

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA**

*Facultad de Ciencias*

*Escuela Profesional de Química*



**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADA EN QUIMICA**

**TITULADA:  
ESTUDIO QUÍMICO DE LAS HOJAS DE LA  
*Peperomia Villipetiola***

**PRESENTADA POR:  
KARINA J. MALQUICHAGUA SALAZAR**

**LIMA – PERU  
2003**

*A Dios*

*Por el Don de la vida y su compañía espiritual.*

*A mi Madre*

*Por su cariño, por su dedicación, por colocar mis pies siempre en la tierra*

*Por ser tan justa.*

*Por ser tan buena Madre.*

*A la Memoria de mi Padre*

*Siempre presente*

*A mis hermanos*

*Por la convivencia*

*A Carlos*

*Gracias por el amor, cariño, y comprensión*

*Agradecimientos:*

*Al Profesor Massuo Jorge Kato por las enseñanzas, y por la amistad durante todo el periodo compartido en São Paulo.*

*A la M. Sc. Virginia Torpoco, por las sugerencias y hacer posible la defensa de la tesis.*

*Al personal de la central analítica del Instituto de química de São Paulo, por el apoyo en la realización de los espectros.*

*A mis amigos: Ausberta, Maribel, Alejandro, Gary, Consuelo, Alex, Richard, Gustavo, Antonio, Elena, Zoila, María, Iliana, Jonnhy, y todos aquellos, con quienes compartí muchos momentos alegres en mi vida universitaria en la UNI.*

*A Clécio, Diego, y Antonio, colegas que me dieron la Bienvenida al Instituto de Química de la Universidad de São Paulo en Brasil*

# ESTUDIO QUÍMICO DE LA *Peperomia villipetiola*

## CONTENIDO RESUMIDO

	Pag.
RESUMEN	IV
GLOSARIO	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE ESPECTROS	XII
INTRODUCCIÓN.	
I. ASPECTOS GENERALES	1
A. PRESENTACIÓN	2
B. OBJETIVO	3
II. ESTUDIO BIBLIOGRAFICO	4
A. LA FAMILIA Piperaceae	5
B. TIPOS DE SUSTANCIAS QUÍMICAS PRESENTES EN LOS PRINCIPALES GÉNEROS DE LA FAMILIA Piperaceae: <i>Piper</i> y <i>Peperomia</i>	6
C. ESTUDIOS QUÍMICOS PRECEDENTES	17
1.- Cromenos	17
2.- Procedimientos experimentales tomados de referencias	17
2.1.-Procedimiento de Baldoqui D. et al. (1999)	18
2.2.-Procedimiento de Díaz D. et al. (1987)	18
2.3.-Procedimiento de Mahiou, V. et. al. (1995).	19
3.- Identificación espectroscopica de compuestos orgánicos	22
3.1.-Espectrometría de masas	22
3.2.- Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear del $^1\text{H}$ , RMN $^1\text{H}$	24
3.3.- Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear del $^{13}\text{C}$ , RMN $^{13}\text{C}$	25

3.4.- Correlación de Desplazamiento Químico Heteronuclear, HECTOR	27
3.5.- Correlación Heteronuclear de Múltiples Enlaces, HMBC	28
3.6.- Espectroscopía de Infrarrojo, IR	30
3.7.- Espectroscopía de Ultravioleta, UV	31
4.- Biogénesis	33
4.1.-Vía Acetato	33
4.2.-Biosíntesis del poli $\beta$ ceto ester	33
4.3.-Biogénesis del Metil,5-metil,7hidroxi-2,2-dimetil-2H-1-cromeno -6-carboxilato, aislado de la <i>Peperomia villipetiola</i>	35
III. PARTE EXPERIMENTAL	37
<u>TRABAJO PRELIMINAR</u>	38
A. ADQUISICIÓN DE LA PLANTA	38
B. DETERMINACIÓN SISTEMÁTICA (IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA)	38
<u>TRABAJO EXPERIMENTAL</u>	39
C. SECADO Y MOLIENDA	39
D. AISLAMIENTO DE LOS PRINCIPALES METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA <i>Peperomia villipetiola</i>	39
E. IDENTIFICACIÓN CLÁSICA	44
F. IDENTIFICACIÓN ESPECTROSCÓPICA	45
IV. RESUMEN DE RESULTADOS	71
V. CONCLUSIONES	73
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
VII. ANEXOS	78
ANEXO N° 1.- IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LA “ <i>Peperomia villipetiola</i> ”	79
ANEXO N° 2.- Datos de RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ (200MHz y 50 MHz, respectivamente) del 2,2-dimetil-2H-1-cromeno 6 ácido carboxílico aislado de <i>Piper aduncum</i> , Baldoqui, et al., 1999.	80

ANEXO N° 3.- Datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$   
(200MHz y 50 MHz, respectivamente) del Metil 2,2-dimetil-2H-1  
cromeno-6 carboxilato, aislado de *Piper hostmannianum*, Diaz D.  
et al., 1987. 81

ANEXO N° 4 .- Datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$   
(200MHz y 50 MHz, respectivamente) del ácido benzoico prenilado,  
aislado de *Peperomia galioides* Mahiou V. et al., 1995. 82

## RESUMEN

La familia Piperaceae, es considerada como la más antigua entre las angiospermas, dentro de esta familia. *Piper* y *Peperomia* son los géneros con mayor número de especies.

El género *Piper*, es ampliamente estudiado y conocido comercialmente por *Piper nigrum*, que es fuente de la pimienta negra y blanca, mientras *Peperomia*, a pesar de tener un número mayor de especies ha sido poco estudiada. En el Perú esta representada por cerca de 320 especies, 226 nativas (Andean Botanical Information System).

Por tal razón, la presente tesis tiene como objetivo contribuir con la química de *Peperomia villipetiola*, que fue proporcionada por el Dr. Biólogo Guillermo Delgado Paredes, profesor de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Pedro Ruiz Gallo-Lambayeque, la planta fue adquirida en el Mercado Modelo de Chiclayo en una tienda de plantas medicinales.

El trabajo experimental fue realizado en el ambiente de investigación de Química de Productos Naturales, ubicado en el Pabellón 11 térreo, del Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo, Sao Paulo-Brasil.

Comprendió el secado y molienda de las hojas de la *Peperomia villipetiola* seguido por extracción con DCM-MeOH (2:1), separación y purificación del metabolito de segunda menor polaridad (denominado PVL1), presente en dicha planta, bajo la asesoría del Dr. Massuo Jorge Kato en Sao Paulo- Brasil y la M. Sc. Virginia Torpoco desde Perú. Este trabajo demandó una dedicación de 5 meses (considerando el trabajo de 4 horas/día, durante 6 días/semana), y se realizó en el periodo de febrero y junio del 2002, de forma paralela a los cursos y trabajo experimental de la tesis de Maestría que me encontraba desarrollando en el Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo-Brasil.

La identificación clásica del compuesto PVL1, fue realizado mediante el análisis porcentual de carbono, nitrógeno e hidrógeno, y su identificación espectroscópica mediante el análisis de los espectros de Masas, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, RMN<sup>13</sup>C (DEPT 135°), HETCOR, UV e IR, los cuales fueron comparados

con los de la literatura (Baldoqui, et al. 1999 y Mahiou, V. Et al. 1995), permitiendo determinar que la estructura básica de la molécula es un cromeno, y determinar que sustituyentes están presentes en él. Sin embargo, fue necesario el uso de una técnica espectroscópica bidimensional denominada HMBC, para asignar la posición de los sustituyentes en el anillo aromático y así lograr determinar que la estructura corresponde a un compuesto nuevo el Metil, 5-metil,7 hidroxil-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato.

Además del estudio químico, se presenta la biogénesis del cromeno aislado de la *Peperomia villipetiola*, por la vía policetidea, vía probada que es seguida por cromenos, aislados en trabajos precios de investigación, (Lock, O. 1988).

## GLOSARIO

$\delta$ - Desplazamiento Químico.

$\mu$ - Micras.

$\lambda$ - Longitud de Onda.

$\nu$ - Número de onda.

**J**- Constante de acoplamiento.

**d**- Doblete.

**s**- Singulete.

**Abs**- Absorbancia.

**DEPT**- Distortionless Enhancement by Polarization Transfer, Transferencia de Polarización Aumentada y no Distorsionada.

**CC**- Cromatografía em columna

**CCFP**- Cromatografía em Capa Fina Preparativa.

**CCFC**- Cromatografía em Capa Fina comparativa.

**CG-MS**- Cromatógrafo de gases acoplado a masas.

**CoA**- Coenzima A.

**DCM**- Diclorometano, Cloruro de metileno,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

**EM**- Espectro de masas.

**EnZ**- Enzima.

**EtOAc**- Acetato de etilo,  $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ .

**Ep**- Éter de petróleo, mezcla de hidrocarburos de bajo punto de ebullición.

**HETCOR**- Heteronuclear Correlation Spectroscopy, Espectroscopia de Correlación de desplazamiento Heteronuclear.

**HMBC**- Heteronuclear Multiple-Bond Correlation, Correlation Heteronuclear de Múltiple Enlace.

**IR**- Infrarrojo.

**MeOH**- Metanol.

**MHz**- Mega Hertz.

**M/z (int. rel.)**- Relación masa carga (intensidad relativa).

**PVL1**- *Peperomia villipetiola* 1.

**RMN<sup>13</sup>C**- Resonancia Magnética Nuclear del Carbono.

**RMN<sup>1</sup>H**- Resonancia Magnética Nuclear del Protón.

**PKS**- Policetideo Sintase.

**UV**- Ultravioleta.

## INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1.- Fenoles presentes en <i>P. Obtusifolia</i>	7
Figura N° 2.- Fenoles presentes en <i>P.galioides</i>	8
Figura N° 3.- Quinonas presentes en <i>P. galioides</i>	9
Figura N° 4.- Secolignanas presentes en <i>P. dindigulensis</i>	9
Figura N° 5.- Secolignana presente en <i>P. Glabella</i>	9
Figura N° 6.- Benzopirano presentes en <i>P. clusiifolia</i>	10
Figura N° 7.- Dimeros presente en <i>P. pellucida</i>	10
Figura N° 8.- Dimeros presente en <i>P. proctorii</i>	11
Figura N° 9.- Amida presente en <i>P. Argrophyllum</i> y <i>P. nigrum</i>	11
Figura N° 10.-Amida presente en <i>P. guineense</i> y <i>P. nigrum</i>	12
Figura N° 11.-Chalconas presentes en <i>P. dilatatum</i>	12
Figura N° 12.-Chalconas presentes en <i>P. argrophyllum</i> , y <i>P. nigrum</i>	12
Figura N° 13.-Chalcona presente en <i>P. methysticum</i>	13
Figura N° 14.-Chalconas presentes en <i>P. aduncum</i>	13

Figura N° 15.-Cromenos presentes en <i>P. aduncum</i>	14
Figura N° 16.-Esterol presente en <i>P. hostmannianum</i>	15
Figura N° 17.-Esterol presente en <i>P. arantiacum</i> y <i>P. methysticum</i>	15
Figura N° 18.-Esterol presente en <i>P. arantiacum</i>	15
Figura N° 19.-Triterpeno presente en <i>P. arantiacum</i>	16
Figura N° 20.- Fenilpropanoides presentes en <i>P. regnelli</i>	16
Figura N° 21.- Flavonoides presentes en <i>P. hostmannianum</i>	16
Figura N° 22.- Cromeno presente en <i>P. Aduncum</i> , Baldoqui, et al. 1999	17
Figura N° 23.- Formación del Malonil-ScoA	34
Figura N° 24.- Formación del poli- $\beta$ ceto ésteres	34
Figura N° 25.-Biogénesis del Metil, 5 metil, 7 hidroxil-2,2-dimetil -2H-1-cromeno-6 carboxilato.	36
Figura N° 26.-Propuesta de fragmentación del cromeno PVL1 en el espectrómetro de masas (70 ev).	47

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1.- Clasificación morfológica de la familia Piperaceae.	6
Tabla N° 2.- Comparación de los tres procedimientos y comentario de cada etapa adoptada en la tesis	21
Tabla N° 3.- Resumen de los resultados de la CC.	42
Tabla N° 4.- Resumen de los resultados de la CFC ( $\lambda=256\text{nm}$ )	43
Tabla N° 5.- Datos de RMN $^1\text{H}$ del cromeno PVL1 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) y del cromeno 2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-ácido carboxílico (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <i>Piper aduncum</i> , Baldoqui, D. et al. 1999.	51
Tabla N° 6.- Datos de RMN $^{13}\text{C}$ del cromeno PVL1 (75 MHz) y del cromeno 2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6 ácido carboxílico (50MHz) de <i>Piper aduncum</i> , Baldoqui D. et al., 1999.	58
Tabla N° 7.- Datos observados en los espectros de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) , RMN de $^{13}\text{C}$ , RMN de $^{13}\text{C}$ - Dept 135° (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), HETCOR (300 y 75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) y NBC (500 MHz y 125 MHz, $\text{CDCl}_3$ , del cromeno PVL1. (*El espectro RMN de $^{13}\text{C}$ -Dept 135° , 300 y 75 MHz, presenta estas señales)	65
Tabla N° 8.- Datos de RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ (200MHz y 50 MHz, respectivamente) del 2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6 ácido carboxílico aislado de <i>Piper aduncum</i> , Baldoqui, et al., 1999.	80

Tabla N° 9.- Datos de RMN<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (200 MHz y 50MHz, respectivamente) del Metil 2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato aislado de *Piper hostamannianum*, Díaz D. et al., 1987. 81

Tabla N° 10.-Datos de RMN<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (200 MHz y 50MHz, respectivamente) del ácido benzoico prenilado, aislado de *Peperomia galioides*, Mahiou V. et al. 1995. 82

## INDICE DE ESPECTROS

Espectro N°1.-	Espectro de masas (70 eV) de PVL1 obtenida a partir de las hojas de <i>Peperomia villipetiola</i> .	49
Espectro N°2.-	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (300MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de PVL1 obtenida a partir de las hojas de <i>Peperomia villipetiola</i> .	52
Espectro N°3.-	Espectro Ampliado (1 a 4 ppm) de RMN <sup>1</sup> H (300MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de PVL1 obtenida a partir de las hojas de <i>Peperomia villipetiola</i> .	53
Espectro N°4.-	Espectro ampliado (5 a 7 ppm) de RMN <sup>1</sup> H (300MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de PVL1 obtenida a partir de las hojas de <i>Peperomia villipetiola</i>	54
Espectro N°5.-	Espectro de RMN <sup>13</sup> C (75MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de PVL1 obtenida a partir de las hojas de <i>Peperomia villipetiola</i> .	59
Espectro N°6.-	Espectro de RMN <sup>13</sup> C DEPT 135° (75MHz,CDCl <sub>3</sub> ) de PVL1 obtenida a partir de las hojas de <i>Peperomia villipetiola</i>	60
Espectro N°7.-	Espectro de HETCOR (300 Y 75MHz,CDCl <sub>3</sub> ) de PVL1 obtenida a partir de las hojas de <i>Peperomia villipetiola</i> .	62
Espectro N° 8.-	Espectro de HMBC (500 Y 125MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de PVL1 obtenida a partir de las hojas de <i>Peperomia villipetiola</i> .	66
Espectro N° 9.-	Espectro de IR de PVL1 obtenida a partir de las hojas de <i>Peperomia villipetiola</i> .	69
Espectro N° 10.-	Espectro de UV de PVL1 obtenida a partir de las hojas de <i>Peperomia villipetiola</i> .	70

**I. ASPECTOS GENERALES**

## A. PRESENTACIÓN

En el presente trabajo se describe el aislamiento y la determinación estructural de una sustancia presente en las hojas de la *Peperomia villipetiola*, oriunda de la región norte del Perú, la cual fue adquirida en el Mercado Modelo de la ciudad de Chiclayo -Perú.

Este trabajo de Tesis comprendió las siguientes actividades:

- i Trabajo experimental en el ambiente de Investigación de Química de Productos Naturales, ubicado en el Pabellón 11 térreo, del Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo, Sao Paulo-Brasil, que comprendió la molienda de las hojas de la *Peperomia villipetiola*, extracción con DCM – MeOH (2:1), aislamiento y purificación de un metabolito de baja polaridad (denominado PVL1).
- ii Identificación clásica mediante el análisis porcentual de carbono, nitrógeno e hidrógeno, identificación espectroscópica de la PVL1 mediante el análisis de los espectros de masas, de RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, RMN<sup>13</sup>C (DEPT 135°), HETCOR, UV e IR, cuyos datos obtenidos fueron comparados con los de la literatura (Baldoqui, et al.1999 y Mahiou, V. et al. 1995), permitiendo determinar como estructura básica de la molécula un cromeno y los sustituyentes que están presentes en él, sin embargo, dada la dificultad para asignar sus posiciones en el anillo aromático, fue necesario el uso de una técnica espectroscópica bidimensional denominada HMBC.
- iii Además del estudio químico, se presenta la biogénesis del cromeno aislado de *Peperomia villipetiola*, vía policetidea, tal como ha sido determinado para otros cromenos en trabajos previos de investigación (Lock , O. 1988).

## **B. OBJETIVO**

El aislamiento e identificación (clásica y espectroscópica) de un constituyente de baja polaridad del extracto DCM-MeOH (2:1), para lo cual se eligió el segundo menos polar, obtenido de las hojas de la *Peperomia villipetiola*.

## **II. ESTUDIO BIBLIOGRAFICO**

## A. LA FAMILIA Piperaceae

La familia Piperaceae, pertenece a la orden Piperales, juntamente con las familias Chlorantaceae y Sauraceae, es considerada como una de las familias más primitivas entre las Angiospermas (Tayler & Hickey, 1984).

Comprende de 14 géneros y cerca de 2000 especies (Mabberley D. 1997), esta familia se encuentra extensamente distribuida en las regiones tropicales y subtropicales del planeta, la mayoría se encuentran en la parte central y norte de América del Sur, unas pocas especies son conocidas de África, Asia y Oceanía. Varias especies nativas son conocidas de las islas de India Oceánica, el Pacífico y el Caribe.

En el Perú se encuentran cerca de 320 especies (Andean Botanical information System)

Muchas de ellas crecen como hierbas, arbustos o pequeños árboles, también pueden ser epífitas, o suculentas.

*Peperomia* es el principal género de la familia de Piperaceae (algunos autores colocan este género en la familia Peperomiaceae). Otro importante género es *Piper*, como importante fuente económica de *Piper nigrum* fuente de pimienta blanca y negra. (Peperomia.net)

La etimología del nombre *Peperomia* está basado en la semejanza de sus flores con las de *Piper*. *Peper-omos* (del griego) que significa parecido a la pimienta. (Peperomia.net)

Algunos botánicos, reconocen dos familias *Piperaceae* y *Peperomiaceae*, como separadas bajo el orden de *Piperales*, sin embargo, la mayoría de los estudiosos de la familia, reconoce solamente una familia, la *Piperaceae*, posición tomada en la presente tesis. Algunos botánicos han reconocido 10-12 géneros (Steyematk A., 1984). (Tabla N°1)

Tabla N°1.- Clasificación morfológica de la familia Piperaceae

Géneros	Distribución
<i>Chavica</i>	Indomalasia
<i>Macropiper</i>	Polinesia
<i>Manekia</i>	Indias Occidentales
<i>Ottonia</i>	Sur América
<i>Peperomia</i>	Pantropical
<i>Piper</i>	Pantropical
<i>Piperanthera</i>	Indias Occidentales
<i>Pothomorphe</i>	América Tropical
<i>Sarcorrhachis</i>	Indias Occidentales, Centro y sur América
<i>Trianaeopiper</i>	Colombia y Ecuador
<i>Verhuellia</i>	Indias Occidentales

Algunos estudiantes investigadores de la familia tienden a considerar *Ottonia* y *Trianaeopiper* como sinónimos de *Piper*, sin embargo, consideran *Pothomorphe* y *Sarcorrhachis* como géneros distintos. (Steyematk A., 1984)

## B. TIPOS DE SUSTANCIAS QUÍMICAS PRESENTES EN LOS PRINCIPALES GÉNEROS DE LA FAMILIA PIPERACEAE: *Piper* y *Peperomia*

Los estudios y publicaciones realizados en la familia Piperaceae, se refieren frecuentemente a las género *Piper*, objetivo de investigación en varios laboratorios de investigación.

A pesar de que el género *Peperomia* tiene un mayor número de especies que el género *Piper*, ha sido poco estudiada. Sin embargo, las sustancias químicas identificadas como resultados de las escasas investigaciones realizadas en las especies de *Peperomia*, presentan una gran variedad estructural.

En el Perú, no se ha encontrado en la literatura, estudio químico alguno en el género *Peperomia*, mientras que desde el punto de vista farmacológico se han realizado algunos testes en ratones como cicatrizante de heridas, usando

el extracto crudo.(Vaisberg et al. 1997), en general, la familia Piperaceae presenta diversos tipos de bioactividad. (Sengupta & Ray, 1987)

Desde el punto de vista químico, dentro de la gran variedad de constituyentes químicos que han sido encontrados en la familia Piperaceae se tiene: mono y sesquiterpenos, fenil propanoides, pironas, polifenoles, secolignanas y alcaloides.

A continuación se presenta algunas estructuras de los géneros *Piper* y *Peperomia*, géneros representativos de esta familia.

## 1.- *Peperomia*

### 1.1.-Fenoles

*P. obtusifolia*. Tanaca, et al., 1997.

Las hojas fueron extraídas con MeOH, y la porción soluble en EtOAc, fue accionada, purificada y caracterizada, como fenoles.

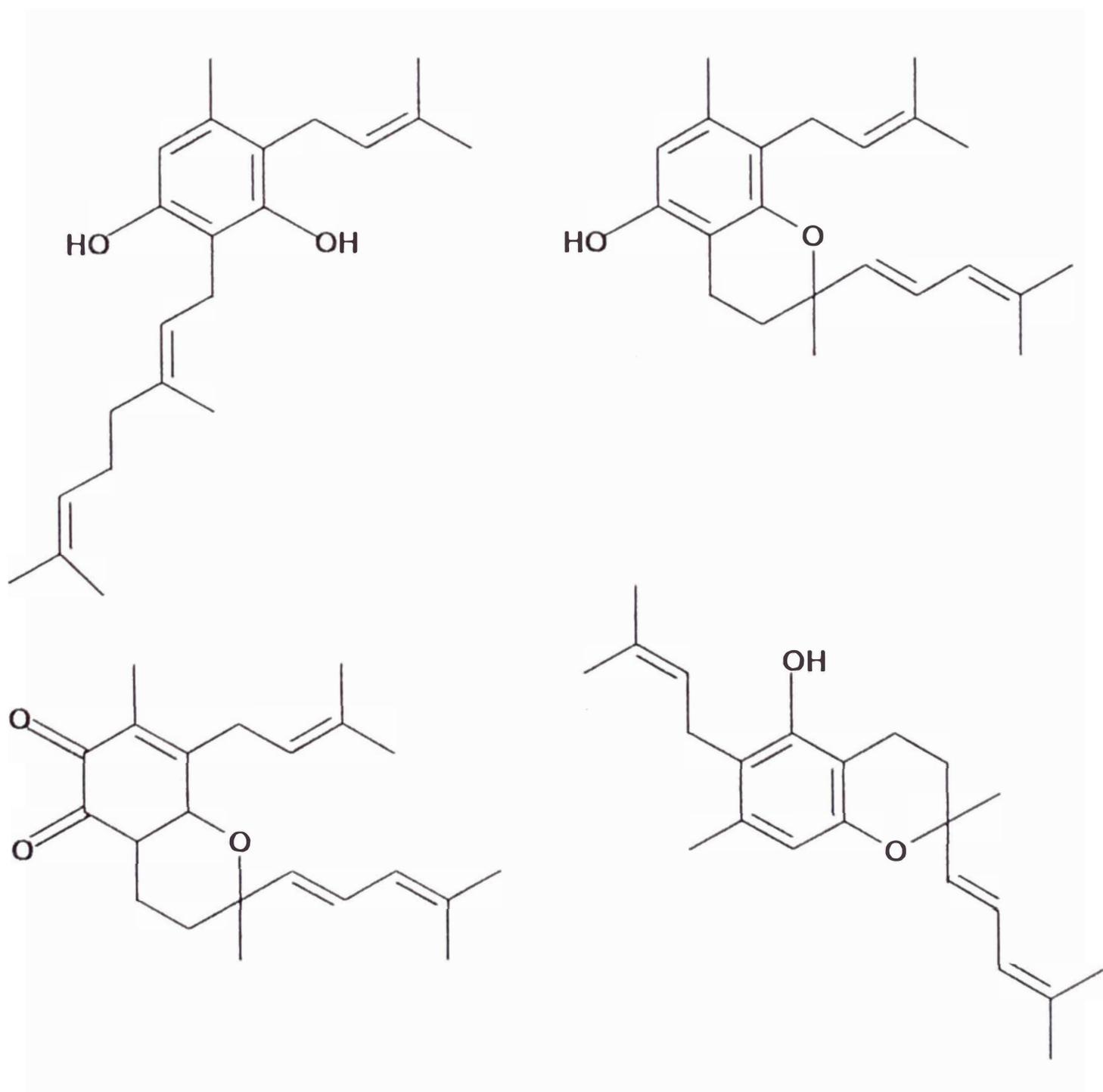


Figura N° 1.- Fenoles presentes en *P. Obtusifolia*

*P. galioides*. Mahiuo, et al., 1996 (1).

La planta entera fue extraída con Ep, DCM y MeOH.

