

Curso 2012/13  
**CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/31**  
I.S.B.N.: 978-84-15939-01-6

**JUAN CARLOS TICONA HUALLPARA**

**Metabolitos secundarios de especies de la flora  
Iberoamericana como potenciales  
agentes antiparasitarios**

**Directores**  
**ISABEL LÓPEZ BAZZOCCHI**  
**IGNACIO ANTONIO JIMÉNEZ DÍAZ**



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

El trabajo de investigación que contiene la presente memoria fue desarrollado en el Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", bajo la dirección de los Doctores Isabel López Bazzocchi e Ignacio Antonio Jiménez Díaz, a quienes expreso mi más profundo agradecimiento por su invaluable ayuda y amistad.

## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar quisiera agradecer a mis directores, Isabel y Antonio, por haber depositado su confianza en mí desde el primer momento, contribuyendo significativamente en mi formación como investigador, apoyándome y haciendo que estos años hayan sido tan extraordinarios.*

*A la Agencia Española de Cooperación Internacional MAEC-AECID, por la beca recibida durante el período 2008-2012, para la realización de la presente Tesis Doctoral.*

*Agradezco al grupo dirigido por el Dr. Francisco Bolás Fernández y la Dra. María Auxiliadora Dea-Ayuela del Departamento de Parasitología, y al Licdo. Pablo Bilbao, de la facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, por la realización de los ensayos de las actividades biológicas y cuyos resultados forman parte de esta Memoria.*

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

*A la Dra. Lucia San Andrés, por la ayuda prestada en la nomenclatura de los productos y por su amistad apoyo brindado.*

*En Bolivia agradezco a los Doctores Ninoska Flores y Alberto Giménez, por su apoyo y amistad brindada y por introducirme al mundo de la química de los productos naturales y ser parte importante de lo que hoy disfruto.*

*Al Ing. Juan C. Ruíz Macedo, por la recolección de las especies Piper estudiadas en esta Memoria.*

*A Oliver por su amistad y apoyo desinteresado, gracias por esos buenos momentos vividos, por los sabios consejos y tu amistad.*

*A mis amigos Nayra, Gaby, Nuria agradezco su amistad, apoyo desinteresado, pero sobre todo gracias por su sincera amistad y compañerismo durante estos años y los que vendrán.*

*A mis amigos Alexander, Carmen Rosa y Faustino, gracias por permitirme disfrutar de su noble amistad y por brindarme su apoyo desinteresado cuando más lo necesité. Siempre contarán con mi apoyo y amistad.*

*A mis amigos Sandra, Lolo, Leti, Marvin Núñez, Martín, Juan Félix, Laura, Guillermo, por su amistad y apoyo brindado.*

*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!!!!***

<b>TABLA DE CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
<b>3. GÉNERO <i>Piper</i></b>	<b>25</b>
<b>3.1. Descripción botánica</b>	<b>25</b>
<b>3.2. Etnofarmacología de las especies del género <i>Piper</i></b>	<b>27</b>
<b>3.3. Metabolitos secundarios aislados del género <i>Piper</i></b>	<b>29</b>
<b>4. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE ESPECIES DEL GÉNERO <i>Piper</i></b>	<b>35</b>
<b>4.1. Estudio fitoquímico de <i>Piper delineatum</i></b>	<b>37</b>
<b>4.2. Estudio fitoquímico de <i>Piper pseudoarboreum</i></b>	<b>40</b>
<b>4.3. Estudio fitoquímico de <i>Piper divaricatum</i></b>	<b>43</b>
<b>4.4. Estudio fitoquímico de <i>Piper glabratum</i></b>	<b>46</b>
<b>4.5. Estudio fitoquímico de <i>Piper heterophyllum</i></b>	<b>48</b>
<b>5. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS NUEVOS METABOLITOS AISLADOS DE ESPECIES DE <i>Piper</i></b>	<b>53</b>
<b>5.1. Flavonoides</b>	<b>57</b>
<b>5.1.1. Resultados y discusión</b>	<b>57</b>
<b>5.1.2. Datos físicos y espectroscópicos</b>	<b>89</b>
<b>5.2. Amidas</b>	<b>103</b>
<b>5.2.1. Resultados y discusión</b>	<b>103</b>
<b>5.2.2. Datos físicos y espectroscópicos</b>	<b>111</b>
<b>5.3. Derivados del ácido benzoico</b>	<b>115</b>
<b>5.3.1. Resultados y discusión</b>	<b>115</b>
<b>5.3.2. Datos físicos y espectroscópicos</b>	<b>131</b>
<b>5.4. Benzopiranos y benzofuranos</b>	<b>137</b>
<b>5.4.1. Resultados y discusión</b>	<b>137</b>
<b>5.4.2. Datos físicos y espectroscópicos</b>	<b>161</b>
<b>5.5. Apocarotenos, terpenos, fenilpropanoides y ácidos grasos</b>	<b>171</b>
<b>5.5.1. Resultados y discusión</b>	<b>171</b>
<b>6. TÉCNICAS EXPERIMENTALES</b>	<b>179</b>
<b>6.1. Técnicas espectroscópicas y espectrométricas</b>	<b>179</b>
<b>6.2. Técnicas cromatográficas</b>	<b>180</b>
<b>6.3. Estudio fitoquímico</b>	<b>182</b>

<b>7. ENFERMEDADES PARASITARIAS</b>	<b>191</b>
<b>7.1. Leishmaniasis</b>	<b>197</b>
<b>Resultados y discusión: Actividad leishmanicida</b>	<b>219</b>
<b>7.2. Giardiasis</b>	<b>241</b>
<b>Resultados y discusión: Actividad giardicida</b>	<b>248</b>
<b>7.3. Material y métodos</b>	<b>259</b>
<b>Fraccionamiento bioguiado</b>	<b>259</b>
<b>Actividad leishmanicida y giardicida</b>	<b>264</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>267</b>



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1. INTRODUCCIÓN

Históricamente, los **productos naturales** han jugado un papel esencial en el descubrimiento de nuevos fármacos<sup>1</sup>. Esto queda reflejado en la cantidad de fármacos de origen natural y derivados sintéticos, actualmente en uso clínico<sup>2</sup>.

Así, un análisis realizado por Newman y Cragg durante el periodo 1981-2010<sup>3</sup>, mostró la continua contribución de la naturaleza, no sólo como fuente de potenciales agentes quimioterapéuticos, sino también como compuestos líderes que aportan inspiración para la semisíntesis o síntesis total de nuevos fármacos. En éste análisis, 1073 fármacos, actualmente en uso clínico fueron clasificados según su procedencia de la siguiente manera:

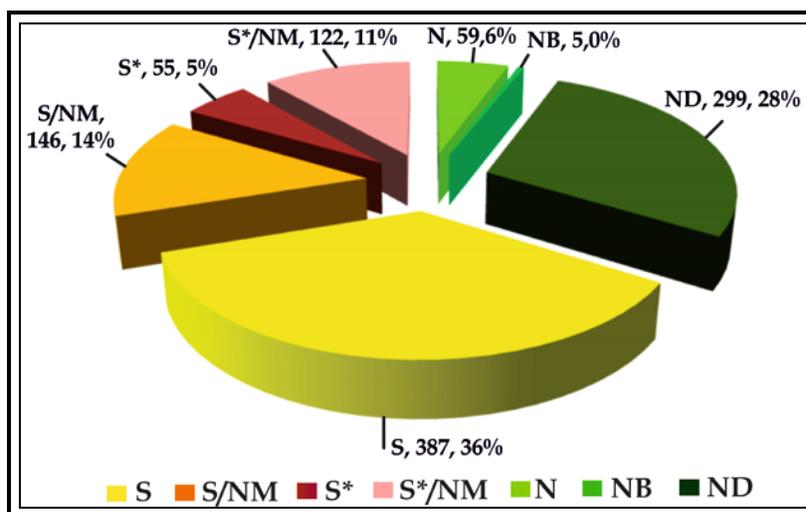
**N:** Productos naturales

**ND:** Derivados de productos naturales (semisíntesis)

**S:** Sintéticos

**S\*:** Compuestos sintéticos basados en el farmacóforo de un producto natural.

**NM:** Productos sintéticos, **S** (ó sintéticos basados en el farmacóforo de un producto natural, **S\***) miméticos de productos naturales (S/NM o S\*/NM).



Nuevas entidades químicas aprobadas para su uso clínico entre 1981-2010.

<sup>1</sup> Cordel, G. A.; Colvard, M. D. *Journal of Natural Products*. **2012**, 75, 514-525.

<sup>2</sup> Kingston, D. G. I. *Journal of Natural Products*. **2011**, 74, 496-511.

<sup>3</sup> Newman, D. J.; Cragg, G. M. *Journal of Natural Products*. **2012**, 75, 311-335.

---

En los años 1970-1980 la investigación de los productos naturales para la búsqueda de nuevos fármacos alcanzó su máximo esplendor fundamentalmente, debido al impulso que le dio la industria farmacéutica a las sustancias no sintéticas. Sin embargo, en la década de los 90 el interés por la investigación de los productos naturales decae<sup>4</sup>. Entre las razones que provocaron este declive, podemos destacar:

- La química combinatoria que ofreció, en un principio, quimiotecas con un gran número de moléculas.
- La aparición de las técnicas de evaluación *in vitro* de alto rendimiento (*high-throughput in vitro screening*, HTS) de dianas moleculares específicas, que favoreció el empleo de quimiotecas de compuestos sintéticos.
- Los avances de la biología molecular, celular y la genómica, que incrementaron el número de dianas terapéuticas, lo que llevó a tiempos de investigación más reducidos.

Sin embargo, el poco éxito de la química combinatoria en la identificación de nuevos compuestos *cabeza de serie*, ha llevado a reconocer que el número de compuestos no determina la calidad de las librerías moleculares, sino que ésta viene determinada por la diversidad y las características similares que tengan las moléculas con los fármacos actuales (*drug-likeness*), como el tamaño, la solubilidad, etc. Esto ha provocado un renovado interés por los productos naturales en la búsqueda de diversidad química y nuevos *cabezas de serie*<sup>5</sup>. Por otra parte, para mejorar el espacio químico en la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas, aún sin explorar, nacen los conceptos de Síntesis Orientada a la Diversidad (*Diversity Oriented Synthesis*, DOS)<sup>6</sup> y Síntesis Biológicamente Orientada (*Biology Oriented Synthesis*, BIOS)<sup>7,8</sup>.

Por tanto, los productos naturales constituyen, sin lugar a dudas, un buen punto de partida para el descubrimiento de nuevos fármacos<sup>9</sup>, ya que se pueden considerar como un grupo de *estructuras privilegiadas* que han sido seleccionadas por la evolución por su capacidad de interaccionar con una amplia variedad de proteínas y otras dianas biológicas. Son sustancias que

---

<sup>4</sup> Koehn, F. E.; Carter, G. T. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2005**, 4, 206-220.

<sup>5</sup> Hong, J. *Current Opinion in Chemical Biology*. **2011**, 15, 350-354.

<sup>6</sup> Burke, M. D.; Lalic, G. *Chemistry & Biology*. **2002**, 9, 535-541.

<sup>7</sup> Wetzal, S.; Bon, R. S.; Kumar, K.; Waldmann, H. *Angewandte Chemie International Edition*. **2011**, 50, 10800-10826.

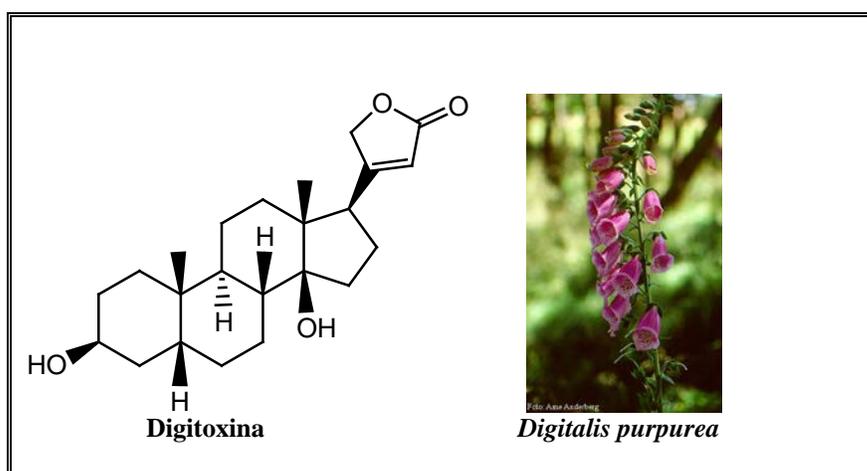
<sup>8</sup> Newman, D. J. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2008**, 51, 2589-2599.

<sup>9</sup> Cragg, M.G.; Newman, D. J. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2013**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>

son biosintetizadas, modificadas y que ejercen su función interaccionando con los dominios proteicos de diferentes proteínas, que son estructuras muy conservadas en la naturaleza<sup>10,11</sup>.

El papel de los productos naturales en la medicina moderna como fuente de nuevos fármacos, discutida y recogida recientemente en diversas revisiones<sup>12,13,14,15,16</sup>, podemos resumirlo en los siguientes aspectos fundamentales:

- ✓ **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>17</sup>.



- ✓ **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

<sup>10</sup> Breinbauer, R.; Vetter, I. R.; Waldmann, H. *Angewandte Chemie International Edition*. **2002**, 41, 2878-2890.

<sup>11</sup> Lachance, H.; Wetzel, S.; Kumar, K.; Waldmann, H. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2012**, 55, 5989-6001.

<sup>12</sup> Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. *Natural Product Reports*. **2000**, 17, 215-234.

<sup>13</sup> Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. *Journal of Natural Products*. **2003**, 66, 1022-1037.

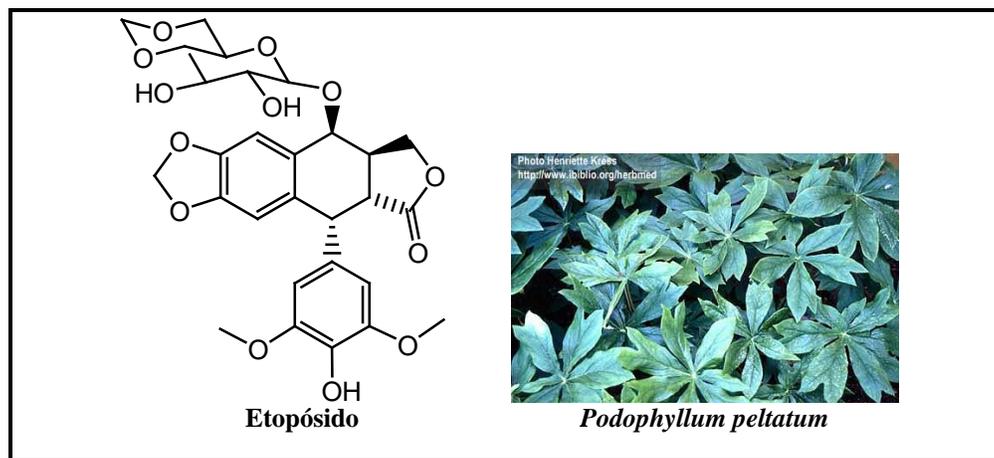
<sup>14</sup> Butler, M. S. *Natural Product Reports*. **2005**, 22, 162-195.

<sup>15</sup> Chin, Y. W.; Balunas, M. J.; Chai, H. B.; Kinghorn, D. A. *Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*. **2006**, 8, E239-E253.

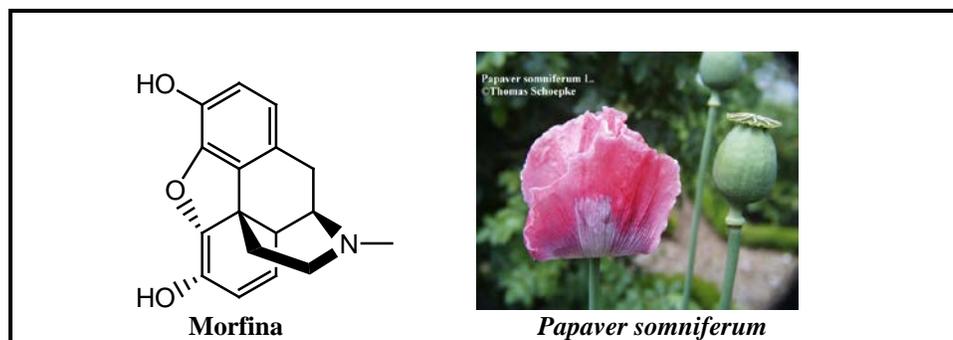
<sup>16</sup> Newman, D. J.; Cragg, G. M. *Journal of Natural Products*. **2007**, 70, 461-477.

<sup>17</sup> Rietbrock, N.; Woodcock, B. G. *Trends in Pharmacological Sciences*. **1985**, 6, 267-269.

semisíntesis de la podofilotoxina, aislado de *Podophyllum peltatum*, es utilizado actualmente en el tratamiento del carcinoma de pulmón, linfomas y algunas leucemias<sup>18</sup>.



- ✓ Los productos naturales sirven como modelo para obtener fármacos sintéticos 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>19</sup>.

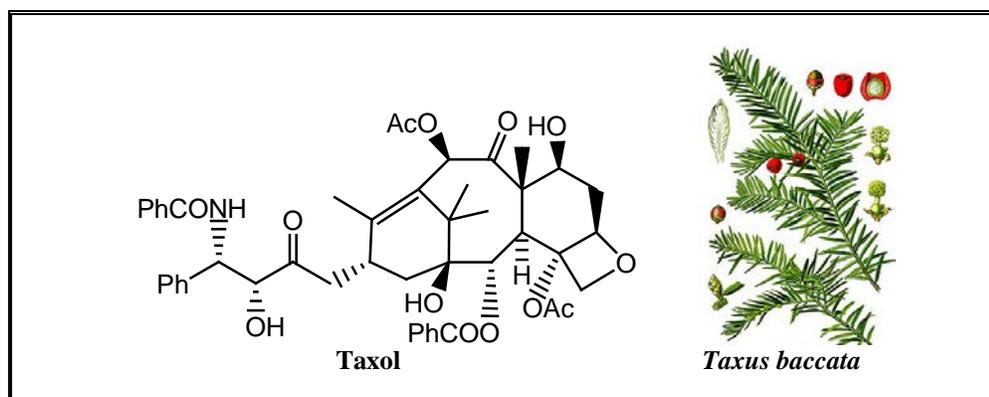


- ✓ Algunos productos naturales son inactivos o poseen muy baja actividad, pero pueden ser modificados mediante métodos químicos o biológicos para producir sustancias potentes que no son fáciles de obtener por otros métodos. Ejemplo de ello es la **baccatina III** y la **10-desacetilbaccatina III**, aisladas de las hojas *Taxus baccata*,

<sup>18</sup> Neuss, N; Neuss, M. N. *The alkaloids*. 1990, Academic Press, New York, 37, 229.

<sup>19</sup> Philipson, J. D. *Phytochemistry*. 2002, 56, 237-243.

que pueden ser transformadas en **taxol** (Paclitaxel), potente anticancerígeno aislado de la corteza del tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia*<sup>20</sup>.



Se han desarrollado diversas metodologías para la selección de especies vegetales a partir de las cuales realizar la búsqueda de sustancias bioactivas<sup>21</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 quimiotaxónomicos 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. Así,

<sup>20</sup> Ulukan, H.; Swaan, P. W. *Drugs*. **2002**, 62, 2039-2057.

<sup>21</sup> Tringaly, C. *Bioactive Compound from Natural Sources*. **2001**, Ed. Taylor and Francis, New York.

---

un análisis realizado por Fabricant y Farnsworth muestran que el uso del 80% de 122 fármacos que fueron aislados de 94 especies de plantas, estaban relacionados con el uso etnofarmacológico<sup>22</sup>.

Las áreas terapéuticas de las enfermedades infecciosas y oncología han sido beneficiadas por una abundante plataforma en diversidad de productos naturales, capaz de interactuar con muchas dianas específicas dentro de la célula y ciertamente por muchos años han sido fuente o inspiración para la mayoría de fármacos aprobados por la FDA (Administración de Alimentos y Fármacos).

Así, entre los fármacos anticancerígenos aislados de plantas, que se utilizan clínicamente, podemos citar como ejemplos clásicos, los alcaloides de la vinca, **vinblastina** y **vincristina**, aislados de *Catharantus roseus*<sup>23</sup>, asimismo como los derivados semisintéticos del productos natural epipodofilotoxina, **etoposido** y **teniposido**<sup>24</sup>.

**Vinblastina** (Alkaban-AQ®, Velban®), inhibe el ensamblaje de los microtubulos. Es utilizada para tratar el linfoma no Hodgkin, la enfermedad de Hodgkin, Sarcoma de Kaposi, cáncer de mama, testicular, pulmón y cuello, tumores cerebrales y coriocarcinoma<sup>25</sup>. **Vinflunina** (Javlor®), derivado fluorado de vinblastina, al superar los ensayos en la fase III en el tratamiento del cáncer vesicular, fue aprobado por la Agencia Europea de Medicamentos y en junio de 2009 el laboratorio Pierre Fabre lo comercializo<sup>26</sup>.

---

<sup>22</sup> Fabricant, D. S.; Farnsworth, N. R. *Envirom. Health Perspect.* **2001**, 109, 67-75.

<sup>23</sup> Roussi, F.; Gueritte, F.; Fahy, J. *Anticancer agents from natural products.* **2012**. Ed. Taylor and Francis, Boca Raton, 177-198.

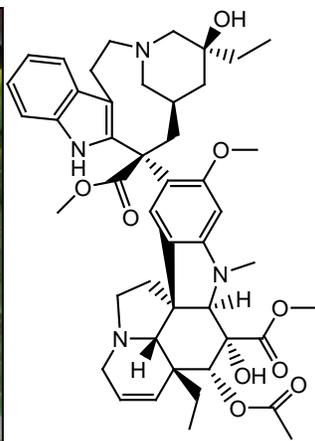
<sup>24</sup> Lee, K. H.; Xiao, Z. *Anticancer agents from natural products.* **2012**. Ed. Taylor and Francis, Boca Raton, 95-122.

<sup>25</sup> Bennouna, J.; Campone, J. P.; Delord, Pinel, M. C. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* **2005**, 14, 1259-1267.

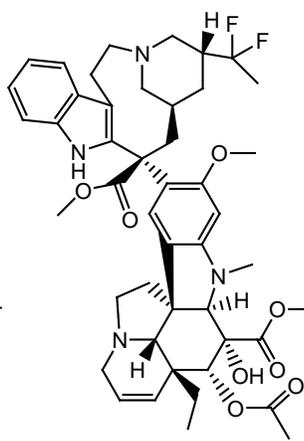
<sup>26</sup> Kingston, D. G.; Newman, D. J. *Current Opinion in Drug Discovery & Developement.* **2007**, 10, 130-144.



*Catharantus roseus*<sup>27</sup>



Vinblastina



Vinflunina

Por otro parte, los fármacos derivados de productos naturales han jugado un papel crucial en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Actualmente muchos de los fármacos antibacterianos en uso clínico son de origen natural o fueron diseñados en base a productos naturales<sup>28</sup>. Algunos de estos fármacos, usados en el tratamiento de enfermedades infecciosas, son los que a continuación se citan:

Un ejemplo es la **eritromicina** un macrólido obtenido del actinomiceto *Streptomyces erythreus*, cuya mecanismo de acción radica en la inhibición de la síntesis de proteínas en las bacterias<sup>29</sup>. Actualmente, se encuentran en desarrollo clínico tres derivados semisintéticos de la eritromicina: **Cetromicina** (ABT-773, Restanza™), **EP-420**<sup>30,31</sup> y **BAL-19403**<sup>32</sup>.

<sup>27</sup> [http://digilander.libero.it/felrig/photos/catharanthus\\_roseus.htm](http://digilander.libero.it/felrig/photos/catharanthus_roseus.htm)

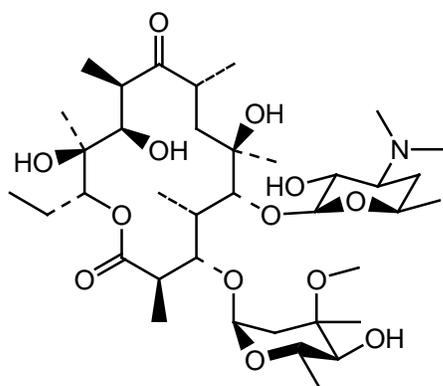
<sup>28</sup> Dias, D. A.; Urban, S., Roessner, U. *Metabolites*. **2012**, 2, 303-336.

<sup>29</sup> Zhanel, G. G.; Hisanaga, T.; Nichol, K.; Wierzbowski, A.; Hoban, D. J. *Expert Opinion on Emerging Drugs*. **2003**, 8, 297-321.

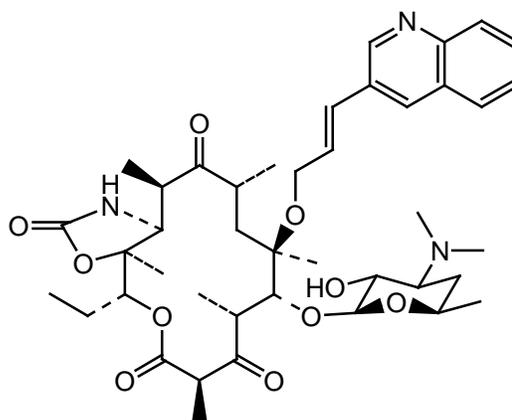
<sup>30</sup> Hammerschlag, M.R.; Sharma, R. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. **2008**, 17, 387-400.

<sup>31</sup> Stucki, A.; Gerber, P.; Acosta, F.; Cottagnoud, M.; Cottagnoud, P.; Jiang, L.; Nguyen, P.; Wachtel, D.; Wang, G.; Phan, L. T. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2008**, 61, 665-669.

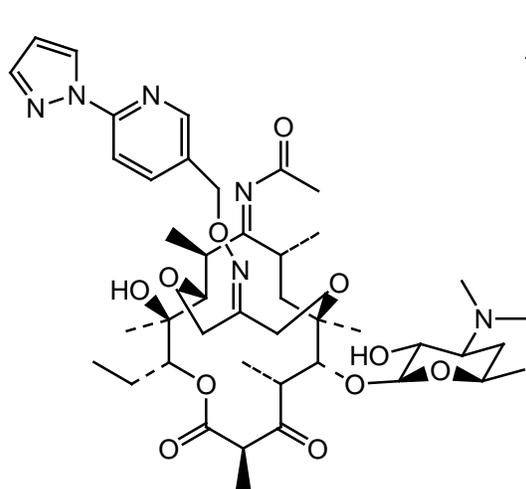
<sup>32</sup> Heller, S.; Kellenberger, L.; Shapiro, S. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2007**, 51, 1956-1961.



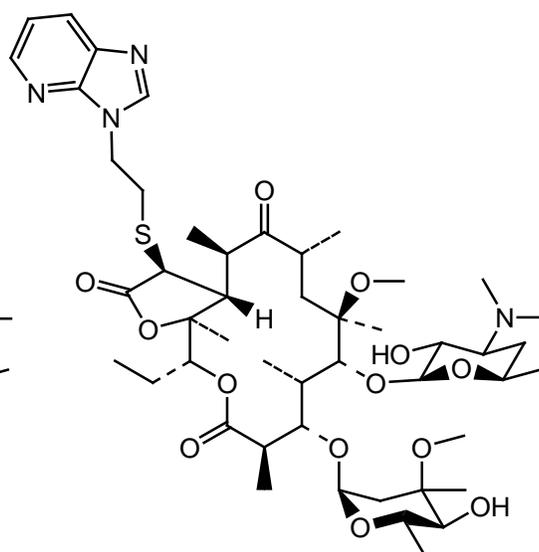
**Eritromicina**



**Cetromicina**



**EP-420**



**BAL-19403**

Cabe destacar que, entre los años 2005 a 2010, fueron aprobados para su uso en clínica, diecinueve entidades químicas basadas en productos naturales (tabla 1), de los cuales siete corresponden a productos de origen naturales, diez semisintéticos y dos compuestos sintéticos derivados de productos naturales<sup>33</sup>.

<sup>33</sup> Mishra, B. B.; Tiwari, V. K. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2011**, 46, 4769-4807.

**Tabla 1. Fármacos derivados de productos naturales aprobados por la FDA durante el periodo 2005-2010.**

Año	Nombre genérico	Cabeza de serie	Clasificación	Enfermedad
2005	Dronabinol/ Cannabidol (Sativex®)	Dronabinol/ Cannabidol	Natural	Dolor
2005	Fumagilina (Flisint®)	Fumagilina	Natural	Antiparasitario
2005	Doripenem (Finibax®/Doribax™)	Tienamicina	Derivado PN	Antibacteriano
2005	Tigeciclina (Tygacil®)	Tetraciclina	Semisintético PN	Antibacteriano
2005	Ziconotida (Prialt®)	Ziconotida	Natural	Dolor
2005	Zotarolimus (Endeavor™stent)	Sirolimus	Semisintético PN	Cardiovascular
2006	Anidulafungina (Eraxis™/Ecalta™)	Equinocandina B	Semisintético PN	Antifúngico
2006	Exenatida (Byetta®)	Exenatida-4	Natural	Diabetes
2007	Lisdexanfetamina (Vyvanse™)	Anfetamina	Derivado PN	ADHD
2007	Retapamulina (Altabax™/Altargo™)	Pleuromutilina	Semisintético PN	Antibacteriano
2007	Temsirolimus (Torisel™)	Sirolimus	Semisintético PN	Oncología
2007	Trabectedina (Yondelis™)	Trabectedina	Natural	Oncología
2007	Ixabepilona (Ixempra™)	Epotilona B	Semisintético PN	Oncología
2008	Metilnaltrexona (Relistor®)	Naltrexona	Semisintético PN	Dolor
2009	Everolimus (Afinitor®)	Sirolimus	Semisintético PN	Oncología
2009	Telavancina (Vibativ™)	Vancomicina	Semisintético PN	Antibacteriano
2009	Romidepsina (Istodax®)	Romidepsina	Natural	Oncología
2009	Capsaicina (Qutenza®)	Capsaicina	Natural	Dolor
2010	Monobactam aztreonam (Cayston™)	Aztreonam	Semisintético PN	Antibacteriano

ADHD: Déficit de Atención con Hiperactividad. PN: Producto natural.

Entre ellos podemos citar Sativex® (GW Pharmaceuticals), primera prescripción médica a nivel mundial proveniente de la planta cannabis<sup>34</sup>. Sativex® es una mezcla de **dronabinol** y **cannabidol**, que fue comercializado en Canadá en abril de 2005 para mitigar el dolor neuropático de la esclerosis múltiple<sup>35</sup>, además, fue aprobado por el sistema de Salud de Canadá en agosto de 2007, para su uso como analgésico en el tratamiento de pacientes con cáncer avanzado, reduciendo de esta manera la necesidad de la medicación de opioides<sup>36</sup>. GW Pharmaceuticals en marzo de 2010, presentó a Sativex® en spray bucal, para el tratamiento de espasmos como síntoma de la esclerosis múltiple<sup>37</sup>.

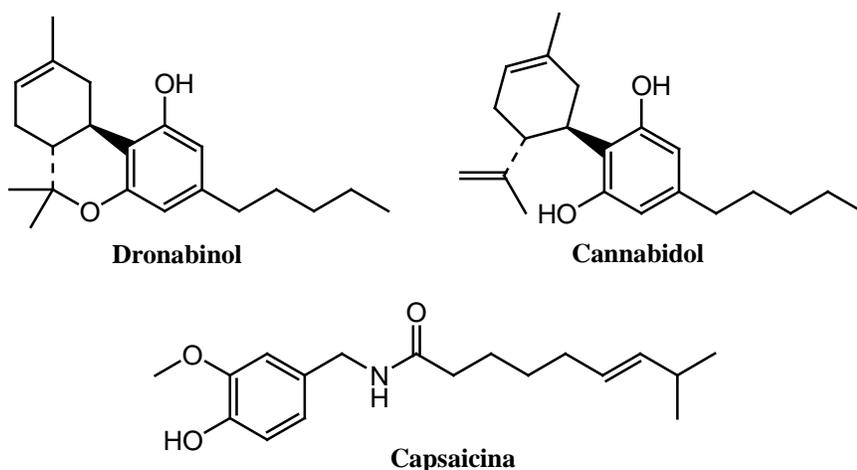
<sup>34</sup> Wade, D. T.; Robson, P.; House, H.; Petra, M.; Aram, J. *Clinical Rehabilitation*. **2003**, 17, 21-29.

<sup>35</sup> Nurmikko, T. J.; Serpell, M. G.; Hoggart, B.; Toomey, P. J.; Morlion, B. J.; Haines, D. *Pain*. **2007**, 133, 210-220.

<sup>36</sup> Johnson, J. R.; Burnell-Nugent, M.; Lossignol, D.; Ganae-Motan, E. D.; Potts, R.; Fallon, M. T. *Journal of Pain and Symptom Management*. **2010**, 39, 167-179.

<sup>37</sup> GW Pharmaceuticals: Comunicado de prensa 10 de abril de 2013. Disponible: <http://www.gwpharm.com/>

**Capsaicina**, presente en la especie *Capsicum annuum* (chile), fue aislado por primera vez por John Clough Thresh en 1876<sup>38</sup>. El mecanismo de acción de la capsaicina radica en su unión al receptor vaniloide subtipo 1 (VR1) del nociceptor, produciendo un efecto analgésico<sup>39</sup>. En noviembre del 2009, NeurogesX obtuvo la aprobación de la FDA para comercializar Qutenza® (un parche transdermal al 8% de capsaicina) para el dolor neuropático combinado con neuralgias post-terapéuticas. En abril del 2010, esta misma empresa lo comercializó en Estados Unidos y posteriormente Astellas Pharma Europe Ltd planifica su comercialización en Europa<sup>40</sup>.



**Trabectedina** (Yondelis®, ecteinascidin-743, ET-743), alcaloide tetrahidroisoquinolina producido por el tunicado *Ecteinascidia turbinata* y comercializado por Zeltia y Johnson & Johnson para su uso en el tratamiento de estadios avanzados del sarcoma de tejidos blandos. Trabectedina se une selectivamente a la guanina del ADN provocando una deformación de la estructura molecular de la hélice y consecuentemente, una alteración de los procesos del ciclo celular que provocan la apoptosis celular. En septiembre de 2009, recibió la aprobación por la Agencia Europea de Medicamentos, en combinación con DOXIL®/Caelyx® para el tratamiento del cáncer de ovario. Trabectedina se encuentra en fase clínica II contra el cáncer de mama, próstata y pulmón<sup>41</sup>.

<sup>38</sup> Caterina, M. J.; Schumacher, M. A.; Tominaga, M.; Rosen, T. A.; Levine, J. D.; Julius, D. **1997**, 389, 816-824.

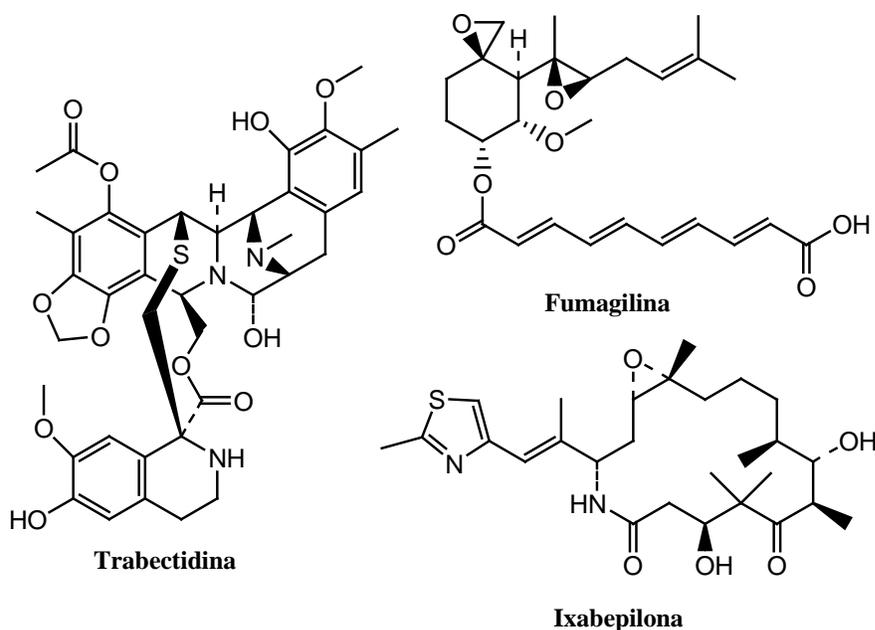
<sup>39</sup> Kissin, I. *Anesthesia & Analgesia*. **2008**, 107, 271-281.

<sup>40</sup> McCoy, K. S.; Quittner, A. L.; Oermann, C. M.; Gibson, R. L.; Retsch-Bogart, G. Z.; Montgomery, A. B. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **2008**, 178, 921-928.

<sup>41</sup> Dalisay, D. S.; Lievens, S. L.; Saludes, J. P.; Molinski, T. F. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2008**, 8, 69-85.

**Fumagilina** (Flisint®, Sanofi-Aventis) un antimicrobiano capaz de inhibir la proliferación de células endoteliales, fue aislado de *Aspergillus fumigatus*. En el año 2005 Francia aprobó su uso, para el tratamiento de la microsporidiosis gastrointestinal, una enfermedad causada por el parásito *Enterocytozoon bieneusi* (esporas unicelulares) que causa diarreas crónicas en pacientes inmunocomprometidos<sup>42</sup>.

**Ixabepilona** (Ixempra™, BMS-247550), derivado semisintético del producto natural epotilona B, producido por el microorganismo *Sorangium cellulosum*. Bristol-Meyer Squibb (BMS) recibió la aprobación de la FDA para su comercialización como fármaco anticancerígeno en monoterapia y en combinación con capecitabina (**Xeloda**®) en pacientes con cáncer de mama metastático, cuando los tratamientos con antraciclinas y taxanos han fallado<sup>43,44</sup>. Su mecanismo de acción es similar al de los alcaloides de la *vinca* y los taxanos.



<sup>42</sup> Lanternier, F.; Boutboul, D.; Menotti, J.; Chandesris, M. O.; Sarfati, C.; Mamzer, M. F.; Bruneel, Y.; Calmus, Y.; Mechaï, F.; Viard, J. P.; Lecuit, M.; Bougnoux, M. E.; Lortholary, O. *Transplant Infectious Disease*. **2009**, 11, 83-88.

<sup>43</sup> Slatkin, N.; Thomas, J.; Lipman, A. G. *Journal of Supportive Oncology*. **2009**, 7, 39-46.

<sup>44</sup> Khrapunovich-Baine, M.; Menon, V.; Huang Yang, C.P. Northcote, P.T.; Miller, J. H.; Angeletti, R. H.; Fiser, A.; Band Horwitz, S.; Xiao, H. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 11765–11778.

---

El uso de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades parasitarias se remonta a registros antiguos que citan, entre otras, las siguientes especies vegetales utilizadas para el tratamiento de la Malaria: *Cinchona calisaya* (corteza), *Strychnos pseudoquina* (corteza), *Deianira erubescens* (raíces y hojas) y *Remijia ferruginea* (corteza)<sup>45</sup>.

En los últimos años ha resurgido el interés por el estudio de plantas medicinales con actividad antiparasitaria en base a estudios etnofarmacológicos. Ello se refleja en numerosas publicaciones que citan plantas medicinales, extractos o productos naturales, que han mostrado actividad frente a parásitos de *Leishmania*, *Plasmodium* o *Trypanosoma*, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*<sup>46,47,48,49,50</sup>.

Un buen ejemplo de la relevancia de la etnomedicina en el descubrimiento y desarrollo de fármacos antiplasmódicos es la **artemisinina**, lactona sesquiterpénica aislada de *Artemisia annua*<sup>51</sup>. En el año 2009, la compañía farmacéutica Ranbaxy, inicio los ensayos clínicos de fase III de **Arterolano** (RBx11160, OZ-277), fármaco sintético, pero basado en el farmacóforo de la artemisinina, en combinación con el fosfato de piperaquina, para el tratamiento de la Malaria en la India, Bangladesh y Tailandia<sup>52</sup>.

**Paromomicina** (Humatin™, King Pharmaceuticals), antibiótico oligosacárido del grupo de los aminoglucósidos, aislado primera vez de *Streptomyces krestomuceticus*, fue desarrollado por el Institute OneWorld Health como un agente terapéutico contra la leishmaniasis visceral<sup>53</sup>. Este fármaco se considera un fármaco huérfano y fue aprobado en septiembre de 2006 por Drug-

---

<sup>45</sup> Silva, J. R.; Ramos, A. S.; Machado, M.; Moura, D. F.; Neto, Z.; Canto-Cavalheiro, M. M.; Figueiredo, P.; Rosário, V. E.; Amaral, A. C. F.; Lopes, D. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **2011**, 106, 142-158.

<sup>46</sup> Vennerstrom, J. L.; Arbe-Barnes, S.; Brun, R.; Charman, S. A.; Chiu F.C.; Chollet J.; Dong Y.; Dorn A.; Hunziker, D.; Matile, H.; McIntosh, K.; Padmanilayam, M.; Santo Tomas, J.; Scheurer, C.; Scorneaux, B.; Tang, Y.; Urwyler, H.; Wittlin, S.; Charman, W. N. *Nature*. **2004**, 430, 900-904.

<sup>47</sup> Peña-Rodríguez, L. M.; Chan-Bacab, M. J. *Natural Product Reports*. **2001**, 18, 674-688.

<sup>48</sup> Tagboto, S.; Townson, S. *Advances in Parasitology*. **2001**, 50, 199-295

<sup>49</sup> Fournet, A.; Muñoz, V. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **2002**, 2, 1215-1237.

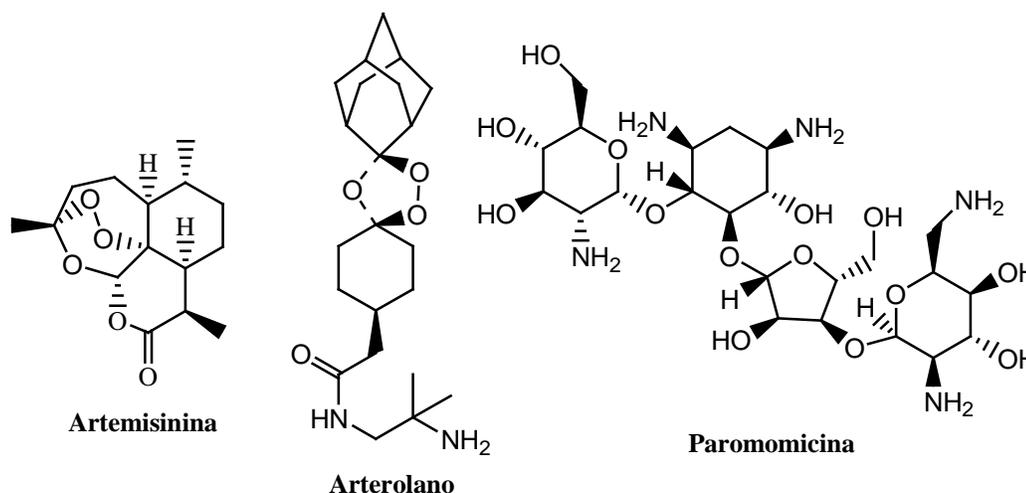
<sup>50</sup> Rocha, L.G.; Almeida, J. R. G. S.; Macedo, R. O.; Barbosa-Filho, J. M. *Phytomedicine*. **2005**, 12, 514-535.

<sup>51</sup> Ro, D-K.; Paradise, E. M.; Ouellet, M.; Fisher, K. J.; Newman, K. L.; Ndungu, J. M.; Ho, K. A.; Eachus, R. A.; Ham, T. S.; Kirby, J.; Chang, M. C. Y.; Withers, S. T.; Shiba, Y.; Sarpong, R.; Keasling, J. D. *Nature*. **2006**, 440, 940-943.

<sup>52</sup> Jefford, C. W. *Drug Discovery Today*. **2007**, 12, 487-495.

<sup>53</sup> Sundar, S.; Jha, T. K.; Thakur, C. P.; Sinha, P. K.; Bhattacharya, S. K. *New England Journal of Medicine*. **2007**, 356, 2571-2581.

Controller General of India para el tratamiento de la leishmaniasis visceral<sup>54</sup>. Posteriormente, King Pharmaceuticals comercializó dicho fármaco en los Estados Unidos para el tratamiento de enfermedades intestinales parasitarias<sup>55</sup>.



Los antiparasitarios aprobados para su uso en clínica<sup>3</sup> durante el periodo 1981 a 2010 se presentan en la siguiente tabla 2. Entre ellos podemos destacar dos fármacos de origen natural y cinco análogos de productos naturales. Así, la artemisinina y los análogos semisintéticos: **arteméter**, **artéeter** y **artesunato**, y un derivado de la quinina, la **mefloquina**, son utilizados actualmente en clínica para el tratamiento de la Malaria<sup>56</sup>. La **ivermectina**, fármaco de origen natural, está indicada para el tratamiento de la estrogiloidiasis<sup>57</sup>. Este antihelmíntico también es utilizada para controlar la oncocercosis, que produce pérdida de visión o ceguera.

La **eflornitina**, un derivado de la ornitina, aminoácido sintetizado en las mitocondrias como producto del glutamato, es utilizada para el tratamiento de tripanosomiasis africana, también conocida como la enfermedad del sueño. Dicho fármaco actúa inhibiendo el enzima

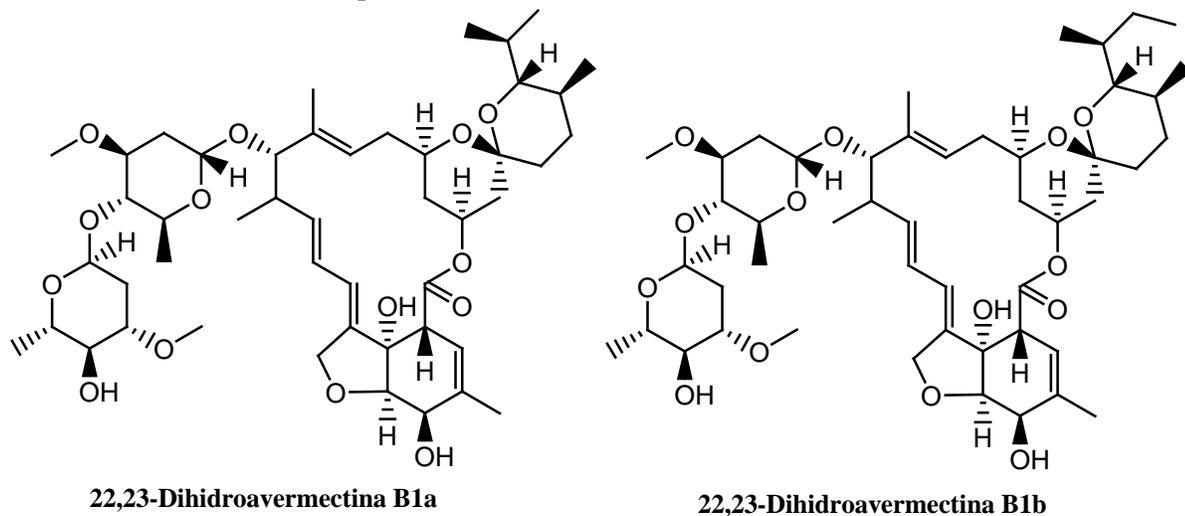
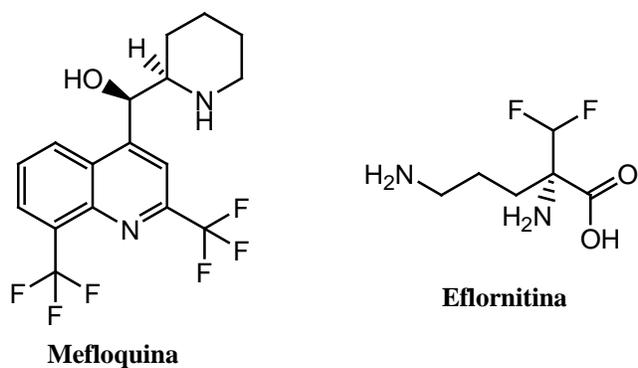
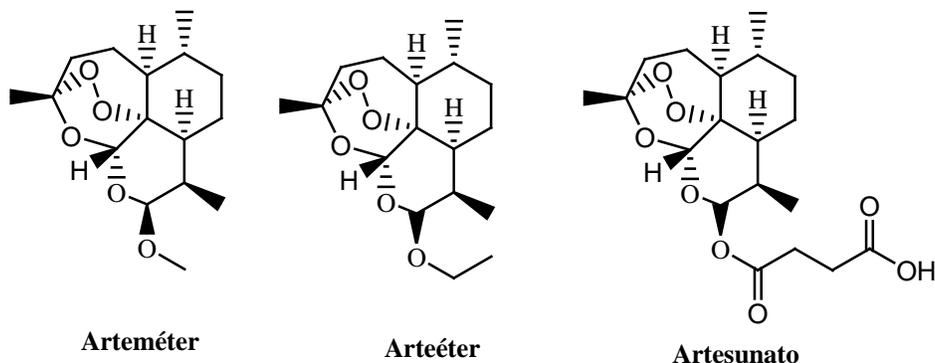
<sup>54</sup> Davidson, R. N.; den Boer, M.; Ritmeijer, K. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **2009**, 103, 653-660.

<sup>55</sup> Chappuis, F.; Sundar, S.; Hailu, A.; Ghalib, H.; Rijal, S.; Peeling, R. W.; Alvar, J.; Boelaert, M. *Nature Reviews Microbiology*. **2007**, 5, 873-882.

<sup>56</sup> Kaur, K.; Jain, M.; Kaur, T.; Jain, R. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2009**, 3229-3256.

<sup>57</sup> WHO *Preventive Chemotherapy in human helminthiasis*, Geneva, Switzerland. **2006**, 1-56.

ornitina decarboxilasa, una enzima caracterizada por participar en la síntesis de la poliamina en el tripanosoma<sup>58</sup>.



Ivermectina (80:20) { 22,23-Dihidroavermectina B1a  
22,23-Dihidroavermectina B1b

<sup>58</sup> Bot, C.; Hall, B. S.; Alvarez, G.; Di Maio, R.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.; Wilkinson, S. R. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2013**, 57, 1638-1647.

**Tabla 2. Fármacos antiparasitarios (1981-2010).**

Nombre genérico	Nombre comercial	Año introducido	Fuente
Artemisinina	Artemisina	1987	N
Ivermectina	Mectizan	1987	N
Arteéter	Artemotil	2000	ND
Artemeter	Artemetheri	1987	ND
Artesunato	Arinate	1987	ND
Eflornitina	Ornidyl	1990	ND
Mefloquina	Fansimef	1985	ND
Albendazol	Eskazole	1982	S
Halofantrina	Halfan	1988	S
Lumefantrina	-	1987	S
Quinfamida	Amenox	1984	S
Atovaquona	Mepron	1992	S*
Bulaquina/cloroquina	Aablaquin	2000	S*
Vacuna trichomonas	Gynatren	1986	V

N: Productos naturales, ND: Derivados de productos naturales (semisíntesis), S: Sintéticos, S\*: Compuestos sintetizados utilizando un farmacóforo de un producto natural, V: Vacunas.

*Sin lugar a duda, la gran ventaja de los productos naturales es la novedad, diversidad y complejidad de sus estructuras, así como la alta selectividad y especificidad que presenta en sus actividades biológicas, que difícilmente podrían ser el resultado de un razonamiento humano por muy creativo que fuese.*

Por ello, podemos afirmar que los productos naturales son la mejor alternativa en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos y la medicina tradicional la mejor estrategia en la selección de la especie vegetal a estudiar. Esta perspectiva se apoya en el hecho de que los productos naturales se han convertido en fármacos efectivos en una amplia variedad de indicaciones terapéuticas<sup>59</sup>.

<sup>59</sup> Koehn, F. E.; Carter, G. T. *Nature Review Drug Discovery*, **2005**, 4, 206-220.



## **2. OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

Una de las fuentes más importantes en la búsqueda de productos naturales con interés medicinal son las plantas. En particular, América Latina posee una gran diversidad etnobotánica, basada en la interacción de la diversidad biológica y cultural, lo que se manifiesta en el extenso uso tradicional de las plantas con fines medicinales por los diferentes grupos étnicos americanos.

El trabajo de investigación que se presenta en esta Memoria se centra en la búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos de especies de la flora Iberoamericana. Nuestra investigación se dirige a especies del género *Piper*, basándonos en su uso extendido en la medicina tradicional y en los antecedentes bibliográficos que describen productos con actividad antiparasitaria, citotóxica, antimicrobiana, insecticida e antiinflamatoria.

Estos antecedentes han incrementado nuestro interés en el estudio de especies de este género, con los objetivos que se concretan a continuación:

- Estudio fitoquímico mediante fraccionamiento bioguiado del extracto, fracciones y subfracciones de las hojas de tres especies de *Piper*: *P. delineatum*, *P. pseudoarboreum* y *P. divaricatum*, frente a formas de promastigote de cuatro especies de *Leishmania*: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. infantum*.
- Estudio fitoquímico mediante fraccionamiento bioguiado del extracto, fracciones y subfracciones de las hojas de *Piper delineatum* frente a trofozoitos de *Giardia intestinalis*.
- En la búsqueda de nuevas estructuras y completar así el estudio fitoquímico, se llevará a cabo el aislamiento y elucidación estructural de aquellas fracciones que resulten inactivas en los ensayos de actividad leishmanicida de las tres especies citadas anteriormente.

- 
- A fin de completar así el estudio fitoquímico, se llevará a cabo el aislamiento y elucidación estructural de aquellas fracciones de *P. delineatum* que resulten inactivas en los ensayos de frente a trofozoitos de *Giardia intestinalis*.
  - Estudio fitoquímico de las hojas de *Piper heterophyllum* y los frutos de *P. glabratum*, especies cuyos extractos no presentaron actividad leishmanicida.
  - Evaluación de la actividad antiparasitaria *in vitro* de los metabolitos obtenidos de las cinco especies de *Piper* objeto de estudio frente a formas promastigote de cuatro especies de *Leishmania*.
  - Evaluación de la actividad antiparasitaria *in vitro* frente amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* y *L. infantum* de aquellos metabolitos que resulten de interés por su actividad leishmanicida frente a formas de promastigote.
  - Evaluación de la actividad giardicida frente a trofozoitos de *Giardia intestinalis* de los metabolitos que se aislen de las especies de *Piper* estudiadas.
  - Estudio de la relación estructura-actividad de los metabolitos aislados, con el objetivo de definir las regiones de la molécula, en cada grupo estructural de metabolitos, responsable de la actividad antiparasitaria frente a *Leishmania* ó *Giardia*.
  - Revisión bibliográfica de los metabolitos descritos en especies del género *Piper* y sus actividades farmacológicas.
  - Estudio de las cuestiones no previstas y que por su interés merezcan su análisis.



### 3. GÉNERO *Piper*

### 3. GÉNERO *Piper*

#### 3.1. Descripción botánica

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 carnosa indehisciente, con una sola semilla.

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), *Pothomorphe* (41 especies), *Sarcorachis* (15 especies), *Verhuellia* (8 especies) y *Zippelia* (6 especies)<sup>1</sup>.



*Macropiper excelsa*<sup>2</sup>



*Peperomia clusiifolia*



*Pothomorphe peltata*

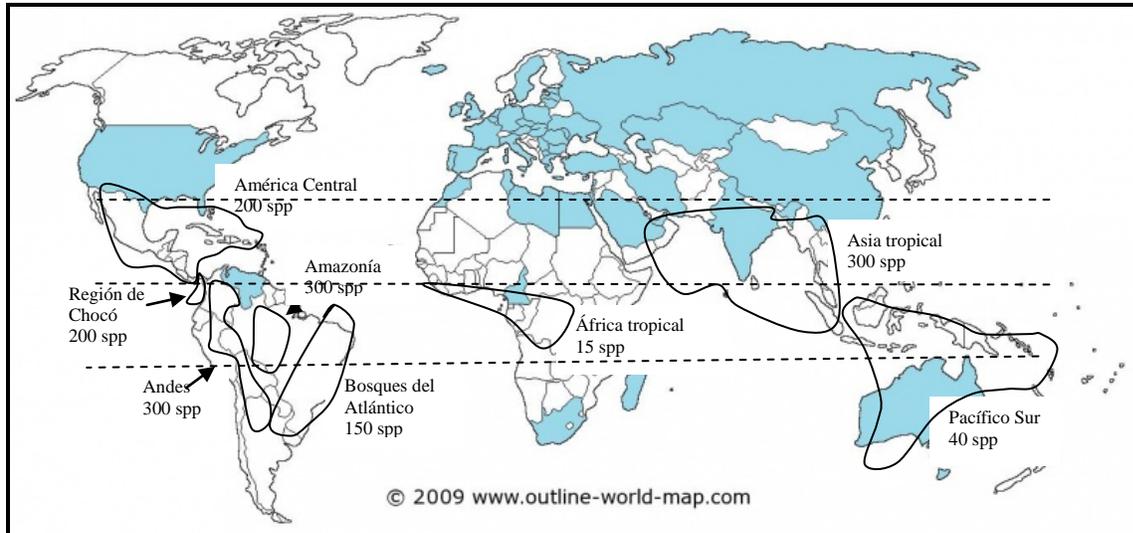
El género *Piper* pertenece a la familia Piperaceae y comprende más de 1.200 especies<sup>3</sup>, ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y sub-tropicales del mundo, la gran mayoría de las cuales se encuentran en los trópicos de América (> 700 especies), seguido por las del Sur de Asia (> 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* varían desde especies endémicas hasta aquellas que presentan una amplia distribución geográfica.

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

<sup>2</sup> Fagg, M. ANBG, [http://www.chah.gov.au/images/photo\\_cd/piperaceae/](http://www.chah.gov.au/images/photo_cd/piperaceae/)

<sup>3</sup> Soltis, P. A.; Soltis, D. E.; Chase, M. W. *Nature*. 1999, 402, 402-404.

Existen numerosas especies que se encuentran restringidas a centros específicos de diversidad, como por ejemplo los Andes o Centro América, mientras que otras pueden encontrarse a través del Neotrópico o Paleotrópico<sup>4,5</sup>.



**Distribución geográfica de especies del género *Piper***

### *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>6,7</sup>.

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

<sup>4</sup> Jaramillo, M. A.; Manos, P. S. *American Journal of Botany*. **2001**, 88, 706-716.

<sup>5</sup> Quijano-Abril, M. A.; Callejas-Posadas, R.; Miranda-Esquivel, D. *Journal of Biogeography*. **2006**, 33, 1266-1278.

<sup>6</sup> Heywood, V. H. *Flowering plants of the World*. **1978**, Ed. Oxford University Press, Oxford, 335.

<sup>7</sup> Stebbins, G. L. *Flowering plants: Evolution above the species level*. **1974**, Ed. Arnold Press London, London, 399.

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



Frutos y hojas de *Piper nigrum*<sup>8</sup>

### 3.2 Etnofarmacología de las 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.

<sup>8</sup> <http://kuhinjica.rs/enciklopedija-hrane/zacini/biber>

Numerosas especies del género *Piper* tienen una gran popularidad en el sistema de la medicina tradicional Ayurvedica de la India y América Latina<sup>9,10</sup>. En las islas del Pacífico a partir de las raíces de *P. methysticum*<sup>11</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>12</sup>, *P. brachystachyum* presenta propiedades insecticidas<sup>13</sup> y los tallos de *P. futukadsura*, planta medicinal China, es ampliamente usado para el tratamiento del asma y la artritis. En Jamaica, de las once especies de *Piper* conocidas, se citan como medicinales *P. aduncum* para dolores estomacales y *P. hispidum* como repelente<sup>14</sup>. En América Latina, *P. amalago*, distribuida desde México hasta Brasil, es usada para aliviar dolores de pecho y como agente antiinflamatorio<sup>15</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*<sup>16</sup>  
Tranquilizante



*P. nigrum*  
Antiinflamatorio



*P. aduncum*  
Analgésico, antimicrobiano

Conocida con el nombre común de “matico”, los Kallawayas y Mosestenes<sup>17</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>18</sup> (Provincia Vaca Díez, Beni) es usada la planta entera de *P. lanceolatum*

<sup>9</sup> Kirtikar, K. R.; Basu, B.D. *Indian Medicinal Plants*, 1933, Vol. II, 2128-2132.

<sup>10</sup> *The Wealth of India*. Vol. VIII, Raw Materials. CSIR, New Delhi, 1969, 83-87.

<sup>11</sup> Singh, Y. N.; Blumenthal, M. *Herbalgram* (Special Review). 1997, 39, 33.

<sup>12</sup> Kirtikar, K. R.; Basu, B. D. *Indian Medicinal Plants*. 1993, Vol III, 2130.

<sup>13</sup> Jacobson, M.; Crosby, D. G. *Naturally Occurring Insecticides* (Marcel Dekker), 1971, 144, 226.

<sup>14</sup> Asprey, G. F.; Thornton, P. *Medicinal plants of Jamaica*, Part II. *West Indies Medicinal Journal*. 1954, 3, 17-41.

<sup>15</sup> Domínguez, X. A.; Alcorn, J. B. *Journal of Ethnopharmacology*. 1985, 13, 139-156.

<sup>16</sup> <http://www.edesignz.co.nz/hosted/MaraReo/TMR-Kawa.html>

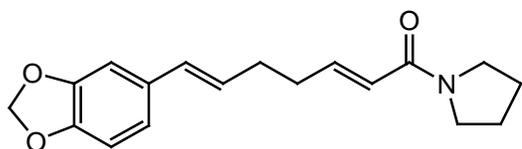
<sup>17</sup> Quintana, P. G.; Vargas, R. L.; Icona, C.; Bozo, S.; Cuata, C. *Guía popular de plantas utilizadas por los Mosestenes de Convento, Santa Ana y Muchanes* (Alto Beni-Bolivia). 1995, FONAMA.

<sup>18</sup> Bergeron, S.; Ortiz, B.; Ortiz, J.; Soria, C.; Ortiz, C. *Guía popular de plantas utilizadas por la etnia Chacobo* (Prov. Vaca Díez, Beni). 1996, FONAMA.

(“joshinia”) y *P. callosum* (“xequihahewa”) hervidas para los casos de viruela; en tanto que *P. darienense* (“nihibosa”) y *P. hostmanianum* (“rarasá”) se utilizan como analgésico para el dolor de muelas. En la etnia Tacana<sup>19</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* y *P. heterophyllum* son utilizadas como antiinflamatorio, en el dolor de los riñones, como desinfectante en heridas y en infecciones de la piel.

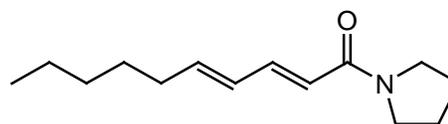
### 3.3. Metabolitos secundarios aislados del género *Piper*

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>20</sup>, destacando los alcaloides, lignanos, neolignanos, terpenoides, kavapironas, piperolidas, amidas chalconas y dihidrochalconas, flavonas y flavanonas, los cuales presentan una amplia gama de actividades biológicas. Algunos ejemplos de metabolitos aislados y su actividad biológica, se muestran a continuación:



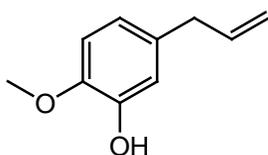
**Sarmentosina** (*P. sarmentosum*)

Actividad antifúngica<sup>17</sup>



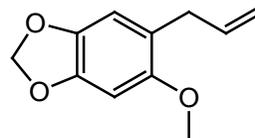
**Sarmentina** (*P. sarmentosum*)

Actividad antiplasmódica<sup>21</sup>



**Chavibetol** (*P. betle*)

Actividad antiinflamatoria<sup>22</sup>



**Asaricina** (*P. lenticellosum*)

Actividad antimicrobiana<sup>23</sup>

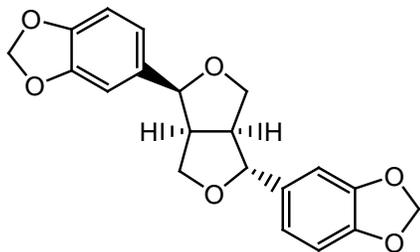
<sup>19</sup> Bourdy, B.; Giménez, A.; Flores, E. N. *Conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas*. **1999**, UMSA-CIPTA-IRD-FONAMA, 32-33.

<sup>20</sup> Parmar, V. S.; Jain, S. C.; Bisht, K. S.; Jain, R.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O. D.; Prasad, A. K.; Wengel, J.; Olsen, C. E.; Boll, P. M. *Phytochemistry*. **1997**, 46, 597-673.

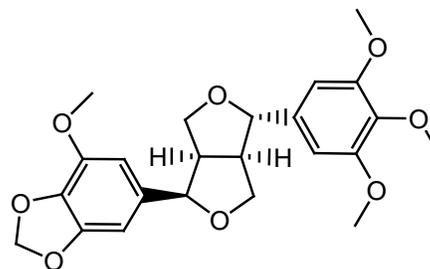
<sup>21</sup> Tuntiwachwuttikul, P.; Phansa, P.; Pootaeng-on, Y.; Taylor, W. C. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **2006**, 54, 149-151.

<sup>22</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.

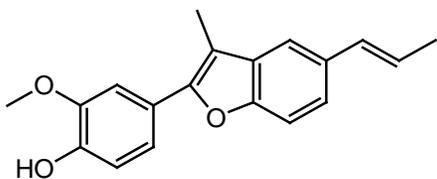
<sup>23</sup> Masuda, T.; Inazumi, A.; Yamada, Y.; Padolina, W. G.; Kikuzaki, H.; Nakatani, N. *Phytochemistry*. **1991**, 30, 3227-3228.



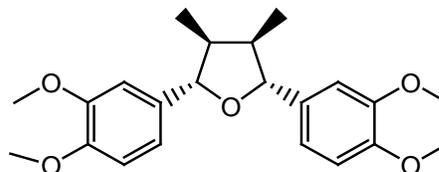
**Asarinina** (*P. longum*)  
Actividad quimiopreventiva<sup>24</sup>



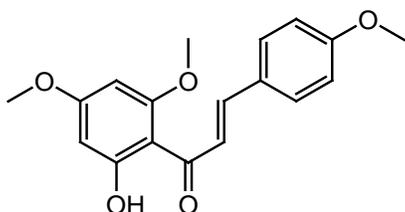
**7'-epi-Sesartemina** (*P. fimbriulatum*)  
Actividad larvicida<sup>25</sup>



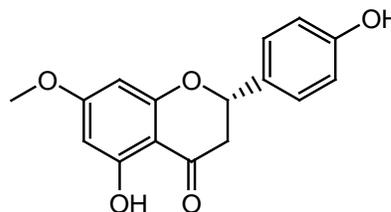
**Eupomatenoid-5** (*P. regnellii*)  
Actividad tripanocida<sup>26</sup>



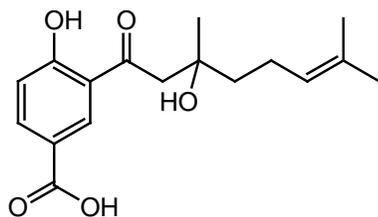
**Galgravina** (*P. Futokadsura*)  
Actividad antioxidante<sup>27</sup>



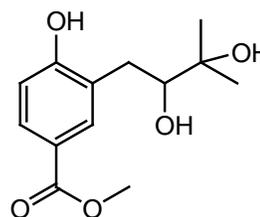
**Flavokavain A** (*P. methysticum*)  
Inductor de la apoptosis<sup>28</sup>



**Sakuranetina** (*P. elongatum*)  
Actividad leishmanicida<sup>29</sup>



**Ácido crassinérvico** (*P. crassinervium*)  
Actividad antifúngica<sup>30</sup>



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

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

<sup>25</sup> Solis, P. N.; Olmedo, D.; Nakamura, N.; Calderón, A. I.; Hattori, M.; Gupta, P. M. *Pharmaceutical Biology*. **2005**, 43, 378-381.

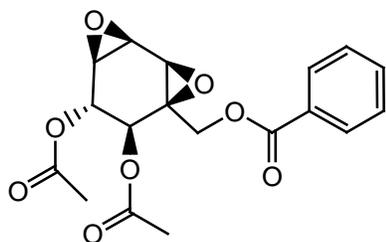
<sup>26</sup> Luize, P. S.; Ueda-Nakamura, T.; Filho, B. P. D.; Cortéz, D. A. G.; Nakamura, C. V. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **2006**, 29, 2126-2130.

<sup>27</sup> Konishi, T.; Konoshima, T.; Daikonya, A.; Kitanaka, S. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **2005**, 53, 121-124.

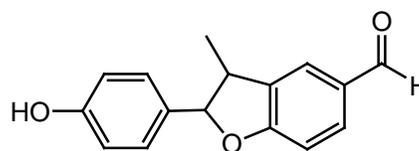
<sup>28</sup> Zi, X.; Simoneau, A. R. *Cancer Research*. **2005**, 65, 8, 3479-3486.

<sup>29</sup> Bravo, J. A.; Sauvain, M.; Gimenez, A.; Massiot, G.; Deharo, E.; Lavaud, C. *Revista Boliviana de Química*. **2003**, 20, 11-17.

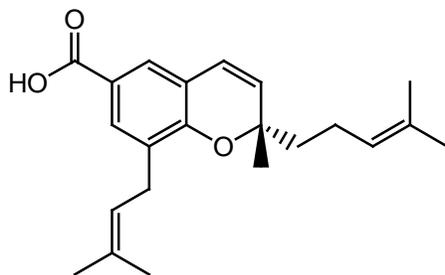
<sup>30</sup> Lago, J. H. G.; Ramos, C. S.; Campos, D.; Casanova, C.; Morandim, A. A.; Bergamo, D. C. B.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani, V. S.; Furlan, M.; Guimaraes, E. F.; Young, M. C. M.; Kato, M. J. *Journal of Natural Products*. **2004**, 67, 1783-1788.



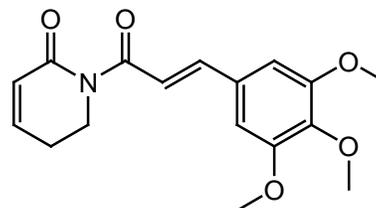
**Crotepoxido** (*P. hookeri*)  
Actividad antitumoral<sup>31</sup>



**Decurrenal** (*P. decurrens*)  
Actividad insecticida<sup>32</sup>



**Ácido gaudichaudianico** (*P. gaudichaudianum*)<sup>33</sup>  
Actividad tripanocida



**Piperlongumina** (*P. tuberculatum*)<sup>34</sup>  
Actividad antitumoral

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*.

<sup>31</sup> Singh, J.; Dhar, K. L.; Atal, C. K. *Current Science*. **1969**, 38, 471.

<sup>32</sup> Chauret, D. C.; Bernard, C. B.; Arnason, J. T.; Durst, T.; Krishnamurthy, H. G.; Sánchez-Vindas, P.; Moreno, N.; San Roman, L.; Poveda, L. *Journal of Natural Products*. **1996**, 59, 152-155.

<sup>33</sup> Batista, J. M.; Lopes, A. A.; Ambrósio, D. L.; Regasini, L. O.; Kato, M. J.; Bolzani, V. S.; Cicarelli, R. M. B.; Furlan, M. *Biological & Pharmaceutical and Bulletin*. **2008**, 31, 538-540.

<sup>34</sup> Parkison, E. I.; Hergenrother, P. J. *ChemMedChem*. **2011**, 6, 1957-1959.



Piper nigrum L.  
Image processed by Thomas Schoepke  
[www.plant-pictures.de](http://www.plant-pictures.de)

## 4. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE ESPECIES DEL GÉNERO *Piper*

#### 4. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE ESPECIES DEL GÉNERO *Piper*

Con los antecedentes anteriormente citados y siguiendo los objetivos propuestos de aislamiento, elucidación estructural de los metabolitos aislados, realizamos el estudio fitoquímico, de las fracciones obtenidas en diclorometano y acetato de etilo tras partición líquido-líquido ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$  y  $\text{AcOEt-H}_2\text{O}$ ) del extracto etanólico de cinco especies del género *Piper*: Los extractos estudiados fueron aquellos obtenidos de las hojas de *P. delineatum*, *P. pseudoarboreum*, *P. divaricatum* y *P. heterophyllum*, así como el de los frutos de *P. glabratum*.

A continuación se detalla el procedimiento experimental seguido para dicho estudio. En primer lugar, se prepararon los extractos etanólicos de cada una de las especies, los cuales fueron resuspendidos en agua y extraídos con diclorometano y acetato de etilo. Posteriormente, las fracciones orgánicas de cada una de las especies, fueron fraccionadas por cromatografía líquida por gravedad (CG), usando como eluyente mezclas de *n*-hexano y acetato de etilo con polaridad creciente. Estas subfracciones 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 radial y cromatografía en capa fina, usando como sistemas de elusión diferentes mezclas de eluyente (*n*-hexano, éter dietílico, diclorometano, acetona, acetato de etilo, isopropanol y metanol), al objeto de aislar e identificar los metabolitos 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). 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 metabolitos aislados de las cinco especies de *Piper* estudiadas han sido agrupados 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:

- ❖ **F:** Flavonoides
- ❖ **A:** Amidas
- ❖ **AB:** Derivados del ácido benzoico
- ❖ **B:** Benzopiranos y Benzofuranos
- ❖ **AP:** Apocarotenos
- ❖ **T:** Terpenos
- ❖ **FP:** Fenilpropanoides
- ❖ **AG:** Ácidos grasos

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

#### 4.1. Estudio fitoquímico de *Piper delineatum*

Del estudio fitoquímico de la fracción de diclorometano y acetato de etilo de las hojas de *P. delineatum*, después de sucesivas cromatografías, según se detalla en la parte experimental, se aislaron veintinueve metabolitos, veinte de los cuales habían sido descritos previamente en la bibliografía química e identificamos como flavonoides: 2',4'-dihidroxi-3,6'-dimetoxi-chalcona<sup>1</sup> (**F2**), cardomomin<sup>2</sup> (**F3**), 2'-hidroxi-3,4',6'-trimetoxi-chalcona<sup>3</sup> (**F6**), 2',3'-dihidroxi-4',6'-dimetoxi-chalcona<sup>4</sup> (**F10**), 3-hidroxielicrisetin<sup>5</sup> (**F11**), 3-metoxielicrisetin<sup>6</sup> (**F12**), uvangoletin<sup>7</sup> (**F14**), alpinetin<sup>2</sup> (**F20**), (2*S*)-7,4'-dihidroxi-5,3'-dimetoxi-flavanona<sup>8</sup> (**F22**), 5,7-dimetoxi-8-hidroxi-flavanona<sup>9</sup> (**F24**), 5,7,3'-trimetoxi-flavanona<sup>10</sup> (**F27**); amidas: houttuynamida A<sup>11</sup> (**A12**), *N*-cinamoil-tiramina<sup>12</sup> (**A14**); un derivado del ácido benzoico: 4-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil) benzoato de metilo<sup>13</sup> (**AB10**); terpenos: óxido de cariofileno<sup>14</sup> (**T2**), (*E*)-fitol<sup>15</sup> (**T6**),  $\beta$ -sitosterol<sup>16</sup> (**T7**), estigmasterol<sup>16</sup> (**T8**); fenilpropanoides: 4-alil-2,6-dimetoxi-fenol<sup>17</sup> (**FP1**), elemicina<sup>18</sup> (**FP2**), así también, se han aislado nueve ácidos grasos saturados lineales y uno insaturado. Los compuestos que hemos denominado: **F1**, **F4**, **F5**, **F7**, **F8**, **F9**, **F15**, **F16** y **F23**, se describen por primera vez en esta Memoria.

<sup>1</sup> Aponte, J. C.; Castillo, D.; Estevez, Y.; Gonzalez, G.; Arevalo, J.; Hammond, G. B.; Sauvain, M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2010**, 20, 100-103.

<sup>2</sup> Kuroyanagi, M.; Noro, T.; Fukushima, S.; Aiyama, R.; Ikuta, A.; Itokawa, H.; Morita, M. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1983**, 31, 1544-1550.

<sup>3</sup> Boumendjel, A.; Boccard, J.; Carrupt, P.-A.; Nicolle, E.; Blanc, M.; Geze, A.; Choisnard, L.; Wouessidjewe, D.; Matera, E.-L.; Dumontet, C. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2008**, 51, 2307-2310.

<sup>4</sup> Chantrapromma, K.; Rat-A-pa, Y.; Karalai, C.; Lojanapiwatana, V.; Seechammanturakit, V. *Phytochemistry*, **2000**, 53, 511-513.

<sup>5</sup> Vogel, S.; Ohmayer, S.; Brunner, G.; Heilmann, J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2008**, 16, 4286-4293.

<sup>6</sup> Vogel, S.; Barbic, M.; Jürgenliemk, G.; Heilmann, J. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2010**, 45, 2206-2213.

<sup>7</sup> Hufford, C. D.; Oguntimein B. O. *Phytochemistry*. **1980**, 19, 2036-2038.

<sup>8</sup> Leu, Y.-L.; Hwang, T.-L.; Chung, Y.-M.; Hong, P.-Y. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **2006**, 57, 1063-1066.

<sup>9</sup> Chantrapromma, K.; Seechammanturakit, V.; Pakawatchai, C.; Chantrapromma, S.; Chinnakali, K.; Fun, H.-K. **1998**, *Acta Crystallographica*, C54, i, IUC9800001/1-3.

<sup>10</sup> Sekizaki, H. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. **1988**, 61, 1407-1409.

<sup>11</sup> Chou, S.-C.; Su, C.-R.; Ku, Y.-C.; Wu, T.-S. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **2009**, 57, 1227-1230.

<sup>12</sup> Nishioka, T.; Watanabe, J.; Kawabata, J.; Niki, R. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **1997**, 61, 1138-1141.

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

<sup>14</sup> Connolly, J. D.; Hill, R. A. *Dictionary of Terpenoids*. Chapman & Hall, London. **1991**, 1, 292.

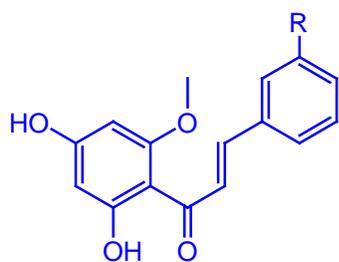
<sup>15</sup> Orjala, J.; Wright, A. D.; Erdelmeier, C. A. J.; Sticher, O.; Rali, T. *Helvetica Chimica Acta*. **1993**, 76, 1481-1488.

<sup>16</sup> Kojima, H.; Sato, N.; Hatano, A.; Ogura, H. *Phytochemistry*. **1990**, 29, 2351-2355.

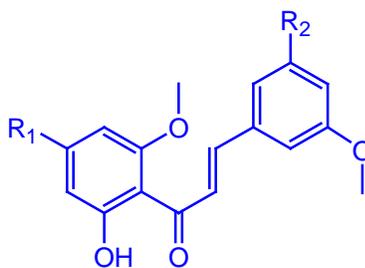
<sup>17</sup> Miyase, T.; Kuroyanagi, M.; Noro, T.; Ueno, A.; Fukushima, S. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **1985**, 33, 4445-4450.

<sup>18</sup> Mohammad, I.; Waterman, P.G.; Thomas, D. W. *Journal of Natural Products*. **1985**, 48, 328-329.

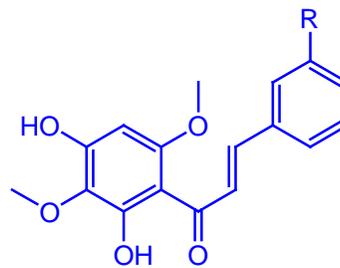
Flavonoides



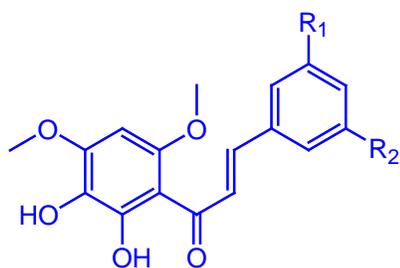
**F1** R = OH  
**F2** R = OCH<sub>3</sub>  
**F3** R = H



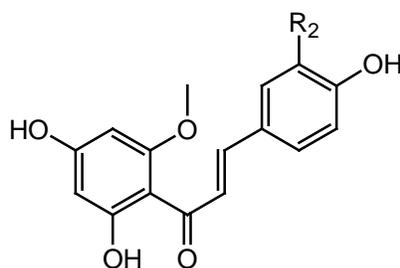
**F4** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OH  
**F5** R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH  
**F6** R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H



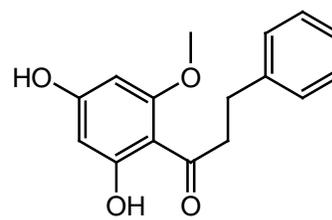
**F7** R = OH  
**F8** R = OCH<sub>3</sub>



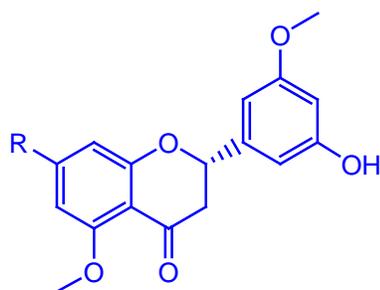
**F9** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>  
**F10** R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H



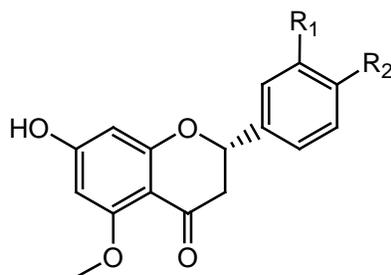
**F11** R = OH  
**F12** R = OCH<sub>3</sub>



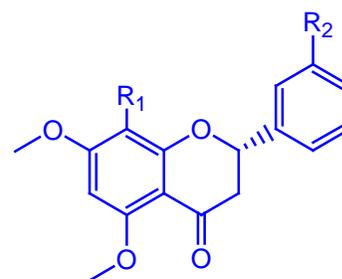
**F14**



**F15** R = OH  
**F16** R = OCH<sub>3</sub>

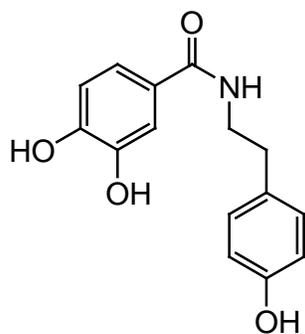


**F20** R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H  
**F22** R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH

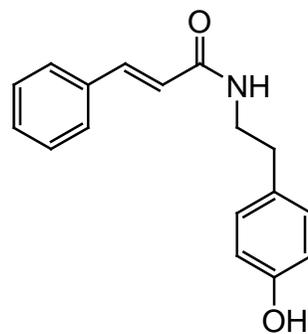


**F23** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>  
**F24** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = H  
**F27** R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>

## Amidas

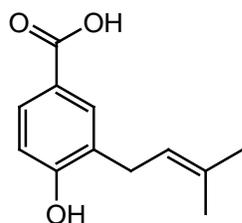


A12



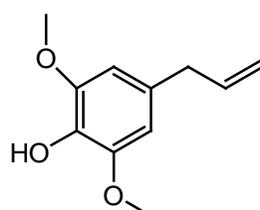
A14

## Derivado del ácido benzoico

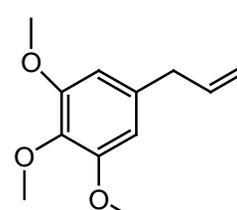


AB10

## Fenilpropanoides

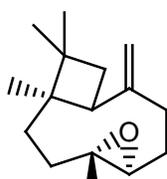


FP1

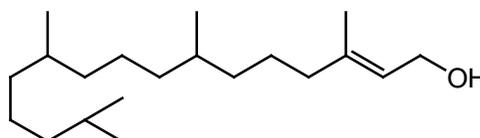


FP2

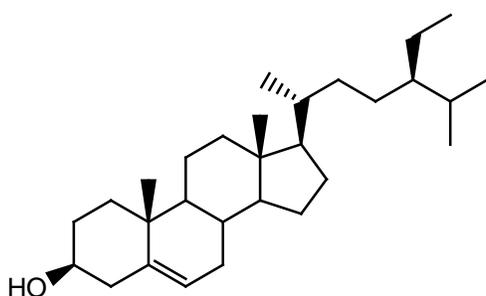
## Terpenos



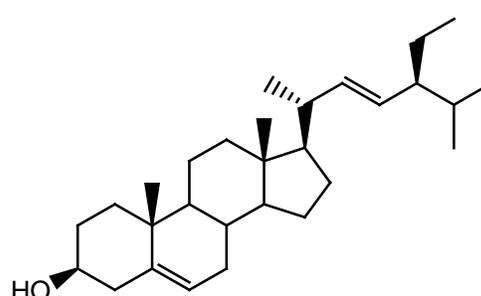
T2



T6

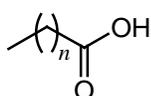


T7



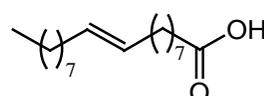
T8

## Ácidos grasos



$n = 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22$

Ácidos grasos saturados



Ácido oleico

## 4.2. Estudio fitoquímico de *Piper Pseudoarboreum*

Del estudio fitoquímico de la fracción de diclorometano de las hojas de *P. pseudoarboreum*, después de sucesivas cromatografías, como se detalla en la parte experimental, se aislaron veinticinco metabolitos, veinticuatro de los cuales habían sido descritos previamente e identificamos como amidas: Sintenpiridona<sup>19</sup> (**A2**), 3-cloro-5,6-dihidro-1*H*-piridin-2-ona<sup>20</sup> (**A3**), demetoxiplartina<sup>21</sup> (**A4**), (*E*)-piplartina<sup>21</sup> (**A5**), (*Z*)-piplartina<sup>22</sup> (**A6**), piplaroxido<sup>23</sup> (**A7**), 3,4-epoxi-8,9-dihidropiplartina<sup>24</sup> (**A8**), 10,11-dihidropiperina<sup>22</sup> (**A9**), 5,6-dihidropiperlonguminina<sup>22</sup> (**A10**), 4-hidroxi-*N*-[2-(4-metoxi-fenil)-etil]-benzamida<sup>25</sup> (**A11**), *N-p*-cumaroil-tiramina<sup>12</sup> (**A13**), (*E*)-*N*-feruloil-tiramina<sup>26</sup> (**A15**), (*Z*)-*N*-feruloil-tiramina<sup>27</sup> (**A16**); apocarotenos: (-)-loliolida<sup>28</sup> (**AP1**), (+)-isololiolida<sup>28</sup> (**AP2**), dehidrovomifoliol<sup>29</sup> (**AP3**); terpenos: (*E*)-fitol<sup>13</sup> (**T6**),  $\beta$ -sitosterol<sup>16</sup> (**T7**), estigmasterol<sup>16</sup> (**T8**), 3-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosido de  $\beta$ -sitosterol<sup>16</sup> (**T9**); fenilpropanoides: ácido (*E*)-cinámico<sup>30</sup> (**FP11**), ácido ferúlico<sup>31</sup> (**FP12**), 4-metoxi-dihidroferúlico<sup>32</sup> (**FP13**) y el ácido 13(*S*)-hidroxi-octadeca-(9*Z*, 11*E*, 15*Z*)-trienoico<sup>33</sup> (**AG1**). El compuesto que denominamos **A1** resultó nuevo en la bibliografía química y su descripción se presenta por primera vez en esta Memoria.

