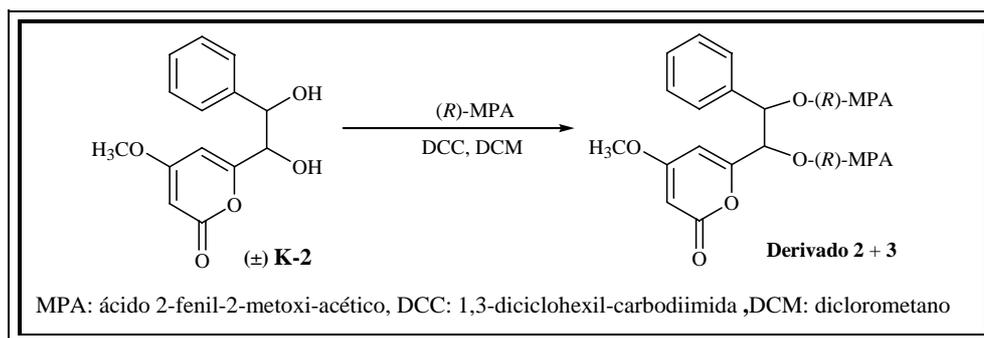
**RMN** <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.54 (3H, s); 1.76 (3H, s); 3.69 (3H, s, OMe); 5.03 (1H, d, *J*= 7.5 Hz, H-7); 5.11 (1H, d, *J*= 7.5 Hz, H-8); 5.52 (1H, d, *J*= 2.1 Hz, H-3); 5.97 (1H, d, *J*= 2.1 Hz, H-5); 7.16-7.32 (5H, m).

**RMN** <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 24.4 (c); 26.6 (c); 55.7 (c, OCH<sub>3</sub>); 77.2 (d, C-7); 77.6 (d, C-8); 87.7 (d, C-3); 100.2 (d, C-5); 110.3 (s); 126.6 (2xd, C-10, C-14); 128.0 (d, C-12); 128.4 (2xd, C-11, C-13); 135.1 (s, C-9); 161.5 (s, C-6); 163.2 (s, C-2); 170.4 (s, C-4).

**EM** *m/z* (%): 302 [M<sup>+</sup>] (1), 287 (22), 245 (11), 196 (77), 138 (100), 125 (23), 110 (14).

**EM de alta resolución:** Calculado para C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>, 302.1154; observado, 302.1167.

**Preparación de los ésteres 2 y 3.** Una solución de (*R*)-MPA (8 mg), el compuesto **K-2** (6 mg), 1,3-diciclohexil-carbodiimida (10 mg) y 4-dimetilaminopiridina (3 mg) en diclorometano seco, se dejó agitando a temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez eliminado el disolvente se obtuvo un crudo de reacción, que fue purificado por cromatografía preparativa, utilizando como eluyente *n*-hexane:EtOAc (6:4), obteniéndose los derivados **2** y **3**.



### Esquema de reacción de los derivados 2 y 3

#### Derivado 2: (-)-(7,8)-Di-[(*R*)- $\alpha$ -metoxi- $\alpha$ -fenilacetato]-5,6-didehidrokavaina

Obtenido como un aceite (5 mg, rendimiento 39%).

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-39.0^\circ$  (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>).

IR  $\nu_{\max}$ (película): 2929, 2853, 1737, 1658, 1573, 1256, 1108, 804, 751, 702 cm<sup>-1</sup>.

RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 3.20 (3H, s); 3.26 (3H, s); 3.69 (3H, s, OMe); 5.31 (1H, d, *J*= 2.1 Hz, H-3); 5.67 (1H, d, *J*= 2.1 Hz, H-5); 5.68 (1H, d, *J*= 7.0 Hz, H-7); 6.00 (1H, d, *J*= 7.0 Hz, H-8); 6.71-7.32 (15H, m).

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>) 57.3 (c); 57.5 (c); 60.3 (c, OCH<sub>3</sub>); 72.7 (d), 73.9 (d), 82.2 (d, C-7); 82.3 (d, C-8); 89.5 (d, C-3); 102.5 (d, C-5); 126.6 (2xd, C-10, C-14); 127.0 (2xd); 127.2 (2xd); 128.1 (2xd, C-11, C-13); 128.5 (2xd); 128.7 (2xd); 128.8 (2xd); 128.9 (d, C-12); 134.0 (s, C-9); 135.1 (s); 135.5 (s); 157.2 (s, C-6); 162.9 (s, C-2); 168.6 (s); 168.9 (s); 169.9 (s, C-4).

EM *m/z* (%): 558 [M<sup>+</sup>] (1), 424 (2), 393 (1), 349 (1), 333 (11), 228 (9), 121 (100).

**EM de alta resolución:** Calculado para C<sub>32</sub>H<sub>30</sub>O<sub>9</sub>, 558.1890; observado, 558.1829

**Derivado 3: (+)-(7,8)-Di-[(R)- $\alpha$ -metoxi- $\alpha$ -fenilacetato]- 5,6-didehidrokavaina**

Obtenido como un aceite (3.6 mg, rendimiento 28 %).

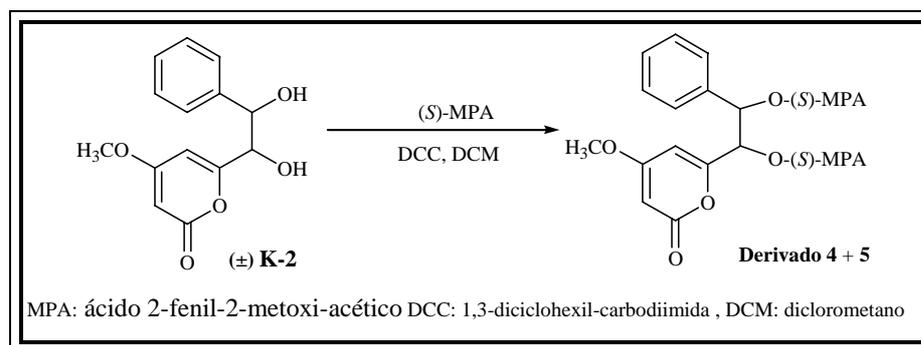
$[\alpha]_D^{20}$ : +19.4 (c 0.36, CHCl<sub>3</sub>).

**RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>):** 3.16 (3H, s); 3.24 (3H, s); 3.60 (3H, s, OMe); 5.11 (1H, d, *J*= 2.2 Hz, H-5); 5.14 (1H, d, *J*= 2.2 Hz, H-3); 5.59 (1H, d, *J*= 7.1 Hz, H-7); 6.10 (1H, d, *J*= 7.1 Hz, H-8); 7.10-7.31 (15H, m).

**RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>):** 55.8 (c, OCH<sub>3</sub>); 57.3 (c); 57.4 (c); 72.5 (d); 73.8 (d); 82.0 (d, C-7); 82.3 (d, C-8); 89.4 (d, C-3); 102.2 (d, C-5); 127.0 (2xd, C-10, C-14); 127.2 (2xd); 127.4 (2xd); 128.5 (2xd, C-11, C-13); 128.6 (2xd); 128.7 (2xd); 128.8 (2xd); 129.1 (d, C-12); 134.6 (s, C-9); 135.2 (s); 135.6 (s); 156.7 (s, C-6); 162.6 (s, C-2), 168.7 (2xs), 169.6 (s, C-4).

Los datos de IR, EM son idénticos a los del compuesto 2.

**Preparación de los ésteres 4 y 5.** Una solución de **K-2** (6 mg) fue tratado con (*S*)-MPA bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para la preparación de los derivados **2** y **3**, obteniéndose los derivados **4** (3 mg) y **5** (4.7 mg).



**Esquema de preparación de los derivados 4 y 5**

**Derivado 4: (+)-(7,8)-Di-[(S)- $\alpha$ -metoxi- $\alpha$ -fenilacetato]- 5,6-didehidrokavaina**

Obtenido como un aceite (3 mg, rendimiento 23%).

$[\alpha]_D^{20}$  : + 43.3° (c 0.3, CHCl<sub>3</sub>).

Los datos espectroscópicos y espectrométricos son idénticos a los dados para el compuesto **2**.

**Derivado 5: (-)-(7,8)-di-[(S)- $\alpha$ -metoxi- $\alpha$ -fenilacetato]- 5,6-didehidrokavaina**

Obtenido como un aceite (4.7 mg, rendimiento 37%)

$[\alpha]_D^{20}$  : -26.3° (c 0.47, CHCl<sub>3</sub>)

Los datos espectroscópicos y espectrométricos son idénticos a los dados para el compuesto **3**.

*Flavonoides*

## FLAVONOIDES

### Introducción

Los flavonoides constituyen uno de los grupos más comunes, ampliamente distribuidos y característicos de metabolitos secundarios de las plantas. Estos compuestos, más que ningún otro, contribuyen al color de las flores y frutos en la naturaleza. Los flavonoles (del latín *flavus*: amarillo) dan color amarillo o naranja, mientras las antocianinas proporcionan el color rojo, azul o violeta, es decir todos los colores del arco iris salvo el verde. Este tipo de heterociclos con oxígeno, que son los flavonoides, está restringido a las plantas superiores y los helechos<sup>1</sup>.



**Los flavonoides: responsables del color de las flores**

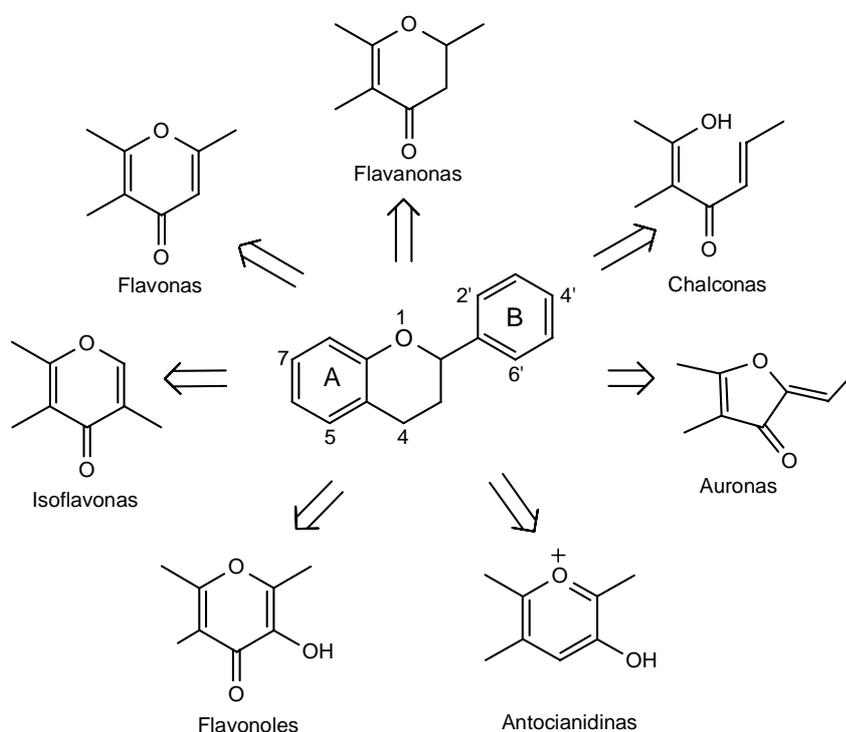
Biológicamente, los flavonoides desempeñan un papel importante en la polinización y alimentación de los insectos en las plantas; algunos tienen un sabor amargo que repele a ciertas orugas e impide que se coman las hojas de las especies que los contienen. Por otra parte, el hombre consume cantidades considerables de flavonoides en la dieta vegetal, lo cual se considera beneficioso para la salud humana, dada sus propiedades antioxidantes, protegiendo contra enfermedades vasculares y algunos tipos de cáncer<sup>2</sup>.

La estructura química de los flavonoides está basada en un esqueleto carbonado C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, compuesto por dos anillos aromáticos (A y B) hidroxilados, unidos por un fragmento de tres carbonos. A menudo uno de los grupos hidroxilos está unido a un azúcar, formando un glicósido. Los dos anillos tienen diferente origen biosintético: el anillo A proviene de la ruta del acetato y el B del ácido sikímico.

<sup>1</sup> Samuelsson, G. *Drugs of Natural Origin*. 1999, Sweeden Pharmaceutical Press, Stockolm, Sweden, 226-227.

<sup>2</sup> Formica, J. V.; Regelson, W. *Food Chem. Toxicol.* 1995, 33, 1061-1080.

Los flavonoides se pueden clasificar en diferentes subgrupos según el nivel de oxidación del anillo central (unidad C<sub>3</sub>) en: flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonoles, antocianidinas, chalconas y auronas. Los dos últimos subgrupos se separan algo de la estructura general: las chalconas tienen una forma isomérica de cadena abierta y las auronas poseen un heterociclo de cinco miembros, en lugar del de seis como en el resto de los flavonoides. Los diferentes flavonoides se forman por adición, en distintas posiciones de los anillos A y B, de grupos hidroxilo, metoxilo, metilo e isoprenilo<sup>3</sup>.



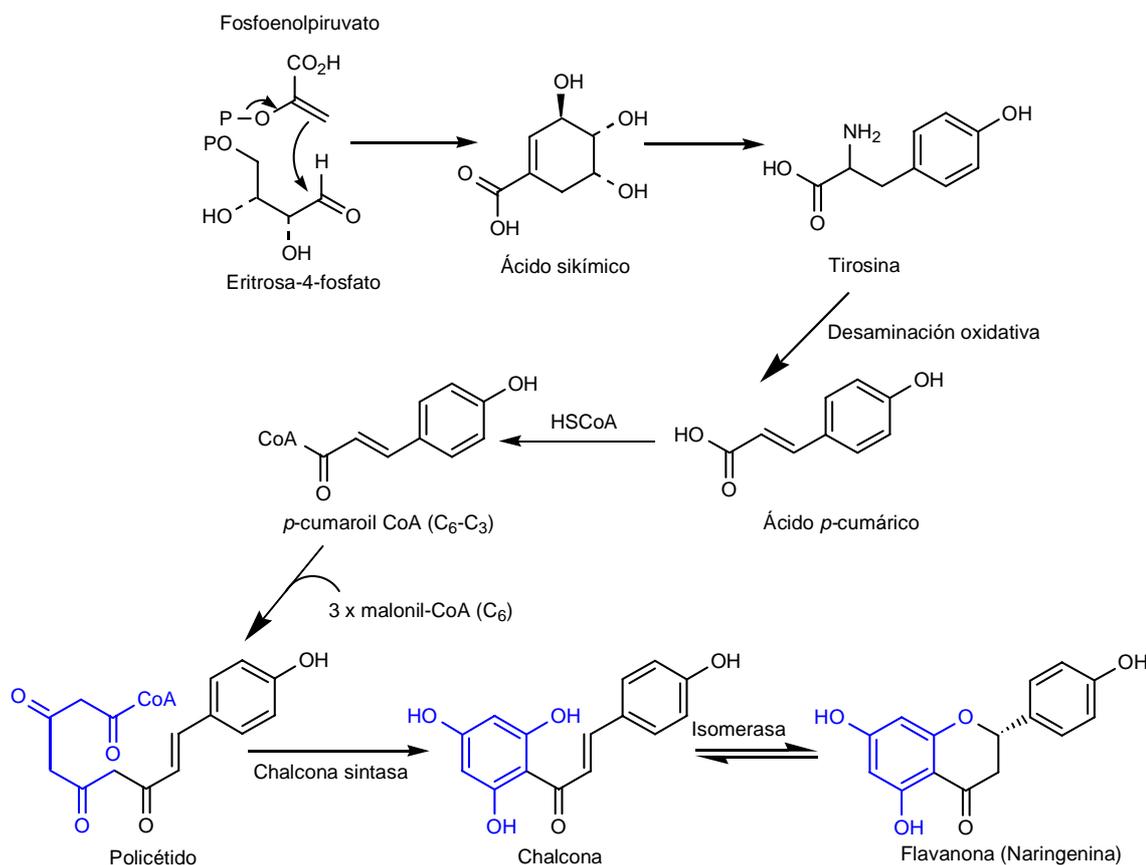
### Clasificación de flavonoides

El origen biogénico mixto, típico de los flavonoides, se pone claramente de manifiesto en la biosíntesis de la naringenina<sup>4</sup>, una flavanona. La unidad iniciadora es la *p*-cumaril-CoA, procedente de la ruta del ácido sikímico, que se incorpora intacta; posteriormente, se condensan tres unidades de malonil-CoA de forma secuencial, dando lugar a un policétido, que por

<sup>3</sup> Gil Ruiz, P. *Productos Naturales*. 2002, Universidad Pública de Navarra, Pamplona, 76-77.

<sup>4</sup> Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*. 2002, John Wiley and Sons, Ltda., U.K. 149-150.

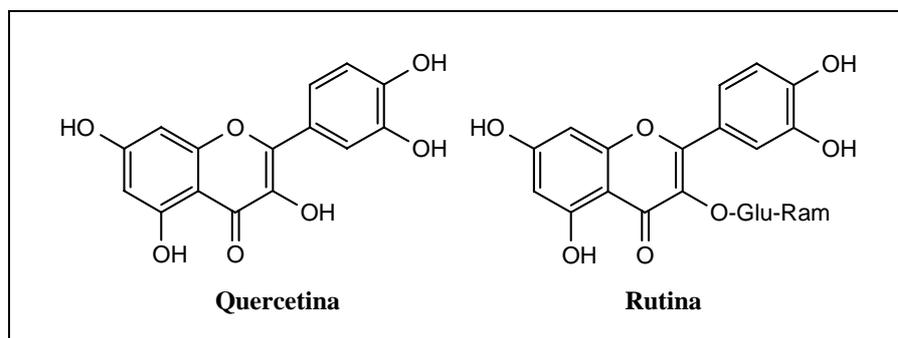
ciclación, origina la chalcona isómera de la naringenina. Por último, con la intervención de la isomerasa correspondiente, se llega a la flavanona, naringenina. Esta reacción es estereoespecífica y se forma un solo enantiómero.



### Biogénesis de los flavonoides

Desde hace muchos años se ha reconocido que los flavonoides poseen numerosos efectos beneficiosos para la salud, como es el caso de la citrina, que fue el primer flavonoide al que se le atribuyó una actividad biológica sobre la permeabilidad vascular, recibiendo por ello el nombre de vitamina P. Posteriormente, se comprobó que la citrina era una mezcla de glucósidos de flavonoides, incluyendo la quercetina, rutina, hesperidina y eriodictina<sup>5</sup>.

<sup>5</sup> Paredes Salido, F.; Fernández, A. C. *Ámbito Farmacéutico Fitoterapia*. 2005, 24, 85-94.



### Flavonoides con actividad antioxidante

Sin embargo, en los últimos años los flavonoides han despertado el interés de los farmacólogos debido al amplio espectro de actividades biológicas que presentan, así podemos citar su acción antialérgica, anti-inflamatoria, antiviral, antimicrobiana, antiparasitaria, antioxidante, antimutagénica, anticancerígena y como modulador de la actividad enzimática. Estos productos naturales también inhiben la actividad de diversas enzimas, incluyendo la lipooxigenasa, ciclooxigenasa, monooxigenasa, xantina oxidasa, ATPasa mitocondrial, fosfolipasa A<sub>2</sub>, proteína quinasa C, MAP-quinasa, topoisomerasa, aldosa reductasa y DNA polimerasa<sup>6</sup>, lo que implica una amplia gama de posibles aplicaciones terapéuticas.

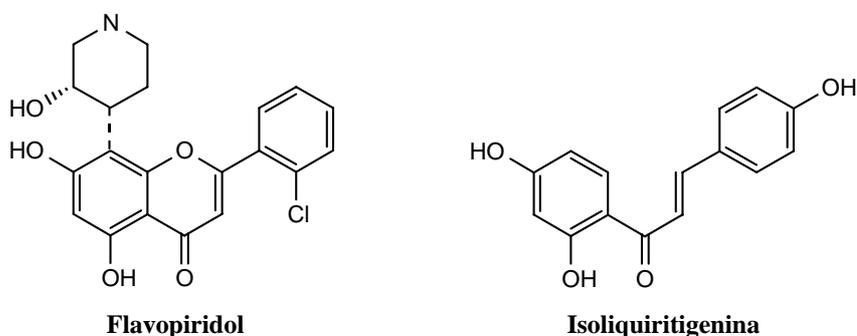
Estudios de laboratorio, investigaciones epidemiológicas y estudios clínicos indican que los flavonoides tienen efectos importantes en la quimioprevención y quimioterapia del cáncer. Algunos mecanismos de acción celular se han identificado gracias al estudio de flavonoides, como son por ejemplo la interrupción del ciclo celular, la inducción a la apoptosis y diferenciación, la inhibición de la angiogénesis, el efecto antiproliferativo o la inactivación de la carcinogénesis<sup>7</sup>. Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que algunos flavonoides pueden contribuir a la prevención del cáncer en las fases I o II del metabolismo, así podemos citar al flavopiridol, que presenta acción inhibitoria sobre las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y actualmente se encuentra en ensayos clínicos<sup>8</sup>. Otro ejemplo es la isoliquiritigenina, aislada de

<sup>6</sup> Das, S.; Rosazza, J. P. N. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 499-508.

<sup>7</sup> Ren, W.; Qiao, Z.; Wang, H.; Zhu, L.; Zhang, L. *Med. Res. Rev.* **2003**, 23, 519-534.

<sup>8</sup> Wang, H. K. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* **2001**, 2, 1149-1155.

*Dipteryx odorata*, que induce la actividad de la quinona-reductasa de forma dosis-dependiente en un rango de concentración de 2-30  $\mu\text{M}$  sin presentar citotoxicidad<sup>9</sup>.



Los flavonoides, como otros compuestos polifenólicos, poseen capacidad antioxidante, siendo excelentes atrapadores de radicales libres al ser altamente reactivos como dadores de protones o electrones, o quelantes de metales de transición. Se han realizado numerosos estudios con el fin de establecer los requerimientos estructurales de los flavonoides que puedan explicar su actividad antioxidante<sup>10</sup>. Así, por ejemplo de las hojas de *Blumea balsamifera* se aíslan nueve flavonoides, los cuales tiene capacidad de atrapar radicales superóxido, siendo el más activo la quercetina a 100 $\mu\text{M}$ . El estudio de la relación estructura-actividad permitió concluir que la presencia de grupos fenólicos libres es uno de los requerimientos estructurales para la actividad, al compararlos con los compuestos metoxilados<sup>11</sup>.

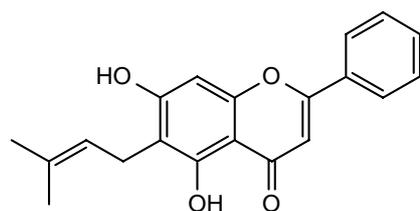
Otra de las actividades a destacar es la capacidad de los flavonoides de revertir la multiresistencia a fármacos (MDR), tanto en células cancerosas como en parásitos resistentes de *Leishmania*. Así, estudios realizados con diferentes tipos de flavonoides, muestran que los más activos son las flavonas 6-prenilcrisina y tectocrisina, cuya acción se asocia con la presencia de un grupo hidroxilo en posición 5, una unidad de isopreno en posición 6 del anillo A, un doble enlace en el anillo C y un anillo B no sustituido<sup>12</sup>.

<sup>9</sup> Muriel Cuedent, C. P.; Oteham, R. C.; Moon, R. C.; Pezzuto, J. M. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 460-463.

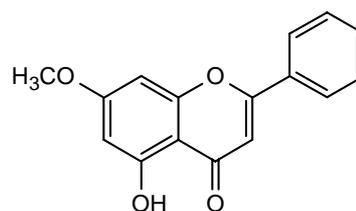
<sup>10</sup> Kaleab Asres, A. S.; El-Fiky, F. K. *Phytochemistry.* **2006**, 67, 2058-2070.

<sup>11</sup> Fazilatun, N.; Nornisah, M.; Zhari, I. *Pharm. Biol.* **2005**, 43, 15-20.

<sup>12</sup> Ahmed-Belkacem, A.; Pozza, A.; Muñoz-Martínez, F.; Bates, E. S.; Castanys, S.; Gamarro, F.; Di Pietro, A.; Pérez-Victoria, J. M. *Cancer Res.* **2005**, 65, 4852-4860.

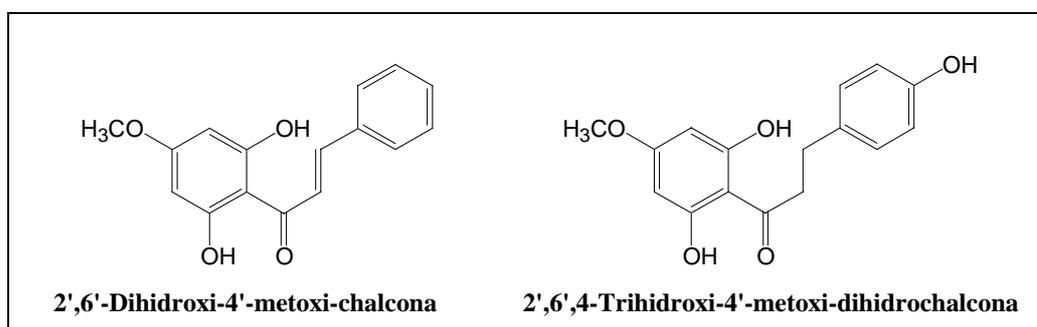


**6-Prenilcrisina**



**Tectocrisina**

En general existen pocos estudios de la actividad leishmanicida de los diferentes tipos de flavonoides, salvo el caso de las chalconas que es, sin lugar a dudas, el grupo más estudiado, fundamentalmente desde que la licochalcona A se describiera como un potente antiparasitario<sup>13</sup>. Una serie de chalconas sintéticas y naturales<sup>14</sup> se han descrito como potenciales agentes leishmanicidas. Así, podemos destacar la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona, aislada de las inflorescencias de *P. aduncum*<sup>15</sup> y 2',6',4-trihidroxi-4'-metoxi-dihidrochalcona<sup>16</sup>, aislada de *P. elongatum*, resultados que confirman el uso tradicional de estas especies para el tratamiento de diferentes enfermedades parasitarias.



**Chalconas aisladas de especies del género *Piper* con actividad leishmanicida**

<sup>13</sup> Chen, M.; Christensen, S. B.; Blom, J.; Lemmich, E.; Nadelmann, L.; Fich, K.; Theader, T. G.; Kharazmi, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, 2550-2556.

<sup>14</sup> Kayser, O.; Kiderlen, A. *Phytother. Res.* **2001**, 15, 148-152.

<sup>15</sup> Torres-Santos, E. C.; Rodríguez, J. M.; Moreira, D. L.; Kaplan, M. A. C.; Rossi-Bergmann, B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43, 1234-1241.

<sup>16</sup> Hermoso, A.; Jiménez, I. A.; Mamani, Z.; Bazzocchi, I. L.; Piñero, J. E.; Ravelo, A. G.; Valladares, B. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 3975-3980.

## Resultados y discusión

Tras repetidas cromatografías del extracto de diclorometano de las hojas de *Piper aduncum*, *P. acutifolium*, *P. elongatum*, *P. glabratum*, *P. heterophyllum*, *P. pilliraneum* y *P. rusbyi*, como se indica en la parte experimental, hemos aislado doce flavonoides, que hemos denominado de **F-1** a **F-12**, resultando el producto que hemos denominado **F-9**, nuevo en la bibliografía química.

Los flavonoides aislados se agruparon en función del grado de oxidación del anillo C de benzo- $\gamma$ -pirona. Teniendo en cuenta esta consideración, el producto que hemos denominado flavokavaina B<sup>17</sup> (**F-1**), se caracteriza por poseer un esqueleto de chalcona; los productos denominados 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-dihidrochalcona<sup>18</sup> (**F-2**), 2',6',4-trihidroxi-4'-metoxi-dihidrochalcona<sup>19</sup> (**F-3**) y 2',4',6'-trihidroxi-dihidrochalcona (**F-4**) tienen un esqueleto de dihidrochalcona; los productos 5,7-dihidroxi-flavanona<sup>20</sup> (**F-5**), 5,7-dihidroxi-4'-metoxi-flavanona<sup>21</sup> (**F-6**), 4',7-dimetoxi-5-hidroxi-flavanona<sup>22</sup> (**F-7**), 3',5',5-trihidroxi-7-metoxi-flavanona<sup>23</sup> (**F-8**) y **F-9**, corresponden a un esqueleto de flavanona; los productos crisin<sup>24</sup> (**F-10**) y 4',5-dihidroxi-3',7-dimetoxiflavona<sup>25</sup> (**F-11**), poseen un esqueleto de flavona y el producto denominado galangin<sup>26</sup> (**F-12**) presenta un esqueleto de flavonol. A continuación se presenta un esquema de los flavonoides aislados de las especies de *Piper* antes citadas, agrupados según sus esqueletos.

<sup>17</sup> Ranjith, H.; Dharmaratne, W.; Nanayakkara, N. P.; Ikhlas, A. K. *Phytochemistry*. **2002**, 59, 429-33.

<sup>18</sup> Bremner, P. D.; Meyer, M. *Planta Med.* **1998**, 64, 777.

<sup>19</sup> Orjala, J.; Wright, A. D.; Behrends, H.; Folkers, G.; Sticher, O. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 1, 18-26.

<sup>20</sup> Díaz, P.; Arias, C. T.; Nathan, J. *Phytochemistry*. **1987**, 26, 809-811.

<sup>21</sup> Vasconcelos, J. M. J.; Silva, A. M.; Cavalheiro, J. A. S. *Phytochemistry*. **1998**, 49, 1421-1424.

<sup>22</sup> Agrawal, P. K. *Studies in Organic Chemistry 39: Carbon-13 NMR of flavonoids*. **1989**, 103-104, Elsevier.

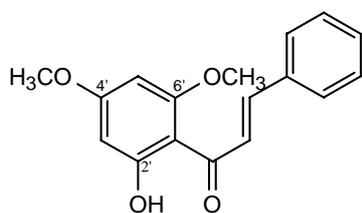
<sup>23</sup> Falzilatum, N.; Nornisah, M.; Zhari, I.; Mas, S. *J. Trop. Med. Plants*. **2001**, 2, 17-22.

<sup>24</sup> Burke, B.; Fair, M. *Phytochemistry*. **1986**, 25, 1427-1430.

<sup>25</sup> Jensen, S.; Olsen, C. E.; Tyagi, O. D.; Boll, P. M.; Husaini, F. A.; Gupta, S.; Bisht, K. S.; Parmar, V. S. *Phytochemistry*. **1994**, 36, 789-792.

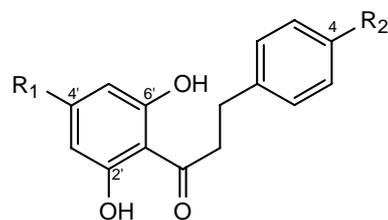
<sup>26</sup> Agrawal, P. K. *Studies in Organic Chemistry 39: Carbon-13 NMR of flavonoids*. **1989**, 152-153, Elsevier.

### Chalcona



**F-1**

### Dihidrochalconas

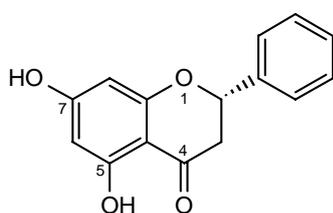


**F-2** R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H

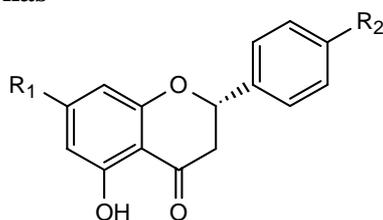
**F-3** R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH

**F-4** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = H

### Flavanonas



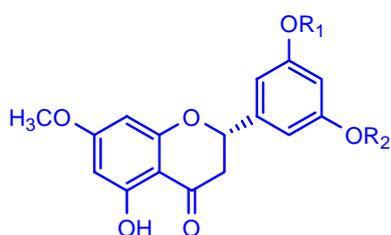
**F-5** R = H



**F-6** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>

**F-7** R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>

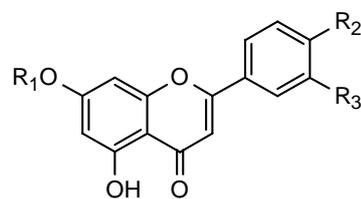
### Flavanonas



**F-8** R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H

**F-9** R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>

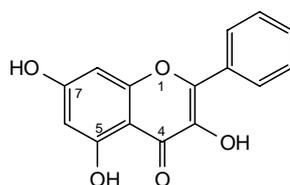
### Flavonas



**F-10** R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = H

**F-11** R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH, R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>

### Flavonol



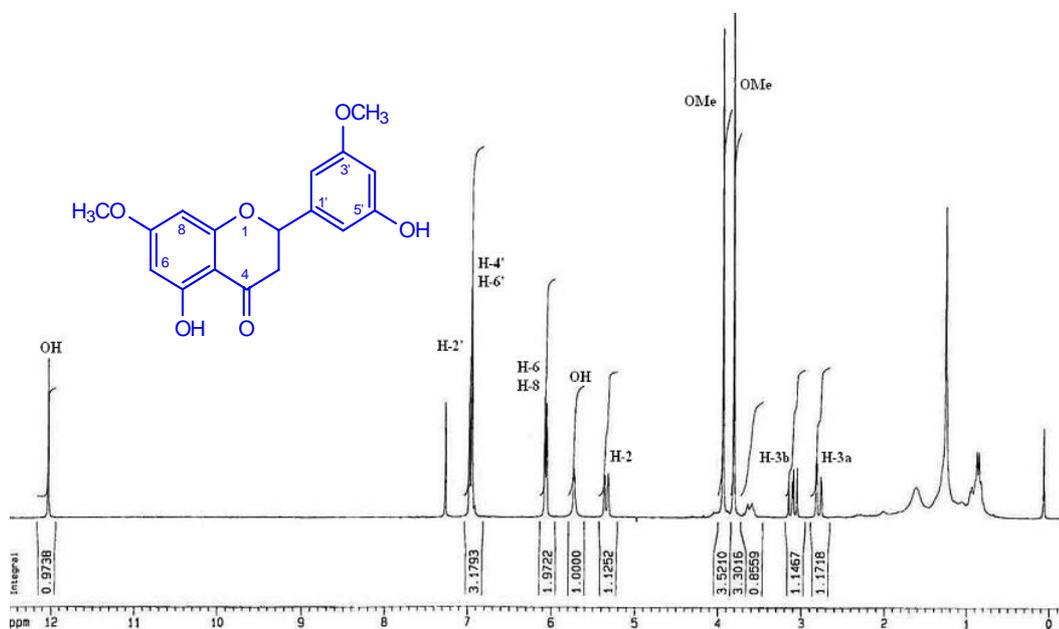
**F-12**

### Flavonoides aislados de las especies de *Piper* estudiadas

A continuación pasamos a discutir la elucidación estructural del producto que resultó nuevo en la bibliografía química, aislado de *P. aduncum* y que hemos denominado **F-9**.

## Determinación estructural del producto F-9

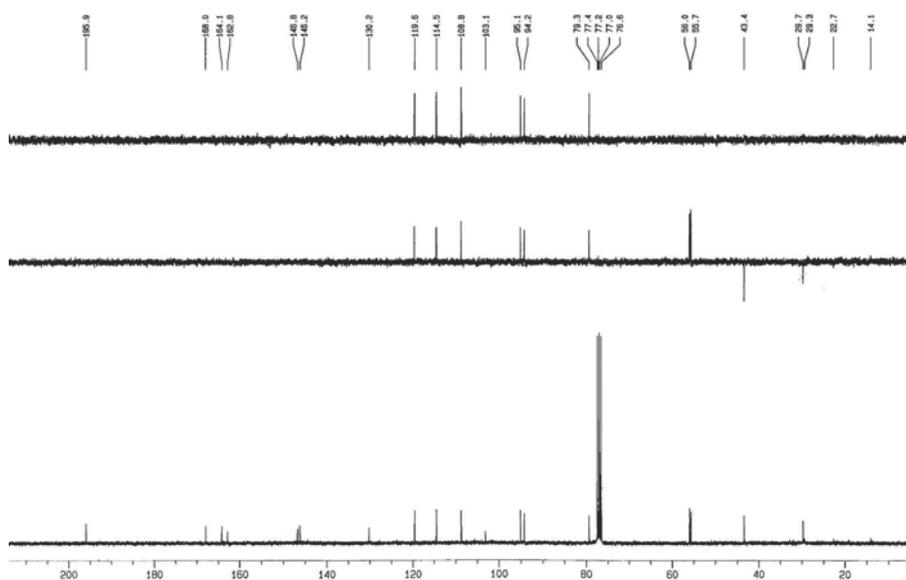
El producto que hemos denominado **F-9** presentó una fórmula molecular de  $C_{17}H_{16}O_6$ , determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución, fórmula que está de acuerdo con diez grados de insaturación en el compuesto. En su espectro de IR se observaron bandas de absorción características de grupos hidroxilo ( $3439\text{ cm}^{-1}$ ), grupo carbonilo ( $1731\text{ cm}^{-1}$ ) y de anillos aromáticos ( $1643, 800\text{ cm}^{-1}$ ). El espectro de masas de baja resolución presentó un ión molecular a  $316\text{ m/z}$  y un fragmento a  $286\text{ m/z}$  correspondiente a la pérdida de un grupo metoxilo  $[M^+ - OCH_3]$ .



Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **F-9**

Su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  presentó señales de un sistema  $\text{AX}_2$ , correspondiente a un doble doblete a  $\delta 5.34$  ( $J = 3.0$  y  $13.0$  Hz) asignado a un protón oximetínico en C-2, acoplado con dos dobles dobletes a  $\delta 2.78$  ( $J = 3.0, 17.1$  Hz) y  $3.10$  ( $J = 13.0, 17.1$  Hz), que integran para un protón cada uno, asignables a protones de un metileno H-3. Así mismo, se observaron dos singletes a  $\delta 3.81$  y  $3.94$ , correspondientes a dos grupos metoxilo; señales para cinco protones en la región aromática del espectro como dos dobletes a  $\delta 6.05$  ( $J = 1.9$  Hz) y  $6.06$  ( $J = 1.9$  Hz), que integran para un protón cada uno, lo que indica una sustitución *para* del anillo aromático y dos singletes a  $\delta 6.95$  y  $6.97$  que integran para dos protones y un protón, respectivamente,

correspondientes al otro anillo aromático, indicando una sustitución 1, 3, 5 sobre dicho anillo. Además, se observaron dos singuletes correspondientes a protones fenólicos a  $\delta$  5.73 y 12.03, intercambiables con agua deuterada, este último característico de un grupo fenólico en disposición *sin* periplanar a un grupo carbonilo. Estos datos indican que el producto **F-9**, es un flavonoide, clase de metabolitos presente en las especies de *Piper*.

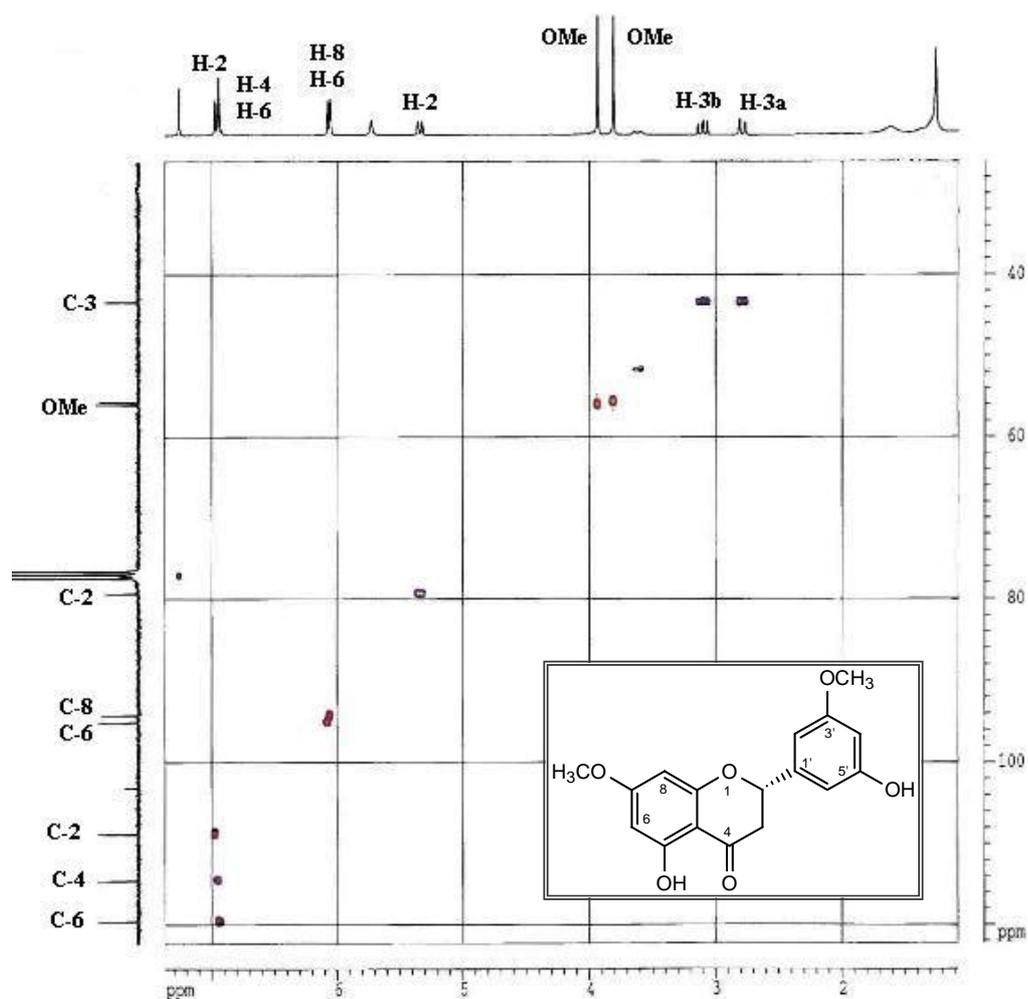


Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) de **F-9**

Los datos anteriores fueron confirmados en su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  y experimentos DEPT 90 y 135, en los que se observaron señales para 17 átomos de carbonos, distribuidos de la siguiente forma, dos carbonos metoxílicos, un carbono metilénico, seis carbonos metínicos y ocho carbonos cuaternarios. El conjunto de estas señales confirmaron la presencia en la molécula de dos anillos aromáticos y un anillo central, característico de una flavanona, destacando en su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  la señal correspondiente a un carbonilo a  $\delta$  195.9 (C-4), un carbono oximetínico a  $\delta$  79.3 (C-2) y un carbono metilénico a  $\delta$  43.4 (C-3).

Estos datos están de acuerdo con una estructura de flavanona para nuestro compuesto, que posee dos anillos aromáticos, uno tetrasustituido y otro trisustituido, dos grupos fenólicos y dos grupos metoxilo.

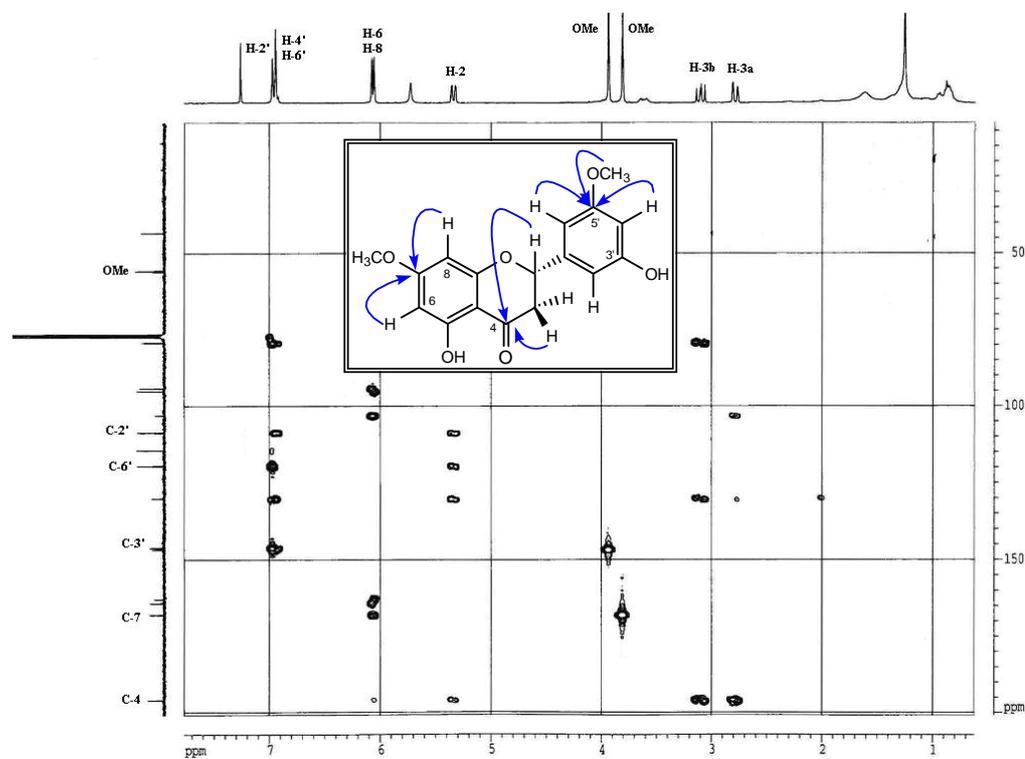
El estudio de los experimentos bidimensionales, homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC), nos permitió establecer la posición de los diferentes grupos en la molécula, confirmando la estructura propuesta.



Experimento HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **F-9**

Así, la localización de los grupos fenólicos y metoxilos en la molécula se determinó mediante un experimento HMBC, destacando las correlaciones de los protones del metoxilo a  $\delta_{\text{H}}$  3.81 y los protones a  $\delta_{\text{H}}$  6.05 (H-6) y  $\delta_{\text{H}}$  6.06 (H-8) con el carbono cuaternario a  $\delta_{\text{C}}$  168.0 (C-7), lo que nos permitió establecer la estructura del anillo A de la molécula y las correlaciones de los protones a  $\delta_{\text{H}}$  5.34 (H-2) y  $\delta_{\text{H}}$  2.78 y 3.10 (H-3) con el carbonilo C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  195.9), nos permitió establecer las características del anillo C. Por último, las correlaciones del protón H-2 con los

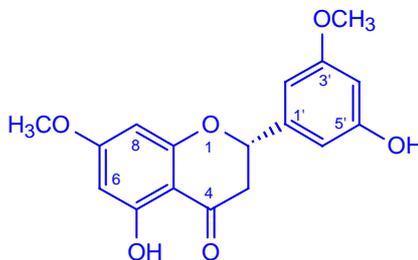
carbonos  $\delta_C$  108.8 (C-2') y  $\delta_C$  119.6 (C-6'), unido a las correlaciones de los protones a  $\delta_H$  6.97 (H-2') y  $\delta_H$  6.95 (H-6') y el metoxilo a  $\delta_H$  3.94 con el carbono cuaternario a  $\delta_C$  146.2 (C-3'), nos permitieron determinar la regiosustitución en el anillo B.



Experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **F-9**

Estos datos y comparación con los datos en la bibliografía química de compuestos relacionados<sup>27</sup>, nos permitieron establecer la estructura de **F-9** como **5,5'-dihidroxi-7,3'-dimetoxi-flavanona**.

<sup>27</sup> Ahmad, I.; Anis, I.; Malik, A.; Nawaz, S. A.; Choudhary, M. I. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, 51, 412-414.

**DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS****Producto F-9: 5,5'-Dihidroxi-7,3'-dimetoxi-flavanona.**

Aislado como sólido amorfo (16.0 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : +1.92 (c 0.26,  $\text{CHCl}_3$ ).

UV  $\lambda_{\text{max}}$  (EtOH): 202, 227, 286 nm.

IR  $\nu_{\text{max}}$  (película): 3439, 2961, 2924, 2852, 1731, 1643, 1453, 1261, 1156, 1091, 1023, 800  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 2.78 (1H, dd,  $J= 3.0, 17.1$  Hz, H-3a); 3.10 (1H, dd,  $J= 13.0, 17.1$  Hz, H-3b); 3.81 (3H, s, OMe); 3.94 (3H, s, OMe); 5.34 (1H, dd,  $J= 3.0, 13.0$  Hz, H-2); 5.73 (1H, s<sub>a</sub>, OH); 6.05 (1H, d,  $J= 1.9$  Hz, H-6); 6.06 (1H, d,  $J= 1.9$  Hz, H-8); 6.95 (2H, s, H-4', H-6'); 6.97 (1H, s, H-2'); 12.03 (1H, s<sub>a</sub>, OH).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 43.4 (t, C-3); 55.7 (c,  $\text{OCH}_3$ ); 56.0 (c,  $\text{OCH}_3$ ); 79.3 (d, C-2); 94.2 (d, C-8); 95.1 (d, C-6); 103.1 (s, C-10); 108.8 (d, C-2'); 114.5 (d, C-4'); 119.6 (d, C-6'); 130.2 (s, C-1'); 146.2 (s, C-3'); 146.8 (s, C-5'); 162.8 (s, C-9); 164.1 (s, C-5); 168.0 (s, C-7); 195.9 (s, C-4).

EM  $m/z$  (%): 316  $[\text{M}]^+$  (92), 299 (6), 286 (10), 256 (21), 193 (22), 180 (36), 167 (100), 150 (50), 137 (53), 68 (48).

EM de alta resolución: Calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6$ , 316.1025; observado, 316.0981.

## *Derivados del ácido benzoico*

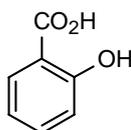
## DERIVADOS DEL ÁCIDO BENZOICO

### Introducción

Las plantas biosintetizan numerosos derivados del ácido benzoico de interés farmacológico. Así, la salicina, que se encuentra en numerosas especies de *Salix* spp, es responsable de la actividad analgésica y antipirética de la corteza del sauce, que ha sido utilizada durante siglos y cuya su estructura sirvió como modelo para la síntesis de la aspirina, fármaco que se sintetizó a finales del siglo XIX y sigue siendo hoy en día el fármaco más vendido de todos los tiempos. Otro ejemplo de derivados del ácido benzoico es el salicilato de metilo, principal componente del aceite de “gaulteria” aislado de *Gaultheria procumbens*; estudios recientes sugieren que dicho compuesto interviene en los mecanismos de defensa de las plantas frente a los insectos. La vainillina, principal componente de las vainas de *Vanilla planifolia*, y presente también en los brotes de espárragos o remolacha, se utiliza como aromatizante en bebidas, alimentos e incluso en perfumería<sup>1</sup>.



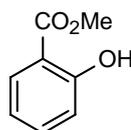
*Salix* spp



Salicina



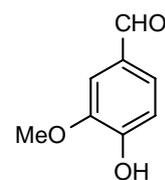
*Gaultheria procumbens*



Salicilato de metilo



*Vanilla planifolia*

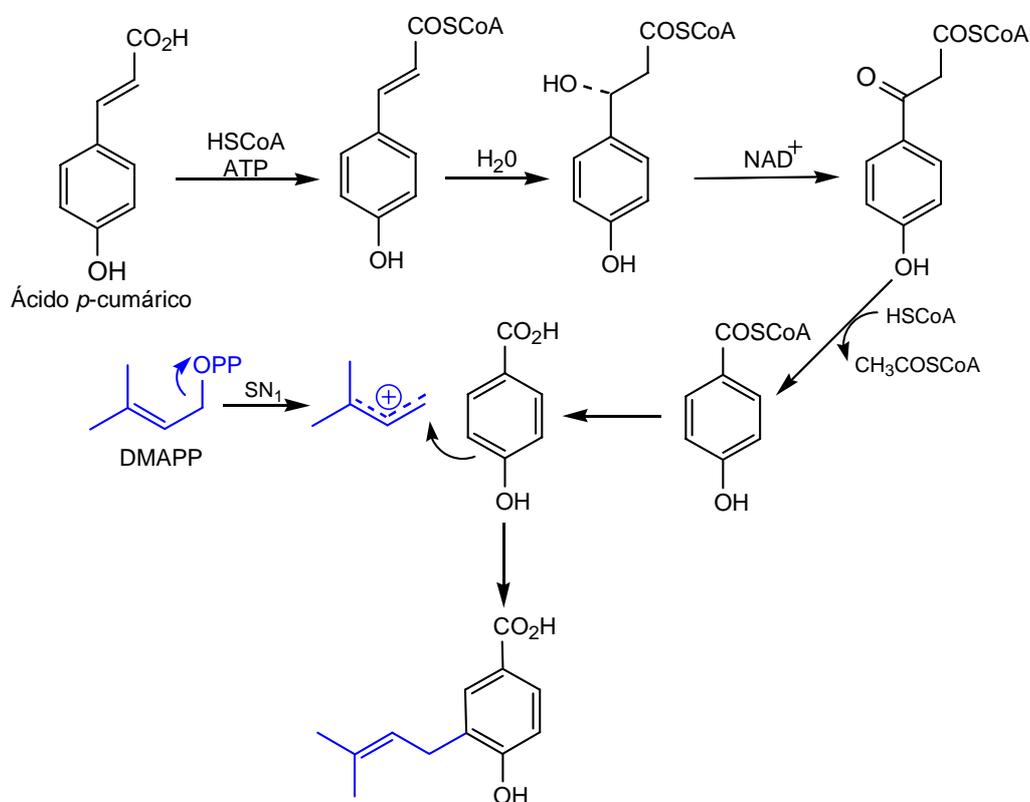


Vainillina

Los derivados del ácido benzoico pueden ser biosintetizados directamente a partir de intermedios de la ruta del sikímico, como por ejemplo el ácido 3-dehidrosikímico o el ácido corísmico. Existe otra ruta alternativa para su biogénesis a partir del ácido cinámico (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), en la que el doble enlace de la cadena lateral sufre una ruptura y pérdida de dos átomos de carbonos,

<sup>1</sup> Gil Ruiz, P. *Productos Naturales*, **2002**, 71-72, Universidad Pública de Navarra, Pamplona.

proceso análogo a la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. En dicho proceso el éster del coenzima A es hidratado, posteriormente el grupo hidroxilo es oxidado a cetona y a partir del  $\beta$ -cetoéster formado, mediante una reacción Claisen inversa se pierde el acetil-CoA, obteniéndose el derivado del ácido benzoico correspondiente y el éster del coenzima A. Así, por ejemplo, a partir del ácido *p*-cumárico se obtiene el ácido *p*-hidroxibenzoico, cuya posición *orto* se encuentra activada, por lo cual puede sufrir reacciones de alquilación, de tal forma que si el agente alquilante es el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), se generan los isoprenilos derivados del ácido *p*-hidroxibenzoico<sup>2</sup>.

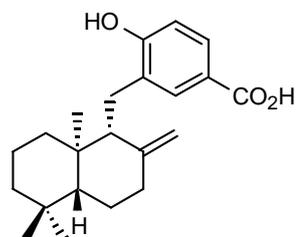


### Ruta biosintética de derivados del ácido benzoico

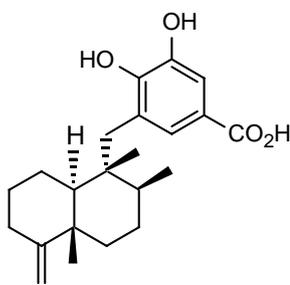
Los derivados de ácido benzoico presentes en la naturaleza pueden estar sustituidos en diferentes posiciones del anillo aromático por unidades de isoprenilo ( $C_5$ ), geranilo ( $C_{10}$ ), farnesilo ( $C_{15}$ ) o geranilgeranilo ( $C_{20}$ ). Estructuras de este tipo se han encontrado en organismos

<sup>2</sup> Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*. 2002, John Wiley and Sons, Ltda., U.K. 141-142.

marinos, así como en diversas especies vegetales. Dentro de los organismos marinos podemos citar al alga *Dycoptopteris undulata* de la que se aísla el ácido zonárico y de la esponja *Siphonodictyon coralliphagum*<sup>3</sup> se obtiene el ácido sifonodictioico.

*Dycoptopteris undulata*

Ácido zonárico



Ácido sifonodictioico

*Siphonodictyon coralliphagum*

Entre las familias de plantas que contienen derivados del ácido benzoico, podemos citar al género *Perithalia*<sup>4</sup> (Hydrophyllaceae) y los géneros *Peperomia* y *Piper* de la familia Piperaceae. Es importante destacar que en especies del género *Piper* se han descrito numerosos derivados del ácido benzoico con unidades de terpeno como por ejemplo isopreno, geranilo, farnesilo y geranilgeranilo, con diversas actividades biológicas. Así, el éster metílico del ácido taboganico, aislado de *P. tabogatum* y *P. dilatatum*, se ha descrito por sus propiedades antifúngicas frente al fitopatógeno *Cladosporium cucumerinum*<sup>5</sup>, el éster metílico del ácido lanceafilico, de *Piper lanceofilium*, es activo frente a la levadura *Candida albicans*<sup>6</sup> y el ácido 4-hidroxi-3-(3,7-dimetil-10xo)-2,6-octadienilbenzoico, aislado de *P. murrayanum*, presenta actividad antifúngica frente a *Cladosporium sphaerospermum*<sup>7</sup>. Así mismo, el ácido nervogénico

<sup>3</sup> Sullivan B. W.; Faulkern, G. K.; Matsumoto, H.; Cun-Heng, Clardy, J. J. *Org. Chem.* **1986**, 51, 4568-4573.

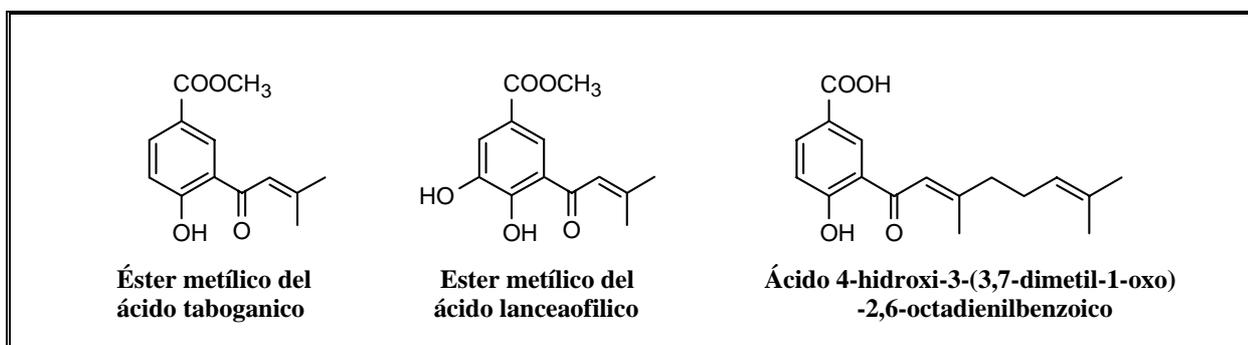
<sup>4</sup> Rochfort, S. J.; Capon, R. J. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 849-851.

<sup>5</sup> Terreaux, C.; Gupta, M.P.; Hostettman, K. *Phytochemistry.* **1998**, 49, 461-464.

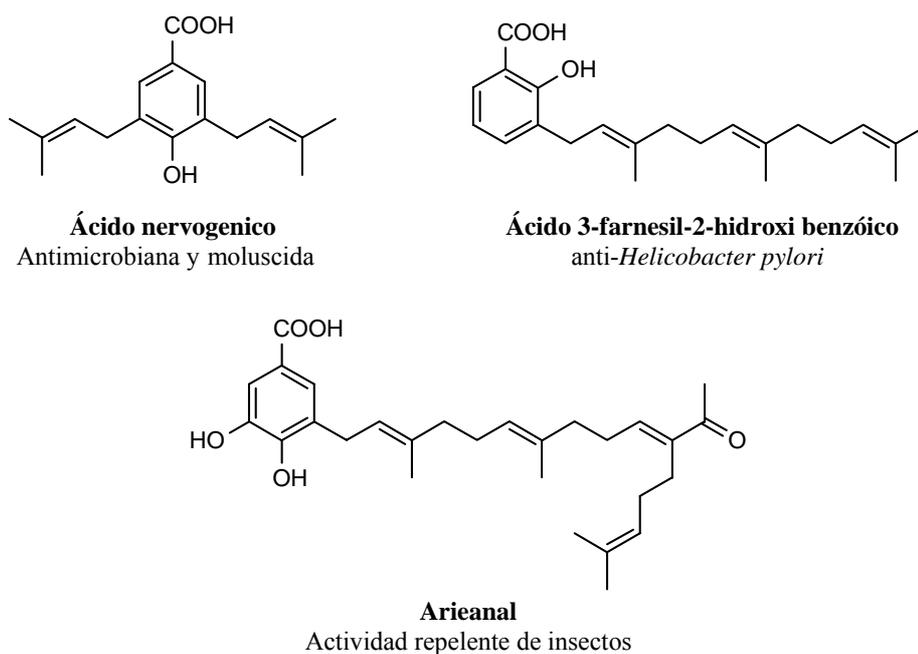
<sup>6</sup> López, A.; Ming, D. S.; Towers, G. H. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 62-64.

<sup>7</sup> Seeram, N. P.; Jacobs, H.; Mclean, S.; Reynolds, W. *Phytochemistry.* **1996**, 43, 863-865.

aislado de *Piper aduncum* posee actividad antimicrobiana<sup>8</sup> y moluscida<sup>9</sup>, el arieanal, aislado de *P. arieatum* es un repelente de insectos<sup>10</sup> y el ácido 3-farnesil-2-hidroxi benzoico, aislado de *P. multiplinervium*, presenta actividad antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori*<sup>11</sup>.



### Derivados de ácido benzoico con actividad antifúngica



<sup>8</sup> Okunade, A. L.; Hufford, C. D.; Clark, A. M.; Lentz, D. *Phytother. Res.* **1997**, 11, 142-144.

<sup>9</sup> Baldoqui, D. C.; Kato, M. J.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani, V. D.; Young, M. C. M.; Furlan, M. *Phytochemistry.* **1999**, 51, 899-902.

<sup>10</sup> Green, T. P.; Treadwell, E. M.; Wiemer, D. F. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 367-368.

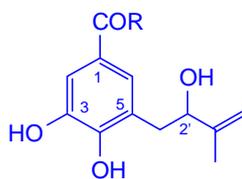
<sup>11</sup> Ruegg, T.; Calderón, A. I.; Queiroz, E. P.; Solís, P. N.; Marston, A.; Rivas, F.; Ortega-Barría, E.; Hostettman, K.; Gupta, M. P. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, 103, 461-467.

## Resultados y discusión

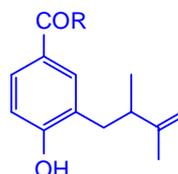
Tras repetidas cromatografías del extracto de diclorometano de las hojas de *Piper aduncum*, *P. acutifolium*, *P. elongatum*, *P. glabratum* y *P. heterophyllum*, aislamos veintidós metabolitos derivados del ácido benzoico, que hemos denominado de **AB-1** a **AB-22**.

Los derivados del ácido benzoico aislados se agruparon para su estudio en función de la sustitución sobre el anillo aromático con diferentes unidades de isopreno. Teniendo en cuenta esta consideración, los productos aislados se han agrupado en:

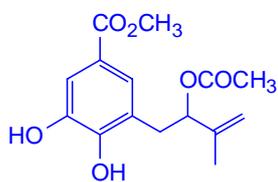
- Derivados del ácido benzoico con una unidad de isopreno**, que corresponden a los metabolitos que hemos denominado de **AB-1** a **AB-7** de los cuales **AB-1**, **AB-2**, **AB-4**, **AB-5** y **AB-7** resultaron nuevos en la bibliografía química. Los restantes metabolitos aislados de este grupo habían sido descritos con anterioridad en la bibliografía química y fueron identificados, basándonos en sus datos físicos y espectroscópicos, como: 4-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoato de metilo<sup>12</sup> (**AB-3**) y 4-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil) benzoato de metilo<sup>13</sup> (**AB-6**).



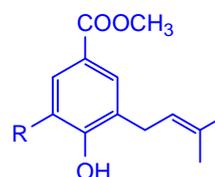
**AB-1** R= OCH<sub>3</sub>  
**AB-2** R= OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>



**AB-3** R= OCH<sub>3</sub>  
**AB-4** R= OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>



**AB-5**

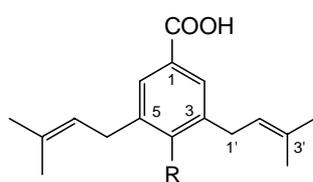


**AB-6** R= H  
**AB-7** R= OH

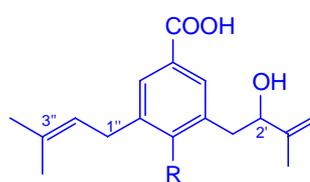
<sup>12</sup> Díaz, D. P. P.; Arias, C. T.; Joseph-Nathan, P. *Phytochemistry*. **1987**, 26, 809-811.

<sup>13</sup> Orjala, J.; Erdelmeire, C. A. J.; Wright, A.; Sticher, O. *Planta Med.* **1993**, 59, 546-551.

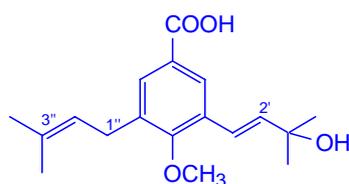
- Derivado del ácido benzoico con dos unidades de isopreno**, en este grupo se incluyen los metabolitos que hemos denominado de **AB-8** a **AB-14** de los cuales de **AB-10** a **AB-13**, resultaron nuevos en la bibliografía química. Aquellos que habían sido descritos con anterioridad en la literatura química fueron identificados como ácido 4-hidroxi-3,5-bis-(3-metil-2-butenil) benzoico<sup>14</sup> (**AB-8**), ácido 3,5-bis-(3-metil-2-butenil)-4-metoxi benzoico<sup>15</sup> (**AB-9**) y ácido 4-hidroxi-3-(3-metil-1-oxo-2-butenil)-5-(3-metil-2-butenil) benzoico<sup>10</sup> (**AB-14**).



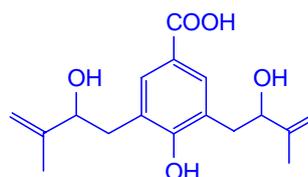
**AB-8** R= OH  
**AB-9** R= OCH<sub>3</sub>



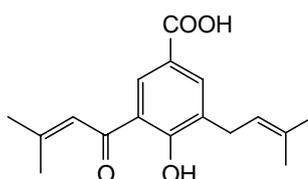
**AB-10** R= OH  
**AB-11** R= OCH<sub>3</sub>



**AB-12**



**AB-13**



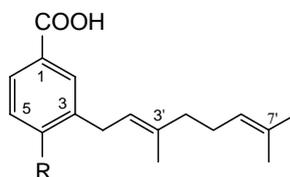
**AB-14**

- Derivados del ácido benzoico con una unidad de geranilo**, se aíslan dos metabolitos con estas características que hemos denominado **AB-15** y **AB-16**, los cuales habían sido descritos con anterioridad en la bibliografía química y fueron identificados como: ácido

<sup>14</sup> Orjala, J.; Erdelmeier, C. A. J.; Wright, A. D.; Rali, T.; Sticher, O. *Planta Med.* **1993**, 59, 546.

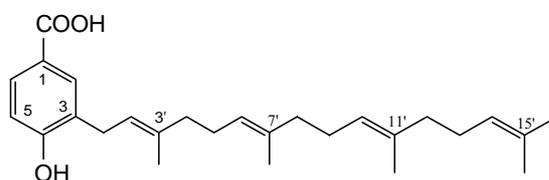
<sup>15</sup> Burke, B.; Nair, M. *Phytochemistry.* **1986**, 25, 1427-1430.

4-hidroxi-3-(3,7-dimetil-2,6-octadienil) benzoico<sup>16</sup> y ácido 3-(3,7-dimetil-2,6-octadienil)-4-metoxi benzoico<sup>17</sup>, respectivamente.

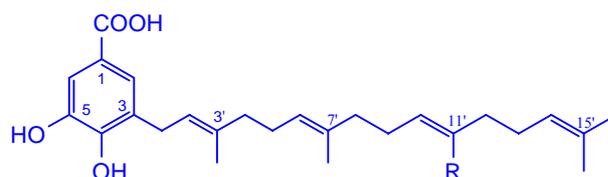


**AB-15** R = OH  
**AB-16** R = OCH<sub>3</sub>

- **Derivados del ácido benzoico con una unidad de geranylgeranilo** se aíslan seis metabolitos, que denominamos de **AB-17** a **AB-22**, de los cuales **AB-20**, **AB-21** y **AB-22** resultaron nuevos en la bibliografía química. Los demás metabolitos incluidos en este grupo fueron identificados como: ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11,15-tetrametil-hexadeca-2,6,10,14-tetraenil) benzoico<sup>18</sup> (**AB-17**), ácido 3,4-dihidroxi-5-(3,7,11,15-tetrametil-hexadeca-2,6,10,14-tetraenil) benzoico<sup>16</sup> (**AB-18**) y ácido 3,4-dihidroxi-5-(11-formil-3,7,15-trimetil-hexadeca-2,6,10,14-tetraenil) benzoico<sup>19</sup> (**AB-19**).



**AB-17**



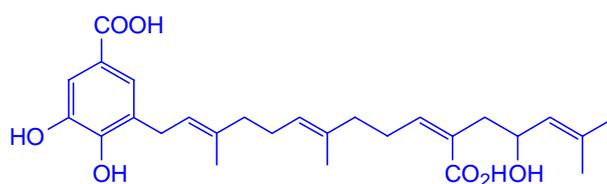
**AB-18** R = CH<sub>3</sub>  
**AB-19** R = CHO  
**AB-20** R = COOH

<sup>16</sup> Seeran, N. P.; Jacobs, H.; McLean, S.; Reynolds, W. F. *Phytochemistry*. **1996**, 43, 863-865.

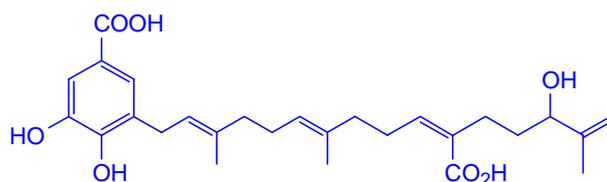
<sup>17</sup> Baldoqui, D. C.; Kato, M. J.; Cavalheiro, A. J.; Da Silva Bolzani, V.; Young, M. C.; Furlan, M. *Phytochemistry*. **1999**, 51, 899-902.

<sup>18</sup> Maxwell, A.; Rampersad, D. *J. Nat. Prod.* **1989**, 52, 614-618.

<sup>19</sup> Green, T. P.; Treadwell, E. M.; Wiemer, D. F. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 367-368.



**AB-21**



**AB-22**

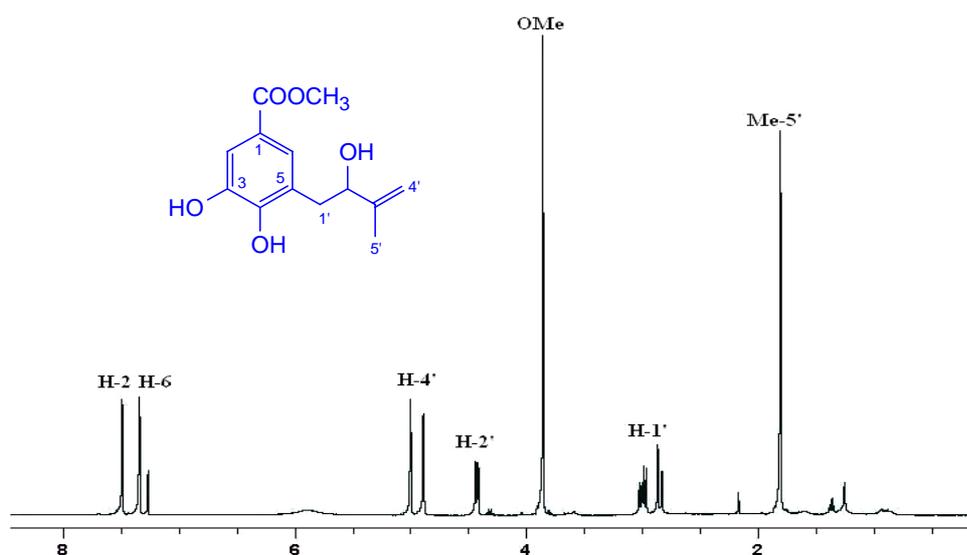
La elucidación estructural de los metabolitos conocidos se realizó mediante comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los existentes en la bibliografía química. Por otro lado, la estructura de los nuevos metabolitos se determinó mediante técnicas espectroscópicas de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, incluyendo experimentos bidimensionales homonucleares (COSY, ROESY) y heteronucleares (HSQC, HMBC), así como infrarrojo (IR), ultravioleta (UV) y espectrometría de masas de baja (EM) y de alta resolución (EMAR).

A continuación pasamos a describir la elucidación estructural de los nuevos derivados del ácido benzoico aislados de las diferentes especies *Piper*.

## Determinación estructural del producto AB-1

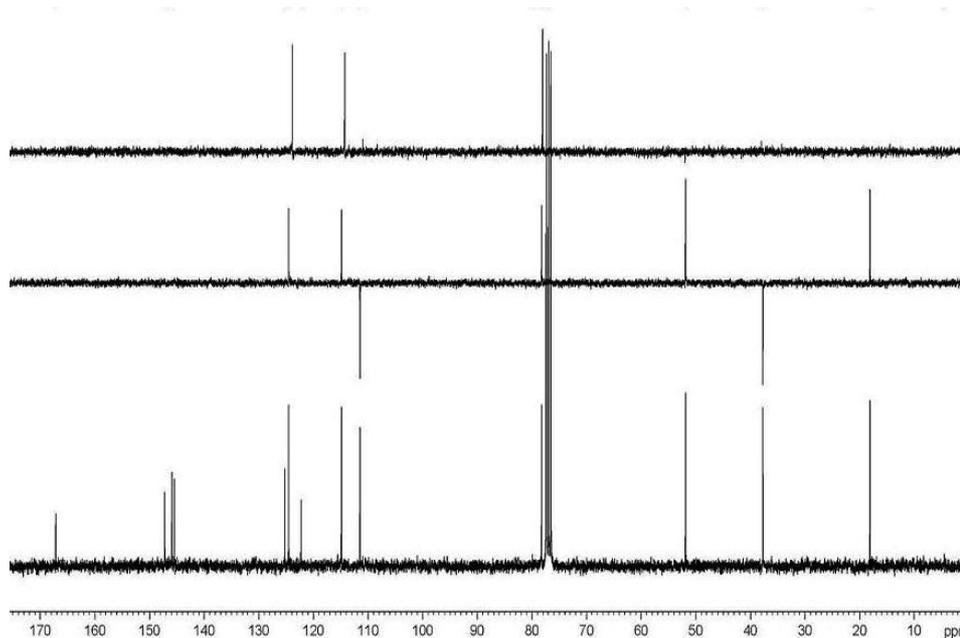
La estructura del compuesto que hemos denominado **AB-1** se estableció mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos. En su espectro de masas de baja resolución presentó un ión molecular a 252  $m/z$ , que corresponde con una fórmula molecular  $C_{13}H_{16}O_5$ , determinada por espectrometría de masas de alta resolución (EMAR). Así mismo, se observaron fragmentos correspondientes a la pérdida de agua  $[M-H_2O]^+$  a 234  $m/z$  y pérdida de agua y metilo  $[M-H_2O-CH_3]^+$  a 219  $m/z$ . En el espectro de IR se observaron bandas características de grupo hidroxilo ( $3409\text{ cm}^{-1}$ ), éster ( $1692\text{ cm}^{-1}$ ) y anillo aromático ( $1602$  y  $770\text{ cm}^{-1}$ ).

Su espectro de RMN  $^1H$  (tabla 3) presentó señales características de metilo sobre doble enlace a  $\delta$  1.81 (3H, s, Me-5'); señales correspondientes a protones metilénicos en posición bencílica como dos doble dobletes a  $\delta$  2.84 (1H,  $J= 2.1, 14.7$  Hz, H-1') y 2.99 (1H,  $J= 8.5, 14.7$  Hz, H-1'); un singulete asignable a un grupo metoxilo a  $\delta$  3.85; un doble doblete a  $\delta$  4.42 (1H,  $J= 2.1, 8.5$  Hz, H-2'), característico de un protón geminal a un grupo hidroxilo y dos singuletes a  $\delta$  4.88 y 4.99, correspondientes a un metileno vinílico terminal (H-4'). Así mismo, en la región aromática se observaron señales para dos protones a  $\delta$  7.33 (d,  $J= 1.9$  Hz, H-6) y 7.48 (d,  $J= 1.9$  Hz, H-2).



Espectro de RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz) de **AB-1**

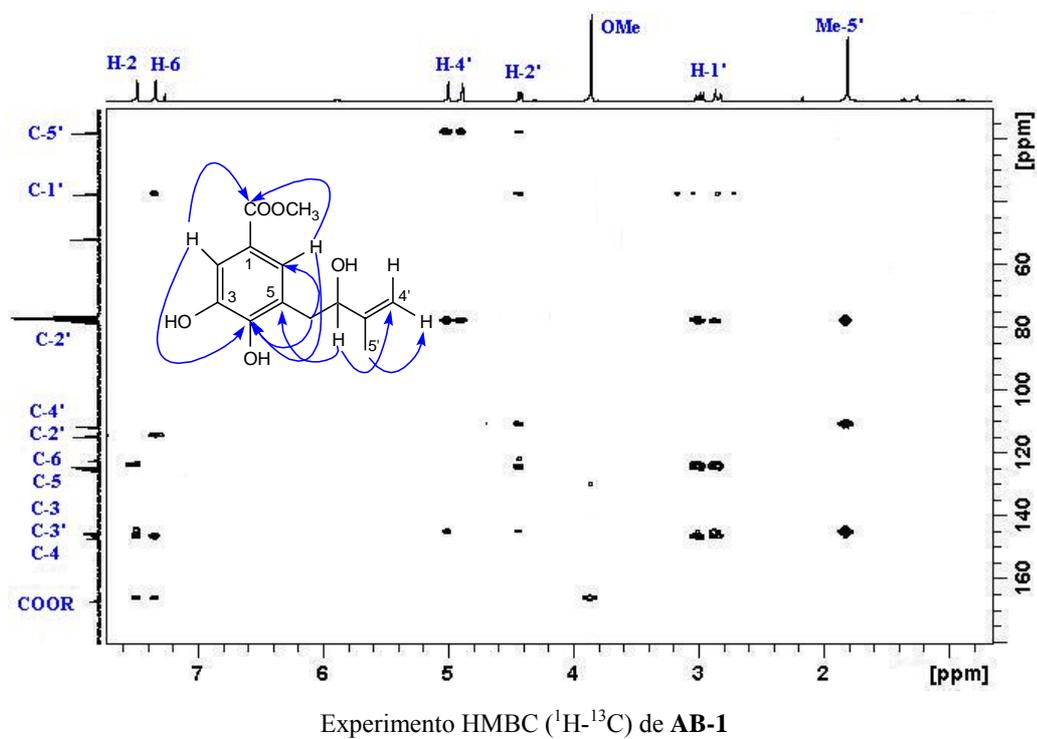
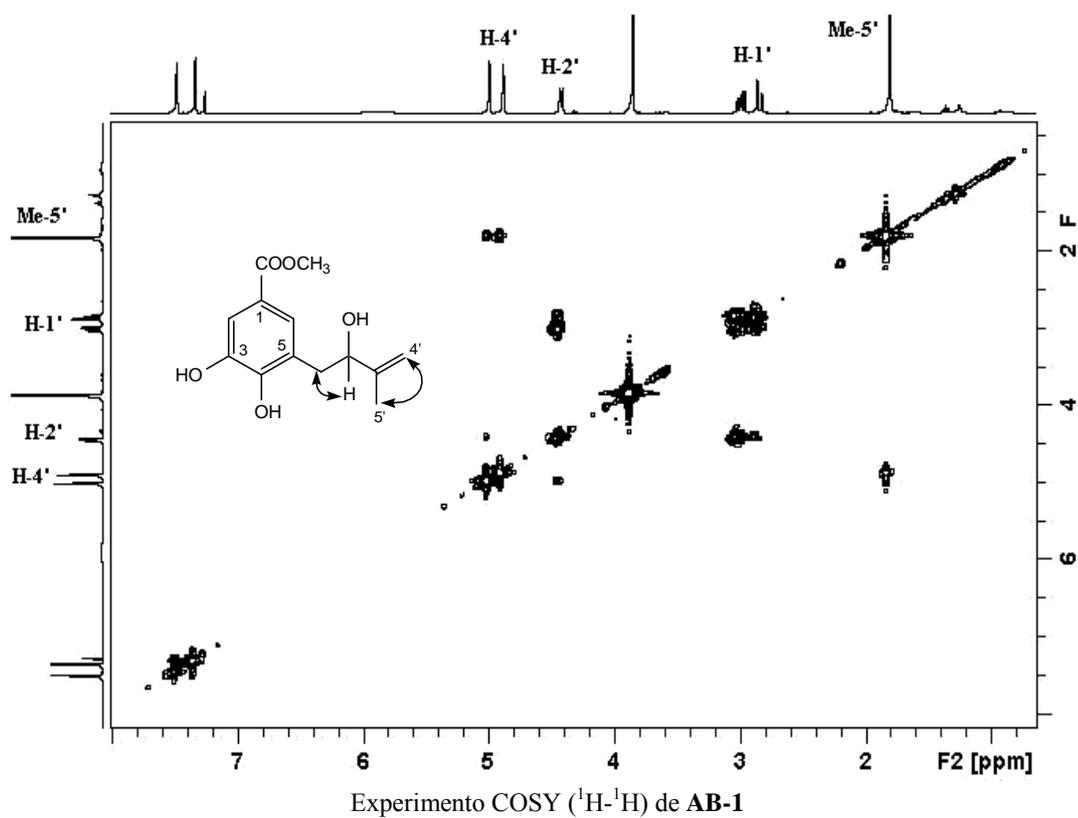
Los datos anteriores se confirmaron en su espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (tabla 4), que presentó señales para 13 carbonos, lo que unido a los experimentos DEPT 90 y 135 estableció la existencia de un metilo a  $\delta$  18.1 (C-5'); un metoxilo a  $\delta$  51.9 (OCH<sub>3</sub>), dos metilenos a  $\delta$  37.7 (C-1') y  $\delta$  111.5 (C-4'); tres metinos a  $\delta$  78.3 (C-2'),  $\delta$  114.9 (C-2) y  $\delta$  124.6 (C-6), y seis carbonos cuaternarios a  $\delta$  122.3 (C-1),  $\delta$  125.2 (C-5),  $\delta$  145.5 (C-3),  $\delta$  145.9 (C-3'),  $\delta$  147.3 (C-4) y  $\delta$  167.2 (COOR). Estos datos están de acuerdo con una estructura de ácido benzoico con una cadena de isopreno y dos grupos fenólicos para nuestro producto **AB-1**.



Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) de **AB-1**

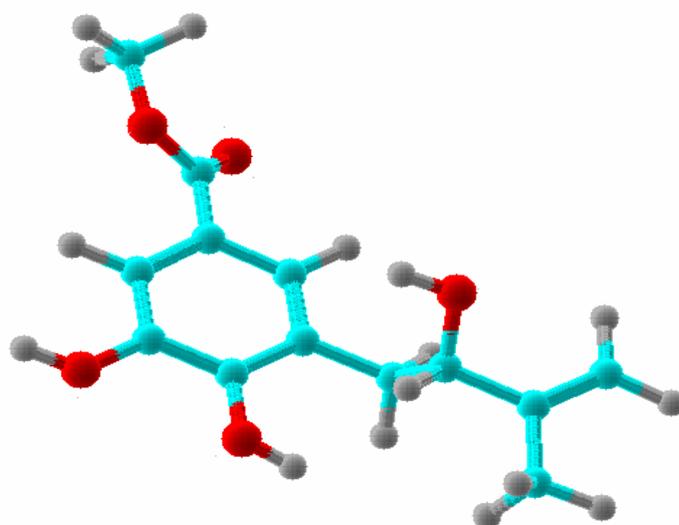
Un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales de RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC), nos permitió asignar las señales correspondientes a los protones existentes en la molécula y correlacionar cada átomo de carbono con sus respectivos protones.

El estudio de las constantes de acoplamiento y el experimento COSY reveló la presencia de un sistema AX<sub>2</sub>, observándose el acoplamiento entre el protón geminal a un grupo hidroxilo a  $\delta_{\text{H}}$  4.42 (H-2') y los protones metilénicos sobre C-1' a  $\delta_{\text{H}}$  2.84 y 2.99.



La localización de los grupos funcionales y los distintos carbonos cuaternarios presentes en la molécula se determinó mediante un experimento HMBC. Así, la regiosustitución en el anillo aromático se estableció por las correlaciones observadas entre los protones H-2 a  $\delta_H$  7.48 y H-6 a  $\delta_H$  7.33 con el carbono C-4 ( $\delta_C$  147.3) y el carbono carboxílico ( $\delta_C$  167.2); la cadena isoprénica se estableció mediante las correlaciones de H-2' a  $\delta_H$  4.42 y el metilo Me-5' a  $\delta_H$  1.81 con los carbonos C-3' ( $\delta_C$  145.9) y C-4' ( $\delta_C$  111.5), mientras la posición de la cadena isoprénica sobre el anillo aromático se fijó sobre el carbono C-5 mediante las correlaciones observadas del protón H-2' con el carbono C-5 ( $\delta_C$  125.2) y de H-1' ( $\delta_H$  2.99) con los carbonos C-6 ( $\delta_C$  124.6), C-5 y C-4.

Estos datos nos permitieron establecer de forma inequívoca la estructura de **AB-1** como **3,4-dihidroxi-5-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoato de metilo**.

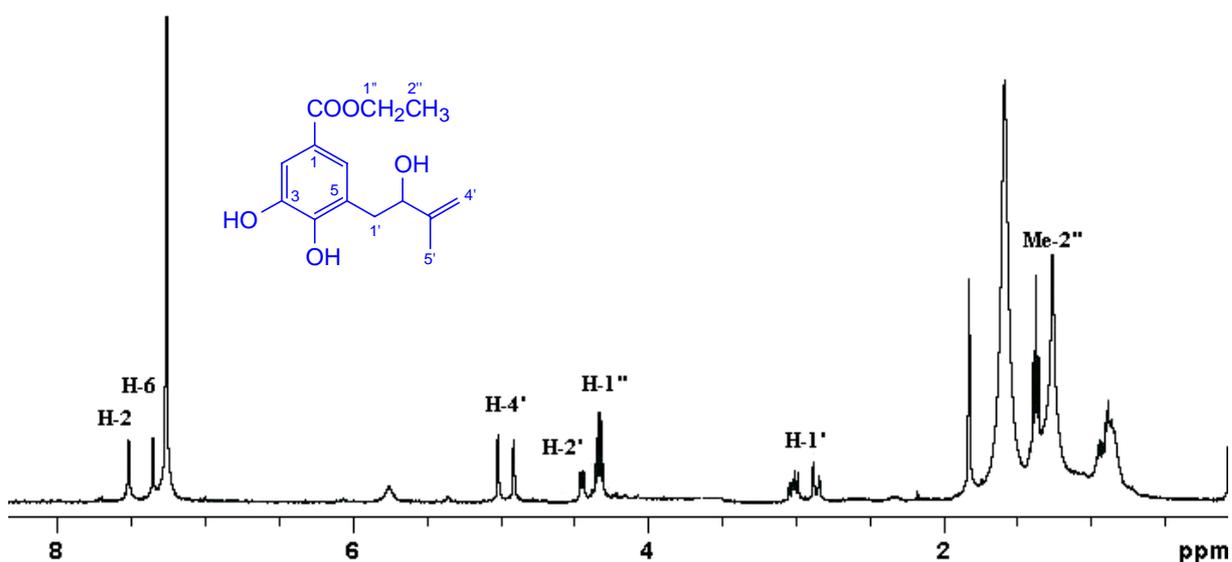


Estructura tridimensional de **B-1**

## Determinación estructural del producto AB-2

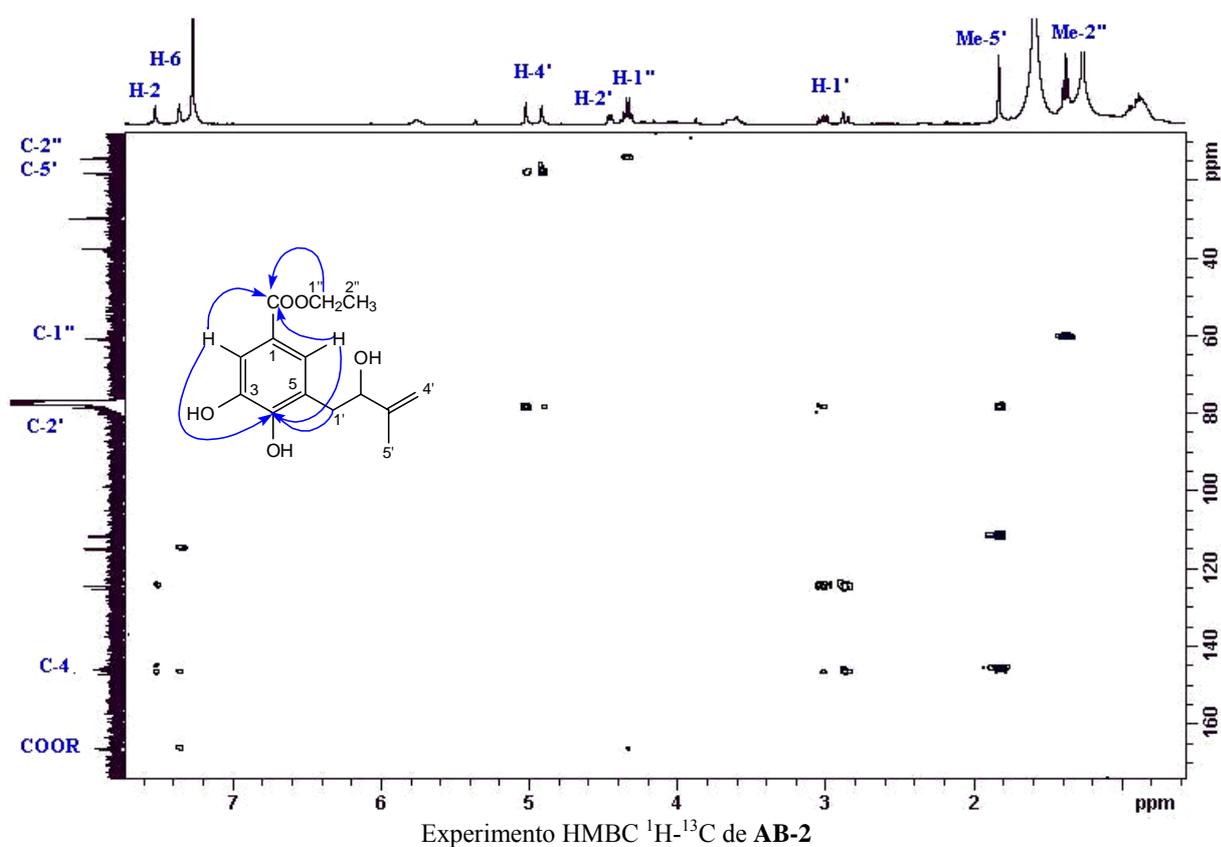
La estructura del compuesto que hemos denominado **AB-2** se estableció mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos, tal como se describe a continuación. Su fórmula molecular  $C_{14}H_{18}O_5$ , fue fijada basándonos en sus datos de espectrometría de masas de alta resolución.

El estudio de los datos espectroscópicos de IR, UV, RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  (tablas 3 y 4) nos indicó que nuestro producto era un derivado del ácido benzoico que presentaba en su estructura dos grupos fenólicos, un alcohol secundario y un grupo etoxilo. Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **AB-1** y **AB-2** mostró que ambos productos están relacionados, siendo la principal diferencia en sus espectros de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  la ausencia de las señales correspondientes al grupo metoxilo a  $\delta_H$  3.85 y  $\delta_C$  51.9 presente en **AB-1** y la presencia de señales correspondientes a un grupo etoxilo adicional en **AB-2** [ $\delta_H$  1.37 (3H, t,  $J=7.2$  Hz, H-2''),  $\delta_C$  14.1 (c, C-2'') y  $\delta_H$  4.32 (2H, c,  $J=7.2$  Hz, H-1''),  $\delta_C$  60.4 (t, C-1'')]. Estos datos están de acuerdo con una estructura de benzoato de etilo derivado de **AB-1** para nuestro producto **AB-2**.



Espectro de RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz) de **AB-2**

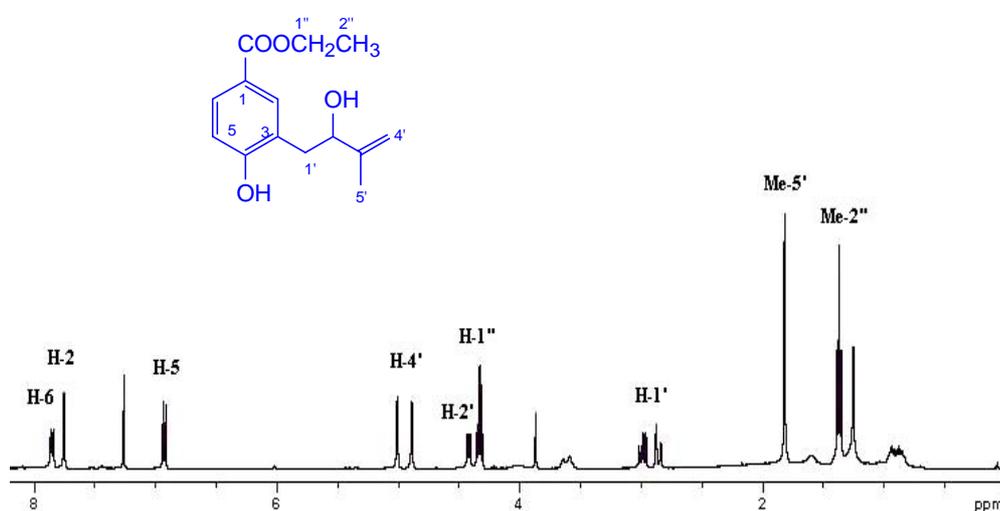
La estructura propuesta fue confirmada mediante el estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC). Así, podemos destacar las correlaciones a larga distancia observadas en el experimento HMBC entre los protones aromáticos H-2 ( $\delta_H$  7.51) y H-6 ( $\delta_H$  7.35) y los protones metilénicos H-1' ( $\delta_H$  3.01) con el carbono fenólico C-4 a  $\delta_C$  146.5, lo que situó la cadena de isopreno sobre el carbono C-5; correlación del protón H-6 y los protones metilénicos H-1'' ( $\delta_H$  4.32) con el carbono carboxílico a  $\delta_C$  166.2, permitió fijar la posición del grupo etoxilo sobre el carbono C-1.



Estos datos nos permitieron proponer la estructura de **3,4-dihidroxi-5-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoato de etilo** para el compuesto que denominamos **AB-2**.

### Determinación estructural del producto AB-4

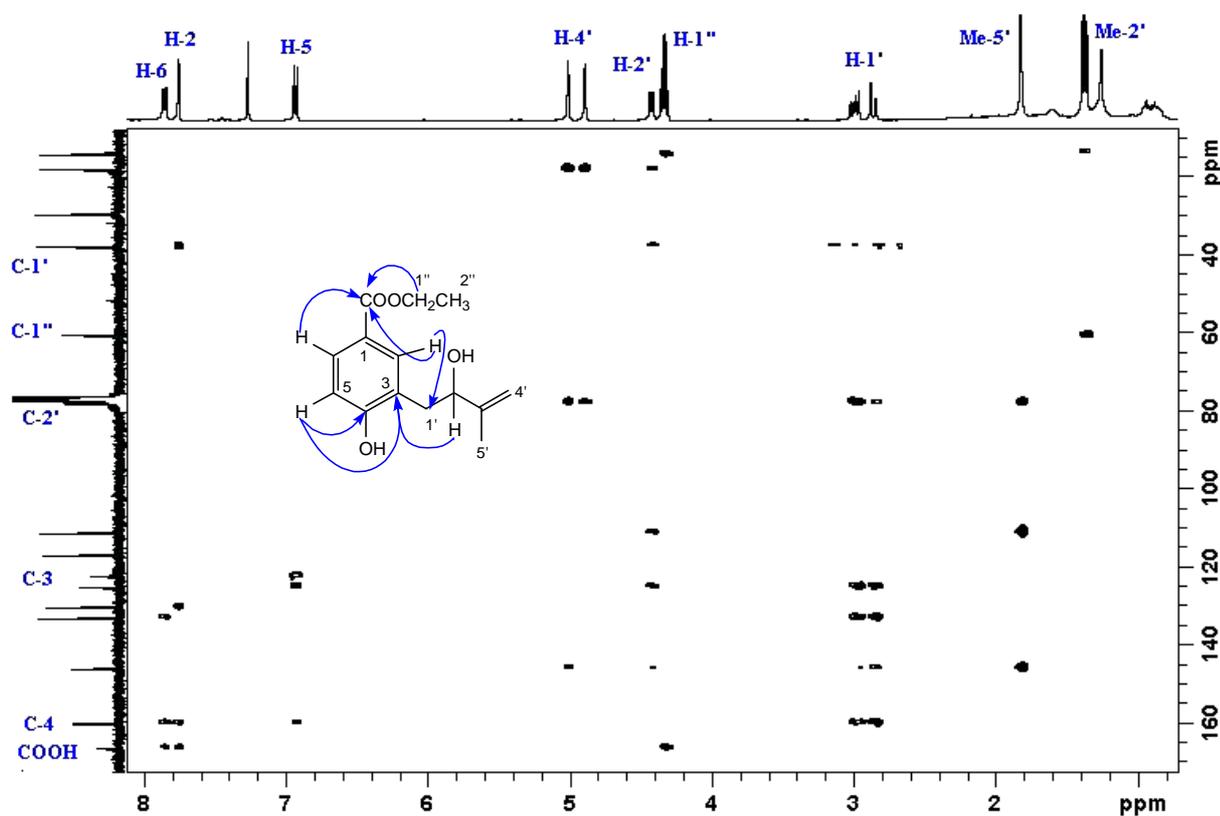
La estructura del compuesto que hemos denominado **AB-4** fue establecida mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos. Su espectro de masas presentó un ión molecular a 250  $m/z$ , que corresponde con una fórmula molecular  $C_{14}H_{18}O_4$  de acuerdo a su espectro de masas de alta resolución (EMAR). Así mismo, se observaron fragmentos correspondientes a la pérdida de agua  $[M-H_2O]^+$  a 232  $m/z$  y pérdida de etoxilo  $[M-OCH_2-CH_3]^+$  a 205  $m/z$ . En el espectro de IR se observaron bandas correspondientes a grupo hidroxilo ( $3409\text{ cm}^{-1}$ ), éster ( $1690\text{ cm}^{-1}$ ) y anillo aromático ( $1607$  y  $772\text{ cm}^{-1}$ ).



Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **AB-4**

El estudio de los datos espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (tablas 3 y 4) nos indicó que nuestro producto era un derivado del ácido benzoico, que presentaba un grupo fenólico, un grupo etoxilo y una cadena de isopreno con un alcohol secundario y un doble enlace terminal. La comparación de sus datos espectroscópicos con los del producto **AB-2**, mostró que la principal diferencia era la sustitución del anillo aromático, así mientras el compuesto **AB-2** presenta este anillo tetrasustituido, en el compuesto **AB-4** este se encuentra trisustituido. Así, en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de **AB-4** se observaron señales a  $\delta_{\text{H}}$  6.92 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5) y  $\delta_{\text{C}}$  116.9 (d, C-5), mientras que en **AB-2** el carbono C-5 corresponde a un carbono cuaternario a  $\delta_{\text{C}}$  145.7 (s, C-5).

La estructura se confirmó mediante el estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC). Así, podemos destacar en el experimento COSY la correlación entre H-1' ( $\delta$  2.85, 2.99) y H-2' ( $\delta$  4.42) y en el experimento HMBC las correlaciones del protón H-5 ( $\delta_H$  6.92) con C-4 ( $\delta_C$  160.0) y C-3 ( $\delta_C$  125.0) y de H-2' ( $\delta_H$  4.42) con C-3. Estos datos nos permitieron establecer la estructura de nuestro producto como **4-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoato de etilo**.

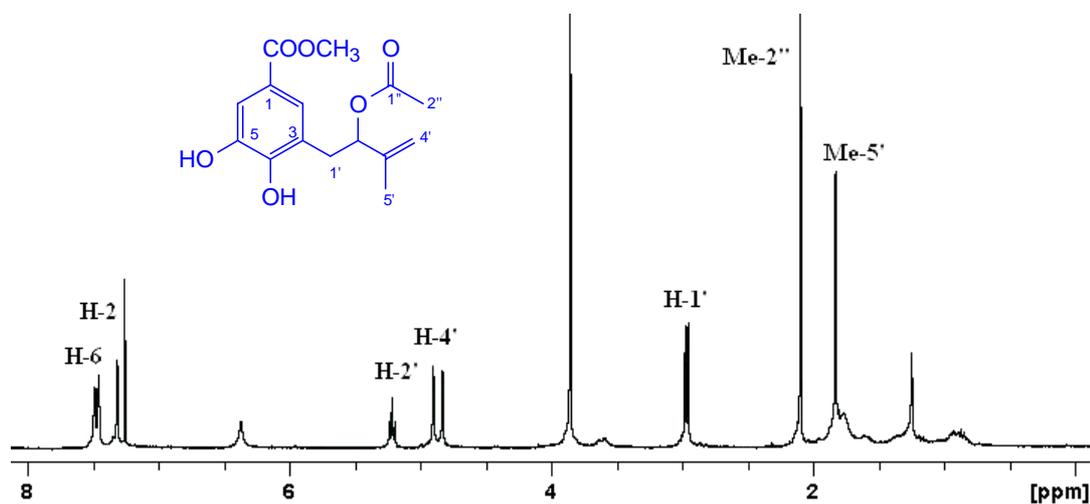


Experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **AB-4**

## Determinación estructural del producto AB-5

El análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos nos permitieron establecer la estructura del compuesto que hemos denominado **AB-5**. Así, presentó un ión molecular a 294  $m/z$ , que está de acuerdo con una fórmula molecular de  $C_{15}H_{18}O_6$ , determinada por espectrometría de masas de alta resolución y un fragmento correspondiente a la pérdida de un grupo acetato [ $M^+ - 60$ ] a 234  $m/z$ . En el espectro de IR se observaron bandas características de grupo hidroxilo, éster y anillo aromático.

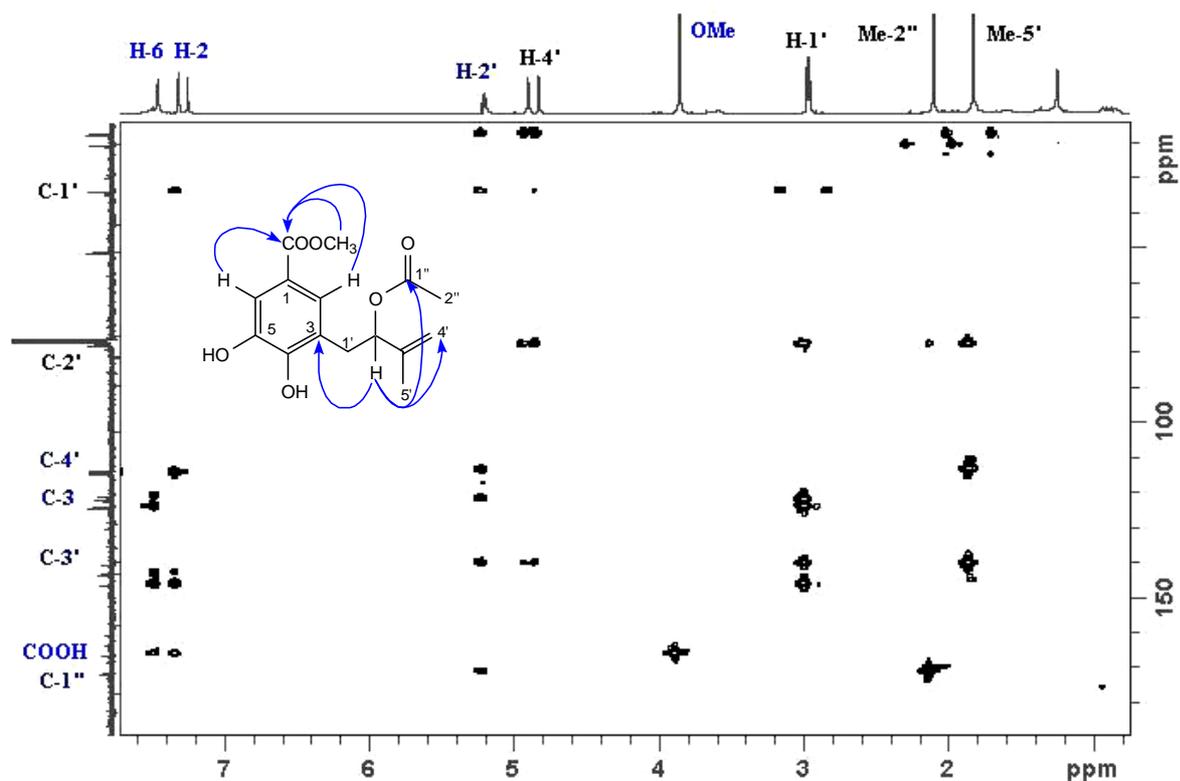
Su espectro de RMN  $^1H$  (tabla 3) presentó señales para tres metilos, uno sobre doble enlace a  $\delta$  1.83 (s, H-5'), un metilo de grupo acetato a  $\delta$  2.10 (s, H-2'') y otro correspondiente a un grupo metoxilo a  $\delta$  3.86, señales correspondientes a dos metilenos, uno como doblete a  $\delta$  2.97 ( $J= 6.3$  Hz, H-1') y el otro como dos singuletes a  $\delta$  4.83 y 4.90 (H-4'), estos últimos característicos de protones de un metileno terminal. Así mismo, se observó una señal correspondiente a un protón geminal a un grupo éster a  $\delta$  5.20 (t,  $J= 6.4$  Hz, H-2') y en la región aromática señales para dos protones como dobletes a  $\delta$  7.32 ( $J= 1.9$  Hz, H-2) y 7.46 ( $J= 1.9$  Hz, H-6), lo que nos indica la presencia de un anillo aromático tetrasustituido.



