



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad  
antimalárica de  
*Piper cumanense* y *Piper holtonii***

**Maritza Adelina Rojas Cardozo Q.F., M.Sc.**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia  
Bogotá D.C., Colombia  
2012



# **Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antimalárica de *Piper cumanense* y *Piper holtonii***

**Maritza Adelina Rojas Cardozo Q.F., M.Sc.**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Doctor en Ciencias Farmacéuticas**

Director:  
Javier Rincón Velandia, Q.F., Ph.D.

Codirector:  
Giovanny Garavito Cárdenas, Q.F., M.Sc., Ph.D.

Línea de investigación:  
Fitoquímica y farmacognosia

Grupo de investigación:  
Principios Bioactivos de Plantas Medicinales  
Departamento de Farmacia-Universidad Nacional de Colombia

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia  
Bogotá D.C., Colombia

2012



*A mis padres y hermanos*



## Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia y al Departamento de Farmacia por la formación profesional y por abrirme sus puertas durante estos años.

A los profesores del Departamento de Farmacia por la formación y respaldo.

Al Grupo de Investigación Principios Bioactivos de Plantas Medicinales del Departamento de Farmacia por el apoyo con sus recursos humanos, físicos y financieros para el desarrollo de este trabajo.

Al grupo de Investigación Fametra-Farmacología de medicina tradicional y popular, por el apoyo con recursos físicos y financieros para la realización de los ensayos de actividad biológica.

Al programa de Becas de estudiantes sobresalientes de posgrado de la Universidad Nacional de Colombia por los recursos proporcionados.

A la División de Investigación sede Bogotá (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia por apoyo financiero al Proyecto titulado “Estudio fitoquímico, actividad vasodilatadora y actividad antioxidante de *Piper cumanense* y *Piper holtonii*”

Al Profesor Massuo Jorge Kato, Lidya Yamaguchi y a todos los integrantes del grupo LQPN del Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo- Brasil por su orientación en los análisis fitoquímicos y por acogerme en su laboratorio.

A los profesores del área de Fitoquímica y Química medicinal del Departamento de Farmacia por apoyarme y respaldarme durante la etapa final del trabajo.

A los funcionarios de la Universidad Nacional de Colombia por su colaboración.

A mis compañeras y amigas Paola Cárdenas, Johanna Morantes, Yenny Lozano, Milena Suta, Sara Giraldo, Nydia Lara, Jimena Ospina y Marcela Aragón por su apoyo, colaboración y amistad.

Al Profesor Giovanni Garavito por la orientación y colaboración en la realización de los ensayos de actividad biológica.

Un agradecimiento especial al profesor Javier Rincón Velandia por su valiosa orientación, apoyo incondicional, dedicación a este trabajo y por su amistad.

A todas las personas que de una u otra manera hicieron parte en la realización de este proyecto

A mi familia por el apoyo incondicional.

A Dios

.

.



## Resumen

El uso terapéutico de plantas medicinales es una práctica común en regiones del mundo donde se presenta la malaria y desempeña un papel importante en la prevención y tratamiento de la enfermedad en zonas endémicas. En Colombia se estima que anualmente se presentan más de 60.000 casos de malaria (INS) y en algunas regiones del país se hace uso de preparaciones con plantas medicinales que incluyen especies del género *Piper* para tratar la enfermedad.

En el presente trabajo se realizó la evaluación de la actividad antimalárica *in vitro* e *in vivo* de los extractos etanólicos y de fracciones de diferente polaridad de las especies vegetales *Piper cumanense* y *Piper holtonii* (Piperaceae), lo que permitió identificar fracciones con actividad antiplasmódica y aislar metabolitos secundarios del grupo de los fenilpropanoides, flavonoides, ácidos benzoicos, esteroides y terpenos. Adicionalmente se caracterizaron microscópicamente las hojas de las dos especies, realizando cortes transversales y longitudinales.

De *P. cumanense* se aisló el cromeno ácido gaudichaudiánico, el ácido 4-metoxi-3-(3-metil-2-butenil)-benzoico, la 2',4',6'-trihidroxi-dihidrochalcona y 3 flavonoides C-glicósidos. Además se aislaron  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol-3-O-glucósido y se detectaron por CG-MS 6 terpenoides.

De *P. holtonii* se aislaron los fenilpropanoides apiol y dilapiol como metabolitos mayoritarios y los flavonoides kaempferol-3-O-rutinósido y rutina, así como  $\beta$ -sitosterol y sitosterol-3-O- $\beta$ -glucósido.

**Palabras clave:** Piperaceae, *Piper cumanense*, *Piper holtonii*, antiplasmódico, flavonoides, cromeno, terpenoides.

## Abstract

The therapeutic use of medicinal plants is a common practice in endemic from malaria regions in the world and plays an important role in the prevention and treatment of disease. In Colombia is estimated to occur annually more than 60,000 cases of malaria and in some regions it herbal preparations are used to treat the disease. In this work, *in vitro* and *in vivo* evaluation of antimalarial activity of ethanolic extracts and different fractions of *P. cumanense* and *P. holtonii* (Piperaceae) results in the identification of active antiplasmodial fractions and also in the isolation of secondary metabolites as phenylpropanoids, flavonoids, benzoic acids, steroids and terpenes. Additionally the leaves of the two species were characterized microscopically.

In *P. cumanense* was isolated gaudichaudianic acid, 4-methoxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-benzoic, 2', 4', 6'-trihydroxydihydrochalcone and C-glycosides flavonoids. In addition were isolated  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol-3-O-glucoside and were detected by GC-MS 6 terpenoids.

In *P. holtonii* was isolated as major metabolites, phenylpropanoids, apiol and dillapiole, and flavonoids kaempferol-3-O-rutinoside, rutine, sitosterol and  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -glucoside.

**Keywords:** Piperaceae, *Piper cumanense*, *Piper holtonii*, antiplasmodial, flavonoids, cromhene, terpenoids.

## Contenido

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>VII</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>X</b>
<b>Contenido</b> .....	<b>XI</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XV</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XX</b>
<b>Lista de ecuaciones</b> .....	<b>XXI</b>
<b>Lista de símbolos y abreviaturas</b> .....	<b>XXII</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>3</b>
1.1    Objetivo general .....	3
1.2    Objetivos específicos .....	3
<b>Marco teórico</b> .....	<b>5</b>
2.1    Malaria .....	5
2.1.1    Antimaláricos .....	7
2.1.2    Malaria en cifras .....	9
2.2    Especies del género <i>Piper</i> .....	11
<b>Equipos, materiales y métodos</b> .....	<b>19</b>
3.1    Equipos .....	19
3.2    Materiales y solventes .....	20
3.3    Colección del material vegetal.....	21
3.4    Caracterización microscópica del material vegetal .....	21
3.5    Elaboración de extractos y fraccionamiento .....	21

---

3.6	Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios.....	22
3.7	Ensayos de actividad antimalárica .....	23
3.7.1	Actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> frente a <i>P. falciparum</i> .....	24
3.7.2	Actividad hemolítica .....	26
3.7.3	Evaluación de la actividad antimalárica <i>in vivo</i> .....	27
3.7.4	Prueba de inhibición de la biocrystalización del heme (FBIT) .....	28
<b>Resultados y Discusión.....</b>		<b>31</b>
4.1	Caracterización microscópica del material vegetal.....	31
4.1.1	<i>Piper cumanense</i> .....	31
4.1.2	<i>Piper holtonii</i> .....	34
4.2	Extracción y fraccionamiento .....	36
4.3	Evaluación biológica de extractos y fracciones .....	37
4.4	Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios de <i>Piper cumanense</i> .....	46
4.4.1	<i>P. cumanense</i> fracción en Diclorometano (PcD) .....	46
4.4.2	<i>P. cumanense</i> fracción en hexano (PcH).....	47
4.4.3	<i>P. cumanense</i> fracción metanólica (PcM).....	47
4.4.4	<i>P. cumanense</i> fracción butanol (PcB).....	49
4.5	Identificación de metabolitos de <i>P. cumanense</i> .....	50
4.5.1	Identificación del compuesto C1.....	50
4.5.2	Análisis de la fracción PcH-2.....	59
4.5.3	Identificación de la muestra C2 .....	61
4.5.4	Identificación del compuesto C3.....	65
4.5.5	Identificación del compuesto C4.....	70
4.5.6	Identificación del compuesto C5.....	75
4.5.7	Identificación del compuesto C6.....	78
4.5.8	Identificación del compuesto C7.....	84
4.5.9	Identificación del compuesto C8.....	90
4.6	Aislamiento y purificación de metabolitos de <i>Piper holtonii</i> .....	95
4.6.1	<i>P. holtonii</i> fracción en diclorometano (PhD).....	95

---

4.6.2	<i>P. holtonii</i> fracción en hexano (PhH).....	95
4.6.3	<i>P. holtonii</i> fracción en Butanol (PhB).....	95
4.7	Identificación de metabolitos de <i>Piper holtonii</i> .....	96
4.7.1	Identificación de los compuestos H1 y H2.....	96
4.7.2	Identificación de la muestra H3.....	96
4.7.3	Identificación del compuesto H4.....	103
4.8	Evaluación de la actividad antimalárica de los metabolitos aislados.....	110
	<b>Conclusiones.....</b>	<b>119</b>
	<b>Recomendaciones.....</b>	<b>121</b>
	<b>Anexo 1: Protocolo para el cultivo de <i>P. falciparum</i>.....</b>	<b>123</b>
	<b>Anexo 2: Protocolo para la realización del ensayo de actividad antiplasmódica <i>in vitro</i>.....</b>	<b>127</b>
	<b>Anexo 3: Protocolo del ensayo de Inhibición de la biomineralización de ferriprotoporfirina IX (FBIT).....</b>	<b>131</b>
	<b>Referencias.....</b>	<b>135</b>



## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
.....	
Figura 2-1. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> . Adaptado de <a href="http://www.cdc.gov">http://www.cdc.gov</a> .....	6
Figura 2-2. Estructura de la quinina.....	7
Figura 2-3. Estructura de la atebriina y cloroquina .....	8
Figura 2-4. Estructura de proguanil y pirimetamina .....	8
Figura 2-5. Estructura de artemisinina y derivados.....	9
Figura 2-6. Incidencia mundial estimada por país de casos de malaria por cada mil habitantes (OMS, 2010). .....	10
Figura 2-7. Distribución de casos confirmados de malaria en Colombia por cada mil habitantes (WHO, 2011).....	11
Figura 2-8. Especie vegetal <i>Piper cumanense</i> (Piperaceae) .....	12
Figura 2-9. Ejemplos de amidas aisladas de especies de <i>Piper</i> .....	13
Figura 2-10. Ejemplos de flavonoides aislados de especies de <i>Piper</i> .....	13
Figura 2-11. Ejemplos de fenilpropanoides aislados de especies de <i>Piper</i> .....	14
Figura 2-12. Ejemplos de lignanos y neolignanos aislados de especies de <i>Piper</i> .....	14
Figura 2-14. Amidas con actividad antiplasmódica aisladas de <i>P. sarmentosum</i> .....	16
Figura 2-15. Metabolitos con actividad antiplasmódica aislados de <i>P. tricuspe</i> .....	16
Figura 2-16. Metabolitos con actividad antiplasmódica aislados de <i>P. glabratum</i> , <i>P. acutifolium</i> y <i>P. peltatum</i> .....	17
Figura 2-17. Metabolitos con actividad antiplasmódica de <i>P. hostmannianum</i> .....	17
Figura 2-18. Chalcona con actividad antiplasmódica aislada de <i>P. hispidum</i> .....	18
Figura 3-1. Fraccionamiento del extracto etanólico de <i>P. cumanense</i> y <i>P. holtonii</i> .....	22
Figura 3-2. Secuencia de procedimientos seguidos en el estudio de las fracciones de <i>P. cumanense</i> y <i>P. holtonii</i> .....	23
Figura 3-3. Distribución de muestras en el ensayo <i>in vitro</i> frente a <i>P. falciparum</i> . .....	25
Figura 4-1. Epidermis superior e inferior de <i>P. cumanense</i> .....	32
Figura 4-2. Corte transversal de la lámina foliar de <i>P. cumanense</i> . .....	32

---

Figura 4-3. Corte transversal de la nervadura principal <i>P. cumanense</i> .....	33
Figura 4-4. Inclusiones no protoplasmáticas de <i>P. cumanense</i> .....	33
Figura 4-5. Epidermis inferior de <i>P. holtonii</i> .....	34
Figura 4-6. Corte transversal de la lámina foliar <i>P. holtonii</i> .....	34
Figura 4-7. Corte transversal de la nervadura principal de <i>P. holtonii</i> .....	35
Figura 4-8. Grupos de metabolitos detectados por CCD en las fracciones de <i>P. cumanense</i> y <i>P. holtonii</i> .....	37
Figura 4-9. Porcentaje de inhibición vs. Log de la concentración del extracto y fracciones de <i>P.cumanense</i> en el ensayo de actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> frente a <i>P. falciparum</i> <sup>a</sup> .....	38
Figura 4-10. Porcentaje de inhibición vs. Log de la concentración del extracto y fracciones de <i>P. holtonii</i> en el ensayo de actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> frente a <i>P. falciparum</i> <sup>a</sup> ....	40
Figura 4-11. Porcentaje de Inhibición vs Log de la concentración de Cloroquina en el ensayo de actividad antiplasmódica <i>in vitro</i> .....	41
Figura 4-12. Porcentaje de inhibición de la parasitemia en la evaluación de actividad antimalárica <i>in vivo</i> (Test de Peters). .....	42
Figura 4-13. Porcentaje de inhibición vs Log de la concentración de los ensayos de FBIT de fracciones de <i>P. cumanense</i> .....	43
Figura 4-14. Cuadro resumen de actividad biológica de fracciones de <i>P. cumanense</i> ....	44
Figura 4-15. Cuadro resumen de actividad biológica de fracciones de <i>P. holtonii</i> .....	44
Figura 4-16. Espectro IR de C1 (celda de NaCl) .....	50
Figura 4-17. Espectro RMN <sup>1</sup> H de C1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	51
Figura 4-18. Espectro RMN <sup>13</sup> C de C1 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	52
Figura 4-19. Espectro DEPT 135 de C1 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	52
Figura 4-20. Espectro <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY de C1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	53
Figura 4-21. Espectro HMQC de C1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	54
Figura 4-22. Espectro HMQC de C1- Expansión 0.6- 3.7 ppm (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	55
Figura 4-23. Espectro HMBC de C1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ; expansión 3.2-8.5 ppm) .....	55
Figura 4-24. Espectro HMBC de C1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ; expansión 1.0-3.7 ppm) .....	56
Figura 4-25. Espectro NOESY de C1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	57
Figura 4-26. Perfil cromatográfico por CG de la fracción PcH-2 .....	59
Figura 4-27. Espectros de masas de los principales picos de la fracción PcH-2 .....	59
Figura 4-28. Principales metabolitos detectados por CG-MS en la fracción de PcH-2.....	61



---

Figura 4-29. Espectro RMN $^1\text{H}$ de la muestra C2 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	62
Figura 4-30. Espectro RMN $^{13}\text{C}$ y DEPT 135 de C2 (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	63
Figura 4-31. Espectro de masas de la muestra C2.....	63
Figura 4-32. Espectro IR de C3 (KBr).....	65
Figura 4-33. Espectro RMN $^1\text{H}$ de C3 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	66
Figura 4-34. Espectro RMN $^{13}\text{C}$ de C3 (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	67
Figura 4-35. Espectro HMQC de C3 ( $\text{CDCl}_3$ ).....	68
Figura 4-36. Espectro HMBC de C3 ( $\text{CDCl}_3$ ) .....	68
Figura 4-37. Espectro de HRMS $[\text{M}-\text{H}]^-$ de C3.....	69
Figura 4-38. Espectro IR de C4 (KBr).....	70
Figura 4-39. Espectro RMN $^1\text{H}$ de C4 (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	71
Figura 4-40. Espectro RMN $^{13}\text{C}$ y DEPT 135 de C4 (75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) .....	71
Figura 4-41. Espectro HMQC de C4 (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	72
Figura 4-42. Espectro HMBC de C4 (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) .....	73
Figura 4-43. Espectro HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ de C4, $m/z$ : 259.0980 (calcd. $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_4$ ).....	74
Figura 4-44. Espectro IR de C5 (KBr).....	75
Figura 4-45. Espectro RMN $^1\text{H}$ de C5a (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	76
Figura 4-46. Espectro RMN $^{13}\text{C}$ de C5a (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	76
Figura 4-47. Espectro IR de C6 (KBr).....	78
Figura 4-48. Espectro RMN $^1\text{H}$ de C6 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ ) .....	79
Figura 4-49. Espectro RMN $^{13}\text{C}$ y DEPT 135 de C6 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ ) .....	80
Figura 4-50. Espectro $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY de C6 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ ) .....	81
Figura 4-51. Espectro HMQC de C6 ( $\text{DMSO}-d_6$ ).....	81
Figura 4-52. Espectro HMBC de C6 ( $\text{DMSO}-d_6$ ).....	82
Figura 4-53. Espectro IR de C7 (KBr).....	84
Figura 4-54. Espectro RMN $^1\text{H}$ de C7 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ ) .....	85
Figura 4-55. Espectro RMN $^{13}\text{C}$ de C7 (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ ) .....	85
Figura 4-56. Espectro $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY de C7 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ ) .....	86
Figura 4-57. Espectro HMQC de C7 ( $\text{DMSO}-d_6$ ).....	87
Figura 4-58. Espectro HMBC de C7 ( $\text{DMSO}-d_6$ ).....	87
Figura 4-59. Cromatograma HPLC y espectro de HRMS de C7 .....	88
Figura 4-60 . Espectro IR de C8 (KBr).....	90
Figura 4-61. Espectro RMN $^1\text{H}$ de C8 (200 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	91
Figura 4-62. Espectro RMN $^{13}\text{C}$ de C8 (50 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) .....	92

---

Figura 4-63. Espectro de HMQC de C8 (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) .....	92
Figura 4-64. Espectro de HMBC de C8 (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	93
Figura 4-65. Cromatograma por HPLC (a) y espectro de masas de HRMS de C8 (b).....	93
Figura 4-66. Espectro IR de H3 (NaCl) .....	97
Figura 4-67. Espectro RMN <sup>1</sup> H de la muestra H3 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	98
Figura 4-68. Espectro RMN <sup>13</sup> C de la muestra H3 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	99
Figura 4-69. Espectro <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY de la muestra H3 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	99
Figura 4-70. Espectro HMQC de la muestra H3 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	100
Figura 4-71. Espectro de HMBC de la muestra H3 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	100
Figura 4-72. Cromatograma de la muestra H3 por CG y espectros de masas de H3-1 y H3-2.....	101
Figura 4-73. Espectro IR de H4 (KBr). .....	103
Figura 4-74. Espectro RMN <sup>1</sup> H de H4 (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) .....	104
Figura 4-75. Espectro RMN <sup>13</sup> C de H4 (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) .....	104
Figura 4-76. Espectro HMQC de H4 (CD <sub>3</sub> OD) .....	105
Figura 4-77. Espectro HMBC de H4 (CD <sub>3</sub> OD).....	106
Figura 4-78. Cromatograma por HPLC y espectro de masas de H4.....	106
Figura 4-79. Espectro de masas de H5.....	108
Figura 4-80. Compuestos aislados de <i>P. cumanense</i> .....	109
Figura 4-81. Compuestos aislados de <i>P. holtonii</i> .....	110
Figura 4-82. Porcentaje de inhibición vs Log concentración de C1 y C3 aislados de <i>Piper cumanense</i> en el ensayo de actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> frente a <i>P. falciparum</i> <sup>a</sup> ....	111
Figura 4-83. Porcentaje de inhibición vs Log concentración de C4 y CQ en el ensayo de actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> frente a <i>P. falciparum</i> <sup>a</sup> .....	112
Figura 5-1. Ácidos benzoicos aislados de especies de <i>Piper</i> evaluados frente a <i>P. falciparum</i> .....	115



## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 3-1.</b> Criterios de clasificación en nivel de actividad en el modelo <i>in vitro</i> sobre cultivo de <i>P. falciparum</i> (Adaptado de Rasoanavio <i>et al.</i> , 2004).....	26
<b>Tabla 3-2.</b> Criterios de clasificación en nivel de actividad en el modelo <i>in vivo</i> (Do. 250 mg/Kg/día) (Rasoanavio <i>et al.</i> , 2004).....	28
<b>Tabla 4-1.</b> Valores de CI <sub>50</sub> (µg/mL) obtenidos en el ensayo de actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> frente a <i>P. falciparum</i> para cada una de las fracciones obtenidas de <i>Piper cumanense</i> . .....	38
<b>Tabla 4-2.</b> Valores de CI <sub>50</sub> (µg/mL) obtenidos en el ensayo de actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> frente a <i>P. falciparum</i> para cada una de las fracciones de <i>Piper holtonii</i> . .....	39
<b>Tabla 4-3.</b> Valores de parasitémia obtenidos en el ensayo de actividad antiparasitaria <i>in vivo</i> frente a <i>P. berghei</i> para cada una de las fracciones obtenidas de <i>P. cumanense</i> y <i>P. holtonii</i> (Do. 250 mg/Kg/día).....	42
<b>Tabla 4-4.</b> Ensayo de FBIT (CI <sub>50</sub> ) de fracciones de <i>P. cumanense</i> y <i>P. holtonii</i> .....	43
<b>Tabla 4-5.</b> Comparación de los datos de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C de C1 con los datos de la literatura para ácido gaudichaudiánico (Lago <i>et al.</i> , 2004) .....	58
<b>Tabla 4-6.</b> Metabolitos identificados en la fracción Pch-2.....	60
<b>Tabla 4-7.</b> Comparación de datos de RMN <sup>13</sup> C de C2 con datos de la literatura para β-sitosterol y estigmasterol (Kojima <i>et al.</i> , 1990) .....	64
<b>Tabla 4-8.</b> Comparación de los datos de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C de C3 con los datos de la literatura para el ácido 4-metoxi-3-(3-metil-2-butenil)-benzoico (Cao <i>et al.</i> , 2003).....	69
<b>Tabla 4-9.</b> Comparación de los datos de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C de C4 con datos de la literatura para 2',4',6'-trihidroxi-dihidrochalcona (Mustafa <i>et al.</i> , 2003).....	74
<b>Tabla 4-10.</b> Comparación de los datos de RMN <sup>13</sup> C de C5a con datos de la literatura para sitosterol-3-O-β-glucopiranosil (Kojima <i>et al.</i> , 1990).....	77
<b>Tabla 4-11.</b> Comparación de los datos de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C de C6 con datos de la literatura para Vitexina (Zhou <i>et al.</i> , 2005).....	83

<b>Tabla 4-12.</b> Comparación de los datos de RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de C7 con datos de la literatura para Orientina (Zhou <i>et al.</i> , 2005).....	89
<b>Tabla 4-13.</b> Comparación de los datos de RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de C8 con datos de la literatura para Isovitexina (Pedras <i>et al.</i> , 2003). .....	94
<b>Tabla 4-14.</b> Comparación de los datos de RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de H3 con datos de la literatura para apiol y dilapiol (Benevides <i>et al.</i> , 1999). .....	102
<b>Tabla 4-15.</b> Comparación de los datos de RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de H4 con datos de la literatura para Kaempferol-3-O-rutinosido (Wen-Chi <i>et al.</i> , 2005).....	107
<b>Tabla 4-16.</b> Valores de $\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenidos en el ensayo de actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> frente a <i>P. falciparum</i> y en el ensayo FBIT para los metabolitos aislados de <i>Piper cumanense</i> y <i>Piper holtonii</i> .....	111

## Lista de ecuaciones

	Pág.
<b>Ecuación 3-1.</b> Cálculo de porcentaje parasitemia y porcentaje de inhibición .....	25
<b>Ecuación 3-2.</b> Porcentaje de hemólisis.....	27
<b>Ecuación 3-3.</b> Cálculo de porcentaje de inhibición en el ensayo <i>in vivo</i> .....	28
<b>Ecuación 3-4.</b> Cálculo de porcentaje de inhibición en el ensayo de FBIT .....	29

## Lista de símbolos y abreviaturas

### Abreviaturas

Abreviatura	Término
AcOEt	Acetato de etilo
BuOH	Butanol
C18	Octadecil silano
C8	Octilsilano
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
CL-EM	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
COSY	<i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>
CQ	Cloroquina
d	Doblete
dd	Doble doblete
DEPT	<i>Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
EM	Espectrometría de masas
EMS	Error Medio Estándar
EtOH	Etanol
FBIT	<i>Ferriprotoporphyrin IX Biomineralisation Inhibition Test</i> (Ensayo de Inhibición de la biomineralización de ferriprotoporfirina IX)
FCB-2	<i>Plasmodium falciparum</i> cepa Falciparum- Colombia-Bogotá-2
FPP-IX	Ferriprotoporfirina IX

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
<b>GRP</b>	Glóbulos Rojos Parasitados
<b>GRNP</b>	Glóbulos Rojos No Parasitados
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>HMBC</b>	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
<b>HMQC</b>	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<b>Hz</b>	Hertz
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>IA</b>	Índice de actividad
<b>ICR</b>	<i>Institute of Cancer Research</i>
<b>IE</b>	Ionización por impacto electrónico
<b>IK</b>	Índice de Kovats
<b>INS</b>	Instituto Nacional de Salud
<b>IP</b>	Intraperitoneal
<b>IR</b>	Espectroscopía infrarroja
<b>J</b>	Constante de acoplamiento
<b>Log</b>	Logaritmo
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>m.s.n.m.</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>m/z</b>	Relación masa / carga
<b>NP/PEG</b>	Reactivo Natural products (Difenilboriloxietilenamina)/Polietilenglicol4000
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Buffer de fosfatos)
<b>PcA</b>	Fracción acuosa de <i>P. cumanense</i>
<b>PcB</b>	Fracción en butanol de <i>P. cumanense</i>
<b>PcD</b>	Fracción en diclorometano de <i>P. cumanense</i>
<b>PcEtOH</b>	Extracto etanólico de <i>P. cumanense</i>
<b>PcH</b>	Fracción en hexano de <i>P. cumanense</i>
<b>PcM</b>	Fracción en metanol de <i>P. cumanense</i>
<b>PF</b>	Punto de fusión
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PhA</b>	Fracción acuosa de <i>P. holtonii</i>
<b>PhB</b>	Fracción en butanol de <i>P. holtonii</i>
<b>PhD</b>	Fracción en diclorometano de <i>P. holtonii</i>

---

<b>PhEtOH</b>	Extracto etanólico de <i>P. holtonii</i>
<b>PhH</b>	Fracción en hexano de <i>P. holtonii</i>
<b>PhM</b>	Fracción en metanol de <i>P. holtonii</i>
<b>RITAM</b>	<i>Research Initiative on Traditional Antimalarial Methods</i>
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
<b>RPMI</b>	Medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>s</b>	Singleto
<b>SIVIGILA</b>	Sistema de Vigilancia en Salud Pública
<b>t</b>	Triplete
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>δ</b>	Desplazamiento químico en ppm



## Introducción

Históricamente se ha recurrido al uso de recursos naturales con fines terapéuticos, los productos naturales de origen vegetal han desempeñado un importante papel como fuente de estructuras químicas con actividad biológica. En el caso particular de la malaria el conocimiento tradicional del uso de las plantas ha sido fuente de información que ha conducido a la obtención de moléculas antimaláricas como la quinina y la artemisinina, metabolitos que ratifican la capacidad de la naturaleza para biosintetizar entidades químicas con importante actividad biológica.

La malaria es una enfermedad parasitaria, que constituye uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, se estima que para el año 2010 esta enfermedad causó en el mundo cerca de 216 millones de episodios y alrededor de 655 mil muertes (WHO, 2011). Algunas de las principales causas de la alta incidencia son la resistencia que ha desarrollado *Plasmodium falciparum* a la cloroquina y el alto costo de nuevos tratamientos que incluyen derivados de artemisinina. Este panorama hace necesaria la búsqueda de alternativas seguras, efectivas, accesibles y asequibles para el tratamiento de la enfermedad y el control del vector. La OMS en las últimas décadas ha focalizado y centralizado el combate a la enfermedad mediante el Programa Mundial para la Malaria que incluye planes de prevención y tratamiento así como incentivos a la investigación en frentes relacionados con la biología del parásito, del hospedero, el desarrollo de vacunas y la obtención de nuevos antimaláricos.

Colombia uno de los países más biodiversos del mundo, con un importante uso tradicional de plantas en regiones donde la malaria se presenta, posee un gran potencial para contribuir al descubrimiento de nuevas alternativas para el tratamiento de la enfermedad y el control del vector.

El presente trabajo se planteó considerando el uso tradicional de especies del género *Piper* para el tratamiento de fiebres y malaria, en un tamizaje inicial se identificaron entre otras las especies *Piper cumanense* y *Piper holtonii* como promisorias y se propuso el estudio de estas dos especies con el fin de aportar información relacionada con la actividad antimalárica, la composición química y las características microscópicas de las mismas.

# Objetivos

## 1.1 Objetivo general

Identificar compuestos químicos de *Piper cumanense* y *Piper holtonii* y evaluar la actividad antimalárica.

## 1.2 Objetivos específicos

Aislar y purificar metabolitos secundarios presentes en las partes aéreas de *Piper cumanense* y *Piper holtonii*.

Identificar metabolitos secundarios aislados de *P. cumanense* y *P. holtonii* utilizando técnicas cromatográficas y espectroscópicas.

Evaluar la actividad antimalárica de los extractos y las fracciones purificadas de *P. cumanense* y *P. holtonii* usando modelos *in vitro* e *in vivo*.

Evaluar la capacidad inhibitoria de la biocristalización del heme como posible mecanismo de acción de fracciones o sustancias aisladas de *P. cumanense* y *P. holtonii* que se presenten activas en el modelo *in vitro*.

Caracterizar microscópicamente las hojas de las especies *P. cumanense* y *P. holtonii*.



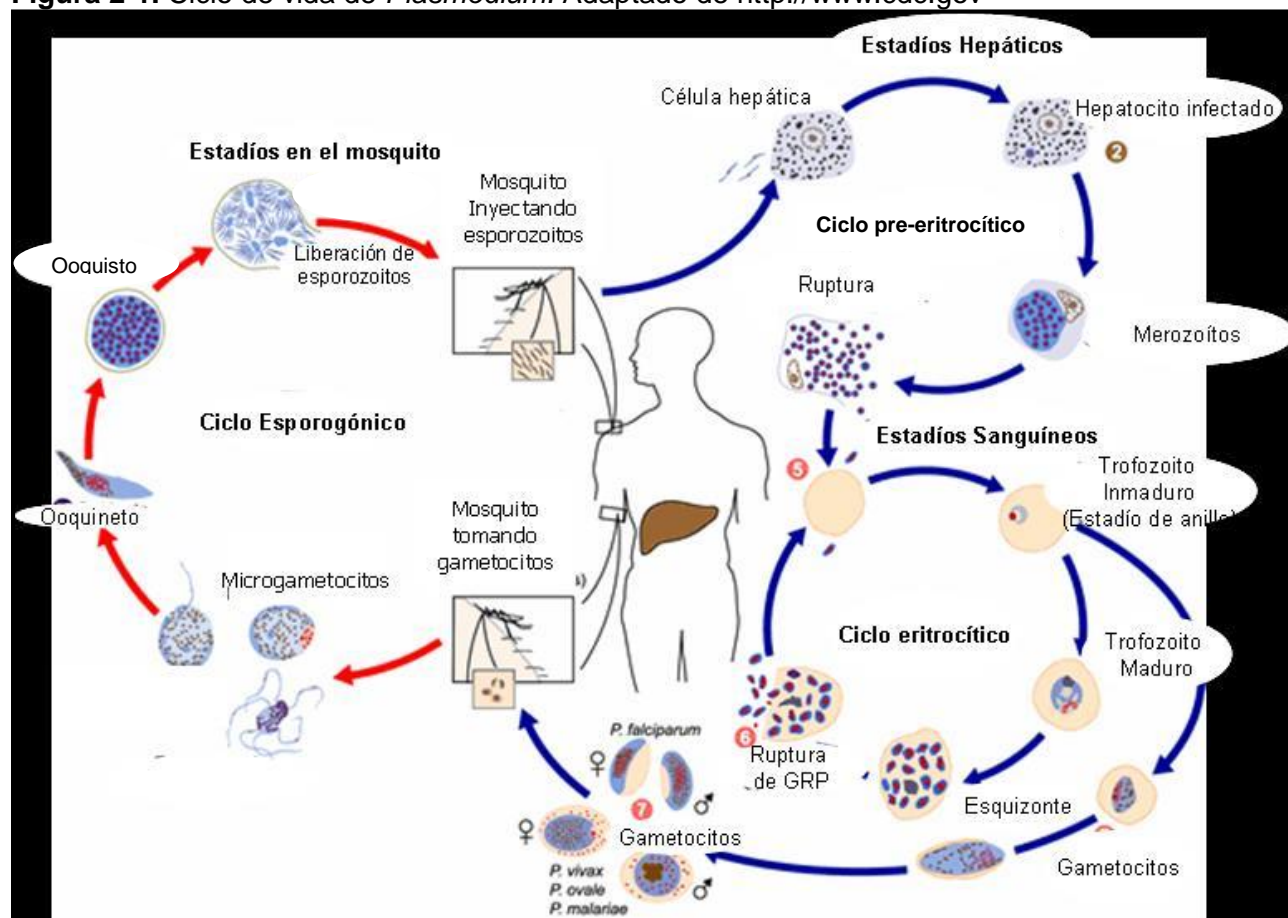
# Marco teórico

## 2.1 Malaria

La malaria es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del género *Plasmodium* transmitidos por mosquitos hembras del género *Anopheles*, siendo la especie más conocida *Anopheles gambiae* uno de los vectores de *Plasmodium falciparum* (Tuteja, 2007).

Cuatro especies de *Plasmodium* generan habitualmente infección en humanos, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*, además de *P. knowlesi* responsable de infecciones emergentes (Sabbatani *et al.*, 2010). Las especies *P. falciparum* y *P. vivax* son las que causan el mayor número de infecciones en el mundo, *P. falciparum* es responsable de la mayoría de los casos severos y de muertes ocasionadas por esta enfermedad y se encuentra distribuida en África subsahariana y el sudeste de Asia, así como en el pacífico occidental y en países de la región amazónica. Los últimos datos reportados indican que *P. vivax* se encuentra distribuido en el sudeste de Asia, en el mediterráneo oriental y en la mayoría de países endémicos de las Américas (WHO, 2011).

El desarrollo del parásito se efectúa en dos ciclos, uno sexual que ocurre en el mosquito y uno asexual que ocurre en el hospedero humano (Figura 2-1). El ciclo sexual inicia cuando la hembra del mosquito *Anopheles*, en búsqueda de alimento para madurar sus huevos, succiona sangre de una persona infectada e incorpora los gametocitos masculinos y femeninos del parásito, éstos se diferencian y fusionan en el tubo digestivo y forman ooquistos en la pared externa, desarrollándose durante varios días y produciendo una gran cantidad de esporozoitos que migran a las glándulas salivales de donde pueden ser inoculados la próxima vez que el mosquito tenga contacto con un hospedero humano (Tuteja, 2007).

**Figura 2-1.** Ciclo de vida de *Plasmodium*. Adaptado de <http://www.cdc.gov>

El ciclo asexual comienza con la transmisión por parte del mosquito, de esporozoitos motiles a un hospedero humano, luego de circular en la sangre se incorporan rápidamente en las células parenquimatosas del hígado donde permanecen en replicación asexual, ésta etapa se conoce como esquizogónia pre-eritrocítica. Después de 9 a 16 días un hepatocito puede llegar a contener varios miles de parásitos jóvenes llamados merozoítos, al lisarse el hepatocito, quedan libres en la circulación y entran a los eritrocitos por un complejo proceso de invasión, iniciando así la etapa de esquizogónia eritrocítica de división asexual (Deharo *et al.*, 2000; Tuteja, 2007; Hanssen *et al.*, 2010).

En los eritrocitos, los parásitos se desarrollan a través de diferentes estadios, crecen y evolucionan en forma de trofozoitos y esquizontes (Figura 2-1). Los eritrocitos infectados se rompen y liberan un grupo de merozoítos que infectan nuevos glóbulos rojos.

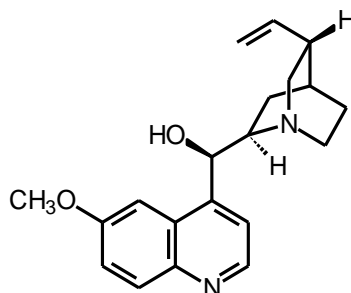
El ciclo intraeritrocítico de invasión–multiplicación–liberación–invasión toma cerca de 48 horas en infecciones con *P. falciparum*, *P. ovale* y *P. vivax* y 72 h en *P. malariae*, durante este período se presentan los síntomas propios de la enfermedad caracterizados por periodos de fiebre, escalofríos, vómitos y dolor de cabeza, que alternan con ciclos asintomáticos (Tuteja, 2007).

Una pequeña porción de los merozoítos se diferencian para producir gametocitos que serán succionados por la hembra del *Anopheles* y que son esenciales para la transmisión de la infección. Debido a la disminución de eritrocitos libres la malaria generalmente produce anemia y esplenomegalia. También puede presentarse menor flujo sanguíneo en órganos como el cerebro, con consecuencias graves, llegando incluso a la muerte (Deharo *et al.*, 2000; Tuteja, 2007). El ciclo de vida y la interacción parásito-hospedero de cada especie de *Plasmodium* determina la severidad y la patogénesis de la enfermedad (Miller *et al.*, 2002).

### 2.1.1 Antimaláricos

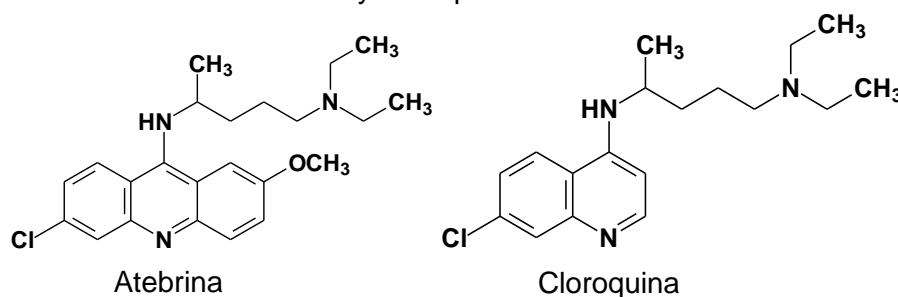
Los primeros avances en el tratamiento de la malaria se originaron a comienzos del siglo XVII cuando misioneros jesuitas aprendieron de indígenas suramericanos el uso de una infusión de la corteza de un árbol para tratar las fiebres: la quina, que en quechua significa cáscara o corteza. Esta “cáscara de la fiebres” también conocida como *Cinchona* fue llevada a Europa a mediados del siglo XVII y usada para el tratamiento de fiebres, en 1820 dos científicos franceses, el químico Joseph Pelletier y el farmacéutico Joseph Caventou aislaron un alcaloide de la corteza de quina al que dieron el nombre de quinina (Figura 2-2), compuesto que se constituyó como el principal tratamiento para la enfermedad por un largo periodo de tiempo (Deane, 2007).

**Figura 2-2.** Estructura de la quinina



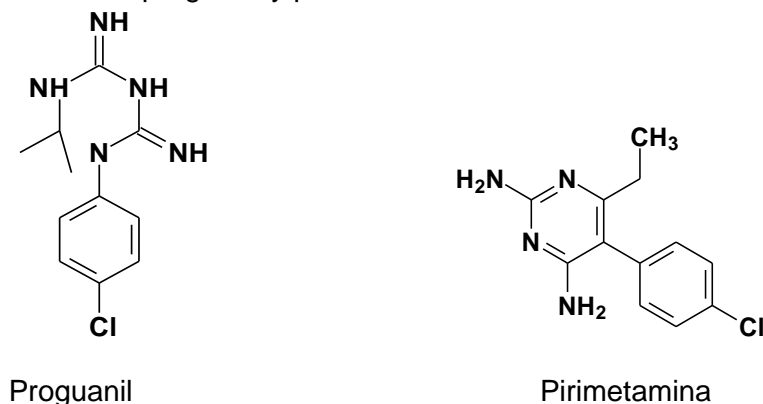
Fue hasta 1930 que se sintetizó la atebrina (Figura 2-3), una molécula con actividad antimalárica que sustituyó de forma importante a la quinina durante la segunda guerra mundial. Hacia 1940 investigadores alemanes en un intento por obtener tratamientos alternativos a los ya existentes, desarrollaron un nuevo antimalárico con una potencia similar a la atebrina sin algunos de sus efectos secundarios, al que se conoce con el nombre común de cloroquina (Figura 2-3) (Deane, 2007).

**Figura 2-3.** Estructura de la atebrina y cloroquina



Durante el periodo de la segunda guerra mundial se sintetizaron cerca de 1600 compuestos como posibles antimaláricos, desarrollo que dio lugar al proguanil (1945) la amodiaquina (1946) y la pirimetamina (1951) (Figura 2-4). Con el surgimiento de nuevos fármacos y el combate al vector usando toldillos e insecticidas en la década de los cincuenta la OMS adoptó la filosofía de la erradicación de la malaria, programa que dio sus frutos eliminando la malaria de países de Europa, América, y algunas regiones de Asia. Sin embargo, en 1960 este programa debió ser replanteado debido al surgimiento de resistencia de *P. falciparum* a la cloroquina y sus derivados. Este hecho sumado a un ambiente triunfalista desencadenó un aumento en la incidencia de la malaria en países de África y de América del sur (Deane, 2007).

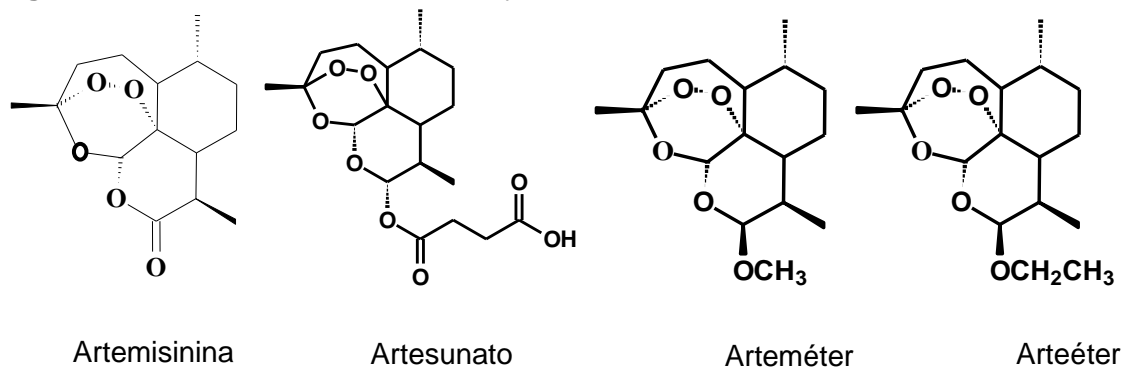
**Figura 2-4.** Estructura de proguanil y pirimetamina





En los años siguientes la búsqueda de nuevos antimaláricos continuó y se sintetizaron fármacos como mefloquina y halofantrina. En 1971 el extracto en éter de petróleo de *Artemisia annua* (*qing hao*) una planta usada en la medicina tradicional china como febrífugo, presentó actividad contra *P. berghei* y *P. cynomolgy* (primates), un año más tarde a partir de esta planta se aisló y purificó una lactona sesquiterpénica a la que se le dio el nombre común de artemisinina, una nueva entidad química con actividad antimalárica que originó una serie de derivados como artesunato, arteméter y arteéter (Figura 2-5), consolidándose como un nuevo aporte de los productos naturales al tratamiento de la enfermedad. Actualmente grupos de investigación en todo el mundo se enfocan en la obtención de moléculas con actividad antimalárica a partir de recursos naturales reportando resultados promisorios que incluyen metabolitos como alcaloides, terpenos, quasinoídes, flavonoides, limonoides, péptidos, xantonas, quinonas, cumarinas entre otros (Kaur *et al.*, 2009).

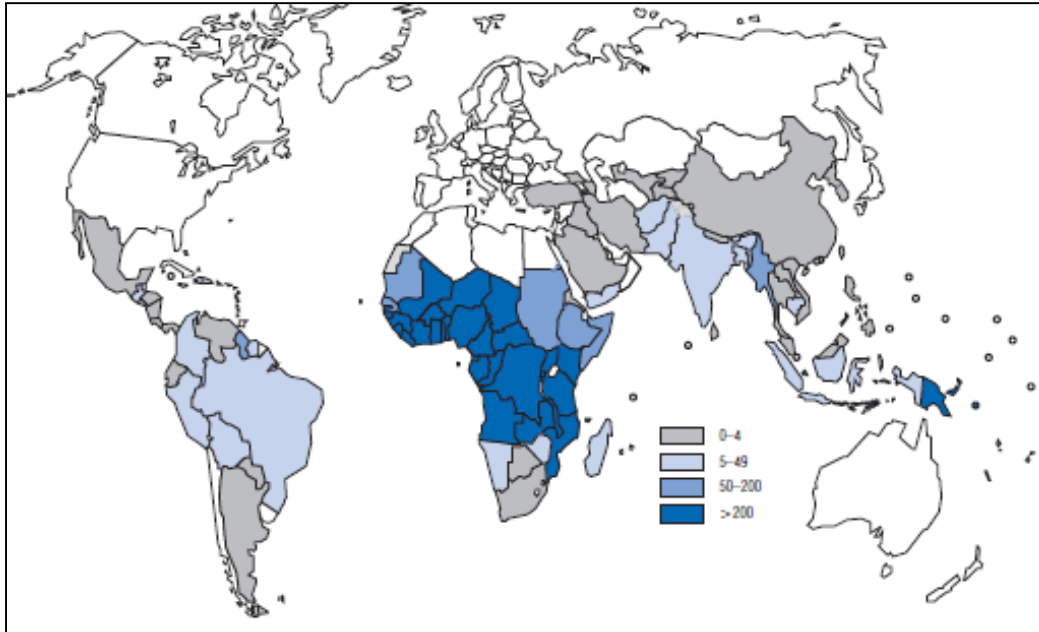
**Figura 2-5.** Estructura de artemisinina y derivados



### 2.1.2 Malaria en cifras

En el mundo se estima que cerca de 3300 millones de personas viven en zonas de riesgo, distribuidos en 109 países o regiones de acuerdo con el último reporte de la OMS, *World Malaria Report, 2010* (WHO, 2010). En la Región de las Américas definida por la OMS la malaria se presenta en 23 países y territorios, con cerca del 20% de la población total en algún grado de riesgo. En cuatro países, Brasil, Colombia, Haití y Perú; se concentraron el 90% de los casos en América del Sur en el año 2009 (WHO, 2010). Las regiones con mayor prevalencia de esta enfermedad en el mundo son África, Asia, Centro y Sur América (Figura 2-6).

**Figura 2-6.** Incidencia mundial estimada por país de casos de malaria por cada mil habitantes (OMS, 2010).

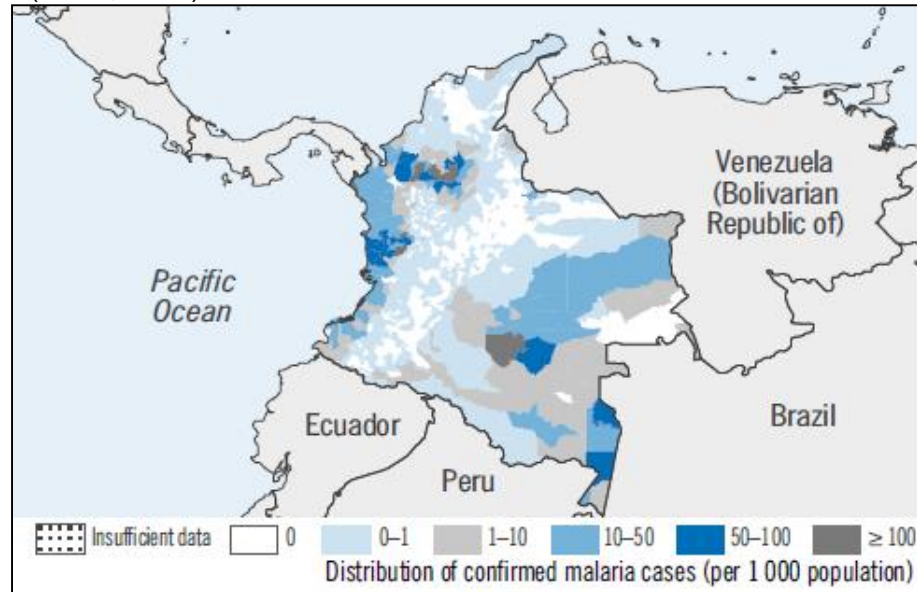


En Colombia de acuerdo con el último reporte de la OMS (WHO, 2011), cerca del 18 % de la población está en riesgo de contraer malaria. Las áreas de mayor riesgo de transmisión incluyen la región baja del río Cauca, las áreas tropicales de la costa pacífica, la región alta del río Sinú y Urabá (WHO, 2011; Instituto Nacional de Salud-SIVIGILA, 2011). El número de casos reportados disminuyó de 231.233 casos en 2001 a 62.969 casos en 2011 y el número de casos mortales se redujo de 58 en 2001 a 17 en 2011, sin embargo se resalta que aproximadamente el 25% (15.599) de los casos fueron causados por *P. falciparum* en el año 2011, al mismo tiempo que se presentaron 46.037 casos por *P. vivax*, 19 por *P. malariae*, 826 de origen mixto y 488 casos de malaria complicada además de los casos no reportados. Los departamentos con mayores reportes durante el año 2011 fueron Antioquia, Chocó, Córdoba y Nariño (Figura 2-7) (INS-SIVIGILA, 2011; WHO, 2011).

A pesar de los esfuerzos realizados en los territorios en riesgo, el acceso a las herramientas terapéuticas para el tratamiento de la malaria en Colombia sigue siendo restringido, debido a la resistencia a los tratamientos habituales y al alto precio de los tratamientos más recientes, lo que hace necesaria y oportuna la investigación en

alternativas seguras, efectivas y accesibles para el tratamiento de la enfermedad y para el control del vector.

**Figura 2-7.** Distribución de casos confirmados de malaria en Colombia por cada mil habitantes (WHO, 2011)



## 2.2 Especies del género *Piper*

El género *Piper* es el género más numeroso de la familia Piperaceae con cerca de 2000 especies (Quijano-Abril *et al.*, 2006) que se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales, siendo el más estudiado y conocido de esta familia desde el punto de vista químico. Algunas especies pertenecientes a este género son reconocidas por su interés comercial y medicinal, se destacan la pimienta (*Piper nigrum*) y especies medicinales como *P. betle*, *P. longum*, *P. angustifolium*, *P. cubeba*, *P. methysticum* y *P. aduncum*, etc. (Parmar *et al.*, 1997; 1998). Las especies del género *Piper* se caracterizan por sus inflorescencias densas en racimos o espigas (García Barriga, 1992; Figura 2-8), característica que conduce a que varias especies referenciadas como medicinales sean usadas indistintamente y que generan dificultad en la clasificación taxonómica (Di Stasi & Hiruma-Lima, 2002).

**Figura 2-8.** Especie vegetal *Piper cumanense* (Piperaceae)

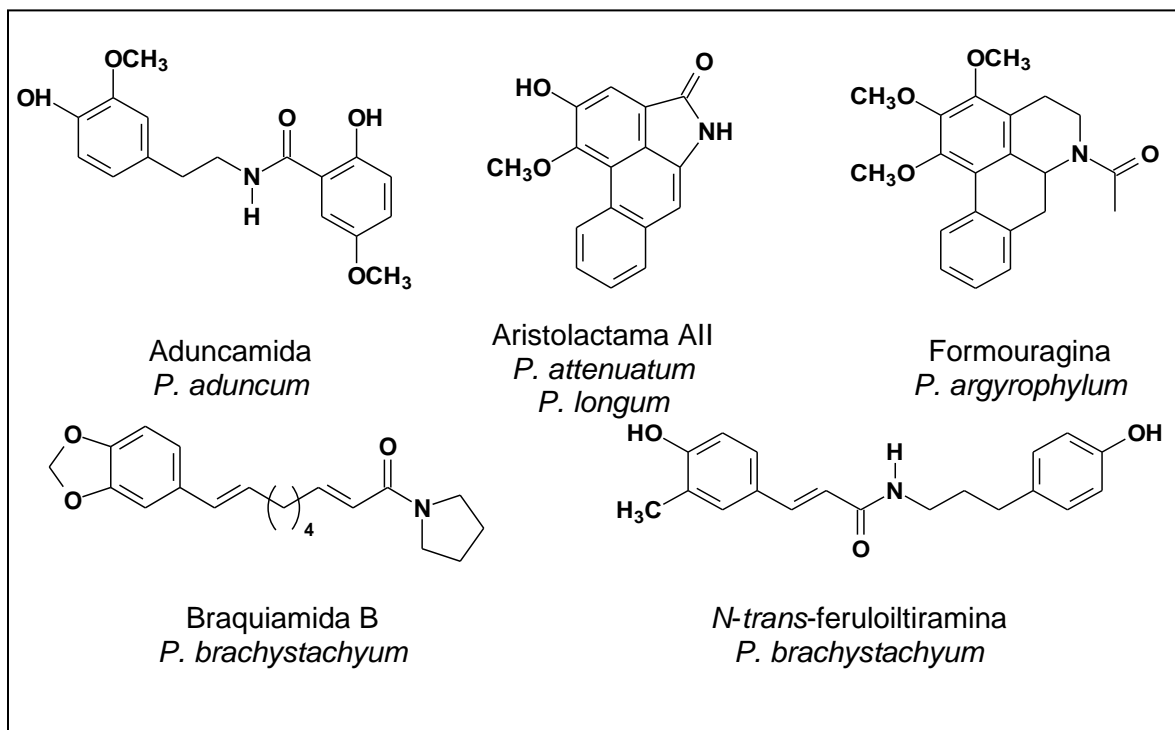
Foto: Javier Rincón, Zapatoca, Santander, Colombia

En Colombia se encuentran aproximadamente 400 especies de este género (Jaramillo, 2006), algunas usadas en medicina popular como cicatrizantes, tónicos estomacales, hemostáticos, analgésicos, antiinflamatorios, en el tratamiento de afecciones pulmonares, malaria y fiebres (García-Barriga, 1992; Blair *et al.*, 1991; Blair & Madrigal, 2005).

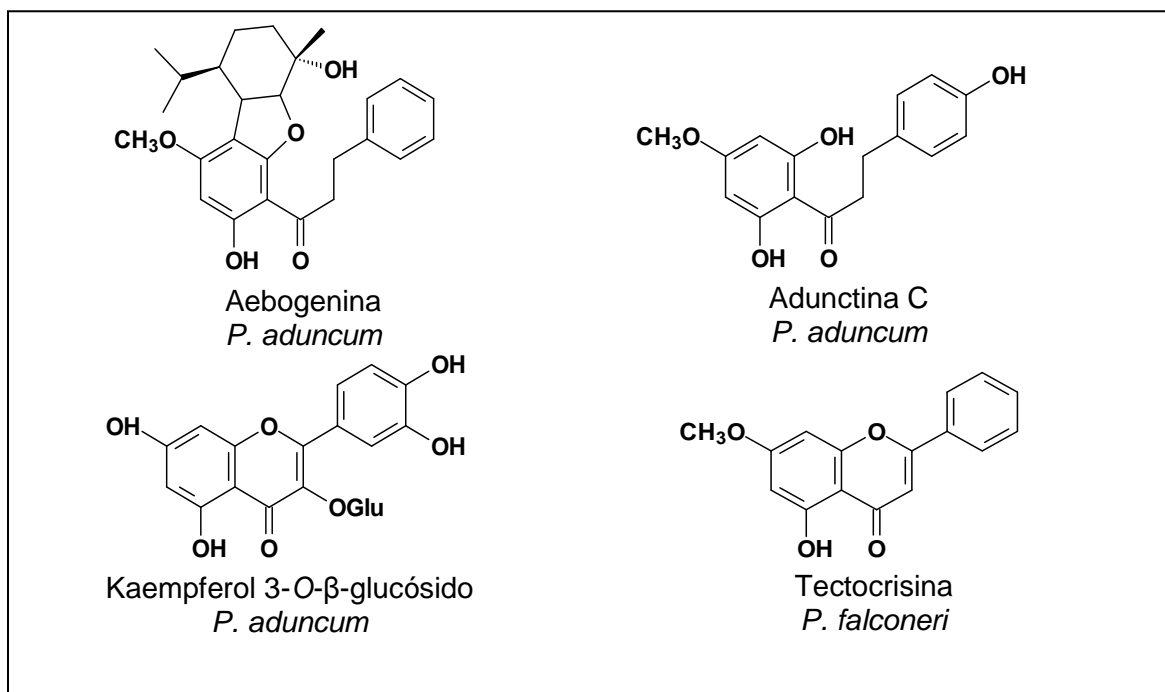
Estudios relacionados con la química del género *Piper* han conducido a identificar grupos de metabolitos secundarios biosintetizados por estas especies, que incluyen amidas (Rukachaisirikul *et al.*, 2002, 2004, Parmar *et al.*, 1997), lignanos y neolignanos (Lee and Ley, 2003), terpenos, esteroides, fenilpropanoides, flavonas, chalconas, dihidrochalconas (Portet, *et al.*, 2007, Parmar *et al.*, 1997, Jenett-Siems *et al.*, 1999) y kavapironas (Parmar *et al.*, 1997). De especies de éste género, hasta el año 2004 cerca de 112 especies habían sido estudiadas químicamente en el mundo (Dyer & Palmer, 2004) y de la farmacología y la química de especies encontradas en el territorio colombiano poco se ha explorado en contraste con el número de especies reportadas.

