

Aislamiento y elucidación estructural por resonancia magnética nuclear (RMN ¹H, RMN ¹³C, DEPT135, COSY y HSQC) del compuesto (*E*)-1,3,5-trimetoxi-2-(prop-1-enil) benceno extraído de hojas de *Piper patulum*.

Revista
Científica



Isolation and structural elucidation by nuclear magnetic resonance (¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT135, COSY and HSQC) of compound (*E*)-1,3,5-trimethoxy-2-(prop-1-enyl) benzene extracted from *Piper patulum*.

Castillo-Arroyave, José; Fuentes, Byron; López-Mayorga, Byron; Álvarez-Toledano, Cecilio

José Castillo-Arroyave
jlcastilloarroyave@gmail.com
Universidad San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala

Byron Fuentes
fuentes.byron@usac.edu.gt
Universidad San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala

Byron López-Mayorga
lopez.byron@usac.edu.gt
Universidad San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala

Cecilio Álvarez-Toledano
cecilio@unam.mx
Instituto de Química Universidad Nacional Autónoma de México, México

Revista Científica
Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala
ISSN-e: 2224-5545
Periodicidad: Semestral
vol. 30, núm. 2, 2022
almadariaga1@gmail.com

Recepción: 24 Noviembre 2021
Aprobación: 03 Agosto 2022

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/50/502701019/>

a. Los autores/as conservan los derechos de autor y ceden a la revista el derecho de la primera publicación, con el trabajo registrado con la licencia de atribución de Creative Commons 4.0, que permite a terceros utilizar lo publicado siempre que mencionen la autoría del trabajo y a la primera publicación en esta revista. b. Los autores/as pueden realizar otros acuerdos contractuales independientes y adicionales para la distribución no exclusiva de la versión del artículo publicado en esta revista (p. ej., incluirlo en un repositorio

Resumen: Guatemala es un país de gran diversidad biológica, la que ha permitido a diferentes investigadores de productos naturales, obtener resultados de interés y relevancia científica, principalmente sobre propiedades farmacológicas, sin embargo, hasta el momento se desconoce la estructura molecular, conformaciones y configuraciones exactas de muchos de los metabolitos secundarios responsables de dichas propiedades. Por lo tanto, en esta investigación se planteó como objetivo aislar y elucidar la estructura de un fenilpropanoide obtenido en las hojas de *Piper patulum*. El aislamiento se realizó por extracciones líquido-líquido y técnicas cromatográficas (cromatografía en columna -CC-), obteniendo .092 g del compuesto de interés. La elucidación se realizó por espectroscopía de masas, espectroscopía infrarroja -IR- y experimentos de resonancia magnética nuclear -RMN-, dando como resultado la estructura correspondiente a (*E*)-1,3,5-trimetoxi-2-(prop-1-enil) benceno. Posteriormente el fenilpropanoide presentó actividad antioxidante mediante la prueba cualitativa con 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo -DPPH-.

Palabras clave: fitoquímica, espectroscopía, metabolito secundario, fenilpropanoide, antioxidante.

Abstract: Guatemala is a country of great biological diversity, which has led natural product researchers to obtain results of great interest and scientific relevance, mainly in pharmacological properties; However, the molecular structure, conformations, and configurations of many secondary metabolites responsible for these properties are unknown. In this research, the objective was to isolate and elucidate the structure of a phenylpropanoid obtained from in the leaves of *Piper patulum*. The isolation was carried out by liquid-liquid extractions and chromatographic techniques (Column Chromatography -CC-), obtaining .092 g. The elucidation was performed by mass spectroscopy, infrared spectroscopy -IR- and nuclear magnetic resonance experiments -NMR-, the data obtained indicates the corresponding (*E*)-1,3,5-trimethoxy-2-(prop-1-enyl) benzene. Subsequently, the

institucional o publicarlo en un libro) siempre que indiquen claramente que el trabajo se publicó por primera vez en esta revista. c. Se permite y recomienda a los autores/as a compartir su trabajo en línea (por ejemplo: en repositorios institucionales o páginas web personales) antes y durante el proceso de envío del manuscrito, ya que puede conducir a intercambios productivos, a una mayor y más rápida citación del trabajo publicado.