Espectro de RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz) de **AB-5**

Estos datos fueron confirmados en su espectro de RMN de  $^{13}C$  (tabla 4), donde se observaron señales para 15 carbonos distribuidos de la siguiente forma, tres cuartetos, dos

tripletes, tres dobletes y siete singuletes, destacando las señales correspondientes a dos carbonos carboxílicos a  $\delta_C$  166.9 y 171.9, asignables a un grupo metil éster y un grupo acetato. Un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales COSY y HSQC, nos permitieron la asignación de las señales correspondientes a los protones existentes en la molécula y además correlacionar cada átomo de carbono con sus respectivos protones, datos que indican que nuestro producto **AB-5** es un derivado del ácido benzoico con una cadena isoprénica, un grupo metoxilo, un grupo acetato y dos grupos fenólicos.



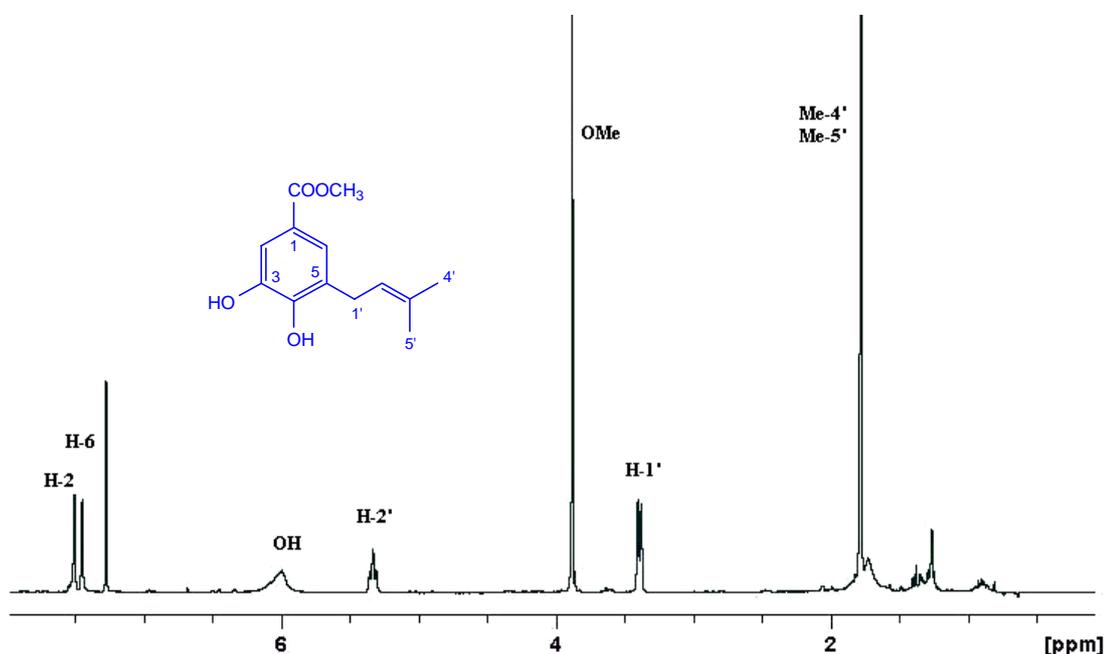
Experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **AB-5**

La localización de los grupos funcionales presentes en la molécula fue determinada mediante un experimento HMBC. Así, las correlaciones observadas de los protones aromáticos H-2 ( $\delta$  7.32) y H-6 ( $\delta$  7.46) y el metoxilo ( $\delta$  3.86) con el carbono carboxílico a  $\delta$  166.9, nos permitió situar los sustituyentes sobre el anillo aromático; las correlaciones del protón H-2' ( $\delta$  5.20) con los carbonos C-4' ( $\delta$  114.2), C-3 ( $\delta$  122.5) y C-1'' ( $\delta$  171.9), situó la cadena isoprénica sobre C-5 y el grupo acetato sobre C-2'. Estos datos nos permitieron establecer la estructura del **AB-5** como **3-[2-(acetoxi)-3-metil-3-butenil]-4,5-dihidroxibenzoato de metilo**.

## Determinación estructural del producto AB-7

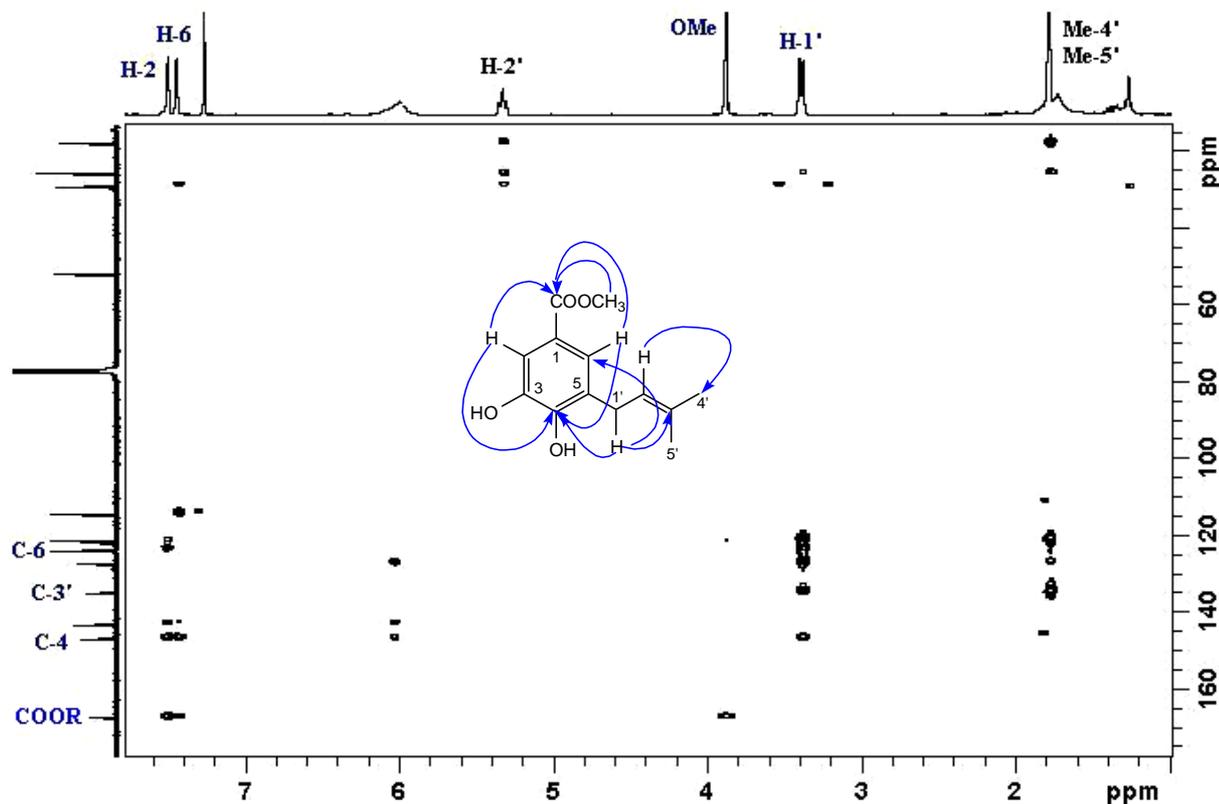
La estructura del compuesto que hemos denominado **AB-7** se estableció mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos. Así, el compuesto presentó un ión molecular a 236  $m/z$ , que está de acuerdo con una fórmula molecular de  $C_{13}H_{16}O_4$ , determinada por espectrometría de masas de alta resolución. En el espectro de IR se observaron bandas correspondientes a grupo hidroxilo ( $3471\text{ cm}^{-1}$ ), éster ( $1692\text{ cm}^{-1}$ ) y anillo aromático ( $1604$  y  $768\text{ cm}^{-1}$ ).

Su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (tabla 3) presentó un singlete a  $\delta$  1.78 que integra para seis protones, assignable a dos metilos sobre doble enlace (Me-4' y Me-5'); una señal a  $\delta$  3.83 como singlete, assignable a un metoxilo; un doblete correspondiente a dos protones alilbencílicos a  $\delta$  3.38 ( $J= 7.2\text{ Hz}$ , H-1'); una señal característica de un protón vinílico a  $\delta$  5.32 (t,  $J= 7.2\text{ Hz}$ , H-2') y en la región aromática se observaron señales para dos protones a  $\delta$  7.43 ( $J= 1.8\text{ Hz}$ , H-6) y 7.49 ( $J= 1.8\text{ Hz}$ , H-2), lo que nos indica la presencia de un derivado del benzoato de metilo trisustituido.



Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **AB-7**

Los datos anteriores se corroboran con su espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (tabla 4), que presentó señales para 13 carbonos, destacando las señales correspondientes a un doble enlace trisustituido a  $\delta_{\text{C}}$  121.8 (d, C-2') y 134.9 (s, C-3') y un carbono carboxilo a  $\delta_{\text{C}}$  167.3. El conjunto de estos datos está de acuerdo con una estructura de derivado del ácido benzoico que presenta un grupo éster metílico, dos grupos fenólicos y una cadena de isopreno.



Experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **AB-7**

La estructura propuesta fue confirmada mediante el estudio de los experimentos bidimensionales homo (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC). Así, podemos destacar como correlaciones más significativas en el experimento HMBC, la correlación de los protones H-1' con los carbonos a  $\delta_{\text{C}}$  146.8 (C-4),  $\delta_{\text{C}}$  123.9 (C-6) y  $\delta_{\text{C}}$  134.9 (C-3'); las correlaciones de los protones aromáticos H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  7.49) y H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  7.43) y el grupo metoxilo a  $\delta_{\text{H}}$  3.83 con el carbono carboxílico a  $\delta_{\text{C}}$  167.3, así como las correlaciones de H-2 y H-6 con el carbono C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  146.8). Estos datos nos permitieron determinar de forma inequívoca la estructura de **AB-7** como **3,4-dihidroxi-5-(3-metil-2-butenil) benzoato de metilo**.

Tabla 3. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) de derivados del ácido benzoico

Posición	AB-1	AB-2	AB-4	AB-5	AB-7
<b>H-2</b>	7.48 dd (1.9)	7.51 d (2.0)	7.75 d (2.1)	7.32 d (1.9)	7.49 (1.8)
<b>H-5</b>			6.92 d (8.4)		
<b>H-6</b>	7.33 d (1.9)	7.35 d (2.0)	7.85 dd (2.1, 8.4)	7.46 d (1.9)	7.43 d (1.8)
<b>H-1'</b>	2.84 dd (2.1, 14.7) 2.99 dd (8.5, 14.7)	2.85 dd (2.0, 14.4) 3.01 dd (8.8, 14.4)	2.85 dd (2.2, 14.8) 2.99 dd (8.5, 14.8)	2.97 d (6.4)	3.38 d (7.2)
<b>H-2'</b>	4.42 dd (2.1, 8.5)	4.44 dd (2.0, 8.8)	4.42 dd (2.2, 8.5)	5.20 t (6.4)	5.32 t (7.2)
<b>H-4'</b>	4.88 s 5.99 s	4.90 s 5.01 s	4.89 s 5.01 s	4.83 s 4.90 s	1.78 s*
<b>H-5'</b>	1.81 s	1.82 s	1.82 s	1.83 s	1.78 s*
<b>OCH<sub>3</sub></b>	3.85 s			3.86 s	3.83 s
<b>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></b>		4.32 c (7.2) 1.37 t (7.2)	4.32 c (7.1) 1.37 t (7.1)		

<sup>a</sup> δ, CDCl<sub>3</sub>. *J* en paréntesis en Hz. Datos basados en los experimentos COSY y HSQC

\* Señales solapadas

Tabla 4. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz) de derivados del ácido benzoico

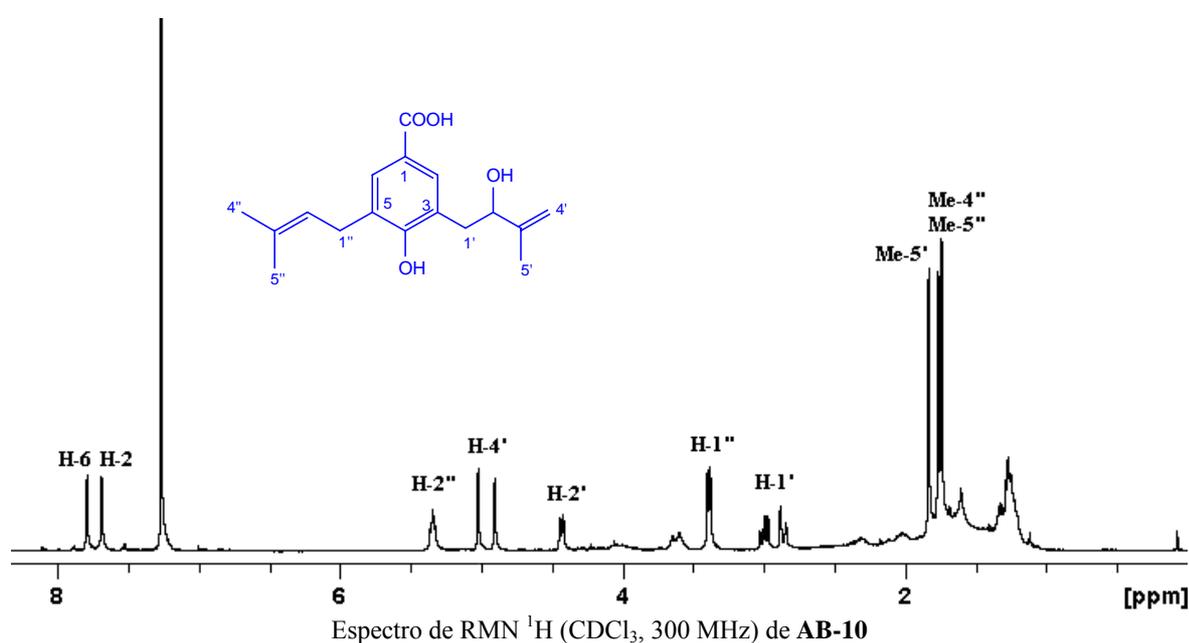
Posición	AB-1	AB-2	AB-4	AB-5	AB-7
<b>C-1</b>	122.3 s	122.4 s	122.1 s	121.4 s	122.2 s
<b>C-2</b>	114.9 d	114.6 d	133.1 d	124.7 d	114.5 d
<b>C-3</b>	145.5 s	146.7 s	125.0 s	122.5 s	143.1 s
<b>C-4</b>	147.3 s	146.5 s	160.0 s	146.9 s	146.8 s
<b>C-5</b>	125.2 s	124.9 s	116.9 d	143.6 s	127.3 s
<b>C-6</b>	124.6 d	124.2 d	130.2 d	114.2 d	123.9 d
<b>COOR</b>	167.2 s	166.2 s	166.4 s	166.9 s	167.3 s
<b>C-1'</b>	37.7 t	37.5 t	37.8 t	34.2 t	29.2 t
<b>C-2'</b>	78.3 d	78.4 d	77.9 d	78.1 d	121.8 d
<b>C-3'</b>	145.9 s	145.7 s	145.9 s	140.9 s	134.9 s
<b>C-4'</b>	111.5 t	111.4 t	111.2 t	114.2 t	17.9 c
<b>C-5'</b>	18.1 c	17.9 c	18.1 c	17.8 c	25.8 c
<b>OMe</b>	51.9 c			51.8 c	52.0 c
<b>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></b>		60.4 t 14.1 c	60.4 t 14.2 c		
<b>OCOCH<sub>3</sub></b>				171.9 s 21.0 c	

<sup>a</sup> δ, CDCl<sub>3</sub>. Datos basados en los experimentos DEPT, HSQC y HMBC

\* Señales solapadas

## Determinación estructural del producto AB-10

El análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos nos permitieron establecer la estructura del compuesto que hemos denominado **AB-10**, el cual presentó un ión molecular a 290  $m/z$ , correspondiente a una fórmula molecular  $C_{17}H_{22}O_4$ , calculada por espectrometría de masas de alta resolución (EMAR). En el espectro de IR se observaron bandas correspondientes a grupo hidroxilo ( $3370\text{ cm}^{-1}$ ), ácido carboxílico ( $3520\text{-}2670$ ,  $1680\text{ cm}^{-1}$ ) y anillo aromático ( $1601$  y  $776\text{ cm}^{-1}$ ).

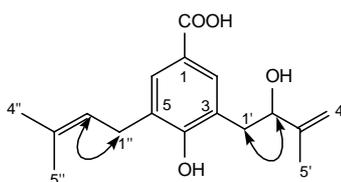


Su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (tabla 5) presentó señales correspondientes a tres metilos como singletes a  $\delta$  1.74, 1.76 y 1.83, que por sus desplazamientos químicos nos indicaron se trataban de metilos sobre doble enlace (Me-4'', Me-5'' y Me-5'); señales para tres sistemas metilénicos, uno de ellos como dos dobles dobles a  $\delta$  2.86 (1H,  $J= 1.3$ , 11.0 Hz, H-1') y 2.99 (1H,  $J= 6.5$ , 11.0 Hz, H-1') acoplados con una señal a  $\delta$  4.43 (1H,  $J= 1.3$ , 6.5 Hz, H-2'), asignada a un protón geminal a un grupo hidroxilo; otro metileno como doblete a  $\delta$  3.38 (2H,  $J= 5.4$  Hz, H-1''), acoplado con un metino a  $\delta$  5.34 (1H, t,  $J= 5.4$  Hz, H-2'') correspondiente a un protón vinílico y un metileno terminal con señales a  $\delta$  4.90 y 5.02 (H-4'). Así mismo, en la región aromática se observaron señales para dos protones como dobletes a  $\delta$  7.68 ( $J= 1.3$  Hz, H-2) y 7.79 ( $J= 1.3$  Hz, H-6), señales que están de acuerdo con un derivado del ácido benzoico trisustituido.

Estos datos fueron confirmados en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (tabla 6), donde se observaron señales para 17 carbonos, que confirma la fórmula molecular dada por EMAR y que junto con los experimentos DEPT 90 y 135 establece la existencia en la molécula de tres metilos a  $\delta_{\text{C}}$  17.5 (c, C-4''), 17.9 (c, C-5') y 25.6 (c, C-5''); tres metilenos a  $\delta_{\text{C}}$  28.6 (t, C-1''), 37.9 (t, C-1') y 111.2 (t, C-4'); cuatro metinos a  $\delta_{\text{C}}$  77.9 (d, C-2'), 121.7 (d, C-2''), 130.7 (d, C-6) y 131.5 (d, C-2), y siete carbonos cuaternarios a  $\delta_{\text{C}}$  121.8 (s, C-1), 124.9 (s, C-3), 129.5 (s, C-5), 133.2 (s, C-3''), 146.2 (s, C-3'), 158.9 (s, C-4) y 170.1 (COOH). El conjunto de estos datos están de acuerdo con una estructura de ácido benzoico con dos cadenas isoprénicas, una de ellas hidroxilada y un grupo fenólico para nuestro compuesto **AB-10**.

Un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales de RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC), nos permitieron la asignación de las señales correspondientes a los protones existentes en la molécula y además correlacionar cada átomo de carbono con sus respectivos protones.

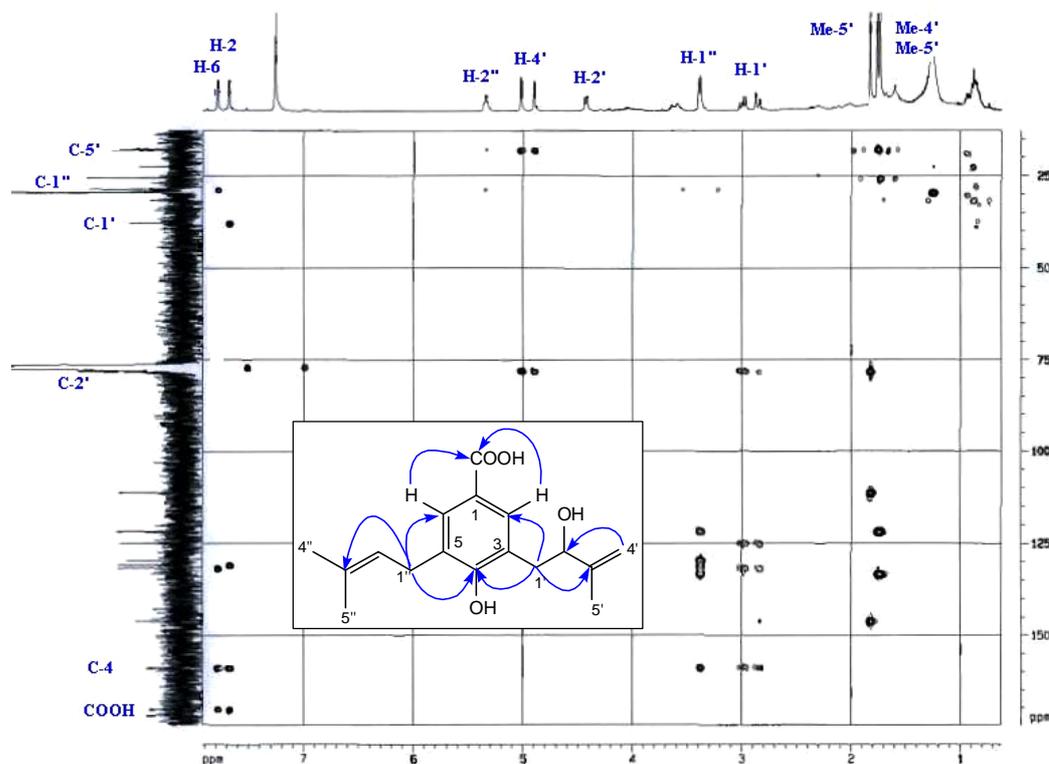
Así, el experimento COSY confirmó la presencia de dos unidades isoprénicas, mostrando acoplamiento entre el protón geminal al grupo hidroxilo H-2' a  $\delta$  4.43 con los protones metilénicos situados sobre C-1' a  $\delta$  2.86 y 2.99, así como correlación del protón vinílico H-2'' ( $\delta$  5.34) con los protones metilénicos H-1'' ( $\delta$  3.38).



Correlaciones  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) de **AB-10**

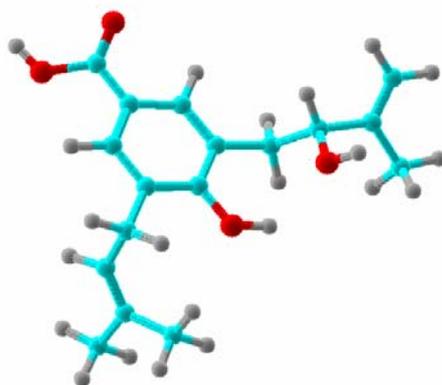
La regiosustitución del anillo aromático se estableció por las correlaciones observadas en el espectro de HMBC. En este experimento se observó correlación a tres enlaces entre la señal de los protones alilbencílico H-1' con los carbonos C-2 ( $\delta$  131.5), C-4 ( $\delta$  158.9) y C-3' ( $\delta$  146.2), así como correlación del metileno H-4' ( $\delta$  4.90, 5.02) con el carbono C-2' ( $\delta$  77.9), datos que nos permitieron situar la cadena de isopreno hidroxilada sobre C-3. Por otro lado, la otra cadena de

isopreno se situó sobre C-5, al observar correlación a tres enlaces de los protones H-1'' a  $\delta$  3.38 con los carbonos C-6 ( $\delta$  130.7), C-4 ( $\delta$  158.9) y C-3'' ( $\delta$  133.2), y correlación de los protones aromáticos H-2 ( $\delta$  7.68) y H-6 ( $\delta$  7.79) con el carbono del ácido carboxílico a  $\delta_C$  170.1.



Experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **AB-10**

Estos datos nos permitieron establecer de forma inequívoca la estructura de **AB-10** como el ácido 4-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-5-(3-metil-2-butenil) benzoico.

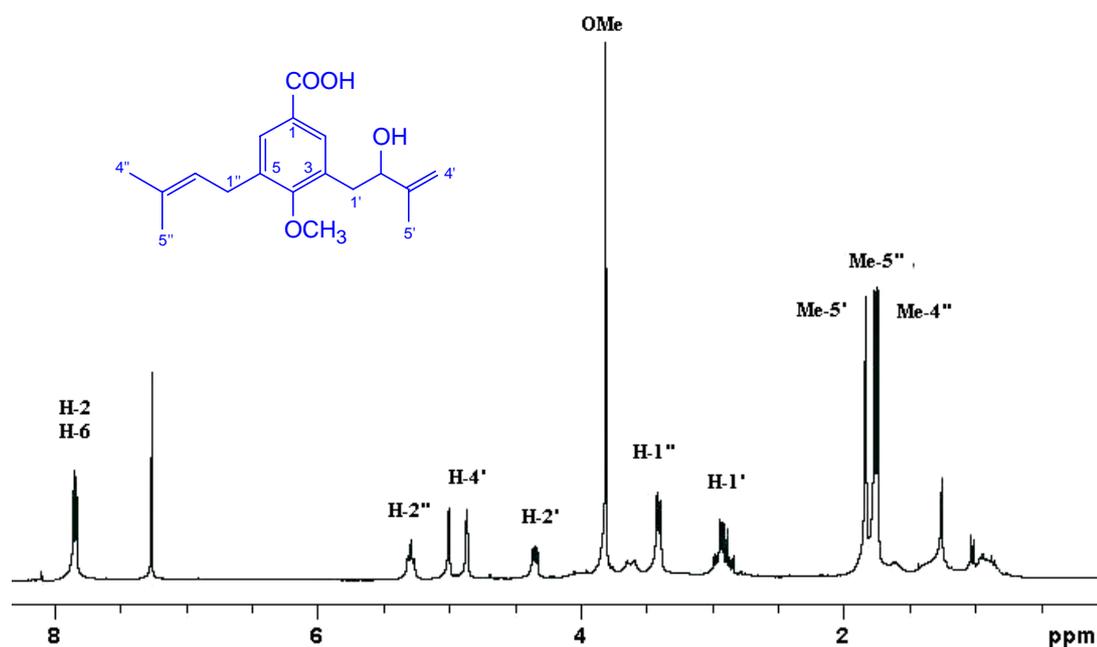


Estructura tridimensional de **AB-10**

## Determinación estructural del producto AB-11

La estructura del compuesto que hemos denominado **AB-11** se estableció mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos, tal como se describe a continuación. Su fórmula molecular  $C_{18}H_{24}O_4$  se determinó basándonos en sus datos de espectrometría de masas de alta resolución.

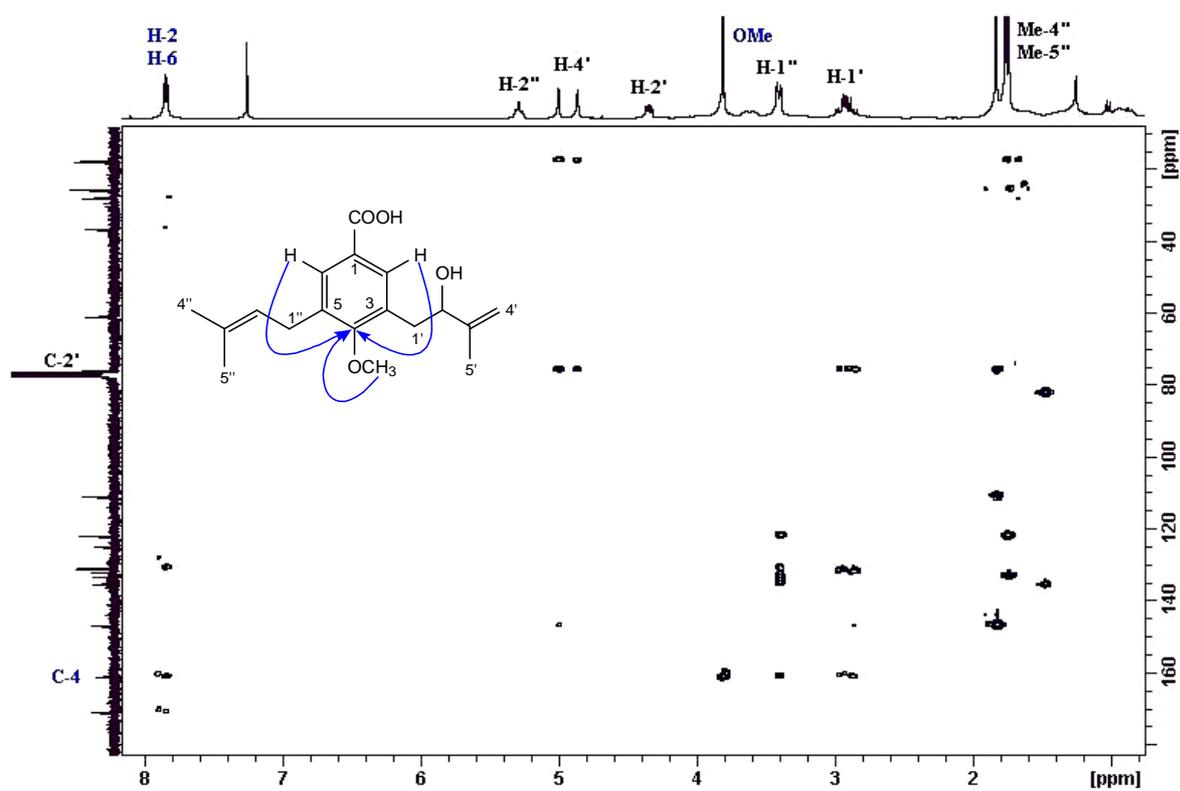
El estudio de los datos espectroscópicos de IR, UV, RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  (tablas 5 y 6) nos indicó que el producto **AB-11** era un derivado del ácido benzoico que presenta en su estructura un ácido carboxílico, un grupo metoxilo y dos cadenas de isopreno, una de ellas con un alcohol secundario. El estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **AB-11** y **AB-10**, mostró que ambos productos están relacionados, siendo la principal diferencia en sus espectros de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  la presencia de un grupo metoxilo adicional en **AB-11** a  $\delta_H$  3.82 y  $\delta_C$  60.8, datos que están de acuerdo con una estructura de 4-metil éter derivado de **AB-10**.



Espectro de RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz) de **AB-11**

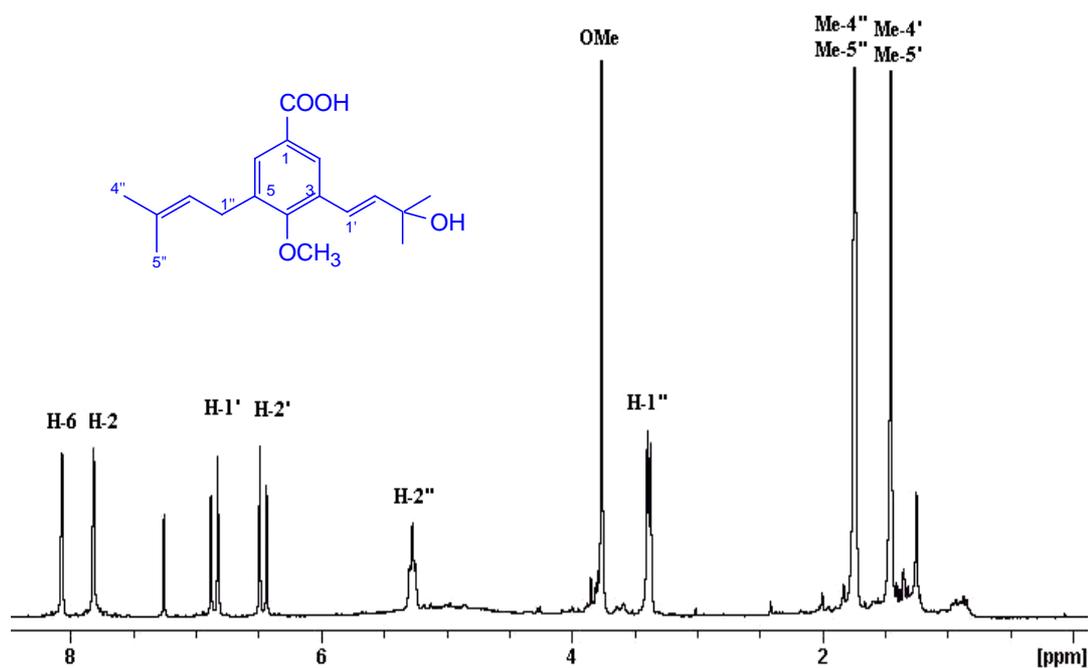
La estructura propuesta fue confirmada mediante el estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC). Así, podemos destacar en el experimento HMBC, correlación a tres enlaces de los protones aromáticos H-2 a  $\delta$  7.83 y H-6 a  $\delta$  7.85 y del metoxilo a  $\delta$  3.82 con el carbono C-4 a  $\delta$  161.1.

El conjunto de estos datos nos permitieron proponer la estructura de **AB-11** como **ácido 3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-5-(3-metil-2-butenil)-4-metoxibenzoico**.



## Determinación estructural del producto AB-12

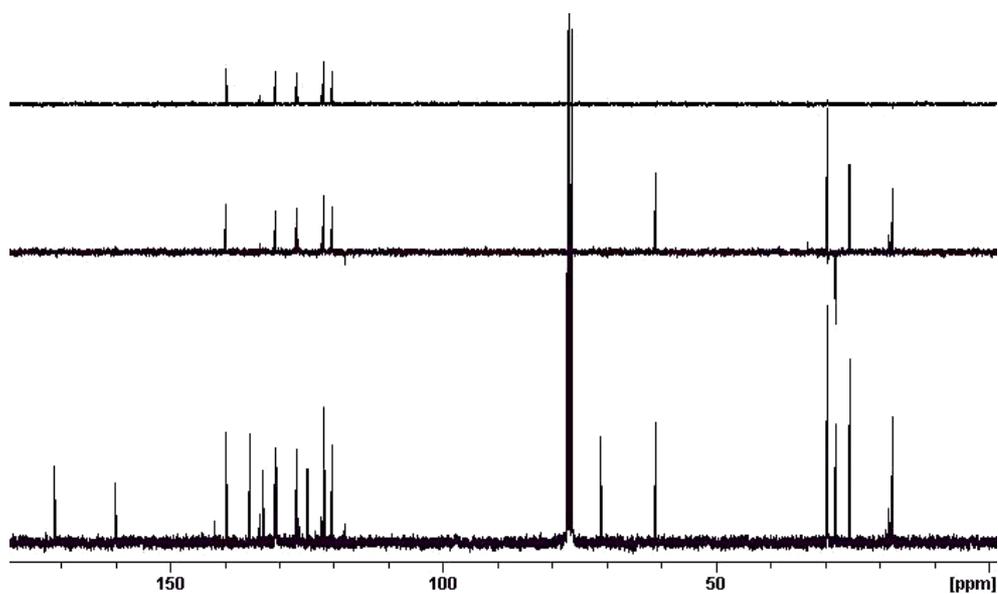
El análisis de los datos espectroscópicos y espectrométricos del compuesto que hemos denominado **AB-12** nos permitió establecer su estructura, que presentó un ión molecular a 304  $m/z$  y un fragmentos correspondientes a la pérdida de agua  $[M-H_2O]^+$  a 286  $m/z$  en su espectro de masas de baja resolución, que corresponde con una fórmula molecular  $C_{18}H_{24}O_4$  (EMAR). En el espectro de IR se observaron bandas correspondientes a grupo hidroxilo ( $3433\text{ cm}^{-1}$ ), ácido carboxílico ( $3829-2790, 1696\text{ cm}^{-1}$ ) y anillo aromático ( $1601$  y  $757\text{ cm}^{-1}$ ).



Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **AB-12**

El estudio de los datos espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (tablas 5 y 6) nos indicó que el producto era un derivado del ácido benzoico que presentaba en su estructura un ácido carboxílico, un grupo metoxilo y dos cadenas de isopreno, una de ellas con un alqueno disustituido y un alcohol terciario. La comparación de los datos espectroscópicos del compuesto **AB-12** con los del producto descrito anteriormente **AB-11**, mostró que ambos productos están relacionados, siendo la única diferencia estructural la funcionalización de una de las cadenas de isopreno, tal como se describe a continuación. En su espectro de RMN  $^1\text{H}$  presentó señales para dos metilos como un singulete a  $\delta$  1.46 (Me-4' y Me-5') que integra para seis protones y señales

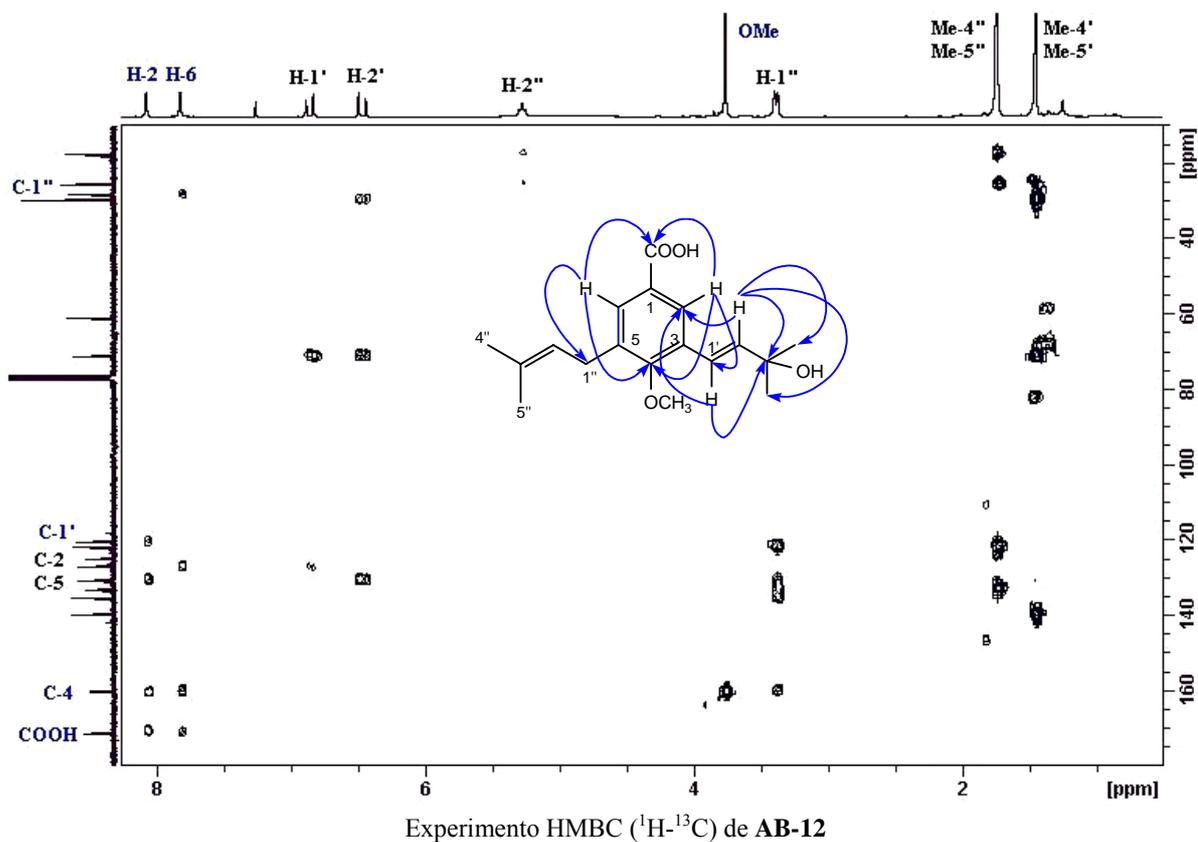
para dos protones vinílicos como dobletes a  $\delta$  6.46 ( $J= 16.2$  Hz, H-2') y  $\delta$  6.86 ( $J= 16.2$  Hz, H-1'). Estos datos fueron confirmados en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  que presentó señales para 18 carbonos, y los experimentos DEPT 90 y 135 indicaron la presencia de cuatro metilos, un grupo metoxilo, un metileno, cinco metinos y siete carbonos cuaternarios en la molécula, siendo las señales más significativas las correspondientes a la nueva cadena de isopreno a  $\delta$  29.6 (2xc, C-4', C-5'), 71.1 (s, C-3'), 120.4 (d, C-1') y 139.8 (d, C-2').



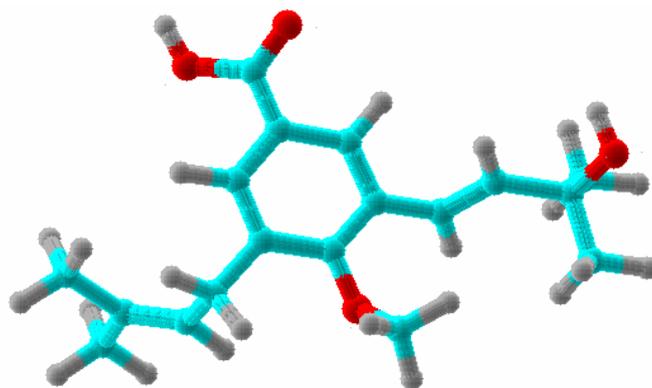
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) de **AB-12**

El estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC), nos permitieron confirmar la estructura propuesta. Así, la regiosustitución en la molécula se estableció mediante el análisis de un experimento HMBC, en el que se observó como correlaciones más significativas las de los protones aromáticos H-2 y H-6 con el carbono carboxílico ( $\delta$  171.2) y C-4 ( $\delta$  160.1); correlación de H-1' ( $\delta$  6.86) y H-2' ( $\delta$  6.46) con el carbono cuaternario C-3' ( $\delta$  71.1) y de este último protón con los Me-4' y Me-5' ( $\delta$  1.46), lo que estableció la posición del alcohol terciario sobre una de las cadenas isoprénicas; por otra parte, correlación de H-2 con C-1' ( $\delta$  120.4) y de H-6 con C-1'' ( $\delta$  28.1) fijó las cadenas isoprénicas sobre los carbonos C-3 y C-5 del anillo aromático.

La estereoquímica relativa del doble enlace  $\Delta^1$  fue establecida mediante el estudio de las constantes de acoplamiento ( $J= 16.2$  Hz), que nos indicó una relación *trans* entre los protones H-1' y H-2'.



Estos datos nos permitieron establecer de forma inequívoca la estructura de AB-12 como el ácido-3-(1-*trans*-3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-5-(3-metil-2-butenil)-4-metoxi benzoico.

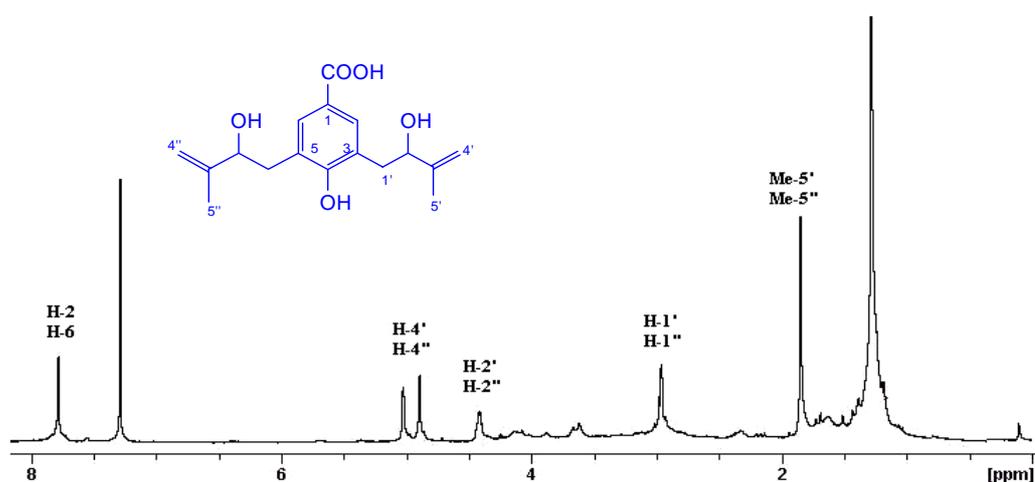


Estructura tridimensional de AB-12

### Determinación estructural del producto AB-13

Al compuesto que hemos denominado **AB-13**, le asignamos la fórmula molecular  $C_{17}H_{22}O_5$ , basándonos en sus datos de espectrometría de masas de alta resolución. En el espectro de IR se observaron bandas correspondientes a grupo hidroxilo ( $3442\text{cm}^{-1}$ ), ácido carboxílico ( $3494\text{-}2776$ ,  $1699\text{ cm}^{-1}$ ) y anillo aromático ( $1605$  y  $773\text{ cm}^{-1}$ ).

El estudio de sus datos espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (tablas 5 y 6), nos indicó que el producto era un derivado del ácido benzoico que presentaba en su estructura un grupo ácido carboxílico, un grupo fenólico y dos cadenas de isopreno idénticas, con un alqueno terminal y un alcohol secundario. Así, su espectro de RMN  $^1\text{H}$  presentó un singulete a  $\delta$  1.82 que integra para seis protones, correspondientes a dos metilos sobre doble enlace (Me-5'' y Me-5'); una señal a  $\delta$  2.93 (4H, d,  $J= 6.5$  Hz, H-1' y H-1''), asignable a dos metilenos; un doblete a  $\delta$  4.38 que integra para dos protones y que se asignó a dos protones de alcoholes secundarios (H-2' y H-2''); dos singuletes a  $\delta$  4.87 y 5.00, que integran para dos protones cada uno, correspondientes a dos metilenos terminales (H-4' y H-4''); así como un singulete a  $\delta$  7.76, asignable a dos protones aromáticos. Estos datos fueron confirmados en su espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  destacando las señales a  $\delta$  76.8, correspondiente a carbonos de alcohol secundario y a  $\delta$  170.2 asignada a un grupo ácido carboxílico. El estudio detallado de los experimentos 2D homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HMQC y HMBC) permitió establecer la estructura de **AB-13** como el **ácido 4-hidroxi-3,5-bis(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoico**.



Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **AB-13**

Tabla 5. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) de AB-10 a AB-13

Posición	AB-10	AB-11	AB-12	AB-13
H-2	7.68 d (1.3)	7.83 s	7.82 d (1.3)	7.76 s*
H-6	7.79 d (1.3)	7.85 s	8.07 d (1.3)	7.76 s*
H-1'	2.86 dd (1.3, 11.0)	2.87 dd (8.6, 13.8)	6.86 d (16.2)	2.93 d (6.5)*
	2.99 dd (6.5, 11.0)	2.95 dd (4.2, 13.8)		
H-2'	4.43 dd (1.3, 6.5)	4.35 dd (4.2, 8.6)	6.56 d (16.2)	4.38 d (6.5)*
H-4'	4.90 s 5.02 s	4.87 s 5.01 s	1.46 s*	4.87 s* 5.00 s*
H-5'	1.83 s	1.84 s	1.46 s*	1.82 s*
H-1''	3.38 d (5.4)	3.41 d (7.1)	3.38 d (5.4)	2.93 d (6.5)*
H-2''	5.34 t (5.4)	5.29 t (7.1)	5.27 t (5.4)	4.38 d (6.5)*
H-4''	1.74 s	1.75 s	1.74 s*	4.87 s* 5.00 s*
H-5''	1.76 s	1.77 s	1.74 s*	1.82 s*
OCH <sub>3</sub>		3.82 s	3.76 s	

<sup>a</sup> δ, CDCl<sub>3</sub>. *J* en paréntesis en Hz. Datos basados en los experimentos COSY y HSQC

\* Señales solapadas

Tabla 6. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz) de AB-10 a AB-13

Posición	AB-10	AB-11	AB-12	AB-13
C-1	121.8 s	124.8 s	124.9 s	121.7 s
C-2	131.5 d	130.9 d*	126.9 d	132.4 d*
C-3	124.9 s	131.9 s	130.7 s	126.9 s*
C-4	158.9 s	161.1 s	160.1 s	159.6 s
C-5	129.5 s	135.2 s	135.4 s	126.9 s*
C-6	130.7 d	130.9 d*	130.6 d	132.4 d*
COOR	170.1 s	170.1 s	171.2 s	170.2 s
C-1'	37.9 t	36.5 t	120.4 d	37.6 t*
C-2'	77.9 d	75.8 d	139.8 d	76.8 d*
C-3'	146.2 s	146.8 s	71.1 s	146.3 s*
C-4'	111.2 t	110.9 t	29.6 c*	110.9 t*
C-5'	17.9 c	17.8 c	29.6 c*	17.9 c*
C-1''	28.6 t	28.0 t	28.1 t	37.6 t*
C-2''	121.7 d	121.8 d	121.9 d	76.8 d*
C-3''	133.2 s	133.3 s	133.1 s	146.3 s*
C-4''	17.5 c	17.7 c	17.6 c	110.9 t*
C-5''	25.6 c	25.5 c	25.5 c	17.9 c*
OMe		60.8 c	60.1 c	

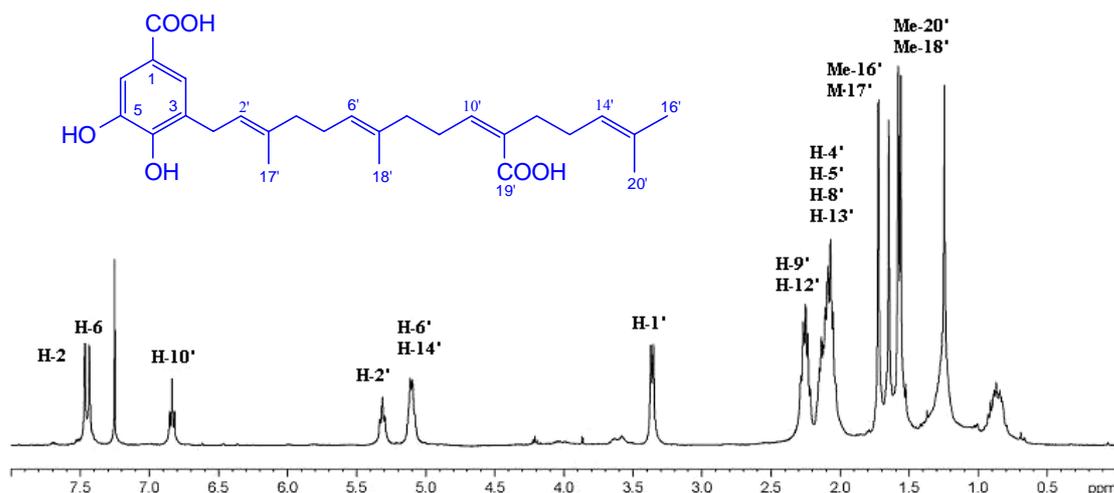
<sup>a</sup> δ, CDCl<sub>3</sub>. Datos basados en los experimentos DEPT, HSQC y HMBC

\* Señales solapadas

## Determinación estructural del producto AB-20

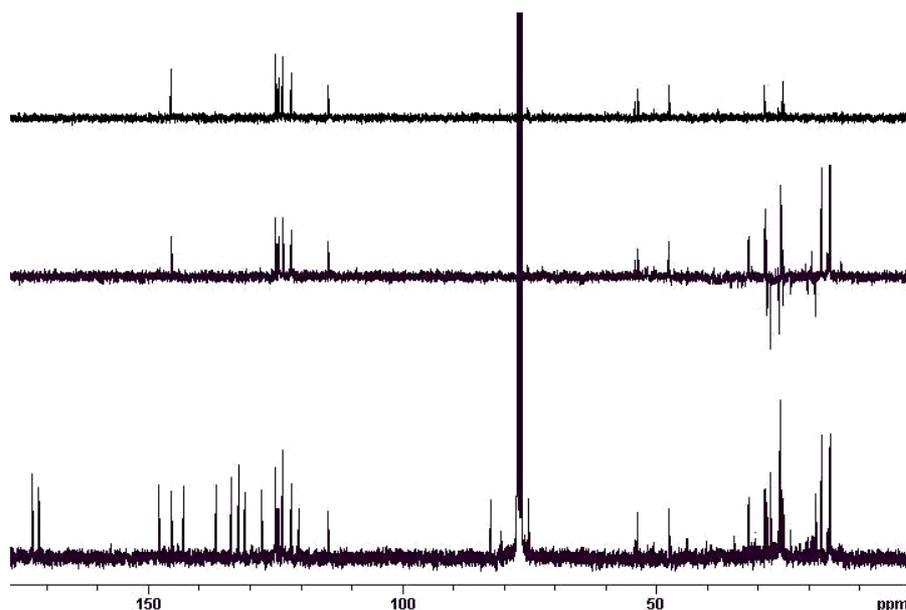
El análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos nos permitieron establecer la estructura del compuesto que hemos denominado **AB-20**, al cual se le asignó una fórmula molecular  $C_{27}H_{34}O_6$ , basándonos en sus espectros de masas de alta resolución, RMN de  $^1H$  y RMN de  $^{13}C$ . En su espectro de masas de baja resolución presentó un ión molecular a  $410 m/z$  [ $M^+ - HCOOH$ ] que corresponde a una fórmula molecular  $C_{26}H_{34}O_4$ , determinada por EMAR. En el espectro de IR se observaron bandas características de grupo hidroxilo ( $3407\text{ cm}^{-1}$ ), ácido carboxílico ( $3520\text{-}2560$ ,  $1681\text{ cm}^{-1}$ ) y anillo aromático ( $1612$  y  $775\text{ cm}^{-1}$ ).

Su espectro de RMN de  $^1H$  (tabla 7) mostró señales correspondientes a cuatro metilos sobre doble enlace a  $\delta$  1.56 (s, H-20'), 1.58 (s, H-18'), 1.65 (s, H-16') y 1.72 (s, H-17'); señales asignables a siete metilenos, seis de ellos como multipletes a  $\delta$  2.05-2.13 (8H, H-4', H-5', H-8', H-13') y 2.19-2.28 (4H, H-9', H-12') y uno como doblete a  $\delta$  3.36 (2H,  $J = 6.7\text{ Hz}$ , H-1'); señales correspondientes a cuatro protones vinílicos, dos de ellos solapados a  $\delta$  5.11 (H-6', H-14') y los otros dos como tripletes a  $\delta$  5.31 ( $J = 6.7\text{ Hz}$ , H-2') y  $\delta$  6.84 ( $J = 7.6\text{ Hz}$ , H-10') y señales correspondientes a dos protones aromáticos como dobletes a  $\delta$  7.44 (1H,  $J = 2.8\text{ Hz}$ , H-6) y 7.47 (1H,  $J = 2.8\text{ Hz}$ , H-2).



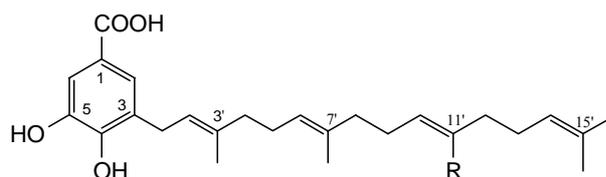
Espectro de RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz) de **AB-20**

Su espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (tabla 8) mostró señales para 27 carbonos, lo que junto con los experimentos DEPT 90 y 135, nos indicó la presencia de cuatro carbonos de metilos, siete carbonos metilénicos, seis carbonos metínicos y diez carbonos cuaternarios, destacando las señales a  $\delta$  142.8 (C-5), 147.7 (C-4), característicos de carbonos fenólicos y los carbonos a  $\delta$  171.3 (COOH), 172.6 (C-19'), asignados a dos ácidos carboxílicos.



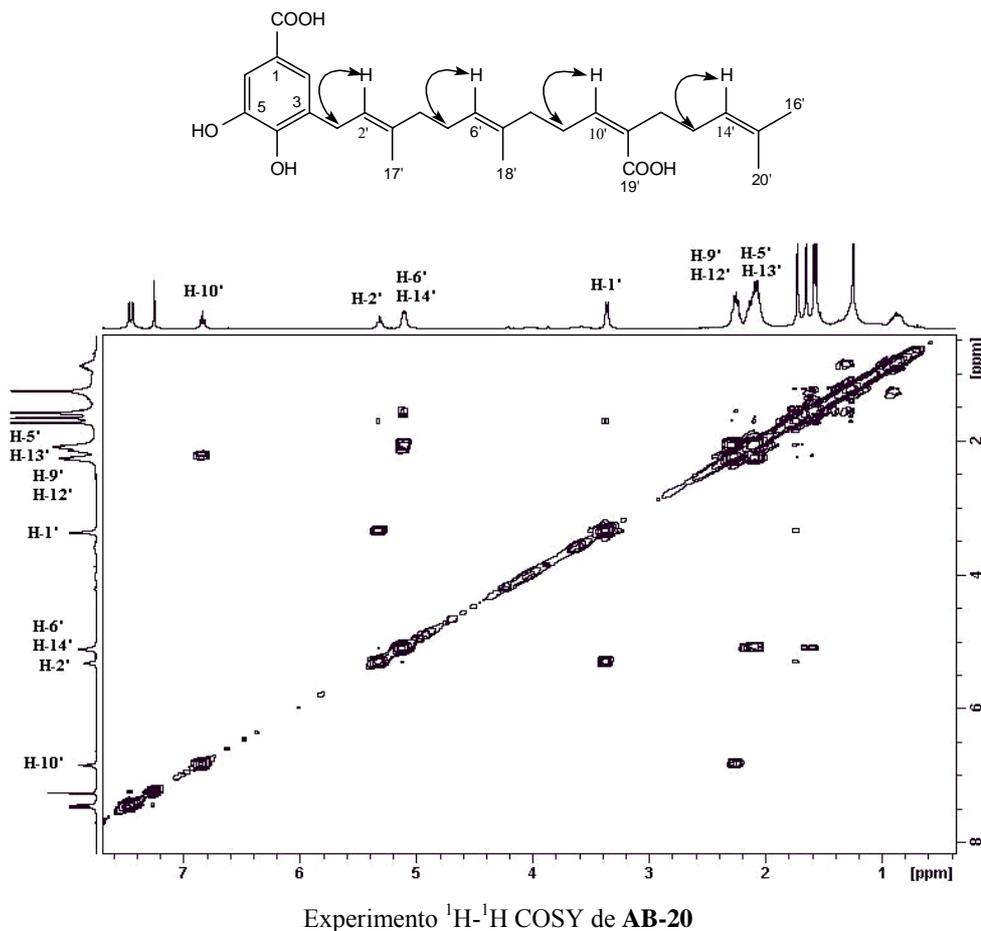
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) de **AB-20**

El conjunto de estos datos están de acuerdo con una estructura de derivado del ácido benzoico que presenta dos ácidos carboxílicos, dos grupos fenólicos y una cadena terpénica de geranilgeranilo. El análisis de los datos espectroscópicos de **AB-20** y comparación con los descritos en la bibliografía para los productos que hemos denominado **AB-18** y **AB-19**, indican que los tres compuestos están relacionados siendo la única diferencia la oxidación del metilo (Me-19') presente en el producto **AB-18** a aldehído en el compuesto **AB-19** y a ácido carboxílico en el compuesto **AB-20**.



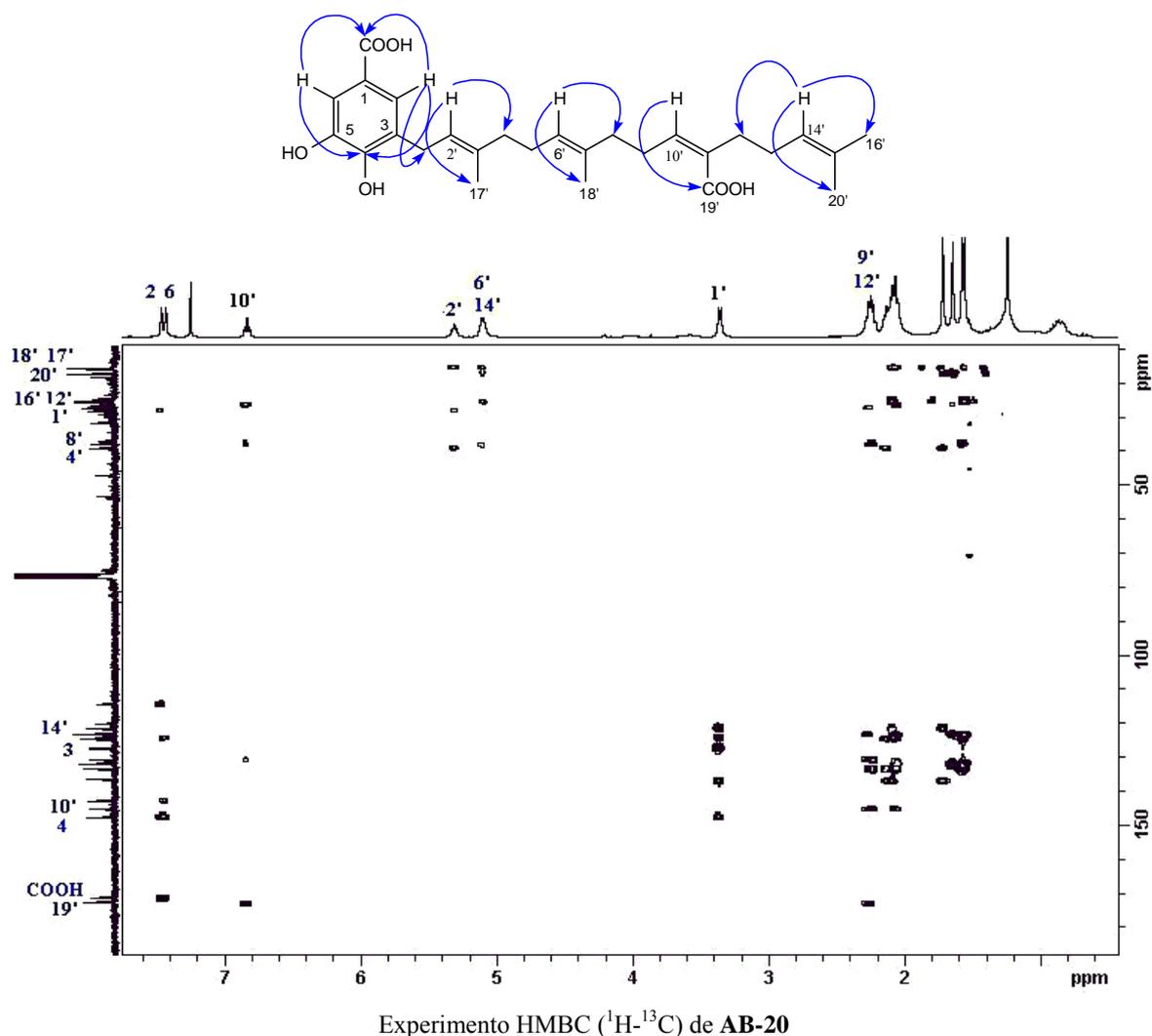
**AB-18** R=  $\text{CH}_3$   
**AB-19** R=  $\text{CHO}$   
**AB-20** R=  $\text{COOH}$

Un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares (COSY, ROESY) y heteronucleares (HSQC, HMBC) de RMN, nos permitió establecer la posición y estereoquímica relativa de los diferentes grupos sobre la molécula. Así, en el experimento COSY se observó correlación entre los protones metilénicos H-1' ( $\delta$  3.36), H-5', H-13' ( $\delta$  2.05-2.13) y H-9' ( $\delta$  2.19-2.28) con los protones vinílicos H-2' ( $\delta$  5.31), H-6' y H-14' ( $\delta$  5.11) y H-10' ( $\delta$  6.84), respectivamente, confirmando la presencia en la molécula de cuatro unidades de isopreno.



La localización de los distintos grupos funcionales en la molécula se determinó a partir de las correlaciones a larga distancia observadas en un experimento HMBC. Así, como correlaciones más relevantes destacamos la de los protones aromáticos H-2 ( $\delta$  7.47) y H-6 ( $\delta$  7.44) con el carbono carboxílico ( $\delta$  171.3) y C-4 ( $\delta$  147.4), y correlación de H-2 con el carbono C-1' ( $\delta$  28.0), lo que nos permitió establecer la posición de los diferentes grupos sobre el anillo aromático. Por otro lado, las correlaciones de los protones vinílicos H-2' ( $\delta$  5.31) y H-6' ( $\delta$  5.11)

con los carbonos de los metilos Me-17' ( $\delta$  15.7) y Me-18' ( $\delta$  15.6), respectivamente, así como correlación de H-14' ( $\delta$  5.11) con los metilos Me-16' ( $\delta$  25.4) y Me-20' ( $\delta$  17.3) y conectividad de H-10' a  $\delta$  6.84 con el carbono carboxílico a  $\delta$  172.6, permitió establecer las características de la unidad diterpénica y fijar la posición del grupo ácido sobre el C-11'.

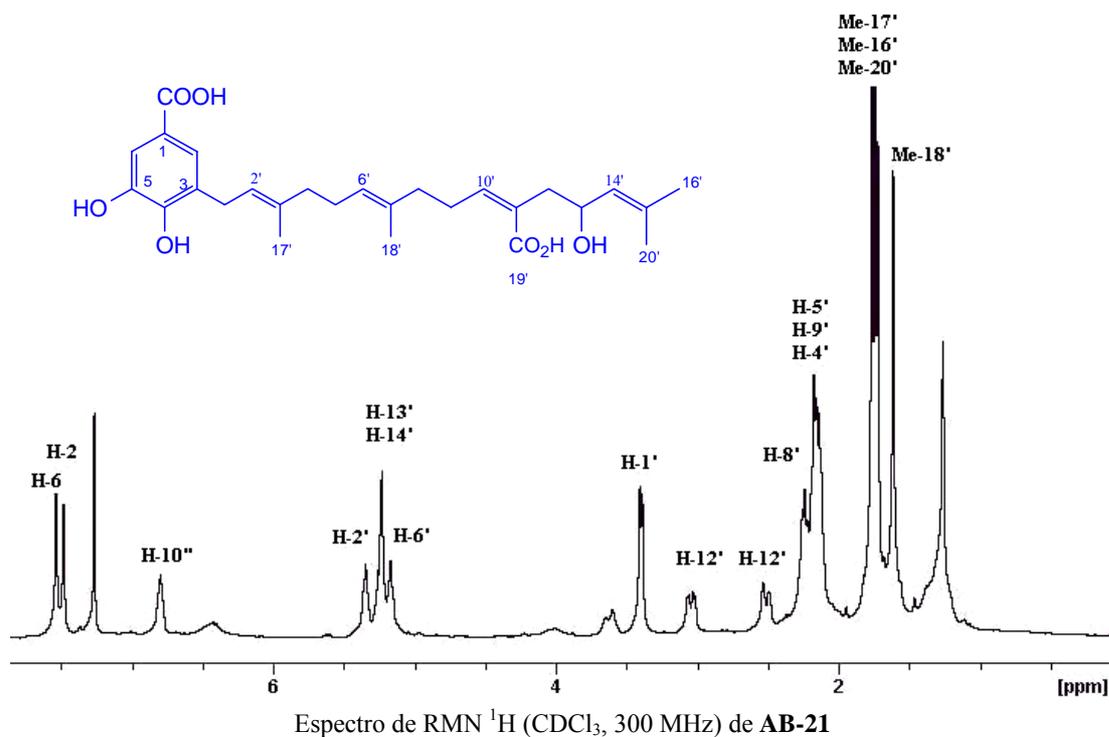


La estereoquímica de los dobles enlaces se determinó mediante un experimento ROESY, donde se observó efecto ROE del metilo Me-17' con H-1' y del protón H-10' con los protones H-8' y H-12', así como por biogénesis y comparación con compuestos relacionados<sup>16</sup>. Estos datos nos permitieron establecer la estructura de AB-20 como el **ácido-3-[(2E,6E,10Z)-11-carboxi-3,7,15-trimetil-2,6,10,14-hexadecatetraenil]-4,5-dihidroxibenzoico**.

## Determinación estructural del producto AB-21

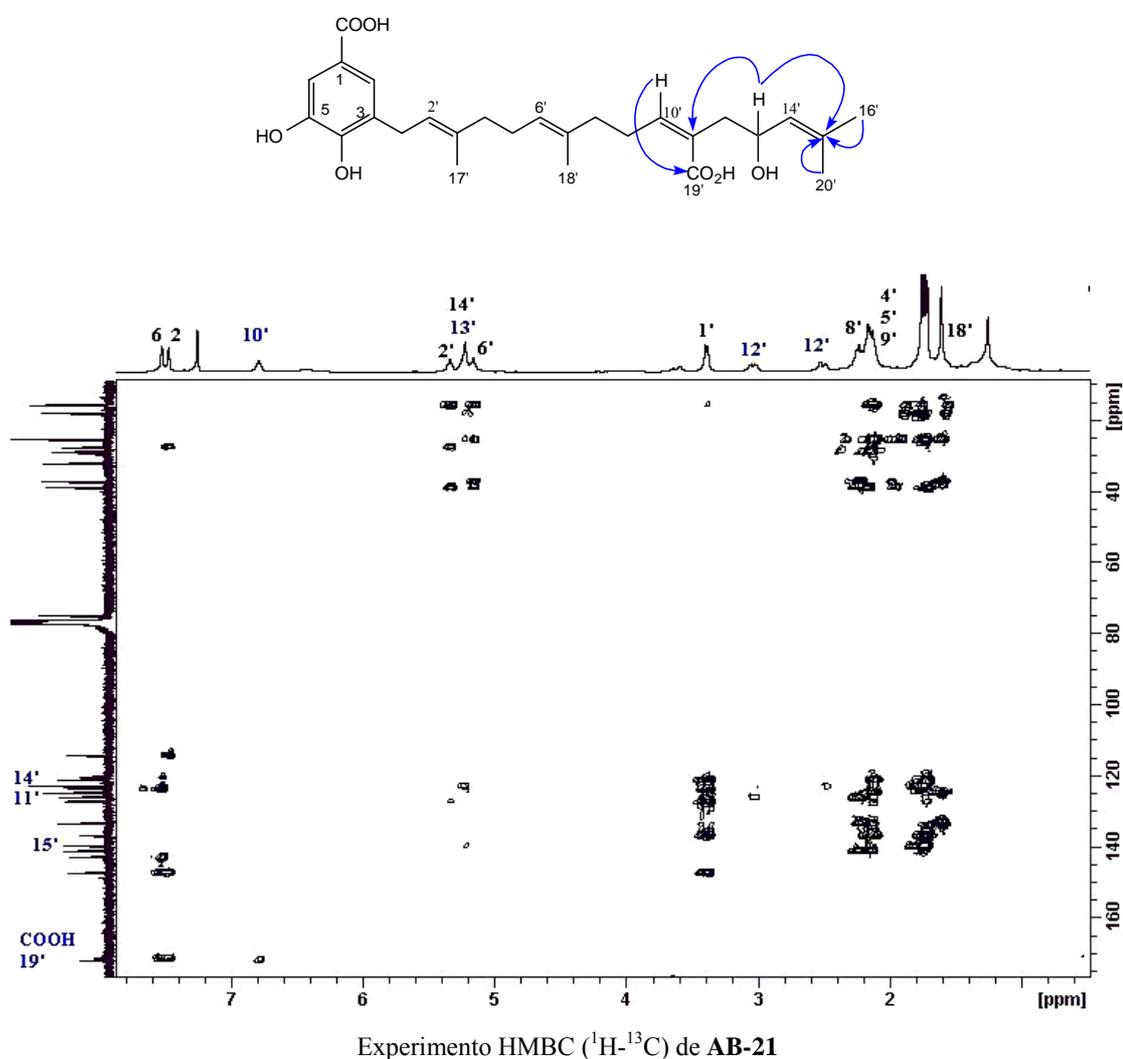
La estructura del compuesto que hemos denominado **AB-21**, que presentó una fórmula molecular  $C_{27}H_{36}O_7$  (EMAR), se estableció mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos.

Así, el estudio de los datos espectroscópicos de IR, UV, RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  (tablas 7 y 8), nos indicó que nuestro producto era un derivado del ácido benzoico que presenta dos grupos fenólicos, una cadena terpénica de veinte átomos de carbono, con cuatro dobles enlaces, un alcohol secundario y un ácido carboxílico. Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **AB-20** y **AB-21** mostró que ambos productos están relacionados, mostrando como única diferencia en sus espectros de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  la ausencia de la señal correspondiente al metileno situado sobre el carbono C-13' a  $\delta_H$  2.05-2.13 y  $\delta_C$  27.3 presente en **AB-20** y la presencia de un alcohol secundario en **AB-21** con señales a  $\delta_H$  5.20-5.27 y  $\delta_C$  75.0, datos que están de acuerdo con una estructura de derivado hidroxilado de **AB-20** para nuestro producto **AB-21**.



Al objeto de confirmar su estructura se realizaron experimentos bidimensionales de RMN (ROESY, COSY, HMQC y HMBC). Así, en el experimento HMBC destacan las correlaciones observadas entre el protón geminal al grupo hidroxilo a  $\delta_{\text{H}}$  5.20-5.27 con los carbonos C-11' ( $\delta$  126.1) y C-15' ( $\delta$  139.8), situando de esta forma la posición del grupo hidroxilo sobre el carbono C-13' ( $\delta$  75.0) en la unidad diterpénica de nuestro compuesto.

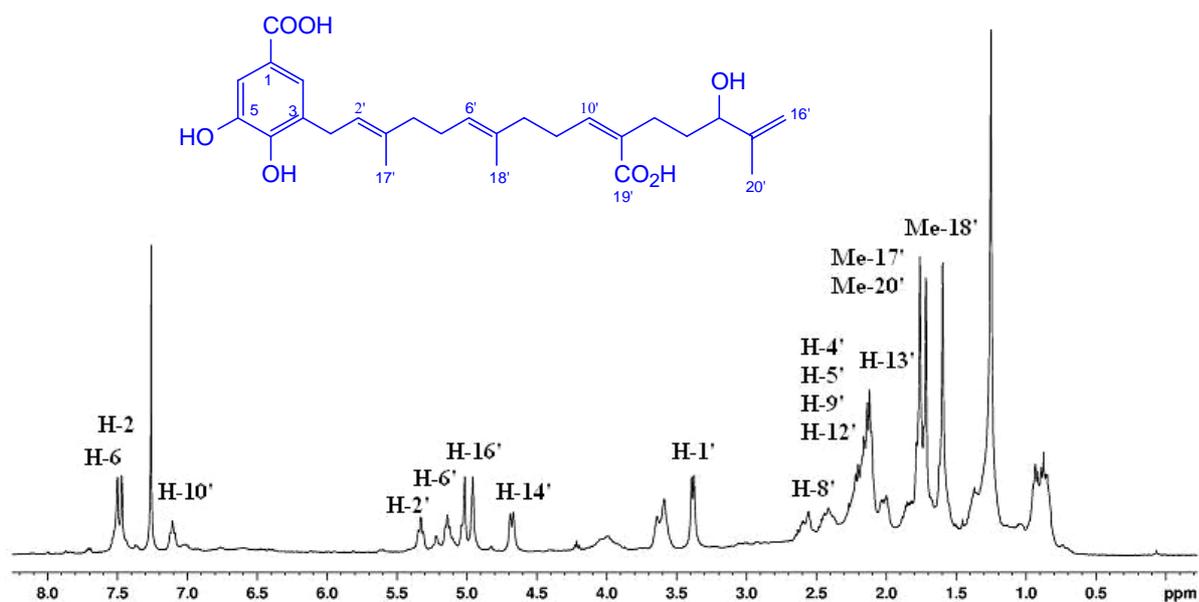
Estos datos nos permitieron establecer la estructura de **AB-21** como el **ácido 3-[(2E,6E,10Z)-11-carboxi-13-hidroxi-3,7,15-trimetil-2,6,10,14-hexadecatetraenil]-4,5-dihidroxi benzoico**.



## Determinación estructural del producto AB-22

El análisis de los datos físicos y espectroscópicos del compuesto que hemos denominado **AB-22** nos permitió establecer su estructura. Su fórmula molecular,  $C_{27}H_{36}O_7$ , fue determinada mediante sus datos de espectrometría de masas de alta resolución y los de resonancia magnética nuclear de  $^1H$  y  $^{13}C$ .

El estudio de los datos espectroscópicos de IR, UV, RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  de **AB-22**, nos indicaron la presencia en la molécula de un alcohol secundario, dos grupos fenólicos, dos ácidos carboxílicos y una unidad de diterpeno. Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **AB-20**, **AB-21** y **AB-22** mostró que los tres productos estaban relacionados, mostrando como diferencias en sus espectros de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  (tablas 7 y 8) las señales correspondientes a la cadena de isopreno terminal de la unidad de terpeno. Así en el espectro de RMN de  $^1H$  de **AB-22** observamos señales correspondientes a un metilo sobre doble enlace a  $\delta$  1.80 (s, H-20'), señales para dos metilenos, uno de ellos alifático a  $\delta$  1.70-1.78 (m, H-13') y el otro olefínico a  $\delta$  4.96 y 5.01 (H-16') y una señal correspondiente a un alcohol secundario a  $\delta$  4.68 (dd,  $J=2.2, 7.8$  Hz, H-14'). Estos datos fueron confirmados en su espectro de RMN de  $^{13}C$  con señales a  $\delta_C$  17.9 (c, C-20'), 27.2 (t, C-13'), 81.9 (d, C-14'), 113.1 (t, C-16') y 141.8 (s, C-15').



Espectro de RMN  $^1H$  (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de **AB-22**

Así como en los compuestos anteriormente descritos, un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares (COSY, ROESY) y heteronucleares (HSQC, HMBC) nos permitió situar los diferentes grupos sobre la molécula. Así, destacan las correlaciones en el experimento HMBC de los protones metilénicos H-16' ( $\delta$  4.96, 5.01) con el metilo Me-20' ( $\delta$  17.9) y C-14' ( $\delta$  81.9) y correlación de H-14' ( $\delta$  4.68) con los carbonos C-16' ( $\delta$  113.1) y C-12' ( $\delta$  22.1), datos que nos permitieron determinar de forma inequívoca la estructura de **AB-22** como **ácido 3-[(2E,6E,10Z)-11-carboxi-14-hidroxi-3,7,15-trimetil-2,6,10,15-hexadecatetraenil]-4,5-dihidroxibenzoico**.

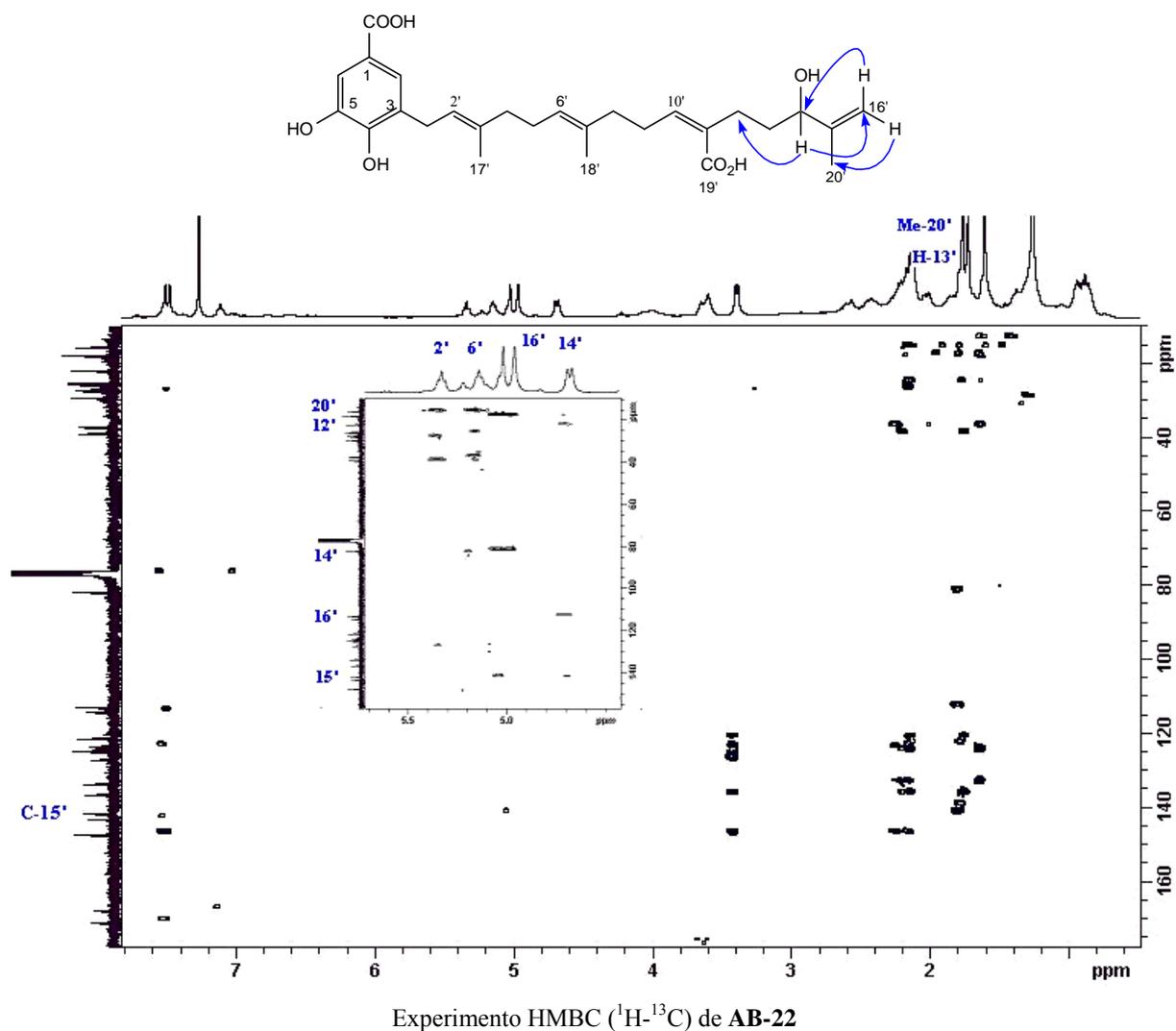


Tabla 7. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) de AB-20 a AB-22

Posición	AB-20	AB-21	AB-22
<b>H-2</b>	7.47 d (2.8)	7.48 s	7.47 d (2.8)
<b>H-6</b>	7.44 d (2.8)	7.54 s	7.52 d (2.8)
<b>H-1'</b>	3.36 d (6.7)	3.42 d (5.2)	3.38 d (6.3)
<b>H-2'</b>	5.31 t (6.7)	5.34 t (5.2)	5.33 t (6.3)
<b>H-4'</b>	2.05-2.13 m*	2.16-2.28 m*	2.05-2.16 m*
<b>H-5'</b>	2.05-2.13 m*	2.16-2.28 m*	2.05-2.16 m*
<b>H-6'</b>	5.11 m*	5.16 t (5.8)	5.15 t (6.9)
<b>H-8'</b>	2.05-2.13 m*	2.16-2.28 m*	2.19-2.40 m
<b>H-9'</b>	2.19-2.28 m*	2.16-2.28 m*	2.05-2.16 m*
<b>H-10'</b>	6.84 t (7.6)	6.79 t (7.2)	7.13 t (6.4)
<b>H-12'</b>	2.19-2.28 m*	2.53 dd (4.9, 13.1) 3.06 dd (3.8, 13.1)	2.05-2.16 m*
<b>H-13'</b>	2.05-2.13 m*	5.20-5.27 m*	1.70-1.78 m
<b>H-14'</b>	5.11 m*	5.20-5.27 m*	4.68 dd (2.2, 7.8)
<b>H-16'</b>	1.65 s	1.76 s	4.96 s 5.01 s
<b>H-17'</b>	1.72 s	1.74 s	1.73 s
<b>H-18'</b>	1.58 s	1.63 s	1.67 s
<b>H-20'</b>	1.56 s	1.78 s	1.80 s

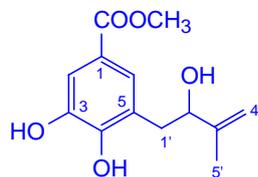
<sup>a</sup> δ, CDCl<sub>3</sub>. *J* en paréntesis en Hz. Datos basados en los experimentos COSY y HSQC

\* Señales solapadas

Tabla 8. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz) de AB-20 a AB-22

<b>Posición</b>	<b>AB-20</b>	<b>AB-21</b>	<b>AB-22</b>
<b>C-1</b>	120.2 s	120.4 s	123.1 s
<b>C-2</b>	124.2 d	123.7 d	123.8 d
<b>C-3</b>	127.5 s	127.2 s	127.3 s
<b>C-4</b>	147.7 s	147.4 s	147.7 s
<b>C-5</b>	142.8 s	143.0 s	143.1 s
<b>C-6</b>	114.4 d	114.4 d	114.3 d
<b>COOH</b>	171.3 s	171.3 s	171.3 s
<b>C-1'</b>	28.0 t	27.7 t	27.8 t
<b>C-2'</b>	121.7 d	121.2 d	121.4 d
<b>C-3'</b>	136.5 s	136.9 s	136.7 s
<b>C-4'</b>	39.2 t	39.0 t	39.0 t
<b>C-5'</b>	25.6 t	25.6 t	26.1 t
<b>C-6'</b>	124.8 d	125.0 d	124.9 d
<b>C-7'</b>	133.5 s	133.5 s	133.6 s
<b>C-8'</b>	37.9 t	37.4 t	37.3 t
<b>C-9'</b>	26.9 t	28.9 t	25.5 t
<b>C-10'</b>	145.2 d	141.4 d	147.5 d
<b>C-11'</b>	130.8 s	126.1 s	124.3 s
<b>C-12'</b>	26.5 t	32.2 t	22.1 t
<b>C-13'</b>	27.3 t	75.0 d	27.2 t
<b>C-14'</b>	123.4 d	123.1 d	81.9 d
<b>C-15'</b>	132.0 s	139.8 s	141.8 s
<b>C-16'</b>	25.4 c	18.2 c	113.1 t
<b>C-17'</b>	15.7 c	15.9 c	15.8 c
<b>C-18'</b>	15.6 c	15.8 c	15.9 c
<b>C-19'</b>	172.6 s	172.0 s	167.8 s
<b>C-20'</b>	17.3 c	25.5 c	17.9 c

<sup>a</sup> δ, CDCl<sub>3</sub>. Datos basados en los experimentos DEPT, HSQC y HMBC

**DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS****Producto AB-1: 3,4-Dihidroxi-5-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoato de metilo**

Aislado como sólido amorfo (14.2 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : + 1.2° (c 0.35, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{\max}$  (EtOH): 214, 266, 298 nm.

IR  $\nu_{\max}$  (película): 3409, 2953, 1692, 1602, 1439, 1311, 1228, 901, 770 cm<sup>-1</sup>.

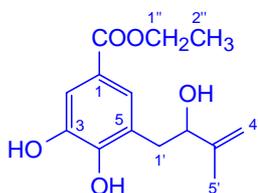
RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>): 1.81 (3H, s, H-5'); 2.84 (1H, dd, J= 2.1, 14.7 Hz, H-1'); 2.99 (1H, dd, J= 8.5, 14.7 Hz, H-1'); 3.09 (1H, s<sub>a</sub>, OH); 3.85 (3H, s, OMe); 4.42 (1H, dd, J= 2.1, 8.5 Hz, H-2'); 4.88 (1H, s, H-4'); 4.99 (1H, s, H-4'); 5.93 (1H, s<sub>a</sub>, OH); 7.33 (1H, d, J= 1.9 Hz, H-6); 7.48 (1H, d, J= 1.9 Hz, H-2); 9.20 (1H, s<sub>a</sub>, OH).

RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>): 18.1 (c, C-5'); 37.7 (t, C-1'); 51.9 (c, OCH<sub>3</sub>); 78.3 (d, C-2'); 111.5 (t, C-4'); 114.9 (d, C-2); 122.3 (s, C-1); 124.6 (d, C-6); 125.2 (s, C-5); 145.5 (s, C-3); 145.9 (s, C-3'); 147.3 (s, C-4); 167.2 (s, COOMe).

EM *m/z* (%): 252 [M<sup>+</sup>] (28), 234 (55), 219 (81), 203 (19), 182 (100), 150 (47), 123 (18).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>, 252.0998; observado, 252.1014.

**Producto AB-2: 3,4-Dihidroxi-5-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoato de etilo.**



Aislado como sólido amorfo (1.2 mg).

$[\alpha]_D^{20}$  : -9.6° (c 0.12, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{max}$  (EtOH): 218, 265, 299 nm.

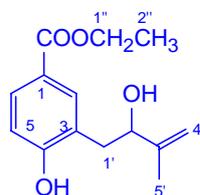
IR  $\nu_{max}$  (película): 3433, 2923, 2853, 1712, 1601, 1448, 1303, 1221, 1056, 767 cm<sup>-1</sup>.

RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.37 (3H, t,  $J$ = 7.2 Hz, H-2''); 1.82 (3H, s, H-5'); 2.85 (1H, dd,  $J$ = 2.0, 14.4 Hz, H-1'); 3.01 (1H, dd,  $J$ = 8.8, 14.4 Hz, H-1'); 4.32 (2H, c,  $J$ = 7.2, Hz, H-1''); 4.44 (1H, dd,  $J$ = 2.0, 8.8 Hz, H-2'); 4.90 (1H, s, H-4'); 5.01 (1H, s, H-4'); 7.35 (1H, d,  $J$ = 2.0 Hz, H-6); 7.51 (1H, d,  $J$ = 2.0 Hz, H-2).

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 14.1 (c, C-2''); 17.9 (c, C-5'); 37.5 (t, C-1'); 60.4 (t, C-1''); 78.4 (d, C-2'); 111.4 (t, C-4'); 114.6 (d, C-2); 122.4 (s, C-1); 124.2 (d, C-6); 124.9 (s, C-5); 145.7 (s, C-3'); 146.5 (s, C-4); 146.7 (s, C-3); 166.2 (s, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

EM  $m/z$  (%): 266 [M<sup>+</sup>] (61), 248 (69), 233 (57), 221 (30), 196 (95), 167 (100), 149 (67), 123 (41), 57 (36).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>, 266.1154; observado, 266.1154.

**Producto AB-4: 4-Hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoato de etilo.**

Aislado como sólido amorfo (6 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : +3.9° (c 0.2, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{\max}$  (EtOH): 260 nm.

IR  $\nu_{\max}$  (película): 3409, 2923, 1710, 1690, 1607, 1284, 1180, 1018, 772 cm<sup>-1</sup>

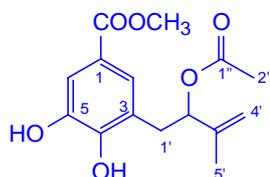
RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.37 (3H, t,  $J$ = 7.1 Hz, H-2''); 1.82 (3H, s, H-5'); 2.85 (1H, dd,  $J$ = 2.2, 14.8 Hz, H-1'); 2.99 (1H, dd,  $J$ = 8.5, 14.8 Hz, H-1'); 4.32 (2H, c,  $J$ = 7.1 Hz, H-1''); 4.42 (1H, dd,  $J$ = 2.2, 8.5 Hz, H-2''); 4.89 (1H, s, H-4'); 5.01 (1H, s, H-4'); 6.92 (1H, d,  $J$ = 8.4 Hz, H-5); 7.75 (1H, d,  $J$ = 2.1 Hz, H-2); 7.85 (1H, dd,  $J$ = 2.1, 8.4 Hz, H-6).

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 14.2 (c, C-2''); 18.0 (c, C-5'); 37.8 (t, C-1'); 60.4 (t, C-1''); 77.9 (d, C-2'); 111.2 (t, C-4'); 116.9 (d, C-5); 122.1 (s, C-1); 125.0 (s, C-3); 130.2 (d, C-6); 133.1 (d, C-2); 145.9 (s, C-3'); 160.0 (s, C-4); 166.4 (s, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

EM  $m/z$  (%): 250 [M<sup>+</sup>] (6), 232 (4), 217 (3), 205 (11), 180 (100), 151 (41), 134 (24), 107 (23), 71 (10).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>, 250.1205; observado, 250.1196.

**Producto AB-5: 3-[2-(Acetoxi)-3-metil-3-butenil]-4,5-dihidroxibenzoato de metilo.**



Aislado como sólido amorfo (6.5 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : -14.0° (c 0.2, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{max}$  (EtOH): 213, 265, 298 nm

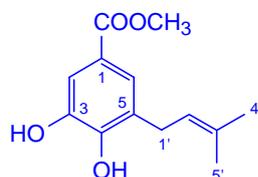
IR  $\nu_{max}$  (película): 3391, 2953, 2926, 1712, 1603, 1441, 1375, 1308, 1233, 1020, 768 cm<sup>-1</sup>.

RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.83 (3H, s, H-5'); 2.10 (3H, s, H-2''); 2.97 (2H, d, *J*= 6.4, Hz, H-1'); 3.86 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); 4.83 (1H, s, H-4'); 4.90 (1H, s, H-4'); 5.20 (1H, t, *J*= 6.4 Hz, H-2'); 7.32 (1H, d, *J*= 1.9 Hz, H-2); 7.46 (1H, d, *J*= 1.9 Hz, H-6).

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 17.8 (c, C-5'); 21.0 (c, C-2''); 34.2 (t, C-1'); 51.8 (c, OCH<sub>3</sub>); 78.1 (d, C-2'); 114.2 (t, C-4'); 114.9 (d, C-6); 121.4 (s, C-1); 122.5 (s, C-3); 124.7 (d, C-2); 140.9 (s, C-3'); 143.6 (s, C-5); 146.9 (s, C-4); 166.9 (s, COOCH<sub>3</sub>), 171.9 (s, C-1').

EM *m/z* (%): 294 [M<sup>+</sup>] (2), 234 (78), 219 (100), 203 (21), 182 (34), 174 (51), 157 (43), 129 (21).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>, 294.1103; observado, 294.1107.

**Producto AB-7: 3,4-Dihidroxi-5-(3-metil-2-butenil) benzoato de metilo.**

Aislado como sólido amorfo (8.5 mg).

**UV  $\lambda_{\max}$  (EtOH):** 217, 266, 295 nm.

**IR $\nu_{\max}$  (película):** 3471, 3371, 2923, 1692, 1604, 1440, 1303, 1237, 1010, 768  $\text{cm}^{-1}$ .

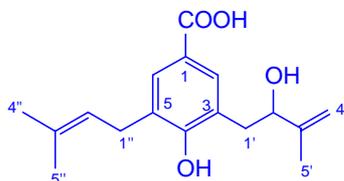
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ):** 1.78 (6H, s, Me-4' y Me-5'); 3.38 (2H, d,  $J= 7.2$  Hz, H-1'); 3.83 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ); 5.32 (1H, t,  $J= 7.2$  Hz, H-2'); 5.98 (1H, s<sub>a</sub>, OH); 7.43 (1H, d,  $J= 1.8$  Hz, H-6); 7.49 (1H, d,  $J= 1.8$  Hz, H-2).

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ):** 17.9 (c, C-4'), 25.8 (c, C-5'), 29.2 (t, C-1'), 52.0 (c,  $\text{OCH}_3$ ), 114.5 (d, C-2), 121.8 (d, C-2'), 122.2 (s, C-1), 123.9 (d, C-6), 127.3 (s, C-5), 134.9 (s, C-3'), 143.1 (s, C-3), 146.8 (s, C-4), 167.3 (s,  $\text{COOCH}_3$ ).

**EM  $m/z$  (%):** 236 [ $\text{M}^+$ ] (100), 221 (5), 205 (18), 180 (101), 148 (18).

**EM de alta resolución:** Calculado para  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_4$ , 236.1049; observado, 236.1034.

**Producto AB-10: Ácido 4-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-5-(3-metil-2-butenil) benzoico.**



Aislado como sólido amorfo (6.6 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-3.6^\circ$  (*c* 0.22, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{\max}$  (EtOH): 209, 258 nm.

IR  $\nu_{\max}$  (película): 3520-2670, 3370, 3167, 2924, 2855, 1680, 1601, 1441, 1409, 1286, 1214, 776 cm<sup>-1</sup>.

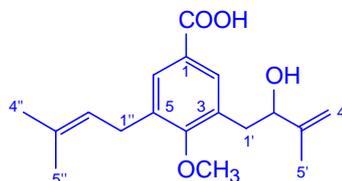
RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.74 (3H, s, H-4''); 1.76 (3H, s, H-5''); 1.83 (3H, s, H-5'); 2.86 (1H, dd, *J* = 1.3, 11.0 Hz, H-1'); 2.99 (1H, dd, *J* = 6.5, 11.0 Hz, H-1'); 3.38 (2H, d, *J* = 5.4 Hz, H-1''); 4.43 (1H, dd, *J* = 1.3, 6.5 Hz, H-2'); 4.90 (1H, s, H-4'); 5.02 (1H, s, H-4'); 5.34 (1H, t, *J* = 5.4 Hz, H-2''); 7.68 (1H, d, *J* = 1.3 Hz, H-2); 7.79 (1H, d, *J* = 1.3 Hz, H-6).

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 17.5 (c, C-4''); 17.9 (c, C-5''); 25.6 (c, C-5''); 28.6 (t, C-1''); 37.9 (t, C-1'); 77.9 (d, C-2'); 111.2 (t, C-4'); 121.7 (d, C-2''); 121.8 (s, C-1); 124.9 (s, C-3); 129.5 (s, C-5); 130.7 (d, C-6); 131.5 (d, C-2); 133.2 (s, C-3''); 146.2 (s, C-3'); 158.9 (s, C-4); 170.1 (s, COOH).

EM *m/z* (%): 290 [M<sup>+</sup>] (5), 272 (29), 257 (45), 217 (38), 199 (100), 173 (55), 159 (39), 91 (50), 69 (53).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>, 290.1518; observado, 290.1537.

**Producto AB-11: Ácido 3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-5-(3-metil-2-butenil)-4-metoxi benzoico.**



Aislado como sólido amorfo (3.7 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : -4.7° (*c* 0.17, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{\max}$  (EtOH): 207, 242 nm.

IR $\nu_{\max}$  (película): 3518-2694, 3469, 2927, 1694, 1603, 1205, 1002, 756 cm<sup>-1</sup>.

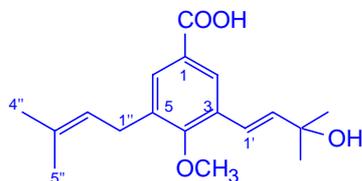
RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.75 (3H, s, H-4''); 1.77 (3H, s, H-5''); 1.84 (3H, s, H-5'); 2.87 (1H, dd, *J*= 8.6, 13.8 Hz, H-1'); 2.95 (1H, dd, *J*= 4.2, 13.8 Hz, H-1'); 3.41 (2H, d, *J*= 7.1 Hz, H-1''); 3.82 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); 4.35 (1H, dd, *J*= 4.2, 8.6 Hz, H-2'); 4.87 (1H, s, H-4'); 5.01 (1H, s, H-4'); 5.29 (1H, t, *J*= 7.1 Hz, H-2''); 7.83 (1H, s, H-2); 7.85 (1H, s, H-6).

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 17.7 (c, C-4''); 17.8 (c, C-5''); 25.5 (c, C-5''); 28.0 (t, C-1''); 36.5 (t, C-1'); 60.8 (c, OCH<sub>3</sub>); 75.8 (d, C-2'); 110.9 (t, C-4'); 121.8 (d, C-2''); 124.8 (s, C-1); 130.9 (2xd, C-2, C-6); 131.9 (s, C-3); 133.3 (s, C-3''); 135.2 (s, C-5); 146.8 (s, C-3'); 161.1 (s, C-4); 170.1 (s, COOH).

EM *m/z* (%): 304 [M<sup>+</sup>] (12), 286 (21), 247 (70), 232 (92), 199 (88), 149 (84), 91 (85), 71 (100).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>, 304.1596; observado, 304.1608.

**Producto AB-12:** **Ácido-3-(1-*trans*-3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-5-(3-metil-2-butenil)-4-metoxi benzoico.**



Aislado como sólido amorfo (1.5 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : +10.0° (*c* 0.10, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{\max}$  (EtOH): 229 nm.

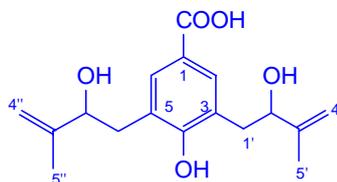
IR  $\nu_{\max}$  (película): 3829-2790, 3433, 2970, 2928, 1696, 1601, 1380, 1265, 1202, 999, 757 cm<sup>-1</sup>.

RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.46 (6H, s, H-4', H-5''); 1.74 (6H, s, H-4'', H-5''); 3.38 (2H, d, *J*= 5.4 Hz, H-1''); 3.76 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); 5.27 (1H, t, *J*= 5.4 Hz, H-2''); 6.46 (1H, d, *J*= 16.2 Hz, H-2'); 6.86 (2H, d, *J*= 16.2, Hz, H-1'); 7.82 (1H, d, *J*= 1.3 Hz, H-2); 8.07 (1H, d, *J*= 1.3 Hz, H-6).

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 17.6 (c, C-4''); 25.5 (c, C-5''); 28.1 (t, C-1''); 29.6 (2xc, C-4', C-5'); 61.0 (c, OCH<sub>3</sub>); 71.1 (s, C-3'); 120.4 (d, C-1'); 121.9 (d, C-2''); 124.9 (s, C-1); 126.9 (d, C-2); 130.6 (d, C-6); 130.7 (s, C-3); 133.1 (s, C-3''); 135.4 (s, C-5); 139.8 (d, C-2'); 160.1 (s, C-4); 171.2 (s, COOH).

EM *m/z* (%): 304 [M<sup>+</sup>] (12), 286 (83), 271 (44), 245 (47), 231 (75), 217 (100), 199 (83), 173 (69), 128 (63), 91 (53), 59 (59).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>, 304.1675; observado, 304.1675.

**Producto AB-13: Ácido 4-hidroxi-3,5-bis(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoico.**

Aislado como sólido amorfo (2.8 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-5.0^\circ$  ( $c$  0.14,  $\text{CHCl}_3$ ).

UV  $\lambda_{\text{max}}$  (EtOH): 213, 253 nm.

IR  $\nu_{\text{max}}$  (película): 3494-2776, 3442, 2925, 2854, 1699, 1605, 1455, 1378, 1292, 1201, 773  $\text{cm}^{-1}$ .

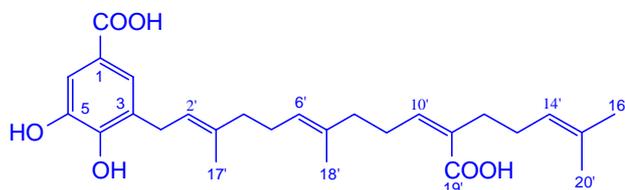
RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.82 (6H, s, H-5', H-5''); 2.93 (4H, d,  $J=6.5$  Hz, H-1', H-1''); 4.38 (2H, d,  $J=6.5$  Hz, H-2', H-2''); 4.87 (2H, s, H-4', H-4''); 5.00 (2H, s, H-4', H-4''); 7.76 (2H, s, H-2, H-6).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 17.9 (2xc, C-5', C-5''); 37.6 (2xt, C-1', C-1''); 76.8 (2xd, C-2', C-2''); 110.9 (2xt, C-4', C-4''); 121.7 (s, C-1); 126.9 (2xs, C-3, C-5); 132.4 (2xd, C-2, C-6); 146.3 (2xs, C-3', C-3''); 159.6 (s, C-4); 170.2 (s, COOH).

EM  $m/z$  (%): 306 [ $\text{M}^+$ ] (5), 288 (7), 270 (14), 236 (48), 218 (100), 203 (32), 173 (24), 130 (18), 69 (57).

EM de alta resolución: Calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_5$ , 306.1467; observado, 306.1521.

**Producto AB-20: Ácido-3-[(2E,6E,10Z)-11-carboxi-3,7,15-trimetil-2,6,10,14-hexadecatetraenil]-4,5-dihidroxibenzoico.**



Aislado como aceite color amarillo (1.3 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : +9.3° (c 0.07, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{max}$  (EtOH): 213, 258 nm.

IR  $\nu_{max}$  (película): 3520-2560, 3407, 2925, 2854, 1681, 1612, 1442, 1380, 1300, 1216, 1196, 775 cm<sup>-1</sup>.

