

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ALCALOIDES PRESENTES EN DOS ESPECIES DEL
GÉNERO *ZANTHOXYLUM* (RUTACEAE), SÍNTESIS DE ANÁLOGOS
BENZOFENANTRIDÍNICOS Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFUNGICA Y
ANTIBACTERIAL**

OSCAR JAVIER PATIÑO LADINO

**LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES VEGETALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
BOGOTÁ
I-2010**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ALCALOIDES PRESENTES EN DOS ESPECIES DEL
GÉNERO *ZANTHOXYLUM* (RUTACEAE), SÍNTESIS DE ANÁLOGOS
BENZOFENANTRIDÍNICOS Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFUNGICA Y
ANTIBACTERIAL**

**Presentada por: OSCAR JAVIER PATIÑO LADINO
Código: 197977**

**Director: Dr. LUIS ENRIQUE CUCA SUAREZ
Profesor Titular Departamento de Química**

Tesis doctoral sometida como requisito parcial para la obtención del título de
DOCTOR EN CIENCIAS-QUÍMICA
en la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Bogotá, Colombia

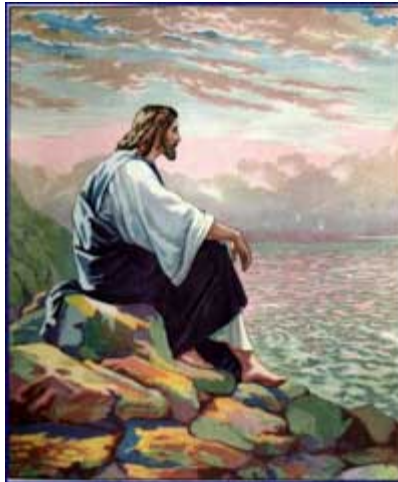
I-2010

AGRADECIMIENTOS

*Agradezco a Dios por darme la vida,
agradezco por estos años vividos.*

*La experiencia adquirida,
la sabiduría que me ha dado,
la dicha de haber llegado hasta aquí.*

*Agradezco el amor de los míos,
el tener a mi padre, hermana y sobrina,
y por los sueños y apoyo que me ha brindado.*



*Agradezco la familia dada,
por las personas puestas en el camino,
profesores, compañeros y amigos.*

*Quiero seguir recorriendo el mundo,
agradeciendo a Dios todo cuanto me ha dado.*

*Agradezco a Dios por permitirme
escribir esta tesis.*

A mi FAMILIA, por su valioso e incondicional apoyo en el logro de mis metas. Por la paciencia y comprensión en el desarrollo de la mi tesis doctoral.

Agradezco al profesor LUIS ENRIQUE CUCA SUÁREZ, por la confianza dada desde mi vinculación al grupo en el 2003. Por las oportunidades brindadas, su dedicación, paciencia, amistad y por su valiosa dirección, orientación y enseñanzas.

Al profesor JOSE MIGUEL AURRECOECHEA agradezco la oportunidad dada para la realización de la pasantía en su grupo de investigación, por su asesoría en el desarrollo sintético de la tesis, por la confianza y amistad brindada.

Agradezco a mi familia de productos naturales vegetales con los que he tenido el placer de compartir en estos años en diferentes momentos y lugares que nos han permitido crecer conjuntamente a nivel personal y profesional (ANDRÉS, ALBERTO, MÓNICA, PATRICIA, RAMSÉS, WILMAN, ERIKA, JUAN DAVID, DIEGO, VÍCTOR, JUAN MANUEL, JULIET, LUDY y JORGE).

A JULIET le doy un agradecimiento especial, adicional a lo mencionado anteriormente, por su gran colaboración en la etapa final de esta tesis.

A la profesora BARBARA MORENO con quien tuve el placer de compartir varias docencias, por su amistad, enseñanzas, consejos y sugerencias.

A los profesores del departamento de química por sus enseñanzas y colaboraciones incondicionales durante el transcurso del doctorado.

Al profesor JOSE MANUEL LOZANO por la asesoría en los ensayos de actividad antibacteriana.

Al químico JUAN DAVID GUZMAN por la recolección de una de las muestras vegetales y por la realización de los ensayos de actividad antituberculosa.

Al profesor JOSE HIPOLITO ISAZA por su colaboración en la obtención de algunos espectros de masas.

A los compañeros de otros grupos de investigación, laboratoristas y personal administrativo que a lo largo de mis estudios de doctorado me brindaron su apoyo y colaboración.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA y a COLCIENCIAS por la financiación del programa doctoral, mediante la convocatoria "Apoyo a la comunidad Científica Nacional, a través de Doctorados-Nacionales año 2005".

A la UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO y al MINISTERIO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ESPAÑA por la financiación de los materiales y reactivos utilizados en el desarrollo sintético de este trabajo.

A la FUNDACION INSTITUTO DE INMUNOLOGIA (FIDIC) por su colaboración en los ensayos de actividad antibacteriana, facilitando las cepas y el material utilizado en los ensayos.

Al INSTITUTO NACIONAL DE SALUD por su colaboracion en los ensayos de actividad antituberculosa, facilitando la cepa y el material utilizado en los ensayo.

Al LABORATORIO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR de la Universidad Nacional de Colombia, por la toma de espectros de RMN.

el CENTRO DE APOYO CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO PARA LA INVESTIGACIÓN (CACTI) de la Universidad de Vigo (España) y al LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LCMS) de la Universidad Nacional de Colombia por la toma de los espectros de masas de baja y/o alta resolucion.

Al HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO de la Universidad Nacional de Colombia por la determinacion taxonómica de las muestras vegetales empleadas en el estudio fitoquimico.

Oscar J. Patiño

CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	v
ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y SIGLAS	ix
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL	xv
1. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE <i>Zanthoxylum quinduense</i> Y <i>Zanthoxylum monophyllum</i>	1
1.1. INTRODUCCIÓN	2
1.2. GENERALIDADES DEL GÉNERO <i>Zanthoxylum</i>	3
1.2.1. Generalidades de la especie <i>Zanthoxylum quinduense</i>	8
1.2.2. Generalidades de la especie <i>Zanthoxylum monophyllum</i>	9
1.3. METODOLOGÍA	12
1.3.1. Procedimientos generales	12
1.3.1.1. Cromatografía	12
1.3.1.2. Técnicas empleadas para la elucidación estructural y caracterización de los compuestos ..	13
1.3.2. Estudio fitoquímico de madera y corteza de <i>Zanthoxylum quinduense</i>	14
1.3.2.1. Material vegetal	14
1.3.2.2. Extracción, fraccionamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en la madera de <i>Z. quinduense</i>	14
1.3.2.3. Extracción, fraccionamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en la corteza de <i>Z. quinduense</i>	16
1.3.3. Estudio fitoquímico de la corteza de <i>Zanthoxylum monophyllum</i>	18
1.3.3.1. Material vegetal	18
1.3.3.2. Extracción, fraccionamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en la corteza de <i>Z. monophyllum</i>	19
1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
1.4.1. Estudio fitoquímico realizado en madera y corteza de <i>Z. quinduense</i>	21
1.4.1.1. Elucidación estructural de los compuestos Z-16 y Z-17	25
1.4.2. Estudio fitoquímico realizado en corteza de <i>Z. monophyllum</i>	33
1.4.2.1. Elucidación estructural del compuesto Z-29	35

CONCLUSIONES	43
REFERENCIAS	44
ANEXOS FITOQUÍMICA	51
2. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS BENZOFENANTRIDÍNICOS	75
2.1. INTRODUCCIÓN	76
2.2. GENERALIDADES EN LA SÍNTESIS DE ANÁLOGOS BENZOFENANTRIDÍNICOS	77
2.3. METODOLOGÍA	86
2.3.1. Procedimientos generales	86
2.3.1.1. Cromatografía	86
2.3.1.2. Técnicas empleadas para la elucidación estructural y caracterización de los compuestos ..	87
2.3.1.3. Disolventes y reactivos	87
2.3.1.4. Técnicas experimentales	88
2.3.2. Preparación de los compuestos.....	88
2.3.2.1. Preparación de los aldehídos	88
2.3.2.2. Preparación de las tetrahidropiridinas.....	89
2.3.2.3. Preparación de espirociclos por ciclación radicalaria.....	90
2.3.2.4. Preparación de análogos por reacción intramolecular de Heck	91
2.3.2.5. Oxidación con DDQ de S-9a y S-10a	93
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	94
2.4.1. Investigación sintética	94
2.4.2. Obtención de la amina S-4	95
2.4.3. Obtención de los arilbutiraldehídos S-1a y S-3a	95
2.4.4. Síntesis de tetrahidropiridinas S-5 y S-6	97
2.4.5. Reacción radicalaria intramolecular para la obtención de los análogos S-7 y S-8	98
2.4.6. Reacción de Heck intramolecular para la obtención de los análogos S-9 y S-10	99
2.4.7. Oxidación con DDQ de S-9a y S-10a	102
CONCLUSIONES	102
REFERENCIAS	103
ANEXOS DE SÍNTESIS	113
3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS AISLADOS Y SINTETIZADOS..	125
3.1. INTRODUCCIÓN	126

3.2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	127
3.2.1. Metodología	129
3.2.1.1. Cepas bacterianas	129
3.2.1.2. Ensayo de actividad antibacteriana por el método de difusión radial	129
3.2.2. Resultados y discusión.....	130
3.3. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	136
3.3.1. Metodología	138
3.3.1.1. Cepa fúngica.....	138
3.3.1.2. Ensayo de actividad antifúngica por el método de bioautografía directa	138
3.3.2. Resultados y discusión.....	138
3.4. ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA	144
3.4.1. Metodología	145
3.4.1.1. Cepa bacteriana	145
3.4.1.2. Ensayo de actividad antituberculosa por el método de microdilución	145
3.4.2. Resultados y discusión.....	146
CONCLUSIONES.....	147
REFERENCIAS	148
 RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS	 155

ÍNDICE DE FIGURAS

1. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *Zanthoxylum quinduense* Y *Zanthoxylum monophyllum*

Figura 1.1. Características morfológicas de algunas especies del género <i>Zanthoxylum</i>	4
Figura 1.2. Distribución geográfica de las especies del género <i>Zanthoxylum</i>	5
Figura 1.3. Principales representantes de los alcaloides benzofenantridínicos.	8
Figura 1.4. Compuestos aislados de la corteza de <i>Z. quinduense</i>	9
Figura 1.5. Compuestos aislados de <i>Z. monophyllum</i> en especímenes no colombianos.....	10
Figura 1.6. Constituyentes químicos encontrados en la especie colombiana de <i>Z. monophyllum</i>	11
Figura 1.7. Esquema general de extracción, fraccionamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en la madera de <i>Z. quinduense</i>	15
Figura 1.8. Esquema general de extracción fraccionamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en la corteza de <i>Zanthoxylum quinduense</i>	17
Figura 1.9. Esquema general de extracción y purificación de los metabolitos secundarios presentes en la corteza de <i>Zanthoxylum monophyllum</i>	20
Figura 1.10. Compuestos aislados de la madera de <i>Z. quinduense</i>	22
Figura 1.11. Compuestos aislados de la fracción de cloroformo para la corteza de <i>Z. quinduense</i>	23
Figura 1.12. Compuestos aislados de la fracción de CHCl ₃ -EtOH para la corteza de <i>Z. quinduense</i> ...	24
Figura 1.13. Espectro de RMN ¹ H de la mezcla de Z-16 y Z-17 (CDCl ₃ -CD ₃ OD, 400 MHz).....	26
Figura 1.14. Espectro de RMN ¹³ C y DEPT 135 de Z-16 y Z-17 (CDCl ₃ -CD ₃ OD, 100 MHz).....	27
Figura 1.15. Espectro HMQC para la mezcla de Z-16 y Z-17 (CDCl ₃ -CD ₃ OD, 400 MHz).....	28
Figura 1.16. Espectro COSY para la mezcla de Z-16 y Z-17 (CDCl ₃ -CD ₃ OD, 400 MHz).....	29
Figura 1.17. Espectro HMBC y para la mezcla de Z-16 y Z-17 (CDCl ₃ -CD ₃ OD, 400 MHz).	30
Figura 1.18. Principales correlaciones en HMBC y NOESY para el compuesto Z-16	30
Figura 1.19. TIC obtenido para la mezcla de Z-16 y Z-17	32
Figura 1.20. Espectros de masas obtenidos por impacto electrónico para Z-16 y Z-17	32
Figura 1.21. Estructura de <i>N</i> -metiltetrahidrocolumbamina y <i>N</i> -metiltetrahidropalmatina.....	33
Figura 1.22. Compuestos aislados de la fracción clorofórmica para <i>Z. monophyllum</i>	34
Figura 1.23. Compuestos aislados de la fracción de CHCl ₃ :EtOH 80:20 para <i>Z. monophyllum</i>	35

Figura 1.24. Espectro RMN ^1H para el compuesto Z-29 (CDCl_3 , 400 MHz)	36
Figura 1.25. Espectro RMN ^{13}C Y DEPT 135 para el compuesto Z-29 (CDCl_3 , 100 MHz).	37
Figura 1.26. Espectro HMQC para el compuesto Z-29 (CDCl_3 , 400 MHz).....	38
Figura 1.27. Espectro COSY para el compuesto Z-29 (CDCl_3 , 400 MHz).....	39
Figura 1.28. Espectro HMBC para el compuesto Z-29 (CDCl_3 , 400 MHz)	40
Figura 1.29. Principales correlaciones en HMBC para el compuesto Z-29	41
Figura 1.30. Espectros de masas por impacto electrónico para el compuesto Z-29	41
Figura 1.31. Espectros de masas por ionización química para el compuesto Z-29	42
Figura 1.32. Estructura de monophyllidina Z-29	42

2. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS BENZOFENANTRIDÍNICOS

Figura 2.1. Tipos de alcaloides benzofenantridínicos encontrados en la naturaleza.	77
Figura 2.2. Rutas de síntesis desarrolladas para alcaloides benzofenantridínicos.	79
Figura 2.3. Algunos tipos de análogos de nitidina 2 sintetizados.	80
Figura 2.4. Ejemplos de análogos de alcaloides benzofenantridínicos sintetizados.....	82
Figura 2.5. Preparación de tetrahidropiridinas	82
Figura 2.6. Estrategia para la formación de análogos de alcaloides	83
Figura 2.7. Alcaloides espirocíclicos del tipo histrionicotoxinas.	84
Figura 2.8. Ruta de síntesis propuesta para la síntesis de análogos de alcaloides	84
Figura 2.9. Ejemplos de reacciones con formación de los intermediario 53 y 54	85
Figura 2.10. Ruta sintética desarrollada para la obtención de análogos de alcaloides	94
Figura 2.11. Preparación de la amina S-4	95
Figura 2.12. Síntesis de unidades de aldehídos sustituidos S-1a y S-3a	96
Figura 2.13. Preparación de tetrahidropiridinas S-5 y S-6	97
Figura 2.14. Preparación de espirociclos por reacción radicalaria.....	98
Figura 2.15. Efectos NOE observados para los compuestos S-7 y S-8	99
Figura 2.16. Preparación de análogos benzofenantridínicos S-9 y S-10	101
Figura 2.17. Efectos NOE observados para los compuestos S-9a , S-9b y S-10a	101

3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS AISLADOS Y SINTETIZADOS

Figura 3.1. Resultados obtenidos con los compuestos naturales contra la cepa <i>E. coli</i>	131
Figura 3.2. Sustancias sintéticas con mayor actividad frente a las cepas <i>Gram (+)</i> y <i>Gram (-)</i>	133
Figura 3.3. Compuestos naturales que presentaron actividad antibacteriana.	135
Figura 3.4. Cultivo de tomate infectado por <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	137
Figura 3.5. Compuestos naturales activos contra <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	141
Figura 3.6. Compuestos sintéticos que presentaron actividad antifúngica	142
Figura 3.7. Fotografías de una cromatoplaaca empleada en el ensayo de actividad antifúngica de los compuestos sintéticos.	143

ÍNDICE DE TABLAS

1. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *Zanthoxylum quinduense* Y *Zanthoxylum monophyllum*

Tabla 1.1. Actividad biológica comprobada en algunas especies del género *Zanthoxylum*. 7

2. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS BENZOFENANTRIDÍNICOS

Tabla 2.1. Condiciones de reacción de la ciclación intramolecular catalizada por paladio. 100

3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS AISLADOS Y SINTETIZADOS

Tabla 3.1. Resultados de actividad antibacteriana para las sustancias naturales y sintéticas. 131

Tabla 3.2. Valores de CMI contra el crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* para las sustancias naturales y sintéticas. 140

Tabla 3.3. Resultados de actividad antituberculosa obtenidos para los compuestos sintéticos... 144

RESUMEN

La investigación fitoquímica representa un potencial inestimable para encontrar nuevos compuestos que puedan ser usados para combatir enfermedades cuyos tratamientos siguen siendo insuficientes y como agroquímicos de bajo impacto ambiental para la agricultura. Los alcaloides benzofenantridínicos son sustancias importantes a nivel fitoquímico y sintético por el amplio espectro de actividades biológicas comprobadas. Su distribución es restringida en plantas, siendo en especies del género *Zanthoxylum* donde se encuentra el mayor número de reportes.

La presente investigación combina estudios fitoquímicos, sintéticos y de actividad biológica preliminar, a fin de contribuir a la búsqueda de compuestos potencialmente útiles. El trabajo comprende aislamiento y caracterización principalmente de los alcaloides presentes en *Z. quinduense* y *Z. monophyllum*, síntesis de nuevos análogos benzofenantridínicos y evaluación de actividad antimicrobiana. La metodología empleada en el estudio fitoquímico involucra extracción de alcaloides asistida por ultrasonido, fraccionamiento y purificación de los metabolitos secundarios por métodos cromatográficos. La ruta sintética desarrollada comprende reacciones de Heck selectivas, reacciones vinílogas de Mannich promovidas por ácidos de Lewis, ciclaciones intramoleculares a partir de enaminas por reacción radicalaria y Heck, y oxidación con DDQ. Las sustancias aisladas y sintetizadas fueron caracterizadas por métodos espectroscópicos, por comparación con datos de la literatura y/o por comparación con muestras auténticas. A los compuestos aislados y sintetizados se les realizó un estudio preliminar de actividad antimicrobiana, para lo cual se evaluó la actividad antibacteriana cualitativa sobre cinco cepas de bacterias patógenas humanas, la actividad antifúngica sobre un hongo fitopatógeno y la actividad antituberculosa.

Del estudio fitoquímico desarrollado en la madera de *Z. quinduense* se aislaron e identificaron tres alcaloides (norqueleritrina **Z-4**, (-)-6-acetonildihidroqueleritrina **Z-5**, decarina **Z-10**), dos bencenoides (*p*-hidroxibenzaldehído **Z-6**, ácido vainillínico **Z-7**), un fenilpropeno (evofolina-C **Z-8**), un lignano ((+)-siringaresinol **Z-9**) y tres esteroides (sitosterol **Z-1**, estigmasterol **Z-2** y campesterol **Z-3**). Como contribución a los estudios fitoquímicos en esta especie, nueve de las diez sustancias aisladas e identificadas (excepto norqueleritrina **Z-4**) son reportadas por primera vez en la madera.

El estudio fitoquímico realizado sobre la corteza de *Z. quinduense* permitió la identificación de doce sustancias, correspondientes a un triterpeno (lupeol **Z-11**) y a once alcaloides isoquinolínicos de los cuales seis son benzofenantridínicos (norqueleritrina **Z-4**, (-)-6-acetonildihidroqueleritrina **Z-5**, decarina **Z-10**, nornitidina **Z-12**, (-)-6-carboximetildihidroqueleritrina **Z-13** y queleritrina **Z-14**), dos bencilisoquinolínicos ((-)-isotembetarina **Z-18** y (-)-xylopinidina **Z-19**), dos tetrahidroprotoberberínicos (*N*-metilitetrahidrocolumbamina **Z-16**, *N*-metiltetrahidropalmatina **Z-17**) y uno berberínico (berberina **Z-15**). Estos resultados contribuyen a las investigaciones en fitoquímica mediante el reporte por primera vez de once compuestos para la especie. Con el trabajo desarrollado en *Z. quinduense* se determinó la existencia de alcaloides, lignanos, fenilpropenos, bencenoides, esteroides y triterpenos como constituyentes de la madera y/o corteza de esta especie.

La investigación fitoquímica llevada a cabo en la corteza de *Z. monophyllum* permitió identificar dieciséis sustancias, correspondientes a siete alcaloides (norqueleritrina **Z-4**, decarina **Z-10**, nornitidina **Z-12**, berberina **Z-15**, thalifolina **Z-25**, jathrorrizina **Z-27** y (-)-monophyllidina **Z-29**), dos lignanos ((+)-siringaresinol **Z-9** e (-)-hinokinina **Z-22**), tres cumarinas ((-)-columbianetina **Z-23**, (+)-marmesina **Z-24** y (+)-ulopterol **Z-26**), dos bencenoides (xanthoxylina **Z-20** y 2-hidroxi-4,6-dimetoxibenzaldehído **Z-21**), un triterpeno (lupeol **Z-11**) y un esteroide (3 β -glucositosterol **Z-28**). El aporte de este estudio fitoquímico a las investigaciones desarrolladas en este campo son el reporte por primera vez de diez compuestos para la especie, incluyendo el nuevo alcaloide (-)-monophyllidina **Z-29**.

Una ruta sintética para la preparación de una nueva clase de análogos benzofenantridínicos fue desarrollada, en la que fueron sintetizados once nuevos compuestos. La metodología empleada comprende la obtención de una enamina cíclica (**S-5** o **S-6**) por condensación entre una amina (**S-4**) y un aldehído (**S-1** o **S-3**) apropiadamente sustituidos, seguido por una reacción de Heck intramolecular sobre la enamina y finalmente oxidación con DDQ para formar los análogos benzofenantridínicos (**S-11** o **S-12**). Adicionalmente, se realizó una reacción radicalaria intramolecular sobre la enamina cíclica (**S-5** o **S-6**), obteniéndose un nuevo tipo de compuestos espirocíclicos (**S-7** o **S-8**) de manera altamente regio- y estereoselectiva cuya subestructura azaespirocíclica está presente en algunos alcaloides naturales, por ejemplo, los aislados de la piel de la rana *Dendrobates histrionicus*. Los métodos desarrollados son eficientes, dan buenos rendimientos y son un buen camino para la síntesis de una

nueva clase de análogos de alcaloides. Además, los núcleos obtenidos pueden ser modificados estructuralmente y permiten la introducción de diversos sustituyentes que darían paso a una serie muy interesante de compuestos para futuros estudios de estructura-actividad.

La actividad antibacteriana se evaluó por el método de difusión radial contra cepas de bacterias estándar *Gram (+)*: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Gram (-)*: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium*, cepas ATCC 14028s y MS7953. De las 26 sustancias naturales evaluadas, 14 causaron algún grado de inhibición del crecimiento bacteriano. El alcaloide benzofenantridínico queleritrina **Z-14**, presentó la mayor actividad, inhibiendo el crecimiento de las cinco cepas con halos de inhibición comparables o superiores a los exhibidos por los controles positivos. De las 12 sustancias sintéticas evaluadas, 10 presentaron actividad antibacteriana. La mayoría de estos compuestos solo inhibieron el crecimiento de la bacteria *Gram (-)* *S. typhimurium* MS7953. Las mezclas de los arilbutiraldehídos (**S-1** y **S-3**) precursores de los análogos alcaloidales presentaron una actividad antibacteriana significativa sobre las cepas *Gram (+)* y *Gram (-)*.

La actividad antifúngica fue evaluada por el método de bioautografía directa contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*. De las 38 sustancias evaluadas, solo 13 presentaron algún grado de actividad inhibitoria sobre el crecimiento del hongo, siendo las más promisorias, queleritrina **Z-14** con CMI de 1 µg y las mezclas de arilbutiraldehídos **S-1** y **S-3** con CMI de 2 y 5 µg, respectivamente.

A los compuestos sintetizados se les determinó su actividad antituberculosa por el método de microdilución. La mezcla de análogos benzofenantridínicos **S-10** (CMI = 8 µg/mL) y la mezcla de aldehídos **S-3** (CMI = 16 µg/mL) fueron las sustancias que presentaron la mayor actividad en el ensayo colorimétrico contra *Mycobacterium tuberculosis*.

Los resultados obtenidos en el estudio preliminar de actividad antimicrobiana para las sustancias naturales y sintéticas, contribuyen al conocimiento de las propiedades biológicas de las mismas, pues a la mayoría no se les han reportado estudios de bioactividad contra los microorganismos empleados en esta investigación. Adicionalmente, la promisoriosa actividad antimicrobiana exhibida por algunas de las sustancias evaluadas, sirven de base para continuar con ensayos de actividad más específicos, a fin de determinar la utilidad de estas sustancias a nivel terapéutico y/o agrícola.

ABSTRACT

The phytochemical investigation represents a big potential to find new compounds that can be used to fight diseases where treatments are still insufficient and as agrochemicals of low environmental impact for agriculture. Benzophenanthridine alkaloids are important substances in phytochemistry and organic synthesis for their broad spectrum of biological activities tested. Its distribution is restricted in plants, being in the genus *Zanthoxylum* where find are the largest number of reports.

This research combines phytochemical, synthetic and preliminary biological activity studies, in order to contribute to the search for potentially useful compounds. The work comprises mainly isolation and characterization of the alkaloids present in *Z. quinduense* and *Z. monophyllum*, synthesis of new benzophenanthridine analogues and evaluation of antimicrobial activity. The methodology used in the phytochemical study involves alkaloids extraction assisted by ultrasound, fractionation and purification of secondary metabolites by chromatographic methods. The developed synthetic route involves selective Heck reactions, vinilogue Mannich reactions promoted by Lewis acids, intramolecular cyclization from enamines by radical and Heck reactions. Isolated and synthesized substances were characterized by spectroscopic methods, by comparison with literature data and /or by comparison with authentic samples. With the isolated and synthesized compounds were made a preliminary study of antimicrobial activity, for which was assessed qualitative antibacterial activity against five strains of human pathogenic bacteria, the antifungal activity against a plant pathogenic fungus and antituberculosis activity.

From the phytochemical study developed in the wood of *Z. quinduense* were isolated and identified three alkaloids (norchelerythrine **Z-4**, (-)-6-acetyldihydrochelerythrine **Z-5**, decarine **Z-10**), two benzenoid (*p*-hydroxybenzaldehyde **Z-6**, vanillic acid **Z-7**), a phenylpropene (evofolin-C **Z-8**), a lignan ((+)-syringaresinol **Z-9**) and three sterols (sitosterol **Z-1**, stigmasterol **Z-2** and campesterol **Z-3**). As a contribution to the phytochemical studies on this species, nine of the ten substances isolated and identified (except norchelerythrine **Z-4**) are reported for the first time in the wood.

The phytochemical study performed on the bark of *Z. quinduense* allowed the isolation and identification of twelve substances, corresponding to a triterpene (lupeol **Z-11**) and eleven isoquinoline alkaloids of which six are benzophenanthridines (norchelerythrine **Z-4**, (-)-6-acetyldihydrochelerythrine **Z-5**, decarine **Z-10**, nornitidine **Z-12**, (-)-6-carboximethyldihydrochelerythrine **Z-13** and chelerythrine **Z-14**), two benzylisoquinolines ((-)-isotembetarine **Z-18** y (-)-xylopinidine **Z-19**), two tetrahydroprotoberberines (*N*-methyltetrahydrocolumbamine **Z-16**, *N*-methyltetrahydropalmatine **Z-17**) and a berberine (berberine **Z-15**). These results contribute to research in phytochemistry through the first report of eleven compounds for the species. With the work developed in *Z. quinduense* determined the presence of alkaloids, lignans, phenylpropenes, benzenoid, sterols and triterpenes as constituents of wood and/or bark of this species.

Phytochemical research made in the bark of *Z. monophyllum* allowed the isolation and identification of sixteen substances, corresponding to seven alkaloids (norchelerythrine **Z-4**, decarine **Z-10**, nornitidine **Z-12**, berberine **Z-15**, thalifoline **Z-25**, jatrorrhizine **Z-27** and (-)-monophyllidine **Z-29**), two lignans ((+)-syringaresinol **Z-9** and (-)-hinokinine **Z-22**), three coumarins ((-)-columbianetin **Z-23**, (+)-marmesin **Z-24** and (+)-ulopterol **Z-26**), two benzenoid (xanthoxyline **Z-20** and 2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzaldehyde **Z-24**), a triterpene (lupeol **Z-11**) and a sterol (3 β -glucositosterol **Z-28**). The contribution of this phytochemical study to the research undertaken in this area is the report of ten compounds for the first time to the species, including the new alkaloid (-)-monophyllidine **Z-29**.

A new synthetic route for the preparation of benzophenanthridine analogues was developed, in which eleven new compounds were synthesized. The methodology includes obtaining a cyclic enamine (**S-5** or **S-6**) by condensation between an amine (**S-4**) and an aldehyde (**S-1** or **S-3**) properly substituted, followed by an intramolecular Heck reaction over the enamine and finally the oxidation with DDQ to form benzophenanthridine analogues (**S-11** or **S-12**). Additionally, was made a radical intramolecular reaction on the cyclic enamine (**S-5** or **S-6**), where were obtaining a new class of spirocyclic compounds (**S-7** or **S-8**) with high regio- and stereoselectivity. The azaspirocyclic substructure is present in some natural alkaloids, for example, the isolated from the skin of the frog *Dendrobates histrionicus*. The developed methods are effective, give good yields and are good way for the synthesis of a new class of alkaloids analogues. In addition, the cores obtained can be modified

structurally and allow the introduction of different substituents, leading to a very interesting series of compounds for future studies of structure-activity.

The antibacterial activity was evaluated by radial diffusion method against standard strains of *Gram (+)* bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Gram (-)* bacteria: *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella typhimurium*, strains ATCC 14028s and MS7953. Of the 26 natural substances evaluated, 14 caused some degree of inhibition of bacterial growth. The benzophenanthridine alkaloid chelerythrine **Z-14**, showed the highest activity, inhibiting the growth of five strains with inhibition zones comparable or superior to those exhibited by the positive controls. Of the 12 synthetic substances evaluated, 10 showed antibacterial activity. Most of these compounds inhibit growth of *Gram (-)* *S. typhimurium* MS7953. The arylbutiraldehydes (**S-1** and **S-3**) precursors of alkaloid analogues showed significant antibacterial activity on *Gram (+)* and *Gram (-)* bacterial strains.

The antifungal activity was evaluated by direct bioautography method of against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*. Of the 38 substances evaluated, only 13 showed some degree of inhibitory activity on fungal growth. The most promising substances were chelerythrine **Z-14** with MIQ of 1 µg and mixtures of arylbutiraldehydes **S-1** and **S-3** with MIQ of 2 and 5 µg, respectively.

Synthesized compounds were determined the antituberculosis activity by microdilution method. The mixture of benzophenanthridine analogues **S-10** (MIC = 8 µg/mL) and the mixture of aldehydes **S-3** (MIC = 16 µg/mL) were the substances that had the highest activity in the colorimetric assay against *Mycobacterium tuberculosis*.

The results obtained in the preliminary study of antimicrobial activity for natural and synthetic substances, contribute to the knowledge of the biological properties of the same, since most are not reported studies of bioactivity against microorganisms used in this research. Additionally, the promising antimicrobial activity exhibited by some of the substances evaluated, provide a basis for further more specific activity assays, to determine the usefulness of these substances in medicine and/or agriculture.

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y SIGLAS

AcOEt	Acetato de etilo
AIBN	2, 2'-azobisisobutironitrilo
ATCC	American Type Culture Collection
Bn	Bencilo
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
(Boc)₂O	Carbonato de di- <i>tert</i> -butilo
Bu₄NCl	Cloruro de tetrabutilamonio
°C	Grado Celcius
c	Cuarteto
CACTI	Centro de Apoyo Científico y Tecnológico a la Investigación
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCDP	Cromatografía en capa delgada preparativa
CF	Cromatografía flash
CDCl₃	Cloroformo deuterado
(CD₃)₂CO	Acetona deuterada
CD₃OD	Metanol deuterado
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CI₅₀	Concentración inhibitoria del crecimiento de la población en 50%
CL₅₀	Concentración letal para el 50% de la población
cm⁻¹	Centímetros inversos
CMI	Concentración mínima inhibitoria o cantidad mínima inhibitoria
COSY	Correlation Spectroscopy
d.i.	Diámetro interno
d	Doblete
da	Doblete ancho
dd	Doble doblete

dt	Doble triplete
DDQ	2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-<i>d</i>6	Dimetilsulfóxido deuterado
DO	Densidad óptica
eq.	Equivalentes
EP	Éter de petróleo
EM	Espectrometría de masas
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
ESI	Ionización por electrospray
Et₃N	Trietilamina
Et₂O	Éter etílico
EtOH	Etanol
FIDIC	Fundación Instituto de Inmunología de Colombia
f. sp.	Forma especial
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HPLC-UV-DAD	Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector ultravioleta–visible de arreglo de diodos
Hz	Hertz
IE	Impacto electrónico
IR	Espectroscopia infrarroja
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LB	Base Luria Broth
LCMS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LC-MS-IT-TOF	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas empleando trampa de iones y detección de tiempo de vuelo.

L-L	Líquido-Líquido
m	Multiplete
m/z	Relación masa/carga
msnm	Metros sobre el nivel del mar
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
MOMCl	Clorometil metil éter
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio
<i>n</i>-BuLi	<i>n</i> -Butillitio
NaOAc	Acetato de sodio
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
(<i>o</i>-Tolil)₃P	Tri- <i>o</i> -tolilfosfina
OADC	Ácido oleico, albúmina, dextrosa, catalasa
ppm	Partes por millón
Pd(AcO)₂	Acetato de paladio
P(Ph)₃	Trifenilfosfina
(PPh₃)₄Pd	Tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0)
PBS	Buffer de fosfato salino
PDA	Medio de agar-papa-dextrosa
quint.	Quinteto
RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
s	Singlete
sa	Singlete ancho
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
t_R	Tiempo de retención
TB	Tuberculosis

TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TIC	Total ion current
TIOAc	Acetato de talio
T.M	Tamiz molecular
TMS	Tetrametilsilano
TMSOF	Trimetilsililoxifurano
TMSOTf	Triflato de trimetilsililo
TSB	Tripticasa de soya
TTMSS	Tris(trimetilsilil)silano
UFC	Unidades formadoras de colonia
UV	Ultravioleta
VRE	Vancomycin-Resistant <i>Enterococcus</i>
[α]	Rotación óptica
δ	Desplazamiento químico
δ_C	Desplazamiento químico en ^{13}C
δ_H	Desplazamiento químico en ^1H

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Parte de los resultados obtenidos de la presente tesis doctoral han sido objeto de las siguientes publicaciones:

1. Patiño, O. J., Cuca, L. E. Estudio Fitoquímico de la Especie *Zanthoxylum quinduense* (Rutaceae). *Scientia Et Technica*, **2007**, 33, 171-172.
2. Aurrecoechea, J. M., Coy, C. A., and Patiño, O. J. Divergent Pd-Catalyzed and Radical Cyclizations of Nucleophilic Cyclic Enamines Derived from Functionalized Amine and Aldehyde Fragments. *Journal of Organic Chemistry* **2008**, 73, 5194-5197.
3. Patiño, O. J., Cuca, L. E. Chemical Constituents of the Wood of *Zanthoxylum quinduense* Tul. (Rutaceae). *Química Nova* **2010**, 33, 1019-1021.
4. Patiño, O. J., Cuca, L. E. Isoquinoline Alkaloids of *Zanthoxylum quinduense* (Rutaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **2010**, (Aceptado).
5. Patiño, O. J., Cuca, L. E. Chemical Constituents of *Zanthoxylum monophyllum* (Rutaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **2010**, (Sometido).
6. Patiño, O. J., Cuca, L. E. Monophyllidin, a New Alkaloid L-Proline Derivative from *Zanthoxylum monophyllum* (Rutaceae). *Phytochemistry Letters* **2010**, (Sometido).
7. Patiño, O. J., Cuca, L. E. Actividad antifúngica frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* de alcaloides aislados de dos especies del género *Zanthoxylum*. *Química Nova* **2010**, (Sometido).
8. Patiño, O. J., Cuca, L. E. Propiedades antibacterianas *in vitro* de metabolitos secundarios aislados de dos especies del género *Zanthoxylum* (Rutaceae). *Revista Cubana de Farmacia* **2010**, (Sometido).

Así mismo se ha participado en los siguientes congresos como ponente:

1. Patiño, O. J.; Cuca, L. E. Alcaloides Presentes en dos Especies del Género *Zanthoxylum*, Síntesis de Análogos Benzofenantridínicos y Evaluación de Actividad Antimicrobiana. X Congreso Colombiano de Fitoquímica. Popayán, Colombia, **2009**. Participación en modalidad oral.
2. Patiño, O. J.; Cuca, L. E. Síntesis y Actividad Antimicrobiana de Nuevos Análogos Benzofenantridínicos. X Congreso Colombiano de Fitoquímica. Popayán, Colombia, **2009**. Participación en modalidad poster.
3. Patiño, O. J.; Cuca, L. E. Constituyentes Químicos Presentes en *Zanthoxylum monophyllum* (Rutaceae). X Congreso Colombiano de Fitoquímica. Popayán, Colombia, **2009**. Participación en modalidad poster.
4. Patiño, O. J.; Cuca, L. E. Alcaloides Isoquinolinícos Aislados de la Corteza de *Zanthoxylum quinduense* (Rutaceae). X Congreso Colombiano de Fitoquímica. Popayán, Colombia, **2009**. Participación en modalidad poster.
5. Patiño, O. J.; Cuca, L. E.; Aurrecoechea, J. M. Aislamiento e Identificación de Alcaloides Presentes en la Corteza de *Zanthoxylum monophyllum* y Síntesis de Nuevos Análogos Mediante Reacción Radicalaría Intramolecular. XXVIII Congreso Latinoamericano de Química. San Juan, Puerto Rico, **2008**. Participación en modalidad poster.
6. Patiño, O. J.; Cuca, L. E. Estudio Fitoquímico de la Especie *Zanthoxylum quinduense* (Rutaceae). IX Congreso Colombiano de Fitoquímica. Pereira, Colombia, **2007**. Participación en modalidad poster.
7. Patiño, O. J.; Cuca, L. E. Metabolitos Aislados en el Género *Zanthoxylum*. XIV Congreso Colombiano de Química. Armenia, Colombia, **2006**. Participación en modalidad poster.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los productos naturales se han utilizado por miles de años para el beneficio de la humanidad, ya sea para alimentos, ropa, cosméticos, construcciones, herramientas, como medicamentos y agentes de protección de cultivos. Han hecho enormes contribuciones a la salud humana a través de compuestos como la quinina, la morfina, la aspirina (un análogo de un producto natural), digitoxina y muchos otros (Cragg *et al.*, 2005). Las investigaciones en este campo son cada vez más numerosas, a tal punto que en los últimos años más de la mitad de los productos farmacéuticos usados son derivados de fuentes naturales, al igual que un número importante de pesticidas (Newman y Cragg, 2007). La importancia de los productos naturales se debe a que son fuente de nuevos compuestos debido a la producción de diversos metabolitos secundarios bioactivos por parte de las plantas e invertebrados marinos como defensa química, han proporcionado muchos medicamentos nuevos, algunos de los cuales son inaccesibles por otras vías, estos pueden proporcionar las plantillas necesarias para el diseño de nuevos productos en el futuro y por ultimo contribuyen a la sistemática de los organismos (Colegate y Molyneux, 2008; Kaufman *et al.*, 2006; Cragg *et al.*, 2005).

Las necesidades terapéuticas insatisfechas en el tratamiento de infecciones bacterianas, parasitarias, virales y fúngicas, el cáncer, el Alzheimer y el SIDA, entre otras enfermedades, han conducido a que la búsqueda de nuevas sustancias con aplicaciones terapéuticas sea indispensable, pues si bien, para la mayoría de enfermedades existe algún tratamiento, muchos de estos son o han empezado a ser insuficientes debido al desarrollo de resistencia a los fármacos que en un principio fueron efectivos y a la baja seguridad que muchos medicamentos presentan para los pacientes. En consecuencia, el desarrollo de alternativas terapéuticas, eficaces y seguras, es esencial para garantizar la disponibilidad de nuevos productos que reduzcan la mortalidad y morbilidad derivadas de estas y otras enfermedades (Pan *et al.*, 2009; Nwaka y Hudson, 2006; Segal y Elad, 2006; Waldvogel, 2004).

La búsqueda de nuevos biocontroladores que permitan tratar plagas y enfermedades que afectan a muchas plantas fuentes de alimento y/o de uso industrial es también de gran interés, pues el uso indiscriminado y permanente de agroquímicos ha conllevado a la aparición de plagas y microorganismos fitopatógenos resistentes, que pueden causar la pérdida parcial o completa de

cultivos (Agris, 2005; Strand, 2000).

El desarrollo de nuevos compuestos potencialmente útiles resulta indispensable para luchar contra estas problemáticas. Con este fin, la investigación en las plantas representa una fuente inestimable para el descubrimiento de nuevas sustancias, si se considera que cada una de estas puede contener centenares, o incluso millares de metabolitos secundarios. De las 250.000 a 300.000 especies vegetales reportadas, solamente una pequeña parte ha sido objeto de estudios fitoquímicos y de sus propiedades biológicas (Tringali, 2001).

Junto con la fitoquímica, la síntesis juega un papel importante en la búsqueda de nuevas sustancias, pues con el desarrollo de nuevas metodologías ha sido posible encontrar análogos de productos naturales con mayor acción biológica y menor toxicidad. Por ejemplo los alcaloides son una clase de metabolitos secundarios de gran interés para los investigadores debido a sus diversas estructuras, diferentes distribuciones en la naturaleza y a la importante actividad biológica que presentan. La síntesis de este tipo de compuestos y análogos es una importante área en la química de heterociclos, a fin de encontrar sustancias con óptimas relaciones de actividad/toxicidad (Tillequin, 2007).

En este contexto, el presente trabajo se planteo con el objetivo de contribuir a las investigaciones dirigidas en la búsqueda de sustancias con posible uso potencial en el campo medicinal y/o agrícola mediante un estudio que comprende fitoquímica, síntesis orgánica y bioensayos preliminares, para lo cual se propuso realizar el aislamiento y caracterización de los alcaloides presentes en dos especies del género *Zanthoxylum* (*Z. quinduense* y *Z. monophyllum*), desarrollar una ruta de síntesis para la preparación de una nueva clase de análogos benzofenantridínicos y evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados y sintetizados.

La tesis doctoral está dividida en tres capítulos. El capítulo 1 describe el estudio fitoquímico realizado para la búsqueda de alcaloides en las especies *Z. quinduense* y *Z. monophyllum*, contribuyendo así a las investigaciones en este campo para especies pertenecientes al género *Zanthoxylum* distribuido en Colombia. En el capítulo 2 se describe la ruta de síntesis desarrollada para la obtención de una nueva clase de análogos alcaloidales, con lo que se hace un aporte a las investigaciones sintéticas de alcaloides y de sus análogos. Por último en el capítulo 3 se presentan los resultados obtenidos en los

bioensayos preliminares de actividad antibacteriana, antifúngica y antituberculosa para los compuestos aislados y sintetizados con lo que se contribuye a la caracterización biológica de estas sustancias.

REFERENCIAS

Agrios, G. *Plant Pathology*. Quinta Edición. Elsevier Academic Press. USA. **2005**, pp. 4-5.

Colegate, S. M.; Molyneux, R. J. *An Introduction and Overview*. En S. M. Colegate; R. J. Molyneux, (Eds), *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination*. Segunda Edición. CRC Press. New York. **2008**, pp. 1-3.

Cragg, G. M.; Kingston, D. G. I.; Newman, D. J. (Eds). *Anticancer Agents from Natural Products*. Taylor & Francis Group, New York. **2005**, pp. 1-3.

Kaufman, P. B.; Kirakosyan, A.; McKenzie, M.; Dayanandan, P.; Hoyt, J. E.; Li, C. *The Uses of Plant Natural Products by Humans and Risks Associated with Their Use*. En L. Cseke; A. Kirakosyan; P. Kaufman; S. Warber; J. Duke; H. Brielmann, (Eds), *Natural Products from Plants*. CRC Taylor & Francis. New York. **2006**, pp. 442-468.

Nwaka, S.; Hudson, A. Innovative Lead Discovery Strategies for Tropical Diseases. *Nature Rev. Drug Discov.* **2006**, 5, 941-955.

Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.*, **2007**, 70, 461-477.

Pan, L; Chay, H.; Kinghorn, A. D. The Continuing Search for Antitumor Agents from Higher Plants. *Phytochem. Lett.* **2009**, In Press.

Segal, E.; Elad, D. Fungal Vaccines and Immunotherapy. *J. Mycol. Med.* **2006**, 16, 134-151.

Strand, J. F. Some Agrometeorological Aspects of Pest and Disease Management for the 21st Century. *Agr. Forest Meteorol.* **2000**, 103, 73-82.

Tillequin, F.; Rutaceous Alkaloids as Models for the Design of Novel Antitumor Drugs. *Phytochem. Rev.* **2007**, 6, 65-70.

Tringali, C. (Ed). Bioactive Compounds from Natural Sources: Isolation, Characterization and Biological Properties. Taylor & Francis. Londres. **2001**, pp. ix-x.

Waldvogel, F. Infectious Diseases in the 21st Century: Old Challenges and New Opportunities. *Int. J. Infect. Dis.* **2004**, 8, 5-12.

1. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *Zanthoxylum quinduense* Y *Zanthoxylum monophyllum*.

1.1. INTRODUCCIÓN

1.2. GENERALIDADES DEL GÉNERO *Zanthoxylum*.

1.2.1. Generalidades de *Zanthoxylum quinduense*.

1.2.2. Generalidades de *Zanthoxylum monophyllum*.

1.3. METODOLOGÍA

1.3.1. Procedimientos generales

1.3.2. Estudio fitoquímico de madera de *Zanthoxylum quinduense*.

1.3.3. Estudio fitoquímico de corteza de *Zanthoxylum quinduense*.

1.3.4. Estudio fitoquímico de corteza de *Zanthoxylum monophyllum*.

1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4.1. Estudio fitoquímico realizado en madera y corteza de *Z. quinduense*.

1.4.2. Estudio fitoquímico de corteza de *Z. monophyllum*.

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

1.1. INTRODUCCIÓN

El actual interés en la investigación de productos naturales se puede atribuir a diferentes factores, entre los que se encuentran necesidades terapéuticas insatisfechas, aparición de plagas agrícolas resistentes a los plaguicidas y la falta de estudios químicos y biológicos completos de un gran número de especies. Adicionalmente, la rápida extinción de las especies, que ha aumentado considerablemente en los últimos 20 años, causaría la pérdida irremediable no solo de las especies sino de compuestos potencialmente útiles. De este modo la investigación fitoquímica representa un potencial inestimable para encontrar nuevos compuestos que puedan ser usados para combatir enfermedades cuyos tratamientos siguen siendo insuficientes, como agroquímicos de bajo impacto ambiental para la agricultura y/o como plantillas para el diseño de medicamentos y agroquímicos.

Las especies del género *Zanthoxylum* tienen gran importancia a nivel etnobotánico, fitoquímico y de actividad biológica, y son una fuente promisoría de alcaloides entre los que se destacan los benzofenantridínicos. Siendo Colombia uno de los países con mayor biodiversidad y en donde se encuentra un número importante de especies pertenecientes al género *Zanthoxylum*, hacen de este país un lugar atractivo para emprender estudios multidisciplinarios que involucren diversas áreas como fitoquímica, biología celular y molecular, síntesis, bioquímica y farmacología, entre otras. Muchas de las especies colombianas no presentan estudios investigativos y algunas solo tienen investigaciones parciales como es el caso de *Z. quinduense* y *Z. monophyllum* por lo que pueden ser base para emprender investigaciones en búsqueda de sustancias potencialmente útiles.

El presente capítulo realiza un aporte a las investigaciones en fitoquímica de especies del género *Zanthoxylum* presentes en Colombia, mediante el aislamiento y caracterización de los alcaloides y otros metabolitos presentes en madera y corteza de *Z. quinduense*, y corteza de *Z. monophyllum*.

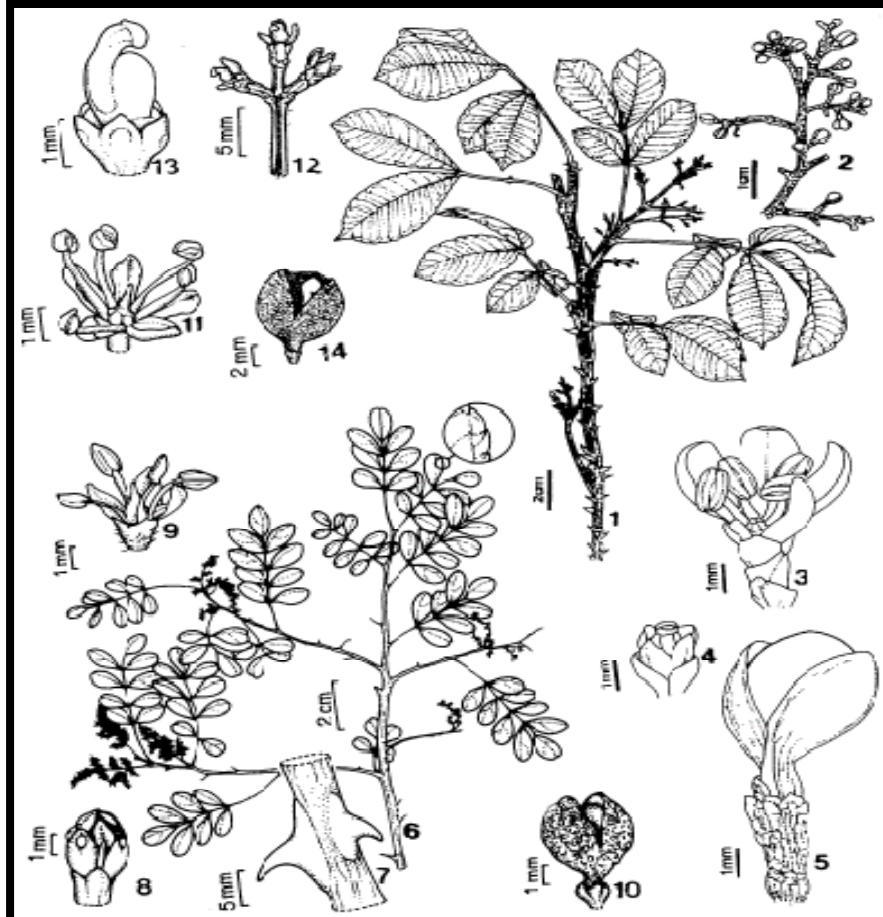
1.2. GENERALIDADES DEL GÉNERO *Zanthoxylum*

El género *Zanthoxylum* pertenece a la familia Rutaceae, la cual es de gran importancia económica debido a sus aplicaciones a nivel alimenticio, industrial y medicinal (Seidemann, 2005; Chase *et al.*, 1999). Las especies de esta familia contienen diversos tipos de metabolitos secundarios, entre los que se destacan alcaloides, lignanos, cumarinas, flavonoides, limonoides, terpenos y amidas. Dada su riqueza química y sus aplicaciones en la medicina tradicional, a muchos de los extractos y compuestos aislados en esta familia se les han realizado diversos ensayos de actividad biológica, obteniéndose resultados promisorios y que han permitido incluso validar sus usos etnobotánicos (Patiño, 2004; Waterman y Grundon, 1983).

El término *Zanthoxylum* es una modificación de la palabra *Xanthoxylum* que viene del griego: *xanthon xylon* que significa "madera amarilla", de ahí la utilización por algunos autores del término *Zanthoxylum* o *Xanthoxylum*. El género *Zanthoxylum* fue creado por Linné en 1757 y desde su origen ha sido confundido con el género *Fagara*. En 1896, Engler hizo la distinción entre los dos géneros por los siguientes caracteres: las especies que pertenecen al género *Zanthoxylum* presentan un perianto simple, mientras que en las especies pertenecientes al género *Fagara* es doble. En 1962, Brizicky descubrió especies que presentan un perianto intermedio entre *Zanthoxylum* y *Fagara*, lo que demostró que el perianto simple de *Zanthoxylum* deriva del de *Fagara* por fracaso de algunos sépalos, por lo que concluyó que el género *Fagara* era igual al género *Zanthoxylum*. Solo hasta el año 1966, Hartley agrupó a *Zanthoxylum* y a *Fagara* bajo el nombre de *Zanthoxylum*, sin embargo, algunos autores siguen utilizando el término *Fagara* (Chaaib, 2004).

Este género comprende árboles y arbustos, generalmente dioicos. Como árboles presentan copa frondosa, con muy pocas ramificaciones y alcanzan hasta 20 metros de altura. Las especies de este género se caracterizan por la presencia de espinas recurvadas en su tronco y ramas. Las hojas son variadas, pueden ser alternas u opuestas, simples o compuestas, parimpanadas o imparipanas, con hasta 15 pares de foliolos. Las inflorescencias son generalmente compuestas en forma de panículas o umbelas compuestas, axilares o terminales de pequeñas flores. Las flores son pequeñas, actinomorfas, hermafroditas y unisexuales, raramente bisexuales, usualmente de color blanco o

verde. Los frutos son folículos o esquizocarpos, contienen de uno a cinco carpelos usualmente aromáticos, es ordinariamente bivalvado, con una única rojiza o negra y lustrosa semilla (Melo y Zickel, 2004; Silva y Paoli, 2004). En la Figura 1.1 se ilustran algunas de las características morfológicas más importantes para el género *Zanthoxylum*.



Z. caribaeum: 1. Hábito. 2. Inflorescencia. 3. Flor masculina evidenciando estambres y pistilodios. 4. Gineceo. 5. Folículo abierto evidenciando semillas. ***Z. fagara***: 6. Hábito. 7. Detalle de dos acúleos. 8. Detalles de botones. 9. Flor masculina evidenciando estambres y pistilodios. 10. Folículo abierto. ***Z. gardneri***: 11. Flor masculina evidenciando estambres y pistilodios. 12. Ramo de inflorescencias. 13. Detalle de gineceos. 14. Folículo evidenciando semillas (Melo y Zickel, 2004).

Figura 1.1. Características morfológicas de algunas especies del género *Zanthoxylum*.

El género *Zanthoxylum* comprende alrededor de 549 especies distribuidas a nivel mundial principalmente en las regiones tropicales y templadas. En Colombia es uno de los de mayor

distribución, se han encontrado 31 especies a lo largo del territorio Colombiano (Global Biodiversity Information Facility, 2010; Instituto de Ciencias Naturales, 2010). En la Figura 1.2 se ilustra la distribución geográfica de especies pertenecientes a este género.

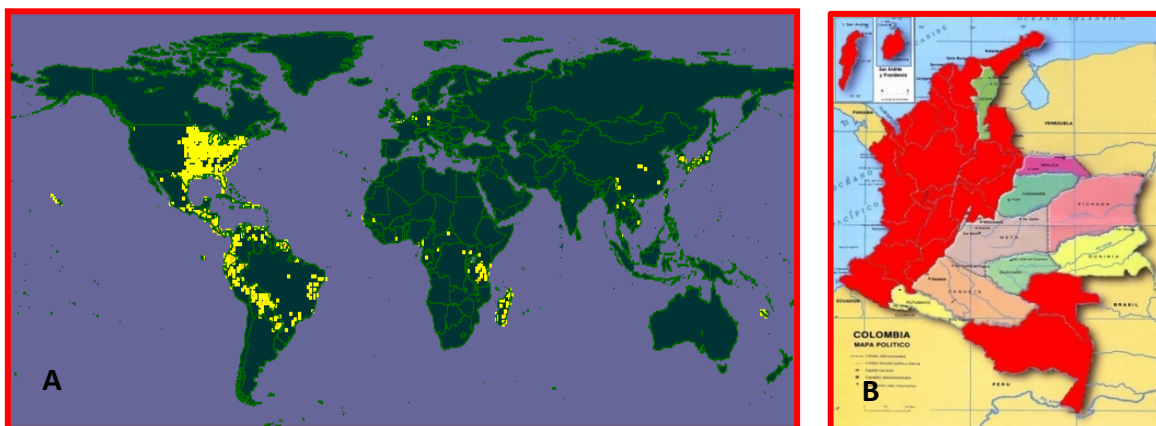


Figura 1.2. Distribución geográfica de las especies del género *Zanthoxylum*. **A)** Distribución a nivel mundial (zonas de color amarillo). **B)** Distribución en Colombia (zonas de color rojo).

Especies de este género son de apreciable importancia económica como fuentes de frutos comestibles, aceites esenciales, madera, materias primas para las industrias, plantas medicinales, plantas ornamentales y por sus aplicaciones gastronómicas (Yang, 2008; Da Silva *et al.*, 2006; Adesina, 2005; Seidemann, 2005). Por ejemplo en África es utilizada la madera de *Z. gillettii*, *Z. tessmannii*, *Z. lemairii* y *Z. leprieurii* en casas, barcos y edificios como revestimiento decorativo de madera, en carpintería, en construcción de tambores y en la industria del papel y la pulpa. En algunos países de este continente la corteza de la raíz y el vástago de muchas especies de *Zanthoxylum* se utilizan como vermífugos, febrífugos y piscicidas (Adesina, 2005).

Diversas especies del género *Zanthoxylum* han sido utilizadas en distintas partes del mundo en especial en Asia, África y América para el tratamiento de un sinnúmero de afecciones en humanos y animales (McGaw *et al.*, 2008; Rochfort *et al.*, 2008; Adesina, 2005; Chaaib, 2004; Diéguez *et al.*, 2004; Patiño, 2004). Así por ejemplo, la corteza de *Z. integrifolium* es utilizada en la medicina tradicional por aborígenes de la tribu Ya-Mei, en la isla Lanyu de Taiwán, como remedio para la mordedura de serpiente, la dispepsia y como un tónico aromático para la fiebre. La corteza de *Z. liebmannianum*, es usada en México para el tratamiento de dolores estomacales, amebiasis, parásitos

intestinales y como agente anestésico local (Ross *et al.*, 2004). Algunas especies son utilizadas para el tratamiento de la malaria, tal es el caso de *Z. rhoifolium* (Jullian *et al.*, 2006; Bertani *et al.*, 2005), *Z. acutifolium* (Arruda *et al.*, 1992), *Z. chalybeum* (Jullian *et al.*, 2006) y *Z. usambarensis* (Kirira *et al.*, 2006).

A muchas especies pertenecientes a este género se les han realizado diversos ensayos de actividad biológica de acuerdo al uso de éstas en medicina tradicional y a los reportes fitoquímicos. Por ejemplo, especies como *Z. rhoifolium* y *Z. usambarensis*, que son utilizados en la medicina tradicional como antimaláricos, se les ha determinado actividad antimalárica *in vitro* y se han aislado los compuestos responsables de la actividad, validando así su uso tradicional (Jullian *et al.*, 2006; Kirira *et al.*, 2006). Las acciones biológicas determinadas con mayor frecuencia están asociadas a la valoración de actividad antibacteriana, antifúngica, insecticida, estudio de efectos diversos sobre el sistema cardiovascular y los componentes celulares de la sangre, demostración de citotoxicidad y actividad antitumoral, acción contra agentes parasitarios, propiedades anti-inflamatorias, actividad antioxidante y sequestradora de radicales libres (Adesina, 2005; Chaaib, 2004; Diéguez *et al.*, 2004; Patiño, 2004). En la Tabla 1.1 se presentan algunos ejemplos de actividad biológica comprobada a extractos, aceites esenciales y/o compuestos aislados de diferentes especies del género *Zanthoxylum*.

De los estudios fitoquímicos realizados sobre especies del género *Zanthoxylum*, alcaloides de diversos tipos, lignanos, amidas y cumarinas son los metabolitos comúnmente reportados y que tienen gran importancia quimiotaxonomía para el género. También han sido aislados en el género flavonoides, esteroides y terpenos (Adesina, 2005; Patiño, 2004; Waterman y Grundon, 1983).

Los alcaloides son la clase de compuestos químicos de mayor relevancia para el género *Zanthoxylum*, pues están presentes en la mayoría de especies y han sido encontrados en todos los órganos vegetales siendo las cortezas de tronco y raíz en donde son más abundantes (Diéguez *et al.*, 2004). Los alcaloides generalmente aislados en especies del género son de dos tipos: isoquinolínicos (benzofenantridínicos, bencilisoquinolínicos, aporfínicos, protoberberínicos y berberínicos) y quinolínicos (Krane *et al.*, 1984; Waterman y Grundon, 1983; Cordell, 1981).

Tabla 1.1. Actividad biológica comprobada en algunas especies del género *Zanthoxylum*.

ESPECIE	SUSTANCIA EVALUADA	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	BIBLIOGRAFÍA
<i>Zanthoxylum avicennae</i>	Constituyentes químicos aislados del tallo.	Actividad antiinflamatoria.	Chen <i>et al.</i> , 2008
<i>Zanthoxylum chalybeum</i>	Extracto metanólico de la corteza de raíz, corteza y hojas.	Actividad antibacteriana y antiinflamatoria.	Matu y van Staden, 2003
<i>Zanthoxylum davyi</i>	Extracto metanólico de la corteza	Actividad antibacteriana sobre <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>S. epidermidis</i> .	Steenkamp <i>et al.</i> , 2007
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	Extracto etanólico y alcaloides aislados de corteza.	Actividad antibacteriana contra algunas bacterias Gram (+/-).	Gonzaga <i>et al.</i> , 2003
<i>Zanthoxylum usambarensis</i>	Extracto metanólico de la corteza de raíz, corteza y hojas.	Antifúngica, insecticida, antibacteriana, antiinflamatoria.	Matu y van Staden, 2003
<i>Zanthoxylum armatum</i>	Extracto metanólico y aceite esencial de las Hojas	Actividad pesticida contra importantes plagas agrícolas	Tewary <i>et al.</i> , 2005
<i>Zanthoxylum americanum</i>	Extractos etanólicos de las hojas, corteza, frutos y raíces.	Actividad antifúngica.	Bafi-Yebova <i>et al.</i> , 2005
<i>Zanthoxylum syncarpum</i>	Amida (sincarpamida) aislada de los tallos	Actividad antimalarica.	Kaur <i>et al.</i> , 2009
<i>Zanthoxylum fagara</i>	Extracto etanólico de la corteza.	Significativa actividad antifúngica.	Diéguez-Hurtado <i>et al.</i> , 2003
<i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i>	Extracto metanólico y algunos constituyentes de las raíces.	Actividad antifúngica e inhibe la enzima acetilcolinesterasa.	Queiroz <i>et al.</i> , 2006

Los benzofenantridínicos son el tipo de alcaloide más reportado en el género *Zanthoxylum* y son de gran interés debido a la importante y variada actividad biológica que presentan, entre las que se destaca la actividad antitumoral (Maiti y Kumar, 2009; Tillequin, 2007; Maiti y Kumar, 2007; Dvořák *et al.*, 2006, Nyangulu *et al.*, 2005, Eun y Koh, 2004, Tang *et al.*, 2003; Slaninová *et al.*, 2001; Simeón *et al.*, 1989). Algunos poseen actividad antimalarica (Nyangulu *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2004), antileucémica (Dupont *et al.*, 2005), antioxidante (Pérez *et al.*, 2003), nematocida (Matsushashi *et al.*, 2002), anti-VIH (Chang *et al.*, 2003), antibacteriana (Gonzaga *et al.*, 2003), antimicrobiana (Nissanka *et al.*, 2001) y antifúngica (Queiroz *et al.*, 2006), entre otras. Su distribución es muy limitada en plantas,

han sido aislados de varios géneros pertenecientes a las familias Papaveraceae, Fumiraceae y Rutaceae principalmente, donde son considerados marcadores quimiotaxonómicos. En la familia Rutaceae están presentes en especies de los géneros *Toddalia*, *Xilocarpus* y *Zanthoxylum*, siendo en este último en donde se encuentran el mayor número de reportes (Krane *et al.*, 1984; Cordell, 1981). Los principales representantes de este tipo de alcaloides de acuerdo a la actividad biológica que presentan son fagaronina **1**, nitidina **2**, queleritina **3** y sanguinarina **4**. Las estructuras de estas sustancias se muestran en la Figura 1.3 (Tang *et al.*, 2003; Simeón *et al.*, 1989).

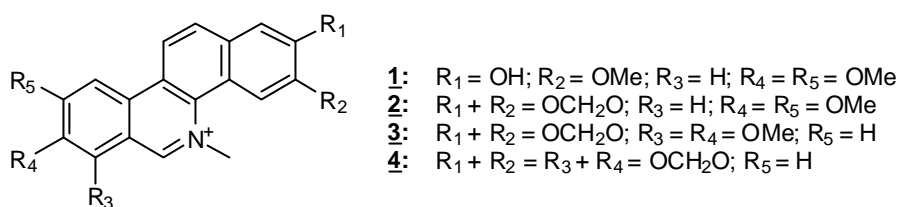


Figura 1.3. Principales representantes de los alcaloides benzofenantridínicos.

De acuerdo a las investigaciones mencionadas a nivel etnobotánico, fitoquímico y de actividad biológica en especies del género *Zanthoxylum*, se puede deducir que son una fuente muy promisoría para emprender investigaciones en búsqueda de sustancias potencialmente útiles. Por lo que en este trabajo se realizó un estudio fitoquímico de dos especies pertenecientes a este género cuyas generalidades se describen a continuación.

1.2.1. Generalidades de la especie *Zanthoxylum quinduense*

La especie *Z. quinduense* Tul., cuenta con los siguientes sinónimos: *Fagara quinduense* (Tul.) Engl., *F. macrosperma* (Tul.) Engl., *Z. macrospermum* (Tul.) (Rodríguez *et al.*, 2006). Generalmente es un árbol que crece en algunos países de Suramérica (Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú) (Global Biodiversity Information Facility, 2010).

A nivel fitoquímico el único reporte de investigaciones que se encuentra fue el realizado en su corteza (Figura 1.4) en donde se aisló e identificó un nuevo alcaloide benzofenantridínico, denominado 8-hidroxi-2,3-metilenodioxo-9-metoxibenzofenantridina **5**, junto con los compuestos conocidos:

norritidina **6**, norqueleritrina **7**, arnotianamida **8** y lupeol **9** (Patiño y Cuca, 2004). No se han encontrado en la bibliografía antecedentes de aplicaciones etnobotánicas y de actividad biológica para la especie.

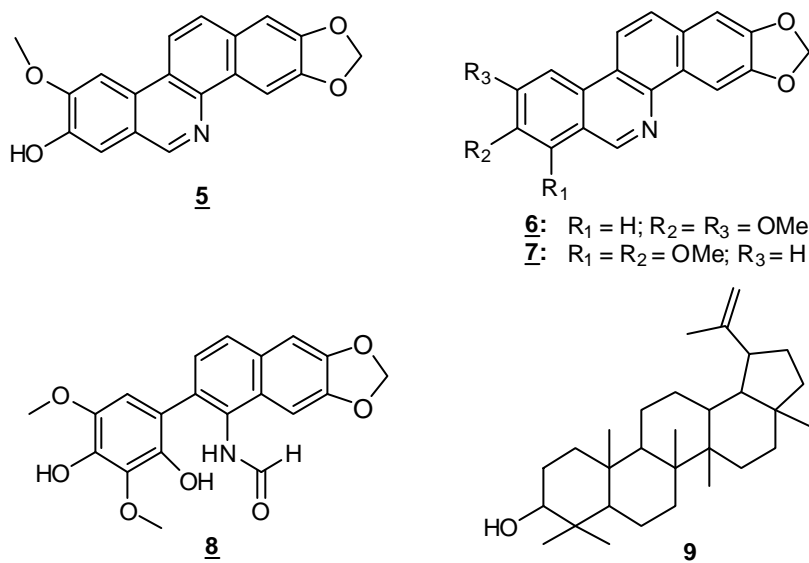


Figura 1.4. Compuestos aislados de la corteza del tronco de *Z. quinduense*.