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

phenylpropanoid presented antioxidant activity through the qualitative test with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl-DPPH

Keywords: phytochemistry, spectroscopy, secondary metabolites, phenylpropanoid, antioxidant.

INTRODUCCIÓN

El género *Piper* es de gran relevancia en la familia piperaceae, (Quijano - Abril et al., 2006) ya que contiene alrededor de 1,000 especies de interés medicinal (Torres-Pelayo et al., 2016). Estas se encuentran geográficamente en regiones tropicales y subtropicales del planeta (Quijano - Abril et al., 2006; Standley & Steyermark, 1952), entre otras, Centroamérica, América del sur incluyendo la Amazonia central, (Jaramillo & Manos, 2001; Quijano - Abril et al., 2006), donde ha encontrado condiciones propicias para su distribución.

Fitoquímicamente es un género con gran diversidad de metabolitos secundarios (Parmar et al., 1997); destacando los alcaloides (Nascimento et al., 2012; Parmar et al., 1997), lignanos (Parmar et al., 1997), neolignanos (Chen et al., 2013), terpenoides (Parmar et al., 1997), kavalactonas (Dharmaratne, et al., 2002), esteroides (Parmar et al., 1997), piperamidas (Dyer et al., 2004; Nascimento et al., 2012), piperólidos (Lago et al., 2005), flavonoides y derivados (chalconas dihidrochalconas, flavonas y flavanonas) (Portet et al., 2007, 2008) y fenilpropanoides (Chen et al., 2013; Masuda et al., 1991).

La diversidad de metabolitos secundarios del género *Piper* le otorga interés para su estudio en aplicaciones biomédicas (Mgbeahuruike et al., 2017) entre las cuales se destacan su actividad bactericida, fungicida (Alécio et al., 1998), anti-leishmaniasis (Bodiwala et al., 2007), antimalárica (Al-Adhroey et al., 2011), anticancerígena (Iwamoto et al., 2015), ansiolítica (Dharmaratne et al., 2002; Garrett et al., 2003; Prinsloo et al., 2019), antiinflamatoria (Ganguly et al., 2007) y antioxidante (Dasgupta & De, 2004; Zarai et al., 2013).

El estudio de *Piper patulum* Betrol, es de gran interés en Guatemala, ya que se encuentra distribuida principalmente en las regiones del sur de México y Guatemala (Álvarez et al., 2014). Debido a sus características fitoquímicas esta especie puede resultar de beneficio para el país. En Guatemala se ha determinado en *Piper patulum* (Cruz et al., 2008) por métodos cualitativos, distintos compuestos como alcaloides, flavonoides, antraquinonas, saponinas, principios amargos, aceites volátiles, cumarinas, y aceites esenciales con actividad antioxidante (Cruz et al., 2012), pero aún no se ha establecido la composición estructural de gran parte de los compuestos responsables de dicha actividad. Adicionalmente, en la actualidad la relación estructura-actividad es un factor importante al momento de seleccionar moléculas que tienen actividad biológica, por lo que conocer la estructura de los metabolitos secundarios cobra aún más relevancia, por tanto, esta investigación tenía como objetivo elucidar la estructura de uno de los compuestos responsables de brindarle la actividad antioxidante a la planta *Piper patulum*. Por esa razón se aisló por cromatografía en columna un fenilpropanoide, cuya estructura se elucidó por técnicas espectroscópicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción y aislamiento.

Se colectaron hojas frescas de *Piper patulum* en el mes de mayo del año 2018, en el municipio de Samayac, departamento de Suchitepéquez, en la Ecoparcela El Kawatal, Guatemala. El material vegetal se seleccionó y

secó en un horno de convección a una temperatura de 50 °C hasta alcanzar un contenido de humedad de 6 %; posteriormente se pulverizó a un tamaño de partícula uniforme de 5 mm.

El material vegetal (200 g) se extrajo por percolación con una mezcla (1.5 L) de diclorometano y metanol 2:1 (v/v). El procedimiento de extracción se realizó por triplicado por 48 h; luego, se eliminó el disolvente a presión reducida obteniéndose 45.19 g del extracto crudo. Se eliminaron las clorofilas según el método de Fernandes et al. (1997) por extracción líquido-líquido obteniéndose una fracción de hexano (1.11 g) y otra de diclorometano (1.31 g).