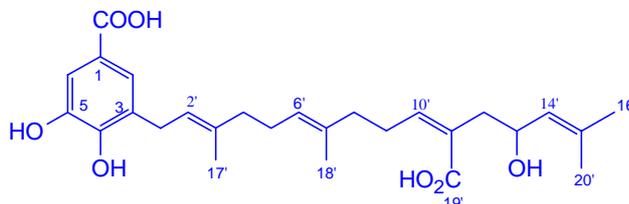
RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>): 1.56 (3H, s, H-20'); 1.58 (3H, s, H-18'); 1.65 (3H, s, H-16'); 1.72 (3H, s, H-17'); 2.05-2.13 (8H, m, H-4', H-5', H-8', H-13'); 2.19-2.28 (4H, m, H-9', H-12'); 3.36 (2H, d, *J* = 6.7 Hz, H-1'); 5.11 (2H, m, H-6', H-14'); 5.31 (1H, t, *J* = 6.7 Hz, H-2'); 6.84 (1H, t, *J* = 7.6 Hz, H-10'); 7.44 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-6); 7.47 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-2).

RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>): 15.6 (c, C-18'); 15.7 (c, C-17'); 17.3 (c, C-20'); 25.4 (c, C-16'); 25.6 (t, C-5'); 26.5 (t, C-12'); 26.9 (t, C-9'); 27.3 (t, C-13'); 28.0 (t, C-1'); 37.9 (t, C-8'); 39.2 (t, C-4'); 114.4 (d, C-6); 120.2 (s, C-1); 121.7 (d, C-2'); 123.4 (d, C-14'); 124.2 (d, C-2); 124.8 (d, C-6'); 127.5 (s, C-3); 130.8 (s, C-11'); 132.0 (s, C-15'); 133.5 (s, C-7'); 136.5 (s, C-3'); 142.8 (s, C-5); 145.2 (d, C-10'); 147.7 (s, C-4); 171.3 (s, COOH); 172.6 (s, C-19').

EM *m/z* (%): 410 [M<sup>+</sup>-HCOOH] (5), 394 (12), 341 (2), 325 (2), 287 (3), 243 (7), 229 (7), 201 (10), 189 (10), 175 (15), 161 (100), 123 (82), 91 (44), 69 (76).

EM de alta resolución: Calculado para [M<sup>+</sup>-HCOOH] C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>, 410.2457; observado, 410.2435.

**Producto AB-21: Ácido 3-[(2E,6E,10Z)-11-carboxi-3,7,15-trimetil-13-hidroxi-2,6,10,14-hexadecatetraenil]-4,5-dihidroxi benzoico.**



Aislado como aceite color amarillo (5.4 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : -8.5° (c 0.3, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{max}$  (EtOH): 213, 262 nm.

IR  $\nu_{max}$  (película): 3513-2593, 3309, 2925, 2854, 1731, 1679, 1604, 1442, 1302, 1215, 1016, 756 cm<sup>-1</sup>.

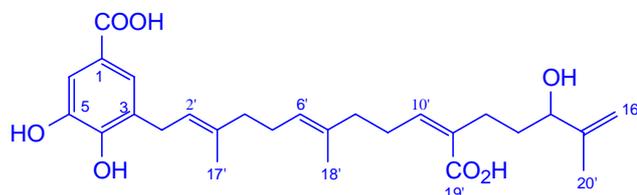
RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>): 1.63 (3H, s, H-18'); 1.74 (3H, s, H-17'); 1.76 (3H, s, H-16'); 1.78 (3H, s, H-20'); 2.16-2.28 (8H, m, H-4', H-5', H-8', H-9'); 2.53 (1H, dd, *J*= 4.9, 13.1, Hz, H-12'); 3.06 (1H, dd, *J*= 3.8, 13.1, Hz, H-12'); 3.42 (2H, d, *J*= 5.2 Hz, H-1'); 5.16 (1H, t, *J*= 5.8 Hz, H-6'); 5.20-5.27 (2H, m, H-13', H-14'); 5.34 (1H, t, *J*= 5.2 Hz, H-2'); 6.79 (1H, t, *J*= 7.2 Hz, H-10'); 7.48 (1H, s, H-2); 7.54 (1H, s, H-6).

RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>): 15.8 (c, C-18'); 15.9 (c, C-17'); 18.2 (c, C-16'); 25.5 (c, C-20'); 25.6 (t, C-5'); 27.7 (t, C-1'); 28.9 (t, C-9'); 32.2 (t, C-12'); 37.4 (t, C-8'); 39.0 (t, C-4'); 75.0 (d, C-13'); 114.4 (d, C-6); 120.4 (s, C-1); 121.2 (d, C-2'); 123.1 (d, C-14'); 123.7 (d, C-2); 125.0 (d, C-6'); 126.1 (s, C-11'); 127.2 (s, C-3); 133.5 (s, C-7'); 136.9 (s, C-3'); 139.8 (s, C-15'); 143.0 (s, C-5); 141.4 (d, C-10'); 147.4 (s, C-4); 171.3 (s, COOH); 172.0 (s, C-19').

EM *m/z* (%): 454 [M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O] (3), 436 (13), 410 (18), 392 (5), 377 (4), 287 (7), 271 (8), 232 (15), 205 (37), 161 (53), 123 (100), 93 (31), 81 (41).

EM de alta resolución: Calculado para [M<sup>+</sup>-18] C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub>, 454.2350; observado, 454.2355.

**Producto AB-22: Ácido 3-[(2*E*,6*E*,10*Z*)-11-carboxi-14-hidroxi-3,7,15-trimetil-2,6,10,15-hexadecatetraenil]-4,5-dihidroxi benzoico**



Aislado como aceite color amarillo (5.1 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : +11.2° (*c* 0.16, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{max}$  (EtOH): 212, 260 nm.

IR  $\nu_{max}$  (película): 3490-2592, 3360, 2925, 2854, 1714, 1679, 1630, 1444, 1379, 1194, 775 cm<sup>-1</sup>.

RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.67 (3H, s, H-18'); 1.73 (3H, s, H-17'); 1.70-1.78 (2H, m, H-13'); 1.80 (3H, s, H-20'); 2.05-2.16 (8H, m, H-4', H-5', H-9', H-12'); 2.19-2.40 (2H, m, H-8'); 3.38 (2H, d, *J*= 6.3 Hz, H-1'); 4.68 (1H, dd, *J*= 2.2, 7.8 Hz, H-14'); 4.96 (1H, s, H-16'); 5.01 (1H, s, H-16'); 5.15 (1H, t, *J*= 6.9, H-6'); 5.33 (1H, t, *J*= 6.3 Hz, H-2'); 7.13 (1H, t, *J*= 6.4 Hz, H-10'); 7.47 (1H, d, *J*= 2.8 Hz, H-2); 7.52 (1H, d, *J*= 2.8 Hz, H-6).

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 15.8 (c, C-17'); 15.9 (c, C-18'); 17.9 (c, C-20'); 22.1 (t, C-12'); 25.5 (t, C-9'); 26.1 (t, C-5'); 27.2 (t, C-13'); 27.8 (t, C-1'); 37.3 (t, C-8'); 39.0 (t, C-4'); 81.9 (d, C-14'); 113.1 (t, C-16'); 114.3 (d, C-6); 121.4 (d, C-2'); 123.1 (s, C-1); 123.8 (d, C-2); 124.3 (s, C-11'); 124.9 (d, C-6'); 127.3 (s, C-3); 133.6 (s, C-7'); 136.7 (s, C-3'); 141.8 (s, C-15'); 143.1 (s, C-5); 147.5 (d, C-10'); 147.7 (s, C-4); 167.8 (s, C-19'); 171.3 (s, COOH).

EM *m/z* (%): 454 [M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O] (5), 436 (12), 410 (2), 368 (2), 287 (3), 271 (7), 205 (100), 161 (10), 123 (15), 93 (30), 81 (43).

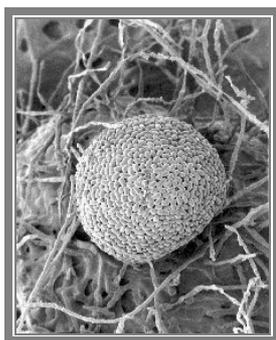
EM de alta resolución: Calculado para [M<sup>+</sup>-18] C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub>, 454.2355; observado, 454.2339.

## *Benzopiranos y benzofuranos*

## BENZOPIRANOS Y BENZOFURANOS

### Introducción

Los 2,2-dimetil-benzopiranos son productos naturales que se han encontrado en numerosas especies vegetales, así como en algunos organismos marinos y hongos. En las plantas estos compuestos se encuentran, generalmente, en hojas y tallos y con menos frecuencia en las raíces.

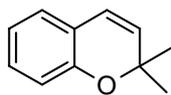


*Coniothyrium minitans*

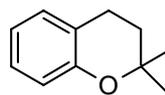


*Sargassum myracanthum*

Una revisión bibliográfica realizada de los 2,2-dimetil-2*H*-benzopiranos, incluyendo cromenos y cromanos, descritos revela la existencia de más de 4000 compuestos con estas características estructurales, incluyendo productos naturales y sintéticos.



**Cromeno**



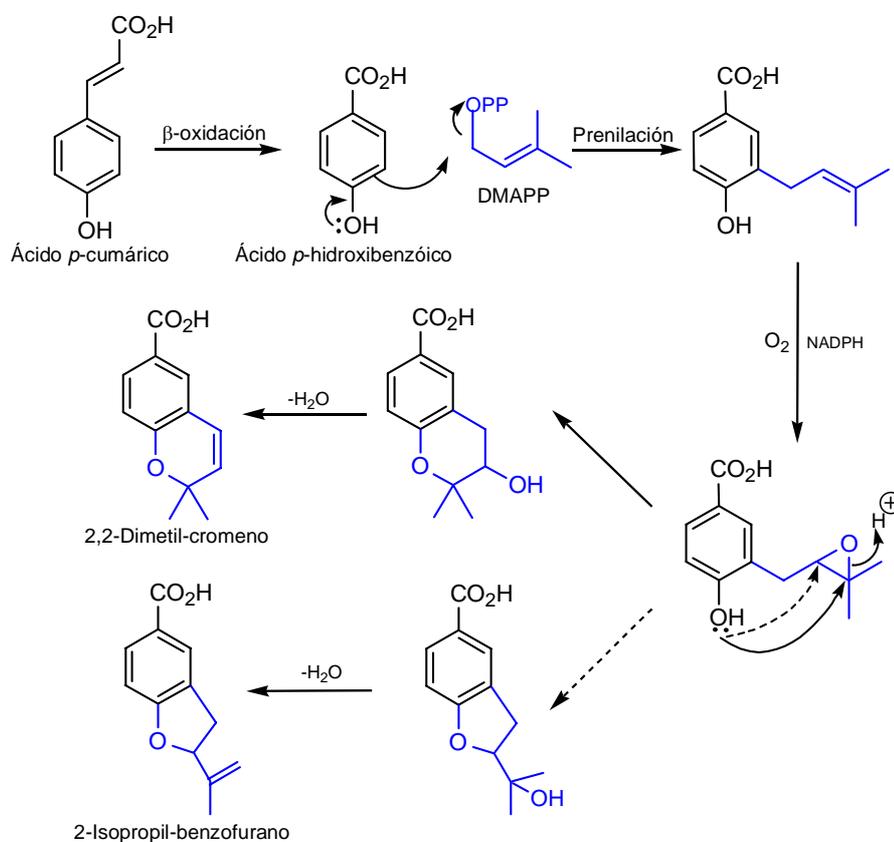
**Cromano**

La incidencia de la unidad de benzopirano y benzofurano en los productos naturales es atribuible a reacciones de prenilación y ciclación en las rutas biosintéticas del acetato<sup>1</sup> y del sikímico<sup>2</sup>. Biogenéticamente, están formados por la combinación de una unidad de isopreno y un sistema fenólico. Estudios recientes han demostrado que el anillo fenólico procede de la ruta del sikímico, mientras que el anillo heterocíclico, formado por una unidad C<sub>5</sub> proviene del metabolismo de los terpenos. La posición *orto* al grupo fenólico se encuentra activada y es

<sup>1</sup> Salazar, K.J.; Delgado, P. E.; Ripalda LL. L.; Max Young, M.C.; Kato, M. S. *Phytochemistry*. **2005**, 66, 573-579.

<sup>2</sup> Morandim, A. de A.; Bergamo, D. C. B.; Kato, M. J.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani V. S.; Furlan M. *Phytochem. Anal.* **2005**, 16, 282-286.

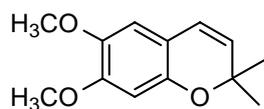
alquilado por el dimetil alil pirofosfato (DMAPP) con participación de la preniltransferasa; la cadena de dimetilalilo sufre oxidación con formación de un epóxido intermedio; posterior ataque nucleofílico del hidroxilo fenólico sobre el epóxido da lugar a la ciclación, generando el anillo heterocíclico. La ciclación puede generar el anillo de 2,2-dimetilcromeno o el de 2-isopropilbenzofurano, reacción que está catalizada por el citocromo P-450 monooxigenasa que requiere como cofactor el nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y oxígeno molecular<sup>3</sup>.



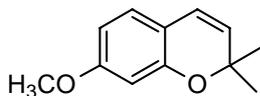
### Ruta biogénica de los benzopiranos y benzofuranos

En la naturaleza estos compuestos raramente carecen de sustituyente en posición *para*, como es el caso de los procenos I y II; y pocos son los ejemplos de este tipo de compuestos con un grupo carbonilo sobre el carbono tres, como es el caso del 3-cetobenzofurano sustituido<sup>3</sup>.

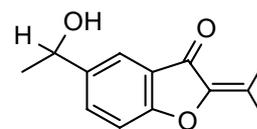
<sup>3</sup> Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*. 2002, John Wiley and Sons, Ltda., U.K. 145-146



Proceno I

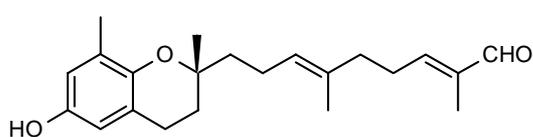


Proceno II

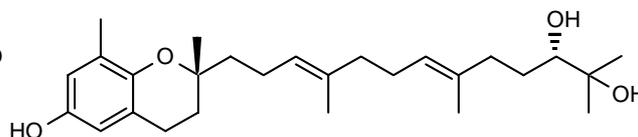
3-Cetobenzofurano  
sustituido

Se han descrito miembros de esta familia de compuestos con una gran diversidad de actividades biológicas, lo que se explica por la interacción de la unidad de benzopirano con múltiples receptores proteicos, como ligandos con alta afinidad, lo que sugiere que estos productos son lo suficiente lipofílicos para atravesar la membrana celular. Por ello, Nicolaou y *col.*<sup>4</sup> identifican la estructura de 2,2-dimetil-2*H*-benzopirano en numerosos productos naturales, designándola como *estructura privilegiada* y proponen una estrategia para la síntesis de una librería de análogos a los productos naturales.

Los benzopiranos terpénicos y estructuras relacionadas se encuentran ampliamente distribuidos en organismos marinos, como microalgas y esponjas. Este tipo de cromenos presenta una amplia gama de actividades biológicas como son actividad antioxidante, anticancerígena y antimutagénica. Así, los sargacromanoles A-P, aislados de algas del género *Sargassum*, se han descrito por su actividad antioxidante, como atrapadores de radicales libres<sup>5</sup> y por su actividad antiviral frente al citomegalovirus (HCMV)<sup>6</sup>. Así mismo, se han encontrado en los frutos de *Iryanthera juruensis*, los compuestos relacionados sargacromanol y 7-metilsargacromanol<sup>7</sup>.



Sargacromanol A



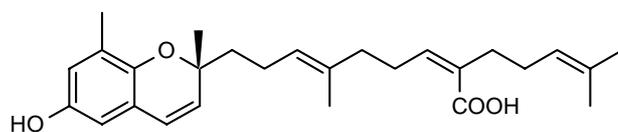
Sargacromanol L

<sup>4</sup> Nicolaou, K. C.; Pferfferkorn, J. A.; Roecker A. J.; Cao, G. Q.; Barluenga, S.; Mitchell, H. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 9939-9953.

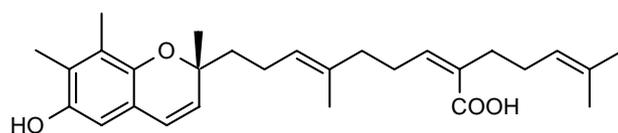
<sup>5</sup> Jang, K. H.; Lee, B. H.; Choi, B. W.; Lee, H. S.; Shin J. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 716-723.

<sup>6</sup> Iwashima, M.; Mor, J.; Ting, X.; Matsunaga, T.; Hayashi, K.; Shinoda, D.; Saito, H.; Sankawa, U.; Hayashi, T. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, 28, 374-377.

<sup>7</sup> Silva, D. H. S.; Pereira, F. C.; Zannoni, M. V. B.; Yoshida, M. *Phytochemistry.* **2001**, 59, 437-442.

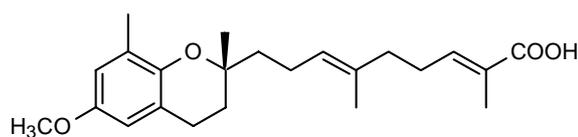


**Sargacromenol**



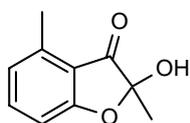
**7-Metilsargacromenol**

Los benzopiranos prenilados, policerasoidin y policerasoidol, aislados de *Polyalthia cerasoides*<sup>8</sup>, inhiben la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. Este tipo de estructuras solo está presente en la familia Annonaceae, ya que es característico de organismos marinos.

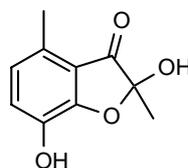


**Policerasoidin**

De cultivos del hongo *Coniothyrium minitans*<sup>9</sup> se han aislado dos benzofuranos y tres cromanos, de los cuales la 2-hidroxi-2,4-dimetil-3(2H) benzofuranona y 2,7-dihidroxi-2,4-dimetil-3-(2H) benzofuranona presentan actividad inhibitoria de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib), micoparásito patógeno de las plantas.



**2-Hidroxi-2,4-dimetil-3-(2H) benzofuranona**

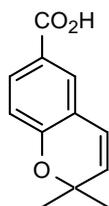


**2,7-Dihidroxi-2,4-dimetil-3-(2H) benzofuranona**

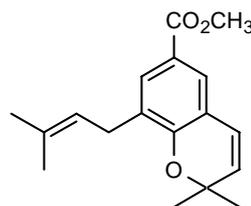
<sup>8</sup> González, M. C.; Sentandreu, M. A.; Sundar Rao, K.; Zafra-Polo, M. C.; Cortes, D. *Phytochemistry*. **1996**, 43, 1361-1364.

<sup>9</sup> Machida, K.; Trifonov, L. S.; Ayer W. A.; Lu, Z. X.; Laroche, A.; Huang, H. C. Cheng, K. J.; Zantige, J. L. *Phytochemistry*. **2001**, 58, 173-177.

Se han descrito numerosos cromenos en las especies del género *Piper*, *P. hostmannianum*<sup>10</sup>, *P. lhotzkyanum* y *P. dilatatum*<sup>11</sup>. Así, el ácido 2,2-dimetil-2*H*-cromeno-6-carboxílico, aislado de *Piper aduncum*, produce daño sobre el ADN de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*<sup>12</sup> y el 2,2-dimetil-2*H*-cromeno-8-(3-metil-2-butenil)-6-carboxilato de metilo aislado de *P. crassinervium*<sup>13</sup> presenta actividad fungicida frente a *Cladosporium cladosporioides*.



**Ácido 2,2-dimetil-2*H*-cromeno-6-carboxílico**

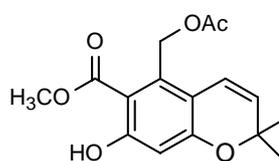


**2,2-Dimetil-2*H*-cromeno-8-(3-metil-2-butenil)-6-carboxilato de metilo**

Estudios recientes han demostrado la presencia de cromenos en especies del género *Peperomia* con actividad antifúngica frente a *Cladosporium sphaerospermum*<sup>1</sup>.



**Ácido 5-metanol-7-metoxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno-6 carboxílico**



**5-Acetoximetanol-7-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno-6 carboxilato de metilo**

<sup>10</sup> Díaz, D. P. P.; Tiberío, A. C.; Joseph-Nathan, P. *Phytochemistry*. **1987**, 26, 809-810.

<sup>11</sup> Moreira, D. L.; Guimara, E. F.; Kaplan, M. A. C. *Phytochemistry*. **1998**, 49, 1339-1342.

<sup>12</sup> Baldoqui, D. C.; Kato, M. J.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani V. S.; Young, M. C. M.; Morandim, A.; Furlan M. *Phytochemistry*. **1999**, 51, 899-902.

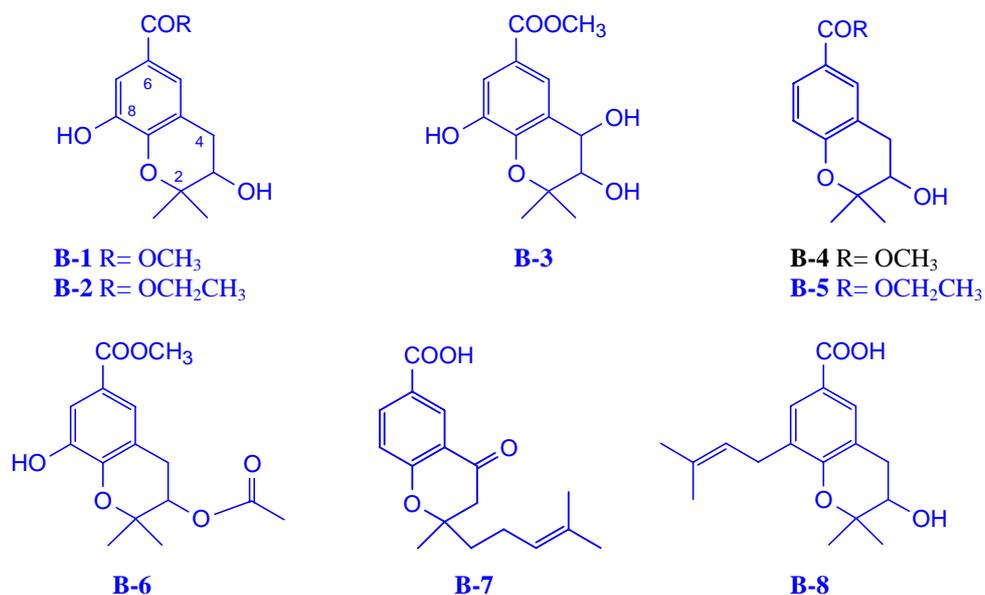
<sup>13</sup> Lago, J. H. G.; Ramos, C. S.; Campos D.; Casanova, C.; Morandim, A. de A.; Bergamo, D. C. B.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani V. S.; Furlan M.; Guimaraes, E. F.; Young, M. C. M.; Kato, M. J. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 1783-1788.

## Resultados y discusión

Tras repetidas cromatografías del extracto de diclorometano de las hojas de *Piper acutifolium*, *P. elongatum*, *P. glabratum*, *P. heterophyllum* y *P. pilliraneum*, se aíslan veintidós metabolitos con estructura de benzopirano o benzofurano, los cuales hemos denominado de **B-1** a **B-22**.

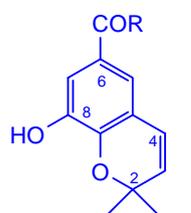
Los productos aislados se agruparon para su estudio de acuerdo a sus estructuras en cromanos, cromenos y benzofuranos, tal como se describe a continuación:

- **Cromanos**, se aíslan ocho metabolitos con este sistema, que hemos denominado de **B-1** a **B-8**, de los cuales siete resultaron nuevos en la bibliografía química. El producto que denominamos **B-4** había sido descrito anteriormente y fue identificado como ácido 2,2-dimetil-3-hidroxi-cromano-6-carboxílico.

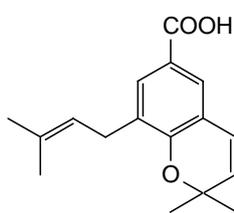


- **Cromenos**, con este sistema se aíslan los metabolitos que denominamos de **B-9** a **B-19**, de los cuales siete resultaron nuevos en la bibliografía química, **B-10**, **B-12** y de **B-15** a **B-19**. Los restantes cromenos aislados se habían descrito anteriormente en la bibliografía química y fueron identificados, basándonos en sus datos físicos y espectroscópicos, como: 8-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-1-cromeno-6-carboxilato de metilo<sup>12</sup> (**B-9**), ácido 2,2-

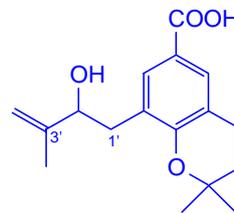
dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2*H*-1-cromeno-6-carboxílico<sup>14</sup> (**B-11**), ácido 2-metil-2-(4-metil-3-pentenil)-2*H*-1-cromeno-6-carboxílico<sup>11</sup> (**B-13**) y 2-metil-2-(4-metil-3-pentenil)-8-(3-metil-2-butenil)-2*H*-1-cromeno-6-carboxilato de metilo<sup>13</sup> (**B-14**).



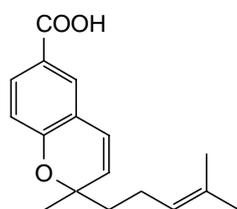
**B-9** R= OCH<sub>3</sub>  
**B-10** R= OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>



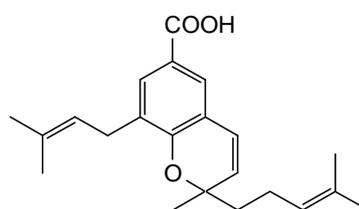
**B-11**



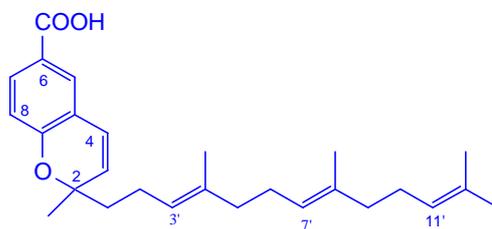
**B-12**



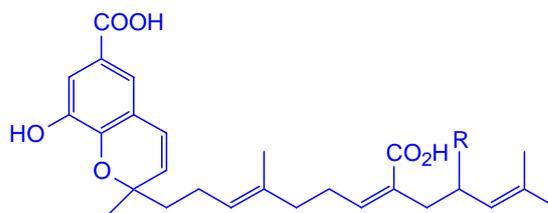
**B-13**



**B-14**

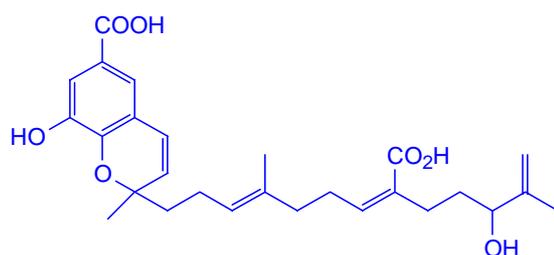


**B-15**

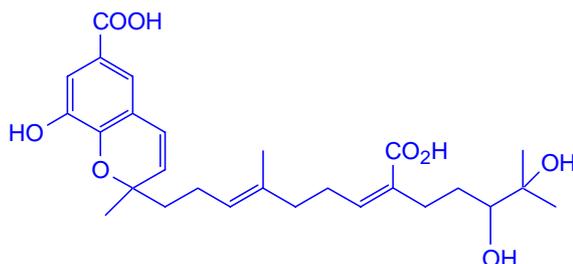


**B-16** R= H  
**B-17** R= OH

<sup>14</sup> Orjala, J.; Erdelmeier, C. A. J.; Wright, A. D.; Rali, T.; Sticher, O. *Phytochemistry*. **1993**, 34, 813-818.

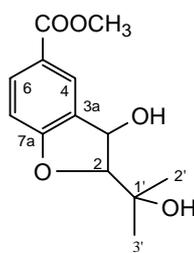


**B-18**

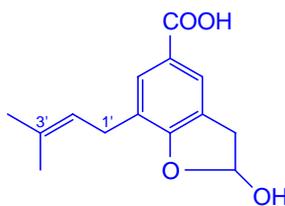


**B-19**

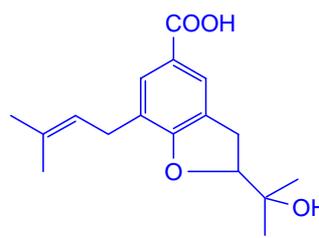
- **Benzofuranos**, se aíslan tres metabolitos denominados de **B-20** a **B-22** con estructura de benzofurano, de los cuales **B-21** y **B-22** resultaron nuevos en la bibliografía química. El producto **B-20** fue identificado como 3-hidroxi-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-2,3-dihidrobenzofurano-5-carboxilato de metilo<sup>15</sup> y aunque había sido descrito con anterioridad en la bibliografía química, sus datos de RMN <sup>13</sup>C no habían sido aportados, por lo que en esta Memoria de Tesis se lleva a cabo la asignación completa de todos sus datos espectroscópicos.



**B-20**



**B-21**



**B-22**

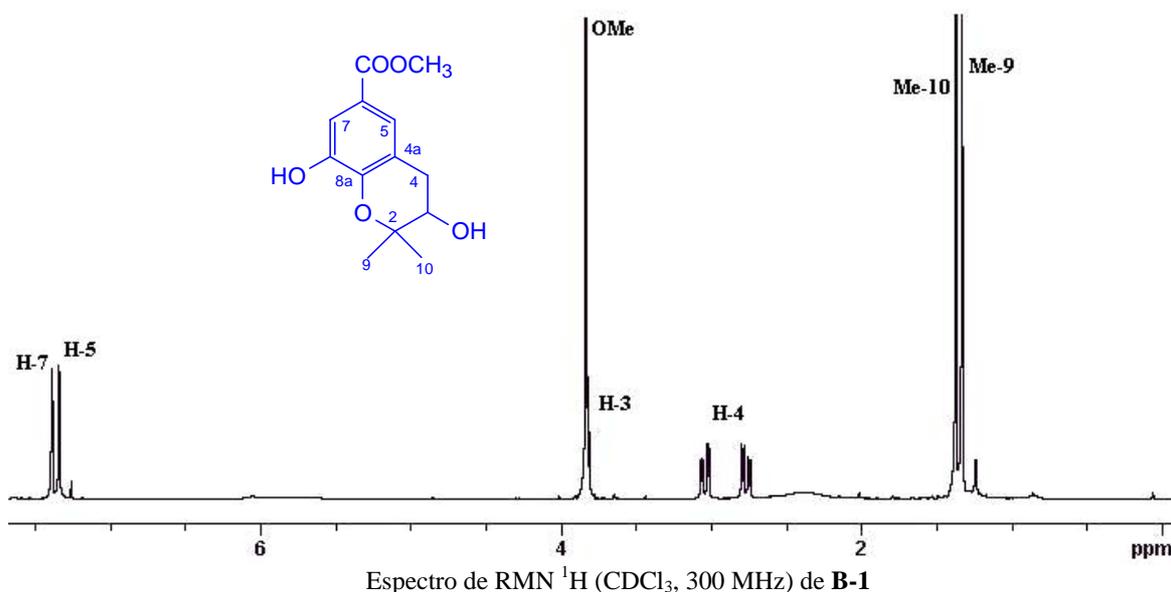
Las estructuras de los nuevos metabolitos se determinaron mediante técnicas espectroscópicas de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, incluyendo experimentos 2D, infrarrojo, ultravioleta y espectrometría de masas. A continuación pasamos a describir la elucidación estructural de los nuevos derivados de benzopirano y benzofurano aislados de las especies de *Piper* estudiadas.

<sup>15</sup> Friederich, U.; Siemens, K.; Solís, P. N.; Gupta, M. P.; Jenet-siemens, K. *Pharmazie*. **2005**, 60, 455-457.

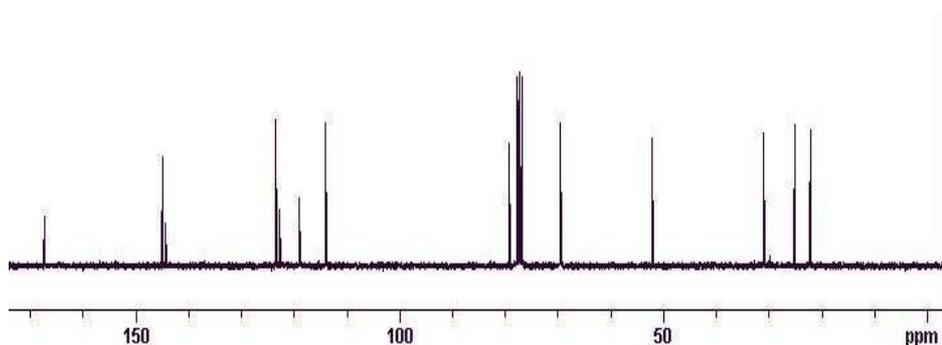
## Determinación estructural del producto B-1

En su espectro de masas, el producto que hemos denominado **B-1**, presentó un ión molecular a 252  $m/z$ , que corresponde con una fórmula molecular  $C_{13}H_{16}O_5$ , según espectrometría de masas de alta resolución (EMAR), lo que indica que nuestro producto presenta seis grados de insaturación. Así mismo, se observaron fragmentos correspondientes a la pérdida de agua  $[M-H_2O]^+$  a 234  $m/z$  y pérdida de metoxilo  $[M-OCH_3]^+$  a 221  $m/z$ . En el espectro de IR se observaron bandas correspondientes a grupo hidroxilo ( $3418\text{ cm}^{-1}$ ), grupo éster ( $1698\text{ cm}^{-1}$ ) y anillo aromático ( $1595$  y  $765\text{ cm}^{-1}$ ).

Su espectro de RMN  $^1H$  (tabla 9) presentó dos singletes a  $\delta$  1.33 y 1.37, correspondientes a metilos geminales, dos dobles dobles a  $\delta$  2.78 ( $J= 4.3, 12.7\text{ Hz}$ ) y 3.03 ( $J= 3.6, 12.7\text{ Hz}$ ), asignables a un metileno; un doble doblete a  $\delta$  3.82 ( $J= 3.6, 4.3\text{ Hz}$ ), asignable a un protón geninal a un grupo hidroxilo, solapado con un singlete a  $\delta$  3.83 característico de un grupo metoxilo y señales para dos protones aromáticos como dos dobles a  $\delta$  7.34 ( $J= 1.3\text{ Hz}$ ) y 7.38 (1H,  $J= 1.3\text{ Hz}$ ), característico de un sistema aromático tetrasustituido.

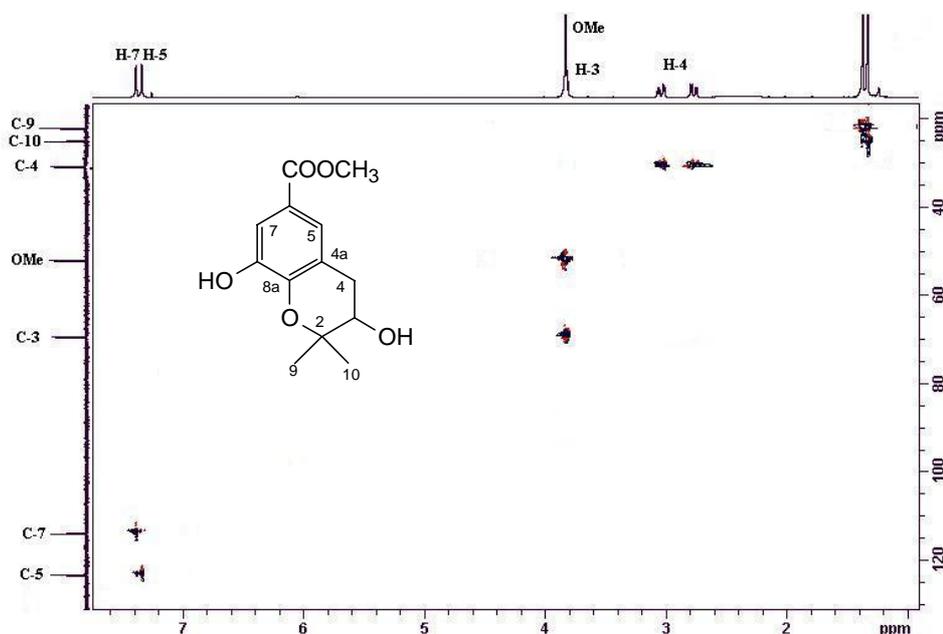


En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (tabla 10) se observaron señales para 13 carbonos y los experimentos DEPT 90 y 135 indicaron la presencia de dos metilos a  $\delta$  22.0 (C-9) y 24.9 (C-10), un grupo metoxilo a  $\delta$  51.9, un metileno a  $\delta$  30.8 (C-4), tres metinos a  $\delta$  69.3 (C-3), 113.8 (C-7) y 123.3 (C-5) y seis carbonos cuaternarios a  $\delta$  79.0 (C-2), 118.8 (C-4a), 122.5 (C-6), 144.2 (C-8a), 144.7 (C-8) y 167.0 (COOMe). El conjunto de estos datos están de acuerdo con una estructura de benzopirano tipo cromano para nuestro producto **B-1**.



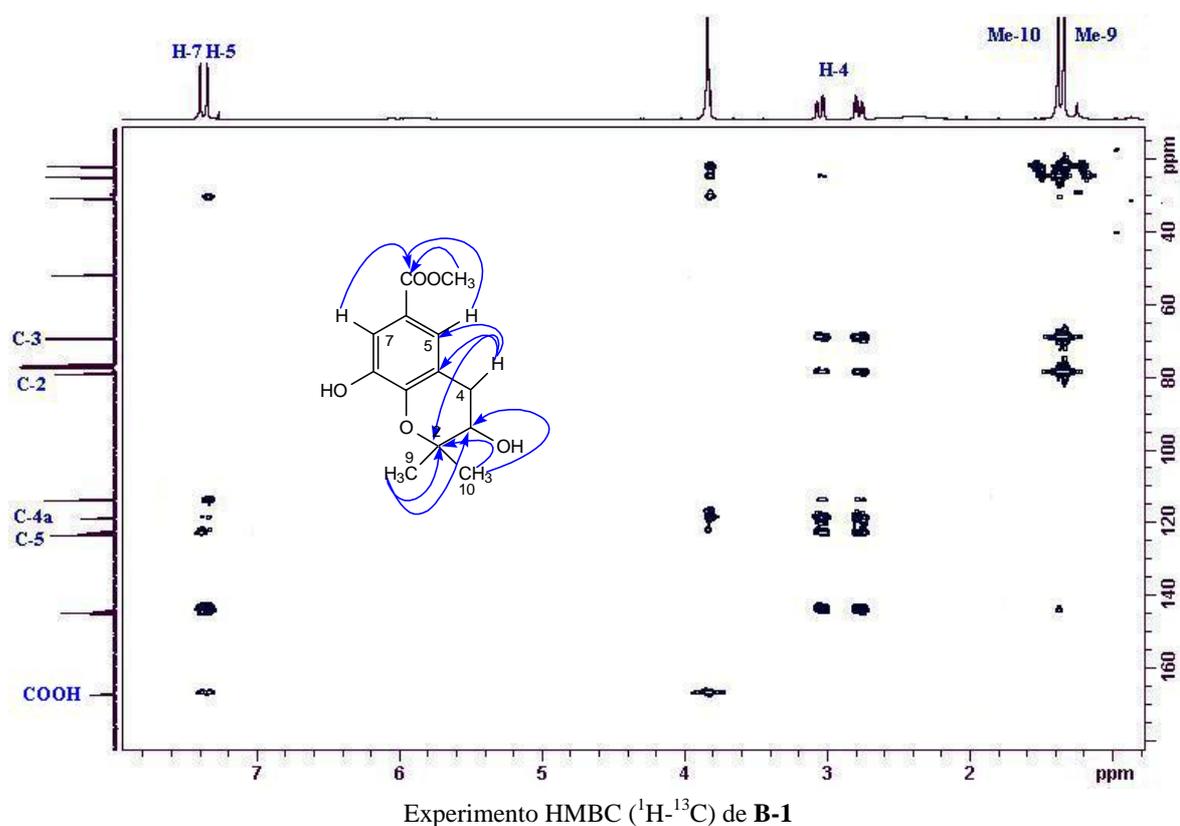
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) de **B-1**

Un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC), nos permitieron la asignación de las señales correspondientes a los protones existentes en la molécula y además correlacionar cada átomo de carbono con sus respectivos protones.



Experimento HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **B-1**

Así, en el experimento COSY se observó la presencia de un sistema AX<sub>2</sub> que presenta señales a  $\delta_H$  a 3.82 (H-3),  $\delta_H$  2.78 y 3.03 (H-4). La regiosustitución sobre el sistema de cromano se estableció mediante las correlaciones detectadas en el experimento HMBC, destacando las correlaciones entre los protones H-4 y los carbonos C-2 ( $\delta$  79.0), C-5 ( $\delta$  123.3) y C-4a ( $\delta$  118.8), así como las correlaciones de los metilos Me-9 a  $\delta$  1.33 y Me-10 a  $\delta$  1.37 con los carbonos C-2 y C-3 ( $\delta$  69.3), lo que permitió situar al grupo hidroxilo sobre C-3; mientras la correlación del grupo metoxilo y los protones aromáticos H-5 ( $\delta$  7.34) y H-7 ( $\delta$  7.38) con el carbono carboxílico a  $\delta$  167.0, situó el grupo metoxilo sobre la molécula.

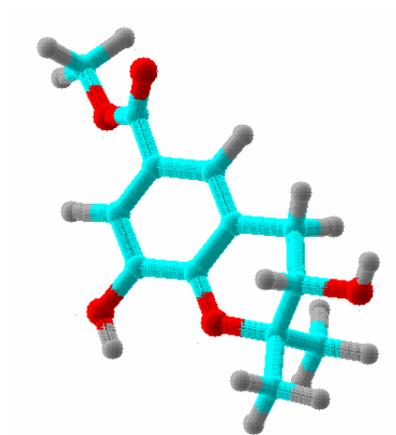


Cálculos de modelización molecular (PCModel)<sup>16</sup> nos indicaron que la conformación más estable para nuestro compuesto corresponde con aquella en la que el grupo hidroxilo sobre C-3 se encuentra en disposición  $\beta$ , lo que por otra parte está de acuerdo con las constantes de acoplamiento de H-3 con H-4 ( $J= 3.6, 4.3$  Hz) observadas en el espectro de RMN <sup>1</sup>H. Una

<sup>16</sup> PC Model from Serena Software, P. O. Box. 3076, Bloomington, IN47402-3076.

disposición  $\alpha$  del grupo hidroxilo daría lugar a unas constantes de acoplamiento de  $J= 5.9$  y  $10.5$  Hz, según los cálculos realizados mediante PCModel.

Estos datos nos permitieron establecer de forma inequívoca la estructura de **B-1** como el **3,8-dihidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de metilo**.

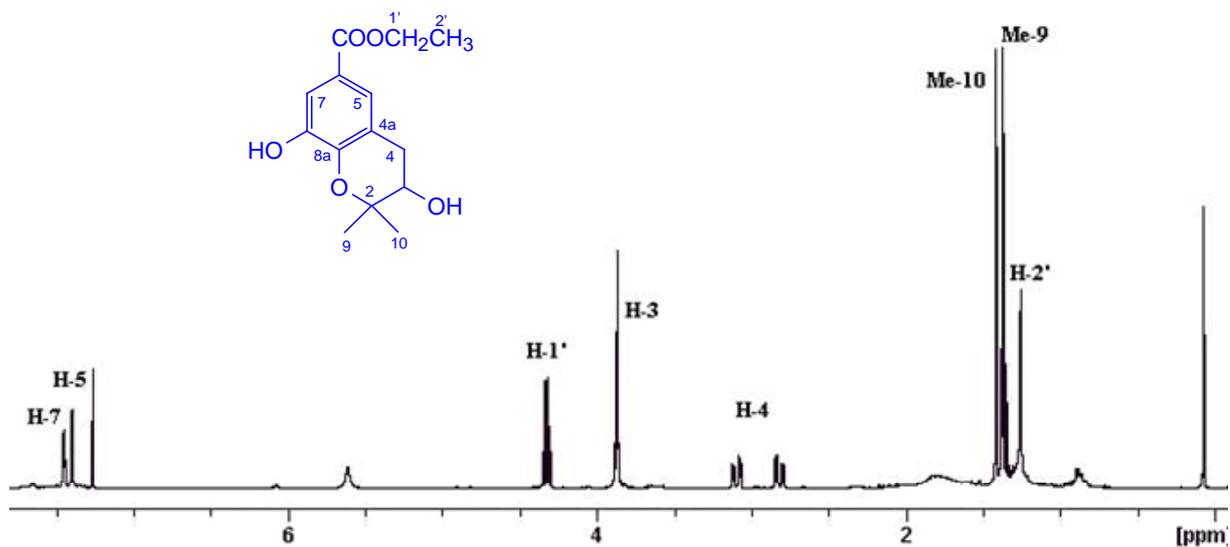


Estructura tridimensional de **B-1**

### Determinación estructural del producto B-2

La estructura del compuesto que hemos denominado **B-2** presentó en su espectro de masas un ión molecular a  $266 m/z$ , que corresponde a una fórmula molecular  $C_{14}H_{18}O_5$  determinada por espectrometría de masas de alta resolución. Además, se observaron fragmentos correspondientes a la pérdida de agua  $[M-H_2O]^+$  a  $248 m/z$  y etoxilo  $[M-OCH_2CH_3]^+$  a  $221 m/z$ . En el espectro de IR se observaron bandas características de grupo hidroxilo ( $3406\text{ cm}^{-1}$ ), grupo éster ( $1705\text{ cm}^{-1}$ ) y anillo aromático ( $1595$  y  $768\text{ cm}^{-1}$ ).

Los datos espectroscópicos para este compuesto fueron muy parecidos a los de **B-1**, con las diferencias que comentamos a continuación. En los espectros de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  (tablas 9 y 10) se observó la presencia de un triplete a  $\delta_H 1.36$  (3H,  $J= 7.0$  Hz) y  $\delta_C 14.3$  (c, C-2'), un cuarteto a  $\delta_H 4.31$  (2H,  $J= 7.0$  Hz) y  $\delta_C 60.7$  (t, C-1') y una señal característica de un carbono carboxílico a  $\delta_C 166.9$ , señales asignables a un grupo carboxilato de etilo.

Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **B-2**

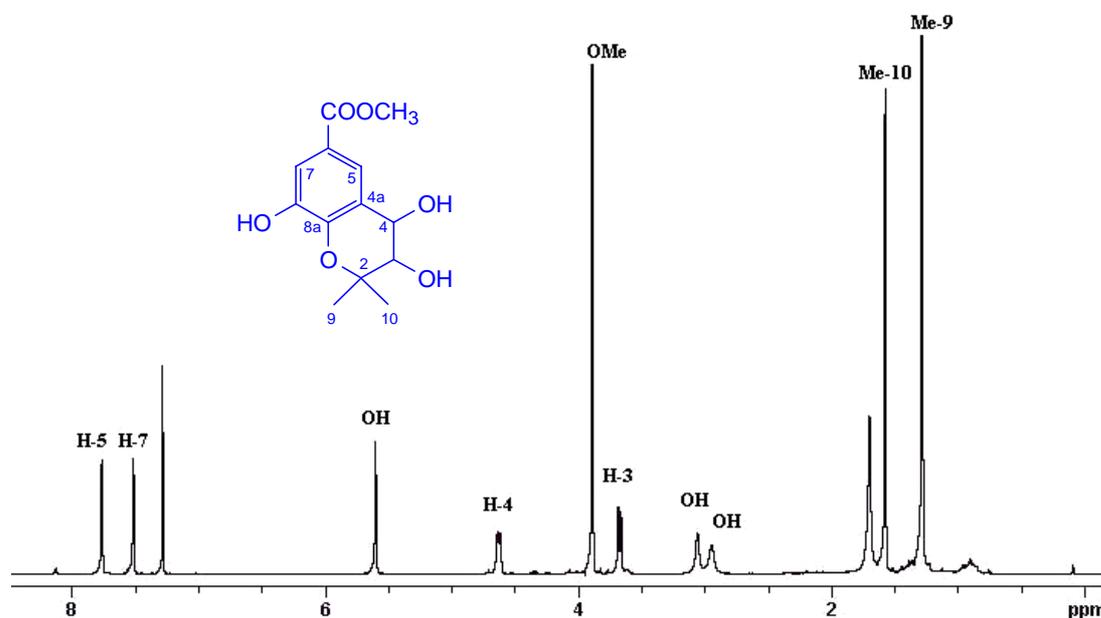
Un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares (COSY, ROESY) y heteronucleares (HSQC, HMBC), permitió situar los diferentes grupos sobre la molécula y establecer la estructura de **B-2** como **3,8-dihidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de etilo**.

### Determinación estructural del producto **B-3**

El producto denominado **B-3** presentó en su espectro de masas un ión molecular a 268  $m/z$ , correspondiente a una fórmula molecular  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_6$  determinada por espectrometría de masas de alta resolución, así como fragmentos correspondientes a la pérdida de una molécula de agua  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$  a 250  $m/z$  y metoxilo  $[\text{M}-\text{CH}_3\text{O}]^+$  a 237  $m/z$ . En el espectro de IR se observaron bandas correspondientes a grupo hidroxilo, grupo éster y anillo aromático.

En su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (tabla 9) se observaron dos singletes a  $\delta$  1.26 y 1.55, correspondientes a metilos geminales y un singlete a  $\delta$  3.87, característico de un grupo metoxilo; dos dobletes a  $\delta$  3.65 ( $J= 8.6$  Hz) y 4.60 ( $J= 8.6$  Hz), asignables a protones geminales a grupos hidroxilos. Así mismo, se observaron dos dobletes a  $\delta$  7.49 ( $J= 1.9$  Hz) y 7.74 ( $J= 1.9$  Hz) que integran para un protón cada uno, característicos de un sistema aromático tetrasustituido

y tres singuletes anchos a  $\delta$  3.00, 3.09 y 5.59, intercambiables con agua deuterada, asignados a grupos hidroxilo. Estos datos están de acuerdo con una estructura de cromano, con dos grupos hidroxilo y un metil éster para el producto **B-3**.



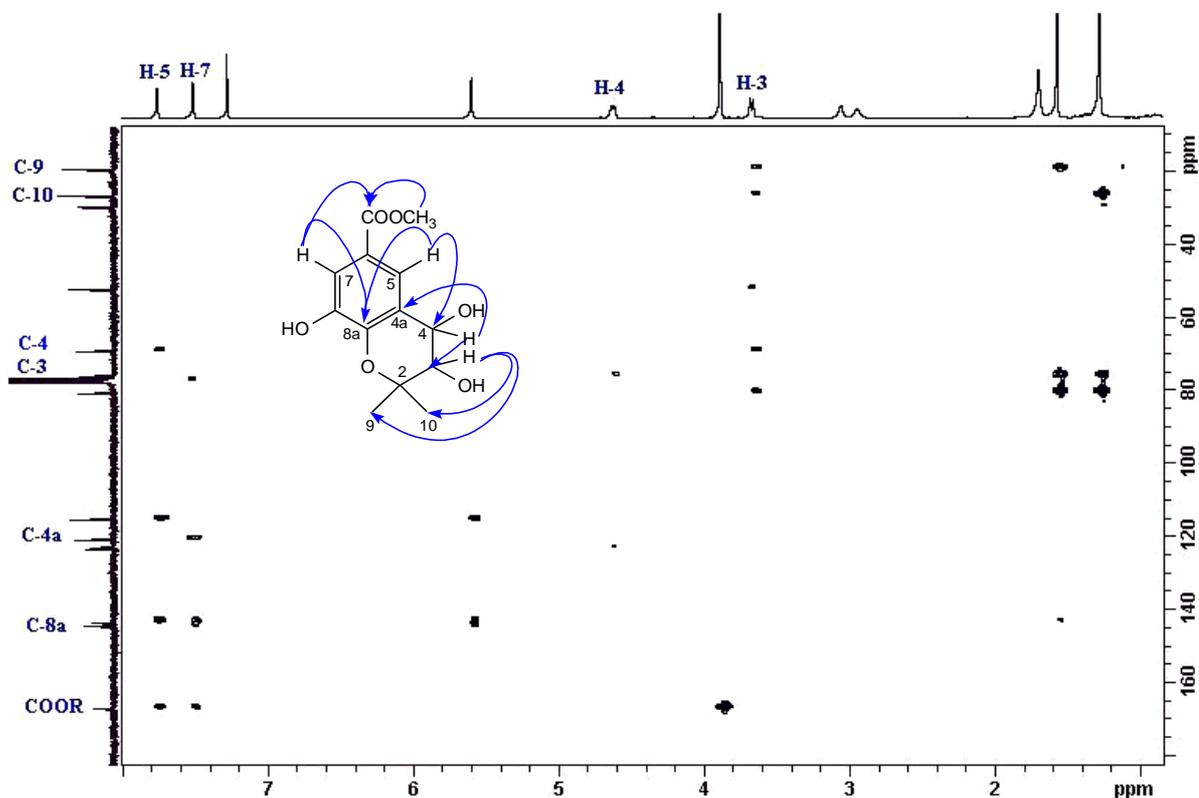
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de **B-3**

Su espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (tabla 10) y experimentos DEPT 90 y 135, indicaron la presencia de dos metilos, un metoxilo, cuatro metinos y seis carbonos cuaternarios, destacando como señales más significativas la presencia de dos carbonos metínicos unidos a oxígeno a  $\delta$  68.8 (C-4) y 75.6 (C-3) y un carbono carboxílico a  $\delta$  166.8.

El estudio de las constantes de acoplamiento y un experimento COSY nos indicó la existencia de un sistema dihidroxílico vecinal en los carbonos C-3 y C-4 del sistema de cromano.

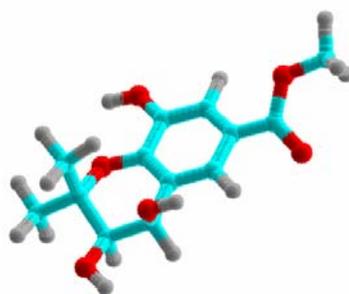
La localización de los grupos funcionales y los distintos carbonos cuaternarios presentes en la molécula se estableció mediante un experimento HMBC, en el cual se observaron como correlaciones más relevantes las del protón a  $\delta$  3.65 (H-3) con los carbonos C-9 ( $\delta$  19.0) y C-10 ( $\delta$  26.2); correlación del protón a  $\delta$  4.60 (H-4) con los carbonos C-3 ( $\delta$  75.6) y C-4a ( $\delta$  122.6), así como correlación de los protones aromáticos a  $\delta$  7.74 (H-5) y  $\delta$  7.49 (H-7) con el carbonos C-

8a ( $\delta$  143.3) y el carbono carboxílico a  $\delta$  166.8 y de los protones del grupo metoxilo a  $\delta$  3.87 con el carbono carboxílico.



Experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **B-3**

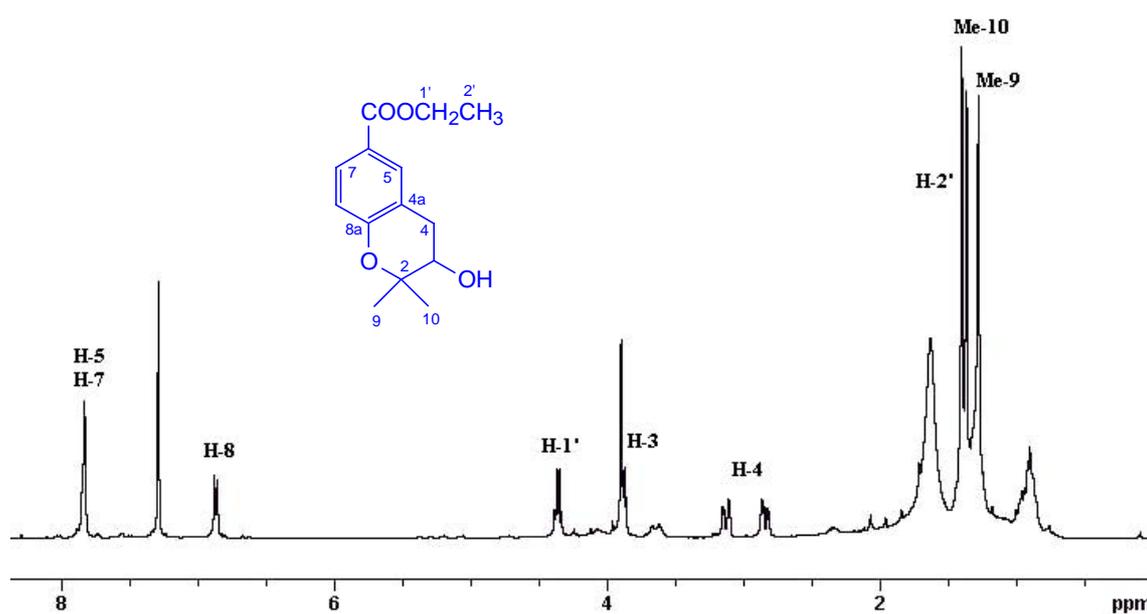
La estereoquímica relativa de los grupos hidroxilo en C-3 y C-4 se estableció basándose en la constante de acoplamiento ( $J= 8.6$  Hz) entre ambos protones, que nos indicó una relación *trans* entre H-3 y H-4, lo que se confirmó mediante cálculos de mecánica molecular (PCModel)<sup>17</sup>. Estos datos nos permiten establecer la estructura de **B-3** como **3,4,8-trihidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de metilo**.



Estructura tridimensional de **B-3**

## Determinación estructural del producto B-5

La estructura del compuesto que hemos denominado **B-5** se estableció mediante el análisis de sus datos físicos y espectroscópicos. Así, su fórmula molecular  $C_{14}H_{18}O_4$ , fue determinada por espectrometría de masas de alta resolución y RMN de  $^{13}C$ . En el espectro de IR se observaron bandas correspondientes a grupo hidroxilo, grupo éster y anillo aromático, lo que se corroboró en su espectro de RMN  $^1H$ , que presentó señales características de un esqueleto de benzopirano tipo cromoano, con un anillo aromático trisustituido, un alcohol secundario y un éster etílico. El conjunto de estos datos mostraron que el producto **B-5** estaba relacionado con el producto que denominamos **B-2**, siendo la diferencia más notable en los espectro de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  (tablas 9 y 10) de **B-5** la presencia en la región aromática de un doblete a  $\delta$  6.83 ( $J=9.1$  Hz,) que integra para un protón y un singulete ancho a  $\delta$  7.80 que integra para dos protones y señales a  $\delta_C$  116.9 (d, C-8), 129.3 (d, C-7) y 132.0 (d, C-5), así como la desaparición de la señal asignada a un grupo fenólico a  $\delta_C$  144.7, presente en **B-2**.



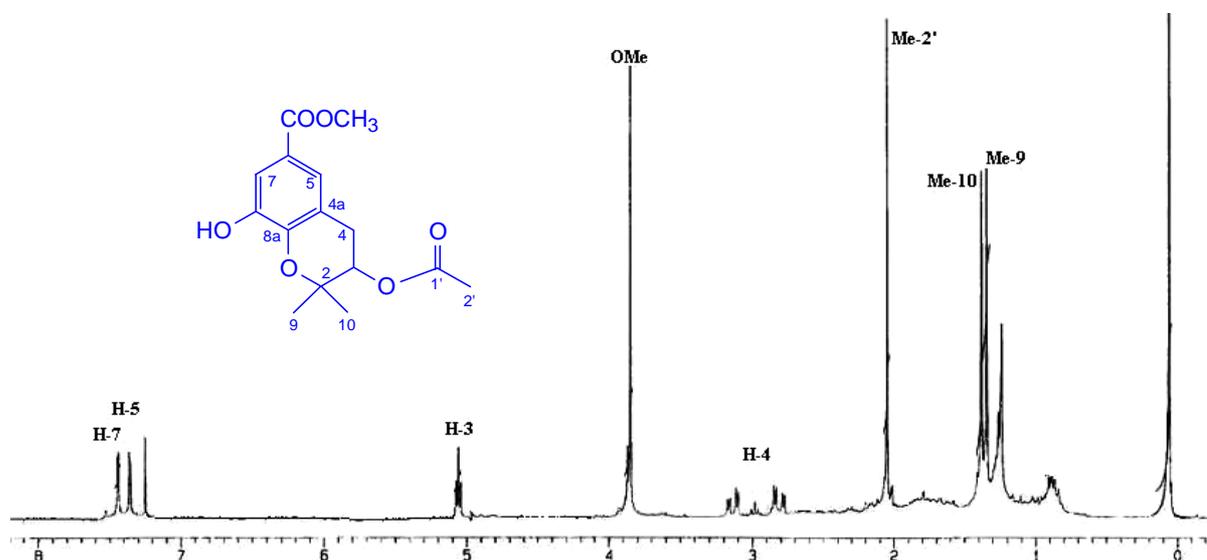
Espectro de RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz) de **B-5**

Un cuidadoso estudio de los experimentos 2D de RMN nos permitió establecer la posición de los diferentes grupos sobre la molécula, determinándose la estructura de **B-5** como **3-hidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de etilo**.

## Determinación estructural del producto B-6

El producto denominado **B-6** presentó en su espectro de masas de baja resolución un ión molecular a 294  $m/z$ , correspondiente a una fórmula molecular  $C_{15}H_{18}O_6$ , determinada por espectrometría de masas de alta resolución, lo que indicó que el producto presenta siete grados de insaturación. Además, se observaron fragmentos correspondientes a la pérdida de grupo metoxilo  $[M-CH_3O]^+$  a 263  $m/z$  y ácido acético  $[M-CH_3COOH]^+$  a 234  $m/z$ . En el espectro de IR se observaron bandas características a grupo hidroxilo ( $3412\text{ cm}^{-1}$ ), grupo éster ( $1715\text{ cm}^{-1}$ ) y anillo aromático ( $1597$  y  $799\text{ cm}^{-1}$ ).

El estudio de sus datos espectroscópicos mostró que estaba relacionado con **B-1**, siendo la principal diferencia en sus espectros de RMN de  $^1H$  (tabla 9), la presencia de un singulete a  $\delta$  2.04 que integra para tres protones y el desplazamiento a campos mas bajos de la señal asignada a H-3 desde  $\delta$  3.82 en **B-1** a  $\delta$  5.07 ( $J=4.8\text{ Hz}$ ), así como la presencia en el espectro de  $^{13}C$  (tabla 10) de señales características de un grupo acetato a  $\delta$  24.9 (c, C-2') y 170.4 (s, C-1').



Espectro de RMN  $^1H$  (C  $DCl_3$ , 300 MHz) de **B-6**

Estos datos y el estudio de los experimentos 2D de RMN nos indicaron que **B-6** es el 3-acetoxi derivado de **B-1** y por lo tanto proponemos la estructura de **3-acetoxi-8-hidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de metilo** para este compuesto.

**Tabla 9. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de los cromanos B-1–B-3, B-5 y B-6**

Posición	B-1	B-2	B-3	B-5	B-6
<b>H-3</b>	3.82 dd (3.6, 4.3)	3.87 m*	3.65 d (8.6)	3.85 dd (5.0, 5.4)	5.07 t (4.8)
<b>H-4</b>	2.78 dd (4.3, 12.7)	2.82 dd (5.7, 16.9)	4.60 d (8.6)	2.81 dd (5.4, 16.4)	2.88 dd (4.8, 17.5)
	3.03 dd (3.6, 12.7)	3.10 dd (4.7, 16.9)		3.09 dd (5.0, 16.4)	3.11 dd (4.8, 17.5)
<b>H-5</b>	7.34 d (1.3)	7.40 s	7.74 d (1.9)	7.80 sa*	7.37 d (1.8)
<b>H-7</b>	7.38 d (1.3)	7.45 s	7.49 d (1.9)	7.80 sa*	7.45 d (1.8)
<b>H-8</b>				6.83 d (9.1)	
<b>Me-9</b>	1.33 s	1.38 s	1.26 s	1.33 s	1.36 s
<b>Me-10</b>	1.37 s	1.42 s	1.55 s	1.37 s	1.39 s
<b>H-1'</b>		4.31 c (7.0)		4.32 c (7.1)	
<b>Me-2'</b>		1.36 t (7.0)		1.39 t (7.1)	2.04 s
<b>OMe</b>	3.83 s		3.87 s		3.89 s

<sup>a</sup> δ, CDCl<sub>3</sub>. *J* en paréntesis en Hz. Datos basados en los experimentos COSY y HSQC

\* Señales solapadas

**Tabla 10. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz) de los cromanos B-1–B-3, B-5 y B-6**

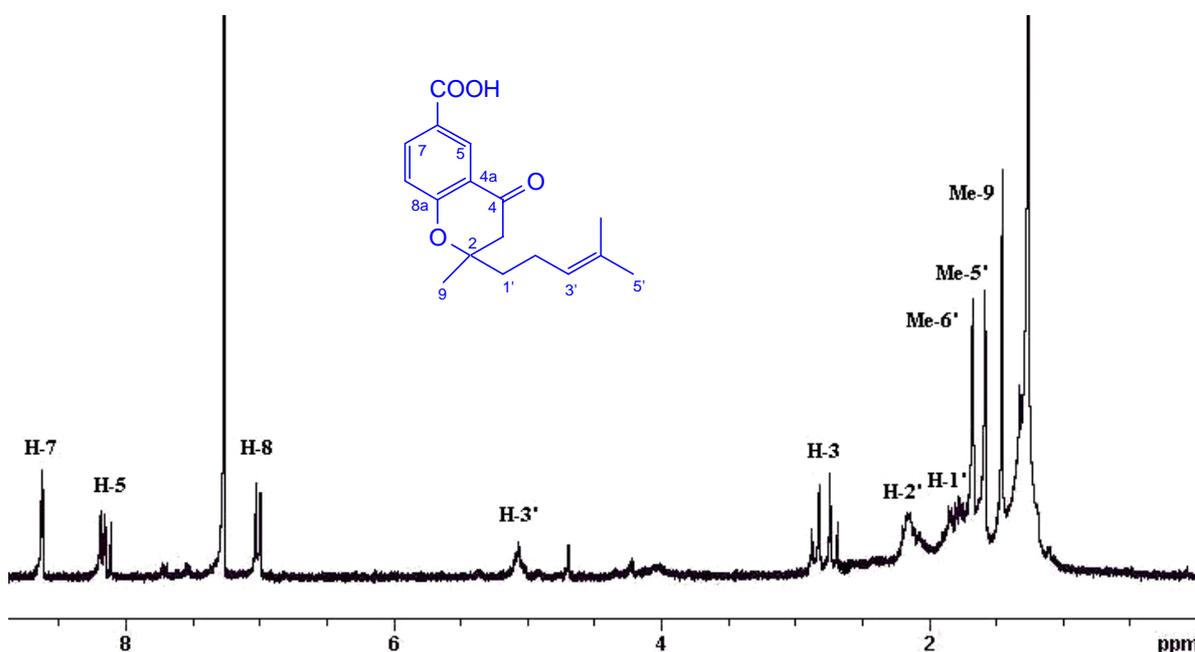
Posición	B-1	B-2	B-3	B-5	B-6
<b>C-2</b>	79.0 s	79.0 s	80.4 s	77.5 s	77.3 s
<b>C-3</b>	69.3 d	69.4 d	75.6 d	69.0 d	70.4 d
<b>C-4</b>	30.8 t	30.9 t	68.8 d	30.9 t	27.9 t
<b>C-4a</b>	118.8 s	118.6 s	122.6 s	118.4 s	118.0 s
<b>C-5</b>	123.3 d	123.3 d	120.6 d	132.0 d	122.9 d
<b>C-6</b>	122.5 s	123.2 s	123.1 s	122.5 s	122.7 s
<b>C-7</b>	113.8 d	113.8 d	115.0 d	129.3 d	113.9 d
<b>C-8</b>	144.7 s	144.7 s	144.2 s	116.9 d	144.7 s
<b>C-8a</b>	144.2 s	143.9 s	143.3 s	156.8 s	143.9 s
<b>C-9</b>	22.0 c	22.9 c	19.9 c	21.9 c	21.0 c
<b>C-10</b>	24.9 c	24.9 c	26.2 c	24.7 c	23.8 c
<b>COOR</b>	167.0 s	166.9 s	166.8 s	166.9 s	166.8 s
<b>C-1'</b>		60.7 t		60.4 t	170.4 s
<b>C-2'</b>		14.3 c		14.2 c	24.9 c
<b>OMe</b>	51.9 c		51.9 c		51.9 c

<sup>a</sup> δ, CDCl<sub>3</sub>. Datos basados en los experimentos DEPT, HSQC y HMBC

## Determinación estructural del producto B-7

En su espectro de masas el producto que hemos denominado **B-7**, presentó un ión molecular a 288  $m/z$ , que corresponde con una fórmula molecular  $C_{17}H_{20}O_4$ , calculada por espectrometría de masas de alta resolución (EMAR). En el espectro de IR se observaron bandas correspondientes a ácido carboxílico ( $3517-2624$ ,  $cm^{-1}$ ), grupo carbonilo ( $1699$   $cm^{-1}$ ) y anillo aromático ( $1611$  y  $772$   $cm^{-1}$ ).

Su espectro de RMN  $^1H$  (tabla 11) presentó señales asignables a tres protones aromáticos a  $\delta$  7.00 (d,  $J= 8.7$  Hz, H-8), 8.16 (dd,  $J= 2.1, 8.7$  Hz, H-7) y 8.62 (d,  $J= 2.1$  Hz, H-5); un protón vinílico a  $\delta$  5.04 (t,  $J= 14.7$  Hz, H-3'); señales correspondiente a tres sistemas metilénicos a  $\delta$  1.76-1.84 (m, H-1'), 2.04-2.17 (m, H-2'), 2.70, 2.84 ( $d_{AB}$ ,  $J= 14.7$  Hz, H-3) y señales asignables a tres metilos, dos de ellos sobre doble enlace a  $\delta$  1.67 (H-5'); 1.74 (H-6') y un tercer metilo sobre carbono unido a oxígeno a  $\delta$  1.45 (H-9).



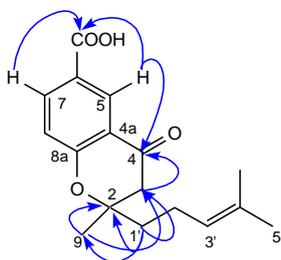
Espectro de RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz) de **B-7**

El espectro de RMN de  $^{13}C$  (tabla 12) y experimentos DEPT 90 y 135 indicó la presencia en la molécula de tres metilos, tres metilenos, cuatro metinos y siete carbonos cuaternarios, destacando con respecto a los compuestos con esqueleto de cromano antes descritos en esta

Memoria, la señal correspondiente a un grupo carbonilo a  $\delta$  191.3 (s, C-4) y una cadena lateral con señales a  $\delta$  17.7 (c, C-5'),  $\delta$  21.6 (t, C-2'),  $\delta$  25.4 (c, C-6'),  $\delta$  39.0 (t, C-1'),  $\delta$  122.7 (d, C-3') y  $\delta$  132.6 (s, C-4').

Un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC), nos permitió la asignación de las señales correspondientes a los protones existentes en la molécula y además correlacionar cada átomo de carbono con sus respectivos protones.

La regiosustitución sobre el sistema de cromano se estableció mediante un experimento HMBC en el que destacan las correlaciones a larga distancia de los protones H-1' ( $\delta$  1.76-1.84) y el metilo Me-9 ( $\delta$  1.45) con los carbonos C-2 ( $\delta$  82.2) y C-3 ( $\delta$  46.7), lo que situó la cadena lateral de pentenilo sobre el esqueleto de benzopirano; correlación de los protones aromáticos H-5 ( $\delta$  8.62) y H-7 ( $\delta$  8.16) con el carbono carboxílico a  $\delta$  163.4, así como correlaciones del protón aromático H-5 y de los protones metilénicos a  $\delta$  2.84 (H-3) con el carbono carbonílico a  $\delta$  191.3 (C-4), lo que confirmó la posición del grupo carbonilo en la molécula.



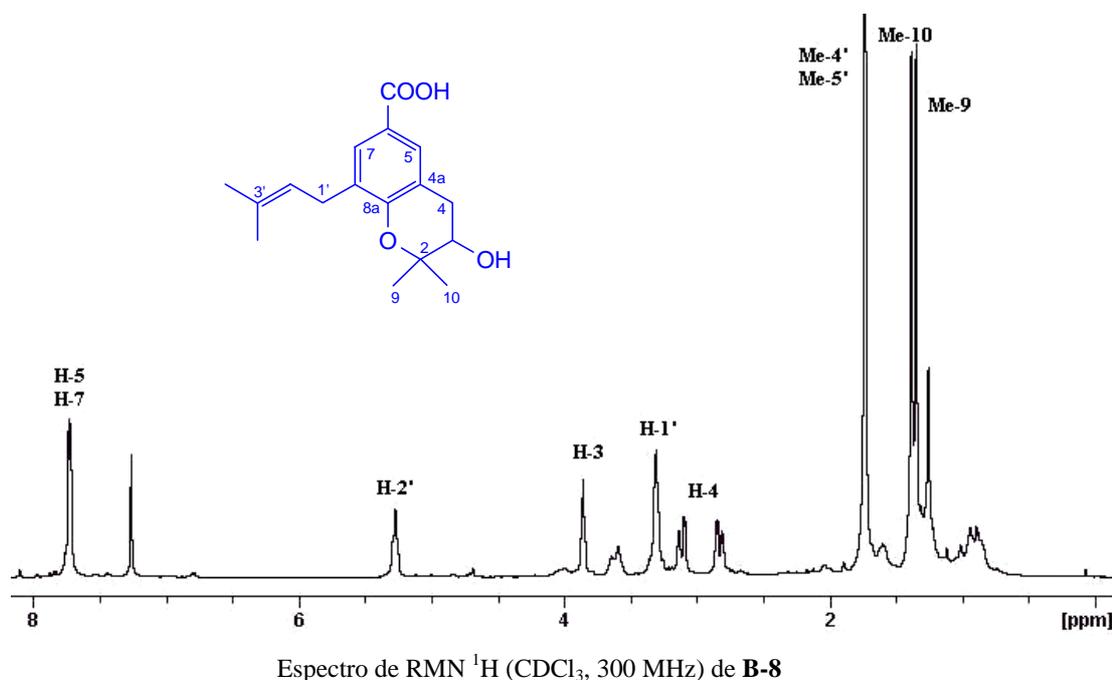
Correlaciones HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **B-7**

Estos datos nos permitieron establecer de forma inequívoca la estructura de **B-7** como **ácido 2-metil-2-(4-metil-3-pentenil)-4-oxo-6-cromanocarboxílico**.

## Determinación estructural del producto B-8

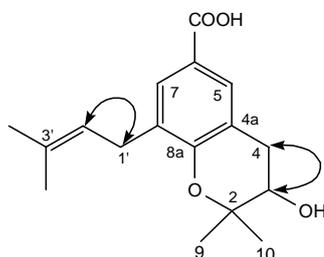
El producto denominado **B-8** presentó en su espectro de masas un ión molecular a 290  $m/z$  que corresponde a una fórmula molecular  $C_{17}H_{22}O_4$ , determinada por espectrometría de masas de alta resolución. En el espectro de IR se observaron bandas correspondientes a grupo hidroxilo, ácido carboxílico y anillo aromático.

En su espectro de RMN de  $^1H$  (tabla 11) se observaron señales características de una estructura de benzopirano tipo cromano con una cadena de isopreno, tal como se detalla a continuación. El sistema de cromano se caracterizó por la presencia de señales correspondientes a dos metilos como singuletes a  $\delta$  1.35 (Me-9) y 1.39 (Me-10); dos dobles dobles a  $\delta$  2.82 ( $J=5.4, 16.9$  Hz) y 3.11 ( $J=5.4, 16.9$  Hz) correspondientes al metileno C-4; un triplete a  $\delta$  3.85 ( $J=5.4$  Hz, H-3), asignable a un protón geminal a un alcohol secundario y en la región aromática se observaron señales para dos protones como singuletes a  $\delta$  7.72 y 7.73. La unidad de isopreno se caracterizó por la presencia de dos singuletes a  $\delta$  1.73 (Me-4') y 1.74 (Me-5'), correspondientes a dos metilos sobre doble enlace, un doblete a  $\delta$  3.31 ( $J=4.5$  Hz, H-1') y un triplete a  $\delta$  5.29 ( $J=4.5$  Hz, H-2').

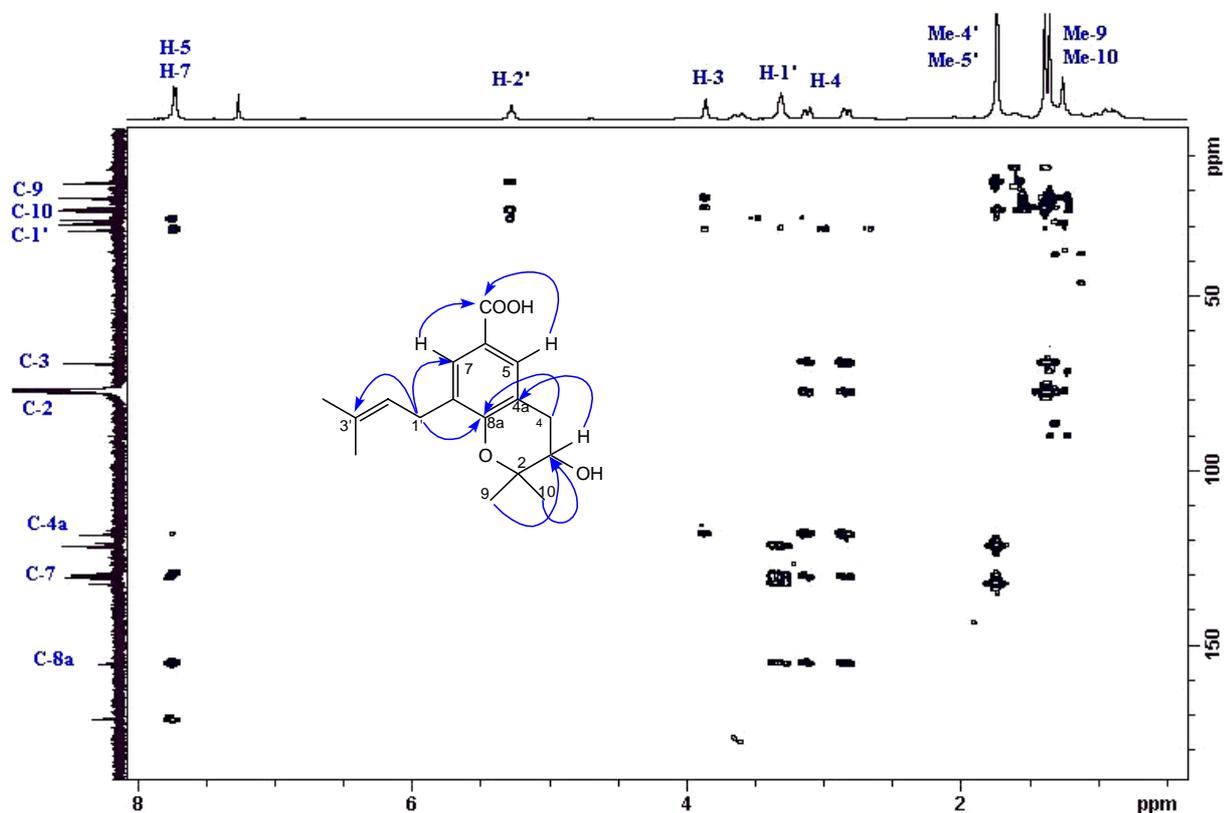


En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (tabla 12) se observaron señales correspondientes a 17 carbonos, lo que confirmó la fórmula molecular determinada por EMAR y los experimentos DEPT 90 y 135 establecieron la presencia en la molécula de cuatro metilos, dos metilenos, cuatro metinos y siete carbonos cuaternarios, datos que están de acuerdo con una estructura de benzopirano que presenta un ácido benzoico, un alcohol secundario y una cadena de isopreno.

El experimento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) indicó la presencia de dos sistemas  $\text{AX}_2$ , al observarse correlación entre el protón vinílico a  $\delta$  5.29 (H-2') y los protones metilénicos a  $\delta$  3.31 (H-1'), así como correlación del protón a  $\delta$  3.85 (H-3) con los protones metilénicos a  $\delta$  2.82 (H-4).



Correlaciones  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) de B-8

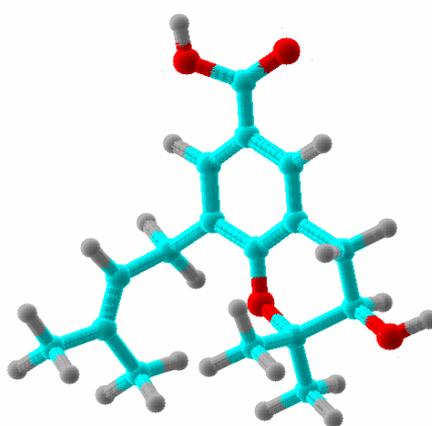


Experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de B-8

Por otra parte, las conectividades observadas en el experimento HMBC nos permitieron situar los grupos funcionales en la molécula. Así, las correlaciones de los protones aromáticos H-5 ( $\delta$  7.72) y H-7 ( $\delta$  7.73) con el carbono carboxílico a  $\delta$  171.0 situaron este último sobre C-6; las correlaciones de los metilos Me-9 ( $\delta$  1.35) y Me-10 ( $\delta$  1.39) con el carbono C-3 ( $\delta$  69.1) permitieron situar el alcohol secundario sobre C-3; el anillo heterocíclico se situó sobre los carbonos C-8a y C-4a, basándonos en las correlaciones de los mismos con los protones H-4 y H-3, respectivamente, mientras que las correlaciones de H-1' ( $\delta$  3.31) con los carbonos C-3' ( $\delta$  132.5), C-7 ( $\delta$  129.6) y C-8a ( $\delta$  155.3), situaron la cadena isoprénica sobre el carbono C-8 del esqueleto de benzopirano.

La estereoquímica relativa del grupo hidroxilo en C-3 se estableció basándonos en la constante de acoplamiento ( $J= 5.4$  Hz) entre H-3 y H-4, que nos indicó una estereoquímica  $\alpha$  para H-3, lo que se está de acuerdo con los cálculos de mecánica molecular (PC Model)<sup>17</sup>, que indican que una disposición  $\alpha$  presenta una  $J_{3,4}= 5.9$  Hz, mientras que una disposición  $\beta$  del protón H-3 le corresponde una  $J_{3,4}= 2.6$  Hz. Estos datos nos sugieren que el grupo hidroxilo sobre C-3, en nuestro compuesto, se encuentra en disposición  $\beta$ .

El conjunto de estos datos nos permitió proponer la estructura de **ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-6-cromanocarboxílico** para el producto **B-8**.

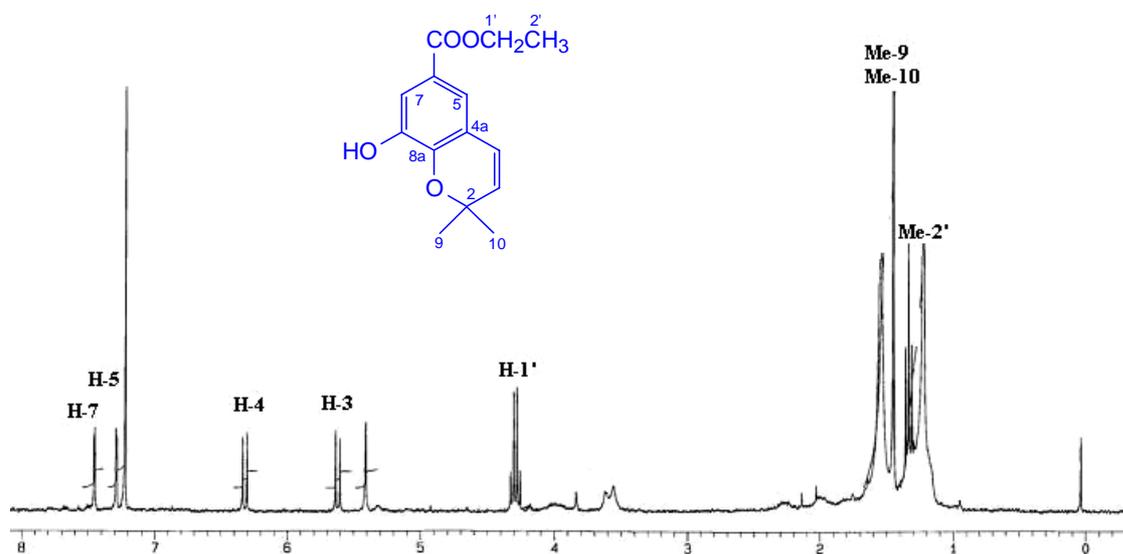


Estructura tridimensional de **B-8**

### Determinación estructural del producto B-10

La estructura del compuesto que hemos denominado **B-10** se estableció mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos, tal como se describe a continuación. Su fórmula molecular  $C_{14}H_{16}O_4$ , se determinó por espectrometría de masas de alta resolución y en el espectro de IR se observaron bandas correspondientes a grupo hidroxilo ( $3410\text{ cm}^{-1}$ ), éster ( $1712\text{ cm}^{-1}$ ) y anillo aromático ( $1024$  y  $775\text{ cm}^{-1}$ ).

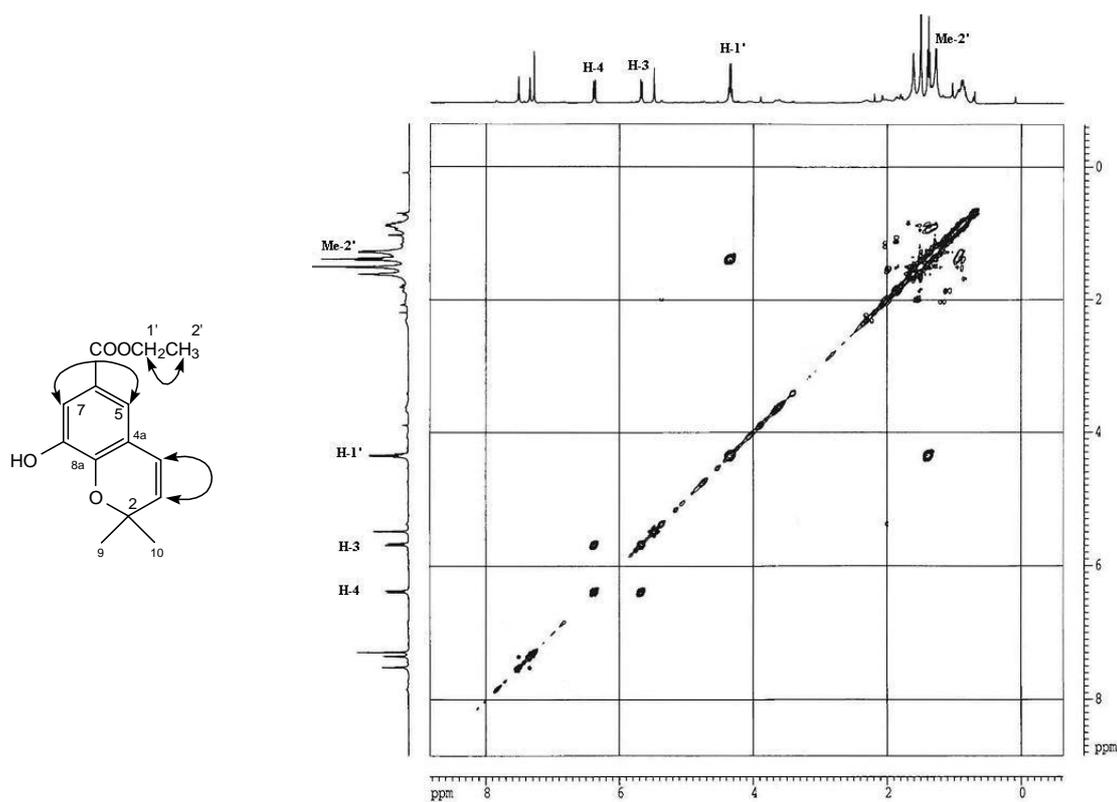
Un cuidadoso estudio de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (tablas 11 y 12) y de los experimentos bidimensionales  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC), nos permitieron la asignación de las señales correspondientes a los protones y carbonos existentes en la molécula. Así, en su espectro de RMN  $^1\text{H}$  se observaron señales asignables a un grupo etoxilo a  $\delta$  1.35 (3H, t,  $J= 7.1$  Hz, H-2') y  $\delta$  4.33 (2H, c,  $J= 7.1$  Hz, H-1'); un singlete a  $\delta$  1.49 que integra para seis protones, correspondientes a dos metilos geminales; señales asignables a dos protones olefínicos a  $\delta$  5.66 (d,  $J= 9.9$  Hz, H-3) y 6.36 (d,  $J= 9.9$  Hz, H-4); señales características de protones aromáticos a  $\delta$  7.33 (d,  $J= 1.9$  Hz, H-5) y 7.49 (d,  $J= 1.9$  Hz, H-7) y un singlete a  $\delta$  5.45 intercambiable con agua deuterada.



Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **B-10**

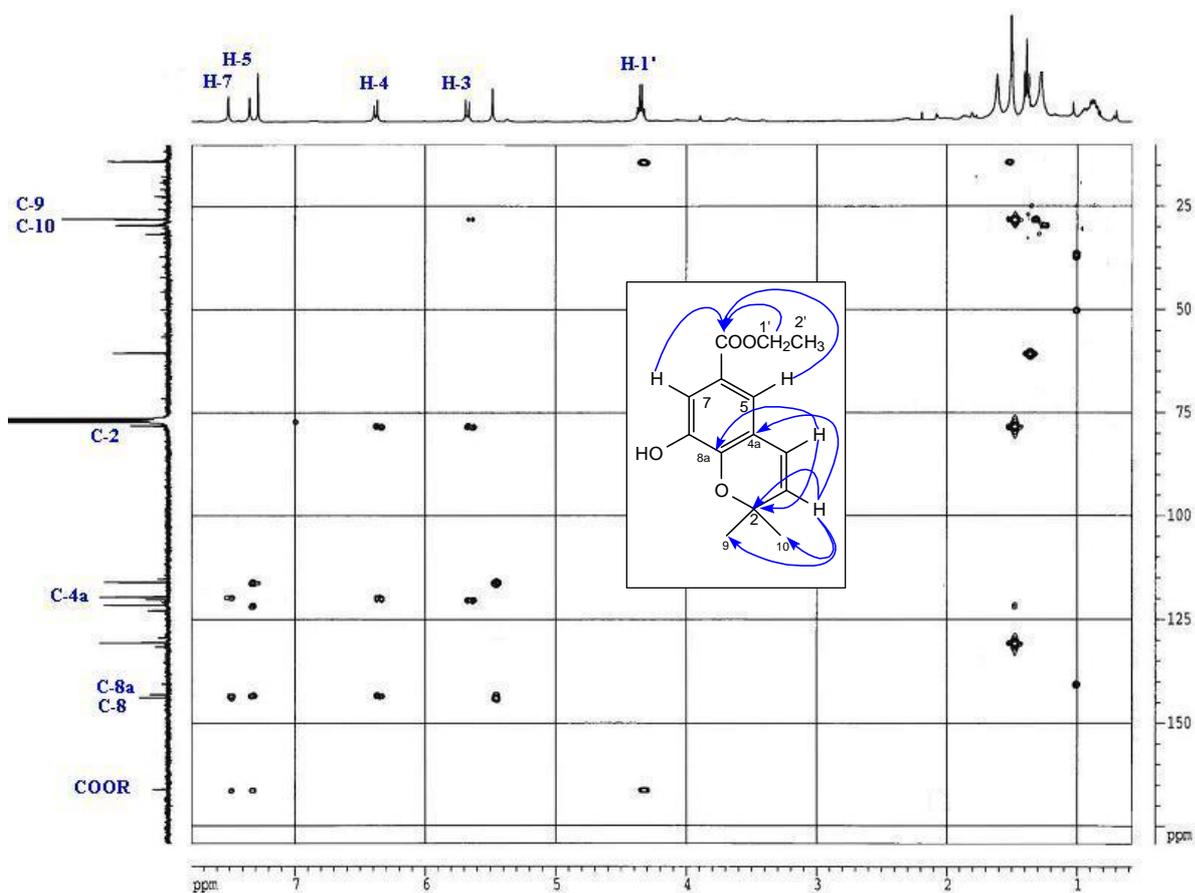
Estos datos fueron confirmados en su espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  y experimentos DEPT 90 y 135, que presentaron señales correspondientes a tres metilos a  $\delta_{\text{C}}$  14.1 (C-2') y 28.0 (C-9, C-10), un metileno a  $\delta_{\text{C}}$  60.4 (C-1'), cuatro metinos a  $\delta_{\text{C}}$  116.0 (C-7), 119.6 (C-5), 121.5 (C-4) y 130.6 (C-3), y seis carbonos cuaternarios a  $\delta_{\text{C}}$  78.2 (C-2), 120.2 (C-4a), 122.9 (C-6), 143.1 (C-8a), 143.8 (C-8) y 166.0 (COOH). El conjunto de estos datos nos indicaron que el producto **B-10** presenta una estructura de cromeno con un anillo aromático tetrasustituido y un éster etílico.

El estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares y heteronucleares, nos permitieron, establecer la posición de los diferentes grupos funcionales sobre la molécula. Así, en el experimento COSY se observaron correlaciones entre las señales a  $\delta$  5.66 y  $\delta$  6.36, asignadas a los protones H-3 y H-4, respectivamente, correlación de las señales a  $\delta$  7.33 (H-5) y  $\delta$  7.49 (H-7) y de los protones H-1' ( $\delta$  4.33) y H-2' ( $\delta$  1.35) del grupo etoxilo.



Experimento COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) de **B-10**

La regiosustitución se estableció por las correlaciones detectadas en el espectro HMBC, destacando la correlación de los protones H-5 ( $\delta$  7.33), H-7 ( $\delta$  7.49) y H-1' ( $\delta$  4.33) con el carbono carboxílico a  $\delta$  166.0, lo que permitió situar de manera inequívoca la posición del grupo éster etílico sobre C-6, las correlaciones de los protones H-3 ( $\delta$  5.66) y H-4 ( $\delta$  6.36) con los carbonos C-2 ( $\delta$  78.2) y C-4a ( $\delta$  120.2) y de H-4 con el carbono C-8a ( $\delta$  143.1). Estos datos permitieron establecer la estructura de **B-10** como **8-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxilato de etilo**.



Experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **B-10**

Tabla 11. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) de los cromenos B-7, B-8 y B-10

Posición	B-7	B-8	B-10
H-3	2.70, 2.84 d <sub>AB</sub> (14.7)	3.85 t (5.4)	4.71 d (9.9)
H-4		2.82 dd (5.4, 16.9)	6.36 d (9.9)
		3.11 dd (5.4, 16.9)	
H-5	8.62 d (2.1)	7.72 s	7.33 d (1.9)
H-7	8.16 dd (2.1, 8.7)	7.73 s	7.49 d (1.9)
H-8	7.00 d (8.7)		
Me-9	1.45 s	1.35 s	1.49 s
Me-10		1.39 s	1.49 s
H-1'	1.76-1.84 m	3.31 d (4.5)	4.33 c (7.1)
H-2'	2.04-2.17 m	5.29 t (4.5)	1.35 t (7.1)
H-3'	5.04 t (14.7)		
H-4'		1.73 s	1.73 s
H-5'	1.67 s	1.74 s	1.74 s
H-6'	1.74 s		

<sup>a</sup> δ, CDCl<sub>3</sub>. *J* en paréntesis en Hz. Datos basados en los experimentos COSY y HSQC.

Tabla 12. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz) de los cromenos B-7, B-8 y B-10

Posición	B-7	B-8	B-10
C-2	82.2 s	77.6 s	78.2 s
C-3	46.7 t	69.2 d	130.6 d
C-4	191.3 s	31.1 t	121.5 d
C-4a	120.2 s	118.2 s	120.2 s
C-5	129.6 d	130.4 d	119.6 d
C-6	121.5 s	120.6 s	122.9 s
C-7	137.3 d	129.6 d	116.0 d
C-8	118.6 d	130.0 s	143.8 s
C-8a	155.3 s	155.3 s	143.1 s
C-9	23.8 c	22.0 c	28.0 c*
C-10		24.9 c	28.0 c*
COOR	163.4 s	171.0 s	166.0 s
C-1'	39.0 t	28.2 t	60.4 t
C-2'	21.6 t	121.7 d	14.1 c
C-3'	122.7 d	132.5 s	133.0 s
C-4'	132.6 s	17.7 c	18.9 c
C-5'	17.7 c	25.5 c	25.6 c
C-6'	25.4 c		

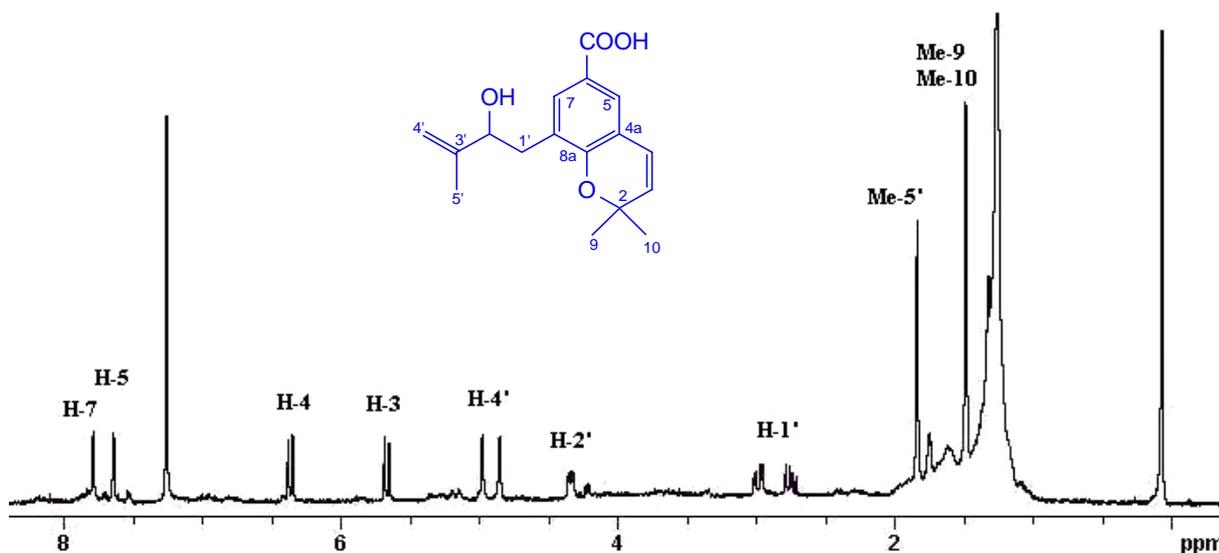
<sup>a</sup> δ, CDCl<sub>3</sub>. *J* en paréntesis en Hz. Datos basados en los experimentos COSY y HSQC

\* Señales solapadas

## Determinación estructural del producto B-12

El producto denominado **B-12** presentó en su espectro de masas un ión molecular a 268  $m/z$ , que corresponde a una fórmula molecular  $C_{17}H_{20}O_4$ , calculada por espectrometría de masas de alta resolución. En el espectro de IR se observaron bandas correspondientes a grupo hidroxilo ( $3473\text{ cm}^{-1}$ ), ácido carboxílico ( $3536\text{-}2770$ ,  $1694\text{ cm}^{-1}$ ) y anillo aromático ( $1604$  y  $772\text{ cm}^{-1}$ ).

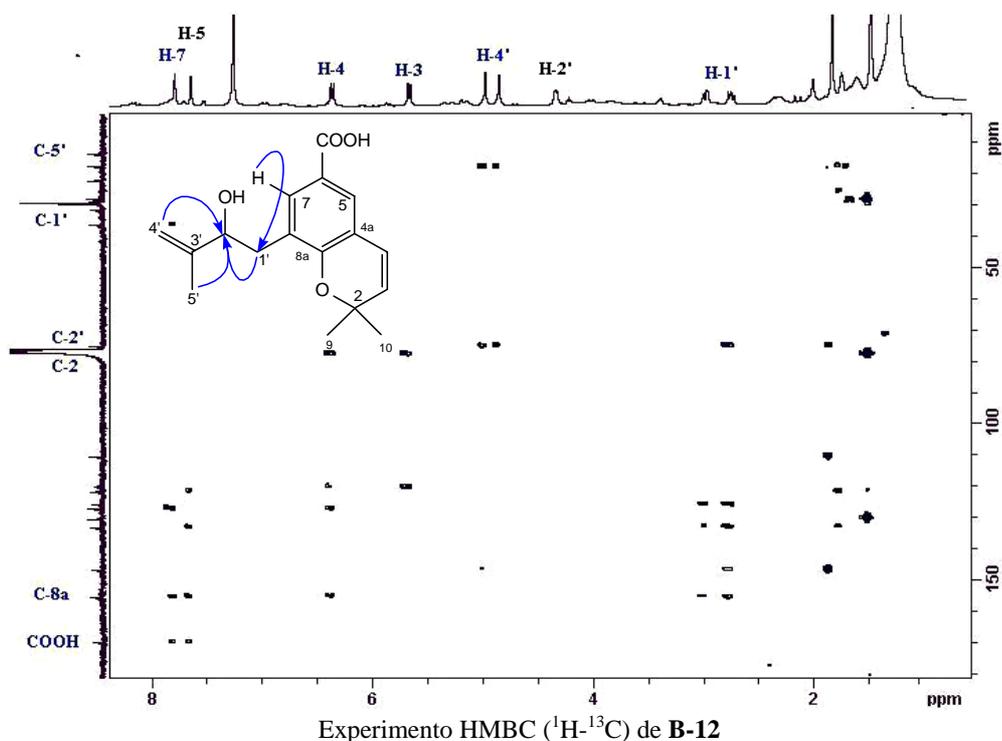
El análisis de los datos espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  indicaron la presencia de dos metilos a  $\delta$  1.48 (6H, s, Me-9, Me-10), dos protones vinílicos como un sistema AB a  $\delta$  5.66 y 6.36, señales asignadas a H-3 y H-4, respectivamente y dos protones aromáticos a  $\delta$  7.64 y 7.79, correspondientes a H-6 y H-7, conjunto de señales que nos indican que **B-12** presenta un esqueleto de benzopirano tipo cromeno al igual que el producto **B-10**. Además, se observaron señales correspondientes a un metilo sobre doble enlace a  $\delta$  1.83 (Me-5'), un metileno como dos dobles dobletes a  $\delta$  2.75 ( $J= 4.0, 13.7\text{ Hz}$ , H-1') y 2.98 ( $J= 8.0, 13.7\text{ Hz}$ , H-1'), una señal asignable a un protón geminal a un alcohol secundario a  $\delta$  4.34 (dd,  $J= 4.0, 8.0\text{ Hz}$ , H-2') y señales para dos protones olefínicos como singuletes a  $\delta$  4.85 y 4.97, atribuibles a un metileno terminal, lo que indica la presencia de una cadena de isopreno con un alcohol secundario en nuestro producto **B-12**.



Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **B-12**

Estos datos fueron confirmados en su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  que presenta señales correspondiente a 17 átomos de carbonos, siendo evidente la presencia de un sistema de cromeno con señales características a  $\delta$  76.7, 130.0 y 121.6, asignables a los carbonos C-2, C-3 y C-4 del anillo de pirano. Por otra parte, se determinaron los carbonos correspondientes a la cadena lateral a  $\delta$  17.9 (c, C-5'), 36.3 (t, C-1'), 75.1 (d, C-2'), 110.6 (t, C-4') y 146.7 (s, C-3'), lo que se corroboró por espectrometría de masas de baja resolución que presentó un pico base a 203  $m/z$ , correspondiente a la pérdida de una unidad de isopreno  $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_9\text{O}]^+$ .