1.2.2. Generalidades de la especie *Zanthoxylum monophyllum*

La especie *Z. monophyllum* (Lam.) P. Wilson cuyo sinónimo es *Fagara monophylla* Lam., ha sido conocida etnobotánicamente como tachuelo o palo rubio en Colombia (Cuca *et al.*, 1998); palo mulato en México; lagarto, lagarto amarillo, lagarto blanco, lagarto colorado, lagarto negro en Costa Rica (Quesada y Fernández, 2005) y como paneque, bosuga o bosúa en Venezuela (Gómez *et al.*, 2007). Es un arbusto o árbol de 4 a 12 m que se distribuye en América Central (Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Haití, República Dominicana y Puerto Rico) y en Colombia a elevaciones de 300 a 1000 msnm (Global Biodiversity Information Facility, 2010).

En la medicina tradicional venezolana, es conocido el uso de *Z. monophyllum* en el tratamiento del romadizo o inflamación de la mucosa nasal, la ictericia, la oftalmia y como anestésico (Gómez *et al.*, 2007; Díaz y Ortega, 2006). Otro uso dado ha sido como colorante (De García *et al.*, 1989).

A la especie *Z. monophyllum* se le han realizado varias investigaciones a nivel fitoquímico en algunos países suramericanos, encontrándose algunas diferencias en su composición (Figuras 1.5 y 1.6). De estudios realizados en los tallos y ramas de esta especie recolectada en Honduras se lograron aislar e identificar varios alcaloides como berberina **10**, zanthofilina **11**, demetilzanthofilina **12** y 8-metoxiflindersina **13**. También se identificó vainillato de metilo **14** y una furocumarina conocida como columbianetina **15** (Stermitz y Sharifi, 1977).

De estudios posteriores realizados por el mismo grupo en una especie recolectada en Puerto Rico (Stermitz *et al.*, 1980), encontraron un alcaloide benzofenantridínico (queleritrina **16**) y dos alcaloides aporfínicos (magnoflorina **17** y **18** que no fue elucidado totalmente). En otra investigación desarrollada sobre su corteza se aislaron e identificaron berberina **10**, lupeol **9**, y asarinina **19** (De García *et al.*, 1989). Las estructura de los compuestos aislado de muestras de *Z. monophyllum* no recolectadas en Colombia se presentan en la Figura 1.5.

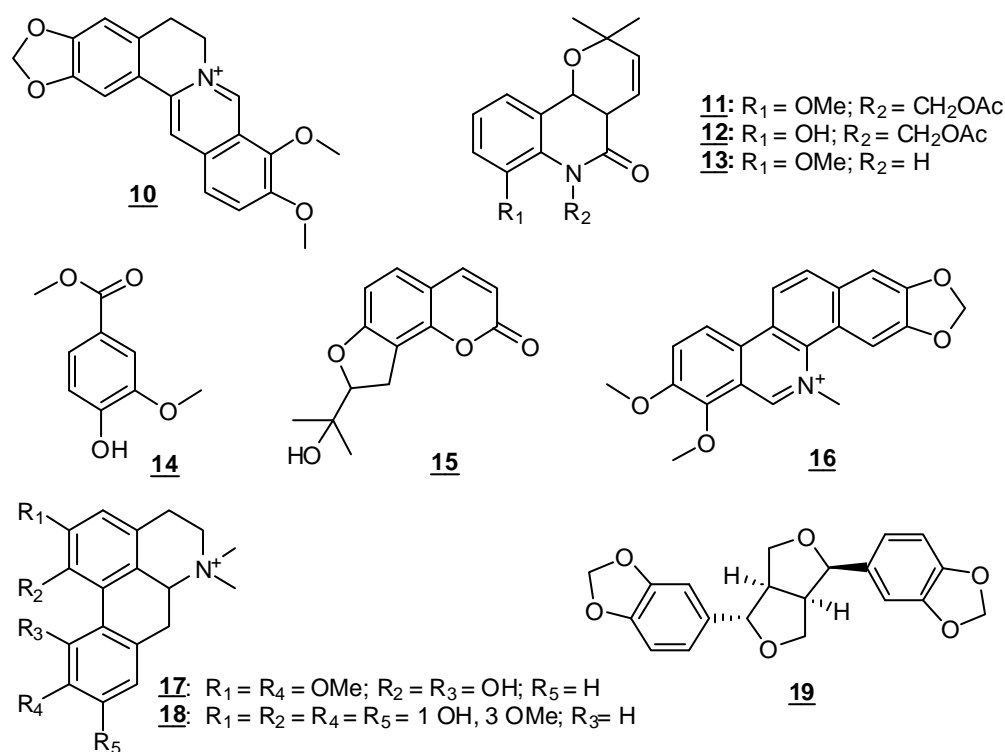


Figura 1.5. Compuestos aislados de *Z. monophyllum* en especímenes no recolectadas en Colombia.

De estudios hechos en Colombia sobre una especie recolectada en cercanías a Tulua, Valle del Cauca se aislaron e identificaron cinco lignanos: asarinina **19**, sesamina **20**, eudesmina **21**, hinokinina **22** y cubebina **23**; dos alcaloides: γ -fagarina **24** y skimmianina **25**; tres cumarinas: columbianetina **15**, osthenol **26**, arnottinina **27**; dos acetofenonas: 2,4-dihidroxi-6-metoxiacetofenona **28** y xanthoxylina **29**; (Figura 1.6). También se aislaron lupeol, sitosterol, ácido oléico y linoleato de etilo (Cuca *et al.*, 1998).

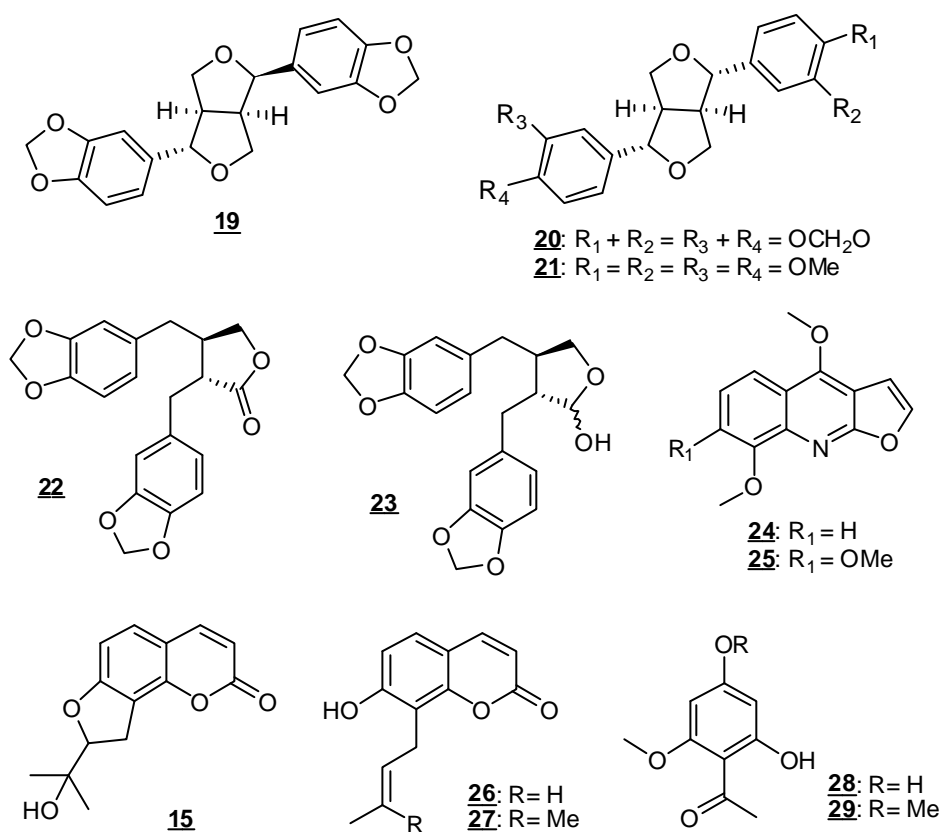


Figura 1.6. Constituyentes químicos encontrados en la especie colombiana de *Z. monophyllum*.

En cuanto a evaluaciones de actividad biológica realizadas para la especie *Z. monophyllum*, se ha reportado que el extracto y algunas fracciones obtenidas de la corteza presentan actividad antifúngica contra los hongos *Aspergillus terreus*, *A. flavus*, *Penicillium digitatum*, *P. citrinum*, *P. funiculosum*, *Paecilomyces* y *Candida albicans* (Gómez *et al.*, 2007). A su vez, al alcaloide berberina, uno de los componentes mayoritarios de la corteza, se le ha determinado que posee actividad citotóxica con valores de CL_{50} inferiores a 50 μM contra diversas líneas celulares (Cordero *et al.*, 2004).

1.3. METODOLOGÍA

1.3.1. Procedimientos generales

1.3.1.1. Cromatografía

Las separaciones cromatográficas en columna se realizaron por efecto de la gravedad (CC) y por aplicación de presión mediante cromatografía flash (CF). La fase estacionaria utilizada para el método tradicional de CC fue sílica gel 60 Merck (70-230 Mesh) y para la CF fue sílica gel 60 Merck (230-400 Mesh). Las separaciones cromatográficas en capa delgada preparativa (CCDP), se realizaron en placas de sílica gel 60 HF₂₅₄ Merck de 1 mm de espesor. Los estudios cromatográficos, el monitoreo de las cromatografías en columna y preparativa, y el control de pureza se realizó por cromatografía en capa fina (CCD) empleando cromatoplasmas de sílica gel 60 HF₂₅₄ Merck, utilizando como reveladores vapores de yodo, luz UV (254 y 365 nm), reactivo de Dragendorff y reactivo de Liebermann-Burchard. Los solventes empleados para las separaciones cromatográficas fueron de grado técnico (destilados antes de su uso) y/o grado analítico.

Como control de pureza también se emplearon los puntos de fusión determinados en un fusiómetro Fisher Johns y la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en la que se utilizó un cromatógrafo (HPLC-UV-DAD) Merck-Hitachi D-7000, equipado con un detector de arreglo de diodos L-4500, bomba inteligente L-6200A e interfase L-6000A, usando una columna analítica de fase reversa C₁₈ (25 cm x 10 mm) y una velocidad de flujo de 0,5 mL/min. Se emplearon solventes LiChrosolv (Merck) para el sistema en fase reversa (filtrados sobre una membrana millipore de nylon 66 y degasificados bajo vacío previamente a su uso).

La separación y análisis de las mezclas poco polares se llevó a cabo por CG-EM empleando un cromatógrafo de gases HP 5890A serie II con detector de masas HP 5972. La separación se hizo en una columna HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), con inyección en modo Split (1:10). Las temperaturas de la cámara de ionización, el inyector y la línea de transferencia fueron 185, 250 y 285 °C, respectivamente. La temperatura en el horno fue programada como sigue: desde 45 °C (2 min) hasta 150 °C (5 min) a 6 °C/min, y posterior aumento hasta 280 °C (30 min) a 8 °C/min, para un tiempo total

de corrida de 75 min. Los espectros de masas fueron adquiridos entre 35 y 450 m/z . La determinación de los constituyentes químicos presentes en las mezclas se realizó con base en el análisis de los fragmentos de masas, con ayuda de los espectros de RMN, así como por la comparación de los espectros de masas con los obtenidos de las librerías Wiley 138 L y NBS 75K L.

1.3.1.2. Técnicas empleadas para la elucidación estructural y caracterización de los compuestos.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C , así como los experimentos DEPT 135, COSY, HMQC, HMBC y NOESY fueron tomados en un espectrómetro Bruker Avance 400, operado a 400 MHz para ^1H y a 100 MHz para ^{13}C empleando cloroformo deuterado (CDCl_3), acetona deuterada ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) y metanol deuterado (CD_3OD) como solventes y patrones internos, a una temperatura de 25 °C. Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en hercios (Hz). Las multiplicidades están asignadas como sigue: s = singlete, d = doblete, t = triplete, c = cuarteto, quint = quinteto, m = multiplete, dd = doblodoblete, dt = dobletriplete, etc. Para los espectros de ^{13}C se indica entre paréntesis la información obtenida de los experimentos DEPT y cuando es posible, la asignación de la señal.

Los espectros Infrarrojo (IR) fueron registrados en un espectrómetro Perkin Elmer FTIR Panagon 500 serie 1000 en una celda de KBr. Solo se incluyen las absorciones características, estando indicada entre paréntesis la asignación.

Los espectros de masas de baja (EM) y/o alta resolución (EMAR) fueron realizados principalmente por el Centro de Apoyo Científico y Tecnológico para la Investigación (CACTI) de la Universidad de Vigo (España) en los espectrómetros de masas Hewlett Packard 5989 A y VG Autospec M., respectivamente. Algunos EM por impacto electrónico (IE) e ionización química (IQ) fueron tomados por el profesor Jose Hipolito Isaza en un equipo Shimadzu GCMS-QP2010 perteneciente a la Universidad Tecnológica de Pereira. A su vez, algunos EMAR fueron tomados por el Laboratorio de Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas (LCMS) de la Universidad Nacional de Colombia en un equipo Shimadzu LCMS-IT-TOF con inyección directa (compuestos puros disueltos en MeOH) usando ionización por electrospray en modo positivo o negativo, de acuerdo al tipo de

compuesto. Los fragmentos significativos se indican como: m/z (intensidad relativa al pico base = 100), con masa exacta determinada para el ión molecular (M) o fragmento iónico adecuado.

Las medidas de rotación óptica específica fueron tomadas en un polarímetro Polartronic E Schmidt + Haensch con lámpara de sodio (589 nm), en celda de 1,00 mL de capacidad con un paso óptico de 0,5 cm a una temperatura de 20 °C, utilizando MeOH o CHCl₃ como solvente.

1.3.2. Estudio Fitoquímico de madera y corteza de *Zanthoxylum quinduense*

1.3.2.1. Material vegetal

La especie *Z. quinduense* Tul., fue recolectada y determinada en septiembre del 2005 en el municipio de Albán, departamento de Cundinamarca por el biólogo Zaleth Cordero. Un espécimen reposa el Herbario Nacional de Colombia del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia con el número de colección COL-511101.

1.3.2.2. Extracción, fraccionamiento y purificación de metabolitos secundarios presentes en la madera de *Z. quinduense*.

La madera seca y molida (4550 g) de *Z. quinduense* fue extraída con etanol al 96% por maceración a temperatura ambiente. El solvente fue evaporado mediante destilación a presión reducida en rotavapor para dar 81.4 g de extracto crudo. A 78 g de extracto se le realizó un fraccionamiento sólido-líquido sucesivo mediante un equipo Soxhlet utilizando como solventes éter de petróleo (EP), diclorometano (CH₂Cl₂), acetato de etilo (AcOEt), acetona y metanol (MeOH). Luego de la evaporación de los solventes en rotavapor se obtuvieron los extractos EP (9,5 g), CH₂Cl₂ (6,5 g), AcOEt (2,0 g), acetona (12,2 g) y MeOH (48,5 g).

El extracto de EP (7,0 g) fue fraccionado mediante CC eluyendo con mezcla de EP-AcOEt en polaridad creciente (90:10 a 50:50), obteniéndose 16 fracciones. De la fracción 8 (1,7 g) mediante extracciones sucesivas con acetona (5 x 2 mL), se obtuvo un sólido cristalino blanco correspondiente a una mezcla denominada **M1** compuesta por sitosterol **Z-1**, estigmasterol **Z-2** y campesterol **Z-3** (440,9 mg,

79:16:5). El sobrenadante de 8 se reunió con la fracción 9 (314,2 mg) y se sometió a CC repetitiva eluyendo con benceno-AcOEt 70:30 y tolueno-AcOEt 70:30, para luego mediante CCDP con sistemas de elución tolueno-AcOEt-ácido fórmico 95:5:0.5 y CH_2Cl_2 -MeOH-ácido fórmico 95:5:0.5, aislar los alcaloides norqueleritrina **Z-4** (3,3 mg) y (-)-6-acetonildihidroqueleritrina **Z-5** (4,0 mg), respectivamente.

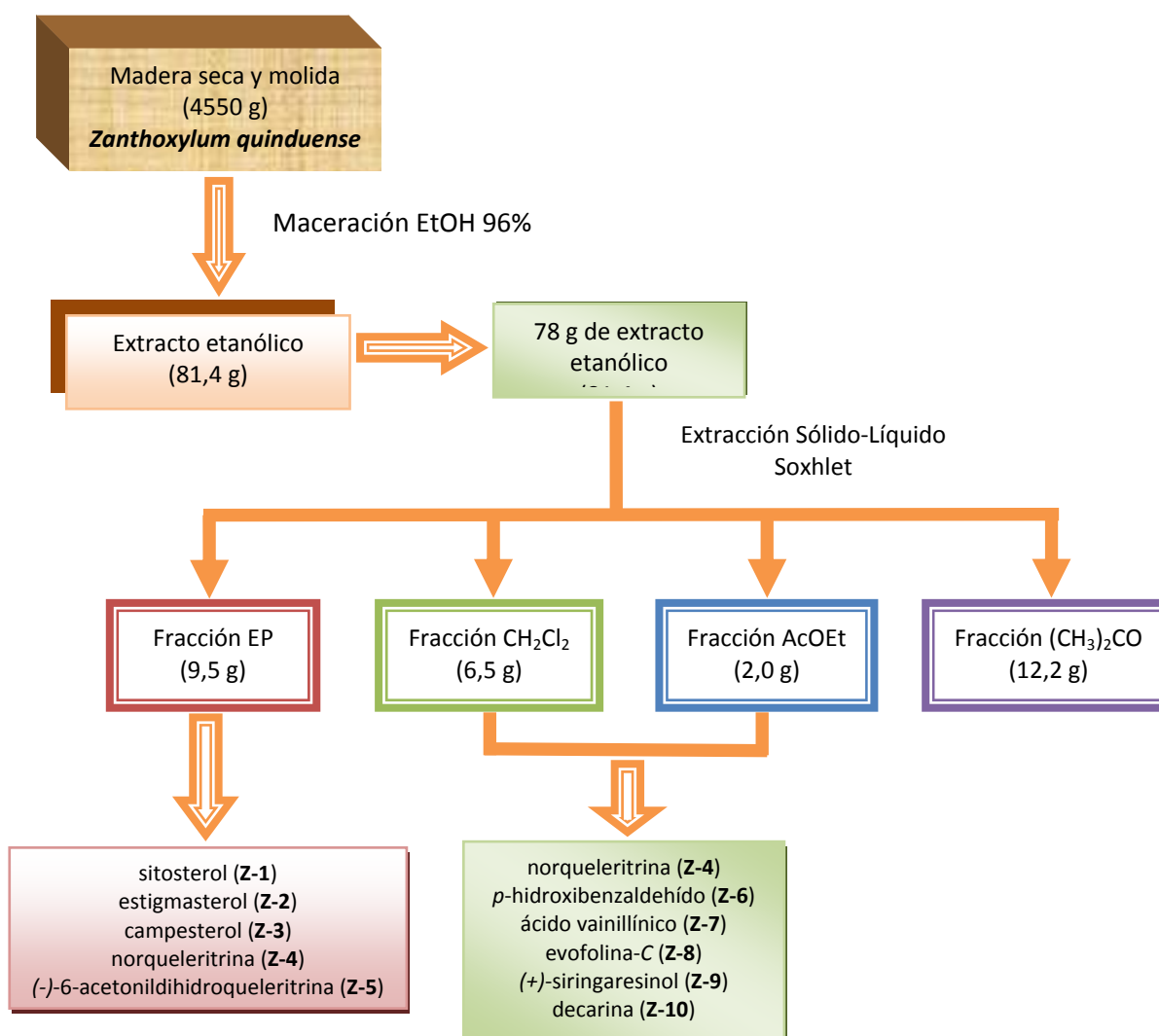


Figura 1.7. Esquema general de extracción, fraccionamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en la madera de *Z. quinduense*.

Los extractos de CH_2Cl_2 y AcOEt fueron reunidos (7,5 g) y fraccionados mediante CC eluyendo con mezcla de tolueno-AcOEt en polaridad creciente (80:20 a 30:70), obteniéndose 14 fracciones. De la fracción 3 (102,7 mg) utilizando CC con tolueno-AcOEt 80:20, se obtuvo norqueleritrina **Z-4** (8,0 mg). La fracción 5 se purificó mediante CC eluyendo con tolueno-AcOEt 90:10 para dar 12 fracciones, en donde las fracciones 6 a 8 fueron reunidas y sometidas a CCDP eluyendo con CH_2Cl_2 -MeOH 98:2 obteniéndose *p*-hidroxibenzaldehído **Z-6** (24,3 mg), ácido vainillínico **Z-7** (17,6 mg) y una mezcla de evofolina-C **Z-8** con algunos esteroides (7,3 mg; 10:7), respectivamente. La fracción 8 (570,4 mg), se sometió a CC con CHCl_3 -MeOH 98:2, aislándose (+)-siringaresinol **Z-9** (62,7 mg) y decarina **Z-10** (4,0 mg). En la Figura 1.7 se resume el proceso de purificación de los metabolitos secundarios aislados de la madera de *Z. quinduense*.

1.3.2.3. Extracción, fraccionamiento y purificación de metabolitos secundarios presentes en la corteza de *Z. quinduense*.

La corteza seca y molida de *Z. quinduense* (396,5 g) fue extraída con etanol al 96 % por el método de maceración a temperatura ambiente. El solvente fue evaporado mediante destilación a presión reducida en rotavapor para dar 61,3 g de extracto crudo. Posteriormente se realizó una extracción ácido-base de alcaloides adaptando una metodología descrita en la literatura con algunas modificaciones (Gonzaga *et al.*, 2003), para lo cual 55 g del extracto fueron solubilizados en una mezcla de H_2O : Et_2O 1:1 (600 mL) con ayuda de ultrasonido y acidificado con HCl 2 N hasta pH 2,0. La fase orgánica fue separada y la capa acuosa fue extraída con Et_2O (3 x 60 mL). Las fases de Et_2O no fueron analizadas. La solución acuosa resultante fue llevada hasta pH 9,0 con NH_4OH y extraída sucesivamente con CHCl_3 y mezcla de CHCl_3 -EtOH 80:20. Luego de la evaporación de los solventes por rotavapor se obtuvieron las fracciones de CHCl_3 (3,0 g) y CHCl_3 -EtOH (1,3 g).

La fracción de CHCl_3 (2,5 g) fue sometida a CF eluyendo con CHCl_3 -MeOH en polaridad creciente (100:0 a 70:30) obteniéndose 60 fracciones que fueron reunidas en 16 fracciones finales de acuerdo al estudio por CCD. La fracción 2 (253,4 mg) fue purificada mediante CF eluyendo con *n*-hexano-AcOEt 80:20, obteniéndose 10 fracciones, de las cuales 3 y 5 correspondieron a lupeol **Z-11** (12,5 mg) y nornitidina **Z-12** (6,4 mg), respectivamente.

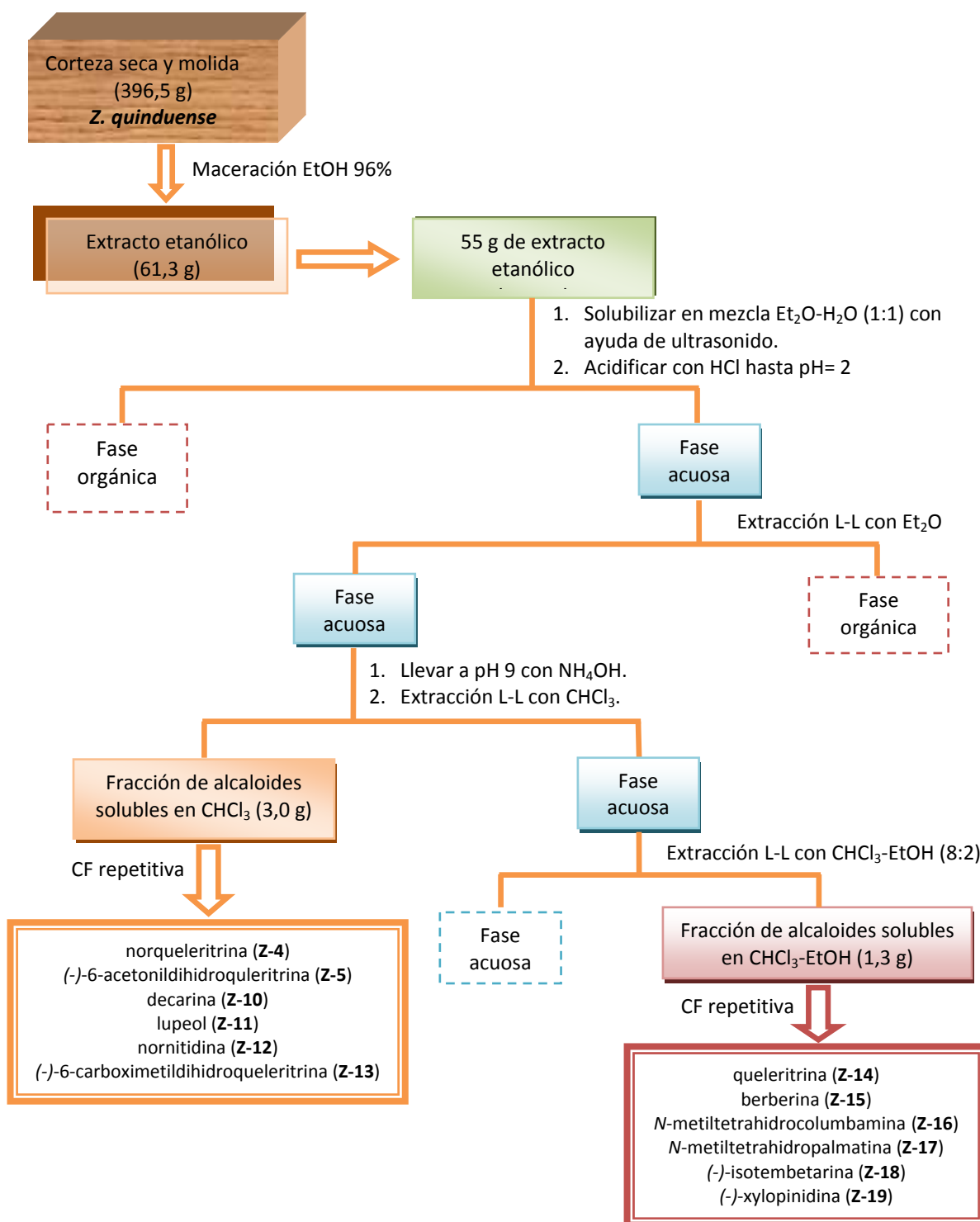


Figura 1.8. Esquema general de extracción fraccionamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en la corteza de *Zanthoxylum quinduense*.

Las fracciones 4-6 se reunieron (285,6 mg) y se purificaron mediante CF sucesivas con *n*-hexano:AcOEt 80:20 y CH₂Cl₂-MeOH 98:2 obteniéndose norqueleritrina **Z-4** (7,3 mg) y (-)-6-acetonildihidroqueleritrina **Z-5** (4,5 mg). De la fracción 8 (226,4 mg) por CF repetitivas con *n*-hexano-AcOEt 70:30, CHCl₃ y CH₂Cl₂-AcOEt 90:10 se aisló decarina **Z-10** (5,3 mg). De la fracción 10 (151,2 mg) se aisló (-)-6-carboximetildihidroqueleritrina **Z-13** (9,3 mg), mediante CF sucesivas con *n*-hexano-acetona 70:30, *n*-hexano-AcOEt 50:50 y CHCl₃-AcOEt 80:20.

La fracción de CHCl₃-EtOH (1,0 g) fue sometida a CF eluyendo con CHCl₃-MeOH en polaridad creciente (90:10 a 70:30) obteniéndose 13 fracciones. De la fracción 1 (15,2 mg) se aisló queleritrina **Z-14** (4,6 mg) por CF eluyendo con CH₂Cl₂-MeOH 95:5. De la fracción 3 (31,6 mg) mediante CF con el sistema de elución CH₂Cl₂-MeOH 90:10 permitió el aislamiento de berberina **Z-15** (8,5 mg). Las fracciones 5-7 reunidas (256,5 mg) fueron purificadas por CF sucesivas eluyendo con CHCl₃-MeOH 85:15, CHCl₃-MeOH 80:20 y CH₂Cl₂-MeOH 85:15 para obtener una mezcla de *N*-metiltetrahidrocolumbamina **Z-16** y *N*-metiltetrahidropalmatina **Z-17** (8,8 mg; 10:3). De la fracción 8 (177,3 mg) se aisló (-)-isotembetarina **Z-18** (70,4 mg) por CF eluyendo con CHCl₃-MeOH 80:20. Las fracciones 9 y 10 fueron reunidas (225 mg) y mediante CF sucesivas eluyendo con CHCl₃-MeOH 80:20, CH₂Cl₂-MeOH 80:20 y CHCl₃-MeOH 70:30 se obtuvo (-)-xylopinidina **Z-19** (22,8 mg). En la Figura 1.8 se resume el estudio fitoquímico realizado en la corteza de *Z. quinduense*.

1.3.3. Estudio fitoquímico de corteza de *Zanthoxylum monophyllum*

1.3.3.1. Material vegetal

La especie *Z. monophyllum* (Lam.) P. Wilson fue recolectada en febrero del 2007 por el Químico M.Sc. Juan David Guzmán en el municipio de San Bernardo, departamento de Cundinamarca. La muestra fue determinada por el biólogo Adolfo Jara Muñoz y un espécimen reposa en el Herbario Nacional de Colombia del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia con el número de colección COL-517520.

1.3.3.2. *Extracción, fraccionamiento y purificación de metabolitos secundarios presentes en la corteza de Z. monophyllum.*

La corteza seca y molida de *Z. monophyllum* (750,5 g) fue extraída por el método de maceración con etanol al 96% a temperatura ambiente. El solvente fue evaporado mediante destilación a presión reducida para dar 80.5 g de extracto crudo. A 78 g de este extracto se le realizó una extracción ácido-base de alcaloides similar a la desarrollada en el numeral 1.3.2.3, para lo cual el extracto se solubilizó en una mezcla de H₂O-Et₂O (1:1) (800 mL) con ayuda de ultrasonido y acidificado con HCl 2N hasta pH 2. La fase orgánica fue separada y la capa acuosa fue extraída con éter (3 x 80 ml). Las fases de Et₂O no fueron analizadas. La solución acuosa fue llevada hasta pH 9,0 con NH₄OH y sucesivamente particionado con CHCl₃ y mezcla de CHCl₃-EtOH 80:20. Luego de la evaporación de los solventes se obtuvieron las fracciones de CHCl₃ (4,0 g) y CHCl₃-EtOH (2,6 g).

La fracción de CHCl₃ (3,8 g) fue sometida a CF eluyendo con CHCl₃-MeOH en polaridad creciente (100:0 a 70:30) para dar 20 fracciones. Las fracciones 2-6 (300 mg) se reunieron y se sometieron a CF con *n*-hexano:AcOEt en polaridad creciente (85:15 a 60:40) obteniéndose 22 fracciones, de las cuales 2, 3 y 5 correspondieron a xanthoxylina **Z-20** (36,3 mg), 2-hidroxi-4,6-dimetoxibenzaldehído **Z-21** (21,3 mg) y lupeol **Z-11** (28,5 mg), respectivamente; las fracciones 6-11 (35 mg), 14 (8,2 mg) y 16-18 (25 mg) se purificaron por CF con sistemas de elución *n*-hexano-acetona (80:20), *n*-hexano-AcOEt (40:60) y *n*-hexano-acetona (80:20) obteniéndose norнитидина **Z-12** (15,7 mg), (-)-hinokinina **Z-22** (2,5 mg) y norqueleritrina **Z-4** (4,3 mg), respectivamente. Las fracciones 8-11 iniciales fueron reunidas (304 mg) y extraídas con CHCl₃ (5 x 2 mL) obteniéndose un residuo correspondiente a decarina **Z-10** (25 mg). El sobrenadante resultante fue sometido a CF con sistema de elución en polaridad creciente *n*-hexano-AcOEt (60:40 a 40:60), obteniéndose 21 fracciones, de las cuales, 8 (79,5 mg) fue purificada por CF con *n*-hexano-AcOEt 50:50 para dar (-)-columbianetina **Z-26** (47,5 mg), 12 y 19 correspondieron a (+)-marmesina **Z-24** (6,6 mg) y (+)-siringaresinol **Z-9** (16,2 mg), respectivamente. La fracción 12 (375,6 mg) fue sometida a purificación por CF sucesivas con los sistema de elución tolueno-AcOEt 60:40 y *n*-hexano-acetona 50:50 resultando thalifolina **Z-25** (6,5 mg). Las fracciones 14-16 fueron reunidas (508,7 mg) y purificadas por CF sucesivas con *n*-hexano-AcOEt 40:60 y CH₂Cl₂-MeOH 90:10 obteniéndose (+)-ulopterol **Z-26** (9,5 mg).

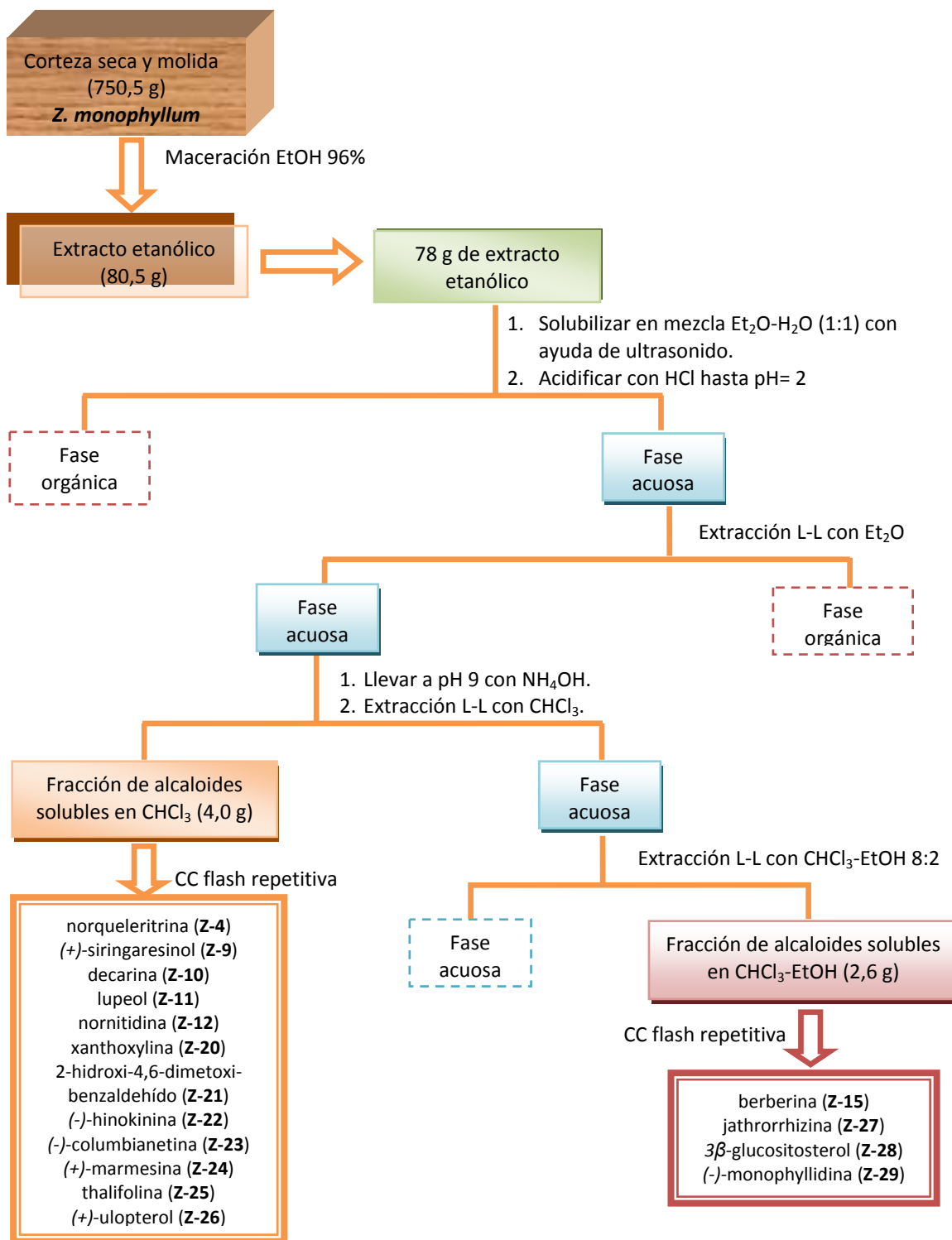


Figura 1.9. Esquema general de extracción y purificación de los metabolitos secundarios presentes en la corteza de *Zanthoxylum monophyllum*.

La fracción de CHCl₃-EtOH (2,3 g) fue sometida a CF eluyendo con CHCl₃-MeOH en polaridad creciente (85:15 a 60:40) resultando 15 fracciones. De 2 a 4 se reunieron (153,2 mg) y se purificaron por CF eluyendo con CHCl₃-MeOH (90:10) obteniéndose thalifolina **Z-25** (14 mg). Las fracciones 7 y 8 fueron reunidas (1250 mg) y sometidas a CF con CHCl₃-MeOH 90:10 obteniéndose 10 fracciones, de las cuales la fracción 6 (715,6 mg) fue purificada por CF con CH₂Cl₂-MeOH 90:10 resultando berberina **Z-15** (574 mg). 9 y 10 reunidas (324,2 mg) fueron purificadas mediante CF sucesivas eluyendo con CHCl₃-MeOH 80:20 y CH₂Cl₂-MeOH 90:10 para obtener jathrorrhizina **Z-27** (7,4 mg). Las fracciones 12 a 14 (296,8 mg) se sometieron a CF con el sistema de elución CHCl₃-MeOH 85:15 para obtenerse 9 fracciones, de las cuales, 3 (25,3 mg) y 9 (36,4 mg) por separado fueron purificadas por CF con CH₂Cl₂-MeOH 90:10 obteniéndose 3 β -glucositosterol **Z-28** (4,3 mg) y (-)-monophyllidina **Z-29** (12,6 mg), respectivamente. La Figura 1.9 resume el estudio fitoquímico realizado en *Z. monophyllum*.

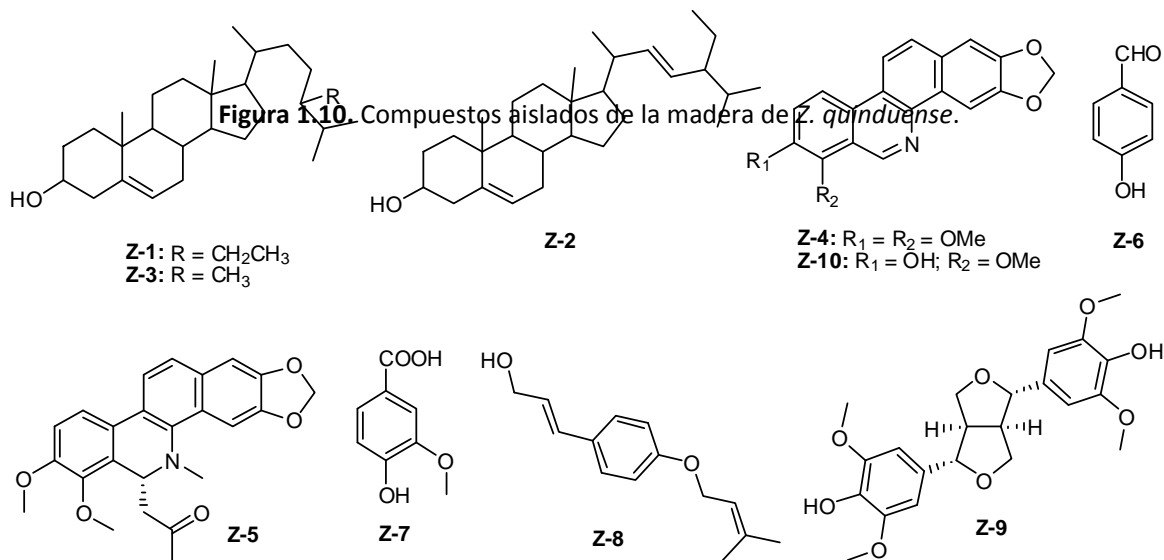
1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4.1. Estudio fitoquímico realizado en madera y corteza de *Z. quinduense*

La purificación por cromatografía en columna y preparativa sobre sílica gel de las fracciones de éter de petróleo, diclorometano y acetato de etilo, obtenidas por Soxhlet a partir del extracto etanólico de la madera de *Z. quinduense* condujo al aislamiento e identificación de tres alcaloides (norqueleritrina **Z-4**, (-)-6-acetonildihidroqueleritrina **Z-5**, decarina **Z-10**), dos bencenoides (*p*-hidroxibenzaldehído **Z-6**, ácido vainillínico **Z-7**), un fenilpropeno (evofolina-C **Z-8**), un lignano ((+)-siringaresinol **Z-9**) y una mezcla de esteroides denominada **M1** (sitosterol **Z-1**, estigmasterol **Z-2** y campesterol **Z-3**). Los compuestos **Z-4** a **Z-10** fueron elucidados por métodos espectroscópicos, por comparación con los datos descritos en la literatura y/o por CCD con muestras auténticas. La mezcla **M1** fue analizada por CG-EM. Las estructuras de los compuestos aislados de madera de *Z. quinduense* se muestran en la Figura 1.10.

De los metabolitos aislados e identificados en la madera de *Z. quinduense* este es el primer reporte sobre la presencia de sitosterol **Z-1**, estigmasterol **Z-2**, campesterol **Z-3**, (-)-6-acetonildihidroqueleritrina **Z-5**, *p*-hidroxibenzaldehído **Z-6**, ácido vainillínico **Z-7**, evofolina-C **Z-8**,

(+)-siringaresinol **Z-9** y decarina **Z-10** en *Z. quinduense*. El alcaloide norqueleritrina **Z-4** ha sido previamente reportado en su corteza (Patiño y Cuca, 2004).



El extracto etanólico obtenido de la corteza de *Z. quinduense* fue sometido a extracción ácido-base de alcaloides (Gonzaga *et al.*, 2003) con algunas modificaciones como lo fue la utilización de ultrasonido para favorecer el proceso de extracción (Wang y Weller, 2006; Seidel, 2006) y la utilización de los solventes cloroformo y mezcla de cloroformo-etanol 80:20 en la extracción líquido-líquido, de acuerdo a un análisis fitoquímico preliminar realizado previamente que permitió determinar los tipos de alcaloides presentes en el extracto (Sanabria, 1983). De este modo, por la extracción ácido-base de alcaloides realizada se obtuvo una fracción enriquecida de alcaloides solubles en cloroformo y una fracción de alcaloides solubles en la mezcla cloroformo-etanol 80:20.

Del estudio fitoquímico realizado a partir de la fracción de alcaloides soluble en cloroformo utilizando como técnica de separación y purificación la cromatografía flash, permitió el aislamiento de seis compuestos, los cuales fueron identificados por métodos espectroscópicos, por comparación con los datos espectroscópicos reportados en la literatura y en algunos casos por comparación en CCD con muestras auténticas. Los compuestos aislados e identificados se ilustran en la Figura 1.11 y corresponden a cinco alcaloides benzofenantridínicos (norqueleritrina **Z-4**, (-)-6-acetonildihidroqueleritrina **Z-5**, decarina **Z-10**, nornitidina **Z-12** y (-)-6-carboximetildihidroqueleritrina **Z-13**) y un triterpeno (lupeol **Z-11**).

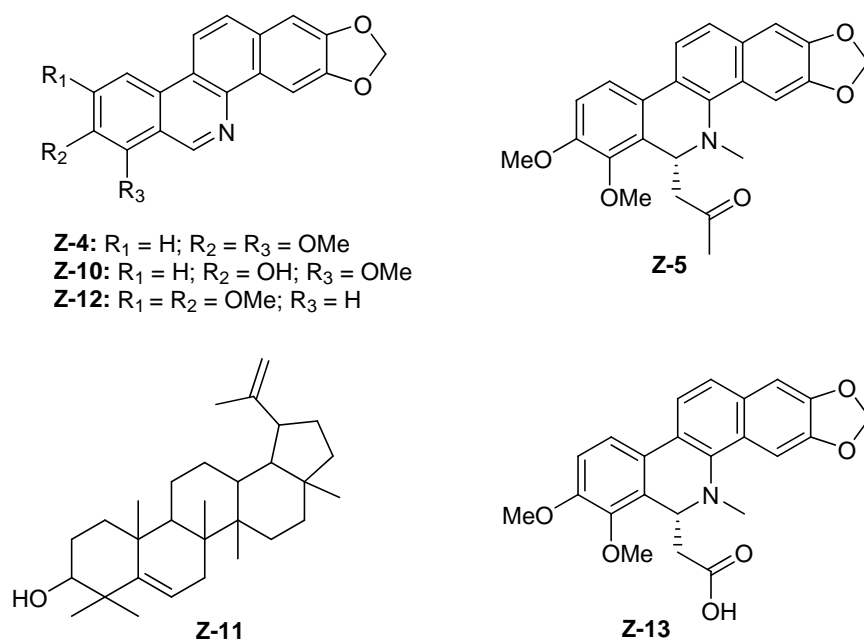


Figura 1.11. Compuestos aislados de la fracción de cloroformo para la corteza de *Z. quinduense*.

De la fracción de alcaloides soluble en la mezcla cloroformo:etanol 80:20, siguiendo una metodología similar a la realizada para la fracción de alcaloides soluble en cloroformo, se identificaron seis alcaloides isoquinolínicos: queleritrina **Z-14**, berberina **Z-15**, *N*-metilisocoripalmina **Z-16**, *N*-metiltetrahidropalmatina **Z-17**, (-)-isotembetarina **Z-18** y (-)-xylopinidina **Z-19** (Figura 1.12).

De acuerdo al estudio fitoquímico realizado sobre la corteza de *Z. quinduense* se concluye que este permitió el aislamiento e identificación de doce sustancias, correspondientes a un triterpeno y a once alcaloides isoquinolínicos, de los cuales seis son benzofenanthridínicos, dos bencilisoquinolínicos, dos tetrahidroprotoberberínicos y uno berberínico.

Respecto a los metabolitos identificados en la corteza de *Z. quinduense*, ocho se reportan por primera vez para la especie ((-)-6-acetonildihidroqueleritrina **Z-5**, decarina **Z-10**, (-)-6-carboximetildihidroqueleritrina **Z-13**, queleritrina **Z-14**, berberina **Z-15**, *N*-metiltetrahidrocolumbamina **Z-16**, *N*-metiltetrahidropalmatina **Z-17**, (-)-isotembetarina **Z-18** y (-)-

xylopinidina **Z-19**). Los demás compuestos ya han sido descritos en la literatura para la especie (Patiño y Cuca, 2004).

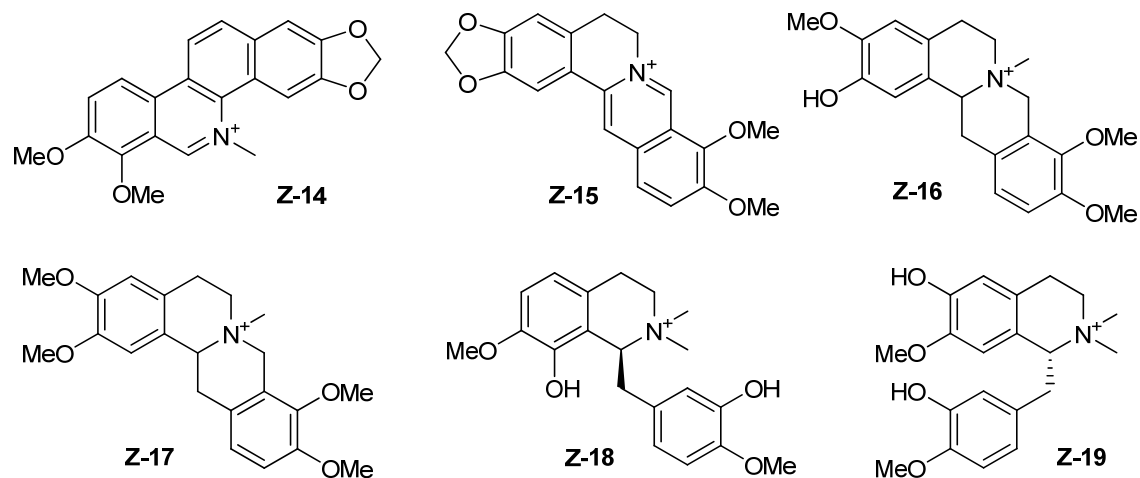


Figura 1.12. Compuestos aislados de la fracción de CHCl_3 -EtOH 80:20 para la corteza de *Z. quinduense*.

El estudio fitoquímico realizado en la madera y corteza ha permitido demostrar la presencia de alcaloides de diversas clases, lignanos, fenilpropanos, bencenoides, esteroides y triterpenos en la especie. Los compuestos comunes encontrados tanto en la madera como en la corteza son los alcaloides benzofenanthridínicos, norqueleritrina **Z-4**, (-)-6-acetonildihidroqueleritrina **Z-5** y decarina **Z-10**. El desarrollo de esta investigación permitió caracterizar por primera vez trece compuestos para la especie *Z. quinduense*.

Todo los tipos de metabolitos encontrados para la especie *Z. quinduense* han sido encontrados en otras especies del género *Zanthoxylum*. Los esteroides y bencenoides son comunes en muchas familias de plantas. La presencia de evofolina-C **Z-8** y (+)-siringaresinol **Z-9** ha sido descrita en muchas plantas de la familia Rutaceae, incluyendo el género *Zanthoxylum*. Los alcaloides isoquinolínicos encontrados han sido aislados en otras especies del género y entre estos se destacan los benzofenanthridínicos que son de interés quimiotaxonómico pues están ampliamente distribuidos en el género, pero no en la familia Rutaceae (Adesina, 2005; Krane *et al.*, 1984; Waterman y Grundon, 1983). A continuación se describe la elucidación estructural de la mezcla de los compuestos **Z-16** y **Z-17**. Los datos espectroscopicos de los demás compuestos se resumen en el anexo de este capítulo.

1.4.1.1. Elucidación estructural de los compuestos **Z-16** y **Z-17**.

Los compuestos **Z-16** y **Z-17** hacen parte de una mezcla obtenida de la fracción soluble en cloroformo-etanol 80:20, cuyo aspecto físico es un aceite de color café oscuro, que da prueba positiva frente al reactivo de Dragendorff, indicando de este modo la posible presencia de alcaloides.

El espectro de RMN ^1H (Figura 1.13), presenta señales entre δ 3 y 7 para un compuesto mayoritario denominado **Z-16**, junto con otras señales de menor integración para compuestos minoritarios. Se observan señales en la región alifática para protones que se encuentran desplazados a campo bajo por la presencia de anillos aromáticos o heteroátomos como nitrógeno u oxígeno, de las cuales se destacan: en δ 3,32 (s, 3H), señal correspondiente a los protones de un grupo metilo unido a nitrógeno de una sal de amonio cuaternario y en δ 3,87 (s, 3H), 3,88 (s, 3H) y 3,90 (s, 3H) señales típicas de los protones de grupos metoxilo unidos a anillos aromáticos. Hacia la región aromática se observan señales características en δ 6,89 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H) y 6,95 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H) de dos protones en posición *orto* y en δ 6,75 (s, 1H) y 6,77 (s, 1H) de protones aislados o en posición *para* sobre anillo aromático.

Analizando las señales de baja integración en la Figura 1.13, se observa que uno de los compuestos minoritarios denominado **Z-17** presenta señales con desplazamientos similares y en proporción de aproximadamente 0,3:1,0 respecto al compuesto mayoritario. De acuerdo a lo anterior es posible determinar para **Z-17** de manera similar a **Z-16** una señal en δ 3,41 (s, 3H) correspondiente al grupo metilo unido a nitrógeno y en δ 3,8-4,0 señales características de los protones de grupos metoxilo que de acuerdo a la integración podrían corresponder a cuatro grupos de este tipo. En la región aromática por la multiplicidad e integración de las señales (δ 6,89 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 6,95 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 6,75 (s, 1H) y 6,71 (s, 1H)) es posible deducir que el compuesto minoritario **Z-17** presenta el mismo patrón de sustitución que **Z-16**.

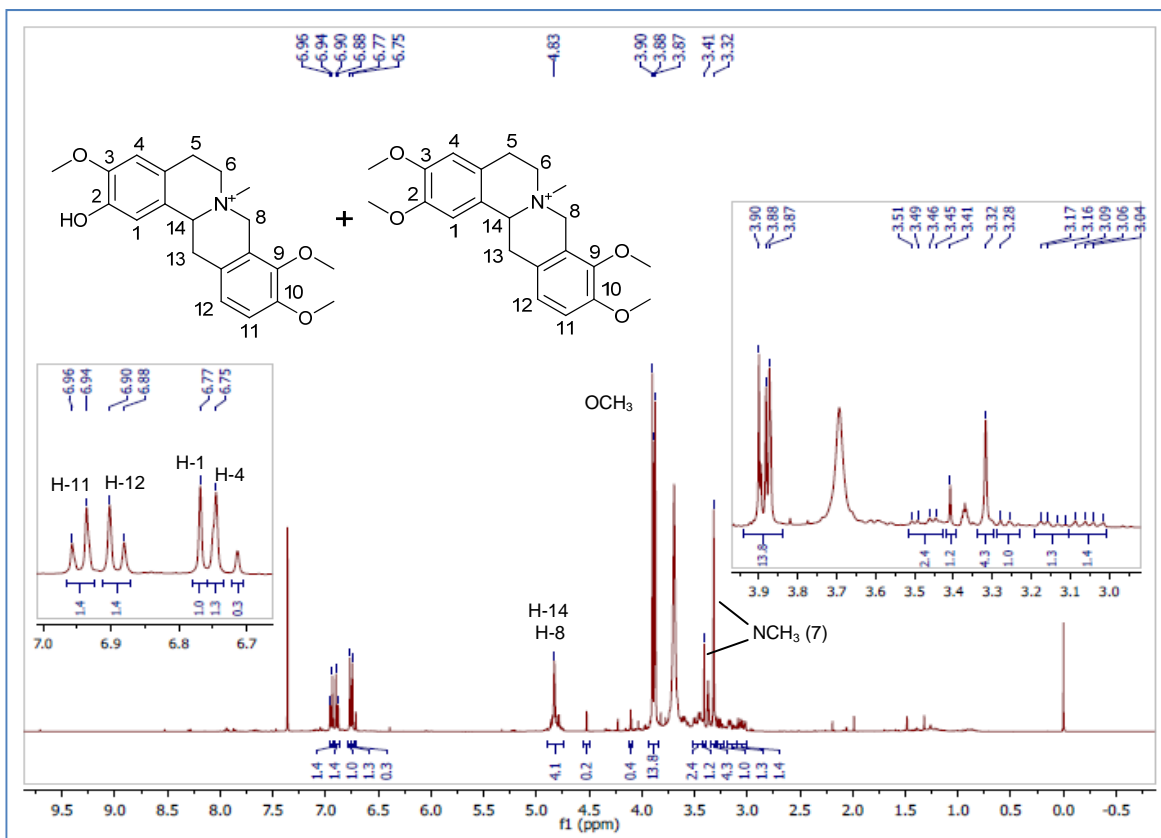


Figura 1.13. Espectro de RMN ^1H de la mezcla de **Z-16** y **Z-17** ($\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$, 400 MHz).

En los espectros de RMN ^{13}C y DEPT 135 (Figura 1.14), se observan señales de carbonos para los dos compuestos mayoritarios presentes en la mezcla. Para el compuesto **Z-16** se observan 21 señales para carbonos correspondientes a cinco metinos (δ 65,8; 109,8; 113,7; 115,4; 123,7), cuatro metilenos (δ 23,0; 34,1; 52,4; 60,2), cuatro metilos (δ 50,4; 56,1; 56,2; 60,9) y ocho carbonos cuaternarios (δ 119,7; 119,7; 121,4; 122,6; 145,6; 147,3; 147,4; 151,4). De las señales observadas, doce son características de carbonos aromáticos por sus desplazamientos entre δ 109 y 152, de las cuales cuatro corresponden a carbonos oxigenados (δ 145,6; 147,3; 147,4; 151,4), indicando así la presencia de dos anillos aromáticos en la estructura básica. A su vez se observan señales para carbonos alifáticos que por sus desplazamientos son característicos de carbonos unidos a anillos aromáticos y/o heteroátomos. Se observa en δ 50,4 (CH_3) una señal característica del carbono de un grupo metilo unido a nitrógeno, en δ 56,1 (CH_3), 56,2 (CH_3) y 60,9 (CH_3) señales típicas de los carbonos de grupos metoxilo unidos a anillos aromáticos.

Las señales anteriormente descritas son características de un alcaloide *N*-metiltetrahidroprotoberberínico con cuatro sustituyentes oxigenados ubicados sobre los anillos aromáticos que deben corresponder a tres grupos metoxilo y a un grupo hidroxilo (Sariyar *et al.*, 1990; Ruangrunsi *et al.*, 1986).

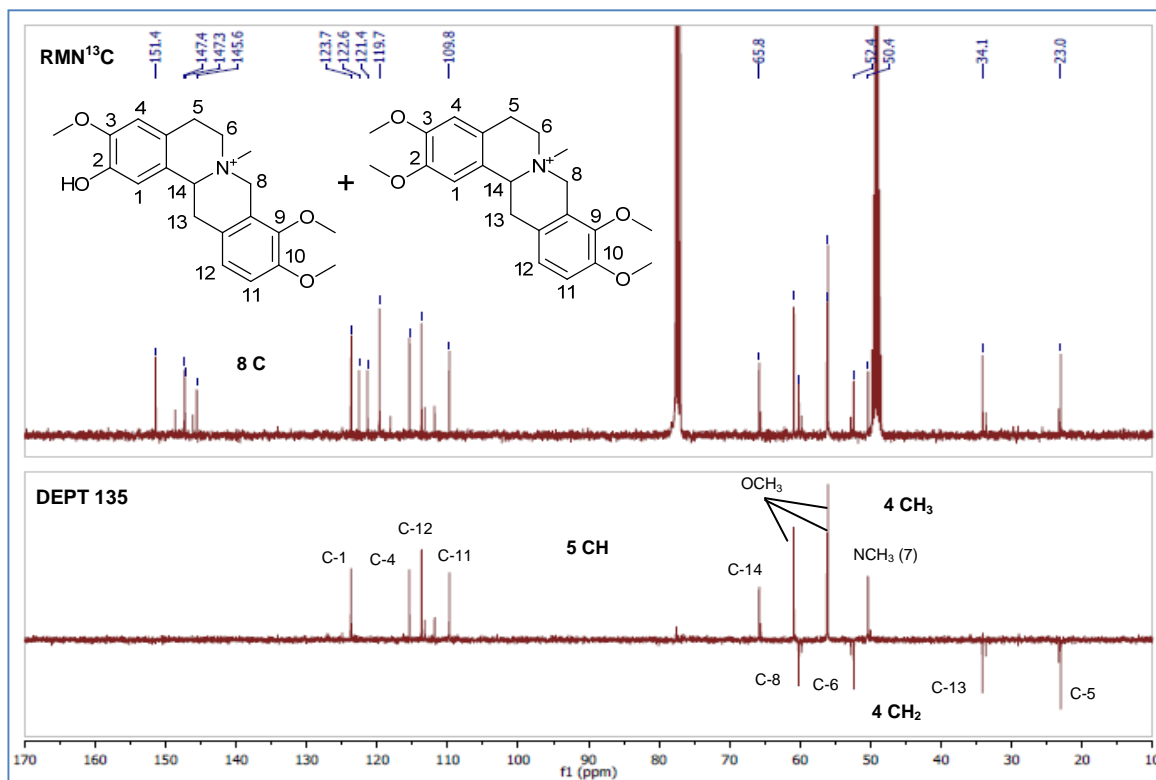


Figura 1.14. Espectro de RMN ^{13}C y DEPT 135 de la mezcla de **Z-16** y **Z-17** ($\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$, 100 MHz).

Las señales en RMN ^{13}C y DEPT para el compuesto minoritario **Z-17** presentan un perfil similar a las de **Z-16**, sugiriendo que **Z-16** y **Z-17** corresponden a alcaloides con el mismo núcleo básico. En el espectro se destacan la presencia de δ 23,3 (CH_2), 33,7 (CH_2), 52,8 (CH_2), 59,8 (CH_2) y 65,6 (CH), señales que por sus desplazamientos y tipos de carbono son característicos de los carbonos alifáticos presentes en los ciclos alifáticos de un alcaloide tetrahidroprotoberberínico y la señal en δ 50,4 (CH_3) característica del carbono de un grupo metilo unido a nitrógeno. La única diferencia entre **Z-16** y **Z-17** está en el tipo de sustituyentes ubicados sobre los anillos aromáticos, en el caso de **Z-16** corresponden a tres grupos

metoxilo y a un grupo hidroxilo, mientras que para **Z-17** de acuerdo al análisis de RMN ^1H corresponden a cuatro grupos metoxilo.

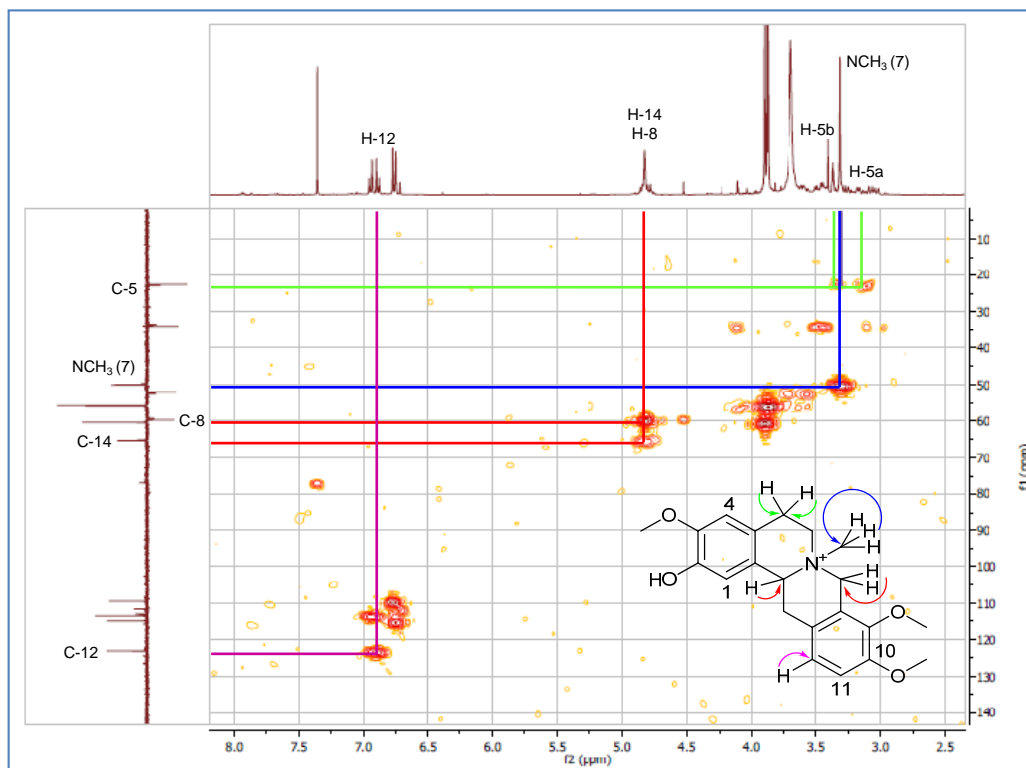


Figura 1.15. Espectro HMQC para la mezcla de **Z-16** y **Z-17** ($\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$, 400 MHz).

La conectividad de cada hidrógeno con el carbono al cual está unido, se realizó mediante análisis del espectro HMQC (Figura 1.15). Para **Z-16** se observan por ejemplo la conectividad de los protones en δ_{H} 3,32 (s, 3H) con el carbono en δ_{C} 50,4 (CH_3) corroborando así la presencia de un grupo metilo unido a nitrógeno. También se observa conectividad de los protones de cada grupo metino con su respectivos carbonos, tal es el caso de δ_{H} 4,79-4,86 (m, 1H) con δ_{C} 65,6 (CH) y δ_{H} 6,95 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H) con δ_{C} 113,7 (CH). El análisis del experimento HMQC permitió determinar la presencia de varios protones diastereotópicos tal es el caso de los protones en δ_{H} 3,15 (dd, $J = 17,4; 6,9$ Hz, 1H) y δ_{H} 3,23-3,29 (m, 1H) que están conectados con el carbono en δ_{C} 23,3 (CH_2).

El análisis del experimento COSY (Figura 1.16), permitió corroborar las asignaciones hechas por HMQC para protones no equivalentes unidos a un mismo carbono, y además determinar sus correlaciones con otros protones unidos a carbonos adyacentes. De este modo se puede destacar la correlación entre sí de los protones diastereotópicos de un grupo metileno en δ_H 3,05 (dd, $J = 18,5; 10,2$ Hz, 1H) y 3,48 (dd, $J = 18,5; 6,0$ Hz, 1H), y de estos con los protones en δ_H 4,78-4,86 (m, 3H).

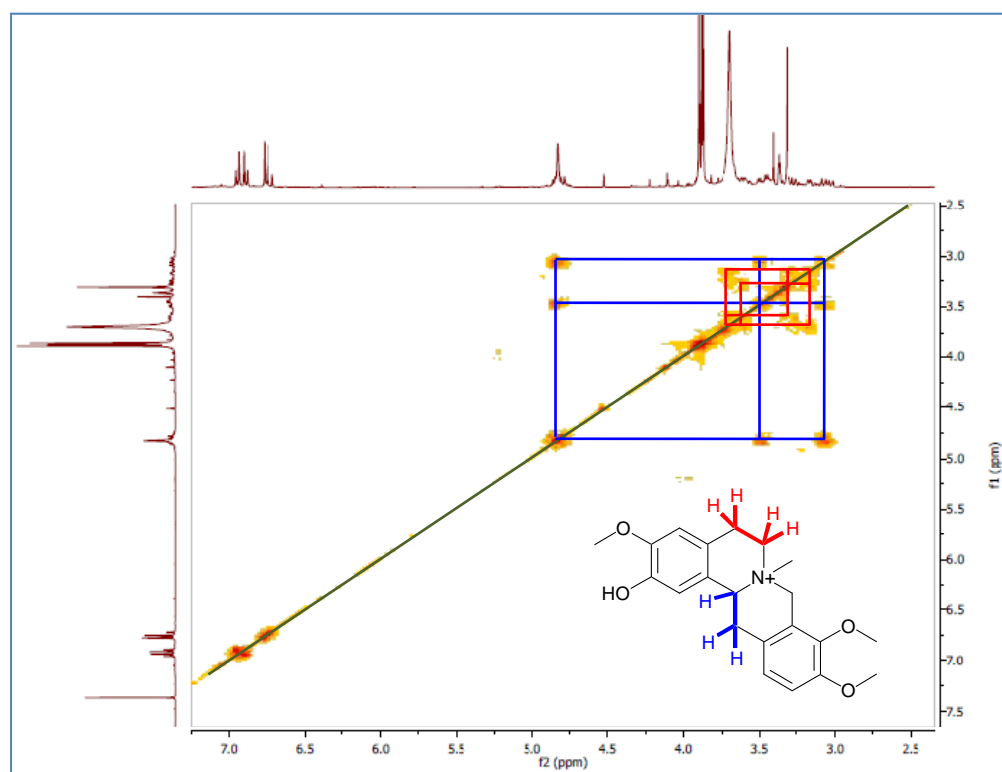


Figura 1.16. Espectro COSY para la mezcla de **Z-16** y **Z-17** ($CDCl_3$ - CD_3OD , 400 MHz).

