



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMEDICA

BIOQUIMICO FARMACEUTICO

TRABAJO DE TITULACIÓN

Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios a partir de la especie *Piper tuberculatum* Jac

Autora: Criollo Maldonado Paola Fernanda

Directora: Ramírez Robles, Jorge Yandry

LOJA - ECUADOR
2020



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NC-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2020

Aprobación del director del trabajo de titulación

Loja, 13, de octubre, de 2020

Mgtr.

Cruz Erazo Claudia Teresa

Coordinadora de Titulación de Bioquímica y Farmacia

Ciudad.-

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación denominado: Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios a partir de la especie *Piper tuberculatum* Jac., realizado por Paola Fernanda Criollo Maldonado, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo. Así mismo, doy fe que dicho trabajo de titulación ha sido revisado por la herramienta antiplagio institucional.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Firma.....
Ramírez Robles, Jorge Yandry

C.I: 1103536411

Declaración de autoría y cesión de derechos

“Yo, Paola Fernanda Criollo Maldonado, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

- Ser autora del Trabajo de Titulación denominado: Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios a partir de la especie *Piper tuberculatum* Jac, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia específicamente de los contenidos comprendidos en: se debe colocar los nombres de los capítulos elaborados en el Trabajo de Titulación, Introducción, Capítulo 1. Marco teórico , Capítulo 2. Materiales y Métodos, Capítulo 3. Resultados y Discusión, Conclusiones y Recomendaciones, siendo PhD. Jorge Yandry Ramirez Robles, director del presente trabajo; y, en tal virtud, eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual. Además, ratifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.
- Que mi obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.
- Autorizo a la Universidad Técnica Particular de Loja para que pueda hacer uso de mi obra con fines netamente académicos, ya sea de forma impresa, digital y/o electrónica o por cualquier medio conocido o por conocerse, sirviendo el presente instrumento como la fe de mi completo consentimiento; y, para que sea ingresada al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma :

Autor : Paola Fernanda Criollo Maldonado

C.I. : 1105885261

Dedicatoria

El presente trabajo de investigación, lo dedico principalmente a Dios, quien, con su bendición, me ha permitido culminar una etapa muy importante en mi vida profesional.

A mis padres Lucio Criollo y Rocío Maldonado, quienes, con su amor, esfuerzo y apoyo incondicional, me han permitido realizarme como profesional, les agradezco infinitamente por estar siempre ahí a pesar de las circunstancias, por guiarme y hacer de mí una persona luchadora y perseverante.

A mi hijo Andrés, quien es mi más grande motivación, en mis más duros momentos ha sido mi motor para seguir adelante, me ha dado la tranquilidad y paz que en muchos momentos necesité, su amor infinito me impulsa para superarme día a día y buscar lo mejor para él.

A mis hermanos Jandry y Alejandra, quienes han estado incondicionalmente junto a mi en todo este proceso, les agradezco por su cariño apoyo en todo momento.

A mis abuelitos María y Abel, quienes me han apoyado desde mi niñez, dándome el amor más sincero e inculcando en mi la humildad y perseverancia.

A mis amigas quienes han estado conmigo en este proceso, brindándome su apoyo incondicional y a todas las personas que a lo largo de mi carrera me apoyaron con sus conocimientos, para al fin lograr mi sueño anhelado.

Paola Fernanda Criollo Maldonado

Agradecimientos

Agradezco infinitamente a la Universidad Técnica Particular de Loja, por darme la oportunidad de formarme académicamente y permitirme culminar mis estudios universitarios.

A mis padres, Lucio y Rocío, por brindarme su apoyo incondicional, por darme amor y hacer de mí una persona luchadora, agradezco todo el esfuerzo que han hecho y siguen haciendo para que culmine mis estudios universitarios.

Un agradecimiento especial al PhD. Jorge Ramírez, por haberme dado la oportunidad de realizar mi trabajo de fin de titulación, por impartirme su conocimiento y apoyarme en todo este transcurso.

A mi tío Jaime Maldonado por brindarme su apoyo y su ayuda incondicional en todo momento.

A Jayro por brindarme su apoyo en todo momento y ayudarme con nuestro hijo.

A los docentes de la Titulación de Bioquímica y Farmacia que en el transcurso de la carrera me impartieron sus conocimientos y supieron guiarme para hoy finalmente culminar con mi trabajo de fin de titulación.

Paola Fernanda Criollo Maldonado

Índice de Contenido

Caratula.....	I
Aprobación del director del trabajo de titulación	II
Declaración de autoría y cesión de derechos	III
Dedicatoria.....	IV
Agradecimientos	V
Índice de Contenido.....	VI
Índice de Tablas	VIII
Resumen	1
Abstract.....	2
Introducción	3
Capítulo 1.....	5
Marco teórico	5
1.1. Biodiversidad del Ecuador.	5
1.2. Plantas Medicinales del Sur del Ecuador	5
1.3. Familia Piperaceae	6
1.4. Género Piper	7
1.5. <i>Piper tuberculatum</i> Jac	7
1.5.1 <i>Taxonomía de la especie Piper tuberculatum</i> Jac.	8
1.6. Metabolitos secundarios	8
1.7. Alcaloides	10
1.8. Técnicas de separación e identificación de metabolitos secundarios	11
1.8.1. <i>Cromatografía en capa fina (CCF)</i>	11
1.8.2. <i>Cromatografía en columna</i>	12
1.8.3. <i>Resonancia magnética nuclear</i>	12
1.8.4. <i>Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas</i>	12
1.8.5. <i>Punto de fusión</i>	13
1.8.6. <i>Experimentos Tocsy</i>	13
Capítulo 2.....	14
Materiales y métodos	14
2.1. Metodología empleada en la investigación.	14
2.2. Área de recolección del material	14
2.3. Obtención del extracto	14
2.4. Cromatografía de capa fina, para el análisis del extracto	15
2.5. Desclorofilación	15
2.5.1. <i>Extracto de Piper tuberculatum</i> Jac.....	15

2.6. Fraccionamiento cromatográfico en columna.....	16
2.7. Purificación de los metabolitos secundarios	18
2.8. Identificación de los metabolitos secundarios.....	18
2.8.1. <i>Resonancia magnetica nuclear</i>	18
2.8.2. <i>Punto de fusión</i>	18
2.8.3. <i>Método Tocsy</i>	19
Capitulo 3	20
Resultados y discusión	20
3.1. Extracto obtenido de la especie <i>Piper tuberculatum</i> Jac.....	20
3.2. Identificación de los compuestos Piperlonguminina y Dihidropiperlonguminina que se obtuvo a partir de la fracción P.C 011/4.	20
Conclusiones:	26
Recomendaciones:.....	27
Referencias.....	28
Anexos.....	35
Anexo 1: Espectro de 1H RMN(CDL3) de los compuestos Piperlonguminina y Dihidropiperlonuminina.....	35
Anexo 2: Espectro de 13C RMN(CDL3) de los compuestos Piperlonguminina y Dihidropiperlonuminina.....	36

Índice de Tablas

Tabla 1	Clasificación taxonómica de <i>Piper tuberculatum</i> Jac	8
Tabla 2	Fracciones obtenidas del extracto hexano/acetato.	17
Tabla 3	Rendimiento del extracto total obtenido de <i>Piper tuberculatum</i> Jac.	20
Tabla 4	Peso y rendimiento del extracto desclorofilado de <i>Piper tuberculatum</i> Jac.....	20
Tabla 5	Datos de ¹ H y ¹³ C de la molécula Piperlonguminina	21
Tabla 6	Datos de ¹³ C de la molécula Dihidropiperlonguminina.	24

Indice de Figuras

Figura 1	<i>Síntesis de Piperamidas</i>	10
Figura 2	<i>Estructura de la metodología</i>	14
Figura 3	<i>Obtención del extracto total: a) Maceración estática,</i>	15
	<i>b) Rotaevaporación a presión reducida, c) Extracto total</i>	15
Figura 5	<i>CC del extracto desclorofilado de P. tuberculatum</i> Jac.....	16
Figura 6	<i>CCF de las fracciones obtenidas de la CC del extracto de Acetato de Etilo</i>	17
Figura 7	<i>Cromatografía de capa fina de la fracción P.C 011/4</i>	18
Figura 8	<i>Punto de fusión</i>	19
Figura 9	<i>Estructura química del alcaloide Piperlonguminina (PL)</i>	21
Figura 10	<i>Estructura química del alcaloide Dihidropiperlonguminina</i>	23

Resumen

La especie *Piper tuberculatum* Jac, perteneciente a la familia Piperaceae, conocida comúnmente como “cordocillo”, fue recolectada en la parroquia 12 de Diciembre del cantón Pindal perteneciente a la provincia de Loja con el objetivo de identificar metabolitos secundarios a partir del estudio fitoquímico.

Mediante técnicas de maceración, filtración y concentración al vacío se obtuvo el extracto en acetato de etilo, a partir del cual se aisló e identificó una mezcla de 2 alcaloides: piperlongumina y dihidropiperlonguminina. La identificación de estas moléculas se logró mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN), ^1H , ^{13}C , Punto de Fusión y Experimentos Tocsy.