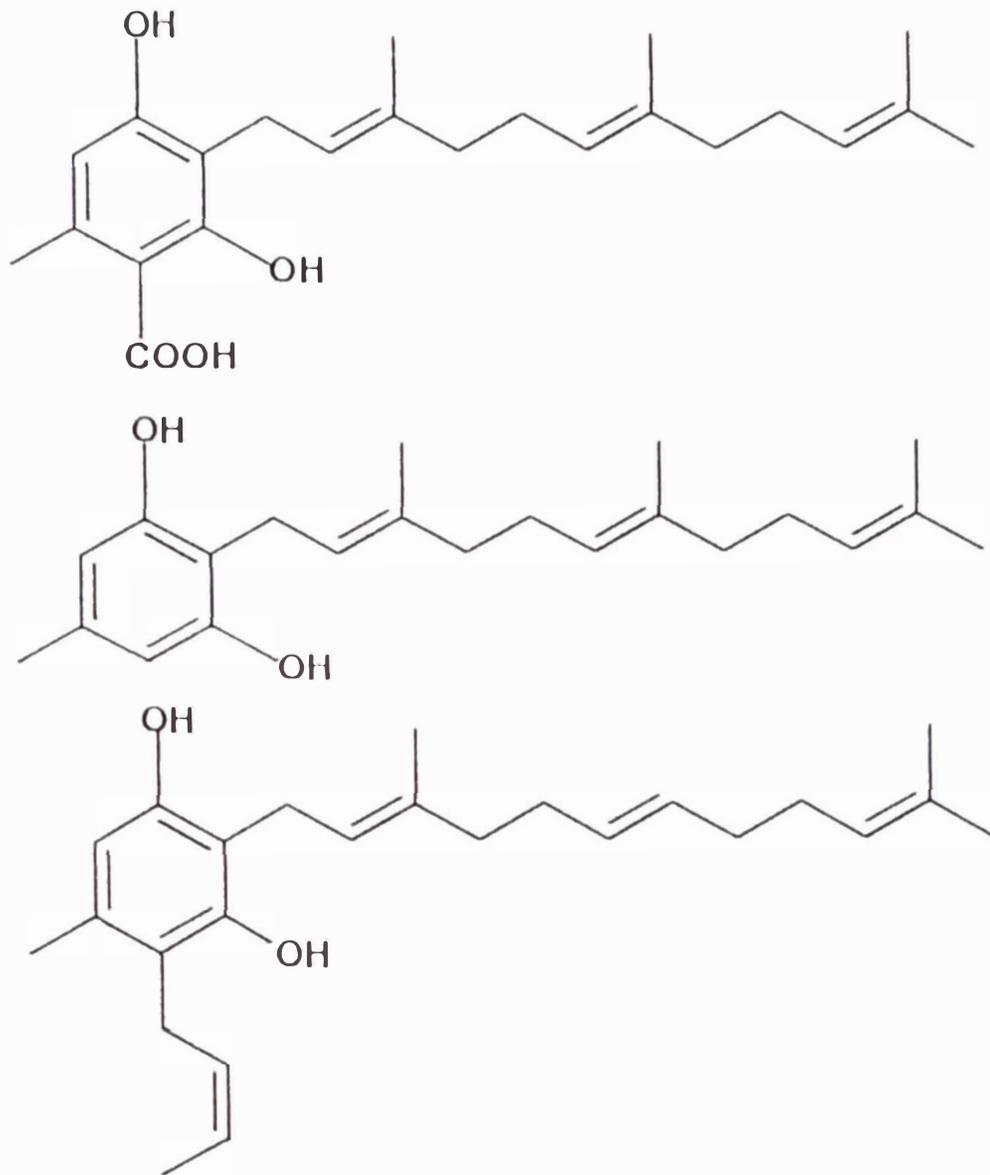
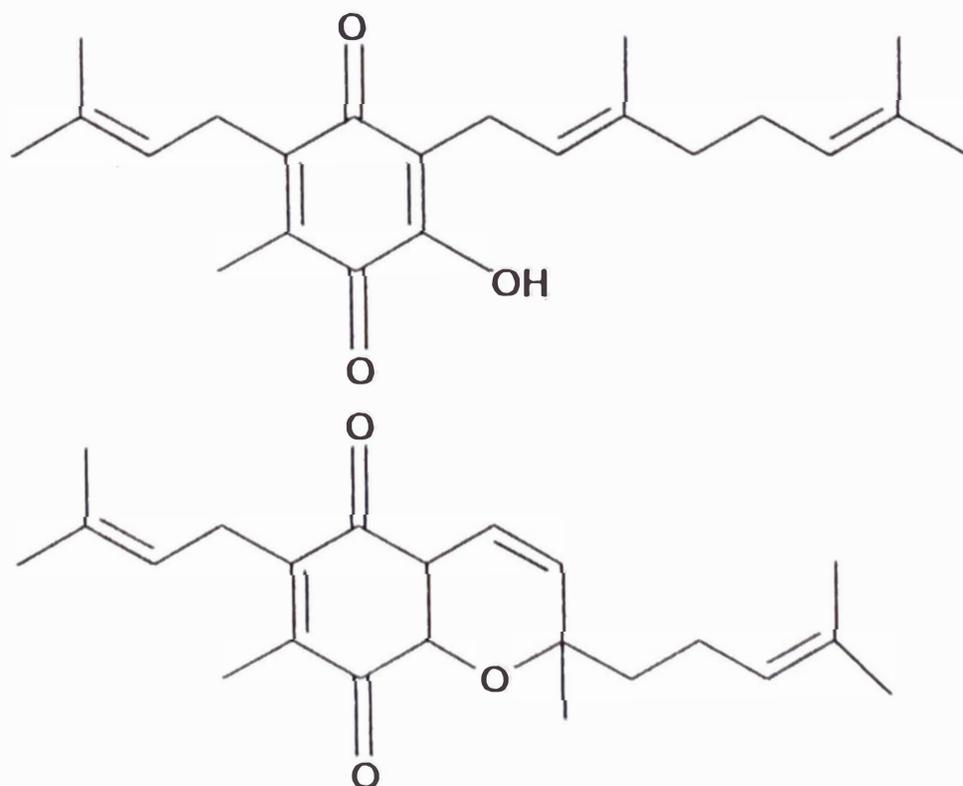


Figura N° 2.- Fenoles presentes en *P. galioides*

## 1.2.- Quinonas

*P. galioides*. Mahiuo, et al., 1996 (2).

La planta entera fue extraída con Ep, DCM y MeOH.



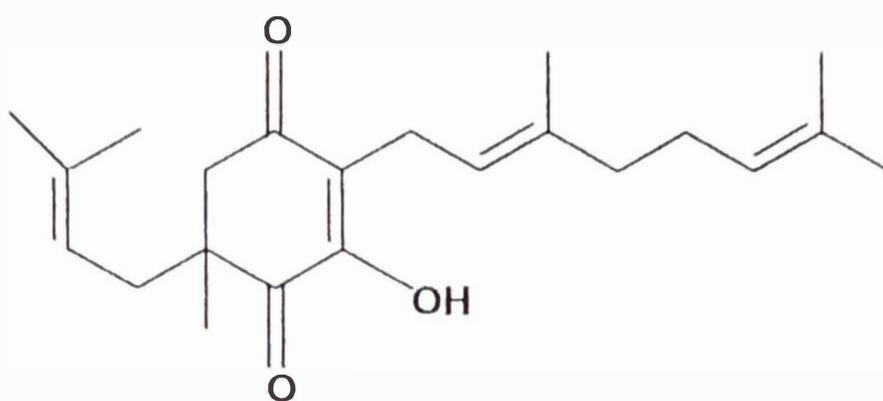


Figura N° 3.- Quinonas presentes en *P. galioides*

### 1.3.- Secolignanas

*P. dindigulensis*, Govindachari, et al., 1998.

La parte aérea fue extraída con EtOH.

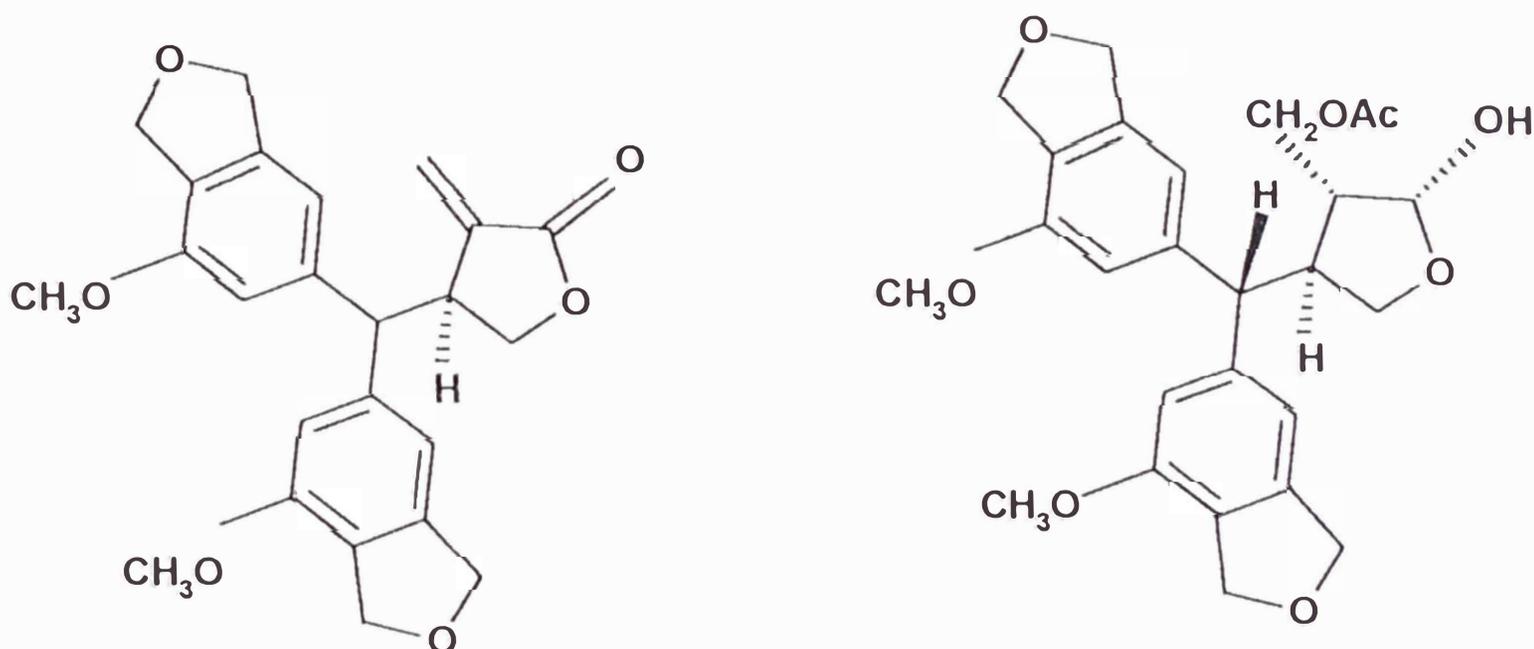


Figura N° 4.- Secolignanas presentes en *P. dindigulensis*

*P. glabella*, Monache & Compagnone, 1996.

La planta entera fue extraída con MeOH.

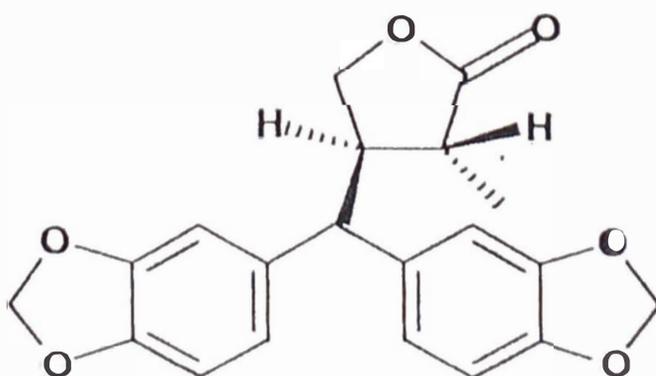


Figura N° 5.- Secolignana presente en *P. glabella*

#### 1.4.- Benzopirano prenilado

*P. clusiifolia*. Seeram, et al. 1998.

La planta entera fue extraída con n-hexano.

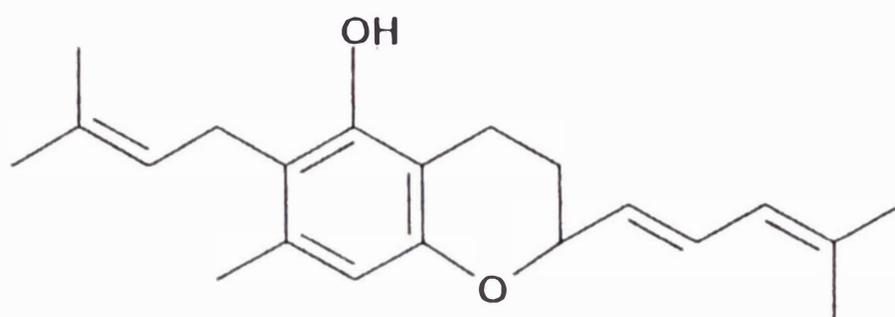


Figura N° 6.- Benzopirano presente en *P. clusiifolia*

#### 1.5.- Otros tipos de sustancias

*P. pellucida*, Bayma, et al. 2000 (1).

La parte aérea fue extraída con EtOH.

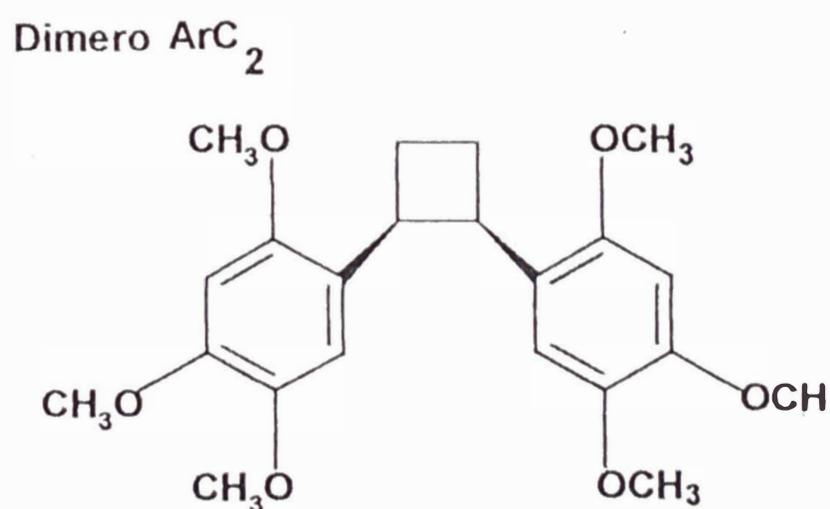


Figura N° 7.- Dimero presente en *P. pellucida*

*P. proctorii*, Seeram, et al. 2000 (2).

La planta entera fue extraída con n-hexano.

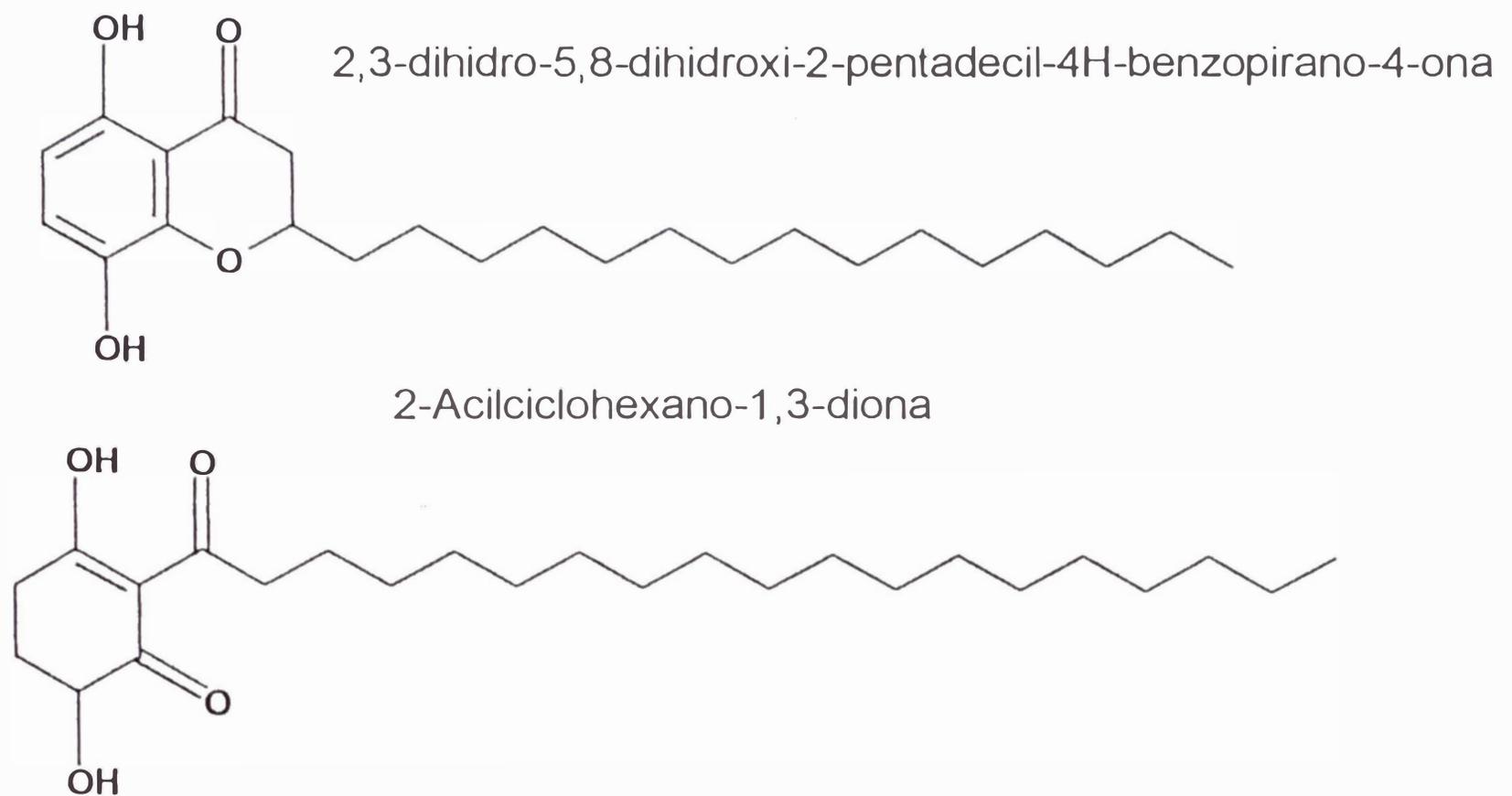


Figura N° 8.- Derivados de cetonas presentes en *P. Proctorii*

## 2.- Piper

### 2.1.- Amidas

*P. argyrophyllum*, Barneji & Nandi, 1988.

*P. nigrum*, Tunman et al., 1918.

#### Piperina

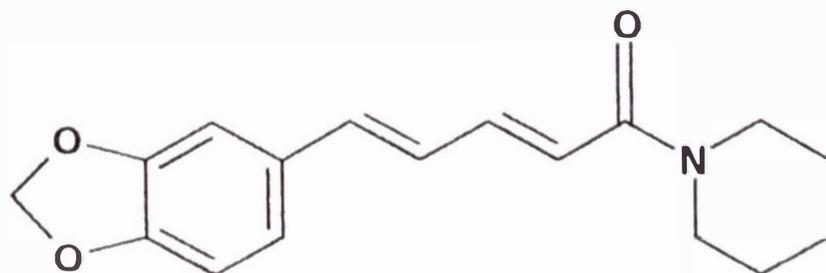


Figura N° 9.- Amida presente en *P. argyrophyllum* y *P. nigrum*

*P. guineense*, *P. Nigrum*, Miyakado et al., 1979

Pipericida

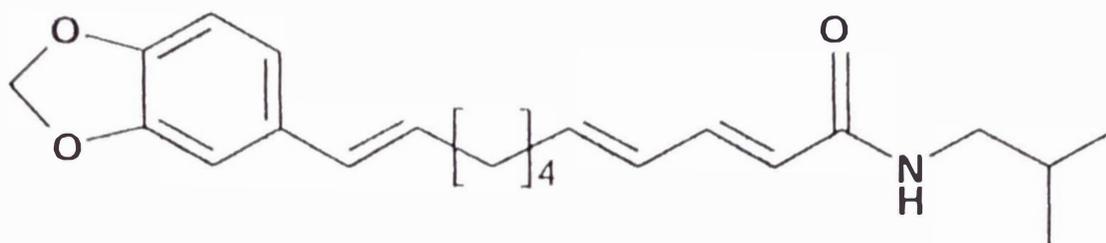
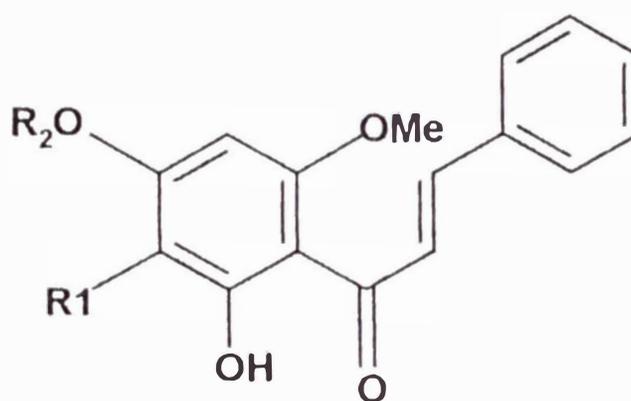


Figura N° 10 Amida presente en *P. guineense* y *P. nigrum*

## 2.2.- Chalconas y dihidrochalconas

*P. dilatatum*, Terreaux et al., 1998.

La parte aérea fue extraída con DCM y MeOH.



R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>

R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = H

R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>

Figura N° 11.- Chalconas presentes en *P. dilatatum*

*P. argyrophyllum*, Barneji & Nandi, 1998.

*P. nigrum*, Tunmann, 1918.

2',3'-dihidroxi-4',6'-dimetoxichalcona

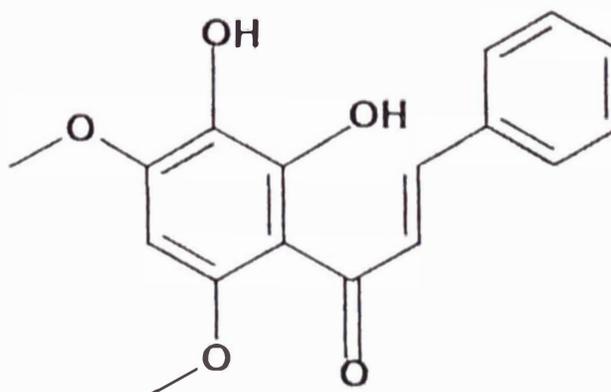


Figura N° 12.- Chalcona presente en *P. argyrophyllum*, y *P. nigrum*

*P. methysticum*, Som, et al., 1985.

Flavocaina

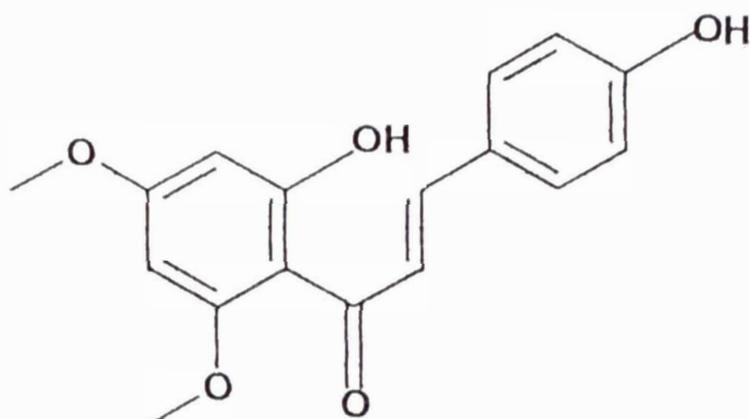
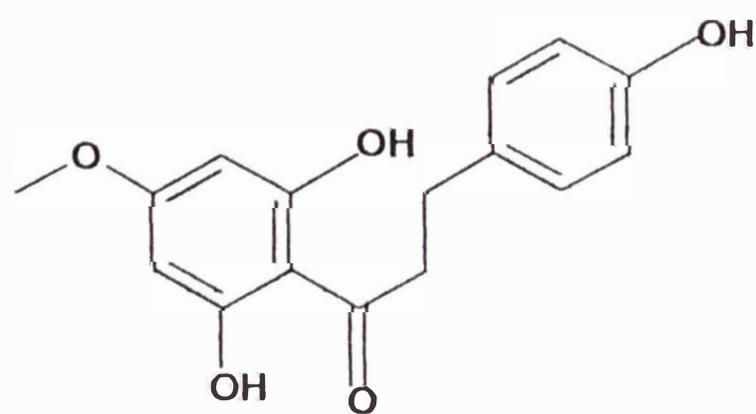
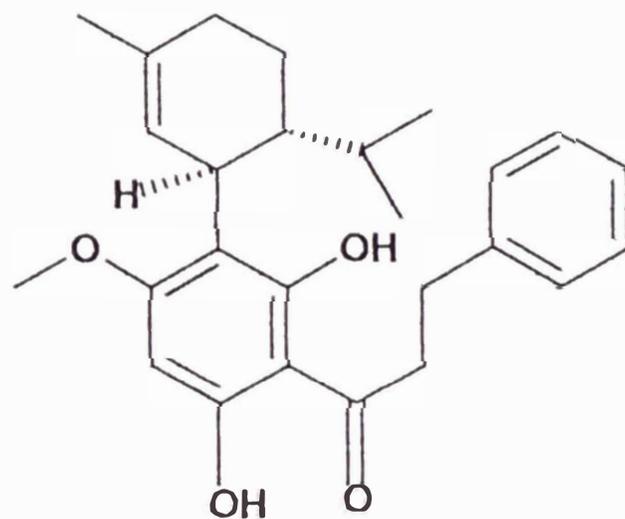


Figura N° 13.- Chalcona presente en *P. methysticum*

*P. aduncum*, Orjala et al., 1993.