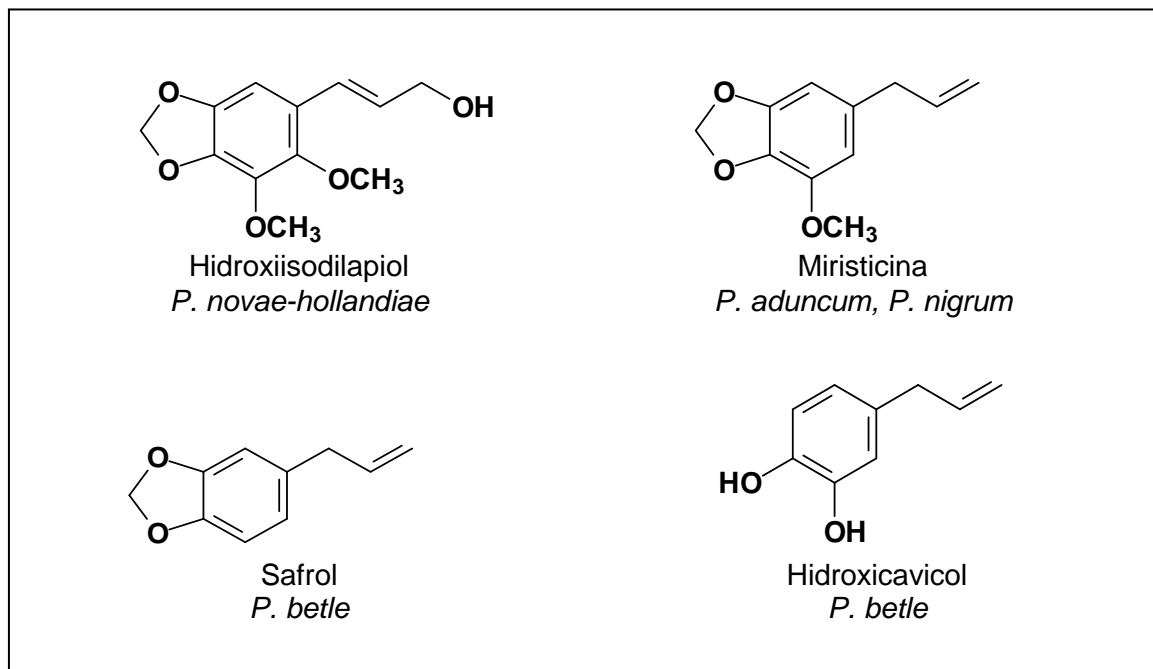
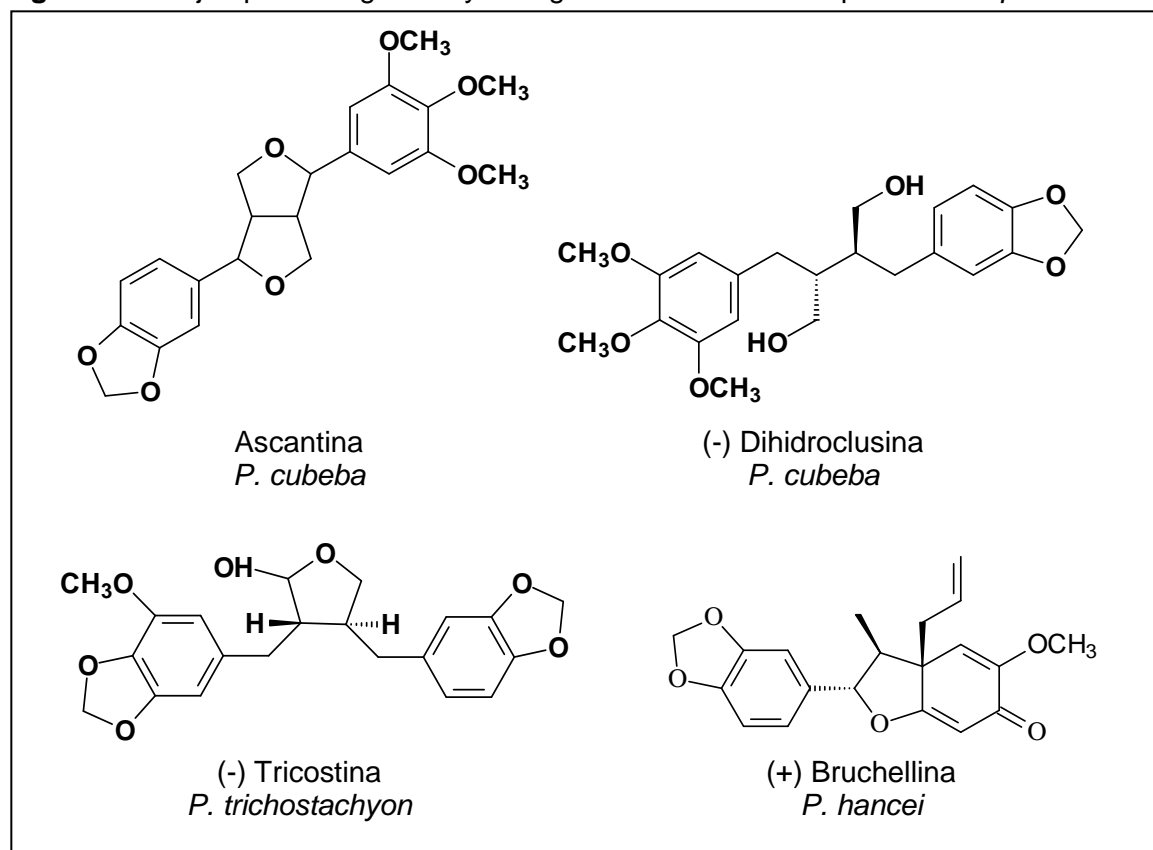
Las Figuras 2-9 a 2-13 presentan algunos ejemplos de metabolitos identificados en el género *Piper*.

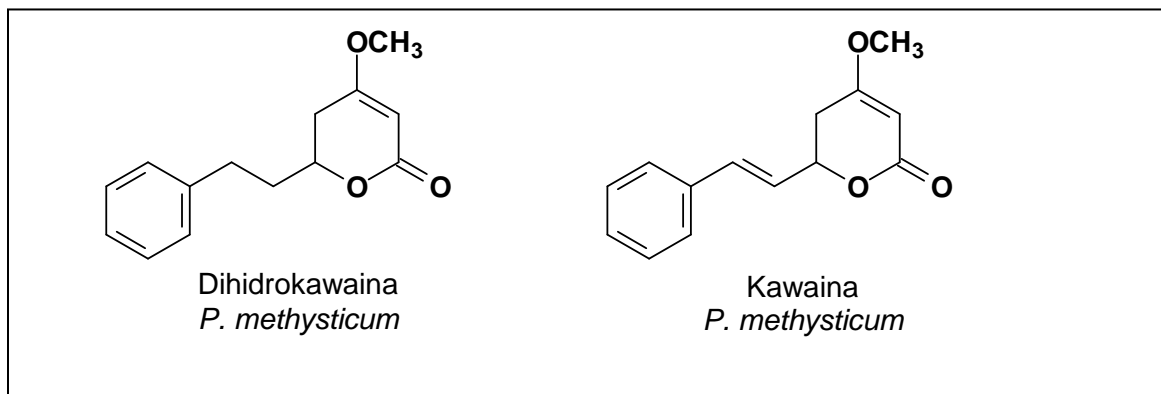
**Figura 2-9.** Ejemplos de amidas aisladas de especies de *Piper*



**Figura 2-10.** Ejemplos de flavonoides aislados de especies de *Piper*



**Figura 2-11.** Ejemplos de fenilpropanoides aislados de especies de *Piper***Figura 2-12.** Ejemplos de lignanos y neolignanos aislados de especies de *Piper*

**Figura 2-13.** Ejemplos de kavapironas aisladas de especies de *Piper*

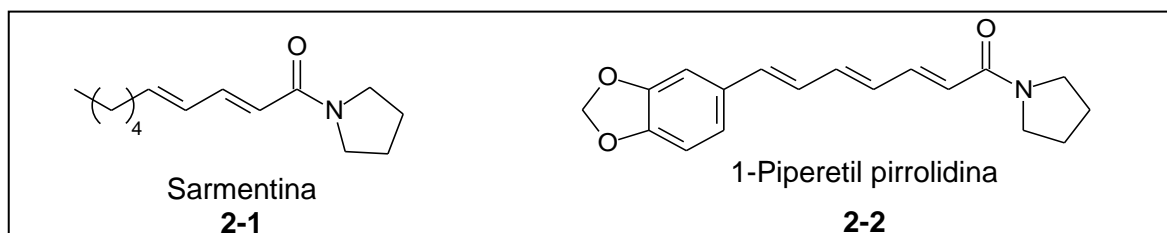
Debido a la riqueza metabólica y al uso reportado para especies del género *Piper* se han realizado estudios de actividad biológica tanto de extractos como de moléculas aisladas, encontrando reportes de actividad insecticida (Boll *et al.*, 1994), antibacteriana, antifúngica (Braga *et al.*, 2007), antimalárica (Portet *et al.*, 2007, Jenett-Siems *et al.*, 1999, Garavito *et al.*, 2006), antiagregante plaquetaria (Chen *et al.*, 2007; Iwashita *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007), antioxidante (Yamaguchi *et al.*, 2006), ansiolítica (Ernst, 2006) y antitumoral (Sunila *et al.*, 2006), etc.

En el caso particular de la actividad antimalárica se ha registrado el uso de especies del género *Piper* para el tratamiento de la enfermedad y de los síntomas asociados a esta. Se encuentran reportes etnofarmacológicos que registran el empleo de las hojas de *P. marginatum* Jacq. en remedios usados por comunidades de Guyana francesa (Vigneron *et al.*, 2005), así como el uso de las partes aéreas de *P. pyriformium* Vahl en remedios empleados por comunidades africanas (Kaou *et al.*, 2008), también el uso de las hojas de *P. peltatum* por grupos nativos de la amazonia peruana (Ruiz *et al.*, 2011) y el uso de las hojas de *P. sarmentosum* conocida en Malasia como “*Kaduk:KudaK*” para tratar la enfermedad (Rahman *et al.*, 1999), entre otras.

La información etnofarmacológica ha sido aprovechada para conducir el estudio del extracto metanólico de las hojas de *P. sarmentosum* que presentó actividad sobre el cultivo de *P. falciparum* con un porcentaje de inhibición del 25.1% a 48 horas de incubación y alcanzando el 100% de inhibición a las 72 horas (Rahman *et al.*, 1999), de esta especie fueron aisladas las amidas 2-1 y 2-2 (Figura 2-14) con valores de  $CI_{50}$  de

18.9 y 6.5  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente en el ensayo sobre *P. falciparum* (Rukachaisirikul *et al.*, 2004).

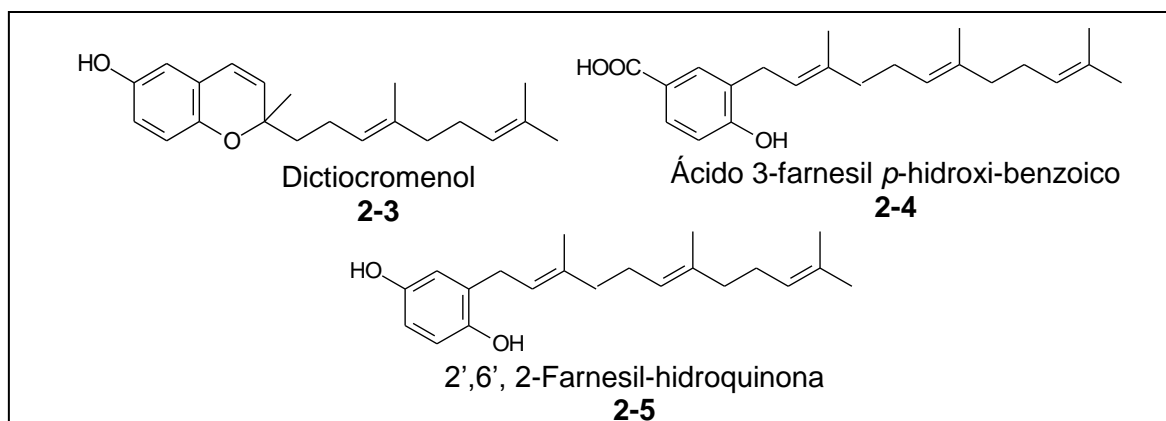
**Figura 2-14.** Amidas con actividad antiplasmódica aisladas de *P. sarmentosum*



En Malasia las hojas de *P. betle* son usadas por la población rural como remedio antimalárico (Al-Adhroey *et al.*, 2010), el extracto metanólico de esta especie presentó actividad en ensayos *in vivo* mostrando un 82.31 % de inhibición a una dosis de 400 mg/Kg en ratones infectados con *P. berghei* (Al-Adhroey *et al.*, 2011).

La especie *P. tricuspe* es usada por comunidades del sur de Colombia para tratar la malaria, de esta especie se aislaron los metabolitos 2-3, 2-4 y 2-5 (Figura 2-15) que presentaron actividad antimalárica *in vitro* con valores de  $\text{CI}_{50}$  de 9.8, 29.78 y 1.37  $\mu\text{M}$  respectivamente (Sáez-Vega *et al.*, 2008).

**Figura 2-15.** Metabolitos con actividad antiplasmódica aislados de *P. tricuspe*

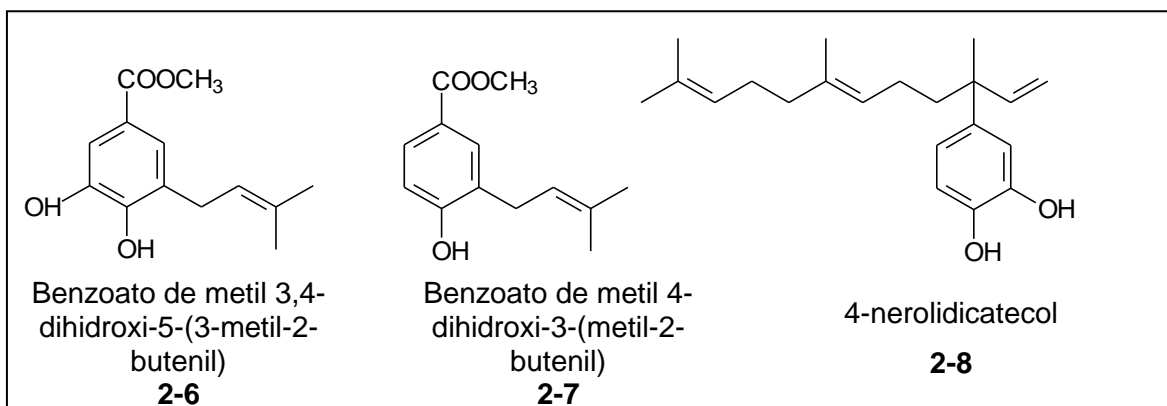


El uso de especies de *Piper* en el tratamiento de enfermedades parasitarias ha direccionado la evaluación antimalárica de metabolitos secundarios aislados, es así como la evaluación de ácidos benzoicos aislados de *P. glabratum* y *P. acutifolium* permitieron



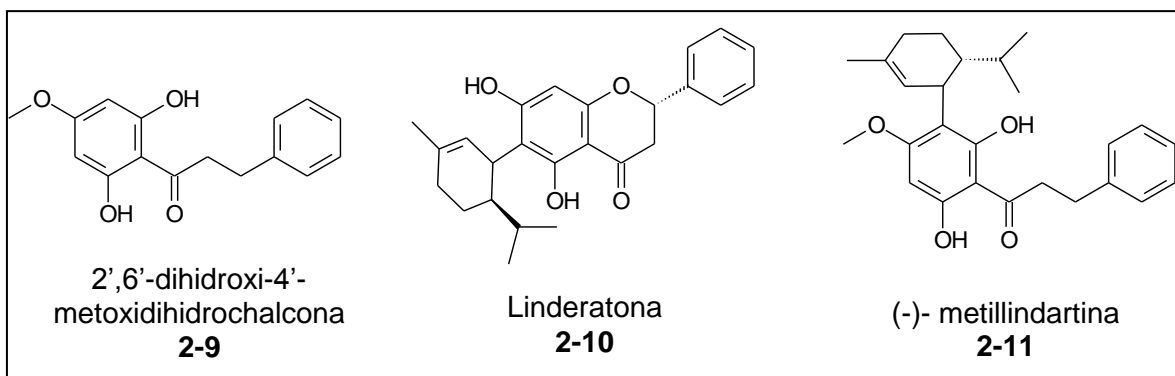
identificar los compuestos 2-6 y 2-7 (Figura 2-16) como metabolitos activos con valores de  $Cl_{50}$  de 2.8 y 4.1  $\mu\text{g/mL}$  sobre el cultivo de *P. falciparum* (Flores *et al.*, 2008).

**Figura 2-16.** Metabolitos con actividad antiplasmódica aislados de *P. glabratum*, *P. acutifolium* y *P. peltatum*



El compuesto 4-nerolidicatecol (Figura 2-16, 2-8) aislado de *P. peltatum* mostró actividad frente a dos cepas de *P. falciparum* con  $Cl_{50}$  de 0.60 y 2.11  $\mu\text{g/mL}$  y también mostró actividad *in vivo* con un porcentaje de inhibición del 63.15% a la dosis de 600 mg/Kg/día en ratones infectados con *P. berghei*. El estudio bioguiado de *P. hostmannianum* condujo al aislamiento de dos dihidrochalconas 2-9 y 2-11 y la flavanona 2-10 (Figura 2-17) con actividad antiplasmódica *in vitro* sobre cultivo de *P. falciparum* con valores de  $Cl_{50}$  de 12.69, 10.33 y 5.64  $\mu\text{M}$  en la cepa F32 y 16.91, 15.06 y 5.27  $\mu\text{M}$  en FCB-1, además el compuesto 2-11 a una dosis de 20 mg/Kg/día presentó una reducción del 80% de la parasitemia en el ensayo murino con *P. vinckei petteri* (Portet *et al.*, 2007).

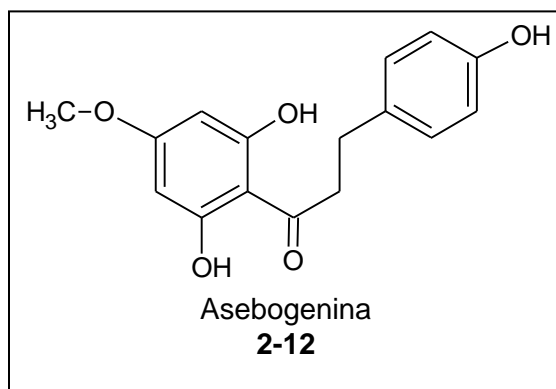
**Figura 2-17.** Metabolitos con actividad antiplasmódica de *P. hostmannianum*



La especie *P. hispidum* es usada por comunidades indígenas de América Central para tratar malaria y fiebres, el extracto lipofílico de las hojas de ésta especie presentó actividad *in vitro* sobre cultivo de *P. falciparum* (cepas PoW y Dd2) con valores de  $CI_{50}$ = 7.6 (cepas PoW) y  $CI_{50}$ = 13.0  $\mu\text{g/mL}$  (cepa Dd2) y condujo al aislamiento de la dihidrochalcona 2-12 (Figura 2-18) con una  $CI_{50}$  de 16.9 y 10.4  $\mu\text{g/mL}$  en estas dos cepas (Jenett-Siems *et al.*, 1999).

En Colombia se ha reportado para el tratamiento de malaria o de fiebres intermitentes el uso de preparaciones que incluyen especies del género *Piper*, como *P. marginatum* (Sin. *P. decumanum* Aubl., *P. caudatum* Vahl.), *P. nigrum*, *P. angustifolium*, *P. brachypodon*, *P. peltatum* y *P. tricuspe* (Blair *et al.*, 1991, Blair & Madrigal, 2005), esta información condujo a ensayos preliminares con algunas especies pertenecientes a este género clasificando como promisorias las especies *P. cumanense* y *P. holtonii* con valores de  $CI_{50}$  de  $< 1 \mu\text{g/mL}$  (Garavito *et al.*, 2006), resultado que incentivó el presente trabajo.

**Figura 2-18.** Chalcona con actividad antiplasmódica aislada de *P. hispidum*



## Equipos, materiales y métodos

### 3.1 Equipos

Los puntos de fusión fueron determinados sin corrección de valores en un equipo A. Kruss Optronic Modelo KSP1. Los espectros obtenidos en la región de infrarrojo fueron registrados en espectrofotómetro FT-IR Genesis en pastillas de KBr y celdas de NaCl. Los espectros de Resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (incluyendo experimentos 2D) fueron obtenidos en espectrómetros Bruker Avance 400 MHz [400 MHz ( $^1\text{H}$ ) y 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ )], Bruker DPX 300 [300 MHz ( $^1\text{H}$ ) y 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ )] y DRX 500 [500 MHz ( $^1\text{H}$ ) y 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ )], los desplazamientos químicos fueron registrados en partes por millón y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) fueron medidas en Hertz (Hz).

Los análisis de CG-MS fueron realizados en un cromatógrafo de gases Shimadzu 14B/QP5050A con analizador tipo cuadrupolo, columna HP-5 (30 m x 0.25 mm), temperatura inicial 80 °C y temperatura final 250 °C, velocidad 5 °C/min. Los análisis de LC-MS fueron registrados en un equipo HPLC Shimadzu dotado con una columna Phenomenex C18 (250x3 mm), acoplado a un espectrómetro de masas micrOTOF-QII Bruker. La rotación óptica específica fue determinada en un polarímetro ADP 440, Bellingham+ Stanley.

El cultivo de *P. falciparum* se mantuvo en una incubadora con  $\text{CO}_2$  SANYO modelo MCO-19AIC (UV), se empleó una cabina de bioseguridad Clase II marca Labconco, para los recuentos microscópicos se utilizó un microscopio óptico Nikon Eclipse.

Las observaciones microscópicas de hojas se realizaron en un microscopio óptico Zeiss Axiostar. Las medidas de absorbancia fueron determinadas en un lector de Placas de micro-ELISA Bio-Rad Modelo 550 y las de fluorescencia en un equipo Tecan GENios Microplate Reader.

## 3.2 Materiales y solventes

Para el análisis en cromatografía en capa delgada se emplearon placas comerciales de sílica gel 60 F<sub>254</sub> en soporte de aluminio con un espesor de 0,25 mm (Merck). Una vez eluidas las placas se revelaron con luz UV a longitudes de onda de 254 y 365 nm y reveladores químicos, como vainillina 1%/ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%/ EtOH (Godin) o reveladores específicos como NP/PEG para flavonoides.

El fraccionamiento por cromatografía en columna (CC) por gravedad y por vacío fue realizado empleando sílica gel 60 (Merck) con un tamaño de partícula de 63 a 200 µm y sílica gel 60 RP-18 (Merck) en columna de vidrio. El fraccionamiento por cromatografía de exclusión se realizó en soporte de Sephadex LH-20 (SIGMA) con un tamaño de partícula de 25-100 µm. Para la realización de la cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP) se emplearon placas de vidrio de 20x20 cm con una capa de sílica gel GF<sub>254</sub> (Merck) de 1,0 mm de espesor. Para la cromatografía líquida de alta eficiencia se emplearon columnas de sílica de fase reversa C18 (Phenomenex, 250 mm, 3 mm).

Se emplearon solventes grado reactivo analítico para la obtención de extractos y para las etapas de fraccionamiento y aislamiento (etanol, hexano, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo, butanol, metanol, etc.), solventes grado HPLC para el análisis de las muestras por esta técnica (MeOH, H<sub>2</sub>O, ACN) y solventes deuterados para los análisis por RMN (CD<sub>3</sub>OD, CDCl<sub>3</sub>, DMSO-d<sub>6</sub>). Para el análisis microscópico de las especies se emplearon soluciones de glicerina al 50%, H<sub>2</sub>O, HCl 10%, lugol y fluoroglucinol al 1%.

Se usaron reactivos grado biológico para el cultivo de *Plasmodium falciparum* y el ensayo de FBIT, el medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco BRL-Life Technologies Inc.), Hipoxantina 99,0 % (SIGMA), Hepes 99,5 % (SIGMA), Glucosa (SIGMA), Giemsa Stain (SIGMA), Cloroquina (SIGMA Lote 84H1169).

### 3.3 Colección del material vegetal

El material vegetal de las partes aéreas de *Piper cumanense* fue colectado en el municipio colombiano de Zapatoca, Santander a 1600 m.s.n.m. (06°49'19"N, 73°15'5"O) y el material de *Piper holtonii* se colectó en el municipio de Mesitas, Cundinamarca, Colombia (04°38'23"N, 74°28'0"O). Un ejemplar de cada una de las especies fue depositado en el Herbario Nacional Colombiano (Universidad Nacional de Colombia) para su clasificación taxonómica, registrados con los números COL 468660 y COL 468663 respectivamente.

### 3.4 Caracterización microscópica del material vegetal

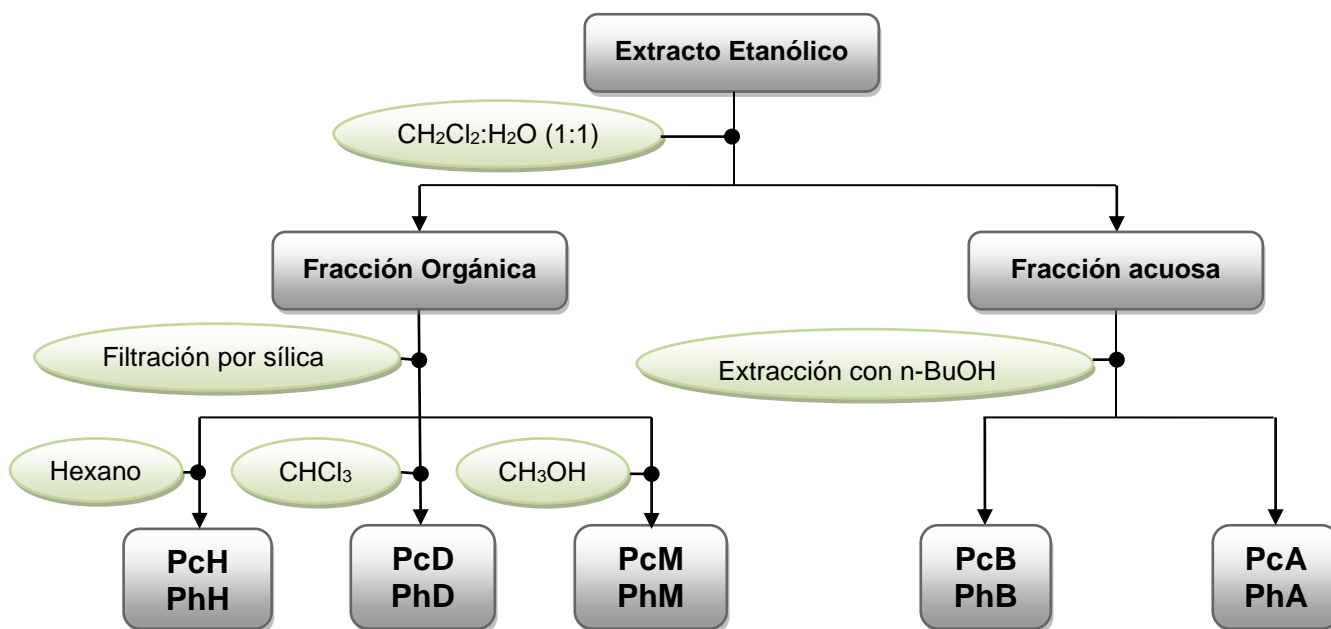
La caracterización microscópica del material de cada una de las especies se realizó utilizando técnicas convencionales en cortes transversales de hojas adultas a mano alzada con ayuda de una lámina cortante y un soporte de pauche (médula de *Polymia pyramidalis*), los cortes fueron realizados en segmentos de aproximadamente 1,0 cm que incluían la nervadura principal en la región del borde foliar y en la región media. Los cortes fueron clarificados con hipoclorito de sodio al 2%, lavados con agua destilada y observados en glicerina al 50%. Se realizaron tinciones con Sudan III (Jensen, 1962), fluoroglucinol/HCl (Johansen, 1940), lugol y montajes en ácido acético para confirmar presencia de oxalato de calcio. Los cortes paradérmicos del haz y envés fueron obtenidos a mano alzada, clarificados con hipoclorito 2% y coloreados con Sudan III. El material vegetal seco y molido también fue observado en glicerina al 50%. Las muestras fueron observadas en un microscopio óptico Zeiss Axiostar con objetivos de 10x y 40x, las imágenes fueron registradas con una cámara Sony DSC-H55.

### 3.5 Elaboración de extractos y fraccionamiento

El material vegetal fresco de *P. cumanense* y *P. holtonii* se secó en estufa de aire circulante a 45°C, se molió y se sometió a extracción por percolación exhaustiva con etanol al 96%, el solvente se retiró empleando evaporador rotatorio conectado a una bomba de vacío, procedimiento que dio lugar a los extractos etanólicos denominados PcEtOH (*P. cumanense*) y PhEtOH (*P. holtonii*).

El extracto etanólico seco de cada una de las especies se sometió a partición líquido-líquido con una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$  (1:1) para obtener una fracción orgánica y una fracción acuosa. La fracción acuosa se extrajo con *n*-Butanol para dar lugar a la fracción butanólica (PB) y a la fracción acuosa (PA). La fracción orgánica se sometió a una columna de filtración por sílica gel empleando como solventes hexano, cloroformo y metanol para obtener las fracciones PH, PD y PM. Las dos especies se sometieron al mismo procedimiento de partición como está registrado en la Figura 3-1.

**Figura 3-1.** Fraccionamiento del extracto etanólico de *P. cumanense* y *P. holtonii*



A cada una de las fracciones se les eliminó el solvente empleando evaporador rotatorio con vacío y cada fracción fue analizada por cromatografía en capa delgada (CCD) para su caracterización.

### 3.6 Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios

Las fracciones clasificadas como prometedoras en los ensayos de actividad *in vitro* frente a *Plasmodium falciparum* se sometieron a procedimientos de separación y purificación empleando técnicas de cromatografía en columna (CC) por gravedad y por vacío, cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP), cromatografía por exclusión en Sephadex LH-20 (CE), dependiendo del tipo de compuestos detectados, la cantidad de

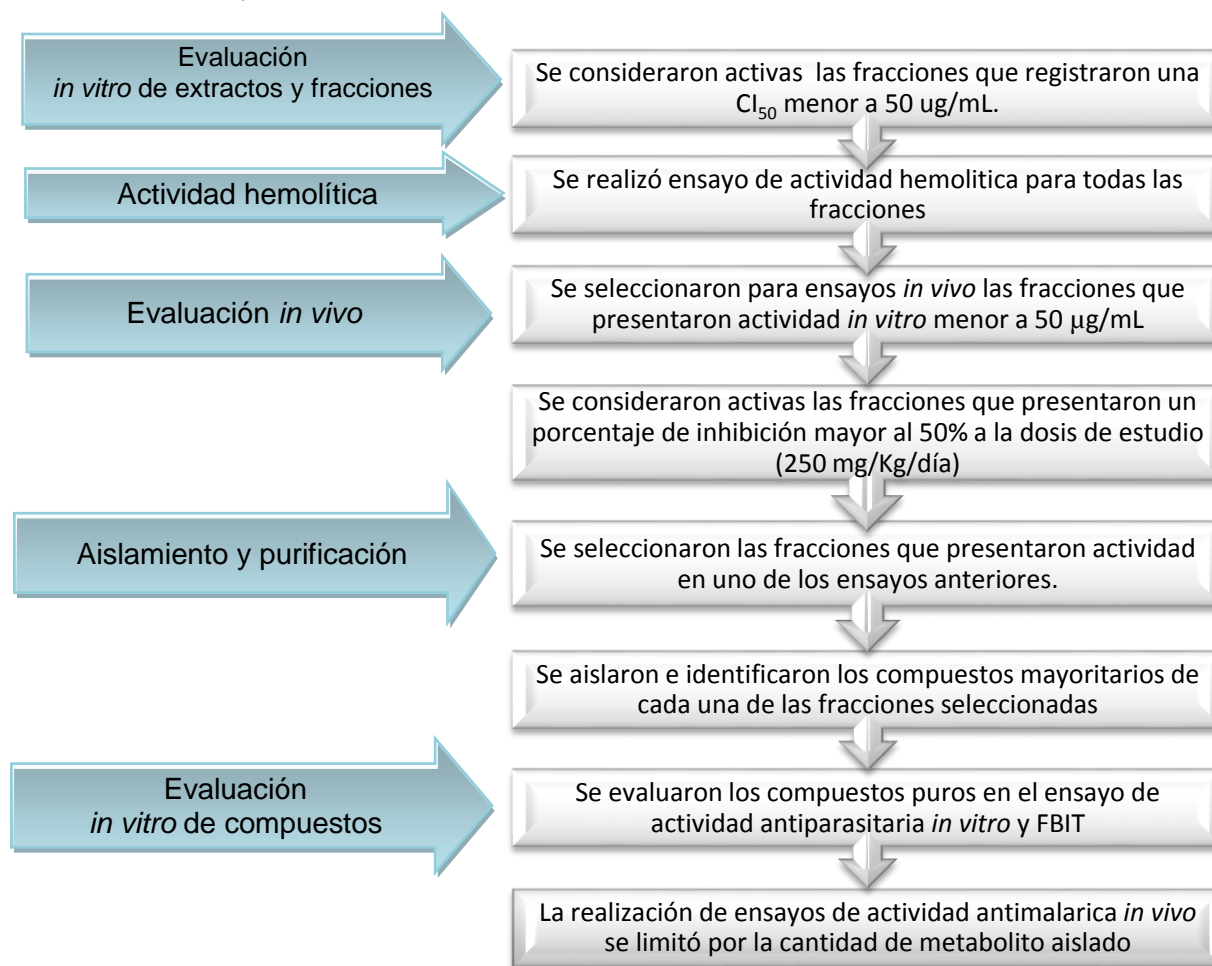
muestra y las características químicas de la fracción a purificar, los procedimientos particulares para cada muestra se describen en el capítulo de resultados.

La elucidación estructural de los metabolitos secundarios aislados se realizó empleando técnicas espectroscópicas de Infrarrojo (IR) en pastillas de KBr y celdas de NaCl, RMN monodimensional ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135) y bidimensional ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HMQC, HSQC, HMBC y NOESY), espectrometría de masas (MS) de impacto electrónico, espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).

### 3.7 Ensayos de actividad antimalárica

Para la realización de las pruebas biológicas se siguió la secuencia presentada en la Figura 3-2.

**Figura 3-2.** Secuencia de procedimientos seguidos en el estudio de las fracciones de *P. cumanense* y *P. holtonii*



Con el fin de evaluar la actividad antimalárica de extractos, fracciones y compuestos puros, se realizaron los siguientes ensayos:

### **3.7.1 Actividad antiparasitaria *in vitro* frente a *P. falciparum***

El ensayo de actividad antimalárica *in vitro* se realizó en un cultivo continuo de *Plasmodium falciparum* cepa cloroquino-resistente FCB-2 (INS-Colombia), la adecuación del parásito y el cultivo se realizó siguiendo el procedimiento propuesto por Trager & Jensen 1976, con modificaciones (Deharo *et al.*, 2000), Anexo 1. Una vez descongelado el parásito fue mantenido a 37°C, en medio RPMI (pH 7.4) suplementado con plasma humano Rh O<sup>+</sup> y mantenido bajo atmósfera de O<sub>2</sub> (5%) y CO<sub>2</sub> (5%), el seguimiento del cultivo fue realizado cada 24 horas, con cambio de medio y observación microscópica para evaluar la parasitemia.

La evaluación de la actividad antimalárica se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Deharo *et al.*, 2000 y adaptado a las condiciones experimentales del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia (Anexo 2) sobre un cultivo de *P. falciparum* al 1% de parasitemia y suplementado con 10% de plasma humano. Previamente a la realización del ensayo, el cultivo se sincronizó a formas jóvenes entre 0-20 horas empleando sorbitol al 5% (Deharo *et al.*, 2000).

Se prepararon soluciones de 20 mg/mL de las muestras a ensayar en dimetilsulfóxido (DMSO) que luego se diluyeron con RPMI suplementado, para alcanzar concentraciones en la microplaca de 50, 25, 10, 1 y 0.1 µg/mL, cada concentración fue evaluada por triplicado (Anexo 1), en cada pozo de la microplaca se colocaron 100 µL de suspensión de glóbulos rojos parasitados y se adicionaron 100 µL de solución de la muestra a ensayar a la concentración correspondiente. El diseño de la microplaca (Figura 3-3) contó con un blanco, vehículo y control de cloroquina a concentraciones de 0.50, 0.25, 0.10, 0.01 y 0.001 µg/mL.



**Figura 3-3.** Distribución de muestras en el ensayo *in vitro* frente a *P. falciparum*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
50 µg/mL	A	M1	M1	M1	M2	M2	M2	V	V	V	CQ	CQ	CQ	A
25 µg/mL	B													B
10 µg/mL	C													C
1.0 µg/mL	D													D
0.1 µg/mL	E													E
Control de parásitos	F													F
	G													G
	H													H

M1=Muestra 1, M2=Muestra 2, CQ=Cloroquina, V=Vehículo

La microplaca se incubó a 37°C durante 48 horas, en atmósfera de O<sub>2</sub> (5%) y CO<sub>2</sub> (5%), finalizado este periodo se retiró el medio sobrenadante de cada pozo y se realizó un extendido con 5 µL de sedimento que se fijó con metanol y se coloreó con Giemsa. La cuantificación de la parasitemia se efectuó en un microscopio óptico con objetivo de inmersión efectuando el recuento de Glóbulos Rojos Normales (GRN) y Parasitados (GRP) por cada 1000 glóbulos rojos totales (Ecuación 3-1). La capacidad inhibitoria de cada una de las muestras evaluadas se expresó como el porcentaje de inhibición (Ecuación 3-1) y la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) se calculó para cada uno de los ensayos mediante análisis de regresión no lineal de los porcentajes de inhibición y el logaritmo de la concentración, empleando el programa GraphPad Prism 5® y expresando los resultados como la media ± EMS de tres ensayos independientes. Las muestras fueron clasificadas en nivel de actividad de acuerdo a la Tabla 3-1.

**Ecuación 3-1.** Cálculo de porcentaje parasitemia y porcentaje de inhibición

$$\% \text{ de parasitemia} = \frac{\text{Globulos Rojos Parasitados}}{\text{Globulos Rojos Totales}} \times 100$$

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Parasitemia de blanco} - \text{Parasitemia de muestra}}{\text{Parasitemia de blanco}} \times 100$$

**Tabla 3-1.** Criterios de clasificación en nivel de actividad en el modelo *in vitro* sobre cultivo de *P. falciparum* (Adaptado de Rasoanavio *et al.*, 2004).

CI <sub>50</sub> (µg/mL)	Nivel de actividad
<0.1	Muy bueno
0.1 – 1.0	Bueno
1.1 - 10	Bueno a moderado
11 - 25	Moderado
26- 50	Bajo
51-100	Débil

El índice de actividad (IA) de los compuestos puros se determinó de acuerdo a la siguiente relación:

$$IA = CI_{50} \text{ muestra} / CI_{50} \text{ patrón}$$

### 3.7.2 Actividad hemolítica

El ensayo de actividad hemolítica busca evaluar el efecto de las fracciones sobre la integridad de los eritrocitos no infectados, se realizó siguiendo el protocolo descrito por Okamoto *et al.*, 1999, cada una de las muestras fue preparada en PBS a una concentración de 100 µg/ mL. En una placa de 96 pozos de fondo en V se colocaron 50 µL de cada muestra por triplicado y se adicionaron 50 µL de una suspensión de eritrocitos al 2 % en PBS. La concentración final a la que se evaluaron los extractos y fracciones fue de 50 µg/ mL, que representa la máxima concentración evaluada en el ensayo de actividad antiplasmódica *in vitro*, se empleó agua para generar el 100 % de hemólisis y PBS como control de 0% de hemólisis, también se evaluó el efecto del vehículo de las muestras en el ensayo de actividad antiplasmódica (DMSO 2%). La placa se incubó a 37°C por una hora, transcurrido este tiempo se centrifugó a 500 G por 10 minutos y se separó el sobrenadante de cada uno de los pozos en una placa de 96 pozos de fondo plano para realizar la lectura espectrofotométrica a 490 nm. El porcentaje de hemólisis fue determinado aplicando la Ecuación 3-2 considerando como control los pozos tratados con PBS.

**Ecuación 3-2.** Porcentaje de hemólisis

$$\% \text{ de hemólisis} = \frac{\text{Absorbancia Control (PBS)} - \text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia control (PBS)}} \times 100$$

**3.7.3 Evaluación de la actividad antimalárica *in vivo***

La evaluación *in vivo* se realizó empleando un modelo de malaria murina “prueba supresiva de cuatro días (*Test de Peters*)” de acuerdo al protocolo descrito por Deharo 2000 adaptado por Garavito 2006. La prueba se llevó a cabo en ratones ICR machos (criados en el Bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia) de aproximadamente 4 semanas de edad (peso 18-22 g), los cuales se mantuvieron con consumo de agua y comida *Ad libitum* en un cuarto con temperatura controlada (22°C +/- 1°C) y ciclos de 12 horas luz/oscuridad. Los grupos de tratamiento estuvieron compuestos por 5 animales.

Los ensayos se desarrollaron buscando emplear el menor número posible de animales, proporcionando a ellos las mejores condiciones y evitando al máximo el sufrimiento de los animales con un punto final adecuado a los fines experimentales. El primer día del experimento los animales se infectaron vía intraperitoneal con aproximadamente  $1 \times 10^7$  parásitos/mL provenientes de ratones infectados con *P. berghei* ANKA y con parasitemia cercana al 20%.

Dos horas después de la infección y a la misma hora durante los 4 días siguientes, los animales recibieron el tratamiento correspondiente por vía oral, siendo la dosis de 250 mg/Kg/día. En cada ensayo se contó con un grupo tratado con el vehículo de los tratamientos (DMSO) y con un control positivo (cloroquina a una dosis de 4mg/Kg/día). El quinto día del ensayo se preparó un extendido de sangre periférica de cada animal que se coloreó con Giemsa y al que se le determinó la parasitemia por observación microscópica.

Como parámetro de actividad biológica se calculó la reducción en la parasitemia de los animales tratados respecto al grupo control, expresado en porcentaje de inhibición

(Ecuación 3-3) como la media  $\pm$  DS y se clasificó cada muestra en nivel de actividad de acuerdo a lo registrado en la Tabla 3-2, siguiendo los parámetros propuestos por RITAM (Rasoanavio *et al.*, 2004). Los animales que sobrevivieron se sometieron a observación diaria, aplicando el sacrificio del animal cuando fue requerido.

Los modelos farmacológicos utilizados se ajustan a las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), de acuerdo al estatuto nacional de protección de los animales (Ley 84 de 1989), a las Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la investigación en salud establecidas en la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia y a los protocolos internos de la Universidad Nacional de Colombia en cuanto al manejo y disposición de material biológico.

**Ecuación 3-3.** Cálculo de porcentaje de inhibición en el ensayo *in vivo*

$$\text{Porcentaje (\%)} \text{ de inhibición} = \frac{\text{Parasitemia de testigo} - \text{Parasitemia de tratamiento}}{\text{Parasitemia de testigo}} \times 100$$

**Tabla 3-2.** Criterios de clasificación en nivel de actividad en el modelo *in vivo* (Do. 250 mg/Kg/día) (Rasoanavio *et al.*, 2004, RITAM).

Porcentaje de inhibición (%)	Nivel de actividad
100- 90	Muy buena a buena actividad
90 -50	Buena a moderada
50 - 10	Moderada a débil
0	Inactiva

### 3.7.4 Prueba de inhibición de la biocrystalización del heme (FBIT)

Las fracciones activas en el modelo *in vitro* y los compuestos aislados de las dos especies vegetales se evaluaron en el ensayo de FBIT (Deharo *et al.*, 2002), con el fin de identificar fracciones o sustancias con posible actividad inhibidora de la biocrystalización del heme.

Las muestras se disolvieron en DMSO y se diluyeron para obtener cuatro concentraciones, 10.0, 5.0, 2.5 y 1.25 mg/mL, en el caso de extractos o fracciones y 1.0, 0.5, 0.25 y 0.12 mg/mL para compuestos puros, cada concentración fue evaluada por triplicado. Cada placa contó con un control positivo (cloroquina a concentraciones de 0.05, 0.025, 0.0125 y 0.00625 mg/mL) y un control de vehículo de los tratamientos (DMSO) (Anexo 3).

En cada pozo de la placa, se dispusieron en orden estricto 50  $\mu$ L de solución de hemina recientemente preparada (0.5 mg/mL en DMSO), 100  $\mu$ L de tampón de acetato de sodio (pH 4.45) y 50  $\mu$ L de solución del extracto o 50  $\mu$ L del control respectivo.

La placa de 96 pozos se incubó a 37°C por 22 horas (Deharo *et al.*, 2002), periodo después del cual se realizó la lectura espectroscópica a 415 nm. La inhibición de la cristalización de ferriprotoporfirina IX (FPP-IX) producida por cada muestra se expresó en porcentaje de inhibición aplicando la Ecuación 3-4. Se consideraron activas las muestras con un porcentaje de inhibición de la biocristalización superior al 50%, como mínimo a la concentración más alta evaluada (10 mg/mL). La determinación de la  $CI_{50}$  se realizó mediante análisis de regresión no lineal de los porcentajes de inhibición vs el logaritmo de las concentraciones empleando el programa GraphPad Prism 5<sup>®</sup>, expresando los resultados como la media  $\pm$  EMS de tres ensayos independientes.

**Ecuación 3-4.** Cálculo de porcentaje de inhibición en el ensayo de FBIT

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Absorbancia Control} - \text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia control}} \times 100$$



## Resultados y Discusión

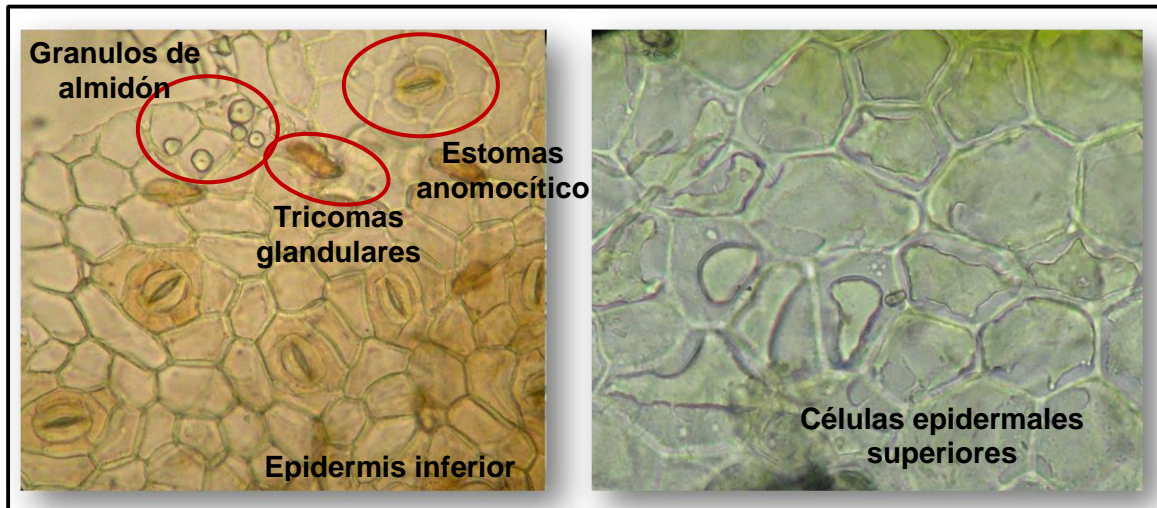
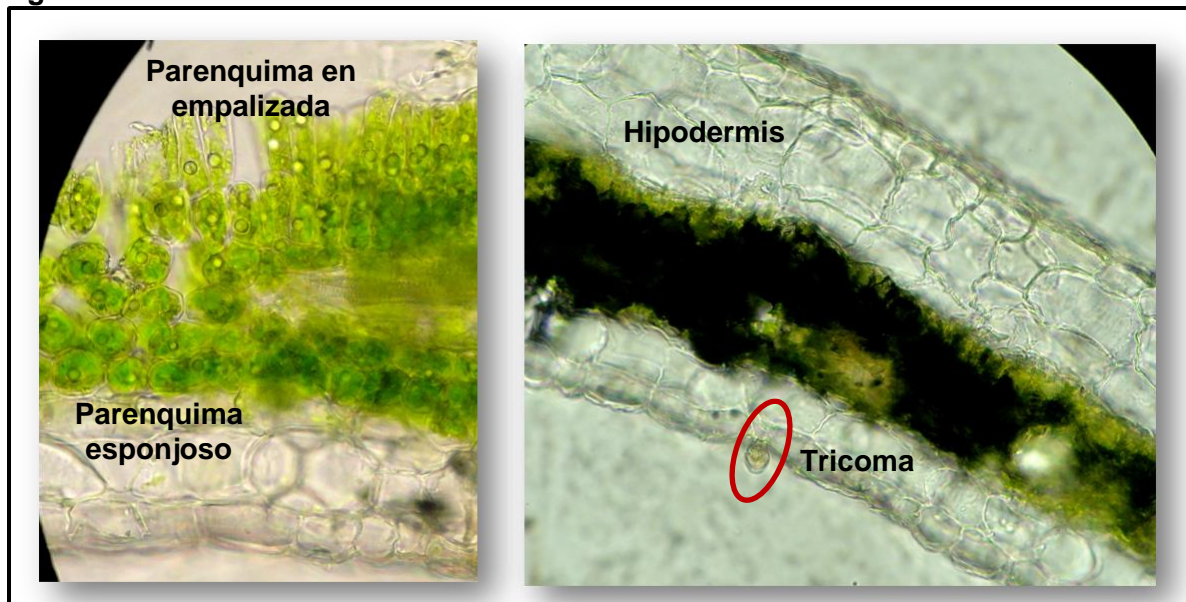
Las especies objeto del presente estudio fueron seleccionadas considerando información previa generada por el grupo de investigación Principios Bioactivos en Plantas Medicinales donde *P. cumanense* y *P. holtonii* fueron clasificadas como promisorias en ensayos de tamizaje frente a *P. falciparum in vitro* con  $CI_{50} < 1.0 \mu\text{g/mL}$  (Garavito *et al.*, 2006), estos resultados motivaron el estudio fitoquímico y farmacológico de los extractos etanólicos de las partes aéreas de las dos especies.

### 4.1 Caracterización microscópica del material vegetal

El material vegetal fue identificado como *Piper cumanense* H.B.K. y *Piper holtonii* registrado en el Herbario Nacional Colombiano con número COL 468660 y COL468663 respectivamente, la clasificación fue realizada por el Dr. Ricardo Callejas de la Universidad de Antioquia.

#### 4.1.1 *Piper cumanense*

Las observaciones de cortes transversales y longitudinales de las hojas de *Piper cumanense* permitieron determinar que en vista frontal la epidermis tanto en el haz como en el envés está constituida por células con paredes rectas, con estomas tipo anomocítico, tricomas glandulares sésiles y gránulos de almidón con hilio concéntrico predominantes en la cara adaxial (Figura 4-1). En la lámina foliar en corte transversal se observa la epidermis seguida de hipodermis con células de mayor tamaño en la cara adaxial. En corte transversal el mesófilo es del tipo dorsiventral, con parénquima en empalizada biseriado y el esponjoso de dos a tres filas (Figura 4-2).

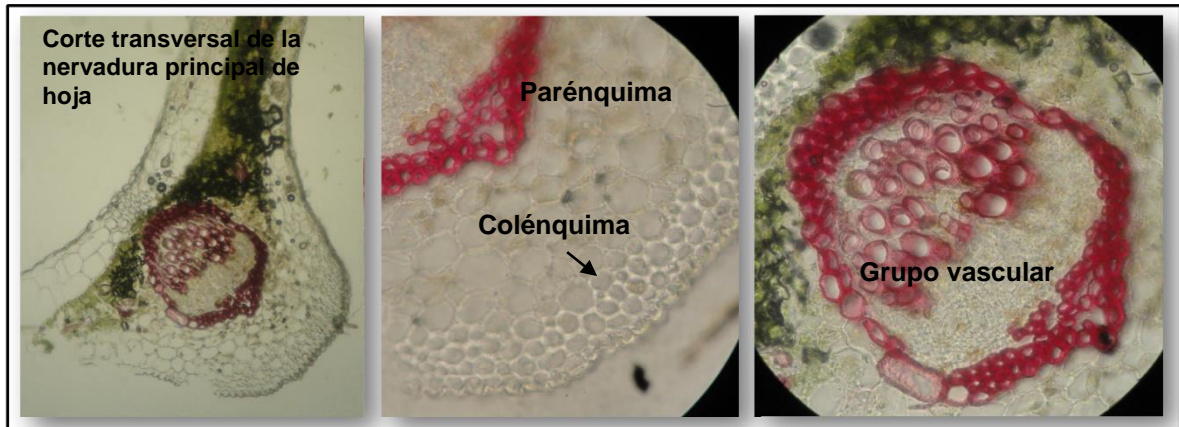
**Figura 4-1.** Epidermis superior e inferior de *P. cumanense***Figura 4-2.** Corte transversal de la lámina foliar de *P. cumanense*.

La nervadura principal en sección transversal exhibe contorno marcadamente convexo en la cara abaxial, la epidermis está conformada por una capa de células grandes redondeadas, adyacente a la epidermis se evidencia colénquima anular conformado por hasta tres filas de células, seguido de parénquima de relleno con algunos granos de almidón y agujas de oxalato de calcio (Figura 4-3). Las inclusiones no protoplasmáticas encontradas tanto en cortes como en el material molido son rafidios de oxalato de calcio

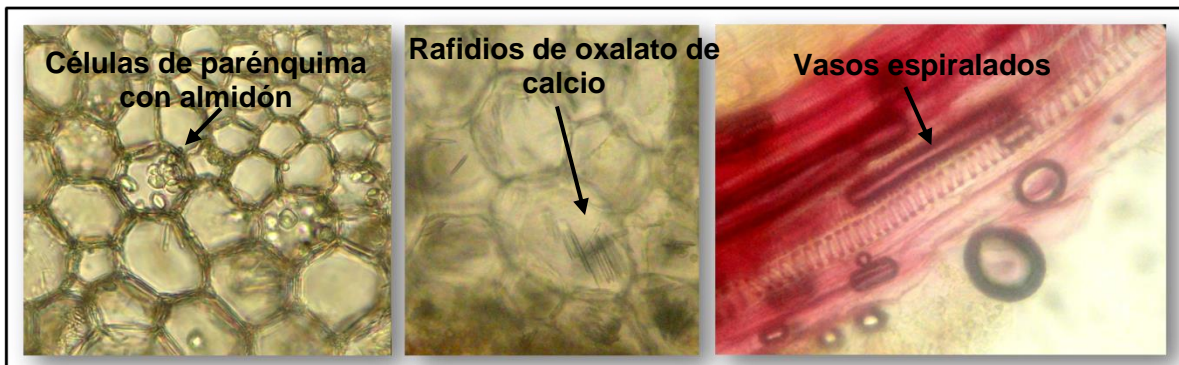


y almidón, en el material molido se observan células esclerenquimáticas, fibras, vasos reticulados y espiralados (Figura 4-4).

**Figura 4-3.** Corte transversal de la nervadura principal *P. cumanense*



**Figura 4-4.** Inclusiones no protoplasmáticas de *P. cumanense*

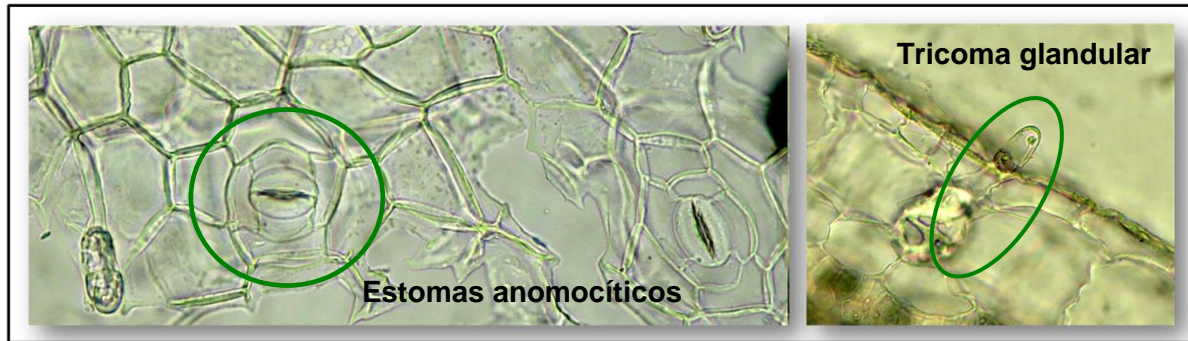


#### 4.1.2 *Piper holtonii*

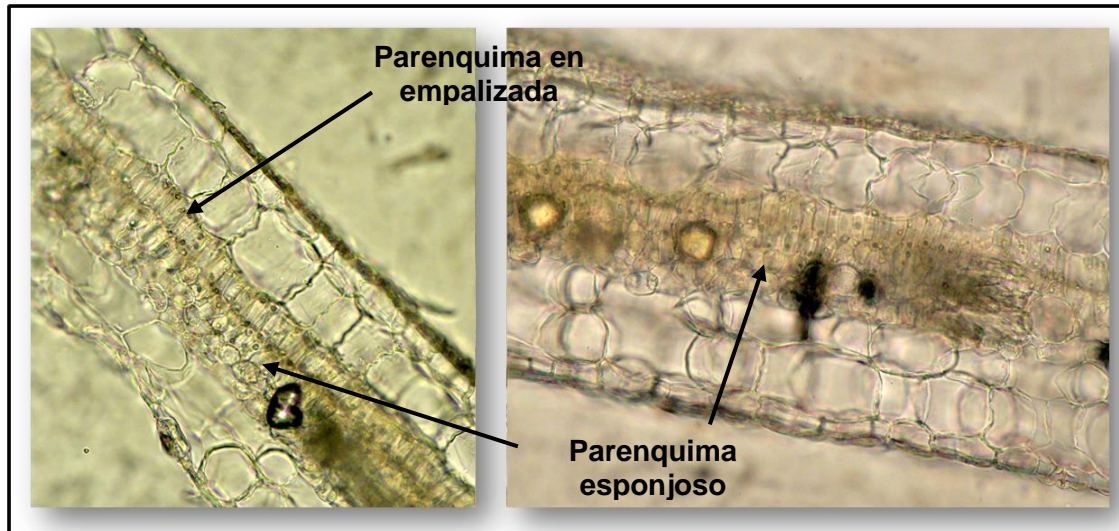
Las observaciones de cortes trasversales y longitudinales de las hojas de esta especie permitieron observar en vista frontal que la epidermis tanto en el haz como en el envés posee células con paredes rectas, el envés presenta estomas tipo anomocítico. Se observan tricomas glandulares sésiles (Figura 4-5).

En la lámina foliar en corte transversal se observa la epidermis seguida de hipodermis y células oleíferas que intensifican su color al colorearlas con Sudan III. En corte transversal el mesófilo es del tipo dorsiventral, con parénquima en empalizada biseriado y el esponjoso en tres filas (Figura 4-6).

