

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Aislamiento bioguiado y análisis espectroscópico de un compuesto presente en fracciones
con actividad antioxidante obtenidas de extractos apolares clorados en hojas de *Piper*
patulum.

José León Castillo Arroyave

Químico Farmacéutico

Guatemala, Marzo de 2019

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Aislamiento bioguiado y análisis espectroscópico de un compuesto presente en fracciones
con actividad antioxidante obtenidas de extractos apolares clorados en hojas de *Piper*
patulum

Informe de Tesis

Presentado por:

José León Castillo Arroyave

Para optar a título de

Químico Farmacéutico

Guatemala, Marzo 2019

JUNTA DIRECTIVA

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	Secretaria
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal I
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Byron Enrique Pérez Díaz	Vocal IV
Br. Pamela Carolina Ortega Jiménez	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

- A mi *alma mater* la Universidad de San Carlos de Guatemala -USAC-
- A PhD. Cecilio Álvarez Toledano por guiarme y enseñarme a lo largo del proyecto.
- La Universidad Nacional Autónoma de México, por su disposición a realizar las pruebas instrumentales.
- Licda. Nora Guzmán Giracca por abrirme las puertas en productos naturales y por su apoyo.
- A mis amigos, Byron López Mayorga, Rony Jose Letona Lee, Alvaro José Castillo Zeceña, Sergio Eduardo Valdéz España, Rodrigo José Wolford Ramírez, Fernando Andrés Hernández, Ramiro Mejía, por su ayuda y gran apoyo durante el proyecto.
- Lic. Armando Cáceres Estrada por su amabilidad y disposición para brindarme el material vegetal necesario para el proyecto.
- A mi asesor Byron Fuentes por su apoyo incondicional.
- A revisor Allan Vasquez por su ayuda y dedicación.
- Diana Pinagel por abrirme las puertas en el departamento de Química Orgánica.

DEDICATORIA

- A mis papas
- A mis hermanas
- A mis abuelitos
- A mi padrino y madrina
- A María Raquel

Por ser las personas mas importantes en mi vida, los quiero.

INDICE

1	RESUMEN.....	1
2	INTRODUCCIÓN.....	3
3	MARCO TEÓRICO.....	5
3.1	Familia piperaceae.....	5
3.2	Género <i>Piper</i>	6
3.2.1	Estudio Fitoquímico.....	7
3.2.1.3	Fenilpropanoides.....	13
3.3	<i>Piper patulum</i>	15
3.3.1	Denominación:.....	15
3.3.2	Nombres vernáculos:.....	15
3.3.3	Descripción Botánica.....	16
3.3.4	Composición química.....	16
3.3.5	Actividad Farmacológica y Biológica.....	17
3.4	Actividad antioxidante.....	18
3.4.1	Medición de la actividad antioxidante.....	18
3.4.1.1	Método DPPH.....	18
5	OBJETIVOS.....	22
5.1	Objetivo General.....	22
5.2	Objetivos Específicos.....	22
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
6.1	Universo de trabajo y muestra.....	23
6.1.1	Universo de trabajo.....	23
6.1.2	Población.....	23
6.1.3	Muestra.....	23
6.2	Recursos.....	23
6.2.1	Equipo.....	23
6.2.2	Materiales.....	23
6.2.3	Reactivos.....	24

6.2.4	Material de oficina.....	24
6.3	Método.....	25
6.3.1	Obtención del material vegetal.....	25
6.3.2	Tratamiento del material vegetal.....	25
6.3.3	Obtención de extracto crudo por medio del método de percolación.....	25
6.3.4	Eliminación de ceras y decoloración.....	26
6.3.5	Fraccionamiento por partición líquido-líquido.....	26
6.3.6	Fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto hexánico.....	26
6.3.8	Análisis espectroscópico.....	27
6.3.9	Actividad Antioxidante.....	28
7	RESULTADOS.....	29
	Parte 1. Extracción y purificación del compuesto.....	29
8	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	36
9	Conclusiones.....	43
10	Recomendaciones.....	44
11	REFERENCIAS.....	45
12	ANEXOS.....	53

ABREVIATURAS

Cromatografía en Capa Fina	TLC
Cromatografía en Columna	CC
Factor de Referencia	Rf
2,2-difenil-1-picrilhidrazilo	DPPH
Cromatografía de Gases acoplado a Espectroscopia de Masas	GC/MS
Espectroscopia de Masas	MS
Resonancia Magnética Nuclear de Protón	RMN ¹ H
Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13	RMN ¹³ C
Aumento sin distorsiones por transferencia de polarización	DEPT 135
Espectroscopia de Correlación	COSY
Espectroscopia de Correlación Heteronuclear Cuántica Simple	HSQC
Dióxido de sílice	SiO ₂
Sulfato de Sodio	Na ₂ SO ₄
Diclorometano	DCM
Acetato de Etilo	AcEt

1 RESUMEN

El género *Piper* está integrado por una amplia variedad de especies de gran interés para el estudio fitoquímico, por su composición de metabolitos secundarios, es utilizado en el área de salud como antioxidante, fungicida, anticancerígeno, antimicrobiano, antileishmaniasis, nematocidas, herbicida, ansiolítico y antidepresivo (Do Nascimento, Vanderlúcia, David, & David, 2012). Es de gran importancia conocer mediante el análisis estructural de metabolitos secundarios del género *Piper* la actividad biológica que poseen.

En este trabajo, se consiguió aislar y elucidar mediante pruebas espectroscópicas, el fenilpropanoide con el nombre IUPAC 1,3,5-trimetoxi-2-[(1E)-prop-1-enil] benceno responsable de brindar la actividad antioxidante a las fracciones apolares cloradas de *Piper patulum*.

El aislamiento del compuesto consistió en extracciones líquido-líquido y técnicas cromatográficas (Cromatografía en columna y Cromatografía en capa fina preparativa) que por medio, de las solubilidades en función a la polaridad de los solventes se lograron separar el compuesto de interés del resto de componentes presentes en el extracto.

Se encontró que el compuesto de interés presentó un factor de retención de 0.63 por TLC, utilizando una mezcla hexano y acetato de etilo de 9:1 como fase móvil y se obtuvo únicamente una banda, lo que indica la pureza del compuesto.

Aislado el compuesto se evaluó instrumentalmente por Cromatografía Gases acoplado a Espectroscopia de Masas -GC/MS⁺, Espectroscopia Infrarroja IR, Resonancia Magnética Nuclear de ¹H y ¹³C, -DEPT 135- y por último RMN en 2 dimensiones COSY y HSQC, estas últimas las de mayor especificidad en el análisis estructural.

Los resultados espectroscópicos revelaron por GC/MS que el compuesto posee una masa de 209, en IR se encontraron bandas en 3003.05 cm⁻¹, 2940.95 cm⁻¹, 2839.49 cm⁻¹, 1600-2100 cm⁻¹, 1125 cm⁻¹ y 799 cm⁻¹. Por RMN ¹H se encontraron señales en 1.94 ppm, 3.8 ppm, 6.17 ppm, 6.17 ppm, 6.5 ppm y 6.6 ppm. Por RMN ¹³C se encontraron señales en 20.8 ppm, 55.63 ppm, 90.74 ppm, 108.39 ppm, 121.07 ppm, 127.82 ppm, 158.81 ppm y por último por COSY y HSQC se mostraron la correlación entre los hidrógenos con los carbonos correspondientes, lo que determina de manera definitiva la composición química del compuesto, los grupos funcionales, la disposición de los sustituyentes y la estereoquímica del fenilpropanoide.

Finalmente se confirmó la actividad antioxidante del compuesto por TLC utilizando 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo -DPPH- como revelador del fenilpropanoide. Mediante un análisis estructural dicha actividad se encuentra ligado a los grupos polifenólicos que representan los sustituyentes 1,3,5 trimetoxi del anillo aromático (Chang et al., 2007).

2 INTRODUCCIÓN.

El género *Piper* comprende alrededor de 1000 especies distribuidas geográficamente en regiones tropicales y subtropicales del planeta, lo cual lo hace un género ideal para su desarrollo en Guatemala (Standley & Steyermark, 1952) (Cáceres, 2011).

Fitoquímicamente es un género con gran diversidad de metabolitos secundarios; destacando los alcaloides, lignanos, neolignanos, terpenoides, kavapironas, esteroides, amidas, apocarotenos, benzofuranos, piperolidas, chalconas y dihidrochalconas, xantonas, flavonas y flavanonas, los cuales se caracterizan por tener funciones terapéuticas antioncológicas, antiinflamatorias, anestésicas, hormonales, antidepresivas y antioxidantes. (Mgbeahuruike, Yrjönen, Vuorela, & Holm, 2017) Muchos de estos compuestos, en especial kawapironas, fenoles, flavonoides y piperamidas exhiben actividad antioxidante. Sin embargo, existen otros compuestos con dicha actividad que no son derivados de estas estructuras bases (Mesa et al., 2011).

Los fitocompuestos con actividad antioxidante son de gran interés para su estudio debido a sus propiedades como fármacos para prevenir las enfermedades degenerativas producidas por los radicales libres, nutricéuticos, y como ingredientes activos en la industria cosmética y alimentaria.

Actualmente en Guatemala se está desarrollando una línea de investigación enfocada en la actividad que presenta el género *Piper*, identificando que muchas de las especies tienen una actividad antioxidante significativa, entre las cuales se encuentra *Piper patulum*, una especie nativa guatemalteca (S. Cruz et al., 2008) (Cáceres, 2011) por lo tanto, es de gran importancia comprender que familia de compuestos es responsable de brindarle dicha actividad, por medio de métodos de elucidación estructural bioguiado.

La finalidad del presente estudio es contribuir al aprovechamiento de los recursos naturales de Guatemala y comprender de mejor manera la fitoquímica de la flora de nuestro país para la implementación y desarrollo de nuevos productos que estarán al alcance de la población guatemalteca.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 Familia piperaceae.

Esta familia pertenece a la categoría de plantas angiospermas, caracterizadas por poseer flores y la producción de frutos que contienen a las semillas. Geográficamente están distribuidas principalmente en las regiones tropicales, bosques húmedos y selvas especialmente de India, Centroamérica, Sudamérica y África (Quijano-Abril, Callejas-Posada, & Miranda-Esquivel, 2006).

Las especies de esta familia se describen botánicamente con mayor frecuencia como arboles pequeños, arbustos, o hierbas que pueden ser anuales o perennes. Se caracteriza por tener flores de tipo inflorescencia y sus hojas son altamente aromáticas, por lo que contienen una vasta cantidad de metabolitos secundarios y aceites esenciales lo que la hace una familia de gran interés fitoquímico (Torres-Pelayo, Fernandez, Carmona-Hernandez, Molina-Torres, & Lozada-Garcia, 2016).

La familia piperaceae contiene 14 géneros (Torres-Pelayo et al., 2016), y el género *Piper* es que posee mayor interés biológico debido a sus usos tanto en la medicina tradicional como en la medicina moderna (Mgbeahuruike et al., 2017), el género *Peperomia* le sigue teniendo reportados una gran diversidad fitoquímica, y usos en médicos (Raman, 2012), sin embargo también se pueden encontrar los siguientes géneros: *Arctotonia*, *Artanthe*, *Lindenipiper*, *Macrapiper*, *Manekia*, *Ottonia*, *Piperanthera*, *Photomorphe*, *Sarcorachis*, *Trianaeopiper*, *Verhuellia* y *Zippelia* (The Plant List, 2010).

3.2 Género *Piper*

El género *Piper* es el de mayor diversidad en la familia Piperaceae, contiene alrededor de 1000-1200 especies (Torres-Pelayo et al., 2016) (Standley & Steyermark, 1952), distribuidas geográficamente en las regiones tropicales y subtropicales del planeta a una altitud que varía entre 0-2500 m sobre el nivel del mar (Quijano-Abril et al., 2006), a pesar que los patrones de distribución son extensos en ciertas *Piper. spp* existen también algunas especies endémicas ubicadas únicamente en regiones específicas de Centroamérica y la amazonia central (Jaramillo & Manos, 2001), dichas regiones corresponden, también a las áreas de mayor riqueza de especies del género *Piper*. (Quijano-Abril et al., 2006), y por ende Guatemala tiene una ventaja geográfica en lo que respecta a la investigación de dicho género (Cáceres, 2011).

Las especies del género *Piper* han sido utilizadas a lo largo de la historia por las civilizaciones más desarrolladas de su época en casi todos los continentes del globo, en China, en la Amazonia y en la polinesia (Kushagra et al., 2011), los que fueron los pioneros en atribuirle propiedades tranquilizantes, analgésicas, antiinflamatorias y en afecciones pulmonares (Molina & Garcia-chavez, 2001). En la actualidad el estudio del género *Piper* ha presentado resultados altamente prometedores, demostrando actividad como agente fungicida, anticancerígeno, antimicrobiano, antileishmaniasis, nematocidas, herbicida, ansiolítico, antidepresivo y antioxidante (Do Nascimento et al., 2012).