Metilindaretina



*P. aduncum*, Orjala et al., 1994.

Asebogenina

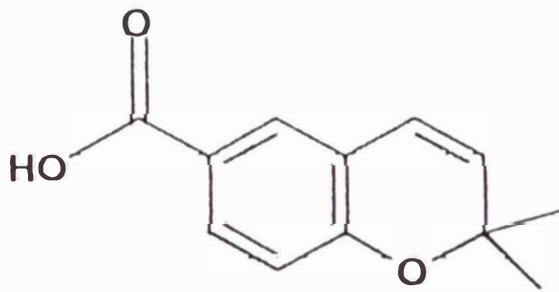
Figura N° 14.- Chalconas presentes en *P. aduncum*

### 2.3.- Cromenos

*P. aduncum*, Baldoqui, et al., 1999.

Las hojas fueron extraídas con MeOH, y la porción soluble en DCM fue fraccionada, purificada y caracterizada, obteniéndose cromenos y un ácido benzoico prenilado.

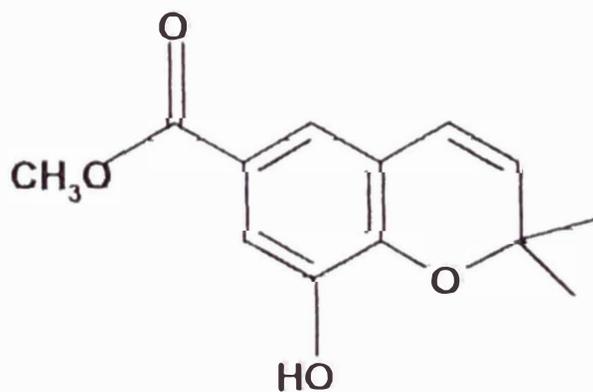
2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-ácido carboxílico.



*P. aduncum*, Orjala, et al., 1993.

Las hojas fueron extraídas con Ep.

Metil 2,2-dimetil-8-hidroxi-2H-1-cromeno-6-carboxilato



Metil 2,2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2H-cromeno-6-carboxilato

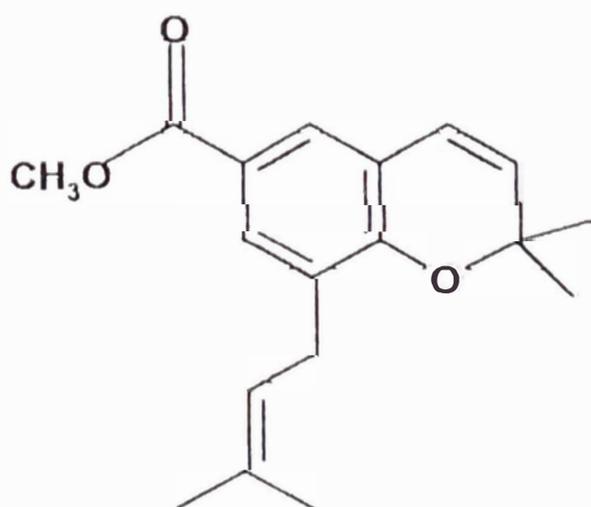


Figura N° 15.- Cromenos presentes en *P. aduncum*

## 2.4.- Esteroides y triterpenos

*P. hostmannianum*, Diaz, et al. , 1986.

Los tallos fueron extraídos con  $C_6H_6$ .

Sitosterol

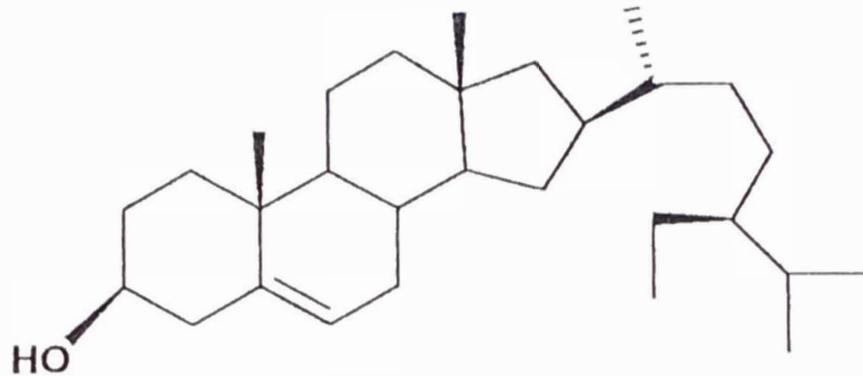


Figura N° 16.- Esterol presente en *P. hostmannianum*

*P. arantiacum*, Singh et l., 1976.

*P. methysticum* , Graesa & Ruff, 1986.

Colesterol

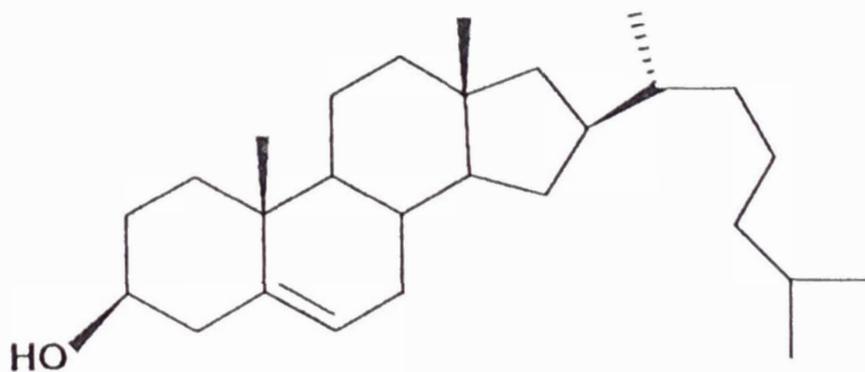
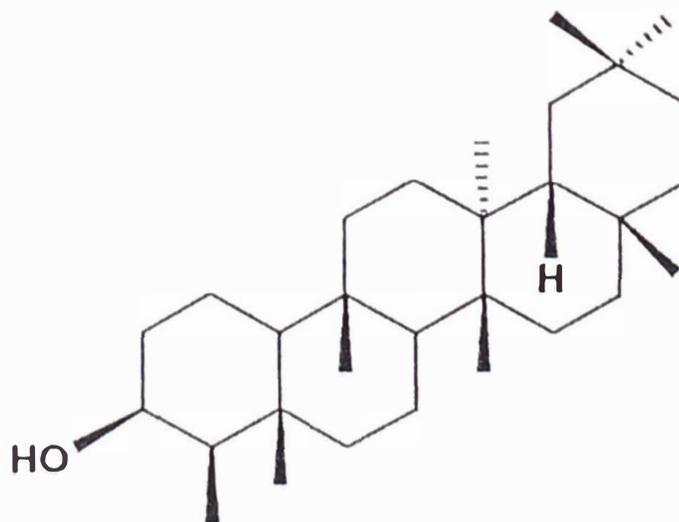


Figura N° 17.- Esterol presente en *P. arantiacum* y *P. methysticum*

*P. arantiacum*, Barneji & Das, 1977.

Friedelano



Friedelina

Figura N° 18.- Esterol presente en *P. arantiacum*

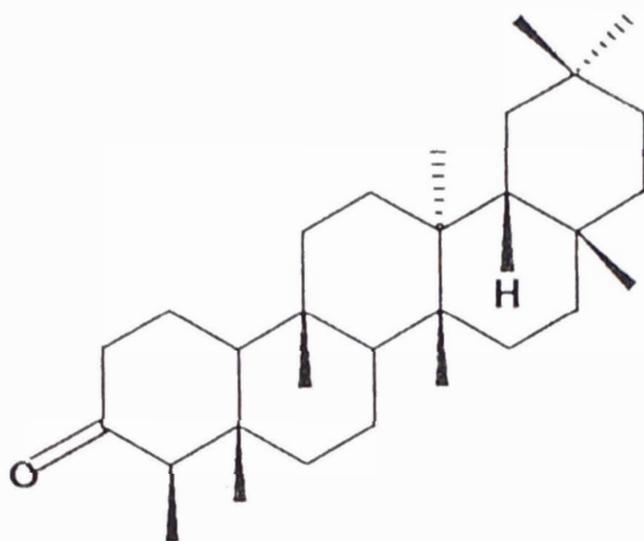


Figura N° 19.- Triterpeno presente en *P. arantiacum*

## 2.5.- Fenilpropanoides

*P. regnelli*, Benevides et al., 1999.

Las raíces fueron extraídas con EtOAC.

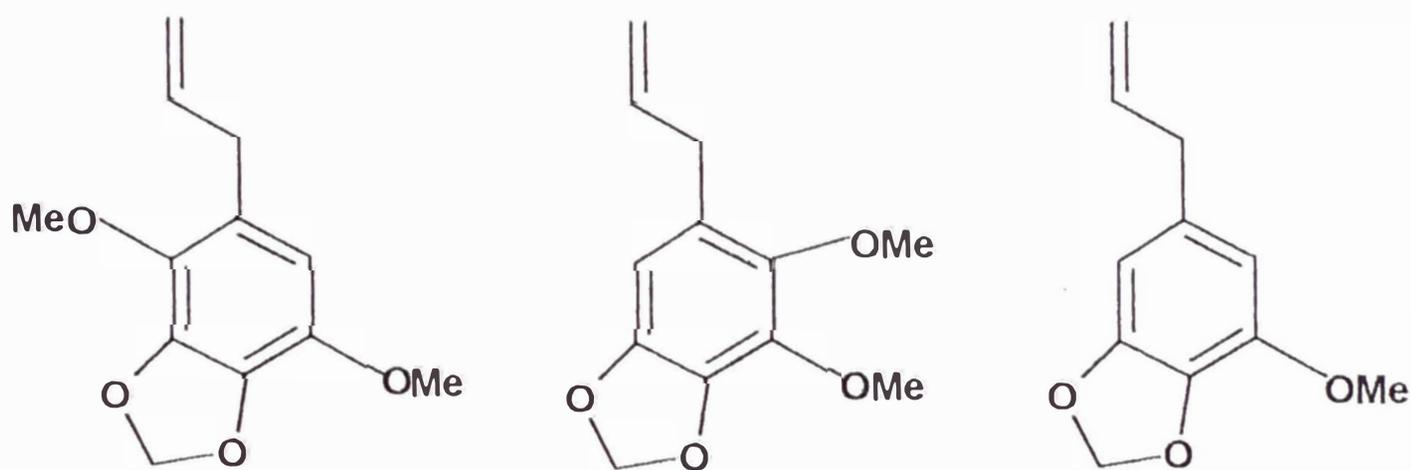


Figura N° 20.- Fenilpropanoides presentes en *P. regnelli*

## 2.6.- Flavonoides

*P. hostmannianum*, Diaz, et al., 1986.

Los tallos fueron extraídos con  $C_6H_6$ .

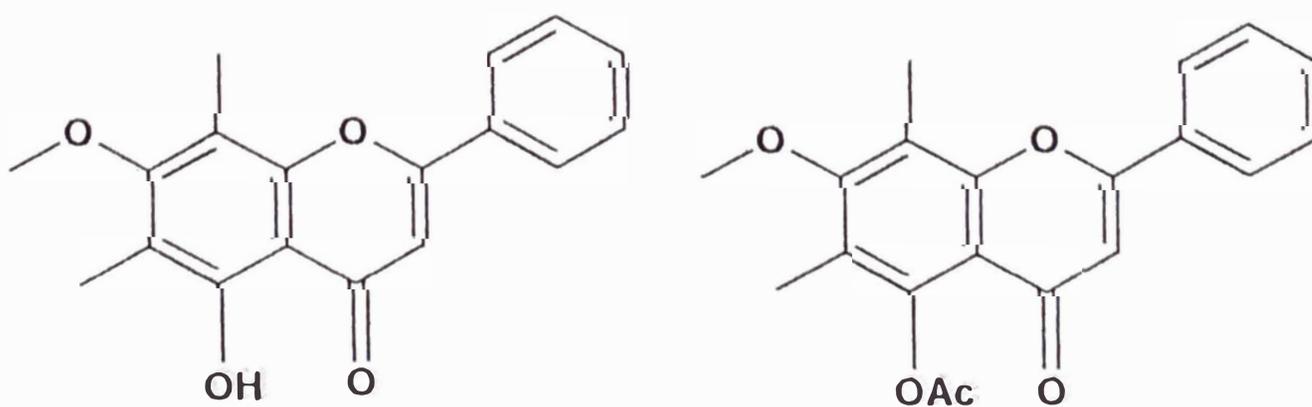


Figura N° 21 Flavonoides presentes en *P. hostmannianum*

## C. ESTUDIOS QUÍMICOS PRECEDENTES

### 1.- Cromenos

Cromeno es un producto natural que se ha encontrado en algunas especies de Rutaceae, Liliaceae, Ciperaceae, y Piperaceae (Figura N° 22), y principalmente en ciertas tribus de las Asteraceae entre las cuales parecen ser exclusivos de las Asterae, Eupatoriae, Heliantheae, Inuleae y Senecioneae. (Proksch, P. & Rodriguez, E., 1983)

Estos compuestos se encuentran presentes generalmente en hojas y tallos y menos comúnmente en raíces habiéndose encontrado en los primeros, hasta en un 5% sobre el peso seco. (Lock de Ugaz, 1988)

Como ejemplo el cromeno:

#### 2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-ácido carboxílico

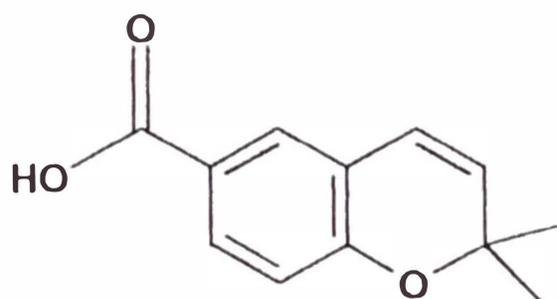


Figura N° 22.- Cromeno presente en *P. aduncum*, Baldoqui, et al., 1999

### 2.- Procedimientos experimentales tomados de referencias

De la revisión bibliografía realizada, aquí se resume el trabajo de investigación, realizado por Baldoqui D. et al. (1999) "A chromene and prenylated benzoic from *Piper aduncum*" publicado en la revista de investigación en productos naturales "Phytochemistry", en castellano el título es "Un cromeno y un ácido benzoico prenilado" cuyo procedimiento y resultados se tomaran de referencia principal en la tesis.

Se presentan dos referencias mas, Díaz D. et al. (1987) y Mahiou, V. et al. (1987) que proporcionaron datos experimentales y espectroscópicos importantes, que complementaron a los de Baldoqui.

Con la asesoría del Dr. Asociado Massuo Jorge Kato, profesor de los Institutos de Química de la Universidad de Sao Paulo, de la Universidad Estadual

Paulista de Araraquara, Sao Paulo – Brasil, y secretario del Área de química de Productos Naturales de Sociedad Química del Brasil y Co-asesoría de la M.sc. Virginia Torpoco, Asociada de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería

### 2.1.- Procedimiento de Baldoqui D. et al. (1999)

- Muestra utilizada: Hojas de *P. aduncum*.
- Procedimiento experimental:
  - i Extracción Sólido-Líquido (Obtención del extracto bruto orgánico).- Las hojas de *P. aduncum* se extraen con MeOH, y la parte soluble en DCM, se concentra en rotavapor.
  - ii Separación: El extracto se solubiliza en CHCl<sub>3</sub> y se extrae con NaHCO<sub>3</sub> (6x50mL). La fracción acuosa se neutraliza con HCl (6N) y es sometida a partición con EtOAc, (3x100mL). La fase orgánica fue llevada a rotavapor, obteniéndose un residuo.
  - iii Purificación: Esta fracción es sometida a cromatografía de capa fina preparativa, usando como eluyente CHCl<sub>3</sub>:MeOH (98:2) y HOAc (1%), se obtuvo un cromeno.
- Identificación espectroscópica: Se usaron técnicas de Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C (los datos están en la Tabla N° 2), donde los datos están expresados en desplazamientos químicos (ppm) y la constante de acoplamiento *J* en Hz. Se uso CDCl<sub>3</sub> como solvente y TMS como referencia, por Espectrometría de masas se determinó la fórmula molecular C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>. El espectro de IR reveló bandas de absorción en 2400-3400/1680 y 1600/1445 cm<sup>-1</sup> característicos de ácido carboxílico y grupos aromáticos, respectivamente.
- Resultado: Los datos obtenidos revelaron un cromeno 2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-ácido carboxílico.

### 2.2.- Procedimiento de Díaz D. et al. (1987). "Un cromeno, un metil hidroxibenzoato isoprenilado y un c-metil flavanona de los tallos de *Piper hostmannianum*"

- Muestra utilizada: Los tallos de *Piper hostmannianum* son secados y pulverizados.

- Procedimiento experimental:
  - i Extracción Sólido-Líquido (Obtención del extracto bruto orgánico).-  
Los tallos secos y pulverizados de *Piper hostmannianum* se percolan con  $C_6H_6$  a temperatura ambiente.
  - ii Separación y purificación: El extracto se aplica a una columna cromatográfica (sílica gel), se usa como eluyente  $Ep-CHCl_3$  (1:1).
- Identificación espectroscópica: Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de  $^1H$  y  $^{13}C$ , (los datos están en la tabla N° 3), donde los datos están expresados en desplazamientos químicos (ppm) y la constante de acoplamiento  $J$  en Hz. Se usó  $CDCl_3$  como solvente y TMS como referencia.  
El espectro de  $IR_{\nu_{max}}^{film}$  reveló bandas de absorción en 3040, 2980, 2840, 2820, 1720, 1645, 1610, 1580, 1490, 1465, 1445, 1385, 1370, 1320, 1290, 1275, 1230, 1200, 1170, 1125, 1090, 990, 930, 910, 880, 850, 840, 760.  
 $UV\lambda_{max}^{MeOH}$  nm ( $\epsilon$ ): 322, 290, 243, (1332, 2058, 16955) .  
EIMS  $m/z$  (intensidad relativa):  $218[M]^+$  (24), 204 (12), 203(100), 187(4), 179(6), 159(4), 144(7), 137(12), 115(5), 109(5), 105(5).
- Resultados: Los datos obtenidos revelaron un Metil 2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6 carboxilato.

### 2.3.- Procedimiento de Mahiou, V. et al. (1995). " Piperogalin, un nuevo difenol prenilado de *Peperomia galioides*"

- Muestra utilizada: La Planta entera *Piper galioides*.
- Procedimiento experimental:
  - i Extracción: Sólido-Líquido: (Obtención del extracto bruto orgánico).-  
La planta seca y pulverizada fue extraída en soxhlet con  $Ep$ .
  - ii Separación: El extracto bruto se disuelve en DCM y se extrae con una solución acuosa de 1N  $NH_3$ . La fase acuosa es acidificada con 1N  $HCl$  y extraído con  $Et_2O$ .
- Identificación espectroscópica: Se usaron técnicas de Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de  $^1H$  y  $^{13}C$ , (los datos están en la tabla N° 8), donde los datos están expresados en desplazamientos químicos (ppm) y

la constante de acoplamiento  $J$  en Hz. Se usó  $\text{CDCl}_3$  como solvente y TMS como referencia.

El espectro de IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$  reveló bandas de absorción en 3400, 1630, 1452, 1380, 1268.

UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  nm ( $\epsilon$ ) : 204, 215, 256, 281 (22908, 22387, 5754, 2570)

EIMS m/z (intensidad relativa): 372  $[\text{M}]^+$  (21), 344 (18), 328(10), 217(96), 191(84), 175 (47), 137(100), 121(48).

- Resultados: Los datos obtenidos revelaron un ácido benzoico prenilado.

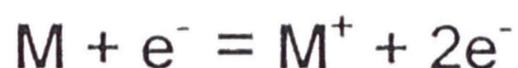
**Tabla N°2.- Comparación de los tres procedimientos y comentario de cada etapa adoptada en la tesis.**

Etapas del procedimiento	Baldoqui D. et al. (1999)	Díaz D. et al. (1987)	Mahiou V. et al. (1995)	Eta p a a d o p t a d a e n l a t e s i s	Comentarios
Extracción	Sólido-Líquido con MeOH (la parte soluble en DCM se concentra).	Sólido-Líquido con Ep, se concentra.	Sólido-Líquido con C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> , se concentra.	Variación de la extracción Sólido-Líquido Baldoqui D.	Sólido-Líquido con DCM:MeOH (2:1), se concentra.
Separación	Líquido- Líquido con NaHCO <sub>3</sub> , (antes el extracto se solubiliza en CHCl <sub>3</sub> ) y la fase acuosa se neutraliza con HCl (6N)/ Partición con EtOAc.	Cromatografía en Columna (CC)/eluentes Ep-CHCl <sub>3</sub> (1:1).	Líquido- Líquido con 1N NH <sub>3</sub> (ac), (antes el extracto se solubiliza en DCM) y la fase acuosa se neutraliza con 1N HCl / partición con Et <sub>2</sub> O.	Variación de la separación Líquido-Líquido de Baldoqui D. Y Diaz D.	Líquido-Líquido con DCM (antes el extracto esta solubilizado en MeOH)
Purificación	Cromatografía de capa fina(CCF)/eluentes CHCl <sub>3</sub> :MeOH (98:2), HOAc 1%			La purificación se realizó similar a la de Baldoqui D. y Mahiou V. juntos.	CC y CF / eluentes gradiente de EtOAc / Hexano (ver sección D)

### 3.- Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos

#### 3.1.- Espectrometría de Masas

En un espectrómetro de masas (EI), la muestra es bombardeada por un haz de electrones. El potencial de ionización de la mayoría de los compuestos orgánicos es aproximadamente de 10 eV y con esta energía mínima el proceso inicial es la producción de iones moleculares con una carga:



Dando un espectro de masas constituido casi exclusivamente por un pico, que corresponde a la masa de la molécula inicial. Si se aumenta la energía del haz de electrones se obtiene un ion con mayor excitación, que se fragmenta en diversas formas, que depende de la naturaleza del ion molecular.

En la mayoría de las aplicaciones se da al haz de electrones una energía de 50 a 70 eV obteniéndose así espectros de mayor información.

Seguidamente un campo electrostático acelera la mezcla de iones resultantes, conduciéndolos hacia el separador (quadripolo), donde de acuerdo a su relación de masa/carga,  $m/z$ , serán separados, que luego serán, colectados, detectados y su señal amplificada.

El espectrometro de masas, proporciona así los datos retratados por computador en la forma de gráfico de barras y tablas, donde la señal (o pico) más intensa en el espectro, se denomina "pico base" se le asigna un valor de 100%, y las intensidades de los otros picos, incluyendo el del ion molecular, son reportados como porcentajes del pico base.

La interpretación de un espectro de masas requiere la comprensión del proceso de ionización que ocurre, aún cuando algunos de estos fenómenos han sido tratados teóricamente, en la mayoría de los casos primero deben observarse los patrones de fragmentación y después tratar de explicar como y porque se presentan.

De esta manera el espectro de masas provee información muy valiosa, entre ellas, dos de mayor importancia son:

- i El peso molecular de la sustancia analizada.

- ii Información, que hace posible deducir la estructura de la sustancia problema, a partir de análisis cuidadoso de los diversos fragmentos que constituyen el espectro de masas.

- Cromatografía de Gas-Espectrometría de Masas (CG-MS)

El espectrómetro de masas es muy valioso para identificar sustancias puras, pero es menos satisfactorio para mezclas.

El acoplamiento del cromatógrafo de gases, el cual es una previa separación, muy aconsejable, con un espectrómetro de masas, es una combinación extremadamente útil.

En cromatografía de gases, una vez que la muestra se inyecta, se mezcla con un gas inerte (fase móvil), que la arrastra a la columna (fase estacionaria), donde los componentes de la muestra se separan a medida que pasan por ella, luego uno tras otro pasan a través de un detector que manda una señal al registrador.

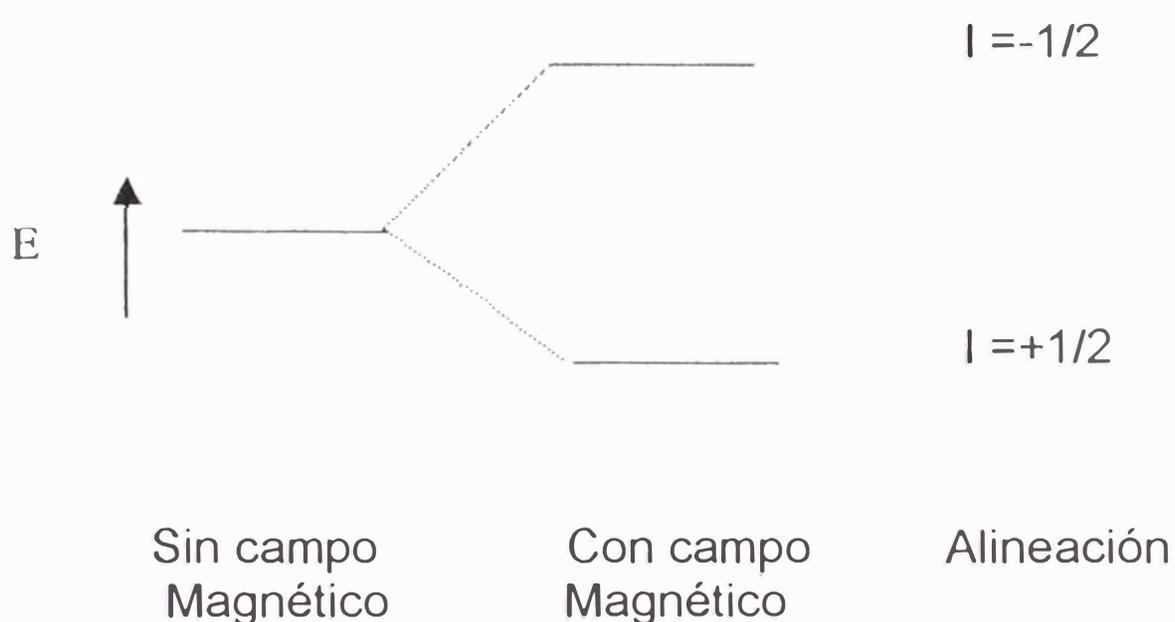
En CG-MS, la muestra, como se nombró en el párrafo anterior, pasa a través de un sistema de inyección, y es introducida en una columna conteniendo una fase estacionaria. En este proceso el uso de temperaturas convenientes en el compartimento de inyección de muestras y de la columna posibilita la vaporización de estas sustancias que, de acuerdo a sus propiedades y a las de la fase estacionaria, son retenidas por tiempos determinados y llega a la salida de la columna en tiempos diferentes, que enseguida son enviadas al espectrómetro de masas.