Se tomaron 1.1172 g de la fracción hexánica luego se realizó cromatografía en columna (CC) utilizando una columna vidrio de 2.5 cm de diámetro y se empacó con sílice hasta alcanzar una altura de 15 cm. Seguidamente se realizaron eluciones de 50 ml utilizando como fase móvil hexano:acetato de etilo (9:1) eluyéndose 5 fracciones de interés, las cuales se mezclaron (.118 g) y se repurificaron por CC utilizando la misma metodología, obteniéndose .092 g. El compuesto obtenido fue cristalino y luego se determinó el R_f (.63) por cromatografía en capa fina (CCF). Debido a la naturaleza y complejidad del estudio no se realizaron repeticiones de estos procedimientos.

Análisis espectroscópico

El compuesto aislado disuelto en cloroformo deuterado se analizó por RMN en un equipo Bruker Avance de 300 MHz para ^1H (32 escaneos por análisis) y de 75 MHz (1024 escaneos por análisis) para ^{13}C y DEPT 135. El espectro de FT-IR (6 escaneos por experimento) se determinó en un equipo TF Bruker tensor, el espectro de GC/MS por la técnica DART⁺ se obtuvo en un equipo JEOL, The accuTOF JMS-T100LC, utilizando Helio como gas ionizador. Todos los análisis se realizan siguiendo las especificaciones del fabricante configurando el número de escaneos por lectura óptimo para los equipos. Se realizó una lectura por cada experimento.

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó por duplicado cualitativamente con CCF utilizando una mezcla de hexano: acetato de etilo 9:1 como fase móvil y fue revelado con DPPH según (Cruz et al., 2008).

Análisis de datos

Los datos obtenidos espectroscópicamente se resolvieron comparando las señales obtenidas con diversas fuentes bibliográficas, (Faix, 1992; Mason, 1971) Para resolver los espectros de RMN se utilizó el software MestRe Nova versión 12.0.0-20080 (Willcott, 2009)

RESULTADOS

Los rendimientos mostrados en la tabla 1 indican que se obtuvo un mayor porcentaje para la fracción con diclorometano, sin embargo, el compuesto que se logró aislar se encontró en la fracción hexánica.

TABLA 1.
Rendimientos de los extractos obtenidos de las hojas de *Piper patulum* Betrol.

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)
(<i>E</i>) 1,3,5-trimetoxi-2-(prop-1-enil) benceno	0.092	0.20 (del extracto crudo)

En la tabla 2 se destaca el valor de referencia de .092, lo que indica su afinidad hacia disolventes apolares. También se puede confirmar su capacidad antioxidante.

TABLA 2.
Características del compuesto (*E*)-1,3,5-trimetoxi-2-(prop-1-enil) benceno.

Estado	Color	Rf ¹
Sólido cristalino	Blanco traslucido	0.63
Actividad antioxidante DPPH ²	Resultado positivo	0.63
Masa ³	208.11 g / mol	

¹ Fase Móvil 9:1 Hex:AcEt ² DPPH; 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo. ³La masa determinó por DART⁺.

En la tabla 3 se presentan las longitudes de onda de las vibraciones características a los distintos grupos funcionales que conforman la molécula aislada. La figura 1 muestra su estructura.

TABLA 3.
IR del fenilpropanoide (*E*)-1,3,5-trimetoxi-2-(prop-1-enil) benceno.

Intensidad ¹	Longitud en cm ⁻¹	Grupo funcional
M	3003	C-H; Sp ² y aromático
M	2940	Alcano
M	2839	Alcano
F	1125	Éter
F	799	Aromático

¹D: Débil, M: Medio, F: Fuerte

En la Tabla 4 se encuentran los desplazamientos en torno al ambiente químico de los protones y los carbonos evaluados por RMN. En la sección de ^1H se describe la identidad de cada hidrógeno, su relación con los hidrógenos de los átomos vecinos y su cantidad (columna 1, 2 y 3, respectivamente) estas características que indican de forma general la estructura del metabolito aislado. En las otras columnas se presentan los desplazamientos para los átomos de carbono, por ejemplo, DEPT-135; la ausencia de 3 señales sugiere que son carbonos cuaternarios; la figura 3 confirma lo descrito en la tabla.