Palabras clave: *Piper tuberculatum* Jac, piperlonguminina, dihidropiperlonguminina, Experimentos Tocsy.

Abstract

The *Piper tuberculatum* Jac species, belonging to the Piperaceae family, commonly known as “cordoncillo”, was collected in 12 de Diciembre parish of the county of Pindal belonging to the province of Loja with the aim of identifying secondary metabolites from the phytochemical study.

Acetate extract was obtained through maceration, filtration, and concentration in vacuo, a mixture of 2 alkaloids was isolated and identified: piperlonguminina and dihydropiperlonguminina. The identification of these molecules was achieved by Nuclear Magnetic Resonance (NMR), ^1H , ^{13}C , Melting Point and Tocsy Experiments.

Keywords: *Piper tuberculatum* Jac, piperlonguminina, dihydropiperlonguminina, Tocsy Experiments.

Introducción

Latinoamérica y el Caribe conforman el 15 % de la extensión del planeta, debido a su gran diversidad y ecoregiones biológicamente diversas (Martínez, 2013). Ecuador se encuentra catalogada dentro de los primeros 17 países que presentan la mayor mega diversidad a nivel mundial, dada su ubicación geográfica y al ser atravesado por la cordillera de los Andes predispone a este sitio a una gran variedad de microclimas desde la humedad de la Amazonia hasta el seco ecosistema del sur, generando de esta manera una inmensa extensión de especies y ecosistemas (Castillo et al., 2017).

Debido a estas extensas regiones naturales, el uso de la medicina tradicional o alternativa que deriva de las plantas medicinales, sigue siendo una práctica habitual que no ha desaparecido con el pasar de los siglos (García et al., 2013). El uso de plantas medicinales data aproximadamente hace unos 4000-5000 aC, siendo el primer sistema de salud de las culturas ancestrales (Hosseinzadeh et al., 2015). Según Organización Mundial de la salud (OMS, 2020), la medicina tradicional es la primera fuente de asistencia médica ya que se registra hasta un 80 % de uso dentro de los sistemas públicos en algunos países en vías de desarrollo.

El desarrollo de nuevas formas de procesar derivados de plantas, ha sido de gran interés debido a la producción de metabolitos que se enmarcan hacia procesos farmacéuticos, alimenticios o cosmética (Pérez y Jiménez, 2011). De la misma forma son establecidas como una fuente prometedora de nuevos fármacos, debido a la generación de metabolitos secundarios, los cuales han producido actualmente cerca del 50% de nuevos medicamentos en el periodo comprendido entre 1981-2010 (Alvin et al., 2014).

En Ecuador el enfoque de los estudios de plantas medicinales presenta mayor interés en la región Central Andina y Amazónica debido a su gran diversidad de zona (Paredes et al., 2015). La provincia de Loja dada su ubicación geográfica y debido a la variedades altitudinales, presenta una geomorfología y una gran diversidad cuencas hidrográficas que

ha permitido diversificar la flora y fauna, en la región sur del país (Mendoza et al., 2017; Ojeda et al., 2018).

La Familia Piperaceae se encuentra enmarcada dentro de las angiospermas más primitivas, tenido aproximadamente 4000 especies en regiones tropicales, siendo el género *P. tuberculatum* un productor de amidas y de metabolitos secundarios, además de presentar actividad biológica antimicótica, insecticida y apoptótica de células cancerígenas (Cotinguiba et al., 2017). Una de las especies más relevante es la denominada *Piper tuberculatum* Jac, empleada en el tratamiento de afecciones respiratorias, digestivas, antiinflamatorias, antimicrobianas y miméticas (Dos Santos et al., 2017).

Los métodos empleados en el proceso de extracción de metabolitos secundarios son de carácter empírico debido al uso de solventes y técnicas que se acoplen a este proceso, siendo una de estas la técnica de cromatografía que se basa en la separación de las moléculas en función de su tamaño forma y carga en base a este principio se pudo determinar dos variantes de cromatografía la denominada cromatografía en columna y la cromatografía en capa fina, la primera implicada en el intercambio iónico, tamices moleculares y fenómenos de absorción, mientras que la segunda involucrada con procesos de absorción donde las muestras se separan en función de la interacción entre capas delgadas de adsorbente unidas a la placa, usada principalmente para compuestos de bajo peso molecular (Altemimi et al., 2017).

La obtención de metabolitos secundarios ha permitido al campo farmacéutico obtener nuevos ejemplares de medicamentos, dada la necesidad y acorde a los nuevos requerimientos terapéuticos hemos visto conveniente plantear el siguiente estudio fitoquímico de la especie *Piper tuberculatum* Jac, en donde mediante el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios, se generará una base científica de los compuestos químicos, contribuyendo de esta manera a la industria farmacéutica.

Capítulo 1

Marco teórico

1.1. Biodiversidad del Ecuador.

La medicina ancestral andina se remonta hace aproximadamente unos 10 000 años, siendo preservada por cerca de cinco siglos en la región latinoamericana, en donde es actualmente uno de los principales sistemas de salud para indios, montubios, campesinos y mestizos (Negrete et al., 2018). La medicina tradicional o medicina alternativa se la puede definir como un amplio conjunto de prácticas de atención de la salud que no forman parte de la medicina convencional del país y que se encuentran paulatinamente integradas a los sistemas de salud convencional (OMS, 2020).

La medicina tradicional o alternativa sigue siendo un gran aporte a la salud de los seres humanos, para tratar y aliviar diversas patologías actualmente existen diversas comunidades latinoamericanas en donde por la carencia de asistencia médica en algunos casos se ve en la necesidad de recurrir a conocedores de la medicina tradicional, denominados como yerbateros, parteras o curanderos (Gómez, 2012). Latinoamérica es una de las regiones más distinguidas a nivel global debido a sus rasgos culturales, esta convergencia cultural ha permitido enmarcarse en el conocimiento de plantas medicinales durante años, basados en la práctica empírica (Caceres et al., 2015).

El sistema ecuatoriano de asistencia médica ha establecido nuevas normas y reconocimiento de la medicina tradicional, teniendo un marco legal en donde genera y promueve el desarrollo de la medicina alternativa en Ecuador (Valarezo, 2014).

1.2. Plantas Medicinales del Sur del Ecuador

El norte del Perú y el sur del Ecuador se lo han definido como “el eje de salud” de la antigua área cultural andina que se extendía desde el sur del Ecuador hasta el norte de Bolivia identificándose por una gran variedad de plantas nativas, empleadas como tratamientos mágicos en diversas zonas latinoamericanas, entre estas podemos citar algunas plantas

como San Pedro (*Echinopsis pachanoi*), Ishpingo (*Nectandra*) o la Ayahuasca en la Amazónica (*Banisteriopsis caapi*) (Bussmann y Sharon, 2014).

Ecuador por su ubicación geográfica presenta una gran diversidad biológica, siendo uno de los países referentes en el uso de plantas medicinales, orientadas casi en su totalidad hacia la región andina y amazónica para prácticas o rituales ancestrales (Zambrano et al., 2015). En Ecuador actualmente cerca del 80% de la población conserva aún la tradición del uso de plantas medicinales (Jerves et al., 2014).

La población indígena conocida como Saraguro al sur del país ha sabido preservar estos conocimientos ancestrales a través del denominado hampiyachakkuna el hombre o mujer sabio quien tiene conocimiento de las propiedades de las plantas medicinales (Armijos et al., 2014).

Entre las familias dominantes de plantas medicinales dentro la región sur del Ecuador podemos destacar Asteraceae, Lamiaceae, Piperaceae, Pteridaceae, Amaranthaceae, Solanaceae, Onagraceae y Rosaceae (Tinitana et al., 2016). Ecuador juega un papel importante dada su biodiversidad, aunque en las últimas décadas, se ha encontrado envuelto en procesos de deforestación y pérdida de conocimiento de la medicina tradicional, actualmente debido a las necesidades de enfrentar nuevas formas patológicas, las farmacéuticas se han visto envueltas en nuevas formas de determinar fármacos basados en los compuestos conocidos como metabolitos (Castillo, Quinatoa, Risco, y Arnelas, 2014).

1.3. Familia Piperaceae

La Piperaceae taxonómicamente perteneciente al orden Piperales (Tabla 1) es una familia de plantas con flores más arcaicas de la clase de las Magnólidas, consta de 13 géneros con aproximadamente 3.600 especies distribuidas principalmente en zonas tropicales y subtropicales en América, esta familia se caracteriza por ser arbustos trepadores y por lo general aromáticos, sus haces vasculares tienden a ser dispersos, los tallos en ocasiones tiende estar enredados dentro la vaina en forma de estipula, suele presentar hojas alternas raramente opuestas, las estipulas se tienden a adherir a los peciolos, las flores son pequeñas y unisexuales (Xu y Deng, 2017). Tiende a ser de madera frágil se desarrollan en áreas

húmedas, algunas de ellas epifitas (Villegas y Chavarria, 2016) desarrollándose en una altura de aproximadamente de 100-1100 m s.n.m (Caquetá y Transición, 2013).