Durante el análisis, la temperatura puede permanecer constante (cromatografía gaseosa isotérmica) o sufrir una variación (cromatografía gaseosa con temperatura programada). La programación de temperatura, es significativamente importante en cromatografía gaseosa, ya que mejora la separación y disminuye el tiempo de análisis.

### 3.2.- Espectroscopía Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear del $^1\text{H}$ , RMN $^1\text{H}$

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  es básicamente una forma de espectrometría de absorción.

Cuando se coloca una muestra bajo condiciones apropiadas en un campo magnético, el hidrógeno con número de spin ( $I$ ) = 1/2, puede adoptar dos orientaciones posibles con relación a este campo, alineado al campo magnético, que es la orientación de menor energía, que por convención se representa por  $I = +1/2$ , u opuesto al campo, de mayor energía  $I = -1/2$ .



En estas condiciones, lo que se hace básicamente en resonancia magnética nuclear, es medir la energía necesaria para pasar el núcleo del nivel mas bajo al nivel mas alto, a este proceso se denomina "resonancia magnética", o se puede decir también que el núcleo resuena a la frecuencia de resonancia adecuada.

En analogía a otras formas de espectrometría en que se miden las mudanzas de energía electrónica o vibracional-rotacional.

El espectro de RMN constituye la gráfica de la frecuencia de los picos de absorción (expresado en unidades de  $\delta$ , en partes por millón-ppm) en función de las intensidades de tales señales.

La interpretación de un espectro de RMN involucra el análisis de las cuatro principales características que presentan estos espectros:

- i) Número de señales, que nos indican cuantas "especies" de protones diferentes hay en la molécula.

- ii Las posiciones de las señales, que nos dan información acerca de los ambientes electrónicos de cada especie de protón.
- iii Las intensidades de las señales, que nos revelan cuantos protones de cada especie existen.
- iv El desdoblamiento de una señal en varios picos, que nos informa sobre el ambiente de un protón, en lo que respecta a otros que se encuentren en el vecindario.

Un espectro se considera plenamente identificado cuando cada una de las señales que aparecen en el espectro se le puede asignar a uno o un grupo de hidrógenos equivalentes, de la molécula, satisfaciendo requerimientos de desplazamiento químico, integración e interacción spin-spin.

Algo importante que nombrar es que en la práctica, se puede conservar la frecuencia de radiación constante y variar la intensidad del campo magnético, hasta obtener un valor de energía necesario para invertir el alineamiento del protón, o viceversa, es decir, mantener fijo el campo magnético y variar la frecuencia de la radiación electromagnética. Ambos sistemas dan los mismos resultados.

### 3.3.- Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear del $^{13}\text{C}$ , RMN $^{13}\text{C}$

Los desplazamientos químicos en los espectros de resonancia magnética nuclear del  $^{13}\text{C}$  ( $I=1/2$ ), aparecen esencialmente por las mismas razones que en los espectros de RMN  $^1\text{H}$ .

Una característica del el isótopo  $^{13}\text{C}$  es que su abundancia natural es 1,1%, esta deficiencia trae como consecuencia dos desventajas:

- i No se observa desdoblamientos  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  en los espectros de RMN $^{13}\text{C}$ , debido a que la posibilidad de encontrarse dos átomos  $^{13}\text{C}$  en una misma molécula es poca, y aun más encontrarlos vecinos.
- ii Para obtener un buen espectro de RMN $^{13}\text{C}$  se necesita una mayor cantidad de masa que para obtener uno de  $^1\text{H}$ .

El espectro de RMN $^{13}\text{C}$  proporciona una mayor aproximación al esqueleto carbonado de los compuestos orgánicos, razón por la cual es considerado como complemento perfecto de RMN  $^1\text{H}$  en la determinación

estructural de un compuesto, debido a que en la mayoría de los espectros se observan señales individuales para cada tipo de carbono en una sustancia. En otras palabras, en ausencia de elementos de simetría, una molécula orgánica proporciona en la gran mayoría de los casos tantas señales como carbonos tenga y esto es considerado ventaja muy importante.

Otra ventaja de un espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  respecto a la del  $^1\text{H}$ , es que la mayoría de las señales de compuestos orgánicos aparecen en un amplio rango de 0 a 250 ppm ( $\delta$ ) hacia campos menores que la señal del tetrametilsilano (TMS, esta sustancia se usa como patrón interno), evitando señales superpuestas.

En general el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da aproximadamente la misma especie de información que RMN  $^1\text{H}$ ,

- i El número de señales, indica cuantos carbonos diferentes o cuantos conjuntos de carbonos equivalentes existen en la molécula.
- ii El desplazamiento químico indica la hibridación de cada carbono.
- iii El desplazamiento químico nos informa sobre el ambiente electrónico de cada carbón respecto a otros carbonos u otros grupos característicos adyacentes.

En la práctica se obtiene los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ , desacoplados, es decir, sin desdoblamiento de sus señales por los hidrógenos enlazados a él, debido a que las señales del espectro de Resonancia Magnética Nuclear del  $^{13}\text{C}$  acoplado, muchas veces se superponen, dificultando la interpretación. Este desacoplamiento se obtiene por aplicación de una segunda radiofrecuencia.

El espectro de  $^{13}\text{C}$ , si bien es cierto, nos proporciona la mayoría de las veces, el número de carbonos que tiene una molécula, sin embargo, no nos permite diferenciar C, CH, CH<sub>2</sub>, y CH<sub>3</sub>, uno de otro, por este motivo, se realiza una serie de variaciones, que se basa en la transferencia de polarización, que nos permite obtener mas información, por ejemplo:

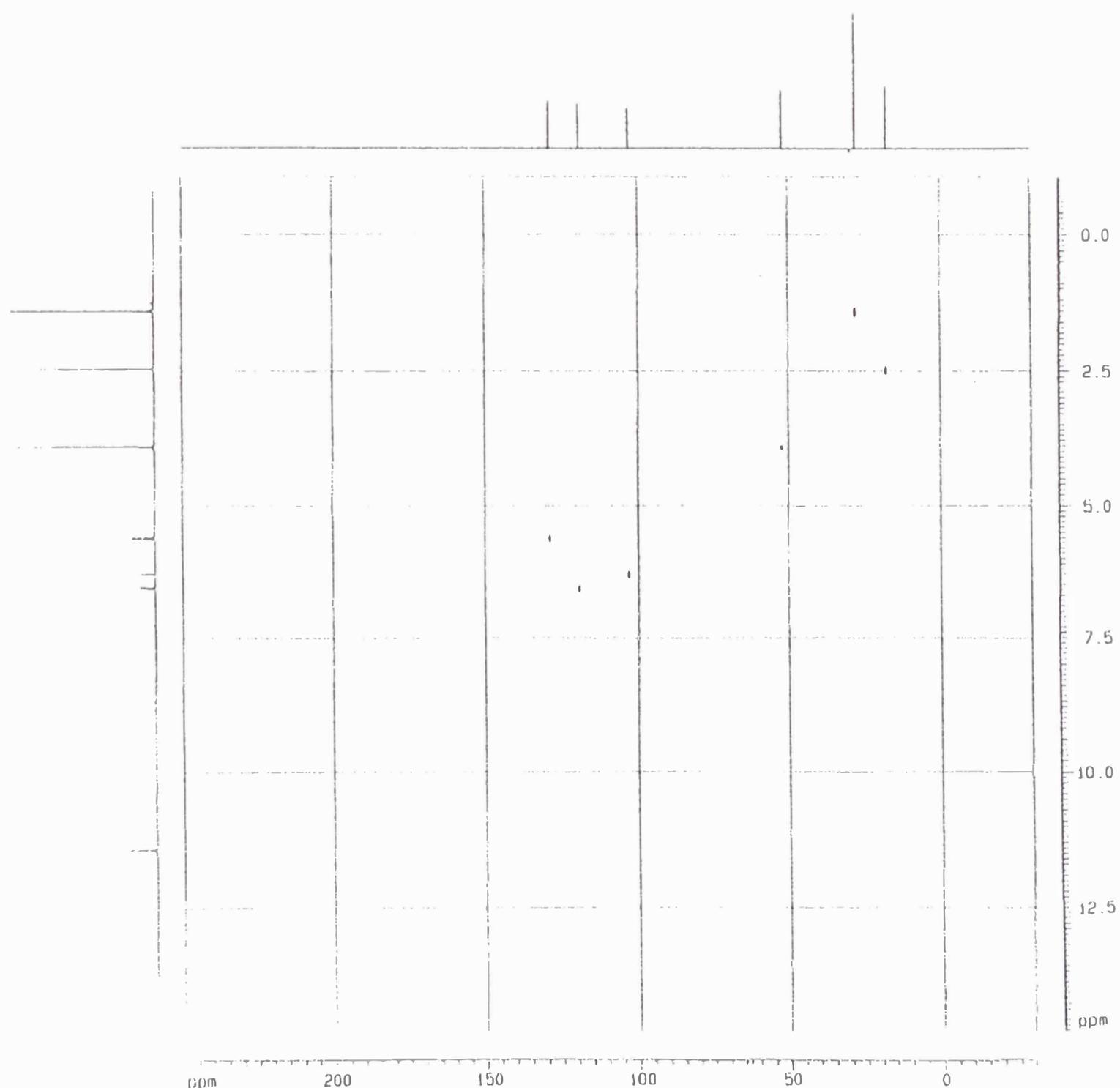
- i.- RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° (“Distorsionless enhanced by polarization transfer”)-  
Transferencia de polarización aumentada y no distorsionada.

Este espectro nos permite diferenciar CH, y CH<sub>3</sub> de CH<sub>2</sub>, donde los metilos y metinos aparecen como señales positivas, mientras metilenos aparecen negativos.

### 3.4.- Correlación de desplazamiento químico heteronuclear, HETCOR

HETCOR, es uno de los espectros más útiles de 2 dimensiones, que relaciona los picos de un espectro  $^1\text{H}$  con los picos de un espectro  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado, mostrando a los hidrógenos que están ligados directamente a cada carbono. ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )

El siguiente espectro HETCOR pertenece a la sustancia aislada denominada PVL1, de la *Peperomia villipetiola*, la cual se muestra señales, que indican correlaciones  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , y que en la práctica es determinada como la intersección de la línea horizontal del pico o multiplete del hidrogeno y de la línea vertical a partir del pico de  $^{13}\text{C}$ .



Espectro N° 7.- Espectro HETCOR (300MHz y 75 MHz) de *Peperomia villipetiola*

En espectroscopia de 2 dimensiones, los experimentos consisten en una secuencia de pulsos, que consisten en periodos de preparación, evolución y detección.

En HETCOR, al espectrómetro se le da como parámetro una constante de acoplamiento ( $J$ ) generalmente 145Hz.

Durante una secuencia de pulsos se focaliza este valor escalar de acoplamiento heteronuclear, el primero de varios pulsos ( $180^\circ$ ) es dirigido sobre el  $^{13}\text{C}$ , de modo que el espectro muestra todas las señales  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , cuya constante de acoplamiento es igual o aproximadamente a la  $J$  en uso.

### 3.5.- Correlación Heteronuclear de Múltiples Enlaces, HMBC.

HMBC, es un espectro también de 2 dimensiones, de gran sensibilidad que detecta acoplamientos entre núcleos de hidrogeno y carbono (también puede ser el  $^{15}\text{N}$ ) separados por más de un enlace, es decir:

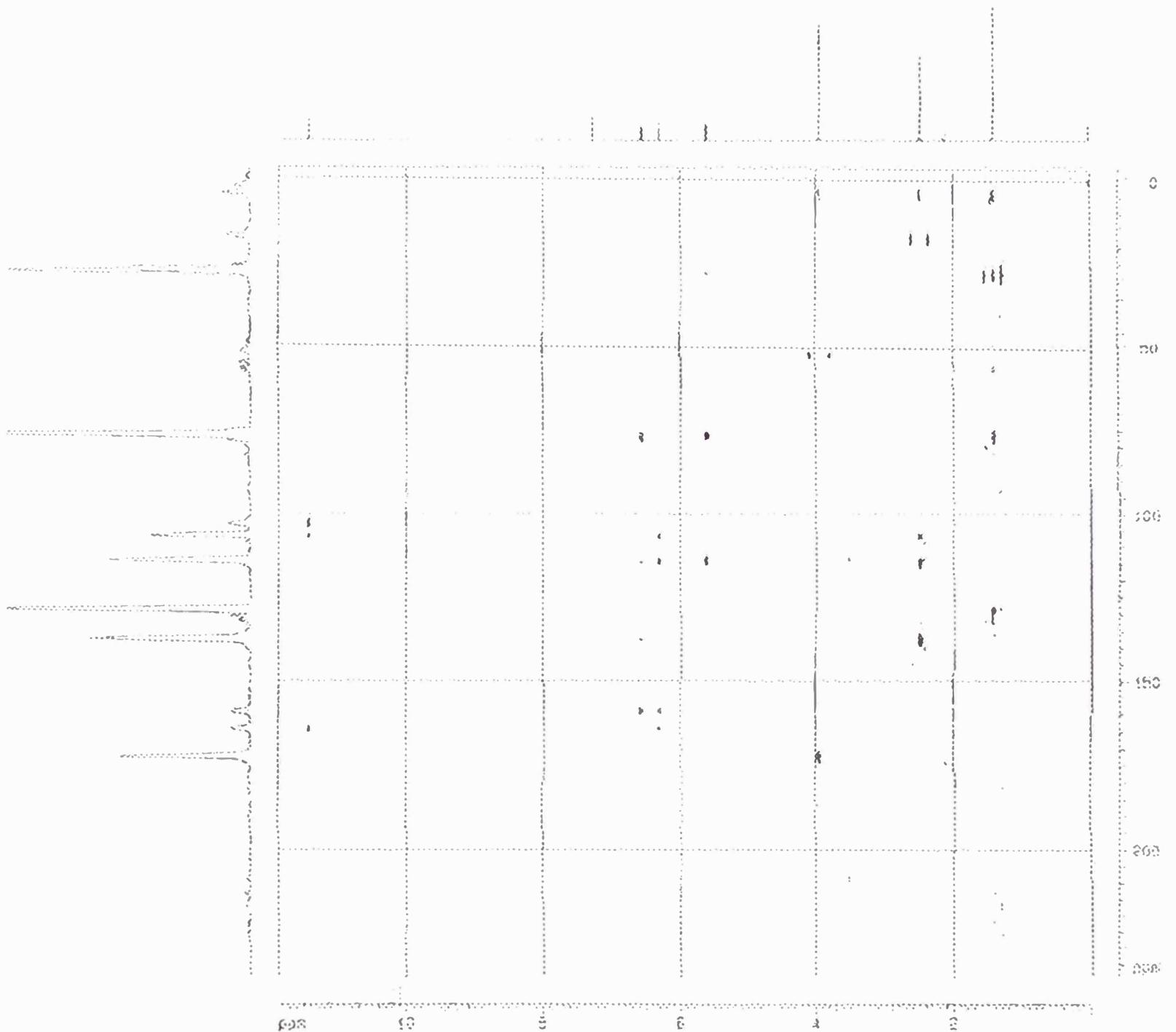
$${}^n J_{\text{CH}}, \quad n=2 \text{ o } 3,$$

Donde: C-H, representa al  $^{13}\text{C}$  y al  $^1\text{H}$ , respectivamente, separados por  $n$  enlaces.

$n$  = número de enlaces que separan al  $^{13}\text{C}$  y al  $^1\text{H}$ .

De forma similar al HETCOR, la correlación es mostrada por la intersección de la línea vertical del pico o multiplete del hidrogeno y de la línea vertical a partir del pico de  $^{13}\text{C}$ , un ejemplo es el espectro registrado de la sustancia aislada denominada PVL1, de la *Peperomia villipetiola*, en la cual se observan señales, que indican correlaciones C-H a larga distancia, y que es determinada como la intersección de la línea vertical del pico o multiplete del hidrógeno y de la línea horizontal a partir del pico de  $^{13}\text{C}$ .

Para realizar un espectro de HMBC, al espectrómetro se le da como parámetro una constante de acoplamiento, que puede ser relativamente grande (4-10Hz) o pequeña (2-4 Hz).



Espectro N° 8.- Espectro HMBC (500 y 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de *Peperomia villipetiola*

En HMBC, también se realiza por una secuencia de pulsos, de los cuales el primero de  $90^\circ$  sobre el carbón (no de la secuencia), sirve como filtro que suprime correlaciones a un enlace, y permite a mayores distancias.

Esta técnica es muy útil en el área de carbohidratos y péptidos - proteínas.

Este espectro tiene como característica la detección indirecta de carbonos cuaternarios acoplados a hidrógenos (a más de 1 enlace).

Esta detección indirecta es una de las características del espectro de HMBC, técnica reciente, que se basa en la detección reversa o indirecta de las señales de núcleos, este tipo de detección es la observación (adquisición

de datos) de un núcleo poco sensitivo a través de uno más sensitivo, generalmente el hidrógeno, como consecuencia HMBC remplazó a COLOC, que se basa en la detección directa, es decir, irradiar al carbono para detectar a hidrógenos, lo cual tomaba mucho más tiempo que lo que ahora toma HMBC, sobre todo cuando se tenía el inconveniente de tener poca muestra.

### 3.6.- Espectroscopía de Infrarrojo, IR

El espectro de infrarrojo de un compuesto, es un ploteo del número de onda ( $\nu^{-1}$ ) o la longitud de onda ( $\lambda$ ) versus transmitancia (%T) o absorbancia (A), de las bandas de absorción.

La radiación infrarroja va aproximadamente de 10,000 a 100  $\text{cm}^{-1}$ , que absorbida por una molécula se convierte en energía de vibración, cuyo espectro acostumbra aparecer como una serie de bandas, esto debido a que cada mudanza de nivel de energía vibracional corresponde una serie de mudanzas de niveles de energía rotacional, originándose superposición de líneas. Sin embargo, el químico orgánico usa solo el rango que va de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , debido a que en este, aparecen la mayoría de las bandas de vibración y rotación, que son las que usaremos.

Cuando una muestra no absorbe radiación a una longitud de onda particular, se registra un 100% T (caso ideal). La porción del espectro donde %T es 100 o cerca de 100 se llama "Línea base" y aparece registrada en la parte superior de un espectro de IR. La absorción de radiación por la muestra de una longitud de onda determinada origina un descenso en el %T, lo que se pone de manifiesto en el espectro en forma de un "pico" o más apropiadamente de una "banda de absorción".

En general la interpretación de un espectro de infrarrojo no es asunto simple, hay bandas que pueden ser resultado de superposición de otras, absorciones secundarias (harmónicos) pueden aparecer exactamente a un número de onda doble de la banda fundamental. La banda de absorción de cierto grupo puede ser desviada por varias razones: estructurales, conjugación, atracción de electrones por un grupo sustituyente vecino, etc.

Sin embargo, el espectro de infrarrojo es muy útil, en el caso de la estructura de un nuevo compuesto, nos indica los grupos que están presentes,

o ausentes, en la molécula. Los grupos de átomos usuales dan origen a bandas de absorción características, es decir, cada uno de estos grupos absorbe energía en ciertos valores de longitud de onda, que poco varían de compuesto a compuesto. Si el compuesto es conocido bastará comparar con el espectro de un patrón las bandas correspondientes.

Debido a esto hechos no podemos depender solo del espectro IR para la identificación de un compuesto orgánico, por lo que no se requerirá un análisis detallado del mismo. Estos espectros se utilizan en conjunción con los otros datos espectrales (masas, RMN, UV) para la determinación de la estructura molecular.

### 3.7.- Espectroscopía de Ultravioleta, UV

El espectro de ultravioleta, es un gráfico de longitudes de onda ( $\lambda$ ) versus intensidad y absorción, expresada como absorbancia (A) o Transmitancia (T). Los datos son frecuentemente, convertidos en un gráfico de longitudes de onda versus absortividad molar ( $\epsilon_{\max}$  o  $\log \epsilon_{\max}$ ).

El uso de absortividad molar como unidad de intensidad de absorción tiene la ventaja que todos los valores de intensidad de absorción se refieren al mismo número de especies que absorben.

Las longitudes de onda entre 400 nm y 750 nm es el visible. Inmediatamente después del rojo en el espectro visible ( $\lambda$  mayor de 750 nm) se encuentra la región roja que acabamos de considerar. Inmediatamente después del extremo violeta del extremo visible ( $\lambda$  menor de 400 nm) esta la región ultravioleta de mayor energía.

El espectro UV consiste en una banda ancha de absorción extendida sobre un amplio rango de longitudes de onda, cuyas características principales son su posición e intensidad.

La posición de la absorción UV se especifica como  $\lambda_{\max}$ , es decir, la longitud de onda del punto máximo de la curva de absorción, la cual corresponde a la longitud de onda de la radiación cuya energía es la requerida para que se produzca una transición electrónica.

Los espectrómetros de ultravioleta comúnmente usados miden la absorción de la luz visible y en la región ultravioleta "próxima", es decir, en el intervalo 200-750 nm. Esta luz tiene mayor frecuencia (y como consecuencia mayor energía) que la luz infrarroja y los cambios que produce, al ser absorbida por la molécula, son naturalmente los que requieren mayor energía: cambios en los estados electrónicos.

Estos cambios en los estados electrónicos se refieren al paso de un electrón de un orbital para otro de mayor energía, este electrón puede ser, un electrón  $\sigma$ , un electrón  $\pi$  o un electrón  $\eta$ . (electrón que no forma parte de un enlace, sino se encuentra como parte de un par de electrones no compartidos)

Las transiciones electrónicas de mayor importancia para el químico orgánico son:

1.-  $n \rightarrow \pi^*$ , donde el electrón pertenece a un par no compartido va para un orbital  $\pi$  inestable. Este tipo de transiciones se presenta en grupos carbonilo o nitro.

2.-  $\pi \rightarrow \pi^*$ , en este caso un electrón pasa de un orbital  $\pi$  estable (ligante) para un orbital  $\pi$  inestable. Este tipo de transiciones se presenta en moléculas que contienen sistemas  $\pi$  conjugados.

La intensidad de la absorción UV (expresada como absorbancia) cumple con la ley de Lambert-Beer:

$$A = \text{Log}_{10} (1/T) = \epsilon cb$$

A=absorbancia.

T=transmitancia.

$\epsilon$ =Absortividad molar.

c=concentración. (mol/L)

b=camino óptico.

## 4.- Biogénesis

En el pasado se especuló que era derivado del p-hidroxiacetofena vía ácido Shikimico, pero estudios más recientes han demostrado que es originado por la vía acetato; mientras que el anillo heterocíclico formado por una unidad de C<sub>5</sub>, a través de un metabolismo terpenoidal. (Lin, T. et. al., 1974)

### 4.1.- Vía Acetato

La vía acetato, es seguida tanto por ácidos grasos como por los policetideos.

Los policetideos constituyen un grupo grande de productos naturales que tienen en común una base biosintética, donde sus diversas estructuras pueden ser explicadas como derivados de cadenas de poli- $\beta$  ceto ester, formadas por acoplamiento de unidades de acetil-S-CoA con malonil-S-CoA, vía reacciones de condensación, produciendo un gran número de compuestos aromáticos, muchos de ellos presentan en disposición meta el grupo metila, pero también otros compuestos cíclicos, que no poseen anillos aromáticos, en general todos esos productos son conocidos como "vía policetidea" (Dewick, 1998), la construcción de estos metabolitos esta bajo el control de enzimas conocidas como policetideo sintase. (Mann, 1994)

### 4.2.- Biosíntesis de la poli $\beta$ ceto ester

La formación de la poli- $\beta$  ceto éster es producto de una serie de reacciones tipo Claisen, se inicia con dos moléculas de acetil-S-CoA que se condensan vía reacción claisen, previa carboxilación de una de ella (por acción de la enzima biotin), donde la conversión de acetil-S-CoA a malonil-S-CoA incrementa la acidez de los hidrógenos  $\alpha$  (Figura 23), y así provee un mejor nucleófilo para la condensación Claisen, el proceso se repite hasta obtener un poli- $\beta$  ceto éster con una longitud de cadena apropiada (Figura 24), la cual debido a su gran reactividad, puede sufrir reacciones intramoleculares tipo Claisen o Aldol, que depende de la naturaleza de la enzima y como el substrato es doblado.

En este paso los metilenos son activados por el hecho de estar rodeados por dos carbonilas, formando carboaniones/enolatos y reacciones subsecuentes

con grupos carbonílicos de cetonas o ésteres, con una natural tendencia a formar anillos de seis miembros, libre de tensión.

