

PIPERLONGUMININA Y ESTIGMASTEROL, COMPUESTOS DE RAÍCES Y TALLOS DE *Piper auritum*, ACTIVIDAD INSECTICIDA DE EXTRACTOS

Jairo Sáez¹, Hillmer Granados¹, Gustavo Escobar¹, Wilson Cardona¹, Lucía Atehortúa², Ricardo Callejas², Diego Cortés³, Carmen González¹.

Recibido: Septiembre 3/97 - Aceptado: Junio 19/98

Keywords: *Piperaceae*, *Piper auritum*, isobutylamide, piperlonguminine.

the control of the grass chinche *Collaria aff. oleosa* (Hemiptera: Miridae).

RESUMEN

De las raíces de *Piper auritum* H.B.K. (Piperaceae), se aisló la piperlonguminina, {N-isobutil-5-(3',4'-metilendioxiifenil)-2-4-pentadienamida} **1** y el estigmasterol (3-β-hidroxi-24-etil-Δ^{5,22}-colestadieno) **2**. Ambos compuestos se identificaron mediante análisis espectral en una y en dos dimensiones. El extracto de acetato de etilo de las raíces de *P. auritum* presentó una actividad moderada sobre el control del chinche de los pastos "*Collaria aff. oleosa*" (Hemiptera: Miridae).

ABSTRACT

From the roots of *Piper auritum* H.B.K. (Piperaceae) were isolated the piperlonguminine {N-isobutyl-5-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-2-4-pentadienamida} **1** and stigmasterol (3-β-hydroxy-24-ethyl-Δ^{5,22}-cholestadiene) **2**. Both compounds were identified on the basis of 1D and 2D NMR. The ethyl acetate extract of the roots of *P. auritum* H.B.K. showed a moderate activity on

INTRODUCCIÓN

Piper auritum se distribuye desde el sur de México y las Antillas hasta Colombia y Venezuela, prospera en áreas perturbadas o claros de bosques secundarios entre 300 y 800 m.s.n.m, a menudo es cultivada en huertos caseros como especie para el consumo o uso medicinal. La especie es conocida bajo el nombre de *Santa María* (Colombia y México), *Candela de Ixote* (Salvador), *Cordoncillo* o *Anisillo* (Colombia), y *Matarro* (Honduras).

Todas las partes de la planta son fuertemente aromáticas. En varios países de América Central, particularmente Honduras y México, la especie se utiliza como condimento para carnes o bien como ensalada, en el Salvador la savia de los tallos machacados se usa para remover ácaros (1). En Colombia los frutos de la especie a menudo son utilizados como condimento en reemplazo del anís, así mismo en el Pacífico se preparan baños con las hojas cocidas para uso analgésico y antirreumático (2,3).

Piper auritum está estrechamente relacionado a un pequeño grupo de 4 especies, las cuales incluyen a *P. marginatum*, *P. peltatum*, *P. umbellatum* y *P. cinereum*.

Un análisis químico del aceite esencial de las hojas frescas, reveló la presencia mayoritaria del saflor; además de

¹Départamento de Química, ²Départamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, A.A. 1226. Medellín, Colombia.

³Départamento de Farmacognosia, Universidad de Valencia, España.

éste, más de cuarenta constituyentes se identificaron, entre ellos canfeno, limoneno, alcanfor, eugenol, miristicina (4,5). De la corteza de raíz de *P. auritum* se reportan los alcaloides cefaradiona A y cefaradiona B. (6). Este género se caracteriza por tener componentes con propiedades insecticidas como por ejemplo las isobutilamidas (7).

PARTE EXPERIMENTAL

La especie *Piper auritum* H.B.K. fue colectada por R. Callejas en el municipio de Tarazá, departamento de Antioquia. Un ejemplar está depositado en el herbario de la Universidad de Antioquia bajo el número HUA 1000.

Las raíces secas y molidas de *P. auritum* se sometieron a extracción por percolación a temperatura ambiente con acetato de etilo durante varios días. El extracto en EtOAc se sometió a cromatografía en columna sobre Sephadex LH-20 eluida con CH_2Cl_2 -MeOH (8:2). Se colectaron 15 fracciones que al monitorearse por cromatografía en capa delgada se agruparon en tres. Posterior purificación de la fracción-3 permitió el aislamiento de 300 mg de la isobutilamida **1**.

