

# CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE ALGUNAS ESPECIES DE LA FAMILIA PIPERACEAE

\* Jairo Calle A.

## 1. INTRODUCCION

La familia Piperaceae comprende de 10 a 12 géneros y cerca de 1200 especies, de las cuales 700 corresponden al género **Piper** (1). Los ejemplares de esta familia pueden ser arbustos, frutices o hierbas. Entre nosotros es más frecuente encontrar arbustos que crecen en climas cálidos o fríos.

En la flora Colombiana están presentes los géneros **Peperonia**, **Piper**, **Pothomorphe**, **Sarcorrhachis** y **Trianaeopiper**, como numerosas especies de las cuales se encuentran 430 (2) en el Herbario Nacional Colombiano.

La palabra **Piper** probablemente se deriva del sánscrito que se refiere al sabor picante y aromático que producen los frutos de **Piper nigrum L.**

Planta ésta que Theophrastus (284 AC) Dioscórides y Plinio mencionan como artículo de cambio entre la India y Europa.

En algunos pueblos de Asia Oriental constituye un hábito masticar las hojas de **Piper Betle L.** Esta práctica cubre más de una tercera parte de la humanidad. En Orissa (India) la raíz de esta planta se usa como anticonceptivo; asimismo se sabe que los frutos de **Piper cubeba Lf.** eran usados por los antiguos médicos árabes y persas para el tratamiento de las enfermedades genitourinarias.

Los extractos de **Piper peepuloides** se han usado para producir convulsiones en los animales de experimentación. Por otra parte, los frutos del **Piper auranticum Wall** son usados en la India como ocitócico.

De esta familia se han aislado: hidrocarburos, fenilpropanos, lignanos, flavonas, isobutilamidas, alcaloides, epóxidos y aceites esenciales (3).

La abundancia del material vegetal y la diversidad de usos de estas plantas, nos motivó a efectuar este trabajo de investigación.

---

\* Profesor Asociado Departamento de Farmacia

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Material botánico.

Las plantas de la familia **Piperaceae** se han estudiado bastante y principalmente sus frutos, tallos y raíces (3, 4, 5, 6, 7, 8). Nosotros para esta investigación elegimos la parte aérea de la planta (hojas), por ser tal vez la menos estudiada, pero principalmente atraídos por los diversos usos que se les dá en medicina popular, en el tratamiento de disenterías, para curar llagas rebeldes, contra la blenorragia, para dolores de estómago, y como digestivo (2).

El material vegetal fué recolectado en mayo de 1977 en diferentes sitios del Departamento de Cundinamarca. Las plantas siguientes, clasificadas por el Biologo Eduardo Barrera T. (Departamento de Biología- Universidad Nacional) , se utilizaron en la parte preliminar:

**Piper bogotense C.D.C.**

**Piper tuberculatum Jacq.**

**Piper reticulatum L.**

**Piper marequitense C.D.C.**

**Piper aduncum L.**

Las hojas de estas plantas se secaron en un horno con aire circulante a 40°C, se molieron y el polvo resultante se guardó en recipientes adecuados, para su posterior utilización.

### 2.2. Marcha fitoquímica preliminar

A las muestras de las especies de las plantas anteriormente citadas se les efectuó un estudio preliminar sometiéndolas a una marcha fitoquímica modificada en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional, por el Profesor Antonio Sanabria.

Los resultados obtenidos se muestran en la TABLA 1. Por la abundancia del material vegetal y la facilidad de recolección se decidió trabajar con el **Piper aduncum L.** Esta planta se recolectó en la carretera que conduce a la población de Une, situada al Oriente del Departamento de Cundinamarca, a 1500 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura promedio de 18°C.