**Figura 4-5.** Epidermis inferior de *P. holtonii*

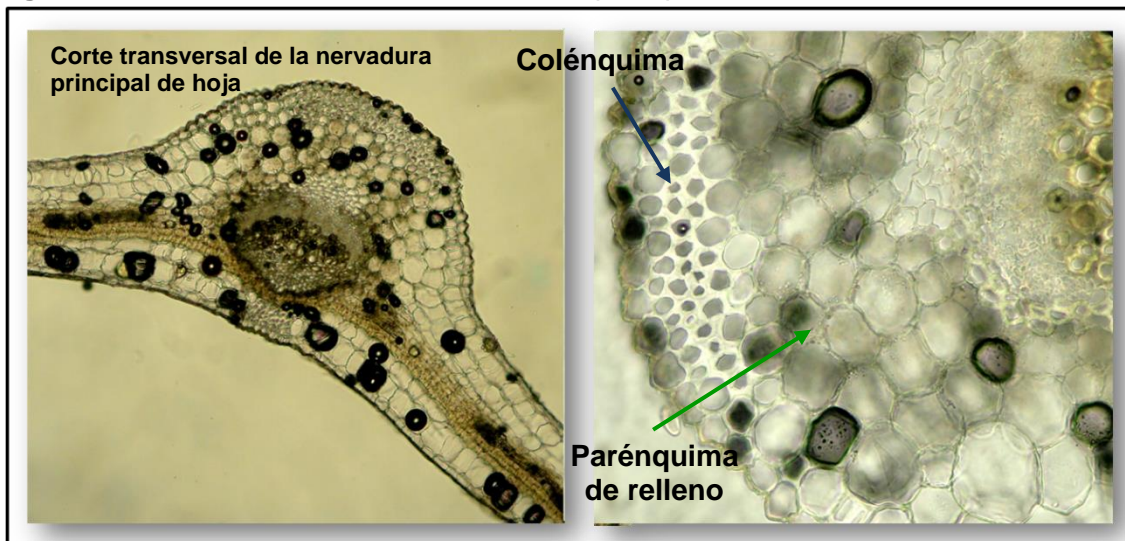


**Figura 4-6.** Corte transversal de la lámina foliar *P. holtonii*



La nervadura principal en sección transversal exhibe contorno marcadamente convexo en el envés, la epidermis está conformada por una capa de células grandes redondeadas, adyacente a la epidermis se evidencia colénquima angular conformado por hasta tres filas de células, seguido de parénquima de relleno con cristales de oxalato de calcio. El grupo vascular es del tipo colateral (Figura 4-7). En el material seco y molido se observan células esclerenquimáticas, fibras, vasos reticulados y espiralados.

**Figura 4-7.** Corte transversal de la nervadura principal de *P. holtonii*



El análisis microscópico de las dos especies de *Piper* permitió recopilar datos que contribuyen a la caracterización y control de calidad del material vegetal y son una herramienta importante para la clasificación taxonómica.

Aunque *Piper cumanense* y *P. holtonii* pueden ser fácilmente diferenciadas macroscópicamente, comparten importantes características anatómicas microscópicas dentro de las que se pueden destacar la presencia de epidermis hipostomática con estomas tipo anomocítico, característica que ha sido reportada para otras especies del género como *Piper hieronymi* y *P. tucumanum* (Arambarri et al., 2009; Cantero et al., 2005), las dos especies presentan similitud en la epidermis tanto del haz como del envés, constituidas por células de paredes rectas e hipodermis en ambas caras de la lámina foliar, característica reportada para *P. aduncum* y *Piper amalago* y relacionada con la protección del parénquima fotosintético a la radiación solar excesiva (Ariza & Bonzani, 1992).

Ambas especies presentan en sus hojas tricomas glandulares sésiles pequeños y alargados, característica común a las especies del género analizadas microscópicamente reportadas en la literatura (Arambarri *et al.*, 2009; Cantero *et.al.*, 2005), también presentan una nervadura principal marcadamente convexa en la cara del envés y mesófilo de tipo dorsiventral. La presencia de oxalato de calcio en las dos especies fue evidente, sin embargo en *P. cumanense* el oxalato de calcio se encuentra en forma de rafidios en células del parénquima y en *P. holtonii* se observaron rosetas y cristales. En *P. cumanense* se observan esferocristales de color amarillo que intensifican su color por adición de NaOH al 10% y que por analogía con otras especies pueden corresponder a depósitos de flavonoides. *P. holtonii* presenta células oleíferas que intensificaron su color con Sudan III y que representan depósitos de aceites esenciales. De acuerdo a la revisión bibliográfica este es el primer reporte de las características microscópicas de *P. cumanense* y *P. holtonii*.

## 4.2 Extracción y fraccionamiento

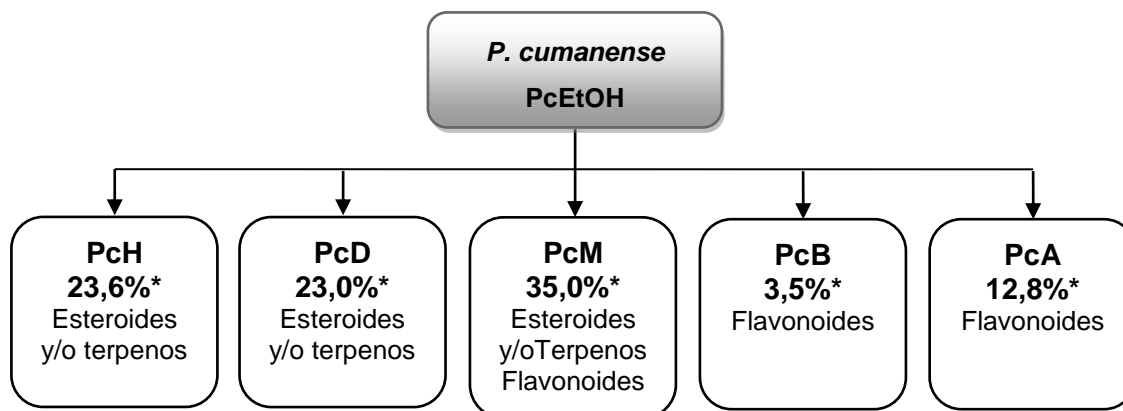
El fraccionamiento de los extractos etanólicos de las dos especies se realizó con el fin de obtener fracciones de diferente polaridad para ser evaluadas inicialmente en el ensayo de actividad antiplasmódica *in vitro* frente a *Plasmodium falciparum*.

El material seco y molido de las partes aéreas de *P. cumanense* (1500 g) produjo 400 g (26% respecto al material seco) de extracto etanólico por percolación exhaustiva, 300 g del extracto seco se sometieron a partición líquido-líquido y filtración sobre sílica gel 60 para obtener las fracciones PcH (71.0 g), PcD (69.0 g), PcM (105.0 g), PcB (10.4 g), PcA (38.3 g).

El material vegetal de *P. holtonii* (750 g) después de percolación exhaustiva en etanol rindió 95,0 g (12 % respecto al material seco) de extracto total (PhEtOH), el proceso de fraccionamiento dio lugar a las fracciones PhH (18,4 g), PhD (12,6 g), PhM (1,8 g), PhB (10,4 g) y PhA (38,3 g).

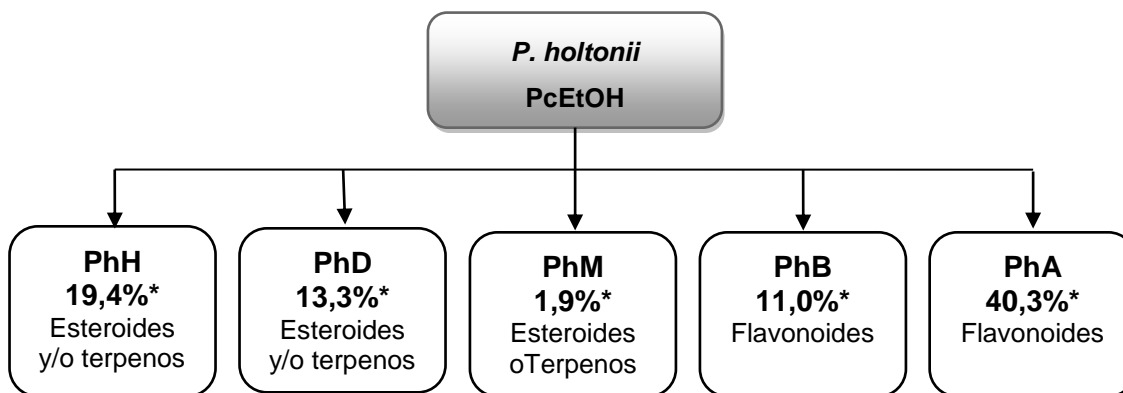
Las fracciones obtenidas de las dos especies fueron analizadas por CCD y se determinaron los grupos de metabolitos mayoritarios que contenía cada fracción (Figura 4-8).

Figura 4-8. Grupos de metabolitos detectados por CCD en las fracciones de *P. cumanense* y *P. holtonii*



PcEtOH: Extracto etanólico de *P. cumanense*, PcH: Fracción hexánica, PcD: Fracción clorofórmica, PcM: fracción metanólica, PcB: Fracción butanólica, PcA: Fracción acuosa.

\*Rendimiento expresado respecto al extracto seco.

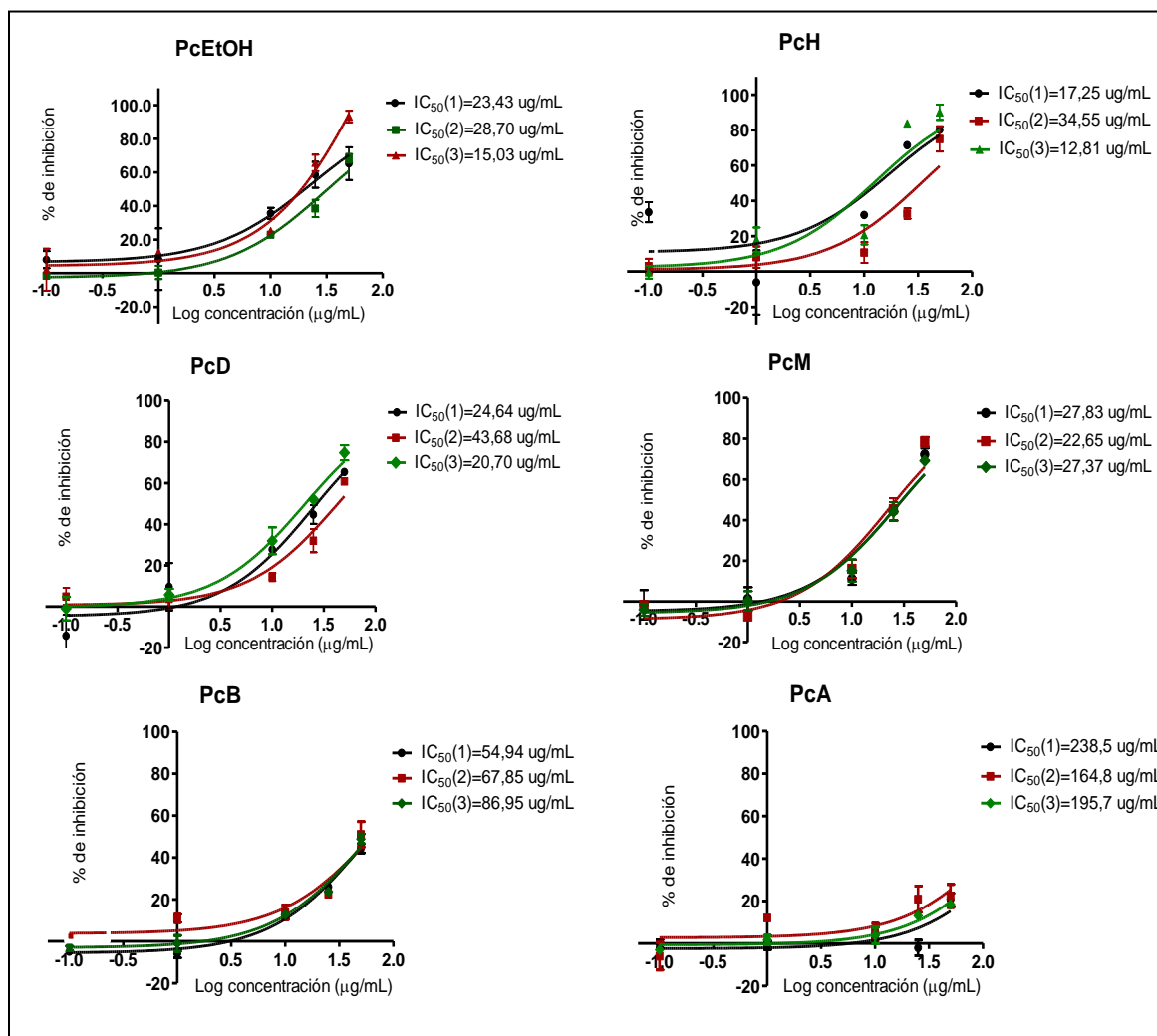


PhEtOH: Extracto etanólico de *P. holtonii*, PhH: Fracción hexánica, PhD: Fracción clorofórmica, PhM: fracción metanólica, PhB: Fracción butanólica, PhA: Fracción acuosa.

\*Rendimiento expresado respecto al extracto seco.

### 4.3 Evaluación biológica de extractos y fracciones

Los extractos etanólicos y las fracciones obtenidas en el proceso de partición se evaluaron en el ensayo de actividad antiplasmódica *in vitro* con el fin de identificar fracciones que presenten inhibición del crecimiento de *P. falciparum* a una concentración menor a 50 µg/mL. Los resultados de actividad antiplasmódica de fracciones de *P. cumanense* se resumen en la Tabla 4-1, las gráficas concentración-respuesta para cada una de las muestras evaluadas se presentan en la Figura 4-9. Las gráficas concentración-respuesta obtenidas para el patrón cloroquina (CQ) se muestran en la Figura 4-11.

**Figura 4-9.** Porcentaje de inhibición vs. Log de la concentración del extracto y fracciones de *P. cumanense* en el ensayo de actividad antiparasitaria *in vitro* frente a *P. falciparum*<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Actividad de las fracciones obtenidas a partir de las partes aéreas de *P. cumanense* sobre formas jóvenes (0-20 horas) de *P. falciparum*, cultivadas durante 48 h a concentraciones de 50, 25, 10, 1 0,1 µg/mL, cada concentración fue evaluada por triplicado y cada ensayo contó con controles de blanco y vehículo y con control de cloroquina, PcEtOH: Extracto etanólico de *P. cumanense*, PcH: Fracción hexánica, PcD: Fracción clorofórmica, PcM: Fracción metanólica, PcB: Fracción butanólica, PcA: Fracción acuosa.

— Ensayo 1  
— Ensayo 2  
— Ensayo 3

**Tabla 4-1.** Valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenidos en el ensayo de actividad antiparasitaria *in vitro* frente a *P. falciparum* para cada una de las fracciones obtenidas de *Piper cumanense*.

Muestras <sup>a</sup>	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ EMS	% de hemólisis
PcEtOH	<b>22.4 <math>\pm</math> 4.0</b>	23.02 $\pm$ 0.12
PcH	<b>21.5 <math>\pm</math> 6.6</b>	2.81 $\pm$ 0.03
PcD	<b>29.7 <math>\pm</math> 7.1</b>	3.45 $\pm$ 0.06
PcM	<b>26.0 <math>\pm</math> 1.7</b>	36.88 $\pm$ 0.04
PcB	>50	1.08 $\pm$ 0.01
PcA	>50	2.13 $\pm$ 0.09
CQ	0.045 $\pm$ 0.007	0.3 $\pm$ 0.12
<i>Cinchona sp.</i>	<0.1	ND

<sup>a</sup>PcEtOH: Extracto etanólico de *Piper cumanense*, PcH: Fracción hexánica, PcD: fracción clorofórmica, PcM: fracción metanólica, PcB: fracción Butanólica, PcA: fracción acuosa, CQ: Cloroquina, EMS: Error medio estándar, ND: No determinada. Los valores se expresan como la media de tres ensayos independientes determinados por regresión no lineal con el software GraphPad Prism. Las muestras resaltadas en la tabla corresponden a las clasificadas como activas.

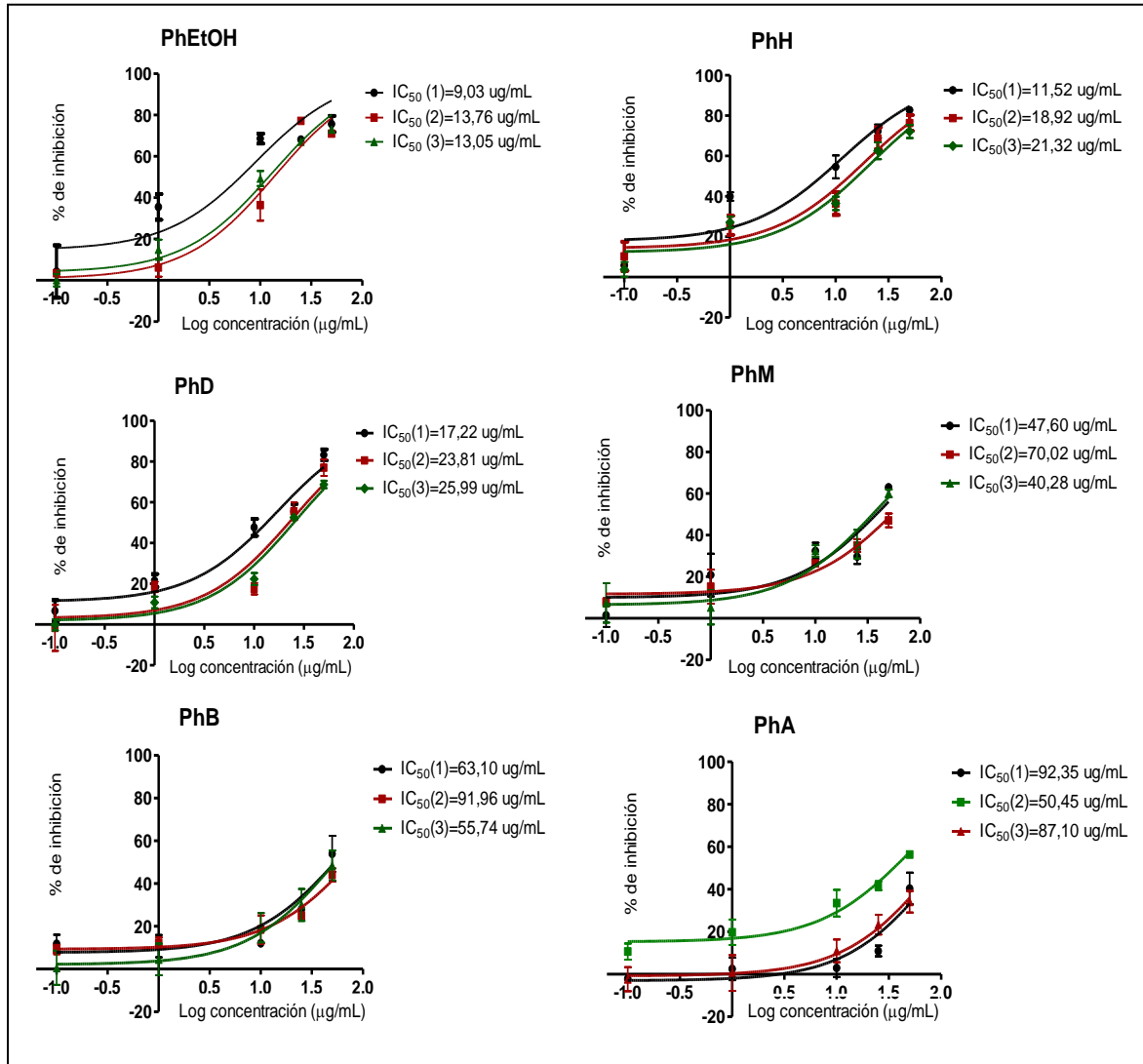
Los resultados de actividad antiplasmódica del extracto y fracciones de *P. holtonii* se resumen en la Tabla 4-2 y las gráficas concentración-respuesta para cada una de las muestras evaluadas se presentan en la Figura 4-10.

**Tabla 4-2.** Valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenidos en el ensayo de actividad antiparasitaria *in vitro* frente a *P. falciparum* para cada una de las fracciones de *Piper holtonii*.

Muestras	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ EMS	% de hemólisis (50 $\mu\text{g/mL}$ )
PhEtOH	<b>12.0 <math>\pm</math> 1.5</b>	1.02 $\pm$ 0.02
PhH	<b>17.2 <math>\pm</math> 3.0</b>	0.22 $\pm$ 0.01
PhD	<b>22.3 <math>\pm</math> 2.6</b>	0.38 $\pm$ 0.01
PhM	>50	3.29 $\pm$ 0.21
PhB	>50	1.45 $\pm$ 0.04
PhA	>50	3.18 $\pm$ 0.10
CQ	0.045 $\pm$ 0.007	0.3 $\pm$ 0.12
<i>Cinchona sp.</i>	<0.1	ND

PhEtOH: Extracto etanólico de *Piper holtonii*, PhH: Fracción hexánica, PhD: fracción clorofórmica, PhM: fracción metanólica, PhB: fracción Butanólica, PhA: fracción acuosa, CQ: Cloroquina, EMS: Error Medio Estándar. Los valores se expresan como la media de tres ensayos independientes determinados por regresión no lineal con el software GraphPad Prism. Las muestras resaltadas en la tabla corresponden a las clasificadas como activas.

**Figura 4-10.** Porcentaje de inhibición vs. Log de la concentración del extracto y fracciones de *P.holtonii* en el ensayo de actividad antiparasitaria *in vitro* frente a *P. falciparum*<sup>a</sup>

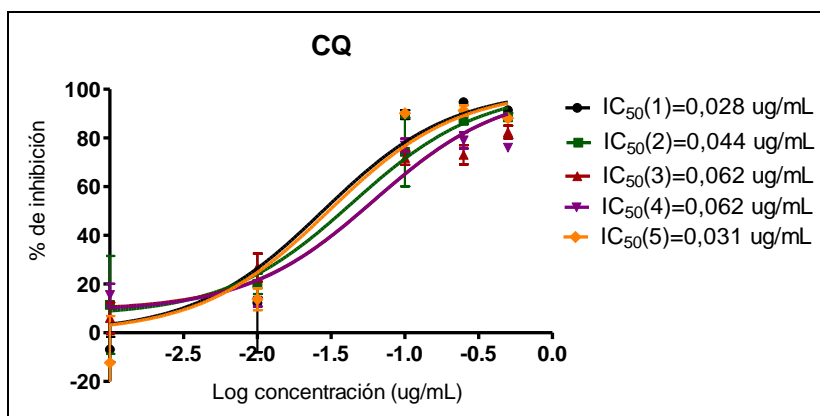


<sup>a</sup>Actividad de las fracciones obtenidas a partir de las partes aéreas de *P. holtonii* sobre formas jóvenes (0-20 horas) de *P. falciparum*, cultivadas durante 48 h a concentraciones de 50,0, 25,0, 10,0, 1,0, 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , cada concentración fue evaluada por triplicado y cada ensayo contó con controles de blanco y vehículo y con control de cloroquina, PhEtOH: Extracto etanólico de *P. holtonii*, PhH: Fracción hexánica, PhD: Fracción clorofórmica, PhM: fracción metanólica, PhB: Fracción butanólica, PhA: Fracción acuosa.

- Ensayo 1
- Ensayo 2
- Ensayo 3



**Figura 4-11.** Porcentaje de Inhibición vs Log de la concentración de Cloroquina en el ensayo de actividad antiplasmódica *in vitro*<sup>a</sup>



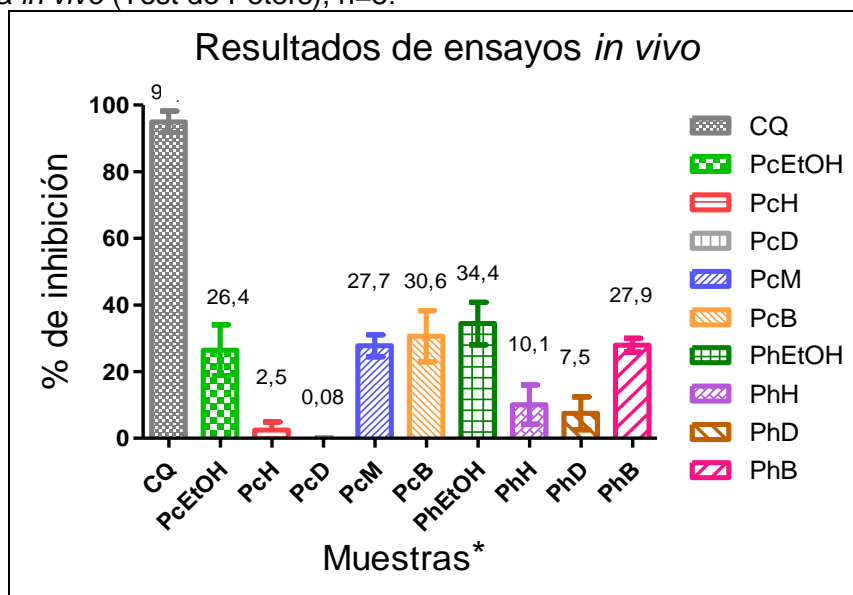
<sup>a</sup> Gráficas de CQ (cloroquina) a concentraciones de 0.5, 0.25, 0.10, 0.01, 0.001  $\mu\text{g/mL}$ .

Los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antiplasmódica para extractos y fracciones permitieron identificar y clasificar como muestras con actividad débil a moderada en el ensayo *in vitro* las fracciones hexánica, clorofórmica y metanólica de *P. cumanense* (PcH, PcD y PcM), y las fracciones en hexano y cloroformo (PhH y PhD) del extracto etanólico de *P. holtonii*, estos resultados guiaron la siguiente etapa de la investigación, las fracciones fueron evaluadas en ensayos de actividad antimalárica *in vivo* y seleccionadas para continuar el proceso de aislamiento, purificación e identificación de metabolitos secundarios. Las fracciones PcB y PhB se incluyeron en los ensayos de actividad antimalárica *in vivo* considerando que la caracterización fitoquímica preliminar indicó la presencia de flavonoides, metabolitos que han sido relacionados con actividad antimalárica en especies del género *Piper* (Portet *et al.*, 2007). Los valores de parasitemias obtenidas en el ensayo *in vivo* se resumen en la Tabla 4-3 y los porcentajes de inhibición generados por cada muestra respecto al grupo control se presentan en la Figura 4-12. Todas las muestras fueron evaluadas a una dosis de 250 mg/Kg/día.

**Tabla 4-3.** Valores de parasitemia obtenidos en el ensayo de actividad antimalárica *in vivo* frente a *P. berghei* para cada una de las fracciones obtenidas de *P. cumanense* y *P. holtonii* (Do. 250 mg/Kg/día)

Muestras*	Parasitemia (%) $\pm$ DS**
PcEtOH	32.64 $\pm$ 6.73
PcH	43.29 $\pm$ 2.42
PcD	44.35 $\pm$ 0.11
PcM	32.07 $\pm$ 2.95
PcB	30.79 $\pm$ 5.88
PhEtOH	29.09 $\pm$ 5.67
PhH	39.90 $\pm$ 4.55
PhD	41.07 $\pm$ 4.89
PhB	31.99 $\pm$ 1.6
CQ	2.24 $\pm$ 10.8
DMSO	44.38 $\pm$ 4.09

\*PcEtOH: Extracto etanólico de *Piper cumanense*, PcH: Fracción hexánica, PcD: fracción clorofórmica, PcM: fracción metanólica, PcB: fracción Butanólica, PcA: fracción acuosa, PhEtOH: Extracto etanólico de *Piper holtonii*, PhH: Fracción hexánica, PhD: fracción clorofórmica, PhM: fracción metanólica, PhB: fracción Butanólica, PhA: fracción acuosa, CQ: Cloroquina, \*\*DS: Desviación estándar.

**Figra 4-12.** Porcentaje de inhibición de la parasitemia en la evaluación de actividad antimalárica *in vivo* (Test de Peters), n=5.

\*PcEtOH: Extracto etanólico de *Piper cumanense*, PcH: Fracción hexánica de *P. cumanense*, PcD: fracción clorofórmica, PcM: fracción metanólica, PcB: fracción butanólica, PhEtOH: Extracto etanólico de *Piper holtonii*, PhH: Fracción hexánica, PhD: fracción clorofórmica, PhB: fracción butanólica, CQ: Cloroquina.

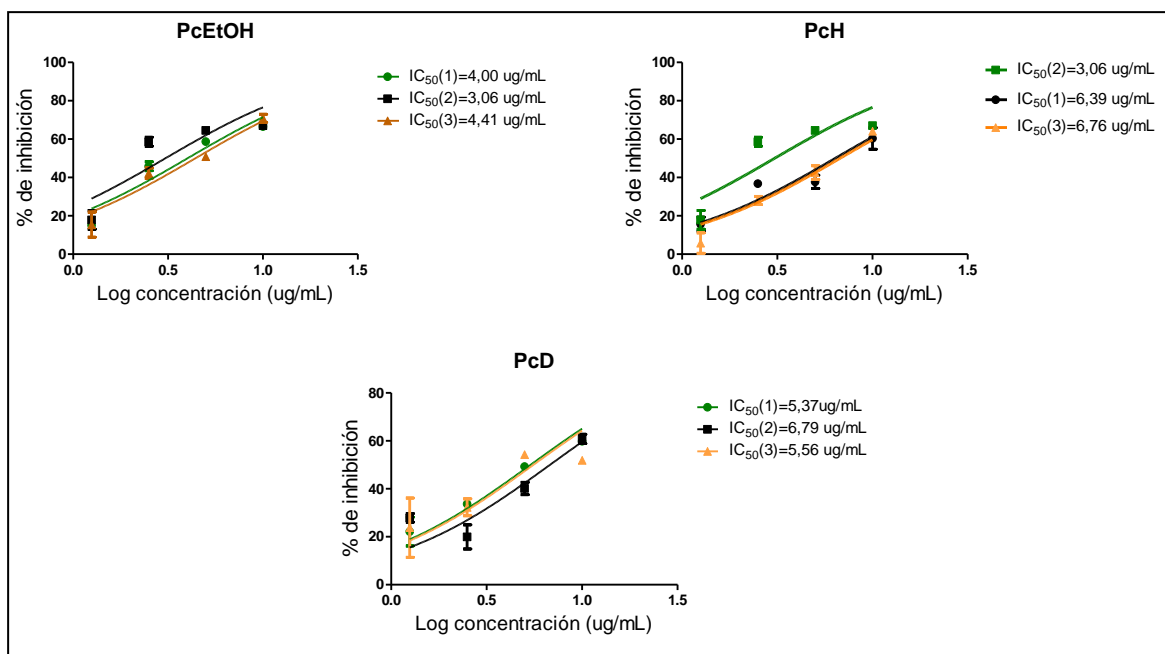
Las fracciones que presentaron actividad en el ensayo *in vitro* fueron evaluadas en el ensayo de FBIT. Los resultados de  $CI_{50}$  para las fracciones de *P. cumanense* y *P. holtonii* se presentan en la Tabla 4-4. La Figura 4-13 muestra el comportamiento de porcentaje de inhibición vs Logaritmo concentración para las muestras que presentaron actividad en este ensayo.

**Tabla 4-4.** Ensayo de FBIT ( $CI_{50}$ ) de fracciones de *P. cumanense* y *P. holtonii*

Muestras <i>P. cumanense</i>	$CI_{50}$ (mg/mL) $\pm$ EMS	Muestras <i>P. holtonii</i>	$CI_{50}$ (mg/mL) $\pm$ EMS
PcEtOH	3.83 $\pm$ 0.39	PhEtOH	>10
PcH	5.41 $\pm$ 1.28	PhH	>10
PcD	6.22 $\pm$ 0.61	PhD	>10
PcM	>10	PhB	>10
PcB	>10	CQ*	0.05 $\pm$ 0.01

\*CQ: Cloroquina

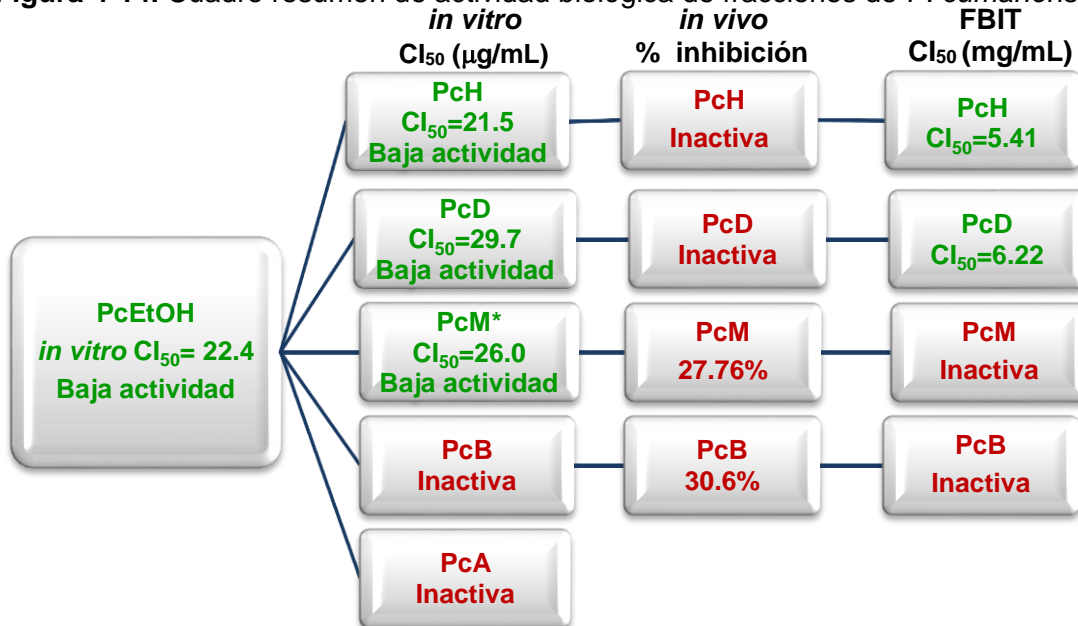
**Figura 4-13.** Porcentaje de inhibición vs Log de la concentración de los ensayos de FBIT de fracciones de *P. cumanense*



<sup>a</sup>Actividad de las fracciones obtenidas a partir de las partes aéreas de *P. cumanense* en el ensayo FBIT después de 22 h a concentraciones de 10.0, 5.0, 2.5 y 1.25  $\mu\text{g/mL}$ , cada concentración fue evaluada por triplicado y cada ensayo contó con control de vehículo y control de cloroquina.

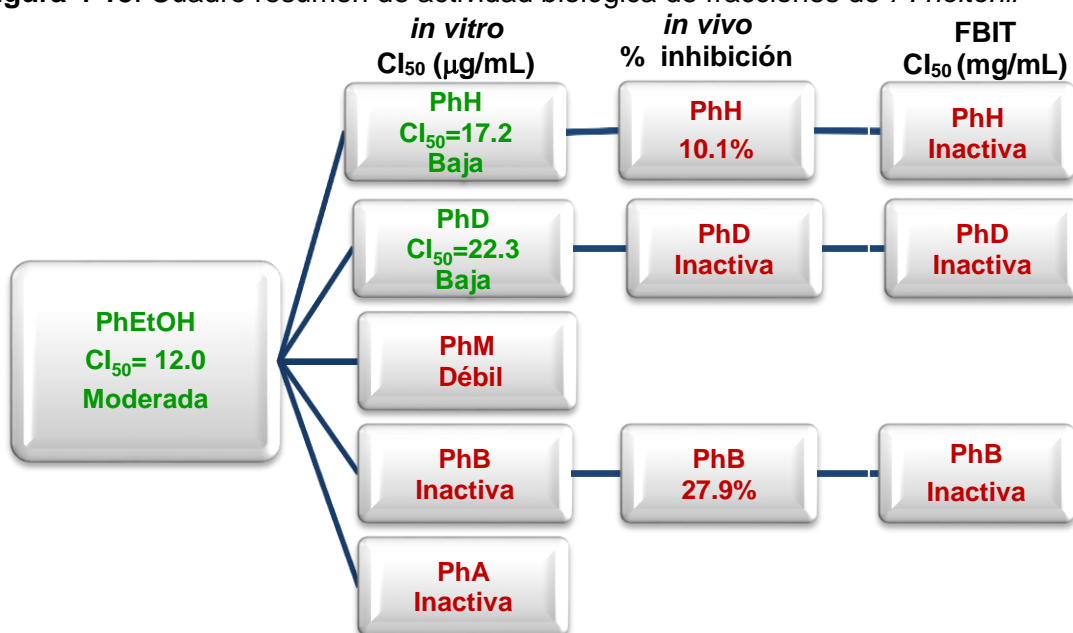
Los resultados de actividad biológica de extractos y fracciones se resumen en las Figuras 4-14 y 4-15, a partir de estos resultados se decidió seleccionar las fracciones PcH, PcD, PcM, PcB, PhH, PhD y PhB de las especies en estudio para continuar los procedimientos de aislamiento y purificación.

**Figura 4-14.** Cuadro resumen de actividad biológica de fracciones de *P. cumanense*



\*La fracción PcM presento efecto hemolítico

**Figura 4-15.** Cuadro resumen de actividad biológica de fracciones de *P. holtonii*



Las muestras que no aparecen en el gráfico no fueron evaluadas en el respectivo ensayo.

Una vez se obtuvieron los extractos y fracciones de diferente polaridad de las especies, se sometieron a caracterización fitoquímica por CCD y a evaluación de actividad biológica frente al cultivo *in vitro* de *P. falciparum*, los resultados de actividad antiparasitaria obtenidos para los extractos en esta ocasión difirieron de los resultados previos, pasando a clasificar los extractos etanólicos como muestras con actividad moderada, lo que puede atribuirse a factores como la época de colecta, la edad de la planta, factores medio ambientales, entre otros. El análisis de los resultados de actividad antiparasitaria de las fracciones permitieron seleccionar cuales serian sometidas a procesos de aislamiento y purificación de metabolitos, estos resultados también permiten proponer la realización a futuro de un perfil metabolómico de las especies en diferentes épocas del año y en diferentes estados de crecimiento de la planta para relacionar la presencia de los metabolitos secundarios con la actividad biológica. La actividad moderada observada tanto en los extractos como en las fracciones de las especies estudiadas soportaría el hecho de combinar plantas como se hace en las preparaciones tradicionales y abre la posibilidad a evaluar otro tipo de actividades relacionadas con la sintomatología de la enfermedad.

Al fraccionar los extractos etanólicos PcEtOH y PhEtOH la actividad no se concentró en una fracción, no obstante las fracciones de menor polaridad presentaron la mayor actividad antiplasmódica (Tablas 4-1 y 4-2), resultado similar al obtenido para otras especies de *Piper* que han sido objeto de evaluación antimaplasmodica cuyas fracciones activas corresponden a las obtenidas en hexano, diclorometano o cloroformo (Jenett *et al.*, 1999, Portet *et al.*, 2007).

Los valores de  $CI_{50}$  de actividad antiplasmódica *in vitro* de las fracciones de *Piper cumanense* PcH, PcD y PcM no mostraron diferencia significativa respecto a la  $CI_{50}$  del extracto PcEtOH (Test de Dunnett  $p < 0,05$ ), resultado que indicaría que la actividad sobre el ciclo eritrocítico presentado por el extracto no es responsabilidad de un solo metabolito, considerando que los perfiles fitoquímicos de las fracciones fueron diferentes.

Con el fin de determinar el efecto de las fracciones sobre la integridad de los eritrocitos se realizó el ensayo de actividad hemolítica, encontrando que únicamente la fracción metanólica de *P. cumanense* (PcM) generó hemólisis significativa con un porcentaje de hemólisis del 36.9%, considerando la polaridad de la muestra se puede inferir que esta

actividad hemolítica es debida a la presencia de saponinas, la fracción PcM se consideró para los procesos de aislamiento y purificación a pesar de su efecto hemolítico debido a que el perfil cromatográfico además de compuestos de tipo esteroidal/terpénico también evidenció otros metabolitos mayoritarios (flavonoides) que podrían ser responsables de la actividad antiplasmódica.

El extracto etanólico de *P. holtonii*, PhEtOH ( $CI_{50}=12.0\mu\text{g/mL}$ ), presentó actividad antiplasmódica significativamente diferente a las fracciones hexánica (PhH,  $CI_{50}=17.2\mu\text{g/mL}$ ) y clorofórmica (PhD,  $CI_{50}= 22.3\mu\text{g/mL}$ ), dato que fue confirmado por un test de Dunnett con un  $p < 0.05$ , esta diferencia puede atribuirse entre otros factores a un posible efecto sinérgico de metabolitos de baja polaridad que componen estas fracciones.

#### **4.4 Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios de *Piper cumanense***

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de actividad biológica se dio continuidad al aislamiento y purificación de metabolitos secundarios presentes en las fracciones seleccionadas. Se decidió aislar compuestos para ser sometidos nuevamente a evaluación antimalárica *in vitro*.

Los procesos de aislamiento y purificación se llevaron a cabo con las fracciones PcD, PcH, PcM, PcB de *P. cumanense* y las fracciones PhH, PhD y PhB de *P. holtonii*, encaminados al aislamiento de los metabolitos mayoritarios.

##### **4.4.1 *P. cumanense* fracción en Diclorometano (PcD)**

La fracción PcD (10 g) fue fraccionada por CC empleando como fase estacionaria sílica gel 60 con un tamaño de partícula de 63 a 200  $\mu\text{m}$ , la elución se inició con hexano como fase móvil aumentando la polaridad con adición de 5% de  $\text{CHCl}_3$  hasta  $\text{CHCl}_3$  al 100% y posteriormente con mezclas de  $\text{CHCl}_3$ : AcOEt (95:5 a 5:95), después de analizar las fracciones por CCD se reunieron en 29 fracciones.

La fracción PcD-3 (140 mg) de carácter líquido, reveló por CCD la presencia de una sustancia mayoritaria, esta se sometió a purificación por CC empleando 15 g de sílica gel eluyendo inicialmente con hexano 100%, aumentando la polaridad con adición de AcOEt al 2% hasta llegar a la mezcla hexano: AcOEt (90:10), posteriormente se realizaron adiciones de 10% de AcOEt hasta 100%. Se obtuvieron un total de 20 fracciones después de agruparlas por su comportamiento en CCD.

La fracción PcD3-6 obtenida de la columna anterior fue sometida a purificación por CC en sílica gel 60, en esta ocasión se empleó como fase móvil mezclas de hexano: AcOEt (90:10 a 10:90) para obtener un total de 10 fracciones. La fracción PcD3-6-3 se sometió a sucesivas CC empleando como fase móvil hexano: AcOEt (90:10) y hexano: AcOEt (80:20). Al final de éste proceso se obtuvo una muestra líquida que se mostró pura en CCD a la que se denominó **C1** (35 mg).

#### **4.4.2 *P. cumanense* fracción en hexano (PcH)**

La fracción PcH (10 g) fue fraccionada empleando sílica gel 60 como fase estacionaria y mezclas de hexano:  $\text{CHCl}_3$  en polaridad creciente como fase móvil, de esta columna se obtuvieron un total de 18 fracciones después de agruparlas por su comportamiento en CCD. La denominada **PcH-2** fue analizada por CG-MS.

La fracción PcH-14 (250 mg), mostró por CCD la presencia de metabolitos tipo esteroidal o terpénico al revelar con vainillina 1%/ $\text{H}_2\text{SO}_4$ /EtOH. Esta fracción fue sometida a una CC sobre sílica gel 60 empleando como fase móvil una mezcla de hexano: $\text{CHCl}_3$  (30:70) que dió lugar a 10 fracciones, la fracción PcH-14-6 presentó un precipitado que fue purificado por recristalización en metanol para obtener 34 mg de un sólido de color blanco que cristalizó en forma de agujas al que se denominó **C2**.

#### **4.4.3 *P. cumanense* fracción metanólica (PcM)**

La fracción metanólica (PcM) reveló por CCD la presencia de un flavonoide mayoritario y compuestos terpénicos y/o esteroidales, varias fracciones de 15 g se sometieron a separación en cromatografía en columna sobre sílica gel 60, la elución se inició con  $\text{CHCl}_3$  y la polaridad de la fase móvil se aumentó por la adición creciente de 5% de

acetato de etilo hasta 100%, posteriormente se eluyó con mezclas de AcOEt: MeOH (50:50) hasta MeOH 100%, como resultado de esta columna se obtuvieron 36 fracciones que fueron caracterizadas por CCD. La fracción PcM-10 (400 mg) reveló la presencia de un compuesto mayoritario que fue purificado empleando CC con sílica gel 60, eluida inicialmente con  $\text{CHCl}_3$  y posteriormente aumentando la polaridad con porciones de 5% de AcOEt hasta 100%. De esta columna se obtuvieron 15 fracciones, de las cuales la denominada PcM10-8 (80 mg) presentó el compuesto mayoritario y fue sometida nuevamente a CC eluida con cloroformo 100 %. Como resultado se obtuvieron 5 fracciones, la PcM10-8-2 (21 mg) se presentó como un sólido que cristalizó en forma de agujas y se denominó compuesto **C3**.

La fracción PcM-19 (2.5 g) mostró por CCD ( $\text{CHCl}_3$ : AcOEt 80:20) la presencia de flavonoides por lo que se purificó empleando CC con sílica gel 60, la elución comenzó con  $\text{CHCl}_3$  seguida de mezclas de  $\text{CHCl}_3$ : AcOEt (90:10) hasta AcOEt 100%, obteniéndose 23 fracciones. La fracción PcM 19-6 (530 mg) que presentó un compuesto principal fue nuevamente sometida a CC sobre sílica gel 60 con  $\text{CHCl}_3$ : AcOEt (70:30) como eluyente y después de analizar las fracciones por CCD se reunieron en 6 grupos. La fracción PcM 19-6-2 (110 mg) fue nuevamente sometida a CC sobre sílica gel 60 empleando  $\text{CHCl}_3$ : AcOEt (80:20) como fase móvil, obteniéndose 5 fracciones, de la fracción 2 cristalizó un sólido blanco al que se denominó compuesto **C4** (34 mg).

La fracción PcM-29 (480 mg) reveló por CCD con vainillina 1% / $\text{H}_2\text{SO}_4$ 10% /etanol la presencia de un compuesto mayoritario del tipo terpeno y/o esteroide por lo que fue sometida a CC sobre sílica gel 60 y eluida con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH (95:5) hasta metanol 100%, obteniéndose 14 fracciones. De estas la fracción PcM 29-7 presentó un precipitado que fue purificado por recristalización con metanol, obteniéndose un sólido blanco denominado **C5**. Debido a su baja solubilidad en los solventes empleados para el análisis por RMN fue necesario realizar la acetilación de la muestra, para tal efecto se tomaron 10 mg que fueron disueltos en 1 mL de piridina y 1 mL de anhídrido acético, esta solución se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas, tiempo después del cual se adicionó agua a 4°C y se realizó extracción con  $\text{CHCl}_3$  (3x5 mL). La fase orgánica se extrajo tres veces con HCl 10% (3 x 10 mL), posteriormente con agua



destilada y finalmente se secó con sulfato de sodio anhidro, el solvente fue retirado empleando rotaevaporador y vacío, la muestra resultante se denominó **C5a**.

#### 4.4.4 *P. cumanense* fracción butanol (PcB)

La fracción butanólica de *P. cumanense* aunque no presentó actividad biológica frente al ensayo de actividad antimalárica *in vitro*, fue la fracción que presentó mejor actividad en los ensayos *in vivo*.

La fracción PcB presentó en su caracterización por CCD con el revelador NP-PEG la presencia de flavonoides. El proceso de separación comenzó filtrando 900 mg de PcB (3 porciones de 300 mg c/u) en una columna de Sephadex LH-20 eluida con una mezcla MeOH: CHCl<sub>3</sub> (80:20), obteniéndose 16 fracciones. Las fracciones PcB-7 a PcB-16 revelaron por CCD la presencia de flavonoides en un sistema AcOEt:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH:HCOOH (100:27:11:11) revelando con NP-PEG.

La fracción PcB-7 (85 mg) fue sometida a purificación sucesivamente (4 veces) utilizando una columna de Sephadex LH-20 y MeOH:CHCl<sub>3</sub> (80:20) como fase móvil, de este proceso se obtuvo un sólido amarillo (12 mg) al que se le asignó el código **C6** que se presentó puro en CCD revelando con NP-PEG.

La fracción PcB-8 (22 mg) también fue purificada por cromatografía en Sephadex LH-20, empleando MeOH:CHCl<sub>3</sub> (90:10) como fase móvil, después de pasar tres veces la muestra en el mismo sistema, se obtuvo un sólido de color amarillo (9 mg) que se codificó como **C7**.

La fracción PcB-10 reveló positivo para flavonoides, la CCD mostró dos compuestos principales con el reactivo NP-PEG con valores de R<sub>f</sub> en 0,6 y 0,4 en el sistema de elución AcOEt: H<sub>2</sub>O: CH<sub>3</sub>COOH: HCOOH (100:27:11:11), esta fracción se purificó repetidamente (4 veces) en una columna de Sephadex LH-20 empleando MeOH como eluyente. Al final del proceso se obtuvo un sólido de color amarillo (8 mg) al que se denominó **C8**.

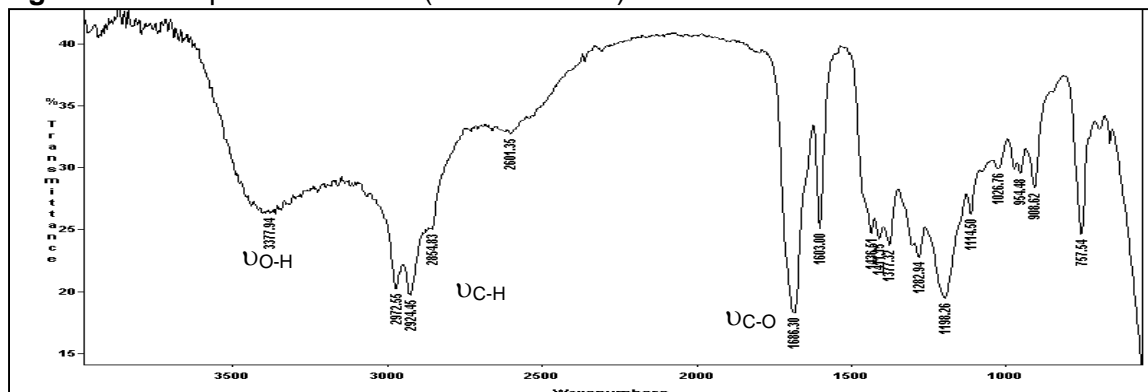
## 4.5 Identificación de metabolitos de *P. cumanense*

En algunas de las Figuras de los espectros se colocan las estructuras químicas o fragmentos de estas, con el fin de facilitar el análisis de los espectros correspondientes.

### 4.5.1 Identificación del compuesto C1

El compuesto **C1** fue aislado como un líquido viscoso de color amarillo, analizado por técnicas de IR, RMN, EM y por comparación con datos de la literatura. El espectro de IR (Figura 4-16) presentó una banda ancha de absorción en  $3378\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{O-H}}$ ) de estiramiento axial de OH característico de ácido carboxílico, función que también se ve reflejada en la banda intensa en  $1686\text{ cm}^{-1}$  de deformación axial de C=O ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), además se presentaron bandas en  $2972$  y  $2924\text{ cm}^{-1}$  de  $\nu_{\text{C-H}}$  ( $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$ ) y entre  $1603$  y  $1450\text{ cm}^{-1}$  características de C=C de aromáticos.

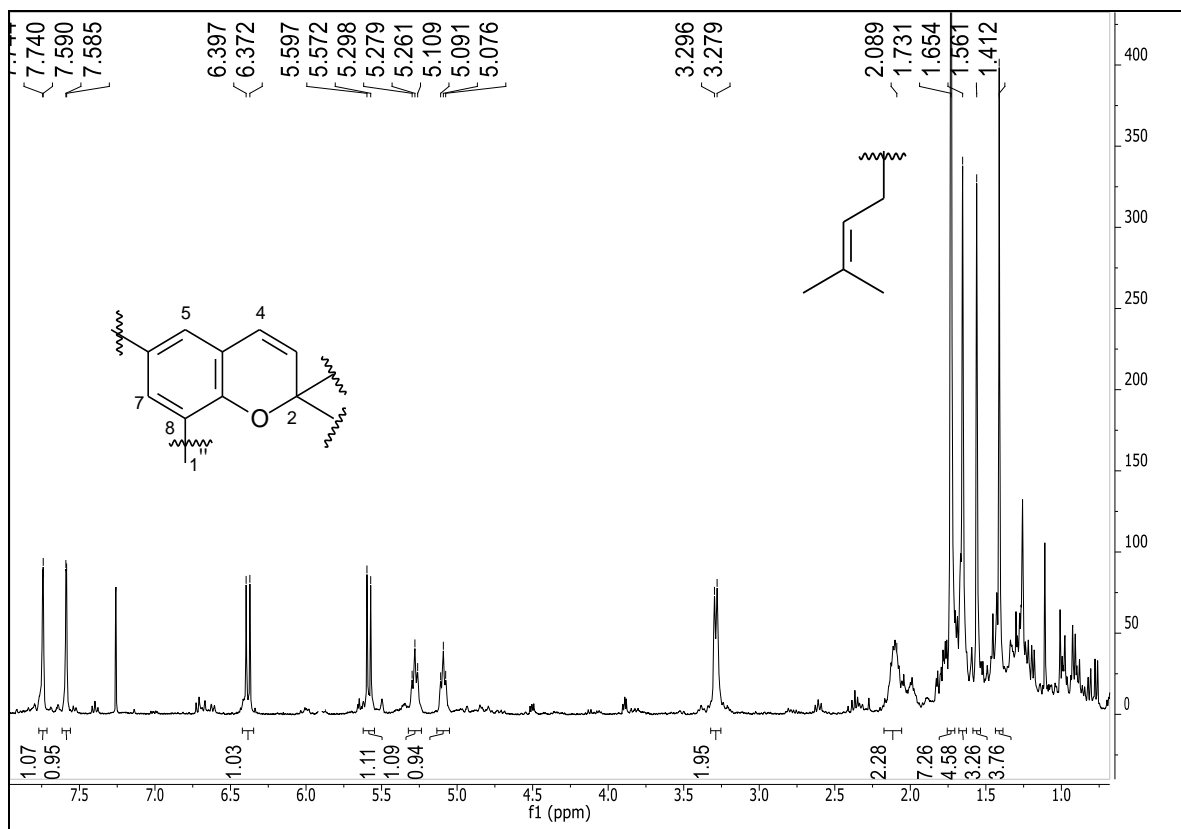
Figura 4-16. Espectro IR de C1 (celda de NaCl)



El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de C1 (Figura 4-17) mostró dos señales en  $\delta_{\text{H}}$  7.74 y 7.59, dobletes con  $J$  de 2.0 Hz que integran cada uno para un hidrógeno, atribuibles a señales de hidrógenos aromáticos que se encuentran en *meta*, dos señales en  $\delta_{\text{H}}$  6.38 y en  $\delta_{\text{H}}$  5.58 dobletes con  $J$  de 10.0 Hz que integran cada uno para un hidrógeno, que por su valor de desplazamiento químico y constante de acoplamiento indican la presencia de dos hidrógenos olefínicos en *cis*. También se observan 2 señales en  $\delta_{\text{H}}$  5.28 (m, 1H) y  $\delta_{\text{H}}$  5.09 (m, 1H) atribuibles a hidrógenos olefínicos, una señal en  $\delta_{\text{H}}$  3.28 (d, 7 Hz, 2H) cuyo valor de desplazamiento indica que está ligado a un anillo aromático o a un heteroátomo, una señal en  $\delta_{\text{H}}$  2.09 que integra para 2 hidrógenos y 4 señales en campo alto

característicos de grupos metílicos ( $\delta_H$  1.41, 1.56, 1.65 y 1.73) que por su valores de desplazamiento químico son propios de unidades isoprénicas.