Esta familia tiene un importante interés debido a las atribuciones medicinales y culinarias (Yang y Chen, 2017). A nivel medicinal se puede destacar la actividad antioxidante combatiendo radicales libres los cuales se asocian a enfermedades como el cáncer, diabetes, problemas cardiacos y envejecimiento prematuro de la misma forma se la asocia con procesos antifúngicos, antidepresivos, antidiarreicos antiinflamatorio analgésicos, antitiroidales entre otros (Correa et al., 2015).

Estas atribuciones medicinales son asociadas hacia a los compuestos denominados como metabolitos secundarios que genera esta especie como fenilpropanoides, amidas aromáticas, amidas alifáticas, terpenos, policetidos, lignoides y alcaloides siendo de un gran interés económico y clínico (Guillermo Delgado et al., 2012).

1.4. Género Piper

El género Piper se distribuye a nivel global con aproximadamente 2.300 especies (Mesa et al., 2012). Esta presenta más de 1.500 taxones aproximadamente distribuidos en nueve subgéneros Enckea, Rádula, MacroPiper, Piper, Ottonia, Macrostachys, Schilleria, Pothomorpha, Peltobryon (Carmona et al., 2016).

El género Piper es un género sustancial en la medicina popular como agente, presentando diversas acciones curativas o farmacológicas de las cuales se las empleado para tratar dolencias como de estómago, artritis reumatoide, calmante menstrual, además de cicatrizante para diversas ulceraciones (Mgbeahuruike et al., 2017).

1.5. *Piper tuberculaum* Jac

Es una planta importante entre la etnobotánica, usada por diversos pueblos indígenas por más de 200 años conocida en Colombia como pipilongo (Montoya et al., 2016), en México como pie de pavito (Alvarez et al., 2017) y cordoncillo en centro y sur América (Martinez et al., 2013).

Es un arbusto heliófilo de 1.5 m , sus hojas presentan un envés pulverulento de 7-9 cm x 13-15 cm de largo, presentan un ápice corto, su base es cordados, pose una inserción

basal conspicuamente asimétrica, sus nervios secundarios presentan entre 6 y 7 ramificaciones a lo largo de la lámina, los peciolos tiene una dimensión de 0.8-1 cm, su espiga presenta un péndulo pulverulento de aproximadamente 2 - 2.3 cm x 2.3 mm de ancho, sus frutos son ovoides y glabros (Trujillo y Hoyos, 2013).

La especie *Piper tuberculatum* Jac es generadora de metabolitos secundarios específicamente amidas que son aquellas que han tenido mayor interés farmacéutico, entre estos podemos destacar piperina, piperlonguminina, 5-6 dihidropiperlonguminina, fagaramida, (E)- piplartina y pellitorina (Delgado, Duque, Vásquez, y Rojas, 2017; Ladino, 2017).

Estos metabolitos secundarios, tienden a manifestarse debido al comportamiento o situaciones ambientales en las que se encuentren involucrados como en reproducción, comunicación o protección de infecciones o depredadores (Ordaz et al., 2011)

1.5.1 Taxonomía de la especie *Piper tuberculatum* Jac.

Tabla 1.

Clasificación taxonómica de Piper tuberculatum Jac.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Piperales
Familia	Piperaceae
Genero	Piper
Especie	<i>Piper tuberculatum Jac</i>

Nota: Global Biodiversity Information Facility, 2020.

1.6. Metabolitos secundarios

Se estima que existen unas 400 000 especies de plantas en la tierra cuyas funciones metabólicas solo se han explorado parcialmente, estos organismos presentan una gran diversidad metabólica debido a la capacidad de sintetizar un enorme repertorio de

compuestos especializados o secundarios (Wang et al., 2019). Los metabolitos se los puede definir como moléculas pequeñas del metabolismo, encargados de desempeñar un papel crucial para los organismos vivos, siendo sintetizadas por diversas vías metabólicas (Amin et al., 2018).

La producción de metabolitos en los estudios fitoquímicos ha sido relevante debido a que estos tienden a generar adaptaciones durante los procesos estresantes o limitantes de la planta a través químicos complejos (Isah, 2019). Se considera que reino vegetal contiene entre 100 000 a un millón de metabolitos y que en cada especie se pueden encontrar más de 5000 metabolitos aproximadamente (Alseekh y Fernie, 2018).

Las plantas sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios encargándose del estrés biótico, cumplir tareas fisiológicas importantes, atraer polinizadores, establecer simbiosis y proporcionar componentes estructurales para lignificar (Guerrero et al., 2018).

Los metabolitos secundarios tienden a ser diversos en las plantas como en su naturaleza química, según la composición química los metabolitos secundarios se dividen en dos grupos, moléculas que tienen nitrógeno (alcaloides) y moléculas deficientes en nitrógeno terpenoides y fenólicos (Patra et al., 2013).

Un metabolito secundario es un producto intermedio que no se encuentra involucrado netamente en el proceso vital de organismo, tales procesos como fotosíntesis, reproducción, respiración entre otras funciones primarias, en el reino vegetal se puede predecir cerca de 200 000 compuestos, si bien estos no cumplen con las funciones esenciales en el desarrollo del organismo si juegan un papel importante en la defensa de la especie, además muchas de estos productos han sido explotados como medicamentos, fragancias, sabores, nutrientes, repelentes y colorantes (Pyne et al., 2019; Cetin, 2014).

Los metabolitos secundarios han jugado y siguen jugando un papel importante en el descubriendo de fármacos y sus potenciales aplicaciones, como lo fue en el aislamiento de la morfina en 1827 por Merck, sin duda la demanda de nuevos productos derivadas de plantas aumentado considerablemente en las últimas décadas dada la constante evolución y resistencia de agentes patógenos, esto a su vez ha permitido el desarrollo de nuevas técnicas

en el descubrimiento de las mismas tales como métodos cromatográficos, técnicas espectroscópicas en la que se encuentra la resonancia magnética o nuclear que servirán de puente en la identificación de nuevas moléculas (Rungsung et al., 2015).

1.7. Alcaloides

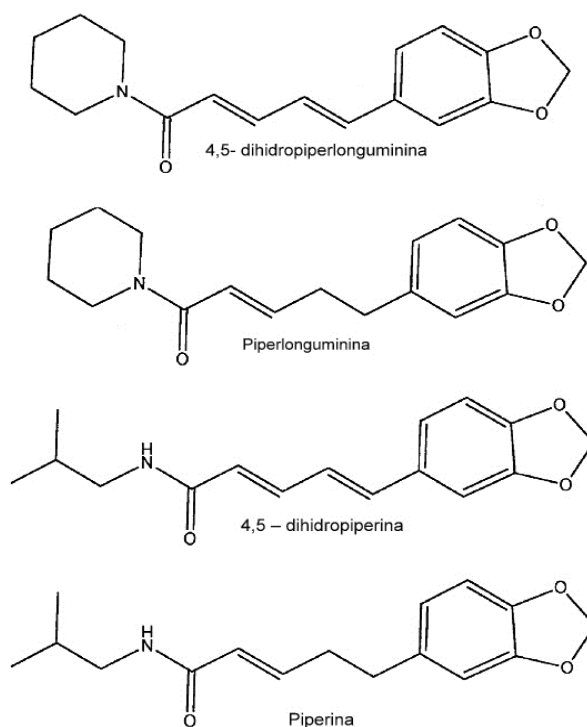
La ruta del ácido shikimico, es la ruta intermediaria para el proceso de síntesis de lignina, aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, tirosina y triptófano que se encuentra involucradas en la síntesis de alcaloides Fig 2. (Bochkov et al., 2012).

El termino alcaloide se lo describió por primera vez en 1819 por W. Meißner, debido a que estos compuestos aparecían como un álcali por lo tanto los denomino alcaloides, los alcaloides se derivan de aminoácidos tienen la característica de compartir un anillo heterocíclico con nitrógeno, presentando una fuerte actividad biológica (Aniszewski, 2015).

Aunque no existe una clasificación estándar de los alcaloides, actualmente se clasifican en base al esqueleto de carbono, identificándose alcaloides verdaderos que presentan un anillo heterocíclico nitrogenado originado de aminoácidos, protoalcaloides que no tienen anillo heterocíclico con nitrógeno, también derivados de aminoácidos y pseudoalcaloides que contienen anillo heterocíclico con nitrógeno pero no son derivados de aminoácidos (Sireesha et al., 2019).

Figura 1

Síntesis de Piperamidas



Nota: Scott et al., 2002.

1.8. Técnicas de separación e identificación de metabolitos secundarios

1.8.1. Cromatografía en capa fina (CCF).

Este tipo de cromatografía TLC por sus siglas en inglés thin layer chromatography, se la puede identificar como de absorción sólido líquido, en esta tipo de cromatografía la fase estacionaria es una sustancia absorbente sólida recubierta en placas de vidrio, como material absorbente, se utilizan sustancias sólidas como la alúmina, gel de sílice, celulosa que son de carácter polar, en esta técnica la fase móvil se desplaza hacia arriba a través de la fase estacionaria, el disolvente se desplaza por la placa empapada con el disolvente mediante acción capilar, también se impulsa la mezcla previamente colocada en las partes inferiores con una pipeta hacia arriba logrando de esta manera que tienden a separarse los analitos, siendo la velocidad de desplazamiento ascendente, dependiente de la polaridad del material, la fase sólida y el disolvente son reveladas con luz fluorescente o ambiental, la posición de cada molécula se puede determinar calcula la relación entre la distancia recorrida por las moléculas y el solvente denominada como movilidad relativa R_f (Coskun, 2016).