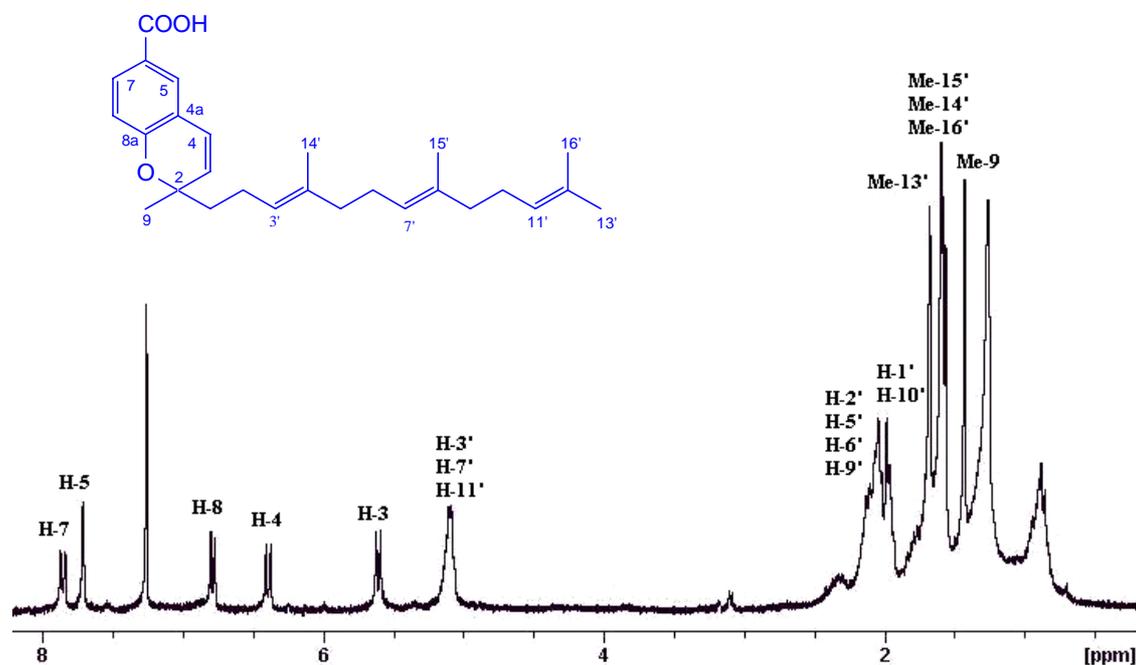
La posición de la cadena de isopreno sobre la unidad de cromeno se determinó mediante el estudio de los experimentos bidimensionales de RMN. Así, en el experimento HMBC se observaron como correlaciones a tres enlaces más significativas las de los protones H-4' ( $\delta$  4.85, 4.97) y el Me-5' ( $\delta$  1.83) con el carbono C-2' ( $\delta$  75.1), lo que estableció las características de la cadena de isopreno; correlación del protón aromático a  $\delta$  7.79 (H-7) y el carbono metilénico a  $\delta$  36.3 (C-1'), permitió determinar la posición de dicha unidad de isopreno en el anillo de benzopirano. El análisis de los datos espectroscópicos nos permitió asignar la estructura de **B-12** como **ácido 8-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxílico**.



## Determinación estructural del producto B-15

El compuesto que hemos denominado **B-15** presentó una fórmula molecular  $C_{27}H_{34}O_3$ , determinada por espectrometría de masas de alta resolución. En el espectro de IR se observaron bandas correspondientes a ácido carboxílico ( $3500-2760$ ,  $1687\text{ cm}^{-1}$ ) y anillo aromático ( $1608$  y  $768\text{ cm}^{-1}$ ).

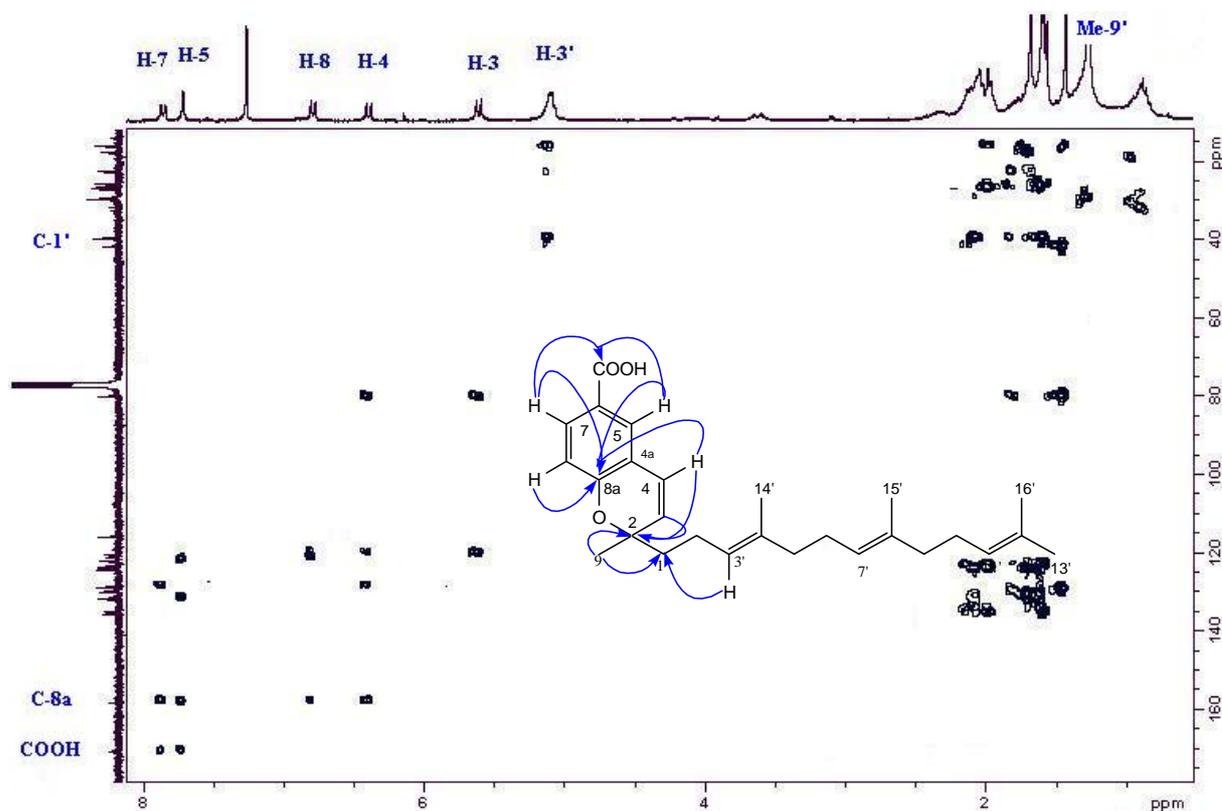
En su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (tabla 13) se observaron señales características de un sistema de cromeno que presenta un anillo aromático trisustituido [ $\delta$  6.78 (d,  $J= 8.5\text{ Hz}$ , H-8),  $\delta$  7.84 (d,  $J= 2.1\text{ Hz}$ , H-5) y  $\delta$  7.86 (dd,  $J= 2.1, 8.5\text{ Hz}$ , H-7)], un doble enlace disustituido [ $\delta$  5.60 (d,  $J= 9.8\text{ Hz}$ , H-3) y  $\delta$  6.38 (d,  $J= 9.8\text{ Hz}$ , H-4)]; un metileno [ $\delta$  1.73-1.83 (m, H-1')] y un metilo [ $\delta$  1.43 (s, H-9)]. Por otro lado, se observaron señales correspondientes a una unidad de sesquiterpeno, con señales asignables a cuatro metilos sobre doble enlace [ $\delta$  1.56 (s, H-15'),  $\delta$  1.58 (s, H-14'),  $\delta$  1.60 (s, H-16') y  $\delta$  1.68 (s, H-13')], cinco metilenos a  $\delta$  1.73-2.10 (m, H-2', H-5', H-6', H-9' y H-10') y tres protones olefínicos a  $\delta$  5.06-5.10 (m, H-3', H-7' y H-11').



Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **B-15**

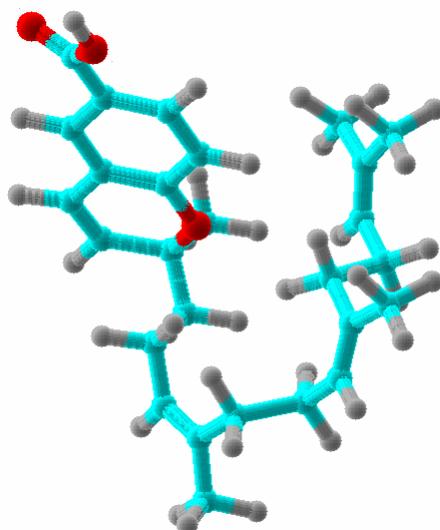
Estos datos fueron confirmados en su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (tabla 14) y experimentos DEPT 90 y 135, que presentan señales asignadas a cinco metilos, seis metilenos, ocho metinos y ocho carbonos cuaternarios, cuyo análisis nos confirma la presencia de una unidad de cromeno similar a la presente en **B-10** y una unidad terpénica lineal de quince átomos de carbono con señales a  $\delta$  15.7 (2xc, C-14', C-15'), 17.4 (c, C-16'), 22.3 (t, C-2'), 25.4 (c, C-13'), 26.5 (t, C-6'), 37.4 (t, C-5'), 39.4 (t, C-9'), 41.5 (t, C-10'), 123.4 (d, C-3'), 123.8 (d, C-7'), 124.1 (d, C-11'), 131.0 (s, C-12'), 134.8 (s, C-4') y 135.3 (s, C-8'), correspondientes a una unidad de farnesilo.

El estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares (COSY, ROESY) y heteronucleares (HSQC, HMBC) nos permitió situar los diferentes grupos sobre la molécula. Así, en el experimento HMBC se observaron correlaciones entre los protones aromáticos H-5 ( $\delta$  7.84) y H-7 ( $\delta$  7.86) con el carbono carboxílico  $\delta$  170.6, así como correlación de estos protones, H-4 ( $\delta$  6.38) y H-8 ( $\delta$  6.78) con C-8a ( $\delta$  158.1); correlación de los protones H-3 ( $\delta$  5.60), H-4 y el metilo Me-9 ( $\delta$  1.43) con el carbono C-2 y de este último metilo con el carbono C-1' ( $\delta$  41.5).



Experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **B-15**

La estereoquímica relativa de los dobles enlaces sobre la cadena terpénica, dado que las señales se encontraban solapadas y no se pudo determinar mediante un experimento ROESY, se estableció basándose en la biogénesis de este tipo de metabolitos, así como por comparación con compuestos relacionados descritos en la bibliografía química<sup>5,7</sup>. Estos datos nos permitieron asignar la estructura de **B-15** como el **ácido 2-metil-2-[(3E,7E)-4,8,12-trimetil-3,7,11-tridecatrienil]-2H-cromeno-6-carboxílico**.



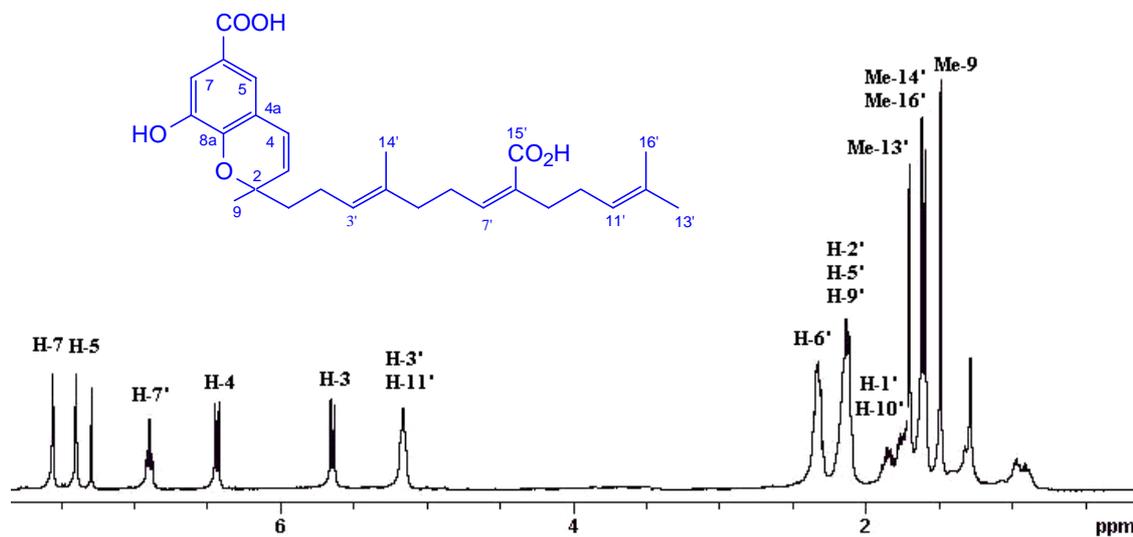
Estructura tridimensional de **B-15**

### Determinación estructural del producto **B-16**

La estructura del compuesto que hemos denominado **B-16** se estableció mediante el análisis de sus datos físicos y espectroscópicos. En su espectro de masas presentó un ión molecular a 454  $m/z$ , que corresponde a una fórmula molecular  $C_{27}H_{34}O_6$ , determinada por espectrometría de masas de alta resolución.

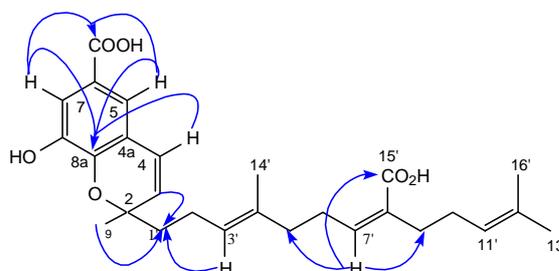
El estudio de sus datos espectroscópicos de IR, UV, RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  (tablas 13 y 14), nos indicaron la presencia de un grupo fenol, dos ácidos carboxílicos y una unidad de sesquiterpeno en un esqueleto de benzopirano tipo cromeno. Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **B-15** y **B-16** mostró que ambos productos están relacionados, mostrando como diferencias en sus espectros de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$ , la presencia de una señal

correspondiente a un ácido carboxílico a  $\delta_C$  173.1 (s, C-15') y un carbono fenólico a  $\delta_C$  143.7 (C-8), así como la ausencia de las señales correspondientes al metilo sobre C-15' y el protón aromático sobre C-8 presentes en **B-15**.

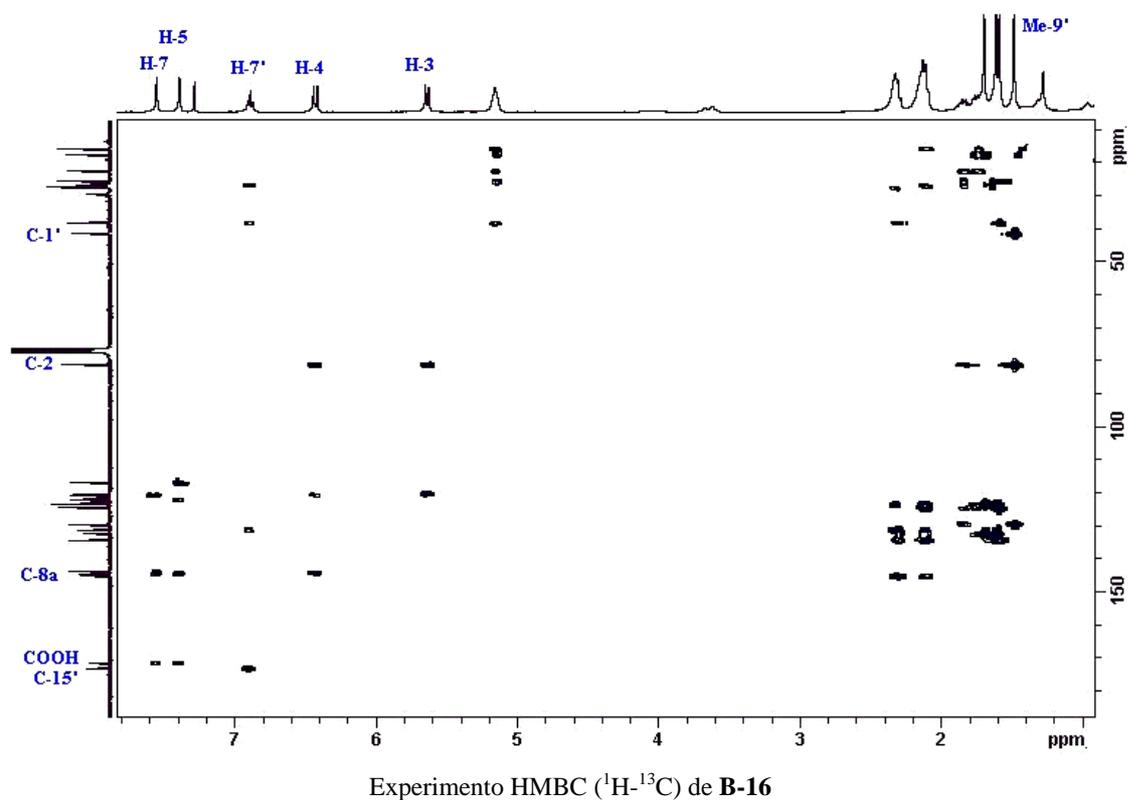


Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **B-16**

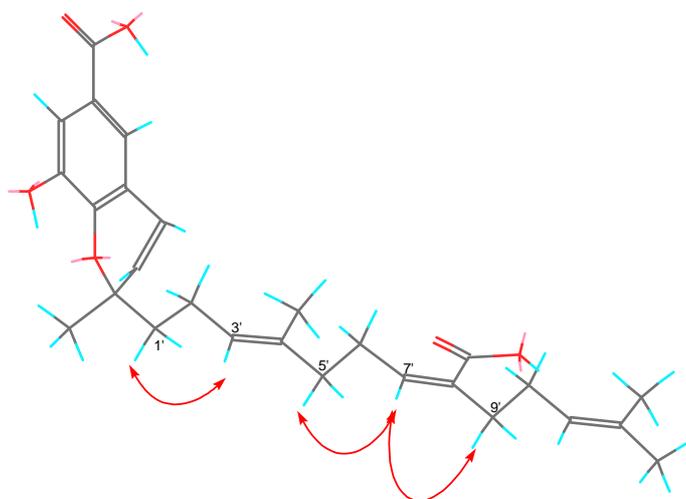
La estructura propuesta fue confirmada mediante el estudio de los experimentos bidimensionales de RMN. Así, podemos destacar las correlaciones observadas en el experimento HMBC de los protones aromáticos H-5 ( $\delta$  7.37) y H-7 ( $\delta$  7.53) con el carbono carboxílico a  $\delta$  173.1 y el carbono C-8a ( $\delta$  144.3); las correlaciones observadas entre los protones H-3 ( $\delta$  5.61), H-3' ( $\delta$  5.13) y el Me-9 ( $\delta$  1.46) con el carbono metilénico C-1' ( $\delta$  41.2), estableció la posición de la cadena de farnesilo en el sistema de cromeno; por otra parte, la posición del ácido carboxílico presente en dicha cadena se determinó por correlación de las señales a  $\delta_H$  6.87 (H-7') y  $\delta_C$  173.1 (C-15').



Correlaciones más significativas en un experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **B-16**



La estereoquímica relativa de los dobles enlaces  $\Delta^3$  y  $\Delta^7$  la determinamos basándonos en las correlaciones observadas en un experimento ROESY, que mostró efecto ROE de H-3' con H-1' y de H-7' con H-5' y H-9'. El análisis de estos datos nos permitió establecer la estructura de **B-16** como **ácido 2-[(3*E*,7*Z*)-8-carboxi-4,12-dimetil-3,7,11-tridecatrienil]-8-hidroxi-2-metil-2*H*-cromeno-6-carboxílico**.

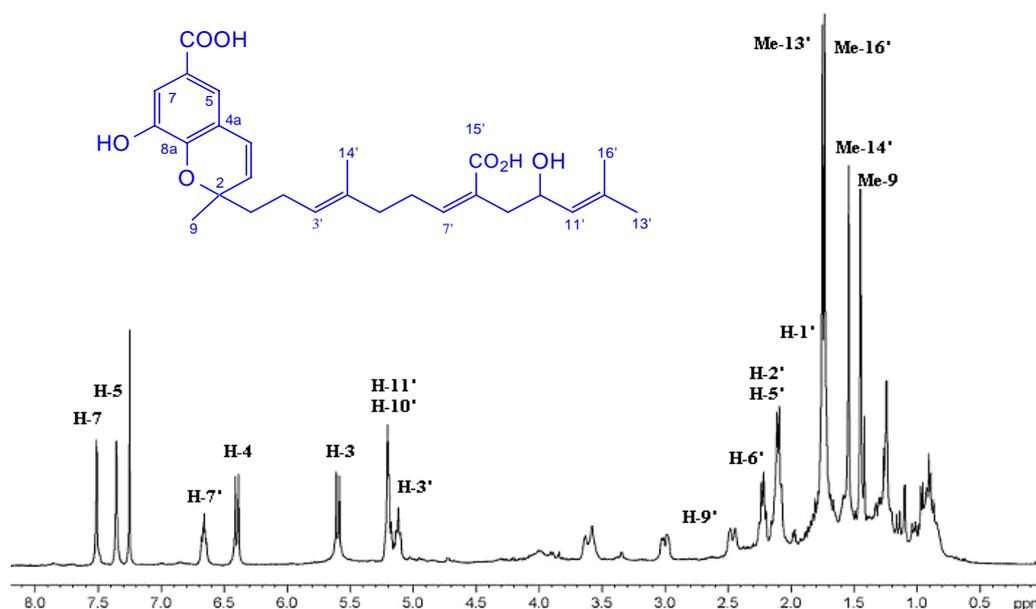


Correlaciones ROE observadas en un experimento ROESY de **B-16**

## Determinación estructural del producto B-17

El análisis de los datos físicos y espectroscópicos del compuesto que hemos denominado **B-17** nos permitió establecer su estructura. En su espectro de masas presentó un ión molecular a 452  $m/z$ , que corresponde a una fórmula molecular  $C_{27}H_{32}O_6$ , determinada por espectrometría de masas de alta resolución.

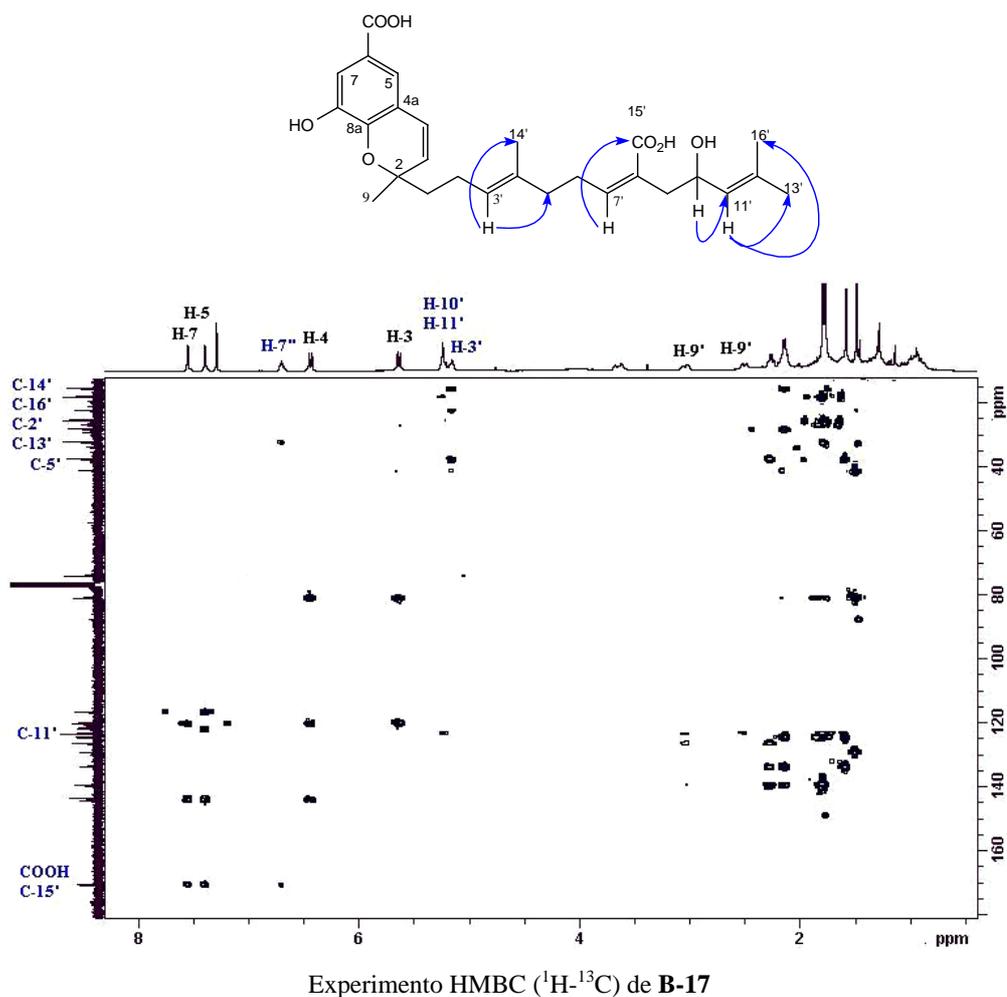
El estudio de los datos espectroscópicos de IR, UV, RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  (tablas 13 y 14) de **B-17**, indicaron la presencia de un alcohol secundario, un fenol, dos ácidos carboxílicos y una unidad de sesquiterpeno en un sistema de benzopirano. Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **B-17** y **B-16** mostró que ambos están relacionados, siendo la principal diferencia en sus espectros de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  la presencia de una señal correspondiente a un alcohol secundario a  $\delta_H$  5.17 (1H, t,  $J=3.2$  Hz) y  $\delta_C$  74.1 (d, C-10') y la desaparición de la señal correspondiente al metileno situado sobre el carbono C-10', presente en **B-16**, datos que están de acuerdo con una estructura de derivado hidroxilado de **B-16** para nuestro producto.



Espectro de RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz) de **B-17**

La estructura propuesta se confirmó mediante el estudio de los experimentos bidimensionales (COSY, ROESY, HSQC, HMBC). Así, podemos destacar como correlaciones más significativas en el experimento HMBC las observadas entre el protón H-3' ( $\delta$  5.12) y los

carbonos C-14' ( $\delta$  15.6), C-2' ( $\delta$  22.4) y C-5' ( $\delta$  37.4), así como correlación de H-7' con el ácido carboxílico a  $\delta$  170.8, lo que sitúa dichos grupos funcionales en la cadena terpénica. Por otra parte, la posición del grupo hidroxilo se situó sobre C-10' por las correlaciones observadas entre H-10' ( $\delta$  5.17) y el carbono C-11' ( $\delta$  123.4) y del protón H-11' ( $\delta$  5.20) con los metilos Me-13' ( $\delta$  25.4) y Me-16' ( $\delta$  18.4), lo que se corroboró en el experimento COSY, al observarse correlación entre los protones H-11' y H-10'.

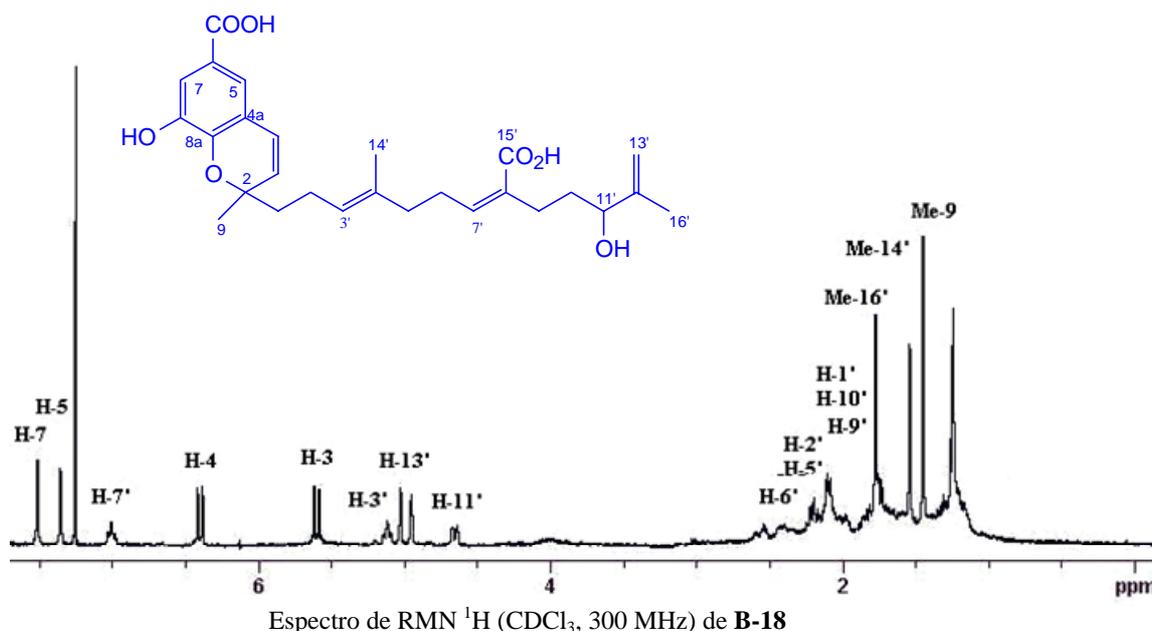


La estereoquímica relativa de los dobles enlaces sobre la cadena terpénica, dado que las señales se encontraban solapadas y no se pudo determinar mediante un experimento ROESY, se estableció basándose en la biogénesis de este tipo de metabolitos, así como por comparación con compuestos relacionados descritos en la bibliografía química<sup>5,7</sup>. El conjunto de estos datos nos permiten asignar la estructura de **B-17** como **ácido 2-[(3*E*,7*Z*)-8-carboxi-10-hidroxi-4,12-dimetil-3,7,11-tridecatrienil]-8-hidroxi-2-metil-2*H*-cromeno-6-carboxílico**.

## Determinación estructural del producto B-18

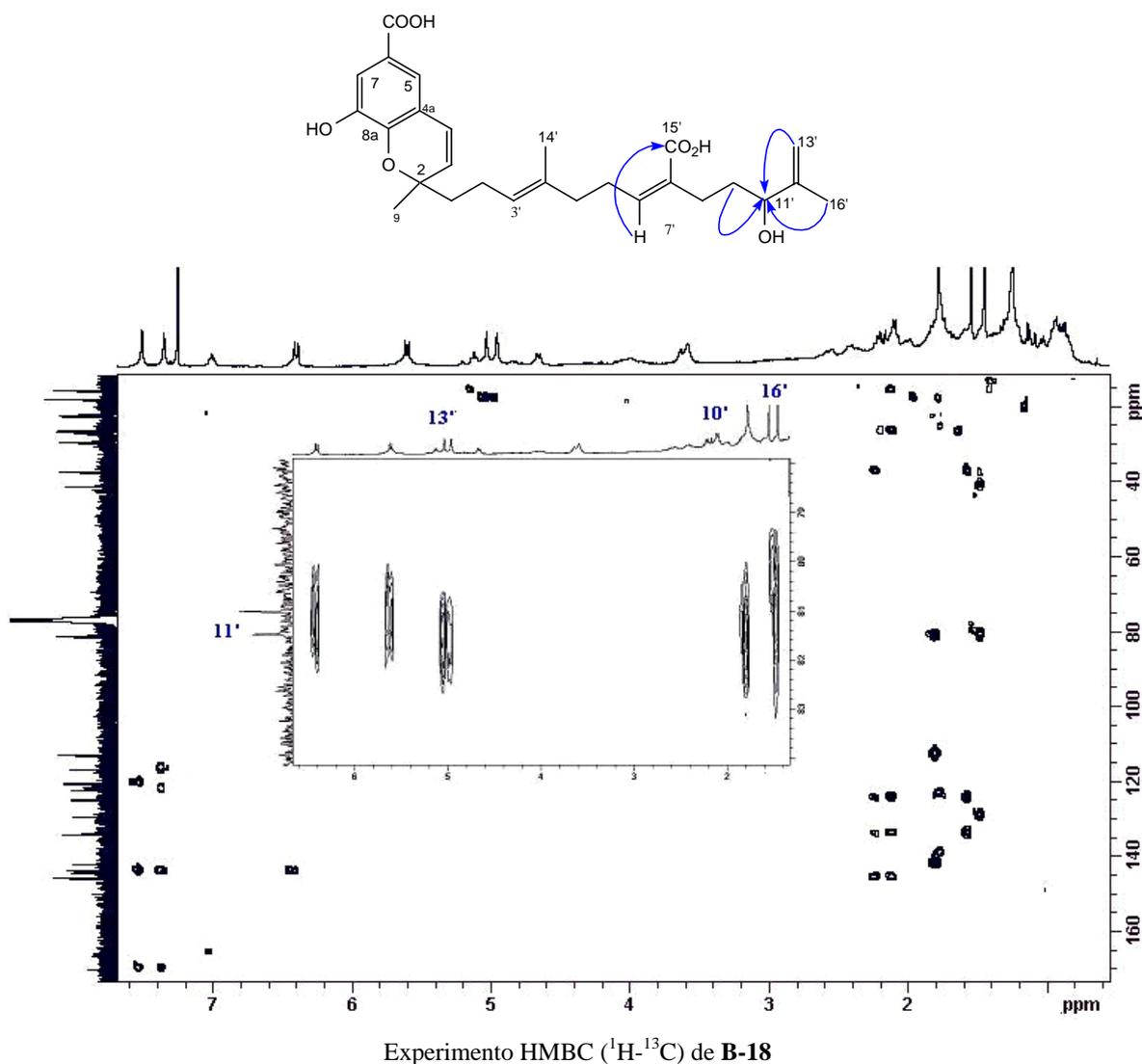
El análisis de los datos físicos y espectroscópicos del compuesto que hemos denominado **B-18** nos permitió establecer su estructura. Así, su fórmula molecular  $C_{27}H_{34}O_7$ , se determinó mediante sus datos de espectrometría de masas de alta resolución y los de resonancia magnética nuclear de  $^1H$  y  $^{13}C$ .

El estudio de sus datos espectroscópicos de IR, UV, RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  de **B-18**, nos indicaron la presencia de un alcohol secundario, un grupo fenol, dos ácidos carboxílicos y una unidad de sesquiterpeno en un esqueleto de benzopirano tipo cromeno. Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **B-18** y **B-17** mostró que ambos productos están relacionados, mostrando como diferencias más significativas en sus espectros de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  las señales correspondientes a la cadena de isopreno terminal de la unidad de terpeno. Así, en el espectro de RMN  $^1H$  (tabla 13) de **B-18** observamos señales correspondientes a un metilo sobre doble enlace a  $\delta$  1.78 (s, H-16'), señales asignadas a dos metilenos, uno de ellos alifático a  $\delta$  1.73-1.84 (m, H-10') y el otro olefinico a  $\delta$  4.96 y 5.04 (H-13') y señal para un alcohol secundario a  $\delta$  4.62 (dd,  $J=2.0, 9.5$  Hz, H-11'), datos que fueron confirmados mediante RMN de  $^{13}C$  (tabla 14) que presentó señales a  $\delta_C$  17.9 (c, C-16'), 26.5 (t, C-10'), 81.4 (d, C-11'), 112.8 (t, C-13') y 142.1 (s, C-12').



El estudio de los experimentos 2D (COSY, HSQC y HMBC), nos permitió situar los diferentes grupos sobre la molécula, destacando las correlaciones en el experimento HMBC de los protones metilénicos H-13' a  $\delta$  4.96 y 5.04 y el Me-16' a  $\delta$  1.78 con el carbono C-11' ( $\delta$  81.4), lo que nos permitió determinar la estructura de la unidad de isopreno terminal. Al igual que en los productos anteriores, la estereoquímica relativa de los dobles enlaces sobre la cadena terpénica se estableció basándonos en la biogénesis de este tipo de metabolitos, así como por comparación con compuestos relacionados descritos en la bibliografía química<sup>5,7</sup>.

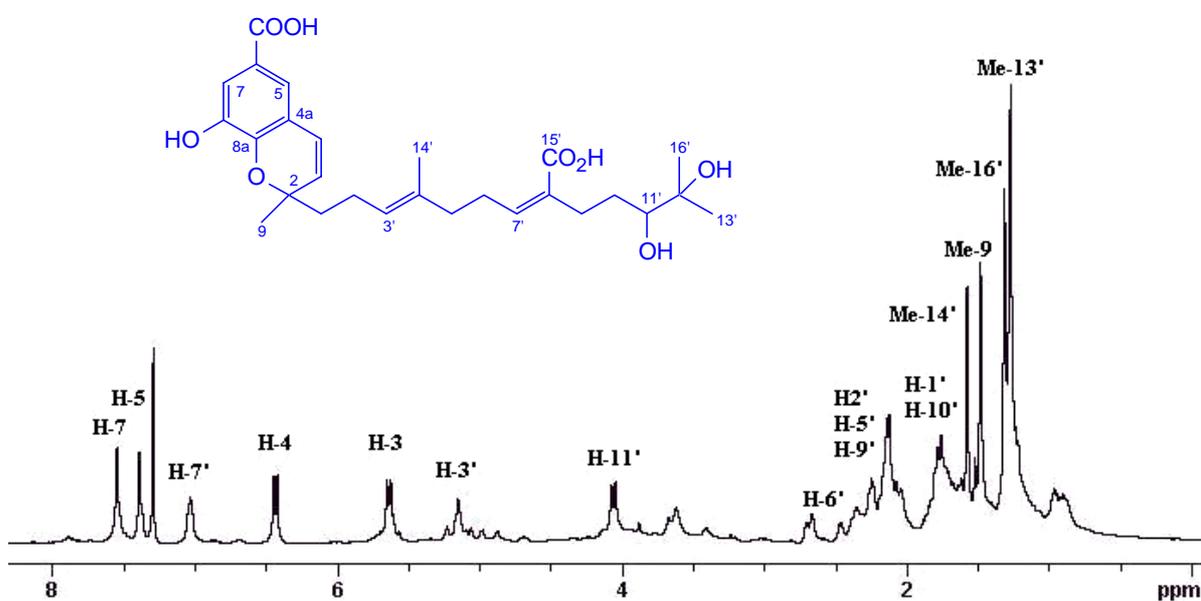
La estructura de **B-18** se estableció como **ácido 2-[(3E,7Z)-8-carboxi-11-hidroxi-4,12-dimetil-3,7,12-tridecatrienil]-8-hidroxi-2-metil-2H-cromeno-6-carboxílico**.



## Determinación estructural del producto B-19

El compuesto que hemos denominado **B-19** presentó una fórmula molecular  $C_{27}H_{36}O_8$ , determinada por espectrometría de masas de alta resolución y resonancia magnética nuclear de  $^1H$  y  $^{13}C$ .

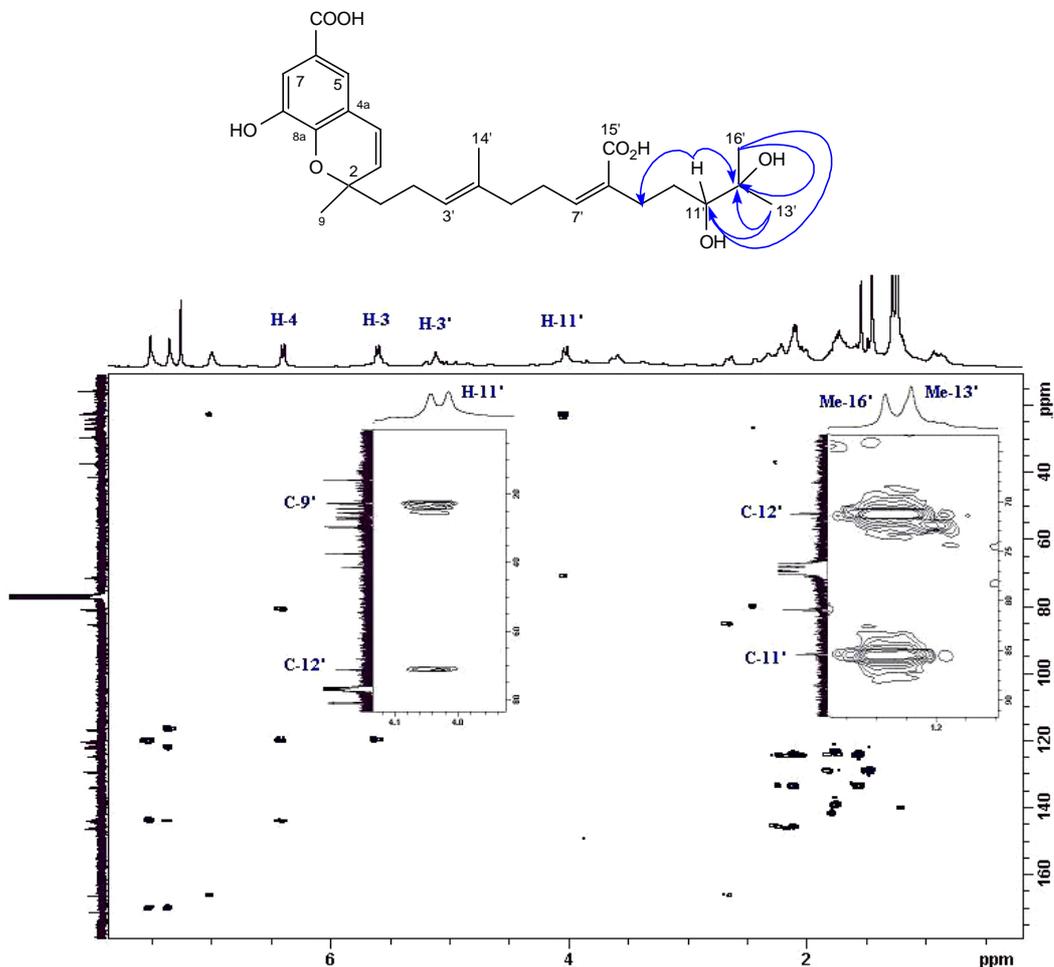
El estudio de sus datos espectroscópicos de IR, UV, RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  (tablas 13 y 14), nos indicaron la presencia de un alcohol secundario, un alcohol terciario, un grupo fenol, dos ácidos carboxílicos y una unidad de sesquiterpeno en un esqueleto de benzopirano tipo cromeno. Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **B-19** y **B-16** mostró que ambos productos están relacionados, mostrando como diferencias más significativas en sus espectros de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  las señales correspondientes a la cadena de isopreno terminal de la unidad de terpeno, mostrando señales asignables a un alcohol secundario a  $\delta_H$  4.03 (dd,  $J = 1.9, 11.5$  Hz, H-11') y  $\delta_C$  85.7 y un alcohol terciario a  $\delta_C$  71.2 (C-12') en los espectros de **B-19**, así como la ausencia de las señales correspondientes al doble enlace situado sobre C-11' y C12' presente en **B-16**.



Espectro de RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz) de **B-19**

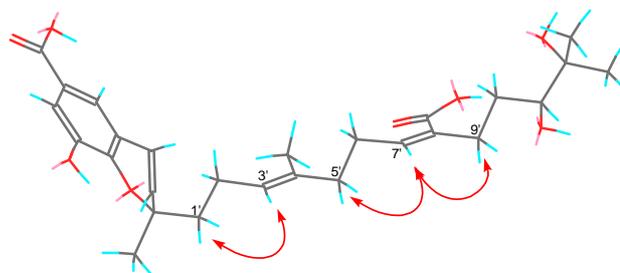
El análisis de los experimentos bidimensionales (COSY, ROESY, HSQC y HMBC) de resonancia magnética nuclear, nos permitieron confirmar la estructura propuesta. Así, en el experimento HMBC se observaron como correlaciones más significativas las establecidas entre

los metilos Me-13' ( $\delta$  1.24) y Me-16' ( $\delta$  1.29) con los carbonos C-12' ( $\delta$  71.2) y C-11' ( $\delta$  85.7), así como correlación entre el protón H-11' a  $\delta$  4.03 con los carbonos C-9' ( $\delta$  22.5) y C-12'.



Experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **B-19**

La estereoquímica relativa de los dobles enlaces  $\Delta^{3'}$  y  $\Delta^{7'}$  la determinamos basándonos en las correlaciones observadas en un experimento ROESY, que presentó efecto ROE de H-3' con H-1' y de H-7' con H-5' y H-9'.



Correlaciones ROE observadas en un experimento ROESY de **B-19**

Estos datos y comparación con los de los compuestos descritos anteriormente, nos permitieron establecer la estructura de nuestro producto **B-19** como el **ácido 2-[(3E,7Z)-8-carboxi-11,12-dihidroxi-4,12-dimetil-3,7-tridecadienil]-8-hidroxi-2-metil-2H-cromeno-6-carboxílico**.

**Tabla 13. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) de los cromenos B-15 a B-19**

Posición	B-15	B-16	B-17	B-18	B-19
<b>H-3</b>	5.60 d (9.8)	5.61 d (10.0)	5.60 d (10.0)	5.61 d (10.1)	5.61 d (10.0)
<b>H-4</b>	6.38 d (9.8)	6.41 d (10.0)	6.40 d (10.0)	6.40 d (10.1)	6.41 d (10.0)
<b>H-5</b>	7.84 d (2.1)	7.37 d (1.6)	7.36 d (1.5)	7.36 d (1.9)	7.36 d (1.9)
<b>H-7</b>	7.86 dd (2.1, 8.5)	7.53 d (1.6)	7.52 d (1.5)	7.51 d (1.9)	7.51 d (1.9)
<b>H-8</b>	6.78 d (8.5)				
<b>Me-9</b>	1.43 s	1.46 s	1.45 s	1.46 s	1.45 s
<b>H-1'</b>	1.73-1.83 m*	1.73-1.87 m*	1.70 m	1.73-1.84 m*	1.63-1.82 m*
<b>H-2'</b>	1.88-2.10 m*	2.06-2.13 m*	1.99-2.12 m*	2.08-2.16 m*	2.01-2.38 m*
<b>H-3'</b>	5.06-5.10 m*	5.13 t (6.0) *	5.12 t (6.1)	5.13 t (7.4)	5.12 t (7.2)
<b>H-5'</b>	1.88-2.10 m*	2.06-2.13 m*	1.99-2.12 m*	2.08-2.16 m*	2.01-2.38 m*
<b>H-6'</b>	1.88-2.10 m*	2.26 m	2.19 m	2.22 m	2.44 m 2.66 m
<b>H-7'</b>	5.06-5.10 m*	6.87 t (7.2)	6.66 m	7.01 t (7.2)	7.03 t (7.0)
<b>H-9'</b>	1.88-2.10 m*	2.06-2.13 m*	2.47 m 3.01 m	1.86-1.99 m	2.01-2.38 m*
<b>H-10'</b>	1.73-1.83 m*	1.73-1.87 m*	5.17 t (3.2)	1.73-1.84 m*	1.63-1.82 m*
<b>H-11'</b>	5.06-5.10 m*	5.13 t (6.0) *	5.20 t (3.2)	4.62 dd (2.0, 9.5)	4.03 dd (1.9, 11.5)
<b>H-13'</b>	1.68 s	1.68 s	1.76 s	4.96 s, 5.04 s	1.24 s
<b>Me-14'</b>	1.58 s	1.57 s	1.55 s	1.54 s	1.57 s
<b>Me-15'</b>	1.56 s				
<b>Me-16'</b>	1.60 s	1.60 s	1.74 s	1.78 s	1.29 s

<sup>a</sup> δ, CDCl<sub>3</sub>. *J* en paréntesis en Hz. Datos basados en los experimentos COSY y HSQC.

\* Señales solapadas

Tabla 14. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz) de los cromenos B-15 a AB-19

Posición	B-15	B-16	B-17	B-18	B-19
<b>C-2</b>	79.8 s	81.0 s	81.0 s	81.0 s	81.0 s
<b>C-3</b>	129.7 d	129.4 d	129.4 d	129.4 d	129.3 d
<b>C-4</b>	121.9 d	122.0 d	122.0 d	122.0 d	122.0 d
<b>C-4a</b>	120.3 s	120.1 s	120.0 s	120.0 s	120.0 s
<b>C-5</b>	128.5 s	120.5 d	120.4 d	120.4 d	120.0 d
<b>C-6</b>	120.9 s	121.5 s	121.3 s	121.3 s	121.3 s
<b>C-7</b>	131.6 d	116.7 d	116.7 d	116.6 d	116.7 d
<b>C-8</b>	115.7 d	143.7 s	143.7 s	143.7 s	143.7 s
<b>C-8a</b>	158.1 s	144.3 s	144.2 s	144.2 s	144.7 s
<b>C-9</b>	26.9 c	27.0 c	27.0 c	27.1 c	27.0 c
<b>COOH</b>	170.6 s	171.4 s	170.6 s	170.0 s	170.4 s
<b>C-1'</b>	41.5 t*	41.2 t*	41.2 t	41.2 t	41.2 t
<b>C-2'</b>	22.3 t	22.4 t	22.4 t	26.2 t	26.8 t
<b>C-3'</b>	123.4 d	123.3 d	124.6 d	124.7 d	124.7 d
<b>C-4'</b>	134.8 s	134.2 s	133.8 s	133.9 s	134.5 s
<b>C-5'</b>	37.4	38.1 t	37.4 t	37.3 t	37.3 t
<b>C-6'</b>	26.5 t	26.5 t	28.3 t	22.2 t	22.6 t
<b>C-7'</b>	123.8 d	145.0 d	139.6 d	145.7 d	146.3 d
<b>C-8'</b>	135.3 s	131.1 s	126.4 s	124.5 s	124.5 s
<b>C-9'</b>	39.4 t	27.4 t	32.2 t	22.5 t	22.5 t
<b>C-10'</b>	41.5 t*	41.2 t*	74.1 d	26.5 t	22.4 t
<b>C-11'</b>	124.1 d	124.4 d	123.4 d	81.4 d	85.7 d
<b>C-12'</b>	131.0 s	132.1 s	139.7 s	142.1 s	71.2 s
<b>C-13'</b>	25.4 c	25.5 c	25.4 c	112.8 t	24.1 c
<b>C-14'</b>	15.7 c*	15.6 c	15.6 c	15.6 c	15.6 c
<b>C-15'</b>	15.7 c*	173.1 s	170.8 s	173.9 s	173.9 s
<b>C-16'</b>	17.4 c	17.4 c	18.4 c	17.9 c	25.3 c

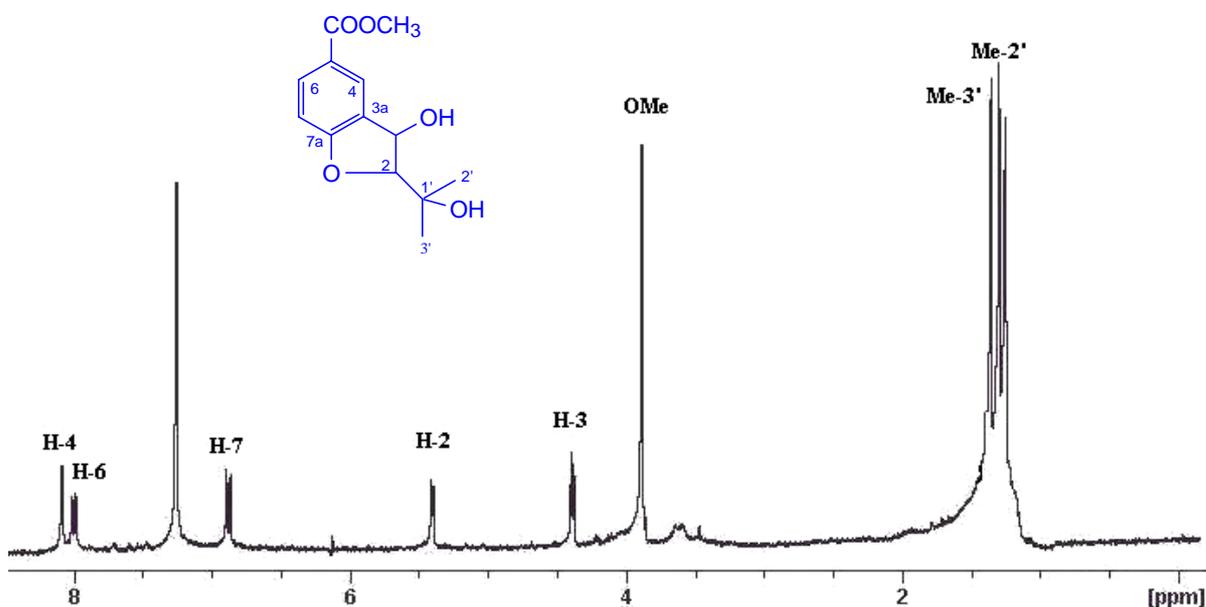
<sup>a</sup> δ, CDCl<sub>3</sub>. Datos basados en los experimentos DEPT, HSQC y HMBC

\* Señales solapadas

## Determinación estructural del producto B-20

El análisis de los datos físicos y espectroscópicos del compuesto que hemos denominado **B-20** nos permitió establecer su estructura. Su fórmula molecular  $C_{13}H_{16}O_5$  fue determinada mediante sus datos de espectrometría de masas de alta resolución y los de resonancia magnética nuclear de  $^1H$  y  $^{13}C$ . En el espectro de IR se observaron bandas correspondientes para grupo hidroxilo ( $3747\text{ cm}^{-1}$ ), éster ( $1717\text{ cm}^{-1}$ ) y anillo aromático ( $1616$  y  $769\text{ cm}^{-1}$ ).

En su espectro de RMN  $^1H$  (tabla 15) se observaron señales asignadas a dos metilos a  $\delta$  1.29 (s, Me-2') y 1.35 (s, Me-3'), un grupo metoxilo a  $\delta$  3.86, un protón geminal a un grupo hidroxilo a  $\delta$  4.39 (d,  $J= 4.7$  Hz, H-3) y señal para un metino a  $\delta$  5.40 (d,  $J= 4.7$  Hz, H-2), así como señales correspondiente a tres protones aromáticos a  $\delta$  6.87 (d,  $J= 8.5$  Hz, H-7),  $\delta$  7.99 (dd,  $J= 1.7, 8.5$  Hz, H-6) y  $\delta$  8.08 (1H, d,  $J= 1.7$  Hz, H-4), lo que indicó la presencia de un anillo aromático trisustituido.

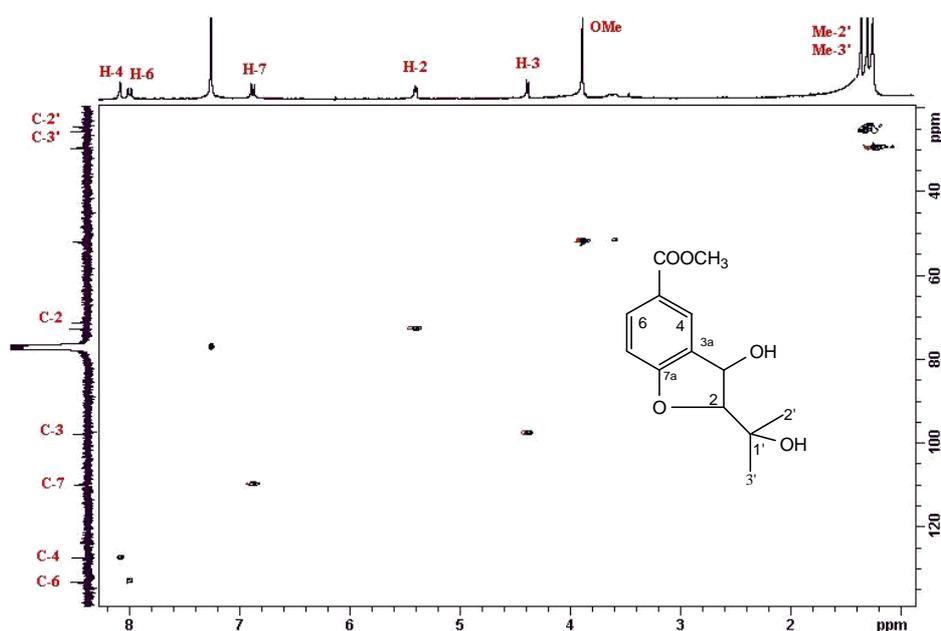


Espectro de RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz) de **B-20**

En el espectro de RMN de  $^{13}C$  (tabla 16) se observaron señales para 13 carbonos y los experimentos DEPT 90 y 135 establecieron la presencia de dos metilos a  $\delta$  24.5 (C-2') y 25.5 (C-

3'), un metoxilo a  $\delta$  51.9, cinco metinos a  $\delta$  72.8 (C-3), 97.7 (C-2), 109.9 (C-7), 127.4 (C-4) y 133.0 (C-6) y cinco carbonos cuaternarios a  $\delta$  71.0 (C-1'), 123.6 (C-5), 129.5 (C-3a), 164.1 (C-7a) y 166.9 (COOH). Estos datos sugieren la presencia en la molécula de un sistema benzofurano, con un grupo metoxilo, un alcohol secundario y otro terciario.

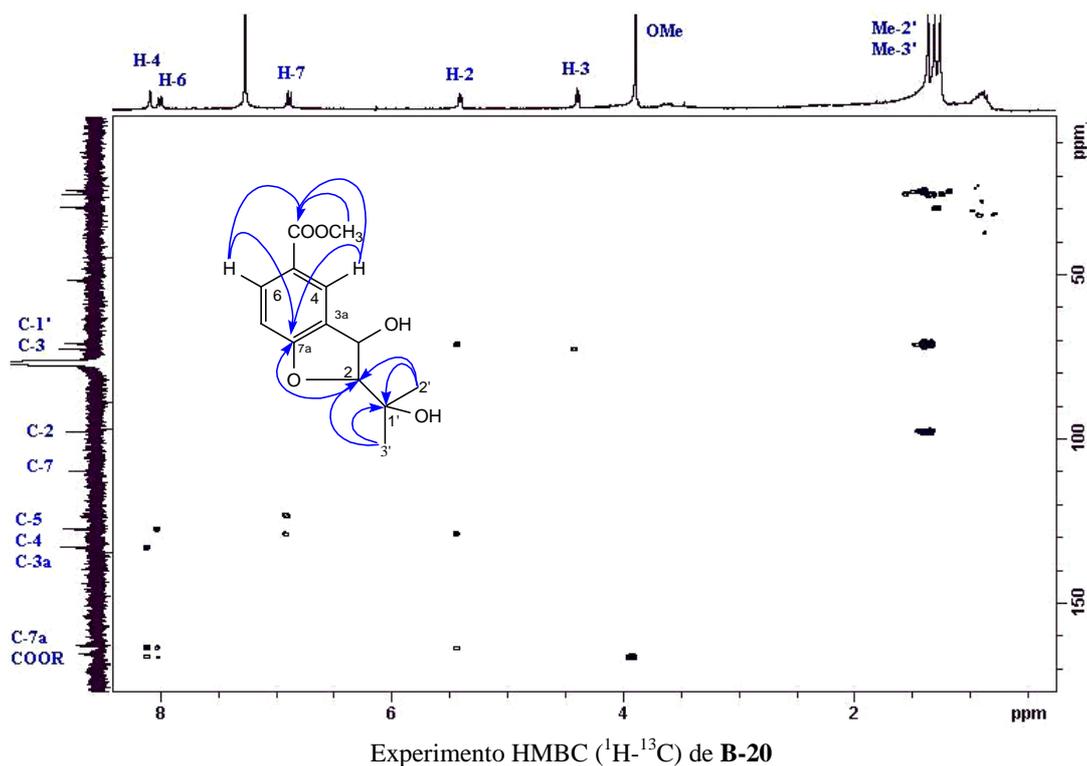
Un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC), nos permitieron la asignación de las señales correspondientes a los protones existentes en la molécula y además correlacionar cada átomo de carbono con sus respectivos protones.



Experimento HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **B-20**

La regiosustitución sobre el sistema de benzofurano fue establecida mediante las correlaciones detectadas en el experimento de HMBC. Así, la sustitución en el anillo aromático se determinó por las correlaciones de los protones aromáticos H-4 ( $\delta$  8.08) y H-6 ( $\delta$  7.99) con el carbono C-7a ( $\delta$  164.1) y de estos protones y el metoxilo a  $\delta$  3.86 con el carbono carboxílico a  $\delta$  166.9, mientras la sustitución sobre el anillo de furano se estableció por las correlaciones del protón H-2 a  $\delta$  5.40 con los carbonos C-1' ( $\delta$  71.0) y C-7a ( $\delta$  164.1). Por otra parte, los Me-2' ( $\delta$  24.5) y Me-3' ( $\delta$  25.5) presentaron correlación con C-1' y C-2 ( $\delta$  97.7).

La estereoquímica relativa de las posiciones 2 y 3 se dedujo de la constante de acoplamiento, ya que en el caso de una relación *cis* esta debe ser de  $J=7.0$  Hz, mientras que en los derivados *trans* es de  $J=4-5$  Hz<sup>17</sup>. El producto **B-20** presentó una  $J_{2,3}=4.7$  Hz, lo que sugiere una relación *trans* de los sustituyentes sobre los carbonos 2 y 3.



Estos datos nos permitieron establecer la estructura de **B-20** como el **3-hidroxi-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-2,3-dihidro-benzofurano-5-carboxilato de metilo**. Una revisión bibliográfica nos indicó que este compuesto había sido aislado anteriormente de *Piper hispidum* y descrito por Friederich y col<sup>18</sup>. Sin embargo, sus datos de RMN de <sup>13</sup>C no se aportaron, por lo que en esta Memoria se presenta por primera vez la asignación completa de los datos de <sup>13</sup>C.

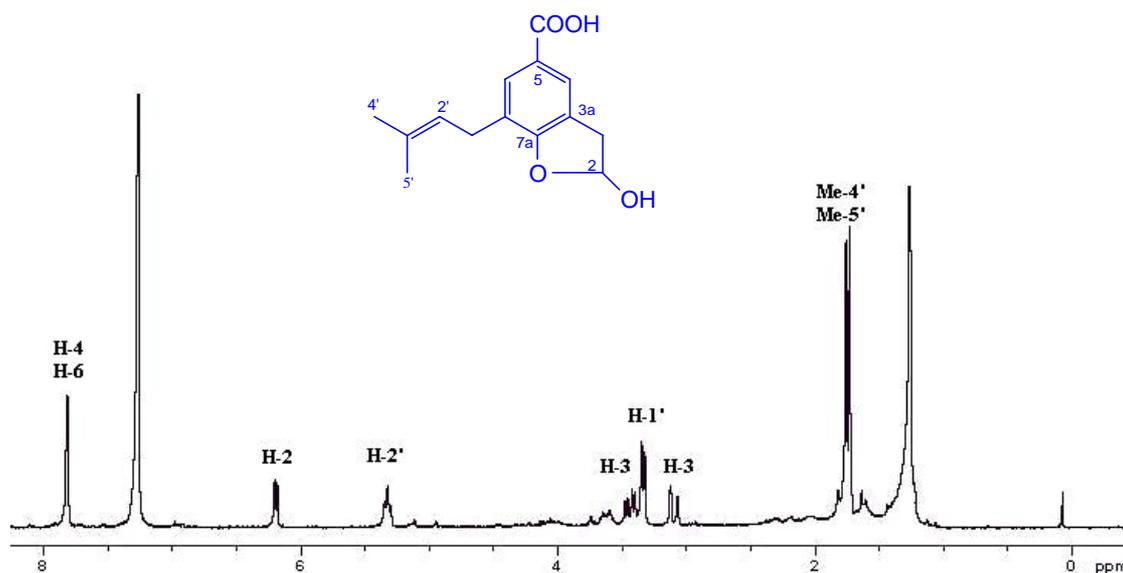
<sup>17</sup> Kawasaki, C.; Okuyama, T.; Shibata, S.; Iitaka, Y. *Planta Med.* **1984**, 60, 492-496.

<sup>18</sup> Friederich, U.; Siems, K.; Solñiz, P. N.; Gupta, M. P.; Jenet-Siems, K. J. *Pharmazie.* **2005**, 60, 455-457.

## Determinación estructural del producto B-21

El compuesto que hemos denominado **B-21** presentó en su espectro de masas un ión molecular a 248  $m/z$ , que corresponde a una fórmula molecular  $C_{14}H_{16}O_4$ , determinada por espectrometría de masas de alta resolución. En el espectro de IR se observaron bandas correspondientes a grupo hidroxilo ( $3415\text{ cm}^{-1}$ ), ácido carboxílico ( $3502\text{-}2745$ ,  $1683\text{ cm}^{-1}$ ) y de anillo aromático ( $1607$  y  $757\text{ cm}^{-1}$ ).

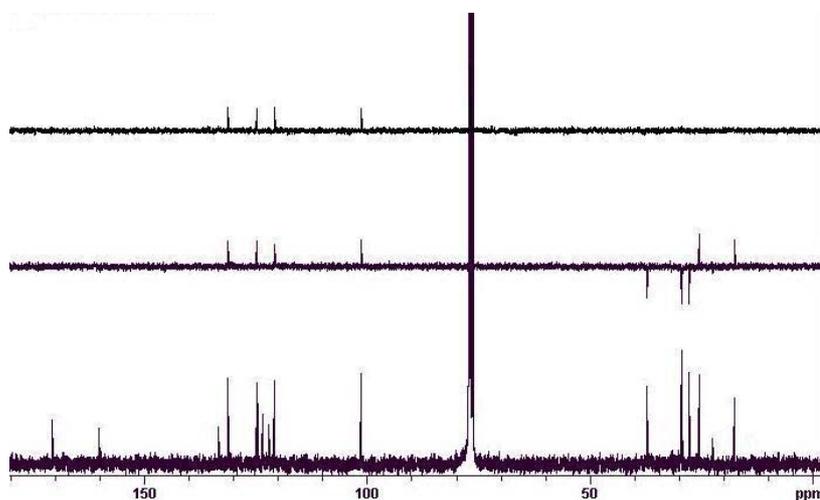
En su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (tabla 15) se observaron señales asignables a dos metilos sobre doble enlace a  $\delta$  1.73 (s) y 1.75 (s); dos metilenos, uno de ellos con señales a  $\delta$  3.10 (dd,  $J= 2.3$ , 17.0 Hz, H-3) y 3.43 (dd,  $J= 6.6$ , 17.0 Hz, H-3) y el otro a  $\delta$  3.33 (d,  $J= 7.3$  Hz, H-1'); señales para un protón vinílico a  $\delta$  5.32 (t,  $J= 7.3$  Hz, H-2') y un protón hemicetálico a  $\delta$  6.19 (dd,  $J= 2.3$ , 6.6 Hz, H-2), así como un singulete que integra para dos protones aromáticos a  $\delta$  7.81 (s).



Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **B-21**

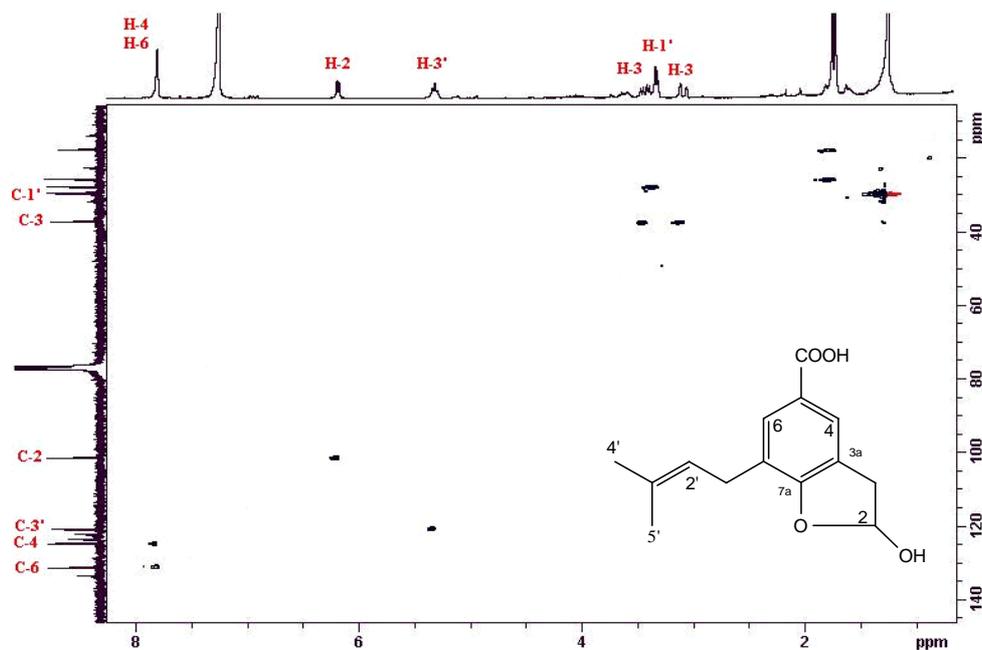
El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (tabla 16) y los experimentos DEPT 90 y 135 confirmaron la presencia en la molécula de dos metilos, dos metileno, cuatro metinos y seis carbonos cuaternarios; destacando las señales características de un carbono carboxílico a  $\delta$  170.7, un carbono hemicetálico a  $\delta$  101.4 y señales asignadas a una unidad de isopreno a  $\delta$  17.6 (c, C-4'),

25.8 (c, C-5'), 27.8 (t, C-1'), 120.8 (d, C-2') y 133.4 (s, C-3'). El conjunto de estos datos sugieren una estructura de benzofurano, que presenta un grupo ácido carboxílico, una cadena de isopreno y un grupo hemiacetalico.



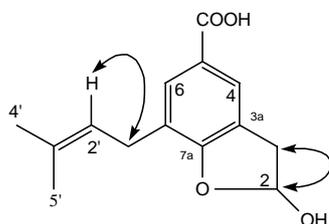
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) de **B-21**

El estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC) nos permitieron establecer la posición de los diferentes grupos funcionales sobre la molécula y la unión entre las unidades de isopreno y de benzofurano.



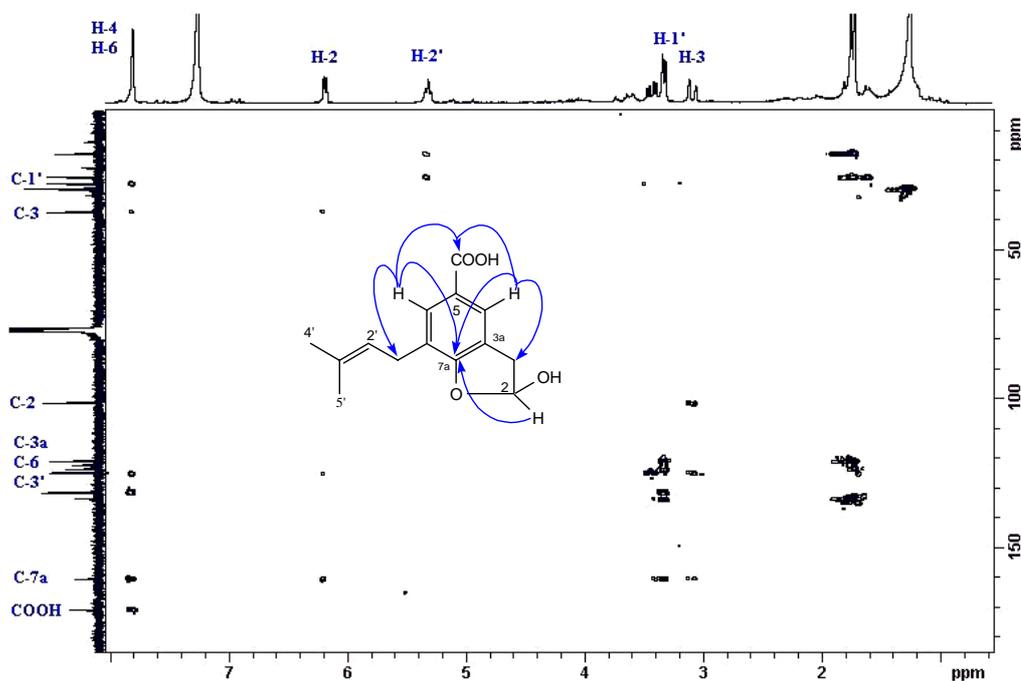
Experimento HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **B-21**

En el espectro COSY se observó correlación de la señal a  $\delta$  3.33 (H-1') con la señal asignada al protón vinílico H-2' a  $\delta$  5.32 y correlación de la señal a  $\delta$  3.10 (H-3) y el protón geminal al grupo hemiacetalico del anillo furánico a  $\delta$  6.19 (H-2).



Correlaciones  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) de **B-21**

El análisis de las correlaciones en el experimento HMBC nos permitió confirmar la posición de los diferentes grupos sobre la estructura de benzofurano, destacando las correlaciones de los protones aromáticos H-4 y H-6 a  $\delta$  7.81 con los carbonos C-7a ( $\delta$  160.3) y el carbono carboxílico ( $\delta$  170.7); correlación del protón H-2 a  $\delta$  6.19 con el carbono C-7a, así como correlación de la señal a  $\delta$  7.81 (H-4 y H-6) con los carbonos C-3 ( $\delta$  37.1), C-6 ( $\delta$  131.3) y C-1' ( $\delta$  27.8), lo que nos permitió situar la cadena de isopreno sobre C-7.



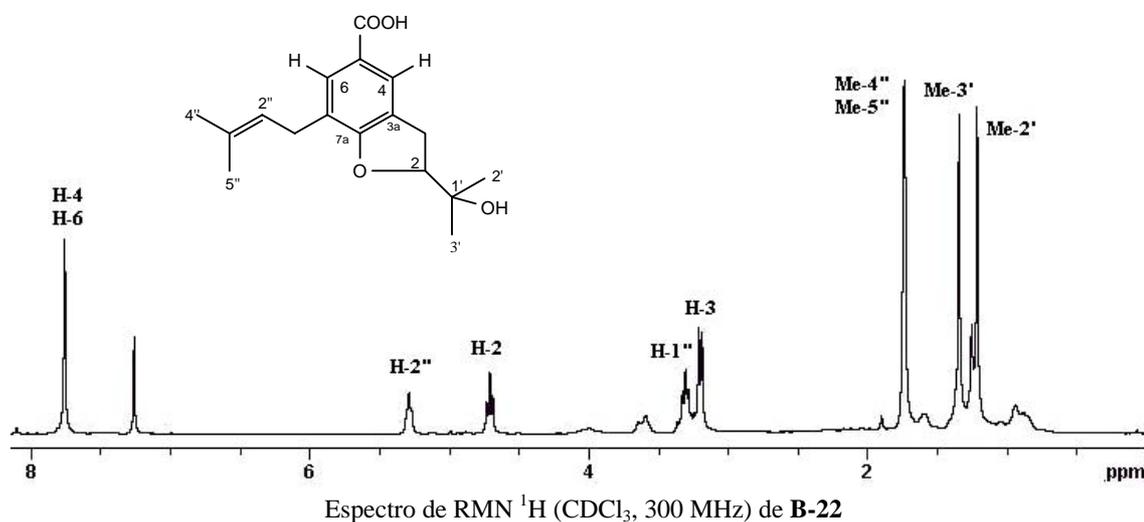
Experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **B-21**

Estos datos nos permitieron proponer la estructura de **B-21** como el **ácido 2-hidroxi-7-(3-metil-2-butenil)-2,3-dihidro-benzofurano-5-carboxílico**.

## Determinación estructural del producto B-22

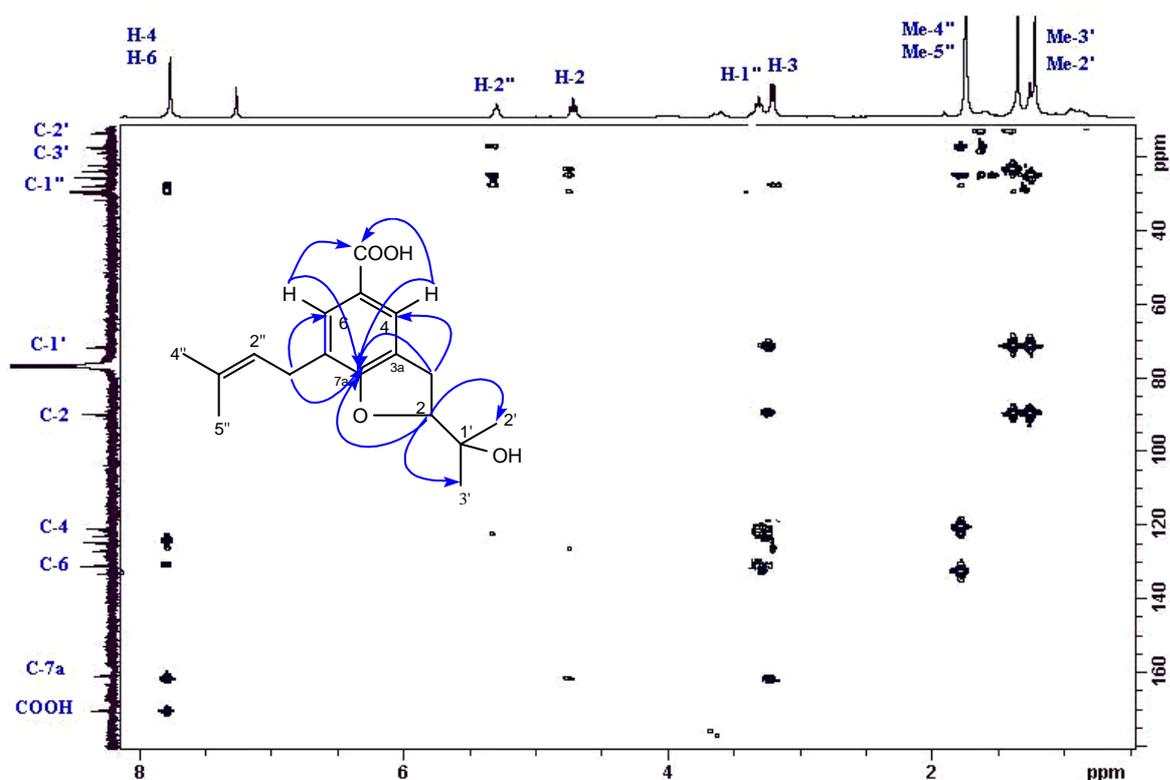
La estructura del compuesto que hemos denominado **B-22** se estableció basándonos en sus datos físicos y espectroscópicos. Así, en su espectro de masas de baja resolución presentó un ión molecular a 290  $m/z$ , que corresponde a una fórmula molecular  $C_{17}H_{22}O_4$ , determinada por espectrometría de masas de alta resolución.

El estudio de los datos espectroscópicos de IR, UV, RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  de **B-22**, nos indicaron la presencia de un alcohol terciario, un ácido carboxílico y una cadena de isopreno en un sistema de benzofurano. Un estudio comparativo de sus datos espectroscópicos con los de **B-20** y **B-21** mostró que estos productos están relacionados. En su espectro de RMN de  $^1H$  (tabla 15) se observaron señales para cuatro metilos ( $\delta$  1.21, 1.34, 1.73 y 1.74), dos metilenos a  $\delta$  3.19 (d,  $J= 8.8$  Hz, H-3) y 3.30 (t,  $J= 6.9$  Hz, H-1''), un metino unido a oxígeno a  $\delta$  4.71 (t,  $J= 6.9$  Hz, H-2) y un protón vinílico a  $\delta$  5.29 (t,  $J= 8.8$  Hz, H-2''), así como dos protones aromáticos a  $\delta$  7.75 (s, H-4, H-6). Estos datos fueron corroborados por en su espectro de  $^{13}C$  (tabla 16) que presentó 17 carbonos.



La estructura propuesta fue confirmada mediante el estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares (COSY, ROESY) y heteronucleares (HSQC, HMBC). Así, podemos destacar las correlaciones observadas en el experimento COSY de las señales a  $\delta$  3.19

y  $\delta$  4.71, asignadas a H-3 y H-2, respectivamente, así como correlación de las señales a  $\delta$  3.30 y 5.29, asignadas a los protones H-1'' y H-2'', respectivamente. En el experimento HMBC se observó correlación entre el protón H-2 a  $\delta$  4.71 con los metilos Me-2' ( $\delta$  23.8) y Me-3' ( $\delta$  25.5) y el carbono C-7a ( $\delta$  162.5), así como correlación del protón H-3 a  $\delta$  3.19 con los carbonos C-1' ( $\delta$  71.7), C-7a y C-4 ( $\delta$  124.7), lo que determinó la sustitución sobre el anillo furánico; correlación de los protones aromáticos H-4 y H-6 a  $\delta$  7.75 con los carbonos C-7a y el carbono carboxílico a  $\delta$  171.7, situó el grupo ácido carboxílico sobre el anillo aromático, mientras que correlación del protón H-1'' ( $\delta$  3.30) con los carbonos C-6 ( $\delta$  131.2) y C-7a, nos permitió situar la cadena de isopreno sobre C-7.



Experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **B-22**

Estos datos nos permiten proponer la estructura de **ácido 2-(1-hidroxi-1-metiletil)-7-(3-metil-2-butenil)-2,3-dihidro-benzofurano-5-carboxílico** para nuestro producto **B-22**.

Tabla 15. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) de los benzofuranos B-20 a B-22

Posición	B-20	B-21	B-22
H-2	5.40 d (4.7)	6.19 dd (2.3, 6.6)	4.71 t (8.8)
H-3	4.39 d (4.7)	3.10 dd (2.3, 17.0) 3.43 dd (6.6, 17.0)	3.19 d (8.8)
H-4	8.08 d (1.7)	7.81 s*	7.75 s*
H-6	7.99 dd (1.7, 8.5)	7.81 s*	7.75 s*
H-7	6.87 d (8.5)		
H-1'		3.33 d (7.3)	
H-2'	1.29 s	5.32 t (7.3)	1.21 s
H-3'	1.35 s		1.34 s
H-4'		1.73 s	
H-5'		1.75 s	
H-1''			3.30 d (6.9)
H-2''			5.29 t (6.9)
H-4''			1.73 s
H-5''			1.74 s
OCH <sub>3</sub>	3.86 s		

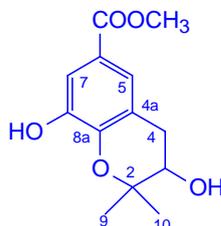
<sup>a</sup> δ, CDCl<sub>3</sub>. *J* en paréntesis en Hz. Datos basados en los experimentos COSY y HSQC

\* Señales solapadas

Tabla 16. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz) de los benzofuranos B-20 a B-22

Posición	AB-20	AB-21	AB-22
C-2	97.7 d	101.4 s	89.9 d
C-3	72.8 d	37.1 t	30.0 t
C-3a	129.5 s	124.6 s	126.9 s
C-4	127.4 d	124.8 d	124.7 d
C-5	123.6 s	122.0 s	121.4 s
C-6	133.0 d	131.3 d	131.2 d
C-7	109.9 d	123.5 s	122.9 s
C-7a	164.1 s	160.3	162.5
COOR	166.9	170.7 s	171.7
C-1'	71.0 s	27.8 t	71.7 s
C-2'	24.5 c	120.8 d	23.8 c
C-3'	25.5 c	133.4 s	25.5 c
C-4'		17.6 c	
C-5'		25.8 c	
C-1''			28.1 t
C-2''			121.0 d
C-3''			133.0 s
C-4''			17.6 c
C-5''			25.6 c
OMe	51.9 c		

<sup>a</sup> δ, CDCl<sub>3</sub>. Datos basados en los experimentos DEPT, HSQC y HMBC

**DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS****Producto B-1: 3,8-Dihidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de metilo.**

Aislado como sólido amorfo (39.2 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-0.5^\circ$  (*c* 0.97, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{\max}$  (EtOH): 214, 267, 298 nm.

IR $\nu_{\max}$  (película): 3418, 2983, 2950, 1698, 1595, 1439, 1324, 1219, 1138, 1064, 765 cm<sup>-1</sup>.

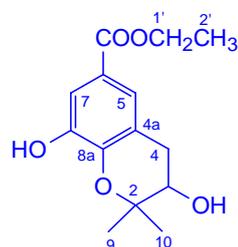
RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.33 (3H, s, H-9); 1.37 (3H, s, H-10); 2.78 (1H, dd, *J*= 4.3, 12.7 Hz, H-4); 3.03 (1H, dd, *J*= 3.6, 12.7 Hz, H-4); 3.82 (1H, dd, *J*= 3.6, 4.3 Hz, H-3); 3.83 (3H, s, OMe); 7.34 (1H, d, *J*= 1.3 Hz, H-5); 7.38 (1H, d, *J*= 1.3 Hz, H-7).

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 22.0 (c, C-9); 24.9 (c, C-10); 30.8 (t, C-4); 51.9 (c, OCH<sub>3</sub>); 69.3 (d, C-3); 79.0 (s, C-2); 113.8 (d, C-7); 118.8 (s, C-4a); 122.5 (s, C-6); 123.3 (d, C-5); 144.2 (s, C-8a); 144.7 (s, C-8); 167.0 (s, COOMe).

EM *m/z* (%): 252 [M<sup>+</sup>] (100), 234 (15), 221 (57), 203 (15), 194 (27), 180 (99), 149 (35), 123 (47), 71 (73).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>, 252.0998; observado, 252.1095.

**Producto B-2: 3,8-Dihidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de etilo.**



Aislado como sólido amorfo (10.0 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-2.8^\circ$  ( $c$  0.25,  $\text{CHCl}_3$ ).

UV  $\lambda_{\text{max}}$  (EtOH): 214, 266, 298 nm.

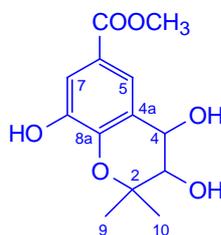
IR  $\nu_{\text{max}}$  (película): 3406, 2925, 2854, 1705, 1595, 1440, 1371, 1323, 1216, 1138, 768  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.36 (3H, t,  $J=7.0$  Hz, H-2'); 1.38 (3H, s, H-9); 1.42 (3H, s, H-10); 2.82 (1H, dd,  $J=5.7, 16.9$  Hz, H-4); 3.10 (1H, dd,  $J=4.7, 16.9$  Hz, H-4); 3.87 (2H, m, OH, H-3); 4.31 (2H, c,  $J=7.0$  Hz, H-1'); 5.60 (1H, s<sub>a</sub>, OH, H-8); 7.40 (1H, s, H-5); 7.45 (1H, s, H-7).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.3 (c, C-2'); 22.0 (c, C-9); 24.9 (c, C-10); 30.9 (t, C-4); 60.7 (t, C-1'); 69.4 (d, C-3); 79.0 (s, C-2); 113.8 (d, C-7); 118.6 (s, C-4a); 123.2 (s, C-6); 123.3 (d, C-5); 143.9 (s, C-8a); 144.7 (s, C-8); 166.9 (s,  $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ).

EM  $m/z$  (%): 266 [ $\text{M}^+$ ] (72), 252 (33), 248 (9), 233 (77), 221 (43), 195 (68), 181 (37), 149 (30), 123 (28), 82 (31), 71 (100).

EM de alta resolución: Calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_5$ , 266.1154; observado, 266.1164.

**Producto B-3: 3,4,8-Trihidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de metilo.**

Aislado como sólido amorfo (5.8 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-2.1^\circ$  ( $c$  0.29,  $\text{CHCl}_3$ ).

UV  $\lambda_{\text{max}}$  (EtOH): 216, 266, 300 nm.

IR  $\nu_{\text{max}}$  (película): 3395, 2924, 1697, 1596, 1439, 1324, 1113, 1012, 767  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.26 (3H, s, H-9); 1.55 (3H, s, H-10); 3.00 (1H,  $s_a$ , OH); 3.09 (1H,  $s_a$ , OH); 3.65 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-3); 3.87 (3H, s, OMe); 4.60 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-4); 5.59 (1H,  $s_a$ , OH); 7.49 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz, H-7); 7.74 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz, H-5).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 19.0 (c, C-9); 26.2 (c, C-10); 51.9 (c,  $\text{OCH}_3$ ); 68.8 (d, C-4); 75.6 (d, C-3); 80.4 (s, C-2); 115.0 (d, C-7); 120.6 (d, C-5); 122.6 (s, C-4a); 123.1 (s, C-6); 143.3 (s, C-8a); 144.2 (s, C-8); 166.8 (s,  $\text{COOCH}_3$ ).

EM  $m/z$  (%): 268 [ $\text{M}^+$ ] (45), 250 (10), 237 (12), 219 (13), 196 (97), 165 (100), 149 (9), 137 (9), 72 (41).

EM de alta resolución: Calculado para  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_6$ , 268.0947; observado, 268.1039.

**Producto B-5: 3-Hidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de etilo.**



Aislado como sólido amorfo (2.1 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : -16.5° (c 0.2, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{max}$  (EtOH): 240, 237, 202, 201 nm.

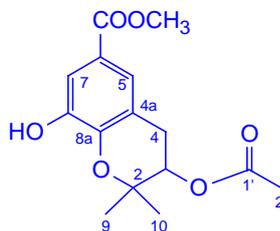
IR $\nu_{max}$  (película): 3409, 2933, 2867, 1724, 1595, 1463, 1379, 1048, 771 cm<sup>-1</sup>.

RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>): 1.33 (3H, s, H-9); 1.37 (3H, s, H-10); 1.39 (3H, t, J= 7.1 Hz, H-2'); 2.81 (1H, dd, J= 5.4, 16.4 Hz, H-4); 3.09 (1H, dd, J= 5.0, 5.4 Hz, H-4); 3.85 (1H, dd, J= 5.0, 5.4 Hz, H-3); 4.32 (2H, c, J= 7.1 Hz, H-1'); 6.83 (1H, d, J= 9.1 Hz, H-8); 7.80 (2H, s<sub>a</sub>, H-5, H-7).

RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>): 14.2 (c, C-2'); 21.9 (c, C-9); 24.7 (c, C-10); 30.9 (t, C-4); 60.4 (t, C-1'); 69.0 (d, C-3); 77.5 (s, C-2); 116.9 (d, C-8); 118.4 (s, C-4a); 122.5 (s, C-6); 129.3 (s, C-7); 132.0 (d, C-5); 156.8 (s, C-8a); 166.9 (s, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

EM *m/z* (%): 252 [M<sup>+</sup>] (7), 239 (4), 234 (2), 213 (34), 173 (16), 159 (44), 145 (49), 107 (51), 95 (58), 71 (100).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>, 252.0947; observado, 252.1039.

**Producto B-6: 3-Acetoxi-8-hidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de metilo.**

Aislado como sólido amorfo (7.1 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : +41.7° (*c* 0.23, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{\max}$  (EtOH): 213, 223, 264, 297 nm.

IR $\nu_{\max}$  (película): 3412, 2960, 2927, 1715, 1597, 1437, 1259, 1217, 1095, 1025, 799 cm<sup>-1</sup>.

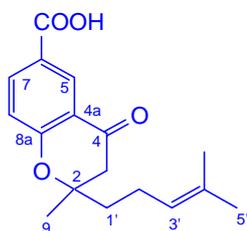
RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.36 (3H, s, H-9); 1.39 (3H, s, H-10); 2.04 (3H, s, H-2'); 2.88 (1H, dd, *J*= 4.8, 17.5 Hz, H-4); 3.11 (1H, dd, *J*= 4.8, 17.5 Hz, H-4); 3.89 (3H, s, OMe); 5.07 (1H, t, *J*= 4.8 Hz, H-3); 7.37 (1H, d, *J*= 1.8 Hz, H-5); 7.45 (1H, d, *J*= 1.8 Hz, H-7).

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 21.0 (c, C-9); 23.8 (c, C-10); 24.9 (c, C-2'); 27.9 (t, C-4); 51.9 (c, OCH<sub>3</sub>); 70.4 (d, C-3); 77.3 (s, C-2); 113.9 (d, C-7); 118.0 (s, C-4a); 122.7 (s, C-6); 122.9 (d, C-5); 143.9 (s, C-8a); 144.7 (s, C-8); 166.8 (s, COOMe); 170.4 (s, C-1').

EM *m/z* (%): 294 [M<sup>+</sup>] (34), 263 (13), 252 (27), 234 (36), 219 (100), 181 (31), 149 (17), 71 (52).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>, 294.1103; observado, 294.1118.

**Producto B-7: Ácido 2-metil-2-(4-metil-3-pentenil)-4-oxo-6-cromanocarboxílico.**



Aislado como sólido amrofo (3.9 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : -12.0° (c 0.1, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{max}$  (EtOH): 230, 258, 320 nm.

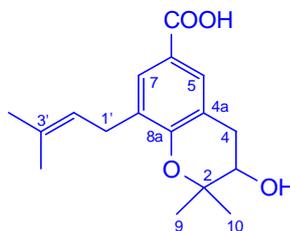
IR  $\nu_{max}$  (película): 3517-2624, 2927, 2857, 1699, 1611, 1273, 1130, 772 cm<sup>-1</sup>.

RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.45 (3H, s, H-9); 1.67 (3H, s, H-5'); 1.74 (3H, s, H-6'); 1.76-1.84 (2H, m, H-1'); 2.04-2.17 (2H, m, H-2'); 2.70, 2.84 (2H, d<sub>AB</sub>,  $J$ = 14.7 Hz, H-3); 5.04 (1H, t,  $J$ = 14.7 Hz, H-3'); 7.00 (1H, d,  $J$ = 8.7 Hz, H-8); 8.16 (1H, dd,  $J$ = 2.1, 8.7 Hz, H-7); 8.62 (1H, d,  $J$ = 2.1 Hz, H-5).

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 17.7 (c, C-5'); 21.6 (t, C-2'); 23.8 (c, C-9); 25.4 (c, C-6'); 39.0 (t, C-1'); 46.7 (t, C-3); 82.2 (s, C-2); 118.6 (d, C-8); 120.2 (s, C-4a); 121.5 (s, C-6); 122.7 (d, C-3'); 129.6 (d, C-5); 132.6 (s, C-4'); 137.3 (d, C-7); 155.3 (s, C-8a); 163.4 (s, COOH); 191.3 (s, C-4).

EM  $m/z$  (%): 288 [M<sup>+</sup>] (7), 273 (3), 205 (100), 165 (49), 149 (13), 109 (19), 69 (23).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>, 288.1362; observado, 288.1363.

**Producto B-8: Ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-6-cromanocarboxílico.**

Aislado como sólido amorfo (5.6 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : -3.6° (c 0.14, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{\max}$  (EtOH): 207, 256 nm.

IR  $\nu_{\max}$  (película): 3496-2764, 3406, 2960, 2933, 2764, 1730, 1606, 1411, 1279, 1139, 1064, 758 cm<sup>-1</sup>.

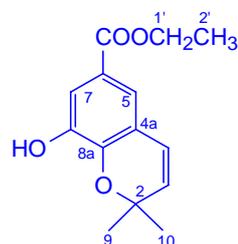
RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>): 1.35 (3H, s, H-9); 1.39 (3H, s, H-10); 1.73 (3H, s, H-4'); 1.74 (3H, s, H-5'); 2.82 (1H, dd, *J*= 5.4, 16.9 Hz, H-4); 3.11 (1H, dd, *J*= 5.4, 16.7 Hz, H-4); 3.31 (2H, d, *J*= 4.5 Hz, H-1'); 3.85 (1H, t, *J*= 5.4 Hz, H-3); 5.29 (1H, t, *J*= 4.5 Hz, H-2'); 7.72 (1H, s, H-5); 7.73 (1H, s, H-7).

RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>): 17.7 (c, C-4'); 22.0 (c, C-9); 24.9 (c, C-10'); 25.5 (c, C-5'); 28.2 (t, C-1'); 31.1 (t, C-4); 69.1 (d, C-3); 77.6 (s, C-2); 118.2 (s, C-4a); 120.6 (s, C-6); 121.7 (d, C-2'); 129.6 (d, C-7); 130.0 (s, C-8); 130.4 (d, C-5); 132.5 (s, C-3'); 155.3 (s, C-8a); 171.0 (s, COOH).

EM *m/z* (%): 290 [M<sup>+</sup>] (100), 272 (3), 257 (35), 236 (15), 218 (35), 203 (46), 175 (28), 163 (39), 115 (15), 91 (31), 71 (70).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>, 290.1518; observado, 290.1514.

**Producto B-10: 8-Hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxilato de etilo.**



Aislado como sólido amorfo (4.0 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : -5.5° (c 0.2, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{\max}$  (EtOH): 249 nm.

IR $\nu_{\max}$  (película): 3410, 2927, 2854, 1712, 1379, 1203, 1127, 1024, 775 cm<sup>-1</sup>.

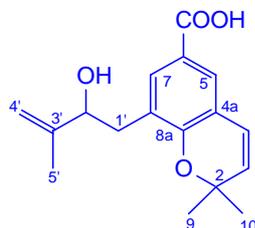
RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>): 1.35 (3H, t, J= 7.1 Hz, H-2'); 1.49 (6H, s, H-9, H-10); 4.33 (2H, c, J= 7.1 Hz, H-1'); 5.45 (1H, s<sub>a</sub>, OH); 5.66 (1H, d, J= 9.9 Hz, H-3); 6.36 (1H, d, J= 9.9 Hz, H-4); 7.33 (1H, d, J= 1.9 Hz, H-5); 7.49 (1H, d, J= 1.9 Hz, H-7).

RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>): 14.1 (c, C-2'); 28.0 (2xc, C-9, C-10); 60.4 (t, C-1'); 78.2 (s, C-2); 116.0 (d, C-7); 119.6 (d, C-5); 120.2 (s, C-4a); 121.5 (d, C-4); 122.9 (s, C-6); 130.6 (d, C-3); 143.1 (s, C-8a); 143.8 (s, C-8); 166.0 (s, COOH).

EM *m/z* (%): 248 [M<sup>+</sup>] (25), 233 (100), 205 (46), 174 (7), 157 (8), 129 (7), 94 (6), 77 (4).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>, 248.1049; observado, 248.1040.

**Producto B-12:** **Ácido 8-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxílico.**



Aislado como un aceite de color amarillo (2.5 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : +5.2° (c 0.25, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{\max}$  (EtOH): 238 nm.

IR $\nu_{\max}$  (película): 3536-2770, 3473, 2956, 2925, 2854, 1694, 1604, 1414, 1259, 1202, 1124, 1023, 800, 772 cm<sup>-1</sup>.

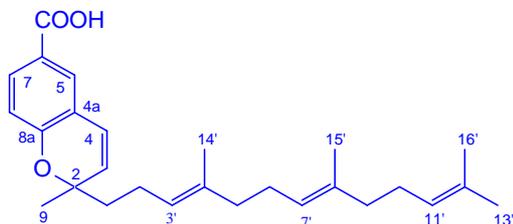
RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.48 (6H, s, H-9, H-10); 1.83 (3H, s, H-5'); 2.75 (1H, dd, *J*= 4.0, 13.7 Hz, H-1'); 2.98 (1H, dd, *J*= 8.0, 13.7 Hz, H-1'); 4.34 (1H, dd, *J*= 4.0, 8.0 Hz, H-2'); 4.85 (1H, s, H-4'); 4.97 (1H, s, H-4'); 5.66 (1H, d, *J*= 9.9 Hz, H-3); 6.36 (1H, d, *J*= 9.9 Hz, H-4); 7.64 (1H, d, *J*= 1.8 Hz, H-5); 7.79 (1H, d, *J*= 1.8 Hz, H-7).

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 17.9 (c, C-5'); 28.2 (c, C-10); 28.3 (c, C-9); 36.3 (t, C-1'); 75.1 (d, C-2'); 76.7 (s, C-2); 110.6 (t, C-4'); 120.2 (s, C-6); 120.4 (s, C-4a); 121.6 (d, C-4); 125.6 (s, C-8); 127.2 (d, C-5); 130.0 (d, C-3); 133.1 (d, C-7); 146.8 (s, C-3'); 155.4 (s, C-8a); 170.5 (s, COOH).

EM *m/z* (%): 288 [M<sup>+</sup>] (14), 273 (44), 218 (67), 203 (100), 173 (10), 149 (15), 97 (15), 71 (29).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>, 288.1362; observado, 268.1362.

**Producto B-15: Ácido 2-metil-2-[(3E,7E)-4,8,12-trimetil-3,7,11-tridecatrienil]-2H-cromeno-6-carboxílico.**



Aislado como un aceite de color amarillo (4.1 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : +3.0° (c 0.2, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{max}$  (EtOH): 237 nm.

IR $\nu_{max}$  (película): 3500-2760, 2926, 2855, 1687, 1608, 1451, 1378, 1270, 1193, 1122, 768 cm<sup>-1</sup>.

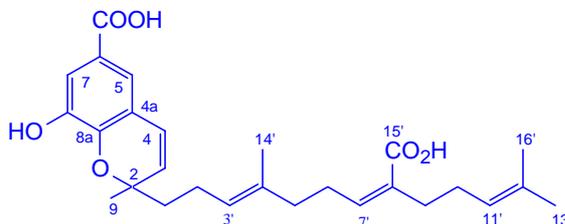
RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>): 1.43 (3H, s, H-9); 1.56 (3H, s, H-15'); 1.58 (3H, s, H-14'); 1.60 (3H, s, H-16'); 1.68 (3H, s, H-13'); 1.73-1.83 (4H, m, H-1', H-10'); 1.88-2.10 (8H, m, H-2', H-5', H-6', H-9'); 5.06-5.10 (3H, m, H-3', H-7', H-11'); 5.60 (1H, d, *J*= 9.8 Hz, H-3); 6.38 (1H, d, *J*= 9.8 Hz, H-4); 6.78 (1H, d, *J*= 8.5 Hz, H-8); 7.84 (1H, d, *J*= 2.1 Hz, H-5); 7.86 (1H, dd, *J*= 2.1, 8.5 Hz, H-7).

RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>): 15.7 (2xc, C-14', C-15'); 17.4 (c, C-16'); 22.3 (t, C-2'); 25.4 (c, C-13'); 26.5 (t, C-6'); 26.9 (c, C-9); 37.4 (t, C-5'); 39.4 (t, C-9'); 41.5 (2xt, C-1', C-10'); 79.8 (s, C-2); 115.7 (d, C-8); 120.3 (s, C-4a); 120.9 (s, C-6); 121.9 (d, C-4); 123.4 (d, C-3'); 123.8 (d, C-7'); 124.1 (d, C-11'); 128.5 (d, C-5); 129.7 (d, C-3); 131.0 (s, C-12'); 131.6 (d, C-7); 134.8 (s, C-4'); 135.3 (s, C-8'); 158.1 (s, C-8a); 170.6 (s, COOH).

EM *m/z* (%): 406 [M<sup>+</sup>] (1), 368 (1), 304 (1), 253 (7), 205 (16), 189 (100), 165 (12), 109 (5), 81 (6), 55 (9).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>O<sub>3</sub>, 406.2508; observado, 406.2490.

**Producto B-16: Ácido 2-[(3*E*,7*Z*)-8-carboxi-4,12-dimetil-3,7,11-tridecatrienil]-8-hidroxi-2-metil-2*H*-cromeno-6-carboxílico.**



Aislado como un aceite de color amarillo (20.0 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-1.5^\circ$  ( $c$  0.4,  $\text{CHCl}_3$ ).

UV  $\lambda_{\text{max}}$  (EtOH): 242 nm.

IR  $\nu_{\text{max}}$  (película): 3490-2543, 3392, 2927, 2857, 1683, 1611, 1418, 1249, 1192, 1106, 758  $\text{cm}^{-1}$ .

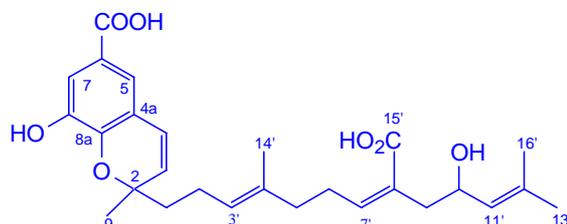
RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.46 (3H, s, H-9); 1.57 (3H, s, H-14'); 1.60 (3H, s, H-16'); 1.68 (3H, s, H-13'); 1.73-1.87 (4H, m, H-1', H-10'); 2.06-2.13 (6H, m, H-2', H-5', H-9'); 2.26 (2H, m, H-6'); 5.13 (2H, t,  $J=6.0$  Hz, H-3', H-11'); 5.61 (1H, d,  $J=10.0$  Hz, H-3); 6.41 (1H, d,  $J=10.0$  Hz, H-4); 6.87 (1H, t,  $J=7.2$  Hz, H-7'); 7.37 (1H, d,  $J=1.6$  Hz, H-5); 7.53 (1H, d,  $J=1.6$  Hz, H-7).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 15.6 (c, C-14'); 17.4 (c, C-16'); 22.4 (t, C-2'); 25.5 (c, C-13'); 26.5 (t, C-6'); 27.0 (c, C-9); 27.4 (t, C-9'); 38.1 (t, C-5'); 41.2 (t, C-1', C-10'); 81.0 (s, C-2); 116.7 (d, C-7); 120.1 (s, C-4a); 120.5 (d, C-5); 121.5 (s, C-6); 122.0 (d, C-4); 123.3 (d, C-3'); 124.4 (d, C-11'); 129.4 (d, C-3); 131.1 (s, C-8'); 132.1 (s, C-12'); 134.2 (s, C-4'); 143.7 (s, C-8); 144.3 (s, C-8a); 145.0 (d, C-7'); 171.4 (s, COOH); 173.1 (s, C-15').

EM  $m/z$  (%): 454 [ $\text{M}^+$ ] (6), 436 (9), 418 (5), 385 (3), 287 (4), 204 (100), 161 (9), 115 (8), 91 (15), 77 (16), 69 (41).

EM de alta resolución: Calculado para  $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_6$ , 454.2355; observado, 454.2358.

**Producto B-17: Ácido 2-[(3*E*,7*Z*)-8-carboxi-10-hidroxi-4,12-dimetil-3,7,11-tridecatrienil]-8-hidroxi-2-metil-2*H*-cromeno-6-carboxílico.**



Aislado como un aceite de color amarillo (7.8 mg).

$[\alpha]_D^{20}$  : -2.5° (c 0.2, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{max}$  (EtOH): 234 nm.

IR $\nu_{max}$  (película): 3500-2760, 3415, 2958, 2931, 1731, 1696, 1611, 1451, 1195, 1019, 757 cm<sup>-1</sup>.