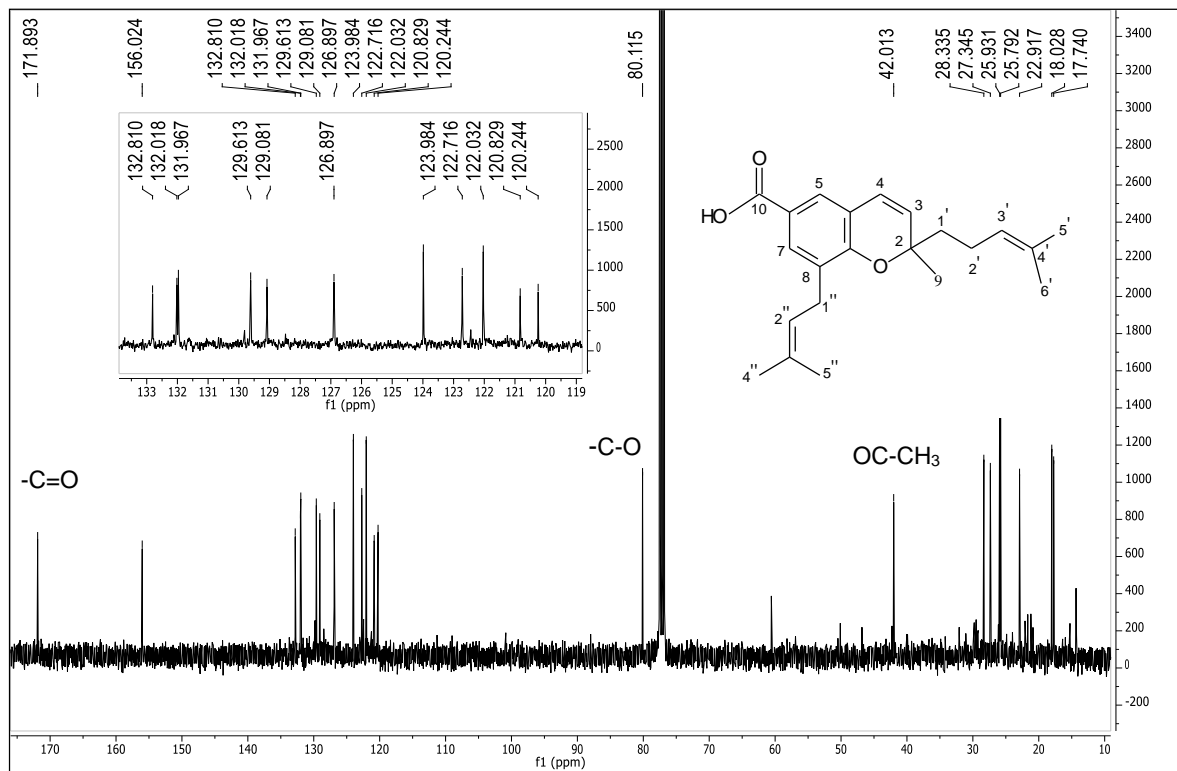
**Figura 4-17.** Espectro RMN  $^1H$  de C1 (400 MHz,  $CDCl_3$ )



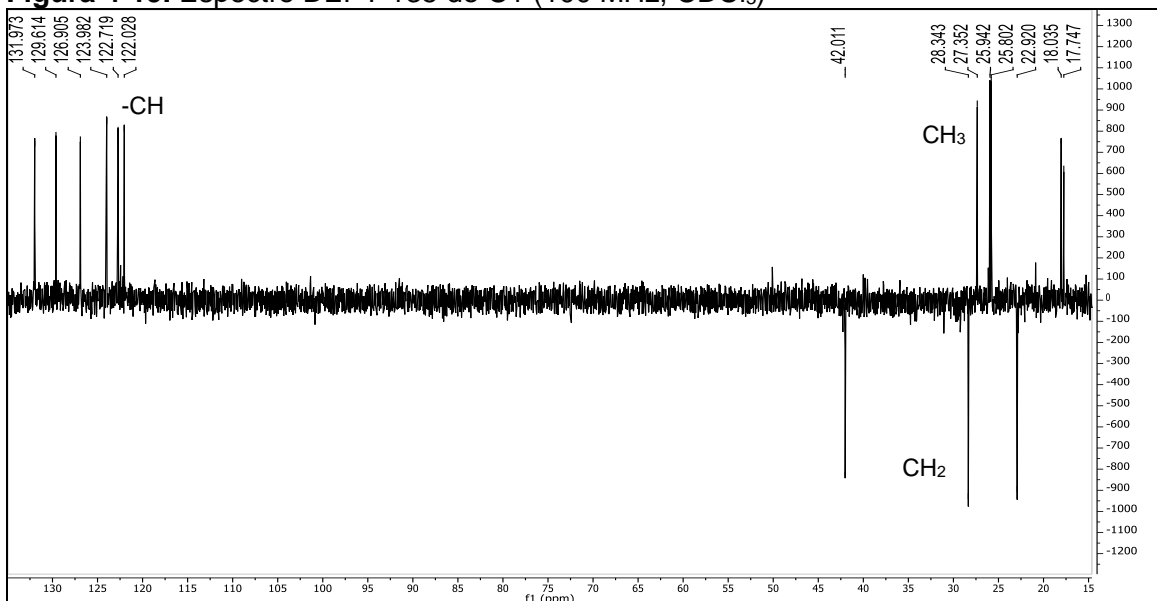
El espectro de  $^{13}C$  (Figura 4-18) presenta un total de 22 señales, una señal de grupo carboxílico en  $\delta_C$  171.89 que por su desplazamiento confirma la presencia de un carbono de un grupo ácido que había sido detectada en el espectro IR, una señal en  $\delta_C$  156.02 de un carbono oxigenado ligado a anillo aromático, 11 señales en la región aromática entre 119 y 133 ppm, 6 de las cuales corresponden a carbonos metílicos y 5 a carbonos cuaternarios de acuerdo con el espectro DEPT 135 (Figura 4-19), una señal en  $\delta_C$  80.11 de carbono cuaternario saturado oxigenado, 3 señales en campo alto correspondientes a carbonos metilénicos y 5 señales de carbonos metílicos. Teniendo en cuenta los valores de desplazamiento químico de los hidrógenos metílicos, el número de señales, las consideraciones biosintéticas y la revisión bibliográfica, se propuso que la molécula cuenta con dos unidades de isopreno o un grupo geranilo. El espectro de correlación homonuclear  $^1H$ - $^1H$  COSY (Figura 4-20) permitió confirmar correlaciones entre las

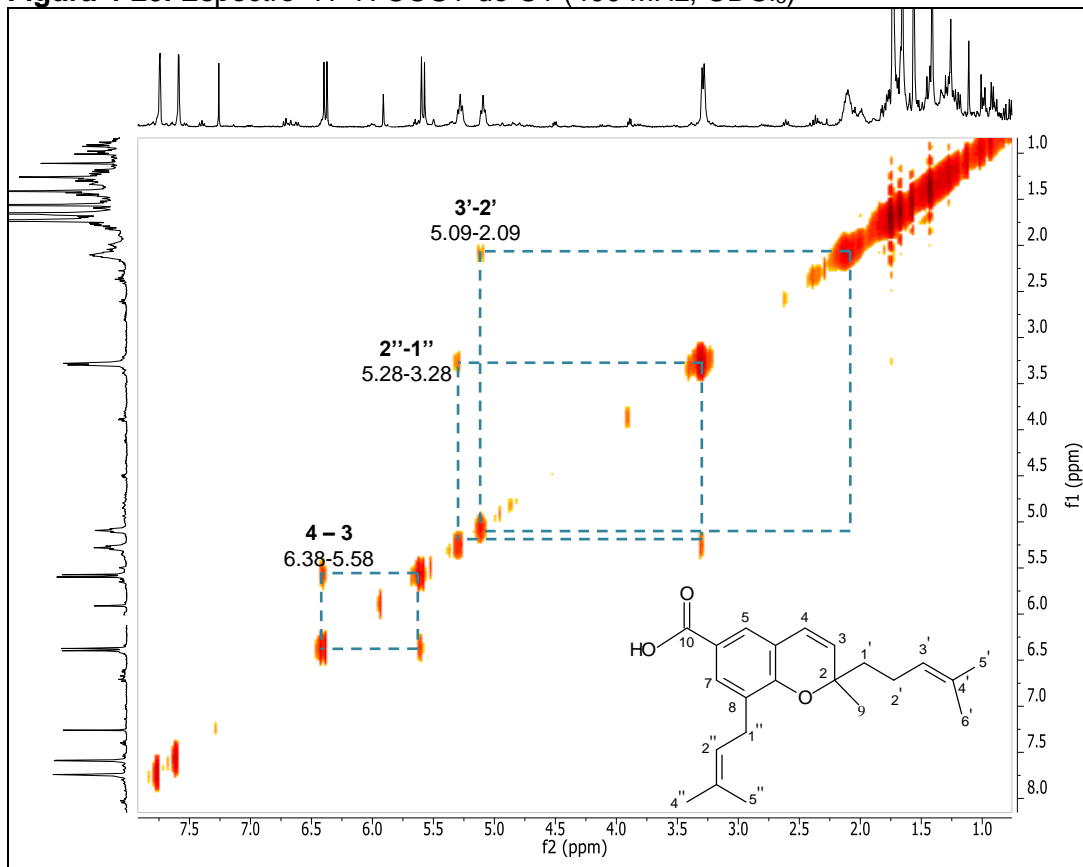
señales  $\delta_H$  6.38 (d, 10 Hz, 1H) y  $\delta_H$  5.58 (d, 10 Hz, 1H), la correlación entre las señales en  $\delta_{CH}$  5.28 y  $\delta_{CH_2}$  3.28 y  $\delta_{CH}$  5.09 y  $\delta_{CH_2}$  2.09 permiten confirmar la presencia de 2 unidades isoprénicas.

**Figura 4-18.** Espectro RMN  $^{13}C$  de C1 (100 MHz,  $CDCl_3$ )

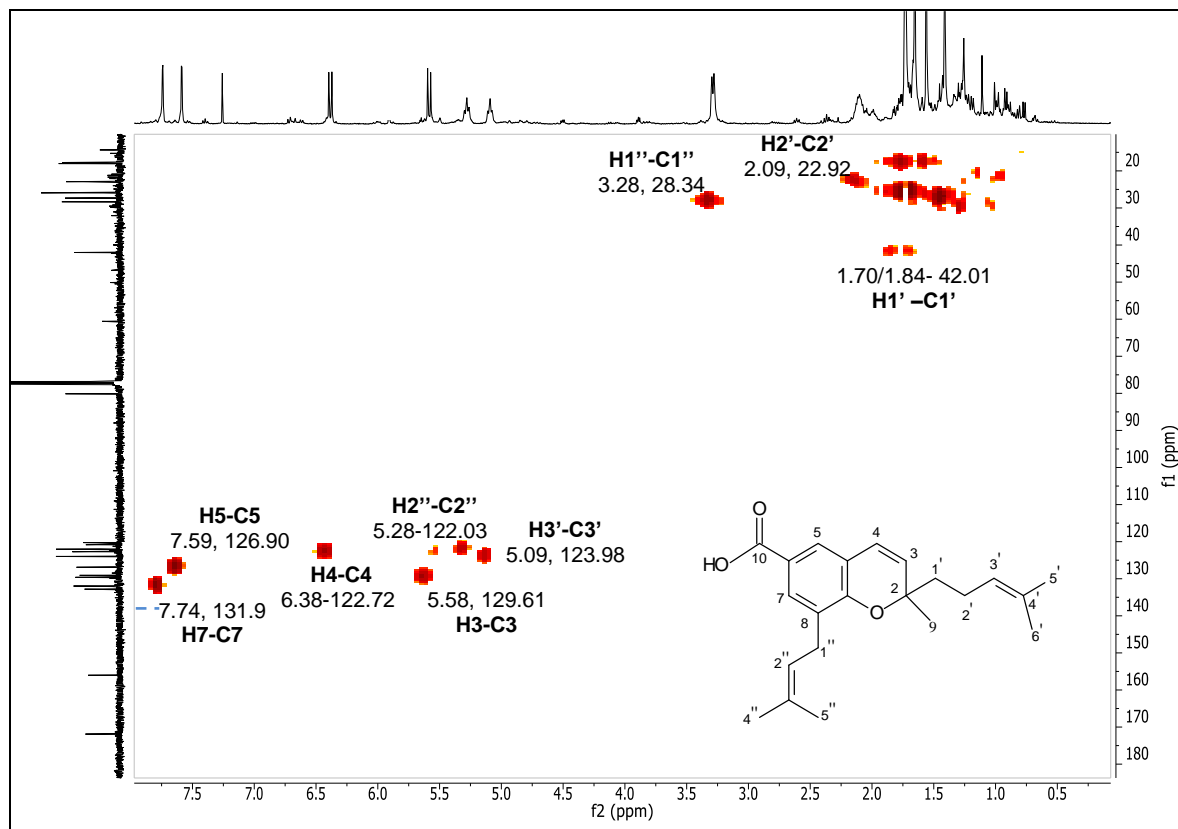


**Figura 4-19.** Espectro DEPT 135 de C1 (100 MHz,  $CDCl_3$ )



**Figura 4-20.** Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de C1 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

El espectro bidimensional HMQC (Figuras 4-21 y 4-22) permitió atribuir y correlacionar las señales de hidrógeno y carbono como se muestra en la Tabla 4-6 y confirmar grupos funcionales propuestos.

Figura 4-21. Espectro HMQC de C1 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

El espectro de correlación HMBC (Figura 4-23) permitió determinar la ubicación de los sustituyentes del anillo aromático. El grupo ácido se ubicó considerando los acoplamientos a  $^3J$  de la señal en  $\delta_C$  171.89 con las señales en  $\delta_H$  7.74 (H-7) y  $\delta_H$  7.59 (H-5) del anillo aromático. Las correlaciones a  $^2J$  y  $^3J$  entre la señal en  $\delta_H$  5.58 (H-3) y las señales en  $\delta_C$  80.11 (C-2) y  $\delta_C$  120.24, (C-4a) así como la correlación a  $^3J$  entre la señal  $\delta_H$  6.38 (H-4) y las señales en  $\delta_C$  80.11 (C-2) y  $\delta_C$  156.02 (C-8a) permitieron definir que el doble enlace es vecino a un carbono oxigenado y a carbonos aromáticos lo que permite proponer como estructura general un cromeno.

Figura 4-22. Espectro HMQC de C1- Expansión 0.6- 3.7 ppm (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

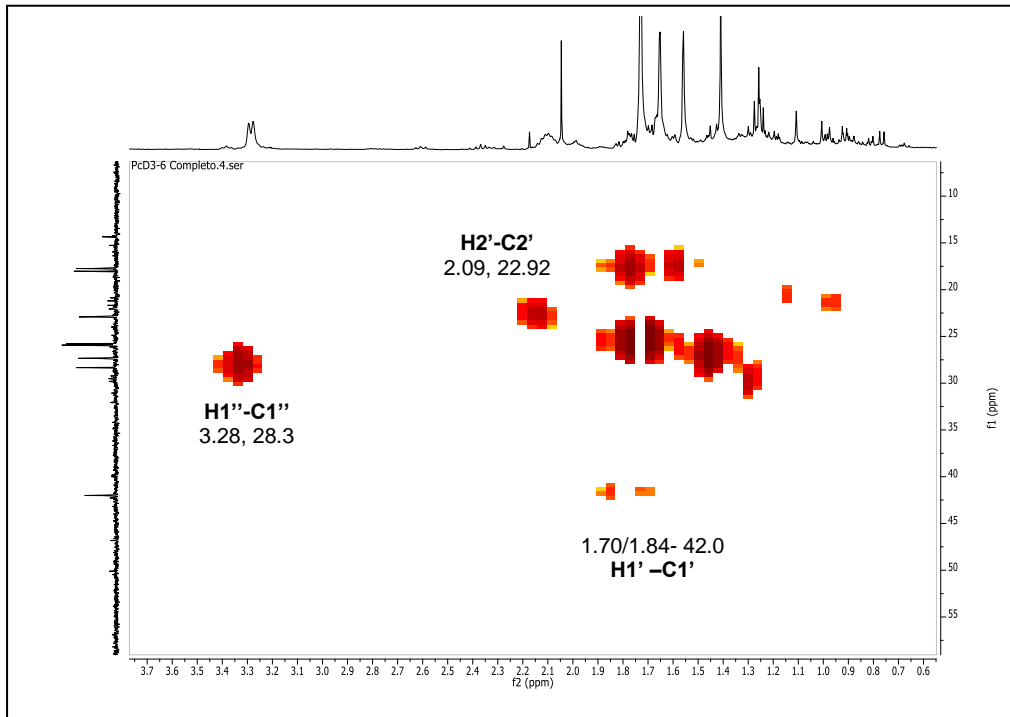
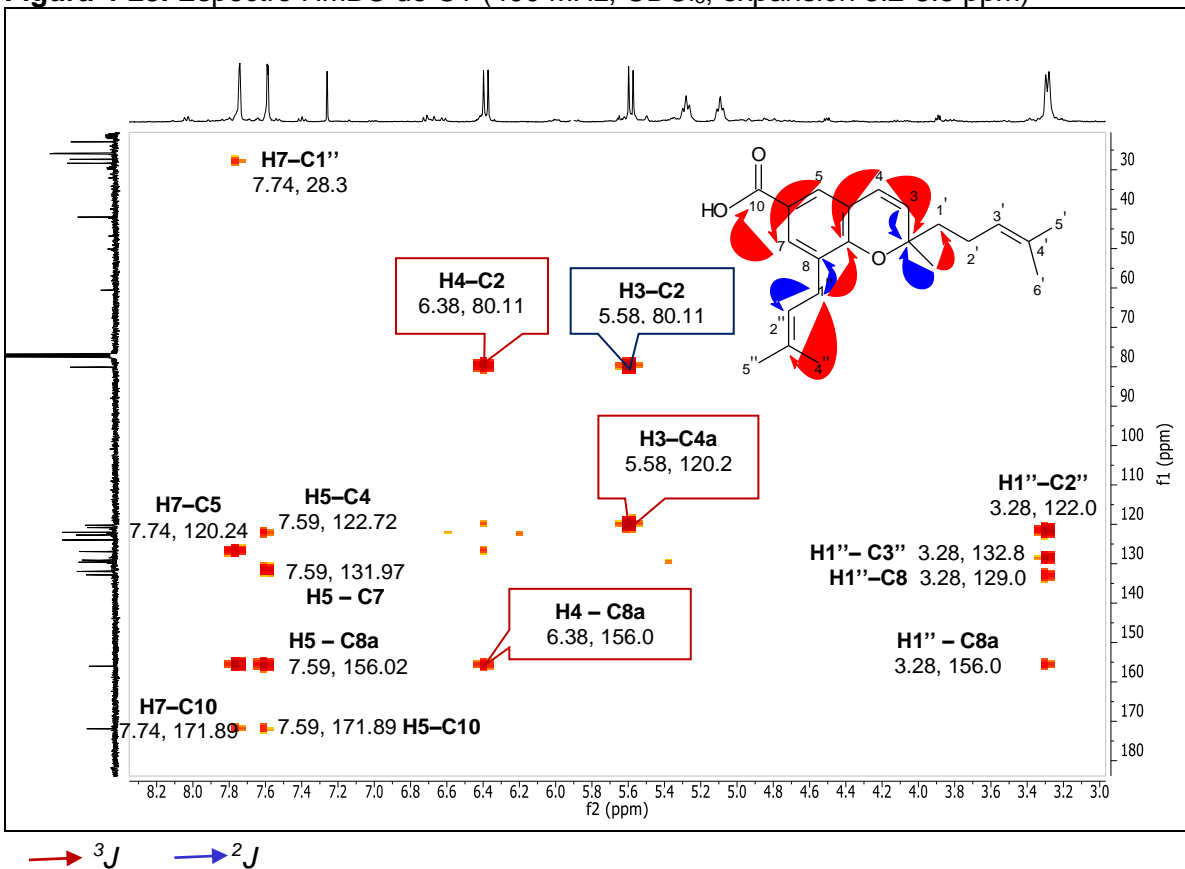


Figura 4-23. Espectro HMBC de C1 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>; expansión 3.2-8.5 ppm)



La correlación entre las señales en  $\delta_H$  1.41 y  $\delta_C$  80.11 (Figura 4-24) indicaron que un radical metilo está directamente unido al carbono oxigenado del cromeno. La correlación a  $^2J$  entre  $\delta_H$  1.41 y  $\delta_C$  42.01 permite proponer que un grupo metileno de una unidad isoprénica está unido al carbono oxigenado del cromeno, propuesta que se confirma por la correlación espacial observada en el espectro NOESY entre las señales en  $\delta_H$  5.58 (H-3) y 2.09 (H-2'') (Figura 4-25). También fue posible asignar la segunda unidad isoprénica por la correlación en el espectro de HMBC entre las señales en  $\delta_H$  3.28 (H-1'') y  $\delta_C$  129.08 (C-8) y entre  $\delta_H$  3.28 (H-1'') y  $\delta_C$  156.02 (C-8a), que ubica esta unidad en la posición C8 del cromeno, afirmación confirmada por el espectro NOESY donde se observa correlación espacial de la señal de hidrógeno en  $\delta_H$  7.74 (H-7) con  $\delta_H$  5.28 (H-2'') y de  $\delta_H$  7.74 (H-7) con  $\delta_H$  3.28 (H-1''). Por comparación con datos de la literatura (Tabla 4-5) se identificó a C1 como el ácido gaudichaudiánico, ácido [2-metil-2-(4'-metil-3'-pentenil)-8-(3''-metil-2''-butenil)-2H-1-benzopirán-6-carboxílico. El valor de rotación óptica para C1 de  $[\alpha]^{25}_D +4.5$  (0.1,  $\text{CHCl}_3$ ) sugiere la presencia de una mezcla de enantiómeros, considerando que el valor de rotación óptica para el enantiómero con configuración S en el C-2 es de  $[\alpha]^{25}_D +21$  (0.1,  $\text{CHCl}_3$ ) (Lago *et al.*, 2004).

**Figura 4-24.** Espectro HMBC de C1 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; expansión 1.0-3.7 ppm)

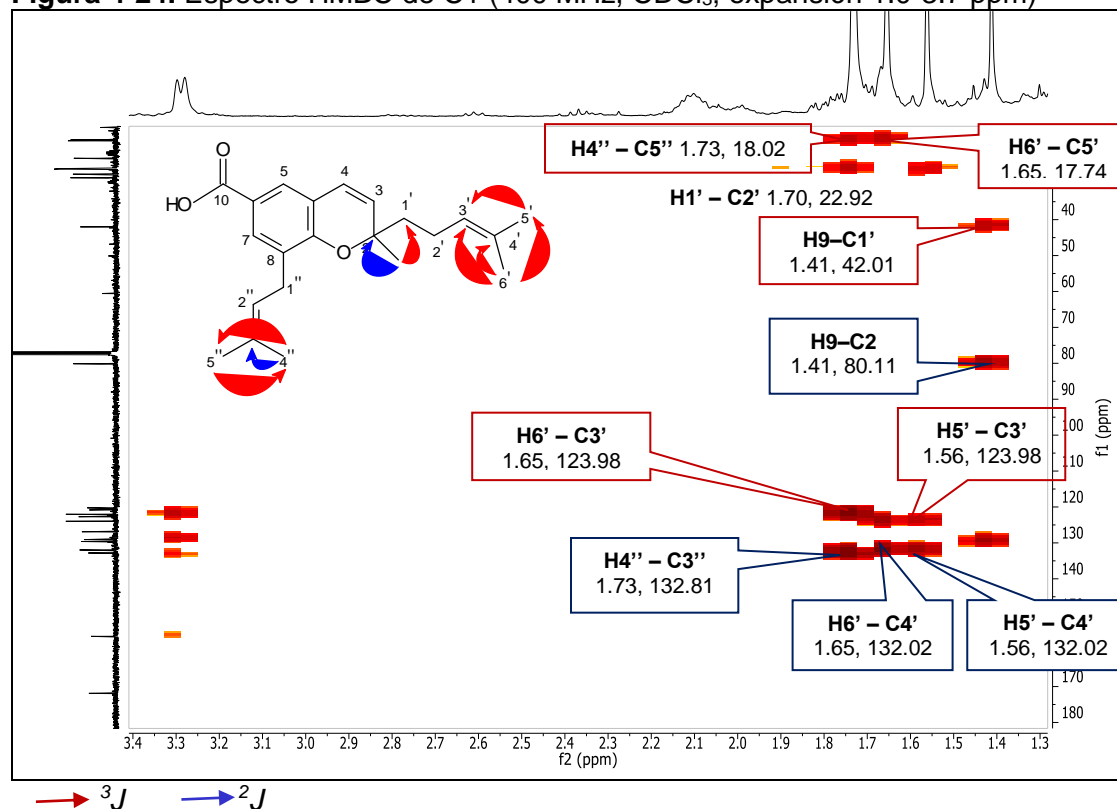
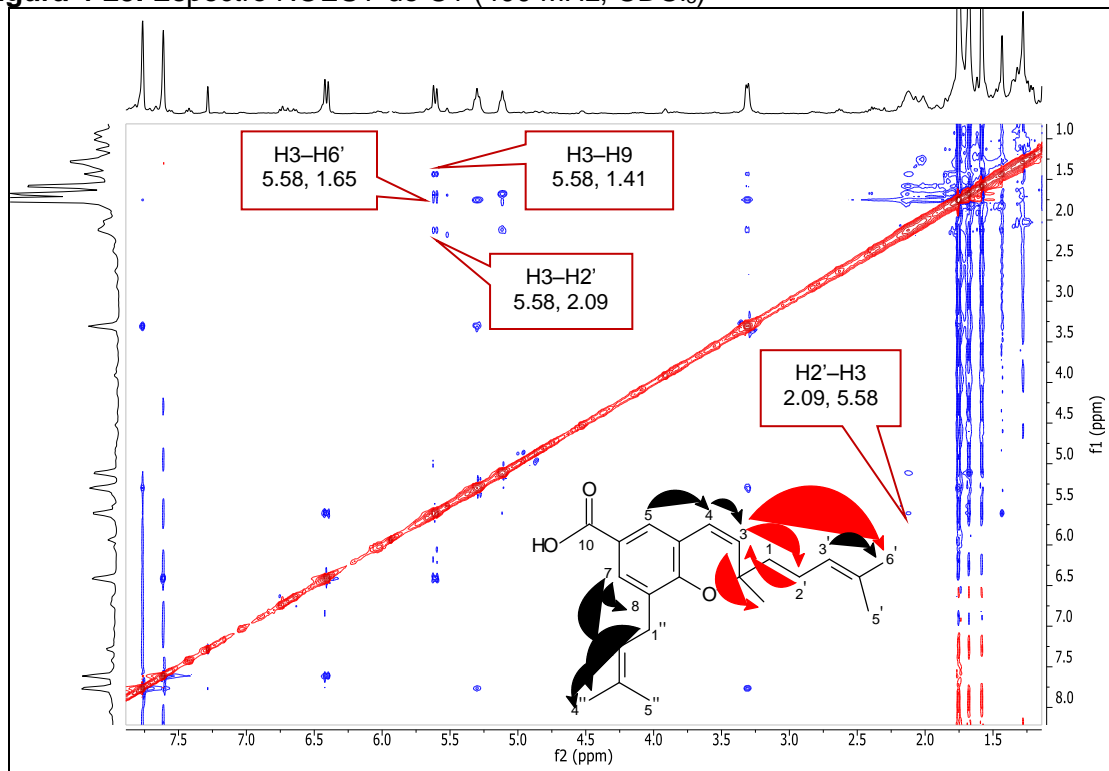
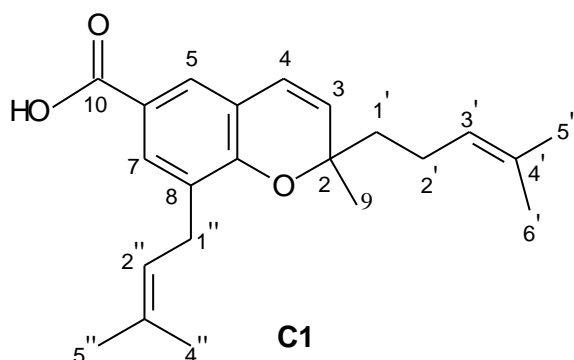




Figura 4-25. Espectro NOESY de C1 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



**Tabla 4-5.** Comparación de los datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de C1 con los datos de la literatura para ácido gaudichaudiánico (Lago *et al.*, 2004)

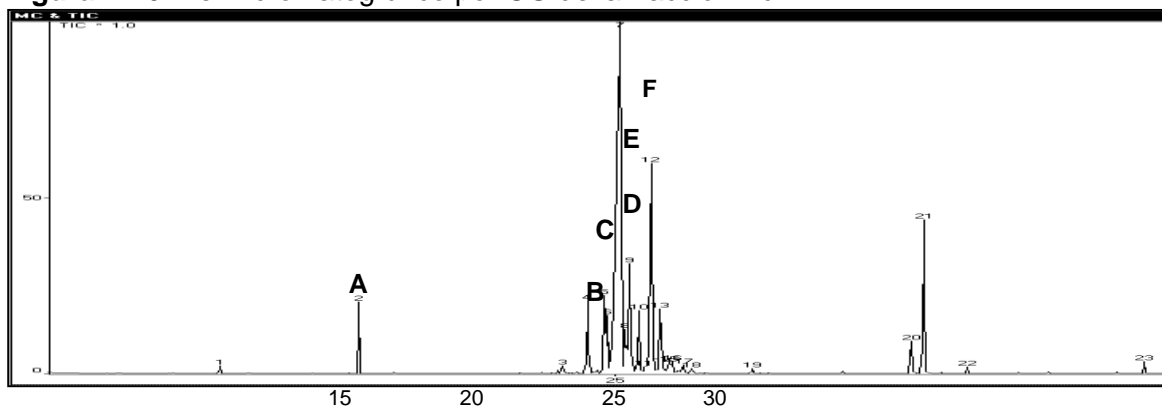
C	Acido gaudichaudiánico		C1 (CDCl <sub>3</sub> )		$^2J$	$^3J$
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) (CDCl <sub>3</sub> )	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) (CDCl <sub>3</sub> )	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)		
2	-	79.9	-	80.11		
3	5.58 (d, 10 Hz, 1H)	129.5	5.58 (d, 10.0 Hz, 1H)	129.61	C4, C2	
4	6.38(d, 10 Hz, 1H)	121.9	6.38 (d, 10.0 Hz, 1H)	122.72	C4a	C5, C8a, C2
4a	-	120.6	-	120.24		
5	7.59 (d, 2.1 Hz, 1H)	126.7	7.59 (d, 2.0 Hz, 1H)	126.90		C4, C7, C10, C8a
6	-	120.8	-	120.83		
7	7.75 (d, 2.1 Hz, 1H)	131.8	7.74 (d, 1,6 Hz, 1H)	131.97		C10, C5, C8a
8	-	128.9	-	129.08		
8a	-	155.8	-	156.02		
9	1.41 (s, 3H)	26.9	1.41 (s, 3H)	27.34	C2	C1'
10	-	172.1	-	171.89		
1'	1.78 (m, 2H)	41.9	1.70 (m, 1H) 1.84 (m, 1H)	42.01		
2'	2.25 (m, 2H)	22.7	2.09 (m, 2H)	22.92		
3'	5.09 (m, 1H)	123.9	5.09 (m, 1H)	123.98		
4'	-	131.8	-	132.02		
5'	1.56 (s, 3H)	17.6	1.56 (s, 3H)	17.74	C3'	
6'	1.67 (s, 3H)	25.6	1.65 (s, 3H)	25.79	C5'	C4', C2'
1''	3.28(d, 7.3 Hz, 2H)	28.2	3.28 (d, 7.2 Hz, 2H)	28.34		
2''	5.28 (m, 1H)	121.9	5.28 (m, 1H)	122.03		
3''	-	132.6	-	132.81		
4''	1.73 (s, 3H)	25.8	1.73 (s, 3H)	25.79	C3''	C5'',
5''	1.73(s, 3H)	17.3	1.73(s, 3H)	18.02		C4''

### 4.5.2 Análisis de la fracción Pch-2

La fracción Pch-2 obtenida de la fracción hexánica de *P. cumanense* fue analizada por CG-EM, el análisis de esta fracción permitió detectar la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos. Los componentes mayoritarios corresponden a óxido de cariofileno, piperitona, espatulenol y  $\alpha$ -cadinol, cubenol, muroleno (Tabla 4-6). La Figura 4-26 muestra el perfil cromatográfico de la muestra Pch-2, la Figura 4-27 muestra los espectros de masas de los picos principales.

Por esta misma técnica fueron analizadas las fracciones Pch-3 y Pch-4 también resultantes de la columna de Pch, los resultados obtenidos por esta técnica fueron similares a los encontrados para Pch-2 (Figura 4-28, Tabla 4-6).

**Figura 4-26.** Perfil cromatográfico por CG de la fracción Pch-2



**Figura 4-27.** Espectros de masas de los principales picos de la fracción Pch-2

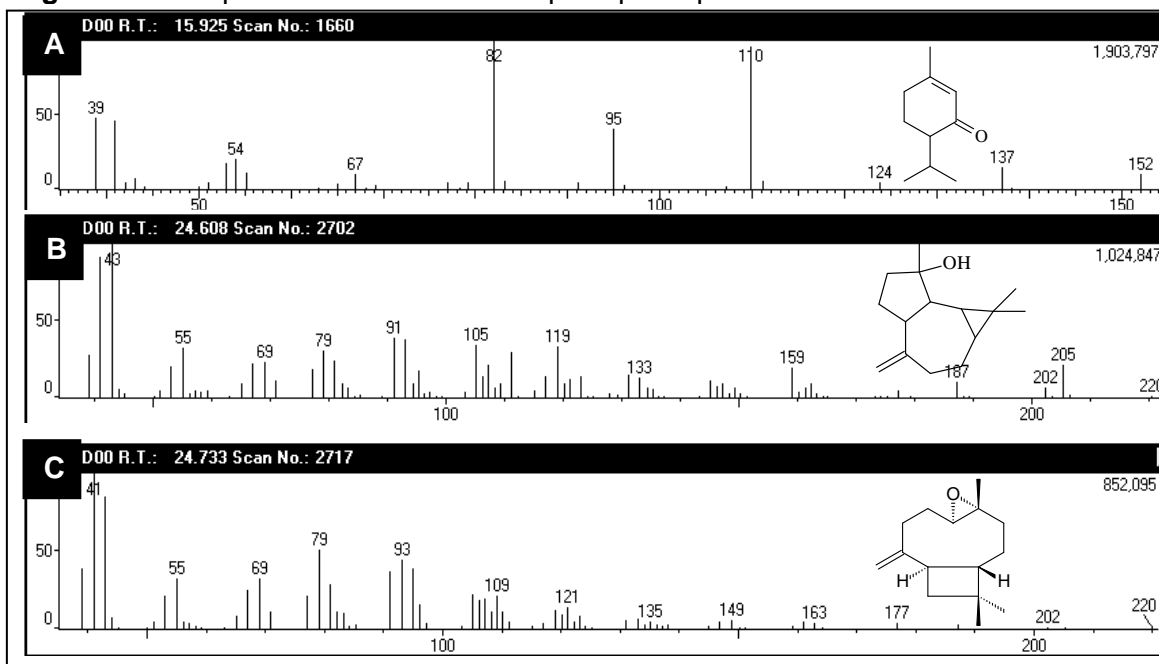


Figura 4-27. (Continuación)

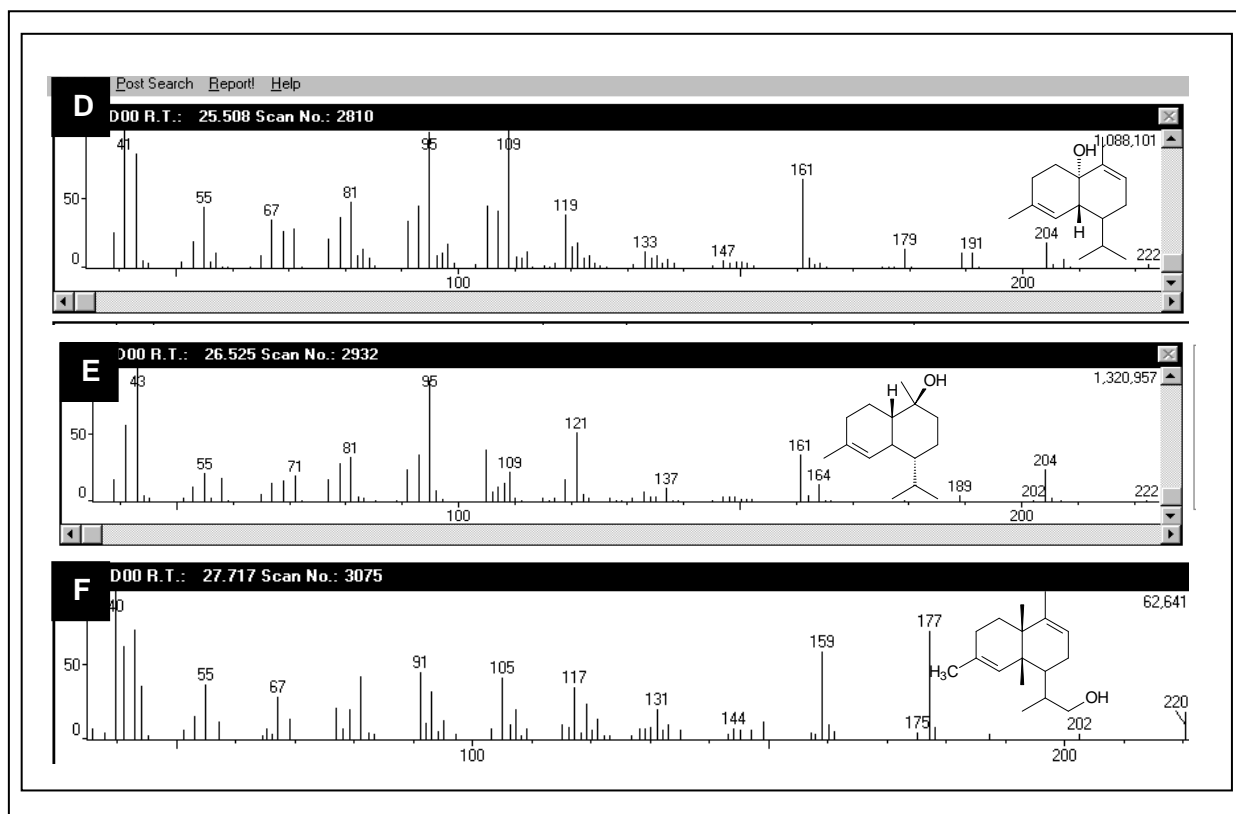
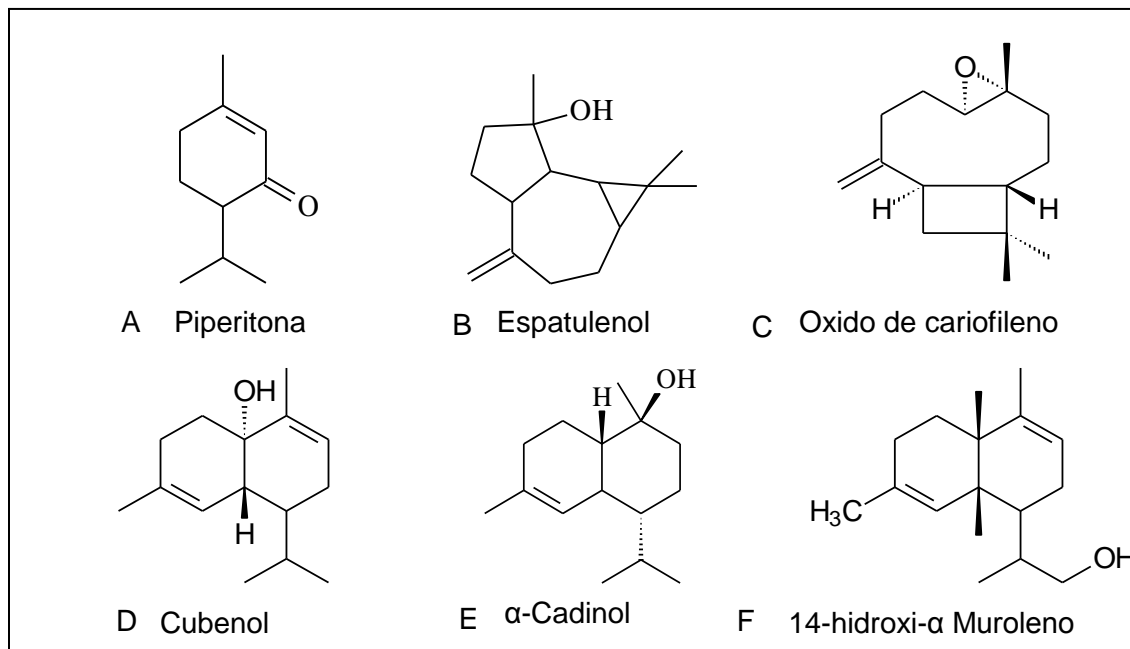


Tabla 4-6. Metabolitos determinados en la fracción Pch-2

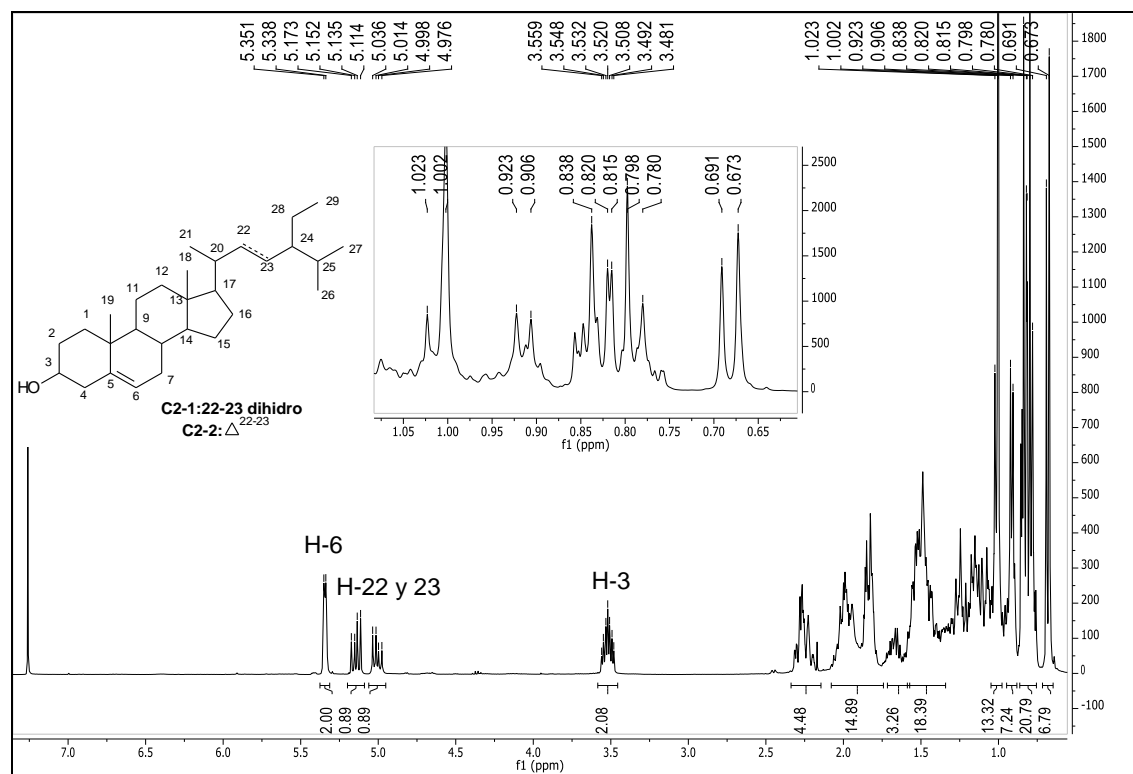
Espectro	Compuesto	PM	Fórmula molecular	IK*	Biblioteca
A	Piperitona	152	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	1255	WILEY229
B	Espatulenol	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	1576	WILEY229
C	Oxido de cariofileno	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	1580	WILEY229
D	Cubenol	222	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	1512	SHIM1607
E	α-Canidol	222	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	1655	WILEY229
F	14-hidroxi-α-Muroleno	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	1640	SHIM1607

\* Índice de Kovats calculado en columna capilar HP-5

**Figura 4-28.** Principales metabolitos detectados por CG-EM en la fracción de Pch-2

### 4.5.3 Identificación de la muestra C2

La muestra C2 fue obtenida como un sólido cristalino (P.F. 127-129 °C) identificado por análisis de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y comparación con datos de la literatura (Kojima *et al.*, 1990). El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4-29) presenta señales entre  $\delta_{\text{H}}$  0.60-2.20 que son compatibles con señales de hidrógenos metílicos y metilénicos de esteroides, entre estas señales se puede destacar los singletos en  $\delta_{\text{H}}$  0.67 y 1.0 de los metilos C-18 y C-19 de un núcleo esteroideal. La señal en  $\delta_{\text{H}}$  3.52 (m) fue atribuida al hidrógeno carbinólico H-3 y la señal en  $\delta_{\text{H}}$  5.34 (s) al hidrógeno olefínico (H-6), estas dos señales presentaron integración para 2 hidrógenos lo que permitió proponer la presencia de dos moléculas. Las señales en  $\delta_{\text{H}}$  5.00 y 5.12 correspondientes a hidrógenos olefínicos permiten proponer que la muestra contiene un esteroil con dos dobles enlaces. Esta mezcla de esteroides es común en plantas y corresponde a  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol (Kojima *et al.*, 1990), ampliamente descrita en la literatura.

**Figura 4-29.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  de la muestra C2 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

El espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4-30) presenta señales que confirman la presencia de dos moléculas en la muestra, se destacan las señales en  $\delta_{\text{C}}138.4$  y  $\delta_{\text{C}}129.5$  propias de carbonos olefínicos adicionales a las señales en  $\delta_{\text{C}}140.9$  y  $\delta_{\text{C}}121.85$  propios de una insaturación entre las posiciones C-5 y C-6 del núcleo esteroidal. Esta propuesta fue confirmada por análisis de CG-MS, los espectros para los dos picos principales se presentan en la Figura 4-31, con valores de  $m/z$  412 y 414. Los datos de  $^{13}\text{C}$  RMN obtenidos fueron comparados con datos de la literatura (Tabla 4-7) confirmando la propuesta realizada.

Figura 4-30. Espectro RMN <sup>13</sup>C y DEPT 135 de C2 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

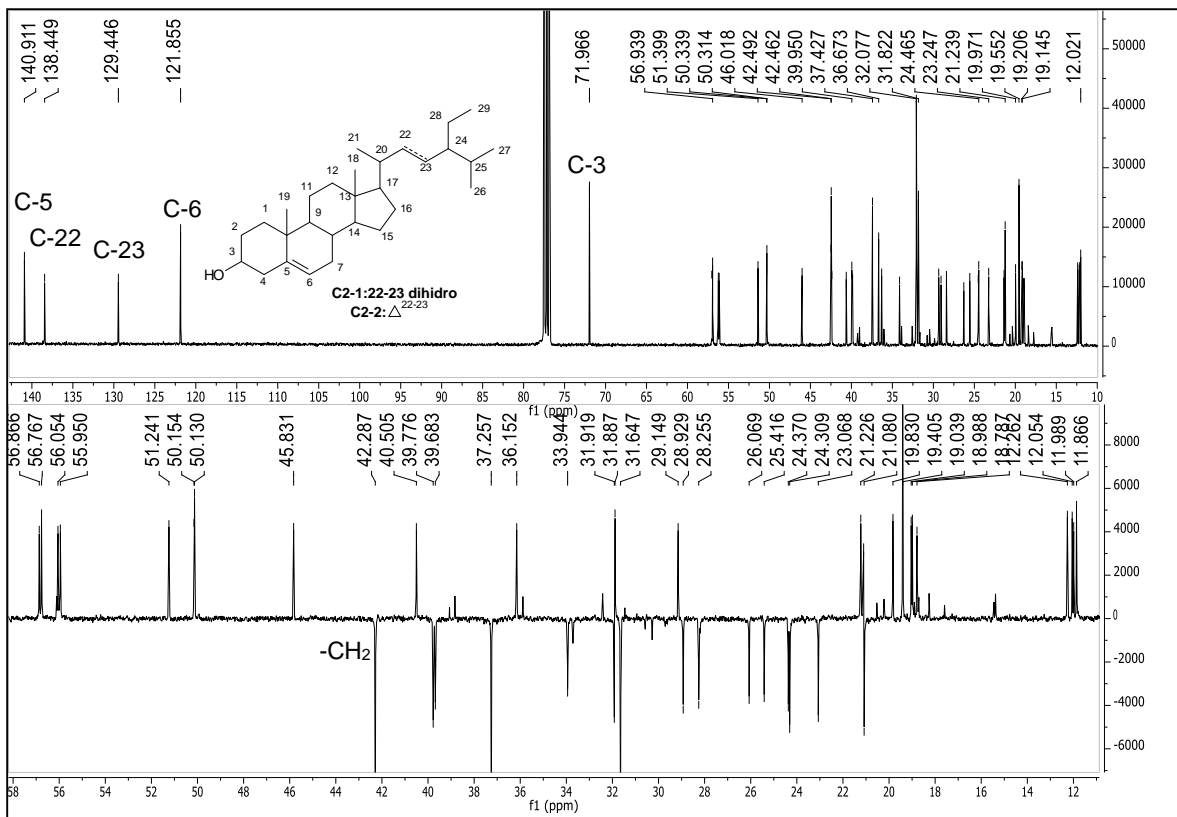
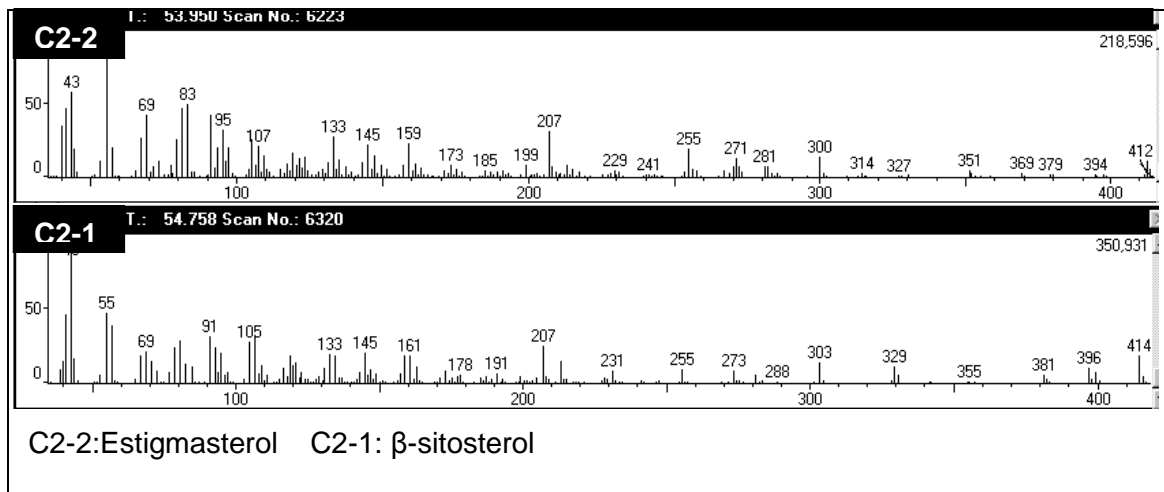
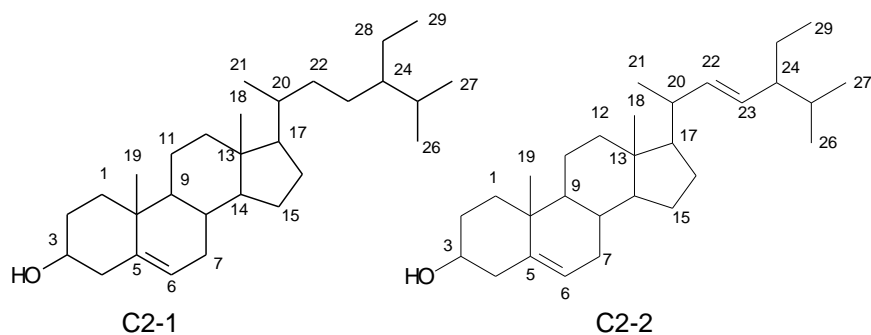


Figura 4-31. Espectro de masas de la muestra C2





**Tabla 4-7.** Comparación de datos de RMN  $^{13}\text{C}$  de C2-1/C2-2 con datos de la literatura para  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol (Kojima *et al.*, 1990)

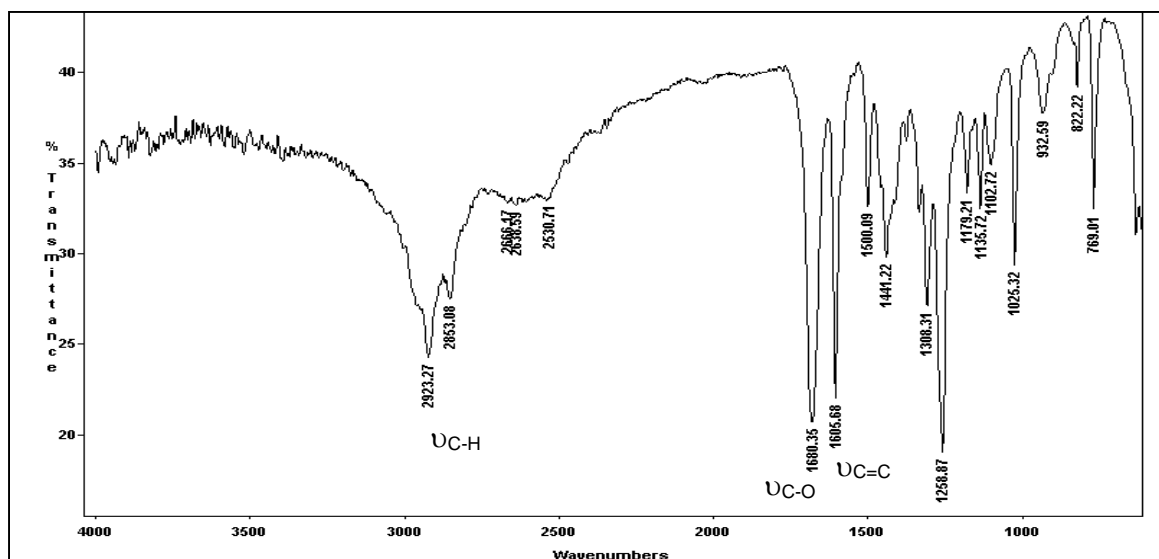
C	Sitosterol $\delta_{\text{C}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ )	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ )	Estigmasterol $\delta_{\text{C}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ )	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ )	C2-1/C2-2 $\delta_{\text{C}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ )	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ )
1	37.2		37.2		37.42	
2	31.6		31.6		31.82	
3	71.8	3.52 m	71.8	3.52 m	71.98	3.52 m
4	42.3		42.3		42.46	
5	140.7		140.7		140.91	
6	121.7	5.35 m	121.7	5.35 m	121.85	5.34 d
7	31.9		31.9		32.08	
8	31.9		31.9		31.92/31.89	
9	50.1		50.1		50.34	
10	36.5		36.5		36.67	
11	21.1		21.1		21.24	
12	39.8		39.7		39.95	
13	42.3		42.2		42.49	
14	56.3		56.8		56.94	
15	24.3		24.4		24.46	
16	28.2		28.9		28.25/28.93	
17	56.0		55.9		56.05/55.95	
18	11.9	0.68	12.0	0.69	11.87/11.99	0.67/0.68
19	19.4	1.01	19.4	1.01	19.40/19.83	1.00
20	36.1		40.5		36.15/40.50	
21	18.8	0.92 d	21.2	1.02	18.79/21.24	0.92
22	33.9		138.3	5.15 dd	33.94 /138.45	5.14 dd
23	26.0		129.2	5.01 dd	26.07/129.45	5.01 dd
24	45.8		51.2		45.83/51.24	
25	29.1		31.9		29.15/31.92	
26	19.8	0.83 d	21.1	0.83 d	19.83/21.08	0.82
27	19.0	0.81 d	19.0	0.81 d	19.00	0.82
28	23.0	0.84 t	25.4	0.84 t	23.07/25.41	0.84
29	12.0		12.3		12.02/12.26	

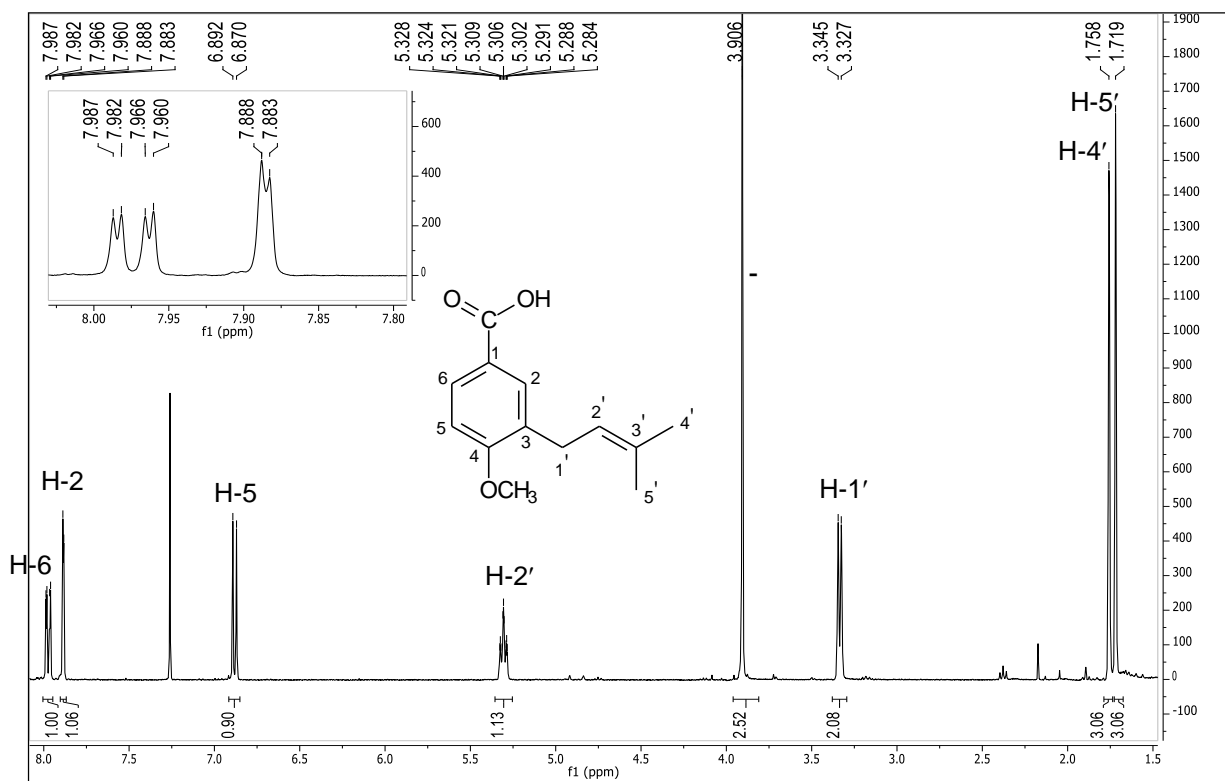


#### 4.5.4 Identificación del compuesto C3

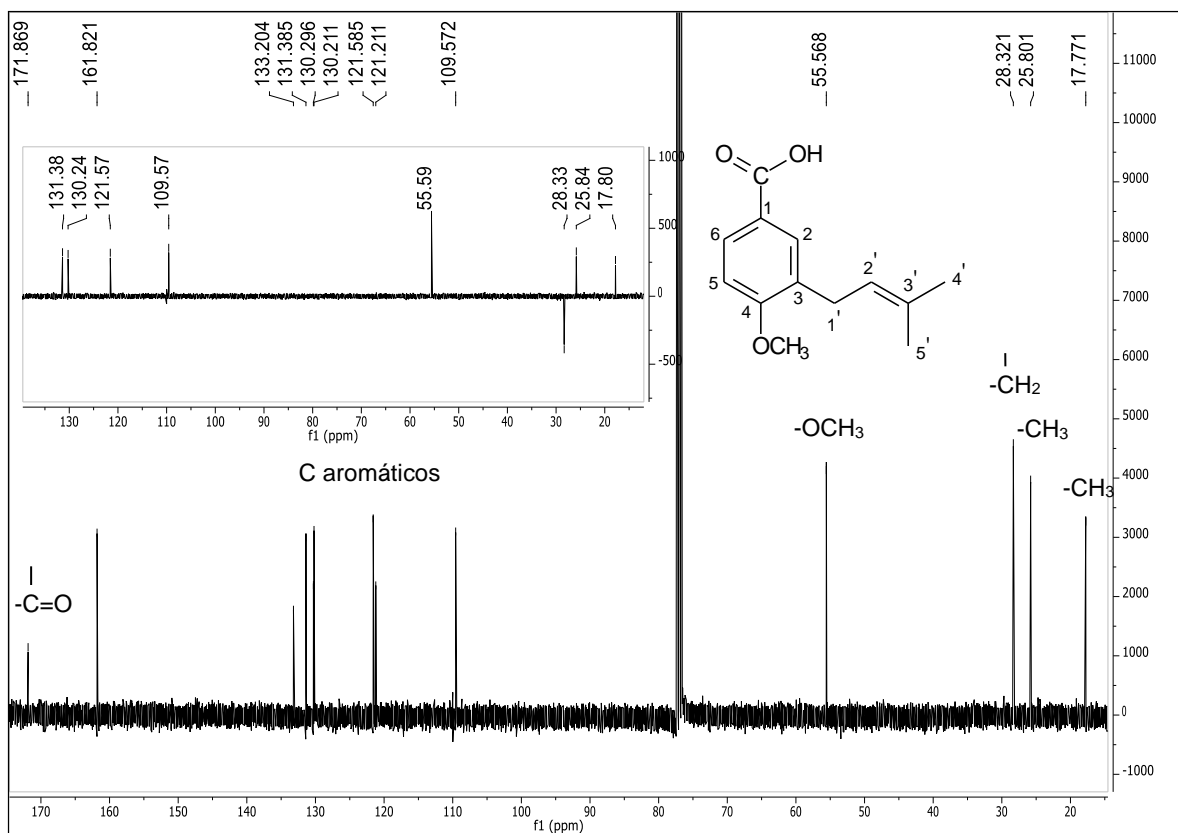
El compuesto C3 fue aislado como un sólido cristalino (P.F.  $115 \pm 2^\circ\text{C}$ ). El espectro de IR (Figura 4-32) presentó bandas de absorción en  $2923$  y  $2683\text{ cm}^{-1}$  de  $\nu_{\text{C-H}}$  ( $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$ ), en  $1680\text{ cm}^{-1}$  de deformación axial de  $\text{C=O}$  ( $\nu_{\text{C=O}}$ ) y en  $1605$ ,  $1500$  y  $1441\text{ cm}^{-1}$  de deformación axial  $\text{C=C}$  de aromáticos ( $\nu_{\text{C=C}}$ ). El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4-33), mostró 8 señales que integran para 15 hidrógenos, 3 de las cuales están ubicadas en la región de hidrógenos de anillo aromático, la señal en  $\delta_{\text{H}} 7,97$  (dd, 2.0, 8.6 Hz) acopla con la señal en  $\delta_{\text{H}} 7.88$  (2.0 Hz) y con la señal en  $\delta_{\text{H}} 6.88$  (8.6 Hz), los valores de  $J$  indican que se encuentran en *orto* y *para* respecto a la señal en  $\delta_{\text{H}} 7.97$ . También se observa una señal en  $\delta_{\text{H}} 5.30$  (m, 1H) de hidrógeno olefínico, una señal en  $\delta_{\text{H}} 3.91$  (s, 3H) de un grupo metoxilo, una señal en  $\delta_{\text{H}} 3.33$  (7.2 Hz) de un hidrógeno metilénico que por su valor de desplazamiento puede encontrarse como sustituyente de un anillo aromático o unido a un heteroátomo y además 2 señales en campo alto de radicales metílicos que por sus valores en  $\delta_{\text{H}} 1.72$  y  $1.76$  son compatibles con hidrógenos metílicos de una unidad isoprénica.