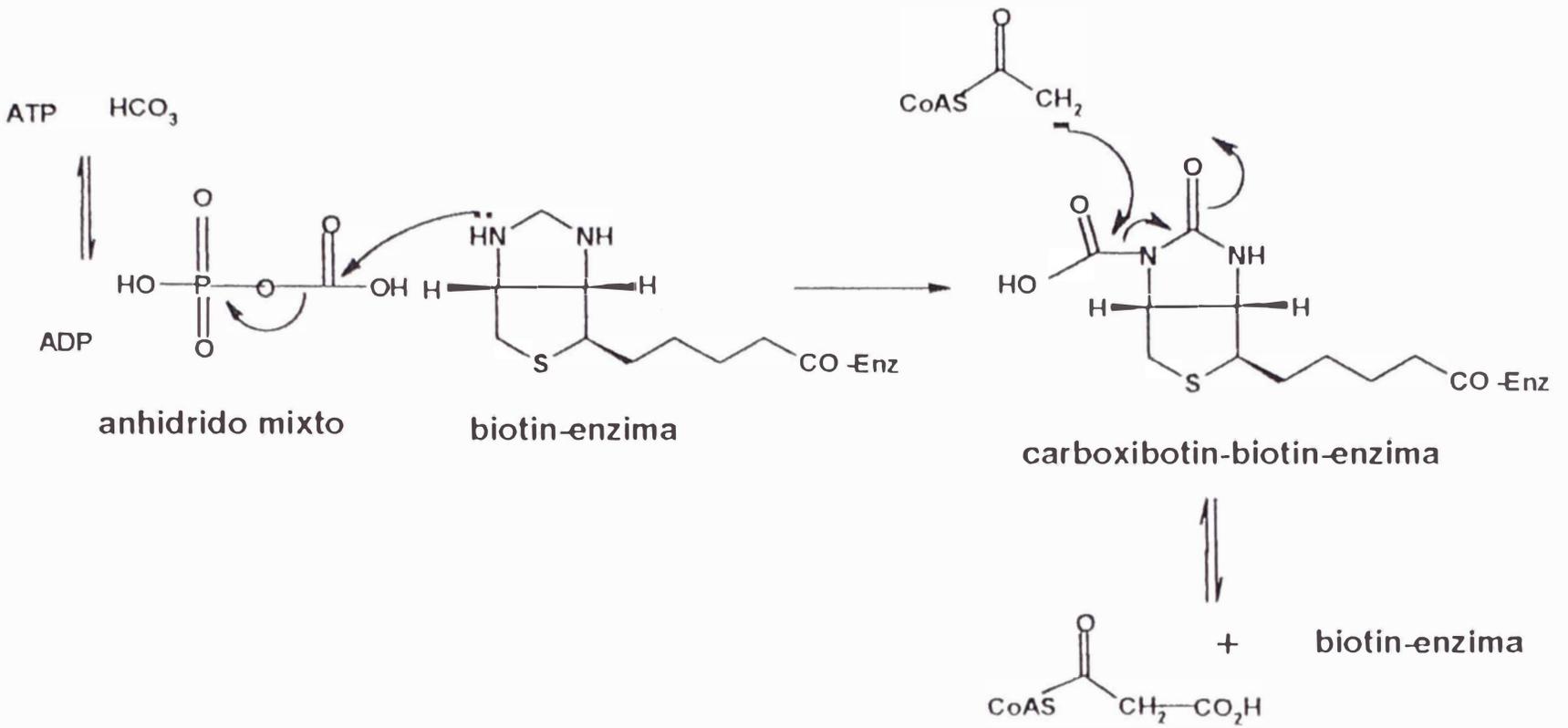


Figura N° 23.- Formación del Malonil-SCoA

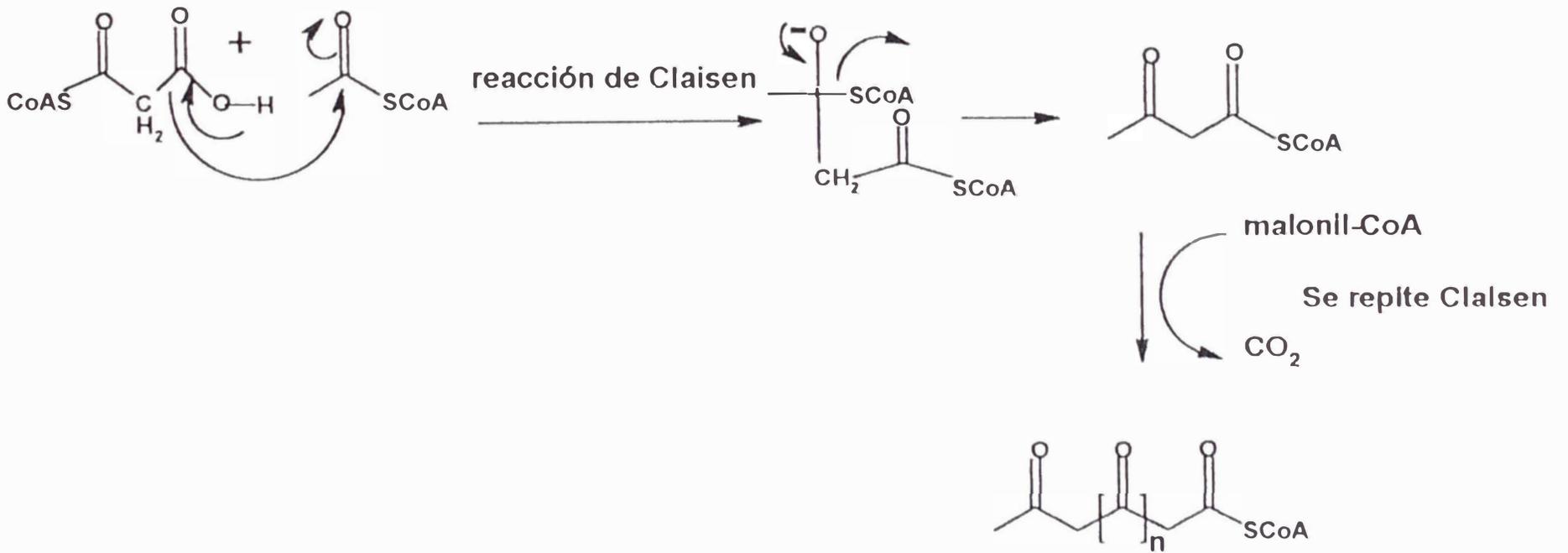


Figura N° 24.- Formación del poli-β ceto ésteres

En el presente trabajo se propone la ruta biosintética (biogénesis), para el cromeno aislado de *Peperomia villipetiola*, vía policetidea. A continuación se presenta la biogénesis utilizando esta vía

#### 4.3.-Biogénesis del Metil,5-metil,7hidroxi-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato, aislado de la *Peperomia villipetiola* (Figura N° 25)

Una vez que se obtiene el poli- $\beta$  ceto éster, a partir un grupo éster y cuatro malonil, se dobla ionizándose el metileno  $\alpha$  seguido por una adición aldol al carbono carbonílico, de tal manera de obtener un anillo de seis miembros, generando un alcohol terciario, seguida por una deshidratación, que ocurre en la mayoría de las reacciones aldol, obteniéndose un alqueno, seguido por enolización que permite alcanzar una mayor estabilidad conferida por el anillo aromático. La hidrólisis del grupo tioéster produce el ácido orselínico.(Dewick)

En esta etapa, se propone que por acción de la preniltransferasa (esta enzima transfiere una isopentila, que participa de muchas biosíntesis, Mann, 1994), el ácido orselínico se prenila, luego la dupla de la isopentila sufre oxidación, el epóxido genera un carbono mas disponible al ataque nucleofílico al oxígeno de la hidroxila, así se genera un anillo de seis miembros, seguido por una deshidratación, favorecida por la formación del sistema conjugado. En este punto el ácido carboxílico del metabolito obtenido se metila obteniéndose la **PVL1**.

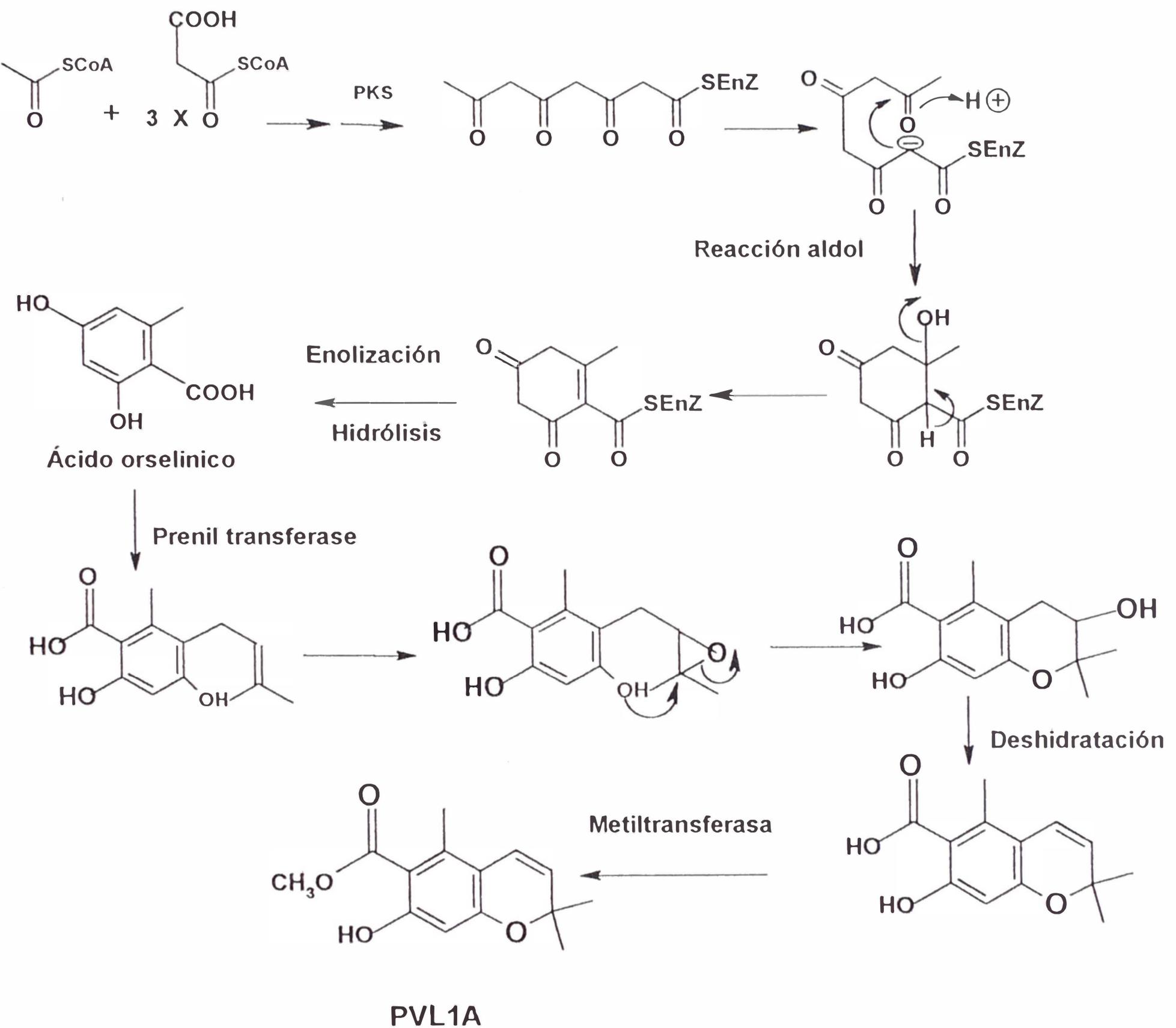


Figura N° 25.-Biogénesis del Metil, 5 metil, 7 hidroxil-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6 carboxilato.

### **III. PARTE EXPERIMENTAL**

## **TRABAJO PRELIMINAR**

### **A.- ADQUISICIÓN DE LA PLANTA**

La planta entera de *Peperomia villipetiola* (FOTO N°1) fue adquirida en el “Mercado Modelo de Chiclayo”, en una tienda de plantas medicinales, el día 2 de marzo del 2001, especie muy común que se expende en este mercado y es conocida popularmente como “hierba de la plata”

Esta planta procede de Miracosta, provincia de Chota, departamento de Cajamarca por información proporcionada por el Dr. Biólogo Guillermo Delgado Paredes, profesor de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Pedro Ruiz Gallo-Lambayeque.

### **B.- DETERMINACIÓN SISTEMÁTICA (IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA)**

La muestra de *Peperomia villipetiola*, fue identificada por el M. Sc. Botánico Santos Llatas Quiroz, Director del Herbario “Pedro Ruiz Gallo-Lambayeque”, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Pedro Ruiz Gallo- Lambayeque (Anexo N°1).



FOTO N° 1.-

Planta adulta de  
*Peperomia villipetiola*

## TRABAJO EXPERIMENTAL

### C.- SECADO Y MOLIENDA (2-5 de marzo del 2001)

Fueron separadas las hojas de los tallos, secados en una estufa "Labor" (Hungría) a 40°C por 72 horas. Al final del período, el material seco fue triturado en un molino de cuchillas para la obtención del material pulverizado, este proceso fue realizado por el Dr. Biólogo Guillermo Delgado Paredes en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Pedro Ruiz Gallo en Lambayeque.

### D.- AISLAMIENTO DE LOS PRINCIPALES METABOLITOS SECUNDARIOS

#### DE LA *Peperomia villipetiola*.

1.- Muestra: Hojas de *Peperomia villipetiola*.

2.- Cantidad de muestra: 24,5 g

3.- Procedimiento:

**a) Extracción Sólido-líquido:** Obtención del Extracto Bruto Orgánico (23 de febrero del 2002).

i Se colocan las hojas (24,5g) secas y molidas, en un frasco Erlenmeyer de 125 mL, se adicionan 120 mL de DCM-MeOH. (2:1) y se agitan durante 1 minuto con ayuda de un extractor eléctrico a una velocidad de 1900 r.p.m. . Luego se filtra (a gravedad) y al sólido recuperado se le aplica este proceso 2 veces más.

El filtrado presenta un color marrón ligeramente verde.

ii El filtrado se concentra en el rotavapor obteniéndose un extracto bruto de color verde oscuro ligeramente marrón.

iii La remoción de la clorofila se realiza por filtración al vacío a través de celita, previamente el extracto es suspendido en 120 mL de MeOH-H<sub>2</sub>O (8,5:1,5).

**b) Separación líquido-líquido:** Obtención del Extracto Bruto Orgánico de mediana polaridad (23 de febrero del 2002).

iv El filtrado obtenido se coloca en una pera de decantación de 250 mL, se agrega 100 mL de DCM, para extraer la fase de mediana polaridad, se agita

y se deja reposar para conseguir una buena separación de fases, se observa que la fase de DCM se ubica en la parte inferior de la pera, se separa, y se realiza la misma operación 3 veces más. Las fases de DCM se reúnen y las fases acuosas metanólicas se desechan.

- El extracto orgánico se concentra en el rotavapor obteniéndose un extracto de color marrón oscuro (1,6g).

**c) Purificación cromatográfica (3 de abril-10 junio del 2002)**

- i Análisis preliminar: Cromatografía de capa fina – CCF (ver Sec. d).
- ii Cromatografía de columna – CC (Ver Sec. e).
- iii Cromatografía de capa fina preparativa – CCF (Ver Sec.f).

**d) Análisis preliminar por cromatografía en capa fina-CCF**

- i Muestra: Una porción (6 mg) del extracto bruto Orgánico de mediana polaridad obtenido de la Sec. b) precedente.
- ii Placa: Placa comercial de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> para cromatografía en capa fina, sobre un soporte de aluminio (Merck).
- iii Eluentes: EtOAc y n-hexano en las siguientes proporciones:
  - 1 0,5:9.5,
  - 2 1,0:9.0 y
  - 3 2,0:8,0.
- iv Procedimiento: La aplicación de la porción extracto, el desarrollo del cromatograma y el revelado de las placas son procedimientos descrito en los textos y guías de practicas de química Orgánica.
- v Revelador: UV (256 nm)/ Sulfato cérico con calentamiento.
- vi Observaciones:
  - 1 Con 0,5:9.5, se observa 5 manchas,
  - 2 Con 1,0:9.0, se observa 5 manchas y
  - 3 Con 2,0:8.0, se observa 7 manchas.
- vi Conclusión: El extracto DCM-MeOH (2:1) de *Peperomia villipetiola* presenta por lo menos siete sustancias, por lo que para realizar la CC, se debe usar el eluente con incremento de polaridad gradual.

**e) Cromatografía de Columna-CC**

- i Muestra: Extracto de las hojas de *Peperomia villipetiola* (e mediana polaridad obtenida de la Sec. b) precedente.
- ii Características de la columna:  $\Phi = 5\text{cm}$ ,  $h = 40\text{cm}$ ; altura de la sílica = 35 cm.
- iii Adsorbente: Sílica gel 60, partícula de 63-210  $\mu\text{m}$ , Merck.
- iv Procedimiento:
  - En la columna se agrega poco a poco la sílica gel, asegurándose que sea compacta, en seguida se adiciona 200 mL de n – hexano, con el objeto que se infle la sílica y se verifica el flujo uniforme del solvente a través de la sílica ( todo el n-hexano es colectado).
  - La muestra se disuelve en 10mL de DCM, en seguida se agrega 5 gr de sílica gel (sílica gel 60, partícula de 63-210  $\mu\text{m}$ , Merck), se mezclan hasta obtener una “masa” homogénea, que se coloca en la parte superior de la columna.
  - Una vez colocada y dispersada uniformemente la muestra en la superficie de la columna “flash” (con un flujo de 70 mL/min., bajo presión de aire) se coloca algodón, para amortiguar el flujo del eluente (el eluente se coloca en una pera de separación).
  - Se inicia con la adición de 70 mL de n-hexano y se colecta en un balón de 250 mL (balón N° 1).
  - A continuación se agrega el eluente seleccionado, 70 mL de 5% de EtOAc en n-hexano, así se colecta la segunda fracción en un balón de 250 mL (balón N° 2), esta operación se repite hasta el balón N° 7
  - Se aumenta la polaridad del eluente y se agrega 70 mL de 10 % de EtOAc en n-hexano, y se recibe en un balón de 250 mL (balón N° 8), esta operación se repite hasta el balón N° 11.
  - De nuevo se aumenta la polaridad del eluente, se agrega 70 mL de 20 % de EtOAc en n-hexano, y se recibe en un balón de 250 mL (balón N° 12), esta operación se repite hasta el balón N° 17.
  - Se aumenta la polaridad del eluente, esta vez 70 mL de 40 % de EtOAc en n-hexano, y se recibe en un balón de 250 mL (balón N° 18), esta operación se repite hasta el balón N° 23.

- Se continua aumentando el gradiente de polaridad del eluente, se agrega 70 mL de 60 % de EtOAc en n-hexano, y se recibe en un balón de 250 mL (balón N° 24), esta operación se repite hasta el balón N° 27.
  - A continuación se agrega 70 mL de EtOAc, se recibe en un balón de 250 mL (balón N° 28).
- y Resultados: Se obtuvieron 28 fracciones, que fueron inmediatamente llevadas al rotavapor, la apariencia de ellas fueron:
- Las tres primeras fracciones presentaron polvillo blanco.
  - Las fracciones N°4 a la N°11, presentaron cristales de color amarillo.
  - Las fracciones N°12 y N°13, presentaron un ligero color verde.
  - Las fracciones N°14 hasta el N°23, presentaron cristales un color ligeramente verde decreciente hasta ser totalmente amarillo.
  - Las fracciones restantes, es decir, del N°24 hasta el N°28 presentaron una sustancia con apariencia aceitosa y coloreada de amarillo.

**Tabla N°3.-** Resumen de los resultados de la CC.

N° de fracción	Característica
N° 1 a N° 3	Polvillo blanco
N° 4 a N° 11	Cristales de color amarillo
N° 12 y N° 13	Cristales amarillos, ligeramente verdes
N° 14 a N°23	Cristales verdes
N° 24 a N°28	Apariencia aceitosa, color amarillento

- A las fracciones se le aplica cromatografía de capa fina -CCFC, Se siguió el procedimiento d) precedente, usando como eluentes EtOAc y n-hexano (0,5:9.5).
- Resultados: El revelado (UV a 256 nm y Sulfato cérico con calentamiento), presenta manchas, suficientemente definidas para reconocer siete sustancias, color morado bajo luz UV (Foto N°2).



FOTO N° 2.- CCFC de las primeras 22 fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto de *Peperomia villipetiola*

Tabla N°4.- Resumen de los resultados de la CCFC ( $\lambda=256\text{nm}$ ).

N° de fracción	N° de sustancias presentes	Nueva denominación de las fracciones reunidas
N° 1 a N° 3	No presentaron sustancias	
N° 4 y N° 5	Presenta 2 sustancias	A
N° 6	Presenta 3 sustancias	B
N° 7 y N° 8	Presenta 2 sustancias	C
N° 9	Presenta 1 sustancia	D
N° 10 y N° 11	Presenta 2 sustancias	E
N° 12 a N° 15	Presenta 1 sustancia	F
N° 16 a N° 18	Presenta 1 sustancia	G
N° 19 a N° 21	Presenta 2 sustancias	H
N° 22 y N° 23	Presenta 1 sustancia	I
N° 24 a N° 28	No presentaron sustancias	

- Conclusión: De los resultados se selecciona la sustancia segunda menos polar, a esta sustancia en la tesis se le denominó PVL1, presente en las fracciones A y B (FOTO N°2).

#### **f) Cromatografía de capa fina preparativa - CCFP**

- i Muestras: Las fracciones "A" y "B" reunidas.
- ii Placa: Placa de Cromatografía en capa fina preparativa (CCFP)
  - Las placas fueron confeccionadas en el laboratorio, para ello se utiliza sílica 60F<sub>254</sub> (Merck). Las cuales fueron preparadas aplicándose una suspensión de gel sílica en agua destilada (9 gr. de sílica y 30 mL de agua aproximadamente, por placa) sobre placas de vidrio (20 x 20 cm.), se utiliza un dispersador "Quickfit", regulado para obtener capas de 1,00 mm de espesura.  
A continuación se deja reposar 12 horas a temperatura ambiente, son llevadas a la estufa (80°C x 1 hora) para "activarlas", después se enfrían 24 horas a temperatura ambiente y están listas para usar.
- iii Eluentes: EtOAc y n-hexano (1,5:8.5).
- iv Procedimiento: La aplicación de las muestras, el desarrollo del cromatograma y el revelado de las placas son procedimientos descritos en los textos de Química Orgánica (Reyna Pinedo, V).
- v Revelador: UV (256nm).
- vi R<sub>f</sub> = 0,63.
- vii Observaciones: se observa una buena separación, bien definida.
- viii Conclusión: La purificación proporcionó 83 mg de PVL1.

#### **E.- IDENTIFICACIÓN CLÁSICA**

1.- Análisis porcentual de carbono, nitrógeno e hidrogeno

i.- Equipo: Analizador elemental 2400CHN.

ii.- Laboratorio: Central Analítica del Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo - Sao Paulo - Brasil.

iii.- Fecha: 20 de junio del 2002.

## iv.- Resultados:

Carbono	Hidrogeno	Nitrógeno
67,07%	6,49%	0,10%

v.- Deducción de la fórmula empírica a partir del porcentaje en peso de los elementos.

- \_ Se asumen 100g de sustancia.
- \_ Las cantidades relativas de C, H y N.

Elemento	%	Peso (g)	Peso atómico	n (moles)	Cantidad relativa(nx5/2)
C	67,07	67,07	12,00	5,59	13,98
H	6,49	6,49	1,00	6,49	16,23
N	0,10	0,10	14,00	0,007	0,02

- \_ Descartamos la cantidad de nitrógeno, debido a la pequeña cantidad presente. Tenemos así:  $C_{14}H_{16}X$ .
- \_ Si asumimos  $X = \text{Oxígeno}$ ,  $\%O = 100 - (67,07 + 6,49) = \%26,44$  en 100 g de sustancia, tendríamos 26,44, y dividido entre 16 (P.A.=16) $\times 2.5 = 4,13$ . Así llegamos a la formula molecular:  $C_{14}H_{16}O_4$ .

## F.- IDENTIFICACIÓN ESPECTROSCÓPICA

De las 7 sustancias aisladas se purifico la sustancia segunda menos polar, que denominamos PVL1.

La determinación estructural del metabolito PVL1 obtenida de las hojas "*Peperomia villipetiola*" se realizó mediante el análisis de sus espectros de masas, UV, IR, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, RMN<sup>13</sup>C (DEPT-135<sup>a</sup>), HETCOR y HMBC.

La sustancia analizada PVL1, son cristales de color blanco, ligeramente crema.

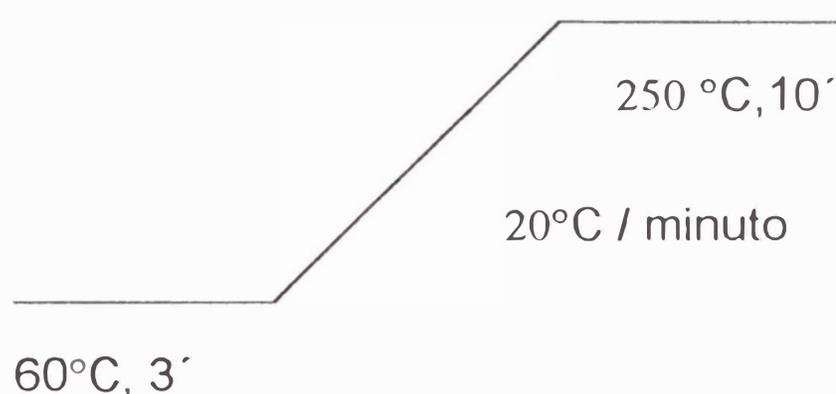
Todos los espectros fueron realizados por la central analítica del Instituto de Química, de la Universidad de Sao Paulo - Sao Paulo, Brasil.

1.- Espectro de masas. Ver espectro N°1

a) Condiciones de trabajo

i.- Equipo: Espectrómetro Shimadzu, MS-QP-5050, operando por impacto de electrones (IE) a 70 eV. (cuadrupolo), acoplado a un cromatógrafo de gases Shimadzu, cromatógrafo modelo CG-17A, equipado con columna capilar DB5 de 30 m de longitud y 0,25mm de diámetro.