<sup>19</sup> Chen, J-J.; Huang, Y-C.; Chen, Y-C.; Huang, Y-T.; Wang, S-W.; Peng, C-Y.; Teng, C-M.; Chen, I-S. *Planta Medica*. **2002**, 68, 980-985.

<sup>20</sup> Producto comercial

<sup>21</sup> Duh, C-Y.; Wu, Y-C.; Wang, S-K. *Phytochemistry*. **1990**, 29, 2689-2691.

<sup>22</sup> Navickiene, H. M.; Alécio, A. C.; Kato, M. J.; Bolzani, V. S.; Young, M. C.; Cavalheiro, A. J.; Furlan, M. *Phytochemistry*. **2000**, 55, 621-626.

<sup>23</sup> Capron, M. A.; Wiemer, D. F. *Journal of Natural Products*. **1996**, 59, 794-795.

<sup>24</sup> Seeram, N. P.; Lewis, P. A.; Jacobs, H. *Journal of Natural Products*. **1996**, 59, 436-437.

<sup>25</sup> Barbosa, J. M.; Da Silva, E. C.; Bhattacharyya, J. *Química Nova*. **1990**, 13, 332-334.

<sup>26</sup> Yoshihara, T.; Takamatsu, S.; Sakamura, S. *Agricultural Biology and Chemistry*. **1978**, 42, 623-627.

<sup>27</sup> Yoshihara, T.; Yamaguchi, K.; Takamatsu, S.; Sakamura, S. *Agricultural Biology and Chemistry*. **1981**, 45, 2593-2598.

<sup>28</sup> Kimura, J.; Maki, N. *Journal of Natural Products*. **2002**, 65, 57-58.

<sup>29</sup> Greca, M.D.; Monaco, P.; Previtera, L. *Journal of Natural Products*. **1990**, 53, 972-974.

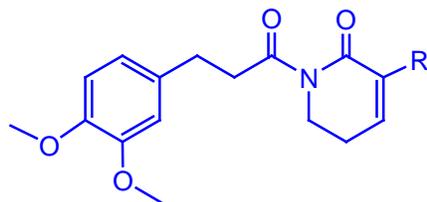
<sup>30</sup> Gao, L.; Xu, X.; Nan, H.; Yang, J.; Sun, G.; Wu, H.; Zhong, M. *Journal of Medicinal Plants Research*. **2012**, 6, 929-931.

<sup>31</sup> Liu, M-H.; Tong, X.; Wang, J-X.; Zou, W.; Cao, H.; Su, W-W. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2013**, 74, 141-155.

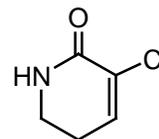
<sup>32</sup> Moreira, D. L.; Guimarães, E. F.; Kaplan, M. A. C. *Phytochemistry*. **2000**, 55, 783-786.

<sup>33</sup> Yadav, J. S.; Deshpande, P. K.; Sharma, G. V. M. *Tetrahedron*. **1992**, 48, 4465-4474.

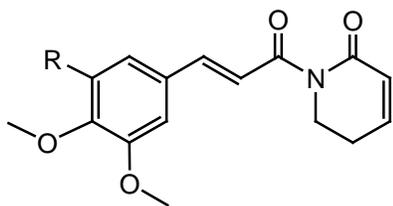
## Amidas



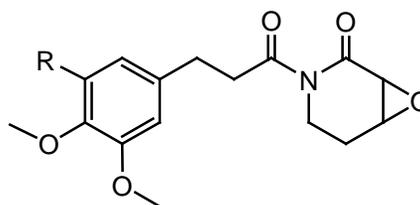
**A1 R = Cl**  
**A2 R = H**



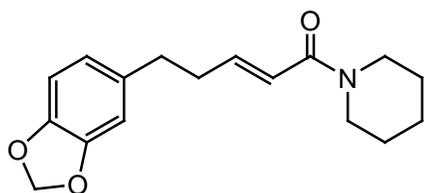
**A3**



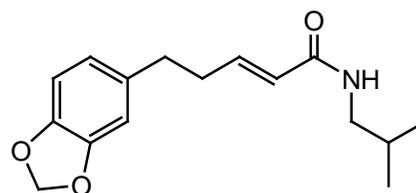
**A4 (E) R = H**  
**A5 (E) R = OCH<sub>3</sub>**  
**A6 (Z) R = OCH<sub>3</sub>**



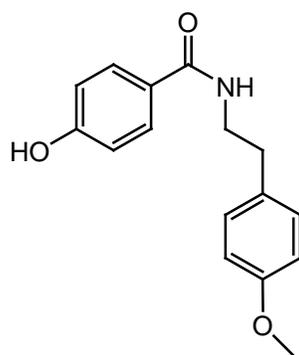
**A7 R = H**  
**A8 R = OCH<sub>3</sub>**



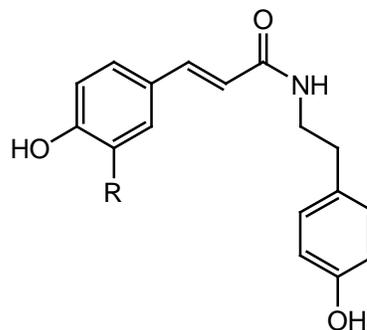
**A9**



**A10**

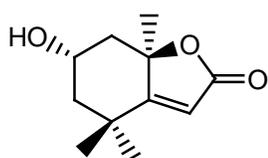


**A11**

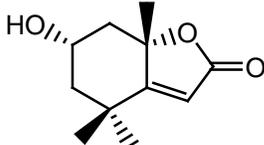


**A13 (E) R = H**  
**A15 (E) R = OCH<sub>3</sub>**  
**A16 (Z) R = OCH<sub>3</sub>**

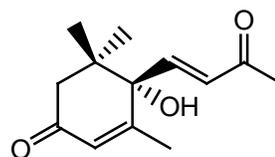
### Apocatorenos



AP1

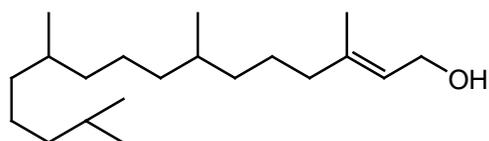


AP2

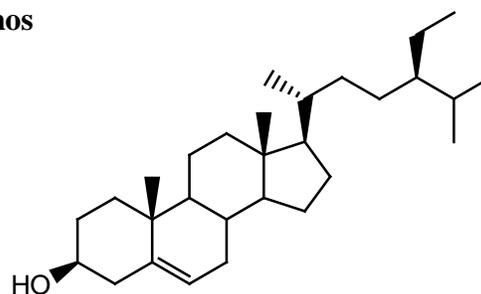


AP3

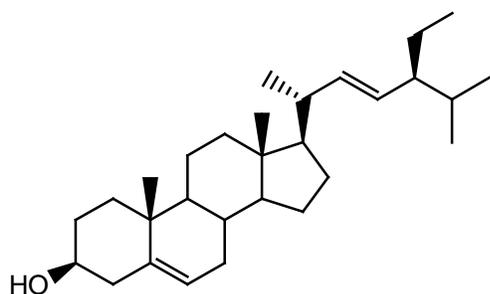
### Terpenos



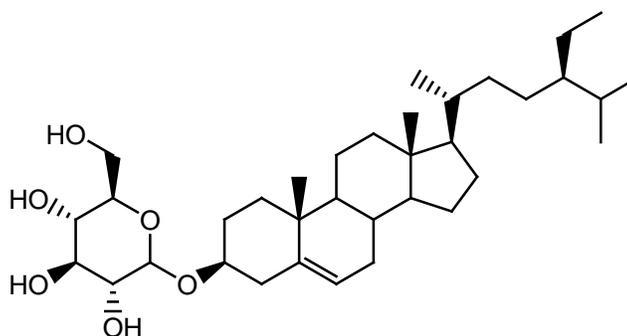
T6



T7

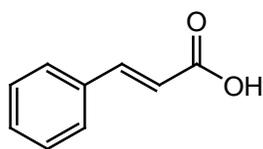


T8

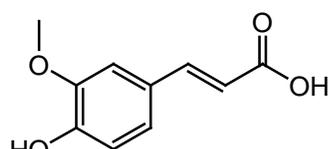


T9

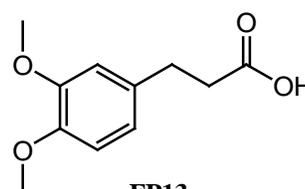
### Fenilpropanoides



FP11

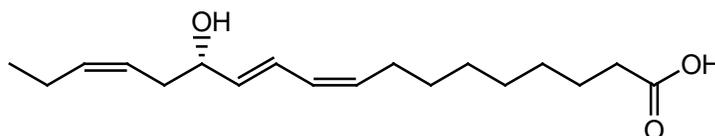


FP12



FP13

### Ácido graso



AG1

### 4.3. Estudio fitoquímico de *Piper divaricatum*

Del estudio fitoquímico de la fracción de diclorometano de las hojas de *P. divaricatum*, después de sucesivas cromatografías, como se detalla en la parte experimental, se aislaron veintiocho metabolitos, veinte de los cuales habían sido descritos previamente y que identificamos como flavonoides: 2',3,4-trihidroxi-4',6'-dimetoxi-chalcona<sup>34</sup> (**F13**), sakuranetina<sup>35</sup> (**F26**), genkwanina<sup>36</sup> (**F30**), 3'-hidroxigenkwanina<sup>37</sup> (**F31**), isokaempferida<sup>38</sup> (**F36**); amidas: (*E*)-*N*-feruloil-tiramina<sup>26</sup> (**A15**), (*Z*)-*N*-feruloil-tiramina<sup>27</sup> (**A16**); derivados del ácido benzoico: ácido 3,4-dihidroxi-5-[(2*E*,6*E*,10*E*)-3,7,11,15-tetrametil-hexadeca-2,6,10,14-tetraenil] benzoico<sup>39</sup> (**AB5**), ácido 4-hidroxi-3-[(2*E*,6*E*,10*E*)-3,7,11,15-tetrametil-hexadeca-2,6,10,14-tetraenil] benzoico<sup>39</sup> (**AB6**), ácido 3-[(2*E*,6*E*,10*E*)-11-carboxi-3,7,15-trimetil-2,6,10,14-hexadecatetraenil]-4,5-dihidroxi benzoico<sup>40</sup> (**AB7**); terpenos: (*E,E*)-farnesilacetona<sup>41</sup> (**T4**),  $\beta$ -sitosterol<sup>16</sup> (**T7**), estigmasterol<sup>16</sup> (**T8**), 3-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosido de  $\beta$ -sitosterol<sup>16</sup> (**T9**); fenilpropanoides: 4-alil-2,6-dimetoxi-fenol<sup>17</sup> (**FP1**), elemicina<sup>42</sup> (**FP2**), miristicina<sup>43</sup> (**FP3**), acetato de metoxi-eugenol<sup>44</sup> (**FP4**), alcohol (*E*)-3,4,5-trimetoxi-cinámico<sup>45</sup> (**FP5**), antriscinol<sup>46</sup> (**FP6**), (*E*)-3,4,5-trimetoxi-cinamaldehído<sup>47</sup> (**FP7**), sinapaldehído<sup>48</sup> (**FP8**) y siringaldehído<sup>49</sup> (**FP9**).

<sup>34</sup> Jun, N.; Hong, G.; Jun, K. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2007**, 15 2396-2402.

<sup>35</sup> Liu, Y-L.; Ho, D. K.; Cassady, J. M. *Journal of Natural Products*. **1992**, 55, 357-363.

<sup>36</sup> Park, Y.; Moon, B-H.; Yang, H.; Lee, Y.; Lee, E.; Lim, Y. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **2007**, 45, 1072-1075.

<sup>37</sup> Ahmad, V.U.; Ali, Z.; Zahid, M.; Alam, N.; Saba, N.; Khan, T.; Qaisar, M. Nisar, M. *Fitoterapia*. **2000**, 71, 84-85.

<sup>38</sup> Agrawal, P. K. *Carbono-13 NMR of Flavonoids*. Elsevier: Amsterdam. **1989**, 160-161.

<sup>39</sup> Maxwell, A.; Rampersad, D. *Journal of Natural Products*. **1989**, 52, 614-618.

<sup>40</sup> Flores, N.; Jiménez, I. A.; Giménez, A.; Ruiz, G.; Gutierrez, D.; Bourdy, G.; Bazzocchi, I. L. *Phytochemistry*. **2009**, 70, 621-627.

<sup>41</sup> Neidlein, R.; Koch, E. *Archiv der Pharmazie*. **1980**, 313, 193-198.

<sup>42</sup> Mohammad, I.; Waterman, P.G.; Thomas, D. W. *Journal of Natural Products*. **1985**, 48, 328-329.

<sup>43</sup> Yakushijin, K.; Tohshima, T.; Suzuki, R.; Murata, H.; Lu, S-T.; Furukawa, H. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **1983**, 31, 2879-2883.

<sup>44</sup> Parmar, V. S.; Jain, S. C.; Gupta, S.; Talwar, S.; Rajwanshi, V. K.; Kumar, R.; Azim, A.; Malhotra, S.; Kumar, N.; Jain, R.; Sharma, N. K.; Tyagi, O. D.; Lawrie, S. J.; Errington, W.; Howarth, O. W.; Olsen, C. E.; Singh, S. K.; Wengel, J. *Phytochemistry*. **1998**, 49, 1069-1078.

<sup>45</sup> San Feliciano, A.; Medarde, M.; Lopez, J. L.; Miguel del Corral, J. M. *Journal of Natural Products*. **1986**, 49, 677-679.

<sup>46</sup> Tanoguchi, M. Kashima, T.; Saika, H.; Inoue, T.; Arimoto, M. Yamaguchi, H. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **1989**, 37, 68-72.

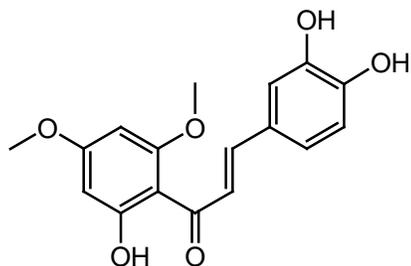
<sup>47</sup> Barcelos, R. C.; Pastre, J. C.; Caixeta, V.; Vendramini-Costa, D. B.; Carvalho, J. E.; Pilli, R. A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2012**, 20, 3635-3651.

<sup>48</sup> Zhu, Y.; Mohammadi, A.; Ralph, J. *Bioenergy Research*. **2012**, 5, 407-411.

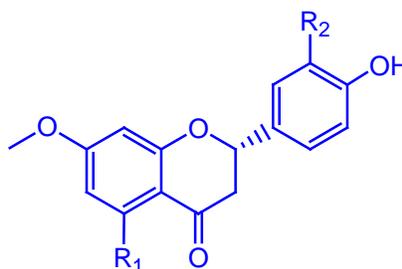
<sup>49</sup> Liu, M-H.; Tong, X.; Wang, J-X., Zou, W.; Cao, H.; Su, W-W. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2013**, 74, 141-155.

Los compuestos que hemos denominado: **F21**, **AB1**, **AB2**, **AB3** y **AB4**, se describen por primera vez en esta Memoria.

### Flavonoides

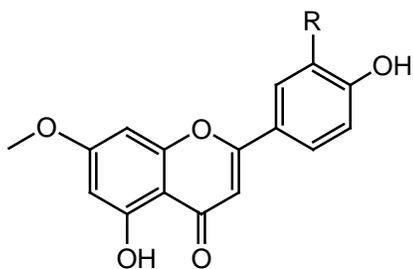


**F13**

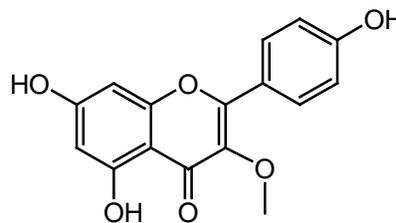


**F21** R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH

**F26** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = H

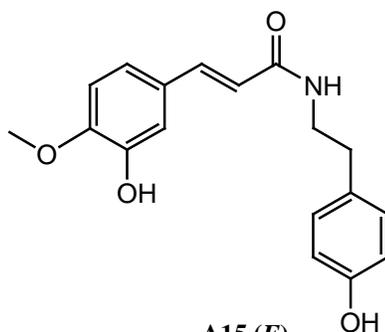


**F30** R = H  
**F31** R = OH



**F36**

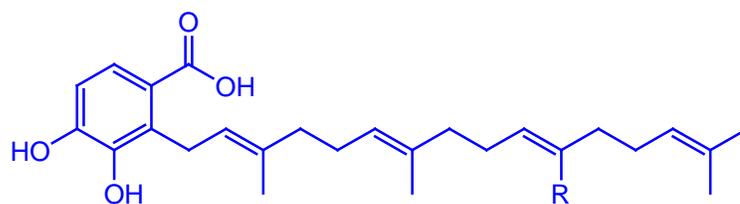
### Amida



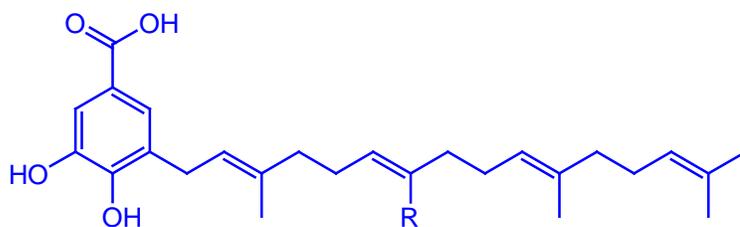
**A15** (*E*)

**A16** (*Z*)

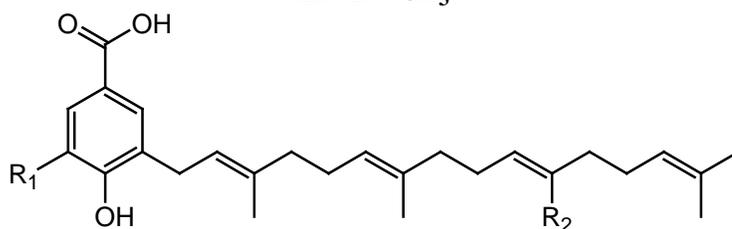
## Derivados del ácido benzoico



AB1 R = CH<sub>3</sub>  
 AB2 R = CH<sub>2</sub>OH  
 AB3 R = COOH

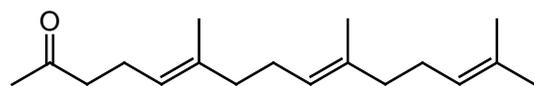


AB4 R = CH<sub>2</sub>OH  
 AB5 R = CH<sub>3</sub>

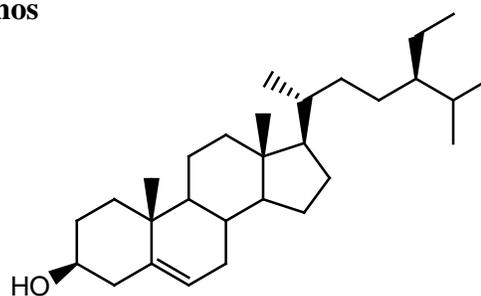


AB6 R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>  
 AB7 R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = COOH

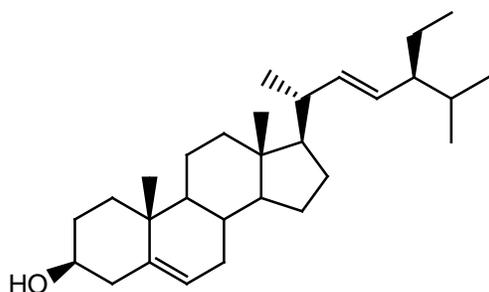
## Terpenos



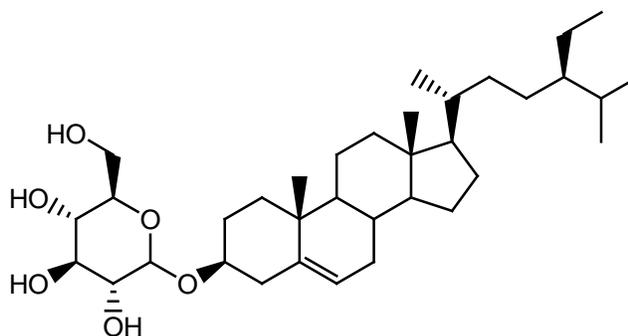
T4



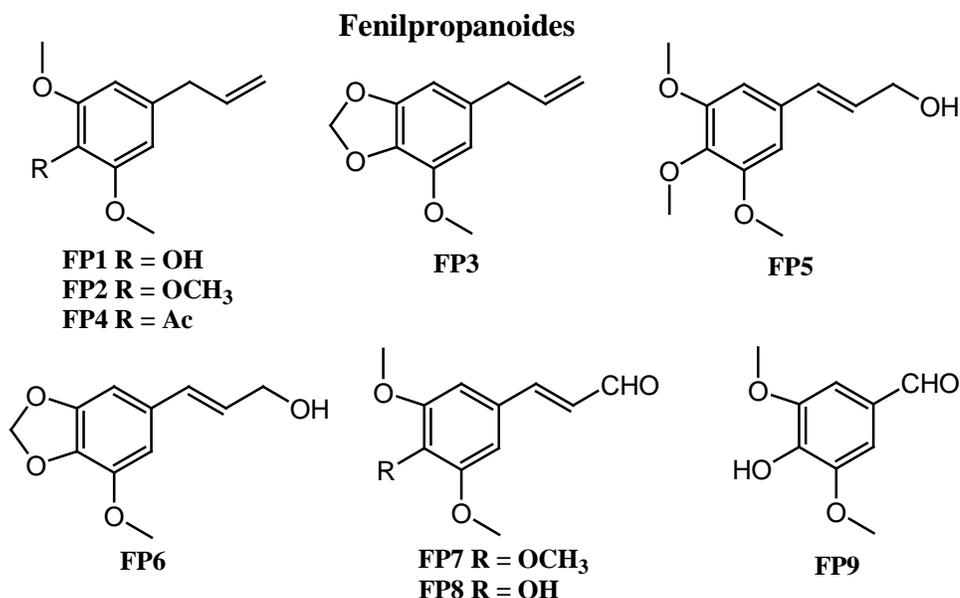
T7



T8



T9



#### 4.4. Estudio fitoquímico de *Piper glabratum*

Del estudio fitoquímico de la fracción de diclorometano de las hojas de *P. glabratum*, después de sucesivas cromatografías, como se detalla en la parte experimental. Se han aislado dieciocho metabolitos, catorce de los cuales habían sido descritos previamente e identificamos como flavonoides: pinocembrin<sup>2</sup> (**F19**), crisin<sup>50</sup> (**F28**), tectocrisin<sup>36</sup> (**F29**), galangin<sup>50</sup> (**F33**), 5,7-dihidroxi-3-metoxi-flavona<sup>38</sup> (**F35**); amida: *N-p*-cumaroil-tiramina<sup>12</sup> (**A13**), derivados del ácido benzoico: 4-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoato de metilo<sup>51</sup> (**AB8**), 3,4-dihidroxi-5-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoato de metilo<sup>52</sup> (**AB9**); benzopiranos y benzofuranos: ácido 2,2-dimetil-3-hidroxi-cromano-6-carboxílico<sup>53</sup> (**B3**), 2,2-dimetil-2*H*-1-cromeno-6-carboxilato de metilo<sup>54</sup> (**B4**), 8-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-1-cromeno-6-carboxilato de metilo<sup>55</sup> (**B5**), 3-hidroxi-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-2,3-dihidrobenzofurano-5-carboxilato de metilo<sup>56</sup> (**B8**); terpenos:  $\beta$ -sitosterol<sup>16</sup> (**T7**), estigmasterol<sup>16</sup> (**T8**).

<sup>50</sup> Papotti, G.; Bertelli, D.; Plessi, M.; Rossi, M. C. *International Journal of Food Science and Technology*. **2010**, 45, 1610-1618.

<sup>51</sup> Díaz, P. P.; Arias, T. C.; Joseph-Nathan, P. *Phytochemistry*. **1987**, 26, 809-811.

<sup>52</sup> Flores, N.; Jiménez, I. A.; Giménez, A.; Ruiz, G.; Gutierrez, D.; Bourdy, G.; Bazzocchi, I. L. *Journal of Natural Products*. **2008**, 71, 1538-1543.

<sup>53</sup> Burke, B.; Fair, M. *Phytochemistry*. **1986**, 25, 1427-1430.

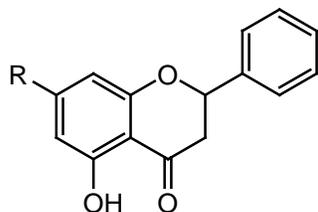
<sup>54</sup> Smith, L. R.; Mahoney, N.; Molyneux, R. J. *Journal of Natural Products*. **2003**, 66, 169-176.

<sup>55</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.

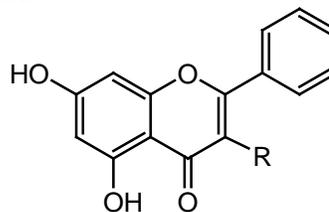
<sup>56</sup> Friederich, U.; Siemens, K.; Solís, P. N.; Gupta, M. P.; Jenet-siemens, K. *Pharmazie*. **2005**, 60, 455-457.

Los compuestos que denominados: **B1**, **B2**, **B9** y **B10**, resultaron nuevos en la bibliografía química y su descripción se presenta en esta Memoria.

### Flavonoides

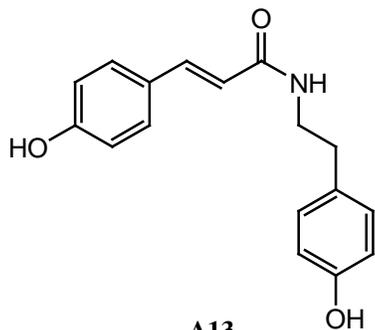


**F19** R = OH  
**F28**  $\Delta^2$ , R = OH  
**F29**  $\Delta^2$ , R = OCH<sub>3</sub>



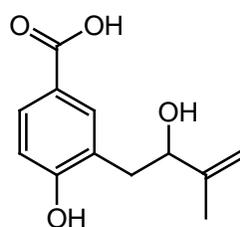
**F33** R = OH  
**F35** R = OCH<sub>3</sub>

### Amida

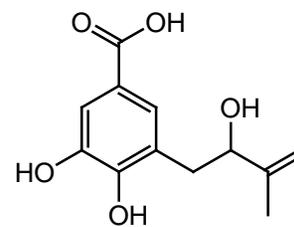


**A13**

### Derivados del ácido benzoico

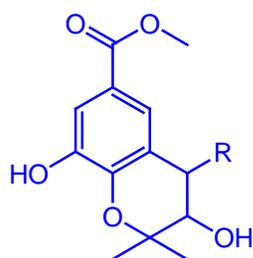


**AB8**

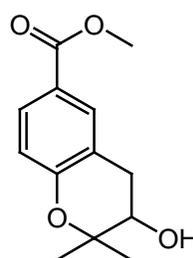


**AB9**

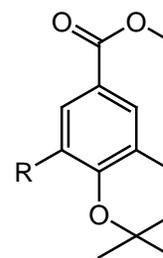
### Benzopiranos



**B1** R = H  
**B2** R = OH

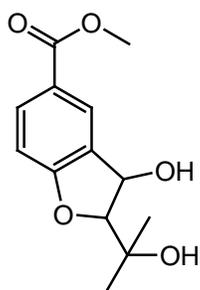


**B3**

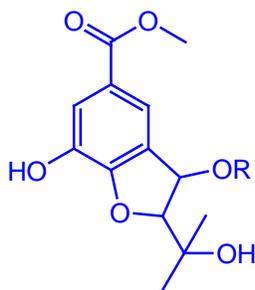


**B4** R = H  
**B5** R = OH

## Benzofuranos



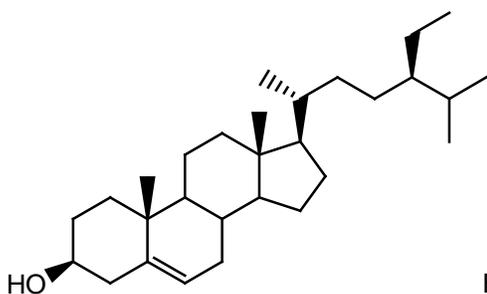
B8



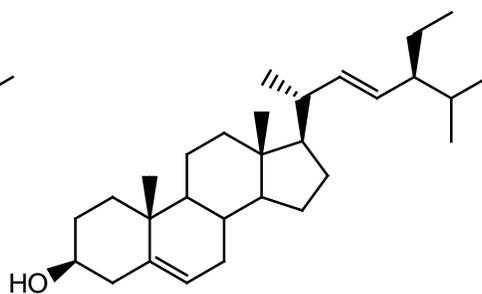
B9 R = H

B10 R = CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>

## Terpenos



T7



T8

4.5. Estudio fitoquímico de *Piper heterophyllum*

Del estudio fitoquímico de la fracción de diclorometano de las hojas de *P. heterophyllum*, después de sucesivas cromatografías, como se detalla en la parte experimental. Se han aislado veintiuno metabolitos, dieciocho de los cuales habían sido descritos previamente y que identificamos como flavonoides: pinostrobin<sup>50</sup> (**F18**), pinocembrin<sup>2</sup> (**F19**), isosakuranetina<sup>35</sup> (**F25**), 3'-hidroxigenkwanina<sup>37</sup> (**F31**), velutin<sup>57</sup> (**F32**), kaempferida<sup>58</sup> (**F34**); derivado del ácido benzoico: ácido 3-[(2*E*,6*E*,10*E*)-11-carboxi-3,7,15-trimetil-2,6,10,14-hexadecatetraenil]-4,5-dihidroxibenzoico<sup>40</sup> (**AB7**); apocarenos: (-)-loliolida<sup>28</sup> (**AP1**), (+)-isololiolida<sup>28</sup> (**AP2**), dehidrovomifoliol<sup>29</sup> (**AP3**), blumenol B<sup>59</sup> (**AP4**), anuionona D<sup>60</sup> (**AP5**); terpenos: (+)-oplopanona<sup>61</sup> (**T1**), alloaromadendrano-4 $\alpha$ -10 $\beta$ -diol<sup>62</sup> (**T3**), ácido cetochabrálico<sup>63</sup> (**T5**);

<sup>57</sup> Das, K. C.; Farmer, W. J.; Weinstein, B. *Journal of Organic Chemistry*. **1970**, 35, 3989-3990.

<sup>58</sup> Lee, E.; Moon, B.-H.; Park, Y.; Hong, S.; Lee, S.; Lee, Y.; Lim, Y. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. **2008**, 29, 507-510.

<sup>59</sup> Galbraith, M. N.; Horn, D. H. S. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. **1972**, 3, 113-114.

<sup>60</sup> Macias, F. A.; Oliva, R. M. Varela, R. M.; Torres, A.; Molinillo, J. M. *Phytochemistry*. **1999**, 52, 613-621.

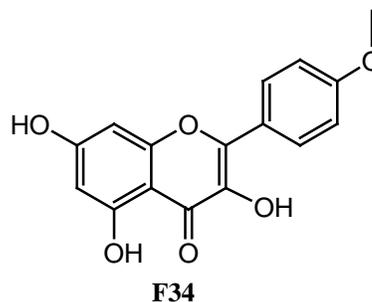
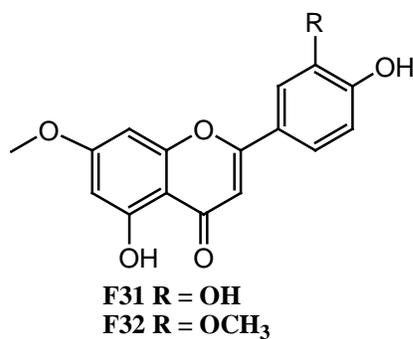
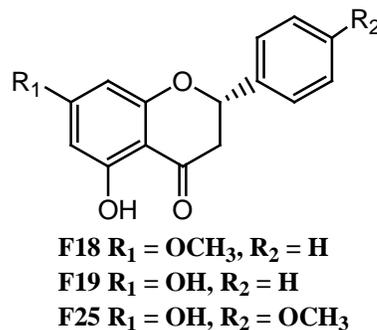
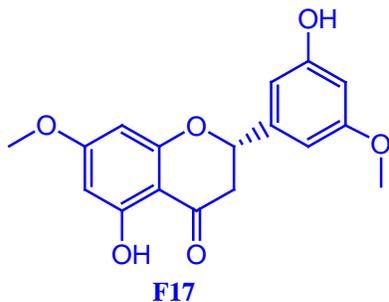
<sup>61</sup> Dastlik, K. A.; Forster, P. G.; Ghisalberti, E. L.; Jefferies, P. R. *Phytochemistry*. **1989**, 28, 1425-1426.

<sup>62</sup> Goldsby, G.; Burke, B. A. *Phytochemistry*. **1987**, 26, 1059-1063.

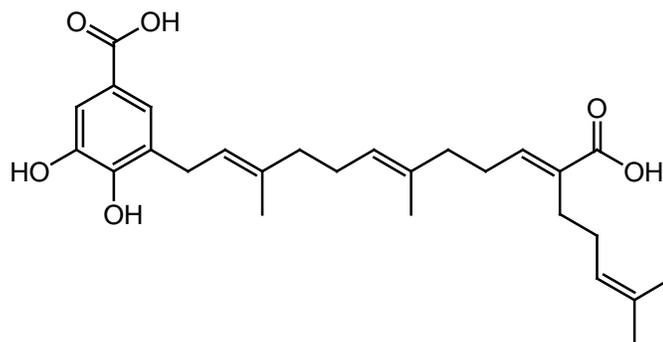
<sup>63</sup> Su, J.-H.; Dai, C.-F.; Huang, H.-H.; Wu, Y.-C.; Sung, P.-J. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **2007**, 55, 594-597.

fenilpropanoides: ácido vainillínico<sup>49</sup> (**FP10**), ácido (*E*)-cinámico<sup>30</sup> (**FP11**) y ácido ferúlico<sup>49</sup> (**FP12**). Los compuestos que hemos denominados: **F17**, **B6** y **B7**, resultaron nuevos en la bibliografía química y su descripción se presenta en esta Memoria.

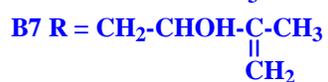
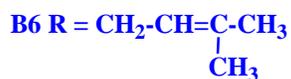
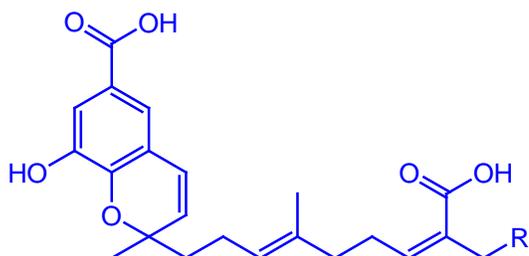
### Flavanoides



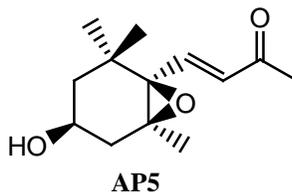
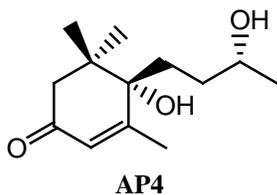
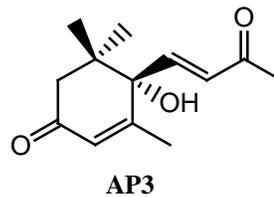
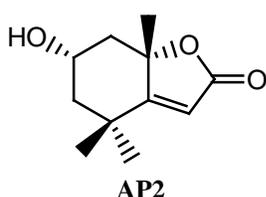
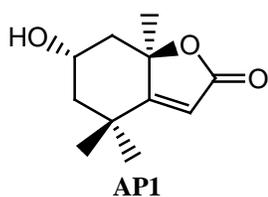
### Derivado del ácido benzoico



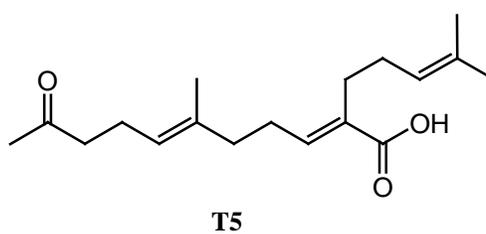
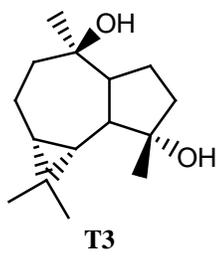
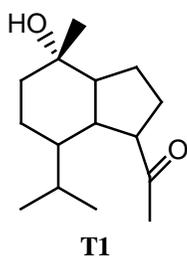
### Benzopiranos



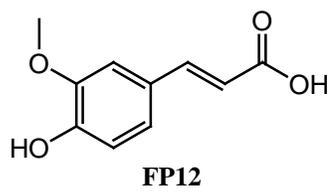
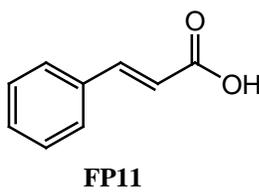
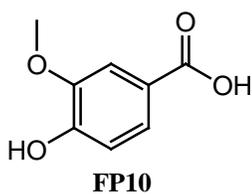
### Apocatorenos

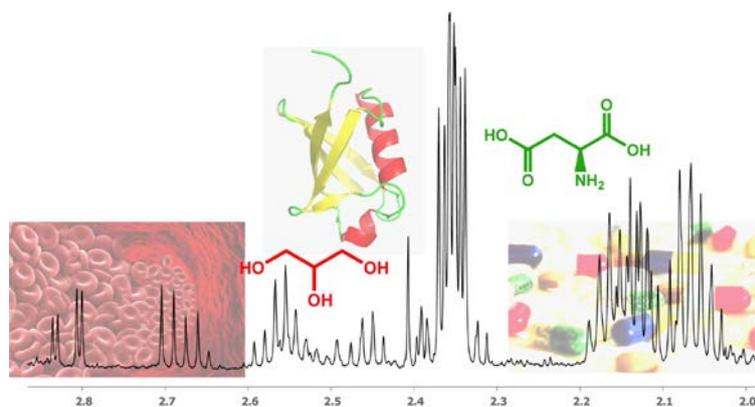


### Terpenos



### Fenilpropanoides





## **5. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS NUEVOS METABOLITOS AISLADOS DE ESPECIES DE *Piper***

## 5. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS NUEVOS METABOLITOS AISLADOS DE ESPECIES DE *Piper*

Siguiendo la metodología descrita en el apartado del estudio fitoquímico de las especies del género *Piper* estudiadas, y según se comenta en dicho apartado 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).

Asimismo y siguiendo el criterio de similitud estructural, pasamos a describir la elucidación estructural de los nuevos metabolitos aislados de las cinco especies de *Piper* estudiadas en la presente Memoria.

- ❖ **F:** Flavonoides
- ❖ **A:** Amidas
- ❖ **AB:** Derivados del ácido benzoico
- ❖ **B:** Benzopiranos y Benzofuranos
- ❖ **AP:** Apocarotenos
- ❖ **T:** Terpenos
- ❖ **FP:** Fenilpropanoides
- ❖ **AG:** Ácidos grasos

## **5.1. Flavonoides**

## 5.1. Flavonoides

### 5.1.1. Resultados y discusión

Tras repetidas cromatografías del extracto de diclorometano de las hojas de *Piper delineatum*, *P. divaricatum*, *P. heterophyllum* y los frutos de *P. glabratrum*, como se indica en la parte experimental, hemos aislado treinta y seis flavonoides, que hemos denominado de **F1** a **F36**.

Los flavonoides aislados se agruparon en función del grado de oxidación del anillo C de benzo- $\gamma$ -pirona. Teniendo en cuenta esta consideración, los productos que hemos denominado **F1**, 2',4'-dihidroxi-3,6'-dimetoxi-chalcona<sup>1</sup> (**F2**), cardomomin<sup>2</sup> (**F3**), **F4**, **F5**, 2'-hidroxi-3,4',6'-trimetoxi-chalcona<sup>3</sup> (**F6**), **F7**, **F8**, **F9**, 2',3'-dihidroxi-4',6'-dimetoxi-chalcona<sup>4</sup> (**F10**), 3-hidroxi-helicrisetin<sup>5</sup> (**F11**), 3-metoxihelicrisetin<sup>6</sup> (**F12**) y 2',3,4-trihidroxi-4',6'-dimetoxi-chalcona<sup>7</sup> (**F13**), se caracterizan por poseer un esqueleto de chalcona; el producto denominado uvangoletín<sup>8</sup> (**F14**), tiene un esqueleto de dihidrochalcona; los productos **F15**, **F16**, **F17**, pinostrobin<sup>9</sup> (**F18**), pinocembrin<sup>2</sup> (**F19**), alpinetin<sup>2</sup> (**F20**), **F21**, (2S)-7,4'-dihidroxi-5,3'-dimetoxi-flavanona<sup>10</sup> (**F22**), **F23**, 5,7-dimetoxi-8-hidroxi-flavanona<sup>11</sup> (**F24**), isosakuranetina<sup>12</sup> (**F25**), sakuranetina<sup>12</sup> (**F26**) y 5,7,3'-trimetoxi-flavanona<sup>13</sup> (**F27**), corresponden a un esqueleto de

<sup>1</sup> Aponte, J. C.; Castillo, D.; Estevez, Y.; Gonzalez, G.; Arevalo, J.; Hammond, G. B.; Sauvain, M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2010**, 20, 100-103.

<sup>2</sup> Kuroyanagi, M.; Noro, T.; Fukushima, S.; Aiyama, R.; Ikuta, A.; Itokawa, H.; Morita, M. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1983**, 31, 1544-1550.

<sup>3</sup> Boumendjel, A.; Boccard, J.; Carrupt, P.-A.; Nicolle, E.; Blanc, M.; Geze, A.; Choisnard, L.; Wouessidjewe, D.; Matera, E.-L.; Dumontet, C. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2008**, 51, 2307-2310.

<sup>4</sup> Chantrapromma, K.; Rat-A-pa, Y.; Karalai, C.; Lojanapiwatana, V.; Seechammanurakit, V. *Phytochemistry*, **2000**, 53, 511-513.

<sup>5</sup> Vogel, S.; Ohmayer, S.; Brunner, G.; Heilmann, J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2008**, 16, 4286-4293.

<sup>6</sup> Vogel, S.; Barbic, M.; Jürgenliemk, G.; Heilmann, J. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2010**, 45, 2206-2213.

<sup>7</sup> Jun, N.; Hong, G.; Jun, K. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2007**, 15, 2396-2402.

<sup>8</sup> Hufford, C. D.; Oguntimein B. O. *Phytochemistry*. **1980**, 19, 2036-2038.

<sup>9</sup> Papotti, G.; Bertelli, D.; Plessi, M.; Rossi, M. C. *International Journal of Food Science and Technology*. **2010**, 45, 1610-1618.

<sup>10</sup> Leu, Y.-L.; Hwang, T.-L.; Chung, Y.-M.; Hong, P.-Y. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **2006**, 57, 1063-1066.

<sup>11</sup> Chantrapromma, K.; Seechammanurakit, V.; Pakawatchai, C.; Chantrapromma, S.; Chinnakali, K.; Fun, H.-K. *Acta Crystallographica*. **1998**, C54, i, IUC9800001/1-3.

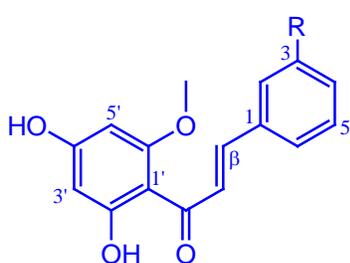
<sup>12</sup> Liu, Y.-L.; Ho, D. K.; Cassady, J. M. *Journal of Natural Products*. **1992**, 55, 357-363.

<sup>13</sup> Sekizaki, H. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. **1988**, 61, 1407-1409.

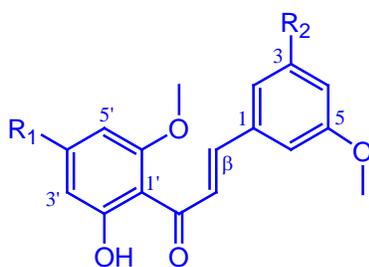
flavanona; los productos crisin<sup>9</sup> (F28), tectocrisin<sup>14</sup> (F29), genkwanina<sup>14</sup> (F30), 3'-hidroxigenkwanina<sup>15</sup> (F31) y velutin<sup>16</sup> (F32), presentan un esqueleto de flavona y los productos denominados galangin<sup>9</sup> (F33), kaempferida<sup>17</sup> (F34), 5,7-dihidroxi-3-metoxi-flavona<sup>18</sup> (F35) e isokaempferida<sup>18</sup> (F36), presentan un esqueleto de flavonol.

A continuación se presentan las estructuras de los flavonoides aislados de las especies de *Piper* antes citadas, agrupados en series según sus esqueletos base.

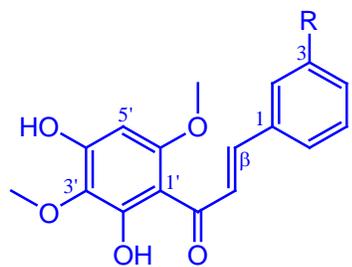
### Chalconas



**F1** R = OH  
**F2** R = OCH<sub>3</sub>  
**F3** R = H

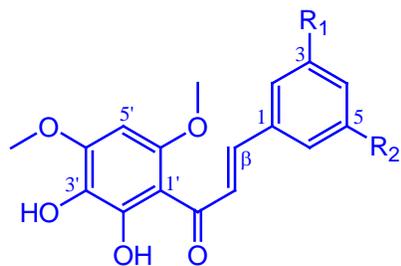


**F4** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OH  
**F5** R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH  
**F6** R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H

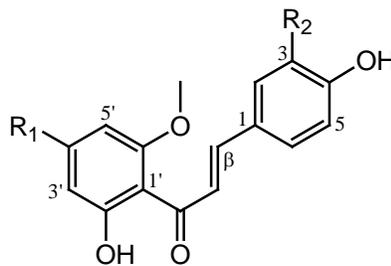


**F7** R = OH  
**F8** R = OCH<sub>3</sub>

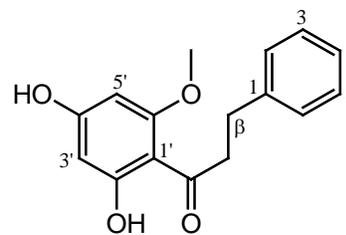
### Dihidrochalcona



**F9** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>  
**F10** R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H



**F11** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OH  
**F12** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>  
**F13** R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH



**F14**

<sup>14</sup> Park, Y.; Moon, B-H.; Yang, H.; Lee, Y.; Lee, E.; Lim, Y. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **2007**, 45, 1072-1075.

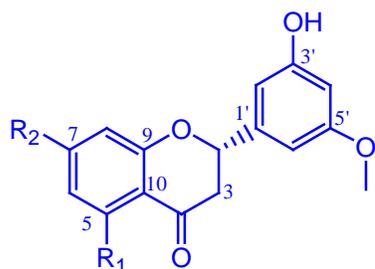
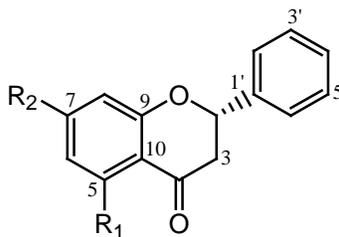
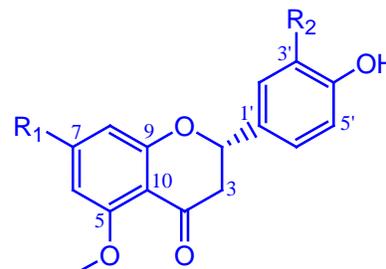
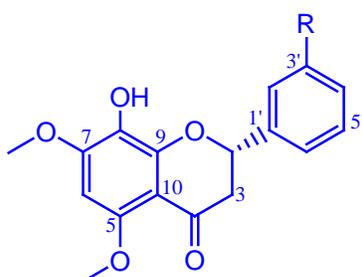
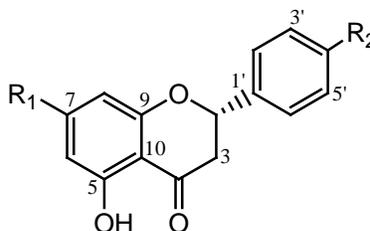
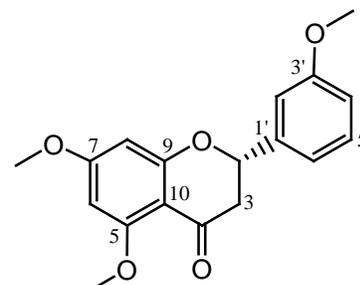
<sup>15</sup> Ahmad, V.U.; Ali, Z.; Zahid, M.; Alam, N.; Saba, N.; Khan, T.; Qaisar, M. Nisar, M. *Fitoterapia*. **2000**, 71, 84-85.

<sup>16</sup> Das, K. C.; Farmer, W. J.; Weinstein, B. *Journal of Organic Chemistry*. **1970**, 35, 3989-3990.

<sup>17</sup> Lee, E.; Moon, B-H.; Park, Y.; Hong, S.; Lee, S.; Lee, Y.; Lim, Y. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. **2008**, 29, 507-510.

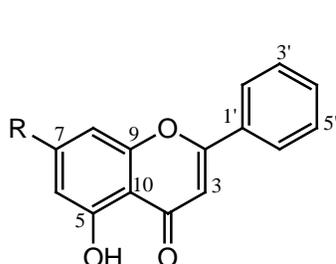
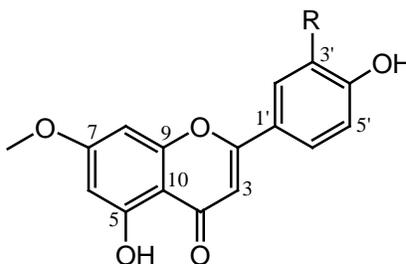
<sup>18</sup> Agrawal, P. K. *Carbon-13 NMR of Flavonoids*. Elsevier: Amsterdam. **1989**, 160-161.

## Flavanonas

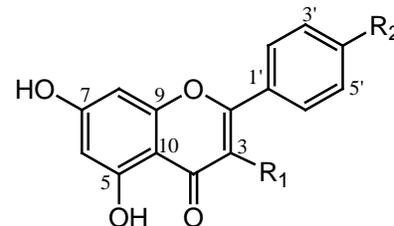
F15  $R_1 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 = \text{OH}$ F16  $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$ F17  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{OCH}_3$ F18  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{OCH}_3$ F19  $R_1 = R_2 = \text{OH}$ F20  $R_1 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 = \text{OH}$ F21  $R_1 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 = \text{OH}$ F22  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{OCH}_3$ F23  $R = \text{OCH}_3$ F24  $R = \text{H}$ F25  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{OCH}_3$ F26  $R_1 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 = \text{OH}$ 

F27

## Flavonas

F28  $R = \text{OH}$ F29  $R = \text{OCH}_3$ F30  $R = \text{H}$ F31  $R = \text{OH}$ F32  $R = \text{OCH}_3$ 

## Flavonoles

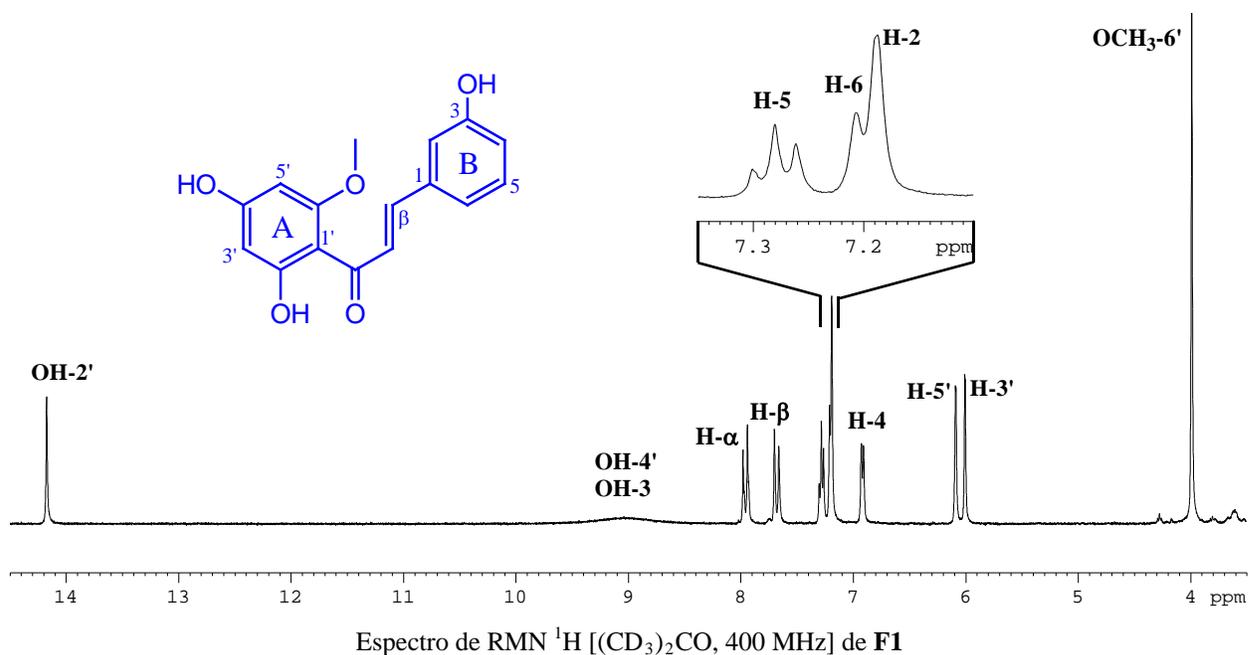
F33  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{H}$ F34  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{OCH}_3$ F35  $R_1 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 = \text{H}$ F36  $R_1 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 = \text{OH}$ 

A continuación pasamos a describir la elucidación estructural de los flavonoides aislados de las diferentes especies *Piper* que resultaron nuevos en la bibliografía química: **F1**, **F4**, **F5**, **F7**-**F9**, **F15**-**F17**, **F21** y **F23**.

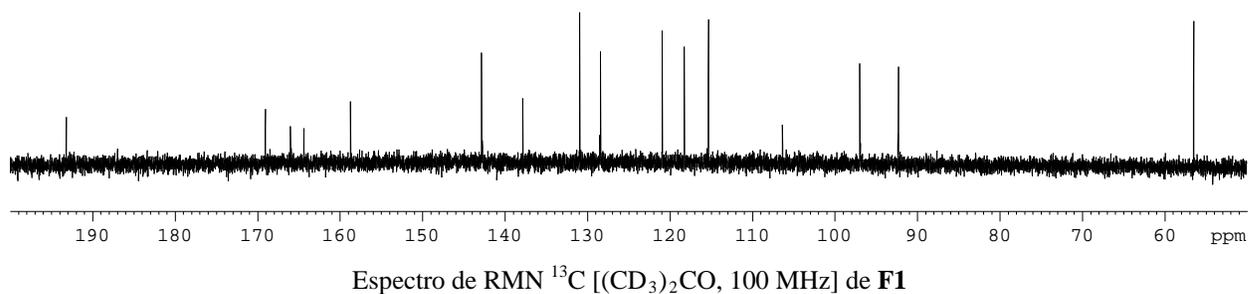
## Determinación estructural del producto F1

El producto que hemos denominado **F1** presentó una fórmula molecular de  $C_{16}H_{14}O_5$ , 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 ultravioleta se pueden distinguir dos bandas de absorción, una banda a 247 nm que corresponde a un anillo aromático y otra a 348 nm, correspondiente a carbonilo conjugado. En su espectro de IR se observaron bandas de absorción características de grupo hidroxilo ( $3376\text{ cm}^{-1}$ ), grupo carbonilo ( $1730\text{ cm}^{-1}$ ) y anillo aromático ( $1593, 802\text{ cm}^{-1}$ ). Estos datos sugieren una estructura de flavonoide para el compuesto F1.

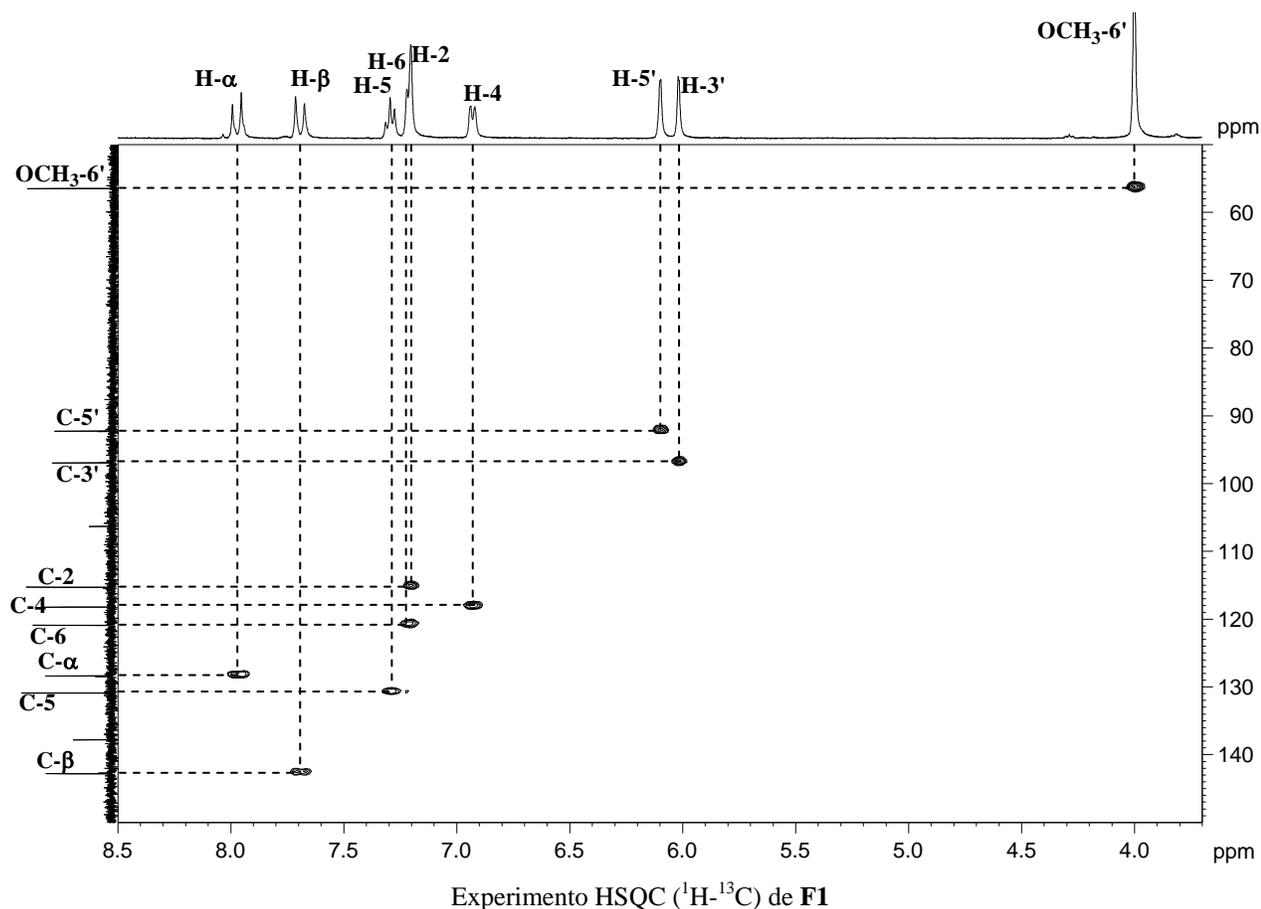
Su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  presentó dos sistemas de espín AB, el primero de ellos formado por dos dobletes a  $\delta_{\text{H}} 7.96$  ( $J= 15.6\text{ Hz}$ ) y  $7.68$  ( $J= 15.6\text{ Hz}$ ), característicos de los protones olefínicos H- $\alpha$  y H- $\beta$  del sistema  $C_3$  de chalcona, y el segundo formado por las señales a  $\delta_{\text{H}} 6.00$  ( $J= 1.6\text{ Hz}$ ) y  $6.08$  ( $J= 1.6\text{ Hz}$ ), que integran para un protón cada uno, lo que indica la presencia de dos protones aromáticos en posición *meta*, correspondientes a los protones H-3' y H-5' del anillo A del esqueleto de chalcona. Señales para cuatro protones aromáticos a  $\delta_{\text{H}} 7.19$  (H-2) como singulete, dos dobletes a  $\delta_{\text{H}} 6.91$  ( $J= 7.6\text{ Hz}$ , H-4) y  $7.20$  ( $J= 7.6\text{ Hz}$ , H-6) y un triplete a  $\delta_{\text{H}} 7.28$  ( $J= 7.6\text{ Hz}$ , H-5), indican un anillo B disustituido. Así mismo, se observó un singulete a  $\delta_{\text{H}} 3.99$ , correspondiente a un grupo metoxilo. Además, se observaron dos señales correspondientes a protones fenólicos a  $\delta_{\text{H}} 9.04$  (OH-3, OH-4') y  $14.17$  (OH-2'), 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 **F1**, es un flavonoide con esqueleto de chalcona, clase de metabolitos presente en las especies de *Piper*.



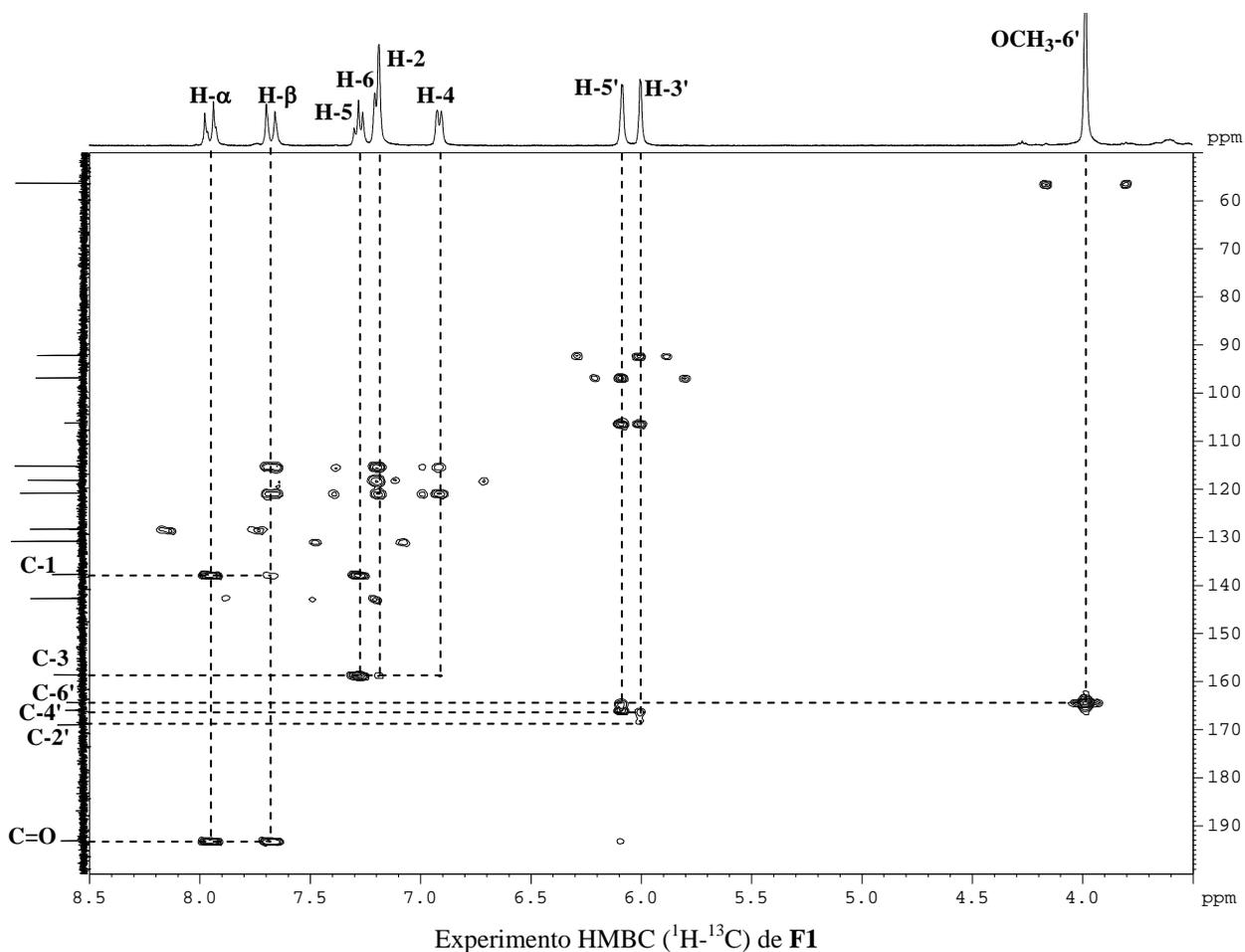
Los datos anteriores fueron confirmados en su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  y experimentos DEPT 90 y 135, en los que se observaron señales para 16 átomos de carbono, incluyendo un carbono metoxílico, ocho carbonos metínicos y siete carbonos cuaternarios. El conjunto de estas señales confirmaron la presencia en la molécula de dos anillos aromáticos y un sistema C<sub>3</sub> abierto, característico de una chalcona, destacando en su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  la señal correspondiente a un grupo carbonilo a  $\delta_{\text{C}}$  193.1 y dos carbonos olefínicos a  $\delta_{\text{C}}$  128.4 (C- $\alpha$ ) y 142.8 (C- $\beta$ ). Estos datos están de acuerdo con una estructura de chalcona para nuestro compuesto, que posee dos anillos aromáticos, uno tetrasustituido y otro disustituido, tres grupos fenólicos y un grupo 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. El 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 todas las señales correspondientes a los protones y carbonos existentes en la molécula.



Así, la regiosustitución en la molécula se determinó mediante un experimento HMBC, destacando las correlaciones de los protones del metoxilo a  $\delta_{\text{H}}$  3.99 y el protón a  $\delta_{\text{H}}$  6.08 (H-5') con el carbono cuaternario a  $\delta_{\text{C}}$  164.4 (C-6') y las correlaciones del protón a  $\delta_{\text{H}}$  6.00 (H-3') con los carbonos cuaternarios a  $\delta_{\text{C}}$  166.0 (C-4') y 169.0 (C-2'), lo que nos permitió establecer la estructura del anillo A de la molécula. Las correlaciones de los protones a  $\delta_{\text{H}}$  6.91 (H-4), 7.19 (H-2) y 7.28 (H-5) con el carbono C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  158.7), nos permitió establecer las características del anillo B, mientras que las correlaciones de los protones a  $\delta_{\text{H}}$  7.68 (H- $\beta$ ) y 7.96 (H- $\alpha$ ) con los carbonos  $\delta_{\text{C}}$  193.1 (C=O) y 137.8 (C-1), establecieron la cadena de C<sub>3</sub> y la unión de la misma con el anillo B.



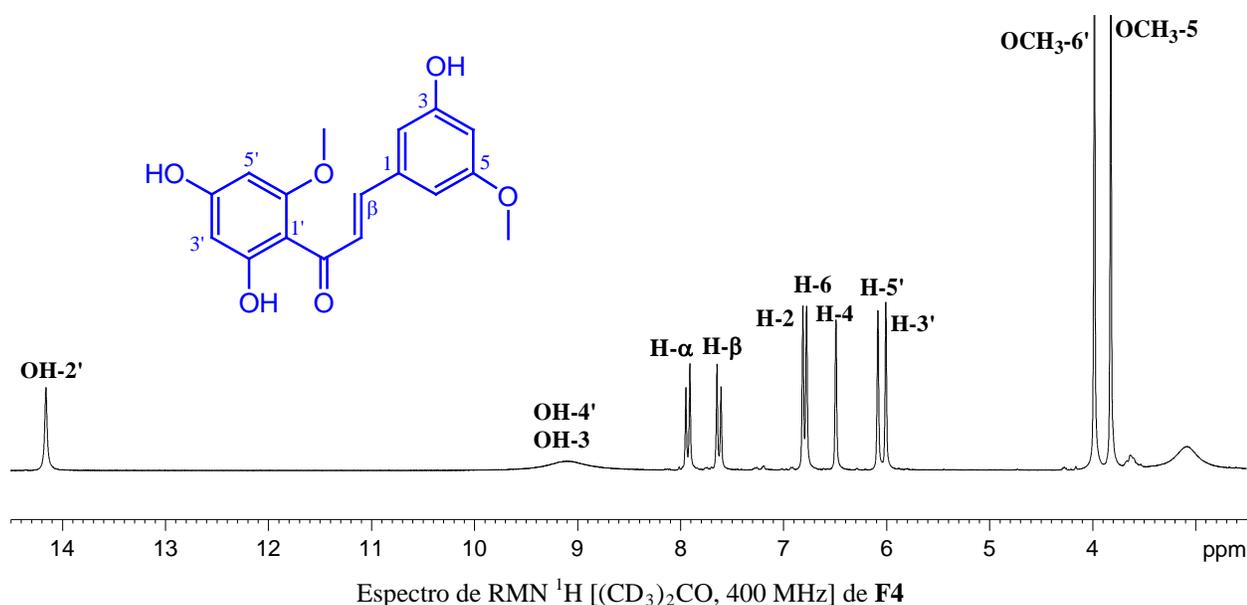
Estos datos y comparación con los datos en la bibliografía química de compuestos relacionados<sup>19</sup>, nos permitieron establecer la estructura de **F1** como **2',4',3-trihidroxi-6'metoxi-chalcona**.

#### Determinación estructural del producto **F4**

La estructura del compuesto que hemos denominado **F4** fue establecida mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos, tal como se muestra a continuación. Su fórmula molecular de  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6$ , fue determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución, fórmula que está de acuerdo con diez grados de insaturación en el compuesto.

<sup>19</sup> Ahmad, I.; Anis, I.; Malik, A.; Nawaz, S. A.; Choudhary, M. I. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **2003**, 51, 412-414.

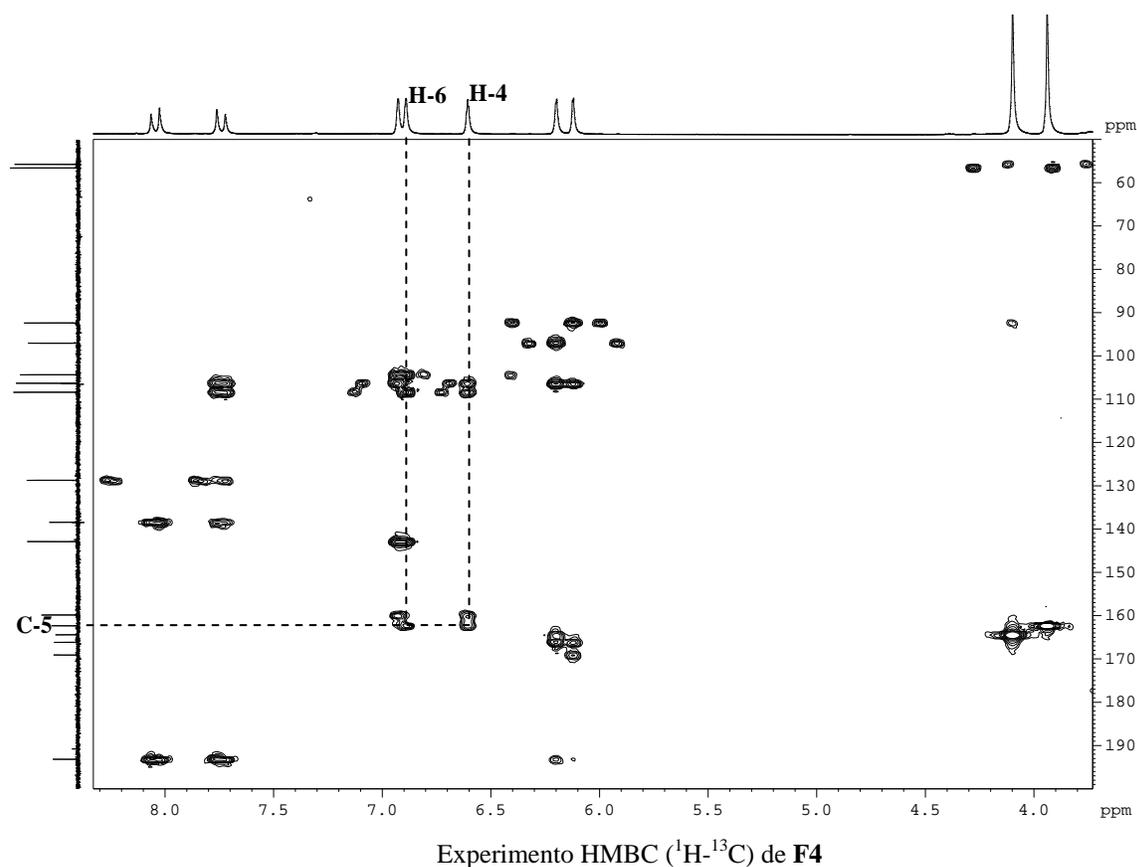
Su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  presentó señales correspondientes a dos sistemas de espín AB, el primero de ellos formado por dos dobletes a  $\delta_{\text{H}}$  7.93 ( $J= 15.5$  Hz) y 7.62 ( $J= 15.5$  Hz), asignables a los protones olefínicos H- $\alpha$  y H- $\beta$  del sistema  $\text{C}_3$  de una chalcona y el segundo formado por dos singuletes a  $\delta_{\text{H}}$  6.00 (H-3') y 6.08 (H-5'), lo que indica que los protones del anillo A aromático se encuentran en posición *meta*. Así mismo, se observaron señales para tres protones aromáticos como singuletes a  $\delta_{\text{H}}$  6.81 (H-2), 6.49 (H-4) y 6.77 (H-6), indicando un anillo B trisustituido y dos singuletes a  $\delta_{\text{H}}$  3.82 (OCH<sub>3</sub>-5) y 3.98 (OCH<sub>3</sub>-6'), correspondientes a dos grupos metoxilo.

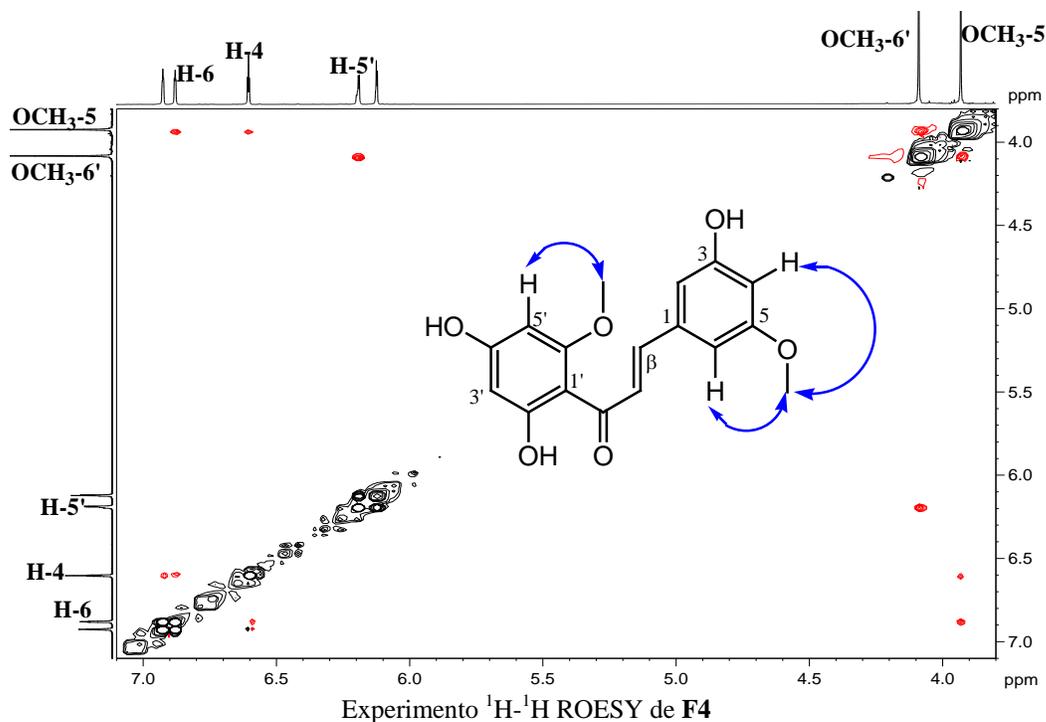


Los datos anteriores fueron confirmados en su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  y experimentos DEPT 90 y 135, en los que se observaron señales para 17 átomos de carbonos: dos carbonos correspondientes a grupos metoxilo, siete carbonos metínicos y ocho carbonos cuaternarios. El conjunto de estas señales confirmaron la presencia en la molécula de dos anillos aromáticos y un sistema  $\text{C}_3$  abierto, característico de una chalcona, destacando en su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  la señal correspondiente a un carbonilo a  $\delta_{\text{C}}$  193.1, y dos carbonos metínicos a  $\delta_{\text{C}}$  128.6 (C- $\alpha$ ) y 142.8 (C- $\beta$ ).

Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **F4** y **F1** mostró que ambos productos estaban relacionados, siendo la principal diferencia la presencia de la señal correspondiente al metoxilo sobre C-5 ( $\delta_H$  3.82,  $\delta_C$  162.2) y la desaparición de la señal correspondiente al protón aromático H-5 ( $\delta_H$  7.28) presente en **F1**.

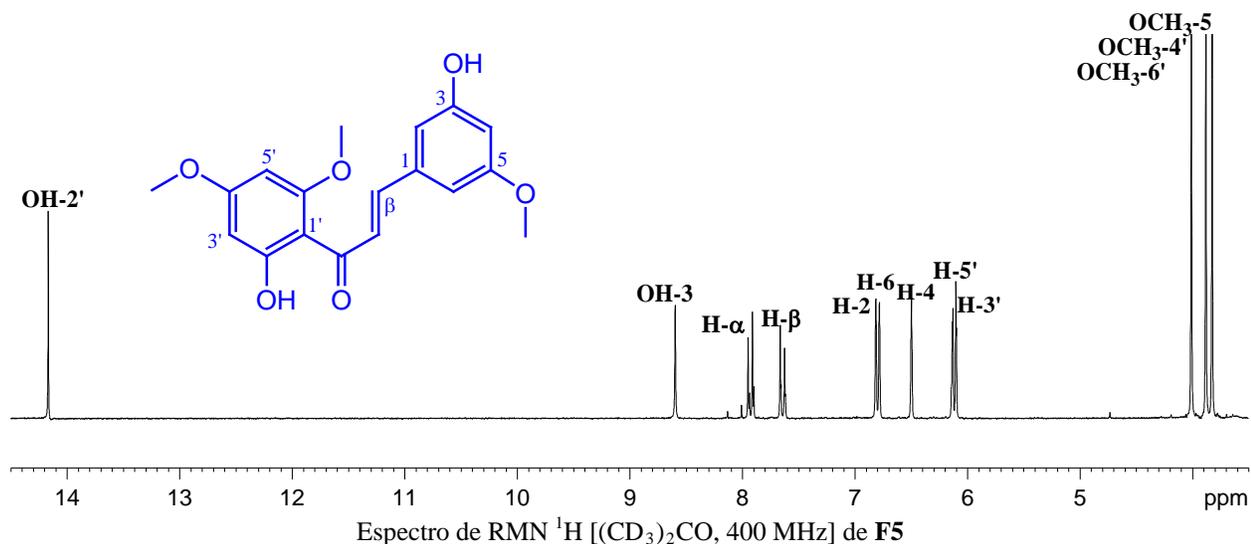
Un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales, homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC), nos permitió establecer la posición de los diferentes grupos en la molécula, confirmando la estructura propuesta. Así, se determinó la regiosustitución del grupo metoxilo sobre C-5 mediante las correlaciones observadas en un experimento HMBC de la señal a  $\delta_H$  3.82, asignada al grupo metoxilo, y las señales correspondientes a H-4 y H-6 con el carbono C-5. Ello fue confirmado en el experimento ROESY, en el que se observó efecto ROE del grupo metoxilo con H-4 y H-6, quedando así fijada la estructura del producto **F4** como **2',4',3-trihidroxi-6',5-dimetoxi-chalcona**.

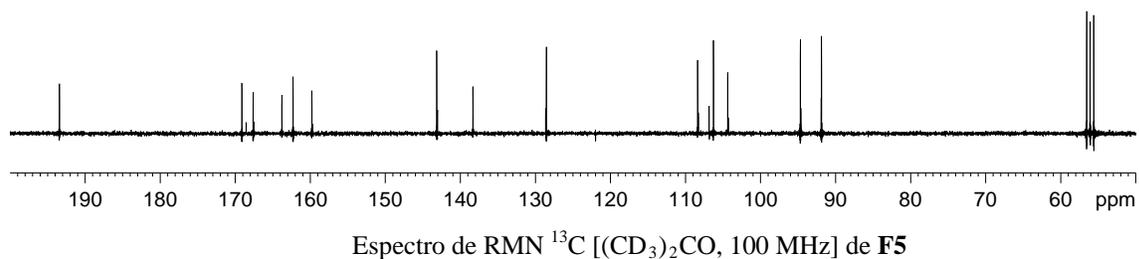




### Determinación estructural del producto F5

El producto que hemos denominado **F5** presentó una fórmula molecular de  $C_{18}H_{18}O_6$ , determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución. El estudio de los datos físicos y espectroscópicos mostró que estaba relacionado con **F4**, siendo la principal diferencia en su espectro de RMN  $^1H$  la presencia de una señal correspondiente a un grupo metoxilo a  $\delta_C$  167.6 y la desaparición de un OH fenólico, lo que por otro parte se confirmó en su espectro de RMN  $^{13}C$ .





Un cuidadoso 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 del compuesto **F5** como: **2',3-dihidroxi-4',6',5-trimetoxi-chalcona**.