Figura 4-32. Espectro IR de C3 (KBr)



**Figura 4-33.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  de C3 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

El espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4-34) presentó un total de 13 señales, la señal en  $\delta_{\text{C}}$  171.87, permitió confirmar la presencia de un carbono de ácido carboxílico. La señal en  $\delta_{\text{C}}$  161.82 se puede atribuir a un carbono oxigenado en un anillo aromático y la señal en  $\delta_{\text{C}}$  55.57 de carbono oxigenado confirma la presencia de un grupo metoxilo. Las señales en campo alto en  $\delta_{\text{C}}$  17.77 y 25.8 ppm, son propias de carbonos metílicos de una unidad de isopreno.

**Figura 4-34.** Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  de C3 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

El análisis del espectro de correlación HMQC (Figura 4-35) posibilitó la asignación de las señales de hidrógeno a sus respectivos carbonos, como se muestra en la Tabla 4-9. El espectro de HMBC (Figura 4-36) permitió ubicar los sustituyentes en el anillo aromático de la siguiente manera, la correlación a  $^2J$  entre  $\delta_{\text{H}}$  3.33 (H-1') y  $\delta_{\text{C}}$  130.30 (C-3) determinó la ubicación de la unidad de isopreno en la posición 3 del anillo aromático, la posición 1 fue asignada al carbono unido al grupo ácido y fue confirmada por las correlaciones entre las señales en  $\delta_{\text{H}}$  7.88 y 7.97 con la señal en  $\delta_{\text{C}}$  171.87. El grupo metoxilo se ubicó en la posición 4 considerando la correlación a  $^3J$  entre  $\delta_{\text{H}}$  3.91 y  $\delta_{\text{C}}$  161.82. De esta manera se concluyó que el compuesto C3 corresponde a el ácido 4-metoxi-3-(3-metil-2-butenil)-benzoico concordante con la  $m/z$  219.1021  $[\text{M}-\text{H}]^-$  calculada para  $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{O}_3$ , (Figura 4-37), estructura que fue confirmada por comparación con datos de la literatura (Tabla 4-8) (Cao *et al.*, 2003).

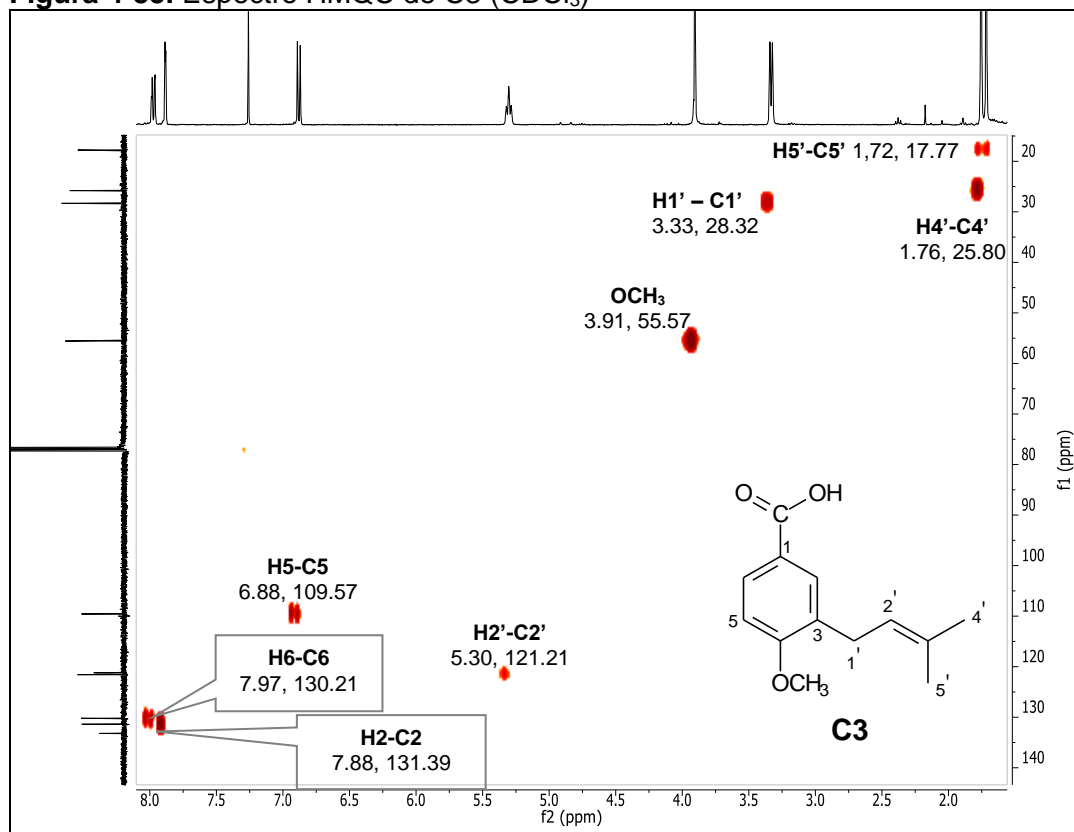
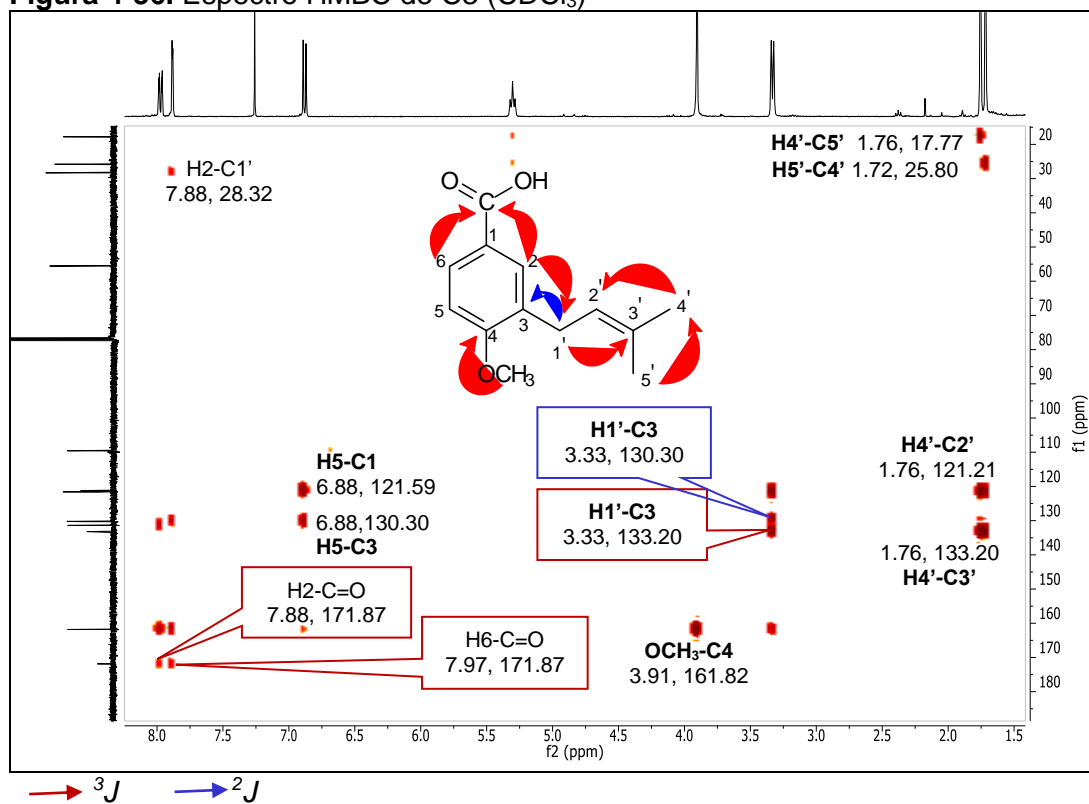
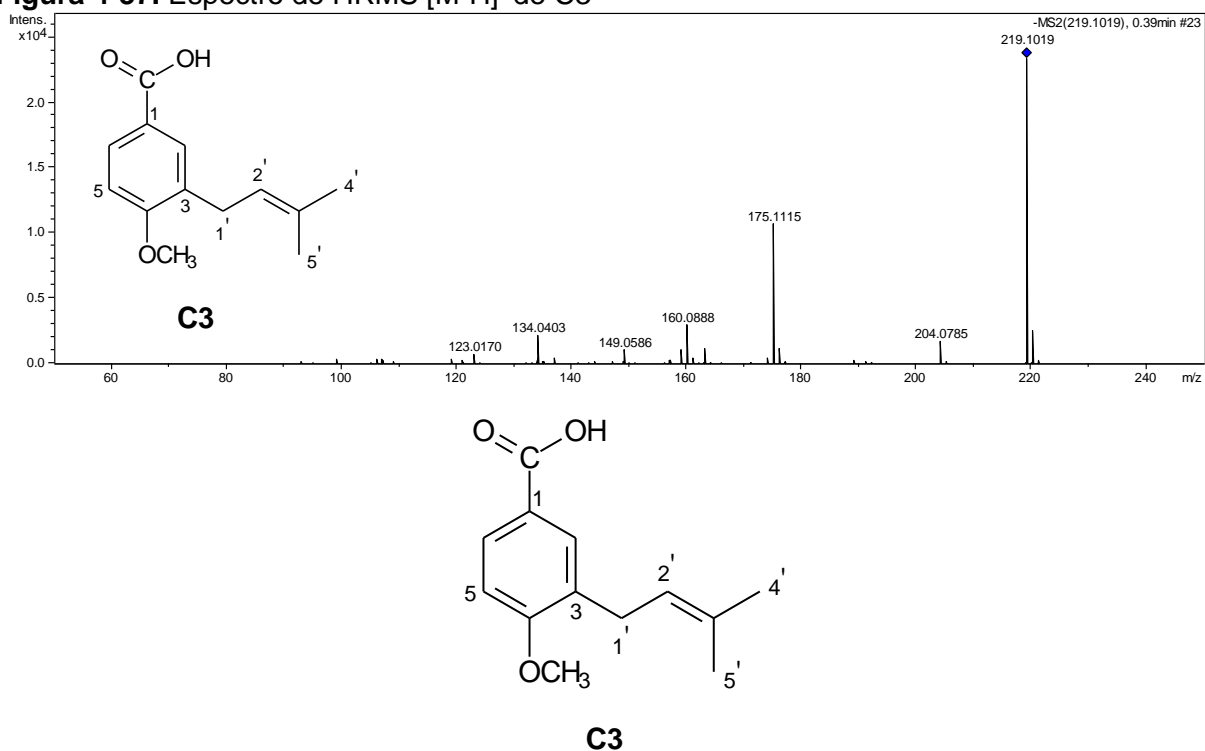
Figura 4-35. Espectro HMQC de C3 (CDCl<sub>3</sub>)Figura 4-36. Espectro HMBC de C3 (CDCl<sub>3</sub>)

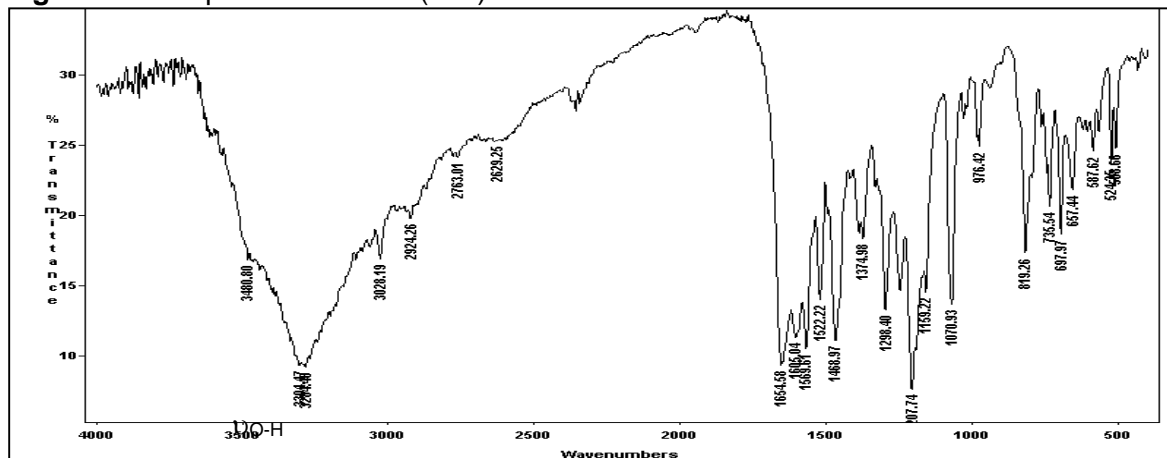
Figura 4-37. Espectro de HRMS [M-H]<sup>-</sup> de C3Tabla 4-8. Comparación de los datos de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de C3 con los datos de la literatura para el ácido 4-metoxi-3-(3-metil-2-butenil)-benzoico (Cao *et al.*, 2003).

C	Acido 4-metoxi-3-(3-metil-2-butenil)-benzoico		C3 (CDCl <sub>3</sub> )		<sup>2</sup> J	<sup>3</sup> J
	δ <sub>H</sub> (ppm) (CDCl <sub>3</sub> )	δ <sub>C</sub> (ppm) (DMSO-d <sub>6</sub> )	δ <sub>H</sub> (ppm)	δ <sub>C</sub> (ppm)		
1	-	122.4	-	121.59		
2	7.83 (d, 2.2, 1H)	129.5	7.88 (d, 2.0 Hz, 1H)	131.39		COOH, C1'
3	-	129.0	-	130.30		
4	-	161.8	-	161.82		
5	6.85 (d, 8.6 Hz, 1H)	109.5	6.88 (d, 8.6 Hz, 1H)	109.57	C6	C1
6	7.97 (dd, 2.2, 8.6 Hz, 1H)	128.4	7.97 (dd, 2.0; 8.6 Hz, 1H)	130.21		C2, COOH, C4
1'	3.30 (d, 7.1 Hz, 2H)	27.2	3.33 (d, 7.2 Hz, 2H)	28.32		C3', C4
2'	5.28 (1H, m)	121.0	5.30 (1H, m)	121.21		
3'	-	132.5	-	133.20		
4'	1.73 (3H, s)	25.2	1.76 (3H, s)	25.80	C5'	C2'
5'	1.69 (3H, s)	17.1	1.72 (3H, s)	17.77	C4'	
OCH <sub>3</sub>	3.88 (3H, s)	55.0	3.91 (3H, s)	55.57		
COOH	-	167.5	-	171.87		

#### 4.5.5 Identificación del compuesto C4

El compuesto C4 fue aislado como un sólido cristalino de color blanco (P.F.  $106.5 \pm 2^\circ\text{C}$ ) que reveló positivo para flavonoides con el reactivo de NP-PEG por CCD y fue identificado por análisis de los espectros de IR, RMN 1D y 2D, EM y comparación con datos de la literatura (Mustafa *et al.*, 2003). El espectro de IR (Figura 4-38) presentó bandas de absorción en  $3304\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la deformación axial de grupos OH, en  $1654\text{ cm}^{-1}$  de deformación axial de grupo carbonilo y en 1605, 1569, 1522,  $1468\text{ cm}^{-1}$  de deformación axial de C=C aromáticos. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4-39) presentó 5 señales. Las señales en  $\delta_{\text{H}}$  7.27 (m, 4H) y 7.17 (m, 1H) por su multiplicidad e integración son atribuibles a hidrógenos de un anillo aromático monosustituido. Una señal en  $\delta_{\text{H}}$  5.85 (s, 2H) de hidrógenos olefínicos y señales en  $\delta_{\text{H}}$  3.33 (m, 2H) y  $\delta_{\text{H}}$  2.98 (m, 2H) atribuibles a hidrógenos de carbonos unidos a sistemas aromáticos o a grupos carbonilo.

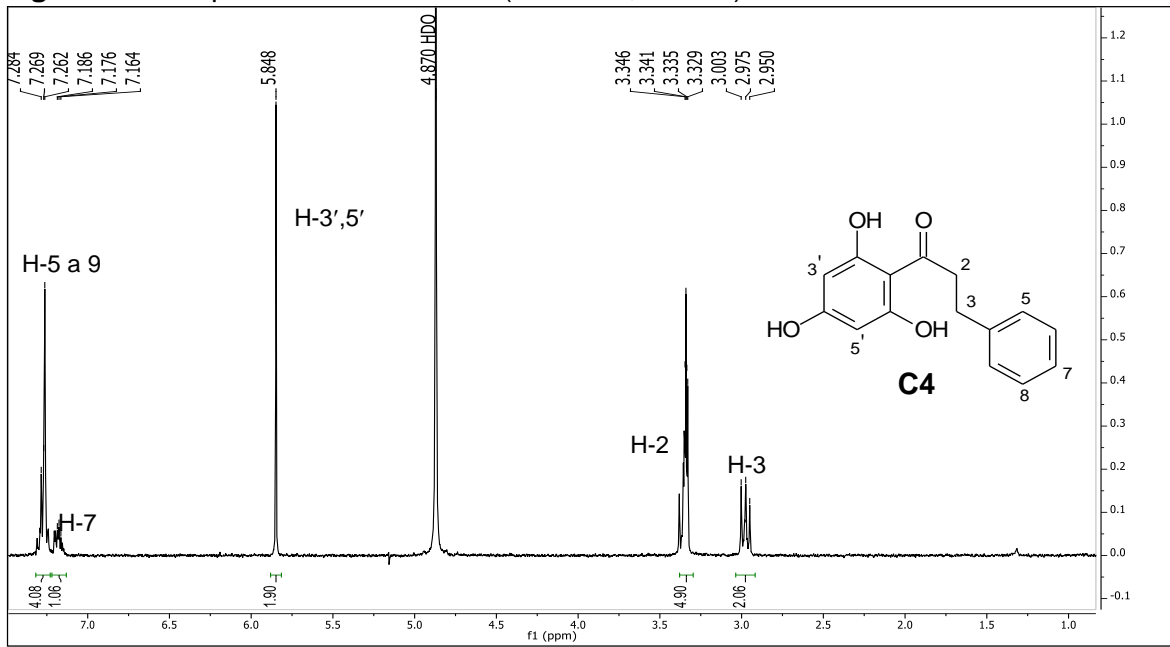
**Figura 4-38.** Espectro IR de C4 (KBr)



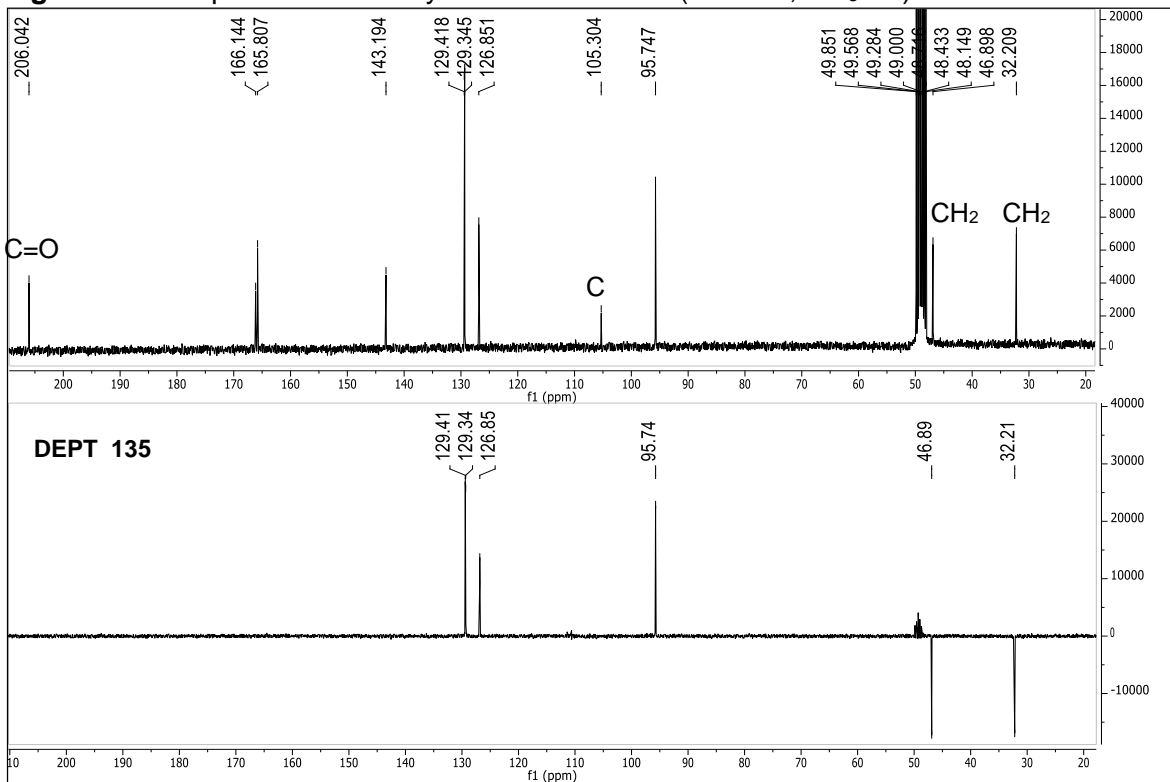
El espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4-40) presentó un total de 10 señales, una en  $\delta_{\text{C}}$  206.04 de un grupo carbonílico de cetona, dos señales en  $\delta_{\text{C}}$  32.21 y 46.90 de carbonos metilénicos, tres señales de carbonos de grupos metínicos y cuatro señales de carbono cuaternario en la región de aromáticos de acuerdo al espectro DEPT 135 (Figura 4-40). Las correlaciones observadas en el espectro HMQC (Figura 4-41) entre  $\delta_{\text{H}}$  3.33 y  $\delta_{\text{C}}$  46.90 son compatibles con las de un radical metilénico vecino a un grupo carbonílico o a heteroátomo. La señal en  $\delta_{\text{C}}$  32.21 y su respectiva señal de hidrógeno en  $\delta_{\text{H}}$  2.98 son propias de un radical  $-\text{CH}_2$  unido a un sistema aromático o perteneciente a un grupo isoprénico que se descartó por la ausencia de grupos metilo en los espectros de RMN. Las señales en la región aromática confirman la presencia de un anillo aromático

monosustituido. Con los datos obtenidos, por consideraciones biosintéticas y después de comparación con la literatura se determinó que la molécula puede corresponder a una chalcona.

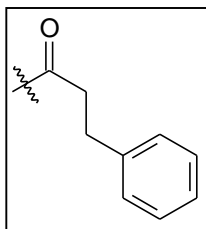
**Figura 4-39.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  de C4 (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



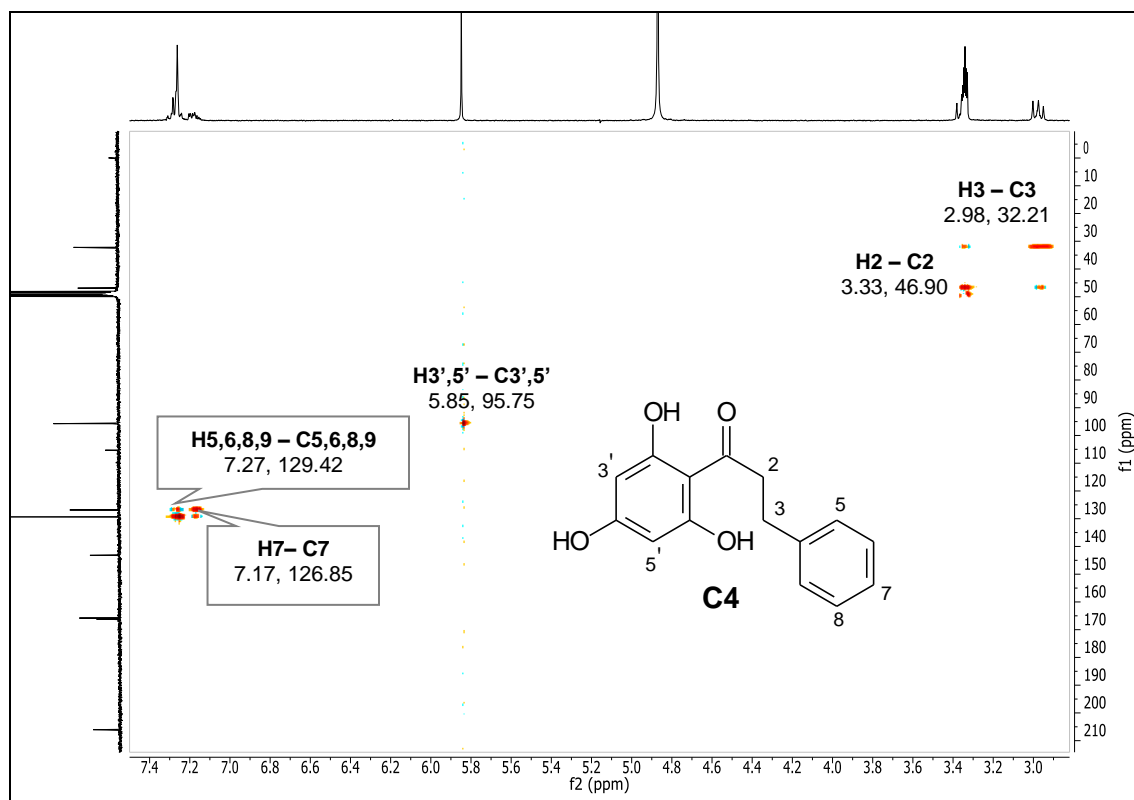
**Figura 4-40.** Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT 135 de C4 (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



El espectro de correlación HMBC (Figura 4-42) mostró que la señal en  $\delta_H$  3.33 acopla con la señal en  $\delta_C$  32.21, estos datos y los anteriormente descritos permitieron definir la presencia de un grupo metilénico que se encuentra unido al anillo aromático monosustituido, la correlación a dos enlaces entre  $\delta_H$  3.33 y  $\delta_C$  32.21 y entre  $\delta_H$  2.98 y  $\delta_C$  46.90 llevó a concluir que los dos grupos metilénicos son vecinos y la correlación entre  $\delta_H$  3.33 con  $\delta_C$  206.04 así como la correlación de  $\delta_H$  2.98 con  $\delta_C$  206.04 permitió definir que los grupos metilénicos se encuentran ligados a un grupo carbonilo, determinando la presencia del siguiente segmento en la molécula:



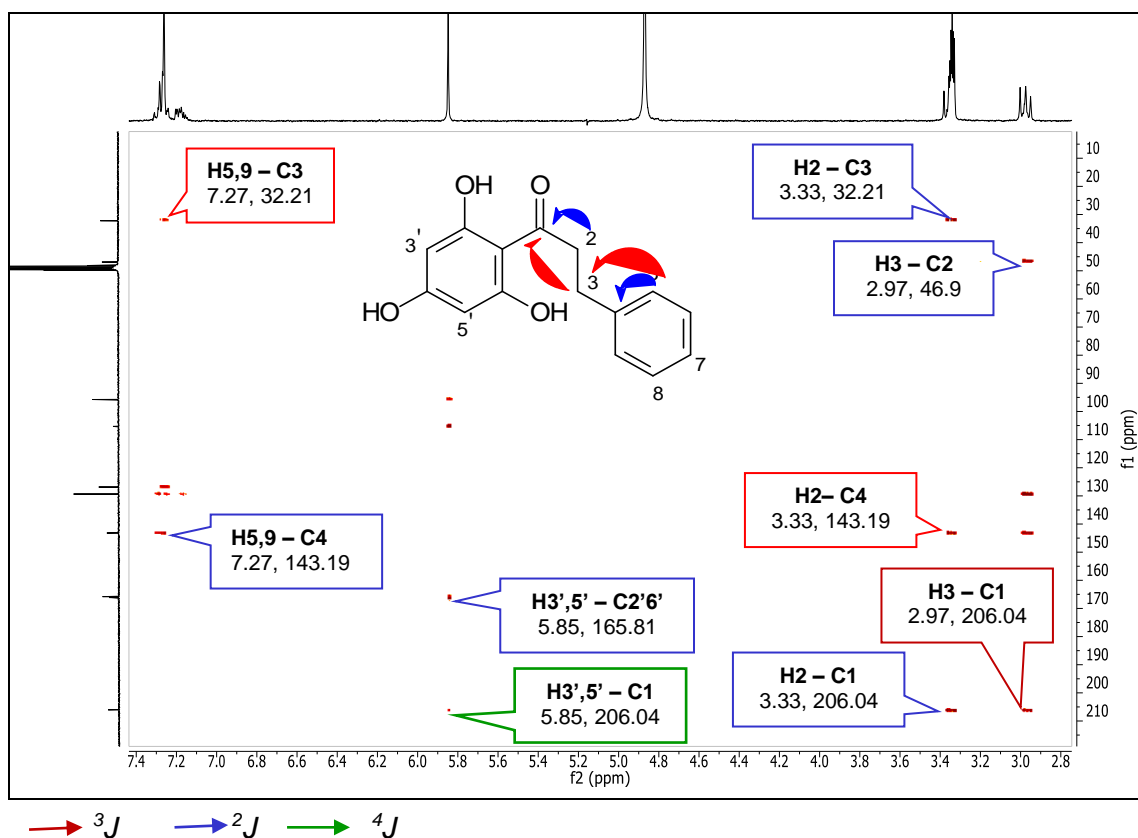
**Figura 4-41.** Espectro HMQC de C4 (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

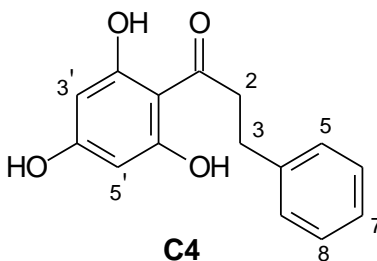
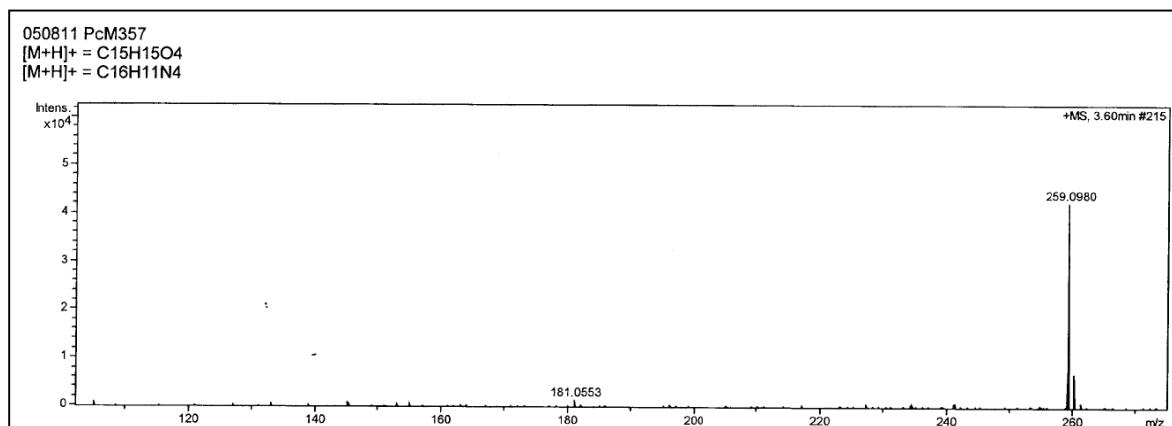




El acoplamiento a  $^4J$  entre las señales en  $\delta_H$  5.85 que integra para dos hidrógenos y  $\delta_{C=O}$  206.04 conllevó a concluir que se presenta un anillo aromático simétrico unido a un grupo carbonilo (Figura 4-42), el valor en  $\delta_H$  5.85 para hidrógenos aromáticos desprotegidos permitió proponer como sustituyentes grupos oxigenados. Teniendo en cuenta lo anterior se propuso la estructura 2',4',6' trihidroxidihidrochalcona que está acorde con el valor de  $m/z$  obtenido en el espectro de masas HRMS con valor de 259.0980  $[M+H]^+$  ( $C_{15}H_{15}O_4$ ) para C4 (Figura 4-43). En la Tabla 4-10 se encuentra la comparación de los datos obtenidos con los reportados en la literatura (Mustafa *et al.*, 2003), otros acoplamientos a dos y tres enlaces se registran en la Figura 4-42 y en la Tabla 4-9 que confirman la propuesta realizada anteriormente.

**Figura 4-42.** Espectro HMBC de C4 (500 MHz,  $CD_3OD$ )



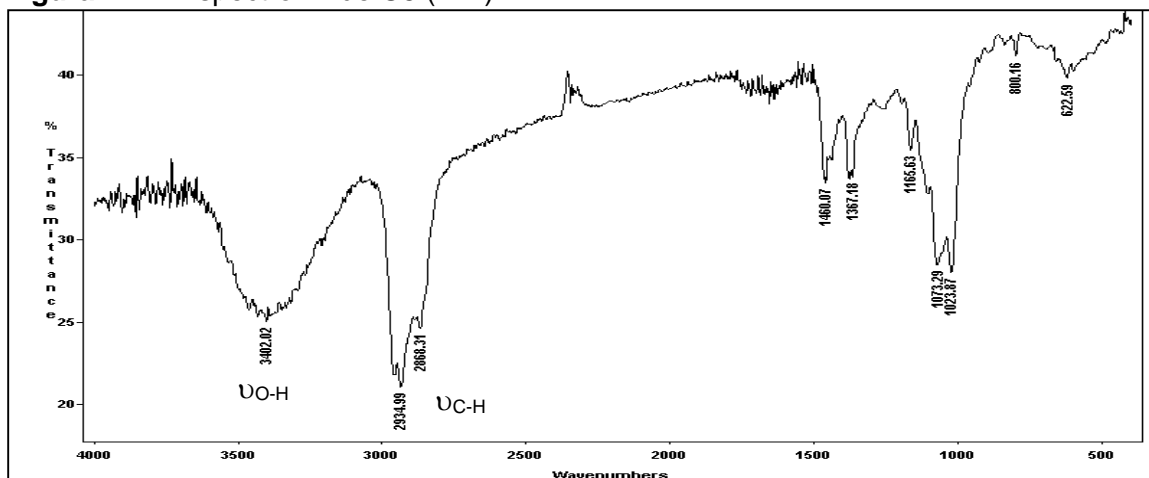
**Figura 4-43.** Espectro HRMS  $[M+H]^+$  de C4,  $m/z$ : 259.0980 (calcd.  $C_{15}H_{15}O_4$ )**Tabla 4-9.** Comparación de los datos de RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  de C4 con datos de la literatura para 2',4',6'-trihydroxidihidrochalcona (Mustafa *et al.*, 2003).

C	2',4',6'-trihydroxidihidrochalcona (Acetona- $d_6$ )		C4 ( $CD_3OD$ )		$^2J$	$^3J$
	$\delta_H$ (ppm)	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$\delta_C$ (ppm)		
1	-	203.3	-	206.04		
2	3.39 (t, 2H)	44.4	3.33 (t, 2H)	46.90	C1, C3	C4
3	2.97 (t, 2H)	29.6	2.98 (t, 2H)	32.21	C2	C1, C5-C9
4	-	141.2	-	143.19		
5, 9	7.27 (m, 4H)	127.7	7.27 (m, 4H)	129.42	C4	C3
7	7.18 (m, 1H)	125.2	7.17 (m, 1H)	126.85		
6, 8	7.27 (m, 4H)	127.7	7.27 (m, 4H)	129.34		
1'	-	103.1	-	105.30		
2', 6'	-	163.6	-	165.81		
3', 5'	5.94 (s, 2H)	94.1	5.85 (s, 2H)	95.75	C4'	C1'
4'	-	164.0	-	166.14		

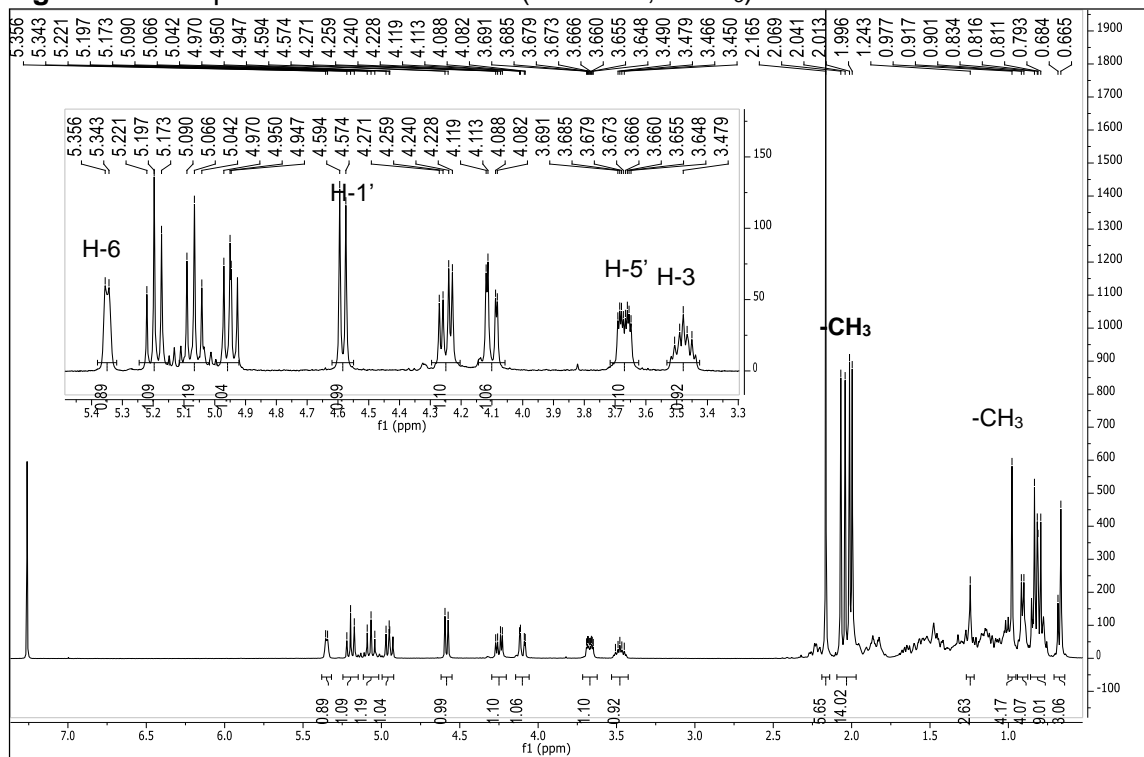
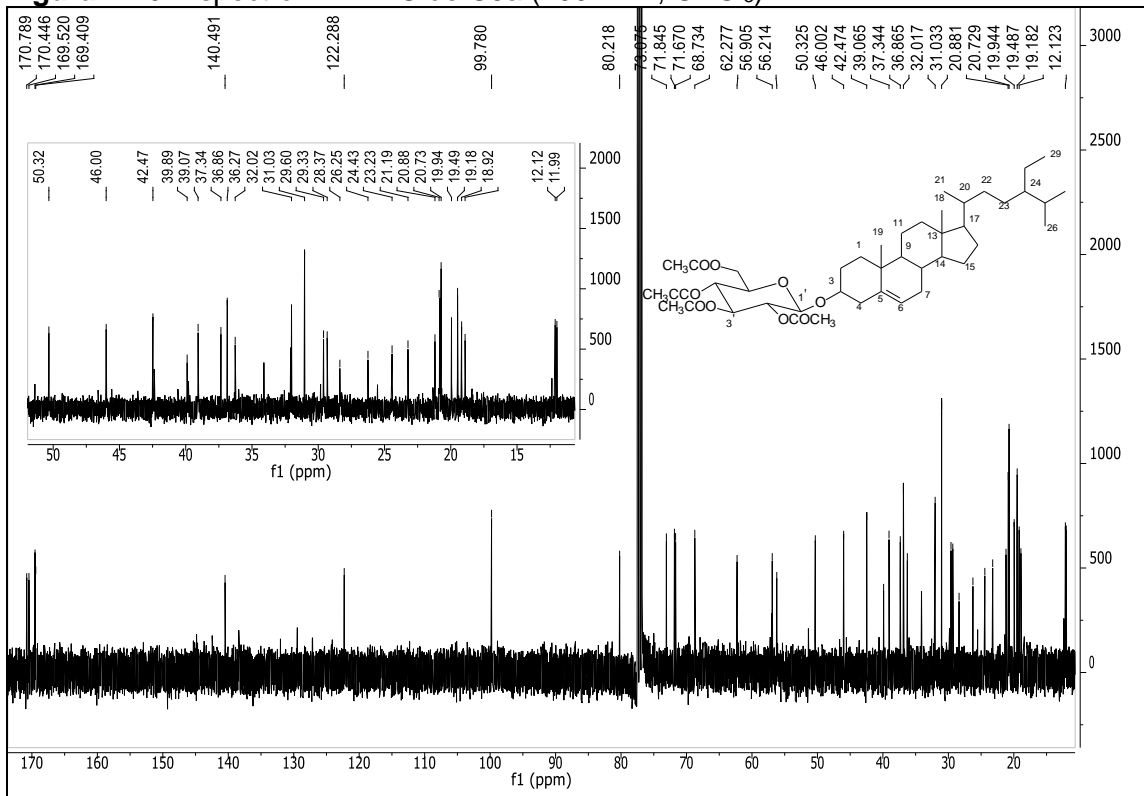
### 4.5.6 Identificación del compuesto C5

Este compuesto se aisló como un sólido blanco con P.F. 307-309°C, esta muestra fue acetilada para facilitar su análisis por RMN. El espectro de IR de C5 (Figura 4-44) reveló bandas de absorción en  $3402\text{ cm}^{-1}$  de estiramiento axial de OH, bandas en  $2934$  y  $2868\text{ cm}^{-1}$  de estiramiento de  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$ , en  $1460, 1367\text{ cm}^{-1}$  de estiramiento C-C y en  $1023\text{ cm}^{-1}$  de estiramiento C-O.

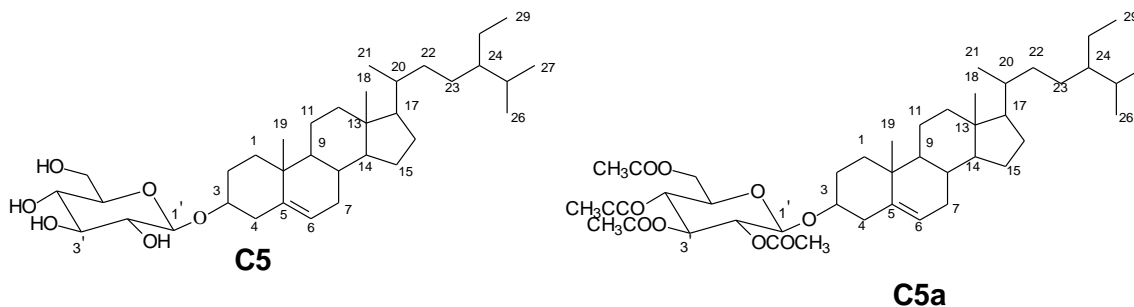
Figura 4-44. Espectro IR de C5 (KBr)



El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la muestra acetilada (**C5a**) (Figura 4-45) se asemeja a los obtenidos para compuestos con núcleos esteroidales, presentó 4 señales entre  $\delta_{\text{H}}$  1.99 y  $\delta_{\text{H}}$  2.09 correspondientes a hidrógenos metílicos propios de 4 grupos acetilo que proponen la presencia de 4 grupos hidroxilo en la molécula de C5, la señal en  $\delta_{\text{H}}$  3.4 es atribuible a un hidrógeno carbinólico característico de un núcleo esteroideal (H-3), también se observan señales en  $\delta_{\text{H}}$  5.35 de un hidrógeno olefínico y una señal en  $\delta_{\text{H}}$  4.58 (d, 8.0 Hz) propia de un hidrógeno anomérico, además de señales entre  $\delta_{\text{H}}$  4.0 y  $\delta_{\text{H}}$  5.2 compatibles con una unidad de carbohidrato. La serie de señales entre  $\delta_{\text{H}}$  0.5 y  $\delta_{\text{H}}$  1.0 son propias de metilos de un esqueleto esteroideal. El espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4-46) mostró señales en  $\delta_{\text{C}}$  140.49 y 122.29 correspondientes a dos carbonos olefínicos de una estructura esteroideal, la señal en 80.21 se atribuye a un carbono carbinólico y una señal en 99.78 que representa un carbono anomérico. Esta unidad fue identificada como glucosa considerando los desplazamientos químicos de los hidrógenos metínicos y los valores de los carbonos correspondientes.

Figura 4-45. Espectro RMN  $^1\text{H}$  de C5a (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )Figura 4-46. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  de C5a (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

La comparación con los datos de  $^{13}\text{C}$  de C5a y datos de la literatura para el tetra-acetato del  $\beta$ -D-glucopiranosil-3-O-sitosterol (Kojima *et al.*, 1990) permitieron identificar a C5 como Sitosterol 3-O- $\beta$ - glucopiranósido (Tabla 4-10).



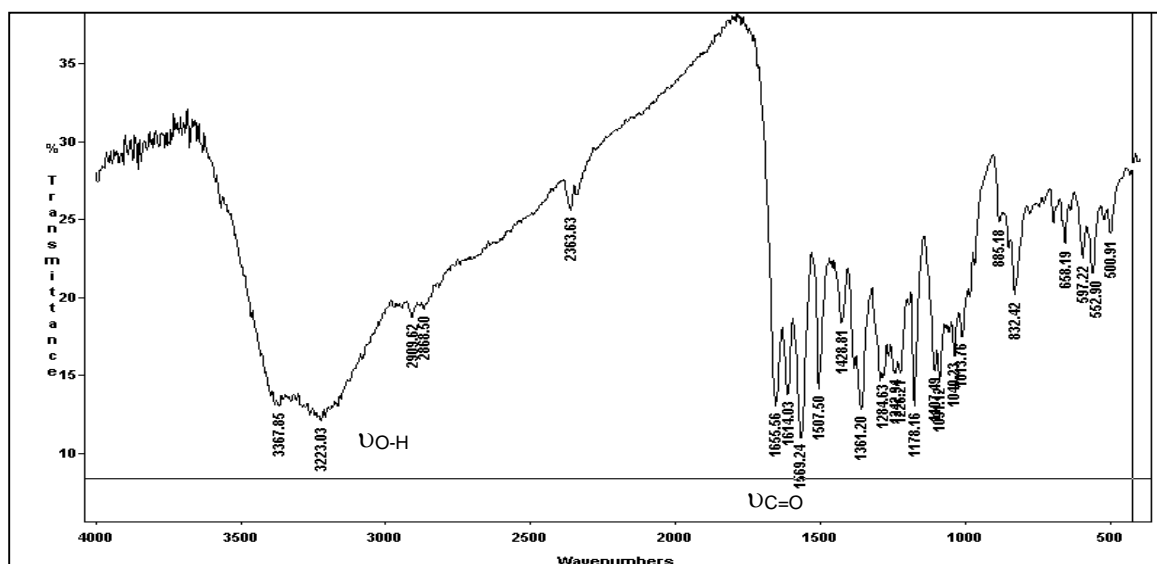
**Tabla 4-10.** Comparación de los datos de RMN  $^{13}\text{C}$  de C5a con datos de la literatura para Tetra O- acetil-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-sitosterol (Kojima *et al.*, 1990).

C	Sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil acetato $\delta_c$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ )	C5a $\delta_c$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ )
1	37.2	37.48
2	29.4	30.27
3	80.1	80.22
4	38.9	39.03
5	140.3	140.49
6	122.2	122.29
7	31.8	32.18
8	31.9	32.02
9	50.1	50.34
10	36.7	36.86
11	21.0	21.19
12	39.7	39.97
13	42.3	42.47
14	56.7	56.91
15	24.3	24.53
16	28.2	29.32
17	56.0	56.25
18	11.8	11.99
19	19.4	19.49
20	36.1	36.42
21	18.8	19.18
22	33.9	34.21
23	26.0	26.35
24	45.8	46.00
25	29.1	29.45
26	19.8	19.94
27	19.0	20.72
28	23.1	23.38
29	12.0	12.12
1'	99.7	99.78
2'	71.5	71.67
3'	72.9	73.07
4'	68.5	68.73
5'	71.7	71.84
6'	62.1	62.28
Me $\text{CO}_2$	170.7, 170.4, 169.4, 169.3	170.79, 170.44, 169.52, 169.41
Me $\text{CO}_2$	20.8, 20.7, 20.6, 20.6	20.88, 20.73, 19.94, 20.0

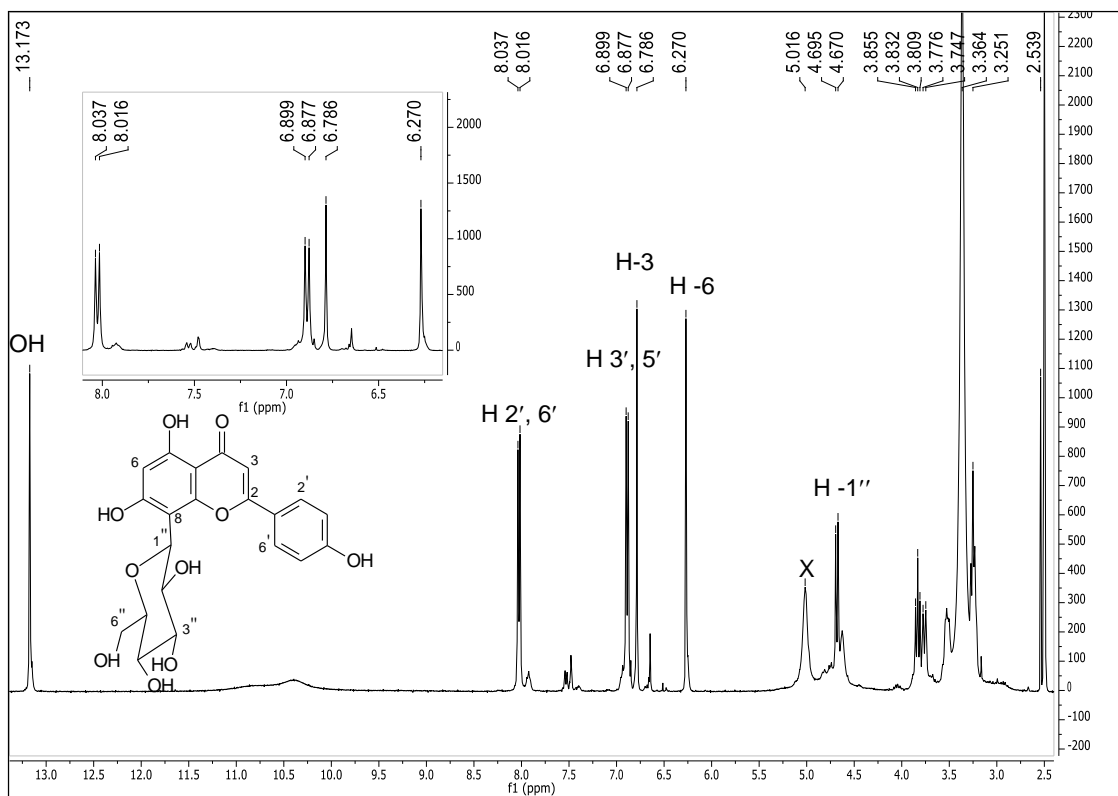
### 4.5.7 Identificación del compuesto C6

El compuesto C6 fue aislado como un sólido amarillo (P.F. 259-261°C), caracterizado por CCD al revelar con NP-PEG al UV y visible. Adicionalmente el espectro de IR (Figura 4-47) presenta bandas de absorción en 3223  $\text{cm}^{-1}$  de deformación axial de -OH, en 2909  $\text{cm}^{-1}$  de estiramiento C-H, en 1655  $\text{cm}^{-1}$  de deformación axial C=O y entre 1614-1507 de estiramientos C-C de aromáticos, los anteriores datos permiten concluir que la muestra C6 posiblemente corresponde a un flavonoide.

Figura 4-47. Espectro IR de C6 (KBr)



El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4-48) presentó una señal en  $\delta_{\text{H}}13.17$  de un grupo hidroxilo formando enlace de hidrógeno, también presenta 4 señales de hidrógenos aromáticos, dos señales en  $\delta_{\text{H}} 8.03$  (d,  $J=8.4$  Hz, 2H) y  $\delta_{\text{H}} 6.89$  (d,  $J=8.4$  Hz, 2H) atribuibles a los hidrógenos de un sistema AA'BB' de un anillo aromático, dos singletos en  $\delta_{\text{H}} 6.79$  (s, 1H) y  $\delta_{\text{H}} 6.27$  (s, 1H) que considerando la caracterización de esta muestra como un flavonoide permiten definir que el anillo A posee un hidrógeno libre y por lo tanto el anillo B corresponde al sistema p-sustituido. La señal en  $\delta_{\text{H}} 4.68$  (d, 10 Hz) es atribuible a un hidrógeno anomérico característico de un C-glicósido y las señales entre  $\delta_{\text{H}} 3.81$  y  $\delta_{\text{H}} 3.20$  son compatibles con la anterior afirmación. Al observar los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de C6 estos son compatibles con los de una flavona.

**Figura 4-48.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  de C6 (400 MHz, DMSO- $d_6$ )

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 4-49) presenta una señal en  $\delta_{\text{C}}182.04$  propia de carbono carbónilico conjugado, las señales en  $\delta_{\text{C}}128.92$  y  $\delta_{\text{C}}115.79$  confirman un sistema aromático del anillo B asignado como un sistema *p*-sustituido por la intensidad y los valores de desplazamiento químico de estas dos señales y las de sus respectivos hidrógenos. Las señales entre  $\delta_{\text{C}}61.28$  y  $\delta_{\text{C}}81.82$  por comparación con datos de la literatura pueden ser atribuidas a una unidad de glucosa (Agrawal, 1992). El espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Figura 4-50) confirma la correlación de las señales del sistema AA'BB', muestra 2 hidrógenos en la región de aromáticos sin correlación y también las correlaciones entre las señales que corresponden a los hidrógenos de una unidad de glucosa. Los espectros de correlación heteronuclear HMQC y HMBC (Figuras 4-51 y 4-52) permitieron asignar la unidad de azúcar como sustituyente en el C-8 del anillo A de una flavona por las correlaciones entre las señales en  $\delta_{\text{H}}4.68$  y  $\delta_{\text{C}}104.60$ , también permitieron confirmar que el flavonoide corresponde a una flavona por la correlación a tres enlaces entre el hidrógeno olefínico en  $\delta_{\text{H}}6.79$  y el carbono en  $\delta_{\text{C}}121.58$  del anillo B del flavonoide y establecer la correlación a  $^3J$  entre la señal en  $\delta_{\text{H}}6.27$  y el carbono en

104.60 ppm. Otras correlaciones se muestran en la Figura 4-52 y se registran en la Tabla 4-11. Estas asignaciones condujeron a concluir que la muestra corresponde a la flavona de nombre común vitexina, los datos de RMN de C6 fueron comparados con varias fuentes bibliográficas, en la Tabla 4-11 se registra la comparación con los datos de Choo *et al.* 2012.