### 2.3. Aislamiento y purificación de los principales componentes del **Piper aduncum L.**

#### 2.3.1. Extracción y separación de los compuestos PA 1 y PA 2.

Las hojas secas y molidas del **Piper aduncum L.** (2600 g) se extrajeron con éter de petróleo (P.E. 40-60°C(8L)) al reflujo, durante 48 horas (ver DIAGRAMA 1). El extracto etéreo se concentró a presión reduci-

**TABLA I**  
**Resultados de la marcha filoquímica preliminar**

PLANTA ANALIZADA (HOJAS)	PRUEBA EFECTUADA PARA								
	Antraquinonas	Flavonoides	Fenoles	Alcaloides	Taninos	Saponinas	Esteroles	Heterósidos cardiotónicos	Sesquiterpenlactonas
Piper bogotensis	(-)	+++	+++	++	(-)	(-)	+++	(-)	(-)
Piper Tuberculatum Jacq.	(-)	(-)	+++	+++	(-)	(-)	+++	(-)	(-)
Piper Rediculata	(-)	(-)	+++	++	(-)	(-)	+++	(-)	(-)
Piper mariquicense L.	(-)	+++	+++	+	(-)	(-)	+++	(-)	(-)
Piper aduncum L.	(-)	+++	+++	+	(-)	(-)	++	(-)	(-)
(-) negativo	(++) abundante								
(+) escaso	(+++) muy abundante								

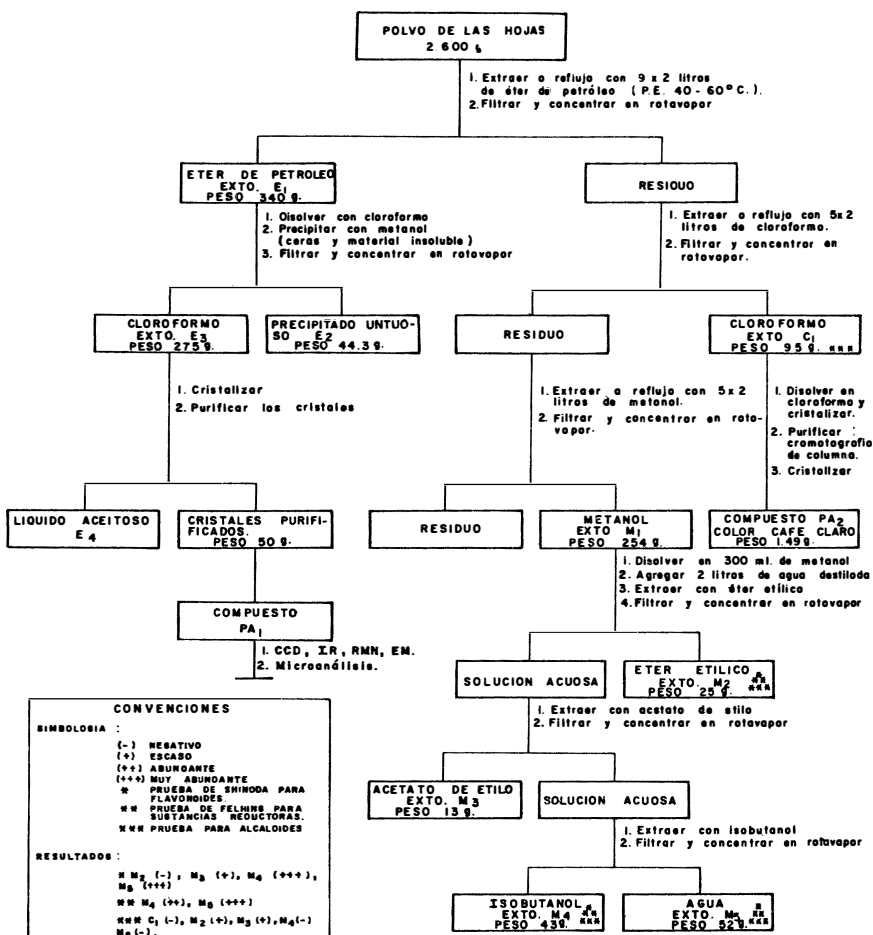
da dando un extracto E<sub>1</sub>. Este extracto se disolvió en cloroformo y se precipitaron ceras y material insoluble con metanol. Se filtró y el filtrado se concentró en rotavapor.

El extracto obtenido se disolvió en etanol, se le cambió la polaridad adicionándole agua destilada hasta que el líquido tomó una apariencia lechosa.