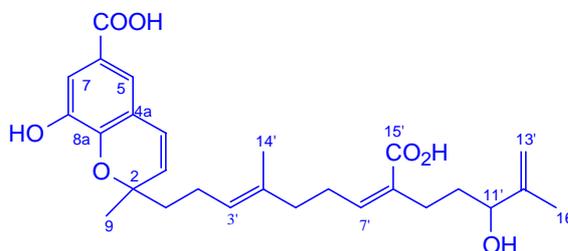
RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.45 (3H, s, H-9); 1.55 (3H, s, H-14'); 1.74 (3H, s, H-16'); 1.76 (3H, s, H-13'); 1.70 (2H, m, H-1'); 1.99-2.12 (4H, m, H-2', H-5'); 2.19 (2H, m, H-6'); 2.47 (1H, m, H-9'); 3.01 (1H, m, H-9'); 5.12 (1H, t, *J*= 6.1 Hz, H-3'); 5.17 (1H, t, *J*= 3.2 Hz, H-10'); 5.20 (1H, t, *J*= 3.2 Hz, H-11'); 5.60 (1H, d, *J*= 10.0 Hz, H-3); 6.40 (1H, d, *J*= 10.0 Hz, H-4); 6.66 (1H, t, *J*= 7.2 Hz, H-7'); 7.36 (1H, d, *J*= 1.5 Hz, H-5); 7.52 (1H, d, *J*= 1.5 Hz, H-7).

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 15.6 (c, C-14'); 18.4 (c, C-16'); 22.4 (t, C-2'); 25.4 (c, C-13'); 27.0 (c, C-9); 28.3 (t, C-6'); 32.2 (t, C-9'); 37.4 (t, C-5'); 41.2 (t, C-1'); 74.1 (d, C-10'); 81.0 (s, C-2); 116.7 (d, C-7); 120.0 (s, C-4a); 120.4 (d, C-5); 121.3 (s, C-6); 122.0 (d, C-4); 123.4 (d, C-11'); 124.6 (d, C-3'); 126.4 (s, C-8'); 129.4 (d, C-3); 133.8 (s, C-4'); 139.7 (s, C-12'); 139.6 (d, C-7'); 143.7 (s, C-8); 144.2 (s, C-8a); 170.6 (s, COOH), 170.8 (s, C-15').

EM *m/z* (%): 452 [M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O] (2), 434 (2), 408 (1), 380 (1), 330 (1), 286 (1), 245 (2), 205 (100), 161 (14), 115 (5), 91(4).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub> [M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O], 452.2199; observado, 452.2177.

**Producto B-18: Ácido 2-[(3*E*,7*Z*)-8-carboxi-11-hidroxi-4,12-dimetil-3,7,12-tridecatrienil]-8-hidroxi-2-metil-2*H*-cromeno-6-carboxílico.**



Aislado como un aceite de color amarillo (6.3 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-3.0^\circ$  ( $c$  0.2,  $\text{CHCl}_3$ ).

UV  $\lambda_{\text{max}}$  (EtOH): 242 nm.

IR  $\nu_{\text{max}}$  (película): 3490-2751, 3415, 2957, 2930, 1727, 1713, 1612, 1451, 1379, 1192, 1064, 757  $\text{cm}^{-1}$ .

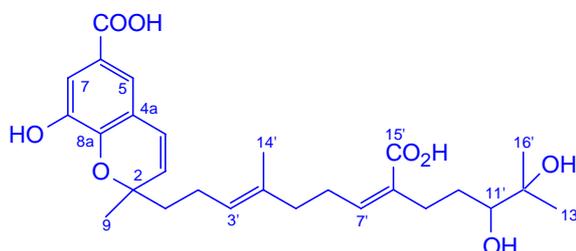
RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.46 (3H, s, H-9); 1.54 (3H, s, H-14'); 1.73-1.84 (4H, m, H-1', H-10'); 1.78 (3H, s, H-16'); 1.86-1.99 (2H, m, H-9); 2.08-2.16 (4H, m, H-2', H-5'); 2.22 (2H, m, H-6'); 4.62 (1H, dd,  $J= 2.0, 9.5$  Hz, H-11'); 4.96 (1H, s, H-13'); 5.04 (1H, s, H-13'); 5.13 (1H, t,  $J= 7.4$  Hz, H-3'); 5.61 (1H, d,  $J= 10.1$  Hz, H-3); 6.40 (1H, d,  $J= 10.2$  Hz, H-4); 7.01 (1H, t,  $J= 7.2$  Hz, H-7'); 7.36 (1H, d,  $J= 1.9$  Hz, H-5); 7.51 (1H, d,  $J= 1.9$  Hz, H-7).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 15.6 (c, C-14'); 17.9 (c, C-16'); 22.2 (t, C-6'); 22.5 (t, C-9'); 26.2 (t, C-2'); 26.5 (t, C-10'); 27.1 (c, C-9); 37.3 (t, C-5'); 41.2 (t, C-1'); 81.0 (s, C-2); 81.4 (d, C-11'); 112.8 (t, C-13'); 116.6 (d, C-7); 120.0 (d, C-4a); 120.4 (d, C-5); 121.3 (s, C-6); 122.0 (d, C-4); 124.5 (s, C-8'); 124.7 (d, C-3'); 129.4 (d, C-3), 133.9 (s, C-4'); 142.1 (s, C-12'); 143.7 (s, C-8); 144.2 (s, C-8a); 145.7 (d, C-7'); 170.0 (s, COOH); 173.9 (s, C-15').

EM  $m/z$  (%): 452 [ $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ] (6), 437 (3), 434 (2), 328 (3), 285 (4), 270 (6), 245 (6), 205 (100), 167 (10), 119 (12), 105 (21), 81 (9).

EM de alta resolución: Calculado para  $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_6$ , 452.2199 [ $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ]; observado, 452.2187.

**Producto B-19: Ácido 2-[(3E,7Z)-8-carboxi-11,12-dihidroxi-4,12-dimetil-3,7-tridecadienil]-8-hidroxi-2-metil-2H-cromeno-6-carboxílico.**



Aislado como un aceite de color amarillo (12.8 mg).

$[\alpha]_D^{20}$  : -1.6° (c 0.64, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{max}$  (EtOH): 241 nm.

IR $\nu_{max}$  (película): 3492-2672, 3391, 2972, 2931, 1695, 1632, 1412, 1379, 1194, 1099, 957, 756 cm<sup>-1</sup>.

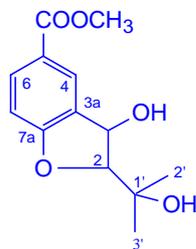
RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.24 (3H, s, H-13'); 1.29 (3H, s, H-16'); 1.45 (3H, s, H-9); 1.57 (3H, s, H-14'); 1.63-1.82 (4H, m, H-1', H-10'); 2.01-2.38 (6H, m, H-2', H-5', H-9'); 2.39-2.46 (1H, m, H-6'); 2.64-2.69 (1H, m, H-6'); 4.03 (1H, dd, *J*= 1.9, 11.5 Hz, H-11'); 5.12 (1H, t, *J*= 7.2 Hz, H-3'); 5.61 (1H, d, *J*= 10.0 Hz, H-3); 6.41 (1H, d, *J*= 10.0 Hz, H-4); 7.03 (1H, t, *J*= 7.0 Hz, H-7'); 7.36 (1H, d, *J*= 1.9 Hz, H-5); 7.51 (1H, d, *J*= 1.9 Hz, H-7).

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 15.6 (c, C-14'); 22.4 (t, C-10'); 22.5 (t, C-9'); 22.6 (t, C-6'); 24.1 (c, C-13'); 25.3 (c, C-16'); 26.8 (t, C-2'); 27.0 (c, C-9); 37.3 (t, C-5'); 41.2 (t, C-1'); 71.2 (s, C-12'); 81.0 (s, C-2); 85.7 (d, C-11'); 112.8 (C-13'); 116.7 (d, C-7); 120.0 (d, C-5); 120.4 (s, C-4a); 121.3 (s, C-6); 122.0 (d, C-4); 124.5 (s, C-8'); 124.7 (d, C-3'); 129.3 (d, C-3); 134.5 (s, C-4'); 143.7 (s, C-8); 144.7 (s, C-8a); 146.3 (d, C-7'); 170.4 (s, COOH); 173.9 (s, C-15').

EM *m/z* (%): 470 [M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O] (1), 271 (1), 253 (4), 205 (100), 189 (35), 161 (22), 107 (7), 91 (7), 55 (12).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>O<sub>7</sub> [M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O] 470.2305; observado, 470.2309.

**Producto B-20: 3-Hidroxi-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-2,3-dihidro-benzofurano-5-carboxilato de metilo.**



Aislado como un aceite de color amarillo (0.8 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : +5.0° (c 0.08, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{\max}$  (EtOH): 222, 248 nm.

IR $\nu_{\max}$  (película): 3747, 2923, 2853, 1717, 1616, 1457, 1290, 1164, 769 cm<sup>-1</sup>.

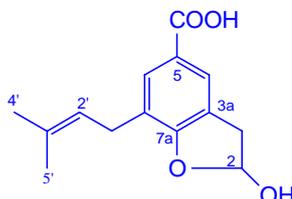
RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.29 (3H, s, H-2'); 1.35 (3H, s, H-3'); 3.86 (3H, s); 4.39 (1H, d, *J*= 4.7 Hz, H-3); 5.40 (1H, d, *J*= 4.7 Hz, H-2); 6.87 (1H, d, *J*= 8.5 Hz, H-7); 7.99 (1H, dd, *J*= 1.7, 8.5 Hz, H-6); 8.08 (1H, d, *J*= 1.7 Hz, H-4).

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 24.5 (c, C-2'); 25.5 (c, C-3'); 51.9 (c, OCH<sub>3</sub>); 71.0 (s, C-1'); 72.8 (d, C-3); 97.7 (d, C-2); 109.9 (d, C-7); 123.6 (s, C-5); 127.4 (d, C-4); 129.5 (s, C-3a); 133.0 (d, C-6); 164.1 (s, C-7a); 166.9 (s, COOH).

EM *m/z* (%): 252 [M<sup>+</sup>] (8), 234 (4), 219 (56), 203 (26), 177 (34), 149 (75), 145 (32), 111 (26), 97 (43), 83 (46), 71 (65).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub> [M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>] 219.0657; observado, 219.0654.

**Producto B-21:** Ácido 2-hidroxi-7-(3-metil-2-butenil)-2,3-dihidro-benzofurano-5-carboxílico.



Aislado como un aceite (3.0 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : -1.6° (c 0.3, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{max}$  (EtOH): 211, 253 nm.

IR  $\nu_{max}$  (película): 3502-2745, 3415, 2924, 2854, 1683, 1607, 1440, 1411, 1283, 1194, 757 cm<sup>-1</sup>.

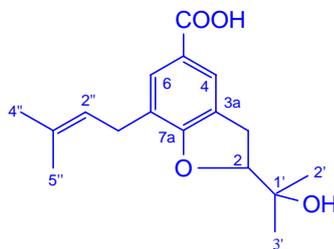
RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.73 (3H, s, H-4'); 1.75 (3H, s, H-5'); 3.10 (1H, dd,  $J = 2.3, 17.0$  Hz, H-3); 3.33 (2H, d,  $J = 7.3$  Hz, H-1'); 3.43 (1H, dd,  $J = 6.6, 17.0$  Hz, H-3); 5.32 (1H, t,  $J = 7.3$  Hz, H-2'); 6.19 (1H, dd,  $J = 2.3, 6.6$  Hz, H-2); 7.81 (2H, s, H-4, H-6).

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 17.6 (c, C-4'); 25.8 (c, C-5'); 27.8 (t, C-1'); 37.1 (t, C-3); 101.4 (d, C-2); 120.8 (d, C-2'); 122.0 (s, C-5); 123.5 (s, C-7); 124.6 (s, C-3a); 124.8 (d, C-4); 131.3 (d, C-6); 133.4 (s, C-3'); 160.3 (s, C-7a); 170.7 (s, COOH).

EM  $m/z$  (%): 248 [M<sup>+</sup>] (94), 230 (22), 219 (100), 193 (79), 163 (50), 148 (75), 130 (66), 119 (50), 83 (55).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>, 248.1049; observado 248.1043.

**Producto B-22: Ácido 2-(1-hidroxi-1-metiletil)-7-(3-metil-2-butenil)-2,3-dihidro-benzofurano-5-carboxílico.**



Aislado como sólido amorfo (10.4 mg)

$[\alpha]_D^{20}$ : -7.0° (c 0.1, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{max}$  (EtOH): 209, 259 nm.

IR $\nu_{max}$  (película): 3528-2630, 3437, 2926, 1686, 1605, 1474, 1288, 756 cm<sup>-1</sup>.

RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.21 (3H, s, H-2'); 1.34 (3H, s, H-3'); 1.73 (3H, s, H-4''); 1.74 (3H, s, H-5''); 3.19 (2H, d, *J*= 8.8 Hz, H-3); 3.30 (2H, d, *J*= 6.9 Hz, H-1''); 4.71 (1H, t, *J*= 8.8 Hz, H-2); 5.29 (1H, t, *J*= 6.9 Hz, H-2''); 7.75 (2H, s, H-4, H-6).

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 17.6 (c, C-4''); 23.8 (c, C-2'); 25.5 (c, C-3'); 25.6 (c, C-5''); 28.1 (t, C-1''); 30.0 (t, C-3); 71.7 (s, C-1'); 89.9 (d, C-2); 121.0 (d, C-2''); 121.4 (s, C-5); 122.9 (s, C-7); 124.7 (d, C-4); 126.9 (s, C-3a); 131.2 (d, C-6); 133.0 (s, C-3''); 162.5 (s, C-7a); 171.7 (s, COOH).

EM *m/z* (%): 290 [M<sup>+</sup>] (16), 232 (24), 218 (20), 192 (46), 176 (47), 164 (27), 131 (27), 91 (31), 71 (41), 59 (100).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>, 290.1518; observado, 290.1512.

## *Fenilpropanoides*

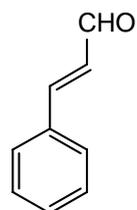
## FENILPROPANOIDES

### Introducción

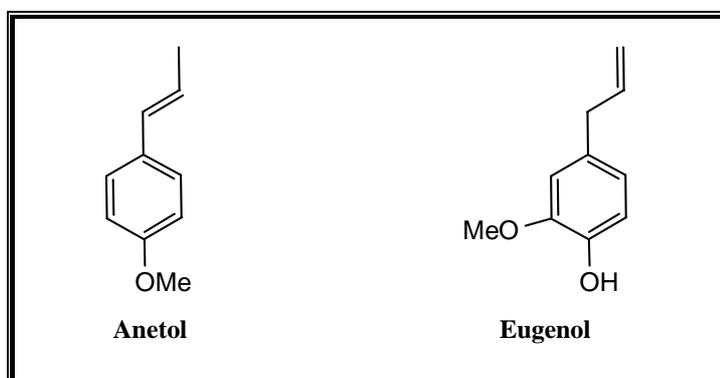
Los fenilpropanoides son compuestos de interés por su uso como aromatizantes, existiendo numerosos ejemplos de su aplicación en la industria alimentaria. Así, el anetol es el principal componente de la esencia obtenida de los frutos del anís, *Pimpinella anisum*; el cinamaldehido se encuentra en la corteza del canelo, *Cinnamomun zeylanicum* y se libera por fermentación en el proceso utilizado en la preparación de la canela para su consumo en la alimentación. El eugenol se obtiene mediante destilación del clavo, que es el botón floral seco de *Eugenia caryophyllus*, utilizado como antiséptico dental de uso tópico<sup>1</sup>.



*Cinnamomun zeylanicum*



Cinamaldehido



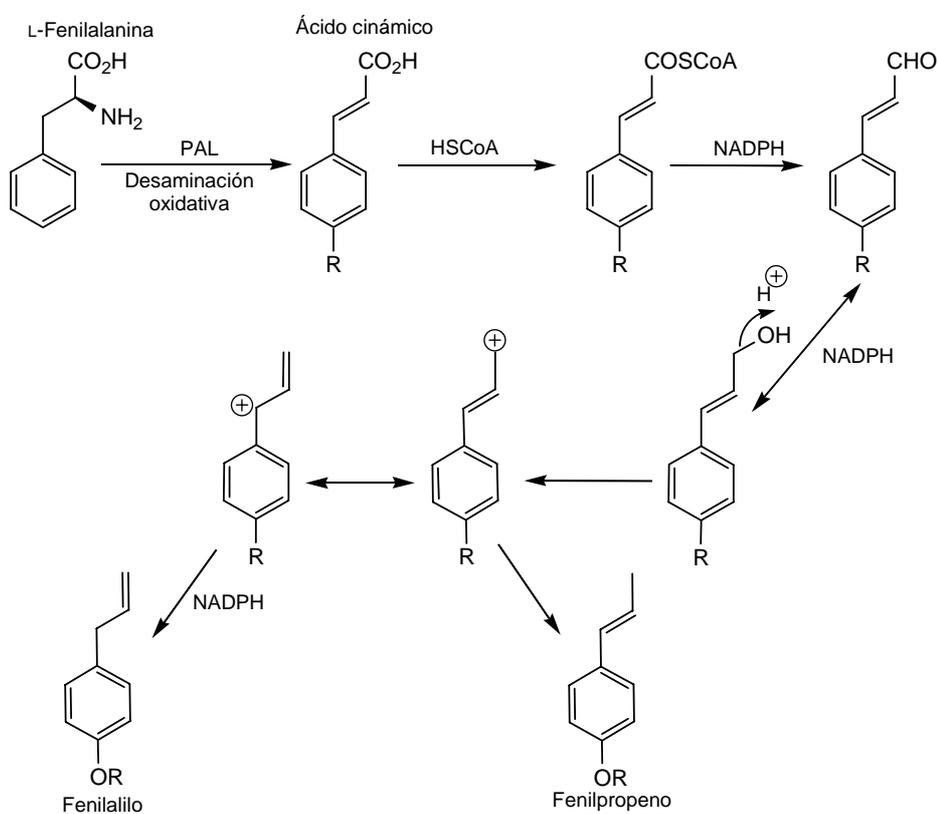
Ejemplos de fenilpropanoides

Los fenilpropanoides son compuestos C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> derivados del ácido cinámico, que poseen un anillo aromático, con frecuencia oxigenado en posición *para* con grupos hidroxilo y metoxilo, unido a una cadena de propilo, la cual deriva directamente de la fenilalanina<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Gil Ruiz, P. *Productos Naturales*. 2002, Universidad Pública de Navarra, Navarra, Pamplona.

<sup>2</sup> Samuelsson, G. *Drugs of Natural Origin*. 1999, Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, Sweden, 144-150.

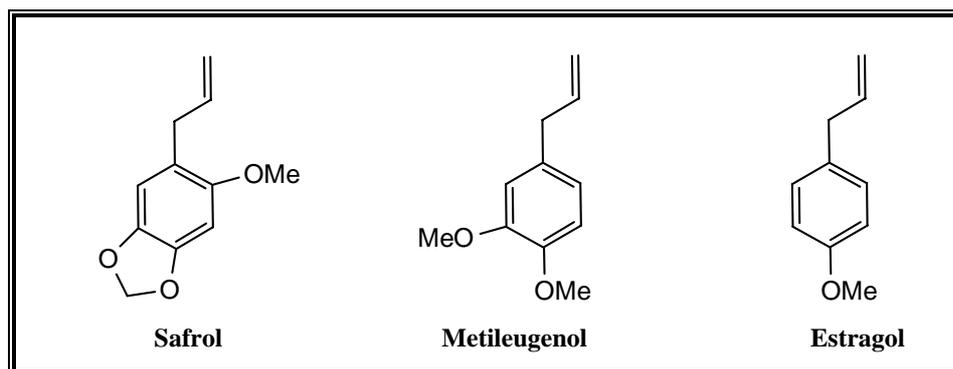
La biosíntesis de los fenilpropanoides sigue la ruta del ácido sikímico. La principal enzima implicada es la fenilalanina liasa (PAL), que cataliza la formación del ácido *trans*-cinámico por desaminación de la L-fenilalanina, primer intermedio en la biosíntesis de compuestos fenólicos. El ácido cinámico, por acción de la coenzima A se transforma en el éster de la coenzima A, primera reducción dependiente de NADPH, formándose el cinamaldehído; una segunda reducción genera el alcohol cinámico. Posteriormente, la pérdida del grupo hidroxilo del alcohol cinámico por protonación o fosforilación, da lugar al catión alílico, que se estabiliza por resonancia, el cual después de la adición de hidruro procedente del NADPH, genera derivados de fenil-propeno o fenilalilo<sup>3</sup>.



### Biosíntesis de fenilpropanoides

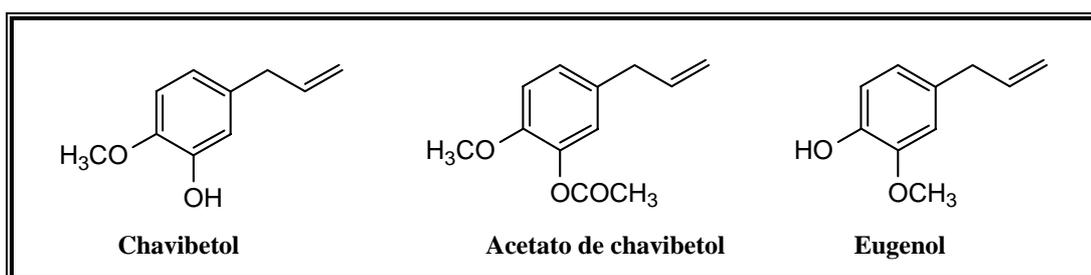
<sup>3</sup> Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*. 2002, John Wiley and Sons, Ltda, UK. 135-140.

Los fenilpropanoides tienen utilidad en la elaboración de fragancias y perfumes. Así mismo, presentan una amplia gama de actividades biológicas, tales como fungicida, nematocida, antimicrobiana y moluscida. Por otra parte, compuestos de esta clase como el safrol, metileugenol o estragol, se han estudiado por su acción genotóxica y carcinogénica, siendo su mecanismo de acción la interacción con el ADN<sup>4</sup>.



#### Fenilpropanoides con actividad genotóxica

Se han descrito derivados de fenilalilo como el anisol, eugenol o safrol en diversas especies del género *Piper*<sup>5</sup>. Así mismo, existen referencias de las propiedades fungicida y nematocida<sup>6</sup> de los fenilpropenos chavicol, chavibetol y su derivado acetilado, aislados del extracto clorofórmico de las hojas de *P. betle*.



#### Fenilpropanoides con actividad fungicida y nematocida

<sup>4</sup> Liu, T. Y.; Chung, Y. T.; Wang, P. F.; Chi, C. W.; Hsieh, L. L. *Mutat. Res.* **2004**, 59, 559-563.

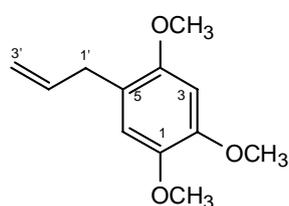
<sup>5</sup> Dubey, P.; Tripathi, S. C. *Zeitschrift Pflanzenkrankh Pflanzenschutz.* **1987**, 94, 235-238.

<sup>6</sup> Evans, P. H.; Bowers, W. S.; Funk, E. J.; Evangeline, J. J. *Agric. Food Chem.* **1984**, 32, 1254-1256.

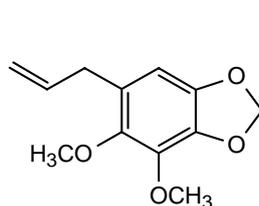
## Resultados y discusión

Tras repetidas cromatografías del extracto de diclorometano de las hojas de *Piper aduncum*, *P. acutifolium* y *P. elongatum*, hemos aislado siete fenilpropanoides que hemos denominado de **FP-1** a **FP-7**, los cuales habían sido descritos previamente en la bibliografía química.

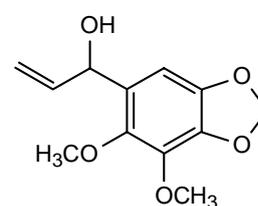
Los productos aislados fueron identificados basándonos en sus datos físicos y espectroscópicos y comparación con los datos de la bibliografía química. Estos se agruparon para su estudio de acuerdo a las características de la cadena lateral en derivados de fenilalilo y fenilpropeno. Teniendo en cuenta esta consideración los compuestos identificados como  $\gamma$ -asarona<sup>7</sup> (**FP-1**), 1-alil-2,3-dimetoxi-4,5-metilendioxi-benceno<sup>8</sup> (**FP-2**) y 1-(1-hidroxi-alil)-2,3-dimetoxi-4,5-metilendioxi-benceno<sup>5</sup> (**FP-3**), se caracterizan por tener un agrupamiento de fenilalilo y  $\alpha$ -asarona<sup>9</sup> (**FP-4**), 3'-hidroxi-isosafrol<sup>10</sup> (**FP-5**), dilapional<sup>11</sup> (**FP-6**) y  $\omega$ -hidroxiisodilapiole<sup>12</sup> (**FP-7**), presentan un agrupamiento fenilpropeno.



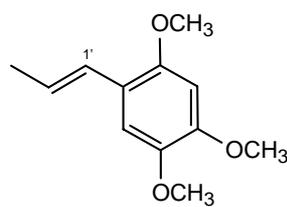
**FP-1**



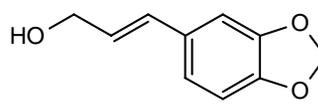
**FP-2**



**FP-3**



**FP-4**



**FP-5**

<sup>7</sup> Patra, A.; Mitra, A. K. *J. Nat. Prod.* **1981**, 44, 668-669.

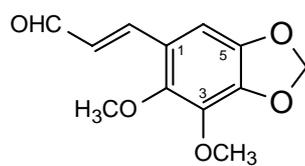
<sup>8</sup> Ramos, L. S.; Da Silva, M. L.; Luz, A. I. R.; Zoghbi, M. G. B.; Maia, J. G. S. *J. Nat. Prod.* **1986**, 49, 712-713.

<sup>9</sup> Masuda, T.; Inazumi, A.; Yamada, Y.; Padolina, W. G.; Kikuzaki, H.; Nakatani, N. *Phytochemistry*. **1991**, 30, 3227-3228.

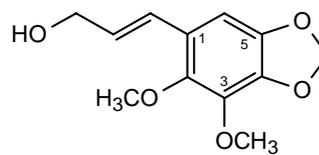
<sup>10</sup> Belleire, J. L.; Mahmoodi, N. O. *J. Nat. Prod.* **1992**, 55, 194-206.

<sup>11</sup> Tomar, S. S.; Mukerjee, S. K. *Indian J. Chem.* **1981**, 20, 723-724.

<sup>12</sup> Falkiner, M.; Loder, J. W.; Russel, J. B.; Shelton, M. *Aust. J. Chem.* **1972**, 2417-2420.



FP-6



FP-7

**Fenilpropanoides aislados de las especies *Piper* estudiadas**

*Terpenos*

## TERPENOS

### Introducción

Los terpenos, también denominados terpenoides o isoprenoides, son probablemente el grupo más numeroso de productos naturales presentes en las plantas, habiéndose descrito alrededor de veinte mil estructuras. Los terpenos pueden encontrarse en todas las partes de las plantas superiores: semillas, flores, frutos, hojas y raíces. También se encuentran en algas, musgos, líquenes, insectos y microorganismos. Los compuestos de este tipo se han utilizado desde la antigüedad como aromatizantes, conservantes, en perfumes, medicinas, jabones y colorantes. El alcanfor por ejemplo, obtenido fácilmente en estado puro como un sólido cristalino y muy oloroso de *Cinnamomum canphora* L, fue introducido en Europa desde Oriente en el siglo XI a.C. y al final de la Edad Media se utilizaba en perfumería y medicina popular, conjuntamente con numerosos aceites esenciales de plantas comunes como lavanda, romero, tomillo o ajenojo<sup>1</sup>.



*Cinnamomum canphora* L

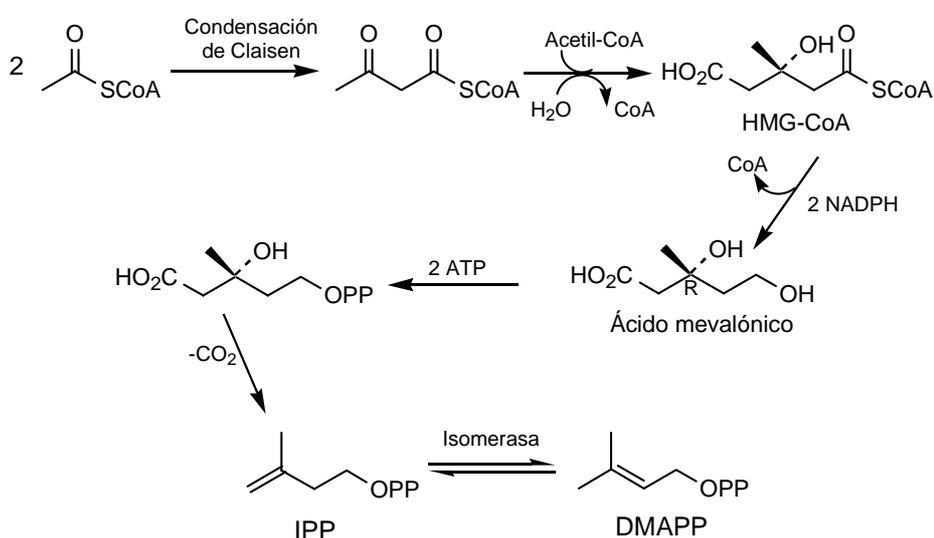


*Lavandula officinalis*

Los terpenos son compuestos que se biosintetizan a partir de unidades de isopreno de cinco átomos de carbono. Su sistema de clasificación es muy sencillo y se agrupan según el número de átomos de carbono del esqueleto carbonado, siempre múltiplo de cinco. Los más sencillos son los monoterpenos ( $C_{10}$ ) que se caracterizan por tener dos unidades de isopreno, le siguen los sesquiterpenos ( $C_{15}$ ) con tres unidades de isopreno, los diterpenos ( $C_{20}$ ) constituidos por dos unidades de geranilo, los triterpenos ( $C_{30}$ ) con dos unidades de farnesilo, los carotenoides ( $C_{40}$ ) con dos unidades de geranilgeranilo y los poliisoprenoides con más de cuarenta átomos de carbono.

<sup>1</sup> Gil Ruiz, P. *Productos Naturales*. 2002, Universidad Pública de Navarra, Navarra, Pamplona, 116-120.

La biosíntesis de los terpenoides sigue la ruta del ácido mevalónico, de forma que a partir de tres moléculas de acetil-CoA se forma el ácido mevalónico. Inicialmente, se combinan dos moléculas de acetil-CoA vía una condensación de Claisen, generando el acetoacetil-CoA, sobre el cual se incorpora una tercera unidad de acetil-CoA, mediante una adición aldólica estereoespecífica, formándose el 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Este se transforma en el ácido mevalónico (enantiómero *R*) por reducción, con participación del NADPH, constituyendo la etapa clave de la secuencia. La fosforilación del alcohol primario del ácido mevalónico y posterior descarboxilación-eliminación, mediada por ATP, conduce al pirofosfato de isopentenilo (IPP) o isopreno activado, que es el precursor directo de los terpenos<sup>2</sup>.

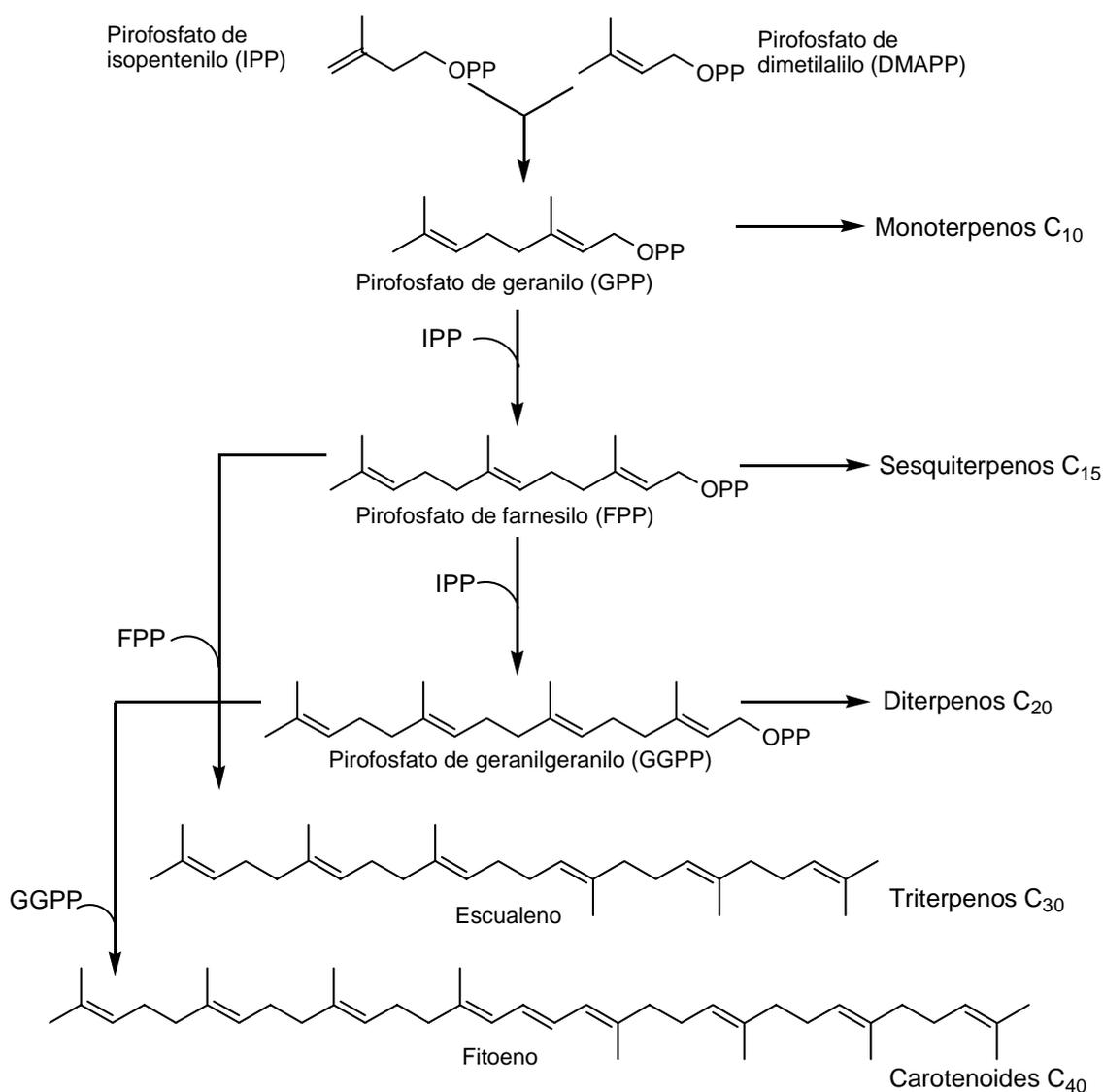


### Ruta biogénica de terpenos

La isomerización del IPP conduce al pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), que es la unidad iniciadora en la biosíntesis de terpenos. El DMAPP tiene un buen grupo saliente, el pirofosfato, lo que origina la formación de un carbocatión alílico que es un electrófilo muy reactivo. El IPP por el contrario actuará como nucleófilo y de esta manera, la unión de una unidad de DMAPP y otra de IPP origina pirofosfato de geranilo (GPP), precursor de los monoterpenos.

<sup>2</sup> Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*. 2002, John Wiley and Sons, Ltda., UK, 167-172.

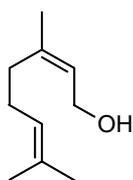
A partir del GPP y tras la incorporación de otra unidad de IPP se genera el pirofosfato de farnesilo (FPP), precursor de los sesquiterpenos; la adición de otra unidad de IPP formaría el pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP), precursor de los diterpenos y por último, la dimerización de FPP origina los triterpenos y la de GGPP los carotenoides.



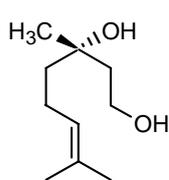
### Clasificación de los terpenos

Los monoterpenos son en su mayoría líquidos volátiles, aunque hay algunos sólidos, como el alcanfor o el mentol. Su principal función en la planta es la de atraer a los polinizadores a las flores y proteger los tejidos verdes del ataque de los herbívoros y de la infección

microbiana, ya que muchos de ellos tienen propiedades bacteriostáticas y a menudo bactericidas. Los monoterpenos tienen importancia comercial<sup>1</sup> debido a que en su mayoría son aceites esenciales, utilizados en perfumería (ejemplos: nerol, linalol, geraniol), como aromatizante (ejemplos: vainillina, mentol, eucaliptol) y más recientemente, en aromaterapia (ejemplos: eucaliptol, timol, mirceno, tujona).



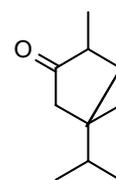
Nerol



Linalol

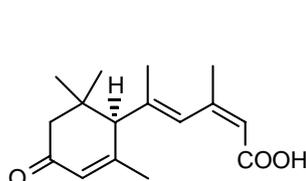


Eucaliptol

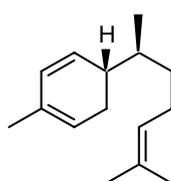


Tujona

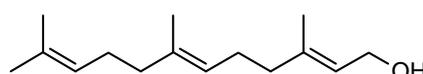
Los sesquiterpenos más numerosos son los cíclicos y presentan numerosas actividades biológicas y aplicaciones. Así por ejemplo, el ácido abscísico es una fitohormona presente en todas las plantas y en algunos hongos; el cingibereno obtenido de las raíces secas del jengibre (*Zingiber officinales*)<sup>3</sup>, es utilizado como aromatizante y la  $\alpha$ -vetivona<sup>4</sup>, es una esencia que se utiliza como base de muchas colonias para varones. Se conocen también algunos sesquiterpenos lineales como el farnesol.



Ácido abscísico



Cingibereno



Farnesol

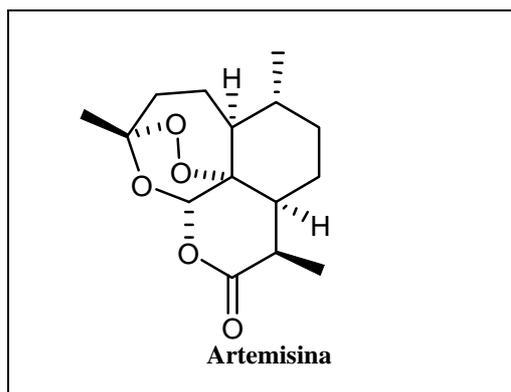
Existe un numeroso grupo de lactonas sesquitérpenicas que se encuentran sobre todo en la familia de las compuestas (Asteraceae) y que tienen interesantes actividades biológicas. Entre ellas podemos citar la artemisinina<sup>5</sup> o qinghaosu, aislada de las flores y hojas de *Artemisia annua*, con actividad antimalárica frente a diferentes formas del *Plasmodium* incluyendo las causadas por *P. falciparum* resistente a la cloroquina. Su modo de acción se debe a la generación

<sup>3</sup> Millar, J. G. *J. Nat. Prod.* **1998**, 6, 1025-1026.

<sup>4</sup> Ferrara, L.; Montesano, D. *Flav. Frag. Chem.* **2000**, 46, 115-118.

<sup>5</sup> Bhattacharya, A. K.; Sharma, R. P. *Heterocycles.* **1999**, 51, 1681-1745.

de radicales libres, los cuales reaccionan con proteínas específicas de la membrana del parásito. Se han llevado a cabo numerosos estudios sintéticos con el fin de simplificar su estructura y obtener una molécula con igual o mejores propiedades que la artemisinina, más fácil de obtener vía sintética, ya que se conoce que el farmacóforo, es decir, el agrupamiento necesario para la expresión de la actividad, corresponde con el puente de endoperóxido<sup>6,7</sup>.



Los diterpenos, por otra parte, son un grupo con una enorme variedad de estructuras algunas de gran complejidad. El más importante de los diterpenos monocíclicos es, sin duda, la vitamina A o retinol, esencial en el proceso de la visión. Dependiendo de cómo se pliegue el geranylgeranilo (GGPP), el sistema bicíclico formado inicialmente durante la biosíntesis de los diterpenos se obtendrá una configuración u otra en los estéreocentros formados y dará lugar a series diferentes de compuestos.

Así, podemos citar al ácido abiético, el componente principal de las resinas de muchas coníferas, es utilizado en la fabricación de barnices, jabones y plásticos. Los *ent*-kaurenos, experimentan reacciones de oxidación, contracción del anillo y lactonización, dando lugar a un sistema tetracíclico para generar las giberelinas, de las cuales el ácido giberélico GA3<sup>8</sup> es el prototipo. Se han caracterizado alrededor de noventa giberelinas, un importante grupo de hormonas vegetales que regulan el crecimiento y desarrollo de partes específicas de las plantas, como ápice y hojas jóvenes en expansión. Este tipo de compuestos fue aislado originariamente

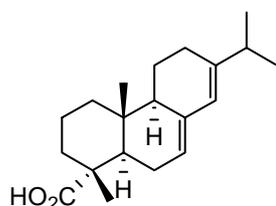
<sup>6</sup> Robert, A.; Meunier, B. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 273-279.

<sup>7</sup> Rucker, G.; Walter, R. D.; Manns, D.; Mayer A.. *Planta Med.* **1991**, 57, 295-296.

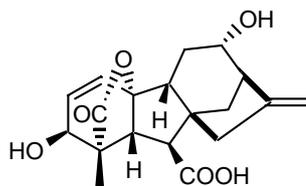
<sup>8</sup> Mander, L. N. *Chemical Reviews.* **1992**, 92, 573-612.

de *Gibberella fujikuroi*, hongo patógeno de las plantaciones de arroz, que produce un alargamiento anormal de los tallos y en consecuencia plantas muy frágiles.

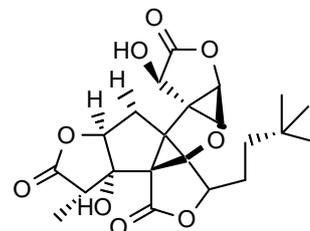
Los gíngólidos, aislados de las raíces y hojas de *Ginkgo biloba*, se han utilizado en la medicina tradicional china desde hace más de 5.000 años y siguen utilizándose en la actualidad por sus propiedades antiasmáticas<sup>9</sup>. El extracto de la planta es utilizado en el tratamiento de enfermedades que aparecen en la tercera edad como el vértigo, el dolor de cabeza o pérdida de la memoria, síntomas que se asocian con la insuficiencia circulatoria periférica que degenera en insuficiencia cerebro vascular. Estudios recientes han demostrado que los gíngólidos tienen acción antagonista del factor de agregación plaquetaria (PAF), inhibiendo el proceso de unión del PAF a los receptores celulares, siendo el gíngólido A el más activo<sup>10</sup>.



Ácido abiético



Ácido giberélico GA3



Gíngólido A

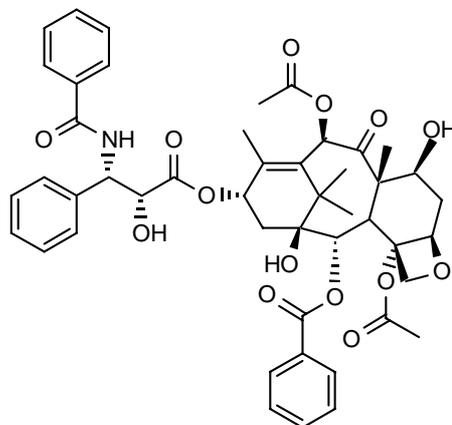
Los taxanos, que resultan de un plegamiento diferencial de GGPP, son diterpenos tricíclicos de los que podemos destacar el taxol<sup>11</sup>, aislado de la corteza de *Taxus brevifolia*, cuyo aislamiento fue el resultado del proyecto de investigación del Instituto Nacional del Cáncer (NCI), en el cual miles de extractos de plantas fueron evaluados para medir la actividad inhibitoria frente a diferentes líneas celulares. El contenido en taxol en especies de *Taxus* es bajo, alrededor del 0.01-0.04%, razón por la cual se recurre a la semisíntesis a partir de la 10-deacetil-baccatina III, que se encuentra en un 0.1% en el extracto de las hojas. La síntesis total del taxol se ha llevado a cabo, pero es demasiado compleja para ser de interés para la industria farmacéutica. El taxol es utilizado como agente quimioterapéutico frente a diferentes tipos de

<sup>9</sup> Braquet, P.; Esanu, A.; Buisine, E.; Hosford, D.; Broquet, C.; Koltai, M. *Med. Res. Rev.* **1991**, 11, 295-355.

<sup>10</sup> Braquet, P.; Hosford, D. *J. Ethnopharmacol.* **1991**, 32, 135-139.

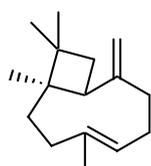
<sup>11</sup> Baloglu, E.; Kingston, D. G. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 1448-1472.

cáncer y actúa estabilizando los microtúbulos e interfiriendo en el equilibrio entre éstos y la tubulina, durante el proceso de división celular<sup>12</sup>.

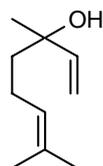


**Taxol**

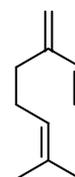
Se han aislado diversos terpenos de especies de *Piper*, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos, siendo poco frecuentes los triterpenos. Así, entre los terpenos más frecuentes se encuentran el  $\beta$ -cariofileno, linalol y mirceno aislados de *P. regnellii*, *P. cernuu*, *P. auritum*, *P. guinense* y *P. cubeba*<sup>13</sup>.



**$\beta$ -Cariofileno**



**Linalol**



**Mirceno**

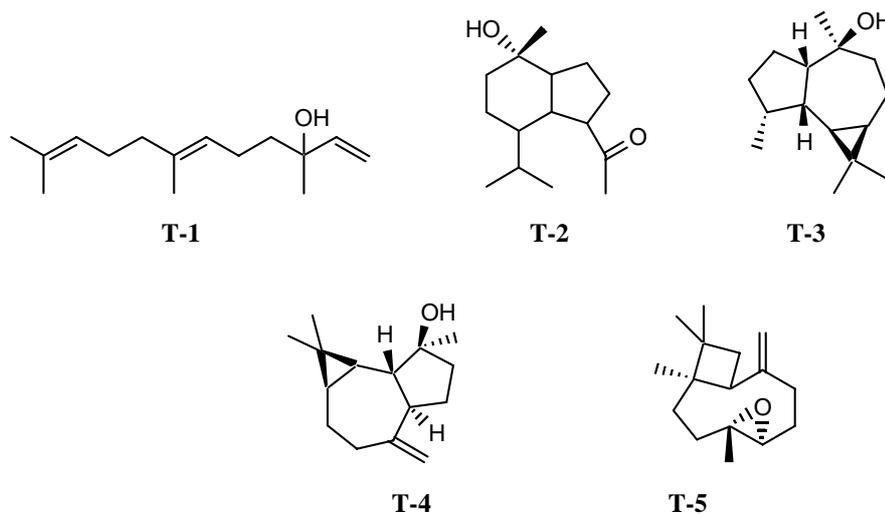
<sup>12</sup> Vyas, D. M.; Kadow, J. F. *Prog. Med. Chem.* **1995**, 32, 289-337.

<sup>13</sup> Costantin, M.B.; Sartorelli, P.; Limberger, R.; Henriques, A. T.; Steppe, M.; Ferreira, M.; Ohara, M. T.; Emerenciano, V. P.; Kato, M. *Planta Med.* **2001**, 67, 771-773.

## Resultados y discusión

Tras repetidas cromatografías del extracto de diclorometano de las hojas de *Piper aduncum*, *P. acutifolium*, *P. glabratum*, *P. heterophyllum*, *P. pilliraneum* y *P. rusbyi*, hemos aislado siete terpenos, que hemos denominado de **T-1** a **T-8** y de los cuales el producto denominado **T-7** resultó nuevo en la bibliografía química.

Los terpenos aislados se agruparon para su estudio de acuerdo a la similitud de sus sistemas carbonados. Teniendo en cuenta esta consideración, los productos que hemos aislado corresponden a un sesquiterpeno lineal, el nerolidol<sup>14</sup> (**T-1**); un sesquiterpeno bicíclico, oplopanona<sup>15</sup> (**T-2**) y los sesquiterpenos tricíclicos, viridiflorol<sup>16</sup> (**T-3**), esfatuleno<sup>17</sup> (**T-4**) y óxido de cariofileno<sup>18</sup> (**T-5**). El compuesto que hemos denominado **T-6** fue identificado como transfitol<sup>19</sup>, un diterpeno y **T-8** se identificó como el  $\beta$ -sitosterol.



Sesquiterpenos aislados de las especies *Piper* estudiadas

<sup>14</sup> Ramos, L. S.; Da Silva, M. L.; Luz, A. I. R.; Zoghi, M.G.B.; Maia, J. G. S. *J. Nat. Prod.* **1986**, 49, 712-713.

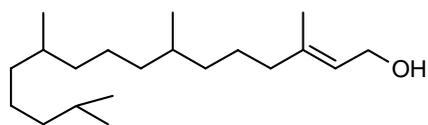
<sup>15</sup> Da Silva, M. H.; Zoghbi, M. G.; Andrade, E. H. A.; Maia, J. G. S.; Museu, P. E. G. *Flav. Frag.* **1999**, 14, 312-314.

<sup>16</sup> San Feliciano, A.; Medarde, M.; Gordaliza, M.; Del Olmo, E.; Miguel del Corral, J. M. *Phytochemistry.* **1989**, 28, 2717-2721.

<sup>17</sup> Fuyihiko, I.; Akira, A. *J. Chem. Soc. Perk T 2.* **1985**, 1773-1778.

<sup>18</sup> Torquillo, H. S.; Pinto, A. C.; Godoy, R. L. O.; Guimaraes, E. F. *J. Essential oil Research.* **1999**, 11, 429-430.

<sup>19</sup> Orjala, J.; Wright A. D.; Erdelmeier C. A. J.; Sticher, O.; Rali T. *Helv. Chim. Acta.* **1993**, 76, 1481-1488.

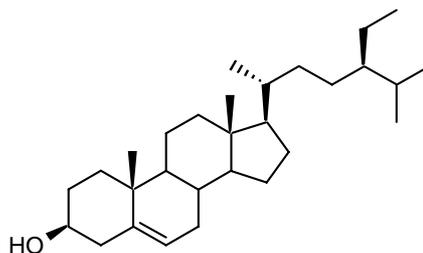


T-6



T-7

### Diterpenos aislados de las especies de *Piper* estudiadas



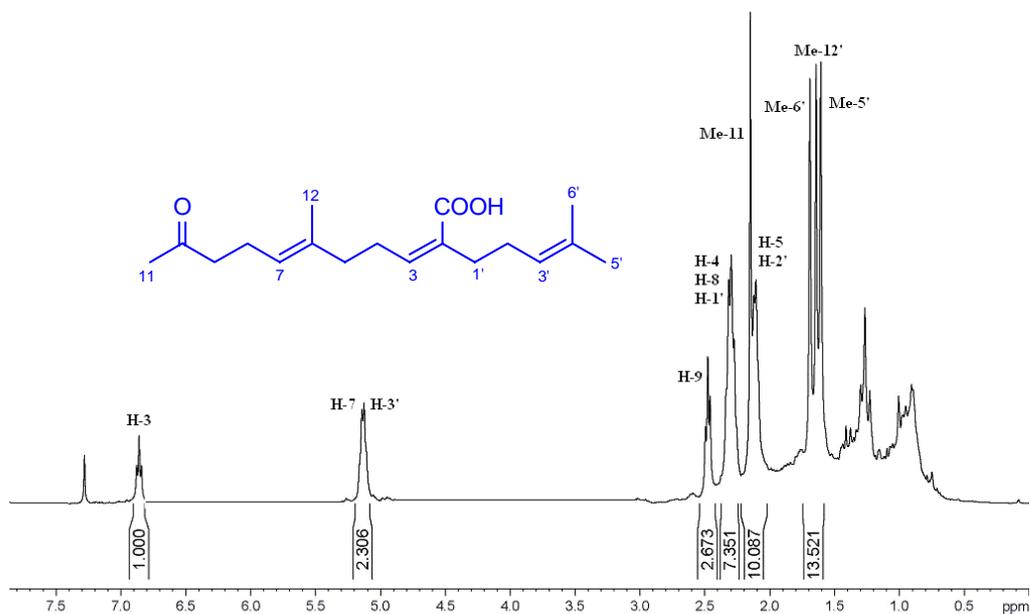
T-8

A continuación pasamos a describir la elucidación estructural del compuestos **T-7**, aislado de *P. heterophyllum*, que resultó nuevo en la bibliografía química.

#### Determinación estructural del producto T-7

En su espectro de masas de baja resolución, el producto que hemos denominado **T-7**, presentó un ión molecular a 292  $m/z$ , que corresponde con una fórmula molecular  $C_{18}H_{28}O_3$  calculada por espectrometría de masas de alta resolución (EMAR), así como un fragmento correspondiente a la pérdida de agua  $[M-H_2O]^+$  a 274  $m/z$ . En el espectro de IR se observaron bandas correspondientes a ácido carboxílico ( $3455-2561\text{ cm}^{-1}$  y  $1698\text{ cm}^{-1}$ ) y grupo carbonilo ( $1711\text{ cm}^{-1}$ ).

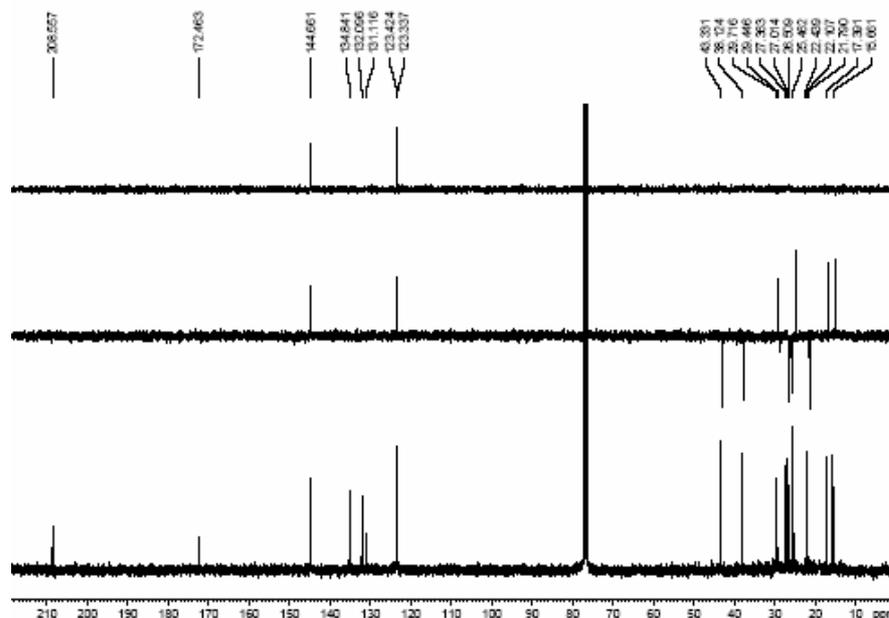
Su espectro de RMN  $^1H$  presentó señales correspondientes a cuatro metilos como singuletes, tres de ellos sobre doble enlace a  $\delta$  1.60 (Me-5'), 1.63 (Me-12) y 1.67 (Me-6') y un metilo en posición  $\alpha$  a un grupo carbonilo a  $\delta$  2.13 (Me-11); señales correspondientes a seis metilenos como dos multiplete a  $\delta$  2.07-2.14 (4H, H-5, H-2') y 2.26-2.33 (6H, H-4, H-8, H-1') y un triplete a  $\delta$  2.47 (2H,  $J= 7.3\text{ Hz}$ , H-9) y señales asignables a tres protones olefínicos a  $\delta$  5.11 (2H, m, H-7, H-3') y  $\delta$  6.85 (1H, t,  $J= 7.3\text{ Hz}$ , H-3).



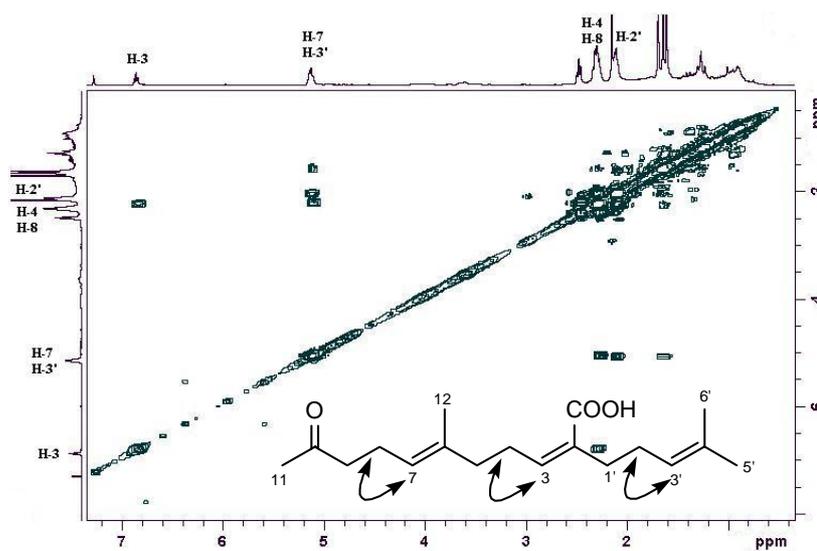
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **T-7**

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  se observaron señales para 18 carbonos, lo que confirmó la fórmula molecular calculada por EMAR, lo que junto con los experimentos DEPT 90 y 135 establecen la presencia en la molécula de cuatro metilos a  $\delta$  15.7 (c, C-12),  $\delta$  17.4 (c, C-5'),  $\delta$  25.5 (c, C-6') y  $\delta$  29.7 (c, C-11), seis metilenos a  $\delta$  22.1 (t, C-8),  $\delta$  26.5 (t, C-1'),  $\delta$  27.0 (t, C-4),  $\delta$  27.4 (t, C-2'),  $\delta$  38.1 (t, C-5) y  $\delta$  43.3 (t, C-9); tres metinos a  $\delta$  123.3 (d, C-7),  $\delta$  123.4 (d, C-3') y  $\delta$  144.7 (d, C-3) y cinco carbonos cuaternarios a  $\delta$  131.1 (s, C-2),  $\delta$  132.1 (d, C-4'),  $\delta$  134.8 (s, C-6),  $\delta$  172.5 (s, C-1) y  $\delta$  208.5 (s, C-10).

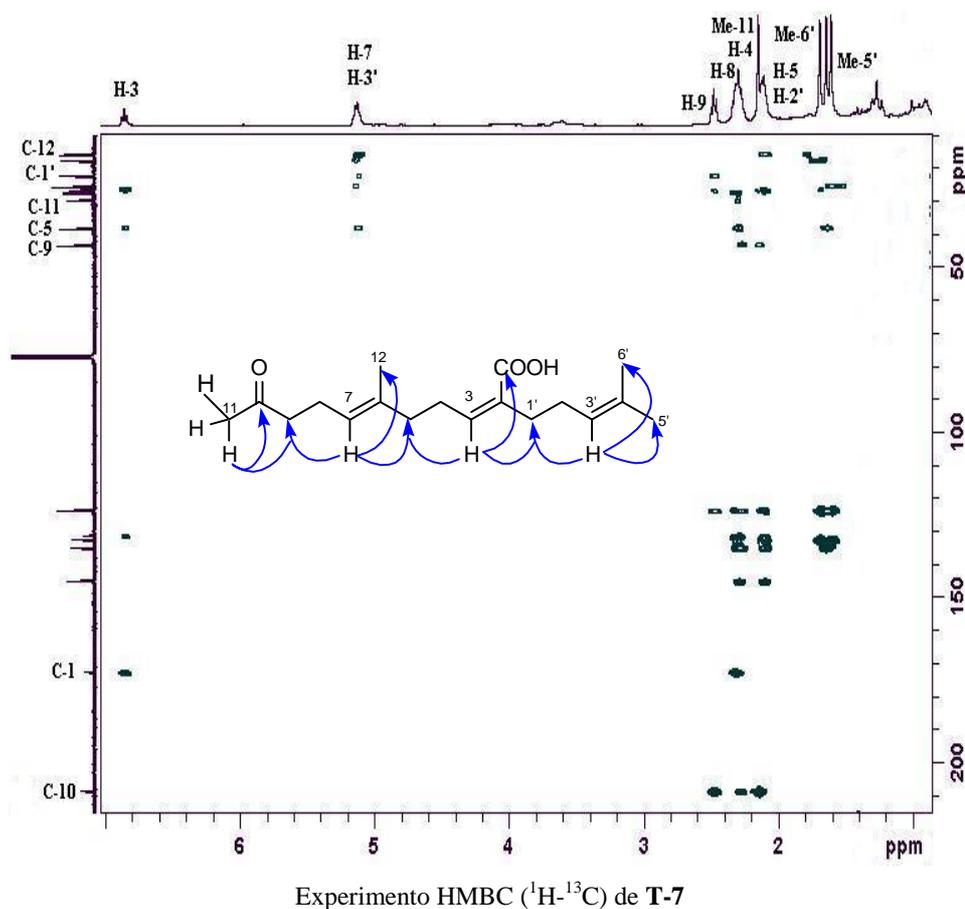
El conjunto de estos datos están de acuerdo con una estructura para el compuesto **T-7** de terpeno con dieciocho átomos de carbono, que posee una metilcetona, un ácido carboxílico y tres dobles enlaces trisustituidos en su estructura.

Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) de T-7

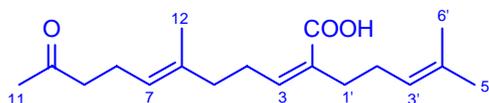
Un cuidadoso estudio de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y de los experimentos bidimensionales  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC), nos permitieron asignar las señales correspondientes a los protones existentes en la molécula y correlacionar cada átomo de carbono con sus respectivos protones. Así, el experimento COSY reveló acoplamiento entre los protones H-7 y H-8, entre H-3 y H-4, y correlaciones entre H-2' y H-3'.

Experimento COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) de T-7

La localización de los grupos funcionales y la conexión de las diferentes unidades de isopreno en la molécula, se estableció por las correlaciones detectadas en un experimento HMBC. Así, se observó correlación a larga distancia entre los protones del metilo Me-11 ( $\delta$  2.13) y los carbonos C-9 ( $\delta$  43.3) y C-10 ( $\delta$  208.5); correlación del protón vinílico H-7 ( $\delta$  5.11) con los carbonos C-5 ( $\delta$  38.1), C-9 y C-12 ( $\delta$  15.7); correlación entre el protón H-3 ( $\delta$  6.85) y los carbonos C-1 ( $\delta$  172.5), C-1' ( $\delta$  26.5) y C-5, y del protón olefinico H-3' ( $\delta$  5.11) con los carbonos C-1', C-4' ( $\delta$  132.1), C-5' ( $\delta$  17.4) y C-6' ( $\delta$  25.5), lo que nos permitió conectar las tres unidades de isopreno y de la metilcetona.



La estereoquímica relativa de los dobles enlaces  $\Delta^{2,3}$  y  $\Delta^{6,7}$  se estableció mediante un experimento ROESY, donde se observó efecto ROE entre los protones H-3 y H-7 con los protones H-1' y H-5, respectivamente. El análisis de estos datos nos permitieron establecer de forma inequívoca la estructura de **T-7** como el **ácido (2Z,6E)-6-metil-2-(4-metil-3-pentenil)-10-oxo-2,6-undecadienoico**.

**DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS****Producto T-7: Ácido (2Z,6E)-6-metil-2-(4-metil-3-pentenil)-10-oxo-2,6-undecadienoico.**

Aislado como un aceite color amarillo (15.1 mg).

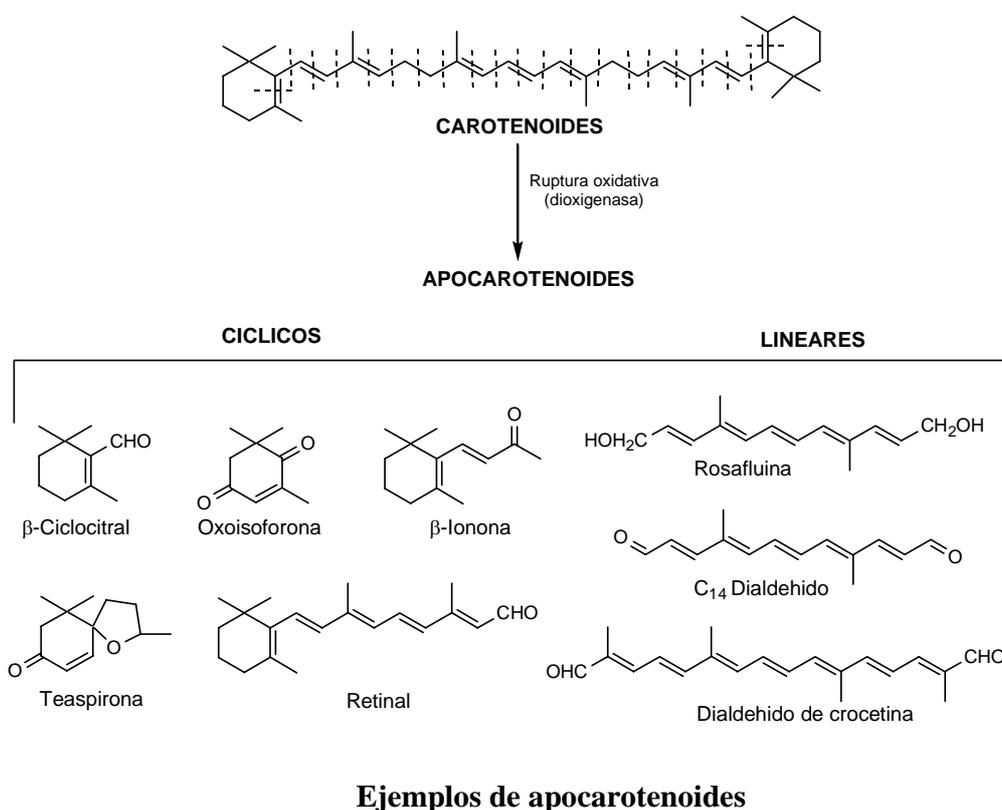
 $[\alpha]_D^{25}$ : +1.2° (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>).**IR<sub>v</sub>max (película):** 3455-2561, 2958, 2931, 2871, 1711, 1698, 1642, 1450, 1376, 1269, 1166, 772 cm<sup>-1</sup>.**RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>):** 1.60 (3H, s, H-5'); 1.63 (3H, s, H-12); 1.67 (3H, s, H-6'); 2.07-2.14 (4H, m, H-5, H-2'); 2.13 (3H, s, H-11); 2.26-2.33 (6H, m, H-4, H-8, H-1'); 2.47 (2H, t, *J*= 7.3 Hz, H-9); 5.11 (2H, m, H-7, H-3'); 6.85 (1H, t, *J*= 7.3 Hz, H-3).**RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>):** 15.7 (c, C-12); 17.4 (c, C-5'); 22.1 (t, C-8); 25.5 (c, C-6'), 26.5 (t, C-1'), 27.0 (t, C-4); 27.4 (t, C-2'); 29.7 (c, C-11); 38.1 (t, C-5), 43.3 (t, C-9); 123.3 (d, C-7); 123.4 (d, C-3'); 131.1 (s, C-2); 132.1 (s, C-4'); 134.8 (s, C-6); 144.7 (d, C-3); 172.5 (s, C-1); 208.5 (s, C-10).**EM *m/z* (%):** 292 [M<sup>+</sup>] (2), 274 (10), 223 (8), 205 (10), 166 (9), 150 (23), 125 (19), 107 (24), 81 (28), 69 (100).**EM de alta resolución:** Calculado para C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>, 292.2038; observado, 292.2031.

*Apocarotenos*

## APOCAROTENOS

### Introducción

Los carotenoides son pigmentos tetraterpénicos, acumulados en los plástidos de las hojas, flores y frutas, donde contribuyen a los colores rojo, naranja y amarillo<sup>1</sup>. El nombre de caroteno se adopta universalmente para designar los tetraterpenos (C<sub>40</sub>) y refleja el descubrimiento de miembros de esta clase en la zanahoria, *Daucus carota*, en el siglo XIX. Además de su papel en las plantas como pigmentos y colorantes, los carotenoides contribuyen a la salud del hombre por sus propiedades antioxidantes, disminuyendo el riesgo de contraer diversas enfermedades, particularmente algunos tipos de cáncer<sup>2,3</sup>.



<sup>1</sup> Gil Ruiz, P. *Productos Naturales*. **2002**, Universidad Pública de Navarra, Navarra, Pamplona, 116-120.

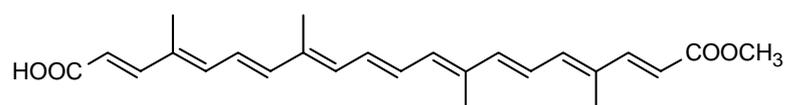
<sup>2</sup> Abdullaev, F. I.; Espinosa-Aguirre, J. J. *Cancer Detect. Prev.* **2004**, 28, 426-432.

<sup>3</sup> Krinsky, N. I.; Johnson, E. J. *Mol. Aspects. Med.* **2005**, 26, 459-516.

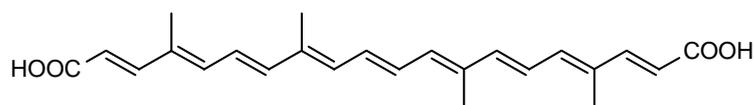
Durante la última década, el papel de los carotenoides como precursores de moléculas aromáticas denominadas apocarotenoides se ha hecho evidente<sup>4</sup>. Los apocarotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y la variedad de los mismos resulta de sus numerosos precursores, así se han identificado más de 600 apocarotenoides. La formación de estos puede ser el resultado de mecanismos no específicos, tales como la oxidación vía lipooxigenasas o la fotooxidación, o bien mediante mecanismos donde dioxigenasas específicas participan en la formación de compuestos tales como la vitamina A y los compuestos aromáticos y pigmentos<sup>5,6</sup>.

Los apocarotenoides en las plantas están implicados en procesos de regulación del crecimiento, en la pigmentación, sabor y aroma de las mismas. Así mismo, son compuestos de defensa actuando como repelentes o atrayentes de insectos, e incluso poseen propiedades antibacterianas y fungicidas<sup>7</sup>.

Numerosos apocarotenoides presentan interés económico, como es por ejemplo la bixina, aislado de las semillas de *Bixa orellana*, que es utilizado como colorante alimenticio natural y de forma similar, la crocetina, carotenoide encontrado en los pistilos de *Crocus sativus*, es el principal pigmento del azafrán.



**Bixina**



**Crocetina**

<sup>4</sup> Giuliano, G.; Al-Babili, S.; Von Lintig, J. *Trends Plant Sci.* **2003**, 8, 145-149.

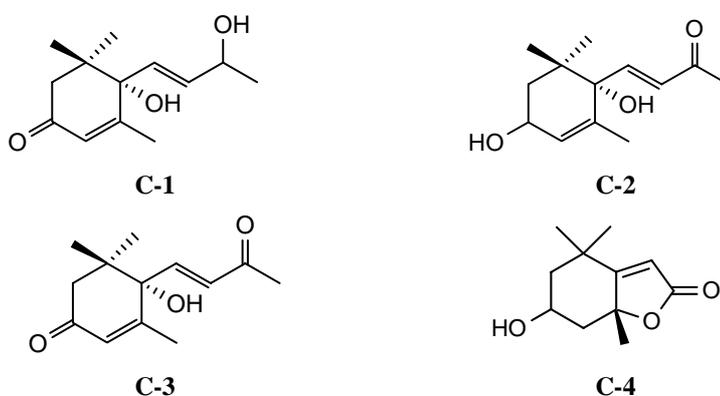
<sup>5</sup> Von Lintig, J.; Vogt, K. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 11915-11920.

<sup>6</sup> Méndez-Robles, M. D.; Permady, H. H.; Jaramillo-Flores, E.; Lugo-Cervantes, C.; Canales-Aguirre, A. A.; López-Dellamary, F.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Tamariz, J. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 1140-1144.

<sup>7</sup> Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach.* **2002**, John Wiley and Sons, Ltda., UK, 230-231.

## Resultados y discusión

Tras repetidas cromatografías del extracto de diclorometano de las hojas de *Piper aduncum*, *P. acutifolium* y *P. elongatum*, hemos aislado cuatro apocarotenoides cíclicos, que hemos denominado de **C-1** a **C-4**, los cuales habían sido descritos previamente en la bibliografía química y cuyas estructuras fueron identificadas, basándonos en sus datos espectroscópicos y comparación con los existentes en la bibliografía química como: blumenol A<sup>8</sup> (**C-1**), (-)-boscialina<sup>9</sup> (**C-2**), dehidrovomifoliol<sup>10</sup> (**C-3**) y loliolida<sup>11</sup> (**C-4**).



### Apocarotenoides aislados de las especies de *Piper* estudiadas

Cabe destacar que los apocarotenoides son un grupo de compuestos poco frecuentes en especies del género *Piper* y en general en la familia Piperaceae. Sólo se ha descrito el aislamiento de un norisoprenoide, blumenol A, en dos especies de *Piper*, *P. elongatum* y *P. taiwanense*. Ello nos indica que el aislamiento de los apocarotenoides, boscialina, dehidrovomifoliol y loliolide de las especies de *Piper aduncum*, *P. acutifolium* y *P. elongatum* constituye una novedad que podría tener implicaciones quimiotaxonómicas.

<sup>8</sup> González, A. G.; Guillermo, J. A.; Ravelo, A. G.; Jiménez, I. A. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 400-402.

<sup>9</sup> Pauli, N.; Séquim, U.; Walter, A. *Helv. Chim. Acta.* **1990**, 73, 578-582.

<sup>10</sup> Mori, K. *Tetrahedron.* **1974**, 30, 1065-1072.

<sup>11</sup> Kimura, J.; Maki, N. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 57-58.

*Amidas*

## AMIDAS

### Introducción

Los alcaloides poseen una diversidad estructural y exhiben una gama de actividades biológicas como ningún otro grupo de productos naturales. Aunque muchos de los alcaloides clásicos fueron aislados y caracterizados hace muchas décadas, se siguen extrayendo y aislando continuamente nuevos compuestos de esta naturaleza. Hoy en día se conocen alrededor de doce mil estructuras y como promedio se describe en la bibliografía un nuevo alcaloide cada día. Se encuentran sobre todo en las plantas, aunque también se han aislado en menor extensión de microorganismos y animales.

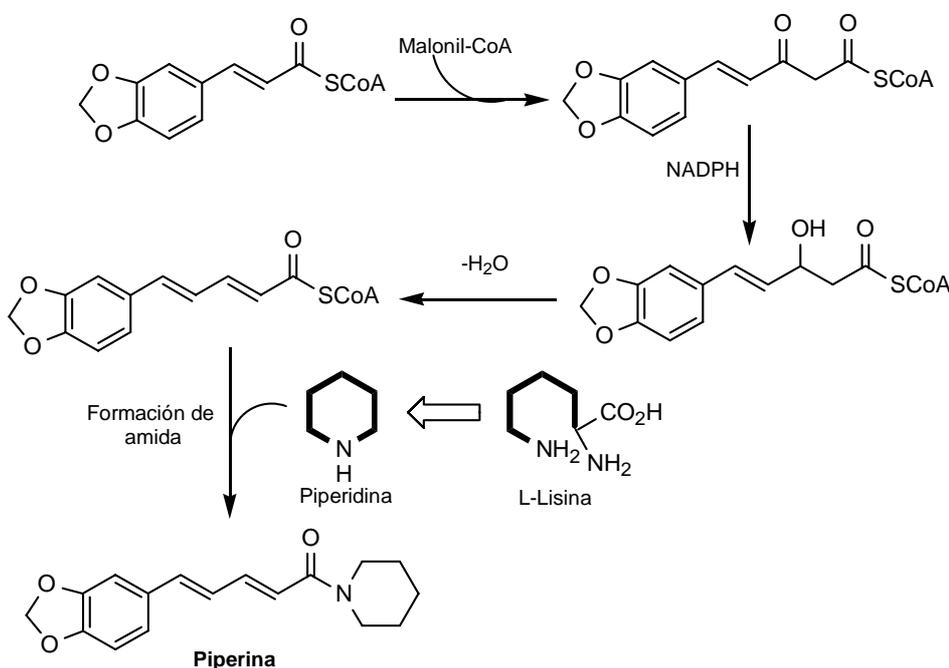
De los miles de alcaloides conocidos la mayoría está presente en las plantas y se calcula que el 40% de todas las familias de plantas tienen al menos una especie que contiene alcaloides, siendo importante su contenido en las leguminosas y las solanáceas, pero poco frecuentes en las gimnospermas, los helechos y las monocotiledoneas<sup>1</sup>. Los alcaloides pueden estar presentes en toda la planta o restringido a ciertos tejidos, como la raíz o la corteza y su concentración puede variar entre el 0.1 y el 12% del peso seco. Los alcaloides se acumulan principalmente en los tejidos de gran actividad (crecimiento), almacenándose frecuentemente en lugares distintos al de su biosíntesis. Cada especie adapta el sistema de biosíntesis a sus necesidades, dinámica que se manifiesta en las oscilaciones en el contenido de alcaloides a lo largo del día, siendo un buen ejemplo de ello las variaciones en la cantidad de morfina del látex de las cápsulas jóvenes de "la adormidera", que por la mañana es mayor que en el resto del día. En cuanto a la función de los alcaloides en la planta, se cree que sirven de protección frente a herbívoros y al mismo tiempo como almacén de reserva de nitrógeno.



<sup>1</sup> Samuelsson, G. *Drugs of Natural Origin*. 1999, Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, Sweden, 415-417.

Químicamente los alcaloides son compuestos nitrogenados con uno o más átomos de nitrógeno, que puede estar presente como amina primaria, secundaria o terciaria. Se clasifican de acuerdo a la naturaleza del tipo de heterociclo de nitrógeno presente en su estructura, como por ejemplo los derivados de pirrolidina, piperidina, quinolina, isoquinolina, indol, etc, mientras que a medida que aumenta su complejidad, se incrementa el número de subdivisiones. El átomo de nitrógeno del aminoácido del cual proviene se mantiene intacto en la estructura del alcaloide, mientras que el carbono carboxílico frecuentemente se pierde por descarboxilación.

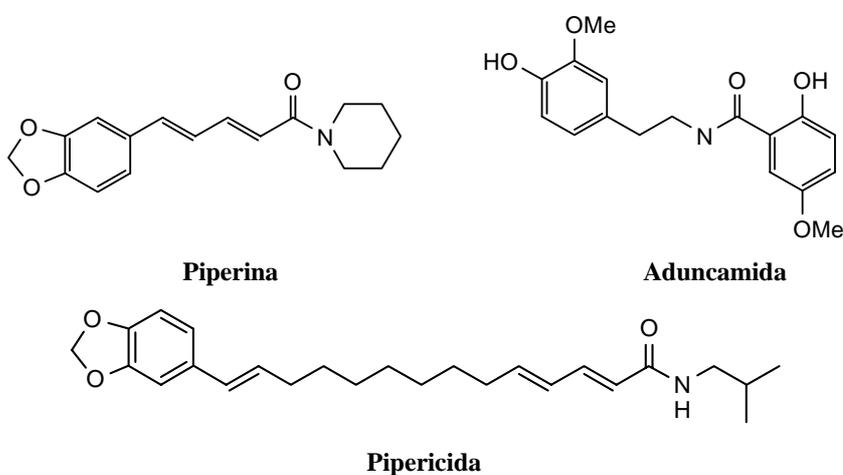
Así por ejemplo la ruta de biogénesis de la **piperina** es mixta. El anillo de piperidina se forma a partir del aminoácido lisina, que por descarboxilación genera la cadaverina y posterior desaminación oxidativa conduce al aminoaldehído, cuya ciclación da lugar a la formación de la piperidina. Esta se condensa con el éster de la coenzima A (CoA) del ácido pipérico, que deriva de la ruta del sikímico, siendo su precursor el cinamoil-CoA, que se condensa con una unidad de malonil-CoA<sup>2</sup>.



### Ruta biogénica de la piperina

<sup>2</sup> Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*. 2002, 308-309, John Wiley and Sons, Ltda., UK.

Los alcaloides tipo piperidina están presentes en diversas especies del género *Piper*, siendo un ejemplo clásico la **piperina**, en cuya estructura el anillo de piperidina forma parte de una amida terciaria, lo que disminuye apreciablemente sus propiedades básicas. La **piperina**<sup>3</sup>, primera amida aislada de *P. nigrum*, es responsable del sabor picante de los frutos de la pimienta negra y presenta numerosas actividades farmacológicas, como son depresor del sistema nervioso central, antipirética, analgésica y antiinflamatoria. La **aduncamida**, aislada de *P. aduncum*, muestra actividad antibacteriana frente a *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus*<sup>4</sup> y citotóxica, mientras que **pipericida**, aislada también de *P. nigrum*, presenta actividad insecticida y larvicida.



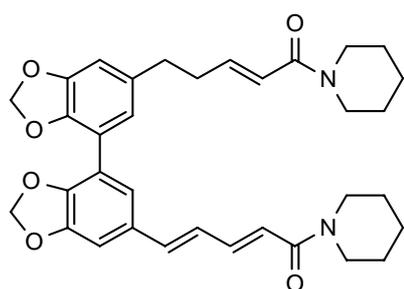
En los últimos años las amidas han generado interés como resultado de sus propiedades insecticidas y antifúngicas. Así, podemos citar a pipsaedina, pipbinina<sup>5</sup>, pipgularina, pipzorina y piptahsina<sup>6</sup>, aisladas de las semillas de *P. nigrum*, con potencial actividad insecticida frente a larvas de *Aedes aegypti*, mosquito que transmite el virus (*Flavivirus dengue*) causante del dengue.

<sup>3</sup> Tunman, O. *Apotheker Zeitung*. **1918**, 33, 353 (Chemical Abstract, 19, 2940).

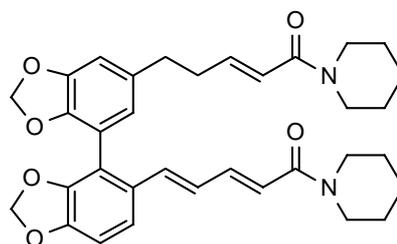
<sup>4</sup> Orjala, J.; Wright, A. D.; Rali, T.; Shiter, O. *Nat. Prod. Lett.* **1993**, 2, 231-236.

<sup>5</sup> Siddiqui, B. S.; Gulzar, T.; Begum, S.; Afshan, F.; Sattar, F. A. *Helv. Chim. Acta.* **2004**, 87, 660-666.

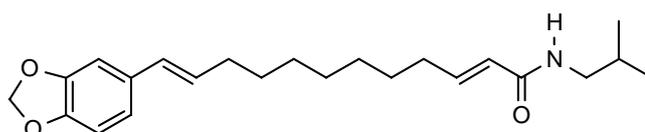
<sup>6</sup> Siddiqui, B. S.; Gulzar, T.; Begum, S.; Rasheed, M.; Sattar, F. A.; Afshan, F. *Helv. Chim. Acta.* **2003**, 86, 2760-2767.



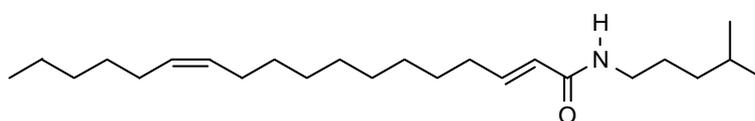
**Pipsaecedina**



**Pipbinina**

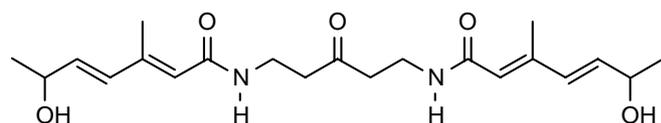


**Pipgulzarina**

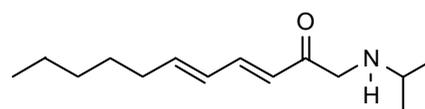


**Pipzorina**

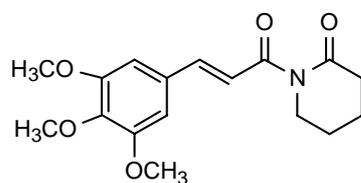
Por otra parte, arboreumina<sup>7</sup>, pellitorina, piplartina, piptartine y piperina<sup>8</sup>, aisladas de diferentes especies de *Piper* (*P. arboreum*, *P. tuberculatum* y *P. hispidum*), poseen actividad antifúngica frente a *Cladosporium sphaerospermum* y *C. cladosporioides*.



**Arboreumina**



**Pellitorina**

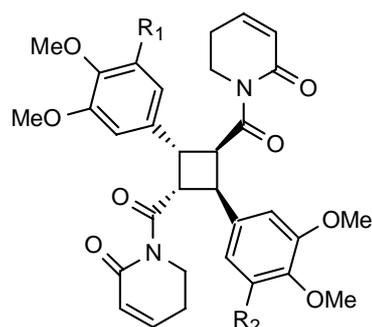


**Piplartina**

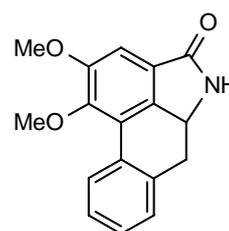
<sup>7</sup> Vasques da Silva, R.; Navickiene, H. M. D.; Kato, M. J.; Bolzani, V. S.; Meda, C. I.; Young, M. C.; Furlan, M. *Phytochemistry*. **2002**, 59, 521-527.

<sup>8</sup> Navickiene, H. M. D.; Alecio, A. C.; Kato, M. J.; Bolzani, V. S.; Young, M. C.; Cavalheiro, J. A.; Furlan, M. *Phytochemistry*. **2000**, 55, 621-626.

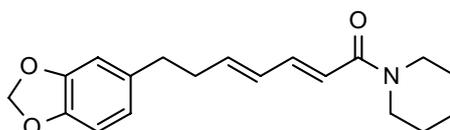
Se han aislado numerosas amidas de especies de la familia Piperaceae que poseen una gran diversidad estructural, presentando unidades de isobutilo, pirrolidina, dihidropirolidona o piperidina en su estructura. Así, podemos destacar por sus características estructurales las piperarboreninas A y B<sup>9</sup>, aisladas de *Piper arborescens*, así como cefaranona B, piperdardina<sup>10</sup> y pellitorina<sup>11</sup>, aisladas de los frutos de *P. tuberculatum*.



**Piperarboreninas A y B**



**Cefaranona B**



**Piperdardina**

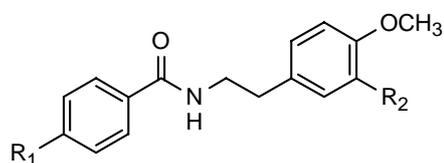
<sup>9</sup> Lee, F. P.; Chen, Y. Ch.; Chen, J. J.; Tsai, I. L.; Chen, I. S. *Helv. Chim. Acta.* **2004**, 87, 463-468.

<sup>10</sup> Araujo-Junior, J. X.; Chaves, M. C. O.; da-Cunha, E. V. L.; Gray, A. I. *Biochem. Syst. Ecol.* **1999**, 27, 325-327.

<sup>11</sup> Da-Cunha, E. V. L.; Oliveira, M. C. *Fitoterapia.* **2001**, 72, 197-199.

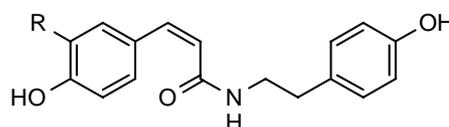
## Resultados y discusión

Tras repetidas cromatografías del extracto de diclorometano de las hojas de *Piper elongatum* y *P. glabratum*, hemos aislado cuatro amidas, que denominamos de **A-1** a **A-4**, los cuales habían sido descritos previamente en la bibliografía química y cuyas estructuras fueron identificadas basándonos en sus datos espectroscópicos y comparación con los existentes en la bibliografía química como: 4-metoxi-*N*-[2-(4-metoxi-5-hidroxi-fenil)-etil]-benzamida (**A-1**)<sup>12</sup>, 4-hidroxi-*N*-[2-(4-metoxi-fenil)-etil]-benzamida (**A-2**)<sup>12</sup>, *N*-*cis*-feruloil-tiramina<sup>13</sup> (**A-3**) y *N*-*p*-cumaroil-tiramina<sup>13</sup> (**A-4**).



**A-1** R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH

**A-2** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = H



**A-3** R = OCH<sub>3</sub>

**A-4** R = H

### Amidas aisladas de *Piper elongatum* y *P. glabratum*

Cabe destacar que mientras los compuestos **A-3** y **A-4** son frecuentes en especies del género *Piper*, **A-1** y **A-2** se describen en esta Memoria por primera vez como aisladas de una de fuente natural.

<sup>12</sup>Barbosa, F. J. M.; Da silva, E. C.; Bhattacharyya, J. *Química Nova*. **1990**, 13, 332-334.

<sup>13</sup>Fukuda, N.; Yonemitsu, M.; Kimura, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, 31, 156-160.

## ***6. TÉCNICAS EXPERIMENTALES***

## Técnicas espectroscópicas y espectrométricas

### Espectroscopía infrarroja (IR)

Los espectros de infrarrojo se realizan con los productos en disolución clorofórmica en película sobre pastillas de NaCl. Se usa el espectrofotómetro Bruker IFS 55 (FTIR). Los valores de  $\nu$  se expresan en  $\text{cm}^{-1}$ .

### Espectroscopía ultravioleta (UV)

Los espectros de ultravioleta se efectúan con el producto disuelto en etanol en una celda de cuarzo de 1 mL de volumen y con un paso de luz de 10 mm. Se utiliza el aparato Jasco V-560. Los valores de la longitud de onda de absorción ( $\lambda$ ) de la muestra se expresan en nm.

### Rotación óptica ( $[\alpha]_D$ )

La determinación del valor de la actividad óptica se realiza en polarímetros Perkin Elmer, modelos 241 y 343, usando la línea D del sodio a 20°C, respectivamente. Para la realización de la medida el producto se disuelve en cloroformo seco, en una célula de 1 ml de volumen y 1 dm de paso de luz. La concentración está expresada en gramos por 100 ml de disolución.

### Espectrometría de masas de baja resolución (EM)

La realización de los espectros de masas de baja resolución se llevan a cabo en espectrómetros Hewlett Packard 5995 o VG Micromass ZAB-2F.

### Espectrometría de masas de alta resolución (EMAR)

La determinación de las fórmulas moleculares, fragmentos y/o iones moleculares, se realizan en espectrómetros VGMicromass ZAB-2F (a potenciales de ionización de 15–70 eV) o Fisons Instruments VG Autospec.

### Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT y bidimensionales se realiza en los espectrómetros Bruker Avance 300 (300 MHz) y Bruker Avance 400 (400 MHz). Los productos se disuelven en un disolvente deuterado, preferiblemente si el producto es soluble, en cloroformo deuterado,

$\text{CDCl}_3$ , que contiene tetrametilsilano (TMS), como referencia interna. El uso de uno u otro disolvente deuterado está en función de la solubilidad del producto en el mismo. Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hz.

Los experimentos bidimensionales se realizan con los programas COSY, ROESY, HSQC y HMBC, suministrados por la casa Bruker.

#### Dicroísmo circular (DC)

El espectro de dicroísmo circular se realiza en un espectropolarímetro Jasco J-600, usando células circulares de cuarzo de 1 cm de longitud. El disolvente utilizado fue acetonitrilo grado espectrofotométrico.

### **Técnicas cromatográficas**

#### Cromatografía en capa fina (CCF)

Las cromatografías en capa fina se realizan sobre cromatofolios (20 x 20 cm) de gel de sílice tipo G de 0.25 mm de espesor, con indicador de fluorescencia a 254 nm, de la empresa Macherey-Nagel Sil G/UV<sub>254</sub>. La detección de los productos sobre las placas se realiza por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y/o 360 nm, o bien pulverizando óleum (disolución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 4%,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 80%,  $\text{H}_2\text{O}$ , 16%) y posterior calentamiento a 120°C.

#### Cromatografía preparativa en capa fina (CPCF)

Se utilizan placas (20 x 20 cm) de 1 mm de espesor de gel de sílice tipo G, con indicador de fluorescencia a 254 nm, de la empresa Macherey-Nagel Sil G-100 UV<sub>254</sub>. La cantidad de muestra a sembrar en estas placas es de unos 40 mg, usándose para la elución diferentes mezclas de disolventes.

La detección de los productos sobre las placas se realiza por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y/o 360 nm, o bien pulverizando óleum sobre el borde, después de proteger convenientemente el resto de la placa con una lámina de vidrio y posterior calentamiento de la zona tratada con una pistola de calor.

### Cromatografía en capa fina de alta resolución (CCFAR)

Se utilizan placas (10 x 10 cm) de 1 mm de espesor de gel de sílice de 60, con indicador de fluorescencia a 254 nm, de la empresa Macherey-Nagel NANO-SIL 20 UV<sub>254</sub>. La resolución de estas placas es mayor que las anteriores y la cantidad a sembrar es entorno a 10 mg, usándose para la elución diferentes mezclas de disolventes.

La detección de los productos sobre las placas se realiza por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y/o 360 nm, o bien pulverizando oleum sobre el borde, después de proteger convenientemente el resto de la placa con una lámina de vidrio y posterior calentamiento de la zona tratada con una pistola de calor.

### Cromatografía en columna (CC)

En la realización de columnas cromatográficas (secas y húmedas) se emplea gel de sílice fina (0.063–0.200 nm de diámetro), de la empresa Macherey-Nagel. Las columnas secas se montan aplicando vacío a la columna mientras se carga lentamente con gel de sílice. La mezcla a resolver se coloca en la parte superior de la columna, adsorbida en gel de sílice gruesa (0.2–0.5 nm de diámetro) de la empresa Merck. Las columnas húmedas se montan con gel suspendido en un disolvente, con posterior compactación por presión, colocando la muestra a resolver disuelta en la mínima cantidad de disolvente.

### Cromatografía líquida al vacío (CLV)

En la realización de las columnas cromatográficas se emplea gel de sílice fina (0.063–0.200 nm de diámetro) de la empresa Macherey-Nagel. Las columnas se montan aplicando vacío, mientras se carga lentamente con gel de sílice. La mezcla a resolver se coloca en la parte superior de la columna, adsorbida en gel de sílice gruesa (0.2–0.5 nm de diámetro) de la empresa Merck. La cromatografía se realiza aplicando vacío, el cual proporciona un aumento de la velocidad del flujo de la fase móvil y las fracciones se recogen en un matraz de fondo redondo.

### Cromatografía de exclusión molecular (CEM)

Se usa como soporte Sephadex LH-20, que suministra la empresa Sigma y se requiere una previa estabilización del polímero en suspensión con metanol (4.1 ml/gr) durante, al menos, doce horas. A continuación, se vierte en la columna y se deja reposar durante una hora,

aproximadamente. Esta columna se estabiliza posteriormente en la mezcla que se va a usar como eluyente, tres veces la cantidad correspondiente al volumen muerto. El eluyente que se utiliza es *n*-hexano–cloroformo–metanol (2:1:1). La muestra a cromatografiar tras ser filtrada se coloca en la cabeza de la columna, disuelta en una cantidad de eluyente no superior al 5% del volumen muerto de la columna. La columna puede ser reutilizada tras ser lavada con metanol y estabilizada con el eluyente que se va utilizar.

## **Estudio fitoquímico**

### Recolección del material vegetal

Las plantas fueron recolectadas en las regiones del Alto Beni (Prov. Abel Iturralde) e Irupana (Prov. Sud Yungas) del Departamento de La Paz, Bolivia, por la Dra. Genevieve Bourdy, como parte del proyecto "Conservación Ambiental a través de la Valoración Etnobotánica y Etnofarmacológica en Bolivia II: Etnia Tacana". *Piper aduncum*, *P. acutifolium*, *P. elongatum* y *P. rusbyi* fueron recolectadas en el mes de septiembre del 2000, mientras el resto de las especies estudiadas se recolectaron en septiembre del año 2002. Las muestras de herbario correspondientes a *P. aduncum* (GB-1578), *P. acutifolium* (GB-1640), *P. elongatum* (GB-1644), *P. glabratum* (GB-1877), *P. heterophyllum* (GB-1922), *P. pilliraneum* (GB-1716) y *P. rusbyi* (GB-1614) fueron depositadas en el Herbario Nacional de La Paz, Bolivia y la identificación fue realizada por el botánico Ricardo Callejas-Posada (Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia).

### Preparación de los extractos

El material vegetal seco y molido fue extraído mediante maceración con etanol (70%) durante 48 horas a temperatura ambiente. El residuo obtenido al evaporar el disolvente se resuspendió en agua y se extrajo tres veces con diclorometano, obteniéndose así una fracción soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y una fracción acuosa. La fracción orgánica se llevó a sequedad, obteniéndose el extracto de diclorometano, mientras que la fracción acuosa fue congelada a -50 °C y liofilizada. Ambos extractos fueron evaluados por su actividad leishmanicida, resultando activos los extractos de diclorometano de todas las especies estudiadas.

### Fraccionamiento bioguiado

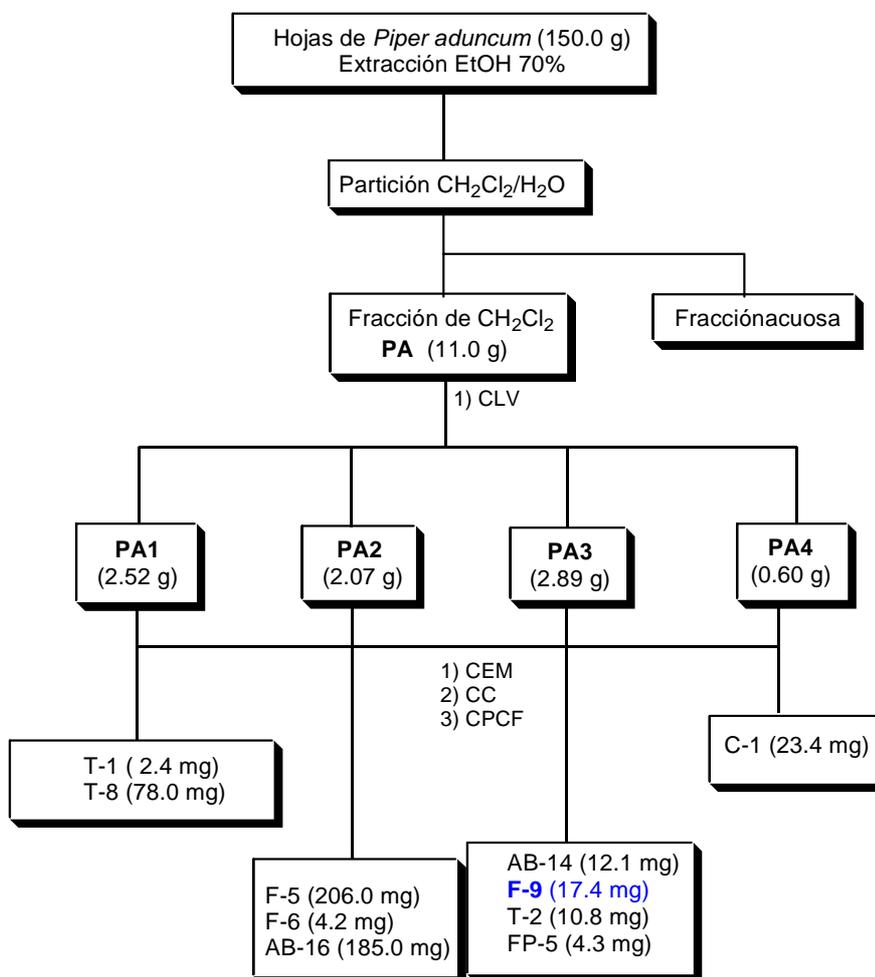
Posteriormente, cada uno de los extractos de diclorometano fueron fraccionado por cromatografía líquida a vacío (CLV), usando como sistema de elusión mezclas de *n*-hexano-Acetato de tilo, en orden creciente de polaridad obteniéndose así numeras fracciones (Según se detalla en cada esquema para cada especie vegetal). Estas fracciones fueron evaluadas frente a tres cepas de *Leishmania*, y la fracción activa en cada una de las especies fue sometida a sucesivas cromatografía, al objeto de aislar e identificar los metabolitos secundarios presentes en dicha fracción.

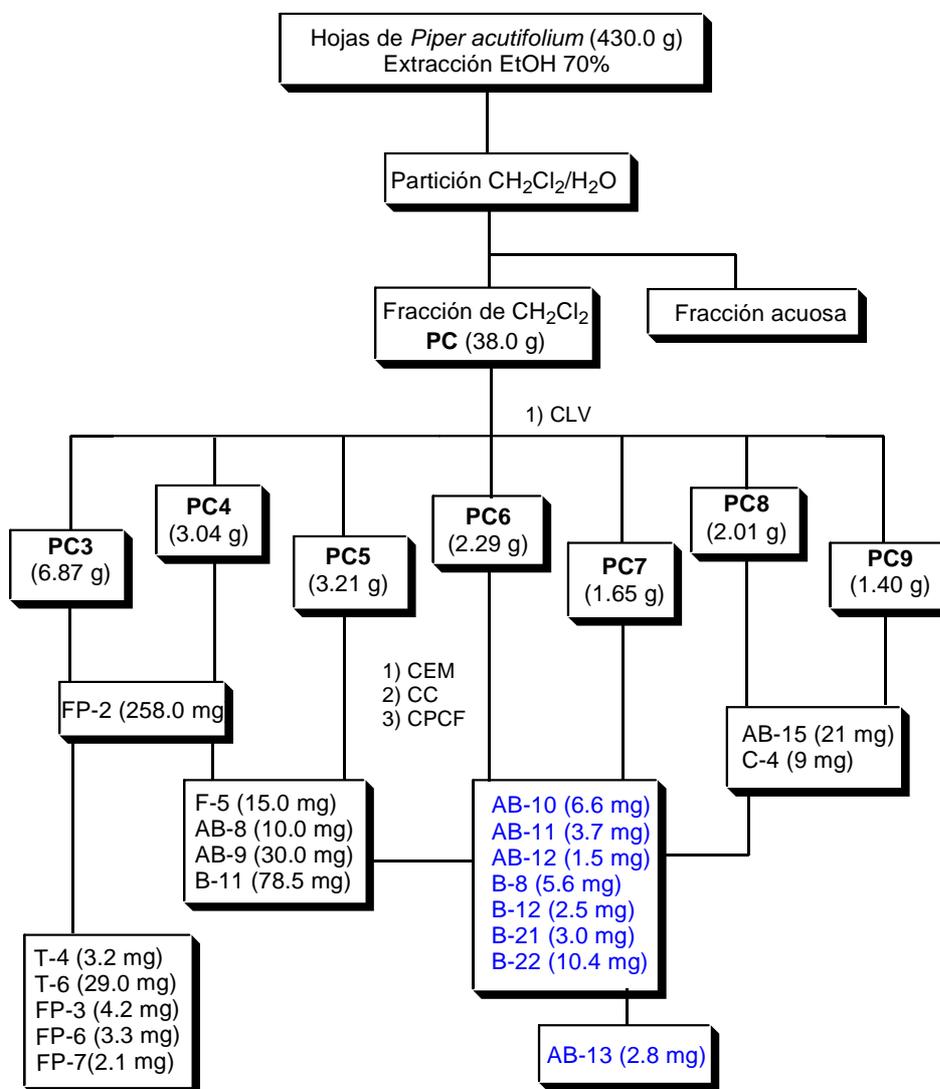
Las restantes fracciones fueron recromatografiadas utilizando cromatografía de exclusión molecular en Sephadex LH-20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH, 1:1), cromatografía flash, cromatografía en placa preparativa y cromatografía en capa fina, usando como eluyente diferentes mezclas de AcOEt, *n*-hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Me<sub>2</sub>CO, Et<sub>2</sub>O, etc para aislar e identificar los metabolitos presentes en estas fracciones.

Los diferentes metabolitos que se describen en la presente Memoria fueron aislados de las fracciones activas y/o de aquellas que resultaron inactivas en los ensayos biológicos.