En la medicina moderna se sabe que la actividad farmacológica de una planta es explicada por los metabolitos secundarios bioactivos que esta posee, los cuáles actúan sobre sitios activos específicos que desencadenan el efecto deseado ya sea directamente

o mediado por una cascada de señalización. El género *Piper* por su diversidad de metabolitos tiene gran interés en estudiarlo fitoquímicamente.

3.2.1 Estudio Fitoquímico

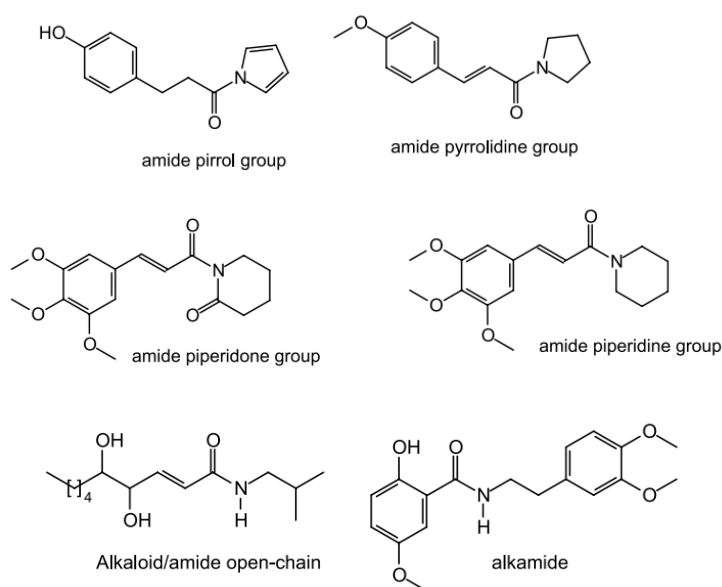
Piper es el género con mayor cantidad de metabolitos secundarios bioactivos en la familia piperaceae (Dyer & Palmer, 2012), entre los compuestos que posee se encuentran alcaloides, amidas, kawalactonas, lignanos, fenoles, fenilpropanoides, neolignanos, terpenos, esteroides, piperolidos, pterocarpanos, C-glucosilos y flavonoides, estos últimos se subclasifican en flavonas, flavanonas, chalconas, dihidrochalconas, isoflavonas, (Parmar et al., 1997) (Do Nascimento et al., 2012) (Torres-Pelayo et al., 2016), los cuales son los responsables de brindarles las acciones farmacológicas a las especies de dicho género, de estas acciones farmacológicas, una de las de mayor interés es la actividad antioxidante (Mgbeahuruike et al., 2017) (Do Nascimento et al., 2012).

Un antioxidante es una sustancia con la capacidad de contrarrestar el daño a nivel celular producido por un agente oxidante, que comúnmente son especies reactivas de oxígeno, superóxidos o radicales libres; dichos compuestos son responsables de producir una amplia gama de patologías incluyendo el envejecimiento, cáncer, diabetes, inflamación, artrosis, obesidad e hipertensión (Kumar, Sharma, & Vasudeva, 2017) en la química de productos naturales se pueden encontrar diversos alcaloides, monoterpenos, sesquiterpenos con actividad antioxidante, sin embargo, son los compuestos fenólicos (chalconas, flavonoides, taninos y fenilpropanoides) los que poseen mayor actividad y por ende mayor interés en el estudio (Kasote, Katyare, Hegde, & Bae, 2015).

3.2.1.1 Amidas

Las amidas son el compuesto mayoritario de muchas especies de *Piper*, (Parmar et al., 1997), fitoquímicamente las amidas pertenecen a la clase alcaloides y son denominadas piperamidas las que poseen un grupo aromático en su estructura y una amida perteneciente a un ciclo (Do Nascimento et al., 2012), el grupo amidas se pueden encontrar principalmente como grupos pirrol, pirrolidina, piperidona y piperidina, sin embargo, también se encuentran amidas alifáticas de cadena abierta, alcanidas, y algunas de mayor complejidad estructural como aristolactamas y ciclohexanamida (Chahal, Ohlyan, Kandale, Walia, & Puri, 2011) (Do Nascimento et al., 2012), las que se encuentran reportadas en (Parmar et al., 1997). (Ver Imagen No. 1)

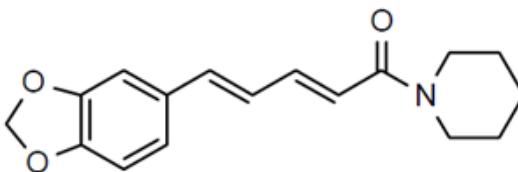
Imagen No. 1 Principales grupos amida encontradas en el género *Piper*.



Fuente: Imagen recuperada de (Do Nascimento et al., 2012).

Debido a su diversidad estructural las amidas comprenden una amplia variedad de funciones biológicas, (Dasgupta & Bratati De, 2004) (Singh & Duggal, 2009), por citar un ejemplo se ha demostrado que la piperina, una amida del tipo piperidina (Chahal et al., 2011), posee actividad antioxidante al igual que sus derivados, pero también se le atribuye propiedades, analgésicas, insecticidas, antiinflamatorias, inmunomoduladoras, antitumorales, antiplaquetaria, antitiroidea, genotóxica y antidepresivas (Singh & Duggal, 2009).

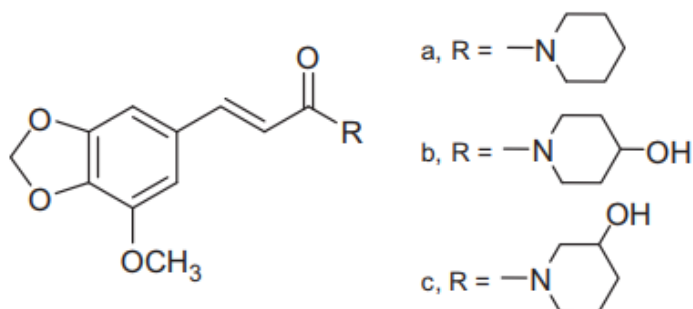
Imagen No. 2 Estructura de la Piperina



Fuente: Imagen recuperada de: (Dyer & Palmer, 2012).

Así mismo se han producido sintéticamente derivados de la piperina que muestran una actividad antioxidante importante in vitro, donde se estableció usando el reactivo revelador 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), él siguiendo patrón de rendimiento $B < C < A$ siendo la concentración inhibitoria 50 - CI_{50} - del compuesto B $8.3 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$ en contraste con el estándar de ácido ascórbico ($12.6 \pm 0.43 \mu\text{g/ml}$) (M K, D Revanasiddappa, Rai, & Bantal, 2012). (**ver imagen No.3**)

Imagen No. 3 Estructura de piperamidas con actividad antioxidante.

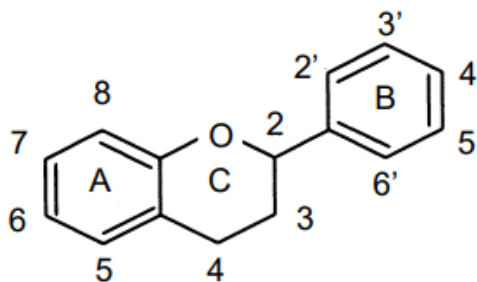


Fuente: Imagen recuperada de: (M K et al., 2012).

3.2.1.2 Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios de gran diversidad estructural, generalmente están compuesto por un núcleo fenil-cromona, (Wang, Li, & Bi, 2018) compuesto por un anillo aromático A, un puente de tres carbonos que puede ser parte de un heterociclo C y otro anillo aromático B C₆—C₃—C₆ (Wang et al., 2018) los anillos se pueden encontrar glicosilados o en forma esterificada (Wang et al., 2018) (Martínez-Flórez, González-Gallego, Culebras, & Tuñón, 2012) (**ver imagen No. 4**).

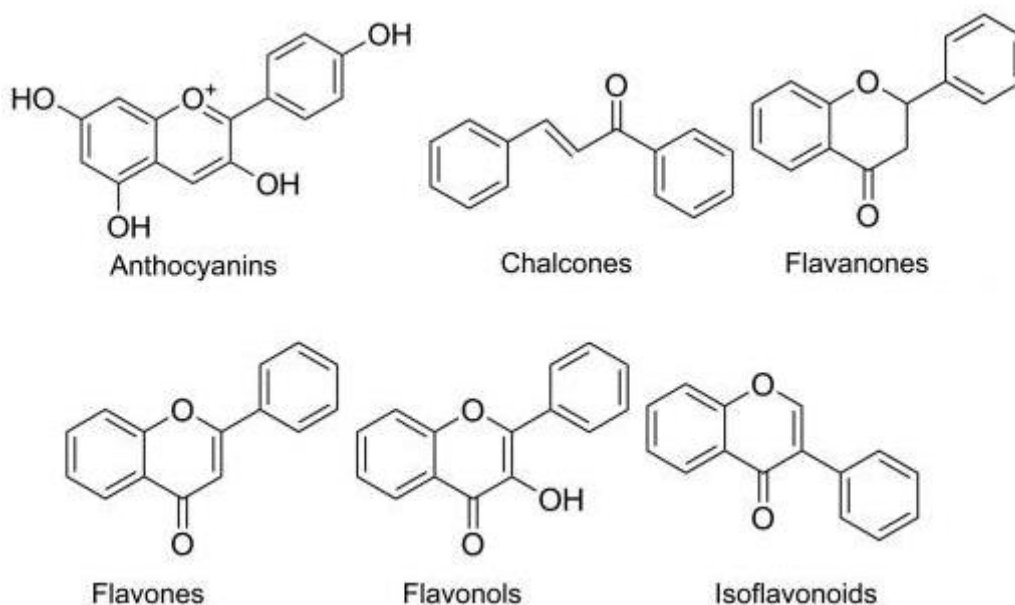
Imagen No. 4 Estructura Base de Flavonoides



Fuente: Imagen recuperada de: (Panche et al., 2016)

De acuerdo con el grado de oxidación de los anillos, las variaciones del patrón de sustitución y anularidad del anillo C (Wang et al., 2018), los flavonoides pueden clasificarse en diferentes subclases, lo que proporciona una gama extremadamente diversa de derivados (Panche et al., 2016) los que el anillo B se encuentra en posición 3 se les denomina isoflanonas, si se encuentra como sustituyente de la posición 2 se clasifican de acuerdo al grado de oxidación del anillo C en flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, catequinas o antocianinas y si el puente de tres carbonos no pertenece a un ciclo se les denomina chalconas (Portet et al., 2008) (Isoda et al., 2014) (Panche et al., 2016). (**Ver imagen No. 5**)

Imagen No. 5 Clasificación de los flavonoides de acuerdo a su estructura química.



Fuente: Imagen recuperada de (Panche et al., 2016).

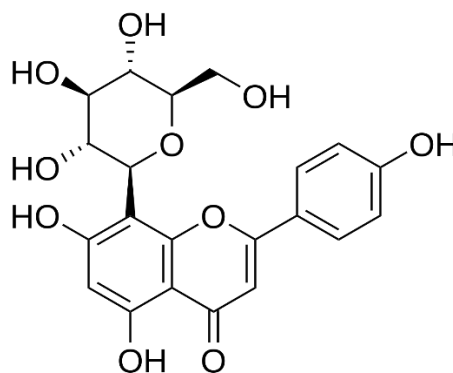
En el género *Piper* se han encontrado con mayor frecuencia flavonoides tipo chalconas, dihidrochalconas, algunas flavanonas y con menor frecuencia flavonas (Parmar et al., 1997) (Plazas, Cuca, & Delgado, 2008) (Martín-Rodríguez et al., 2015). Todos los flavonoides se encuentran vinculados con la actividad antioxidante (Panche et al., 2016) (Martínez-Flórez et al., 2012), en gran parte por su estructura polifenólica (Wang et al., 2018) ya que le brinda la capacidad de donar un hidrogeno en reacciones de Oxido-Reducción (Wang et al., 2018).

Sin embargo, también se han encontrado flavonoides con actividad antileishmaniasis, antimicótica, antibiótica, antiparasitaria, citotóxica, antiinflamatoria, antimutagénica (Portet et al., 2007) (Panche et al., 2016) y capacidad inhibitoria sobre la ciclooxigenasa COX (Panche et al., 2016).