Se dejó cristalizando de un día para otro; los cristales se separaron mediante filtración y se lavaron con agua destilada, se secaron a una temperatura de 40°C.

Para la purificación del compuesto, se disolvieron los cristales en etanol de 90°, se les agregó carbón activado al 1% y se filtró sobre celita. Se procedió a cristalizar de la manera indicada anteriormente; la recrystalización se hizo por tres veces. A este compuesto se le denominó PA<sub>1</sub>. El residuo de material vegetal que quedó se extrajo calentando a reflujo con 10 L. de cloroformo durante 48 horas. Se reunieron los extractos y se filtraron; el filtrado se concentró a presión reducida con la ayuda de rotavapor. Los cristales obtenidos directamente a partir del extracto se disolvieron en etanol, se adicionó carbón activado al 1% y se filtró sobre celita. Variando la polaridad de la solución anterior con agua, se obtuvo por cristalización el compuesto PA<sub>2</sub> (ver DIAGRAMA I).

**DIAGRAMA I**  
**ASLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DEL**  
**PIPER ADUNCUM L.**



**CONVENCIONES**

**SIMBOLOGIA :**

(-) NEGATIVO  
 (+) ESCASO  
 (++) ABUNDANTE  
 (+++) MUY ABUNDANTE  
 \* PRUEBA DE SHIMODA PARA FLAVONOIDES  
 \*\* PRUEBA DE FELIUS PARA SUSTANCIAS REDUCTORAS.  
 \*\*\* PRUEBA PARA ALCALOIDES

**RESULTADOS :**

M<sub>2</sub> (-), M<sub>3</sub> (+), M<sub>4</sub> (+++), M<sub>5</sub> (\*\*\*\*)  
 M<sub>1</sub> (\*\*\*\*)  
 \*\* M<sub>4</sub> (++) , M<sub>5</sub> (+++)  
 \*\*\* M<sub>1</sub> (-), M<sub>2</sub> (+), M<sub>3</sub> (++) , M<sub>4</sub> (-)  
 M<sub>5</sub> (-).

Otro método usado para obtener este compuesto fue la cromatografía en columna.

El residuo obtenido de la extracción anterior se extrajo calentando al reflujo con 10 L de metanol durante 72 horas, se reunieron los filtrados y se concentraron a presión reducida con la ayuda de rotavapor. Se designó como extracto  $M_1$ . Este extracto  $M_1$  se disolvió en una mezcla de metanol y agua destilada, extrayéndose enseguida con éter étílico. Se reunieron los extractos, se agregó sulfato de sodio anhidro para quitarle la humedad y se concentraron a presión reducida con la ayuda de rotavapor, obteniéndose el extracto  $M_2$ .

El residuo hidrometanólico anterior se extrajo con acetato de etilo por varias veces. Se reunieron los extractos, se les agregó sulfato de sodio anhidro para quitarle la humedad, se concentró a presión reducida con la ayuda de rotavapor, obteniéndose así el extracto  $M_3$ .

La solución acuosa proveniente de la extracción anterior se extrajo nuevamente con alcohol isobutilico por varias veces, se reunieron los extractos y se concentró a presión reducida con la ayuda de rotavapor, obteniéndose el extracto  $M_4$ ; por último, la solución acuosa restante se concentró en baño de maría, obteniéndose el extracto  $M_5$ . Todas las extracciones efectuadas con la anterior serie de solventes: éter étílico, acetato de etilo, alcohol isobutilico se hicieron con el propósito de separar los flavonoides y compuestos fenólicos como aglicones o glicósidos con uno, dos o tres azúcares en su molécula.

A los extractos  $C_1$ ,  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$ , y  $M_5$  se les hicieron pruebas para flavonoides (Shinoda), para sustancias reductoras (Felhing) y para alcaloides (Dragendorff, Valser, Mayer).

### 2.3.2. Identificación del compuesto $PA_1$

- a. La pureza del compuesto  $PA_1$  se comprobó mediante cromatografía de capa fina sobre placas de Silica Gel HF 254 utilizando como eluentes los siguientes sistemas de solventes:

$CHCl_3 - CH_3 - COCH_3(30:70)$ ;  $CHCl_3 - Met\ OH(80:20)$ .