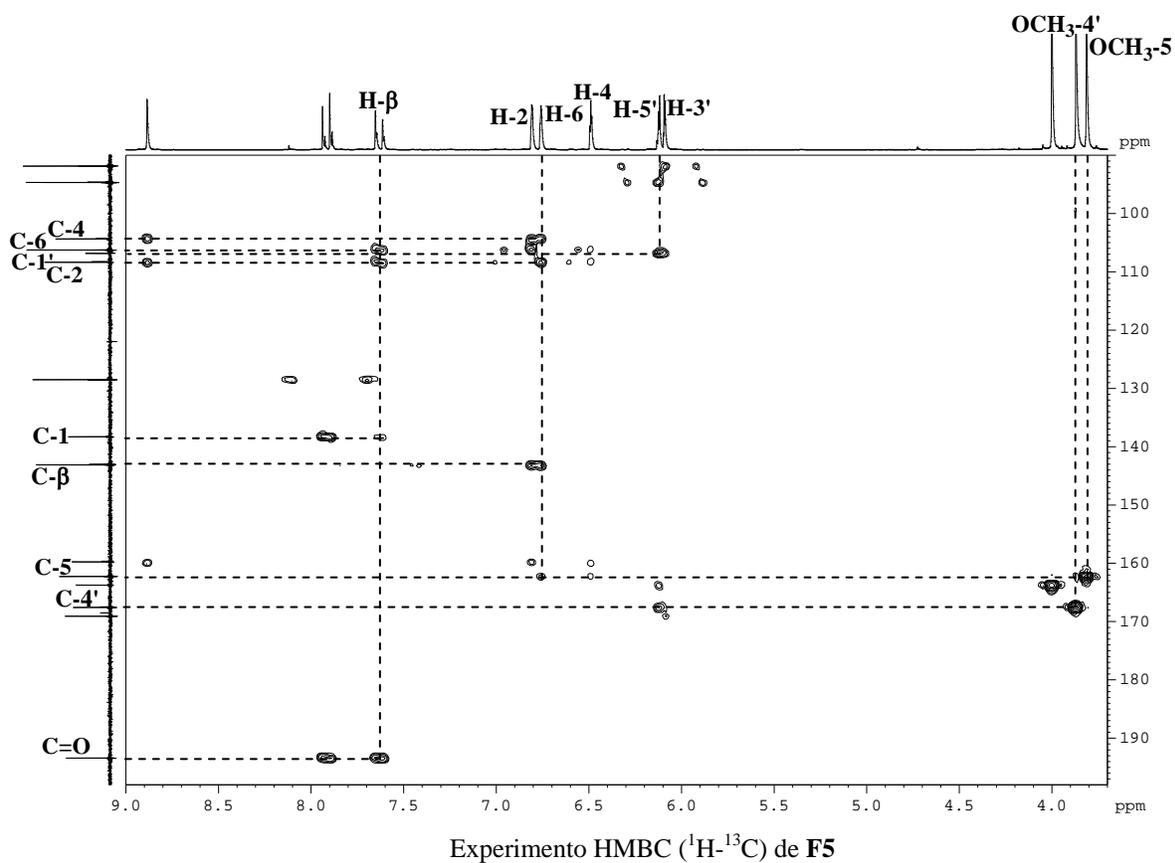


Tabla 3. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) de F1, F4 y F5.

Posición	F1	F4	F5
H-2	7.19 s	6.81 s	6.81 s
H-4	6.91 d (7.6)	6.49 s	6.50 s
H-5	7.28 t (7.6)		
H-6	7.20 d (7.6)	6.77 s	6.78 s
H- $\alpha$	7.96 d (15.6)	7.93 d (15.5)	7.93 d (15.7)
H- $\beta$	7.68 d (15.6)	7.62 d (15.5)	7.64 d (15.7)
H-3'	6.00 d (1.6)	6.00 s	6.10 s
H-5'	6.08 d (1.6)	6.08 s	6.13 s
OCH <sub>3</sub> -5		3.82 s	3.82 s
OCH <sub>3</sub> -4'			3.88 s
OCH <sub>3</sub> -6'	3.99 s	3.98 s	4.01 s
OH-2'	14.17 s	14.16 s	14.16 s
OH-4'	9.04 s <sub>a</sub> *	9.10 s <sub>a</sub> *	
OH-3	9.04 s <sub>a</sub> *	9.10 s <sub>a</sub> *	8.60 s

<sup>a</sup>  $\delta$ , (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO. *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 (100 MHz) de F1, F4 y F5.

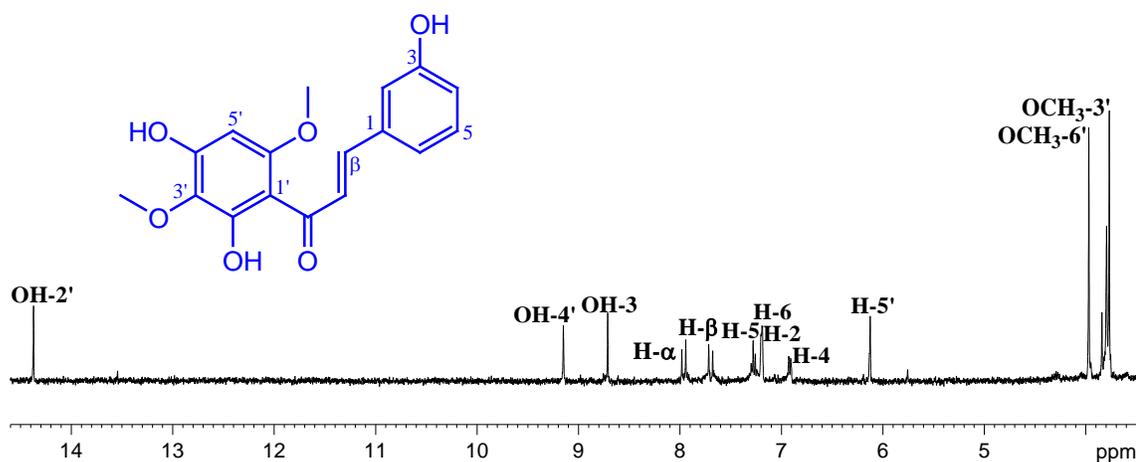
Posición	F1	F4	F5
C-1	137.8 s	138.4 s	138.3 s
C-2	115.3 d	108.3 d	108.4 d
C-3	158.7 s	159.8 s	159.8 s
C-4	118.2 d	104.3 d	104.4 d
C-5	131.0 d	162.2 s	162.3 s
C-6	121.0 d	106.2 d	106.3 d
C=O	193.1 s	193.1 s	193.4 s
C- $\alpha$	128.4 d	128.6 d	128.6 d
C- $\beta$	142.8 d	142.8 d	143.2 d
C-1'	106.3 s	106.3 s	106.9 s
C-2'	169.0 s	169.0 s	169.1 s
C-3'	97.0 d	97.0 d	94.7 d
C-4'	166.0 s	166.1 s	167.6 s
C-5'	92.3 d	92.3 d	91.9 d
C-6'	164.4 s	164.3 s	163.8 s
OCH <sub>3</sub> -5		55.6 c	55.6 c
OCH <sub>3</sub> -4'			56.1 c
OCH <sub>3</sub> -6'	56.5 c	56.4 c	56.6 c

<sup>a</sup>  $\delta$ , (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO. Datos basados en los experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

## Determinación estructural del producto F7

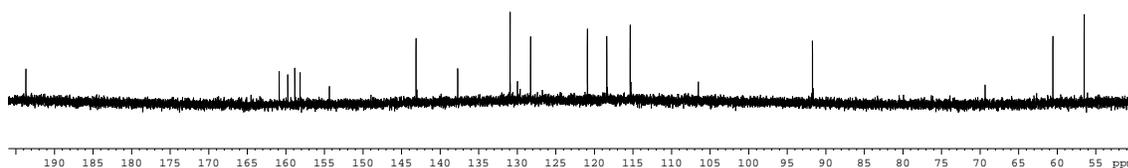
El producto que hemos denominado **F7** presentó una fórmula molecular de  $C_{17}H_{16}O_6$ , determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución, fórmula que está de acuerdo con diez grados de insaturación en el compuesto. En su espectro de ultravioleta se puede distinguir una banda de absorción a 351 nm correspondiente a carbonilo conjugado. En su espectro de IR se observaron bandas de absorción características de grupo hidroxilo ( $3358\text{ cm}^{-1}$ ), grupo carbonilo ( $1726\text{ cm}^{-1}$ ) y de anillo aromático ( $1586, 792\text{ cm}^{-1}$ ).

Su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  presentó señales de un sistema de espín AB, formado por dos dobletes a  $\delta_{\text{H}}$  7.96 ( $J= 15.6\text{ Hz}$ ) y 7.69 ( $J= 15.6\text{ Hz}$ ), asignables a los protones olefínicos H- $\alpha$  y H- $\beta$  del sistema  $C_3$  de una chalcona y un singulete a  $\delta_{\text{H}}$  6.12, asignable al protón aromático H-5' del anillo A de una chalcona. Señales para cuatro protones aromáticos, formado por un singulete a  $\delta_{\text{H}}$  7.19 (H-2), dos dobletes a  $\delta_{\text{H}}$  6.92 ( $J= 8.5\text{ Hz}$ , H-4) y 7.20 ( $J= 6.8\text{ Hz}$ , H-6) y un triplete a  $\delta_{\text{H}}$  7.29 ( $J= 8.0\text{ Hz}$ , H-5), indican un anillo aromático disustituido. Así mismo, se observaron dos singuletes a  $\delta_{\text{H}}$  3.76 ( $\text{OCH}_3$ -3') y 3.97 ( $\text{OCH}_3$ -6'), correspondientes a dos grupos metoxilos. Además, se observaron tres singuletes correspondientes a protones fenólicos a  $\delta_{\text{H}}$  8.76 (OH-3), 9.20 (OH-4') y 14.39 (OH-2'), intercambiables con agua deuterada, éste último característico de un grupo fenólico en disposición *sin* periplanar a un grupo carbonilo. Estos datos indican que el producto **F7**, es un flavonoide con esqueleto de chalcona, con un anillo A pentasustituido y un anillo B disustituido.

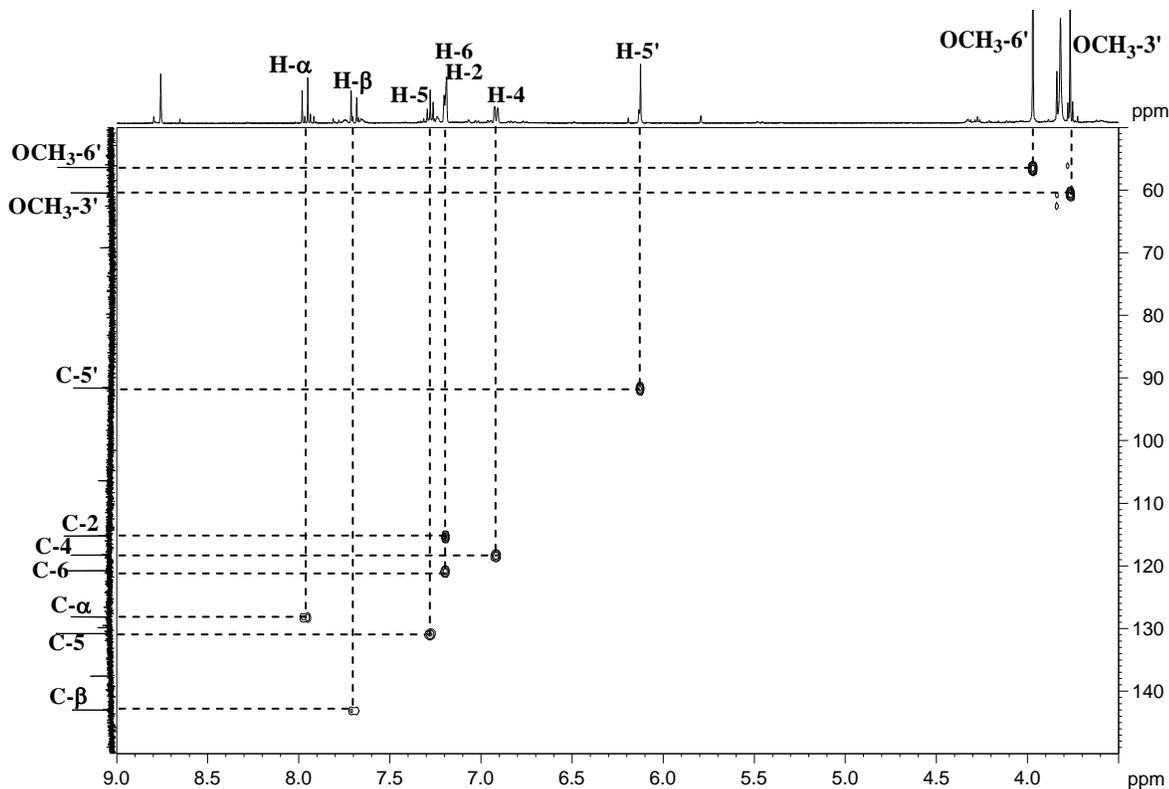


Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [ $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 400 MHz] de **F7**

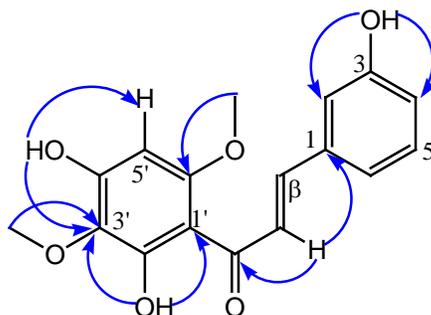
Los datos anteriores fueron confirmados en su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  y experimentos DEPT 90 y 135, en los que se observaron señales para 17 átomos de carbono, incluyendo, dos carbonos de grupos metoxilo, siete carbonos metínicos y ocho carbonos cuaternarios. El conjunto de estas señales confirmaron la presencia en la molécula de dos anillos aromáticos y un sistema  $\text{C}_3$  abierto, característico de una chalcona, destacando en su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  la señal correspondiente a un carbonilo a  $\delta_{\text{C}}$  193.7 y dos carbonos metínicos a  $\delta_{\text{C}}$  128.2 (C- $\alpha$ ) y 143.1 (C- $\beta$ ).

Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  [ $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 100 MHz] de **F7**

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 **F7**

Así, la regiosustitución en la molécula se determinó mediante un experimento HMBC, destacando las correlaciones de los protones de los metoxilo a  $\delta_H$  3.76 y 3.97 con los carbonos a  $\delta_C$  130.0 (C-3') y 159.7 (C-6'), respectivamente. Asimismo, se observaron correlaciones de los protones fenólicos a  $\delta_H$  14.39 (OH-2') con los carbonos cuaternarios a  $\delta_C$  106.5 (C-1') y 130.0 (C-3') y correlación de la señal a  $\delta_H$  9.20 (OH-4') con los carbonos C-5' ( $\delta_C$  91.7) y C-3', que permitieron establecer la estructura del anillo A en la molécula. La correlación de la señal a  $\delta_H$  8.76 (OH-3) con los carbonos a  $\delta_C$  115.3 (C-2) y 118.4 (C-4) confirmaron la regiosustitución en el anillo B, mientras que las correlaciones de los protones a  $\delta_H$  7.69 (H- $\beta$ ) y 7.96 (H- $\alpha$ ) con los carbonos a  $\delta_C$  193.7 (C=O) y 137.7 (C-1) nos permitieron determinar la cadena de C<sub>3</sub> y la unión de la misma con el anillo B.

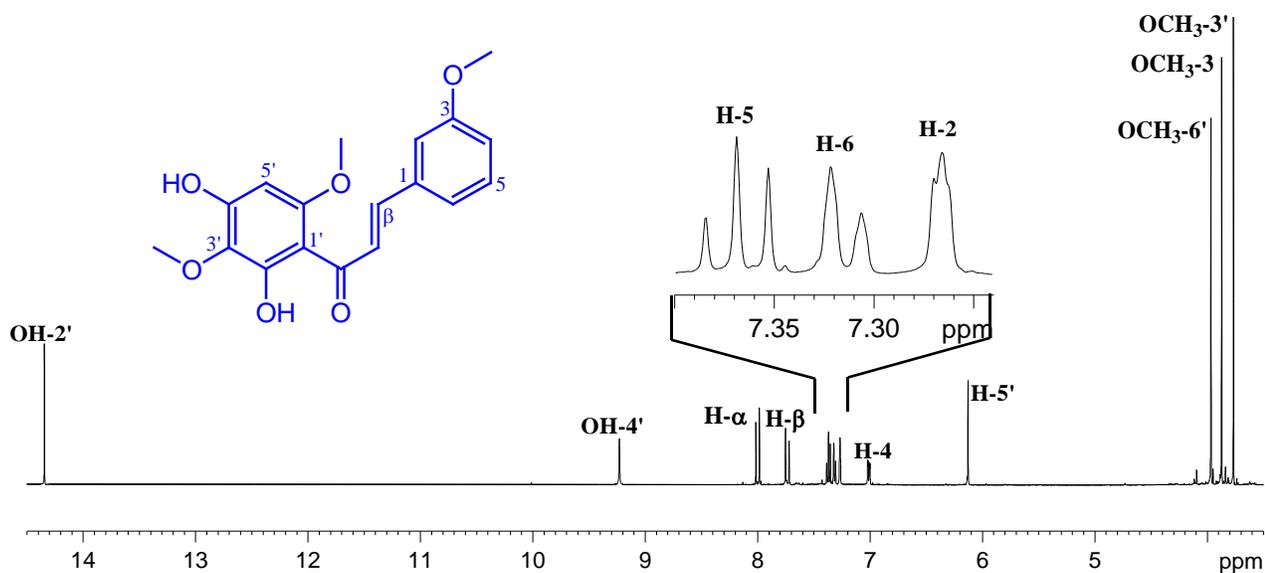
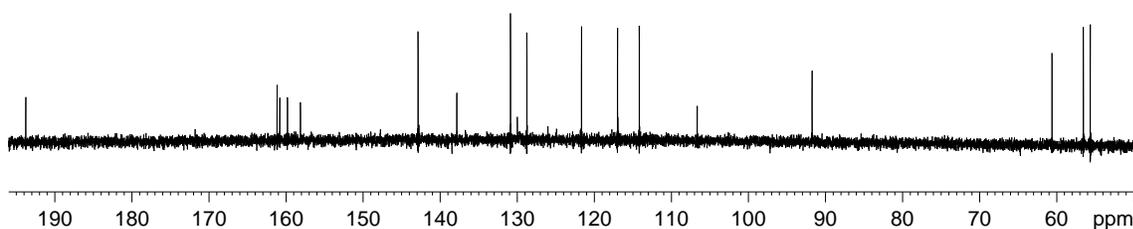


Correlaciones observadas en el experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **F7**

Estos datos y comparación con los datos en la bibliografía química de compuestos relacionados<sup>19</sup>, nos permitieron establecer la estructura de **F-7** como **2',4',3-trihidroxi-3',6'-dimetoxi-chalcona**.

### Determinación estructural del producto **F8**

El producto que hemos denominado **F8** presentó una fórmula molecular de C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución. El estudio de los datos físicos y espectroscópicos mostró que estaba relacionado con **F7**, siendo la principal diferencia en su espectro de RMN  $^1\text{H}$ , la presencia de una señal correspondiente a un grupo metoxilo adicional a  $\delta_C$  55.6 y la desaparición de un OH fenólico ( $\delta_H$  8.76), lo que por otro parte se confirmó en su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ .

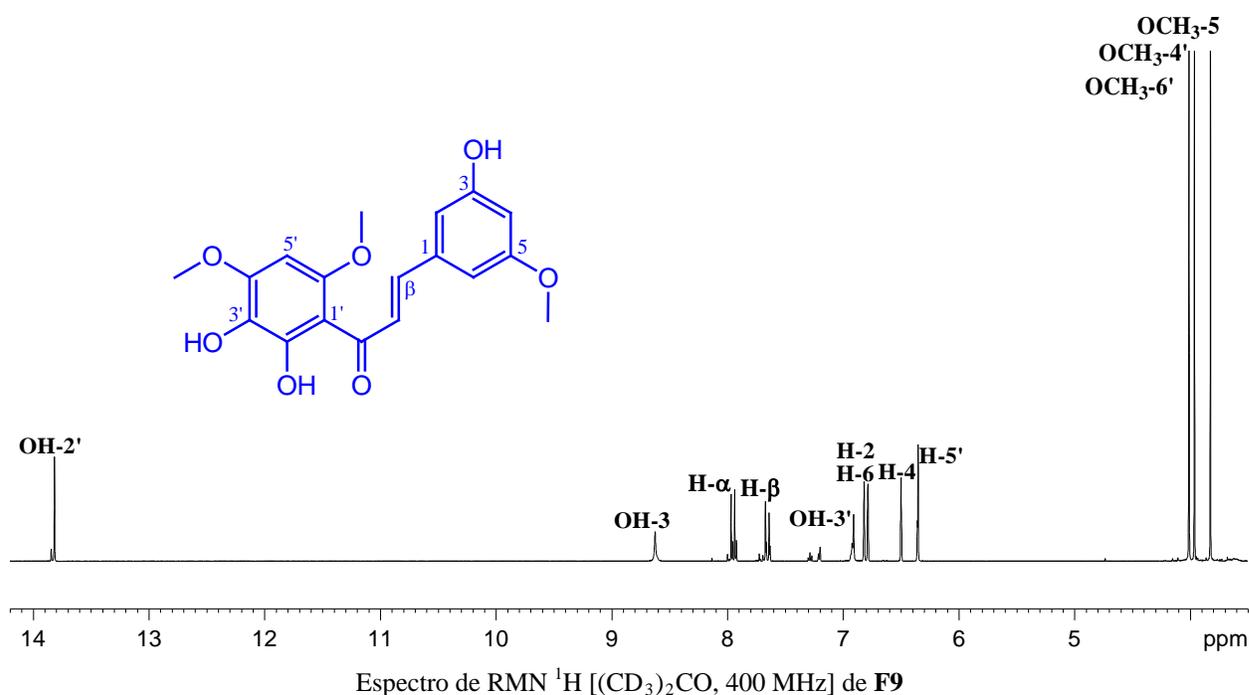
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [ $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 400 MHz] de **F8**Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  [ $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 100 MHz] de **F8**

Un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales, homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC), nos permitió la asignación de las señales de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y establecer la posición de los diferentes grupos en la molécula, confirmando la estructura del compuesto **F8** como: **2',4',3-trihidroxi-3',6'-dimetoxi-chalcona**.

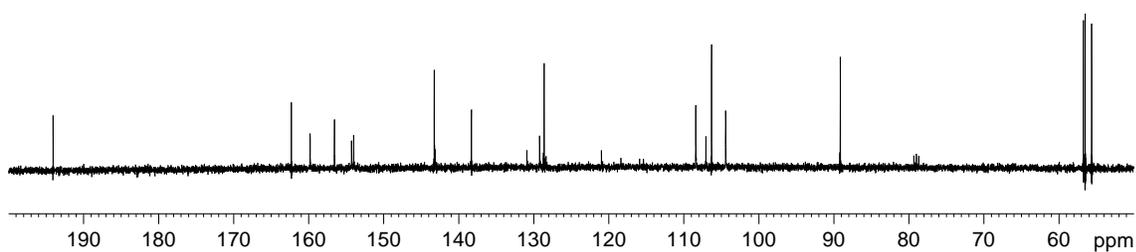
### Determinación estructural del producto **F9**

La estructura del compuesto que hemos denominado **F9** fue establecida mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos, tal como se describe a continuación. Su fórmula molecular  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_7$ , fue determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución, fórmula que está de acuerdo con diez grados de insaturación en el compuesto.

Su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  presentó señales correspondientes a un sistema de espín AB formado por dos dobletes a  $\delta_{\text{H}}$  7.95 ( $J= 15.6$  Hz) y 7.65 ( $J= 15.6$  Hz), asignables a los protones olefínicos H- $\alpha$  y H- $\beta$  de un sistema  $\text{C}_3$  de chalcona, un singulete a  $\delta_{\text{H}}$  6.35 (H-5') asignable al anillo A aromático y señales para tres protones aromáticos a  $\delta_{\text{H}}$  6.50 (t,  $J= 2.0$  Hz, H-4), 6.82 (s, H-2) y 6.78 (s, H-6), indicando un anillo B trisustituido con una sustitución *meta* de dichos protones. Así mismo, se observaron tres singuletes a  $\delta_{\text{H}}$  3.82 ( $\text{OCH}_3$ -5), 3.96 ( $\text{OCH}_3$ -4') y 4.01 ( $\text{OCH}_3$ -6'), correspondiente a tres grupos metoxilo y una señal a  $\delta_{\text{H}}$  13.81, intercambiable con agua deuterada, característico de un grupo fenólico en disposición *sin* periplanar a un grupo carbonilo.



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 18 átomos de carbonos: tres carbonos correspondientes a grupos metoxílico, seis carbonos metínicos y nueve carbonos cuaternarios. El conjunto de estas señales confirmaron la presencia en la molécula de dos anillos aromáticos, uno de ellos pentasustituido y otro trisustituido y un sistema  $\text{C}_3$  abierto, característico de una chalcona, destacando en su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  la señal correspondiente a un carbonilo a  $\delta_{\text{C}}$  194.1 y dos carbonos metínicos a  $\delta_{\text{C}}$  128.6 (C- $\alpha$ ) y 143.3 (C- $\beta$ ).

Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  [ $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 100 MHz] de **F9**

Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **F9** y **F5** mostró que ambos productos estaban relacionados, siendo la principal diferencia la presencia de un OH fenólico adicional a  $\delta_{\text{H}}$  6.91 sobre C-3' ( $\delta_{\text{C}}$  129.2) y la desaparición de la señal que corresponde a un protón aromático H-3' ( $\delta_{\text{H}}$  6.10) presente en **F5**.

Un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales, homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC), nos permitió confirmar la posición de los diferentes grupos en la molécula, quedando así establecida la estructura del producto **F9** como **2',3',3-trihidroxi-4',6',5-trimetoxi-chalcona**.

Tabla 5. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) de F7, F8 y F9.

Posición	F7	F8	F9
H-2	7.19 s	7.27 d (2.4)	6.82 s
H-4	6.92 d (8.0)	7.01 dd (2.4, 8.0)	6.50 t (2.0)
H-5	7.29 t (8.0)	7.37 t (8.0)	
H-6	7.20 d (8.0)	7.31 d (8.0)	6.78 s
H- $\alpha$	7.96 d (15.6)	7.99 d (15.5)	7.95 d (15.6)
H- $\beta$	7.69 d (15.6)	7.73 d (15.5)	7.65 d (15.6)
H-5'	6.12 s	6.13 s	6.35 s
OCH <sub>3</sub> -3		3.87 s	
OCH <sub>3</sub> -5			3.82 s
OCH <sub>3</sub> -3'	3.76 s	3.77 s	
OCH <sub>3</sub> -4'			3.96 s
OCH <sub>3</sub> -6'	3.97 s	3.97 s	4.01 s
OH-3	8.76 s		8.62 s <sub>a</sub>
OH-2'	14.39 s	14.34 s	13.81 s
OH-3'			6.91 s
OH-4'	9.20 s	9.22 s	

<sup>a</sup>  $\delta$ , (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO. *J* en paréntesis en Hz. Datos basados en los experimentos COSY y HSQC.

Tabla 6. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz) de F7, F8 y F9.

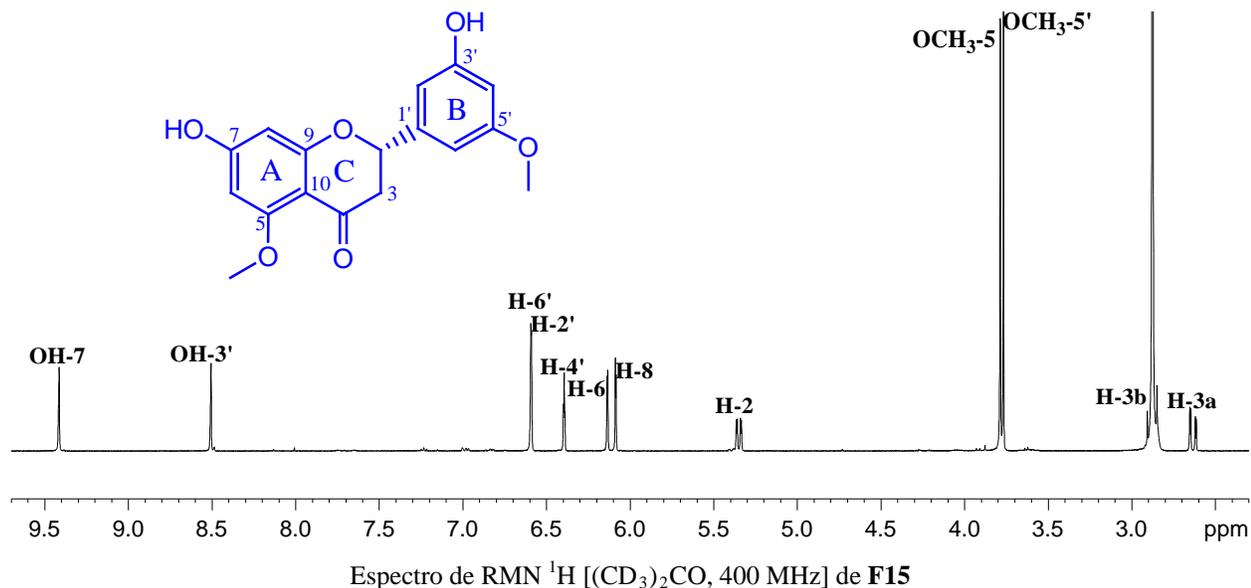
Posición	F7	F8	F9
C-1	137.7 s	137.8 s	138.3 s
C-2	115.3 d	114.2 d	108.4 d
C-3	158.8 s	161.1 s	159.8 s
C-4	118.4 d	117.0 d	104.4 d
C-5	130.9 d	130.9 d	162.3 s
C-6	120.9 d	121.7 d	106.3 d
C=O	193.7 s	193.7 s	194.1 s
H- $\alpha$	128.2 d	128.8 d	128.6 d
H- $\beta$	143.1 d	142.9 d	143.3 d
C-1'	106.5 s	106.6 s	107.1 s
C-2'	160.8 s	160.8 s	154.0 s
C-3'	130.0 s	130.0 s	129.2 s
C-4'	158.1 s	158.1 s	154.3 s
C-5'	91.7 d	91.7 d	89.2 d
C-6'	159.7 s	159.8 s	156.6 s
OCH <sub>3</sub> -3		55.6 c	
OCH <sub>3</sub> -5			55.6 c
OCH <sub>3</sub> -3'	60.6 c	60.6 c	
OCH <sub>3</sub> -4'			56.5 c
OCH <sub>3</sub> -6'	56.5 c	56.5 c	56.7 c

<sup>a</sup>  $\delta$ , (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO. Datos basados en los experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

## Determinación estructural del producto F15

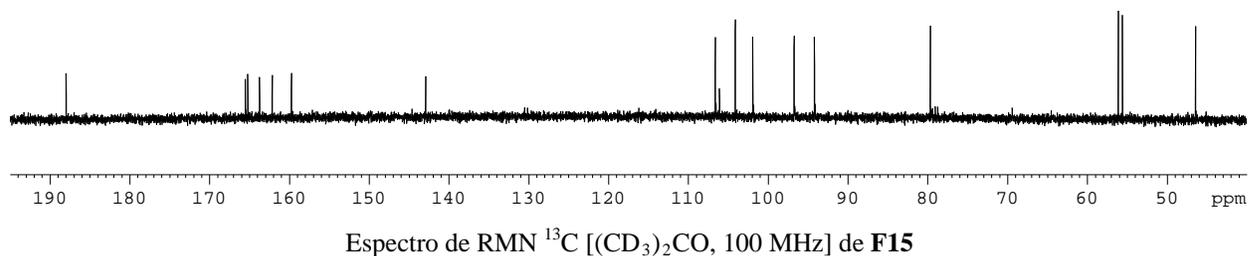
El producto que hemos denominado **F15** presentó una fórmula molecular de  $C_{17}H_{16}O_6$ , determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución, fórmula que está de acuerdo con diez grados de insaturación en el compuesto. En su espectro de UV se pueden distinguir dos bandas de absorción, a 226 nm, característico de anillo aromático y a 284 nm, asignable a carbonilo conjugado. En su espectro de IR se observaron bandas de absorción características de grupo hidroxilo ( $3432\text{ cm}^{-1}$ ), grupo carbonilo ( $1729\text{ cm}^{-1}$ ) y anillo aromático ( $1605, 828\text{ cm}^{-1}$ ).

Su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  presentó señales de un sistema de espín  $AX_2$ , correspondiente a un doble doblete a  $\delta_H$  5.35 ( $J= 3.1$  y  $12.4$  Hz) asignado a un protón oximetínico (H-2), acoplado con dos doble dobletes a  $\delta_H$  2.63 ( $J= 3.1$  y  $16.3$  Hz) y 2.88 ( $J= 12.4$  y  $16.3$  Hz), que integran para un protón cada uno, asignables a protones metilénicos (H-3). Asimismo, se observaron señales para cinco protones en la región aromática del espectro, dos de ellos formando un sistema de espín AB ( $\delta_H$  6.14 y 6.09,  $J= 2.1$  Hz) asignables a los protones aromáticos H-6 y H-8 en posición *meta* y dos singuletes ( $\delta_H$  6.59, H-2' y 6.60, H-6') y un triplete ( $\delta_H$  6.40,  $J= 2.2$  Hz, H-4'), que indicaron un anillo 1',3',5'-trisustituido. Señales correspondientes a dos singuletes a  $\delta_H$  3.77 ( $\text{OCH}_3$ -5') y 3.79 ( $\text{OCH}_3$ -5) indican la presencia en la molécula de dos grupos metoxilo, mientras que las señales a  $\delta_H$  8.51 (OH-3') y 9.41 (OH-7), intercambiables con agua deuterada, sugieren dos protones fenólicos.

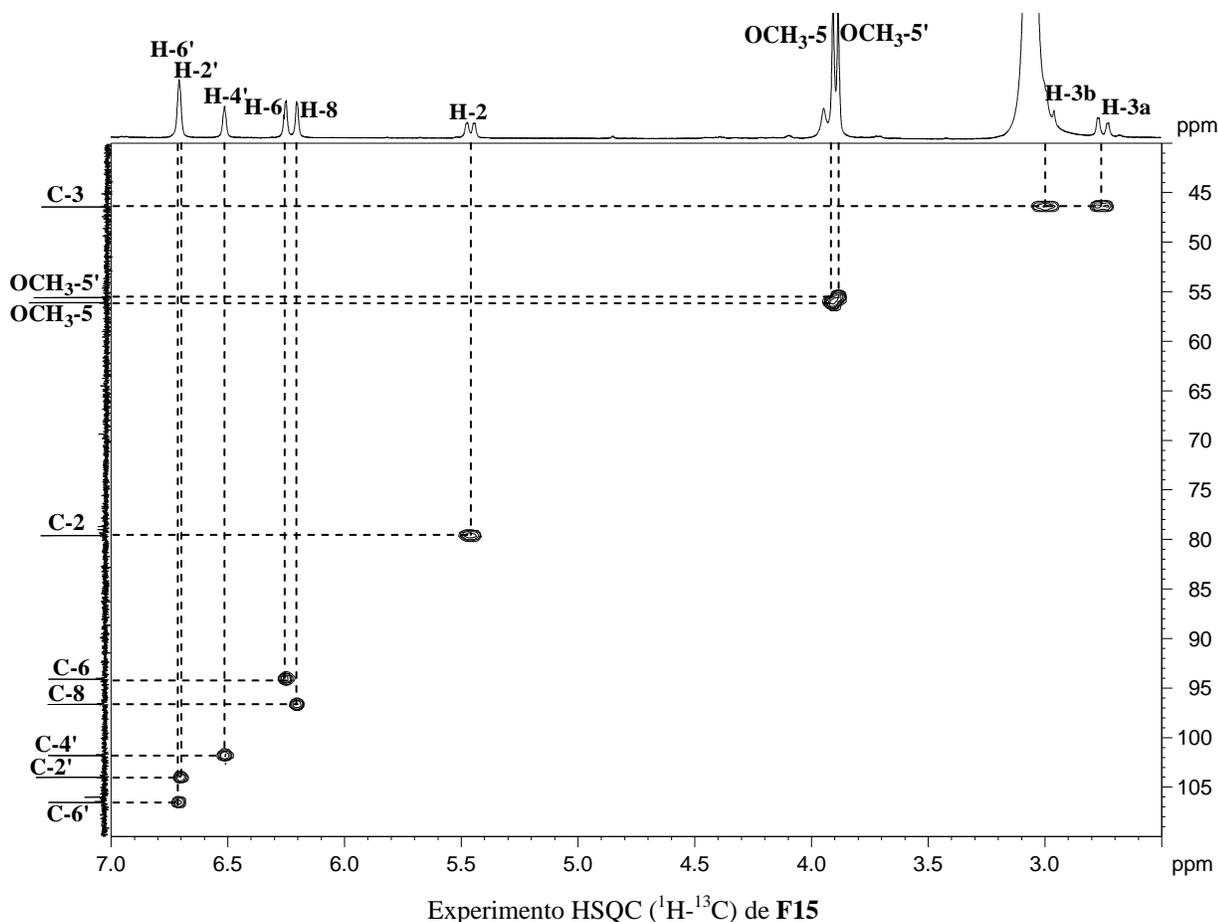


Estos datos sugieren una estructura de flavonoide con esqueleto de flavanona para el compuesto **F15**, que posee dos anillos aromáticos, uno tetrasustituido y otro trisustituido, dos grupos fenólicos y dos grupos metoxilo.

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, incluyendo dos carbonos correspondientes a grupos metoxilo, 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 sistema  $\text{C}_3$  cerrado, destacando en su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  la señal correspondiente a un carbonilo a  $\delta_{\text{C}}$  187.9 (C=O), un carbono oximetínico a  $\delta_{\text{C}}$  79.6 (C-2) y un carbono metilénico a  $\delta_{\text{C}}$  46.4 (C-3).

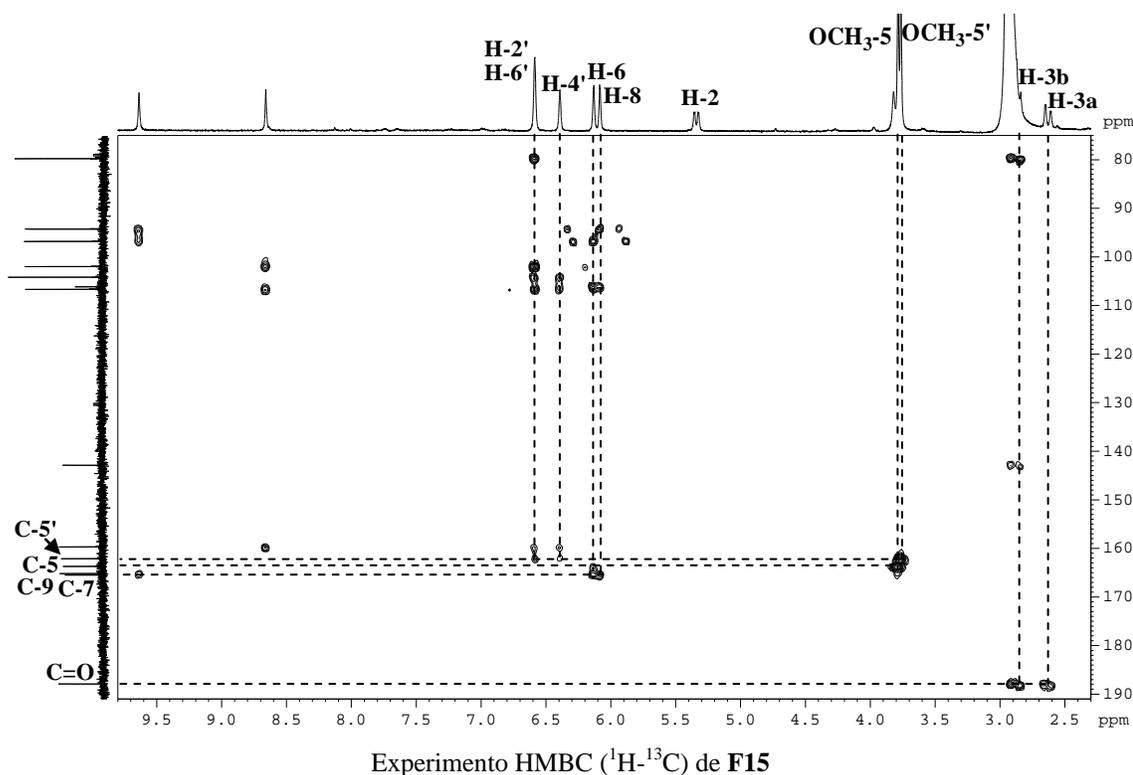


El estudio de los experimentos bidimensionales, homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC), nos permitió establecer la posición de los diferentes grupos en la molécula, confirmando la estructura propuesta. El estudio de los experimentos bidimensionales,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC) nos permitieron la asignación de todas las señales correspondientes a los protones y carbonos existentes en la molécula.



Así, la regiosustitución en la molécula se determinó mediante un experimento HMBC, destacando las correlaciones de los protones del metoxilo a  $\delta_{\text{H}}$  3.79 y el protón a  $\delta_{\text{H}}$  6.14 (H-6) con el carbono cuaternario a  $\delta_{\text{C}}$  163.7 (C-5), y las correlaciones del protón a  $\delta_{\text{H}}$  6.09 (H-8) con los carbonos cuaternarios a  $\delta_{\text{C}}$  165.2 (C-7) y 165.5 (C-9), lo que nos permitió confirmar la estructura del anillo A de la molécula. Las correlaciones de los protones a  $\delta_{\text{H}}$  2.63 y 2.88 (H-3) con el carbono C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  187.9), establecieron las características del anillo C, mientras que las correlaciones de los protones a  $\delta_{\text{H}}$  6.40 (H-4') y  $\delta_{\text{H}}$  6.60 (H-6') y el metoxilo a  $\delta_{\text{H}}$  3.77 con el carbono cuaternario a  $\delta_{\text{C}}$  162.1 (C-5'), confirmaron las características de sustitución del anillo B.

Estos datos y comparación con los datos en la bibliografía química de compuestos relacionados<sup>19</sup>, nos permitieron establecer la estructura de **F15** como **7,3'-dihidroxi-5,5'-dimetoxi-flavanona**.



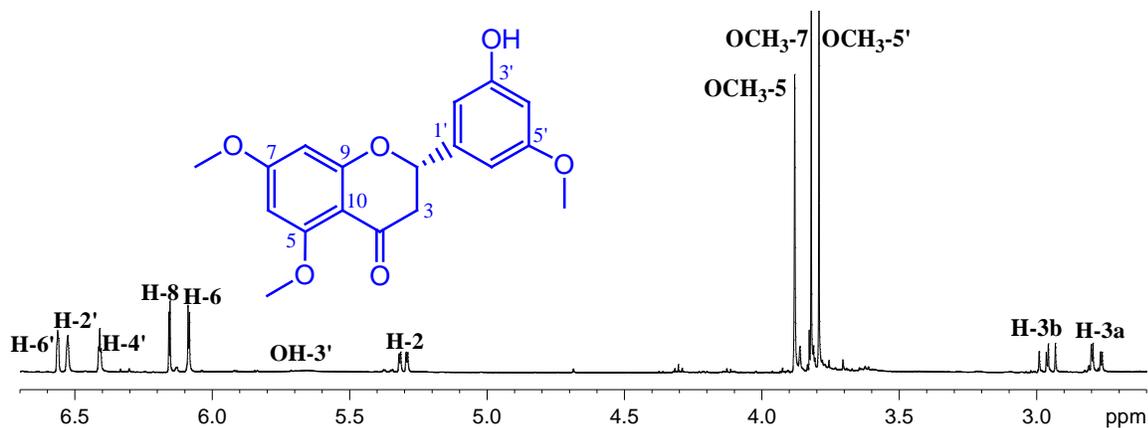
### Determinación estructural del producto **F16**

La estructura del compuesto que hemos denominado **F16** fue establecida mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos, tal como se muestra a continuación. Su fórmula molecular de  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_6$ , fue determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución, fórmula que está de acuerdo con diez grados de insaturación en el compuesto.

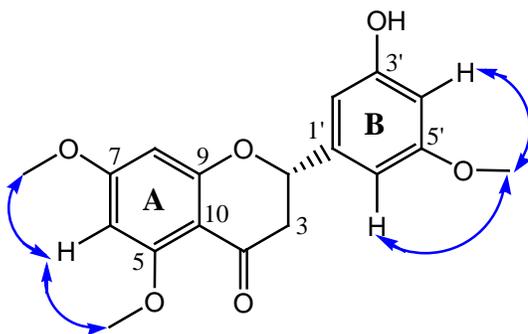
Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de **F16** y **F15** mostró que ambos productos estaban relacionados, siendo la principal diferencia la presencia de la señal correspondiente al metoxilo a  $\delta_{\text{H}}$  3.82 sobre C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  166.3) y la desaparición de la señal correspondiente a un hidroxilo fenólico OH-7 ( $\delta_{\text{H}}$  9.41) presente en **F15**.

Un cuidadoso 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. Así, se determinó la

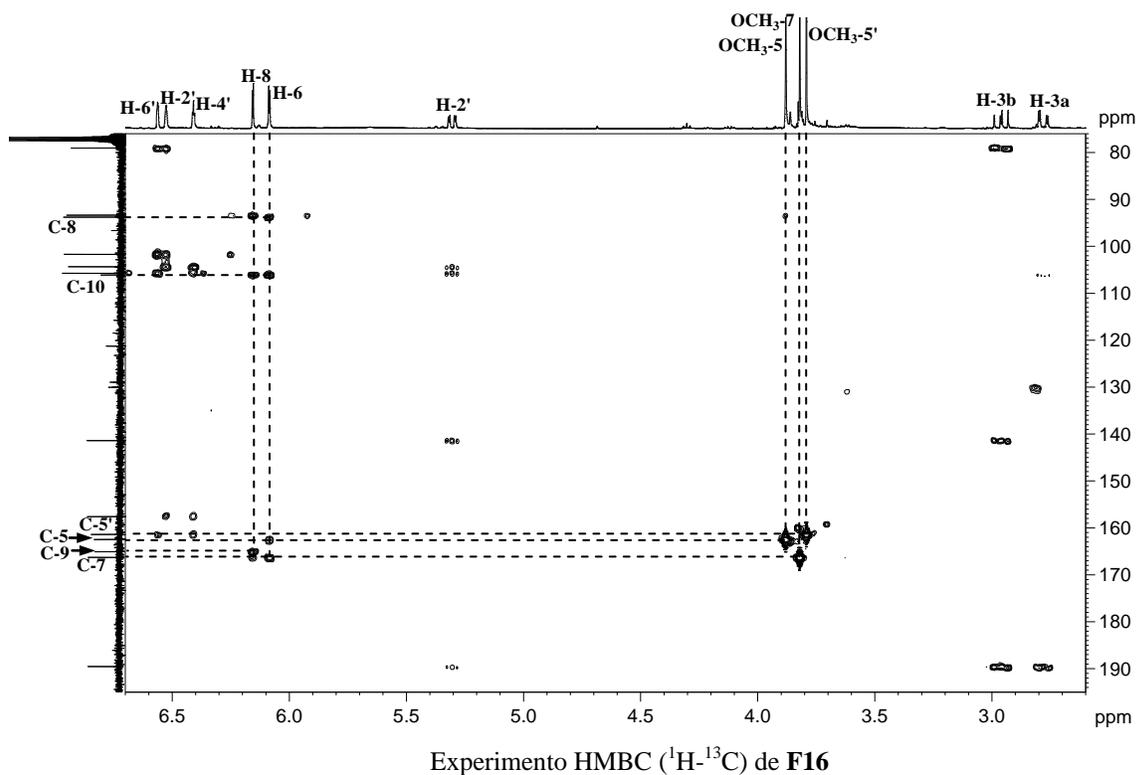
regiosustitución de un grupo metoxilo sobre C-5 mediante las correlaciones observadas en un experimento HMBC de la señal del grupo metoxilo a  $\delta_H$  3.88 con el carbono C-5, correlación del protón H-6 ( $\delta_H$  6.08) con los carbonos cuaternarios C-5 ( $\delta_C$  162.5), C-7 ( $\delta_C$  166.3), C-10 ( $\delta_C$  106.0) y C-8 ( $\delta_C$  93.8) y las correlaciones del protón a  $\delta_H$  6.15 (H-8) con los carbonos C-7 ( $\delta_C$  166.3) y C-9 ( $\delta_C$  165.1). Ello fue confirmado en el experimento ROESY donde se observó efecto ROE de las señales de los OCH<sub>3</sub>-5 y OCH<sub>3</sub>-7 con el protón aromático H-6 del anillo A y efecto ROE de la señal del OCH<sub>3</sub>-5' con H-4' y H-6' del anillo B trisustituido, confirmando la regiosustitución de los grupos metoxilo en la molécula. La estructura del producto **F16** quedó así establecida como: **3'-hidroxi-5,7,5'-trimetoxi-flavanona**.



Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de **F16**



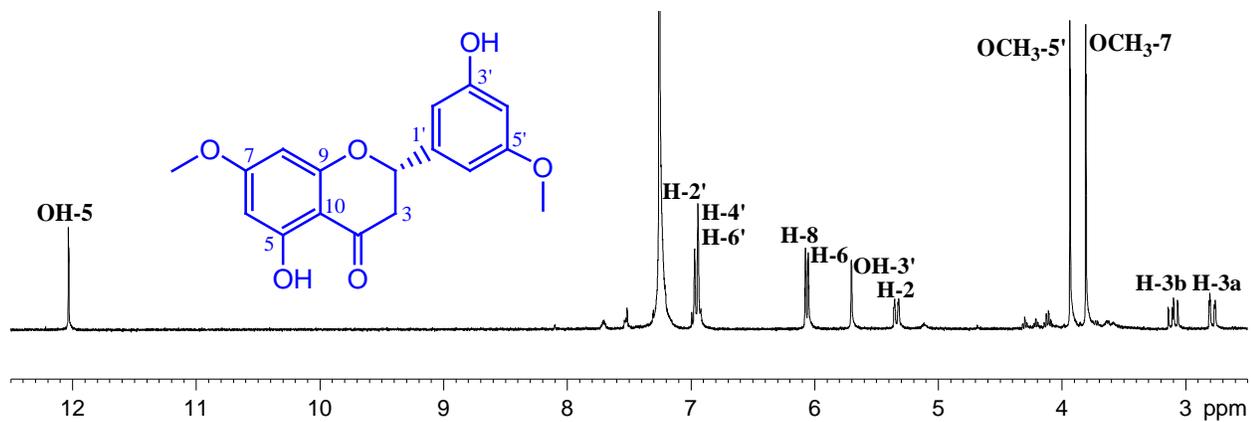
Efectos ROE (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H) observados en el experimento ROESY para **F16**



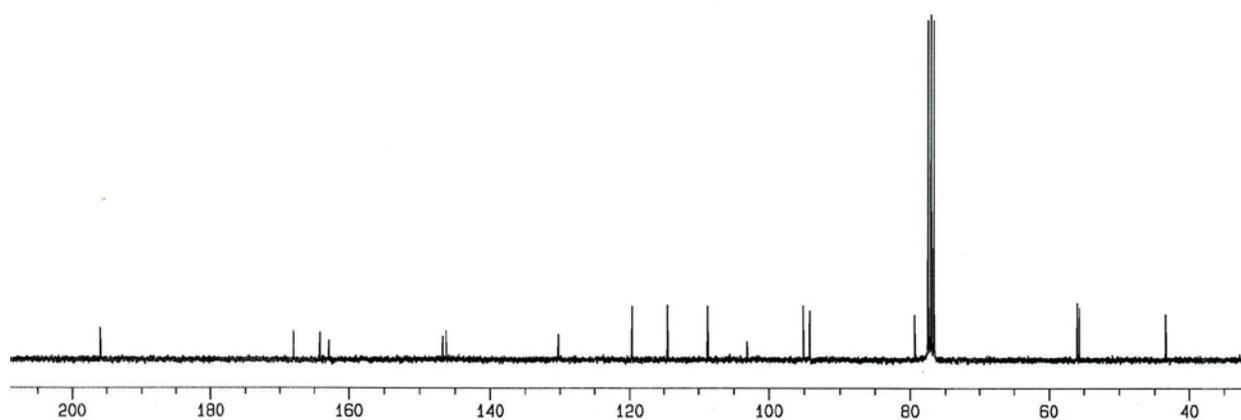
### Determinación estructural del producto **F17**

El producto que hemos denominado **F17** presentó una fórmula molecular de  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6$ , determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución. El estudio de los datos físicos y espectroscópicos mostró que estaba relacionado con **F16**, así la principal diferencia en su espectro de RMN  $^1\text{H}$ , es la presencia de un OH fenólico adicional situado sobre C-5 a  $\delta_{\text{C}}$  164.1 y la desaparición de la señal correspondiente al grupo metoxilo, lo que por otro parte se confirmó en su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ .

Un cuidadoso 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 del compuesto **F17** como: **5, 3'-dihidroxi-7,5'-dimetoxi-flavanona**.



Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de F17



Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) de F17

Tabla 7. Datos de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) de F15, F16 y F17.

Posición	F15 <sup>a</sup>	F16 <sup>b</sup>	F17 <sup>b</sup>
H-2	5.35 dd (3.1, 12.4)	5.30 dd (3.0, 13.0)	5.34 dd (3.0, 13.0)
H-3a	2.63 dd (3.1, 16.3)	2.78 dd (3.0, 16.6)	2.78 dd (3.0, 17.1)
H-3b	2.88 dd (12.4, 16.3)	2.96 dd (13.0, 16.6)	3.10 dd (13.0, 17.1)
H-6	6.14 d (2.1)	6.08 d (2.3)	6.05 d (1.9)
H-8	6.09 d (2.1)	6.15 d (2.3)	6.06 d (1.9)
H-2'	6.59 s	6.53 s	6.97 s
H-4'	6.40 t (2.2)	6.40 t (2.2)	6.95 s*
H-5'			
H-6'	6.60 s	6.56 s	6.95 s*
OCH <sub>3</sub> -5	3.79 s	3.88 s	
OCH <sub>3</sub> -7		3.82 s	3.81 s
OCH <sub>3</sub> -5'	3.77 s	3.79 s	3.94 s
OH-7	9.41 s		
OH-3'	8.51 s	5.66 s <sub>a</sub>	5.73 s
OH-5			12.03 s

<sup>a</sup> δ, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, <sup>b</sup> δ, CDCl<sub>3</sub>. *J* en paréntesis en Hz. Datos basados en los experimentos COSY y HSQC.  
\*Señales solapadas.

Tabla 8. Datos de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz) de F15, F16 y F17.

Posición	F15 <sup>a</sup>	F16 <sup>b</sup>	F17 <sup>b</sup>
C-2	79.6 d	79.1 d	79.3 d
C-3	46.4 t	45.7 t	43.4 t
C=O	187.9 s	189.5 s	195.9 s
C-5	163.7 s	162.5 s	164.1 s
C-6	94.1 d	93.4 d	95.1 d
C-7	165.2 s	166.3 s	168.0 s
C-8	96.7 d	93.8 d	94.2 s
C-9	165.5 s	165.1 s	162.8 s
C-10	106.0 s	106.0 s	103.1 s
C-1'	142.9 s	141.4 s	130.2 s
C-2'	104.1 d	105.7 d	108.8 d
C-3'	159.7 s	157.6 s	146.2 s
C-4'	101.9 d	101.7 d	114.5 d
C-5'	162.1 s	161.4 s	146.8 d
C-6'	106.6 d	104.3 d	119.6 d
OCH <sub>3</sub> -5	56.1 c	56.3 c	
OCH <sub>3</sub> -7		55.8 c	55.7 c
OCH <sub>3</sub> -5'	55.6 c	55.6 c	56.0 c

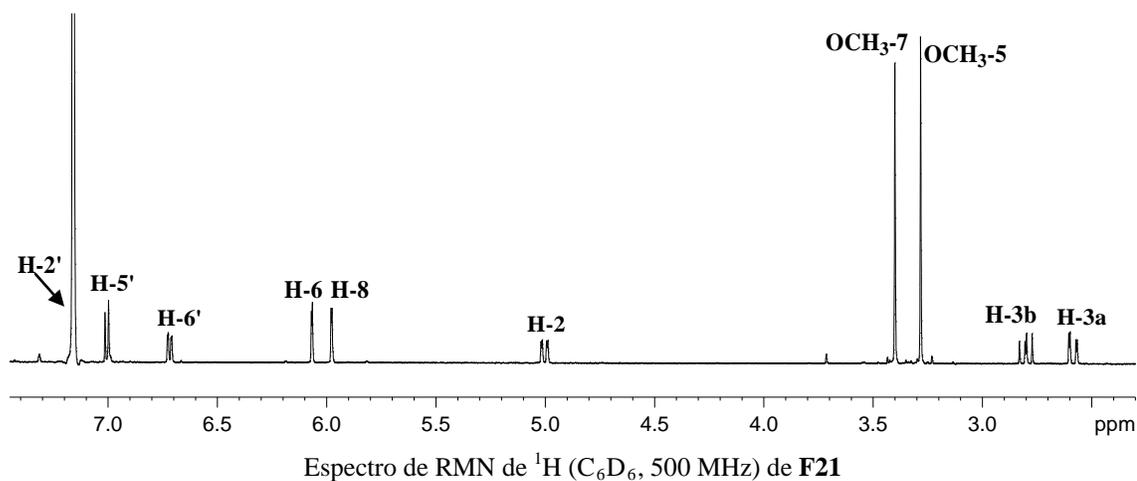
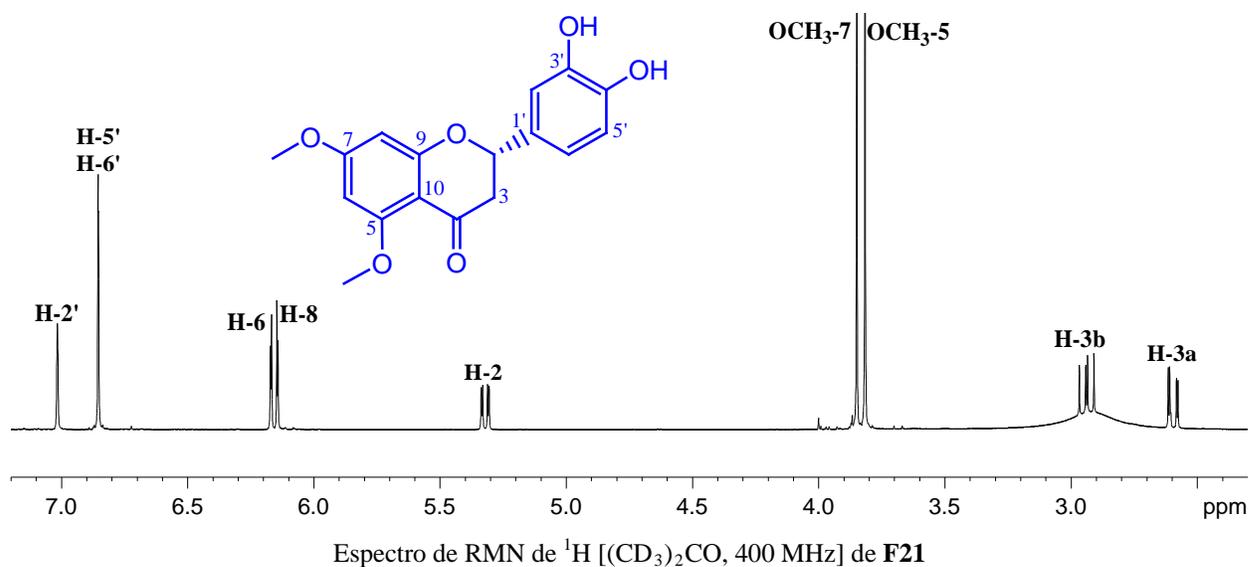
<sup>a</sup> δ, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, <sup>b</sup> δ, CDCl<sub>3</sub>. Datos basados en los experimentos DEPT, HSQC y HMBC.  
\*Señales solapadas.

## Determinación estructural del producto F21

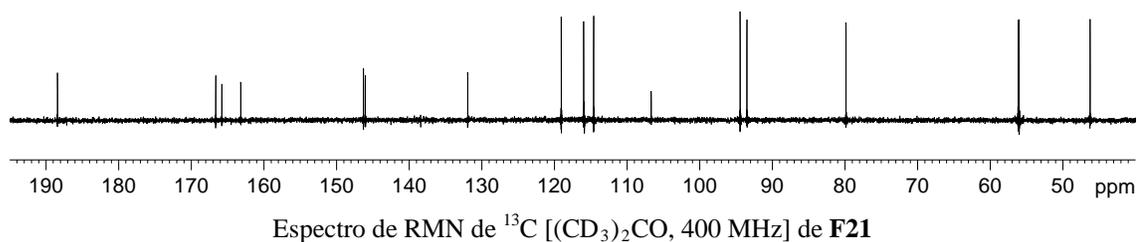
La estructura del compuesto que hemos denominado **F21** fue establecida mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos, tal como se muestra a continuación. Su fórmula molecular de  $C_{17}H_{16}O_6$ , fue determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución, fórmula que está de acuerdo con diez grados de insaturación en el compuesto.

Su espectro de RMN de  $^1H$  presentó señales de un sistema de espín  $AX_2$ , correspondientes a un doble doblete a  $\delta_H$  5.32 ( $J= 2.9$  y  $12.7$  Hz), asignado a un protón oximetínico (H-2), acoplado con dos doble dobletes a  $\delta_H$  2.59 ( $J= 2.9$  y  $16.3$  Hz) y 2.94 ( $J= 12.6$  y  $16.3$  Hz), que integran para un protón cada uno, asignables a protones metilénicos (H-3). Asimismo, se observaron señales para cuatro protones en la región aromática del espectro, dos de ellos formando un sistema de espín AB como dos dobletes a  $\delta_H$  6.14 y 6.17 ( $J= 2.3$  Hz) asignables a los protones aromáticos H-6 y H-8 en posición *meta* en el anillo A de un flavonoide y dos singuletes a  $\delta_H$  7.01 (H-2') y  $\delta_H$  6.85 (H-5', H-6'). Señales correspondientes a dos singuletes a  $\delta_H$  3.82 (OCH<sub>3</sub>-5) y 3.85 (OCH<sub>3</sub>-7), indican la presencia en la molécula de dos grupos metoxilo.

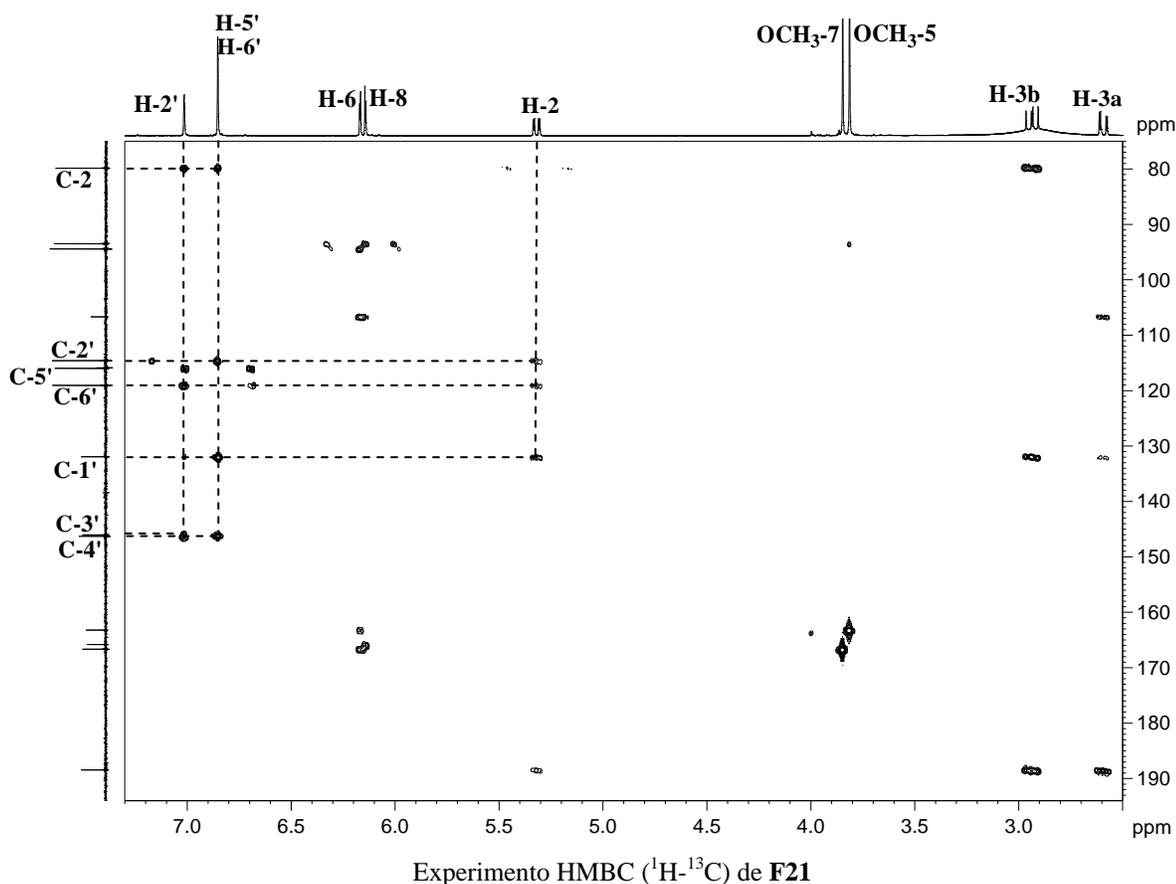
Dado que en el espectro de RMN  $^1H$  en acetona- $d_6$ , la señal a  $\delta_H$  6.85 integraba para dos protones y por consiguiente las señales correspondientes a los protones H-5' y H-6' estaban solapadas, realizamos el espectro en benceno- $d_6$ . En dicho espectro, si bien la señal asignada a H-2' esta solapada con la señal del benceno a  $\delta_H$  7.16, las señales correspondientes a los protones H-5' y H-6' presentaron diferente desplazamiento químico y multiplicidad, con señales a  $\delta_H$  7.01 (d,  $J= 8.1$  Hz) y  $\delta_H$  6.72 (dd,  $J= 1.9$  y  $8.1$  Hz), respectivamente, lo que indicó que el anillo B se encontraba 1',3',4'-trisustituido.



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, incluyendo dos carbonos correspondientes a grupos metoxilo, 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 sistema  $\text{C}_3$  cerrado.

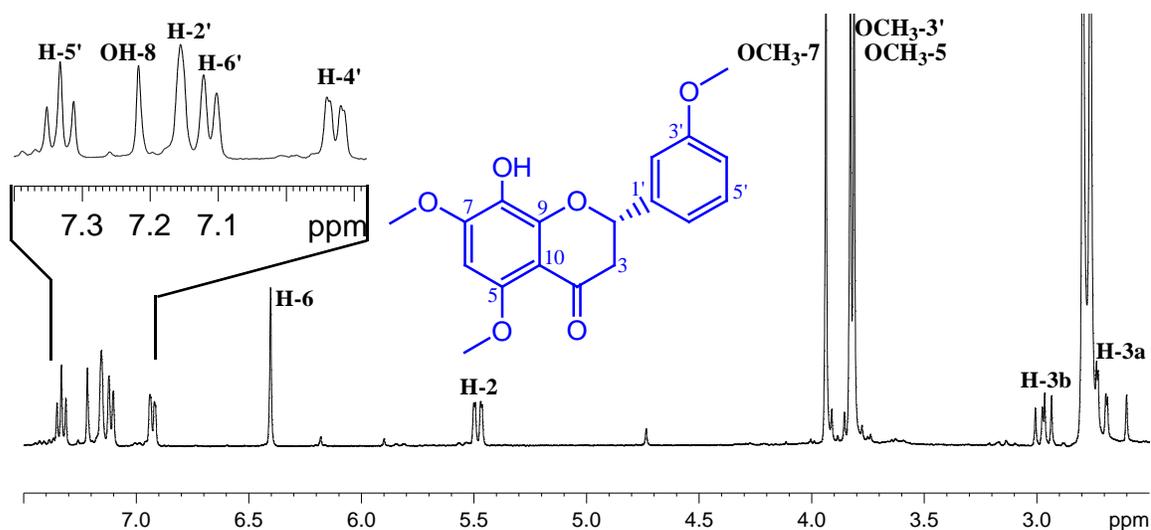
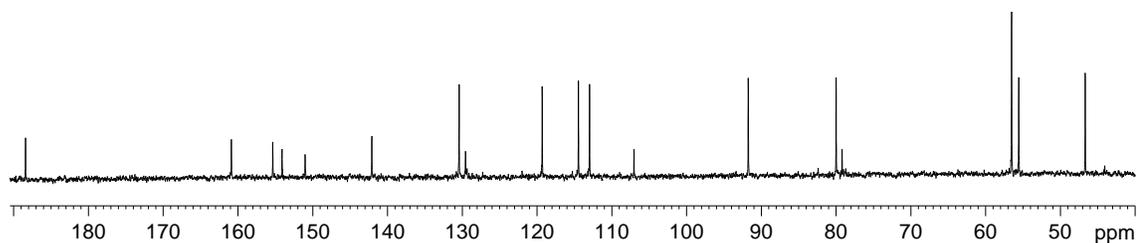


Un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales, homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC), nos permitieron establecer la estructura de **F21** como **3',4'-dihidroxi-5,7-dimetoxi-flavanona**.



### Determinación estructural del producto **F23**

El compuesto **F23** presentó una fórmula molecular de  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_6$  que fue determinada por espectrometría de masas de alta resolución y RMN de  $^{13}\text{C}$ . En su espectro de IR se observaron bandas de absorción correspondientes a grupos hidroxilo, carbonilo y anillos aromáticos.

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [ $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 400 MHz] de **F23**Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  [ $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 100 MHz] de **F23**

Un cuidadoso 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. Así, se observó en un experimento HMBC correlación de los protones del  $\text{OCH}_3\text{-5}$  ( $\delta_{\text{H}}$  3.81) con el carbono C-5, correlación de H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  6.40) con los carbonos C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  155.3), C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  154.1), C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  129.6) y C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  107.0) y correlación de los protones del  $\text{OCH}_3\text{-3'}$  ( $\delta_{\text{H}}$  3.83), H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  7.16) y H-4' ( $\delta_{\text{H}}$  6.93) con el carbono C-3' ( $\delta_{\text{C}}$  160.9), confirmando la regiosustitución de los grupos metoxilos en la molécula. La estructura del producto **F23** quedó así establecida como **8-hidroxi-5,7,3'-trimetoxi-flavanona**.

Tabla 9. Datos de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) de F21 y F23.

Posición	F21 <sup>a</sup>	F21 <sup>b</sup>	F23 <sup>a</sup>
H-2	5.32 dd (2.9, 12.7)	5.00 dd (2.9, 12.8)	5.48 dd (3.0, 12.3)
H-3a	2.59 dd (2.9, 16.3)	2.59 dd (2.9, 16.3)	2.70 dd (3.0, 16.4)
H-3b	2.94 dd (12.6, 16.3)	2.80 dd (12.8, 16.3)	2.97 dd (12.3, 16.4)
H-6	6.17 d (2.3)	6.07 d (2.2)	6.40 s
H-8	6.14 d (2.3)	5.98 d (2.2)	
H-2'	7.01 s	7.16 s*	7.16 s
H-4'			6.93 dd (2.4, 8.0)
H-5'	6.85 s*	7.01 d (8.1)	7.33 t (8.0)
H-6'	6.85 s*	6.72 dd (1.9, 8.1)	7.11 d (8.0)
OCH <sub>3</sub> -5	3.82 s	3.28 s	3.81 s
OCH <sub>3</sub> -7	3.85 s	3.40 s	3.94 s
OCH <sub>3</sub> -3'			3.83 s
OH-8			7.22 s
OH-3'			
OH-4'			

<sup>a</sup> $\delta$ , (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, <sup>b</sup> $\delta$ , C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>. *J* en paréntesis en Hz. Datos basados en los experimentos COSY y HSQC.

\*Señales solapadas.

Tabla 10. Datos de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de F21 y F23.

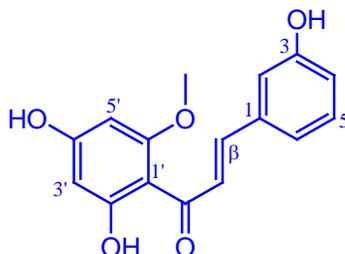
Posición	F21	F23
C-2	79.9 d	80.0 d
C-3	46.3 t	46.7 t
C=O	188.4 s	188.4 s
C-5	163.2 s	155.3 s
C-6	93.5 d	91.8 d
C-7	166.6 s	154.1 s
C-8	94.4 d	129.6 s
C-9	165.8 s	151.0 s
C-10	106.7 s	107.0 s
C-1'	132.0 s	142.1 s
C-2'	114.6 d	113.0 d
C-3'	146.0 s	160.9 s
C-4'	146.3 s	114.5 d
C-5'	116.0 d	130.4 d
C-6'	119.1 d	119.3 d
OCH <sub>3</sub> -5	56.2 c	56.5 c*
OCH <sub>3</sub> -7	56.0 c	56.5 c*
OCH <sub>3</sub> -3'		55.6 c

$\delta$ , (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO. Datos basados en los experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

\*Señales solapadas.

### 5.1.2. Datos físicos y espectroscópicos

#### Producto F1: 2',4',3-Trihidroxi-6'-metoxi-chalcona



Aislado como sólido amorfo amarillo (249.8 mg).

**UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ):** 206 (5.11), 247 (4.37), 348 (4.87) nm.

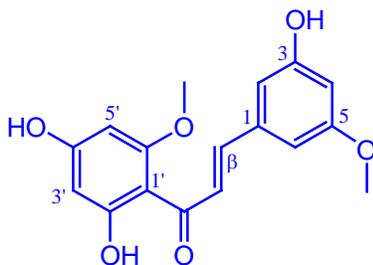
**IR  $\nu_{\max}$  (película):** 3376, 2957, 2923, 2853, 1730, 1593, 1462, 1331, 1262, 1205, 1163, 1110, 1029, 802, 759, 712  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN  $^1\text{H}$  [ $\delta$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]:** 3.99 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -6'); 6.00 (1H, d,  $J= 1.6$  Hz, H-3'); 6.08 (1H, d,  $J= 1.6$  Hz, H-5'); 6.91 (1H, d,  $J= 7.6$  Hz, H-4); 7.19 (1H, s, H-2); 7.20 (1H, d,  $J= 7.6$  Hz, H-6); 7.28 (1H, t,  $J= 7.6$  Hz, H-5); 7.68 (1H, d,  $J= 15.6$  Hz, H- $\beta$ ); 7.96 (1H, d,  $J= 15.6$  Hz, H- $\alpha$ ); 9.04 (2H, s<sub>a</sub>, OH-4', OH-3); 14.17 (1H, s, OH-2').

**RMN  $^{13}\text{C}$  [ $\delta$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]:** 56.5 (c,  $\text{OCH}_3$ -6'); 92.3 (d, C-5'); 97.0 (d, C-3'); 106.3 (s, C-1'); 115.3 (d, C-2); 118.2 (d, C-4); 121.0 (d, C-6); 128.4 (d, C- $\alpha$ ); 131.0 (d, C-5); 137.8 (s, C-1); 142.8 (d, C- $\beta$ ); 158.7 (s, C-3); 164.4 (s, C-6'); 166.0 (s, C-4'); 169.0 (s, C-2'); 193.1 (s, C=O).

**EM  $m/z$  (%):** 286  $[\text{M}]^+$  (98), 269 (12), 258 (9), 193 (100), 167 (44), 69 (19).

**EM de alta resolución:** Calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$ , 286.0841; observado, 286.0875.

**Producto F4: 2',4',3-Trihidroxi-6',5-dimetoxi-chalcona**

Aislado como sólido amorfo amarillo (329.0 mg).

**UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ):** 210 (4.97), 348 (4.73) nm.

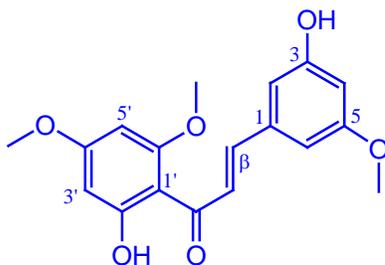
**IR  $\nu_{\max}$  (película):** 3408, 2955, 2923, 2853, 1729, 1660, 1592, 1531, 1463, 1279, 1196, 1161, 1114, 1066, 957, 836, 730  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN  $^1\text{H}$  [ $\delta$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]:** 3.82 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -5); 3.98 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -6'); 6.00 (1H, s, H-3'); 6.08 (1H, s, H-5'); 6.49 (1H, s, H-4); 6.77 (1H, s, H-6); 6.81 (1H, s, H-2); 7.62 (1H, d,  $J=15.5$  Hz, H- $\beta$ ); 7.93 (1H, d,  $J=15.5$  Hz, H- $\alpha$ ); 9.10 (2H,  $s_a$ , OH-4', OH-3); 14.16 (1H, s, OH-2').

**RMN  $^{13}\text{C}$  [ $\delta$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]:** 55.6 (c,  $\text{OCH}_3$ -5); 56.4 (c,  $\text{OCH}_3$ -6'); 92.3 (d, C-5'); 97.0 (d, C-3'); 104.3 (d, C-4); 106.2 (d, C-6); 106.3 (s, C-1'); 108.3 (d, C-2); 128.6 (d, C- $\alpha$ ); 138.4 (s, C-1); 142.8 (d, C- $\beta$ ); 159.8 (s, C-3); 162.2 (s, C-5); 164.3 (s, C-6'); 166.1 (s, C-4'); 169.0 (s, C-2'); 193.1 (s, C=O).

**EM  $m/z$  (%):** 316  $[\text{M}]^+$  (81), 286 (18), 257 (8), 193 (100), 167 (50), 69 (16).

**EM de alta resolución:** Calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6$ , 316.0947; observado, 316.0967.

**Producto F5: 2',3-Dihidroxi-4',6',5-trimetoxi-chalcona**

Aislado como sólido amorfo amarillo (26.1 mg).

**UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ):** 211 (4.92), 345 (4.66) nm.

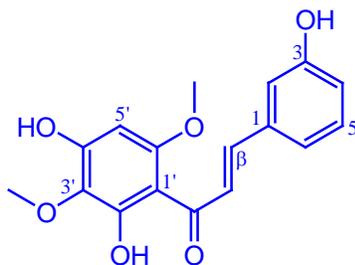
**IR  $\nu_{\max}$  (película):** 3326, 2924, 2851, 1726, 1622, 1582, 1431, 1386, 1329, 1284, 1210, 1153, 1112, 1049, 963, 935, 855, 822, 791, 758  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN  $^1\text{H}$  [ $\delta$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]:** 3.82 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -5); 3.88 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -4'); 4.01 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -6'); 6.10 (1H, s, H-3'); 6.13 (1H, s, H-5'); 6.50 (1H, s, H-4); 6.78 (1H, s, H-6); 6.81 (1H, s, H-2); 7.64 (1H, d,  $J=15.7$  Hz, H- $\beta$ ); 7.93 (1H, d,  $J=15.7$  Hz, H- $\alpha$ ); 8.60 (1H, s, OH); 14.16 (1H, s, OH-2').

**RMN  $^{13}\text{C}$  [ $\delta$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]:** 55.6 (c,  $\text{OCH}_3$ -5); 56.1 (c,  $\text{OCH}_3$ -4'); 56.6 (c,  $\text{OCH}_3$ -6'); 91.9 (d, C-5'); 94.7 (d, C-3'); 104.4 (d, C-4); 106.3 (d, C-6); 106.9 (s, C-1'); 108.4 (d, C-2); 128.6 (d, C- $\alpha$ ); 138.3 (s, C-1); 143.2 (d, C- $\beta$ ); 159.8 (s, C-3); 162.3 (s, C-5); 163.8 (s, C-6'); 167.6 (s, C-4'); 169.1 (s, C-2'); 193.4 (s, C=O).

**EM  $m/z$  (%):** 330  $[\text{M}]^+$  (100), 313 (9), 271 (9), 207 (97), 181 (35), 151 (11), 69 (6).

**EM de alta resolución:** Calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_6$ , 330.1103; observado, 330.1090.

**Producto F7: 2',4',3-Trihidroxi-3',6'-dimetoxi-chalcona**

Aislado como sólido amorfo amarillo (1.9 mg).

**UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ):** 207 (4.31), 351 (4.02) nm.

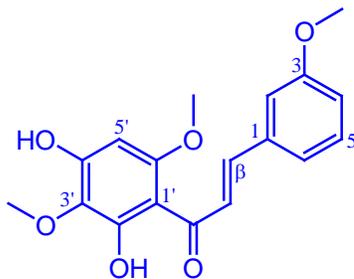
**IR  $\nu_{\max}$  (película):** 3358, 2922, 2852, 1726, 1628, 1586, 1450, 1329, 1276, 1196, 1109, 1010, 977, 858, 792, 736  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN  $^1\text{H}$  [ $\delta$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]:** 3.76 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -3'); 3.97 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -6'); 6.12 (1H, s, H-5'); 6.92 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-4); 7.19 (1H, s, H-2); 7.20 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-6); 7.29 (1H, t,  $J=8.0$  Hz, H-5); 7.69 (1H, d,  $J=15.6$  Hz, H- $\beta$ ); 7.96 (1H, d,  $J=15.6$  Hz, H- $\alpha$ ); 8.76 (1H, s, OH-3); 9.20 (1H, s, OH-4'); 14.39 (1H, s, OH-2').

**RMN  $^{13}\text{C}$  [ $\delta$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]:** 56.5 (c,  $\text{OCH}_3$ -6'); 60.6 (c,  $\text{OCH}_3$ -3'); 91.7 (d, C-5'); 106.5 (s, C-1'); 115.3 (d, C-2); 118.4 (d, C-4); 120.9 (d, C-6); 128.2 (d, C- $\alpha$ ); 130.0 (s, C-3'); 130.9 (d, C-5); 137.7 (s, C-1); 143.1 (d, C- $\beta$ ); 158.1 (s, C-4'); 158.8 (s, C-3); 159.7 (s, C-6'); 160.8 (s, C-2'); 193.7 (s, C=O).

**EM  $m/z$  (%):** 316  $[\text{M}]^+$  (100), 230 (8), 223 (19), 196 (49), 181 (32), 167 (11), 153 (19), 139 (7), 91 (6).

**EM de alta resolución:** Calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6$ , 316.0947; observado, 316.0935.

**Producto F8: 2',4',3-Trihidroxi-3',6'-dimetoxi-chalcona**

Aislado como sólido amorfo amarillo (15.2 mg).

**UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ):** 211 (3.15), 345 (2.88) nm.

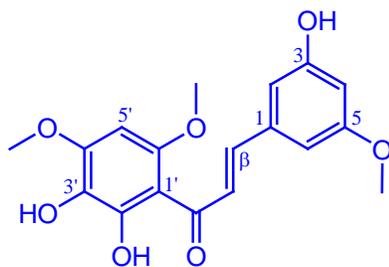
**IR  $\nu_{\max}$  (película):** 3375, 2919, 2850, 1725, 1628, 1586, 1429, 1331, 1259, 1196, 1159, 1110, 1010, 977, 851, 786, 726  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN  $^1\text{H}$  [ $\delta$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]:** 3.77 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -3'); 3.87 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -3); 3.97 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -6'); 6.13 (1H, s, H-5'); 7.01 (1H, dd,  $J= 2.4$  y 8.0 Hz, H-4); 7.27 (1H, d,  $J= 2.4$  Hz, H-2); 7.31 (1H, d,  $J= 8.0$  Hz, H-6); 7.37 (1H, t,  $J= 8.0$  Hz, H-5); 7.73 (1H, d,  $J= 15.5$  Hz, H- $\beta$ ); 7.99 (1H, d,  $J= 15.5$  Hz, H- $\alpha$ ); 9.22 (1H, s, OH-4'); 14.34 (1H, s, OH-2').

**RMN  $^{13}\text{C}$  [ $\delta$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]:** 55.6 (c,  $\text{OCH}_3$ -3); 56.5 (c,  $\text{OCH}_3$ -6'); 60.6 (c,  $\text{OCH}_3$ -3'); 91.7 (d, C-5'); 106.6 (s, C-1'); 114.2 (d, C-2); 117.0 (d, C-4); 121.7 (d, C-6); 128.8 (d, C- $\alpha$ ); 130.0 (s, C-3'); 130.9 (d, C-5); 137.8 (s, C-1); 142.9 (d, C- $\beta$ ); 158.1 (s, C-4'); 159.8 (s, C-6'); 160.8 (s, C-2'); 161.1 (s, C-3); 193.7 (s, C=O).

**EM  $m/z$  (%):** 330  $[\text{M}]^+$  (81), 300 (25), 223 (14), 196 (100), 181 (13), 150 (20), 138 (4).

**EM de alta resolución:** Calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_6$ , 330.1103; observado, 330.1104.

**Producto F9: 2',3',3-Trihidroxi-4',6',5-trimetoxi-chalcona**

Aislado como sólido amorfo amarillo (27.7 mg).

**UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ):** 209 (4.59), 346 (3.93) nm

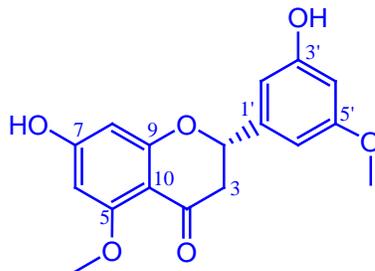
**IR  $\nu_{\max}$  (película):** 3417, 3010, 2944, 2851, 1733, 1635, 1596, 1565, 1458, 1432, 1319, 1288, 1233, 1214, 1118, 1084, 1063, 976, 899, 843, 806, 759, 683  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN  $^1\text{H}$  [ $\delta$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]:** 3.82 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -5); 3.96 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -4'); 4.01 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -6'); 6.35 (1H, s, H-5'); 6.50 (1H, t,  $J=2.0$  Hz, H-4); 6.78 (1H, s, H-6); 6.82 (1H, s, H-2); 6.91 (1H, s, OH-3'); 7.65 (1H, d,  $J=15.6$  Hz, H- $\beta$ ); 7.95 (1H, d,  $J=15.6$  Hz, H- $\alpha$ ); 8.62 (1H, s<sub>a</sub>, OH-3); 13.81 (1H, s, OH-2').