1.8.2. Cromatografía en columna

La cromatografía de columna Figura 3 es una extensión de la cromatografía de capa fina o TLC, es una técnica sólido líquido, el fundamento de esta técnica se basa en la absorción diferencial de la sustancia absorbente determinada por la polaridad de las interacciones de las moléculas de la muestra con el eluyente y los adsorbentes. Los adsorbentes se presentarán en la fase estacionaria en la columna de vidrio siendo los adsorbentes más comunes la alúmina o el gel de sílice caracterizados por su polaridad permitiendo de esta manera absorber la muestra, es decir la adhesión de las moléculas entre sí, sin formar enlaces químicos el eluyente también denominada como fase móvil, atraviesa la columna en donde las moléculas se desordenan del adsorbente y se disolverán en el eluyente siempre que coincidan las polaridades tanto de la molécula como la del eluyente los cuales serán recolectados continuamente (Priyadarshini et al., 2016).

1.8.3. Resonancia magnética nuclear

La resonancia magnética nuclear (RMN) o espectroscopia se lo puede definir como un fenómeno físico en el cual los núcleos en un campo magnético absorben y reemiten radiación electromagnética (Hadi et al., 2017). Esta técnica ha permitido proporcionar una vista macroscópica de los metabolitos requiriendo menos preparación para la muestra y mejorando la optimización de resultados (Kumar, 2016).

1.8.4. Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas

Esta técnica comprende un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Figura 5, el cual permitirá cuantificar e identificar complejos químicos, consiste en una fase estacionaria y una móvil, a partir del cromatógrafo de gases se inyectara una cantidad de muestra para el análisis en donde se producirá una vaporización, este se transportara hacia una columna cromatográfica por el gas transportador, esta fluirá a través de la columna y los compuestos que comprenden la mezcla de interés se separan conforme interaccionen con el recubrimiento de la columna o fase estacionaria y el gas portador fase móvil, la última parte de la columna pasa a través de una línea de transferencia calentada terminando en la fuente de iones, donde los compuestos eluyen de la columna y se convierten en iones, estos son

bombardeados con una corriente de electrones que hacen que se rompan los fragmentos y entren en un detector que envía una señal donde se recepta y se registra todos los datos (Stashenko & Martínez, 2014).

1.8.5. Punto de fusión

Un compuesto sólido pasa al estado líquido cuando hay un cambio en su temperatura, lo que se conoce como punto de fusión, en el momento en que la temperatura aumenta, la vibración de las partículas sobrepasa la fuerzas de atracción del interior del sólido y éste pasa a estado líquido (Burns, 2011).

1.8.6. Experimentos Tocsy

TOCSY se usa generalmente para moléculas grandes con muchas redes de acoplamiento independientes, como péptidos, proteínas, oligosacáridos y polisacáridos. Se puede utilizar para segmentar la señal de protones en grupos o redes de acoplamiento, particularmente cuando se sobreponen múltiples picos (los cambios químicos son muy similares) o hay un acoplamiento extenso de segundo orden. El espectro TOCSY se obtiene por correlación de enlaces mediante acoplamiento espín-espín. (NMRLAB. Instituto de Química, 2018).

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1. Metodología empleada en la investigación.

Figura 1.

Estructura de la metodología



2.2. Área de recolección del material

Las hojas y flores de la especie *Piper tuberculatum* Jac, fueron recolectadas en la provincia de Loja, parroquia 12 de diciembre, perteneciente al cantón Pindal, en mayo del 2019 a una altura aproximada de 800 m s.n.m con las siguientes coordenadas geográficas: 601417,5 E y 9549752,2 N.

Las muestras fueron identificadas taxonómicamente por el Dr. Nixon Cumbicus y recolectadas con permiso de investigación número (MAE- DBN- 2016-0655) otorgado por el Ministerio del Ambiente del Ecuador.

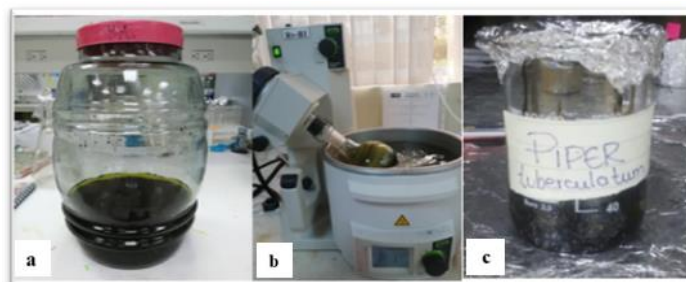
2.3. Obtención del extracto

Para la obtención del extracto de la especie *Piper tuberculatum* Jac, las hojas y flores fueron secadas a una temperatura de 35 °C por un periodo de siete días, a continuación, se trituró el material vegetal y se pesó 300 g para obtener el extracto.

El material vegetal fue sometido a maceración estática (55 minutos) y dinámica (5 minutos), en esta técnica se usó como disolvente el acetato de etilo para la obtención del extracto total, este proceso se realizó tres veces seguidas, luego se filtro al vacío y empleando el Rotaevaporador a una temperatura de 35 a 36 °C se logró concretar el extracto hasta quedar totalmente seco (Figura 3).

Figura 3.

Obtención del extracto total: a) Maceración estática, b) Rotaevaporación a presión reducida, c) Extracto total



2.4. Cromatografía de capa fina, para el análisis del extracto

El extracto obtenido fue sometido a cromatografía de capa fina (CCF), para dicho proceso se utilizó placas de sillice gel 60 F254 fase directa y RP-18 fase inversa, en distintas polaridades, para establecer las óptimas condiciones para la desclorofilación del extracto. A continuación se observaron las placas en la luz ultravioleta con longitudes de onda de 254 y 365 nm, las cuales fueron reveladas con ácido sulfúrico al 5 % y vainilina repectivamente.

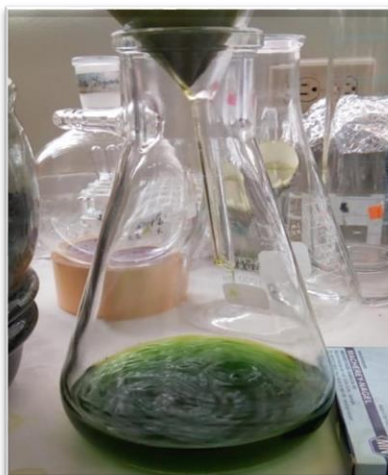
2.5. Desclorofilación

2.5.1. *Extracto de piper tuberculatum Jac.*

Se realizó la eliminación de clorofilas a partir de 5.75 g del extracto obtenido, este proceso se llevo a cabo mediante una columna SPE Discovery -18 de 60 ml, en la que se realizó una mezcla isocrática de MeOH: H₂O en una proporción 96:4 v/v. El resultado de este proceso permitió la obtencion de 1.7 g de extracto libre de clorofilas.

Figura 2.

Desclorofilación del extracto de P. tuberculatum Jac.



2.6. Fraccionamiento cromatográfico en columna

Con el extracto obtenido de la especie *Piper tuberculatum* Jac, el cual se encuentra libre de clorofila, se realizó el fraccionamiento en columna en relación 1:100 (muestra – sílica), en dicha columna se sembró 1 g de la muestra en 100 g de sílica gel F254, se utilizó una mezcla isocrática de Hex/AcOEt en relación 7:3.

Figura 3.

CC del extracto desclorofilado de P. tuberculatum Jac.



De esta columna se obtuvieron 201 tubos (muestras) a los cuales se les realizó cromatografía de capa fina usando sílice del 60 F254 fase directa, en una mezcla Hex/AcOEt en relación 7:3, estas muestras fueron observadas en la luz UV y posteriormente reveladas con ácido sulfúrico al 5 % y vainilina, con la finalidad de unir las fracciones de acuerdo a la similitud del color de mancha y a la semejanza de Rf obteniendo como resultado un total de 15 fracciones (P.C 01/4 – P.C 015/4).

Figura 4.

CCF de las fracciones obtenidas de la CC del extracto de Acetato de Etilo.

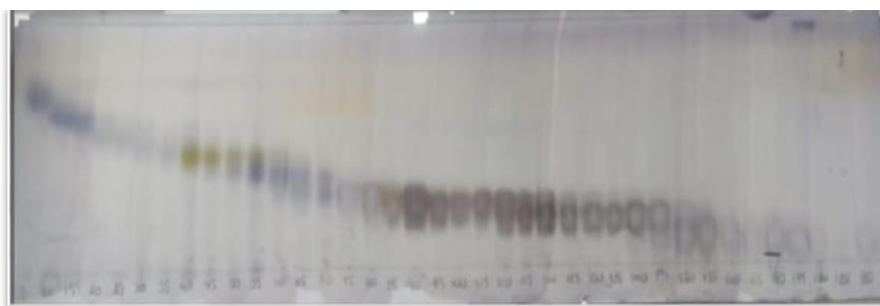


Tabla 2

Fracciones obtenidas del extracto hexano/acetato.