TABLA 4.
RMN ^1H y ^{13}C del fenilpropanoide (*E*)-1,3,5-trimetoxi-2-(prop-1-enil) benceno.

RMN ^1H		RMN ^{13}C		DEPT 135	C^1
δ_{H}	Tipo ²	integración	$J(\text{Hz})^3$	δ_{C} (ppm)	δ_{C} (ppm)
(ppm)					
1.95	dd	3 hidrógenos	1.5, 6	20.1	20.1
3.83	s	3 hidrógenos	-	55.2	55.2
3.85	s	6 hidrógenos	-	55.6	55.6
6.17	s	2 hidrógenos	-	90.8	90.8
6.51	dd	1 hidrógeno	1.5, 18	121.0	121.0
6.57	dq	1 hidrógeno	1.5, 6, 18	127.8	127.8
				108.4	
				158.8	
				159.5	

¹ C representa el número de carbono del compuesto 1 ² dd: doble de doble S: simple dq: doble de cuádruple ³J= constante de acoplamiento

Las figuras 1 y 2 corresponden a experimentos de RMN de correlación, donde es posible observar los acoplamientos spin-spin entre los núcleos, indicando la posición estructural de los átomos en la molécula. En la figura 1 se muestra solamente una relación entre los átomos 7 y 8 por lo que son vecinos (Tabla 4); ahora bien, en la figura 2 se encuentran múltiples correlaciones, donde cada una indica la asignación de los hidrógenos para cada carbono. Es importante acotar que los desplazamientos químicos (δ) se describen en la tabla 4.

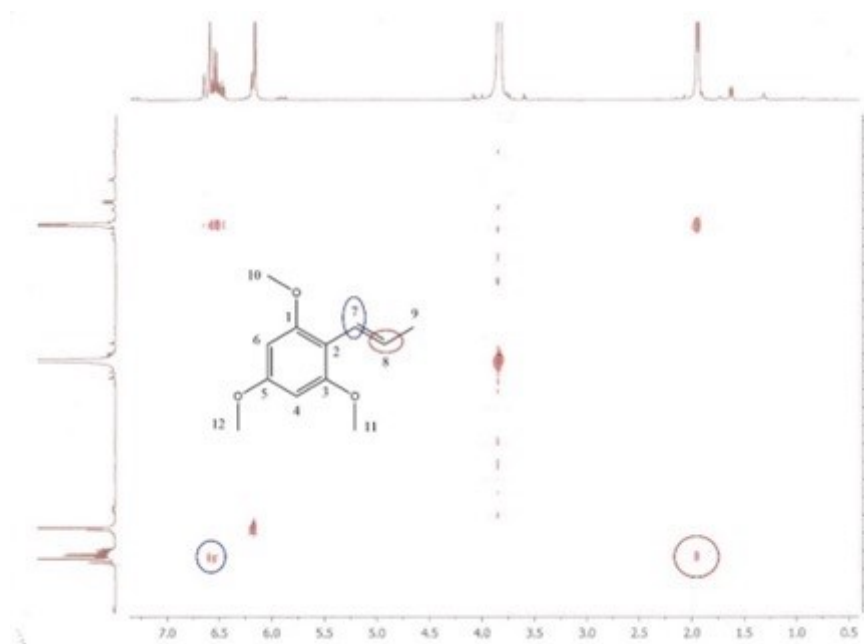


Figura 1. COSY espectroscopía de correlación homonuclear (*E*)-1,3,5-trimetoxi-2-(prop-1-enil) benceno.