**RMN  $^{13}\text{C}$  [ $\delta$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]:** 55.6 (c,  $\text{OCH}_3$ -5); 56.5 (c,  $\text{OCH}_3$ -4'); 56.7 (c,  $\text{OCH}_3$ -6'); 89.2 (d, C-5'); 104.4 (d, C-4); 106.3 (d, C-6); 107.1 (s, C-1'); 108.4 (d, C-2); 128.6 (d, C- $\alpha$ ); 129.2 (s, C-3'); 138.3 (s, C-1); 143.3 (d, C- $\beta$ ); 154.0 (s, C-2'); 154.3 (s, C-4'); 156.6 (s, C-6'); 159.8 (s, C-3); 162.3 (s, C-5); 194.1 (s, C=O).

**EM  $m/z$  (%):** 346  $[\text{M}]^+$  (55), 316 (42), 297 (33), 223 (12), 196 (100), 181 (18), 178 (13), 167 (10), 150 (31), 91 (7), 57 (8).

**EM de alta resolución:** Calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_7$ , 346.1037; observado, 346.1053.

**Producto F15: 7,3'-Dihidroxi-5,5'-dimetoxi-flavanona**

Aislado como sólido amorfo blanco (1.1787 g).

$[\alpha]_D^{20}$ : +2.0 (c 0.30, MeOH).

**UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ):** 203 (4.84), 226 (4.53), 284 (4.38) nm.

**IR  $\nu_{\max}$  (película):** 3432, 2925, 2854, 1937, 1729, 1605, 1462, 1378, 1264, 1162, 1113, 1076, 884, 828, 756  $\text{cm}^{-1}$ .

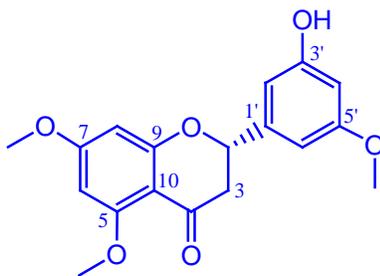
**RMN  $^1\text{H}$  [ $\delta$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]:** 2.63 (1H, dd,  $J= 3.1$  y 16.3 Hz, H-3a); 2.88 (1H, dd,  $J= 12.4$  y 16.3 Hz, H-3b); 3.77 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -5'); 3.79 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -5); 5.35 (1H, dd,  $J= 3.1$  y 12.4 Hz, H-2); 6.09 (1H, d,  $J= 2.1$  Hz, H-8); 6.14 (1H, d,  $J= 2.1$  Hz, H-6); 6.40 (1H, t,  $J= 2.2$  Hz, H-4'); 6.59 (1H, s, H-2'); 6.60 (1H, s, H-6'); 8.51 (1H, s, OH-3'); 9.41 (1H, s, OH-7).

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):** 2.59 (1H, dd,  $J= 2.6$  y 16.2 Hz, H-3a); 2.78 (1H, dd,  $J= 12.9$  y 16.2 Hz, H-3b); 3.41 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -5'); 3.49 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -5); 5.05 (1H, dd,  $J= 2.5$  y 12.6 Hz, H-2); 6.19 (1H, s, H-8); 6.39 (1H, d,  $J= 1.9$  Hz, H-6); 6.50 (1H, s, H-4'); 6.60 (1H, d,  $J= 1.9$  Hz H-2'); 6.73 (1H, s, H-6'); 8.46 (1H, s, OH-3'); 9.42 (1H, s, OH-7).

**RMN  $^{13}\text{C}$  [ $\delta$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]:** 46.4 (t, C-3); 55.6 (c,  $\text{OCH}_3$ -5'); 56.1 (c,  $\text{OCH}_3$ -5); 79.6 (d, C-2); 94.1 (d, C-6); 96.7 (d, C-8); 101.9 (d, C-4'); 104.1 (d, C-2'); 106.0 (s, C-10); 106.6 (d, C-6'); 142.9 (s, C-1'); 159.7 (s, C-3'); 162.1 (s, C-5'); 163.7 (s, C-5); 165.2 (s, C-7); 165.5 (s, C-9); 187.9 (s, C=O).

**EM  $m/z$  (%):** 316  $[\text{M}]^+$  (100), 299 (8), 193 (68), 167 (62), 150 (14), 138 (9).

**EM de alta resolución:** Calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6$ , 316.0947; observado, 316.0932.

**Producto F16: 3'-Hidroxi-5,7,5'-trimetoxi-flavanona**

Aislado como sólido amorfo blanco (7.5 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : +4.39 (c 0.36, MeOH).

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 203 (4.65), 227 (4.36), 283 (4.21) nm.

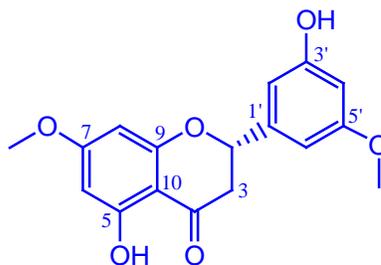
IR  $\nu_{\max}$  (película): 3325, 3008, 2926, 2853, 1726, 1658, 1608, 1573, 1461, 1433, 1364, 1340, 1271, 1216, 1159, 1113, 1071, 1012, 994, 945, 824, 757  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 2.78 (1H, dd,  $J=3.0$  y 16.6 Hz, H-3a); 2.96 (1H, dd,  $J=13.0$  y 16.6 Hz, H-3b); 3.79 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -5'); 3.82 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -7); 3.88 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -5); 5.30 (1H, dd,  $J=3.0$  y 13.0 Hz, H-2); 5.66 (1H, s, OH-3'); 6.08 (1H, d,  $J=2.3$  Hz, H-6); 6.15 (1H, d,  $J=2.3$  Hz, H-8); 6.40 (1H, t,  $J=2.2$  Hz, H-4'); 6.53 (1H, s, H-2'); 6.56 (1H, s, H-6').

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 45.7 (t, C-3); 55.6 (c,  $\text{OCH}_3$ -5'); 55.8 (c,  $\text{OCH}_3$ -7); 56.3 (c,  $\text{OCH}_3$ -5); 79.1 (d, C-2); 93.4 (d, C-6); 93.8 (d, C-8); 101.7 (d, C-4'); 104.3 (d, C-6'); 105.7 (d, C-2'); 106.0 (s, C-10); 141.4 (s, C-1'); 157.6 (s, C-3'); 161.4 (s, C-5'); 162.5 (s, C-5); 165.1 (s, C-9); 166.3 (s, C-7); 189.5 (s, C=O).

EM  $m/z$  (%): 330  $[\text{M}]^+$  (100), 300 (10), 207 (79), 193 (12), 181 (53), 151 (10), 137 (11), 120 (10), 57 (9).

EM de alta resolución: Calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_6$ , 330.1103; observado, 330.1115.

**Producto F-17: 5,3'-Dihidroxi-7,5'-dimetoxi-flavanona**

Aislado como sólido amorfo (1.7 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : +1.92 (c 0.26, CHCl<sub>3</sub>).

UV (EtOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 203 (4.96), 228 (4.65), 287 (4.48) nm.

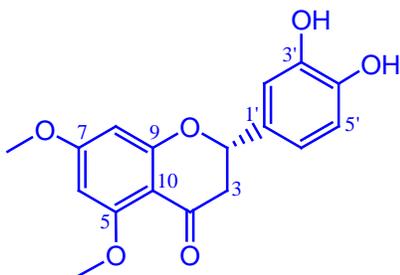
IR  $\nu_{\max}$  (película): 3439, 2961, 2924, 2852, 1731, 1643, 1453, 1261, 1156, 1091, 1023, 800 cm<sup>-1</sup>.

RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 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, OCH<sub>3</sub>-7); 3.94 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-5'); 5.34 (1H, dd,  $J$ = 3.0, 13.0 Hz, H-2); 5.73 (1H, s, OH-3'); 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, OH-5').

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 43.4 (t, C-3); 55.7 (c, OCH<sub>3</sub>-7); 56.0 (c, OCH<sub>3</sub>-5'); 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=O).

EM  $m/z$  (%): 316 [M]<sup>+</sup> (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 C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>, 316.1025; observado, 316.0981.

**Producto F21: 3',4'-Dihidroxi-5,7-dimetoxi-flavanona**

Aislado como sólido amorfo amarillo (18.3 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : -1.75 (c 0.25, MeOH).

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 204 (5.23), 226 (4.99), 283 (4.87) nm.

IR  $\nu_{\max}$  (película): 3399, 2943, 1728, 1652, 1607, 1569, 1523, 1457, 1428, 1338, 1272, 1216, 1158, 1111, 1072, 1038, 959, 870, 820, 753  $\text{cm}^{-1}$ .

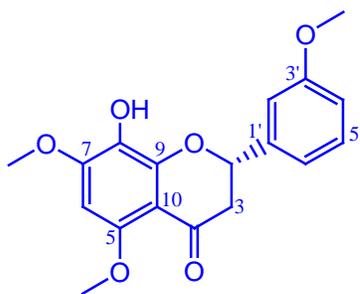
RMN  $^1\text{H}$  [ $\delta$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]: 2.59 (1H, dd,  $J=2.9$  y 16.3 Hz, H-3a); 2.94 (1H, dd,  $J=12.6$  y 16.3 Hz, H-3b); 3.82 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -5); 3.85 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -7); 5.32 (1H, dd,  $J=2.9$  y 12.7 Hz, H-2); 6.14 (1H, d,  $J=2.3$  Hz, H-8); 6.17 (1H, d,  $J=2.3$  Hz, H-6); 6.85 (2H, s, H-5', H-6'); 7.01 (1H, s, H-2').

RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ): 2.59 (1H, dd,  $J=2.9$  y 16.3 Hz, H-3a); 2.80 (1H, dd,  $J=12.8$  y 16.3 Hz, H-3b); 3.28 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -5); 3.40 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -7); 5.00 (1H, dd,  $J=2.9$  y 12.8 Hz, H-2); 5.98 (1H, d,  $J=2.2$  Hz, H-8); 6.07 (1H, d,  $J=2.2$  Hz, H-6); 6.72 (1H, dd,  $J=1.9$  y 8.1 Hz, H-6'); 7.01 (1H, d,  $J=8.1$  Hz, H-5'); 7.16 (1H, s, H-2') solapado con  $\text{C}_6\text{D}_6$ .

RMN  $^{13}\text{C}$  [ $\delta$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]: 46.3 (t, C-3); 56.0 (c,  $\text{OCH}_3$ -7); 56.2 (c,  $\text{OCH}_3$ -5); 79.9 (d, C-2); 93.5 (d, C-6); 94.4 (d, C-8); 106.7 (s, C-10); 114.6 (d, C-2'); 116.0 (d, C-5'); 119.1 (d, C-6'); 132.0 (s, C-1'); 146.0 (s, C-3'); 146.3 (s, C-4'); 163.2 (s, C-5); 165.8 (s, C-9); 166.6 (s, C-7); 188.4 (s, C=O).

EM  $m/z$  (%): 316  $[\text{M}]^+$  (100), 288 (22), 207 (54), 194 (47), 181 (69), 154 (15), 137 (20), 123 (10).

EM de alta resolución: Calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6$ , 316.0947; observado, 316.1088.

**Producto F23: 8-Hidroxi-5,7,3'-trimetoxi-flavanona**

Aislado como sólido amorfo blanco (5.8 mg).

$[\alpha]_D^{20}$  : - 2.13 (c 0.30, MeOH).

**UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ):** 206 (5.59), 243 (5.08), 285 (5.15), 348 (3.71) nm.

**IR  $\nu_{\max}$  (película):** 3388, 3006, 2924, 2848, 1725, 1666, 1613, 1588, 1512, 1494, 1462, 1438, 1417, 1370, 1346, 1265, 1210, 1155, 1111, 1046, 1013, 919, 856, 792, 755, 702  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN  $^1\text{H}$  [ $\delta$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]:** 2.70 (1H, dd,  $J= 3.0$  y 16.4 Hz, H-3a); 2.97 (1H, dd,  $J= 12.3$  y 16.4 Hz, H-3b); 3.81 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -5); 3.83 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -3'); 3.94 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -7); 5.48 (1H, dd,  $J= 3.0$  y 12.3 Hz, H-2); 6.40 (1H, s, H-6); 6.93 (1H, dd,  $J= 2.4$  y 8.0 Hz, H-4'); 7.11 (1H, d,  $J= 8.0$  Hz, H-6'); 7.16 (1H, s, H-2'); 7.22 (1H, s, OH-8); 7.33 (1H, t,  $J= 8.0$  Hz, H-5').

**RMN  $^{13}\text{C}$  [ $\delta$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]:** 46.7 (t, C-3); 55.6 (c,  $\text{OCH}_3$ -3'); 56.5 (c,  $\text{OCH}_3$ -5,  $\text{OCH}_3$ -7); 80.0 (d, C-2); 91.8 (d, C-6); 107.0 (s, C-10); 113.0 (d, C-2'); 114.5 (d, C-4'); 119.3 (d, C-6'); 129.6 (s, C-8); 130.4 (d, C-5'); 142.1 (s, C-1'); 151.0 (s, C-9); 154.1 (s, C-7); 155.3 (s, C-5); 160.9 (s, C-3'); 188.4 (s, C=O).

**EM  $m/z$  (%):** 330  $[\text{M}]^+$  (62), 196 (100), 178 (8), 150 (21).

**EM de alta resolución:** Calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_6$ , 330.1103; observado, 330.1111.

## **5.2. Amidas**

## 5.2. Amidas

### 5.2.1. Resultados y discusión

El estudio fitoquímico de los extractos de diclorometano de las hojas de *Piper delineatum*, *P. divaricatum* y *P. pseudoarboreum*, y los frutos de *P. glabratrum*, después de repetidas cromatografías, como se detalla en el apartado de separación cromatográfica de esta Memoria, nos permitió el aislamiento de dieciséis amidas, quince de las cuales habían sido descritos previamente en la bibliografía química e identificadas basándonos en sus datos físicos, espectroscópicos y comparación con los datos existentes en la bibliografía química.

Así, las amidas aisladas anteriormente fueron identificadas como: sintenpiridona<sup>1</sup> (**A2**), 3-cloro-5,6-dihidro-1*H*-piridin-2-ona<sup>2</sup> (**A3**), (*E*)-demetoxiplartina<sup>3</sup> (**A4**), (*E*)-piplartina<sup>3</sup> (**A5**), (*Z*)-piplartina<sup>4</sup> (**A6**), piplaroxido<sup>5</sup> (**A7**), 3,4-epoxi-8,9-dihidropiplartina<sup>6</sup> (**A8**), 10,11-dihidropiperina<sup>4</sup> (**A9**), 5,6-dihidropiperlonguminina<sup>4</sup> (**A10**), 4-hidroxi-*N*-[2-(4-metoxi-fenil)-etil]-benzamida<sup>7</sup> (**A11**), houttuynamida<sup>8</sup> (**A12**), (*E*)-*N-p*-cumaroil-tiramina<sup>9</sup> (**A13**), (*E*)-*N*-cinamoil-tiramina<sup>9</sup> (**A14**), (*E*)-*N*-feruloil-tiramina<sup>10</sup> (**A15**), (*Z*)-*N*-feruloil-tiramina<sup>11</sup> (**A16**).

<sup>1</sup> Chen, J.-J.; Huang, Y.-C.; Chen, Y.-C.; Huang, Y.-T.; Wang, S.-W.; Peng, C.-Y.; Teng, C.-M.; Chen, I.-S. *Planta Medica*. **2002**, 68, 980-985.

<sup>2</sup> Feng, Y.; Minard, R. D.; Bollag, J.-M. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **1998**, 17, 814-819.

<sup>3</sup> Duh, C.-Y.; Wu, Y.-C.; Wang, S.-K. *Phytochemistry*. **1990**, 29, 2689-2691.

<sup>4</sup> Navickiene, H. M.; Alécio, A. C.; Kato, M. J.; Bolzani, V. S.; Young, M. C.; Cavalheiro, A. J.; Furlan, M. *Phytochemistry*. **2000**, 55, 621-626.

<sup>5</sup> Capron, M. A.; Wiemer, D. F. *Journal of Natural Products*. **1996**, 59, 794-795.

<sup>6</sup> Seeram, N. P.; Lewis, P. A.; Jacobs, H. *Journal of Natural Products*. **1996**, 59, 436-437.

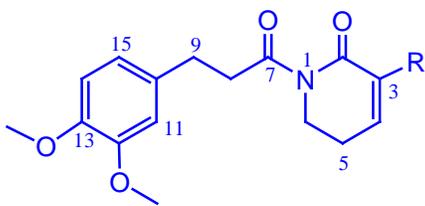
<sup>7</sup> Barbosa, J. M.; Da Silva, E. C.; Bhattacharyya, J. *Química Nova*. **1990**, 13, 332-334.

<sup>8</sup> Chou, S.-C.; Su, C.-R.; Ku, Y.-C.; Wu, T.-S. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **2009**, 57, 1227-1230.

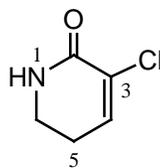
<sup>9</sup> Nishioka, T.; Watanabe, J.; Kawabata, J.; Niki, R. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **1997**, 61, 1138-1141.

<sup>10</sup> Yoshihara, T.; Takamatsu, S.; Sakamura, S. *Agricultural Biology and Chemistry*. **1978**, 42, 623-627.

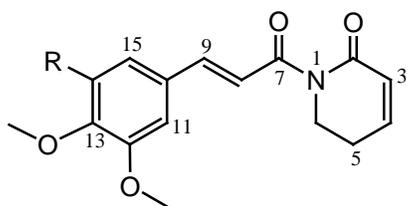
<sup>11</sup> Yoshihara, T.; Yamaguchi, K.; Takamatsu, S.; Sakamura, S. *Agricultural Biology and Chemistry*. **1981**, 45, 2593-2598.



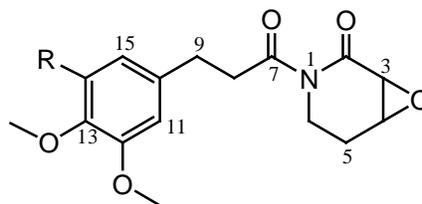
**A1 R = Cl**  
**A2 R = H**



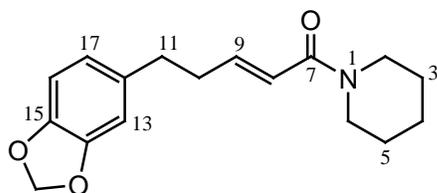
**A3**



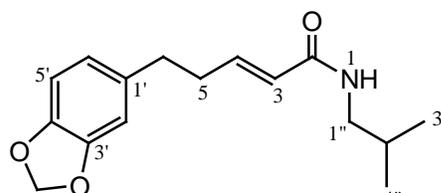
**A4 (E) R = H**  
**A5 (E) R = OCH<sub>3</sub>**  
**A6 (Z) R = OCH<sub>3</sub>**



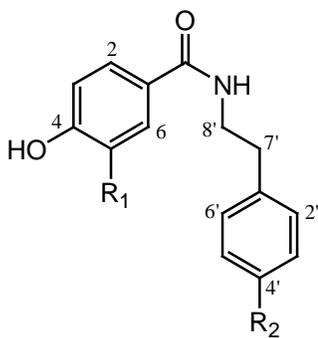
**A7 R = H**  
**A8 R = OCH<sub>3</sub>**



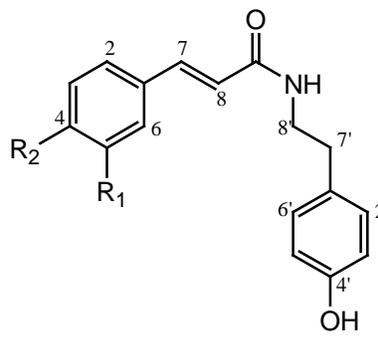
**A9**



**A10**



**A11 R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>**  
**A12 R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OH**



**A13 (E) R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OH**  
**A14 (E) R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H**  
**A15 (E) R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH**  
**A16 (Z) R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH**

**Amidas aisladas de las especies de *Piper* estudiadas**

A continuación pasamos a describir la elucidación estructural de la amida que hemos denominado **A1**, aislada de la especie *Piper pseudoarboreum*, que resultó nueva en la bibliografía química.

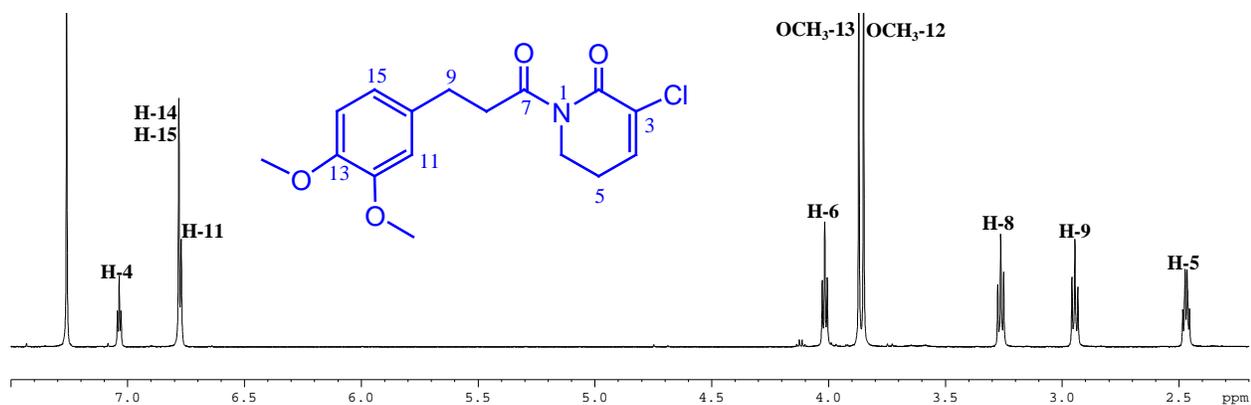
### Determinación estructural del producto A1

El compuesto que hemos denominado **A1** fue aislado como un líquido oleoso incoloro que muestra una mancha de color marrón en cromatografía en capa fina analítica (diclorometano-éter dietílico, 9:1), cuando fue revelado con oleum (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-AcH-H<sub>2</sub>O, 4:20:1) seguido de calentamiento en placa.

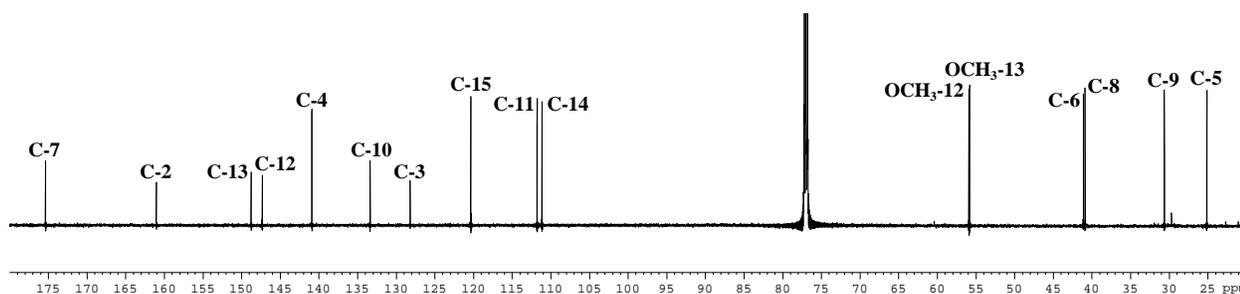
La estructura del compuesto que hemos denominado **A1** se estableció mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos. En su espectro de masas de baja resolución (EM) presentó un ión molecular a 323 *m/z*, que corresponde con una fórmula molecular C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>4</sub>Cl, determinada por espectrometría de masas de alta resolución (EMAR). En el EM se observaron fragmentos isotópicos a 323 [M<sup>+</sup>] y 325 [M<sup>+</sup>+2] *m/z* en una relación 3:1 confirmado la presencia de un átomo de cloro en el producto<sup>12</sup>. En el espectro de infrarrojo se observaron bandas características de grupo éter a 1160 cm<sup>-1</sup>, carbonilo a 1696 cm<sup>-1</sup> y anillo aromático a 1514, 1462 y 759 cm<sup>-1</sup>. La presencia de un anillo aromático se pone de manifiesto al observarse bandas de absorción en su espectro de ultravioleta a 226 y 276 nm.

Su espectro de RMN <sup>1</sup>H presentó señales características para protones metilénicos como un doble triplete a δ<sub>H</sub> 2.47 (2H, *J*= 4.6 y 6.6 Hz, H-5) y tres tripletes a δ<sub>H</sub> 2.95 (2H, *J*= 7.6 Hz, H-9), 3.26 (2H, *J*= 7.6 Hz, H-8) y 4.02 (2H, *J*= 6.6 Hz, H-6), señal de un protón metínico a δ<sub>H</sub> 7.03 (t, *J*= 4.6 Hz, H-4) y dos singuletes asignables a grupos metoxilo a δ<sub>H</sub> 3.85 (OCH<sub>3</sub>-12) y 3.87 (OCH<sub>3</sub>-13). Así mismo, en la región aromática se observaron señales para tres protones como dos singuletes a δ<sub>H</sub> 6.77 (1H, H-11) y 6.78 (2H, H-14 y H-15), datos que sugieren un anillo aromático trisustituido.

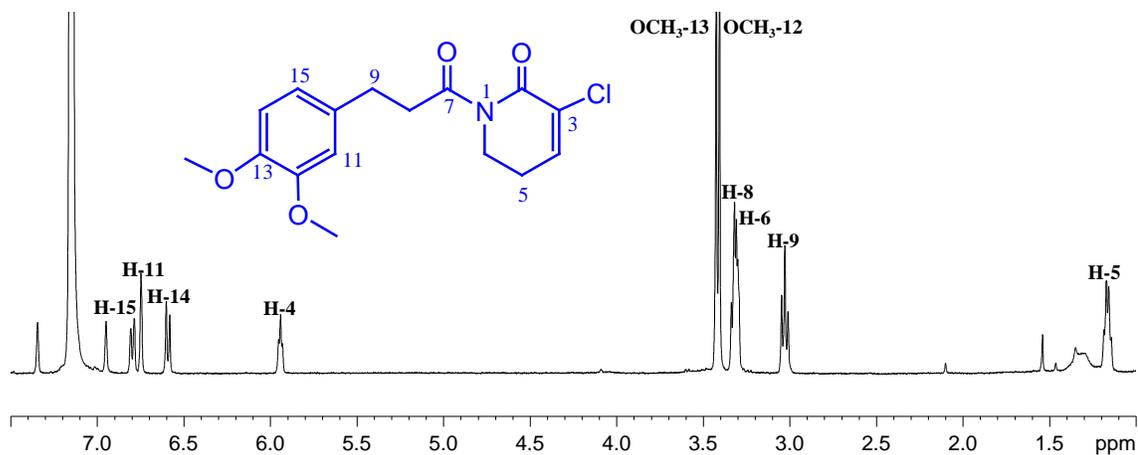
<sup>12</sup> Chen, J. J.; Li, W. X.; Gao, K.; Jin, X. J.; Yao, X. J. *Journal of Natural Products*. **2012**, 75, 1184-1188.

Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) de **A1**

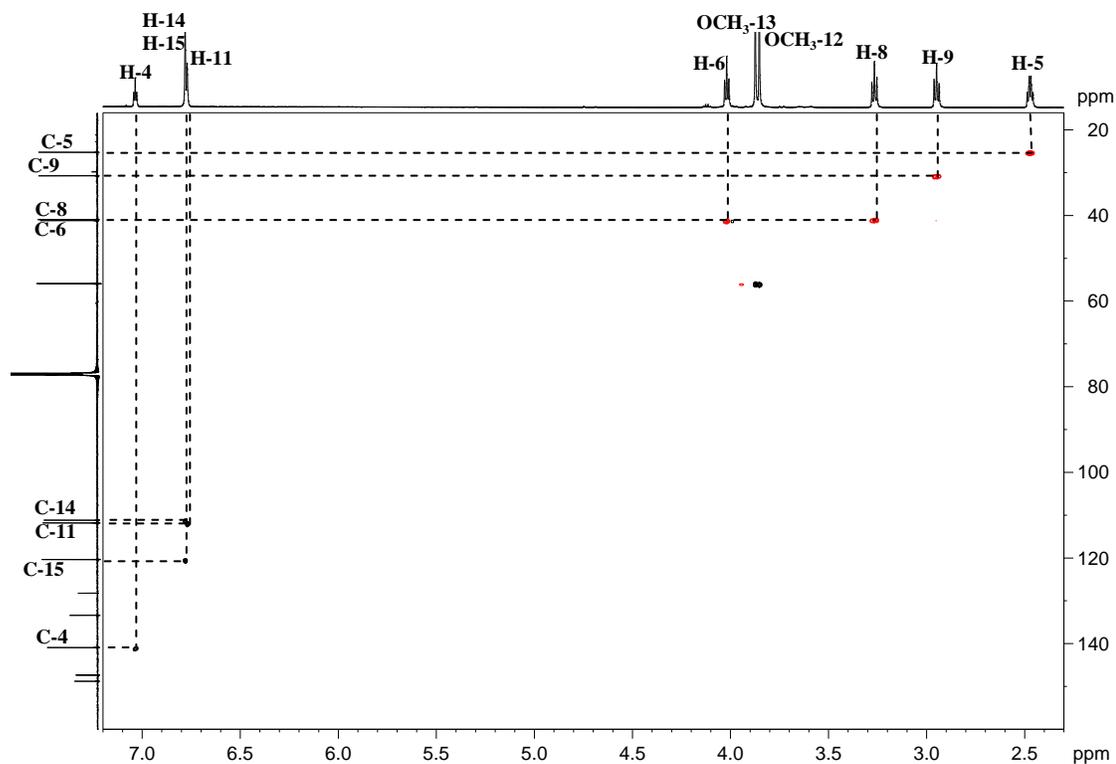
Los datos anteriores se confirmaron en su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , que presentó señales para 16 carbonos, lo que unido a los experimentos DEPT 90 y 135 estableció la existencia de dos metoxilos a  $\delta_{\text{C}}$  55.8 (OCH<sub>3</sub>-13) y 55.9 (OCH<sub>3</sub>-12), cuatro metilenos a  $\delta_{\text{C}}$  25.1 (C-5), 30.6 (C-9), 40.9 (C-8) y 41.1 (C-6), cuatro metinos a  $\delta_{\text{C}}$  111.1 (C-14), 111.8 (C-11), 120.3 (C-15) y 140.9 (C-4) y seis carbonos cuaternarios a  $\delta_{\text{C}}$  128.2 (C-3), 133.4 (C-10), 147.3 (C-12), 148.8 (C-13), 161.0 (C-2) y 175.3 (C-7). Estos datos están de acuerdo con una estructura de *N*-alquilamida para el producto **A1**, que presenta un anillo aromático trisustituido, dos grupos metoxilo, una cadena alifática de tres carbonos, una  $\delta$ -lactama de seis miembros tipo piridona y un átomo de cloro.

Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) de **A1**

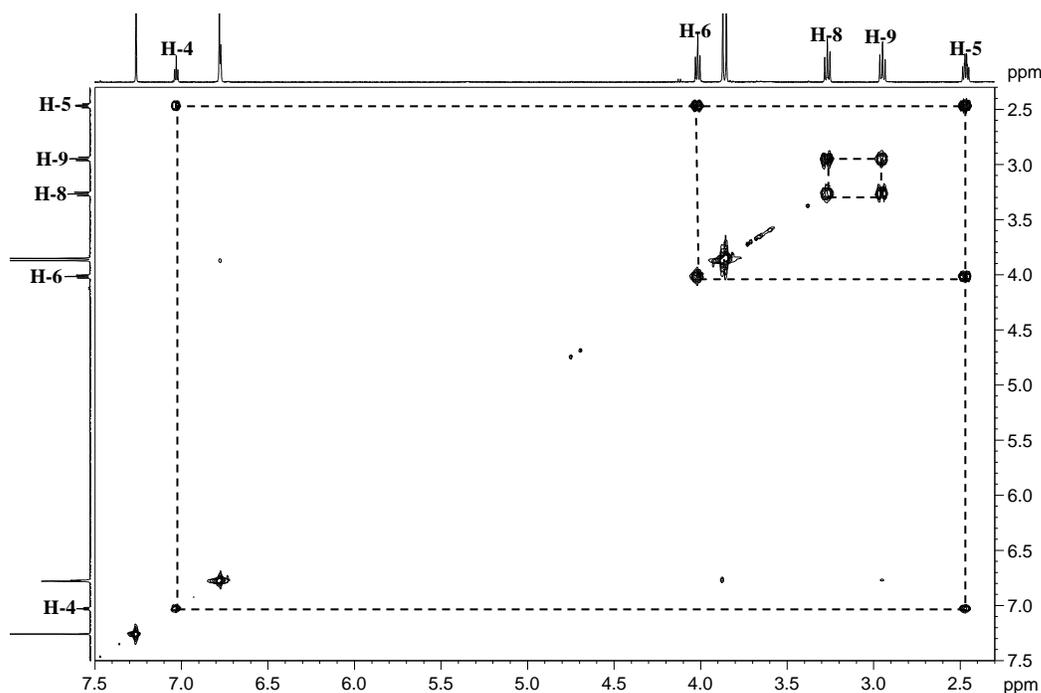
Con la finalidad de resolver la discrepancia que existía en la regiosustitución del anillo aromático entre los datos de RMN  $^1\text{H}$ , que sugería un anillo 1,3,5-trisustituido y los de RMN  $^{13}\text{C}$  que apuntaban a un anillo 1,3,4-trisustituido, realizamos un espectro de RMN  $^1\text{H}$  en benceno deuterado. En dicho espectro se observó, en la región aromática un patrón clásico para un anillo aromático 1,3,4-trisustituido, con la presencia de dos dobletes a  $\delta_{\text{H}}$  6.59 (1H,  $J$  = 8.4 Hz, H-14) y 6.79 (1H,  $J$  = 8.4 Hz, H-15) y un singlete a  $\delta_{\text{H}}$  6.78 (1H, H-11).

Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 400 MHz) de **A1**

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

Experimento  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC-editado) de **A1**

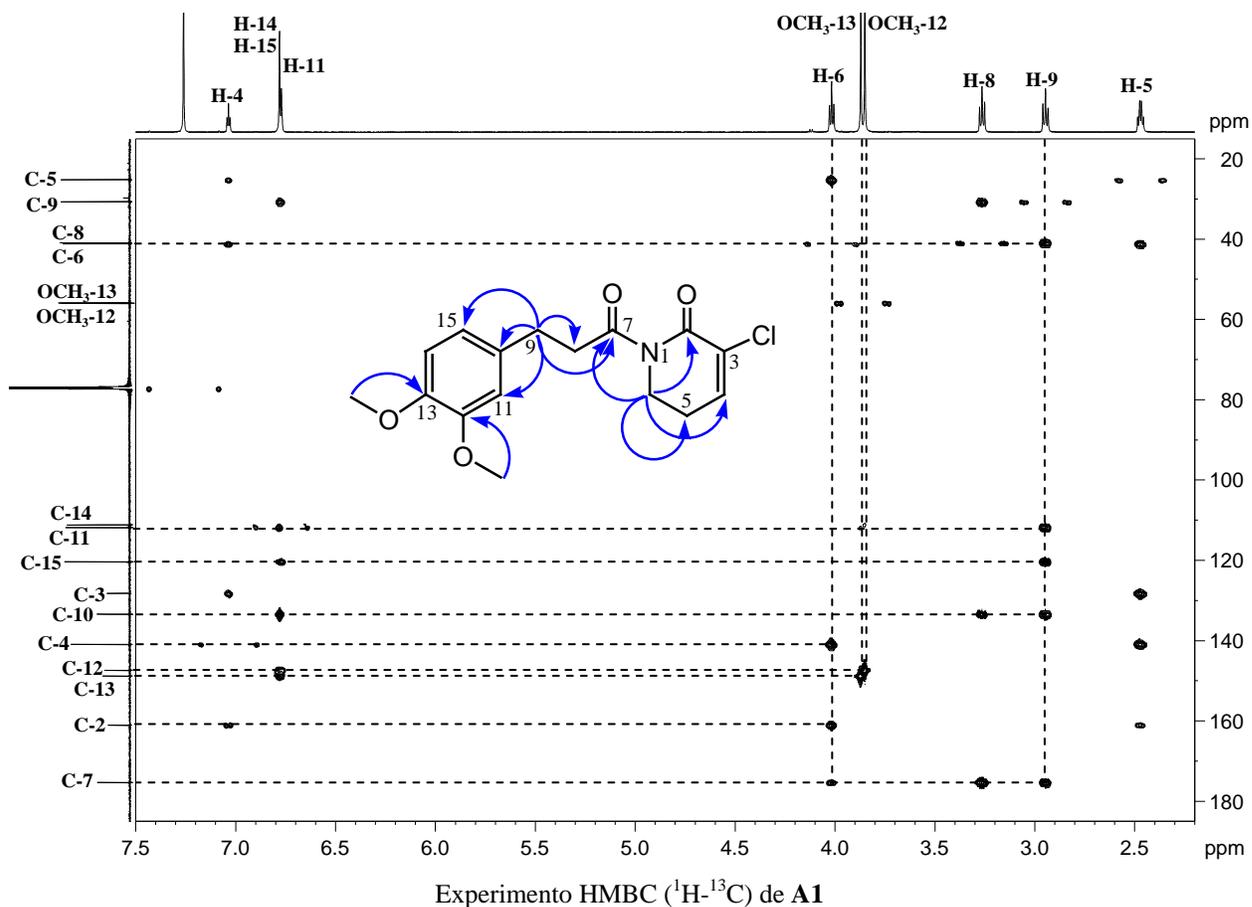
El estudio de las constantes de acoplamiento y el experimento COSY reveló la presencia de dos sistemas de espín, el primero fue identificado como  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  correspondiente a las señales a  $\delta_{\text{H}}$  2.95 (H-9) y 3.26 (H-8), mientras que el segundo fue identificado como un sistema  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-$  correspondiente a las señales a  $\delta_{\text{H}}$  4.02 (H-6), 2.47 (H-5) y 7.03 (H-4).



Experimento COSY ( $^1\text{H}-^1\text{H}$ ) de A1

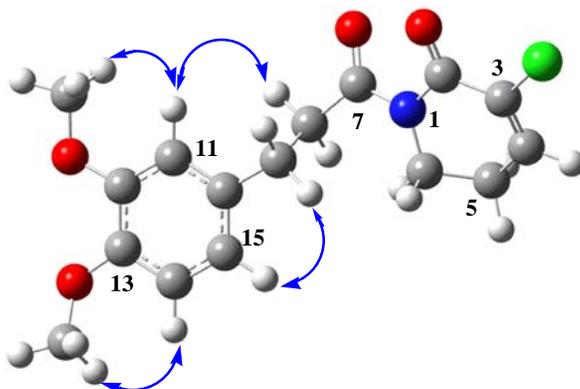
La localización de los grupos funcionales y los distintos carbonos cuaternarios presentes en la molécula se determinó mediante un experimento HMBC. Así, la regiosustitución en el anillo aromático se estableció por las correlaciones observadas entre los protones H-9 a  $\delta_{\text{H}}$  2.95 con el carbonilo de la amida C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  175.3), el carbono metilénico C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  40.9) y los carbonos aromáticos C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  133.4), C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  111.8) y C-15 ( $\delta_{\text{C}}$  120.3), así como las correlaciones observadas entre los protones de los metoxilos a  $\delta_{\text{H}}$  3.85 y 3.87 con los carbonos fenólicos C-12 ( $\delta_{\text{C}}$  147.3) y C-13 ( $\delta_{\text{C}}$  148.8), respectivamente. La estructura del anillo de piridona se estableció mediante las correlaciones de H-6 a  $\delta_{\text{H}}$  4.02 con el carbonilo de  $\delta$ -lactama C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  161.0) y el carbono olefínico C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  140.9). La unión de la amida con el anillo de piridona fue fijada sobre C-7 por la correlación observada de H-6 con el carbono C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  175.3), quedando como única posibilidad para el átomo de cloro el carbono C-3, lo que se confirmó por las correlaciones

observadas de H-5 a  $\delta_H$  2.47 con los carbonos C-4 ( $\delta_C$  140.9) y C-3 ( $\delta_C$  128.2) y correlación de H-4 ( $\delta_H$  7.03) con el carbono C-3.



Los efectos ROE observados en el experimento ROESY están de acuerdo con la estructura propuesta, así como efectos ROE más significativos podemos destacar los observados: H-8, OCH<sub>3</sub>-12/H-11, H-15/H-9 y H-14/OCH<sub>3</sub>-13.

Estos datos y comparación con los datos en la literatura para la **sintenpiridona**<sup>1</sup> nos permitieron establecer de forma inequívoca la estructura de A1 como **N-[3-(3,4-dimetoxifenil)-1-oxopropyl]-3-cloro-5,6-dihidro-piridin-2-ona (3-cloro-sintenpiridona)**.

Efectos ROE ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) observados en el experimento ROESY de **A1****Tabla 11.** Datos de RMN del compuesto **A1**

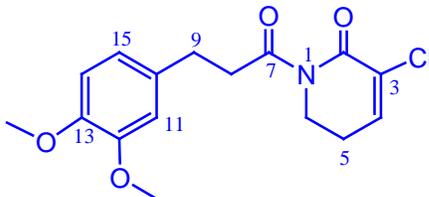
Posición	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$	HMBC
2			161.0 s	
3			128.2 s	
4	7.03 t (4.6)	5.93 t (4.5)	140.9 d	C-2, C-3, C-5, C-6
5	2.47 dt, (4.6, 6.6)	1.16 dc (4.5, 6.2)	25.1 t	C-3, C-2, C-4, C-6
6	4.02 t (6.6)	3.30 t (6.2)	41.1 t	C-2, C-3, C-4, C-5, C-7
7			175.3 s	
8	3.26 t (7.6)	3.32 t (7.5)	40.9 t	C-7, C-9, C-10
9	2.95 t (7.6)	3.03 t (7.5)	30.6 t	C-7, C-8, C-10, C-11, C-15
10			133.4 s	
11	6.77 s	6.78 s	111.8 d	C-9, C-10, C-12, C-13, C-15
12			147.3 s	
13			148.8 s	
14	6.78 s*	6.59 d (8.4)	111.1 d	C-10, C-12, C-13, C-15
15	6.78 s*	6.79 d (8.4)	120.3 d	C-9, C-10, C-11, C-13, C-14
12-OCH <sub>3</sub>	3.85 s	3.40 s	55.9 c	
13-OCH <sub>3</sub>	3.87 s	3.42 s	55.8 c	

<sup>a</sup>  $\delta$  en ppm,  $J$  en Hz, 600 MHz en CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup> 400 MHz en C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, <sup>c</sup> 150 MHz en CDCl<sub>3</sub>,

\*Señales solapadas.

### 5.2.2. Datos físicos y espectroscópicos

**Producto A1: N-[3-(3,4-Dimetoxifenil)-1-oxopropyl]-3-cloro-5,6-dihidro-piridin-2-ona,  
(3-cloro-sintenpiridona)**



Aislado como líquido oleoso incoloro (1.6 mg).

**UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH):** 226 (3.99), 276 (3.40) nm.

**IR  $\nu_{\max}$  (película):** 1696, 1514, 1462, 1160, 759  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ):** 2.47 (2H, dt,  $J= 4.6$  y  $6.6$  Hz, H-5); 2.95 (2H, t,  $J= 7.6$  Hz, H-9); 3.26 (2H, t,  $J= 7.6$  Hz, H-8); 3.85 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -12); 3.87 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -13); 4.02 (2H, t,  $J= 6.6$  Hz, H-6); 6.77 (1H, s, H-11), 6.78 (2H, s, H-14, H-15); 7.03 (1H, t,  $J= 4.6$  Hz, H-4).

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):** 1.16 (2H, dc,  $J= 4.5$  y  $6.2$  Hz, H-5); 3.03 (2H, t,  $J= 7.5$  Hz, H-9); 3.30 (2H, t,  $J= 6.2$  Hz, H-6); 3.32 (2H, t,  $J= 7.5$  Hz, H-8); 3.40 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -12); 3.42 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -13); 5.93 (1H, t,  $J= 4.5$  Hz, H-4); 6.59 (1H, d,  $J= 8.4$  Hz, H-14); 6.78 (1H, s, H-11), 6.79 (1H, d,  $J= 8.4$  Hz, H-15).

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ):** 25.1 (t, C-5); 30.6 (t, C-9); 40.9 (t, C-8); 41.1 (t, C-6); 55.8 (c,  $\text{OCH}_3$ -13); 55.9 (c,  $\text{OCH}_3$ -12); 111.1 (d, C-14); 111.8 (d, C-11); 120.3 (d, C-15); 128.2 (s, C-3); 133.4 (s, C-10); 140.9 (d, C-4); 147.3 (s, C-12), 148.8 (s, C-13); 161.0 (s, C-2); 175.3 (s, C-7).

**EM  $m/z$  (%):** 325 [ $\text{M}^+ + 2$ ] (10), 323 [ $\text{M}^+$ ] (27), 192 (26), 164 (100), 151 (49), 132 (6), 91 (8).

**EM de alta resolución:** Calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N O}_4\text{Cl}$ , 323.0924; observado, 323.0916.

### **5.3. Derivados del ácido benzoico**

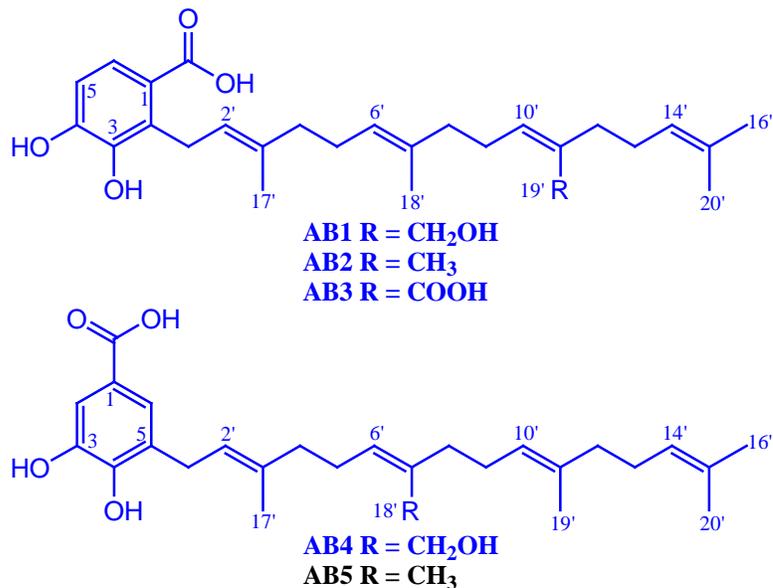
### 5.3. Derivados del ácido benzoico

#### 5.3.1. Resultados y discusión

Tras repetidas cromatografías del extracto de diclorometano de las hojas de *Piper delineatum*, *P. divaricatum* y *P. heterophyllum*, y los frutos de *P. glabratrum*, según como se indica en la parte experimental de esta Memoria se aislaron diez derivados del ácido benzoico, que hemos denominado de **AB1** a **AB10**.

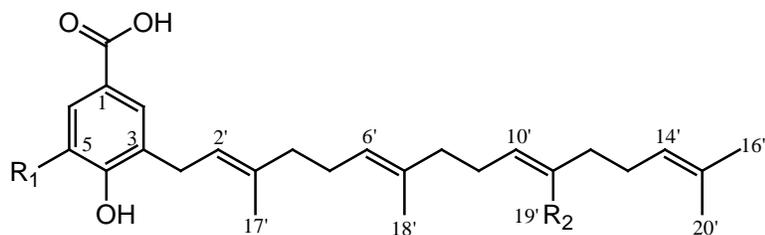
Los derivados del ácido benzoico aislados se agruparon para su estudio en función de la sustitución sobre el anillo aromático con diferentes unidades de isopreno. Teniendo en cuenta esta consideración, los productos aislados se han agrupado en:

**Derivados del ácido benzoico con una unidad de geranilgeranilo**, se aíslan siete metabolitos con estas características estructurales que denominamos de **AB1** a **AB7**, de las cuales **AB1-AB4** resultaron nuevos en la bibliografía química. Los demás metabolitos incluidos en este grupo fueron identificados como: ácido 3,4-dihidroxi-5-[(2*E*,6*E*,10*E*)-3,7,11,15-tetrametil-2,6,10,14-hexadecatetraenil] benzoico<sup>1</sup> (**AB5**), ácido 4-hidroxi-3-[(2*E*,6*E*,10*E*)-3,7,11,15-tetrametil-2,6,10,14-hexadecatetraenil] benzoico<sup>1</sup> (**AB6**) y ácido 3-[(2*E*,6*E*,10*E*)-11-carboxi-3,7,15-trimetil-2,6,10,14-hexadecatetraenil]-4,5-dihidroxi benzoico<sup>2</sup> (**AB7**).



<sup>1</sup> Maxwell, A.; Rampersad, D. *Journal of Natural Products*. **1989**, 52, 614-618.

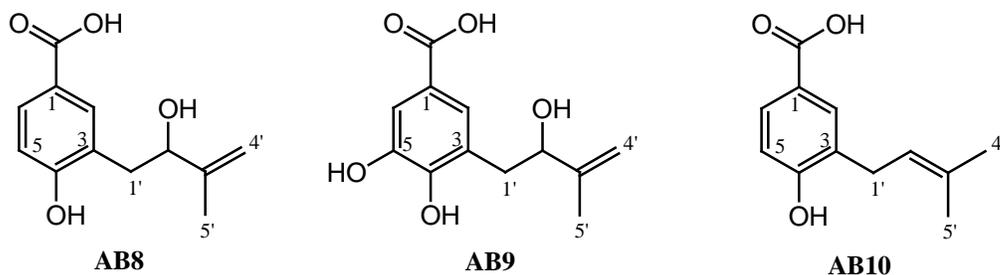
<sup>2</sup> Flores, N.; Jiménez, I. A.; Giménez, A.; Ruiz, G.; Gutierrez, D.; Bourdy, G.; Bazzocchi, I. L. *Phytochemistry*. **2009**, 70, 621-627.



**AB6**  $R_1 = H, R_2 = CH_3$

**AB7**  $R_1 = OH, R_2 = COOH$

**Derivados del ácido benzoico con una unidad de isopreno**, que corresponden a los metabolitos que hemos denominado de **AB8** a **AB10**. Estos metabolitos habían sido descritos con anterioridad en la bibliografía química y fueron identificados como: 4-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoato de metilo<sup>3</sup> (**AB8**), 4,5-dihidroxi-3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil) benzoato de metilo<sup>4</sup> (**AB9**) y 4-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil) benzoato de metilo<sup>5</sup> (**AB10**).



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  $^1H$  y  $^{13}C$ , 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 del género *Piper* estudiadas.

<sup>3</sup> Díaz, P. P.; Arias, T. C.; Joseph-Nathan, P. *Phytochemistry*. **1987**, 26, 809-811.

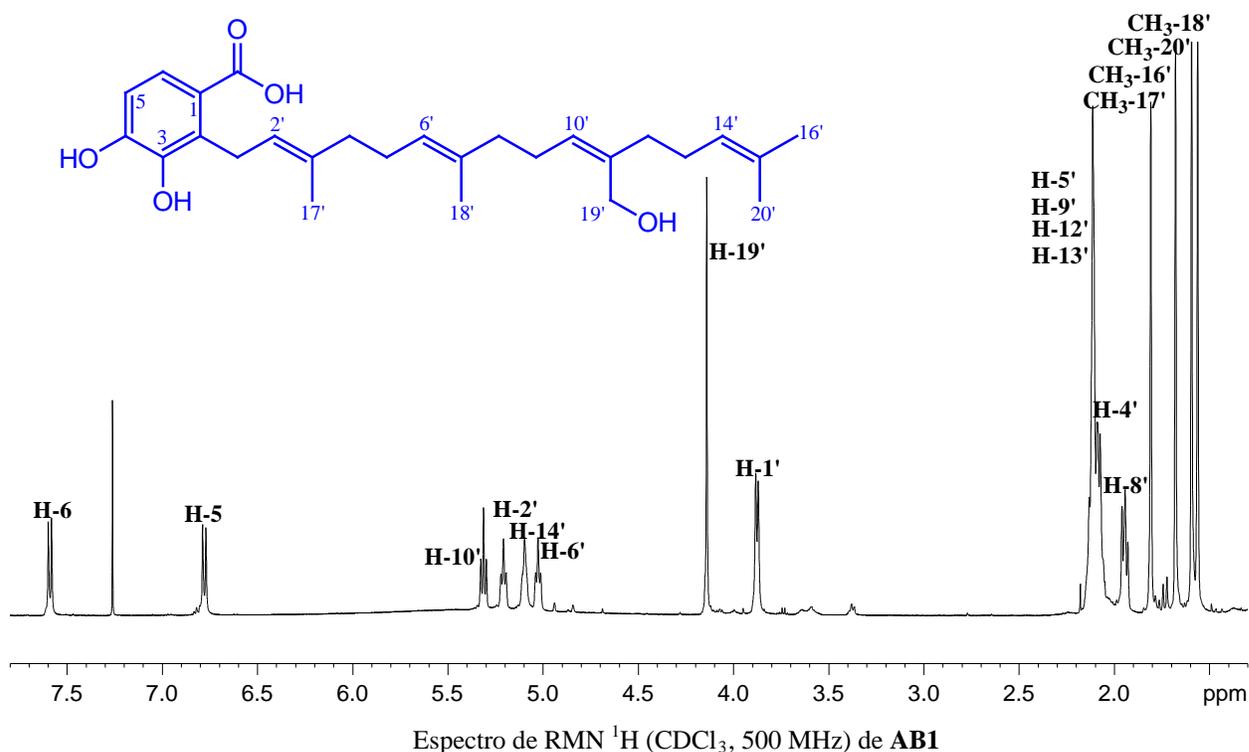
<sup>4</sup> Flores, N.; Jiménez, I. A.; Giménez, A.; Ruiz, G.; Gutierrez, D.; Bourdy, G.; Bazzocchi, I. L. *Journal of Natural Products*. **2008**, 71, 1538-1543.

<sup>5</sup> Orjala, J.; Erdelmeire, C. A. J.; Wright, A. D.; Rali, T.; Sticher, O. *Planta Medica*. **1993**, 59, 546-551.

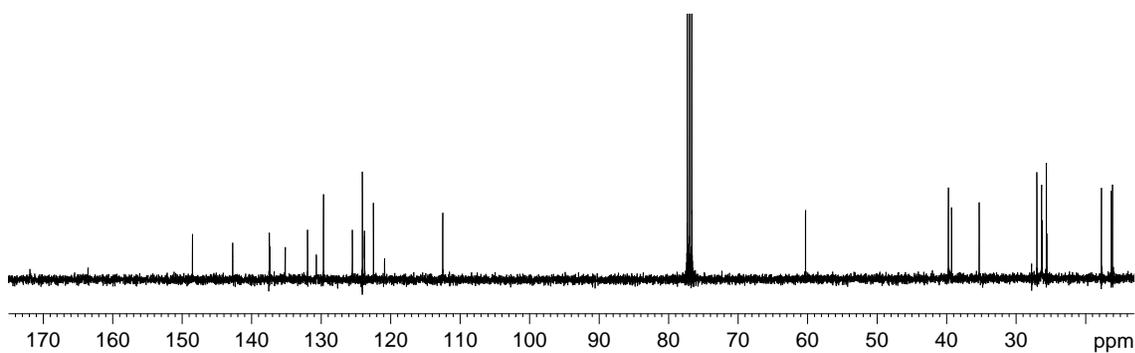
## Determinación estructural del producto AB1

El compuesto que hemos denominado **AB1**, mostró una fórmula molecular  $C_{27}H_{38}O_5$  442.2617  $m/z$ , determinada mediante espectrometría de masas (ESI), RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$ . En el espectro de IR se observaron bandas características de grupo hidroxilo ( $3175\text{ cm}^{-1}$ ), ácido carboxílico ( $3519\text{-}2561$ ,  $1682\text{ cm}^{-1}$ ) y anillo aromático ( $1610$  y  $758\text{ cm}^{-1}$ ).

Su espectro de RMN de  $^1H$  mostró señales correspondientes a cuatro metilos sobre doble enlace a  $\delta_H$  1.56 (s, H-18'), 1.59 (s, H-20'), 1.68 (s, H-16') y 1.81 (s, H-17'); señales asignables a ocho metilenos, dos de ellos como triplete a  $\delta_H$  1.94 ( $J= 8.4\text{ Hz}$ , H-8') y 2.09 ( $J= 7.3\text{ Hz}$ , H-4'), cuatro multipletes a  $\delta_H$  2.11 (H-5', H-9', H-12', H-13'), un doblete a  $\delta_H$  3.88 ( $J= 6.6\text{ Hz}$ , H-1') y un metileno asignable a un alcohol primario a  $\delta_H$  4.14 (2H, H-19'), así como señales correspondientes a cuatro protones vinílicos a  $\delta_H$  5.03 ( $J= 6.6\text{ Hz}$ , H-6'), 5.10 ( $J= 6.2\text{ Hz}$ , H-14'), 5.21 ( $J= 6.6\text{ Hz}$ , H-2') y 5.31 ( $J= 7.3\text{ Hz}$ , H-10'). Las señales correspondientes a dos protones aromáticos a  $\delta_H$  6.78 (1H,  $J= 8.7\text{ Hz}$ , H-5) y 7.59 (1H,  $J= 8.7\text{ Hz}$ , H-6), indican una posición *orto* de los mismos en un anillo aromático.



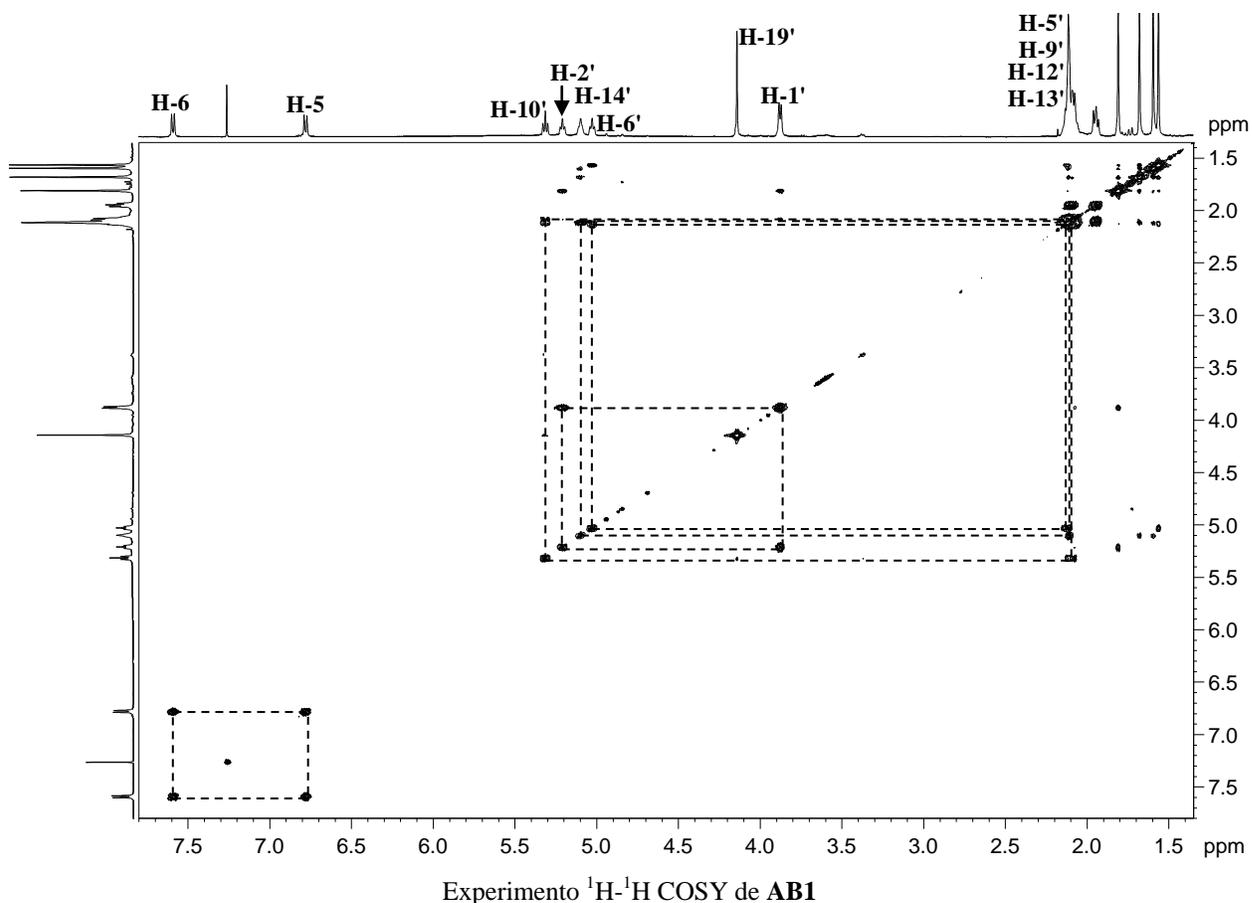
Su espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostró señales para 27 carbonos, lo que junto con los experimentos DEPT 90 y 135 indicaron la presencia de cuatro metilos, ocho metilenos, seis metinos y nueve carbonos cuaternarios, destacando las señales de cuatro carbonos unidos a oxígeno a  $\delta_{\text{C}}$  142.7 (C-3) y 148.5 (C-4), característicos de carbonos fenólicos, a  $\delta_{\text{C}}$  60.3 (C-19) asignado a un carbono de un alcohol primario y una señal a  $\delta_{\text{C}}$  171.9, característica de ácido carboxílico.



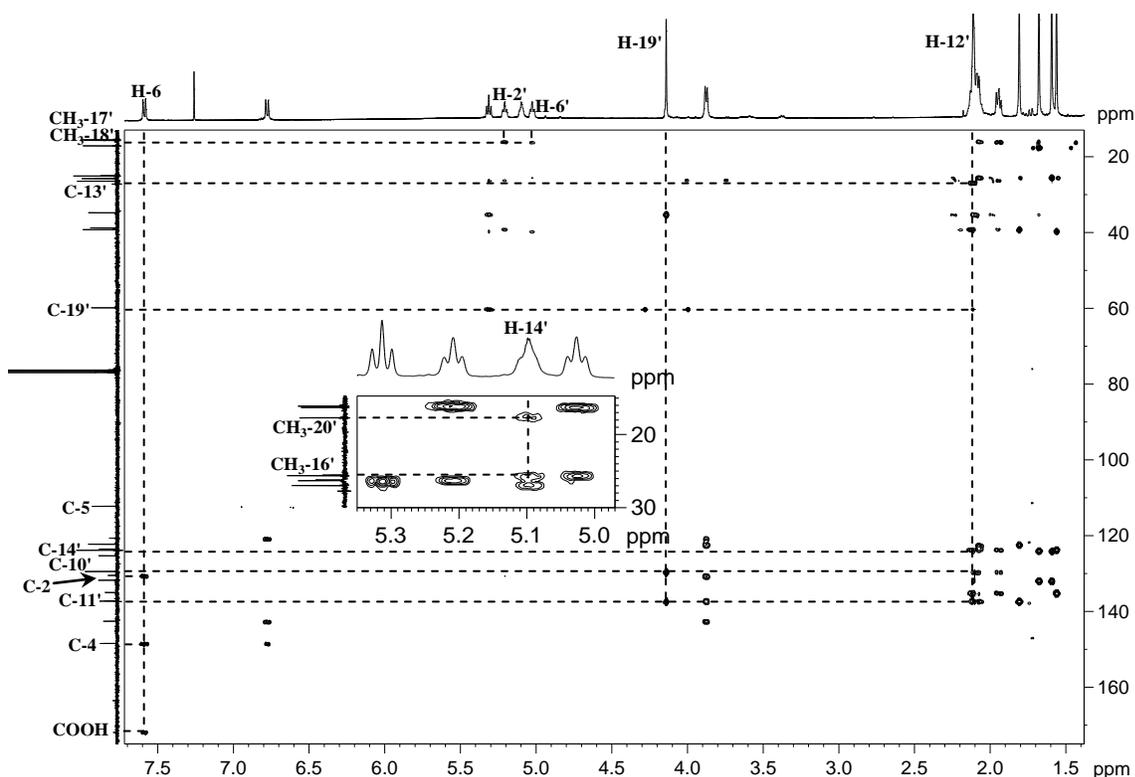
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) de **ABI**

El conjunto de estos datos están de acuerdo con una estructura de derivado del ácido benzoico que presenta un ácido carboxílico, dos grupos fenólicos, un alcohol primario y una cadena terpénica de geranilgeranilo.

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 aromáticos H-5 ( $\delta_{\text{H}}$  6.78,  $J= 8.7$  Hz) y H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  7.59,  $J= 8.7$  Hz), lo que confirma una posición *orto* en el anillo aromático. Las correlaciones  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ : H-1'/H-2', H-5'/H-6', H-9'/H-10' y H-13'/H-14', confirman la presencia en la molécula de cuatro unidades de isopreno.

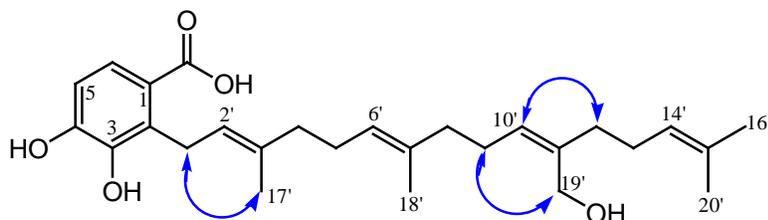


La localización de los distintos grupos funcionales en la molécula se determinó a partir de las correlaciones a larga distancia observadas en un experimento HMBC. Así, podemos destacar como correlaciones más relevantes la del protón aromático H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  7.59) con el carbono carboxílico ( $\delta_{\text{C}}$  171.9) y los carbonos C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  112.5), C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  130.7) y C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  148.5), lo que nos permitió establecer la regiosustitución del anillo aromático. Por otro lado, se observó correlación de los protones vinílicos H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  5.21) y H-6' ( $\delta_{\text{H}}$  5.03) con los carbonos de los metilos CH<sub>3</sub>-17' ( $\delta_{\text{C}}$  16.1) y CH<sub>3</sub>-18' ( $\delta_{\text{C}}$  16.3), respectivamente, así como correlación de H-14' ( $\delta_{\text{H}}$  5.10) con los metilos CH<sub>3</sub>-16' ( $\delta_{\text{C}}$  25.7) y CH<sub>3</sub>-20' ( $\delta_{\text{C}}$  17.7) y correlación de H-12' ( $\delta_{\text{H}}$  2.11) con los carbonos metilénicos C-19' ( $\delta_{\text{C}}$  60.3) y C-13' ( $\delta_{\text{C}}$  27.0), los carbonos metínicos C-10' ( $\delta_{\text{C}}$  129.7) y C-14' ( $\delta_{\text{C}}$  124.1) y el carbono cuaternario C-11' ( $\delta_{\text{C}}$  137.5), lo que permitió establecer las características de la unidad diterpénica de la molécula y fijar la posición del alcohol primario sobre el C-11'.

Experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **AB1**

La estereoquímica de los dobles enlaces se estableció basándonos en consideraciones biogénicas y comparación con compuestos relacionados<sup>1</sup>, y confirmamos mediante un experimento ROESY, en el que se observaron los siguientes efectos ROE:  $\text{CH}_3$ -17'/H-1', H-10'/H-12' y H-9'/H-19'.

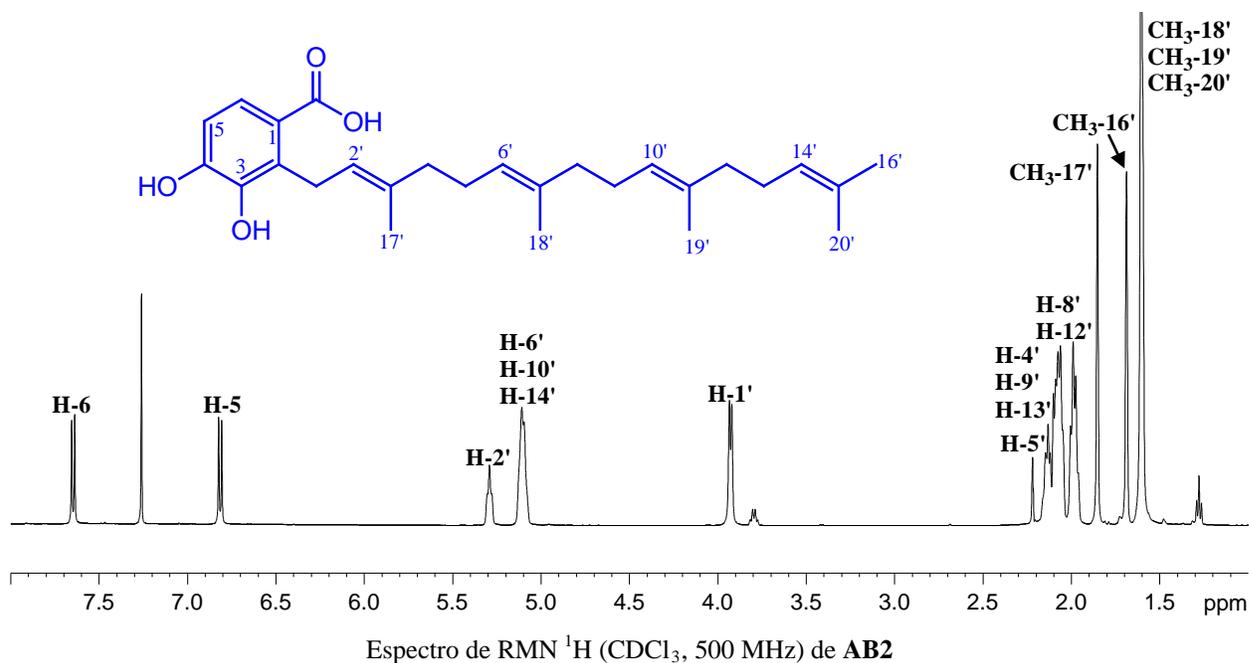
Estos datos nos permitieron establecer la estructura de **AB1** como el ácido **3,4-dihidroxi-2-[(2*E*,6*E*,10*Z*)-11-(hidroximetil)-3,7,15-trimetil-2,6,10,14-hexadecatetraenil] benzoico**.

Efectos ROE ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) observados en el experimento ROESY de **AB1**

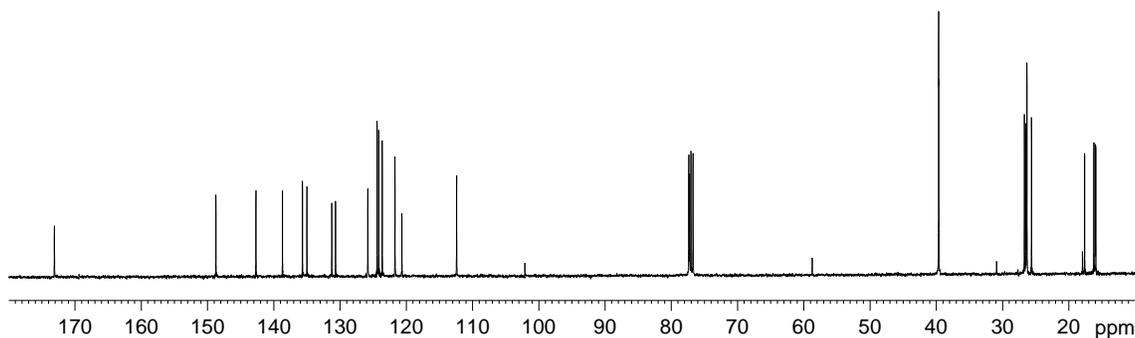
## Determinación estructural del producto AB2

La estructura del compuesto que hemos denominado **AB2**, que presentó una fórmula molecular  $C_{27}H_{38}O_4$ , (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  $^{13}C$ , nos indicó que nuestro producto es un derivado del ácido benzoico que presenta en su estructura un ácido carboxílico, dos grupos fenólicos y una cadena terpénica de veinte átomos de carbono. Así, en el espectro de RMN de  $^1H$  se observaron señales para dos protones aromáticos como dobletes a  $\delta_H$  6.81 (1H,  $J= 8.6$  Hz, H-6) y 7.65 (1H,  $J= 8.6$  Hz, H-6), lo que indica se encuentran posición *ortho*. La cadena terpénica en la molécula se identificó por las siguientes señales: tres singuletes a  $\delta_H$  1.61 (9H, H-18', H-19', H-20'), 1.69 (H-16') y 1.85 (H-17') asignables a cinco metilos sobre doble enlace, un triplete a  $\delta_H$  5.29 (1H,  $J= 6.6$  Hz, H-2') y un multiplete solapado a  $\delta_H$  5.10 (3H, H-6', H-10' y H-14') asignables a cuatro protones vinílicos. Así mismo, se observaron dos multipletes a  $\delta_H$  1.99 (4H, H-8', H-12') y 2.08 (6H, H-4', H-9', H-13'), un triplete a  $\delta_H$  2.13 (2H,  $J= 6.2$  Hz, H-5') y un doblete a  $\delta$  3.93 (2H,  $J= 6.7$  Hz, H-1'), correspondientes a siete grupos metilenos.



Su espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostró señales para 27 carbonos, lo que junto con los experimentos DEPT 90 y 135 indicó la presencia de cinco metilos, siete metilenos, seis metinos y nueve carbonos cuaternarios, destacando las señales a  $\delta_{\text{C}}$  142.7 (C-3), 148.8 (C-4), característicos de carbonos fenólicos y un carbono a  $\delta_{\text{C}}$  173.1 (COOH), característico de un ácido carboxílico.



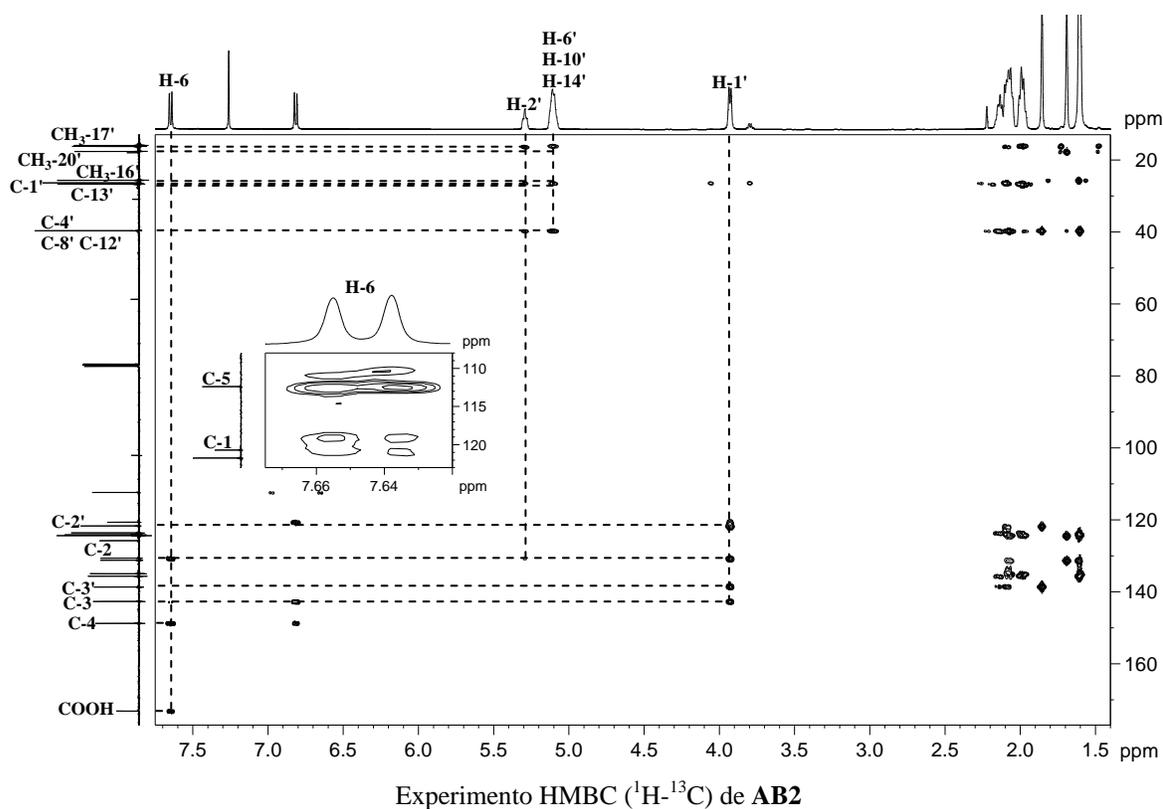
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) de **AB2**

Al objeto de confirmar la estructura se realizaron experimentos bidimensionales de RMN (ROESY, COSY, HSQC y HMBC). Así, en el experimento HMBC destacan las correlaciones observadas entre el protón H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  7.65) y los carbonos C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  112.4), C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  120.7), C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  130.7), C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  148.8) y el carbono carboxílico ( $\delta_{\text{C}}$  173.1), lo que nos permitió establecer la regiosustitución del anillo aromático. Por otro lado, las correlaciones siguientes: H-1'/C-2' ( $\delta_{\text{C}}$  121.7), C-3' ( $\delta_{\text{C}}$  138.7), C-2 y C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  142.7), H-2'/C-2, C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  26.4), C-4' ( $\delta_{\text{C}}$  39.6) y  $\text{CH}_3$ -17' ( $\delta_{\text{C}}$  16.3) y H-14'/C-13' ( $\delta_{\text{C}}$  26.8), C-12' ( $\delta_{\text{C}}$  39.7),  $\text{CH}_3$ -16' ( $\delta_{\text{C}}$  25.7) y  $\text{CH}_3$ -20' ( $\delta_{\text{C}}$  17.7), nos permitieron establecer las características de la unidad diterpénica de la molécula.

El conjunto de estos datos están de acuerdo con una estructura de derivado del ácido benzoico que presenta un ácido carboxílico, dos grupos fenólicos y una cadena terpénica de geranilgeranilo.

El análisis de los datos espectroscópicos de **AB2** y comparación con los datos del producto que hemos denominado **AB1**, indican que los dos compuestos están relacionados, siendo la una diferencia estructural la sustitución del alcohol primario sobre C-19' presente en **AB1** por un grupo metilo.

Estos datos y comparación con los datos en la bibliografía química de compuestos relacionados<sup>1</sup>, nos permitieron establecer la estructura de **AB2** como el **ácido 3,4-dihidroxi-2-[(2E,6E,10E)-3,7,11,15-tetrametil-2,6,10,14-hexadecatetraenil] benzoico**.

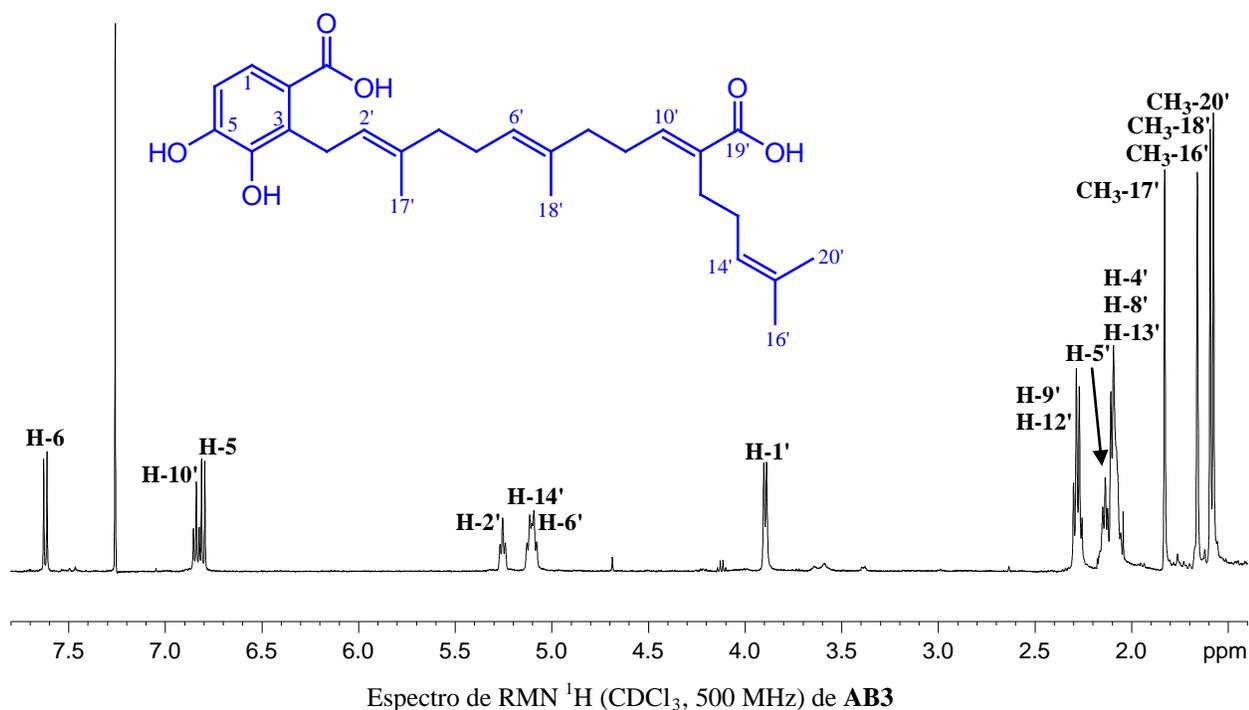


### Determinación estructural del producto **AB3**

El análisis de los datos físicos y espectroscópicos del compuesto que hemos denominado **AB3** nos permitió establecer su estructura. Su fórmula molecular, C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>, 456.2403 *m/z*, determinada mediante espectrometría de masas (ESI), fue determinada mediante sus datos de espectrometría de masas de alta resolución y los de resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C.

El estudio de los datos espectroscópicos de IR, UV, RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de **AB3**, nos indicaron la presencia en la molécula de dos grupos fenólicos, dos ácidos carboxílicos y una unidad de diterpeno. Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **AB1**, **AB2** y **AB3** mostró que los tres productos estaban relacionados, mostrando como principal diferencia en sus espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C las señales correspondientes al carbono C-19'. Así, el compuesto

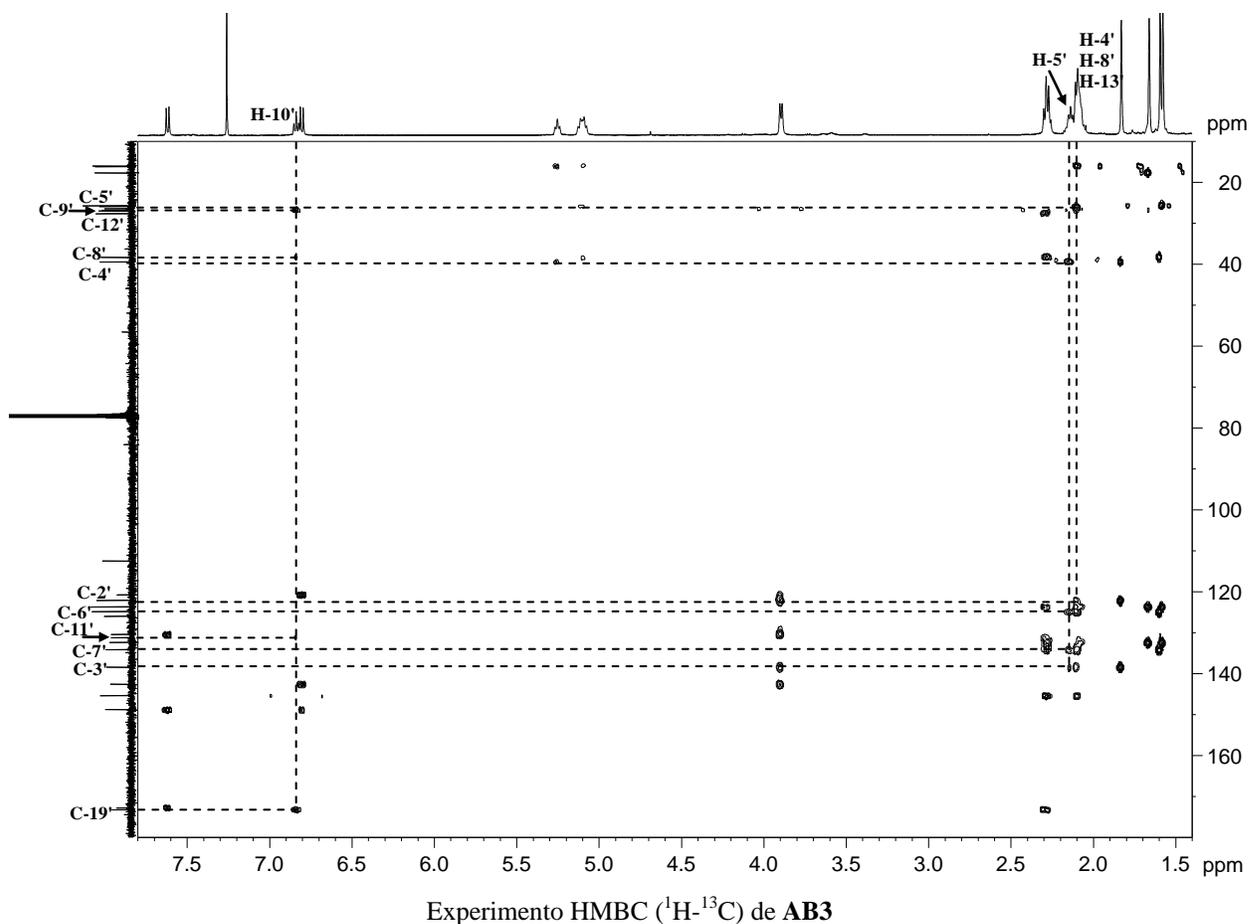
**AB2** presenta en esta posición un grupo metilo, que se encuentra oxidado a un alcohol primario en **AB1** y a su vez oxidado a un ácido carboxílico ( $\delta_C$  173.3) en **AB3**.