Como reveladores se usaron:

1. Luz ultravioleta 254 nm
2. Vainillina al 3% en etanol
3. Acido fosfomolibdico al 3% en etanol

Después de usar los reveladores 2 y 3 se calentaron las placas a 110°C hasta la aparición de las manchas.

- b. Equivalente de neutralización. El equivalente de neutralización se determinó de la siguiente manera: 179,2 mg del compuesto PA<sub>1</sub> se disolvieron en etanol de 96% neutralizado con NaOH y se tituló con NaOH 0.92 N.

Como blanco se usó etanol de 96%. Se aplicó la siguiente fórmula para encontrar el valor:

$$\text{Equivalente de neutralización} = \frac{\text{Peso del problema en mg}}{\text{Vol. NaOH} \times N}$$

El equivalente de neutralización de este compuesto fué de 291,2.

- c. Análisis elemental. El análisis elemental del compuesto PA<sub>1</sub> fué hecho en el Departamento de Química de la Universidad de Alabama por el Dr. William Paudler.

Dió los siguientes resultados:

C = 75,15%; H = 8,43%; O = 16,42%.

La fórmula condensada es: C<sub>18</sub> H<sub>24</sub> O<sub>3</sub> .

Los datos calculados para esta fórmula son:

C = 77,77%; H = 7,40%; O = 14.83%

- d. Punto de fusión. Se utilizó el fusiómetro Buchi modelo SMP 20. El valor obtenido sin corregir fué de 92°C.
- e. Estudio espectroscópico. Espectro al U.V.: Se determinaron en un espectrofotómetro Beckman DEG, usando como solvente metanol R.A.

$$\lambda \text{ máx.} = 237,5 \text{ nm}$$

Espectro al I.R.: Se tomaron en un espectrofotómetro marca Perkin Elmer, modelo 457. La muestra se trabajó en pastilla de K Br.

$\nu$  max. = 3.400- 2.890 (OH asociado), 2.590 (CH-OCH<sub>3</sub>), 1688 (C=O del COOH), 1678 y 1598 (C=C aromático), 848 (O-CH<sub>3</sub>), 794 cm<sup>-1</sup> (aromático)

Espectros de RMN<sup>1</sup>H: Se tomaron en espectrógrafo marca Varian, modelos EM 360 de 60 MHz y EM 390 de 90 MHz.

Valores dados en ppm ( $\delta$ ) ( $\text{CDCl}_3$ ) 11.00 = (S ancho  $W \frac{1}{2} = 14$  Hz, 1 H, COOH), 7.80 (S, 2H,  $C_2$  y  $C_6$ ), 5.20 (m, 2H,  $W \frac{1}{2} = 18$  Hz H-C de los prenilos), 1,85 (S, 12H,  $\text{CH}_3$  prenilos).

Espectro de masas: Se hizo en un espectrómetro JMS-051G-2 Jeol. (73 eV) iones m/e (%):  $M^+$  288 (98%), 273 (7), 257 (18), 243 (60), 232 (61), 217 (99), 189 (100), 69 (57).

### 2.3.4. Aislamiento, purificación e identificación del compuesto $\text{PA}_3$

Del extracto acuoso  $M_5$  (VER DIAGRAMA I) cristalizó directamente una sustancia que se purificó utilizando una mezcla de etanol agua (8:2), se recrystalizó tres veces. Este compuesto se secó en un horno a una temperatura de  $60^\circ\text{C}$ . No redujo el reactivo de Felhing, pero al hacer la hidrólisis y repetir la prueba de azúcares reductores con este reactivo la reacción fue positiva. Para comprobar la pureza del compuesto se usó cromatografía en capa fina utilizando como adsorbente Sílica Gel G, ácido bórico 0.1M y como solvente alcohol isopropílico agua (4:1); como revelador se utilizó el reactivo de Lemieux.

Solución A: Peryodato de Sodio al 2% en agua destilada.