El tallo de *P. auritum* seco y molido (500 g), se sometió a percolación a temperatura ambiente con etanol durante una semana. La solución etanólica concentrada, se fracciona con hexano y luego con diclorometano- H_2O . La solución de CH_2Cl_2 por cromatografía en capa delgada presentó como componente mayoritario la isobutilamida **1**. La solución de hexano evaporada a presión reducida y sometida a cromatografía en columna de sílica gel eluida con hexano-diclorometano (1:2) permitió el aislamiento de 100 mg de estigmasterol **2**.

Los ensayos biológicos se realizaron en dos etapas, en condiciones del insectario de la Universidad Nacional de Colombia, Seccional de Medellín a 1540 m.s.n.m., correspondiente a la formación ecológica

de bosque húmedo premontano (bh-Pm), con una temperatura promedio de 22 °C, precipitación media anual de 1597 mm y humedad relativa entre 65 y 70%.

Los insectos de *Collaria* recolectados son afines a los clasificados como *Collaria oleosa* que se encuentran en el catálogo N° 3638 del Museo Entomológico Francisco L. Gallego de la U. Nacional, Seccional Medellín.

En la primera etapa, con la finalidad de determinar la fitotoxicidad del portador, se sembraron plántulas de frijol en 8 potes de 9 onzas, a las cuales, después de alcanzar un buen desarrollo del primer trifolio (18 días después de la siembra), se les aplicó el portador polivinilpirrolidona (pvp) a concentraciones de 10, 20, 50, 100, 200, 400, 2000 y 4000 ppm en volúmenes de 50 mL respectivamente. Para cada parte se hicieron tres réplicas. Las observaciones efectuadas sobre las plantas no mostraron indicios de fitotoxicidad del pvp a estas concentraciones, comparado con el testigo absoluto (H_2O).

En la segunda etapa se determinó la actividad insecticida del extracto de EtOAc de las raíces de *P. auritum* sobre *Collaria aff. oleosa*, utilizando pvp como portador.

Preparación de la muestra.

Se preparó una solución madre mezclando en metanol el extracto con el portador en relación 1:4, luego de evaporar a presión reducida se prepararon a partir de la mezcla obtenida, concentraciones de 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 5 y 2.5 ppm (8).

Las aplicaciones se realizaron colocando volúmenes de 200 mL con un aspersor casero en cada unidad experimental que constaba de un matero con pasto Raigrass infestado con 15 individuos entre ninfas del 4° y 5° instar y adultos de *Collaria* en su mayoría. Cada matero se cubrió con una jaula de tull para evitar el escape de los insectos. Las evaluaciones

se realizaron a partir de conteos de insectos vivos y muertos a las 24, 72 y 120 horas después de las aplicaciones. Para el análisis estadístico se utilizó la transformación $(X+0.5)^{0.5}$ (9,10).

Para el registro de los espectros IR se utilizó un equipo Perkin Elmer 843. Los espectros UV se registraron en un espectrofotómetro Perkin Elmer LAMBDA 15 en etanol. Para los registros de RMN de ^1H y ^{13}C en 1D y 2D se utilizó un equipo BRUKER AC 400.

{N-isobutil-5-(3',4'-metilendioxiifenil)-2-4-pentadienamida} (1).

$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_3$. Cristales incoloros de acetato de etilo; UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 337(3.82); IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3278, 1604, 1253, 986; EM 70 eV, m/z (int. rel): 273 (88), 216 (28), 201 (100), 173 (81), 143 (33), 115 (72); RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): 0.93 (6H, d, $j=6.7$, Me-C3'' y Me-

C4''), 1.8(1H, m, H-2''), 3.18(2H, t, $j=6.5$, H-1''), 5.67(1H, m, NH), 5.93(1H, d, $J=14.4$, H-2), 7.35(1H, dd, $J=14.4$, $j'=10.8$, H-3), 6.66(1H, dd, $J=15.6$, $j'=10.8$, H-4), 6.75(1H, d, $J=15.6$, H-5), 6.96(1H, d, $J=1.6$, H-2'), 6.87(1H, dd, $J=8$, $J'=1.6$, H-6'), 6.76(1H, d, $J=8$, H-5'), 5.96(2H, s, OCH_2O), ppm; RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 100.5 MHz): 166.14 (s, C-1), 123.21 (d, C-2), 140.94(d, C-3), 122.56 (d, C-4), 138.75 (d, C-5), 148.15 (s, C-3', C-4'), 105.66 (d, C-2'), 130.83 (s, C-1'), 124.63 (d, C-6'), 108.05 (d, C-5'), 46.93 (t, C-1''), 28.37 (d, C-2''), 20.09 (q, C-3'', C-4''), 101.27 (t, OCH_2O).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El compuesto **1** aislado en forma de cristales incoloros, presenta un máximo de absorción en UV (etanol) a 337 nm y bandas de absorción en el infrarrojo a 3278 cm^{-1} característica de estiramientos