**Figura 4-49.** Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT 135 de C6 (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )

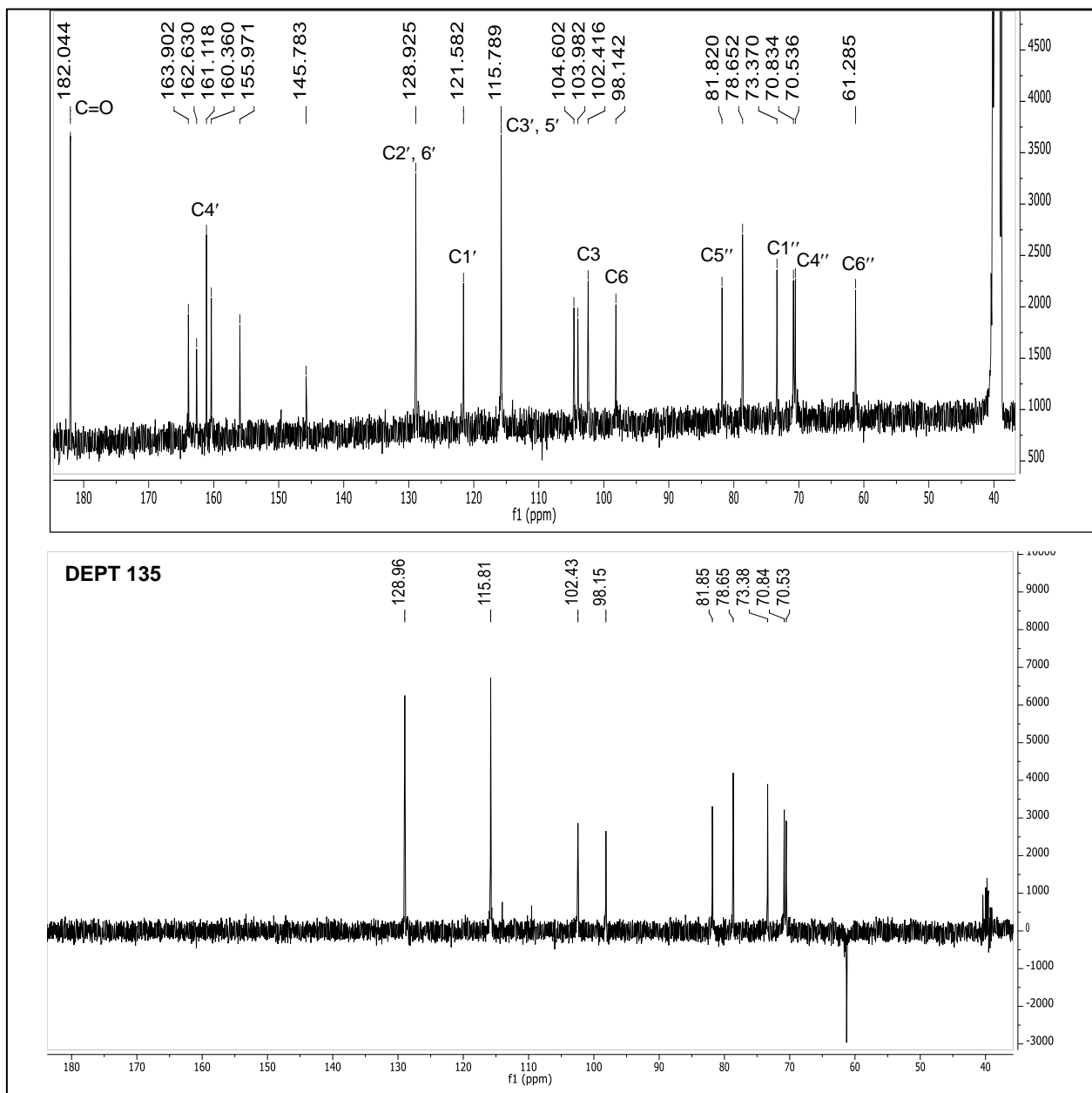




Figura 4-50. Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de C6 (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )

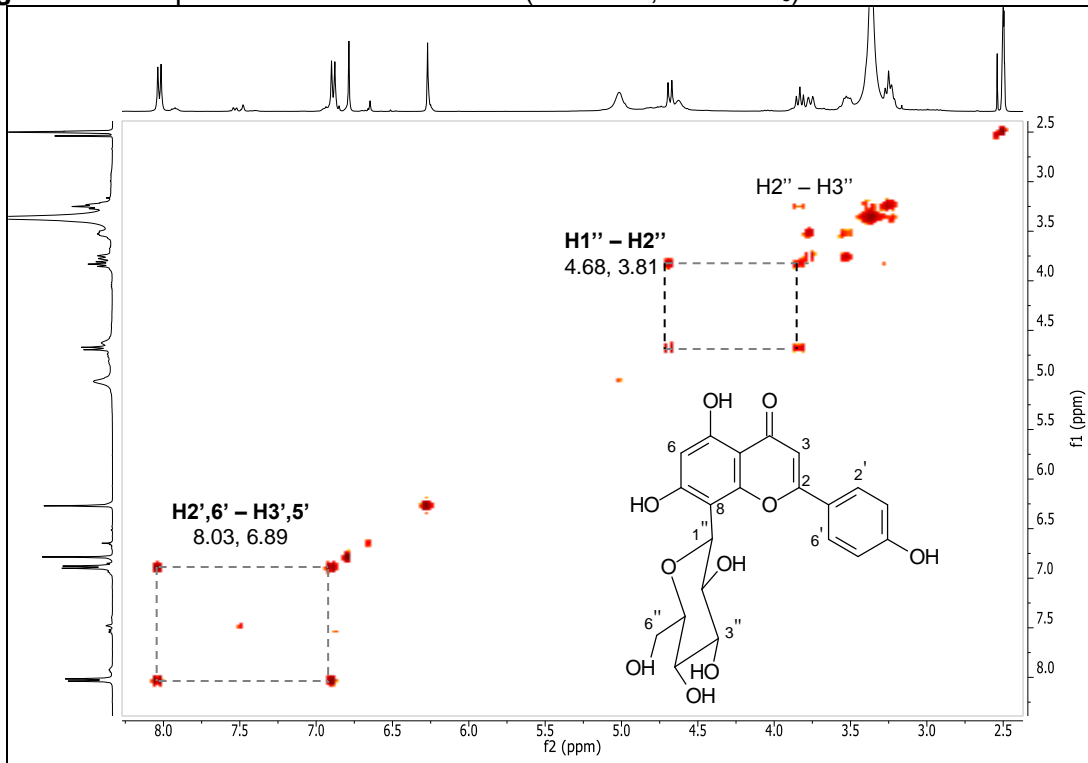


Figura 4-51. Espectro HMQC de C6 ( $\text{DMSO-d}_6$ )

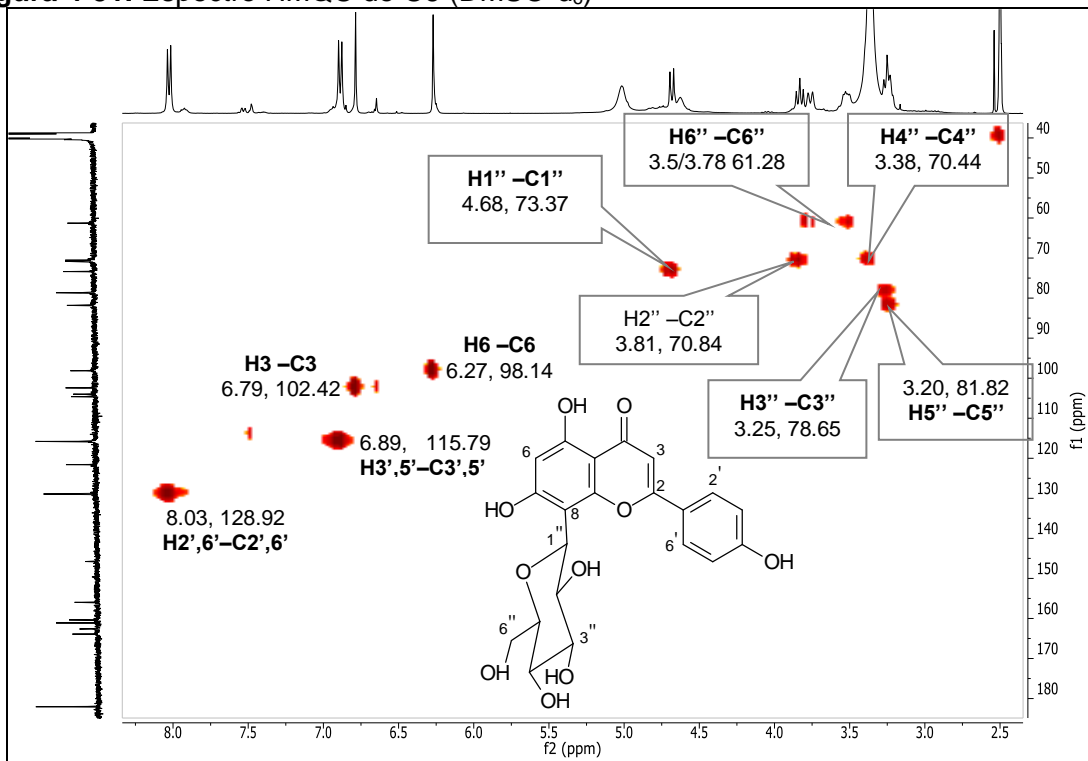
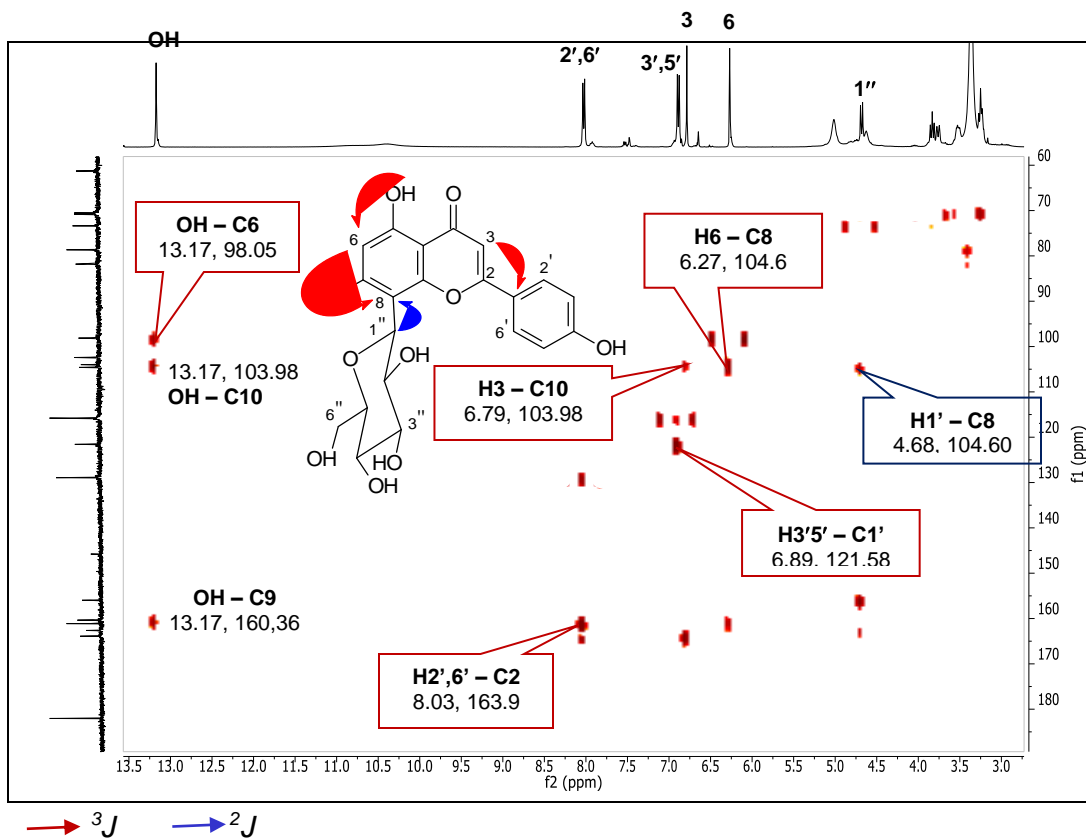
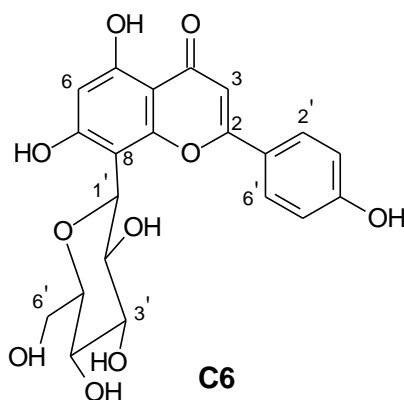


Figura 4-52. Espectro HMBC de C6 (DMSO-d<sub>6</sub>)



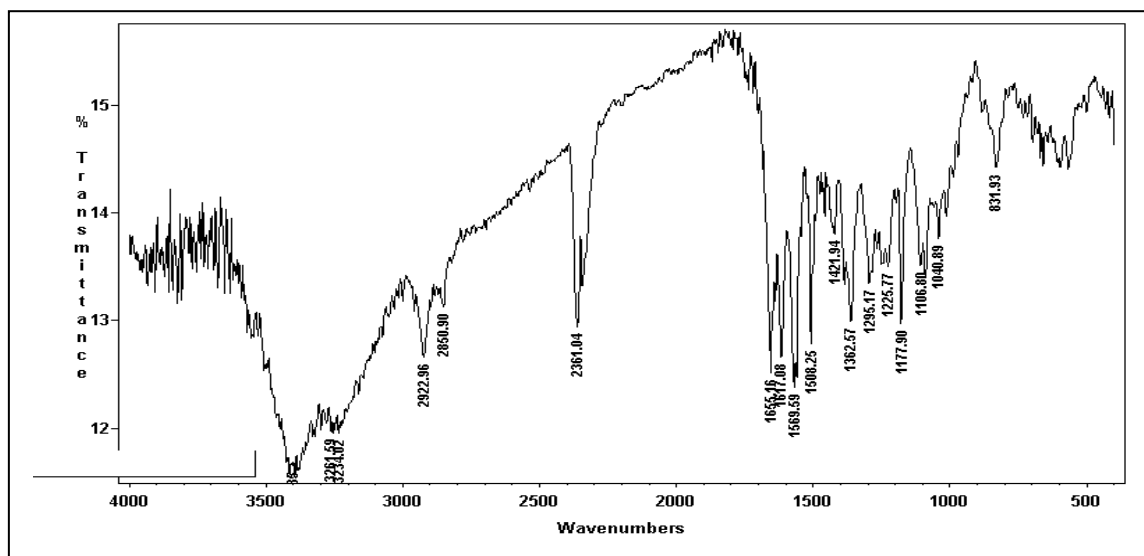
**Tabla 4-11.** Comparación de los datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de C6 con datos de la literatura para Vitexina (Choo *et al.*, 2012)

C	Vitexina (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)		C6 (DMSO- $d_6$ , 400 Hz)		$^2J$	$^3J$
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)		
2	-	164.3	-	163.90		
3	6.7 (s, 1H)	102.8	6.79 (s, 1H)	102.42	C2	C10
4	-	182.4	-	182.04		
5	-	161.5	-	160.36		
6	6.2 (s, 1H)	98.6	6.27 (s, 1H)	98.14		
7	-	161.5	-	162.63		
8	-	105.0	-	104.60		
9	-	156.4	-	155.97	C7	C8
10	-	104.3	-	103.98		
1'	-	122.0	-	121.58		
2',6'	8.0 (d, 7.2 Hz, 2H)	129.3	8.03 (d, 8.4, 2H)	128.92		C4' - C3', 5'
3',5'	6.9 (d, 8.5 Hz, 2H)	116.2	6.89 (d, 8.8, 2H)	115.79		C1' - C2', 6'
4'	-	160.8	-	161.11		
1''	4.9 (d, 8.5 Hz, 1H)	73.8	4.68 (d, 10.0, 1H)	73.37	C8	C7, C9
2''	3.1 a 3.9 (6H)	71.3	3.81 (m)	70.84		
3''		79.1		78.65		
4''		70.9		70.54		
5''		82.2		81.82		
6''		61.7		61.28		
OH		13.17 (s, 1H)		-	13.17 (s, 1H)	-

#### 4.5.8 Identificación del compuesto C7

Este compuesto fue aislado como un sólido amarillo con P.F. 210.4 °C, que revela positivo para un flavonoide por CCD empleando el revelador NP-PEG. El espectro de IR (Figura 4-53) presentó bandas de absorción en 3330  $\text{cm}^{-1}$  de deformación axial de OH, en 2922  $\text{cm}^{-1}$  de estiramiento C-H, en 1651  $\text{cm}^{-1}$  de deformación axial C=O y entre 1617-1508  $\text{cm}^{-1}$  de deformación axial C=C de anillo aromático.

**Figura 4-53.** Espectro IR de C7 (KBr)



El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4-54) presentó una señal en  $\delta_{\text{H}}$  13.17 de un grupo hidroxilo conjugado y cinco señales en la región de hidrógenos aromáticos. La señal de hidrógeno aromático en  $\delta_{\text{H}}$  7.53 (dd, 1.6, 8.4 Hz, 1H) presenta acoplamiento con las señales en  $\delta_{\text{H}}$  6.86 (d, 8.4 Hz) y  $\delta_{\text{H}}$  7.47 (d, 1.6 Hz, 1H), los valores de constante de acoplamiento indican una sustitución *meta* y *para* respecto al hidrógeno en  $\delta_{\text{H}}$  7.53 en el anillo B del flavonoide. La señal en  $\delta_{\text{H}}$  4.68 revela la presencia de una unidad de azúcar en la molécula, el valor de desplazamiento indica un enlace C-glicosídico (Agrawal, 1992).

El espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4-55) muestra una señal en  $\delta_{\text{C}}$  182.04 de un carbono carbonílico conjugado característico de una  $\gamma$ -benzopirona, una señal en  $\delta_{\text{C}}$  98.14 atribuible a un carbono anomérico, 5 señales de carbonos metínicos de azúcar que por comparación con datos de la literatura son atribuidos a una unidad de glucosa, las demás señales son compatibles con las de un núcleo de flavonoide similar al compuesto C-6.

Figura 4-54. Espectro RMN <sup>1</sup>H de C7 (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

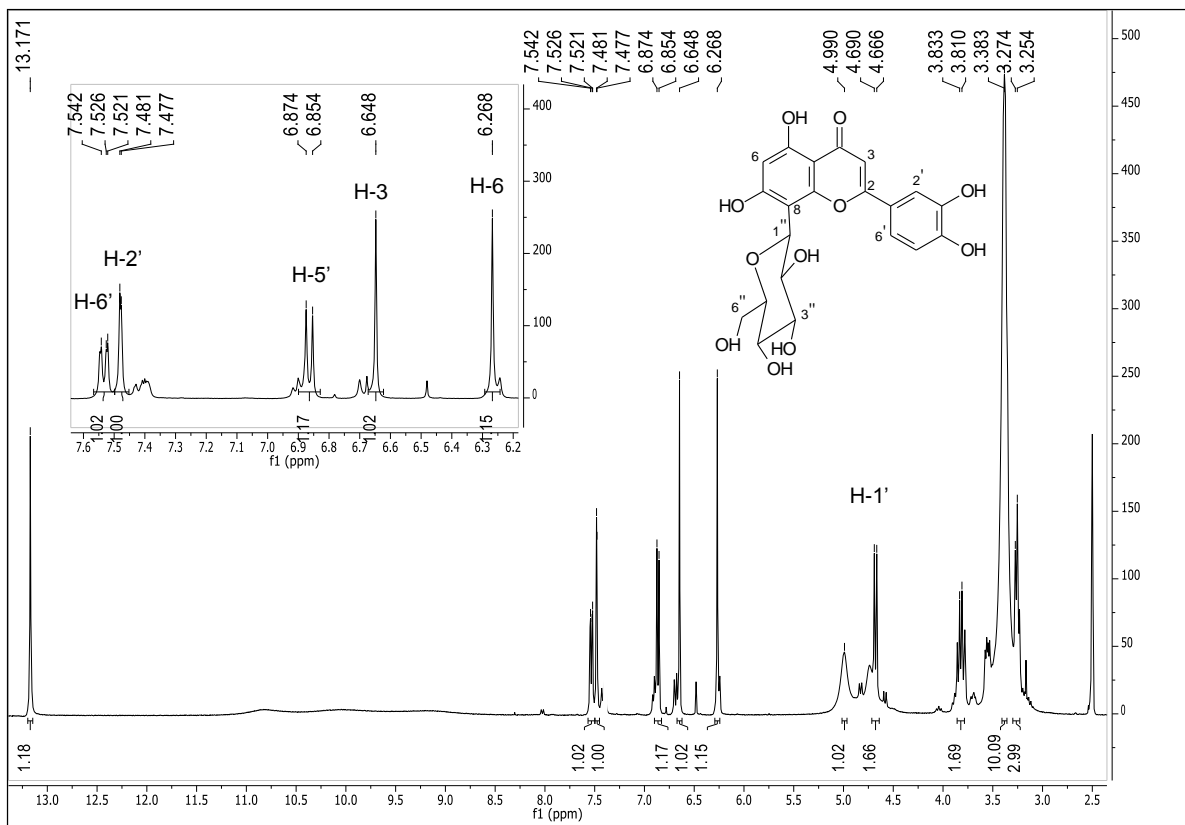
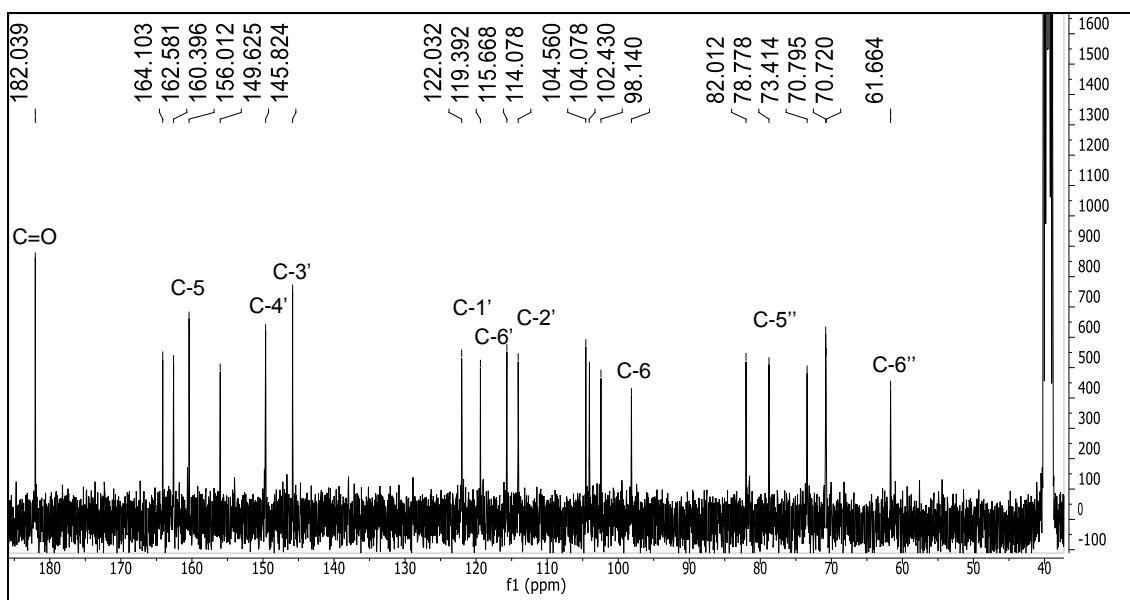


Figura 4-55. Espectro RMN <sup>13</sup>C de C7 (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)



El espectro de correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Figura 4-56) confirma el acoplamiento de las señales en  $\delta_{\text{H}}$  7.48 y  $\delta_{\text{H}}$  6.86 y permite determinar este sistema como del anillo B de una flavona. El espectro HMQC (Figura 4-57) condujo a atribuir las señales de hidrógeno a las respectivas señales de carbono como se registra en la Tabla 4-12 y a atribuir plenamente la unidad de glucosa. El espectro de HMBC (Figura 4-58) muestra correlaciones a tres enlaces entre las señales en  $\delta_{\text{H}}$  7.53 y  $\delta_{\text{H}}$  7.48 con  $\delta_{\text{C}}$  164.10 que confirman la unidad de  $\gamma$ -benzopirona de una flavona. La correlación entre  $\delta_{\text{H}}$  6.64 y  $\delta_{\text{C}}$  122.03 confirma que  $\delta_{\text{H}}$  6.64 representa la señal de un hidrógeno olefínico sustentado por el C-3 de una flavona, señal que además acopla con el carbonilo en  $\delta_{\text{C}=\text{O}}$  182.04. La correlación entre las señales en  $\delta_{\text{H}}$  6.27 y  $\delta_{\text{C}}$  160.40 indican que el anillo A solo cuenta con un hidrógeno libre, el acoplamiento de la señal en  $\delta_{\text{H}}$  4.68 y  $\delta_{\text{C}}$  156.01 permite asignar la unidad glicosídica en la posición C-8 de la flavona y de esta manera se propone la estructura de la orientina, los demás datos de correlación están consignados en la Tabla 4-12 así como la comparación con datos de la literatura. La propuesta concuerda con el valor de  $m/z$  449.1071  $[\text{M}+\text{H}]^+$  obtenido para C7 (Figura 4-59).

**Figura 4-56.** Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de C7 (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )

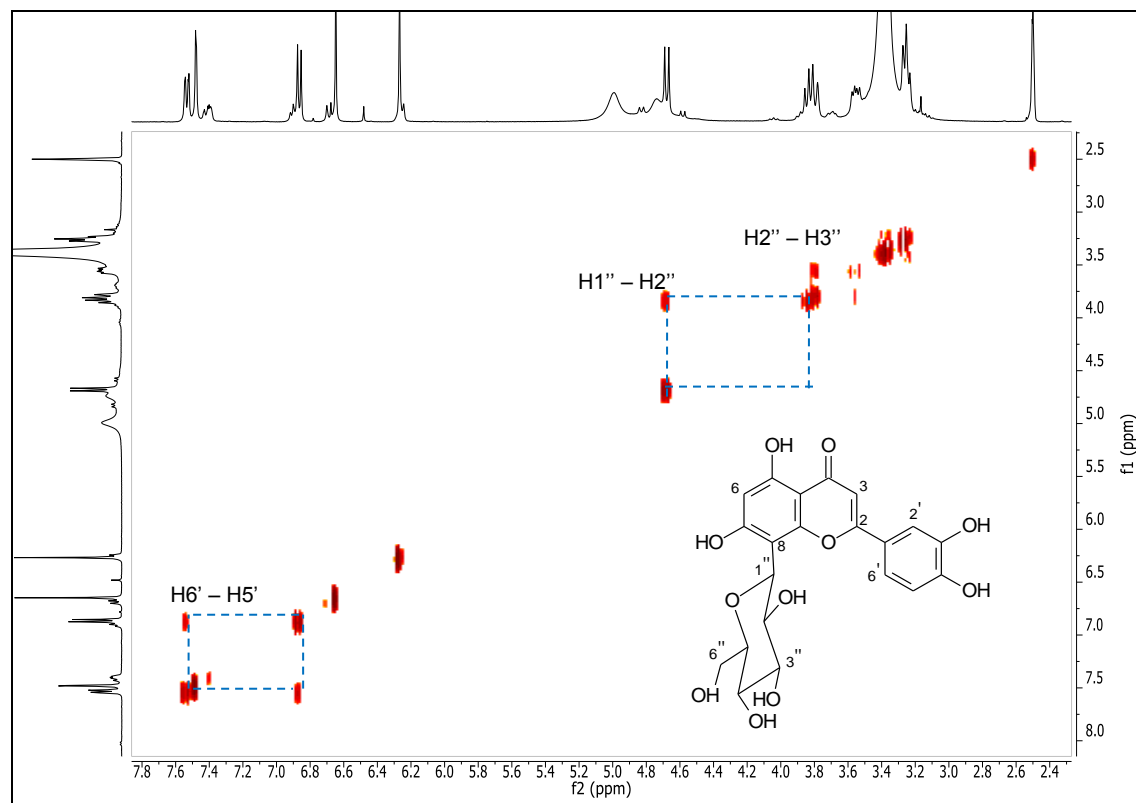


Figura 4-57. Espectro HMQC de C7 (DMSO-d<sub>6</sub>)

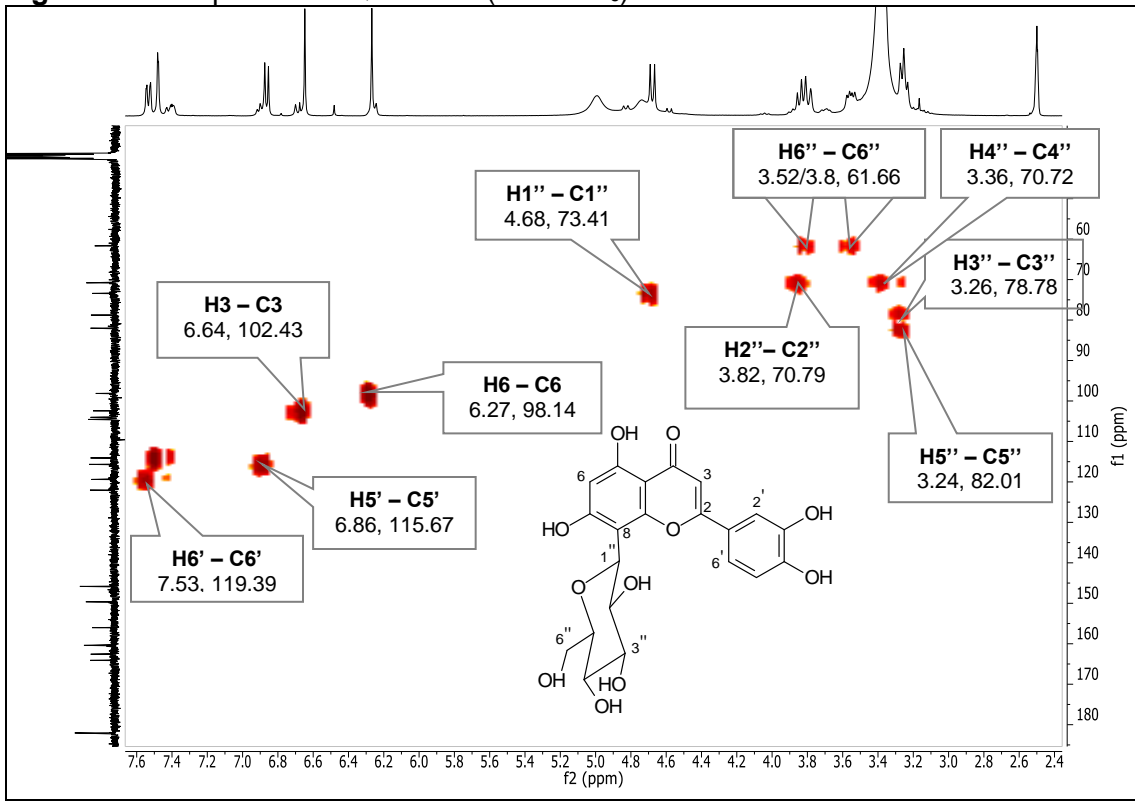
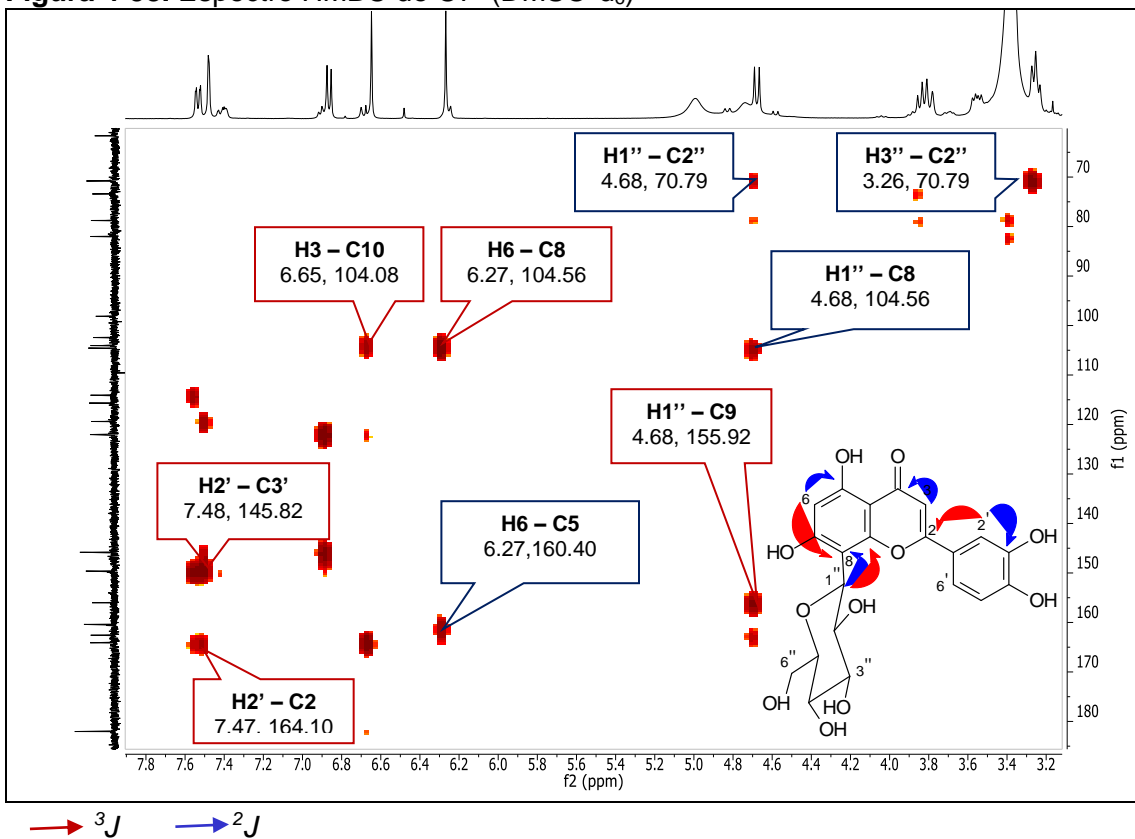
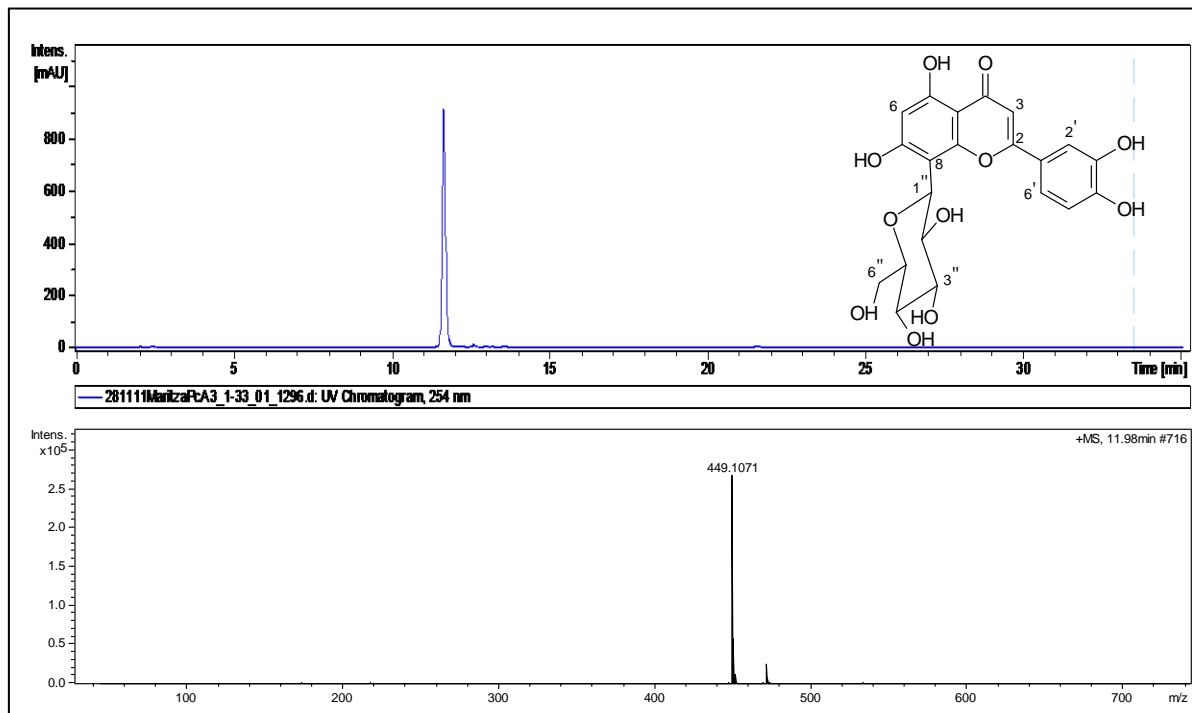


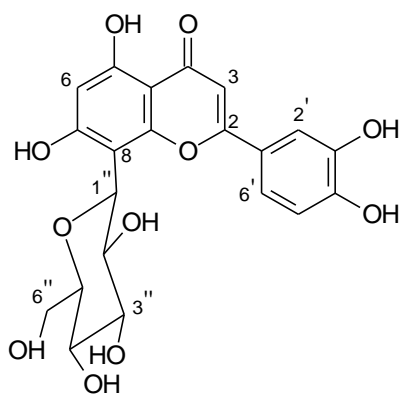
Figura 4-58. Espectro HMBC de C7 (DMSO-d<sub>6</sub>)



**Figura 4-59.** Cromatograma HPLC y espectro de HRMS de C7

<sup>a</sup> Cromatograma HPLC en columna Phenomenex C18 (250x3mm), fase móvil MeOH:agua (0,2 % de ácido fórmico), gradiente 0 min 40 % MeOH, 2 min 40 % MeOH, 25 min 100 % MeOH, 30 min 100 % MeOH, 32 min 40 % MeOH, 35 min 40 % MeOH, flujo: 0,5 mL/min, 254 nm. <sup>b</sup> Espectro de masas HRMS obtenido en modo negativo con energía de colisión de 8eV



**C7****Tabla 4-12.** Comparación de los datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de C7 con datos de la literatura para Orientina (Zhou *et al.*, 2005).

C	Orientina ( DMSO- $d_6$ )		C7 (DMSO- $d_6$ )		$^2J$	$^3J$
	$\delta_H$ (ppm)	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$\delta_C$ (ppm)		
2	-	164.16	-	164.10		
3	6.65 (s, 1H)	102.41	6.64 (s, 1H)	102.43	C10	C1'
4	-	182.03	-	182.04		
5	-	160.47	-	160.40		
6	6.25 (s, 1H)	98.31	6.27 (s, 1H)	98.14	C5	C8
7	-	162.80	-	162.58		
8	-	104.65	-	104.56		
9	-	155.01	-	156.01		
10	-	103.99	-	104.08		
1'	-	121.97	-	122.03		
2'	7.44 (d, 2.1 Hz, 1H)	114.07	7.48 (d, 1.6 Hz, 1H)	114.08	C3'	C2
3'	-	145.95	-	145.82		
4'	-	149.90	-	149.62		
5'	6.90 (d, 8.2 Hz, 1H)	115.78	6.86 (d, 8.0 Hz, 1H)	115.67		
6'	7.50 (dd, 2.1, 8.0 Hz, 1H)	119.45	7.53 (dd, 1.6, 8.4 Hz 1H)	119.39		C2
1''	4.72 (d, 9.0 Hz, 1H)	73.50	4.68 (d, 9.6 Hz, 1H)	73.41	C2'', C8	C9
2''	3.88- 3.22	70.40	3.82 (m)	70.79		
3''		78.88	3.26*	78.78	C2''	
4''		70.83	3.36*	70.72		
5''		82.04	3.24*	82.01		
6''		61.76	3.5* / 3.8*	61.66		
OH	13.15 (s, 1H)		13.17 (s, 1H)	-		

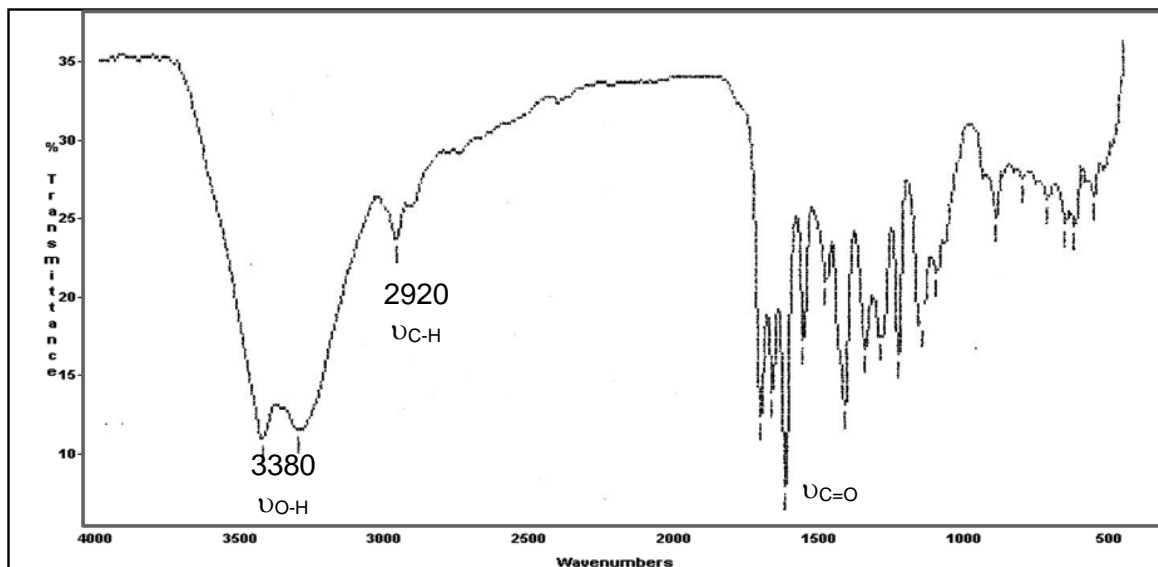
\*Valores determinados por correlaciones observadas es el espectro HMBC.

#### 4.5.9 Identificación del compuesto C8

El compuesto C8 fue obtenido como un sólido amorfo de color amarillo (PF 246-248°C), caracterizado como flavonoide por medio de CCD al revelar con NP/PEG. El espectro de IR (Figura 4-60) es similar al obtenido para los compuestos C6 y C7, presenta bandas en 3380 y 3254  $\text{cm}^{-1}$  de deformación axial de OH, en 2920  $\text{cm}^{-1}$  de estiramiento C-H, en 1656  $\text{cm}^{-1}$  de deformación axial C=O y entre 1641-1501  $\text{cm}^{-1}$  de deformación axial de C=C de anillo aromático.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4-61) presentó 4 señales en la región de hidrógenos aromáticos. Las señales en  $\delta_{\text{H}}$  7.80 (d, 8.8 Hz) y  $\delta_{\text{H}}$  6.89 (d, 8.8 Hz) que muestran cada una una integración para 2 hidrógenos, indican la presencia de un sistema *p*-sustituido que puede corresponder al anillo B de un flavonoide. La señal en  $\delta_{\text{H}}$  4.59 revela la presencia de un hidrógeno anomérico unido por un enlace C-C a la molécula (Agrawal, 1992). Las señales en 6.56 (s, 1H) y  $\delta_{\text{H}}$  6.46 (s, 1H) son atribuibles a hidrógenos olefínicos.

**Figura 4-60** . Espectro IR de C8 (KBr)



El espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4-62) muestra una señal en  $\delta_{\text{C}}182.42$  de un carbono carbonílico conjugado, una señal en  $\delta_{\text{C}} 73.87$  de un carbono anomérico y 5 señales de carbonos metínicos característicos de azúcar entre 61.45 y 81.21, el desplazamiento de estas señales corresponden por comparación con datos de la literatura a una unidad de glucosa (Agrawal, 1992). El espectro de HMQC permitió asignar las señales de hidrógeno a los carbonos correspondientes como se muestra en la Figura 4-63 y en la Tabla 4-10. El espectro de HMBC (Figura 4-64) permitió definir la posición del azúcar en el carbono C-6 por la correlación de las señales en  $\delta_{\text{H}} 4.59$  (d) del hidrógeno anomérico y la señal en  $\delta_{\text{C}} 107.75$  (C-6) y por la correlación entre  $\delta_{\text{H}} 4.59$  y  $\delta_{\text{C}} 163.57$  asignado a C-7. Esta información junto con el valor de masa observado en el espectro de HRMS (Figura 4-65) obtenido en modo positivo con valor  $m/z$  433.113 permitió concluir que la muestra C8 corresponde al flavonoide isovitexina. Los datos de RMN obtenidos para C8 se compararon con valores reportados en la literatura (Pedras *et al.*, 2003) (Tabla 4-13).

**Figura 4-61.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  de C8 (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

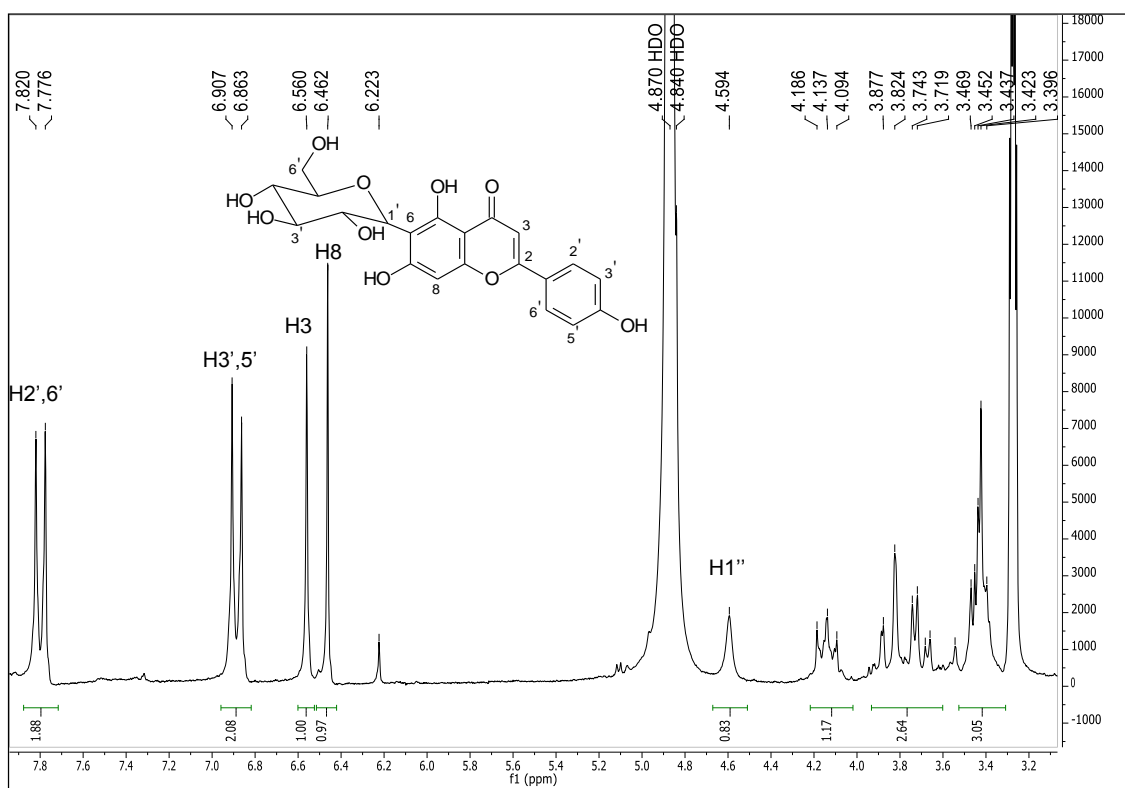


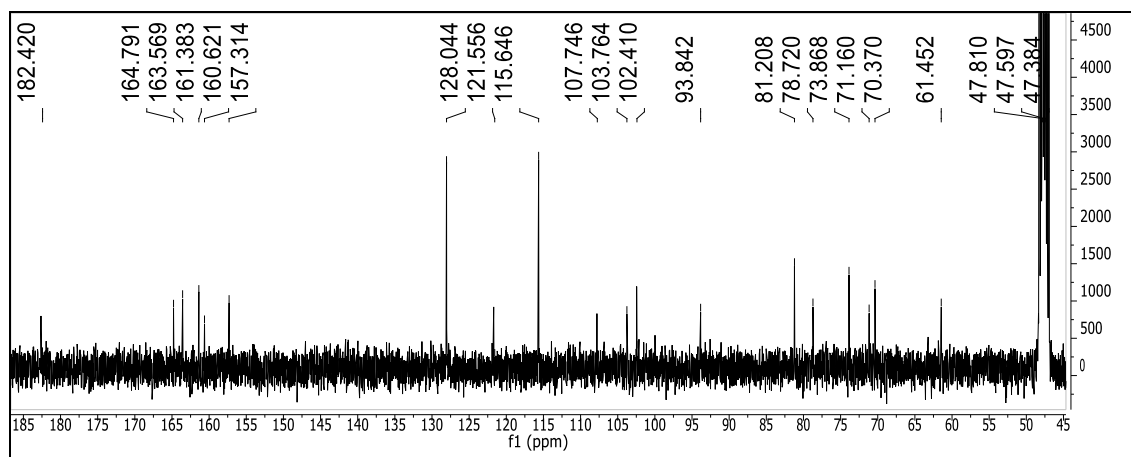
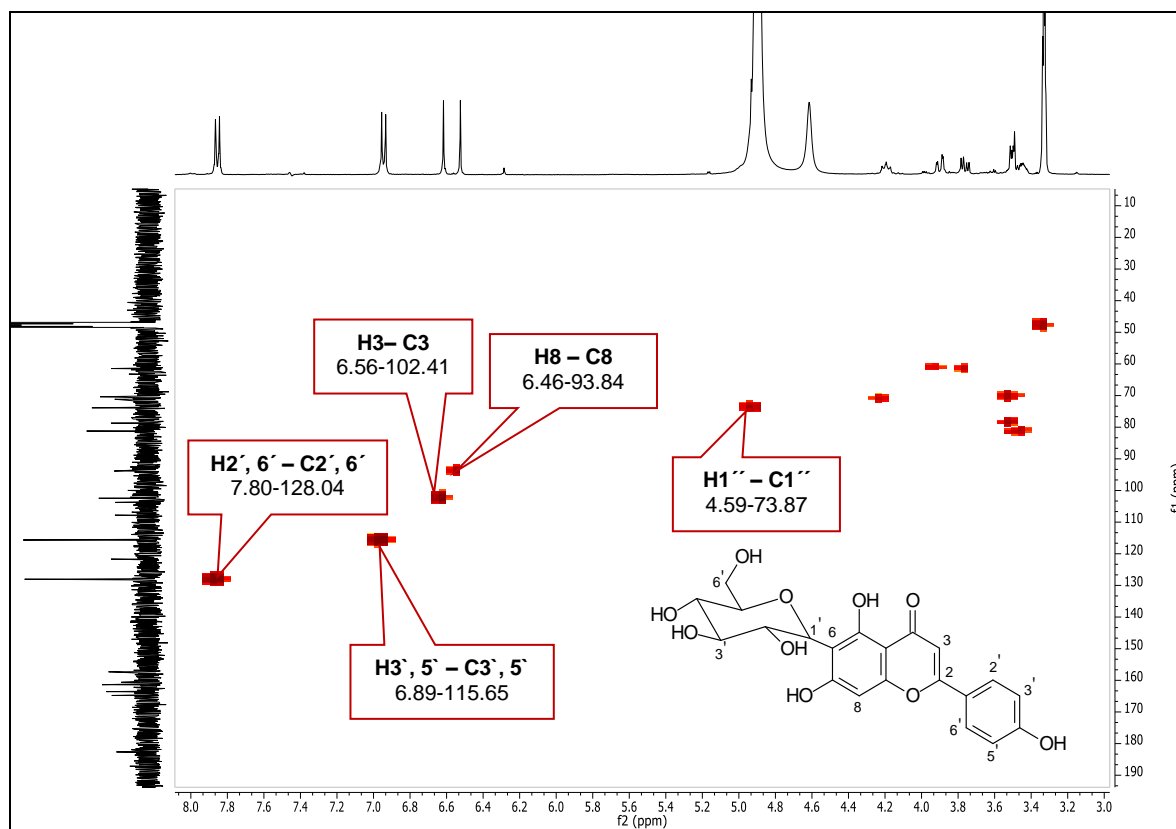
Figura 4-62. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  de C8 (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )Figura 4-63. Espectro de HMQC de C8 (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

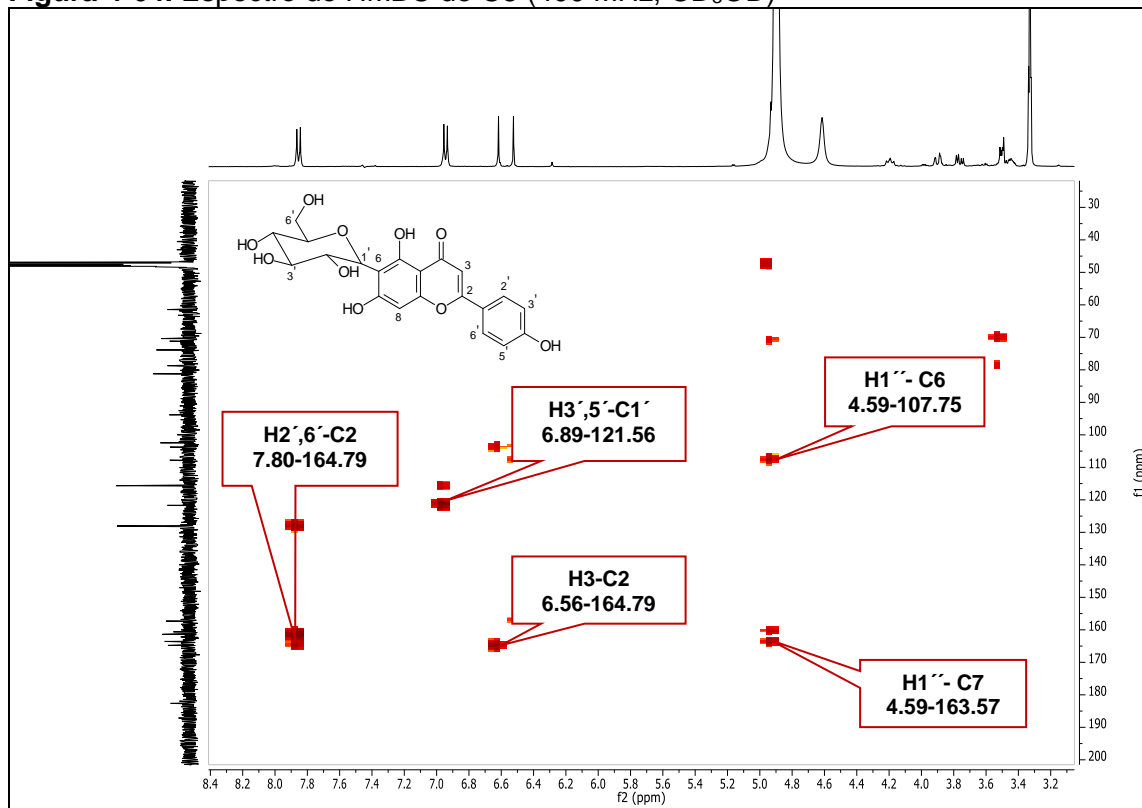
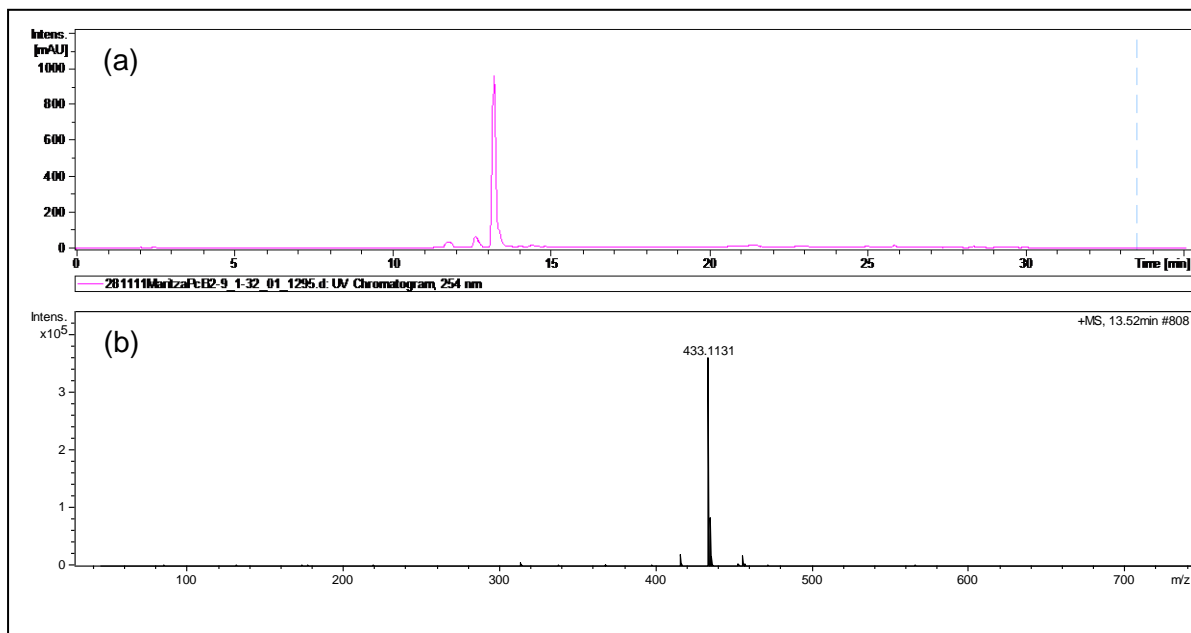
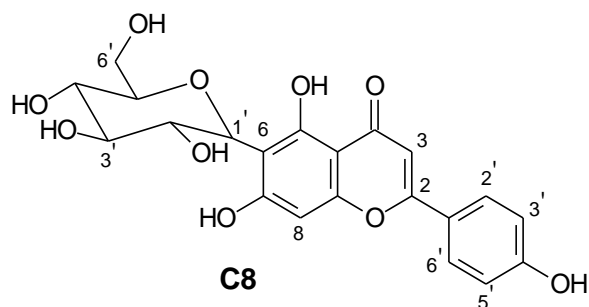
Figura 4-64. Espectro de HMBC de C8 (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

Figura 4-65. Cromatograma por HPLC (a) y espectro de masas de HRMS de C8 (b)



<sup>a</sup> Cromatograma HPLC en columna Phenomenex C18 (250x3mm), fase móvil MeOH:agua (0,2 % de ácido fórmico), gradiente 0 min 40 % MeOH, 2 min 40 % MeOH, 25 min 100 % MeOH, 30 min 100 % MeOH, 32 min 40 % MeOH, 35 min 40 % MeOH, flujo: 0,5 mL/min, 254 nm. <sup>b</sup> Espectro de masas HRMS obtenido en modo negativo con energía de colisión de 8eV



**Tabla 4-13.** Comparación de los datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de C8 con datos de la literatura para Isovitexina (Pedras *et al.*, 2003).

C	Isovitexina (DMSO- $d_6$ )		C8 (CD $_3$ OD)	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
2	-	164.6	-	164.79
3	6.74 (s, 1H)	102.6	6,56 (s,1H)	102.41
4	-	181.7	-	182.42
5	-	160.6	-	160.62
6	-	108.9	-	107.75
7	-	163.3	-	163.57
8	6.46 (s, 1H)	93.8	6,46 (s,1H)	93.84
9	-	156.3	-	157.31
10	-	102.8	-	103.76
1'	-	121.0	-	121.56
2', 6'	7.90 (d, 8 Hz, 2H)	128.3	7.80 (d, 8.8 Hz, 2H)	128.04
3', 5'	6.92 (d, 8 Hz, 2H)	116.0	6.89 (d, 8,8 Hz, 2H)	115.65
4'	-	161.3	-	161.38
1''	4.59 (d, 9.7 Hz, 1H)	73.2	4.59 (1H)	73.87
2''	3.68 (m, 6H)	70.2	-	70.37
3''	-	78.9	-	78.72
4''	-	70.5	-	71.16
5''	-	81.4	-	81.21
6''	-	61.4	-	61.45
OH	13.72 (1H, s)		-	

## 4.6 Aislamiento y purificación de metabolitos de *Piper holtonii*

### 4.6.1 *P. holtonii* fracción en diclorometano (PhD)

La fracción PhD (15,0 g) fue fraccionada empleando sílica gel 60 como fase estacionaria y como fase móvil mezclas de hexano: CHCl<sub>3</sub> (90:10) hasta CHCl<sub>3</sub> 100% y CHCl<sub>3</sub>: AcOEt (80:20), de ésta columna después de reunir las fracciones de acuerdo a su comportamiento por CCD se obtuvieron un total de 32 fracciones. La fracción denominada PhD-12 (1.0 g) una muestra líquida de color amarillo intenso, mostró por CCD un componente principal al revelar con vainillina 1%/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/EtOH. Esta fracción se sometió a CC empleando como fase móvil una mezcla de hexano:CHCl<sub>3</sub> (30:70) que dio lugar a 16 fracciones. La fracción PhD12-5 fue purificada por cromatografía en columna eluida con mezclas de hexano:CHCl<sub>3</sub> 90:10 hasta 10:90, proceso que se llevó a cabo en tres ocasiones. Al final del proceso se obtuvo una muestra que se mostró pura por CCD y fue denominada **H1** (700 mg).