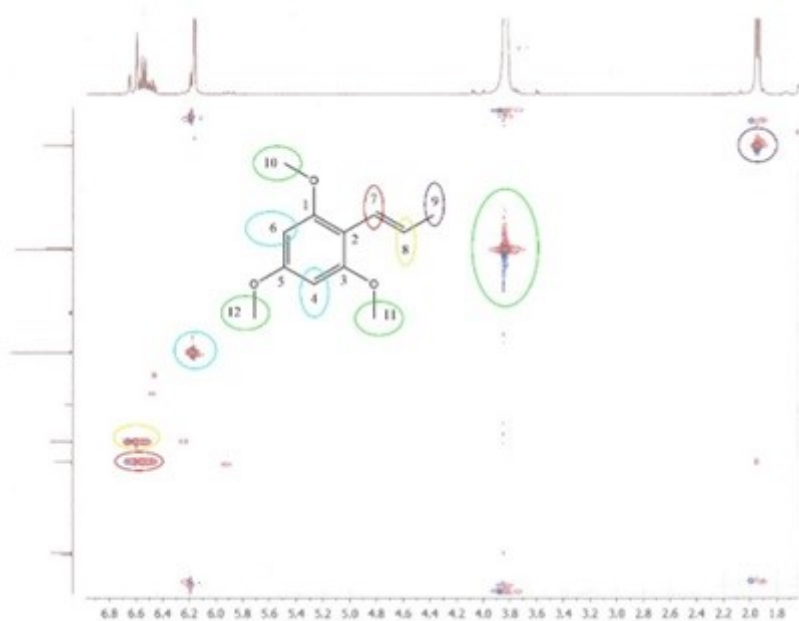


Figura 2. HSQC Espectroscopía de correlación heteronuclear (*E*)-1,3,5-trimetoxi-2-(prop-1-enil) benceno.

En la figura 3 se indica la estructura de la molécula aislada, la posición de los sustituyentes en el anillo aromático y su configuración geométrica descrita en la tabla 4 y en las figuras 2 y 3.

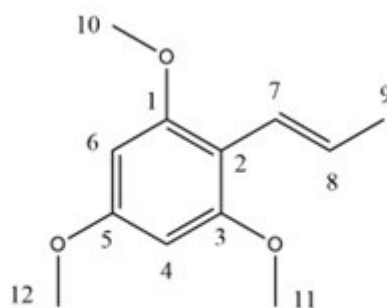


Figura 3. Fenilpropanoide con el nombre IUPAC (*E*)-1,3,5-trimetoxi-2-(prop-1-enil) benceno.

DISCUSIÓN

En un estudio previo (Cruz et al., 2012) se propuso la presencia del fenilpropanoide utilizando la técnica de GC/MS. En la presente investigación se consiguió aislarlo y elucidar inequívocamente su estructura.

La importancia de determinar la estructura exacta en los compuestos químicos adquirió relevancia en la farmacología por el caso de la talidomida (Fabro et al., 1967), conociéndose las implicaciones que tiene la configuración enantiomérica de una especie química. En la química de productos naturales se encuentran situaciones similares, se sabe que los fenilpropanoides que poseen isómero geométrico *cis*, presentan una mayor toxicidad, hepatotoxicidad y daño cardíaco en contraposición del isómero *trans* (Benny et al., 2017).

Dada la importancia de determinar la configuración geométrica del compuesto aislado, se empleó la RMN como herramienta para asignarla; esta técnica junto con la difracción de rayos X son las de mayor efectividad para determinar los isómeros orgánicos. En la tabla 4 RMN ^1H se muestran los valores de las constantes de acoplamiento (J), este parámetro nos permite conocer las interacciones que tienen los átomos vecinos sobre el ambiente químico del núcleo analizado, por un fenómeno que se conoce como acoplamiento spin-spin (Bax & Freeman, 1981). Para la olefina se encuentra una constante de acoplamiento de 18 Hz (Tabla 4) este valor indica que el grupo alqueno presente configuración *trans*.

La técnica de espectroscopía por infrarrojo nos permite determinar en base la frecuencia e intensidad de las vibraciones la identidad de diversos grupos funcionales presentes en la molécula, por lo cual en conjunto con técnicas complementarias como RMN es posible elucidar la estructura del compuesto aislado.

En la investigación sobre los fenilpropanoides fueron identificadas no solamente las diferentes configuraciones geométricas, más también los diversos isómeros estructurales (Parmar et al., 1997) por lo tanto en esta investigación se realizaron análisis bidimensionales de RMN -COSY- y -HSQC- figura 1 y 2, siendo posible llegar a conclusiones asertivas sobre las posiciones de sustituyentes, (Figura 3). Por lo tanto, el nombre IUPAC que corresponde al fenilpropanoide aislado es (*E*)-1,3,5-trimetoxi-2-(prop-1-enil) benceno.