	Fracción	Código	Peso en(mg)
1	1-7	P.C 001/4	3.5
2	8-18	P.C 002/4	4.9
3	19-28	P.C 003/4	7.2
4	29-36	P.C 004/4	8.9
5	37-43	P.C 005/4	1.9
6	44-49	P.C 006/4	3.8
7	50-60	P.C 007/4	5.6
8	61-72	P.C 008/4	3.5
9	73-80	P.C 009/4	7.8
10	81-88	P.C 010/4	26.2
11	89-108	P.C 011/4	84.8
12	109-124	P.C 012/4	73.6
13	125-146	P.C 013/4	25.8
14	147-158	P.C 014/4	7.8
15	159-201	P.C 015/4	8.8

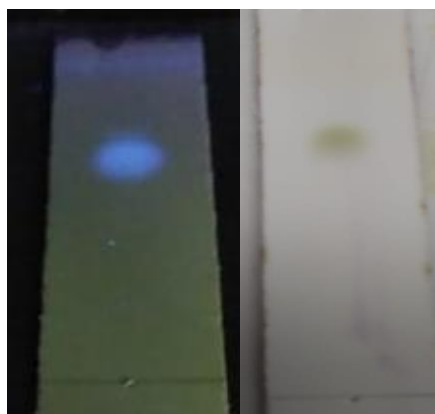
Nota: Fuente, el autor.

2.7. Purificación de los metabolitos secundarios

De las 15 fracciones obtenidas, la fracción P.C 011/4 presentó la formación de cristales, para la purificación de ésta fracción se añadió metanol con el fin de separar las impurezas presentes en el vial y de esta manera obtener cristales totalmente puros, los cuales se analizaron mediante RMN ^1H , ^{13}C , Tocsy.

Figura 5.

Cromatografía de capa fina de la fracción P.C 011/4



2.8. Identificación de los metabolitos secundarios

2.8.1. Resonancia magnética nuclear

Las moléculas aisladas fueron identificadas a través del análisis de los espectros, mediante el equipo de Resonancia Magnética Nuclear, el espectro de las muestras fue sometido a las siguientes condiciones: 500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C , el disolvente utilizado fue cloroformo deuterado (CDCl_3).

2.8.2. Punto de fusión

Se utilizó el equipo Fisher-Johns para la determinación del punto de fusión de las moléculas aisladas, se colocó una pequeña fracción de la muestra y se esperó a que el equipo caliente, este proceso es lento, finalmente se registra la temperatura en la que la muestra pasó de estado sólido a estado líquido.

Figura 6.

Punto de fusión



2.8.3. Método Tocsy

Las moléculas aisladas fueron sometidas a experimentos Tocsy con el fin de segmentar las señales de los protones en grupos o redes de acoplamiento, este método se utiliza generalmente cuando se sobreponen múltiples picos.

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1. Extracto obtenido de la especie *Piper tuberculatum*

El rendimiento del extracto se obtuvo, pesando la muestra y dividiendola para la cantidad del material vegetal utilizado en la maceración todo esto multiplicado por 100.

$$R = \frac{\text{peso del extracto final}}{\text{peso de la muestra seca}} \times 100$$

Tabla 3

Rendimiento del extracto total obtenido de Piper tuberculatum Jac.

Extracto Total	Peso inicial de la especie seca (g)	Peso final (g)	Rendimiento
Acetato de etilo	300 g	5.75 g	1.91%

Tabla 4

Peso y rendimiento del extracto desclorofilado de Piper tuberculatum Jac.

Extracto Total	Peso inicial del extracto (g)	Peso del extracto desclorofilado(g)	Rendimiento
MeOH:H ₂ O	5.75 g	2.7g	0.90 %

3.2. Identificación de los compuestos Piperlonguminina y Dihidropiperlonguminina que se obtuvo a partir de la fracción P.C 011/4.

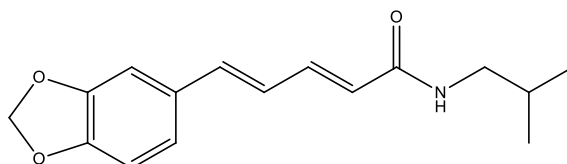
Se obtuvo las moléculas Piperlonguminina y Dihidropiperlonguminina a partir de la fracción P.C 011.4, la cual se presentó en forma de cristales finos, color blanquecinos con un peso de 83 mg, soluble en diclorometano y cloroformo, se realizó cromatografía en capa fina usando como eluyente una mezcla de diclorometano/acetato de etilo 6:4, en donde se observó a los compuestos como una mancha de color amarilla.

De acuerdo a los espectros de RMN, ^1H , ^{13}C , Experimentos Tocsy, y comprando con bibliografía (Sáez et al, 1998) (Navickiene et al, 2000), se identificó una mezcla de compuestos conocidos como Piperlonguminina y Dihidropiperlonguminina, con peso molecular de 273 g/mol y 275 g/gmol, respectivamente, y fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ para Piperlonguminina y $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ para Dihidropiperlonguminina (Navickiene et al, 2000).

En los espectros de RMN se observa que en la señal 0,9 ppm integra para doce protones, es decir, 4 metilos y se acompaña del multiplete en 1,8 que integra para dos. Además, un doblete de tripletes en 6,8 ppm, un triplete en 2,65 ppm y un cuarteto en 2,45 ppm, las señales anchas en 5,55 y 5,70 ppm parecen corresponder a NH, uno de los cuales muestra un acoplamiento triplete, indicando que está al lado de un CH_2 . Esto, unido a la presencia en el espectro de ^{13}C de dos señales en 166,20 y 165,87 ppm indica la presencia de una amida. Cada uno de los compuestos tiene una unidad fenilo y, en el otro extremo, una cadena, la diferencia está en la cadena del medio, ya que en un caso es con la señal en 5,93 unida al CO, como lo demuestra el HMBC en la correlación H5,93 ppm-C166,3 ppm y en el otro la cadena del medio será el acople entre la cadena intermedia y el fenilo será a través del extremo alquílico, como lo demuestra en el HMBC la correlación del protón vinílico en 5,78 ppm al carbono CO en 165,96.

Figura 7

Estructura química del alcaloide Piperlonguminina (PL).



En la tabla 5, se muestran los datos espectroscopicos de RMN de ^1H y ^{13}C de la molécula Piperlonguminina corroborado con la literatura.

Tabla 5

Datos de ^1H y ^{13}C de la molécula Piperlonguminina

Pos ición de átomo de hidrogeno y carbono	(Sáez et al, 1998) ¹ H(MHZ)	Datos experimentales H NMR (MHZ)	(Sáez et al, 1998) ¹³ C(MHZ)	Datos experimentales ¹³ C(MHZ)
1	5,67	5,68	-	-
2	-	-	166,14	165,94
3	5,93	5,93	123,21	123,30
4	7,35	7,35	140,94	140,80
5	6,66	6,65	122,56	124,70
6	6,76	6,78	138,75	138,80
1'	-	-	130,83	130,89
2'	6,96	6,98	105,66	105,80
3'	-	-	148,50	148,30
4'	-	-	148,50	148,21
5'	6,87	6,77	108,05	108,50
6'	6,76	6,88	124,63	122,70
1''	3,18	3,13	46,93	47.02
2''	1,80	1,70	28,37	28,60
3''	0,93	0,90	20,90	20,14
4''	0,93	0,90	20.90	20,14
OCH2O	5,96	5,97	101,27	101,40

Piperlonguminina es un alcaloide amida natural, descrito en algunas especies del género *Piper*, y se aisló por primera vez de la especie *Piper longum* (Azevedo et al., 2019).

Estudios previos reportan la presencia de este compuesto en otras especies medicinales como: *Piper chaba Hunter* (Mishra & Tewari, 1964), *Piper tuberculatum* (Palacios et al., 2009), *Piper alatabaccum* (Facundo et al., 2005), *Piper puberulum Benth* (Wu et al., 1997) entre otras.

Investigaciones acerca de la actividad biológica de Piperlonguminina han demostrado varios efectos farmacológicos, incluido una potente actividad antitumoral, en un estudio realizado en líneas de cáncer de ovario de epitelio humano. (Gong et al., 2014), demostraron

que Piperlonguminina inhibió selectivamente el crecimiento de las células cancerígenas, e indujo notablemente la apoptosis celular, siendo así un agente eficaz en la terapia para pacientes con cáncer de ovario. De la misma manera (Ginzburg et al., 2014), demuestran que Piperlonguminina afecta la proliferación e invasión de células cancerígenas prostáticas.

Otros autores reportan a esta molécula como un agente antibacterial, así lo señala (Reddy et al., 2008), en un ensayo realizado en varias cepas de bacterias, en donde Piperlonguminina mostro alta actividad contra Gram-positivas y moderada contra Gram-negativas, en especial, demostró ser un potente inhibidor sobre *Bacillus subtilis*.