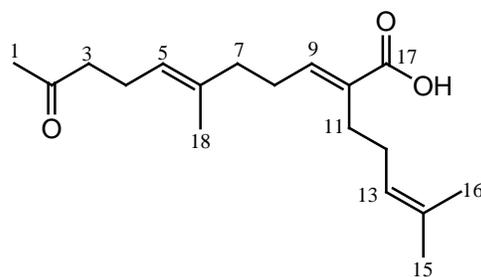
Un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares (COSY, ROESY) y heteronucleares (HSQC, HMBC) nos permitió confirmar la posición de los diferentes grupos funcionales sobre la molécula. Así, destacan en el experimento HMBC las correlaciones del protón metilénico H-4' ( $\delta_H$  2.10) con los carbonos C-2' ( $\delta_C$  122.3) y C-5' ( $\delta_C$  26.0), correlación de H-5' ( $\delta_H$  2.14) con los carbonos C-3' ( $\delta_C$  138.6), C-4' ( $\delta_C$  39.6), C-6' ( $\delta_C$  125.0) y C-7' ( $\delta_C$  134.3), así como correlación del protón vinílico H-10' ( $\delta_H$  6.84) con los carbonos C-8' ( $\delta_C$  38.4), C-9' ( $\delta_C$  26.9), C-11' ( $\delta_C$  131.4) y C-19' ( $\delta_C$  173.3).

La geometría del doble enlace sobre C-10' y C-11' fue establecida como *E* dado el desplazamiento químico a campo significativamente bajo del protón vinílico H-10' a  $\delta_H$  6.84<sup>6</sup> en el espectro de RMN  $^1\text{H}$ .

<sup>6</sup> Su, J-H.; Dai, C-F.; Huang, H-H.; Wu, Y-C.; Sung, P-J. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **2007**, 55, 594-597.



Estos datos y comparación con los datos en la literatura para el ácido (*E,E*) cetochabrólico<sup>6</sup>, nos permitieron determinar de forma inequívoca la estructura de **AB3** como ácido 2-[(*2E,6E,10E*)-11-carboxi-3,7,15-trimetil-2,6,10,14-hexadecatetraenil]-3,4-dihidroxi benzoico.

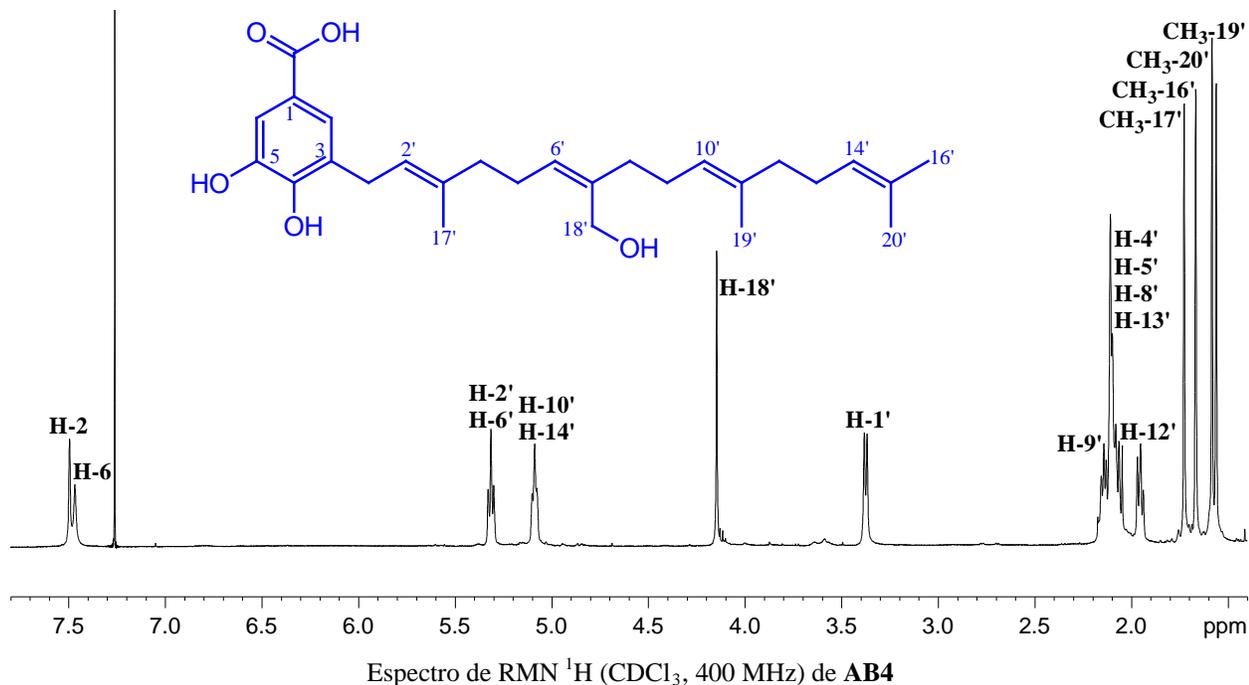


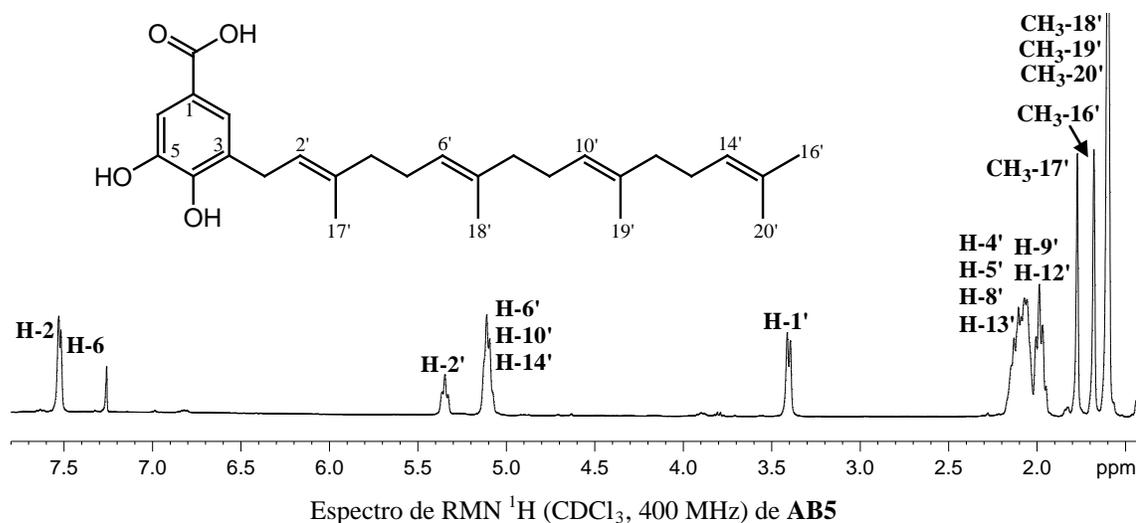
Ácido (*E,E*)-cetochabrólico

## Determinación estructural del producto AB4

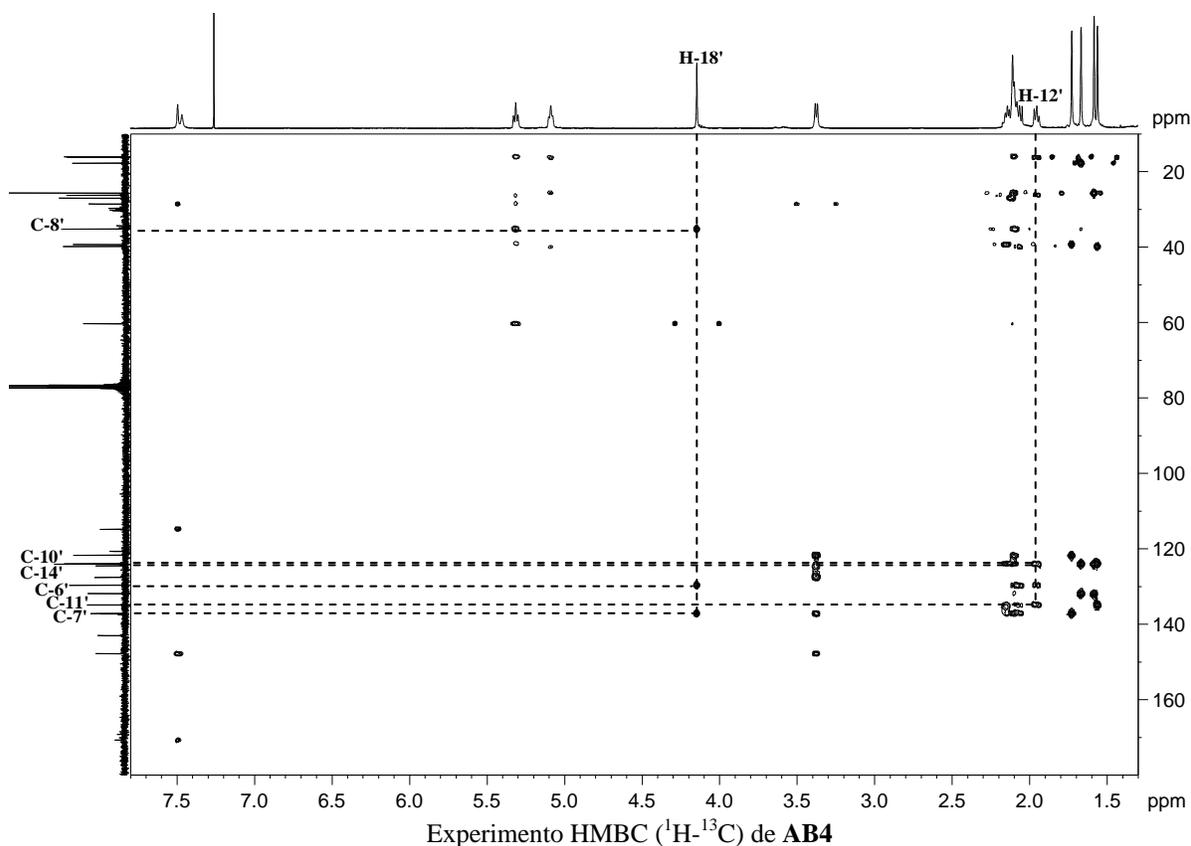
El análisis de los datos físicos y espectroscópicos del compuesto que hemos denominado **AB4** nos permitió establecer su estructura. Su fórmula molecular,  $C_{27}H_{38}O_5$ , fue determinada mediante sus datos de espectrometría de masas de alta resolución y los de resonancia magnética nuclear de  $^1H$  y  $^{13}C$ .

El estudio de los datos espectroscópicos de IR, UV, RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  de **AB4** nos indicaron la presencia en la molécula de un alcohol primario, dos grupos fenólicos, un ácido carboxílico y una unidad de diterpeno. Un estudio comparativo de sus datos espectroscópicos con los del producto **AB5**<sup>1</sup>, que aislamos de *Piper divaricatum* en el presente estudio y había sido descrito anteriormente en la bibliografía química, nos indicó que los dos productos estaban relacionados, siendo la principal diferencia en sus espectros de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$ , la presencia de un singlete a  $\delta_H$  4.15 (H-18') y un carbono secundario a  $\delta_C$  60.3 (C-18') característicos de un alcohol primario.

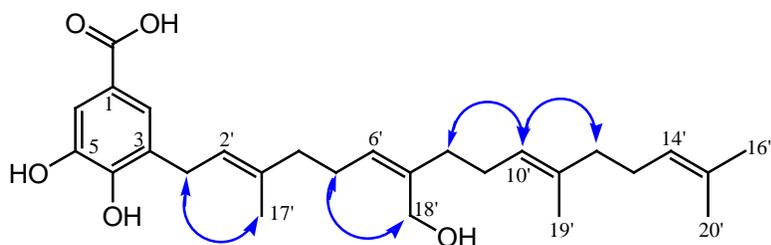




Así como en los compuestos anteriormente descritos, un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares (COSY, ROESY) y heteronucleares (HSQC, HMBC) nos permitió confirmar los diferentes grupos sobre la molécula. Cabe destacar las correlaciones observadas en un experimento HMBC entre H-18' ( $\delta_{\text{H}}$  4.15) y los carbonos C-6' ( $\delta_{\text{C}}$  129.7), C-7' ( $\delta_{\text{C}}$  137.3) y C-8' ( $\delta_{\text{C}}$  35.2) confirmaron la posición de un alcohol primario sobre C-18'.



La estereoquímica de los dobles enlaces se estableció por biogénesis y comparación con los datos de compuestos relacionados<sup>1</sup> y se confirmó mediante un experimento ROESY, en el que se observó efectos ROE de CH<sub>3</sub>-17'/H-1', H-18'/H-5' y H-10'/H-8', H-13'. Estos datos nos permitieron determinar de forma inequívoca la estructura de **AB4** como **ácido 4,5-dihidroxi-3-[(2E,6Z,10E)-7-(hidroximetil)-3,11,15-trimetil -2,6,10,14-hexadecatetraenil] benzoico**.



Efectos ROE (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H) observados en un experimento ROESY de **AB4**

Tabla 12. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) de AB1-AB4

Posición	AB1	AB2	AB3	AB4
<b>H-2</b>				7.49 s
<b>H-5</b>	6.78 d (8.7)	6.81 d (8.6)	6.81 d (8.6)	
<b>H-6</b>	7.59 d (8.7)	7.65 d (8.6)	7.62 d (8.6)	7.47 s
<b>H-1'</b>	3.88 d (6.6)	3.93 d (6.7)	3.90 d (6.7)	3.37 d (7.1)
<b>H-2'</b>	5.21 t (6.6)	5.29 t (6.6)	5.26 t (6.7)	5.32 t* (7.3)
<b>H-4'</b>	2.09 t (7.3)	2.08 m*	2.10 m*	2.10 m*
<b>H-5'</b>	2.11 m*	2.13 t (6.2)	2.14 t (6.0)	2.10 m*
<b>H-6'</b>	5.03 t (6.6)	5.10 m*	5.09 m	5.32 t* (7.3)
<b>H-8'</b>	1.94 t (8.4)	1.99 m*	2.10 m*	2.10 m*
<b>H-9'</b>	2.11 m*	2.08 m*	2.28 m*	2.14 t (6.7)
<b>H-10'</b>	5.31 t (7.3)	5.10 m*	6.84 t (7.4)	5.09 t* (6.7)
<b>H-12'</b>	2.11 m*	1.99 m*	2.28 m*	1.95 t (6.9)
<b>H-13'</b>	2.11 m*	2.08 m*	2.10 m*	2.10 m*
<b>H-14'</b>	5.10 t (6.2)	5.10 m*	5.11 m	5.09 t* (6.7)
<b>CH<sub>3</sub>-16'</b>	1.68 s	1.69 s	1.66 s	1.67 s
<b>CH<sub>3</sub>-17'</b>	1.81 s	1.85 s	1.83 s	1.73 s
<b>H-18'</b>	1.56 s	1.61 s*	1.60 s	4.15 s
<b>H-19'</b>	4.14 s	1.61 s*		1.56 s
<b>CH<sub>3</sub>-20'</b>	1.59 s	1.61 s*	1.58 s	1.58 s

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

\* Señales solapadas

Tabla 13. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz) de AB1 a AB4

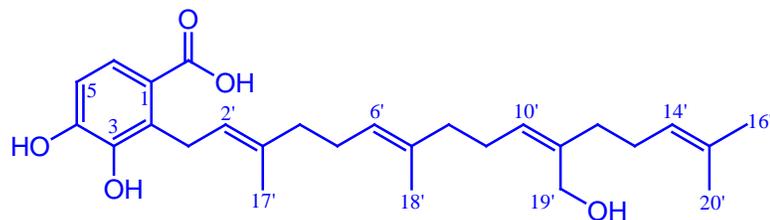
Posición	AB1	AB2	AB3	AB4
<b>C-1</b>	120.9 s	120.7 s	120.9 s	120.7 s
<b>C-2</b>	130.7 s	130.7 s	130.6 s	124.5 d
<b>C-3</b>	142.7 s	142.7 s	142.7 s	127.6 s
<b>C-4</b>	148.5 s	148.8 s	148.9 s	147.8 s
<b>C-5</b>	112.5 d	112.4 d	112.6 d	143.1 s
<b>C-6</b>	125.5 d	125.8 d	126.1 d	114.9 d
<b>COOH</b>	171.9 s	173.1 s	172.9 s	170.8 s
<b>C-1'</b>	26.3 t	26.4 t*	26.6 t	28.5 t
<b>C-2'</b>	122.5 d	121.7 d	122.3 d	121.7 d
<b>C-3'</b>	137.4 s	138.7 s	138.6 s	137.2 s
<b>C-4'</b>	39.3 t	39.6 t	39.6 t	39.3 t
<b>C-5'</b>	25.6 t	26.4 t*	26.0 t	26.2 t
<b>C-6'</b>	123.7 d	123.7 d	125.0 d	129.7 d
<b>C-7'</b>	135.2 s	135.7 s	134.3 s	137.3 s
<b>C-8'</b>	39.8 t	39.7 t*	38.4 t	35.2 t
<b>C-9'</b>	26.4 t	26.6 t	26.9 t	25.6 t
<b>C-10'</b>	129.7 d	124.2 d	145.5 d	124.0 d
<b>C-11'</b>	137.5 s	135.0 s	131.4 s	134.9 s
<b>C-12'</b>	35.3 t	39.7 t*	27.8 t	39.8 t
<b>C-13'</b>	27.0 t	26.8 t	27.2 t	27.0 t
<b>C-14'</b>	124.1 d	124.4 d	123.8 d	124.1 d
<b>C-15'</b>	131.9 s	131.3 s	132.5 s	131.9 s
<b>CH<sub>3</sub>-16'</b>	25.7 c	25.7 c	25.9 c	25.6 c
<b>CH<sub>3</sub>-17'</b>	16.1 c	16.3 c	16.1 c	16.0 c
<b>C-18'</b>	16.3 c	16.0 c	16.3 c	60.3 t
<b>C-19'</b>	60.3 t	16.1 c	173.3 s	16.2 c
<b>CH<sub>3</sub>-20'</b>	17.7 c	17.7 c	17.8 c	17.7 c

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

\* Señales solapadas

### 5.3.2. Datos físicos y espectroscópicos

#### Producto AB1: Ácido 3,4-dihidroxi-2-[(2E,6E,10Z)-11-(hidroximetil)-3,7,15-trimetil-2,6,10,14-hexadecatetraenil] benzoico



Aislado como aceite amarillo (19.5 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-1.7^\circ$  (*c* 0.25,  $\text{CHCl}_3$ ).

UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ): 211 (4.70), 256 (3.91), 290 (3.62) nm.

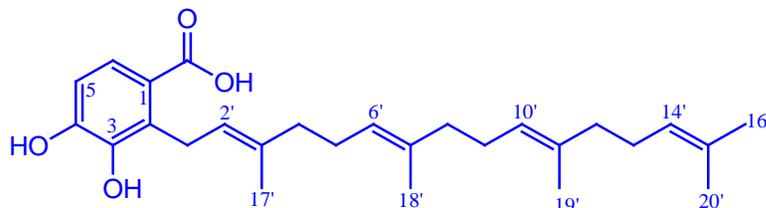
IR  $\nu_{\text{max}}$  (película): 3519-2561, 3175, 2924, 2856, 1682, 1610, 1586, 1446, 1293, 1203, 1002, 758  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.56 (3H, s, H-18'); 1.59 (3H, s, H-20'), 1.68 (3H, s, H-16'); 1.81 (3H, s, H-17'); 1.94 (2H, t,  $J=8.4$  Hz, H-8'); 2.09 (2H, t,  $J=7.3$  Hz, H-4'); 2.11 (2x4H, m, H-5', H-9', H-12', H-13'); 3.88 (2H, d,  $J=6.6$  Hz, H-1'); 4.14 (2H, s, H-19'); 5.03 (1H, t,  $J=6.6$  Hz, H-6'); 5.10 (1H, t,  $J=6.2$  Hz, H-14'); 5.21 (1H, t,  $J=6.6$  Hz, H-2'); 5.31 (1H, t,  $J=7.3$  Hz, H-10'); 6.78 (1H, d,  $J=8.7$  Hz, H-5); 7.59 (1H, d,  $J=8.7$  Hz, H-6).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 16.1 (c, C-17'); 16.3 (c, C-18'); 17.7 (c, C-20'); 25.6 (t, C-5'); 25.7 (c, C-16'); 26.3 (t, C-1'); 26.4 (t, C-9'); 27.0 (t, C-13'); 35.3 (t, C-12'); 39.3 (t, C-4'); 39.8 (t, C-8'); 60.3 (t, C-19'); 112.5 (d, C-5); 120.9 (s, C-1); 122.5 (d, C-2'); 123.7 (d, C-6'); 124.1 (d, C-14'); 125.5 (d, C-6); 129.7 (d, C-10'); 130.7 (s, C-2); 131.9 (s, C-15'); 135.2 (s, C-7'); 137.4 (s, C-3'); 137.5 (s, C-11'); 142.7 (s, C-3); 148.5 (s, C-4); 171.9 (s, COOH).

ESIMS  $m/z$  (%): 465  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (100)

AR-ESI/MS  $m/z$ : Calculado para  $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_5 \text{Na} [\text{M} + \text{Na}]^+$ , 465.2617; observado, 465.2622.

**Producto AB2: Ácido 3,4-dihidroxi-2-[(2E,6E,10E)-3,7,11,15-tetrametil-2,6,10,14-hexadecatetraenil] benzoico**

Aislado como aceite amarillo (194.5 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : +6.13° (*c* 0.16, CHCl<sub>3</sub>).

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 210 (4.66), 257 (3.88), 291 (3.65) nm.

IR $\nu_{\max}$  (película): 3528-2567, 3187, 2967, 2922, 2855, 1682, 1587, 1449, 1293, 828 cm<sup>-1</sup>.

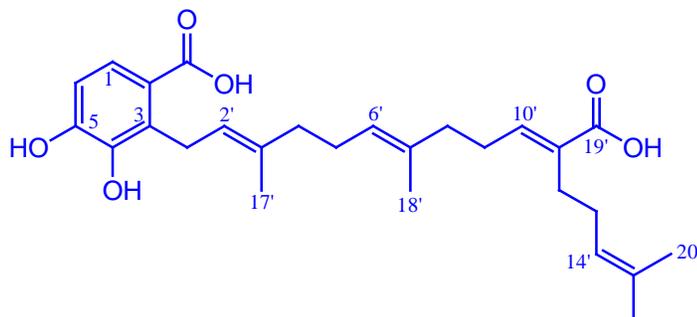
RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.61 (9H, s, H-18', H-19', H-20'); 1.69 (3H, s, H-16'); 1.85 (3H, s, H-17'); 1.99 (4H, m, H-8', H-12'); 2.08 (6H, m, H-4', H-9', H-13'); 2.13 (2H, t, *J* = 6.2 Hz, H-5'); 3.93 (2H, d, *J* = 6.7 Hz, H-1'); 5.10 (3H, m, H-6' H-10' H-14'); 5.29 (1H, t, *J* = 6.6 Hz, H-2'); 6.81 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-5); 7.65 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-6).

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 16.0 (c, C-18'); 16.1 (c, C-19'); 16.3 (c, C-17'); 17.7 (c, C-20'); 25.7 (c, C-16'); 26.4 (t, C-1', C-5'); 26.6 (t, C-9'); 26.8 (t, C-13'); 39.6 (t, C-4'); 39.7 (t, C-8', C-12'); 112.4 (d, C-5); 120.7 (s, C-1); 121.7 (d, C-2); 123.7 (d, C-6'); 124.2 (d, C-10'); 124.4 (d, C-14'); 125.8 (d, C-6); 130.7 (s, C-2); 131.3 (s, C-15'); 135.0 (s, C-11'); 135.7 (s, C-7'); 138.7 (s, C-3'); 142.7 (s, C-3); 148.8 (s, C-4); 173.1 (s, COOH).

ESIMS *m/z* (%): 449 [M + Na]<sup>+</sup> (100)

AR-ESI/MS *m/z*: Calculado para C<sub>27</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub> Na [M + Na]<sup>+</sup>, 449.2668; observado, 449.2657.

**Producto AB3: Ácido 2-[(2E,6E,10E)-11-carboxi-3,7,15-trimetil-2,6,10,14-hexadecatetra-enil]-3,4-dihidroxi benzoico**



Aislado como aceite amarillo (4.1 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : -1.4° (c 0.26, CHCl<sub>3</sub>).

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 210 (4.67), 254 (3.92), 292 (3.63) nm.

IR $\nu_{\max}$  (película): 3496-2557, 3197, 2926, 2853, 1682, 1613, 1447, 1294, 1202, 757 cm<sup>-1</sup>.

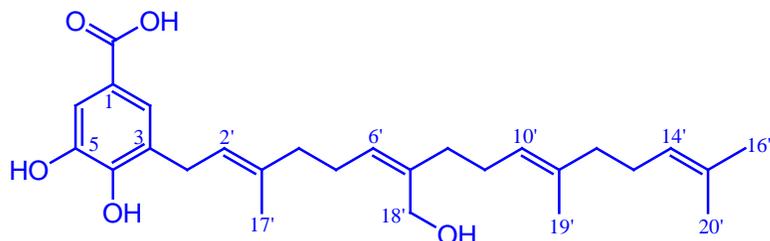
RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.58 (3H, s, H-20'); 1.60 (3H, s, H-18'); 1.66 (3H, s, H-16'); 1.83 (3H, s, H-17'); 2.10 (6H, m, H-4', H-8', H-13'); 2.14 (2H, t,  $J$ = 6.0 Hz, H-5'); 2.28 (4H, m, H-9', H-12'); 3.90 (2H, d,  $J$ = 6.7 Hz, H-1'); 5.09 (1H, m, H-6'); 5.11 (1H, m, H-14'); 5.26 (1H, t,  $J$ = 6.7 Hz, H-2'); 6.81 (1H, d,  $J$ = 8.6 Hz, H-5); 6.84 (1H, t,  $J$ = 7.4 Hz, H-10'); 7.62 (1H, d,  $J$ = 8.6 Hz, H-6).

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 16.1 (c, C-17'); 16.3 (c, C-18'); 17.8 (c, C-20'); 25.9 (c, C-16'); 26.0 (t, C-5'); 26.6 (t, C-1'); 26.9 (t, C-9'); 27.2 (t, C-13'); 27.8 (t, C-12'); 38.4 (t, C-8'); 39.6 (t, C-4'); 112.6 (d, C-5); 120.9 (s, C-1); 122.3 (d, C-2'); 123.8 (d, C-14'); 125.0 (d, C-6'); 126.1 (d, C-6); 130.6 (s, C-2); 131.4 (s, C-11'); 132.5 (s, C-15'); 134.3 (s, C-7'); 138.6 (s, C-3'); 142.7 (s, C-3); 145.5 (d, C-10'); 148.9 (s, C-4); 172.9 (s, COOH); 173.3 (s, C-19').

ESIMS  $m/z$  (%): 479 [M + Na]<sup>+</sup> (100)

AR-ESI/MS  $m/z$ : Calculado para C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub> Na [M + Na]<sup>+</sup>, 479.2410; observado, 479.2403.

**Producto AB4: Ácido-4,5-dihidroxi-3-[(2E,6Z,10E)-7-(hidroximetil)-3,11,15-trimetil-2,6,10,14-hexadecatetraenil] benzoico**



Aislado como aceite amarillo (38.0 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : -1.55° (c 0.23, EtOH).

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 208 (4.59), 258 (3.96), 293 (3.59) nm.

IR $\nu_{\max}$  (película): 3520-2564, 3294, 2924, 2856, 1681, 1603, 1442, 1301, 1224, 996, 758  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.56 (3H, s, H-19'); 1.58 (3H, s, H-20'), 1.67 (3H, s, H-16'); 1.73 (3H, s, H-17'); 1.95 (2H, t,  $J= 6.9$  Hz, H-12'); 2.10 (8H, m, H-4', H-5', H-8', H-13'); 2.14 (2H, t,  $J= 6.7$  Hz, H-9'); 3.37 (2H, d,  $J= 7.1$  Hz, H-1'); 4.15 (2H, s, H-18'); 5.09 (2H, t,  $J= 6.7$  Hz, H-10', H-14'); 5.32 (2H, t,  $J= 7.3$  Hz, H-2', H-6'); 7.47 (1H, s, H-6); 7.49 (1H, s, H-2).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 16.0 (c, C-17'); 16.2 (c, C-19'); 17.7 (c, C-20'); 25.6 (t, C-9'; c, C-16'); 26.2 (t, C-5'); 27.0 (t, C-13'); 28.5 (t, C-1'); 35.2 (t, C-8'); 39.3 (t, C-4'); 39.8 (t, C-12'); 60.3 (t, C-18'); 114.9 (d, C-6); 120.7 (s, C-1); 121.7 (d, C-2'); 124.0 (d, C-10'); 124.1 (d, C-14'); 124.5 (d, C-2); 127.6 (s, C-3); 129.7 (d, C-6'); 131.9 (s, C-15'); 134.9 (s, C-11'); 137.2 (s, C-3'); 137.3 (s, C-7'); 143.1 (s, C-5); 147.8 (s, C-4); 170.8 (s, COOH).

EM  $m/z$  (%): 442 [ $\text{M}^+$ ] (3), 424 (31), 380 (3), 257 (23), 205 (80), 167 (100), 135 (88), 69 (82).

EM de alta resolución: Calculado para  $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_5$ , 442.2719; observado, 442.2741.

## **5.4. Benzopiranos y benzofuranos**

## 5.4. Benzopiranos y benzofuranos

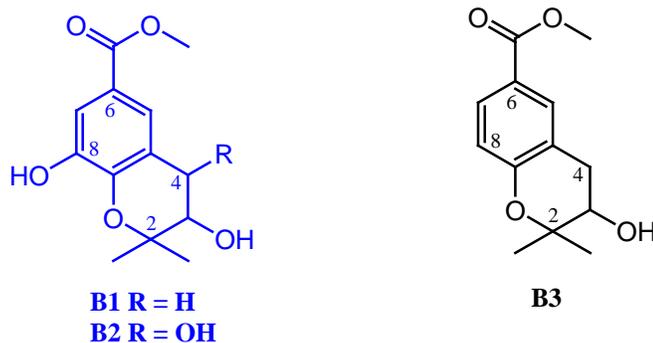
### 5.4.1. Resultados y discusión

El estudio fitoquímico de los extractos de diclorometano de las hojas de *Piper heterophyllum* y los frutos de *P. glabratrum*, después de repetidas cromatografías como se detalla en el apartado de separación cromatográfica, dio lugar al aislamiento de diez metabolitos con estructura de benzopirano o benzofurano, que hemos denominado de **B1** a **B10**. Los productos aislados se agruparon para su estudio de acuerdo a sus estructuras en: benzopiranos, que incluyen cromanos, cromenos y benzofuranos, tal como se describe a continuación.

### Benzopiranos

#### Cromanos

Se aíslan tres metabolitos con este sistema, que hemos denominado de **B1** a **B3**, de los cuales dos resultaron nuevos en la bibliografía química, **B1** y **B2**. El producto que denominamos **B3** había sido descrito anteriormente y fue identificado, basándonos en sus datos físicos y espectroscópicos y comparación con los datos existentes en la bibliografía química como: 3-hidroxi-2,2-dimetil-cromano-6-carboxilato de metilo<sup>1</sup>.

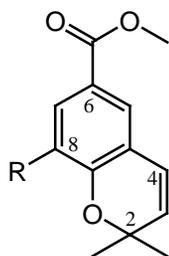


#### Cromenos

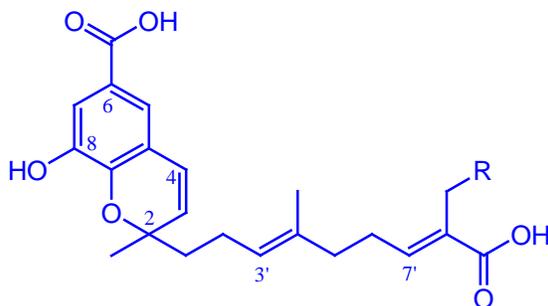
Con este sistema se aíslan los metabolitos que denominamos de **B4** a **B7**, de los cuales dos resultaron nuevos en la bibliografía química, **B6** y **B7**. Los restantes cromenos aislados se habían descrito anteriormente en la bibliografía química y fueron identificados, basándonos en sus datos físicos y espectroscópicos y comparación con los datos existentes en la bibliografía

<sup>1</sup> Terreaux, C.; Gupta, M. P.; Hostettmann, K. *Phytochemistry*. **1998**, 49, 461-464.

química como: 2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato de metilo<sup>2</sup> (**B4**) y 8-hidroxi-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato de metilo<sup>3</sup> (**B5**).



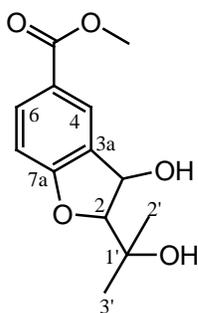
**B4** R = H  
**B5** R = OH



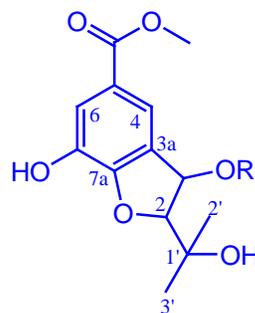
**B6** R =  $\text{CH}_2\text{-CH}=\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}\text{-CH}_3$   
**B7** R =  $\text{CH}_2\text{-CHOH}-\underset{\text{CH}_2}{\text{C}}\text{-CH}_3$

## Benzofuranos

Se aíslan tres metabolitos denominados de **B8** a **B10** con estructura de benzofurano, de los cuales **B9** y **B10** resultaron nuevos en la bibliografía química. El producto **B8** fue identificado como 3-hidroxi-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-2,3-dihidro-benzofurano-5-carboxilato de metilo<sup>4</sup> y aunque había sido descrito con anterioridad en la bibliografía química, sus datos de RMN <sup>13</sup>C no habían sido asignado, por lo que en esta Memoria de Tesis se lleva a cabo la asignación completa de todos sus datos espectroscópicos.



**B8**



**B9** R = H  
**B10** R =  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$

<sup>2</sup> Smith, L. R.; Mahoney, N.; Molyneux, R. J. *Journal of Natural Products*. **2003**, 66, 169-176.

<sup>3</sup> Orjala, J.; Erdelmeier, C.A. J.; Wright, A. D.; Rali, T.; Sticher, O. *Phytochemistry*. **1993**, 34, 813-818.

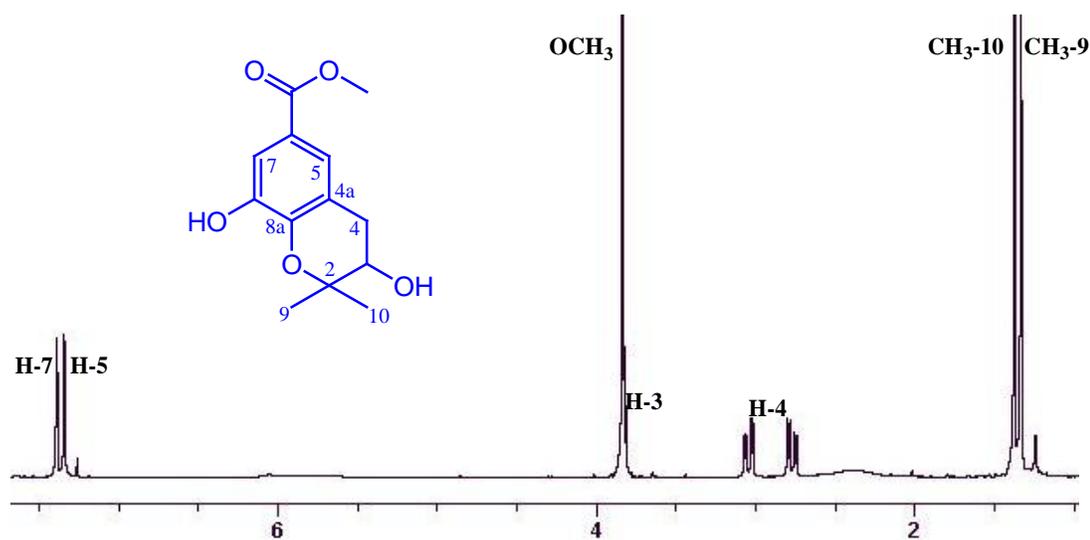
<sup>4</sup> Friederich, U.; Siemens, K.; Solís, P. N.; Gupta, M. P.; Jenet-siemens, K. *Pharmazie*. **2005**, 60, 455-457.

A continuación pasamos a describir la elucidación estructural de los derivados de benzopirano y benzofurano aislados de las especies de *Piper* estudiadas, que resultaron nuevos en la bibliografía química: **B1**, **B2**, **B6**, **B7**, **B9** y **B10**.

### Determinación estructural del producto B1

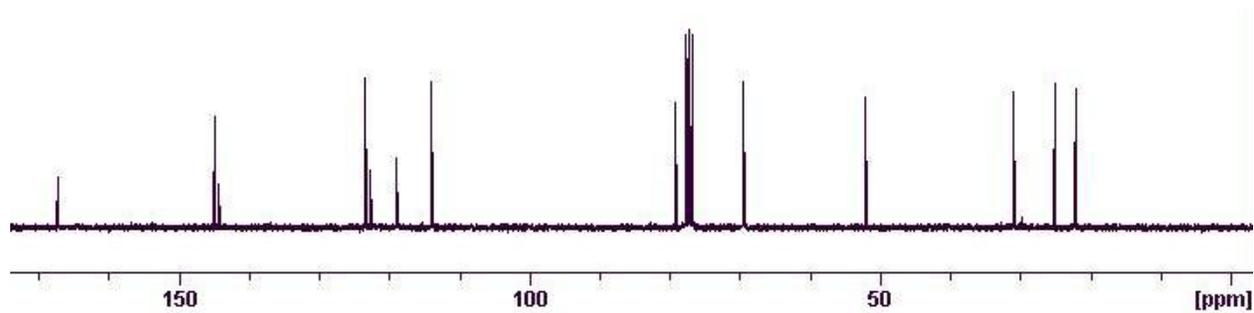
En su espectro de masas, el producto que hemos denominado **B1**, presentó un ión molecular a 252  $m/z$ , que corresponde con una fórmula molecular  $C_{13}H_{16}O_5$ , según espectrometría de masas de alta resolución (EMAR), lo que indica que el producto presenta seis grados de insaturación. Así mismo, se observaron fragmentos correspondientes a la pérdida de agua  $[M-H_2O]^+$  a 234  $m/z$  y pérdida de grupo 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  $^1H$  presentó dos singuletes a  $\delta_H$  1.33 y 1.37, correspondientes a metilos geminales, dos doble dobles a  $\delta_H$  2.78 ( $J= 4.3, 12.7\text{ Hz}$ ) y 3.03 ( $J= 3.6, 12.7\text{ Hz}$ ), asignables a un metileno, un multiplete a  $\delta_H$  3.82, asignable a un protón geminal a un grupo hidroxilo, solapado con un singulete a  $\delta_H$  3.83, característico de un grupo metoxilo y señales para dos protones aromáticos como dos dobletes a  $\delta_H$  7.34 ( $J= 1.3\text{ Hz}$ ) y 7.38 (1H,  $J= 1.3\text{ Hz}$ ), característico de un sistema aromático tetrasustituido.

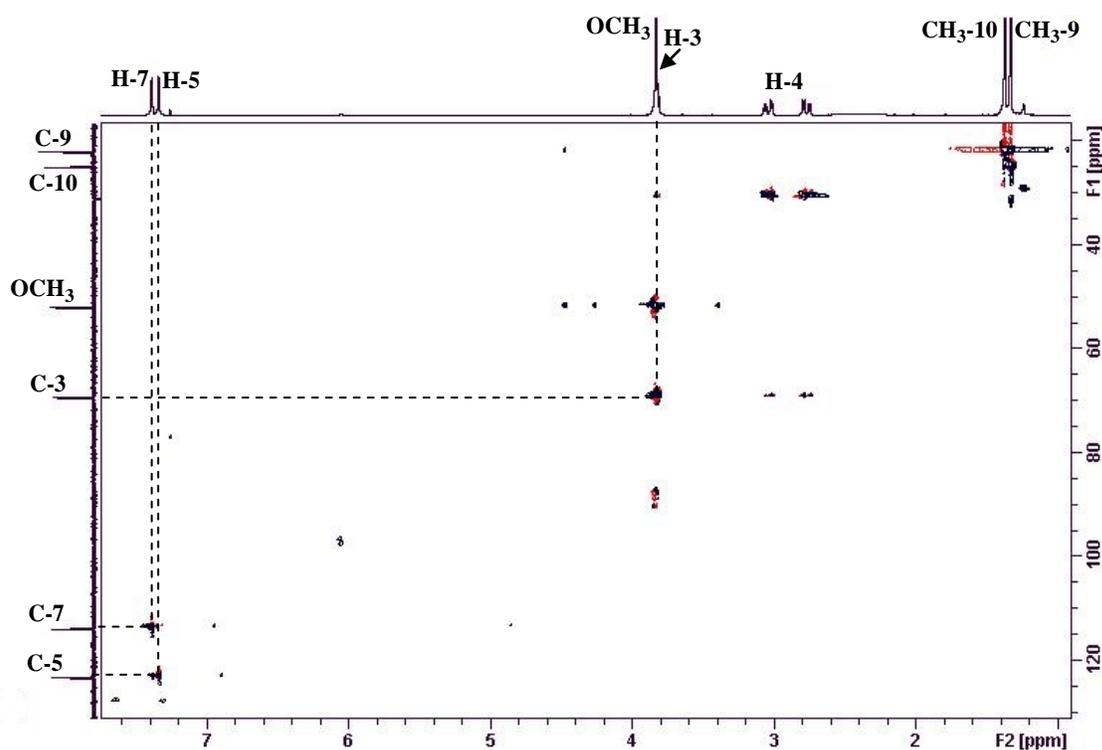


Espectro de RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz) de **B1**

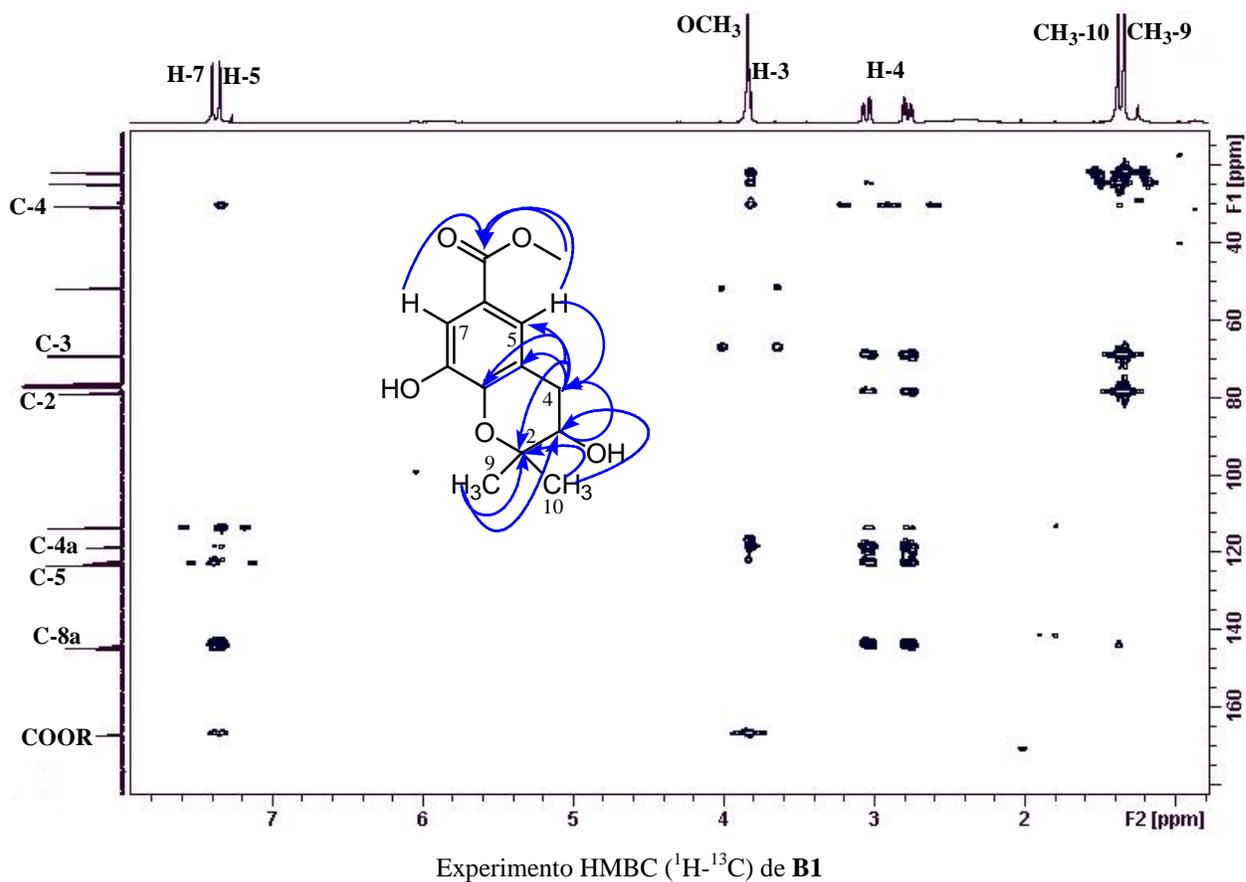
En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  se observaron señales para 13 carbonos y los experimentos DEPT 90 y 135 indicaron la presencia de dos metilos a  $\delta_{\text{C}}$  22.0 (C-9) y 24.9 (C-10), un grupo metoxilo a  $\delta_{\text{C}}$  51.9, un metileno a  $\delta_{\text{C}}$  30.8 (C-4), tres metinos a  $\delta_{\text{C}}$  69.3 (C-3), 113.8 (C-7) y 123.3 (C-5) y seis carbonos cuaternarios a  $\delta_{\text{C}}$  79.0 (C-2), 118.8 (C-4a), 122.5 (C-6), 144.2 (C-8a), 144.7 (C-8) y 167.0 (COOR). El conjunto de estos datos están de acuerdo con una estructura de benzopirano tipo cromano para el producto **B1**.

Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) de **B1**

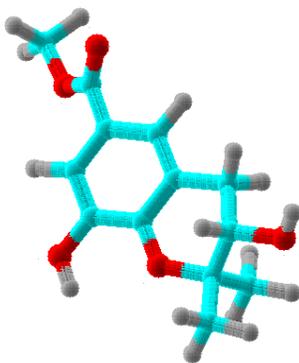
Un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC) nos permitieron la asignación de las señales correspondientes a los protones existentes en la molécula y además correlacionar cada átomo de carbono con sus respectivos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

Experimento HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **B1**

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 ( $\delta_C$  79.0), C-5 ( $\delta_C$  123.3), C-4a ( $\delta_C$  118.8) y C-8a ( $\delta_C$  144.2), así como las correlaciones de los metilos CH<sub>3</sub>-9 a  $\delta_H$  1.33 y CH<sub>3</sub>-10 a  $\delta_H$  1.37 con los carbonos C-2 y C-3 ( $\delta_C$  69.3), lo que permitió establecer al grupo hidroxilo sobre C-3; mientras la correlación del grupo metoxilo y los protones aromáticos H-5 ( $\delta_H$  7.34) y H-7 ( $\delta_H$  7.38) con el carbono carboxílico a  $\delta_C$  167.0, establecieron el grupo metoxilo sobre la molécula.



Cálculos de modelización molecular (PCModel)<sup>5</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 ecuatorial, lo que por otra parte está de acuerdo con las constantes de acoplamiento observadas para H-4, que indican una  $J_{3,4} = 3.6, 4.3$  Hz observadas en el espectro de RMN <sup>1</sup>H. Una disposición axial 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 **B1** como el **3,8-dihidroxi-2,2-dimetil-cromano-6-carboxilato de metilo**.



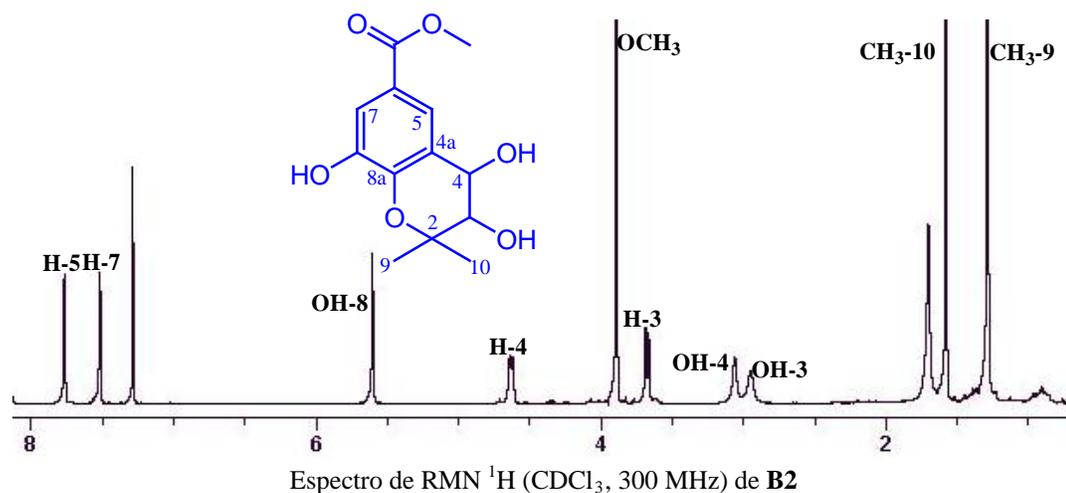
Estructura tridimensional de **B1**

### Determinación estructural del producto **B2**

La estructura del producto denominado **B2** se estableció mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos, presentado una fórmula molecular  $C_{13}H_{16}O_6$  (EMAR). Los datos de IR, RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C, están de acuerdo con una estructura de benzopirano con esqueleto de cromano, que presenta grupos hidroxilo, un grupo éster y un anillo aromático tetrasustituido.

Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **B2** con **B1** mostró que ambos productos están relacionados, siendo la principal diferencia en sus espectros de RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C la ausencia de la señal asignable al metileno bencílico en C-4 [ $(\delta_H 2.78, dd, J = 4.3, 12.7$  Hz, H-4),  $(\delta_C 30.8, t, C-4)$ ] y la presencia de señales asignables a un alcohol secundario adicional [ $(\delta_H 4.60, d, J = 8.6$  Hz, H-4),  $(\delta_C 68.8, d, C-4)$ ] en el compuesto **B2**.

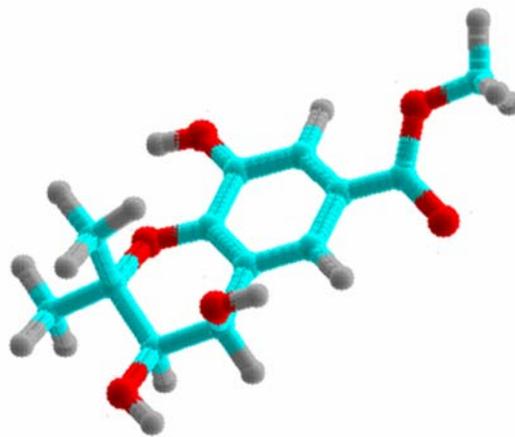
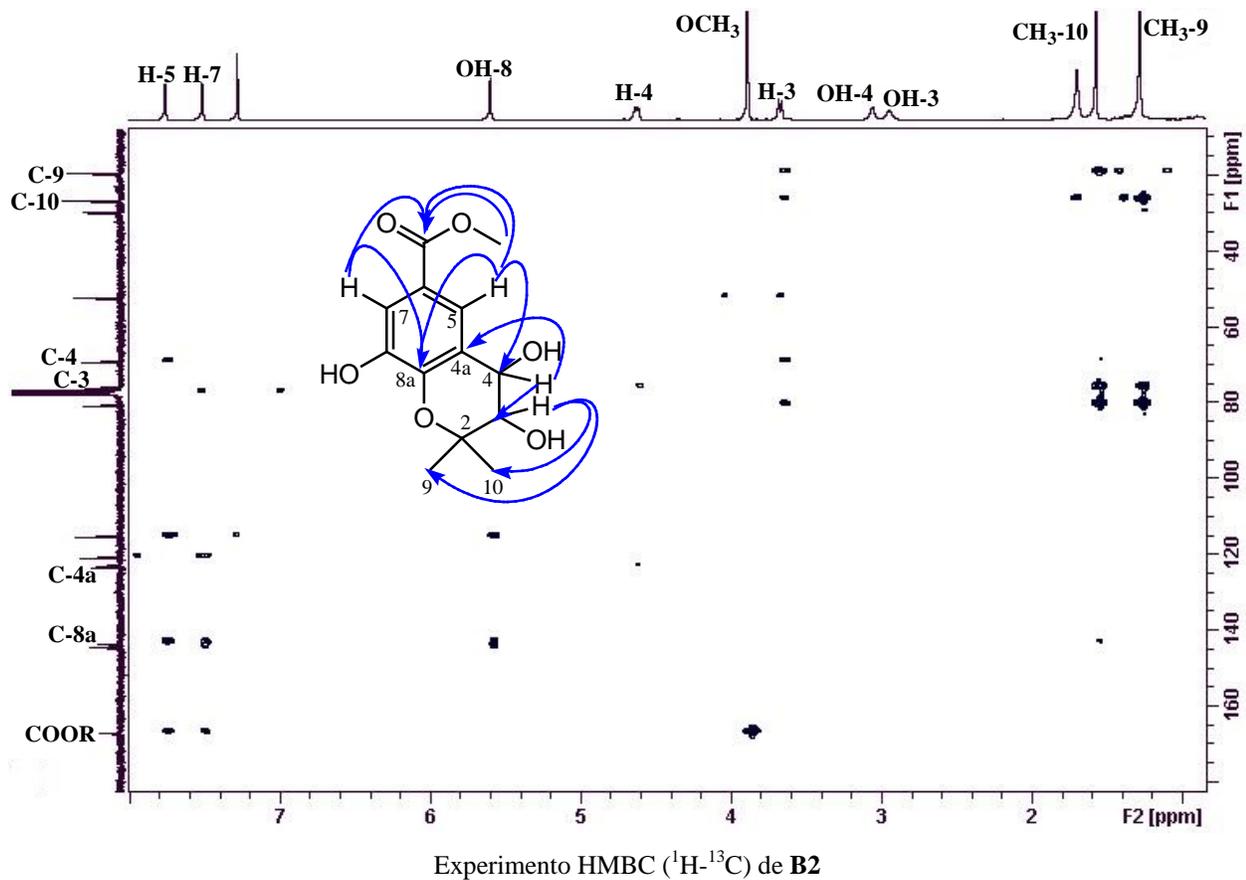
<sup>5</sup> PC Model from Serena Software, P. O. Box. 3076, Bloomington, IN47402-3076.



Con el fin de confirmar la estructura propuesta se realizaron experimentos 2D de RMN. Así, el estudio de las constantes de acoplamiento y un experimento COSY indicó la presencia 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 establecieron mediante un experimento HMBC, en el cual se observaron como correlaciones más relevantes las del protón a  $\delta_{\text{H}}$  3.65 (H-3) con los carbonos C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  19.9) y C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  26.2) y correlación del protón a  $\delta_{\text{H}}$  4.60 (H-4) con los carbonos C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  75.6) y C-4a ( $\delta_{\text{C}}$  122.6). Así mismo se observó correlación de los protones aromáticos a  $\delta_{\text{H}}$  7.74 (H-5) y  $\delta_{\text{H}}$  7.49 (H-7) con el carbono C-8a ( $\delta_{\text{C}}$  143.3) y el carbono carboxílico a  $\delta_{\text{C}}$  166.8 y correlación de los protones del grupo metoxilo a  $\delta_{\text{H}}$  3.87 con el carbono carboxílico.

La estereoquímica relativa de los grupos hidroxilo en C-3 y C-4 se estableció basándonos 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>5</sup> y un experimento ROESY, en el cual se observó efecto ROE del protón oximetínico H-3 con H-4 y el metilo CH<sub>3</sub>-10. Estos datos nos permiten establecer la estructura de **B2** como **3,4,8-trihidroxi-2,2-dimetil-cromano-6-carboxilato de metilo**.



Efectos ROE ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) observados en un experimento ROESY de **B2**

Tabla 14. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de los cromanos B1 y B2.

Posición	B1	B2
H-3	3.82 m*	3.65 d (8.6)
H-4	2.78 dd (4.3, 12.7) 3.03 dd (3.6, 12.7)	4.60 d (8.6)
H-5	7.34 d (1.3)	7.74 d (1.9)
H-7	7.38 d (1.3)	7.49 d (1.9)
CH <sub>3</sub> -9	1.33 s	1.26 s
CH <sub>3</sub> -10	1.37 s	1.55 s
OCH <sub>3</sub>	3.83 s*	3.87 s
OH-8	5.83 s <sub>a</sub>	5.57 s <sub>a</sub>
OH-3		3.00 s <sub>a</sub>
OH-4		3.09 s <sub>a</sub>

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

\* Señales solapadas

Tabla 15. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz) de los cromanos B1 y B2.

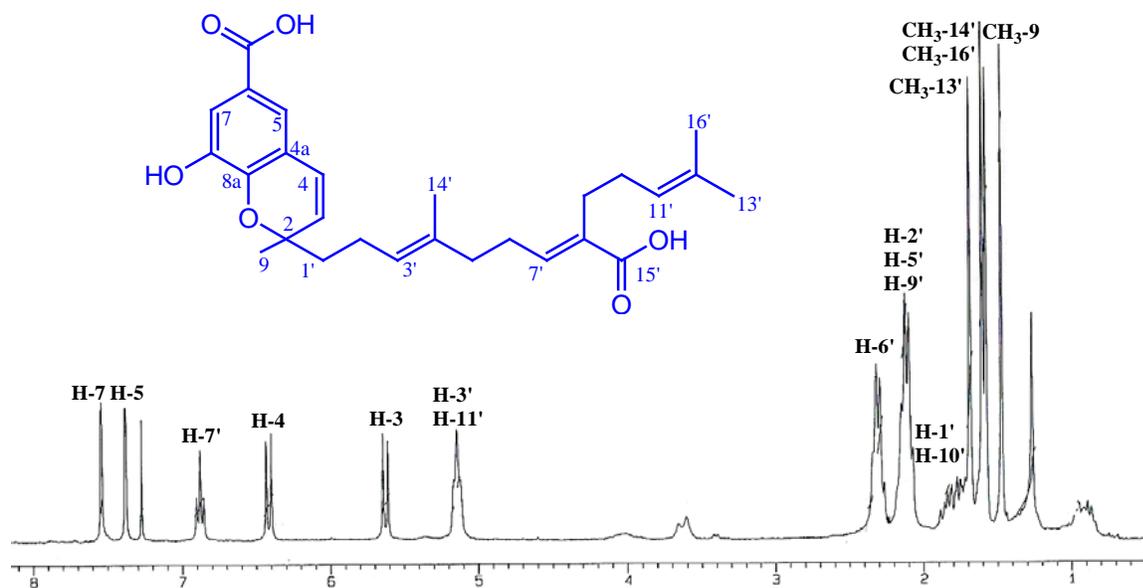
Posición	B1	B2
C-2	79.0 s	80.4 s
C-3	69.3 d	75.6 d
C-4	30.8 t	68.8 d
C-4a	118.8 s	122.6 s
C-5	123.3 d	120.6 d
C-6	122.5 s	123.1 s
C-7	113.8 d	115.0 d
C-8	144.7 s	144.2 s
C-8a	144.2 s	143.3 s
C-9	22.0 c	19.9 c
C-10	24.9 c	26.2 c
COOR	167.0 s	166.8 s
OCH <sub>3</sub>	51.9 c	51.9 c

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

## Determinación estructural del producto B6

El compuesto que hemos denominado **B6** presentó una fórmula molecular  $C_{27}H_{34}O_6$ , determinada por espectrometría de masas de alta resolución. En el espectro de IR se observaron bandas correspondientes a ácido carboxílico ( $3490-2543$ ,  $1683\text{ cm}^{-1}$ ) y anillo aromático ( $1611$  y  $758\text{ cm}^{-1}$ ).

En su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se observaron señales características de un sistema de cromeno que presenta un anillo aromático tetrasustituido [ $\delta_{\text{H}}$  7.37 (d,  $J= 1.6\text{ Hz}$ , H-5) y  $\delta_{\text{H}}$  7.53 (d,  $J= 1.6\text{ Hz}$ , H-7)], un grupo 2*H*-pirano trisustituido [ $\delta_{\text{H}}$  5.61 (d,  $J= 10.0\text{ Hz}$ , H-3) y  $\delta_{\text{H}}$  6.41 (d,  $J= 10.0\text{ Hz}$ , H-4)] y un metilo [ $\delta_{\text{H}}$  1.46 (s,  $\text{CH}_3$ -9)]. Así mismo, se observaron señales correspondientes a una unidad de sesquiterpeno, con señales asignables a tres metilos sobre doble enlace [ $\delta_{\text{H}}$  1.57 (s, H-14'),  $\delta_{\text{H}}$  1.60 (s, H-16') y  $\delta_{\text{H}}$  1.68 (s, H-13')], seis metilenos a  $\delta_{\text{H}}$  1.73-2.26 (m, H-1', H-2', H-5', H-6', H-9' y H-10') y tres protones olefínicos a  $\delta_{\text{H}}$  5.13 (2H, t,  $J= 6.0\text{ Hz}$ , H-3' y H-11') y a  $\delta_{\text{H}}$  6.87 (1H, t,  $J= 7.2\text{ Hz}$ , H-7').

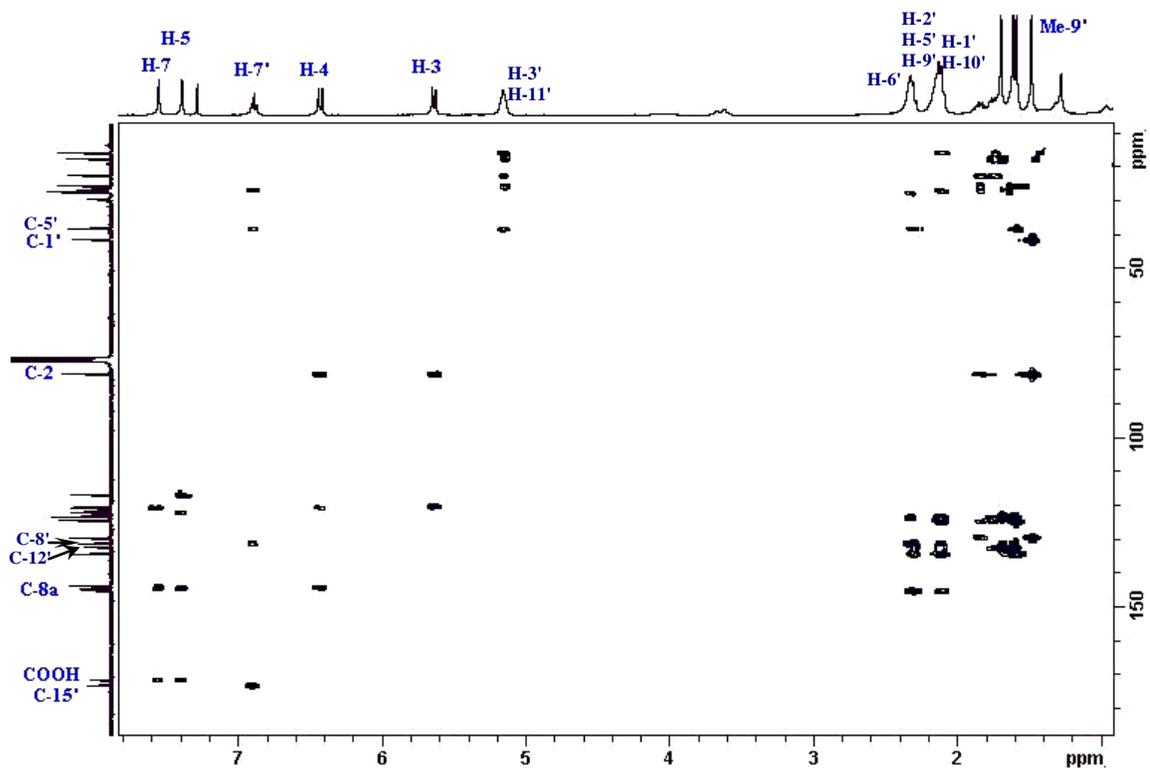


Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **B6**

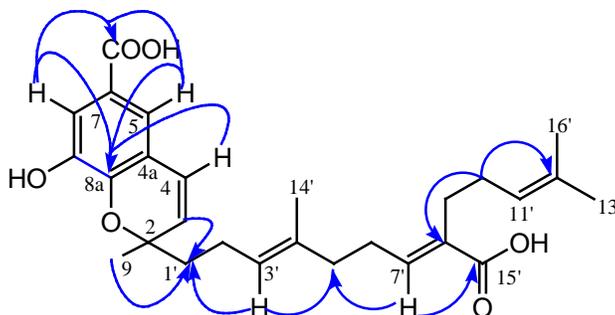
Estos datos fueron confirmados en su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  y experimentos DEPT 90 y 135, que presentan señales asignadas a cuatro metilos, seis metilenos, siete metinos y diez

carbonos cuaternarios, cuyo análisis nos confirma la presencia de una sistema de cromeno y una unidad terpénica lineal de quince átomos de carbono con señales a  $\delta_C$  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'), 27.4 (t, C-9'), 38.1 (t, C-5'), 41.2 (t, C-1', C-10'), 123.3 (d, C-3'), 124.4 (d, C-11'), 131.1 (s, C-8'), 132.1 (s, C-12'), 134.2 (s, C-4'), 145.0 (d, C-7') y 173.1 (s, C-15'), correspondientes a una unidad de farnesilo que presenta tres unidades de isopreno con un grupo ácido.

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 ( $\delta_H$  7.37) y H-7 ( $\delta_H$  7.53) con el carbono carboxílico a  $\delta_C$  171.4 y el carbono C-8a ( $\delta_C$  144.3), las correlaciones observadas entre los protones H-3 ( $\delta_H$  5.61), H-3' ( $\delta_H$  5.13) y el CH<sub>3</sub>-9 ( $\delta_H$  1.46) con el carbono metilénico C-1' ( $\delta_C$  41.2), estableció la posición de la cadena de farnesilo en el sistema de cromeno, asimismo, 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').



Experimento HMBC (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C) de **B6**

Correlaciones más significativas en el experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **B6**

La estereoquímica relativa del doble enlace  $\Delta^{3'}$  la determinamos basándonos en las correlaciones observadas en un experimento ROESY, que mostró efecto ROE de H-3'/H-1' y la geometría del doble enlace sobre C-7' y C-8' fue establecida como *E* dado el desplazamiento químico del protón vinílico H-7' a  $\delta_{\text{H}}$  6.87<sup>6</sup> en el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , que fue confirmado por el efecto ROE observado entre H-7'/H-5'. El análisis de estos datos nos permitió establecer la estructura de **B6** como **ácido 2-[(3*E*,7*E*)-8-carboxi-4,12-dimetil-3,7,11-tridecatrienil]-8-hidroxi-2-metil-2*H*-cromeno-6-carboxílico**.

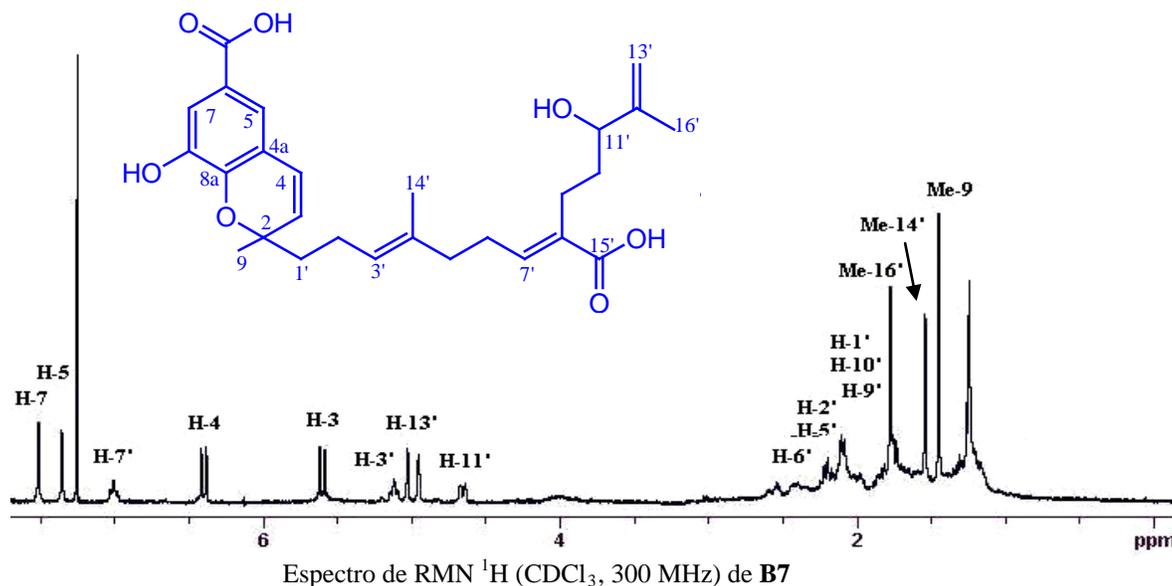
### Determinación estructural del producto **B7**

El análisis de los datos físicos y espectroscópicos del compuesto que hemos denominado **B7** nos permitió establecer su estructura. Así, su fórmula molecular  $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_6$  se determinó mediante sus datos de espectrometría de masas de alta resolución y los de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

El estudio de sus datos espectroscópicos de IR, UV, RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , 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 **B7** y **B6** mostró que ambos productos están relacionados, mostrando como diferencias más significativas en sus espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  las señales correspondientes a la cadena de isopreno terminal de la unidad de terpeno. Así, en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **B7** observamos señales correspondientes a un metilo sobre doble enlace ( $\delta_{\text{H}}$  1.78, s,

<sup>6</sup> Su, J-H.; Dai, C-F.; Huang, H-H.; Wu, Y-C.; Sung, P-J. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **2007**, 55, 594-597.

H-16'), a un metileno oleofínico ( $\delta_{\text{H}}$  4.96, 5.04, H-13') y un alcohol secundario ( $\delta_{\text{H}}$  4.62, dd,  $J=2.0$  y 9.5 Hz, H-11'), datos que fueron confirmados en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  que presentó señales a  $\delta_{\text{C}}$  17.9 (c, C-16'), 81.4 (d, C-11'), 112.8 (t, C-13') y 142.1 (s, C-12').

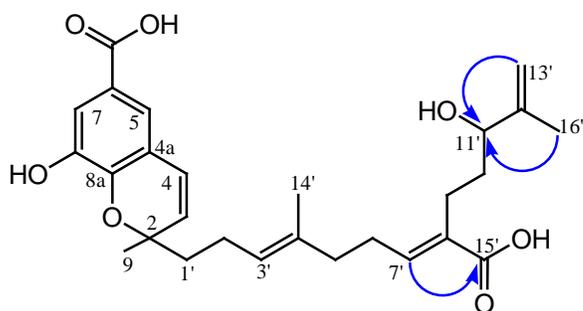


El estudio de los experimentos 2D (COSY, HSQC y HMBC), nos permitió establecer los diferentes grupos sobre la molécula, destacando las correlaciones en el experimento HMBC de los protones metilénicos H-13' a  $\delta_{\text{H}}$  4.96 y 5.04 y el  $\text{CH}_3$ -16' a  $\delta_{\text{H}}$  1.78 con el carbono C-11' ( $\delta_{\text{C}}$  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 consideraciones biogénicas, así como por comparación con compuestos relacionados descritos en la bibliografía química<sup>6,7,8</sup>.

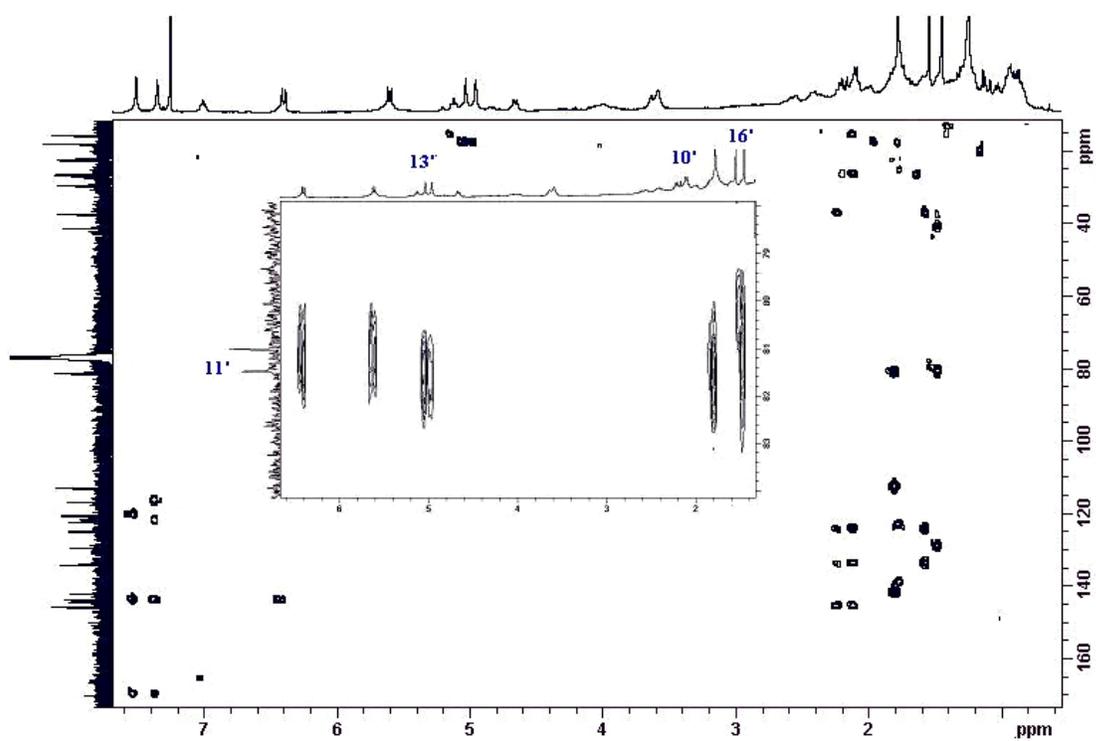
La estructura de **B7** se estableció así como **ácido 2-[(3E,7E)-8-carboxi-11-hidroxi-4,12-dimetil-3,7,12-trideca- trienil]-8-hidroxi-2-metil-2H-cromeno-6-carboxílico**.

<sup>7</sup>Jang, K. H.; Lee, B. H.; Choi, B. W.; Lee, H.S.; Shin J. *Journal of Natural Products*. **2005**, 68, 716-723.

<sup>8</sup>Silva, D. H. S.; Pereira, F. C.; Zanoni, M. V. B.; Yoshida, M. *Phytochemistry*. **2001**, 59, 437-442.



Correlaciones más significativas en el experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **B7**



Experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **B7**

**Tabla 16. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) de los cromenos B6 y B7.**

<b>Posición</b>	<b>B6</b>	<b>B7</b>
<b>H-3</b>	5.61 d (10.0)	5.61 d (10.1)
<b>H-4</b>	6.41 d (10.0)	6.40 d (10.1)
<b>H-5</b>	7.37 d (1.6)	7.36 d (1.9)
<b>H-7</b>	7.53 d (1.6)	7.51 d (1.9)
<b>CH<sub>3</sub>-9</b>	1.46 s	1.46 s
<b>H-1'</b>	1.73-1.87 m*	1.73-1.84 m*
<b>H-2'</b>	2.06-2.13 m*	2.08-2.16 m*
<b>H-3'</b>	5.13 t (6.0) *	5.13 t (7.4)
<b>H-5'</b>	2.06-2.13 m*	2.08-2.16 m*
<b>H-6'</b>	2.26 m	2.22 m
<b>H-7'</b>	6.87 t (7.2)	7.01 t (7.2)
<b>H-9'</b>	2.06-2.13 m*	1.86-1.99 m
<b>H-10'</b>	1.73-1.87 m*	1.73-1.84 m*
<b>H-11'</b>	5.13 t (6.0) *	4.62 dd (2.0, 9.5)
<b>H-13'</b>	1.68 s	4.96 s, 5.04 s
<b>CH<sub>3</sub>-14'</b>	1.57 s	1.54 s
<b>CH<sub>3</sub>-16'</b>	1.60 s	1.78 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 17. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz) de los cromenos B6 y B7.

Posición	B6	B7
C-2	81.0 s	81.0 s
C-3	129.4 d	129.4 d
C-4	122.0 d	122.0 d
C-4a	120.1 s	120.0 s
C-5	120.5 d	120.4 d
C-6	121.5 s	121.3 s
C-7	116.7 d	116.6 d
C-8	143.7 s	143.7 s
C-8a	144.3 s	144.2 s
C-9	27.0 c	27.1 c
COOH	171.4 s	170.0 s
C-1'	41.2 t*	41.2 t
C-2'	22.4 t	26.2 t
C-3'	123.3 d	124.7 d
C-4'	134.2 s	133.9 s
C-5'	38.1 t	37.3 t
C-6'	26.5 t	22.2 t
C-7'	145.0 d	145.7 d
C-8'	131.1 s	124.5 s
C-9'	27.4 t	22.5 t
C-10'	41.2 t*	26.5 t
C-11'	124.4 d	81.4 d
C-12'	132.1 s	142.1 s
C-13'	25.5 c	112.8 t
C-14'	15.6 c	15.6 c
C-15'	173.1 s	173.9 s
C-16'	17.4 c	17.9 c

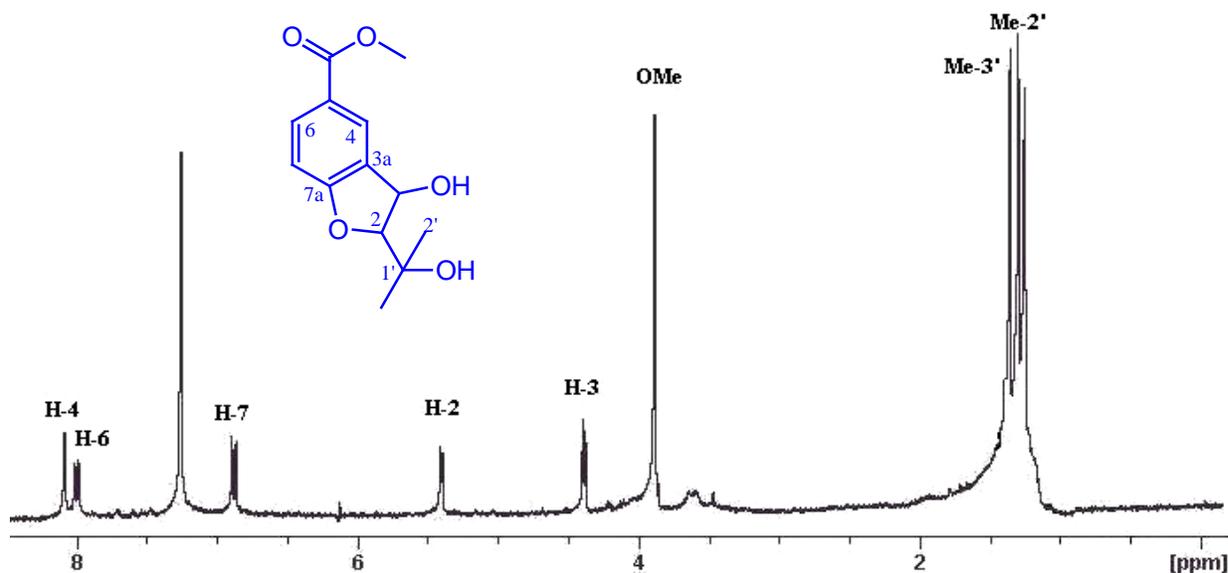
<sup>a</sup>  $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>. Datos basados en los experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

\* Señales solapadas.

## Determinación estructural del producto B8

El análisis de los datos físicos y espectroscópicos del compuesto que hemos denominado **B8** 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  $^1H$  se observaron señales asignadas a dos metilos a  $\delta_H$  1.29 (s,  $CH_3-2'$ ) y 1.35 (s,  $CH_3-3'$ ), un grupo metoxilo a  $\delta_H$  3.86, un protón geminal a un grupo hidroxilo a  $\delta_H$  4.39 (d,  $J= 4.7$  Hz, H-3) y un metino a  $\delta_H$  5.40 (d,  $J= 4.7$  Hz, H-2), así como señales correspondiente a tres protones aromáticos a  $\delta_H$  6.87 (d,  $J= 8.5$  Hz, H-7), 7.99 (dd,  $J= 1.7, 8.5$  Hz, H-6) y 8.08 (1H, d,  $J= 1.7$  Hz, H-4), lo que indicó la presencia de un anillo aromático trisustituido.

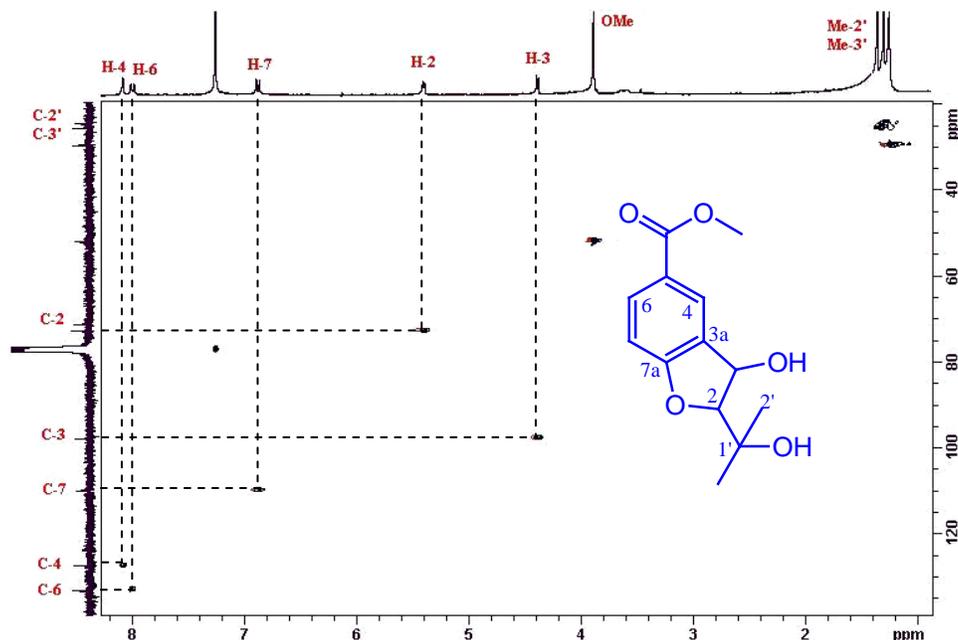


Espectro de RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz) de **B8**

En su espectro de RMN de  $^{13}C$  se observaron señales para 13 carbonos y los experimentos DEPT 90 y 135 establecieron la presencia de dos metilos a  $\delta_C$  24.5 (C-2') y 25.5 (C-3'), un metoxilo a  $\delta_C$  51.9, cinco metinos a  $\delta_C$  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  $\delta_C$  71.0 (C-1'), 123.6 (C-5), 129.5 (C-3a), 164.1

(C-7a) y 166.9 (COOR). Estos datos sugieren la presencia en la molécula de un sistema benzofurano, con un grupo metoxilo, un alcohol secundario y otro terciario.