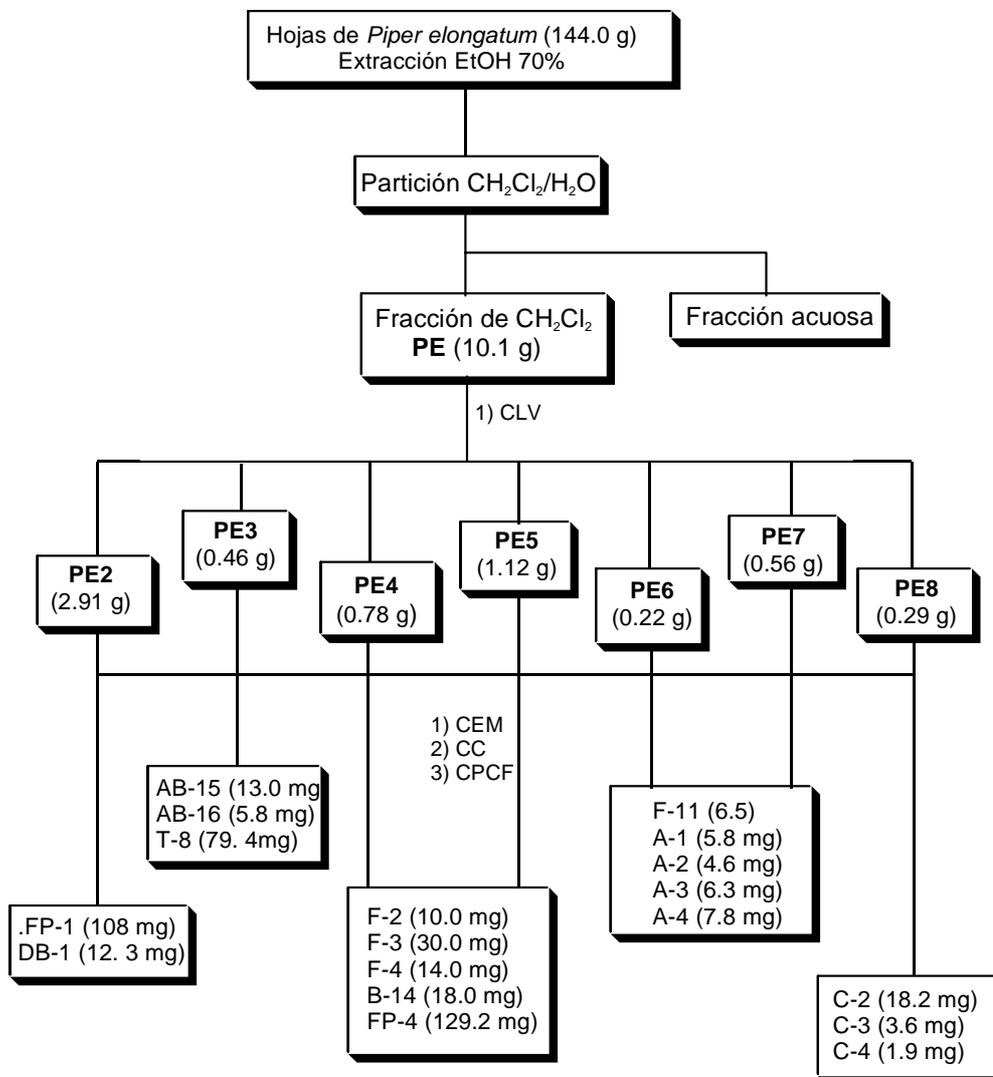
A continuación se presentan los esquemas (esquemas 1-7) del fraccionamiento realizado para el estudio fitoquímico de las especies de *Piper* objeto de este trabajo de investigación.

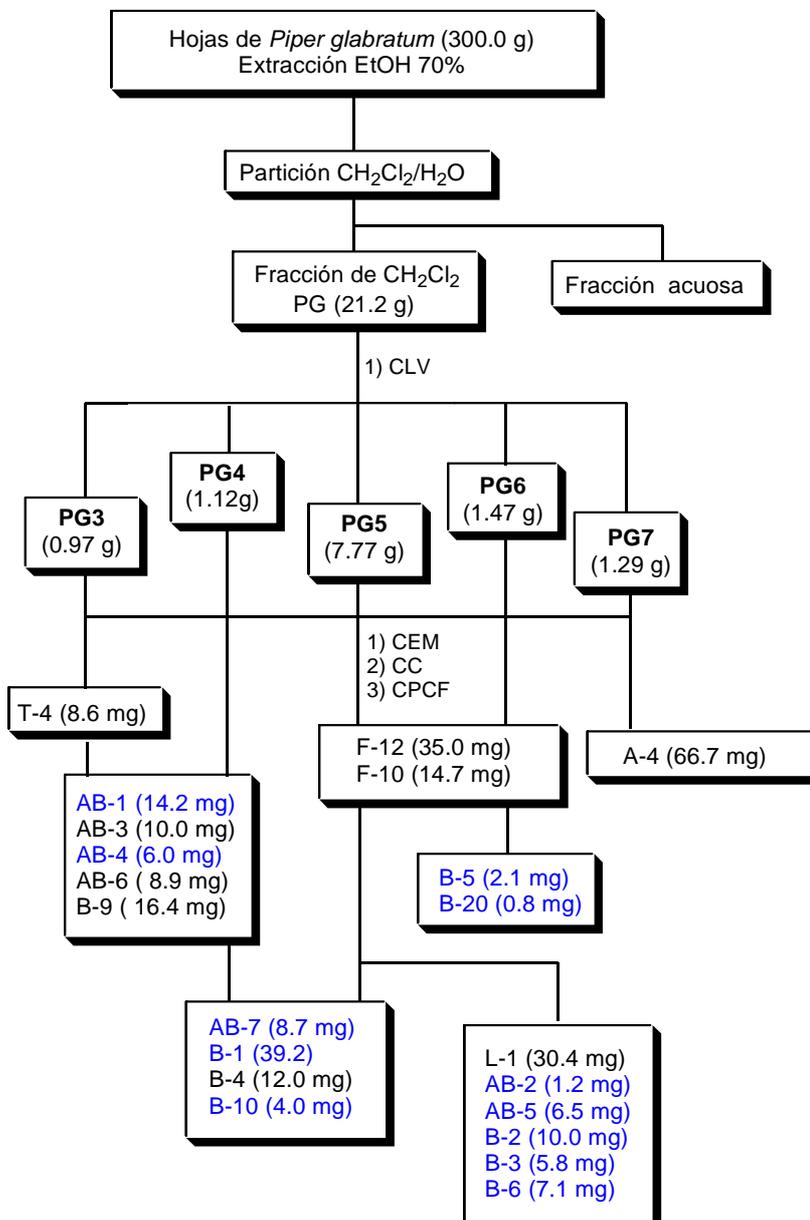
**ESQUEMA 1. Estudio fitoquímico de *P. aduncum***



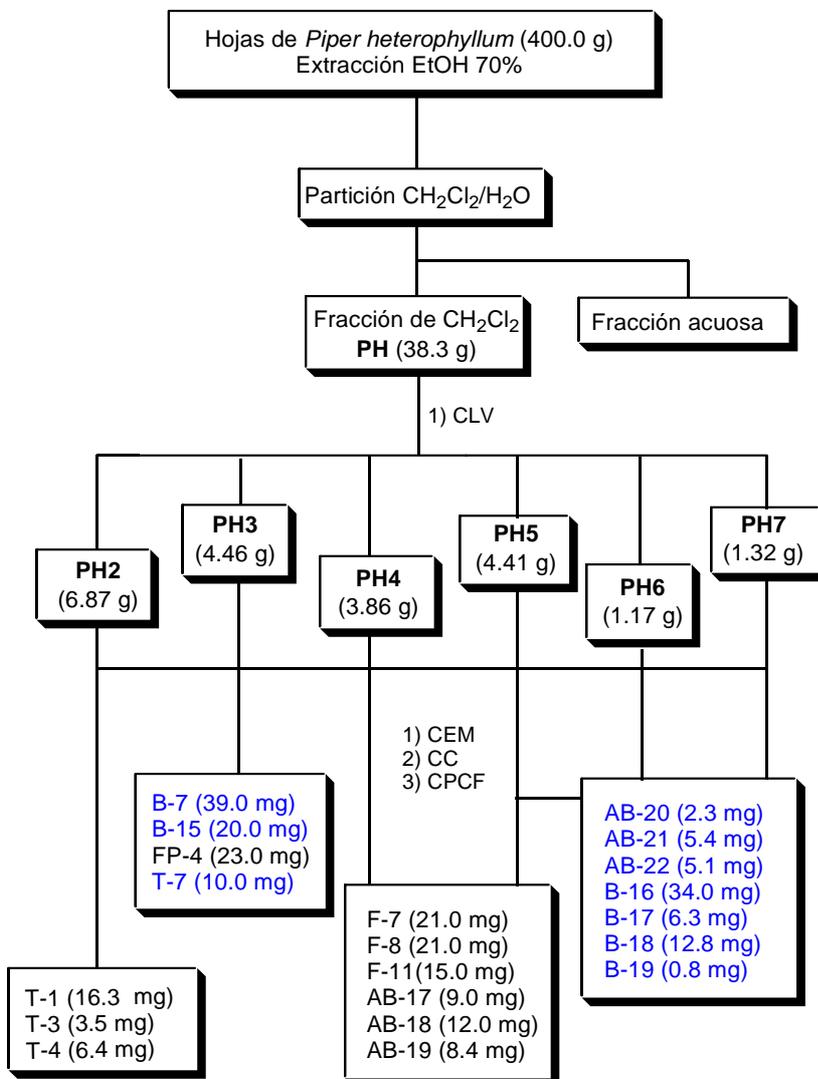
ESQUEMA 2. Estudio fitoquímico de *P. acutifolium*

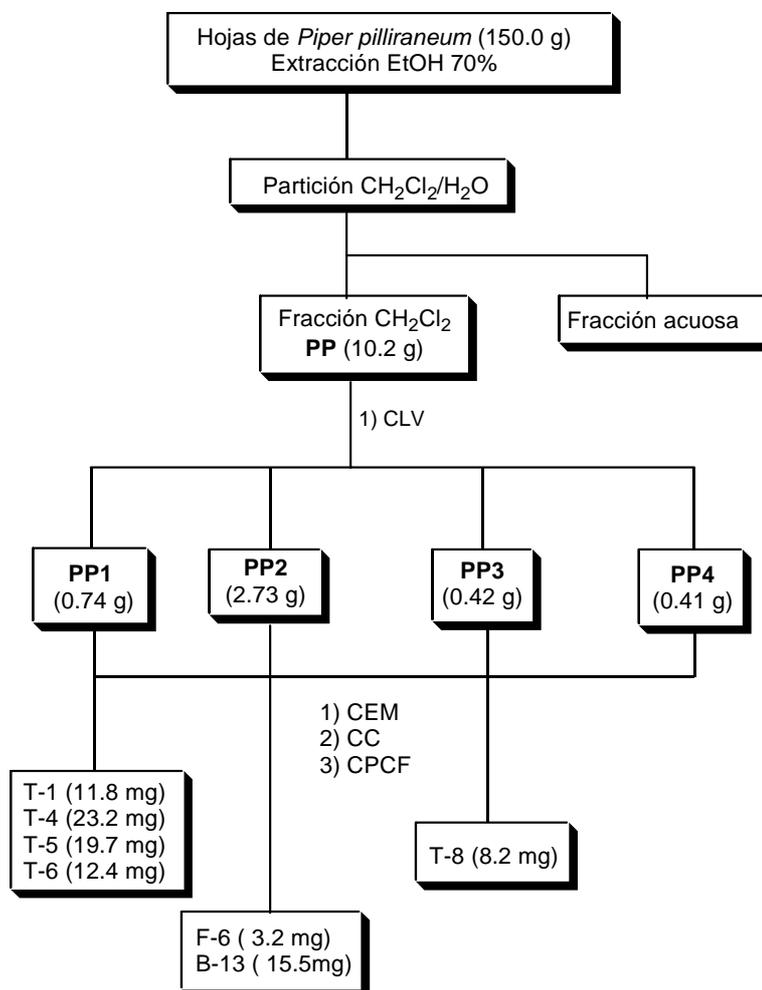
**ESQUEMA 3. Estudio fitoquímico de *P. elongatum***



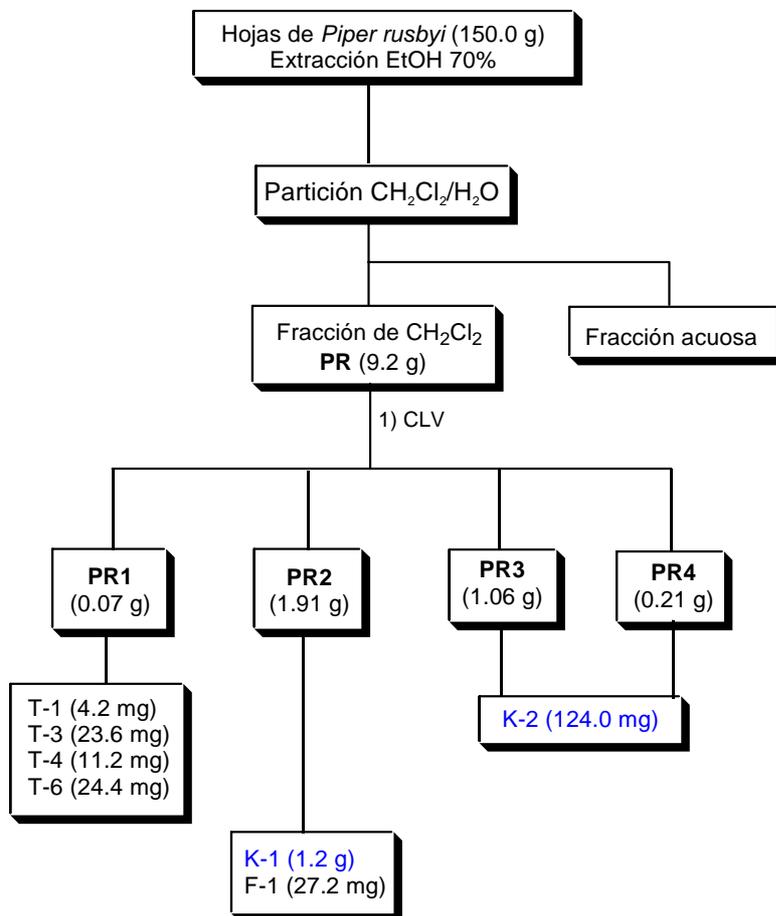
ESQUEMA 4. Estudio fitoquímico de *P. glabratum*

**ESQUEMA 5. Estudio fitoquímico de *P. heterophyllum***



**ESQUEMA 6. Estudio fitoquímico de *P. pilliraneum***

**ESQUEMA 7. Estudio fitoquímico de *P. rusbyi***



## ***7. ENFERMEDADES PARASITARIAS***

## ENFERMEDADES PARASITARIAS TROPICALES

Dentro de las enfermedades infecciosas, las enfermedades parasitarias continúan siendo el principal problema de salud pública, afectando a cientos de millones de personas. Estudios recientes indican que las enfermedades tropicales constituyen el 10% de las enfermedades globales, así dentro de las 11 enfermedades tropicales consideradas altamente prioritarias por el programa de enfermedades tropicales (TDR) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), siete son parasitarias<sup>1</sup>. La incidencia y mortalidad anuales de las principales enfermedades parasitarias se detalla en la siguiente tabla.

**Tabla 17. Principales enfermedades parasitarias**

Enfermedad (parásito responsable)	Población en riesgo (millones)	Muertes en el 2002 (miles)	DALYs <sup>a</sup> 2002 (millones)
<b>Malaria</b> <i>Plasmodium spp</i>	> 2.100	1.272	46.4
<b>Leishmaniasis</b> <i>Leishmania spp</i>	350	51	2.1
<b>Tripanosomiasis Africana</b> <i>Trypanosoma brucei</i>	> 60	48	1.5
<b>Enfermedad de Chagas</b> <i>Trypanosoma cruzi</i>	120	14	0.7
<b>Esquistosomiasis</b> <i>Schistosoma spp</i>	600	15	1.7
<b>Filariasis linfática</b> <i>Brugia malawy</i>	1.000	0	5.8
<b>Oncocercosis</b> <i>Onchocerca volvulus</i>	120	0	0.5

<sup>a</sup>DALYs: Discapacidad y años de vida perdidos

Las enfermedades parasitarias, constituyen el principal problema de salud pública que en los países en desarrollo. Estos países se ubican en las regiones intertropicales y están condicionados por la realidad geográfica, económica y social existente. Esta realidad geográfica tiene gran relevancia en la prevalencia de las enfermedades parasitarias, dada las condiciones climáticas que permiten su proliferación, persistencia y permanencia, ya que el clima cálido y húmedo del trópico permite la multiplicación de los vectores reservorios de estas enfermedades. Ello limita el desarrollo de las comunidades donde se presentan estas enfermedades<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> World Health Organization. *World Health Report*. 2004.

<sup>2</sup> Pink, R.; Hudson, A.; Mouriés, M. A.; Bending, M. *Nature Rev. Drug Discov.* 2005, 4, 727-740.

En la actualidad hay un número limitado de fármacos antiparasitarios efectivos y seguros para uso humano; algunos son poco tolerados debido a sus numerosos efectos secundarios y en otros casos no existe una adecuada terapia, como ocurre por ejemplo en los estadios crónicos de la enfermedad de Chagas. Otros problemas de los fármacos de uso clínico incluyen su limitada disponibilidad, el elevado costo y el incremento cada vez más acelerado de la aparición de resistencia a los mismos, sobre todo en los casos de terapias únicas.

Así, los fármacos utilizados actualmente en el tratamiento de estas enfermedades están lejos de ser ideales y muchos de ellos fueron introducidos décadas atrás. Los problemas asociados con algunos de los fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento de la malaria, leishmaniasis y enfermedad de Chagas, así como las terapias combinadas utilizadas o introducidas recientemente<sup>2</sup>, se resumen en la siguiente tabla.

**Tabla 18. Fármacos utilizados en el tratamiento de malaria, leishmaniasis y enfermedad de Chagas**

Enfermedad (parásito responsable)	Fármacos utilizados y combinaciones	Desventajas
<b>Malaria</b> <i>Plasmodium spp</i>	Cloroquina Sulfadoxina/Pyrimetamina Mefloquina Artemisina Artemeter/lumefantrone Atavaquona/proguanil Clorproguanil/dapsona	Resistencia Efectos secundarios  Elevado costo
<b>Leishmaniasis</b> <i>Leishmania spp</i>	Pentamidina Antimonio pentavalente Anfotericina B liposomal Miltefosina	Baja eficacia Resistencia Elevado costo Efectos secundarios
<b>Enfermedad de Chagas</b> <i>Trypanosoma cruzi</i>	Nifurtimox  Benznidazole	Periodos largos de tratamiento Inefectivo en fase crónica

Por lo tanto, numerosos factores limitan la utilidad de los fármacos actualmente en clínica para el tratamiento de las enfermedades parasitarias y de ahí la urgente necesidad de descubrir nuevos fármacos más efectivos, seguros y sin problemas de resistencia.

Como muchos autores han enfatizado, los esfuerzos realizados en el descubrimiento y desarrollo de fármacos nuevos para estas enfermedades son insuficientes. De más de los 1.300

nuevos fármacos introducidos para todas las indicaciones entre 1975-1999, solo **trece** fueron indicados para el tratamiento de **enfermedades tropicales**. En el año 2000, solo el 0.1% de la inversión global para investigación en salud se ha dedicado al descubrimiento de fármacos para determinadas enfermedades tropicales (malaria, leishmaniasis y tripanosomiasis) y la tuberculosis, que por otra parte constituyen aproximadamente el 5% de la carga global de estas enfermedades<sup>3</sup>.

En los últimos años los esfuerzos realizados han dado un nuevo impulso al descubrimiento de fármacos antiparasitarios. Esto incluye el descubrimiento de la secuencia del genoma de diversos parásitos, aunque aún queda mucho por descubrir en esta área, lo que nos indica que "el siguiente objetivo en la resolución del problema que suponen las enfermedades tropicales es establecer la mejor estrategia para trasladar la información genómica al descubrimiento de nuevos fármacos"<sup>2</sup>.

El desarrollo de asociaciones entre entidades públicas y privadas (PPPs), dirigidos especialmente hacia las enfermedades tropicales, contrarresta en parte la falta de una implicación directa por parte de muchas compañías farmacéuticas. Algunas PPPs actualmente implicadas en el descubrimiento de fármacos antiparasitarios son Medicine Malaria Venture (MMV), Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi) y el Institute for One World Health (IOWH)<sup>4</sup>. Sin embargo, una mayor participación de investigadores del sector sanitario público y de las industrias líderes en los países donde estas enfermedades son endémicas constituye un reto.

En general, el descubrimiento de fármacos es un proceso interactivo, que depende de la estrategia utilizada y comprende diferentes pasos: identificación y validación de la diana, desarrollo del ensayo (basado en la célula completa o en una diana molecular) para identificar un cabeza de serie, la preparación de derivados para el estudio de relaciones estructura-actividad que permitan determinar el farmacóforo y el diseño racional de nuevas moléculas más activas y que presenten menos efectos secundarios.

---

<sup>3</sup> Trouiller, E.; Olliaro, P.; Torreele, E.; Orbinski, J.; Laing, R.; Ford, N. *The Lancet*. **2002**, 359, 2188-2194.

<sup>4</sup> Nwaka, S.; Ridley, R. G. *Nature Rev. Drug Discov.* **2003**, 2, 919-928.

El descubrimiento de fármacos para el tratamiento de enfermedades parasitarias no es más costoso o técnicamente complejo que para otras indicaciones. Por el contrario, para las enfermedades infecciosas (incluyendo las parasitarias), los modelos pre-clínicos tienden a ser más predictivos y los ensayos clínicos menos complejos y costosos que para las enfermedades no infecciosas. Se estima que el costo para introducir un nuevo antimalárico en el mercado es aproximadamente de 300 millones de dólares americanos, frente a un costo medio de 500 millones de dólares para un nuevo fármaco, e incluso el riesgo de fallo de los ensayos clínicos en fase II se estima que sea el 50% para los fármacos antimaláricos, que es inferior al correspondiente riesgo para una enfermedad no infecciosa<sup>5</sup>.

El descubrimiento de fármacos antiparasitarios no es comercialmente rentable, de hecho muchos fármacos antiparasitarios fueron desarrollados primero para otras indicaciones terapéuticas. Este enfoque oportunista de capitalización del conocimiento adquirido para indicaciones no parasitarias ha sido muy útil y tiene una clara ventaja en términos de reducción de costos.

Las diferentes aproximaciones en el descubrimiento de fármacos para el tratamiento de las enfermedades tropicales, como se ha publicado recientemente para la malaria<sup>6</sup> y la tuberculosis<sup>7</sup>, pueden clasificarse en aquellas realizadas a corto plazo (basadas en explotar compuestos existentes o análogos de una clase de compuestos específica) y las que requieren un periodo largo de tiempo (que implican el descubrimiento de nuevos compuestos químicos)<sup>8</sup>.

Entre las estrategias a corto plazo podemos citar, la **combinación de fármacos existentes**, lo que ofrece la posibilidad de sinergismo, reducción de la toxicidad, regímenes de tratamientos cortos y bajas posibilidades en el desarrollo de resistencia. Así, se ha utilizado ampliamente la combinación de fármacos en la terapia de la malaria (Tabla 19)<sup>9</sup>.

---

<sup>5</sup> [www.mnv.org/filesupld/53.pdf](http://www.mnv.org/filesupld/53.pdf) . *Annual Report 2002*, Medicines for Malaria Venture.

<sup>6</sup> Willcox, M.; Bodeker, G. B. *Parasitol. Today*. **2000**, 16, 220-221.

<sup>7</sup> Basur P. *Nature Biotechnol.* **2004**, 22, 263-265.

<sup>8</sup> Nwaka, S.; Hudson, A. *Nature Rev. Drug Discov.* **2006**, 5, 941-955.

<sup>9</sup> Rossental, P. *J. J. Exp. Biol.* **2003**, 206, 3735-3744.

El uso de fármacos existentes para nuevas indicaciones, constituye una estrategia atractiva a corto plazo, que reduce el tiempo y los costos del desarrollo del fármaco. Históricamente, esta aproximación ha dado excelentes resultados y ejemplo de ello es el DB289, usado inicialmente para el tratamiento de *Pneumocystis pneumoniae*, que está ahora en ensayos clínicos para el tratamiento de la malaria y los estadios tempranos de la tripanosomiasis africana<sup>10-11</sup>.

**Tabla 19. Ejemplos del desarrollo de fármacos antiparasitarios**

Compuesto	Indicación	Situación	Evolución histórica	
<b>Eflornitina</b> <sup>12</sup>	Tripanosomiasis africana	Registrado	Anticancerígeno Tripanocida en ratones Registrado tripanocida Comercializado Fase II formulación oral (en proceso)	1970 1980 1991 2001
<b>Fosfomicidomina</b> <sup>13</sup>	Malaria	Fase II Clindamicina	Antibacteriano Diana antiparasitaria Fase II Fase II en combinación	1980 1999 2002 2005
<b>OZ 277</b> <sup>14</sup> <b>Artemisona</b> <sup>10</sup>	Malaria	Fase II	Extracto de <i>Artemisia</i> (fiebre) Endoperóxidos identificados Clínicamente efectivo Síntesis total Evaluación de análogos Fase II	Antiguo 1972 1979 1992 1983- 2005 2005
<b>Miltefosina</b> <sup>15</sup>	Leishmaniasis visceral	Registrado Fase IV	Anticancerígeno Leishmanicida <i>in vivo</i> Estudios clínicos Fase II Registrado en India	1987 1987 1995 1999 2002
<b>DB289</b> <sup>12</sup>	Malaria Tripanosomiasis africana	Fase II	Anti- <i>Pneumocystis carinii</i> Activos frente a parásitos Estudios clínicos Fase II: malaria, Tripanosomiasis africana	1996 1998 2004 2005

<sup>10</sup> Medicines for Malaria. *Annual Report 2003* Venture [www.mnv.org/filesupld/184.pdf](http://www.mnv.org/filesupld/184.pdf)

<sup>11</sup> Yeates, C. I. *Drugs*. **2003**, 6, 1086-1093.

<sup>12</sup> Burri, C.; Brun, R. *Parasitol. Res.* **2003**, 90, 49-52.

<sup>13</sup> Lee, B. J.; Singh, A.; Chiang, P.; Kemp, S. J.; Goldman, E. A.; Weinhouse, M. I.; Blasuk, G. P.; Rossental, P. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 735-738.

<sup>14</sup> Nishtar, S.; *Health Res. Policy Syst.* **2004**, 2, 5.

El **desarrollo de análogos de antiparasitarios existentes**, es una estrategia a medio plazo que puede ser efectiva. Así por ejemplo, se han diseñado análogos de la pirimetamina específicamente para evitar la resistencia a fármacos antimaláricos como resultado de la mutación de la dihidrofolato reductasa<sup>16</sup>. Otro ejemplo es la ferroquina, que contiene un núcleo similar a la cloroquina pero con un grupo ferrociano en la cadena lateral y que presenta una excelente actividad frente a *Plasmodium*, incluyendo los parásitos resistentes a la cloroquina<sup>17</sup>.

Una alternativa bien argumentada y productiva, es aquella que se dirige a la evaluación de amplias librerías de compuestos frente a parásitos completos, haciendo énfasis en compuestos con efectos biológicos específicos frente a parásitos relacionados o con actividad inhibidora de isoenzimas o receptores de dianas moleculares conocidas en otros organismos. Esta estrategia es particularmente de interés en la búsqueda de nuevos antimaláricos y esquistosomicidas, para los cuales la capacidad de cribado está limitada por la disponibilidad de ensayos efectivos frente a helmintos de interés clínico. Así, los trabajos sobre la secuencia del genoma de ciertos parásitos, complementado con investigaciones bioquímicas, ha permitido identificar enzimas como la proteína farnesil transferasa, cisteína proteasa, histona desacetilasa o acil ácidos sintasa, como potenciales dianas de fármacos para el tratamiento de la malaria o las enfermedades causadas por *Trypanosoma*.

**Las estrategias a largo plazo**, tienen como objetivo el descubrimiento de nuevos compuestos activos no relacionados con los ya existentes. El tamizaje de colecciones de compuestos con el parásito completo en ensayos *in vitro* declinó en las dos últimas décadas, pero ha vuelto a resurgir debido principalmente a los avances en las técnicas de los bioensayos. Ello es especialmente evidente en los ensayos usando *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi* y diferentes especies de *Leishmania*. Los ensayos hoy día usan con frecuencia parásitos transfectados con genes conocidos, como son las proteínas fluorescentes,  $\beta$ -lactamasas o  $\beta$ -galactosidasas, que permiten una detección rápida y fácil de la actividad antiparasitaria. Así

---

<sup>15</sup> Jha T. K.; Sundar, S.; Thakur, C. P.; Bachmann, P.; Karbwang, J.; Fischer, C.; Voss, A.; Berman, J. *New. Engl. J. Med.* **1999**, 341, 1795-1800.

<sup>16</sup> Yuvaniyama, J.; Chitnumsub, P.; Kamchonwongpaisan, S.; Vanichtanankul, J.; Sirawaraporn, W.; Taylor, P.; Walkinshaw, M. D.; Yuthavong, Y. *Nature Struct. Biol.* **2003**, 10, 357-365.

<sup>17</sup> Biot, C.; Taramelli, D.; Forfar-Bares, I.; Maciejewski, L. A.; Boyce, M.; Nowogroki, G.; Brocart, J. S.; Basilico, N.; Olliaro, P.; Egan, T. J. *Mol. Pharm.* **2005**, 2, 185-193.

mismo, se han hecho avances al adaptarse el uso de placas de 384 pocillos en el cribado de los protozoos, especialmente para evaluar productos frente a *P. falciparum*.

La evaluación de librerías de productos naturales tiene una especial ventaja para las enfermedades parasitarias, al igual que para otras enfermedades infecciosas o el cáncer. Los productos naturales son atractivos por su extraordinaria diversidad estructural y para las enfermedades parasitarias en particular, las plantas medicinales pueden ser una fuente potencial de nuevos farmacóforos<sup>18</sup>. Así por ejemplo el antimalárico artemisinina fue aislado por primera vez de una planta usada en la medicina tradicional China. Otros productos naturales que están siendo explorados en los programas de descubrimiento de fármacos incluyen las manzaminas<sup>19</sup>, chalconas<sup>20</sup> y borrelidinas<sup>21</sup>, que presentan actividad antimalárica en modelos animales.

Muchos productos naturales aislados de especies vegetales, son biosintetizados en momentos específicos del ciclo de crecimiento y en diferentes partes de la planta, lo que hace difícil obtenerlos en cantidades suficientes para su estudio. Sin embargo, la asombrosa diversidad de especies vegetales y la confianza depositada en las plantas medicinales, especialmente en los países tropicales y subtropicales, donde estas enfermedades son endémicas, hace que los productos naturales sean una excelente alternativa en la búsqueda de nuevos antiparasitarios.

---

<sup>18</sup> Tagboto, S. Townson, S. *Adv. Parasitol.* **2001**, 50, 199-295.

<sup>19</sup> Andg, K. K.; Holmes, M. J.; Higa, T.; Hamann, M. T.; Kara, U. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, 44, 1645-1649.

<sup>20</sup> Lui, m.; Wilairat, P.; Croft, S. L.; Tan, L. C. A.; Go, L. M. *Biorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 2729, 2738,

<sup>21</sup> Otoguro, K.; Ui, H.; Ishiyama, A.; Kobayashi, M.; Togashi, H.; Takanashi, Y.; Masuma, R.; Tanaka, H.; Tomoda, H.; Yamada, H.; Omura, S. *J. Antibiot.* **2003**, 56, 727-729.

# *Leishmaniasis*

## LEISHMANIASIS

La leishmaniasis se puede definir como un conjunto de enfermedades provocadas por la infección de diferentes especies de protozoos parásitos pertenecientes al género *Leishmania*. La epidemiología de la enfermedad es extremadamente diversa: unas 20 especies y subespecies de *Leishmania* son patogénicas para el hombre y unas 30 especies de mosquitos (género *Phlebotomus*) pueden actuar como vectores.



*Phlebotomus sp*



*Leishmania donovani*

La leishmaniasis se puede clasificar en cuatro tipos principales<sup>1</sup>:

- **Leishmaniasis visceral (LV):** Es la forma más agresiva y mortal en unos meses, cuando no se trata. Involucra todo el sistema retículo-endotelial y se caracteriza por espasmos irregulares y fiebre, pérdida sustancial de peso, hepato y esplenomegalia y anemia. Después de una curación aparente pueden aparecer complicaciones cutáneas tardías, las dermatitis "post-kala-azar", particularmente frecuentes en la India y en Sudán.
- **Leishmaniasis cutánea (LC):** La forma más común. La incubación es de duración muy variable, generalmente de uno a tres meses, al final de cuyo período aparece, generalmente, en el punto de inoculación, la lesión ulcerosa de 0.5 a 10 cm de diámetro, recubierta de una costra con un borde saliente morado y escamoso.
- **Leishmaniasis cutánea difusa (LCD):** Enfermedad difícil de tratar, que se caracteriza por la aparición en todo el cuerpo de nódulos diseminados que se extienden poco a poco

<sup>1</sup> World Health Organization. [www.who.int/tdr/diseases/leishmaniasis/diseaseinfo.htm](http://www.who.int/tdr/diseases/leishmaniasis/diseaseinfo.htm). Fecha de acceso diciembre 2006.

hasta llegar a ser confluentes. Se trata de una forma que corresponde con un estado de debilitamiento del paciente.



**Leishmaniasis visceral**



**Leishmaniasis cutánea**



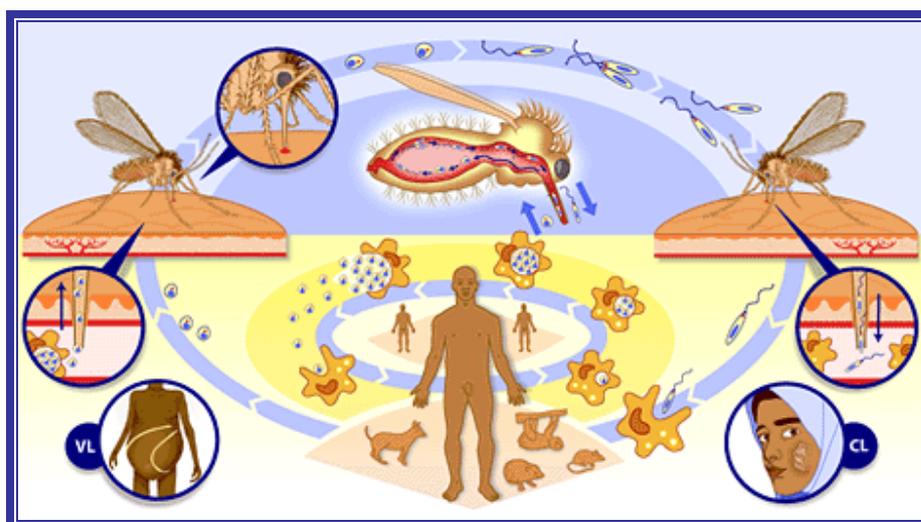
**Leishmaniasis mucocutánea**

- **Leishmaniasis mucocutánea (LMC):** También llamada "espundia", es una afección de las selvas tropicales amazónicas. Al inicio es exclusivamente cutánea (una o varias lesiones) y parece curar al cabo de algunos meses. Pero después de un tiempo, entre un 20 y 50% de los casos, según los focos, aparecen lesiones granulomatosas hemorrágicas en la mucosa nasal, luego bucal y rinofaríngea, evolucionando hacia una necrosis extendida y espantosas mutilaciones.

### **Ciclo biológico de *Leishmania***

Durante su ciclo biológico, los parásitos del género *Leishmania* existen en dos formas, según el hospedador en el que se encuentran:

- Forma promastigote, móvil, flagelada y extracelular que se encuentra en el vector.
- Forma amastigote, inmóvil, no flagelada e intracelular, que se encuentra en el hombre y los mamíferos.



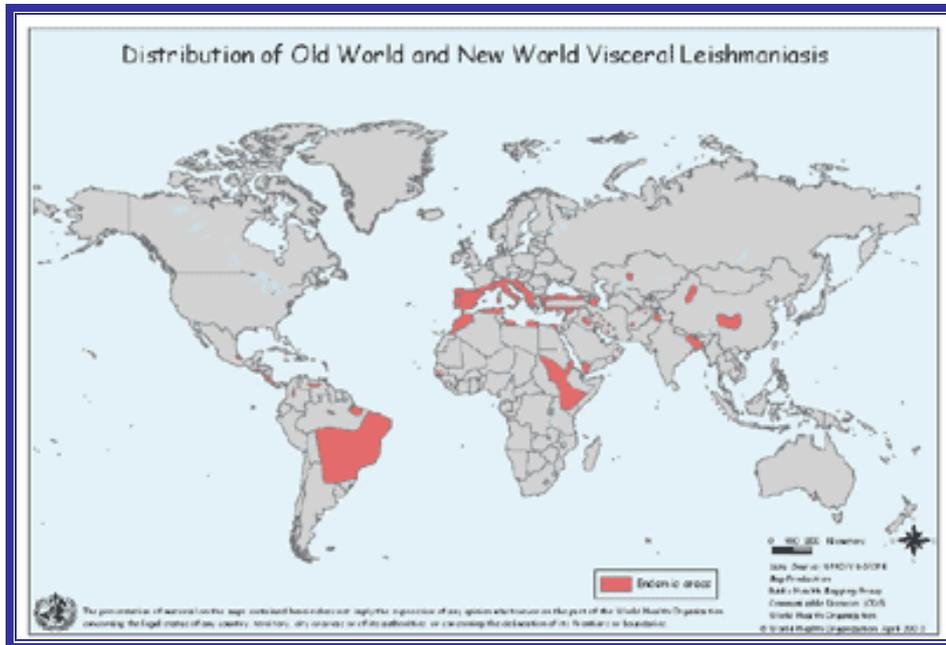
**Ciclo biológico de *Leishmania***

El ciclo comienza cuando un mosquito hembra infectado pica a un hospedador. Las formas promastigote del parásito entran en el hospedador a través de la probóscide, junto con la saliva anticoagulante del mosquito. Una vez dentro del hospedador, las formas promastigote son fagocitadas por macrófagos, dentro de los cuales son capaces de sobrevivir, pasando a formas amastigote y reproduciéndose por división binaria. El número de parásitos aumenta hasta que acaban rompiendo el macrófago. Las formas amastigote liberadas son fagocitadas por nuevos macrófagos y el ciclo continúa cuando un nuevo mosquito hembra pica al hospedador infectado y en la sangre que extrae se lleva macrófagos infectados. Las formas amastigote son liberadas en el estómago del insecto y casi inmediatamente pasan a formas promastigote que se dividirán por fisión binaria, cerrándose así el ciclo.

### **Epidemiología**

La leishmaniasis constituye un grave problema de salud pública mundial, que afecta a 88 países, 67 en el viejo mundo y 21 en América, 72 de los cuales son países en vías de desarrollo y 13 se encuentran entre los países menos desarrollados. El 90% de los casos de leishmaniasis visceral se presenta en cinco países: Bangladesh, India, Nepal, Sudan y Brasil y el 90% de los casos de leishmaniasis cutánea se dan en siete países: Afganistán, Argelia, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudita y Siria. La incidencia anual se estima en 1.5 millones de casos de leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis cutánea difusa y 500.000 casos de

leishmaniasis visceral. Actualmente, existen 12 millones de casos, 350 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad y unas 59.000 muertes anuales causadas por la leishmaniasis<sup>2</sup>.



### **Distribución geográfica de leishmaniasis visceral**

En diversas regiones del mundo los casos de leishmaniasis están aumentando claramente; así, por ejemplo, la leishmaniasis cutánea en Brasil pasó de 21.800 casos en el 1998 a 60.000 en el 2003 y en Kabul y Afganistán, los casos de leishmaniasis cutánea en 1994 eran 14.200 y en el año 2002 aumentaron hasta 67.500. Numerosas regiones, particularmente África Oriental y el Medio Oriente, sufren epidemias mortales. Recientemente, se ha descrito la aparición de casos de leishmaniasis visceral en perros localizados en 21 estados de EE.UU. y Canadá<sup>3</sup>.

En Europa, la leishmaniasis es una infección oportunista que afecta a pacientes tratados con inmunosupresores o pacientes con HIV, afectando entre el 2-7% de los pacientes con SIDA<sup>4</sup>. En el este de Africa y en la India, el problema está frecuentemente relacionado con

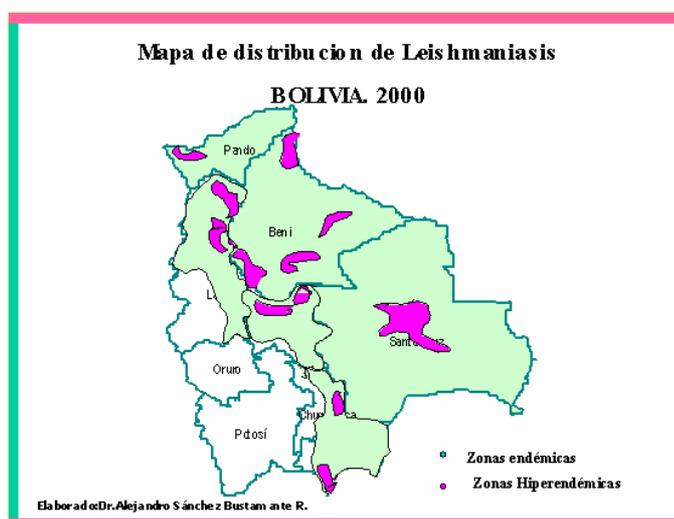
<sup>2</sup> WHO. Weekly. *Epidemiological Record*. **2002**, 77, 365.

<sup>3</sup> Gaskin, A. A.; Schantz, P.; Jackson, J.; Birkenheuer, A.; Tomlinson, L.; Gramiccia, M.; Levy, M.; Steurer, F.; Kollmar, E.; Hegarty, B. C.; Ahn, A.; Breithschwerdt, E. B. *J. Vet. Intern. Med.* **2002**, 16, 34.

<sup>4</sup> Desjeux, P. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2001**, 95, 239-243.

inmigrantes, trabajadores estacionales, refugiados, profesionales del sexo y camioneros. Además, la malnutrición y la inmunosupresión juegan papeles importantes como factores de riesgo individuales.

En Bolivia, aproximadamente 800.000 individuos se encuentran en alto riesgo de enfermar con leishmaniasis. En general, se trata de grupos humanos muy receptivos, que provienen de zonas no infectadas. Los datos disponibles aún son considerados parciales y no revelan la magnitud del problema, pero orientan a definir áreas de trabajo prioritarias, como se muestra en el siguiente mapa<sup>5</sup>.



### Zonas endémicas de leishmaniasis en Bolivia

Esta tendencia al aumento de casos, está relacionada con el desarrollo económico y cambios ambientales que aumentan la exposición a los vectores como son los nuevos asentamientos en zonas no habitadas previamente, intrusión en bosques primarios, deforestación, migraciones masivas de zonas rurales a zonas urbanas y una urbanización no planificada.

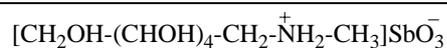
### Tratamiento de la leishmaniasis: Quimioterapia

Se deben tener en cuenta muchos factores a la hora de elegir el tratamiento más apropiado. Así, podemos citar el carácter endémico de las cepas de *Leishmania*, el estado

<sup>5</sup> Sánchez Bustamante, A. *Anuario epidemiológico en Bolivia 2000*. 2000, OPS/OMS, Bolivia, 75-79.

nutricional e inmune de la población, el nivel y patrón de la resistencia del parásito a los fármacos y obviamente el coste del tratamiento.

Actualmente, para el tratamiento de la leishmaniasis están disponibles los derivados **antimoniales pentavalentes**, el antimonio de meglumina (Glucantime®), vía intramuscular y el estibogluconato sódico (Pentostam®), vía intravenosa, que continúan siendo los fármacos de primera elección en la mayoría de regiones del mundo<sup>6,7</sup>.



**Antimoniato de *N*-metil glucamina**

Sin embargo, estos principios activos poseen numerosos inconvenientes, ya que son caros, requieren un largo período de tratamiento (4 semanas), deben ser administrados por vía parenteral y sus numerosos efectos secundarios limitan su utilización: toxicidad hepática, pancreatitis, náuseas, dolores abdominales, pancitopenia y toxicidad cardíaca. Una forma genérica del estibogluconato sódico está siendo actualmente comercializado por Albert David, Calcuta, este genérico es 5 veces más económico y tiene la misma eficacia que el Pentostam®. El mayor problema de este tratamiento es la aparición de cepas resistentes, así más del 50 % de casos de leishmania visceral en la India son resistentes a glucantime, debido a la aparición de líneas de *Leishmania donovani* resistentes a los antimoniales<sup>8</sup>.

En el caso de pacientes infectados con cepas de *Leishmania* resistentes a los antimoniales, el tratamiento de primera elección es con **anfotericina B** en liposomas (Ambisome), formulación que ha aumentado la eficacia de la anfotericina convencional. La duración del tratamiento se ha recudido a 5-7 días, existiendo la posibilidad de tratamientos más cortos en niños, lo que representa una ventaja respecto a las terapias tradicionales. Sus efectos secundarios están ligados principalmente a la vía de administración (fiebre, temblores, dolor óseo) o a la toxicidad (insuficiencia renal, anemia y toxicidad cardíaca), aunque en muchas

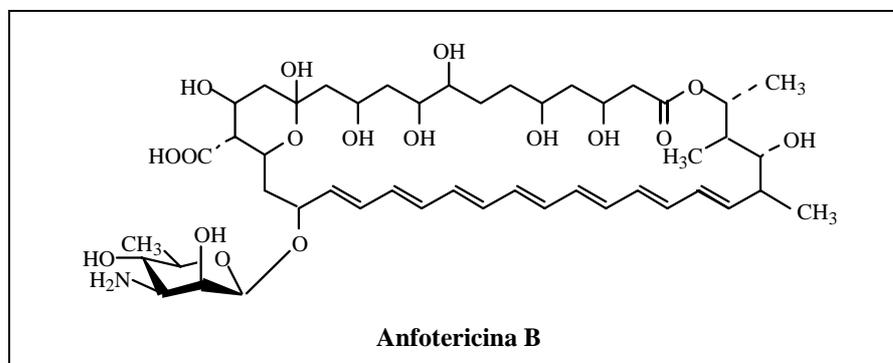
---

<sup>6</sup> Basu, J. M.; Mookerjee, A.; Sen, P.; Bhaumik, S.; Sen, P.; Banerjee, S.; Naskar, K.; Chouchuri, S. K.; Saha, B.; Raha, S.; Roy, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50, 1788-1797.

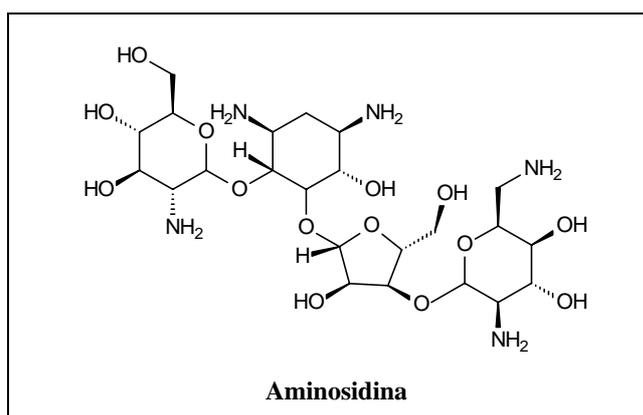
<sup>7</sup> Murray, H. W.; Berman, J. D.; Davies, C. R.; Saravia, N. G. *Lancet.* **2005**, 366, 1561-1577.

<sup>8</sup> Lira, R.; Sundar, S.; Makharia, A.; Kenney, R.; Gam, E.; Saravia, E.; Sacks, D. *J. Infect. Dis.* **1999**, 180, 564-567.

ocasiones esta toxicidad es controlable<sup>9</sup>. Sin embargo, el elevado costo es un serio inconveniente para los países en desarrollo, lo que limita la utilización de estas formulaciones.



La **aminosidina** (Paranomicina) es un fármaco alternativo de segunda línea. Es un antibiótico aminoglucosídico con alta actividad leishmanicida, demostrada desde los años 60. En el curso de los ensayos en las fases I y II en Kenya, Sudan e India, el medicamento resultó seguro, bien tolerado y con buena actividad, tanto administrado solo o con derivados pentavalentes del antimonio<sup>10</sup>. Los recientes ensayos de fase III en la India<sup>11</sup> (15mg/kg/día durante tres semanas) han confirmado la eficacia del medicamento (94,6% de curación total después de un seguimiento de 6 meses y 96,6% en el grupo pediátrico)<sup>10</sup>. En cuanto a los efectos secundarios se puede decir que es casi inocuo, con una ototoxicidad reversible en un 0,6% de los casos y elevación de enzimas hepáticas en el 3% de los casos.

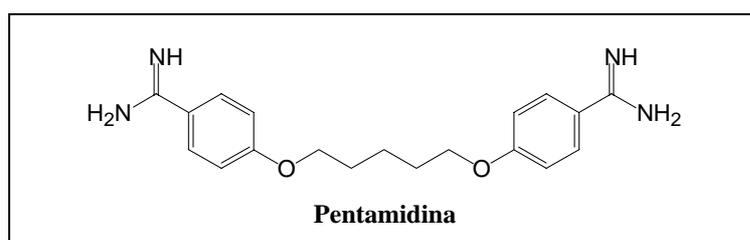


<sup>9</sup> Marry, P.; Rosenthal, E. *Expert Opinion Pharmacotherapy*. **2002**, 3, 1101-1108.

<sup>10</sup> Desjeux, P. *Med. Mal. Infect.* **2005**, 35, S74-76

<sup>11</sup> Jha, T. K.; Sundar, S.; Thakur, C. P.; Bachman, P.; Karbwang, J.; Fisher, C.; Voss, A.; Berman, J. *Abstract Book-Third World Congress on Leishmaniasis*. **2005**, Sicilia, Italia.

La **pentamidina** (Pentacarinat) ha sido utilizada como tratamiento de segunda elección en zonas de resistencia a los derivados del antimonio. No se utiliza en leishmaniasis visceral por sus graves efectos secundarios y en leishmaniasis cutánea se ha usado la pentamidina isotionato. Se caracteriza por presentar efectos secundarios particularmente en el páncreas, con riesgo de diabetes mellitus irreversible, lo que conjuntamente con su elevado costo hace que su uso sea muy restringido<sup>12</sup>.



La **miltefosina** pertenece a una serie de alquil-lisofosfolípidos desarrollados inicialmente como antitumorales. Es el primer medicamento de administración por vía oral (vida media larga 150-200 horas) utilizado en leishmaniasis visceral<sup>13,14</sup> y cuya venta ha sido autorizada su venta en la India y Alemania, después de realizar estudios clínicos en pacientes con leishmaniasis visceral resistente a los antimoniales y con leishmaniasis cutánea<sup>15</sup>. También fue aprobado en el 2005 para el tratamiento de leishmaniasis cutánea del nuevo mundo (Perú, Guatemala, Colombia) por los buenos resultados obtenidos<sup>16, 17</sup>. Sin embargo, su utilización en los países en desarrollo tiene algunos inconvenientes, ya que es teratógeno, tiene un costo elevado (120 \$US/paciente en la India), un bajo índice terapéutico y es susceptible de favorecer las resistencias en monoterapia<sup>9</sup>. En este sentido, cabe destacar las investigaciones realizadas en la búsqueda del posible mecanismo de resistencia de estos fármacos en especies de *Leishmania*,

---

<sup>12</sup> Fries, D. S.; Fairlamb, A. H. *Antiprotozoal agents. Burger's Medicinal Chemistry*. **2003**, 6<sup>th</sup> Edition, John Wiley & Sons, 1033-1087.

<sup>13</sup> Croft, S. L.; Neal, R. A.; Pendergast, W.; Chan, J. H. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, 36, 2633-2636.

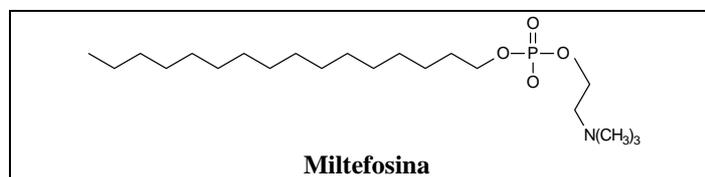
<sup>14</sup> Sundar, S.; Jha, T. K.; Thakur, C. P.; Engel, L.; Sinderman, H.; Fisher, C.; Junge, K.; Bryceson, A.; Berman, J. N. *Engl. J. Med.* **2002**, 347, 1739-1746.

<sup>15</sup> Schmidt-Ott, R.; Klenner, T.; Overath, P.; Aebischer, T. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1999**, 93, 85.

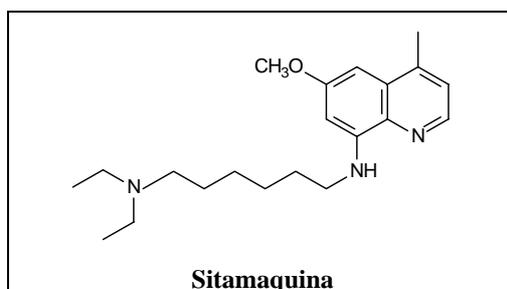
<sup>16</sup> Berman, J. *Expert Opin. Pharmacother.* **2005**, 6, 1381-1388.

<sup>17</sup> Croft, S. L.; Barret, M. P.; Urbina, J. A. *Trends Parasitol.* **2005**, 21, 508-512.

así como de nuevos revertidores de la multiresistencia a los mismos<sup>18</sup>. Los efectos secundarios observados hasta el momento son tolerables, siendo los más frecuentes los vómitos y diarreas.



La **sitamaquina**, es una 8-aminoquinolina que se encuentra en fase II de ensayos clínicos en Kenia y Brasil, su administración es vía oral y los resultados obtenidos hacen de él un fármaco prometedor. Actualmente, se están realizando estudios para determinar la eficacia y el patrón de toxicidad de este compuesto<sup>19, 20</sup>.



Uno de los principales problemas concernientes al control de la leishmaniasis es el incremento de la resistencia a los fármacos utilizados en su tratamiento. En los últimos años se han hecho importantes avances en el conocimiento de los mecanismos implicados en la multiresistencia a los fármacos (MDR). La sobreexpresión de transportadores como la glicoproteína P (Pgp) reduce la acumulación intracelular de los fármacos, confiriendo el fenotipo de la MDR. Las Pgps son bombas activas de la superfamilia de proteínas ATP-binding cassette (ABC). La búsqueda de transportadores ABC-MDR en parásitos protozoarios ha revelado que sólo dos de ellos están relacionados con la MDR y la inhibición de la actividad de estas proteínas representa una interesante alternativa para el control de la resistencia.

<sup>18</sup> Pérez-Victoria, J. M.; Pérez-Victoria, F. J.; Parodi-Talice, A.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; Castanys, S.; Gamarro, F. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45, 2468-2474.

<sup>19</sup> Wasunna, M. K.; Rashid, J. R.; Embui, J.; Kirigi, G.; Kinoti, D.; Lodenyo, h.; Felton, J. M.; Sabin, A. J.; Horton, J. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005**, 73, 871-876.

<sup>20</sup> Garnier, T.; Brown, M.; Lawrence, M. J.; Croft, S. L. *J. Pharm. Pharmacol.* **2006**, 58, 1043-1054.

Cabe destacar que la mayoría de los fármacos convencionales moduladores de la actividad Pgp-MDR en los mamíferos son ineficaces en la modulación de la actividad Pgp de los parásitos de *Leishmania*, por consiguiente existe la necesidad de investigar nuevos moduladores efectivos de la actividad Pgp específicamente para parásitos protozoarios<sup>21</sup>.

Recientemente, las terapias alternativas que utilizan nuevas formulaciones y sistemas de liberación de fármacos, como son los polímeros biodegradables, representan un avance en la eficacia de los tratamientos para la leishmaniasis, debido a su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad, lo que permite reducir la dosis, la frecuencia de administración, los posibles efectos secundarios y por consiguiente se incrementa la eficacia del tratamiento. En la actualidad se están elaborando diversos polímeros biodegradables que presentan una gran versatilidad en términos de la amplia gama de fármacos que pueden ser encapsulados, así como los diferentes tiempos y vías de liberación. La inclusión de los fármacos en polímeros biocompatibles de ácido poliláctico (PLA) y ácido poliláctico/glicólico (PLGA) presentan ventajas sobre otros sistemas debido a la fácil preparación, largo tiempo de vida, liberación prolongada y gran estabilidad en los fluidos biológicos<sup>22</sup>.

En esta línea, los primeros trabajos descritos desarrollan nanopartículas con poliláctido biodegradable, que se proponen como un sistema de liberación de los fármacos en los macrófagos, lo que podría incrementar el índice terapéutico de los agentes leishmanicidas<sup>23</sup>. Esta metodología se aplicó para la preparación de nanopartículas de poliláctido (D, L) con 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona, lo que mejoró notablemente la actividad leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de esta chalcona<sup>24</sup>. También han sido evaluadas frente a *Leishmania*<sup>25</sup>, microesferas de fosfolípidos y nanopartículas biodegradables preparadas con PLGA. Así mismo, se evaluó en un modelo experimental *in vivo* la actividad de *trans*-chalcona en implantes de polímeros

---

<sup>21</sup> Pérez-Victoria, J. M.; Di Pietro, A.; Barron, D.; Ravelo, A. G.; Castanys, S.; Gamarro, F. *Current Drug Targets*. **2002**, *3*, 311-333.

<sup>22</sup> Langer, R. *Nature*. **1998**, *392*, 5-10.

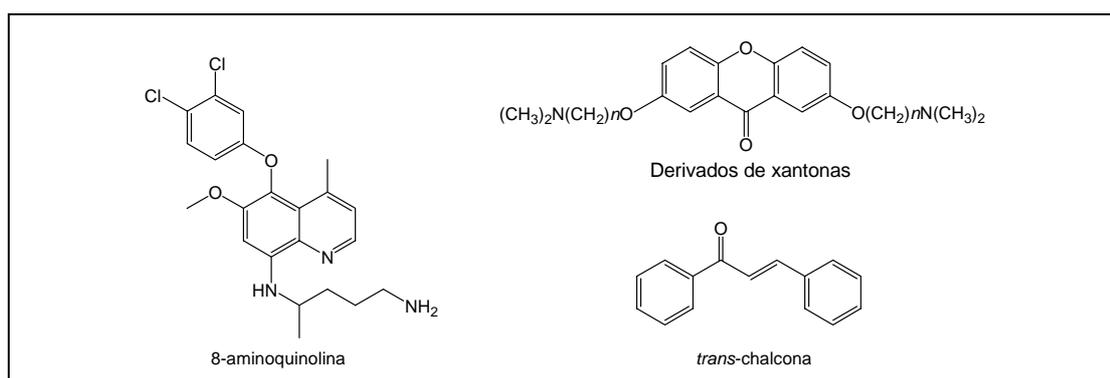
<sup>23</sup> Rodrigues, J. M.; Croft, S. L.; Fessi, H.; Bories, C.; Devissaguet, J. P. *Trop. Med. Parasitol.* **1994**, *45*, 223-228.

<sup>24</sup> Torres-Santos, E. C.; Rodríguez, J. M.; Moreira, D. L.; Kaplan, M.A.; Rossi-Bergman, B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1776-1778.

<sup>25</sup> Medda, S.; Jaisankar, P.; Manna, R. K.; Pal, B.; Giri, V. S.; Basu, M. K. *J. Drug Target.* **2003**, *11*, 123-128.

biodegradables sintéticos, como el PLA y PLGA y cuyos resultados han mostrado que los implantes de PLGA presentan una mayor eficacia que los de PLA<sup>26</sup>.

Un exhaustivo análisis de las patentes registradas en los últimos años<sup>27,28</sup> nos permite destacar las siguientes consideraciones. En primer lugar, la mayoría de las patentes han sido producidas en el ámbito académico y no por la industria farmacéutica, siendo la posible causa que la enfermedad se desarrolla en países con escasos recursos económicos y sanitarios. Otro aspecto de gran relevancia es que un alto porcentaje de patentes son de productos naturales o derivados, como la 8-aminoquinolina, derivados de xantonas, chalconas (*trans*-chalcona), dihidrochalconas o compuestos relacionados. Así mismo, resaltar que existen dos patentes para el tratamiento de leishmania visceral mediante la administración oral del extracto de *Piper betle*<sup>29,30</sup> y en ambas patentes se pone de manifiesto el amplio uso en la medicina tradicional de las especies del género *Piper* en el tratamiento de enfermedades parasitarias.



El hecho de que la mayoría de los fármacos disponibles para el tratamiento de la leishmaniasis tengan un costo elevado, sean tóxicos, requieran tratamientos prolongados y sean cada vez menos efectivos debido a la aparición de resistencia, ha hecho que uno de los grandes objetivos de la Organización Mundial de la Salud relacionado con la leishmaniasis sea el desarrollo de nuevos tratamientos, más efectivos y menos costosos. Por otra parte, se ha demostrado que la sobreexpresión de la glicoproteína P es la principal causa de la aparición de

<sup>26</sup> Piñero, J. Temporal, R. M.; Silva-Goncalves, A. J.; Jiménez, I. A.; Bazzocchi, L. I.; Oliva, A.; Perera, A.; León, L. L.; Valladares, B. *Acta Tropica*. **2006**, 98, 59-65.

<sup>27</sup> Werbovetz K. A. *Expert. Opin. Ther. Patents*, **2002**, 6 (4), 407-422.

<sup>28</sup> Ravelo, A. G.; Jiménez, I. A.; Piñero, J. E.; Valladares, B. *Expert. Opin. Ther. Patents*. **2004**, 14, 1113-1123.

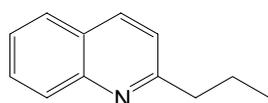
<sup>29</sup> Bandyopadhyay y col. Número de patente US0098251, **2002**.

la MDR, por lo que la búsqueda de revertidores de la pg-P son una excelente opción en la resolución de los problemas ocasionados en los fallos de los tratamientos farmacológicos de la leishmaniasis.

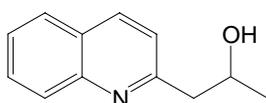
### PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD LEISHMANICIDA

Los productos naturales han jugado un importante papel en los procesos de descubrimiento de nuevos leishmanicidas a través de las pasadas centurias, existiendo una amplia bibliografía de productos naturales, aislados de extractos de plantas, que muestran actividad frente a parásitos de *Leishmania*<sup>31,32,33,34</sup>.

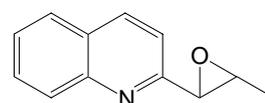
Así, se han descrito numerosos metabolitos secundarios con actividad leishmanicida, entre los que podemos citar los alcaloides derivados de la 2-alkilquinolina, aislados de las hojas de *Galipea longiflora*, la **2-*n*-propilquinolina**, **2-(2'-hidroxipropil)-quinolina** y la **chimanina D**, efectivos en un modelo *in vivo* de leishmaniasis cutánea y visceral<sup>35</sup>, siendo tan activos como el control, la pentamidina.



**2-*n*-Propilquinolina**



**2-(2'-Hidroxipropil)-quinolina**



**Chimanina D**

Otros alcaloides bioactivos corresponden a las naftilisoquinolinas, aisladas de especies de las familias Ancistrocladaceae y Dioncophyllaceae, entre las que destaca **ancistroealaina A**, aislada de *Ancistrocladus ealaensis*, que resultó más activo frente a *L. donovani* que el Pentostam®, fármaco de uso clínico, sin evidencia por otra parte de citotoxicidad<sup>36</sup>.

<sup>30</sup> Bandyopadhyay y col. Número de patente US00150637, **2002**.

<sup>31</sup> Peña-Rodríguez, L. M.; Chan-Bacab, M. J. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 674-688.

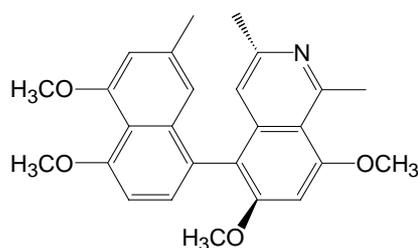
<sup>32</sup> Tagboto, S.; Townson, S. *Adv. Parasitol.* **2001**, 50, 199-295.

<sup>33</sup> Fournet, A.; Muñoz, V. *Current Trop. Med. Chem.* **2002**, 2, 1215-1237.

<sup>34</sup> Rocha, L. G.; Almeida, J. R. G. S.; Macedo, R. O.; Barbosa-Filho, J. M. *Phytomedicine.* **2005**, 12, 514-535.

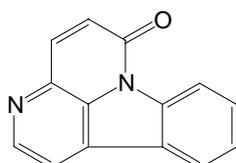
<sup>35</sup> Fournet, A.; Gantier, J. C.; Gautheret, A.; Leysalles, L.; Muñoz, L. H.; Mayrargue, J.; Moskowitz, H.; Cavé, A.; Hocquemiller, R. *J. Antimicrob. Chemother.* **1994**, 33, 537-544.

<sup>36</sup> Bringmann, G.; Hamm, A.; Gunther, C.; Michel, M.; Brun, R.; Mudogo, V. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 1465-1470.

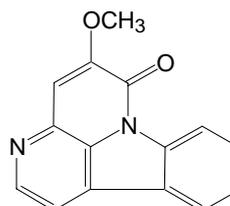


Ancistrocalaina A

En la búsqueda de compuestos leishmanicidas, se han realizado numerosos estudios de la flora de Paraguay. Así, se ha descrito la actividad leishmanicida del extracto de *Zanthoxullum chiloperone*, del cual se aíslan **cantina-6-ona** y **metoxicantina-6-ona**, que fueron administrados de forma oral, subcutánea e intralesional en ratones infectados con *L. amazonensis*, resultando cantina-6-ona el producto más activo, con una DL<sub>50</sub> de 400 mg/kg y sin efectos de toxicidad<sup>37</sup>. Estos resultados hacen promisorio su uso en el tratamiento tópico de la leishmaniasis cutánea.



Cantina-6-ona



Metoxicantina-6-ona

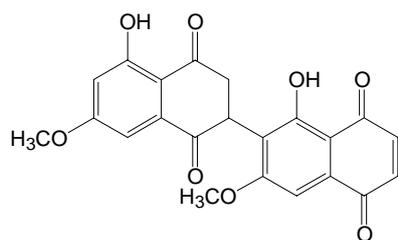
Entre otros productos naturales con actividad leishmanicida podemos citar a **diospirina**, una bis-naftoquinona aislada de las raíces de *Diospyros montana*<sup>38</sup> y la **plumbagina**, aislada de las raíces de *Pera benencis*<sup>39,40</sup>, planta utilizada en Bolivia para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea.

<sup>37</sup> Ferreira, M.; Rojas de Arias, A.; Torres, S.; Inchausti, A.; Nayakama, H.; Thouvenel, C.; Duret, P.; Hocquemiller, R.; Fournet, A. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, 80, 199-202.

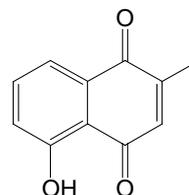
<sup>38</sup> Hazra, B.; Saha, A. K.; Ray, R.; Roy, D. K.; Banerjee, A. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1987**, 81, 738-741.

<sup>39</sup> Fournet, A.; Angelo, A.; Muñoz, V.; Roblot, F.; Hocquemiller, R.; Cavé, A. *J. Ethnopharmacol.* **1992**, 37, 159-164.

<sup>40</sup> Fournet, A.; Muñoz, V.; Roblot, F.; Hocquemiller, R.; Cavé, A. *Trop. Med. Parasitol.* **1992**, 43, 219-222.

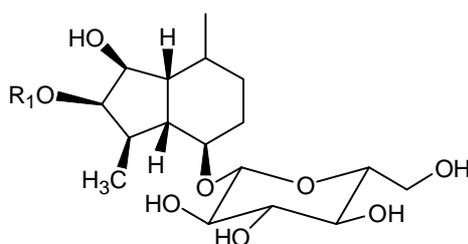


Diospirina

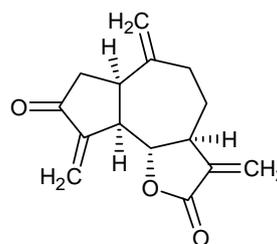


Plumbagina

El grupo más numeroso de productos naturales bioactivos lo constituyen los terpenos. Así, podemos destacar el monoterpreno glicosilado **arbortristósido A**, aislado de las semillas de *Nyctanthes arbortristis*<sup>41</sup> y la lactona sesquiterpénica, **dehidrozaluzanina C**, aislada de la hojas de *Munnozia maronii*<sup>42</sup>, los cuales reducen de forma significativa las lesiones causadas por *L. donovani* y *L. amazonensis*<sup>43</sup>.

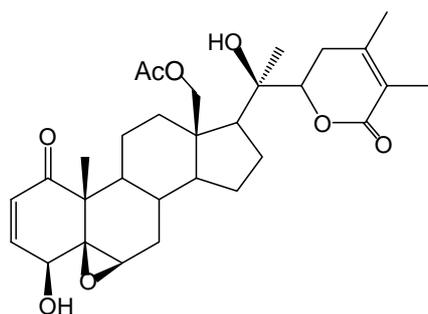


Arbortristósido A

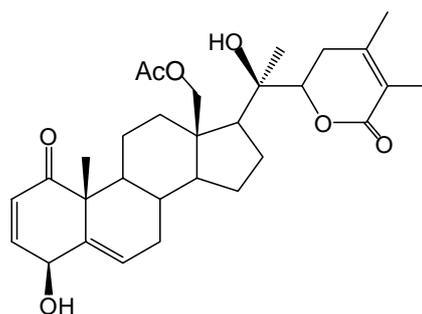


Dehidrozaluzanina C

Del fraccionamiento bioguiado de *Dunalia brachyacantha* se han aislado dos withanolidas, **18-acetoxiwithanolida D** y **18-acetoxi-5,6-deoxi-5-withanolida D**, con actividad frente a diferentes cepas de *Leishmania spp*<sup>44</sup>.



18-Acetoxiwithanolida D



18-Acetoxi-5,6-deoxi-5-withanolida D

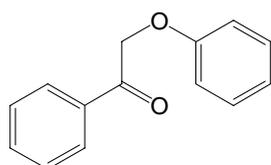
<sup>41</sup> Tandon, J. S.; Srivastava, V.; Guru, P. Y. *J. Nat. Prod.* **1991**, 54, 1102-1104.

<sup>42</sup> Fournet, A.; Muñoz, V.; Roblot R. F.; Hocquemiller, R.; Cavé, A.; Gantier, J. *Phyther. Res.* **1993**, 7, 111-115.

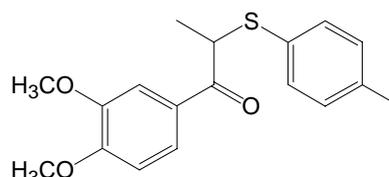
<sup>43</sup> Francois, G.; Passreiter, C. M.; Woerdenbag, H. J.; Van Loren, M. *Planta Medica.* **1996**, 62, 126-129

<sup>44</sup> Bravo, J. A.; Sauvain, M.; Gímenez, A.; Balanza, E.; Serani, E.: Massiot, G. *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 720-725.

El extracto de *Virola surinamensis* dio lugar al aislamiento de veinte neolignanós, los cuales han sido evaluados frente a formas promastigote de *L. donovani*, resultando activos la **8-fenoxi-acetofenona** y su derivado **3,4-dimetoxi-8-(4'-metoxiltiofenoxi)-propiofenona** y cuya administración en un modelo *in vivo* redujo al 50% de la carga parasitaria en el hígado<sup>45</sup>.



**8-Fenoxi-acetofenona**



**3,4-Dimetoxi-8-(4'-metoxiltiofenoxi)-propiofenona**

Durante las dos últimas décadas, se han intensificado las investigaciones en la búsqueda de nuevos leishmanicidas, destacando los excelentes resultados obtenidos con flavonoides tipo chalcona. Así por ejemplo se evaluaron una serie de chalconas naturales<sup>46</sup> y sintéticas<sup>47</sup> frente a diferentes cepas de *Leishmania*, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. El mecanismo de acción de este tipo de compuestos radica en la inhibición de la respiración del parásito, actuando sobre la deshidrogenasa de la mitocondria<sup>48</sup>. Así, estudios con la **lico-chalcona A**, aislada de *Glycyrrhiza sp*<sup>49-50</sup>, muestran que ésta inhibe la actividad fumarato reductasa (FRD), succinato deshidrogenasa (SDH), deshidrogenasa-NADH (NDH), succinato reductasa y NADH-citocromo C reductasa en la mitocondria del parásito. Estos resultados señalan a la FRD, una de las enzimas de la cadena respiratoria del parásito, como una diana específica y selectiva en la búsqueda de nuevos fármacos antiparasitarios<sup>51</sup>, ya que esta enzima no está presente en las células de los mamíferos. Por otra parte, a pesar de que las chalconas presentan como efecto

<sup>45</sup> Barata, L. E. S.; Santos, L. S.; Ferri, P. H.; Philipson, J. D.; Paine, A.; Croft, S. L. *Phytochemistry*. **2000**, 55, 589-595.

<sup>46</sup> Kayser, O.; Kiderlen, A. *Phytother. Res.* **2001**, 15, 148-152

<sup>47</sup> Nielsen, S. F.; Christensen, S.; Cruciani, G.; Kharazmi, A. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 4819-4832.

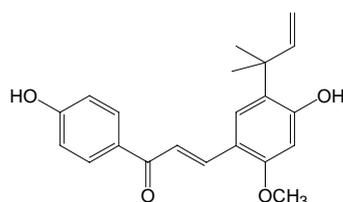
<sup>48</sup> Zhai, L.; Blom, J.; Chen, M.; Christensen, S. B.; Kharazmi, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, 39, 2742-2748.

<sup>49</sup> Chen, M.; Christensen, S. B.; Blom, J.; Lemmich, E.; Nadelmann, L.; Fich, K.; Theander, T. G.; Kharazmi, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, 37, 2550-2556.

<sup>50</sup> Chen, M.; Christensen, S. B.; Theander, T. G.; Kharazmi, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, 38, 1339-1344.

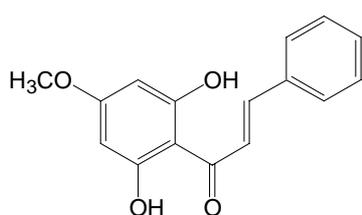
<sup>51</sup> Chen, M.; Zhai, L.; Christensen, S. B.; Theander, T. G.; Kharazmi, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45, 2023-2029.

secundario la supresión del sistema inmune, los estudios de relación estructura-actividad revelan que es posible separar la actividad leishmanicida y la inmunosupresora en este tipo de estructuras.

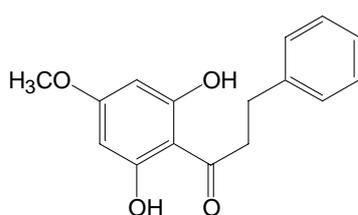


Licochalcona A

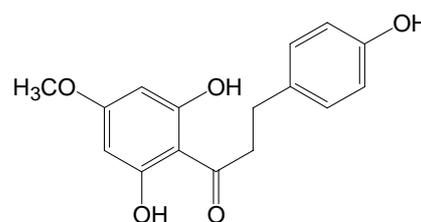
Estudios realizados con la **2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona**, aislada del extracto de *Piper aduncum*<sup>52</sup>, mostraron que ésta presenta una significativa actividad *in vitro* e *in vivo*, inhibiendo el crecimiento intracelular de *L. amazonensis*. Por otra parte, las dihidrochalconas **2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-dihidrochalcona** y **2',6',4-trihidroxi-4'-metoxi-dihidrochalcona** mostradas, aisladas de las hojas de *P. elongatum*<sup>53</sup>, presentan actividad frente a *L. braziliensis*, *L. tropica* y *L. infantum*. Con el fin de determinar los requerimientos estructurales para la expresión de dicha actividad, se evaluaron una serie de derivados semisintéticos de estos chalconas y compuestos sintéticos relacionados, concluyéndose que los derivados semisintéticos acetilados fueron los compuestos más prometedores.



2', 6'-Dihidroxi-4'-metoxichalcona



2',6'-Dihidroxi-4'-metoxi-dihidrochalcona



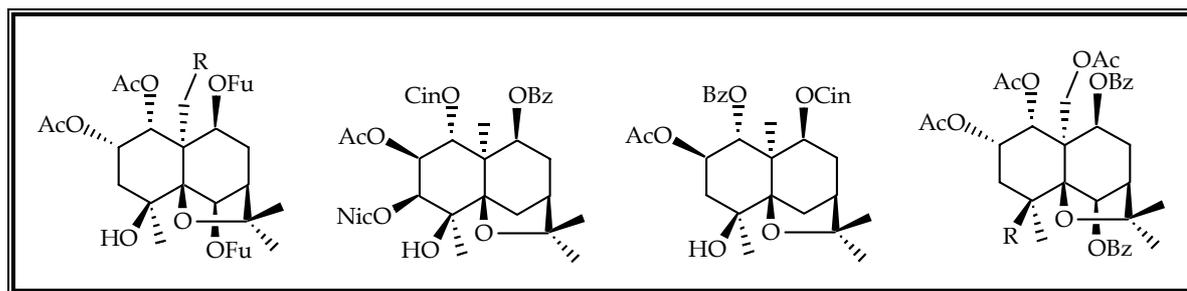
2',6',4-Trihidroxi-4'-metoxi-dihidrochalcona

Como se ha comentado anteriormente, la resistencia a los fármacos de uso actual constituye uno de los principales problemas en los tratamientos farmacológicos, por lo que la búsqueda de compuestos revertidores de la MDR en *Leishmania*, constituye una de las

<sup>52</sup> Torres-Santos, E. C.; Moreira, D. L.; Kaplan, M. A. C.; Meirelles, M. N.; Rossi-Bergman, B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43, 1234-1241.

estrategias a seguir. En este sentido, numerosos productos naturales tales como diterpenos<sup>54-55</sup>, flavonoides<sup>56</sup>, naftoquinonas<sup>57</sup>, esteroides<sup>58</sup> y saponinas<sup>59</sup>, han mostrado relevante efecto modulador de la MDR<sup>60</sup>.

Así mismo, se ha llevado a cabo un amplio estudio de sesquiterpenos dihidro- $\beta$ -agarfuranos naturales, asilados de especies de Celestraceae, así como derivados semisintéticos, resultando algunos de ellos excelentes revertidores del fenotipo MDR en *Leishmania* con diferentes niveles de selectividad y una baja toxicidad, permitiendo así la acumulación del fármaco intracelular. Los estudios de relación estructura-actividad cuantitativa tridimensional (QSAR) han permitido diseñar un modelo idóneo de este tipo de estructuras para la expresión de esta actividad. Alguno de estos metabolitos podrían ser considerados compuestos líderes para el desarrollo de futuros fármacos revertidores<sup>61-62</sup>.



Sesquiterpenos dihidro- $\beta$ -agarfuranos con actividad revertidora de la MDR

<sup>53</sup> Hermoso, A.; Jiménez, I. A.; Mamani, A. Z.; Bazzocchi, I. L.; Piñero, J. E.; Ravelo, A. G.; Valladares, B. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 3975-3980.

<sup>54</sup> Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzoti, V. G.; Motti, R.; Simón, P. N.; Dumontet, C. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 988-992.

<sup>55</sup> Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzoti, V.; Tablialaeta-Scafari, O.; Appendino, G.; Ballero, M. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 3395-3402.

<sup>56</sup> Pérez-Victoria, J. M.; Chiquero, M. J.; Conseil, G.; Dayan, D.; Di Pietro, A.; Barron, D. *Biochemistry.* **1999**, 38, 1736-1743.

<sup>57</sup> Chen, X.; Yang, L.; Zhang, N.; Turpin, J. A.; Buckheit, R. W.; Osterling, C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 2810-2816.

<sup>58</sup> Hirotsu, M.; Hirotsu, S.; Takayanagi, H.; Komiyama, K.; Yoshikawa, T. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 7975-7979.

<sup>59</sup> Choi, C.H.; Kang, G.; Min, Y. D. *Planta Med.* **2003**, 69, 235-240.

<sup>60</sup> Loganzo, F.; Discafani, C.M.; Annable, T.; Beyer, C.; Musto, S.; Hari, M. *Cancer Res.* **2003**, 63, 1838-1845.

<sup>61</sup> Cortés-Selva, F.; Jiménez, I. A.; Muñoz-Martínez, F.; Campillo, M.; Bazzocchi I. L.; Pardo, L.; Ravelo, A. G.; Castanys, S.; Gamarro, F. *Current Pharm. Design.* **2005**, 11, 1-15.

<sup>62</sup> Cortés-Selva, F.; Campillo, M.; Reyes, C. P.; Jiménez, I. A.; Castanys, S.; Bazzocchi, I. L.; Muñoz-Martínez, F.; Gamarro, F. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 576-587.

Sin lugar a dudas, los productos naturales podrían considerarse como líderes potenciales, bien actuando directamente como leishmanicidas o como revertidores de la MDR, sin embargo en muchas ocasiones su desarrollo como fármacos se ve limitado por la falta de interés de las compañías farmacéuticas y la necesidad de un mejor entendimiento de su biodisponibilidad.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN: ACTIVIDAD LEISHMANICIDA**

Uno de los objetivos propuestos en esta Memoria es el estudio fitoquímico de las distintas especies del género *Piper*, mediante fraccionamiento bioguiado, frente a formas promastigote de tres cepas de *Leishmania*: *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. donovani*. Así, en primer lugar se prepararon los extractos etanólicos de las hojas de cada una de las especies de *Piper* objeto de esta Memoria, los cuales fueron resuspendidos en agua y extraídos con diclorometano. Las fracciones de diclorometano y agua de las siete especies estudiadas fueron evaluadas para determinar su actividad leishmanicida. Los resultados se expresan como  $CI_{50}$  (concentración que inhibe el crecimiento del 50% de los parásitos).

**Tabla 20.** Actividad leishmanicida de las fracciones orgánicas de especies de *Piper*

Especie	Código	$CI_{50} \pm DE$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. donovani</i>
<i>P. aduncum</i>	<b>PA</b>	25.2 $\pm$ 0.5	36.9 $\pm$ 1.9	46.1 $\pm$ 0.9
<i>P. acutifolium</i>	<b>PC</b>	70.1 $\pm$ 2.5	36.1 $\pm$ 1.3	35.8 $\pm$ 1.5
<i>P. elongatum</i>	<b>PE</b>	69.7 $\pm$ 0.9	36.1 $\pm$ 0.2	70.2 $\pm$ 0.6
<i>P. glabratum</i>	<b>PG</b>	7.6 $\pm$ 0.4	7.6 $\pm$ 0.2	21.4 $\pm$ 0.9
<i>P. heterophyllum</i>	<b>PH</b>	35.2 $\pm$ 4.2	58.3 $\pm$ 5.8	60.8 $\pm$ 2.6
<i>P. pilliraneum</i>	<b>PP</b>	99.2 $\pm$ 1.9	100.4 $\pm$ 0.4	100.1 $\pm$ 6.1
<i>P. rusbyi</i>	<b>PR</b>	41.2 $\pm$ 7.6	40.9 $\pm$ 7.7	41.7 $\pm$ 9.2

Droga control: Pentamidina ( $CI_{50}$  10.0  $\mu\text{g/ml}$ ), DE: Desviación estandar

Los resultados obtenidos (tabla 20) mostraron que las fracciones acuosas fueron inactivas y las fracciones orgánicas de las siete especies estudiadas presentaron algún grado de actividad frente a las tres cepas de *Leishmania* evaluadas. Destacan las fracciones orgánicas correspondientes a *P. aduncum*, *P. glabratum* y *P. rusbyi* ( $CI_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$ ), siendo la más activa la de *P. glabratum*, con una  $CI_{50}$  de 7.6  $\mu\text{g/ml}$  para *L. amazonensis* y *L. braziliensis*, presentando además selectividad frente a estas dos cepas, ya que la  $CI_{50}$  que presentó frente a *L. donovani* fue de 21.4.  $\mu\text{g/ml}$ . Cabe destacar que dicho extracto posee una actividad superior a la pentamidina ( $CI_{50}$  10  $\mu\text{g/ml}$ ) utilizada como control en este ensayo y que constituye un fármaco de primera línea en el tratamiento de la leishmaniasis.

Una vez evaluada la actividad biológica de las fracciones orgánicas y acuosas, los distintos extractos de diclorometano fueron fraccionados mediante cromatografía líquida al vacío, utilizando diferentes sistemas de elusión, tal como se indica en la parte experimental. Las distintas fracciones así obtenidas fueron a su vez evaluadas para determinar su actividad leishmanicida y los resultados se muestran en la tabla 21, presentándose sólo los datos de aquellas fracciones que presentaron algún grado de actividad ( $CI_{50} \leq 60 \mu\text{g/ml}$ ).

**Tabla 21.** Actividad leishmanicida de las fracciones de las especies de *Piper*

Especie	Fracción	$CI_{50} \pm DE (\mu\text{g/ml})$		
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. donovani</i>
<i>P. aduncum</i>	<b>PA2</b>	26.3 $\pm$ 0.2	10.9 $\pm$ 0.4	24.1 $\pm$ 3.1
<i>P. acutifolium</i>	<b>PC4</b>	20.8 $\pm$ 0.7	19.8 $\pm$ 1.4	20.4 $\pm$ 0.7
	<b>PC5</b>	20.3 $\pm$ 2.5	19.9 $\pm$ 0.6	20.1 $\pm$ 0.4
<i>P. elongatum</i>	<b>PE4</b>	25.1 $\pm$ 0.6	17.0 $\pm$ 0.7	21.2 $\pm$ 0.7
	<b>PE5</b>	20.1 $\pm$ 0.2	20.8 $\pm$ 0.6	56.2 $\pm$ 0.8
<i>P. glabratum</i>	<b>PG4</b>	25.3 $\pm$ 0.6	24.4 $\pm$ 0.2	23.7 $\pm$ 1.0
	<b>PG5</b>	7.6 $\pm$ 1.4	22.6 $\pm$ 0.7	22.6 $\pm$ 0.7
<i>P. heterophyllum</i>	<b>PH4</b>	61.8 $\pm$ 4.4	58.3 $\pm$ 1.4	61.0 $\pm$ 4.0
	<b>PH5</b>	50.0 $\pm$ 2.3	50.8 $\pm$ 0.8	52.8 $\pm$ 6.4
<i>P. pilliraneum</i>	<b>PP2</b>	10.2 $\pm$ 2.9	14.1 $\pm$ 2.7	16.3 $\pm$ 2.5
<i>P. rusbyi</i>	<b>PR2</b>	26.1 $\pm$ 0.5	31.2 $\pm$ 0.4	24.2 $\pm$ 0.9

Droga control: Pentamidina ( $CI_{50}$  10.0  $\mu\text{g/ml}$ ), DE: Desviación estandar

Estas fracciones activas fueron sometidas a sucesivas cromatografías, como se indica en la parte experimental, con la finalidad de aislar e identificar los metabolitos responsable de la actividad leishmanicida. Posteriormente, se realizó el estudio cromatográfico de las fracciones no activas con el objetivo de aislar e identificar los metabolitos presentes, los cuales fueron así mismo evaluados. Los resultados obtenidos de la evaluación de todos los metabolitos aislados se presentan agrupados según las características estructurales de dichos metabolitos, a fin de facilitar su discusión y establecer, cuando fuera posible, una relación estructura-actividad que nos permitiera determinar los requerimientos estructurales en cada grupo de compuestos.

Así, se presentarán y discutirán los resultados de la actividad leishmanicida de los compuestos aislados en el siguiente orden:

- ◆ kavalactonas
- ◆ flavonoides
- ◆ derivados del ácido benzoico
- ◆ benzopiranos
- ◆ terpenos
- ◆ amidas y fenilpropanoides

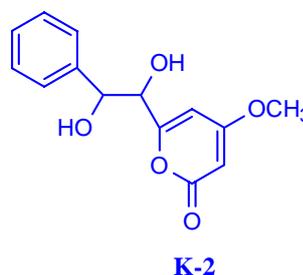
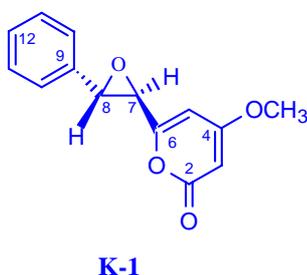
#### *Actividad leishmanicida de kavalactonas*

En la tabla 22 se presentan los datos de la actividad leishmanicida de las dos kavalactonas ensayadas, resultando **K-1** con una baja actividad ( $CI_{50}$  20  $\mu\text{g/ml}$ ), mientras que la presencia de un diol en **K-2** en lugar de un epóxido, hace que esta actividad se pierda completamente

**TABLA 22.** Actividad leishmanicida de **kavalactonas** frente a formas promastigote de *Leishmania spp*

Producto	$CI_{50} \pm DE$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. donovani</i>
<b>K-1</b>	20.4 $\pm$ 3.1	20.1 $\pm$ 3.1	20.0 $\pm$ 4.1
<b>K-2</b>	78.1 $\pm$ 1.4	101.3 $\pm$ 0.7	119.5 $\pm$ 1.9

Droga control: Pentamidina ( $CI_{50}$  10.0  $\mu\text{g/ml}$ ), DE: Desviación estandar



**Actividad leishmanicida de flavonoides**

Con respecto a los flavonoides evaluados (tabla 23), cabe destacar que tres de ellos, la flavokavaina B (**F-1**), la dihidrochalcona **F-3** y la flavanona **F-5**, resultaron más activos frente a las tres líneas de *Leishmania* ensayadas que la pentamidina (CI<sub>50</sub> 10 µg/ml) utilizada como control, siendo **F-1** (CI<sub>50</sub> 3.2 µg/ml) del orden de tres veces más potente.

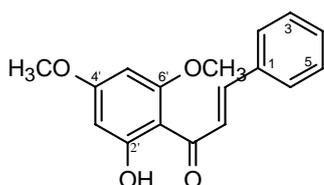
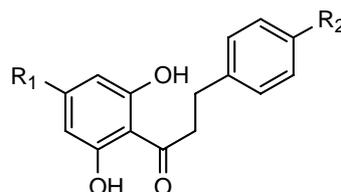
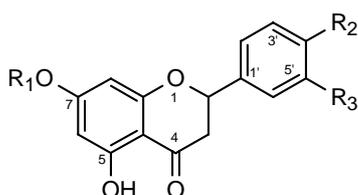
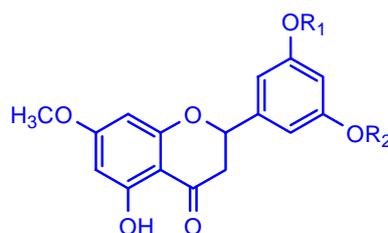
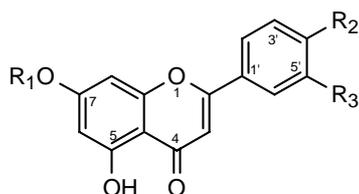
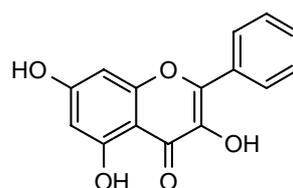
Por otra parte, las dihidrochalconas **F-2** y **F-4**, y la flavanona **F-6**, presentaron una actividad similar al control (CI<sub>50</sub> ≤ 10 µg/ml). En el esqueleto tipo dihidrochalcona, la presencia de un hidroxilo en C-4 incrementa la actividad al doble (**F-3** vs **F-2**, **F-4**), pasando de una CI<sub>50</sub> de 5 µg/ml en **F-3** a una CI<sub>50</sub> de 10 µg/ml en **F-2** y **F-4**. Por otra parte, al comparar los valores de CI<sub>50</sub> de las flavanonas, **F-5**, **F-6** y **F-7**, podemos concluir que en este grupo la presencia de un hidroxilo adicional en **F-6** (CI<sub>50</sub> 6.7-10.3 µg/ml) respecto a **F-5** (CI<sub>50</sub> 5.1-6.7 µg/ml) reduce ligeramente la actividad, mientras que la presencia de grupos metoxilo en la posiciones C-7 y C-4' en **F-7** (CI<sub>50</sub> 37.4-41.8 µg/ml) hace que esta actividad se pierda por completo.

**Tabla 23.** Actividad leishmanicida de **flavonoides** frente a formas promastigote de *Leishmania spp*

Producto	CI <sub>50</sub> ± DE (µg/ml)		
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. donovani</i>
<b>F-1</b>	<b>3.2 ± 2.4</b>	<b>3.2 ± 2.4</b>	<b>3.2 ± 1.4</b>
<b>F-2</b>	10.1 ± 1.6	6.7 ± 0.6	10.1 ± 1.4
<b>F-3</b>	<b>4.9 ± 0.2</b>	<b>5.2 ± 0.3</b>	<b>5.2 ± 0.3</b>
<b>F-4</b>	10.1 ± 0.6	9.8 ± 0.7	10.3 ± 0.3
<b>F-5</b>	<b>6.2 ± 0.9</b>	<b>5.1 ± 1.2</b>	<b>6.7 ± 0.7</b>
<b>F-6</b>	10.3 ± 0.9	6.7 ± 0.7	10.1 ± 1.1
<b>F-7</b>	41.8 ± 0.3	37.4 ± 0.3	40.9 ± 0.5
<b>F-8</b>	56.8 ± 1.5	<b>8.9 ± 0.2</b>	38.4 ± 0.5
<b>F-9</b>	55.0 ± 1.9	50.2 ± 0.3	50.1 ± 0.3
<b>F-10</b>	60.9 ± 0.8	73.7 ± 0.3	74.5 ± 0.9
<b>F-11</b>	78.4 ± 0.4	78.2 ± 0.4	79.3 ± 1.1
<b>F-12</b>	58.9 ± 0.9	58.9 ± 0.8	63.9 ± 0.8

Droga control: Pentamidina (CI<sub>50</sub> 10.0 µg/ml), DE: Desviación estandar

La flavanona **F-8** presentó una excelente selectividad para *Leishmania braziliensis* ( $CI_{50}$  de 8.9  $\mu\text{g/ml}$ ) frente a las otras dos líneas evaluadas ( $CI_{50}$  38.4 y 56.8  $\mu\text{g/ml}$  para *L. amazonensis* y *L. donovani*, respectivamente), mientras que **F-9** cuya única diferencia estructural es la presencia de un metoxilo en C-3', resultó inactivo frente a las tres líneas evaluadas ( $CI_{50} > 50$   $\mu\text{g/ml}$ ). Ello nos sugiere la necesidad de grupos hidroxilo en el anillo B en este tipo de flavonoides para la expresión de la actividad.

**F-1****F-2**  $R_1 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 = \text{H}$ **F-3**  $R_1 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 = \text{OH}$ **F-4**  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{H}$ **F-5**  $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$ **F-6**  $R_1 = R_3 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{OH}$ **F-7**  $R_1 = \text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{OCH}_3$ ,  $R_3 = \text{H}$ **F-8**  $R_1 = R_2 = \text{OH}$ **F-9**  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{OCH}_3$ **F-10**  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = R_3 = \text{H}$ **F-11**  $R_1 = \text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{OH}$ ,  $R_3 = \text{OCH}_3$ **F-12**

Cabe destacar que así como existe una amplia bibliografía de la actividad leishmanicida de chalconas y derivados, tanto de origen natural como sintético, sólo se han investigado unas pocas dihidrochalconas para este fin. En nuestro grupo de investigación se llevó a cabo el estudio de dos dihidrochalconas, aisladas de *P. elongatum*, así como de veinte compuestos sintéticos, estableciéndose una relación estructura-actividad<sup>53</sup>. Trabajos previos llevados a cabo en nuestro

grupo de investigación en colaboración con los Doctores Piñero y Valladares del Departamento de Parasitología de la Universidad de La Laguna y datos existentes en la bibliografía química, indican que las chalconas se caracterizan por presentar una excelente actividad leishmanicida, lo que ha motivado el interés en este tipo de productos naturales.

#### **Actividad leishmanicida de derivados del ácido benzoico**

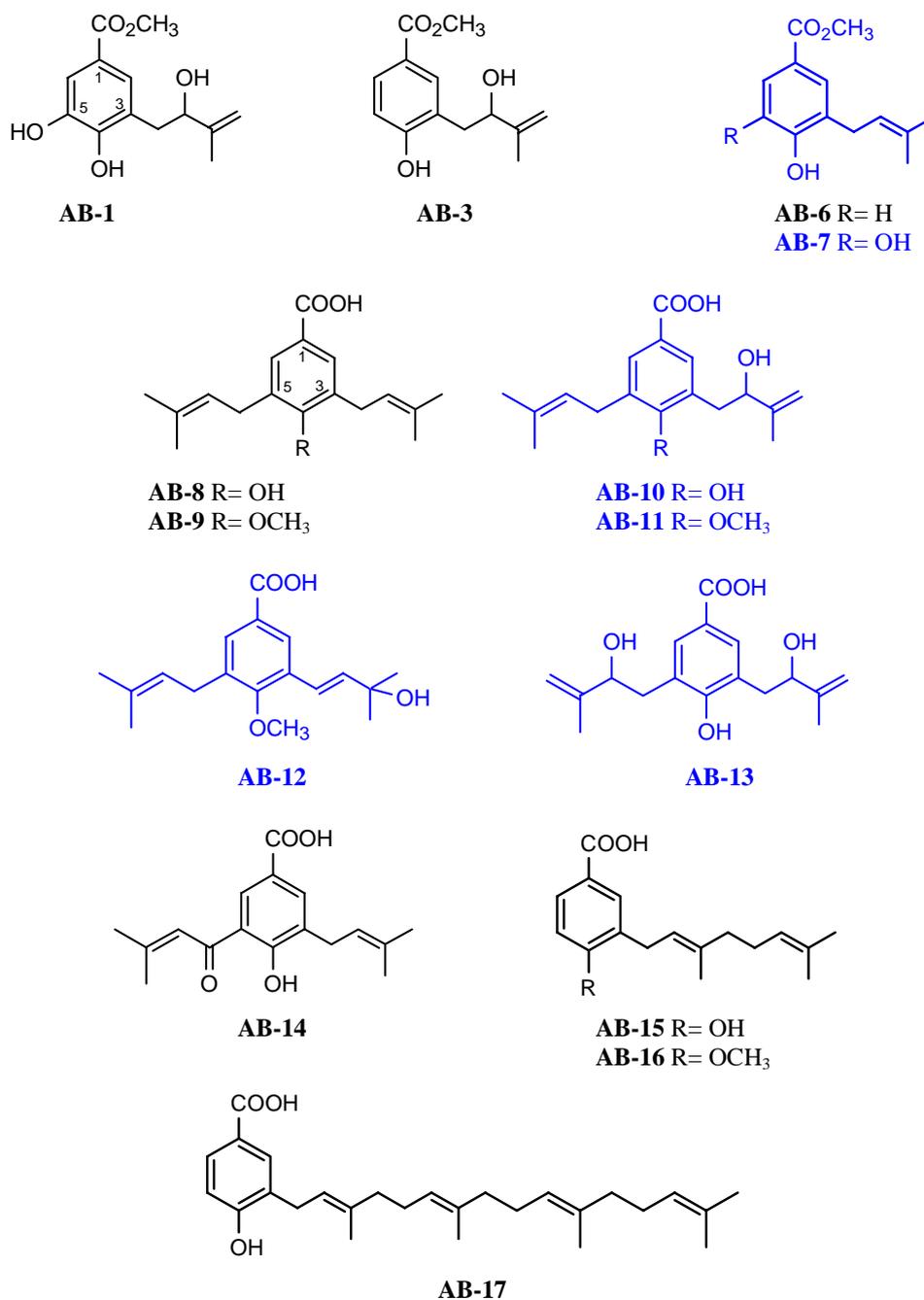
Con respecto a los compuestos evaluados dentro de este grupo (tabla 24), destacar que el compuesto **AB-7** presentó una  $CI_{50}$  13.8-18.5  $\mu\text{g/ml}$  frente a las tres cepas evaluadas, mientras que el compuesto **AB-6**, cuya única diferencia estructural con el anterior es que no presenta grupo hidroxilo sobre C-5, resultó inactivo.

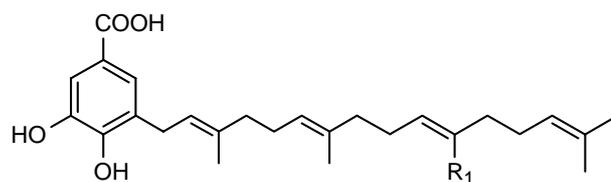
**Tabla 24.** Actividad leishmanicida de **derivados del ácido benzoico** frente a formas promastigote de *Leishmania spp*

Producto	$IC_{50} \pm DE$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. donovani</i>
<b>AB-1</b>	89.5 $\pm$ 0.8	81.9 $\pm$ 0.6	81.9 $\pm$ 0.6
<b>AB-3</b>	78.2 $\pm$ 1.4	74.4 $\pm$ 0.4	86.9 $\pm$ 1.0
<b>AB-6</b>	74.4 $\pm$ 2.7	74.4 $\pm$ 1.9	62.5 $\pm$ 1.1
<b>AB-7</b>	<b>18.2 <math>\pm</math> 0.7</b>	<b>13.8 <math>\pm</math> 0.5</b>	<b>18.5 <math>\pm</math> 0.2</b>
<b>AB-8</b>	45.3 $\pm$ 1.6	34.1 $\pm$ 0.5	40.0 $\pm$ 1.4
<b>AB-9</b>	>100	>100	>100
<b>AB-10</b>	67.6 $\pm$ 6.4	67.6 $\pm$ 3.4	67.3 $\pm$ 2.5
<b>AB-11</b>	>100	>100	>100
<b>AB-12</b>	>100	78.8 $\pm$ 2.2	>100
<b>AB-13</b>	>100	>100	>100
<b>AB-14</b>	<b>17.8 <math>\pm</math> 1.1</b>	<b>17.8 <math>\pm</math> 0.4</b>	<b>17.8 <math>\pm</math> 0.7</b>
<b>AB-15</b>	27.0 $\pm$ 4.1	27.0 $\pm$ 1.9	27.0 $\pm$ 1.5
<b>AB-16</b>	50.1 $\pm$ 0.9	<b>6.5 <math>\pm</math> 0.4</b>	50.3 $\pm$ 1.1
<b>AB-17</b>	56.8 $\pm$ 0.9	44.5 $\pm$ 0.9	41.8 $\pm$ 2.6
<b>AB-18</b>	56.1 $\pm$ 3.6	33.7 $\pm$ 0.5	42.9 $\pm$ 2.5
<b>AB-19</b>	77.0 $\pm$ 0.5	68.5 $\pm$ 1.5	53.9 $\pm$ 0.1
<b>AB-20</b>	64.2 $\pm$ 0.5	39.0 $\pm$ 1.5	43.9 $\pm$ 1.6
<b>AB-21</b>	63.1 $\pm$ 1.0	40.7 $\pm$ 0.8	46.8 $\pm$ 1.1

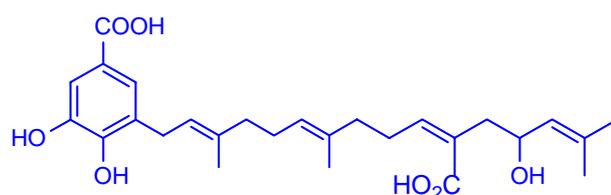
Droga control: Pentamidina ( $CI_{50}$  10.0  $\mu\text{g/ml}$ ), DE: Desviación estándar

Así mismo, el compuesto **AB-14** ( $CI_{50}$  17.8  $\mu\text{g/ml}$ ) que presenta un grupo carbonilo sobre C-1, a diferencia del resto de los derivados de esta serie, presentó una actividad similar a **AB-7** frente a las tres líneas de *Leishmania* evaluadas. Por otra parte, el compuesto **AB-16**, con sustituyente en C-3 y un grupo metoxilo en posición *para*, respecto a **AB-15**, fue selectivo frente a *L. braziliensis* ( $CI_{50}$  6.5  $\mu\text{g/ml}$ ), siendo incluso mas potente que el control.





**AB-18** R= CH<sub>3</sub>  
**AB-19** R= CHO  
**AB-20** R= COOH



**AB-21**

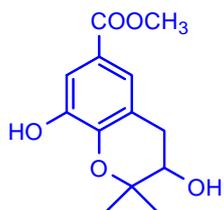
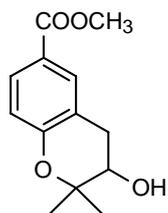
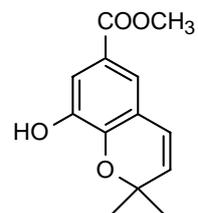
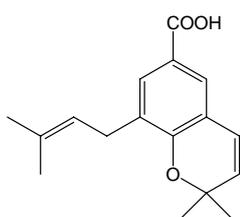
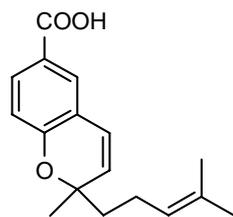
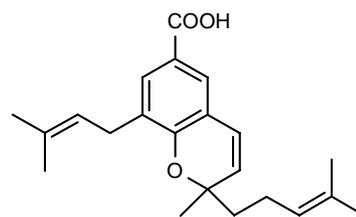
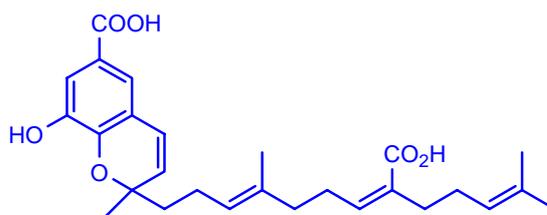
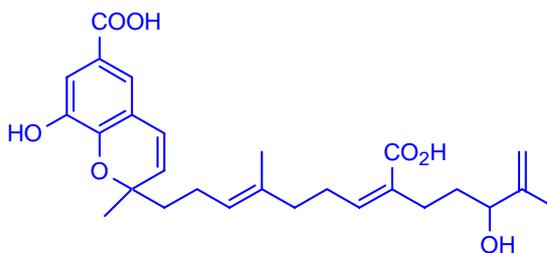
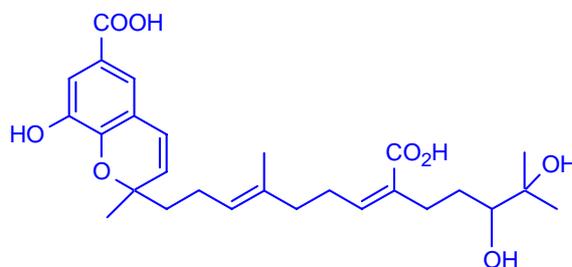
#### Actividad leishmanicida de benzopiranos

En lo que respecta a los benzopiranos ensayados (tabla 25), destacar que sólo los compuesto **B-13** y **B-14** presentaron una actividad similar a la del control, pentamidina. Si comparamos la estructura de estos dos compuestos con la de **B-11** se observa que este último carece de la cadena de isopentenilo sobre el carbono C-2, lo que sugiere que ésta es relevante para la actividad.