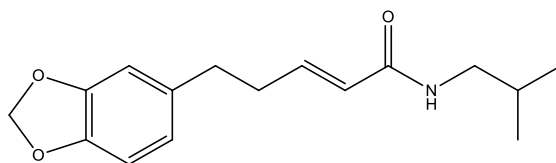
(Yadav et al., 2015), revelan que Piperlonguminina posee un alto potencial analgésico y de supresión de la respuesta al estrés, en este estudio, utilizaron un procedimiento de bioensayo en ratónes farmacológicamente caracterizados, con el fin de estimar las dosis terapéuticas para regular la respuesta fisiológica al estrés y alivio al dolor, comparando la eficacia analgésica de la molécula con la de la aspirina. En el cual se manifestó que Piperlonguminina mostro una actividad similar, en cuanto a la inhibición de la liberación de las prostaglandinas, y los perfiles de actividad antiinflamatoria y analgésica; con diferencia que Piperlonguminina demostró propiedades gastro protectoras a dosis bajas.

Por lo tanto, este compuesto puede conducir al desarrollo de nuevos fármacos naturales que sean una opción más segura como coadyuvante para la prevención y tratamiento de los síntomas asociados al dolor y estrés que la aspirina, u otros medicamentos antiinflamatorios actualmente disponibles.

Además de lo ya mencionado este compuesto ha sido investigado por su capacidad anticoagulante y antiplaquetaria (Ginzburg et al., 2014), antihelmíntica (Campelo et al., 2018) y actividad leishmanicida (Bodiwala et al., 2007).

Figura 8.

Estructura química del alcaloide Dihidropiperlonguminina.



En la tabla 6 se muestran los datos espectroscopicos de ^{13}C de la molécula Dihidropiperlonguminina corroborado con la literatura.

Tabla 6

Datos de ^{13}C de la molécula Dihidropiperlonguminina.

Posición de átomo de carbono	(Navickiene et al, 2000) ^{13}C (MHz)	Datos experimentales ^{13}C (MHz)
1	-	-
2	166,0	166,3
3	120,8	121,1
4	142,6	143,3
5	33,8	34,10
6	34,1	34,45
1'	134,6	134,9
2'	107,9	108,9
3'	145,5	145,8
4'	147,5	147,6
5'	108,4	108,2
6'	124,2	124,3
1''	46,7	46,85
2''	28,3	28,66
3''	19,9	20,17
4''	19,9	20,17
OCH ₂ O	100,5	100,8

Se reporta la presencia de Dihidropiperlonguminina en la especie *Piper tuberculatum* Jac, aislada a partir del extracto de CH_2Cl_2 : MeOH (2:1) de tallos y hojas, además se

manifiesta que esta molécula posee actividad antifúngica contra los hongos *Trichophyton rubrum*, *Mycosporum canis* y *M. gypseum* (Gonzalez et al., 2013).

(Soberón et al., 2006) demuestra la capacidad insecticida de este compuesto sobre insectos-plaga *Diatraea saccharalis*, mostrando niveles significativos de mortalidad larval.

Como es conocido, la fitoquímica del género *Piper* a manifestado la presencia de diversos compuestos como terpenos, flavonas, alcaloides, entre otros, los cuales son utilizados para la elaboración de insecticidas naturales y sintéticos (Carmona et al., 2014)

Entre sus actividades biológicas se destaca, la acción inhibitoria de Dihidropiperlonguminina, ya que minimiza la expresión del gen APP (Proteína precursora amiloidea) (Xia et al., 2007). El cual está involucrado en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer, que de acuerdo a investigaciones, relacionan el depósito de cantidades excesivas de esta proteína sobre las placas amiloideas del tejido cerebral, entre las primeras causas de la enfermedad por los efectos tóxicos directos sobre las neuronas (Menéndez et al., 2002). Por consiguiente, Dihidropiperlonguminina tiene una perspectiva positiva en cuanto al desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la demencia senil (Xia et al., 2007).

Conclusiones:

El rendimiento de extracto total de acetato de etilo obtenido de la especie *Piper tuberculatum* Jac, fue de 1.91 %, mientras que del extracto desclorofilado se obtuvo un rendimiento de 0,90 %.

Se logró identificar dos compuestos (Piperlonguminina, Dihidropiperlonguminina) a partir del extracto desclorofilado de acetato, utilizando las técnicas de cromatografía en capa fina, cromatografía en columna, Espectroscopia RMN y Experimentos TOCSY.

Recomendaciones:

Continuar con el estudio de la especie *Piper tuberculatum* Jac con los distintos solventes y posteriormente realizar el fraccionamiento de los extractos con el fin de caracterizar metabolitos secundarios.

Determinar la actividad biológica de la especie *Piper tuberculatum* Jac, con el proposito de evaluar y determinar su potencial terapeutico.

Referencias

- Alseekh, S., y Fernie, A. (2018). Metabolomics 20 years on: what have we learned and what hurdles remain? *Plant Journal*, *94*(6), 933–942. <https://doi.org/10.1111/tpj.13950>
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D., y Lightfoot, D. A. (2017). Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*, *6*(4), 32–36. <https://doi.org/10.3390/plants6040042>
- Alvarez, V., Caso, L., Aliphat, M., y Galmiche, A. (2017). Plantas medicinales con propiedades frías y calientes en la cultura Zoque de Ayapa, Tabasco, México. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, *16*(4), 428–454.
- Alvin, A., Miller, K., y Neilan, B. (2014). Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiological Research*, *169*(7–8), 483–495. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.12.009>
- Amin, A., Mohamed, Z., y Kanaya, S. (2018). Investigating metabolic pathways and networks. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics*, 1–3, 489–503. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20140-4>
- Aniszewski, T. (2015). Definition, typology, and occurrence of alkaloids. In *Alkaloids* (2nd ed.). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-59433-4.00001-8>
- Armijos, C., Cota, I., y González, S. (2014). Traditional medicine applied by the Saraguro yachakkuna: a preliminary approach to the use of sacred and psychoactive plant species in the southern region of Ecuador. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/1746-4269-10-26>
- Azevedo, A., Baliza, I., Bezerra, D., Dias, R. B., Neto, J. H., Sales, C., Santos, L., Silva, S., Soares, M., & Rocha, C. (2019). Ruthenium Complexes With Piplartine Cause Apoptosis Through MAPK Signaling by a p53-Dependent Pathway in Human Colon Carcinoma Cells and Inhibit Tumor Development in a Xenograft Model. *Frontiers in Oncology*, *9*(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00582>
- Bochkov, D., Sysolyatin, S., Kalashnikov, A., y Surmacheva, I. (2012). Shikimic acid: Review of its analytical, isolation, and purification techniques from plant and microbial sources. *Journal of Chemical Biology*, *5*(1), 5–17. <https://doi.org/10.1007/s12154-011-0064-8>
- Bussmann, R., y Sharon, D. (2014). Two decades of ethnobotanical research in Southern Ecuador and Northern Peru. *Ethnobiology and Conservation*, *3*(2014), 1–50. <https://doi.org/10.15451/ec2014-6-3.2-1-50>.
- Bodiwala, H., Singh, G., Singh, R., Dey, C. S., Sharma, S. S., Bhutani, K. K., & Singh, I. P. (2007). Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. *Journal of Natural Medicines*, *61*(4), 418–421. <https://doi.org/10.1007/s11418-007-0159->

- Burns, R. A. (2011). *Fundamentos de Química* (5ta edición ed.). PEARSON EDUCACION.
- Caceres, P., Ribas, A., Gaioli, M., Quattrone, F., y Macchi, A. (2015). The state of the integrative medicine in Latin America: The long road to include complementary, natural, and traditional practices in formal health systems. In *European Journal of Integrative Medicine* (Vol. 7, Issue 1, pp. 5–12). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2014.06.010>
- Campelo, Y., Ombredane, A., Vasconcelos, A. G., Albuquerque, L., Moreira, D. C., Plácido, A., Rocha, J., Fokoue, H. H., Yamaguchi, L., Mafud, A., Mascarenhas, Y. P., Delerue-Matos, C., Borges, T., Joanitti, G. A., Arcanjo, D., Kato, M. J., Kuckelhaus, S. A. S., Silva, M. P. N., de Moraes, J., & Leite, J. R. S. A. (2018). Structure–Activity relationship of piplartine and synthetic analogues against schistosoma mansoni and cytotoxicity to mammalian cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061802>
- Caquetá, A., y Transición, Z. D. E. (2013). El genero Piper L.(Piperaceae) en el alto Caqueta, Zona de transición Andino-Amazónico de Colombia. *Revista Colombiana Amazónica*, 110–121.
- Carmona, O., Lozada, J., Martinez, J., Socorro, M., y Torres, V. (2016). Piper L. genus potential as natural biocide Oscar. *Wulfenia Journal*, 23(6), 65–95.
- Carmona, Ó., Fernández, S., Palmeros Sánchez, B., & Lozada, A. (2014). Actividad Insecticida de Extractos Etanolicos Foliare de Nueve Piperaceas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 30(January), 67–73.
- Castillo, D., Carrasco, J., Quevedo, L., Ricaurte, C., Gavilanes, A., y Borz, S. (2017). Diversity, Composition and Structure of Andean High Forest in Ecuador, South America. *Bulletin of the Transilvania University of Braşov*, 10(2), 16.
- Castillo, M., Quinatoa, E., Risco, D., y Arnelas, I. (2014). Preliminary phytochemical screening of some andean plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 28(2), 35–37.
- Cetin, E. (2014). Induction of secondary metabolite production by UV-C radiation in *Vitis vinifera* L. Öküzgözü callus cultures. *Biological Research*, 47(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-37>
- Correa, Y., Palominio, Lady, y Marino, O. (2015). Actividad antioxidante y antifúngica de piperaceas de la flora colombiana. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(2), 167–181.
- Coskun, O. (2016). Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. *Northern Clinics of Istanbul*, 3(2), 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>