El género *Piper* posee al menos 39 flavonoides diferentes (Parmar et al., 1997) por ende se ha determinado que posee una actividad antioxidante significativa, donde se ha determinado actividad frente a reactivos DPPH, ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) (Bhuvaneswari, Sripriya, Santhanakrishnan, & Nyayiru Kannaian, 2014) (Cáceres, 2011) y el poder antioxidante reductor del hierro -FRAP- por sus siglas en inglés. (Bhuvaneswari et al., 2014) conjuntamente se ha determinado la actividad citoprotectora contra el estrés-oxidativo de los flavonoides encontrados en *Piper sarmentosum*, concluyendo que la vitexina (**Ver imagen No. 6**) reduce significativamente el daño oxidativo del H₂O₂ en las células endoteliales obtenidas del cordón umbilical de los humanos.

(Ugusman, Zakaria, Hui, Nordin, & Mahdy, 2012) Así como también se ha encontrado que una doble O-metilacion de la Luteonina produce un derivado llamado velutina (que se ha aislado de *piper clarkii*) (Parmar et al., 1997) el cual es un potente inhibidor del factor de necrosis tumoral TNF- α e interleucina IL-6 los que están involucrados en el estres-oxidativo y en la producción de diversas patologías degenerativas (Koirala, Thuan, Ghimire, Thang, & Sohng, 2016).

Imagen No. 6 Flavonoide vitexina encontrado en *piper sarmentosum*



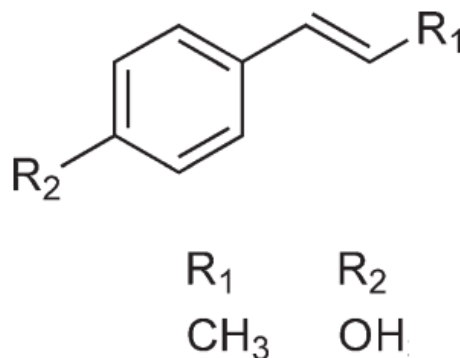
Fuente: imagen Recuperada de: (Ugusman et al., 2012)

3.2.1.3 Fenilpropanoides

Los fenilpropanoides tienen un esqueleto 4-hidroxi-C₆-C₃ (Vogt, 2010) (**Ver Imagen No 7**) biosintéticamente provienen del aminoácido fenilalanina, pasando por el intermediario 4-coumaroil; Mediante diferentes modificaciones estructurales la vía biosintética de los fenilpropanoides puede derivar una gran cantidad de metabolitos secundarios que también poseen actividad antioxidante (Korkina, 2007) como lo son los flavonoides, cumarinas, lignanos y algunos esteres y amidas

de fenilpropanoide (Vogt, 2010) Estructuralmente al igual que los flavonoides su capacidad antioxidante depende del grupo fenólico en su estructura (Korkina, 2007) (**Ver imagen No.7**).

Imagen No.7 Estructura Base de los fenilpropanoides



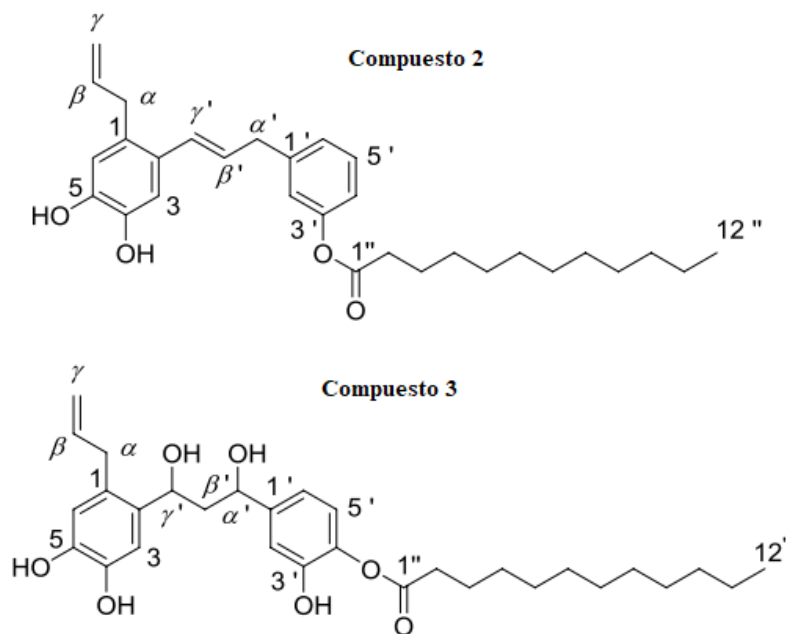
Fuente: (Vogt, 2010)

Los fenilpropanoides son la clase de compuestos que se encuentran con mayor frecuencia en las hojas de *piper sarmentosum* seguido por las amidas y las piperamidas (Aslam, Ahmad, Ahmad, & Akhlaq, 2017) también se han encontrado fenilpropanoides en fracciones cloroformo/metanol en *Piper betle*, incluyendo 2 fenilpropanoides que no se habían descubierto, el compuesto 2 y 3 (**Ver imagen No 8**) (Atiya, Sinha, & Lal, 2017).

Adicionalmente se determinó su capacidad antioxidante por el método DPPH calculando un CI50 de 12.67 $\mu\text{g/ml}$ y 1.08 $\mu\text{g/ml}$ para el compuesto 2 y 3 respectivamente en comparación con el estándar de ácido ascórbico 6.60 $\mu\text{g /ml}$ (Atiya et al., 2017) paralelamente se determinó también la actividad citotóxica contra células de cáncer oral AW13516 obteniendo un

GI50 de 19.61 y 10.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en contraste con el estándar de doxorubicina 10 $\mu\text{g}/\text{m}$ (Atiya et al., 2017) El estudio de relación estructura actividad SAR de los compuestos 2 y 3 mostro que se requiere del grupo catecol para la actividad anticancerígena. (Atiya et al., 2017) además de su actividad antioxidante los fenilpropanoides también poseen actividad antimicrobiana (Masuda et al., 1991) antifímicos y antiplaquetaria (Chen et al., 2013).

Imagen No.8 Nuevos fenilpropanoides encontrados en *Piper bitle*.



Fuente: Imagen recuperada de (Atiya et al., 2017).

3.3 *Piper patulum*

3.3.1 Denominación:

Hoja y raíz de *Piper patulum* Bertol.

3.3.2 Nombres vernáculos:

Cordoncillo

3.3.3 Descripción Botánica

Piper Patulum es un árbol pequeño de aproximadamente de 3-4m de alto con grandes ramificaciones, posee un tallo leñoso y grueso. Contiene pecíolos delgados y largos de hasta 7cm, vaginado en casi todo su largo. Las hojas son palmatinervias y delgadas, finamente y densamente pelúcido-punteadas, cordado-ovadas a redondo-cordado, comúnmente 10-20cm de largo y 7.5 15cm de ancho, abruptamente acuminado o largo-acuminado, cordadas en la base con lóbulos basales redondeados y muy separados entre sí, verde oscuro en el haz y algo pálido en el envés. Pedúnculo grueso cerca de 1cm de largo o menos. Inflorescencias en espigas solitarias, largas, delgadas, frecuentemente o usualmente curvadas, cerca de 12-16cm de largo, las brácteas densamente pilosuloso o tomentuloso (Cáceres, 2011).

3.3.3.1 Altura y distribución geográfica

Se encuentra principalmente en las regiones en Guatemala en los departamentos de Alta Verapaz, Jutiapa, Santa Rosa, Escuintla, Chimaltenango, Suchitepéquez, Retalhuleu, Quetzaltenango, en el sur de México, El Salvador, Honduras a alturas menores a 1200 metros sobre el nivel del mar (Cáceres, 2011).

3.3.4 Composición química

Se ha encontrado que extractos de *piper patulum* contiene alcaloides, flavonoides, antraquinonas, saponinas, principios amargos, aceite volátil y cumarinas (Zelada V, Cáceres A, & de Carvalho joao, 2016) (S. Cruz et al., 2008).

Su aceite esencial contiene α -pineno, β -pineno, α -terpineno, 1-metil-5-ciclohexano, (+)-3-careno, α -terpinoleno, transanetol, β -cariofileno, miristicina, α -humuleno, benzonitrilo, 1,6,10dodecatrien-3-ol, bicilogermacrano, transasarona, β -eudismol, 1,3,5 trimetoxi-2-propenilbenzeno, metil eugenol y cariofileno (S. M. Cruz, Cáceres, Álvarez, Apel, & Henriques, 2012).

3.3.5 Actividad Farmacológica y Biológica

Los extractos diclorometánicos, metanólicos, acetado de etilo y hexánicos de hojas poseen actividad antioxidante (Zelada V et al., 2016) siendo el CI50 1.37 +/- 0.1 y 1.50 +/- 0.1 $\mu\text{g/ml}$ para los extractos obtenidos por diclorometano y metanol respectivamente en contraste con el estándar de quercitina y butilhidroquinona terciaria TBHQ 0.64 y 1.16 $\mu\text{g/ml}$ (Zelada V et al., 2016) .

Así mismo en se ha determinado que posee actividad genotóxica contra cepas de MCF-7 una línea de células cancerígenas de células mamarias, NCI-H460 células cancerígenas pulmonares y U251 células que causan glioblastoma. Al mostrar una inhibición de crecimiento TGI de 17 $\mu\text{g/mL}$ en la fracción con hexano y 31.0 $\mu\text{g/mL}$ para la diclorometánica contra MCF-7 (Zelada V et al., 2016) posee actividad antibacteriana contra *M. smegmatis* y *B. subtilis* con una CI50 a 100 $\mu\text{g/mL}$ (Zelada V et al., 2016) y el aceite esencial obtenido por el método neoclevenger posee actividad citotóxica contra nauplios de *Artemia salina*, DL50 de 0.72 mg/mL y 1.46 mg/ml para extractos diclorometánicos y metanólicos (Zelada V et al., 2016).

3.4 Actividad antioxidante

Los radicales libres son moléculas o átomos que contienen uno o más electrones desapareados en su orbital externo, por lo tanto, son sitios altamente reactivos, para estabilizarse busca obtener electrones de otras moléculas. Esto hace que haya más moléculas inestables, provocando una retroalimentación positiva, oxidando muchas estructuras biológicas y dañándolas como consecuencia. A este proceso se le llama daño oxidativo (Orbe Saavedra & Tuesta Pinedo, 2013).

Comúnmente el organismo posee sistemas para reducir el daño oxidativo de manera natural, el problema radica cuando se produce un exceso de radicales libres durante años, lo cual sobrepasa los sistemas biológicos encargados de neutralizar estas especies reactivas, dando lugar a que se desencadenen procesos degenerativos como lo son el envejecimiento, el cáncer, la aterosclerosis, los procesos inflamatorios crónicos y las cataratas, que son la mayor relevancia (Vargas, Rivas, Nursamaa, & Zoltan, 2007).

3.4.1 Medición de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante no se puede directamente, en cambio se determina utilizando un modelo de oxidación controlado que produzca un cambio cualitativo o cuantitativo que puede determinarse, para lo cual pueden usarse intermediarios o productos finales para determinar su actividad antioxidante (Guija-Poma, Inocente-Camones, Ponce-Pardo, & Zarzosa-Norabuena, 2015).

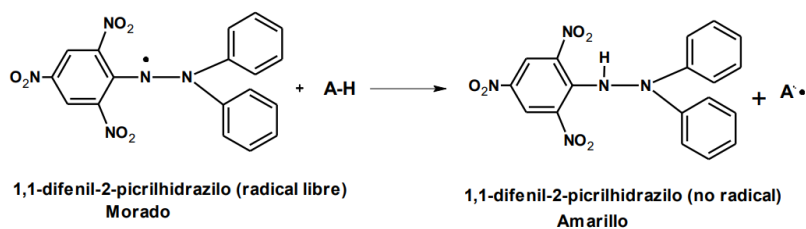
3.4.1.1 Método DPPH

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) (**Ver imagen No.9**) es un radical libre estable debido a la deslocalización del radical desapareado por conjugación de orbitales π libres. La deslocalización del radical también

intensifica el color violeta intenso típico del radical. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante, que puede donar un átomo de hidrógeno se pierde la conjugación y por ende el color violeta se desvanece hacia un tono amarillo (Guija-Poma et al., 2015).

Existen un gran número de pruebas para determinar la actividad antioxidante, sin embargo, el uso de DPPH tiene la ventaja que el reactivo se puede mezclar directamente en un medio orgánico, y puede ser utilizado ya sea cualitativamente por medio de cromatografía en capa fina CCF, o por medio de mediciones espectrofotométricas (Guija-Poma et al., 2015).

Imagen No. 9 Reacción del DPPH frente a un compuesto con actividad antioxidante.