En lo que respecta a su actividad biológica, en la tabla 2, se observan los datos que indican que el fenilpropanoide es secuestrador activo de radicales libres sobre DPPH (función antioxidante), siendo esta característica un avance en el conocimiento de los metabolitos, ya que en trabajos anteriores se había demostrado que los extractos provenientes de *Piper patulum* poseen actividad antioxidante (Cáceres et al., 2012), pero hasta el momento no se había podido atribuir dicha actividad a un compuesto en particular, por lo cual se concluye que el (*E*)-1,3,5-trimetoxi-2-(prop-1-enil) benceno es uno de los componentes responsables de actividad.

Se ha demostrado que la actividad antioxidante de los fenilpropanoides está relacionada con su capacidad para donar densidad electrónica (Boulebd, 2019). Ya que en esta investigación se elucidó la estructura del

fenilpropanoide aislado, es posible indicar que los grupos metoxilos en 1,3,5 y electrones π deslocalizados de la olefina en *trans* con el anillo bencénico (Chang et al., 2007) son los responsables de la capacidad antioxidante del compuesto identificado como (*E*)-1,3,5-trimetoxi-2-(prop-1-enil) benceno.

La importancia de los resultados de esta investigación radica no solo en la elucidación estructural de la molécula, sino en el valor intrínseco de lograr concretar una metodología viable para el aislamiento del fenilpropanoide, así como demostrar su actividad antioxidante y de esta forma sentar las bases para futuras investigaciones sobre aislamiento de productos naturales.

AGRADECIMIENTOS

Al Lic. Armando Cáceres Estrada por proporcionar el material vegetal.

REFERENCIAS

- Al-Adhroey, A. H., Nor, Z. M., Al-Mekhlafi, H. M., Amran, A. A., & Mahmud, R. (2011). Antimalarial Activity of Methanolic Leaf Extract of *Piper betle* L. *Molecules*, 16(1), 107-118. <https://doi.org/10.3390/molecules16010107>
- 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>
- Álvarez, L. E., Rosales de Zea, C., & Cáceres, A. (2014). Micromorfoanatomía de hoja de *Piper patulum* Bertol. (Piperaceae) colectadas en Samayac, Suchitepéquez, Guatemala. *Dominguezia*, 30(2), 19-26.
- Bax, A., & Freeman, R. (1981). Investigation of complex networks of spin-spin coupling by two-dimensional NMR. *Journal of Magnetic Resonance* (1969), 44(3), 542-561. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(81\)90287-0](https://doi.org/10.1016/0022-2364(81)90287-0)
- Benny, B., George Priya Doss, C., Thirumal Kumar, D., & Asha Devi, S. (2017). Assessing reproductive toxicity and antioxidant enzymes on beta asarone induced male Wistar albino rats: In vivo and computational analysis. *Life Sciences*, 173, 150-160. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.08.021>
- Bodiwala, H. S., 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/s11418-007-0159-2>
- Boulebd, H. (2019). DFT study of the antiradical properties of some aromatic compounds derived from antioxidant essential oils: C-H bond vs. O-H bond. *Free Radical Research*, 53(11-12), 1125-1134. <https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1690652>
- Cáceres, A., Cruz, S. M., Gaitán, I., Guerrero, K., Álvarez, L. E., & Marroquín, M. N. (2012). Antioxidant activity and quantitative composition of extracts of *Piper* species from Guatemala with potential use in natural product industry. *Acta Horticulturae*, 964, 77-84. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.964.9>
- 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 and 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., Chang, H. S., Wang, C. J., Wong, S. L., & 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>
- Cruz, S., Véliz, R., Gómez, A., Álvarez, L., Cáceres, A., Morales, J., Apel, M., & Henríquez, A. (2008). Caracterización química de los aceites esenciales y extractos de especies mesoamericanas del género *Piper* como nuevos recursos aromáticos. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia*, 4(1) 25-29. <http://www.revistasguatemala.usac.edu.gt/index.php/qyf/article/view/441>
- Cruz, S., Cáceres, A., Álvarez, L., Apel, M., & Henríquez, A. (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>