El uso de las correlaciones a larga distancia, proporcionadas por el experimento HMBC (Figura 1.17), permitió la ubicación de cada uno de los sustituyentes sobre el núcleo básico y la asignación de los carbonos cuaternarios presentes. De este modo para **Z-16** se observan correlaciones a tres enlaces entre los protones de los grupos metoxilo en δ_H 3,87 (s, 3H) y 3,90 (s, 3H) con los carbonos aromáticos en δ_C 151,4 (C) y 145,6 (C), respectivamente. A su vez se observa la correlación de estos carbonos de manera respectiva con los protones en δ_H 6,89 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H) y 6,95 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H) que sugirieron la ubicación de dos grupos metoxilo en el anillo D del núcleo básico. Las correlaciones

observadas en HMBC y en NOESY permitieron ubicar sobre la estructura base tres grupos metoxilo en las posiciones 3, 9 y 10, y un grupo hidroxilo en la posición 2 (Figura 1.18).

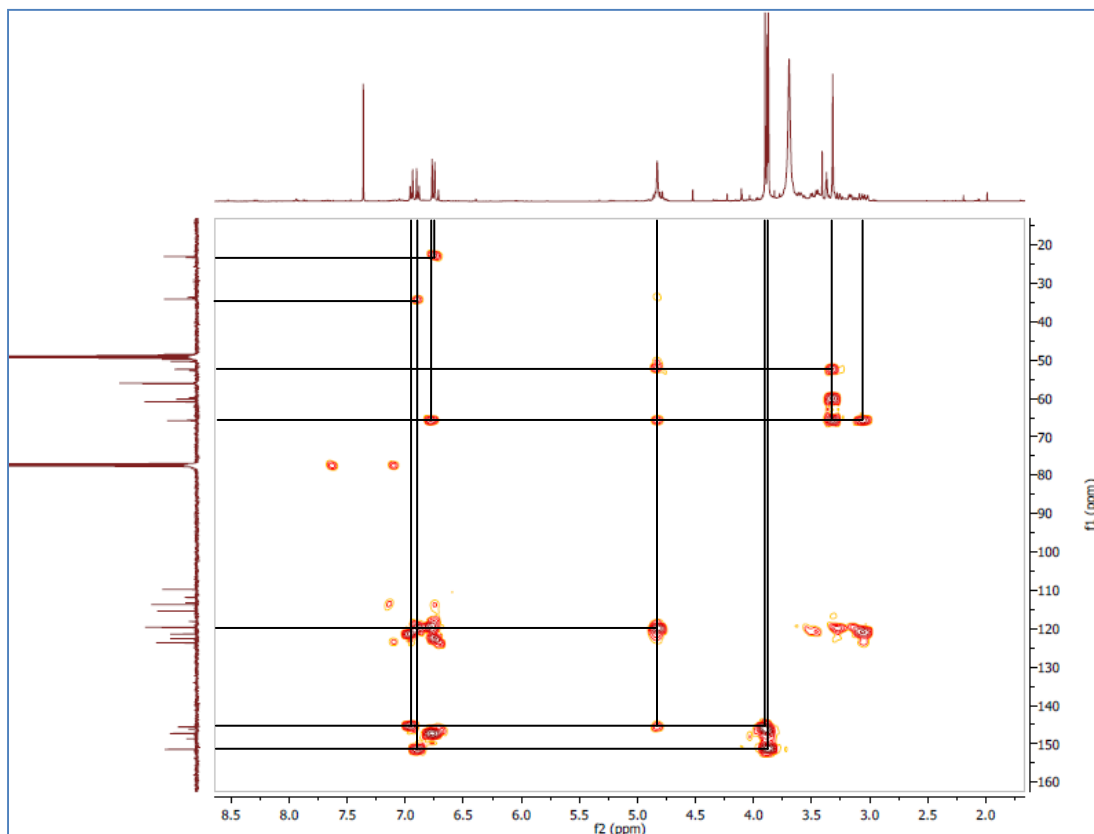


Figura 1.17. Espectro HMBC para la mezcla de Z-16 y Z-17 (CDCl₃-CD₃OD, 400 MHz).

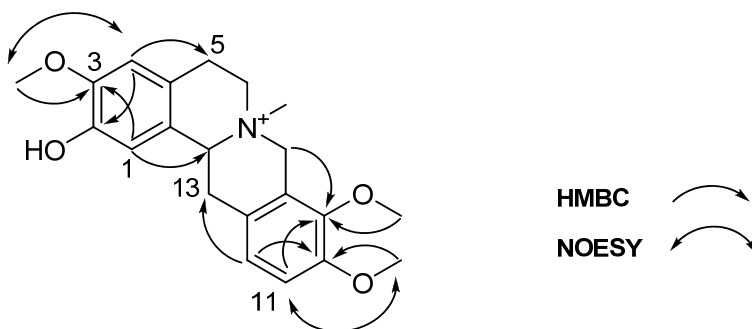


Figura 1.18. Principales correlaciones en HMBC y NOESY para el compuesto Z-16.

Las fórmulas moleculares fueron establecidas como $C_{21}H_{26}NO_4$ (m/z 355,1792 $[M-H]^+$, calculado para $C_{21}H_{25}NO_4$, 355,1784) para **Z-16** y como $C_{22}H_{28}NO_4$ (m/z 369,1941 $[M-H]^+$, calculado para $C_{22}H_{27}NO_4$, 369,1940) para **Z-17**, por análisis de EMAR. Cada fórmula es consistente con 10 grados de insaturación y están de acuerdo al análisis espectroscópico realizado.

A su vez la mezcla fue analizada por CG-EM obteniéndose el TIC (Figura 1.19) en el cual se observan cinco picos, correspondiendo a **Z-16** y **Z-17** los de mayor abundancia de acuerdo a los espectros de masas (Figura 1.20). En el espectro de masas obtenido por impacto electrónico para el compuesto **Z-16** (Figura 1.20 A) se observa el ión con m/z 355 $[M-1]^+$ que está de acuerdo con la fórmula establecida por EMAR. Este espectro se caracteriza por un ión prominente con m/z 341 $[M-15]^+$, que sugiere la pérdida de un grupo metilo y por los iones característicos de una fragmentación retro Diels-Alder asociada con el núcleo tetrahidroprotoberberínico permitiendo ubicar dos grupos metoxilo en el anillo D (m/z 164 $[M-192]^+$) y un grupo metoxilo e hidroxilo en el anillo A (m/z 176 $[M-180]^+$) (Grycová *et al.*, 2007). En el espectro de masas en modo IE para el compuesto **Z-17** (Figura 1.20 B) se observan fragmentaciones similares a las encontradas para **Z-16**, en donde se destacan: un ión con m/z 369 $[M-1]^+$ indicativo de la pérdida de un hidrogeno, un pico intenso con m/z 354 $[M-16]^+$ indicativo de la pérdida de un grupo metilo y los iones característicos de la fragmentación retro Diels-Alder sugiriendo dos grupos metoxilo en el anillo D (m/z 164 $[M-206]^+$) y dos grupos metoxilo en el anillo A (m/z 190 $[M-180]^+$) de manera similar a la tetrahidropalmatina (Ruangrungsi, 1986). El anterior análisis realizado confirma la ubicación de los sustituyentes sobre el núcleo básico para **Z-16** y **Z-17**.

De esta forma los alcaloides **Z-16** y **Z-17** fueron identificados como *N*-metiltetrahidrocolumbamina y *N*-metiltetrahidropalmatina, respectivamente (Figura 1.21). El compuesto **Z-16**, no ha sido reportado previamente en especies del género *Zanthoxylum*, mientras que **Z-17** ha sido aislado en especies de este género y en especies de otras familias de plantas (Guo *et al.*, 1999; Likhitwitayawuid *et al.*, 1993; Watermann y Grundon, 1983).

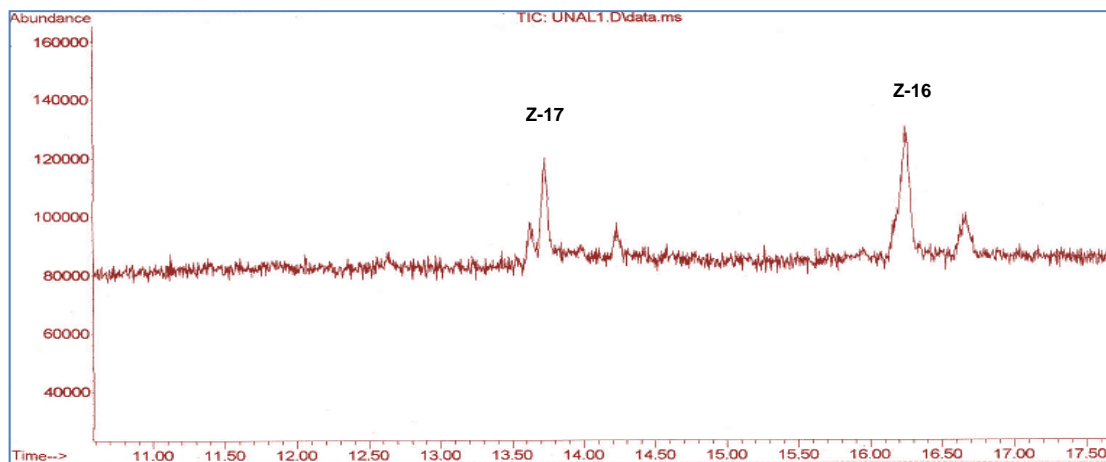


Figura 1.19. TIC obtenido para la mezcla de Z-16 y Z-17.

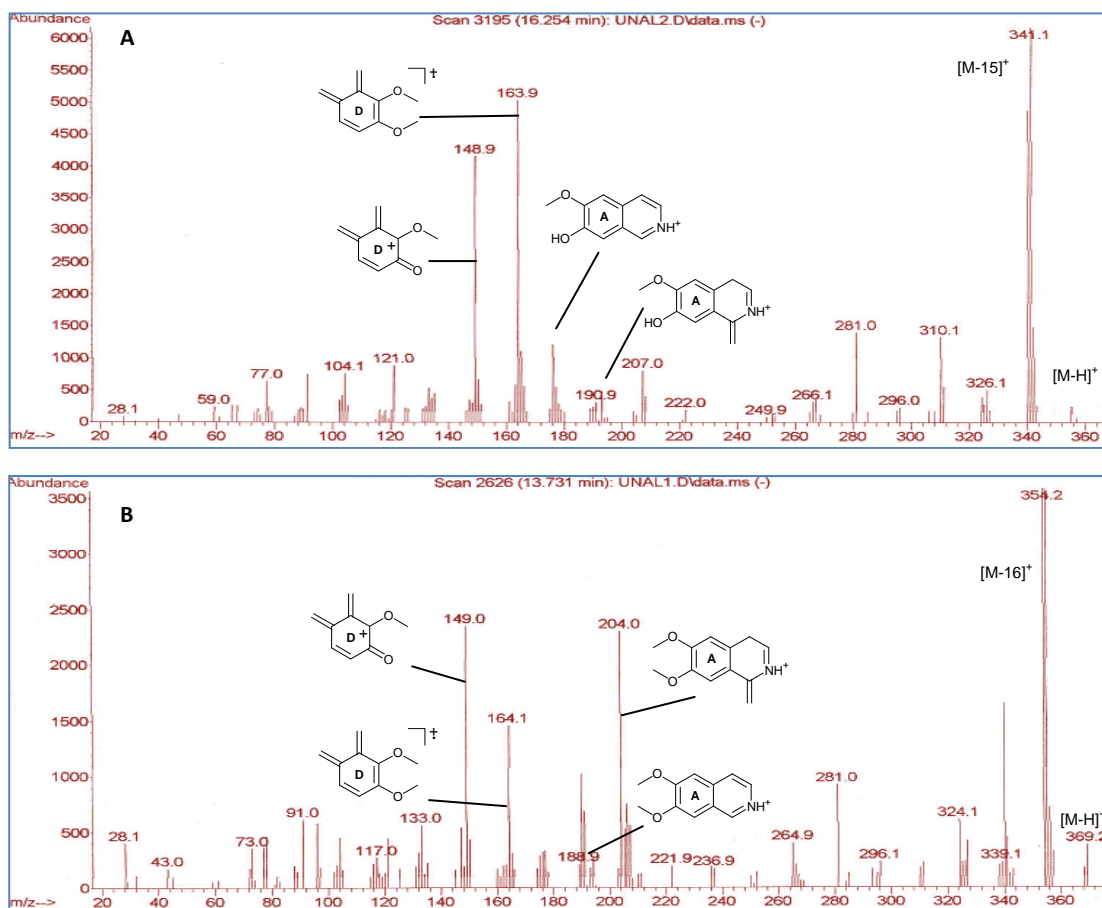


Figura 1.20. Espectros de masas obtenidos por impacto electrónico para Z-16 y Z-17. A) Espectro de masas del compuesto Z-16. B) Espectro de masas del compuesto Z-17.

Los alcaloides tetrahidroprotoberberínicos se encuentran distribuidos generalmente en especies de las familias Papaveraceae, Berberidaceae, Fumiraceae, Menispermaceae, Ranunculaceae, Annonaceae y Rutaceae (Grycová *et al.*, 2007). En la familia Rutaceae se han reportado principalmente en especies de los géneros *Zanthoxylum* y *Phellodendron* (Watermann y Grundon, 1983). Por lo tanto el aislamiento de estos dos alcaloides isoquinolínicos está de acuerdo con los metabolitos que han sido encontrados en el género y por medio de este trabajo son reportados por primera vez en la especie *Z. quinduense*.

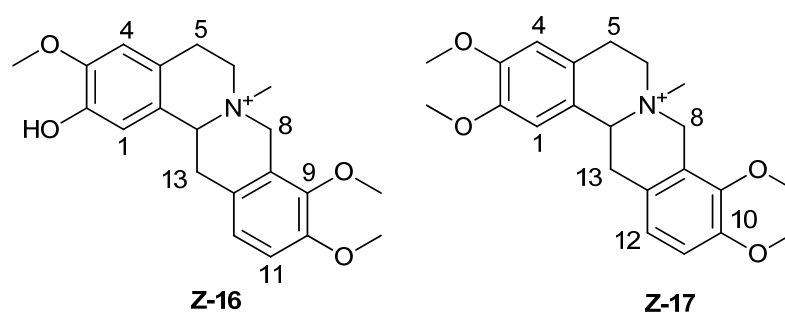


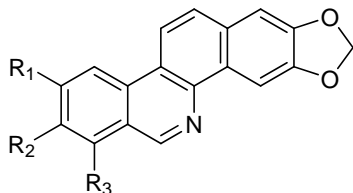
Figura 1.21. Estructura de *N*-metiltetrahydrocolumbamina **Z-16** y *N*-metiltetrahydropalmatina **Z-17**.

1.4.2. Estudio fitoquímico realizado en la corteza de *Z. monophyllum*

El extracto etanólico de la corteza de *Z. monophyllum* fue sometido a extracción ácido-base de alcaloides, de manera similar a la empleada para la corteza de *Z. quinduense*, obteniéndose una fracción enriquecida en alcaloides solubles en cloroformo y una fracción de alcaloides solubles en la mezcla CHCl_3 -EtOH 80:20. Los compuestos fueron aislados mediante CF y fueron identificados empleando técnicas espectroscópicas, por comparación con datos en la literatura y en algunos casos por comparación en CCD con muestras ya identificadas.

A partir de la fracción enriquecida en alcaloides soluble en cloroformo se aislaron e identificaron doce compuestos (Figura 1.22): tres alcaloides benzofenantridínicos, norqueleretrina **Z-4**, decarina **Z-10** y nornitidina **Z-12**; un alcaloide isoquinolónico, thalifolina **Z-25**; dos lignanos, del tipo diarilbutirolactónico y biciclo[3.3.0]octánico, (-)-hinokinina **Z-22** y (+)-siringaresinol **Z-9**, respectivamente; tres coumarinas, (-)-columbianetina **Z-23**, (+)-marmesina **Z-24** y (+)-ulopterol **Z-26**;

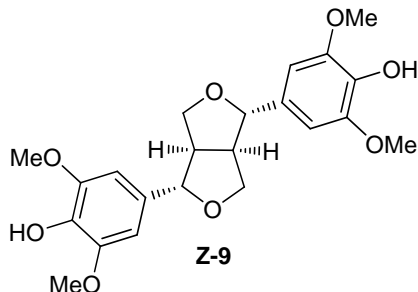
dos bencenoides, xanthoxylina **Z-20** y 2-hidroxi-4,6-dimetoxibenzaldehído **Z-21**; un triterpeno, lupeol **Z-11**.



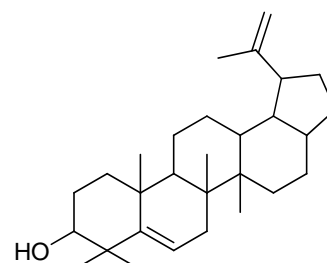
Z-4: R₁ = H; R₂ = R₃ = OMe

Z-10: R₁ = H; R₂ = OH; R₃ = OMe

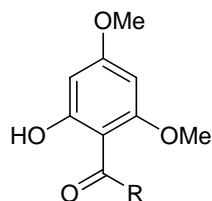
Z-12: R₁ = R₂ = OMe; R₃ = H



Z-9

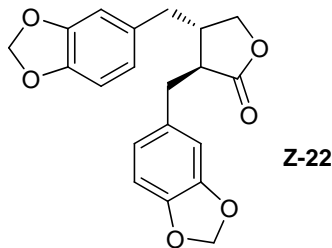


Z-11

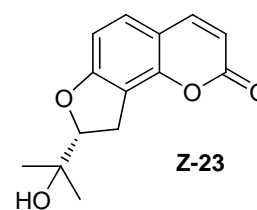


Z-20: R = CH₃

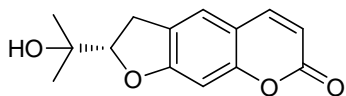
Z-21: R = H



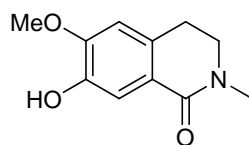
Z-22



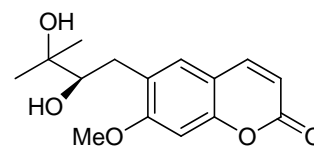
Z-23



Z-24



Z-25



Z-26

Figura 1.22. Compuestos aislados de la fracción clorofórmica para *Z. monophyllum*.

De la fracción enriquecida en alcaloides solubles en la mezcla cloroformo:etanol 80:20, se aislaron e identificaron 5 compuestos (Figura 1.23): un nuevo alcaloide denominado (-)-monophyllidina **Z-29**, junto con los compuestos conocidos berberina **Z-15**, thalifolina **Z-25**, jathrorrhizina **Z-27** y 3 β -glucositosterol **Z-28**.

De acuerdo al estudio fitoquímico realizado sobre la corteza de *Z. monophyllum*, se concluye que éste permitió el aislamiento e identificación de 16 sustancias correspondientes a siete alcaloides, dos lignanos, tres cumarinas, dos bencenoides, un triterpeno y un estero. Los diferentes tipos de metabolitos aislados han sido previamente reportados en la familia Rutaceae, incluyendo el género *Zanthoxylum*, excepto el compuesto denominado (-)-monophyllidina que no presenta reportes

previos en la literatura, estando así de acuerdo con la quimiotaxonomía de la familia y del género. Entre estos metabolitos se destacan los alcaloides de diversos tipos, lignanos y cumarinas aislados que son de gran importancia y característicos para el género *Zanthoxylum* (Grycová *et al.*, 2007; Adesina, 2005; Krane, *et al.*, 1984; Waterman y Grundon, 1983).

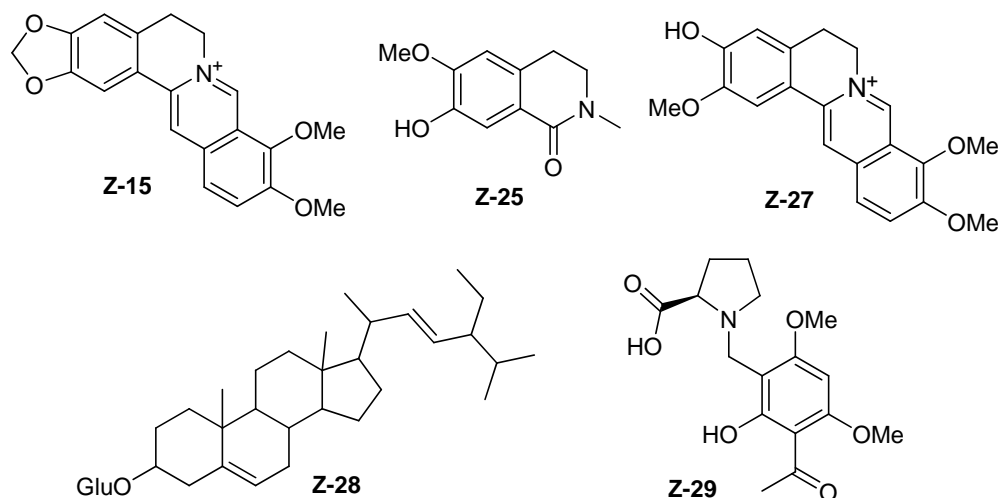


Figura 1.23. Compuestos aislados de la fracción de CHCl_3 -EtOH 80:20 para *Z. monophyllum*.

La investigación realizada ha permitido demostrar la presencia de diversos alcaloides isoquinolonícos junto con un nuevo tipo de alcaloide derivado de prolina en la especie. Este es el primer reporte de norqueleretrina **Z-4**, (+)-siringaresinol **Z-9**, decarina **Z-10**, norritidina **Z-12**, 2-hidroxi-4,6-dimetoxibenzaldehído **Z-21**, (+)-marmesina **Z-24**, thalifolina **Z-25**, (+)-ulopterol **Z-26**, jathrorrhizina **Z-27** y (-)-monophyllidina **Z-29** en *Z. monophyllum*. Los compuestos lupeol **Z-11**, berberina **Z-15**, xanthoxylina **Z-20**, (-)-hinokinina **Z-22** y (-)-columbianetina **Z-23**, ya han sido reportados en investigaciones previas para la especie *Z. monophyllum* (Cuca *et al.*, 1998). A continuación se describe la elucidación estructural del compuesto **Z-29**. Los datos espectroscópicos de los demás compuestos se resumen en el anexo de este capítulo.

1.4.2.1. Elucidación estructural del compuesto **Z-29**.

El compuesto **Z-29** es un sólido cristalino de color blanco con punto de fusión de 150-151 °C (CHCl_3), que da prueba positiva frente al reactivo de Dragendorff indicando así la posible presencia de un

nitrógeno básico en su estructura. Su espectro IR tomado en película se caracteriza por presentar señales indicativas de grupos hidroxilo (en 3415 cm^{-1} , banda ancha de estiramiento O-H y en 1250 , 1231 cm^{-1} señales por tensión C-O), de grupos carbonílicos (señales intensas en 1725 y 1680 cm^{-1} , características de estiramientos C=O), de grupos alifáticos (señales en 2919 , 2851 cm^{-1} por tensiones C-H y en 1450 , 1355 cm^{-1} por flexiones en el plano H-C-H) y aromáticos (señales en 1600 , 1498 y 1462 cm^{-1} de las tensiones C=C en aromáticos).

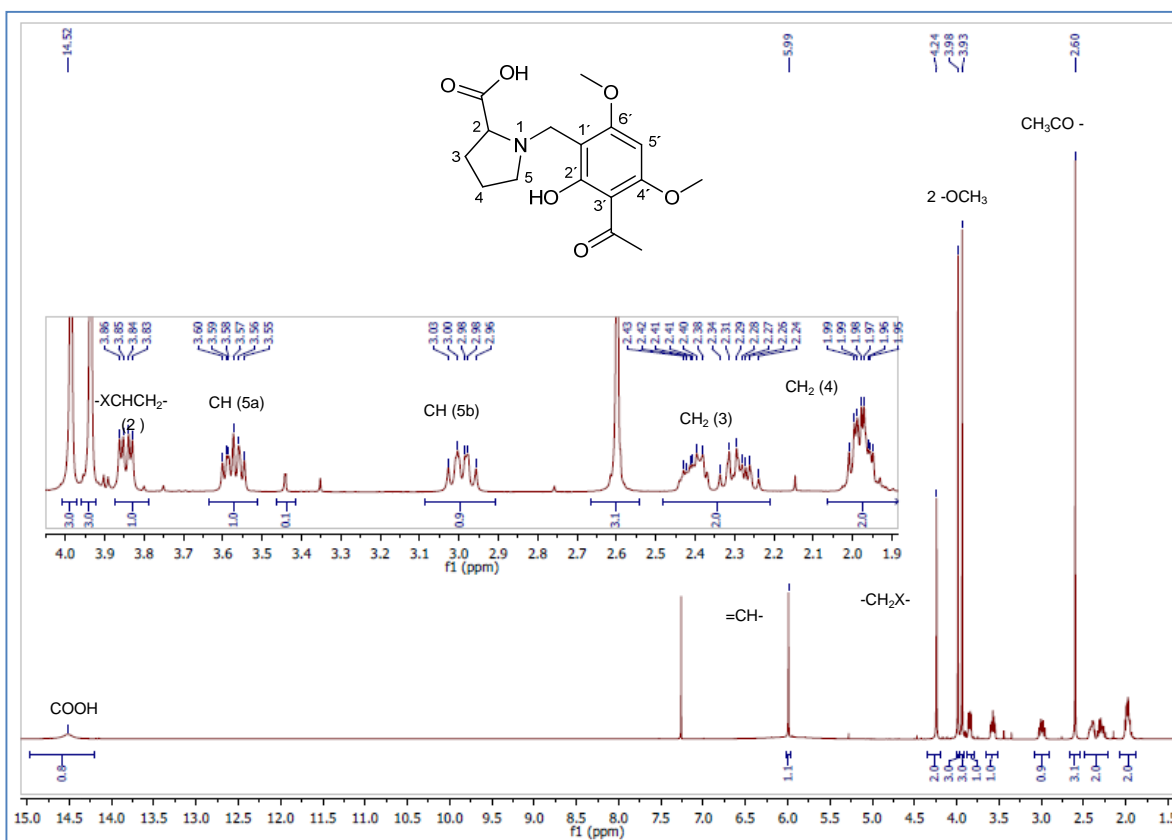


Figura 1.24. Espectro RMN ^1H para el compuesto Z-29 (CDCl_3 , 400 MHz).

Su espectro de RMN ^1H (Figura 1.24), presenta señales para un total de 20 protones, entre las que se destacan las señales en δ 2,60 (s, 3H) característica de un grupo metilo unido a carbonilo en un grupo acetilo $\text{CH}_3\text{CO}-$ y en δ 3,93 (s, 3H), 3,98 (s, 3H) señales típicas de los protones de dos grupos metoxilo unidos a anillo aromático. En el espectro también se destacan las siguientes señales: en δ 3,85 (dd, $J = 9,2$; 3,7, 1H) señal que por su desplazamiento y multiplicidad corresponde al protón de un grupo

metino que está entre un heteroátomo y un metileno (-XCHCH₂-); en δ 4,24 (s, 2H) señal que por su multiplicidad, integración y desplazamiento sugiere la presencia de un grupo metileno aislado unido a heteroátomo (-CH₂X); señal con δ 5,99 (s, 1H) característica para un protón sobre carbono olefínico o aromático y en δ 14,52 (sa, 1H) señal correspondiente al protón de ácido carboxílico.

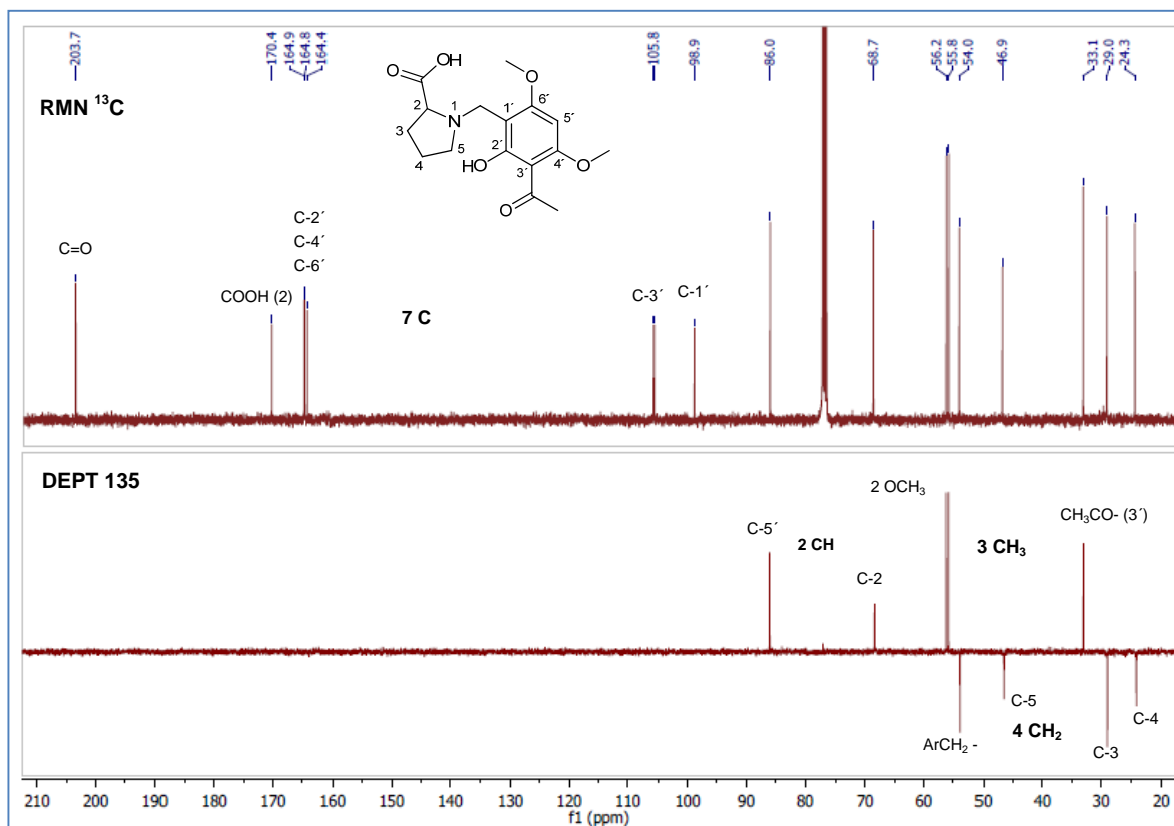


Figura 1.25. Espectro RMN ¹³C Y DEPT 135 para el compuesto **Z-29** (CDCl₃, 100 MHz).

Del análisis de los espectros RMN ¹³C y DEPT 135 (Figura 1.25), se observan en total 16 señales de carbonos para el compuesto **Z-29** de las cuales tres corresponden a carbonos tipo metilo con δ 33,0 (CH₃), 55,8 (CH₃) y 56,2 (CH₃) característicos en un grupo acetilo y en dos grupos metoxilo respectivamente; cuatro señales son debidas a carbonos tipo metileno con δ 24,0 (CH₂), 28,9 (CH₂), 46,6 (CH₂) y 53,8 (CH₂), correspondiendo estas dos últimas de acuerdo a su desplazamiento a carbonos unidos a heteroátomos; dos son de carbonos tipo metino con δ 68,4 (CH) y 86,1 (CH), y siete corresponden a carbonos cuaternarios con δ 98,8 (C), 105,7 (C), 164,4 (C), 164,8 (C), δ 64,9 (C), 170,4

(C) y 203,6 (C), siendo las dos últimas señales características de carbonos carbonílicos de tipo ácido y cetona, respectivamente. Las señales con δ 86,1 (CH), δ 98,8 (C), δ 105,7 (C), 164,5 (C), δ 164,9 (C) y δ 164,9 (C), sugieren la presencia de un anillo aromático pentasustituido en la molécula con tres sustituyentes oxigenados ubicados sobre éste. Los tres sustituyentes oxigenados deben corresponder a dos grupos metoxilo y a un grupo hidroxilo.

Con el espectro HMQC, se determinó la conectividad de cada hidrógeno con el correspondiente carbono, por ejemplo en el espectro se destacan las conectividades del protón en δ_H 5,99 (s, 1H) con el carbono en δ_C 86,1 (CH), del protón en δ_H 3,85 (dd, $J = 9,2, 3,7$, 1H) con el carbono en δ_C 68,4 (CH) y de los protones de un grupo metileno en δ_H 2,92-3,06 (m, 1H) y 3,51-3,65 (m, 1H) con el carbono en δ_C 54,0 (CH₂). Las correlaciones observadas en el espectro de HMQC se ilustran en la Figura 1.26.

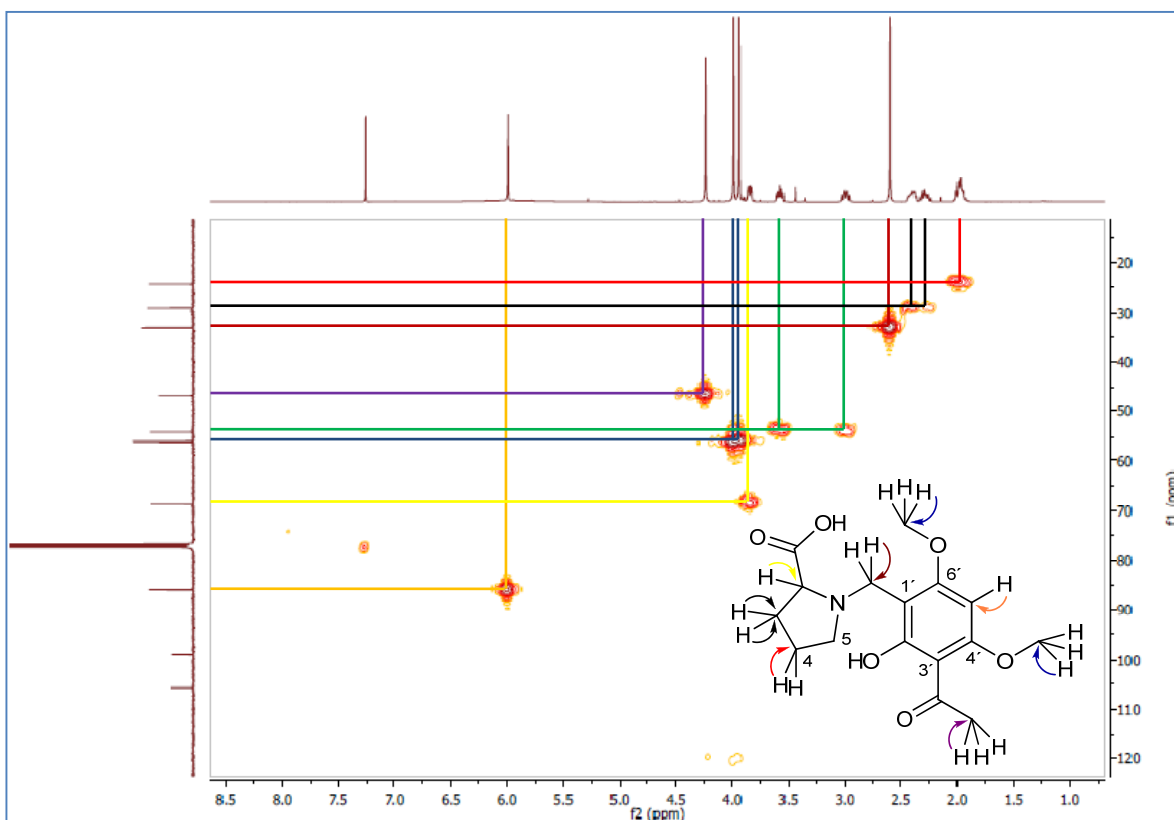


Figura 1.26. Espectro HMQC para el compuesto **Z-29** (CDCl₃, 400 MHz).

El espectro COSY ^1H - ^1H permitió determinar correlaciones escalares existentes entre los protones ubicados sobre carbonos vecinos con lo cual se pudo establecer el anillo pirrolidínico sustituido en posición 2. En la Figura 1.27 se presentan las correlaciones existentes entre las señales de hidrógeno, observándose la del protón en δ_{H} 3,85 (dd, $J = 9,2, 3,7, 1\text{H}$) con las señales de los protones de un grupo metileno en δ_{H} 2,21-2,34 (m, 1H) y 2,35-2,446 (m, 1H), los cuales correlacionan con las señales de un metileno en δ_{H} 1,95-2,01 (m, 2H) que a su vez correlaciona con las señales de los protones diastereotópicos de un grupo metileno en δ_{H} 2,92-3,06 (m, 1H) y 3,51-3,55 (m, 1H).

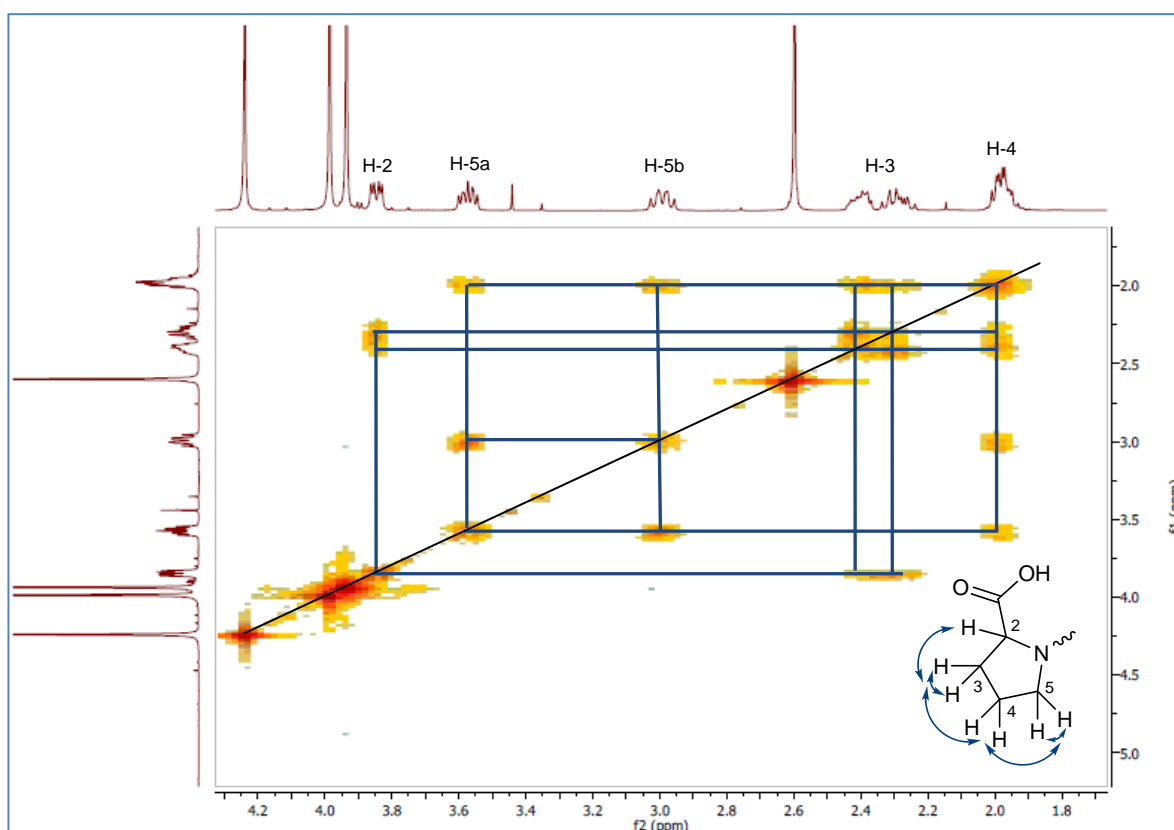


Figura 1.27. Espectro COSY para el compuesto **Z-29** (CDCl_3 , 400 MHz).

Mediante el experimento HMBC se realizó la ubicación de los sustituyentes, la confirmación de los fragmentos propuestos y la asignación de los carbonos cuaternarios. De este modo, por ejemplo se observan correlaciones a tres enlaces entre los protones de un grupo metileno en δ_{H} 4,24 (s, 2H) con los carbonos aromáticos en δ_{C} 98,8 (C), 164,4 (C) y 164,8 (C), y con los carbonos de las posiciones 2 y 5

del ciclo pirrolidínico en δ_C 68,4 (CH) y 54,0 (CH₂), respectivamente. Estas correlaciones permitieron ubicar un grupo metileno entre el anillo aromático en la posición 1 y el átomo de nitrógeno de la pirrolidina. De igual forma se realizó la ubicación del grupo carboxilo en la posición 2 del ciclo pirrolidínico mediante la correlación de los protones en δ_H 2,24-2,34 (m, 1H) y 2,37-2,44 (m, 1H) con el carbono en δ_C 170,4 (C), estableciéndose así la presencia del aminoácido prolina en la estructura. A su vez se estableció por HMBC que el fragmento aromático es similar a la acetofenona xanthoxylina **Z-20** aislada previamente de la fracción alcaloidal soluble en CHCl₃ y que está unido al aminoácido prolina por medio de un metileno. Algunas correlaciones observadas en el espectro de HMBC se ilustran en las Figuras 1.28 y 1.29.

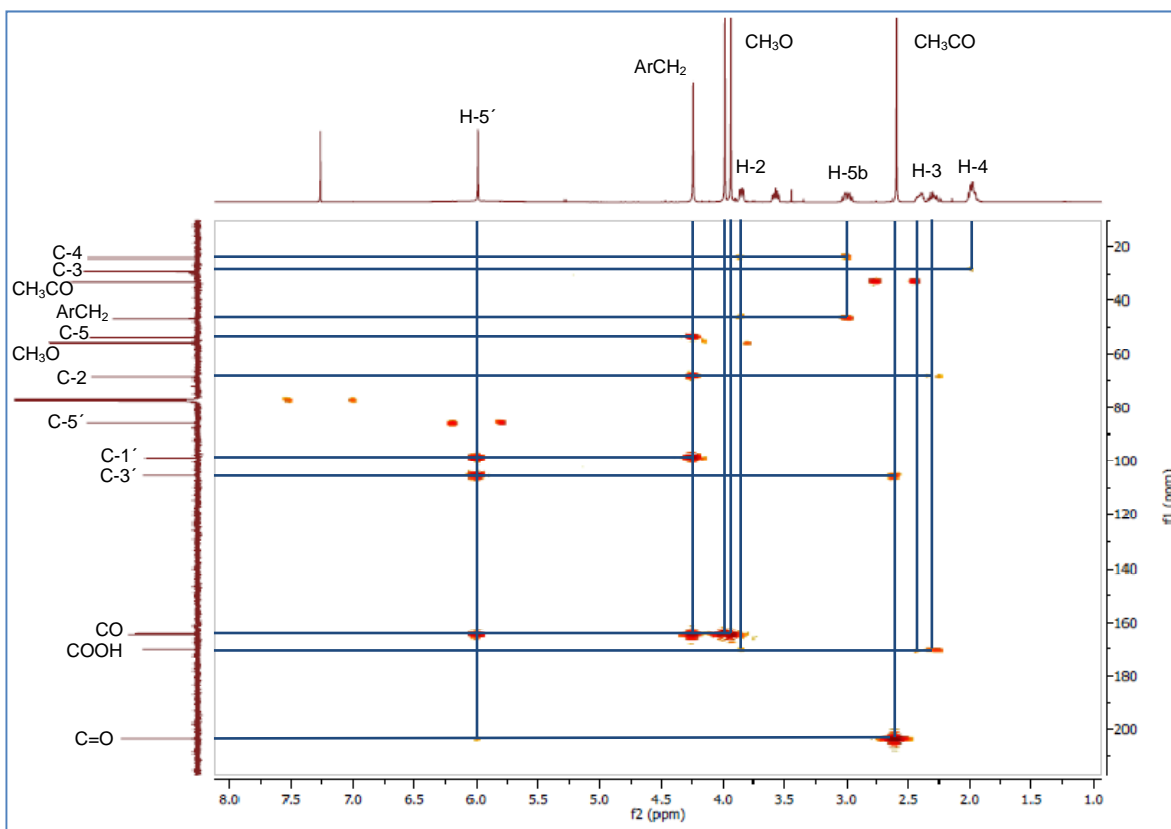


Figura 1.28. Espectro HMBC para el compuesto **Z-29** (CDCl₃, 400 MHz).

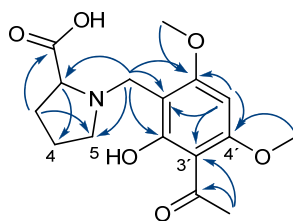


Figura 1.29. Principales correlaciones en HMBC para el compuesto **Z-29**.

Por análisis de EMAR la fórmula molecular fue establecida como $C_{16}H_{21}NO_6$ (m/z 324,1323 $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{22}NO_6$, 324,1447) y es consistente con el resultado del análisis espectroscópico realizado. En el espectro de masas obtenido por impacto electrónico (Figura 1.30) no aparece el ión molecular, se observa los iones con m/z 278 $[M-45]^+$ indicativo de la pérdida del grupo carboxilo, con m/z 209 $[M-114]^+$ originado por pérdida de la prolina y con m/z 70 $[M-253]^+$ un ión correspondiente al pico base y que es característico de pirrolidinas (Mazzini *et al.*, 1997). En el espectro de masas obtenido por ionización química positiva (Figura 1.31) se observa el ión con m/z 324 $[M+1]^+$ que está de acuerdo con la fórmula establecida por EMAR. Este espectro se caracteriza por presentar un pico base con m/z 209 $[M-114]^+$ y la presencia del ión con m/z 70 $[M-253]^+$. El análisis realizado por EM confirma la estructura propuesta para el compuesto **Z-29**.

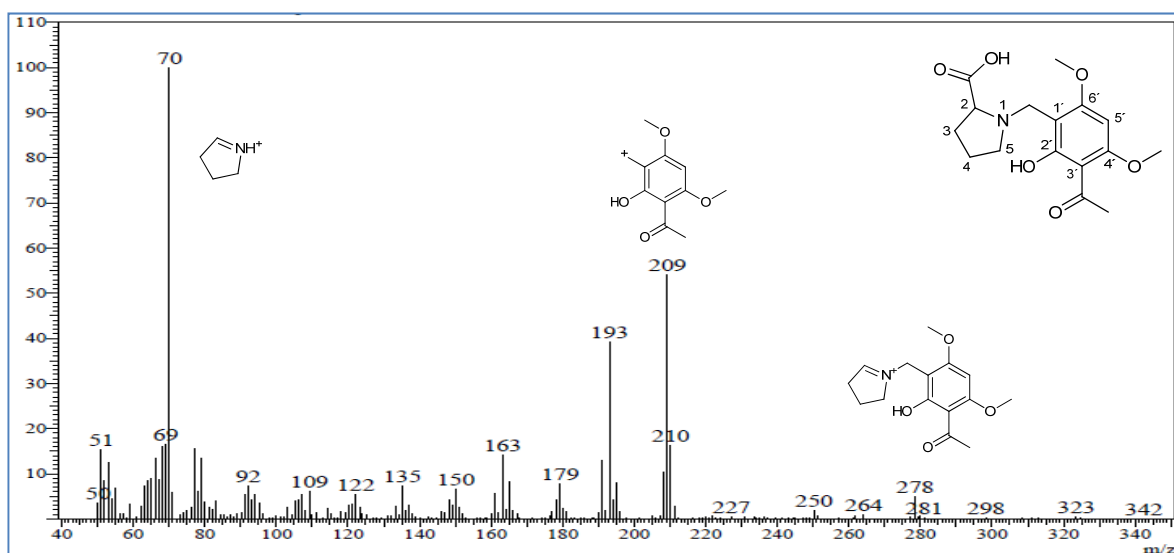


Figura 1.30. Espectros de masas por impacto electrónico para el compuesto **Z-29**.

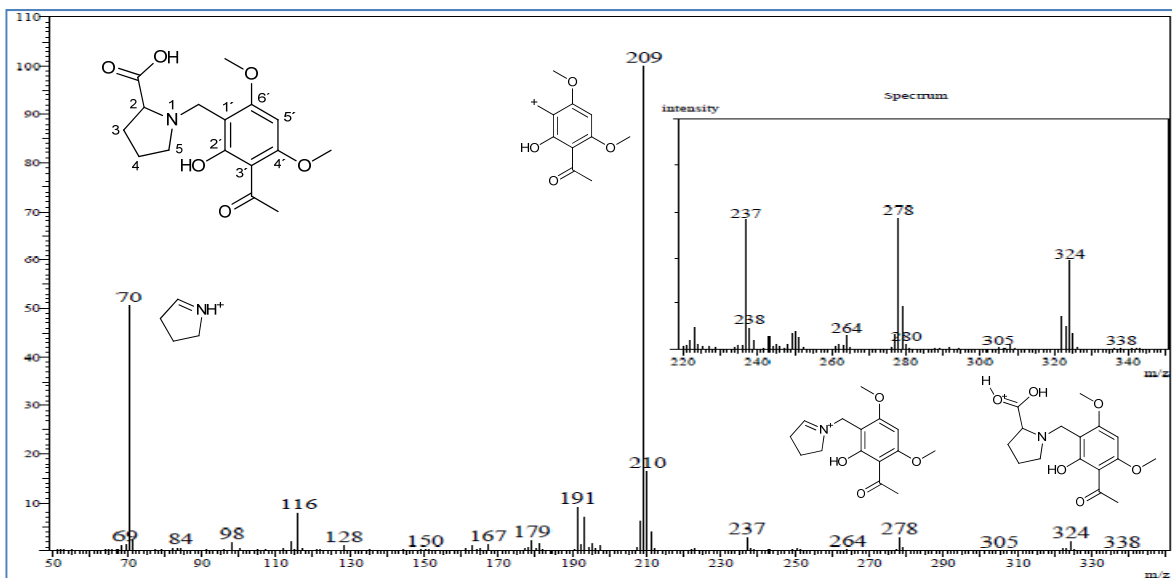


Figura 1.31. Espectros de masas por ionización química para el compuesto **Z-29**.

La rotación óptica determinada fue $[\alpha]_D^{20} -40.2^\circ$ (c 0.28, CHCl_3), que por comparación con los signos reportados para los enantiómeros de la prolina y sus derivados (Mazzini *et al.*, 1997), permite la identificación del compuesto **Z-29**, como el ácido 2S-1-(3'-acetil-2'-hidroxi-4',6'-dimetoxibencil)pirrolidin-2-carboxílico, el cual fue denominado (-)-monophyllidina y para el que no se han encontrado reportes en la literatura (Figura 1.32). En la familia Rutaceae aunque no es muy común este tipo de alcaloides, se han reportados en algunas especies pirrolidinas sustituidas. Teniendo en cuenta su estructura y de acuerdo a los metabolitos aislados en este trabajo se puede deducir que **Z-29** es originado por condensación de los precursores xanthoxylina y el aminoácido *L-N*-metilprolina (Watermann y Grundon, 1983).

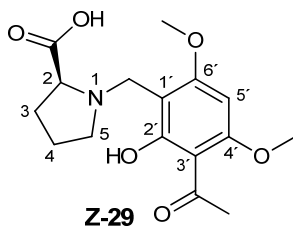


Figura 1.32. Estructura de monophyllidina **Z-29**.

CONCLUSIONES

El presente estudio realiza un aporte a las investigaciones en fitoquímica de especies del género *Zanthoxylum* presentes en Colombia, mediante el aislamiento y caracterización de los metabolitos presentes en dos especies del género (madera y corteza de *Z. quinduense* y corteza de *Z. monophyllum*) y del cual se identificó un nuevo alcaloide, junto con veinte y ocho compuestos conocidos, lo que ha permitido concluir lo siguiente:

- El trabajo fitoquímico desarrollado en la madera de *Z. quinduense* permitió el aislamiento e identificación de tres alcaloides benzofenantridínicos, dos bencenoides, un fenilpropeno, un lignano furofuránico y tres esteroides, de los cuales nueve se reportan por primera vez en la madera de la especie.
- De la corteza de *Z. quinduense* se aislaron e identificaron doce sustancias correspondientes a un triterpeno y a once alcaloides isoquinolínicos de los cuales seis son benzofenantridínicos, dos bencilisoquinolínicos, dos tetrahidroprotoberberínicos y uno berberínico, siendo ocho de ellos reportados por primera vez en la corteza de la especie.
- El trabajo fitoquímico desarrollado sobre la corteza de *Z. monophyllum* permitió el aislamiento e identificación de dieciséis sustancias correspondientes a siete alcaloides (tres benzofenantridínicos, dos berberínicos, un isoquinolínico y uno derivado de prolina), dos lignanos (un furofuránico y uno diarilbutirolactónico), tres cumarinas (dos furocumarinas y una 6,7-sustituida), dos bencenoides, un triterpeno y un esteroide, siendo este el primer reporte de un nuevo alcaloide derivado de prolina denominado (-)-monophyllidina **Z-29** y de la presencia de diez de estos compuestos por primera vez en la especie.
- La investigación desarrollada en *Z. quinduense* y *Z. monophyllum* permitió determinar la presencia de alcaloides de diversas clases, lignanos, fenilpropenos, bencenoides, esteroides, y triterpenos en las especies, entre los cuales, los más representativos por su abundancia y diversidad son los alcaloides.

REFERENCIAS

- Adesina, S. K. The Nigerian *Zanthoxylum*: Chemical and Biological Values. *Afr. J. Trad. CAM.* **2005**, 2, 282-301.
- Arruda, M. S. P.; Fernandes, J. B.; Silva, M. G. F.; Vieira, P. C.; Pirani, J. R. Quinolone Alkaloids from *Zanthoxylum acutifolium*. *Phytochemistry.* **1992**, 31, 3617-3619.
- Bafi-Yebo, N. F. A.; Arnason, J. T.; Baker, J.; Smith, M. L. Antifungal Constituents of Northern Prickly Ash, *Zanthoxylum americanum* Mill. *Phytomedicine.* **2005**, 12, 370-377.
- Bertani, S.; Bourdy, G.; Landau, I.; Robinson, J. C.; Esterre, Ph.; Deharo, E. Evaluation of French Guiana Traditional Antimalarial Remedies. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, 98, 45-54.
- Chaaib, K. F. Investigation Phytochimique d'une Brosse à Dents Africaine *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Syn. *Fagara zanthoxyloides* L.) (Rutaceae). Thèse de doctorat. Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne. **2004**. pp. 11-44.
- Chang, Y.-C.; Hsieh, P.-W.; Chang, F. R.; Wu, R.-R.; Liaw, C.-C.; Lee, K.-H.; Wu, Y.-C. Two New Protopine Argemexicaines A and B and the Anti-HIV Alkaloid 6-Acetyldihydrochelerythrine from Formosan *Argemone mexicana*. *Planta Med.* **2003**, 69, 148-152.
- Chase, M. W.; Morton, C. M.; Kallunki, J. A. Phylogenetic Relationships of Rutaceae: a Cladistic Analysis of the Subfamilies Using Evidence from *rbcL* and *atpB* Sequence Variation. *Am. J. Bot.* **1999**, 86, 1191-1199.
- Chen, J.-J.; Wang, T.-Y.; Hwang, T.-L. Neolignans, a Coumarinolignan, Lignan Derivatives, and a Chromene: Anti-inflammatory Constituents from *Zanthoxylum avicennae*. *J.Nat.Prod.* **2008**, 71, 212-217.

Cordell, A. G. Introduction to Alkaloids -A Biogenetic Approach. John Wiley & Sons. New York, **1981**. pp. 509-517.

Cordero, C. P.; Gómez, S.; León, C. J.; Morantes, S. J.; Aristizabal, F. A. Cytotoxic Activity of five Compounds Isolated from Colombian Plants. *Fitoterapia*. **2004**, 75, 225-227.

Cuca, L. E.; Martínez, J. C.; Monache, F. D. Constituyentes Químicos de *Zanthoxylum monophyllum*. *Rev. Colomb. Quim.* **1998**, 27, 17-27.

Da Silva, S. L.; Figueredo, P. M. S.; Yano, T. Antibacterial and Antifungal Activities of Volatile Oils from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Leaves. *Pharmac. Biol.* **2006**, 44, 657-659.

De García, L. A.; Calle, J.; Reguero, M. T.; Nathan, P. J. Phytochemical Study of *Zanthoxylum monophyllum*. *Fitoterapia*. **1989**, 60, 447-448.

Díaz, W.; Ortega, F. Inventario de Recursos Botánicos Útiles y Potenciales de la Cuenca del Río Morón, Estado Carabobo, Venezuela. *Ernstia*. **2006**, 16, 31-67.

Dieguez-Hurtado, R.; Garrido-Garrido, G.; Prieto-González, S.; Iznaga, Y.; González, L.; Molina-Torres, J.; Curini, M.; Epifanio, F.; Marcotullio, M. C. Antifungal Activity of Some Cuban *Zanthoxylum* Species. *Fitoterapia*. **2003**, 74, 384-386.

Dieguez, R.; Rivas, Y.; Prieto-González, S.; Garrido, G.; Molina-Torres, J. Potencialidad del Género *Zanthoxylum* como Fuente de Agentes con Actividad Biológica. *Acta Farm. Bonaerense*. **2004**, 23, 243-251.

Dupont, C.; Couillerot, E.; Gillet, R.; Caron, C.; Zeches-Hanrot, M.; Riou J.-F.; Trentesaux, C. The Benzophenanthridine Alkaloid Fagaronine Induces Erytroleukemic Cell Differentiation by Gene Activation. *Planta Med.* **2005**, 71, 489- 494.

Dvořák Z.; Kubáň V.; Klejdus B.; Hlaváč J.; Vičar J.; Ulrichová J.; Šimánek V. Quaternary Benzo[c]phenanthridines Sanguinarine and Chelerythrine: A Review of Investigations from Chemical and Biological Studies. *Heterocycles*. **2006**, 68, 2403-2422.

Eun, J.-P.; Koh, G. Y. Suppression of Angiogenesis by the Plant Alkaloid, Sanguinarine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, 317, 618-624.

Global Biodiversity Information Facility: Biodiversity occurrence data. Información obtenida el 20 de Marzo de 2010, a través de GBIF Data Portal <http://data.gbif.org/species/>.

Guo, Y.; Kojima, K.; Lin, L.; Fu, X.; Zhao, C.; Hatano, K.; Chen, Y.; Ogihara, Y. A New *N*-Methyltetrahydroprotoberberine Alkaloids from *Tinospora hainanensis*. *Chem. Pharm Bull.* **1999**, 47, 287-289.

Gómez, Y.; Gil, K.; González, E.; Farías, L. M. Actividad antifúngica de extractos orgánicos del árbol *Fagara monophylla* (Rutaceae) en Venezuela. *J. Trop. Biol.* **2007**, 55, 767-775.

Gonzaga, W. A.; Weber, A. D.; Giacomelli, S. R.; Dalcol, I. I.; Hoelzel, S. C. S.; Morel, A. F. Antibacterial alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. *Planta Med.* **2003**, 69, 371-374.

Gryková, L.; Dostál, J.; Marek, R.; Quaternary Protoberberine Alkaloids. *Phytochemistry*. **2007**, 68, 150-175.

Instituto de Ciencias Naturales: Colecciones en línea. Información obtenida el 20 de Marzo de 2010, a través del portal <http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/>

Jullian, V.; Bourdy, G.; Georges, S.; Maurel, S.; Sauvain, M. Validation of Use of a Traditional Antimalarial Remedy from French Guiana, *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, 106, 348-352.

Kaur, K.; Meenaskhi, J.; Kaur, T.; Jain, R. Antimalarials from Nature. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3229-3256.

Kirira, P. G.; Rukunga, G. M.; Wanyonyi, A. W.; Muregi, F. M.; Gathirwa, J. W.; Muthaura, C. N.; Omar, S. A.; Tolo, F.; Mungai, G. M.; Ndiege, I. O. Anti-plasmodial Activity and Toxicity of Extracts of Plants Used in Traditional Malaria Therapy in Meru and Kilifi Districts of Kenya. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *106*, 403-407.

Krane, B. D.; Fagbule, M. O.; Shamma, M. The Benzophenanthridine Alkaloids. *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*, 1-43.

Likhitwitayawuid, K.; Angerhofer, C. K.; Chai, H.; Pezzuto, J. M.; Cordell, G. A. Cytotoxic and Antimalarial Alkaloids from the Tubers of *Stephania perrei*. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1468-1478.

Maiti, M.; Kumar, G. S. Molecular Aspects on the Interaction of Protoberberine, Benzophenanthridine, and Aristolochia Group of Alkaloids with Nucleic Acid Structures and Biological Perspectives. *Med. Res. Rev.* **2007**, *27*, 649-695.

Maiti, M.; Kumar, G. S. Biophysical Aspects and Biological Implications of the Interaction of Benzophenanthridine Alkaloids with DNA. *Biophys. Rev.* **2009**, *1*, 119-129.

Matsushashi, R.; Satou, T.; Koike, K.; Yokosuka, A.; Mimaki, Y.; Sashida, Y.; Nikaido, T. Nematocidal Activity of Isoquinoline Alkaloids Against a Species of Diplogastridae. *Planta Med.* **2002**, *68*, 169-171.

Matu, E. N.; van Staden, J. Antibacterial and Anti-inflammatory Activities of Some Plants Used for Medicinal Purposes in Kenya. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *87*, 35-41.

Mazzini, C.; Sambri, L.; Regeling, H.; Zwanenburg, B.; Chittenden, G. J. F. Enantiospecific Syntheses of (*R*)- and (*S*)-Proline and Some Derivatives from D-glucono-1,5-lactone. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 3331-3356.

Melo, M. F. F.; Zickel, C. S. Os Gêneros *Zanthoxylum* L. e *Esenbeckia* Kunth (Rutaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Bot. Bras.* **2004**, 18, 73-90.

McGaw, L. J.; Lall, N.; Meyer, J. J. M.; Eloff, J. N. The Potential of South African Plants Against *Mycobacterium* Infections. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, 119, 482-500.

Nissanka, A. P.; Karunaratne, V.; Bandara, B. M. R.; Kumar, V.; Nakanishi, T.; Nishi, M.; Inada, A.; Tillekeratne, L. M.; Wijesundara, D. S. A.; Gunatilaka, A. A. Antimicrobial Alkaloids from *Zanthoxylum tetraspermum* and *caudatum*. *Phytochemistry.* **2001**, 56, 857-861.

Nyangulu, J. M.; Hargreaves, S. L.; Sharples, S. L.; Mackay, S. P.; Waigh, R. D.; Duval, O.; Mberu, E. K.; Watkins, W. M. Antimalarial Benzo[c]phenanthridines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 2007-2010.

Patiño, O. J. Estudio Fitoquímico Parcial de *Zanthoxylum quinduensis* (Rutaceae). Tesis de grado, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. **2004**, pp. 2-56.

Patiño, O. J.; Cuca, L. E. Alcaloides Benzofenantridínicos de *Zanthoxylum quinduensis*. *Rev. Colomb. Quim.* **2004**, 33, 13-20.

Pérez, R. M.; Vargas, R.; Martínez, F. J.; García, E. V.; Hernández, B. Actividad Antioxidante de los Alcaloides de *Bocconia arborea*. Estudio Sobre Seis Métodos de Análisis. *Ars Pharmaceutica.* **2003**, 44, 5-21.

Queiroz, E. F.; Hay, A.-E.; Chaaib, F.; Diemen, D.; Diallo, D.; Hostettmann, K. New and Bioactive Aromatic Compounds from *Zanthoxylum xanthoxyloides*. *Planta Med.* **2006**, 72, 746-750.

Quesada, R. M.; Fernández, J. V. Actualización de Listado de Especies Arbóreas de Uso Forestal y otros Usos en Costa Rica. *Kurú: Revista Forestal* (Costa Rica). **2005**, 2, 1-45.

Rochfort, S.; Parker, A. J.; Dunshea, F. R. Plant Bioactives for Ruminant Health and Productivity. *Phytochemistry.* **2008**, 69, 299-322.

Rodríguez, E. F.; Vásquez, R.; Rojas, R.; Calatayud, G.; León, B.; Campos, J. Nuevas Adiciones de Angiospermas a la Flora del Perú. *Rev. Peru. Biol.* **2006**, 13, 129-138.

Ross, S. A.; Sultana, G. N. N.; Burandt, C. L.; ElSohly, M. A.; Marais, J. P. J.; Ferreira, D. Syncaparmide, a New Antiplasmodial (+)-Norepinephrine Derivative from *Zanthoxylum syncarpum*. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 88-90.

Ruangrungsi, N. Constituents of *Parabaena sagittata*. Two new Tetrahydroprotoberberine Alkaloids. *J. Nat. Prod.* **1986**, 49, 253-258.

Sanabria A. Análisis Fitoquímico Preliminar, Metodología y su Aplicación en la Evaluación de 40 plantas de la Familia Compositae. Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. **1983**, 62-77.

Sariyar, G.; Sari, A.; Freyer, A. J.; Guinaudeau, H.; Shamma, M. Quaternary Isoquinolines Alkaloids from *Papaver* Species. *J. Nat. Prod.* **1990**, 53, 1302-1306.

Saidel, V. *Initial and Bulk Extraction*. En Sarker, S. D.; Latif, Z.; Gray, A.I.; (Eds), *Methods in Biotechnology*. Vol. 20: Natural Products Isolation. Second Edition, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey. **2006**. p. 32.

Seidemann, J. *World Spice Plants: Economic Usage, Botany, Taxonomy*. Springer-Verlag, Berlin. **2005**, p. 399-402.

Silva, L. L.; Paoli, A. A. S. Caracterizacão Morfo-Anatômica da Semente de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam.-Rutaceae. *Rev. Bras. Sementes*. **2000**, 22, 250-256.

Simeón, S.; Rios, J. L., Villar, A. Pharmacological Activities of Benzophenanthridine and Phenanthrene Alkaloids. *Pharmazie*. **1989**, 44, 593-597.

Slaninová, I.; Táborská, E.; Bochořáková H.; Slanina, J. Interaction of Benzo[c]phenanthridine and Protoberberine Alkaloids with Animal and Yeast Cells. *Cell Biol.Toxicol.* **2001**, *17*, 51-63.

Steenkamp, V.; Fernandes, A. C.; van Rensburg, C. E. J. Antibacterial Activity of Venda Medicinal Plants. *Fitoterapia.* **2007**, *78*, 561-564.

Stermitz, F. R.; Sharifi, I. A. Alkaloids of *Zanthoxylum monophyllum* and *Z. punctatum*. *Phytochemistry.* **1977**, *16*, 2003-2006.

Stermitz, F. R.; Caolo, M. A.; Swinehart, J. A. Alkaloids and other Constituents of *Zanthoxylum williamsii*, *Z. monophyllum* and *Z. fagara*. *Phytochemistry.* **1980**, *19*, 1469-1472.