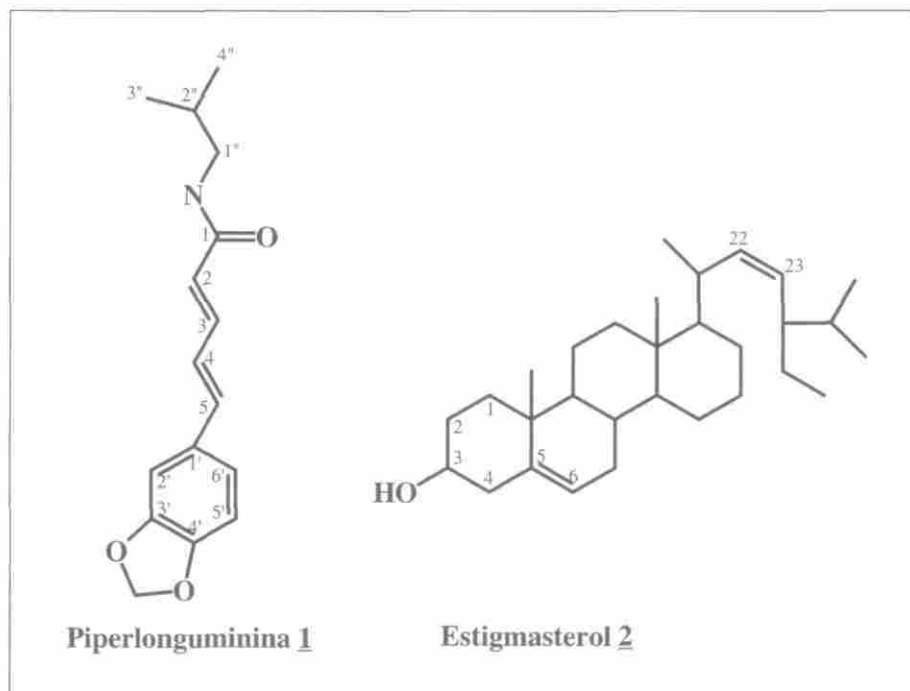


Figura 1. Compuestos aislados de raíces y tallos de *P. auritum* H.B.K.

N-H, 1253 cm^{-1} y 1604 cm^{-1} propias de estiramientos NH-C=O (11). El espectro de masas presenta un ion molecular a $[M^+]$ de 273 u.m.a, que concuerda con una fórmula condensada $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_3$.

El espectro de RMN- ^1H del compuesto **1** presenta un doblete a 0.93 ppm para seis hidrógenos, un multiplete a 1.80 ppm para un solo hidrógeno y un triplete a campo bajo a 3.98 ppm para dos hidrógenos, característicos de protones metílicos, metínicos y metilénicos, este último unido a un grupo que desprotege. En el espectro COSY ^1H - ^1H se observa que los protones de los grupos metilo a 0.93 ppm están acoplados al protón metínico a 1.8 ppm y éste a su vez está acoplado al grupo metileno a 3.18 ppm. Los hidrógenos metilénicos no presentan otra correlación lo que implica que están adyacentes a un carbono cuaternario o a un heteroátomo.

También se observa en el espectro RMN- ^1H , señales para 4 protones olefínicos, dos señales aparecen a 5.93 y 7.35 ppm atribuidas a los protones H-2 y H-3

de un sistema carbonil α , β -insaturado y dos protones a 6.66, 6.75 ppm de los hidrógenos H-4, H-5 que acoplan en posición trans del segundo doble enlace conjugado con el primero. Se observa un singlete para dos protones a 5.96 ppm, característico del grupo metilendioxi, grupo que es corroborado por el espectro de RMN- ^{13}C DEPT- ^{13}C con una señal para carbono secundario a 101.27 ppm. La región entre 7.38 ppm y 6.63 ppm presenta un sistema AMX con las siguientes señales: doblete a 6.96 ppm ($J=1.6$ Hz), doblete a 6.87 ppm ($J=8$ Hz, $J'=1.6$ Hz) y doblete a 6.76 ppm ($J=8$ Hz).