- Dasgupta, N., & De, B. (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>
- Dharmaratne, H., Nanayakkara, N. P., & Khan, I. A. (2002). Kavalactones from *Piper methysticum*, and their ¹³C NMR spectroscopic analyses. *Phytochemistry*, 59(4), 429-433. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00443-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00443-5)
- Dyer, L. A., Richards, J., & Dodson, C. D. (2004). Isolation, Synthesis, and Evolutionary Ecology of *Piper* Amides. En L. A. Dyer & A. D. N. Palmer (Eds.), *Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution* (pp. 117-139). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-30599-8_7
- Fabro, S., Smith, R. L., & Williams, R. T. (1967). Toxicity and Teratogenicity of Optical Isomers of Thalidomide. *Nature*, 215 (5098), 296. <https://www.nature.com/articles/215296a0>
- Faix, O. (1992). Fourier Transform Infrared Spectroscopy. En S. Y. Lin & C. W. Dence (Eds.), *Methods in Lignin Chemistry* (pp. 83-109). Springer. Series in Wood Science. https://doi.org/10.1007/978-3-642-74065-7_7
- Fernandes, A. M., Prado, A. L., Barata, L. E. S., Paulo, M. Q., Azevedo, N. R., & Ferri, P. H. (1997). A Method to Separate Lignoids from *Virola* Leaves. *Phytochemical Analysis*, 8(1), 18-21.
- Ganguly, S., Mula, S., Chattopadhyay, S., & Chatterjee, M. (2007). An ethanol extract of *Piper betle* Linn. Mediates its anti-inflammatory activity via down-regulation of nitric oxide. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(5), 711-718. <https://doi.org/10.1211/jpp.59.5.0012>
- Garrett, K. M., Basmadjian, G., Khan, I. A., Schaneberg, B. T., & Seale, T. W. (2003). Extracts of kava (*Piper methysticum*) induce acute anxiolytic-like behavioral changes in mice. *Psychopharmacology*, 170(1), 33-41. <https://doi.org/10.1007/s00213-003-1520-0>
- Iwamoto, L. H., Vendramini-Costa, D. B., Araujo Monteiro, P., Gois Ruiz, A. L., Ruiz, de Oliveira Souza, I. M., Foglio, M. A., de Carvalho, J. E., & Ferreira Rodrigues, R. A. (2015). Anticancer and Anti-Inflammatory Activities of a Standardized Dichloromethane Extract from *Piper umbellatum* L. Leaves. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2015 ID 948737. <https://doi.org/10.1155/2015/948737>
- 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>
- Lago, J. H. G., Tanizaki, T. M., Young, M. C. M., Guimarães, E. F., & Kato, M. J. (2005). Antifungal piperolides from *Piper malacophyllum* (Prels) C. DC. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(2), 153-156. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532005000200005>
- Mason, J. (1971). The interpretation of carbon nuclear magnetic resonance shifts. *Journal of the Chemical Society A: Inorganic, Physical, Theoretical*, 0, 1038-1047. <https://doi.org/10.1039/J19710001038>
- 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)
- 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>
- Nascimento, J., de Paula, V., David, J., & David, J. (2012). Occurrence, biological activities and ¹³C NMR data of amides from *Piper* (Piperaceae). *Química Nova*, 35, 2288-2311. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001100037>
- Parmar, V. S., Jain, S. C., Bisht, K. S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O. D., Prasad, A. K., Wengel, J., Olsen, C. E., & 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)
- Portet, B., Fabre, N., Roumy, V., Gornitzka, H., Bourdy, G., Chevalley, S., Sauvain, M., Valentin, A., & 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>
- Prinsloo, D., Dyk, S. van, Petzer, A., & Petzer, J. P. (2019). Monoamine Oxidase Inhibition by Kavalactones from Kava (*Piper Methysticum*). *Planta Medica*, 85(14-15) 1136-1142. <https://doi.org/10.1055/a-1008-9491>
- 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>
- Standley, P., & Steyermark, J. (1952). Piperaceae. *Flora of Guatemala*. Fieldiana, Bot, 24(3), 228-337.
- Torres-Pelayo, A., Fernández, Ma. S., Carmona-Hernández, O., Molina-Torres, J., & Lozada-García, A. (2016). A Phytochemical and Ethnopharmacological Review of the Genus Piperaceae a Potent Bio-Insecticide. *Research & Reviews: Research Journal of Biology*.
- Willcott, M. R. (2009). MestRe Nova. *Journal of the American Chemical Society*, 131(36), 13,180. <https://doi.org/10.1021/ja906709t>
- Zarai, Z., Boujelbene, E., Ben Salem, N., Gargouri, Y., & Sayari, A. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 634-641. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.036>