Las condiciones empleadas en el análisis fueron:



ii.- Fecha: 21 de abril del 2001.

iv.- Peso de la muestra: 5 mg.

b).-Características del espectro: PVL1,  $R_f=20,21$  min.

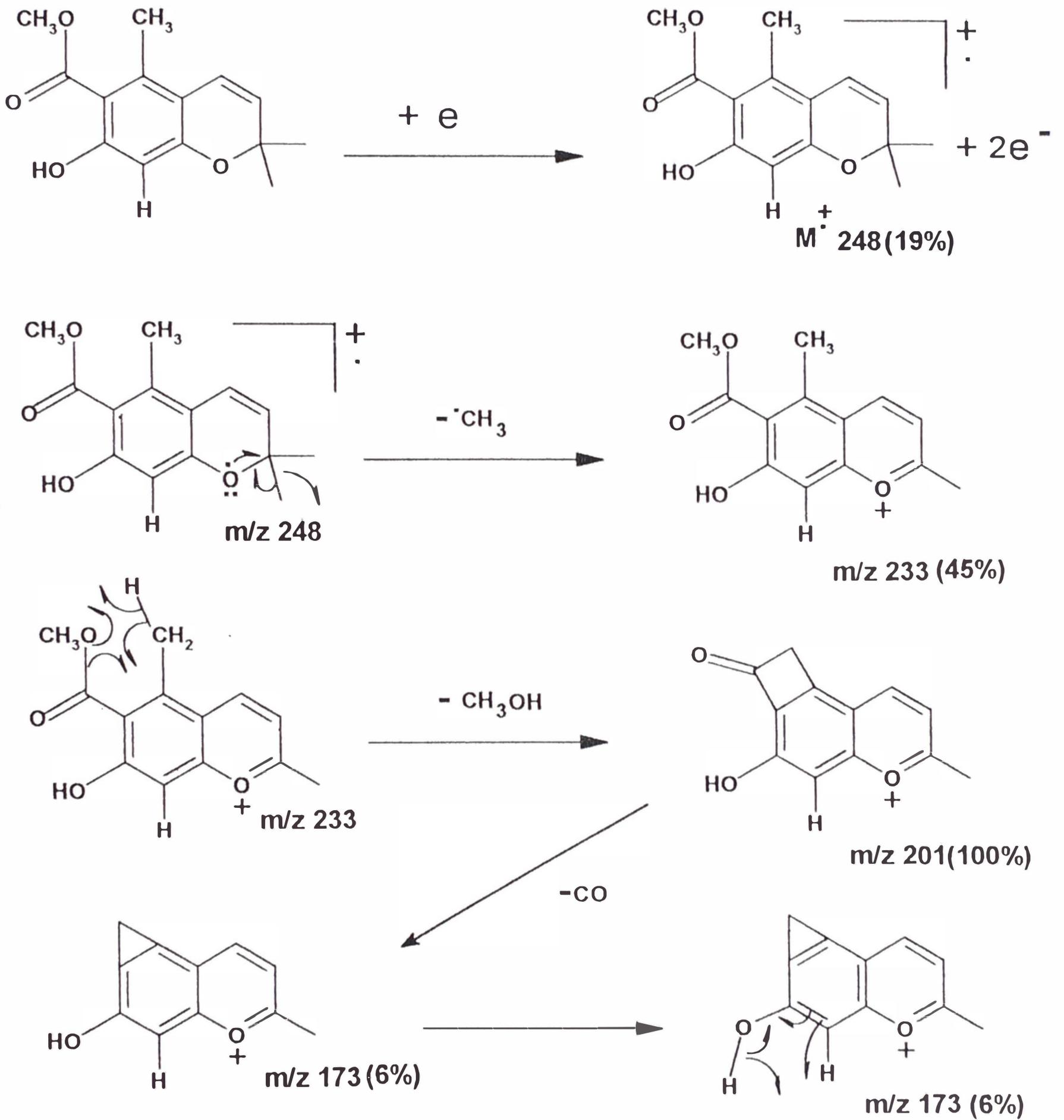
m/z (int. rel.): 248  $[M]^+$  (18,72), 217(3,75), 233 (44,89), 201(100), 173 (5,78), 145 (19,94), 131 (3,57), 69(9,95).

c).- Análisis del espectro

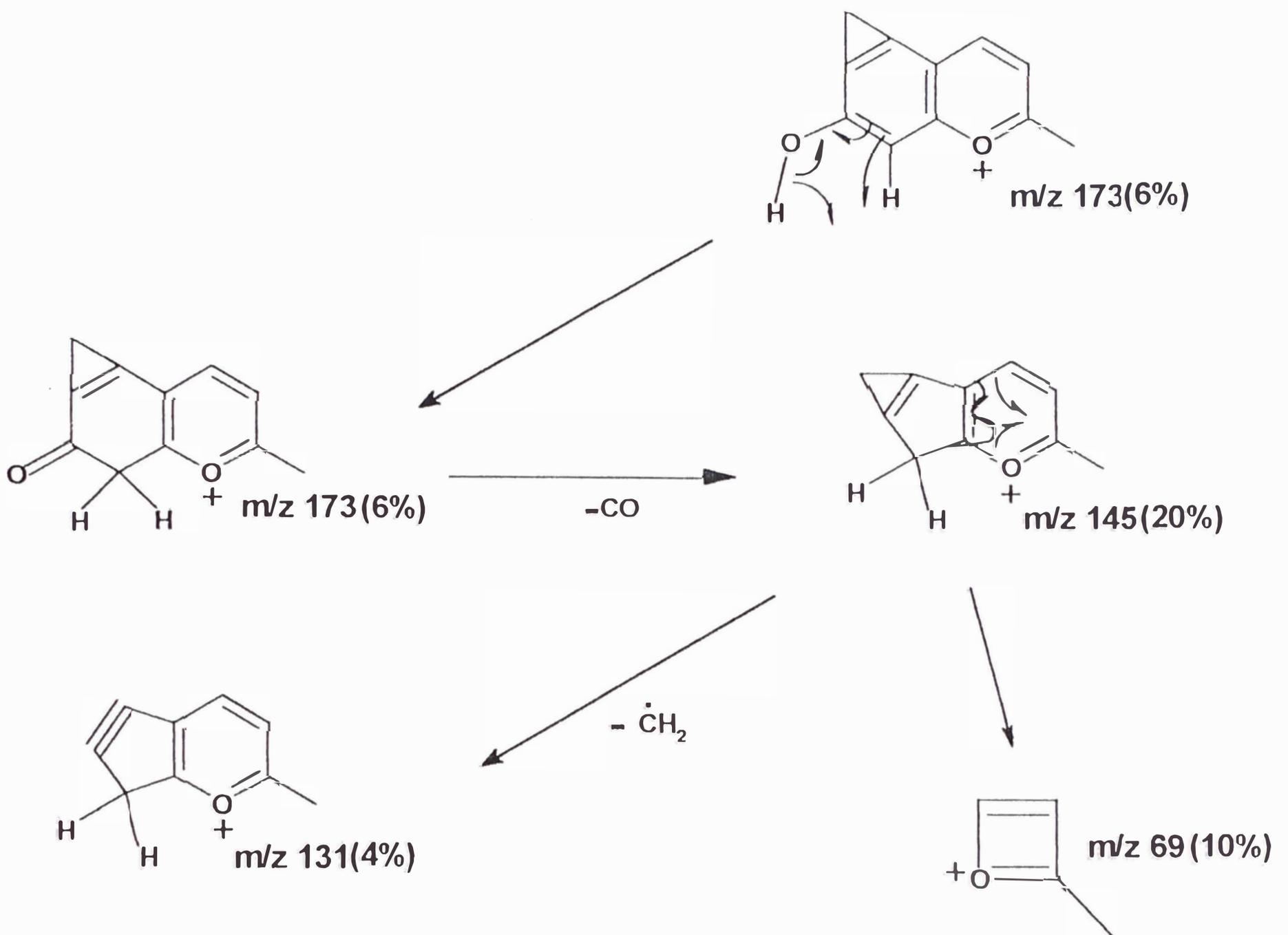
La propuesta de fragmentación correspondientes a los picos m/z 248, 233, 201, 173, 145, 131 y 69, se encuentran en el Figura N° 26, pagina 47.

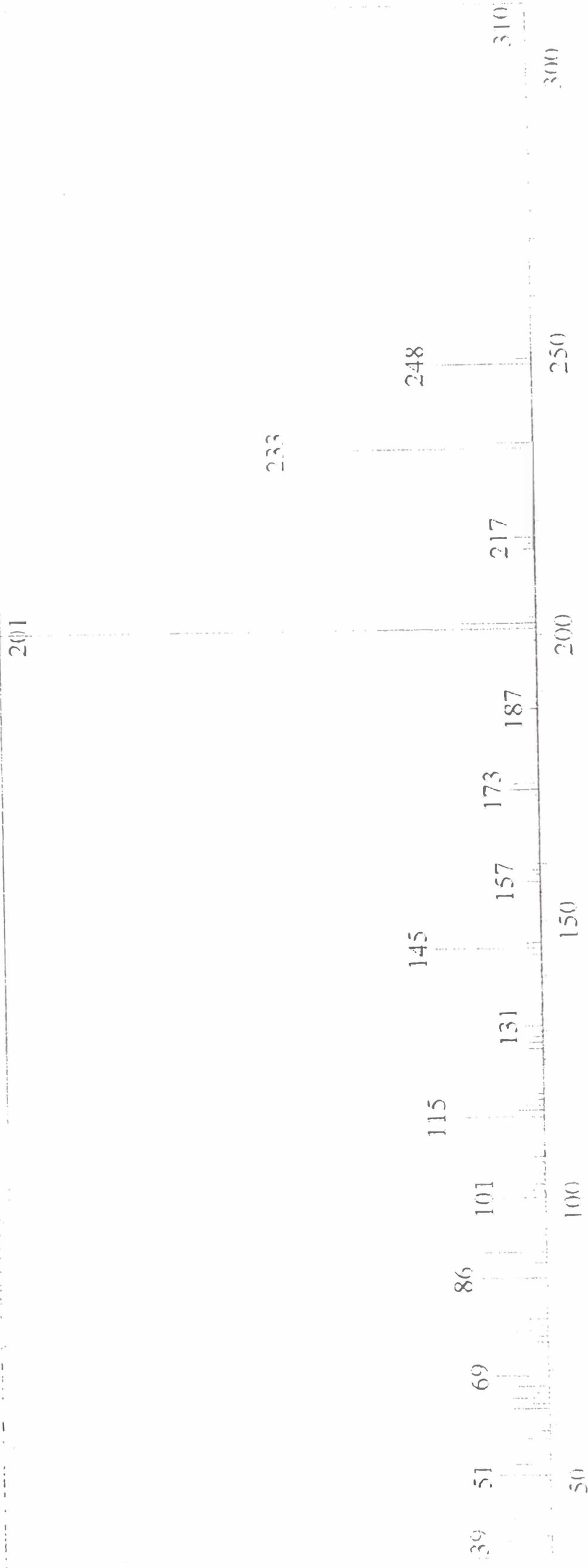
d).- Conclusión: El análisis elemental de la sustancia (Formula molecular  $C_{14}H_{16}O_4$ ) y el espectro de masas de PVL1, presentan datos compatibles. Existe correspondencia entre los picos presentes en el espectro de masas y los fragmentos propuestos en el Figura N° 26 que presenta el pico molecular en 248, además, el pico m/z 233 debido a la eliminación de un radical metilo generando un catión, característico de los cromenos (Sección 2.1 y 2.2).

Figura N° 26 Propuesta de fragmentación del cromeno PVL1 en el espectrómetro de masas(70 ev).



Continuación de la Figura N° 26





Espectro N°1.- Espectro de masas (70 eV) de PVL1 obtenida a partir de las hojas de *Peperomia villipetiola*.

2.- Espectro de RMN<sup>1</sup>H. Ver espectro N° 2, 3 y 4.

a) Condiciones de trabajo

i.- Equipo: Bruker DPX-300, operando a 300 MHz.

ii.- Operador: Operador de turno.

iii.- Fecha: 30 de abril del 2002.

iv.- Peso de la muestra: 20 mg

v.- Solvente: CDCl<sub>3</sub>.

b) Características del espectro

El espectro de RMN <sup>1</sup>H presenta señales correspondientes a un hidrogeno aromático en 6,29 ppm (s, 1H); a un grupo metoxílico en 3,92 ppm (s, 3H); además la presencia de dos singuletes correspondientes a los protones olefínicos en un sistema AB en 5,60 y 6,54 δ, con J<sub>A,B</sub> = 10,23 Hz, relativo a los hidrógenos olefínicos del cromeno; dos grupos metílicos en posición *gem* en 1,41 ppm (s, 6H) y un grupo metilo en 2,48 ppm (s, 3H), desplazamiento característico de un grupo metilo enlazado a un anillo aromático.

c) Análisis del espectro –Comparación con bibliografía revisada.

A través de la revisión bibliográfica realizada en la literatura, se constata la semejanza de los datos de RMN <sup>1</sup>H obtenidos de PVL1 con los del 2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-ácido carboxílico, cromeno aislado por Baldoqui et al. (Tabla N°5), motivo por el cual se coloca los datos lado a lado, para una mejor apreciación.

Con la diferencia de que PVL1 presenta un grupo CH<sub>3</sub>, que se presenta en 3.93 ppm, desplazamiento característico de los hidrogenos de un grupo metoxilo, el cual se encuentra formando parte de un ester aromático.

Otro punto que notar es que PVL1, solo presenta un hidrógeno aromático, que implica que el anillo aromático esta penta sustituido, además este único hidrogeno aromático se presenta un campo mas alto de lo reportado en la literatura, debido a que a diferencia del cromeno aislado por Baldoqui D. et al. que esta en posición orto del grupo carbonílico, el hidrógeno aromático de PVL1 no lo esta y esta en posición orto de un grupo metilo y en para de uno hidroxilo, ambos buenos activadores, que van

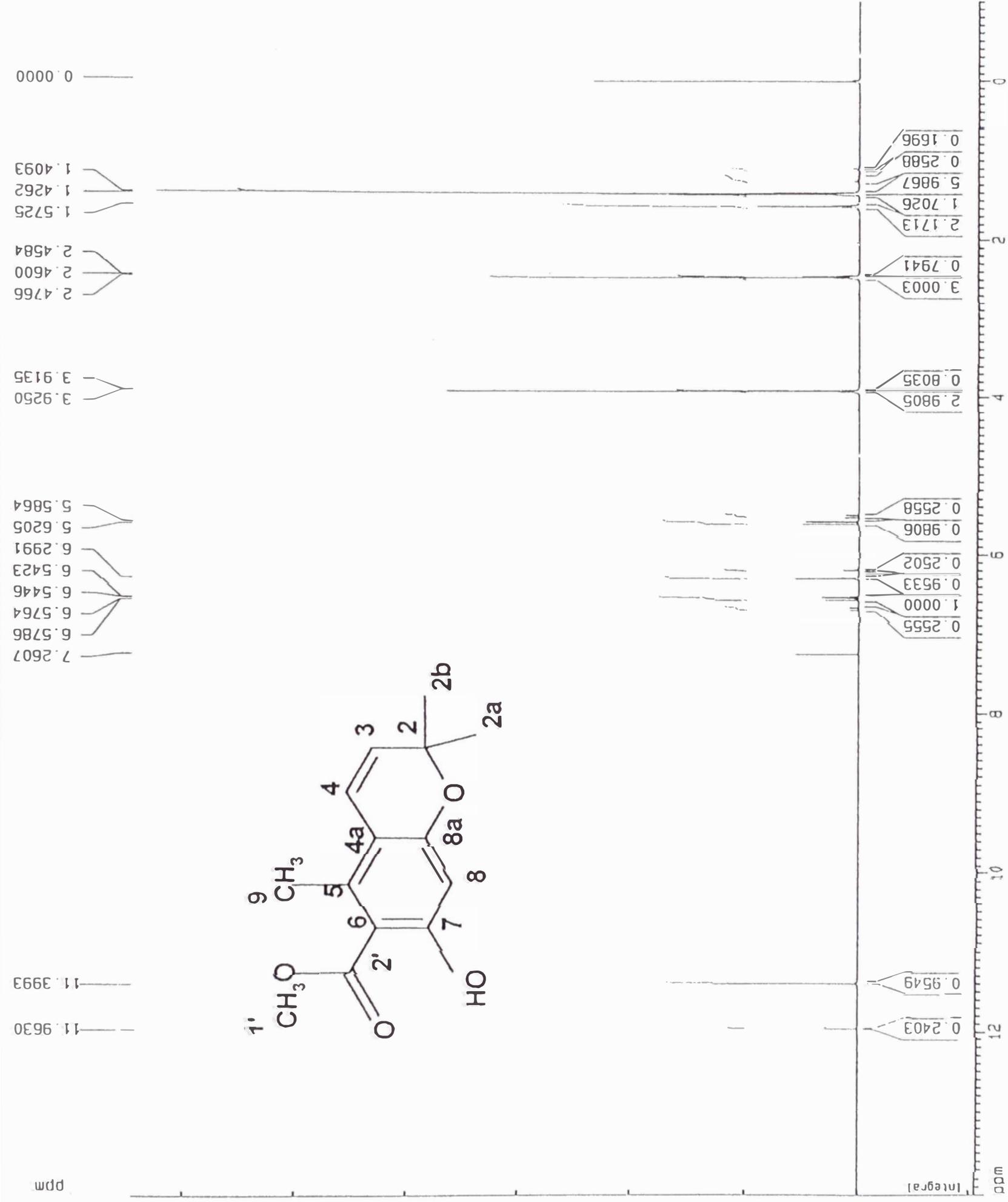
a blindar al hidrógeno aromático por efecto inductivo y resonante, respectivamente, y como consecuencia va a presentar señal a un campo mayor.

d) Conclusión:

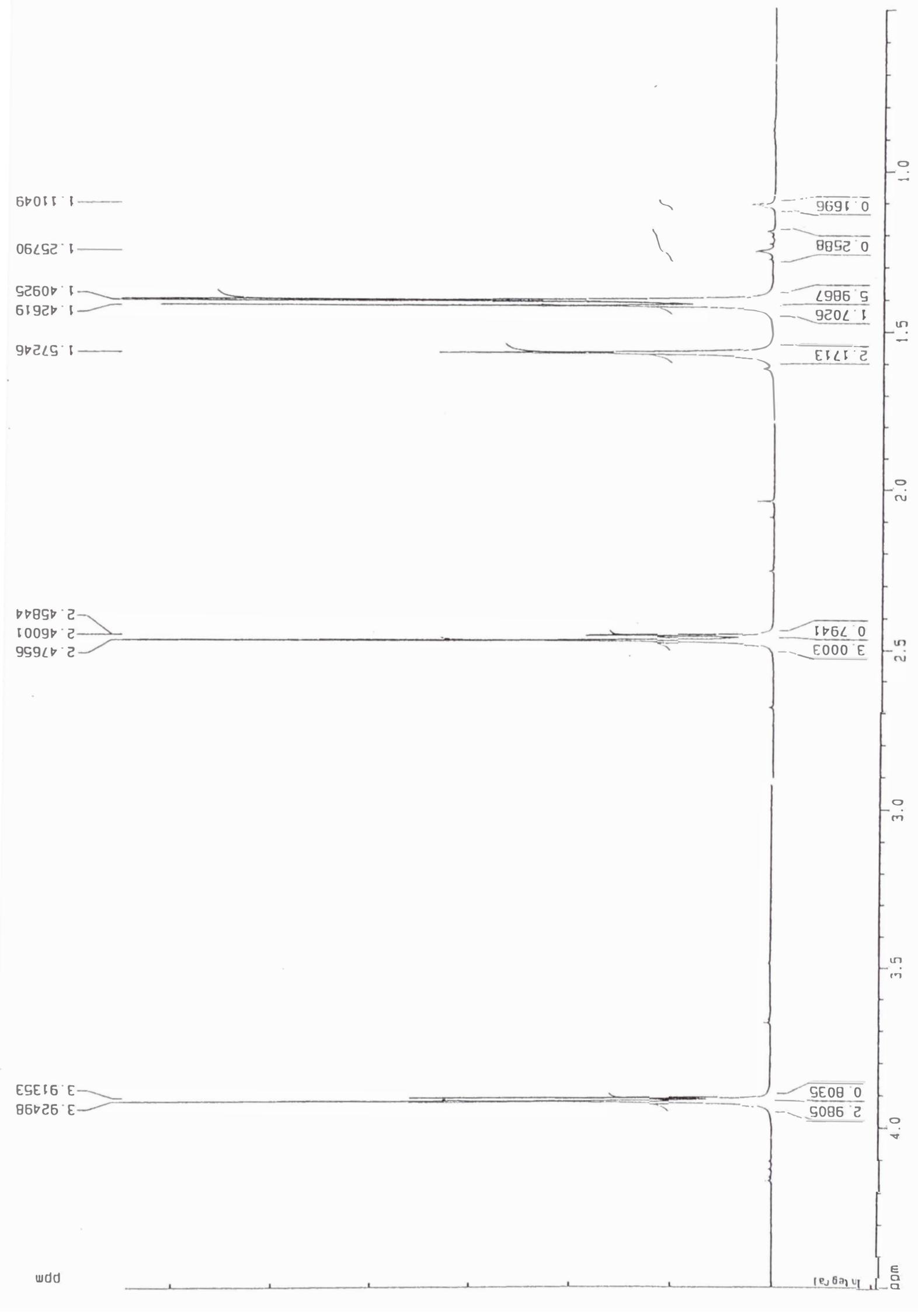
La similitud parcial de datos, permite proponer como esqueleto un cromeno, con la diferencia de que PVL1 solo presenta un hidrógeno aromático, lo que implica que el anillo aromático esta penta sustituido.

**Tabla N° 5.-** Datos de RMN  $^1\text{H}$  del cromeno PVL1 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) y del cromeno 2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-ácido carboxílico (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de *Piper aduncum*, Baldoqui, D. et al. 1999.

Posición (C)	$\delta$ , integración, multiplicidad, <i>J</i> (Hz) (PVL1)	$\delta$ , integración, multiplicidad, <i>J</i> (Hz) (Cromeno, Baldoqui et al., 1999)
2		
2a/2b	1,41 (s, 6H)	146(s, 6H)
3	5.60 (d, 10, 1H)	5,65 (d, 1H, 9,9)
4	6.56 (d, 10, 1 H)	6,34 (d, 1H, 9,9)
4a		
5		7,72 (d, 1H, 2,0)
6		
7		7,86 (dd, 1H, 8,4, 2,0)
8	6.29 (s, 1 H)	6,79 (d, 1H, 8,4)
8a		
9	2.48 (s, 3 H)	
1'		
2'	3.93 (s, 3 H)	
<u>OH</u>	11.39 (s, 1H)	

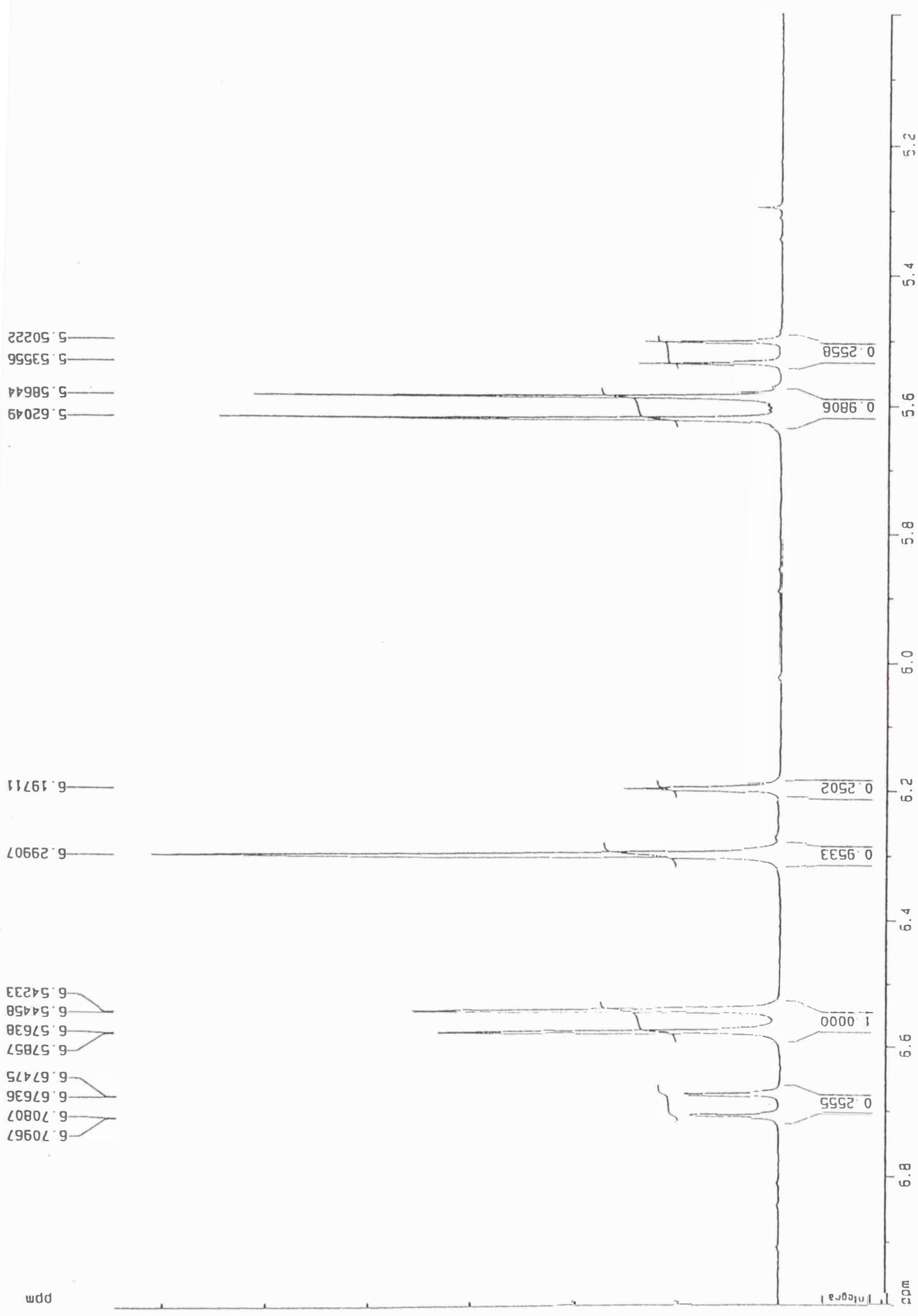


Espectro N° 2.- Espectro de RMN<sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PVL1 obtenida a partir de las hojas de *Peperomia vilipetioia*.