Tang, W.; Hemm, I.; Bertram, B. Recent Development of Antitumor Agents from Chinese Herbal Medicines; Part I. Low Molecular Compounds. *Planta Med.* **2003**, *69*, 97-108.

Tewary, D. K.; Bhardwaj, A.; Shanker, A. Pesticidal Activities in Five Medicinal Plants Collected from Mid Hills of Western Himalayas. *Ind. Crops Prod.* **2005**, *22*, 241-247.

Tillequin, F. Rutaceous Alkaloids as Models for the Design of Novel Antitumor Drugs. *Phytochem. Rev.* **2007**, *6*, 65-70.

Wang, L.; Weller, C. L. Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants, *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, *17*, 300-312.

Waterman, P. G.; Grundon, M. F. Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales. Academic Press, London. **1983**.

Yang, X. Aroma Constituents and Alkylamides of Red and Green Huajiao (*Zanthoxylum bungeanum* and *Zanthoxylum schinifolium*). *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1689-1696.

ANEXOS DE FITOQUÍMICA

Datos Espectroscópicos y Constantes Físicas los Compuestos:

Norqueleritrina (Z-4)

(-)-6-Acetonildihidroqueleritrina (Z-5)

Evofolina-C (Z-8)

(+)-Siringaresinol (Z-9)

Decarina (Z-10)

Nornitidina (Z-12)

(-)-6-Carboximetildihidroqueleritrina (Z-13)

Queleritrina (Z-14)

Berberina (Z-15)

N-metiltetrahydrocolumbamina (Z-16) y *N*-metiltetrahidropalmatina (Z-17)

(-)-Isotembetarina (Z-18)

(-)-Xylopinidina (Z-19)

(-)-Hinokinina (Z-22)

(-)-Columbianetina (Z-23)

(+)-Marmesina (Z-24)

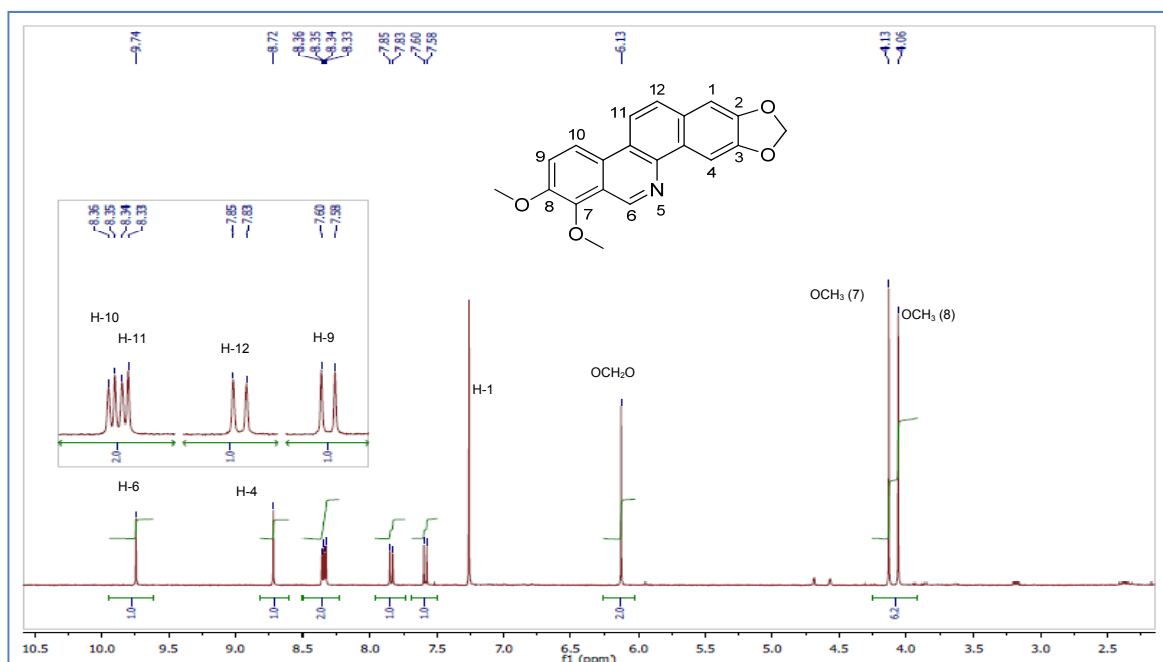
Thalifolina (Z-25)

(+)-Ulopterol (Z-26)

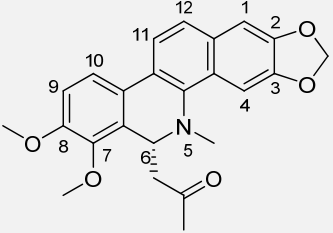
Jathrorrhizina (Z-27)

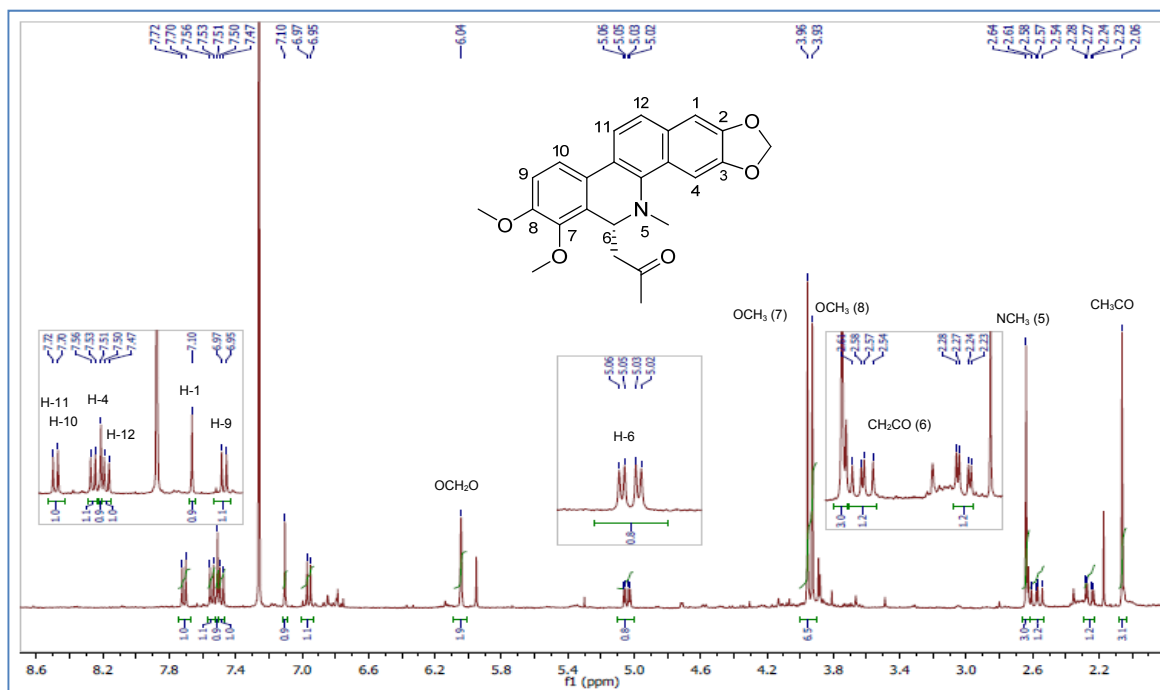
(-)-Monophyllidina (Z-29)

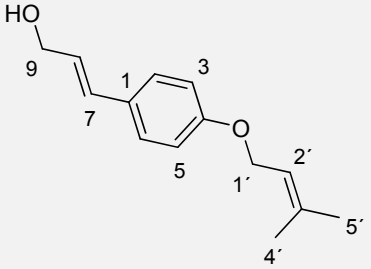
	Nombre:	Norqueleritrina (Z-4)
	Estado físico	Sólido amarillo claro.
	Formula molecular	C ₂₀ H ₁₅ NO ₄
	Peso molecular	333,3 g/mol
	Punto de fusión	213-215°C (CHCl ₃)
	Datos EMAR	EMAR calculada para C ₂₀ H ₁₅ NO ₄ 333,1001, observada 333,1000.
EM-IE: m/z (%) = 333 (100), 318 (26), 290 (72), 275 (34), 232 (14), 188 (13), 98 (16).		
IR: ν = 3012 (=C-H), 2924 (C-H), 1593 (C=C), 1529 (C=C), 1503 (C=C), 1463 (C=C), 1383 (H-C-H), 1250 (C-O), 1215 (C-O), 1073 (C-O) y 1037 (C-O) cm ⁻¹ .		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃): δ 9.74 (1H, s, H-6), 8.72 (1H, s, H-4), 8.35 (1H, d, <i>J</i> = 9.1 Hz, H-10), 8.34 (1H, d, <i>J</i> = 8.9 Hz, H-11), 7.84 (1H, d, <i>J</i> = 8.9 Hz, H-12), 7.59 (1H, d, <i>J</i> = 9.1 Hz, H-9), 7.26 (1H, s, H-1), 6.13 (2H, s, OCH ₂ O), 4.13 (3H, s, OCH ₃), 4.06 (3H, s, OCH ₃).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): δ 149.4 (C-8), 148.5 (C-3), 148.3 (C-2), 145.2 (C-7), 146.5 (C-6), 140.0 (C-4b), 129.7 (C-12a), 129.2 (C-4a), 128.1 (C-10a), 127.0 (C-12), 121.8 (C-6a), 120.0 (C-10b), 118.7 (C-9), 118.3 (C-10), 118.3 (C-11), 104.4 (C-1), 102.2 (C-4), 101.3 (OCH ₂ O), 61.9 (OCH ₃), 56.8 (OCH ₃).		
Datos espectroscópicos descritos en la literatura: (Tousek <i>et al.</i> , 2004).		

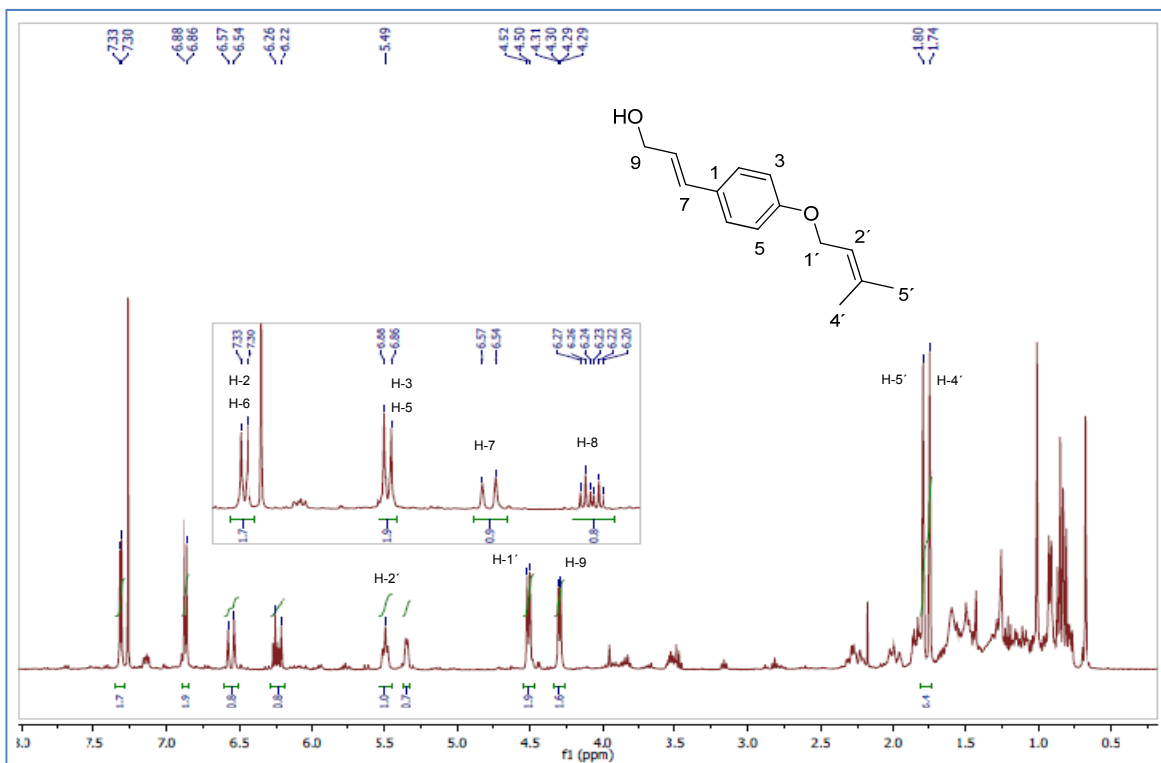


Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de norqueleritrina **Z-4**.

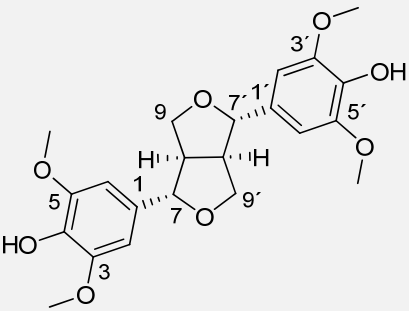
	Nombre:	(-)-6-Acetonildihidroqueleritina (Z-5)
	Estado físico	Solido de color amarillo claro.
	Formula molecular	C ₂₄ H ₂₃ NO ₅
	Peso molecular	405.4 g/mol
	Punto de fusión	188-192°C (CHCl ₃)
	Rotación óptica	[α] _D ²⁰ : -135 (c 0.13, CHCl ₃)
IR: ν = 3015 (=C-H), 2927 (C-H), 1715 (C=O), 1610 (C=C), 1529 (C=C), 1463 (C=C), 1383 (H-C-H), 1278 (C-O), 1175 (C-O), 1075 (C-O) y 1040 (C-O) cm ⁻¹ .		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃): δ 7.71 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-11), 7.54 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-10), 7.53 (1H, s, H-4), 7.49 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-12), 7.14 (1H, s, H-1), 6.96 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-9), 6.04 (2H, s, OCH ₂ O), 5.06 (1H, dd, J = 11.2, 3.6 Hz, H-6), 3.96 (3H, s, OCH ₃), 3.93 (3H, s, OCH ₃), 2.66 (3H, s, NCH ₃), 2.61 (1H, dd, J = 15.0, 11.2 Hz, CH _B), 2.25 (1H, dd, J = 15.0, 3.6 Hz, CH _A), 2.07 (3H, s, CH ₃ CO).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): δ 207.7 (CO), 152.2 (C-8), 148.2 (C-3), 147.6 (C-2), 145.6 (C-7), 139.2 (C-4b), 130.9 (C-12a), 128.1 (C-6a), 127.3 (C-4a), 124.7 (C-10a), 123.8 (C-12), 123.2 (C-10b), 119.8 (C-11), 118.8 (C-10), 111.6 (C-9), 104.4 (C-1), 101.1 (OCH ₂ O), 100.6 (C-4), 61.0 (OCH ₃), 55.8 (OCH ₃), 54.8 (C-6), 46.8 (CH ₂ CO), 42.8 (NCH ₃), 31.0 (CH ₃ CO).		
Datos descritos en la literatura (Chen <i>et al.</i> , 2005; Martínez-Martínez <i>et al.</i> , 2002; Krane <i>et al.</i> , 1984).		

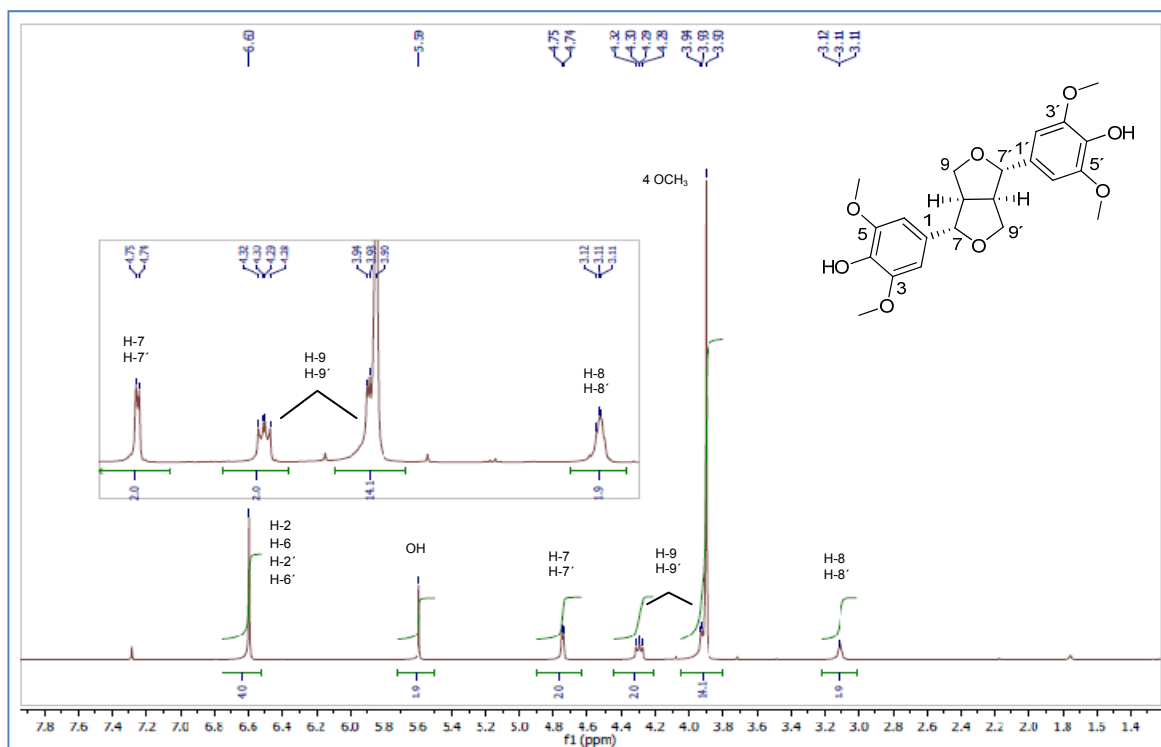

 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de (-)-6-acetonildihidroqueleritina **Z-5**.

	Nombre:	Evofolina-C (Z-8)
	Estado físico	Aceite
	Formula molecular	C ₁₄ H ₁₈ O ₂
	Peso molecular	218,3 g/mol
	RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃): δ 7.31 (2H, d, <i>J</i> = 8.7 Hz, H-2, H-6), 6.86 (2H, d, <i>J</i> = 8.7 Hz, H-3, H-5), 6.55 (1H, da, <i>J</i> = 15.9 Hz, H-7), 6.23 (1H, dt, <i>J</i> = 15.8, 6.0 Hz, H-8), 5.49 (1H, m, H-2'), 4.50 (2H, d, <i>J</i> = 6.8 Hz, H-1'), 4.29 (2H, dd, <i>J</i> = 5.9, 1.0 Hz, H-9), 1.80 (3H, sa, H-5'), 1.74 (3H, sa, H-4').	
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): δ 158.6 (C-4), 138.3 (C-3'), 131.0 (C-7), 129.3 (C-1), 126.1 (C-8), 126.1 (C-3 and C-5), 119.6 (C-2'), 114.7 (C-2 and C-6), 64.8 (C-1'), 64.0 (C-9), 25.8 (C-5'), 18.2 (C-4').		
Datos reportados en la literatura (Brader <i>et al.</i> , 1997).		

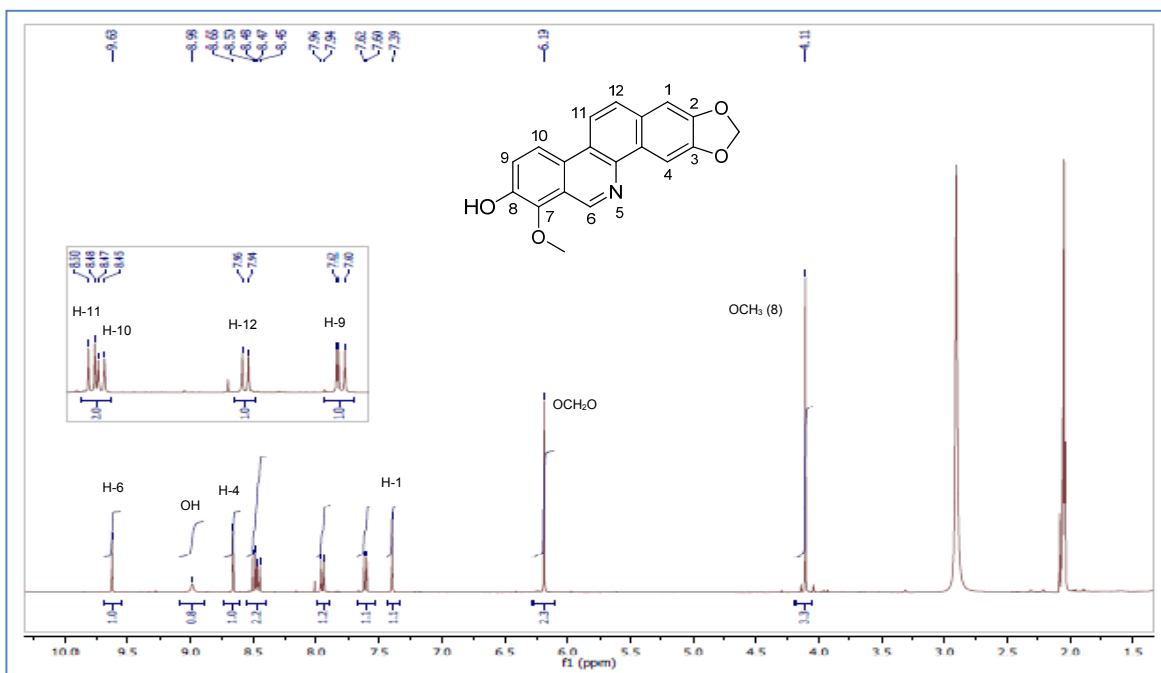


Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de una mezcla en donde se identifico evofolina-C **Z-8**.

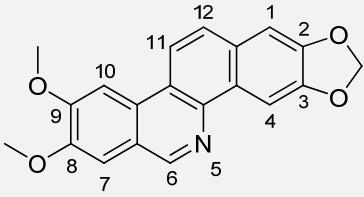
	Nombre:	(+)-Siringaresinol (Z-9)
	Estado físico	Aceite incoloro
	Formula molecular	C ₂₂ H ₂₆ O ₈
	Peso molecular	418.4 g/mol
	Rotación óptica	[α] _D ²⁵ : +41.2° (c 0.28, CHCl ₃)
IR: ν = 3420 (O-H), 2942 (C-H), 1605 (C=C), 1519 (C=C), 1464 (C=C), 1420 (H-C-H), 1380 (H-C-H), 1230 (C-O), 1110 (C-O) cm ⁻¹ .		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃): δ 6.60 (4H, s, H-2, H-6, H-2', H-6'), 5.59 (2H, sa, OH), 4.75 (2H, d, J = 4.2 Hz, H-7, H-7'), 4.30 (2H, dd, J = 9.0, 6.8 Hz, H-9 _{eq} , H-9' _{eq}), 4.05-3.90 (2H, m, H-9 _{ax} , H-9' _{ax}), 3.90 (12H, s, OMe), 3.13-3.10 (2H, m, H-8, H-8').		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): δ 147.1 (C-3, C-5, C-3', C-5'), 134.3 (C-4, C-4'), 132.0 (C-1, C-1'), 102.7 (C-2, C-6, C-2', C-6'), 86.8 (C-7, C-7'), 71.7 (C-9, C-9'), 56.3 (OMe), 54.3 (C-8, C-8').		
Datos descritos en la literatura (El-Hassan <i>et al.</i> , 2003; Ayres y Loike, 1990).		

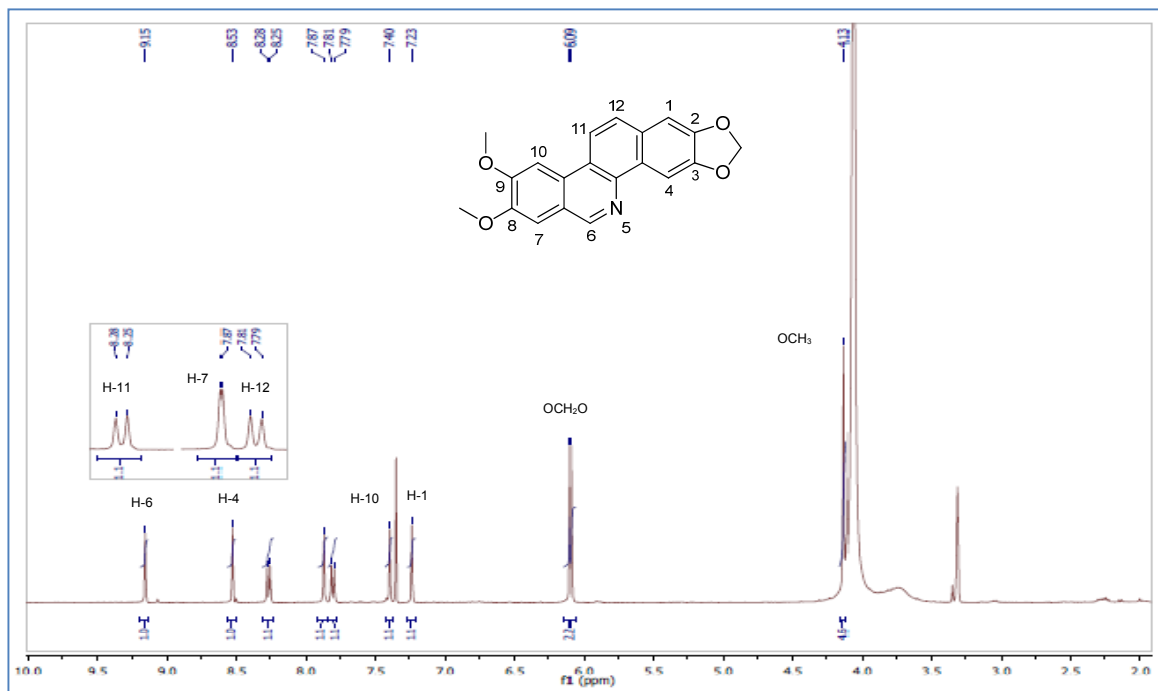

 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de (+)-siringaresinol **Z-5**.

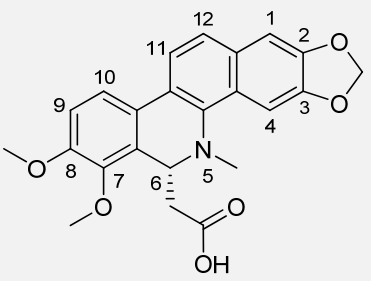
	Nombre:	Decarina (Z-10)
	Estado físico	Sólido amorfo de color café oscuro.
	Formula molecular	C ₁₉ H ₁₃ NO ₄
	Peso molecular	319,3 g/mol
	Punto de fusión	247-249°C (CHCl ₃ -MeOH)
	Datos EMAR	EMAR calculada para C ₁₉ H ₁₃ NO ₄ 319,0845, observada 319,0842.
EM-IE: <i>m/z</i> (%) = 319 (100), 304 (81), 276 (68), 218 (15), 190 (15).		
IR: ν = 3300 (O-H), 2920 (C-H), 1590 (C=C), 1520 (C=C), 1500 (C=C), 1455 (C=C), 1360 (H-C-H), 1237 (C-O), 1205 (C-O), y 1037 (C-O) cm ⁻¹ .		
RMN ¹H (400 MHz, acetona-d ₆): δ 9.63 (1H, s, H-6), 8.98 (1H, sa, OH), 8.66 (1H, s, H-4), 8.49 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz, H-11), 8.45 (1H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz, H-10), 7.95 (1H, d, <i>J</i> = 8.9 Hz, H-12), 7.61 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz, H-9), 7.39 (1H, s, H-1), 6.19 (2H, s, OCH ₂ O), 4.11 (3H, s, OCH ₃).		
RMN ¹³C (100 MHz, acetona-d ₆): δ 150.4 (C-3), 150.2 (C-2), 149.4 (C-8), 147.6 (C-6), 144.5 (C-7), 141.4 (C-4b), 131.6 (C-12a), 130.9 (C-4a), 129.2 (C-10a), 128.9 (C-12), 125.0 (C-9), 123.8 (C-6a), 122.2 (C-10b), 120.6 (C-10), 120.3 (C-11), 106.2 (C-1), 103.3 (C-4), 103.5 (OCH ₂ O), 63.2 (OCH ₃).		
Datos espectroscópicos descritos en la literatura (Martin <i>et al.</i> , 2005; Krane <i>et al.</i> , 1984).		

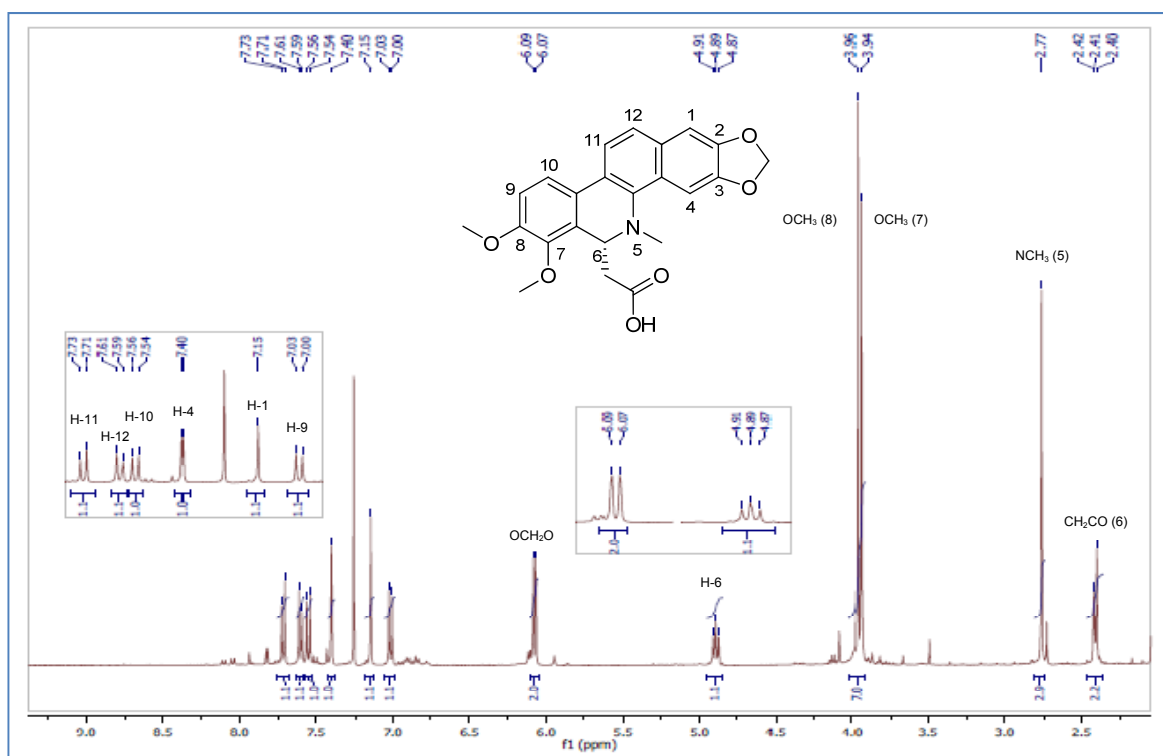


Espectro de RMN ¹H (acetona-d₆, 400 MHz) de decarina **Z-10**.

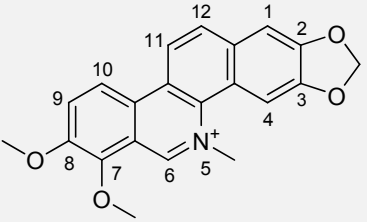
	Nombre:	Nornitidina (Z-12)
	Estado físico	Sólido amarillo claro.
	Formula molecular	C ₂₀ H ₁₅ NO ₄
	Peso molecular	333,3 g/mol
	Punto de fusión	280-282°C (CHCl ₃ -MeOH)
	Datos EMAR	EMAR calculada para C ₂₀ H ₁₅ NO ₄ 333.1001, observada 333.1001.
EM-IE: <i>m/z</i> (%) = 333 (74), 318 (15), 290 (24), 196 (15), 181 (62), 136 (21), 135 (100), 120 (54), 105 (62), 77 (50) .		
IR: ν = 2923 (C-H), 2854 (C-H), 1619 (C=C), 1496 (C=C), 1463 (C=C), 1251 (C-O), 1190 (C-O), y 1035 (C-O) cm ⁻¹ .		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃ -CD ₃ OD): δ 9.15 (1H, s, H-6), 8.53 (1H, s, H-4), 8.26 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz, H-11), 7.87 (1H, s, H-7), 7.80 (1H, d, <i>J</i> = 8.9 Hz, H-12), 7.40 (1H, s, H-10), 7.23 (1H, s, H-1), 6.09 (2H, s, OCH ₂ O), 4.13 (3H, s, OCH ₃), 4.10 (3H, s, OCH ₃).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃ -CD ₃ OD): δ 153.0 (C-9), 149.3 (C-8), 149.2 (C-6), 148.3 (C-3), 148.1 (C-2), 140.0 (C-4b), 129.5 (C-4a), 129.0 (C-6a), 128.2 (C-12a), 126.6 (C-12), 121.9 (C-10a), 120.0 (C-10b), 118.0 (C-11), 107.2 (C-10), 104.3 (C-1), 101.5 (C-7), 101.4 (C-4), 101.2 (OCH ₂ O), 55.9 (OCH ₃), 55.8 (OCH ₃).		
Datos espectroscópicos descritos en la literatura (Sukari <i>et al.</i> , 1999; Krane <i>et al.</i> , 1984).		

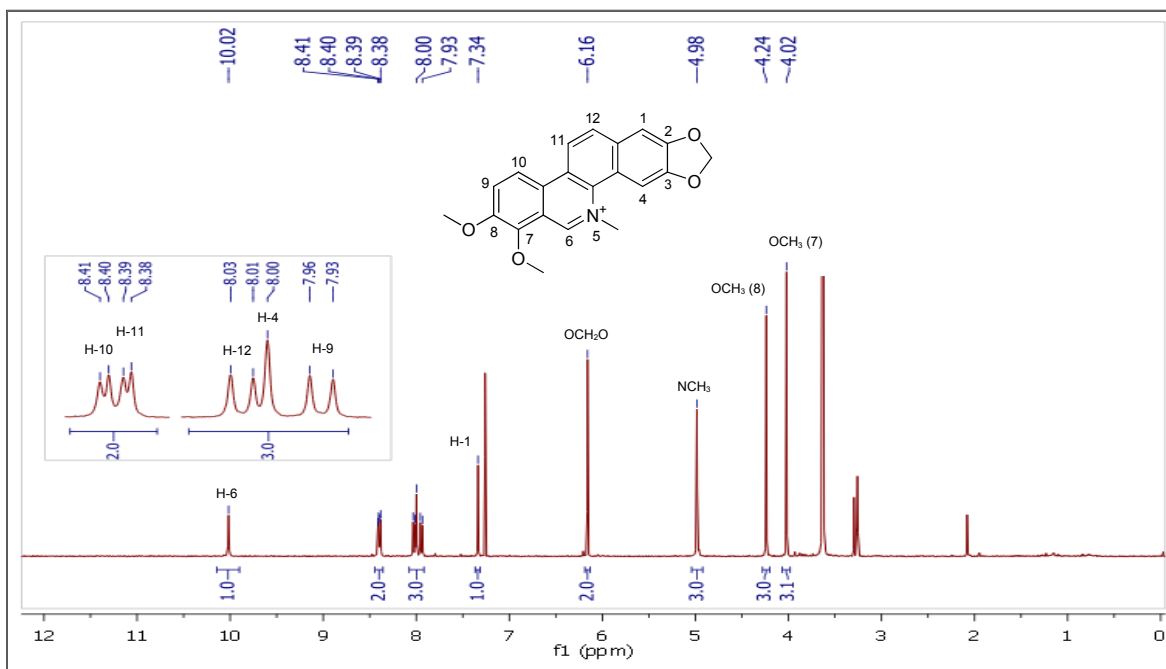
Espectro de RMN ¹H (CDCl₃-CD₃OD, 400 MHz) de nornitidina **Z-12**.

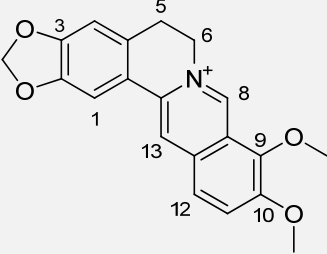
	Nombre:	(-)-6-Carboximetildihidroqueleritrina (Z-13)
	Estado físico	Sólido amarillo claro
	Formula molecular	C ₂₃ H ₂₁ NO ₆
	Peso molecular	407.4 g/mol
	Punto de fusión	222-225 °C (CHCl ₃)
	Rotación óptica	[α] _D ²⁰ : -65,6 (c 0.13, CHCl ₃)
IR: ν = 3450 (O-H), 2900 (C-H), 2830 (C-H), 1710 (C=O), 1500 (C=C), 1460 (C=C), 1420 (H-C-H), 1280 (C-O), 1175 (C-O), 1090 (C-O) y 1045 (C-O) cm ⁻¹ .		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃): δ 7.72 (1H, d, J = 8,6 Hz, H-11), 7.60 (1H, d, J = 8,6 Hz, H-12), 7.55 (1H, d, J = 8,6 Hz, H-10), 7.40 (1H, s, H-4), 7.15 (1H, s, H-1), 7.02 (1H, d, J = 8,6 Hz, H-9), 6.08 (2H, d, J = 6,5 Hz, OCH ₂ O), 4.89 (1H, t, J = 7,7 Hz, H-6), 3.96 (3H, s, OCH ₃), 3.94 (3H, s, OCH ₃), 2.77 (3H, s, NCH ₃), 2.42-2.40 (2H, m, CH ₂ COOH).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): δ 172.7 (CO), 152.5 (C-8), 149.2 (C-3), 147.9 (C-2), 145.8 (C-7), 134.6 (C-4b), 131.3 (C-12a), 126.2 (C-4a), 126.1 (C-12), 125.4 (C-6a), 123.8 (C-10b), 123.5 (C-10a), 119.8 (C-11), 119.3 (C-10), 112.4 (C-9), 104.8 (C-1), 101.4 (OCH ₂ O), 98.9 (C-4), 61.1 (OCH ₃), 55.9 (OCH ₃), 55.0 (C-6), 42.1 (NCH ₃), 36.0 (CH ₂ CO),		
Datos descritos en la literatura (Ming <i>et al.</i> , 1997).		

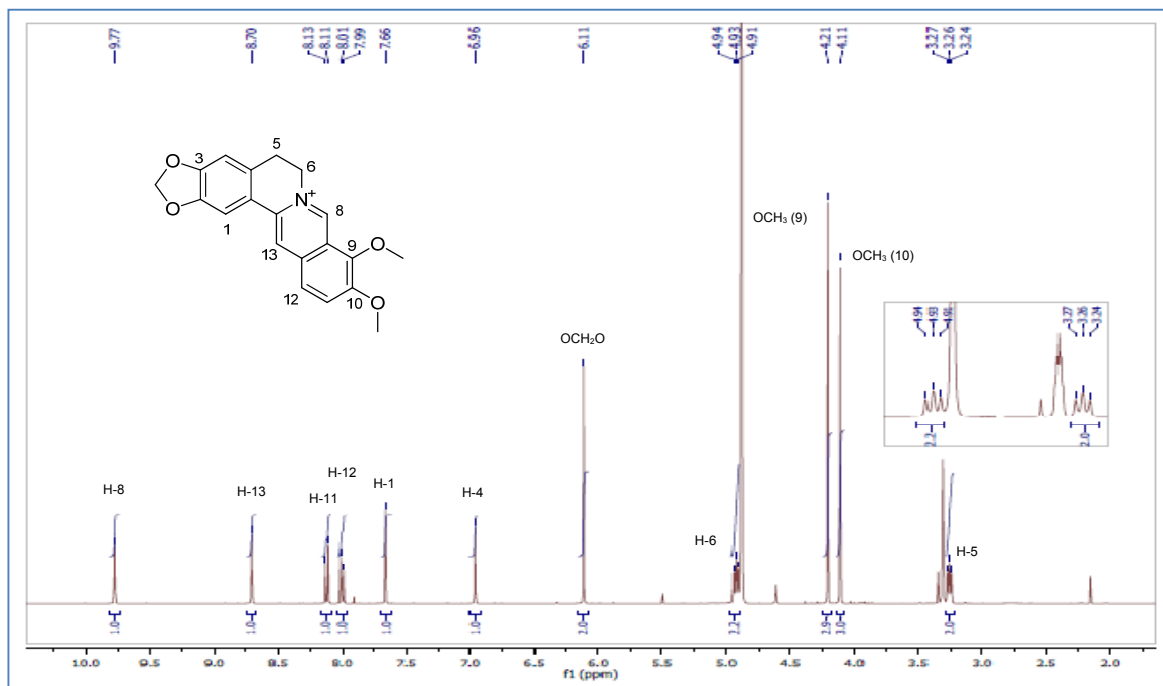


Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de (-)-6-acetonildihidroqueleritrina **Z-13**.

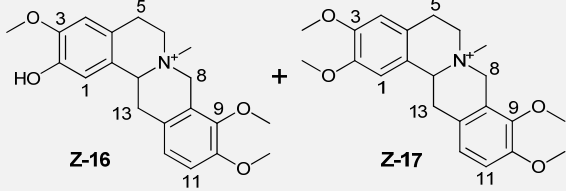
	Nombre:	Queleritrina (Z-14)
	Estado físico	Sólido amarillo
	Formula molecular	C ₂₁ H ₁₈ NO ₄ ⁺
	Peso	348,4 g/mol
	Punto de fusión	205-207 °C (CHCl ₃ -MeOH)
	Datos EMAR	EMAR calculada para C ₂₁ H ₁₈ NO ₄ ⁺ 348.1236, observada 348.1238
IR: $\nu = 3012$ (=C-H), 2924 (C-H), 1605 (C=C), 1503 (C=C), 1425 (C=C), 1278 (C-O), 1175 (C-O), y 1040 (C-O) cm ⁻¹ .		
EM (IE) m/z (%) 348 (58), 334 (31), 333 (100), 318 (36), 293 (19), 291 (21), 290 (77), 275 (39), 232 (18), 189 (15).		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃ -CD ₃ OD): δ 10.02 (1H, s, H-6), 8.40 (1H, d, $J = 9.2$, Hz, H-10), 8.39 (1H, d, $J = 8.9$, Hz, H-11), 8.02 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-12), 8.00 (1H, s, H-4), 7.94 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-9), 7.34 (1H, s, H-1), 6.16 (2H, s, OCH ₂ O), 4.98 (3H, s, NCH ₃), 4.24 (3H, s, OCH ₃), 4.02 (3H, s, OCH ₃).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃ -CD ₃ OD): δ 150.4 (C-8), 150.2 (C-6), 149.4 (C-3), 149.3 (C-2), 146.4 (C-7), 132.5 (C-12a), 131.8 (C-4b), 131.4 (C-12), 128.5 (C-10a), 125.9 (C-9), 125.6 (C-10b), 120.2 (C-4a), 119.4 (C-6a), 118.1 (C-10), 118.0 (C-11), 106.0 (C-1), 103.7 (C-4), 102.6 (OCH ₂ O), 62.4 (OCH ₃), 56.8 (OCH ₃), 52.3 (NCH ₃).		
Datos descritos en la literatura (Krane <i>et al.</i> , 1984).		

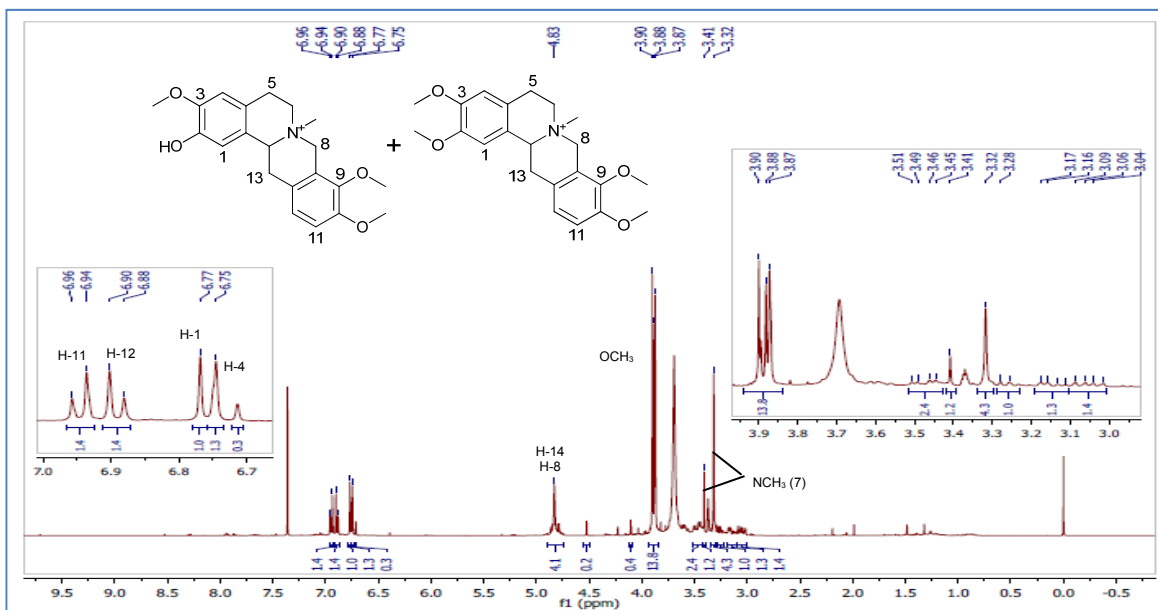

 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃-CD₃OD, 400 MHz) de queleritrina **Z-14**.

	Nombre:	Berberina (Z-15)
	Estado físico	Sólido amarillo
	Formula molecular	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄ ⁺
	Peso	336,4 g/mol
	Punto de fusión	(Cl) 200-203 °C (MeOH)
	Datos EMAR	EMAR calculada para C ₂₀ H ₁₈ NO ₄ ⁺ 336.1236, observada 336.1242
IR: $\nu = 2845$ (C-H), 1633 (C=C), 1568 (C=C), 1506 (C=C), 1278 (C-O), 1175 (C-O), y 1040 (C-O) cm ⁻¹ .		
EM (IE) m/z (%) 337 (13), 336 (19), 335 (22), 321 (80), 320 (67), 306 (36), 292 (40), 278 (100), 276 (23), 223 (23).		
RMN ¹H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 9.77 (s, 1H, H-8), 8.70 (s, 1H, H-13), 8.12 (d, $J = 9.1$, Hz, 1H, H-11), 8.00 (d, $J = 9.1$, Hz, 1H, H-12), 7.66 (s, 1H, H-1), 6.96 (s, 1H, H-4), 6.11 (s, 2H, OCH ₂ O), 4.98-4.91 (m, 2H, H-6), 4.21 (s, 3H, OCH ₃), 4.11 (s, 3H, OCH ₃), 3.28-3.22 (m, 2H, H-5).		
RMN ¹³C (100 MHz, CD ₃ OD): δ 152.2 (C-3), 152.1 (C-2), 150.0 (C-10), 146.4 (C-8), 145.9 (C-9), 139.8 (C-13a), 135.3 (C-12a), 132.0 (C-4a), 128.2 (C-11), 124.6 (C-12), 123.4 (C-8a), 121.9 (C-13b), 121.6 (C-13), 109.4 (C-4), 106.6 (C-1), 103.7 (OCH ₂ O), 62.6 (C-6), 57.7 (OCH ₃), 57.2 (OCH ₃), 28.3 (C-5).		
Datos descritos en la literatura (Neretina <i>et al.</i> , 2004; Tripathi <i>et al.</i> , 2007).		

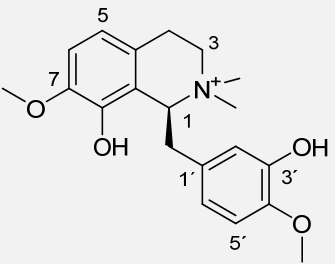


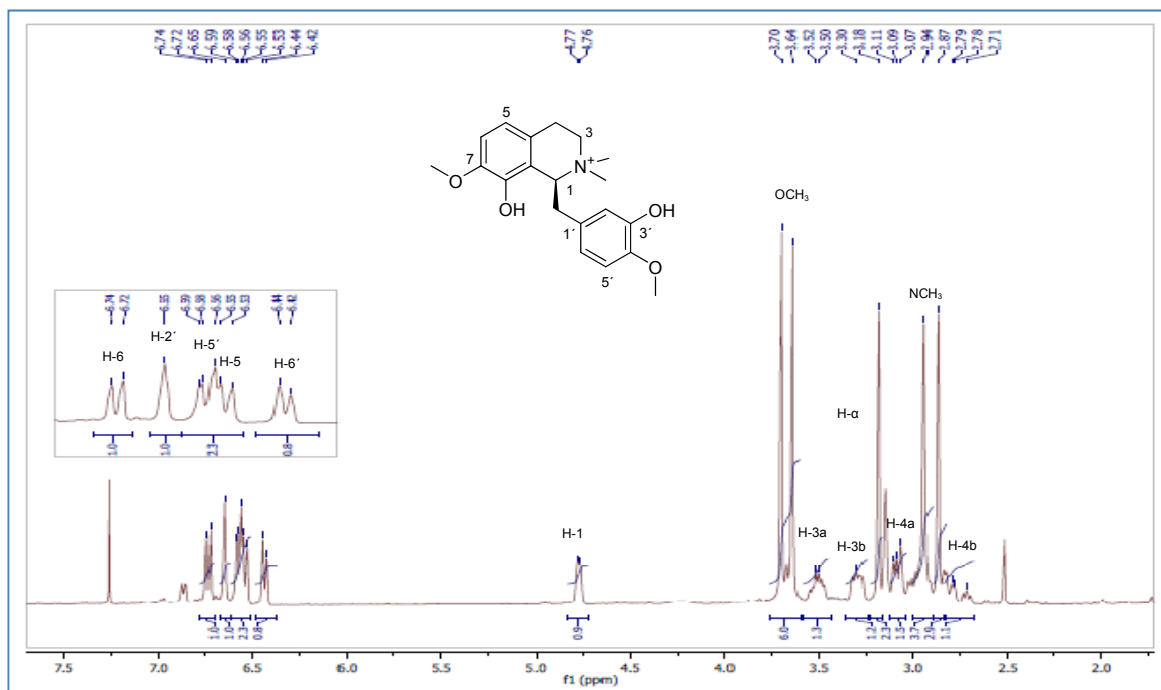
Spectro de RMN ¹H (CDCl₃-CD₃OD, 400 MHz) de berberina **Z-15**.

 <p>Z-16 Z-17</p>	<p>Nombre:</p> <p>Estado físico</p> <p>Formula molecular</p> <p>Peso</p>	<p><i>N</i>-metiltetrahydrocolumbamina (Z-16) y <i>N</i>-metiltetrahydrocolumbamina (Z-17)</p> <p>Aceite amarillo</p> <p>$C_{21}H_{26}NO_4^+$ y $C_{22}H_{28}NO_4^+$</p> <p>356,4 y 370,4 g/mol</p>
<p>Datos para Z-16 (desde la mezcla) = RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃-CD₃OD): 6,95 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H, H-11), δ 6,89 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H, H-12), 6,77 (s, 1H, H-1) y 6,75 (s, 1H, H-4), 4.88-4.77 (m, 3H, H-8, H-14), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 3.60 (dd, <i>J</i> = 18.7, 11.1 Hz, 2H, H-6), 3.49 (dd, <i>J</i> = 18.5, 6.0 Hz, 1H, H-13a), 3.32 (s, 3H, NCH₃), 3.27 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H, H-5a), 3.15 (dd, <i>J</i> = 17.4, 6.9 Hz, 1H, H-5b), 3.05 (dd, <i>J</i> = 18.5, 10.2 Hz, 1H, H-13b); RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD): δ 151.4 (C-10), 147.4 (C-3), 147.3 (C-2), 145.6 (C-9), 123.7 (C-12), 122.6 (C-14a), 121.4 (C-12a), 119.7 (C-4a, C-8a), 115.4 (C-4), 113.7 (C-11), 109.8 (C-1), 65.8 (C-14), 60.9 (OCH₃), 60.2 (C-8), 56.2 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 52.4 (C-6), 50.4 (NCH₃), 34.1 (C-13), 23.0 (C-5). EM (IE) <i>m/z</i> (%) 356 (7), 341 (100), 310 (30), 281 (31), 164 (78), 149 (65); EMAR calculada para C₂₁H₂₅NO₄⁺ 355.1792, observada 355.1784.</p>		
<p>Datos para Z-17 (desde la mezcla): RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃-CD₃OD): 6,95 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H, H-11), δ 6,89 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H, H-12), 6,75 (s, 1H, H-1) y 6,71 (s, 1H, H-4), 4.88-4.77 (m, 2H, H-8a, H-14), 4.52 (s, 1H, H-8b), 3.80-4.00 (m, 12H, OCH₃), 3.60 (dd, <i>J</i> = 18.7, 11.1 Hz, 2H, H-6), 3.49 (dd, <i>J</i> = 18.5, 6.0 Hz, 1H, H-13a), 3.41 (s, 3H, NCH₃), 3.27 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H, H-5a), 3.15 (dd, <i>J</i> = 17.4, 6.9 Hz, 1H, H-5b), 3.05 (dd, <i>J</i> = 18.5, 10.2 Hz, 1H, H-13b); RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD): δ 151.4 (C-10), 148.7 (C-2), 146.2 (C-3), 145.6 (C-9), 123.8 (C-12), 123.7 (C-14a), 121.3 (C-12a), 119.6 (C-4a, C-8a), 118.1 (C-4), 113,3 (C-11), 111.9 (C-1), 65.6 (C-14), 60.2 (OCH₃), 59.8 (C-8), 56.2 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 56.1 (OCH₃); 52.4 (C-6), 50.4 (NCH₃), 33.6.1 (C-13), 23.3 (C-5). EM (IE) <i>m/z</i> (%) 369 (10), 354 (100), 339 (52), 281 (34), 204 (63), 164 (47), 149 (65); EMAR calculada para C₂₂H₂₇NO₄⁺ 369.1940, observada 369.1941.</p>		
<p>IR (mezcla): ν = 3270 (O-H), 2860 (C-H), 1631 (C=C), 1568 (C=C), 1506 (C=C), 1278 (C-O), 1175 (C-O), 1040 (C-O) cm⁻¹</p>		
<p>La elucidación estructural de la mezcla se describe en el capítulo 1.</p>		



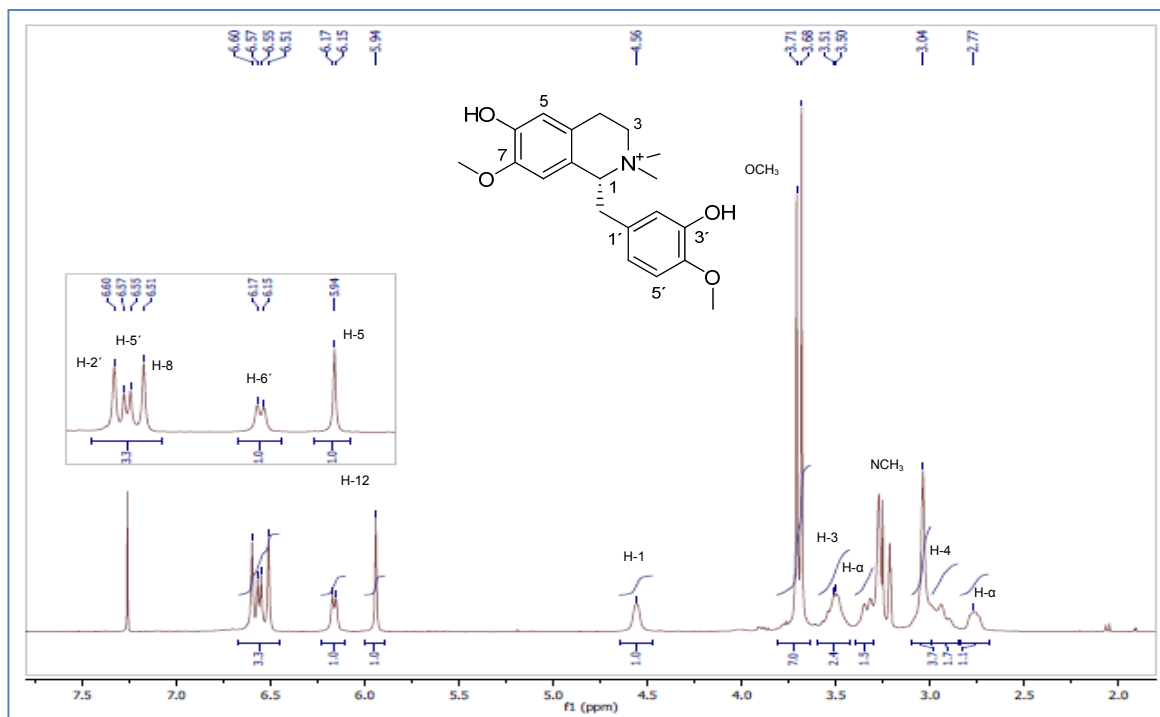
Espectro de RMN ¹H (CDCl₃-CD₃OD, 400 MHz) de la mezcla de **Z-16** y **Z-17**.

	Nombre:	(-)-(<i>S</i>)-Isotembetarina (Z-18)
	Estado físico	Aceite amarillo
	Formula molecular	C ₂₀ H ₂₆ NO ₄ ⁺
	Peso	344,4 g/mol
	Rotación óptica	[α] _D ²⁰ : -5.5 (c 0.45, MeOH)
	Datos EMAR	EMAR calculada para C ₂₀ H ₂₅ NO ₄ ⁺ 343.1784, observada 343.1785
IR: ν = 3380 (O-H), 2853 (C-H), 1612 (C=C), 3(C=C), 1465 (C=C), 1245 (C-O), 1170 (C-O), y 1035 (C-O) cm ⁻¹ .		
EM (IE) m/z (%) 344 (23), 343 (100), 273 (58), 253 (24), 230 (19), 193 (21), 181 (23), 151 (25), 137 (36).		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃ -CD ₃ OD): δ 6.73 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H, H-6), 6.65 (s, 1H, H-2'), 6.62-6.51 (m, 2H, H-5, H-5'), 6.43 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H, H-6'), 4.77 (d, <i>J</i> = 4.0 Hz, 1H, H-1), 3.70 (s, 3H, OCH ₃), 3.64 (s, 3H, OCH ₃), 3.51 (td, <i>J</i> = 12.4, 6.4 Hz, 1H, H-3a), 3.29 (dd, <i>J</i> = 11.9, 5.4 Hz, 1H, H-3b), 3.12-3.04 (m, 2H, H-α), 3.00 (dd, <i>J</i> = 13.7, 6.2 Hz, 1H, H-4a), 2.94 (s, 3H, NCH ₃), 2.87 (s, 3H, NCH ₃), 2.85-2.68 (m, 1H, H-4b).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃ -CD ₃ OD): δ 146.4 (C-4'), 145.8 (C-7), 145.7 (C-3'), 142.3 (C-8), 129.5 (C-1'), 120.1 (C-4a), 119.0 (C-5), 118.2 (C-8a), 115.4 (C-2'), 111.6 (C-6), 111.4 (C-5'), 69.1 (C-1), 55.7 (OCH ₃), 55.4 (OCH ₃), 54.0 (C-3), 53.0 (NCH ₃), 50.7 (NCH ₃), 36.5 (C-α), 22.45 (C-4).		
Datos de la literatura (Nishiyama <i>et al.</i> , 2004; Moriyasu <i>et al.</i> , 1997)		

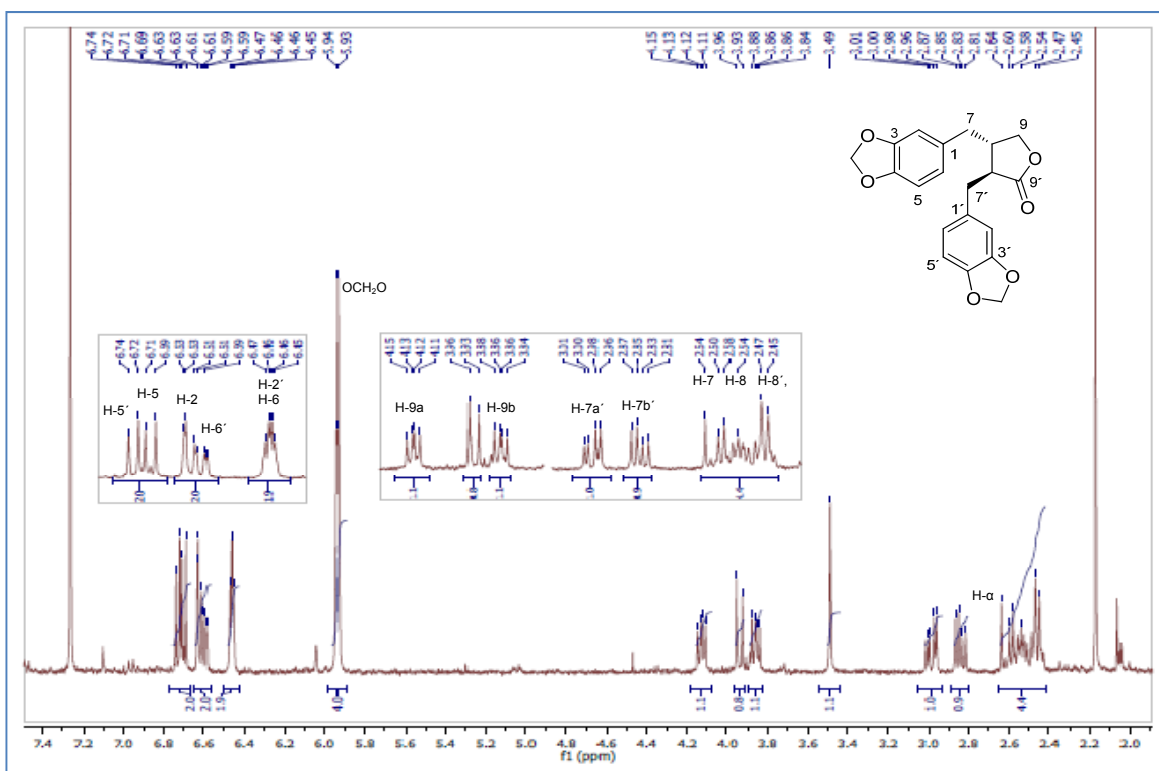


Espectro de RMN ¹H (CDCl₃-CD₃OD, 400 MHz) de (-)-isotembetarina **Z-18**.

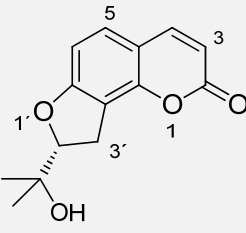
	Nombre:	(-)-(R)-Xylopinidina (Z-19)
	Estado físico	Aceite amarillo oscuro
	Formula molecular	C ₂₀ H ₂₆ NO ₄ ⁺
	Peso	344,4 g/mol
	Rotación óptica	α_D^{20} : -72.5 (c 0.13, MeOH)
Datos EMAR	EMAR calculada para C ₂₀ H ₂₅ NO ₄ ⁺ 343.1784, observada 343.1787	
IR: ν = 3400 (O-H), 2850 (C-H), 1610 (C=C), 1506 (C=C), 1460 (C=C), 1250 (C-O), 1175 (C-O), y 1033 (C-O) cm ⁻¹ .		
EM (IE) m/z (%) 343 (13), 206 (11), 193 (13), 192 (100), 177 (57), 148 (12), 137 (17).		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃ -CD ₃ OD): δ 6.60 (s, 1H, H-2), 6.56 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-5'), 6.51 (s, 1H, H-8), 6.16 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H-6'), 5.94 (s, 1H, H-5), 4.56 (s, 1H, H-1), 3.71 (s, 3H, OCH ₃), 3.68 (s, 3H, OCH ₃), 3.57-3.43 (m, 2H, H-3), 3.39-3.29 (m, 1H, H- α), 3.27 (s, 3H, NCH ₃), 3.04 (s, 3H, NCH ₃), 2.92 (d, J = 16.7 Hz, 2H, H-4), 2.77 (sa, 1H, H- α).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃ -CD ₃ OD): δ 148.0 (C-7), 146.7 (C-4'), 146.0 (C-3'), 144.8 (C-6), 127.1 (C-1'), 122.1 (C-4a), 121.0 (C-6'), 118.4 (C-8a), 115.8 (C-2'), 114.4 (C-5), 111.3 (C-5'), 110.6 (C-8), 72.2 (C-1), 55.5 (OCH ₃), 55.4 (OCH ₃), 54.8 (C-3), 52.1 (NCH ₃), 50.80 (NCH ₃), 37.7 (C- α), 23.2 (C-4).		
Datos de literatura para sustancias similares (Nishiyama <i>et al.</i> , 2004; Moriyasu <i>et al.</i> , 1997)		

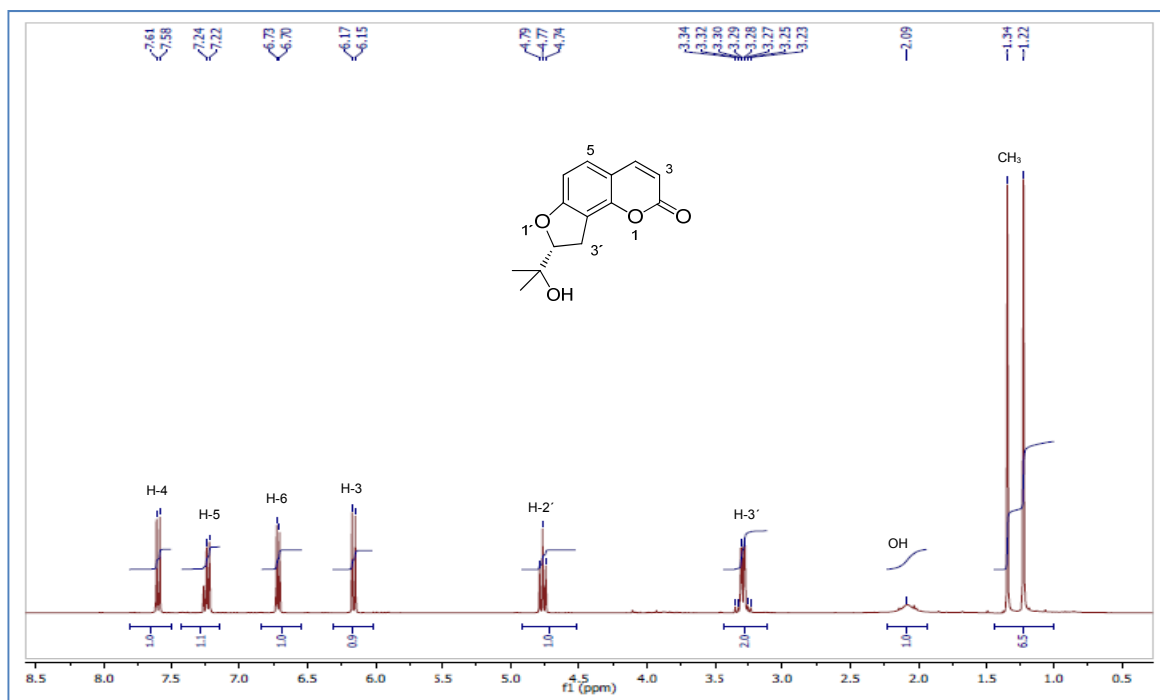
Espectro de RMN ¹H (CDCl₃-CD₃OD, 400 MHz) de (-)-xylopinidina **Z-19**.