Fuente: imagen recuperada de (Guija-Poma et al., 2015)

4 JUSTIFICACION

El género *Piper* es uno de los más antiguos e importantes géneros de plantas que ha proporcionado una gran variedad de medicamentos y fuentes de alimentos para las civilizaciones. Se han utilizado para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, enfermedades malignas, infecciones microbianas, micóticas, parasitarias y antioxidantes. (Mgbeahuruike, Yrjönen,, Vuorela, & Holm, 2016) (Jara, 2013) por ello es de gran importancia el estudio de las especies de este género. Guatemala al ser un país de gran diversidad biológica, cuenta con diversas especies endémicas de dicho género, entre las que se encuentra *Piper patulum*, la cual en estos últimos años ha sido investigada fitoquímicamente con resultados altamente prometedores, especialmente por su capacidad antioxidante.

Actualmente se conoce que es de gran importancia investigar los compuestos con actividad antioxidantes por su capacidad de inhibir, retardar o interrumpir las reacciones de oxidación vía radicales libres, las cuales son responsables de causar daño y deterioro celular, que desencadenan un gran número de enfermedades cardiovasculares, degenerativas, y se cree que son causantes del envejecimiento prematuro.

Los antioxidantes no solo son importantes como fármacos y alimentos nutritivos sino también se requieren antioxidantes para evitar el deterioro de los productos que se producen en las industrias cosmética, alimentaria, farmacéutica y plástica.

Por ello es necesario encontrar nuevos compuestos que estén al alcance de la población, con alta capacidad antioxidante para ser utilizados tanto para el área de salud como para la industria y el sector privado en beneficio de los guatemaltecos.

Por último, un estudio de elucidación estructural puede brindar mucha información en estudios posteriores sobre los metabolitos antioxidantes que contiene la especie *Piper patulum*, con el objeto de comprender los mecanismos farmacodinámicos y farmacocinéticos, los cuales están implicados en el metabolismo de las sustancias por el cuerpo y su sitio de acción.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Aislar y analizar por métodos espectroscópicos un compuesto presente en fracciones con actividad antioxidante, obtenidas de extractos apolares clorados de hojas de *Piper patulum*.

5.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la presencia de metabolitos con actividad antioxidante que se encuentran en los extractos y fracciones mayoritarias de *Piper patulum*.
- Purificar utilizando métodos cromatográficos al menos un compuesto que tenga actividad antioxidante en las fracciones obtenidas.
- Analizar por métodos espectroscópicos la estructura de un compuesto o una familia de compuestos con actividad antioxidante.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Universo de trabajo y muestra

6.1.1 Universo de trabajo

Metabolitos con actividad antioxidante presentes en *Piper patulum*.

6.1.2 Población

Metabolitos con actividad antioxidante presente en los extractos apolares clorados de *Piper patulum*.

6.1.3 Muestra

Metabolito con actividad antioxidante obtenido de una fracción de *piper patulum*.

6.2 Recursos

6.2.1 Equipo

- Difractor de rayos X monocristal
- Resonancia magnética nuclear
- Cromatógrafo Gases-Masas
- Espectrómetro Infrarrojo
- Horno de convección
- Balanza de humedad
- Balanza analítica
- Balanza semianalítica
- Bomba de vacío
- Campana de extracción de gases
- Desecadora
- Estufa eléctrica
- Lámpara de ultravioleta-visible
- Rotavapor
- Enfriador de agua (Chiller)

6.2.2 Materiales

- Cámaras cromatográficas
- Gradillas para tubo de ensayo
- Papel filtro
- Percolador de acero inoxidable
- Refrigeradora

- Tubos de ensayo
- Viales ámbar
- Beakers 50 ml
- Beaker 100 ml
- Beaker 250 ml
- Beaker 1000 ml
- Kitazato 1000 ml
- Embudo buchner
- Ampolla de decantación 1 litro
- Columna para cromatografía
- Filtro de Celite
- Recristalizadores
- Tubos viales 20 ml ambar
- Probeta 10 ml
- Probeta 25 ml

6.2.3 Reactivos

- Diclorometano
- Cromatoplasmas de Sílicagel 60 F254
- Cromatoplasmas preparativas
- Metanol
- Agua destilada
- Hexano
- Acetato de etilo
- Sulfato de sodio anhidro
- DPPH
- Ácido acético glacial
- Muestra de *Piper patulum*

6.2.4 Material de oficina

- Papel
- Lapiceros
- Impresora
- Tinta para impresora
- Computadora
- Material Bibliográfico
- Bitácora
- Folder con gancho metálico

6.3 Método

6.3.1 Obtención del material vegetal

Se recolectaron las hojas frescas en el municipio de Samayac, departamento de Suchitepéquez, Guatemala. Las hojas fueron seleccionadas escogiendo únicamente las hojas enteras, de color característico, y se eliminaron las hojas que tenían hongo, virus o hayan sido afectadas por los insectos (Sasidharan, Chen, Saravanan, Sundram, & Yoga Latha, 2010).

6.3.2 Tratamiento del material vegetal

Se colocaron las hojas entre capas de papel periódico para eliminar el exceso de humedad durante el transporte a la ciudad de Guatemala, seguidamente fueron seleccionadas nuevamente, eliminando las que contenían un exceso de humedad y las que fueron dañadas durante el transporte, y se procedió a secarlas en un horno de convección a una temperatura no mayor a 50 °C hasta alcanzar un contenido de humedad de 6%, y por último se trituró y tamizó el material vegetal hasta obtener un tamaño uniforme de partícula de 5mm (Sasidharan et al., 2010).

6.3.3 Obtención de extracto crudo por medio del método de percolación

Se colocaron 200 gramos de material vegetal seco y tamizado en un percolador de acero inoxidable forrado en el interior con papel filtro previamente tarado y se agregó una mezcla de diclorometano/metanol en relación 2:1 hasta cubrir completamente el material vegetal y se dejó reposar por alrededor de 24 horas seguidamente se repitió el proceso 3 veces más. Luego se reconcentró el muestra con ayuda de un rotavapor (Fernandes et al., 1997).

6.3.4 Eliminación de ceras y declorofilación

El extracto crudo se disolvió en 600 ml metanol y se colocó en un baño de hielo hasta la precipitación de las ceras y grasas, las cuales fueron filtradas a presión reducida.

Al filtrado se adicionaron porciones de agua para aumentar la polaridad, hasta llegar a una proporción de 3:2 v/v logrando la floculación total de las clorofilas, las cuales en seguida fueron filtradas con celite y vidrio fritado (Fernandes et al., 1997).

6.3.5 Fraccionamiento por partición líquido-líquido

El filtrado obtenido (metanol-agua) se fraccionó por el método de partición líquido-líquido utilizando una ampolla de decantación de 1L con hexano como solvente extractor, y se realizaron 3 fracciones con 200 ml cada uno. Posteriormente, se realizaron 4 extracciones más utilizando 200 ml de diclorometano.

A las fracciones obtenidas se les eliminó el disolvente y finalmente se colocaron en una desecadora por 2 días. (Fernandes et al., 1997).

6.3.6 Fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto hexánico

El sólido obtenido de la partición liquido-liquido proveniente del hexano se fraccionó por cromatografía en columna utilizando SiO_2 de 40-75 μm .

La columna fue empaquetada colocando un pedazo de algodón desengrasado en la parte inferior y posteriormente una capa fina de sulfato de sodio anhidro (NaSO_4), seguidamente se agregó la sílica (SiO_2) en húmedo con hexano, y otra capa de NaSO_4 anhidro, por último, se colocó la muestra soportada en sílice bajo

una capa de NaSO₄ anhidro (Alécio, Bolzani, Young, Kato, & Furlan, 1998; Fernandes et al., 1997; Vasques da Silva et al., 2002).

El fraccionamiento se realizó siguiendo una serie eluotrópica con hexano-acetato de etilo siguiendo la siguiente proporción: 100:0, 99:01, 98:02, 95:05, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 y 0:100. Se siguió con la polaridad del disolvente hasta que por TLC no se encontrara ningún compuesto lo que indicó que era necesario un aumento en la polaridad. (Alécio et al., 1998; Vasques da Silva et al., 2002)

Las 20 fracciones fueron clasificadas por TLC determinando los R_f, utilizando como reveladores DPPH y luz UV a 254nm y 366nm.

6.3.7 Purificación de la fracción con actividad antioxidante

Las fracciones de la 1-5 fueron purificadas nuevamente por CC utilizando hexano: acetato de etilo por la siguiente serie eluotrópica: 100:0, 99:01, 98:02, 97:03, 95:05, 90:10, 85:15, 80:20 y 60:40 y 50:50. Las fracciones que contenían un R_f de 0.63 se colectaron y fueron purificadas finalmente por TLC preparativa (Gbewonyo & Candy, 1992).

6.3.8 Análisis espectroscópico

El compuesto purificado con actividad antioxidante fue analizado por IR, GC-MS⁺, RMN de ¹H y ¹³C, DEPT 135 y espectroscopia RMN 2D, COSY y HSQC.

6.3.9 Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante fue evaluada cualitativamente por el método de DPPH por TLC, que consistió en asperjar una solución de DPPH /metanol (1mg/ml) a una placa de TLC que se corrió previamente con una mezcla de solventes hexano:acetato de etilo 9:1 y se observó visualmente la decoloración (S. Cruz et al., 2008).

7 RESULTADOS

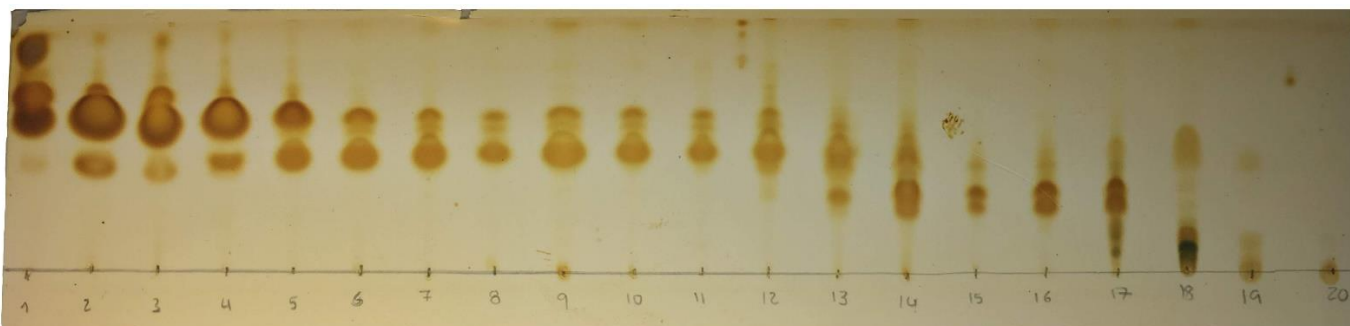
Parte 1. Extracción y purificación del compuesto

Tabla No. 1 Rendimientos de los extractos obtenidos de las hojas de *Piper patulum*

Extracto	Cantidad (g)	Porcentaje de Rendimiento
Extracto Crudo	45.1950	22.5 (de la muestra)
Fracción Hexánica	1.1172	2.4 (del extracto crudo)
Fracción Diclorometánica	1.3142	2.9 (del extracto crudo)

Fuente: Datos Experimentales obtenidos en laboratorio de química orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, -USAC-

Cromatografía No. 1 TLC de las fracciones obtenidas por CC del extracto crudo hexánico.



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el laboratorio de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, -USAC-: Revelado con yodo, Fase móvil 9:1 Hex: AcEt

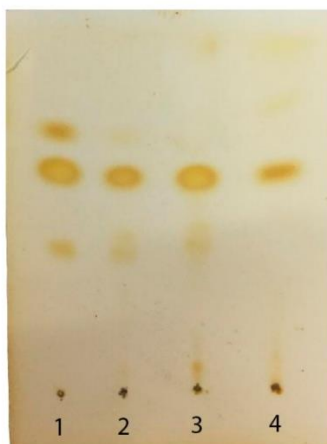
*. Se colocaron las fracciones de la 1 a la 5 únicamente debido a que en ellas se encuentra el compuesto de interés.

- Fracción 1: Valores de Referencia 0.44, 0.63, 0.73, 0.9
- Fracción 2: Valores de Referencia 0.44, 0.63, 0.73, 0.95
- Fracción 3: Valores de Referencia 0.44, 0.63, 0.73, 0.95
- Fracción 4: Valores de Referencia 0.44, 0.63, 0.73, 0.95
- Fracción 5: Valores de Referencia 0.44, 0.63, 0.73, 0.95

Tabla No 2. Factores referencia -Rf- de las fracciones obtenidas por la segunda columna, que presentan actividad antioxidante determinada cualitativamente por DPPH de las hojas de *Piper patulum*.