Espectro N° 3.- Espectro ampliado (1 a 4 ppm) de RMN<sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PVL1 obtenida a partir de las hojas de

*Peperomia villipetiola*.



Espectro N° 4.- Espectro ampliado (5 a 7 ppm) de RMN<sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PVL1 obtenida a partir de las hojas de

*Peperomia villipetiola*

3.- Espectros de RMN<sup>13</sup>C. Ver espectros N° 5 y 6.

a) Condiciones de trabajo

i.- Equipo: Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup>C fueron registrados en un espectrómetro: Bruker DPX-300, operando a 75 MHz. Los datos están expresados en desplazamientos químicos (ppm).

ii Operador: Operador de turno.

iii.- Fecha: 30 de abril del 2002.

iv.- Peso: 20 mg.

v.- Solvente: CDCl<sub>3</sub>

b) Características de los espectros

(A) Espectro <sup>13</sup>C, Ver Espectro N°5.

Los datos obtenidos en el espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Tabla N° 6) fueron plenamente compatibles con la estructura propuesta para un cromeno:

Carbono cuaternario (C)	(C <sub>2</sub> ):	76,22 ppm.
	(C <sub>4a</sub> ):	113,86 ppm.
	(C <sub>5</sub> ):	137,39 ppm.
	(C <sub>6</sub> ):	106,40 ppm.
	(C <sub>7</sub> ):	164,03 ppm.
	(C <sub>8a</sub> ):	158,86 ppm.
	(C <sub>1</sub> ):	172,16 ppm.
Carbono terciario (CH)	(C <sub>3</sub> ):	128,75 ppm.
	(C <sub>4</sub> ):	119,12 ppm.
	(C <sub>8</sub> ):	102,90 ppm.
Carbono primario (CH <sub>3</sub> )	(C <sub>9</sub> ):	17,55 ppm.
	(C <sub>2</sub> ):	51,91 ppm.
	(C <sub>2a/2b</sub> ):	28,01 ppm.

(B) Espectro de DEPT 135°, Ver espectro N°6.

Se observan seis señales correspondientes (Tabla N° 6):

Carbono terciario (CH) (C <sub>3</sub> ):	128,72 ppm.
	(C <sub>4</sub> ): 119,08 ppm.
	(C <sub>8</sub> ): 102,86 ppm.

Carbono primario (CH<sub>3</sub>)

(C<sub>9</sub>): 17,53 ppm.

(C<sub>2</sub>): 51,89 ppm.

(C<sub>2a/2b</sub>): 27,97 ppm.

c).- Análisis de los espectros de los espectros de RMN <sup>13</sup>C y DEPT 135°.

A través de la revisión bibliográfica realizada en la literatura, se constató una vez más, la semejanza de los datos publicados para el cromeno aislado de *Piper aduncum* por Baldoqui, et al. 2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6 ácido carboxílico con los de PVL1 (Tabla N° 6).

Lo primero a notar del espectro RMN <sup>13</sup>C de PVL1, es la presencia de dos carbonos más que del cromeno de *Piper aduncum*

Al analizar estas señales, una de ellas se presenta en 51,91 ppm. En PVL1 mientras que en el cromeno de *Piper aduncum* no, sin embargo, tienen en común una señal cerca a 172 ppm, perteneciente a un carbono que forma parte del grupo carbonílico, estas dos informaciones son valiosas, porque permiten proponer un grupo éster metílico, como sustituyente del anillo aromático, lo cual tiene sentido, con el desplazamiento químico que presenta el carbono a 51,91 ppm, característico de un grupo metoxilo que forma parte de un éster de ácido carboxílico, enlazado a un anillo aromático.

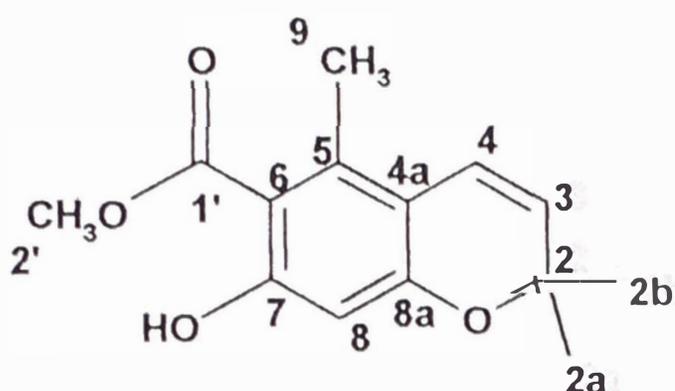
El otro carbono, aparece en de 17,55 ppm, y en el espectro de hidrogeno en 2.48 ppm, si comparamos estos datos con los de la estructura del ácido carboxílico prenilado (Sección 2.3) reportado por Mahiou, V. et al. (1995), se puede proponer que estas señales corresponden a un grupo metilo enlazado al anillo aromático.

El espectro DEPT 135° presenta 6 señales que indica que la estructura de PVL1 tiene 6 tipos de carbonos enlazados a 1H o a 3H, eliminando la posibilidad de la presencia de un grupo metileno. Teniendo presente esta información y que el espectro RMN <sup>13</sup>C presenta 13 señales, se puede afirmar que 7 carbonos o tipos carbonos son cuaternarios, lo cual se verifica satisfactoriamente con la estructura propuesta de PVL1.

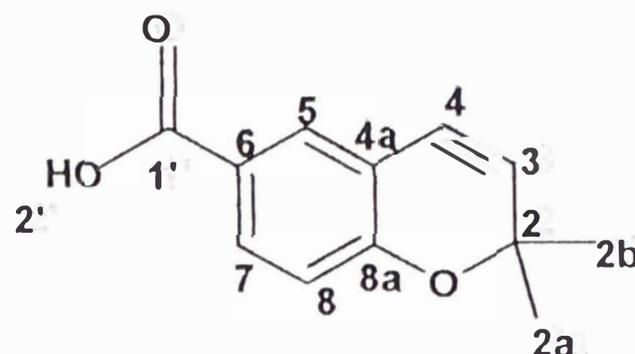
**d).-Conclusión**

Ambos espectros, verifican datos muy similares, que confirman que el esqueleto de la sustancia PVL1 es un cromeno. Además de la presencia de 2 carbonos mas en PVL1 a comparación del aislado por Baldoqui D., 1999, donde, el primero se propone que pertenece al carbono de un grupo metoxilo de un éster metílico aromático, en cuanto el segundo carbono de un grupo metilo, enlazado al anillo aromático (estas proposiciones son confirmados mas adelante).

**Tabla N° 6.-** Datos de RMN  $^{13}\text{C}$  del cromeno PVL1 (75 MHz) y del cromeno 2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6 ácido carboxílico (50MHz) de *Piper aduncum*, Baldoqui D. et al., 1999.

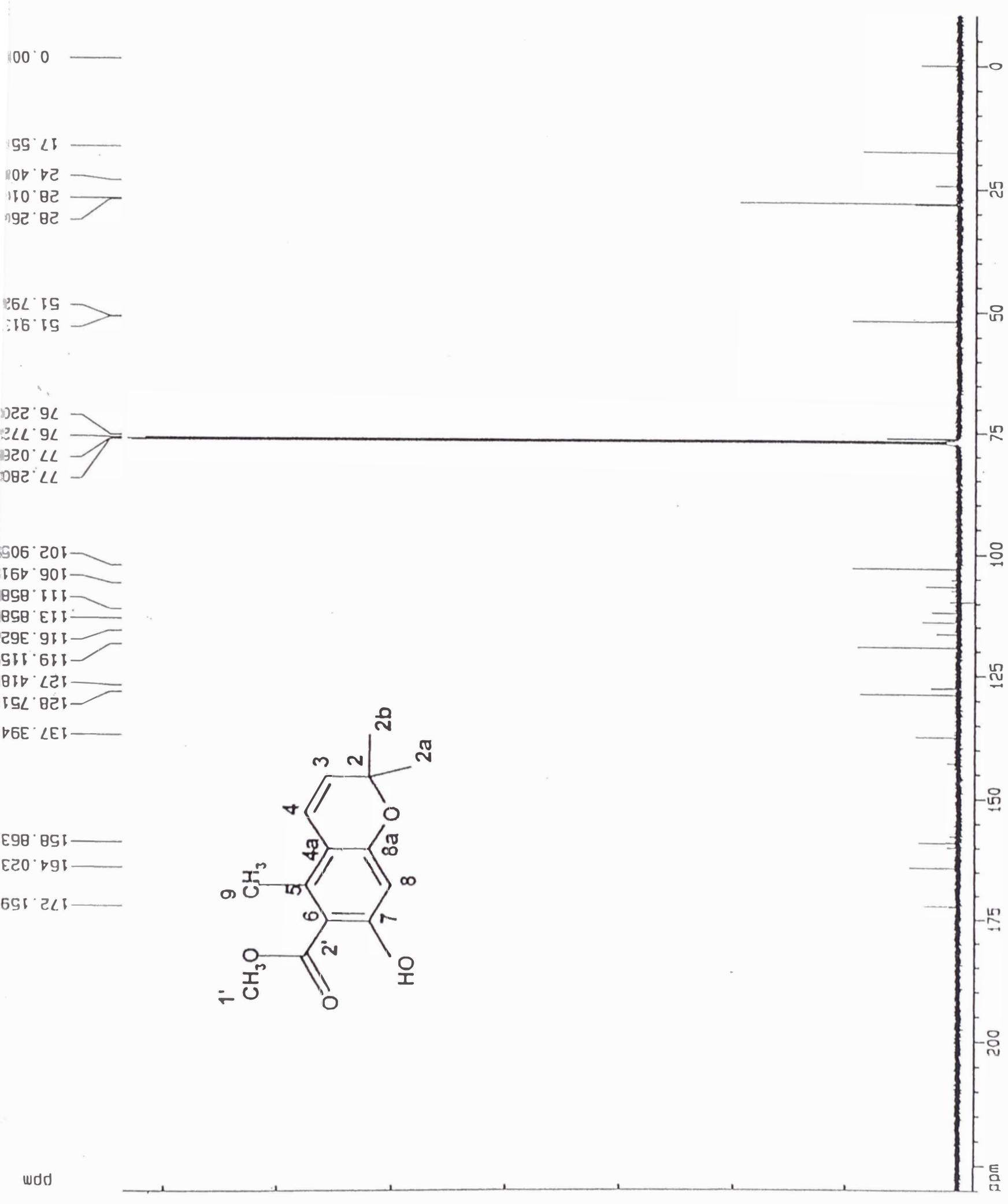


PVL1

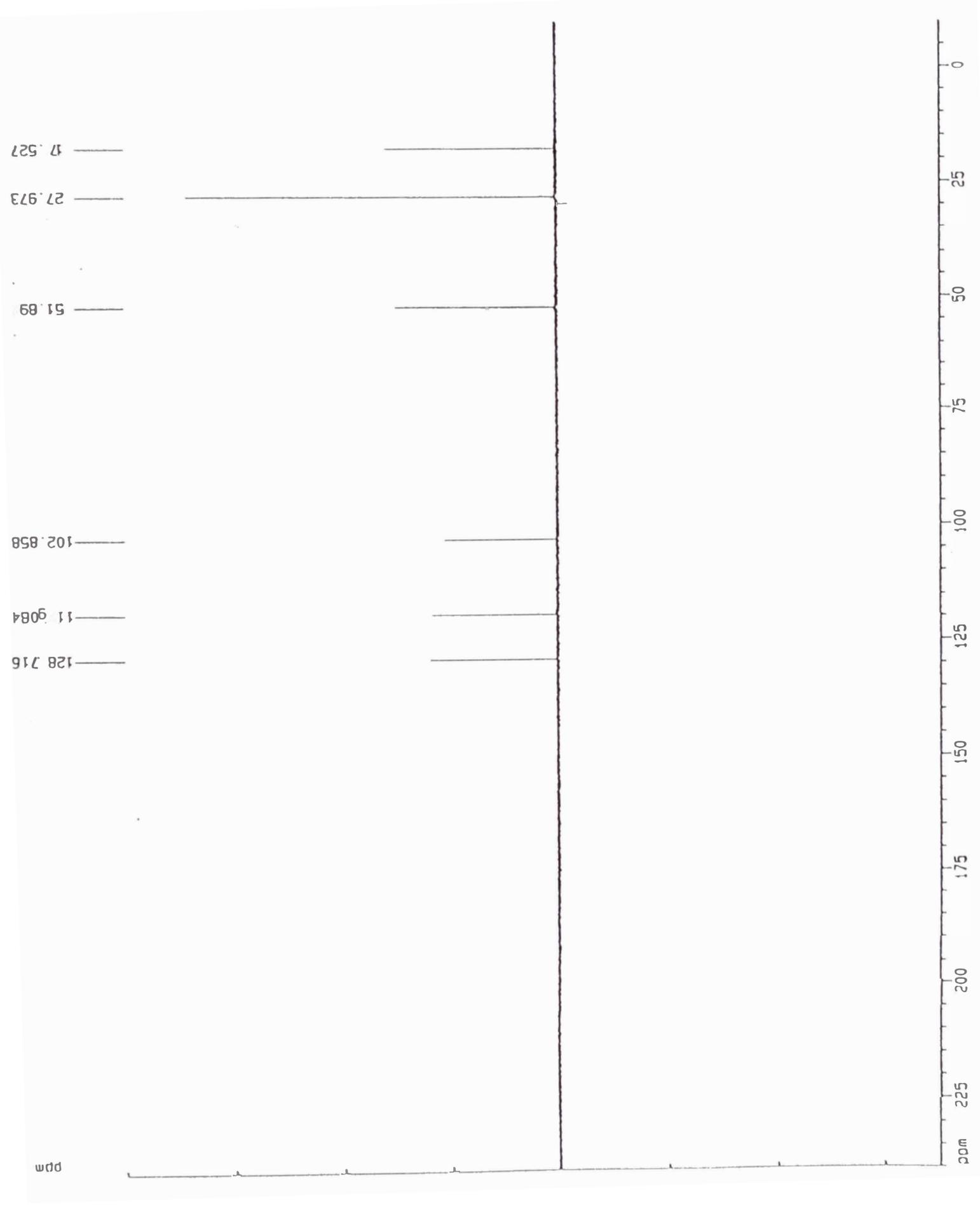


Cromeno, Baldoqui et al., 1999

Posición (C)	$\delta^{13}\text{C}$ (PVL1)	$\delta^{13}\text{C}$ (DEPT 135°) (PVL1)	$\delta^{13}\text{C}$ (Cromeno, Baldoqui et al., 1999)
2	76,22 (C)		77,20 (C)
2a/2b	28,01 (2CH <sub>3</sub> )*	27,97 (2CH <sub>3</sub> )	28,40 (2CH <sub>3</sub> )
3	128,75 (CH)	18,72 (CH)	131,00 (CH)
4	119,12 (CH)	119,08 (CH)	121,40 (CH)
4a	113,86 (C)		120,70 (C)
5	137,39 (C)		128,70 (C)
6	106,40 (C)		121,50 (C)
7	164,03 (C)		131,80 (C)
8	102,90 (CH)	116,30 (CH)	116,30 (CH)
8a	158,86 (C)		157,90 (C)
9	17,55 (C H <sub>3</sub> )	17,53 (CH <sub>3</sub> )	
1'	172,16 (C)		171,00 (C)
2'	51,91(OCH <sub>3</sub> )	51,89 (CH <sub>3</sub> )	



Espectro N°5.- Espectro de RMN <sup>13</sup>C (75MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PVL1 obtenida a partir de las hojas de *Peperomia villipetiola*.



Espectro N° 6.- Espectro de RMN<sup>13</sup>C-DEPT 135° (75MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PVL1 obtenida a partir de las hojas de *Peperomia villipetiola*.

## a).-Condiciones de trabajo

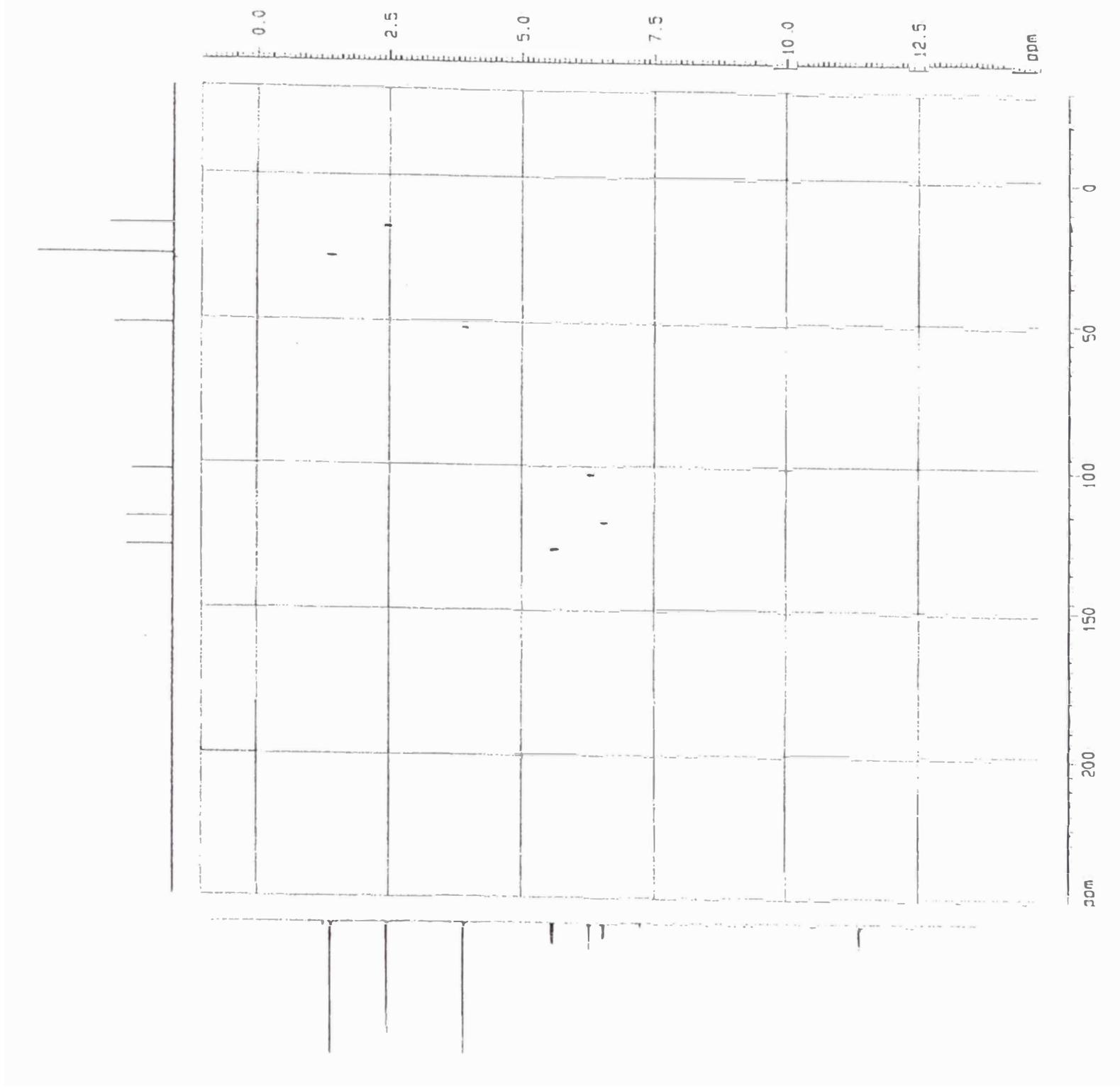
- i.- Equipo: El espectro de HETCOR fue registrado en un Bruker DPX-300, operando a 300 y 75 MHz.
- ii.- Operador: Operador de turno.
- iii.- Fecha: 23 mayo del 2002.
- iv.- Peso de la muestra: 20 mg
- v.- Solvente:  $\text{CDCl}_3$ .

## b).-Características del espectro

El espectro bidimensional HETCOR, presenta correlaciones de los carbonos con los hidrógenos enlazados a él separados por un enlace. (Tabla N° 7)

Se observa correlaciones que confirman la correspondencias propuestas:

2CH <sub>3</sub> :	28,01ppm (C) -----	1,41 ppm (6H)
1CH alifático:	128,75 δ (C) -----	5,60 ppm (H)
1CH alifático:	119,12 ppm (C)- ---	6,56 ppm (H)
1CH aromático:	102,90 (C) -----	6,29 ppm (H)
CH <sub>3</sub> :	17,55 ppm (C) -----	2,48 ppm (3H)
1OCH <sub>3</sub> :	51,91 ppm (C) -----	3,93 ppm (3H)



Espectro N° 7.- Espectro de HETCOR (300 Y 75MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PVL1 obtenida a partir de las hojas de *Peperomia villipetiola*.

## c).-Análisis del espectro

Héctor confirma correlaciones propuestas, dos metilos equivalentes, que en el espectro de RMN<sup>1</sup>H aparecen en 1,41 ppm.

Confirma la presencia de un tercer carbono enlazado a tres hidrógenos, que debe estar enlazado a un oxígeno, para formar un grupo metoxilo, confirmado por el desplazamiento químico característico en RMN<sup>13</sup>C en 51,91 ppm., que a su vez forma parte de un ester metílico enlazado al anillo aromático (esto es comprobado en HMBC).

También presenta un cuarto carbono enlazado a tres hidrógenos, que forma un grupo metilo enlazado al anillo aromático.

Héctor también presenta tres señales correspondientes a tres metinos, donde dos de ellos son alifáticos y el tercero aromático.

Y recordando que el espectro de RMN<sup>1</sup>H presenta una señal de singulete en 11.39 ppm., que debe pertenecer al hidrógeno de un grupo hidroxilo (esto es comprobado en HMBC), que es desplazado a un campo bajo por interacción con el oxígeno del grupo carbonilo que debe estar entonces en posición orto, a él, mediante un enlace intramolecular puente hidrogeno así ya tendríamos 4 sustituyentes (los otros dos carbonos forman parte del anillo piránico).

## 5.- Espectros de HMBC. Ver espectro N°8

## a).-Condiciones de trabajo

i.- Equipo: El espectro de HMBC fue registrado en un: Bruker DPX-500, operando a 500 y 125 MHz.

ii.- Operador: Operador de turno.

iii.- Fecha: 30 de Julio del 2002.

iv.- Peso de la muestra: 20 mg

v.- Solvente: CDCl<sub>3</sub>.

## b).-Características del espectro

El espectro bidimensional HMBC, presenta correlaciones de los hidrógenos y carbonos separados por 2 o 3 enlaces. (Tabla N° 7)

## c).-Análisis del espectro

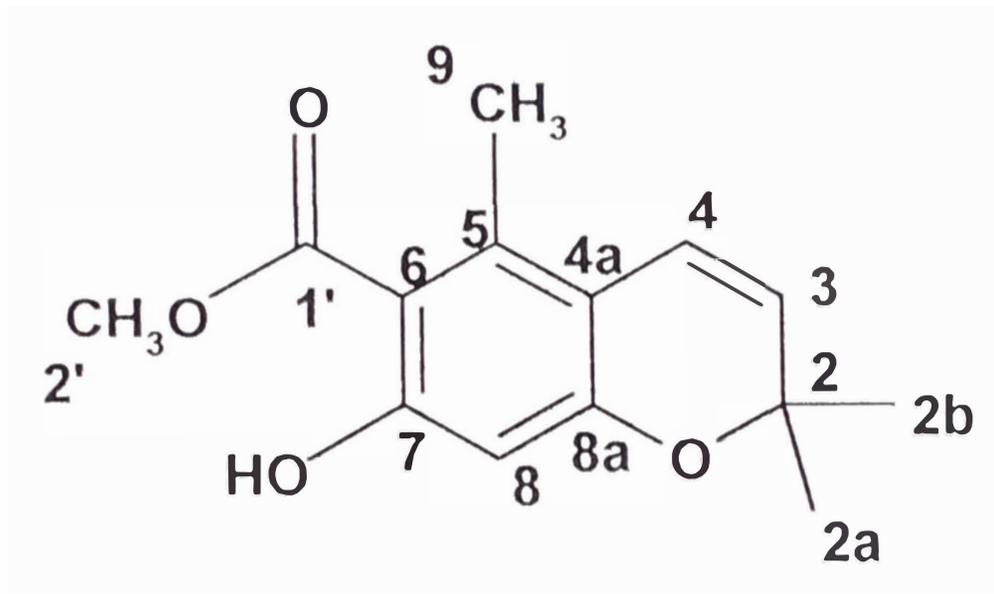
Hasta HETCOR, se había determinado que el anillo aromático esta penta sustituido: dos sustituyentes son parte del anillo piránico, el tercer

sustituyente es un éster metílico, el cuarto, un grupo hidroxilo, y el quinto un grupo metilo.