- Cotinguiba, F., López, S., Budzinski, I., Labate, C., Kato, M., y Furlan, M. (2017). Proteomic profile of *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Brazilian Journal of Biology*, 78(1), 117–124. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.07816>
- Delgado, G, Duque, A., Vásquez, C., y Rojas, C. (2017). Propagación masiva del matico (*Piper tuberculatum* Jacq.) y su aplicación en la erradicación de vectores de enfermedades metaxénicas en Lambayeque (Perú). *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 13(2), 39–50.
- Delgado, Guillermo, Kato, M., Vázquez, N., Minchala, J., y Rojas, C. (2012). Cultivo de tejidos de *Piper* sp. (Piperaceae): Propagación, organogénesis y conservación de germoplasma in vitro. *Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal Proyecto*, XIV, 49–60. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77625401006%0ACómo>
- Dos Santos, V., Do Nascimento, E., Brito, Á., Nogueira, M., De Araújo, G., Carneiro, T., Tintino, S., Rodolpho, F., De Figueiredo, D., De Souza, C., Martins, J., Melo, H., Bezerra, C., Alencar, I., y Kerntopf, M. (2017). Modulação in vitro da atividade antibiótica pelo óleo essencial dos frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 22(1), 1–10.
- Facility, G. (2020). *Piper tuberculatum*. <https://doi.org/https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2020-02-12.
- Facundo, V. ., Silveira, A. S. P., & Morais, S. . (2005). Constituents of *Piper alatabaccum* Trel & Yuncker (Piperaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(7), 753–756.
- García, J., Ramírez, B., Arellano, G., Hernández, J., Salcedo, A., y García, J. (2013). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos. Revista de Ciencias Sociales*, 39, 29. <https://doi.org/10.29340/39.238>
- Ginzburg, S., Golovine, K. V., Makhov, P. B., Uzzo, R. G., Kutikov, A., & Kolenko, V. M. (2014). Piperlongumine inhibits NF- κ B activity and attenuates aggressive growth characteristics of prostate cancer cells. *Prostate*, 74(2), 177–186. <https://doi.org/10.1002/pros.22739>
- Gómez, R. (2012). PLANTAS MEDICINALES EN UNA ALDEA DEL ESTADO DE TABASCO, MÉXICO. *Sociedad Mexicana de Fitogenética A.C.*, 35(1), 43–49.
- Gong, L. H., Chen, X. X., Wang, H., Jiang, Q. W., Pan, S. S., Qiu, J. G., Mei, X. L., Xue, Y. Q., Qin, W. M., Zheng, F. Y., Shi, Z., & Yan, X. J. (2014). Piperlongumine induces apoptosis and synergizes with cisplatin or paclitaxel in human ovarian cancer cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 10. <https://doi.org/10.1155/2014/906804>
- Gonzalez, M. A., Hoyo Vadillo, C., & Perez Gutierrez, M. R. (2013). Alkaloids from *Piper*: a review of its phytochemistry and pharmacology. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 13(2), 163–193.
- Guerrero, G., Berni, R., Muñoz, A., Apone, F., Abdel, E., Qahtan, A., Alatar, A., Cantini, C., Cai, G., Hausman, J., Sohail, K., Hernandez, T., y Faisal, M. (2018). Production of plant

- secondary metabolites: Examples, tips and suggestions for biotechnologists. *Genes*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/genes9060309>
- Gurley, B., Kin, E., y Gardner, Z. (2012). Pharmacokinetic herb-drug interactions (part 2): Drug Interactions Involving Popular Botanical Dietary Supplements and Their Clinical Relevance. *Planta Medica*, 78(13), 1478–1489. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1298273>
- Hadi, I., Fauzi, A., y Jawad, M. (2017). Uses of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Technique in Pharmaceutical Analysis: A Review. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, 8(02). <https://doi.org/10.25258/ijcpr.v8i02.9189>
- Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A., y Armand, R. (2015). The Application of Medicinal Plants in Traditional and Modern Medicine: A Review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine*, 06(09), 635–642. <https://doi.org/10.4236/ijcm.2015.69084>
- Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*, 52(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>
- Jerves, L., León, F., Peñaherra, E., Cuzco, N., Tobar, V., Ansaloni, R., Maes, L., y Wilches, I. (2014). Medicinal plants used in South Ecuador for gastrointestinal problems: An evaluation of their antibacterial potential. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(45), 1310–1320. <https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5656>
- Kumar, D. (2016). Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy For Metabolic Profiling of Medicinal Plants and Their Products. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 46(5), 400–412. <https://doi.org/10.1080/10408347.2015.1106932>
- Ladino, C. (2017). *Potencialidad del género Piper como fuente de sustancias para el control de hongos Fitopatógenos*. Universidad Nacional de Colombia.
- Martinez, C., Martinez, D., y Asostegui, S. (2013). *Plantas Hospederas y Nectáreas de Lepidópteros de las familias Nymphalidae, Papilionidae y Pieridae del Jardín Botánico Ambiental de la UNAN-León*. [Universidad Auntonoma de Nicaragua]. <https://poseidon01.ssrn.com/delivery.php?ID=5630061100270850180860810971050681101020130670920700871260021091000170950770781261130991221160020190250280020811071140180880691260320130320390920011211230290810000950570390030910641230721270161040751211090720080>
- Martínez, M. (2013). Las plantas medicinales en Latinoamérica. *Gattuso, Martha*, 29(2), 493. <http://www.dominguezia.org/volumen/articulos/2921.pdf>
- Mendoza, Z., Mendoza, N., y Johana, M. (2017). Biodiversidad de la provincia de Loja, Ecuador. *Arnaldoa*, 24(2), 523–542. <http://www.scielo.org.pe/pdf/arnal/v24n2/a06v24n2.pdf>
- Menéndez, S. G., Pérez, N. P., & Rodríguez, J. (2002). Péptido beta amiloide, proteína tau y enfermedad de Alzheimer. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 21(4), 253–

261.