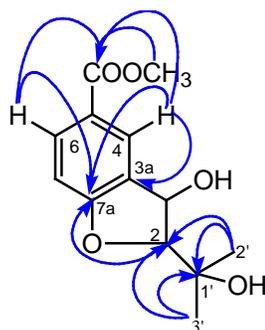
Un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC), nos permitieron la asignación de las señales correspondientes a los protones existentes en la molécula y además correlacionar cada átomo de carbono con sus respectivos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



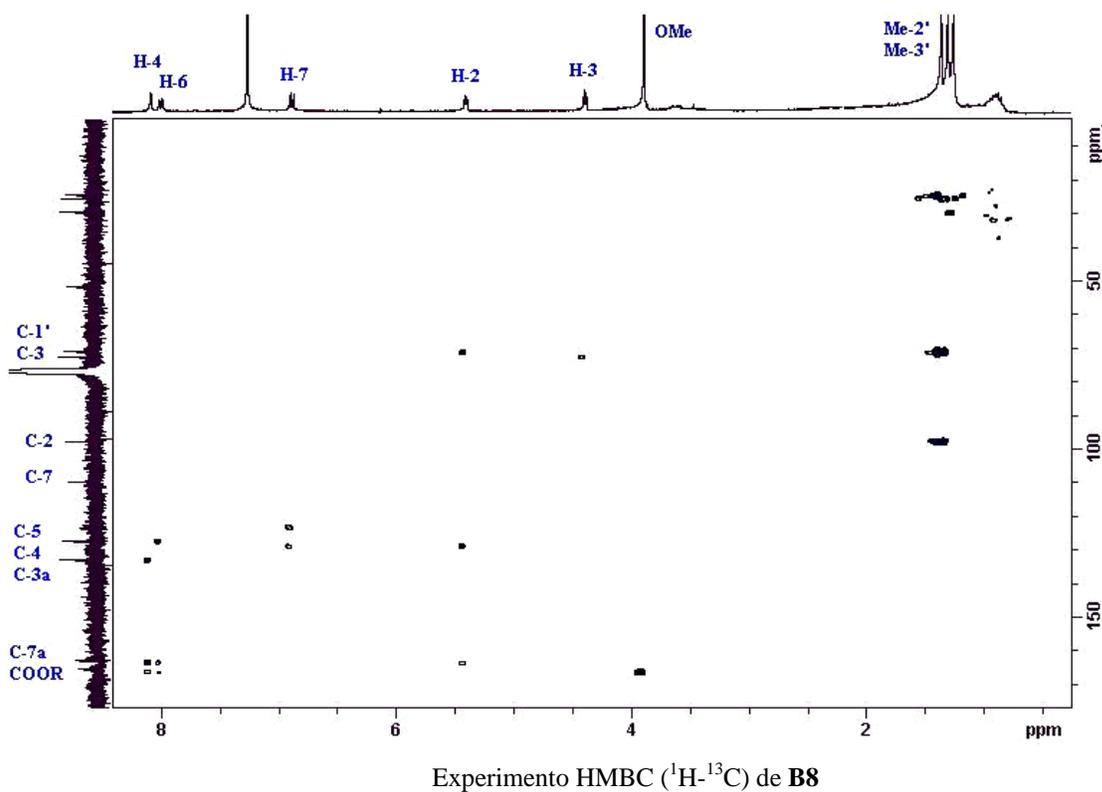
Experimento HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **B8**

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 ( $\delta_{\text{H}}$  8.08) y H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  7.99) con el carbono C-7a ( $\delta_{\text{C}}$  164.1) y de estos protones y el metoxilo a  $\delta_{\text{H}}$  3.86 con el carbono carboxílico a  $\delta_{\text{C}}$  166.9, mientras la sustitución sobre el anillo de furano se estableció por las correlaciones del protón H-2 a  $\delta_{\text{H}}$  4.39 con los carbonos C-7a y C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  71.0). Por otra parte, las señales correspondientes a  $\text{CH}_3$ -2' ( $\delta_{\text{H}}$  1.29) y  $\text{CH}_3$ -3' ( $\delta_{\text{H}}$  1.35) presentaron correlación con C-1' y C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  97.7).

La estereoquímica relativa de las posiciones C-2 y C-3 se dedujo de la constante de acoplamiento, ya que en el caso de una relación *cis* ésta debe ser de  $J = 7.0$  Hz, mientras que en los derivados *trans* es de  $J = 4.0-5.0$  Hz<sup>9</sup>. El producto **B8** presentó una  $J_{2,3} = 4.7$  Hz, lo que sugiere una relación *trans* de los sustituyentes sobre los carbonos C-2 y C-3.



Correlaciones observadas en el experimento HMBC ( $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ ) de **B8**

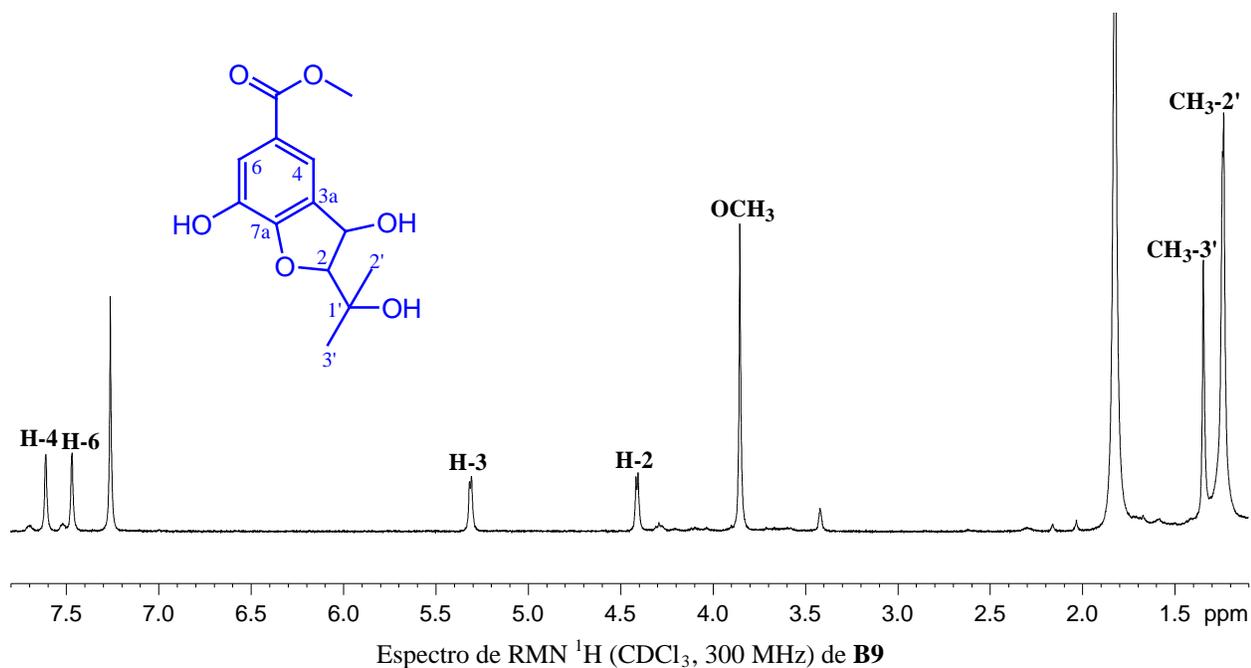


<sup>9</sup> Kawasaki, C.; Okuyama, T.; Shibata, S.; Iitaka, Y. *Planta Medica*. **1984**, 60, 492-496.

Estos datos nos permitieron establecer la estructura de **B8** 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>4</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.

### Determinación estructural del producto B9

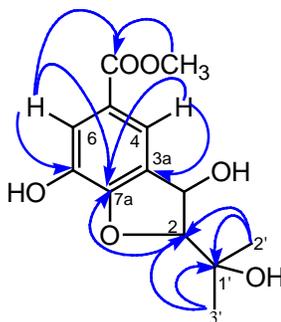
La estructura del compuesto que hemos denominado **B9** fue establecida mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos. Su espectro de masas presentó un ión molecular a 268 *m/z*, que corresponde con una fórmula molecular C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub> de acuerdo a su espectro de masas de alta resolución (EMAR). En el espectro de IR se observaron bandas correspondientes a grupo hidroxilo (3381 cm<sup>-1</sup>), éster (1700 cm<sup>-1</sup>) y anillo aromático (1607 y 769 cm<sup>-1</sup>).



El estudio de los datos espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C nos indicó que el producto es un derivado de benzofurano, que presenta un grupo fenólico, un alcohol secundario y un terciario y un derivado de ácido carboxílico. La comparación de sus datos espectroscópicos con el producto **B8**, mostró que la principal diferencia era la sustitución del anillo aromático, ya que

el compuesto **B8** presenta este anillo trisustituido, mientras que en **B9** éste se encuentra tetrasustituido. Así, en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de **B8** se observaron señales a  $\delta_{\text{H}}$  6.87 (1H, d,  $J= 8.5$  Hz, H-7) y  $\delta_{\text{C}}$  109.9 (d, C-7), mientras que en **B9** el carbono C-7 corresponde a un carbono cuaternario a  $\delta_{\text{C}}$  142.1 (s, C-7).

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-3 ( $\delta_{\text{H}}$  5.31) y H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  4.40) y en el experimento HMBC destacan las correlaciones del protón H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  7.47) con C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  142.1) y C-7a ( $\delta_{\text{C}}$  153.2) y con el carbono del derivado de ácido carboxílico ( $\delta_{\text{C}}$  167.3). La estequímica relativa de las posiciones C-2 y C-3 se dedujo de la constante de acoplamiento, el producto **B9** presentó una  $J_{2,3}= 4.6$  Hz, que sugiere una relación *trans* de los sustituyentes sobre los carbonos C-2 y C-9<sup>9</sup>. Estos datos nos permitieron establecer la estructura del producto como **3,7-dihidroxi-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-2,3-dihidro-benzofurano-5-carboxilato de metilo**.



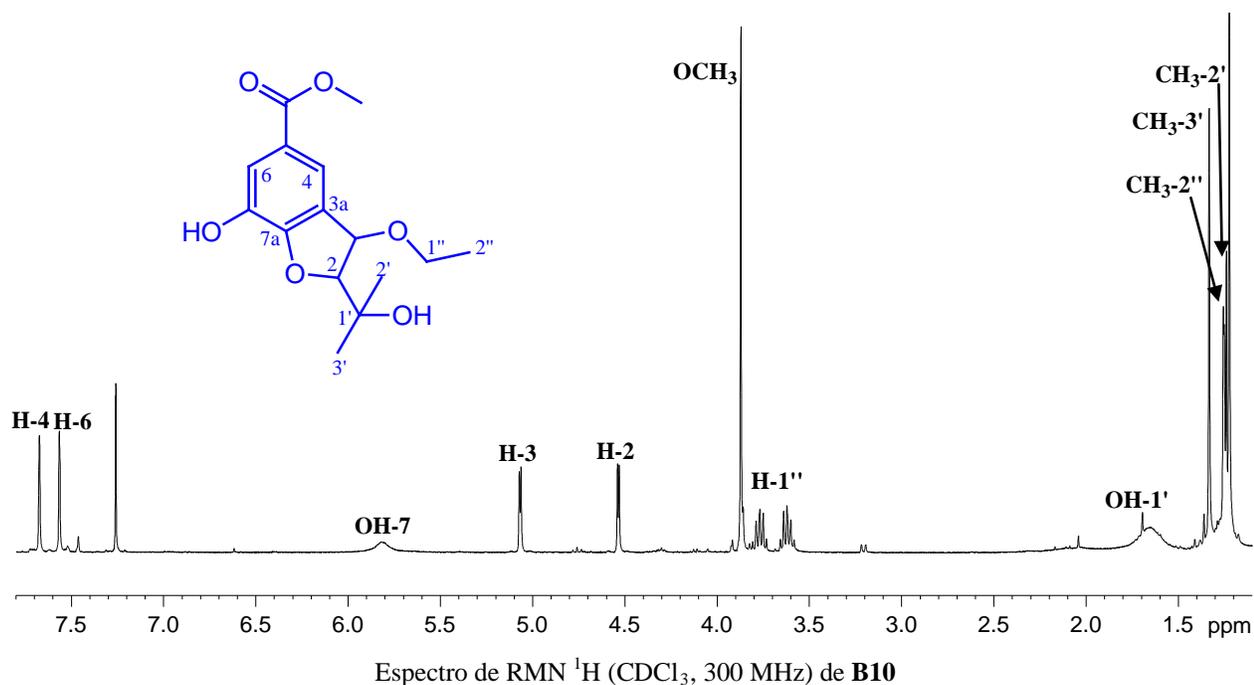
Correlaciones más significativas en el experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **B9**

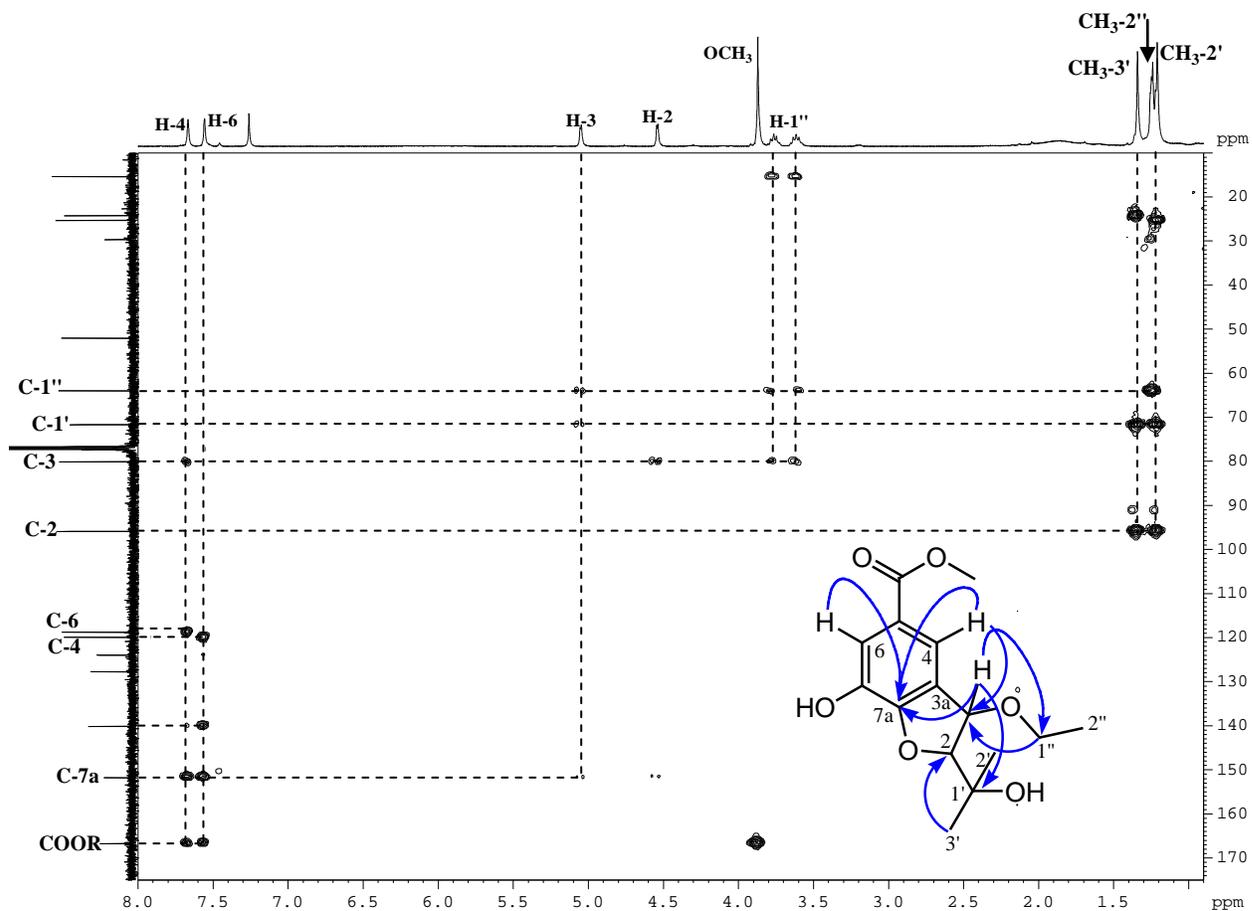
### Determinación estructural del producto **B10**

La estructura del compuesto que hemos denominado **B10** se estableció mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos, tal como se describe a continuación. Su fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6$ , fue fijada basándonos en sus datos de espectrometría de masas de alta resolución.

El estudio de los datos espectroscópicos de IR, UV, RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  indicó que el producto es un derivado de benzofurano que presentaba en su estructura un grupo fenólico, un alcohol terciario, un derivado de ácido carboxílico y un grupo etoxilo. Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **B9** y **B10** mostró que ambos productos están relacionados, siendo la principal diferencia en sus espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  la presencia de las señales correspondientes a un grupo etoxilo adicional en **B10** [ $\delta_{\text{H}}$  1.24 (3H, t,  $J=7.2$  Hz, H-2'') y  $\delta_{\text{C}}$  15.4 (c, C-2'') y 3.62, 3.77 (2H, m, H-1''), 64.0 (t, C-1'')].

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-4 ( $\delta_{\text{H}}$  7.67) y H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  7.57) y el protón metínico H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  5.07) con el carbono fenólico C-7a ( $\delta_{\text{C}}$  151.8) nos permitió establecer la regiosustitución del sistema benzofuránico, por otro lado la correlación del protón H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  5.07) con el carbono del metileno C-1'' ( $\delta_{\text{C}}$  64.0) nos permitió fijar la posición del grupo etoxilo sobre el carbono C-3.



Experimento HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de **B10**

La estereoquímica relativa del producto se dedujo por la constante de acoplamiento que presentó una  $J_{2,3} = 3.6$  Hz, lo que sugiere una relación *trans* de los sustituyentes sobre los carbonos C-2 y C-3<sup>10</sup>. Estos datos nos permitieron establecer la estructura del producto como **3-etoxi-7-hidroxi-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-2,3-dihidro-benzofurano-5-carboxilato de metilo** para el compuesto que hemos denominado **B10**.

Tabla 18. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) de los benzofuranos B8 a B10.

Posición	B8	B9	B10
H-2	4.39 d (4.7)	4.40 d (4.6)	4.54 d (3.6)
H-3	5.40 d (4.7)	5.31 d (4.6)	5.07 d (3.6)
H-4	8.08 d (1.7)	7.61 s	7.67 s
H-6	7.99 dd (1.7, 8.5)	7.47 s	7.57 s
H-7	6.87 d (8.5)		
CH <sub>3</sub> -2'	1.29 s	1.24 s	1.23 s
CH <sub>3</sub> -3'	1.35 s	1.35 s	1.34 s
CH <sub>2</sub> -1''			3.62, 3.77 m
CH <sub>3</sub> -2''			1.24 t (7.2)
OCH <sub>3</sub>	3.86 s	3.85 s	3.87 s
OH-1'			1.65 s <sub>a</sub>
OH-7			5.82 s <sub>a</sub>

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

\* Señales solapadas

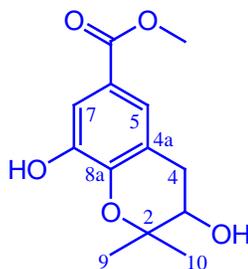
Tabla 19. Datos<sup>a</sup> de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz) de los benzofuranos B8 a B10.

Posición	B8 <sup>a</sup>	B9 <sup>b</sup>	B10 <sup>a</sup>
C-2	97.7 d	99.2 d	95.9 d
C-3	72.8 d	73.5 d	80.1 d
C-3a	129.5 s	132.6 s	127.8 s
C-4	127.4 d	119.4 d	119.9 d
C-5	123.6 s	124.2 s	124.0 s
C-6	133.0 d	118.5 d	118.8 d
C-7	109.9 d	142.1 s	140.1 s
C-7a	164.1 s	153.2 s	151.8 s
COOR	166.9 s	167.3 s	166.7 s
C-1'	71.0 s	71.1 s	71.7 s
CH <sub>3</sub> -2'	24.5 c	25.7 c	24.3 c
CH <sub>3</sub> -3'	25.5 c	25.8 c	25.3 c
CH <sub>2</sub> -1''			64.0 t
CH <sub>3</sub> -2''			15.4 c
OCH <sub>3</sub>	51.9 c	52.0 c	52.1 c

<sup>a</sup> δ, CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup> δ, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO. Datos basados en los experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

## 5.4.2. Datos físicos y espectroscópicos

## Producto B1: 3,8-Dihidroxi-2,2-dimetil-cromano-6-carboxilato de metilo



Aislado como sólido amorfo (15.7 mg).

$[\alpha]_D^{20}$  : -0.5° (*c* 0.97, CHCl<sub>3</sub>).

UV  $\lambda_{\max}$  (EtOH): 214, 267, 298 nm.

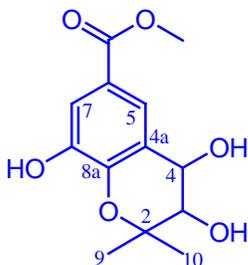
IR  $\nu_{\max}$  (película): 3418, 2983, 2950, 1698, 1595, 1439, 1324, 1219, 1138, 1064, 765 cm<sup>-1</sup>.

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, m, H-3); 3.83 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); 5.83 (1H, s<sub>a</sub>, OH-8); 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, COOR).

EM *m/z* (%): 252 [M<sup>+</sup>] (100), 234 (15), 221 (57), 203 (15), 194 (27), 180 (99), 149 (35), 123 (47), 71 (73).

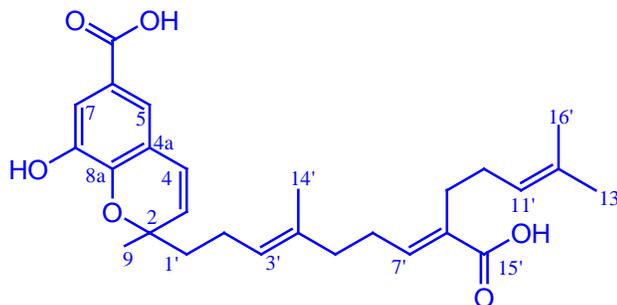
EM de alta resolución: Calculado para C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>, 252.0998; observado, 252.1095.

**Producto B2: 3,4,8-Trihidroxi-2,2-dimetil-cromano-6-carboxilato de metilo**

Aislado como sólido amorfo (21.5 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); 3.09 (1H,  $s_a$ , OH-4); 3.65 (1H, d,  $J= 8.6$  Hz, H-3); 3.87 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ); 4.60 (1H, d,  $J= 8.6$  Hz, H-4); 5.57 (1H,  $s_a$ , OH-8); 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, COOR).
- 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 B6: Ácido 2-[(3E,7E)-8-carboxi-4,12-dimetil-3,7,11-tridecatrienil]-8-hidroxi-2-metil -2H-cromeno-6-carboxílico**



Aislado como aceite amarillo (2.2 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  $\text{cm}^{-1}$ .

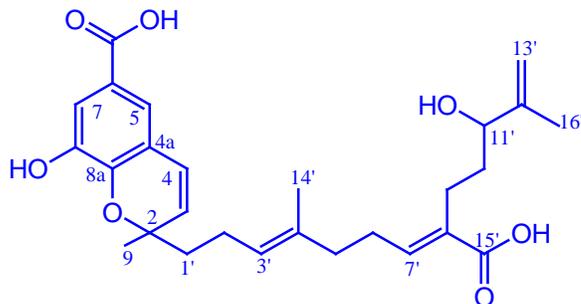
RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.46 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -9); 1.57 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -14'); 1.60 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -16'); 1.68 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -13'); 1.73-1.87 (4H, m, H-1', H-10'); 2.06-2.13 (6H, m, H-2', H-5', H-9'); 2.26 (2H, m, H-6'); 5.13 (2H, t,  $J$ = 6.0 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 B7: Ácido 2-[(3E,7E)-8-carboxi-11-hidroxi-4,12-dimetil-3,7,12-tridecatrienil]-8-hidroxi-2-metil-2H-cromeno-6-carboxílico**



Aislado como aceite amarillo (4.3 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  $\text{cm}^{-1}$ .

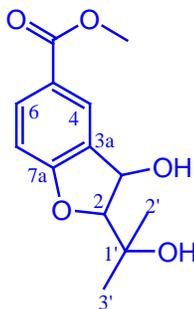
RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ): 1.46 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -9); 1.54 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -14'); 1.73-1.84 (4H, m, H-1', H-10'); 1.78 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -16'); 1.86-1.99 (2H, m, H-9); 2.08-2.16 (4H, m, H-2', H-5'); 2.22 (2H, m, H-6'); 4.62 (1H, dd,  $J$ = 2.0, 9.5 Hz, H-11'); 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 B8: 3-Hidroxi-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-2,3-dihidro-benzofurano-5-carboxilato de metilo**



Aislado como aceite amarillo (7.8 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>.

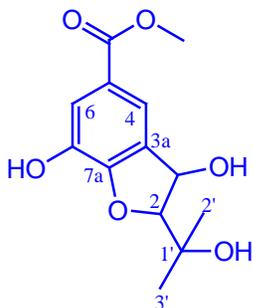
RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.29 (3H, s, CH<sub>3</sub>-2'); 1.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>-3'); 3.86 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); 4.39 (1H, d, *J*= 4.7 Hz, H-3); 5.40 (1H, d, *J*= 4.7 Hz, H-2); 6.87 (1H, d, *J*= 8.5 Hz, H-7); 7.99 (1H, dd, *J*= 1.7, 8.5 Hz, H-6); 8.08 (1H, d, *J*= 1.7 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, COOR).

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 B9: 3,7-Dihidroxi-2-(1'-hidroxi-1'-metiletil)-2,3-dihidro-benzofurano-5-carboxilato de metilo**



Aislado como aceite amarillo (3.4 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ : +2.1° (c 0.20, CHCl<sub>3</sub>).

UV (EtOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 202 (3.98), 229 (3.97), 262 (3.82), 293 (3.45) nm.

IR $\nu_{\max}$  (película): 3381, 2955, 2924, 1700, 1607, 1440, 1339, 1252, 1181, 1085, 1000, 769 cm<sup>-1</sup>.

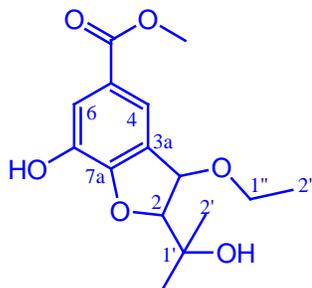
RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.24 (3H, s, CH<sub>3</sub>-2'); 1.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>-3'); 3.85 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.40 (1H, d, *J* = 4.6 Hz, H-2); 5.31 (1H, d, *J* = 4.6 Hz, H-3), 7.47 (1H, s, H-6), 7.61 (1H, s, H-4).

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , Acetona-d<sub>6</sub>): 25.7 (c, C-2'), 25.8 (c, C-3'), 52.0 (c, OCH<sub>3</sub>), 71.1 (s, C-1'), 73.5 (d, C-3), 99.2 (d, C-2), 118.5 (d, C-6); 119.4 (d, C-4), 124.2 (s, C-5), 132.6 (s, C-3a), 142.1 (s, C-7), 153.2 (s, C-7a), 167.3 (s, COOR).

EM *m/z* (%): 268 [M<sup>+</sup>] (70), 235 (37), 208 (12), 193 (100), 161 (60), 149 (6), 133 (10), 59 (53).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>, 268.0947; observado 268.0953.

**Producto B10: 3-Etoxi-7-hidroxi-2-(1'-hidroxi-1'-metiletil)-2,3-dihidro-benzofurano-5-carboxi lato de metilo**



Aislado como aceite amarillo (6.9 mg).

$[\alpha]_D^{20}$  : +2.5° (c 0.21, CHCl<sub>3</sub>).

UV (EtOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 219 (4.10), 229 (4.09), 268 (3.97), 301 (3.61) nm.

IR $\nu_{\max}$  (película): 3396, 2976, 2926, 1702, 1612, 1440, 1340, 1231, 1185, 1058, 1001, 768 cm<sup>-1</sup>.

RMN <sup>1</sup>H ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 1.23 (3H, s, CH<sub>3</sub>-2'); 1.24 (3H, t,  $J$ = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-2''); 1.34 (3H, s, CH<sub>3</sub>-3'); 1.65 (1H, s<sub>a</sub>, OH-1'), 3.62 (1H, m, H-1''), 3.77 (1H, m, H-1''), 3.87 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.54 (1H, d,  $J$ = 3.6 Hz, H-2); 5.07 (1H, d,  $J$ = 3.6 Hz, H-3), 5.82 (1H, s<sub>a</sub>, OH-7), 7.57 (1H, s, H-6), 7.67 (1H, s, H-4).

RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 15.4 (c, C-2''), 24.3 (c, C-2'), 25.4 (c, C-3'), 52.1 (c, OCH<sub>3</sub>), 64.0 (t, C-1''), 71.7 (s, C-1'), 80.1 (d, C-3), 95.9 (d, C-2), 118.8 (d, C-6); 119.9 (d, C-4), 124.0 (s, C-5), 127.8 (s, C-3a), 140.1 (s, C-7), 151.8 (s, C-7a), 166.7 (s, COOR).

EM  $m/z$  (%): 296 [M<sup>+</sup>] (54), 263 (59), 224 (19), 193 (100), 161 (65), 148 (22), 59 (49).

EM de alta resolución: Calculado para C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>, 296.1260; observado 296.1269.

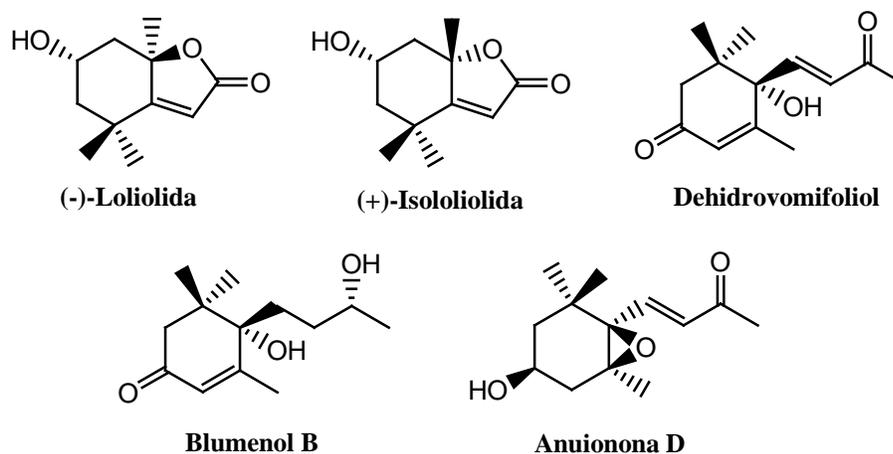
## **5.5. Apocarotenos, terpenos, fenilpropanoides y ácidos grasos**

## 5.5. Apocarotenos, terpenos, fenilpropanoides y ácidos grasos

### 5.5.1. Resultados y discusión

Tras repetidas cromatografías de los extractos de diclorometano de las hojas de *Piper delineatum*, *P. divaricatum*, *P. heterophyllum* y *P. pseudoarboreum*, y los frutos de *P. glabratum*, como se indica en la parte experimental de esta Memoria, se aislaron cinco apocarotenoides: dos C-11 *nor*-isoprenoides (-)-loliolida<sup>1</sup> (**AP1**) y (+)-isololiolida<sup>1</sup> (**AP2**) y tres C-13 *nor*-isoprenoides, dehidrovomifoliol<sup>2</sup> (**AP3**), blumenol B<sup>3</sup> (**AP4**) y anuionona D<sup>4</sup> (**AP5**).

#### Apocaretenos



Por otro lado, se aislaron nueve terpenos, identificados como: un sesquiterpeno bicíclico, (+)-oplopanona<sup>5</sup> (**T1**); dos sesquiterpenos tricíclicos, óxido de cariofileno<sup>6</sup> (**T2**) y alloaromadendrano-4 $\alpha$ -10 $\beta$ -diol<sup>7</sup> (**T3**); dos C-18 *nor*-isoprenoides, (*E,E*)-farnesilacetona<sup>8</sup> (**T4**) y ácido (*E,E*)-cetoabrálico<sup>9</sup> (**T5**); un diterpeno, (*E*)-fitol<sup>10</sup> (**T6**) y tres esteroides,  $\beta$ -sitosterol<sup>11</sup> (**T7**), estigmasterol<sup>11</sup> (**T8**) y 3-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosido de  $\beta$ -sitosterol<sup>11</sup> (**T9**).

<sup>1</sup> Kimura, J.; Maki, N. *Journal of Natural Products*. **2002**, 65, 57-58.

<sup>2</sup> Greca, M.D.; Monaco, P.; Previtera, L. *Journal of Natural Products*. **1990**, 53, 972-974.

<sup>3</sup> Galbraith, M. N.; Horn, D. H. S. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. **1972**, 3, 113-114.

<sup>4</sup> Macias, F. A.; Oliva, R. M. Varela, R. M.; Torres, A.; Molinillo, J. M. *Phytochemistry*. **1999**, 52, 613-621.

<sup>5</sup> Dastlik, K. A.; Forster, P. G.; Ghisalberti, E. L.; Jefferies, P. R. *Phytochemistry*. **1989**, 28, 1425-1426.

<sup>6</sup> Connolly, J. D.; Hill, R. A. *Dictionary of Terpenoids*. Chapman & Hall, London. **1991**, 1, 292.

<sup>7</sup> Goldsby, G.; Burke, B. A. *Phytochemistry*. **1987**, 26, 1059-1063.

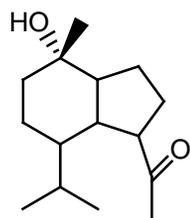
<sup>8</sup> Neidlein, R.; Koch, E. *Archiv der Pharmazie*. **1980**, 313, 193-198.

<sup>9</sup> Su, J.-H.; Dai, C.-F.; Huang, H.-H.; Wu, Y.-C.; Sung, P.-J. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **2007**, 55, 594-597.

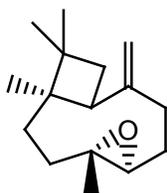
<sup>10</sup> Orjala, J.; Wright, A. D.; Erdelmeier, C. A. J.; Sticher, O.; Rali, T. *Helvetica Chimica Acta*. **1993**, 76, 1481-1488.

<sup>11</sup> Kojima, H.; Sato, N.; Hatano, A.; Ogura, H. *Phytochemistry*. **1990**, 29, 2351-2355.

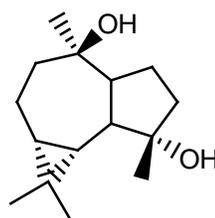
## Terpenos



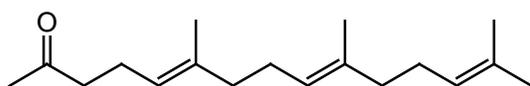
(+)-Oplopanona



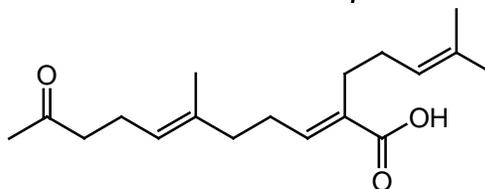
Óxido de cariofileno



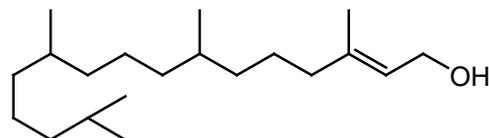
Alloaromadendrano-4α-10β-diol



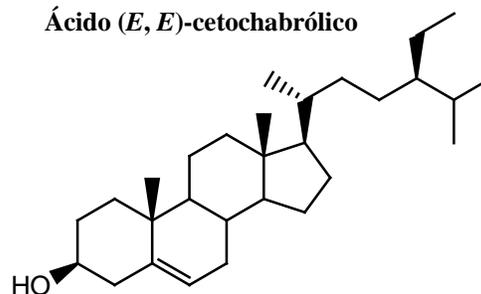
(*E,E*)-Farnesilacetona



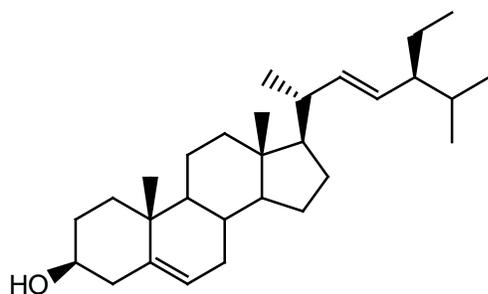
Ácido (*E,E*)-cetochabrólico



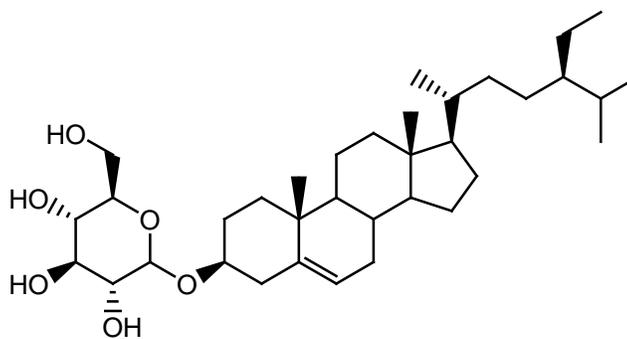
(*E*)-Fitol



β-Sitosterol



Estigmasterol



3-*O*-β-D-Glucopiranosido de β-sitosterol

Así también hemos aislado trece fenilpropanoides, que fueron identificados como: 4-alil-2,6-dimetoxi-fenol<sup>12</sup> (**FP1**), elemicina<sup>13</sup> (**FP2**), miristicina<sup>14</sup> (**FP3**), acetato de metoxi-eugenol<sup>15</sup>

<sup>12</sup> Miyase, T.; Kuroyanagi, M.; Noro, T.; Ueno, A.; Fukushima, S. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **1985**, 33, 4445-4450.

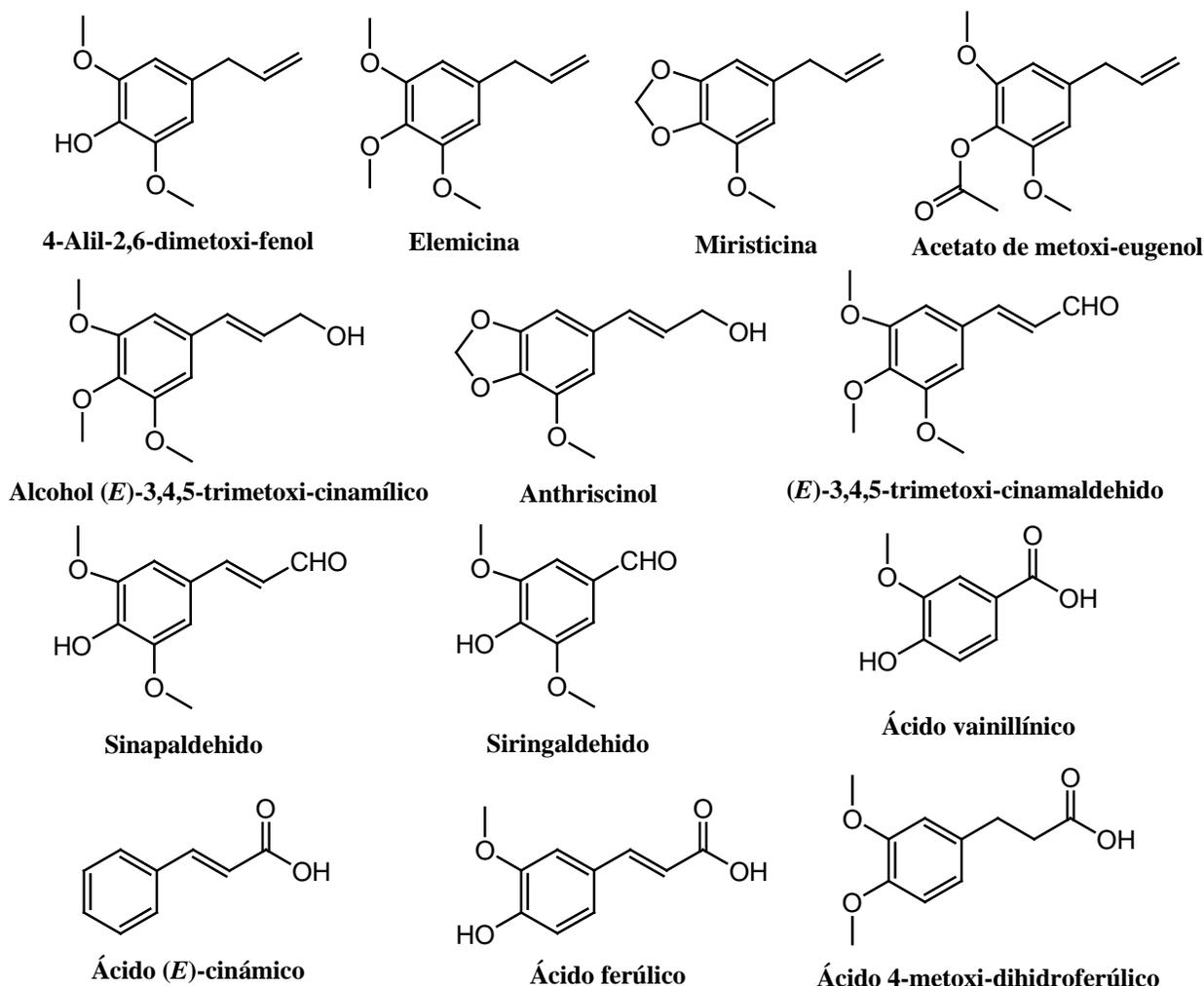
<sup>13</sup> Mohammad, I.; Waterman, P.G.; Thomas, D. W. *Journal of Natural Products*. **1985**, 48, 328-329.

<sup>14</sup> Yakushijin, K.; Tohshima, T.; Suzuki, R.; Murata, H.; Lu, S-T.; Furukawa, H. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **1983**, 31, 2879-2883.

<sup>15</sup> Parmar, V. S.; Jain, S. C.; Gupta, S.; Talwar, S.; Rajwanshi, V. K.; Kumar, R.; Azim, A.; Malhotra, S.; Kumar, N.; Jain, R.; Sharma, N. K.; Tyagi, O. D.; Lawrie, S. J.; Errington, W.; Howarth, O. W.; Olsen, C. E.; Singh, S. K.; Wengel, J. *Phytochemistry*. **1998**, 49, 1069-1078.

(**FP4**), alcohol (*E*)-3,4,5-trimetoxi-cinámico<sup>16</sup> (**FP5**), antriscinol<sup>17</sup> (**FP6**), (*E*)-3,4,5-trimetoxi-cinamaldehído<sup>18</sup> (**FP7**), sinapaldehído<sup>19</sup> (**FP8**), siringaldehído<sup>20</sup> (**FP9**), ácido vainillínico<sup>20</sup> (**FP10**), ácido (*E*)-cinámico<sup>21</sup> (**FP11**), ácido ferúlico<sup>20</sup> (**FP12**) y 4-metoxi-dihidroferúlico<sup>22</sup> (**FP13**).

### Fenilpropanoides



<sup>16</sup> San Feliciano, A.; Medarde, M.; Lopez, J. L.; Miguel del Corral, J. M. *Journal of Natural Products*. **1986**, 49, 677-679.

<sup>17</sup> Tanoguchi, M. Kashima, T.; Saika, H.; Inoue, T.; Arimoto, M. Yamaguchi, H. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **1989**, 37, 68-72.

<sup>18</sup> Barcelos, R. C.; Pastre, J. C.; Caixeta, V.; Vendramini-Costa, D. B.; Carvalho, J. E.; Pilli, R. A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2012**, 20, 3635-3651.

<sup>19</sup> Zhu, Y.; Mohammadi, A.; Ralph, J. *Bioenergy Research*. **2012**, 5, 407-411.

<sup>20</sup> Liu, M-H.; Tong, X.; Wang, J-X., Zou, W.; Cao, H.; Su, W-W. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2013**, 74, 141-155.

<sup>21</sup> Gao, L.; Xu, X.; Nan, H.; Yang, J.; Sun, G.; Wu, H.; Zhong, M. *Journal of Medicinal Plants Research*. **2012**, 6, 929-931.

<sup>22</sup> Moreira, D. L.; Guimarães, E. F.; Kaplan, M. A. C. *Phytochemistry*. **2000**, 55, 783-786.

Estos compuestos habían sido descritos previamente en la bibliografía química y fueron identificados, basándonos en sus datos físicos, espectroscópicos y comparación de los mismos con los datos existentes en la bibliografía química.

Por otro lado, se aisló un ácido graso hidroxilado identificado como ácido 13(*S*)-hidroxioctadeca-(9*Z*, 11*E*, 15*Z*)-trienoico<sup>23</sup> (**AG1**) de las hojas de *P. pseudoarboreum*.

Asimismo, se identificaron mediante el análisis de cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/MS) nueve ácidos grasos saturados (**AG2-AG10**) y un ácido graso insaturado (**AG11**) de una subfracción de las hojas de *P. delineatum*, según se detalla en la parte experimental de esta Memoria.

Estos compuestos habían sido descritos previamente en la bibliografía química y fueron identificados, basándonos en sus datos espectrométricos y comparación de los mismos con los datos existentes en la base de datos del cromatógrafo de GC/MS.

**Tabla 20. Ácidos grasos identificados por GC/MS de *Piper delineatum*.**

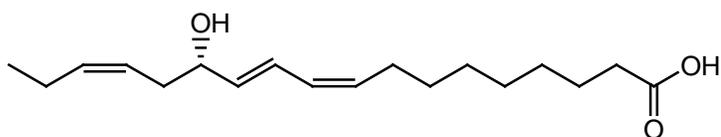
Ácidos grasos saturados e insaturados	TR	%	<i>m/z</i> (%): [M] <sup>+</sup>	Fórmula molecular
Ácido <i>n</i> -hexadecanoico ( <b>AG2</b> )	31.38	45	256 (54)	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Ácido heptadecanoico ( <b>AG3</b> )	32.73	3	270 (54)	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
Ácido octadecanoico ( <b>AG4</b> )	35.23	100	284 (80)	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>
Ácido nonadecanoico ( <b>AG5</b> )	36.32	2	298 (55)	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>
Ácido eicosanoico ( <b>AG6</b> )	38.22	56	312 (92)	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>
Ácido heneicosanoico ( <b>AG7</b> )	39.44	2	326 (100)	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>
Ácido docosanoico ( <b>AG8</b> )	41.03	13	340 (100)	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>
Ácidotricosanoico ( <b>AG9</b> )	42.38	2	354 (95)	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>
Ácido tetracosanoico ( <b>AG10</b> )	43.79	1	368 (100)	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>
Ácido oleico ( $\Delta^9$ ) ( <b>AG11</b> )	34.47	68	282 (3)	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>

TR = Tiempo de retención.

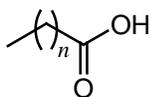
<sup>23</sup> Yadav, J. S.; Deshpande, P. K.; Sharma, G. V. M. *Tetrahedron*. **1992**, 48, 4465-4474.

En el análisis del porcentaje relativo de los ácidos grasos identificados por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas, observamos que el ácido graso insaturado **AG11** presenta el mayor porcentaje con un 68% en relación a el compuesto **AG4** (100%), seguido de los ácidos grasos saturados **AG6** y **AG2** con un 56% y 45%, respectivamente, y en menor porcentaje los compuestos **AG5** (2%), **AG9** (2%) y **AG10** (1%).

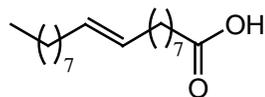
### Ácidos grasos



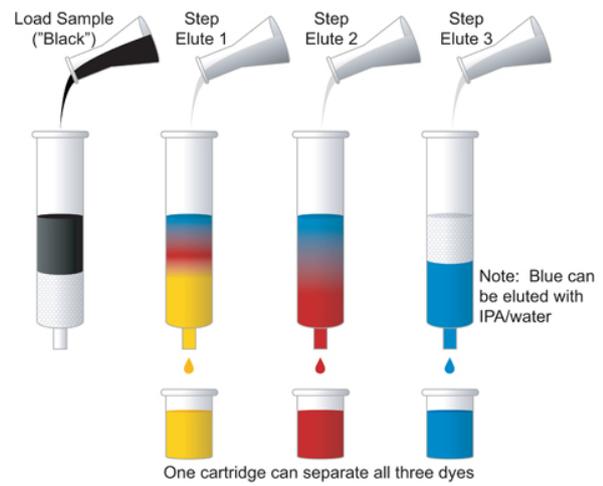
Ácido 13(S)-hidroxi-octadeca-(9Z,11E,15Z)-trienoico (AG1)



$n = 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22$   
(AG2-AG10)



Ácido oleico (AG11)



## 6. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

## 6. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

### 6.1. Técnicas espectroscópicas y espectrométricas

#### Rotación óptica

Para las determinaciones de la actividad óptica se empleó un polarímetro Perkin–Elmer®, modelo 241, a una temperatura de 20 °C y usando la línea D del sodio ( $\lambda = 589$  nm). Los compuestos fueron disueltos en cloroformo seco, salvo que se especifique otro disolvente, y se empleó una celda de 1 mL de volumen y 1 dm de paso de luz. La concentración ( $c$ ) está expresada en gramos por 100 mL de disolución.

#### Espectroscopía ultravioleta (UV)

Los espectros UV–visible fueron registrados en un espectrofotómetro Jasco V–560. El producto se disolvió en metanol ó etanol de calidad proanálisis y se colocó en una celda de cuarzo de 1 mL de volumen y con un paso de luz de 10 mm. Los valores de longitud de onda de absorción ( $\lambda$ ) se expresan en nm.

#### Espectroscopía infrarroja (IR)

Los espectros de IR fueron registrados en un espectrofotómetro FT–IR Bruker®, modelo IFS 55, utilizando disoluciones de los compuestos en cloroformo seco sobre una pastilla de cloruro de sodio (NaCl). Los valores de  $\nu$  se expresan en  $\text{cm}^{-1}$ .

#### Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de RMN se realizaron en los espectrofotómetros Bruker Avance 300 (300 MHz,  $^1\text{H}$  y 75 MHz,  $^{13}\text{C}$ ) y 400 (400 MHz,  $^1\text{H}$  y 100 MHz,  $^{13}\text{C}$ ), Bruker AMK 500 (500 MHz,  $^1\text{H}$  y 125 MHz,  $^{13}\text{C}$ ) y/o 600 (600 MHz,  $^1\text{H}$  y 150 MHz,  $^{13}\text{C}$ ). Los productos se disuelven en cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), acetona deuterada [ $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ], benceno deuterado ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ) ó metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), que contiene tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hz. En los experimentos de RMN  $^1\text{H}$ , la multiplicidad de las señales se indica por las abreviaturas: (s) singulete, (d) doblete, (dd) doble doblete (t) triplete y (m) multiplete y en los

experimentos de RMN  $^{13}\text{C}$ , (c)  $\text{CH}_3$ , (t)  $\text{CH}_2$ , (d)  $\text{CH}$  y (s)  $\text{C}$ . Los experimentos bidimensionales se han realizado con los programas DEPT, COSY, ROESY, HSQC, HSQC editado y HMBC, suministrados por la casa BRUKER. El procesamiento y el análisis de los espectros de RMN, se efectuaron utilizando el programa TopSpin<sup>TM</sup> v.2.1 (Bruker®).

### **Espectrometría de masas de baja y alta resolución (EM y EMAR)**

Los espectros de masas de baja resolución, así como la determinación de las fórmulas moleculares, de fragmentos y/o iones moleculares, se llevaron a cabo en espectrómetros Fisons Instruments VG Autospec (sector magnético) y LCT Premier XE Micromass Electrospray spectrometer. Los métodos de ionización empleados son impacto electrónico (IE, potencial de ionización 70 eV) y electrospray (ESI modo positivo).

### **Cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/MS)**

El análisis cromatográfico se realiza en el cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N acoplado al espectrómetro de masas VG Autospec a 70 eV, columna capilar de sílica (30 m x 0.32 mm), flujo de Helio 0.5 mL/minuto y la temperatura programada de 50 a 250 °C (5 °C/minuto).

## **6.2. 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  $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{SO}_4:\text{CH}_3\text{COOH}$ , 4:1:20) y posterior calentamiento a 120°C.

### **Cromatografía en columna (CC)**

En la realización de columnas cromatográficas (secas y húmedas) se emplea gel de sílice fina de 0,063–0,200 mm de diámetro, de la empresa Macherey-Nagel. El gel de sílice se suspende en el eluyente y se compacta con una bomba de vacío. La muestra se puede aplicar disuelta o adsorbida en gel de sílice de 0,2-0,5 mm de diámetro.

### **Cromatografía en capa fina centrífuga**

En la separación de mezclas de metabolitos con  $R_f$  próximos, se utilizó un equipo *Chromatotron*®, modelo 7924T, 24VDC, 0.5 A, el cual separa en función de la elución de la fase móvil accionada por la fuerza centrífuga. Para muestras entre 50-150 mg se usaron placas circulares de 1 mm de espesor y para muestras entre 150-300 mg se usaron placas circulares de 2 mm de espesor. Se usó gel de sílice Merk 60 PF 254 con yeso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$ ) para las placas circulares.

### **Cromatografía de exclusión molecular (CEM)**

Se utilizó como fase estacionaria la resina lipofílica Sephadex® LH-20 (25–100  $\mu\text{m}$ ), de Sigma–Aldrich Co. Las columnas fueron preparadas humectando la resina en metanol durante 12 h, siguiendo las instrucciones del fabricante, y empaquetadas por gravedad con la elución mínima de tres volúmenes muertos de metanol antes de cada cambio de fase móvil. El eluyente que en general se utiliza es cloroformo–metanol (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.

### **6.3. Recolección del material vegetal**

Las especies de *Piper delineatum*, *P. pseudoarboreum* y *P. divaricatum*, fueron recolectadas en Iquitos (Prov. de Maynas) del Departamento de Loreto, Perú, por el Ing. Juan C. Ruiz Macedo, en el mes de noviembre de 2009. Las muestras de herbario correspondientes a *P. delineatum* (No. Voucher 10484), *P. pseudoarboreum* (No. Voucher 10549) y *P. divaricatum* (No. Voucher 10548), fueron depositadas en el Herbario Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, Iquitos, Perú. La identificación fue realizada por el Ing. Juan C. Ruiz Macedo (Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, Iquitos, Perú).

Las especies de *Piper heterophyllum* y *P. glabratum*, fueron recolectadas en la región del Alto Beni (Prov. Abel Iturralde) del Departamento de La Paz, Bolivia, por la Dra. Genevieve Bourdy, en el mes de septiembre del 2002. Las muestras de herbario correspondientes a *P. glabratum* (No. Voucher GB-1877) y *P. heterophyllum* (No. Voucher GB-1922), fueron

depositadas en el Herbario Nacional de La Paz, Bolivia. La identificación fue realizada por el botánico Ricardo Callejas-Posada (Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia).

#### 6.4. Separación cromatográfica

##### Preparación de los extractos

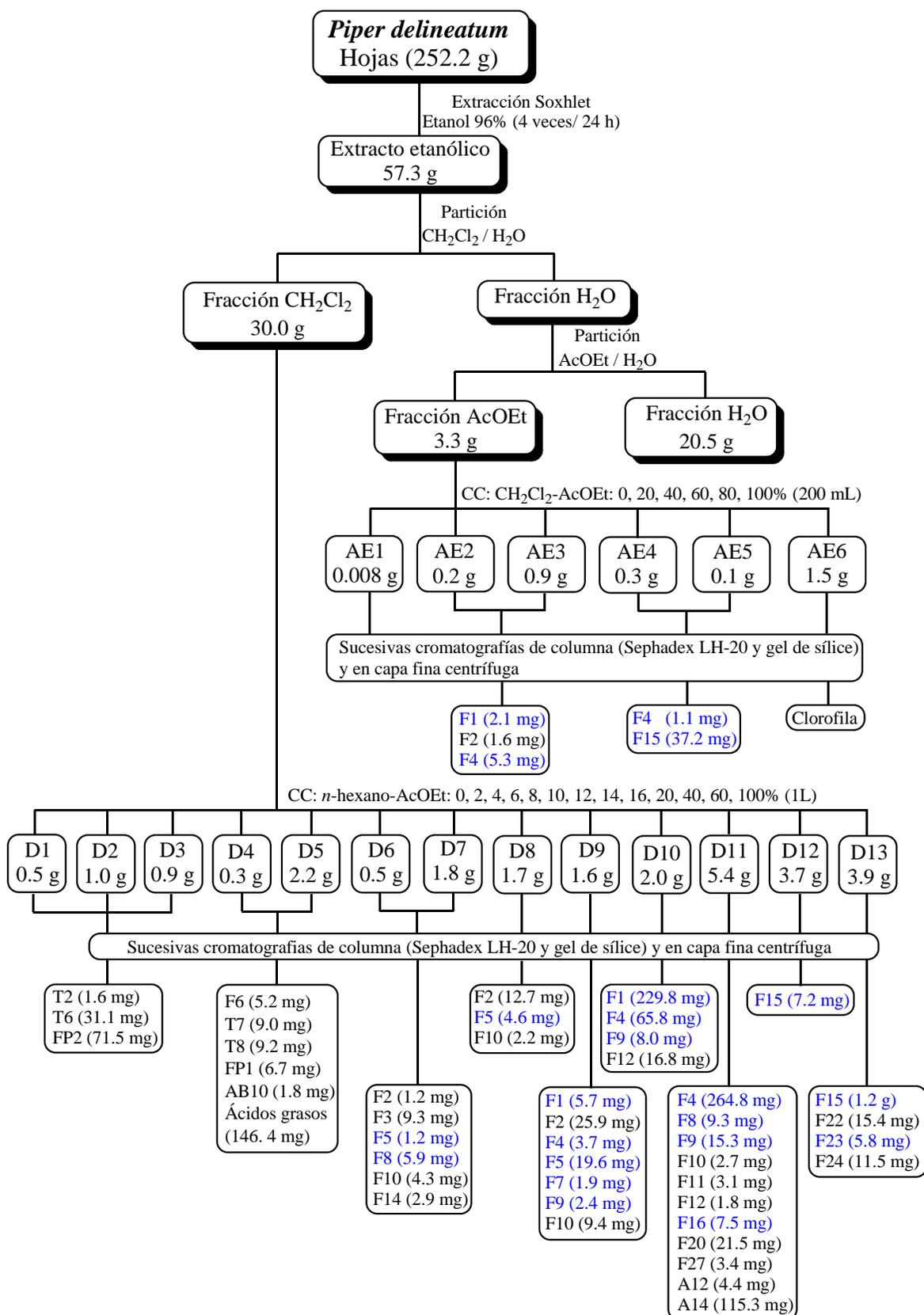
El material vegetal seco y molido de las especies de *Piper*, fueron extraídas por el método de Soxhlet con etanol a 96% (4 veces/ 24 h). Así también, los frutos de *P. glabratum*, fueron extraídos por maceración con etanol al 70% (4 veces/ 24 h). El residuo obtenido al evaporar el disolvente se resuspendió en agua y extrajo tres veces con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, obteniendo una fracción soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y una fracción acuosa. La fracción orgánica se llevó a sequedad, obteniéndose una fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fracción acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo (AcOEt), obteniendo una fracción soluble en AcOEt y una fracción acuosa. La fracción orgánica se llevó a sequedad, obteniéndose la fracción de AcOEt y la fracción acuosa fue congelada a -50°C y posteriormente liofilizada.

##### Fraccionamiento fitoquímico

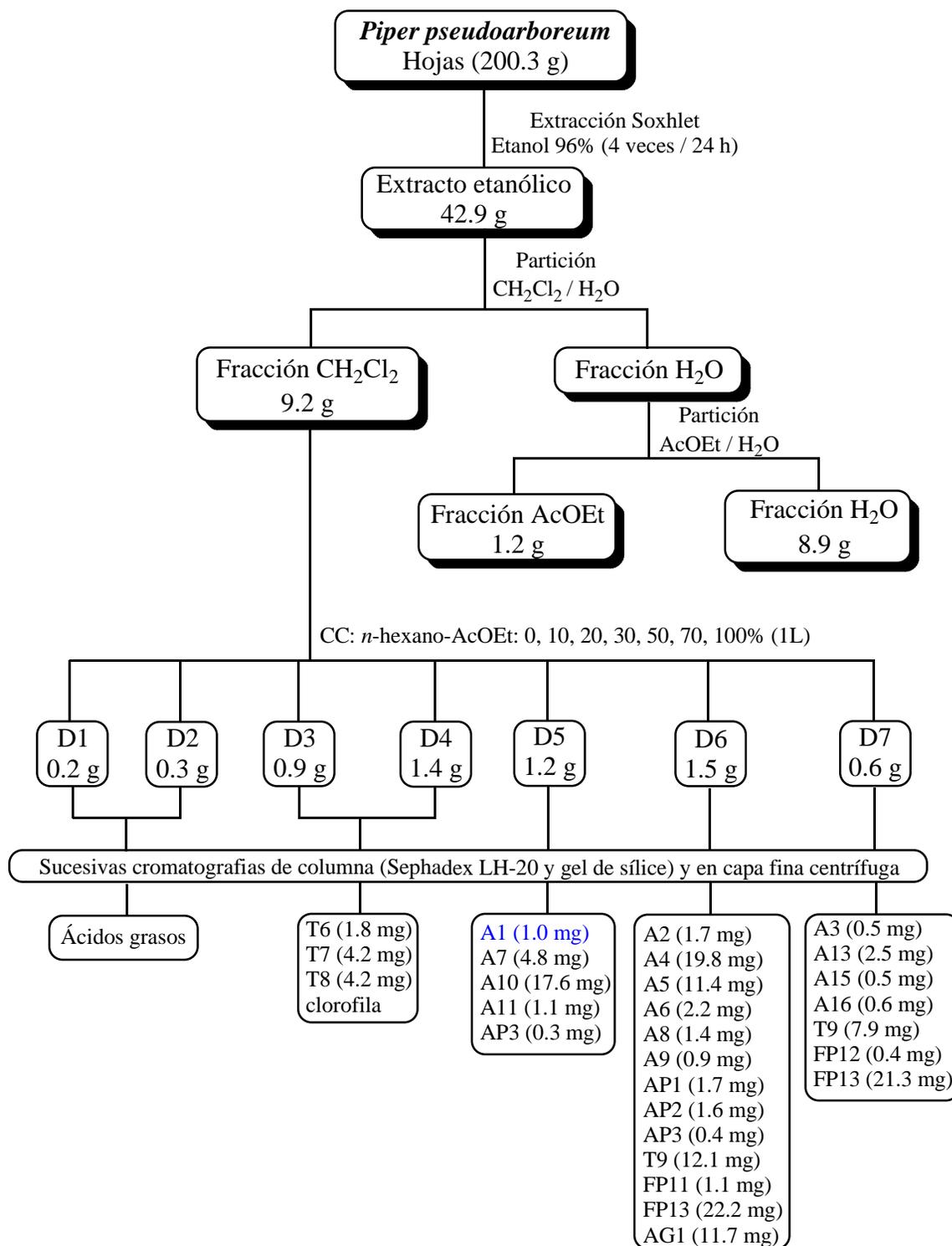
Las diferentes fracciones de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y AcOEt fueron fraccionadas por cromatografía líquida por gravedad, usando sistemas de elución: *n*-hexano-acetato de etilo, en orden creciente de polaridad, obteniéndose así numerosas subfracciones (según se detalla en el esquema para cada especie vegetal).

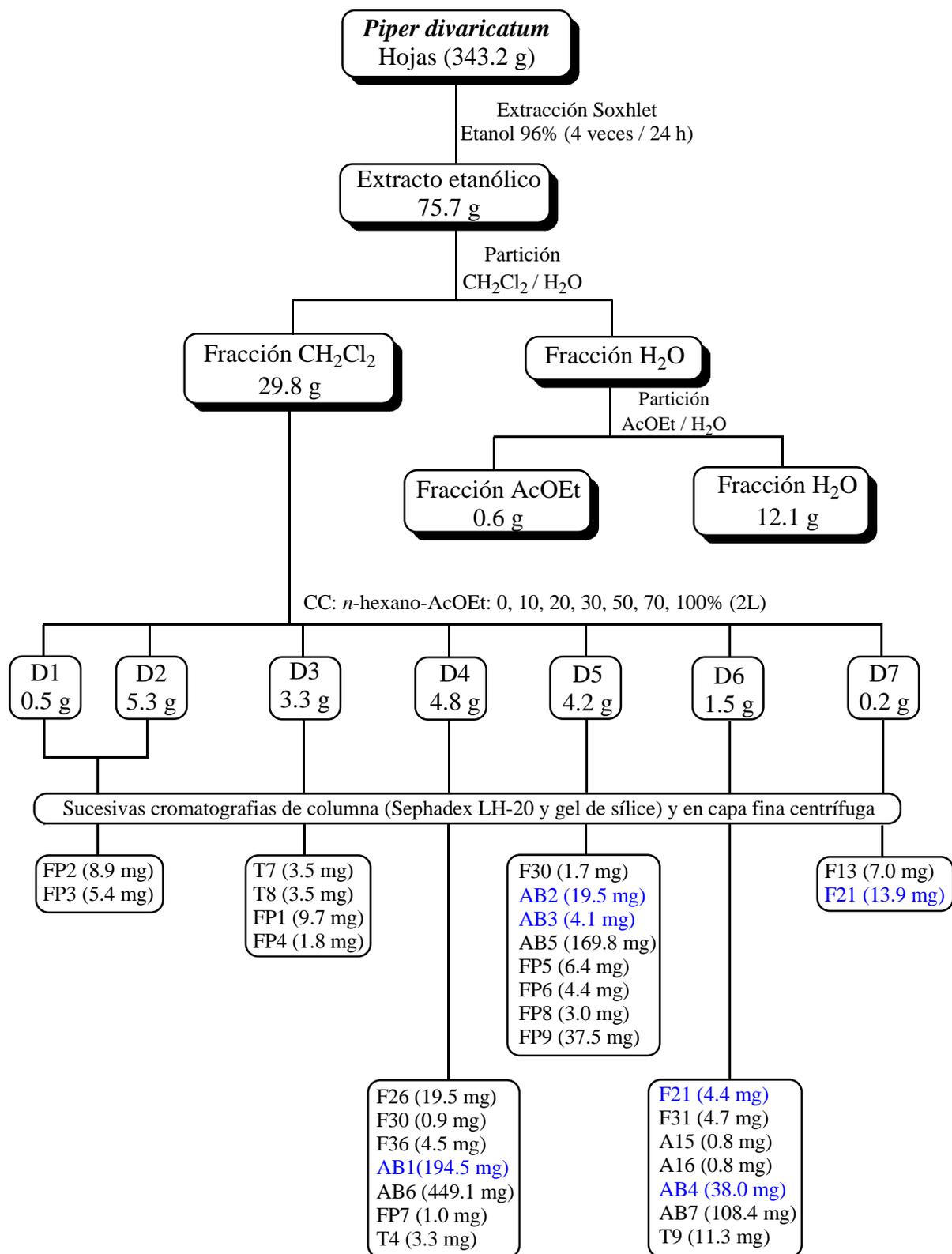
Las subfracciones fueron recromatografiadas utilizando cromatografía de exclusión molecular en Sephadex LH-20 (CHCl<sub>3</sub>-MeOH, 1:1), cromatografía flash, cromatografía en capa fina, usando como eluyente diferentes mezclas de *n*-hexano, éter dietílico, diclorometano, acetona, acetato de etilo, isopropanol y metanol, para aislar e identificar los metabolitos presentes en dichas subfracciones.

A continuación se presentan los esquemas del fraccionamiento realizado para el estudio fitoquímico de las especies de *Piper* objeto de este trabajo de investigación.

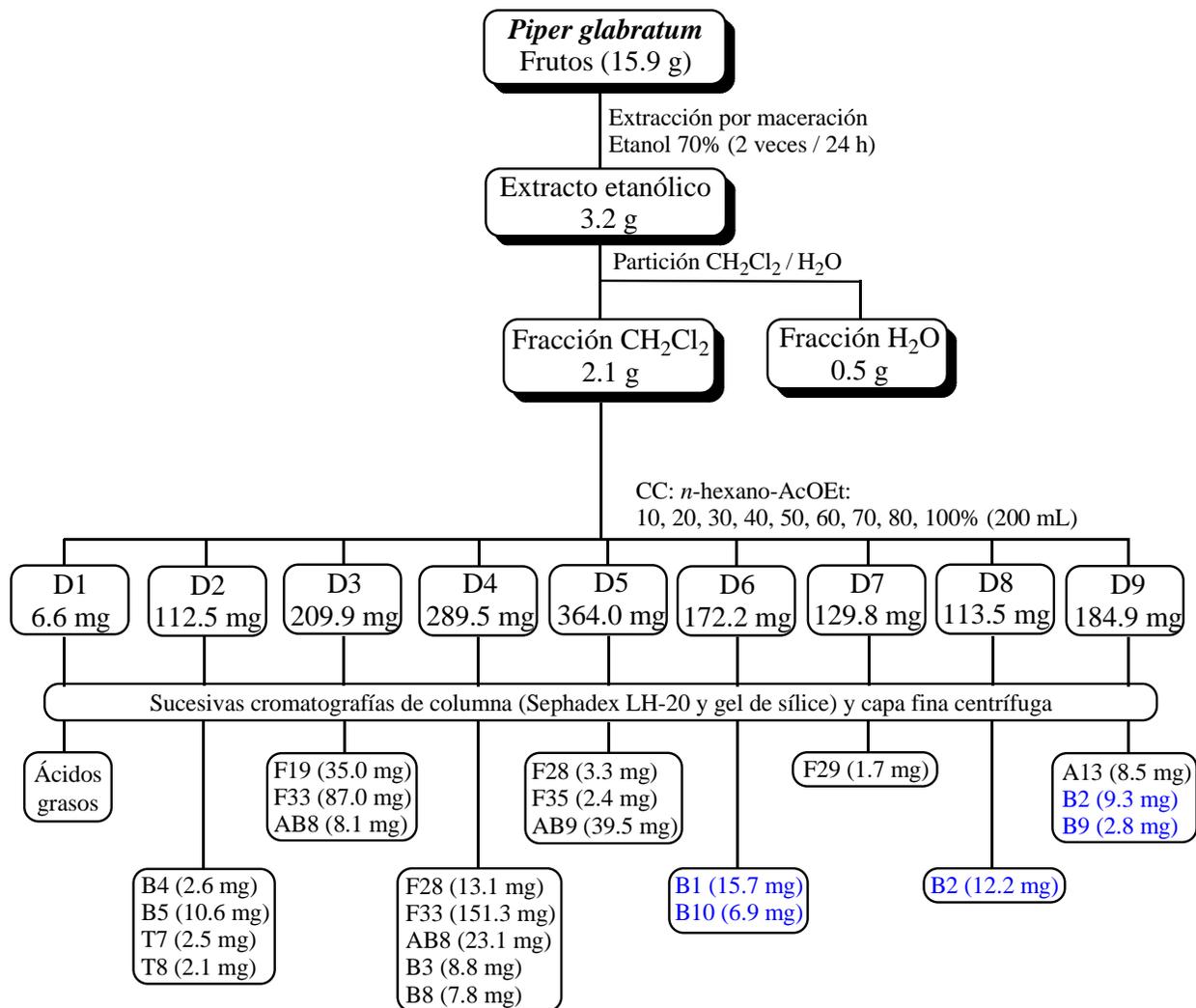
Esquema 1. Estudio fitoquímico de *P. delineatum*

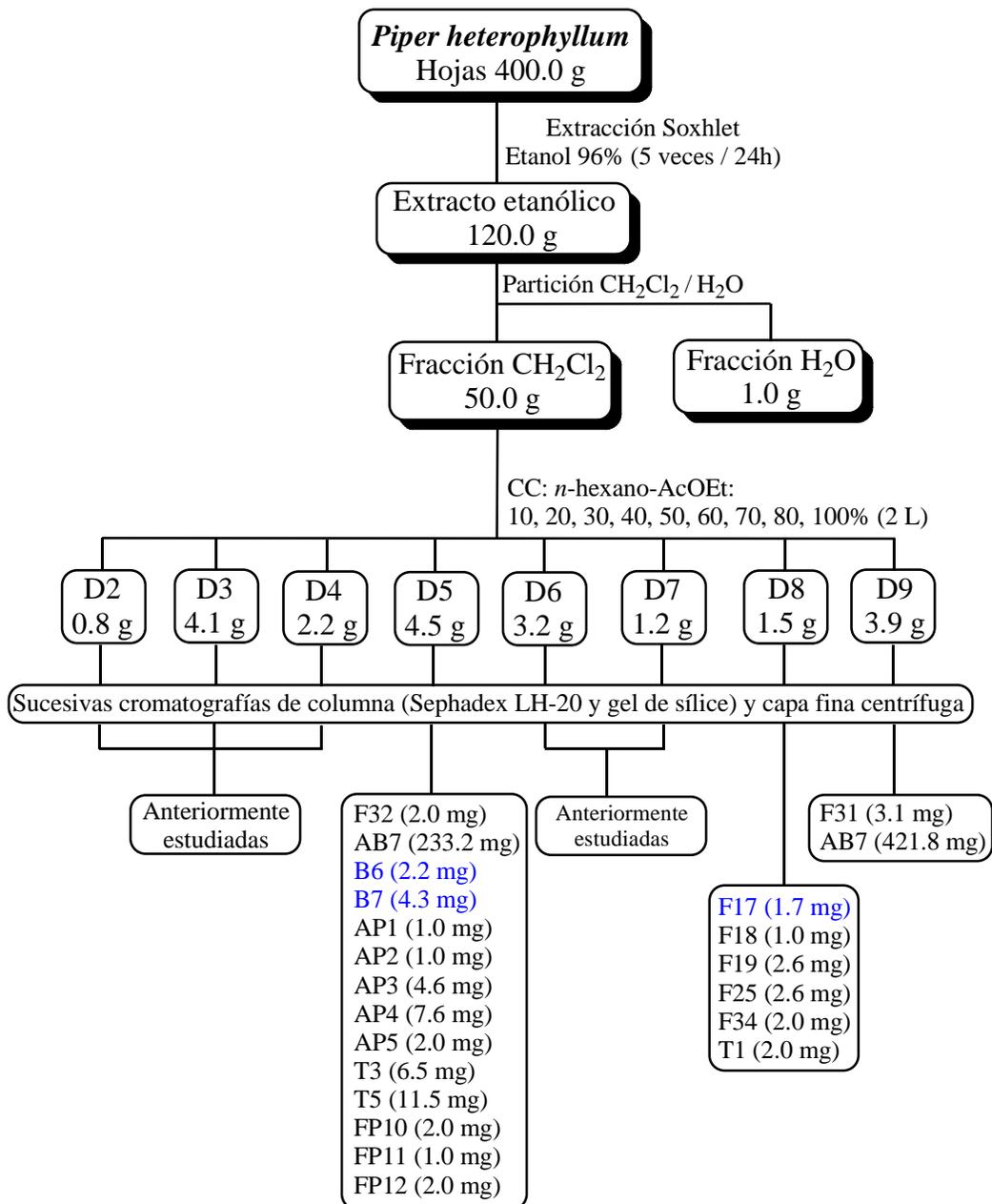
Esquema 2. Estudio fitoquímico de *P. pseudoarboreum*



Esquema 3. Estudio fitoquímico de *P. divaricatum*

**Esquema 4. Estudio fitoquímico de *P. glabratum***



Esquema 5. Estudio fitoquímico de *P. heterophyllum*

## **7. ENFERMEDADES PARASITARIAS**

## 7. ENFERMEDADES PARASITARIAS

Se trata de un conjunto de enfermedades de origen infeccioso que en la actualidad persisten casi exclusivamente en las comunidades más pobres y postergadas del mundo, donde frecuentemente se agrupan y sobreponen. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más de mil millones de personas sufren de una o más de estas enfermedades, y que hay varios millones viviendo en zonas en las cuales existe el riesgo de contraerlas. A este grupo de enfermedades se les denomina “desatendidas u olvidadas” porque comparten dos características esenciales: primero, que han sido objeto de desatención, desde el nivel local, nacional, o internacional, lo que se manifiesta en la falta de recursos (financieros, técnicos y humanos) otorgados para su abordaje y control, y segundo, porque se asocian fuertemente a la pobreza y marginalidad.

La OMS señala una relación de 17 patologías, que en su mayoría son infecciones crónicas, a veces mortales y frecuentemente deformantes, que prevalecen en poblaciones de Asia, África y en las zonas tropicales de América: 9 son causadas por microparásitos y 8 por macroparásitos. La OMS denomina a éstas enfermedades como tropicales desatendidas ya que la mayor incidencia de enfermedad se encuentra en países tropicales de África, Asia y América<sup>1</sup>. 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>.

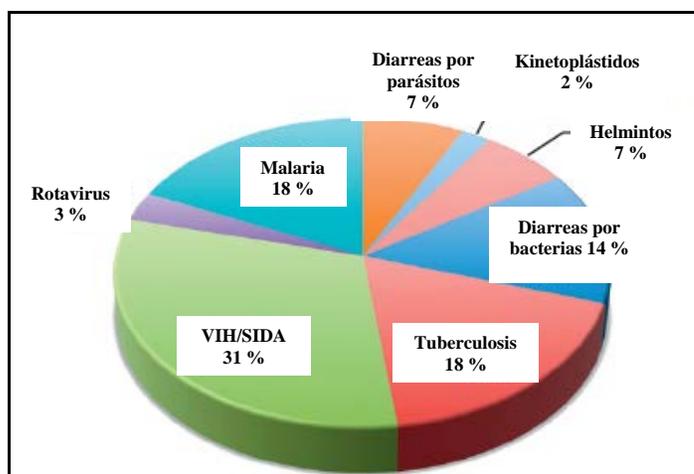
Según la última actualización de la Organización Mundial de la Salud sobre las enfermedades a nivel mundial, los parásitos son responsables del 34% de discapacidades y años de vida perdidos, entre las enfermedades principales ocasionadas por parásitos podemos mencionar a la Malaria, las leishmaniasis, la enfermedad del Chagas, infecciones intestinales

---

<sup>1</sup> OPS-OMS. *Guía para el desarrollo de planes integrados de acción para la prevención, control y eliminación de las enfermedades infecciosas desatendidas en Latino América y el Caribe*. 2011, 1-94.

<sup>2</sup> Pink, R.; Hudson, A.; Mouriés, M. A.; Bending, M. *Nature Reviews Drugs Discovery*. 2005, 4, 727-740.

provocadas por helmintos, la filariasis y las diarreas parasitarias siendo los principales agentes causantes: *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* y *Entamoeba histolytica*<sup>3</sup> (Tabla 21).



Distribución mundial de las principales enfermedades infecciosas según la OMS.

**Tabla 21. Enfermedades infecciosas y parasitarias a nivel mundial<sup>2</sup>**

	Mundo		África	
	DALYs <sup>a</sup> (Millones)	% de enfermedades infecciosa DALYs	DALYs (millones)	% de enfermedades infecciosa DALYs
<b>Total DALYs</b>	<b>1523.2</b>	<b>-</b>	<b>376.5</b>	<b>-</b>
<b>Todas las enfermedades infecciosas</b>	<b>302.1</b>	<b>100</b>	<b>159.8</b>	<b>100</b>
<b>Enfermedades parasitarias<sup>4</sup></b>	<b>63.9</b>	<b>21.2</b>	<b>44.7</b>	<b>27.9</b>
<b>Enfermedades por helmintos</b>	<b>12.1</b>	<b>4.0</b>	<b>5.7</b>	<b>3.5</b>
<b>Enfermedades diarreicas</b>	<b>72.8</b>	<b>24.1</b>	<b>32.2</b>	<b>20.1</b>
<b>VIH /SIDA</b>	<b>58.5</b>	<b>19.4</b>	<b>46.7</b>	<b>29.2</b>
<b>Tuberculosis</b>	<b>34.2</b>	<b>11.3</b>	<b>10.8</b>	<b>6.8</b>
<b>Malaria</b>	<b>34.0</b>	<b>11.2</b>	<b>30.9</b>	<b>19.4</b>
<b>Filariasis linfática</b>	<b>5.9</b>	<b>2.0</b>	<b>2.3</b>	<b>1.4</b>
<b>Infecciones intestinales por nemátodos</b>	<b>4.0</b>	<b>1.3</b>	<b>1.5</b>	<b>1.0</b>
<b>Leishmaniasis</b>	<b>2.0</b>	<b>0.6</b>	<b>0.3</b>	<b>0.2</b>
<b>Esquistosomiasis</b>	<b>1.7</b>	<b>0.1</b>	<b>1.5</b>	<b>0.9</b>
<b>Tripanosomiasis</b>	<b>1.7</b>	<b>0.6</b>	<b>1.6</b>	<b>1.0</b>
<b>Enfermedad del Chagas</b>	<b>0.4</b>	<b>0.1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Oncocercosis</b>	<b>0.4</b>	<b>0.1</b>	<b>0.4</b>	<b>0.2</b>

Datos obtenidos de la Organización Mundial de la Salud. <sup>a</sup> DALYs : Discapacidad y años de vida perdidos.

<sup>3</sup> Modis, Y. *Trends in Parasitology*. 2012, 28, 124-130.

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". 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. Así, los fármacos utilizados actualmente en el tratamiento de estas enfermedades están lejos de ser ideales y muchos de ellos fueron introducidos décadas atrás.

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. Entre las PPPs implicadas en el descubrimiento de fármacos antiparasitarios podemos citar: *Medicine Malaria Venture (MMV)*, *Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi)* e *Institute for One World Health (IOWH)*<sup>5</sup>.

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. Sin embargo, 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<sup>6</sup>.

---

<sup>4</sup> Andrews, K. T.; Haque, A.; Jones, M. K. *Immunology and Cell Biology*. **2012**, 90, 66-77.

<sup>5</sup> Nwaka, S.; Ridley, R. G. *Nature Reviews Drugs Discovery*. **2003**, 2, 919-928.

<sup>6</sup> <http://www.mmv.org/newsroom/publications/annual-report-2002> , *Medicines for Malaria Venture*. Annual Report **2002**, 1-38.

---

Las diferentes aproximaciones en el descubrimiento de fármacos para el tratamiento de las enfermedades tropicales, como se ha publicado recientemente para la malaria<sup>7</sup> y la tuberculosis<sup>8</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>9</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 antiplasmódicos y esquistosomicidas, para los cuales la capacidad de cribado está limitada por la disponibilidad de ensayos efectivos frente a helmintos de interés clínico.

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>10</sup>.

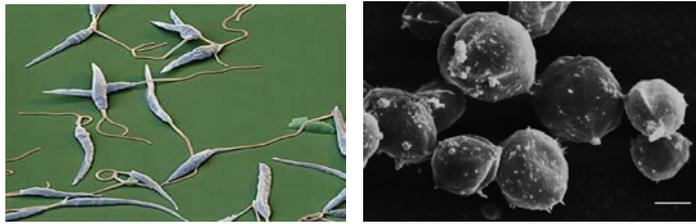
---

<sup>7</sup> Nogueira C. R., Lopes, L. M. X. *Molecules*. **2011**, 16, 2146-2190.

<sup>8</sup> Banyal, S.; Malik, P.; Tuli, H. S.; Mukherjee, T. K. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. **2013**, 19, 289-297.

<sup>9</sup> Nwaka, S.; Hudson, A. *Nature Rev. Drug Discov*. **2006**, 5, 941-955.

<sup>10</sup> Tagboto, S. Townson, S. *Advance in Parasitology*. **2001**, 50, 199-295.



## **7.1. Leishmaniasis**

## 7.1. Leishmaniasis

Las leishmaniasis son enfermedades de transmisión vectorial con un amplio espectro clínico e importante diversidad epidemiológica. Se puede definir como un conjunto de enfermedades provocadas por la infección de diferentes especies de protozoos parásitos pertenecientes al género *Leishmania*. Su presencia está directamente vinculada a la pobreza y factores sociales, además de a los cambios climáticos. Aproximadamente, 21 especies de *Leishmania* son patógenas para el humano, y son transmitidos por alrededor de 30 especies de dípteros del género *Phlebotomus* y 450 especies del género *Lutzomyia*, que actúan como vectores.



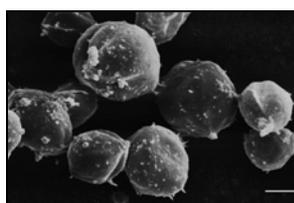
*Lutzomyia longipalpis*<sup>1</sup>



*Leishmania donovani*<sup>2</sup>



**Promastigote**



**Amastigote**

Imagen tridimensional obtenida por microscopia electrónica de dos estadios de *L. amazonensis*<sup>3</sup>.

Las leishmaniasis se pueden clasificar de acuerdo a las manifestaciones clínicas dependiendo del tipo de especie de *Leishmania*<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> <https://www.vectorbase.org/organisms/lutzomyia-longipalpis>

<sup>2</sup> <http://josejuancanel-jose.blogspot.com.es/2012/01/leishmania-donovani-resistente-los.html>

<sup>3</sup> Oliveira, A.; Ueda-Nakamura, T.; Dias, B. P.; Veiga, V. F., Vataru-Nakamura, C. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **2012**,1-7.

<sup>4</sup> [http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=category&layout=blog&id=3835&Itemid=4098&lang=es](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=3835&Itemid=4098&lang=es)

---

**Leishmaniasis visceral (LV):** Es una enfermedad crónica, sistémica que afecta principalmente a niños menores de cinco años y está asociada a desnutrición y a condiciones de inmunosupresión como el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Si no se instaura un tratamiento adecuado evoluciona ocasionando la muerte en más de 90% de los casos.

El período de incubación oscila entre 10 días y 24 meses, con una media de 2 a 6 meses. La infección se caracteriza por un amplio espectro clínico, que puede variar desde manifestaciones clínicas leves hasta moderadas y graves, como fiebre, pérdida de peso, esplenomegalia y hepatomegalia, anemia, además de ocasionar síntomas secundarios que incluyen trastornos respiratorios o gastrointestinales, como vómitos y diarrea. Después de una curación aparente pueden aparecer complicaciones cutáneas tardías, como la dermatitis "post-kala-azar", particularmente frecuente en la India y en Sudán<sup>5</sup>.