La fracción PhD-29 (157 mg) reveló en la caracterización por CCD la presencia de metabolitos esteroidales y/o terpénicos, la fracción fue sometida a separación por CC en sílica gel 60 empleando como fase móvil mezclas de CHCl<sub>3</sub> : AcOEt (90:10 a 10:90), de esta columna se obtuvieron 8 fracciones, la fracción PhD29-5 presentó un precipitado que se purificó por recristalización en metanol y se denominó **H2**

### 4.6.2 *P. holtonii* fracción en hexano (PhH)

La fracción PhH (10 g) se sometió a separación por CC usando sílica gel 60 como fase estacionaria y como fase móvil hexano y posteriormente mezclas de Hexano:CHCl<sub>3</sub> (95:5) hasta CHCl<sub>3</sub> (100%). Se obtuvieron un total de 38 fracciones después del análisis por CCD. La fracción denominada PhD-13 mostró un precipitado que se purificó por recristalización en MeOH y se denominó **H3** (30 mg).

### 4.6.3 *P. holtonii* fracción en Butanol (PhB)

En la fracción PhB se detectó la presencia de flavonoides por CCD al revelar con NP-PEG. La fracción PhB (5,0 g) fue sometida a separación sobre sílica gel RP18 como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó una mezcla de MeOH:H<sub>2</sub>O (50:50), posteriormente se modificó la polaridad con adición de 10% de MeOH hasta MeOH

100%. Una vez se realizó el análisis por CCD se obtuvieron un total de 15 fracciones. Las fracciones PhB-8 a PhB-12 revelaron positivo para flavonoides con el revelador NP-PEG por CCD, por lo que la fracción PhB-10 (1200 mg) fue purificada en Sephadex LH-20 empleando MeOH como solvente de elución, de esta columna se obtuvieron 7 fracciones. La fracción PhB10-6 (53 mg) se purificó nuevamente se eluyó 2 veces por Sephadex LH-20 con MeOH hasta obtener una muestra que se presentó pura por CCD, de la cual se obtuvo un sólido amarillo amorfo (17 mg) que se denominó **H4**.

## 4.7 Identificación de metabolitos de *Piper holtonii*

### 4.7.1 Identificación de los compuestos H1 y H2

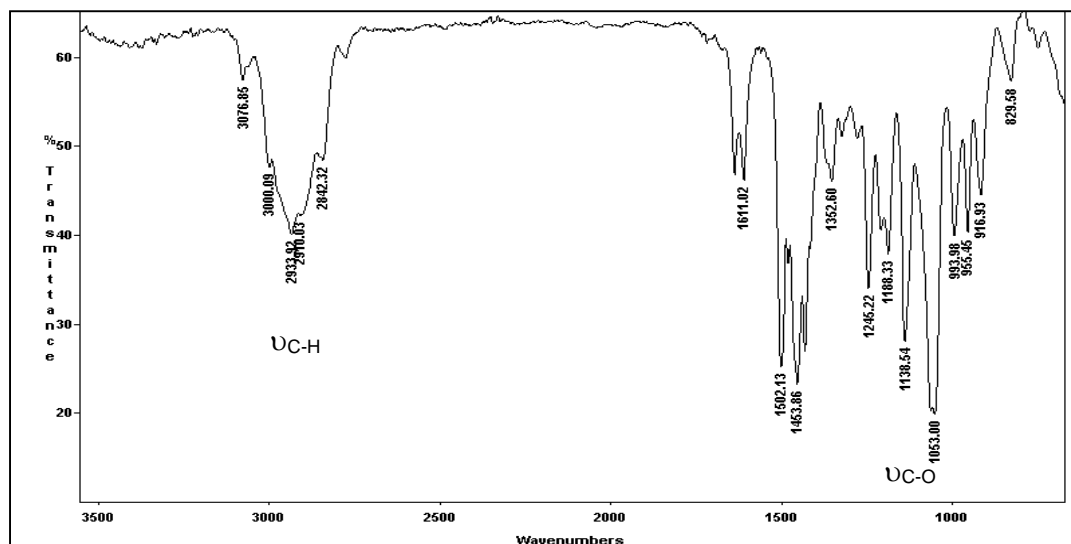
El compuesto H1 se aisló como un sólido blanco en forma de agujas con PF (130.2 °C). La caracterización por CCD, el espectro de IR y de RMN <sup>1</sup>H permitieron identificar que el compuesto presenta características de un núcleo esteroidal, por lo que se comparó con el compuesto C2 obtenido de *P. cumanense*. El compuesto H1 se identificó como β-sitosterol después del análisis de los datos de IR y RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) que fueron interpretados de manera similar al compuesto C2.

El compuesto H2, un sólido amorfo de color blanco con P.F. 309.3 °C, presentó en el espectro de IR una banda ancha en 3402 cm<sup>-1</sup> de estiramiento axial de OH, bandas en 2934 cm<sup>-1</sup> y 2868 cm<sup>-1</sup> de ν<sub>C-H</sub> (CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>), 1460,1367 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>C-C</sub>) y en 1023 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>C-O</sub>). Debido a la baja solubilidad en CHCl<sub>3</sub> y MeOH se comparó por CCD con el compuesto C5 de *P. cumanense*, la comparación se realizó con las siguientes fases móviles, CHCl<sub>3</sub>: MeOH (80:20) y CHCl<sub>3</sub>: AcOEt (60:40) encontrándose el mismo R<sub>f</sub> para las dos muestras. El espectro de RMN de <sup>1</sup>H de la muestra acetilada confirmó que este compuesto corresponde a la estructura de sitosterol 3-O-β-glucósido. El análisis de la muestra fue idéntico que para C5a.

### 4.7.2 Identificación de la muestra H3

La muestra H3 fue obtenida como un líquido de color amarillo intenso, el espectro de IR (Figura 4-66) muestra bandas en 2933 y 2842 cm<sup>-1</sup> de estiramiento de C-H de CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>, bandas en 1611, 1502 y 1463 cm<sup>-1</sup> de estiramiento de C-C y una banda intensa en 1053 cm<sup>-1</sup> de estiramiento de C-O.

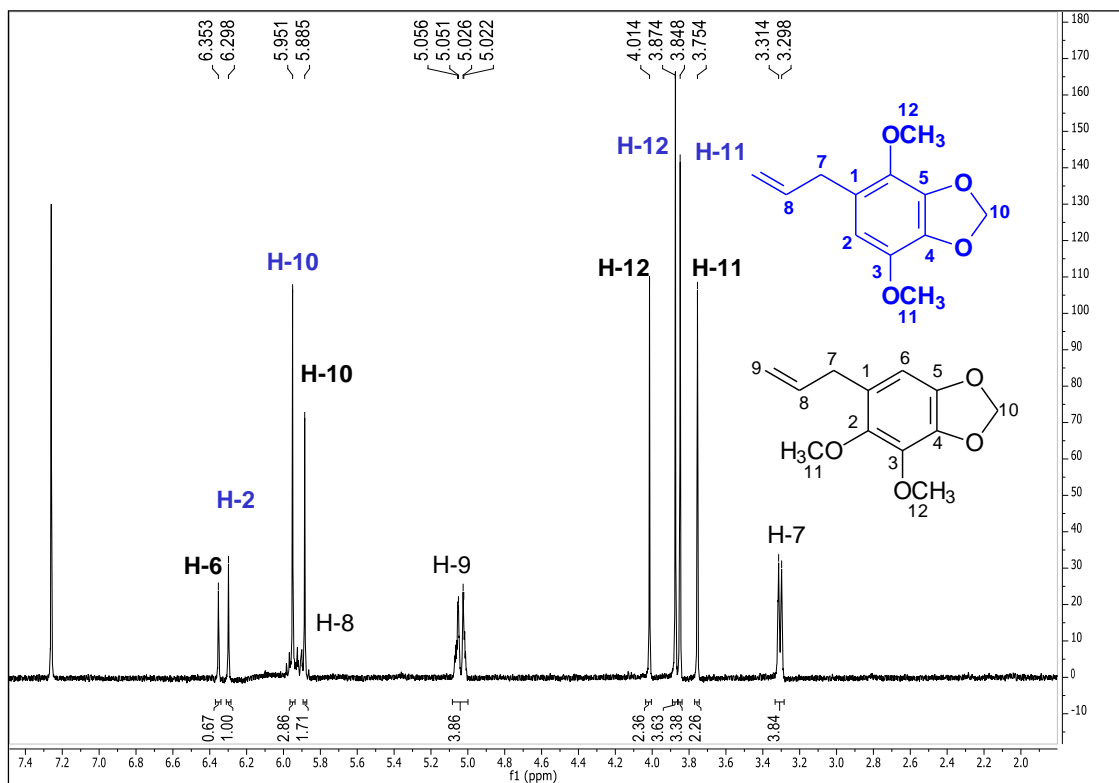


**Figura 4-66.** Espectro IR de H3 (NaCl)

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la muestra H3 (Figura 4-67) presenta señales que por las diferencias de integración permiten proponer la presencia de dos compuestos. Considerando los valores de integración para las señales en la región aromática que se presentan como singletos se puede inferir que las dos moléculas tienen 2 hidrógenos libres diferentes. Se presentan 4 señales de hidrógenos en la región de metoxilos, 2 de la molécula mayoritaria en  $\delta_{\text{H}}$  3.87 y  $\delta_{\text{H}}$  3.85 y 2 de la minoritaria en  $\delta_{\text{H}}$  4.01 y  $\delta_{\text{H}}$  3.75.

Las señales en  $\delta_{\text{H}}$  5.95 y  $\delta_{\text{H}}$  5.88 por su integración y valor de desplazamiento químico son atribuibles a hidrógenos de un grupo metilendioxi presente en las dos moléculas, la integración de la señal olefínica en  $\delta_{\text{H}}$  5.03 y del metileno en  $\delta_{\text{H}}$  3.3 indican que son comunes a las dos moléculas. Los compuestos presentes en la mezcla se encuentran en relación 7:10.

El espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4-68) confirmó la presencia de 4 metoxilos en la mezcla con las señales en  $\delta_{\text{C}}$  57.05, 60.13, 60.31 y 61.44, las señales en  $\delta_{\text{C}}$  34.07 y 34.25 son atribuibles a señales de 2 metilenos.

**Figura 4-67.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  de la muestra H3 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

El espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Figura 4-69) permitió confirmar la señal sobrelapada entre  $\delta_{\text{H}}$  5.88 y 5.95 correspondiente al hidrógeno H-8. El espectro de HMQC (Figura 4-70) confirmó que las señales en 3.3 y 5.02 son comunes a las dos moléculas y permitió asignar las señales de  $^1\text{H}$  a sus respectivos carbonos como se muestra en la Tabla 4-15. El espectro de HMBC (Figura 4-71) permitió asignar los sustituyentes en cada uno de los anillos aromáticos, la correlación entre las señales en  $\delta_{\text{H}}$  3.30 y  $\delta_{\text{C}}$  102.68 y entre  $\delta_{\text{H}}$  3.85 y  $\delta_{\text{C}}$  139.0 permitió definir la posición de los grupos metoxilo de una de las moléculas. Los valores de desplazamiento químico permitieron proponer que la muestra H3 corresponde a un mezcla de apiol y dilapiol, dos metabolitos del tipo fenilpropanoide que se han aislado de varias especies del género *Piper*, el análisis por CG-EM de esta muestra confirmó la presencia de estos dos metabolitos (Figura 4-72), la comparación con datos de la literatura es mostrada en la Tabla 4-14 (Benevides *et al.*, 1999).

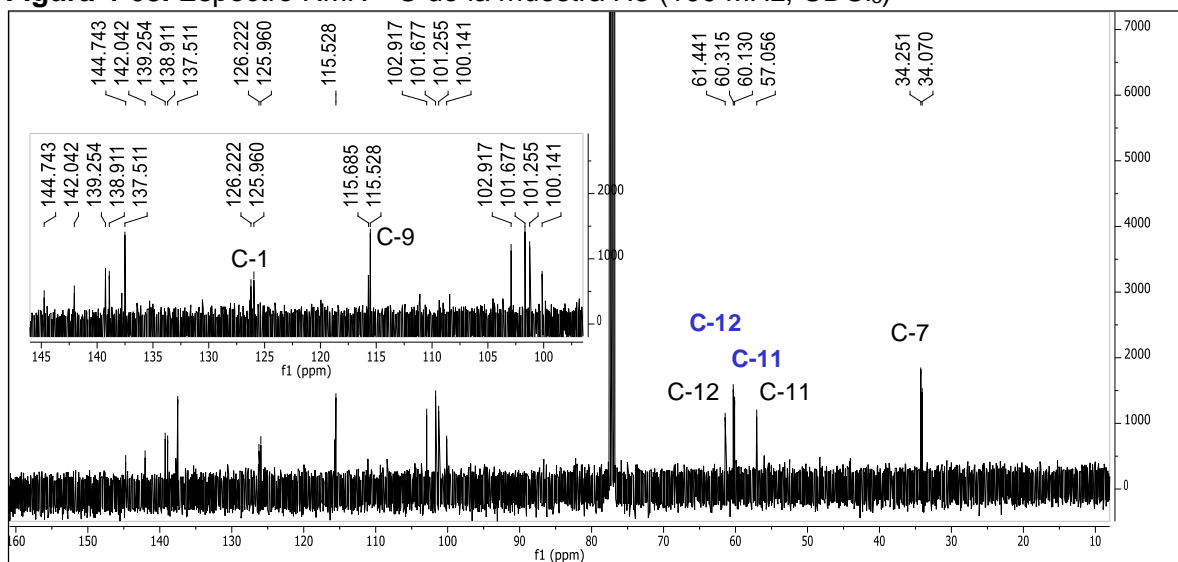
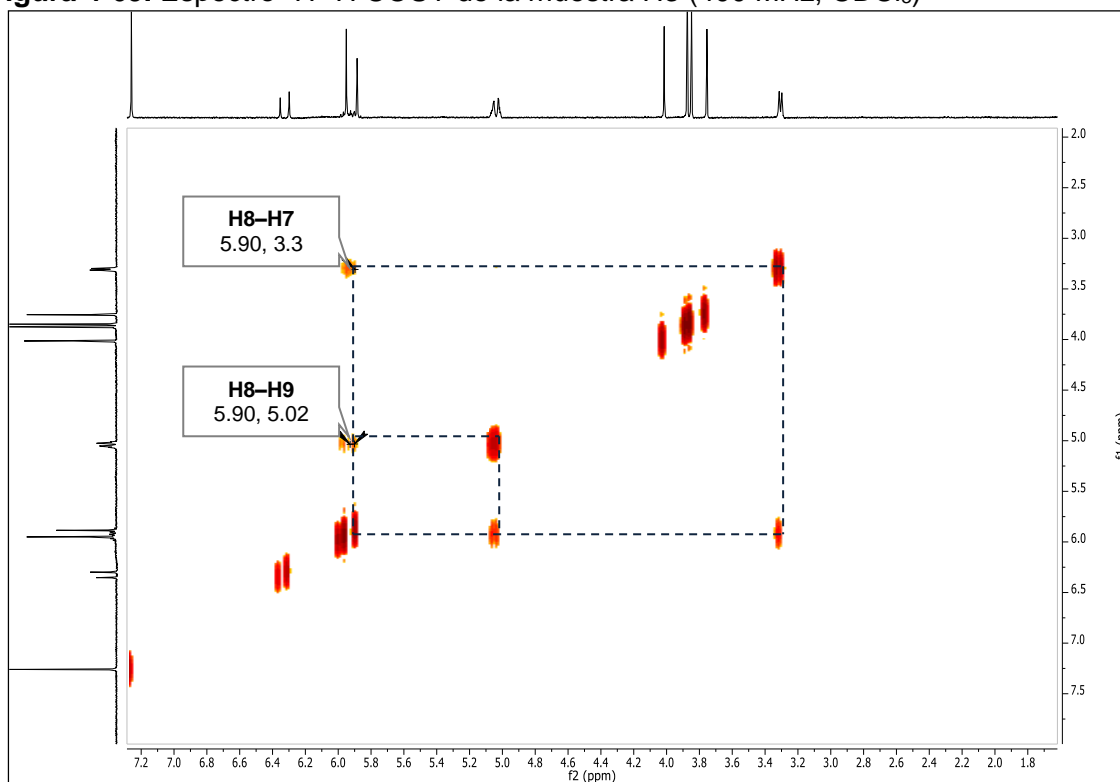
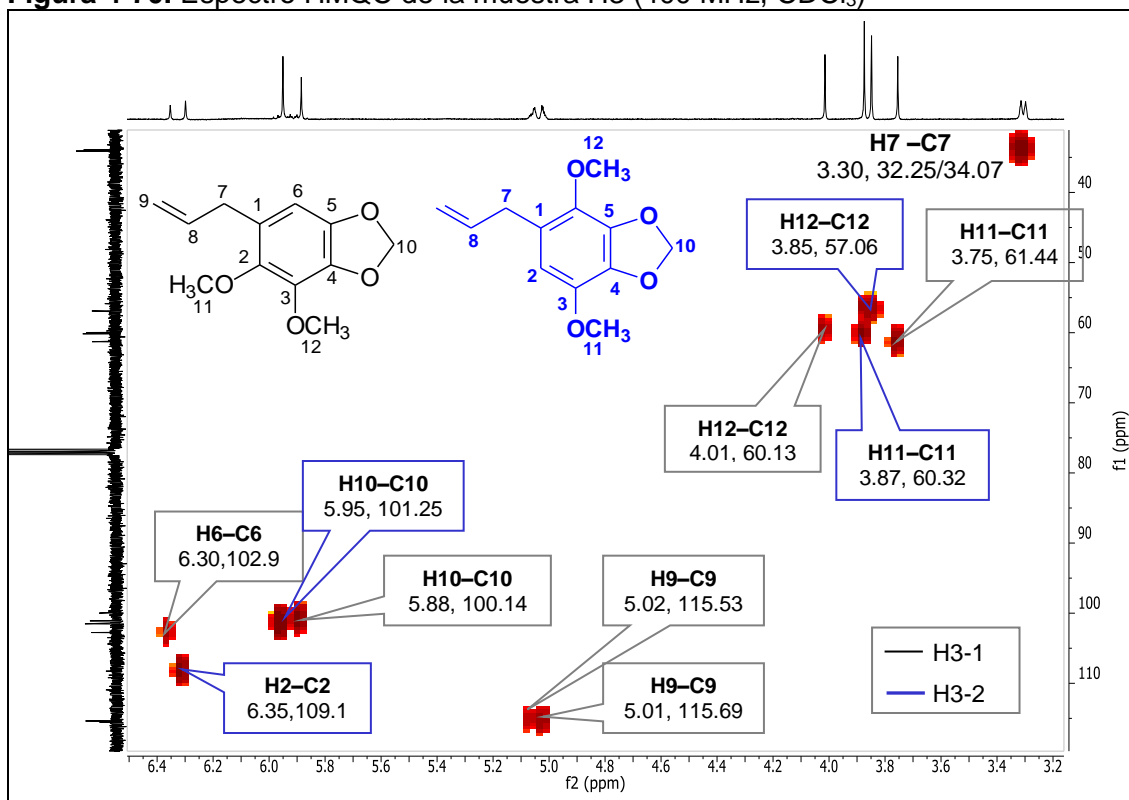
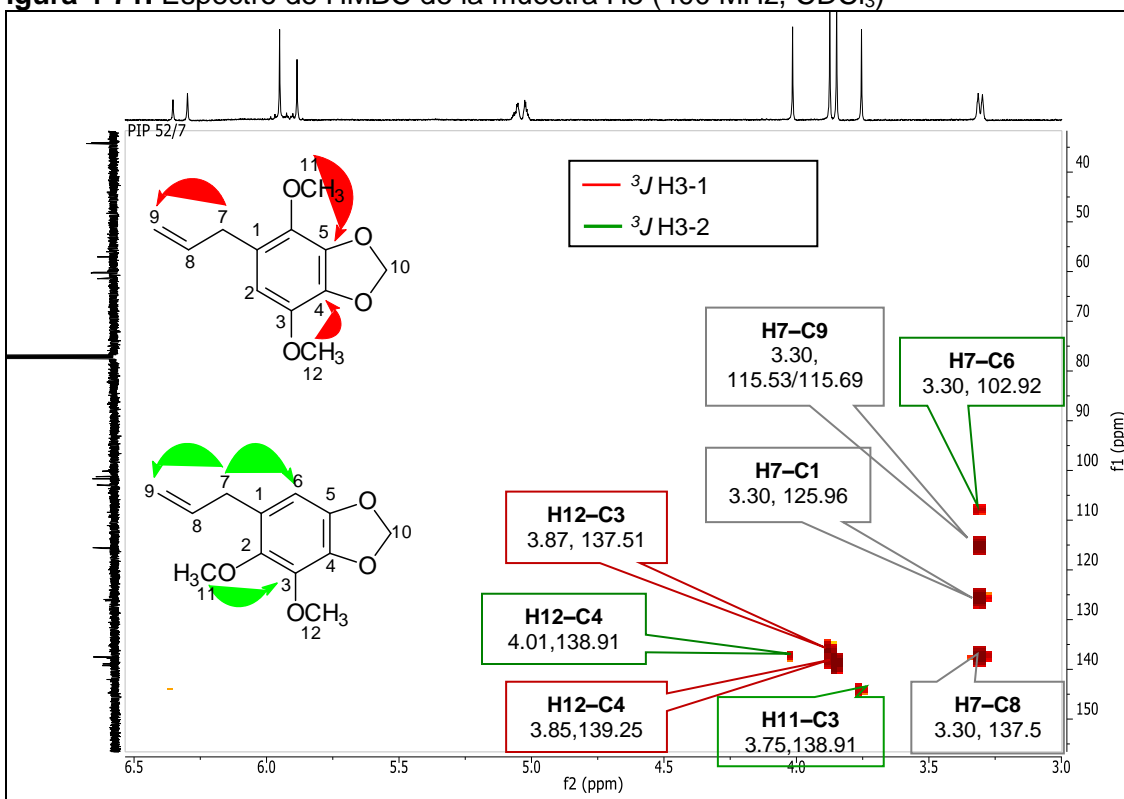
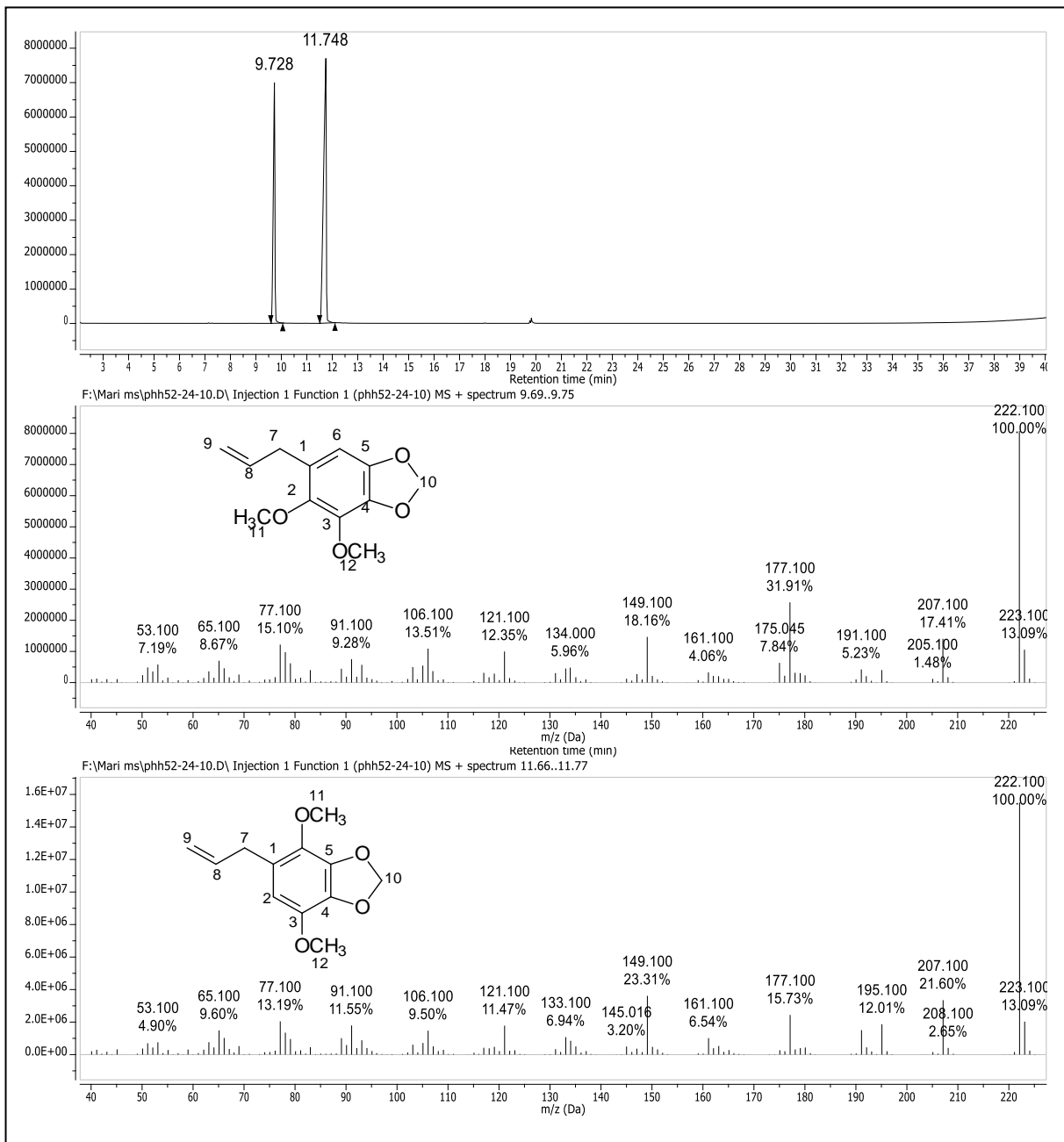
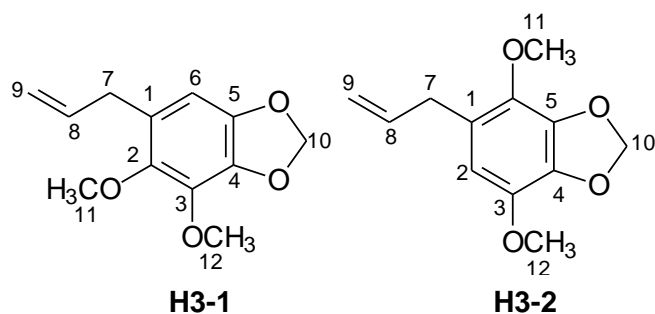
**Figura 4-68.** Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  de la muestra H3 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**Figura 4-69.** Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de la muestra H3 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Figura 4-70. Espectro HMQC de la muestra H3 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)Figura 4-71. Espectro de HMBC de la muestra H3 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

**Figura 4-72.** Cromatograma de la muestra H3 por CG y espectros de masas de H3-1 y H3-2.



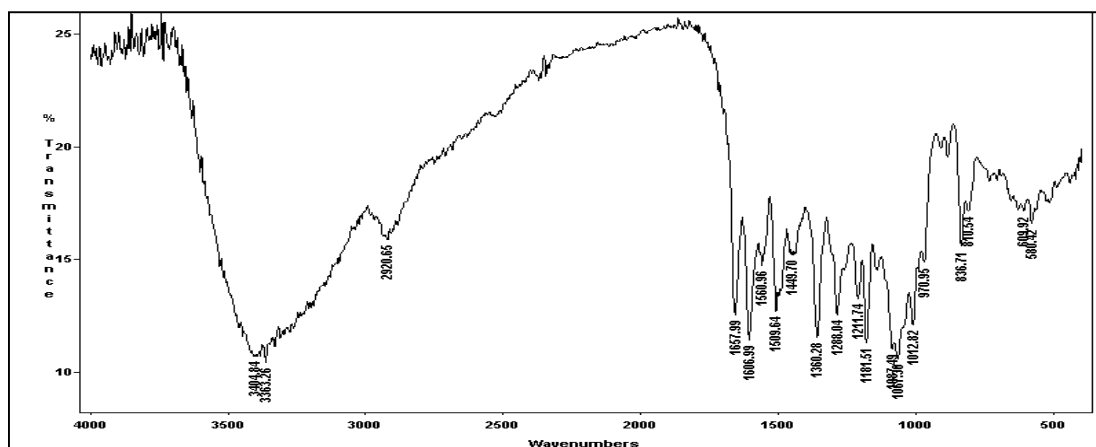
**Tabla 4-14.** Comparación de los datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de H3 con datos de la literatura para apiol y dilapiol (<sup>a</sup>Benevides *et al.*, 1999,<sup>b</sup> De O'Santos *et al.*, 1998).

C	Dilapiol <sup>a</sup>		H3-1 (CDCl <sub>3</sub> )		Apiol <sup>b</sup>		H3-2 (CDCl <sub>3</sub> )	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	-	126.0	-	126.22	-	110.8	-	125.96
2	-	135.1	-	137.51	6,31	108.5	6.35 (s, 1H)	109.1
3	-	137.6	-	138.91	-	139.2	-	138.91
4	-	144.6	-	142.04	-	135.2	-	139.25
5	-	144.3	-	144.74	-	139.0	-	144.74
6	6.23 (s,1H)	102.7	6.30 (s, 1H)	102.92	-	136.5	-	137.51
7	3.24(dd,1.5; 6.6 Hz, 2H)	33.9	3.30 (d, 4 H)	34.07	3.31 (d, 6.4 Hz, 2H)	34.3	3.30 (d, 4 H)	33.25
8	5.81(m, 1H)	137.4	5.90 (m)	137.51	5.94 (m, 1H)	137.6	5.90 (m)	137.51
9	4.96 (dd, 1.5, 9.0 Hz, 1H) 4.97 (dd, 1.5, 15.4 Hz, 1H)	115.5	5.02 (dd, 2.0, 10 Hz, 4H)	115.69	5.05 (m, 2H)	115.6	5.02 (dd, 2.0, 10 Hz, 4H)	115.53
10	5.88 (s, 2H)	101.1	5.88 (s)	100.14	5.96 (s, 2H)	101.7	5.95 (s)	101.25
11	3.78(s,3H)	61.3	3.75 (s)	61.44	3.88 (s,3H)	60.4	3.87 (s)	60.32
12	3.80 (s, 3H)	50.9	4.01 (s)	60.13	3.86 (s,3H)	57.1	3.85 (s)	57.06

### 4.7.3 Identificación del compuesto H4

El compuesto H4 fue aislado como un sólido amarillo amorfo (PF 202-204 °C), por CCD reveló positivo para flavonoides con el reactivo NP/PEG. El espectro de IR (Figura 4-73) mostró bandas de absorción en  $3404\text{ cm}^{-1}$  debido a deformación axial de OH, en  $2920\text{ cm}^{-1}$  de estiramiento C-H, en  $1657\text{ cm}^{-1}$  de deformación axial C=O y en  $1640\text{ cm}^{-1}$  de deformación axial e C=C de anillo aromático.

**Figura 4-73.** Espectro IR de H4 (KBr).

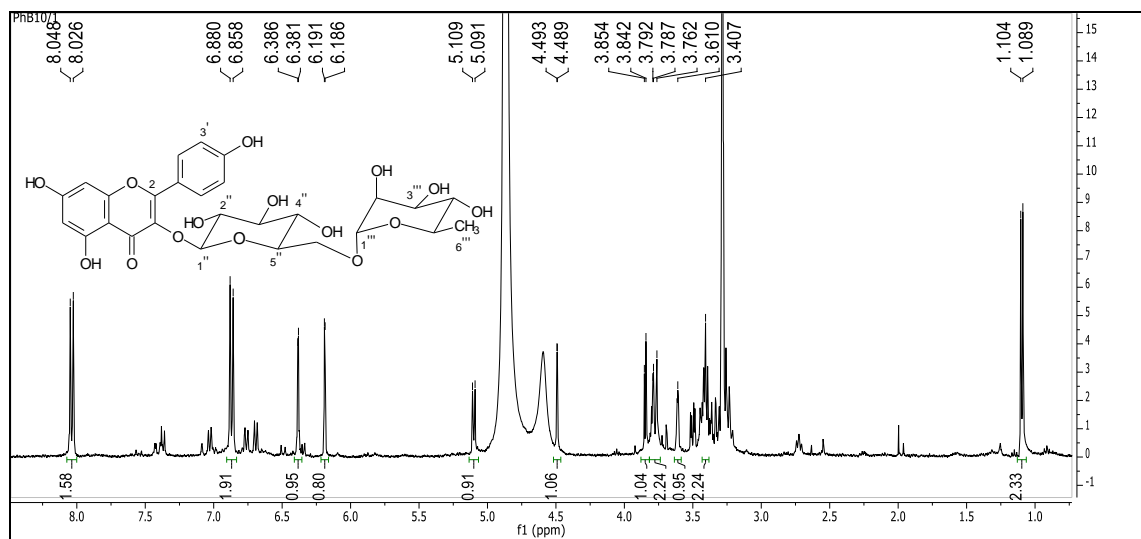


El espectro de  $^1\text{H}$  (Figura 4-74) presenta 2 señales en  $\delta_{\text{H}}$  8.03 (d, 8.8 Hz, 2H) y  $\delta_{\text{H}}$  6.87 (d, 8.8 Hz, 2H) atribuibles a un sistema AA'BB', considerando el resultado positivo para flavonoides por CCD se puede concluir que corresponde al anillo B de un flavonoide. También se presentan 2 señales en  $\delta_{\text{H}}$  6.38 (d, 2.0 Hz, 1H) y  $\delta_{\text{H}}$  6.19 (d, 2.0 Hz, 1H) de dos hidrógenos aromáticos en *meta* atribuibles el anillo A del flavonoide, de esta manera se determinó como núcleo básico el kaempferol. La señal en  $\delta_{\text{H}}$  5.10 (d, 7.2 Hz, 1H) es atribuible a un hidrógeno ligado a un carbono anomérico de un enlace O-glicosídico. La señal en  $\delta_{\text{H}}$  4.49 (sl) también atribuible a un hidrógeno anomérico, indica la presencia de dos unidades de azúcar, lo que se confirma por las señales de hidrógeno entre  $\delta_{\text{H}}$  3.41 y 3.85. En este mismo espectro se observa una señal en  $\delta_{\text{H}}$  1.09 atribuible a un metilo.

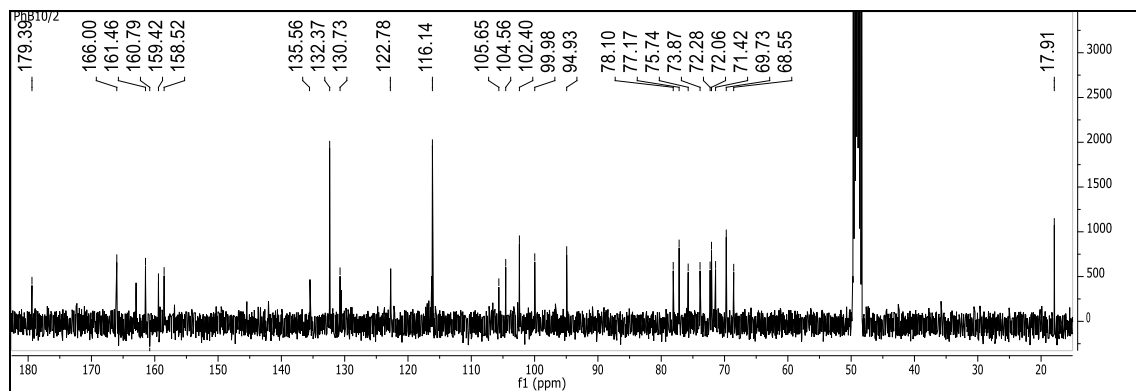
El espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4-75) muestra una señal en  $\delta_{\text{C}}$  179.39 de carbono carbonílico, dos señales de carbonos anoméricos en  $\delta_{\text{C}}$  104.56 y  $\delta_{\text{C}}$  102.40, nueve señales de carbonos de unidades glicosídicas, lo que confirma que la molécula contiene 2 unidades de azúcar, una señal en  $\delta_{\text{C}}$  17.91 de un carbono metílico que puede pertenecer a una

unidad de azúcar, afirmación que se confirmó con el espectro de HMBC que muestra correlación entre la señal en 1.09 y carbonos glicosídicos.

**Figura 4-74.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  de H4 (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



**Figura 4-75.** Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  de H4 (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



El espectro de HMQC muestra los acoplamientos de las señales de hidrógeno con las respectivas señales de carbono como se muestra en la Tabla 4-16, las principales correlaciones son mostradas la Figura 4-76. El análisis del espectro HMBC (Figura 4-77) permitió establecer correlaciones entre las señales en  $\delta_{\text{H}}$  17.91 y  $\delta_{\text{C}}$  69.73, lo que llevó a definir una de las unidades de azúcar como ramnosa, por comparación con datos de la literatura (Wen-Chi *et al.*, 2005) se determinaron las unidades de azúcar como glucosa y ramnosa definiendo el compuesto H4 como Kaempferol 3-O-rutinósido (nicotiflorina)



(Tabla 4-15). La propuesta corresponde con la  $m/z$  595.1650  $[M+H]^+$  determinada por HRMS (Figura 4-78).

**Figura 4-76.** Espectro HMQC de H4 ( $CD_3OD$ )

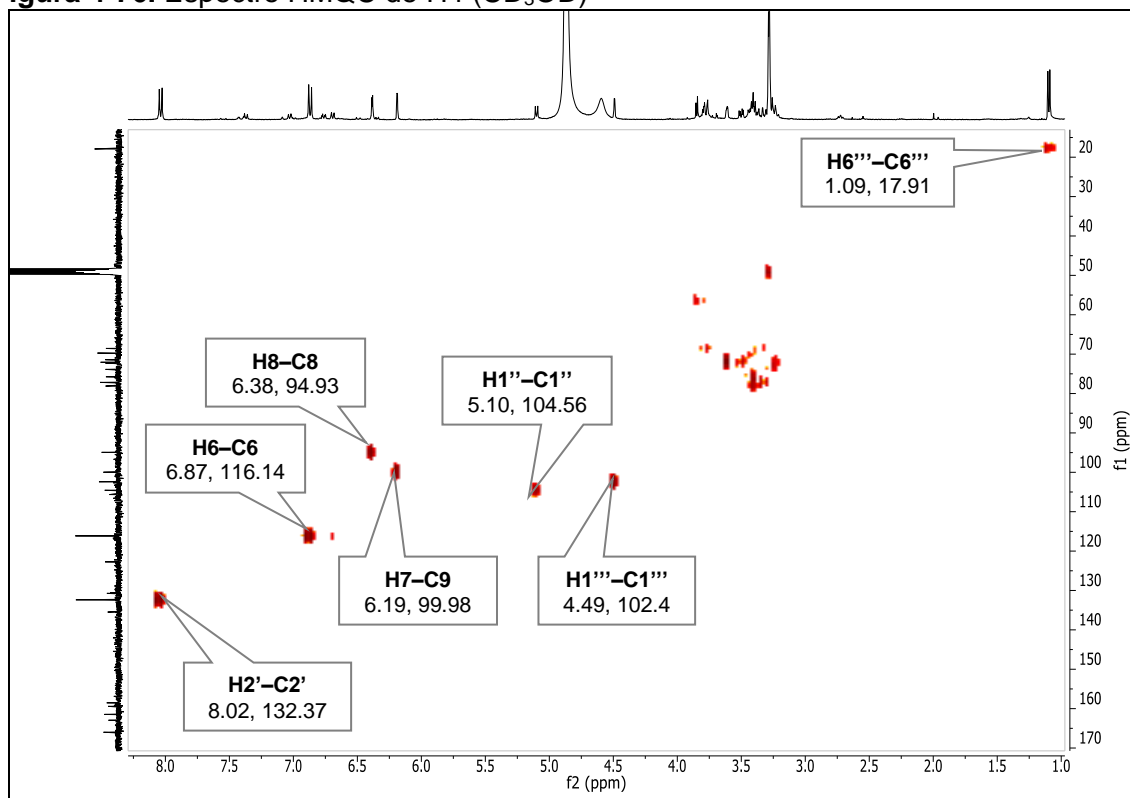


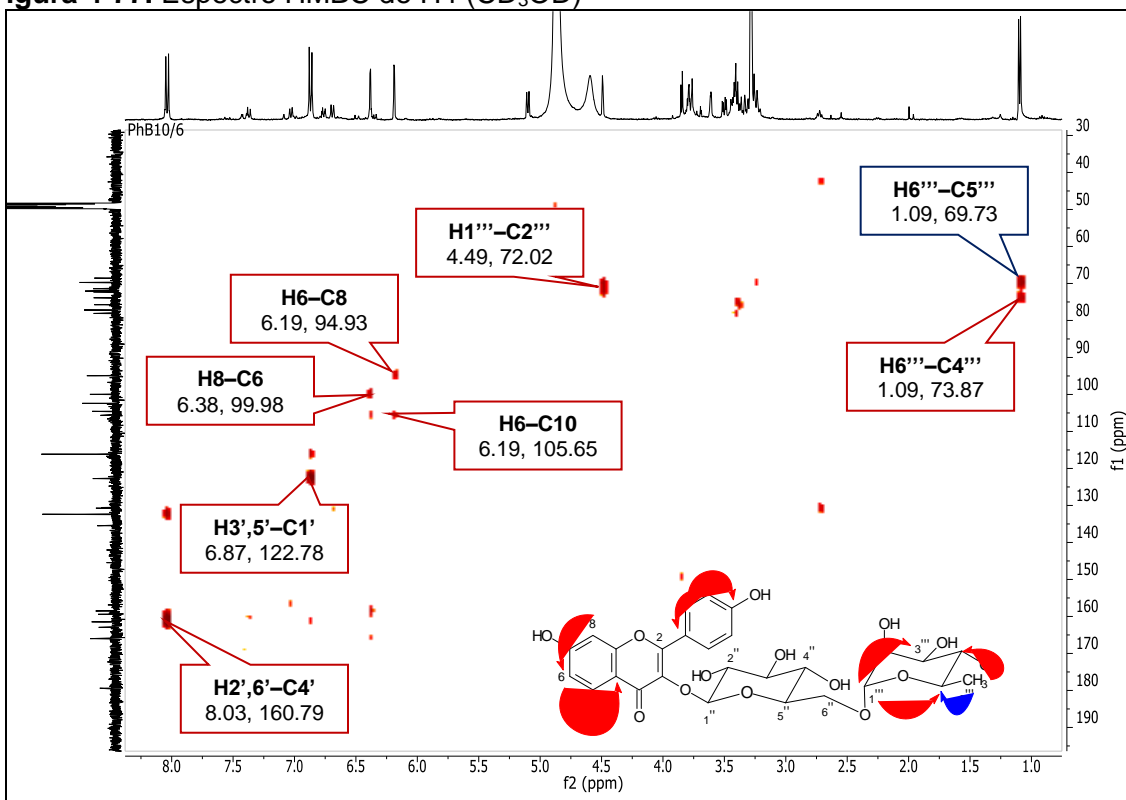
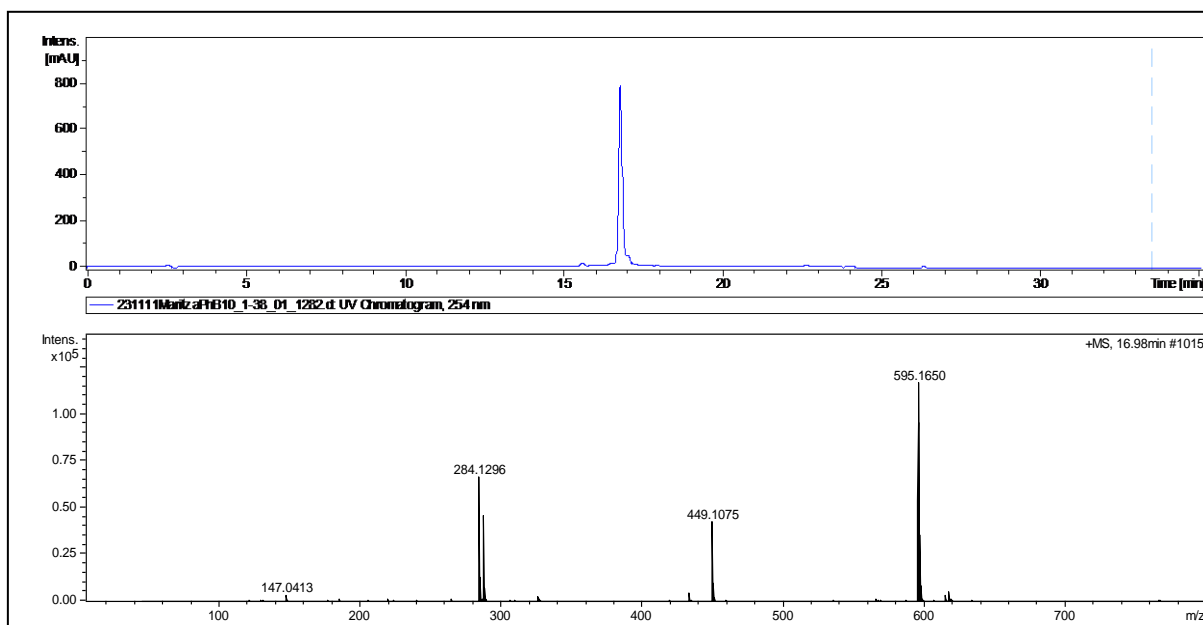
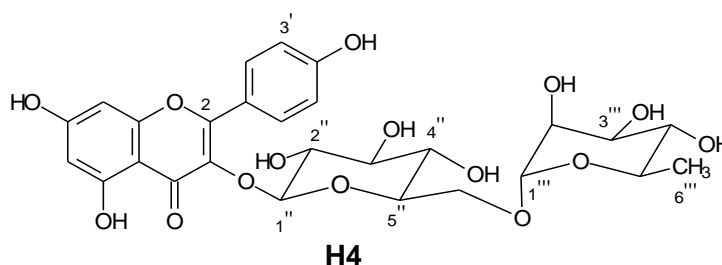
Figura 4-77. Espectro HMBC de H4 (CD<sub>3</sub>OD)

Figura 4-78. Cromatograma por HPLC y espectro de masas de H4



<sup>a</sup> Cromatograma HPLC en columna Phenomenex C18 (250x3mm), fase móvil MeOH:agua (0,2 % de ácido fórmico), gradiente 0 min 40 % MeOH, 2 min 40 % MeOH, 25 min 100 % MeOH, 30 min 100 % MeOH, 32 min 40 % MeOH, 35 min 40 % MeOH, flujo: 0,5 mL/min, 254 nm. <sup>b</sup> Espectro de masas HRMS obtenido en modo negativo con energía de colisión de 8eV



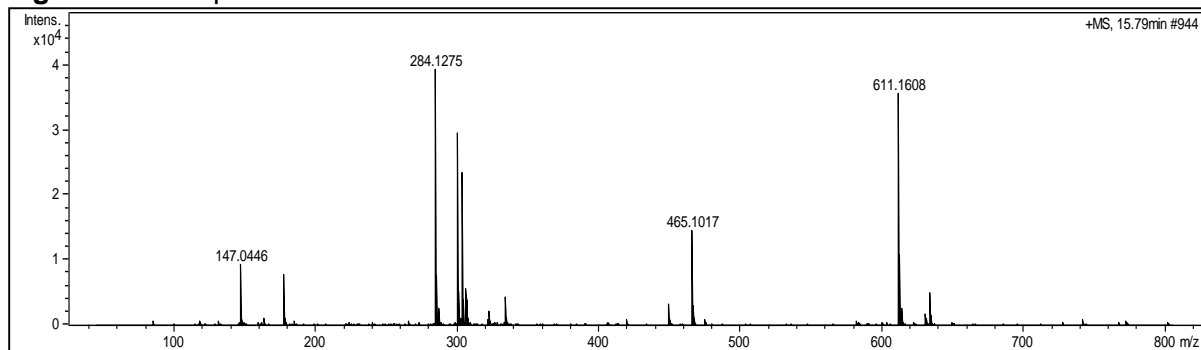
**Tabla 4-15.** Comparación de los datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de H4 con datos de la literatura para Kaempferol-3-O-rutinosido (Wen-Chi *et al.*, 2005).

C	Kaempferol-3-O-rutinósido (CD <sub>3</sub> OD)		D4 (400 Hz, CD <sub>3</sub> OD)	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
2	-	158.6	-	158.52
3	-	135.5	-	135.56
4	-	179.4	-	179.39
5	-	163.0	-	161.46
6	6.21 (d, 2.0 Hz, 1H)	100.0	6.19 (d, 2.0 Hz, 1H)	99.98
7	-	166.0	-	166.0
8	6.40 (d, 2.2 Hz, 1H)	94.9	6.38 (d, 2.0 Hz, 1H)	94.93
9	-	159.4	-	159.42
10	-	105.7	-	105.65
1'	-	122.8	-	122.78
2', 6'	8.06 (d, 8.9 Hz, 2H)	132.4	8.03 (d, 8.8 Hz, 1H)	132.37
3', 5'	6.90 (d, 8.9 Hz, 2H)	116.2	6.87 (d, 8.8 Hz, 1H)	116.14
4'	-	161.5	-	160.79
1''	5.12 (d, 7.4 Hz, 1H)	104.6	5.10 (d, 7.2 Hz, 1H)	104.56
2''	3.0-4.0 m	75.8	3.4-3.9 m	75.74
3''		78.2		78.10
4''		71.5		71.42
5''		77.2		77.17
6''	3.38 (dd, 4.7, 10.8 Hz, 1H) 3.80 (dd, 1.0, 10.4 Hz, 1H)	68.6		68.55
1'''	4.53 (d, 1.6 Hz, 1H)	102.6	4.49 (d, 1.6 Hz, 1H)	102.40
2'''	3.0-4.0 m	72.0	3.4-3.9 m	72.06
3'''		72.3		72.28
4'''		73.9		73.87
5'''		69.7		69.73
6'''	1.11 (d, 6.2 Hz, 3H)	17.9	1.09 (d, 6.0 Hz, 3H)	17.91

La fracción PhB7-6 que reveló positivo para flavonoides por CCD, obtenida de la columna de PhB, fue analizada por LC-MS. La muestra fue eluida con una fase móvil MeOH: H<sub>2</sub>O (1:1) con 0.2 % de ácido fórmico en un sistema gradiente hasta MeOH 100% en una columna C18, el cromatograma permitió detectar la presencia de un compuesto mayoritario cuyo espectro de masas presentó una  $m/z$  611.1508  $[\text{M}+\text{H}]^+$  correspondiente

a la fórmula molecular  $C_{27}H_{30}O_{16}$  (Figura 4-79), el pico principal presentó el mismo índice de retención al patrón Rutina, por lo que se identificó como Quercetina-3-O-rutinosido (H5).

**Figura 4-79.** Espectro de masas de H5



<sup>a</sup> Espectro de masas HRMS obtenido en modo negativo con energía de colisión de 8eV

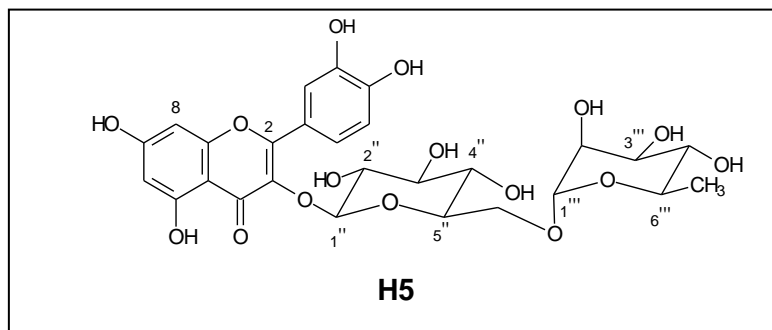


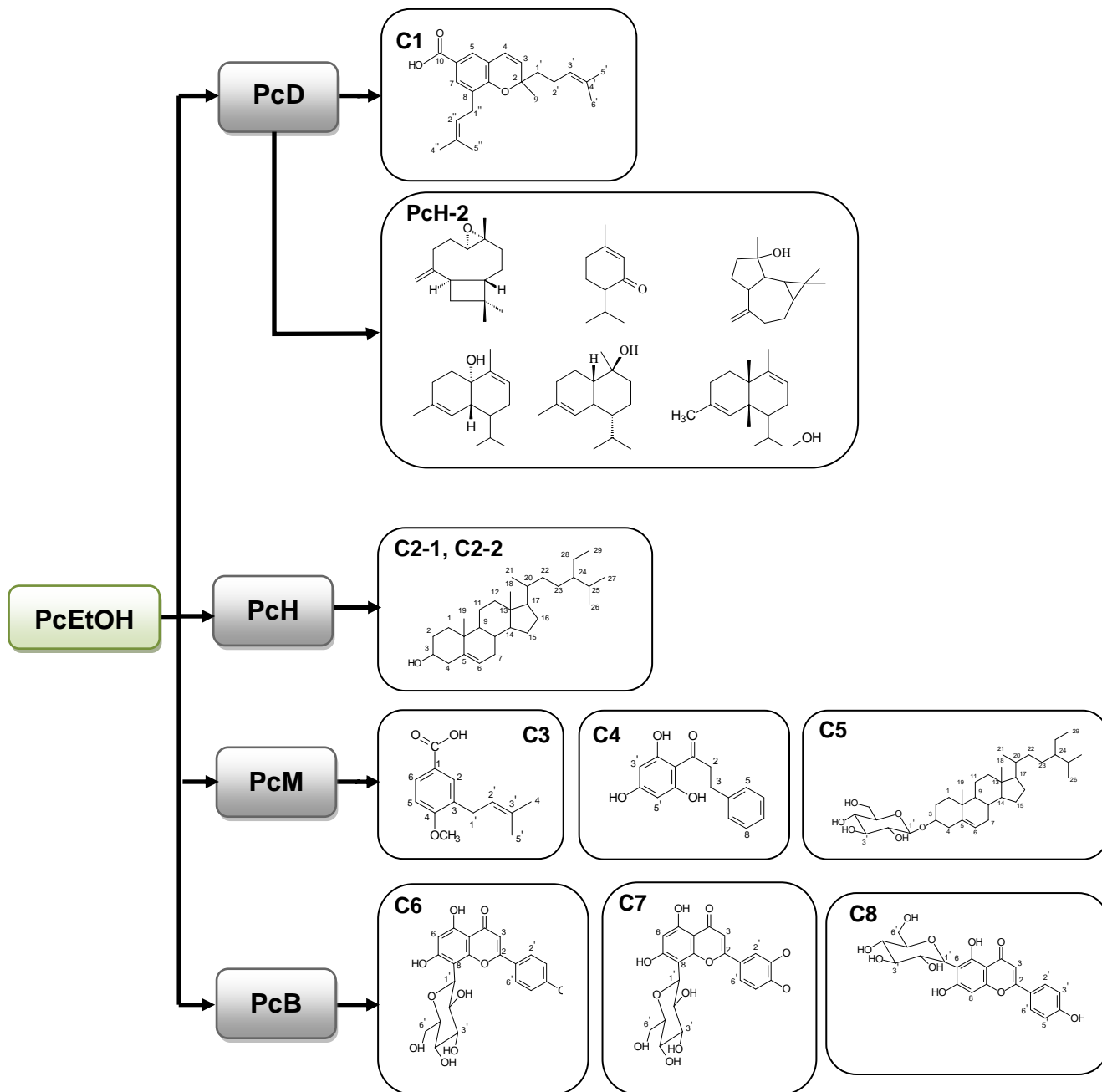
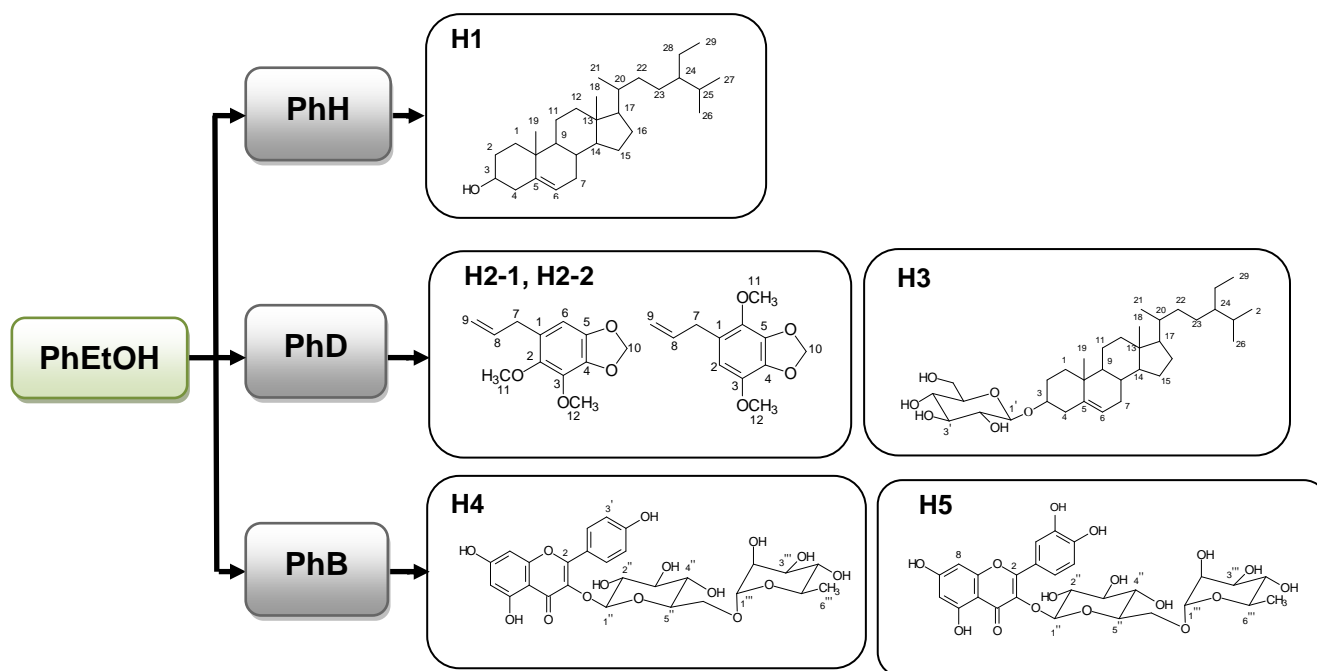
Figura 4-80. Compuestos aislados y/o detectados de *P. cumanense*

Figura 4-81. Compuestos aislados de *P. holtonii*

## 4.8 Evaluación de la actividad antimalárica de los metabolitos aislados

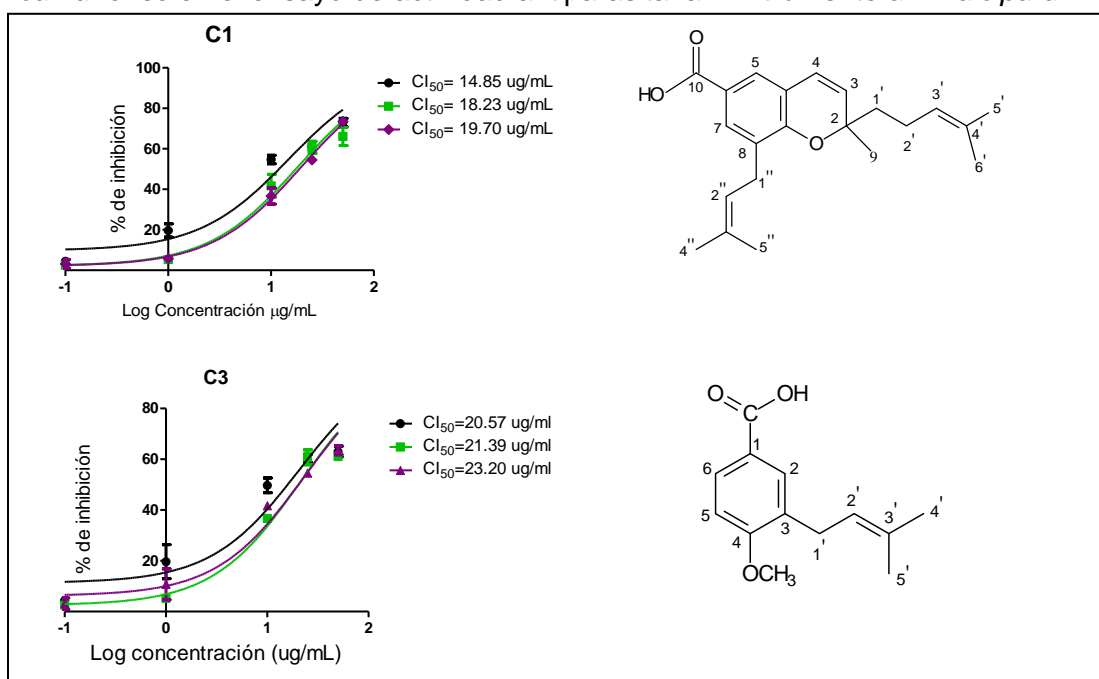
Los metabolitos secundarios aislados de las especies *Piper cumanense* y *Piper holtonii* se evaluaron en el ensayo de actividad antimalárica *in vitro* sobre el cultivo continuo de *Plasmodium falciparum*. Cada una de las muestras se evaluó siguiendo la misma metodología para extractos y fracciones (Anexo1), la  $CI_{50}$  se calculó como el resultado de tres ensayos independientes (Figura 4-82, 4-83) y fue expresada como la media  $\pm$  EMS (Tabla 4-16).