Numero de fracción	RF
1	0.63
2	0.63
3	0.63
4	0.63
5	0.63

Fuente: Datos Experimentales obtenidos en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, -USAC-

Cromatografía No. 2 TLC de las fracciones después de la primera purificación por CCF

Fuente: Fuente: Datos experimentales obtenidos en el laboratorio de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, -USAC- Revelado con yodo. Fase móvil 9:1 Hex: AcEt

- Fracción 1: Valores de Referencia 0.44, 0.63, 0.73
- Fracción 2: Valores de Referencia 0.44, 0.63
- Fracción 3: Valores de Referencia 0.44, 0.63
- Fracción 4: Valores de Referencia 0.63

Cromatografía No. 3 TLC del compuesto aislado llamado 1,3,5-trimetoxi-2-((E)-1-en-propil) benceno para determinación de actividad antioxidante.

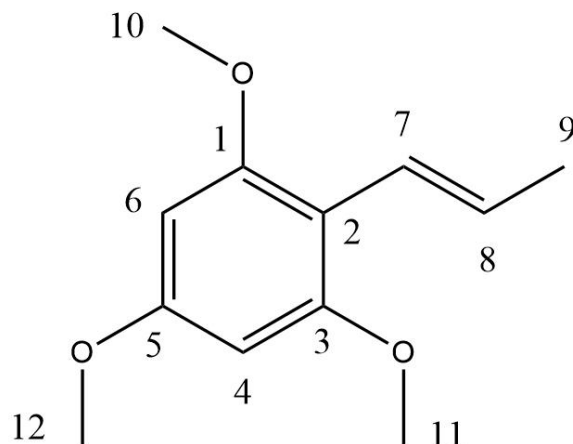


Fuente: Datos Experimentales obtenidos en Facultad de Ciencias Químicas Y Farmacia, -USAC- Revelado con 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH). Fase Móvil

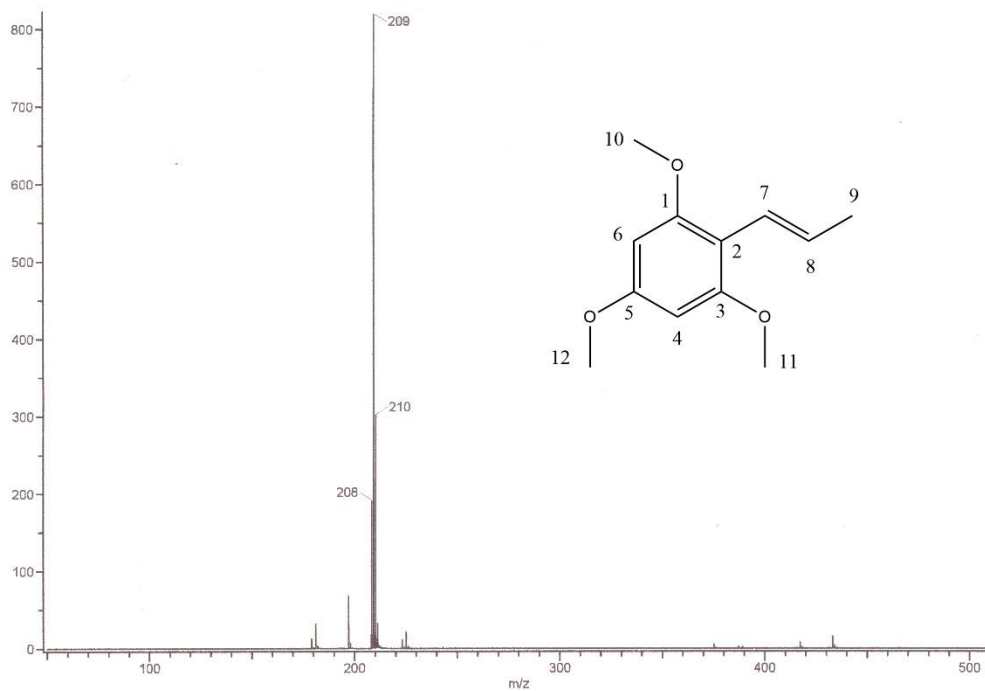
- 9:1 Hex:AcEt
- Valor de Referencia 0.63

Parte II. Análisis espectroscópico

Compuesto No .1 Fenilpropanoide con el nombre IUPAC 1,3,5-trimetoxi-2-[(1E)-prop-1-enil] benceno.



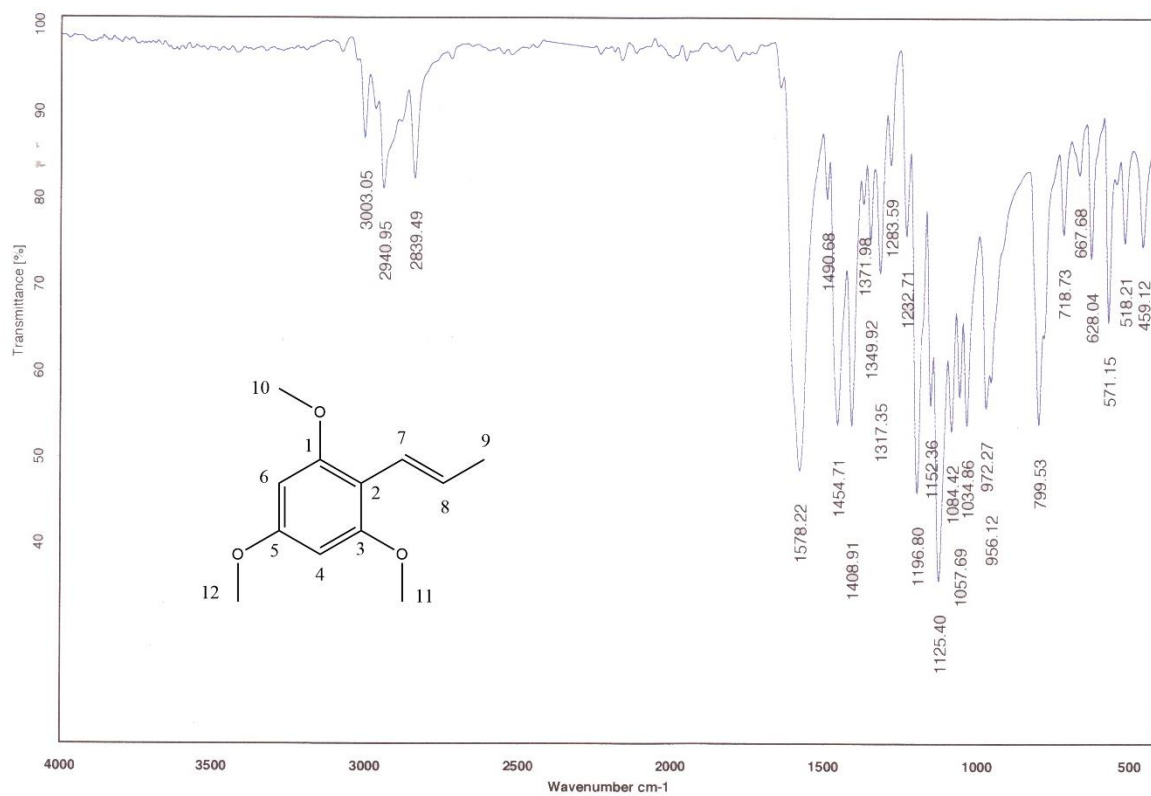
Espectro No. 1. Espectro de masas del 1,3,5-trimetoxi-2-[(1E)-prop-1-enil] benceno.



Fuente: Instituto de química, Laboratorio de espectroscopia, Universidad Nacional Autónoma de México -UNAM- DART+

- 208 m/Z pico madre que equivale a la masa atómica del compuesto.

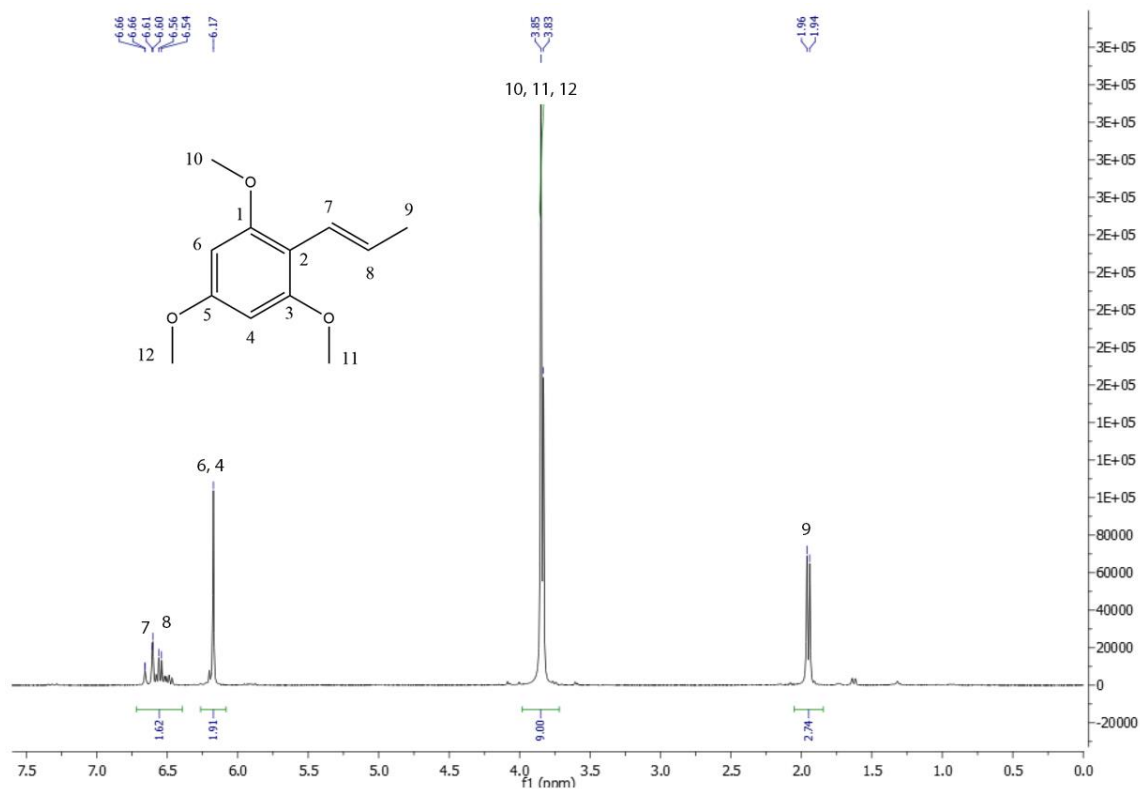
Espectro No. 2. Espectroscopia Infrarroja de 1,3,5-trimetoxi-2-[(1E)-prop-1-enil] benceno.



Fuente: Instituto de química, Laboratorio de espectroscopia, Universidad Nacional Autónoma de México -UNAM-

- 3003.05 estiramiento de enlace C-H del anillo aromático
- 2940.95 estiramiento asimétrico de enlace C-H de carbono SP³
- 2839.49 estiramiento simétrico de enlace C-H de carbono SP³
- 1600-2100 sobretonos del anillo aromático
- 1125 estiramiento simétrico de C-O-C
- 799, oscilación del enlace C-H aromático

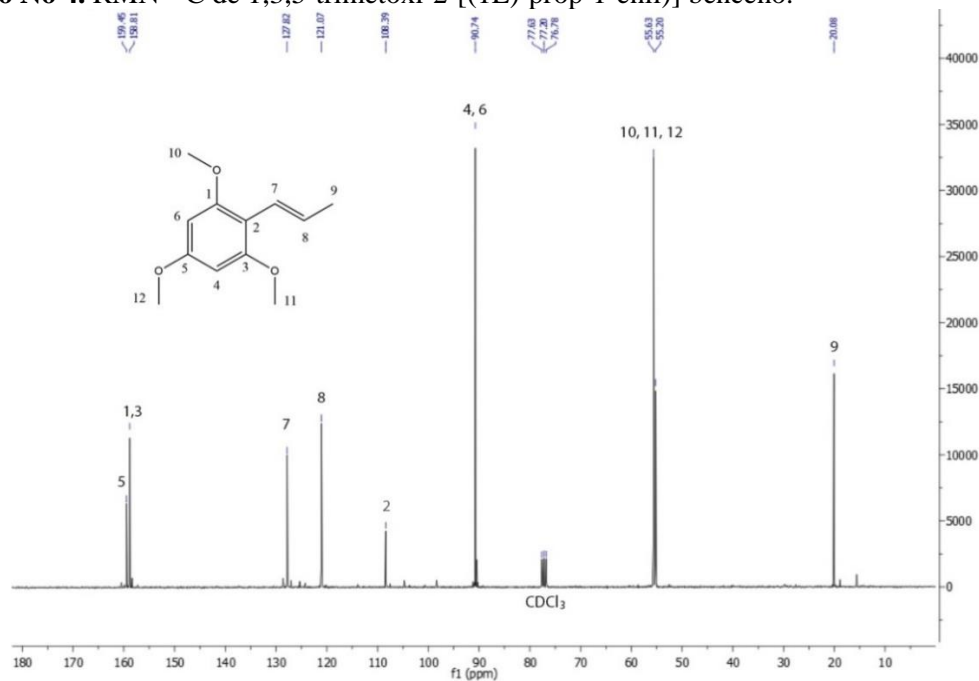
Espectro No 3. Resonancia Magnética Nuclear de protón ^1H de 1,3,5-trimetoxi-2-[(1E)-prop-1-enil] benceno.