**TABLA 25.** Actividad leishmanicida de **benzopiranos** frente a formas promastigote de *Leishmania spp*

Producto	CI <sub>50</sub> ± DE (µg/ml)		
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. donovani</i>
<b>B-1</b>	>100	>100	37.9 ± 0.6
<b>B-4</b>	44.1 ± 0.9	20.8 ± 0.8	31.2 ± 1.7
<b>B-9</b>	>100	>100	95.8 ± 0.8
<b>B-11</b>	46.2 ± 0.8	46.6 ± 0.9	46.1 ± 0.3
<b>B-13</b>	<b>9.9 ± 1.1</b>	<b>10.2 ± 0.6</b>	<b>10.8 ± 0.9</b>
<b>B-14</b>	<b>9.7 ± 0.8</b>	<b>10.1 ± 0.7</b>	<b>10.4 ± 0.5</b>
<b>B-16</b>	52.1 ± 3.4	41.8 ± 2.1	45.3 ± 1.3
<b>B-18</b>	>100	>100	>100
<b>B-19</b>	>100	>100	>100

Droga control: Pentamidina (CI<sub>50</sub> 10.0 µg/ml), DE: Desviación estandar

**B-1****B-4****B-9****B-11****B-13****B-14****B-16****B-18****B-19**

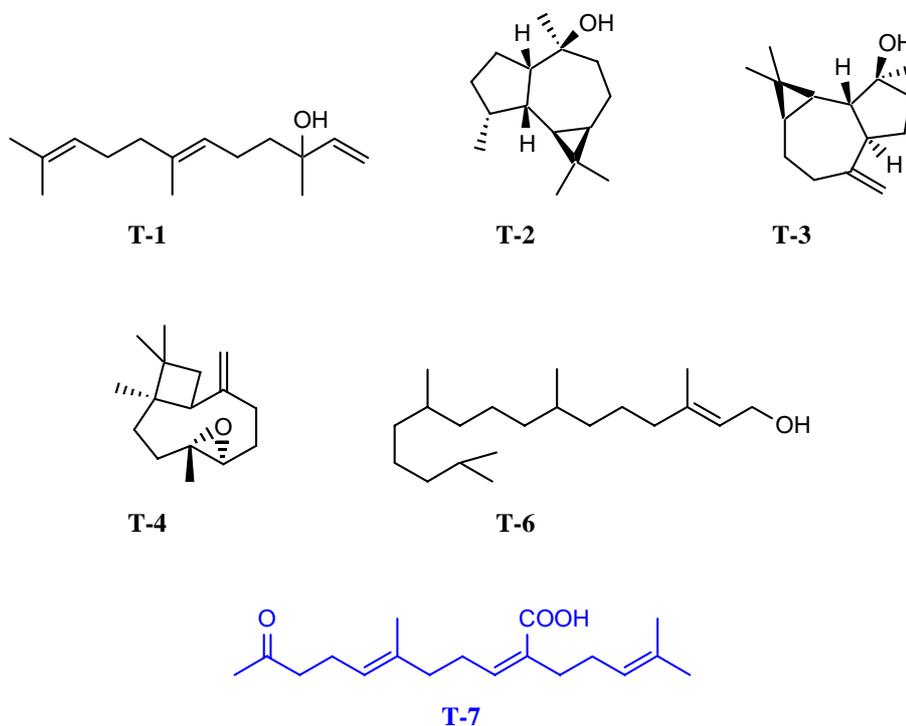
**Actividad leishmanicida de terpenos, amidas y fenilpropanoides**

En lo que respecta a estos grupos de metabolitos (tablas 26 y tabla 27), ninguno de ellos presento una actividad destacable.

**Tabla 26.** Actividad leishmanicida de **terpenos** frente a formas promastigote de *Leishmania spp*

Producto	CI <sub>50</sub> ± DE (µg/ml)		
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. donovani</i>
<b>T-1</b>	73.4 ± 0.6	73.4 ± 0.6	55.5 ± 0.1
<b>T-3</b>	38.8 ± 0.9	53.7 ± 4.1	63.2 ± 0.9
<b>T-4</b>	>100	>100	>100
<b>T-5</b>	62.3 ± 0.9	62.3 ± 1.8	62.3 ± 0.7
<b>T-6</b>	52.8 ± 0.1	43.9 ± 3.6	33.3 ± 0.6
<b>T-7</b>	40.9 ± 0.9	33.5 ± 1.8	28.5 ± 0.8

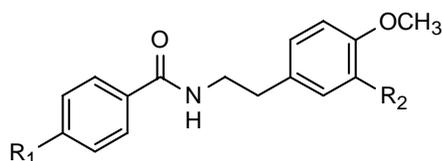
Droga control: Pentamidina (CI<sub>50</sub> 10.0 µg/ml), DE: Desviación estandar



**Tabla 27.** Actividad leishmanicida de **amidas y fenilpropanoides** frente a formas promastigote de *Leishmania spp*

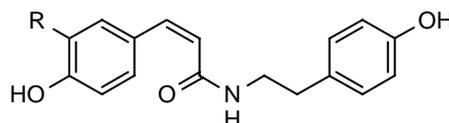
Producto	CI <sub>50</sub> ± DE (µg/ml)		
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. donovani</i>
<b>A-1</b>	>100	>100	>100
<b>A-2</b>	>100	>100	>100
<b>A-3</b>	>100	>100	>100
<b>A-4</b>	68.5 ± 1.5	>100	73.2 ± 1.6
<b>FP-1</b>	63.9 ± 0.6	58.3 ± 0.7	62.3 ± 0.7
<b>FP-4</b>	57.3 ± 0.7	56.8 ± 1.3	57.5 ± 0.3

Droga control: Pentamidina (CI<sub>50</sub> 10.0 µg/ml), DE: Desviación estandar



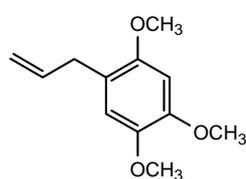
**A-1** R<sub>1</sub>= OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>= OH

**A-2** R<sub>1</sub>= OH, R<sub>2</sub>= H

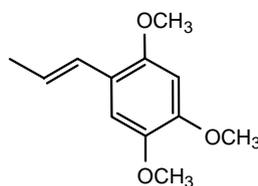


**A-3** R= OCH<sub>3</sub>

**A-4** R= H



**FP-1**

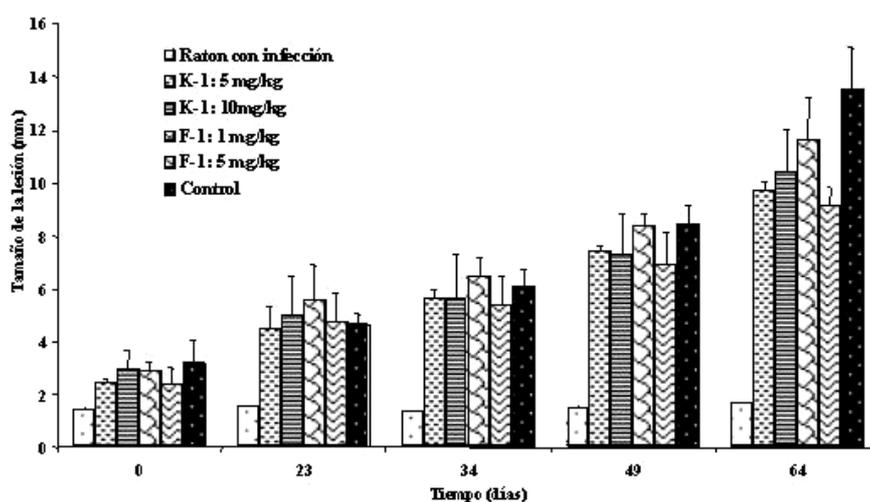


**FP-4**

### Evaluación de la actividad leishmanicida *in vivo*

La flavokavaina B (**F-1**), que resultó el compuesto más activo en los ensayos *in vitro* frente a las tres cepas de *Leishmania* utilizadas ( $CI_{50}$  3.2  $\mu\text{g/ml}$ ), fue evaluado en un modelo *in vivo*. Así mismo, se evaluó la kavalactona **K-1** a pesar de que presentó una baja actividad en los ensayos *in vitro* ( $CI_{50}$  20  $\mu\text{g/ml}$ ), dado la novedad estructural del mismo.

Como se muestra en la figura 1, la administración subcutánea de **flavokavaina B** en ratones infectados con *L. amazonensis*, a una dosis de 5 mg/kg/día durante 28 días, produjo después de ocho semanas del tratamiento, una reducción significativa ( $P < 0.05$ ) del tamaño de las lesiones (32.17 %) en comparación con los ratones no tratados. En este grupo, durante el último mes del experimento, el tamaño de la lesión aumentó gradualmente, mientras que en el grupo de ratones no tratados, se observó un aumento rápido de la lesión. Los ratones tratados con **K-1**, a dosis de 5 y 10 mg/kg/día, tuvieron una evolución similar durante el primer mes del experimento con la administración de ambas dosis. Por otra parte, en las últimas cuatro semanas del experimento, los ratones tratados con ambos compuestos presentaron una evolución similar. Los resultados obtenidos en estos ensayos *in vivo* muestran la eficacia de la **flavokavaina B** ( $P < 0.05$ ) a una dosis de 5 mg/kg/día y en menor medida la de la kavalactona.



**Figura 1.-** Efecto de **F-1** y **K-1** en el desarrollo de lesiones en ratones infectados con *L. amazonensis*. Los resultados son la media  $\pm$  D.E. por cinco ratones en cada grupo.

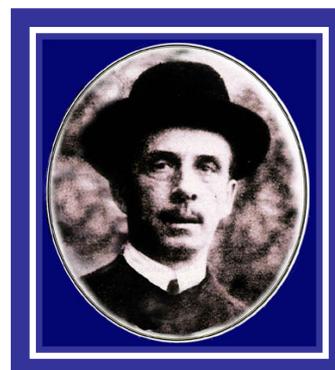
Los resultados obtenidos muestran que las especies de *Piper* estudiadas, presentan metabolitos con actividad leishmanicida. Así, podemos considerar que los flavonoides **F-1** a **F-6**, son los responsables de la actividad de los extractos de *P. aduncum*, *P. acutifolium*, *P. elongatum* y *P. rusbyi*, mientras el cromeno **B-14** responsable de la actividad del extracto de *P. pilliraneum*. Estos compuestos son realmente prometedores como leishmanicidas y por lo tanto las especies anteriormente citadas pueden ser consideradas como una fuente de estos agentes. El uso en la medicina popular de especies del género *Piper*, para el tratamiento de la leishmaniasis, en países donde la medicina moderna no cubre las necesidades primarias de salud, queda perfectamente justificado y en consecuencia validado.

Los trabajos futuros estarán encaminados a realizar modificaciones estructurales en los metabolitos activos especialmente de la flavokavaina B (**F-1**), con el fin de potenciar su actividad, mejorar su selectividad e investigar nuevos modelos de administración para el tratamiento de la leishmaniasis experimental.

# *Enfermedad de Chagas*

## ENFERMEDAD DE CHAGAS

La primera información que se tuvo sobre la enfermedad de Chagas fue en 1909, cuando el médico brasileño Carlos Chagas trabajando en la región de Minas Gerais describió que un insecto (barbeiros-vinchucas) transportaba en su intestino un parásito unicelular flagelado que se teñía con azul de tripan. Lo notable es que Carlos Chagas realizó un triple descubrimiento: el parásito, el vector y las manifestaciones clínicas de la enfermedad<sup>1</sup>.



Carlos Chagas

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana, es una zoonosis producida por el protozooario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. La principal vía de transmisión del *Trypanosoma* entre sus hospedadores es la vectorial por insectos de la familia Triatominae (*Rhodnius*, *Triatoma* y *Pastrogylus*) infectados con *T. cruzi*, aunque también se transmite por transfusiones sanguíneas (5-20%) y por vía congénita (0.5-8%)<sup>2</sup>.



Vinchuca



*Trypanosona cruzi*

A partir de cualquiera de estas vías de transmisión, la enfermedad de Chagas se desarrolla con diferentes manifestaciones clínicas según la etapa de la infección.

La **fase aguda** puede presentarse con o sin sintomatología. Cuando la sintomatología se hace evidente, puede ser muy variada, con signos como el de mazza-romaña o chagoma de inoculación, además de manifestaciones sistémicas comunes a otras enfermedades. En esta fase

<sup>1</sup> Díaz, J. C. P.; Schofield, C. J. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **1999**, 94 (1), 103-121.

<sup>2</sup> World Health Organization. *Tropical Disease Research: Chagas disease*. Disponible en <http://www.who.int/tdr/disease/chagas/default.htm>. (Fecha de acceso diciembre 2006).

los niveles elevados de parasitemia son controlados por la respuesta inmune. Esta respuesta no erradica completamente al parásito, manteniéndose una parasitemia subpatente durante toda la vida del hospedador.



**Signo de Romaña**  
(Enfermedad de Chagas)

Una vez superada la fase aguda los individuos infectados pasan por un período sin sintomatología clínica, llamada **fase indeterminada o asintomática**. Aproximadamente el 70% de los pacientes infectados permanece así durante toda su vida, conviviendo con el parásito, sin desarrollar daños importantes en sus tejidos. De estos pacientes aproximadamente un 30% de ellos, después de permanecer por un tiempo asintomático, desarrollan la fase sintomática con evidencia de lesiones en el tejido cardíaco y/o digestivo y la enfermedad puede ser mortal en ambos casos.

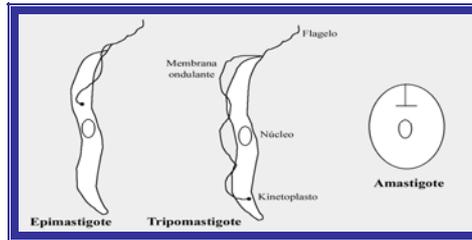
### **Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi***

El *Trypanosoma cruzi* es un parásito unicelular que alterna su vida entre dos hospedadores multicelulares, uno invertebrado (insecto vector) y uno vertebrado (mamífero hospedador), presentando un ciclo de vida digenético. En función de la forma general de las células, la posición relativa entre el núcleo y el cinetoplasto, así como las características del flagelo, presenta cuatro estadios morfológicos:<sup>3</sup>

- I.** Esferomastigote (triatominos)
- II.** Epimastigotes (triatominos)
- III.** Tripomastigotes (triatominos, hombre y otros mamíferos)
- IV.** Amastigotes (hombre y otros mamíferos)

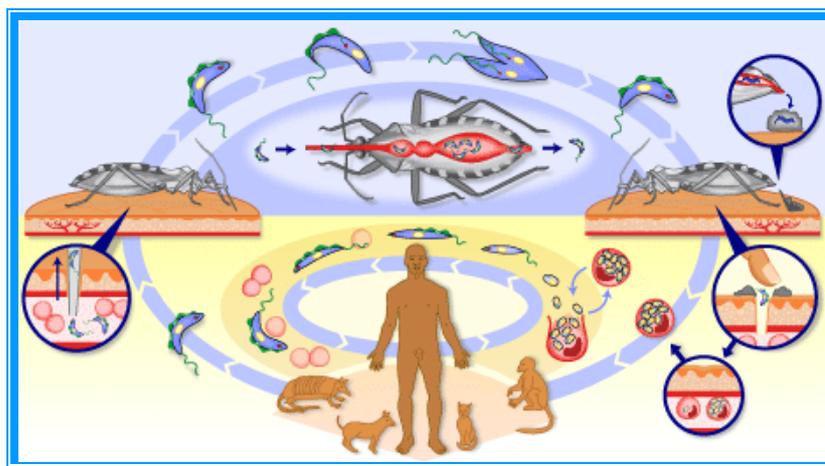
---

<sup>3</sup> Guzmán-Marín, E.; Zavala-Csastro, J. E.; Acosta-Viana, C. Y.; Rosado-Barrera, M. E. *Rev. Biomed.* **1999**, 10.



Estadios morfológicos de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo evolutivo puede partir desde el triatoma infectado con el *T. cruzi*, lo cual significa que en su intestino posterior tiene formas tripomastigotes metacíclicos. Al picar al hombre u otro mamífero para alimentarse (hematófago), defeca simultáneamente, dejando sobre la piel o mucosas la deposición u orina (deyecciones) con un elevado número de tripomastigotes metacíclicos, los cuales ingresan al organismo a través de las excoriaciones que se producen al rascarse el individuo y/o la contaminación de manos hacia las mucosas. Se forma así el llamado chagoma de inoculación, por la invasión de las células del tejido celular laxo cercano al lugar de penetración, donde los tripomastigotes metacíclicos se transforman en amastigotes, que se multiplican por fisión binaria, hasta reventar la célula y pasar a la circulación, transformándose a la forma tripomastigote circulante, diseminándose por todo el organismo e invadiendo nuevos tejidos, especialmente el corazón y la musculatura de vísceras huecas. Este ciclo endógeno se repite al parecer toda la vida de la persona o mamífero infectado, lo cual permite la presencia de parasitemia abundante en la fase aguda, aunque disminuye notablemente en las fases indeterminadas y crónicas.



Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

## Epidemiología

La enfermedad de Chagas es una enfermedad crónica debilitante que afecta a la salud, el bienestar y la productividad de un gran número de seres humanos y representa un problema de salud pública en América Latina. Se encuentra ampliamente distribuida en el continente Americano desde el sur de los Estados Unidos hasta Chile y Argentina, y en algunos países de las Antillas.



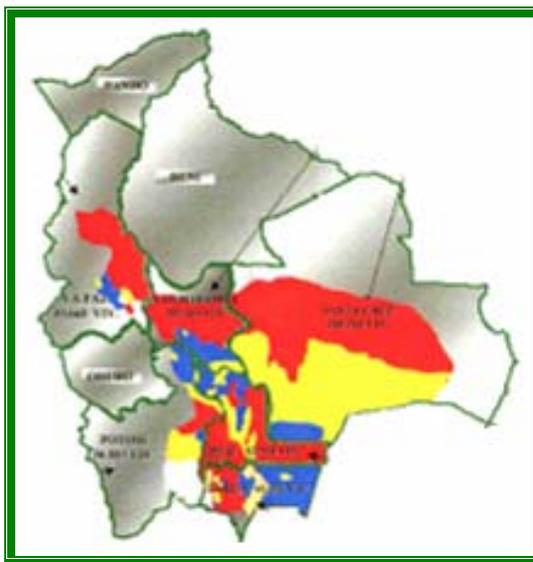
Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas

Del total de los casi 400 millones de personas que habitan los países latinoamericanos, la Organización Mundial de la Salud publicó que unos 100 millones (el 25% de la población) se encuentran expuestas a contraer la infección y el número de personas infectadas es de 16 a 19 millones, de los cuales no menos del 10% desarrollan cardiopatías chagásicas crónicas, constituyendo esta enfermedad el 10% de las causas de muerte entre adultos de las áreas endémicas<sup>4</sup>. Estudios epidemiológicos indican que en el 30% de la población infectada manifiesta la enfermedad clínicamente, es decir que alrededor de 4,8 a 5,4 millones de personas presentan síntomas clínicos atribuibles a la enfermedad de Chagas<sup>5</sup>.

<sup>4</sup> World Helth Organization Expert Comité. *World Helth Organ. Tech. Res. Ser.* **2002**, 905, 1-109.

<sup>5</sup> *Repor of the Scientific Working Groups on Chagas Disease.* **2005**, Buenos Aires, Argentina.

En Bolivia la enfermedad de Chagas representa un serio problema de salud pública tanto por su magnitud como por su impacto. El área de dispersión del vector cubre aproximadamente el 60% del territorio, en zonas geográficas comprendidas entre los 300 y 3.500 m.s.n.m., con una población en riesgo de 3.7 millones de habitantes, resultando una seroprevalencia del 40% para la población total del país<sup>6</sup>.



**Zonas endémica de la enfermedad de Chagas en Bolivia**

La transmisión por vectores representa más del 80% de todos los casos y de la cadena epidemiológica de la enfermedad, el vector en el domicilio es el más vulnerable hasta el momento; así, el promedio de vinchucas infectadas con el parásito *T. cruzi* es del 30%, alcanzando en algunas áreas hasta el 90% de positividad.

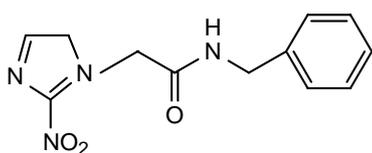
La situación socioeconómica de la población boliviana, donde existe una gran migración campo-ciudad, hace que esta patología manifieste una de sus formas de transmisión a través de la vía transfusional, especialmente en grandes centros urbanos. También es necesario resaltar los altos índices de infección en mujeres embarazadas, siendo el Chagas congénito otra forma importante de transmisión, aunque aún no se conoce realmente su magnitud.

<sup>6</sup> Guillen G. *Anuario epidemiológico 2000*. 2000, 65-69, OPS-OMS.

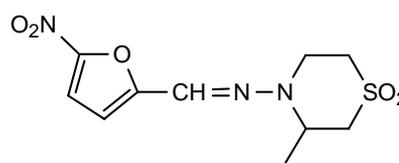
La enfermedad de Chagas, más que cualquier otra enfermedad parasitaria, se relaciona con el desarrollo económico y social, ya que las vinchucas y la enfermedad que ellas transmiten existirán en Latinoamérica mientras persista la vivienda precaria, la migración frecuente de la población y la rápida urbanización, lo cual se potencia con la falta de información y desconocimiento del problema entre las comunidades afectadas.

### Tratamiento de la enfermedad de Chagas

Los fármacos más utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son compuestos nitroheterociclos: **nifurtimox** (nitrofurano) y **benznidazol** (nitroamida), ambos descubiertos en los años 70. Estos dos fármacos son hasta la fecha los únicos internacionalmente aprobados<sup>7</sup>.



**Benznidazol**



**Nifurtimox**

**Nifurtimox** (Lampit), posee un mecanismo de acción vía reducción del grupo nitro a radicales aniónicos inestables, lo cual produce una reacción que conlleva a la producción de especies de oxígeno altamente tóxicas, anión superóxido y peróxido de hidrógeno, ya que el parásito es deficiente en mecanismos de detoxificación para estas especies de oxígeno. El mecanismo del **benznidazol** (Rochagan, Radanil), se debe a su unión a macromoléculas ocasionando daño a nivel del ADN del parásito<sup>8</sup>.

Nifurtimox y benznidazol, se utilizan en las fases aguda y crónica recientes de la enfermedad, casos congénitos y en infección accidental. El tiempo de duración del tratamiento oscila entre 90-120 días y su administración es por vía oral, en dos o tres dosis diarias. Ambos fármacos tienen actividad en la fase aguda, con un 80% de cura parasitológica<sup>9</sup>, que se define como un resultado negativo para todas las pruebas de parasitología y serología. Tienen efectos

<sup>7</sup> Gildert, D. N.; Moellering, R. C.; Sande, M. A. *Guide to Antimicrobial Therapy*. 2003, 33 Ed.

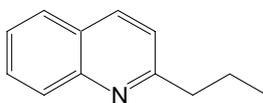
<sup>8</sup> Goodman and Gilman's. *The pharmacological bases of therapeutics*. 2002, 9<sup>th</sup> Ed., Editorial McGraw-Hill.

<sup>9</sup> Cancado, J. R. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1999, 94 (Suplemento 1), 331-336.

colaterales, probablemente como consecuencia del daño oxidativo en el tejido del hospedador. En las primeras semanas de tratamiento puede aparecer anemia, intolerancia digestiva y fotodermatitis, debiéndose interrumpir el tratamiento en algunos casos.

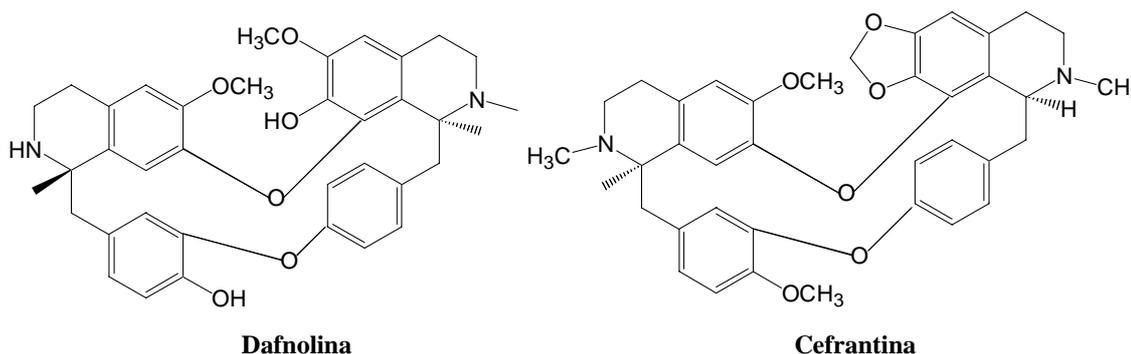
### PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD TRIPANOCIDA

Los alcaloides derivados de las 2-alkilquinolinas, como la **2-*n*-propilquinolina** presentan una alta eficacia en ratones infectados con *T. cruzi* en fase aguda, con resultados similares al fármaco control benzimidazol<sup>10</sup>.



**2-*n*-propilquinolina**

Alcaloides tipo bisbencilisoquinolínicos, están presentes en muchas especies de plantas de las familias Menispermaceae, Ramunculaceae, Berberidaceae, Monimiaceae, Annonaceae y Laureaceae. Así, **cefrantina** y **dafnolina**, aislados de *Stephania cepharantha*, presentan actividad tripanocida frente a *T. cruzi* y estudios *in vivo* revelan que producen una reducción significativa de la parasitemia comparado con el control, benzimidazol. Su mecanismo de acción radica en la inhibición de la enzima tripanotona reductasa, enzima responsable de la eliminación de especies reactivas de oxígeno, ya que concentraciones altas de estas especies tóxicas del oxígeno son las responsables de la muerte del parásito<sup>11</sup>.



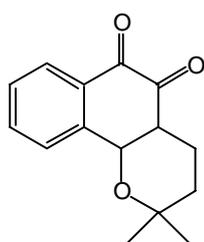
**Dafnolina**

**Cefrantina**

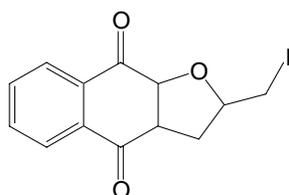
<sup>10</sup> Nayakama, H.; Ferreira, M. E.; Rojas de Arias, A.; Vera de Bilbao, N.; Torres, S.; Schinini, A.; Fournet, A. *Phytother. Res.* **2001**, 15, 630-632.

<sup>11</sup> Fournet, A.; Inchausti, A.; Yaluff, G.; Rojas de Arias, A.; Guinaudeau, H.; Bruneton, J.; Breindenchach, M.; Karplus, P.; Faerman, C. H. *J. Enzyme Inhib.* **1998**, 13, 1-9.

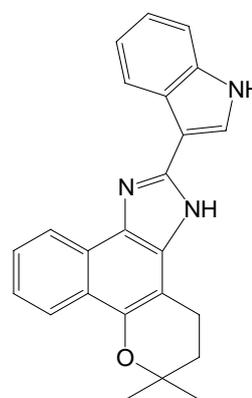
Otro grupo de productos naturales de interés son las quinonas, entre las que podemos citar a las naftoquinonas abundantes en especies del género *Tabebuia*, árbol conocido como “lapacho” en Argentina, “tajibo” en Bolivia y “tajy” en Paraguay, donde es utilizado como planta medicinal. El **lapachol** (2-hidroxi-naftoquinona) y  **$\beta$ -lapachona** presentan actividad frente a las formas promastigote de *T. cruzi*. Se han preparado numerosos derivados semisintéticos como los naftoimidazoles<sup>12</sup> y naftofuranoquinonas<sup>13</sup>, siendo los más activos un derivado del **naftoimidazol** con una  $CE_{50}$  de 15.4  $\mu$ M, que presenta un sustituyente indólico y la **2-iodometil-2,3-dihidro-nafto-[2,3-*b*]-furan-4,9-diona** ( $CI_{50}$  158  $\mu$ M), ambos más activos que el control violeta de cristal ( $CI_{50}$  536  $\mu$ M).



**$\beta$ -Lapachona**



**2-Iodometil-2,3-dihidro  
-nafto-[2,3-*b*]-furan-4,9-diona**



**Naftoimidazol**

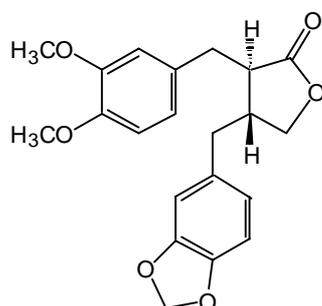
Los lignanos tipo dibenzilbutirolactona, son otra clase productos naturales con diversas actividades biológicas. Así del extracto de hexánico de las hojas de *Zanthoxylum naranjillo* se han aislado 7 lignanos, los cuales fueron evaluados en ratones infectados con *T. cruzi*, resultando el producto más activo (-)-**metilpluviatolida**<sup>14</sup>. Este resultado prometedor, llevó a la síntesis parcial de diversos derivados, obteniéndose en estos estudios la (-) **hinokinina** con una  $CI_{50}$  de 0.7  $\mu$ M, similar al control benznidazol (0.8  $\mu$ M)<sup>15</sup>.

<sup>12</sup> De Moura, K. C. G.; Salomao, K. Menna-Barreto, R. F. S.; Emery, f. S.; Pinto, M. F. R.; Pinto, A. V.; De Castro, S. L. *European J. Med. Chem.* **2004**, 39, 639-645.

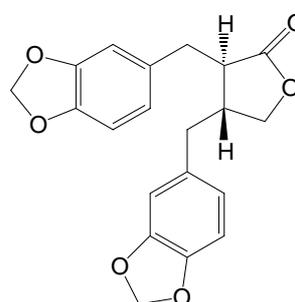
<sup>13</sup> Silva, R. S. F.; Costa, E. M.; Trindale, U. L. T.; Teixeira, D. V.; Pinto, M. C. F. R.; Santos, G. L.; Malta, V. R. S.; De Simone, C. A.; Pinto, A. V.; De Castro, S. L. *European J. Med. Chem.* **2006**, 41, 526-530.

<sup>14</sup> Bastos, J. K.; Albuquerque, S.; Silva, M. L. *Planta Med.* **1999**, 65, 541-544.

<sup>15</sup> Souza, B. A.; Da Silva, R.; Pereira, A. C.; Royo, V. A.; Saravia, J.; Montanheiro, M.; Souza, G. H. B.; Da Silva Filho, A. A.; Granado, M. D.; Donate, P. M.; Bastos, J. K.; Albuquerque, S.; Silva, M. L. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 303-307.

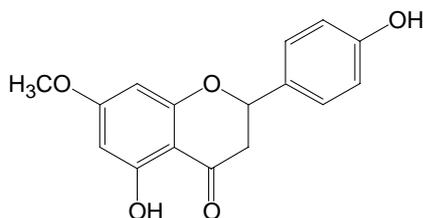


(-)-Metilpluviatolida

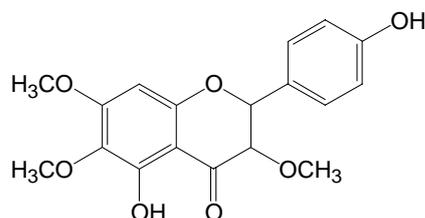


(-) Hinokinina

En un esfuerzo por descubrir nuevos compuestos para tratar o prevenir la enfermedad de Chagas, se estudiaron 50 especies de la familia Asteraceae de las sabanas del Brazil. En este estudio se encontró que el extracto de *Trixis vauthieri* L presentaba actividad tripanocida y el fraccionamiento bioguiado condujo al aislamiento de dos flavonoides, **sakuranetina** y **7-metoxi-aromadendrina**, como los metabolitos responsables de la actividad tripanocida del extracto, con una actividad lítica del 100% sobre el parásito<sup>16</sup>.



Sakuranetina



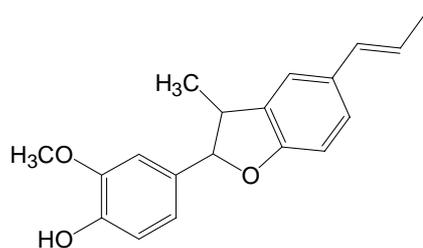
7-Metoxi-aromadendrina

Del extracto de acetato de etilo de las hojas de *Piper regnellii* se aislaron una serie de neolignanicos activos frente a *T. cruzi*, siendo los productos más activos, **eupomatenoide 5** y **6**, con una  $CI_{50}$  de 7.0 y 7.5  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente<sup>17</sup>. **Eupomatenoide-5** produce alteraciones en la ultraestructura del parásito y cambios morfológicos como vacuolización del citoplasma, daño mitocondrial y multinucleación<sup>18</sup>.

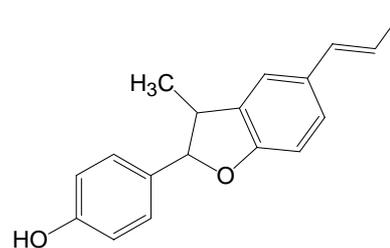
<sup>16</sup> Ribeiro, A.; Pilo-Velos, D.; Romanha, A. J.; Zani, C. L. *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 836-838.

<sup>17</sup> Luize, P. S.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B. P.; Cortéz, D. A. G.; Nakamura, C. V. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, 29, 2126-2130.

<sup>18</sup> Luize, P. S.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B. P.; Cortéz, D. A. G.; Morgado-Díaz, J. A.; De Souza, W.; Nakamura, C. V. *Parasitol. Res.* **2006**, 100, 31-37.

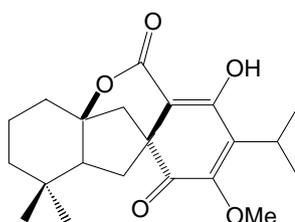


**Eupomatenoide-5**



**Eupomatenoide-6**

**Komarovispirona**, un diterpeno con un nuevo esqueleto, aislado de *Dracocephalum komarovi*, presentó actividad tripanocida frente a las formas epimastigote de *T. cruzi* con una CI<sub>50</sub> de 23  $\mu$ M, siendo su posible mecanismo de acción la producción de especies reactivas de oxígeno en el parásito, de forma similar al modo de acción de las naftoquinonas<sup>19</sup>.



**Komarovispirona**

---

<sup>19</sup> Uchiyama, N.; Ito, M.; Kiuchi, F.; Honda, G.; Takeda, Y.; Khodzhimatov, O. K.; Ashurmetov, O. A. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 531-533.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN: ACTIVIDAD TRIPANOCIDA

Los metabolitos seleccionados para evaluar la actividad tripanocida frente a *Trypanosoma cruzi*, son los que se detallan a continuación:

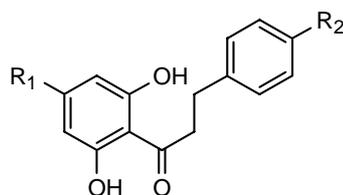
- *Kawalactonas*: K-1 y K-2.
- *Flavonoides*: F-2, F-3, F-4, F-5, F-6, F-7, F-8, F-9, F-10, F-11 y F-12.
- *Derivados del ácido benzoico*: AB-1, AB-3, AB-6, AB-7, AB-8, AB-9, AB-10, AB-11, AB-12, AB-13, AB-14, AB-16, AB-18, AB-17, AB-20, AB-21.
- *Cromenos*: B-1, B-4, B-9, B-11, B-13, B-14, B-16, B-18 y B-19.
- *Terpenos*: T-1, T-2, T-3, T-4, T-6 y T-7.
- *Amidas y fenilpropanoides*: A-1, A-2, A-3, A-4, FP-1 y FP-4.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla, en la cual de los productos ensayados sólo se reflejan aquellos que presentaron un  $CI_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$ .

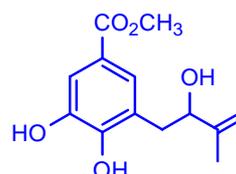
**TABLA 28.** Actividad tripanocida de metabolitos aislados de especies de *Piper*

Producto	$CI_{50} \pm DE$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) <i>T. cruzi</i>	Producto	$CI_{50} \pm DE$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) <i>T. cruzi</i>
<b>F-2</b>	$10.0 \pm 0.9$	<b>B-1</b>	$18.7 \pm 0.2$
<b>F-3</b>	$6.7 \pm 0.6$	<b>B-4</b>	$16.8 \pm 1.0$
<b>F-4</b>	$19.8 \pm 0.5$	<b>B-9</b>	$11.2 \pm 1.3$
<b>AB-1</b>	$16.4 \pm 0.8$	<b>B-13</b>	$20.0 \pm 0.2$
<b>AB-3</b>	$15.6 \pm 0.7$	<b>T-3</b>	$11.5 \pm 1.2$
<b>AB-7</b>	$18.5 \pm 0.3$	<b>T-6</b>	$10.7 \pm 0.4$
<b>AB-14</b>	$16.5 \pm 0.5$	<b>Anfotericina B</b>	0.2

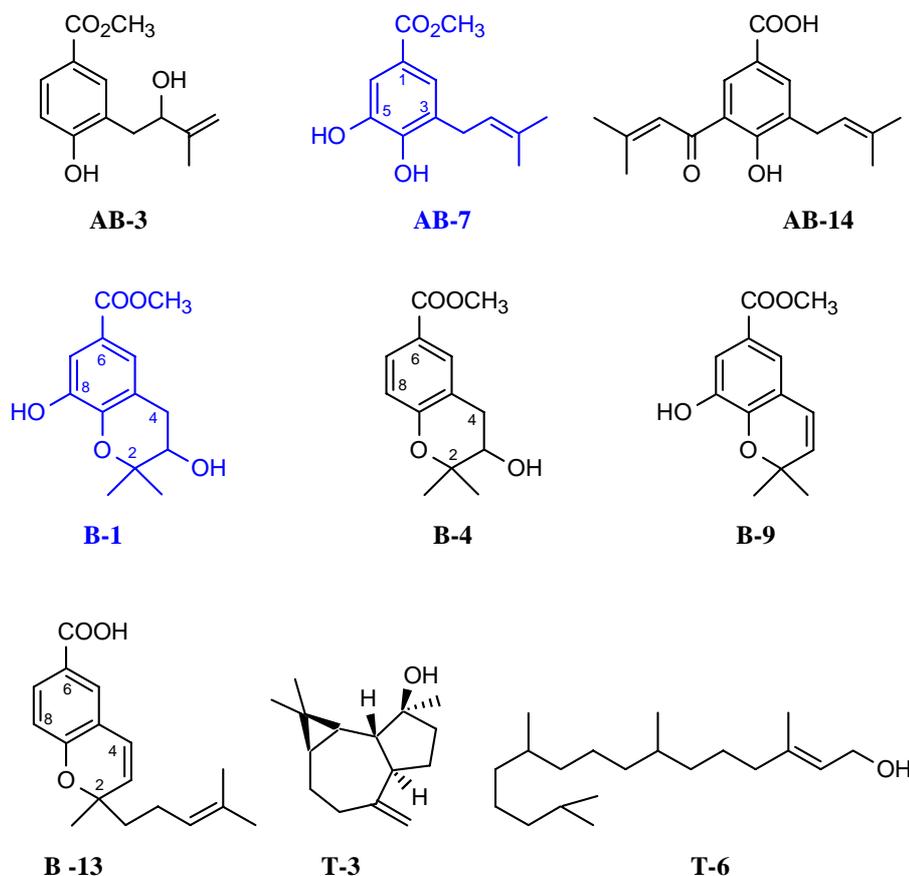
DE: Desviación estandar



**F-2**  $R_1 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 = \text{H}$   
**F-3**  $R_1 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 = \text{OH}$   
**F-4**  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{H}$



**AB-1**



El análisis de los resultados nos permite deducir que de los cincuenta compuestos evaluados, trece mostraron algún grado de actividad ( $\text{CI}_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$ ). Así, los compuestos **B-13**, **F-4**, **B-1**, **AB-7**, **B-4**, **AB-14**, **AB-1** y **AB-3** presentaron una baja actividad con una  $\text{CI}_{50}$  20-15.6  $\mu\text{g/ml}$ . Por otra parte, los terpenos **T-3** y **T-6** y las dihidrochalconas **F-2** y **F-3** presentaron una actividad moderada, resultando este último el más activo de los compuestos ensayados ( $\text{CI}_{50}$  6.7  $\mu\text{g/ml}$ ). Cabe destacar que este compuesto presentó así mismo una excelente actividad frente a *Leishmania*, lo que nos sugiere que la presencia del grupo metoxilo en posición C-4' y el hidroxilo sobre C-4 del esqueleto de dihidrochalcona son relevantes para la actividad antiparasitaria.

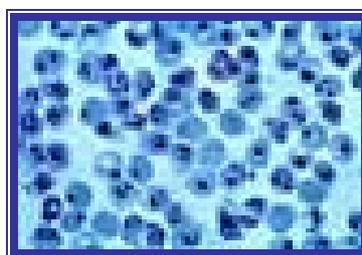
*Malaria*

## MALARIA

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria provocada por la infección de diferentes especies de protozoos parásitos pertenecientes al género *Plasmodium*. La enfermedad en el hombre está causada por cuatro especies diferentes: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. De ellas, la especie *P. falciparum* es la más relevante, por ser altamente infectante, producir gran morbilidad, ser la especie más agresiva con el índice de mortalidad más alto, estar ampliamente distribuida y ser la causa más frecuente de malaria endémica (provoca el 80% de los casos de malaria)<sup>1</sup>.



*Anopheles*



*Plasmodium falciparum*

El parásito causante de la malaria tiene un ciclo biológico que se reparte entre un huésped vertebrado y un insecto vector, el mosquito *Anopheles*. El parásito se transmite de una persona a otra únicamente a través de la picadura de los mosquitos hembra y de las 380 especies de *Anopheles* sólo las hembras de 60 especies son capaces de transmitir la enfermedad.

Las manifestaciones clínicas de la malaria son escalofríos y palidez cutánea, que se alternan con sensación de calor y rubefacción cutánea, sequedad e hipertermia. Frecuentemente, el paroxismo febril se acompaña de cefalea, mialgia, hepatoesplenomegalia y anemia.



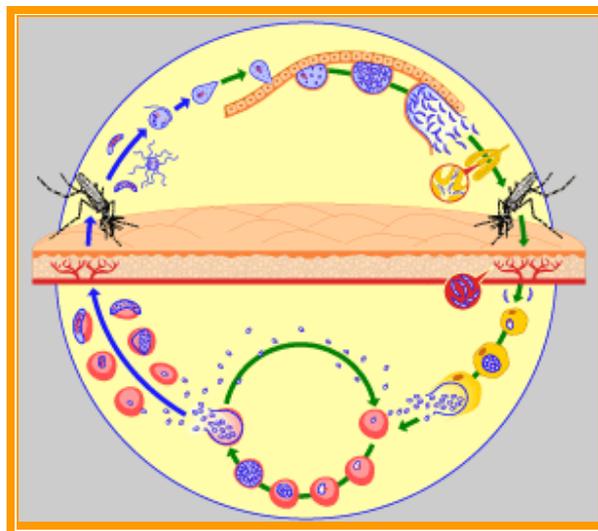
**Enfermo de malaria**

<sup>1</sup> World Health Organization. [www.who.int/tdr/disease/malaria/diseaseinfo.htm](http://www.who.int/tdr/disease/malaria/diseaseinfo.htm). Fecha de acceso diciembre 2006.

La infección por *P. falciparum* puede complicarse con un cuadro de malaria grave, caracterizada por una anemia importante (hematocrito  $<20\%$ ), hiperparasitemia ( $>5\%$ ), hipoglucemia, afección renal y cerebral, con alteración de la conciencia y coma.

### Ciclo biológico

El ciclo vital del parásito es heteroxénico, con alternancia de la reproducción sexual (esporogónica), que ocurre en el mosquito *Anopheles* y la asexual (esquizogónica), que tiene lugar en el hombre<sup>2</sup>.



Ciclo biológico de *Plasmodium*

El ciclo comienza cuando un mosquito *Anopheles* hembra libre de parásitos pica a una persona infectada con malaria, ingiere con la sangre gametocitos sexuales del parásito, macrogametocitos (femeninos) y microgametocitos (masculinos), los cuales al llegar al estómago del parásito inician la reproducción sexual, de forma que el microgametocito se une al macrogametocito formándose un ooqueto que atraviesa la pared del estómago, transformándose en ooquiste. Del ooquiste se liberan esporozoitos no infectivos que, gracias a su capacidad de movilidad y desplazamiento, migran a las glándulas salivales donde maduran, convirtiéndose en infectivos.

<sup>2</sup> Granda, S.; Jiménez, M. *Control de Calidad SEIMC*, 2003, 1-10.

Cuando un mosquito infectado pica a un segundo hospedador, la saliva que contiene los esporozoitos infectivos se inyectan en el torrente circulatorio del hombre. Después de circular por sangre durante aproximadamente 20 a 30 minutos, los esporozoitos penetran en las células parenquimatosas del hígado, donde forman una vacuola y comienzan a multiplicarse, convirtiéndose en merozoitos que pasan al torrente circulatorio y penetran en los eritrocitos. Dentro del eritrocito el merozoito sufre una serie de cambios adoptando una forma de anillo, el trofozoito, éste entra en división esquizogónica dando lugar a esquizontes inmaduros, que al madurar liberan nuevos merozoitos. Después de varios ciclos eritrocíticos, algunos merozoitos se transforman en gametocitos sexuales y de esta manera continúa el ciclo biológico del parásito, cuando el mosquito se alimenta nuevamente.

El período de incubación del *Plasmodium* es variable, los períodos mas cortos se presentan en *P. vivax*, *P. ovale* y *P. falciparum*, con una media de 7-12 días, mientras que en el caso de *P. malariae* es más prolongado, entre 27 y 40 días.

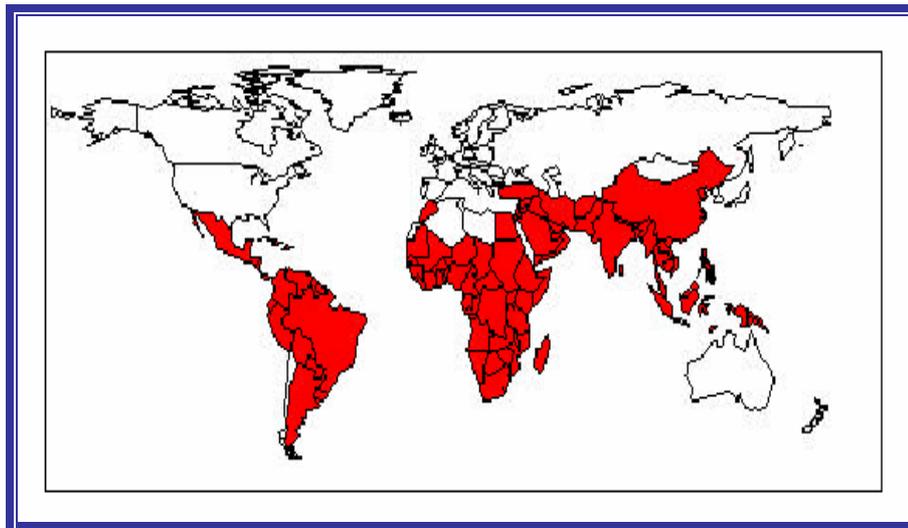
Estos mosquitos se reproducen en aguas estancadas donde tardan de 1 a 3 semanas en completar su ciclo vital y son frecuentes en todas las regiones tropicales y de clima templado, pero en general el parásito *Plasmodium* que transportan sólo se puede desarrollar en condiciones muy cálidas.

## **Epidemiología**

La malaria es una enfermedad infecciosa que afecta de 200 a 300 millones de personas anualmente y por la que fallecen 2.5 millones al año en el mundo. Actualmente esta enfermedad es endémica en 100 países y se manifiesta principalmente en las regiones tropicales y subtropicales menos desarrolladas de África, Asia y América Latina. Es una de las enfermedades infecciosas con mayor índice de morbilidad y mortalidad<sup>3</sup>.

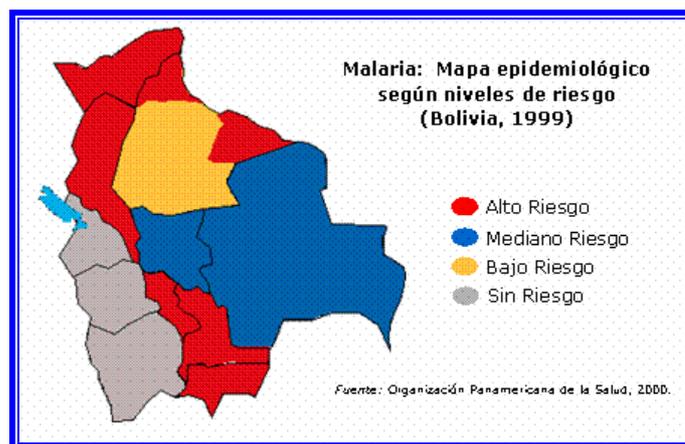
---

<sup>3</sup> Hay, S. I. *Lancet Infect. Dis.* **2004**, 4, 327-336.



**Distribución geográfica mundial de malaria**

En Bolivia, la malaria es un problema de Salud pública que tiene repercusión en el desarrollo socioeconómico de las regiones endémicas, provocando discapacidades que se traducen en pérdidas económicas para el estado. El área endémica de la malaria representa el 75% de la superficie total boliviana, que comprende los llanos orientales, el chaco boliviano y los valles, con una población en riesgo de 3.5 millones de habitantes.<sup>4</sup>



**Zonas endémicas de malaria en Bolivia**

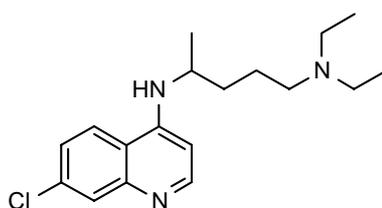
<sup>4</sup> Mollinedo-Llave, E. E. *Anuario Epidemiológico 2000*. 2000, OMS-OPS, 53-63.

## Tratamiento de la malaria

De todos los fármacos disponibles en la actualidad para el tratamiento de la malaria, ninguno actúa sobre todos los estadios del ciclo vital del parásito. Los fármacos de uso clínico son los que comentamos a continuación

Los *derivados quinolónicos*, entre los que podemos citar la cloroquina, quinina, quinidina, amodiaquina, mefloquina, halofantrina y primaquina. Estos fármacos inhiben la actividad de la hemopolimerasa en la vacuola alimenticia del parásito, interfiriendo en la conversión del grupo hemo en hemozoina no tóxica; además, ejercen una acción secundaria, que involucra la inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos y las proteínas del parásito<sup>5</sup>.

La **cloroquina**, es el fármaco de primera elección en caso de infección por *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. El fármaco se administra por vía oral o intravenosa y el índice de curación supera el 95%. Usualmente es bien tolerado y sus efectos secundarios son transitorios<sup>6</sup>. En caso de resistencia a cloroquina, los pacientes son tratados con mefloquina, halofantrina o sulfato de quinina más tetraciclinas o sulfonamidas. La **primaquina**, es utilizada para prevenir la recaída por infección con *P. vivax* y *P. ovale*, siendo el único fármaco aceptado para la erradicación del parásito en los hepatocitos.

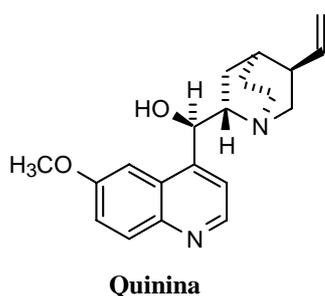


**Cloroquina**

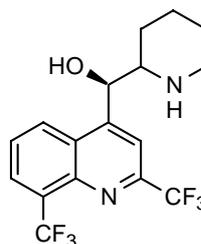
La **quinina**, es la terapia recomendada para pacientes infectados por *P. falciparum* resistente a cloroquina, se administra en forma de sulfato por vía oral, combinado con primetamina. La eficacia de los regímenes a base de quinina es mayor al 90% en la mayoría de las áreas endémicas. En pacientes que no toleran la terapia oral se administra gluconato o clorhidrato de quinina por vía intravenosa.

<sup>5</sup> Foley, M.; Tiley, L. *Pharmacol. Ther.* **1998**, 79, 55-87.

<sup>6</sup> Fitch, C. D.; Chou, A. C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41, 2461-2465.



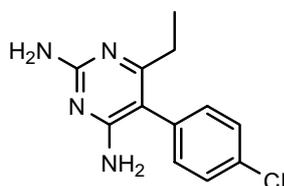
**Quinina**



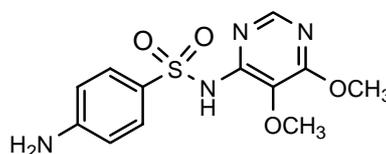
**Mefloquina**

La **mefloquina**, es el fármaco que cura del 90 al 95% de los casos de malaria causados por *P. falciparun*, siendo sus efectos secundarios vómitos, toxicidad neurológica y convulsiones. Sus limitaciones son que no puede administrarse en niños, ni en pacientes que esten recibiendo quimioprofilaxis, para evitar la resistencia cruzada.

Los **antifolatos**: **pirimetamina**, **sulfonamidas**, **dapsona**, **proguanil** y la combinación de pirimetamina-sulfadoxina, tienen acción sobre las formas intrahepáticas del parásito. La **pirimetamina** es además gametocida, con lo cual previene la transmisión por el mosquito<sup>7</sup>.



**Pirimetamina**



**Sulfadoxina**

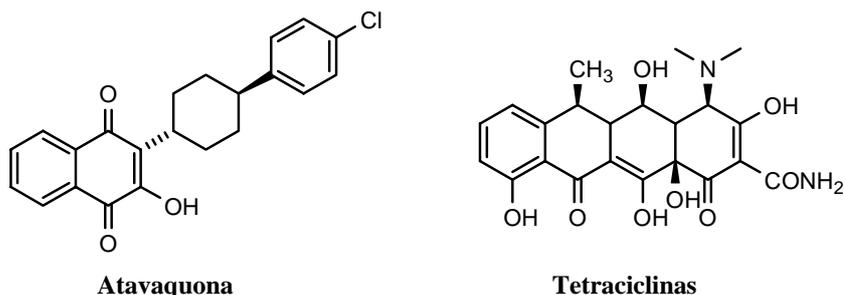
*Derivados de artemisinina*, **artemetero** y **artesunato**, estos fármacos actúan interfiriendo en la conversión del grupo hemo en hemozoina no tóxica. Son el tratamiento de elección para *P. falciparun* resistente a quinina y eliminan la parasitemia rápidamente. Cuando se administran sólo deben darse durante 5-7 días, para evitar la recrudescencia que se observa cuando se administra como monoterapia, por lo que deben ser combinados preferiblemente con mefloquina, tetraciclinas o clindamicina<sup>8,9</sup>.

<sup>7</sup> Barat, L. M.; Bloland, P. B.; *Infect. Dis. Clin North Am.* **1997**, 11, 969-987.

<sup>8</sup> Price, R.; Van Vugt, M.; Nosten, F. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1998**, 59, 883-888.

<sup>9</sup> Nosten, F.; Van Vugt, M.; Price, R.; Luxemburger, C.; Thway, K. L.; Brockman, A.; McGready, R.; Looareesuwan, S. *The Lancet.* **2000**, 356, 297-302.

Antibióticos como la **clindamicina**, **atovaquona** y **tetraciclinas**. Tienen efectos sinérgicos con los derivados quinoleínicos, incrementando la acción esquizotocida sanguínea. **Atovaquona**, no se administra sola porque desarrolla resistencia rápida, por lo que se combina frecuentemente con proguanil, ya que se ha demostrado su sinergismo con índices de curación del 95% en malaria causada por *P. falciparum* sin efectos adversos severos<sup>10,11</sup>.



El desarrollo de la multiresistencia a fármacos en los parásitos ha forzado al uso de regímenes combinados de fármacos antimaláricos para incrementar la eficacia de la terapia. Estas combinaciones han disminuido el tiempo de duración del tratamiento, el riesgo de desarrollo de resistencia por el parásito durante la terapia y ha mejorado su utilización en niños y mujeres embarazadas.<sup>12</sup> Sin embargo, aún estamos lejos de descubrir la terapia combinada ideal, siendo las mejores opciones: mefloquina + artesunato o clindamicina + quinina, efectivos en pacientes inmunocomprometidos, lo que sugiere que la combinación clindamicina + artesunato podría ser estudiada<sup>13</sup>.

<sup>10</sup> Looareesuwan, S.; Chulay, J. D.; Canfield, C. D. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1999**, 93, 637-640.

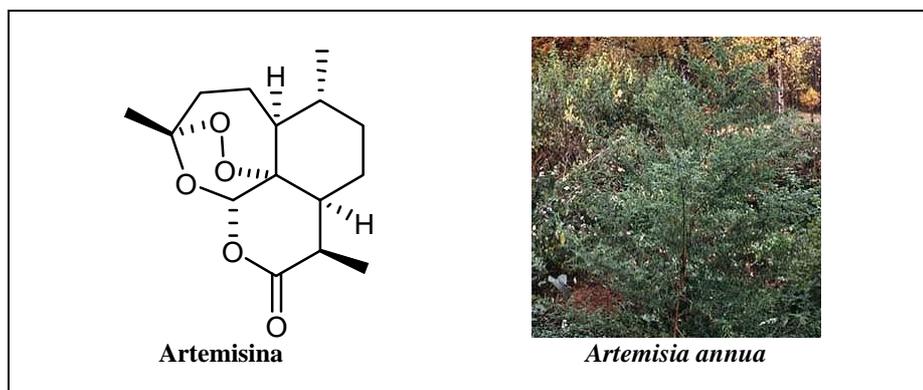
<sup>11</sup> Hogh, B.; Clarke, P. D.; Camus, d.; Nothdurft, H. D.; Gunter, M.; Joubert, I.; Kain, K. C.; Shaw, D.; Roskell, N. S.; Chulay, J. D. *The Lancet.* **2000**, 356, 1888-1894.

<sup>12</sup> Kremsner, P. G.; Krishna, S. *The Lancet.* **2004**, 364, 285-294.

<sup>13</sup> Van den Broek, I. V.; Maung, U. A.; Peters, A.; Liem, L.; Kamal, M.; Rahman, M.;n Rahman, R. M.; Bangali, A. M.; Barends, M.; Faiz, A. M. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2005**, 99, 727-735.

## PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA

La evaluación científica de las plantas medicinales utilizadas en la preparación de remedios caseros, ha proporcionado a la medicina moderna fármacos efectivos para el tratamiento de la malaria. Algunos de los metabolitos obtenidos de plantas utilizadas en el tratamiento de esta enfermedad incluyen quinonas, alcaloides y terpenos. Como un ejemplo de ello es importante recordar que el primer producto farmacéutico desarrollado para el tratamiento de la malaria y la amebiasis fueron los alcaloides **quinina** y **emetina**, obtenidos de especies del género *Cinchona* y *Cephaelis*, respectivamente. Recientemente, la **artemisina**, una lactona sesquiterpénica, aislada de *Artemisia annua*<sup>14,15</sup>, se usa en clínica para el tratamiento de la malaria.



Dentro de los productos naturales con actividad antiplasmódica podemos citar la **2-n-pentenilquinolina** aislada de las hojas de *Galipea longiflora*, el metabolito más activo frente a *P. vinccke* en comparación con la cloroquina<sup>16</sup>.

**Dioncofilina A, B, C** y **dioncopeltina A**, aislados de *Triphyophyllum peltatum*, han sido evaluados frente a *P. falciparum* sensible y resistente a cloroquina, presentando una elevada actividad frente a las dos cepas. También fueron evaluados en un modelo *in vivo* frente a *P. berghei*, obteniéndose resultados prometedores con **dioncofilina C**<sup>17</sup>. Esta planta es utilizada en

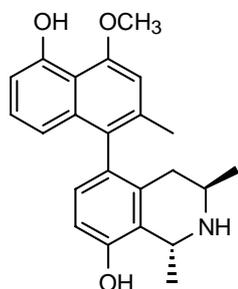
<sup>14</sup> Ziffer, H.; Hight, R. J.; Klayman, D. L. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **1997**, 72, 121-214.

<sup>15</sup> Castel, D. A.; *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 16, 55-73.

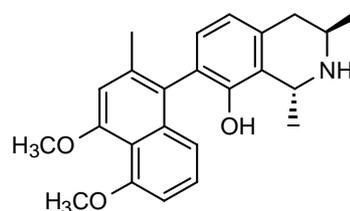
<sup>16</sup> Gantier, J. C.; Fournet, A.; Muñoz, M.; Hocquemiller, R. *Planta Med.* **1996**, 62, 285-286.

<sup>17</sup> Francois, C.; Timperman, G.; Holenz, J.; Aké Assi, L.; Geuder, T.; Maes, L.; Dubois, J.; Hanocq, M.; Bringmann, G. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1996**, 90, 115-123.

la medicina tradicional de África y Asia para el tratamiento de la fiebre, la malaria y la elefantiasis.



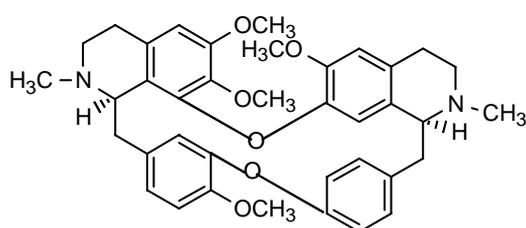
Dioncofilina C



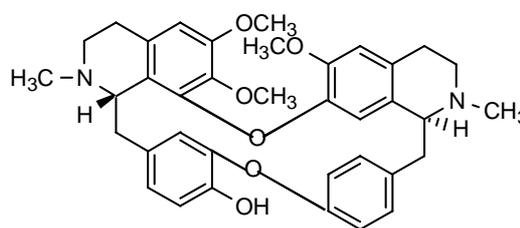
Dioncopeltina

Dentro de los alcaloides bisbenzylisoquinolínicos, **cefrantina** presenta actividad moduladora de la resistencia frente a *P. falciparum* resistente a cloroquina y los resultados obtenidos muestran una actividad 50 veces mayor que el verapamilo, un conocido revertidor de la multiresistencia a fármacos<sup>18</sup>.

**Tetrandine**, aislado de las raíces de *Cyclea barbata*, presentó actividad frente a *P. falciparum*. Otro alcaloide, **pendulina**, aislado de *Isopyrum thalictroides*, es 5 veces más efectivo que tetrandine, con bajos niveles de toxicidad y un índice de seguridad del 100%, lo que indica que podría ser un compuesto prometedor como antimalárico<sup>19</sup>. Este tipo de compuestos ha llamado la atención por su acción sinérgica de los fármacos antimaláricos comerciales; así, combinaciones de tetrandine con cloroquina y artemisina están en estudio.



Tetrandine

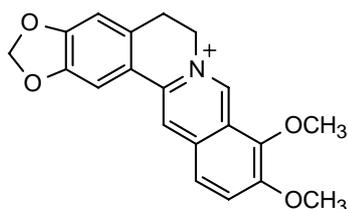


Pendulina

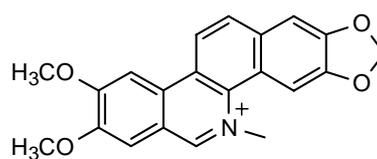
<sup>18</sup> Haruky, K.; Bray, P. G.; Ono, M.; Ward, S. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, 44, 2706-2708.

<sup>19</sup> Valentin, A.; Benoit-Vical, F.; Moulis, C.; Stanislas, E.; Mallié, M.; Fouraste, I.; Bastide, J. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41, 2305-2307.

Diversos alcaloides tipo protoberberina como la **berberina** son compuestos muy potentes y actúan inhibiendo la proliferación de los parásitos de malaria en un modelo *in vitro* pero no son efectivos *in vivo*<sup>20</sup>. La **nitidina**, es muy activo y su mecanismo podría estar relacionado con la inhibición de las topoisomerasas, sin embargo ensayos clínicos como agente antileucémico indican que el compuesto es tóxico<sup>21</sup>.

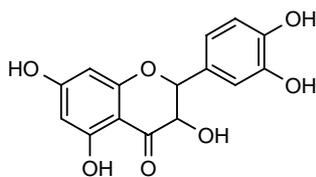


**Berberina**

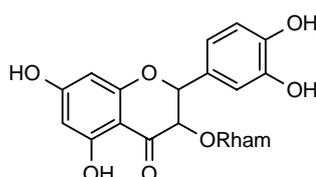


**Nitidina**

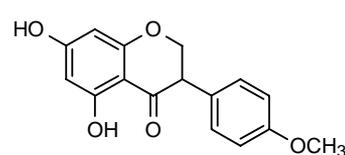
Los flavonoides en general con compuestos que tienen una moderada actividad como agentes antimaláricos, así por ejemplo la **quercetina** tiene un  $CI_{50}$  de 21  $\mu$ M, mientras que su glucósido **rutina** no presenta actividad<sup>22</sup>. En contraste, los isoflavonoides como la **biochanina C**, tienen actividad similar a las chalconas. La **licochalcona A**, aislada de *Glycyrrhiza sp.*<sup>23</sup>, presenta actividad *in vitro* e *in vivo* frente a *P. falciparum* sensible a la cloroquina y la administración oral de este flavonoide en ratones infectados con *P. yoelii*, mostró ser eficaz al controlar la infección<sup>24</sup>.



**Quercetina**



**Rutina**



**Biochanina C**

<sup>20</sup> Wright, C. W.; Marshall, S. J.; Russell, P. F.; Anderson, M. M.; Phillipson, J. D.; Kirby, G. C.; Warshurst, D. C.; Schiff, P. L. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 1638-1640.

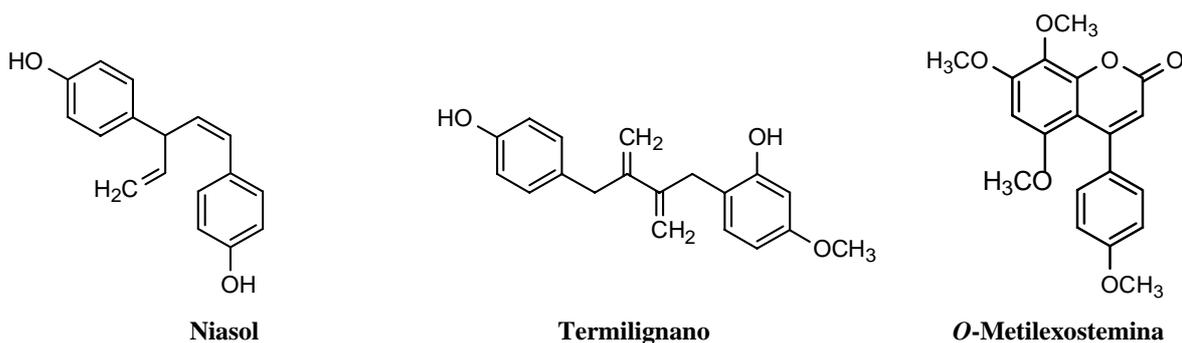
<sup>21</sup> Gakunju, D. M. N.; Mberu, E. K.; Dossaji, S. F.; Gray, A. I.; Waigh, R. D.; Waterman, P. G.; Watkins, W. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, 39, 2606-2609.

<sup>22</sup> Khalid, S. A.; Farouk, A.; Geray, T. G.; Jensen, J. B. *J. Ethnopharmacol.* **1986**, 15, 201-209.

<sup>23</sup> Chen, M.; Christensen, S. B.; Blom, J.; Lemmich, E.; Nadelmann, L.; Fich, K.; Theander, T. G.; Kharazmi, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, 37, 2550.

<sup>24</sup> Kharazmi, A.; Chen, M.; Zhai, L.; Theander, T. G.; Christensen, S. *Antrop. Med. Parasitol.* **1997**, 91, S91-95.

Los neolignanós tipo **niasol** y **termilignano** inhiben de manera significativa el desarrollo de cepas de *P. falciparum* cloroquina sensible y resistente. El fraccionamiento bioguiado del extracto de *Exostema mexicanum*, conocida como “quina” en México y utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de la malaria, rindió fenilcumarinas de las cuales **O-metilexostemina** mostró actividad antiplasmódica frente a *P. falciparum*<sup>25</sup>.



<sup>25</sup> Köhler, I.; Jenett-Siems, K.; Mockenhaupt, F. P.; Siems, K.; González, J. C.; Hernández, M. A.; Ibarra, R. A.; Berendsohn, W. G.; Bienzle, U.; Eich, E. *Planta Med.* **2001**, 67, 89-91.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN: ACTIVIDAD ANTIPLASMÓDICA**

Los compuestos seleccionados para evaluar la actividad antiplasmódica frente a una cepa de *Plasmodium falciparum* cloroquina resistente (P-32), son los que se detallan a continuación:

- ✓ *Kavalactonas*: K-1 y K-2
- ✓ *Flavonoides*: F-5, F-6, F-7, F-8, F-9, F-10, F-11 y F-12.
- ✓ *Derivados del ácido benzoico*: AB-1, AB-3, AB-6, AB-7, AB-8, AB-9, AB-10, AB-11, AB-12, AB-13, AB-16, AB-17, AB-18, AB-19, AB-20 y AB-21,
- ✓ *Benzopiranos*: B-1, B-4, B-9, B-16, B-18 y B-19.
- ✓ *Terpenos*: T-1, T-3, T-4, T-6 y T-7
- ✓ *Amidas*: A-1, A-2, A-3 y A-4

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla. Los productos que no se reflejan en la misma presentaron un  $CI_{50} > 10 \mu\text{g/ml}$ .

**Tabla 29.** Actividad antiplasmódica de metabolitos aislados de especies del género *Piper*

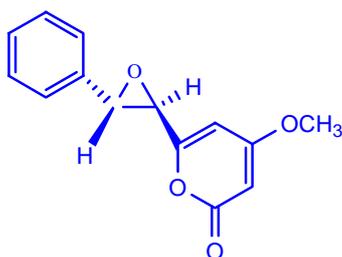
Producto	$CI_{50} \pm DE \mu\text{g/ml}$
	<i>P. falciparum</i>
<b>K-1</b>	<b>0.5 ± 0.1</b>
<b>F-7</b>	3.5 ± 0.5
<b>F-8</b>	8.1 ± 0.9
<b>AB-3</b>	10.0 ± 0.9
<b>AB-6</b>	2.8 ± 0.6
<b>B-7</b>	4.1 ± 0.5
<b>AB-20</b>	3.2 ± 0.4
<b>B-4</b>	3.9 ± 0.6
<b>T-4</b>	3.9 ± 0.5
<b>T-7</b>	1.6 ± 0.0
<b>A-3</b>	4.2 ± 0.5
<b>A-4</b>	<b>0.7 ± 0.1</b>

Droga control: Cloroquina  $CI_{50}$  0.1  $\mu\text{g/ml}$

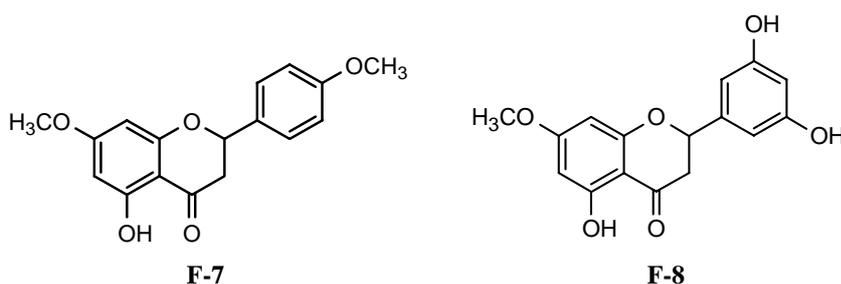
DE: Desviación estandar

Como se deduce de los datos que se presentan en la tabla 29, sólo once de los cuarenta compuestos evaluados mostraron algún grado de actividad ( $CI_{50} \leq 10 \mu\text{g/ml}$ ); sin embargo, ninguno de ellos presentó una actividad comparable a la cloroquina ( $CI_{50} 0.1 \mu\text{g/ml}$ ). Podemos considerar que los productos **AB-3** y **F-8** presentaron una baja actividad ( $CI_{50} 10-8 \mu\text{g/ml}$ ); los compuestos **AB-7**, **A-3**, **B-4**, **F-7**, **AB-20** y **AB-6** una actividad moderada en orden decreciente ( $CI_{50} 4-2.8 \mu\text{g/ml}$ ), mientras que la kavapirona **K-1**, la amida **A-4** y el terpeno **T-7**, resultaron ser los más activos, con  $CI_{50}$  de 0.5, 0.7 y 1.6  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

Cabe destacar que de las dos kavapironas evaluadas, **K-1** que presenta un epóxido entre los carbonos C-7 y C-8 resultó activo comparado con su correspondiente diol (**K-2**), lo que sugiere, al igual que en el caso de la actividad leishmanicida, que dicho epóxido es relevante en la actividad antiparasitaria. De los flavonoides evaluados sólo dos de ellos, **F-7** y **F-8**, ambos con esqueleto de flavanona, presentaron algún grado de actividad.



**K-1**



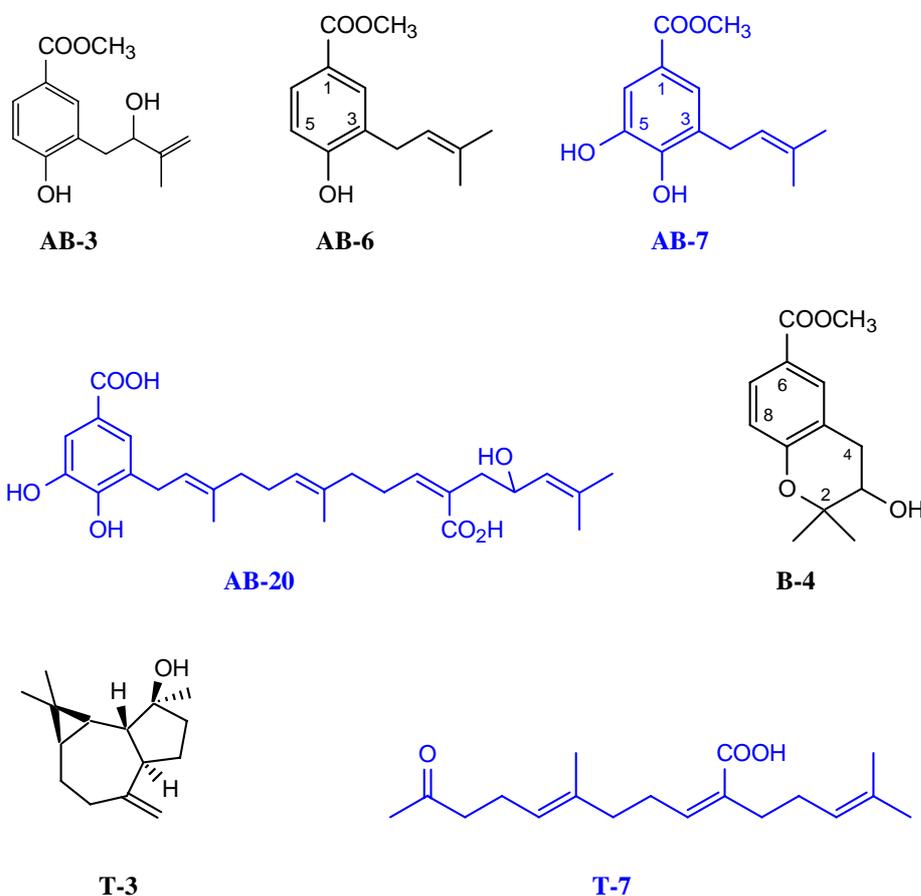
**F-7**

**F-8**

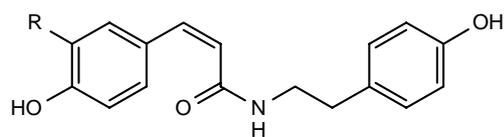
En lo que respecta a los derivados del ácido benzoico, comentar que aquellos que presentaron algún grado de actividad fueron los que contenían una única cadena lateral en posición C-3 y curiosamente, en aquellos con cadena lateral de isopreno se observó que al aumentar el grado de oxidación bien sobre el anillo aromático (**AB-7**) o bien sobre la cadena

lateral (**AB-3**) se reduce la actividad. Por otra parte, si comparamos **AB-18**, **AB-19** y **AB-20**, cuya única diferencia radica en el grado de oxidación del carbono C-11', observamos que la presencia del grupo ácido potencia la actividad (**AB-20**) frente a un aldehído (**AB-19**) o un grupo metilo (**AB-18**).

Cabe comentar que el benzopirano **B-4** fue el único derivado de esta serie que presentó actividad ( $CI_{50}$  3.9  $\mu\text{g/ml}$ ) siendo por otra parte de los dos cromanos evaluados aquel que no presentó grupo hidroxilo sobre C-8.



Por último, en lo que a la actividad de las amidas se refiere, **A-3** y **A-4**, derivadas del ácido *cis*-cinámico, presentaron una excelente actividad con  $CI_{50}$  4.2 y 0.7  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, lo que sugiere que dicho ácido es relevante para la actividad, así como el tipo de sustitución en el anillo aromático.



A-3 R= OCH<sub>3</sub>

A-4 R= H

Estos resultados nos orientan en la búsqueda de compuestos prometedores como antimaláricos y los esfuerzos futuros estarán dirigidos hacia la obtención de derivados de kavalactonas con epóxido sobre C-7 y C-8, que parece ser necesario para la expresión de la actividad, así como ácidos grasos insaturados, compuestos de gran abundancia natural.

Como conclusión de los resultados obtenidos en la evaluación de los metabolitos aislados como antiparasitarios, podemos afirmar que sin lugar a dudas dichos resultados ponen de manifiesto que las especies del género *Piper* son una prometedora fuente de agentes antiparasitarios. Su uso en la medicina tradicional, para el tratamiento de las enfermedades parasitarias está justificada por la presencia en las mismas de compuestos activos. Estos metabolitos son potenciales agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de estas enfermedades infecciosas que azotan numerosos países en desarrollo y para las cuales, como hemos comentado anteriormente, no existen tratamientos adecuados o estos presentan numerosos efectos secundarios.

## *Material y métodos*

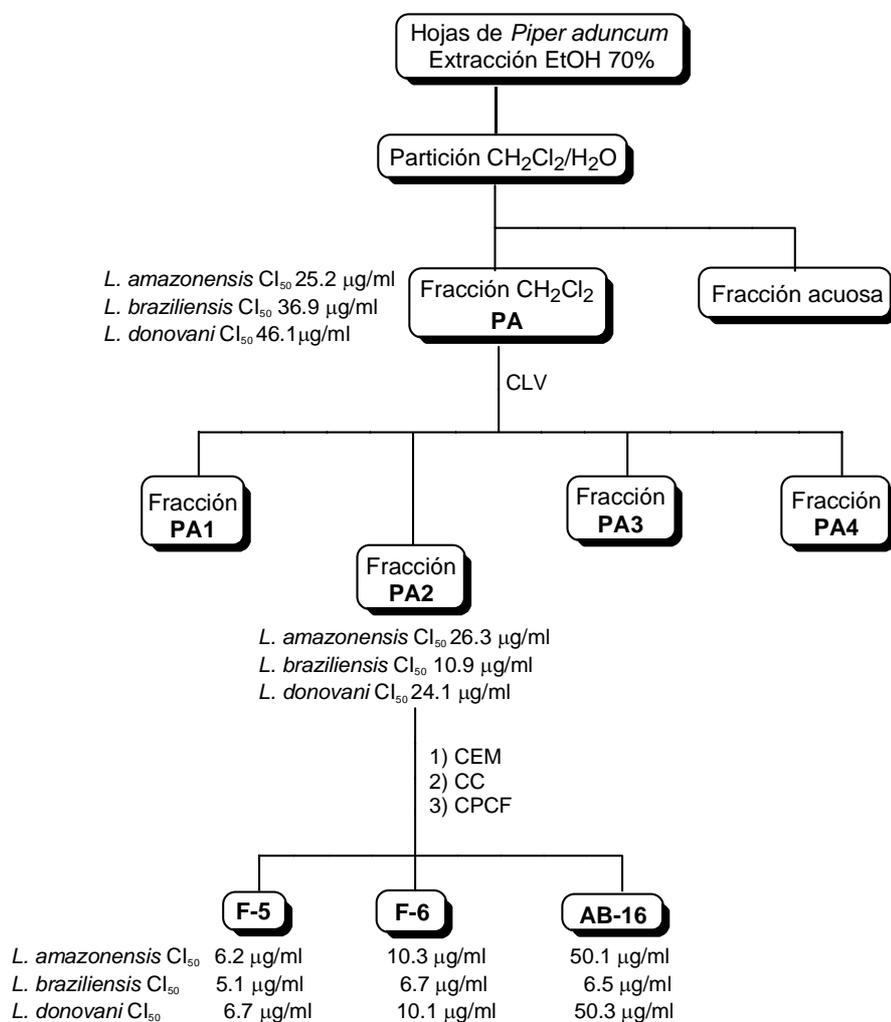
## FRACCIONAMIENTO BIOGUIADO

El material vegetal seco y molido fue extraído mediante maceración con etanol (70%) durante 48 horas a temperatura ambiente. El residuo obtenido al evaporar el disolvente se resuspendió en agua y se extrajo tres veces con diclorometano, obteniéndose así una fracción soluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y una fracción acuosa. La fracción orgánica se llevó a sequedad, obteniéndose el extracto de diclorometano y la fracción acuosa fue congelada a  $-50\text{ }^\circ\text{C}$  y liofilizada, obteniéndose así el extracto acuosa. Ambos extractos fueron evaluados biológicamente, resultando activos todos los extractos de diclorometano.

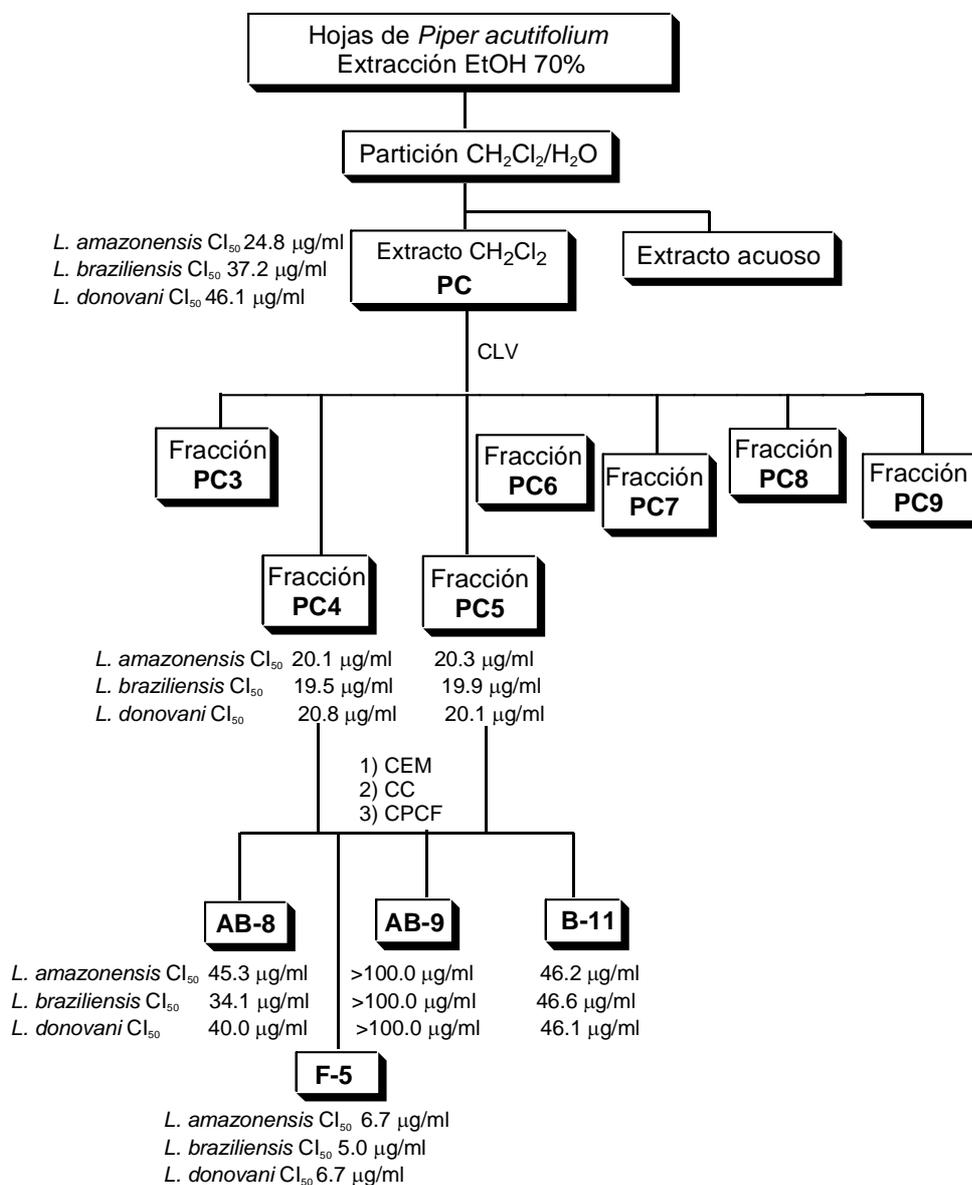
Posteriormente, cada uno de los extractos de diclorometano fué fraccionado por cromatografía líquida a vacío (CLV), usando como sistemas de elusión, éter de petróleo, éter de petróleo-éter dietílico, éter dietílico y éter dietílico-metanol, obteniéndose así cuatro fracciones. Estas fracciones fueron evaluadas frente a tres cepas de *Leishmania* y las fracciones activas en cada una de las especies fue sometida a sucesivas cromatografías, al objeto de aislar e identificar los metabolitos secundarios presentes en las mismas.

A continuación se presentan los esquemas (esquemas 8-14) del fraccionamiento bioguiado de cada una de las especies de *Piper* objeto de estudio de la presente Memoria.

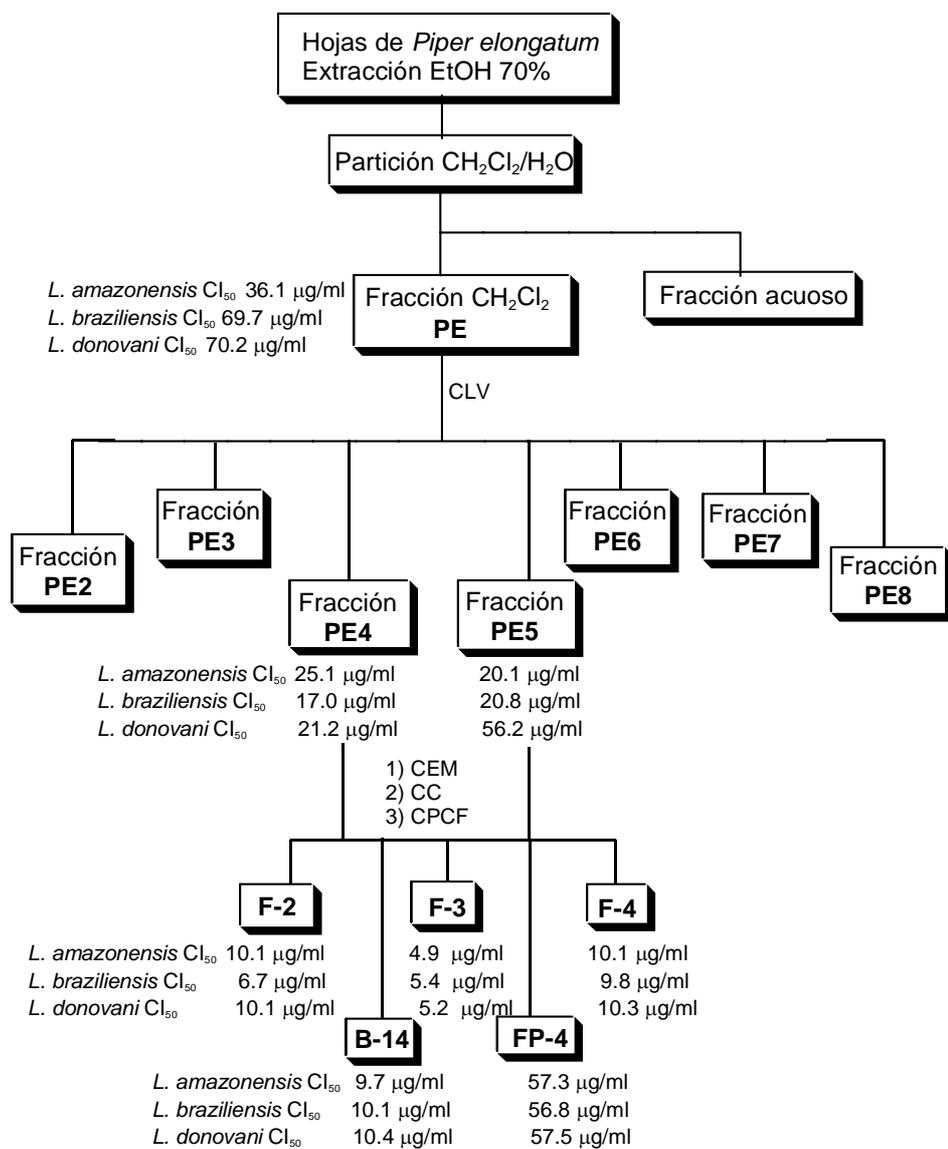
**ESQUEMA 8. Fraccionamiento bioguiado de *P. aduncum***

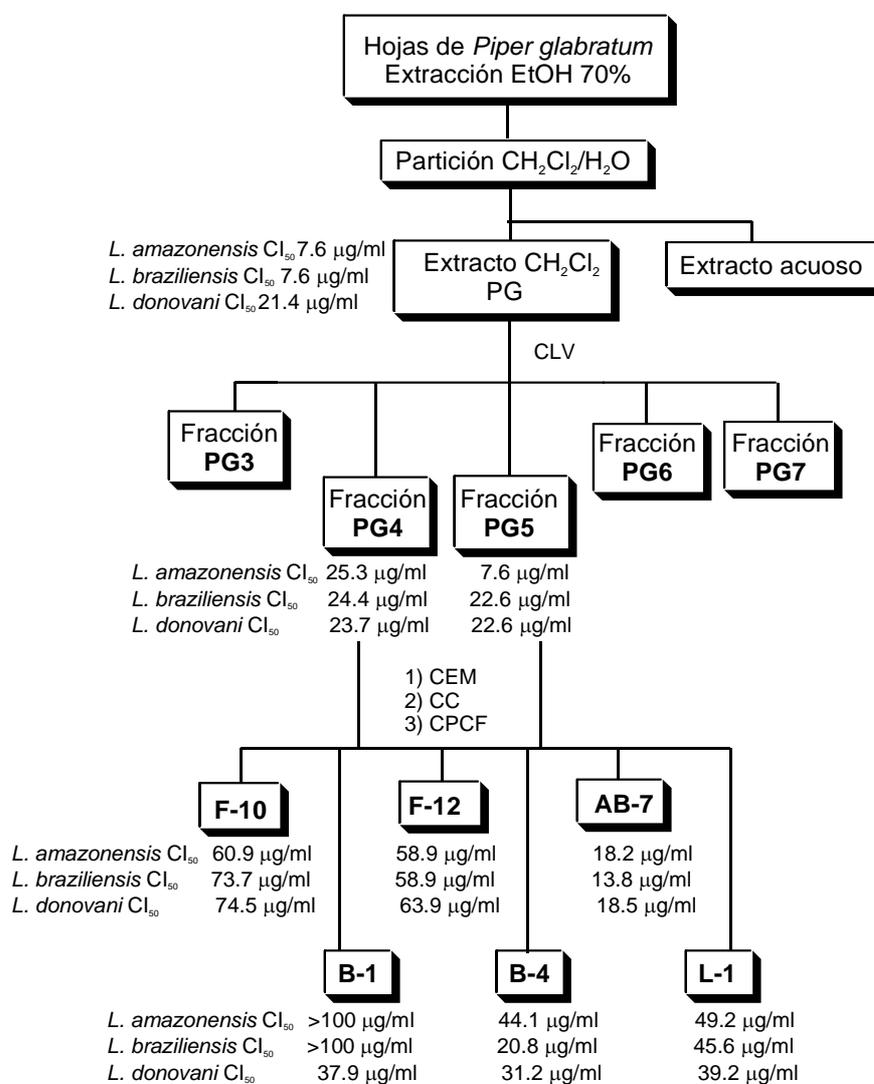


**ESQUEMA 9. Fraccionamiento bioguiado de *P. acutifolium***

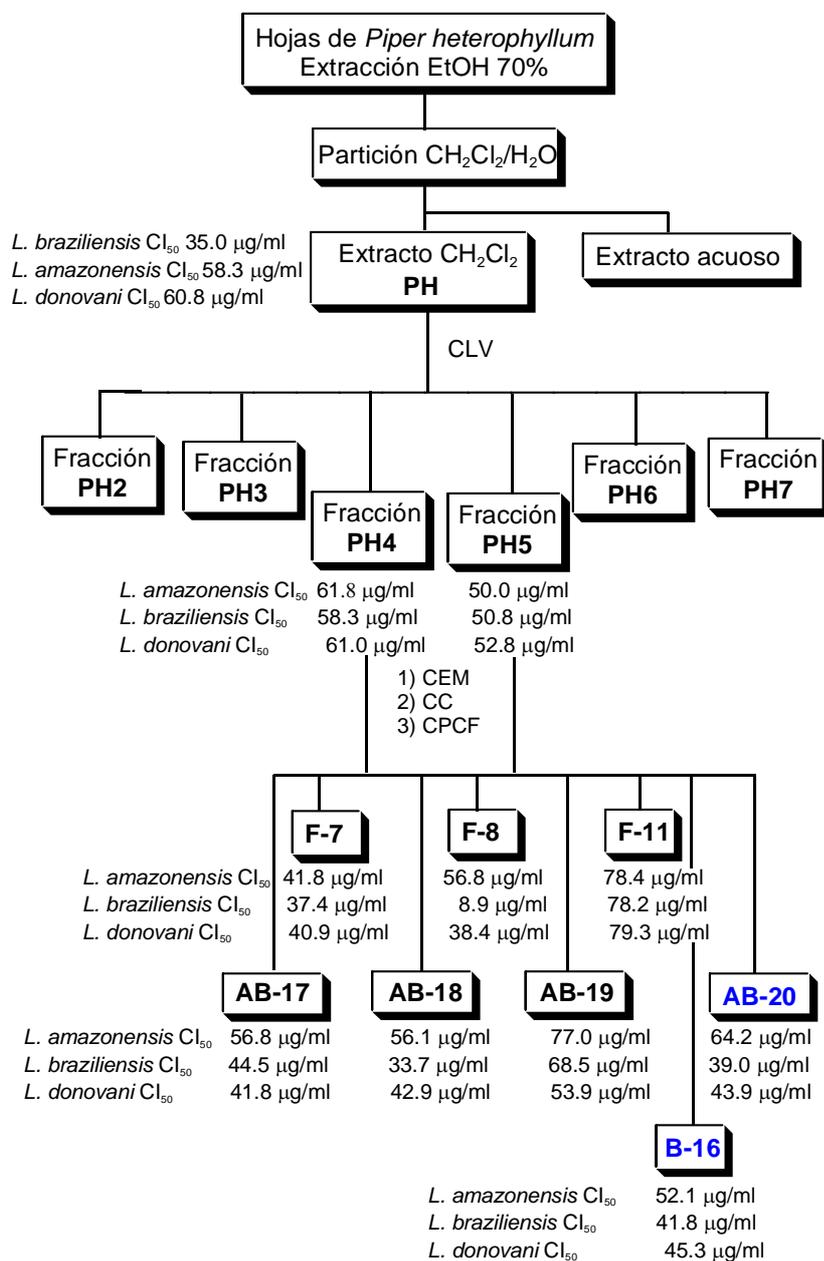


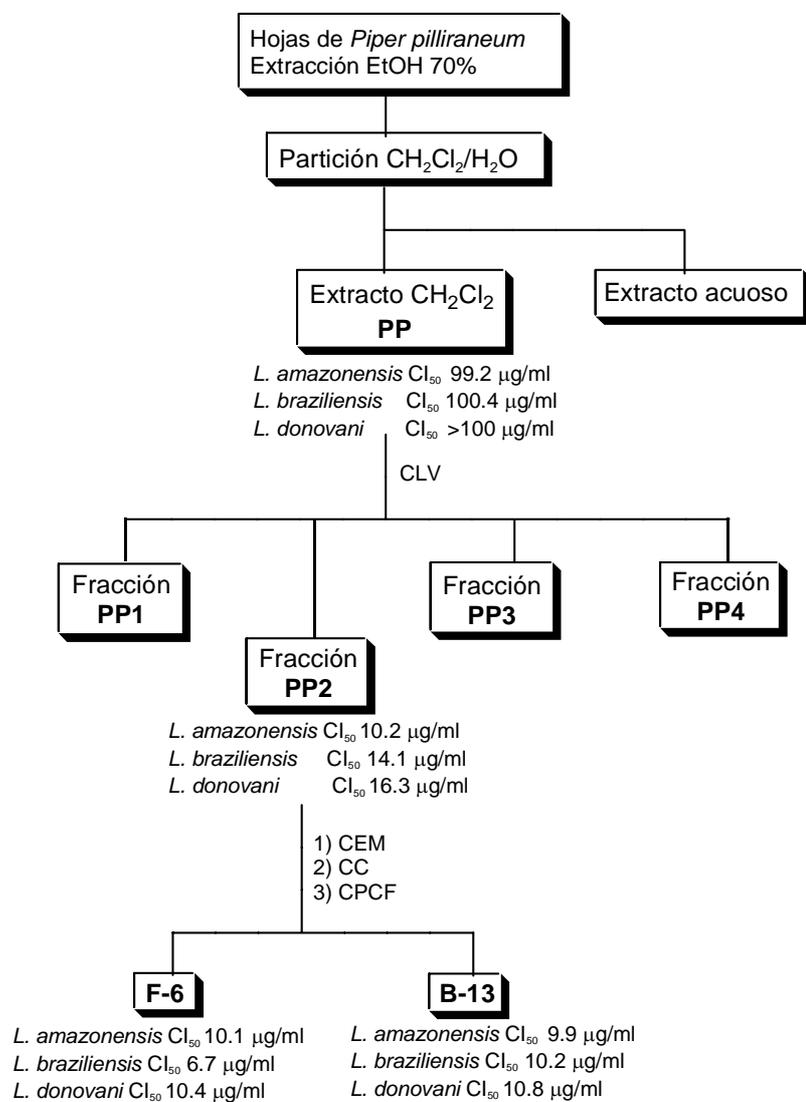
**ESQUEMA 10. Fraccionamiento bio guiado de *P. elongatum***



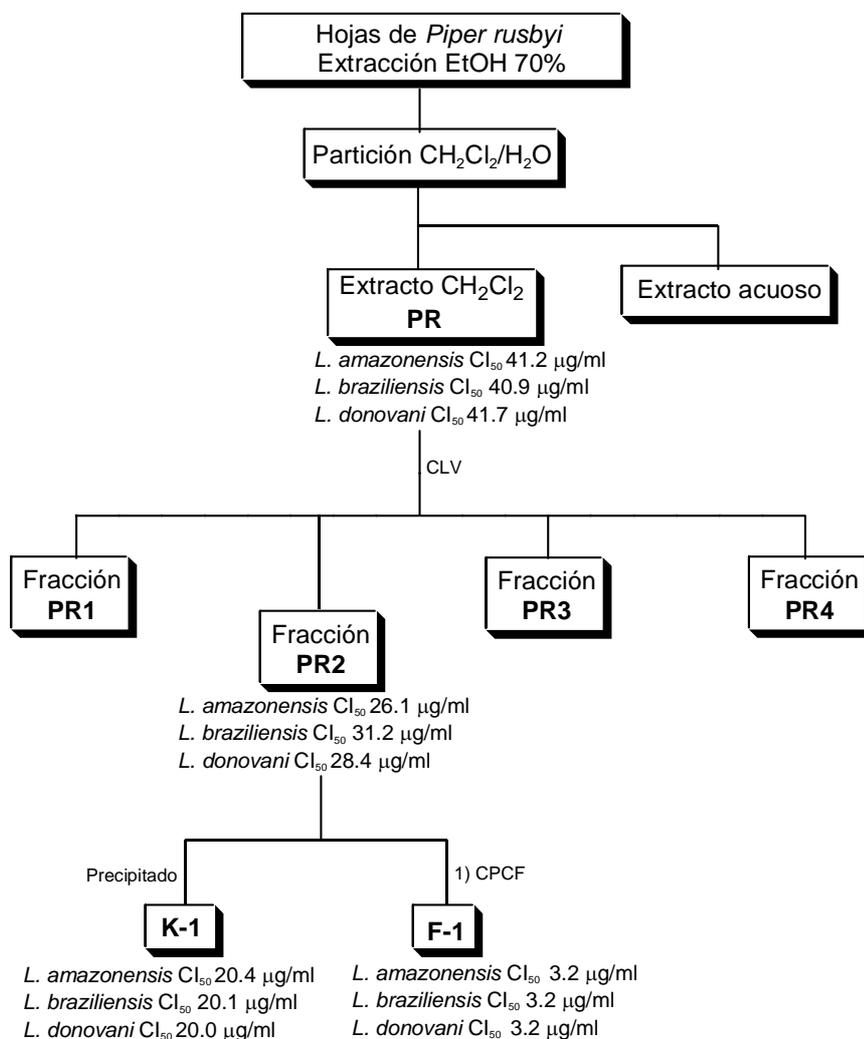
ESQUEMA 11. Fraccionamiento bioguiado de *P. glabratum*

ESQUEMA 12. Fraccionamiento bioguiado de *P. heterophyllum*



ESQUEMA 13. Fraccionamiento bioguiado de *P. pilliraneum*

**ESQUEMA 14. Fraccionamiento bioguiado de *P. rusbyi***



### Actividad leishmanicida *in vitro*

La actividad leishmanicida de las muestras fue medida sobre cultivos *in vitro* del estadio promastigote de cepas de *Leishmania braziliensis* 2903, *L. amazonensis* PH8 y *L. donovani* PP75. El mantenimiento de las formas promastigote de *Leishmania* se realizó mediante resiembras cada 48 o 72 h en 2 ml de medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) e incubados a temperatura de 22 °C.

Los extractos, fracciones o productos a ensayar fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) y almacenados a 4 °C hasta su utilización. Los ensayos se realizaron en placas de microtitulación estériles de 96 pocillos. En estos pocillos se añadieron 250.000 parásitos, en forma promastigote y procedentes de cultivos en fase logarítmica de crecimiento y la cantidad de producto necesario para lograr la concentración a ensayar. El volumen final por pocillo fue de 200 µl. Los ensayos se realizan por triplicado y se repitieron al menos dos veces para verificar los resultados obtenidos. Se ensayaron distintas concentraciones de los productos y se procedió a contar los parásitos después de 48 y 72 horas.

Los resultados de actividad leishmanicida son expresados en valores de  $CI_{50}$  (concentración de la droga que inhibe el 50% del desarrollo del parásito), obtenido mediante una típica curva dosis respuesta (log de la concentración de la droga vs % de inhibición). Este recuento se realizó tres veces, expresándose el resultado como la media de dichos recuentos. El porcentaje de inhibición se calculó considerando el número de parásitos del control como el 100 % de crecimiento, o lo que es lo mismo el 0 % de inhibición.

El número de parásitos por mililitros se calcula mediante la ecuación:  $N_1 = N_0 \times f \times 10 \times 1000$

$N_1$  = Número de parásitos por ml.

$N_0$  = Número de parásitos por 0'1 mm<sup>3</sup> (volumen de cada cuadrado).

f = Dilución de la muestra en PBS y formol.