Solución B: Permanganato de Potasio al 1% en solución de carbonato de sodio al 2%. Se mezclan A y B en proporción de 4 a 1; este reactivo puede durar hasta una semana en refrigeración.

Comparando la sustancia aislada con un patrón de sacarosa se obtuvo una sola mancha de color verde claro sobre un fondo violeta. Al compuesto aislado y a la sacarosa se le hicieron espectros al infrarrojo empleando pastilla en KBr.

Los dos espectros resultaron ser iguales en cuanto a número y posición de las bandas.

## 3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

El compuesto aislado y purificado que se denominó  $\text{PA}_1$  muestra en el espectro IR un grupo carboxilo libre, un grupo metoxilo y dos grupos dimetil-alilo (prenilos), además aromaticidad, lo que nos indica que estamos frente a un ácido aromático con sustituyentes alifáticos y un metoxilo. La RMN muestra un protón a 11 ppm, que es típico de ácidos carboxílicos; dos protones aromáticos equivalentes, un grupo metoxilo y cuatro metilos sobre doble enlace. El desplazamiento de dos protones equivalentes es el correcto para cuando los prenilos están meta al carboxilo y orto al metoxilo, confirmando lo observado en el IR.

El espectro de masas presenta un ión molecular a 288 y más fragmentos típicos para compuestos que contienen los grupos arriba descritos en sus moléculas. Así pues, tenemos fragmentos tales como: m/e 257 que corresponde a la pérdida de un grupo metoxilo; m/e 271 pérdida de OH que corresponde a una pérdida de 99. Estas fragmentaciones pueden verse en el esquema de la FIGURA 1.

El espectro UV de esta sustancia presenta alguna diferencia con respecto al calculado teóricamente. Sin embargo, la diferencia entre el calculado (261 nm) y el experimental (257,5 nm) no es muy significativo y más si nos atenemos a la dificultad que existe para aplicar las reglas de Scott.

El compuesto PA<sub>3</sub> se identificó por medio de cromatografía en capa fina y por espectroscopía al infrarrojo.

El compuesto PA<sub>2</sub> no se logró identificar porque su estructura presenta dificultades por lo cual se hace necesario utilizar la Resonancia de C13 una vez se haya logrado aislar y purificar nuevamente dicho compuesto.

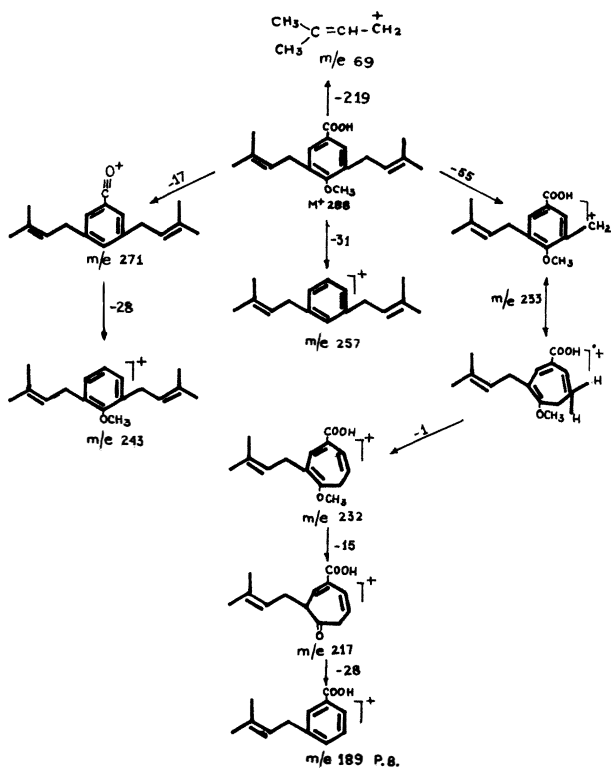
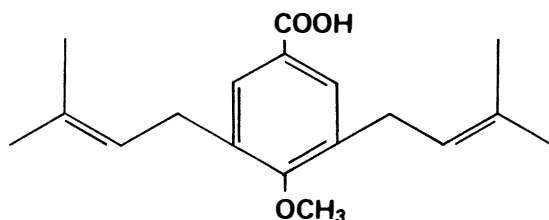