Fuente: Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México -UNAM-

*. Disolvente CDCl_3 ; RMN ^1H 300 MHz

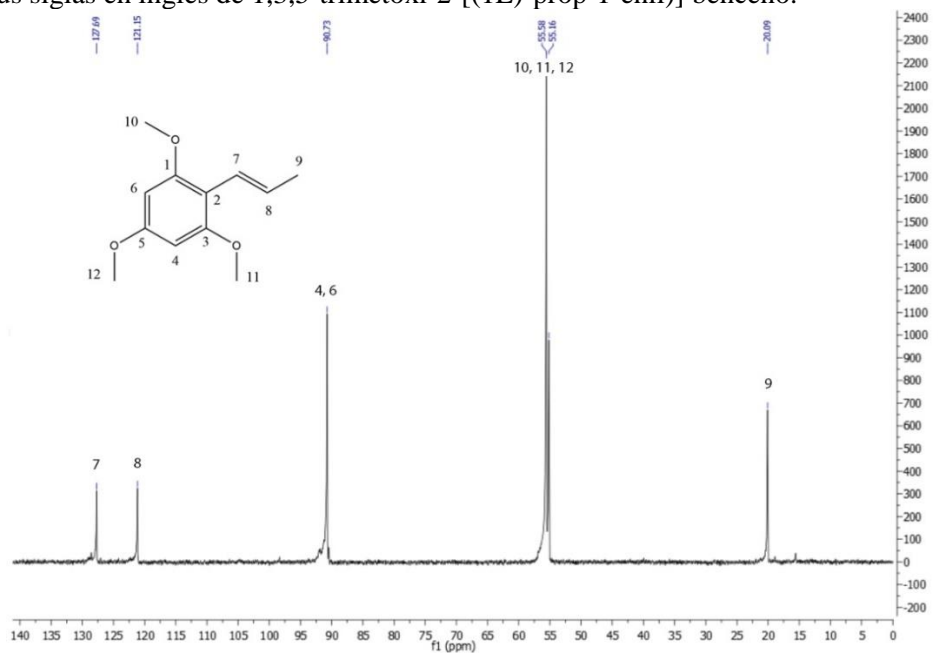
Espectro No 4. RMN ^{13}C de 1,3,5-trimetoxi-2-[(1E)-prop-1-enil] benceno.



Fuente: Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México -UNAM-

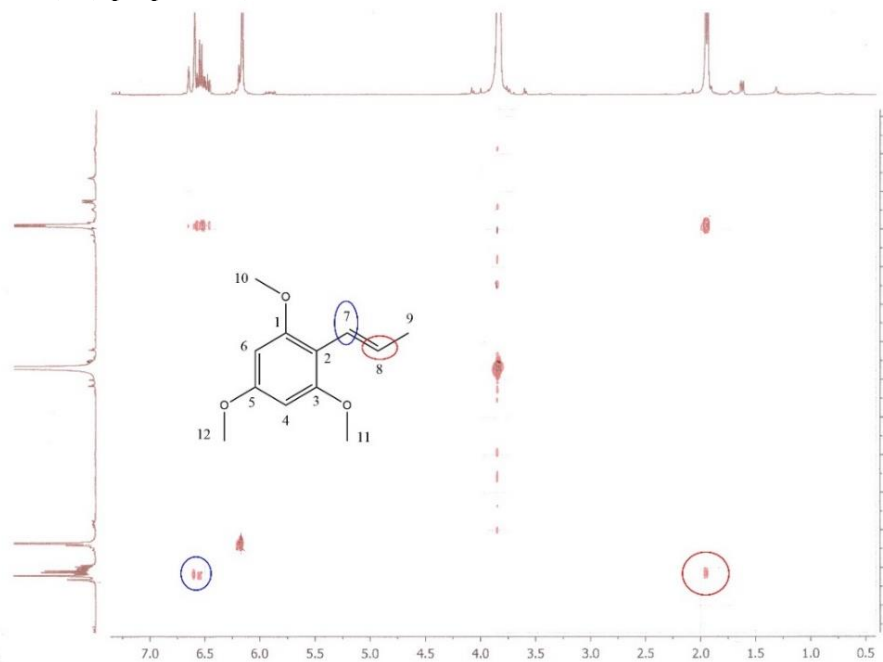
*. RMN ^{13}C 75MHz CDCl₃

Espectro No 5. Realce sin distorsión mediante espectros de transferencia de polarización. DEPT-135 por sus siglas en ingles de 1,3,5-trimetoxi-2-[(1E)-prop-1-enil] benceno.



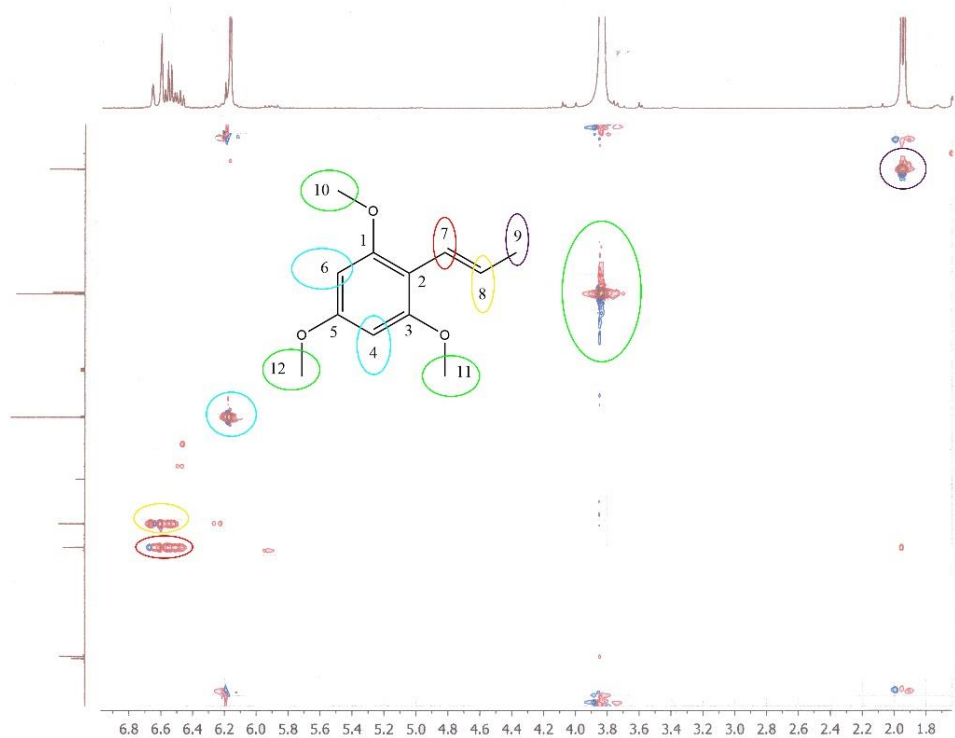
Fuente: Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México -UNAM- DEPT 135

Espectro No 6. Espectroscopia de correlacion ^1H - ^1H -COSY- por sus siglas en ingles 2D-NMR de 1,3,5-trimetoxi-2-[(1E)-prop-1-enil] benceno.



Fuente: Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México -UNAM-

Espectro No. 7 correlación heteronuclear simple cuanto -HSQC- por sus siglas en ingles de 2D-NMR de 1,3,5-trimetoxi-2-[(1E)-prop-1-enil] benceno.



Fuente: Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México -UNAM-

8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los productos naturales, debido a su complejidad estructural poseen una gran diversidad de funciones biológicas de interés para el área de salud, como lo es la actividad antioxidante, que está ligada estructuralmente a los compuestos polifenólicos: flavonoides, taninos y fenilpropanoides (Kumar et al., 2017), por lo tanto es importante conocer las estructuras que son responsables de brindarle dicha actividad.

En el presente trabajo se logró aislar y determinar por métodos espectroscópicos (RMN ^1H y ^{13}C , DEPT 135, COSY, HSQC) el compuesto 1,3,5-trimetoxi-2-[(1E)-prop-1-enil] benceno (Compuesto No 1.) a partir de extractos con actividad antioxidante de hojas de *Piper patulum*.

La extracción del compuesto por percolación, utilizando una mezcla de diclorometano (CH_2Cl_2), metanol (CH_3OH) 2:1 permitió extraer tanto los metabolitos apolares (terpenos, sesquiterpenos etc.) como los de polares (fenilpropanoides, flavonoides, chalconas, antocianinas, etc) debido a la polaridad de la mezcla (Kasote et al., 2015) lo que se refleja en el porcentaje de rendimiento en el extracto crudo en tabla No. 1 (Anexo No. 1).

Por extracción líquido-líquido (Anexo No.2) se obtuvieron dos fracciones (hexánica y diclorometánica) con similar porcentaje de rendimiento (ver tabla No.1) sin embargo debido a que la fracción hexánica solidificó en el matraz (Anexo No. 3) y por su capacidad antioxidante, se procedió a fraccionarla por cromatografía en columna (ver Anexo No.4), de la cual se obtuvieron 20 fracciones (Ver Cromatografía No 1.).

La técnica de cromatografía en capa fina reveló que las fracciones con mayor pureza y cantidad de compuesto fueron de la 2 a la 5 (ver RF en cromatografía No 1.) debido a su

similitud fueron mezcladas y purificadas por cromatografía en columna (Anexo No.5). Por su polaridad el fenilpropanoide eluyó con una mezcla de hexano: acetato de etilo 99:1 en las primeras fracciones, lo que concuerda estructuralmente, ya que posee grupos metoxi en posiciones 1, 3 y 5, y una olefina en posición 2 como sustituyentes, estos sustituyentes son de naturaleza apolar (Vogt, 2010).

Las primeras fracciones (Ver cromatografía No.2) demostraron que el compuesto de interés se podía resolver con una cromatografía en capa fina preparativa (Anexo No. 6), que nos permite separar los compuestos, con la ventaja de no perder la molécula de interés sobre la sílice y gastar una menor cantidad del disolvente en comparación con la cromatografía en columna.

Conociendo la polaridad del compuesto mayoritario (Anexo No. 7), se procedió a lavar los cristales con metanol, un solvente que por su polaridad no solvató al compuesto de interés, pero sí a las trazas de impurezas que fueron arrastradas durante la purificación. Finalmente, por la pureza del compuesto y su estructura tridimensional se logró cristalizarlo (Anexo No.8).

El compuesto purificado fue analizado por GC/MS⁺ por la técnica “*Direct Analysis in Real Time*” -DART- por sus siglas en inglés, y se obtuvo el correspondiente a la masa del compuesto (Espectro No.1) que concuerda con la estructura No.1.

Por espectroscopia infrarroja, se determinaron los grupos funcionales (Espectro No 2.) en 3003.05 cm⁻¹ se observa el estiramiento del enlace C-H aromático, en 2940.95 y 2839.49 cm⁻¹ se encuentran los estiramientos del enlace C-H de carbono SP₃, (Los carbonos serán nombrados C9,C10,C11 y C12 en base a la numeración del compuesto No 1.) la

diferencia entre ambas bandas se debe a que el estiramiento en 2940.95 es asimétrico el cual tiene un mayor momento dipolar y por ende absorbe en una región mayor que el estiramiento simétrico (Silverstein et al., 2014).

Los carbonos pertenecientes al anillo aromático muestran un sobretono en la región de 1600-2000 cm^{-1} que se encuentra como resultado de las bandas fundamentales ubicadas en la región comprendida entre 700-1000 cm^{-1} . El estiramiento C=C del anillo aromático se observa en 1578.22 cm^{-1} y la banda en 799.93 cm^{-1} representa la oscilación del enlace C-H aromático que se encuentra acoplado por los sustituyentes adyacentes. Por último, el grupo funcional metoxi se observa en 1125.40 cm^{-1} que corresponde al estiramiento simétrico de C-O-C (C1, C3, C5) (Silverstein et al., 2014).