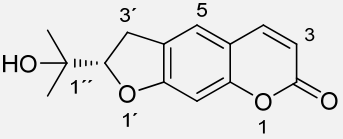
	Nombre:	(-)-Hinokinina (Z-22)
	Estado físico	Sólido amarillo claro
	Formula molecular	C ₂₀ H ₁₈ O ₆
	Peso	354,4 g/mol
	Punto de fusión	92-95 °C (MeOH)
	Rotación óptica	[α] _D ²⁰ : -25.4 (c 0.13, CHCl ₃)
IR: ν = 2920 (C-H), 1610 (C=C), 1506 (C=C), 1280 (C-O), 1220 (C-O), 1100 (C=O) y 1033 (C-O) cm ⁻¹ .		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃): δ 6.73 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H, H-5'), 6.70 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H, H-5), 6.63 (d, <i>J</i> = 1.4 Hz, 1H, H-2), 6.60 (dd, <i>J</i> = 7.8, 1.6 Hz, H-6'), 6.48-6.44 (m, 2H, H-2', H-6), 5.93 (d, <i>J</i> = 2.9 Hz, 4H, OCH ₂ O), 4.13 (dd, <i>J</i> = 9.2, 6.9 Hz, 1H, H-9a), 3.86 (dd, <i>J</i> = 9.2, 7.0 Hz, 1H, H-9b), 2.99 (dd, <i>J</i> = 14.1, 5.0 Hz, 1H, H-7a'), 2.84 (dd, <i>J</i> = 14.1, 7.2 Hz, 1H, H-7b'), 2.67-2.41 (m, 4H, H-7, H-8, H-8').		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): δ 178.41 (C-9'), 147.9 (C-5), 147.8 (C-5'), 146.5 (C-4), 146.4 (C-4'), 131.6 (C-1), 131.3 (C-1'), 122.2 (C-6), 121.6 (C-6'), 109.4 (C-2), 108.8 (C-2'), 108.4 (C-7), 108.3 (C-7'), 101.0 (OCH ₂ O), 71.1 (C-9), 46.5 (C-8'), 41.3 (C-8), 38.4 (C-7), 34.9 (C-7').		
Datos reportados en la literatura (Helena <i>et al.</i> , 2006; Lopes <i>et al.</i> , 1983).		

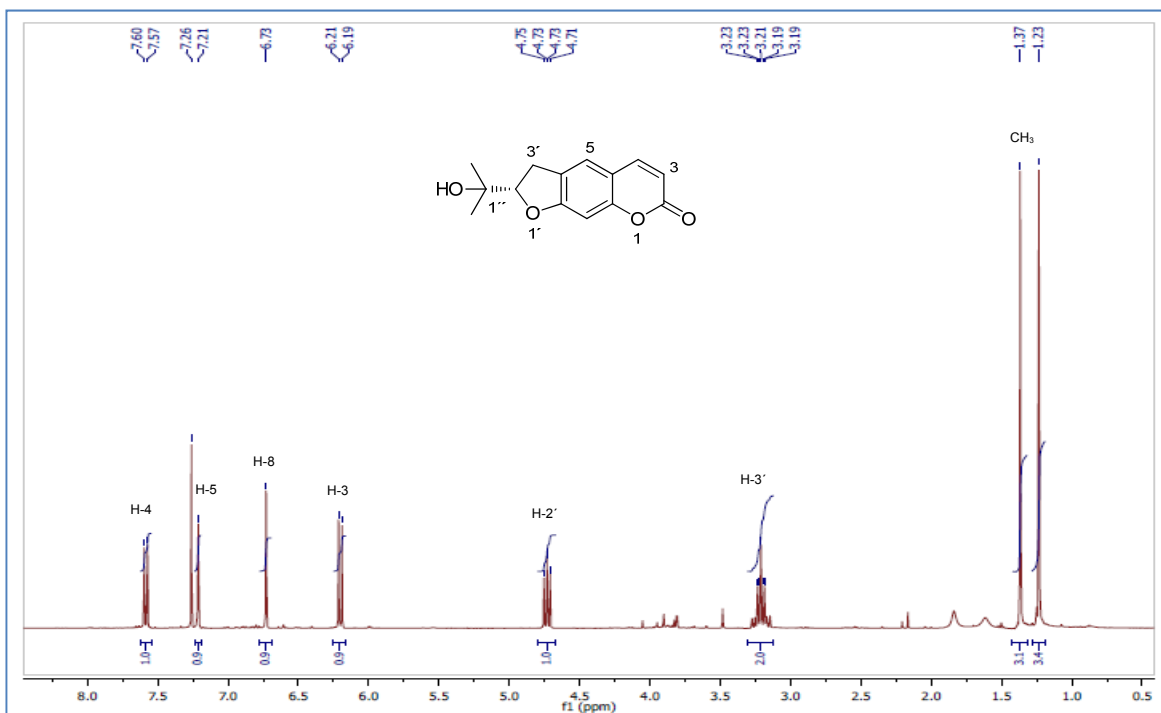


Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de (-)-hinokinina **Z-22**.

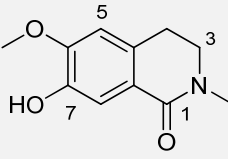
	Nombre:	(-)-(<i>R</i>)-Columbianetina (Z-23)
	Estado físico	Sólido blanco
	Formula molecular	C ₁₄ H ₁₄ O ₄
	Peso	246,3 g/mol
	Punto de fusión	164-166 °C (CHCl ₃)
	Rotación óptica	[α] _D ²⁰ : -175.3 (c 0.13, CHCl ₃)
	Datos EMAR	EMAR calculada para C ₁₄ H ₁₄ O ₄ 246.0892, observada 246.0894
EM (IE) m/z (%) 246 (32), , 213 (41), 188 (69), 187 (100), 175 (18), 160 (39), 159 (19).		
IR: ν = 3196 (O-H), 1675 (C=O), 1607 (C=C), 1550 (C=C), 1490 (C=C), 1237 (C-O), 1160 (C-O), y 1076 (C-O) cm ⁻¹ .		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃): δ 7.59 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H, H-4), 7.23 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H, H-5), 6.71 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H, H-6), 6.16 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H, H-3), 4.77 (t, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H, H-2'), 3.43-3.11 (m, 1H, H-3'), 2.09 (sa, 1H, OH), 1.34 (s, 3H, CH ₃), 1.22 (s, 3H, CH ₃).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): δ 163.7 (C-7), 161.0 (C-2), 151.2 (C-8a), 143.9 (C-4), 128.7 (C-5), 113.9 (C-8), 113.0 (C-4a), 112.1 (C-3), 106.6 (C-6), 91.3 (C-2'), 71.6 (C-1''), 27.4 (C-3'), 25.8 (CH ₃), 24.0 (CH ₃).		
Datos de literatura (Cuca <i>et al.</i> , 1998; Murray <i>et al.</i> , 1989)		

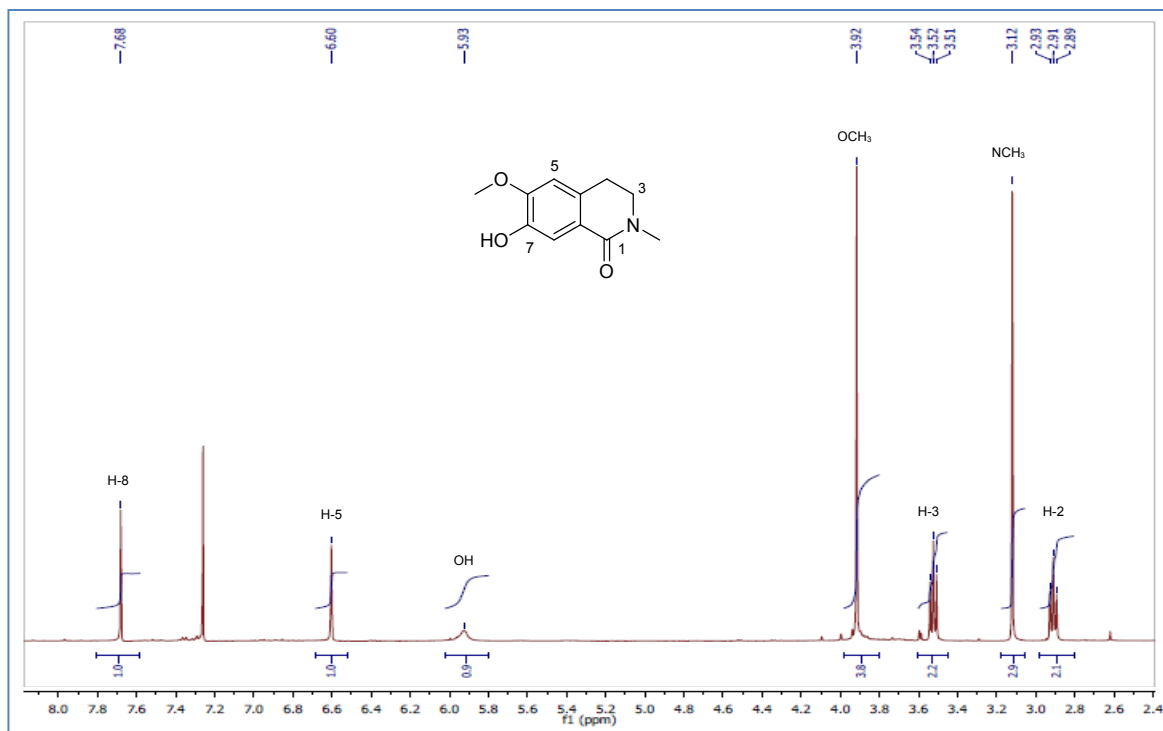

 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de (-)-columbianetina **Z-23**.

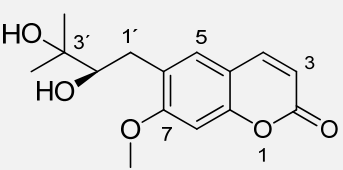
	Nombre:	(+)-(S)-Marmesina (Z-24)
	Estado físico	Cristales blancos
	Formula molecular	C ₁₄ H ₁₄ O ₄
	Peso	246,3 g/mol
	Punto de fusión	187-189 °C (CHCl ₃)
	Rotación óptica	[α] _D ²⁰ : +10.2 (c 0.12, CHCl ₃)
	Datos EMAR	EMAR calculada para C ₁₄ H ₁₄ O ₄ 246.0892, observada 246.0891
EM (IE) m/z (%) 246 (35), 213 (30), 188 (65), 187 (100), 160 (33).		
IR: ν = 3150 (O-H), 1670 (C=O), 1610 (C=C), 1506 (C=C), 1460 (C=C), 1250 (C-O), 1150 (C-O), y 1090 (C-O) cm ⁻¹ .		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃): δ 7.58 (d, J = 9.5 Hz, 1H, H-4), 7.21 (s, 1H, H-5), 6.73 (s, 1H, H-8), 6.20 (d, J = 9.5 Hz, 1H, H-3), 4.73 (dd, J = 9.1, 8.5 Hz, 1H, H-2'), 3.32-3.11 (m, 1H, H-3'), 1.37 (s, 3H, CH ₃), 1.23 (s, 3H, CH ₃).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): δ 163.2 (C-7), 161.0 (C-2), 155.6 (C-8a), 143.6 (C-4), 125.0 (C-6), 123.4 (C-5), 112.8 (C-4a), 112.3 (C-3), 97.9 (C-8), 91.1 (C-2'), 71.6 (C-1''), 29.5 (C-3'), 26.1 (CH ₃), 24.2 (CH ₃).		
Datos de literatura (Ross <i>et al.</i> , 2004; Elgamal <i>et al.</i> , 1979; Murray <i>et al.</i> , 1989)		

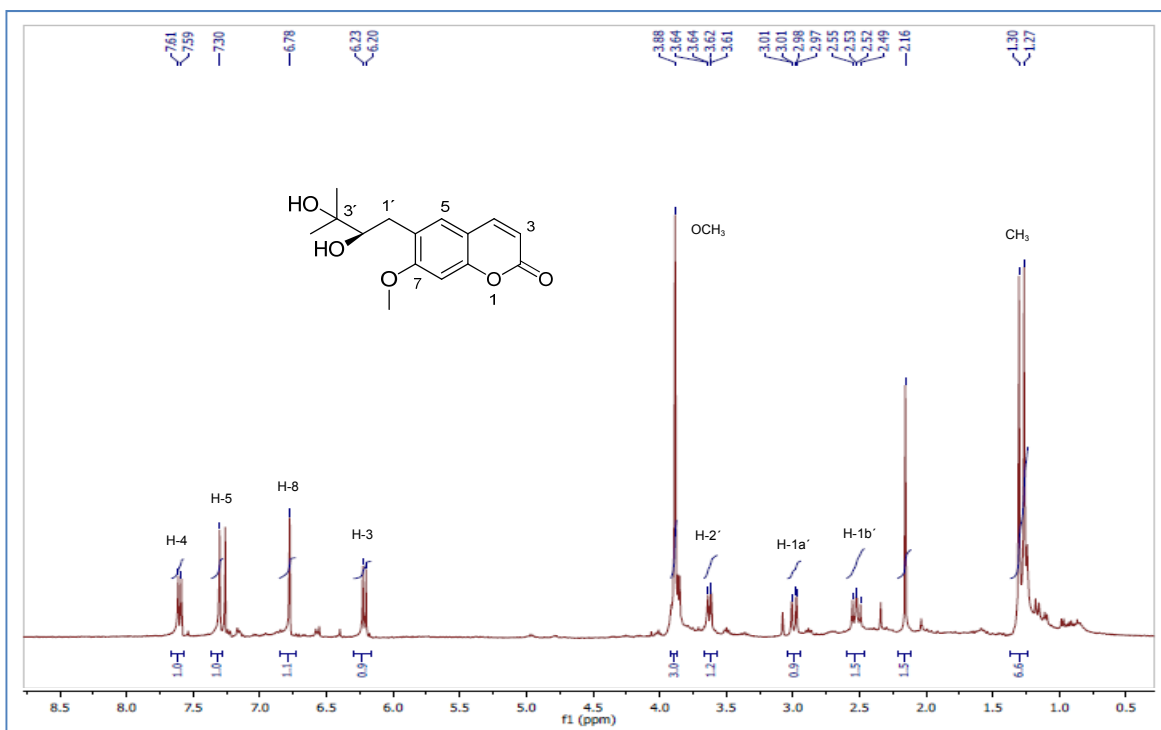


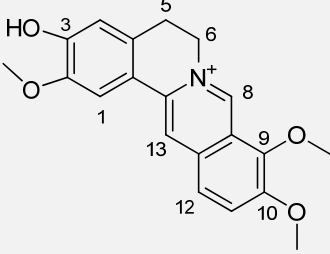
Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de (+)-marmesina **Z-24**.

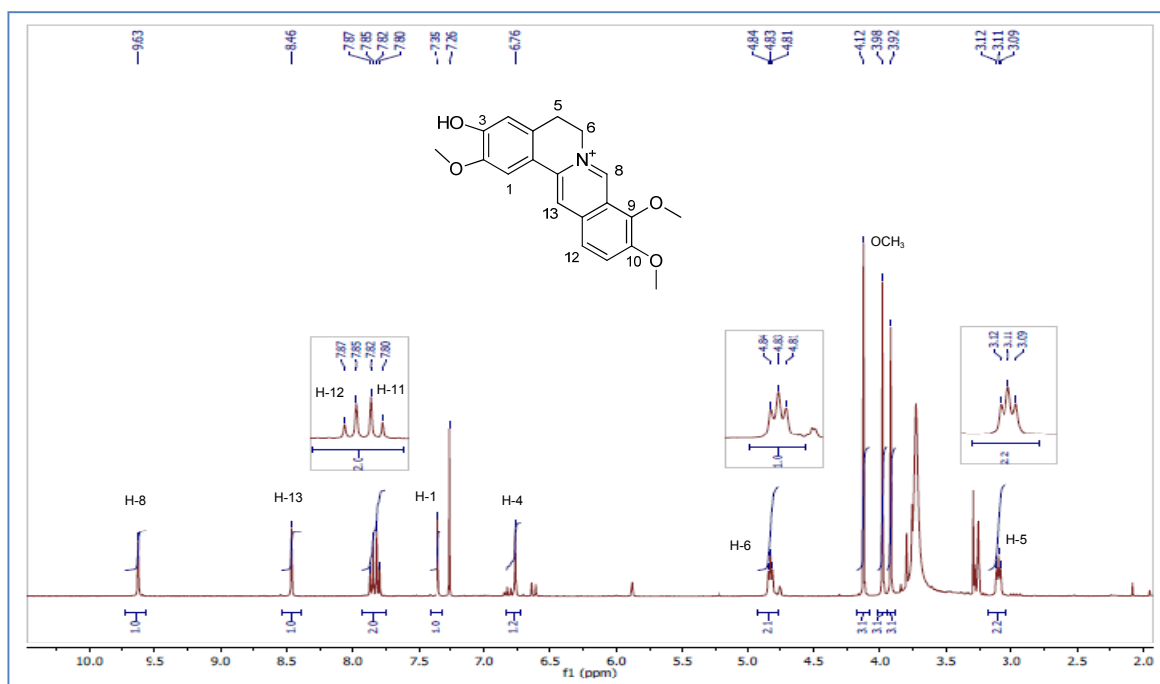
	Nombre:	Thalifolina (Z-25)
	Estado físico	Sólido amarillo claro
	Formula molecular	C ₁₁ H ₁₃ NO ₃
	Peso	207,2 g/mol
	Punto de fusión	209-211 °C (CHCl ₃)
	Datos EMAR	EMAR calculada para C ₁₁ H ₁₃ NO ₃ 207.0895, observada 207.0896
	EM (IE) m/z (%)	207 (68), 164 (87), 136 (100).
IR: $\nu = 3320$ (O-H), 2920 (C-H), 1640 (C=O), 1610 (C=C), 1510 (C=C), 1472 (C=C), 1250 (C-O), 1175 (C-O cm ⁻¹).		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃): δ 7.68 (s, 1H, H-8), 6.60 (s, 1H, H-5), 5.93 (s, 1H, OH), 3.92 (s, 3H, OCH ₃), 3.52 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, H-4), 3.12 (s, 3H, NCH ₃), 2.91 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, H-4).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): δ 164.8 (C-1), 149.6 (C-6), 144.7 (C-7), 130.8 (C-4a), 122.5 (C-8a), 114.4 (C-8), 108.8 (C-5), 56.0 (OCH ₃), 48.4 (C-3), 35.2 (NCH ₃), 27.57 (C-4).		
Datos de literatura (Wang y Georgiou, 2002)		

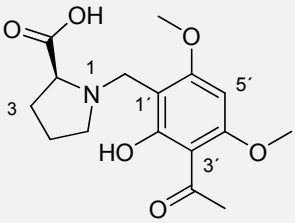
Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de thalifolina **Z-25**.

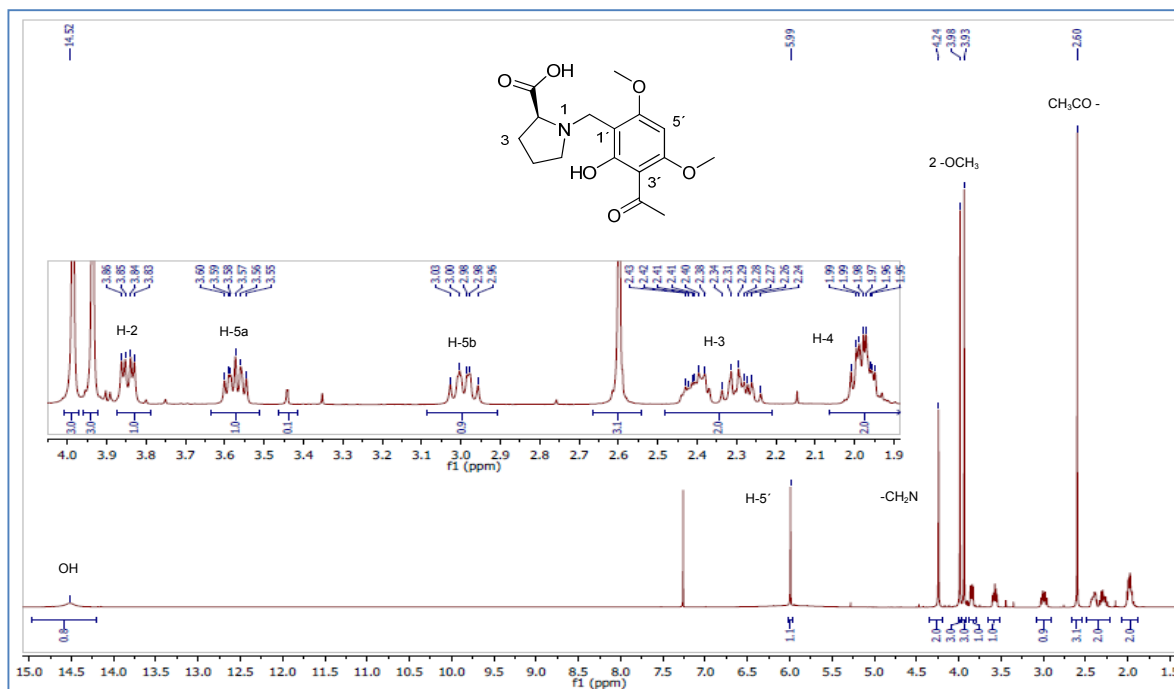
	Nombre:	(+)-(R)-Ulopterol (Z-26)
	Estado físico	Cristales blancos
	Formula molecular	C ₁₅ H ₁₈ O ₅
	Peso	278.3 g/mol
	Punto de fusión	139-141 °C (CHCl ₃)
	Rotación óptica	[α] _D ²⁰ : +63.5 (c 0.13, CHCl ₃)
	Datos EMAR	EMAR calculada para C ₁₅ H ₁₈ O ₅ 278.1154, observada 278.1159
	EM (IE) m/z (%)	220 (11), 189 (100), 177 (30), 159 (21), 131 (20).
IR: ν = 3450 (O-H), 1719 (C=O), 1610 (C=C), 1506 (C=C), 1460 (C=C), 1250 (C-O), 1150 (C-O), y 1090 (C-O) cm ⁻¹ .		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃): δ 7.60 (d, J = 9.4 Hz, 1H, H-4), 7.30 (s, 1H, H-5), 6.78 (s, 1H, H-8), 6.22 (d, J = 9.5 Hz, 1H, H-3), 3.88 (s, 3H, OCH ₃), 3.63 (dd, J = 10.3, 1.8 Hz, 1H, H-2'), 2.99 (dd, J = 13.9, 1.5 Hz, 1H, H-1a'), 2.52 (dd, J = 13.9, 10.5 Hz, 1H, H-1b') 1.30 (s, CH ₃), 1.27 (s, CH ₃).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): δ 161.3 (C-2), 160.7 (C-7), 154.8 (C-8a), 143.4 (C-4), 129.6 (C-5), 125.0 (C-6), 113.1 (C-3), 112.1 (C-4a), 98.81 (C-8), 77.6 (C-2'), 72.9 (C-3'), 56.0 (OCH ₃), 32.5 (C-1'), 26.3 (CH ₃), 23.5 (CH ₃).		
Datos de literatura (Abyshev <i>et al.</i> , 1970; Murray <i>et al.</i> , 1989)		

Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de (+)-ulopterol **Z-26**.

	Nombre:	Jathrorrhizina (Z-27)
	Estado físico	Sólido cristalino amarillo
	Formula molecular	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄ ⁺
	Peso	338.4 g/mol
	Punto de fusión	(Cl) 195-198 °C (MeOH)
	Datos EMAR	EMAR calculada para C ₂₀ H ₂₀ NO ₄ ⁺ 338.1392, observada 338.1399
IR: $\nu = 3350$ (O-H), 2845 (C-H), 1633 (C=C), 1568 (C=C), 1506 (C=C), 1278 (C-O), 1177 (C-O), y 1035 (C-O) cm ⁻¹ .		
EM (IE) m/z (%) 338 (26), 337 (100), 323 (75), 322 (82), 308 (63), 294 (90), 280 (48), 278 (54), 265 (37), 250 (25), 236 (31), 220 (26).		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃ -CD ₃ OD): δ 9.63 (s, 1H, H-8), 8.46 (s, 1H, H-13), 7.86 (d, $J = 9.1$, Hz, 1H, H-12), 7.81 (d, $J = 9.1$, Hz, 1H, H-11), 7.35 (s, 1H, H-1), 6.76 (s, 1H, H-4), 4.83 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, H-6), 4.12 (s, 3H, OCH ₃), 3.98 (s, 3H, OCH ₃), 3.92 (s, 3H, OCH ₃), 3.11 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, H-5).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃ -CD ₃ OD): δ 150.4 (C-3), 150.0 (C-10), 148.1 (C-2), 144.3 (C-9), 144.2 (C-8), 138.7 (C-13a), 133.7 (C-12a), 128.3 (C-4a), 126.6 (C-11), 122.9 (C-12), 121.7 (C-8a), 119.6 (C-13), 117.4 (C-13b), 114.7 (C-4), 108.3 (C-1), 61.9 (OCH ₃), 56.8 (C-6), 56.2 (2OCH ₃), 26.5 (C-5).		
Elucidación estructural por análisis espectroscópico (Grycova <i>et al.</i> , 2007).		


 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃-CD₃OD, 400 MHz) de jathrorrhizina **Z-27**.

	Nombre:	(-)-Monophyllidina (Z-29)
	Estado físico	Sólido cristalino blanco
	Formula molecular	C ₁₆ H ₂₁ NO ₆
	Peso	323.3 g/mol
	Punto de fusión	150-151 °C (CHCl ₃)
	Rotación óptica	[α] _D ²⁰ : -40.3 (c 0.28, CHCl ₃)
	Datos EMAR	EMAR calculada para C ₁₆ H ₂₂ NO ₆ 324.1447, observada 324.1323
IR: v = 3415 (O-H), 2919 (C-H), 2851 (C-H), 1725 (C=O), 1690 (C=O), 1600 (C=C), 1498 (C=C), 1462 (C=C), 1275 (C-O), 1250 (C-O), y 1231 (C-O) cm ⁻¹ .		
EM (IE) m/z (%) 278 (4), 210 (16), 209 (54), 193 (39), 163 (14), 70 (100), 69 (16), 68 (16), 51 (15). (IQ) m/z (%) 324 (2), 278 (3), 210 (16), 209 (100), 70 (50).		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃): δ 14.52 (s, 1H, OH), 5.99 (s, 1H, H-5'), 4.24 (s, 2H, NCH ₂), 3.98 (s, 3H, OCH ₃), 3.93 (s, 3H, OCH ₃), 3.85 (dd, J = 9.2, 3.7 Hz, 1H, H-2), 3.65-3.51 (m, 1H, H-5), 3.06-2.92 (m, 1H, H-5), 2.60 (s, 3H, CH ₃ CO), 2.46-2.35 (m, 1H, H-3a), 2.34-2.21 (m, 1H, H-3b), 2.01-1.95 (m, 2H, H-4).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃): δ 203.7 (CO), 170.4 (COOH), 164.9 (C-4'), 164.8 (C-6'), 164.4 (C-2'), 105.8 (C-3'), 98.9 (C-1'), 86.0 (C-5'), 68.7 (C-5), 56.2 (C-2), 55.8 (OCH ₃), 54.0 (OCH ₃), 46.9 (NCH ₂), 33.1 (CH ₃), 29.0 (C-4), 24.2 (C-3).		
Elucidación estructural por análisis espectroscópico descrita en el capítulo 1.		



REFERENCIAS

Abyshev, A. Z.; Kutnevich, A. M.; Kostyuchenko, N. P.; Anisimova, O. S.; Ermakov, A. I.; Sheinker, Y. N. The Structure of Ulopterol. *Chem. Nat. Compd.* **1970**, 6, 300-304.

Ayres, D. C.; Loike, J. D. Lignans. Chemical, Biological and Clinical Properties. Cambridge University Press. **1990**. pp. 208-213.

Brader, G.; Bacher, M.; Hofer, O.; Greger, H. Prenylated Phenylpropenes from *Coleonema pulchellum* with Antimicrobial Activity. *Phytochemistry*. **1997**, 45, 1207-1212.

Chen, J. J.; Fang, H. Y.; Dhu, C. Y.; Chen, I. C. New Indolopyridoquinazoline, Benzo[c]phenanthridines and Cytotoxic Constituents from *Zanthoxylum integrifoliolum*. *Planta Med.* **2005**, 71, 470-475.

Cuca, L. E.; Martinez, J. C.; Monache, F. D. Constituyentes Químicos de *Zanthoxylum monophyllum*. *Rev. Colomb. Quim.* **1998**, 27, 17-27.

El-Hassan, A.; El-Sayed, M.; Hamed, A. I.; Rhee, I. K.; Ahmed, A. A.; Zeller, K. P.; Verpoorte, R. Bioactive Constituents of *Leptadenia arborea*. *Fitoterapia*. **2003**, 74, 184-187.

Elgamal, M. H. A.; Elewa, N. H.; Elkhisy, E. A. M.; Duddeck, H. ¹³C NMR Chemical Shifts and Carbon-Proton Coupling Constants of Some Furocoumarins and Furochromones. *Phytochemistry*. **1979**, 18, 139-143.

Gryková, L.; Dostál, J.; Marek, R.; Quaternary Protoberberine Alkaloids. *Phytochemistry*. **2007**, 68, 150-175.

Heleno, V. C. G.; Da Silva, R.; Pedersoli, S.; De Albuquerque, S.; Bastos, J. K.; Silva, M. L. A.; Donate, P. M.; Da Silva, G. V.; Lopes, J. L. C. Detailed ¹H and ¹³C NMR Structural Assignment of Three Biologically Active Lignan Lactones. *Spectrochim. Acta, Part A*. **2006**, 63, 234-239.

Krane, B. D.; Fagblue, M. O.; Shamma, M.; Gözler, B. The Benzophenanthridine Alkaloids. *J. Nat. Prod.* **1984**, 47, 1-43.

Lopes, L. M. X.; Yoshida, M.; Gottlieb, O. Dibenzylbutyrolactone Lignans from *Virola sebifera*. *Phytochemistry*. **1983**, 22, 1516-1518.

Martin, M. T.; Rasoanaivo, L. H.; Raharisololalao, A. Phenanthridine Alkaloids from *Zanthoxylum magadascariense*. *Fitoterapia*. **2005**, 76, 590-593.

Martínez-Martínez, F. J.; Padilla-Martínez, I. I.; Hernández-Carlos, B.; Pérez-Gutiérrez, R. M.; García-Báez, E. V. X-ray diffraction and total ^1H and ^{13}C NMR Assignment of (*RS*)-5,6-dihydro-7,8-dimethoxy-5-methyl-6-(2-oxopropyl)-(2,3-methylenedioxyphenyl)-[c]-phenanthridine, (*RS*)-6-acetonyldihydrochelerythrine). *J. Chem. Crystallogr.* **2002**, 32, 3-4.

Mazzini, C.; Sambri, L.; Regeling, H.; Zwanenburg, B. Chittenden, G. J. F. Enantioespecific syntheses of (*R*)- and (*S*)-proline and Some Derivatives from *D*-glucono-1,5-lactone. *J. Chem. Soc.* **1997**, 1, 3351-3356.

Murray, R. D. H.; Méndez, J.; Brown, S. A. The Natural Coumarins. Occurrence, Chemistry and Biochemistry. John Wiley & Sons LTD. **1982**. pp. 343-345, 356.

Ming Ng, K.; Gray, A. I.; Waterman, P. G. Benzophenanthridine Alkaloids from the Steam Bark of a *Zanthoxylum* Species. *Phytochemistry*. **1987**, 26, 3251-3254.

Moriyasu, M.; Ichimaru, M.; Nishiyama, Y.; Kato, A. (*R*)-Isotembetarine, a Quaternary Alkaloid from *Zanthoxylum nitidum*. *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 299-301.

Neretina, O. V.; Gromova, A. S.; Lutskii, V. I.; Semenov, A. A.; Ushakov, I. A.; Dmitrenok, P. S.; Oven, N. L. Isolariciresinol Glucoside, Berberine, and Phenolic Acids from the Aerial Part of *Hedysarum setigerum*. *Chem. Nat. Compd.* **2004**, 40, 609-610.

Nishiyama, Y.; Moriyasu, M.; Ichimaru, M.; Iwasa, K.; Kato, A.; Mathenge, S. G.; Chalo, P. B.; Juma, F. D. Quaternary Isoquinoline Alkaloids from *Xylopi*a *parviflora*. *Phytochemistry*. **2004**, 65, 939-944.

Ross, S. A.; Sultana, G. N. N.; Burandt, C. L.; ElSohly, M. A.; Marais, J. P. J.; Ferreira, D. Syncaparmide, a New Antiplasmodial (+)-Norepinephrine Derivative from *Zanthoxylum syncarpum*. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 88-90.

Sukari, M. A.; Salim, W. S. W.; Ibrahim, N. H.; Rahmani, M. (1999). Phenanthridine Alkaloids from *Zanthoxylum myriacanthum*. *Fitoterapia* **1999**, 70, 197-200.

Tripathi, A. N.; Chauhan, L.; Thankachan, P.P.; Barthwal, R. Quantum Chemical and Nuclear Resonance Spectral Studies on Molecular Properties and Electronic Structure of Berberine and Berberrubine. *Magn. Reson. Chem.* **2007**, 45, 647-655.

Tousek, J.; Dostál, J.; Marek, R. Theoretical and Experimental NMR Chemical Shifts of Norsanguinarine and Norchelerythrine. *J. Mol. Struct.* **2004**, 689, 115-120.

Wang, Y. C.; Georghiou, P. E. An Efficient Synthesis of Thalifoline. *Synthesis*. **2002**, 15, 2187-2190.

2. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS BENZOFENANTRIDÍNICOS

2.1. INTRODUCCIÓN

2.2. GENERALIDADES EN LA SÍNTESIS DE ALCALOIDES BENZOFENANTRIDÍNICOS Y SUS ANÁLOGOS

2.3. METODOLOGÍA

- 2.3.1. Procedimientos generales
- 2.3.2. Preparación de los compuestos

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- 2.4.1. Investigación sintética
- 2.4.2. Obtención de la amina **S-4**
- 2.4.3. Obtención de los arilbutiraldehídos **S-1a** y **S-3a**
- 2.4.4. Síntesis de tetrahidropiridinas **S-5** y **S-6**
- 2.4.5. Reacción radicalaria intramolecular para la obtención de los análogos **S-7** y **S-8**.
- 2.4.6. Reacción de Heck intramolecular para la síntesis de los análogos **S-9** y **S-10**.
- 2.4.7. Oxidación con DDQ de **S-9a** y **S-10a**.

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

2.1. INTRODUCCIÓN

Generalmente muchos de los metabolitos secundarios aislados de productos naturales han sido fuente de inspiración para la búsqueda de compuestos con acción biológica más potente, específica, de mayor estabilidad y de baja toxicidad.

Los alcaloides representan un grupo muy extenso de metabolitos secundarios con diversas estructuras, distribuciones en la naturaleza e importantes actividades biológicas. Los isoquinolínicos son uno de los más grandes tipos de alcaloides que incluyen bencilisoquinolinas, protoquinas, benzo[c]fenantridinas y protoberberinas, entre otros.

Los alcaloides benzo[c]fenantridínicos son compuestos de gran interés debido a la importante y variada actividad biológica que presentan, entre las que se destaca la actividad antitumoral. Sin embargo, a pesar de su actividad terapéutica ampliamente comprobada, la elevada toxicidad e inestabilidad asociada con los miembros más activos de este grupo ha limitado en gran medida su utilización clínica. Por estas razones la síntesis de alcaloides benzofenantridínicos y de sus análogos es una importante área en la química de heterociclos, en la que se han desarrollado métodos versátiles y concisos para la síntesis de este tipo de compuestos. Una gran variedad de alcaloides han sido preparados, pero muchas de estas síntesis son complejas, dan rendimientos bajos y otras ofrecen pocas generalidades; haciéndose así necesario el desarrollo de nuevas metodologías de síntesis para este tipo de alcaloides y de sus análogos, con el objeto de acceder a compuestos que presenten óptimas relaciones de actividad/toxicidad.

Para este fin se iniciaron exploraciones en la síntesis de análogos benzofenantridínicos evaluando la reactividad de una enamina apropiadamente sustituida mediante adiciones intramoleculares por reacción radicalaria y de Heck.

El presente capítulo realiza un aporte a las investigaciones sintéticas de alcaloides y de sus análogos mediante el desarrollo de una ruta de síntesis para la obtención de una nueva clase de compuestos.

2.2. GENERALIDADES EN LA SÍNTESIS DE ANÁLOGOS BENZOFENANTRIDÍNICOS

Como se ha mencionado en el capítulo 1 los alcaloides benzofenantridínicos son compuestos de origen natural cuya distribución es muy limitada en plantas y se encuentran con mayor frecuencia en especies del género *Zanthoxylum* (Rutaceae). Son aislados en pequeñas cantidades de algunas especies de las familias Rutaceae, Papaveraceae y Fumiraceae principalmente (Krane *et al.*, 1984). En la literatura se reportan rendimientos en el rango de 0.003 a 0.07 % para el aislamiento de nitidina **2** desde varias especies de *Zanthoxylum* y *Fagara* (Cushman y Cheng, 1978).

Existen diversos alcaloides clasificados dentro del grupo de los benzofenantridínicos. En la Figura 2.1 se ilustran algunos tipos que se caracterizan por ser terciarios (norsanguinarina **30**), cuaternarios (sanguirubina **31**), por no presentar el ciclo C estando en forma de amidas (arnottianamida **32**), por estar parcialmente saturados como las dihidrobenzofenantridinas (dihidosanguinarina **33**), dihidrobenzofenantridinas 6-sustituidas (6-metoxidihidosanguinarina **34**) y hexahidrobenzofenantridinas ((+)-chelidonina **35**) (Krane *et al.*, 1984).

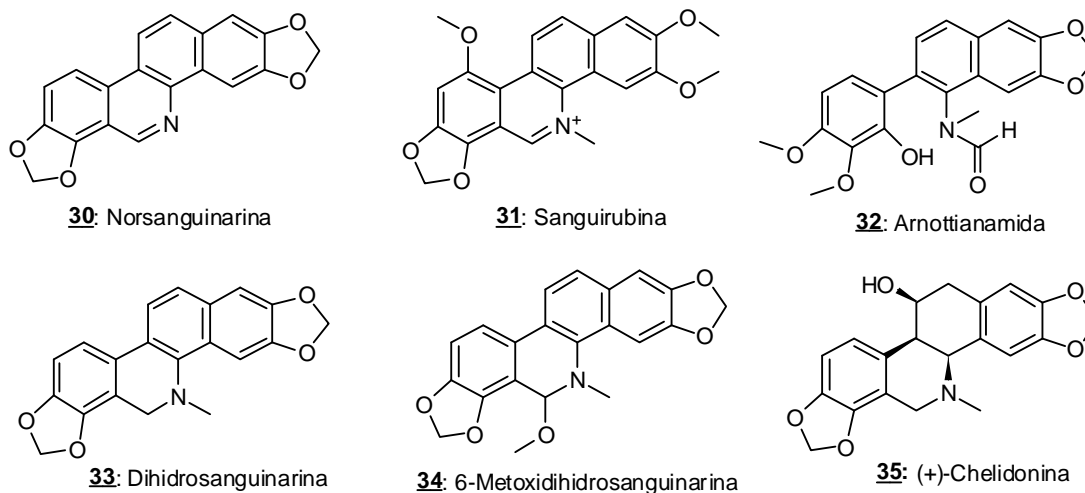


Figura 2.1. Tipos de alcaloides benzofenantridínicos encontrados en la naturaleza.

Esta clase de metabolitos llama la atención de los investigadores por la importante y variada actividad

biológica que presentan, destacándose entre estas la actividad antitumoral, siendo fagaronina **1**, nitidina **2**, queleritrina **3** y sanguinarina **4** los principales representantes de este tipo de alcaloides (Maiti y Kumar, 2009; Tillequin, 2007; Maiti y Kumar, 2007; Dvořák *et al.*, 2006, Nyangulu *et al.*, 2005, Eun y Koh, 2004, Tang *et al.*, 2003; Slaninová *et al.*, 2001; Simeón *et al.*, 1989). Fagaronina y nitidina han sido objeto de numerosas investigaciones por su potente actividad antitumoral y antimalarica (Tillequin, 2007; Nyangulu *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2003). La sanguinarina ha presentado actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante y antiangiogénica, pero su uso principal ha sido en productos dentales donde su actividad antibacteriana, antifúngica y antiinflamatoria reduce la inflamación gingival y la formación de placa supragingival (Dvořák *et al.*, 2006; Eun y Koh, 2004).

Alcaloides hexahidrobzofenantridínicos también son de interés, por ejemplo chelidonina **35** ha sido muy utilizado en oncología experimental, es citotóxico, y es el principal componente del medicamento anticancerígeno Ukrain® elaborado por semisíntesis a partir de los alcaloides aislados de *Chelidonium majus* y un producto sintético derivado del ácido tiofosfórico (McManus, *et al.*, 2007).

Dada su importante actividad antitumoral, se han realizado ensayos *in vitro* contra diversas líneas celulares para este tipo de alcaloides, encontrándose que varios de estos compuestos poseen una limitada actividad antitumoral debido a la toxicidad e inestabilidad de algunos en medios biológicos. Sanguinarina **4** y queleritrina **3** exhiben citotoxicidad *in vitro* pero no tienen significativa actividad antitumoral *in vivo*. Nitidina **2** a pesar de mostrar un espectro de actividades similar a fagaronina **1**, presentó toxicidad en los ensayos preclínicos. La diferencia estructural entre **1** y **2** es un grupo metilendioxo, el cual puede ser el responsable de la toxicidad de **2** (Clement *et al.*, 2005; Phillips y Castle, 1981).

Por el gran interés en la actividad biológica de estas sustancias naturales, la síntesis de alcaloides benzofenantridínicos y derivados es una importante área en la química de heterociclos. Los problemas toxicológicos y de estabilidad en medios biológicos que acompañan algunos de los alcaloides naturales han conducido a que se investigue en la búsqueda no solo de nuevas rutas de síntesis para estos alcaloides sino para sus análogos, desarrollándose de este modo bastantes investigaciones en este campo (Yapi *et al.*, 2010; Kohno *et al.*, 2009; Ramani y Fontana, 2008; Buden y Rossi, 2007; Luo *et al.*, 2006; Herrera *et al.*, 2006; Kock *et al.*, 2005; Nyangulu *et al.*, 2005; Prado *et al.*,

2004; Le *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2003; Harayama *et al.*, 2003; Jarayaman *et al.*, 2002; Treus *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2001; Treus *et al.*, 2000; Nakanishi *et al.*, 2000).

A través de un análisis retrosintético sencillo, propuesto en la Figura 2.2, se resumen las rutas de síntesis descritas para la preparación de benzo[*c*]fenantridinas que pueden clasificarse en función del anillo formado en la etapa clave del proceso. De acuerdo con esta clasificación, se distinguen dos aproximaciones correspondientes a la formación del anillo **C** (rutas 1-4) y del anillo **B** (ruta 5).

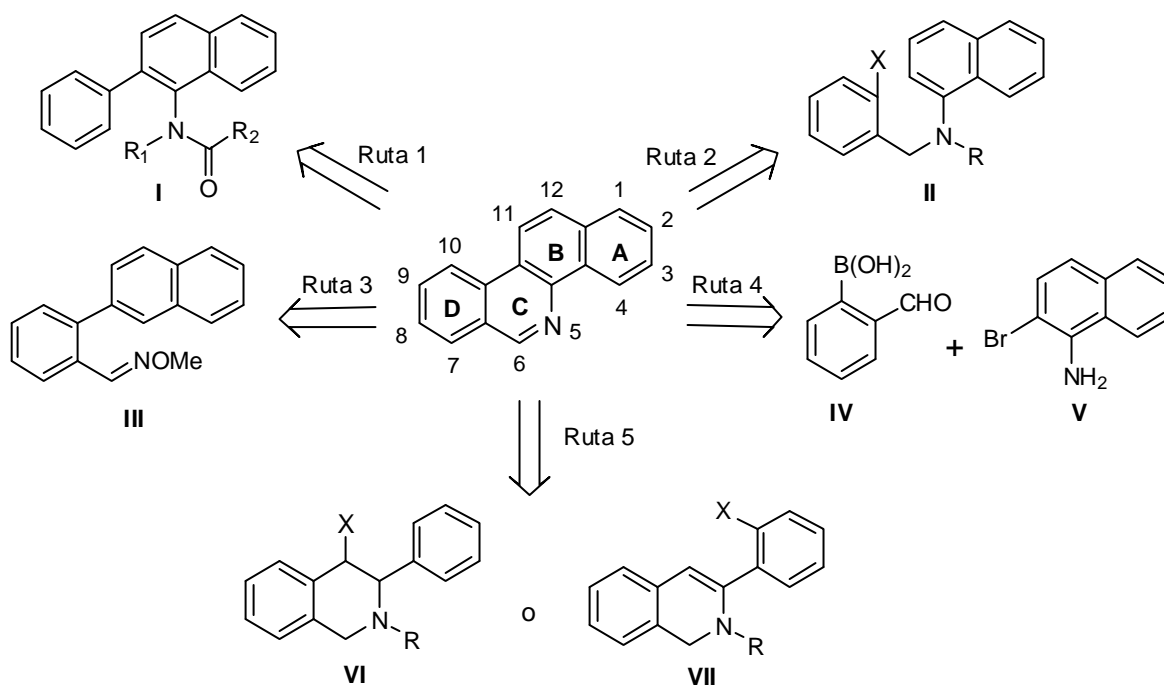


Figura 2.2. Rutas de síntesis desarrolladas para alcaloides benzofenantridínicos.

Las rutas de síntesis basadas en la formación final del anillo **C** se pueden clasificar en función del intermediario usado. En este contexto, se ha utilizado la reacción de Bischler-Napieralski sobre naftilamidas **I** (ruta 1) para formar el enlace entre los carbonos 6 y 6a (Treus *et al.*, 2000; Sotomayor *et al.*, 1996; Ishikawa *et al.*, 1995; Janin y bisagni, 1993). Alternativamente el acoplamiento biarílico intramolecular de bencilnaftilaminas **II** con un grupo funcional adecuado sobre el anillo aromático (ruta 2) ha sido muy empleado para la formación del enlace entre los carbonos 10a y 10b (Ramani y Fontana, 2008; Budén y Rossi, 2007; Prado *et al.*, 2004; Harayama *et al.*, 2003; Harayama *et al.*, 2001; Nakanishi *et al.*, 2000). Recientemente, mediante una reacción electrocíclica asistida por microondas

sobre un derivado de *O*-metiloxima **III** (ruta 3) ha permitido formar el enlace entre 4b y 5 (Kohno *et al.*, 2009). Por último a través de reacción de Suzuki entre el ácido fenilborónico α -formilado **IV** y la bromonaftilamina **V** (ruta 4) se obtuvo el anillo **C** mediante la formación de los enlaces entre 10a-10b y 5-6 (Geen *et al.*, 1998).

En cuanto a las vías sintéticas desarrolladas para la formación del anillo **B**, se destacan las ciclaciones intramoleculares a través de intermediarios 3-arilisoquinolinicos convenientemente funcionalizados (intermediarios **III** y **IV**, ruta 5) en donde se han formado los enlaces entre los carbonos 10b-11 o entre 12-12a del núcleo benzo[*c*]fenantridínico (Luo *et al.*, 2006; Nyangulu *et al.*, 2005; Le *et al.*, 2004; Treus *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2001; Minami *et al.*, 1995). No se han encontrado en la bibliografía antecedentes de síntesis de benzo[*c*]fenantridinas con preparación del anillo **B** mediante la formación del enlace entre los carbonos 4a y 4b.

Diversas clases de análogos han sido sintetizados teniendo como base la estructura de los alcaloides benzofenantridínicos, diferentes actividades se les han determinado y algunas relaciones de estructura-actividad han sido establecidas (Yapi *et al.*, 2010; Buden y Rossi, 2007; Herrera *et al.*, 2006; Kock *et al.*, 2005; Nyangulu *et al.*, 2005; Prado *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2003; Harayama *et al.*, 2003; Jarayaman *et al.*, 2002; Treus *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2001; Treus *et al.*, 2000; Nakanishi *et al.*, 2000). Por ejemplo análogos del alcaloide antimalarico nitidina **2** han sido preparados y su actividad biológica evaluada (Figura 2.3), cuyos estudios han permitido encontrar algunos compuestos con actividad *in vitro* frente a cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes y sensibles a cloroquina, siendo *N*-etiletoxidina **36** uno de los más promisorios con Cl_{50} menor a 30 ng/mL contra ambas cepas evaluadas (Nyangulu *et al.*, 2005).

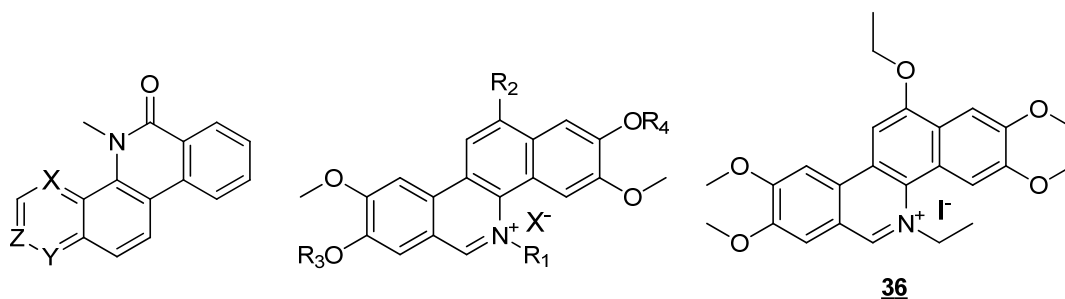


Figura 2.3. Algunos tipos de análogos de nitidina **2** sintetizados.

En este contexto, las sales de alcaloides benzofenantridínicos, representados por fagaronina **1** y nitidina **2** aparecen como modelos interesantes para el desarrollo de nuevos antitumorales. En efecto, estos compuestos han demostrado ser citotóxicos y actúan como inhibidores de la topoisomerasa I en concentraciones bajas e inhibidores de la topoisomerasa II en altas concentraciones. Se ha especulado que la carga positiva sobre el nitrógeno de estos alcaloides es necesaria para la actividad biológica, en conexión con su reactividad frente a un ataque nucleofílico; pero otras investigaciones realizadas han demostrado que análogos de nitidina no cargados pueden actuar como inhibidores de la topoisomerasa y exhibir una potente actividad citotóxica (Prado *et al.*, 2004).

Con base en estos modelos naturales, en los últimos años diversas series de análogos han sido preparados a fin de mejorar la actividad, de incrementar la penetración celular y la afinidad hacia el ADN. En efecto, algunos de los compuestos sintetizados se ilustran en la Figura 2.4, los cuales se caracterizan por presentar modificaciones estructurales sobre el núcleo base benzofenantridínico como sustitución de un anillo de seis miembros por uno de cinco miembros (**37-39**) (Jarayaman *et al.*, 2002), cambio en la posición del nitrógeno endocíclico (**40**) (Li *et al.*, 2003), reemplazo de un anillo aromático por uno de piridina (**41, 42**) (Prado *et al.*, 2004) e introducción de sustituyentes particulares sobre el núcleo base (**43, 44**) (Kock *et al.*, 2005). Los más promisorios de acuerdo a su actividad antitumoral han sido las series de los análogos no cuaternarios indenoisoquinolinas, dibenzonaftiridionas y benzofenantrolinas (Tillequin, 2007).

Muchos de los procesos sintéticos desarrollados para alcaloides benzofenantridínicos y análogos han mostrado ciertas desventajas: numerosos pasos, bajos rendimientos y otras ofrecen pocas generalidades. Así, adecuadas rutas de síntesis para estos compuestos y sus análogos son requeridas a fin de continuar con las investigaciones sobre este tipo de alcaloides.

Con el objeto de contribuir en el desarrollo de nuevas rutas de síntesis que puedan ser utilizadas para la preparación de diversos análogos, fue desarrollado un esquema sintético tomando como base enaminas sustituidas **47**, recientemente sintetizadas mediante una condensación entre el aducto vinílico de Mannich **45** y el aldehído **46** apropiadamente sustituido, tal como se ilustra en la Figura 2.5 (Aurrecoechea *et al.*, 2006; Aurrecoechea y Suero, 2005).

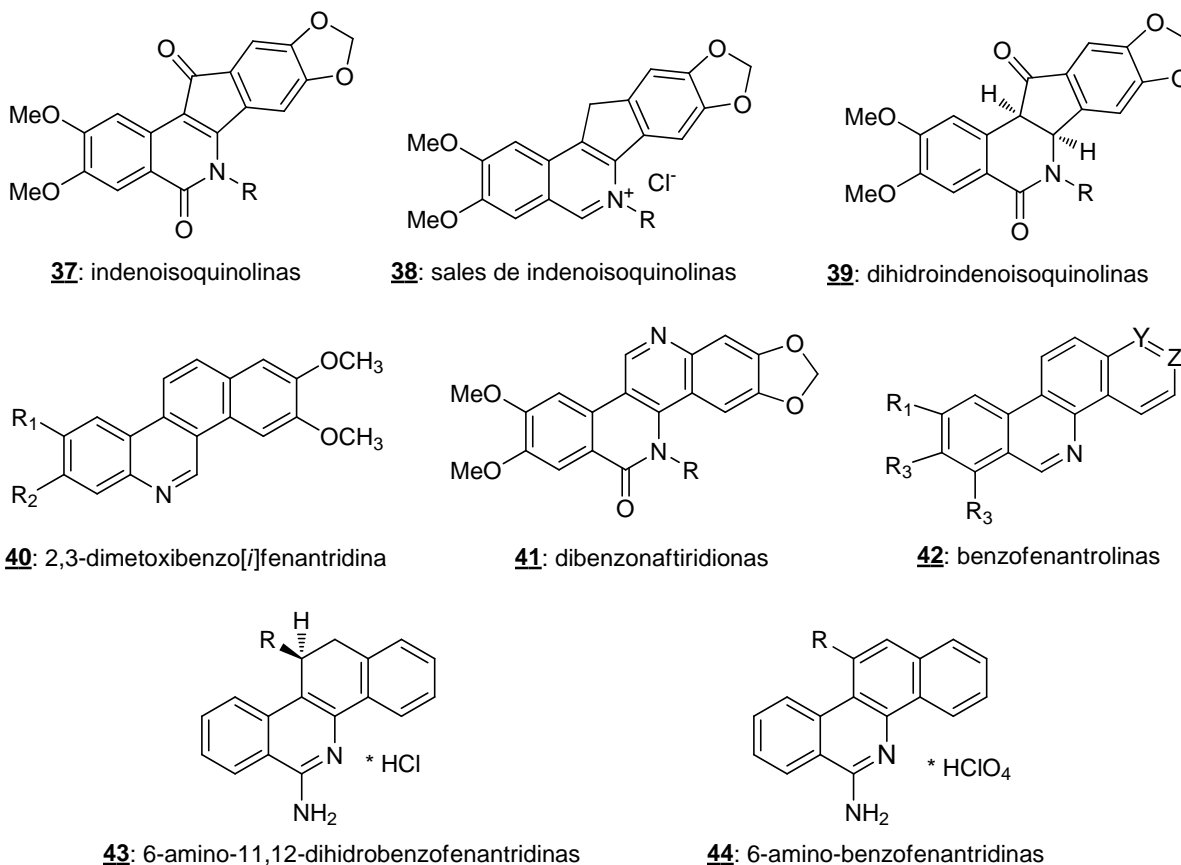


Figura 2.4. Ejemplos de análogos de alcaloides benzofenantridínicos sintetizados.

Tetrahidropiridinas apropiadamente sustituidas como del tipo **48** serían los precursores necesarios para la formación de los posibles sistemas policíclicos **51** y/o **52**, vía adiciones intramoleculares de tipo radicalaria o Heck al doble enlace de la enamina, a través de intermediarios como **49** y **50**, respectivamente (Figura 2.6).

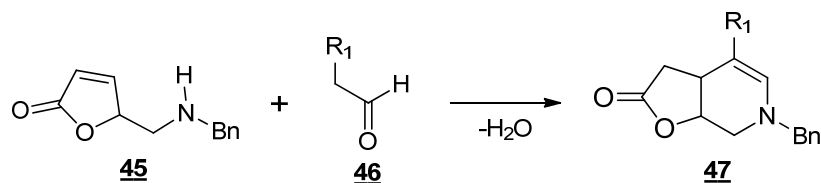


Figura 2.5. Preparación de tetrahidropiridinas

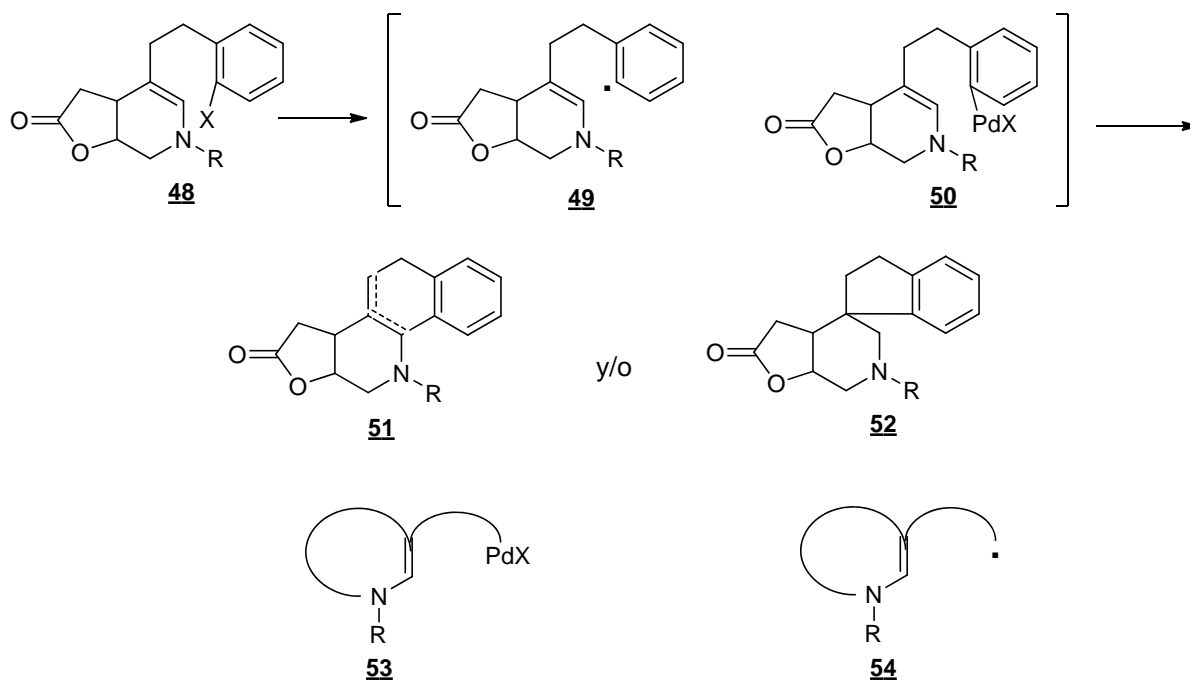


Figura 2.6. Estrategia para la formación de análogos de alcaloides.

El compuesto policíclico **51** resulta interesante desde el punto de vista estructural ya que su esqueleto básico es análogo al de los alcaloides benzo[*c*]fenantridínicos (Figura 2.1) en el cual se ha sustituido un anillo aromático por un ciclo butirolactónico, grupo funcional presente en diversos productos naturales bioactivos. Adicional a esto, este tipo de alcaloides no han sido sintetizados por esta ruta que involucra una ciclación intramolecular conducente a la formación del enlace entre los carbonos 4a y 4b. Compuestos espirocíclicos del tipo **52** pueden ser formados y son de gran interés ya que sus subestructuras azaespirocíclicas están presentes en numerosos compuestos biológicamente activos como es el caso de histrionicotoxinas (Figura 2.7), una familia de alcaloides aislados del extracto de la piel de las ranas colombianas “flecha venenosa” *Dendrobates histrionicus* (Stockman, 2000).

De esta forma en la Figura 2.8 se resume el esquema sintético diseñado. La ruta propuesta permite introducir con facilidad los grupos funcionales en la enamina **48**, necesarios para las reacciones radicalaria y Heck, a partir de aldehídos simples como **57** que pueden ser preparados mediante una reacción de Heck selectiva para yodo en presencia de bromo (Gibson *et al.*, 1999; Jeffery, 1996). El otro precursor necesario para la preparación de la enamina **48** es **45** el cual puede ser preparado en

cuatro pasos y con buen rendimiento de acuerdo al procedimiento descrito en la literatura para este compuesto (Aurrecochea y Suero, 2005). La química prevista en este esquema de síntesis es variada, e implica reacciones de Heck selectivas, reacciones vinílogas de Mannich promovidas por ácidos de Lewis, ciclaciones intramoleculares a partir de enaminas por reacción radicalaria y Heck.

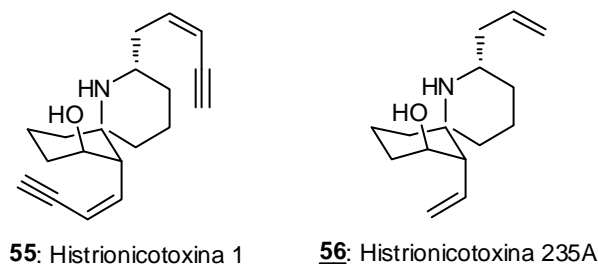


Figura 2.7. Alcaloides espirocíclicos del tipo histrionicotoxinas.

El método de ciclación para este tipo de tetrahidropiridinas **48** es el paso más importante de la ruta sintética ya que excepto para enaminas de tipo indólico no hay precedentes bibliográficos para ciclaciones intramoleculares a través de intermediarios nucleofílicos del tipo general representados en **53** y **54**, donde la enamina tiene carácter nucleofilo (Figura 2.9) (Avila-Zarraga *et al.*, 2006; Joucla *et al.*, 2005; Flanagan *et al.*, 2003; Parson *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1993).

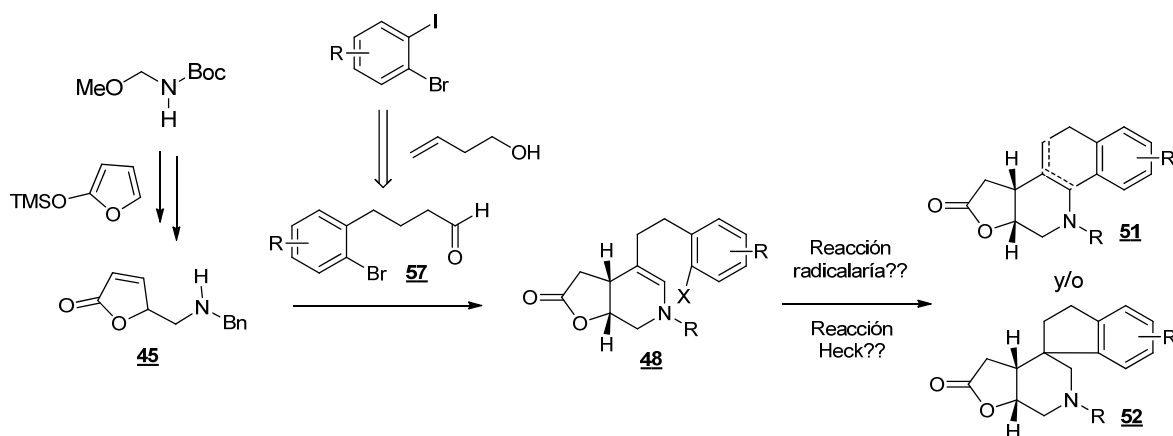


Figura 2.8. Ruta de síntesis propuesta para la síntesis de análogos de alcaloides.

En el caso de reacciones radicalarias que involucran intermediarios del tipo **54** como en los ejemplos a y b de la Figura 2.9, las ciclaciones suelen ser pobremente regioselectivas (Flanagan *et al.*, 2003) cuando no hay activación adicional con un sustituyente en la posición α de la enamina (Yang *et al.*, 1993). Las ciclaciones radicalarias sobre enaminas tienden a producir radicales α -aminoalquilo debido al efecto estabilizante del grupo amino, por lo que en esta vía se forman principalmente los derivados espiránicos siguiendo un camino *5-exo-trig*. (Ripa y Hallberg, 1998; Aurrecoechea y Suero, 2004).

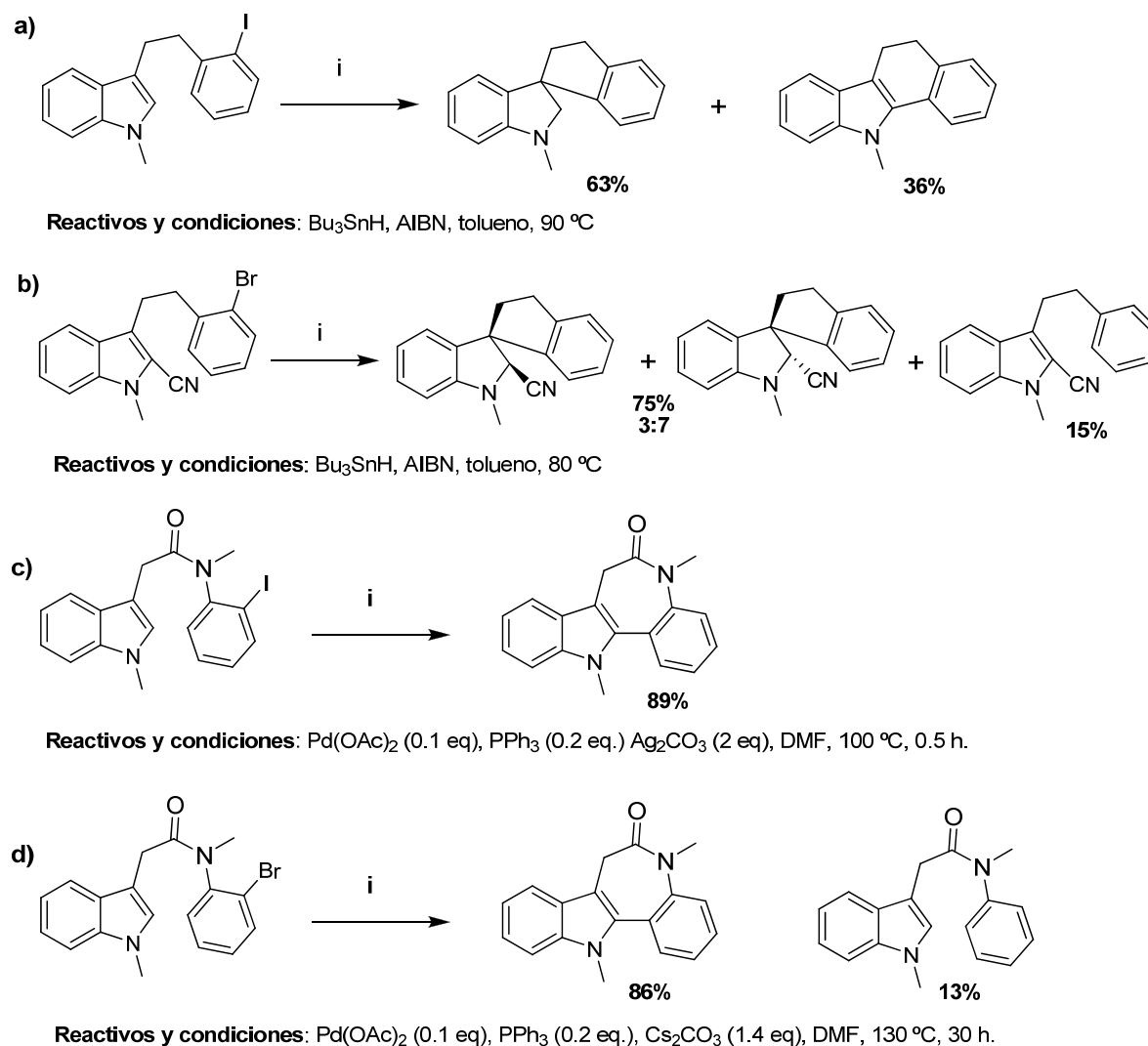


Figura 2.9. Ejemplos de reacciones con formación de los intermediario **53** y **54**.