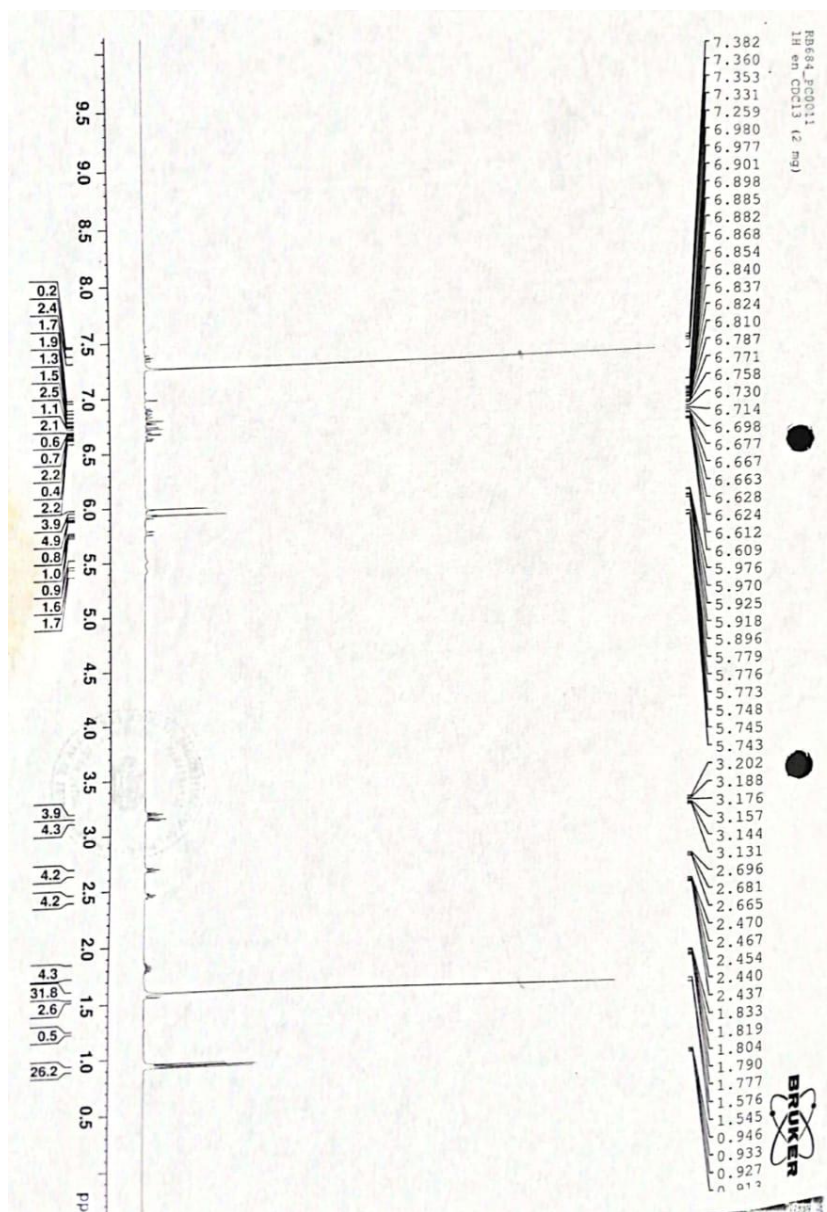
- Mesa, A., Toro, J., Cardona, F., y Blair, S. (2012). Antiplasmodial and cytotoxic activity of ethanol extracts of species of the genus *Piper*. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 11(2), 154–162.
- Meyer, E., Gallen, S., y Gallen, S. (2013). CHROMATOGRAPHY | Principles. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* (Issue March). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.00081-0>
- Mgbeahuruike, E., Yrjönen, T., Vuorela, H., y 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>
- Mishra, S., & Tewari, P. (1964). Phytochemical Investigation of *Piper cbaba*. *Journal of Pharmaceutical Sciences The*, 53(11), 1–2.
- Montoya, S., Rojas, V., y Torres, A. (2016). Interactions between frugivorous bats (Chiroptera: Phyllostomidae) and *Piper tuberculatum* (Piperaceae) in a tropical dry forest in Valle del Cauca, Colombia. *Biología Tropical*, 64, 701–713.
- Negrete, E., Negrete, E., Carrasco, A., Negrete, A., y Santos, D. (2018). Archivo del Hospital Universitario “ General Calixto García .” *Archivos Del Hospital Universitario "General Calixto García,* 6(1), 56–64. <http://www.revcaxltxto.sld.cu/index.php/ahcg/article/view/245/235%0A>
- NMRLAB. Instituto de Química, U. H. de J. (2018). TOCSY. <http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/techniques/2d/tocsy/tocsy.html#top>
- Ojeda, S., Herrera, C., Gaona, T., y Aguirre, T. (2018). Estructura y composición florística de un bosque siempreverde montano bajo en Palanda , Zamora Chinchipe , Ecuador Structure and floristic composition of a lower montane evergreen forest in Palanda, Zamora. *Arnaldoa*, 25(2), 615–630.
- OMS. (2020). *Cambio climático y salud humana*. 1–4. <https://www.who.int/globalchange/ecosystems/biodiversity/es/>
- OMS. (2020). *Traditional, Complementary and Integrative Medicine*. https://www.who.int/health-topics/traditional-complementary-and-integrative-medicine#tab=tab_1
- Ordaz, G., D'Armas, H., Yáñez, D., y Moreno, S. (2011). Composición química de los aceites esenciales de las hojas de *Helicteres guazumifolia* (Sterculiaceae), *Piper tuberculatum* (Piperaceae), *Scoparia dulcis* (Arecaceae) y *Solanum subinerme* (Solanaceae), recolectadas en Sucre, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 59(2), 585–595.
- Palacios, Z., Delgado, G., Moreno, M., Kato, M., & Rojas, C. (2009). In vitro antifungal activity of crude extracts of *Piper tuberculatum*. *Revista Peruana de Biología*, 16(2), 209–214.
- Paredes, D., Buenaño, M., y Mancera, N. (2015). Usos de plantas medicinales en la comunidad

- San Jacinto del Cantón Ventanas, Los Ríos - Ecuador. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 18(1), 39–50. <https://doi.org/10.31910/rudca.v18.n1.2015.452>
- Patra, B., Schluttenhofer, C., Wu, Y., Pattanaik, S., y Yuan, L. (2013). Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(11), 1236–1247. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.09.006>
- Pérez, N., y Jimenez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*, 11(4), 195–211.
- Priyadarshini, R., Raj, G., y Shewade, D. (2016). Chromatography - the Essence of Bioanalysis. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 366–377. www.ejbps.com
- Pyne, M., Narcross, L., y Martin, V. (2019). Engineering plant secondary metabolism in microbial systems. *Plant Physiology*, 179(3), 844–861. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01291>
- Reddy, S., Jamil, K., Madhusudhan, P., Anjani, G., & Das, B. (2008). Antibacterial activity of isolates from Piper longum and Taxus baccata. *Pharmaceutical Biology*, 39(3), 236–238. <https://doi.org/10.1076/phbi.39.3.236.5926>
- Rungsung, W., Kumar, K., Dutta, S., Kumar, A., y Hazra, J. (2015). SECONDARY METABOLITES OF PLANTS IN DRUGS DISCOVERY. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4, 604–613.
- Scott, I., Puniani, E., Durst, T., Phelps, D., Merali, S., Assabgui, R., Sánchez, P., Poveda, L., Philogène, B., y Arnason, J. (2002). Insecticidal activity of Piper tuberculatum Jacq. extracts: Synergistic interaction of piperamides. *Agricultural and Forest Entomology*, 4(2), 137–144. <https://doi.org/10.1046/j.1461-9563.2002.00137.x>
- Sireesha, B., Venkateswara, B., Basha, K., Chandra, K., Anasuya, D., y Bhavani, M. (2019). A Review on Pharmacological Activities of Alkaloids. *World Journal of Current Medical and Pharmaceutical Research*, 1, 230–234. <https://doi.org/http://doi.org/10.37022/WJCMR.2019.01068> INTRODUCTION
- Soberón, G., Rojas, C., Saavedra, J., Kato, M. J., & Delgado, G. (2006). Acción biocida de plantas de Piper tuberculatum Jacq. sobre Diatraea saccharalis (Lepidóptera, Pyralidae). *Revista Perú*, 13(1), 107–112.
- Speight, J. (2017). Sources and Types of Inorganic Pollutants. In *Environmental Inorganic Chemistry for Engineers* (Elsevier I, pp. 231–282). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-849891-0.00005-9>
- Stashenko, E., y Martínez, J. (2014). *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. INTECH. <https://www.intechopen.com/books/advances-in-gas-chromatography/gas-chromatography-mass-spectromet>
- Tinitana, F., Rios, M., Romero, J., de la Cruz, M., y Pardo, M. (2016). Medicinal plants sold at

- traditional markets in southern Ecuador. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13002-016-0100-4>
- Toro, A. (2015). Identificación de metabolitos secundarios Tipo Amina en la semilla de Especie *Piper tuberculatum* del Valle del Cauca. In *Universidad del Valle*. Universidad del Valle.
- Trujillo, W., y Hoyos, F. (2013). El género *Piper* (Piperaceae) en la reserva natural Las Dalias, municipio de La Montañita-Caquetá. *Momento de Ciencia*, 2, 88–96.
- Valarezo, C. (2014). Aceptación de la medicina alternativa en la población urbana de Riobamba-Ecuador. *REE Unach*, 8(1), 1–7.
- Valli, M., Altei, W., Dos Santos, R., De Lucca, E., Dessoy, M., Pioli, R. M., Cotinguiba, F., Cachet, X., Michel, S., Furlan, M., Dias, L. C., Andricopulo, A., & Bolzani, V. (2017). Synthetic analogue of the natural product piperlongumine as a potent inhibitor of breast cancer cell line migration. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28(3), 475–484. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20160303>
- Villegas, S., y Chavarria, M. (2016). Morfometría foliar y clorofila de *Piper reticulatum* (Piperaceae) en luz y sombra en la Estación Biológica La Selva, Costa Rica. *UNED Research Journal*, 8(2), 255–258. <https://doi.org/10.22458/urj.v8i2.1569>
- Wang, S., Alseekh, S., Fernie, A., y Luo, J. (2019). The Structure and Function of Major Plant Metabolite Modifications. *Molecular Plant*, 12(7), 899–919. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.06.001>
- Wu, Q. L., Wang, S. P., Tu, G. Z., Feng, Y. X., & Yang, J. S. (1997). Alkaloids from *Piper puberulum*. *Phytochemistry*, 44(4), 727–730.
- Xia, W., Zeng, J. P., Chen, L. B., Jiang, A. L., Xiang, L., Xu, J., Cui, X., & Han, E. J. (2007). Inhibition of β -amyloid precursor protein gene in SK-N-SH cells by piperlonguminine/dihydropiperlonguminine components separated from Chinese herbal medicine *Futokadsura* stem. *Chinese Journal of Physiology*, 50(4), 157–163.
- Xu, Z., y Deng, M. (2017). Identification and Control of Common Weeds: Volume 2. *Identification and Control of Common Weeds: Volume 2*, 2, 115–118. <https://doi.org/10.1007/978-94-024-1157-7>
- Yadav, V., Chatterjee, S. S., Majeed, M., & Kumar, V. (2015). Preventive potentials of piperlongumine and a *Piper longum* extract against stress responses and pain. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 6(4), 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2015.11.001>
- Yang, S., y Chen, P. (2017). Cambial variations of *Piper* (Piperaceae) in Taiwan. *Botanical Studies*, 58(1). <https://doi.org/10.1186/s40529-017-0172-z>
- Zambrano, L., Buenaño, M., Mancera, N., y Jiménez, E. (2015). Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la Parroquia San Carlos , Quevedo , Ecuador. *Universidad y Salud*, 97–111.

Anexos

Anexo 1: Espectro de ^1H RMN(CDCl₃) de los compuestos Piperlonguminina y Dihidropiperlonuminina.



Anexo 2: Espectro de ¹³C RMN(CDL3) de los compuestos Piperlonguminina y Dihidropiperlonuminina.