10 = Factor de conversión de 0'1 mm<sup>3</sup> a 1 mm<sup>3</sup>.

1000 = Factor de conversión de mm<sup>3</sup> a ml.

Estas pruebas fueron realizadas por la Lic. Grace Ruiz, bajo la dirección del Dr. Alberto Giménez T. en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés (IIFB-UMSA), La Paz, Bolivia.

### Actividad leishmanicida *in vivo*

Los ensayos de actividad *in vivo* se realizaron en un modelo experimental con ratones Balb/c infectados con la especie *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016).

Para comprobar la eficacia del tratamiento *in vivo* se llevó a cabo la infección de ratones Balb/c con promastigotes infectivos de *Leishmania amazonensis*. Las formas promastigote (conteniendo un alto porcentaje de parásitos metacíclicos) se lavaron dos veces con PBS (Tampón fosfato salino) a pH 7.2, se ajustaban a una concentración de  $10^7$  células/ml y se inoculaban 50  $\mu$ l, por vía subcutánea, en la pata trasera derecha de los ratones que tenían entre 4 y 6 semanas de edad. Tras 4-6 semanas, los animales desarrollaban una ulceración cutánea debido a la infección parasitaria inducida. Posteriormente, se evaluó la evolución de las lesiones cutáneas en la pata infectada de los animales.

Para observar la evolución de las lesiones *in vivo* se utilizaron grupos de 4 ratones Balb/c machos inoculados por vía subcutánea, en su pata trasera derecha, con 50  $\mu$ l de una solución que contenía  $10^7$  parásitos/ml. Después de cinco semanas de infección la lesión había evolucionado lo suficiente como para ser visible y se empezaron a determinar semanalmente los tamaños de las patas mediante un micrómetro calibrador Vernier. A partir de la sexta semana existía ya evidencia de infección en el ratón, empezando el tratamiento. El peso de los ratones fue controlado desde el inicio de la infección, durante el tratamiento y hasta el sacrificio del animal.

Se utilizaron dos principios activos con una pauta de tratamiento por vía subcutánea. La kavapirona (**K-1**) se utilizó en dosis de 5 y 10 mg/kg/día durante 28 días en días alternativos y la flavokavaina (**F-1**), en dosis de 1 y 5 mg/kg/día durante 28 días en días alternativos. La medida de las patas lesionadas se monitorizó durante dos meses.

**Análisis estadístico.** Se utilizó el ensayo de vías (paired two-tailed *t*-test) para el análisis de los datos. Los valores de  $P < 0.05$  fueron considerados significativos.

Esta prueba se realizó en el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, Universidad de La Laguna, Tenerife, por la Lic. Gabriela Cabrera bajo la dirección del Dr. José Piñero.

### **Actividad tripanocida *in vitro* sobre la forma epimastigote**

La actividad tripanocida de las muestras fue medida sobre cultivos *in vitro* de las formas epimastigote de *Trypanosoma cruzi*, cepa Tulahuen. Las cepas fueron cultivadas a 26 °C en medio LIT (Liver Infusion Tryptose), suplementado con suero fetal bovino inactivado (56 °C por 30 min) al 5 % (técnica modificada por Chiari y *col.*)<sup>1</sup>. Los parásitos en fase logarítmica de crecimiento fueron distribuidos en platos de 96 pocillos a una concentración de 5x10<sup>4</sup>/ml. Los parásitos fueron expuestos a diferentes concentraciones de los compuestos desde 10 µg/ml a 100 µg/ml, durante 72 horas. La actividad fue medida por conteo óptico a través de un microscopio invertido y comparación con el control. Anfotericina B fue utilizada como droga de referencia y los ensayos se realizaron por triplicado.

La CI<sub>50</sub> del extracto o fracción se determinó mediante el análisis de regresión lineal de un gráfico, representando el porcentaje de inhibición frente al logaritmo de la concentración del extracto o compuesto puro. El vehículo utilizado para la preparación de los extractos fue dimetilsulfóxido (DMSO) y su concentración no fue superior al 1%, condiciones en las que la supervivencia de los parásitos es del 100%.

### **Actividad antiplasmódica *in vitro***

La actividad antiplasmódica de los diferentes productos fue medida sobre cultivos *in vitro* de cepas de *Plasmodium falciparum* F32, cepa de referencia sensible a la cloroquina. El mantenimiento de estas cepas se realizó mediante un cambio diario del medio de cultivo, realizando las diluciones correspondientes, para que la parasitemia no aumentara de manera peligrosa y llegar a una sobrepoblación, lo que lleva consigo la pérdida de esta cepa.

Se prepararon soluciones madre de las muestras, disolviéndolas en dimetilsulfóxido (DMSO) y los ensayos se realizaron en placas de microtitulación estériles de 96 pocillos, donde primeramente se colocaron 200 µl de agua destilada estéril en los bordes superior e inferior de las placas, para evitar el “efecto borde”. En cada pocillo se colocaron 100 µl de una suspensión de glóbulos rojos con un hematocrito del 2% (para ello se utiliza RPMI con suero o plasma al

---

<sup>1</sup> Chiari, E.; Braga, A.; Soares, D.; Mesquita, A.; Tavares, K. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1991**, 85, 372-374.

20%), además de una parasitemia del 1% (los parásitos deben estar en el estadio anillo en su mayoría, no se toman en cuenta los otros estadios), a continuación se añadieron las concentraciones seriadas de los productos (volumen final de 200 µl) y la placa se incubó a 37 °C por un período de 48 horas. Una vez que la placa de 96 pocillos fue incubada, se eliminó completamente la fase superior del cultivo, se hizo un frotis del sedimento de cada alveólo, fijando primeramente con metanol y realizando la tinción durante 15 minutos con una solución de Giemsa (20% en PBS), posteriormente éste se lavó con agua, dejando secar a medio ambiente. Por último, se observó en el microscopio, con lente de inmersión X 100, contando tanto glóbulos rojos no infectados (GRL) como infectados (GRI), para así tener el % de inhibición, calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inh} = \frac{(\text{GRL} - \text{GRI})}{\text{GRL}} \times 100$$

El cálculo para hallar la Concentración Inhibitoria del 50% (CI<sub>50</sub>) en la maduración de los esquizontes, se hizo por el método gráfico mediante el programa Cricket Graph 1.3<sup>2</sup> y los resultados se interpretan de la siguiente manera: inactivo (> 10 µg/ml), activo (< 10 µg/ml).

Estas pruebas se realizaron en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés (IIFB-UMSA), La Paz, Bolivia, por el Ms Sc. David Gutiérrez Yapu, bajo la dirección del Dr. Alberto Giménez Turba.

---

<sup>2</sup> CA-Cricket Graph Software. Graphic Presentation. Computer Associates.

## **8. CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

Del trabajo de investigación llevado a cabo para la realización de la presente Memoria extraemos las siguientes conclusiones:

- Se realiza el estudio fitoquímico de la fracción de diclorometano del extracto etanólico de las hojas de siete especies del género *Piper*: *P. aduncum*, *P. acutifolium*, *P. elongatum*, *P. glabratum*, *P. heterophyllum*, *P. pilliraneum* y *P. rusbyi*, recolectadas en las regiones del Alto Beni (Prov. Abel Iturralde) e Irupana (Prov. Sud Yungas) del Departamento de La Paz, Bolivia.
- Los metabolitos aislados de las siete especies de *Piper* estudiadas, se agruparon para su estudio de acuerdo a sus características estructurales en: kavalactonas, flavonoides, derivados del ácido benzoico, benzopiranos, benzofuranos, fenil propanoides, terpenos, apocarotenoides y amidas.
- Se aíslan dos kavalactonas de las hojas de *P. rusbyi* que resultaron nuevas en la bibliografía química y cuyas estructuras se elucidaron mediante un cuidadoso estudio de sus datos espectroscópicos como: 7*R*,8*S*-epoxi-desmetoxiyangonin y 7,8-dihidroxi-5,6-didehidrokavaina. Cabe destacar que sólo se han aislados este tipo de metabolitos de *P. methysticum*, por lo que es la primera vez que se aíslan de otra especie del género *Piper*.
- La configuración absoluta de 7*R*,8*S*-epoxi-desmetoxiyangonin se estableció mediante el estudio de la curva de dicroísmo circular, haciendo uso del método de la quiralidad del benzoato, una extensión del método de excitón quiralidad.
- La configuración relativa de 7,8-dihidroxi-5,6-didehidrokavaina se determinó mediante el análisis de la constante de acoplamiento  $J_{7,8}$  y un experimento ROESY del derivado acetónico. La configuración absoluta de los carbonos C-7 y C-8, se determinó aplicando el método de Riguera, una variación del método de Mosher, basada en el uso del ácido 2-fenil-2-metoxiacético (MPA) como reactivo, para lo cual se prepararon los ésteres derivados del (*S*) y (*R*)-MPA, asignándose la configuración absoluta mediante el estudio de los desplazamientos

químicos de RMN <sup>1</sup>H de estos derivados. Los resultados obtenidos permitieron concluir que el compuesto es una mezcla racémica de (7*R*,8*R*/7*S*,8*S*)-7,8-dihidroxi-5,6-didehidrokavaina, que podría formarse por el ataque nucleofílico no regioselectivo de una molécula de agua al grupo epóxido de la 7*R*,8*S*-epoxi-desmetoxiyangonin, aislada de *Piper rusbyi*. Estos datos y el hecho de que es la primera vez que se describe la presencia de un diol en este tipo de esqueleto, nos sugieren que este compuesto se trata de un artefacto.

➤ Se aíslan doce metabolitos con esqueleto de flavonoide, once de los cuales habían sido descritos previamente en la bibliografía química y cuyas estructuras fueron identificadas como: flavokavaina B, 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-dihidrochalcona, 2',6',4-trihidroxi-4'-metoxi-dihidrochalcona, 2',4',6'-trihidroxi-dihidrochalcona, 5,7-dihidroxi-flavanona, 5,7-dihidroxi-4'-metoxi-flavanona, 4',7-dimetoxi-5-hidroxi-flavanona, 3',5',5-trihidroxi-7-metoxi-flavanona, crisin, 4',5-dihidroxi-3',7-dimetoxiflavona y galangin.

➤ Así mismo, de las hojas de *P. aduncum* se aísla y determina la estructura de la 5,5'-dihidroxi-7,3'-dimetoxiflavanona, no descrita anteriormente en la bibliografía química.

➤ Se aíslan diez metabolitos derivados del ácido benzoico, previamente descritos en la bibliografía química e identificados como: 4-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-benzoato de metilo, 4-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-benzoato de metilo, ácido 4-hidroxi-3,5-bis-(3-metil-2-butenil) benzoico, ácido 3,5-bis-(3-metil-2-butenil)-4-metoxi benzoico, ácido 4-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-5-(3-metil-2-butenil) benzoico, ácido 4-hidroxi-3-(3,7-dimetil-2,6-octadienil) benzoico, ácido 3-(3,7-dimetil-2,6-octadienil)-4-metoxi benzoico, ácido 4-hidroxi-3-(3,7,11,15-tetrametil-hexadeca-2,6,10,14-tetraenil) benzoico, ácido 3,4-dihidroxi-5-(3,7,11,15-tetrametil-hexadeca-2,6,10,14-tetraenil) benzoico y ácido 3,4-dihidroxi-5-(11-formil-3,7,15-trimetil-hexadeca-2,6,10,14-tetraenil) benzoico.

➤ Se obtuvieron, asimismo, doce derivados del ácido benzoico, aislados de *Piper acutifolium*, *P. glabratrum* y *P. heterophyllum*, que resultaron nuevos en la bibliografía química y cuyas estructuras se establecieron como: 3,4-dihidroxi-5-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoato de metilo, 3,4-dihidroxi-5-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoato de etilo, 4-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-

metil-3-butenil) benzoato de etilo, 3-[2-(acetoxi)-3-metil-3-butenil]-4,5-dihidroxibenzoato de metilo, 3,4-dihidroxi-5-(3-metil-2-butenil) benzoato de metilo, ácido 4-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-5-(3-metil-2-butenil) benzoico, ácido 3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-5-(3-metil-2-butenil)-4-metoxi benzoico, ácido-3-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-5-(3-metil-2-butenil)-4-metoxi benzoico, ácido 4-hidroxi-3,5-bis(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoico, ácido-3-[(2*E*,6*E*,10*Z*)-11-carboxi-3,7,15-trimetil-2,6,10,14-hexadecatetraenil]-4,5-dihidroxibenzoico, ácido 3-[(2*E*,6*E*,10*Z*)-11-carboxi-13-hidroxi-3,7,15-trimetil-2,6,10,14-hexadecatetraenil]-4,5-dihidroxi benzoico y ácido 3-[(2*E*,6*E*,10*Z*)-11-carboxi-14-hidroxi-3,7,15-trimetil-2,6,10,15-hexadecatetraenil]-4,5-dihidroxi benzoico.

➤ La estereoquímica de los dobles enlaces en los nuevos derivados del ácido benzoico con unidad de geranilo o geranilgeranilo se determinó basándonos en experimentos ROESY, biogénesis y comparación con compuestos relacionados.

➤ Se aíslan y determinan las estructuras de ocho benzopiranos con sistema cromano, de los cuales siete resultaron nuevos en la bibliografía química y sus estructuras fueron establecidas, basándonos en sus datos físicos y espectroscópicos como: 3,8-dihidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de metilo, 3,8-dihidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de etilo, 3,4,8-trihidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de metilo, 3-hidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de etilo, 3-acetoxi-8-hidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de metilo, ácido 2-metil-2-(4-metil-3-pentenil)-4-oxo-6-cromanocarboxílico y ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-6-cromanocarboxílico.

➤ Se aíslan y determinan las estructuras de once benzopiranos con sistema cromeno, de los cuales siete resultaron nuevos en la bibliografía química y sus estructuras fueron establecidas como: 8-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno-6-carboxilato de etilo, ácido 8-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-2,2-dimetil-2*H*-cromeno-6-carboxílico, ácido 2-metil-2-[(3*E*,7*E*)-4,8,12-trimetil-3,7,11-tridecatrienil]-2*H*-cromeno-6-carboxílico, ácido 2-[(3*E*,7*Z*)-8-carboxi-4,12-dimetil-3,7,11-tridecatrienil]-8-hidroxi-2-metil-2*H*-cromeno-6-carboxílico, ácido 2-[(3*E*,7*Z*)-8-carboxi-10-hidroxi-4,12-dimetil-3,7,11-tridecatrienil]-8-hidroxi-2-metil-2*H*-cromeno-6-carboxílico, ácido 2-[(3*E*,7*Z*)-8-carboxi-11-hidroxi-4,12-dimetil-3,7,12-tridecatrienil]-8-hidroxi-2-metil-2*H*-

cromeno-6-carboxílico y ácido 2-[(3*E*,7*Z*)-8-carboxi-11,12-dihidroxi-4,12-dimetil-3,7-tridecadienil]-8-hidroxi-2-metil-2*H*-cromeno-6-carboxílico.

➤ La estereoquímica relativa de los dobles enlaces sobre la cadena terpénica de los benzopiranos aislados, se determinó basándonos en experimentos ROESY, la biogénesis de este tipo de metabolitos y comparación con compuestos relacionados descritos en la bibliografía química.

➤ Se aíslan y determinan las estructuras de tres metabolitos con estructura de benzofurano, dos los cuales resultaron nuevos en la bibliografía química y sus estructuras fueron establecidas como: ácido 2-hidroxi-7-(3-metil-2-butenil)-2,3-dihidro-benzofurano-5-carboxílico y ácido 2-(1-hidroxi-1-metiletil)-7-(3-metil-2-butenil)-2,3-dihidro-benzofurano-5-carboxílico.

➤ Se aporta la asignación completa de los datos espectroscópicos del 3-hidroxi-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-2,3-dihidro-benzofurano-5-carboxilato de metilo, anteriormente descrito.

➤ Se aíslan de *Piper aduncum*, *P. acutifolium* y *P. elongatum* los siguientes metabolitos con estructura de fenilpropanoide, previamente descritos en la bibliografía química:  $\gamma$ -asarona, 1-alil-2,3-dimetoxi-4,5-metilendioxi-benceno, 1-(1-hidroxi-alil)-2,3-dimetoxi-4,5-metilendioxi-benceno,  $\alpha$ -asarona, 3'-hidroxi-isosafrol, dilapional y  $\omega$ -hidroxiisodilapiol.

➤ Se aíslan y determinan las estructuras de los siguientes sesquiterpenos nerolidol, oplopanona, viridiflorol, esfatulenol y óxido de cariofileno y el diterpeno, transfitol, previamente descritos en la bibliografía química.

➤ Se obtuvo, asimismo, un nuevo terpeno lineal, aislado de las hojas de *P. heterophyllum*, cuya estructura se elucidó mediante el estudio de sus datos espectroscópicos como ácido (2*Z*,6*E*)-6-metil-2-(4-metil-3-pentenil)-10-oxo-2,6-undecadienoico.

- Se da cuenta del aislamiento de cuatro metabolitos, anteriormente descritos, con estructura de apocarotenoide cíclico ( $C_{13}$ -*norisoprenoides*): blumenol A, (-)-boscialina, dehidrovomifoliol y loliolida. Cabe destacar, que este tipo de metabolitos son pocos frecuentes en el género *Piper*.
  
- Se aíslan de las hojas de *P. elongatum* y *P. glabratum* cuatro amidas previamente descritas en la bibliografía química y cuyas estructuras se establecieron como: *N-cis*-feruloil-tiramina, *N-p*-cumaroil-tiramina, 4-hidroxi-*N*-[2-(4-metoxi-fenil)-etil]-benzamida y 4-metoxi-*N*-[2-(4-metoxi-5-hidroxi-fenil)-etil]-benzamida. Cabe destacar, que estas dos últimas amidas se aíslan por primera vez de fuente natural.
  
- Se determina la estructura de un lignano, justicidina B y del 2,4,5-trimetoxibenzaldehído, aislados de *P. glabratum* y *P. acutifolium*, respectivamente, compuestos descritos con anterioridad en la bibliografía química.
  
- Los extractos etanólicos de las hojas de las siguientes especies de *Piper*: *P. aduncum*, *P. acutifolium*, *P. elongatum*, *P. glabratum*, *P. heterophyllum*, *P. pilliraneum* y *P. rusbyi*, fueron resuspendidos en agua y extraídos con diclorometano y ambas fracciones fueron evaluadas para determinar su actividad leishmanicida. Las fracciones orgánicas de las siete especies estudiadas presentaron algún grado de actividad ( $CI_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$ ) frente a tres cepas de *Leishmania*: *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. donovani* en un modelo *in vitro* evaluadas.
  
- Las fracciones orgánicas de *P. aduncum*, *P. glabratum* y *P. rusbyi* resultaron las más activas ( $CI_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$ ), destacando *P. glabratum* con una  $CI_{50}$  de  $7.6 \mu\text{g/ml}$  frente a *L. amazonensis* y *L. braziliensis* y de  $21.4 \mu\text{g/ml}$  frente a *L. donovani*.
  
- Se determinó la actividad leishmanicida de las fracciones obtenidas de la cromatografía líquida al vacío de la fracción de diclorometano de las siete especies de *Piper* estudiadas.
  
- De las dos *kavalactonas* ensayadas, **K-1** que posee un grupo epóxido en su estructura presentó una ligera actividad ( $CI_{50} 20 \mu\text{g/ml}$ ), mientras que la presencia de un diol en **K-2** hace que la actividad leishmanicida se pierda completamente.

- La flavokavaina B, la 2',6',4-trihidroxi-4'-metoxi-dihidrochalcona y la 5,7-dihidroxi-flavanona resultaron más activos, frente a las tres líneas de *Leishmania* ensayadas, que la pentamidina, utilizada como control (CI<sub>50</sub> 10 µg/ml), resultando a flavokavaina B del orden de tres veces más potente (CI<sub>50</sub> 3.2 µg/ml).
  
- La 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-dihidrochalcona, la 2',4',6'-trihidroxi-dihidrochalcona y la 5,7-dihidroxi-4'-metoxi-flavanona, presentaron una actividad similar al control (CI<sub>50</sub> 10 µg/ml). En este grupo de compuestos la presencia de un grupo hidroxilo adicional reduce ligeramente la actividad en (**F-6 versus F-5**), mientras que la presencia de grupos metoxilo en la posiciones C-7 y C-4' (**F-7**) hace que esta actividad se pierda por completo.
  
- En el esqueleto tipo dihidrochalcona, la presencia de un grupo hidroxilo en C-4 con respecto a un metoxilo, reduce la actividad a la mitad, pasando de una CI<sub>50</sub> de 5 a 10 µg/ml (**F-3 versus F-2 y F-4**).
  
- La 3',5',5-trihidroxi-7-metoxi-flavanona presentó selectividad frente a *Leishmania braziliensis* (CI<sub>50</sub> de 8.9 µg/ml), mientras que **F-9** cuya única diferencia estructural es la presencia de un metoxilo en C-3', resultó inactivo frente a las tres líneas evaluadas (CI<sub>50</sub>>50µg/ml). Un estudio de la relación estructura-actividad preliminar sugiere la necesidad de grupos hidroxilo en el anillo B en este tipo de flavonoides para la expresión de la actividad.
  
- Los datos obtenidos nos indican que los flavonoides son una clase de productos naturales potenciales agentes en el tratamiento de la leishmaniasis.
  
- El ácido 3-(3,7-dimetil-2,6-octadienil)-4-metoxi benzoico presentó selectividad frente a *L. braziliensis* (CI<sub>50</sub> 6.5 µg/ml), siendo incluso mas potente que el control pentamidina (CI<sub>50</sub> 10.0 µg/ml).

- Los benzopiranos, ácido 2-metil-2-(4-metil-3-pentenil)-2*H*-cromeno-6-carboxílico y ácido 2-metil-2-(4-metil-3-pentenil)-8-(3-metil-2-butenil)-2*H*-cromeno-6-carboxílico, presentaron una actividad similar a la pentamidina, utilizada como control, relacionándose la actividad de este grupo de compuestos con la cadena isoprenica situada sobre C-2.
  
- La evaluación de la actividad en un modelo *in vivo* frente a *Leishmania amazonensis* de flavokavaina B y 7*R*,8*S*-epoxi-desmetoxiyangonin, mostró la eficacia de flavokavaina B a una dosis de 5mg/Kg/día y en menor medida la de kavalactona.
  
- Se realizó el estudio de la actividad tripanocida frente a formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, en un modelo *in vitro* de cincuenta de los metabolitos aislados.
  
- Los terpenos, viridiflorol y transfitol, y las dihidrochalconas, 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-dihidrochalcona y 2',6',4-trihidroxi-4'-metoxi-dihidrochalcona, presentaron una moderada actividad tripanocida, resultando este último compuesto el más activo de los ensayados (CI<sub>50</sub> 6.7 µg/ml).
  
- Se evaluó la actividad antiplasmódica frente a *Plasmodium falciparum* (cloroquina resistente P.32) en un modelo *in vitro* de cuarenta de los metabolitos aislados.
  
- El terpeno lineal, ácido (2*Z*,6*E*)-6-metil-2-(4-metil-3-pentenil)-10-oxo-2,6-undecadienoico, la *N-p*-cumaroil-tiramina y la 7*R*,8*S*-epoxi-desmetoxiyangonin, fueron los metabolitos con mayor actividad antiplasmódica, presentando unas CI<sub>50</sub> de 1.6, 0.7 y 0.5 µg/ml, respectivamente.
  
- Estos resultados nos orientan en la búsqueda de compuestos prometedores para el tratamiento de la malaria y los esfuerzos futuros estarán dirigidos hacia la obtención de derivados de kavalactonas con epóxido sobre C-7 y C-8, que parece un requisito para la expresión de la actividad, así como ácidos grasos insaturados, compuestos de gran abundancia natural.

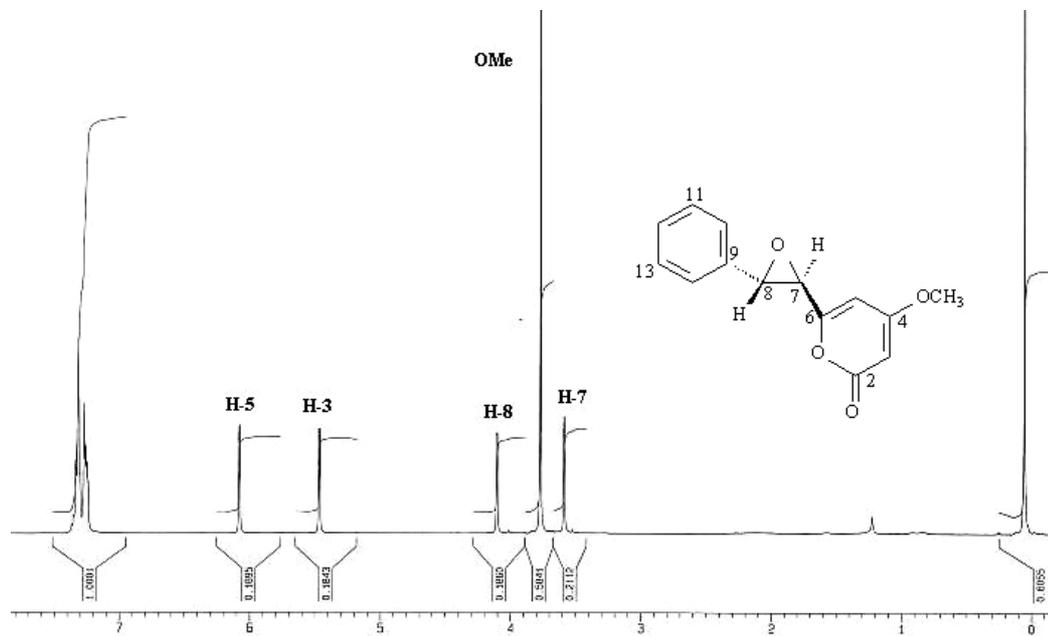
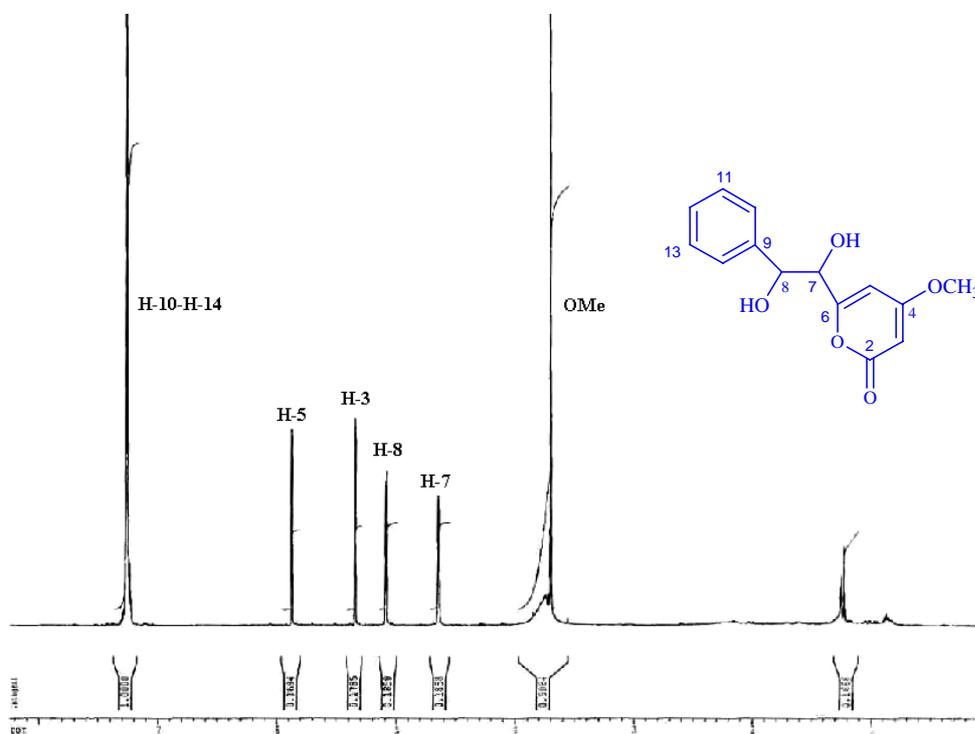
- Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que las especies del género *Piper* son una prometedora fuente de potenciales agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de enfermedades parasitarias que azotan numerosos países en desarrollo y para las cuales no existen tratamientos adecuados.
  
- Se valida el uso en la medicina tradicional de especies de *Piper* para el tratamiento de las enfermedades parasitarias, justificada por la presencia en las mismas de compuestos activos.
  
- Finalmente, podemos concluir que se han aislado un total de ochenta y tres metabolitos de las siete especies del género *Piper* estudiadas, de las cuales treinta y tres presentan estructuras nuevas, siendo doce de ellas derivados del ácido benzoico y diecisiete derivados ciclados con estructura de benzopirano, lo que representa el ochenta y ocho por ciento del total de las estructuras nuevas.
  
- La actividad antiparasitaria de los metabolitos evaluados se centra en siete de los derivados del ácido benzoico y en cinco de los benzopiranos aislados, representando un cuarenta y uno por ciento del total de los compuestos que resultaron activos. Estos datos son indicadores de que esta clase de metabolitos poseen interés farmacológico como potenciales agentes antiparasitarios y las especies del género *Piper*, dado su alto contenido en los mismos, una excelente fuente de estos prometedores agentes.

## ***9. ÍNDICE DE PRODUCTOS***

<b>Código</b>	<b>Producto</b>	<b>PT</b>	<b>PE</b>
<b>K-1</b>	7 <i>R</i> ,8 <i>S</i> -Epoxi-desmetoxiyangonina	53	63
<b>K-2</b>	(7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> /7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> )-Dihidroxi-5,6-didehidrokavaina	58	64
<b>F-9</b>	5,5'-dihidroxi-7,3'-dimetoxi-flavanona.	79	83
<b>AB-1</b>	3,4-Dihidroxi-5-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoato de metilo	95	129
<b>AB-2</b>	3,4-Dihidroxi-5-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoato de etilo	99	130
<b>AB-4</b>	4-Hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoato de etilo	101	131
<b>AB-5</b>	3-[2-(Acetoxi)-3-metil-3-butenil]-4,5-dihidroxibenzoato de metilo	103	132
<b>AB-7</b>	3,4-Dihidroxi-5-(3-metil-2-butenil) benzoato de metilo.	105	133
<b>AB-10</b>	Ácido 4-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-5-(3-metil-2-butenil) benzoico.	108	134
<b>AB-11</b>	Ácido 3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-5-(3-metil-2-butenil)-4-metoxi benzoico.	111	135
<b>AB-12</b>	Ácido 3-(1- <i>trans</i> -3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-5-(3-metil-2-butenil)-4-metoxi benzoico.	113	136
<b>AB-13</b>	Ácido 4-hidroxi-3,5-bis(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoico.	116	137
<b>AB-20</b>	Ácido-3-[(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,10 <i>Z</i> )-11-carboxi-3,7,15-trimetil-2,6,10,14-hexadecatetraenil]-4,5-dihidroxibenzoico.	118	138
<b>AB-21</b>	Ácido 3-[(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,10 <i>Z</i> )-11-carboxi-3,7,15-trimetil-13-hidroxi-2,6,10,14-hexadecatetraenil]-4,5-dihidroxi benzoico.	122	139
<b>AB-22</b>	Ácido 3-[(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,10 <i>Z</i> )-11-carboxi-14-hidroxi-3,7,15-trimetil-2,6,10,15-hexadecatetraenil]-4,5-dihidroxi benzoico	124	140

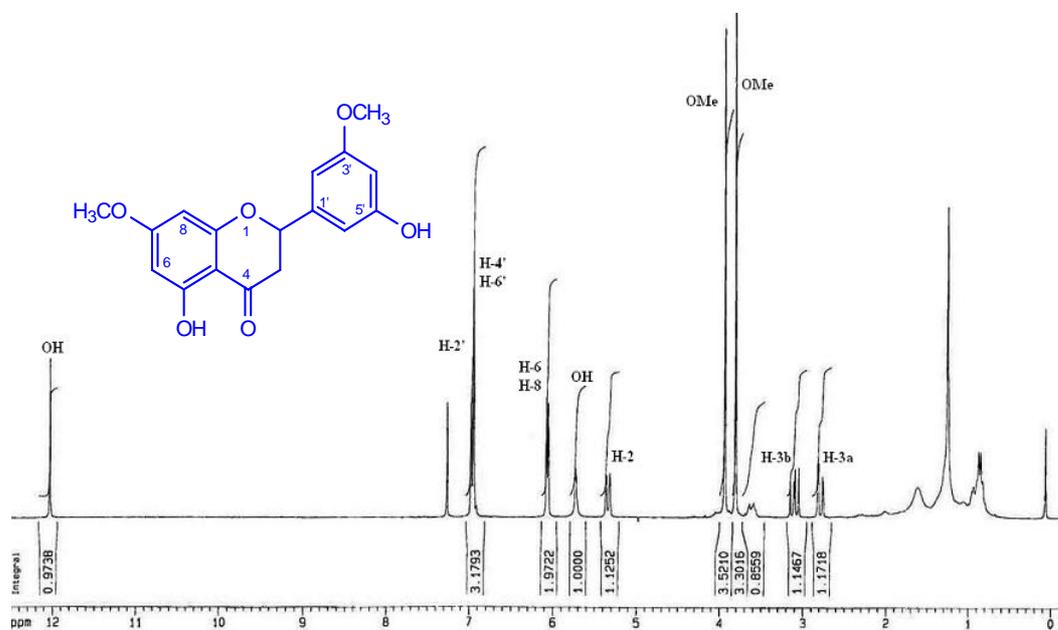
<b>Codigo</b>	<b>Producto</b>	<b>PT</b>	<b>PE</b>
<b>B-1</b>	3,8-Dihidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de metilo.	<b>151</b>	<b>195</b>
<b>B-2</b>	3,8-Dihidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de etilo.	<b>154</b>	<b>196</b>
<b>B-3</b>	3,4,8-Trihidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de metilo	<b>155</b>	<b>197</b>
<b>B-5</b>	3-Hidroxi-2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato de etilo	<b>158</b>	<b>198</b>
<b>B-6</b>	3-Acetoxi-8-hidroxi-2,2-dimetil -6-cromanocarboxilato de metilo	<b>159</b>	<b>199</b>
<b>B-7</b>	Ácido 2-metil-2-(4-metil-3-pentenil)-4-oxo-6-cromanocarboxílico	<b>161</b>	<b>200</b>
<b>B-8</b>	Ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-6-cromanocarboxílico	<b>163</b>	<b>201</b>
<b>B-10</b>	8-Hidroxi-2,2-dimetil-2 <i>H</i> -cromeno-6-carboxilato de etilo	<b>167</b>	<b>202</b>
<b>B-12</b>	Ácido 8-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-2,2-dimetil-2 <i>H</i> -cromeno-6-carboxílico.	<b>170</b>	<b>203</b>
<b>B-15</b>	Ácido 2-metil-2-[(3 <i>E</i> ,7 <i>E</i> )-4,8,12-trimetil-3,7,11-tridecatrienil]-2 <i>H</i> -cromeno-6-carboxílico.	<b>172</b>	<b>204</b>
<b>B-16</b>	Ácido 2-[(3 <i>E</i> ,7 <i>Z</i> )-8-carboxi-4,12-dimetil-3,7,11-tridecatrienil]-8-hidroxi-2-metil-2 <i>H</i> -cromeno-6-carboxílico.	<b>175</b>	<b>205</b>
<b>B-17</b>	Ácido 2-[(3 <i>E</i> ,7 <i>Z</i> )-8-carboxi-10-hidroxi-4,12-dimetil-3,7,11-tridecatrienil]-8-hidroxi-2-metil-2 <i>H</i> -cromeno-6-carboxílico.	<b>177</b>	<b>206</b>
<b>B-18</b>	Ácido 2-[(3 <i>E</i> ,7 <i>Z</i> )-8-carboxi-11-hidroxi-4,12-dimetil-3,7,12-tridecatrienil]-8-hidroxi-2-metil-2 <i>H</i> -cromeno-6-carboxílico.	<b>180</b>	<b>207</b>
<b>B-19</b>	Ácido 2-[(3 <i>E</i> ,7 <i>Z</i> )-8-carboxi-11,12-dihidroxi-4,12-dimetil-3,7-tridecadienil]-8-hidroxi-2-metil-2 <i>H</i> -cromeno-6-carboxílico.	<b>182</b>	<b>208</b>
<b>B-20</b>	3-Hidroxi-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-2,3-dihidro-benzofurano-5-carboxilato de metilo.	<b>186</b>	<b>209</b>
<b>B-21</b>	Ácido 2-hidroxi-7-(3-metil-2-butenil)-2,3-dihidro-benzofurano-5-carboxílico.	<b>189</b>	<b>210</b>
<b>B-22</b>	Ácido 2-(1-hidroxi-1-metiletil)-7-(3-metil-2-butenil)-2,3-dihidro-benzofurano-5-carboxílico.	<b>192</b>	<b>211</b>
<b>T-7</b>	Ácido (2 <i>Z</i> ,6 <i>E</i> )-6-metil-2-(4-metil-3-pentenil)-10-oxo-2,6-undecadienoico	<b>231</b>	<b>235</b>

## ***10. ANEXOS***

**KAVALACTONAS****Producto K-1****Producto K-2**

**FLAVONOIDE**

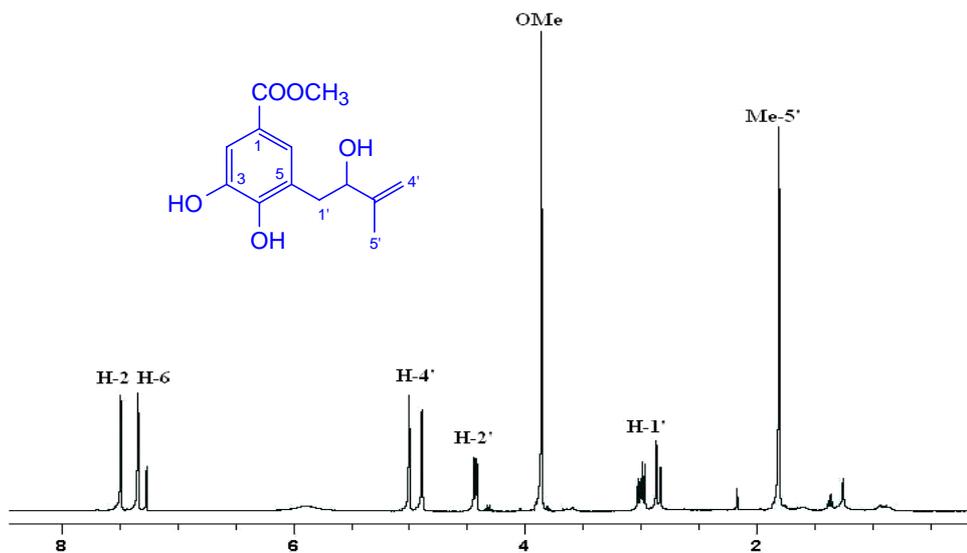
**Producto F-9**



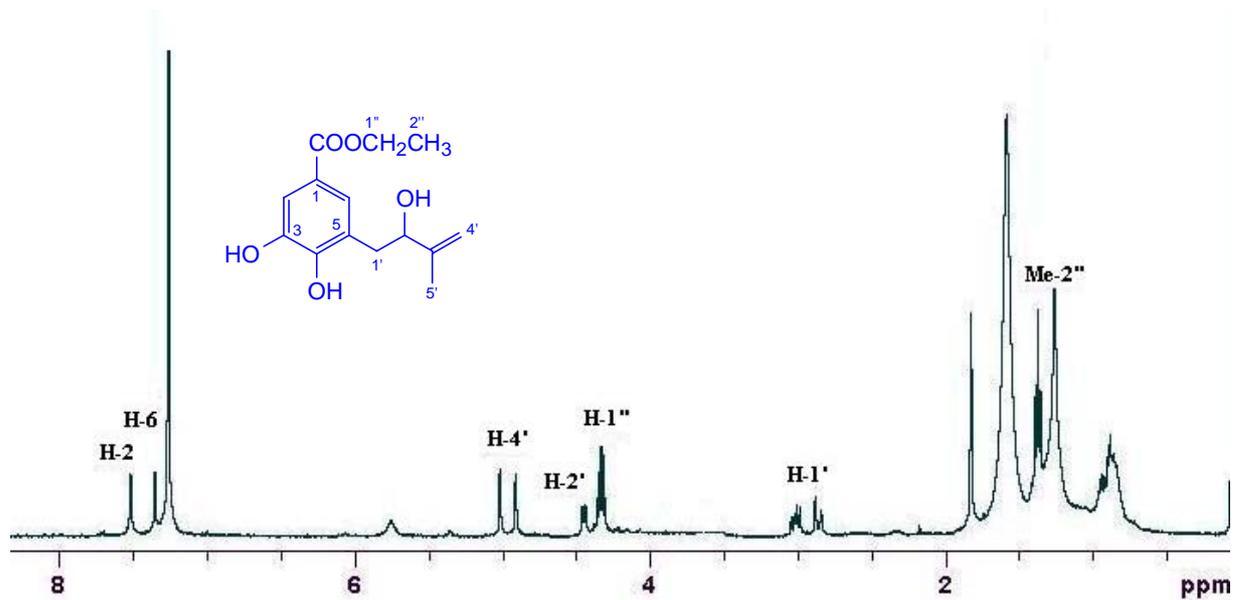
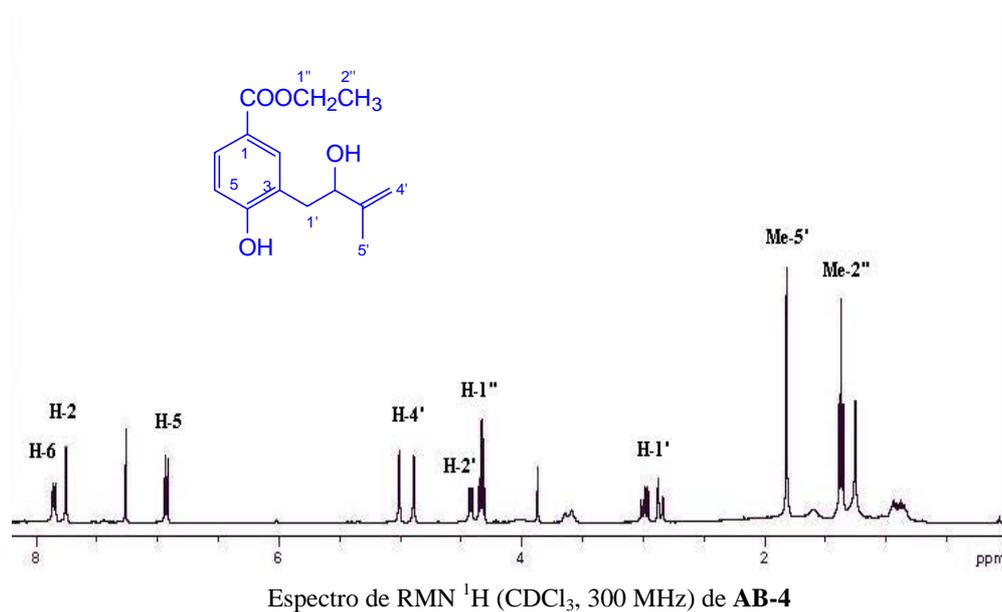
Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de **F-9**

**DERIVADOS DEL ÁCIDO BENZOICO**

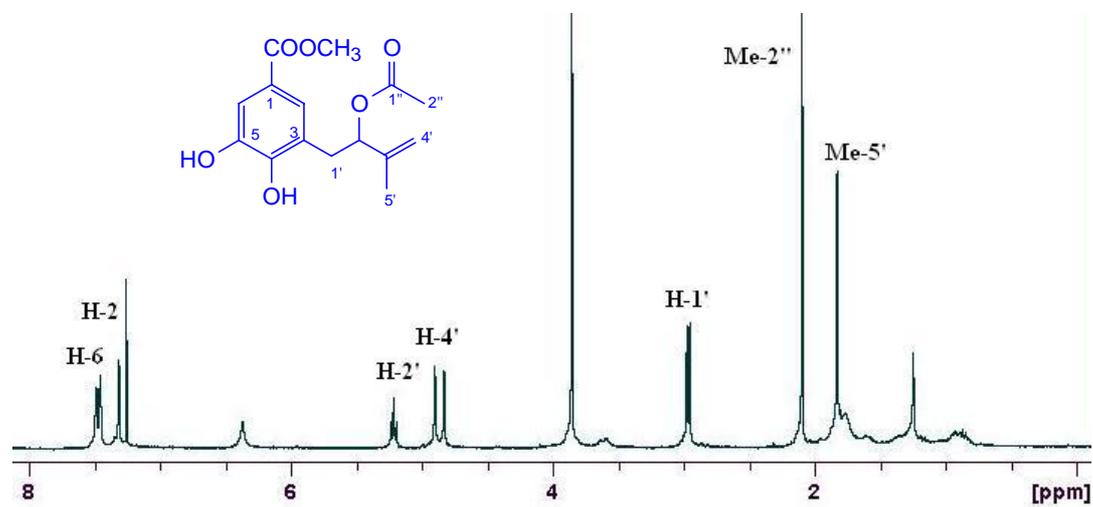
**Producto AB-1**



Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de **AB-1**

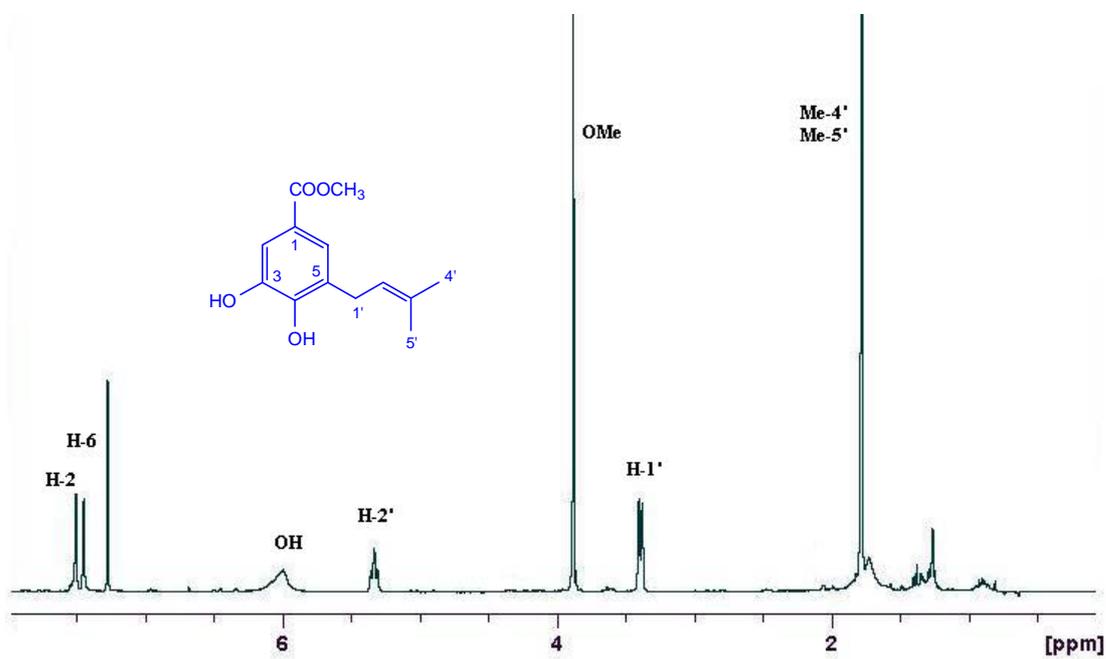
**Producto AB-2****Producto AB-4**

### Producto AB-5



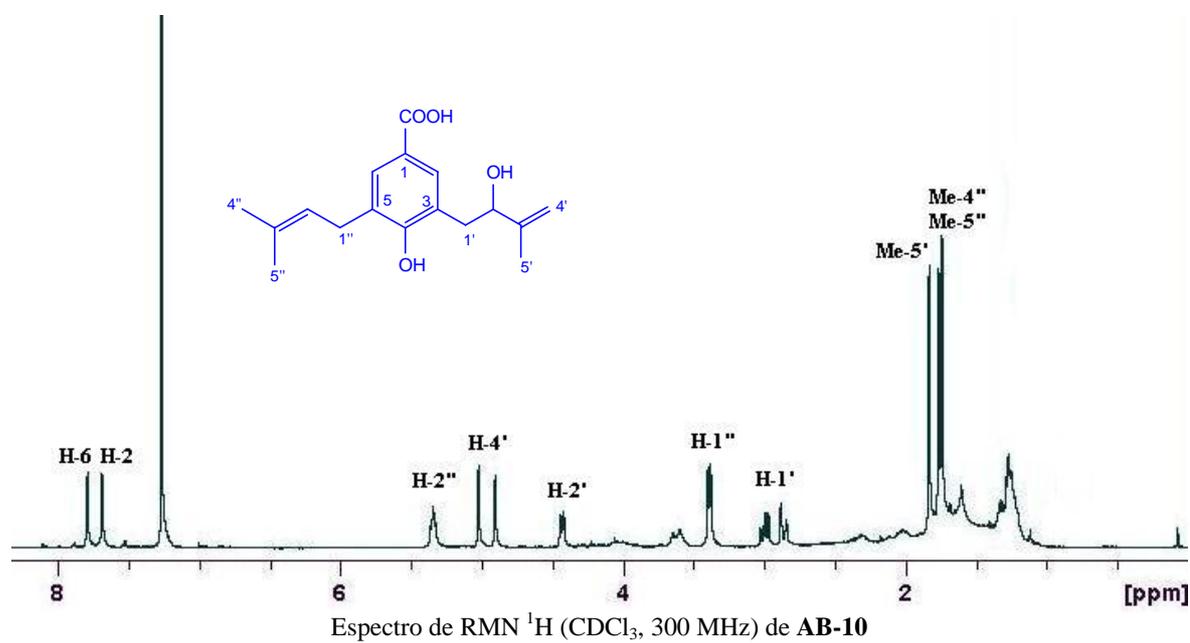
Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de AB-5

### Producto AB-7

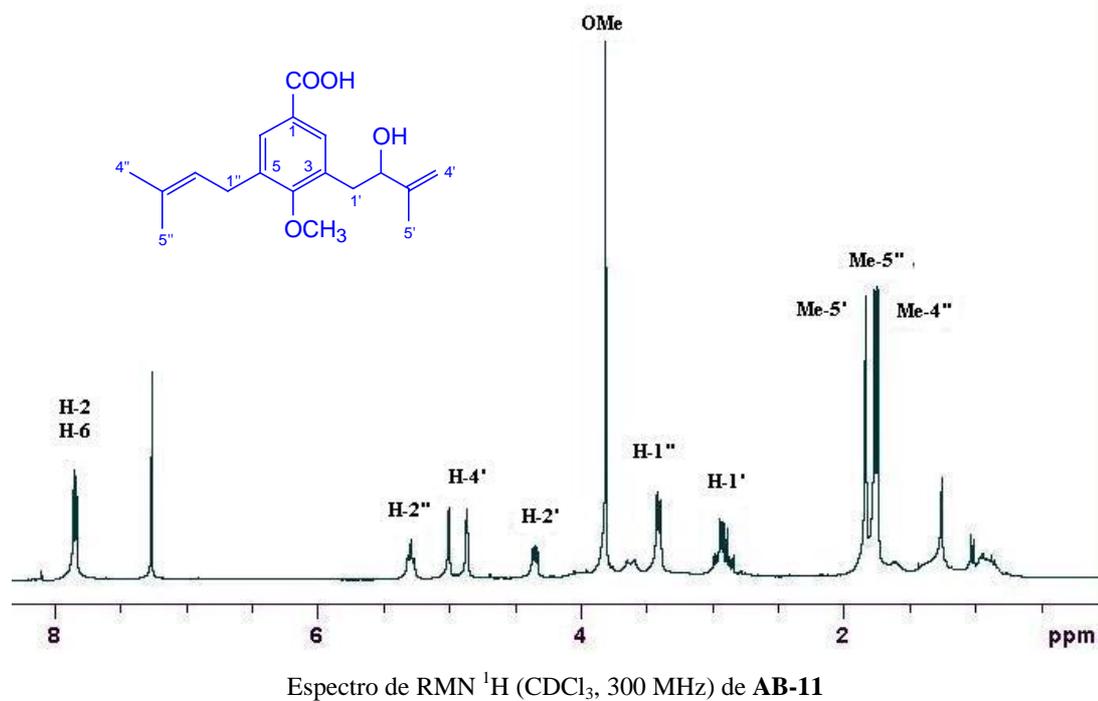


Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de AB-7

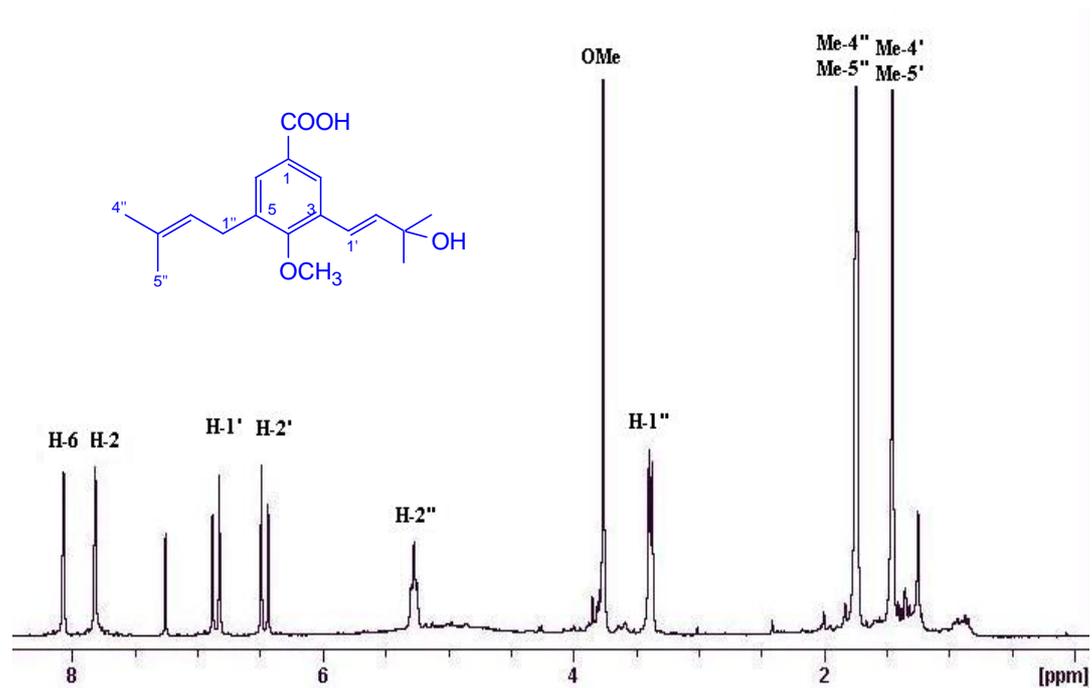
## Producto AB-10



## Producto AB-11

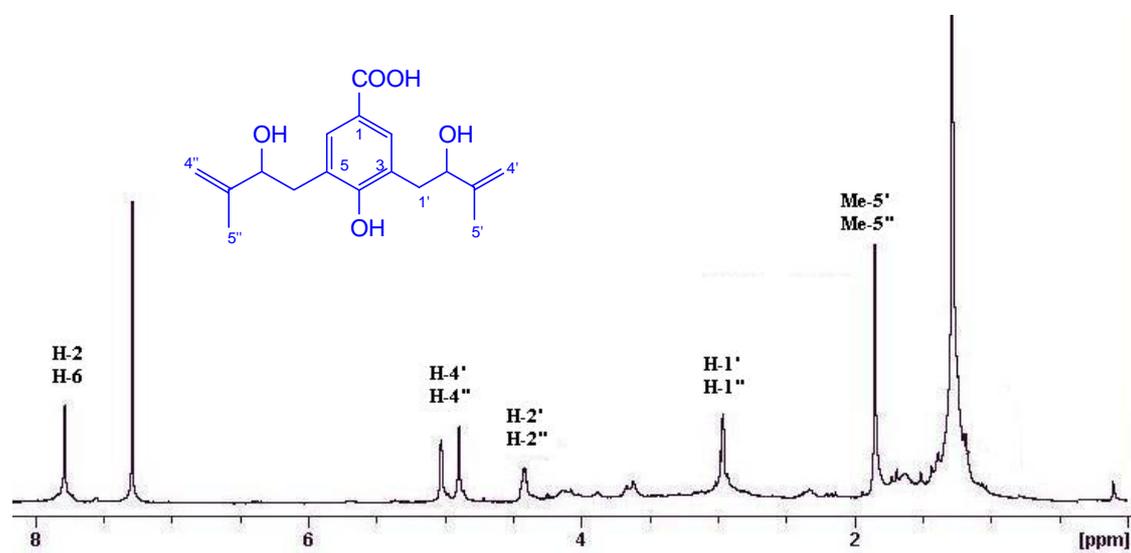


### Producto AB-12



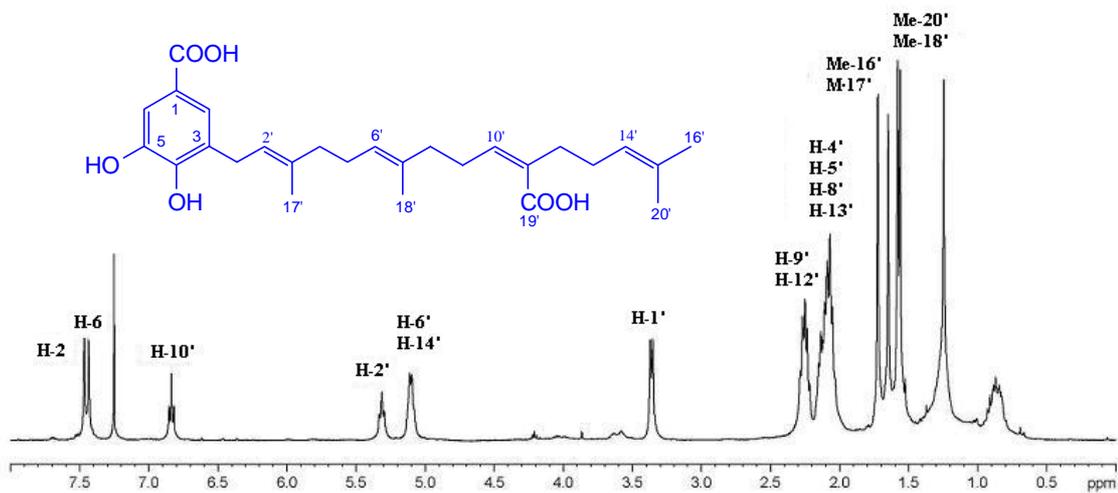
Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de AB-12

### Producto AB-13

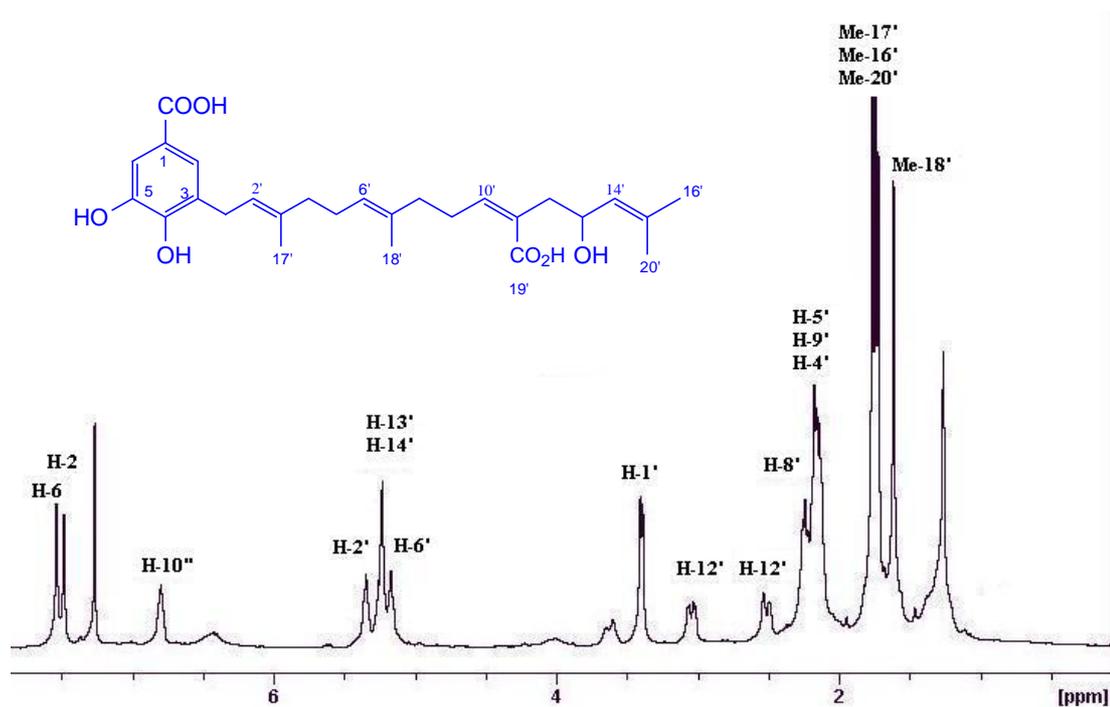


Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de AB-13

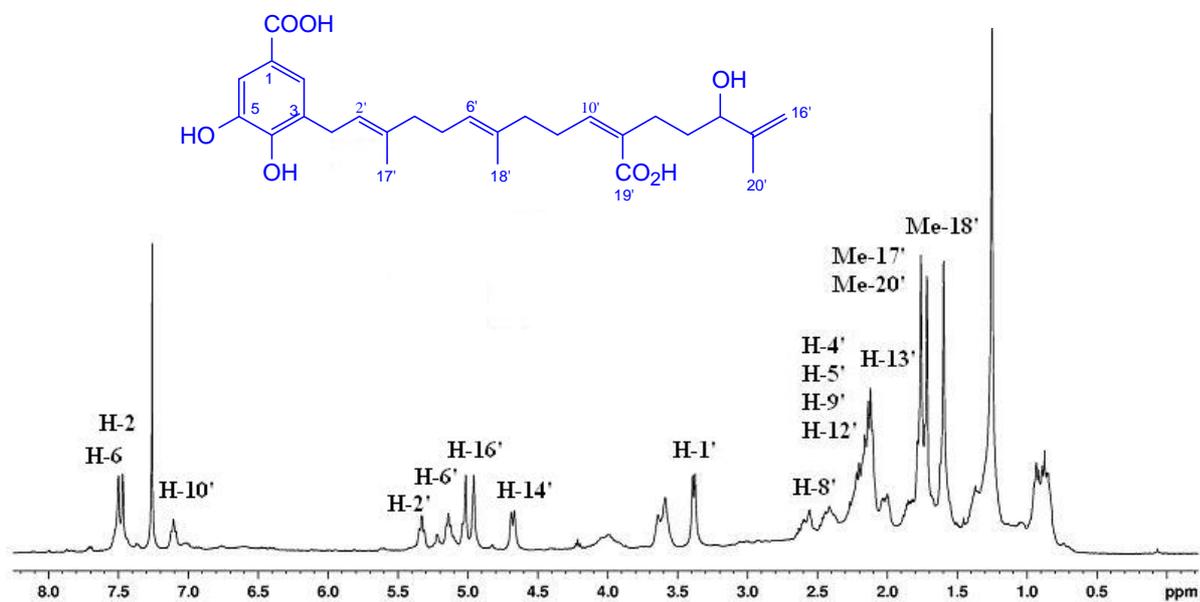
## Producto AB-20

Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de AB-20

## Producto AB-21

Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de AB-21

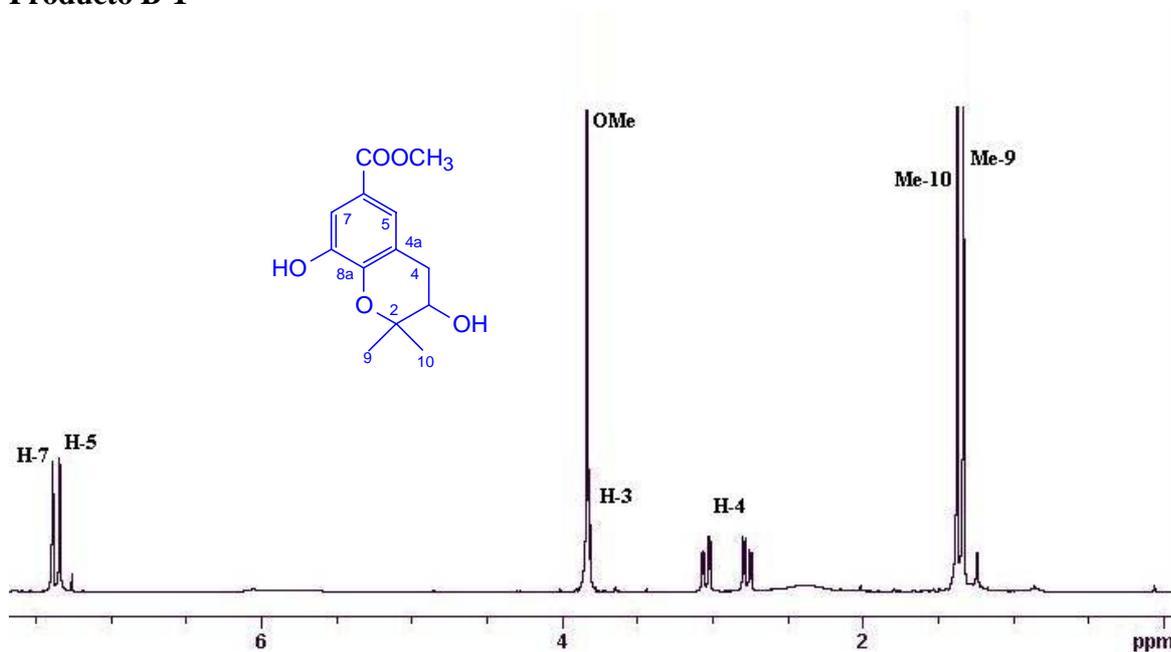
## Producto AB-22



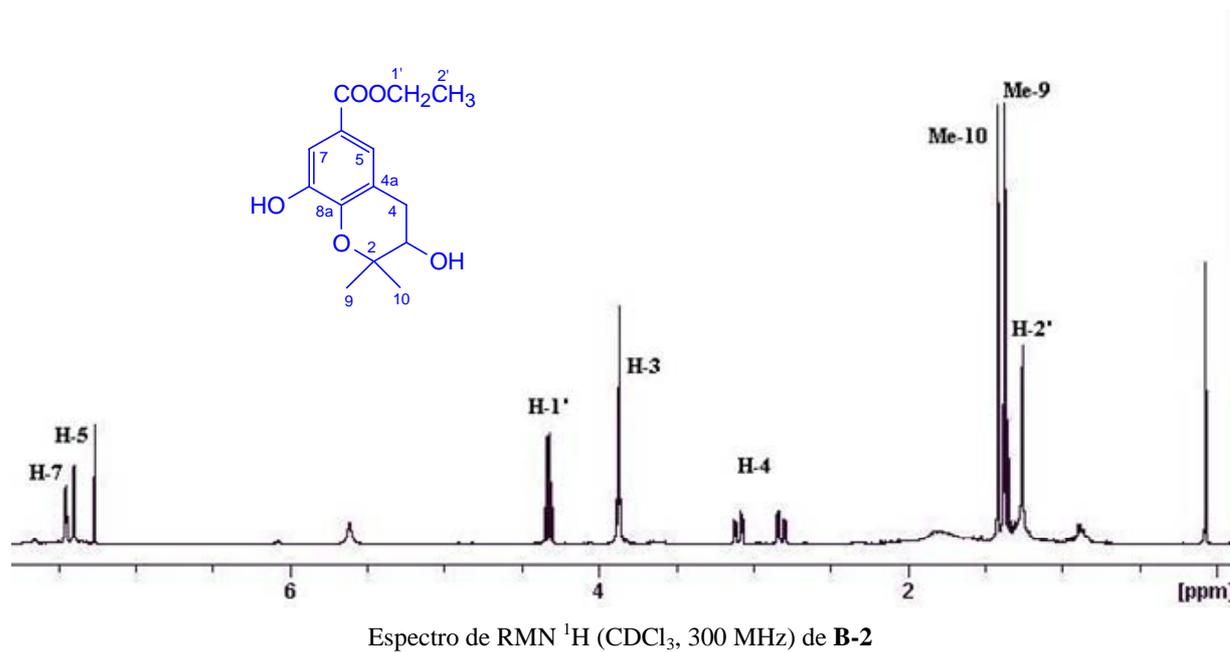
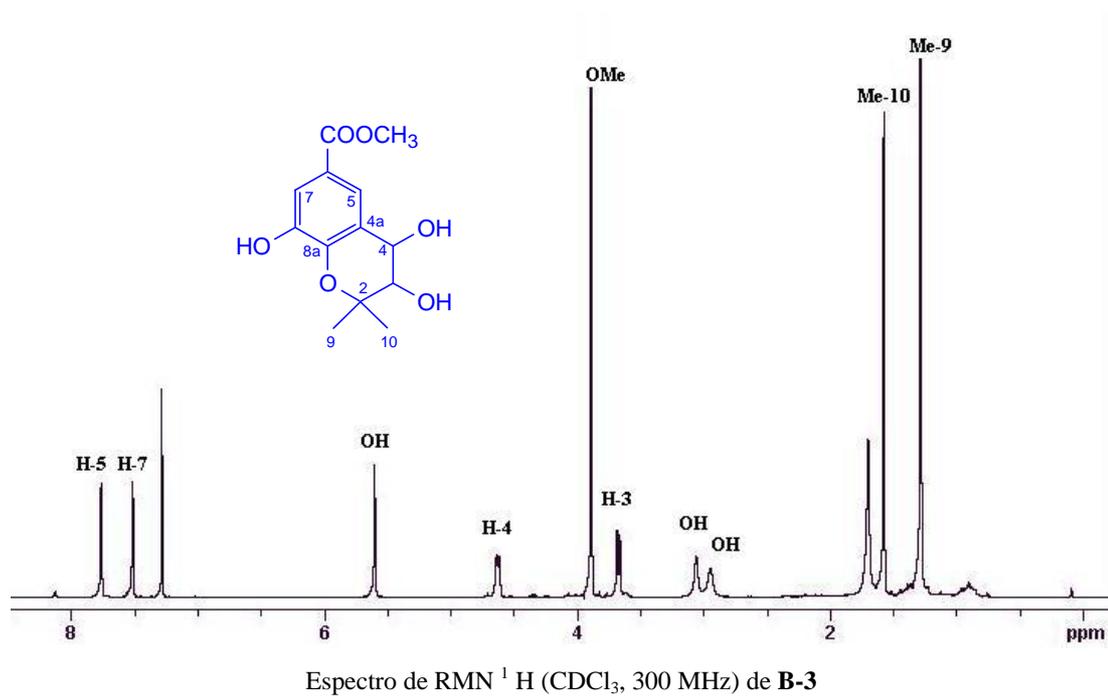
Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de AB-22

## BENZOPIRANOS

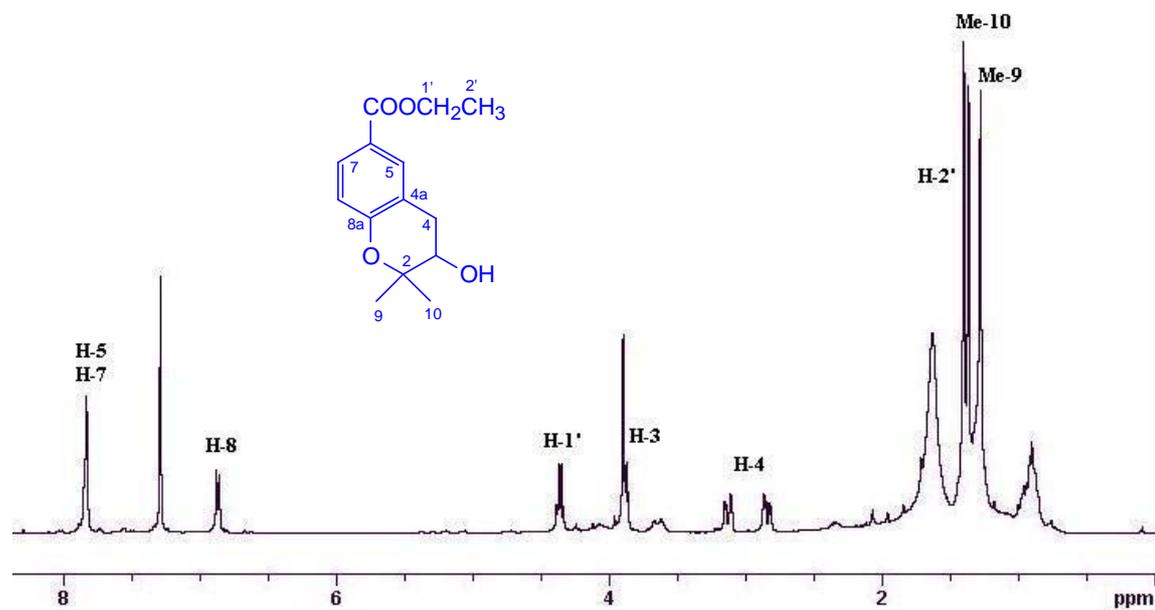
### Producto B-1



Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de B-1

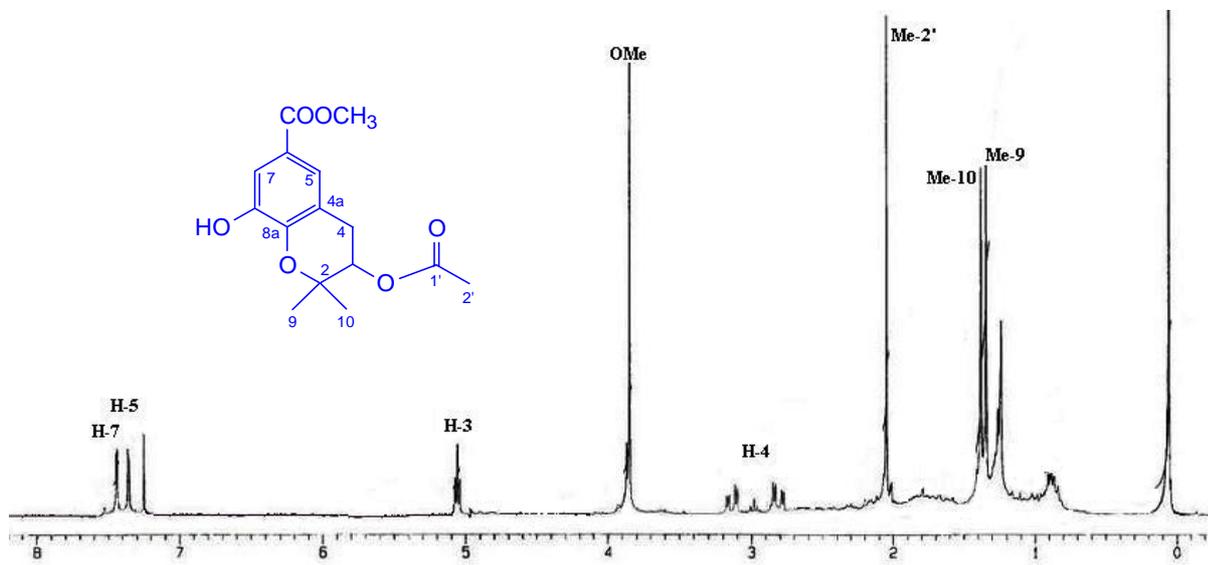
**Producto B-2****Producto B-3**

### Producto B-5

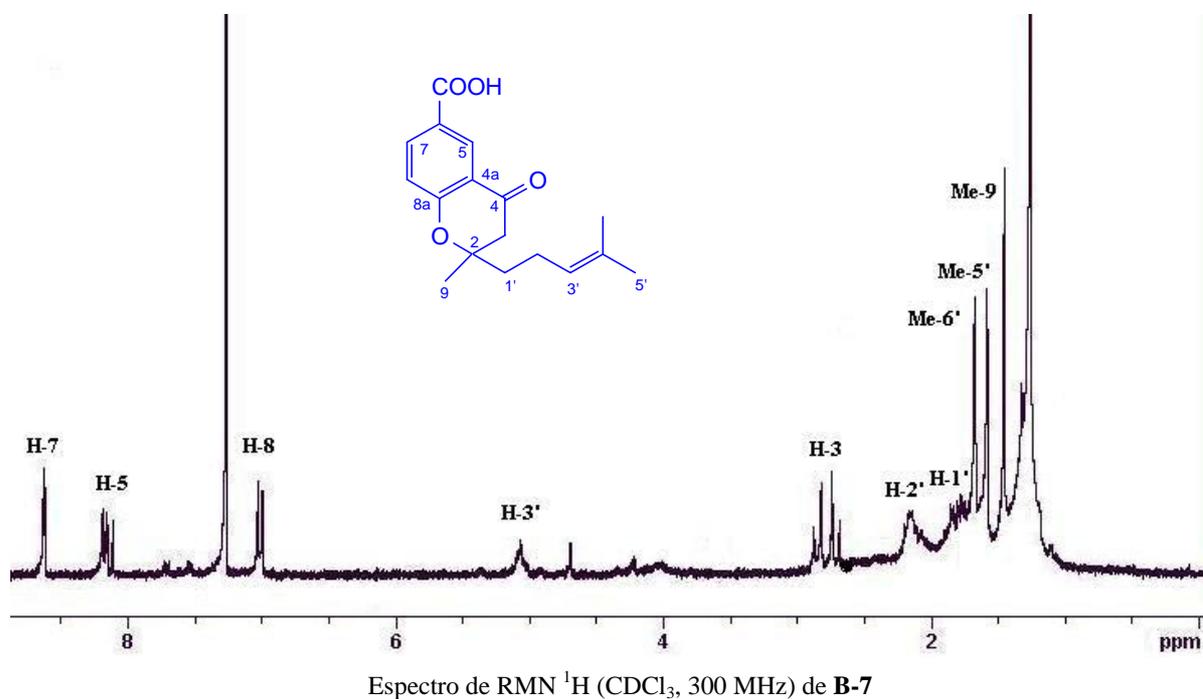
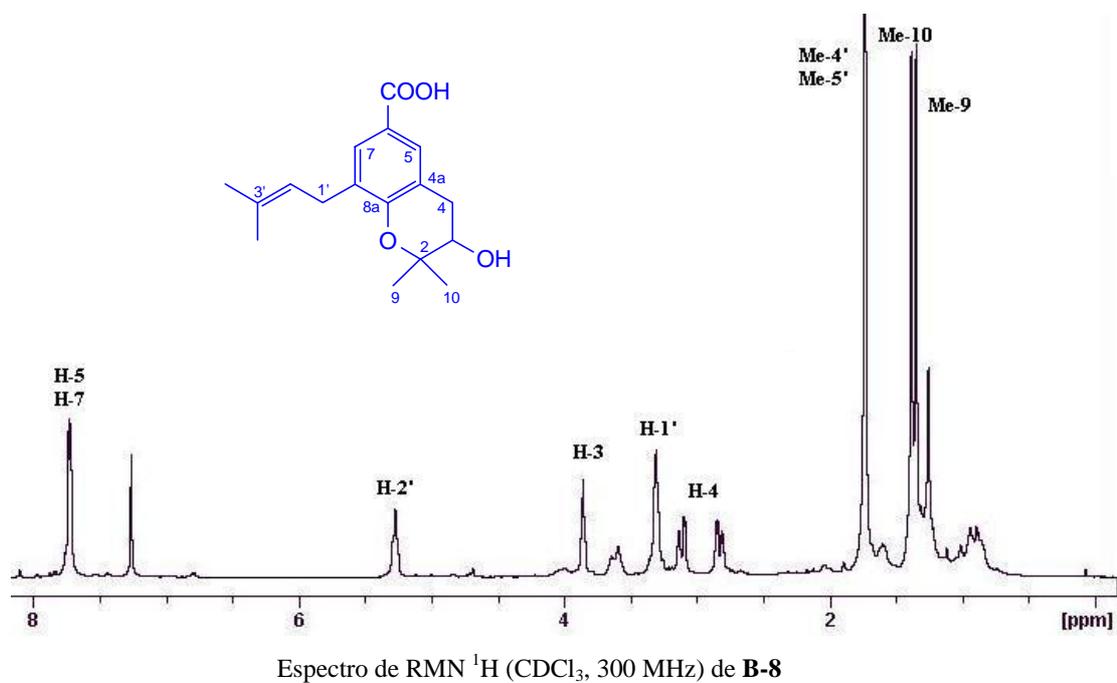


Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de B-5

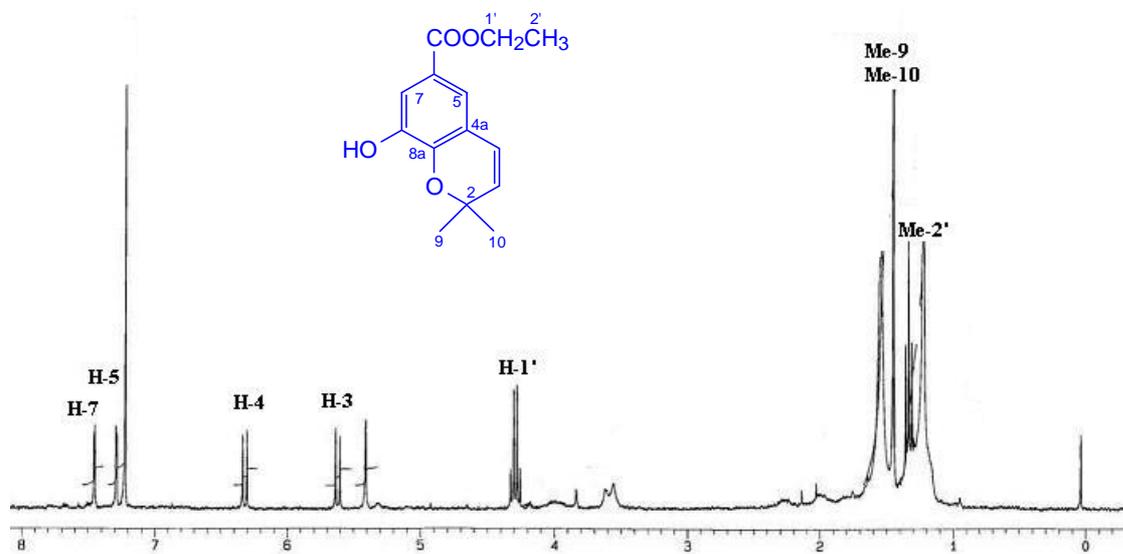
### Producto B-6



Espectro de RMN <sup>1</sup>H (C DCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de B-6

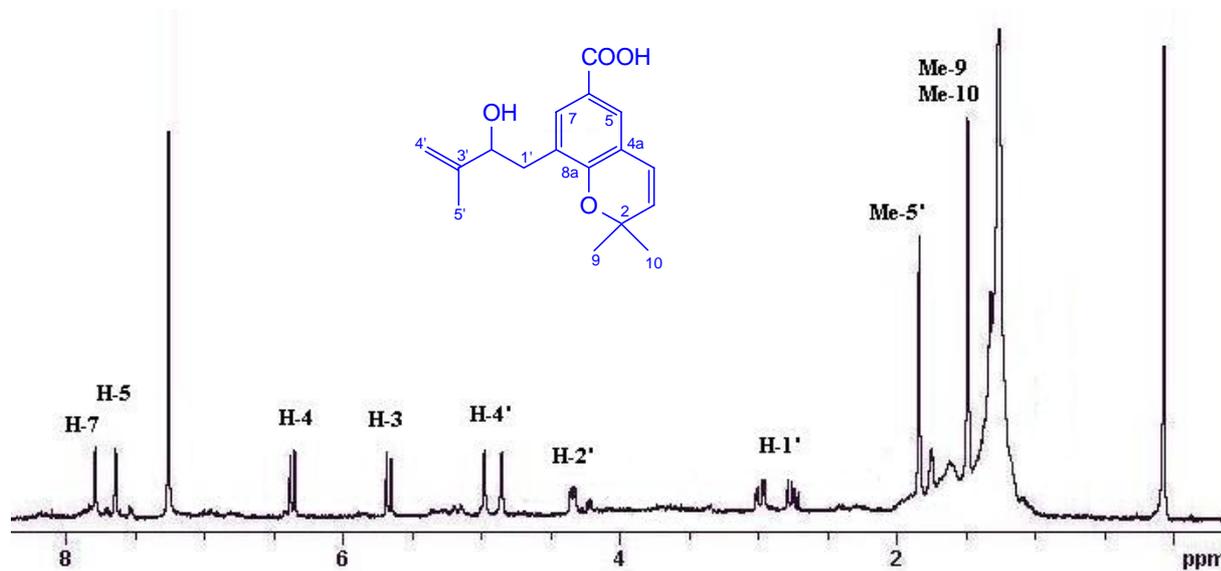
**Producto B-7****Producto B-8**

### Producto B-10



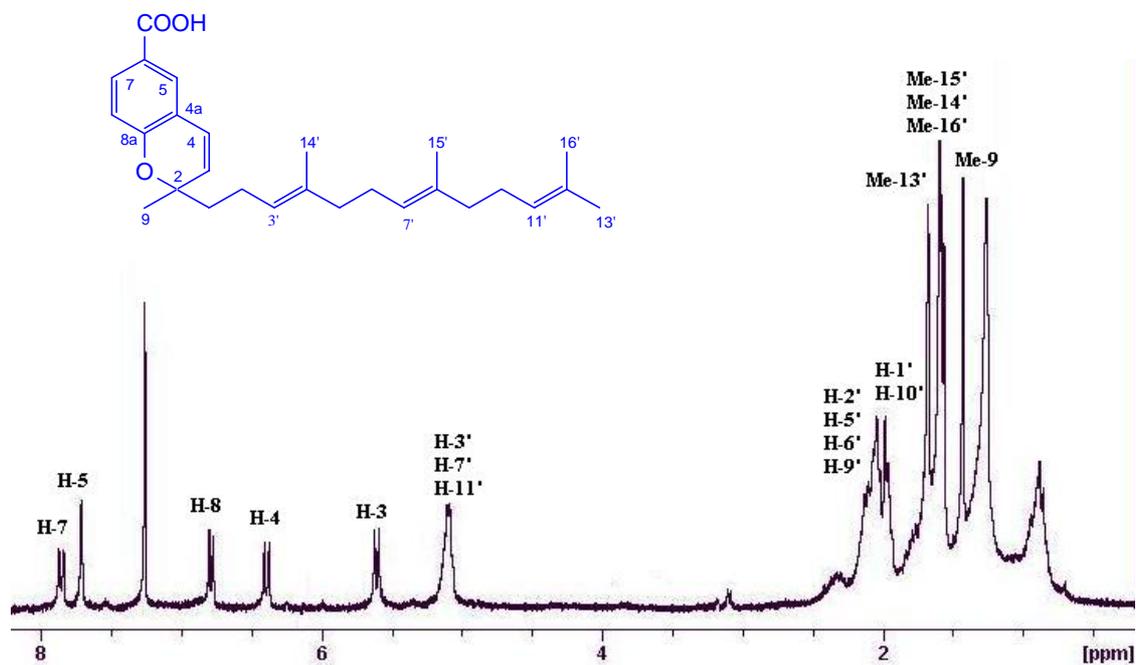
Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de B-10

### Producto B-12

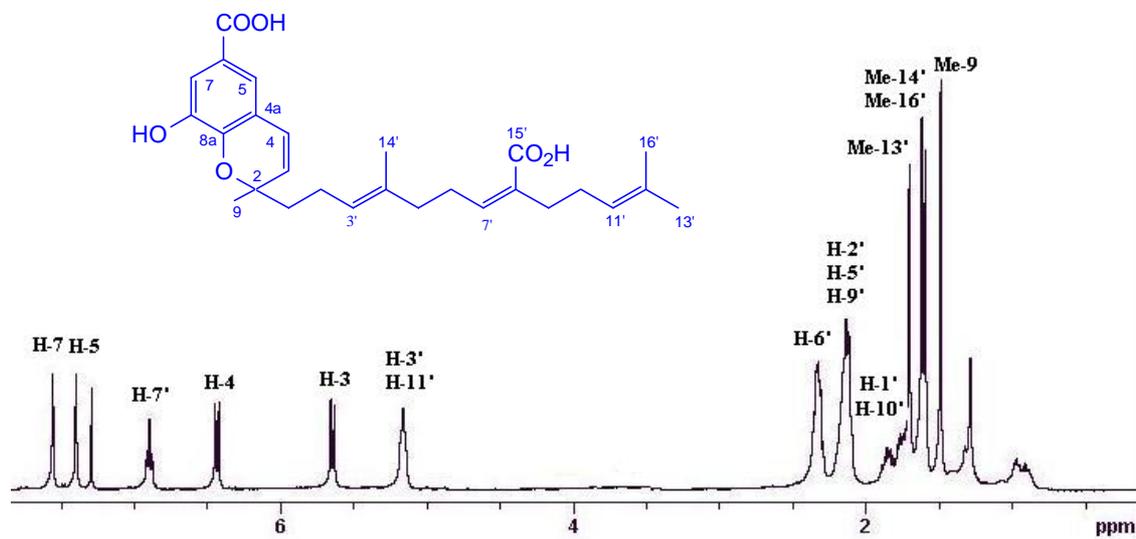


Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de B-12

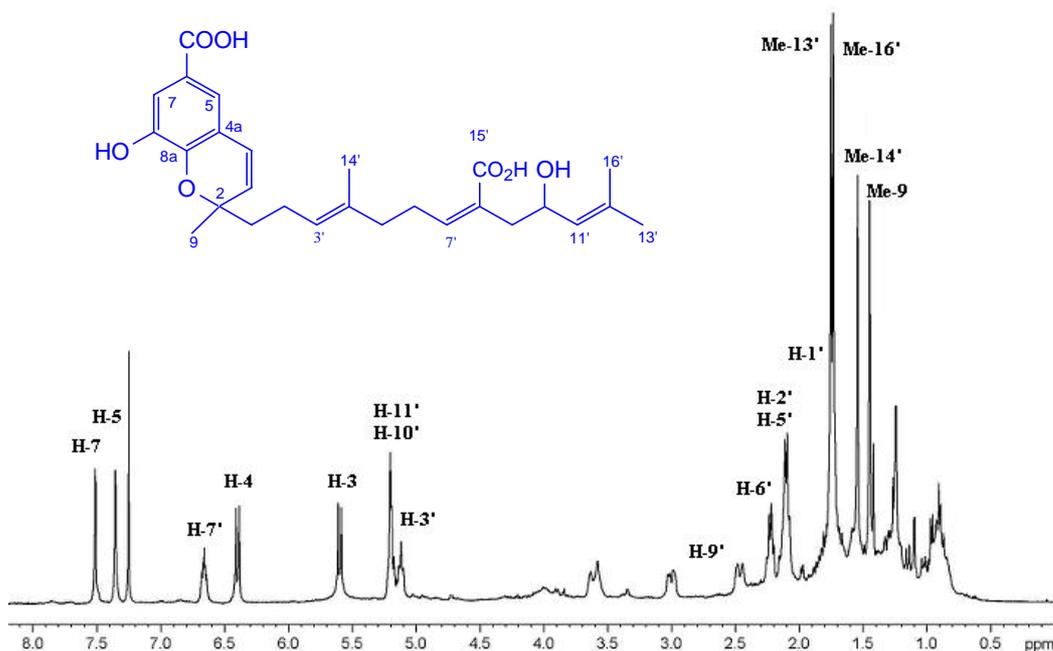
## Producto B-15



## Producto B-16

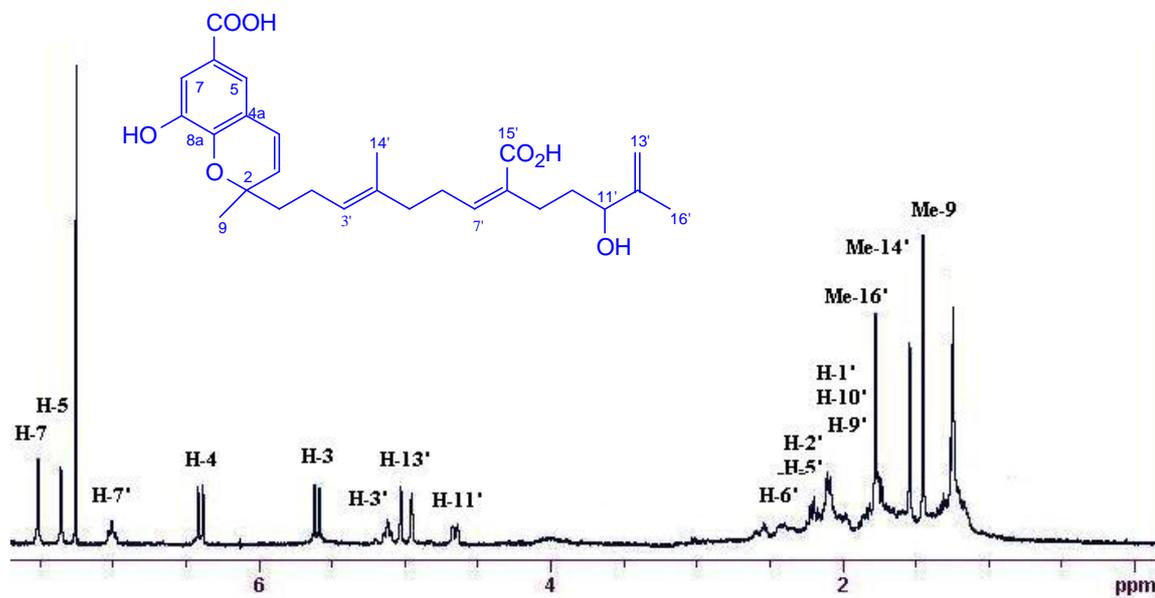


### Producto B-17

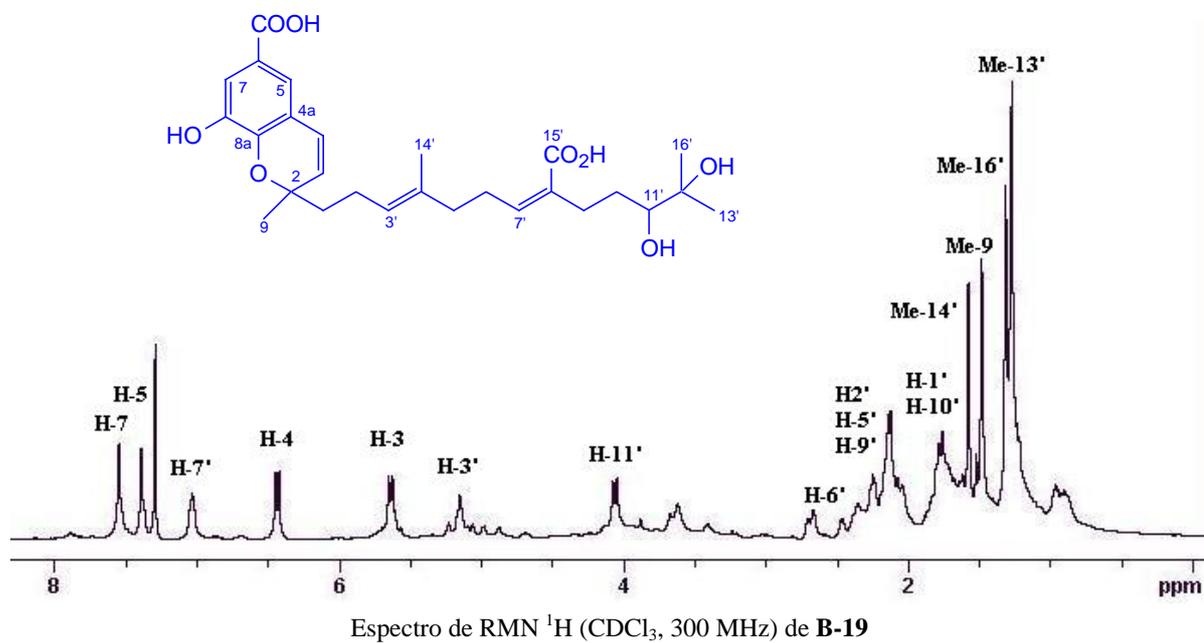
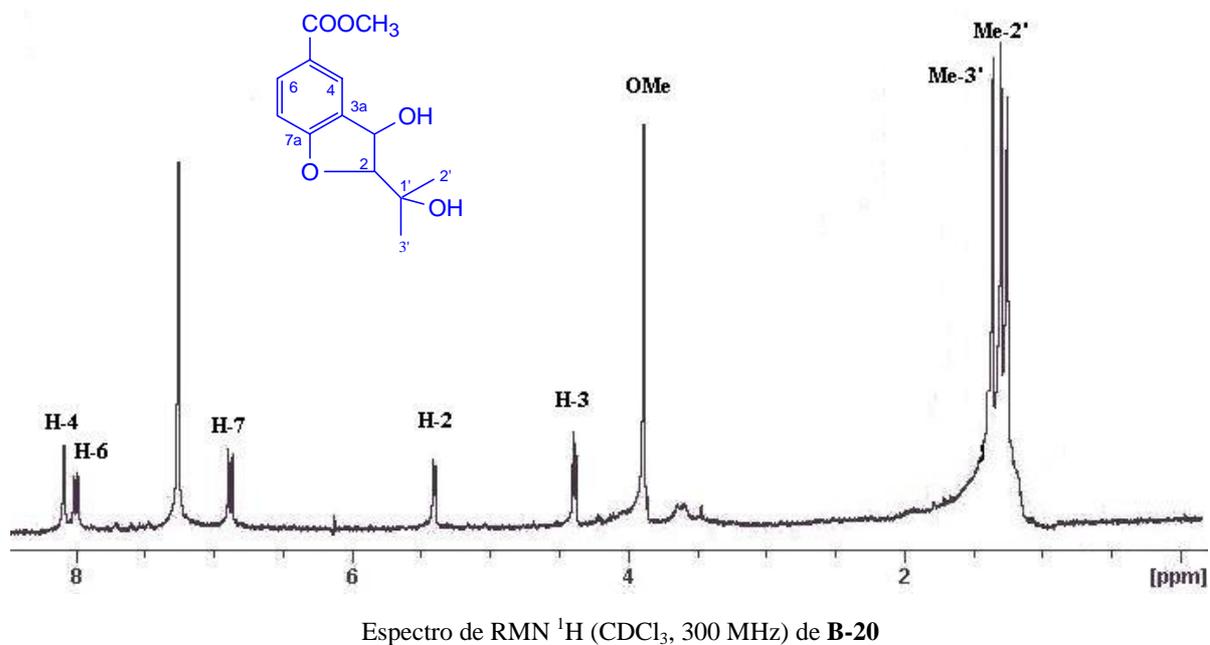


Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de B-17

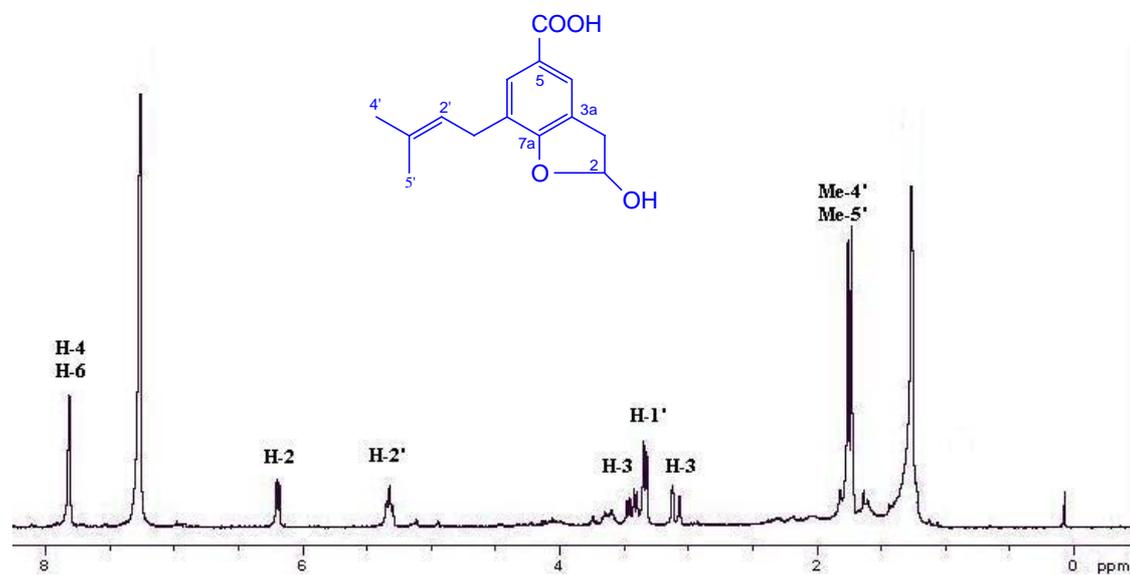
### Producto B-18



Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de B-18

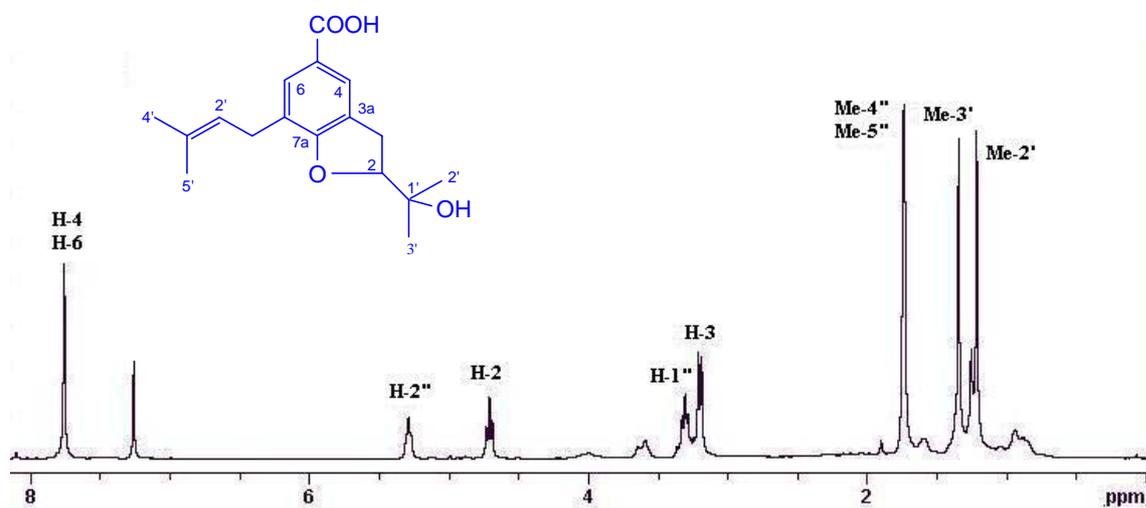
**Producto B-19****DERIVADOS DE BENZOFURANO****Producto B-20**

### Producto B-21

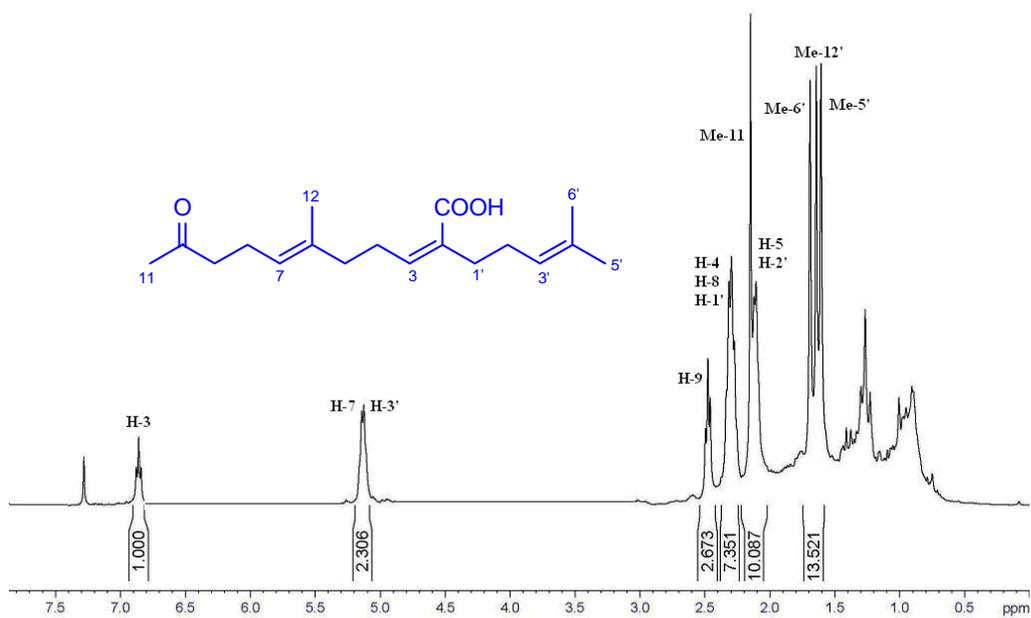


Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de B-21

### Producto B-22



Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de B-22

**TERPENO****Producto T-7**Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **T-7**