**Leishmaniasis cutánea (LC):** Es la forma más común esta parasitosis. El período de incubación es de 2 a 3 meses en promedio, aunque puede tener períodos más cortos (2 semanas) ó más largos (dos años). Las personas con LC tienen una o más lesiones en la piel y las úlceras pueden cambiar de tamaño y apariencia con el tiempo. Las lesiones comienzan como una pápula que evoluciona a nódulo redondeado, indoloro, que aumenta progresivamente de tamaño y se ulcera. Inicialmente las úlceras están cubiertas por una costra y al desprenderse, se observa la úlcera típica de fondo limpio, color rosado y tejido granuloso. En ocasiones las úlceras pueden infectarse secundariamente con otros agentes microbianos.

**Leishmaniasis cutánea-difusa (LCD):** Es difícil de tratar y que se caracteriza por la aparición en todo el cuerpo de nódulos diseminados que se extienden poco a poco hasta llegar a ser confluentes. Se trata de una forma que corresponde con un estado de debilitamiento del paciente.

**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 un 50% de los

---

<sup>5</sup> [http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6420&Itemid=39347](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6420&Itemid=39347)

casos, según los focos, aparecen lesiones granulomatosas hemorrágicas en la mucosa nasal, luego bucal y rinofaríngea, evolucionando hacia una necrosis extendida y espantosas mutilaciones que causan desfiguraciones faciales<sup>6</sup>.



Leishmaniasis visceral



Leishmaniasis cutánea

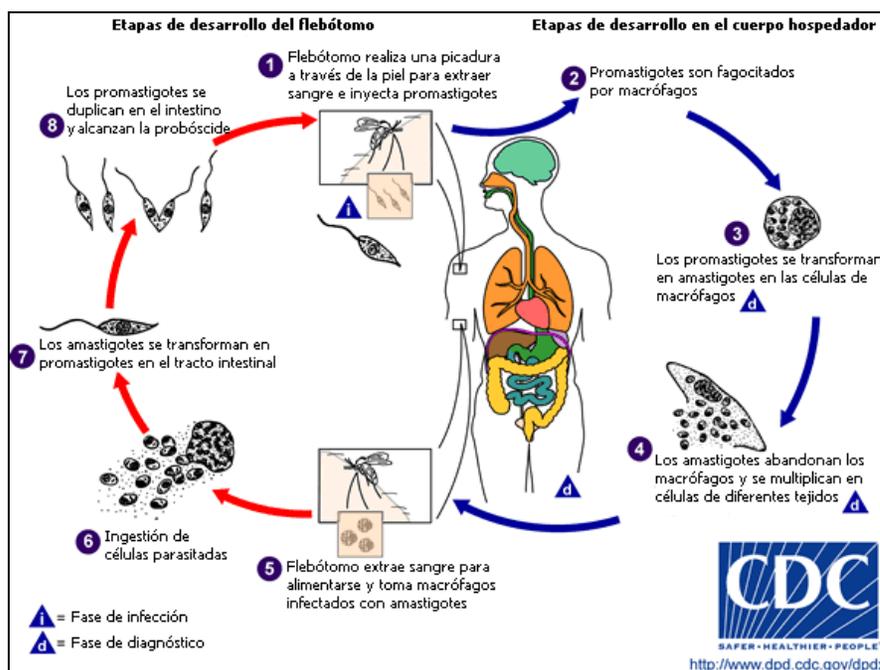


Leishmaniasis mucocutánea

### Ciclo biológico de *Leishmania*

Durante su ciclo biológico, los parásitos del género *Leishmania* se presentan 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*<sup>7</sup>

<sup>6</sup> [http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6417&Itemid=39345](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417&Itemid=39345)

<sup>7</sup> <http://phil.cdc.gov/phil/sessionexpired.asp>

---

El ciclo comienza cuando un mosquito hembra infectado pica a un hospedador. La forma promastigote del parásito entran en el hospedador a través de la probóscide, junto con la saliva anticoagulante del mosquito. Una vez dentro del hospedador, la forma promastigote es fagocitada por macrófagos, dentro de los cuales son capaces de sobrevivir, pasando a una forma amastigote y reproduciéndose por división binaria. El número de parásitos aumenta hasta que el macrófago sufre una lisis. Los amastigotes liberados son fagocitados por nuevos macrófagos y el ciclo continúa cuando un nuevo mosquito hembra pica al hospedador infectado, llevándose en la sangre que extrae macrófagos infectados. Los amastigotes son liberados en el estómago del insecto y casi inmediatamente pasan al estadio promastigote que se dividen por fisión binaria, cerrándose así el ciclo.

## **Epidemiología**

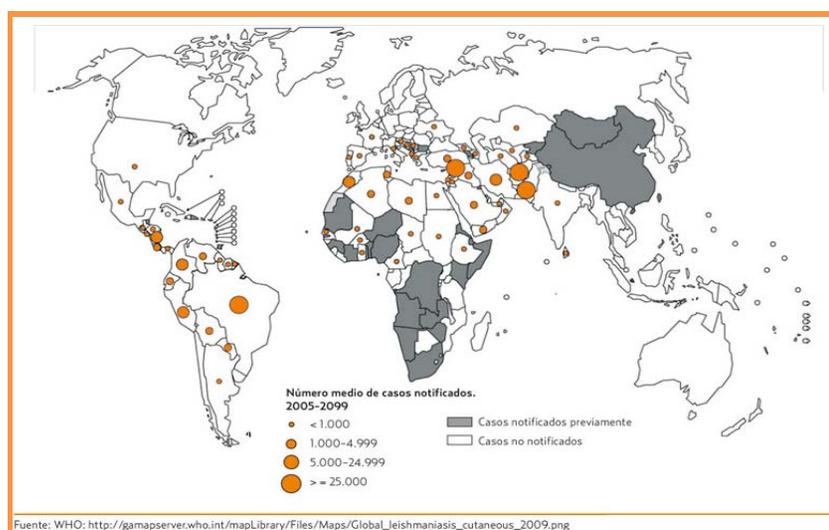
La leishmaniasis es endémica en 98 países y más de 350 millones de personas están en riesgo. Existe una incidencia de 2 millones de casos nuevos por año aproximadamente (1.5 millones son de leishmaniasis cutánea y 0.5 millones de leishmaniasis visceral). Esta enfermedad es endémica en regiones tropicales, subtropicales, incluyendo la parte Sur de Europa, los bosques pluviales en América y desiertos en el continente de Asia.

La leishmaniasis visceral causa aproximadamente 50.000 muertes por año, ocupando el noveno lugar en el análisis global de enfermedades infecciosas. La leishmaniasis visceral es endémica en más de 60 países, sin embargo, el 90% de 500.000 nuevos casos por año, están concentrados únicamente en 6 países India, Bangladesh, Nepal, Brasil, Etiopia y Sudan.

La leishmaniasis cutánea es endémica en más de 70 países, con una estimación de 1.5-2 millones de nuevos casos por año. Afganistan, Siria y Brasil son los países con más casos. La leishmaniasis mucocutánea aparece en un pequeño número de pacientes con leishmaniasis cutánea en el Nuevo Mundo, no obstante, puede cursar a una fase crónica y poner en riesgo la vida del paciente<sup>8</sup>.

---

<sup>8</sup> WHO Technical Report Series 949. *Control of the leishmaniases. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases*. Geneva, Switzerland. **2010**, 1-185.

Distribución geográfica de leishmaniasis visceral en el Viejo y el Nuevo Mundo<sup>8</sup>.Distribución geográfica de leishmaniasis cutánea en el Viejo y el Nuevo Mundo<sup>8</sup>.

La enfermedad puede propagarse por varios factores de riesgo, que incluyen cambios climatológicos, movimiento de población, turismo y comercio de larga distancia. En la última década, la leishmaniasis se ha expandido a nivel mundial como resultado de la expansión del díptero, insecto transmisor, debido a factores naturales y humanos, como la urbanización, deforestación y calentamiento global. La leishmaniasis cutánea se encuentra entre las 10 primeras enfermedades de turistas con problemas de piel que retornan de países tropicales. Así también, se han descrito casos de leishmaniasis en pacientes receptores de órganos<sup>9</sup>.

<sup>9</sup> Pavli, A.; Maltezou, H. C. *International Journal of Infectious Diseases*. **2010**, 14, e1032-e1039.

---

En Bolivia la leishmaniasis se extiende en más del 70% del territorio, concretamente en los departamentos de La Paz, Cochabamba, Santa Cruz, Beni, Pando y Tarija. En el año 2010 se diagnosticaron 1.810 casos de leishmaniasis cutánea y mucocutánea en todo el país, según el Ministerio de Salud y Deporte y el Programa Nacional de la leishmaniasis. 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<sup>10</sup>.

En la Unión Europea la principal amenaza viene de la propagación de dos parásitos endémicos *Leishmania infantum*, a través de una transmisión zoonótica que causa una leishmaniasis visceral y cutánea en humanos y perros domésticos (huésped reservorio) y *L. tropica*, a través de una transmisión antroponótica que causa una leishmaniasis cutánea<sup>11</sup>. En Europa, la leishmaniasis es una infección oportunista que afecta a pacientes tratados con inmunosupresores o pacientes con VIH, afectando entre el 2-7% de los pacientes con el Síndrome de la inmunodeficiencia humana (Sida)<sup>12</sup>.

La organización Mundial de Salud muestra que la coinfección con *Leishmania* y el VIH es alta en España, comparado con otros países Mediterráneos<sup>13</sup>. Así, en un estudio epidemiológico realizado en España se puso de manifiesto que entre los pacientes diagnosticados con leishmaniasis durante un periodo de 12 años (1997-2008), un tercio de ellos fueron coinfectados con el VIH<sup>14</sup>. Por otra parte, en un estudio realizado en España (julio de 2009 hasta junio de 2012), se han registrado 321 casos en 4 municipios: Fuenlabrada con 268 casos, Leganés con 31, Getafe con 17 y Humanes con 5, que agrupan una población de unos 600.000 habitantes. En total, 127 pacientes han tenido una leishmaniasis visceral y 194 una leishmaniasis cutánea, siendo el principal reservorio doméstico el perro para la especie de *L. infantum*.

---

<sup>10</sup> Barrientos, R. A. *Boletín epidemiológico, Unidad de epidemiología. La Leishmaniasis*. **2011**, 6, 1-4.

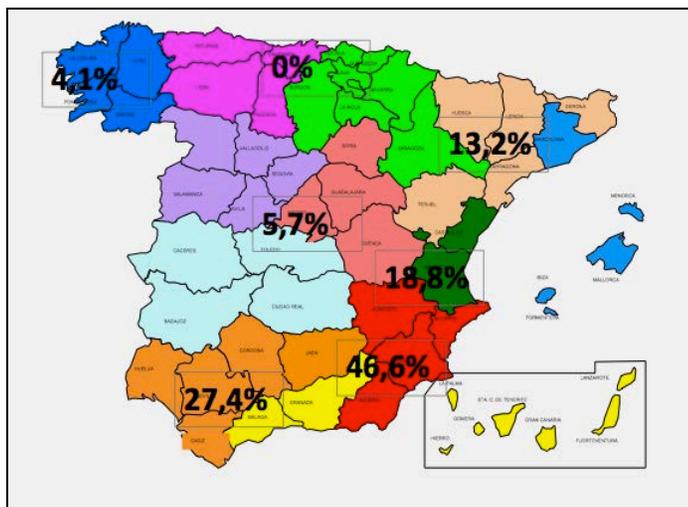
<sup>11</sup> Ready, P. D. *Eurosurveillance*. **2010**, 15, (10), 1-11.

<sup>12</sup> Desjeux, P. *Transactions of the Royal Society Tropical & Medicinal & Hygiene*. **2001**, 95, 239-243.

<sup>13</sup> Desjeux, P.; Alvar, J. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. **2003**, 97, 3-15.

<sup>14</sup> Prieto, R. G.; Walter, S.; Alvar, J. Gil, A. M. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **2011**, 85, 820-825.

La Presidenta de *Forum Bayer* destacó que la leishmaniasis canina es una enfermedad endémica en España y que a raíz del estudio de seroprevalencia de cinco enfermedades de transmisión parasitaria que se realizó en 1.100 perros de 57 clínicas veterinarias en España, presentan una prevalencia del 46.6% las provincias de Albacete, Alicante, Almería y Murcia, una prevalencia del 27.4% las provincias de Cádiz, Córdoba, Jaén, Huelva y Sevilla, y un 18.8% las provincias de Castellón y Valencia<sup>15</sup>.



Distribución de leishmaniasis canina en España<sup>16</sup>.

Esto ha llevado a la definición de la situación como brote comunitario en pacientes mayoritariamente inmunocompetentes, centrado en el norte de España en el municipio de Fuenlabrada, donde han habido cambios medioambientales importantes que coinciden con la génesis del brote, destacando una superpoblación de liebres concentrada en un espacio protegido de reciente creación<sup>17</sup>. El hallazgo de liebres infectadas en zonas colindantes a la población afectada y de que éstas han sido capaces de infectar a los flebótomos, hace que se las pueda considerar al menos como reservorios secundarios, lo que sugiere la existencia de un ciclo de transmisión silvestre ligada a la periferia urbana, para recientes brotes de leishmaniasis visceral en Madrid, no descrita hasta ahora en España<sup>18</sup>.

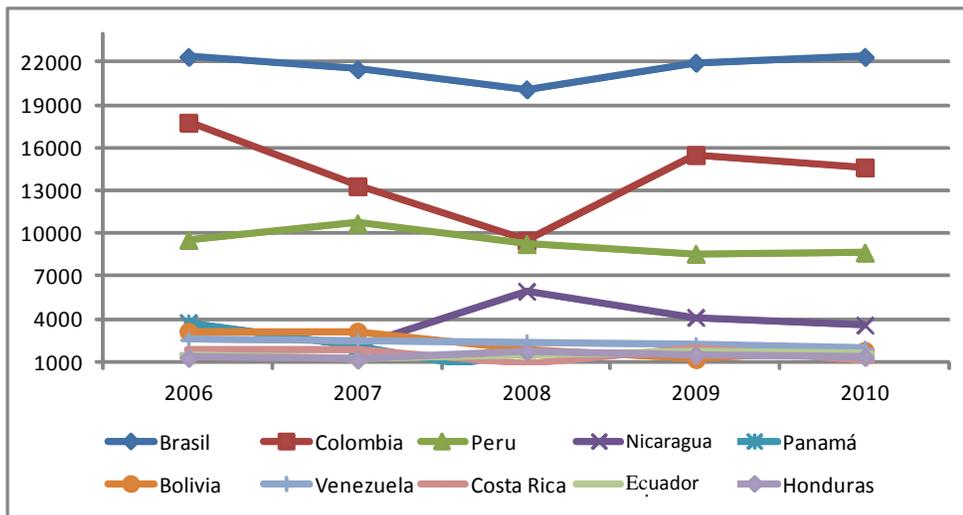
<sup>15</sup> Alvar, J.; Cañavate, C.; Molina, R.; Moreno, J.; Nieto, J. *Advances in Parasitology*. **2004**, 57,1-88.

<sup>16</sup> <http://noticiasaxoncomunicacion.net/2012/06/la-leishmaniosis-canina-gana-presencia-en-el-estado-espanol/>

<sup>17</sup> Noguero, M.; Aparicio, P. *Actualización en Medicina de Familia*. **2012**, 8, 509-516.

<sup>18</sup> Molina, R.; Jiménez, M. I.; Cruz, I.; Iriso, A.; Martín-Martín, I.; Sevillano, O.; Melero, S.; Bernal, J. *Veterinary Parasitology*. **2012**, 190, 268-271.

En un estudio realizado en los países de América Latina, durante los años 2006-2010, se concluye que Brasil es el país que presenta un mayor número de casos de leishmaniasis cutánea, seguido de Colombia.



Casos de leishmaniasis cutánea en las Américas según países de mayor ocurrencia, 2006-2010<sup>19</sup>.

## Vacunación contra la leishmaniasis

Una buena vacuna debe inducir niveles de protección del sistema inmunitario y tener una adecuada duración. Además, su administración debe ser segura, asequible y adecuada para la población, ya que en poblaciones diferentes podría diferir en su respuesta genética. Sin embargo, a pesar del conocimiento sobre la respuesta inmune contra los parásitos de *Leishmania*, actualmente no existen vacunas seguras y efectivas contra alguna forma de leishmaniasis humana. La única protección de larga duración contra la leishmaniasis cutánea en humanos fue la leishmanización (vacunación con parásitos virulentos) pero han sido abandonados por razones de seguridad<sup>20-21</sup>. La única vacuna exitosa es Leishmune® que bloquea la transmisión de leishmaniasis canina. Esta vacuna, está formada por una fracción de glicoproteínas de promastigote de *L. donovani*, cuya composición no está completamente definida, llamada ligando fucosa-manosa (FML), más un adyuvante formado de saponinas de

<sup>19</sup> <http://new.paho.org> OPS/OMS Datos disponibles según los programas de control de leishmaniasis.

<sup>20</sup> Handman, E. *Clinical Microbiology Reviews*. **2001**, 14, 229-243.

<sup>21</sup> Nadim, A. J., Javadian, E.; Mohebbali, M. *Eastern Mediterranean Health Journal*. **1997**, 3, 284-289.

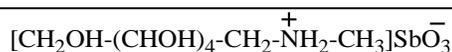
*Quillaja saponaria*<sup>22</sup>. La primera vacuna canina europea de *Leishmania*, CaniLeish® (LiESAp) compuesto por un antígeno de superficie de promastigote, proteínas excretadas de *Leishmania infantum*, fue puesto al mercado en el año 2011. La escasez de vacunas seguras o quimiopprofilaxis, limita las opciones para la prevención de esta enfermedad<sup>23</sup>.

### Tratamiento de la leishmaniasis

De manera similar a la vacunación, la variedad y eficacia de fármacos leishmanicidas está limitada. Sin embargo, la eficacia de las sustancias difiere drásticamente dependiendo de la forma clínica de la leishmaniasis, diferentes especies de *Leishmania* y región geográfica.

Los fármacos de primera línea usados para tratar la leishmaniasis visceral y cutánea son los antimoniales pentavalentes (antimoniato de *N*-metil glucamina y estibogluconato de sodio), anfotericina B y pentamidina.

Así, los derivados **antimoniales pentavalentes**, el antimoniato de *N*-metil glucamina (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>24,25</sup>.



**Antimoniato de *N*-metil glucamina**

Sin embargo, estos principios activos poseen numerosos inconvenientes, son costosos, 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

<sup>22</sup> Dantas-Torres, F. *Veterinary Parasitology*. **2006**,141,1-8.

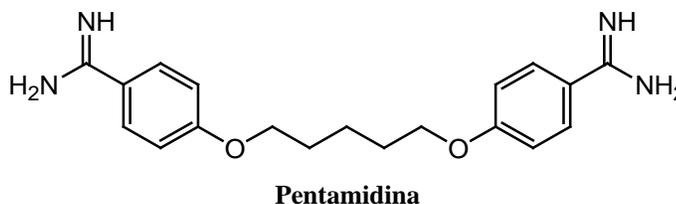
<sup>23</sup> Day, M. J. *Parasites & Vectors*. **2011**, 4, 48-60.

<sup>24</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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2006**, 50, 1788-1797.

<sup>25</sup> Murray, H. W.; Berman, J. D.; Davies, C. R.; Saravia, N. G. *The Lancet*. **2005**, 366, 1561-1577.



con riesgo de diabetes mellitus irreversible, lo que conjuntamente con su elevado costo hace que su uso sea muy restringido<sup>28</sup>.



Por otro lado, una gama de fármacos alternativos incluyen a miltefosina, paramomicina, azoles, azitromicina, alopurinol, dapsona y rifampicina.

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>29,30</sup> y cuya venta ha sido autorizada en la India y Alemania, después de realizar estudios clínicos en pacientes con leishmaniasis visceral resistente a los antimoniales y con leishmaniasis cutánea<sup>31</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>32,33</sup>. Sin embargo, su utilización en los países en desarrollo tiene algunos inconvenientes, por su teratogenicidad, un bajo índice terapéutico y es susceptible de favorecer la resistencia. En este sentido, cabe destacar las investigaciones realizadas en la búsqueda del posible mecanismo de resistencia de estos fármacos en especies de *Leishmania*, así como de nuevos revertidores de la multiresistencia a los mismos<sup>34</sup>. Los efectos secundarios observados hasta el momento son tolerables, siendo los más frecuentes los vómitos y diarreas.

<sup>28</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>29</sup> Croft, S. L.; Neal, R. A.; Pendergast, W.; Chan, J. H. *Biochemical Pharmacology*. **1987**, 36, 2633-2636.

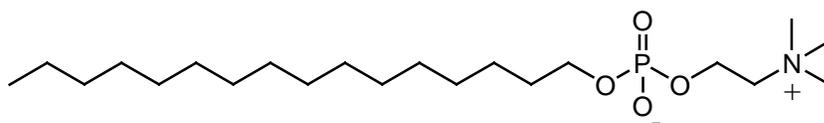
<sup>30</sup> Sundar, S.; Jha, T. K.; Thakur, C. P.; Engel, L.; Sinderman, H.; Fisher, C.; Junge, K.; Bryceson, A.; Berman, J. *New England Journal of Medicine*. **2002**, 347, 1739-1746.

<sup>31</sup> Schmidt-Ott, R.; Klenner, T.; Overath, P.; Aebischer, T. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*. **1999**, 93, 85.

<sup>32</sup> Berman, J. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. **2005**, 6, 1381-1388.

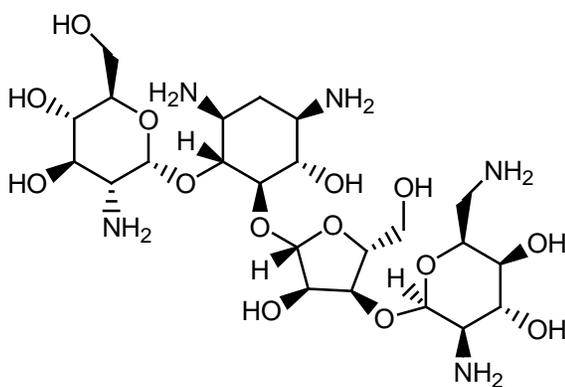
<sup>33</sup> Croft, S. L.; Barret, M. P.; Urbina, J. A. *Trends in Parasitology*. **2005**, 21, 508-512.

<sup>34</sup> Pérez-Victoria, J. M.; Pérez-Victoria, F. J.; Parodi-Talice, A.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; Castanys, S.; Gamarro, F. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2001**, 45, 2468-2474.



**Miltefosina**

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 Kenia, Sudan e India, el fármaco resultó seguro, bien tolerado y con buena actividad, tanto administrado solo o con derivados pentavalentes del antimonio<sup>35</sup>. Los recientes ensayos de fase III en la India<sup>36</sup> (15 mg/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. En el nuevo Mundo, los índices de recuperación se encuentran en un 85.7% para *L. braziliensis* y *L. mexicana* en Guatemala<sup>37</sup>, y resultó un fracaso para *L. mexicana* y *L. chagasi* en Honduras<sup>38</sup>.



**Aminosidina**

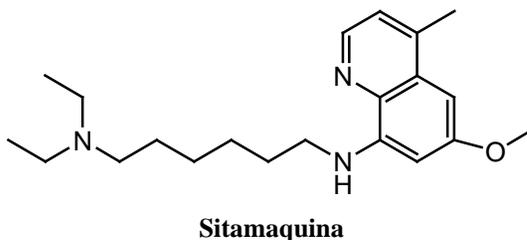
<sup>35</sup> Desjeux, P. *Medicine et Maladies Infectieuses*. **2005**, 35, S74-76.

<sup>36</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 Leishmaniosis*. **2005**, Sicilia, Italia.

<sup>37</sup> Arana, B. A.; Mendoza, C. E.; Rizzo, N. R.; Kroeger, A. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **2001**, 65, 466-470.

<sup>38</sup> Neva, F. A. Ponce, C.; Ponce, E.; Kreutzer, R.; Modabber, F.; Olliaro, P. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*. **1997**, 91, 473-475.

La **sitamaquina**, es una 8-aminoquinolina, fármaco probado para la administración oral para la leishmaniasis visceral. En ensayos clínicos, los índices de recuperación en pacientes con leishmaniasis visceral, *L. chagasi* y *L. donovani* varían enormemente, muy bajos en Brasil y entre un 80-90% en la India y Kenia. El fármaco presenta efectos nefrotóxicos<sup>39-40</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, que representa una interesante alternativa para el control de la resistencia.

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>41</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

<sup>39</sup> Wasunna, M. K.; Rashid, J. R.; Embui, J.; Kirigi, G.; Kinoti, D.; Lodenyo, H.; Felton, J. M.; Sabin, A. J.; Horton, J. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **2005**, 73, 871-876.

<sup>40</sup> Jha, T. K.; Sundar, S.; Thakur, C. P.; Felton, J. M.; Sabin, A. J.; Horton, J. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **2005**, 73, 1005-1011.

<sup>41</sup> Pérez-Victoria, J. M.; Di Pietro, A.; Barron, D.; Ravelo, A. G.; Castanys, S.; Gamarro, F. *Current Drug Targets*. **2002**, 3, 311-333.

---

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>42</sup>.

En esta línea, los primeros trabajos descritos desarrollan nanopartículas con poliláctico 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>43</sup>. Esta metodología se aplicó para la preparación de nanopartículas de poliláctico con 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona, lo que mejoró notablemente la actividad leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de esta chalcona<sup>44</sup>. También han sido evaluadas frente a *Leishmania*<sup>45</sup>, microesferas de fosfolípidos y nanopartículas biodegradables preparadas con PLGA. Así mismo, se evaluó en un modelo experimental *in vivo* la actividad de la chalcona en implantes de polímeros 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>46</sup>.

Un exhaustivo análisis de las patentes registradas en los últimos años<sup>47,48</sup> nos permite destacar las siguientes consideraciones. En primer lugar, la mayoría de las patentes han sido

---

<sup>42</sup> Langer, R. *Nature*. **1998**, 392, 5-10.

<sup>43</sup> Rodrigues, J. M.; Croft, S. L.; Fessi, H.; Bories, C.; Devissaguet, J. P. *Trop. Medicine and Parasitology*. **1994**, 45, 223-228.

<sup>44</sup> Torres-Santos, E. C.; Rodríguez, J. M.; Moreira, D. L.; Kaplan, M.A.; Rossi-Bergman, B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1999 b**, 43, 1776-1778.

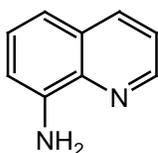
<sup>45</sup> Medda, S.; Jaisankar, P.; Manna, R. K.; Pal, B.; Giri, V. S.; Basu, M. K. *Journal of Drug Targeting*. **2003**, 11, 123-128.

<sup>46</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.

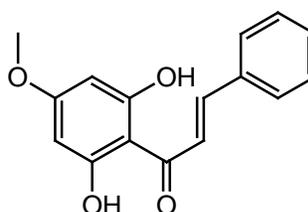
<sup>47</sup> Werbovetz K. A. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. **2002**, 6 (4), 407-422.

<sup>48</sup> Ravelo, A. G.; Jiménez, I. A.; Piñero, J. E.; Valladares, B. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. **2004**, 14, 1113-1123.

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-aminoquinoleína, derivados de xantonas, chalconas, 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>49,50</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.



8-aminoquinoleína



2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-chalcona

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 la MDR, por lo que la búsqueda de revertidor de la Ppg es una excelente opción en la resolución de los problemas ocasionados en los fallos de los tratamientos farmacológicos de la leishmaniasis. La quimioterapia queda como una única alternativa, enfatizando la necesidad de identificar nuevas dianas terapéuticas de *Leishmania*<sup>51</sup>.

<sup>49</sup> Bandyopadhyay y col. Número de patente US0098251, **2002**.

<sup>50</sup> Bandyopadhyay y col. Número de patente US00150637, **2002**.

<sup>51</sup> Saha, P.; Mukhopadhyay, D.; Chatterjee, M. *International Immunopharmacology*. **2011**, 11, 1668-1679.

---

## Terapia combinada

El uso de la terapia combinada en el tratamiento de la enfermedad de la leishmaniasis comparado con la monoterapia, puede tener ventajas significativas y mejorar el efecto terapéutico. Así, en el tratamiento de la leishmaniasis visceral, la combinación de miltefosina con paromomicina y con otros fármacos leishmanicidas (antimoniales pentavalentes, anfotericina B), mostró una eficacia superior que utilizando un sólo fármaco frente a esta enfermedad<sup>52</sup>. Además, los antimoniales pentavalentes son ampliamente combinados con otros fármacos. Por ejemplo, en el tratamiento de leishmaniasis cutánea la administración de estibogluconato sódico en combinación con ketoconazol, mostró un 92.3% de recuperación de las lesiones en los pacientes tratados<sup>53</sup>. No obstante, en el tratamiento de la leishmaniasis mucocutánea con antimoniales pentavalentes combinado con alopurinol, no mostró mejoría en su efecto terapéutico (63.6% la terapia combinada y 75% la monoterapia con los antimoniales pentavalentes)<sup>54</sup>.

## 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 décadas, existiendo una amplia bibliografía de productos naturales, aislados de extractos de plantas, que muestran actividad frente a parásitos de *Leishmania*<sup>55,56,57,58</sup>.

Así, se han descrito numerosos metabolitos secundarios con actividad leishmanicida, entre los que podemos citar los alcaloides derivados de la 2-alquilquinoleina, aislados de las hojas de *Galipea longiflora*, la **2-n-propilquinoleina**, **chimanina B** y **chimanina D**, efectivos

---

<sup>52</sup> Van Griensven, J.; Balasegaram, M.; Meheus, F.; Alvar, J. Lynen, L.; Boelaert, M. *Lancet Infectious Diseases*. **2010**, 10, 184-194.

<sup>53</sup> El-Sayed, M.; Anwar, A. E. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. **2010**, 24, 335-340.

<sup>54</sup> Llanos-Cuentas, A.; Echevarria, J. Cruz, M.; La Rosa, A.; Campos, P.; Campos, M.; Franke, E.; Berman, J.; Modabber, F.; Marr, J. *Clinical Infectious Diseases*. **1997**, 25, 677-684.

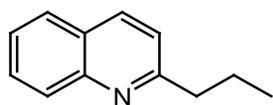
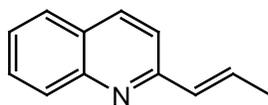
<sup>55</sup> Peña-Rodríguez, L. M.; Chan-Bacab, M. J. *Natural Product Reports*. **2001**, 18, 674-688.

<sup>56</sup> Tagboto, S.; Townson, S. *Advances in Parasitology*. **2001**, 50, 199-295.

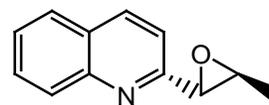
<sup>57</sup> Fournet, A.; Muñoz, V. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **2002**, 2, 1215-1237.

<sup>58</sup> Rocha, L. G.; Almeida, J. R. G. S.; Macedo, R. O.; Barbosa-Filho, J. M. *Phytomedicine*. **2005**, 12, 514-535.

en un modelo *in vivo* de leishmaniasis cutánea y visceral<sup>59</sup>, siendo tan activos como el control, la pentamidina.

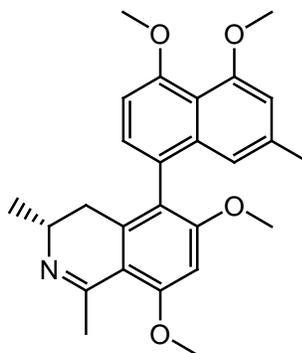
2-*n*-Propil-quinoleina

Chimanina B



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>60</sup>.



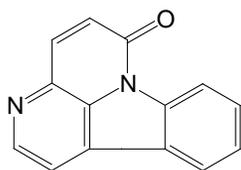
Ancistroealaina A

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 aislaron **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>61</sup>. Estos resultados hacen promisorio su uso en el tratamiento tópico de la leishmaniasis cutánea.

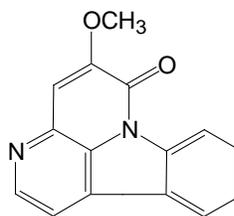
<sup>59</sup> Fournet, A.; Gantier, J. C.; Gautheret, A.; Leysalles, L.; Muñoz, L. H.; Mayrargue, J.; Moskowitz, H.; Cavé, A.; Hocquemiller, R. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **1994**, 33, 537-544.

<sup>60</sup> Bringmann, G.; Hamm, A.; Gunther, C.; Michel, M.; Brun, R.; Mudogo, V. *Journal of Natural Products*. **2000**, 63, 1465-1470.

<sup>61</sup> Ferreira, M.; Rojas de Arias, A.; Torres, S.; Inchausti, A.; Nayakama, H.; Thouvenel, C.; Duret, P.; Hocquemiller, R.; Fournet, A. *Journal of Ethnopharmacology*. **2002**, 80, 199-202.

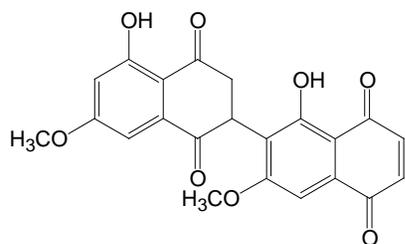


**Cantina-6-ona**

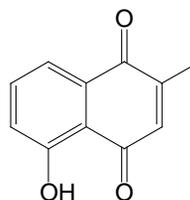


**Metoxicantina-6-ona**

Entre otros productos naturales con actividad leishmanicida podemos citar **diospirina**, una bis-naftoquinona aislada de las raíces de *Diospyros montana*<sup>62</sup> y la **plumbagina**, aislada de las raíces de *Pera benencis*<sup>63,64</sup>, planta utilizada en Bolivia para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea.



**Diospirina**



**Plumbagina**

El grupo más numeroso de productos naturales bioactivos lo constituyen los terpenos. Así, podemos destacar el monoterpeno glicosilado **arbortristósido A**, aislado de las semillas de *Nyctanthes arbortristis*<sup>65</sup> y la lactona sesquiterpénica, **dehidrozaluzanina C**, aislada de la hojas de *Munnozia maronii*<sup>66</sup>, los cuales reducen de forma significativa las lesiones causadas por *L. donovani* y *L. amazonensis*<sup>67</sup>.

<sup>62</sup> Hazra, B.; Saha, A. K.; Ray, R.; Roy, D. K.; Banerjee, A. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **1987**, 81, 738-741.

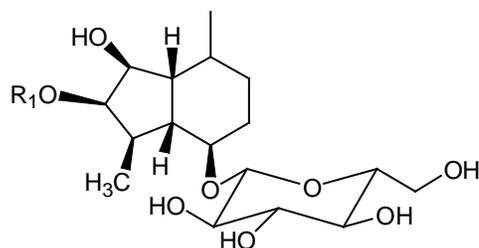
<sup>63</sup> Fournet, A.; Angelo, A.; Muñoz, V.; Roblot, F.; Hocquemiller, R.; Cavé, A. *Journal of Ethnopharmacology*. **1992**, 37, 159-164.

<sup>64</sup> Fournet, A.; Muñoz, V.; Roblot, F.; Hocquemiller, R.; Cavé, A. *Tropical Medicine and Parasitology*. **1992**, 43, 219-222.

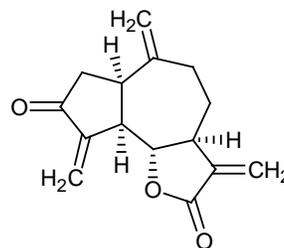
<sup>65</sup> Tandon, J. S.; Srivastava, V.; Guru, P. Y. *Journal of Natural Products*. **1991**, 54, 1102-1104.

<sup>66</sup> Fournet, A.; Muñoz, V.; Roblot R. F.; Hocquemiller, R.; Cavé, A; Gantier, J. *Phytotherapy Research*. **1993**, 7, 111-115.

<sup>67</sup> Francois, G.; Passreiter, C. M.; Woerdenbag, H. J.; Van Loren, M. *Planta Medica*. **1996**, 62, 126-129

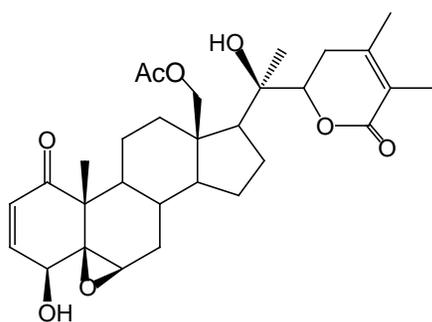


Arbortristósido A

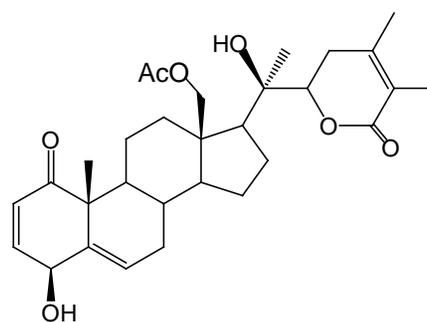


Dehidrozaluzanina C

El fraccionamiento bioguiado de *Dunalia brachyacantha* condujo al aislamiento de dos withanolidas, **18-acetoxiwithanolida D** y **18-acetoxi-5,6-deoxi-5-withanolida D**, con actividad frente a diferentes cepas de *Leishmania spp*<sup>68</sup>.

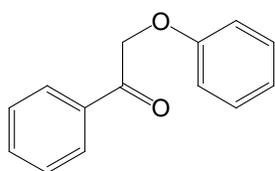


18-Acetoxiwithanolida D

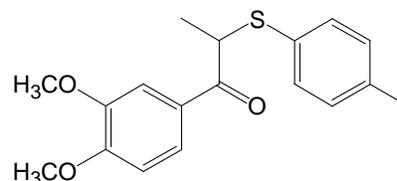


18-Acetoxi-5,6-deoxi-5-withanolida D

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>69</sup>.



8-Fenoxi-acetofenona

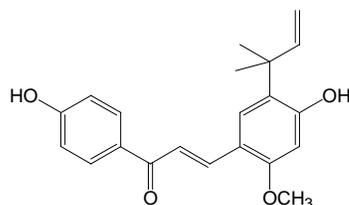


3,4-Dimetoxi-8-(4'-metoxiltiofenoxi)-propiofenona

<sup>68</sup> Bravo, J. A.; Sauvain, M.; Gímenez, A.; Balanza, E.; Serani, E.; Massiot, G. *Journal of Natural Products*. **2001**, 64, 720-725.

<sup>69</sup> Barata, L. E. S.; Santos, L. S.; Ferri, P. H.; Philipson, J. D.; Paine, A.; Croft, S. L. *Phytochemistry*. **2000**, 55, 589-595.

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>70</sup> y sintéticas<sup>71</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>72</sup>. Así, estudios con la **lico-chalcona A**, aislada de *Glycyrrhiza sp*<sup>73,74</sup>, muestran que ésta inhibe la actividad de 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>75</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 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>76</sup>, mostraron que ésta presenta una significativa actividad *in vitro* e *in vivo*,

<sup>70</sup> Kayser, O.; Kiderlen, A. *Phytotherapy Research*. **2001**, 15, 148-152.

<sup>71</sup> Nielsen, S. F.; Christensen, S.; Cruciani, G.; Kharazmi, A. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1998**, 41, 4819-4832.

<sup>72</sup> Zhai, L.; Blom, J.; Chen, M.; Christensen, S. B.; Kharazmi, A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1995**, 39, 2742-2748.

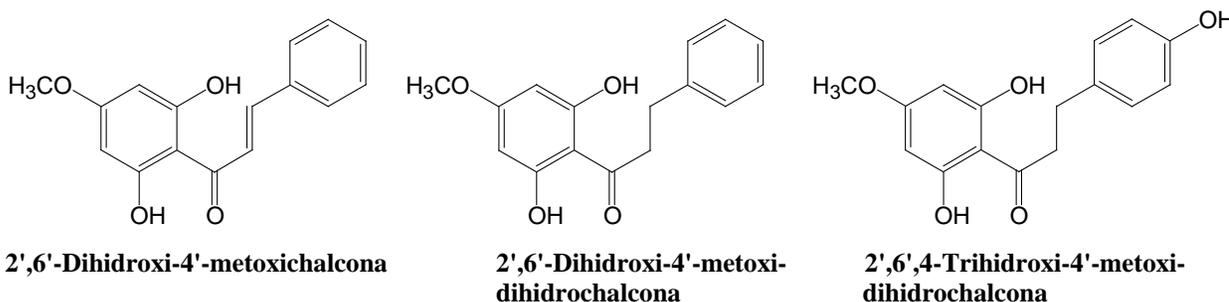
<sup>73</sup> Chen, M.; Christensen, S. B.; Blom, J.; Lemmich, E.; Nadelmann, L.; Fich, K.; Theander, T. G.; Kharazmi, A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1993**, 37, 2550-2556.

<sup>74</sup> Chen, M.; Christensen, S. B.; Theander, T. G.; Kharazmi, A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1994**, 38, 1339-1344.

<sup>75</sup> Chen, M.; Zhai, L.; Christensen, S. B.; Theander, T. G.; Kharazmi, A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2001**, 45, 2023-2029.

<sup>76</sup> Torres-Santos, E. C.; Moreira, D. L.; Kaplan, M. A. C.; Meirelles, M. N.; Rossi-Bergman, B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1999**, 43, 1234-1241.

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**, aisladas de las hojas de *P. elongatum*<sup>77</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 estas chalconas y compuestos sintéticos relacionados, concluyéndose que los derivados semisintéticos acetilados fueron los compuestos más prometedores.



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 estrategias a seguir. En este sentido, numerosos productos naturales tales como diterpenos<sup>78-79</sup>, flavonoides<sup>80</sup>, naftoquinonas<sup>81</sup>, esteroides<sup>82</sup> y saponinas<sup>83</sup>, han mostrado relevante efecto modulador de la MDR<sup>84</sup>.

<sup>77</sup> Hermoso, A.; Jiménez, I. A.; Mamani, A. Z.; Bazzocchi, I. L.; Piñero, J. E.; Ravelo, A. G.; Valladares, B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2003**, 11, 3975-3980.

<sup>78</sup> Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzoti, V. G.; Motti, R.; Simón, P. N.; Dumontet, C. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2004**, 47, 988-992.

<sup>79</sup> Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzoti, V.; Tablialaeta-Scafari, O.; Appendino, G.; Ballero, M. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2003**, 46, 3395-3402.

<sup>80</sup> Pérez-Victoria, J. M.; Chiquero, M. J.; Conseil, G.; Dayan, D.; Di Pietro, A.; Barron, D. *Biochemistry*. **1999**, 38, 1736-1743.

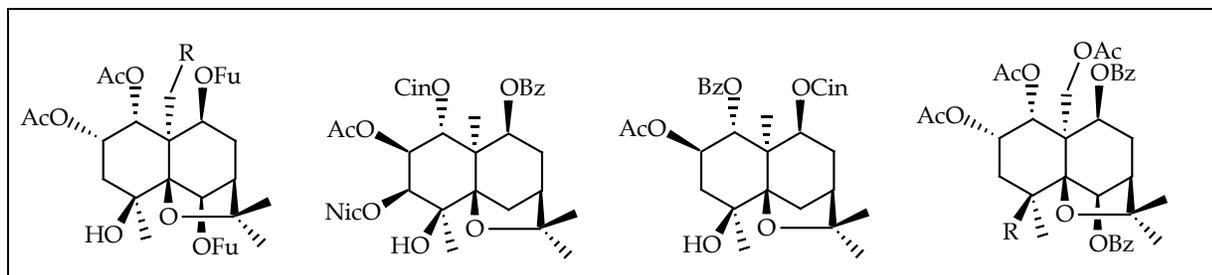
<sup>81</sup> Chen, X.; Yang, L.; Zhang, N.; Turpin, J. A.; Buckheit, R. W.; Osterling, C. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2003**, 47, 2810-2816.

<sup>82</sup> Hirovani, M.; Hirovani, S.; Takayanagi, H.; Komiyama, K.; Yoshikawa, T. *Tetrahedron Letters*. **2003**, 44, 7975-7979.

<sup>83</sup> Choi, C.H.; Kang, G.; Min, Y. D. *Planta Medica*. **2003**, 69, 235-240.

<sup>84</sup> Loganzo, F.; Discafani, C.M.; Annable, T.; Beyer, C.; Musto, S.; Hari, M. *Cancer Research*. **2003**, 63, 1838-1845.

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>85,86</sup>.



Sesquiterpenos dihidro- $\beta$ -agarfuranos con actividad revertidora de la MDR

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. Además de la escasa eficacia de fármacos leishmanicidas o su alto costo, sus efectos secundarios y resistencia a fármacos señalan la necesidad de buscar nuevos fármacos leishmanicidas.

<sup>85</sup> Cortéz-Selva, F.; Jiménez, I. A.; Muñoa-Martínez, F.; Campillo, M.; Bazzocchi I. L.; Pardo, L.; Ravelo, A. G.; Castanys, S.; Gamarro, F. *Current Pharmaceutical Design*. **2005**, 11, 1-15.

<sup>86</sup> Cortéz-Selva, F.; Campillo, M.; Reyes, C. P.; Jiménez, I. A.; Castanys, S.; Bazzocchi, I. L.; Muñoz-Martínez, F.; Gamarro, F. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2004**, 47, 576-587.

### 7.1.1. Resultados y discusión: Actividad leishmanicida

#### *Fraccionamiento bioguiado de especies de Piper*

Uno de los objetivos propuestos en el trabajo presentado en esta Memoria es el estudio fitoquímico de las distintas especies del género *Piper*, mediante fraccionamiento bioguiado, frente a formas promastigote de cuatro especies de *Leishmania*: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. infantum*.

Para ello, en primer lugar se prepararon los extractos etanólicos de las hojas de cada una de las especies de *Piper* a estudiar, los cuales fueron resuspendidos en agua y extraídos con diclorometano y acetato de etilo. Las fracciones de diclorometano, acetato de etilo y agua de las especies estudiadas fueron, posteriormente, evaluadas para determinar su actividad leishmanicida. Paralelamente, se lleva a cabo la evaluación de la actividad citotóxica frente a macrófagos murinos j774 para determinar así el índice de selectividad de cada extracto (IS, relación de la concentración que reduce el número de células viables al 50% dividido por la concentración que inhibe el crecimiento del 50% de los parásitos,  $CC_{50}/CI_{50}$ ).

Los resultados de la actividad leishmanicida se expresan como  $CI_{50}$  (concentración que inhibe el crecimiento del 50% de los parásitos) y su citotoxicidad como  $CC_{50}$  (concentración citotóxica media, concentración que reduce el número de células viables al 50%), ambos expresándose en  $\mu\text{g/mL}$ .

Una vez evaluada la actividad biológica del extracto etanólico y las fracciones orgánicas y acuosas, aquellas fracciones que resultaron activas ( $CI_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ ) fueron fraccionados mediante cromatografía líquida por gravedad, utilizando diferentes sistemas de elución, tal como se indica en la parte experimental. Cabe señalar que el extracto etanólico *Piper glabratum* y *P. heterophyllum* resultaron inactivos frente a las cuatro especies de *Leishmania* evaluadas. Con esta premisa realizamos el fraccionamiento bioguiado de tres de las especies de *Piper* objeto de nuestro estudio: *P. delineatum*, *P. pseudoarboreum* y *P. divaricatum*.

---

Las distintas fracciones obtenidas fueron a su vez evaluadas para determinar su actividad leishmanicida, y los resultados obtenidos de actividad leishmanicida, citotóxica, así como el índice de selectividad para cada una de las especies estudiadas se muestran en las tablas 22-24.

*P. delineatum* resultó la especie más prometedora, ya que tanto el extracto etanólico (CI<sub>50</sub> 5.5-9.1 µg/mL) como las fracciones orgánicas presentaron algún grado de actividad frente a las cuatro especies de *Leishmania* evaluadas, destacando la actividad de la fracciones de diclorometano y acetato de etilo frente a *L. guyanensis* con valores de CI<sub>50</sub> 3.0 y 3.4 µg/mL, respectivamente, con índices de selectividad inferiores a 2.6 (IS ≤ 2.6). Cabe destacar que dicho extracto y fracciones poseen una actividad superior a la miltefosina (CI<sub>50</sub> 7.2-12.5 µg/mL) utilizada como control en este ensayo, fármaco utilizado en el tratamiento de la leishmaniasis.

En cuanto a la especie *P. pseudoarboresum*, el extracto etanólico (CI<sub>50</sub> 21.3-41.3 µg/mL) y la fracción de diclorometano (CI<sub>50</sub> 14.7-18.4 µg/mL) presentaron una actividad moderada frente a las cuatro especies *Leishmania*, observándose IS en un ragon de 1.3-2.6. Por otra parte, la fracción de diclorometano de *P. divaricatum* (CI<sub>50</sub> 48.4 µg/mL) presentó una baja actividad leishmanicida frente a *L. braziliensis*.

En cuanto a los resultados obtenidos de las subfracciones de acetato de etilo y diclorometano de *P. delineatum* evaluadas, cabe destacar que ocho de ellas, **AE2-AE3** y **D6-D11**, resultaron más activas frente a las cuatro líneas de *Leishmania* ensayadas que la miltefosina, siendo las fracciones **D7** (0.8-1.5 µg/mL), **D8** (1.0-1.7 µg/mL), **AE2** (1.8-2.8 µg/mL), **AE3** (2.0-3.1 µg/mL), **D10** (2.1-3.0 µg/mL) y **D9** (4.4-5.4 µg/mL) del orden de tres veces más potentes, presentado en todos los caso un IS moderado ≥ 0.9-11.0.

Por otro parte, los resultados obtenidos mostraron que las fracciones acuosas de las tres especies de *Piper* estudiadas fueron inactivas (CI<sub>50</sub> < 50 µg/mL).

**Tabla 22. Actividad leishmanicida y citotóxica del extracto, fracciones y subfracciones de las hojas de *Piper delineatum* frente a formas promastigote de *Leishmania spp.***

	CI <sub>50</sub> (µg/mL) ± DE								CC <sub>50</sub> ±DE
	<i>L. a.</i>	IS	<i>L. b.</i>	IS	<i>L. g.</i>	IS	<i>L. i.</i>	IS	j774
<b>EE</b>	7.6±1.3	0.9	9.1±0.5	0.8	8.0±0.9	0.9	5.5±0.6	1.3	7.1±0.6
<b>D</b>	9.4±0.6	0.7	6.9±0.8	1.0	3.0±0.2	2.2	4.7±0.2	1.4	6.6±0.1
<b>AE</b>	8.3±0.1	0.6	6.7±0.7	0.7	3.4±1.0	1.4	4.9±0.2	1.0	4.9±0.4
<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>D1</b>	35.1±0.5	0.9	23.3±1.1	1.3	27.0±1.3	1.2	32.7±1.4	1.0	31.2±1.4
<b>D2</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>D3</b>	-	-	26.7±3.1	3.7	-	-	-	-	>100
<b>D4</b>	39.2±1.8	2.6	20.6±1.0	4.9	33.4±1.9	3.0	27.9±0.5	3.6	>100
<b>D5</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>D6</b>	4.10±0.03	3.7	1.90±0.04	8.2	2.7±0.1	5.6	3.10±0.04	5.0	15.5±1.0
<b>D7</b>	1.5±0.1	6.0	0.80±0.03	10.8	1.20±0.03	7.4	1.4±0.1	6.6	9.2±1.2
<b>D8</b>	1.7±0.1	6.5	1.0±0.1	11.0	1.40±0.03	8.0	1.7±0.1	6.3	10.9±0.6
<b>D9</b>	4.4±0.1	4.0	4.2±0.2	4.2	4.4±0.1	4.0	5.4±0.1	3.2	17.5±1.2
<b>D10</b>	2.10±0.04	2.1	2.60±0.02	1.8	2.4±0.1	1.9	3.0±0.1	1.5	4.5±0.9
<b>D11</b>	3.3±0.2	3.2	4.0±0.1	2.7	4.4±0.2	2.4	5.00±0.04	2.1	10.6±1.4
<b>D12</b>	17.0±0.9	5.7	19.4±0.1	5.1	20.5±0.5	4.8	22.4±0.4	4.4	97.9±4.3
<b>D13</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>AE1</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>AE2</b>	1.80±0.03	1.7	2.20±0.02	1.5	2.2±0.1	1.4	2.80±0.03	1.1	3.2±0.1
<b>AE3</b>	2.0±0.1	1.3	2.60±0.03	1.1	2.4±0.1	1.1	3.1±0.1	0.9	2.7±0.1
<b>AE4</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>AE5</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>AE6</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>M</b>	12.5±0.4	4.4	7.2±0.2	7.7	7.9±0.5	7.0	7.2±0.6	7.7	55.4±4.2

**EE** = Extracto Etanólico, **D** = Fracción de diclorometano, **AE** = Fracción de acetato de etilo, **A** = Fracción acuosa. **D1-D13** = Subfracciones de la fracción de diclorometano. **AE1-AE6** = Subfracciones de la fracción de acetato de etilo. *L. a.* (*L. amazonensis*), *L. b.* (*L. braziliensis*), *L. g.* (*L. guyanensis*), *L. i.* (*L. infantum*). **j774** (macrófagos murinos). **IS** = Índice de selectividad. **DE** = Desviación estándar. **M** = Miltefosina, fármaco de referencia. (-) = Inactivo (CI<sub>50</sub> > 50 µg/mL). n.e. = No ensayado.

En lo referente a las subfracciones de acetato de etilo y diclorometano de *P. pseudoarborescens*, destacar que la subfracción **D6** (2.2-3.4 µg/mL) resultó más activa frente a las cuatro líneas de *Leishmania* ensayadas que la miltefosina (7.2-12.5 µg/mL), siendo del orden de entre dos a cinco veces más potente, con un IS moderado  $\geq 2.0$ .

**Tabla 23. Actividad leishmanicida y citotoxicidad del extracto, fracciones y subfracciones de las hojas de *Piper pseudoarborescens* frente a formas de promastigote de *Leishmania spp.***

	CI <sub>50</sub> (µg/mL) ±								CC <sub>50</sub> ±DE
	L. a.		L. b.		L. g.		L. i.		
	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS	
<b>EE</b>	31.4±2.5	1.8	21.3±1.0	2.6	41.3±1.4	1.3	32.3±1.4	1.7	55.0±4.1
<b>D</b>	17.7±0.3	1.9	14.7±0.8	2.3	19.1±0.2	1.8	18.4±0.3	1.9	34.1±3.4
<b>AE</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>D1</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>D2</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>D3</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>D4</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>D5</b>	18.5±0.1	1.2	15.7±2.8	1.4	20.8±0.8	1.1	20.3±0.3	1.1	22.6±2.2
<b>D6</b>	2.50±0.02	2.6	2.2±0.1	3.0	3.4±0.2	1.9	3.0±0.1	2.2	6.5±1.3
<b>D7</b>	40.0±1.1	0.8	46.7±5.1	0.7	-	-	-	-	30.8±2.8
<b>M</b>	12.5±0.4	4.4	7.2±0.2	7.7	7.9±0.5	7.0	7.2±0.6	7.7	55.4±4.2

**EE** = Extracto Etanólico, **D** = Fracción de diclorometano, **AE** = Fracción de acetato de etilo, **A** = Fracción acuosa. **D1-D7** = Subfracciones de la fracción de diclorometano. **L. a.** (*L. amazonensis*), **L. b.** (*L. braziliensis*), **L. g.** (*L. guyanensis*) **L. i.** (*L. infantum*). **j774** (macrófagos murinos). **IS** = Índice de selectividad. **DE** = Desviación estándar. **M** = Miltefosina, fármaco de referencia. (-) = Inactivo (CI<sub>50</sub> > 50 µg/mL). n.e. = No ensayado.

Por otra parte, entre las subfracciones de diclorometano de *P. divaricatum* evaluadas, **D1**, **D4** y **D5** presentaron una baja actividad (27.8-47.6 µg/mL) frente a las cuatro líneas de *Leishmania* ensayadas, siendo el resto de las subfracciones inactivas.

**Tabla 24. Actividad leishmanicida y citotoxicidad del extracto, fracciones y subfracciones de las hojas de *Piper divaricatum* frente a formas de promastigote de *Leishmania spp.***

	CI <sub>50</sub> (µg/mL) ± DE						CC <sub>50</sub> ± DE		
	<i>L. a.</i>	IS	<i>L. b.</i>	IS	<i>L. g.</i>	IS	<i>L. i.</i>	IS	j774
<b>EE</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	30.0±1.5
<b>D</b>	-	-	48.4±0.9	0.4	-	-	-	-	17.5±0.7
<b>AE</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>D1</b>	41.2±1.8	1.3	28.1±1.1	1.9	27.8±1.0	1.9	32.1±0.8	1.7	54.1±3.3
<b>D2</b>	-	-	27.9±0.2	3.6	48.1±4.1	2.1	-	-	>100
<b>D3</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>D4</b>	37.3±0.6	1.5	34.6±0.9	1.6	40.6±0.5	1.3	42.0±0.4	1.3	54.6±2.6
<b>D5</b>	47.6±0.5	1.0	36.0±0.2	1.3	40.8±0.6	1.2	41.5±0.8	1.2	48.5±1.5
<b>D6</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>D7</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>M</b>	12.5±0.4	4.4	7.2±0.2	7.7	7.9±0.5	7.0	7.2±0.6	7.7	55.4±4.2

**EE** = Extracto Etanólico, **D** = Fracción de diclorometano, **AE** = Fracción de acetato de etilo, **A** = Fracción acuosa. **D1-D7** = Subfracciones de la fracción de diclorometano. **L. a.** (*L. amazonensis*), **L. b.** (*L. braziliensis*), **L. g.** (*L. guyanensis*), **L. i.** (*L. infantum*). **j774** (macrófagos murinos). **IS** = Índice de selectividad. **DE** = Desviación estándar. **M** = Miltefosina, fármaco de referencia. (-) = Inactivo (CI<sub>50</sub> > 50 µg/mL). n.e. = No ensayado.

### ***Evaluación leishmanicida de metabolitos aislados de especies de Piper***

Las fracciones activas de las tres especies de *Piper* estudiadas mediante fraccionamiento bioguiado fueron sometidas a sucesivas cromatografías, como se indica en la parte experimental de esta Memoria, con la finalidad de aislar e identificar los metabolitos responsable de la actividad leishmanicida.

Posteriormente, con el objetivo de aislar e identificar todos los metabolitos presentes en las especies objeto de estudio y completar así el estudio fitoquímico de las mismas, se realizó también el estudio cromatográfico de aquellas fracciones que resultaron inactivas, evaluándose así mismo los metabolitos aislados.

---

Así, se llevó a cabo la evaluación frente a las cuatro especies de *Leishmania* de los metabolitos aislados de las especies de *Piper* objeto de nuestro estudio. A fin de facilitar la discusión y establecer, cuando fuera posible, una relación estructura-actividad que nos permitiera determinar los requerimientos estructurales en cada grupo de compuestos, se presentan y discuten los resultados de la actividad leishmanicida de los compuestos aislados de las hojas de *Piper delineatum*, *P. pseudoarboreum*, *P. divaricatum*, *P. heterophyllum* y los frutos de *P. glabratum*.

Así, se presentarán y discutirán los resultados de la actividad leishmanicida de los compuestos aislados en el siguiente orden:

- ❖ Flavonoides: F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10, F10, F11, F12, F13, F14, F15, F16, F19, F20, F21, F22, F23, F24, F26, F27, F28, F30, F31, F33, F36.
- ❖ Amidas: A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A14, A15, A16.
- ❖ Derivados del ácido benzoico: AB1, AB2, AB4.
- ❖ Fenilpropanoides: FP1, FP2, FP3, FP4, FP5, FP6, FP7, FP8, FP9, FP13.
- ❖ Terpenos: T3, T4.
- ❖ Benzopirano y Benzofurano: B2, B10.
- ❖ Ácido graso: AG1.

### Actividad leishmanicida de flavonoides

Se evaluó la actividad leishmanicida de 36 flavonoides y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 25. Cabe destacar que de los flavonoides ensayados, 29 presentaron algún grado de actividad frente al menos a tres de las especies de *Leishmania* ensayadas.

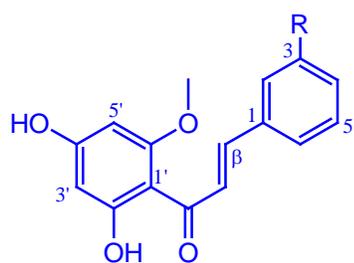
El análisis de los resultados obtenidos (tabla 25) indicaron que nueve de ellos, las chalconas **F1-F6**, **F9**, **F10** y **F12**, presenta una actividad superior al control (CI<sub>50</sub> 7.2-12.5 µg/mL), siendo **F5** (CI<sub>50</sub> 0.2-0.8 µg/mL) del orden de 17 veces más potente, con un IS entre 5.6-19.6 superior a la miltefosina. Por otra parte, dos chalconas (**F7** y **F8**), una dihidrochalcona (**F14**) y tres flavanonas (**F16**, **F20** y **F27**), mostraron una actividad similar al control. Los compuestos **F7**, **F14** y **F20** mostraron un índice de selectividad similar al control.

**Tabla 25. Actividad leishmanicida y citotoxicidad de flavonoides frente a formas de promastigote de *Leishmania* spp.**

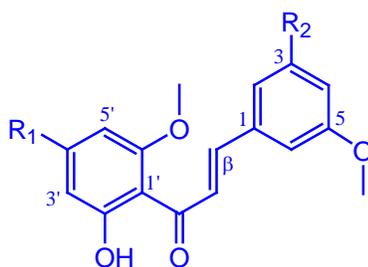
	CI <sub>50</sub> (µg/mL) ± DE						CC <sub>50</sub> ± DE		
	<i>L. a.</i>	IS	<i>L. b.</i>	IS	<i>L. g.</i>	IS	<i>L. i.</i>	IS	j774
<b>F1</b>	2.9±0.4	1.3	3.0±0.2	1.2	1.6±0.2	2.3	2.1±0.1	1.8	3.7±0.2
<b>F2</b>	1.30±0.01	3.5	0.50±0.04	9.0	1.20±0.04	4.1	1.1±0.1	4.2	4.7±0.2
<b>F3</b>	3.00±0.02	3.4	2.6±0.004	3.9	2.90±0.01	3.5	3.5±0.1	2.9	10.2±1.1
<b>F4</b>	1.9±0.1	2.0	3.0±0.2	1.3	1.6±0.1	2.4	1.6±0.1	2.4	3.8±0.1
<b>F5</b>	0.70±0.04	6.6	0.20±0.02	19.6	0.30±0.01	15.2	0.8±0.1	5.6	4.7±0.2
<b>F6</b>	1.80±0.04	3.9	1.7±0.1	4.2	1.70±0.03	4.2	2.0±0.1	3.6	7.1±0.5
<b>F7</b>	12.2±0.2	4.8	12.9±0.2	4.5	12.0±0.3	4.8	16.5±0.1	3.5	58.3±2.6
<b>F8</b>	21.4±0.6	0.7	19.8±0.7	0.7	19.0±1.5	0.8	21.0±0.1	0.7	14.6±0.7
<b>F9</b>	7.7±0.2	2.2	18.1±0.6	0.9	15.0±0.5	1.1	8.5±0.2	2.0	16.8±0.8
<b>F10</b>	3.0±0.1	2.6	1.9±0.1	3.9	2.60±0.03	3.0	2.9±0.3	2.6	7.6±0.4
<b>F11</b>	34.6±1.3	0.6	36.0±0.4	0.6	35.0±0.4	0.6	38.6±1.9	0.6	21.7±1.2
<b>F12</b>	5.9±0.1	0.9	8.1±0.2	0.6	6.1±0.2	0.8	5.7±0.1	0.9	5.20±0.03
<b>F13</b>	5.2±0.4	5.3	5.8±0.1	4.7	6.5±0.1	4.2	5.5±0.3	5.0	27.5±2.9
<b>F14</b>	18.1±0.2	5.5	16.6±0.5	6.0	13.0±0.7	7.7	16.8±1.2	6.0	>100
<b>F15</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>F16</b>	16.2±0.6	2.1	17.8±0.9	1.9	19.0±0.6	1.8	18.7±0.9	1.8	34.3±2.8
<b>F19</b>	-	-	34.2±0.4	2.3	17.8±0.7	4.5	23.1±1.3	3.5	79.9±2.7
<b>F20</b>	19.4±0.4	5.2	25.3±0.5	4.0	20.0±0.4	5.0	23.3±1.0	4.3	>100
<b>F21</b>	33.8±1.8	1.3	30.5±1.1	1.5	34.2±2.4	1.3	34.4±1.0	1.3	45.3±3.2
<b>F22</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>F23</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>F24</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>F26</b>	24.7±1.3	2.1	34.5±2.1	1.5	26.5±1.0	2.0	33.2±1.2	1.6	52.7±2.3
<b>F27</b>	12.3±0.3	3.7	15.0±0.3	3.0	13.0±0.6	3.5	15.9±0.6	2.9	45.4±2.3
<b>F28</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>F30</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>F31</b>	18.7±0.3	5.3	15.7±0.3	6.4	23.1±0.1	4.3	-	-	>100
<b>F33</b>	-	-	25.2±0.3	1.5	13.6±0.6	2.8	39.5±3.3	0.9	37.4±2.1
<b>F36</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>M</b>	12.5±0.4	4.4	7.2±0.2	7.7	7.9±0.5	7.0	7.2±0.6	7.7	55.4±4.2

*L. a.* (*L. amazonensis*), *L. b.* (*L. braziliensis*), *L. g.* (*L. guyanensis*), *L. i.* (*L. infantum*). **j774** (macrófagos murinos) **IS** = Índice de selectividad. **DE** = Desviación estándar. **M** = Miltefosina, fármaco de referencia. (-) = Inactivo (CI<sub>50</sub> > 50 µg/mL). n.e. = No ensayado.

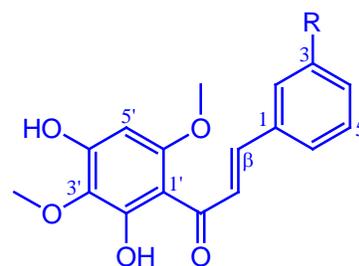
## Chalconas



**F1** R = OH  
**F2** R = OCH<sub>3</sub>  
**F3** R = H

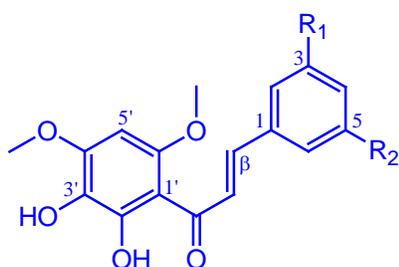


**F4** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OH  
**F5** R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH  
**F6** R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H

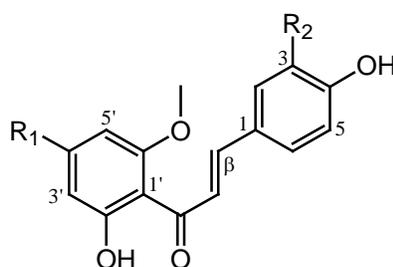


**F7** R = OH  
**F8** R = OCH<sub>3</sub>

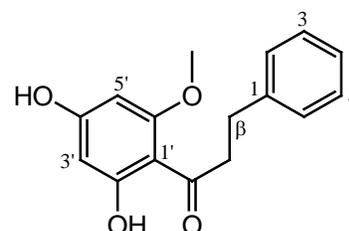
## Dihidrochalcona



**F9** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>  
**F10** R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H

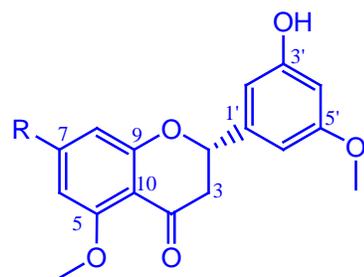


**F11** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OH  
**F12** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>  
**F13** R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH

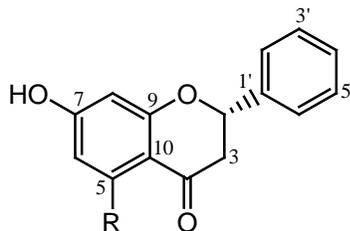


**F14**

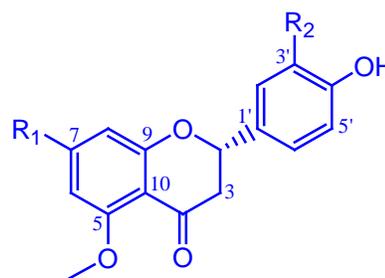
## Flavanonas



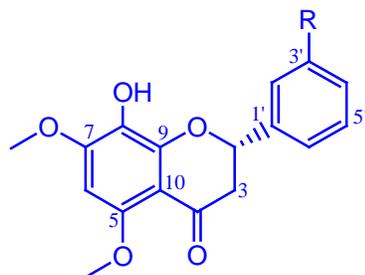
**F15** R = OH  
**F16** R = OCH<sub>3</sub>



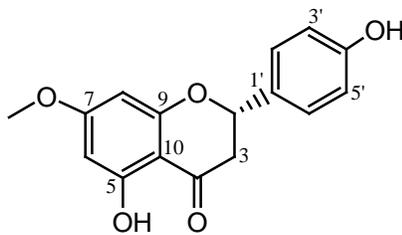
**F19** R = OH  
**F20** R = OCH<sub>3</sub>



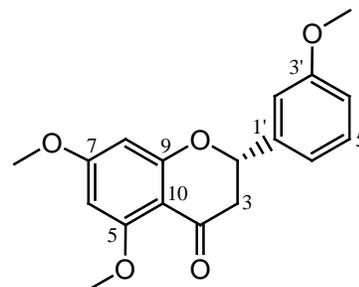
**F21** R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH  
**F22** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>



**F23** R = OCH<sub>3</sub>  
**F24** R = H

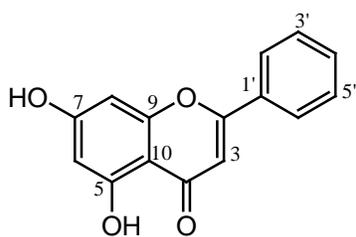


**F26**

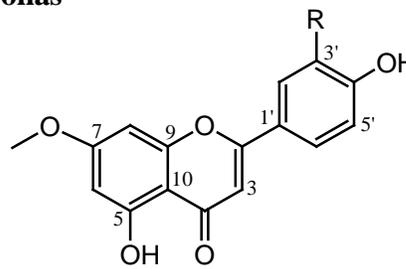


**F27**

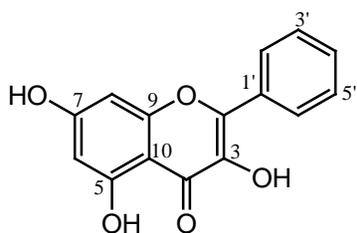
## Flavonas



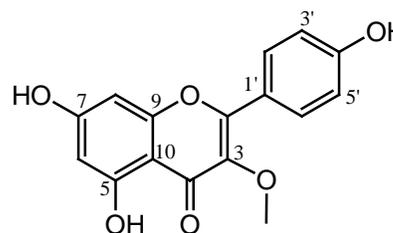
F28

F30 R = H  
F31 R = OH

## Flavonoles



F33



F36

Un cuidadoso análisis del efecto de los sustituyentes sobre la actividad leishmanicida nos permitió obtener las siguientes conclusiones en cuanto a la relación estructura-actividad (SAR):

1. Los compuestos con esqueleto de chalcona presentan mayor actividad que las dihidrochalconas y flavanonas, tal como se observa al comparar los valores de  $CI_{50}$  de la chalcona **F3** ( $CI_{50}$  2.6-3.5  $\mu\text{g/mL}$ ) con su correspondiente dihidrochalcona **F14** ( $CI_{50}$  13.0-18.1  $\mu\text{g/mL}$ ) ó la actividad de la chalcona **F5** ( $CI_{50}$  0.2-0.8  $\mu\text{g/mL}$ ) con su isómero flavanona **F16** ( $CI_{50}$  16.2-19.0  $\mu\text{g/mL}$ ). Ello nos indica que el **sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado de la unidad de  $C_3$**  juega un papel importante en la actividad de este tipo de compuesto.

2. El **grado de oxidación en la molécula**, juega un papel crucial en la actividad leishmanicida, ya que aquellos compuestos que presentan cinco posiciones oxidadas resultaron ser los más activos. Ello es evidente al comparar la actividad de los compuestos **F2** ( $CI_{50}$  0.5-1.3  $\mu\text{g/mL}$ ) y **F1** ( $CI_{50}$  1.6-3.0  $\mu\text{g/mL}$ ) que poseen cinco carbonos oxidados con **F3** ( $CI_{50}$  2.6-3.5  $\mu\text{g/mL}$ ) que presenta sólo cuatro carbonos oxidados. La misma tendencia se observa al comparar la actividad de **F4** ( $CI_{50}$  1.6-3.0  $\mu\text{g/mL}$ ) y **F5** ( $CI_{50}$  0.2-0.8  $\mu\text{g/mL}$ ) con el derivado **F6**, menos oxidado ( $CI_{50}$  1.7-2.0  $\mu\text{g/mL}$ ).

---

3. El análisis de los sustituyente sobre las unidades de C<sub>6</sub> indicó que el **tipo de sustituyente** juega un papel importante. Así, los flavonoides con grupos metoxilos tienden a aumentar su actividad, como se deduce al comparar los compuestos **F2**, **F5** y **F16** que poseen 2 ó 3 grupos metoxilo, con sus correspondientes fenoles **F1**, **F4** y **F15**. Ello indica que el grupo metoxilo es el mejor sustituyente para la expresión de actividad leishmanicida, lo cual se explicaría por las posibles interacciones de tipo aceptor de **enlaces de hidrogeno** con el receptor, lo que también estaría de acuerdo con que la **lipofilia** de la molécula contribuye a la actividad.

Existe una amplia bibliografía de la actividad leishmanicida de chalconas y derivados<sup>1,2,3</sup>, tanto de origen natural como sintético. Además, trabajos previos<sup>4,5</sup> llevados a cabo en nuestro grupo de investigación, en colaboración con los Doctores J. Piñero y B. Valladares del Departamento de Parasitología de la Universidad de La Laguna muestran 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 amidas**

Se evaluaron 16 compuestos dentro del grupo de las amidas aisladas, y el análisis de los resultados obtenidos (tabla 26) mostró que 8 de ellas presentan algún grado de actividad frente a las cuatro especies de *Leishmania* evaluadas. Podemos destacar los compuestos **A1**, **A4**, **A5** y **A6** (CI<sub>50</sub> 0.5-1.7 µg/mL), que resultaron más activos frente a las cuatro especies ensayadas que la miltefosina, utilizada como control, siendo **A4** (CI<sub>50</sub> 0.5-1.1 µg/mL) del orden de catorce veces más potente y la alcanida **A2** (CI<sub>50</sub> 7.1-8.3 µg/mL) mostró una actividad similar al control. Cabe destacar que las alcanidas **A1**, **A4**, **A5** y **A6**, presentaron un índice de selectividad > 2.

---

<sup>1</sup> Aponte, J. C.; Castillo, D.; Estevez, Y.; Gonzalez, G.; Arevalo, J.; Hammond, G. B.; Sauvain, M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2010**, 20, 100-103.

<sup>2</sup> Rojas de Arias, A.; Pandolfi, E.; Vega, M. C.; Rolon, M. *Current Bioactive Compound*. **2012**, 8, 307-333.

<sup>3</sup> Schmidt, T. J.; Khalid, S. A.; Romanha, A. J.; Alves, T. M. A.; Biavatti, M. W.; Brun, R.; Da Costa, F. B.; de Castro, S. L.; Ferreira, V. F.; de Lacerda, M. V. G.; et al. *Current Medicinal Chemistry*. **2012**, 19, 2176-2228.

<sup>4</sup> Hermoso, A.; Jiménez, I. A.; Mamani, Z. A.; Bazzocchi, I. L.; Piñero, J. E.; Ravelo, A. G.; Valladares, B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2003**, 11, 3975-3980.

<sup>5</sup> Flores, N.; Cabrera, G.; Jiménez, I. A.; Piñero, J.; Giménez, A.; Bourdy, G.; Cortés-Selva, F.; Bazzocchi, I. L. *Planta Medica*. **2007**, 73, 206-211.

**Tabla 26. Actividad leishmanicida y citotoxicidad de amidas frente a promastigote de *Leishmania spp.***

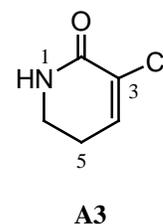
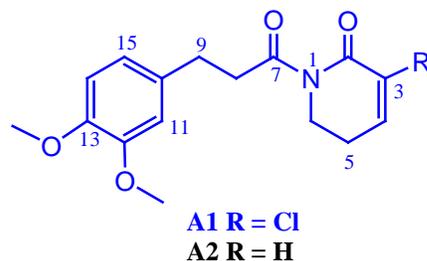
	CI <sub>50</sub> (µg/mL) ± DE						CC <sub>50</sub> ± DE		
	<i>L. a.</i>	IS	<i>L. b.</i>	IS	<i>L. g.</i>	IS	<i>L. i.</i>	IS	j774
<b>A1</b>	1.1±0.1	2.3	1.1±0.1	2.3	1.2±0.1	2.1	1.7±0.1	1.5	2.50±0.03
<b>A2</b>	8.1±0.3	0.8	8.3±0.3	0.8	7.10±0.02	0.9	8.0±0.5	0.8	6.7±0.9
<b>A3</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>A4</b>	0.5±0.1	6.6	0.50±0.03	6.6	0.60±0.04	5.5	1.1±0.1	3.0	3.3±0.2
<b>A5</b>	0.70±0.01	4.7	0.5±0.1	6.6	0.7±0.1	4.7	0.7±0.5	4.7	3.3±0.3
<b>A6</b>	1.10±0.04	3.6	0.80±0.02	5.0	1.20±0.01	3.3	1.7±0.1	2.4	4.0±1.2
<b>A7</b>	21.7±0.2	0.9	19.4±1.5	1.0	15.9±0.03	1.2	16.4±1.6	1.1	18.5±11.3
<b>A8</b>	36.4±0.8	0.5	35.2±3.2	0.5	29.5±0.8	0.6	42.6±3.1	0.4	17.5±7.7
<b>A9</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>A10</b>	29.5±0.7	0.6	31.2±0.6	0.5	23.2±1.6	0.7	25.4±1.7	0.6	16.4±6.8
<b>A11</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>A12</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>A13</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>A14</b>	-	-	31.3±10.4	-	-	-	31.9±3.5	-	>100
<b>A15</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>A16</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>M</b>	12.5±0.4	4.4	7.2±0.2	7.7	7.9±0.5	7.0	7.2±0.6	7.7	55.4±4.2

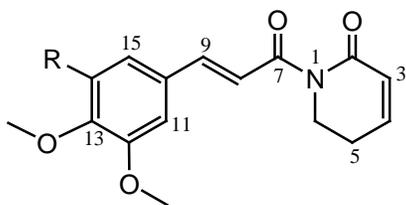
*L. a.* (*L. amazonensis*), *L. b.* (*L. braziliensis*), *L. g.* (*L. guyanensis*), *L. i.* (*L. infantum*). **j774** (macrófagos murinos).

**IS** = Índice de selectividad. **DE** = Desviación estándar. **M** = Miltefosina, fármaco de referencia.

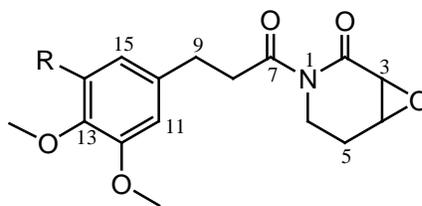
(-) = Inactivo. (CI<sub>50</sub> > 50 µg/mL). n.e. = No ensayado.

### Amidas

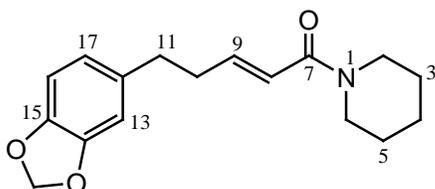




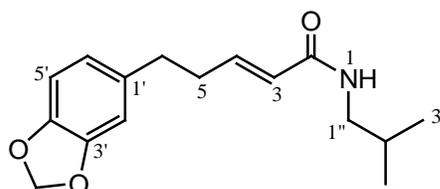
**A4 (E) R = H**  
**A5 (E) R = OCH<sub>3</sub>**  
**A6 (Z) R = OCH<sub>3</sub>**



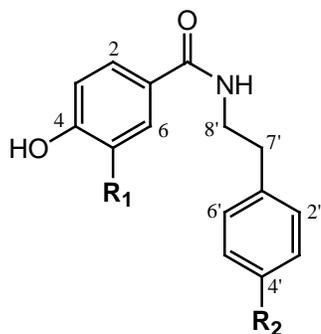
**A7 R = H**  
**A8 R = OCH<sub>3</sub>**



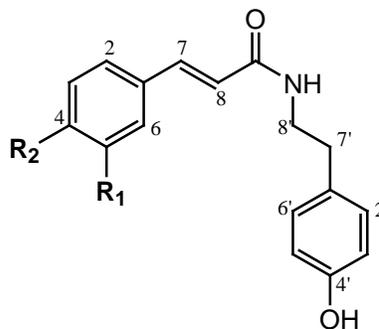
**A9**



**A10**



**A11 R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>**  
**A12 R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OH**



**A13 (E) R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OH**  
**A14 (E) R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H**  
**A15 (E) R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH**  
**A16 (Z) R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH**

Un cuidadoso análisis del efecto de los sustituyentes en las amidas sobre la actividad leishmanicida nos permitió obtener las siguientes conclusiones de la relación estructura-actividad:

1. Los compuestos con **estructura de alcamida-lactama (A1, A2, A4-A8)** presentan mejor actividad que aquellos que sólo poseen un sistema lactama (A3) o alcamida (A9-A16).

2. El **grado de oxidación del anillo aromático** en la molécula, parece que no es crucial para la expresión de la actividad leishmanicida, a diferencia de lo observado para el grupo de flavonoides, ya que compuestos que presentan un anillo derivado del ácido ferúlico como **A4** (CI<sub>50</sub> 0.5-1.1 µg/mL), con dos posiciones oxidadas, presenta una actividad similar al compuesto **A5** (CI<sub>50</sub> 0.5-0.7 µg/mL) que posee un anillo aromático con tres posiciones oxidadas. No obstante, ocurre lo contrario con el compuesto **A7** (CI<sub>50</sub> 15.9-21.7 µg/mL), que presenta una actividad dos veces más potente que el compuesto **A8** (CI<sub>50</sub> 29.5-36.4 µg/mL).

3. El análisis de los valores de CI<sub>50</sub> de la amida **A4** (0.5-1.1 µg/mL) y el correspondiente dihidro-derivado **A2** (7.1-8.3 µg/mL), indica que la **unidad C<sub>3</sub> juega un papel importante** en la actividad de este tipo de compuesto.

4. El análisis del efecto de los **sustituyente sobre la unidad de δ-lactama** permitieron obtener las siguientes conclusiones:

a) El tipo de sustituyente en la posición C<sub>3</sub> juega un papel importante en la actividad. Así, la presencia de un átomo de cloro en la molécula conduce a un aumento tanto de la actividad leishmanicida como de la selectividad (**A1 vs A2**), lo que podría ser el resultado de un cambio de la densidad electrónica o una interacción del átomo de cloro con el receptor.

b) El análisis de los valores de CI<sub>50</sub> de la amida **A1** (1.1-1.7 µg/mL) y su epoxi-derivado, **A7** (15.9-21.7 µg/mL), sugieren que la unidad α,β-insaturada-δ-lactama juega un papel importante en la actividad de este tipo de compuesto.

#### **Actividad leishmanicida de derivados del ácido benzoico**

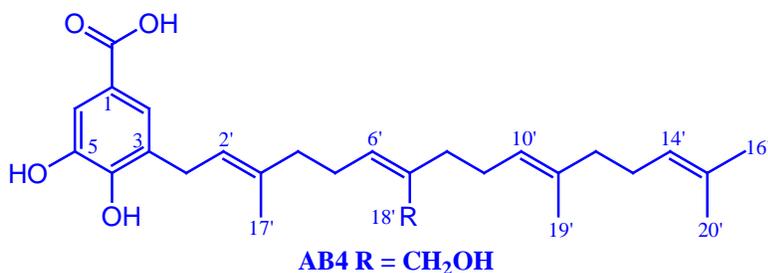
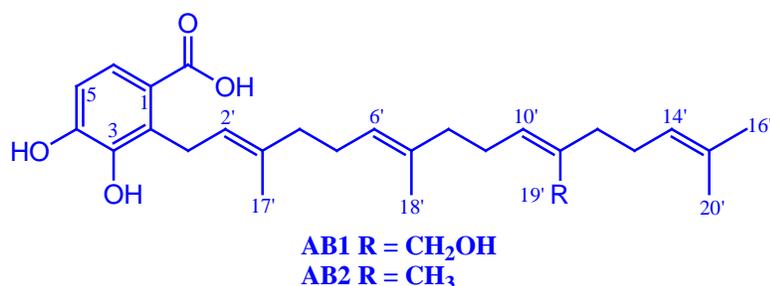
En lo que se respecta a los derivados del ácido benzoico ensayados (tabla 27), cabe destacar que el compuesto **AB2**, presenta una baja actividad (CI<sub>50</sub> 35.6-46.9 µg/mL) frente a las cuatro especies de *Leishmania*, mientras que el compuesto **AB1** cuya diferencia estructural con el anterior es la presencia de un alcohol alílico sobre C-19', resultó inactivo frente a tres de las especies de *Leishmania* ensayadas, mientras el compuesto **AB4**, que presenta un alcohol alílico sobre C-18' y un ácido carboxílico en posición *para*, resultó inactivo (CI<sub>50</sub> > 50 µg/mL).