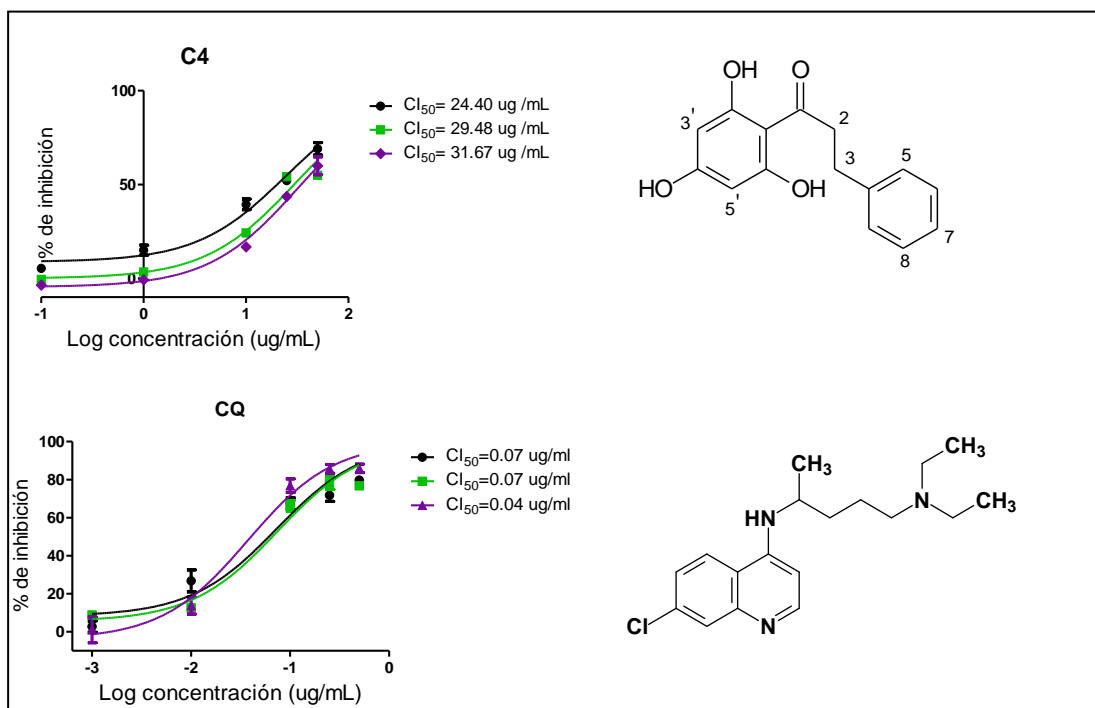
**Tabla 4-16.** Valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenidos en el ensayo de actividad antiparasitaria *in vitro* frente a *P. falciparum* y en el ensayo FBIT para los metabolitos aislados de *Piper cumanense* y *Piper holtonii*.

Muestras*	<i>P. falciparum in vitro</i> $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ EMS	IA	FBIT $CI_{50}$ (mg/mL) $\pm$ EMS	IA
C1	17.6 $\pm$ 1.5	352	0.46 $\pm$ 0.10	11.5
C3	28.5 $\pm$ 2.1	570	>50	-
C4	29.6 $\pm$ 3.3	592	0.23 $\pm$ 0.02	5.7
C5	>50	-	>50	-
C6	>50	-	>50	-
C7	>50	-	>50	-
C8	>50	-	>50	-
H3	>50	-	>50	-
H4	>50	-	>50	-
CQ	0.05 $\pm$ 0.06	-	0,04 $\pm$ 0.02	-

CQ: Cloroquina, EMS:Error medio estándar, IA: Índice de actividad. Valores expresados como la media de tres ensayos independientes determinados por regresión no lineal con el software GraphPad Prism.

**Figura 4-82.** Porcentaje de inhibición vs Log concentración de C1 y C3 aislados de *Piper cumanense* en el ensayo de actividad antiparasitaria *in vitro* frente a *P. falciparum*<sup>a</sup>



**Figura 4-83.** Porcentaje de inhibición vs Log concentración de C4 y CQ en el ensayo de actividad antiparasitaria in vitro frente a *P. falciparum*<sup>a</sup>

CQ: Cloroquina, EMS: Error medio estándar, ND: No determinada. Los valores se expresan como la media de tres ensayos independientes determinados por regresión no lineal con el software GraphPad Prism

El proceso de aislamiento y purificación de las fracciones de *P. cumanense* y *P. holtonii*, generó una serie de compuestos que permitieron identificar diferencias químicas entre las dos especies de estudio. En primer lugar se identificaron diferencias en las fracciones de baja y media polaridad, la especie *Piper cumanense* biosintetiza como constituyentes mayoritarios en las condiciones de colecta del presente estudio un cromeno prenilado, un ácido benzoico y una chalcona, mientras que *P. holtonii* sintetiza una significativa proporción de fenilpropanoides, apiol y dilapiol. Las diferencias también se presentaron en las fracciones más polares, en *P. cumanense* se identificaron flavonas C-glicosiladas como vitexina y orientina, mientras que *P. holtonii* se caracterizó por la presencia de flavonoles del tipo O-glicosilado. En las dos especies estudiadas no se detectaron amidas, un grupo de metabolitos frecuentemente encontrado en el género *Piper*. Las diferencias encontradas pueden ser útiles en el análisis quimiotaconómico.

El aislamiento de metabolitos secundarios mayoritarios a partir de las fracciones que presentaron actividad antiplasmódica moderada condujo a la identificación del compuesto



**C1** denominado como ácido gaudichaudiánico, que corresponde a un cromeno con sustituyentes isoprénicos, aislado por primera vez de *P. gaudichaudianum* (Lago *et al.*, 2004), se ha reportado su aislamiento tanto de las raíces como de las hojas de esta especie y en plántulas se ha descrito el aislamiento de una mezcla racémica (Batista *et al.*, 2011). En el presente trabajo la actividad antiplasmódica expuesta por este metabolito se clasificó como moderada con un valor de  $CI_{50}$  de 17.6  $\mu\text{g/mL}$  y además presentó una  $CI_{50}$  de 0.46 mg/mL en el ensayo de FBIT, la actividad observada para el extracto total de *P. cumanense* es parcialmente explicada por la actividad antiplasmódica de éste compuesto. Los cromenos, como el ácido gaudichaudiánico, son una clase de compuestos representativos del género *Piper*, han sido aislados de especies como *P. aduncum* (Baldoqui *et al.*, 1999), *P. tricuspe* (Saéz-Vega *et al.*, 2008), *P. Ihotzkyanum* (Moreira *et al.*, 1998), *P. cumanense* (Parra *et al.*, 2011), *Peperomia blanda* (Veloza *et al.*, 2006) y *Peperomia serpens* (Saga *et al.*, 2006), derivados de cromenos han sido objeto de evaluación antiplasmódica presentando actividad baja a moderada con  $CI_{50}$  que van desde 6,8 hasta 39,8  $\mu\text{M}$  (Devakaram *et al.*, 2012). De otra parte ha sido reportada su importante actividad tripanocida frente a la cepa Y de *Tripanosoma cruzi*, se ha demostrado que la mezcla racémica presenta mejor actividad frente a epimastigotes de *T. cruzi* con una  $CI_{50}$  de  $55.8 \pm 2.2 \mu\text{M}$ , que los enantiómeros por separado (Batista *et al.*, 2011). La actividad antiplasmódica en el presente trabajo fue evaluada con la mezcla de enantiómeros (de acuerdo a resultados de rotación óptica, 4.5.1) obtenida de *P. cumanense*, por lo que la evaluación de la mezcla racémica y de cada uno de los enantiómeros es importante para definir la actividad de este metabolito. El ácido gaudichaudiánico también ha presentado actividad como antimicótico frente a los hongos *Cladosporium cladosporides* y *C. sphaerospermum* (Lago *et al.*, 2004).

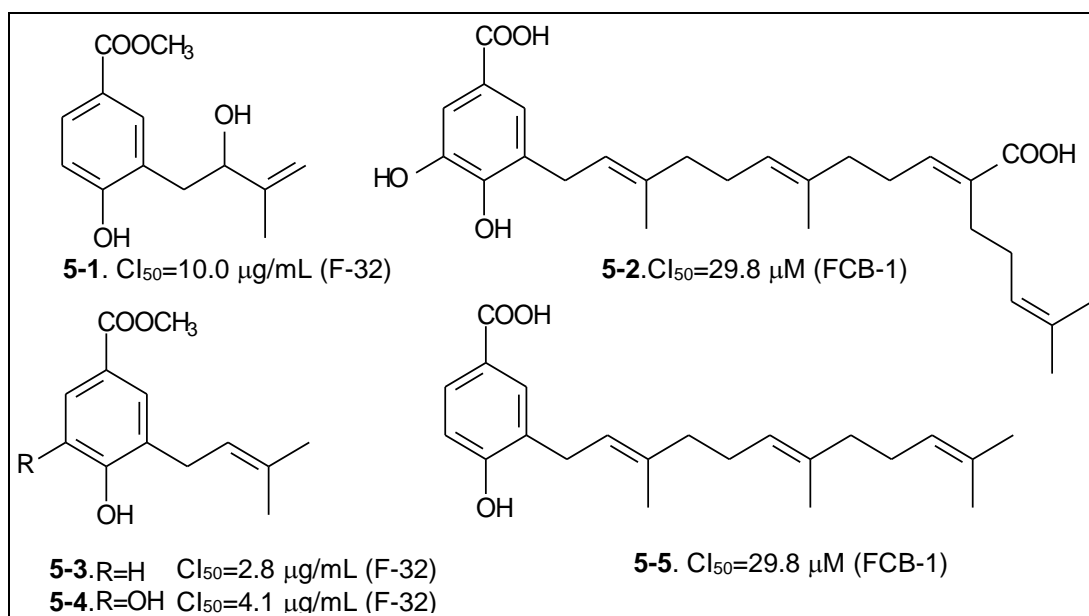
La fracción (PcM) que presentó actividad moderada en el ensayo *in vitro*, condujo al aislamiento de 3 metabolitos mayoritarios, siendo el compuesto **C4** identificado como 2',4',6' trihidroxidihidrochalcona reportado por segunda vez en la familia Piperaceae (Jenett-Siems *et al.*, 1999) y por primera vez en *P. cumanense*, esta chalcona presentó actividad antiplasmódica con un valor de  $CI_{50}$  de 29.6  $\mu\text{g/mL}$ . Este compuesto como la mayoría de las dihidrochalconas aisladas de especies de *Piper* presenta oxigenaciones en las posiciones C-2', C-4' y C-6' y un anillo B no sustituido (Parmar *et al.*, 1998), fue aislado previamente de la especie *P. hispidum* y evaluado frente a *Plasmodium*

*falciparum* en las cepas poW y Dd2, no presentando actividad con una  $CI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$  (Jenett-Siems *et al.*, 1999). La actividad antiplasmódica de algunas chalconas ha sido reconocida, probablemente como resultado de una adición de Michael de especies nucleofílicas al doble enlace de la enona (Troeberg *et al.*, 2000; Ram *et al.*, 2000), en las chalconas se ha observado la importancia de los sustituyentes del anillo B en la actividad, el tamaño e hidrofobicidad de los sustituyentes se han identificado como un parámetro crítico para la actividad antiplasmódica, así, chalconas hidroxiladas han mostrado menor actividad que los análogos alcoxilados. La cetona  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturada que proporciona conjugación entre los grupos aromáticos en ambos extremos de la molécula, al parecer es una condición crítica para una actividad adecuada (Nowakowaska, 2007), estos parámetros explicarían la baja actividad presentada por la dihidrochalcona aislada de *P. cumanense*.

Adicionalmente algunas dihidrochalconas han demostrado relativa buena actividad frente a bacterias Gram-positivas como *S. aureus* y *B. subtilis* y bacterias Gram-negativas como *Pseudomona aeruginosa* (Nowakowaska, 2007).

El ácido 4-metoxi-3-(3-metil-2-butenil)-benzoico **C3**, también aislado de la fracción PcM ha sido previamente aislado de la especie vegetal *Wigandia urens* (Cao *et al.*, 2003) y hace parte de los derivados del ácido benzoico, una de las clases de metabolitos representativos del género *Piper*. Esta clase de metabolitos constituyen un grupo numeroso de compuestos que generalmente se presentan prenilados, metilados o hidroxilados y que han sido evaluados como antiparasitarios (Flores *et al.*, 2008, 2009). El compuesto **C3** aislado de *Piper cumanense* presentó una  $CI_{50}$  de  $28.5 \mu\text{g/mL}$ , un valor que indica actividad antiplasmódica débil (Rasoanavio *et al.*, 2004). Derivados del ácido benzoico como los compuestos 5-1 a 5-5 (Figura 5-1), aislados de especies de *Piper*, han presentado actividad antiparasitaria frente a *P. falciparum*, el compuesto 5-3 presenta la mayor actividad con un valor de  $CI_{50}$  de  $2.8 \mu\text{g/mL}$ , estructuralmente es el menos hidroxilado y de menor peso molecular. El compuesto **C3** aislado en el presente trabajo esta estructuralmente relacionado con el compuesto 5-1, sin embargo las diferencias en la posición de los grupos funcionales se ve reflejada en la variación de la actividad antiparasitaria frente a *P. falciparum*, cabe aclarar que los resultados corresponden a ensayos sobre diferentes cepas.

**Figura 5-1. Ácidos benzoicos aislados de especies de *Piper* evaluados frente a *P. falciparum***



La fracción hexánica de *P. cumanense* (PcH) presentó una baja actividad *in vitro* con una  $Cl_{50}$  de  $21.5 \mu\text{g/mL}$  y no presentó actividad en el ensayo *in vivo*, mostrando un comportamiento similar al de la fracción PcD, de esta fracción se aisló una mezcla de esteroides,  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol, la actividad de esta fracción no se relacionó directamente con la presencia de un compuesto.

La fracción butanólica de *P. cumanense* (PcB) no presentó actividad en el ensayo *in vitro*, y mostró sólo un 30.63% de inhibición en el ensayo *in vivo* resultado que no permite clasificar la muestra como activa (Porcentaje de inhibición  $\geq 50\%$ , Rasoanavio *et al.*, 2004). La caracterización química preliminar de ésta fracción reveló la presencia de flavonoides lo que motivó los procesos de aislamiento y purificación, siendo que flavonoides del grupo de las flavonas han sido reportados como antiparasitarios frente a *P. falciparum* como inhibidores de la biosíntesis de ácidos grasos (FAS-II) (Gupta *et al.*, 2010) proceso fundamental en el desarrollo del parásito.

La fracción PcB permitió el aislamiento de tres flavonoides C-glicosilados mayoritarios, vitexina, isovitexina y orientina que han sido reportados previamente en otras especies

de *Piper*, estos compuestos no presentaron actividad en las condiciones del estudio sobre *P. falciparum*, sin embargo constituyen el primer reporte de estos flavonoides para la especie *Piper cumanense*. Aunque los metabolitos vitexina, isovitexina y orientina han sido aislados de diversas fuentes vegetales, aún se continúan investigando sus funciones en las plantas y su actividad biológica, estos flavonoides son reconocidos por su actividad antioxidante, por lo que se han estudiado como antiinflamatorios, anticancerígenos, antibacteriales entre otros, mas recientemente se ha asociado la presencia de vitexina e isovitexina con la actividad hipoglicemiante de *Ficus deltoidea* actividad debida probablemente a inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa demostrada por evaluación *in vitro* con valores de  $CI_{50}$  de 4.1 y 6.7 mg/mL respectivamente (Choo *et al.*, 2012).

El flavonoide vitexina también ha demostrado un significativo efecto antinociceptivo en modelos de analgesia química (Gorzalczany *et al.*, 2011) e isovitexina ha mostrado ser estimulante de la secreción de insulina en ratas hiperglicémicas (Folador *et al.*, 2010). *Piper cumanense* es una fuente importante de vitexina, isovitexina y orientina flavonoides encontrados en el presente trabajo, que pueden generar interés farmacéutico adicional al ya conocido.

Aunque los compuestos aislados presentaron actividad antiplasmódica leve a moderada, la actividad de las moléculas aisladas no explican la actividad del extracto total, este comportamiento es usual cuando se evalúan plantas medicinales usadas tradicionalmente en el tratamiento de la malaria y que se relaciona con la complejidad de estructuras químicas presentes, tal como expone Deharo *et al.*, 2011 en un estudio que recopila información de extractos activos y compuestos puros y en el que sólo en casos particulares la actividad de un extracto es explicada en mas del 50% por un metabolito aislado. En este mismo estudio se sugiere que las perspectivas de investigación podrian enfocarse a la búsqueda de drogas o metabolitos aislados de fuentes naturales que potencien o mejoren la actividad de fármacos usados en clínica, iniciativa que se suma a lo propuesto por la OMS y que conduciría a replantear la bateria de ensayos de screening.

En el caso de la especie *P. holtonii*, la fracción hexánica (PhH) condujo a la obtención de una mezcla de apiol y dilapiol que no presentó actividad antiplasmódica, estos

fenilpropanoides son frecuentemente biosintetizados por especies del género *Piper* y constituyen metabolitos mayoritarios en especies como *P. aduncum*, *P. argyrophyllum*, *P. brachystachyum*, *P. schmidtii*, *P. banksii*, *P. guineense*, *P. novae-hollandiae* y *P. marginatum* (Parmar *et al.*, 1998). La actividad presentada por las fracciones PhH y PhD podría estar asociada a metabolitos de baja polaridad que no fueron identificados. La fracción PhD presentó actividad sobre promastigotes de *Leshmania panamensis* con una  $CL_{50}$  de 55.3  $\mu\text{g/mL}$  (Sánchez-Suárez *et al.*, 2010).

La fracción butanólica de *P. holtonii* (PhB) no presentó actividad *in vitro*, fue considerada para estudios fitoquímicos debido a la presencia de flavonoides, de esta fracción se aisló el flavonol Kaempferol-3-O-rutinósido y se detectó la presencia de rutina por LC-MS, este tipo de flavonoles son frecuentemente reportados en plantas. Los metabolitos tipo flavonoide de las dos especies no presentaron actividad en el ensayo *in vitro*, se ha reportado que la quercetina, aglicona de la rutina, presenta actividad en ensayos frente a la cepa NF-54 de *P. falciparum* con  $CI_{50}$  de 10  $\mu\text{M}$ .

Los metabolitos activos frente a *P. falciparum* aislados en este trabajo presentan índices de actividad (IA) antiparasitaria mayores a 100 respecto a cloroquina, lo que indica una potencia baja respecto a este fármaco, sin embargo generan información acerca de estructuras que poseen una actividad antiparasitaria inherente y que pueden ser importantes para posteriores estudios.

La información química y los datos de actividad farmacológica presentan un aporte al conocimiento de estas dos especies que hacen parte de la flora tropical colombiana.



## Conclusiones

El aislamiento de metabolitos a partir de las fracciones con potencial actividad antiplasmódica de *Piper cumanense* condujo a la identificación de 8 compuestos, dos derivados de ácido benzoico, el ácido 2-metil-2-(4'-metil-3'-pentenil)-8-(3''-metil-2''-butenil)-2*H*-1-benzopirano-6-carboxílico reportado como ácido gaudichaudiánico **C1** y el ácido 4-metoxi-3-(3-metil-2-butenil)-benzoico **C3**, de una chalcona identificada como 2',4',6'-trihydroxidihydrochalcona **C4**, de 3 flavonoides C-glicosilados identificados como vitexina **C6**, orientina **C7** e isovitexina **C8**, metabolitos por primera vez reportados para esta especie. También se aisló sitosterol 3-*O*- $\beta$ -glucósido **C5** y una mezcla de  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol.

En las fracciones de baja polaridad de *P. cumanense* se detectaron por CG-EM los monoterpenos y sesquiterpenos, óxido de cariofileno, piperitona, espatulenol, 14-hidroxi- $\alpha$ -muroleno, cubenol y canidol.

El aislamiento de metabolitos a partir de las fracciones de *Piper holtonii* condujo a la identificación de dos fenilpropanoides, apiol y dilapiol, 2 flavonoides *O*-glicosilados identificados como kaempferol-3-*O*-rutinosido y rutina, además de  $\beta$ -sitosterol y sitosterol 3-*O*- $\beta$ -glucósido, metabolitos por primera vez registrados para las partes aéreas de ésta especie vegetal.

La evaluación de la actividad antiplasmódica *in vitro* de las fracciones y de los metabolitos aislados de *Piper cumanense* permitió identificar una actividad moderada sobre eritrocitos infectados con *P. falciparum*, lo que podría aportar a justificar el uso de mezclas de plantas en las preparaciones tradicionales para el tratamiento de la malaria que incluyen especies del género *Piper*.

Como metabolitos asociados a la actividad antiplasmodica se identificaron los compuestos ácido gaudichaudiánico (**C1**) con un valor de  $CI_{50}$  = 17.6  $\mu\text{g/mL}$ , ácido 4-metoxi-3-(3-metil-2-butenil)-benzoico (**C3**) con una  $CI_{50}$  de 28.5  $\mu\text{g/mL}$  y 2',4',6'-trihydroxidihydrochalcona (**C4**) con un valor de  $CI_{50}$  de 29.6  $\mu\text{g/mL}$ , como compuestos con actividad moderada. El ácido gaudichaudiánico y la 2',4',6'-trihydroxidihydrochalcona presentaron además actividad inhibidora de la biocristalización del heme (FBIT) con valores de  $CI_{50}$  de 0.46 y 0.23  $\mu\text{g/mL}$ , lo que genera información adicional de estos compuestos frente a un posible blanco terapéutico de interés.

La caracterización microscópica de las hojas de *P. cumanense* y *P. holtonii* permitió concluir que las especies presentan similitudes microscópicas que son reportadas por primera vez para estas especies y que pueden ser útiles para el control de calidad como droga vegetal.

Los resultados obtenidos en la presente investigación contribuyen al conocimiento farmacognóstico y de actividad biológica de dos especies que hacen parte de la flora colombiana y que son utilizadas para el tratamiento de la malaria y sus síntomas en la medicina tradicional.



## Recomendaciones

La realización del estudio químico y biológico de *P. cumanense* y *P. holtonii* permiten proponer las siguientes recomendaciones:

Generar perfiles metabolómicos y evaluar la actividad biológica de extractos obtenidos en diferentes épocas del año y estados de desarrollo de la planta.

Realizar ensayos de actividad antimalárica *in vivo* en modelo murino con el ácido gaudichaudiánico, el ácido 4-metoxi-3-(3-metil-2-butenil)-benzoico y la 2',4',6'-trihidroxi-dihidrochalcona.

Realizar ensayos de cronofarmacología y potenciación de los compuestos que presentaron actividad con fármacos usados en clínica.

Evaluar la actividad antimalárica de otros ácidos benzoicos prenilados, chalconas y cromenos de origen natural o semisintético para avanzar en el estudio de la relación estructura actividad de este grupo de metabolitos secundarios.

Estudiar las fracciones hexánica y clorofórmica de *P. holtonii* (PhH y PhD) para identificar otros metabolitos presentes que puedan estar involucrados en la actividad antiplasmódica reportada.



# Anexo 1: Protocolo para el cultivo de *P. falciparum*

## Equipos, Materiales y Reactivos

### Equipos

- Balanza analítica
- Cabina de flujo laminar de bioseguridad Tipo II
- Incubadora
- Centrifuga para tubos de 15 mL.
- Agitador Minishaker
- Autoclave
- Bomba de vacío
- Microscopio óptico
- Congelador -70 °C
- Tanque de nitrógeno

### Materiales

- Cajas de cultivo estériles de 25 mL
- Frascos tipo Schott estériles de 100 mL, 250 mL, 500 mL y 1 L.
- Sistemas de filtración 0,22  $\mu\text{m}$
- Pipetas aforadas estériles de 2 mL, 5mL, 10 mL y 25 mL
- Pipetas Pasteur estériles
- Viales de criopreservación
- Jeringas de 10 a 20 mL
- Filtros de 0,22  $\mu\text{m}$
- Tubos para centrifuga estériles de 15 mL y 50 mL
- Balones aforados de 50 mL, 500 mL y 1L
- Láminas portaobjetos

### Reactivos

- Medio RPMI 1640
- Hidróxido de sodio
- Sorbitol
- Agua destilada
- Giemsa stain

- Glucosa
- Hepes
- Hipoxantina
- NaHPO<sub>4</sub>
- KHPO<sub>4</sub>
- Plasma O<sup>+</sup>
- Glóbulos Rojos O<sup>+</sup>

### **Preparación de medio RPMI 1640**

- Pesar 5,92 g de Hepes y disolver en 100 mL de agua destilada.
- Pesar 10 mg de hipoxantina y disolver en agua destilada en ebullición.
- Pesar 2 g de glucosa y disolver en agua destilada.
- Disolver en aproximadamente 500 mL de agua destilada un frasco (10,4 g) de medio RPMI 1640.
- Traspasar las soluciones a un balón de 1 L, las soluciones deben estar a temperatura ambiente
- Adicionar 60 mg de gentamicina.
- Completar a 1 L.
- Filtrar por membrana de 0,22 µm en cabina de flujo laminar.
- Mantener a 4 °C, usar a 37 °C.

### **Preparación medio RPMIc (Medio de cultivo RPMI completo)**

Preparar en el momento de su utilización.

- Preparar una solución con 85 % medio RPMI suplementado con 10 % de plasma humano y 5 % de una solución de bicarbonato de sodio al 5%.

### **Preparación Colorante Giemsa**

- Pesar 1 g de colorante, disminuir el tamaño de partícula en un mortero.
- Adicionar 10 mL de metanol hasta disolver el colorante.
- Transferir a un frasco ámbar, adicionar 74 mL más de metanol y 54 mL de glicerina.
- Dejar madurar por 5 días a temperatura ambiente.
- Filtrar y guardar nuevamente en frasco ámbar.

### **Preparación Buffer de Giemsa**

- Pesar 0,273 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y disolver en 40 mL de agua.
- Pesar 0,227 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y disolver en 40 mL de agua.
- Transferir las dos soluciones a un balón de 500 mL y completar a volumen con agua.
- Homogenizar y almacenar a 4°C.

Todos los procesos de manipulación del cultivo de *P. falciparum*, se realizan en cabina de seguridad biológica tipo II.

### **Descongelación del parásito**

- Retirar un vial del tanque de nitrógeno.
- Descongelar el vial por un minuto a 37°C.
- Transferir el contenido del vial a un tubo estéril de 15 mL.
- Adicionar gota a gota, agitando suavemente 0.1 mL de solución estéril de NaCl 12%.
- Dejar en reposo por 5 minutos.
- Adicionar gota a gota, agitando suavemente 5 mL de solución estéril de NaCl 1.6%.
- Centrifugar a 500 G por 10 minutos.
- Retirar el sobrenadante.
- Adicionar al pellet 5 mL de una solución estéril de NaCl 0.9% - Dextrosa 0.2%.
- Centrifugar a 500 x G por 10 minutos.
- Retirar el sobrenadante.
- Adicionar 5 mL de medio RPMI estéril y mezclar suavemente.
- Centrifugar a 500 x G por 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante.
- Adicionar 200 µL de glóbulos rojos frescos y 10 mL de RPMIc estéril.
- Transferir a la caja de cultivo, gasear con mezcla de gases (5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, balance de Nitrógeno) por 1 minuto o colocar en cabina de CO<sub>2</sub>.
- Cultivar a 37°C en incubadora.

### **Congelación del parásito**

- Realizar frotis para confirmar estadio de anillos con una parasitemia igual o superior al 4%
- Sincronizar con sorbitol al 5% (de ser necesario)
- Transferir el cultivo a congelar a un tubo de 15 mL.
- Centrifugar a 500 G por 10 minutos.
- Retirar el sobrenadante.
- Adicionar al pellet en proporción 1:4 una solución de glicerol al 5%.
- Repartir en tubos de congelación, no más de 0,7 mL por tubo.
- Congelar a -70°C por 24 horas y almacenar en tanque de nitrógeno.

### **Tinción de Giemsa**

- Realizar el frotis en láminas portaobjetos.
- Secar el frotis.
- Fijar el frotis con la adición de 1 o 2 mL de metanol a la lámina
- Permitir la evaporación del metanol.

- Colocar una solución al 10 % de Giemsa en la solución buffer cubriendo el frotis.
- Dejar en reposo por 10 minutos.
- Lavar la lámina con abundante agua.

### **Mantenimiento diario del Cultivo**

- Mantener la caja de cultivo siempre en posición horizontal.
- Retirar de la incubadora la caja de cultivo y manipularla dentro de la cabina de seguridad biológica.
- Abrir la caja de cultivo.
- Retirar cuidadosamente el medio sobrenadante.
- Tomar una muestra para realizar el frotis correspondiente.
- Realizar la tinción de Giemsa del frotis.
- Establecer microscópicamente el estadio y calcular la parasitemia.
- Si la parasitemia es mayor al 4%, adicionar glóbulos rojos normales para mantener una parasitemia aproximada al 2%.
- Mantener el hematocrito menor al 5 %, en caso de ser necesario dividir el cultivo.
- Adicionar medio RPMIc estéril suficiente para un hematocrito de 5%.
- Gasear con mezcla de gases (5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, balance de Nitrógeno) por 1 minuto o colocar en incubadora con CO<sub>2</sub>.
- Cultivar a 37°C.

### **Sincronización del cultivo a estadios jóvenes (0-20 horas)**

- Tomar la suspensión de glóbulos rojos parasitados, transferir a un tubo estéril de 15 mL.
- Centrifugar a 500 G por 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante.
- Adicionar 9 partes de sorbitol 5% estéril, al pellet.
- Homogenizar e incubar a 37 °C por 10 minutos.
- Centrifugar a 500 G por 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante.
- Adicionar 5 mL de RPMI, homogenizar.
- Centrifugar a 500 G por 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante, adicionar RPMIc estéril suficiente para hematocrito 5%.
- Transferir a una caja de cultivo.
- Gasear con mezcla de gases (5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, balance de Nitrógeno) por 1 minuto o colocar en incubadora con CO<sub>2</sub>.
- Cultivar a 37°C en incubadora.

## **Anexo 2: Protocolo para la realización del ensayo de actividad antiplasmódica *in vitro*.**

### **Equipos, Materiales y Reactivos**

#### **Equipos**

- Balanza analítica
- Cabina de flujo laminar de bioseguridad Tipo II
- Incubadora
- Centrifuga para tubos de 15 mL.
- Agitador Minishaker
- Autoclave
- Microscopio óptico

#### **Materiales**

- Placas de 96 pozos de fondo plano
- Viales estériles
- Gradillas para viales
- Gradillas para tubos de 15 mL
- Micropipeta de 200  $\mu$ L multicanal
- Micropipeta de 100 – 1000  $\mu$ L
- Micropipeta de 20 – 200  $\mu$ L
- Micropipeta de 2.0 – 20.0  $\mu$ L
- Puntas para micropipetas
- Racks de puntas para micropipetas
- Cajas de cultivo estériles de 25 mL
- Frascos tipo Schott estériles de 100 mL, 250 mL, 500 mL y 1 L.
- Pipetas aforadas estériles de 2 mL, 5mL, 10 mL y 25 mL
- Pipetas Pasteur estériles
- Tubos para centrifuga estériles de 15 mL y 50 mL

## Reactivos y solventes

- Medio RPMI completo
- Hidróxido de sodio 5%
- Sorbitol 5%
- Colorante Giemsa
- Plasma O<sup>+</sup>
- Glóbulos Rojos O<sup>+</sup>
- Muestras a ensayar

## Preparación de las muestras a ensayar

- Solución inicial (Solución A): Preparar una solución de 10 mg/mL en DMSO de la muestra a ensayar
- En cabina de flujo realizar las siguientes diluciones:
  - Tomar 100  $\mu$ L de solución A y adicionar 900  $\mu$ L de RPMIc (Solución B).
  - Tomar 100  $\mu$ L de solución B y adicionar 900  $\mu$ L de RPMIc (Solución C).

## Preparación del patrón (Cloroquina)

- Solución inicial (Solución A): Preparar una solución 1 mg/mL en agua destilada.
- En cabina de flujo realizar las siguientes diluciones:
  - Tomar 100  $\mu$ L de solución A y disolver en 900  $\mu$ L de RPMIc (Solución B).
  - Tomar 10  $\mu$ L de solución B y disolver en 990  $\mu$ L de RPMIc (Solución C).

## Preparación de la suspensión de glóbulos rojos parasitados.

- Preparar una suspensión de glóbulos rojos parasitados, sincrónicos en estadios jóvenes, con un hematocrito del 4%-5% y un porcentaje de parasitemia cercano al 1%.

## Diluciones en placa

Las concentraciones a ensayar se obtienen por dilución seriada en la microplaca de 96 pozos de fondo plano. Para tal efecto colocar en los pozos de la microplaca las siguientes cantidades de medio RPMI completo.

- En las filas C colocar 100  $\mu$ L de RPMIc
- En las filas D colocar 120  $\mu$ L de RPMIc
- En las filas E colocar 180  $\mu$ L de RPMIc
- En las filas F colocar 180  $\mu$ L de RPMIc
- En las filas G colocar 100  $\mu$ L de RPMIc



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
	A	M1	M1	M1	M2	M2	M2	V	V	V	CQ	CQ	CQ	A
50 $\mu\text{g/mL}$	B													B
25 $\mu\text{g/mL}$	C													C
10 $\mu\text{g/mL}$	D													D
1.0 $\mu\text{g/mL}$	E													E
0.1 $\mu\text{g/mL}$	F													F
Control de parásitos	G													G
	H													H

M1=Muestra 1, M2=Muestra 2, CQ=Cloroquina, V=Vehículo

Seguidamente realizar los siguientes pasos

- Colocar en la fila B 200  $\mu\text{L}$  de solución A de los muestras a ensayar por triplicado como se dispone en la Figura 1.
- Tomar 100  $\mu\text{L}$  de la fila B y traspasar a la fila C, homogenizar.
- Tomar 80  $\mu\text{L}$  de la fila C y traspasar a la fila D, homogenizar.
- Tomar 20  $\mu\text{L}$  de la fila D y traspasar a la fila E, homogenizar.
- Tomar 20  $\mu\text{L}$  de la fila E y traspasar a la fila F, homogenizar.
- Desechar de la fila F 100  $\mu\text{L}$ .
- Desechar de la fila E 80  $\mu\text{L}$ .
- Desechar de la fila D 80  $\mu\text{L}$ .
- Desechar de la fila C 20  $\mu\text{L}$ .

Una vez se cuenta con las muestras y sus respectivas concentraciones en la microplaca:

- Colocar 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de glóbulos rojos parasitados, en todos los pozos de las letras B a G del número 1 al 12.
- Tapar las placas, colocarlas en un recipiente adecuado, gasear con mezcla de gases (5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, balance de Nitrógeno) por 5 minutos o colocar directamente en incubadora con CO<sub>2</sub>.
- Incubar a 37 °C por 48 horas.

### Realización de frotis

Transcurridas las 48 horas, retirar la microplaca de la incubadora y trabajar bajo cabina de seguridad biológica.

- Retirar cuidadosamente de uno de los pozos control (pozos de la fila G) el medio sobrenadante.
- Realizar un frotis del pellet, evaluar la parasitemia y los estadíos del cultivo.
- Verificar que el cultivo se encuentra en estadíos jóvenes y la parasitemia es considerablemente superior a la inicial.
- Tomar la placa y centrifugarla a 500 G por 10 minutos.
- Eliminar cuidadosamente el sobrenadante de cada pozo.
- Realizar un frotis de cada uno de los pozos.
- Fijar el frotis con metanol
- Realizar la tinción de Giemsa.
- Realizar el conteo de glóbulos rojos parasitados y no parasitados por el método visual (1000 glóbulos rojos totales)
- Realizar el cálculo de parasitemia y porcentaje de inhibición de acuerdo a las ecuaciones

$$\% \text{ de parasitemia} = \frac{\text{Globulos Rojos Parasitados}}{\text{Globulos Rojos Totales}} \times 100$$

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Parasitemia de blanco} - \text{Prasitemia de muestra}}{\text{Parasitemia de blanco}} \times 100$$

# **Anexo 3: Protocolo del ensayo de Inhibición de la biomineralización de ferriprotoporfirina IX (FBIT)**

## **1.0 Equipos, Materiales y Reactivos**

### **1.1 Equipos**

- Balanza Analítica
- Incubadora
- Lector de Placas de micro-ELISA Bio-Rad Modelo 550
- Centrifuga con cabezote para placas de 96 pozos
- Agitador Minishaker

### **1.2 Materiales**

- Placas de 96 pozos de fondo plano FALCON® 353072
- Micropipeta múltiple
- Micropipeta de 100 – 1000 µL
- Micropipeta de 20 – 100 µL
- Puntas para micropipetas

### **1.3 Reactivos**

- Cloruro de hemina bovino
- Ácido acético glacial Merck
- Acetato de sodio
- Hidróxido de sodio
- Agua destilada desionizada
- Dimetil sulfoxido DMSO

## **2.0 Preparación de Soluciones**

### **2.1 Buffer de Acetato de Sodio**

#### **2.1.1 Soluciones Stock**

- Solución A: Medir 1.15 mL de ácido acético y disolver en agua destilada c.s.p. 100 mL
- Solución B: Pesar 1.64 g de acetato de sodio y disolver en agua destilada c.s.p. 100 mL

#### **2.1.2 Preparación del Buffer (el día del ensayo)**

- Mezclar 61 mL de solución A con 39 mL de solución B
- Verificar el pH de la solución a  $4.45 \pm 0.1$ , en caso de ser necesario ajustar el pH

**2.2 Solución de NaOH 0.1 M**

- Pesar NaOH 1 g y disolver en agua destilada c.s.p. 250 mL
- Almacenar en nevera (en frasco de vidrio)

**2.3 Solución de Hemina (preparar el día del ensayo)**

- Pesar 2.5 mg y disolver en 5 mL de DMSO
- Preparar 5mL por cada microplaca

**2.4 Preparación de muestras**

- Concentración 1 (C1): Pesar 10 mg de muestra y disolver en 1 mL de DMSO
- Concentración 2 (C2): Tomar 500  $\mu$ L de C1 y completar a 1mL con DMSO
- Concentración 3 (C3): Tomar 500  $\mu$ L de C2 y completar a 1 mL con DMSO
- Concentración 4 (C4): Tomar 500 L de C3 y completar a 1 mL con DMSO
- Preparar los extractos preferencialmente en DMSO otros vehículos pueden ser agua, metanol, etanol 100% y etanol/agua (70/30).

**2.6 Preparación del patrón (cloroquina)**

- Concentración 1(C1): Pesar 1 mg de cloroquina y disolver en 5 mL de agua destilada.
- Concentración 2 (C2): Tomar 500  $\mu$ L de C1 y completar a 1mL con agua destilada
- Concentración 3 (C3): Tomar 500  $\mu$ L de C2 y completar a 1 mL con agua destilada.
- Concentración 4 (C4): Tomar 500  $\mu$ L de C3 y completar a 1 mL con agua destilada

### 3.0 Diseño de la microplaca

El diseño de la microplaca permite evaluar 6 muestras y cuenta con pozos con vehículo (V) y patrón (CQ) tal como se observa en la Figura 1, cada muestra se evalúa a 4 concentraciones y cada concentración por triplicado. Se deben realizar como mínimo 3 ensayos independientes para determinar la CI<sub>50</sub>.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
C1	A	M1	M1	M1	M2	M2	M2	M3	M3	M3	M4	M4	M4	A
C2	B													B
C3	C													C
C4	D													D
C1	E	M5	M5	M5	M6	M6	M6	V	V	V	CQ	CQ	CQ	E
C2	F													F
C3	G													G
C4	H													H

M1: Muestra 1, M2: Muestra 2, M3: Muestra 3, M4: Muestra 4, M5. Muestra5, M6: Muestra 6

### 3.1 Montaje de la microplaca

Colocar en estricto orden las soluciones de acuerdo a la distribución de la microplaca de la siguiente manera:



- 1.) 50 µL de solución de hemina (0.5 mg/mL recientemente disuelta en DMSO)
- 2.) 100 µL de buffer de acetato de sodio (pH 4.45 )
- 3.) 50 µL de solución del extracto o 50 µL del control respectivo ver la preparación de las soluciones en 4.0

- Una vez montada la microplaca agitar durante 3- 5 minutos
- Incubar a 37°C por 22 horas
- Trascurrido el periodo de incubación, centrifugar a 1600 G durante 5 minutos, la diferencia entre las placas no debe ser superior a 7 g.
- Descargar el sobrenadante mediante dos descargas no muy fuertes y girando la placa entre ellas.
- Redisolver el pellet con 200 µL de DMSO para remover la hemina que no reaccionó

- Centrifugar a 1600 G durante 5 minutos (2800 RPM)
- Descargar el sobrenadante (mediante dos descargas no muy fuertes y girando la placa entre ellas)
- Redisolver el pellet (precipitado de hematina) en 200  $\mu$ L de solución de NaOH 0.1 M, agitar suavemente durante 30 segundos.
- Hacer la lectura espectroscópica a 415 nm en un espectrofotómetro de placas.

#### 4.0 Cálculos

##### 4.1 Cálculo de los porcentajes de inhibición

Se obtienen los porcentajes de inhibición de biocristalización de FPIX mediante la siguiente ecuación.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Absorbancia Control} - \text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia control}} \times 100$$

Se considera activo un extracto si presenta un porcentaje de inhibición de la biocristalización superior al 50 % por lo menos con la concentración más alta evaluada.

## Referencias

Agrawal P.K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*. **1992**, 31, 3307.

Al-Adhroey A.H., Nor Z.M., Al-Mekhlafi H.M., Mahmud R. Ethnobotanical study on some Malaysian anti-malarial plants: A community based survey. *Journal of Ethnopharmacology*. **2010**, 132, 362.

Al-Adhroey A.H., Nor Z.M., Al-Mekhlafi H.M., Amran A.A., Mahmud R. Antimalarial Activity of Methanolic Leaf Extract of *Piper betle* L. *Molecules*. **2011**, 16, 107.

Anoopkumar-Dukie, S., J.B. Carey, T. Conere, E. O'Sullivan, F.N. van Pelt, y A. Allshire, *Resazurin assay of radiation response in cultured cells. British Journal of Radiology*. **2005**, 78, 945.

Arambarri A. M., Freire S.E. Bayón N.D, Colares M.N., Monti C., Novoa M.C., Hernández M.P. Micrografía foliar de arbustos y pequeños árboles medicinales de la Provincia Biogeográfica de las Yungas (Argentina). *Kurtziana*. **2009**, 35,1,15.

Ariza L., Bonzani N. El Mático de la Región de Cuyo (Argentina). *Acta Farmacéutica Bonaerense*. **1992**, 11, 3, 139.

Baldoqui D.C., Kato M.J., Cavalheiro A. J, Bolzani V., Young M.C.M., Furlan M. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*. **1999**, 5, 899.

Benevides P.J.C., Sartorelli P., Kato M.J. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. *Phytochemistry*. **1999**, 52, 339.

Blair S., Correa A., Madrigal B., Zuluaga C., Franco H. Plantas antimaláricas. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. **1991**, 55.

Blair S., Madrigal B. Plantas antimaláricas de Tumaco, Costa Pacífica Colombiana. Editorial Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. **2005**, 207.

Boll P.M., Parmar V.S., Tyagi O.D., Prasad A., Wengel J., Olseng C.E. Some recent isolation studies from potential insecticidal *Piper species*. *Pure and Applied Chemistry*. **1994**, 66, 2339.

Braga F.G., Bouzada M.L.M., Fabri R.L., Matos M. de O. Moreira F.O., Scio E., Coimbra E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. **2007**, 111, 396.

Cao S., Rossant C., Ng S., Buss A.D., Butler M.S. Phenolic derivatives from *Wigandia urens* with weak activity against the chemokine receptor CCR5. *Phytochemistry*. **2003**, 64, 987.

Cantero E.A., Albornoz P.L., Arias M.E., Álvarez M.J. Anatomía foliar de *Piper tucumanum* C.DC. y *Piper hieronymi* C. (Piperaceae) Tucumán, Argentina. *Lilloa*. **2005**, 42, 3.

Chen Y.C., Liao C.H., Chen I.S. Lignans, an amide and anti-platelet activities from *Piper philippinum*. *Phytochemistry*. **2007**, 68, 2101.

Choo C.Y., Sulong N.Y., man F., Wong T.W. Vitexin and isovitexin from the leaves of *Ficus deltoidea* with in-vivo  $\alpha$ -glucosidase inhibition. *Journal of ethnopharmacology*. **2012**, 142, 776.

Deane L. Os grandes marcos na história do controle da malária. *Revista Brasileira de Medicina Tropical*. **2007**, 40,59.

Deharo E., Gautre Ph., Muñoz V., Sauvain M. Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas. CYTED-IRD, La Paz. **2000**, 21-25.

Deharo E., Garcia R.N., Oporto P., Gimenez A., Sauvain M., Jullian V., Ginsburg H. A non-radiolabelled ferriprotoporphyrin IX biomineralisation inhibition test for the high throughput screening of antimalarial compounds. *Experimental Parasitology*. **2002**, 100, 252.

Deharo E., Ginsburg H. An analysis of additivity and synergism in the anti-plasmodial effect of purified compounds from plant extracts. *Malaria Journal*. **2011**, 10, 1, S5.

De O' Santos B.V., Da- Cunha V.L., De Chaves M.C., Gray A.I. Phenylalkanoids from *Piper marginatum*. *Phytochemistry*. **1998**, 49, 1381.

Devakaram R., Black S.D., Choomuenwai V., Davis R.A., Kumar N. Synthesis and antiplasmodial evaluation of novel chromeno [2,3-b] chromene derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2012**, 20, 1527.

Di-Stasi L.C., Hiruma-Lima C.H. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica, 2a edição, Editora UNESP. **2002**, 120.



Dyer L.E., Palmer A.D.N. A model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. **2004**.

Ernst E. Herbal remedies for anxiety – a systematic review of controlled clinical trials. *Phytomedicine*. **2006**, 13, 205.

Flores N., Jiménez I.A., Giménez A., Ruiz G., Gutiérrez D., Bourdy G., Bazzocchi I.L. Benzoic Acid Derivatives from *Piper* Species and Their Antiparasitic Activity. *Journal Natural Products*. **2008**, 71, 1538.

Flores N., Jiménez I.A., Giménez A., Ruiz G., Gutiérrez D. Bourdy G., Bazzocchi I.L. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. *Phytochemistry*. **2009**, 70, 621.

Folador P., Cazarolli L.H., Reginatto F.H., Schenkel E.P., Silva F.R.M.B. Potential insulin secretagogue effects of isovitexin and swertisin isolated from *Wilbrandia ebracteata* roots in non-diabetic rats. *Fitoterapia*. **2010**, 81, 1180

Garavito G., Rincón J., Arteaga L., Hata Y., Bourdy G., Gimenezc A., Pinzón R., Deharo E. Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **2006**, 107, 460.

García-Barriga H. *Flora Medicinal de Colombia - Botánica Médica*. Mundo Editores, Bogotá. **1992**, 222.

Gorzalczany S., Marrassini C., Miño J., Acavedo C., Ferraro G. Antinociceptive activity of ethanolic extract and isolates compounds from *Urtica circularis*. *Journal of Ethnopharmacology*. **2011**, 134, 733.

Hanssen E., McMillan P.J., Tilley L. Cellular architecture of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *International Journal for Parasitology*. **2010**, 40, 1127.

INS-Instituto Nacional de Salud; SIVIGILA, Vigilancia rutinaria a semana 52 de 2011. **2011**, <http://www.ins.gov.co/?idcategoria=1729>.

Iwashita M., Oka N., Ohkubo S., Saito M., Nakahata N. Piperlongumine, a constituent of *Piper longum* L., inhibits rabbit platelet aggregation as a thromboxane A2 receptor antagonist. *European Journal of Pharmacology*. **2007**, 570, 38.

Jaramillo M.A. Using *Piper* species diversity to identify conservation priorities in the Chocó Region of Colombia. *Biodiversity and Conservation*. **2006**, 15, 1695.

Jensen, W. A. *Botanical histochemistry. Principles and practice*. W. H. Freeman y Co. San Francisco. **1962**.

Jenett-Siems K., Mockenhaupt F.P., Bienzle U., Gupta M.P., Eich E. *In vitro* antiplasmodial activity of Central American medicinal plants. *Tropical Medicine and International Health*. **1999**, 4, 611.

- Johansen D. A. *Plant microtechnique*. Mc Graw-Hill Book Co. Onc. New York. **1940**
- Kaou A.M., Mahiou-Leddé V., Hutter S., Aïnouddine S., Hassani S., Yahaya I., Azas N., Ollivier E. Antimalarial activity of crude extracts from nine African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **2008**, 116, 74.
- Kaur K., Jain M., Kaur T., Jain R. Antimalarials from nature. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2009**, 17, 3229–3256.
- Kojima H., Sato N., Hatano A., Ogura H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*. **1990**, 29, 7, 2351.
- Lago J.H.G., Sousa Ramos C., Campos Casanova D., Morandim A. A., Bergamo D.C.B., Cavalheiro A.J., Bolzani V. da S., Furlan M., Guimarães E.F., Young M.C.M., Kato M.J. Benzoic Acid Derivatives from *Piper* Species and Their Fungitoxic Activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. *Journal of Natural Products*. **2004**, 67, 1783.
- Lee A.L., Ley S.V. The synthesis of the anti-malarial natural product polysphorin and analogues using polymer-supported reagents and scavengers. *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2003**, 1, 3957.
- Moreira D., Guimaraes E. F., Kaplan M. A. A C-glucosylfavone from leaves of *Piper Ihotzkyanum*. *Phytochemistry*. **2000**, 55, 783.
- Miller L.H., Baruch D. I., Marsh K., Doumbo O. K. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. **2002**, 415, 673.
- Moreira D.de L., Guimaraes E.F., Kaplan M.A. Non!polar constituents from leaves of *Piper Ihotzkyanum*. *Phytochemistry*. **1998**, 49, 5, 1339.
- Mustafa K., Kjaergaard H.G., Perry N.B., Weavers R.T. Hydrogen-bonded rotamers of 2',4',6'-trihydroxy-3-formyldihydrochalcone, an intermediate in the synthesis of a dihydrochalcone from *Leptospermum recurvum*. *Tetrahedron*. **2003**, 59, 6113.
- Nowakowska Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2007**, 42, 125.
- Okamoto Y., Ohkoshi K., Itagaki H., Tsuda T., Kakishima H., Ogawa T., Kasai Y., Ohuchi J., Kojima H., Kurishita A. Kaneko T., Matsushima Y., Iwabuchi Y., Ohno Y. Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (3) Evaluation of the haemolysis test. *Toxicology in vitro*. **1999**, 13,1, 115.
- Park B.S., Son D.J., Park Y.H., Kim T.W., Lee S.E. Antiplatelet effects of acidamides isolated from the fruits of *Piper longum* L. *Phytomedicine*. **2007**, 14, 853.

- Parmar V.S., Jain S.C., Bisht K.S., Jain R., Taneja P., Jha A., Tyagi O.D., Prasad A.K., Wengel J., Olsen C.E., Boll P.M., Phytochemistry of the Genus *Piper*. *Phytochemistry*. **1997**, 46, 4, 591.
- Parmar V.S., Jain S. C, Gupta S., Talwar S., Rajwanshi V. K., Kumar R., Azim A.L., Malhotra S., Kumar N., Jain R., Sharma N. K., Tyagi O., Dlawrie S. J., Errington W., Howarth O.R W., Olsen C. E., Singh S. K., Wengel J. Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. *Phytochemistry*. **1998**, 38, 3, 958.
- Parra J.E., Delgado W.A., Cuca L.E. Cumanensic acid, a new chromene isolated from *Piper cf. cumanense* Kunth (Piperaceae). *Phytochemistry Letters*. **2011**, 4, 3, 280.
- Pedras M.S.C., Chumala P.B., Suchy M. Phytoalexins from *Thlaspi arvense*, a wild crucifer resistant to virulent *Leptosphaeria maculans*: structures, syntheses and antifungal activity. *Phytochemistry*. **2003**, 64, 949.
- Portet B., Fabre N., Roumy V., Gornitzka H., Bourdy, G., Chevalley S., Sauvain M., Valentin, A., Moulis C. Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. *Phytochemistry*. **2007**, 68, 1312.
- Quijano-Abril M. A., Callejas-Posada R., Miranda-Esquivel D. R. Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). *Journal of Biogeography*. **2006**, 33, 1266.
- Rahman N.N.A, Furuta T., Kojima S., Takane K., Mohd M.A. Antimalarial activity of extracts of Malaysian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **1999**, 64, 249.
- Ram V.J., Saxena A.S., Srivastava S., Chandra S. Oxygenated chalcones and bischalcones as potential antimalarial agents. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*. **2000**, 10, 2159.
- Ruiz L., Ruiz L., Maco M., Cobos M., Gutierrez-Choquevilca A.L., Roumy V. Plants used by native Amazonian groups from the Nanay River (Peru) for the treatment of malaria. *Journal of Ethnopharmacology*. **2011**, 133, 917.
- Rasoanavio P., Deharo E., Ratsimamanga-Urveg S., Frappier F. Guidelines for the nonclinical evaluation of the efficacy of traditional Antimalarials. In: Tradicional Medicinal Plantas and Malaria. Editado por Willcox M., Bodeker G., Rasoanaivo P. CRC press. **2004**, 262.
- Rukachaisirikul T., Prabpai S., Champung P., Suksamrain A. Chabamide, a novel piperine dimer from stems of *Piper chaba*. *Planta Medica*. **2002**, 68, 853.
- Rukachaisirikul T., Siriwattanakit P., Sukcharoenphol K., Wongvein C., Ruttanaweang P., Wongwattanavuch P., Suksamrarn A. Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*. *Journal of Ethnopharmacology*. **2004**, 93, 173.

- Sabbatani S., Fiorino S., Manfredi R. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*). A public health concern?. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. **2010**, 14, 3, 299.
- Sáez Vega A., Rojanoa B., Blair S. Segura C., Figadere B., Seone B., Grellierf P., Sáez J. Antimalarials and antioxidants compounds from *Piper tricuspe* (Piperaceae). *Pharmacologyonline*. **2008**, 1, 1.
- Saga K.R.O., Romoff P., Young M.C.M., Kato M.J., Lago J.H.G. Chromenes from *Peperomia serpens* (Sw.) Loudon (Piperaceae). *Phytochemistry*. **2006**, 67, 2398.
- Sánchez-Suárez J., Albarracín D., Rojas M., Rincón J., Robledo S., Muñoz D. L., Oviedo J. J., Calderón M. N., Fernández N., Delgado G. Evaluación de la actividad citotóxica y leishmanicida de extractos y fracciones de *Piper cumanense* y *Piper holtonii*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico- Farmacéuticas*. **2010**, 39, 1, 21.
- Schwikkard S., Van Heerden F.R. Antimalarial activity of plant metabolites. *Natural Product Reports*. **2002**.19, 675.
- Sunila E.S., Kuttan G. *Piper longum* inhibits VEGF and proinflammatory cytokines and tumor-induced angiogenesis in C57BL/6 mice. *International Immunopharmacology*. **2006**, 6, 733.
- Trager W, Jensen J.B. Human malaria in continuous culture. *Science*. **1976**, 193, 673.
- Troeberg X., Chen T.M., Flaherty R.E., Morty M., Cheng H., Hua C., Springer J.H., McKerrow J.H., Kenyon G.L., Lonsdale-Eccles J.D., Coetzer T.H., Cohen F.E. Chalcone, acyl hydrazide, and related amides kill cultured *Trypanosoma brucei brucei*. **2000**, 6, 660.
- Tuteja R., Malaria an overview. *FEBS Journal*. **2007**, 274, 4670.
- Veloza L.S.M., Ferreira M.J.P., Santos M.I.S., Moreira D.L., Emerenciano V.P., Kaplan M.A.C. Unusual chromenes from *Peperomia blanda*. *Phytochemistry*. **2006**, 67, 492.
- Vignerón M., Deparis X., Deharo E., Bourdy G. Antimalarial remedies in French Guiana: A knowledge attitudes and practices study. *Journal of Ethnopharmacology*. **2005**, 98 351.
- Wagner H., Blatt S., Zgainski E.M., Plant drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas, Springer Verlag. **1984**, 165.
- Wen-Chi H., Rong-Dih L., Tzong-Huei L., Ying-Hua H., Feng-Lin H., Mei-Hsien L. The phenolic constituents and free radical scavenging activities of *Gynura formosana* Kiamra. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2005**, 85, 615.
- WHO, Global Malaria Programme, World malaria Report: 2008, Switzerland, **2008**
- WHO, Global Malaria Programme, World malaria Report: 2010, Switzerland, **2010**
- WHO, Global Malaria Programme, World malaria Report: 2011, Switzerland, **2011**

---

WHO, Roll Back Malaria, The Global Malaria Action Plan, Part I- Malaria Today. **2011**. <http://www.rbm.who.int/gmap/1-1.html>.

Yamaguchi L.F., Lago J.H.G., Tanizaki T.M., Di Mascio P., Kato M.J. Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry*. **2006**, 67, 1838.

Zhou X., Peng J., Fan G., Wu Y. Isolation and purification of flavonoid glycosides from *Trollius ledebouri* using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase. *Journal of Chromatography A*. **2005**, 1092, 216.