El espectro de masas presenta además del ion molecular $[M^+]$ a 273 u.m.a, señales a m/z 216, 201 y 173, originadas por las rupturas en las posiciones α al grupo carbonilo y al nitrógeno. El análisis de los datos espectrales permite concluir que la isobutylamida **1** corresponde a la {N-isobutil-5-(3',4'-metilendioxiifenil)-2-4-pentadienamida} (figura 1), conocida como piperlonguminina, aislada por primera vez de *Piper longum* y luego de *P. tuberculatum* (12,13).

Tabla 1. Mortalidad acumulada para *Collaria aff. oleosa* en condiciones de laboratorio.

Concentración del extracto de <i>P. auritum</i> (Raíces) (ppm)	% de Mortalidad		
	Muestra 1 (24 h)	Muestra 2 (72h)	Muestra 3 (120 h)
2.5	0.0	5.2	13.9
5.0	13.1	22.7	35.7
25.0	22.8	28.6	48.1
50.0	10.1	15.2	41.4
100.0	17.2	26.4	41.8
250.0	10.9	16.3	18.1
500.0	5.4	14.6	25.3
1000.0	10.5	18.9	32.5

El estigmasterol **2**, se identificó por comparación directa en cromatografía de capa delgada, IR y RMN de la literatura (14).

La tabla 1 muestra la actividad insecticida preliminar del extracto de acetato de etilo de raíces de *Piper auritum* en *collaria aff. oleosa*, utilizando pvp como portador.

El mayor porcentaje de mortalidad se da a concentraciones de 25 y 100 ppm, 48.1 y 41.8% respectivamente, cuando se hizo el conteo de insectos vivos Vs. insectos muertos a las 120 horas. Sin embargo el extracto no muestra resultados promisorios en las condiciones de trabajo, ya que estos valores de mortalidad obtenidos están muy cercanos al valor del testigo absoluto (H₂O), 38.9%.

El efecto moderado se debe, entre otros factores, al hecho de haber empleado poblaciones de insectos trasladados desde el campo, lo cual pudo haber contribuido con la infección de algún patógeno, con el recorte del ciclo de vida de los insectos o con cierto stress generado por la manipulación.

Es recomendable por lo anterior, con el fin de mejorar los resultados de inhibición, realizar los ensayos con insectos criados *in situ*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Antioquia el apoyo financiero para la realización de éste trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Von Reis Altschul, S. *Drugs and Foods from little known plants*, Harvard Univ. Press, Massachusetts, 1973, 366.

2. Perez-Arbelaez, E. *Plantas útiles de Colombia*, 1978, 832.

3. Caballero, M. *La Etnobotánica en las comunidades negras e Indígenas del delta del río Patía*, Universidad Nacional de Colombia, 1995, 248.

4. Gupta, M.P.; Arias T.D. *J. Nat. Prod.* 1985, 48, 330.

5. Nair, M.G.; Sommerville, J.; Burke, B. *Phytochemistry*, 1989, 28, 654.

6. Hansel, R.; Leuschke, A. *J. Nat. Prod.* 1975, 38, 529.

7. Waller, D.P.; Zanevel, L.J.D.; Fong, H.H.S., *Contraception*, 1980, 22, 183.

8. Arnason, J.T.; Philogene, B.J.; Morand, P. *Insecticides of Plant Origin*, Symposium series 387 American Chemical Society, 1988, 213.

9. Acevedo, D.P.; Isaza, C.E. *Evaluación de formulaciones a base de Metharhizium anisopliae y Paecilomyces sp. en control de tres insectos plagas de pasto kikuyo.*, Tesis Universidad Nacional Seccional Medellín, Colombia, 1995.

10. Barreto, T.; Martinez, G.E.; Corredor, P.D. *Patrón de disposición espacial del chinche de los pastos Collaria colombiensis en la sabana de Bogotá*, XXI Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Santa Fe de Bogotá, 1995.

11. Pretsch, E.; Clerc, T.; Seibl, J.; Simon, W. *Tablas para la elucidación estructural de Compuestos Orgánicos por Métodos espectroscópicos*, Editorial Alhambra, 1980, 150.

12. Chatterjee, A.; Dutt, C.P., *Tetrahedron Letters*, 1966, 1797.

13. Bernard, C.B.; Krishnamurty, H.G.; Chauret, D.; Philogene, D.J.; Poveda, L.; Roman, L.S.; Arnason J.T. *J. Chem. Ecology*, 1995, 21, 801.

14. Ikan, R. *Natural Products, a laboratory guide*, Academic Press, San Diego, California, 1991, 138.