En este punto de la determinación espectrométrica, HMBC es realmente útil, debido a que proporciona información que determina la posición de cada sustituyente en el anillo. Los datos se encuentran en la Tabla N° 7.

d).-Conclusión:

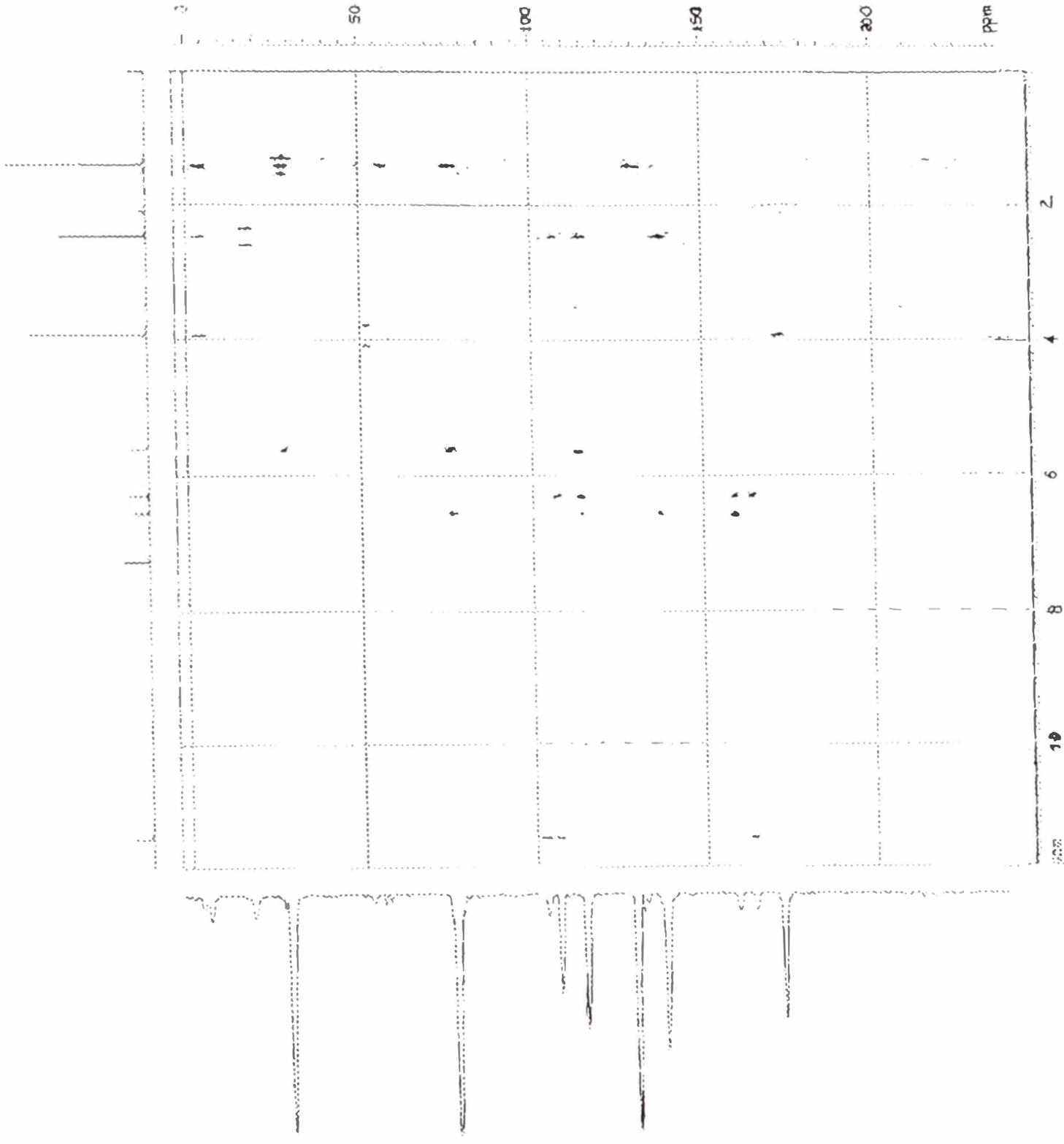
Los datos obtenidos por HMBC son completamente compatibles con la siguiente estructura:



Metil, 5-metil, 7-hidroxi-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato.

**Tabla N° 7.-** Datos observados en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), RMN de  $^{13}\text{C}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  - Dept 135° (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), HETCOR (300 y 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) y HMBC (500 MHz y 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , del cromeno PVL1.  
( \* El espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  -Dept 135° , 300 y 75 MHz, presenta estas señales)

Posición (C)	$\delta$ , multiplicidad, integración, $J$ (Hz), $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	HETCOR (C-H)	HMBC (H→C)
2		76,22 (C)		
2a/2b	1,41 (s, 6H)	28,01 (2CH <sub>3</sub> )	2CH <sub>3</sub> *	C <sub>2</sub> y C <sub>3</sub>
3	5.60 (d, 10, H)	128,75 (CH)	CH*	C <sub>2</sub> , C <sub>2a/2b</sub> y C <sub>4a</sub>
4	6.56 (d, 10, H)	119,12 (CH)	CH*	C <sub>2</sub> , C <sub>5</sub> , C <sub>8a</sub> y C <sub>4a</sub>
4a		113,86 (C)	C	
5		137,39 (C)	C	
6		106,40 (C)	C	
7		164,03 (C)	C	
8	6.29 (s, 1H)	102,90 (CH)	CH*	C <sub>4a</sub> , C <sub>6</sub> , C <sub>7</sub> y C <sub>8a</sub>
8a		158,86 (C)	C	
9	2.48 (s, 3H)	17,55 (C H <sub>3</sub> )	CH <sub>3</sub> *	C <sub>4a</sub> , C <sub>5</sub> y C <sub>6</sub>
1'		172,16 (C)	C	
2'	3.93 (s, 3H)	51,91(OCH <sub>3</sub> )	CH <sub>3</sub> *	C <sub>1</sub>
OH	11.39 (s, 1H)			C <sub>6</sub> , C <sub>7</sub> y C <sub>8</sub>



Espectro N° 8.- Espectro de HMBC (500 y 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PVL1 obtenido a partir de las hojas de *Peperomia villipetiola*

## 6.- Espectro de IR. Espectro N°9

## a).-Condiciones de trabajo

i.- Equipo: El espectro fue registrado en un equipo BOMEM MB 100 Perkin-Elmer.

ii.- Operador: Operador de turno.

iii.-Fecha: 21 de mayo del 2002.

iv.-Peso de la muestra: 10 mg. , se preparó una pastilla de KBr(s).( $\theta=5\text{mm}$ )

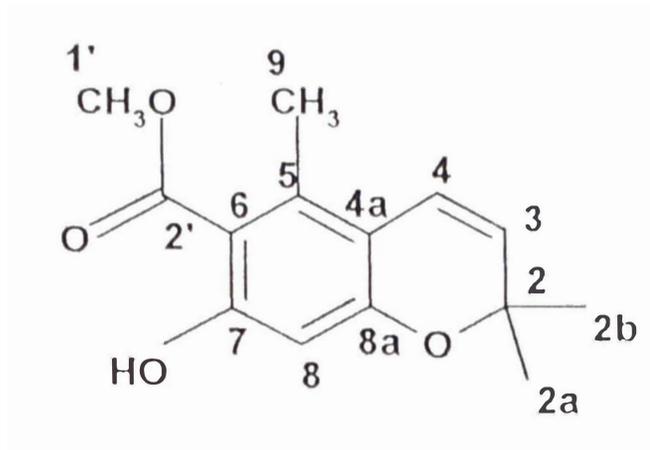
## b).-Características y análisis del espectro

El espectro de Infrarrojo presenta una banda en  $3441\text{ cm}^{-1}$  característica del enlace intramolecular de puente hidrogeno entre el oxígeno del grupo carbonílico y el hidrogeno del grupo hidroxilo en posición orto, este dato es muy importante, debido a que muestra que el grupo carbonilo se encuentra próximo del grupo hidroxilo, una banda de absorción intensa en  $1665\text{ cm}^{-1}$  característica del estiramiento del carbonilo del ester aromático, bandas entre  $2871\text{-}2972\text{ cm}^{-1}$  características de la deformación axial de C-H metilo, además presenta bandas en  $1589\text{ cm}^{-1}$ , entre  $1441\text{-}1467\text{ cm}^{-1}$ , entre  $1000\text{-}1320\text{ cm}^{-1}$  y entre  $900\text{ y }670\text{ cm}^{-1}$ , características de la deformación de los enlaces C-C del anillo aromático, (la presencia de todas estas bandas sugiere la presencia de un anillo aromático), una banda en  $1370\text{ cm}^{-1}$  característica de la deformación angular en el plano de O-H, una banda en  $1262\text{ cm}^{-1}$  característica de la deformación axial C-O .

Estas bandas son similares a los reportados en Mahiou, *Peperomia galiodes*, ( Sección 2.3)

## c).-Conclusión:

El espectro de IR fue particularmente informativo, debido a que presenta una banda en  $3441\text{ cm}^{-1}$  que muestra interacción entre el grupo carbonilo del ester metílico y el hidrógeno del grupo hidroxilo, sugiriendo una disposición estructural próximas entre sí, como se observa en la siguiente estructura, en general el espectro presenta bandas que corresponden a lo esperado para la estructura de la sustancia PVL1.



Metil, 5-metil, 7-hidroxi-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato

## 7.- Espectro de UV. Espectro N°10

### a).- Condiciones de trabajo

i.- Equipo: El espectro fue registrado en un espectrómetro Philips U-300.

ii.- Operador: Operador de turno.

iii.- Fecha: 21 de mayo del 2002.

iv.- Peso de la muestra: 10 mg.

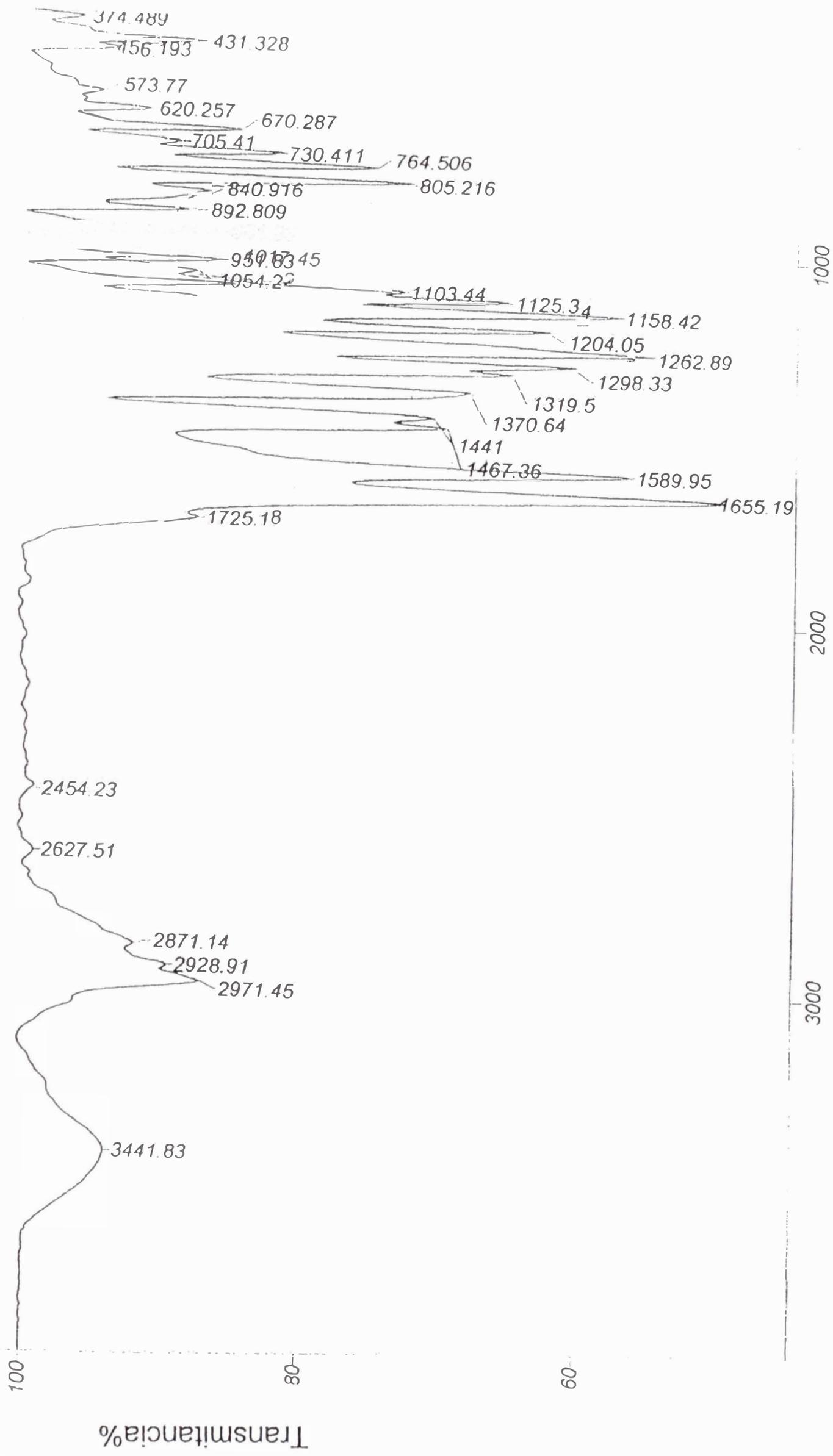
### b).-Características:

Máximo de absorción,  $\lambda_{\max}$  ( $\epsilon$ ): 247 (26462), 251 (25994) y 318 (3000).

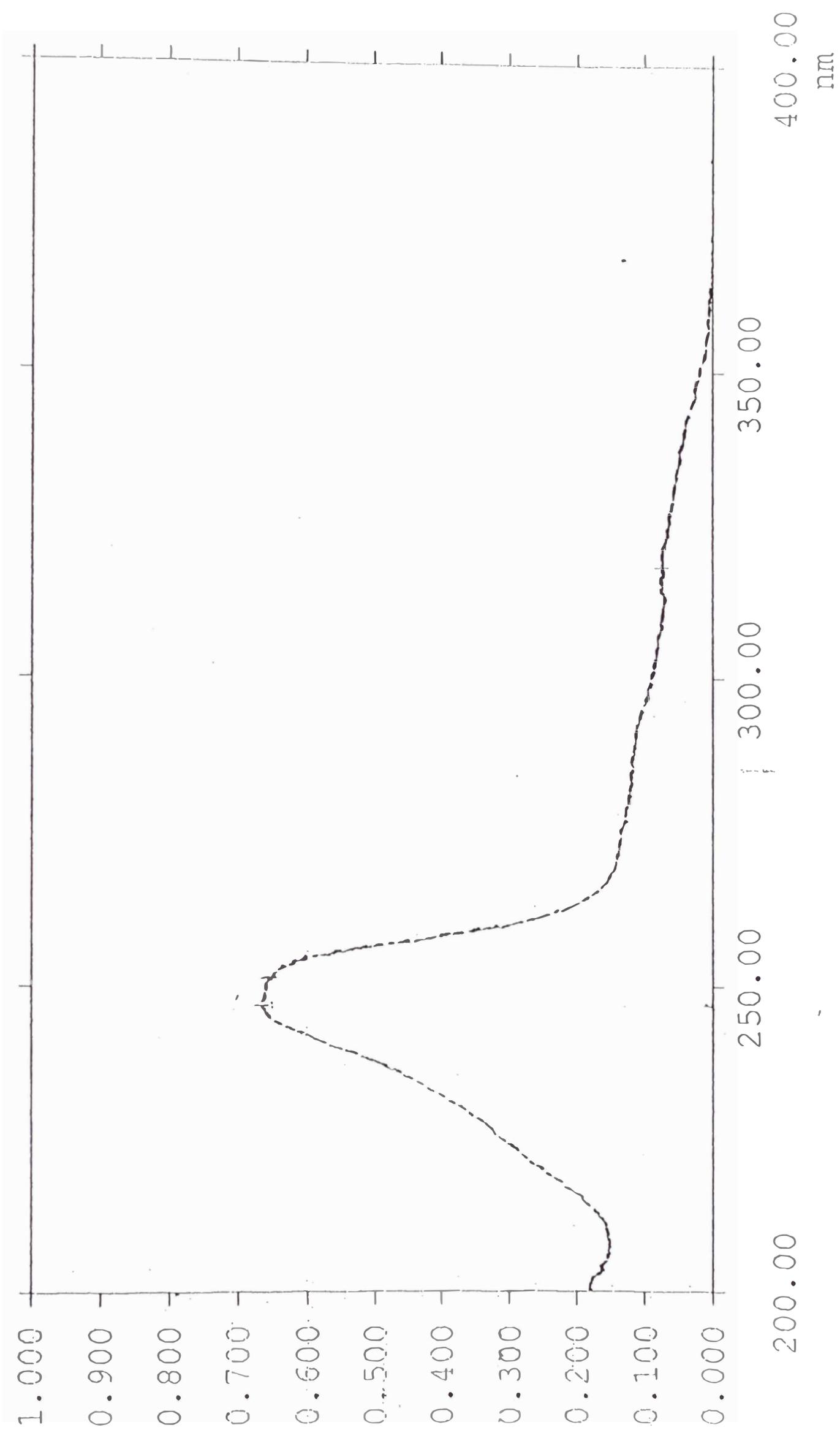
### c).-Análisis del espectro:

Estos valores son análogos a aquellos publicados en Díaz D. et al. (1987) y Mahiou, V. et al. (1995) (Secciones 2.2 y 2.3).

d).-Conclusión.- El espectro UV obtenido corresponde a lo esperado para la estructura de la sustancia PVL1.



Espectro N° 9.- Espectro de IR de PVL1 obtenida a partir de las hojas de *Peperomia villosa*.

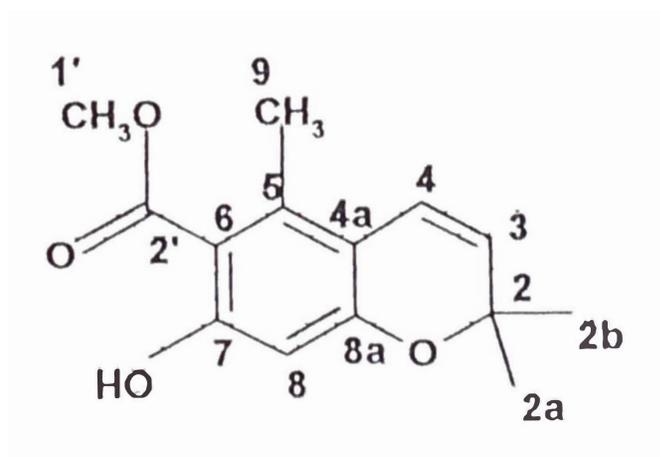


Espectro N° 10.- Espectro de UV de PVL1 obtenida a partir de las hojas de *Peperomia villipetiola*.

#### **IV. RESUMEN DE RESULTADOS**

I.- Obtención del cromeno a partir de las hojas de "*Peperomia villipetiola*"

- a. A partir de 24,5 g de hojas secas y molidas de *Peperomia villipetiola*, se obtuvo por extracción con una mezcla de mediana polaridad de solventes DCM-MeOH (2:1), un extracto (previamente filtrado a través de celita) cuya parte soluble en DCM, fue aplicado a una columna cromatográfica "flash" obteniéndose 28 fracciones, que presentaron siete sustancias, se purificó el segundo menos polar, obteniéndose 83 mg al cual se denominó PVL1 (Rf= 0,63).
- b. La caracterización clásica de PVL1 se realizó mediante, la determinación del Rf =0,63 y el análisis elemental (C 67,07%, H 6,49%, O 26,44%) que fue compatible con los datos de espectrometría de masas. Los espectros de RMN<sup>1</sup>H (300MHz), RMN<sup>13</sup>C(75MHz), RMN<sup>13</sup>C (DEPT 135°), HETCOR (300 y 75 MHz), HMBC (500 y 125 MHz), IR y UV, presentaron datos similares reportados para cromenos aislados por Baldoqui D. et al. (1999), Díaz D. et al. (1987) y un ácido carboxílico prenilado por Mahiou, V. et al. (1995), que en conjunto, proporcionaron información suficiente, para determinar, una nueva estructura:



Metil, 5-metil, 7-hidroxi-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato

**V. CONCLUSIONES**

- 1 El extracto DCM-MeOH de las hojas de la *Peperomia villipetiola* fue fraccionada por técnicas cromatográficas resultando el aislamiento de siete sustancias y en la identificación por técnicas espectroscópicas de la segundo menos polar ( $R_f=0,63$ ), el Metil, 5-metil,7hidroxi-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilato, que resultó ser un compuesto nuevo.
  
- 2 El cromeno aislado de la *Peperomia villipetiola* debe ser oriundo de la vía policetidea, tal como previas investigaciones afirman, como ruta biosintética de cromenos.

**VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

1. Ampofo, S.A.; Roussis, V. And Wiemer, D. F. (1987) *Phytochemistry*, **26**,2367.
2. Andean Botanical information System. [www.sacha.org](http://www.sacha.org)
3. Baldoqui, D.C.; Jorge, M.; Cavalheiro, A.; Silva, B. V.; Young, M.C. and Furlan, M. (1999) *Phytochemistry*, **51**, 899-902.
3. Barneji, A. And Nandi, (1988) *G. Indian Journal of Chemistry*, **27B**, 163.
4. Bayma, J., Arruda, M. S.M.; Muller, H.A.; Arruda, A.C. and Canto, W., (1998) *Phytochemistry*, **55** , 779-782.
5. Dominguez, X.A. and Alarcon, J.B., (1985) *Journal of Ethnopharmacology*, **13**, 139.
6. Diaz, D. P.; Arias, C. T. and Nathan, P. J. (1987). *Phytochemistry*, **26** (3), 809- 811.
7. Dewick, P. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach, ed. John Wiley & Sons. New York USA. 1997.
8. Evans, P.H.; Bowers, W.S.; Funk, E. J. And Evangeline, J. (1984) *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **32**, 1254.
9. Graeza, L. and Ruff, P. (1986) *Archives of Pharmacology*, **319**,475.
10. Govindachari, T.R.; Krishna, G. N.; Partho, P.D., (1998) *Phytochemistry* , **49**, 2129-2131.
11. Lin, T. J., Ramstad, E. And Heistein, P. (1974) *Phytochemistry* , **13**, 1817-1823.
12. Miyakado, M.; Nakayama, I.; Yoshioca, H. And Nakatami, N., (1979) *Agriculture and biological Chemistry*, **43**, 1609.
13. Moreira, L.,Guimarães F.,Kaplan C. (1998), *Phytochemistry*, **48** (6),1075-1077.
14. Monache, F. D. And Compagnone, R. S., (1996), *Phytochemistry*, **43**, 1097- 1098.
15. Mahiou,V., Roblot,F., Hocquemiller,R., Cavé,A. (1995). *Journal Natural Products*, **58**,324-328.
16. Mahiou, V., Roblot, F., Hocquemiller, R., and Cavé, A., (1996). *Journal Natural products*, **59**, 694-6970
17. Mann,J., Chemical Aspect of Biosynthesis, ed. Oxford University Pres, New York, 1994.

18. Macbrigde, J. F. Flora del Perú. Field museum of natural history, ed. B. Edahlgren, departament of botany. Chicago USA. Vol. II (1). 1937.
19. Mabberley, D.J. The plant-book. A portable dictionariy of the higher plants, ed. Cambrige Univ. Press. New York, 1997.
20. Navindra, P., Stewart Mc Lean, and Reynolds, W., (1998) *Phytochemistry*, **49** (5), 1389-1391.
21. Lock de Ugaz, O.; Investigación Fitoquímica, ed. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. **FALTA**
22. Orjala, C.A.; Eldelmeier, C.A.; Wright, A. D.; Rali, T. and Sticher, Otto., (1993), *Plant Medical*, **59**, 546.(1)
23. Orjala, C.A.; Eldelmeier, C.A.; Wright, A. D.; Rali, T. and Sticher, Otto., (1993), *Helvetica Chimica Acta*, **76**, 1481.(2)
24. Peperomia.net, [WWW.peperomia.net](http://WWW.peperomia.net)
25. Proksch, P. and Rodriguez, E. (1975), *Phytochemistry*, **22**, 235-2348.
26. Reyna Pinedo, V., Guías de laboratorio de química Orgánica.
27. Roussis, V.; Ampofo S. A, and Wiemer, D. F. (1990) *Phytochemistry*, **29** (6), 1787-1788.
28. Som, U. K.; Dutta, C.P.; Sarkar, J.; and Banerjee, R.D., (1985) *National Academic of Science letters*, **8**, 109.
29. Saed, S. A.; Farnaz, S.; Simjee, R.U. and Malik, A., (1993) *Biochemistry Society Transactions*, **21**, 462.
30. Sumathkuty, M.A. and Rao, J. M. (1993) *Fitoterapia*, **64**, 281.
31. Singh, J.; Podar, M.A.; Atal. C.K, and Dhar, K. L. (1974) *Phytochemistry*, **13** , 677.
32. Steyemark A.S. Flora de Venezuela, ed. Educación ambiental, **2**(2), 1984.
33. Tayler, D.W.; and Hickey, J.L. (1984) *Plant. Syst. Evol.*, **180**, 137.
34. Tanaka, T., Asai, F., Inuma, M., (1998) *Phytochemistry* , **49**, 229-232.
35. Tunmann, O., (1918) *Apotheker Zeitung*, **33**, 353.
36. Vaisberg, A.J.; Fernandez, I.D.; Maldonado, H.; Villegas, L.F.; Zavaleta, A.; and Hammond, G.B. (1997). *Journal of Ethnopharmacology* .**55**, 193-200.
37. Vyas, and Mulchandani, N.B. (1980) *Phytochemistry*, **19**, 2597-2598.