**Tabla 27. Actividad leishmanicida y citotoxicidad de derivados del ácido benzoico frente a promastigote de *Leishmania* spp.**

	CI <sub>50</sub> (µg/mL) ±								CC <sub>50</sub> ± DE
	L. a.		L. b.		L. g.		L. i.		
	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS	IS	j774
AB1	-	-	-	-	-	-	42.2±0.6	0.8	31.8±3.0
AB2	39.3±1.1	0.7	46.9±0.4	0.6	44.8±0.5	0.6	35.6±1.0	0.7	26.1±1.2
AB4	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
M	12.5±0.4	4.4	7.2±0.2	7.7	7.9±0.5	7.0	7.2±0.6	7.7	55.4±4.2

*L. a.* (*L. amazonensis*), *L. b.* (*L. braziliensis*), *L. g.* (*L. guyanensis*), *L. i.* (*L. infantum*). **j774** (macrófagos murinos). **IS** = Índice de selectividad. **DE** = Desviación estándar. **M** = Miltefosina, fármaco de referencia. (-) = Inactivo. (CI<sub>50</sub> > 50 µg/mL). n.e. = No ensayado.

### Derivados del ácido benzoico



### Actividad leishmanicida de fenilpropanoides

En lo que se respecta a los fenilpropanoides ensayados (tabla 28), comentar que 6 de estos metabolitos presentaron una actividad y selectividad en un rango de baja a moderada (CI<sub>50</sub> 17.8-45.0 µg/mL, IS ≤ 3.9) frente a una o varias de las especies de *Leishmania* evaluadas, mientras el resto de los fenilpropanoides ensayados resultaron inactivos (CI<sub>50</sub> > 50 µg/mL). El

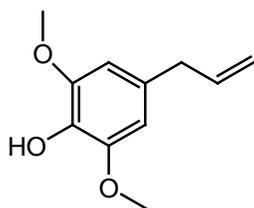
compuesto más activo **FP6**, presentó una  $CI_{50}$  de 17.8  $\mu\text{g/mL}$  frente a *L. infantum*,  $IS = 5.6$ , pero fue inactivo frente a las demás especies de *Leishmania*, lo que resulta de interés, ya que aunque con una actividad leishmanicida moderada resultó selectivo frente a una única especie de las cuatro ensayadas.

**Tabla 28. Actividad leishmanicida y citotoxicidad de fenilpropanoides frente a formas de promastigote de *Leishmania spp.***

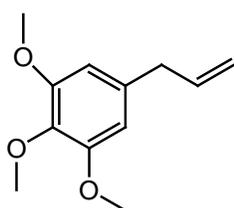
	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ DE						$CC_{50} \pm$ DE		
	<i>L. a.</i>	IS	<i>L. b.</i>	IS	<i>L. g.</i>	IS	<i>L. i.</i>	IS	j774
<b>FP1</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>FP2</b>	-	-	-	-	42.1 $\pm$ 1.7	2.4	-	-	>100
<b>FP3</b>	-	-	43.0 $\pm$ 4.3	2.3	29.4 $\pm$ 1.0	3.4	28.8 $\pm$ 1.6	3.5	>100
<b>FP4</b>	-	-	-	-	48.0 $\pm$ 8.7	2.1	-	-	>100
<b>FP5</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>FP6</b>	-	-	-	-	-	-	17.8 $\pm$ 0.1	5.6	>100
<b>FP7</b>	41.2 $\pm$ 1.2	1.9	37.3 $\pm$ 0.5	2.2	20.5 $\pm$ 2.1	3.9	-	-	80.3 $\pm$ 3.2
<b>FP8</b>	45.0 $\pm$ 0.4	1.5	36.1 $\pm$ 1.8	1.9	20.1 $\pm$ 0.1	3.5	-	-	69.5 $\pm$ 3.5
<b>FP9</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>FP13</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>M</b>	12.5 $\pm$ 0.4	4.4	7.2 $\pm$ 0.2	7.7	7.9 $\pm$ 0.5	7.0	7.2 $\pm$ 0.6	7.7	55.4 $\pm$ 4.2

*L. a.* (*L. amazonensis*), *L. b.* (*L. braziliensis*), *L. g.* (*L. guyanensis*), *L. i.* (*L. infantum*). **j774** (macrófagos murinos). **IS** = Índice de selectividad. **DE** = Desviación estándar. **M** = Miltefosina, fármaco de referencia. (-) = Inactivo ( $CI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ ). n.e. = No ensayado.

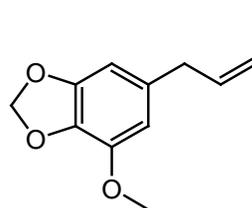
#### Fenilpropanoides



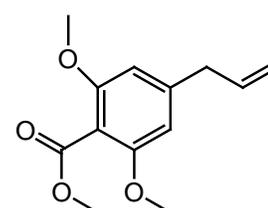
4-Alil-2,6-dimethoxy-fenol (FP1)



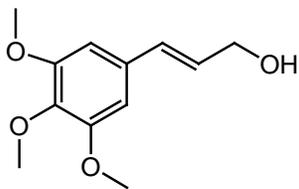
Elemicina (FP2)



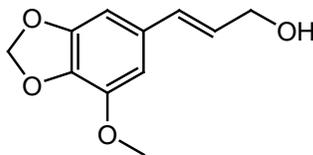
Miristicina (FP3)



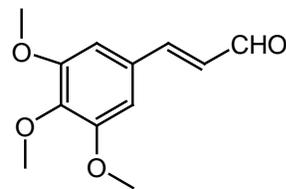
Acetato de metoxi-eugenol (FP4)



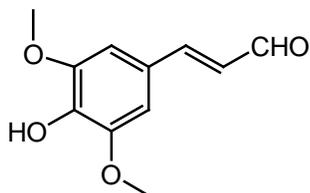
Alcohol (*E*)-3,4,5-trimetoxi-cinámico (FP5)



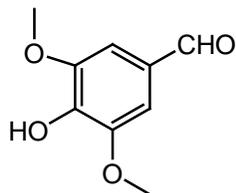
Anthriscinol (FP6)



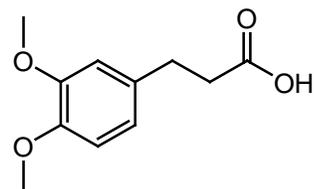
(*E*)-3,4,5-trimetoxi-cinamaldehído (FP7)



Sinapaldehído (FP8)



Siringaldehído (FP9)



Ácido 4-metoxi-dihidroferúlico (FP13)

### Actividad leishmanicida de terpenos, un cromano, un benzofurano y un ácido graso

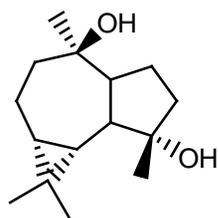
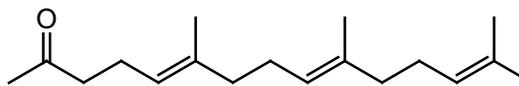
En lo que se respecta a los compuestos ensayados que hemos incluido en este apartado y cuyo resultados se muestran en la tabla 29, cabe destacar que el ácido graso denominado **AG1**, presenta una buena actividad con valores de  $CI_{50}$  en un rango de 5.5-8.7  $\mu\text{g/mL}$ , mientras el terpeno **T4** presentó una actividad moderada (11.5-15.0  $\mu\text{g/mL}$ ) frente a las cuatro especies de *Leishmania* en ambos con una índice de selectividad moderada.

**Tabla 29. Actividad leishmanicida y citotoxicidad de dos terpenos, un cromano, un benzofurano y un ácido graso hidroxilado frente a promastigote de *Leishmania spp.***

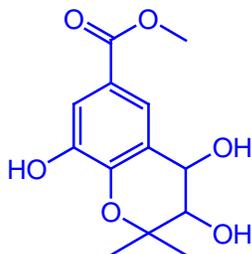
	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ DE								$CC_{50} \pm$ DE
	<i>L. a.</i>	IS	<i>L. b.</i>	IS	<i>L. g.</i>	IS	<i>L. i.</i>	IS	
<b>T3</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>T4</b>	15.0 $\pm$ 0.4	2.2	11.5 $\pm$ 0.4	2.8	14.4 $\pm$ 0.5	2.2	13.1 $\pm$ 1.5	2.5	32.3 $\pm$ 1.0
<b>B2</b>	39.9 $\pm$ 0.7	0.9	-	-	-	-	-	-	34.6 $\pm$ 7.6
<b>B10</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.
<b>AG1</b>	6.2 $\pm$ 0.7	4.0	5.50 $\pm$ 0.04	4.5	6.4 $\pm$ 0.5	3.8	8.7 $\pm$ 0.6	2.8	24.5 $\pm$ 7.1
<b>M</b>	12.5 $\pm$ 0.4	4.4	7.2 $\pm$ 0.2	7.7	7.9 $\pm$ 0.5	7.0	7.2 $\pm$ 0.6	7.7	55.4 $\pm$ 4.2

*L. a.* (*L. amazonensis*), *L. b.* (*L. braziliensis*), *L. g.* (*L. guyanensis*), *L. i.* (*L. infantum*). **j774** = macrófagos murinos. **IS** = Índice de selectividad. **DE** = Desviación estándar. **M** = Miltefosina, fármaco de referencia. (-) = inactivo ( $CI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ ). n.e. = No ensayado.

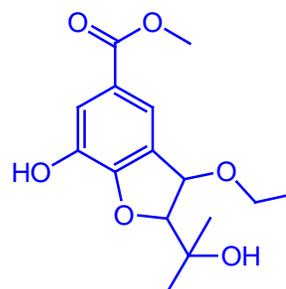
### Terpenos, cromano, benzofurano y ácido graso hidroxilado

Alloaromadendrano-4 $\alpha$ -10 $\beta$ -diol (T3)

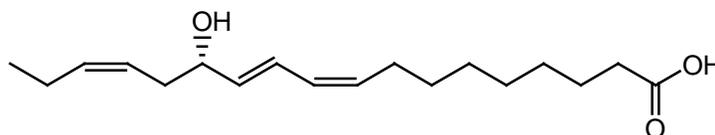
(E, E)-Farnesilacetona (T4)



B2



B10



Ácido 13(S)-hidroxi-octadeca-(9Z,11E,15Z)-trienoico (AG1)

### Actividad leishmanicida frente amastigotes intracelulares

Con la finalidad de profundizar en el potencial de las fracciones o productos que resultaron de interés por su actividad leishmanicida *in vitro*, se realizó un estudio de la actividad leishmanicida frente a formas amastigotes intracelulares.

En el estudio del fraccionamiento bioguiado, las subfracciones **D4**, **D8** y **D12** de la fracción de diclorometano de *P. delineatum*, ensayadas *in vitro* frente a las cuatro especies de *Leishmania*, presentaron una  $CI_{50}$  1.0–39.2  $\mu\text{g/mL}$ , no obstante, resultaron inactivas al ser evaluadas frente amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* y *L. infantum*.

Así mismo, los compuestos **F2**, **F5**, **F10**, **A4** y **A5** que resultaron los más activos en los ensayos *in vitro* frente a las cuatro especies de *Leishmania* utilizadas ( $CI_{50}$  0.2 – 3.0  $\mu\text{g/mL}$ ), fueron evaluados frente amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* y *L. infantum*. Los resultados obtenidos fueron alentadores ya que dos de los compuestos seleccionados, **F2** y **F5**,

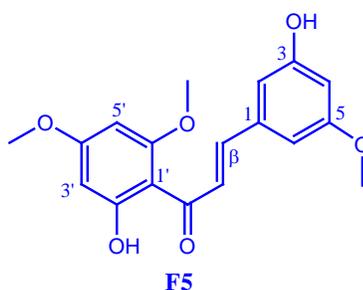
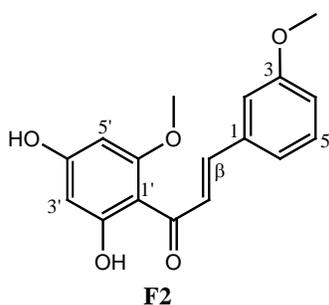
con valores de  $CI_{50}$  en un rango de 1.8 - 1.9  $\mu\text{g/mL}$ , resultaron cinco veces más potente que el fármaco de referencia ( $CI_{50}$  9.6  $\mu\text{g/mL}$ ) frente a *L. infantum*. Por otra parte, los compuestos **F10**, **A4** y **A5** con una  $CI_{50}$  de 2.6  $\mu\text{g/mL}$  frente a *L. amazonensis*, presentaron una actividad similar al fármaco de referencia.

**Tabla 30. Actividad leishmanicida de chalconas y amidas frente a amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* y *L. infantum*.**

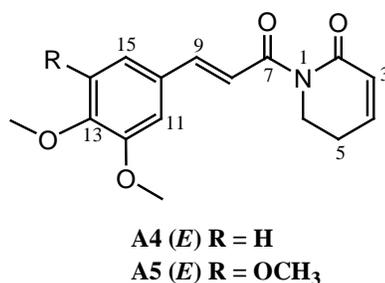
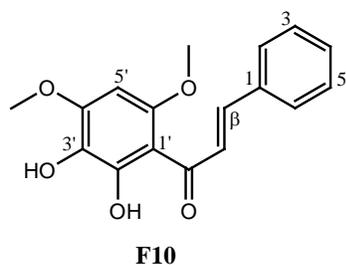
	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ DE	
	<i>L. a.</i>	<i>L. i.</i>
<b>F2</b>	>5.0	1.8 $\pm$ 0.1
<b>F5</b>	4.8 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.3
<b>F10</b>	2.6 $\pm$ 0.1	4.4 $\pm$ 0.7
<b>A4</b>	2.6 $\pm$ 0.2	-
<b>A5</b>	2.6 $\pm$ 0.1	-
<b>M</b>	3.3 $\pm$ 0.2	9.6 $\pm$ 0.4

*L. a.* (*L. amazonensis*), *L. i.* (*L. infantum*). **DE** = Desviación estándar. **M** = Miltefosina, fármaco de referencia. (-) = Inactivo. ( $CI_{50} > 5 \mu\text{g/mL}$ ).

### Chalconas



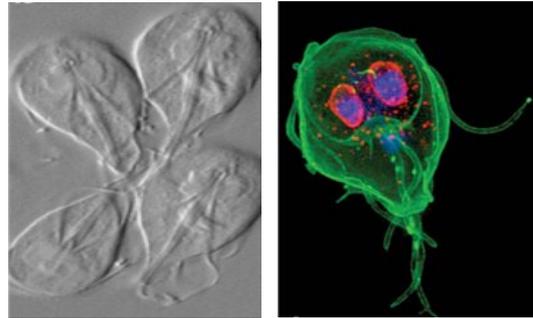
### Amidas



Los resultados obtenidos muestran que las especies de *Piper* estudiadas, presentan metabolitos con actividad leishmanicida prometedora. Así, podemos considerar los flavonoides **F2**, **F5** y **F10**, así como las amidas **A4** y **A5** responsables de la actividad de los extractos de *Piper delineatum* y *Piper pseudoarboreum*, respectivamente.

Estos compuestos son realmente prometedores como leishmanicidas y por lo tanto, las especies anteriormente citadas pueden ser consideradas como 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.

En el futuro, se llevarán a cabo transformaciones químicas, para el desarrollo de una quimioteca que nos permita realizar un análisis más detallado de la relación estructura-actividad (SAR) y en consecuencia el diseño racional de nuevos leishmanicidas.



## **7.2. Giardiasis**

## 7.2. Giardiasis

La giardiasis es una enfermedad diarreica causada por *Giardia intestinalis* (también es conocido como *G. lamblia* y *G. duodenalis*), parásito unicelular que coloniza el tracto intestinal de humanos y otros mamíferos. En muchos países de todo el mundo la giardiasis es una parasitosis gastrointestinal de gran importancia epidemiológica, por su alta prevalencia y patogenicidad. Esta enfermedad es la principal causa de diarrea entre niños y viajeros<sup>1</sup>.

Como otras especies de este género, el **ciclo biológico** de *G. intestinalis*, incluye dos estadios: El trofozoíto (forma vegetativa) cuyo hábitat es el intestino delgado, siendo responsable de las manifestaciones clínicas, y el quiste (forma resistente e infecciosa) responsable de la transmisión del parásito, que está protegido por una cobertura externa que le permite sobrevivir en el medio ambiente por largos periodos de tiempo.

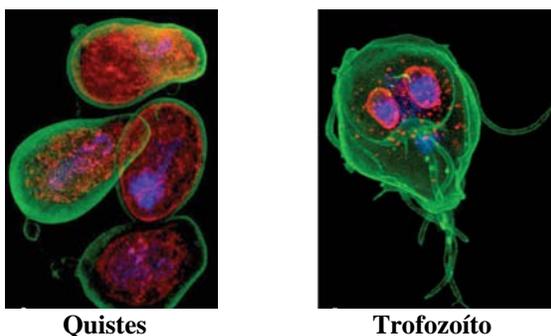


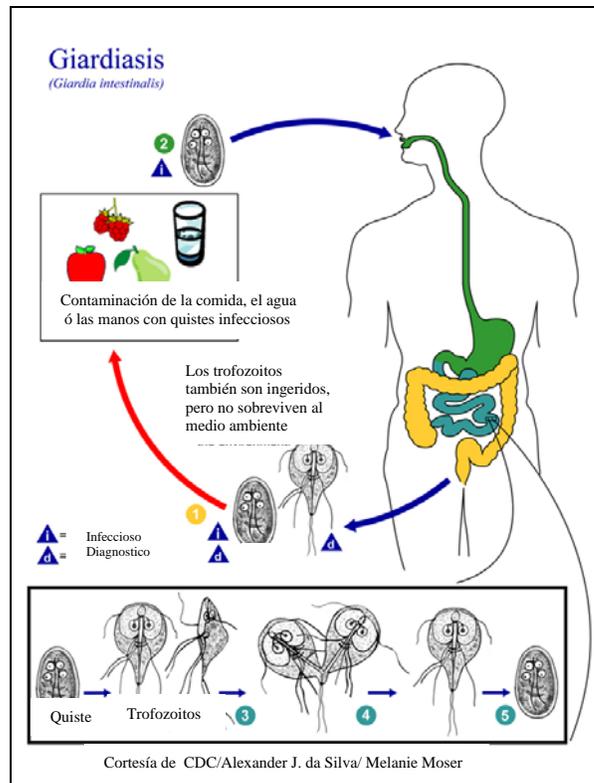
Imagen tridimensional por microscopía de fluorescencia de los estadios de *Giardia intestinalis*.<sup>2</sup>

Los trofozoítos se dividen en el intestino delgado mediante un proceso de fisión binaria, que incluye la división nuclear en primer lugar, seguida del aparato neuromotor y del disco ventral, y la separación posterior del citoplasma, obteniéndose dos trofozoítos hijos. El siguiente paso es el enquistamiento de los trofozoítos, una vez que se dirigen hacia el colon. Los quistes expulsados junto a las heces son infectantes. Cuando dichos quistes son ingeridos por un nuevo hospedador, llegan al duodeno, donde se produce la lisis de la pared quística, dando así lugar a

<sup>1</sup> Buret, A. G. *Parasite*. **2008**, 15, 261-265.

<sup>2</sup> Ratner, D. M.; Cui, J. Steffen, M.; Moore L. L.; Robbins, P. W.; Samuelson, J. *Eukaryotic Cell*. **2008**, 7, 1930-1940.

un quiste tetranucleado que se divide en dos trofozoítos binucleados y se anclan al epitelio intestinal, cerrando así su ciclo vital<sup>3</sup>.



Ciclo biológico de *Giardia intestinalis*<sup>4</sup>.

## Epidemiología

La infección por *G. lamblia* es cosmopolita y se puede desarrollar tanto de forma endémica (afectando fundamentalmente a la población infantil, con frecuentes reinfecciones) o de forma epidémica (brotes que afectan a comunidades cerradas o viajeros que visitan zonas endémicas). Entre un 2-3% de todas las diarreas del viajero están causadas por *Giardia*. La infección se adquiere por la ingestión de quistes o, más raramente, por trofozoítos, procedentes de la materia fecal. La transmisión es fundamentalmente fecal-oral directa, por contacto con personas o animales infectados con quistes. La transmisión fecal-oral indirecta, por el consumo de aguas o alimentos contaminados con quistes, suele ser el origen de brotes epidémicos. *Giardia* también se transmite por vía sexual, sobre todo entre la población homosexual.

<sup>3</sup> Haider, S. S.; Sherwani, S. K.; Irshad, A.; Kazmi, S. U.; Munir, S.; Ahmed, H. *Pakistan Journal Health Research*. 2013, 1, 17-24.

<sup>4</sup> <http://www.niaid.nih.gov/topics/pathogenGenomics/Pages/giardiaImage.aspx>

La Organización mundial de la salud ha estimado que 280 millones de personas son infectadas cada año<sup>5</sup>. La prevalencia de infección varía del 2-7% en países industrializados y más del 50% en países en vías de desarrollo (Asia, África y América Latina<sup>6,7</sup>). A nivel mundial la enfermedad de la giardiasis es considerado como una de las infecciones protozoarias más comunes<sup>8</sup>. Alrededor de 200 millones de personas en Asia, África y América Latina tiene infecciones sintomáticas, sin embargo, la giardiasis asintomática ocurre frecuentemente en países en vías de desarrollo.

Además, las especies del género *Giardia* son parásitos muy comunes en animales domésticos (perros, gatos), en la ganadería y en animales salvajes. Una de las especies dentro de este género, *Giardia duodenalis*, causa giardiasis en humanos. La transmisión zoonótica parece posible, aunque ha sido discutida por varios autores y aun no está claro. Animales infectados con *Giardia* pueden transmitirla a humanos<sup>9</sup>.

Los índices de infección por giardiasis en humanos son, generalmente, bajos en países desarrollados: 1.4% en Estados Unidos y Reino Unido, 1.5% en Alemania, 5.4% en España, 7.6% en Nueva Zelanda y 28.9% en Canadá, y elevados en países en vías de desarrollo: 34.6% en Egipto, 40.7% en Uganda, y entre un 5.0-14.0% en refugiados africanos y nuevos emigrantes en Estados Unidos, Holanda y España<sup>10</sup>.

## Sintomatología

En la mayor parte de los pacientes infectados por *G. lamblia* la infección es asintomática, se estima que alrededor de un 60% de las giardiasis cursan de esta manera. El periodo de incubación de la giardiasis sintomática oscila entre 3 y 45 días. La infección puede evolucionar de forma aguda, subaguda o crónica. Aunque la giardiasis suele resolverse de forma espontánea, en otras ocasiones la parasitación puede durar semanas o meses en ausencia de tratamiento.

---

<sup>5</sup> Upcroft, P.; Upcroft, J. A. *Clinical Microbiology Review*. **2001**, 14, 150-164.

<sup>6</sup> Odoi, A.; Martin, S. W.; Michel, P.; Holt, J.; Middleton, D.; Wilson, J. *Epidemiology & Infection*. **2004**, 132, 967-975.

<sup>7</sup> Yason J. A.; Rivera, W.L. *Parasitology Research*. **2007**, 101, 681-687.

<sup>8</sup> Wright, J. M.; Dunn, L. A.; Upcroft P.; Upcroft, J. A. *Expert Opinion Drug Safety*. **2003**, 2, 529-541.

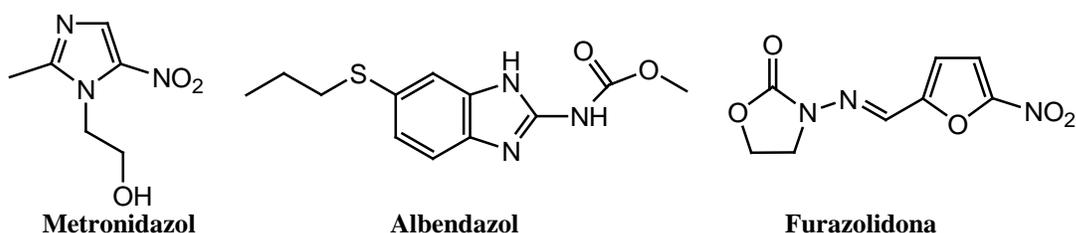
<sup>9</sup> Plutzer, J.; Ongerth, J.; Karanis, P. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. **2010**, 213, 321-333.

<sup>10</sup> Feng, Y. Xiao, L. *Clinical Microbiology Review*. **2011**, 24, 110-140.

Además, las formas agudas pueden evolucionar, en un número limitado de casos, a una infección crónica, con mayor frecuencia entre la población infantil. La sintomatología gastrointestinal es la más frecuente y comprende un amplio espectro de manifestaciones clínicas: enteritis aguda, diarrea crónica, mala absorción con esteatorrea y pérdida de peso<sup>11,12</sup>. Las manifestaciones extraintestinales más frecuentes asociados a la giardiasis son erupción maculopapular, urticaria, aftas, poliartritis, colangitis, asma bronquial, iridociclitis y retinitis. En las formas de giardiasis crónica los síntomas predominantes son el malestar abdominal acompañado de dolor epigástrico difuso, la diarrea puede persistir o alternar con estreñimiento, acompañado de pérdida de peso<sup>13</sup>.

## Tratamiento

El tratamiento de este tipo de parasitosis se basa en la administración de metronidazol, tinidazol, quinacrina, furazolidona, albendazol y/o nitazoxanida.



Sin embargo, la mayoría de estos antiparasitarios presentan efectos secundarios, por ejemplo, el albendazol produce náuseas, sabor metálico, coloración amarillenta de la piel e incremento de las enzimas hepáticas<sup>11,14</sup>; el metronidazol, fármaco más recetado para tratar la giardiasis, es citotóxico<sup>15</sup>; la furazolidona es un potencial mutagénico que induce tumores de mama en ratas, mientras que los benzimidazoles presentan teratogenicidad<sup>16</sup>. A estos efectos secundarios, hemos de añadir la aparición de resistencia del parásito a estos fármacos<sup>17</sup>, lo que

<sup>11</sup> Ranjan, F.; Sujatha, F.; Leong, A. *Tropical Infectious Diseases; Epidemiology, Investigation, Diagnosis and Management*, 1ª ed., Greenwich Medical Media Limited: London, **2001**.

<sup>12</sup> Ponce-Macotela, M.; Gómez-Garduño, J.; González-Maciél, A.; Reynoso-Robles, R.; Anislado-Tolentino, V.; Martínez-Gordillo, M. *Revista de Investigación Clínica*. **2001**, 53, 41-45.

<sup>13</sup> Wolfe, M. S. *Clinical Microbiology Review*. **1992**, 5, 97-105.

<sup>14</sup> Ortega, Y.; Adam, R. *Clinical Infectious Diseases*. **1997**, 25, 545-550.

<sup>15</sup> López Nigro, M. M.; Palermo, A. M.; Mudry, M. D.; Carballo, M. A. *Toxicology In Vitro*. **2003**, 17, 35-40.

<sup>16</sup> Liu, L. X.; Weller, P. F. *New England Journal of Medicinal*. **1996**, 334, 1178-1184.

<sup>17</sup> Lemée, V.; Zaharia, I.; Nevez, G.; Rabodonirina, M.; Brasseur, P.; Ballet, J. J.; Favennec, L. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2000**, 46, 819-821.

hace evidente la necesidad de agentes antiparasitarios más seguros y efectivos frente a esta enfermedad.

Se han evaluado cinco análogos del metronidazol (MTZ) frente a trofozoítos de *G. lamblia*. Los compuestos MTZ-Br (CI<sub>50</sub> de 0.28 µg/mL) y MTZ-I (CI<sub>50</sub> de 0.40 µg/mL) fueron los más activos y no presentaron efectos citotóxicos frente a células mononucleares de sangre periférica humana<sup>18</sup>. Estos dos análogos, fueron evaluados frente a gerbilinos infectados con *G. lamblia*, los cuales mostraron una mayor reducción de la carga parasitaria en comparación con el metronidazol<sup>19</sup>.

### Productos naturales con actividad giardicida

Gran parte de los esfuerzos en la búsqueda de nuevos anti-giardíacos se han dirigido hacia los productos naturales, enfocándose, principalmente, en la evaluación de plantas con aplicaciones etnomédicas para el tratamiento de diarreas. A través de estudios biodirigidos se ha logrado el aislamiento de compuestos derivados de la ruta de fenilpropanoides para tratar esta enfermedad. Así, de *Geranium niveum* se obtuvieron dos nuevas proantocianidinas, geraninas A y B, activas frente a *G. intestinalis*, con una CI<sub>50</sub> de 2.4 y 6.0 µg/mL, respectivamente<sup>20</sup>. Así mismo, de la parte aérea de *Rubus coriifolius* se aisló (-)-epicatequina, compuesto que presentó una CI<sub>50</sub> de 1.6 µg/mL<sup>21</sup>, y de la parte aérea de *Teloxys graveolens* fue aislada melilotosida que exhibió una CI<sub>50</sub> de 16.8 µg/mL<sup>22</sup> frente a los trofozoítos de *G. intestinalis*.

Se han realizado ensayos *in vivo*<sup>23</sup> de flavonoides, aislados de varias especies (*Geranium mexicanum*, *Cuphea pinetorum*, *Helianthemum glomeratum*, *Rubus coriifolius*), siendo el flavonoide (-)-*epi*-catequina el que resultó más activo, más incluso que el metronidazol, usado como control positivo.

---

<sup>18</sup> Busatti, H.G.N.O.; Vieira, A. E. D.; Viana, J. C.; Silva, H. E.; Souza-Fagundes, E. M.; Martins-Filho, O. A.; Alves, R. J.; Gomes M. A. *Parasitology Research*. **2007**, 102, 145-149.

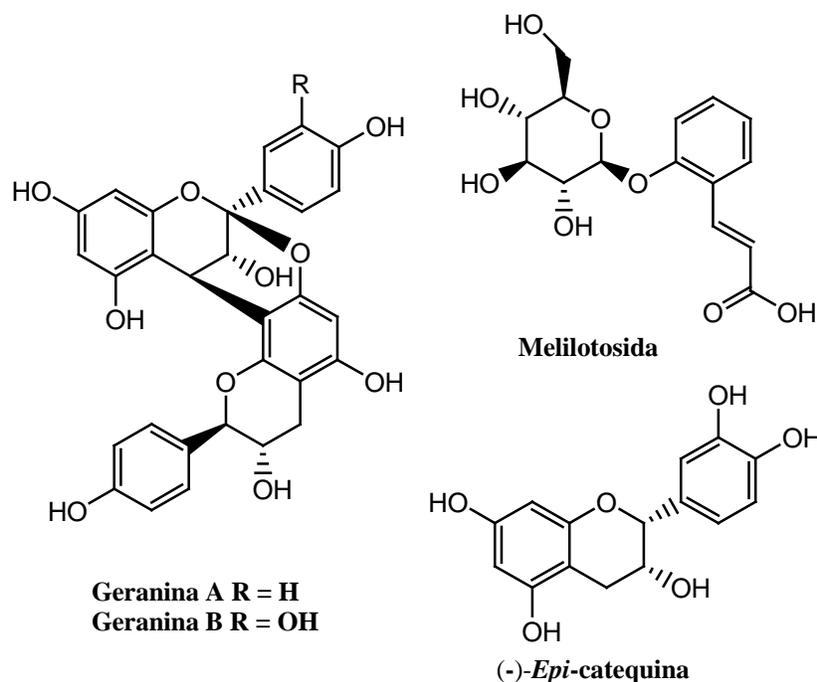
<sup>19</sup> Busatti, H. G. N. O.; Alves, R. J.; Santana-Anjos, K. G.; Gil, F. F.; Cury, M. C.; Vannier-Santos, M. A.; Gomes M. A. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **2013**, 75, 160-164.

<sup>20</sup> Calzada, F.; Cerda-García, C. M.; Meckes, M.; Cedillo-Rivera, R.; Bye, R.; Mata, R. *Journal of Natural Products*. **1999**, 62, 705-709.

<sup>21</sup> Alanis, A.; Calzada, F.; Cedillo-Rivera, R.; Meckes, M. *Phytotherapy Research*. **2003**, 17, 681-682.

<sup>22</sup> Calzada, F.; Velázquez, C.; Cedillo-Rivera, R.; Esquivel, B. *Phytotherapy Research*. **2003**, 17, 731-732.

<sup>23</sup> Barbosa, E.; Calzada, F.; Campos, R. *Journal of Ethnopharmacology*. **2007**, 109, 552-554.



#### Compuestos de origen natural con actividad giardicida

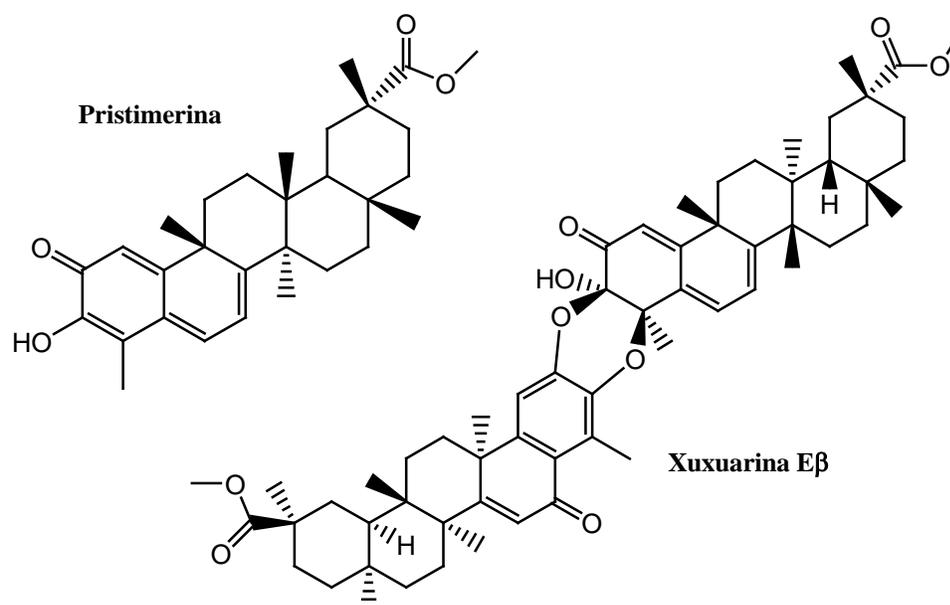
En ensayos *in vitro*, el extracto etanólico de *Piper longum* mostró un 100% de actividad giardicida (125 µg/mL) y en ensayos *in vivo* la supervivencia de trofozoítos fue de  $5.81 \times 10^4$ , cuatro veces inferior al control ( $23.4 \times 10^4$ )<sup>24</sup>.

En lo que se refiere a la familia Celastraceae, se han evaluado algunos compuestos como antiparasitarios frente a *G. intestinalis*, desde triterpenos y triterpenometilénquinonas hasta dímeros triterpénicos, siendo éstos los primeros ejemplos de este tipo de compuestos evaluados frente a este parásito<sup>25,26</sup>. Entre los compuestos más activos cabe destacar la pristimerina que presenta una  $CI_{50}$  de 0.11 µM y un dímero triterpénico (xuxuarina Eβ) con una  $CI_{50}$  de 11.3 µM. La actividad de la pristimerina es notable, pues resultó diez veces más potente que el metronidazol (1.23 µM), usado como control positivo.

<sup>24</sup> Tripathi, D. M.; Gupta, N.; Lakshmi, V.; Saxena, K. C.; Agrawal, A. K. *Phytotherapy Research*. **1999**, 13, 561-565.

<sup>25</sup> Mena-Rejón, G. J.; Pérez-Espadas, A. R.; Moo-Puc, R. E.; Cedillo-Rivera, R.; Bazzocchi, I. L.; Jiménez-Díaz, I. A.; Quijano, L. *Journal of Natural Products*. **2007**, 70, 863-865.

<sup>26</sup> Mena-Rejón, G. J.; Cedillo-Rivera, R.; Quijano, L. *Phytochemistry*. **2008**, 69, 1057-1064.



Compuestos aislados de celastráceas con actividad giardicida.

Con estos antecedentes, en la búsqueda de agentes antiparasitarios, hemos decidido evaluar la actividad de los metabolitos aislados de las diferentes especies de *Piper* que se describen en esta Memoria frente a *Giardia intestinalis*.

---

### 7.2.1. Resultados y discusión: Actividad giardicida

#### *Fraccionamiento bioguiado de Piper delineatum*

Abordando otro de los objetivos propuestos en esta Memoria, llevamos a cabo el estudio fitoquímico de las hojas de *Piper delineatum*, mediante fraccionamiento bioguiado, frente a formas trofozoito de *Giardia intestinalis*. Para ello, en primer lugar se preparó el extracto etanólico, el cual fue resuspendido en agua y extraído con diclorometano y acetato de etilo. Las fracciones de diclorometano, acetato de etilo y agua, así obtenidas, fueron evaluadas para determinar su actividad giardicida y paralelamente, se evaluó la citotoxicidad frente a macrófagos murinos j774 para determinar el índice de selectividad de las muestras.

Los resultados de la actividad giardicida se expresan como  $CI_{50}$  (concentración que inhibe el crecimiento del 50% de los parásitos) y la citotoxicidad como  $CC_{50}$  (concentración citotóxica media, concentración que reduce el número de células viables al 50%), ambos valores se expresan en  $\mu\text{g/mL}$ .

Una vez evaluada la actividad biológica de las fracciones orgánicas y acuosas, las fracciones de diclorometano y acetato de etilo que resultaron activas, fueron cromatografiadas mediante cromatografía líquida por gravedad, utilizando diferentes sistemas de elución, tal como se indica en la parte experimental. Las distintas fracciones fueron a su vez evaluadas por su potencial giardicida y los resultados se muestran en la tabla 31.

Los resultados obtenidos mostraron que tanto el extracto etanólico como las fracciones orgánicas de *Piper delineatum* presentaron algún grado de actividad frente a *Giardia intestinalis*, mientras la fracción acuosa resultó inactiva ( $CI_{50} > 20 \mu\text{g/mL}$ ). Sin embargo, se observó una pérdida de actividad en el proceso de partición líquido-líquido del extracto etanólico, que presentó una potente actividad ( $CI_{50} 1.9 \mu\text{g/mL}$ ), que aunque fue algo inferior a la actividad presentada por el Metronidazol ( $0.43 \mu\text{g/mL}$ ), utilizado como control, resultaba sumamente interesante para ser un extracto crudo. No obstante, la actividad aumentó en el fraccionamiento cromatográfico, aunque nunca hasta recuperar el  $CI_{50}$  del extracto original. Así ocho de las subfracciones evaluadas presentaron valores de  $CI_{50}$  entre  $3.3-9.3 \mu\text{g/mL}$ .

**Tabla 31. Actividad frente a trofozoitos de *Giardia intestinalis* y citotoxicidad del extracto, fracciones y subfracciones de hojas de *Piper delinatum*.**

	CI <sub>50</sub> (µg/mL) ± DE		CC <sub>50</sub> ± DE
	<i>G. i.</i>	IS	j774
<b>EE</b>	1.9±1.5	3.7	7.1±0.6
<b>D</b>	16.0±1.2	0.4	6.6±0.1
<b>AE</b>	19.7±0.7	0.3	4.9±0.4
<b>A</b>	-	-	n.e.
<b>D1</b>	-	-	n.e.
<b>D2</b>	-	-	n.e.
<b>D3</b>	-	-	n.e.
<b>D4</b>	-	-	n.e.
<b>D5</b>	-	-	n.e.
<b>D6</b>	5.6±1.3	2.8	15.5±1.0
<b>D7</b>	3.3±0.7	2.8	9.2±1.2
<b>D8</b>	4.7±0.1	2.3	10.9±0.6
<b>D9</b>	9.3±1.5	1.9	17.5±1.2
<b>D10</b>	5.0±1.1	0.9	4.5±0.9
<b>D11</b>	7.5±0.5	1.4	10.6±1.4
<b>D12</b>	-	-	n.e.
<b>D13</b>	-	-	n.e.
<b>AE1</b>	-	-	n.e.
<b>AE2</b>	3.7±1.3	0.9	3.2±0.1
<b>AE3</b>	4.5±0.9	0.6	2.7±0.1
<b>AE4</b>	-	-	n.e.
<b>AE5</b>	-	-	n.e.
<b>AE6</b>	-	-	n.e.
<b>Me</b>	0.43±0.1	233	>100

**EE** = Extracto Etanólico, **D** = Fracción de diclorometano.

**AE** = Fracción de acetato de etilo, **A** = Fracción acuosa.

**D1-D13** = Subfracciones de la fracción de diclorometano.

**AE1-AE6** = Subfracciones de la fracción de acetato de etilo.

*G. i.* (*Giardia intestinalis*). **j774** (macrófagos murinos).

**IS** = Índice de selectividad. **DE** = Desviación estándar.

**Me** = Metronidazol, fármaco de referencia.

(-) = Inactivo (CI<sub>50</sub> > 20 µg/mL). n.e. = No ensayado.

---

Las fracciones activas fueron, posteriormente, sometidas a sucesivas cromatografías, como se indica en la parte experimental de esta Memoria, con la finalidad de aislar e identificar los metabolitos responsables de la actividad giardicida. Con el objetivo de completar el estudio fitoquímico de *P. delineatum*, se realizó el estudio cromatográfico de las fracciones inactivas y los metabolitos aislados e identificados fueron así mismo evaluados.

### ***Evaluación giardicida de metabolitos aislados de especies de Piper***

Se llevó a cabo la evaluación frente a *G. intestinalis* de los metabolitos aislados de las especies de *Piper* objeto de este estudio: *Piper delineatum*, *P. divaricatum*, *P. heterophyllum* y *P. glabratum*. A fin de facilitar la discusión y establecer, cuando fuera posible, una relación estructura-actividad que nos permitiera determinar los requerimientos estructurales para la actividad giardicida, se presentan y discuten los resultados para cada grupo de compuesto, según se indica:

- ❖ Flavonoides: F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10, F10, F11, F12, F13, F14, F15, F16, F19, F20, F21, F22, F23, F24, F26, F27, F28, F30, F31, F33, F36.
- ❖ Derivados del ácido benzoico: AB1, AB2, AB4.
- ❖ Fenilpropanoides: FP1, FP2, FP3, FP4, FP5, FP6, FP7, FP8, FP9.
- ❖ Terpenos: T3, T4.
- ❖ Cromano y Benzofurano: B2, B10.

### **Actividad giardicida de flavonoides**

El análisis de los resultados obtenidos (tabla 32) nos muestra como resultado más relevante que la chalcona **F5** (CI<sub>50</sub> 0.02 µg/mL) resultó 22 veces más activo frente a *G. intestinalis* que el metronidazol (CI<sub>50</sub> 0.43µg/mL), utilizado como fármaco de referencia. Por otro lado, cabe destacar, el alto índice de selectividad que presenta **F5** (IS = 235), similar al metronidazol (IS = 233). Además, resaltar que siete de las chalconas evaluadas (**F1-F4**, **F6**, **F10** y **F12**) mostraron una actividad moderada (CI<sub>50</sub> 1.4-3.4 µg/mL) y un índice de selectividad ≤ 3.9.

**Tabla 32. Actividad giardicida y citotoxicidad de flavonoides frente a de trofozoitos de *G. intestinalis*.**

	CI <sub>50</sub> (µg/mL) ± DE		CC <sub>50</sub> ± DE
	<i>G. i.</i>	IS	j774
<b>F1</b>	2.0±0.1	1.9	3.7±0.2
<b>F2</b>	1.4±0.1	3.4	4.7±0.2
<b>F3</b>	2.6±0.2	3.9	10.2±1.1
<b>F4</b>	1.9±0.3	2.0	3.8±0.1
<b>F5</b>	0.020±0.001	235	4.7±0.2
<b>F6</b>	3.4±0.1	2.1	7.1±0.5
<b>F7</b>	15.1±1.2	3.9	58.3±2.6
<b>F8</b>	10.8±1.3	1.4	14.6±0.7
<b>F9</b>	7.8±0.8	2.2	16.8±0.8
<b>F10</b>	2.2±0.6	3.5	7.6±0.4
<b>F11</b>	-	-	n.e.
<b>F12</b>	3.3±0.2	1.6	5.20±0.03
<b>F13</b>	-	-	n.e.
<b>F14</b>	19.2±0.3	5.2	>100
<b>F15</b>	-	-	n.e.
<b>F16</b>	-	-	n.e.
<b>F19</b>	-	-	n.e.
<b>F20</b>	-	-	n.e.
<b>F21</b>	-	-	n.e.
<b>F22</b>	-	-	n.e.
<b>F23</b>	-	-	n.e.
<b>F24</b>	-	-	n.e.
<b>F26</b>	15.0±2.1	3.5	52.7±2.3
<b>F27</b>	15.5±0.9	2.9	45.4±2.3
<b>F28</b>	-	-	n.e.
<b>F30</b>	-	-	n.e.
<b>F31</b>	-	-	n.e.
<b>F33</b>	-	-	n.e.
<b>F36</b>	-	-	n.e.
<b>Me</b>	0.43±0.1	233	>100

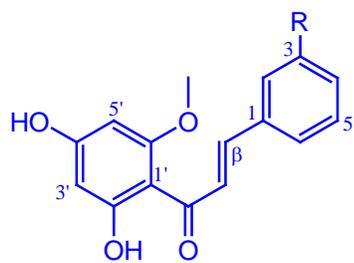
*G. i.* (*Giardia intestinalis*). **j774** (macrófagos murinos).

**IS** = Índice de selectividad. **DE** = Desviación estándar.

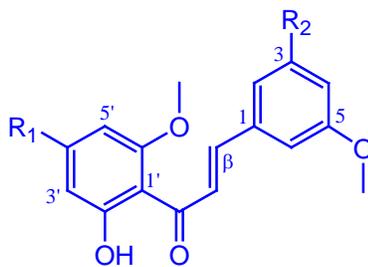
**Me** = Metronidazol, fármaco de referencia.

(-) = Inactivo (CI<sub>50</sub> > 20 µg/mL). n.e. = No ensayado.

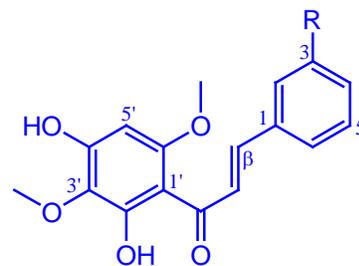
## Chalconas



**F1** R = OH  
**F2** R = OCH<sub>3</sub>  
**F3** R = H

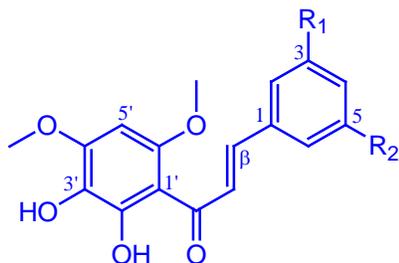


**F4** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OH  
**F5** R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH  
**F6** R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H

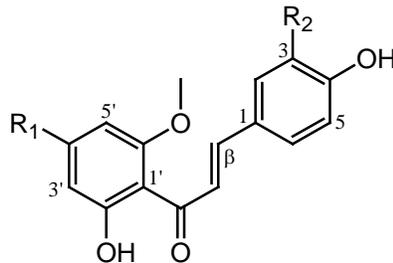


**F7** R = OH  
**F8** R = OCH<sub>3</sub>

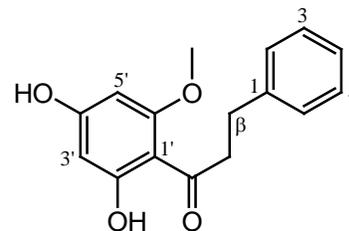
## Dihidrochalcona



**F9** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>  
**F10** R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H

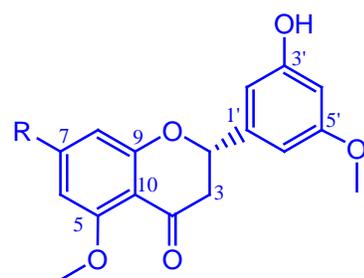


**F11** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OH  
**F12** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>  
**F13** R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH

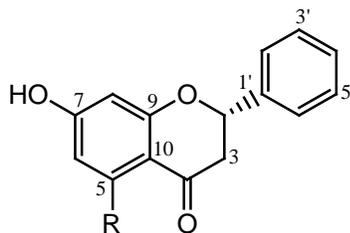


**F14**

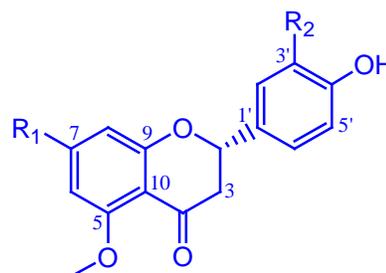
## Flavanonas



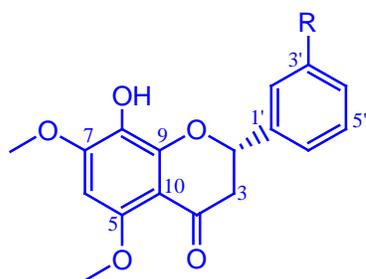
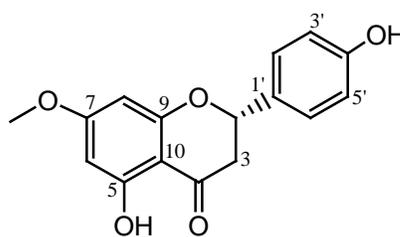
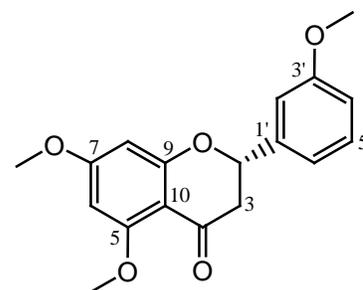
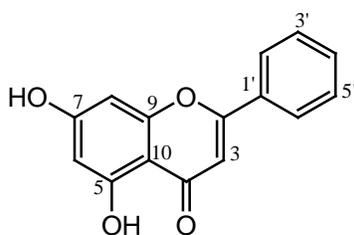
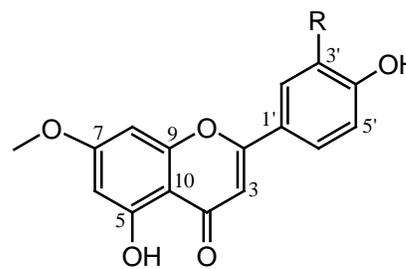
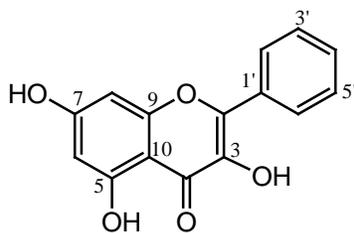
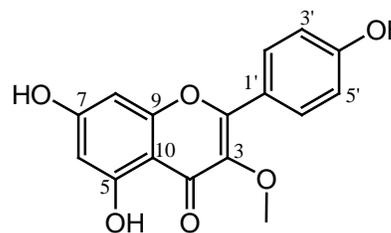
**F15** R = OH  
**F16** R = OCH<sub>3</sub>



**F19** R = OH  
**F20** R = OCH<sub>3</sub>



**F21** R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH  
**F22** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>

**F23 R = OCH<sub>3</sub>****F24 R = H****F26****F27****Flavonas****F28****F30 R = H****F31 R = OH****Flavonoles****F33****F36**

Un cuidadoso análisis del efecto de los sustituyentes en el esqueleto de los distintos flavonoides sobre la actividad giardicida, nos permitió determinar los aspectos más destacados de la relación estructura-actividad, que podemos resumir en los siguientes:

1. Los compuestos con **estructura de chalcona** presentan mejor actividad que las dihidrochalconas y flavanonas, tal como se observa al comparar los valores de  $CI_{50}$  de la chalcona **F3** ( $CI_{50}$  2.6  $\mu\text{g/mL}$ ) con los de su correspondiente dihidrochalcona **F14** ( $CI_{50}$  19.2  $\mu\text{g/mL}$ ), así como la actividad de la chalcona **F5** ( $CI_{50}$  0.02  $\mu\text{g/mL}$ ) con la de la flavanona **F16**

---

(CI<sub>50</sub> 20.4 µg/mL). Ello sugiere que la unidad de C<sub>3</sub> juega un papel importante en la actividad en este tipo de compuesto.

2. El **grado de oxidación** en la molécula juega un papel crucial en la actividad giardicida, ya que aquellos compuestos que presentan cinco posiciones oxidadas resultaron los más activos, lo que es evidente al comparar la actividad de los compuestos **F2** (CI<sub>50</sub> 1.4 µg/mL) y **F1** (CI<sub>50</sub> 2.0 µg/mL) con **F3** (CI<sub>50</sub> 2.6 µg/mL) ó la actividad de **F4** (CI<sub>50</sub> 1.9 µg/mL) y **F5** (CI<sub>50</sub> 0.02 µg/mL) con la de **F6** (CI<sub>50</sub> 3.4 µg/mL).

3. La **regiosustitución de los anillos aromáticos** en el esqueleto de chalcona es un elemento relevante para la actividad, incluso diríamos que crucial, ya que aquellos compuestos con sistema *meta*-oxigenado en ambos anillos presentaron mayor actividad.

Así el análisis del efecto del **sustituyente sobre el anillo A** indicó que:

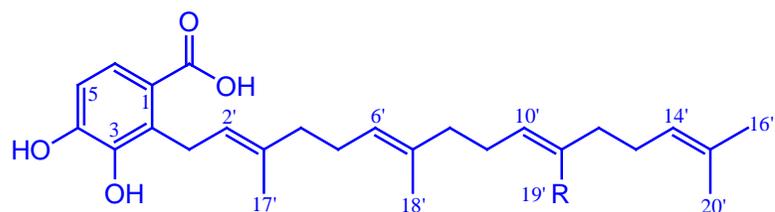
- a) El grupo metoxilo en C-4' es crucial, lo que se pone de manifiesto si comparamos la actividad de **F5** con el correspondiente derivado fenólico **F4**, siendo **F5** del orden de 95 veces más potente que **F4**.
- b) La introducción de un sustituyente en C-3' induce una reducción de la actividad, como se deduce al comparar la actividad de **F1 versus F7** y **F2 versus F8**, en los cuales la sustitución del hidrógeno por un grupo metoxilo conduce a una pérdida de la actividad antiparasitaria. Sin embargo, el mismo tipo de sustitución produce un cambio muy drástico al comparar **F5** con **F9**, ya que **F5**, que presenta un átomo de hidrogeno, resultó del orden de 390 veces más potente que **F9** con un grupo hidroxilo.

El análisis del tipo **sustituyente sobre el anillo B** indica que este juega un papel importante en la actividad, así, un sistema *meta*-oxidado formado por un grupo metoxilo y un hidroxilo son fundamentales para la actividad frente a *G. intestinalis*. La presencia de un segundo grupo funcional con regiosustitución *meta* en el anillo B hace que los compuestos sean muchos más activos, como se deduce al comparar los valores de CI<sub>50</sub> de **F5** y **F6**, siendo **F5** del orden de 170 veces más potente que **F6**.

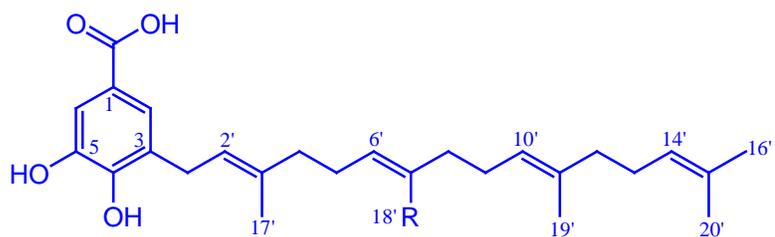
**Actividad giardicida de derivados del ácido benzoico, fenilpropanoides, terpenos, cromano y benzofurano**

La evaluación de la actividad giardicida de tres derivados del ácido benzoico **AB1**, **AB2** y **AB4**, los fenilpropanoides **FP1-FP9**, los terpenos **T3** y **T4**, el cromano **B2** y el benzofurano **B10**, indicó que estos metabolitos eran inactivos ( $CI_{50} > 20 \mu\text{g/mL}$ ).

**Derivados del ácido benzoico**

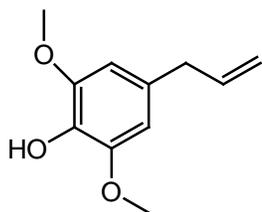


**AB1 R = CH<sub>2</sub>OH**  
**AB2 R = CH<sub>3</sub>**

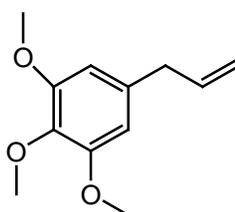


**AB4 R = CH<sub>2</sub>OH**

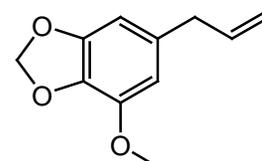
**Fenilpropanoides**



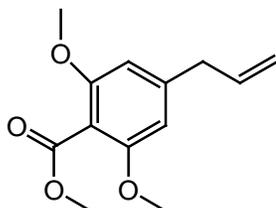
**4-Alil-2,6-dimetoxi-fenol (FP1)**



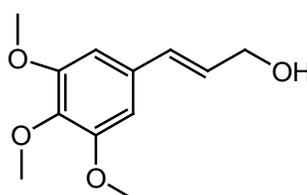
**Elemicina (FP2)**



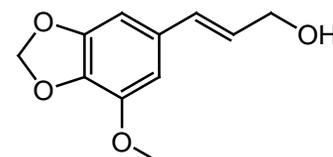
**Miristicina (FP3)**



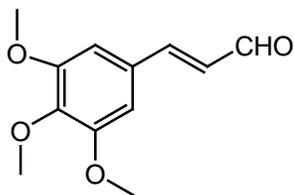
**Acetato de metoxi-eugenol (FP4)**



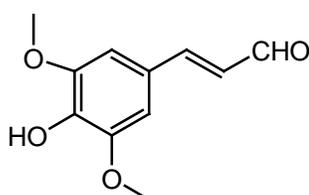
**Alcohol (E)-3,4,5-trimetoxi-cinámico (FP5)**



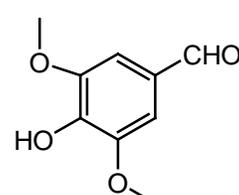
**Anthriscinol (FP6)**



(*E*)-3,4,5-trimetoxi-cinamaldeo (FP7)

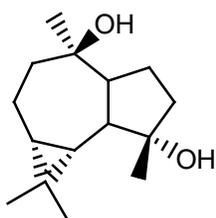


Sinapaldeo (FP8)

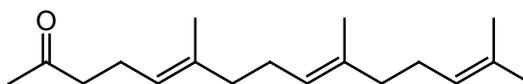


Siringaldeo (FP9)

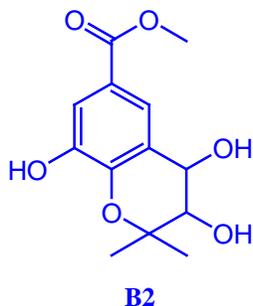
### Terpenos, cromano y benzofurano



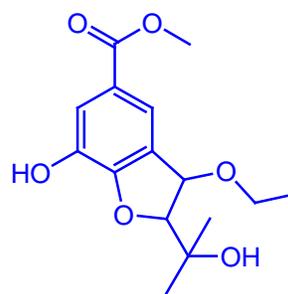
Alloaromadendrano-4 $\alpha$ -10 $\beta$ -diol (T3)



(*E, E*)-Farnesilacetona (T4)



B2



B10

Nuestros resultados muestran que los flavonoides son los compuestos responsables de la actividad antiparasitaria que presenta el extracto etanólico de *P. delineatum*, siendo la chalcona **F5** el compuestos más prometedor, y se perfila como un excelente candidato para futuros estudios dirigidos a explorar su potencial terapéutico en el tratamiento de la giardiasis.



### **7.3. Material y métodos**

### 7.3. Material y métodos

#### Fraccionamiento bioguiado

El material vegetal seco y molido de las especies de *Piper* fueron extraídas por el método de soxhlet con etanol a 96% (4 veces/ 24 h). El residuo obtenido al evaporar el disolvente se resuspendió en agua y extrajo tres veces con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , obteniendo una fracción soluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y una fracción acuosa. La fracción orgánica se llevo a sequedad, obteniéndose una fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fracción acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo (AcOEt), obteniéndose una fracción soluble en AcOEt y una fracción acuosa. La fracción orgánica se llevó a sequedad, obteniéndose así una fracción de AcOEt y una fracción acuosa que fue congelada a  $-50^\circ\text{C}$  y liofilizada.

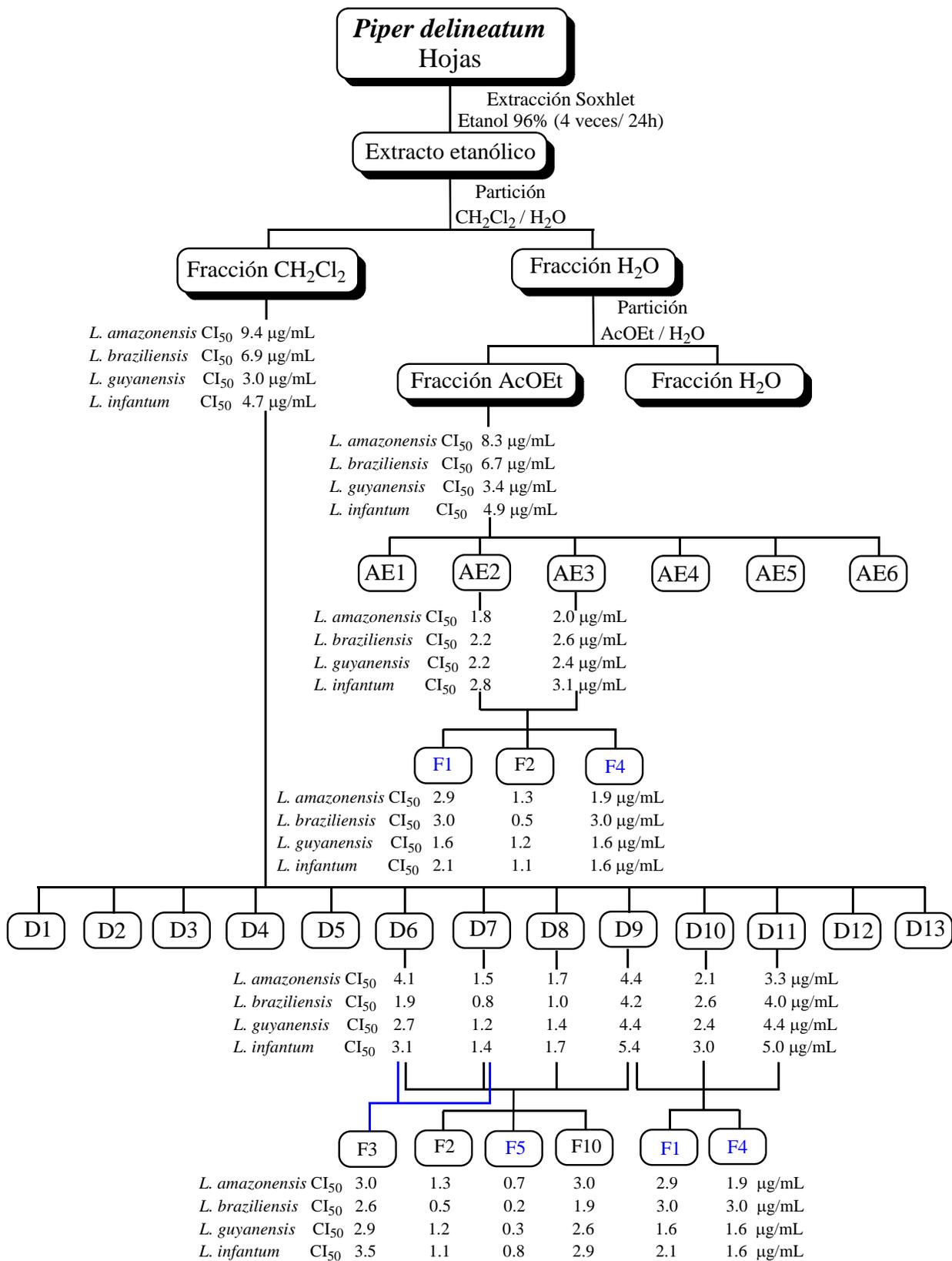
Los extractos y fracciones así obtenidas fueron evaluados frente a cuatro especies de *Leishmania*, así como frente a *Giardia intestinalis*. Posteriormente, las diferentes fracciones activas de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y AcOEt fueron fraccionada por cromatografía líquida por gravedad, obteniéndose numerosas subfracciones (según se detalla en el esquema para cada especie vegetal).

Las subfracciones activas fueron evaluadas frente a cuatro especies de *Leishmania* y *G. intestinalis* y fueron sometidas a sucesivas cromatografías, al objeto de aislar e identificar los metabolitos secundarios presentes en dicha subfracción.

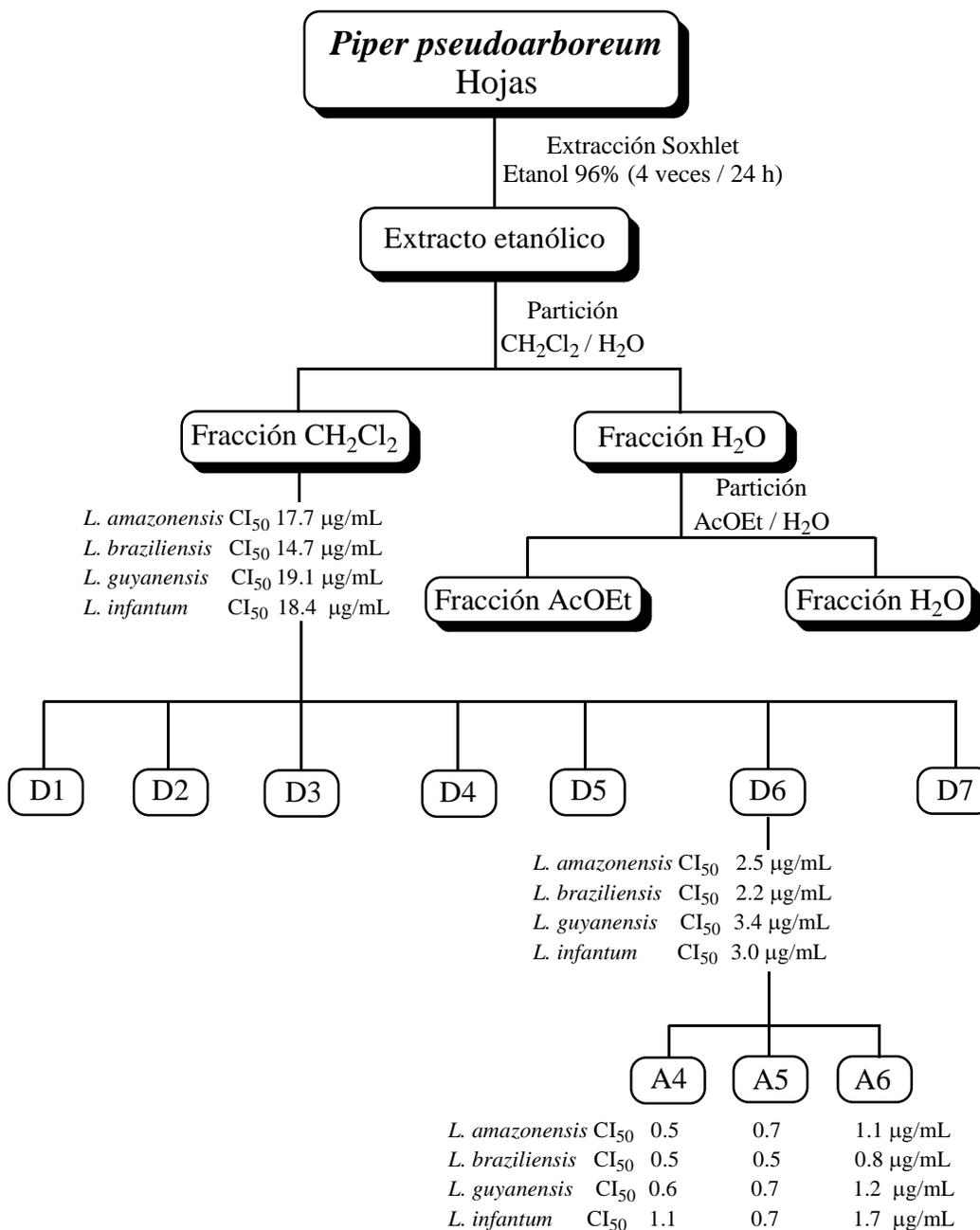
Las restantes subfracciones fueron recromatografiadas utilizando cromatografía de exclusión molecular en Sephadex LH-20 ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH, 1:1), cromatografía flash, cromatografía en capa fina, usando como eluyente diferentes mezclas de *n*-hexano, éter dietílico, diclorometano, acetona, acetato de etilo, isopropanol y metanol, para aislar e identificar los metabolitos presentes en dichas subfracciones.

A continuación se presentan los esquemas (esquemas 6-9) del fraccionamiento bioguiado realizado para el estudio de las especies de *Piper* objeto de este trabajo de investigación.

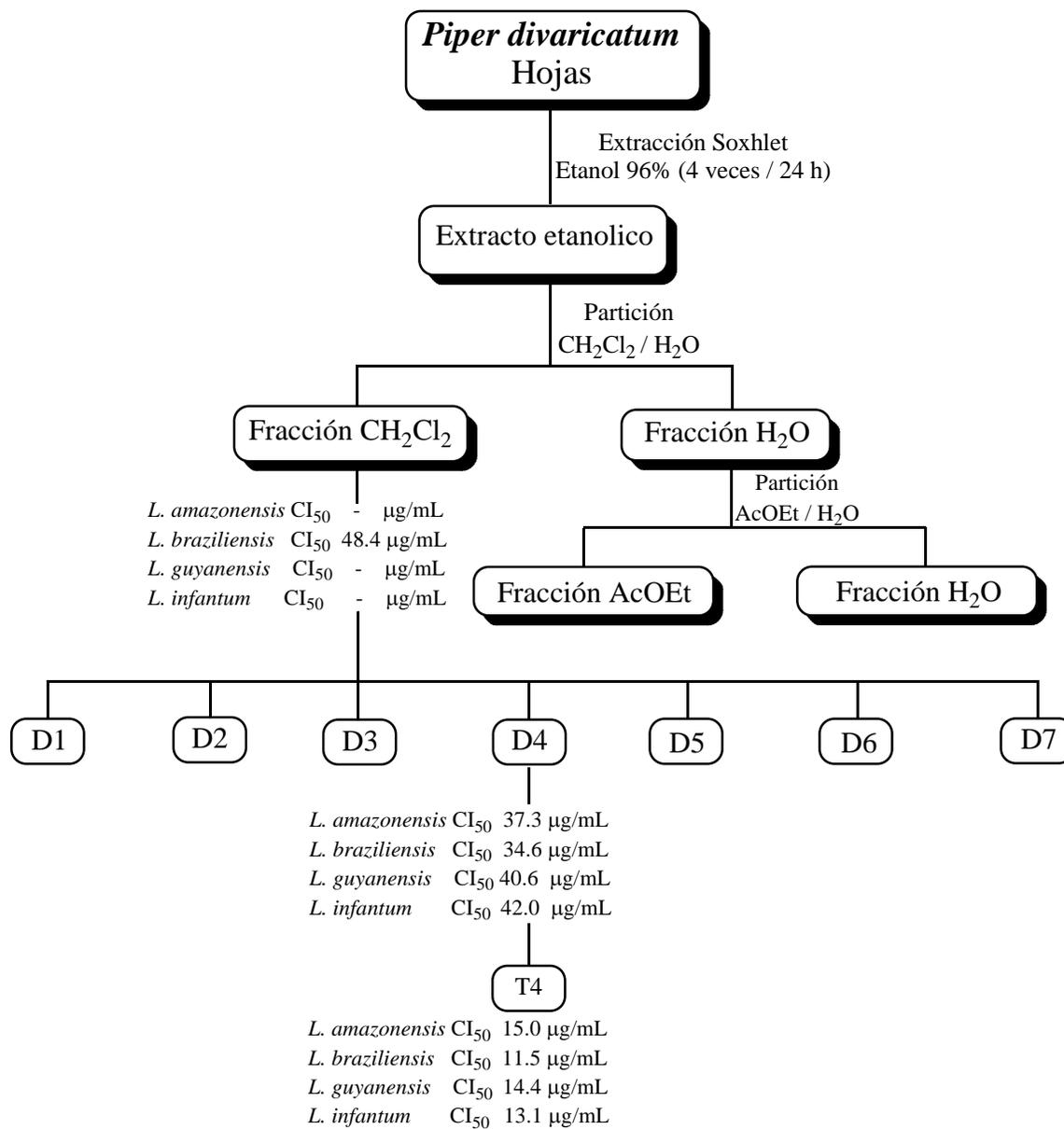
**ESQUEMA 6. Fraccionamiento bioguiado de *P. delineatum* (*Leishmania*)**



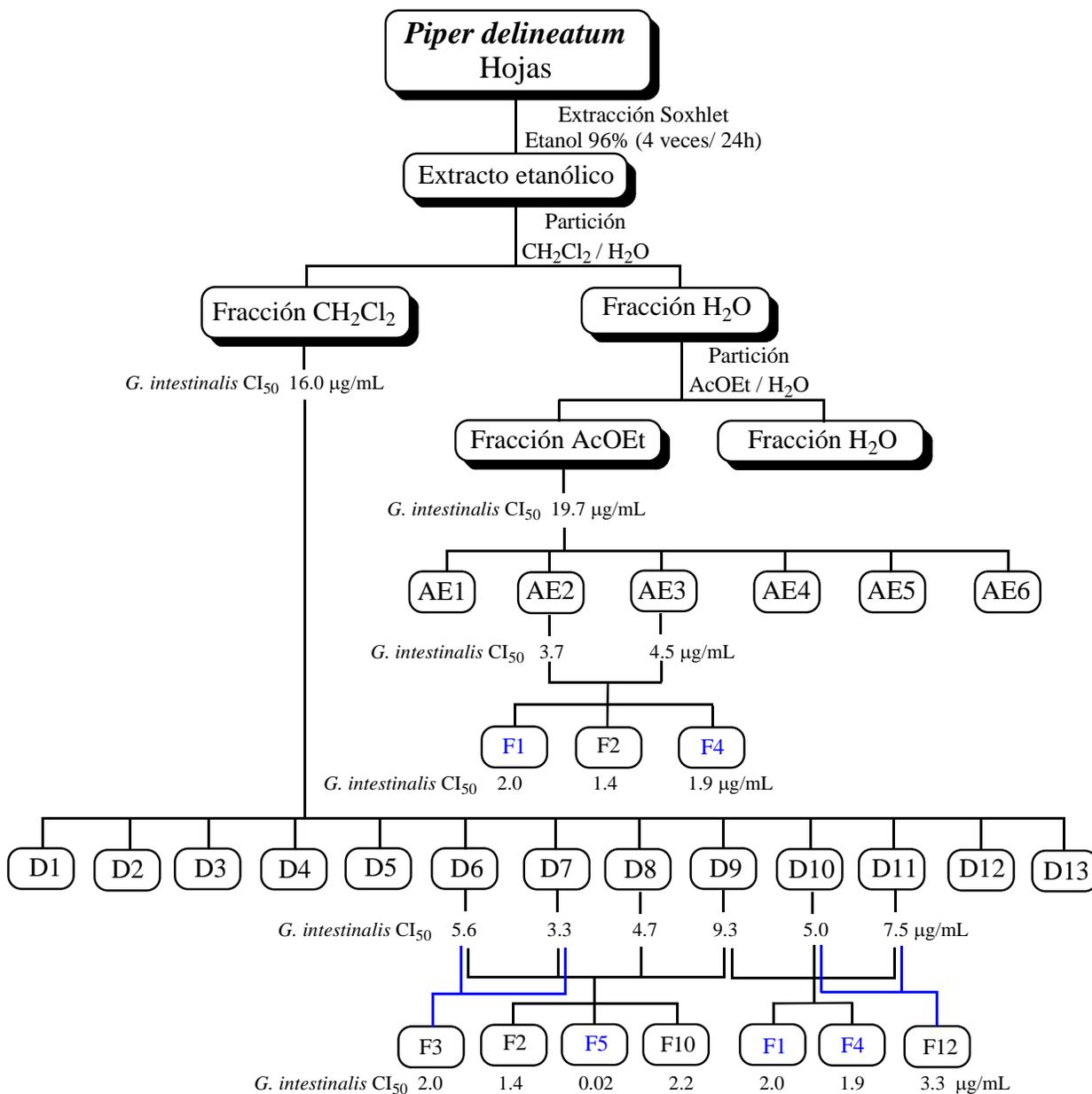
**ESQUEMA 7. Fraccionamiento bioguiado de *P. pseudoarboresum* (*Leishmania*)**



**ESQUEMA 8. Fraccionamiento bioguiado de *P. divaricatum* (*Leishmania*)**



**ESQUEMA 9. Fraccionamiento bioguiado de *P. delineatum* (*Giardia*)**



---

## Actividad leishmanicida y giardicida

Los ensayos de actividad leishmanicida y giardicida *in vitro* fueron realizadas por el Licdo. Pablo Bilbao Ramos, bajo la dirección de la Dra. María Auxiliadora Dea-Ayuela y del Dr. Francisco Bolás Fernández, en el Departamento de Parasitología, de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, España, a través de una colaboración establecida entre ambos grupos de investigación.

Se han evaluado extractos, fracciones, subfracciones y productos de la serie de los flavonoides, amidas, derivados del ácido benzoico, fenilpropanoides, terpenos, cromanos, benzofuranos y ácidos grasos, aislados de las especies *P. delineatum*, *P. pseudoarboresum*, *P. divaricatum*, *P. heterophyllum* y *P. glabratum*, usando la metodología disponible en el laboratorio de la Dra. Dea-Ayuela, según se detalla en los trabajos anteriormente publicados<sup>1</sup>. Estos ensayos fueron realizados mediante el método fluorométrico<sup>2</sup> frente a promastigotes de *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. infantum*), frente a amastigotes intracelulares de *Leishmania* (*L. amazonensis* y *L. infantum*) y los ensayos de citotoxicidad frente a macrófagos murinos j774. Los ensayos de actividad giardicida fueron evaluados frente a trofozoitos de *Giardia intestinalis*, mediante el método fluorométrico<sup>3</sup>.

Los extractos y fracciones de las especies de *Piper glabratum* y *P. heterophyllum* fueron evaluados frente a promastigotes de *Leishmania* (*L. amazonensis* PH8, *L. braziliensis* 2903 y *L. donovani* PP75), según se detalla en la referencia<sup>4</sup>. Estas pruebas fueron realizadas por la Licda. Grace Ruiz, bajo la dirección de la Dra. Ninoska Flores y el Dr. Alberto Giménez T. en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.

---

<sup>1</sup> Dea-Ayuela, M. A.; Castillo, E., Gonzalez-Alvarez, M.; Vega, C.; Rolón, M.; Bolás-Fernández, F.; Borrás, J.; González-Rosende, M. E. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2009**, 17, 7449-7456.

<sup>2</sup> Bilbao-Ramos, P.; Sifontes-Rodriguez, S.; Dea-Ayuela, M. A.; Bolás-Fernández, F. *Journal of Microbiological Methods*. **2012**, 89, 8-11.

<sup>3</sup> Clark, C. G.; Diamond, L. S. *Clinical Microbiology Reviews*. **2002**, 15, 329-341.

<sup>4</sup> Deharo, E.; Ruiz, G.; Vargas, F.; Sagua, H.; Ortega, E.; Rojas, A.; Giménez, A. *Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antichagas y leishmanicidas*. Prisa Ltda-CYTED: La Paz, **2004**.



## **8. CONCLUSIONES**

## 8. CONCLUSIONES

El trabajo de investigación llevado a cabo durante la realización de esta Tesis Doctoral incluye el estudio fitoquímico de las hojas de *Piper delineatum*, *P. pseudoarboreum*, *P. divaricatum*, *P. heterophyllum* y los frutos de *P. glabratrum*, así como el fraccionamiento bioguiado y la evaluación biológica de los metabolitos aislados frente a *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. infantum*) y *Giardia intestinalis*.

De dicha investigación podemos extraer las siguientes conclusiones:

- Se aíslan y determinan las estructuras de treinta y seis flavonoides, trece de ellos con esqueleto de chalcona, una dihidrochalcona, trece flavanonas, cinco flavonas y cuatro flavonoles, resultando nuevos en la bibliografía química once de estos compuestos.
- Se describen las estructuras de dieciséis amidas, una de las cuales resultó nueva en la bibliografía química.
- Así mismo, se aísla y determina la estructura de diez derivados de ácido benzoico, tres de ellos con una unidad de isopreno y siete con unidad de geranilgeranilo, resultando nuevos en la bibliografía cuatro de estos metabolitos.
- Por otro lado, se describen diez metabolitos con esqueleto de cromano, cromeno o benzofurano, seis de los cuales resultaron nuevo en la bibliografía química.
- Asimismo, se aísla y determina la estructura de veintiocho metabolitos anteriormente descritos en la bibliografía química: cinco apocareenos, nueve terpenos, trece fenilpropanoides y un ácido graso hidroxilado. Por otra parte, se han identificado nueve ácidos grasos saturados y un ácido graso insaturado a través de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

- 
- El estudio fitoquímico mediante fraccionamiento bioquímico del extracto, fracciones y subfracciones de las hojas de *Piper delineatum*, *P. pseudoarboreum* y *P. divaricatum*, frente a cuatro especies de *Leishmania*, nos permitió concluir que las hojas de *Piper delineatum* y *P. pseudoarboreum* presentan una potente actividad leishmanicida, y que dicha actividad se debe a la presencia de flavonoides en *P. delineatum* y de alcaloides en *P. pseudoarboreum*.
  - Se evalúa la actividad de veinte flavonoides frente a cuatro especies de *Leishmania*: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. infantum*. Los resultados obtenidos indican que los flavonoides ensayados presentan una potente actividad leishmanicida, resultando nueve chalconas más potentes que la pentamidina usada como control, siendo la chalcona **F5 (2',3-dihidroxi-4',6',5-trimetoxi-chalcona)** del orden de diecisiete veces más potente que la misma, con un IS entre 5.6-19.6 superior a la miltefosina.
  - El análisis preliminar de la relación estructura-actividad nos permitió sacar las siguientes conclusiones: a) Los flavonoides con esqueleto de chalcona son los que mejor actividad presentan. b) La regiosustitución de los anillos aromáticos en el esqueleto de los flavonoides es un elemento importante para la actividad, de tal forma que los compuestos con sistema *meta*-oxigenado presentan mayor actividad que los poseen una sustitución *orto*-oxigenado.
  - Se evalúa la actividad de dieciséis alcaloides frente a cuatro especies de *Leishmania*: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. infantum*. Los resultados obtenidos indican que las alcaloides ensayadas presentan una potente actividad leishmanicida, cabe destacar que cuatro de ellas, **A1, A4, A5 y A6**, presentaron una actividad superior al control, siendo **A4 [(E)-demetoxipiplartina]**, del orden de catorce veces más potente. Las alcaloides **A1, A4, A5 y A6**, presentaron un índice de selectividad > 2.
  - Un cuidadoso análisis del efecto de los sustituyentes en las alcaloides sobre la actividad leishmanicida nos permitió establecer como conclusión que los compuestos con estructura de alcaloide-lactama (**A1, A2, A4-A8**) presentan mejor actividad.

- Los resultados de la actividad leishmanicida indican que la amida **A4** (CI<sub>50</sub> 0.5-1.1 μg/mL) es del orden de dieciséis veces más potente frente a *L. amazonensis* y *L. braziliensis*, y siete veces más potente frente a *L. infantum* que su dihidro-derivado **A2** (7.1-8.3 μg/mL).
- La unidad de C<sub>3</sub> del ácido cinámico, la unidad α,β-insaturada-δ-lactama y el átomo de cloro juegan un papel importante en la actividad leishmanicida de las alcanidas.
- El estudio fitoquímico mediante fraccionamiento bioguiado del extracto, fracciones y subfracciones de las hojas de *Piper delineatum* frente a *Giardia intestinalis*, indicaron que esta especie presenta una potente actividad giardicida, y que los metabolitos responsables de dicha actividad son los flavonoides.
- Se evalúa la actividad de veinte flavonoides frente a *Giardia intestinalis*. Los resultados obtenidos indican que los flavonoides ensayados presentan una potente actividad giardicida, destacando la chalcona **F5** que presentó una actividad del orden de veinte veces superior al control. Por otra parte siete chalconas presentaron una actividad moderada.
- El análisis preliminar de la relación estructura-actividad nos permitió obtener las siguientes conclusiones: La unidad de C<sub>3</sub>, el grado de oxidación y la regiosustitución de los anillos aromáticos juegan un papel importante en la actividad giardicida en los compuestos con esqueleto de flavonoide.
- Finalmente, podemos concluir que, tanto los flavonoides aislados de *Piper delineatum*, las amidas aislados de *Piper pseudoarboreum*, se perfilan como candidatos para posteriores estudios, dirigidos a explorar su potencial como agentes terapéuticos en el tratamiento de la leishmaniasis y giardiasis.

- 
- 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 aun no existen tratamientos adecuados.