En la ciclación intramolecular de la enamina por reacción de Heck es de esperarse que la formación del enlace carbono-carbono se lleve a cabo por el extremo más deficiente en electrones del alqueno, siguiendo la tendencia normal de este tipo de reacciones (Ripa y Hallber, 1996, 1997; Hughes y Trauner, 2004). Existen amplios precedentes sobre el uso de enamidas, formamidas, enaminoésteres, dehidroaminoésteres, enamionas, pirroles e índoles en reacciones intramoleculares de Heck (Avila-Zarraga *et al.*, 2006; Joucla *et al.*, 2005; Wu, *et al.*, 2005; Braese y de Meijere, 2004; Sorensen y Pombo-Villar, 2004; Larhed y Halberg, 2002; Ripa y Hallber, 1996, 1997). Son escasos los reportes del uso de enaminas simples y en algunos casos están restringidos a la adición *5-endo* en posición β de la enamina (Ackerman y Althammer, 2006).

Por lo tanto la posibilidad de usar tetrahidropiridinas del tipo **48** posee gran valor con el fin de realizar exploraciones en la química radicalaria y catalizada por paladio para el grupo funcional enamino y más aún si está enfocada a la síntesis de análogos de alcaloides presentes en la naturaleza con importante actividad biológica.

2.3. METODOLOGÍA

2.3.1. Procedimientos generales

2.3.1.1. Cromatografía

Las separaciones cromatográficas en columna se realizaron por el método flash (CF) utilizando sílica gel 60 Merck (230-400 Mesh) como fase estacionaria. Los estudios cromatográficos, el monitoreo tanto de las reacciones como de las cromatografías en columna, se realizaron por cromatografía en capa fina (CCD) empleando cromatoplasmas de sílica gel 60 HF₂₅₄ Merck, usando como reveladores luz UV (254 y 365 nm) y una disolución al 10% de ácido fosfomolibdico en etanol.

2.3.1.2. Técnicas empleadas para la elucidación estructural y caracterización de los compuestos.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C , así como los experimentos DEPT 135, COSY, HMQC y HMBC fueron tomados en un espectrómetro Bruker Avance AC-300 (300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C) y/o Bruker AV-500 (500 MHz para ^1H y 125.8 MHz para ^{13}C), siendo utilizados cloroformo deuterado (CDCl_3) y dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) como disolventes y patrones internos (CDCl_3 : $\delta = 7.26$ para ^1H y $\delta = 77.0$ para ^{13}C ; DMSO-d_6 : $\delta = 2.50$ para ^1H y $\delta = 39.5$ para ^{13}C) a una temperatura de 25 °C, a no ser que se indique de otro modo. Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en hertz (Hz). Para los espectros de ^{13}C se indica entre paréntesis la información obtenida de los experimentos DEPT y cuando es posible, la asignación de la señal. Los espectros de infrarrojo (IR) fueron realizados en un espectrómetro Perkin-Elmer R-1430, en celda de NaCl.

Los espectros de masas de baja (EM) y alta resolución (EMAR) fueron realizados en el Centro de Apoyo Científico y Tecnológico para la Investigación (CACTI) de la Universidad de Vigo (España) en un espectrómetro de masas VG Autospec M. Los fragmentos significativos se indican como: m/e (intensidad relativa al pico base = 100), con masa exacta determinada para el ión molecular (M) o fragmento iónico adecuado. Para la cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) se usó una columna HP-5MS (0.25 μm , 30 m x 0.25 mm) que tiene un relleno de (5%-fenil)-metilpolisiloxano, con una rampa de temperaturas de 40-280 °C y un incremento en la temperatura de 20 °C/min.

La determinación de los puntos de fusión fue realizada en un fusiómetro Büchi modelo B-540. El termómetro de este equipo fue calibrado previamente con patrones.

2.3.1.3. Disolventes y reactivos

Los solventes empleados se purificaron antes de su utilización siguiendo los procedimientos descritos en la bibliografía (Martínez y Csáký, 2001). El hexano y acetato de etilo, utilizados como eluyentes en cromatografía, se destilaron antes de su uso. Los solventes diclorometano, éter etílico, dimetilformamida (DMF), tolueno y trietilamina fueron destilados en presencia de CaH_2 y luego almacenados sobre tamiz molecular de 4 Å en atmósfera de argón. El tetrahidrofurano (THF) se

destiló en presencia de sodio/benzofenona y fue almacenado durante tiempo corto sobre tamiz molecular de 4 Å en atmósfera inerte. Los demás reactivos utilizados fueron adquiridos comercialmente y usados sin purificación adicional.

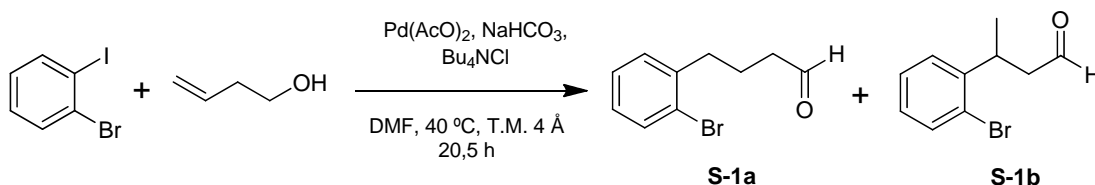
2.3.1.4. Técnicas experimentales

Todas las reacciones que requerían condiciones inertes (ausencia de humedad y aire), se llevaron a cabo en una atmósfera de argón, previo secado del gas a través de una columna de KOH y CaCl₂. Todo el material de vidrio en estos experimentos fue secado en un horno a 120 °C durante 12 horas. Para los trasvases de líquidos en condiciones inertes se utilizaron jeringas o cánulas de acuerdo con los procedimientos estándar descritos en la bibliografía (Martínez y Csáky, 2001).

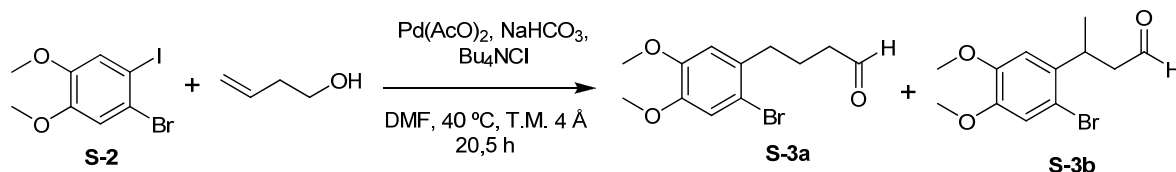
2.3.2. Preparación de los compuestos

2.3.2.1. Preparación de los aldehídos

2.3.2.1.1. 4-(2'-bromofenil)butanal (**S-1a**)

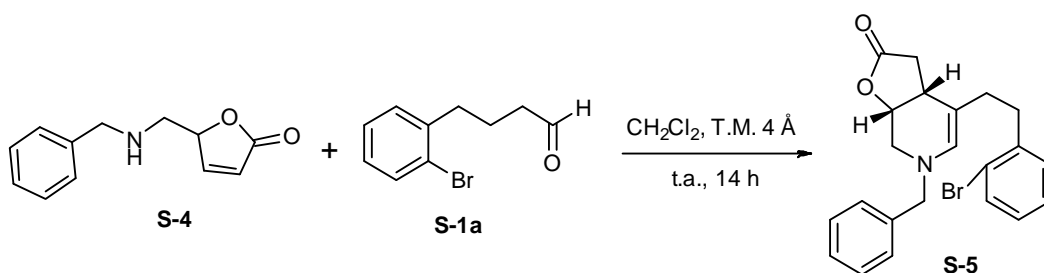


En un experimento adaptado del descrito en la literatura para la síntesis de este compuesto (Gibson *et al.*, 1999), a una mezcla de Pd(AcO)₂ (31.7 mg, 0.141 mmol), bicarbonato de sodio anhidro (1.48 g, 17.7 mmol), cloruro de tetrabutilamonio (1.97 g, 7.09 mmol) y tamiz molecular de 4 Å (4.0 g) en atmósfera de argón se le adicionaron sucesivamente DMF (7.0 mL), yodobenceno (910 µL, 7.07 mmol) y 3-buten-1-ol (910 µL, 10.6 mmol). La mezcla de reacción fue agitada constantemente a 40 °C, bajo atmósfera de argón, durante 20,5 horas. Transcurrido el tiempo, la mezcla se llevó a temperatura ambiente, se diluyó con éter etílico (15 mL) y se filtró sobre Celita. Los solventes fueron eliminados a presión reducida y el residuo obtenido fue sometido a CF (*n*-hexano/AcOEt 90:10), obteniéndose un aceite de color amarillo claro correspondiente a una mezcla de dos regioisómeros denominados **S-1a** y **S-1b** (1.33 g, 83%, 91:9).

2.3.2.1.2. 4-(2'-bromo-4',5'-dimetoxifenil)butanal (**S-3a**)

Realizando una metodología similar a la utilizada en la preparación de **S-1a** (Gibson *et al.*, 1999), a una mezcla de **S-2** (Orito *et al.*, 1995) (2.40 g, 7.00 mmol), $\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (31,4 mg, 0.140 mmol), bicarbonato de sodio anhidro (1.47 g, 17,5 mmol), cloruro de tetrabutilamonio (1.94 g, 7.0 mmol) y tamiz molecular de 4 Å (4.0 g) en atmosfera de argón se adicionaron sucesivamente DMF (7.0 mL), y 3-buten-1-ol (900 μL , 10.50 mmol). La mezcla de reacción fue agitada constantemente bajo atmósfera de argón a $40\text{ }^\circ\text{C}$ durante 22 horas. Transcurrido el tiempo, la mezcla se llevó a temperatura ambiente, se diluyó con éter etílico (20 mL) y se filtró sobre Celita. Los solventes fueron eliminados a presión reducida y el residuo obtenido fue sometido a CF (*n*-hexano/AcOEt 85:15), obteniéndose un aceite de color amarillo claro correspondiente a una mezcla de dos regioisómeros denominados **S-3a** y **S-3b** (1.72 g, 86%, 87:13).

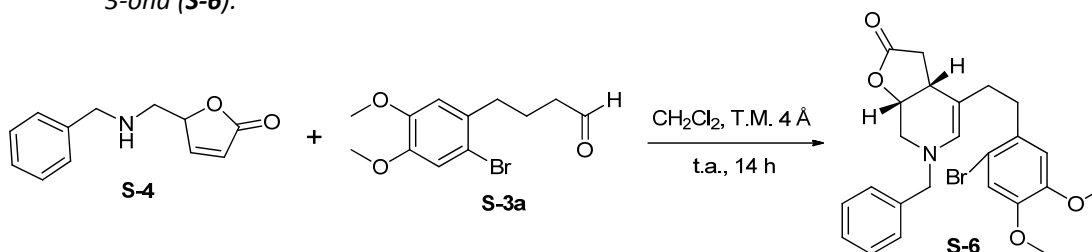
2.3.2.2. Preparación de las tetrahidropiridinas

2.3.2.2.1. (1*R**,5*R**)-8-Bencil-6-(2'-bromofenil)etil-2-oxa-8-azabicyclo[3.4.0]non-6-en-3-ona (**S-5**).

En un experimento adaptado del descrito en la literatura para compuestos de este tipo, se adicionó tamiz molecular de 4 Å pulverizado (4.0 g) sobre una solución de **S-4** (Aurrecochea *et al.*, 2006) (0.402 g, 1.98 mmol) y **S-1** (0.450 g, **S-1a/S-1b** 91:9, 1.80 mmol de **S-1a**) en CH_2Cl_2 (24 mL). La suspensión resultante fue agitada a temperatura ambiente durante 14 horas. La mezcla se filtró sobre Celita y el sólido fue lavado con CH_2Cl_2 (3 x 15 mL). El aceite resultante de la evaporación de los solventes se

purificó por CF (silica gel saturada con Et₃N, *n*-hexano/AcOEt/Et₃N 80:17:3) obteniéndose **S-5** (0.742 g, 72 %) como un aceite amarillo.

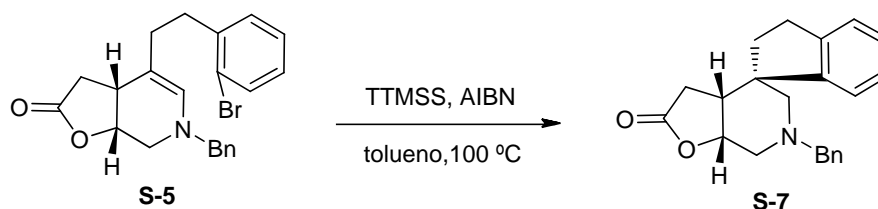
2.3.2.2.2. (1*R**,5*R**)-8-Bencil-6-(2'-bromo-4',5'-dimetoxifenil)etil-2-oxa-8-azabicyclo[3.4.0]non-6-en-3-ona (**S-6**).



En un experimento similar al realizado para la preparación de **S-5**, se adicionó tamiz molecular de 4 Å pulverizado (4.0 g) sobre una solución de **S-4** (Aurrecoechea et al., 2006) (0.670 g, 3.30 mmol) y **S-3** (0.947 g, **S-3a/S-3b** 87:13, 2.87 mmol de **S-3a**) en CH₂Cl₂ (40 mL). La suspensión resultante fue agitada a temperatura ambiente durante 14 horas. La mezcla se filtró sobre Celita y el sólido fue lavado con CH₂Cl₂ (3 x 15 mL). El aceite resultante de la evaporación de los solventes se purificó por CF (silica gel saturada con Et₃N, *n*-hexano/AcOEt/Et₃N = 70:27:3) obteniéndose **S-6** (1.49 g, 78 %) como un sólido de color amarillo.

2.3.2.3. Preparación de espirociclos por ciclación radicalaria

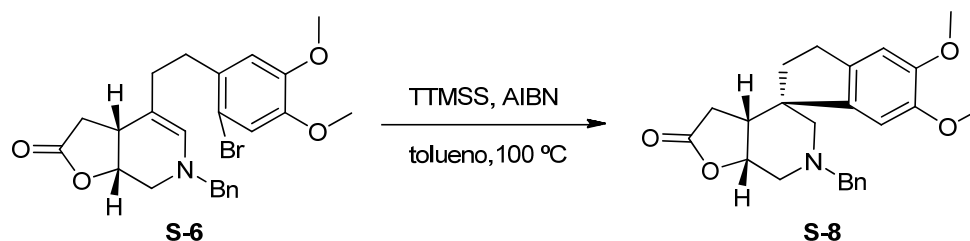
2.3.2.3.1. (1*R**,5*R**,6*S**)-8-Bencil-2-oxa-8-azabicyclo[3.4.0]nonan-3-ona-6-espiro-1'-indano (**S-7**).



Se calentó una solución de **S-5** (0.412 g, 1.0 mmol), AIBN (0.164 g, 0.30 mmol) y TTMSS (616 μL, 2.0 mmol) en tolueno (10 mL) a 100 °C (temperatura del baño de aceite) con agitación constante durante 16 horas bajo atmósfera de argón. Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción es llevada a temperatura ambiente, diluida con acetato de etilo (20 mL) y extraída con solución de HCl 1.0 M (3 x 15 mL). Las capas acuosas combinadas se basificaron con una solución saturada de NaHCO₃ hasta pH 8

y se extrajeron con CH_2Cl_2 (3 x 25 mL). Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con salmuera (10 mL) y secadas (Na_2SO_4). El residuo resultante de la evaporación de los solventes se purificó por CF (silica gel saturada con Et_3N , *n*-hexano/AcOEt/ Et_3N 85:13:2) obteniéndose un aceite amarillo correspondiente a una mezcla de isómeros de la cual solo fue identificado el isómero mayoritario denominado **S-7** (0.200 g, 60 %, 14:1).

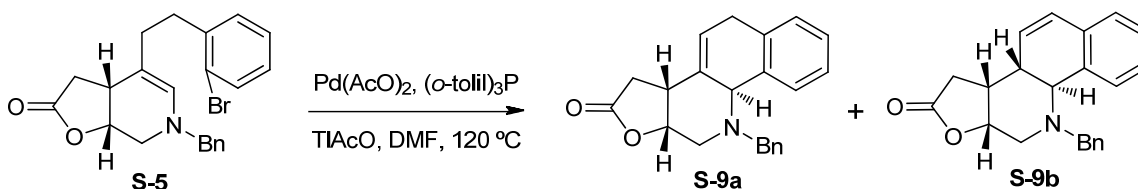
2.3.2.3.2. (1*R**,5*R**,6*S**)-8-Bencil-2-oxa-8-azabicyclo[3.4.0]nonan-3-ona-6-espiro-1'-(5',6'-dimetoxi)indano (**S-8**).



Se calentó una solución de **S-6** (0.222 g, 0.470 mmol), AIBN (0.0232 g, 0.141 mmol) y TTMSS (292 μL , 0.944 mmol) en tolueno (5.0 mL) a 100 °C (temperatura del baño de aceite) durante 14 horas bajo argón. Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción es llevada a temperatura ambiente, diluida con acetato de etilo (20 mL) y extraída con solución de HCl 1.0 M (3 x 15 mL). Las capas acuosas combinadas se basificaron con una solución saturada de NaHCO_3 hasta pH 8 y se extrajeron con CH_2Cl_2 (3 x 25 mL). Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con salmuera (10 mL) y secadas (Na_2SO_4). El residuo resultante de la evaporación de los solventes se purificó por CF (silica gel saturada con Et_3N , *n*-hexano/AcOEt/ Et_3N 70:27:3) obteniéndose un sólido blanco correspondiente a una mezcla de isómeros de la cual solo fue identificado el isómero mayoritario denominado **S-8** (92,5 mg, 50 %, 14:1).

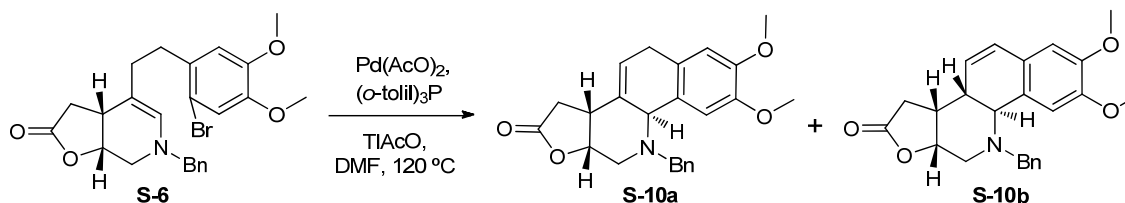
2.3.2.4. Preparación de análogos por reacción intramolecular de Heck

2.3.2.4.1. (9*S**,13*R**,14*R**)-11-Bencil-9,11,12,13,14,15-hexahidro-6*H*-17-oxa-11-azaciclopenta[*a*]fenantren-16-ona (**S-9a**) y (8*S**,9*S**,13*R**,14*R**)-11-bencil-9,11,12,13,14,15-hexahidro-8*H*-17-oxa-11-azaciclopenta[*a*]fenantren-16-ona (**S-9b**).

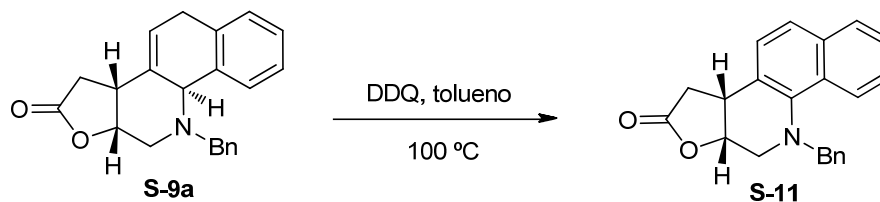


Se establecieron algunas condiciones experimentales para la síntesis de **S-9a** por medio de una reacción de Heck intramolecular (Tabla 2.1). En las mejores condiciones de reacción para la obtención a **S-9a** con buen rendimiento, se calentó una suspensión de **S-5** (0.206 g, 0.5 mmol), $\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (5.61 mg, 0.025 mmol), acetato de talio ((0.145 g, 0.55 mmol) y *o*-tolilfosfina (0.015 g, 0.05 mmol) en DMF (6.0 mL) a 120 °C (temperatura del baño de aceite) con agitación constante durante 3,5 horas. Tras enfriar, se eliminó el solvente a presión reducida y el residuo resultante fue purificado por CF (silica gel saturada con Et_3N , *n*-hexano/ $\text{AcOEt}/\text{Et}_3\text{N}$ 85:13:2), obteniéndose **S-9a** (86.2 mg, 52%) y **S-9b** (8.3 mg, 5%).

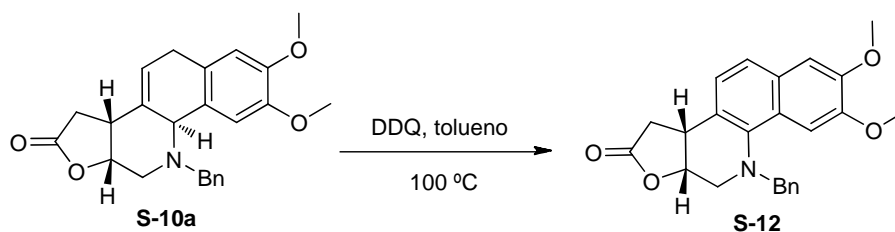
2.3.2.4.2. (9*S**,13*R**,14*R**)-11-Bencil-2,3-dimetoxi-9,11,12,13,14,15-hexahidro-6*H*-17-oxa-11-azaciclopenta[*a*]fenantren-16-ona (**S-10a**).



Siguiendo un procedimiento similar con las condiciones establecidas para la preparación de **S-9**, fue calentada una suspensión de **S-6** (0.236 g, 0.5 mmol), $\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (5.61 mg, 0.025 mmol), acetato de talio (0.145 g, 0.55 mmol) y *o*-tolilfosfina (0.015 g, 0.05 mmol) en DMF (6.0 mL) a 120 °C (temperatura de baño de aceite) con agitación constante durante 6 horas. Tras enfriar, se eliminó el solvente mediante presión reducida y el residuo resultante fue purificado por CF (silica gel saturada con Et_3N , *n*-hexano/ $\text{AcOEt}/\text{Et}_3\text{N}$ 65:32:3), obteniéndose una mezcla de dos isómeros **S-10a** y **S-10b** (157 mg, 80%, **10a/10b** 18:1).

2.3.2.5. Oxidación con DDQ de **S-9a** y **S-10a**2.3.2.5.1. (13*R**,14*R**)-11-Bencil-12,13,14,15-tetrahidro-11*H*-17-oxa-11-azaciclopenta[*a*]fenantren-16-ona (**S-11**).

En un experimento de oxidación con 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona (DDQ) (Dalla Via *et al.*, 2003), una solución de **S-9a** (0.150 g, 0.450 mmol) y DDQ (0,310 g, 1,35 mmol) en tolueno (20 mL) fue calentada a 100 °C con agitación constante durante 6 horas. Tras enfriar, se eliminó el solvente mediante presión reducida y el residuo obtenido fue purificado por CF (*n*-hexano/AcOEt 90:10), obteniéndose **S-11** como un sólido blanco (119 mg, 80%).

2.3.2.5.2. (13*R**,14*R**)-11-Bencil-2,3-dimetoxi-12,13,14,15-tetrahidro-11*H*-17-oxa-11-azaciclopenta[*a*]fenantren-16-ona (**S-12**)

En un experimento de oxidación con DDQ similar al anterior, una solución de **S-10a** (0.152 g, 0.450 mmol) y DDQ (0,313 g, 1,35 mmol) en tolueno (20 mL) fue calentada a 100 °C con agitación constante durante 6 horas. Tras enfriar, se eliminó el solvente mediante presión reducida y el residuo obtenido fue purificado por CF (*n*-hexano/AcOEt 80:20), obteniéndose **S-12** como un aceite (149 mg, 85%).

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1. Investigación sintética

Una metodología de síntesis que conduce a la obtención de nuevos tipos de análogos de alcaloides fue realizada y se resume en la Figura 2.10, para lo cual se hizo necesario el desarrollo y optimización de un nuevo tipo de ciclación sobre enaminas cíclicas. La síntesis realizada comprende inicialmente una condensación entre una amina como **S-4** y un aldehído del tipo **S-1** o **S-3** apropiadamente sustituidos. Las tetrahidropiridinas resultantes **S-5** y **S-6** se hicieron reaccionar bajo las condiciones típicas para una reacción radicalaria obteniéndose los espirociclos **S-7** y **S-8** de manera altamente regio- y estereoselectiva. A su vez, las enaminas fueron examinadas bajo las condiciones de una reacción de Heck intramolecular y se establecieron algunas condiciones experimentales que conducen eficientemente a la formación altamente regio- y estereoselectiva de los análogos benzofenantridínicos **S-9** y **S-10**. Finalmente la oxidación de **S-9** y **S-10** con DDQ produjo **S-11** y **S-12**.

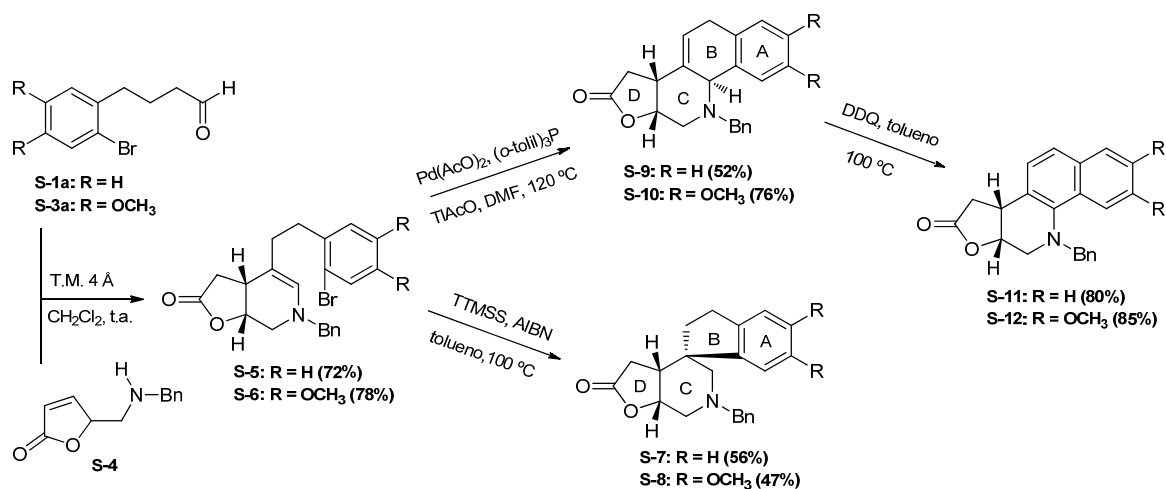


Figura 2.10. Ruta sintética desarrollada para la obtención de análogos de alcaloides.

Esta ruta sintética desarrollada tiene como aplicación potencial la preparación de familias de heterociclos nitrogenados con diversidad estructural, con modificaciones sobre los grupos funcionales presentes, así como por la introducción de distintos sustituyentes y heteroátomos sobre el anillo **A** del núcleo básico de los productos formados que pueden ser de interés para futuras investigaciones.

2.4.2. Obtención de la amina **S-4**

La amina de estructura **S-4** fue preparada mediante una reacción de Mannich viníloga entre trimetilsililoxifurano (TMSOF) y la α -alcoxiamina protegida con Boc **S-13** (Figura 2.11), de acuerdo al procedimiento descrito en la literatura para este compuesto (Aurrecoechea *et al.*, 2006). Se había descrito previamente una preparación directa de la amina **S-4** partiendo de TMSOF y un derivado de triazina que actúa como un equivalente sintético de bencilmetilenoamina (Ha *et al.*, 1997). Sin embargo, la ruta indirecta descrita en la Figura 2.11 resulta preferible, ya que permite almacenar cantidades multigramos del derivado más estable **S-14a**, que luego por desprotección con ácido trifluoroacético (TFA) proporciona la amina libre **S-4** con pureza adecuada para ser utilizada sin purificación adicional. Los datos espectroscópicos de los compuestos sintetizados están de acuerdo a los reportados para los mismos compuestos (Aurrecoechea *et al.*, 2006).

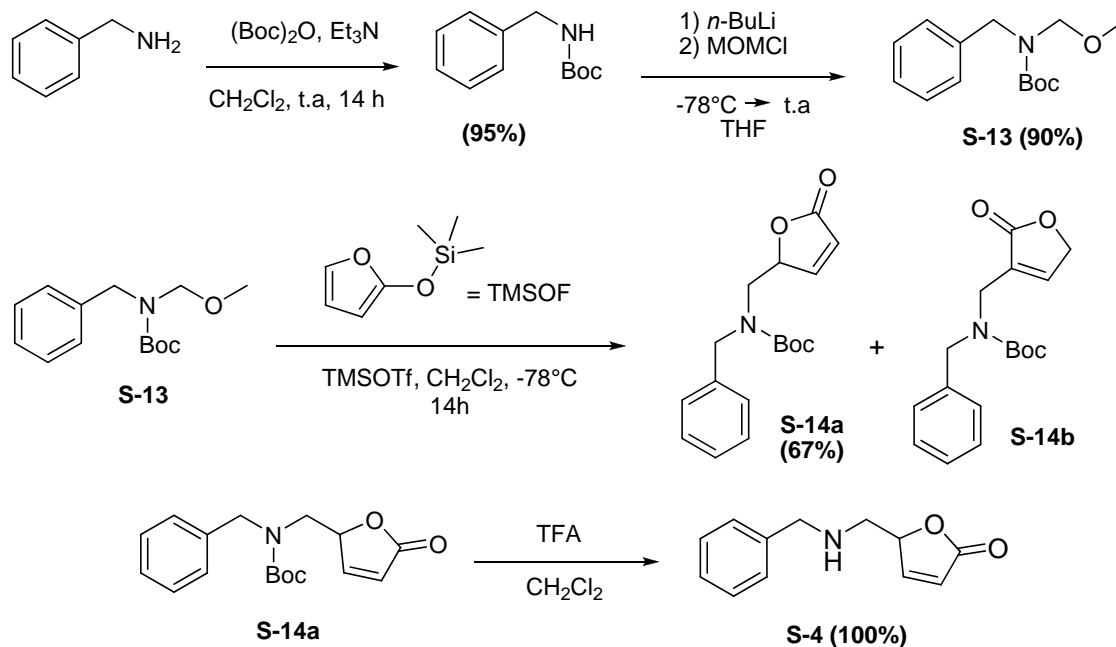


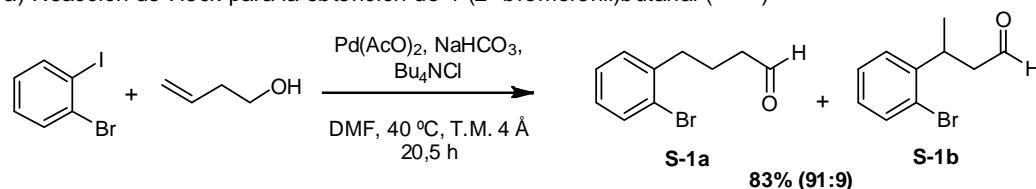
Figura 2.11. Preparación de la amina **S-4**

2.4.3. Obtención de los arilbutiraldehidos **S-1a** y **S-3a**

Para el desarrollo de la ruta sintética propuesta se hizo necesaria la preparación de aldehídos apropiadamente sustituidos, indispensables para la formación de las enaminas del tipo **S-5** y **S-6**. Los

aldehídos de interés son derivados del butanal con un sustituyente aromático en la posición 4 que va a corresponder al ciclo **A** en los productos finales y un átomo de bromo en posición 2' de este anillo aromático que es necesario para la ciclación intramolecular por reacción radicalaria y/o Heck en la formación del ciclo **B**.

a) Reacción de Heck para la obtención de 4-(2'-bromofenil)butanal (**S-1a**)



b) Síntesis en dos pasos de 4-(2-bromo-4,5-dimetoxifenil)butanal (**S-3a**)

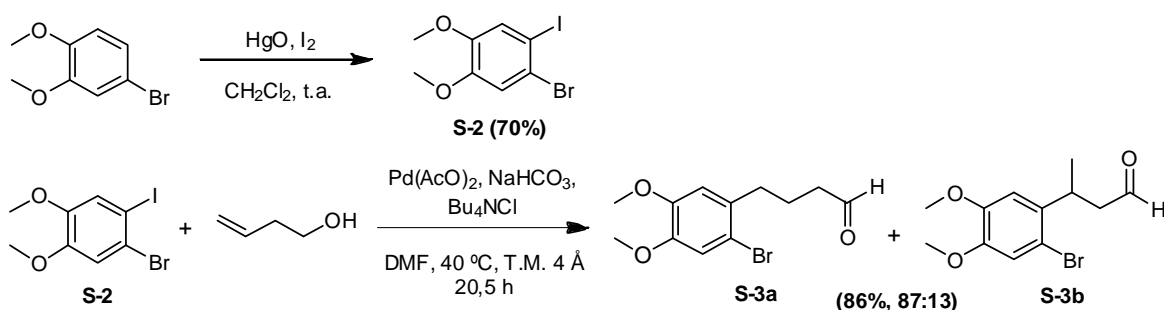


Figura 2.12. Síntesis de unidades de aldehídos sustituidos **S-1a** y **S-3a**.

El aldehído de partida necesario para las síntesis de los análogos del tipo **S-7** y **S-9** fue el 4-(2'-bromofenil)butanal **S-1a** preparado a partir del bromiodobenceno y 3-buten-1-ol por medio de una reacción de Heck descrita en la literatura para esta sustancia (Figura 2.12), cuyas condiciones de reacción conducen a una transformación selectiva del yodo en presencia del átomo de bromo para así formar el aldehído **S-1a** (Gibson *et al.*, 1999). Se hizo necesaria la adición de tamiz molecular de 4 Å en el medio de reacción para mantener las condiciones anhidras y así favorecer la reacción ya que algunos de los reactivos utilizados son bastante higroscópicos (Jeffery, 1996). Adicionalmente en los espectros de RMN se observaron señales que indican la formación en pequeña proporción de su regioisómero **S-1b** (91:9), originado en el proceso de inserción del complejo de paladio al doble enlace del 3-buten-1-ol. Este tipo de isómero ha sido descrito en la literatura como un posible producto secundario de la reacción de Heck (Calò *et al.*, 2007), pero en el caso específico de la síntesis de **S-1a**

no había sido reportado. Los datos espectroscópicos del isómero mayoritario **S-1a** se resumen en el anexo de este capítulo y están de acuerdo a los reportados en la literatura.

Para la síntesis de los análogos **S-8** y **S-10**, el aldehído de partida necesario fue el 4-(2'-bromo-4',5'-dimetoxifenil)butanal **S-3a** sintetizado por primera vez en este trabajo junto con su regioisómero **S-3b** a partir del 3,4-dimetoxi-1-bromobenceno mediante una iodación selectiva para alquil aril éteres (Orito *et al.*, 1995), seguido luego por una reacción de Heck empleando las mismas condiciones utilizadas para la formación del aldehído **S-1a** (Figura 2.12). Esta metodología sintética desarrollada abre la posibilidad para la preparación de aldehídos con diversos sustituyentes sobre el anillo aromático e incluso permite la utilización de compuestos heterocíclicos como derivados de piridina y tiofeno entre otros, que darían acceso a una serie muy interesante de análogos.

2.4.4. Síntesis de tetrahidropiridinas **S-5** y **S-6**.

Las enaminas de estructura **S-5** y **S-6** necesarias para los pasos siguientes de ciclación intramolecular fueron preparadas siguiendo la metodología general descrita en la literatura para compuestos similares (Aurrecoechea *et al.*, 2006). Así de este modo por condensación entre los aldehídos **S-1** y **S-3** con la amina **S-4** bajo condiciones suaves de reacción se produjeron **S-5** y **S-6** con buenos rendimientos y como un único estereoisómero con las lactonas en fusión *cis* de manera similar a las diversas enaminas preparadas por este método (Figura 2.13). Estos compuestos fueron convenientemente purificados por cromatografía flash en presencia de trietilamina (Et₃N) para neutralizar la acidez de la silica gel y pudieron ser almacenados a 4 °C por varios días sin apreciable degradación. Las dos tetrahidropiridinas fueron caracterizadas por métodos espectroscópicos y EMAR, cuyos datos se presentan en el anexo.

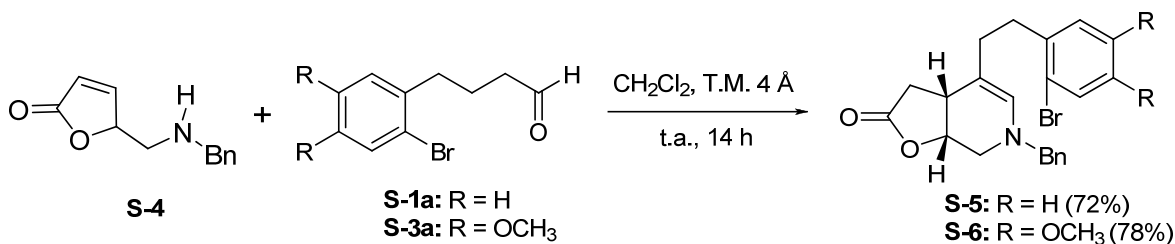


Figura 2.13. Preparación de tetrahidropiridinas **S-5** y **S-6**.

2.4.5. Reacción radicalaria intramolecular para la obtención de los análogos **S-7** y **S-8**.

Se examinó la reactividad de las enaminas **S-5** y **S-6** bajo condiciones típicas de ciclación radicalaria para lo cual se utilizó 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN) como iniciador de radicales y tris(trimetilsilil)silano (TTMSS) como agente reductor en lugar de los comunes reactivos de estaño utilizados en procesos radicalarios debido a su baja toxicidad y a que facilita los procesos de purificación (Brazeau, 2007). El tratamiento de **S-5** y **S-6** bajo las condiciones típicas de ciclación radicalaria con TTMSS/AIBN en tolueno a 100 °C condujo a la formación de los espirociclos **S-7** y **S-8** con buenos rendimientos (Figura 2.14). Los productos principales fueron obtenidos de una manera regio y estereoselectiva, junto con pequeñas cantidades de regioisómeros y/o estereoisómeros que no fueron identificados y que están presentes en pequeña proporción (14:1) en relación a **S-7** y **S-8**. Como era de esperarse los estereoisómeros mayoritarios en esta reacción fueron formados por adición radicalaria hacia la cara menos congestionada del doble enlace de la enamina, es decir en posición *anti* al fragmento de lactona fusionada. Esta configuración relativa fue determinada por la observación del efecto NOE entre los protones en las posición cabeza de puente del anillo lactónico y el protón aromático más próximo al carbono cuaternario espirocíclico (Figura 2.15).

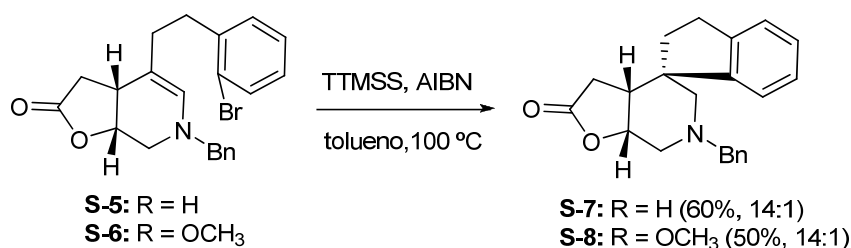


Figura 2.14. Preparación de espirociclos por reacción radicalaria.

La reacción presentada en la Figura 2.14 representa un inusual tipo de ciclación por adición de un C-radical nucleófilo al doble enlace de una enamina nucleófila. Se ha comprobado que este carácter electrónico retarda la adición de un C-radical nucleófilo a la enamina (Giese, 1983), por lo que en reacciones intermoleculares principalmente se han empleado radicales electrofílicos conteniendo grupos electroatrayentes (Chuang y Wu, 2004; Tsai y Chuang, 2006), mientras las correspondientes reacciones intramoleculares se han limitado a derivados indólicos y a enaminas con activación adicional proporcionada por grupos arilo (Ozlu et al., 1991). Así, las reacciones descritas en este

trabajo son los primeros ejemplos de ciclaciones radicalarias *5-exo-trig* para enaminas con sustituyente *N*-alquilo que no implican derivados indólicos.

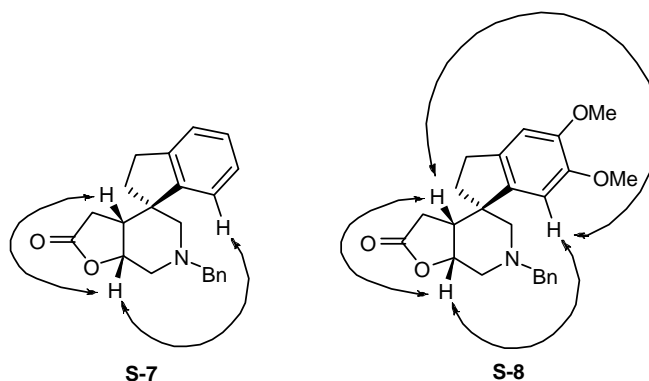
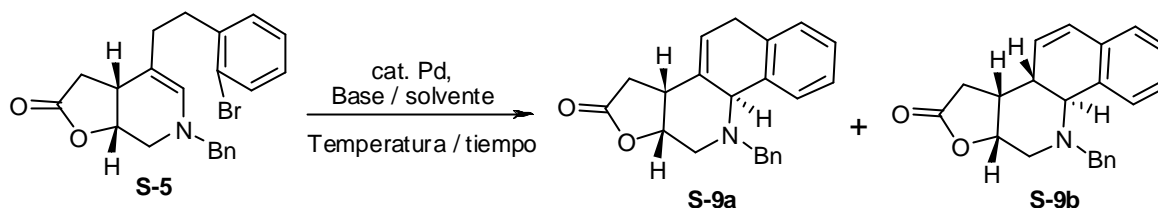


Figura 2.15. Efectos NOE observados para los compuestos **S-7** y **S-8**.

La regioquímica de estas ciclaciones radicalarias sigue la tendencia observada para las ciclaciones de radicales de tipo 5-hexenilo, los cuales reaccionan de modo *5-exo-trig* con alta selectividad (Chatgililoglu, 2004; Aurrecochea y Suero, 2004). Además, este modo de adición también es coherente con la tendencia mostrada por las adiciones radicalarias intermoleculares a enaminas sin restricciones estéricas, donde la regioquímica parece regirse por la preservación de la conjugación y así dar como resultado la adición del radical arilo por el carbono β del doble enlace de la enamina con formación de un radical α -aminoalquilo relativamente estable. Sin embargo, también se ha encontrado que la relación *5-exo* a *6-endo* es muy dependiente del grado de congestión estérica alrededor del doble enlace involucrado en la adición. Por lo tanto, en las ciclaciones radicalarias realizadas de las enaminas estéricamente impedidas como **S-5** y **S-6**, la fuerza motriz proporcionada por la formación de un radical α -aminoalquilo es notable y en buena medida es la responsable de la formación de los espirociclos *5-exo-trig* con alta regioselectividad.

2.4.6. Reacción de Heck intramolecular para la síntesis de los análogos **S-9** y **S-10**.

Se evaluó también la reactividad de las enaminas bajo condiciones típicas de Heck. Inicialmente se realizó un estudio de la reacción de Heck con **S-5** para determinar algunas condiciones experimentales que condujeran eficientemente a los productos de arilación intramolecular (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Condiciones de reacción de la ciclación intramolecular catalizada por paladio

ENT.	SOLV.	Pd cat (% mol)	T (°C)	t (h)	BASE (Equiv.)	OTROS (Equiv.)	S-9a	S-9b
1	CH ₃ CN	Pd(AcO) ₂ (10) /PPh ₃ (20)	80	51	K ₂ CO ₃ (2.0)	Bu ₄ NCl (1,0)	< 39	< 14
2	DMF	(PPh ₃) ₄ Pd (5)	120	4	KOAc (2.0)	----	33	4
3	DMF	(PPh ₃) ₄ Pd (5)	120	10	NaOAc (3.0)	----	22	---
4	DMF	Pd(AcO) ₂ (5) /(<i>o</i> -tol) ₃ P (10)	120	4	KOAc (2.0)	----	31	22
5	DMF	Pd(AcO) ₂ (5) /(<i>o</i> -tol) ₃ P (10)	120	3,5	TIOAc (1.1)	----	52	5
6	DMF	Pd(AcO) ₂ (5) /(<i>o</i> -tol) ₃ P (10)	120	2,0	TIOAc (2.2)	----	46	< 14
7	DMF	Pd(AcO) ₂ (5) /(<i>o</i> -tol) ₃ P (10)	120	2.0	DIPEA(3.0) / TIOAc (1.1)	----	48	< 10

Se realizaron diferentes ensayos sobre **S-5** en los que se aplicaron variaciones en las condiciones típicas utilizadas en reacciones de Heck, así se aumentó la temperatura para disminuir el tiempo de reacción y se hicieron cambios de base. Estos ensayos, condujeron a la formación de dos productos en bajos rendimientos (entradas 1-4). El principal producto formado **S-9a** presenta un fragmento de alqueno exocíclico respecto al anillo de la piperidina y fue acompañado de pequeñas cantidades de producto de isomerización del doble enlace, **S-9b**. El uso de acetato de talio (TIOAc) como aditivo para disminuir la isomerización en las reacciones de Heck es muy conocido (Cabri y Candiani, 1995) y resultó importante para disminuir la formación de uno de los dos isómeros, como se ve en el incremento de **S-9a** cuando KOAc fue reemplazado por TIOAc (entradas 4 y 5). La formación de **S-9a** y **S-9b** tuvo lugar con alta estereoselectividad ya que no se encontraron otros isómeros. De este modo las mejores condiciones determinadas fueron Pd(AcO)₂ (0.05 eq), (*o*-tol)₃P (0.10 eq), TIOAc (1.1 eq) y

DMF a 120 °C que permitieron sintetizar **S-9a** y **S-9b** a partir de **S-5** con rendimientos del 52% y 5% respectivamente (entrada 5).

Estas condiciones de reacción fueron aplicadas a la tetrahidropiridina **S-6** que se caracteriza por tener un grupo arilo rico electrónicamente por los sustituyentes metoxilo, obteniéndose la formación de una mezcla de isómeros **S-10a** y **S-10b** con mejor rendimiento que para **S-9** (Figura 2.16). De este modo se confirma la ruta planteada para la síntesis de una nueva clase de análogos benzofenantridínicos. La estereoquímica de los productos de la reacción de Heck fue establecida por experimentos NOE (Figura 2.17) y es consistente con el curso de la reacción que envuelve carbopaladación por la cara menos impedida del doble enlace de la enamina, seguido por la eliminación Pd-H con la unidad de metileno exocíclico.

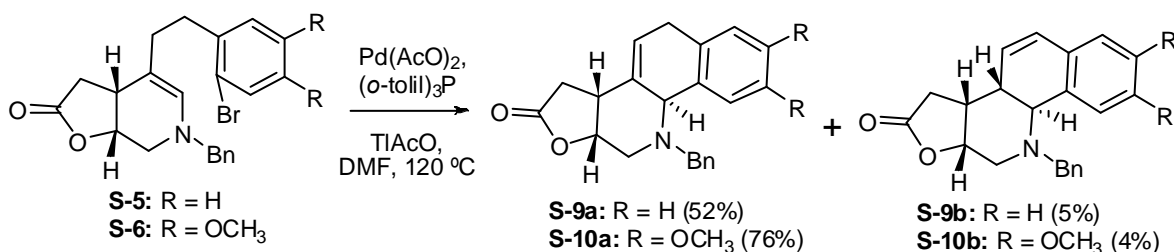


Figura 2.16. Preparación de análogos benzofenantridínicos **S-9** y **S-10**.

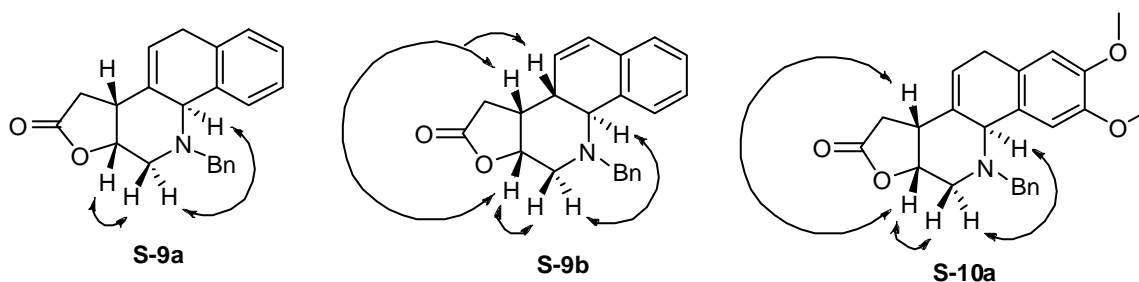


Figura 2.17. Efectos NOE observados para los compuestos **S-9a**, **S-9b** y **S-10a**.

2.4.7. Oxidación con DDQ de **S-9a** y **S-10a**

Luego de haber desarrollado uno de los pasos claves de la síntesis para la obtención de los compuestos policíclicos como lo es la ciclación intramolecular, a los productos sintetizados se les pueden realizar modificaciones estructurales mediante reacciones sencillas como desbencilaciones, reducciones y/o oxidaciones para obtener una variedad de compuestos. En un experimento realizado se sometieron **S-9a** y **S-10a** bajo las condiciones de oxidación con DDQ, para aromatizar la molécula, obteniendo como resultado la formación de los análogos **S-11** y **S-12** que se caracterizan por presentar un doble enlace adicional formando parte del anillo **B** aromatzado.

En resumen, la presente investigación permitió el desarrollo una ruta de síntesis convergente para la obtención de una nueva clase de análogos benzofenantridínicos y de alcaloides con subestructura azaespirocíclica. La síntesis realizada comprende alrededor de ocho pasos de reacción y los rendimientos globales de reacción oscilan entre 17 y 34%. En total se prepararon 19 sustancias de las cuales 11 fueron sintetizadas y caracterizadas por primera vez en este trabajo.

CONCLUSIONES

El presente estudio realiza un aporte a las investigaciones sintéticas sobre análogos de alcaloides en el que se exploraron técnicas divergentes para la construcción de compuestos policíclicos a través de una tetrahidropiridina común (**S-5** y **S-6**), utilizando adiciones radicalarias *5-exo-trig* o acoplamientos de Heck *6-endo*, de manera altamente regio- y estereoselectiva, lo que ha permitido concluir lo siguiente:

- Se ha desarrollado una nueva metodología de síntesis partiendo de aldehídos (**S-1** y **S-3**) y una amina **S-4** fácilmente disponibles, mediante la combinación táctica de un paso de condensación, uno de ciclación intramolecular de Heck y uno de oxidación con DDQ para la formación de análogos benzofenantridínicos con buenos rendimientos.

- Se obtuvo una nueva clase de espirociclos de manera altamente regio- y estereoselectiva por reacción radicalaria *5-exo-trig*, cuyo método presenta una regioquímica complementaria a la obtenida por acoplamiento de Heck cuyos productos formados son *6-endo*.
- La reacción intramolecular de Heck realizada sobre enaminas cíclicas con adición *6-endo* en posición α al nitrógeno constituye un aporte a la química de las enaminas ya que reportes de la reactividad de enaminas simples en condiciones de Heck son escasos y están restringidos a la adición *5-endo* en posición β de la enamina.
- Las reacciones radicalarias descritas para la síntesis de espirociclos representan los primeros ejemplos de ciclaciones radicalarias *5-exo-trig* para enaminas con sustituyentes *N*-alquilo que no implican derivados indólicos.
- La ruta de síntesis convergente desarrollada permite a priori obtener una amplia variedad de análogos de alcaloides por modificaciones sobre los grupos funcionales presentes, así como por la introducción de distintos sustituyentes sobre el anillo **A** del núcleo básico que pueden ser base para estudios posteriores de estructura-actividad.

REFERENCIAS

Ackermann, L.; Althammer, A. One-Pot Indole Synthesis Consisting of a Ruthenium-Catalyzed Hydroamination and a Palladium-Catalyzed Heck Reaction Using 2-Chloroaniline" *Synlett* **2006**, 3125-3129.

Aurrecoechea, J. M.; Suero, R.. Recent Developments in Cyclization Reactions of α -Amino alkyl Radicals. *Arkivoc.* **2004**, 14, 10-35.

Aurrecoechea, J. M.; Suero, R. Stereocontrolled Synthesis of Polysubstituted Piperidines from Vinylogous Mannich Adducts and Aldehydes. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 4945-4947.

Aurrecoechea, J. M.; Suero, R.; Torres, E.; Divergent Synthetic Strategy Leading Structurally Diverse Pyrrolidines and Piperidines from Common γ -Aminoalkyl Butenolide and Aldehyde Precursors. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8767-8777.

Avila-Zárraga, J. G.; Lujan-Montelongo, A.; Covarrubias-Zúñiga, A.; Romero-Ortega, M. New Heck Coupling Strategies for the Synthesis of Paullone and Dimethyl Paullone. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7987-7989.

Braese, S.; de Meijere, A. In *Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions*, 2nd ed.; de Meijere, A., Diederich, F. Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2004**; Vol. 1, pp 217-315.

Brazeau, J.-F.; Tris(trimethylsilyl)silane (TMSS). *Synlett.* **2007**, No. 12, 1972-1973.

Buden, M. E.; Rossi, R. Syntheses of Phenanthridines and Benzophenanthridines by Intramolecular *ortho*-Arylation of Aryl Amide Ions with Aryl Halides via $S_{RN}1$ Reactions. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8739-8742.

Cabri, W.; Candiani, I. Recent Developments and New Perspectives in the Heck Reactions. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 2-7.

Calò, V.; Nacci, A.; Monopoli, A.; Ferola, V.; Palladium-Catalyzed Heck Arylations of Allyl Alcohols in Ionic Liquids: Remarkable Base Effect on the Selectivity. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2596-2601.

Chatgililoglu, C.; *Organosilanes in Radical Chemistry*; John Wiley & Sons Ltd., **2004**, pp. 51-82.

Chuang, C.-P.; Wu, Y.-L. Oxidative Free Radical Reactions of Enamino Esters. *Tetrahedron.* **2004**, *60*, 1841-1847.

Clement, B.; Weide, M.; Wolschendorf, U.; Kock, I.; A Two-Step Synthesis of Cytostatically Active Benzo[c]phenanthridine Derivatives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 635-638.

Cushman, M.; Cheng L. Total Synthesis of Nitidine Chloride. *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 286-288.

Dalla Via, L.; Uriarte, E.; Quezada, E.; Dolmella, A.; Ferlin, M. G.; Gia, O.; Novel Pyrone Side Tetracyclic Psoralen Derivatives: Synthesis and Photobiological Evaluation. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 3800-3810.

Dvořák Z.; Kubáň V.; Klejdus B.; Hlaváč J.; Vičar J.; Ulrichová J.; Šimánek V.; Quaternary Benzo[c]phenanthridines Sanguinarine and Chelerythrine: A Review of Investigations from Chemical and Biological Studies. *Heterocycles.* **2006**, 68, 2403-2422.

Eun, J.-P.; Koh, G. Y. Suppression of Angiogenesis by the Plant Alkaloid, Sanguinarine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, 317, 618-624.

Flanagan, S. R.; Harrowven, D. C.; Bradley, M. Radical Cyclisation Reactions with Indoles. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 1795-1798.

Geen, G. R.; Mann, I. S.; Mullane, M. V.; McKillop, A. A Versatile Synthesis of Fully Aromatic Benzo[c]phenanthridine Alkaloids. *Tetrahedron.* **1998**, 54, 9875-9894.

Gibson, S. E.; Jones, J. O.; McCague, R.; Tozer, M. J. ; Whitcombe, N. J. A Bromoarene Based Approach to Phenylalanine Analogues Hic and Nic. *Synlett* **1999**, S1, 954-956.

Giese, B. Formation of CC Bonds by Addition of Free Radicals to Alkenes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, 22, 753-764

Ha, H.-J.; Sub, J.-M.; Ahn, Y.-G.; Dong, Y.; Yun, H.; Addition of 1-Boc-2-*tert*-butyldimethylsilyloxyproline to *N*-methyleneamine Equivalents: Synthesis of 1-Boc-5-aminomethyl-2,5-dihydropyrrol-2-ones and 1-Boc-2-oxo-1,7,9-triazaspiro[4,5]dec-3-enes. *Heterocycles.* **1999**, 50, 203-214.

Harayama, T.; Akamatsu, H.; Okamura, K.; Miyagoe, T.; Akiyama, T.; Abe, H.; Takeuchi, Y. Synthesis of Trisphaeridine and Norchelerythrine Through Palladium-Catalyzed Aryl-Aryl Coupling Reactions. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* **2001**, 523-528.

Harayama, T.; Sato, T.; Nakano, Y.; Abe, H.; Takeuchi, Y. Concise Synthesis of Fagaridine and Decarine, Phenolic Benzo[c]phenanthridines Alkaloids, Using the Palladium- Assisted Biaryl Coupling Reaction. *Heterocycles.* **2003**, 59, 293 – 301.

Herrera, A.; Martinez-Alvarez R.; Chioua, M.; Chatt, R.; Chioua R.; Sanchez, A.; Almy, J. The Reaction of Tetralones with Nitriles: A Simple Approach to the Synthesis of New Substituted Benzo[h]quinazolines, Benzo[f]quinazolines and Dibenzo[*a,i*]phenanthridines. *Tetrahedron.* **2006**, 62, 2799-2811.

Hughes, C. C.; Trauner, D. Palladium-catalyzed coupling to nucleophilic heteroarenes: the total synthesis of (-)-frondosin B. *Tetrahedron*, **2004**, 60, 9675-9686.

Ishikawa, T.; Saito, T.; Ishii, H. Synthesis of Macarpine and its Cytotoxicity: Toward a Synthetic Route for 12-Alkoxybenzo[c]phenanthridine Alkaloids Through Aromatic Nitrosation Under Basic Condition. *Tetrahedron.* **1995**, 51, 8447-8458.

Janin, Y. L.; Bisagni, E. A Formal New Access to the Benzo[c]phenanthridine Alkaloids, Synthesis of Nitidine and *O*-Methyl Fagaronine Analogues. *Tetrahedron.* **1993**, 49, 10305-10316.

Jarayaman, M.; Fox, B. M.; Hollingshead, M.; Koshlhamen, G.; Pommier, Y.; Cushman, M. Synthesis of New Dihydroindeno[1,2-*c*]isoquinoline and Indenoisoquinolinium Chloride Topoisomerase I Inhibitors Having High *in Vivo* Anticancer Activity in the Hollow Fiber Animal Model. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 242-249.

Jeffery, T. On the Efficiency of Tetraalkylammonium Salts in Heck Type Reactions. *Tetrahedron* **1996**, 52, 10113-10130.

Joucla, L.; Putey, Aurélien; Joseph, B. Synthesis of Fused Heterocycles with a Benzazepinone Moiety via Intramolecular Heck Coupling. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 8177-8179.

Kanazawa, A. M.; Correa, A.; Denis, J. N.; Luche, M. J.; Greene, A. E. A Short Synthesis of the Taxotere Side Chain Through Dilithiation of Boc-benzylamine *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 255-257.

Kock, I.; Heber, D.; Weide, M.; Wolschendorf, U.; and Clement, B.; Synthesis and Biological Evaluation of 11-Substitued 6-Aminobenzo[c]phenanthridine Derivatives, A New Class of Antitumor Agentes. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 2772-2777.

Kohno, K.; Azuma, S.; Choshi, T., Nobuhiro, J.; Hibino, S. A New Benzo[c]phenanthridines Nornitidine, Noravicine, and Iodecarine, based on Microwave-assisted Electrocyclic reaction of the Aza 6 π -electron system. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 590-592.

Krane, B. D.; Fagbule, M. O.; Shamma, M. The Benzophenanthridine Alkaloids. *J. Nat. Prod.* **1984**, 47, 1-43.

Le, T. N.; Gang, S. G.; Cho, W.-J. A Facile Synthesis of Benzo[c]phenanthridine Alkaloids: Oxynitidine and Oxysanguinarine Using Lithiated Toluamide-Benzonitrile Cycloaddition. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 2763-2766.

Larhed, M.; Hallberg, A. In Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Synthesis; Negishi, E. Ed.; Wiley and Sons: New York, **2002**; Vol. 1, pp 1133-1178.

Li, D.; Zhao, B.; Sim, S.-P.; Li, T.-K.; Liu, A.; Liu, L. F.; LaVoie, E. J. 2,3-Dimethoxybenzo[i]phenanthridines: Topoisomerase I-Targeting Anticancer Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 521-528.

Luo, Y.; Mei, Y.; Zhang, J.; Lu, W.; Tang, J. A Concise Synthesis of Nornitidine via Nickel- or Palladium-Catalyzed Annulations. *Tetrahedron* **2006**, 62, 9131-9134.

McManus, H. A.; Fleming, M. J.; Lautens, M. Enantioselective Total Synthesis of (+)-Homochelidonine by a Pd^{II}-Catalyzed Asymmetric Ring-Opening Reaction of a *meso*-Azabicyclic Alkene with an Aryl Boronic Acid. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 433-436.

Maiti, M.; Kumar, G. S.; Molecular Aspects on the Interaction of Protoberberine, Benzophenanthridine, and Aristolochia Group of Alkaloids with Nucleic Acid Structures and Biological Perspectives. *Med. Res. Rev.* **2007**, *27*, 649-695.

Maiti, M.; Kumar, G. S. Biophysical Aspects and Biological Implications of the Interaction of Benzophenanthridine Alkaloids with DNA. *Biophys. Rev.* **2009**, *1*, 119-129.

Martínez, M. A.; Csákÿ, A. G. Técnicas Experimentales en Síntesis Orgánica. Editorial Síntesis, S.A. Madrid **2001**. pp. 45-60.

Minami, T.; Nishimoto, A.; Hanaoka, M. Formal Synthesis of Nitidine through Palladium-Catalyzed Isocoumarin Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9505-9508.

Moreno, I.; Tellitu, I.; Etayo, J.; SanMartín R.; Domínguez E. Novel Applications of Hypervalent Iodine: PIFA Mediated Synthesis of Benzo[c]phenanthridines and Benzo[c]phenanthridinones. *Tetrahedron.* **2001**, *57*, 5403-5411.

Nakanishi, T.; Masuda, A.; Suwa, M.; Akiyama, Y.; Hoshino-Abe, N.; Suzuki, M. Synthesis of Derivatives of NK-109, 7-OH Benzo[c]phenanthridine Alkaloid, and Evaluation of their Cytotoxicities and Reduction-Resistant Properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2321-2323.

Nyangulu, J. M.; Hargreaves, S. L.; Sharples, S. L.; Mackay, S. P.; Waigh, R. D.; Duval, O.; Mberu, E. K.; Watkins, W. M. Antimalarial Benzo[c]phenanthridines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2007-2010.

Ozlu, Y.; Cladingboel, D. E.; Parsons, P. J. Tandem Radical Cyclisations: Synthesis of Lysergic Acid Derivatives. *Tetrahedron.* **1991**, *50*, 2183-2206.

Orito, K.; Hatakeyama, T.; Takeo, M.; Suginome, H.; Iodination of Alkyl Aryl Ethers by Mercury (II) Oxide-Iodine Reagent in Dichloromethane. *Synthesis*. **1995**, 1273-1277.

Parsons, P. J.; Penkett, C. S.; Cramp, M. C.; West, R. I.; Warren, E. S. The Facile Construction of Indole Alkaloid Models: A Tandem Cascade Approach for the Synthesis of a Model for Pseudocopsinine. *Tetrahedron*. **1996**, 52, 647-660.

Phillips, S. D.; Castle, R. N. A Review of the Chemistry of the Antitumor Benzo[c]phenanthridine Alkaloids Nitidine and Fagaronine and of the Related Antitumor Alkaloid Coralyne. *J. Heterocycle. Chem.* **1981**, 18, 223-232.

Prado, S.; Michel, S.; Tillequin, F.; Koch, M.; Pfeiffer B.; Pierre, A.; Leonce, S.; Colson, P.; Baldeyrou, B.; Lansiaux, A.; Bailly, C. Synthesis and Cytotoxic Activity of Benzo[c][1,7] and [1,8]phenanthrolines Analogues of Nitidine and Fagaronine. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 3943-3953.

Ramani, P.; Grabile, F. A New Synthetic Approach to 7-Hydroxynitidine. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 5262-5264.

Ripa, L.; Hallberg, A. Controlled Double-Bond Migration in Palladium-Catalyzed Intramolecular Arylation of Enamidines. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 7147-7155.

Ripa, L.; Hallberg, A. Intramolecular Enantioselective Palladium-Catalyzed Heck Arylation of Cyclic Enamides. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 595-602.

Ripa, L.; Hallberg, A. Aryl Radical Endo Cyclization of Enamidines. Selective Preparation of *Trans* and *Cis* Fused Octahydrobenzo[f]quinolines. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 84-91.

Serensen, U. S.; Pombo-Villar, E. Synthesis of Cyclopenta[b]indol-1-ones and Carbazol-4-ones from *N*-(2-Halophenyl)-Substituted Enaminones by Intramolecular *Heck* Reaction. *Helv. Chim. Acta.* **2004**, 87, 82-89.

Simeón, S.; Rios, J. L., Villar, A. Pharmacological Activities of Benzophenanthridine and Phenanthrene Alkaloids. *Pharmazie*. **1989**, 44, 593-597.

Slaninová, I.; Táborská, E.; Bochořáková H.; Slanina, J. Interaction of Benzo[c]phenanthridine and Protoberberine Alkaloids with Animal and Yeast Cells. *Cell Biol.Toxicol*. **2001**, 17, 51-63.

Sotomayor, N.; Dominguez, E.; Lete, E. Bischler-Napieralski Cyclization-*N/C*-Alkylation Sequences for the Construction of isoquinoline Alkaloids. Synthesis of protoberberines and benzo[c]phenanthridines via C-2'-Funcionalized 3-Arylisoquinolines. *J. Org. Chem*. **1996**, 61, 4062-4072.

Stockman, R. A. Two-directional Synthesis. Part 1: A Short Formal Synthesis of (±)-histrionicotoxin and (±)-histrionicotoxin 235A. *Tetrahedron Lett*. **2000**, 41, 9163-9165.

Tang, W.; Hemm, I.; Bertram, B. Recent Development of Antitumor Agents from Chinese Herbal Medicines; Part I. Low Molecular Compounds. *Planta Med*. **2003**, 69, 97-108.