FIG. 1 FRAGMENTACION DEL COMPUESTO PA<sub>1</sub>



#### 4. CONCLUSIONES.

1. Todas las especies de Piper estudiadas presentan un buen contenido de esteroides y fenoles; no tienen antraquinonas ni heterósidos cardiotónicos, ni sesquiterpenlactonas; sólo tres especies mostraron la presencia de flavonoides y todos alcaloides en diferentes cantidades, como se observó en la marcha fitoquímica preliminar.
2. Del extracto metanólico y utilizando disolventes de polaridad creciente como: éter etílico, acetato de etilo, alcohol isopropílico y finalmente concentrando el extracto acuoso, se logró separar los flavonoides como aglicones y glicósidos que tienen de uno a tres azúcares en su molécula.
3. De acuerdo con los datos espectroscópicos y con el análisis elemental del compuesto PA<sub>1</sub> podemos concluir que la estructura probable de dicho compuesto es la siguiente:



El método de extracción y purificación usado es óptimo para aislar este compuesto, el cual se encuentra en una concentración aproximada de 2%.

4. A partir del extracto acuoso M<sub>5</sub> se logró aislar e identificar un disacárido: la sacarosa.

**Nota:** Este trabajo se llevó a cabo dentro del proyecto de investigación titulado "Comprobación científica de la actividad medicamentosa y de los principios activos de plantas de la flora colombiana, usualmente empleadas como medicinales", del cual es director el Doctor Jorge E. Olarte y copatrocinado por Colciencias.

#### RESUMEN

El examen preliminar de las 5 especies de Piper analizadas mostró la presencia de flavonoides, alcaloides y esteroides.

A partir del extracto en éter de petróleo de las hojas de **Piper aduncum L.** se aisló y purificó un compuesto y para su identificación se utilizaron técnicas espectroscópicas. Se propone la siguiente estructura para el compuesto: ácido 3,5- $\gamma$ - $\gamma$ - dimetil-alil- 4- metoxi-benzoico, el cual se encuentra en buena proporción en esta planta

Del extracto acuoso se aisló un disacárido, el cual se identificó como sacarosa.

### SUMMARY

Flavonoids, alkaloids and steroids were found in five species of Piper studied.

One compound was obtained in good yield from the petroleum ether extract of leaves of **Piper aduncum** and further purified and identified by spectroscopic techniques. The proposed structure for this compound is 3,5- $\gamma$ - $\gamma$ - Dimethyl, allyl -4-methoxy-benzoic acid.

Sacarose was isolated from the aqueous extract.

### BIBLIOGRAFIA

1. Lawrence, H.M. George. Taxonomy of vascular plants. The Macmillan Company. N.Y. pág. 444 (1951).
2. García-Barriga H., Flora Medicinal de Colombia, Botánica Médica. Tomo I, Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional, Bogotá, D.E., Colombia (1975).
3. Atal, C.K., Dhar, K.L. and Pelter, A. Structure of pipataline, an extractive from Piper peepuloides Roxb. Chem. Ind. London (1967).
4. Atal, C.K., Dhar, K.L. and Singh J., The Chemistry of Indian Piper species. Lloydia, 38, 256 (1975).
5. Atal, C.K.; Dhar, K.L.; and Pelter, A. Isolation and Structure determination of (+) diaudesmin. The first naturally occurring diaxially substituted 3,7-dioxobicyclo (3,3,0) octane Lignan, J. Chem. Soc. (c) 2228 (1967).

6. Takahashi, S. The presence of tumor inhibitor crotepoixide (futoxide) in Piper futoxide. *Phytochemistry* 8, 321 (1969).
7. Dhar, K.L., Atal, L.K. and Pelter R, A. Flavonoids compounds from Piper peepuloides. *Planta Médica* 18, 332 (1976).
8. Calle-Alvarez J., Ferreira-Ardila, S., Estudio fitoquímico del aceite esencial de Piper Lenticellosum C.D.C., *Rev. Col. Quím. Farm.* Vol. 2, No. 381 (1973).