La RMN ^1H permite determinar los tipos de protones ^1H de cada molécula, es decir a que grupo funcional se encuentran enlazados, y es determinado por el entorno químico del núcleo (Balci, 2005; Silverstein et al., 2014). En el espectro No 3. A campo bajo aparece una señal doble en 1.94 ppm que integra para 3 hidrógenos que pertenecen al metilo vinílico (C12). Esta señal se clasifica como señal doble, ya que únicamente tiene un protón vecino (Silverstein et al., 2014). La señal simple (no tiene hidrógenos vecinos) en 3.8 ppm que integra para 9 hidrógenos se asigna a los hidrógenos de los metilos metoxilos (C10, C11, C12) esta señal se encuentra desplazada respecto a la señal anterior, debido a que el oxígeno por su electronegatividad desprotege los electrones (Silverstein et al., 2014). En 6.17 ppm se ubica la señal simple que integra para los 2 hidrógenos unidos a los carbonos aromáticos (C4 y C6). Por último, en 6.5 y 6.6 ppm se encuentran los hidrógenos que pertenecen a la olefina, nótese que C7 está más desplazado, ya que la conjugación con el anillo aromático desprotege al protón. En C7 se presenta una señal doble y en C8 es una señal quintuple debido a que

poseen 1 y 4 hidrógenos vecinos respectivamente (Nathan & Diaz, 1970; Silverstein et al., 2014) los carbonos C1, C2, C3 y C5 de la estructura No 1. no muestran ninguna señal debido a que no poseen hidrógenos. Así mismo en C7 y C8 se les asigna la estereoquímica conformación trans, siendo en este trabajo la primera vez que se determinó a partir de extractos obtenidos en *Piper patulum*.

La técnica de RMN ^{13}C determina el esqueleto de carbono de las moléculas, al igual que en RMN ^1H los desplazamientos químicos se deben al entorno químico del núcleo. (Atta-Ur-Rahman & Ahmad, 1992; Silverstein et al., 2014) En el espectro No 4. la señal en 20.8 ppm pertenece al metilo en posición C9, en cambio debido a la electronegatividad de los oxígenos vecinos, los metilos en C10 C11 y C12 se les asigna la señal en 55.63 ppm. Los carbonos de la olefina se encuentran en 121.07 y 127.82 ppm, al igual que en RMN ^1H en C7 se encuentra más desplazado debido su conjugación con el anillo aromático.

Los desplazamientos químicos para los carbonos aromáticos son determinados por la electronegatividad de los sustituyentes en el anillo, así como su posición (Richards & Hollerton, 2010; Silverstein et al., 2014). En 90.74 ppm aparecen las señales de los carbonos C4 y C6 ya que ambos poseen en *orto* y *para* sustituyentes metoxi, de manera similar en C2 presenta un desplazamiento en 108.39 ppm, que se encuentra justificado por la conjugación con el vinilo. Los carbonos en C1, C3 y C5 son los que se encuentran más desprotegidos a 158.81 ppm ya que se encuentran unidos al oxígeno.

En el espectro No .5 se muestra el RMN por DEPT 135, esta técnica instrumental permite un mayor análisis estructural de los compuestos orgánicos, ya que distingue entre los metilos $-\text{CH}_3-$ y metilidinos $-\text{CH}-$, con señales positiva, y para los metilenos $-\text{CH}_2-$ señales negativas.

De la misma manera que en el espectro de RMN ^{13}C en DEPT 135, los desplazamientos químicos siguen el mismo patrón, sin embargo, ya que esta técnica no distingue carbonos cuaternarios -C- las señales de C1, C2, C3 y C5 no se muestran en el espectro, confirmando su presencia. Así como tampoco se encuentran señales negativas por la ausencia de CH_2 (Colegate & Molyneux, 1993).

Los análisis de RMN 2D (COSY y HSQC), nos brindan mucha información sobre la estructura de la molécula, si bien en RMN ^1H se pueden determinar la cantidad de hidrógenos vecinos, el análisis RMN 2D nos indica de mejor manera la correlación que posee cada señal incluyendo el ^{13}C (Richards & Hollerton, 2010; Silverstein et al., 2014)

El espectro COSY No. 6 se muestra la correlación entre los protones ^1H - ^1H , representadas en el espectro como las marcas circuladas. En el círculo rojo, se entrecruzan las señales en 1.94 ppm y 6.54 ppm asignadas a los hidrógenos unidos a los átomos de carbono C9 y C8, así como también en azul se observa la correlación de las señales en 6.5 con 6.6 ppm los que representan los carbonos del alqueno en C7 y C8. Por lo tanto, el espectro COSY concuerda con la interpretación del espectro RMN ^1H en las señales dobles en C9, quintuples para C8 y doble para C7.

En el espectro HSQC No 7. Se representa la correlación ^1H - ^{13}C . El círculo en morado se encuentra entre las señales de 1.94 ppm para el ^1H , con la señal 20.8 ppm de ^{13}C , por ende, se asigna la pertenencia de los 3 hidrógenos metílico al carbono en C9. En el círculo verde existe la correlación para las señales en 3.8 ppm con 55.63 ppm, por lo que se asigna a los carbonos metoxilos en C10, C11 y C12. En el círculo celeste se encuentra en la región que aparecen las señales aromáticas para ^1H y ^{13}C asignados a C4 y C6 y por último en círculo

celeste la correlación pertenece a la olefina. En C1, C2, C3, y C5 no se encuentra correlación debido a que no poseen hidrógenos.

Tomando en conjunto el análisis instrumental del producto aislado es posible asignarle con total certeza la estructura correspondiente al fenilpropanoide con el nombre IUPAC 1,3,5-trimetoxi-2-((E)-1-en-propil) benceno.

El fenilpropanoide fue aislado y elucidado estructuralmente por primera vez en el género *Piper* a partir de extractos de hojas de *Piper marginatum* utilizando las técnicas instrumentales (GC/MS⁺ RMN 1H, RMN 13C, COSY y HMBC) y fue denominado como piper margina (Santos, Chaves, & Gray, 1998), concordando los resultados con los propuestos en este trabajo. Así mismo, S. Cruz et al., 2012, propuso que dicho compuesto se encontraba en los aceites esenciales de hojas de *Piper patulum* mediante la concordancia del patrón de fragmentación por GC/MS⁺ con una librería de datos.

A través del presente trabajo, es la primera vez que se aísla y se analiza el compuesto piper margina por los métodos espectroscópicos RMN ¹H, ¹³C, COSY y HSQC, que se confirma por medio de elucidación estructural e incluso estableciendo su configuración geométrica, que proviene de *Piper patulum*.

Finalmente, la **cromatografía No 3**. Revela la capacidad del compuesto piper margina para reducir al radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo -DPPH- demostrando así su actividad antioxidante. Estructuralmente se encuentra vinculado con dicha actividad por los el fenilmetoxi, que son capaces de reducir al ion radical. (Chang et al., 2007)

La capacidad antioxidante de los fenilpropanoides se debe a los grupos polifenolicos en su estructura (Chang et al., 2007), sin embargo, como se observa en el **compuesto No 1**

al encontrarse metilados su capacidad se reduce. (Chang et al., 2007; Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996) Sin embargo, a pesar de no poseer una alta capacidad antioxidante, es de gran importancia, ya que es la primera vez que se logró realizar las pruebas para comprobar dicha actividad del fenilpropanoide aislado de las fracciones apolares cloradas de *Piper patulum*.

9 Conclusiones

1. Se aisló el fenilpropanoide 1,3,5-trimetoxi-2-[(1E)-prop-1-enil] benceno, utilizando las técnicas cromatográficas de columna, capa fina preparativa.
2. Se elucidó la estructura del fenilpropanoide nombrado según IUPAC como 1,3,5-trimetoxi-2-[(1E)-prop-1-enil] benceno por medio de técnicas espectroscópicas GC/MS⁺, RMN ¹H, RMN ¹³C, DEPT 135, COSY y HSQC.
3. Se determinó que el compuesto 1,3,5-trimetoxi-2-[(1E)-prop-1-enil] benceno es responsable de brindarle la actividad antioxidante a la fracción obtenida de los extractos apolares clorados de *Piper patulum*.

10 Recomendaciones

1. Realizar un proceso de optimización estructural del compuesto 1,3,5 trimetoxi-2-((E)-1-en-propil) benceno para potenciar la actividad antioxidante.
2. Cuantificar la cantidad del compuesto 1,3,5-trimetoxi-2-[(1E)-prop-1-enil] benceno en las hojas de *Piper patulum*.
3. Evaluar la actividad anticancerígena del compuesto 1,3,5 trimetoxi-2-((E)-1-en-propil) benceno, debido a que han reportado que algunos fenilpropanoides poseen dicha actividad. (Atiya et al., 2017)
4. Sintetizar por métodos químicos el compuesto 1,3,5 trimetoxi-2-((E)-1-en-propil) benceno.
5. Realizar la determinación cuantitativa de la capacidad antioxidante del compuesto 1,3,5-trimetoxi-2-[(1E)-prop-1-enil] benceno.
6. En la literatura se reporta que varios compuestos con actividad antioxidante se encuentran en la fracción diclorometánica, por lo cual se recomienda aislar y elucidar la estructura de los componentes de dicha fracción obtenida de hojas de *Piper patulum*. (Mgbeahuruike et al., 2017)

11 REFERENCIAS

- Alécio, A. C., Bolzani, V. da S., Young, M. C. M., Kato, M. J., & Furlan, M. (1998). Antifungal Amide from Leaves of *Piper hispidum*. *Journal of Natural Products*, 61(5), 637-639. <https://doi.org/10.1021/np9703656>
- Aslam, M., Ahmad, M. S., Ahmad, M. A., & Akhlaq, M. (2017). An updated review on Phytochemical and Pharmacological properties of *Piper sarmentosum*. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 11, 345-356.
- Atiya, A., Sinha, B. N., & Lal, U. R. (2017). Bioactive phenylpropanoid analogues from *Piper betle* L. var. *birkoli* leaves. *Natural Product Research*, 31(22), 2604-2611. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1285297>
- Atta-Ur-Rahman, & Ahmad, V. U. (1992). *13C-NMR of Natural Products*. Springer Science & Business Media.
- Balci, M. (2005). *Basic 1H- and 13C-NMR Spectroscopy*. Elsevier.
- Bhuvaneshwari, S., Sripriya, N., Santhanakrishnan, D., & Nyayiru Kannaian, U. P. (2014). Studies on antioxidant activities of six cultivars of piper betle linn. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6.
- Cáceres, A. (2011). *Caracterización de la actividad antioxidante de extractos de especies nativas del género piper y cuantificación de metabolitos secundarios con potencial de desarrollo* (p. 140). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Chahal, J., Ohlyan, R., Kandale, A., Walia, A., & Puri, S. (2011). Introduction, Phytochemistry, Traditional uses and Biological Activity of Genus *Piper*: A review. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, 2, 130.

- Chang, Y.-C., Lee, F.-W., Chen, C.-S., Huang, S.-T., Tsai, S.-H., Huang, S.-H., & Lin, C.-M. (2007). Structure-activity relationship of C6-C3 phenylpropanoids on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Free Radical Biology & Medicine*, *43*(11), 1541-1551. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.08.018>
- Chen, S., Huang, H.-Y., Cheng, M.-J., Wu, C.-C., Ishikawa, T., Peng, C.-F., ... Chen, I.-S. (2013). Neolignans and phenylpropanoids from the roots of *Piper taiwanense* and their antiplatelet and antitubercular activities. *Phytochemistry*, *93*, 203-209. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.03.008>
- Colegate, S. M., & Molyneux, R. J. (1993). *Bioactive Natural Products Detection, Isolation, and Structural Determination*. CRC Press.
- Cruz, S. M., Cáceres, A., Álvarez, L. E., Apel, M. A., & Henriques, A. T. (2012). Chemical Diversity of essential oils of 15 piper species from Guatemala. *Acta Horticulturae*, (964), 39-46. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.964.4>
- Cruz, S., Véliz, R., Gómez, A., Álvarez, L., Cáceres, A., Morales, J., ... Henriquez, A. (2008). Caracterización química de los aceites esenciales y extractos de especies mesoamericanas del genero piper como nuevos recursos aromáticos. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia*, *18*(1). Recuperado de <http://www.revistasguatemala.usac.edu.gt/index.php/qyf/article/view/441>
- Dasgupta, N., & Bratati De. (2004). Antioxidant activity of Piper betle L. leaf extract in vitro. *Food Chemistry*, *88*(2), 219-224. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.036>
- Do Nascimento, J. C. do, Vanderlúcia, P., David, J. M., & David, J. P. (2012). Occurrence, biological activities and ¹³C NMR data of amides from Piper (Piperaceae). *Química Nova*, *35*(11), 2288-2311. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001100037>