Tillequin, F.; Rutaceous Alkaloids as Models for the Design of Novel Antitumor Drugs. *Phytochem. Rev*. **2007**, 6, 65-70.

Treus, M.; Estévez, J. C.; Castedó, L.; Estévez, R. J. A Novel C-N Cleavage in Isoquinolines Allowing the Firts Direct Transformation of 1-Benzylisoquinolines into Benzo[c]phenanthridines and a New Route to 2-Phenyl-1,4-naphtoquinones. *Tetrahedron Lett*. **2000**, 41, 6351-6353.

Treus, M.; Estévez, J. C.; Castedó, L.; Estévez, R. J. A New Route to 3-(2-vinylphenyl)-2-methyl-2*H*-isoquinolin-1-ones and Benzo[c]phenanthridines: Total Synthesis of Fagaronine. *Tetrahedron Lett*. **2002**, 43, 5323-5325.

Tsai, A.-I; Chuang, C.-P. Synthesis of Highly Substituted Pyrroles via Oxidative Free Radical Reactions of β -Aminocinnamates. *Tetrahedron*. **2006**, 62, 2235-2239.

Wu, X.; Nilsson, P.; Larhed, M. Microwave-Enhanced Carbonylative Generation of Indanones and 3-Acylaminoindanones. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 346-349.

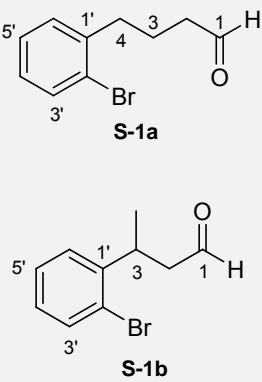
Yang, C.-C.; Chang, H.-T.; Fang, J.-M. Nucleophilic-Type Radical Cyclizations of Indoles: Conversion of 2-Cyano 3-Substituted Indoles to Spiro-Annulated Indolines and Tetrahydrocarbazolones. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3100-3105.

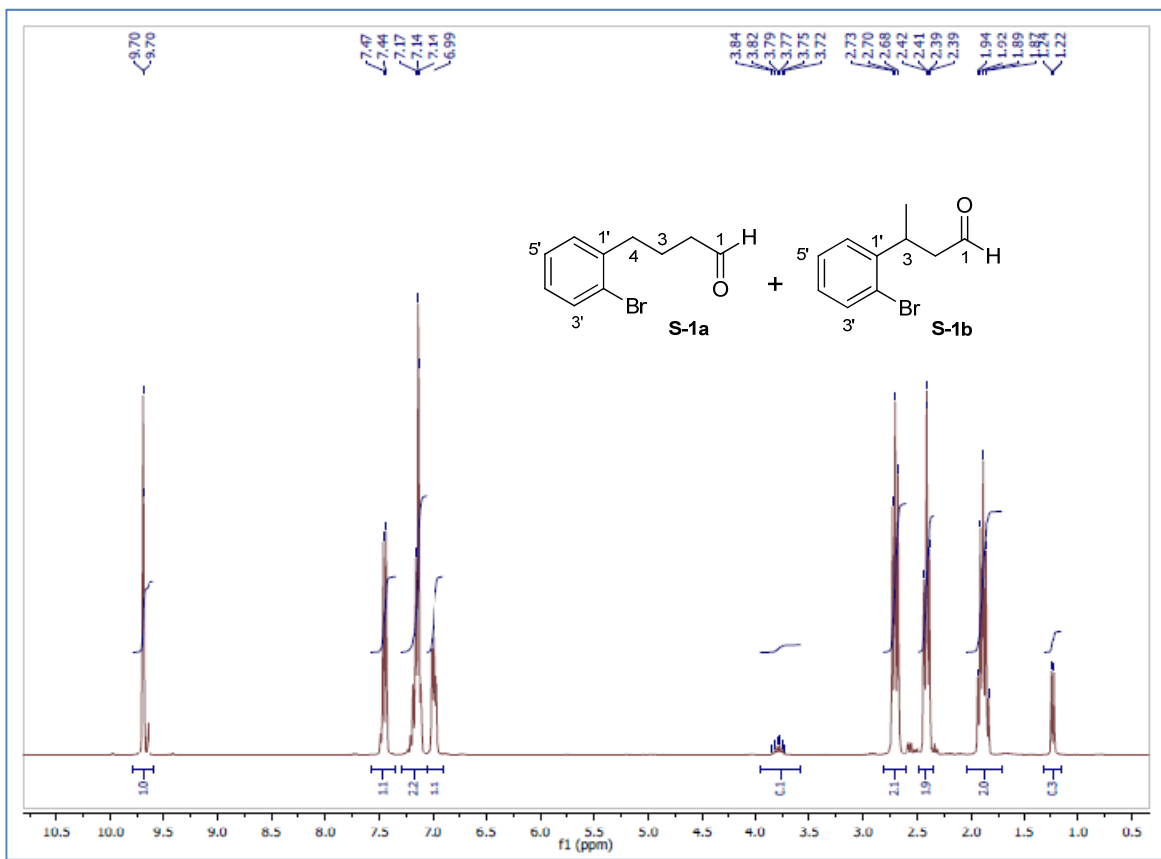
Yapi, A.-D.; Desbois, N.; Chezal, J.-M.; Chavignon, O.; Teulade, J.-C.; Valentin, A.; Blaches, Y. Design and Preparation of Aza-analogues of Benzophenanthridine Framework with Cytotoxic and Antiplasmodial Activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2010** (en prensa)

ANEXOS DE SÍNTESIS

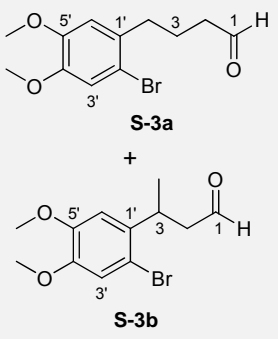
Datos Espectroscópicos y Constantes Físicas los Compuestos:

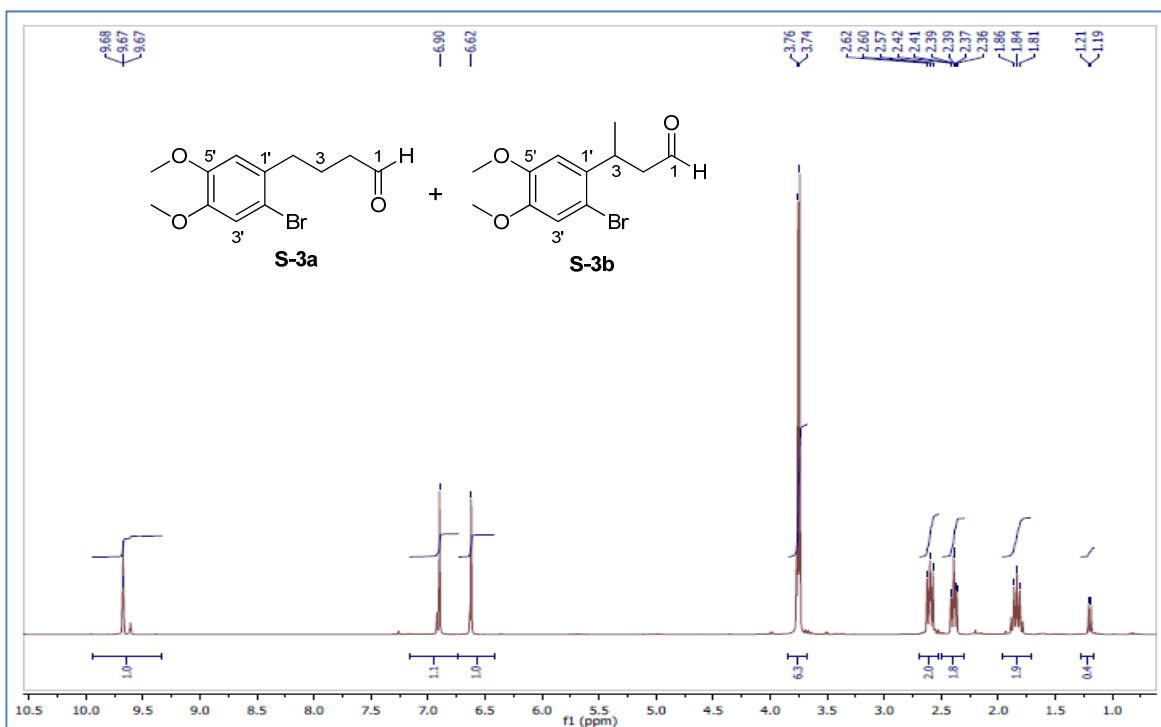
4-(2'-bromofenil)butanal **S-1a** y 3-(2'-bromofenil)butanal **S-1b**
4-(2'-bromo-4',5'-dimetoxifenil)butanal **S-3a** y 3-(2'-bromo-4',5'-dimetoxifenil)butanal **S-3b**
(1*R**,5*R**)-8-bencil-6-(2'-bromofenil)etil-2-oxa-8-azabicyclo[3.4.0]non-6-en-3-ona **S-5**
(1*R**,5*R**)-8-bencil-6-(2'-bromo-4',5'-dimetoxifenil)etil-2-oxa-8-azabicyclo[3.4.0]non-6-en-3-ona **S-6**
(1*R**,5*R**,6*S**)-8-bencil-2-oxa-8-azabicyclo[3.4.0]nonan-3-ona-6-espiro-1'-indano **S-7**
(1*R**,5*R**,6*S**)-8-bencil-2-oxa-8-azabicyclo[3.4.0]nonan-3-ona-6-espiro-1'-(5',6'-dimetoxi)indano **S-8**
(9*S**,13*R**,14*R**)-11-bencil-9,11,12,13,14,15-hexahidro-6*H*-17-oxa-11-azaciclopenta[*a*]fenantren-16-ona **S-9a**
(8*S**,9*S**,13*R**,14*R**)-11-bencil-9,11,12,13,14,15-hexahidro-8*H*-17-oxa-11-azaciclopenta[*a*]fenantren-16-ona **S-9b**
(9*S**,13*R**,14*R**)-11-Bencil-2,3-dimetoxi-9,11,12,13,14,15-hexahidro-6*H*-17-oxa-11-azaciclopenta[*a*]fenantren-16-ona **S-10a**
(13*R**,14*R**)-11-Bencil-12,13,14,15-tetrahidro-11*H*-17-oxa-11-azaciclopenta[*a*]fenantren-16-ona **S-11**
(13*R**,14*R**)-11-Bencil-2,3-dimetoxi-12,13,14,15-tetrahidro-11*H*-17-oxa-11-aza-ciclopenta[*a*]fenantren-16-ona **S-12**

 <p>S-1a</p> <p>S-1b</p>	Composición mezcla de isómeros	4-(2'-bromofenil)butanal (S-1a) y 3-(2'-bromofenil)butanal (S-1b)
	Estado físico	Aceite amarillo claro.
	Formula molecular	C ₁₀ H ₁₁ BrO
	Peso molecular	227,1 g/mol
	Datos IR	IR: $\nu = 2929$ (m, C-H), 2834 (m, C-H), 2719 (d, C-H), 1722 (f, C=O), 1607 (m, C=C), 1503 (f, C=C), 1378 (f, C-H) cm ⁻¹ .
<p>Datos para S-1a (desde la mezcla) = RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 1.96 (quint, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.48 (td, $J = 7.3, 1.3$ Hz, 2H), 2.77 (dd, $J = 7.8, 7.6$ Hz, 2H), 7.02-7.08 (m, 1H), 7.18-7.26 (m, 2H), 7.52 (d, $J = 7.8$, 1H), 9.77 (t aparente, $J = 1.5$, 1H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 22.1 (CH₂), 35.1 (CH₂), 42.9 (CH₂), 124.3 (C), 127.4 (CH), 127.8 (CH), 130.3(CH), 132.8 (CH), 140.5 (C), 202.0 (CH).</p> <p>Datos para S-1b (desde la mezcla) = RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 1.30 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 2.38-2.65 (m, 2H), 3.85 (m, 1H), 7.02-7.56 (m, 4H), 9.71 (t aparente, $J = 1.8$ Hz, 1H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 20.6 (CH₃), 32.8 (CH), 50.5 (CH₂), 124.0 (C), 127.1 (CH), 127.9 (CH), 130.3 (CH), 133.0 (CH), 143.9 (C), 201.0 (CH).</p>		

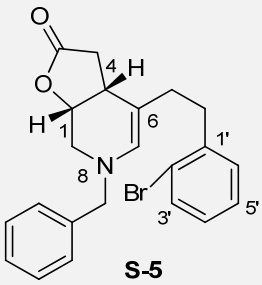


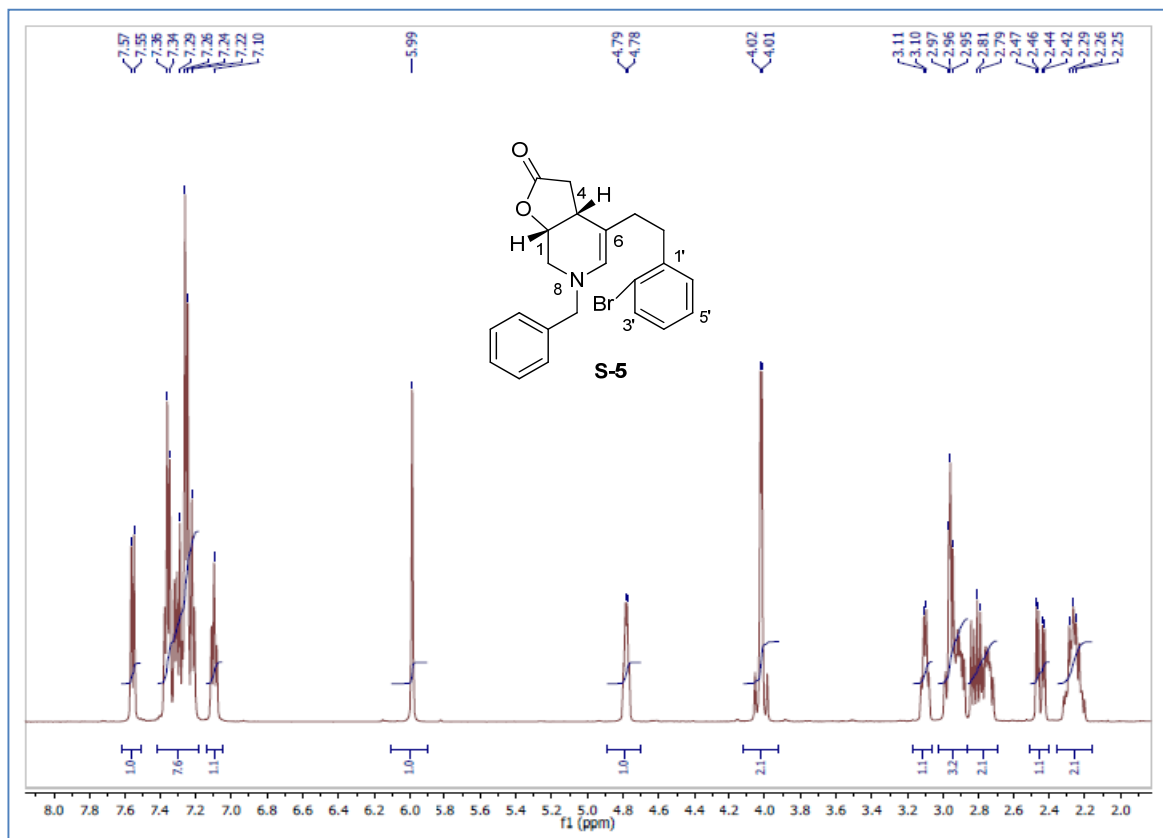
Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) de la mezcla S-1.

 <p>S-3a</p> <p>+</p> <p>S-3b</p>	Composición mezcla de isómeros	4-(2'-bromo-4',5'-dimetoxifenil)butanal (S-3a) y 3-(2'-bromo-4',5'-dimetoxifenil)butanal (S-3b)
	Estado físico	Aceite amarillo claro.
	Formula molecular	C ₁₂ H ₁₅ BrO ₃
	Peso molecular	287,0 g/mol
	Datos EMAR	EMAR calculada para C ₁₂ H ₁₅ ⁷⁹ BrO ₃ 286.0205, observada: 286.0201; calculada para C ₁₂ H ₁₅ ⁸¹ BrO ₃ 288.0184, observada 288.0188
Datos EM	EM (mezcla) (IE) m/z (%) 288 (M, 35), 286 (M, 37), 244 (96), 231 (53), 229 (97), 207 (21), 151 (22), 107 (27), 77 (25).	
IR (mezcla, neto): $\nu = 2931$ (m, C-H), 2837 (m, C-H), 2719 (d, C-H), 1719 (f, C=O), 1602 (m, C=C), 1502 (f, C=C), 1378 (f, C-H), 1255 (f, C-O), 1200 (f, C-O), 1161 (f, C-O), 1026 (f, C-O) cm ⁻¹ .		
<p>Datos para S-3a (desde la mezcla) = RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 1.84 (quint, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.39 (td, $J = 7.2, 1.5$ Hz, 2H), 2.60 (dd, $J = 7.9, 7.4$ Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 6.62 (s, 1H), 6.90 (s, 1H), 9.67 (t, $J = 1.2$ Hz, 1H). RMN¹³C ((75 MHz, CDCl₃) δ 22.3 (CH₂), 34.5 (CH₂), 42.7 (CH₂), 55.7 (CH₃), 55.8 (CH₃), 112.7 (CH), 113.7 (C), 115.3 (CH), 132.2 (C), 147.7 (C), 148.1 (C), 201.8 (CH).</p>		
<p>Datos para S-3b (desde la mezcla) = RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 1.20 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 2.47-2.67 (m, 2H), 3.64-3.73 (m, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 6.63 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 9.61 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H). RMN¹³C ((75 MHz, CDCl₃) δ 20.5 (CH₃), 32.5 (CH), 50.5 (CH₂), 55.7 (CH₃), 55.8 (CH₃), 109.7 (CH), 113.4 (C), 115.4 (CH), 135.6 (C), 147.8 (C), 148.5 (C), 200.9 (CH).</p>		

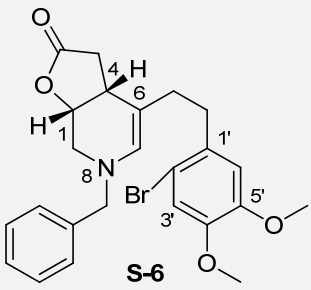


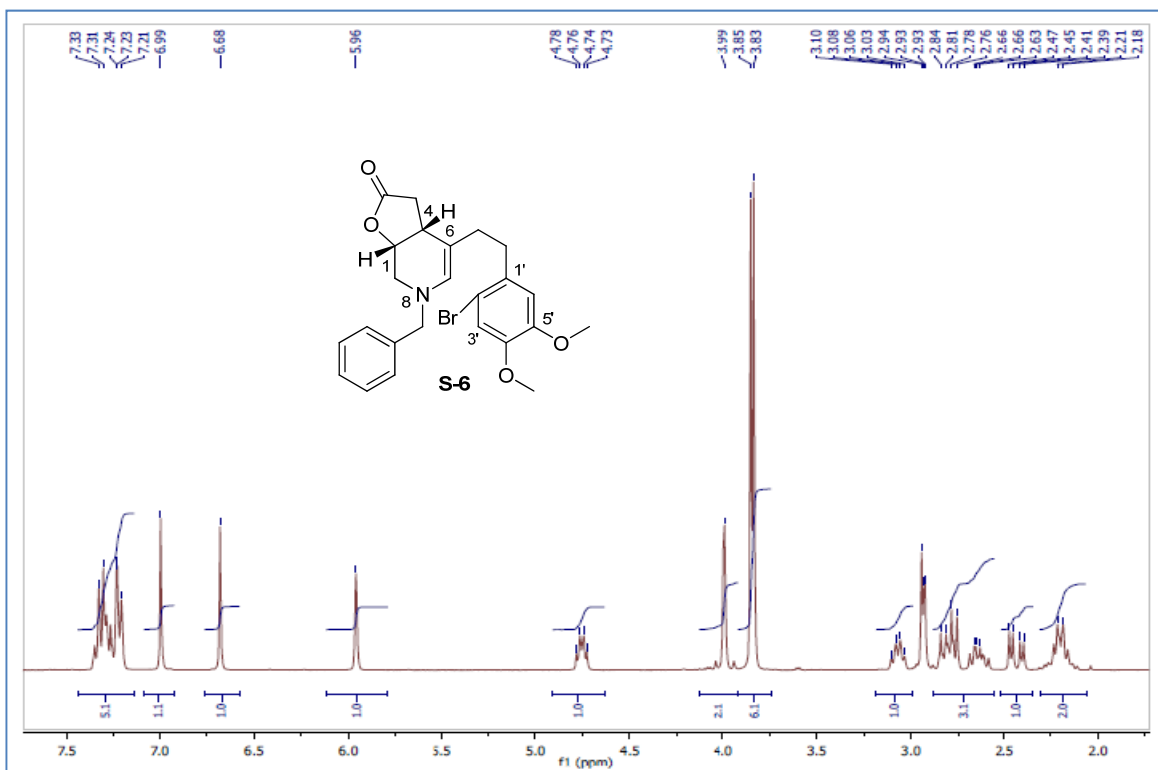
Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de la mezcla **S-1**.

 <p style="text-align: center;">S-5</p>	Nombre:	(1 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *)-8-bencil-6-(2'-bromofenil)etil-2-oxa-8-azabicyclo[3.4.0]non-6-en-3-ona (S-5)
	Estado físico	aceite amarillo
	Formula molecular	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{BrNO}_2$
	Peso	412,1 g/mol
	Datos EMAR	EMAR calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{22}^{79}\text{BrNO}_2$ 411.0834, observada: 411.0841; calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{22}^{81}\text{BrNO}_2$ 413.0813, observada 413.0803
Datos IR	IR: $\nu = 1772$ (f, C=O), 1655 (m, C=C) cm^{-1} .	
EM (IE) m/z (%) 413 (M, 0.32), 411 (M, 0.37), 243 (11), 242 (100), 91 (97).		
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 2.20-2.32 (m, 2H), 2.45 (dd, $J = 17.4, 5.8$ Hz, 1H), 2.72-2.78 (m, 1H), 2.82 (dd, $J = 17.4, 8.6$ Hz, 1H), 2.88-3.00 (m, 3H), 3.10 (dd, $J = 14.1, 6.9$ Hz, 1H), 4.00 y 4.04 (c AB, $J = 14.6$ Hz, 2H), 4.78 (dd, $J = 10.1, 6.3$ Hz, 1H), 5.99 (s, 1H), 7.10 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.21-7.37 (m, 7H), 7.56 (d, $J = 7.95$ Hz, 1H).		
RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 33.0 (CH_2), 34.5 (CH), 34.9 (CH_2), 35.7 (CH_2), 47.8 (CH_2), 59.1 (CH_2), 77.4 (CH), 106.8 (C), 124.4 (C), 127.4 (CH), 127.7 (CH), 128.0 (CH), 128.5 (CH), 130.4 (CH), 132.8 (CH), 133.7 (CH), 137.5 (C), 141.0 (C), 176.5 (C).		

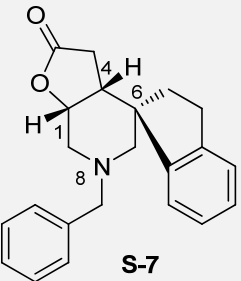


Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de **S-5**.

 <p>S-6</p>	Nombre:	(1 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *)-8-bencil-6-(2'-bromo-4',5'-dimetoxifenil)etil-2-oxa-8-azabicyclo[3.4.0]non-6-en-3-ona (S-6)
	Estado físico	sólido de color amarillo claro
	Formula molecular	$\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{BrNO}_4$
	Peso	472,1 g/mol
	Punto de fusión	102-104 °C
	Datos EMAR	EMAR calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{26}^{79}\text{BrNO}_4$ 471.1045, observada: 471.1045; calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{26}^{81}\text{BrNO}_2$ 473.1025, observada 473.1024
Datos IR	IR: $\nu = 2920$ (d, C-H), 2837 (d, C-H), 1772 (f, C=O), 1655 (d, C=C), 1502 (m, C=C) cm^{-1} .	
EM (IE) m/z (%) 473 (M, 0.75), 471 (M, 0.88), 242 (100), 91 (88).		
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 2.11-2.28 (m, 2H), 2.43 (dd, $J = 17.1, 5.7$ Hz, 1H), 2.64 (ddd, $J = 13.2, 9.1, 7.0$ Hz, 1H), 2.80 (ddd, $J = 15.1, 9.1, 4.3$ Hz, 1H), 2.88-2.90 (m, 2H), 3.07 (dd, $J = 14.1, 7.5$ Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.96 y 4.02 (c AB, $J = 15.0$ Hz, 2H), 4.75 (dd, $J = 11.2, 5.2$ Hz, 1H), 5.96 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 7.21-7.35 (m, 5H).		
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 33.2 (CH ₂), 34.4 (CH), 34.9 (CH ₂), 35.3 (CH ₂), 47.8 (CH ₂), 56.0 (CH ₃), 56.1 (CH ₃), 59.1 (CH ₂), 77.4 (CH), 106.7 (C), 112.9 (CH), 113.9 (C), 115.5 (CH), 127.4 (CH), 128.0 (2CH), 128.5 (2CH), 132.9 (C), 133.6 (CH), 137.4 (C), 147.9 (C), 148.4 (C), 176.5 (C).		



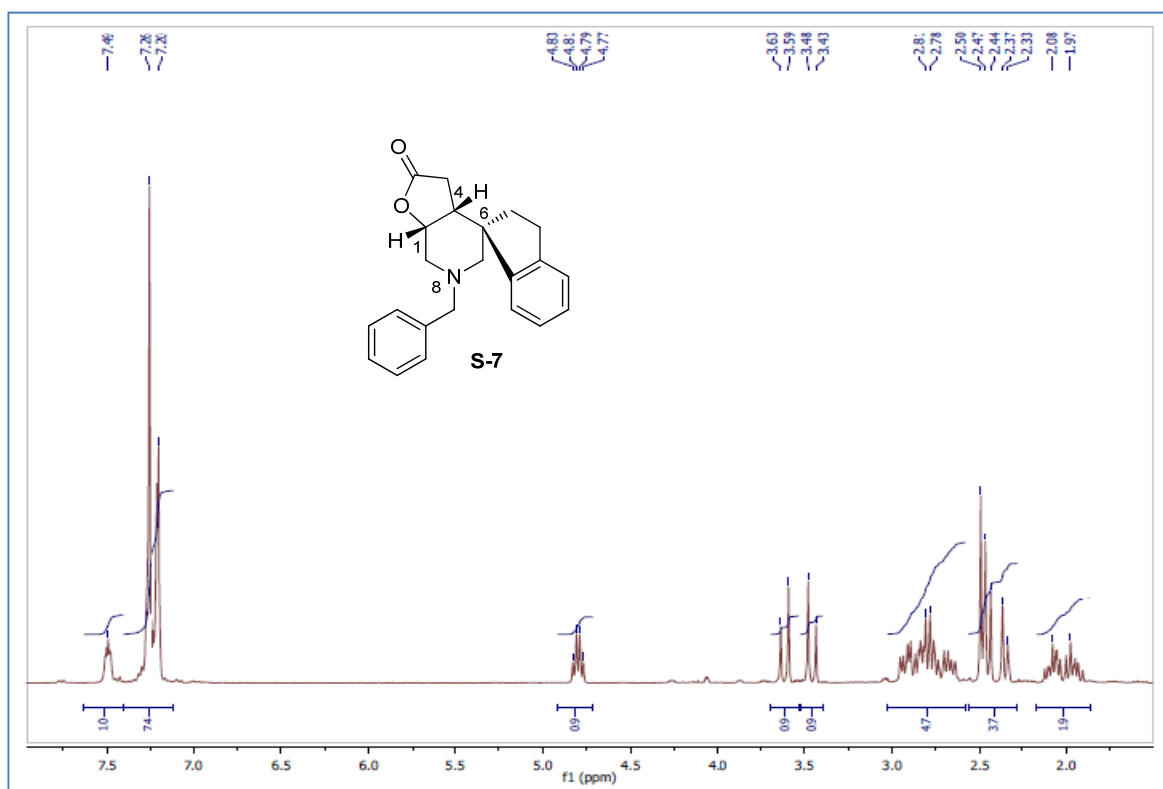
Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) de S-6.

 <p style="text-align: center;">S-7</p>	Nombre:	(1 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *,6 <i>S</i> *)-8-bencil-2-oxa-8-azabicyclo[3.4.0]nonan-3-ona-6-espiro-1'-indano (S-7)
	Estado físico	Aceite amarillo
	Formula molecular	C ₂₂ H ₂₃ NO ₂
	Peso	333,2 g/mol
	Datos EMAR	EMAR calculada para C ₂₂ H ₂₃ NO ₂ 333.1729, observada 333.1724
	Datos IR	IR: ν = 1772 (f, C=O) cm ⁻¹ .

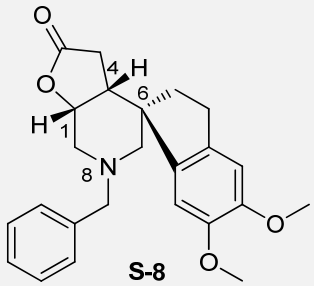
EM (IE) m/z (%) 333 (M, 15), 163 (10), 149 (11), 149 (12), 143 (45), 137 (18), 135 (18), 134 (98), 130 (15), 129 (25), 128 (24), 125 (12), 123 (17), 121 (13), 115 (17), 111 (23), 109 (18), 98 (14), 97 (38), 96 (13), 95 (29), 93 (12), 91 (54), 85 (24), 85 (12), 84 (14), 83 (36), 83 (20), 82 (14), 81 (51), 73 (20), 71 (33), 70 (15), 69 (100), 68 (14), 67 (19), 60 (14).

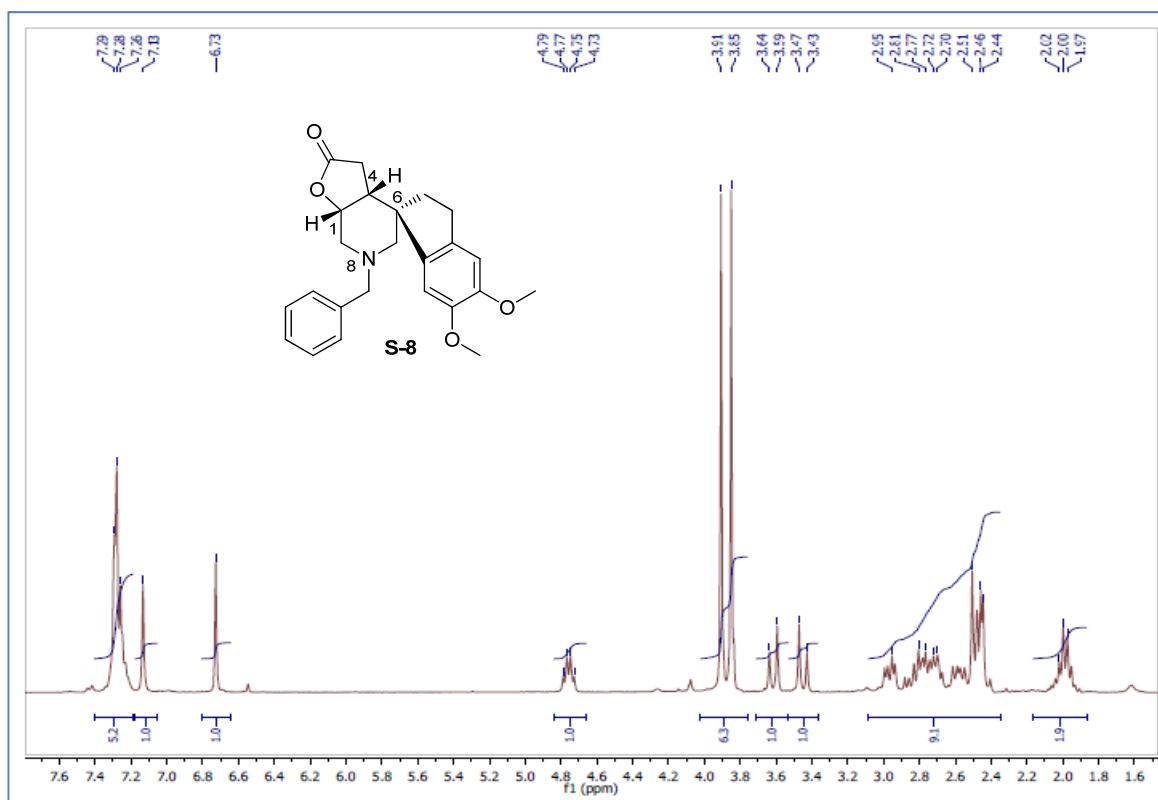
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 1.92-2.00 (m, 1H, H-2'), 2.07 (ddd, *J* = 13.2, 8.0, 5.2 Hz, 1H, H-2'), 2.36 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, H-7'), 2.46 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, H-7'), 2.49 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-4), 2.67 (dd, *J* = 12.0, 6.5 Hz, 1H, H-9), 2.76-2.90 (m, 3H, H-5, H-3'), 2.93 (dd, *J* = 12.2, 5.2 Hz, 1H, H-9), 3.46 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H, PhCH), 3.61 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H, PhCH), 4.80 (dd, *J* = 12.0, 6.5 Hz, 1H, H-1), 7.18-7.80 (m, 8H), 7.49 (m, 1H, H-7').

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 30.0 (CH₂), 31.6 (CH₂), 34.5 (CH₂), 41.8 (CH), 49.4 (C), 54.2 (CH₂), 59.3 (CH₂), 62.3 (CH₂), 77.0 (CH), 124.0 (CH), 124.9 (CH), 126.3 (CH), 127.2 (CH), 127.4 (CH), 128.3 (CH), 128.8 (CH), 137.6 (C), 143.2 (C), 148.2 (C), 176.4 (C).

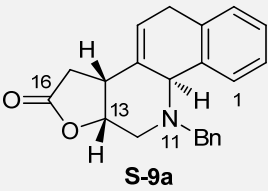


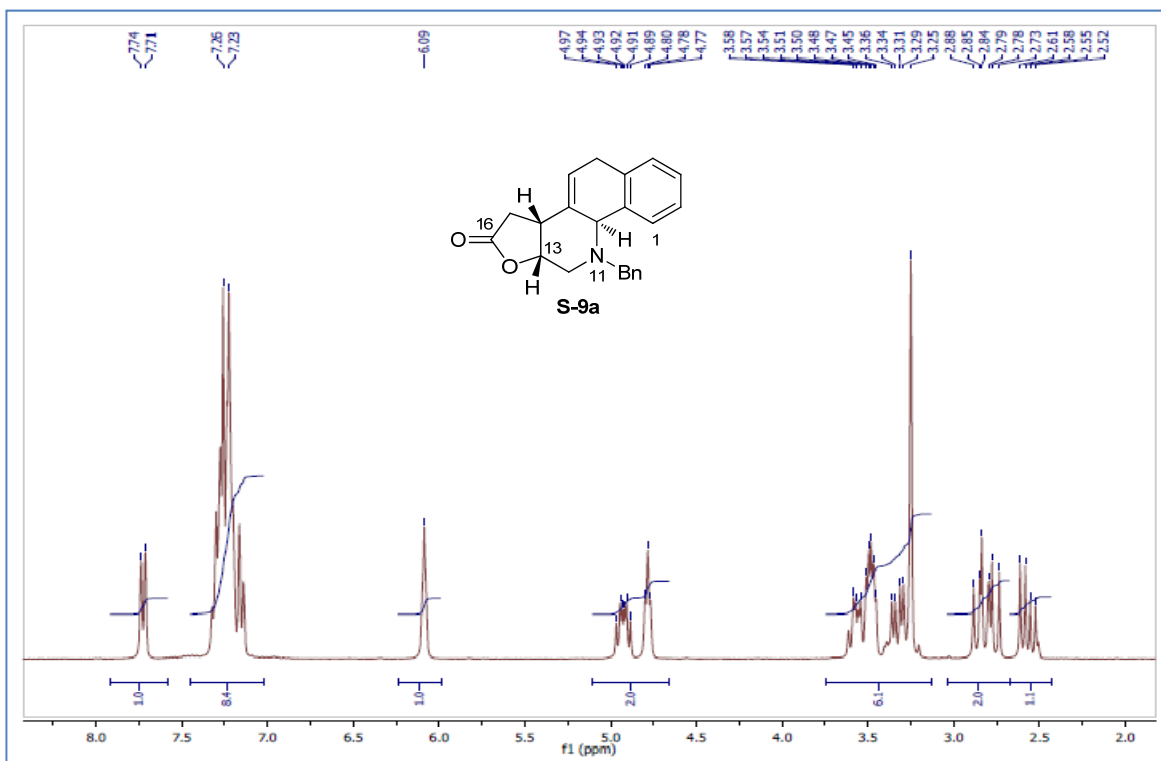
Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) de S-7.

 <p>S-8</p>	Nombre:	(1 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *,6 <i>S</i> *)-8-bencil-2-oxa-8-azabicyclo[3.4.0]nonan-3-ona-6-espiro-1'-(5',6'-dimetoxi)indano (S-8)
	Estado físico	Sólido cristalino blanco
	Formula molecular	C ₂₄ H ₂₇ NO ₄
	Peso	393,2 g/mol
	Punto de fusión	51-53 °C
Datos EMAR	EMAR calculada para C ₂₄ H ₂₇ NO ₄ 393.1940, observada 393.1937.	
IR: ν = 2932 (d, C-H), 1772 (f, C=O), 1602 (d, C=C), 1464 (m, H-C-H), 1455 (m, H-C-H) cm ⁻¹ .		
EM (IE) m/z (%) 393 (M, 22), 203 (46), 190 (20), 134 (100), 91 (68).		
RMN ¹H (500 MHz, CDCl ₃) δ 1.91-2.08 (m, 2H), 2.40-2.61 (m, 5H), 2.67-2.88 (m, 3H), 2.96 (dd, <i>J</i> = 12.2, 5.2 Hz, 1H), 3.45 (d, <i>J</i> = 13.2 Hz, 1H), 3.61 (d, <i>J</i> = 13.1 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 4.76 (dd, <i>J</i> = 12.3, 6.3 Hz, 1H), 6.73 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.24-7.30 (m, 5H).		
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl ₃) δ 30.0 (CH ₂), 31.4 (CH ₂), 35.2 (CH ₂), 42.1 (CH), 49.2 (C), 54.1 (CH ₂), 55.9 (CH ₃), 56.2 (CH ₃), 59.6 (CH ₂), 62.5 (CH ₂), 76.8 (CH), 107.7 (CH), 107.8 (CH), 127.3 (CH), 128.3 (2CH), 128.8 (2CH), 134.8 (C), 137.7 (C), 140.2 (C), 147.8 (C), 148.8 (C), 176.3 (C).		

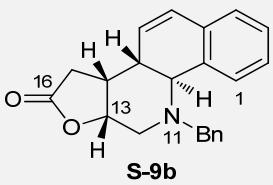


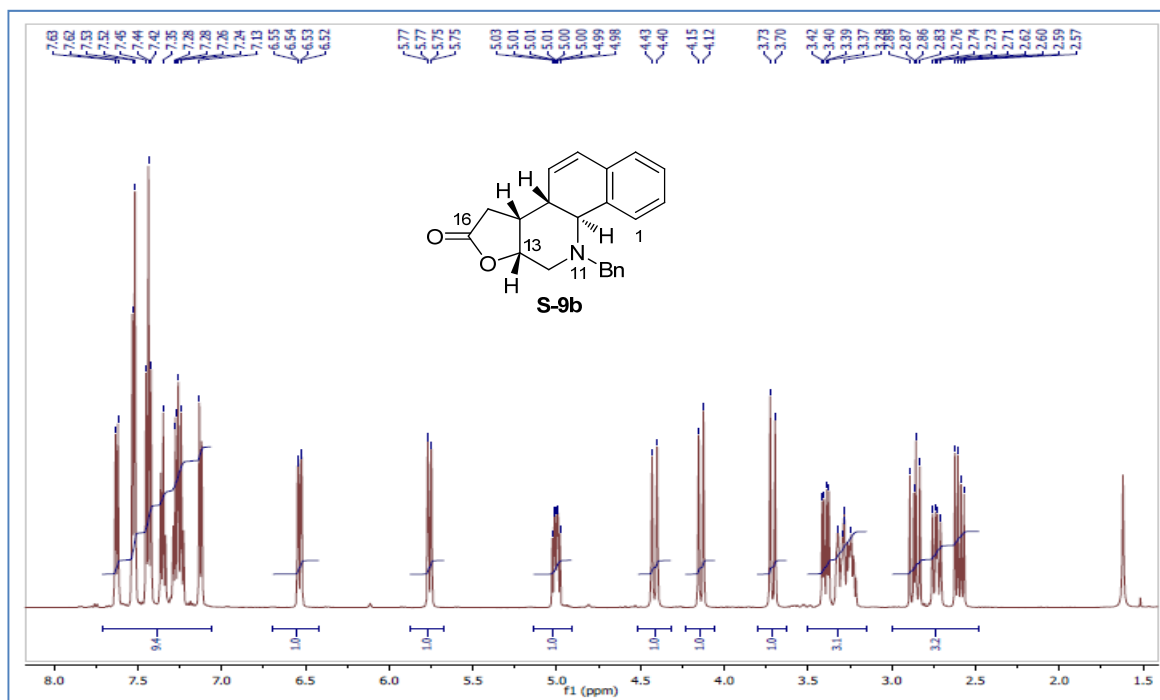
Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz) de **S-8**.

 <p style="text-align: center;">S-9a</p>	Nombre:	(9 <i>S</i> *, 13 <i>R</i> *, 14 <i>R</i> *)-11-bencil-9,11,12,13,14,15-hexahidro-6 <i>H</i> -17-oxa-11-azaciclopenta[<i>a</i>]fenantren-16-ona (S-9a)
	Estado físico	Sólido blanco
	Formula molecular	C ₂₂ H ₂₁ NO ₂
	Peso	331,2 g/mol
	Punto de fusión	171-173 °C
Datos EMAR	EMAR calculada para C ₂₂ H ₂₁ NO ₂ 331.1572, observada 331.1575.	
IR: ν = 3010 (d, C-H), 2945 (d, C-H), 2826 (d, C-H), 1772 (f, C=O), 1608 (d, C=C), 1508 (m, C=C), 1243 (m, C-H) cm ⁻¹ .		
EM (IE) m/z (%) 331 (M, 14), 256 (10), 240 (54), 239 (12), 213 (14), 185 (13), 180 (14), 157 (10), 156 (20), 155 (30), 154 (14), 153 (15), 152 (10), 141 (17), 137 (17), 129 (31), 128 (21), 125 (12), 123 (14), 121 (12), 120 (28), 115 (16), 111 (23), 109 (14), 99 (11), 98 (13), 97 (38), 96 (15), 95 (24), 91 (78), 81 (45), 69 (100).		
RMN ¹H (300 MHz, CDCl ₃) δ 2.57 (dd, <i>J</i> = 17.7, 9.3 Hz, 1H), 2.74-2.89 (m, 2H), 3.20-3.61 (m, 6H), 4.78 (t aparente, <i>J</i> = 4.5 Hz, 1H), 4.93 (ddd, <i>J</i> = 10.8, 7.6, 6.5 Hz, 1H), 6.09 (t aparente, <i>J</i> = 2.7 Hz, 1H), 7.15 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 7.20-7.32 (m, 7H), 7.72 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H).		
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl ₃) δ 29.5 (CH ₂), 31.4 (CH ₂), 42.3 (CH), 49.1 (CH ₂), 49.8 (CH ₂), 55.7 (CH), 74.2 (CH), 125.0 (CH), 127.2 (CH), 127.4 (CH), 127.7 (CH), 128.3 (CH), 128.6 (2CH), 128.8 (2CH), 129.2 (C), 129.5 (CH), 133.1 (C), 134.7 (C), 139.0 (C), 176.6 (C).		

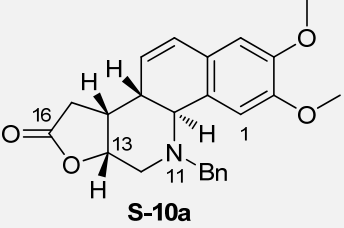


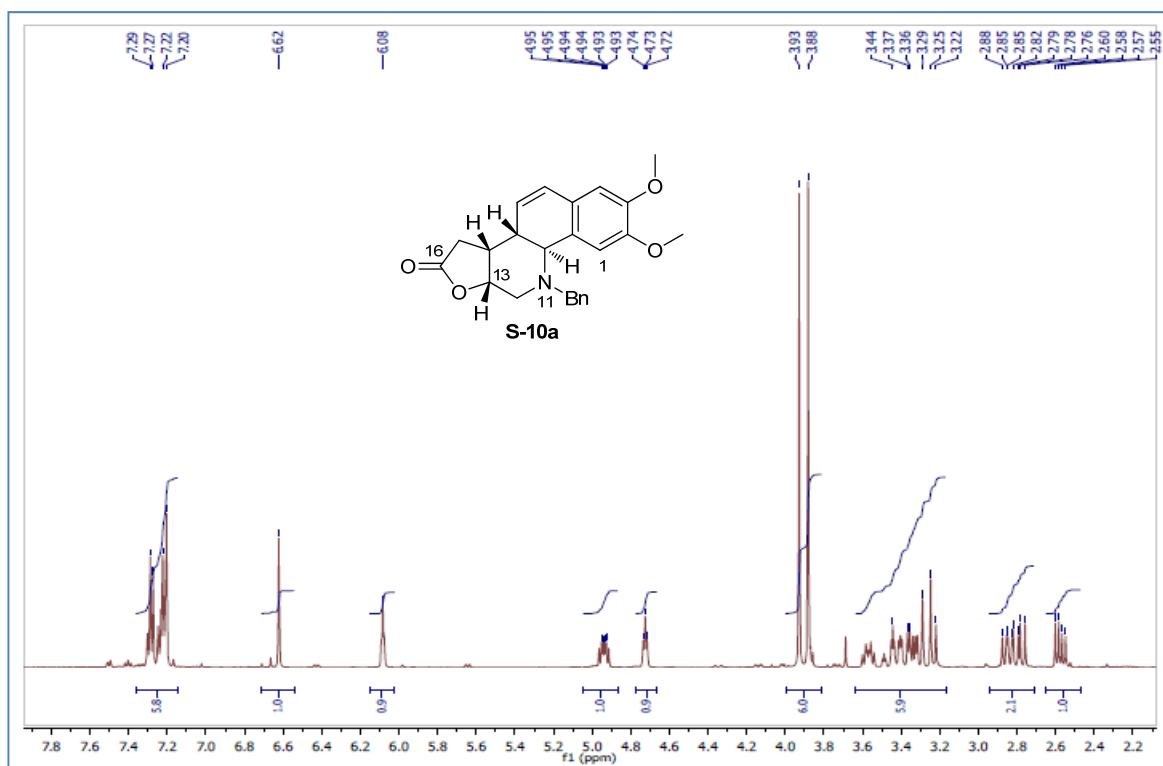
Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) de **S-9a**.

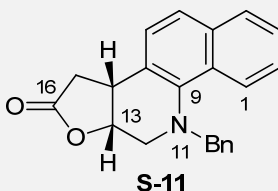
 <p>S-9b</p>	Nombre:	(8 <i>S</i> *,9 <i>S</i> *,13 <i>R</i> *,14 <i>R</i> *)-11-bencil-9,11,12,13,14,15-hexahidro-8 <i>H</i> -17-oxa-11-azaciclopenta[<i>a</i>]fenantren-16-ona (S-9b)
	Estado físico	Sólido blanco
	Formula molecular	C ₂₂ H ₂₁ NO ₂
	Peso	331,2 g/mol
	Punto de fusión	162-164 °C
	Datos EMAR	EMAR calculada para C ₂₂ H ₂₁ NO ₂ 331.1572, observada 331.1580
	Datos IR	IR: $\nu = 3013$ (d, C-H), 2947 (d, C-H), 2828 (d, C-H), 1772 (f, C=O), 1608 (d, C=C), 1508 (m, C=C), 1243 (m, C-H) cm ⁻¹ .
EM (IE) m/z (%) 331 (M, 3), 256 (10), 240 (21), 213 (14), 185 (21), 137 (16), 129 (37), 128 (84), 125 (17), 123 (16), 121 (11), 115 (12), 113 (10), 111 (34), 110 (11), 109 (20), 99 (14), 98 (18), 97 (54), 96 (18), 95 (32), 93 (11), 91 (28), 87 (11), 85 (36), 84 (28), 83 (55), 82 (19), 81 (48), 79 (10), 73 (50), 71 (45), 70 (19), 69 (100), 68 (14), 67 (24), 60 (31).		
RMN ¹H (300 MHz, CDCl ₃) δ 2.60 (dd, <i>J</i> = 17.5, 9.0 Hz, 1H), 2.73 (dd, <i>J</i> = 14.5, 10.0 Hz, 1H), 2.86 (dd, <i>J</i> = 18.0, 12.0 Hz, 1H), 3.21-3.30 (m, 2H), 3.40 (dd, <i>J</i> = 14.8, 5.8 Hz, 1H), 3.71 (d, <i>J</i> = 14.5 Hz, 1H), 4.14 (d, <i>J</i> = 14.5, 1H), 4.42 (d, <i>J</i> = 15.5 Hz, 1H), 5.00 (ddd, <i>J</i> = 9.8, 7.6, 5.8 Hz, 1H), 5.76 (dd, <i>J</i> = 9.8, 1.8 Hz, 1H), 6.53 (dd, <i>J</i> = 9.5, 3.0 Hz, 1H), 7.13 (dd, <i>J</i> = 7.0, 1.3 Hz, 1H), 7.23-7.29 (m, 2H), 7.35 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H), 7.44 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 7.52 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 7.63 (d, <i>J</i> = 7.0 Hz, 1H).		
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl ₃) δ 28.7 (CH ₂), 31.9 (CH), 37.5 (CH), 49.3 (CH ₂), 50.7 (CH ₂), 58.8 (CH), 73.4 (CH), 125.1 (CH), 126.9 (CH), 127.3 (2CH), 127.9 (2CH), 128.2 (2CH), 128.7 (2CH), 129.3 (CH), 133.7 (C), 134.3 (C), 138.6 (C), 175.9 (C).		

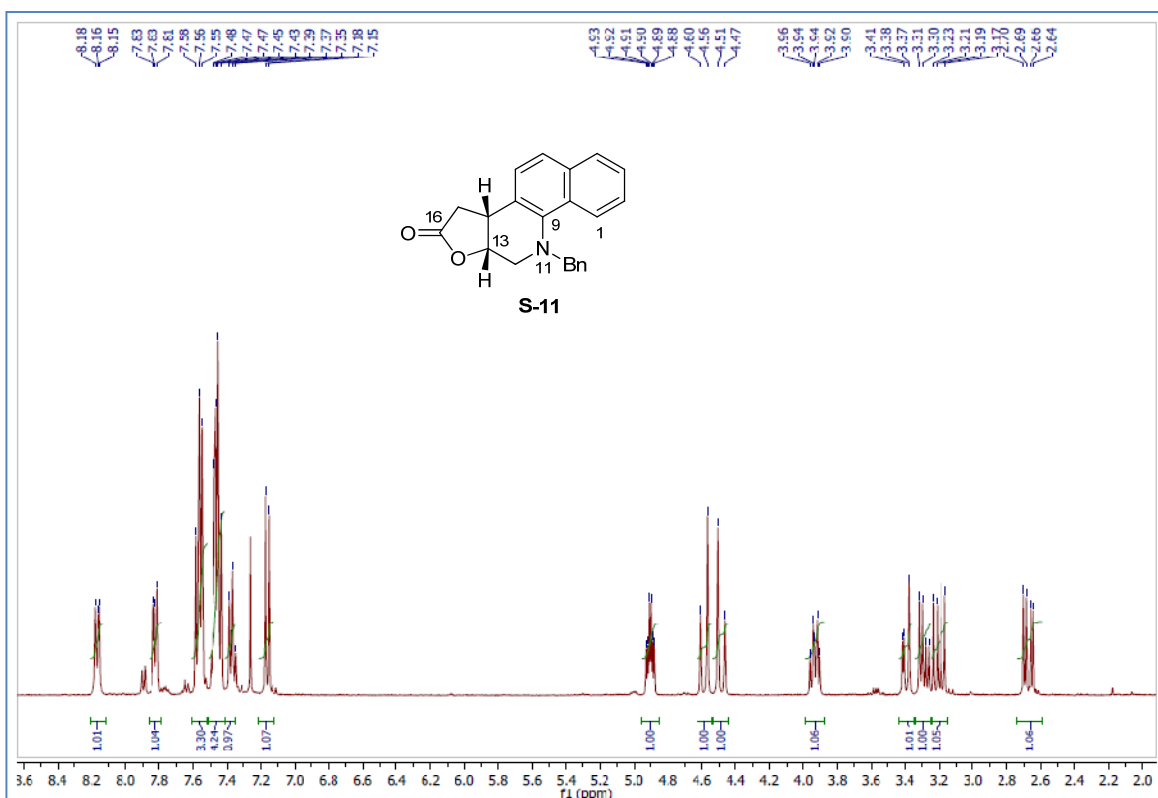


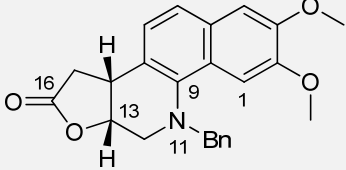
Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) de **S-9b**.

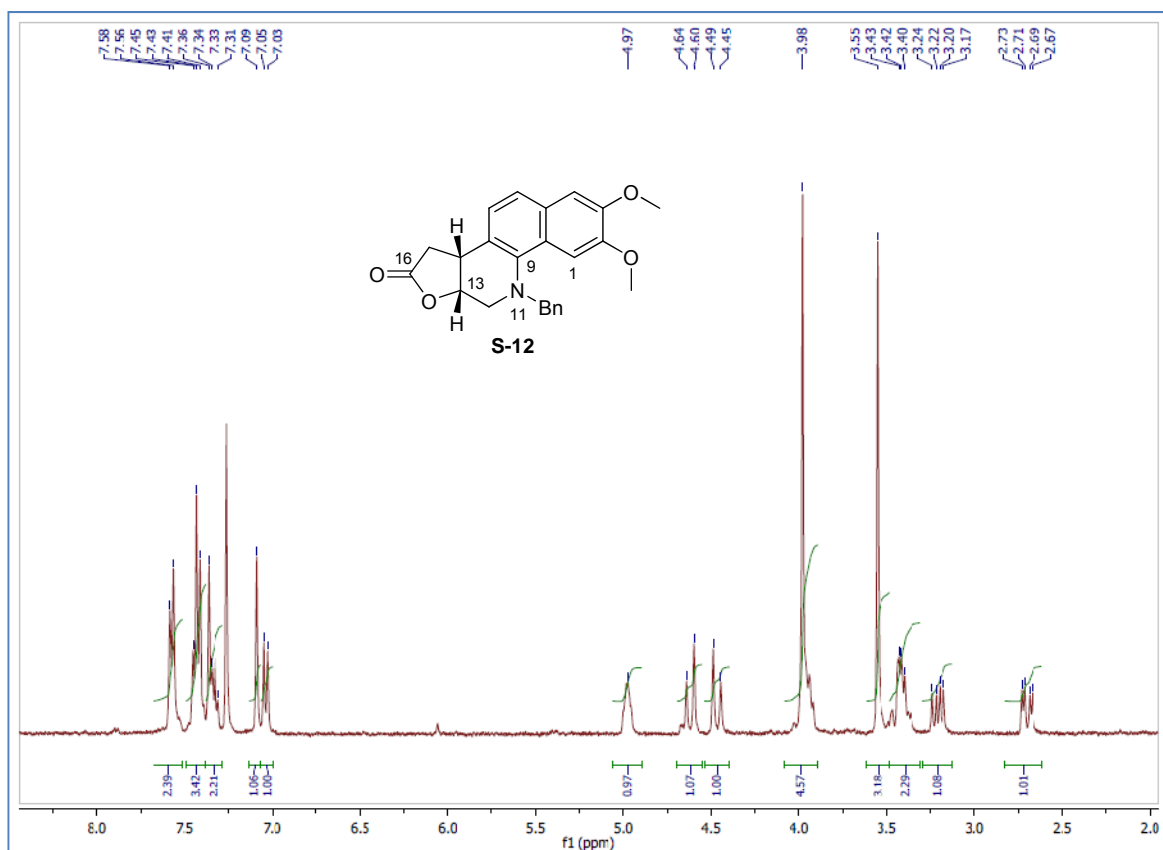
 <p>S-10a</p>	Nombre:	(9 <i>S</i> *, 13 <i>R</i> *, 14 <i>R</i> *)-11-Bencil-2,3-dimetoxi-9,11,12,13,14,15-hexahidro-6 <i>H</i> -17-oxa-11-azaciclopenta[<i>a</i>]fenantren-16-ona (S-10a)
	Estado físico	Sólido blanco
	Formula molecular	C ₂₄ H ₂₅ NO ₄
	Peso	331,2 g/mol
	Punto de fusión	181-182 °C
	Datos EMAR	EMAR calculada para C ₂₄ H ₂₅ NO ₄ 391.1784, observada 391.1782
IR: ν = 3017 (d, C-H), 2963 (d, C-H), 2826 (d, C-H), 1772 (f, C=O), 1608 (d, C=C), 1508 (m, C=C), 1243 (m, C-H) cm ⁻¹ .		
EM (IE) m/z (%) 391 (M, 65), 373 (32), 214 (45), 201 (31), 128 (24), 91 (100).		
RMN ¹H (500 MHz, CDCl ₃) δ 2.58 (dd, <i>J</i> = 17.8, 9.2 Hz, 1H), 2.76-2.88 (m, 2H), 3.22-3.50 (m, 5H), 3.57 (dt <i>J</i> = 12.5, 8.6 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 4.72 (t, <i>J</i> = 5.0 Hz, 1H), 4.94 (ddd, <i>J</i> = 10.9, 7.6, 6.4 Hz, 1H), 6.08 (t, <i>J</i> = 3.3 Hz, 1H), 6.62 (s, 1H), 7.20-7.30 (m, 6H).		
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl ₃) δ 29.5 (CH ₂), 31.6 (CH ₂), 42.3 (CH), 48.9 (CH ₂), 49.9.0 (CH ₂), 55.6 (CH ₃), 55.7 (CH ₃), 55.8 (CH), 74.1 (CH), 109.8 (CH), 110.8 (CH), 124.6 (C), 124.7 (CH), 126.5 (C), 127.0 (CH), 128.2 (CH), 128.3 (CH), 128.6 (C), 138.7 (C), 148.1 (C), 148.4 (C), 175.9 (C).		

Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz) de **S-10a**.

 <p>S-11</p>	Nombre:	(13 <i>R</i> *,14 <i>R</i> *)-11-Bencil-12,13,14,15-tetrahydro-11 <i>H</i> -17-oxa-11-azaciclopenta[<i>a</i>]fenantren-16-ona (S-11)
	Estado físico	Sólido amarillo
	Formula molecular	C ₂₂ H ₁₉ NO ₂
	Peso	329,4 g/mol
	Punto de fusión	153-155 °C
	Datos EMAR	EMAR calculada para C ₂₂ H ₁₉ NO ₂ 329.1416, observada 329.1416
	Datos IR	IR: $\nu = 3012$ (d, C-H), 2943 (d, C-H), 2826 (d, C-H), 1772 (f, C=O), 1608 (d, C=C), 1508 (m, C=C), 1243 (m, C-H) cm ⁻¹ .
EM (IE) m/z (%) 329 (M, 100), 239 (14), 238 (29), 210 (12), 194 (11), 180 (43), 168 (33), 167 (22), 152 (14), 91 (89).		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃) δ 2.67 (dd, <i>J</i> = 17.7, 6.8 Hz, 1H), 3.20 (dd, <i>J</i> = 17.7, 9.7 Hz, 1H), 3.29 (dd, <i>J</i> = 14.5, 7.2 Hz, 1H), 3.39 (dd, <i>J</i> = 14.5, 3.6 Hz, 1H), 3.99 – 3.87 (m, 1H), 4.49 (d, <i>J</i> = 15.8 Hz, 1H), 4.58 (d, <i>J</i> = 15.8 Hz, 1H), 4.90 (td, <i>J</i> = 7.4, 3.6 Hz, 1H), 7.16 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 7.38 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H), 7.51-7.41 (m, 4H), 7.61-7.52 (m, 3H), 7.86-7.79 (m, 1H), 8.21-8.11 (m, 1H).		
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl ₃) δ 36.3 (CH), 37.2 (CH ₂), 46.9 (CH ₂), 59.6 (CH ₂), 75.7 (CH), 123.3 (CH), 124.2 (CH), 124.9 (C), 126.1 (CH), 126.2 (CH), 126.5 (CH), 127.5 (CH), 127.6 (2CH), 128.2 (C), 128.5 (CH), 128.8 (2CH), 133.8 (C), 138.5 (C), 142.5 (C), 175.8 (C).		

Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 400 MHz) de **S-11**.

 <p style="text-align: center;">S-12</p>	Nombre:	(13 <i>R</i> *, 14 <i>R</i> *)-11-Bencil-2,3-dimethoxy-12,13,14,15-tetrahydro-11 <i>H</i> -17-oxa-11-aza-ciclopenta[aj]fenantren-16-ona (S-12)
	Estado físico	Aceite amarillo
	Formula molecular	C ₂₄ H ₂₃ NO ₄
	Peso	389,4 g/mol
	Datos EMAR	-----
	Datos IR	IR: $\nu = 3010$ (d, C-H), 2945 (d, C-H), 2828 (d, C-H), 1772 (f, C=O), 1609 (d, C=C), 1509 (m, C=C), 1243 (m, C-H) cm ⁻¹ .
<p>RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.70 (dd, $J = 17.6, 6.4$ Hz, 1H), 3.21 (dd, $J = 17.7, 9.5$ Hz, 1H), 3.55 (s, 1H), 3.49-3.33 (m, 2H), 3.55 (s, 3H), 3.98 (s, 3H), 4.00-3.91 (m, 1H), 4.47 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 4.62 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H), 4.97 (s, 1H), 7.04 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.34 (dd, $J = 14.5, 7.1$ Hz, 2H), 7.43 (t, $J = 7.7$ Hz, 3H), 7.57 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H).</p>		
<p>RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 36.22 (CH), 37.55 (CH₂), 47.69 (CH₂), 55.47 (CH₃), 55.84 (CH₃), 59.25 (CH₂), 77.0 (CH), 103.07 (CH), 107.01 (CH), 122.64 (CH), 122.94 (C), 123.51 (C), 124.81 (CH), 126.99 (2CH), 127.37 (CH), 128.86 (2CH), 129.40 (C), 138.92 (C), 141.45 (C), 149.44 (C), 149.50 (C), δ 175.98 (C).</p>		

Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 400 MHz) de **S-12**.

3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS AISLADOS Y SINTETIZADOS

3.1. INTRODUCCIÓN

3.2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

3.2.1 Metodología

3.2.2. Resultados y Discusión

3.3. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

3.3.1 Metodología

3.3.2. Resultados y Discusión

3.4. ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA

3.4.1 Metodología

3.4.2. Resultados y Discusión

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

3.1. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevas sustancias con aplicaciones terapéuticas se ha hecho indispensable, pues si bien, para la mayoría de enfermedades existe algún tratamiento, muchos de estos son o han empezado a ser insuficientes debido a la aparición de resistencia a los fármacos que en un principio fueron efectivos y a la baja seguridad que muchos medicamentos presentan para los pacientes. Actualmente, las enfermedades infecciosas originadas por diferentes microorganismos, son una de las mayores causas de muerte a nivel mundial.

El desarrollo de biocontroladores para la agricultura que permitan tratar enfermedades y plagas que afectan a muchas plantas fuentes de alimentos y/o de uso industrial también es necesario, pues el uso indiscriminado y permanente de agroquímicos ha conllevado a la aparición de plagas y microorganismos fitopatógenos resistentes. Sus efectos son notables, pues a nivel económico causan la pérdida parcial o completa de cultivos. Adicionalmente, la mayoría de los pesticidas empleados comúnmente son tóxicos y ocasionan serios problemas de contaminación ambiental.

Una de las fuentes potenciales para encontrar compuestos antimicrobianos son los productos naturales, en donde se han reportado diversos tipos de compuestos con propiedades antimicrobianas, lo cual indica que no hay una única entidad química que sirva como agente antimicrobiano. Las especies del género *Zanthoxylum*, pueden ser estudiadas para este fin, pues presentan diversos tipos de metabolitos secundarios y a muchas sustancias obtenidas de estas especies se les han determinado propiedades biológicas contra diversos microorganismos patógenos y fitopatógenos, validando así algunos de los usos dados en medicina tradicional.

Con el objeto de contribuir al conocimiento de las propiedades biológicas de diversas sustancias y de acuerdo a los antecedentes bibliográficos de especies del género *Zanthoxylum*, se evaluó la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados y sintetizados. En el presente capítulo se describen los resultados de la evaluación de actividad antibacteriana, antituberculosa y antifúngica de algunos de los metabolitos secundarios aislados en el estudio fitoquímico de las especies *Z. quinduense* y *Z. monophyllum* (capítulo 1), y de los compuestos sintetizados en el desarrollo de análogos benzofenantridínicos (capítulo 2).

3.2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Las infecciones causadas por bacterias se han convertido en una de las enfermedades más difíciles y costosas de tratar, debido a la aparición de nuevas enfermedades infecciosas, al resurgimiento de infecciones que parecían haber sido controladas y al aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos (Valgas *et al.*, 2007; Patrick, 2001).

Si bien, la resistencia bacteriana es un fenómeno biológico natural que está en continua evolución, ésta se ha convertido en un importante problema de salud pública a nivel mundial, pues las bacterias se han adaptado rápidamente a diferentes agentes antimicrobianos debido a su inadecuado uso en medicina, en la alimentación de animales, en producción de cultivos y en productos de aseo (Biswas *et al.*, 2008; Lovoba *et al.*, 2008; Nuñez y Salazar, 2005; Patrick, 2001; Benin y Dowell, 2001).

La adquisición de resistencia antibiótica depende de la capacidad de las bacterias para ir adquiriendo o acumulando resistencia a varios antibióticos. Así, el calificativo de “**bacteria multirresistente**” se aplica a aquellos microorganismos que presentan resistencia a tres o más grupos de antibióticos no relacionados entre sí y que son utilizados habitualmente en el tratamiento de las infecciones producidas por éstos (Márquez, 2008). Algunas de las bacterias patógenas humanas que han desarrollado resistencia ante diferentes antibióticos son *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, las cuales son causantes de múltiples enfermedades en humanos.

Staphylococcus aureus es uno de los patógenos *Gram (+)* más temidos por su capacidad de causar enfermedades en humanos y porque puede ser adquirido fácilmente en hospitales (Honeyman *et al.*, 2002). Las enfermedades causadas por esta bacteria van desde pequeñas infecciones en heridas y rasguños, hasta casos graves de bacteriemia, endocarditis, osteomielitis, meningitis, neumonía e infecciones de la piel, entre otras. A pesar de las enfermedades que origina, la presencia de *S. aureus* en la flora intestinal y la piel del hospedero es considerada normal (François *et al.*, 2010; Huong *et al.*, 2010; Taalo *et al.*, 2009). Hoy en día, aproximadamente el 60% de las cepas de esta bacteria son resistentes a penicilina y metilina, dejando a la vancomicina como el fármaco de elección para el tratamiento de infecciones contra *S. aureus* multirresistente (MRSA). Sin embargo, son cada vez más

frecuentes las cepas de *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (Silva-Carvalho *et al.*, 2009; Piérard *et al.*, 2004; von Eiff *et al.*, 2002).

Enterococcus faecalis es una bacteria *Gram* (+) comensal, que habita en el tracto gastrointestinal de humanos y animales. En la actualidad, es responsable de infecciones del tracto urinario, endocarditis, infecciones de heridas, abscesos intra-abdominales, así como de las enfermedades transmitidas por los alimentos contaminados con este microorganismo. *E. faecalis* es uno de los principales agentes etiológicos de las infecciones nosocomiales, que exhibe altas tasas de resistencia a los antibióticos (Flannagan *et al.*, 2008; Arcíola *et al.*, 2007). Esta bacteria ha presentado resistencia en general a los antibióticos a base de aminoglucósidos, como la gentamicina, aunque también se han aislado en hospitales cepas de *E. faecalis* resistentes a vancomicina (VRE) y a las penicilinas, hecho que ha dificultado el tratamiento de pacientes con infecciones avanzadas (Malani *et al.*, 2002).

Escherichia coli es un organismo procariote *Gram* (-), genéticamente diverso y de gran importancia científica, económica y médica, que se encuentra generalmente en los intestinos de humanos y animales, y por ende en las aguas negras. Puede causar infecciones del aparato excretor, diarrea, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía (Donnenberg, 2002; Garcia y Bouguéneq, 1996). En los últimos años se han encontrado cepas de *E. coli* resistentes a algunos antibióticos pertenecientes al grupo de las tetraciclinas como es el caso de doxiciclina, así como a los antibióticos trimetoprima y sulfametoxazol, sustancias que son ampliamente empleadas para el tratamiento de las enfermedades causadas por esta bacteria (Elsinghorst, 2002).

Las bacterias del género ***Salmonella*** son un grupo de microorganismos *Gram* (-) y anaerobios, capaces de causar enfermedades en humanos y animales cuando entran en el cuerpo del hospedero. Estas bacterias han sido consideradas por muchos años como la causa más importante de las enfermedades producidas por alimentos contaminados. Los tipos de *Salmonella* que pueden infectar humanos son conocidos como serotipos (Brands, 2006), siendo los de mayor importancia *S. paratyphi*, *S. typhi*, *S. typhimurium*, *S. dysenteriae*, *S. enteritidis*, *S. agona*, *S. hadar* y *S. virchow*. Las enfermedades causadas por los serotipos de *Salmonella* incluyen principalmente gastroenteritis, diarrea, fiebre tifoidea, disentería bacilar y septicemia. Generalmente, solo los casos graves de salmonelosis son tratados con

antibióticos como ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, sulfonamidas y tetraciclinas, entre otros, y frente a los cuales la bacteria ya ha mostrado casos de resistencia (Bell y Kyriakides, 2002).

La rápida propagación de multirresistencia en cepas bacterianas ha generado investigaciones dirigidas hacia la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos. Con este fin, se realizó la evaluación de actividad antibacteriana cualitativa de los compuestos aislados y sintetizados.

3.2.1. Metodología

El ensayo de actividad antibacteriana cualitativo fue asesorado por el Doctor José Manuel Lozano perteneciente a la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC).

3.2.1.1. Cepas bacterianas

Se emplearon cepas de bacterias *Gram (+)* (*Staphylococcus aureus* ATCC 65380 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) y *Gram (-)* (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028s y MS7953). Las bacterias fueron suministradas por el Profesor E. A. Groisman del Departamento de Microbiología Molecular de la Universidad de Washington, St. Louis, MO, USA y están mantenidas en la FIDIC en un medio de agar nutritivo a 37 °C.

3.2.1.2. Ensayo de actividad antibacteriana por el método de difusión radial

La actividad antibacteriana cualitativa de los compuestos aislados y sintetizados fue evaluada frente a las cinco cepas bacterianas por la técnica de difusión radial en agar (Lehrer *et al.*, 1991). En un ensayo típico se toma una colonia aislada de cada cepa y se siembra en 3 mL de tripticasa de soya (TSB) para las bacterias *Gram (+)* y 3 mL de base Luria Broth (LB) para las bacterias *Gram (-)*. Se incuban a 37 °C con agitación constante durante la noche. Del cultivo resultante se toman 200 µL y se inoculan en 20 mL de TSB o LB según el caso y se incuban por 5 horas a 37 °C con agitación constante hasta que los microorganismos se encuentren en la fase logarítmica. Posteriormente se centrifugan las suspensiones por 10 minutos a 10000 rpm a 4 °C, se retira el sobrenadante y el sedimento obtenido se resuspende en 10 mL de buffer de fosfato salino (PBS) pH 7.2, realizando luego 3 lavados con PBS

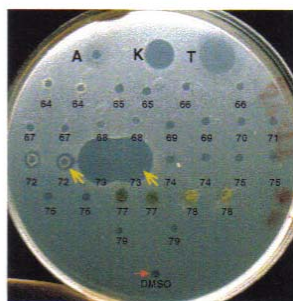
centrifugando por 5 minutos a 10000 rpm cada uno. Finalmente el sedimento se resuspende en 5 mL de PBS y se determina la densidad óptica (DO) a 620 nm, con el fin de calcular el número de unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro. Teniendo en cuenta la relación $DO_{620nm} 0.2 = 5 \times 10^7$ UFC (Lehrer *et al.*, 1991), se calcula el volumen que contiene 4×10^7 UFC para ser dispersadas en cada caja de Petri. El volumen medido se mezcla y homogeniza en 15 mL de agarosa de baja electroendósmosis fundida a más o menos 45 °C. La suspensión bacteriana se sirve en cajas de Petri, se deja solidificar a temperatura ambiente y luego se hacen perforaciones de 2 mm de diámetro con un sacabocados estéril. Para el ensayo las muestras se prepararon disolviendo 1 mg de compuesto puro en 500 µL de DMSO. 8 µL de la solución se aplican por duplicado y se incuban las cajas a 37 °C por 30 minutos. Al cabo de este tiempo se adiciona el medio nutritivo fundido que contiene agar-agar y TSB, se incuba por 18 horas a 37 °C y finalmente se mide el diámetro del halo formado por la actividad antibacteriana del compuesto. En el ensayo se utilizaron como controles positivos los antibióticos ampicilina (50 mg/mL), kanamicina (10 mg/mL) y tetraciclina (4.12 mg/mL) en una dilución 1:100 en PBS y como controles negativos se emplearon DMSO y PBS, aplicando 8 µL de cada uno por pozo. El diámetro de las zonas claras o halos de inhibición de crecimiento bacteriano causado por el compuesto en análisis se midió en mm y los resultados son reportados como halos de inhibición.

3.2.2. Resultados y discusión

Se evaluó la actividad antibacteriana cualitativa de 38 sustancias, siendo 26 obtenidas del estudio fitoquímico y 12 del estudio sintético por el método de difusión radial en agar (Lehrer *et al.*, 1991), frente a dos cepas bacterianas *Gram (+)* (*S. aureus* ATCC 6538 y *E. faecalis* ATCC 29212) y tres cepas *Gram (-)* (*E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 14028s y *S. typhimurium* MS795). En la Figura 3.1 se ilustra a manera de ejemplo los resultados obtenidos contra *E. coli* para algunos de los compuestos naturales, en donde se puede observar claramente que el compuesto marcado con el número 73, correspondiente a queleritrina **Z-14**, causa una significativa inhibición del crecimiento bacteriano, que incluso es mayor a la exhibida por algunos de los controles positivos a la dosis evaluada.

Los resultados de actividad antibacteriana se resumen en la Tabla 3.1, en donde se reportan como halos de inhibición, están ordenados y diferenciados por colores de acuerdo al origen de las

sustancias. De las 38 sustancias ensayadas, 24 mostraron algún grado de inhibición del crecimiento frente a por lo menos una de las cinco cepas bacterianas.



A: antraciclina
K: kanamicina
T: tetraciclina

Figura 3.1. Resultados obtenidos con los compuestos naturales contra la cepa *E. coli*.






Los compuestos de origen natural, mostraron una tendencia a inhibir selectivamente el crecimiento de bacterias *Gram (+)* y no el de las *Gram (-)*. En cambio, la mayoría de los compuestos sintéticos presentaron actividad antibacteriana de manera selectiva contra la cepa *Gram (-)* *S. typhimurium* MS7953, correspondiente a una bacteria mutada menos virulenta que la cepa madre *S. typhimurium* ATCC 14028s (Buchmeier y Heffron, 1989; Fields *et al.*, 1986).

Tabla 3.1. Resultados de actividad antibacteriana para las sustancias naturales y sintéticas.

SUSTANCIA	HALOS DE INHIBICIÓN (mm)				
	Cepa A	Cepa B	Cepa C	Cepa D	Cepa E
Mezcla β -sitosterol (Z-1), estigmasterol (Z-2) campesterol (Z-3)	--	--	--	--	--
(-)-6-acetonildihidroqueleritrina (Z-5)	--	3,0	--	--	3,0
p-hidroxibenzaldehído (Z-6)	--	--	--	--	--
Ácido vainillínico (Z-7)	--	--	--	--	--
Mezcla evofolina-C (Z-8) y esteroides	--	--	--	--	--
(-)-6-carboximetildihidroqueleritrina (Z-13)	--	--	--	--	--
Queleritrina (Z-14)	10,3	8,8	8,5	10,0	10,3
Mezcla N-metiltetrahydrocolumbamina (Z-16) y N-metiltetrahidropalmatina (Z-17)	3,0	4,0	3,0	--	3,5
(-)-isotembetarina (Z-18)	3,0	3,5	--	--	--
(-)-xylopinidina (Z-19)	--	3,0	--	--	--
Norqueleritrina (Z-4)	--	3,0	--	--	--
(+)-siringaresinol (Z-9)	--	--	--	--	--
Decarina (Z-10)	3,5	3,5	--	--	--
Lupeol (Z-11)	--	--	--	--	--
Nornitidina (Z-12)	--	--	--	--	--

Berberina (Z-15)	4,0	3,5	3,5	3,5	5,5
Xanthoxylina (Z-20)	3,0	4,0	--	--	--
4,6-dimetoxi-2-hidroxibenzaldehído (Z-21)	--	--	--	--	--
(-)-hinokinina (Z-22)	--	--	--	--	--
(-)-columbianetina (Z-23)	3,0	3,5	--	--	--
(+)-marmesina (Z-24)	3,5	3,5	--	--	--
Thalifolina (Z-25)	--	--	--	--	--
(+)-uloptero (Z-26)	--	--	--	--	--
Jatrorrhizina (Z-27)	--	3,0	--	--	3,5
3 β -glucositosterol (Z-28)	--	3,5	--	--	--
(-)-monophyllidina (Z-29)	--	3,0	--	--	--
Mezcla de arilbutiraldehídos (S-1)	7,0	8,0	8,0	9,0	8,0
1-bromo-2-iodo-4,5-dimetoxibenceno (S-2)	--	--	--	4,0	4,0
Mezcla de arilbutiraldehídos (S-3)	4,0	--	6,0	6,0	7,0
Enamina cíclica (S-5)	--	--	--	--	3,0
Enamina cíclica (S-6)	--	--	--	--	3,0
Azaespirociclo (S-7)	--	--	--	--	3,0
Azaespirociclo (S-8)	--	--	--	--	4,0
Análogo benzofenantridínico (S-9a)	--	--	--	--	3,0
Análogo benzofenantridínico (S-9b)	--	--	--	--	--
Mezcla de análogos benzofenantridínicos (S-10)	--	--	--	--	3,0
Análogo benzofenantridínico (S-11)	--	--	--	--	--
Butenólido (S-14a)	--	--	--	--	4,0
TETRACICLINA	9,0	9,0	10,0	11,0	0
ANTRACICLINA	12,0	11,0	7,0	16,0	14,0
KANAMICINA	9,0	6,0	9,0	8,0	9,0

A: *S. aureus*, B: *E. faecalis*, C: *E. coli*, D: *S. typhimurium* ATCC 14028s, E: *S. typhimurium* MS7953.

 *Z. quinduense*  *Z. quinduense* y *Z. monophyllum*  *Z. monophyllum*  Síntesis  Control +

Los alcaloides naturales queleritrina **Z-14**, berberina **Z-15** y la mezcla de *N*-metiltetrahidrocolumbamina **Z-16** con *N*-metiltetrahidropalmatina **Z-17**, así como los compuestos sintéticos correspondientes a las mezclas de arilbutiraldehídos, (**S-1** y **S-3**), fueron los más promisorios contra las bacterias *Gram (+)* y *Gram (-)*, siendo queleritrina **Z-14** el compuesto más activo, seguido por la mezcla de aldehídos **S-3**, los cuales producen halos de inhibición comparables a los exhibidos por los tres antibióticos empleados como controles positivos.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la evaluación de actividad antibacteriana para las 12 sustancias sintéticas, se observa que la mayoría presentan inhibición del crecimiento de la cepa *S. typhimurium* MS7953, con halos de inhibición entre 3 y 9 mm, siendo las mezclas de aldehídos (**S-1** y **S-3**) las de mayor actividad y las únicas que causaron inhibición en las otras cepas bacterianas (Figura

3.2). La mezcla de aldehídos **S-1** presentó promisorio actividad antibacteriana sobre las cepas *Gram (+)* y *Gram (-)* evaluadas; mientras que la mezcla de arilbutiraldehídos **S-3** solo presentó actividad antibacteriana contra *S. aureus* y las tres bacterias *Gram (-)*. Teniendo en cuenta las diferencias estructurales existentes entre las dos mezclas de aldehídos (**S-1** y **S-3**), se puede deducir que los grupos metoxilo ubicados sobre el anillo aromático de los aldehídos **S-3** pueden ser los responsables de la disminución de la actividad contra las cepas bacterianas *Gram (+)*, haciéndolos de este modo selectivos a bacterias *Gram (-)*. Este estudio constituye el primer reporte de evaluación actividad antibacteriana para los compuestos sintetizados.

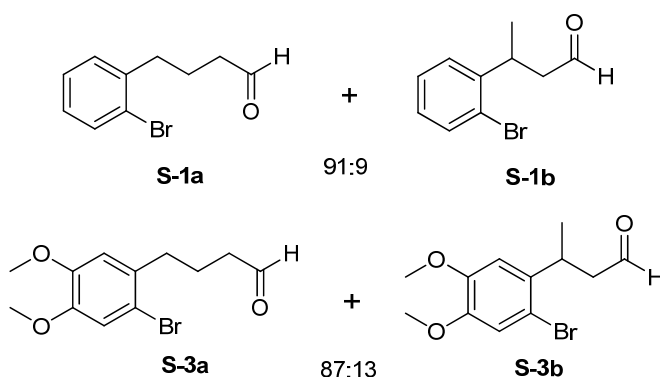


Figura 3.2. Sustancias sintéticas con mayor actividad frente a las cepas *Gram (+)* y *Gram (-)*.

De las 26 sustancias naturales evaluadas, 14 presentaron actividad inhibitoria sobre el crecimiento de por lo menos una de las 5 cepas bacterianas (Figura 3.3), con valores de halo de inhibición iguales o superiores a 3 mm. Entre las sustancias activas se encuentran cuatro alcaloides benzofenantridínicos (norqueleritrina **Z-4**, (-)-6-acetonildihidroqueleritrina **Z-5**, decarina **Z-10** y queleritrina **Z-14**), dos alcaloides bencilisoquinolínicos ((-)-isotembetarina **Z-18** y (-)-xylopinidina **Z-19**), dos alcaloides berberínicos (berberina **Z-15** y jatrorrizina **Z-27**), un alcaloide derivado de la prolina ((-)-monophyllidina **Z-29**), dos cumarinas ((-)-columbianetina **Z-23** y (+)-marmesina **Z-24**), un bencenoide (xanthoxylina **Z-20**), un esteroide (3β -glucositosterol **Z-28**) y la mezcla de alcaloides tetrahidroprotoberberínicos (*N*-metiltetrahidrocolumbiamina **Z-16** y *N*-metiltetrahidropalmatina **Z-17**). De estas sustancias, queleritrina **Z-14** presentó la mayor actividad antibacteriana a la dosis evaluada, con valores de halos de inhibición entre 8,5 y 10,3 mm.

Los alcaloides benzofenantridínicos evaluados presentaron mayor actividad antibacteriana que sus análogos sintéticos, lo que indica que el reemplazo de uno de los anillos aromáticos por la butirolactona, la presencia del grupo bencilo sobre el átomo de nitrógeno, los sustituyentes y el patrón de sustitución del anillo **A**, y/o la no aromaticidad del anillo **C**, pueden ser las características estructurales que disminuyen considerablemente la actividad antibacteriana. Para determinar cuál de las diferencias estructurales es la causante de la pérdida de la actividad, es necesario continuar con el desarrollo de la ruta sintética propuesta, a fin de obtener diversos tipos de análogos que permitan establecer relaciones de estructura-actividad.

En cuanto a los compuestos con alguna tendencia a inhibir el crecimiento de alguna cepa bacteriana, solo se han reportado diversos estudios de actividad antibacteriana para los alcaloides jathrorrizina **Z-27**, (-)-6-acetonildihidroqueleritrina **Z-5**, queleritrina **Z-14** y berberina **Z-15**. Jatrorrhizina ha presentado una fuerte actividad sobre 20 cepas de bacterias causantes del acné, pertenecientes al género *Propionobacterium* (Grycová *et al.*, 2007). Para el alcaloide (-)-6-acetonildihidroqueleritrina se ha reportado que no posee actividad antibacteriana sobre las cepas *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella setubal* (Weber, 2005). A queleritrina se le ha determinado actividad contra *Mycobacterium aurum*, *M. smegmatis* y *M. bovis* (Okunade *et al.*, 2004; Newton *et al.*, 2002), así como contra algunas cepas Gram (+) y Gram (-), dentro de las cuales se encuentran las bacterias *S. aureus* y *E. coli* (Weber, 2005). Finalmente, a berberina se le han determinado que presenta promisorio actividad contra diversas cepas bacterianas, incluidas *S. aureus* y *E. coli* (Wang *et al.*, 2009; Iwasa *et al.*, 1996). Los resultados obtenidos en estas investigaciones sobre las cepas *S. aureus* y *E. coli*, concuerdan con los encontrados en este trabajo.

Los resultados obtenidos en este estudio para la evaluación de actividad antibacteriana de las sustancias naturales y sintéticas contribuyen al conocimiento de las propiedades biológicas de las muestras evaluadas, confirman y complementan los resultados obtenidos por otros investigadores y constituyen el primer reporte de actividad antibacteriana para la mayoría de las sustancias ensayadas.

La actividad antibacteriana preliminar exhibida por varios de los compuestos evaluados los hace promisorios para continuar con ensayos de actividad biológica más específicos, que permitan obtener

resultados más completos, a fin de determinar si estas sustancias pueden llegar a convertirse en nuevos antibióticos y/o en compuestos plantilla para el diseño de nuevos medicamentos antibacterianos.

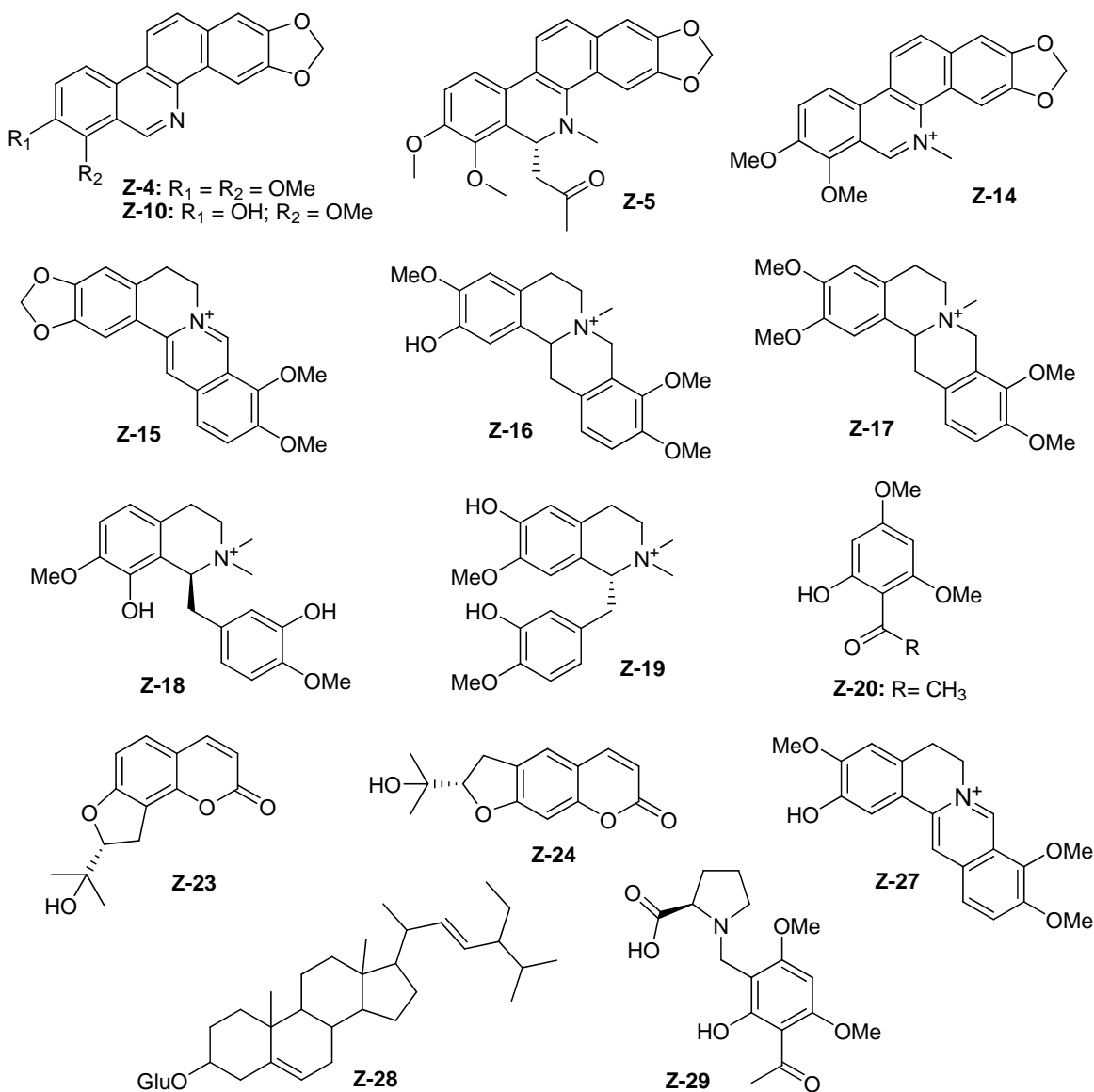


Figura 3.3. Compuestos naturales que presentaron actividad antibacteriana.

3.3. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

El ataque de plagas y enfermedades a cultivos y productos post-cosecha continúa siendo un problema de gran importancia en el sector agrícola. De los diversos microorganismos fitopatógenos que atacan a las plantas, dentro los que se encuentran virus, hongos, bacterias, nematodos y fitoplasmas; los hongos son uno de los que más enfermedades ocasionan. Se sabe que más de 8.000 especies de hongos pueden causar enfermedades en plantas, las cuales originan elevados daños económicos en cultivos de importancia agrícola, pues producen en sus hospederos una amplia variedad de síntomas que afectan el sabor, textura, color y forma de los productos de interés. Los hongos fitopatógenos, además de causar escasez de alimentos, pueden afectar directamente la salud de los seres humanos y de los animales por intoxicación con toxinas producidas por ellos (Agrios, 2005, Punja, 2004).

Los hongos del género *Fusarium* son cosmopolitas y muy abundantes en las zonas tropicales y templadas del mundo. Un número importante de especies de este género son hongos fitopatógenos, que causan daño a diversas hortalizas, plantas ornamentales y plantaciones de cultivos ocasionando distintos tipos de enfermedades, tales como manchas en las hojas, pudrición de raíces y de la base del tallo, muerte descendente, pudrición de frutos y marchitamientos vasculares. La mayoría de los hongos del género *Fusarium* causantes de marchitamiento pertenecen a *Fusarium oxysporum* (Leslie y Summerell, 2006; Garcés *et al.*, 2001).

F. oxysporum es una de las especies más importantes del género *Fusarium* por las pérdidas económicas que causa en cultivos comerciales. Es un hongo que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchas plantas. La morfología de las colonias es muy variable, las más comunes son las de tipo micelial caracterizadas por la producción de abundante micelioaéreo, algodonoso, con una coloración variable, de blanco a rosado durazno, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar. Este hongo produce tres tipos de esporas: las microconidias, macroconidias y clamidosporas, siendo estas últimas las responsables de que el hongo sobreviva en condiciones ambientales desfavorables y en el suelo como saprófito de vida libre en ausencia de plantas hospedantes (Lizcano, 2007; Leslie y Summerell, 2006; Garcés *et al.*, 2001).

Este hongo puede presentarse como patógeno especializado, denominado forma especial (f. sp.), según la planta hospedante que afecte. El taxón forma especial corresponde a cepas cuyas características morfológicas y de cultivo son indistinguibles, pero muestran diferentes propiedades fisiológicas en su habilidad para parasitar un hospedero específico. Este taxón se ha empleado para categorizar aislamientos que causan enfermedades en una especie, género o familia en particular. El patógeno especializado *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, ataca cultivos de tomate, razón por la que es conocido como el hongo del tomate. El hongo sobrevive en restos de cultivo de una temporada a otra y posee estructuras resistentes que le permiten perdurar en el suelo por un espacio de 6 años. El hongo penetra en la planta a nivel del suelo ya sea por el tallo o raíces superficiales, luego por los ases vasculares es trasladado a toda la planta. Estos causan en las plantas caída de pecíolos, de hojas superiores, amarillamiento de hojas inferiores que avanza hacia el ápice hasta secar las hojas. En ocasiones el amarillamiento comienza en las hojas inferiores y termina por secar la planta (Figura 3.4). La transmisión a distancia de este patógeno se da principalmente por semilla y plántulas infectadas (Garcés *et al.*, 2001).



Figura 3.4. Cultivo de tomate infectado por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Para controlar la enfermedad causada por el hongo del tomate, se han utilizado fungicidas sistémicos como los benzimidazoles, pero la efectividad de estas sustancias ha disminuido notablemente en los últimos años, debido a la aparición de cepas resistentes (Lizcano, 2007). La resistencia a los distintos fungicidas comerciales ha estimulado el interés en la búsqueda de nuevas sustancias antifúngicas, para lo cual las plantas constituyen una fuente potencial para el desarrollo y optimización de nuevos agroquímicos que permitan controlar las enfermedades causadas por hongos.

3.3.1. Metodología

3.3.1.1. Ceba Fúngica

La cepa empleada para el ensayo de actividad antifúngica fue *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, donada por el Profesor Álvaro Celis del Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Agronomía de la Universidad de Cundinamarca. La cepa fue mantenida en medio de agar de papa dextrosa (PDA) en incubadora a 25 °C.

3.3.1.2. Ensayo de actividad antifúngica por el método de bioautografía directa

La actividad antifúngica contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* de las sustancias naturales y sintéticas fue determinada empleando la técnica de bioautografía directa en cromatoplasmas de sílica gel (Marques *et al.*, 2007; Homans y Fuchs, 1970). Se prepararon soluciones de cada sustancia en diferentes concentraciones (10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,2 y 0,1 µg/µL), y se aplicaron 10 µL de cada solución sobre cromatoplasmas de sílica gel, correspondiendo a 100, 50, 25, 10, 5, 2 y 1 µg de cada sustancia aplicada. Las placas fueron asperjadas con una suspensión de esporas [10^6 UFC] del hongo en caldo nutritivo de sales y glucosa. Las placas se incubaron en atmósfera húmeda y oscura a 25 °C por 72 horas. La detección de las zonas de inhibición se realizó mediante la exposición de las placas a luz ultravioleta (254 nm) y vapores de yodo. La presencia de zonas de inhibición luego del revelado de las placas indica que las sustancias evaluadas presentan actividad inhibitoria contra el crecimiento del hongo. Como control positivo se empleó el fungicida comercial Benomyl (1µg) y como control negativo se emplearon los solventes en los que se disolvieron las muestras.

3.3.2. Resultados y discusión

La actividad antifúngica de 38 sustancias fue evaluada contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, siendo 26 obtenidas del estudio fitoquímico y 12 de la investigación sintética. La actividad se determinó por el método de bioautografía directa sobre cromatoplasmas de sílica gel (Marques *et al.*, 2007; Homans y Fuchs, 1970). Este método fue seleccionado debido a que es un método económico, rápido y reproducible, además permite disolver la muestra en el solvente adecuado para su posterior aplicación sobre la placa sin interferir en los resultados (Chaaib, 2004; Hadacek y Greger, 2000).

En la Tabla 3.2 se resumen los resultados obtenidos, expresados como cantidad mínima inhibitoria (CMI), donde este valor representa la mínima cantidad de sustancia que produce algún grado de inhibición sobre el crecimiento del hongo (Hadacek y Greger, 2000). De las 26 sustancias naturales evaluadas, solo 8 presentaron actividad antifúngica. Entre las sustancias que inhibieron el crecimiento del hongo se encuentran tres alcaloides benzofenantridínicos (norqueleritrina **Z-4**, (-)-6-acetonildihidroqueleritrina **Z-5** y queleritrina **Z-14**), un alcaloide berberínico (jatrorrhizina **Z-27**), un alcaloide quinolónico (thalifolina **Z-25**), una mezcla de un fenilpropeno y esteroides (evofolina-C **Z-8**) y dos cumarinas ((-)-columbianetina **Z-23** y (+)-ulopterol **Z-26**). En la Figura 3.5 se ilustran los metabolitos secundarios que presentaron actividad antifúngica.

El alcaloide queleritrina **Z-14**, fue el compuesto de origen natural que presentó la mayor actividad antifúngica (CMI = 1 µg). A este alcaloide se le ha determinado en investigaciones previas actividad antifúngica contra 6 especies multirresistentes del género *Candida* (Meng *et al.*, 2009), así como contra dos especies del género *Fusarium*, *F. solani* y *F. culmorum*, hongos responsables de fusariosis severa en humanos, animales y plantas (Matos *et al.*, 1999). Los resultados presentados en este trabajo, constituyen el primer reporte de la actividad antifúngica de queleritrina sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

De las sustancias que en este trabajo inhibieron el crecimiento del hongo, se tiene que además de queleritrina **Z-14**, a los alcaloides (-)-6-acetonildihidroqueleritrina **Z-5** y jatrorrhizina **Z-27**, así como para las cumarinas (-)-columbianetina **Z-23** y (+)-ulopterol **Z-26**, se han descrito algunos estudios de actividad antifúngica.

Para el alcaloide berberínico jatrorrhizina **Z-27**, se ha reportado que presenta una fuerte actividad antifúngica sobre 4 especies de hongos multiresistentes del género *Candida* y contra *Cryptococcus neoformans*, donde los 5 microorganismos son causantes de enfermedades en humanos (Rao *et al.*, 2009; Abad *et al.*, 2007). El alcaloide (-)-6-acetonildihidroqueleritrina **Z-5** ha sido evaluado frente los hongos *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *Sacharomyces cerevisiae* y *C. neoformans*, encontrándose que no presenta actividad antifúngica sobre ninguno de los cuatro hongos (Weber, 2005). Los resultados encontrados en este trabajo, representan el primer reporte de actividad antifúngica sobre hongos fitopatógenos para jatrorrhizina y (-)-6-acetonildihidroqueleritrina.

Tabla 3.2. Valores de CMI contra el crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* para las sustancias naturales y sintéticas.

SUSTANCIA	CMI (μg)	FUENTE
Mezcla β -sitosterol (Z-1), estigmasterol (Z-2) campesterol (Z-3)	---	 Zanthoxylum quinduense
(-)-6-acetonildihidroqueleritrina (Z-5)	25	
p-hidroxibenzaldehído (Z-6)	---	
Ácido vainillínico (Z-7)	---	
Mezcla evofolina-C (Z-8) y esteroides	25	
(-)-6-carboximetildihidroqueleritrina (Z-13)	---	
Queleritrina (Z-14)	1	
Mezcla N-metiltetrahydrocolumbamina (Z-16) y N-metiltetrahidropalmitina (Z-17)	---	
(-)-isotembetarina (Z-18)	---	
(-)-xylopinidina (Z-19)	---	
Norqueleritrina (Z-4)	50	Zanthoxylum quinduense y Zanthoxylum monophyllum
(+)-siringaresinol (Z-9)	---	
Decarina (Z-10)	---	
lupeol (Z-11)	---	
Nornitidina (Z-12)	---	
Berberina (Z-15)	---	
Xanthoxylina (Z-20)	---	
4,6-dimetoxi-2-hidroxibenzaldehído (Z-21)	---	 Zanthoxylum monophyllum
(-)-hinokinina (Z-22)	---	
(-)-columbianetina (Z-23)	100	
(-)-marmesina (Z-24)	---	
Thalifolina (Z-25)	100	
(+)-uloptero (Z-26)	50	
Jatrorrhizina (Z-27)	100	
3 β -glucositosterol (Z-28)	---	
(-)-monophyllidina (Z-29)	---	
Mezcla de arilbutiraldehídos (S-1)	2	
1-bromo-2-iodo-4,5-dimetoxibenceno (S-2)	10	
Mezcla de arilbtiraldehídos (S-3)	5	
Enamina cíclica (S-5)	---	
Enamina cíclica (S-6)	---	
Azaespirociclo (S-7)	---	
Azaespirociclo (S-8)	---	
Análogo benzofenantridínico (S-9a)	---	
Análogo benzofenantridínico (S-9b)	---	
Mezcla de análogos benzofenantridínicos (S-10)	---	
Análogo benzofenantridínico (S-11)	25	
Butenólido (S-14a)	10	
BENOMYL	1	Control Positivo

(-)-Columbianetina **Z-23**, una de las cumarinas aisladas de *Z. monophyllum*, presentó una actividad antifúngica débil (CMI = 100 μg) sobre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. En un estudio de actividad antifúngica sobre hongos fitopatógenos se reporta que columbianetina presenta una actividad antifúngica fuerte sobre *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Afek *et al.*, 1995), tres hongos fitopatógenos que atacan hortalizas, granos, cereales, plantas ornamentales y frutales, principalmente cuando se encuentran almacenados (Feng y Zheng, 2007; Fernando *et al.*, 2007; Andersen *et al.*, 2001; Rosslenbroich y Stuebler, 2000). Anteriormente no se había reportado actividad antifúngica de (-)-columbianetina sobre hongos del género *Fusarium*.

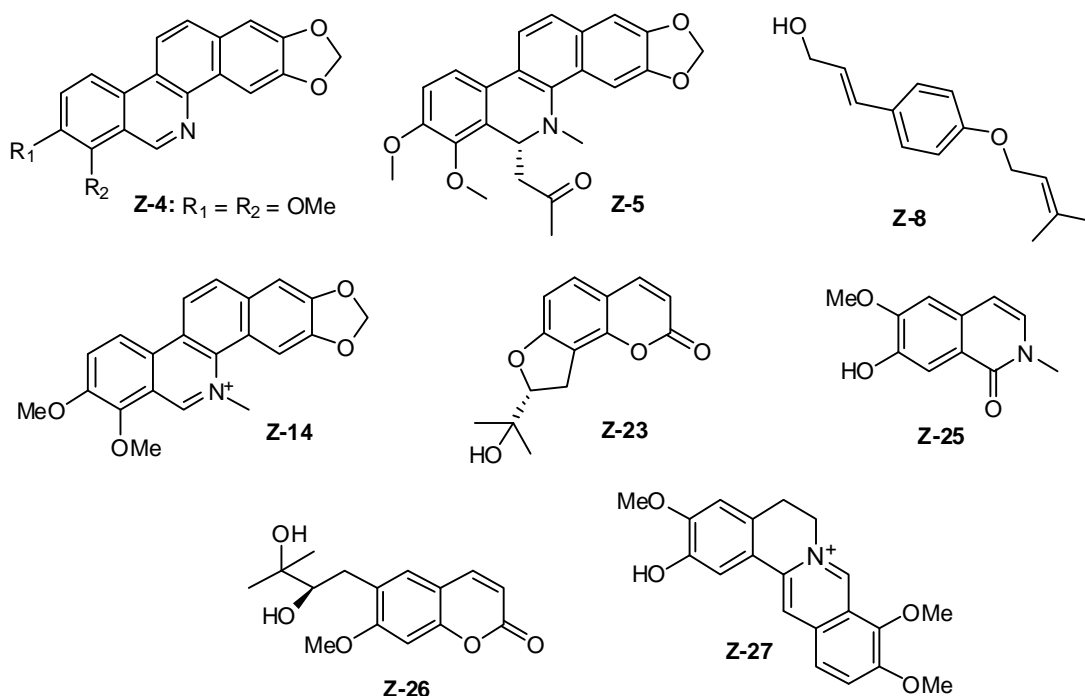


Figura 3.5. Estructuras de los compuestos naturales activos contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Para la cumarina (+)-ulopterol **Z-26** se ha reportado que presenta actividad antifúngica contra dos hongos patógenos humanos: *Curvularia lunata* y *Drechslera rostrata* con CMI = 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sultana, 2000). Los resultados encontrados en este trabajo, constituyen el primer reporte actividad antifúngica de (+)-ulopterol sobre hongos fitopatógenos.

Para norqueleritrina **Z-4**, evofolina-C **Z-8** y thalifolina **Z-25** no se han reportado en la literatura resultados de actividad antifúngica sobre hongos patógenos y/o fitopatógenos, siendo este el primer reporte de esta actividad para los metabolitos secundarios mencionados.

Teniendo en cuenta las estructuras de los alcaloides benzofenantrídicos evaluados y la actividad antifúngica que presentan, se puede deducir que la presencia del catión iminio es importante para la actividad antifúngica pues al comparar el valor de CMI obtenido para la queleritrina **Z-14** (1 μg) con el obtenido para la norqueleritrina **Z-4** (50 μg), se observa que la queleritrina **Z-14** es 50 veces más activa. También, la presencia de un grupo acetoniolo sobre la posición 6 del núcleo benzofenantrídico al parecer podría ser la responsable de la actividad presentada por (-)-6-acetonildihidroqueleritrina **Z-5**.

Ahora, considerando los resultados obtenidos para las sustancias sintéticas, se encuentra que de las 12 sustancias evaluadas, sólo 5 presentaron actividad antifúngica (Figura 3.6). Entre las sustancias que presentaron actividad se encuentran las mezclas de arilbitaldehídos **S-1** y **S-3**, un ariléter **S-2**, la amina **S-14a** y uno de los análogos benzofenantrídicos **S-11**.

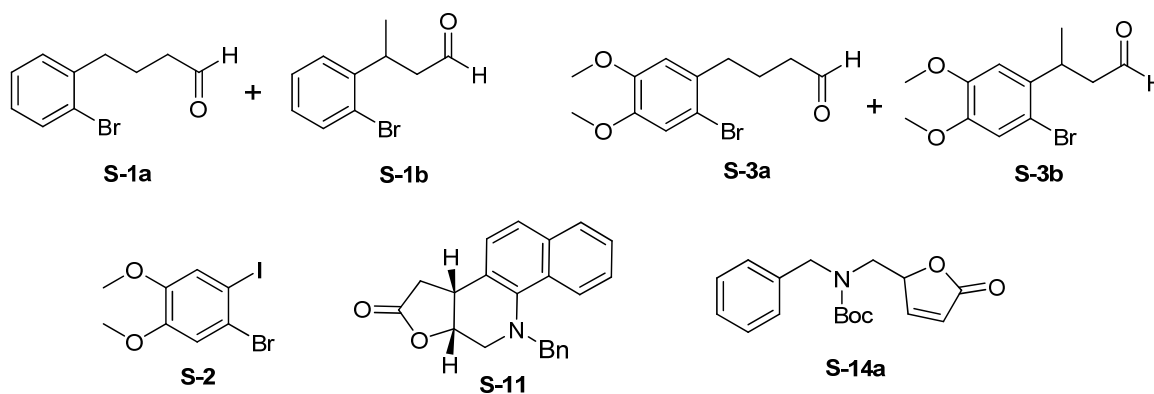


Figura 3.6. Compuestos sintéticos que presentaron actividad antifúngica.

Los aldehídos precursores de los análogos benzofenantrídicos fueron las sustancias sintéticas que presentaron mayor actividad, siendo la mezcla de **S-1** (CMI = 2 μg) la más activa, seguido por la mezcla de aldehídos **S-3** (CMI = 5 μg). En la Figura 3.7 se muestran la fotografías de la placa cromatográfica

obtenida para los compuestos sintéticos después de realizar el ensayo de actividad antifúngica sobre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, revelando con luz UV y vapores de yodo.

Al observar los resultados de actividad antifúngica obtenidos para los análogos de alcaloides sintetizados, se encuentra que sólo el análogo benzofenantridínico **S-11** (CMI = 25 µg) presenta actividad antifúngica, el cual se caracteriza por tener el anillo B aromático a diferencia de su precursor **S-9**, por lo que se puede especular que posiblemente la aromaticidad de dicho anillo potencia considerablemente la actividad contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Faltaría determinar la actividad del otro producto de aromatización **S-12** para ver si continúa la tendencia. Estos resultados constituyen los primeros reportes de actividad antifúngica frente a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* para las sustancias sintetizadas.

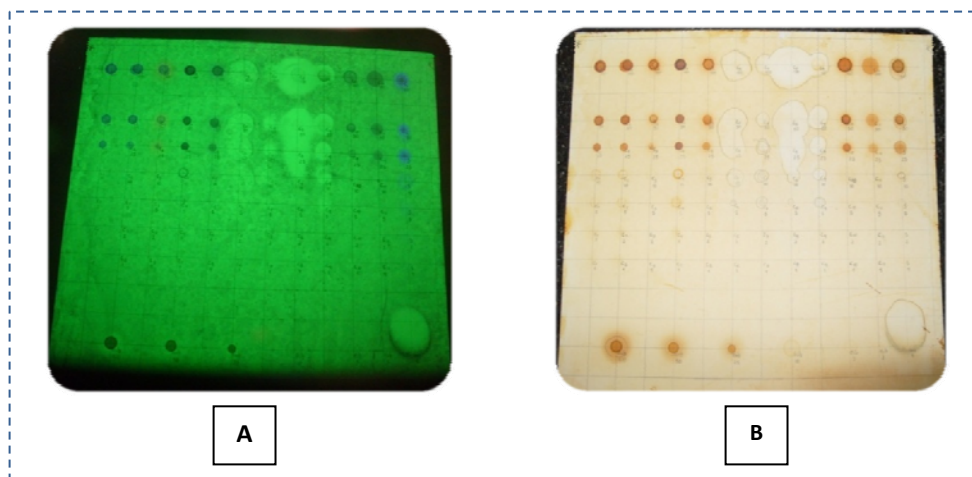


Figura 3.7. Fotografías de una cromatoplatea empleada en el ensayo de actividad antifúngica de los compuestos sintéticos. A) Revelada con luz UV. B) Revelada con vapores de yodo.

Los resultados obtenidos para la evaluación de actividad antifúngica de las sustancias naturales y sintéticas son un aporte importante para el conocimiento de las propiedades biológicas de las muestras evaluadas, confirman y complementan los resultados obtenidos por otros investigadores y constituyen el primer reporte de actividad antifúngica sobre un hongo fitopatógeno para la mayoría de las sustancias ensayadas.

La actividad antifúngica preliminar exhibida por varios de los compuestos evaluados, los hace promisorios para continuar con ensayos de actividad antifúngica más específicos, que permitan obtener resultados más completos, a fin de determinar si estas sustancias pueden llegar a convertirse en nuevos biocontroladores y/o en compuestos plantilla para continuar con la búsqueda de pesticidas ambientalmente amigables y efectivos para combatir las enfermedades que causa *F. oxysporum* f. sp. *lycpersici* en plantaciones de tomate.

3.4. ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades más antiguas que afectan a los seres humanos. Hoy en día esta enfermedad infecciosa sigue siendo una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, una persona muere cada minuto por tuberculosis (Tabuti *et al.*, 2010; Caminero Luna, 2005).

La TB es una enfermedad infecciosa producida por *Mycobacterium tuberculosis*, uno de los cuatro microorganismos que integran el *Complejo Mycobacterium tuberculosis* y que es el responsable de más del 98% de los casos de tuberculosis. *M. tuberculosis*, también denominado bacilo de Koch, es un microorganismo *Gram (+)* con forma de bastón curvado (bacilo), que se comporta como aerobio estricto. Su crecimiento está subordinado a la presencia de oxígeno y al valor del pH circundante, pues resiste valores ácidos de pH. Su multiplicación es muy lenta, oscilando entre 14 y 24 horas (Yancey, 2008; Hitner y Nagle, 2007; Caminero Luna, 2005).

La tuberculosis generalmente afecta al pulmón, pero también puede afectar el sistema nervioso central, los sistemas linfático, circulatorio, genitourinario, gastrointestinal, los huesos, las articulaciones y en algunos casos la piel. Con frecuencia, la reemergencia del microorganismo ocurre cuando disminuye la resistencia a la infección (Hitner y Nagle, 2007; Caminero Luna, 2005).

Uno de los mayores problemas en el tratamiento de la tuberculosis es la resistencia bacteriana a los tratamientos existentes, que por lo general comprenden la administración de tres o cuatro fármacos diferentes por periodos prolongados, a menudo por un año o más. Este problema se debe principalmente a que *M. tuberculosis* ha adquirido la capacidad de mutar fácil y rápidamente,

generando así mecanismos de resistencia ante los medicamentos que en algún momento la controlaron. Por esta razón, la enfermedad se ha convertido nuevamente en una amenaza para las personas de todas las edades y de todos los ámbitos de vida (Tabuti *et al.*, 2010; Navarro y Rodríguez, 2005). Debido a la reemergencia de la tuberculosis, es necesario buscar nuevos agentes terapéuticos que permitan controlar a este microorganismo que cada día cobra más vidas.

3.4.1. Metodología

El ensayo se realizó en el Instituto Nacional de Salud bajo la colaboración del Químico M.Sc. Juan David Guzmán Vásquez.

3.4.1.1. Ceba bacteriana

La cepa bacteriana *Gram (+)* empleada en el ensayo fue *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. La cepa es mantenida en el Instituto Nacional de Salud en medio de cultivo Middlebrook 7H9, OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa, catalasa) en incubadora a 37 °C.

3.4.1.2. Ensayo de actividad antituberculosa por el método de microdilución

En este ensayo se determinó la susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv frente algunos de los compuestos sintetizados, mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), por el método de microdilución estandarizado por el Químico M.Sc. Juan David Guzmán Vásquez, adaptado de la metodología descrita por Yoya (Yoya, 2009).

Se empleó un microensayo colorimétrico basado en la reducción de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (Sigma)) a un formazán insoluble por acción de las bacterias viables. Para cada compuesto se partió de una solución stock de 10 mg/ml en DMSO, a la cual se adicionó medio de cultivo Middlebrook 7H9, OADC, glicerol y tween 80, obteniendo una concentración de 512 µg/mL. En microplacas de 96 pozos se realizó una dilución seriada a partir de la solución stock de 512 µg/mL y medio de cultivo. A cada pozo se le adicionaron 100 µL de una suspensión de *M. tuberculosis* y se dejó incubar por seis días. Luego se adicionaron 22 µL de una mezcla de MTT (5 mg/ml) y tween 80 en relación 12:10 y se incubó por 18 horas. Como control

positivo se empleó rifampicina a 8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ en el medio 7H9. Se realizó un control de esterilidad del medio y un control de crecimiento. Cada experimento se realizó por triplicado. Pasadas las 18 horas se determinó la CMI como la mínima concentración donde no se observa crecimiento micobacteriano.

3.4.2. Resultados y Discusión

Los compuestos sintetizados fueron evaluados frente a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv por el método de microdilución (Yoya, 2009). Este ensayo colorimétrico permitió establecer la concentración mínima inhibitoria del crecimiento micobacteriano (CMI), la cual es determinada mediante la reducción del indicador de viabilidad MTT a un formazán de color violeta cuando hay crecimiento bacteriano. Los resultados de CMI fueron complementados con un ensayo de esterilidad que permitió garantizar que no estaban presentes otros microorganismos que interfirieran en el ensayo. Los valores de CMI obtenidos para los compuestos sintéticos son reportados en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Resultados de actividad antituberculosa obtenidos para los compuestos sintéticos.

COMPUESTO	CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Mezcla de arilbutiraldehídos (S-1)	64
1-Bromo-2-iodo-4,5-dimetoxibenceno (S-2)	64
Mezcla de arilbutiraldehídos (S-3)	16
Enamina cíclica (S-5)	64
Enamina cíclica (S-6)	64
Azaespirociclo (S-7)	64
Análogo benzofenantridinico (S-9a)	> 128
Análogo benzofenantridinico (S-9b)	64
Mezcla de análogos benzofenantridínicos (S-10)	8,0
Análogo benzofenantridinico (S-11)	128
Butenólido (S-13a)	---
RIFAMPICINA	0,13

De acuerdo a los resultados obtenidos, la mezcla de análogos benzofenantridínicos **S-10** (CMI = 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y la mezcla de aldehídos **S-3** (CMI = 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 3.8), fueron las sustancias sintéticas más activas contra *M. tuberculosis*, con valores de CMI mayores que los exhibidos por el control positivo Rifampicina. Teniendo en cuenta la estructura de los compuestos evaluados es posible notar

que los compuestos que presentaron actividad a diferencia de sus similares, presentan grupos metoxilo sobre los anillos aromáticos, lo que al parecer incrementa la actividad antituberculosa de estas sustancias. En la literatura se reporta que para que una sustancia sea considerada promisoriosa los valores de CMI deben ser inferiores o iguales a 6,25 µg/mL, por lo que los resultados obtenidos no son representativos (Orme y colaboradores en 2001). El presente estudio aunque preliminar y sin resultados prometedores es importante porque permite establecer una tendencia estructural que sería base para nuevos estudios en busca de una sustancia más activa.

CONCLUSIONES

El estudio preliminar de actividad antimicrobiana realizado a 38 sustancias entre naturales y sintéticas, contribuye al conocimiento de las propiedades biológicas de las mismas, pues para la mayoría no hay reportes de estudios de bioactividad contra los microorganismos empleados y cuya investigación ha permitido concluir:

- De las 26 sustancias naturales evaluadas contra las cinco cepas bacterianas, 14 presentaron actividad. Entre los compuestos activos se encuentran cuatro alcaloides benzofenantridínicos, dos alcaloides bencilisoquinolínicos, dos alcaloides berberínicos, un alcaloide derivado de prolina, una mezcla de dos alcaloides protoberberínicos, tres cumarinas y un esteroide glicosidado, siendo queleritrina **Z-14**, el compuesto que presentó la más promisoriosa actividad, inhibiendo el crecimiento de las cinco cepas con halos de inhibición entre 8,5 mm y 10,3 mm.
- De las 12 sustancias sintéticas evaluadas, 10 presentaron actividad antibacteriana. La mayoría de estos compuestos solo inhibieron el crecimiento de la bacteria *Gram (-)* *S. typhimurium* MS7953, siendo las mezclas de los arilbutiraldehídos (**S-1** y **S-3**) los que presentaron la mayor actividad frente las cepas *Gram (+)* y *Gram (-)* evaluadas.
- Los compuestos naturales que exhibieron actividad antibacteriana muestran una tendencia a inhibir solo el crecimiento de las cepas bacterianas *Gram (+)*, mientras que la mayoría de los

sustancias sintéticas, solo inhibieron el crecimiento de la bacteria *Gram (-) Salmonella typhimurium* MS7953.

- Se realizó la evaluación de actividad antifúngica por el método de bioautografía directa contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*. para 38 sustancias de origen natural y sintético, de las cuales solo 14 presentaron algún grado de actividad inhibitoria sobre el crecimiento del hongo, siendo las más promisorias, queleritrina **Z-14** con CMI de 1 µg y las mezclas de arilbutiraldehídos **S-1** y **S-3** con CMI de 2 y 5 µg, respectivamente.
- La mezcla de análogos benzofenatrídínicos **S-10** (CMI = 8 µg/mL) y la mezcla de aldehídos **S-3** (CMI = 16 µg/mL) fueron las sustancias sintéticas que presentaron la mayor actividad antituberculosa en el ensayo colorimétrico contra *Mycobacterium tuberculosis*, sugiriendo así, que la presencia de grupos metoxilo como sustituyentes potencia la actividad antimicobacteriana de estas sustancias.

REFERENCIAS

Abad, M. J.; Ansuategui, M.; Bermejo, P. Active Antifungal Substances from Natural Sources. *Arkivoc.* **2007**, 7, 116-145.

Afek, U.; Carmeli, S.; Aharoni, N. Columbianetin, a Phytoalexin Associated with Celery Resistance to Pathogens During Storage. *Phytochemistry.* **1995**, 39, 1347-1350.

Agrios, G.N. Plant Pathology. Quinta Edición. Elsevier Academic Press. USA. **2005**, pp. 4, 5, 386-403.

Andersen, B.; Kroger, E.; Roberts, R. Chemical and Morphological Segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycol. Res.* **2001**, 103, 291-299.

Arciola, C.; Campoccia, D.; Baldassarri, L.; Pirini, V.; Huebner, J.; Montanaro, L. The Role of *Enterococcus faecalis* in Orthopaedic Peri-implant Infections Demonstrated by Automated Ribotyping and Cluster Analysis. *Biomaterials.* **2007**, 28, 3987-3995.

Bell, C.; Kyriakides, A. *Salmonella: A Practical Approach to the Organism and its Control in Foods*. Blackwell Publishing Ltda. **2002**, pp. 1-25.

Benin, A. L.; Dowell, S. F. *Antibiotic Resistance and Implications for the Appropriate Use of Antimicrobial Agents*. En A. Mainous; C. Pomeroy, (Eds), *Management of Antimicrobials in Infectious Diseases: Impact of Antibiotic Resistance*. Humana Press. USA. **2001**, pp. 13-18.

Biswas, S.; Roul, D.; Rolain, J. A Bioinformatic Approach to Understanding Antibiotic Resistance in Intracellular Bacteria Through Whole Genome Analysis. *Int. J. Antimicro. Ag.* **2008**, 32, 207-220.

Brands, D. *Deadly Diseases and Epidemics: Salmonella*. Chelsea House Publishers. USA. **2006**, pp. 14-17.

Buchmeier, N.; Heffron, F. Intracellular Survival of Wild-Type *Salmonella typhimurium* and Macrophage-Sensitive Mutants in Diverse Populations of Macrophages. *Infect. Immun.* **1989**, 57, 1-7.

Caminero Luna, J. A. *Tuberculosis Pulmonar*. En P. Cabrera Navarro, F. Rodríguez de Castro, (Eds), *Manual de Enfermedades Respiratorias*. Segunda edición, Unión Internacional Contra la Tuberculosis y las Enfermedades Respiratorias. París – Francia, **2005**, pp. 321-334.

Chaaib, K. F. *Investigation Phytochimique d'une Brosse à Dents Africaine Zanthoxylum zanthoxyloides (Lam.) Zepernick et Timler (Syn. Fagara zanthoxyloides L.) (Rutaceae)*. Thèse de doctorat. Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne. Francia. **2004**, pp. 49-50.

Donnenberg, M. S. (Ed), *Escherichia coli: Virulence Mechanisms or Versatile Pathogen*. Elsevier. Londres. **2002**, pp. xxi-xxv.

Elsinghorst, E. A. *Enterotoxigenic Escherichia coli*. En M. S. Donnenberg (Ed), *Escherichia coli: Virulence Mechanisms or Versatile pathogen*. Elsevier. Londres. **2002**, p. 171.

Feng, W.; Zheng, X. Essential Oils to Control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. *Food Control*. **2007**, *18*, 1126-1130.

Fernando, W. G. D.; Nakkeeran, S.; Zhang, Y.; Savchuk, S. Biological Control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* Species on Canola Petals. *Crop Prot.* **2007**, *26*, 100-107.

Fields, P.; Swanson, R.; Haidaris, C.; Heffron, F. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot Survive within the Macrophage are Avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1986**, *83*, 5189-5193.

Flannagan, S. E.; Clewell, D. B.; Sedgley, C. M. A "Retrocidal" Plasmid in *Enterococcus faecalis*: Passage and Protection. *Plasmid*, **2008**, *59*, 217-230.

François, P.; Scherl, A.; Hochstrasser, D.; Schrenzel, J. Proteomic Approaches to Study *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *J. Proteomics*, **2010**, *73*, 701-708.

Garcés de Granada, E.; Orozco de Amézquita, M.; Bautista, G. R.; Valencia, H. *Fusarium oxysporum*: El Hongo que Nos Falta Conocer. *Acta Biol. Colomb.*, **2001**, *6*, 7-21.

Garcia, M. I.; Le Bouguéneq, C. Role of Adhesion in Pathogenicity of Human Uropathogenic and Diarrhoeogenic *Escherichia coli*. *Bull. Inst. Pasteur.* **1996**, *4*, 201-236.

Gibbons, S. Plants as Source of Bacterial Resistance Modulators and Anti-infective Agents. *Phytochem. Rev.* **2005**, *4*, 63-78.

Grycová, L.; Dostál, J.; Marek, R. Quaternary Protoberberine Alkaloids. *Phytochemistry*. **2007**, *68*, 150-175.

Hadacek, F.; Greger, H. Testing of Antifungal Natural Products: Methodologies, Comparability of Results and Assay Choice. *Phytochem. Anal.* **2000**, *11*, 137-147.

Hitner, H.; Nagle, B. Introducción a la Farmacología. Quinta Edición. McGraw Hill. México. **2007**, pp. 506-507.

Homans, A. L.; Fuchs, A. Direct Bioautography on Thin-layer Chromatograms as a Method for Detecting Fungitoxic Substances. *J. Chromatog.* **1970**, 51, 325-327.

Honeyman, A.; Friedman, H.; Bendinelli, M., (Eds). *Staphylococcus aureus* Infection and Disease. Kluwer Academic Publishers. USA. **2002**, pp. xi-xiii.

Huong, B.; Mahmud, Z.; Neogi, S.; Kassu, A.; Nhien, N.; Mohammad, A.; Yamato, M.; Ota, F.; Lam, N.; Dao, H.; Khan, N. Toxigenicity and Genetic Diversity of *Staphylococcus aureus* Isolated from Vietnamese Ready-to-Eat Food. *Food Control.* **2010**, 21, 166-171.

Iwasa, K.; Kamigauchi, M.; Ueki, M.; Taniguchi, M. Antibacterial Activity and Structure-Activity Relationships of Berberine Analogs. *Eur. J. Med. Chem.* **1996**, 31, 469-478.

Lehrer, R. I.; Rosenman, M.; Harwig, S. S. S. L.; Jackson, R.; Eisenhauer, P. Ultrasensitive Assay for Endogenous Antimicrobial Polypeptides. *J. Immunol. Methods.* **1991**, 137, 167-173.

Leslie, J. F.; Summerell, B. A. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. USA. **2006**, pp. 1, 2, 5-7, 113-118.

Lizcano, M. C. Evaluación de la Actividad Antifúngica del Extracto de Tomillo (*Thymus vulgaris*) Contra *Botrytis cinérea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Tesis de grado, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, **2007**, pp. 24-27.

Lobova, T.; Barkhatov, Y.; Salamatina, O.; Popova, L. Multiple Antibiotic Resistance of Heterotrophic Bacteria in the Littoral Zone of Lake Shira as an Indicator of Human Impact in the Ecosystem. *Microbiol. Res.*, **2008**, 163, 152-160.

Malani, P. N.; Kauffman, C. A.; Zervos, M. J. *Enterococcal Disease, Epidemiology, and Treatment*. En M. Gilmore (Ed), *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*. ASM Press. USA. **2002**, pp. 385-408.

Marques, J. V.; Kitamura, R. O. S.; Lago, J. H. G.; Young, M. C. M.; Guimarães, E. F.; Kato, M. J. Antifungal Amides from *Piper scutifolium* y *Piper hoffmanseggianum*. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 2036-2039.

Márquez, E. Análisis de los Patrones de Resistencia a Antibióticos en *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus agalactiae* Aislados en Muestras Clínicas de Nuestro Medio. Tesis de Doctorado, Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología, Universidad de Granada. España. **2008**, pp. 2-4.

Matos, O. C.; Baeta, J.; Silva, M. J.; Pinto, C. P. Sensitivity of *Fusarium* Strains to *Chelidonium majus* L. Extracts. *J. Ethnopharm.* **1999**, 66, 151-158.

Meng, F.; Zuo, G.; Hao, X.; Wang, G.; Xiao, H.; Zhang, J.; Xu, G. Antifungal Activity of the Benzo[c]phenanthridine Alkaloids from *Chelidonium majus* Linn Against Resistant Clinical Yeast Isolates. *J. Ethnopharm.* **2009**, 125, 494-496.

Newton, S. M.; Lau, C.; Gurcha, S. S.; Bersa, G. S.; Wright, C. W. The Evaluation of Forty-Three Plant Species for *in vitro* Antimycobacterial Activities; Isolation of Active Constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. *J. Ethnopharm.* **2002**, 79, 57-67.

Núñez, B.; Salazar, R. Uso Racional de Antibióticos. Módulo 2. Línea Antibiótica – Bristol Mayers Squibb. Universidad Central de Ecuador. Ecuador. **2005**, pp. 4-5.

Okunade, A. L.; Elvin-Lewis, M. P. F.; Lewis, W. H. Natural Antimycobacterial Metabolites: Current Status. *Phytochemistry.* **2004**, 65, 1017-1032.

Orme, I. Search for New Drugs for Treatment of Tuberculosis. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2001**, 45, 1943-1946.

Patrick, G. An Introduction to Medicinal Chemistry. Segunda Edición. Oxford University Press. USA. **2001**, pp. 429-431.

Piérard, D.; Vandebussche, H.; Verschraegen, I., Lauwers, S. Screening for *Staphylococcus aureus* with a Reduced Susceptibility to Vancomycin in: a Belgian hospital. *Pathol Biol.* **2004**, 52, 486-488.

Rao, G-X.; Zhang, S.; Wang, H-M.; Li, Z-M.; Gao, S.; Xu, G-L. Antifungal Alkaloids from the Fresh Rattan Stem of *Fibraurea recisa* Pierre. *J. Ethnopharm.* **2009**, 123, 1-5.

Rosslénbroich, H-J.; Stuebler, D. *Botrytis cinerea* – History of Chemical Control and Novel Fungicides for its Management. *Crop Prot.* **2000**, 19, 557-561.

Scheel, D.; Nuemberger, T. *Signal Transduction in Plant Defense Responses to Fungal Infection*. En Z. K. Punja, (Ed), *Fungal Disease Resistance in Plants: Biochemistry, Molecular Biology, and Genetic Engineering*. Food Products Press. New York. **2004**, pp. 1-5.

Silva-Carvalho, M. C.; Bonelli, R. R.; Rodrigues, R. R.; Moreira, S.; Galvão dos Santos, L. C.; Conceição, M. S.; Mello, S. J.; Carballido, J. M.; Rito, P. N.; Vieira, V. V.; Teixeira, L. A.; Figueiredo, A. M. S. Emergence of Multiresistant Variants of the Community-acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Lineage ST1-CSSmecIV in 2 Hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn. Micr. Infec. Dis.* **2009**, 65, 300-305.

Sultana, N. Phytochemical and Structural Studies on the Chemical Constituents of *Adhatoda vasica*, *Sarcococca saligna* and *Skimmia laureola*. Tesis de Doctorado, International Center for Chemical Sciences. University of Karachi. Pakistán. **2000**, p. 176.

Tabuti, J. R. S.; Kukunda, C. B.; Waako, P. J. Medicinal Plants Used by Traditional Medicine Practitioners in the Treatment of Tuberculosis and Related Ailments in Uganda. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, 127, 130-136.

Taulo, S.; Wetlesen, A.; Abrahamsen, R. K.; Narvhus, J. A.; Mkakosya, R. Quantification and Variability of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Cross-Contamination During Serving and Consumption of Cooked Thick Porridge in Lungwena Rural Households, Malawi. *Food Control.* **2009**, 20, 1158-1166.

Valgas, C.; Machado de Souza, S.; Smania, E.; Smania, A. Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. *Braz. J. Microbiol.* **2007**, 38, 369-380.

Van Eiff, C.; Peters, G.; Proctor, A. R. *Small Colony Variants of Staphylococcus aureus: Mechanism for Production, Biology of Infection, and Clinical Significance*. En A. Honeyman, H. Friedman, M. Bendinelli, (Eds). *Staphylococcus aureus* Infection and Disease. Kluwer Academic Publishers. USA. **2002**, pp. 17-18.

Wang, X.; Yao, X.; Zhu, Z.; Tang, T.; Dai, K.; Sadovskaya, I.; Flahaut, S.; Jabbouri, S. Effect of Berberine on *Staphylococcus epidermis* Biofilm Formation. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2009**, 34, 60-66.

Weber, A. D. Estudo Fitoquímico e da Actividade Biológica de *Zanthoxylum rhoifolium*. Tesis de Maestría. Centro de Ciencias Naturais e Exatas. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil. **2005**, pp. 116-121.

Yancey, D. Tuberculosis. Twenty-First Century Books. USA, **2008**, pp. 31-43.

Yoya, G.; Bedos, F.; Constant, P.; Duran, H.; Daffé, M.; Baltas, M. Synthesis and Evaluation of a Novel Series of Pseudo-Cinnamic Derivatives as Antituberculosis Agents. *Bioorga. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 341-343.

RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

Continuar con el proceso de aislamiento, purificación e identificación de los constituyentes presentes en las fracciones y otros órganos vegetativos no incluidos en esta investigación a fin de completar el estudio fitoquímico de las especies *Z. quinduense* y *Z. monophyllum*.

Es necesario continuar con las investigaciones fitoquímicas en especies del género *Zanthoxylum* aprovechando su gran distribución en Colombia y que la mayoría no presenta ningún tipo de investigación o tienen estudios parciales.

Dado el gran número de compuestos aislados, purificados e identificados en las dos especies estudiadas, permite su utilización como patrones en estudios futuros de dereplicación para determinar los constituyentes presentes en otras especies del género *Zanthoxylum*.

La ruta de síntesis desarrollada es la base de futuras investigaciones para realizar la preparación de diversos análogos a fin de validar la ruta sintética y así obtener una serie de compuestos que permitan desarrollar estudios de estructura-actividad.

Al continuar con el desarrollo de la ruta sintética mediante modificaciones estructurales sencillas sobre el núcleo base de los análogos sintetizados es posible obtener compuestos con mayor analogía a los alcaloides benzofenantridínicos aislados en este trabajo y de esta forma poder adelantar estudios comparativos de estructura-actividad más precisos entre los alcaloides aislados y los análogos sintetizados.

Teniendo en cuenta la tendencia antimicrobiana presentada por algunos de los compuestos evaluados, es necesario continuar con la realización ensayos más específicos para determinar cuáles son los más promisorios de acuerdo a su relación de actividad-toxicidad.

Es necesario seguir realizando otros ensayos de actividad biológica a fin de seguir contribuyendo a la caracterización de las propiedades biológicas de las sustancias aisladas y sintetizadas.