- Dyer, L. A., & Palmer, A. (2012). *Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution*. Springer Science & Business Media.
- Fernandes, A., L. Prado, A., Barata, L., Q. Paulo, M., Azevedo, N., & Ferri, P. (1997). A Method to Separate Lignoids from *Virola* Leaves. *Phytochemical Analysis - PHYTOCHEM ANALYSIS*, 8, 18-21. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(199701\)8:13.3.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(199701)8:13.3.CO;2-2)
- Gbewonyo, W. S. K., & Candy, D. J. (1992). Chromatographic isolation of insecticidal amides from *Piper guineense* root. *Journal of Chromatography A*, 607(1), 105-111. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)87059-H](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)87059-H)
- Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M. Á., Ponce-Pardo, J., & Zarzosa-Norabuena, E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico*, 15(1), 57-60.
- Isoda, H., Motojima, H., Onaga, S., Samet, I., Villareal, M. O., & Han, J. (2014). Analysis of the erythroid differentiation effect of flavonoid apigenin on K562 human chronic leukemia cells. *Chemico-Biological Interactions*, 220, 269-277. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.07.006>
- Jaramillo, M. A., & Manos, P. S. (2001). Phylogeny and Patterns of Floral Diversity in the Genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany*, 88(4), 706-716. <https://doi.org/10.2307/2657072>
- Kasote, D. ., Katyare, S., Hegde, M., & Bae, H. (2015). Significance of Antioxidant Potential of Plants and Its Relevance to Therapeutic Applications. *International Journal of Biological Sciences*, 11, 982-991. <https://doi.org/10.7150/ijbs.12096>
- Koirala, N., Thuan, N. H., Ghimire, G. P., Thang, D. V., & Sohng, J. K. (2016). Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and

- perspectives for biotechnological production. *Enzyme and Microbial Technology*, 86, 103-116. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.02.003>
- Korkina, L. G. (2007). Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, 53(1), 15-25.
- Kumar, S., Sharma, S., & Vasudeva, N. (2017). Review on antioxidants and evaluation procedures. *Chinese Journal of Integrative Medicine*.
<https://doi.org/10.1007/s11655-017-2414-z>
- Kushagra, N., Mukesh, K., Amit, A., Tekeshwar, K., Dhansay, D., Hemant, B., & Tripathi, D. (2011). Piper betle L.: A review on its ethnobotany, phytochemistry, pharmacological profile and profiling by new hyphenated technique DART-MS (Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry). *Journal of Pharmacy Research*, 4(11), 2991.
- M K, D. P., D Revanasiddappa, H., Rai, K., & Bantal, V. (2012). Synthesis, characterization, antidepressant and antioxidant activity of novel piperamides bearing piperidine and piperazine analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.09.089>
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J., & Tuñon, M. (2012). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*, 7(6).
- Martín-Rodríguez, A. J., Ticona, J. C., Jiménez, I. A., Flores, N., Fernández, J. J., & Bazzocchi, I. L. (2015). Flavonoids from *Piper delineatum* modulate quorum-sensing-regulated phenotypes in *Vibrio harveyi*. *Phytochemistry*, 117, 98-106.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.06.006>

- Masuda, T., Inazumi, A., Yamada, Y., Padolina, W. G., Kikuzaki, H., & Nakatani, N. (1991). Antimicrobial phenylpropanoids from *Piper sarmentosum*. *Phytochemistry*, 30(10), 3227-3228. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83180-S](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83180-S)
- Mesa, A. M., Rincón, D. C., Toro, J. F., Tamayo, A., Blair, S., & Rojano, B. A. (2011). Actividad antioxidante de *Piper Piedecuestanum* Trel. & Yuncck. y *Piper Subpedale* Trel. & Yuncck. *Revista latinoamericana de química*, 39(3), 91-99.
- Mgbeahuruike, E. E., Yrjönen, T., Vuorela, H., & Holm, Y. (2017). Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on *Piper* species. *South African Journal of Botany*, 112, 54-69. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.007>
- Molina, J., & Garcia-chavez, A. (2001). Alcamidas en plantas: distribución e importancia. *Avance y perspectiva*, 20, 377-387.
- Nathan, P., & Diaz, E. (1970). *Introducción a la resonancia magnetica nuclear* (Primera ed). Mexico: Limusa-Wiley.
- Orbe Saavedra, P., & Tuesta Pinedo, G. (2013). Evaluación de la actividad antioxidante y alelopática de las hojas de *Piper tenuistylum* C.DC. y *Piper lagenaebaccum* Trel. *Universidad Nacional de la Amazonía Peruana*. Recuperado de <http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/UNAP/3666>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Parmar, V. S., Jain, S. C., Bisht, K. S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., ... Boll, P. M. (1997). Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*, 46(4), 597-673. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00328-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00328-2)

- Plazas, E., Cuca, L., & Delgado, L. (2008). Isolated Flavonoids from inflorescences of *Piper hispidum* Kunth (Piperaceae) and acetylated derivatives. *Revista colombiana de química*, 37(2), 135-144.
- Portet, B., Fabre, N., Roumy, V., Gornitzka, H., Bourdy, G., Chevalley, S., ... Moulis, C. (2007). Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. *Phytochemistry*, 68(9), 1312-1320. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.02.006>
- Portet, B., Fabre, N., Rozenberg, R., Habib-Jiwan, J.-L., Moulis, C., & Quetin-Leclercq, J. (2008). Analysis of minor flavonoids in *Piper hostmannianum* var. *berbicense* using liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1210(1), 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.055>
- Quijano-Abril, M. A., Callejas-Posada, R., & Miranda-Esquivel, D. R. (2006). Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). *Journal of Biogeography*, 33(7), 1266-1278. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01501.x>
- Raman, N. (2012). *Isolation of chemical compound from Methanol extract of Peperomia pellucida*. Universidad de Malasia Terengganu, Malasia. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/260677109_Isolation_of_chemical_compound_from_Methanol_extract_of_Peperomia_pellucida
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)

- Richards, S. A., & Hollerton, J. C. (2010). *Essential Practical NMR for Organic Chemistry*. John Wiley & Sons.
- Santos, B. V. de O., Chaves, E. V. L. da-C. M. C. de O., & Gray, A. I. (1998). Phenylalkanoids from piper Marginatum. This paper is based on the M.Sc. project of B.V. de o.s., Itf \ ufpb, Brazil and on the Ph.D. research of e.v.l. da C., University of Strathclyde. *Phytochemistry*, 49(5), 1381-1384.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00100-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00100-9)
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Yoga Latha, L. (2010). Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 8(1), 1-10.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J., & Bryce, D. L. (2014). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. John Wiley & Sons.
- Singh, A., & Duggal, S. (2009). Piperine- Review of advances in pharmacology. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 2(3), 615-620.
- Standley, P., & Steyermark, J. (1952). *Flora of Guatemala* (Philadelphia Botany). Chicago.
- The Plant List. (2010). Recuperado 10 de junio de 2018, de <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Piperaceae/>
- Torres-Pelayo, Fernandez, S., Carmona-Hernandez, O., Molina-Torres, J., & Lozada-Garcia, A. (2016). A Phytochemical and Ethnopharmacological Review of the Genus Piper: as a Potent Bio-Insecticide. *Research & Reviews: Research Journal of Biology*, 4, 45-50.

- Ugusman, A., Zakaria, Z., Hui, C. K., Nordin, N. A. M. M., & Mahdy, Z. A. (2012). Flavonoids of *Piper sarmentosum* and its cytoprotective effects against oxidative stress. *EXCLI Journal*, *11*, 705-714.
- Vargas, F., Rivas, C., Nursamaa, A., & Zoltan, T. (2007). Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. *Avances en Química*, *2*(2), 3-15.
- Vasques da Silva, R., Navickiene, H. M. D., Kato, M. J., Bolzani, V. da S., Méda, C. I., Young, M. C. M., & Furlan, M. (2002). Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, *59*(5), 521-527.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, *3*(1), 2-20.
<https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>
- Wang, T., Li, Q., & Bi, K. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *13*(1), 12-23. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>
- Zelada V, Cáceres A, & de Carvalho joao. (2016). Evaluation of the antioxidant, genotoxic and cytotoxic activity of organic fractions from leaves and roots of *Piper patulum* Bertol. from Guatemala. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, *3*(1), 8-8. <https://doi.org/10.15171/ijpni.2016.08>

12 ANEXOS

Anexo No 1. Extracto crudo obtenido de hojas de *Piper patulum*

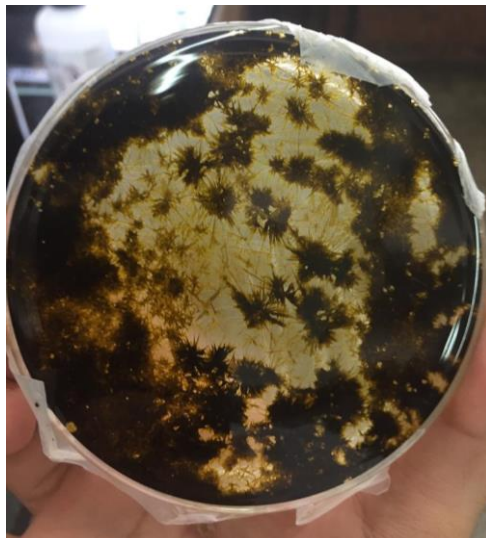


Fuente: Imagen tomada en laboratorio de orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, -USAC-

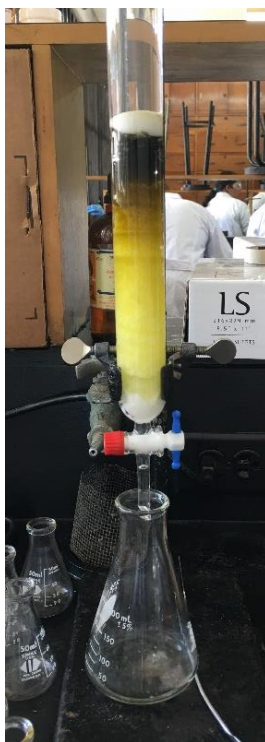
Anexo No 2. Extracción liquido-liquido (hexano:metanol/agua) del extracto crudo



Fuente: Imagen tomada en laboratorio de orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, -USAC-

Anexo No 3. Fraccion Hexanica del extracto crudo

Fuente: Imagen tomada en laboratorio de orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, -USAC-

Anexo No 4. Cromatografía en Columna de fracción hexánica

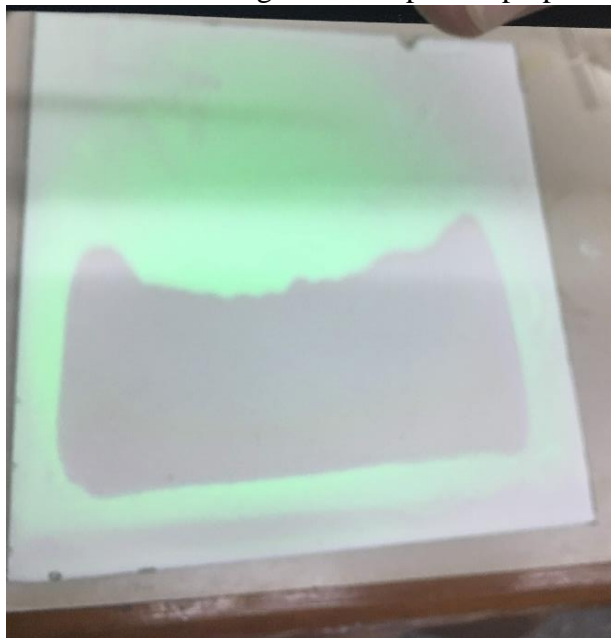
Fuente: Imagen tomada en laboratorio de orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, -USAC-

Anexo No 5. Fracciones obtenidas por cromatografía en columna

Fuente: Imagen tomada en laboratorio de orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, -USAC-

Anexo No 5. Cromatografía en columna de fracciones 2-5 en TLC

Fuente: Imagen tomada en laboratorio de orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, -USAC-

Anexo No 6. cromatografía en capa fina preparativa

Fuente: Imagen tomada en laboratorio de orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, -USAC-

Anexo No 7. compuesto 1,3,5-trimetoxi-2-[(1E)-prop-1-enil] benceno purificado

Fuente: Imagen tomada en laboratorio de orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, -USAC-

Anexo No 8 compuesto 1,3,5-trimetoxi-2-[(1E)-prop-1-enil] benceno cristalizado



Fuente: Imagen tomada en laboratorio de orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, -USAC-



Br. José León Castillo Arroyave

Tesista



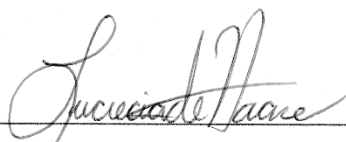
M.Sc. Byron Francisco Fuentes Juarez

Asesor



Lic. Allan Ronaldo Vásquez Bolaños

Revisor



M.A. Lucrecia Martínez de Haase

Directora de Escuela



M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto

Decano